

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：34506
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23651130
研究課題名（和文） 核酸の自在設計性と金属錯体の機能性をもつ核酸—金属—有機構造体の創製
研究課題名（英文） Nucleic acid-metal-organic nanostructure based on nucleic acid designability and metal complex functionality
研究代表者 三好 大輔（MIYOSHI DAISUKE） 甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授 研究者番号：50388758

研究成果の概要（和文）：

ボトムアップナノテクノロジーの実用化には、様々なナノ構造の自在設計とその機能化が必要である。本研究では、ナノ構造体の設計に核酸を用い、ナノ構造体の機能化に金属錯体を用いた。さらに、核酸の四重らせん構造を用いてナノ構造体と金属錯体を融合することを試みた。その結果、四重らせん構造とその安定性を自在に制御できた。また、核酸構造スイッチの構築もできた。金属錯体の配向化については、四重らせん構造のみと結合する金属錯体を見出すことができた。同時に、その結合を化学刺激によって制御できた。

研究成果の概要（英文）：

To achieve practical application of bottom-up nanotechnology, designability and functionality are required. Here, we used nucleic acids as designable nanostructure scaffolds and metal complexes as functional materials. Especially, to fabricate metal complexes on DNA nanostructures, we focused on G-quadruplex, which has large aromatic planar surface. It was found that long guanine-rich DNAs fold to form a beads-on-a-string structure, making us possible to design a G-quadruplex array. Moreover, some anionic ligands such as copper phthalocyanine are suitable to bind G-quadruplex specifically. These results allow us to design nucleic acid-metal-organic nanostructure based on nucleic acid designability and metal complex functionality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：DNAデバイス、DNA ナノテクノロジー、金属有機構造体

1. 研究開始当初の背景

微細加工（トップダウン）によるデバイスの開発に代わり、分子や原子の自己組織化を利用するボトムアップテクノロジーが注目されている。ボトムアップナノテクノロジーの実用化には、次の二点の要素技術の確立が必要である。

(1)二次元・三次元の「ナノ構造の自在設計技術」

(2)実用化に向けた「ナノ構造の機能化技術」要素技術(1)については、DNA ナノテクノロジーが目覚ましい成果を収めている。にもかかわらず、DNA ナノテクノロジーの実用化は未だ達成されていない。これは、要素技術(2)の確立が遅れていることによる。一方で、要素技術(2)を満たすボトムアップアプローチに金属・有機構造体（Metal-Organic Framework: MOF）がある。しかし、MOF

においては、フレームとなる有機化合物が限定されており、要素技術(1)として、さらなる構造の多様性と自在性が必要である。本研究では、化学刺激応答性と分子認識性をもつDNA四重らせん構造に着目した。DNA四重らせん構造は、中心に金属イオンを配位した広い π 平面をもつため、芳香族性配位子との親和性が高い。そのため、四重らせん構造を導入したDNAナノ構造体を用いれば、金属錯体を配向化できることから、構造設計性と機能性を満たす分子集合体を構築できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、DNAナノ構造体に化学刺激応答性をもつ四重らせん構造を導入し、ナノ構造体の形成・解離を自在制御する。さらに、分子認識性をもつ四重らせん構造を鋸として、DNAナノ構造体と金属-有機構造体を融合することを試みた。

そのために必要な上述の要素技術(1)を確立するために、様々な化学刺激を用いて核酸の構造やその熱力学的安定性を制御できるかについて検討した。具体的には、広い π 平面をもつことから金属錯体との親和性が高いと考えられる四重らせん構造と、プロトンに反応して構造をスイッチできる平行型二重らせん構造に着目し、様々な分子環境下における挙動を定量解析することで、ナノ構造体の自在設計性と自在制御性の構築を試みた。要素技術(2)については、金属錯体であるフタロシアニンやポルフィリンとの相互作用を解析し、その融合化の方法を検討した。さらに、ナノ粒子やグラフェンなどとの相互作用も用いながら、核酸分子の機能化を試みた。

3. 研究の方法

四重らせん構造を形成するDNA鎖の塩基配列は、グアニンに富んだ配列である。細胞内での展開も視野に入れ、ヒトテロメア由来の配列である、 $(GGGTTA)_n$ (n は繰り返し数)を用いて検討を行った。また、他の生物由来である $(GGGGTTTT)_n$ を基本配列として系統的な検討も行った。パラレル型四重らせん構造の検討には、プリンに富んだ配列とピリミジンに富んだ鎖を用いた。塩基修飾が施されたDNA鎖も同様にして調製した。DNA鎖は、固相合成し液体クロマトグラフィーもしくは変性ゲル電気泳動で精製した。主鎖修飾が施されたLNAは、株式会社ジーンデザインから購入した。

DNA鎖が形成する構造の決定には、円二色性スペクトルや未変性ゲル電気泳動を用いた。構造の熱力学的安定性の検討には、波長260 nm及び295 nmにおけるUV融解曲線を測定した。熱力学的諸量の算出は、融解曲線を理

論式にフィッティングすることにより行った。

金属錯体とDNAの相互作用の検討には、金属錯体にDNAを滴下した際の吸光度変化もしくは蛍光強度変化を用いた。結合定数の算出は、滴定曲線を理論式でフィッティングすることにより行った。複合体形成に伴う水和状態の変化の定量化は、水の活量変化と結合定数の相関関係を用いて行った。

また、DNAなどの機能性デバイスの構築に用いたグラフェン酸化物や金属ナノ粒子は、それぞれ定法に従って調製した。

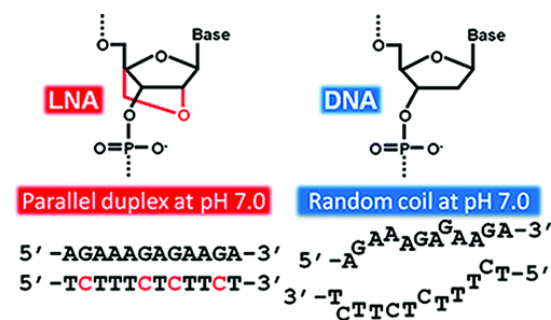
4. 研究成果

本研究では、(1)核酸構造の自在設計性と自在制御性に関する要素技術と、(2)金属錯体や有機・無機分子を用いた機能発現に関する要素技術の構築を目指した。以下ではそれぞれの要素技術に分類し、研究成果の概要を記す。

(1)核酸構造の自在設計性と自在制御性に関する要素技術に関する研究成果

①核酸ナノ構造形成の制御スイッチとして有用な平行型二重らせん構造の設計に関する成果

平行型二重らせん構造は、その構造形成にシトシンのプロトン化が必要であるため、構造の形成と解離を繰り返し制御できる。しかし、その熱力学的安定性が低いことが問題である。そこで本研究では、安定な二重らせん構造得形成できるボースの2'-酸素と4'-炭素の間がロックされた核酸(LNA)を含むDNA鎖が形成する逆平行型二重らせん構造と平行型二重らせん構造の形成を速度論的・熱力学的に検討した。その結果、LNAを導入した平行型二重らせん構造は、天然のDNA鎖が形成する二重らせん構造よりも安定であることが示された。さらに、溶液のpHを変化させることで、平行型二重らせん構造と逆平行型二重らせん構造間の構造スイッチを自在に制御することが可能となった。

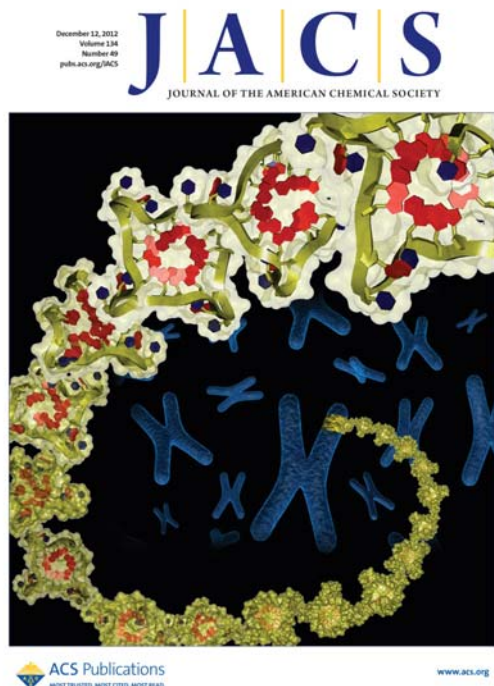


②長鎖DNAを用いた四重らせん構造の自在

配向制御に関する成果

細胞の寿命を制御するテロメア DNA は、グアニンに富んだ塩基配列をもち、四重らせん構造を形成する。細胞内に実際に存在するテロメアは、100 塩基以上と非常に鎖が長い。この長鎖テロメア DNA が、規則的な構造を形成するのであれば、グアニンに富んだ塩基配列が形成する四重らせん構造の自在配向技術を構築できる。

そこで、長鎖テロメア DNA の構造と熱力学的安定性を解析した。その結果、最短の配列が形成する四重らせん構造をユニットとし、このユニットが数珠のように連結した構造を、長鎖テロメア DNA が形成することが見出された。これを用いることで、四重らせん構造を凝集させることなく、直鎖状に配向させることが可能になった。興味深いことに、細胞を模倣した「分子クラウディング」による化学刺激を与えることで、この数珠構造の熱力学的安定性を大幅に低下させることも可能となった。このことを利用して、四重らせん構造の配向化のみならず、その熱力学的安定性の自在制御も可能となった。また、テロメア DNA は、医薬品開発の標的としても重要であるため、このような知見は今後の医薬品開発を促進するものと期待される。本成果は、細胞内外におけるテロメア DNA 鎖が形成する高次構造を解明した点が評価され、米国化学会誌の掲載号の表紙として採択され、注目の論文を紹介する「spotlights on recent JACS publications」においても特集された。



③四重らせん構造の熱力学的安定性の自在制御技術

四重らせん構造は、化学刺激に極めて鋭敏に応答するだけでなく、配列の微細な変化が全体構造を劇的に変化させる。この分子機構を解明できれば、本研究の鍵となる四重らせん構造の熱力学的安定性の自在制御技術の構築につながる。そこで、4 重らせん構造を形成する DNA 鎖の塩基配列を系統的に変化させ、さらに4 重らせん構造の構造多様性を誘起することが知られている外部環境因子（金属イオンと分子クラウディング）の効果を定量的に検討した。その結果、連続するグアニンの数が多く、且つ連続するグアニンを連結するループ領域が短い場合に、構造が分子クラウディングによってスイッチすることが示された。このような知見は、分子スイッチの合目的設計に有用である。さらに、これらの DNA 鎖が形成する4 重らせん構造の熱力学的安定性について検討した。その結果、ループの長さによって全体構造の安定性が大きく変化することがわかった。また、安定な4 重らせん構造を形成するために最適な鎖長のループが存在することも分かった。興味深いことに、ループに含まれる塩基間に強いスタッキング相互作用が形成されると、全体構造の熱力学的安定性のみならず、全体構造の水和環境も大きく変化することが見出された。より熱力学的に安定なループは、水分子の結合サイトとなることで、構造形成に伴ってより多くの水分子と結合する(水和する)ことがわかった。このような、核酸構造における、構造・熱力学的安定性・水和の相関は、これまでに報告例がなく、核酸化学や生物物理化学の分野において大きなイン



パクトを与える結果となった。そのため、米国化学会発行の物理化学分野の専門誌である、*Journal of Physical Chemistry B* の表紙として採択された。

