

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23750181

研究課題名(和文)自己複製超分子を指向した金属錯体型人工DNAのPCR様増幅サイクルの構築

研究課題名(英文)Construction of PCR-like amplification system of artificial metallo-DNAs

## 研究代表者

竹澤 悠典 (Takezawa, Yusuke)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70508598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、金属錯体形成により核酸塩基対を形成する金属錯体型人工DNA鎖の複製反応の実現を目指し、新規金属錯体型人工DNAの合成と金属配位子型人工ヌクレオチドの縮合反応の開発を行った。その結果、Cu(II)イオンと錯体形成するヒドロキシピリドン型人工ヌクレオチドを基質とし、鋳型非依存性DNA合成酵素を用いて、人工DNAオリゴマーを合成することに成功した。また、5-ヒドロキシウラシル塩基が、Gd(III)イオンとDNA二重鎖中で金属錯体型塩基対を形成しうることを見出した。

研究成果の概要(英文)：This research aims to construct self-replicating artificial metallo-DNA duplexes, in which natural hydrogen-bonded base pairs are replaced by artificial metal-mediated base pairs. In this study, we have developed a novel metal-mediated base pair and investigated various condensation reactions of artificial ligand-bearing nucleotides. It was found that artificial oligonucleotides possessing multiple hydroxypyridone-bearing nucleotides, which form Cu(II)-mediated base pairs, were successfully synthesized by using a template-independent DNA polymerase. Furthermore, a novel metallo-DNA duplex was constructed using a 5-hydroxyuracil nucleobase as a metal ligand, which formed Gd(III)-mediated base pairs.

研究分野：超分子化学

キーワード：人工DNA 金属錯体型塩基対 超分子化学 錯体化学 酵素合成

### 1. 研究開始当初の背景

DNAは、核酸塩基間の相補的な水素結合により配列特異的に会合し、遺伝情報の貯蔵・複製・増幅を担う高度な情報分子である。DNAの持つ自己複製能を人工分子で模倣することは、生命を特徴付ける機能の再構成として、生体機能関連化学や超分子化学において挑戦的な課題であった。先駆的な事例としては、水素結合で会合する基質を用いた鋳型触媒反応や、オリゴヌクレオチドの2分子鋳型縮合、さらにDNA鎖を鋳型としたヌクレオチド誘導体のオリゴマー合成などが報告されている。しかし多くの場合、鋳型分子へのモノマーの会合や縮合反応の効率が低く、また長時間の反応が必要であるといった課題を抱えていた。

一方、我々は今までに水素結合の代わりに金属配位結合により塩基対を形成する金属錯体型人工DNAの合成研究を行ってきた。これらの人工DNAは金属錯体形成を駆動力として会合するため、水中でもモノマーの塩基対形成が可能である。さらに、配位子となる人工ヌクレオチドの分子設計および金属イオンの種類に応じて、金属錯体の生成定数や配位構造を調整することも可能である。そこで、金属錯体型塩基対形成を駆動力として、人工DNAオリゴマーの鋳型合成およびPCR様の複製サイクルが実現できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では自己複製が可能で人工DNA超分子の創製を目指し、金属錯体型人工DNAオリゴマーの新規縮合・増幅反応を目指した。具体的には、金属配位部位を有する人工ヌクレオチドを導入したDNA鎖を鋳型とし、金属錯体型塩基対の形成を駆動力として人工ヌクレオチドモノマーを会合させ、引き続く縮合反応により人工DNAオリゴマーの鋳型合成を行うことを考えた。そのために本研究では、新規金属錯体型人工DNAの合成とDNAオリゴマーの縮合反応の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

自己複製が可能で人工DNA鎖の創製には、金属錯体型人工DNAの鋳型合成反応の開発が肝要である。そこで、主に以下の2つの課題に焦点を絞って研究を遂行した。

#### (1) 金属配位子型人工DNA鎖の縮合反応の開発

Cu<sup>II</sup>イオン存在下で安定な金属錯体型塩基対(H-Cu<sup>II</sup>-H)を形成するヒドロキシピリドン型ヌクレオチド(H)を用い、ヌクレオチドモノマーの縮合反応を検討した。

具体的には、基質となる人工ヌクレオチドモノマー(三リン酸等)の化学合成、人工ヌクレオチドモノマーの縮合反応の開発の順に研究を進めた。に関しては、縮合剤を用いた化学的縮合反応に加え、DNAポリメ

ラーゼによる酵素反応も検討した。さらに、多分子の人工ヌクレオチドの縮合反応の鋳型となる人工DNAオリゴマーの合成についても、同様に検討を行った。反応の解析は主に、変性ポリアクリルアミド電気泳動により行った。

#### (2) 新規金属錯体型人工DNAの合成

金属錯体型塩基対は、配位子部位の分子設計と金属イオンの選択により、熱力学的安定性や配位子交換速度、配位構造をデザインできるという特徴がある。複製反応が可能で金属錯体型人工DNAを創製するには、錯体形成能や配位構造の異なる多様な金属錯体型塩基対を検討する必要がある。そこで、種々の配位部位を系統的に導入することが可能で、かつ比較的簡便に合成できる配位子型ヌクレオチドとして、5位修飾ピリミジン塩基を設計し、その金属錯体型塩基対形成を評価した。

具体的には、新規配位子型核酸塩基(5位修飾ピリミジン塩基)の分子設計、人工ヌクレオチドの化学合成とDNA鎖への導入、

DNA二重鎖内での金属錯体型塩基対形成の評価の順に研究を進めた。金属錯体形成については、DNA二重鎖融解実験、紫外可視吸収スペクトル測定、および質量分析等により評価した。さらに得られた金属錯体型DNA二重鎖の構造を、円二色性(CD)スペクトル測定、およびNMR構造解析により評価した。

### 4. 研究成果

(1) 鋳型非依存性DNAポリメラーゼを用いた金属配位子型人工DNAオリゴマーの合成(図1)

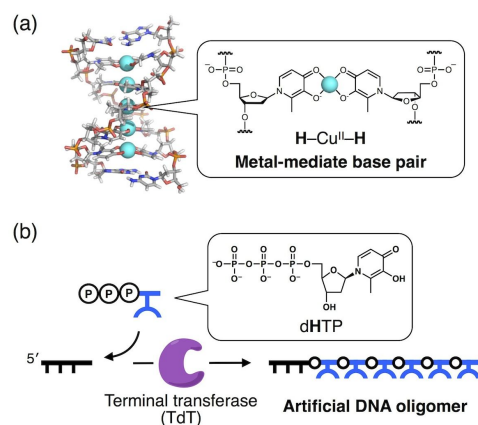


図1. (a) ヒドロキシピリドン型人工ヌクレオチド(H)を用いた金属錯体型人工DNA二重鎖。(b) ターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)による金属配位子型人工DNAの酵素合成。

金属錯体型人工DNAの自己複製反応を達成するには、高効率な人工DNA鎖の縮合反

応の開発と、鑄型となる配位子型人工 DNA オリゴマーの合成が必要となる。そこで本研究では、 $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオンを介して金属錯体型塩基対( $\text{H}-\text{Cu}^{\text{II}}-\text{H}$ )を形成するヒドロキシピリドン型ヌクレオシド( $\text{H}$ )を選択し、ヌクレオシドおよび DNA 鎖の各種縮合反応およびオリゴマー合成を検討した。縮合剤を用いた化学反応、および DNA 合成酵素を用いた酵素反応について、種々の検討を行った結果、鑄型非依存性 DNA ポリメラーゼであるターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)により、 $\text{H}$ ヌクレオシドのオリゴマーを合成できることを見出した。

TdT は鑄型鎖を必要とせず、DNA プライマー鎖の 3'末端に基質であるヌクレオチド三リン酸を付加する酵素である。種々の非天然塩基を DNA 末端に導入する目的でも使われており、基質とするヌクレオチドの構造に高い許容性を持つことが知られている。

