

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750009

研究課題名 (和文) 高効率な過剰電子移動反応を誘起する DNA 構造の精密設計

研究課題名 (英文) Highly Efficient Excess Electron Transfer
in Precisely Designed DNA Architectures

研究代表者

伊藤 健雄 (ITO TAKEO)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80378801

研究成果の概要 (和文)：

DNA を利用した電子材料を開発することを目指して、二重鎖内電子移動の効率に影響を及ぼす因子を調べた。種々の光誘起電子注入剤を含む DNA 二重鎖を新たに合成し、DNA 塩基配列が鎖内電子移動反応に及ぼす影響を生成物分析法により定量した。その結果、二重鎖の局所構造の乱れや DNA 塩基の電子親和性、ならびに光誘起電子供与体の酸化還元特性が見かけの電子移動効率に大きく影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Effects of DNA structure on the DNA-mediated electron transfer efficiency were quantitatively investigated using DNA containing novel photo-induced electron donors. It was suggested that local structural changes and electron affinities of DNA sequences as well as redox properties of the electron donors highly affect the electron transfer efficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：生物物理化学・DNA 内電子移動、核酸、時間分解分光測定、核酸塩基損傷

1. 研究開始当初の背景

DNA 塩基の酸化還元反応特性は、放射線や光が及ぼす生体影響と関連して古くから注目されてきたが、近年、DNA 二重鎖において発生した正孔 (ホール) が核酸塩基対の π 軌道を介して長距離移動することが実験的

に示され、電荷移動と DNA 損傷反応機構の関連性が指摘されている。光化学技術を用いた多くの実験の結果、DNA 内で生成したホールが移動して、酸化電位の低いグアノシン部位に酸化損傷が集中する事実が明らかになり、その生化学的意義が注目されている。

これに対して、ホール移動とともに起こると期待されるDNA内での過剰電子移動反応についての研究は実験研究・理論研究をあわせても報告例は少ない。我々はこれまでに、光誘起によりDNAへの過剰電子注入を可能にする機能性DNAシステムを構築し、過剰電子移動反応の距離依存性および、競争的なプロトン移動反応の存在を明らかにしている。過剰電子移動反応効率は、DNAを構成する核酸塩基の電子親和性や構造因子、軌道間の重なりなど様々な要因に依存すると考えられるが、その詳細を検討し報告した例は無い。このようなDNA内電荷移動反応特性を考慮し、プローブDNAを電極上に固定し電荷移動度を測定することで、二重鎖内のミスマッチ（一塩基多型）を検出する試みもなされている。従って、このようなDNAの基礎物性を調べることは、医学分野における遺伝子診断においても有用な情報を与えることが期待できる。

2. 研究の目的

DNA二重鎖を経る過剰電子移動の反応機構を提示するためには、個々の核酸塩基の物理化学物性や二重鎖局所構造と電子移動効率の相関を詳細に調べる必要がある。

そこで本研究では、天然4種の核酸塩基に加えて、電子親和性の異なる修飾塩基を合成、DNA鎖内に導入し、過剰電子移動に及ぼす影響を検討するとともに、修飾塩基導入により引き起こされる局所構造変化の効果について、電気泳動法、高速液体クロマトグラフィーによる生成物分析法を併用することにより調べ、考察した。

最近の研究で、二重鎖内の過剰電子移動反応を調べるために構築された光誘起電子供与体-DNA複合体において、紫外線照射によりDNAに注入される電子は、塩基間移動と競争して電荷再結合（逆電子移動）が高効率で起こることが示唆されている。そこで、DNA構造の及ぼす影響に加えて、光誘起電子供与体の構造の影響、逆電子移動反応の寄与を明らかにすることを目的として、種々の光誘起電子供与体を合成することとした。こうして得られた複合体は、過剰電子移動の時間分解分光分析にも用いることができるため、より定量的に反応機構を議論することができる。

3. 研究の方法

(1) DNA内過剰電子移動効率定量的ための反応系構築

修飾塩基をDNAに導入すると二重鎖が解離し易くなるために、過剰電子移動の局所構造変化の影響を調べるためには、二重鎖全体の安定性を保持する必要がある。そこで二重鎖DNAの不安定化を抑える目的で、光誘起

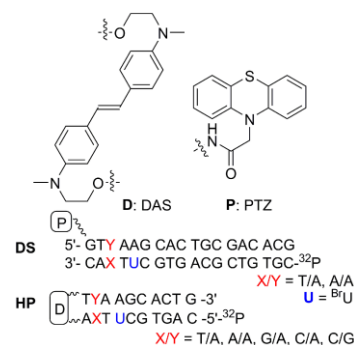


図1. ジアミノスチルベンを含むヘアピン型 DNA

一電子還元剤を含むヘアピン型DNAの合成を試みることにした。Lewisらは光誘起電子受容体を含むDNAヘアピンの合成をすでに報告しており、それを参考にしてジアミノスチルベンを誘導体化し、DNA自動合成機を用いた固相合成法によりDNA鎖末端への導入を検討した(図1)。

(2) DNA鎖内過剰電子移動反応と競争する逆電子移動反応の考察

(1)で構築した電子移動評価系では、光照射により一電子注入することができる反面、塩基間の電子移動と競争して、電子供与体への逆電子移動が起こることが予想される。そこで、シクロプロピル基を有する芳香族アミン誘導体をジアミノスチルベンに代わる電子供与体としてDNA鎖に結合し、その電子移動特性を調べた。光励起されるシクロプロピル基含有芳香族アミンはラジカルカチオンを生じ、速やかに三員環開裂を起こすために、逆電子移動反応を抑制することができることを期待した。

(3) 修飾塩基を含む二重鎖DNA上の過剰電子移動反応性

電子親和性の異なる核酸塩基としてウラシル誘導体をDNAに導入し、過剰電子移動反応性を上述のように評価した。ウラシル誘導体の電子親和性の見積もりは、*ab initio* 計算により行った。また、それぞれの二重鎖の熱安定性については、紫外線吸収(波長 260 nm)の温度依存性を調べることにより評価、考察した。

(4) 時間分解分光法による過剰電子移動の直接観測

ラジカルイオン中間体の挙動観測をナノ秒領域で行うために、上記で合成した試料に対してDNAの吸収波長とは異なる波長(355 nm)でレーザー励起を行い、生成するラジカルイオンのスペクトルを分析した。ナノ秒領域で減衰する電子供与体由来の吸収の変化から、電子移動反応速度を見積もることができると期待した。

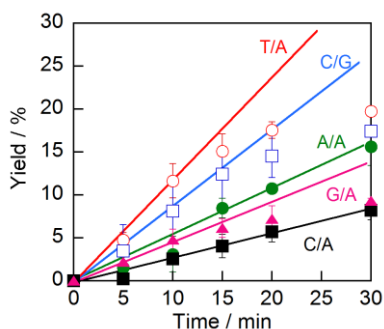


図2. ヘアピン型 DNA 内過剰電子移動反応に及ぼすミスマッチ塩基対の影響

4. 研究成果

(1) DNA内過剰電子移動効率定量的ための反応系構築

本研究ではまず、図1に示すジアミノスチルベンを電子供与体として含むDNAを合成した。ジアミノスチルベンは、DNA自動合成機による反応過程で、ヨウ素により容易に酸化分解することがわかったため、通常のプロトコルを変更し、(2*R*, 8*aS*)-(+)-(camphorylsulfonyl)oxaziridine を酸化剤として用いた温和な条件で合成を試みたところ、目的とするヘアピン型DNAを得ることができた。鎖内にはその他に、過剰電子移動反応プローブとして5-ブロモウラシルを導入した。5-ブロモウラシルは過剰電子との反応により脱ブロモ化し、DNA切断を誘起することから、反応生成物を定量することで過剰電子移動反応効率を決定することができる。DNA末端を放射性同位元素 ^{32}P で標識化し、ゲル電気泳動ならびにオートラジオグラフィにより電子移動誘起DNA切断反応の定量を行った。

合成したヘアピン型DNAは、通常の二重鎖構造よりも安定性が高く、配列にミスマッチ塩基対や損傷塩基構造(チミジングリコール)が存在する場合にも、高い安定性を保持した。

種々のミスマッチ塩基対を含むヘアピン型DNA(HP、図1)の分子内過剰電子移動反応性を定量した(図2)。その結果、ミスマッチ塩基対が存在すると一様に電子移動効率が低下し、この結果は、これまでに不安定なミスマッチDNAを用いた電子移動反応実験の場合とは異なる結果であった。従って、本研究で合成したヘアピン型DNAは、DNA局所構造のみを変化し、二重鎖の解離を引き起こすことがないことが示唆された。

(2) DNA鎖内過剰電子移動反応と競争する逆電子移動反応の考察

新規光誘起電子供与体として、アミノナフタレンを基本骨格として持つN-シクロプロピル誘導体(cNAP)、N-メチル誘導体(mNAP)を

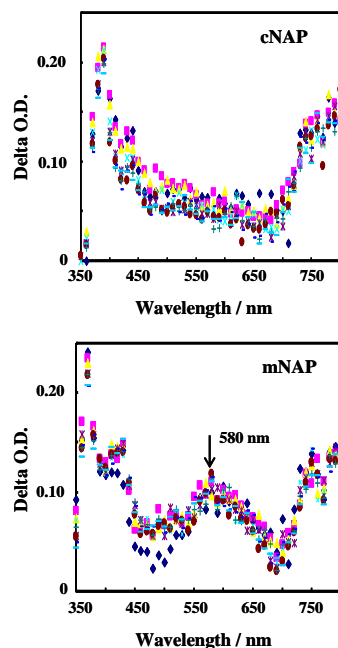


図3. N-シクロプロピルアミノナフタレン(上)とN-メチルアミノナフタレン(下)のレーザーフラッシュフォトリス

合成した。まず、レーザーフラッシュフォトリス法によりこれらの短寿命中間体のスペクトルを測定したところ、cNAPラジカルカチオンにおいて迅速なシクロプロピル基開環反応が進行することがわかった(図3)。従って、光励起したcNAPはラジカルカチオンを生じ、速やかな開環反応により分解することが確認できた。

つぎにこれらをDNA末端に結合し、光誘起電子移動反応を行った。ゲル電気泳動による生成物分析の結果、いずれのアミノナフタレン誘導体もDNA二重鎖内に効率よく電子を注入する光誘起電子供与体として機能することがわかった。また、cNAP導入DNAを用いた場合には、シクロプロピル基開環反応と競争する逆電子移動反応の寄与を示唆する結果が得られた。今後、本実験モデルを用いた蛍光寿命測定、およびナノ秒より短い時間領域での過渡化学種の生成と消滅の速度論解析により、還元的電子移動反応機構の詳細を解明しようと期待できる。

(3) 修飾塩基を含む二重鎖DNA上の過剰電子移動反応性

二重鎖内電子移動におけるキャリア核酸塩基の電子親和性の影響を調べるために、配列の一部のチミン(T)をウラシル誘導体[5-フルオロウラシル(FU)、ウラシル(U)]に置換したDNA二重鎖を合成した。それらの二重鎖解離温度を測定したところ、いずれのDNAもほぼ同程度の熱安定性を示した($\pm 2^\circ\text{C}$)ことから、局所構造変化の影響は小さ

いことが確認できた。

各ウラシル誘導体を構成塩基とする 2'-デオキシウリジンと 2'-デオキシアデノシンから成る塩基対の電子親和性を Hartree-Fock 法(3-21G)により求めたところ、LUMO のエネルギー準位は T > U > FU の塩基対順に低下することがわかった。さらに、光誘起電子移動反応を定量したところ、挿入したウラシル誘導体の電子親和性に比例して電子移動効率が大きくなる傾向があることが示唆された。このことは、天然の DNA 塩基 4 種類にくわえて、ウラシル誘導体を配列内に加えた二重鎖でも電子移動キャリアとして利用可能であることを示しており、二重鎖の最低非占有電子軌道 (LUMO) 準位を精密に制御することにより、今後新たなナノスケール材料として応用できると考えられる。

