

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：11301
 研究種目：新学術領域研究
 研究期間：2008～2012
 課題番号：20108015
 研究課題名（和文） π 電子豊富分子の生体内化学

研究課題名（英文）Chemistry and biology of π -rich molecules

研究代表者

磯部 寛之 (ISOBE HIROYUKI)
 東北大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：30302805

研究成果の概要（和文）：本研究では、 π 電子豊富分子が、高次構造体として組織化することで特異な相互作用が生じることに着目し、組織化構造による機能性に焦点をあてた。とくに π 電子豊富な生体内機能性分子である核酸が組織化構造により高い機能性をもつことに着目し、高安定核酸模倣分子「トリアゾール連結核酸」を開発した。クリック化学（Click chemistry）を活用した分子構造を設計することでオリゴマー合成を実現するとともに、末端擬糖部位などの構造的特色を活用した機能性を開拓することで、既存の人工核酸になし得なかった「酵素基質化」という独自の機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Replacement of internucleoside phosphodiester linkages of DNA or RNA with non-natural structures would generate intriguing oligonucleotides with functions that could explore the field of medicinal chemistry, chemical biology and materials science. The Nature's choice of phosphine for the internucleoside linkage is so divine that allows the connection and cleavage of the oligonucleotides at will. We developed non-natural oligonucleotides with an internucleosidic modification. Adopting an effective reaction from the click chemistry, copper-catalyzed Huisgen cycloaddition, we designed and synthesized the new analogues, triazole-linked DNA and RNA (^{TL}DNA/^{TL}RNA). The robust synthesis supported the concise synthesis of oligonucleotides with triazole-linkages and the development of their functions in bioorganic and materials chemistry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
総計	24,200,000	7,260,000	31,460,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード： π 豊富分子，人工核酸，二重らせん，酵素，水銀

1. 研究開始当初の背景

π 電子豊富分子は、高次構造体として組織化することで特異な相互作用を生じ、さまざ

まな機能を発現する。生体内における π 電子豊富な機能分子である核酸は、核酸塩基が載ったフラノース環がリン酸ジエステルに

より鎖状に連なった構造をしており、二本の核酸は相補的な塩基間の相互作用により二重らせんを形成する。その美しさに加え「らせん階段さながらの自然界の π 空間に、生命の遺伝情報が暗号化され閉じ込められている」という事実が多く研究者を引き寄せてきた。この遺伝情報の伝達において、鍵反応となっているのがリン酸ジエステル部のP-O結合生成/切断反応である。この部分を安定な構造で置き換えれば、生体内で代謝され得ない人工核酸を創り出すことができ、その高次構造体を組織化することで、新機能の創出が可能となると期待できる。一方でこうした人工核酸は二重らせん形成のための精巧な分子設計に加え、単量体の簡便な合成法や高効率な伸長反応を実現しなければならず、有機合成化学の力量が問われるところとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、高安定な核酸模倣分子として、リン酸ジエステル部位をトリアゾールに置き換えた「トリアゾール連結核酸」を開発し、その機能開拓を行う。天然型および非天然型 π 電子豊富分子同士の相互作用を探ることで、これまでの常識にない特異な物性・機能性を探ることを目的とするものである。本申請課題で最も困難が予想される新現象の発見については、すでに申請者のこれまでの研究により実現している。とくに π 電子豊富物質上での生体内関連物質の異常挙動などは世界的にも注目される発見であり、本申請課題の遂行によりその先導性をさらに確たるものとする。

3. 研究の方法

高安定な核酸模倣分子として、リン酸ジエステル部位をトリアゾールに置き換えた「トリアゾール連結核酸」を開発する(図1)。クリック化学(Click chemistry)を活用した分子構造を設計することでオリゴマー合成を実

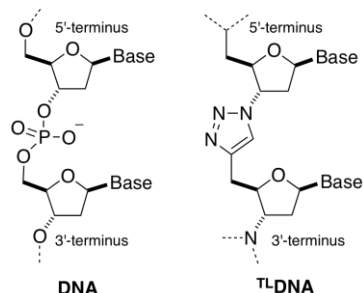


図1 DNAとTL-DNAの構造

現するとともに、末端擬糖部位などを活用した機能性を開拓する。TL-DNAは鎖状構造上6結合毎に同じ要素が現れる周期性を保持しており、その連結部以外の分子構造が天然核酸と共通であるという特徴を活かすことで、独自の機能性を開拓する。

