



DNA のバイオナノエンジニアリング

—生命と物質の融合をめざして—

小野 晶*

Bio-nano-engineering of DNA

Akira ONO*

1. はじめに

文部科学省のホームページによると、ナノテクノロジーとは「原子や分子の配列をナノスケール(10^{-9} m)で自在に制御することにより、望みの性質を持つ材料、望みの機能を発現するデバイスを実現し、産業に活かす技術」と、やや宣伝口調で、定義されている¹⁾。もう少し科学的に考察すると、ナノテクノロジー研究において開発されるべき技術は、「原子・分子の配列と配置を制御する技術」と「ナノスケールの物質の構造と機能を制御する技術」に分けると議論しやすい²⁾。分かり易さから「ナノテクノロジー」=「ナノスケールの物質の構造と機能を制御する技術」と一般に理解されているところもあるが、将来的に大きなブレークスルーに結びつくのは「原子・分子の配列と配置を制御する技術」であるとする研究者も少なくない。

ナノスケールの構造を有する物質（以下ナノ物質と呼ぶ）を調製する手法は、トップダウン法とボトムアップ法に大別される。トップダウン法とは物質の塊をナノスケールまで微細化する方法で、例えば基盤上にパターンを書き込む集積回路の製造法はトップダウン法に分類される。ボトムアップ法は、原子・分子を組み上げてナノスケールの物質を得る方法である。上で触れたように、将来的にはボトムアップ法の発展が大きなブレークスルーに結びつくと期待されている。

バイオナノテクノロジーは、字面を追えば「バイオに関するナノテクノロジー」であるが、研究内容は以下、(1)「上記のナノテクノロジーの成果を生命科学や医療に応用する」、(2)「生体物質（蛋白質、生体膜、DNA/RNA

など）がボトムアップを駆使した精巧な自己組織化構造を有し、それらの構造が機能に関連していることに学び、生体物質を模倣、または利用して新規ナノ物質を開発する」、に分類して考察される³⁾。

本論文の研究は上記(2)に関連し、DNAが精巧な自己組織化構造を有し、その構造が機能に関連していることに学び、DNAを模倣、または利用して新規ナノ物質を開発することを目的とする。

2. DNAの構造と自己組織化

DNA（デオキシリボ核酸）は遺伝子の本体であり、生命科学研究の主役の一つである。一方、化学的視点からその構造と物性に着目すれば、DNAは機能性分子開発の基盤構造として有用である^{4,5)}。例えば、現在、DNAの導電性とその利用が注目されている⁶⁾。では、どのようなDNAの構造的特徴が導電性に結びつくのだろうか。

2.1 DNAの構造

DNAは直径約2nmの糸状の分子であり、天然のナノワイヤーと呼ぶに相応しい構造を有する。2本のDNA鎖が水素結合を介して結合し、二本鎖構造（duplex構造）を形成している（図1左）。内側に塩基対が積層し、その周囲に糖—リン酸バックボーンが巻きついた螺旋階段様の構造である。上下の核酸塩基間の距離は平均3.4Åと密に充填され、そのため核酸塩基（芳香環）間にはアロマトニックスタッキングが存在し、 π 電子の相互作用が導電性に結びついているのである。2本のDNA鎖は、核酸塩基間の水素結合を介して結合するが、その際、アデニン塩基（A）とチミン塩基（T）、グアニン塩基（G）とシトシン塩基（C）が特異的に結合しワトソン—クリック型の塩基対（A-T塩基対とG-C塩基対）を形成するのであって、通常は、A-G、C-Aなどの組み合わせ

*教授、応用化学科

Professor, Department of Applied Chemistry

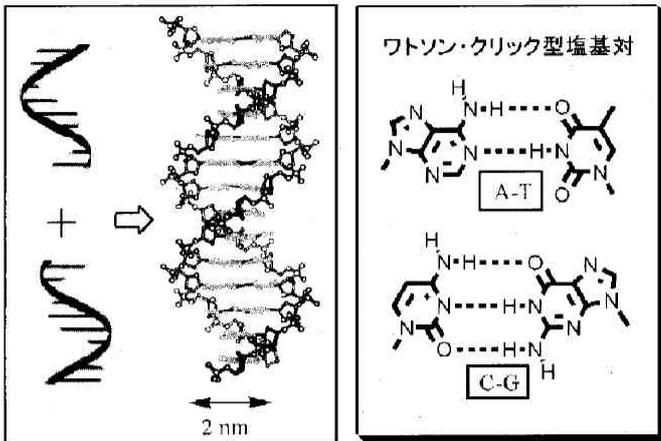


図1 二本鎖 DNA 構造 (duplex structure)

せは出来ない。この特異的にワトソン・クリック型塩基対が形成されるという特徴が、DNA の規則正しい自己組織化構造の基盤となっている。

2.2 DNA の自己組織化

DNA には 4 種の塩基が含まれているが、塩基がデオキシリボースと結合したものをデオキシヌクレオシドと呼ぶ(図2)。DNA 鎖は、4 種類のデオキシヌクレオシドがリン酸ジエステル結合を介して結合したものである。DNA 鎖中では、ヌクレオシドの 3'-水酸基と別のヌクレオシドの 5'-水酸基が順次結合している。その結果、DNA 鎖には方向性が生じ、5'-末端と 3'-末端が出来る。DNA 鎖は、相補的配列(ワトソン・クリック型塩基対を介して二本鎖構造を形成する相手方)を探して、自己組織化的に二本鎖構造を形成する。二本鎖 DNA 構造中の各ストランドは、一方が 5'→3'であれば、もう一方は 3'→5'となる関係にあり、この関係を二本の DNA は逆平行であると言う⁴⁾。

計画的にデザインされた塩基配列を持つ DNA 鎖を調製しさえすれば、適当な緩衝液中に溶解することで、DNA は期待する高次構造を形成する。図3に例をあげて説明する。図3aは最も単純な二本鎖構造の形成であり、ある DNA が相補的配列を有するもう一本の DNA と結合する。図3bは、自己相補的配列を有する DNA が自ら二本鎖構造を形成する例である。相補的配列を有する 2 本の DNA をリンカーで結合したものはヘアピン様の構造を形成する(c)。3 本の DNA 鎖を組み合わせた構造(d)、4 本の DNA 鎖を組み合わせた構造(e)、さらに複雑な格子状構造を構築することも可能である^{4,6)}。

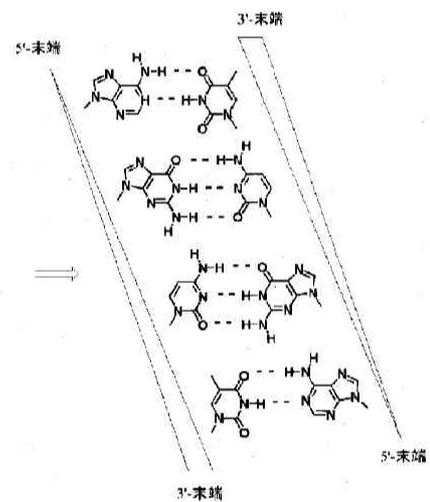
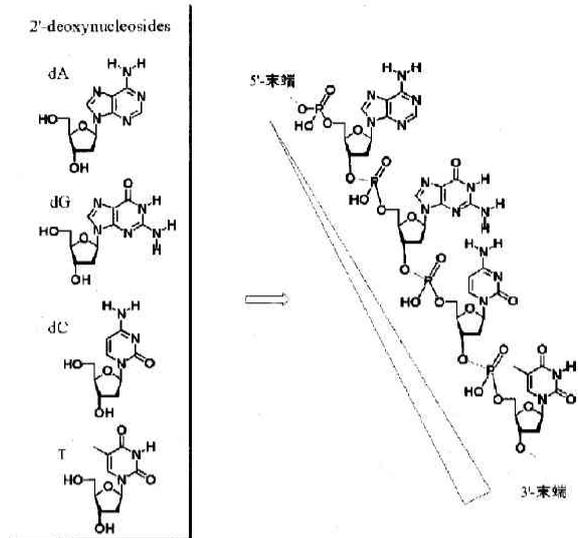


図2 DNA の自己組織化構造

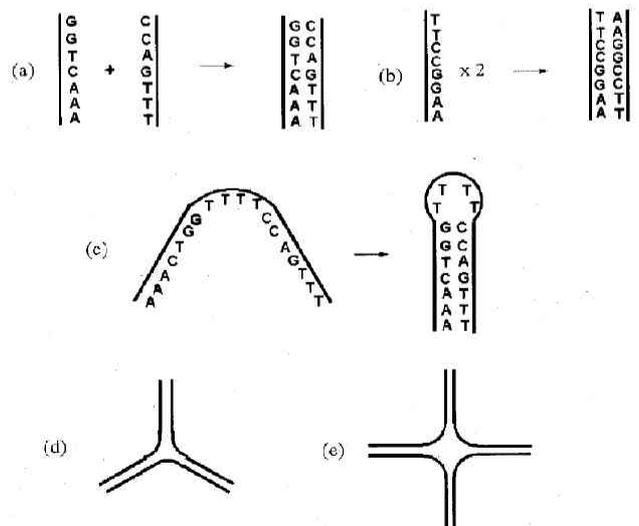


図3 DNA の高次構造の例

2.3 DNA 構造の特徴

さて、DNA 構造の特徴の一つに、簡単な構造単位（塩基部、糖部、リン酸ジエステル）が螺旋軸に沿って繰り返すことがある（図4右）。DNA が本来持っている構造単位を機能化することにより、機能性単位が規則正しく配列されたワイヤー状分子を合成することが可能となるであろう⁷⁾。この配列制御は、DNA 合成技術を利用すると、比較的簡単に実現される。

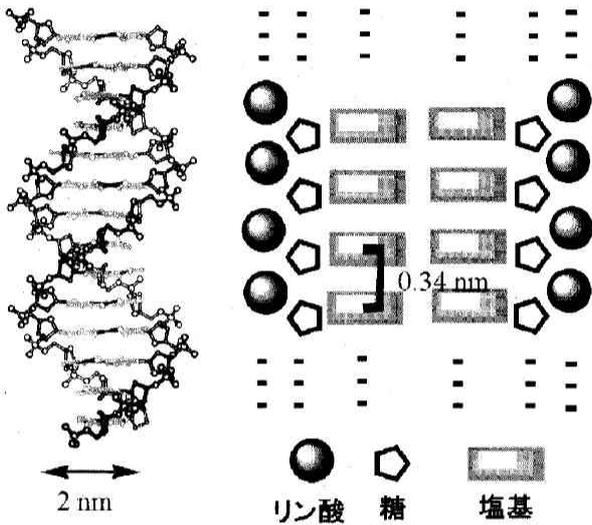


図4 DNA 構造の特徴

2.4 DNA 合成機の活用

図5にDNA 自動合成機の仕組みを模式的に示した⁸⁾。DNA の構成成分である4種のヌクレオシドを、DNA 自動合成用のモノマーユニットへと誘導する。モノマーユニットを任意の順に固相担体に結合することが出来るので、任意の塩基配列のDNA が得られる。さらに、人工ヌクレオシド (X) を組み込むことも可能である。

