

報告番号	甲 第 11482 号
------	-------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 Study on Functionalization of DNA by Artificial Pseudo Base Pairs  
(DNA を機能化する疑似塩基対の開発に関する研究)

氏 名 土居 哲也

### 論 文 内 容 の 要 旨

DNA は規則正しい二重らせん構造を持ち、また、配列選択的に相補鎖を認識する。これらの性質から、近年 DNA はナノマテリアルとして盛んに利用されており、DNA ナノ構造体や DNA 分子マシンなど、様々な応用が報告されている。しかしながら、天然の DNA はナノマテリアルとして最適化された材料であるとは言えず、未だ解決すべき問題は多く残されている。具体的には、天然 DNA を構成する天然塩基は塩基対形成以外の機能、例えば、蛍光性や反応性を有さず、応用の幅が限られるという問題を有している。また、天然塩基の塩基対形成は可逆的であり、高温条件下においては二重鎖構造が崩壊してしまうという問題がある。さらに、天然塩基対は AT あるいは GC ペアの組み合わせしか存在せず、そのため、配列パターンが制限されるという問題がある。近年、これらの問題を解決するため、非天然分子を利用した「人工塩基対」の開発が盛んに行われている。具体的には、天然塩基対と直交性を持つ認識機構を有した人工塩基対の利用による配列パターンの多様化や、光反応性を有する分子を利用した DNA 二重鎖安定性の可逆的变化など、様々な例が報告されている。これらの非天然分子による人工塩基対は、DNA の機能性を多様化し、ナノマテリアルとしての応用の幅を広げるうえで非常に期待される手法である。

その中において、本研究では、DNA 二重鎖を機能化する新規「疑似塩基対」の開発を目指した。D-threoinol をリンカーとして利用することで、DNA 鎖中に様々な非天然分子を導入することが可能になる。この手法を利用することで、機能性分子を導入した人工 DNA を合成し、導入した非天然分子による新たな機能性付与を目指した。DNA 鎖中に導入された非天然芳香族分子は、分子同士の $\pi$ - $\pi$ 相互作用によって DNA 二重鎖を安定化する塩基対の代わりとして働く。本研究では、このような非天然分子を「疑似塩基対」と称し、疑似塩基対による DNA 二重鎖の機能化について検討を行った。

本論文は全5章から構成されており、各章の要旨を以下に示す。

## 第1章 研究の背景及び目的

第1章では、本研究の背景と目的について記した。DNAの構造や化学的特徴、およびDNAをナノマテリアルとして利用した応用例についてまとめ、その問題点を挙げた。さらに、その問題点を解決すべく開発されてきた人工塩基対・疑似塩基対についてまとめ、そのうえで、本研究で目指した新規疑似塩基対の特徴を記した。

## 第2章 分子の静電的相補性に基づくヘテロ選択的疑似塩基対の開発

第2章では、分子のドナー・アクセプター性に基づいた疑似塩基対の開発について記した。これまでに報告されている分子の $\pi$ - $\pi$ 相互作用に基づく疑似塩基対の多くは、その認識機構から、複雑な配列パターンを構築することが困難であった。第2章では、その問題を解決するために分子の電子密度に注目し、分子の静電相補性に基づいたヘテロ選択的 $\pi$ - $\pi$ 相互作用を有する疑似塩基対の開発を目指した。第2章では、アクセプター分子として *p*-nitroazobenzene (N)、ドナー分子として Methyl Red (M) という2種類のアゾベンゼン誘導体を用いた (Fig.1)。そしてこれらの分子がDNA配列中へ導入された際、N/NやM/Mといったホモペアと比較して、N/Mのヘテロペアが高い安定性を示すことを期待した。

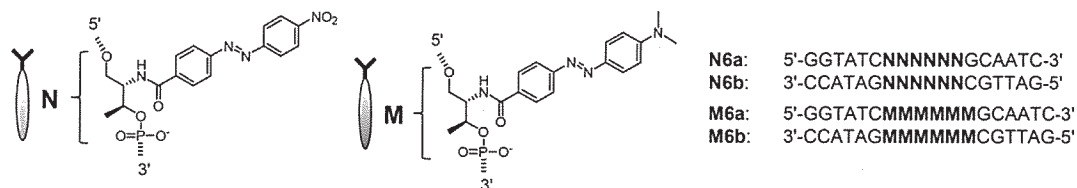


Figure 1. Sequences and chemical structures of synthesized DNAs containing N or M residues.

DNA配列中にNやMを導入し、二重鎖の融解温度測定からその安定性評価を行った。結果、N/NやM/Mといったホモペアと比較して、N/Mヘテロペアの融解温度は10℃以上高い値を示した (Fig.2)。この結果より、NとMは互いを認識して、ヘテロ選択的にDNA二重鎖を安定化する疑似塩基対として機能することが確認された。

さらに、第2章では配列パターンの多様化を目指し、ドナー・アクセプター認識と直交する認識能の付与を目指した。そのため、アゾベンゼン誘導体をDNA鎖中へ導入する際のリンカーのキラリティに注目し、D-threoninolに加え、L-threoninolリンカーを用いてアゾベンゼン誘導体をDNA鎖中へ導入した。D-threoninolリンカーで導入された色素は、DNA二重鎖内で右巻きの会合体を形成する一方、L-threoninolでは左巻き会合体を形成する。そこで、分子のドナー・アクセプター性だけではなく、会合体の「巻き方向」による疑似塩基対形成の選択性付与を目指した。結果、D体/D体やL体/L体のドナー・アクセプターペアと比較して、D体/L体のペアの安定性は著しく低下した。このことより、アゾベンゼン誘導体を利用した疑似塩基対は、分子のドナー・アクセプター性に加え、リンカーのキラリティも認識して、選択的にペアを形成することが確認された。

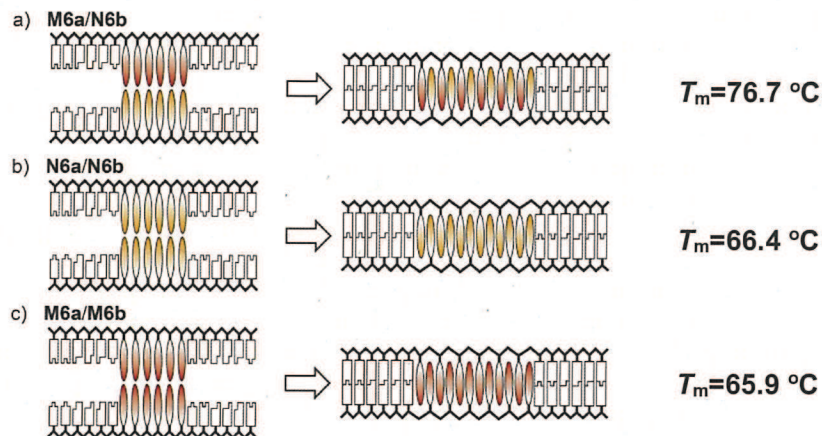


Figure 2. Schematic illustration of duplex formation and results of melting measurements.

### 第3章 ドナー・アクセプター分子を用いたヘテロ選択的人工二重鎖形成

第3章では、ドナー・アクセプター型疑似塩基対の機能化を目指し、蛍光性ドナー・アクセプター疑似塩基対の開発について検討を行った結果を記した。第2章で述べたように、分子の静電的相補性はヘテロ選択的疑似塩基対を設計するうえで効果的であることが確認された。しかしながら、多くの有機色素は、多数集積化された状態では分子間の相互作用によって自己消光し、蛍光性を有さない。一方で、蛍光性疑似塩基対は、塩基対形成のモニタリングや、検出プローブへの利用など応用の幅が広い。そこで第3章では、蛍光性ドナー・アクセプター型疑似塩基対の開発を目指した。第3章では、集積化された状態でも蛍光性を有するドナー分子としてピレンを用いた。他方、アクセプター性の消光剤としてアントラキノンを用いた (Fig. 3)。ピレンは会合状態で蛍光性のエキシマーを形成する。そのため、一本鎖状態では蛍光発光が観測される一方、二重鎖形成時にはアントラキノンによる蛍光消光が起こることを期待した。さらに本章では、これまでに報告のない新規超分子モチーフとして、疑似塩基対のみからなる配列を用いた完全人工二重鎖形成についても検討を行った。

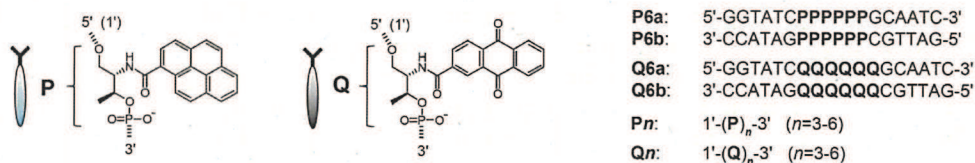
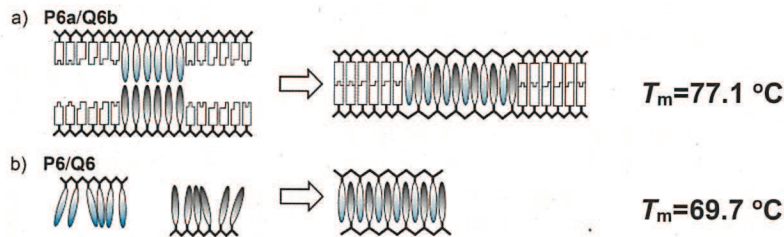


Figure 3. Sequences and chemical structures of synthesized DNAs containing P or Q residues.

DNA鎖中にPあるいはQを導入し、その融解温度測定から安定性について評価を行った。結果、P/PやQ/Qといったホモペアと比較して、P/Qヘテロペアにおいて5°C以上高い融

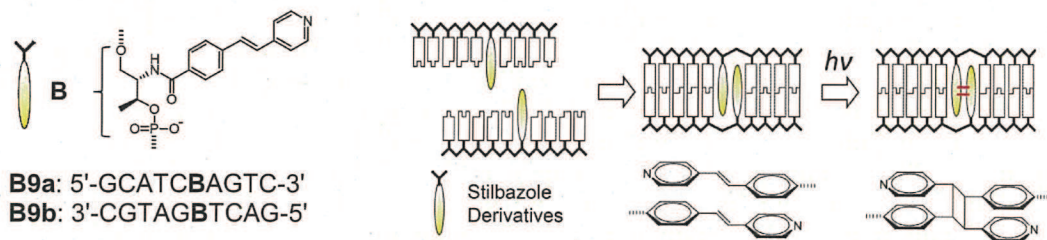
解温度が見られた。このことより **P** と **Q** はヘテロ選択的に DNA 二重鎖を安定化することが確認された(Fig. 4a)。さらに、**P** 導入配列は一本鎖状態でピレンのエキシマー発光に対応する強い蛍光を示した一方、**Q** 導入配列との二重鎖形成時にはほぼ完全な蛍光消光が見られた。このことより、**P/Q** ペアを利用することで蛍光による二重鎖形成モニタリングが可能であることが示された。さらに、疑似塩基対からなる配列において、完全人工二重鎖の形成が確認され、**P** と **Q** は非常に安定なペアを形成することが確認された (Fig. 4b)。



**Figure 4.** Schematic illustration of duplex formation of a) DNA and b) totally artificial sequence, and the results of melting measurements.

#### 第 4 章 *p*-Stilbazole の [2+2] 光環化付加反応を利用した DNA 二重鎖の光架橋

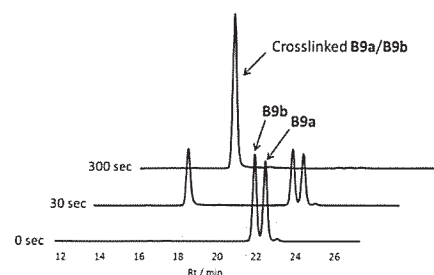
第 4 章では、光反応型疑似塩基対を用いた、DNA 二重鎖の光架橋反応について検討を行った結果を記した。DNA の二重鎖形成は熱的に可逆的であり、そのために、複雑な DNA ナノ構造体は熱的に不安定であったり、形成に厳密な温度制御を要する、といった問題を抱える。これに対し、DNA 二重鎖を共有結合的に架橋することができれば、熱的な可逆性を排し、複雑な DNA ナノ構造体を構築するうえで有用であると考えられる。そこで第 4 章では、DNA を光反応で共有結合的に架橋できる光反応型疑似塩基対の開発を目指した。第 4 章では、そのような反応として stilbazole 誘導体(**B**)の [2+2] 光環化付加反応に注目し、stilbazole 類の環化付加反応によって DNA 二重鎖を架橋することを目指した (Fig.5)。



**Figure 5.** Sequences and chemical structures of synthesized DNAs containing **B** residues and schematic illustration of photodimerization in DNA duplex.

DNA 二重鎖内に **B** を一対導入し、340 nm の紫外光照射に伴う変化を HPLC によって測定した。結果、光照射に伴って反応前的一本鎖に対応するピークが減少し、新たに単一のピークの生成が見られた (Fig. 6)。NMR および MALDI-TOF による解析の結果、この新たな生成物は鎖間で架橋された二重鎖であることが確認された。さらに興味深いことに、モノ

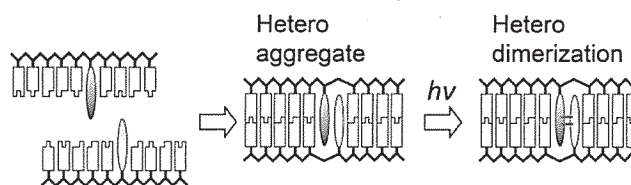
マー状態で見られる **B** の *cis* 体への異性化は見られず、DNA 二重鎖内においては二量化反応のみが選択的に進行していることが確認された。また、架橋された DNA 二重鎖の融解温度を測定したところ、架橋前と比べて 30 °C 以上大幅に安定化していることが確認された。このような大幅な安定化は、DNA が鎖間で架橋されており、二重鎖形成が分子間反応から分子内反応へと変化したことを示す。以上の結果より、**B** は DNA を架橋するための光反応型疑似塩基対として優れたポテンシャルを有することが確認された。



**Figure 6.** HPLC chromatograms of **B9a/B9b** before and after photoirradiation, photoirradiation: 340 nm, 0 °C

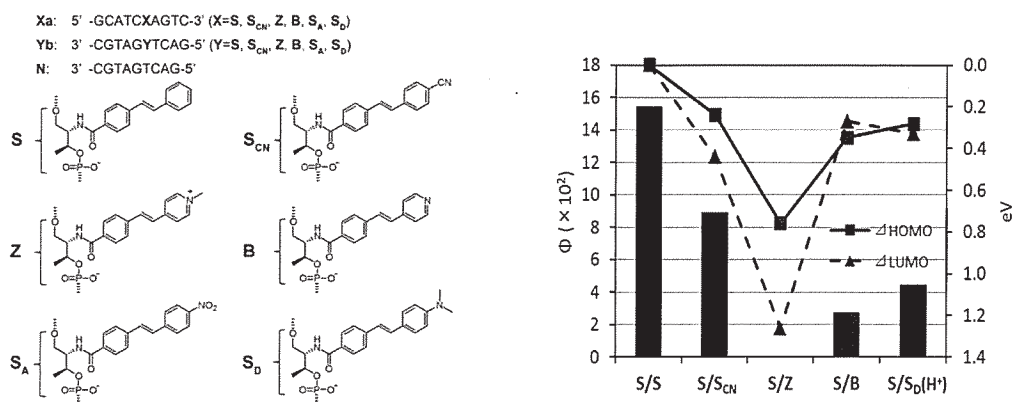
### 第 5 章 DNA 二重鎖を反応場として利用したスチルベン誘導体の光二量化反応性解析

第 5 章では、DNA 二重鎖を足場として利用することで、様々なスチルベン誘導体の [2+2] 光環化付加反応の反応性を解析することを目指した。第 4 章で述べたように、DNA 二重鎖内において、stilbazole 類の光環化付加反応が非常に高い選択性で進行することが明らかになった。このことより、DNA を反応場として利用することで、様々なスチルベン誘導体の光環化付加反応性が解析できると考えた。スチルベン誘導体の光二量化反応性を系統的に解析することは困難であり、これまでそのような報告はなされていない。一方で、様々なスチルベン誘導体の反応性が明らかになれば、波長や反応性制御の観点から、光反応性疑似塩基対開発を行う上で有用であるといえる。そこで第 5 章では、様々なスチルベン誘導体の光環化付加反応性、特にこれまで全く報告がなかった異なるスチルベン誘導体間の交差光環化付加の反応性についても検討を行った (Fig.7)。



**Figure 7.** Schematic illustration of hetero-photodimerization using DNA duplex as a scaffold.

DNA 鎖中に様々なスチルベン誘導体を導入することで、二重鎖内において任意のスチルベンのペアを調製した (Fig.8 left)。各 DNA 二重鎖に対し光照射を行った際の反応性を評価した。結果、同じ誘導体間のホモ二量化反応においては、反応性と一重項励起エネルギーとの間に相関が見られた。さらに、交差光二量化反応においては、異なる誘導体間のフロンティア軌道のエネルギー差と良い相関が見られた (Fig.8 right)。このように、DNA 二重鎖を反応場として利用することで、様々なスチルベン誘導体の光二量化反応性と、反応性の決定因子が明らかになった。これらの結果は、光反応型疑似塩基対を設計するために利用できるだけでなく、光化学的にも有用な知見であると考えられる。



**Figure 8.** Quantum yields of photodimerizations of **Sa/Xb** duplexes (bar graph), and energy gaps of HOMO or LUMO.