

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03033

研究課題名(和文) DNA二重鎖中で無限に金属イオンが連続する超分子錯体：精密合成・結晶構造・物性

研究課題名(英文) Synthesis and characterization of metallo-DNA nanowire with infinite, uninterrupted one-dimensional metal ions array

研究代表者

小野 晶 (Ono, Akira)

神奈川大学・工学部・教授

研究者番号：10183253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：機能性材料の開発を目的として、DNAを基盤構造とする一次元超錯体(金属-DNAナノワイヤー)の開発研究に従事した。代表的成果として、DNA二重鎖中で無限に銀イオンが連続する一次元超分子錯体(銀-DNAワイヤー)、また、DNA二重鎖中で水銀イオンが連続する水銀-DNAワイヤーの結晶を得た。また、銀イオンが高密度で集積したDNA二重鎖中の合成法を開発し、その構造を証明した。これらの成果は著名な科学雑誌に掲載され、また、表紙画像として採用された。さらに、水溶液中で安定に形成される金属-DNAナノワイヤーの合成研究を実施した。また、内部に水銀イオンを含むDNA二重鎖の単分子導電性測定に着手した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で合成したDNAを基盤構造とする一次元超錯体(金属ナノワイヤー)は、新規構造を有していること、導電性ナノワイヤーや磁性体開発の基盤構造となる可能性があることが評価され、世界的に著名な学術雑誌に掲載されている。重要論文に認定され、また表紙画像として採用されていること、学術的に高い評価を得ている証である。今すぐに製品開発に結び付く等、実用的に利用されるものではないが、将来、ナノサイエンスの発展に寄与する研究成果である。社会的意義は、将来、科学技術の発展に貢献する可能性を有することである。

研究成果の概要(英文)：For developing functional nanomaterials such as nanowires, we have engaged in synthesizing DNA structure based one dimensional metal complexes (metallo-DNA nanowires). We have reported a crystal structure of Ag-DNA wires in which silver ions are uninterruptedly arrayed in DNA duplexes, and a crystal structure of Hg-DNA wires. Also, we have developed a procedure for preparing DNA duplex in which Ag ions were accumulated in a high density. The reports have been published in highly rated scientific journals and a structure was selected as a cover picture. We have started to prepare metallo-DNA wires which are stable in solutions. Also, we have started to measure electrical conductance of DNA duplex having metallo-base pairs.

研究分野：核酸化学。DNA/RNA構造を利用してナノワイヤーなどの機能性材料や、核酸医薬を開発する。

キーワード：DNA nanowire DNA Supermolecule Molecular architecture metallo-DNA/RNA metallo-base pairs crystal structure Molecule Conductance DNA/RNA synthesis

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

その自己組織化的高次構造形成能を利用し、核酸 (DNA/RNA) を基盤構造とするナノ構造体を開発する研究が盛んである。また、その糸状の形態に着目し、DNA/RNA をナノワイヤー開発の基盤構造とする研究報告も多い。さらに、もう一つの DNA/RNA の構造の特徴—簡単な構造単位がタンデムに連結している—ことを利用して、DNA/RNA 構造上に機能性基を集積化する方法論が注目されている。

その一つとして、合成オリゴヌクレオチド (短鎖 DNA) の塩基部を金属イオン錯体に変換し、DNA 二重鎖に金属イオンを集積化する方法がある。塩谷らに代表されるが、金属結合部位に人工塩基を用いる方法論が主流である (超分子金属錯体—錯体化学会選書—藤田誠・塩谷光彦 編著)。一方、代表者と田中 (分担者) らは天然型 DNA を用いて金属含有 DNA 二重鎖を形成させる手法を研究している (Y. Tanaka---A. Ono, *Chem. Comm.*, **2015**, *51*, 17343. Feature Article)。例を挙げると、DNA 二本鎖中の T-T ミスペアに Hg(II)イオンが、また C-C ミスペアに Ag(I) イオンが高選択的に結合し、T-Hg(II)-T、C-Ag(I)-C が形成されることを世界に先駆けて見出した (*J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 2172\_被引用件数,814、*Chem. Comm.*, **2008**, *39*, 4825\_被引用件数 533. 2021年6月 Web of Science)。近藤 (分担者) は T-Hg(II)-T、または C-Ag(I)-C を有する二重鎖の立体構造を明らかにした (図 1a b、*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 2385, Very Important Paper、*ibid.*, **2015**, *45*, 13323)。また、代表者は DNA を基盤構造とする Hg(II)イオンセンサーを報告している (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4300、被引用件数 1014)。しかし、人工塩基を用いる方法、天然型塩基を用いる方法、どちらを用いても、金属含有 DNA 二重鎖中に連続する金属イオンの数は、多くて 10 数個であり、長鎖の金属含有 DNA 二重鎖は報告されていない。

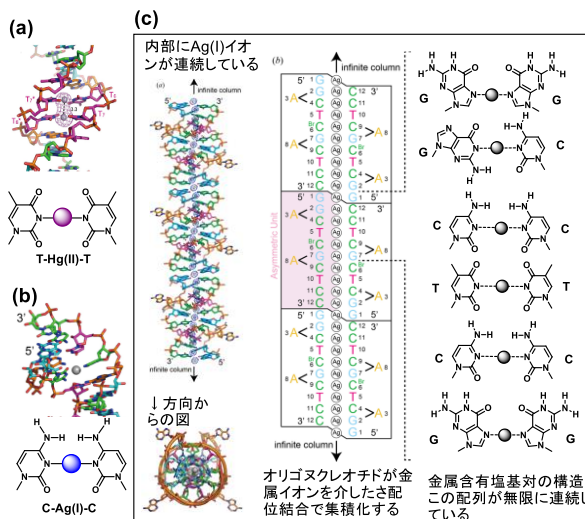


図1 天然型DNAの形成する金属含有DNA二重鎖

ところが、2016年、申請者らは長鎖金属含有 DNA 二重鎖の結晶を得た (図 1c)。構造と形成過程は後で説明するが、緩衝液中で短鎖の天然型 DNA と金属イオンを混合するだけで、無限に銀イオンが連続する超分子錯体 (Ag-DNA wire) が得られた (2017年に報告された。*Nature Chemistry*, **2017**, *9*, 956-960)。新規ナノ構造体の萌芽であり、本研究の契機となった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、金属-DNA wire の合成法を開発することである。前述の Ag-DNA wire (図 1C) は、偶然、結晶として得られた。任意の金属-DNA ワイヤーを合成する方法論を開発し、さらに金属-DNA ワイヤーの物性を調査し、機能化への足掛かりを得る。次の3項目を具体的な目的とした。(1) 鎖長 (数 nm~mm) と金属イオンの配列を厳密に制御した多様な金属-DNA ワイヤーを合成する。(2) X線結晶構造解析法により金属-DNA ワイヤーの構造を解析する。特に“連続する金属イオン間に生じる相互作用が塩基部の化学修飾や連続する金属イオンの個数と種類によってどのように変化するのか”という問いは興味深く、物性 (導電性など) を議論するうえで有用な情報となる。(3) 一分子の金属=DNA ナノワイヤーを単離し、(4) その物性を解析する

3. 研究の方法種々の合成オリゴヌクレオチドヌクレオチドと金属イオンを混合して、金属-DNA ワイヤーを合成し、その構造を結晶構造解析法、分光法、NMR 法などの手法で解析した。概要を項目に分けて列記する。

### (1) 【鎖長と金属イオンの配列の制御された DNA 金属ワイヤーの合成】

①長鎖 DNA 金属ナノワイヤーの合成: 図 1c の DNA 銀ワイヤーの形成過程を模式的に示す (図 2)。12 塩基からなる合成 DNA と Ag(I)イオンの混液から銀ナノワイヤーの結晶を得た (図 1C)。DNA の A 残基は二重鎖の外部に押し出され、既知の C-Ag(I)-C と新規の T-Ag(I)-T、G-Ag(I)-C、G-Ag(I)-G によって二重鎖が形成された (図 1c)。末端の G 残基 (のりしろ) が G-Ag(I)-G を形成すると二重鎖が次々と連なり、無限に連続する金属ナノワイヤーが形成される。すなわち、“のりしろ”を使って短鎖金属含有 DNA 二重鎖を連結することで DNA 金属ナノワイヤーが形成される。このようにして、短鎖 DNA から長鎖の金属-DNA ワイヤーを得る。

②鎖長の制御された金属含有 DNA 二重鎖の合成: 塩基数が増えると、複数の構造体を与える。本研究では、短鎖の DNA を連結することで長鎖の DNA 金属ナノワイヤーとする。またリンカーで結合したオリゴヌクレオチドを用いて構造を制御の制御された金属含有 DNA 二重鎖を合成する。

③**金属イオンの配列の制御された DNA 金属ワイヤーの合成**：塩基部のカルボニル基をチオカルボニルに変換すると、高密度で金属イオンが集積化される。

(2) **【結晶化】** 金属含有 DNA 二重鎖の結晶構造の報告は少ない。元来、生体高分子の結晶化は容易ではないが、金属含有塩基対のみからなる金属含有 DNA 二重鎖（ワトソクニック塩基対を含まない）の結晶は図 1c の DNA 銀ナノワイヤー以外に報告が無い。高純度の金属含有 DNA 二重鎖（超分子錯体）を合成し、さらに結晶中で規則正しく配列させる工夫が必要である。

(3) **【溶液中で安定な DNA 金属ワイヤーの合成と検出】**

DNA 鎖を共有結合で連結することでワイヤーを安定化する。DNA リガーゼを利用する方法、機能性残基の光反応などを用いる。長鎖の DNA を検出することで、溶液中で DNA 金属ナノワイヤーが形成されたことを証明するが、ゲル電気泳動法、表面科学的手法を利用する。

(4) **【金属ワイヤーの物性】**：申請者らは金属結合部位の電子状態解析、金属イオン結合の熱力学的パラメータ解析など、物性研究を遂行してきた。本計画では、特に DNA 金属ナノワイヤーの導電性測定に着手する。

4. 研究成果

**長鎖 DNA 金属ワイヤーの合成**

本研究で 3 種の金属-DNA ワイヤーの結晶構造を得た(図 2)。Ag-DNA ワイヤー(図 2A)の構造は図 1C に詳しく記した。図 2B は短鎖の Ag-DNA ワイヤーである。両ワイヤー共に、隣り合う Ag(I)イオン間の距離は van der Waals 半径の 2 倍よりも小さい。即ち、隣り合う Ag(I)イオン間に金属間相互作用が存在した。短鎖 Ag-DNA ワイヤー(B)の溶液構造に関しては後半に記す。図 2C は、Hg-DNA ワイヤーであり、DNA 二重鎖中に Hg(II)イオンが集積されている。短鎖の合成 DNA (5'-TTTGC-3') と Hg(II)イオンの溶液から結晶として得られた。このワイヤーでは隣り合う Hg(II)イオン間に金属相互作用は存在しなかった。分光実験から、結晶構造と同様の構造が溶液中で形成されることが推測された。権威ある学術雑誌(査読付き)に掲載されたが、referee から高い評価を受けたことから Very Important Paper として認定された。

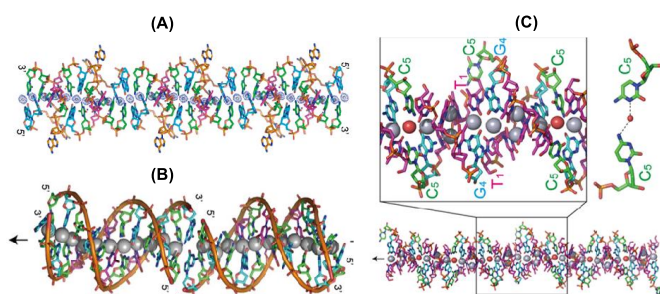


図 2. 金属-DNA ワイヤーの結晶構造。(A) Ag-DNA Wire; *Nature Chem.*, **2017**, *9*, 956-960. (B) Short Ag-DNA Wire. 論文準備中。(C) Hg-DNA Wire; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*, 16835-16838 Very Important Paper.

高密度で Ag(I)イオンが集積化された DNA 二重鎖の合成：

研究代表者らは、チミン

ーチミン (T-T) 塩基対に

Hg(II)イオンが結合して、

安定な T-Hg(II)-T 塩基対が

形成され (*J. Am. Chem.*

*Soc.*, **2006**, *128*, 2172)、シト

シンーシトシン (C-C) 塩

基対に Ag(I)イオンが結合

して、安定な C-Ag(I)-C 塩

基対が形成される (*Chem.*

*Comm.*, **2008**, *39*, 4825) こと

を報告している(図 3 左)。

天然型のチミン塩基の 4 位

カルボニル基をチオカル

ボニル基に置換した 4-チ

オチミン (S) を用いて、DNA 二重鎖中に S-S 塩基対を形させる。Ag(I)イオンを添加すると、S と S の間に二つの Ag(I)イオンを有する塩基対、S-2Ag(I)-S、が形成された(図 3 中央)。研究代表者らは、この塩基対の構造を分光学的研究や質量分析研究で予想していたが (I. Okamoto...A. Ono, *Chem. Comm.*, **2012**, *48*, 4347-4349)、本研究で結晶構造が明らかとなった (*Chem. Comm.*, **2017**, *53*, 11747-11750) (図 3 右)。DNA 二重鎖中に S-2Ag(I)-S が連続することで、Ag(I)イオンが高密度で集積化された。隣り合う Ag(I)イオン間に金属相互作用が存在する。論文は高い評価を得て表紙の画像に採用された。

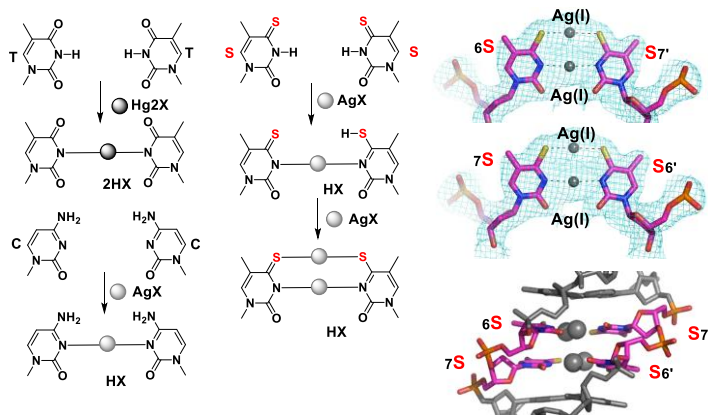


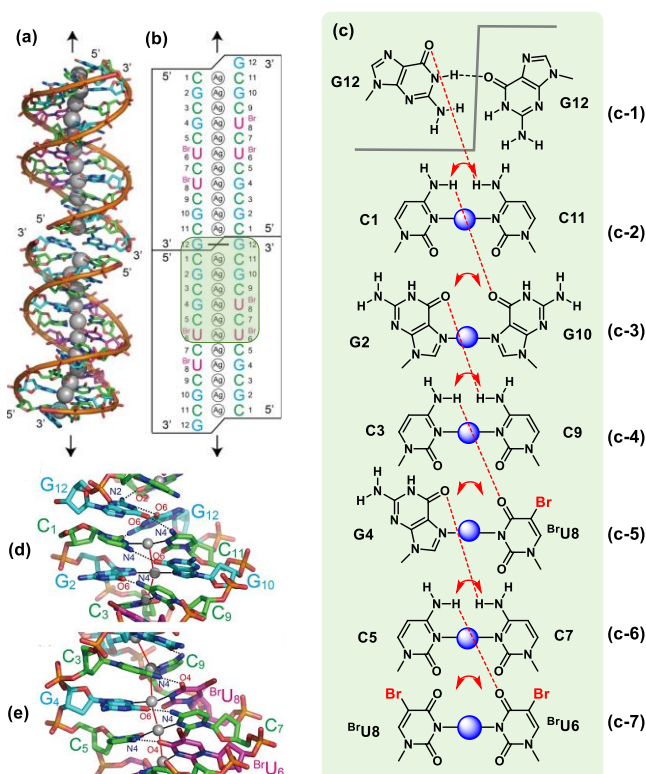
図 3 高密度で Ag(I)を集積した DNA 二重鎖。 *Chem. Comm.*, **2017**, *53*, 11747-11750. (Front cover picture).



鎖長の制御された金属含有 DNA 二重鎖の合成：図 2B に示した短鎖 Ag-DNA ワイヤの、さらに詳しい構造を図 4 に示した。11 個の Ag(I) イオンを有する短鎖 Ag-DNA ワイヤが、結晶中、非ワトソクリック型 G—G 塩基対を形成しながら連結している。即ち、非ワトソクリック型 G—G 塩基対がのりしろとなって短鎖 Ag-DNA ワイヤが連結している。

Ag(I) イオン含有塩基対間に連続して形成される水素結合 (赤い点線)、塩基対のねじれがアミノ基間、カルボニル基間の立体反発 (赤い湾曲両矢印) を解消する様子など、構造の細部が明らかとなった。このような構造の特徴は長鎖 Ag-DNA ワイヤ (*Nature Chem.*, 2017, 9, 956-960) と同様であった。

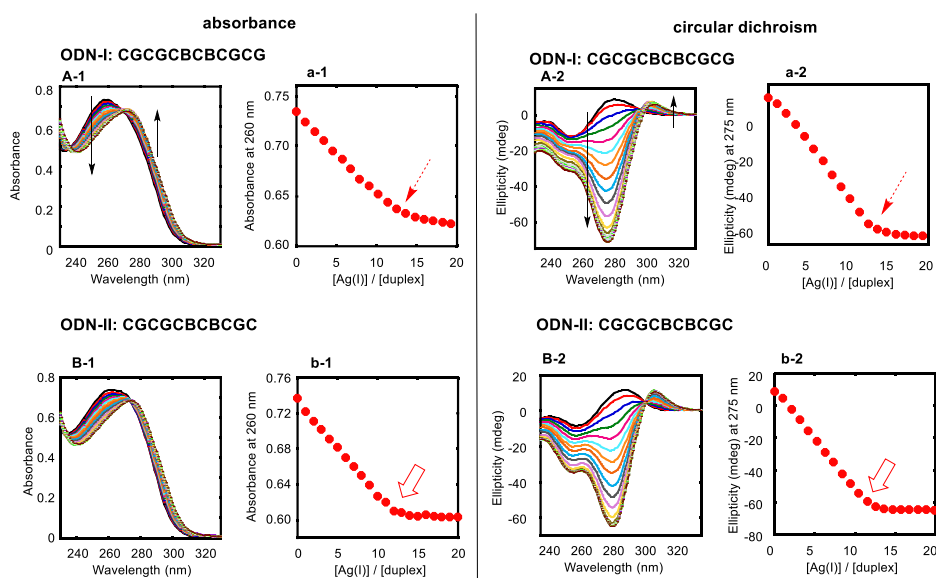
のりしろ部分では非ワトソクリック型 G—G 塩基対が形成され、Ag-DNA ワイヤ内部では G-Ag(I)-G 塩基対が形成される。のりしろ部分の非ワトソクリック型 G—G 塩基対を除去すると、切り離された短鎖 Ag-DNA ワイヤが得られると考えた。



**Figure 4.** Structure of the short Ag(I)-DNA wires. (a): Crystal structure of a dodecamer duplex. For each base and its associated deoxyribose, the carbons are shown in one color (G, blue; C, green; BrU pink). N, blue; O, red; P, orange; Ag, silver spheres. For a better understanding, hydrogen atoms included in the structure refinement are not shown. (b): The secondary structure shows two representative dodecamer duplexes of an extended wire. (c): Chemical structure of a G-G pair and six silver-mediated base pairs: G-G (c-1), C-Ag-C (c-2), G-Ag-G (c-3), C-Ag-C (c-4), G-Ag-BrU (c-5), C-Ag-C (c-6) and BrU-Ag-BrU (c-7). Inter-base pair hydrogen bonds between amino and carbonyl groups are represented by red dotted lines. (d) (e): Tertiary structures of the parts of the short Ag(I)-DNA wire. Views are from the major groove. (d), G12-G12/C1-C11/G2-Ag-G10 base pairs. (e), C3-Ag-C9/G4-Ag-BrU8/C5-Ag-C7 base pairs.

### 溶液中の短鎖 Ag-DNA ワイヤ形成

結晶を与えたオリゴヌクレオチド (5'-CGCGCBCBCGCG-3', B = 5-bromo-2'-deoxyuridine) を ODN-I とし、ODN-I の 3'末端の G 残基を除去したオリゴヌクレオチド (5'-CGCGCBCBCGC-3')



**Figure 5.** A-1 and B-1; Absorption response of ODN-I or ODN-II on addition of Ag(I) ions. a-1 and b-1; The optical density (at 260 nm) versus Ag(I) ion concentration. A-2 and B-2; CD spectra of ODN-I and ODN-II on addition of Ag(I) ions. a-2 and b-2; Ellipticity versus Ag(I) ion concentration. Each solution contained 2 M oligonucleotide in 10 mM Mops, 20 mM NaNO<sub>3</sub>, pH 7.1. Each spectrum was measured at 20 °C.