DNA を合成するためにはモノマーユニットをホスホジエステル結合で連結するのだが、モノマーユニットの構造や縮合試薬を工夫することで、オリゴエステルやオリゴアミドの合成に利用することも可能であろう。

3. 金属含有 DNA ナノワイヤー

3.1 DNA 構造に沿って金属イオンを規則正しく配列させる

先に述べた様に DNA 二本鎖構造においては核酸塩基対（ワトソン・クリック型塩基対、W-C 型）が積層している（図6左）。W-C 型塩基対を、金属を介した塩基対に変換することにより、DNA 螺旋構造を鋳型に、金属イオンが一次元に規則正しく配列された分子が得られる（図6右）。

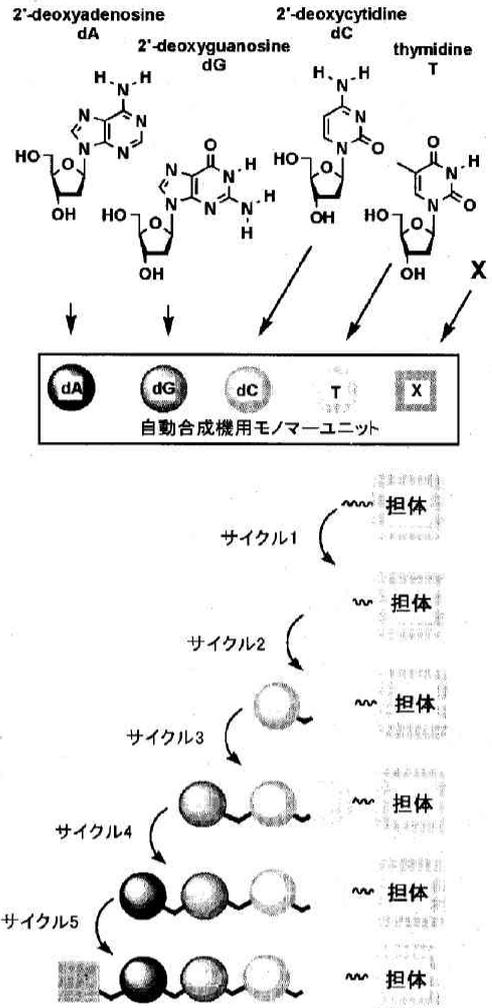
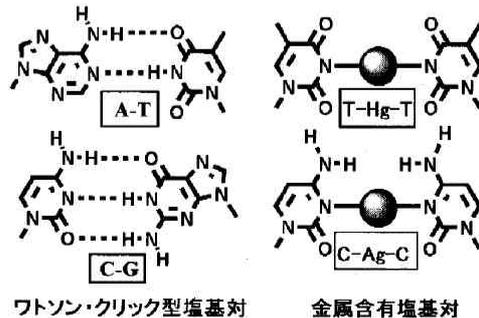
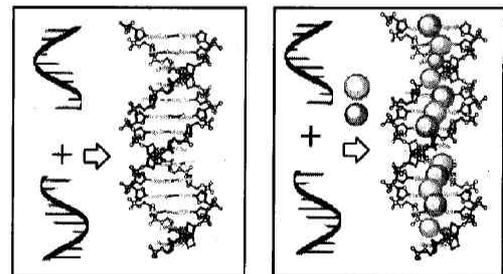


図5 DNA 自動合成機の模式的表現

DNA:天然のナノワイヤー 金属含有DNAナノワイヤー



ワトソン・クリック型塩基対 金属含有塩基対

図6 天然型 DNA と金属含有 DNA

筆者は、DNA 合成技術を利用して、天然にはほとんど存在しないチミン-チミン塩基対 (T-T ペア)、あるいはシトシン-シトシン塩基対 (C-C ペア) を含む DNA を合成し、各種金属イオンとの相互作用を検討した結果、T-T ペアに水銀(II)イオンが、C-C ペアに銀(I)イオンが高選択的に結合し、金属イオンを介した塩基対が形成されることを見出した (図 6 右)⁹⁾。天然型の DNA が容易に金属含有ワイヤーに変換されるという現象は、盲点を突いた発見である。結晶化に依存することなく規則正しい構造が形成され、溶液中でも維持されるという優れた特性を有する。配位子である核酸塩基を任意の順で結合した DNA (即ち配位子が規則正しく配列された配位子集合体) を用いると、任意の金属を任意の順で配列させることが可能となる。この配列制御は DNA 合成技術を利用することにより実現される。

3.2 金属含有 DNA ナノワイヤーの構造と安定性

ここでは DNA と金属イオンの結合様式を「ホスト-ゲスト化学」と「超分子構造の形成」に大別して議論する。DNA 二本鎖中のチミン (T) 塩基の間に Hg(II) が、シトシン (C) 塩基の間に Ag(I) が高選択的に取り込まれる現象は、「ホスト-ゲスト化学」として説明しうるであろう (図 7)。W-C 型塩基対で形成された DNA 二本鎖構造中に、金属イオン結合部位が一つ存在する。二本鎖構造の軸を挟んで向き合ったチミン (又はシトシン) 残基間の空孔に Hg (又は Ag) が選択的に結合するのである。上図の結合を立体紙模型で表した (図 8)。向き合った T 残基と上下の塩基対からなるポケットが形成され (図 8 左上)、金属イオンが具合良く収まる (図 8 左下)。TT ペアと CC ペアの化学構造に注目すると、単純に適当な大きさのポケットに金属イオンが入るのではなく、各金属イオンがポケットの配位環境を厳密に選択していることは明らかである。この機構の解明は、今後の課題の一つである。

二本の DNA 鎖と金属イオンから、金属イオンが連続して配列された分子 (図 6 右、図 8 右) を構築することも可能である。これは「超分子構造形成」と分類される。紙模型では串団子のような構造になる (図 8 右)¹⁰⁾。NMR や結晶解析法による金属配位部位の構造解析研究、遺伝子の一塩基多型 (SNAP)⁵⁾ 検出手法の開発を目指した基礎的熱力学的特性の解析研究が進行中である¹¹⁾。

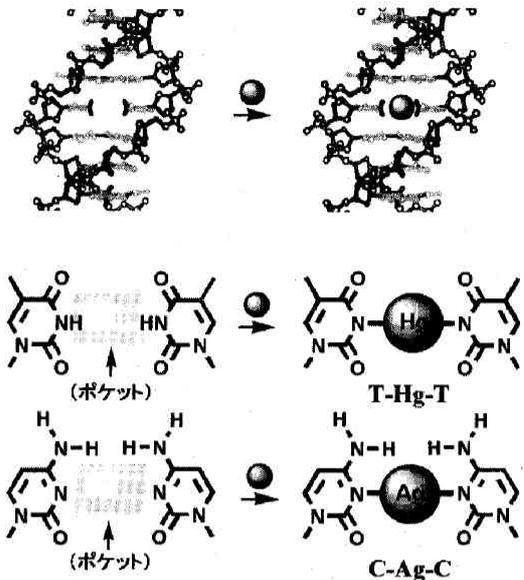


図 7 DNA 二本鎖への金属の結合—ホストゲスト化学—

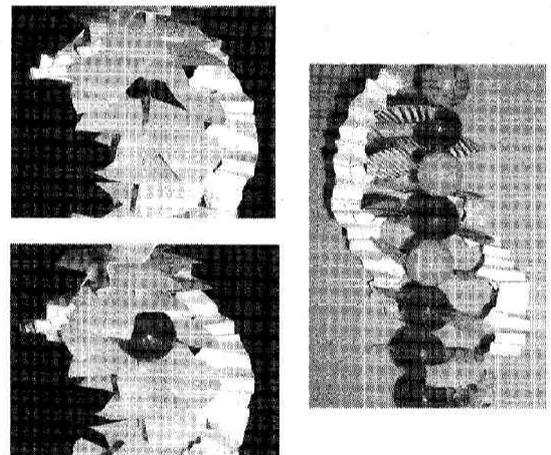


図 8 5-置換ウラシルと金属イオンの結合

3.3 種々の金属イオンを取り込む試み

これまでは天然型 DNA から成る金属含有 DNA ワイヤーに関して述べてきたが、最近、人工的配位子を組み込んだ DNA を利用して金属イオンを結合する研究も報告されている¹²⁾。ここでは筆者等の発見した興味深い現象を記す。即ち、配位子の pKa を変化させることにより、錯体の立体構造を大きく変えることなく、金属イオン選択性を変化させた例を紹介する¹³⁾。

先に述べたように DNA 二本鎖中の T-T ペアに Hg(II) イオンが選択的に結合する。チミン 5 位のメチル基を電子吸引性の置換基に変換すると、ピリミジン環 N3 位の pKa が小さくなる (図 9)¹⁴⁾。一連の 5 位置換ウラシル (チミンは 5-メチルウラシルである) を組み込んだ

DNA二本鎖を合成し、金属イオンとの相互作用を検討したところ、溶液のpHによって金属イオン選択性が変化することを発見した。

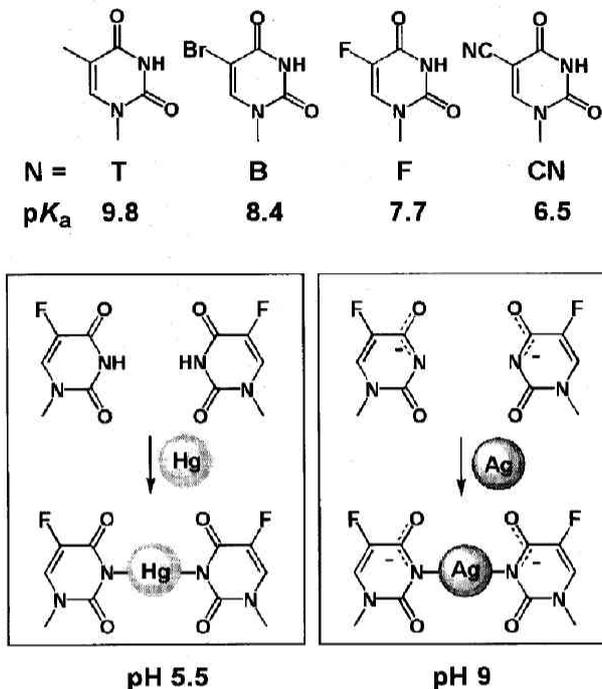


図9

5-フルオロウラシル(F)を例に概説する。本実験に用いた全てのpH (pH 4.4~pH 10) でF-Hg-Fペアが形成されたが、F-Ag-Fペアは塩基性領域でのみ形成された。塩基対の安定性はpHにより変化し、pH 5.5ではF-Hg-Fペアが安定であるが、pH 9ではF-Hg-FペアよりもF-Ag-Fペアがより安定になる(図9)。即ち、ウラシル類の pK_a を境にして、より小さなpHではHg(II)イオン、より大きなpHではAg(I)イオンがより強く結合する。単に金属イオンとリガンドの結合の強弱のみならず、溶媒や塩の関与した静電的相互作用が、各ペアの安定性に関与しているのであろう。

ウラシル5位は金属イオン結合部位から離れている。また、5位置換基はDNA二本鎖構造に大きな影響を与えない。錯体の立体構造を大きく変えることなく、溶液のpHを変化させることにより金属イオン選択性を変化させることに成功した、興味深い例である。

筆者らは、天然型塩基及び人工塩基を利用してHg(II)、Ag(I)、Cu(II)、Ni(II)を選択的にDNA二本鎖に取り込むことに成功している¹³⁾。この技術を利用すると異種金属イオンを任意の順に配列させることが出来る(図10)。

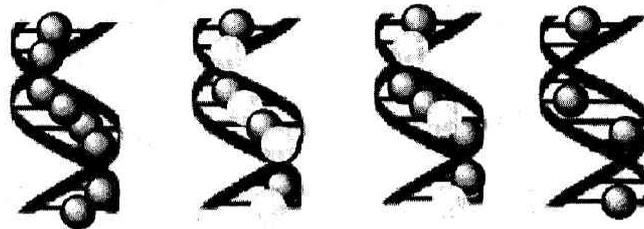


図10 DNA鎖に沿って配列された金属イオンの模式的表現

3.4 応用に向けて

金属含有DNAは導電性ワイヤーや分子磁石開発の基盤構造として利用可能であると期待されるが、ここでは別の可能性を議論したい。

金属イオンセンサーの開発：DNA二本鎖中のT-TペアにHg(II)が高選択的に結合することを利用して溶液中の水銀イオンを検出するセンサーの開発研究を行った¹⁵⁾。センサーはDNAの両端に蛍光残基と消光残基を有しており、DNAは水銀結合部位とリンカー部位に大別される(図11)。水銀イオン非存在下では蛍光発光が観測される。水銀イオンの添加によりT-Hg-T塩基対が形成されると、DNA部位がリンカー部位を蝶番として折れ曲がりヘアピン様の構造をとる。蛍光残基と消光残基の距離が近づくことで、両残基間にFluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)が進行し、蛍光強度が減少する。図11中のグラフは520nmの蛍光強度と水銀イオン濃度のプロットである。水銀イオン濃度と蛍光強度により相関が見られる。同様の機構をredox-sensorとして利用することも可能である¹⁶⁾。将来的には、様々な金属イオンを結合する手法と組み合わせることにより、多様な金属イオンを検出するセンサー群を開発することが可能であると期待される。

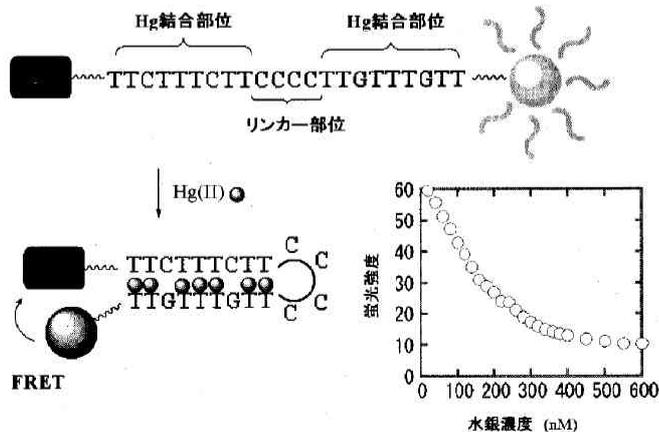


図11 センサーの水銀イオン検出機構

さて、DNA を基盤構造とするセンサーの利点の一つは、チップ技術と組み合わせることにあると考えている。即ち、センサー群をガラス基板に規則正しく結合し、金属イオンを網羅的に検出する簡易手法の開発に利用出来るのではないか、と期待している。例えば「ガラス基板上の4列2行目のセンサーはPb(II)に反応する」ということが予め分かっているので、サンプルにPb(II)が存在することが分かる、という仕組みである(図12)。

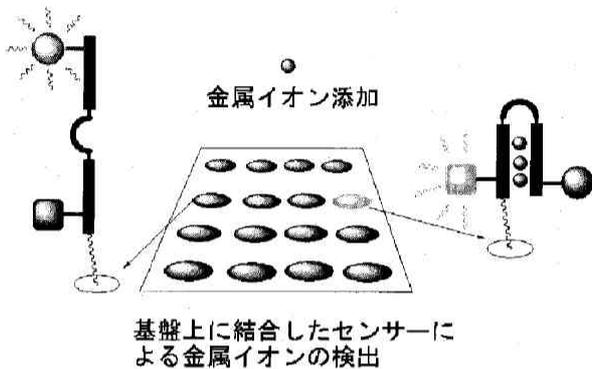


図12 金属イオン検出用チップの模式図

4 ナノ分子温度計の開発

冒頭で記した様に、二本鎖 DNA 構造は、内側に塩基対が積層し、その周囲に糖-リン酸バックボーンが巻きついた螺旋階段様の構造(図13左)であるが、一本鎖 DNA もまた、螺旋状の構造を形成すると期待される。図13 b は二本鎖 DNA 中の一本の DNA 鎖を抜き出したものであるが、一本鎖でも螺旋状構造をとっていることが分かる。実際には、溶液中の一本鎖 DNA が、二本鎖 DNA 構造中の DNA 鎖と、全く同じ構造をとっているわけではなく、より自由に運動していると考えられるが、平均的には螺旋状構造であると考えられる。

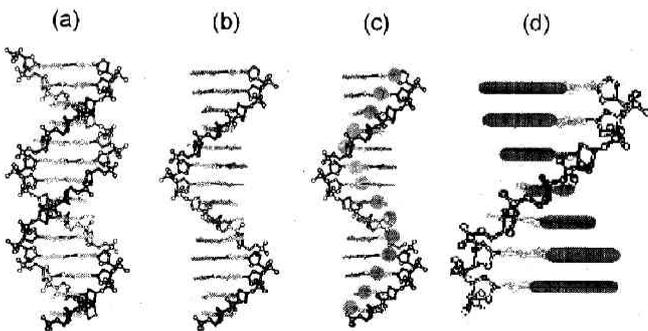


図13 一本鎖 DNA の形成する螺旋状構造の模式図

さて、DNA 構造の特徴の一つは、簡単な構造単位(塩基部、糖部室、リン酸ジエステル)が螺旋軸に沿って繰り返すことであると、図4で説明した。一本鎖 DNA 構造においても構造単位が連続しており、螺旋状に配置される。そこで、構造単位に機能性を結合すると、機能性は DNA 鎖に沿って螺旋状に配列されるであろう(図13 c)。機能性基として芳香環を用いると、芳香環が DNA 鎖に沿って積層すると期待される(図13 d)。言うまでも無いことではあるが、すべての生体高分子は溶液中で(往々にして結晶中でも)構造を変化させており(分子内で運動しており)、分子の構造はあくまでも平均構造で議論される。ゆえに、以下に記す修飾 DNA の分光学的データは、その分子の平均構造を反映している。

4.1 DNA 鎖に沿って配列されたピレンクラスターの調製

ピレンは蛍光性の芳香族炭化水素であり、化学的に安定であることから、生体分子の蛍光標識に利用されて来た。ピレンはモノマー分子に由来するモノマー蛍光と、励起されたピレン分子と基底状態にあるピレン分子からなる複合体に由来するエキシマー蛍光¹⁷⁾が知られている(図14)。DNA 構造に沿ってピレン基を規則正しく配列することにより、ピレン基が複合体を形成し易くなり、強いエキシマー蛍光が観測されると期待した。

A dimer which is associated in an electronic excited state and which is dissociative in its ground state

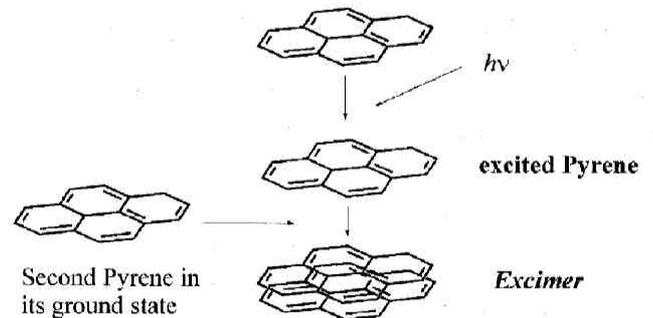


図14 ピレンのエキシマー発光

図15にピレン結合型 DNA の化学合成ルートを模式的に示した。市販のチミジン、及びピレン酢酸から出発して、チミジン-ピレン複合体(1)を合成し、さらに DNA 化学合成用モノマーユニットへと変換した。市販の DNA 合成機を用いて天然型 DNA の 5'-末端にチミジン-ピレン複合体が1~5残基結合した短鎖 DNA を合成した。

