

研究課題別評価

1 研究課題名:

錯体型人工DNAを用いた金属イオン配列制御と機能発現

2 研究者氏名:

田中 健太郎

3 研究のねらい:

DNA 核酸塩基として金属配位子を導入した人工 DNA が、水素結合の代わりに金属イオンとの錯形成により二重らせん構造を形成することを見いだしてきた。DNA はヌクレオチドの逐次的な縮合により合成できるため、ビルディングブロックを任意に配列化する手法として優れている点に着目し、本研究では、金属イオンをナノメートルスケールで集積する場としての錯体型人工 DNA の創製と、その機能化を目的とした。具体的には、任意の金属イオンに選択性を持つ配位子を人工ヌクレオチドとして DNA 骨格中に並べることにより、①「数」と「順序」を制御して合目的に金属イオンを集積する方法論を確立し、②スイッチング機能をもつ分子磁性体や分子電線などの分子素子の構築を目指した。

4 研究成果:

(1) 金属錯体型人工 DNA の合成

本研究では新しい人工 DNA として、DNA の核酸塩基を金属配位に置き換えることを考えた。このような人工 DNA は、金属イオンの存在下、錯形成を通して塩基対を形成することが期待できる (図 1)。金属錯体は、金属イオンと配位子の組み合わせにより、(1) 結合、解離の熱力学や速度論を調節できる、(2) 二配位直線型、四面体型、平面四角型、六配位八面体型など様々な構造をとる、(3) 酸化還元性、磁性、光応答・反応性、放射活性、ルイス酸性など多彩な物性を示す、といった、有機化合物とは異なる特性を持つため、DNA 骨格へ金属錯体を組み込むことにより、新しい機能性分子としての人工 DNA が構築できる。そこで、単座配位子型、二座配位子型、ハードドナー型、ソフトドナー型など様々なタイプの、ビルディングブロックとなる人工ヌクレオチドを合成した。また、これらヌクレオチドを DNA 鎖の配列中に導入し、金属錯形成を通じた塩基対結合による二重鎖形成に成功した。

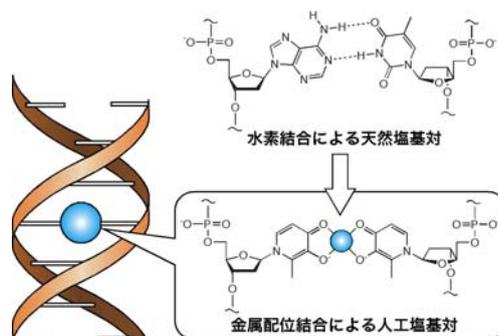


図1 錯体型人工 DNA

(2) 金属錯体型塩基対形成による DNA 高次構造制御

DNA は熱的に塩基対間の水素結合が切断することにより、二重鎖→一本鎖への転移をするなど、大きな高次構造変化を起こすことが知られている。金属錯体型塩基対による DNA の高次構造制御を検討した。人工 DNA 高次構造の熱的安定性は、金属錯体型人工塩基対の形成により大きく変化することが明らかとなった(図 2)。

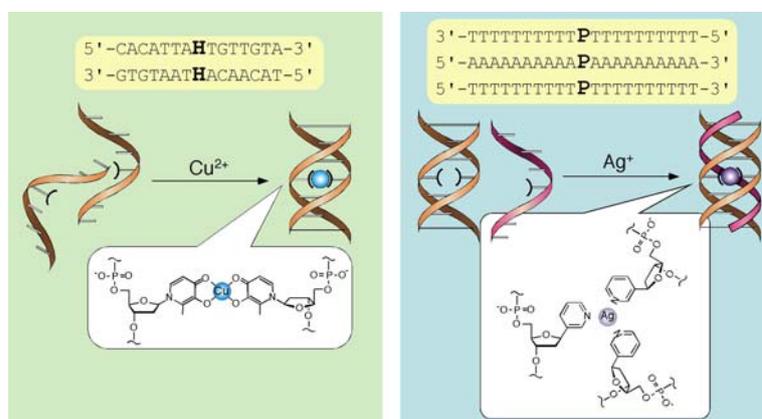


図2 金属錯体型人工塩基対形成による DNA 高次構造制御

以上のように、金属錯体型塩基対を導入した DNA は、金属イオンをトリガーとして、高次構造の安定性を制御できることが明らかとなった。DNA は複製や転写の過程において二重鎖や三重鎖の結合、解離のプロセスが重要となる。よって、このような外的因子による高次構造制御は遺伝子発現をコントロールする一つの手段となる可能性を持っている。

(3) 人工DNAによるDNA伸長反応制御

DNA の複製や転写に関わる酵素反応を制御することにより、より直接的に遺伝子発現を制御することができると考えられる。DNA ポリメラーゼはテンプレートとなる DNA の配列に相補的な配列を持つ DNA 鎖を逐次的に合成するための酵素である。金属錯体型人工 DNA は金属イオンと 2:1 の錯体を形成することにより塩基対を形成するため、金属イオンの存在、非存在により塩基対形成を制御することができる。よって、錯体型人工塩基対をトリガーとした DNA ポリメラーゼ伸長反応のスイッチングなど、酵素的遺伝子関連反応制御のための方法論として金属錯体型人工 DNA を用いることが期待できる。本研究では、まず DNA ポリメラーゼによる伸長反応に及ぼす人工 DNA の影響を調べるために、6 種類の人工 β -C-ヌクレオシド-5'-三リン酸を合成し、*in vitro* での DNA ポリメラーゼ反応における構造活性相関を検討した。フェノール性水酸基を持つ人工ヌクレオシド-5'-三リン酸が DNA ポリメラーゼと特異的な相互作用をすることが認められた。よって、金属配位子を持つ人工 DNA を持つテンプレート DNA 鎖を用いて、金属イオン存在下、人工ヌクレオチドを DNA 鎖へ酵素的に導入することに興味を持たれる。また、これらの人工ヌクレオチドは RNA ポリメラーゼや DNA ヌクレアーゼにも同様の阻害効果が見られた。特に、DNA ヌクレアーゼの人工 DNA による阻害効果は、非特異的切断活性を示すヌクレアーゼに、新しい制限酵素様のレギオ選択性を与える方法論として興味深い。

(4) 金属錯体型人工 DNA を用いた金属錯体のナノ集積化

今まで、金属錯体の一次元集積化の方法はほとんどが結晶化を基本とするため、一次元鎖上の金属イオンの数や、複雑な配列構造を制御することは困難であった。DNA を機能性分子構築のための骨格として用いる利点は、「数」と「配列」を制御して機能性ユニットを配列化できるところにある。そこで、ヒドロキシピリドン(H)型ヌクレオチドを系統的に配列した自己相補的な二重鎖DNA、 $d(5'-GH_nC-3')$ ₂ ($n = 1 - 5$) を合成し、二重鎖内へのCu²⁺イオンの集積を行った(図 3)。

