

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12522

研究課題名(和文)直交性核酸を使用したクロストーク型増幅回路の設計

研究課題名(英文)Design of cross-talking amplification circuit with orthogonal nucleic acid

研究代表者

浅沼 浩之 (Asanuma, Hiroyuki)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：20282577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：直交性とは、互いに干渉(相互作用)しない一連の要素群の関係を示す。我々は、これまでにセリノール誘導体を用いた3種類の非環状骨格型人工核酸D-aTNA, L-aTNA, SNAの開発に成功している。これらは全て、極めて安定なホモ二重鎖を形成する。D-aTNAは天然のDNAやRNAと二重鎖を形成しないのに対し、アキラルな骨格を持つSNAは、D-, L-aTNA、DNA、RNA全てと安定な二重鎖を形成する。そこで本研究では、RNAと直交しているD-aTNAのみで論理回路を設計し、SNAをインターフェースに用いて、RNAが入力するとD-aTNA回路が作動するシステムを設計した。

研究成果の概要(英文)：Orthogonality is a key concept that has been broadly interpreted to mean that components or elements do not affect each other or behave independently. Previously, we have developed three artificial nucleic acids, D-aTNA, L-aTNA, SNA, composed of acyclic serinol derivatives as scaffolds. All of them can form remarkably stable homo-duplexes. While D-aTNA cross-pairs neither natural DNA (D-DNA) nor RNA (D-RNA), SNA with achiral scaffold can cross-pair with D-, L-aTNA, D-DNA, and D-RNA. In the present study, we designed a logic gate with D-aTNA that is orthogonal to D-RNA, which can be activated by D-RNA input via SNA as an interface: A seesaw gate with D-aTNA and interface SNA targeting miR21 was designed. Fluorescence could successfully be amplified by D-RNA (miR21) input that triggered D-aTNA seesaw gate via SNA.

研究分野：生物有機化学

キーワード：直交性 DNA RNA 論理回路 人工核酸 蛍光増幅

1. 研究開始当初の背景

直交性 (orthogonality) とは、互いに干渉 (相互作用) しない一連の要素群の関係を示す。核酸化学分野でも、DNA コンピューティングという概念が一般化してから、DNA や RNA の配列特異性を直交性と表現されるようになった。そして配列の異なる DNA オリゴマーが高い直交性 (= 高い配列特異性) を持つことを利用して、様々な論理回路が設計されてきた。しかし DNA のみを用いて配列を工夫するだけで設計可能な論理回路には限界がある上、より複雑な回路を設計しようと DNA の鎖長を長くすると直交性の確保が難しくなり、意図しない二重鎖形成による誤作動の問題があった。このように天然の D-リボースを骨格とする DNA (D-DNA) のみを用いたコンピューティングは限界に近づいていた。そのため、直交性を拡張する必要があった。

2. 研究の目的

互いにキラルな関係にある分子同士は一般的に互いに干渉しない“直交性”を有している。D-リボースを骨格に持つ天然の D-DNA と、そのエナンチオマーである L-DNA は、配列が互いに相補的であっても二重鎖形成しない。我々は、これまでに非環状ジオールのセリノール誘導体を骨格に用いた3種類の非環状骨格型人工核酸 (図 1: D-*a*TNA, L-*a*TNA, SNA) の開発に成功している。これらは全て、極めて安定なホモ二重鎖を形成する。一方互いにエナンチオマーの関係にある D-*a*TNA は、L-*a*TNA とは安定な二重鎖を形成しない。それに対してアキラルな骨格を持つ SNA は、D-, L-*a*TNA、D-, L-DNA (D-, L-RNA) 全てと安定な二重鎖を形成する。またアキラルなペプチド核酸 (PNA) も SNA と同様の機能が期待できる。