を ODN-II とする。チミジン (T) の代わりに B を使用したのは、結晶構造解析に重元素法を用いる可能性を考えたことによる。ODN-I と ODN-II のワイヤー構造形成を、吸収スペクトル、また、CD スペクトルによって解析した (Fig. 5)。オリゴヌクレオチドの溶液に Ag(I) イオンを添加しながら吸光スペクトル (Fig. 5 A-1, B-1) と CD スペクトル (Fig. 5 A-2, B-2) を測定した。

Ag(I) イオンを添加するに従いスペクトルが変化した。スペクトルに顕著な変化があった波長を選択し、水銀イオンとスペクトル強度をプロットした (Fig. 5 a-1 と b-1 または a-2 と b-2)。Ag(I) イオン濃度が増加するにしたがい強度が減少するが、ある Ag(I) イオン濃度で、現象の度合いが小さくなった。即ち、変曲点が見られた。ODN-II では明確な変曲点を与えた (Fig. 4 b-1, b-2)。一方、ODN-I を用いた実験で見られた変曲点はなだらかであった (Fig. 5 a-1, a-2)。のりしる部分が G—G 塩基対、G-Ag(I)-G 塩基対など、複数の構造の平衡にあると推測される。

NMR 実験には ODN-I と ODN-II の B を T に変換したオリゴヌクレオチド、ODN-I-t と ODN-II-t を使用した (Fig. 6)。ODN-II-t は、過剰の Ag(I) イオンを添加しても、シャープなピークを与えた (Fig. 6b)。溶液中で短鎖 Ag-DNA ワイヤが形成され、安定に存在していることを示唆する結果である。一方、過剰の Ag(I) イオン存在下、ODN-I-t の NMR シグナルはブロードになり、ほぼ消失した (Fig. 6a)。のりしる部分の G 残基によって Ag-DNA ワイヤが連結し、高分子化することでシグナル強度が減少したと理解される。

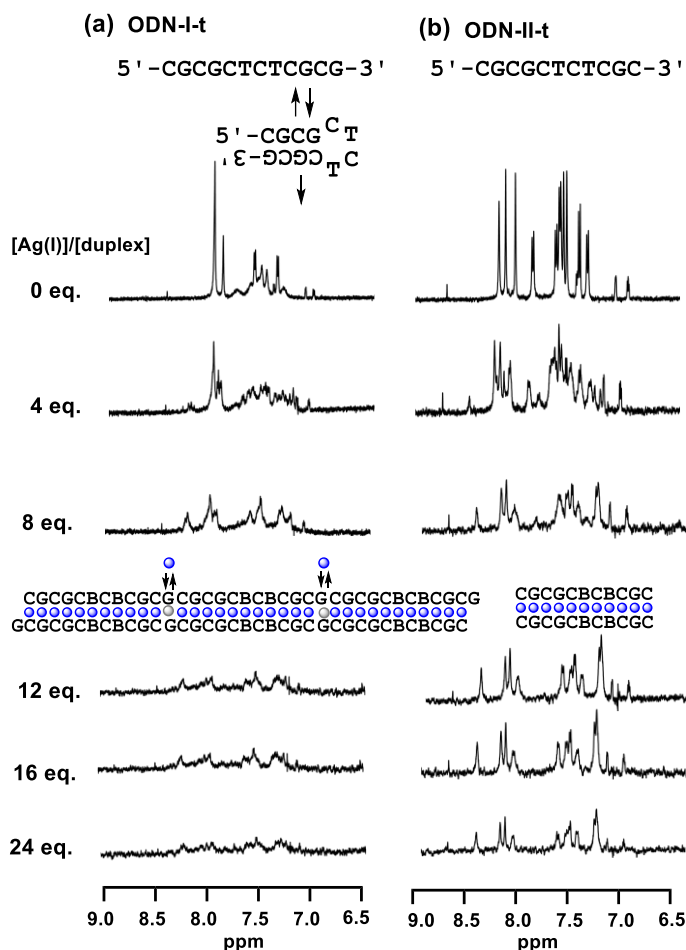
**金属ナノワイヤーの物性測定：STM-break junction 法を用いて T-Hg(II)-T 塩基対を有する短鎖 DNA 二重鎖の導電性を測定する実験に着手した (Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids, 2020, 39 (8), 1083-1087)。金属含有塩基対、T-Hg(II)-T、の導入によって導電性が向上するという結果は得られなかった。さらなる研究が必要である。**

