

## 活動報告

### MERIT 自主参加型共同研究

シルパ チャンドラン ラジャスリー

理学系研究科化学専攻生物無機化学研究室

#### 期間

---

2021 年 10 月～2022 年 5 月

#### 協力者

---

上智大学理工学部物質生命理工学科 近藤研究室 江口奈津実さん

#### 研究テーマ

---

エテンアデノシン塩基を金属結合部位とした  $\text{Cu}^{\text{II}}$  イオン集積 DNA 二重鎖の構造解析

#### 背景

---

金属イオンをナノスケールで配列させることは、デバイスの小型化などにつながるため、ナノテクノロジーに不可欠な研究である。金属有機構造体 (MOF) をはじめとするボトムアップによる金属集積構造の開発は、エレクトロニクスからバイオナノテクノロジーに至るまで幅広い分野での応用が期待されている。金属イオンのナノスケールでの配列は、適切な有機配位子を設計することにより実現できるため、様々な分子設計や合成戦略が可能である。しかし、金属イオンを配列するための適切な有機配位子の開発は、煩雑な合成工程のために依然として困難なことが多い。

DNA 分子を鋳型とした金属イオンの配列化は、配列や長さをプログラム可能なため、金属ナノワイヤーを構築するシンプルかつ強力な戦略である。DNA 自動合成装置を用いることにより、金属配位子型非天然核酸塩基を DNA 鎖内の任意の位置に組み込むことができる。DNA 二重鎖内部で配位子型核酸塩基が金属イオンに配位して 2:1

錯体を作ること、「金属錯体型人工塩基対」を形成することができる(図1)。所属する塩谷研究室では様々な金属錯体型塩基対を開発し、 $\text{Cu}^{\text{II}}$ 、 $\text{Hg}^{\text{II}}$ 、 $\text{Gd}^{\text{III}}$ などの金属イオンの一次元配列化を実現してきた<sup>[1]</sup>。また、これらの金属錯体型塩基対を利用して、DNA三

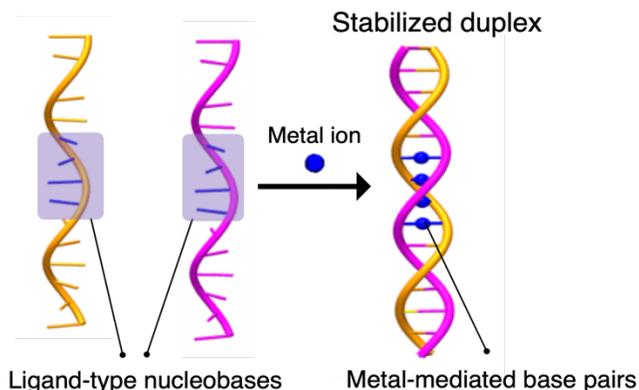


図1. DNA二重鎖内部での金属錯体型塩基対の形成の模式図

叉路分岐構造の安定化<sup>[2]</sup>やアロステリックDNA酵素(DNAzyme)の開発<sup>[3]</sup>など、高度なDNA構造体の構築も行っている。

金属錯体型人工塩基対の初期の研究では、*O,O*-二座配位子であるヒドロキシピリドン(H)などの完全人工核酸塩基が広く利用されてきた<sup>[4]</sup>。しかし、その多段階かつ低収量の合成工程のため、ナノテクノロジーへの応用は限定的であった。人工核酸塩基とは対照的に、修飾核酸塩基は広く研究されており、天然の類縁体から容易に誘導することができるため、金属錯体型塩基対形成の優れた候補となると考えた。そこで私は、修飾核酸塩基を利用して、DNA二重鎖中への金属イオンの集積化に取り組んでいる。今までに、よく知られている損傷塩基である $1,N^6$ -エテンアデノシン( $\epsilon\text{A}$ )を金属結合部位として使い、 $\text{Cu}^{\text{II}}$ イオンをDNA二重鎖内に集積・配列することに成功した。 $\epsilon\text{A}-\epsilon\text{A}$ ペアを含む二重鎖は、 $\text{Cu}^{\text{II}}$ イオンを加えることにより $\epsilon\text{A}-\text{Cu}^{\text{II}}-\epsilon\text{A}$ 塩基対が形成され、熱的に安定化された。そこで私は、 $\epsilon\text{A}-\epsilon\text{A}$ ミスマッチの数を変えたDNA二重鎖を合成し、 $\epsilon\text{A}$ 塩基の数に応じた $\text{Cu}^{\text{II}}$ イオンの定量的な集積化を実現した(図2)<sup>[5-7]</sup>。

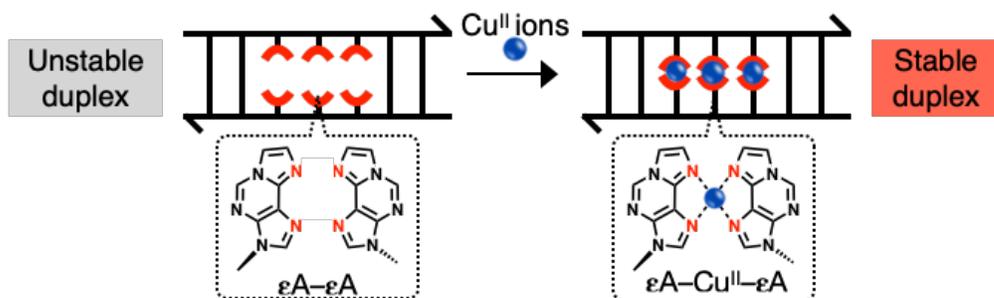


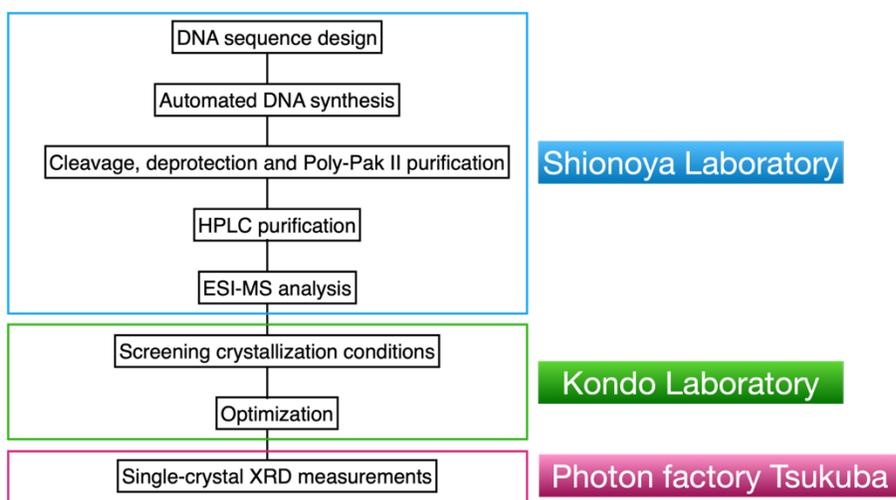
図2.  $1,N^6$ -エテンアデノシン( $\epsilon\text{A}$ )を金属結合部位として用いたDNA二重鎖内への $\text{Cu}^{\text{II}}$ イオンの集積化。

## 課題

このような金属錯体型人工塩基対の構造情報の解明は、これまでの研究のボトルネックの一つであった。特に、DNA を鋳型とした金属イオン集合体の構造解析は、 $\epsilon\text{A}-\text{Cu}^{\text{II}}-\epsilon\text{A}$  などの塩基対の導入によって生じる二重鎖の構造歪みや、らせん性の変化、金属-金属相互作用に関する重要な情報を解き明かすことになる。このような要因を理解することは、金属錯体型人工 DNA を用いた分子デバイスの開発や、金属に応答する高次 DNA 構造体の設計などの応用のために重要である。本研究で目的とする  $\epsilon\text{A}-\text{Cu}^{\text{II}}-\epsilon\text{A}$  塩基対を導入した DNA 二重鎖の構造解析は、金属錯体型人工 DNA の固相・結晶状態における新しい化学を切り開くものと期待される。

## 実験

$\epsilon\text{A}-\text{Cu}^{\text{II}}-\epsilon\text{A}$  塩基対を導入した DNA 二重鎖の構造解析に向けて、上智大学近藤研究室の江口奈津実さん（M2）と共同研究を開始した。近藤次郎准教授の研究室では、 $\text{Ag}^{\text{I}}$  や  $\text{Hg}^{\text{II}}$  を介した金属錯体型塩基対を含む DNA 二



スキーム 1. 本共同研究プロジェクトの研究の流れ

重鎖の結晶構造を報告しており、金属錯体型 DNA の結晶構造解析のノウハウがあります<sup>[8,9]</sup>。本研究では、まず結晶形成に適した DNA 配列を設計し、その後、塩谷研究室ですでに確立したプロトコルに従い DNA 合成と精製を行った。その後、近藤研究室において、DNA の結晶化に最適な条件（緩衝液、対カチオンなど）のスクリーニングを

行った。単結晶X線結晶構造解析は、つくばにある放射光施設フォトンファクトリーで行った(スキーム1)。

## 結果と考察

---

本項は、機密保持のため、未発表事項を一部省略している。

### (1) DNA の配列設計

DNA 分子はポリアニオンであるため、一般に結晶化は非常に困難である。本研究の最も重要なステップは、結晶化に適した DNA 配列の設計である。我々は全部で 5 つの DNA 配列を設計したが、この報告書ではそのうちの 2 つの配列について説明する。最初に合成した 2 種類の DNA 鎖は、Dickerson-Drew 配列と呼ばれる 12 量体の配列になって設計した。Dickerson-Drew DNA (DDD) 配列は、以下に示す利点をもつ理想的な配列である。

- a) 生物学的に関連した配列であり、標準的な B-DNA 構造をとることが知られている。
- b) 結晶化に適したバッファー条件がすでに知られている。
- c) DDD 配列の結晶構造は広く研究されており、PDB データベースからいくつかの構造文献を得ることができる。実際、DNA の単結晶 XRD 解析の最初の報告は、DDD 配列に基づくものである。
- d) DDD 配列の MD シミュレーションも広く研究されており、解析が容易である。

DDD 配列に含まれる天然塩基を  $\epsilon A$  塩基に置き換えることで、非天然の  $\epsilon A$  核酸塩基を含む DNA 鎖を設計した。二重鎖の中央に  $\epsilon A$  核酸塩基を組み込むことで、両端に天然塩基対が形成されて、安定な二重鎖を形成することを期待した。本研究で使用した DDD DNA 鎖の配列を以下に示す。

1. DD-2eA: 5'-CGC GA $\epsilon A$   $\epsilon A$ TC GCG-3'
2. DD-4eA: 5'-CGC G $\epsilon A\epsilon A$   $\epsilon A\epsilon A$ C GCG-3'

さらに、結晶構造解析の過程において異常分散法により位相問題を解決するために、5-ブロモウリジン ( $BrU$ ) を導入した配列も設計した。

## 2) DNA の合成と精製

DNA の合成は、標準的なホスホロアミダイト化学による固相合成法で行った。1,*N*<sup>6</sup>-エテンアデノシン (**εA**) および 5-ブromoウリジン (**BrU**) を含む DNA 鎖は、NTS M-2-MX DNA/RNA 合成機で合成した。ウルトラマイルド合成試薬およびホスホロアミダイト (Glen Research 社) を用いて、DMTr-on モードで 1-μmol スケールで合成した。すべての DNA 鎖は、99%前後の良好な収率で得られた。

固体担体からの切り出しと脱保護は、以前に最適化したプロトコルに従い、25% NH<sub>3</sub> 水溶液を用いて室温で 2.5 時間行った。得られた DNA 鎖は、Poly-Pak™ II カートリッジ (Glen Research 社製) を用いて、標準的なプロトコルにより脱トリチル化および簡易生成を行った。さらに、逆相 HPLC で精製した (Waters XBridge C18 カラム。バッファー: A = MeCN, B = 0.1 M TEAA (pH 7.0) + 2% MeCN, 流速: 1 mL min<sup>-1</sup>, 温度: 60 °C)。

