

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22750152

研究課題名（和文） 可視光照射により酸化反応を触媒する太陽光駆動型オキシダーゼの開発

研究課題名（英文） Development of the Artificial Oxidase Driven by Visible Light

研究代表者

田井中 一貴 (TAINAKA KAZUKI)

独立行政法人理化学研究所・合成生物学研究グループ・研究員

研究者番号：80506113

研究成果の概要（和文）：

長距離の正孔輸送媒体として働く DNA を「リレーユニット」として、可視光を吸収し、DNA 内のグアニン塩基を酸化する増感剤である Ru(II) 錯体を「光アンテナ」として設計した「光アンテナリレーユニット」複合体を作製した。金電極上に作製した Ru(II) 錯体修飾 DNA 自己組織化膜が、可視光照射により正孔を発生し、DNA を経由した正孔輸送を誘発する「光アンテナリレーユニット」複合体として機能することを実証した。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we developed a photoelectric transducer consist of Ru(II) complex as a light-harvesting antenna and DNA scaffold as a charge transporter. The DNA-modified films tethering Ru(II) complex showed cathodic photocurrent under visible light irradiation due to photoinitiated hole transport through DNA duplexes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：光アンテナ・Ru(II)錯体修飾 DNA・可視光・光電流応答・ピロロキノリンキノン・グルコース脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

近年、太陽光エネルギーの有効利用が望まれており、光合成過程を模倣した人工光合成システムの開発に注目が集まっている。光合成の明反応において生じている光化学反応は、①光アンテナによる太陽光の捕集、②正孔・電子への光電変換、③酵素の活性中心への正孔・電子伝達、④酸化・還元反応、とし

て示される。これまで人工光合成システムの構築を目指し、人工の光アンテナ分子、光電変換素子、反応中心等の分子素子が開発されてきたが、光電変換により発生する正孔・電子を酵素の活性中心に輸送する電子伝達システムは未だに確立されていない。汎用性の高い正孔・電子輸送リレーユニットを開発することにより、これまでに開発された光アン

テナ分子を利用した人工の光化学反応中心を設計・作製し、太陽光駆動型酵素などの物質変換システムが実現できる。

「正孔輸送リレーユニット」は、光アンテナと活性中心を連結するスペーサーとしての役割だけでなく、光アンテナから活性中心への方向性をもった正孔輸送を仲介する媒体でなければならない。また、リレーユニットから輸送される正孔を活性中心に供給する電子伝達システムを構築するためには、活性中心とリレーユニットが化学的に連結した複合体を設計できることが望ましい。DNAは高度に組織化された自己集合体を形成し、有機化学的手法により配列上の任意の位置に様々な化学修飾を導入可能な生体高分子である。特に、光増感剤と核酸塩基の間の光誘起電子移動により発生した正孔が、DNA内を100 Åにわたって移動(Nunez, M. E. et al. Chem. Biol., 1999, 6, 85)し、グアニンよりも酸化電位の低い有機分子に正孔が伝達される(Takada, T., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2004, 101, 14002)ことから、「正孔輸送リレーユニット」として適している。

これまでに可視光照射によりDNA内正孔輸送に由来する光電流応答を観測している実証例はなく、また、DNAをリレーユニットとして、光化学反応中心を作製した報告例は今までにない。そこで、申請者は、DNAを正孔輸送のリレーユニットとして用い、可視光照射により酸化反応を触媒する太陽光駆動型オキシダーゼの開発を目指した。

2. 研究の目的

以下に示す段階的な戦略に従い、太陽光駆動型オキシダーゼの設計・作製を行う。

(1) 可視光照射により正孔輸送を誘発するDNAリレーユニットの作製

金電極上に固定化した紫外光増感剤を含むDNA自己組織化膜にUV照射することによって観測されるカソード光電流応答は、正孔がDNAを経由して金電極まで輸送されていることの指標となる(Okamoto, A. et al., J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 14732)。可視領域に強い吸収を示し、遠方グアニン部位の酸化損傷を誘発することが知られている[Ru(bpy)(dppz)(phen)]²⁺ (Ru(II)錯体)(Arkin, M. R. et al., Chem. Biol., 1997, 4, 389)を修飾したDNA自己組織化膜を金電極上に作製し、可視光照射時においてカソード光電流応答が観測されることを確認する。