### まとめ

3 項目を具体的な目的の一つ— (1) 鎖長 (数 nm~mm) と金属イオンの配列を厳密に制御した多様な金属-DNA ワイヤを合成する—に関しては、3 種の金属-DNA ワイヤを得た。鎖長の揃った短鎖の Ag-DNA ワイヤの合成にも成功した。

(2) X 線結晶構造解析法により金属ナノワイヤーの構造を解析する。特に“連続する金属イオン間に生じる相互作用が塩基部の化学修飾や連続する金属イオンの個数と種類によってどのように変化するのか”という問いは興味深く、物性 (導電性など) を議論するうえで有用な情報となる—に関しては、結晶構造中で Ag(I) イオン間に金属相互作用が存在することを明らかにした。金属間距離を制御する手法の開発には至らなかった

(3) 一分子の DNA 金属ナノワイヤーを単離し、(4) その物性解析に着手する—に関しては、STM-break junction 法を用いる導電性測定に着手したに止まった。今後の研究が期待される。



**Figure 6.** (A-1) Absorption response of ODN-II on addition of Ag(I) ions. (A-2) The optical density (at 260 nm) versus Ag(I) ion concentration. (a-1) CD spectra of ODN-II on addition of Ag(I) ions. (b-2) Ellipticity versus Ag(I) ion concentration. Each solution contained oligonucleotide in 10 mM Mops, 20 mM NaNO<sub>3</sub>, pH 7.1. Each spectrum was measured at 20 °C.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Ryo, Nomura Issei, Yamaguchi Yuki, Matsuda Yosuke, Hattori Yoshikazu, Tada Hirokazu, Ono Akira, Tanaka Yoshiyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Electrical conductance measurement of HgII-mediated DNA duplex in buffered aqueous solution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1083~1087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2020.1755044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akira Ono, Hiroki Kanazawa, Hikari Ito, Misato Goto, Koudai Nakamura, Hisao Saneyoshi, Jiro Kondo	4. 巻 58
2. 論文標題 Novel DNA helical wire containing Hg(II) mediated T:T and T:G pairs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed	6. 最初と最後の頁 16835-16838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201910029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akira Ono, Toru Sugawara, Hisao Saneyoshi, Jiro Kondo	4. 巻 53
2. 論文標題 Crystal structure of a DNA duplex containing four Ag(I) ions in consecutive dinuclear Ag(I)-mediated base pairs: 4-thiothymine-2Ag(I)-4-thiothymine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11747-11750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CC06153F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jiro Kondo, Yoshinari Tada, Takenori Dairaku, Yoshikazu Hattori, Hisao Saneyoshi, Akira Ono, Yoshiyuki Tanaka,	4. 巻 9
2. 論文標題 A metallo-DNA nanowire with uninterrupted one-dimensional silver array	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Chemistry	6. 最初と最後の頁 956-960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nchem.2808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計34件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 19件）

1. 発表者名 Akira Ono, Hisao Saneyoshi, Jiro Kondo, Yoshiyuki Tanaka
2. 発表標題 Preparations and structure elucidations of metallo-DNAs: DNA nanowire with uninterrupted one-dimensional silver ion array
3. 学会等名 23th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 次郎  (Kondo Jiro)  (10546576)	上智大学・理工学部・准教授    (32621)	
研究分担者	實吉 尚郎  (Saneyoshi Hisao)  (10564784)	滋賀医科大学・医学部・助教    (14202)	
研究分担者	山田 亮  (Yamada Ryo)  (20343741)	大阪大学・基礎工学研究科・准教授    (14401)	
研究分担者	田中 好幸  (Tanaka Yoshiyuki)  (70333797)	徳島文理大学・薬学部・教授    (36102)	
研究分担者	鳥越 秀峰  (Torigoe Hidetaka)  (80227678)	東京理科大学・理学部第一部応用化学科・教授    (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------