4. 研究成果

(1) 4種の核酸塩基をもつTL-DNA単量体合成法の開発

DNAの遺伝情報は4種の核酸塩基の配列により記述され、その配列は相補的な配列をもつ核酸鎖との二重らせん構造の形成に必須である。TL-DNAの多様な塩基配列をもつ天然核酸を標的とした遺伝子発現制御へと展開すべく、核酸塩基の多様化を行った。まず天然ヌクレオシドであるチミンを出発原料として、高効率・簡便かつ量的供給が可能なチミン型単量体の合成経路を確立した。チミン以外の核酸塩基は、チミン型単量体に対して、核酸塩基を入れ替える反応であるトランスグリコシル化反応を利用することで、一段階で導入することができた。合成した単量体はいずれも溶液中での構造解析から、ヌクレオシド類縁体はいずれも天然ヌクレオシドに類似の立体配座をとることを明らかにした。

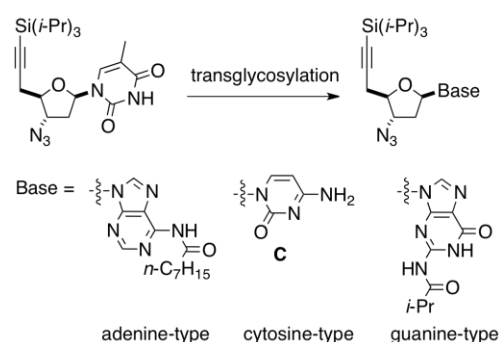


図2 TL-DNAの塩基の多様化

(2) 高効率TL-DNA固相合成法の開発

TL-DNAオリゴマーの合成には、反応後の精製工程を省略できる固相合成法を活用した。クリック連結および脱シリル化反応を繰り返すことで12量体が得られた(図3)。一伸長あたりの平均収率は85%であり、DNA/PNA合成に匹敵する効率を実現した。DNA/PNA合成では伸長単位を反応活性な中間体へと変換するのにに対し、本手法では銅アセチリドの生成により固相上末端が活性化するため、伸長後に単量体を回収・再利用することができる。

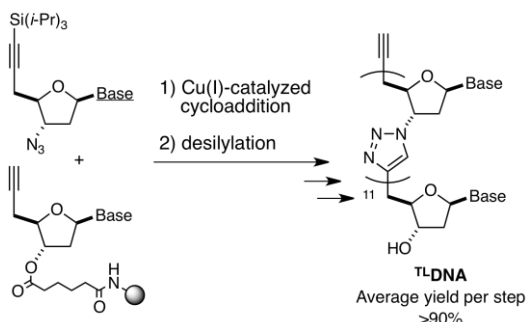


図3 T¹DNA 固相合成法

(3) T¹DNA の収束合成法の開発

液相合成では短鎖オリゴマーの連結により量的供給可能な長鎖オリゴマーの合成を試みている。3'端の反応部位であるアジド基が比較的容易に導入可能であることに着眼した手法である。3'端にβ配置のヒドロキシ基をもった短鎖オリゴマーは容易に調製でき、さらにこの求核置換反応によりα配置のアジド基へと変換した。この変換によりオリゴマーを伸長単位とすることが可能となり、4 + 3さらには4 + 4の連結によりそれぞれ7量体と8量体を合成した。反応条件の最適化も併せ検討することで(図4)、この等量連結反応の収率は90%を越えた。この収束的な伸長法を用いれば、将来、オリゴヌクレオチドを「コドン単位」で組み上げていくような展開も可能だと期待している。

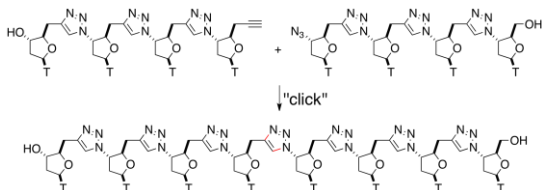


図4. 長鎖 T¹DNA の収束的合成法

(4) T¹RNA の合成

RNA と DNA の構造上の違いは2'位ヒドロキシ基の有無のみであるが、この差が機能上では大きな違いとなる。人工核酸でもヒドロキシ基による機能性の違いが期待されるが、RNA 類縁体はこのヒドロキシ基の存在が合成上の制約となるため報告例は数例しかない。我々はクリック伸長法の官能基許容性の高さに着目し、この手法を T¹RNA 合成へと展開した。安価な D-キシロースを出発原料とし

