

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620136

研究課題名(和文)単分子エレクトロニクスへの応用を指向した導電性DNAワイヤーの開発

研究課題名(英文)Construction of conductive DNA wires toward single-molecule electronics

## 研究代表者

山名 一成 (Yamana, Kazushige)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70192408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、化学合成で得られる長さや配列が決まったDNAをテンプレートに用い、酵素反応によって分子結合部位の導入を行い、DNA分子ワイヤーの作製を目指し研究を行った。ウラシル塩基(dU)を選択的に除去するUDGで処理することによって、DNA内部に結合部位と反応サイトとして働く空間を形成させ、還元的アミノ化反応によって分子を特異的に修飾する反応を調べた。アミノ基を有するペリレンジイミド(PDI)とDNAを混合し、還元的アミノ化反応を行うことで、dUの数に応じて複数のPDIが導入できることが示され、dUの配列に応じてPDIをDNA上に配列させることが可能であることが実証された。

研究成果の概要(英文)：Artificial nucleic acids modified with functional molecules have been utilized to develop DNA-based biosensors and biological imaging tools. In this research, we studied convenient and site-specific covalent modification of DNA with the perylenediimide (PDI) molecules through inclusion complex of PDI with DNA and construction of the cluster of the PDI molecules. The abasic (AP) sites generated by the removal of deoxyuridines with enzymatic reaction were used as molecular binding sites and reactive sites for covalent modification. Reductive amination in the presence of NaBH<sub>3</sub>CN was applied for conjugation at the abasic site. The PDI molecules were also incorporated at the AP sites in good yield. These results show that the organization and covalent modification using the abasic sites within DNA can be applied to construct the conjugates of DNA with functional molecules, which is applicable for the design of DNA-based molecular electronics and diagnostic tools.

研究分野：生体機能化学

キーワード：DNA 電子移動 ペリレンジイミド 会合体

1. 研究開始当初の背景

DNA は核酸塩基対が一次元に  $\pi$  スタックした特徴的な構造を有しており、化学的に合成でき、生化学的な方法で増幅も可能なため、塩基配列と長さ（塩基数）が明確に決まった DNA を容易に得ることができる。さらに、化学修飾によって天然の DNA が持たない機能を有する人工 DNA を作製することが可能である。さらに近年、DNA の塩基配列情報に基づく自己集合を利用した構造体構築の研究が盛んに行われ、二次元、三次元の高様な形状の DNA ナノ構造体の作製されている。これらの特徴から、DNA はナノテクノロジー分野における有望な分子ナノ材料となりえると期待されている。

2. 研究の目的

これまで我々の研究グループでは有機合成と核酸化学に基づく化学修飾に基づき、様々な機能を有する修飾核酸（DNA, RNA）の開発を行ってきた。さらに最近では核酸化学合成に頼らない、DNA の配列情報と構造を利用した超分子アプローチによって機能分子を配列・集積して方法を確立し、機能性 DNA 構造体の開発を行ってきた。本研究では、生体分子としての DNA の特徴を利用し、酵素反応によって DNA の増幅と結合部位導入を行い、秩序性を保ったまま DNA 上に分子を配列することによって導電性を示す DNA 分子ワイヤーを作製し、それを利用した単分子デバイスおよび光デバイスの開発を目的とした研究を行った（図 1）。

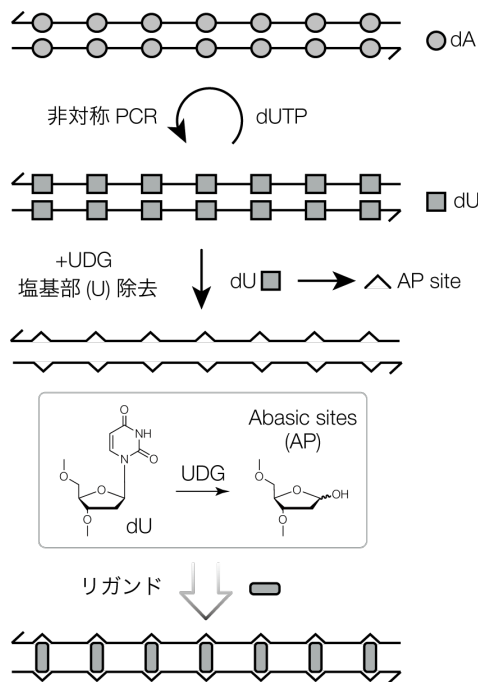


図 1 酵素反応による分子結合空間形成と色素による空間認識を利用した分子の組織化方法

これまでに、DNA 内部に人工的に導入した疎水空間に、疎水性分子のペリレンジイミドが強固に結合することを発見し、空間配列によってそれらの複数の分子を DNA 上に配列できることを明らかにした。この現象を利用し、酵素反応を利用して自在に空間を配列することで機能性色素分子を集積する方法を確立し、導電性を示す DNA ワイヤの作製を研究目標とした。

3. 研究の方法

DNA 分子を足場として機能性色素を一次元状に配列する手法を確立することを目的として、DNA にデオキシウリジンを導入した DNA を合成し、ウラシルを選択的に除去する Uracil-DNA glycosylase (UDG) で DNA を処理することで、DNA 内部に分子の結合空間および反応部位を形成させ、機能性色素の選択的結合、および還元的にアミノ化反応による結合形成を利用することで、任意の位置に目的分子を導入した DNA の作製を行った。結合形成反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)、単離した生成物を MALDI-MS により分析することで、目的とした反応システムの分析・評価を行った。

4. 研究成果

デオキシウリジン (dU) とその対面にスパーサーとなるリンカー (C3) を導入した DNA を用いて反応を検討した (図 2)。ウラシルを特異的に除去する uracil-DNA glycosylase (UDG) で処理することで、反応活性部位となる abasic site を DNA 内部に発生させた。アミノ基を有する PDI をその部位に結合させ、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$  存在下で還元アミノ化反応を行うことで、PDI を位置特異的に導入することを行った。HPLC によって反応解析を行ったところ、DNA に対し 1.5 当量の PDI を加えて反応を 24 時間行った結果、新たに PDI の吸収を示すピークが主要生成物として得られた (図 2b)。この生成物を分取、単離し、MALDI-MS による分析から、無塩基部位に PDI が共有結合によって導入された目的の反応物が得られたことが分かった (図 2c)。pH、反応温度等を変化させ反応の最適化を経て、最終的には 90% 以上の効率で反応が進行することが分かった。カチオン性 PDI は DNA 内部の空間に選択的に結合することが分かっており、これによって高効率に反応が進行したと考えられる。また、吸収スペクトルや融解温度測定等から、化学結合によって導入された PDI 分子は DNA 内にスタックしていることが示された。

次に、dU を連続させた  $(\text{dU/C3})_2$  および  $(\text{dU/C3})_3$  配列を有する DNA を用いて同様の反応を行ったところ、期待通り PDI の二量体および三量体を配列内部に有する

DNA が高収率で得られ、MALDI-MS による同定から、DNA に導入した dU の配列に応じて PDI 分子を DNA 内に位置特異的に導入し、配列化できることが示された (図 3a)。さらに、DNA 二本鎖内に dU/dU の塩基ペアを導入して反応を行ったところ、二つの DNA の鎖を架橋する様式で結合形成反応が起こることがわかり、PDI によって DNA のクロスリンク反応も高効率に進行することが分かった (図 3b)。

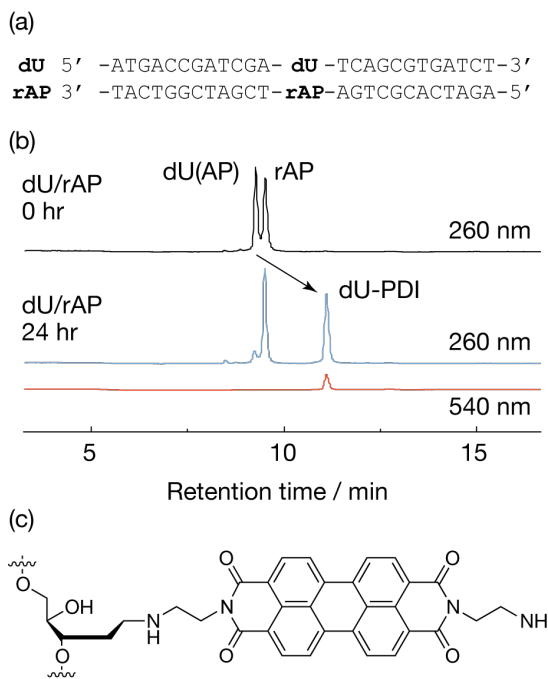


図 2 酵素反応を利用した PDI の位置特異的導入。(a) DNA 配列。(b) 反応前後の HPLC チャート。(c) 無塩基部に PDI が導入された構造。

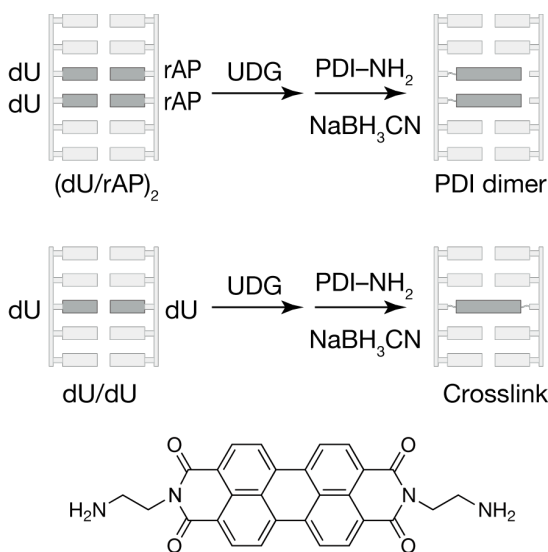


図 3 DNA 構造内にスタックした PDI オリゴマーの構造(a)とクロスリンク反応生成物の構造(b)。

本手法を用いて、異なる電子的特性、物性を示す PDI 誘導体の導入が可能であるかどうかを次に検討した。ペリレン環に電子ドナー性官能基としてピペリジンを導入した PDI 誘導体(PDI-N)を合成し、無塩基部位での還元的アミノ化反応によって導入を行った (図 4)。HPLC による反応解析結果から、通常の PDI と同様に、効率良く目的部位に修飾できることが分かった。片方の鎖に PDI を、もう一方の鎖に PDI-N を導入することで、DNA の二本鎖形成を利用して異なる特性を持つ PDI 誘導体のヘテロ会合体を構築できることがわかり、会合体形成によって PDI の発光が極めて高い効率で消光されることが示され、発光分子・消光分子対として有用であることが分かった。

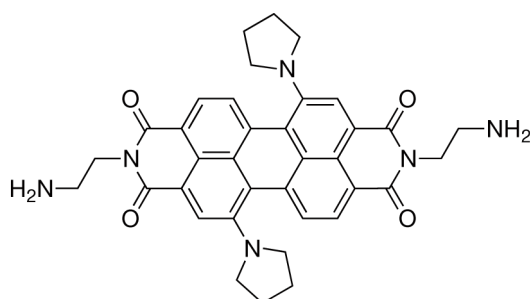


図 4 ピペリジンをペリレン環に導入した PDI 誘導体(PDI-N)の分子構造

以上、dU を化学的および酵素的に導入した DNA を反応基質として、酵素反応によって形成させた無塩基部位を分子結合部位、結合形成部位とすることで、DNA の目的位置に極めて高効率に分子を導入できることを明らかにした。また、dU の配列に応じて分子を導入できることから、DNA を構造の足場とした一次元分子組織化法として利用可能であることから、DNA を用いた導電性、光応答性機能性材料の開発への応用が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① T. Takada, M. Takemura, Y. Kawano, M. Nakamura and K. Yamana, "Photoresponsive DNA monolayer prepared by primer extension reaction on the electrode" *Langmuir*, **31**, 3993-3998 (2015).  
(査読有)  
DOI:10.1021/la505013u
- ② T. Takada, M. Ido, A. Ashida, M. Nakamura, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima and K. Yamana, "Photocurrent generation through charge-transfer processes in

noncovalent perylenediimide/DNA complexes" *Chem. Eur. J.*, **21**, 6846-6851 (2015). (査読有)  
DOI:10.1002/chem.201406592

- ③ K. Tsuto, M. Nakamura, T. Takada and K. Yamana, "Diketo-pyrrolopyrrole j-aggregates formed by self-organization with DNA." *Chem. Asian J.*, **9**, 1618-1622 (2014). (査読有)  
DOI:10.1002/asia.201402063

- ④ T. Takada, K. Yamaguchi, S. Tsukamoto, M. Nakamura and K. Yamana, "Light-up fluorescent probes utilizing binding behavior of perylenediimide derivatives to a hydrophobic pocket within DNA." *The Analyst*, **139**, 4016-4021 (2014). (査読有)  
DOI:10.1039/c4an00493k

- ⑤ T. Takada, A. Ashida, M. Nakamura, M. Fujitsuka, T. Majima and K. Yamana, "Photocurrent generation enhanced by charge delocalization over stacked perylenediimide chromophores assembled within DNA." *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 6814-6817 (2014). (査読有)  
DOI:10.1021/ja501535z

- ⑥ T. Takada, T. Tochi, M. Nakamura and K. Yamana, "Preparation of ferrocene-functionalized gold nanoparticles by primer extension reaction on the particle surface." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 2661-2663 (2014). (査読有)  
DOI:10.1016/j.bmcl.2014.04.062

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 除村あゆみ・津門貢司・中村光伸・高田忠雄・山名一成, DNA-色素会合体による光電変換システム, 日本化学会第 95 春季年会(2015), 日本大学(千葉県船橋市), 2015 年 3 月 27 日
- ② 井脇世拓・高田忠雄・中村光伸・山名一成, DNA 構造を利用したポルフィリン集合体の構築, 日本化学会第 95 春季年会(2015), 日本大学(千葉県船橋市), 2015 年 3 月 26 日
- ③ 守法寿恵・高田忠雄・中村光伸・山名一成, DNA 自己組織化を利用した金ナノ粒子/色素複合体の構築と光応答, 第 60 回高分子研究発表会(神戸), 兵庫県民会館(兵庫県神戸市), 2014 年 7 月 25 日

- ④ M. Ido, T. Takada, M. Nakamura and K. Yamana, DNA-templated synthesis of cofacially stacked perylenediimide assembly, ISNAC 2014, 北九州国際会議場(福岡県北九州市), 2014 年 11 月 6 日
- ⑤ K. Tsuto, M. Nakamura, T. Takada and K. Yamana, Photochemical properties of DNA templated dye aggregates, ISNAC 2014, 北九州国際会議場(福岡県北九州市), 2014 年 11 月 6 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/msc1/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山名 一成 (YAMANA, Kazushige)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 7 0 1 9 2 4 0 8