

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：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350040

研究課題名(和文) スプリット有機分子触媒の創成および化学的シグナル増幅系への応用

研究課題名(英文) Split molecular catalyst and its analytical application as a signal amplifier

研究代表者

井原 敏博 (Ihara, Toshihiro)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：40253489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はDNAをテンプレートして複数の機能性分子を組合わせて発光特性、電気化学特性などが制御できることを示してきた。本研究では、特定の反応を触媒する構造を一旦スプリット(分断)し、テンプレート上でもとの活性な構造を再構築する仕組みをつくり、この系をDNAをはじめとする様々な分子のセンシングに応用したいと考えた。1)有機分子触媒、2)シクロデキストリン包接を利用する触媒系、および3)DNAzymeをスプリットし、それらをスプリットした構成要素をDNAに修飾したものを利用して検討を行った。適切に設計された系においては特定の刺激により期待された触媒活性が著しく向上することを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Chemically engineered DNAs, global conformation of which can be modulated in response to specific stimuli, could be allosteric functional DNAs or work as a modulator of the functional nucleic acids such as DNAzymes and aptamers. We showed that two terpyridines built in the DNA backbone form a stable intramolecular 1 : 2 complex, $[M(\text{terpy})_2]^{2+}$, with divalent transition metal ions. Upon complexation, the DNA conjugates adopt a β -shape structure in which two distal sequences located outside the terpyridines connect with each other to form a continuous segment with a specific structure or sequence. Such DNA structure is globally controlled by local metal complexation events that can be rationally designed based on general coordination chemistry. This method is regarded as metal ion-directed dynamic sequence edition or DNA splicing. Split DNAzymes with peroxidase-like activity can thus be regulated by several transition metal ions through sequence edition techniques based on the β -motif.

研究分野：核酸化学、生物分析化学

キーワード：DNA DNAコンジュゲート 機能性核酸 アプタマー DNAzyme 金属イオン シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでに異なる複数の機能性コンジュゲートを同時に用いて幾つかのスプリットプローブを提案してきた。すなわち、照射によりターゲット DNA 上で二量体を形成するもの、2分子がターゲット上で複合体を作ることによって蛍光性を増大させたり、電気化学活性が消えたりするもの、さらにターゲットにより配位子が集積し、そこに希土類錯体が形成することで特異的に発光するタイプのバイナリーな分子システムなどである。

最後の研究例のコンセプトは、本研究に直接つながるものである。希土類金属と錯生成して発光性の錯体を与える配位子の多くは機能的に異なる2つの要素からなる。すなわち、金属を確実に捕まえる強い配位子と、励起エネルギーを集めてそれを金属イオンに伝達するアンテナ部位である。我々は、この2つの構造要素を一旦分離し、それらを異なる DNA の末端に連結した DNA コンジュゲートを作製した。ターゲットとのハイブリダイゼーションにより2分子が集まり、“完全な”配位構造が再構成され、そこに希土類金属を収容して光するという仕組みである(図1)。しかし、上記のいずれの系も、非常に高い選択性はあったが、ターゲットへの結合という一回のイベントあたり、シグナル発生も一回であり、感度の観点からは改善の余地があった。

2. 研究の目的

シグナルを化学的に増幅する手段として、酵素反応を用いることは多い。しかしながら、バックグラウンドシグナルの抑制や失活などに注意を払う必要がある。より堅牢で選択的な化学増幅システムを構築することを目的として、最近注目されている有機分子触媒に着目し、これをスプリット法で実現したいと考えた。

3. 研究の方法

以下に示す3種の系により DNA をベースとしてスプリット型触媒を構築した。いずれ

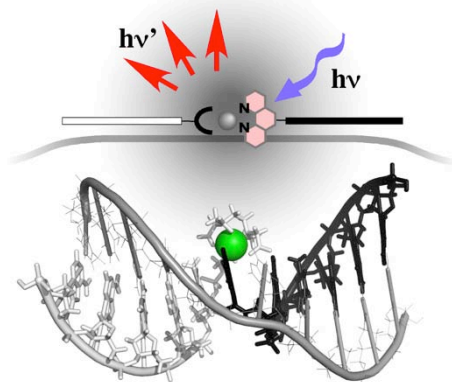


図1 スプリットプローブによる DNA 上での発光性金属錯体形成 DNA 上で EDTA と phen が協同的に希土類金属と錯生成する。

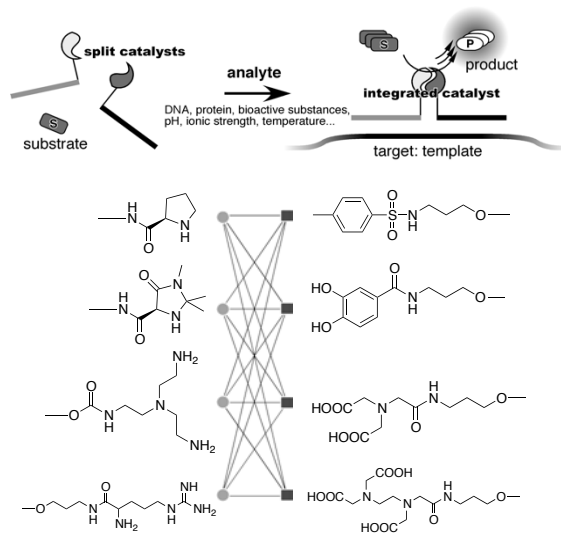


図2 スプリット触媒ライブラリー 制御された可逆的複合体形成によりスプリット触媒を組合せて有効なペアを探す。

も、触媒の構成要素としてはたらくことを期待できる分子で修飾した DNA コンジュゲートを使用する。いずれも、逆相 HPLC で精製し MALDI-TOF MS で同定した。

(1) スプリット有機分子触媒

これまでに報告されている有機分子触媒のうち、おもにプロリン系の分子を参考にして(親構造として)、これを DNA やペプチド基体上で刺激依存的に、かつ可逆的に再構成したいと考えた。

有機分子触媒を構成する機能要素をコンジュゲートした種々のスプリット触媒(候補)から成る小規模ライブラリーを構築した。反応としては、Michael 付加、Aldol 反応などの炭素-炭素結合形成を想定した。図2に合成したスプリット触媒(候補)の一部を示す。求核剤として、エナミン中間体を形成することを期待してアミノ基、特にプロリンなどの5員環アミンやグアニジウム基、Brønsted 酸としてスルホンアミド、カテコール、イミノ二酢酸、EDTA などを導入する。他にも、求核性、 pK_a の異なるもの、疎水的構造の導入、リンカー長なども検討した。

(2) シクロデキストリンと金属錯体

包接反応により基質が濃縮されることを期待して DNA コンジュゲートの一つとして、 β -シクロデキストリン(β CyD) 修飾 DNA を用いた。もう片方の DNA コンジュゲートとしてはジピコリルアミン(Dpa)を用いた。Dpa が β CyD に包接された基質の近傍に Zn^{2+} を運び、活性エステルの加水分解を促進することを期待している。

まず、一点修飾によりチオールを導入した β CyD を合成した。DNA 末端に導入したアミノ基に SPDP を化学修飾し、チオール化 β CyD とのカップリングにより β CyD-DNA を合成した。一方、Dpa-DNA も常法にしたがって

合成した。**Dpa-DNA** は、まず Zn^{2+} と錯体を形成させ、等量の βCyD -DNA と組み合わせで使用した。

(3) 錯生成による触媒活性制御

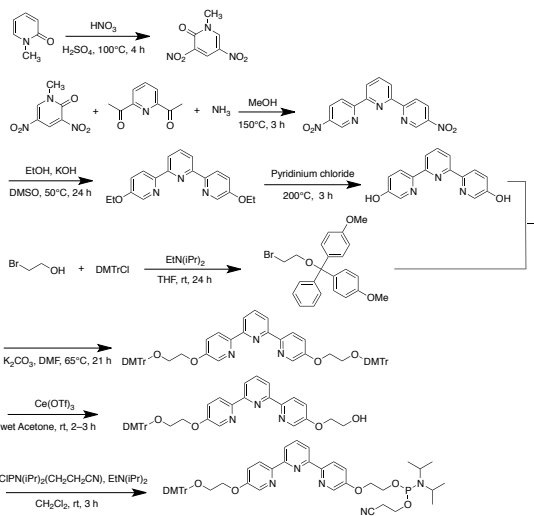
DNA 骨格中、ループシーケンスを挟む互いに離れた二箇所にターピリジン (terpy) を組込んだ DNA コンジュゲート **terpy₂DNA** を合成した。この構造を DNA 骨格に導入するためには terpy を基本構造とするアミダイト試薬を合成する必要がある。Scheme 1 に従って terpy アミダイト (**tpy-amidite**) を合成した。**tpy-amidite** を用いて合成した DNA コンジュゲートは terpy の 5, 5'-位から DNA へと繋がった構造を与える。**tpy-amidite** を DNA 自動合成装置に導入して骨格中に 2 つの terpy を有する DNA コンジュゲート **terpy₂DNA** を合成した。