酵素反応の基質となるヒドロキシピリドン型ヌクレオチド-5'-三リン酸(dHTP)は、定法の一つである Eckstein 法により合成した。種々の保護基を検討した結果、ヒドロキシピリドンの 3 位水酸基およびリボース部位の 3' 位水酸基をベンゾイル基で保護し、引き続くリン酸化反応により dHTP を得た。目的物はイオン交換カラムクロマトグラフィーおよび HPLC により精製し、 $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{31}\text{P}$  NMR および質量分析により同定した。

TdT が dHTP を基質として認識することは、プライマー伸長反応により確かめた。蛍光標識した 8 塩基長の DNA プライマー鎖(5  $\mu\text{M}$ )に対して、ヌクレオチド三リン酸 dNTP (N = A, T, G, C,  $\text{H}$ , 20 当量)と TdT (2 U/ $\mu\text{L}$ )を加えた。 $\text{Mg}^{\text{II}}$  イオン存在下、37 度で反応を行い、反応生成物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で評価した。天然の三リン酸を基質とした場合は数-20 個以上のヌクレオチドが付加した伸長生成物が得られたのに対し、dHTP を基質とした場合は 3-8 個の  $\text{H}$ ヌクレオチドが付加した生成物が得られた。すなわち、天然基質に比べて反応速度は遅いものの、TdT が dHTP を基質として認識し、 $\text{H}$ のオリゴマーを合成できたことが示された。

補因子である 2 価金属イオンの種類や、dHTP の当量、反応時間、反応温度等を変えて反応の進行を評価したが、 $\text{H}$ の伸長は最大 6-8 塩基程度で停止した。この結果は、TdT の結合サイト内の DNA 鎖が人工ヌクレオチド鎖に置き換わったことで親和性が低下し、人工 DNA 伸長鎖から TdT が解離したためと考察した。これは、TdT の結合サイト内に格納される DNA 鎖の長さが約 6 塩基長であるとする X 線結晶構造解析(Delarue et al., 2013)とも合致する。そこで、DNA 鎖の初期濃度を上昇させ、DNA 鎖と酵素の実質的会合度を大きくした結果、さらに伸長反応の進行した人工 DNA オリゴマーの生成が示唆された。

以上の検討から、適切な濃度の DNA プライマーと dHTP を用いることで、ヒドロキシ

ピリドン型ヌクレオシド( $\text{H}$ )が複数導入された人工 DNA オリゴマーの酵素合成に成功した。従来の化学合成法では  $\text{H}$ の縮合反応の効率が低く、長鎖の人工 DNA 鎖の合成は困難であった。そのため本研究で確立した TdT による酵素合成法は、長鎖金属錯体型人工 DNA の構築や、人工 DNA の複製反応の鑄型鎖の調製への応用が期待される。

## (2) 5-ヒドロキシウラシル塩基を用いた金属錯体型人工 DNA の構築

より簡便な金属錯体型人工 DNA の合成を目指し、新規配位子型人工ヌクレオシドの開発を行った。天然ウラシル塩基の 5 位に配位性の水酸基を導入した 5-ヒドロキシウラシル( $\text{U}^{\text{OH}}$ )塩基が、希土類金属イオン存在下、DNA 二重鎖中で金属錯体型塩基対を形成していることを見出した。

5-ヒドロキシウラシル( $\text{U}^{\text{OH}}$ )は、4 位のカルボニル基に加え、5 位に配位性の水酸基を有するため、二座配位子として金属イオンに配位すると期待される。DNA 二重鎖の向かい合う位置に  $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基を導入すれば、先行研究のヒドロキシピリドン塩基( $\text{H}$ )と同様に、金属イオン存在下で金属錯体型塩基対  $\text{U}^{\text{OH}}-\text{M}-\text{U}^{\text{OH}}$  (M は金属イオン)を形成すると考えた。 $\text{U}^{\text{OH}}$ のデオキシヌクレオシド体は、市販のデオキシウリジンから一段階で合成でき、酵素反応による DNA 鎖への導入も可能であるため、簡便な金属錯体型人工 DNA の合成が期待される。

## 希土類金属イオンを介した金属錯体型人工 DNA の構築 (図 2)

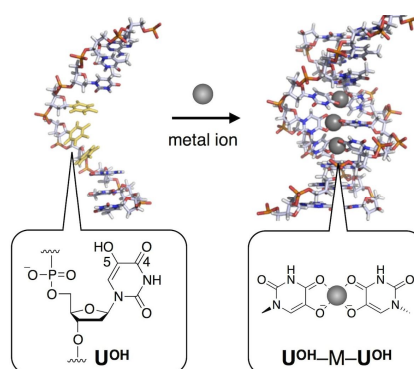


図 2. 5-ヒドロキシウラシル( $\text{U}^{\text{OH}}$ )を配位子とした金属錯体型人工 DNA。金属イオン(M)に配位する他の分子は示していない。

既報に従い、DNA 自動合成機を用いた固相合成により、 $\text{U}^{\text{OH}}-\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基対を 3 対導入した 15 塩基対の DNA 二重鎖 1-2 を合成した。種々の金属イオンの存在下、二重鎖融解実験を行ったところ、 $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンや  $\text{Eu}^{\text{III}}$ イオンなどの希土類金属イオンを加えると、二重鎖の熱的安定性が顕著に上昇することを見出した。例えば、二重鎖 1-2 の融解温度( $T_m$ )は 22.8  $^{\circ}\text{C}$ であったのに対し、3 当量の  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンを加え

たときに最大の熱的安定化( $T_m = 41.1\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_m = +18.3\text{ }^\circ\text{C}$ )を示した。また、 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基をチミン(T)塩基に置き換えた DNA 二重鎖では融解挙動に変化は見られなかったことから、 $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンが  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-U}^{\text{OH}}$ 塩基対部位に結合し、金属配位結合により二重鎖が架橋されたことが示された。

DNA 二重鎖中での金属錯体形成を詳細に評価するために、紫外吸収スペクトルの測定を行った。二重鎖 1-2 に  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンを加えると、310 nm 付近に新たな吸収が現れた。このスペクトル変化は、 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基の 5 位の水酸基の脱プロトン化に帰属され、 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基が  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンに配位したことが示された。さらに、滴定実験および質量分析測定から、二重鎖に 3 個の  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンが結合した  $1\cdot 2\cdot \text{Gd}^{\text{III}}_3$ の生成が確認された。以上から、3 個の  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンが DNA 二重鎖中の 3 対の  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-U}^{\text{OH}}$ 塩基対に定量的に結合したことが明らかとなり、希土類金属イオンを介した金属錯体型塩基対  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-Gd}^{\text{III}}\text{-U}^{\text{OH}}$ の形成が強く示唆された。詳細な配位構造は解析中であるが、希土類金属イオンは一般的に高配位数をとることから、向かい合う一対の  $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基に加えて、隣接する核酸塩基や水分子が配位していると考えられる。

次に、円二色性(CD)スペクトルを測定したところ、金属錯体型人工 DNA 二重鎖  $1\cdot 2\cdot \text{Gd}^{\text{III}}_3$ は全体として B 型の右巻き構造を維持していることが示された。さらに  $\text{Gd}^{\text{III}}$ 錯体由来する 300–340 nm にもコットン効果がみられ、 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-Gd}^{\text{III}}\text{-U}^{\text{OH}}$ がキララな二重らせん構造内に収まっていることが示された。さらに NMR による構造解析からも、 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基が選択的に  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンに配位したこと、得られた金属錯体型 DNA 二重鎖が錯体部分を除き B 型二重らせん構造をとっていることを示唆する結果を得た。

以上のように本研究では、希土類イオン存在下、5-ヒドロキシウラシル( $\text{U}^{\text{OH}}$ )塩基が DNA 二重鎖中で金属錯体型塩基対を形成しうることを見出し、新規金属錯体型人工 DNA の構築に成功した。 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基を導入した DNA 鎖は、比較的短工程かつ高収率で合成できるため、金属錯体型塩基対の形成を駆動力とした人工 DNA の鋳型合成や複製系の構築に有用である。さらに、人工 DNA 鎖を鋳型とした金属イオンの集積化や、新規 DNA 超分子の構築など、DNA ナノテクノロジーや材料化学分野への展開が期待される。

金属錯体形成に基づく人工 DNA 二重鎖の安定性制御

5-ヒドロキシウラシル塩基( $\text{U}^{\text{OH}}$ )は、天然のチミン(T)と同じ水素結合部位を有しており、アデニン(A)塩基とワトソン-クリック型塩基対  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-A}$ を形成する。中央に 3 対の  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-A}$ 塩基対を導入した 15 塩基対の DNA 二重鎖 1-3 ( $T_m = 45.2\text{ }^\circ\text{C}$ )に対して、3 当量の  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンを加えたところ、その熱的安定性が著し

く低下した( $T_m = 30.9\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_m = -14.3\text{ }^\circ\text{C}$ )。天然 T-A 塩基対や、 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-G}$ などのミスマッチ塩基対に対しては、 $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンによる不安定化は見られなかった。これは、 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基に  $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンが結合し、 $\text{U}^{\text{OH}}\text{-A}$ 塩基対が選択的に不安定化されたためと考えられる。

以上から、 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基を導入した DNA 二重鎖の熱的安定性を、 $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオンによって制御できることを見出した。二重鎖融解温度を比較すると、金属イオン非存在下では  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-A}$ 塩基を含む二重鎖 1-3 がもっとも安定であり、 $\text{Gd}^{\text{III}}$ イオン存在下では  $\text{U}^{\text{OH}}\text{-Gd}^{\text{III}}\text{-U}^{\text{OH}}$ 塩基対を形成した二重鎖 1-2 がもっとも安定となった。このことは、人工 DNA 鎖の会合挙動を金属イオンによって制御できることを示しており、金属錯体形成を駆動力とした人工 DNA の構造・機能変換への展開を計画している。PCR 様の分子増幅サイクルを構築するためには、生成物を鋳型鎖から解離させ、縮合反応を繰り返す必要がある。本研究で見出した DNA 鎖の会合挙動の変換は、 $\text{U}^{\text{OH}}$ 塩基を用いた金属錯体型人工 DNA の複製反応の開発に応用できると期待される。

以上のように、5-ヒドロキシウラシル( $\text{U}^{\text{OH}}$ )塩基を用いて、自己複製系の構築に利用可能な新規金属錯体型人工 DNA を得ることに成功した。さらに、5 位にその他の配位性官能基を導入した修飾ピリミジン塩基についても、種々の金属イオンを介した金属錯体型塩基対形成の評価を行っている。

## 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 3 件、すべて査読あり)

J.-L. H. A. Duprey, Y. Takezawa, and M. Shionoya, “Metal-Locked DNA Three-Way Junction”, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 1212–1216.

Y. Takezawa, and M. Shionoya, “Metal-Mediated DNA Base Pairing: Alternatives to Hydrogen-Bonded Watson–Crick Base Pairs”, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 2066–2076.

S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X. Guo, and M. Shionoya, “Direct Conductance Measurement of Individual Metallo-DNA Duplexes within Single-Molecule Break Junctions”, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 8886–8890.

[学会発表](計 21 件)

竹澤悠典・米田周平・塩谷光彦、 “Induction of an Artificial DNA Three-way Junction Structure Triggered by Metal Complexation”, 日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26–29 日、日本大学(千葉)  
西山康太郎・竹澤悠典・塩谷光彦、「5-

ヒドロキシウラシル塩基の金属錯体形成に基づく DNA 二重鎖の熱的安定性の制御」, 日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26–29 日、日本大学 (千葉)

小林輝樹・竹澤悠典・塩谷光彦、「鋳型非依存性 DNA ポリメラーゼによる金属配位子型人工 DNA の長鎖合成」, 日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26–29 日、日本大学 (千葉)

佐々木大介・小林輝樹・竹澤悠典・塩谷光彦、「天然 DNA 鎖を鋳型として用いた金属配位子型人工 DNA の酵素的ライゲーション反応」, 日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26–29 日、日本大学 (千葉)

西山康太郎・竹澤悠典・塩谷光彦、「DNA 二重鎖中における 5-ヒドロキシウラシル塩基と希土類イオンとの錯体形成挙動」, 錯体化学会第 64 回討論会、2014 年 9 月 18–20 日、中央大学 (東京)

小林輝樹・坂本晶・竹澤悠典・塩谷光彦、「金属イオンの多数集積化を指向した金属配位子型人工 DNA 鎖の酵素合成」, 日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27–30 日、名古屋大学 (愛知)

竹澤悠典・DUPREY, Jean-Louis・米田周平・塩谷光彦、「金属錯体により架橋した安定な DNA 三叉路モチーフの構築」, 錯体化学会第 63 回討論会、2013 年 11 月 2–4 日、琉球大学 (沖縄)

西山康太郎・竹澤悠典・塩谷光彦、「5-ヒドロキシウリジンオリゴマーを鋳型配位子とした金属イオンの一次元配列化」, 錯体化学会第 63 回討論会、2013 年 11 月 2–4 日、琉球大学 (沖縄)

Yusuke Takezawa, Jean-Louis H. A. Duprey, Shuhei Yoneda, Mitsuhiko Shionoya, "Metal-dependent Stabilization of Artificial DNA Junction Structures", 16th International Conference on BioInorganic Chemistry (ICBIC16), 2013 年 7 月 22–26 日、グルノーブル (フランス)

竹澤悠典・DUPREY, Jean-Louis・塩谷光彦、「金属錯体形成による人工 DNA ジャンクション構造の安定化」, 日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22–25 日、立命館大学 (滋賀)

西山康太郎・竹澤悠典・塩谷光彦、「金属配位子として 5-ヒドロキシウラシルを導入した人工 DNA 鎖の合成と錯体形成」, 日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22–25 日、立命館大学 (滋賀)

Yusuke Takezawa, Jean-Louis H. A. Duprey, Shuhei Yoneda, Mitsuhiko Shionoya, "Stabilization of DNA Three-way Junction Structures by Metal-coordination", The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2012), 2012 年 11 月 15–17 日、名古屋大学 (愛知)

Yusuke Takezawa, Jean-Louis H. A. Duprey, Shoichi Takada, Akira Sakamoto,

Song Liu, Guido H. Clever, Motoo Kaneko, Kentaro Tanaka, Xuefeng Guo, Mitsuhiko Shionoya, "Metal-mediated artificial base pairing for the development of DNA-based nanomaterials", The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011), 2011 年 11 月 9–11 日、北海道大学 (北海道)

〔図書〕(計 2 件)

Y. Takezawa, J.-L. H. A. Duprey, and M. Shionoya, "Metal-Aided Construction of Unusual DNA Structural Motifs" in *DNA in Supramolecular Chemistry and Nanotechnology*. John Wiley & Sons, Inc., in press (2015).

Y. Takezawa, and M. Shionoya, "DNA Inspired Self-Assembled Metal Arrays" in *Biomimetics Bioinspired Materials, Mechanics, and Dynamics, Vol. 1 of Handbook of Biomimetics and Bioinspiration*. World Scientific Publishing, pp. 217–245 (2014).

〔その他〕

ホームページ

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/~bioinorg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹澤 悠典 (TAKEZAWA, Yusuke)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70508598