

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 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350105

研究課題名（和文） DNA 高次構造を応用する重金属イオン検出・除去システムの開発

研究課題名（英文） Development of new DNA duplex-based materials for detecting and removing heavy metal ions in aqueous solutions.

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

研究成果の概要（和文）：水溶液中の Hg(II)イオンを選択的に結合する材料を合成する目的で、チミン（ウラシル）残基を結合した高分子を合成したが、Hg(II)イオン結合能は低かった。チミン（ウラシル）残基をアルキルリンカーで結合することで、Hg(II)イオン結合能が大きく向上した。ウラシルダイマー、ウラシルダイマーを結合した高分子ともに、良好な Hg(II)イオン結合能を有していた。長鎖アルキル基を結合したチミンを溶解した液膜は、Hg(II)イオンを選択的に透過した。

研究成果の概要（英文）： In order to develop noble methods for selectively binding Hg(II) ions in aqueous solutions, we synthesized polymers carrying thymine (uracil) residues of which Hg(II) binding activities were low. Thymine (uracil) dimer, in which two pyrimidine bases were connected by alkyl linker showed good Hg(II) ions binding activity. Polymers carrying the pyrimidine dimer residues also showed good Hg(II) ions binding activities. Through a liquid membrane containing thymine with long alkyl chain, Hg(II) ions were selectively penetrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・機能材料デバイス

キーワード：DNA、透過膜、金属イオン検出、環境材料、水質浄化、チミン結合高分子

1. 研究開始当初の背景

研究計画を立案する前に、代表者らはDNA構造の特徴を利用して高選択的に金属イオンを捕獲することを報告していた。即ち、DNA二本鎖中のT-TミスペアにHg(II)イオンが、C-CミスペアにAg(I)イオンが高選択的に結合

しDNA二本鎖構造を大きく安定化することを見出した (Y. Miyake, A. Ono, J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 2172-2173. Y. Tanaka, A. Ono, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 224-225. A. Ono et al., Chem. Comm., 2008, 4725-4727.)。C-C塩基対がAg(I)イオ

ンと高選択的に結合する現象は代表者の新規発見であった。T-T塩基対とHg(II)イオンの結合が高選択的であることも代表者の発見であるが、科学史を振り返るとDNA中のチミン残基が水銀イオンと結合することが既に1960年代に報告されていた。さらに代表者は塩基配列が設計された合成DNAを用いて、T-T塩基対がHg(II)イオンを選択的に取り込むことを明らかにし、さらに先端機器分析技術（高分解NMR法）を用いて構造を証明した。

一方、代表者の報告した応用研究もまた多くの注目を集めた。即ちDNAと水銀イオンの結合が高選択的であることに着目し、DNAを基盤構造とする水銀イオンセンサーを合成した(H. Togashi & A. Ono, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 4300-4302.)。この報告は*Science*のEditor's Choice (2004, 305, 1533,)で紹介された。2012年5月、引用件数が380を超えた。代表者の報告を参考にした水銀イオンセンサーの開発研究が次々と報告されており、欧米のみならず中国、シンガポールなど東南アジアからかなりの投稿がある。先進国、途上国を問わず環境問題が喫緊の課題であることが分かる。

2. 研究の目的

本計画では、○金属イオンと選択的に結合するDNA模倣分子、○金属イオンを選択的に透過する人工膜、○金属イオンを検出するセンサー、の三種の機能性分子を開発する。

3. 研究の方法

(1)チミン（ウラシル）残基を結合した人工高分子を化学合成する。1位をアルキルリンカーで結合したチミン（ウラシル）ダイマーを化学合成し、さらに人工高分子に導入する。

(2)長鎖アルキル基を結合したチミンを合成し、液膜に溶解する。液膜を介した金属イオン透過性を検討する。

(3)金属イオン存在下で安定な二重鎖を形成するオリゴヌクレオチドを開発する。オリゴヌクレオチドにはレポーターグループ（ピレンなど）が結合しており、二重鎖を形成することで蛍光を発する。即ち、金属イオンを検出して蛍光を発するセンサーを開発する。

4. 研究成果

研究成果を、以下の項目ごとに記載する。

(1)Hg(II)イオンと高選択的に結合するDNA模倣分子の開発

①チミンダイマーによるHg(II)イオンの結合上でも述べたが、DNA二重鎖中のチミン-チミン塩基対に結合し、安定な金属含有塩基対、T-Hg(II)-T、が形成される。2残基のチミンがHg(II)イオンに結合することで、チミン-Hg(II)複合体は大きく安定化される。チミン

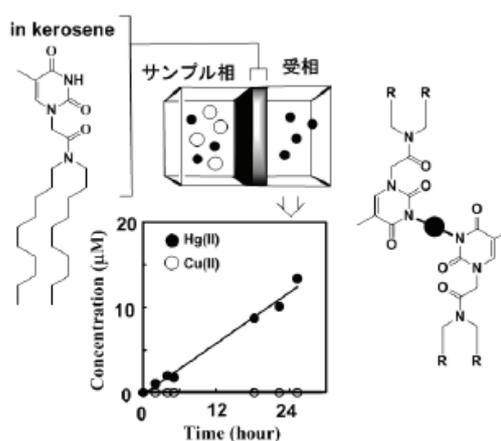
残基1位がアルキルリンカーで連結したチミンダイマーはチ

ミンモノマーに比較して、より優れたHg(II)イオン結合能を持つと期待される。

チミンダイマーを合成し、そのHg(II)イオン結合能を調べたところ、チミンモノマーより強くHg(II)イオンに結合した。チミンダイマーを結合した人工高分子（ポリメタクリル酸類）を合成し、Hg(II)イオン結合能を調べたところ、フリーのチミンダイマー残基と同様の結合能を有していた。

(2)Hg(II)イオンを選択的に透過する液膜の開発

1位に長鎖アルキル基の結合したチミン（本研究で合成されたもの）を有機相に溶解した液膜を調整した。サンプル相にHg(II)イオンとCu(II)イオンの混合液、受相に酸性溶液を用いた。一定時間ごとに受相の金属イオン濃度を測定したところ、Hg(II)イオン濃度が、経過時間に比例して、増加した。一方、Cu(II)イオン濃度はまったく増加しなかった。長鎖アルキル側鎖を含む液膜はHg(II)イオンを選択的に透過することが明らかとなった。膜内でHg(II)を介した塩基対が形成されていると予想され

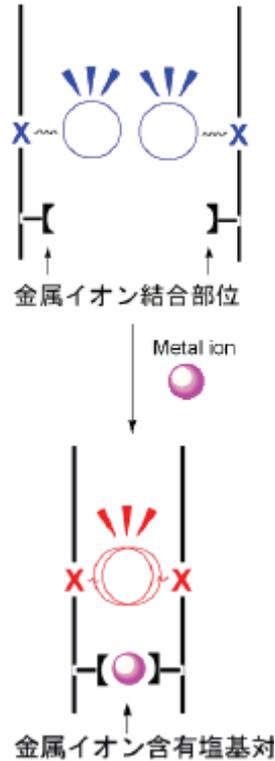


る。

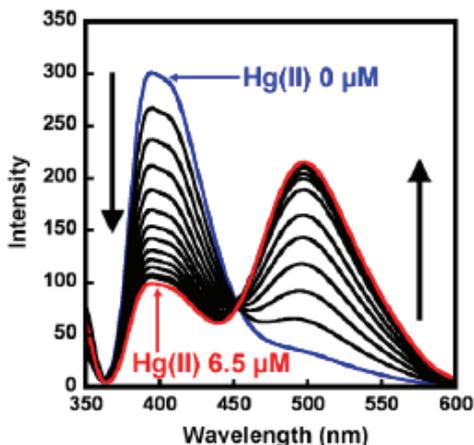
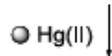
(3)DNAを基盤構造とする金属イオンセンサーの開発

①ピレンを蛍光性レポーターとするHg(II)イオンセンサー、Cu(II)イオンセンサーの開発

右に、センサーの基本概念を図示した。センサーは二本のDNA鎖からなる。DNA鎖は、溶液中で、一本鎖として存在するが、目的の金属イオンが存在すると安定な二重鎖を形成するようにデザインされている。即ち、各DNA鎖に金属イオン結合部位があり、金属イオンを介して安定な複合体を形成する。レポーターグループとしてピレンを使用する。DNA鎖が一本鎖として溶けているときは、ピレンモノマーに由来する蛍光を示す。金属イオンを介して安定な複合体が形成されることでDNA二重鎖が形成安定化される。DNA二重鎖上で接近したピレン残基はエキシマー由来の蛍光を示す。

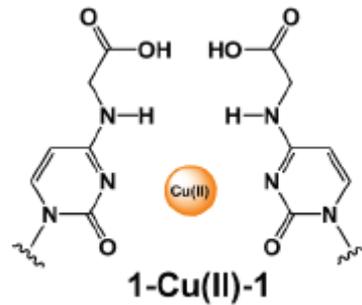


チミン残基を Hg(II)イオン結合部位として用いたセンサーの例を下に示した。Hg(II)イオン非存在下では、400 nm 付近にピレンモノマー由来の蛍光が観測された。Hg(II)イオンを添加するに従い、400 nm 付近の蛍光強度が減少し、520 nm 付近にピレンエキシマー由来の蛍光が現れた。蛍光強度と波長の変化から Hg(II)イオンを検出するセンサーの開発に成功した。Cu(II)イオンセンサーに関しては下のセクションに記載する。

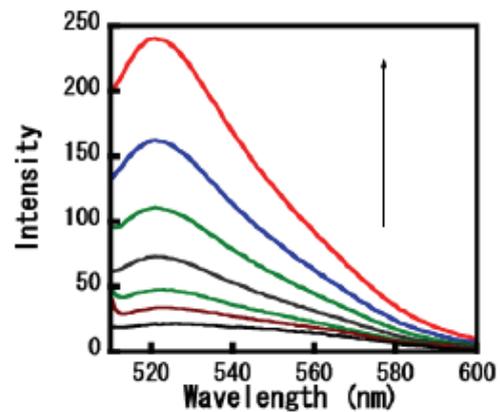
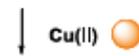


②二重鎖 DNA 結合性色素をレポーターとする Hg(II)イオンセンサー、Cu(II)イオンセンサーの開発

我々は、4N-カルボキシメチルシトシン塩基対に Cu(II)イオンが結合し、安定な金属含有塩基対を形成することを見出している。この塩基対と Cu(II)イオンの結合は選択的である。



4N-カルボキシメチルシトシン残基を有するDNA二重鎖をCu(II)イオンセンサーとして利用した。Cu(II)イオン存在下でDNA二重鎖は安定化される。センサー溶液中には、あらかじめ二重鎖に選択的に結合し蛍光を発する色素 (Sybr Green) が溶解している。Cu(II)イオン存在で安定化されたDNA二重鎖に色素が結合することで強い蛍光が観測された。



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] Itaru Okamoto, Takashi Ono, Rimi Sameshima and Akira Ono, “Metal ion-binding properties of DNA duplexes containing thiopyrimidine base pairs, 査読あり、*Chem. Commun.*, **2012**, *48* (36), 4347–4349.

[2] Tomomi Uchiyama, Takashi Miura, Hideo Takeuchi, Takenori Dairaku, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Yoshinori Kondo, Ladislav Benda, Vladimir Sychrovsky, Petr Bour, Itaru Okamoto, Akira Ono and Yoshiyuki Tanaka,

“Raman spectroscopic detection of the T-Hg^{II}-T base pair and the ionic characteristics of mercury” 査読あり、*Nucleic Acids Res.*, **2012**, doi:10.1093/nar/gks208.

[3] Hidetake Torigoe, Yukako Miyakawa, Akira Ono, Tetsuo Kozasa, “Positive cooperativity of the specific binding between Hg²⁺ ion and T:T mismatched base pairs in duplex DNA” *Thermochimica Acta*, 査読あり、**2012**, *532*, 28–35.

[4] Akira Ono, Hidetaka Torigoe, Yoshiyuki Tanaka, Itaru Okamoto, “Binding of metal ions by pyrimidine base pairs in DNA duplexes” 査読あり、*Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5855–5866.

[5] Takashi Ono, Yuko Saotome, Rei Sakabe, Itaru Okamoto and Akira Ono, “Synthesis of Covalently Linked Parallel and Antiparallel DNA Duplexes Containing the Metal-Mediated Base Pairs T-Hg(II)-T And C-Ag(I)-C”, 査読あり、*Chem. Comm.*, **2011**, *47*, 1542–1544.

[6] Hidetaka Torigoe, Yukako Miyakawa, Akira Ono, and Tetsuo Kozasa, “THERMODYNAMIC PROPERTIES OF THE SPECIFIC BINDING BETWEEN Ag⁺ IONS AND C:C MISMATCHED BASE PAIRS IN DUPLEX DNA” 査読あり、*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2011**, *30*, 149–167.

[7] Hidetaka Torigoe, Akira Ono, Tetsuo Kozasa
“Detection of single nucleotide polymorphisms by the specific interaction between transition metal ions and mismatched base pairs in duplex DNA” 査読あり、*Transition Metal Chemistry*, **2011**, *36*, 131–144.

[8] Hidetaka Torigoe, Akira Ono, and Tetsuo Kozasa, “Hg(II) Ion Specifically

Binds with T:T Mismatched Base Pair in Duplex DNA”, 査読あり、*Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 13218–13225.

[学会発表] (計 24 件)

[1] 高崎俊一、矢部裕之、岡本到、小野晶 “リンカーで結合したチミンダイマーの合成と反応” 日本化学会第92春季年会 (2011年3月25日、慶応義塾大学日吉キャンパス)

[2] 矢部裕之、岡本到、小野晶 “ウラシル結合高分子によるHg(II)イオンの除去” 日本化学会第92春季年会 (2011年3月25日、慶応義塾大学日吉キャンパス)

[3] 荒川薫、岡本到、小野晶 “金属イオン結合性側鎖を有する短鎖DNA二重鎖の合成” 日本化学会第92春季年会 (2011年3月25日、慶応義塾大学日吉キャンパス)

[4] 富士京、小野晶、鳥越秀峰、 “重金属イオンと5-フルオロウラシルを含むミスマッチ塩基対の相互作用解析” 日本化学会第92春季年会 (2011年3月25日、慶応義塾大学日吉キャンパス)

[5] Itaru Okamoto, Takashi Ono, Rimi Sameshima, Akira Ono, “Metal ion mediated thiopyrimidine base pairs in DNA duplexes” *The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011)* (11月10日、北海道大学)

[6] Kaoru Arakawa, Itaru Okamoto, Akira Ono, “Synthesis of oligodeoxyribonucleotides carrying metal ion binding residues”, *The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011)* (11月10日、北海道大学)

[7] Hiroyuki Yabe, Syunichi Takasaki, Itaru Okamoto, Akira Ono, “Synthesis and metal ion binding of polymers carrying uracil/thymine residues”, *The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011)* (11月10日、北海道大学)

[8] Akira Ono, Kumiko Sugiyama, Yuko Koyama, Yusuke Yamoto, Takashi Yazawa, Itaru Okamoto, “Synthesis of Metal Ion Sensors Based on DNA-Metal Interactions”, *12th International Symposium on Biotechnology Metal Complexes and Catalysis (BMC-XII)* (8月11日、Inner Mongolian Univ., Hohhot, China)

[9] Samanta Anirban, Okamoto Itaru, Ono Akira, “Metal ion binding properties of DNA duplex containing 6-thioguanine” 日本化学会第90春季年会 (2011年3月27日、神奈川大学横浜キャンパス)

[10] Akira Ono, “Metal ion interaction with pyrimidine-pyrimidine base pairs in DNA duplexes”, *2010 International*

Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Honolulu, (12月16日, 2010、)ハワイコンベンションセンター).

[11] Akira Ono, Takashi Ono, Itaru Okamoto, “Synthesis of covalently linked parallel and antiparallel DNA duplexes containing the Metal-Mediated Base Pairs”, *The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC)*, 220-221(Hamagin Hall “VIA MARE”, Yokohama) (Nov. 11, 2010).

[12] Takenori Dairaku, Itaru Okamoto, Akira Ono, Yoshinori Kondo, Yoshiyuki Tanaka, “NMR studies of Ag(I) ion-mediated C-C base pairs in a DNA duplex”, *The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC)*, 226-227(Hamagin Hall “VIA MARE”, Yokohama) (Nov. 11, 2010).

[13] Itaru Okamoto, Takashi Ono, Akira Ono, “Metal-ion binding property of DNA duplexes containing thiopyrimidine base pairs”, *The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC)*, 320-321(Hamagin Hall “VIA MARE”, Yokohama) (Nov. 11, 2010).

[14] 小野晶・岩本健司・岡本到、 “溶液のpHに依存して金属イオンを交換するピリミジン塩基対”、第40回複素環化学討論会 (2010年10月15日、仙台市民会館)

[15] 大樂武範・大瀧裕之・根東義則・小野晶・田中好幸、 “DNA 中における銀(I)を介したC-C 塩基対の構造解析”、第40回複素環化学討論会 (2010年10月15日、仙台市民会館)

[16] Akira Ono, Takashi Ono, Yuko Saotome, Rei Sakabe, Itaru Okamoto, “Preparation and properties of covalently linked antiparallel and parallel duplexes containing metal ion mediated base pairs”, *19th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids(IRT 2010)* (2010年8月31日、Lyon, France) (Université Claude Bernard Lyon 1)

[17] Itaru Okamoto, Takashi Ono and Akira Ono, “Metal binding of thiopyrimidine base pairs in DNA duplexes” *19th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids(IRT 2010)* (2010年8月31日、Lyon, France) (Université Claude Bernard Lyon 1)

[18] Hidetake Torigoe, Yukako Miyakawa, Miyako Fukushima, Akira Ono, Tetsuo Kozasa, “A novel device to trap heavy metal cations based on the specific interaction between heavy metal cation and mismatch base pair”, *19th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic*

Acids(IRT 2010) (2010年8月31日、Lyon, France) (Université Claude Bernard Lyon 1)

[19] 小野貴司・岡本到・小野晶、 “平行DNA二重鎖を安定化する非Watson-Crick型塩基対” 日本化学会第90春季年会 (2010年3月28日、近畿大学本部キャンパス)

[20] Akira Ono, Kenji Iwamoto, Kumiko Sugiyama and Itaru Okamoto, “Metal ion binding of modified pyrimidine-base pairs in DNA Duplexes” *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*(Sept. 28, 2009, Takayama, Japan). *Nucleic Acids Symposium Series No. 53*, 17-18 (2009).

[21] Hidetaka Torigoe, Yukako Miyakawa, Miyako Fukushima, Akira Ono and Tetsuo Kozasa “Development of a novel device to trap heavy metal cations: Application of the specific interaction between heavy metal cation and mismatch DNA base pair”, *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*(Sept. 28, 2009, Takayama, Japan). *Nucleic Acids Symposium Series No. 53*, 23-24 (2009).

[22] Tetsuo Kozasa, Yukako Miyakawa, Miyako Fukushima, Akira Ono and Hidetaka Torigoe, “Development of a novel method to determine the concentration of heavy metal cations: Application of the specific interaction between heavy metal cation and mismatch DNA base pair”, *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*(Sept. 28, 2009, Takayama, Japan). *Nucleic Acids Symposium Series No. 53*, 179-180 (2009).

[23] 小野貴司・早乙女優子・坂部伶・鈴木竜二・岡本到・小野晶、 “C-Cミスペアを含む平行DNA duplexの研究” 第24回生体機能関連化学シンポジウム、第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム (2009年9月14日、九州大学) 講演要旨集94頁

[24] Akira Ono, “Preparation of DNA Containing Metal Ions at Desired Sites”, *International Symposium on Chiral Compounds and Special Polymers (CCSP)*, July 15, 2009, Harbin, China (Suihua Univ.).

[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◇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〕

ホームページ等

[http://apchem2.kanagawa-u.ac.jp/~onolab/
newpage2_Report081017.html](http://apchem2.kanagawa-u.ac.jp/~onolab/newpage2_Report081017.html)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

岡本 到 (OKAMOTO ITARU)
神奈川大学・工学部・特別助教
研究者番号：40460133

(3) 連携研究者

()

研究者番号：