て擬糖構造を構築した後、グリコシル化反応により核酸塩基を導入することで各種単量体を高効率・簡便に合成することができた(図5)。T¹DNA と比べ、選択性・効率とも良好な経路となった。クリック伸長反応は、ヒドロキシ基の影響を受けず高効率に進行することを確認している。今後長鎖 T¹RNA を合成し、その機能開発を行う予定である。

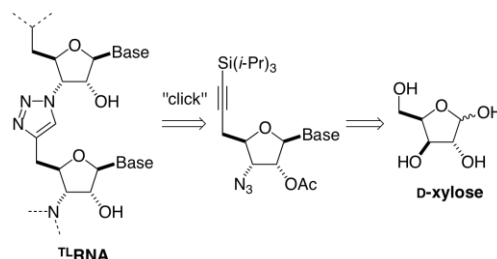


図5 T¹RNA の合成法

(5) T¹DNA の二重らせん形成

T¹DNA は天然核酸と二重らせんを形成することができ、それが高い安定性をもつことがわかった。T¹DNA 10量体とオリゴアデニン配列をもつ相補鎖 DNA との淡色効果解析を行った。天然 DNA 同士の間鎖は 20.0 °C で二重鎖に由来した淡色効果が半減する(図6)。この温度は融解温度と定義され、二重鎖の安定性の指標となる。相補鎖の片側を T¹DNA に置き換えると融解温度が 61.1 °C まで上昇した。Job プロットと CD スペクトル分析から、この効果が T¹DNA・DNA 二重らせん形成に由来することを明らかにした(図6b)。

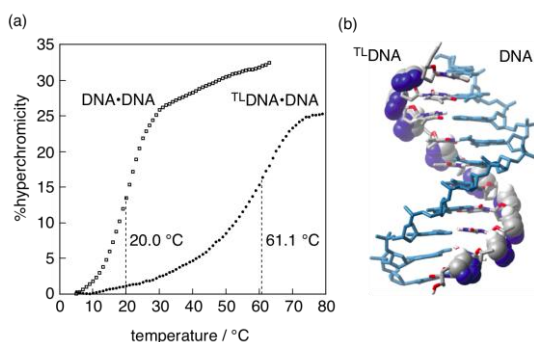


図6 (a) 二重鎖の融解曲線. (b) T¹DNA・DNA 二重鎖モデル図.

我々は天然 DNA に相補的な構造をもつならば、T¹DNA 同士の二重らせんも構築可能であろうと考えた。また、「たくさんつく

れて高安定」という ^{11}L DNA には、生命科学のみならず材料科学分野を含めさまざまな分野への展開が可能であろうと期待している。両者の着想を組み合わせた試みが、水銀イオンを二重鎖の架橋部位にした ^{11}L DNA $\cdot^{11}\text{L}$ DNA 二重らせんである。水銀イオンがチミン塩基を二つ架橋できることは古くから知られてきたが、最近になり小野晶教授らによりオリゴヌクレオチドの二重鎖中にも含めることが明らかにされている。さらに最近の理論研究により、中央に配列する水銀が「電子の通り道」となる可能性が示唆されている。そこでオリゴチミン 3 量体に水銀イオンを添加すると、想定通りの二重らせんが組み上がった (図 7)。3 量体という通常の塩基対からなる天然 DNA ならば二重鎖形成は検出できないほどの長さであったが、質量分析により二重鎖が確認できた。さらに CD スペクトルから、らせん構造に起因するシグナルが観測されたことから ^{11}L DNA 同士が二重らせんが確認できた。さらに、この溶液を水晶基盤上に展開・乾固することで薄膜を作製し、時間分解マイクロ波吸収伝導度測定を行うと、薄膜内での電子移動が検出された。この測定から得られるキャリア移動度は $1.3 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ であり、塗布型の有機半導体と同程度であった。これまでに同じ測定法を用いて天然 DNA 二重らせん中のキャリア移動は、正孔として $5 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ と報告されている。将来、 ^{11}L DNA/ ^{11}L RNA を利用し、材料科学分野でも魅力的な高安定・高機能な短鎖オリゴヌクレオチドが設計可能となることを期待させる結果である。