terpy₂DNA は、適当な金属イオン共存下、分子内で terpy : M^{2+} = 2 : 1 の錯体 ($[M(terpy)_2]^{2+}$) を形成することが期待される。両 terpy ユニットは一次構造上の離れた位置に導入しているの、錯生成に伴って **terpy₂DNA** は Ω 型のコンフォメーションを形成することになる。このとき、**terpy₂DNA** の 2 つの terpy に挟まれたループシーケンスがつまみ出されて、同時に外側の 2 つのシーケンスが互いに連結されたような状況が生じる。この新しく生じたシーケンスをテンプレートとして、スプリットされた DNAzyme を再構築することでその触媒活性の制御を行った。

4. 研究成果

(1) スプリット有機分子触媒

図 3 に示す CPM を基質として図 2 に示すスプリット有機分子触媒の構成要素を、テンプレート DNA 上で種々組み合わせることで有効な組み合わせを検索した。コンジュゲートの修飾構造が互いに向き合うような配向のタンデム二本鎖を与える DNA をテンプレートとした。構成要素の組み合わせ、温度、



Scheme 1. **tpy-amidite** の合成

および pH 条件に関して効率的に条件を検討するためにプレートリーダーを利用した。幾つかの組み合わせに関して、CPM の反応を促進するものがあつたが、その加速効果はわずかであり、再現性にも問題があつた。

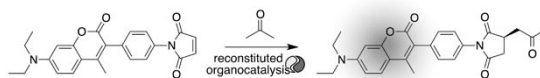


図 3 触媒をスクリーニングする Michael 反応 CPM はそのマレイミド構造へのアセトンの Michael 付加により蛍光性となる。この反応により触媒反応をリアルタイムで追跡することができる。

(2) シクロデキストリンと金属錯体

スプリット有機分子触媒の系において著しい触媒効果を得ることができなかつたのは、基質 CPM を反応サイトに濃縮することができなかつたことがおもな理由と考えた。そこで、基質を濃縮するために分子包接能を有する βCyD に着目した。 βCyD で基質を捕まえ、さらに近傍に反応を促進する可能性のある構造として Dpa の遷移金属錯体を配置し、両者が協調してはたらくことで有効な触媒活性が発揮されることを期待した。

DNA コンジュゲート、 βCyD -DNA と **Dpa-DNA** (Zn^{2+} 錯体) を調製し、両修飾構造である βCyD と Dpa が互いに向き合った配置になるようなタンデム二本鎖を与える DNA 相補配列をテンプレートとして利用して活性エステル (キノリンカルボン酸の p-ニトロフェノールエステル) の加水分解 (図 4) を様々な実験条件下においてモニターした。その結果、pH 中性領域において活性エステル基質の加水分解が優位に加速されていることが分かつた。テンプレートとして用いた DNA (あるいは DNA と相互作用する分子) を検出する手法とするにはさらに感度を向上させる必要がある。今後は、使用する基質の構造を種々変化させることで反応性、選択性、感度などを調整することでシグナル増幅型バイオセンサーの汎用の構成要素としての可能性が現実的となる。

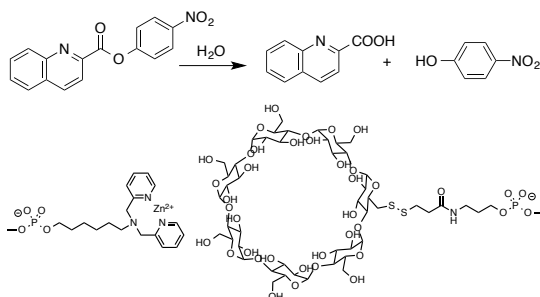


図 4 シクロデキストリンと亜鉛錯体による協同的加水分解反応 キノリンカルボン酸の p-ニトロフェノールエステル (上) を基質として使用する。DNA テンプレート上で βCyD -DNA と Dpa-DNA が協同的にはたらいて (下) 基質を触媒的に加水分解することを期待した。

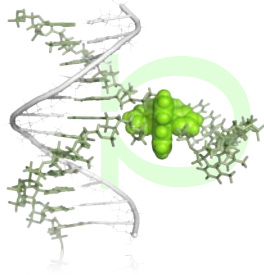


図5 **terpy₂DNA/cDNA** 二本鎖の最安定化構造 (Macro Model, Amber*)

(3) 錯生成による触媒活性制御

外部刺激により DNA 構造を劇的に変化させたいと考え、1 分子の DNA 骨格内のループシークエンスを挟んだ互いに離れた部位に 2 つの terpy を組込んだ DNA コンジュゲート **terpy₂DNA** を合成した。**terpy₂DNA** は、適当な金属イオン共存下、分子内で **terpy : M²⁺ = 2 : 1** の錯体 (**[M(terpy)₂]²⁺**) を形成することが期待される。両 terpy ユニットは一次構造上の離れた位置に導入しているため、錯生成に伴って **terpy₂DNA** は Ω 型のコンフォメーションを形成することになる。このとき、図 5 に示すように、**terpy₂DNA** の 2 つの terpy に挟まれたループシークエンスがつまみ出されて、同時に外側の 2 つのシークエンスが互いに連結されたような状況が生じる。これは、可逆的な錯生成を利用した DNA の塩基配列の編集、あるいは人工的なスプライシングとみなすことができる。

terpy₂DNA において観察された金属イオンによる可逆的なスプライシングを利用して DNAzyme の活性制御の可能性を検討した。ここでは、四本鎖構造を基体としたペルオキシダーゼ活性を有する DNAzyme を利用した。この DNAzyme はヘムのアプタマーでもあり、

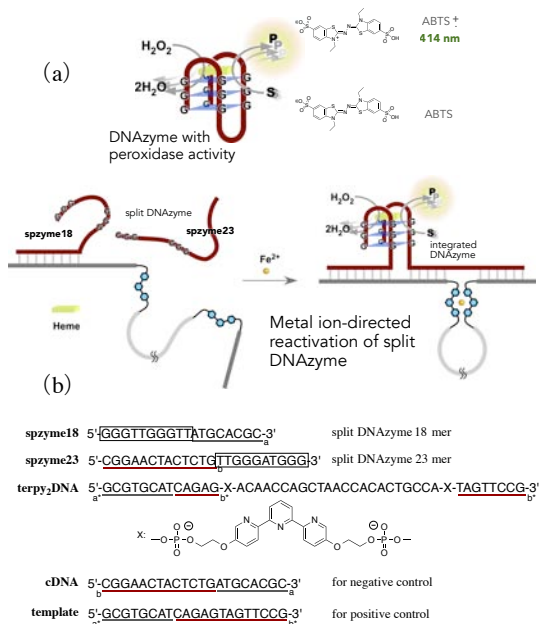


図6 金属イオンによる **terpy₂DNA** の可逆的なスプライシングを利用した DNAzyme の活性制御 (a) 活性制御機構の模式図。(b) 使用した DNA の構造と塩基配列 □ で囲まれた部分がスプリットされた DNAzyme。同色の下線部が相補的な塩基配列。

触媒活性にはヘムは必須因子である。この DNAzyme をスプリットして一旦不活性化する。DNA 骨格中に組込んだ terpy と特定の金属イオンとの錯生成により **terpy₂DNA** のコンフォメーションを制御 (塩基配列を編集) する。その結果として **terpy₂DNA** が完全体の DNAzyme を再構成するための有効なテンプレートとなることを期待している。split DNAzyme の金属イオンによる活性制御の概念図、およびこの実験で用いた DNA の塩基配列をそれぞれ図 6 (a)と(b)に示す。

ABTS の酸化に伴う発色を利用して触媒反応を追跡した。結果を図 7 に示す。スプリットすることで完全に失われていた触媒活性が、**terpy₂DNA** と等量の Fe²⁺および Ni²⁺を添加することにより positive control (**spzyme18/spzyme23/template**) に対して遜色のないレベルまで復活することがわかった。さらに、この反応が、添加した金属イオンそのもの、あるいは terpy 錯体 **[Fe(terpy)₂]²⁺** によって触媒されたものでないことは、negative control (**terpy₂DNA/cDNA**) において反応がまったく進行しないことから確認することができた。

観察された結果が、図 6 (a)に示した触媒活性の制御機構、すなわち金属錯体形成による Ω 型のコンフォメーション形成に基づく活性化であることを裏付けるために系に影響を

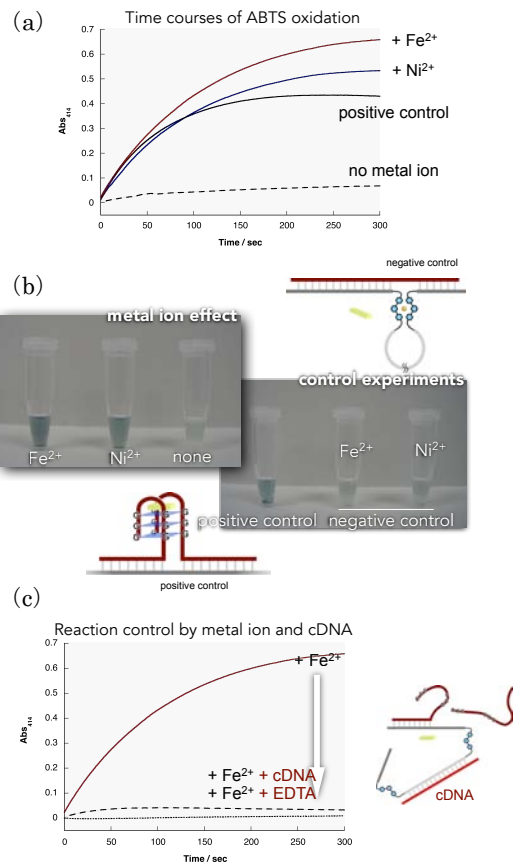


図7 金属イオンによる DNAzyme の活性制御 (a) ABTS の反応の時間依存性 (b) 反応溶液の色変化、およびコントロール実験 (c) 金属マスク剤 EDTA、および、ループ部分に相補的な DNA の添加効果

与え得る添加剤を加え、同様に ABTS の反応を観察した。結果を図 7 (c) に示す。金属イオンの強力なマスク剤である EDTA を添加した結果、触媒活性はほぼ完全になくなったことから、split DNAzyme の活性化には Fe^{2+} が必須であることがわかった。さらに、2つの terpy に挟まれたループ部分に相補的な DNA を添加した場合にも同様に反応を完全に抑制することができた。分子内で錯体 $[\text{Fe}(\text{terpy})_2]^{2+}$ が形成するためには **terpy₂DNA** は Ω 型となり、図 5 に示すようにループ部分がコンパクトに折り畳まれる必要がある。一本鎖 DNA の持続長は数塩基であるが、二本鎖では 100~150 塩基であることが知られている。つまり、二本鎖を形成することによりループ部分が rigid になることで分子内錯生成 (terpy₂DNA が Ω 型になること) が阻害され、terpy₂DNA が有効なテンプレートとしてはたらくことができなくなった結果と考えられる

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 20 件)

- ① T. Ihara, H. Ohura, C. Shirahama, T. Furuzono, H. Shimada, H. Matsuura, Y. Kitamura, “Metal Ion-directed Dynamic Splicing of DNA through Global Conformational Change by Intramolecular Complexation” *Nat. Commun.*, **6**, 6640 (2015). 査読有 DOI: 10.1038/ncomms7640
- ② K. Nakano, T. Kimura, Y. Kitamura, T. Ihara, R. Ishimatsu, T. Imato, “Potentiometric DNA Sensing Platform Using Redox-Active DNA Probe Pair for Sandwich-Type Dual Hybridization at Indicator Electrode Surface” *J. Electroanal. Chem.*, **720-721**, 71-75 (2014). 査読有 DOI: 10.1016/j.jelechem.2014.03.029
- ③ S. Urata, T. Miyahata, H. Matsuura, Y. Kitamura, T. Ihara, “Alteration of DNAzyme Activity by Silver Ion” *Chem. Lett.*, **43**, 1020–1022 (2014). 査読有 DOI: 10.1246/cl.140197
- ④ M. R. Karim, Y. Ikeda, T. Ide, S. Sugimoto, K. Toda, Y. Kitamura, T. Ihara, T. Matsui, T. Taniguchi, M. Koinuma, Y. Matsumoto, S. Hayami, “In Situ Oxygenous Functionalization of a Graphite Electrode for Enhanced Affinity toward Charged Species and a Reduced Graphene Oxide Mediator” *New J. Chem.*, **38**, 2120–2127 (2014). 査読有 DOI: 10.1039/c3nj01471a
- ⑤ Y. Kitamura, S. Yamamoto, Y. Osawa, H. Matsuura, T. Ihara, “Versatile Allosteric Molecular Devices Based on Reversible Formation of Luminous Lanthanide Complexes” *Chem. Commun.*, **49**, 285–287 (2013). 査読有 DOI: 10.1039/c2cc36979f
- ⑥ A. Futamura, A. Uemura, T. Imoto, Y. Kitamura, H. Matsuura, C.-X. Wang, T. Ichihashi, Y. Sato, N. Teramae, S. Nishizawa, T. Ihara, “Rational Design for Cooperative Recognition of Specific Nucleobases Using β -Cyclodextrin-Modified DNAs and Fluorescent Ligands on DNA and RNA Scaffolds” *Chem. Eur. J.*, **19**, 10526–10535 (2013). 査読有 DOI: 10.1002/chem.201300985
- ⑦ H. Shimada, T. Sakurai, Y. Kitamura, H. Matsuura, T. Ihara, “Metallo-regulation of the Bimolecular Triplex Formation of a Peptide Nucleic Acid” *Dalton Trans.*, **42**, 16006–16013 (2013). 査読有 DOI: 10.1039/c3dt51386f
- ⑧ T. Miyahata, Y. Kitamura, A. Futamura, H. Matsuura, K. Hatakeyama, M. Koinuma, Y. Matsumoto, T. Ihara, “DNA Analysis Based on Toehold-mediated Strand Displacement on Graphene Oxide” *Chem. Commun.*, **49**, 10139–10141 (2013). 査読有 DOI: 10.1039/c3cc45531a
- ⑨ 井原敏博, 北村裕介, “スプリット型プローブの協同的錯体形成を利用する DNA の認識及び検出” *分析化学*, **61**, 193–206 (2012). 査読有 DOI: 10.2116/bunsekikagaku.61.193
- ⑩ T. Ihara, Y. Kitamura, “Photochemically Relevant DNA-based Molecular Systems Enabling Chemical and Signal Transductions and Their Analytical Applications” *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **13**, 148–167 (2012). 査読有 DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.03.002
- ⑪ N. Kise, Y. Hamada, T. Sakurai, “Electroreductive Coupling of Optically Active α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds with Diaryl Ketones: Asymmetric Synthesis of 4,5,5-Trisubstituted γ -Butyrolactones” *Org. Lett.*, **16**, 3348–3351 (2014). 査読有 DOI: 10.1021/ol5013789
- ⑫ N. Kise, Y. Kawano, T. Sakurai, “Reductive Coupling of Phthalimides with Ketones and Aldehydes by Low-Valent Titanium: One-Pot Synthesis of Alkylideneisoindolin-1-ones” *J. Org. Chem.*, **78**, 12453–12459 (2013). 査読有 DOI: 10.1021/jo402125u
- ⑬ T. Imahori, T. Tokuda, T. Taguchi, H. Takahata, “An Alternative Approach to *para*-C-H Arylation of Phenol: Palladium-Catalyzed Tandem γ -Arylation/Aromatization of 2-Cyclohexen-1-one derivatives” *Org. Lett.*, **14**, 1172–1175 (2012). 査読有 DOI: 10.1021/ol300145g

⑭ T. Imahori, R. Yamaguchi, S. Kurihara, “Azobenzene-tethered Bis(trityl alcohol) as A Photoresponsive Cooperative Acid Catalyst for Morita-Bailis-Hillman reaction” *Chem. Eur. J.*, **18**, 10802–10807 (2012). 査読有 DOI: 10.1002/chem.201201383

⑮ A. Kato, E. Hayashi, S. Miyauchi, I. Adachi, T. Imahori, Y. Natori, Y. Yoshimura, R. J. Nash, H. Shimaoka, I. Nakagome, J. Koseki, S. Hirono, H. Takahata, “ α -1-C-Butyl-1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol as a Second-Generation Iminosugar-Based Oral α -Glucosidase Inhibitor for Improving Postprandial Hyperglycemia” *J. Med. Chem.*, **55**, 10347–10362 (2012). 査読有 DOI: 10.1021/jm301304e

[学会発表] (計 32 件)

① T. Miyahata, T. Matsuo, Y. Kitamura, T. Ihara, “Signal Amplification in Gene Analysis Based on Graphene Oxide and DNA Circuit”, 日本化学会第95春季年会 2015, 2015年3月27日, 船橋市

② T. Ihara, H. Ohura, H. Kodani, S. Urata, Y. Kitamura, “Stimuli-responsive DNA Splicing through Global Conformational Change”, 日本化学会第95春季年会 2015, 2015年3月27日, 船橋市

③ R. Ozaki, Y. Azuma, Y. Kitamura, T. Ihara, “Biosensing Based on Catalytic Formation of Luminous Metal Complex on DNA”, 日本化学会第95春季年会 2015, 2015年3月27日, 船橋市

④ 井原敏博, 宮端孝明, 尾崎理依, 大浦博之, 北村裕介, “核酸の動的構造をプログラムして増幅型バイオセンサをつくる”, 第17回生命科学研究会, 2015年1月9日, 高知市

⑤ H. Ohura, T. Furuzono, Y. Kitamura, T. Ihara, “Dynamic DNA Splicing by Specific Metal Complexation”, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014年11月5日, Kitakyushu

⑥ Y. Kitamura, T. Miyahata, T. Ihara, “Graphene Oxide-based DNA Sensor with Catalytic Signal Amplification”, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014年11月5日, Kitakyushu

⑦ H. Ohura, T. Furuzono, C. Shirahama, Y. Kitamura, T. Ihara, “Metal Ion-directed Reversible DNA Splicing”, Switzerland-Japan Chemical Biology Symposium 2014, 2014年10月3日, Bern

⑧ 井原敏博, 大浦博之, 宮端孝明, 北村裕介, “相互作用をプログラムして核酸を分析する”, 14-1 バイオ・高分子研究会, 2014年9月26日, 長崎市, 招待講演

⑨ 北村裕介, 宮端孝明, 松尾朋弥, 井原敏博, “酸化グラフェン上でのDNA鎖交換反応を利用したシグナル増幅型核酸分析法の開発”, 日

本分析化学会第63年会, 2014年9月17日, 東広島市

⑩ 大浦博之, 古園智大, 白浜千里, 北村裕介, 井原敏博, “金属イオン応答型可逆的スプライシングを利用したDNAzymeの活性制御”, 日本分析化学会第63年会, 2014年9月17日, 東広島市

⑪ 古谷英長, 大浦博之, 成合裕哉, 白浜千里, 古園智大, 北村裕介, 井原敏博, “金属配位基を骨格中に組み込んだ人工核酸によるDNAzymeの活性制御”, 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 2014年9月11日, 岡山市

⑫ 野崎晃広, 二村朱香, 北村裕介, 井原敏博, “機能性核酸複合体を反応場とした触媒反応の検索”, 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 2014年9月11日, 岡山市

⑬ T. Miyahata, T. Matsuo, Y. Kitamura, T. Ihara, “Signal Amplification in DNA Sensing Using Toehold-mediated Strand Exchange on Graphene Oxide”, RSC Tokyo International Conference 2014 -Analytical Technology towards Future Society-, 2014年9月4日, Tokyo

⑭ 宮端孝明, 松尾朋弥, 北村裕介, 井原敏博, “酸化グラフェンとDNAの相互作用に関する基礎的研究および遺伝子センサーへの応用”, 酸化グラフェン研究会 第2回シンポジウム, 2014年6月24日, 熊本市, 招待講演

⑮ T. Ihara, “Bioanalysis through Cooperative Work of DNA Conjugates”, Sichuan University Research Conference, 2014年5月12日, Sichuan, 招待講演

[図書] (計 1 件)

北村裕介, 井原敏博, 千喜良誠, “金属錯体の特異的形成および相互作用を利用した核酸プロービング”

ナノスケール・ミクロスケールから見えるビックな世界, 301–333 (2013).

新藤斎 編著, 中央大学出版部

[その他]

ホームページ等

<http://133.95.131.186/~toshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 敏博 (IHARA TOSHIHIRO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 40253489

(2) 研究分担者

櫻井 敏彦 (SAKURAI TOSHIHIKO)

鳥取大学・工学部・准教授
研究者番号: 10332868

今堀 龍志 (IMAHORI TATSUSHI)

東京理科大学・工学部・講師
研究者番号: 90433515