

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6月7日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22750159

研究課題名（和文）DNA 結合性分子モーターの開発とそのらせん構造制御

研究課題名（英文）Synthetic Study of A Heterocyclic Molecular Motor Toward DNA Conformational Change

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

研究成果の概要（和文）：

光照射で一方向の回転をおこす新規複素環型分子モーター**2**を合成し、DNA のらせん構造を自在に変化、制御することを目的とした。本研究において、分子モーター**2**の前駆体である(±)-*trans*-**8**、(±)-*cis*-**8**の合成に成功し、その相対配置を X 線結晶構造解析により決定した。(±)-*trans*-**10**、(±)-*cis*-**10**と B-DNA の相互作用を CD スペクトルにより調べたが、明確な結合を確認することはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

We have designed a new heterocyclic molecular motor **2**, which would intercalate in the DNA and induce conformational change of the DNA structure. Heterocyclic molecular motors (±)-*trans*-**8** and (±)-*cis*-**8** were prepared by the McMurry coupling and Buchwald-Hartwig reaction of heterocyclic ketone (±)-**7d**. The relative stereochemistry of (±)-*trans*-**8** and (±)-*cis*-**8** was determined as (2*R**,2'*R**)-(*P**,*P**) by X-ray crystallography. CD spectral titration experiments exhibit that significant conformational changes of B-DNA are not induced by (±)-*trans*-**10** and (±)-*cis*-**10**.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：構造有機化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：分子マシン・分子モーター・DNA・光スイッチ

1. 研究開始当初の背景

DNA は遺伝情報を担う生体高分子であり、様々な高次構造を有している。例えば、種々

のらせん構造をもつ二本鎖 DNA や、グアニン四量体の面が積み重なった構造をもつ G-quadruplex などが挙げられる。しかし、そ

これらの特殊な高次構造の生物学的役割においては未解明の点が多く残され、分子レベルでの研究解明が求められている。特に B-DNA と反対の左巻らせん構造をもつ Z-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、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、その役割および機能の詳細は、これまで未解明のままである。このような背景から、Z-DNA 構造を認識、検出、構造制御を誘起するプローブの開発が強く求められている。

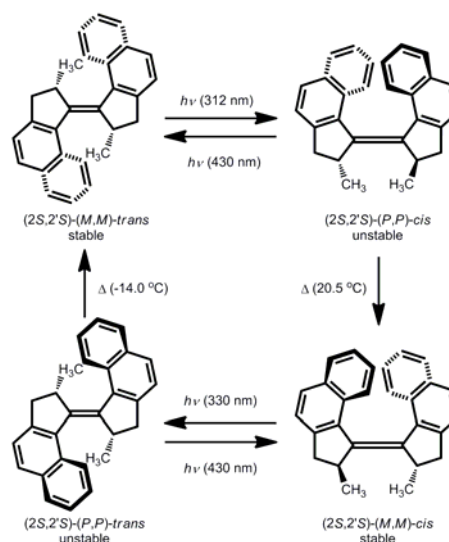
これまでに Z-DNA を認識、安定化させる化合物として、8-メチルグアノシンを用いた機能性核酸や、カチオン性亜鉛ポルフィリンを用いた例が挙げられる。また興味深い例として、B-DNA から Z-DNA への構造変化を誘起するキラルヘリセンが京都大学の杉山らによって報告されている。しかし、これまでの研究例では B-DNA, Z-DNA のらせん構造をそれぞれ一方的に作り出すだけである。外部刺激により、B-DNA, Z-DNA のらせん構造を目的に応じて自由に相互変換、制御するという研究は、これまで例がない。照射を用いた DNA の二本鎖形成と解離の制御の例自体もほとんどなく、近年、東京大学の浅沼、小宮山教授らによるアゾベンゼン修飾 DNA や大阪大学の中谷教授らによるアゾベンゼン修飾「分子糊」の報告のみである。

2. 研究の目的

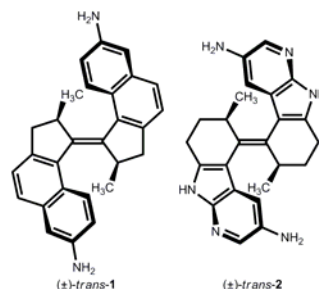
近年「分子マシン」の開発が盛んに行われている。分子マシンとは、ナノサイズの分子構造体に対して人間の意図を伝え、機械的運動によって実用的なアウトプットを得るシステムであり、ナノテクノロジーの究極の目標として幅広い分野への展開が期待されている。最近までに、分子シャトル、分子ペンチ、ナノカーなど興味深い動作をする分子マシンが報告されている。著者らはこれまで、「光動力キラル分子モーター」の開発を報告してきた。キラル分子モーターは、光エネルギーによって二重結合の *cis-trans* 異性化による不安定系を作り出し、分子のキラリティーによって回転方向を制御するという分子系である。また、この系は 360 度回転し原形に戻ることから、機械運動のように一方向の連続回転が可能である。

筆者は分子モーターの分子の骨格が、Z-DNA への構造変化を誘起するキラルヘリセンに類似していることに着目した。すなわち、分子モーターを核酸塩基対間にインターカレートさせ、分子モーターの回転運動を DNA の骨格に伝えることができれば、B-Z DNA 間のらせん構造を自由に制御できる可能性がある。

Scheme 1



本研究に関連したこれまでの研究において、アミノ基を連結させた分子モーター *trans-1*, *cis-1* の合成に成功したが、水への溶解性などに問題があり、DNA との結合が確認できなかった。本研究では、芳香環部分に窒素を含む複素環を導入して水溶性を向上させた複素環型分子モーター *trans-2*, *cis-2* を合成する。さらに照射により分子モーターを回転させ、その運動の伝達により B-Z DNA 間のらせん構造を自由に制御することを目的とした。



3. 研究の方法

(1) 複素環型分子モーターの合成

本研究では、芳香環を有したまま水溶性を改善させるために、核酸塩基に近い分子構造を含む複素環型分子モーター *trans-2*, *cis-2* を合成する。特に分子モーター *cis-2* は、キラルヘリセンと同じようならせん構造を持つなど分子構造が類似していることから、インターカレーションにより DNA に結合し得ると考えられる。

(2) 複素環型分子モーターの回転挙動の調査

合成した分子モーター *trans-2*, *cis-2* に照射を行い、極性溶媒中でも一方向の回転が起こるかを NMR スペクトル、UV、CD スペクトルにより確認する。さらに照射の条件、特に効率的に異性化を起こす波長の検討を行う。また、回転における繰り返し耐久性も調べる。

(3) DNA と分子モーターの結合性の調査と分

分子モーターの回転によるDNAの構造制御

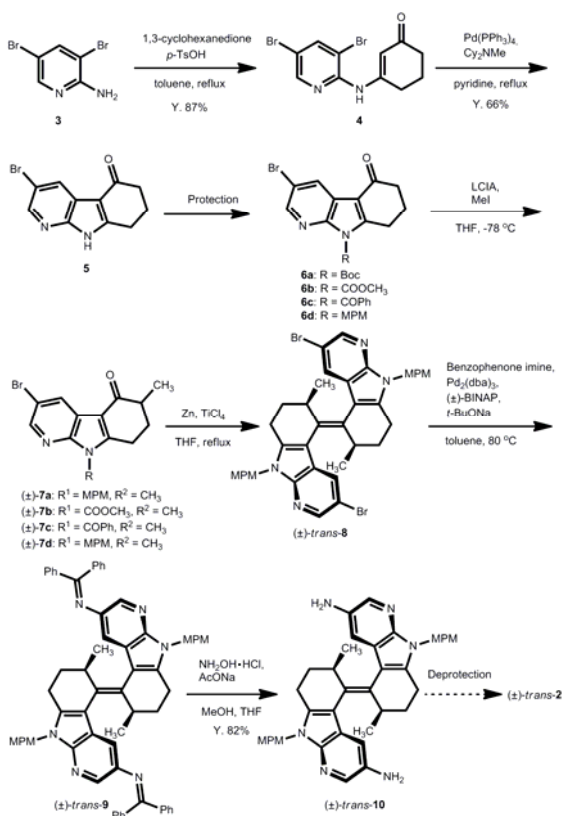
分子モーター *trans-2*, *cis-2* と DNA との結合の形成を UV, CD スペクトルにより確認する. 分子モーターを DNA に結合させた状態で照射して分子モーターを回転させる. その際の DNA の立体構造変化を CD スペクトルにより追跡する. 最終的に多種類の DNA の B-Z のらせん構造を, 照射により制御できる条件の検討を行う.

4. 研究成果

(1) 複素環型分子モーターの合成

市販品のアミン **3** を出発物質とし, 1,3-シクロヘキサジオンとの脱水縮合, Heck 反応による分子内環化によりアザインドール骨格を備えた環状ケトン **5** を得た. **5** の 2 級アミンを保護した後, ケトンの α 位のモノメチル化反応を行った. この反応において, カルバメート, アミド系の保護基を用いた系 **6a-c** では保護基の脱離による副生成物を得られるのみであった. 保護基として MPM 基を用いた系 **6d** ではモノメチル化が進行し, 目的のケトン (\pm)-**7d** を得ることができた.

Scheme 2



(\pm)-**7d** を四塩化チタン, 亜鉛を用いた McMurry 反応によって二量化させ, ジブロミド (\pm)-**trans-8**, (\pm)-**cis-8** を得た. これらの構造は, ¹H NMR および NOESY によって解析した. *trans* 体は, メチル基とピリジン環の 4 位

のプロトンが立体的に近づくことから NOESY において相関がみられた. 一方 *cis* 体では同様の相関がみられないことから, *trans* 体と *cis* 体を同定することが出来た. さらに (\pm)-**trans-8**, (\pm)-**cis-8** から単結晶を得ることができ, X 線構造解析において相対配置を ($2R^*,2'R^*$)-(P^*,P^*)-(\pm)-**trans-8**, ($2R^*,2'R^*$)-(P^*,P^*)-(\pm)-**cis-8** と決定することができた (Figure 1).

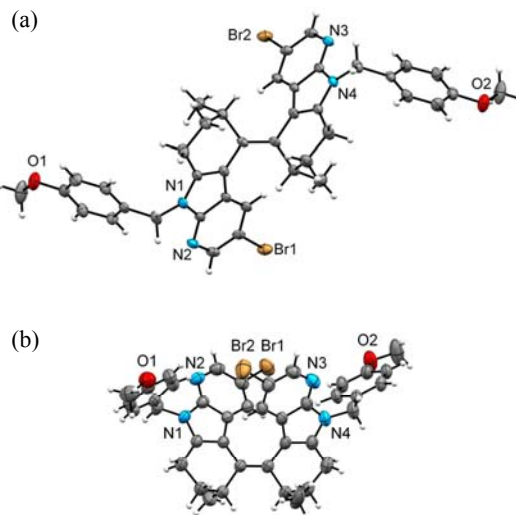


Figure 1. ORTEP drawing of ($2R^*,2'R^*$)-(P^*,P^*)-(\pm)-*trans-7* (a), ($2R^*,2'R^*$)-(P^*,P^*)-(\pm)-*cis-7* (b).

次に (\pm)-**trans-8** のアミノ化を試みた. Buchwald-Hartwig 反応によりベンゾフェノンイミン中間体 (\pm)-**trans-9** とした後, 塩酸を用いてアミン (\pm)-**trans-10** への変換を試みた. しかし, 得られた粗生成物を HPLC で分離した結果, 目的物の (\pm)-**trans-10** は得られず中心部位の二重結合が単結合へと変化した生成物を得られた. 一方, イミンからアミンへの変換をヒドロキシルアミン塩酸塩, 酢酸ナトリウム条件下で行った結果, 83%の収率で目的物である (\pm)-**trans-10** を得ることができた. 同様の条件で (\pm)-**cis-10** を得た.

(\pm)-**trans-10** の MPM 基の脱保護の検討を行った. DDQ を用いて脱保護反応を検討した結果, 中心部位の二重結合が単結合へと変化した副生成物のみが得られた. 次に塩化アルミニウムを用いたが, 反応は進行しなかった. 今後, (\pm)-**trans-10** の脱保護法の検討が必要である.

(2) 分子モーター **10** と DNA との結合性の調査

目的物である分子モーター *trans-2*, *cis-2* の前駆体である (\pm)-**trans-10**, (\pm)-**cis-10** も DNA と相互作用しうる複素環部位と 1 級アミン部位をもつことから, DNA との結合能を示すと考えた. はじめに B-DNA と相互作用するキラルヘリセンと構造が類似する (\pm)-**cis-8** を用

いて DNA との結合性を調べた. B-DNA (poly(dGdC)₂)の水溶液に(±)-*cis-10*のメタノール溶液を滴下していき, B-DNA の構造変化を CD, UV スペクトルにより追跡した. (±)-*cis-10* の添加による UV 吸収の増加はみられるものの CD スペクトルに変化はないことから, (±)-*cis-8* と DNA との結合は確認できなかった (Figure 2). 同様に B-DNA に(±)-*trans-10* を添加した場合においても CD スペクトルに変化は見られなかった. (±)-*trans-10*, (±)-*cis-10* は保護基としての MPM 基が DNA へのインターカレーションを阻害していることが考えられ, 今後目的物である *trans-2*, *cis-2* を用いて DNA との結合性を調べる必要がある.

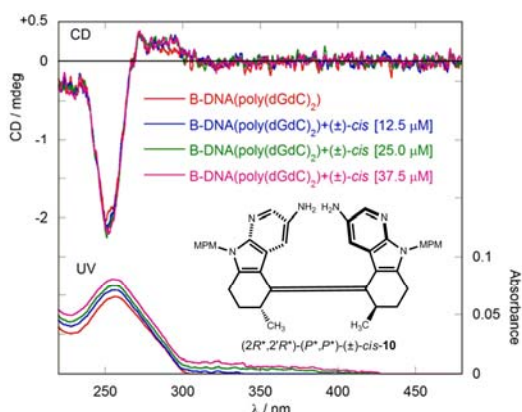
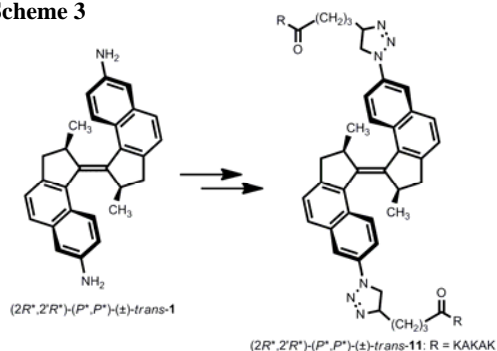


Figure 2 CD, UV spectra of DNA (poly(dGdC)₂, 10 mM) with or without (±)-*cis-8* (0-37.5 mM in MeOH) in 20 mM cacodylate buffer and 2.25 M NaCl.

(3) ペプチド連結型分子モーターの合成

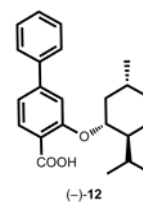
分子モーター *trans-1*, *cis-1* のアミノ基をアジドに変換した後, Huisgen 反応によりペプチドを連結させた分子モーター *trans-11*, *cis-11* を合成することに成功した. *trans-11*, *cis-11* は水中でも光異性化反応を起こすことがわかった. ペプチド側鎖は DNA と相互作用することが分かっているため, 今後 *rans-11*, *cis-11* による DNA の構造制御が期待できる.

Scheme 3

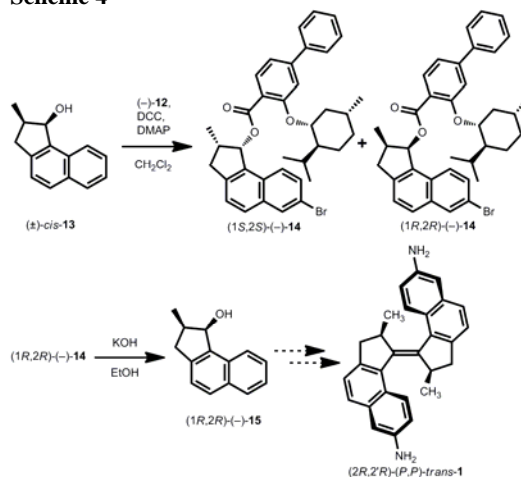


4) 新規光学分割剤の開発

分子モーター *trans-11* の一方の回転を用いて DNA の構造を制御する場合, 光学活性な *trans-11* の合成とその絶対配置決定が必要である. 本研究において, 芳香族アルコール類の光学分割と絶対配置決定に有効な 2-メントキシ安息香酸誘導体 (-)-**12** の開発に成功した. (-)-**12** を芳香族アルコール (±)-*cis-13* と縮ませジアステレオマー混合物 (1*S*,2*S*)-(-)-**14** と (1*R*,2*R*)-(-)-**14** を得た. (1*S*,2*S*)-(-)-**14** と (1*R*,2*R*)-(-)-**14** は逆相 HPLC により光学分割することができた. それぞれの CD スペクトルを測定したところ, ナフタレンとビフェニル発色団間において励起子分裂型の Cotton 効果が観測でき, 絶対配置を決定することに成功した. (1*R*,2*R*)-(-)-**14** を加水分解することにより芳香族アルコール (1*R*,2*R*)-(-)-**13** を得ることができた. 今後 (1*R*,2*R*)-(-)-**13** からの変換により (2*R*,2'*R*)-(P,P)-*trans-1* の合成を行う予定である.



Scheme 4



以上, 本研究によって複素環型分子モーター **2** の前駆体である (±)-*trans-10*, (±)-*cis-10* の合成に成功し, その絶対配置を X 線結晶構造解析により決定した. 今後, (±)-*trans-10*, (±)-*cis-10* の脱保護を行うことで *trans-2*, *cis-2* を合成し, DNA との結合性を調べる予定である.

一方, 芳香族アルコール類の光学分割と絶対配置決定に有効な新規メントキシカルボン酸 (-)-**12** を開発することに成功した. 本方法を用いることにより, 種々の光学活性な分子モーターの合成が期待できる.

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 1 件）

- ① Synthesis of Peptide-conjugated Light-driven Molecular Motors and Evaluation of Their DNA-binding Properties
Fumi Nagatsugi, Yusuke Takahashi, Maiko Kobayashi, Shunsuke Kuwahara, Shuhei Kusano, Tomoko Chikuni, Shinya Hagihara and Nobuyuki Harada
Mol. BioSyst., **2013**, 9 (5), 969-973. 査読有.
DOI: 10.1039/C2MB25520K.

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① DNA の構造制御を目指した複素環型分子モーターの合成研究
野口敏明, 幅田揚一, 桑原俊介
(日本化学会, 第 93 春季年会, 平成 25 年 3 月 23 日, 草津)
- ② 2-メントキシ安息香酸による芳香族アルコールの光学分割・絶対配置決定
田崎信由, 幅田揚一, 桑原俊介
(日本化学会, 第 93 春季年会, 平成 25 年 3 月 23 日, 草津)
- ③ DNA の構造制御を目指した新規分子モーターの合成研究
野口敏明, 幅田揚一, 桑原俊介
(日本化学会, 第 2 回化学フェスタ, 平成 24 年 10 月 16 日, 東京)
- ④ 芳香族アルコールの光学分割・絶対配置決定を目指した 2-メントキシ安息香酸の開発
田崎信由・幅田揚一・桑原俊介
(日本化学会, 第 2 回化学フェスタ, 平成 24 年 10 月 16 日, 東京)
- ⑤ DNA の構造制御を目指した光駆動型分子モーターの合成研究
野口敏明, 幅田揚一, 桑原俊介
(日本化学会, 第 92 春季年会, 平成 24 年 3 月 26 日, 横浜)
- ⑥ 2-メントキシ安息香酸:芳香族アルコールの光学分割・絶対配置決定試薬
田崎信由, 幅田揚一, 桑原俊介
(日本化学会, 第 92 春季年会, 平成 24 年 3 月 26 日, 横浜)
- ⑦ 新規 2-メントキシ安息香酸:芳香族アルコールの光学分割—絶対配置決定用試薬
田崎信由, 幅田揚一, 桑原俊介
(第 22 回基礎有機化学討論会, 平成 23 年 9 月 22 日, つくば)

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