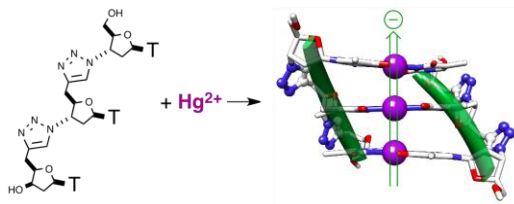


図 7. 水銀架橋型 ^{11}L DNA 二重鎖の合成

(6) ^{11}L DNA の酵素基質化

^{11}L DNA の最大の特徴は天然 DNA と連結部以外の構造が全く同じであることである。核酸の 3'末端は転写・複製過程における反応点であるが、我々は ^{11}L DNA の 3'末端も逆転写酵素により反応点として認識されることを見いだした。逆転写酵素は、成熟 mRNA の情報を相補的 DNA (cDNA) として入手する際に活用されている。mRNA には 3'末端にポリアデニン配列が存在し、DNA オリゴチミンを開始鎖とした逆転写反応を行えば、細胞抽出

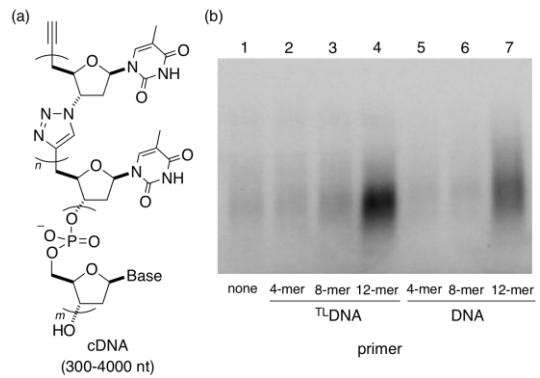


図 8 (a) ^{11}L DNA 下流に伸長した cDNA. (b) 逆転写後の電気泳動図。

後の全 RNA から選択的に mRNA の情報を写し取ることができる。この逆転写反応に ^{11}L DNA オリゴチミンを添加すると、これが開始鎖基質となり、逆転写生成物である長鎖 DNA が得られた (図 8)。その生成量は DNA オリゴチミン生成物の 1.5 倍であり、効率的な開始鎖基質となったことが示唆された。生成した DNA が cDNA であったことは、その PCR により細胞由来 β -アクチン遺伝子が増幅されたことから確認している。

さらにこの cDNA 上流には加水分解を受けない ^{11}L DNA 部が存在することを活用し、5'-エキソヌクレアーゼ反応により cDNA 合成に

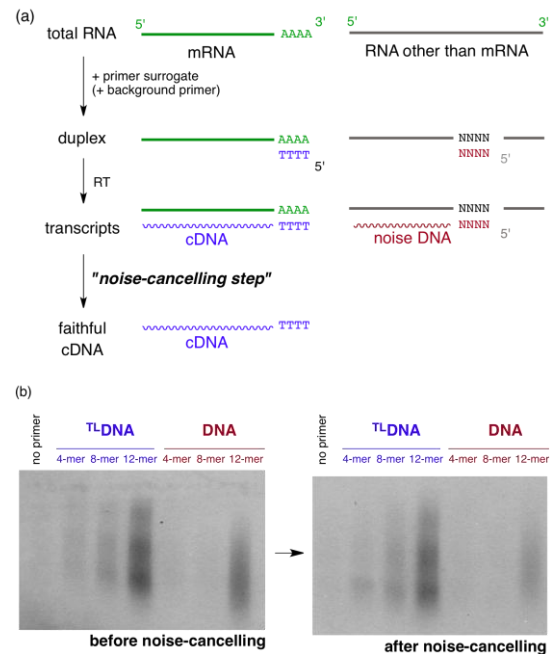


図 9 (a) cDNA 合成のノイズキャンセル法. (b) ノイズキャンセル前後の電気泳動図. DNA プライマー由来の cDNA (雑音配列のモデル分子) が選択的に分解・除去されている。

において副生する非 mRNA 由来の雑音配列を除去できることを見いだした (図 9). 今後、高純度 cDNA の簡便生成法への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1) Molecular bearing of finite carbon nanotube and fullerene in ensemble rolling motion, Isobe, H.; Hitosugi, S.; Yamasaki, T.; Iizuka, R. *Chem. Sci.* 査読有, **2013**, 4 (3), 1293-1297. (<http://dx.doi.org/10.1039/c3sc22181d>)
- 2) トリアゾール連結核酸の化学, 磯部寛之, 藤野智子, 有機合成化学協会誌, 査読有, 2012, 70 (8), 821-830.
- 3) Bottom-up synthesis and thread-in-bead structures of finite ($n,0$)-zigzag single-wall carbon nanotubes, Hitosugi, S.; Yamasaki, T.; Isobe, H. *J. Am. Chem. Soc.* 査読有, **2012**, 134 (30), 12442-12445. (<http://dx.doi.org/10.1021/ja305723j>) Featured in JACS Spotlights (<http://dx.doi.org/10.1021/ja3076956>)
- 4) Synthesis of triazole-linked analogues of RNA (TL RNA), Fujino, T.; Endo, K.; Yamazaki, N.; Isobe, H. *Chem. Lett.* 査読有, **2012**, 41 (4), 403-405. (<http://dx.doi.org/10.1246/cl.2012.403>)
- 5) Atropisomerism in a belt-persistent nanohoop molecule: Rotational restriction forced by macrocyclic ring strain, Hitosugi, S.; Nakanishi, W.; Isobe, H. *Chem. Asian J.* 査読有, **2012**, 7 (7), 1550-1552. (<http://dx.doi.org/10.1002/asia.201200187>); Featured in the front cover (<http://dx.doi.org/10.1002/asia.201290025>)
- 6) Efficient and improved synthesis of triazole-linked DNA (TL DNA) oligomers, Fujino, T.; Yamazaki, N.; Hasome, A.; Endo, K.; Isobe, H. *Tetrahedron Lett.* 査読有, **2012**, 53 (7), 868-870. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.12.026>)
- 7) Bottom-up synthesis of finite models of helical (n,m)-single-wall carbon nanotubes, Hitosugi, S.; Nakanishi, W.; Yamasaki, T.; Isobe, H. *Nat. Commun.* 査読有, **2011**, 2 (10), doi: 10.1038/ncomms1505 (5 pages). (<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1505>)
- 8) Triazole-linked DNA as a primer surrogate in the synthesis of first-strand cDNA, Fujino, T.; Yasumoto, K.; Yamazaki, N.; Hasome, A.; Sogawa, K.; Isobe, H. *Chem. Asian J.* 査読有, **2011**, 7 (11), 2956-2960.

- (<http://dx.doi.org/10.1002/asia.201100712>)
- 9) Illusory molecular expression of "Penrose stairs" by an aromatic hydrocarbon, Nakanishi, W.; Matsuno, T.; Ichikawa, J.; Isobe, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有, **2011**, 50 (27), 6048-6051. (<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201102210>)
- 10) [n]Cyclo-2,7-naphthylenes: Synthesis and isolation of macrocyclic aromatic hydrocarbons having bipolar carrier transport ability, Nakanishi, W.; Yoshioka, T.; Taka, H.; Xue, J. Y.; Kita, H. Isobe, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有, **2011**, 50 (23), 5323-5326. (<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201101314>)
- 11) Electron mobility in a mercury-mediated duplex of triazole-linked DNA (TL DNA), Isobe, H.; Yamazaki, N.; Asano, A.; Fujino, T.; Nakanishi, W.; Seki, S. *Chem. Lett.* 査読有, **2011**, 40 (3), 318-319. (<http://dx.doi.org/10.1246/cl.2011.318>)
- 12) Disilanyl double-pillared bisanthracene: A bipolar carrier transport material for organic light emitting diode devices, Nakanishi, W.; Hitosugi, S.; Piskareva, A.; Shimada, Y.; Taka, H.; Kita, H.; Isobe, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有, **2010**, 49 (40), 7239-7242. (<http://dx.doi.org/10.1002/anie.2010024332>)
- 13) Synthesis and structures of deoxyribonucleoside analogues for triazole-linked DNA (TL DNA), Fujino, T.; Tsunaka, N.; Guillot-Nieckowski, M.; Nakanishi, W.; Iwamoto, T.; Nakamura, E.; Isobe, H. *Tetrahedron Lett.* 査読有, **2010**, 51 (15), 2036-2038. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.02.046>)
- 14) Nanometer-size fluororous fullerene vesicles in water and on solid surfaces, Homma, T.; Harano, K.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有, **2010**, 49 (9), 1665-1668. (<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200904659>)
- 15) In vivo gene delivery by cationic tetraamino fullerene, Maeda-Mamiya, R.; Noiri, E.; Isobe, H.; Nakanishi, W.; Okamoto, K.; Doi, K.; Sugaya, T.; Izumi, T.; Homma, T.; Nakamura, E. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 査読有, **2010**, 107 (12), 5339-5344. (<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0909223107>)
- 16) Convergent synthesis of oligomers of triazole-linked DNA analogue (TL DNA) in solution phase, Fujino, T.; Yamazaki, N.; Isobe, H. *Tetrahedron Lett.* 査読有, **2009**, 50 (28), 4101-4103. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.04.101>)

[学会発表] (計 12 件)

- 1) 磯部寛之「Structural Science of Nanocarbon Molecules: A Synthetic Approach from Organic Chemistry」分子研コロキウム, 2013年1月18日, 岡崎
- 2) 磯部寛之「Molecular design of functional π -systems」岡山理科大学グリーン元素講演会, 2012年9月1日, 岡山
- 3) 磯部寛之「ナノカーボンインスパイアード分子の設計・合成」第24回 万有札幌シンポジウム, 2012年7月7日, 札幌
- 4) 磯部寛之「 π 電子豊富分子の科学」第22回 万有仙台シンポジウム, 2011年12月19日, 仙台
- 5) Hiroyuki Isobe, "Nanocarbon-inspired Molecular Design: Interesting Stairs for Interdisciplinary Research", ISNA-14 (Invited Lecture), 2011年7月24日, Oregon, U. S. A.
- 6) Hiroyuki Isobe, "Functional Assembly of Amphiphilic Carbon Clusters", 9th International Symposium on Functional π -Electron Systems (Plenary Lecture), 2010年5月28日, Georgia, U. S. A.
- 7) Hiroyuki Isobe, JSPS Asian Core Program, International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia Lectureship in Singapore, 2009年10月, Nanyang Technological University, National University of Singapore, Singapore
- 8) Hiroyuki Isobe, JSPS Asian Core Program, International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia Lectureship in China, 2009年10月, Shaanxi Institute of Organic Chemistry, Shaanxi Normal University, China
- 9) Hiroyuki Isobe, "Eye-catching dynamics of small molecules" (G-COE International Symposium on Dynamic Phenomena in Molecular Complex Chemistry, 2009年10月2日, 仙台
- 10) 磯部寛之「ナノカーボン有機化学の展開」基礎有機化学討論会(野副記念奨励賞受賞講演, 2009年9月30日, 桐生
- 11) 磯部寛之「ナノカーボン有機化学から探る組織化機能」階層横断生命科学シンポジウム, 2009年8月8日, 和光
- 12) 磯部寛之「 π 電子系を使って見る分子のかたち」第二次先端ウォッチング調査:複合領域の創成, π 電子化学-可能性の追求と展望, 2009年3月, 千葉

[図書] (計2件)

- 1) 芳香族連結輪状分子シクロアリーレンの科学, 磯部寛之, 一杉俊平, 中西和嘉, 「未来材料を創出する π 電子系の科学:新しい合成・構造・機能化研究(CSJカレントレビュー12)」, 化学同人, pp54-60 (2013).

- 2) π 電子豊富分子の生体内化学:クリック化学人工核酸, 磯部寛之, 藤野智子, 「高次 π 空間の創発と機能開発」, シーエムシー出版, pp208-212 (2013).

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: トリアゾール連結型環状ジヌクレオチド誘導体

発明者: 磯部寛之, 藤野智子, 岡田滉大

権利者: 東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-001994

出願年月日: 2013年1月9日

国内外の別: 国内

名称: 縮退系大環状分子大環状化合物, ならびに, その結晶および製造方法

発明者: 磯部寛之, 中西和嘉, 吉岡知昭

権利者: 東北大学

種類: 特許

番号: 2010-275387

出願年月日: 2010年12月10日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.orgchem2.chem.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 寛之 (ISOBE HIROYUKI)

東北大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 30302805

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし