

平成 22 年 2 月 24 日現在

研究種目： 基盤 (B)  
 研究期間： 2006～2008  
 課題番号： 18350034  
 研究課題名 (和文) 金属錯体と量子ドットクラスターの超分子自由配列. ジンクフィンガーと DNA の利用  
 研究課題名 (英文) Supramolecular alignment of the functionalities of coordination compounds and quantum dot clusters at will on DNA. Use of zinc finger motifs.  
 研究代表者  
 山村 剛士 (YAMAMURA TAKESHI)  
 東京理科大学・理学部化学科・教授

研究成果の概要： 金ナノパーティクルを 2 次元平面上に自在に配列することは、多くの研究者が挑戦している目標であるが、従来の配列法では小型のナノパーティクルを設計パターンどおりに配列させることが出来なかった。本研究はこの問題に対して、重金属捕捉蛋白質 MT と DNA 結合蛋白質 ZF の人工融合蛋白質 ZFMT を合成し、金クラスター (Au11) と化学量論的に結合させた後、DNA の高次構造体上に定位することにより、幾何模様を描かせることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	0	0	0
2010 年度	0	0	0
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野： 化学

科研ひの分科・細目： 基礎化学・無機化学・超分子

キーワード： ナノドット 光活性錯体 自由配列 ジンクフィンガー DNA

## 1. 研究開始当初の背景

無機・物理化学とバイオコンジュゲート化学の発展の結果、ナノ粒子を生体分子の助けを借りて配列させようとする試みが現在盛んに行われているが、未だ金ナノ粒子のリソグラフィを行えるまでに達していない。

大型の金クラスターを含め、金ナノ粒子は離散的エネルギー準位を有し、量子サイズ効果に基づく様々な特性を示す。その代表的な例が電子の流れを数個単位で制御するクーロンブロッケイドであり、単一電子トランジスタや量子コンピューターの素子である量子セルオートマトンへの応用の基となる。後者では室温動作を実現するには 2 nm の量

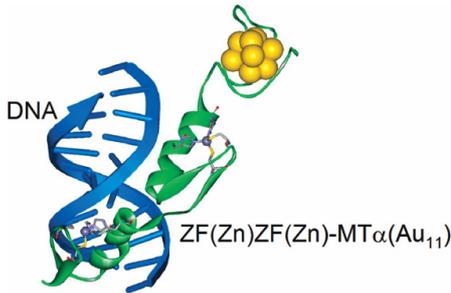
子ドットをパターンニングする必要がある。しかし、現段階では、これらのデバイス構築には程遠いものしか出来ない。これは、フォトエッチング法では X 線を用いても数 nm がリソグラフィの限界になるからである。一方、自己組織化に基づく限り、大きさの不揃いな合成金ナノ粒子を、ほぼ一定の距離間隔を置いて基盤の目状に並べることまでしか出来ない。それは、配列の鑄型となる分子が単純な構造情報しか持っていないからであり、また、金ナノ粒子の表面を覆い、分子認識に関わるべき配位子が高度な認識能を持たないからである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、金ナノ粒子を特定の幾何学模様を描くよう、ナノメートルレベルで自在配列する方法を開発することである。

## 3. 研究の方法

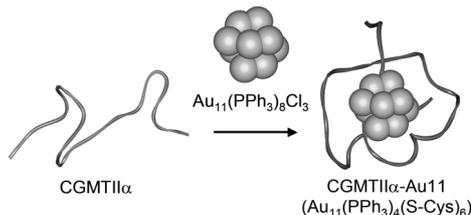
本研究では、金クラスターと 1:1 結合するタンパク質と 2 重螺旋 DNA と部位特異的に結合するタンパク質を融合させて、新規人工タンパク質を合成し、これを介して、DNA の塩基配列情報に基づいた金クラスターのパターンニングを行う、と言う基本方針を立てた。(Fig. 1) 鋳型となる DNA は将来におけるパ



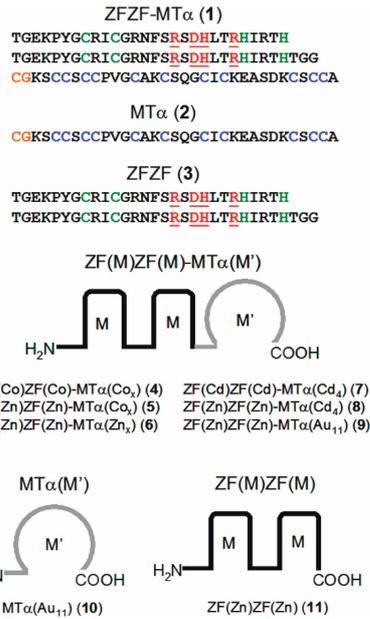
**Fig. 1.** Positioning of an Au cluster on dsDNA using ZF(Zn)ZF(Zn)-MTR(Au11).

ターニングを見越し、二次元展開が可能であり、且つ、DNA 結合タンパク質が結合可能な構造を持つ dxDNA を採用することにした。

金クラスターと DNA の仲立ちとして、DNA 結合モチーフである Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 型のジンクフィンガー (ZF) を採用した。この ZF は Zn<sup>2+</sup> 存在下、特有の ββα 折り畳み構造をとり、1 ドメインにつき、3 塩基対を認識する。さらに、DNA-ZF 相互作用のコード表が明らかにされているため、認識塩基の設計が自由に出来る。しかし、ZF は金クラスターと容易に反応するとシステイン (Cys) を含む。ZF を始め、タンパク質は多くの金属イオン結合性の官能基を表面に有する。一方、金クラスターはすべての表面原子が配位結合能力を持っている。そのため、タンパク質と金クラスターの複合系では、タンパク質の折り畳み構造の崩壊や、非化学量論的な複合化が起こる可能性が高く、化学量論的な複合体の形成が難しい。そこで本研究では、ク



**Fig. 2.** Complexation of Au11 with CGMTIIα.

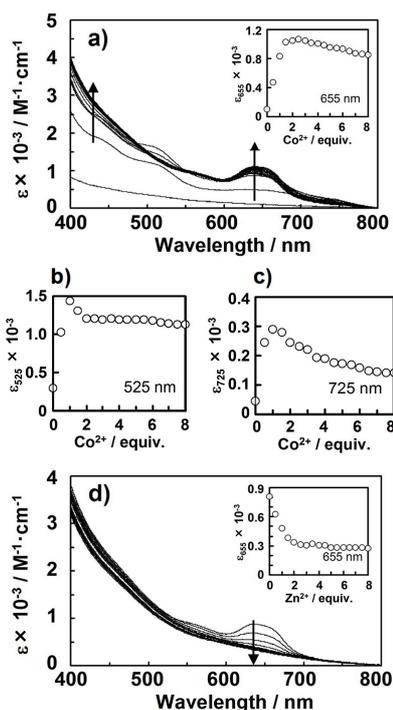


**Fig. 3.** Schematic drawings of the peptides 1, 2, and 3 and the inorganic bioconjugates investigated in this study 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 11. The amino acid sequences are written according to the IUPACIUB JCBN nomenclature. The DNA-recognizing and metal-binding residues of the ZF domain are shown by the underlined red and green characters, respectively, whereas the metal-binding residues of the MT domain are shown by the blue characters. The orange characters denote the residues for NCL.

ラスター表面の金原子を安定に被覆することが出来、ZF との共存を許す候補として、メタロチオネイン (MT) を採用し、ZF と MT の融合タンパク質 ZFMT を合成することにした。これによって、金ナノクラスターと DNA の化学量論的結合を図り、高次 DNA 構造体上でのパターンニングが可能になると考えた。

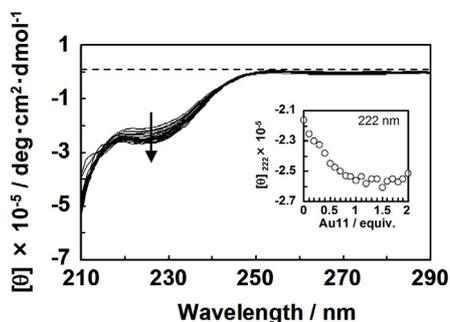
## 4. 研究成果

MT は体内で不必要な重金属イオンをトラップして無毒化する Cys rich なタンパク質である。MT を参考にクラスター結合モジュールとして CGMTIIα を設計した。CGMTIIα は置換活性のある PPh<sub>3</sub> を配位子とする Au<sub>11</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub> (Au11) と不活性ガス下中性条件下で反応して、CGMTIIα:Au11 = 1:1 の量比で複合体を形成する (CD スペクトルによる Au11 滴定)。さらに、複合体中では金コアが Au<sub>11</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(S-Cys)<sub>6</sub> として存在し、化学量論的である (GPC、TEM-EDS、XPS)。タンパク質と金クラスターの複合系としては、これまで大型で剛直なタンパク質への結合例もなく、小型のタンパク質を用いて化学量論的な複合体を形成した例はなかった。最後に、CGMTIIα の N 端の Cys は native chemical ligation (NCL) 法を用いて更に他のタンパク質と融合させることが可能であることを明らかにした (Fig. 2)。



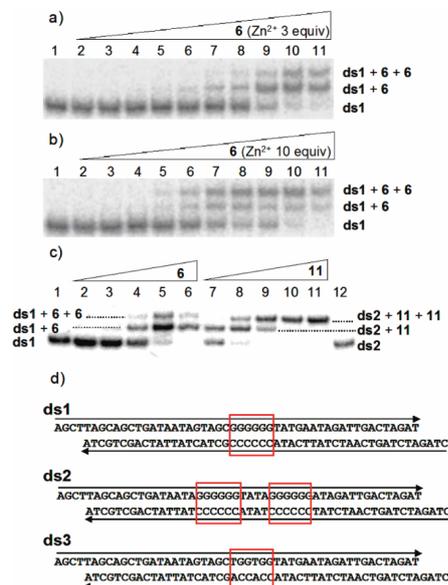
**Figure 4.** The results of  $\text{Co}^{2+}$  (2 mM) titration to a solution (10 mM Tris-HCl) containing **1** (50  $\mu\text{M}$ ) monitored by UV-vis spectroscopy (a). The titration curves monitored at 655, 525, and 725 nm are shown in the insets of (a), (b), and (c), respectively. The result of  $\text{Zn}^{2+}$  (2 mM) titration to a solution (10 mM Tris-HCl) containing **4** (50  $\mu\text{M}$ ) (d). The inset shows the titration curve monitored at 655 nm.

NCL 法による CGMTIII $\alpha$  と ZF の融合は CGMTIII $\alpha$  部分に存在する多数の Cys の妨害を受けることなく進行する。得られた融合蛋白質 ZFMT は、ZFMT は天然の ZF とほぼ同じ  $\beta\alpha$  折り畳み構造を保ち (Fig. 4) CGMTIII $\alpha$  に由来する重金属 ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) 結合能を有する (UV-vis, CD スペクトル)。また、電気泳動実験 ( $^{32}\text{P}$  標識 DNA 使用) から CGMTIII $\alpha$  ユニットの存在によって、ZFMT の DNA への結合能が低下するものの、ZF 由来の部位特異的結合能を有してい

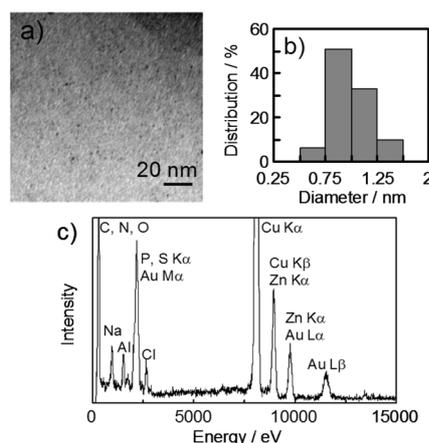


**Fig. 5.** CD spectral change observed for Au11 titration into **6**. The titration curve observed at 222 nm is shown in the inset. A 50  $\mu\text{M}$  MeOH solution of Au11 was added dropwise to 10 mM of Tris-HCl solution containing 12.5  $\mu\text{M}$  of **6** (3 equiv of  $\text{Zn}^{2+}$ ).

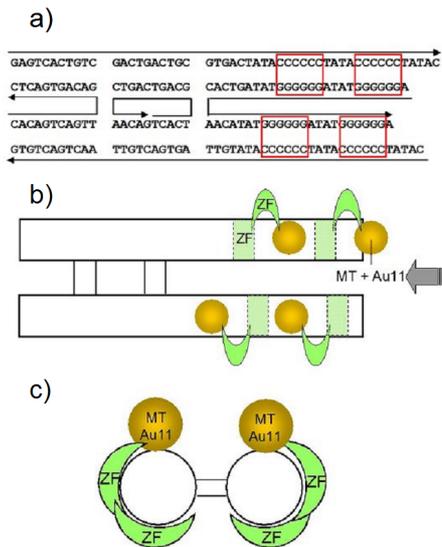
ることを明らかにした。さらに、CGMTIII $\alpha$  の場合と同様に、ZFMT と Au11 は温和な条件で 1:1 複合体 (ZFMT-Au11) を形成すること (Fig. 5)、Au11 との複合化の前後において、ZF の  $\beta\alpha$  折り畳み構造—DNA への部位特異的結合に必須である—が保持されてい



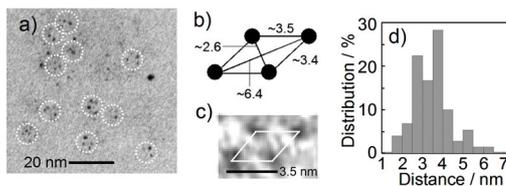
**Fig. 6.** EMSA for **6** ( $^{32}\text{P}$  labeled DNA was used). (a) **6** (3 equiv of  $\text{Zn}^{2+}$ ) + **ds1**. (b) **6** (10 equiv of  $\text{Zn}^{2+}$ ) + **ds1**. The concentration of **6** increases from left to right in lanes 1-11 (0, 2.9, 5.9, 11.7, 23.4, 46.4, 93.8, 187.5, 375, 750, and 1500 nM). (c) Lanes 2-6, **6** (10 equiv of  $\text{Zn}^{2+}$ ) + **ds1**; lanes 7-11, **11** (10 equiv of  $\text{Zn}^{2+}$ ) + **ds2**. The concentration of **6** or **11** increases from left to right in the lanes. Each loading mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 8), 33.3 mM NaCl, 5% glycerol, 0.005% NP-40, 1 mM dithiothreitol, poly-(dl-dC) (10 ng/ $\mu\text{L}$ ), and  $^{32}\text{P}$ -end-labeled DNA fragments (ca. 500 cpm). (d) The base sequences of the DNAs, **ds1**, **ds2**, and **ds3**, used in this study (lower). The ZF-recognizing bp are surrounded by red squares.



**Fig. 7.** Results of TEM-EDS analyses for **9** (accelerating voltage, 200 kV; bright-field mode; resolution of scale bar, 20 nm). (a) TEM image of **9**. (b) Core size distribution of the Au clusters in **9**. (c) EDS analyses for **9** (the EDS peaks of Cu and Al originate from the Cu grid and sample holder, respectively).



**Fig. 8.** DNA or nucleotide sequence and design of **dx1**. DNA or nucleotide sequence of **dx1** (a). on **dx1** from the (b) top view and (c) side view. Schematic images of the position of 9 nucleotide sequence of **dx1** (a). Schematic images of the position of 9 on **dx1** from the (b) top view and (c) side view.



**Fig. 9.** TEM observation of the Au cluster alignment used by 9 + **dx1** (accelerating voltage, 200 kV; bright-field mode; resolution of scale bar, 20 nm). (a) TEM observation of the mixture of 9 and **dx1**. (b) Expected interparticle distances of Au clusters on **dx1**. (c) Expanded TEM image of the typical parallelogram comprising four Au11. (d) The interparticle distance distribution in 9 + **dx1**.

る (CD スペクトルの加成性) こと、また、複合体 ZFMT-Au11 においても ZF 由来の DNA への部位特異的結合能を有していること (標的 DNA との電気泳動)、また、金クラスターが 11 核を維持していること、等を明らかにした (Fig. 6, Fig. 7)。これらの実験結果を基に、**dxDNA** 上での金クラスターの配列を検討した。**dxDNA** は二重螺旋 DNA が 2 本より合わさった構造を持つ、DNA の高次構造体であり、格子系やシートへの拡張の出発点になる。本研究では、金クラスターが一边およそ 3.5 nm の平行四辺形の頂点を形成するように **dxDNA** 上に ZF 結合部位を四箇所設定した (Fig. 8)。TEM 観察の結果は、設計どおりの金クラスターの四つ組配列を示した。間接的ではあるが、ZF が **dxDNA** に結合することを初めて明らかにしたものである (Fig. 9)。以上の結果から、本研究が DNA・タンパク質・ナノクラスター三元系による金クラスターの自在配列の実現に成功

したことが明らかになった。

## 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 8 件)

- ① Shinnya Ariyasu, Akira Onoda, Ryota Sakamoto, and Takeshi Yamamura, Conjugation of Au11 Cluster with Cys-rich Peptides Containing the  $\alpha$ -Domain of Metallothionein, *Dalton Trans.*, 査読あり, 2009, 3742-3747.
- ② Akira Onoda, Takako Suzuki, Hiroaki Ishizuka, Rumiko Sugiyama, Shinya Ariyasu and Takeshi Yamamura, Minimal motif peptide structure of metzincin zinc peptidases in micelles, *J. Pept. Sci.*, 査読あり, 15 巻, 2009, 832-8445.
- ③ Ryota Sakamoto, Taishiro Sasaki, Norikazu Honda and Takeshi Yamamura, 5,15-Bis(di-*p*-anisylamino)-10,20-diphenylporphyrin: distant and intense electronic communication between two amine sites, *Chem. Commun.*, 査読あり, 2009, 5156-5158.
- ④ Takeshi Yamamura, Shingo Suzuki, Tomotaka Taguchi, Akira Onoda, Toshiaki Kamachi, and Ichiro Okura, Porphyrin Arrays Responsive to Additives. Fluorescence Tuning, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読あり, 131 巻, 2009, 11719-11726.
- ⑤ Shinnya Ariyasu, Akira Onoda, Ryota Sakamoto, and Takeshi Yamamura, Alignment of Gold Clusters on DNA via a DNA-recognizing Zinc Finger-Metallothionein Fusion Protein, *Bioconjugate Chem.*, 査読あり, 20 巻, 2009, 2278-2285.
- ⑥ Akira Onoda, Masahiro Igarashi, Satoshi Naganawa, Kiyomi Sasaki, Shinya Ariyasu and Takeshi Yamamura, Neutral Zinc Porphyrin-Oligonucleotide Conjugates Modified with Flexible Linker, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 査読あり, 82 巻, 2009, 1280-1286.
- ⑦ Ryota Sakamoto, Michihiro Nishikawa, Takeshi Yamamura, Shoko Kume, Hiroshi Nishihara, A new special pair model comprising meso-di-*p*-anisylaminoporphyrin: enhancement of visible-light absorptivities and quantification of electronic communication in mixed-valent cation radical, *Chem. Commun.*, 査読あり, 2010, in press.
- ⑧ Kiyomi Sasaki, Akira Onoda, Mina Mizota, Ryota Sakamoto, and Takeshi Yamamura, DX DNAs as Templates for Multiple Arrangement of Zinc Fingers, *Nucleic Acids Symposium Series*, 査読あり, 52 巻, 2008, 695-696.