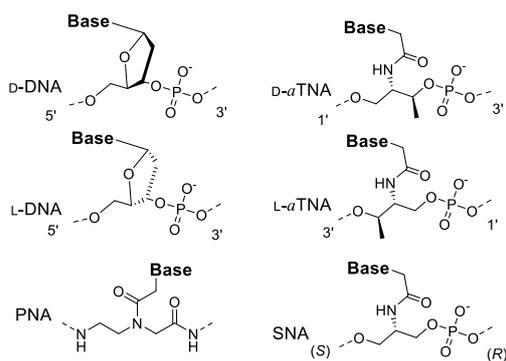


図 1 各種天然および人工核酸の構造

そこで本申請では、D 体あるいは L 体の DNA (*a*TNA) のみで論理回路をそれぞれ設計し、アキラルな人工核酸をインターフェースに用いて、D 体 (L 体) が入力すると L 体 (D 体) の回路が作動する仕組みを設計する。このように本来直交している二つの論理回路を、インターフェースを通じてクロストークさせるシステムを構築する。

3. 研究の方法

設計が比較的単純な、Winfree らの提案した Seesaw gate を使用して、miR21 (D-RNA) を標的にした増幅回路を設計する。Seesaw gate はすべて、L-DNA あるいは D-*a*TNA で設計する。以下にその具体的な設計を示す。

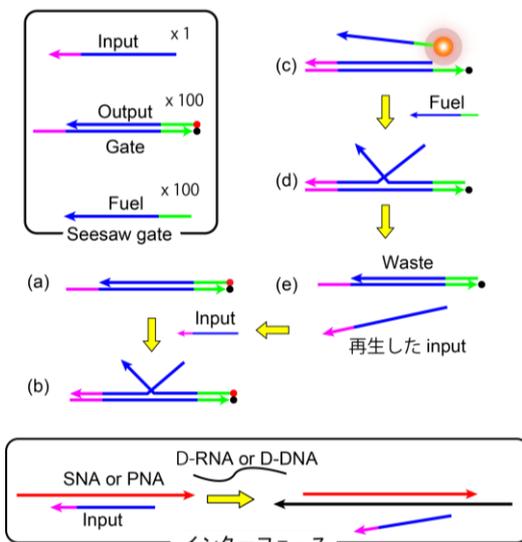


図 2 本研究で設計した Seesaw gate およびインターフェース

**初期状態(a)**: 初期状態の溶液には、あらかじめハイブリダイズさせておいた Output/Gate 二重鎖と Fuel 鎖が存在する。Output と Gate の末端はそれぞれ蛍光色素と消光色素でラベルされており、Output が初期状態で蛍光を出すことは無い。また Fuel は末端に消光色素が無いことを除けば Output と全く同じ配列だが、Gate のオーバーハング部位 (ピンク色) と二重鎖形成する部位が Fuel に存在しないので、Fuel と Output の交換は起きない。

**Input の添加(b)→(c)**: Input は Gate のオーバーハング部位と相補的な配列を持つので、極少量でも Input が溶液に添加されると toehold exchange 反応により Output との交換反応が起き (図 2 (b))、Output が Gate から引き剥がされることで蛍光シグナルを出す (図 2 (c))。Fuel 鎖との交換(d)→(e): 生成した Gate と Input の二重鎖は、今度はピンク色ではなく緑色部分がオーバーハング部位となる。Toehold exchange 反応で生成した Output よりも Fuel の方が大過剰に存在するため、逆 toehold exchange ((c)から(a)) ではなく、Fuel との toehold exchange ((d)から(e)) が優先的に起きて Gate/Fuel 二重鎖 (Waste) が生成することで、Input 鎖が再生する。再生された Input は、大過剰に存在する Output/Gate と再び toehold exchange 反応を起こす。すなわち Output/Gate 二重鎖と Waste がほぼ同量になるまでこの回路が作動し、Output を出力 (すなわち蛍光増強) し続ける。

