

論文の内容の要旨

論文題目 **Control of Higher-Order Structure Formation of DNAs and Metal
Assembly with Pyridine-Bearing Artificial Nucleosides**
(ピリジン型人工 DNA を用いた DNA の高次構造制御と金属イオンの集積化)

氏 名 山 田 泰 之

DNA は遺伝情報の貯蔵・伝達を担う生体高分子である。その遺伝情報は、ビルディングブロックであるヌクレオチドの配列として DNA 高次構造内に記述されている。これらの高次構造形成の基本原理は、核酸塩基間の水素結合、および塩基対間のスタッキング相互作用であることが知られている。一方、遷移金属錯体は d 電子に由来する融通性のある電子状態をもち、その多様な電子配置に由来する興味深い物性を有している。本研究では、DNA 高次構造形成の基本原理の一つである核酸塩基間の水素結合を、ピリジン型人工核酸塩基を利用して「金属配位結合」に置き換えることを考えた。DNA はヌクレオチドを逐次的に縮合・伸長させることにより、任意の長さや配列を持つシーケンスを合成することが可能であるため、この金属配位型人工核酸塩基を DNA シ

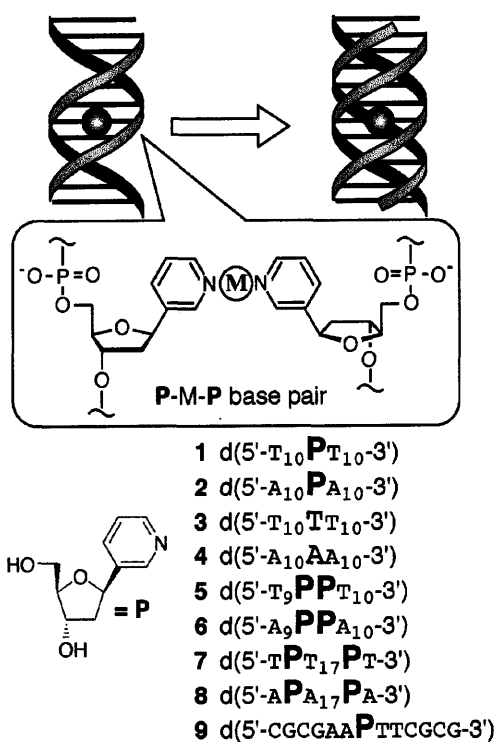
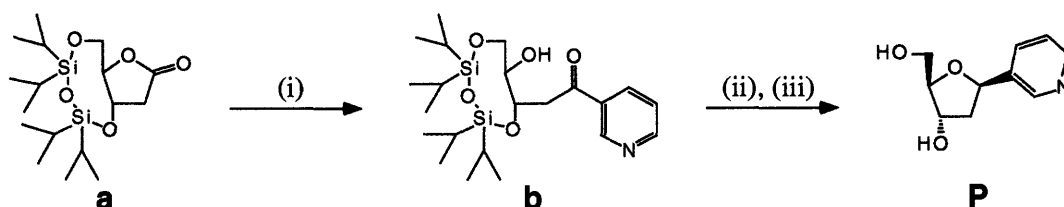


Fig. 1

ークエンス中へ導入することにより、金属錯形成により二重鎖や三重鎖等の高次構造を形成する人工 DNA の構築が期待できる。さらに、導入する人工ヌクレオチドの位置および数により、多彩な金属イオン集積体の構築が期待できる。筆者は、ピリジン型ヌクレオシド **P** を用いて、金属イオンによる人工 DNA 二重鎖および三重鎖構造の熱的安定性の制御、および人工 DNA 内部への金属イオンの集積化について検討した (Fig. 1)。

【ピリジン型人工核酸塩基対の DNA 二重鎖への導入】

2-デオキシ-D-リボースより誘導したリボノラクトン **a** に、3-リチオピリジンを付加することにより化合物 **b** を得た。続いて化合物 **b** の 1'位を $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を用いて還元的に閉環し、脱保護を経て、目的とする β 型のピリジン型人工ヌクレオシド **P** を合成した (Scheme 1)。



Scheme 1. (i) 3-bromopyridine (1 equiv), *n*BuLi (1 equiv), Et_2O , -78°C , 2 h, 59%; (ii) Et_3SiH (5 equiv), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (5 equiv), CH_2Cl_2 , -50°C , 40 h, 19%; (iii) *n*Bu₄NF (3 equiv), THF, room temperature, 1.1 h, 88%.

DNA 自動合成機を用いて、ホスホロアミダイト法により、ピリジン型人工ヌクレオシド **P** を導入したオリゴヌクレオチド **1-9** を合成し、金属錯形成による人工 DNA 二重鎖の熱的安定性の変化について検討した。ピリジン型ヌクレオチドを 21mer のシーケンスの中心に導入した二重鎖 **1·2** に対して Ag^+ イオンを加えた融解実験を UV 吸収スペクトル測定により行った。人工 DNA 二重鎖に対して Ag^+ イオンを添加していくと、 Ag^+ イオンの濃度の上昇にともなって融解曲線は徐々に高温側にシフトし、3 当量の Ag^+ イオンを加えた状態で T_m は 41.0°C となった。これに対して、天然型 A-T 二重鎖 **3·4** では、 Ag^+ イオンを添加しても、二重鎖の安定性はほとんど変化しなかった (Fig. 2)。さらに、人工 DNA **9** を用いた $^1\text{H-NMR}$ ス

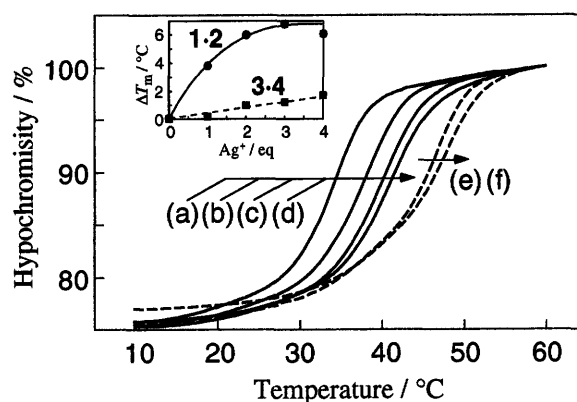


Fig. 2 UV-melting curves ($\lambda = 260 \text{ nm}$) of the duplexes **1·2** (a-d) and **3·4** (e, f) with different concentrations of AgNO_3 , $[\mathbf{1}\cdot\mathbf{2}] = [\mathbf{3}\cdot\mathbf{4}] = 1.2 \mu\text{M}$ in 10 mM Mops, 100 mM NaNO_3 , pH 7.0 with $[\text{Ag}^+] = (\text{a}), (\text{e}) 0 \mu\text{M}$, (b) $1.2 \mu\text{M}$, (c) $2.4 \mu\text{M}$, and (d), (f) $3.6 \mu\text{M}$. Inset, effect of Ag^+ concentration on ΔT_m .

ベクトル測定の結果により、DNA **9** の自己相補型二重鎖 (**9-9**) の形成がピリジンと Ag^+ イオンとの錯形成により誘起されることが明らかになった。以上の結果により、ピリジン型塩基対を含む人工 DNA 二重鎖に Ag^+ イオンを添加すると、**P-Ag⁺-P** 直線型塩基対が形成されて二重鎖が安定化されることが分かった。また、添加する金属イオンとして、 Ni^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Hg^+ イオンについてもそれぞれ人工 DNA 二重鎖 **1-2** の融解温度に及ぼす影響を検討したが、融解温度はほとんど変化しなかった ($|\Delta T_m| < 0.6^\circ\text{C}$)。したがって、ピリジン型人工 DNA 二重鎖 **1-2** の安定化は Ag^+ イオンに特異的に起こることが明らかになった。

DNA の大きな特徴の一つに、任意の配列を持つシーケンスを合成する手法が確立されている点あげられる。二重鎖 **1-2**、**3-4** に加えて、中央に 2 つのピリジン型塩基対を含む二重鎖 **5-6** と両端に 2 つのピリジン型塩基対を含む二重鎖 **7-8** を合成し、それぞれピリジン型塩基対に対して等量の Ag^+ イオンを加えた融解実験を行った。この結果、ピリジン型塩基対を導入したいずれの二重鎖においても Ag^+ イオンの添

duplex	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$
1-2	+3.8
3-4	+0.2
5-6	+6.8
7-8	+2.0

Table 1. ΔT_m values of various DNA duplexes.

加により融解温度が上昇し、**P-Ag⁺-P** 型塩基対の形成が示唆された (**Table 1**)。このように、DNA 合成の手法を用いれば、位置及び数を制御した人工核酸塩基対の配列化が可能である。

【ピリジン型人工核酸塩基対の DNA 三重鎖への導入】

ピリジン型人工ヌクレオシド **P** をシーケンスの中央に導入したホモチミンオリゴマー **1** およびホモアデニンオリゴマー **2** からなる人工 DNA 三重鎖 **1-2-1** に Ag^+ イオンを加えた融解実験を行ったところ、二段階の融解プロセスを示す融解曲線が得られた。

人工 DNA 三重鎖 **1-2-1** に対して 1 当量の Ag^+ イオンを添加することにより、三重鎖から二重鎖への解離温度 (T_{m1}) は 2.3 $^\circ\text{C}$ 上昇し、二重鎖から一

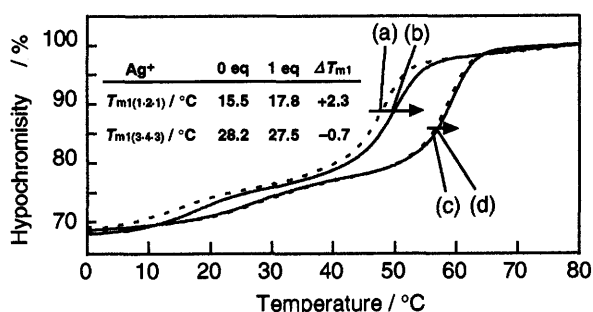


Fig. 3 UV-melting curves ($\lambda = 260 \text{ nm}$) of the triplexes **1-2-1** (a, b) and **3-4-3** (c, d), [triple] = 1.2 μM in 10 mM Mops, 100 mM NaNO_3 , pH 7.0 with $[\text{Ag}^+] =$ (a), (c) 0 μM , (b), (d) 1.2 μM .

本鎖への解離温度 (T_{m2}) も同様に 2.2 $^\circ\text{C}$ 上昇した。一方、天然の核酸塩基のみからなる三重鎖 **3-4-3** は Ag^+ イオンによる安定化の効果はほとんど見られなかった (**Fig. 3**)。この結果は、人工 DNA 二重鎖 **1-2** の場合と同様に人工 DNA 三重鎖 **1-2-1** においても、 Ag^+ イ

オンがピリジン部位との錯形成により塩基対を形成して三重鎖構造が安定化されたためであると考えられる。これらの結果より、ピリジン型人工ヌクレオシド **P** を導入した DNA 三重鎖の熱的安定性は、 Ag^+ イオンの添加という外部刺激によって制御できることが明らかになった。

【人工 DNA を用いた金属イオンの集積化】

二核の隣接したピリジン型人工核酸塩基対の構造について詳細に検討するとともに、より一般的な金属イオンの集積化法の開発を目指して、天然の核酸塩基を含まない完全人工型 DNA **10** (Fig. 4) を用いた金属イオンの集積化について検討した。過塩素酸水銀(II) を **10** に対して徐々に添加していき、水銀二核錯体 $10 \cdot 2\text{Hg}^{2+}$ (Fig. 4) の形成を UV スペクトル測定により追跡した。その結果、ピリジン部位の $\pi - \pi^*$ 遷移に由来する 260 nm における吸収帯の吸光度は、**10** に対して 2 当量の Hg^{2+} イオンを添加するまで等吸収点を通りながら直線的に変化した (Fig. 5)。この結果により、人工 DNA **10** のピリジン部位は Hg^{2+} イオンと $\text{P-Hg}^{2+}\text{-P}$ 直線型錯体を形成していることがわかった。また、 $^1\text{H-NMR}$ 滴定実験および ESI-TOF MS スペクトル測定の結果から、 $10 \cdot 2\text{Hg}^{2+}$ の形成を示唆する結果が得られた。このように、ピリジン型人工 DNA を用いれば、DNA 二重鎖内に Hg^{2+} イオンのようなカチオンを集積化できることが明らかになった。

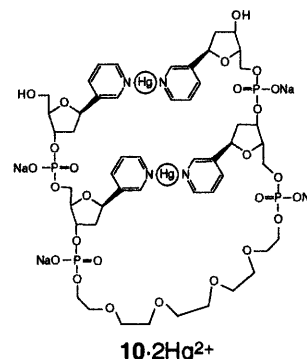


Fig. 4

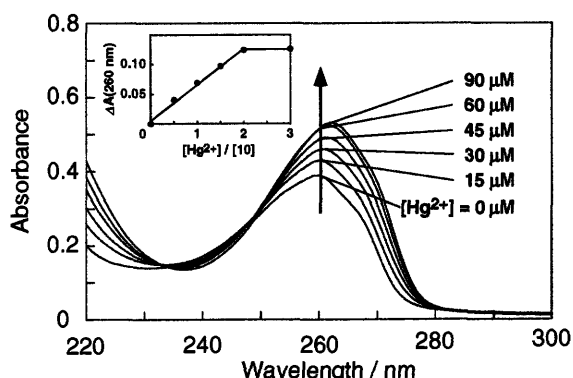


Fig. 5 Effect of Hg^{2+} ions on UV absorption of **10**. $[\mathbf{10}] = 30 \mu\text{M}$ in H_2O . Inset, effect of Hg^{2+} ion concentration on absorption of **10** at 260 nm.

【結論】

筆者は、核酸塩基としてピリジン型人工ヌクレオシド **P** を導入した人工 DNA を合成し、これらの人工 DNA の二重鎖構造や三重鎖構造といった DNA 高次構造の熱的安定性を、 Ag^+ イオンと人工 DNA のピリジン部位との錯形成によって制御できることを明らかにした。さらに、ピリジン型人工塩基対を利用すれば、 Ag^+ イオンや Hg^{2+} イオンのようなカチオンを DNA 内部に集積化できることを明らかにした。このように金属錯体を位置および数を制御して配列化できる手法は他に類をみない。今後、ピリジン型人工 DNA を用いた更なる DNA 高次構造の構築および金属イオンの集積化に展開したい。