[学会発表] (計 55 件)

- ①有安真也、ジンクフィンガーを介した二重交差 DNA テンプレート上での金クラスターの配列、第 59 回錯体討論会：平成 21 年 9 月 25 日、長崎大学・文教キャンパス
- ②Shinya Ariyasu, Conjugation of Au11 cluster with Cys-rich peptides containing the a-domain of metallothionein、14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 平成21年7月25日、名古屋市国際会議場
- ③Kiyomi Sasaki, DX DNAs as templates for multiple arrangement of zinc fingers、18th International Round Table Meeting: Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Kyoto Uji, Japan, September 8 (2008).
- ④Shinya Ariyasu, Location of a Gold Cluster at the Desired Position of DNA Via a Zinc Finger-metallothionein Conjugate、The IUMRS Interational Conference in Asia 2008, (IUMRS-ICA2008)、(国際 MRS 連合アジア国際会議)、平成 20 年 12 月 9 日、名古屋市国際会議場
- ⑤山村 剛士、ジンクフィンガーを介した錯体および量子ドットの自在配列. DS-DNA 上への多重結合と光エネルギー移動、第58回錯体討論会、平成20年9月20日、金沢大学角間キャンパス
- ⑥佐々木澄美、Ru, Os 錯体を結合したジンクフィンガーのDX 上への二次元精密配置、第58回錯体討論会、平成20年9月20日、金沢大学角間キャンパス
- ⑦山村剛士、ダブルクロスオーバーDNA への tbp 錯体-ジンクフィンガー複合体の結合とエネルギー移動、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、平成 20 年9月18日(木)、東京工業大学すずかけ台キャンパス
- ⑧有安 真也、ジンクフィンガー・メタロチオネイン融合蛋白質を用いたDNA 上への金クラスターの配列、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、平成20年9月18日(木)、東京工業大学すずかけ台キャンパス
- ⑨山村剛士、 $[M(\text{bpy})_3]^{2+}$  (M = Ru, Os) を N 端に有するジンクフィンガーのDS<sup>-</sup> および DX-DNA 上への同時自在定位とこれら複合体の光化学的挙動、平成 20 年光化学討論会、平成20年9月11日 (木)、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
- ⑩有安真也、メタロチオネインを持つ新規人工ジンクフィンガーの合成、第 22 回生体機能関連化学シンポジウム、2007 年 9 月 28 日、東北大学・多元物質科学研究所
- ⑪山村剛士、ジンクフィンガーと Au ナノドット・クラスターの 1 : 1 複合体形成、第 56 回錯体討論会、平成 18 年 9 月 16 日、広島大学東千田キャンパス

- ⑫山村剛士、Ru, Os ビピリジン錯体を結合させた新規ジンクフィンガーの合成と DNA との結合性、第 56 回錯体討論会、平成 18 年 9 月 16 日、広島大学東千田キャンパス

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山村 剛士 (YAMAMURA TAKESHI)  
東京理科大学・理学部化学科・教授  
研究者番号 00114702

### (2)研究分担者

小野田 晃 (ONODA AKIRA)  
大阪大学大学院・工学研究科・高度人材育成センター・応用化学専攻・助教  
研究者番号： 60366424  
(H18 → H19)

坂本 良太 (SAKAMOTO RYOUTA)  
東京大学大学院・理学研究科・化学専攻・助教  
研究者番号： 80453843  
(H19)

### (3)連携研究者