(2) DNAを経由した正孔輸送による補酵素の酸化反応を誘発する光化学反応中心の作製

補酵素を活性中心とする酵素は、酵素の機能を損なわずに、補酵素に化学修飾を導入できる可能性がある。本研究では、酵素の機能

と構造に関する詳細な知見が明らかになっている補酵素ピロキノリンキノン(PQQ)依存可溶性グルコース脱水素酵素(sGDH)を用いる(Oubrie, A., et al., EMBO J., 1999, 18, 5187)。PQQをDNAの末端に導入し、Ru(II)錯体を修飾した相補鎖DNAと二重鎖を形成させることで、可視光照射により還元体PQQH₂の酸化反応を誘発する光化学反応中心を作製する。

(3) 太陽光駆動型オキシダーゼの作製と機能評価

(2)で作製した光化学反応中心とアポ酵素sGDHとの複合体を構築し、光照射時における酵素活性の評価を行う。DNA内における正孔は、核酸塩基のπスタックを経由して輸送されるため、酵素内部に結合したPQQH₂への正孔伝達効率の低下が懸念される。そこで、グアニンよりも酸化されやすく、核酸塩基とのπスタックによりDNA内の正孔輸送の媒体となるトリプトファン等のメディエーターをDNAとPQQH₂の間に挿入することで、PQQH₂への正孔伝達効率の改善を試みる(図1)。

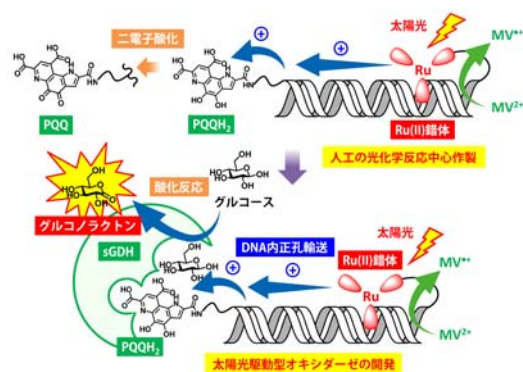


図1. 太陽光駆動型オキシダーゼの設計

3. 研究の方法

(1) 可視光照射により正孔輸送を誘発するDNAリレーユニットの作製

[Ru(bpy)(dppz)(phen)]²⁺ (Ru(II)錯体)をDNAの5'末端に導入したRu(II)修飾DNAを合成(Arkin, M. R. et al., Chem. Biol., 1997, 4, 389)し、金電極上において相補鎖とのハイブリダイゼーションを行う(Herne, T. M. et al., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 8916)ことで光アンテナ修飾DNA自己組織化膜を作製する。メチルピオロゲン存在下で可視光を照射することで、正孔輸送に由来するカソード光電流応答の観測が期待できる。そこで、一定電位かつ光照射の下、アンペロメトリーによる光電流応答測定を行う。保持する電極電位と観測される光電流値の関係、及びミスマッチ塩基対を含むDNA二重鎖における光電流値を評価することにより、DNAを経由した正孔輸送に由来するカソード光電流応答であることを確認する。

(2) DNA を経由した正孔輸送による補酵素の酸化反応を誘発する活性中心の作製

補酵素 PQQ が酵素の活性中心として機能することを検証するために、DNA 内電荷輸送によって伝達される正孔により、還元体 PQQH₂ が、二電子酸化反応によって酸化体 PQQ に変換されることを実証する。まず、系中において PQQ を修飾した DNA を電極上に固定化し、還元剤存在下かつ脱気条件下において PQQH₂ に還元する。電位を正に印可した際に発生すると予想される PQQH₂ から PQQ への酸化反応に由来する電流応答を確認することで、還元体 PQQH₂ の二電子酸化反応を確認する。実際に PQQ に変換されていることを実証するために、338 nm の吸光度の経時変化を同時に追跡する。また、PQQH₂ の再酸化過程が PQQ セミキノラジカルを経て、段階的に二電子酸化されていることを確認するために ESR 測定を行う。

最後に、PQQ と Ru(II) 錯体をそれぞれ DNA の 5' 末端に導入した DNA をハイブリダイゼーションさせ、『光アンテナ-正孔輸送リレーユニット-活性中心』から構成される光化学反応中心を構築する。系中において PQQ を PQQH₂ に還元した後に、照射によって PQQH₂ が PQQ に再酸化される過程を 338 nm の吸光度の経時変化により追跡することで、光駆動型オキシダーゼの光化学反応中心として機能することを実証する。

(3) 太陽光駆動型オキシダーゼの作製と機能評価

(2) で作製した人工活性中心とアポタンパク質 sGDH との複合体形成能、並びに酵素活性に対する影響を検討する。複合体形成能及び酵素活性が著しく阻害される場合は、PQQ と DNA 間の連結部の検討を行い、ホロ酵素を形成し、かつ酵素活性を維持するリンカー部の最適化を行う。holo-sGDH 形成後、等量のグルコースを混合することで、PQQ を PQQH₂ に還元し、照射下において、PQQH₂ が PQQ に酸化されることを確認する。

ここで、PQQH₂ が PQQ に再酸化されない、もしくは再酸化される効率が著しく低下する場合は、PQQ と DNA の間に正孔のメディエーターとなるトリプトファンを挿入した人工活性中心の作製を検討する。放射性同位体 (³H) 標識したグルコースを基質として用い、HPLC による照射後の生成物を解析することで酵素の活性評価を行う。

4. 研究成果

(1) 可視光照射により正孔輸送を誘発する DNA リレーユニットの作製

[Ru(bpy)(dppz)(phen)]²⁺ (Ru(II) 錯体) を DNA の 5' 末端に導入した Ru(II) 修飾 DNA の

合成は過去の文献に基づいて行った (Arkin, M. R. et al., Chem. Biol., 1997, 4, 389)。また、5' 末端をチオール修飾した相補鎖を金電極上に固定化し、合成した Ru(II) 修飾 DNA をハイブリダイゼーションする (Herne, T. M. et al., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 8916) ことで、金電極上に光アンテナ修飾 DNA 自己組織化膜を再構成した (図 2 (a))。5 mM メチルビオロゲン (MV²⁺)、10 mM Tris-HCl 緩衝溶液中 (pH 7.6) において、水銀光源 (60 mW/cm², バンドパスフィルター; 436 ± 5 nm) 照射条件下で、アンペロメトリー測定を行った。-0.2 V の電位印加時において、光を照射したときの電流応答、及び、-0.2 ~ +0.2 V 印加時の電圧に対する光電流応答値をプロットしたグラフをそれぞれ図 2 (b)、(c) に示す。

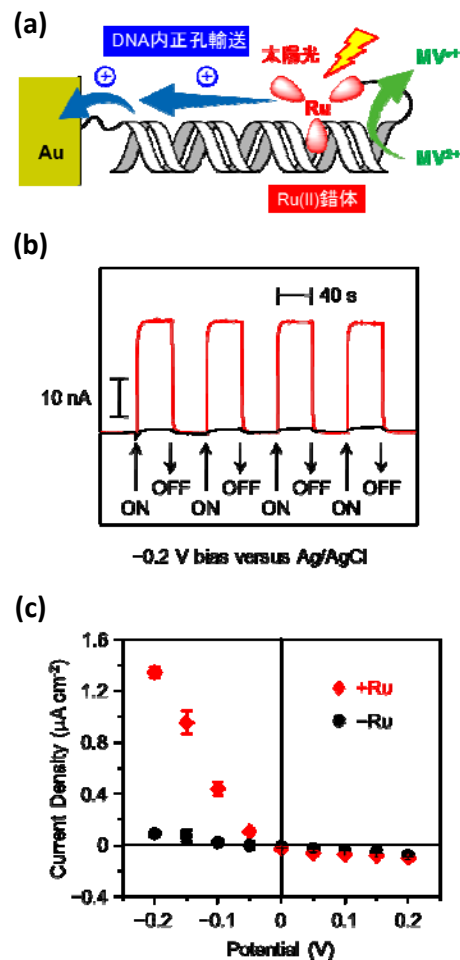


図 2. (a) 金電極上に固定化する Ru(II) 修飾 DNA 自己組織化膜の模式図、(b) -0.2 V の電位印加時における光電流応答、(c) -0.2 ~ +0.2 V 印加時における印加した電圧に対する光電流応答値のプロット。図中の黒色及び赤色のプロットは、それぞれ Ru(II) 未修飾 DNA 自己組織化膜、Ru(II) 修飾 DNA 自己組織化膜に対応している。