## 3) 同定

合成した DNA 鎖は ESI-TOF 質量分析で同定した。この DNA オリゴマーを凍結乾燥し、結晶化実験のために上智大学に送った。

## 4) 結晶化条件のスクリーニング

結晶化実験は、上智大学近藤研究室で行った。DNA の結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。DNA 試料溶液と沈殿剤とを含む液滴を、高濃度の沈殿剤を含むリザーバーが入ったウェルに入れた。液滴の蒸発を防ぎ、液滴とリザーバーの蒸気拡散の平衡を保つために、ウェルを密閉した。DNA 試料を含む液滴からリザーバー溶液への水蒸気が拡散することにより、DNA 溶液は過飽和に達し、核生成と初期成長が起こり結晶形成に至る。

結晶化は、Cu<sup>II</sup> イオンもしくは Ag<sup>I</sup> イオンの存在下、293 K でハンギングドロップ蒸気拡散法によって行った。DNA 溶液 (4 mM) を同量の 8 mM CuSO<sub>4</sub> または AgNO<sub>3</sub> と

混合した。試料溶液 1  $\mu\text{L}$  と 50 mM 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) (pH 7.0), 10 mM spermine, 10% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol および 10–500 mM の金属硝酸塩を含む結晶化溶液 1  $\mu\text{L}$  を混合し、結晶化液滴を調製した。液滴は 40% (v/v) の 2-メチル-2,4-ペンタジオールを含むリザーバー溶液に対して平衡化し、結晶化を検討した。各 DNA 試料について、数十種類の結晶化条件を検討した。

#### (5) 単結晶 XRD 測定による結晶構造解析

結晶化を試みた 5 種類の DNA のうち、2 種類から良質の結晶が得られた。結晶化の条件や配列情報については、未発表事項を含むためここでは公開しない。結晶は、40%(v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol を保護剤としてナイロンクライオルーブ (Hampton Research) にマウントし、液体窒素中に保存した。得られた結晶は、つくばのフォトンファクトリーに送り、単結晶 XRD 測定を行った。解析の結果、それぞれの結晶は異なる空間群を持っていることが判明した。しかし、これまでに構造を解いた結晶は、いずれも目的の  $\epsilon\text{A}-\text{Cu}^{\text{II}}-\epsilon\text{A}$  塩基対を含んでいなかった。現在、結晶化条件の最適化と XRD 測定の解析が進行中である。

#### 参考文献

---

- [1] Y. Takezawa, J. Müller, M. Shionoya, *Chem. Lett.*, **2017**, 46, 622.
- [2] Y. Takezawa, S. Sakakibara, M. Shionoya, *Chem. Eur. J.*, **2021**, 27, 16626.
- [3] T. Nakama, Y. Takezawa, D. Sasaki, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 10153.
- [4] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science.*, **2003**, 299, 5610.
- [5] S. C. Rajasree, Y. Takezawa, M. Shionoya, *The 101<sup>st</sup> CSJ Annual Meeting*, **A25-4am-03**, “Oral”, Online.
- [6] S. C. Rajasree, Y. Takezawa, M. Shionoya, *The 71<sup>st</sup> Conference of Japan Society of Coordination Chemistry*, **PE1-10**, “Poster”, Online.
- [7] S. C. Rajasree, Y. Takezawa, M. Shionoya, *The 102<sup>nd</sup> CSJ Annual Meeting*, **P1-4am-03**, “Poster”, Online.
- [8] J. Kondo, T. Sugawara, H. Saneyoshi, A. Ono, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 11747.
- [9] J. Kondo, Y. Tada, T. Dairaku, Y. Hattori, H. Saneyoshi, A. Ono, Y. Tanaka, *Nat. Chem.* **2017**, 9, 956.

## 謝辞

---

DNA の結晶化および単結晶 XRD 解析に関する知識と技術を教えてくださった江口奈津実さん、近藤次郎准教授をはじめとする近藤研究室の皆様から心から感謝いたします。この共同研究により、DNA 配列設計のスキルを磨き、結晶化実験の技術的ノウハウを学ぶことができました。この共同研究プロジェクトが両研究室の関係を強化し、DNA ナノテクノロジー分野の研究を推進する一助になればと願っています。また、塩谷光彦教授、竹澤悠典助教の継続的なご指導とご支援に感謝いたします。MERIT プログラムの副指導教員である相田卓三教授には、この研究プロジェクトを通して励まされたことに感謝します。最後になりましたが、この共同研究プロジェクトを財政的に支援してくださった MERIT プログラムに感謝いたします。