(4) 時間分解分光法による過剰電子移動の直接観測

(1) で合成したジアミノスチルベンを含む DNA 二重鎖 (DS、図 1) に対してナノ秒レーザーフラッシュフォトリススを行ったところ (励起波長 355 nm)、ジアミノスチルベンのラジカルカチオンに由来する吸収スペクトルが得られた。しかしながら、素早い逆電子移動が支配的であるためか、吸収の時間変化を速度論解析するには至らなかった。

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 11 件)

① Takeo Ito、Akiko Kondo、Tomoyuki Kamashita、Kazuhito Tanabe、Hisatsugu Yamada、Sei-ichi Nishimoto、Pathways of Excess Electron Transfer in Phenothiazine-tethered DNA Containing Single-base Mismatches、Org. Biomol. Chem. 7, 2009, 2077-2081. (査読有)

② Takeo Ito、Aiko Hayashi、Akiko Kondo、Tsukasa Uchida、Kazuhito Tanabe、Hisatsugu Yamada、Sei-ichi Nishimoto、DNA Hairpins Containing a Diaminostilbene Derivative as a Photo-induced Electron Donor for Probing the Effects of Single-Base Mismatches on Excess Electron Transfer in DNA、Org. Lett. 11, 2009, 927-930. (査読有)

③ Takeo Ito、Susumu Kuno、Tsukasa Uchida、Shin-ichi Fujita、Sei-ichi Nishimoto、Properties and Reactivity of Adenosine Radical Generated by Radiation-Induced Oxidation in Aqueous Solution、J. Phys. Chem. B 113, 2009, 389-394. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

① Takeo Ito、Aiko Hayashi、Tsukasa Uchida、Tanabe Kazuhito、Hisatsugu Yamada、Sei-ichi Nishimoto、Photoinduced electro transfer reaction in diaminostilbene-tethered DNA duplexes、The 6th International symposium on Nucleic Acids Chemistry、Takayama、Gifu、Sep. 29, 2009.

② 内田 吏、伊藤 健雄、林 亜衣子、田邊 一仁、山田 久嗣、西本 清一、ジアミノスチルベンを含む DNA における電子移動反応の塩基配列依存性、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、福岡、福岡、2009 年 9 月 13~15 日

③ 伊藤 健雄、林 亜衣子、内田 吏・八田 博司、西本 清一、ジアミノスチルベンを光誘起電子供与体として含むヘアピン型 DNA 内過剰電子移動反応、船橋、千葉、第 89 春季年会、2009 年 3 月 27 日~30 日

④ Takeo Ito、Akiko Kondo、Aiko Hayashi、Tsukasa Uchida、Kazuhito Tanabe、Sei-ichi Nishimoto、Photoinduced excess electron injection into DNA duplexes containing mismatched base pairs、Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、Kyoto、Sep. 8-12, 2008.

⑤ Aiko Hayashi、Takeo Ito、Akiko Kondo、Sei-ichi Nishimoto、Reductive electron transfer in DNA (2): Synthesis of a New Electron Donor for Investigating Structure-Dependent Electron Transfer in DNA、10th Int. Workshop Radiation Damage to DNA、Urabandai、Fukushima、Jun. 8-12, 2008.

⑥ Takeo Ito、Akiko Kondo、Tsukasa Uchida、Sei-ichi Nishimoto、Reductive electron transfer in DNA (1): Implications for radiation-induced reductive DNA damage 10th Int. Workshop Radiation Damage to DNA、Urabandai、Fukushima、Jun. 8-12, 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 健雄 (ITO TAKEO)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80378801

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

西本 清一 (NISHIMOTO SEI-ICHI)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10115909

田邊 一仁 (TANABE KAZUHITO)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40346086

山田 久嗣 (YAMADA HISATSUGU)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80512764