-0.2 V の電位印加時、光照射下において Ru(II)錯体を含む DNA 自己組織化膜は、 $1.35 \pm 0.17 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ の電流応答を示した。また、負のポテンシャルを印加した場合、ポテンシャルの減少に対して光電流応答の増大が確認されたことから、観測された光電流応答がカソード光電流応答であることが示された。以上より、Ru(II)錯体修飾 DNA が可視光照射により連続的かつ方向性をもった正孔輸送を誘発する「光アンテナ-リレーユニット」複合体として機能することが実証された。

(2) DNA を経由した正孔輸送による補酵素の酸化反応を誘発する活性中心の作製

PQQ が DNA を介した正孔輸送により、還元体 PQQH₂ から酸化体 PQQ に変換されることを実証するために PQQ を「活性中心」、DNA を「リレーユニット」として設計した PQQ 修飾 DNA を作製した。(1)と同様の手法により、PQQ 修飾 DNA を電極上に固定化し、電位を正に印可した条件下で電流応答の確認を試みたところ、負電荷を有する DNA が電極上に誘引されることで、電極と PQQ の間の直接の電子移動が生じていることが示唆された。そこで、正孔輸送の媒体となり、かつ正の電位印可時に電極上に誘引されない中性の骨格を有するペプチド核酸 (PNA) に着目した。PQQ を N 末端に化学修飾した PNA の合成に成功した。

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 6 件)

① Inoue M, Konno T, Tainaka K, Nakata E, Yoshida H, Morii T., Positional effects of phosphorylation on the stability and morphology of tau-related amyloid fibrils., *Biochemistry*, 査読有, 51, 2012, 1396-1406, doi: 10.1021/bi201451z

② Osakada Y, Kawai K, Tachikawa T, Fujitsuka M, Tainaka K, Tero-Kubota S, Majima T., Generation of singlet oxygen during photosensitized one-electron oxidation of DNA., *Chemistry*, 査読有, 18, 2012, 1060-1063, doi: 10.1002/chem.201101964

③ Tainaka K, Okamoto A., ICON probes: synthesis and DNA methylation typing., *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.*, 査読有, 8, 2011, Unit 8.7.1-17., doi: 10.1002/0471142700.nc0807s47

④ Tainaka K, Fujitsuka M, Takada T, Kawai K, Majima T., Sequence dependence of

excess electron transfer in DNA., *J Phys Chem B.*, 査読有, 114, 2010, 14657-14663, doi: 10.1021/jp1024685

⑤ Tainaka K, Sakaguchi R, Hayashi H, Nakano S, Liew FF, Morii T., Design strategies of fluorescent biosensors based on biological macromolecular receptors., *Sensors (Basel)*., 査読有, 10, 2010, 1355-1376, doi: 10.3390/s100201355

⑥ Sakaguchi R, Tainaka K, Shimada N, Nakano S, Inoue M, Kiyonaka S, Mori Y, Morii T., An in vivo fluorescent sensor reveals intracellular ins(1,3,4,5)P4 dynamics in single cells., *Angew Chem Int Ed Engl.*, 査読有, 49, 2010, 2150-2153, doi: 10.1002/anie.200903951

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 非天然型塩基を含むオリゴデオキシヌクレオチドの切断による 5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法

発明者: 上田泰己、池田修司、田井中一貴

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2012-084249

出願年月日: 2012 年 4 月 2 日

国内外の別: 国内

名称: 非天然型塩基を含むオリゴデオキシヌクレオチドの切断による 5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法

発明者: 上田泰己、池田修司、田井中一貴

権利者: 同上

種類: PCT

番号: JP2013/058349

出願年月日: 2012 年 4 月 2 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田井中 一貴 (TAINAKA KAZUKI)

独立行政法人理化学研究所・合成生物学研究グループ・研究員

研究者番号: 80506113