

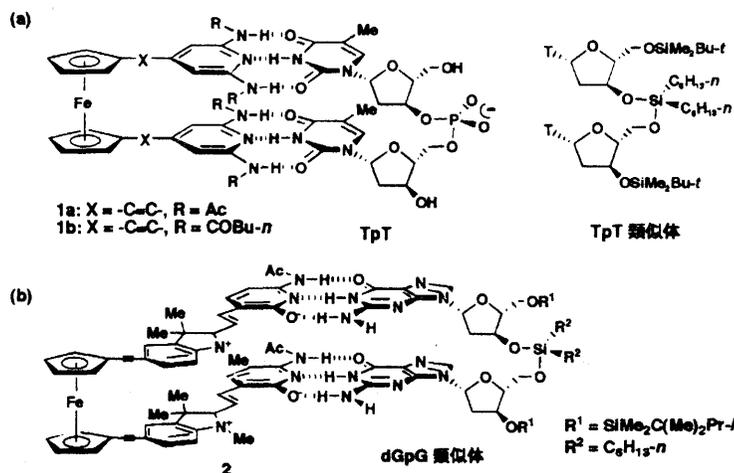
氏 名 たか せ まさ よし
 高 瀬 雅 祥
 学位(専攻分野) 博 士 (理 学)
 学位記番号 理 博 第 2637 号
 学位授与の日付 平 成 15 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
 研究科・専攻 理 学 研 究 科 化 学 専 攻
 学位論文題目 Molecular Recognition Abilities of Ferrocene-Modified Multitopic Receptors
 (フェロセンで修飾された多官能性レセプターの分子認識能)
 (主 査)
 論文調査委員 教 授 大 須 賀 篤 弘 教 授 林 民 生 教 授 時 任 宣 博

論 文 内 容 の 要 旨

ジヌクレオチド等の複数の核酸塩基を有する基質を、水素結合などの非共有結合性相互作用を用いて効果的に認識する人工レセプターの開発を行った。その際重要になるのは、レセプター分子の会合時におけるエントロピー損失をいかにして低減させるかである。そこで申請者は、フェロセンなどの、適度な自由度を持ちながらも明瞭な幾何学的構造を持つ分子を連結部位に用いることで、この課題に取り組んだ。本論文において、一連のレセプター分子の設計と合成、および天然のジヌクレオチドに対する認識能等の機能評価についての研究成果を報告した。

フェロセンは、2つのシクロペンタジエニル(Cp)環の距離(0.33nm)がDNA二重らせん中の核酸塩基間距離(0.35nm)とほぼ等しく、そのコンフォメーション変化がCp環の平行を保ったままでの自由回転のみに限られる。このことは、ジヌクレオチドなどの2つの認識箇所を必要とする分子に対する人工レセプターを開発する上で、非常に重要な役割を果たすと予想される。そこで申請者は、フェロセンを連結部位に用いた二官能性人工レセプターを新たに設計・合成した(Scheme 1a)。有機溶媒に可溶性 TpT 類似体を用いて、合成した人工レセプターの認識能を評価した結果、非常に強力にジヌクレオチドの核酸塩基部位と相互作用することを見出した。(クロロホルム中での 1a と TpT 類似体との会合定数: $K_a = 1.2 \times 10^5 \text{M}^{-1}$)。この値は、一つしか認識部位を持たない人工レセプターによる認識能と比べて、自由エネルギー変化にして約1.7倍であり、認識箇所の二官能基化に伴う人工レセプターのエントロピー損失が非常に少ないことを示している。同様に、明瞭な幾何学的構造を持つ多核芳香環を連結部位に用いた人工レセプターの合成も行い、会合能を比較した。このうち、天然の核酸塩基間距離にほぼ等しい距離を保っているビフェニレンを連結部位に用いた人工レセプターが、最も強く TpT 類似体と会合することが分かった。次に、天然のジヌクレオチド(TpT)との会合について、固一液抽出実験を用い

Scheme 1



て検討した。18-クラウン-6エーテル存在下，人工レセプター 1b のクロロホルム溶液に TpT を加えたところ，その可溶化が確認された。¹H NMR により見積もられたその抽出率は，人工レセプターに対してほぼ100%であった。また，その選択性について検討すべく，モノヌクレオチド，および数種のジヌクレオチド共存下で抽出実験を行ったところ，選択的に TpT のみを可溶化することが確認された。これらの事実は，この人工レセプターが，ジヌクレオチドの分離・精製を行うための分子材料として有用であることを示している。

人工レセプターの連結部位としてのフェロセンの優位性に基づき，二官能基化させた情報発信型の人工レセプターの開発を検討した。これまでも，認識に伴ってその構造変化が誘起され，認識現象を色の変化で視覚的に読み取ることができる人工レセプターはいくつか報告されている。しかしながら，情報発信分子を規定された空間に複数個配置させた人工レセプターの報告例はなかった。そこで申請者は，グアニン塩基と相補的に水素結合が可能なスピロピラン誘導体をフェロセンに連結させた二官能性レセプター 2 の開発を行った (Scheme 1b)。2 のクロロホルム溶液中に，有機溶媒に可溶性な dGpG 類似体を加えることにより，溶液の色が薄いピンク色から濃いワインレッド色へと変化した。この事実は，2 が dGpG 類似体を認識することによって，スピロピラン構造がメロシアニン構造へと異性化したことを示唆している。また，TpT 類似体や dApA 類似体等，他のジヌクレオチド類似体の存在下ではこの変化は見られず，dGpG 類似体に対してのみ特異的な認識が起きることが明らかとなった。

申請者は，フェロセンで修飾した人工レセプターの，電気化学的特性を利用した修飾オリゴヌクレオチドの開発も行った。ヒトゲノムのドラフトシーケンスの完了により，SNP (一塩基多型) 診断などの DNA 診断をより一般化させる方法が必要に迫られている。このためには，より簡便で迅速，さらには高感度に DNA を検出する手法を開発する必要がある。そこで，フェロセンで修飾した人工レセプターを応用し，ターゲット DNA を検出することを目的とした DNA プローブの開発を行った (Scheme 2)。この DNA プローブは，電気化学的に活性なフェロセン部位を有している

ため，電気化学的手法を用いて，簡便で迅速な DNA の検出が可能になると考えた。DNA 自動合成機を用いて，DNA の 5' 末端にはフェロセンで修飾した核酸塩基認識部位を連結させ，3' 末端には金電極に固定化させるためのチオール基を連結させた。この DNA プローブを金電極表面に固定化させ，目的とする電極を作成した。20 μ mol/ μ l の DNA プローブ溶液を用いて電極表面を修飾し，微分パルスボルタンメトリー法を用いた測定を行ったところ，DNA プローブのみではほんのわずかな電気化学的レスポンスしか検出されなかった。しかしながら，ターゲット DNA を DNA プローブにハイブリダイゼーションさせた後には，フェロセン部位の酸化電位に由来する特徴的な電気化学的レスポンスが確認できた。これは，DNA プローブがターゲット DNA と二本鎖を形成することによって核酸塩基間に重なりが生じ，そこを介してフェロセン部位から電子が流れ，電気化学的なレスポンスが観測されたものだと考えられる。

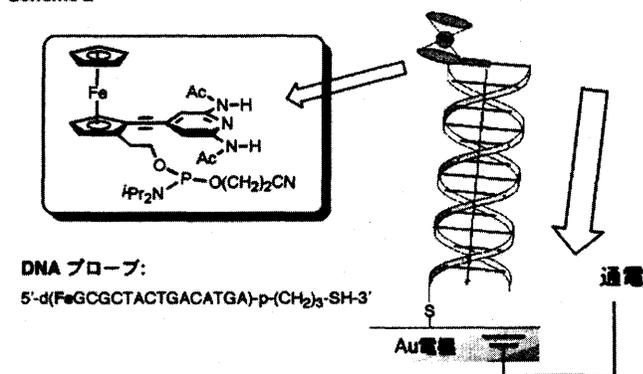
以上，フェロセンを連結部位に用いた種々のレセプターに関するこれらの研究は，単に有機化学な視点において画期的な成果を得たというのみならず，分子生物学や生化学，また，遺伝子科学への応用が期待され得るという点で，意義は大きい。

論文審査の結果の要旨

本論文において申請者は，ジヌクレオチド等の複数の核酸塩基を有する基質を，水素結合などの非共有結合性相互作用を用いて効果的に認識する人工レセプターの開発を行った。その際重要になるのは，レセプター分子の会合時におけるエントロピー損失をいかにして低減させるかである。そこで申請者は，フェロセンなどの，適度な自由度を持ちながらも明瞭な幾何学的構造を持つ分子を連結部位に用いることで，この課題に取り組んだ。本論文において，一連のレセプター分子の設計と合成，および天然のジヌクレオチドに対する認識能等の機能評価についての研究成果を報告した。

フェロセンは，2つのシクロペンタジエニル (Cp) 環の距離 (0.33nm) が DNA 二重らせん中の核酸塩基間距離

Scheme 2



(0.35nm) とほぼ等しく、そのコンフォメーション変化が Cp 環の平行を保ったままでの自由回転のみに限られる。このことは、ジヌクレオチドなどの2つの認識箇所を必要とする分子に対する人工レセプターを開発する上で、非常に重要な役割を果たすと予想される。そこで申請者は、フェロセンを連結部位に用いた二官能性人工レセプターを新たに設計・合成した。有機溶媒に可溶性 TpT 類似体を用いて、合成した人工レセプターの認識能を評価した結果、非常に強力にジヌクレオチドの核酸塩基部位と相互作用することを見出した。天然のジヌクレオチド (TpT) との会合については、固一液抽出実験を用いて検討した。人工レセプターのクロロホルム溶液に TpT 等のヌクレオチドを加え評価した結果、この人工レセプターが、TpT の分離・精製を行うための分子材料として有用であることを明らかにした。

人工レセプターの連結部位としてのフェロセンの優位性に基づき、二官能基化させた情報発信型の人工レセプターの開発を検討した。申請者は、グアニン塩基と相補的に水素結合が可能なスピロピラン誘導体をフェロセンに連結させた二官能性レセプターを合成した。この人工レセプターのクロロホルム溶液に、有機溶媒に可溶性 dGpG 類似体を加えたときのみ、選択的に溶液の色が薄いピンク色から濃いワインレッド色へと変化することを見出した。

また、それまでのレセプターの基本特性を利用し、電気化学的にターゲット DNA を検出する新規な DNA プローブの開発も検討した。フェロセンで修飾した核酸塩基認識部位を DNA の 5' 末端に連結させ、3' 末端には金電極に固定化させるためのチオール基を連結させた。この DNA プローブを金電極表面に固定化させ、目的とする電極を作成した。この電極を用い微分パルスボルタメトリー法を用いた測定を行ったところ、DNA プローブのみではほんのわずかな電気化学的レスポンスしか検出されなかった。しかしながら、ターゲット DNA を DNA プローブにハイブリダイゼーションさせた後には、フェロセン部位の酸化電位に由来する特徴的な電気化学的レスポンスが確認でき、新規な DNA 検出システムとなり得る可能性を示唆した。

以上のように、申請者はフェロセンで修飾した一連の人工レセプターの開発を行い、ジヌクレオチドに対する特異的認識とそれに基づいた様々な機能を評価した。さらには DNA プローブへの応用を展開させた。これらの業績は高く評価できる。よって申請者の研究は、博士(理学)の称号に値するものであることを認める。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野に試問した結果、合格と認めた。