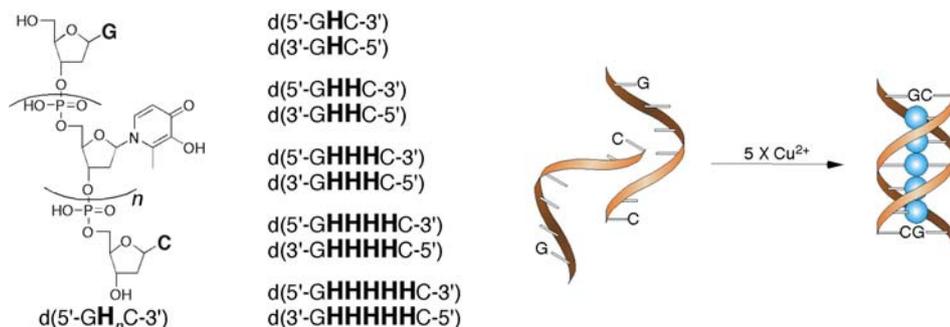


図 3 人工 DNA を用いた金属イオン集積

二重鎖はそれぞれH-H塩基対の数 n に応じて、 n 個のCu²⁺イオンを集積する場として働くことが明らかとなった。これらの人工DNA、 $d(5'-GH_nC-3')$ ₂ · nCu^{2+} (Cu- n)は、天然のDNAと同様な右巻き二重らせん構造をしており、その中心でらせん軸方向にCu²⁺イオンが並んでいる。集積化したCu²⁺イオンは3.7 Åずつ離れており、お互いに強磁性的なスピンスピン相互作用を示した。この強磁性的相互作用は、DNAのらせん構造に基づき、それぞれのCu²⁺イオンが相対的に非共有軌道配置に置かれるためと考えられる。以上のように、金属錯体型人工DNAが、デザイン通りの数のスピンを配向集積する場として機能することが示された。原理的にはさらに鎖長を延ばすことができ、このような方法論が高分子磁性体のモチーフとなる可能性を持っている。



図 4 DNA 中に配列化したスピンの模式図

(5) 金属錯体型人工 DNA をテンプレートとした異種金属イオンの精密集積

DNA内へ集積化した金属イオン間の相互作用を制御する方法論として、人工DNAに配列化した金属配位子をテンプレートとした異種金属錯体の精密集積化が上げられる。金属イオンのハード・ソフト、配位数、配位構造、電荷の違いを利用し、人工ヌクレオシドと金属イオンの結合特性を選択することができるため、DNA二重鎖中にプログラムした金属配位子の配列をテンプレートに、デザインした配列で金属錯体を集積化することが期待できる。

一例として、ヒドロキシピリドン型ヌクレオシド(H)とピリジン型ヌクレオシド(P)を配列化した人工DNA二重鎖 $d(\text{GHPHC})_2$ 、および $d(\text{GHHPHHC})_2$ を合成し、金属イオンの集積化を行った。Hは Cu^{2+} イオンと平面四配位型錯体を形成し、またPは Hg^{2+} と直線二配位構造を形成することにより、それぞれ定量的かつ位置選択的に H-Cu^{2+} 、 H-P-Hg^{2+} 塩基対を形成した (図 5)。本研究では、人工DNAをテンプレートとすることにより、自己組織化を基にして、異種金属イオンアレイを簡便に 100%の収率で合成することに成功した。この方法論は、配位子と金属イオンの組み合わせを選ぶことにより、種々の金属イオン配列に適用が可能であると考えられる。このように、高分子領域まで通じる合成法を用いながら、「長さ」や「配列」に分布を持たない物質を構築する方法は、ほとんど例を見ないため、新しい物性発現の場としての応用が期待できる。

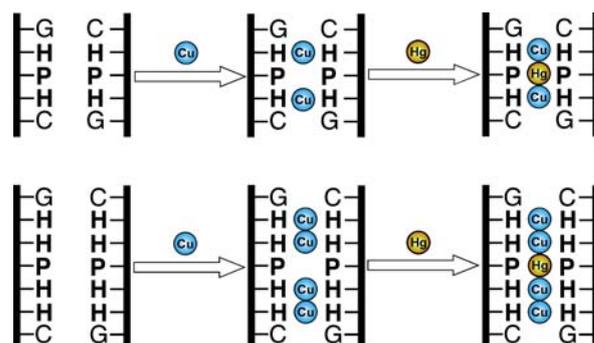


図 5 DNA 上のプログラムに基づいた金属イオンの位置選択的、定量的集積化の例

5 自己評価:

本研究では、DNA の骨格構造がビルディングブロックの配列化に適した分子構造である点に着目し、DNA 核酸塩基間の水素結合による塩基対を金属錯体に置き換えた人工 DNA を構築し、金属イオンをトリガーとして DNA の高次構造をコントロールできること、DNA の構造を利用した金属イオンの集積構造構築が可能であることを示した。DNA を分子骨格として機能性分子を構築する最大の利点は、機能性ビルディングブロックの集積構造をデザインできる点にある。高分子に通じる合成法を用い、機能性ビルディングブロックを「数」、「組成」、「配列」、「方向」、「空間配置」において分布なく集積する方法論を見出すことができた。また、この方法論をもとに精密集積化した金属錯体が、単一な集積構造に伴う物性を発現することを示した。当初は、これらの人工 DNA を素子として集積化し、分子電線や分子磁石などとしての応用まで研究を進めることを予定したが、そこまでは至ることができなかった。一方、類似の方法論を用い、同じく生体分子をモチーフしたペプチド骨格を利用し、金属錯体の分子集積化を行えることも見出しており、今後は、より大きな機能性分子・分子集合体を自由にマニピュレートするための新たな方法論の創出、分子の機能性の実際的な応用にも研究を広げていきたい。

6 研究総括の見解:

DNA が分子内および分子間相互作用によって特異な高次構造を持つことに着目し、水素結合の代わりに金属配位結合を利用することによって金属原子を含む錯体人工 DNA を合成し、新しい機能を見出すことを研究の目的とした。

主要な研究成果として次の4点を挙げる事が出来る。第1に配位数、配位構造の異なる種々の人工ヌクレオシドを合成し、これを用いて銅イオンを含む金属錯体型人工 DNA を構築するとともに、紫外吸光度の温度依存性より、銅イオンの添加が熱的安定性を顕著に向上させることを見出したこと; 第2に酵素的遺伝子関連反応の制御を目的として DNA ポリメラーゼによる伸張反応に及ぼす人工 DNA の効果を調べ、顕著な阻害効果の存在を確認したこと; 第3にヒドロキシピリドン型ヌクレオシド 6 を系統的に配列した二重鎖 DNA を合成し、二重鎖内への銅イオンの集積を行い、5 個のイオンの一次元配列を実現し、紫外吸光度の銅イオン滴定による変化で確かめたこと; 第4に人工錯体型人工 DNA をテンプレートとした異種金属イオンの集積化を行ったこと、である。これらは今後材料科学的、生物化学的に有用な物質合成の基礎として重要な知見である。

研究成果は Science 誌を含む国際学術誌への6篇の原著論文、7 篇の解説論文、13 件の招待講演などで公表され、錯体化学会より研究奨励賞を受賞している。全体としてほぼ予想の程度の成果が達成されたと判断する。

7 主な論文等:

原著論文 6件

特許 国内1件 外国2件

招待講演 13 件
受賞 1 件

(1) 論文(原著論文)発表

“Artificial Nucleosides Possessing Metal Binding Sites at the 3'- and 5'-Positions of the Deoxyribose Moieties”

J. Chiba, K. Tanaka, Y. Ohshiro, R. Miyake, M. Shiro, and M. Shionoya
J. Org. Chem., **68**, 331-338 (2003).

“A Discrete Self-Assembled Metal Array in Artificial DNA”

K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama and M. Shionoya
Science, **299**, 1212-1213 (2003).

“Role of a Non-natural β -C-Nucleotide Unit in DNA as a Template for DNA and RNA Syntheses and as a Substrate for Nucleolytic Digestion”

S. Aketani, K. Tanaka, K. Yamamoto, A. Ishihama, H. Cao, A. Tengeiji, and M. Shionoya
Eur. J. Pharm. Sci., **20**, 43-51 (2003).

“Artificial Metallo-DNA: Structural Control and Discrete Metal Assembly”

K. Tanaka, Y. Yamada, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, Y. Takezawa, M. Yori, M. Shiro, and M. Shionoya
Nucleic Acids Research Supplement, **3**, 121-122 (2003).

“Artificial Metallo-DNA: A Bio-Inspired Approach to Metal Array Programming”

M. Shionoya and K. Tanaka
Curr. Opin. Chem. Biol. **8**, 592-579 (2004).

“Heterogeneous Assembly of Silver(I) and Calcium(II) Ions Accompanying a Dimer Formation of *Cyclo(L-Ala-L-Met)₃*”

T. Okada, K. Tanaka, M. Shiro, and M. Shionoya
Chem. Commun., **2005**, 1484-1486 (2005).

(2) 特許

発明者: Mitsuhiko Shionoya, Kentaro Tanaka, Tatsuhisa Kato

発明の名称: Metal complex type nucleic acid

出願人: Japan Science and Technology Agency

PCT 公開番号(公開日): WO2005026188 (2005-03-24)

米国国内移行済み

発明者: 塩谷光彦・田中健太郎・加藤立久

発明の名称: 金属錯体型人工 DNA による複数金属の位置選択的配列化

出願人: 科学技術振興機構

PCT 公開番号(公開日): WO2005023829 (2005-03-17)

米国国内移行済み

(3) 招待講演

“金属錯体型人工DNA: DNAの構造制御と金属錯体のナノ集積化”, 田中健太郎, 第53回錯体化学討論会, 山形(2003).

“金属イオンナノ集積場としての金属錯体型人工DNA”, 田中健太郎, 分子研研究会「ナノ反応場におけるサイズ効果」, 愛知(2004)

“人工DNAをテンプレートとした金属錯体の精密集積化”, 田中健太郎, 分子研研究会「錯体科学の挑戦」, 愛知(2004)

“金属錯体型人工DNAによる金属錯体のナノ集積化”, 田中健太郎, 日本薬学会第124年会ミニシンポジウム薬学における生命志向型化学, 大阪(2004)

“Metal Array in DAN Double Helix”, Kentaro Tanaka, The 6th International Conference on Nano-Molecular Electronics -ICNME2004-, Kobe, Japan (2004).

“Discrete Metal Array in Artificial DNA”, Kentaro Tanaka, NTU-SNU-UT Tri-Department Chemistry Symposium 2004, Taipei (2004).

“DNAやペプチドをテンプレートとした金属錯体の精密集積化”, 田中健太郎, DV-X α 研究協会材料物性部会第3回錯体量子化学研究会, 東京(2005).

“Functional Metal Array on Bio-Inspired Templates”, Kentaro Tanaka, Tokyo Summer School on Frontier Chemistry 2005 (FrontChem2005), Kanagawa, Japan (2005).

“人工バイオ分子をテンプレートとした精密機能集積”, 田中健太郎, 東京工業大学資源化学研究所光機能化学講演会, 神奈川(2005).

“Functional Metal Array in Artificial DNA”, Kentaro Tanaka, Yusuke Takezawa, Takuya Agata, and Mitsuhiko Shionoya, First International Symposium on Chemistry of Coordination Space -ISCCS 2005-, Okazaki, Japan (2005).

“人工バイオ分子をテンプレートとした金属錯体の精密集積化”, 田中健太郎, 名古屋大学21世紀COEプログラム「物質科学の拠点: 分子機能の解明と創造」第3回無機化学若手研究会, 名古屋(2006).

“精密機能分子集積を目指した人工バイオ分子の創製”, 大阪大学産業科学研究所21世紀COE 平成17年度新規事業「ナノバイオテクノロジーの最先端と新展開」, 兵庫(2006).

“バイオインスパイアード・テンプレートを利用した金属イオンの精密集積”, 田中健太郎, 分子研研究会「生体における金属イオンの役割とその利用」, 愛知(2006).

(3) 受賞

錯体化学会研究奨励賞 (錯体化学会) 平成15年9月25日