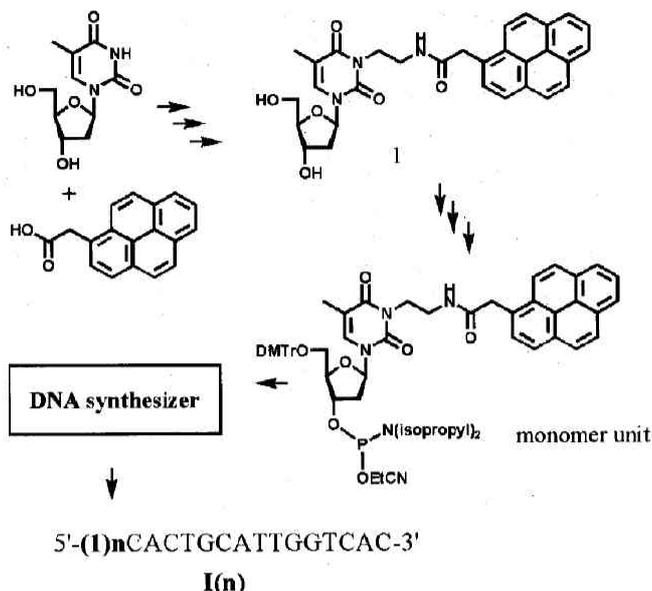


図15 ピレン結合型DNAの化学合成ルート

4.2 DNA鎖に沿って配列されたピレンクラスターの分光学的特性

ピレン残基の結合したDNAの水中での可視・紫外吸収スペクトルを図16aに示した。ピレン残基由来の吸収が300~400 nm領域に観測されるが、DNAに結合したピレン残基の数に比例して、ピレン由来の吸収が増大した。

図16bは蛍光発光スペクトルである。400 nm付近にピレンモノマー由来の発光スペクトルが、また500 nm付近にエキシマー由来の発光スペクトルが観測された。特筆すべきは、ピレン残基数の増加に対応して、エキシマー発光強度が指数関数的に増大したことである。これは、DNAに結合したピレン残基が、ピレン残基同士が会合してエキシマーを形成するのに適当な配置で、規則正しく配列されていることを示すものである^{7a)}。

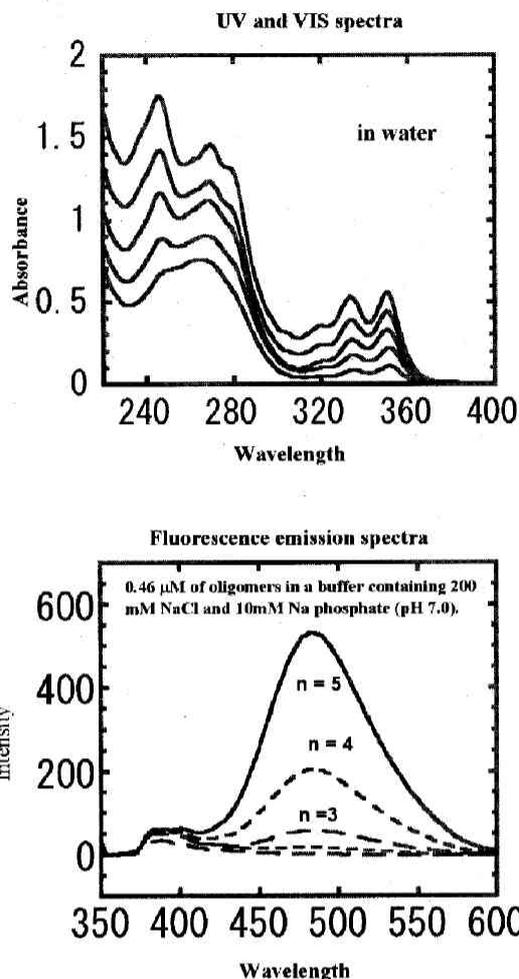


図16 ピレン結合DNA (n=1~5)の分光

- a) 可視・紫外スペクトル。DNAに結合したピレン基が増加するとともに、300~360nm付近のピレン由来の吸収強度が増加した。
- b) 蛍光発光スペクトル(励起光342nm)。ピレン基が増加するとエキシマー由来の発光スペクトル強度が指数関数的に増加した。

図17に溶液温度を変化させて蛍光発光を観測した実験結果を示した。発光スペクトルの形は変化しなかったが、その強度には温度依存性が見られ、液温が上昇するに従って発光強度が減少し、逆に液温が低下するに従って発光強度が増加した(図17a)。これは、液温が高くなると分子の運動が大きくなり、ピレン残基同士が複合体を形成する効率が低下するためであると考えられる。溶液温度と発光強度には良好な相関が見られた(図17b)。これは、蛍光スペクトルから溶液温を推定することが可能であることを示すものである。即ち、ピレン残基を結合したDNAは、温度変化を蛍光発光強度の変化として検出するセンサー、ナノ分子温度計、として作用する。

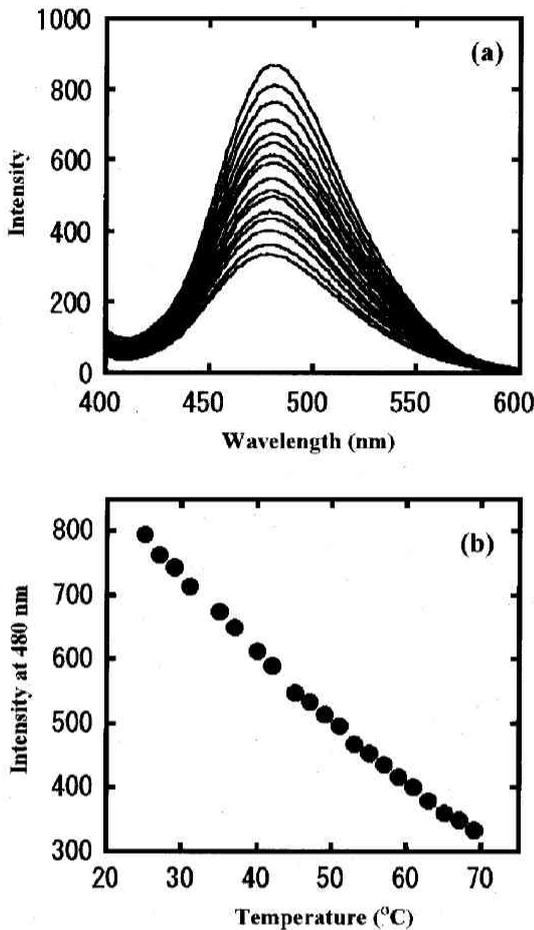


図17 ピレン結合DNA ($n=5$) の蛍光スペクトル

- a) 発光より高温でより強く、より低温側でより弱くなった (21, 23, 27, 31, 35, 37, 40, 42, 45, 49, 51, 55, 57, 61, 65, 69 °C)。0.46 μM の DNA を 10 mM Na phosphate, 100 mM NaCl (pH 7.0) の緩衝液に溶解した。
- b) 液温と 480 nm における発光強度のプロット。

5. おわりに

バイオナノサイエンスという研究分野は、その語感とは異なり、漠然としたバイオの概念を捨てて、生体物質を化学的視点から再吟味し物質化学に利用することに、その主眼があると思われる。核酸 (DNA、RNA、ヌクレオチド、ヌクレオシド) の化学は、その黎明期から生命科学への応用を目的として発展し、膨大な反応及び構造化学的知識が蓄積されている。今回、あえて生命科学を離れ、物質化学への応用を試みたところ、金属含有 DNA という新規ナノワイヤーや蛍光性ナノ分子センサーを見出すに至った。DNA と金属イオンの化学は、センサーの開発研究や遺伝子の一塩基多型 (SNP) 検出手法の開発研究へと展開され、現在筆者の構想の中で、再び生命科学に貢献する可能性を見せている。核酸化学は

生命科学に止まらず様々な分野に発展するポテンシャルを持っており、その一層の発展に貢献したいと願っている。

ご指導ご助言を頂きました東京都立大学理学研究科化学専攻、神奈川大学工学部応用化学科の諸先生、及び共に実験を行っていただいた学生諸氏に感謝いたします。種々の御援助を頂きました東京都、文部科学技術省、日本学術振興会、三菱財団に感謝いたします。

参考文献

- 1) <http://www.nanonet.go.jp/japanese/nano/>
- 2) 五島綾子、中垣正幸 (共著) “ナノの世界が開かれるまで” 海鳴社 (2004)
- 3) 堀池靖浩、片岡一則 (共著) “バイオナノテクノロジー” オーム社 (2003)
- 4) W. Sanger Ed., “Principles of Nucleic Acid Structure” Springer-Verlag, New York (1984).
- 5) 関根光雄、斎藤烈 (編) “ゲノムケミストリー” 講談社サイエンティフィク (2003). 小野晶 “DNA 高次構造を利用した機能性分子の開発—金属含有 DNA ワイヤ—” 化学と工業, 58巻4月号, 469-472ページ (2005).
- 6) N. C. Seeman, *Methods in Molecular Biology*, 303, 143-166. (2005)
- 7) (a) M. Kosuge, et al., *Tetrahedron Lett.*, 45, 3945 (2004). (b) M. Kubota, A. Ono *Tetrahedron Lett.*, 45, 5755 (2004).
- 8) 丹羽峰雄 (著) “DNA の化学合成法” (廣川 化学と生物 実験ライン22) 廣川書店(1992).
- 9) (a) Ono, A. Miyake, Y. *Nucleic Acids Res. Supplement*, No. 3, 227 (2003). (b) Y. Miyake, et al., Submitted.
- 10) あたかも金属と金属が接触しているかの様なモデルであるが、実際には金属間に隙間がある可能性がある。
- 11) (a) H. Yamaguchi, et al., *Nucleic Acids Symposium Series No. 48*, 113 (2004). (b) H. Torigoe, et al., *ibid.*, No. 48, 101 (2004). (c) H. Torigoe, et al., *ibid.*, No. 48, 275 (2004). H. Torigoe, et al., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, in press.
- 12) (a) N. Zimmermann, et al., *Bioorganic Chemistry*, 32, 12 (2004). (b) K. Tanaka, et al., *Science*, 299, 1212 (2003). (c) N. Zimmermann, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 13684 (2002). (d) K. Tanaka, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 8802 (2002). (e) K. Tanaka, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 12494 (2002). (f) S. Atwell, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 12364 (2001). (g) H. Weizman, & Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 3375 (2001). (h) E. Meggers, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 10714 (2000).
- 13) Y. Watanabe, et al., *Nucleic Acids Symposium Series No. 48*, 85 (2004).
- 14) R. Ishikawa, et al., *J. Mag. Res. in Chem.*, 39, S159 (2001).
- 15) A. Ono & H. Togashi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 4300 (2004)
- 16) Y. Miyake & A. Ono, *Tetrahedron Lett.*, 46, 2441-2446 (2005).
- 17) F. M. Winnik, *Chem. Rev.*, 93, 587-614 (1993)