

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24245037

研究課題名(和文) DNAを利用する重金属イオン除去膜、導電性ワイヤーの開発研究 構造、物性、応用

研究課題名(英文) Development of DNA based heavy metal ions removing membranes and nanowires-structures, properties, applications.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはDNA二重鎖中のピリミジン-ピリミジン塩基対に金属イオンが結合し金属含有塩基対、チミン-Hg(II)-チミン(T-Hg(II)-T)及びシトシン-Ag(I)-シトシン(C-Ag(I)-C)が形成されることを見出した。本研究ではHg(II)除去膜や導電性ナノワイヤーの開発に向けて、金属含有塩基対の構造と物性を研究した。金属含有塩基対を有する二重鎖核酸の結晶構造を解明し、金属含有塩基対の電子配置を計算した。応用研究としてHg(II)イオン除去膜を開発した。

研究成果の概要(英文)：The applicants have found that heavy metal ions and pyrimidine-pyrimidine base pairs in duplexes form metal ion mediated base pairs such as thymine-Hg(II)-thymine and cytosine-Ag(I)-cytosine. In the project, for developing DNA based heavy metal ions removing membranes and nanowires in future, we have studied structures and properties of the metal ion mediated base pairs. Crystal structures of duplexes having the metal ion mediated base pairs have been solved, and electron density distributions were calculated. As application study, we developed a mercury ion removing material consisting of polystyrene and thymine residues.

研究分野：機能物質化学

キーワード：環境浄化 水銀イオンの除去 水銀イオンの検出 結晶構造解析 多次元多核種NMR法 ナノワイヤー

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは 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 (右図 1)。

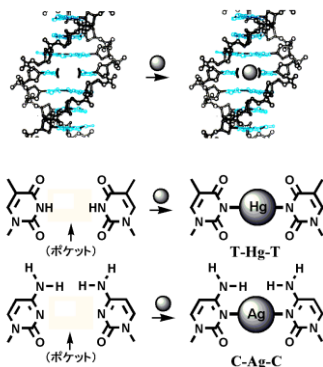


図 1

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申請者の発見であるが、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る。申請者は塩基配列が設計された合成 DNA を用いて、Hg(II)イオンが T-T 塩基対に高選択的に取り込まれることを明らかにした (*J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2172, 2006、引用件数 190)。また安定同位体標識高分解能 NMR 法を用いて構造を証明した (*J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 224, 2007、引用件数 120)。C-C 塩基対が Ag(I)イオンと高選択的に結合する現象は申請者の新規発見である (*Chem. Comm.*, 4725-4727, 2008、引用件数 70)。上記の成果は世界的に注目され、依頼されて総説を執筆した (*Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5855-5866. DOI: 10.1039/c1cs15149e.)。申請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 (Togashi & Ono, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 4300, 2004) (図 2)。この報告は *Science* の Editor's Choice (**305**, 1533, 2004) で紹介され、現在の引用件数 340 でその数は増え続けている。

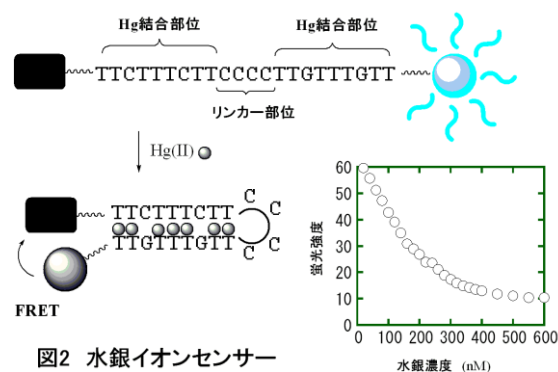


図2 水銀イオンセンサー

申請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

本研究は核酸化学/機能物質化学に新しいジャンルを開拓するものである。申請者の発見した「金属イオン含有 DNA 二重鎖」の構造・物性を解明し、さらに DNA を基盤構造とする重金属除去膜や導電性ナノワイヤーの開発に挑む。以下に主要な項目を列記する。  
 ①NMR 法、②結晶解析法により金属含有塩基対の構造を解明する。その眼目は“隣り合う金属含有塩基対において、金属イオン間に軌道の相互作用が存在し得るのか”という究極の問いに答えることであり、導電性を議論する上で必須の情報となる。  
 ③塩基対と金属イオンの結合の熱力学的研究。その重要性は論を俟たないであろう。  
 ④環境浄化に向け、Hg(II)イオン選択的除去膜を開発する。  
 ⑤導電性ワイヤーの開発に向けて、長鎖金属含有 DNA の合成に挑戦する。化学合成法、酵素法を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1)金属含有塩基対の構造解析

**NMR 法**：安定同位体標識 DNA を用いることで、類推の余地なく C-Ag(I)-C の構造を決定する。

**X 線結晶構造解析**：結晶構造解析の眼目は、DNA 二重鎖中に連続する T-Hg(II)-T 塩基対の、Hg(II)―Hg(II)の配置と距離) を明らかに

にすることである。金属含有 DNA の物性研究を大きく前進させるであろう。

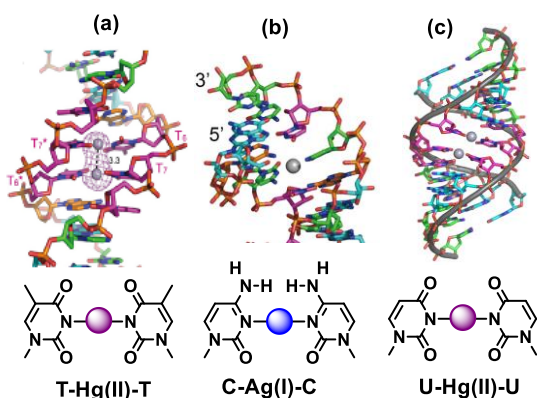
**(2)塩基対—金属イオン結合の熱力学的解析：**ITC（等温滴定型熱量測定）は、DNA 二重鎖中の塩基対と金属イオンの結合の解析にも有用である。

**(3)Hg(II)イオン選択的除去膜の開発：**水系中の重金属イオンの除去を目的とする。チミン塩基が Hg(II)イオンと高選択的に結合することを利用、チミンを結合した人工高分子を合成し、Hg(II)イオンを選択的に除去する手法を開発する。液膜法、高分子膜法を検討する。

#### 4. 研究成果

**(1)NMR 法及び X 線結晶構造解析法による構造解析**

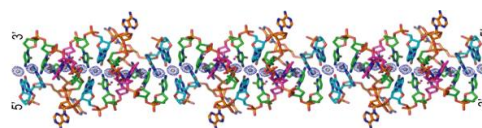
Hg(II)イオン含有 duplex の溶液構造 (*Nucleic Acids Research*, **2014**, 42, 4094-4099) および結晶構造 (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 2385-2388. Very important paper) を明らかにした。この結晶構造では、連続する T-Hg(II)-T ペアの二つの Hg(II)イオン間距離が、DNA 塩基対間距離に比較して短いことが注目される。即ち Hg(II)原子間に軌道の相互作用が存在する (図 a)。この特性は、計算科学からも支持された (*J. Phys. Chem. B*, **2014**, 118, 5374)。



C-Ag(I)-C を有する RNA 二重鎖の結晶構造を明らかにした (図 b, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54, 13323-13326)。さらに図 c は連

続する U-Hg(II)-U を有する RNA 二重鎖での結晶構造である (論文作成中)。

2015 年初夏、研究を新たな次元に導く新規ナノワイヤーの結晶構造を見出した。無限に伸びるワイヤー構造の内部で銀イオンが連続している。その距離から銀イオン間の軌道の相互作用が有り得る。錯体化学全般を見渡しても稀有な物質である。しかもこの驚くべき構造体が簡単なユニット—12 塩基の天然型合成 DNA—から形成される (論文投稿中)。



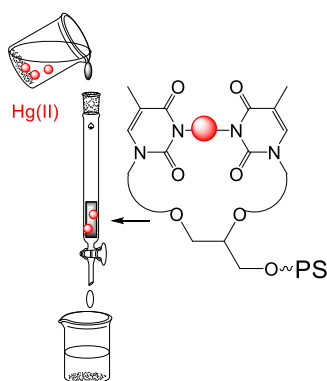
また、DNA 合成酵素を利用して、一度の反応で複数のタイプの金属含有塩基対を形成しうることを見出した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 6624)。

NMR 法により C-Ag(I)-C における、塩基と金属間の化学結合位置を明らかにした (論文投稿中)。金属含有 DNA の電子状態解析についてはラマンスペクトル振動解析と LUMO の軌道 (*Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40, 5766)、水銀原子間に働く相対論効果由来の引力の存在 (*J. Phys. Chem. A*, **2012**, 116, 8313)、 $^{15}\text{N}/^{199}\text{Hg}/^{109}\text{Ag}$  NMR スペクトル (*Chem. Comm.*, **2015**, 51, 8488-8491) がある。

**(2)塩基対—金属イオン結合の熱力学的解析：**ITC（等温滴定型熱量測定）法を用いて T-T 塩基対と Hg(II)イオン、C-C 塩基対と Ag(I) の結合に伴う熱力学的パラメータを得た。

**(3)Hg(II)イオン選択的除去膜の開発：**脂溶性のアルキル化チミンを含有する液膜を合成した。Hg(II)イオンが選択的に輸送された (*Chem. Lett.*, **2015**, 44, 1732-1734)。

チミン塩基をアルキルリンカーで結合したチミンダイマーを合成し、ポリスチレン担体に結合した。複数の金属イオンの混液中の Hg(II)イオンを選択的に結合した (論文準備中)。



## 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 15 件)

- ① Tatsuo Kurokawa, Manabu Igawa, Akira Ono, and Itaru Okamoto  
 “Selective Transport of Mercury(II) Ions across Supported Liquid Membrane with Thymine Derivative as Carrier”  
*Chem. Lett.*, **2015**, *44*, 1732–1734. (査読有)
- ② Jiro Kondo\*, Yoshinari Tada, Takenori Dairaku, Hisao Saneyoshi, Itaru Okamoto, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono,  
 “High-resolution crystal structure of Ag<sup>I</sup>-RNA hybrid duplex containing Watson-Crick-like C–Ag<sup>I</sup>–C metallo-base pairs”  
*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, Issue 45, 13323–13326. (査読有)
- ③ Yoshiyuki Tanaka\*, Jiro Kondo, Vladimír Sychrovský, Jakub Šebera, Takenori Dairaku, Hisao Saneyoshi, Hidehito Urata, Hidetaka Torigoe and Akira Ono\*  
 “Structures, physicochemical properties, and applications of T–Hg<sup>II</sup>–T, C–Ag<sup>I</sup>–C, and other metallo-base-pairs”  
*Chem. Comm.*, **2015**, *51*(98), 17343–17360. “Feature Article” (査読有)

- ④ Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Yoshinori Kondo, Chojiro Kojima, Akira Ono & Yoshiyuki Tanaka\*  
 “Exploring a DNA Sequence for the Three-Dimensional Structure Determination of a Silver(I)-Mediated C-C Base Pair in a DNA Duplex By <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy”  
*Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **2015**, *34*(12), 877-900. (査読有)
- ⑤ Tatsuo Kurokawa,\* Manabu Igawa, Akira Ono, and Itaru Okamoto\*  
 “Selective Transport of Mercury(II) Ions across Supported Liquid Membrane with Thymine Derivative as Carrier”  
*Chem. Lett.*, **2015**, *44*, 1732–1734. (査読有)
- ⑥ Tatsuya Funai, Junko Nakamura, Yuki Miyazaki, Risa Kiri, Osamu Nakagawa, Shunichi Wada, Akira Ono, and Hidehito Urata\*  
 “Regulated Incorporation of Two Different Metal Ions into Programmed Sites in a Duplex by DNA Polymerase Catalyzed Primer Extension”  
*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 6624-6627. (査読有)
- ⑦ J. Kondo, T. Yamada, C. Hirose, I. Okamoto, Y. Tanaka, A. Ono,  
 “Crystal structure of metallo-DNA duplex containing consecutive Watson-Crick-like T–Hg(II)–T base pairs”  
*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 2385-2388. (査読有)
- ⑧ H. Yamaguchi, J. Šebera, J. Kondo, S. Oda, T. Komuro, T. Kawamura, T. Dairaku, Y. Kondo, I. Okamoto, A. Ono, J. V. Burda, C. Kojima, V. Sychrovský

- and Y. Tanaka,  
 “The structure of metallo-DNA with consecutive thymine–Hg<sup>II</sup>–thymine base pairs explains positive entropy for the metallo base pair formation”  
*Nucleic Acids Research*, **2014**, *42*, 4094-4099. (査読有)
- ⑨ Jakub Šebera, Jaroslav Burda, Michal Straka, Akira Ono, Chojiro Kojima, Yoshiyuki Tanaka, and Vladimír Sychrovský\*  
 “Formation of a Thymine-HgII-Thymine Metal-Mediated DNA Base Pair: Proposal and Theoretical Calculation of the Reaction Pathway” *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 9884 – 9894. (査読有)
- ⑩ Itaru Okamoto, Takashi Ono, Rimi Sameshima and Akira Ono,  
 “Metal ion-binding properties of DNA duplexes containing thiopyrimidine base pairs”  
*Chem. Comm.*, (2012) **48**, 4347-4349.  
 (査読有)
- ⑪ Tatsuya Funai, Yuki Miyazaki, Megumi Aotani, Eriko Yamaguchi, Osamu Nakagawa, Shunichi Wada, Hidetaka Torigoe, Akira Ono, and Hidehito Urata\*  
 “Ag<sup>I</sup> Ion Mediated Formation of a C–A Mismatch by DNA Polymerases”  
*Angew. Chem. Int. Ed.*, (2012), **51**, 6464 –6466. (査読有)
- ⑫ Hidetaka Torigoe,\* Itaru Okamoto, Takenori Dairaku, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono, T. Kozasa,  
 “Thermodynamic and structural properties of the specific binding between Ag<sup>+</sup> ion and C:C mismatched base pair in duplex DNA to form C-Ag-C metal-mediated base pair”  
*Biochimie*, (2012), *94*, 2431-2440. (査読有)
- 有)  
 [学会発表] (計 36 件)
- ① Yoshinari Tada, Takenori Dairaku, Itaru Okamoto, Hisao Saneyoshi, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono, Jiro Kondo  
 “Structure of C-Ag(I)-C metallo base pair in RNA duplex”  
*pp266-267*, *The 42<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2015)*, (*Egret Himeji, Himeji*) (Sep. 23, 2015).
- ② Hidetaka Torigoe, Kanako Deguchi, Tetsuo Kozasa, Akira Ono  
 “Thermodynamic properties of the specific interaction between metal ion and mismatched base pair”  
*pp114-115*, *The 42<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2015)*, (*Egret Himeji, Himeji*) (Sep. 23, 2015).
- ③ Akira Ono, Itaru Okamoto, Hidehito Urata, Hidetake Torigoe, Hisao Saneyoshi, Jiro Kondo, Yoshiyuki Tanaka  
 “Syntheses of DNA duplexes containing metal ion mediated base pairs”  
 12<sup>th</sup> European Biological Inorganic Chemistry Conference (Aug. 26) (Zurich, Switzerland) (招待講演)
- ④ Akira Ono, Itaru Okamoto, Hidehito Urata, Hidetake Torigoe, Hisao Saneyoshi, Jiro Kondo, Yoshiyuki Tanaka  
 “Syntheses and characterizations of DNA duplexes having metal ion mediated base pairs”  
 16<sup>th</sup> Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components (June 10, 2014) (Český Krumlov, Czech

- Republic) (招待講演)
- ⑤ Jiro Kondo, Tom Yamada, Chika Hirose, Itaru Okamoto, Yoshiyuki Tanaka, Akira Ono  
 “Crystal Structure of DNA duplex containing two consecutive T-Hg(II)-T base pairs”  
*114-115pp, The 40<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2013), (Kanagawa University, Yokohama) (Nov. 13, 2013).*
- ⑥ Tatsuya Funai, Yuki Miyazaki, Megumi Aotani, Eriko Yamaguchi, Osamu Nakagawa, Shun-ichi Wada, Hidetaka Torigoe, Akira Ono, Hidehito Urata  
 “Silver(I) Ion-Mediated Cytosine-Adenine Base Pairs Recognized by DNA polymerases”  
*The 39<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC), (Nagoya University, Nagoya) (Nov. 15, 2012).*
- ⑦ Vladimir Sychrovsky, Michal Straka, Ladislav Benda, Petr Bour, Tomomi Uchiyama, Takashi Miura, Hideo Takeuchi, Takenori Dairaku, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Yoshinori Kondo, Akira Ono, Itaru Okamoto, Yoshiyuki Tanaka  
 “Metallophilic attraction in mercury-mediated nucleic acids base pairs and their characterization with Raman spectroscopy”  
*The 39<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC), (Nagoya University, Nagoya) (Nov. 15, 2012).*
- ⑧ Syunichi Takasaki, Hiroyuki Yabe, Itaru Okamoto, Akira Ono\*  
 “Synthesis and Metal-Ion Binding Properties of a Thymine Dimer Unit”  
 XX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids,

(Montreal, Quebec, Canada) (August 7, 2012).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称:水銀イオン捕捉材及びその製造方法、並びに処理対象の水から水銀イオンを除去する方法

発明者:小野晶

権利者:学校法人神奈川大学

種類:C O 2 F 1 / 2 8

番号:特願 2015-123393

出願年月日:2015年6月19日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

特になし

#### 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

近藤 次郎 (KONDO, Jiro)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号:10546576

實吉 尚郎 (SANEYOSHI, Hisao)

神奈川大学・工学部・助教

研究者番号:10564784

田中 好幸 (TANAKA, Yoshiyuki)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号:70333797

浦田 秀仁 (URATA, Hidehito)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号:80211085

鳥越 秀峰 (TORIGOE, Hidetake)

東京理科大学・理学部・教授

研究者番号:80227678

南川 典昭 (MINAKAWA, Noriaki)

徳島大学・理学部・教授

研究者番号:40209820