

蛍光性や触媒機能を有する機能性核酸の開発

Development of Functionalized DNA as Fluorescent Probes and Catalysts

朴 昭映

京都大学大学院理学研究科

Soyoung Park

Graduate School of Science, Kyoto University

Functionalized DNA has been received much attention as versatile tools for chemical biology. Here, we introduce our research projects with DNA focusing on two applications: (1) Fluorescent nucleoside analogues to investigate higher order structure of DNA and (2) DNA-based hybrid catalysts for asymmetric synthesis.

1. はじめに

地球上のほぼ全ての生物は生命を維持・継承するために必要な情報をデオキシリボ核酸 (DNA) と呼ばれる生体高分子に保存している。DNA の構成要素のひとつである核酸塩基はアデニン・チミン・グアニン・シトシン (A・T・G・C) の4種類からなり、その配列により膨大な情報を記録している。また、A と T, G と C がそれぞれ水素結合を介して相補的に塩基対を形成することでDNA はユニークならせん構造を形成し、熱力学的に高い安定性を持つ (図1)。このようなDNA の性質はナノ空間を創造・制御する重要な始発点であり、今やDNA ナノテクノロジーと呼ばれる分野の研究が活発に行われている。著者が属している生物化学研究室では、遺伝物質としてDNA の構造や機能発現に関する研究を行うとともに、有用な機能を有する機能性核酸の開発に取り込んでいる。例えば、核酸塩基に蛍光性を付与した蛍光核酸類縁体を開発し、生体分子間の相互作用やそのふるまいを調べる蛍光プローブとしての応用を目指している。また、DNA が持つらせん不斉に着目し、DNA を反応場とする不斉反応を開拓している。本研究ノートでは、我々の研究室で行なっている機能性核酸研究について、特に蛍光性ヌクレオシドとDNA ハイブリッド触媒に関して最新の研究成果を紹介したい。

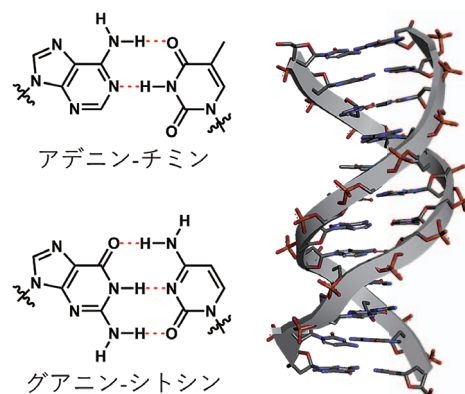


図1. 塩基対の構造, 及びそれにより形成されるDNA の二重らせん構造。

2. 蛍光性核酸とDNAにおける構造変化の可視化

1969年 Stryer らは核酸塩基に類似した化合物である2-Aminopurine (2AP) と糖が結合した化合物 (ヌクレオシド) の蛍光特性が、周囲の環境に応じて鋭敏に変化することを見いだした [1]. 2AP は二本鎖DNA 中においては隣接塩基との相互作用により消光するが、一本鎖となった場合

や、タンパク質との相互作用により二本鎖の外側へとフリップアウトした場合は蛍光強度が増加する。さらに、2APは天然のアデニンと比較して構造と酵素に対する反応性の両方において類似している。以上の性質から、2APはDNAやDNA-タンパク複合体の構造変化を可視化するため幅広く使用されてきた。他にも多種多様な蛍光性ヌクレオシドの開発が進み、2011年にはTorらにより、チオフェン骨格を有する蛍光性RNAが開発された[2]。我々は同様のチオフェン骨格を有する蛍光DNAを合成し、応用研究を行っている。一例として、チエノ[3,4-d]ピリミジン骨格を有するデオキシグアノシン類縁体、^hdGを合成し、DNAのB型-Z型コンホメーション変化を蛍光で可視化することに成功している。

二本鎖DNAは通常、右巻きのB型構造をとる。しかし、GC繰り返し配列を持つDNAは、高塩濃度条件化や特定のタンパク質存在下においては左巻きのZ型構造をとることが知られている(図2)。WatsonとCrickによりDNAは右巻きの二重らせん構造をとることが提唱されたことは余りにも有名だが、初めて得られたDNAの結晶はZ型構造であることはあまり知られていない[3]。Z-DNAに関しては、構造や特異的な結合タンパク等は明らかにされたが、生物学的な機能は未だに分からないことが多い。そのためB型-Z型コンホメーション変化を可視化するツールの開発は重要な研究の一つである。B型DNAとZ型DNAの構造を比較すると塩基の重なり方が大きく異なる。

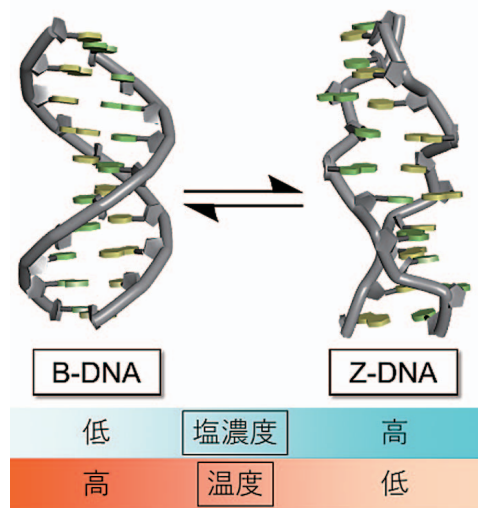


図2. B型DNAとZ型DNA.

すなわち、B型ではそれぞれの一本鎖DNAにおいて連続的な π スタックを形成しているが、Z型では四塩基スタックが不連続に形成される。この特徴に着目して、我々はZ-DNAの蛍光検出法を開発することに成功した[4]。Z-DNAはGC繰り返し配列において形成されるため、GあるいはCに類似した構造をもつ蛍光性ヌクレオシドの使用が望まれる。我々は450 nm周辺に蛍光を持つグアニン類縁体、^hdGを用いた系を開発した[5]。^hdGを組み込んだDNAを合成し、様々な条件化において円二色性偏光(CD)スペクトルと蛍光スペクトルを測定した(図3)。

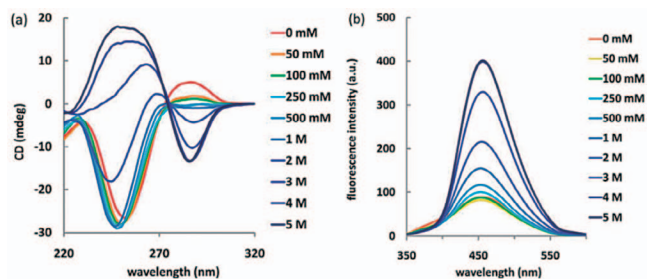


図3. 様々な濃度(0-5 M)のNaClO₄を含む溶液の(a) CDスペクトルと(b) 蛍光スペクトル。(c) 塩濃度が5 M(左), 50 mM(右)のDNA溶液にUV照射した際の写真。

通常、DNAの高次構造はCDスペクトルにより評価する。Z-DNAは295 nm付近に負のコットン効果、260 nm付近に正のコットン効果を示す(図2a, 青)。それに対してB型はほぼx軸対称なスペクトルとなる(図2a, 赤)。^hdGを組み込んだDNAを用いて塩濃度依存性を調べたところ、NaClO₄の濃度上昇に従って、CDスペクトルはZ-DNAの形成を明らかに示した。それに伴い^hdGの蛍光強度が上昇した。NaClO₄の濃度が0 mMから5 MにかけてB型からZ型への変化が完全に進行したと見られ、その過程において^hdGの蛍光強度は4倍程度増加している。次に我々はこ

の DNA の温度変化に対する挙動を調べるために 5-40 °C においてスペクトル測定を行った (図 4). 低温では Z 型が, 高温では B 型が優勢となるため, 図で示したような蛍光強度の変化が見られた. この変化は可逆的かつ繰り返し観察することが可能であった [6]. さらに, B 型と Z 型の变化は温度依存的に起こるため, 温度変化をモニターするナノデバイスとしての応用も試みた [6].

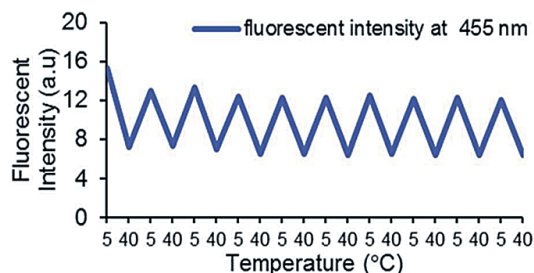


図 4. 温度変化に対する ¹²⁵dG を組み込んだ DNA の蛍光強度変化

3. 蛍光ヌクレオシドを用いた FRET 系の開発

フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, 略して FRET) とは励起したドナーのエネルギーがアクセプターへと無輻射で移動する物理現象である (図 5) [7]. これはドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸光スペクトルに重なりがある, かつ両者が近接している場合に起こる. このエネルギー移動の効率 (FRET 効率) は, ドナー・アクセプター間の距離の 6 乗に反比例するため, FRET はナノスケールの定規として生体分子の構造・動力学解析に用いられてきた [8]. 核酸において FRET を観察した研究も報告されているが, 多くの系において蛍光分子は柔軟なリンカーを通して導入されている. そのような系とは異なり, 蛍光分子の回転が制限されている場合, FRET 効率は距離のみならず配向にも依存する. 核酸における配向依存的な FRET 系は 2009 年に Wilhelmsson らにより報告されて以来いくつかの例がある [9]. それらにおいて, 蛍光分子は水素結合による塩基対形成や隣接塩基との π - π スタッキング相互作用により, その位置及び向きが固定されている. そのため一般的な FRET 系には見られない配向依存性を獲得しているのである.

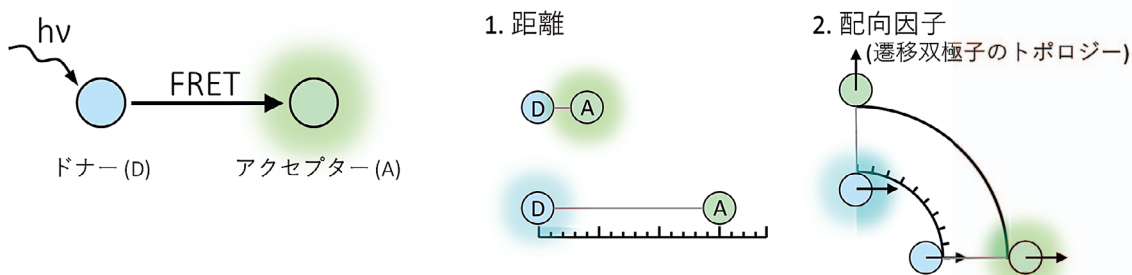


図 5. FRET, 及び FRET 効率と距離・配向因子の関係を表す模式図

我々は先に述べた ¹²⁵dG をドナー, tC をアクセプターとした FRET 系を構築した [10]. ¹²⁵dG は 450 nm 周辺に蛍光を, tC は 400 nm 周辺に吸光を持つ. それぞれを組み込んだ一本鎖 DNA を組み合わせることでドナー・アクセプター間の塩基対数 n が異なる二本鎖 DNA を調製した. それらに対してドナーの蛍光スペクトルと蛍光寿命を測定することで, 図 6 に示した式から FRET 効率を得た. 配向非依存的な FRET 系においては n に対して FRET 効率が単調に減少するが, 我々の系では 25 Å 付近で局所的な増減が見られ, 配向依存性を明らかに示す結果となった. その後, ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸光スペクトルとの重なりや, 各蛍光塩基の遷移双極子等を計算することで FRET 効率の理論値を得た. 実験値と理論値は同様の傾向を示したものの, 高い一致は見られなかった (図 7). これに関しては, ¹²⁵dG と tC の導入が二本鎖 DNA の構造にゆがみをもたらしたた

めだと考えている。さらに、この系はドナーとアクセプターの蛍光スペクトルには重なりがあるため FRET 効率の実験値の算出が煩雑だという欠点も抱えている。この問題を解決すべく、我々は蛍光スペクトルが短波長シフトした蛍光ヌクレオシドの開発に取り組み、現在新たな FRET 系の構築に取り組んでいる [11]。

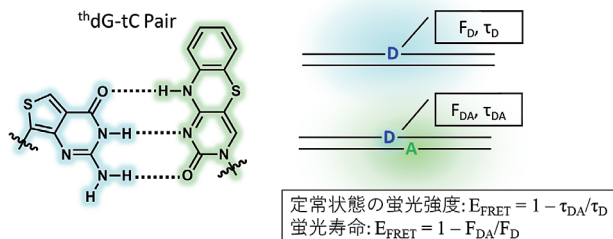


図 6. thdG-tC ペアの構造、及び FRET 効率の実験値の算出方法。

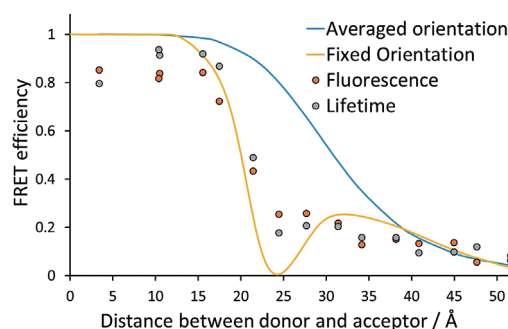


図 7. FRET 効率の実験値と理論値の比較。配向非依存系での理論値(青)、配向依存系での理論値(黄)、蛍光強度に基づく実験値(橙)、蛍光寿命に基づく実験値(灰)。

4. DNA ハイブリッド触媒

らせん DNA を不斉触媒として用いる概念は、2005 年 Roelfes と Feringa により初めて報告された [12]。これは超分子集合型 DNA ハイブリッド触媒と呼ばれ、触媒能をもつ金属-配位子複合体と不斉源としてらせん構造をもつ天然 DNA を組み合わせたものである。DNA ハイブリッド触媒は以下の利点を持つ。(1) 安価で調製が容易である。(2) 水中で反応が進むため環境への負荷が少ないグリーンケミストリーである。(3) DNA は右巻き二重らせん以外の多様な三次構造を構築できる。(4) RNA やタンパク質と比べ、熱的・化学的に安定であり扱いやすい。これらの特徴を持つ DNA ハイブリッド触媒系は、 α 、 β -不飽和 2-アシルイミダゾールを基質とした Diels-Alder 反応や Michael 付加反応、Friedel-Crafts 反応など様々な炭素-炭素結合反応で 90 % ee 以上の高いエナンチオ選択性で生成物を与えることが報告されてきた。当研究室では分子モデリング研究で不斉発現メカニズムを説明するため、分子間反応よりコンホメーションの自由度の少ない分子内反応に着目し、DNA ハイブリッド触媒による分子内不斉 Friedel-Crafts アルキル化反応を開発した。また、分子力場計算法を用いて金属配位子-DNA 複合体と主生成物のエナンチオマーの docking モデルを構築した後、構造のエネルギー最小化を行うことにより DNA のリン酸骨格から生じる立体障害が生成物のエナンチオ選択性に大きく影響している可能性を提案した(図 8)。

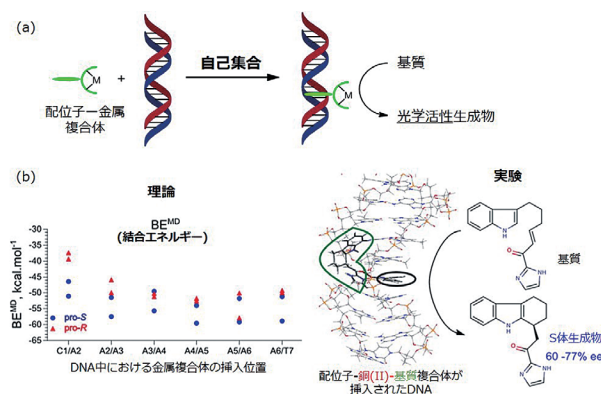


図 8. (a) 超分子集合型 DNA ハイブリッド触媒の模式図。(b) エネルギー最小化を行った結合エネルギー (BE^{MD}) と実験結果。S 体が優先的に生成した実験結果に一致する、反応中間体での基質-触媒間の安定化が算出された。

5. 自動固相 DNA 合成法を用いた modular DNA ハイブリッド触媒の開発

従来の超分子集合型 DNA ハイブリッド触媒は、金属-配位子錯体を DNA の水溶液にただ混

合するだけで簡単に作製できるという利点を持つものの、導入した配位子が DNA のあらゆる場所に結合するため、結合部位を厳密に制御することは困難である。これに対して、共有結合で配位子を導入する方法 (covalent anchoring strategy) では、DNA 固相合成法によって DNA の塩基配列の任意の箇所に配位部位を導入

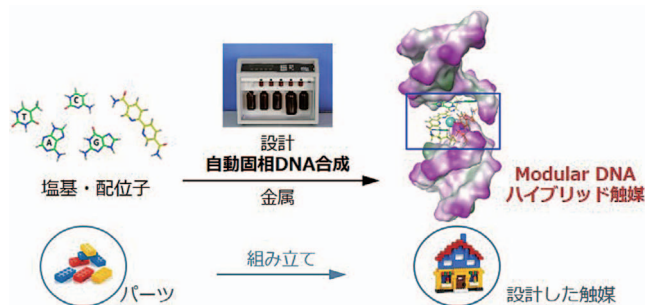


図 9. Modular DNA ハイブリッド触媒の模式図.

入できることから、活性点及びその周辺環境をより精密に制御することが可能になる (図 9). 我々は DNA 骨格にリン酸エステル結合を介してビピリジン配位子を導入する方法を確立し、modular DNA ハイブリッド触媒を開発している. 図 9 で示した modular DNA ハイブリッド触媒を用いることにより分子内 Friedel-Crafts アルキル化反応において多環インドール誘導体を良好な選択性で (up to 86% ee) 得ることに成功した. また、反応メカニズムの研究も行い、今まで不明確であった活性部位の DNA 塩基が不斉反応に与える影響も解明することができた [13]. すなわち、ビピリジンの対塩基や隣接塩基によってらせん中の触媒ポケットの形が異なり、エナンチオ選択性及び収率に影響することを明らかにした. 例えば、隣接塩基が GC 対であると触媒ポケットが狭いため、分子内反応や小さな求核剤を用いた反応に適する. 一方、AT 対ではポケットが広く、分子間反応に適する. 他にも、DNA 鎖中の反応場の位置が影響する. 反応場が DNA 鎖の端よりも真ん中にある方が、十分なキラル環境を持つことが分かっている. また、この研究では DNA ハイブリッド触媒において活性化部位を構築する時にシトシン塩基が最も重要であることを示唆する結果が得られた. それに基づき我々は、DNA のリン酸骨格に配位子ではなくオリゴエチレングリコールやアルキルリンカーを導入した DNA ハイブリッド触媒を合成した. 驚くべきことに、不斉 Diels-Alder 反応において右巻きのらせん不斉を保ったまま、既存の DNA ハイブリッド触媒とは逆のエナンチオマーが高選択性 (up to 97% ee) で得られることを確認した. これは、配位子やリンカーなど人工的な官能基を導入することなく二重らせん DNA と金属イオンの相互作用のみで不斉 Diels-Alder 反応が進行することを見出した初めての例であり、タンパク質酵素、RNA 酵素とは異なる新しいタイプの金属酵素として DNA 金属酵素を開発することに成功したことを意味する [14] (図 10).

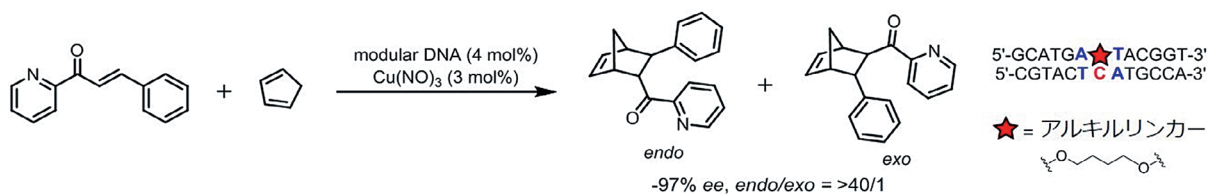


図 10. アルキルリンカーを導入した modular DNA ハイブリッド触媒を用いた不斉 Diels-Alder 反応. (右端に記した modular DNA 触媒の構造中、赤文字で示した C (シトシン) が配位活性部位)

自然界では、様々な加水酵素 (hydratase) が存在しており、温和な条件下で水の付加反応を行うことにより生体内に必要な水和物を合成している. しかし、これらに匹敵する有機金属触媒の開発は非常に難しい挑戦的なテーマである. 近年我々は D-threoninol 骨格を介してビピリジン配位子を導入した modular DNA ハイブリッド触媒を開発し、 α , β -不飽和ケトンの水和反応で 87% という高い選択性で生成物が得られることし成功している. これは、既知の酵素の機能を

DNA で代替できる可能性が示す興味深い結果である [15].

6. おわりに

以上、本稿では機能性核酸研究として蛍光性ヌクレオシドの開発、DNA ハイブリッド触媒とそれを用いた不斉反応について紹介した。蛍光核酸類縁体は DNA のダイナミックな構造変化の検出や DNA-タンパク質の相互作用の検出法にとっても有用なツールとして、現在も優れた光物理的特性を持つプローブの開発が活発に行われている。また、DNA ハイブリッド触媒はグリーンサステナブルケミストリーを目指す不斉触媒として期待されている。生物化学研究室のメンバーは機能性核酸研究領域を大いに発展させるために日々研究生活に取り込んでいる。筆者は本稿を通じて多くの研究者がこの興味深い研究領域に興味を持つことを期待する。

謝辞

本原稿の作成にあたっては、当研究室の修士 2 年平島眞吾、修士 1 年福本こゆきからご協力をいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Stryer, L., *et al. J. Biol. Chem.* **244**, 1228 (1969).
- [2] Tor, Y., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14912 (2011).
- [3] Rich, A., *et al. Nature.* **282**, 680 (1979).
- [4] Sugiyama, H., *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 6018 (2003).
- [5] Park, S., *et al. Chem. Commun.* **50**, 1573 (2014).
- [6] Park, S., *et al. RSC Adv.* **5**, 104601 (2015).
- [7] Förster, T., *J. Biomed. Opt.* **17**, 011002 (2012).
- [8] Medintz, I. L., *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4562 (2006).
- [9] Wilhelmsson, L. M., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4288, (2008).
- [10] Park, S., *et al. Chem. Eur. J.* **23**, 7607 (2017).
- [11] Park, S., *et al. Chem. Eur. J.* **25**, 9913, (2019)
- [12] Roelfes, G. and Feringa, B.L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3230 (2005).
- [13] Park, S., *et al. ACS Catalysis*, **4**, 4070 (2014).
- [14] Park, S., *et al. ACS Catalysis*, **5**, 4708 (2015)..
- [15] Park, S., *et al. Org. Biomol. Chem.*, **17**, 2548 (2019).

著者略歴



朴 昭映 (Soyoung Park)

2005 年韓国科学技術院大学大学院 (KAIST) 化学専攻にて修士課程修了した後日本に来て 2009 年京都大学大学院理学研究科化学専攻にて博士(理学)を取得。

2009 年 4 月から 2010 年 3 月まで京都大学大学院理学研究科にて博士研究員。

2010 年 4 月から 2011 年 12 月まで JSPS 外国人特別研究員。

2012 年 1 月より京都大学大学院理学研究科にて助教に着任し、現在に至る。