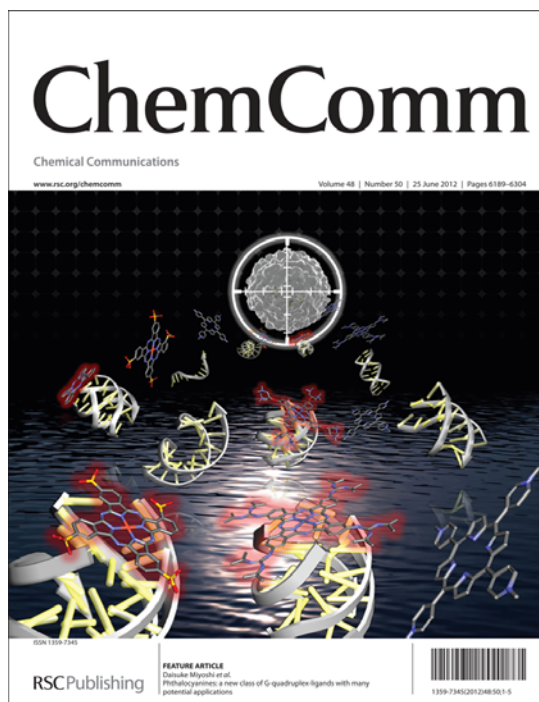
これらの成果のほかにも、四重らせん構造の鎖の配向性や熱力学的安定性を変化させる塩基の化学修飾の効果の定量化や、低分子化合物による核酸構造スイッチの開発なども達成できた。また、これらの成果は、総説としてまとめて発表した。以上のことから、本研究課題の要素技術である、核酸構造の自在設計技術の構築が可能となった。

(2) 金属錯体や有機・無機分子を用いた機能発現に関する要素技術に関する成果

①DNAナノ構造体の骨格の二重らせん構造には結合することなく銚の四重らせん構造と特異的に結合するリガンド

核酸ナノ構造体に含まれる四重らせん構造に特異的に金属錯体を配向させるには、四重らせん構造のみに結合し、二重らせん構造には親和性をもたない特性が必要になる。しかしこれまでに、四重らせん構造に対して高い特異性をもつ金属錯体はほとんど報告されていなかった。

そこで我々は、これまでに開発されてきたリガンドの多くが、正電荷を有していることに着目した。この正電荷は、核酸鎖が負電荷を有するために、親和性を向上させるには有効である。しかし、電荷どうしの結合（静電的相互作用）があるために、二重らせん構造に対する親和性を抑制することができない。一



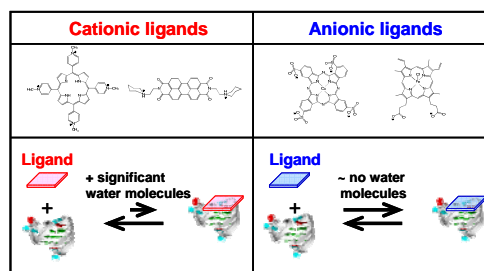
方で、無電荷の化合物は水溶性が低く、生体への展開が困難である。このような仮説から、負電荷をもつ金属錯体が、四重らせん構造への特異的結合に適している可能性が考えられる。負電荷をもつ高分子である核酸鎖を負電荷をもつ低分子化合物で認識するには、負電荷間の反発に勝る相互作用エネルギーが必要となる。そこで、極めて広いπ平面を有し、その大きさが、四重らせん構造とほぼ同様のフタロシアニンが四重らせん認識骨格として有用であると考えた。様々なフタロシアニンについて四重らせん構造との結合親和性と結合特異性を調べたところ、他の化合物に勝る新規四重らせん構造リガンドのモチーフとして有用であることが示された。本成果は、英国王立化学会誌（*Chemical Communication*）の表紙として掲載された。

また、金属錯体と世重らせん構造を組み合わせることで、センサーや触媒機能をもつ機能性分子として活用できることも報告した。

②四重らせん構造と金属錯体の結合と解離の合目的制御

DNA ナノ構造体と金属錯体の結合と解離を制御することができれば、その複合体の機能発現を調節することにつながる。そこで、化学刺激によって、四重らせん構造と金属錯体の結合親和性がどのように変化するかについて検討した。

その結果、正電荷をもつ金属錯体やリガンドは、二重らせん構造との非特異的な吸着を抑制することができず、DNA ナノ構造体のように大過剰の二重らせん構造が存在する条件では、四重らせん構造への親和力を失うことが示された。また、分子クラウディング環境においては、金属錯体の正電荷と核酸の負電荷による静電的相互作用は、その安定化エネルギーが低下することも示された。一方、負電荷をもつ金属錯体やリガンドは、二重らせん構造とは全く親和性がなく、大過剰の二重らせん構造が存在しても、四重らせん構造への親和性は保持されることが示された。これは、核酸鎖との間の静電的な斥力によるものである。負電荷をもつリガンドには、負電荷間の反発エネルギーを超えるために、広



い芳香環を導入した。これにより、四重らせん構造との間に、スタッキング相互作用を形成する。スタッキング相互作用は、分子クラウディング環境において、その安定化エネルギーを減少させないことも示された。このように、四重らせん構造と特異的に結合する金属錯体を決定することができた。

さらに、これらの知見を利用して、二重らせん構造と四重らせん構造からなるナノ構造体に、金属フタロシアニンを任意の間隔で配向することや、異核のフタロシアニンを交互配向することも可能となった。

また、四重らせん構造を用いたタンパク質の特異的検出システムや、構築される構造体の機能評価に有用なグラフェンや金属ナノ粒子を用いたバイオセンサーの構築にも成功している。これらのことから、本研究課題の要素技術である金属錯体や有機・無機分子を用いた機能発現に関しても十分な成果が得られたといえる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

①H. Yaku, T. Murashima, H. Tateishi-Karimata, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto
Study on Effects of Molecular Crowding on G-quadruplex-ligand Binding and Ligand-mediated Telomerase Inhibition Methods, *in press* (2013). (査読有)

②T. Fujimoto, S. Nakano, N. Sugimoto, D. Miyoshi
Thermodynamics - Hydration Relationships within Loops that Affect G-Quadruplexes under Molecular Crowding Conditions
J. Phys. Chem. B, 117, 963-972 (2013). (査読有)
(Highlighted as the cover)

③H. Yu, X. Gu, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto
The beads-on-a-string structure of long telomeric DNAs under molecular crowding conditions
J. Am. Chem. Soc., 134, 20060-20069 (2012). (査読有)
(Highlighted as the cover and introduced in the Spotlights on Recent JACS Publications)

④H. Yaku, T. Fujimoto, T. Murashima, D. Miyoshi, Naoki Sugimoto
Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications
Chem. Commun., 48, 6203-6216 (2012). (査読有)

(Feature Article & Front Cover)

⑤J. Bhattacharyya, S. Maiti, S. Muhuri, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto
Effect of Locked Nucleic Acid Modification on Thermal Stability of Non-canonical DNA Structure
Biochemistry, 50, 7414-7425 (2011). (査読有)

[学会発表] (計 31 件)

①Daisuke Miyoshi, Valerie Gabelica, Ryuichi Maeda, Takeshi Fujimoto, Hidenobu Yaku, Ta-kashi Murashima, Naoki Sugimoto
THIOFLAVINE-T AS HUMAN TELOMERIC G-QUADRUPLEX PROBE
XX International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Montreal, Canada, 2012/8/6-9

②三好大輔
細胞内環境因子に応答する核酸デバイスの開発 日本化学会第92春季年会(若い世代の特別講演会), 東京, 2012/3/27

③Daisuke Miyoshi, Hidenobu Yaku, Takeshi Fujimoto, Takashi Murashima, Naoki Sugimoto
A new fluorescent light-up probe for DNA
The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Hokkaido Univ., 2011/11/10

[図書] (計 2 件)

①D. Miyoshi, T. Fujimoto, N. Sugimoto
Molecular Crowding and Hydration Regulating of G-Quadruplex Formation
Topics in Current Chemistry, 330, 87-110 (2013).

②D. Miyoshi, N. Sugimoto
G-quartet, G-quadruplex, and G-wire Regulated by Chemical Stimuli
DNA Nanotechnology (Methods in Molecular Biology series), 749, 93-104 (2011).

[その他]

ホームページ等
<http://www.pi.konan-u.ac.jp/miyoshi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三好 大輔 (MIYOSHI DAISUKE)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：50388758