**インターフェースの設計 (図 2 の下枠内)** 互いに直交している核酸同士をクロストーク

させるためのインターフェースで、SNA あるいは PNA で設計する。Seesaw gate を起動可能な Input に対して相補鎖的な SNA あるいは PNA を設計し、あらかじめハイブリッドしておく。D-DNA あるいは D-RNA が入力された場合に toehold exchange で Input が出力され、Seesaw gate が起動することでシグナル増幅する。

#### 4. 研究成果

##### 4-1: PNA と SNA のインターフェース機能の比較

miR21 と同じ配列を持つ D-DNA を標的として D-DNA および L-DNA で Seesaw gate を設計し、PNA あるいは SNA をインターフェースに使用した増幅回路を設計した。設計通り L-DNA 回路と D-DNA 回路は直交しており、L-DNA seesaw gate に L-DNA を入力した場合にのみ回路は起動し、D-DNA では起動しなかった。同様なことは D-DNA seesaw gate でも観察された。そこで PNA をインターフェースに用いて、D-DNA 入力で L-DNA を出力させて L-DNA seesaw gate が起動可能か調べた。PNA あるいは入力 D-DNA の濃度を様々に変化させたが、D-DNA 入力で L-DNA 回路が起動することは無かった。その原因として、PNA/L-DNA 二重鎖が安定すぎるため、D-DNA 入力による toehold exchange が遅すぎるためと考えた。SNA は PNA ほど DNA に対する親和性が高くないため、SNA をインターフェースに用いて同様の検討を行った。その結果、入力 D-DNA の濃度依存的に L-DNA 回路が起動することが判明した。しかし L-DNA がリークするためか、D-DNA 入力なしでも蛍光増加が若干観察された。

以上の結果から、インターフェースとしては PNA よりも toehold exchange が起きやすい SNA の方が優れていることが判明した。

##### 4-2: D-aTNA seesaw gate の設計

SNA をインターフェースに用いた場合 L-DNA 回路ではリークが起きることから、SNA との親和性が高い D-aTNA で Seesaw gate を設計し、入力に D-DNA ではなく SNA と親和性の高い D-RNA を用いた。まずは D-aTNA で天然の D-DNA と同様に Seesaw gate が起動するか確認した。図 3 に、実際に設計した配列を示す。

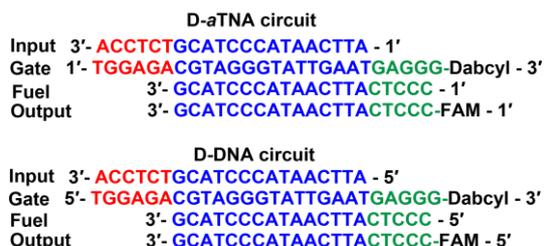


図 3 Seesaw gate の配列

D-DNA と全く同じ配列の D-aTNA 回路を設計し、D-DNA と同様に Seesaw gate が機能するか確認した。その結果、D-DNA は 25°C で回

路が起動したのに対し、ホモ二重鎖が D-DNA より安定な D-aTNA で設計した回路は、50°C で起動した (図 4a)。また配列特異性を調べたところ、フルマッチの Input 入力で蛍光増幅は起きたが、Mismatch や Scramble ではほとんど起きなかった (図 4b)。このように D-aTNA でも天然の D-DNA と同様に Seesaw gate は機能し、十分な配列特異性を有していることが判明した。

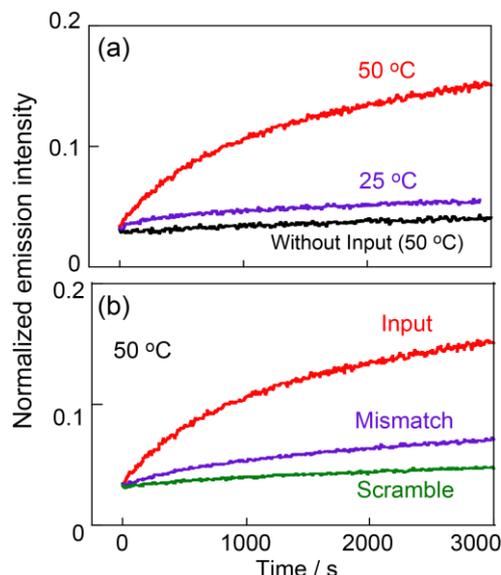


図 4 D-aTNA seesaw gate の、(a) Input 入力後のシグナル増幅の温度依存性、(b) 配列依存性

反応条件: 1.0 mM EDTA, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris buffer, pH 8.0, 10 nM output/gate duplex, 100 nM Fuel. 1.0 nM Input.

Input: 3'-ACCTCTGCATCCCACTTA-1'

Mismatch 3'-ACCACTGCATCCCACTTA-1'

Scramble: 3'-AATCTATTATCTTCTAGCCTT-1'

##### 4-3: D-DNA と D-aTNA 回路の直交性

次に DNA と D-aTNA seesaw gate 間で直交性が維持されているか、互いの Input を添加して検証した。図 5 a に示すように、D-DNA の Input を添加しても D-aTNA 回路は起動しなかった。同様に D-aTNA の Input を添加しても D-DNA 回路は起動しなかった (図 5b)。このよう二つの回路は完全に直交しており、特定の配列を持つフルマッチの Input のみで起動することが確認できた。この結果から、D-aTNA で増幅回路を設計すれば、夾雑 D-DNA や D-RNA による誤動作のないロバストなシステムが期待できる。そこで Gate のオーバーハング部位に対してのみ相補的な配列をもつ D-DNA を夾雑 D-DNA として添加し、その Seesaw gate への影響を調べた。図 6 a に示すように、D-DNA では Gate のオーバーハング部位に夾雑 D-DNA がハイブリッドするため、Input を添加しても増幅回路は起動しないと予想される。一方 D-aTNA 回路では夾雑 D-DNA と直交しているため、その影響を受けずに Input 添加による増幅回路の起動が期待できる。D-DNA seesaw gate では、予想通り夾

雑 D-DNA の添加で全く起動しなくなった。一方 D-aTNA では逆に夾雑 D-DNA の影響を全く受けずに起動した。このように D-aTNA で回路設計すれば、夾雑物の影響を受けないロバストなシステム設計が可能なのことが示された。

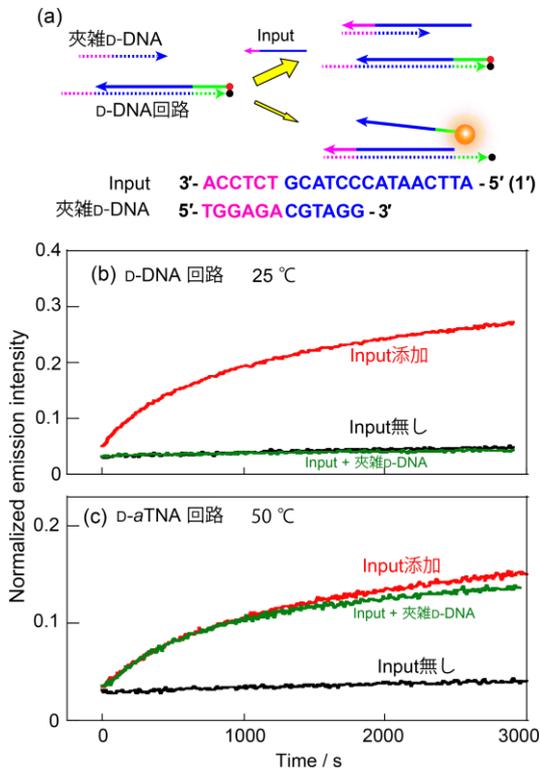


図 6 夾雑 D-DNA の Seesaw gate への影響  
(a) 夾雑 D-DNA の Seesaw gate への影響のモデル図  
(b) D-DNA 回路の、夾雑 D-DNA の存在下での起動  
(c) D-aTNA 回路の、夾雑 D-DNA の存在下での起動

反応条件：1.0 mM EDTA, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris buffer, pH 8.0. 1.0 nM Input, 1.0 nM 夾雑 D-DNA, 10 nM Output/Gate, 100 nM Fuel.

#### 4-4: SNA インターフェースによる D-RNA → D-aTNA 変換

D-aTNA 回路を天然の D-DNA あるいは D-RNA 入力で起動させるためには、D-DNA (D-RNA) を D-aTNA に変換する必要がある。SNA が D-DNA (D-RNA) と D-aTNA の両方と配列特異的に二重鎖を組むという特徴を生かし、toehold exchange で D-aTNA を出力するようなインターフェースを設計した。

図 7a に示すように、Input(D-aTNA) のオーバーハングを含む部位を覆い、かつ SNA 配列全てが標的の D-DNA (D-RNA) と相補的になるよう、インターフェース SNA を設計した。系内には D-aTNA seesaw gate と共に、あらかじめ Input(D-aTNA) をハイブリダイズさせておいた SNA インターフェースを共存させておく。Input(D-aTNA) が存在しても、Gate

の toehold に該当する配列はインターフェース SNA と二重鎖形成しているため、回路が起動することは無い。一方 D-DNA (D-RNA) が入力すると、Toehold exchange により SNA と二重鎖形成することで Input(D-aTNA) が出力され、D-aTNA seesaw gate が起動して蛍光増幅する。なお SNA は D-DNA (D-RNA) より D-aTNA への親和性が高いので、D-aTNA よりも標的 D-DNA (D-RNA) に対して長めに二重鎖形成するよう、SNA インターフェースを設計した。図 7b に示すように、標的である miR21(D-RNA) 非存在下では蛍光増幅が起きなかったが、D-RNA を添加したところ、期待通り蛍光増幅が起り、D-aTNA seesaw gate の起動が確認できた。SNA インターフェースなしでは標的 D-RNA を加えても蛍光増幅が起きなかったことから、設計通りに SNA がインターフェースとして機能していることが確認された。なお D-RNA のかわりに同じ配列を持つ D-DNA を添加したところ、蛍光増幅は起きなかった。これは D-DNA の SNA に対する親和性が低いため、Input(D-aTNA) との toehold exchange 反応が効率的に起きなかったためと考えられる。

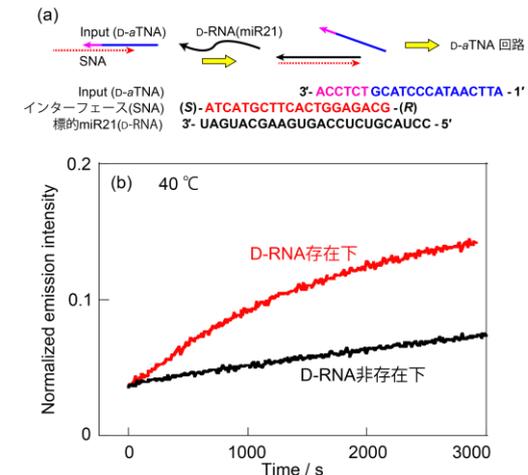


図 7 D-RNA(miR21) 添加に伴う SNA インターフェースを介した D-aTNA seesaw gate の起動

- (a) SNA インターフェースの作用機序の模式図  
(b) 標的 D-RNA(miR21) 添加に伴う蛍光増幅

反応条件：1.0 mM EDTA, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris buffer, pH 8.0. 1.0 nM Input (D-aTNA), 1.0 nM SNA インターフェース, 10 nM Output/Gate, 100 nM Fuel. 1.0 nM の D-RNA(miR21) を 0 sec で添加。

以上のように、本来直交している二つの論理回路を、インターフェースを通じてクロストークさせるシステムを構築するという当初の目標を、我々が開発した人工核酸 D-aTNA と SNA を使用することで達成した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) K. Murayama, R. Nagao, and H. Asanuma, “D-*a*TNA Circuit Orthogonal to DNA Can Be Operated by RNA Input via SNA”, *ChemistrySelect*, **2017**, *2*, 5624-5627.
- 2) B. Cheng, H. Kashida, N. Shimda, A. Maruyama, and H. Asanuma, “Chaperone-Polymer-Assisted, Photo-driven DNA Strand Displacement”, *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 1568-2572. (Front cover, 査読有り)
- 3) K. Murayama and H. Asanuma, “Effect of Methyl Group on Acyclic Serinol Scaffold for Tethering Dyes on the DNA Duplex Stability” *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 142-149. (査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

- 1) Hiroyuki Asanuma, “Creation of functional oligonucleotide with nucleotide-analogues designed from acyclic scaffold”, 日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月 20-23 日 (日大)、学術賞受賞講演
- 2) Hiroyuki Asanuma, “Azobenzene-tethered DNA for the photo-regulation of DNA functions”, INTERNATIONAL CONGRESS ON PURE & APPLIED CHEMISTRY 2018 (ICPAC2018), Mar. 7-10, 2018, Seim Reap(Cambodia) [Invited].
- 3) Hiroyuki Asanuma, “Light-driven DNA nanomachine with an azobenzene-tethered DNA as photon-engine”, the Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON 2018), Feb. 7-9, 2018, Hat Yai (Thailand) [Invited].
- 4) Hiroyuki Asanuma, “Light-driven molecular machines with azobenzene-tethered DNA”, International Conference on Natural and Artificial Molecular Machines (NAMM2018) Dec. 18-20, 2017, IIT Bombay (India) [Invited]
- 5) Hiroyuki Asanuma, “Design of totally acyclic XNAs for medical applications”, The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017), Dec. 14-16, 2017, Kyoto [Invited]
- 6) Keiji Murayama, Ryuya Nagao, Hiroyuki Asanuma, “Acyclic artificial nucleic acid circuit for sensitive detection of RNA”, The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017), Dec. 14-16, 2017, Kyoto.
- 7) 村山恵司, 長尾竜弥, 浅沼浩之, 「非環状型人工核酸で構成されるシグナル増幅回路の開発と RNA 可視化への応用」、第 66 回高分子討論会、2017 年 9 月 20-22 日

(愛媛大学)

- 8) 村山恵司, 樫田啓, 浅沼浩之, 「非環状型人工核酸への色素導入による高機能化」、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年 9 月 7-9 日 (東京大学)
- 9) 村山恵司, 長尾竜弥, 浅沼浩之, 「非環状型人工核酸 *a*TNA 及び SNA を利用したシグナル増幅回路の開発」、第 27 回バイオ・高分子シンポジウム、2017 年 7 月 27-28 日 (東工大)
- 10) Hiroyuki Asanuma, “Orientation-dependent FRET in DNA duplex”, FIBER International Summit for Nucleic Acids 2017 (FISNA2017), Jul. 19-21, Kobe, [Invited].
- 11) 浅沼浩之, 「直交人工核酸の拓く分子ナノテクノロジー」、新学術領域「分子ロボティクス」最終公開シンポジウム、2017 年 7 月 15 日 (東京大学)
- 12) 村山恵司, 長尾竜弥, 浅沼浩之, 「非環状型人工核酸を用いたシグナル増幅回路の開発と RNA 検出への応用」、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 16 日-19 日 (慶応大学)
- 13) 長尾竜弥, 村山恵司, 浅沼浩之, 「人工核酸 *a*TNA を用いたシグナル増幅回路の開発と核酸検出への応用」、第 47 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2016 年 11 月 5 日-6 日 (豊橋)

[図書] (計 1 件)

- 1) 浅沼浩之, 樫田啓, 丸善プラネット, ナノテクノロジーが拓く未来の医療、2017、21

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/seigyol/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅沼浩之 (ASANUMA HIROYUKI)  
名古屋大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：20282577

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし