

研究課題別評価

1 研究課題名:精密分子認識に基づく人工 DNA の創成とナノ材料への応用

2 研究者氏名:井上 将彦(研究期間 H.14.11~H18.3)

研究員氏名:千葉 順哉(研究期間 H.15.11~H18.3)

3 研究のねらい:

オングストローム解像度の合成化学と分子認識化学を基盤として、ナノメートルレベルの人工 DNA を組み立て、バイオサイエンスとバイオテクノロジーの発展に資する物質群を創成する。

第一点目のサイエンスとして、全ての核酸塩基を人工の水素結合能を有する分子に置き換え、人工的な“分子部品”で DNA 様の構造を構築することを目標とする。さらに人工 DNA の、天然の DNA ポリメラーゼ、もしくはそのミュータントへの適合性を調べ、自己複製が可能な人工分子システム(疑似遺伝子)へと展開する。

第二点目のテクノロジーとして、電気化学的あるいは光化学的応答を有する人工分子部品を天然の DNA に組み込むことにより、センシング機能を有する人工 DNA を構築する。これらの人工 DNA を用いて、バイオテクノロジーの分野において有用な分子材料、例えば DNA プローブや分子センサーを開発する。

4 研究成果:

(1)人工ヌクレオシド(人工 DNA ユニット)の多様性のある合成法の確立

完全人工 DNA の創成を念頭に、人工的な“分子部品”で DNA 様の構造を構築することを目指した。具体的には、全ての核酸塩基を人工の水素結合能を有する分子に置き換え、またその水素結合分子と糖鎖との連結も非天然様式とする戦略をとった。

図1a には、完成させた4種類の水素結合分子の構造を示してある。これらの4種類の分子は、その水素結合のパターンが ADA、DAD、DAA、ADD (D = Donor, A = Acceptor) であり、ADA は DAD と、DAA は ADD (この二つは互変異性体の関係) とのみ、強固な水素結合が可能である。また、水素結合分子とデオキシリボースとを、非天然の β -C-グリコシド結合でアセチレンを介して連結する合成法も新規に開発した(図1b)。本法は一般性があり、水素結合分子のみならず様々な芳香族化合物を連結できる力量のある合成法である。この人工ヌクレオシドを用いた完全人工 DNA の合成、さらにはその高次構造の解析を現在検討中である。また、ここで開発した水素結合分子や連結法は、以下の研究において重要な役割を果たした。

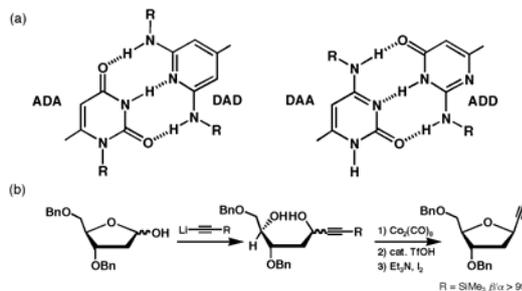


図1 (a) 4種類の水素結合分子の構造 (b) 非天然 β -C-グリコシドの合成法

また、水素結合分子とデオキシリボースとを、非天然の β -C-グリコシド結合でアセチレンを介して連結する合成法も新規に開発した(図1b)。本法は一般性があり、水素結合分子のみならず様々な芳香族化合物を連結できる力量のある合成法である。この人工ヌクレオシドを用いた完全人工 DNA の合成、さらにはその高次構造の解析を現在検討中である。また、ここで開発した水素結合分子や連結法は、以下の研究において重要な役割を果たした。

(2)蛍光分子の発光スイッチングを利用する DNA 分子センサー

代表的な疎水性蛍光分子であるピレンは、低濃度下では青紫色のモノマー発光を示し、高濃度下では黄緑色のエキシマー発光を示す。このピレンの光化学的な特徴を利用して、ステム&ループ構造を有するオリゴヌクレオチド鎖の両末端の双方にピレンを導入し、エキシマー・モノマー発光のスイッチングを利用した DNA プロブ 1 を開発した(図2a)。本プロブの最も重要な特徴としては、エキシマー・モノマー発光の“ratio 測定”が可能なことである。発光波長の“比”を測定することにより、他の光化学活性な生体分子からの影響や、プロブの不均一分散に絡む不確実性を大幅に低減できる。

1 のループ領域に対する完全相補鎖を加えていったところ、等量に達した段階でエキシマー発光は消失し、モノマー発光に切り替わった(図2b)。相補鎖不在時におけるモノマー発光強度($I_{382\text{ nm}}$)とエキシマー発光強度($I_{498\text{ nm}}$)比が $I_{382\text{ nm}} / I_{498\text{ nm}} = 0.2$ であるのに対し、相補鎖検出時にはそれが 20 と

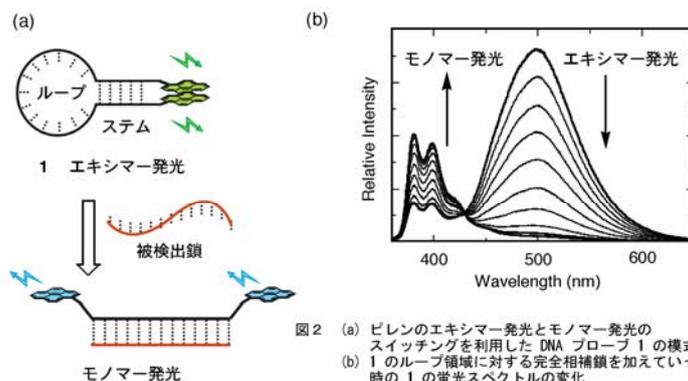


図2 (a) ピレンのエキシマー発光とモノマー発光のスイッチングを利用した DNA プロブ 1 の模式図 (b) 1 のループ領域に対する完全相補鎖を加えていった時の 1 の蛍光スペクトルの変化

なり、約 100 倍の変化が観測された。このスイッチングは完全相補鎖の場合のみ起こり、一塩基多型 (SNPs) 由来のミスマッチ鎖の場合にはほとんど蛍光の変化は見られなかった。完全相補鎖とミスマッチ鎖とを“ratio測定”で判別できるので、“Real Time”での PCR モニターなど幅広い応用が期待できる。

(3) デジタル的な“on-off” 応答性を有する電気化学 DNA プローブ

電気化学活性なフェロセンを、 π 共役可能なアセチレンで水素結合性分子と連結した新規人工ヌクレオシドを開発した。この人工ヌクレオシドとオリゴヌクレオチドの 5' 末端を、ホスホロアミダイト法によって連結し、3' 末端にはスペーサーを介してチオール基 (SH 基) をつけ電気化学活性 DNA プローブ 2 とした (図3の中央)。このプローブと検出鎖とで二重らせんを形成させた後に金電極に固定化して、電気化学的に相補鎖を検出する戦略をたてた。

完全相補鎖ならびにミスマッチ鎖をハイブリダイゼーションさせた DNA プローブ電極の SWV (Square Wave Voltammetry) 測定を行った。結果、完全相補鎖では明らかにフェロセン由来の電流 (0.31 V vs Ag/AgCl) が観測されたのに対し、ミスマッチ鎖ではほとんど電流は観測されなかった。種々の部位に種々のミスマッチを有する場合にも、ほとんどデジタル的な on/off 応答で完全相補鎖から識別することに成功した。電気化学触媒反応を組

み合わせることなく、1回の SWV 測定で高感度にミスマッチ鎖を識別できた前例はなく、学問的にも SNPs 検出における実用を考える上でも非常に注目すべき結果である。

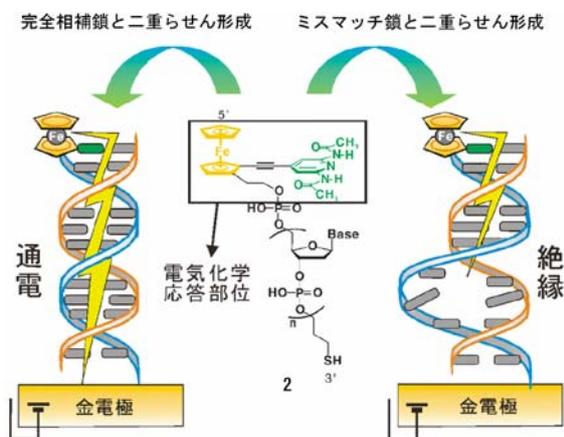


図3 電気化学 DNA プローブ 2 の構造式とミスマッチ鎖検出の概念図

(4) DNA 二重らせん構造を“足場”とする多様性のある分子認識センサー

合成化学の手法を用いて分子認識センサーを構築する場合、最も困難なことはそれを水中で働かせることである。また水中では、その認識力を十分に発揮させることが難しいことも問題点として上げられる。水中で小分子を効率的に認識し、かつセンサーとして働く分子システムとして、人工 DNA を用いる二重らせん型分子認識センサーを開発した。本センサーにおいては、二本のピレン修飾 DNA 鎖を「定常部」とし、小分子を認識する部位を「可変部」として、種々のターゲットに対する多様性を確保できる。

まずは「可変部」として、15-クラウン-5 エーテルを用いる分子認識センサーを合成した。2本の DNA 鎖は、それらのみでは室温で“ぎりぎり”二重らせんを組まない相補的な配列として、一方の DNA 鎖の 5' と 3' 末端にはピレンとクラウンエーテルを、もう一方の DNA 鎖にはそれを逆にして連結した。クラウンエーテルがサンドイッチ型で認識する K^+ の存在下、DNA 鎖中のピレンの発光がモノマーからエキシマーへと明瞭に変化した (図4)。本センシングシステムにおいては、タ

ーゲットに応じて分子認識部位を替えればよく、また認識力は DNA 鎖の長さや塩基配列で容易に調整が可能である。

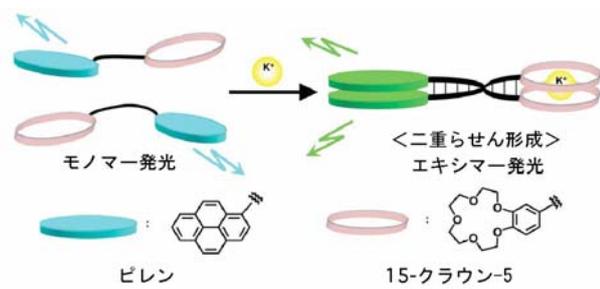


図4 DNA 二重らせんの形成に基づく分子認識センサー

(5) アルキニルピレンを骨格とする高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブの開発

ピレンはその構造の単純さと疎水性、エキシマー発光を示すという特有の光化学的性質より、蛍光プローブ分子としての応用が数多くなされている。蛍光プローブ分子として魅力的なピレンだが、励起波長が短波長、蛍光量子収率が低い、溶媒中の溶存酸素による消光を受けやすいといった問題が存在する。(2)の研究の際に、様々な置換基を有するピレンを合成し、その光物性を詳細に検討した。その結果、アリール基を有するアルキニルピレンが、励起波長 ($\lambda_{ex} \geq 400 \text{ nm}$)・蛍光量子収率 ($\phi_f > 0.8$) とともに良好な結果を与えることがわかった。

ペプチド・タンパクに対する蛍光プローブとして、アルキニルピレン **4** を合成した(図5a)。**4** はマレイミド部位で、システイン残基に対して蛍光標識を行うことができる。また **4** 自身は非蛍光性であり、反応したもののみが蛍光性を示す。ウシ血清アルブミン(BSA)を、**4** および市販の **3** と反応させたときのゲル電気泳動の結果を図5b,c に示す。UV-イルミネーション下、**4** で標識された BSA は、**3** の場合と比較してはるかに明瞭なバンドで確認することができた。この結果より、BSA 中の **4** は非常に高い蛍光量子収率であることが予想され、**4** は高感度なタンパクの蛍光プローブとして機能することが判明した。

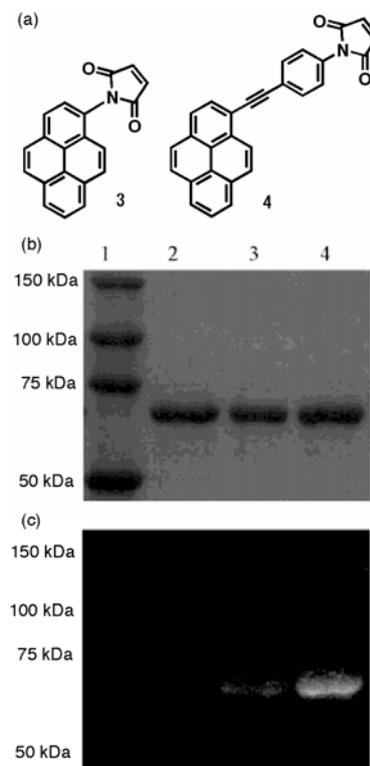


図5 (a) 市販のプローブ **3** と高蛍光量子収率プローブ **4**
 (b) BSA を標識後の SDS-PAGE を Coomassie Blue で染色した場合
 (c) BSA を標識後の SDS-PAGE を 312 nm の光で照射した場合
 (b, c) lane 1: 分子量マーカー
 lane 2: BSA のみ
 lane 3: **3** で標識
 lane 4: **4** で標識

5 自己評価:

研究は、ナノサイエンスとしての人工 DNA の創成と、ナノテクノロジーとしての人工 DNA の利用を同時並行的に、かつそれぞれの結果を互いにフィードバックさせつつ遂行した。結論からいえば、初期の設定目標に対してナノサイエンスは 50 点、ナノテクノロジーは 85 点の自己評価である。

ナノサイエンスの研究は、著者の得意とする合成化学を存分に活用し、4種類の核酸塩基と相補的に相互作用する人工ヌクレオシド(人工 DNA ユニット)の構築までは完成した。しかしながらそれらを用いる「完全人工 DNA」の創成は、3年経った現在において、やっとその汎用的ルートを確立したという一里塚である。DNA 合成機にかけるための、“新規な保護基”・“新規な合成条件”・“新規な脱保護条件”の最適化に相当な時間を費やした。この後には、完全人工 DNA の高次構造の確認、さらには自己複製が可能な人工分子システム(疑似遺伝子)への展開という、より高い壁が待ち受けている。それでも本さきがけ研究では若干の進捗がみられた。“フラスコの中の自己複製分子”の創成は、本研究者のライフワークである。地道にでも必ず続けていきたい研究テーマである。

ナノテクノロジーとしての人工 DNA の利用に関しては、当初の予定+ α の成果を得ることができた。人工 DNA ユニートを部分的に天然の DNA に組み込むことは、ナノサイエンスの成果をフィードバックすることで容易に達成された。また、その結果得られた人工 DNA に関して、多種多様なセンシング機能の付加など広範囲な研究へと展開することができた。蛍光分子の発光スイッチングを利用する DNA 分子センサー、デジタル的な“on-off”応答性を有する電気化学 DNA プローブ、DNA 二重らせん構造を“足場”とする多様性のある分子認識センサー、などがその成果である。これらの研究過程で、偶然にも非常に高い蛍光量子収率をもつピレン誘導体を発見した。本さきがけ課題と直接的には関係しないが、タンパクや細胞膜に対する優れた疎水性蛍光プローブ分子へと研究を展開した。-15 点分は、電気化学 DNA プローブの研究の際、基盤への固定化とその再現性に手間取ったこと、またその界面科学を十分には追求できなかったことである。しかし本さきがけ研究期間中に、専門の研究者の方々から多大なるサジェスチョンをいただいた。それを基に、もう少し深く界面科学の視点からも研究を展開することが今後の課題である。

本さきがけ研究はポスドク参加型である。研究期間の3年半のうち約2年半を、1名のポスドク(千葉順哉氏)とともに研究を遂行した。実際にポスドクの参加によって、研究は飛躍的に進捗・発展した。これは、異なるバックグラウンドをもつポスドクが、異なる視点から研究を展開してくれたことに負うところが大きい。

6 研究総括の見解:

人工 DNA の創成により DNA 多型を識別可能な電気化学 DNA プローブを開発した成果が高く評価できる。簡明な合成戦略のもとに種々の物質を創成して、DNA 関連のセンサー開発に成果を挙げており、新しい方向を見出している研究である。伝導性の分子機構などについては今後の解明が期待される。DNA 二重螺旋構造を利用した分子認識センサーは、微量物質の検出への応用も期待されるが、DNA を使用することによるデバイスとしての安定性、温度変化に伴う測定データの再現性が今後の課題であろう。

7 主な論文等:

<論文>

1. Alkynylpyrenes as Improved Pyrene-Based Biomolecular Probes with the Advantages of High Fluorescence Quantum Yields and Long Absorption/Emission Wavelengths
Maeda, H.; Maeda, T.; Mizuno, K.; Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M.
Chem. Eur. J. **2006**, *12*, 824–831.
2. A General and Versatile Molecular Design for Host Molecules Working in Water: A Duplex-Based Potassium Sensor Consisting of Three Functional Regions
Fujimoto, K.; Muto, Y.; Inouye, M.
Chem. Commun. **2005**, 4780–4782.
3. Single-Nucleotide Polymorphism Detection with “Wire-Like” DNA Probes that Display Quasi “On-Off” Digital Action
Inouye, M.; Ikeda, R.; Takase, M.; Tsuru, T.; Chiba, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2005**, *102*, 11606–11610.
4. Tautomeric Self-Dimerization and Molecular Recognition Properties of 2-Amino-pyrimidinone Derivatives as Triple Hydrogen-Bonding Modules in Molecular Assemblies
Abe, H.; Takase, M.; Doi, Y.; Matsumoto, S.; Furusyo, M.; Inouye, M.
Eur. J. Org. Chem. **2005**, 2931–2940.
5. Unambiguous Detection of Target DNAs by Excimer-Monomer Switching Molecular Beacons
Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M.
J. Org. Chem. **2004**, *69*, 3271–3275.

<特許>

- 1 発明の名称:高蛍光量子収率型疎水性蛍光プローブ、それを用いる生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法
発明者:井上将彦; 藤本和久; 清水久夫
出願者:国立大学法人 富山医科薬科大学
出願番号:特願2005-118313.
- 2 発明の名称: π 共役型電気化学活性非天然ヌクレオシドを用いる相補鎖核酸分子配列検出方法及び SNP 検出方法
発明者:井上将彦; 千葉順哉; 池田怜男奈; 高瀬雅祥
出願者:独立行政法人 科学技術振興機構
出願番号:特願2005-218129.
- 3 発明の名称:蛍光性分子のモノマー発光とエキシマー発光のスイッチングを利用した分子ビーコンを用いる DNA 検出法
発明者:井上将彦; 藤本和久; 清水久夫
出願者:科学技術振興事業団
出願番号:特願 2003-320311; 特開 2005-80637.

<招待講演>

- 1 Ferrocene-Conjugated DNAs as an Electrochemical Probe for Single-Base Mismatch Detection
16th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers
Lanzhou, China, 7/24-27, 2006.
- 2 精密分子認識に基づく電気化学活性 DNA プローブの開発
第8回生命化学研究会シンポジウム
富山, 1/13, 2006.
- 3 Electrochemical SNPs Detection with Ferrocene-Modified "Wire-Like" DNA Probes
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2005
Honolulu, USA, 12/12-20, 2005.
- 4 Alkynylpyrenes as Improved Pyrene-Based Biomolecular Probes
The 12th China-Japan Bilateral Symposium on Intelligent Electrophotonic Materials and

Molecular Electronics

Suzhou, China, 12/8-11, 2005.

- 5 電気化学活性人工 DNA をプローブとする高効率な SNPs 検出法の開発
第3回環境調和型有機反応プロセス研究会
和歌山, 11/18. 2005.