

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750103

研究課題名 (和文) 分子モーターによる DNA のらせん構造制御

研究課題名 (英文) Development of New Model of Molecular Motors toward DNA Conformational Change

研究代表者

桑原 俊介 (KUWAHARA SHUNSUKE)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：40359550

研究成果の概要：

本研究では、新規キラル分子モーターを開発し、DNA の特殊構造の認識、および構造変化の制御を目指した。本研究の結果、アミノ基を備えた新規キラル分子モーターの合成、絶対配置決定に成功した。また、キラル分子モーターを DNA に連結させた DNA-分子モーターコンジュゲートの合成に成功し、その構造決定に成功した。さらに、DNA-分子モーターコンジュゲートのシス体は DNA の二本鎖構造を安定化させることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	0	2,500,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：機能物質科学

キーワード：分子認識

1. 研究開始当初の背景

ナノサイズの分子構造体に対して人間の意図を伝え、機械的運動によって実用的なアウトプットを得る仕組み、すなわち「人工分子機械」の開発は、ナノテクノロジーの究極の目標であり、ナノ医療、ナノ機能性材料など幅広い分野への展開が期待されている重要な研究課題である。現在までに、実際の機械の部品を模して、様々な分子機械の構成部品 (スイッチ、ギア、ラチェット、シャトル、モーターなど) が設計、合成されてきた。しかしこれらは、スライド運動、回転運動などの基本的な動作を起こすのみである。従って、

構成部品の一次的な運動を、他の構成物質の二次的な運動に変換させる研究が、次の課題として残っている。しかし、合成の困難さなどからこのような研究はほとんど報告されておらず、東大の金原、相田らによる「分子ピンセット」の研究例が最近報告されたのみである。

一方、Z 型 DNA は、生体の細胞内において DNA の局所的な部分構造として存在し、その右巻きらせん構造は、DNA の高次構造に大きな影響を与え、タンパク質合成の遺伝情報の発現にも重要な役割を果たしているといわれている。しかし、詳細はこれまで未

解明のままである。従って、Z 型 DNA を特異的に認識する、または構造変化を誘起する低分子化合物の開発が求められている。

2. 研究の目的

我々はこれまで、「光動力キラル分子モーター」の開発を報告してきた。光動力キラル分子モーターは、光エネルギーによって二重結合のシス-トランス異性化による不安定系(高エネルギー状態)を作り出し、分子のキラリティー(光学異性)によって回転方向を制御(安定系への熱異性化)するという分子系である。また、この系は 360 度回転し原形に戻ることから、機械運動のように連続回転が可能である。さらに、最近開発した新規分子モーターは、従来の分子モーターの回転で必要であった高温での反応が必要なく、室温程度で熱反応が進行するという利点がある。

本研究では、DNA と相互作用する種々の分子モーター誘導体を合成する。さらに、光照射による外部刺激により分子モーターを回転させ、その運動により DNA のらせんの反転を誘起し、B 型 DNA、Z 型 DNA のらせん構造を自由に制御することを目的とする。

3. 研究の方法

DNA を認識するキラル分子モーターの開発

近年、キラルヘリセンを、DNA の二本鎖の間にインターカレートさせ、DNA の構造を認識するという報告がある。我々のキラル分子モーターとは立体構造が極めて類似しており、DNA に対して相互作用し得ると考えられる。DNA と相互作用し、結合する分子構造として、DNA の二本鎖の塩基対の間にインターカレートし、スタッキング相互作用で安定化するため、ナフタレンの様な大きい芳香環が必要である。また、DNA はヌクレオチドごとに -1 価の電荷をもつポリアニオンであり、リン酸側鎖と相互作用するためには、カチオン性の置換基が必要となる。さらに、水への溶解性も必要であることから、アミノ基、アミジノ基、キノリン誘導体などを備えた分子モーター誘導体を合成する。

DNA と分子モーター誘導体の結合性の調査

二本鎖 DNA の構造変化を追跡する前に、分子モーター誘導体が DNA にきちんと取り込まれたかを確認する必要がある。合成した分子モーター誘導体と各種 DNA との結合を蛍光、UV、CD スペクトル等の分光スペクトル、 T_m (融解温度)測定などで調べる。

分子モーター誘導体を用いた DNA の構造変化の追跡

合成した各種分子モーター誘導体を DNA に取り込ませた後、光を照射する。単位時間

の光照射後の DNA の構造を追跡する。特に CD スペクトルで 240~300 nm 付近の DNA の塩基部分の Cotton 効果を追跡することにより、らせんの反転を含めた DNA の立体構造の変化を調べる。すなわち、DNA が B 型から Z 型に異性化した場合、塩基対を含めたらせん構造が反転するので 240~300 nm 付近の Cotton 効果の符号も反転することに注目する。

4. 研究成果

アミノ基を備えた新規キラル分子モーターの合成と絶対配置決定

はじめに、臭素を含む新規分子モーター誘導体の前駆体である五員環メチルケトン合成した (Scheme 1)。五員環メチルケトン McMurry 反応により二量化し、臭素を置換した分子モーターのシス体、およびトランス体の合成に成功した。それらの構造の相対配置は、X 線結晶解析によって確認することができた。さらに、アミノ化、脱保護を行い、目的のアミノ基を備えた新規分子モーター誘導体の合成に成功した。合成した新規分子モーター誘導体は、キラルカラムを用いて光学分割し、その光学活性体の合成に成功した。さらに、CD スペクトルの比較による絶対配置の決定に成功した (Figure 1)。

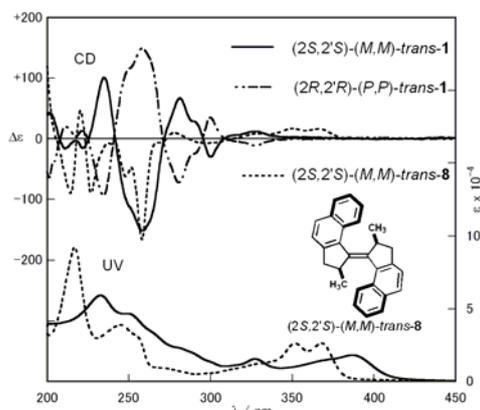
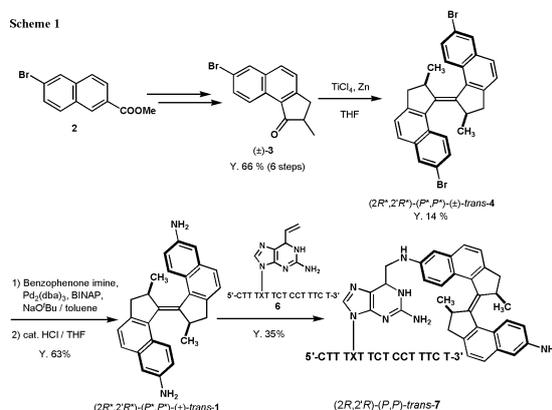


Figure 1. CD and UV spectra of *trans*-1 and *trans*-8.

新規キラル分子モーターの光異性化挙動

モノクロメーターを用いて新規分子モーター誘導体のトランス体に 387 nm の光を室温で照射し、異性化率を UV、HPLC で追跡した。その結果、照射 10 秒でシス体に 76 % 異性化することがわかった。同様にシス体に 415 nm の光を 10 秒照射したところ、53 % トランス体に異性化した。室温での光照射ではシス、トランス体の不安定中間体が熱異性化を起こし、次のステップの光異性化も同時に進行してしまっているといえる。温度、照射波長の検討は今後の課題である。

DNA と分子モーター誘導体の結合性の調査

分子モーターの回転運動を用いて B 型と Z 型 DNA のらせん構造を制御するため、新規分子モーター誘導体と DNA との結合を調べた。種々の塩基配列の DNA 溶液にアミン置換分子モーターを添加しその相互作用を CD スペクトルで追跡した。また、臭化エチジウム競合実験を UV スペクトルで追跡した。しかし、両スペクトルとも変化を示さず、DNA へのインターカレーションが起っていないことが示唆された。

分子モーター-DNAコンジュゲートの合成

新規分子モーターがインターカレーションしづらいという結果から、新規分子モーターと DNA を直接共有結合させた系を開発することを考え、分子モーターと 2-amino-6-vinylpurine を組み込んだオリゴ DNA との連結反応を行った。その結果、片方のアミノ基と結合したトランス体、およびシス体分子モーター-DNA コンジュゲートをそれぞれ 30% 程度の収率で得ることに成功した。さらにトランス体、シス体分子モーター-DNA コンジュゲートとその相補鎖により二本鎖を形成させ、融解温度 (T_m) を測定した。その結果、トランス体や SMe 体に比べてシス体とのコンジュゲートの二本鎖の方が T_m が 13 °C 程度高いことがわかった (Table 1)。すなわちシス体の分子モーターの構造が DNA の二本鎖を安定化させることがわかった。今後、トランス体、シス体分子モーター-DNA コンジュゲートの物性を詳細に検討し、分子モーターの回転による DNA の構造変化の追跡を目指す予定である。

Table 1. Melting Temperatures of the Duplexes between the Motor Conjugates and the Complementary

Compound	T_m (°C)	ΔT_m for native (°C)	ΔT_m for SMe (°C)
native	51.6	—	+16.7
SMe	34.9	-16.7	—
(2S,2'S)-(Al,M)- trans-7A	38.9	-14.7	+2.0
(2R,2'R)-(P,F)- trans-7B	33.9	-17.7	-1.0
(±)-cis-7	48.8	-2.8	+13.9

Counterpart = 5'-AGAAAGGAGAAACAAAG-3'
[Compound] = 1 mM, [NaCl] = 100 mM at pH = 7, 20 mM cacodylate buffer

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)

[学会発表] (計 7 件)

- DNA の構造制御を目指した新規分子モーター誘導体の合成と物性
桑原俊介, 永谷直人, 原田宣之, 永次史
(第 22 回生体機能関連化学シンポジウム, 平成 19.9, 仙台)
- DNA の構造制御を目指した新規分子モーター誘導体の合成と機能評価
永谷直人, 桑原俊介, 原田宣之, 永次史
(第 33 回反応と合成の進歩シンポジウム, 平成 19.11, 長崎)
- 分子モーターを導入したオリゴ DNA の合成とその機能評価
永谷直人, 桑原俊介, 原田宣之, 永次史
(日本化学会, 第 88 春季年会, 平成 20.3, 東京)
- DNA の構造制御を目指した新規分子モーターの設計と合成
小林麻衣子, 永谷直人, 桑原俊介, 永次史
(第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 平成 20.9, 横浜)
- DNA の構造制御を目指した新規分子モーター誘導体の合成
桑原俊介
(2008 年度若手研究者のためのセミナー, 有機合成化学協会関東支部, 平成 20.11, 東京)
- 分子モーターを組み込んだオリゴ DNA の合成とその機能評価
永谷直人, 桑原俊介, 原田宣之, 永次史
(日本化学会, 第 89 春季年会, 平成 21.3, 船橋)
- DNA の構造制御を目指したペプチド導入分子モーターの開発
小林麻衣子, 永谷直人, 桑原俊介, 原田宣之, 永次史
(日本化学会, 第 89 春季年会, 平成 21.3, 船橋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 俊介 (KUWAHARA SHUNSUKE)
東邦大学理学部・講師
研究者番号: 40359550

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし