

平成 30 年 5 月 25 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：16K14031

研究課題名(和文) 多重鎖形成可能な人工核酸の開発

研究課題名(英文) Development of artificial nucleic acids forming multi-stranded structures

研究代表者

榎田 啓 (Kashida, Hiromu)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30452189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：天然核酸はプリン塩基の両面で水素結合することにより、三重鎖や四重鎖構造を形成することが知られている。本研究では、この天然塩基を模倣し両面で水素結合可能な人工塩基を導入した人工核酸を合成した。その結果、この人工核酸が六重鎖構造を形成することを明らかにした。この六重鎖構造は、二価陽イオン存在下や低pHで安定化することが分かった。これらのことは六重鎖構造がpHセンサーや金属イオンセンサーとして機能することを示唆している。また、分子モデリング計算を行ったところ六重鎖構造は内部に空孔をもったユニークな構造をしていることが示唆された。そのため、新たな超分子モチーフやイオンチャネルとしての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Natural nucleic acids can form a triplex and a quadruplex by forming hydrogen bonds at both sides of purine bases. In this study, we synthesized novel artificial nucleic acids bearing novel nucleobases, which have hydrogen bonding sites at both sides. And we found that a hexaplex was successfully formed by these nucleic acids. The hexaplex was stabilized in the presence of divalent cations and low pH, indicating the potential of the hexaplex as pH and metal ion sensors. Molecular modelling calculation indicated that the hexaplex has a very unique structure with a pore at its center. It could be applied as novel supramolecular motifs and ion channels.

研究分野：生体関連化学

キーワード：六重鎖 人工核酸 人工塩基 シアヌル酸 アミノピリミジン 水素結合

1. 研究開始当初の背景

天然核酸が持つプリン塩基（アデニン、グアニン）は両面で水素結合することにより三重鎖や四重鎖構造を形成することが知られている。これらは医薬や検出材料といった応用が盛んに研究されているが、天然塩基だけではその構造や機能に制限があるため、応用範囲に限界があった。もし、両面で水素結合可能な人工塩基によるオリゴマーを調製することが出来れば、天然核酸では実現しえない多重鎖構造を調製することが可能となる。実際、近年人工塩基を用いた三重鎖や五重鎖形成や小分子（シアヌル酸）を介した三重鎖形成が報告されている。しかしながら、六重鎖以上の多重鎖はこれまで報告されていない。その原因として従来の人工塩基はほとんどすべて D-リボース骨格を利用していた点が挙げられる。D-リボースを介した人工塩基の導入は、一般的に煩雑な合成ステップが必要であり、またある種の分子は導入できないことが報告されている。このように D-リボースを主鎖骨格にもつ人工塩基の合成には大きな問題点があった。

それに対し、我々は D-リボースの代わりに D-トレオニノールを主鎖骨格にもつ D-aTNA の開発に成功した。また、この D-aTNA が天然核酸よりもはるかに安定な二重鎖を形成できることを明らかにした。更に、この D-aTNA は従来の D-リボースを介した人工塩基導入法と比較して合成が簡便であり、幅広い化学構造の分子を容易にオリゴマー化できるといった特長がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では D-aTNA 骨格に両面で水素結合可能な人工塩基を導入することにより、天然核酸では実現しえない多重鎖構造を調製することを目指した。具体的には天然塩基との三重鎖形成及び人工塩基のみによる六重鎖形成について検討を行った。これらは特異な金属イオン応答性や pH 応答性を示す全く新しい核酸材料としての応用が期待できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 人工塩基導入 D-aTNA オリゴマーの合成

本研究で合成した人工塩基の構造を図 1 に示す。

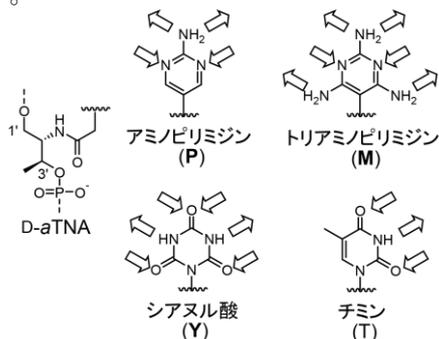


図 1. 人工塩基の化学構造

アミノピリミジン (P) はアデニン様の水素結合部位を両サイドにもつ。そのため、チミンとの三重鎖形成が期待できる。また、シアヌル酸 (Y) はチミン様の水素結合部位を両面にもつ。従ってアミノピリミジンと六重鎖形成が期待できる。更にトリアミノピリミジン (M) はアミノピリミジンにアミノ基を二つ導入した構造をしており、より安定な三重鎖・六重鎖形成が期待できる。これらの人工塩基及びチミンを D-aTNA 骨格に導入し、これらのオリゴマーによる 10 量体を合成した。また、それぞれのオリゴマーの末端には蛍光色素（フルオレセイン; f) もしくは消光剤（ダブシル; d) を導入した。こうすることで三重鎖及び六重鎖形成を蛍光によって評価することが可能となる。

(2) 人工塩基導入 D-aTNA の三重鎖及び六重鎖形成評価

多重鎖形成は基本的に蛍光変化によって評価した。また、六重鎖形成を証明するために native MS 測定や AFM 測定、ゲル電気泳動、GPC 測定を行った。更に、六重鎖の対イオン依存性や pH 応答性について検討を行った。

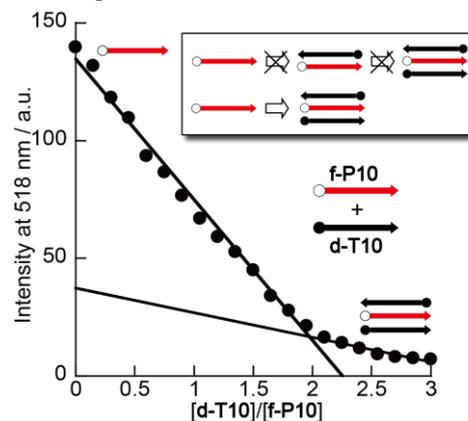


図 2. アミノピリミジンオリゴマーに対してチミンオリゴマーを滴定した際の蛍光変化

4. 研究成果

(1) アミノピリミジン及びチミンオリゴマーによる三重鎖形成

まずアミノピリミジンオリゴマーとチミンオリゴマーによる三重鎖形成について検討を行った。蛍光ラベルしたアミノピリミジン 10 量体 (f-P10) に対して消光剤でラベルしたチミン 10 量体 (d-T10) を滴定した際の蛍光変化を図 2 に示す。d-T10 を f-P10 に対して 2 当量加えた際に変曲点が現れたことから、設計通りアミノピリミジンオリゴマーがチミンオリゴマーと三重鎖を形成していることが明らかとなった。また、1 当量では変曲点は現れず、2 当量でのみ変曲点が現れたことから、一本鎖から直接三重鎖を形成することが明らかとなった。更に、この三重鎖形成の温度変化を図 3 に示す。降温過程、昇温過程における融解温度の差は 1 1 °C 程度であった。また、変曲点が一つのみ観察されたことから、一本鎖から三重鎖を直接形成していることが裏付けられた。アデニン-チミンな

どの天然核酸による三重鎖においては二重鎖を形成した後に三重鎖を形成することが知られている。アミノピリミジンは同一の水素結合部位を両面にもつために、協同的に三重鎖形成するという興味深い性質をもつことが分かった。

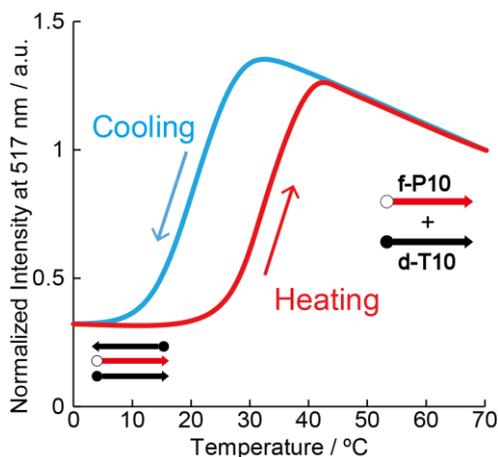


図3. アミノピリミジンオリゴマーとチミンオリゴマーによる三重鎖形成の温度変化

(2) アミノピリミジンオリゴマーとシアヌル酸オリゴマーによる六重鎖形成  
次にトリアミノピリミジンを一残基導入したアミノピリミジンオリゴマー (f-MP9) とシアヌル酸オリゴマー (d-Y10) による六重鎖形成について検討を行った。これらを混合した際の蛍光の温度変化を図4に示す。その結果、降温過程と昇温過程で約58°Cのもの非常に大きなヒステリシスを示すことが分かった。このヒステリシスは(1)の三重鎖と比較しても非常に大きいことから分子間で三重鎖以上の大きさをもつ複合体を形成していることが明らかとなった。

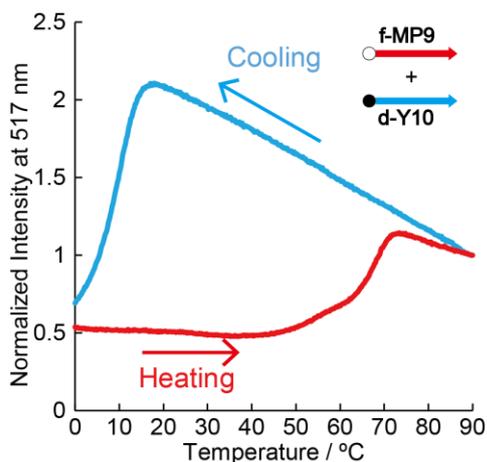


図4. アミノピリミジンオリゴマーとシアヌル酸オリゴマーによる六重鎖形成の温度変化

また、六重鎖形成を更に検討するために非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行

った。その結果、オリゴマーを混合した場合のみ一本鎖の上方にバンドが観察された。この結果は六重鎖形成を支持している。更にSECを測定した結果を図5に示す。その結果、一本鎖と比較してより高分子量側に一本のピークが観察された。また、一本鎖に対応するピークがほぼ観察されなかったことから複合体形成が極めて効率的であることが明らかとなった。

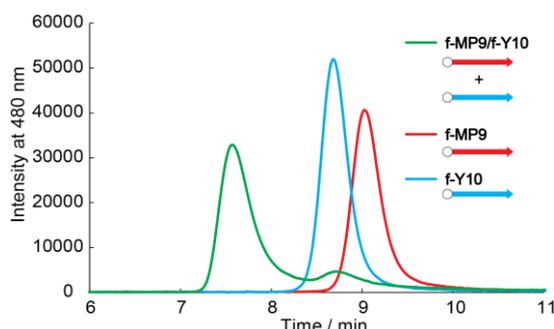


図5. 六重鎖のSEC測定結果

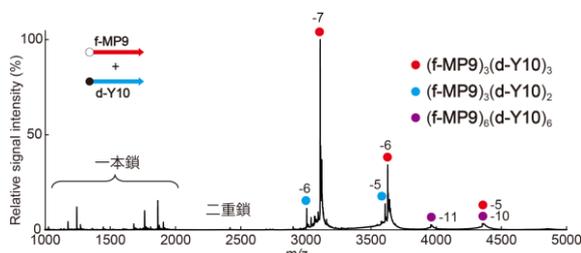


図6. 六重鎖のNative MS測定結果

そこで、六重鎖形成を直接証明するためにNative MS測定を行った(図6)。その結果、六重鎖に対応するピークが観察されたことから、合成したオリゴマーが設計通り六重鎖を形成していることが明らかとなった。これまでも人工塩基を利用した五重鎖形成の報告はあったが、本研究の成果によってオリゴマーによる六重鎖構造を初めて調製することに成功した。

六重鎖の機能について検討するために、六重鎖安定性の対イオン依存性及びpH依存性について検討した。MgCl<sub>2</sub> 20mMでは図4のような融解曲線を示したのに対し、NaCl 100mMの条件下ではほとんどヒステリシスを示さなかった。このことはNaCl存在下では六重鎖構造を形成していないことを示している。更に、様々な対イオン存在下で融解曲線を測定したところ、Ca<sup>2+</sup>やSr<sup>2+</sup>存在下では大きなヒステリシスを示した一方、K<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>やCs<sup>+</sup>ではほとんどヒステリシスは観察されなかった。このことは六重鎖構造が二価イオンによって安定化されることを示している。グアニン四重鎖はK<sup>+</sup>イオン存在下安定化することが知られているが、我々が開発した六重鎖は二価イオンに依存して形成するという興味深い性質が明らかになった。これらのことは六重鎖が金属イオン検出プローブとして機能することを示唆している。

また、六重鎖形成の pH 依存性について検討を行った。小分子のシアヌル酸単体での pKa は 6.9 と報告されているため、低 pH で六重鎖が安定化されると考えた。実際に様々な pH で測定した昇温過程における融解曲線を図 7 に示す。

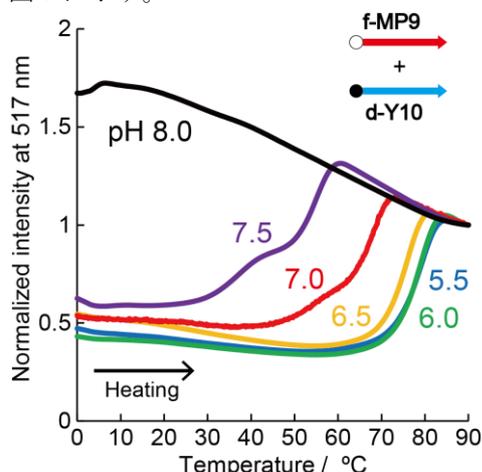


図 7. 六重鎖の融解温度 (昇温過程) の pH 依存性

その結果、pH を低下させるに伴い六重鎖は安定化し、pH6 以下ではほとんど変化しないことが分かった。一方、pH8 においては変曲点が観察されなかったことから、pH8 では六重鎖を形成できないことが分かった。このことは pH8 においてシアヌル酸が脱プロトン化し、六重鎖を不安定化したことを示している。このように本研究で調製した六重鎖はユニークな対イオン依存性、及び pH 依存性を示すことが明らかになった。

調製した六重鎖の分子モデリングを行った結果を図 8 に示す。その結果、中央に空孔をもつ直径約 2.7 nm の極めてユニークな円柱形状をとっていることが示唆された。実際、液中 AFM において六重鎖を観察したところ、円柱状の形状が見られた。また、高さ解析を行ったところ 2.88±0.46nm と計算されたことから、調製した六重鎖が図 8 に示すような円柱形状を形成していることが支持された。

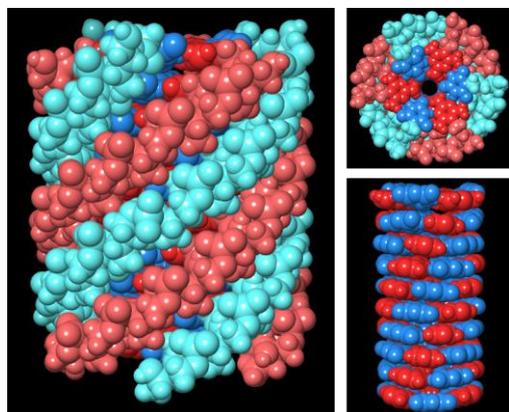


図 8. 六重鎖の分子モデリング。塩基部分のみの構造を右下に示す。

以上のように両面に水素結合を有する人

工塩基によるオリゴマーを合成することによって六重鎖構造を調製することに初めて成功した。調製した六重鎖は顕著な pH 依存性や金属イオン依存性を示すことから、pH センサーや金属イオンセンサーとしての応用が期待できる。また、六重鎖構造は特徴的な空孔を有していると考えられるため、イオンチャンネルなどの応用も期待できる。なお、これらの研究成果を元に現在論文投稿中である。

#### 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 4 件)

- ① H. Kashida, A. Kurihara, H. Kawai, H. Asanuma “Orientation-dependent FRET system reveals differences in structures and flexibilities of nicked and gapped DNA duplexes” *Nucleic Acids Res.*, 45, e105 (2017) DOI: 10.1093/nar/gkx200
- ② B. Cheng, H. Kashida, N. Shimada, A. Maruyama, H. Asanuma “Chaperone polymer-assisted, photo-driven DNA strand displacement” *ChemBioChem*, 18, 1568-1572 (2017) DOI: 10.1002/cbic.201700394
- ③ H. Kashida, H. Asanuma “Development of pseudo base-pairs on D-threoinol which exhibit various functions.” (review) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 90, 475-484 (2017) DOI: 10.1246/bcsj.20160371
- ④ 榎田啓、浅沼浩之 “DNA 二重鎖の高い安定性と直交性をもつ疑似塩基対の開発” 高分子論文集, 74, 257-264 (2017). DOI: 10.1295/koron.2017-0009

[学会発表] (計 11 件)

- ① 服部悠平, 榎田啓, 石井健太郎, 内山進, 浅沼浩之 “両面に水素結合部位を有する人工塩基を用いた六重鎖の調製” 日本化学会第 98 春季年会 2018 年
- ② 服部悠平, 榎田啓, 石井健太郎, 内山進, 浅沼浩之 “シアヌル酸とアミノピリミジンを用いた人工六重鎖の調製” 第 48 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2017 年
- ③ 服部悠平, 田添佳歩, 榎田啓, 石井健太郎, 内山進, 浅沼浩之 “人工塩基導入 aTNA を用いた人工六重鎖の開発” 第 66 回高分子討論会 2017 年
- ④ 服部悠平, 榎田啓, 石井健太郎, 内山進, 浅沼浩之 “非天然塩基導入 aTNA による人工六重鎖の開発” 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム 2017 年
- ⑤ 服部悠平, 榎田啓, 石井健太郎, 内山進, 浅沼浩之 “新規核酸材料の開発を目指した人工六重鎖の調製” 第 161 回東海高分子研究会講演会 (夏期合宿) 2017

年

- ⑥ Hiromu Kashida “Chemical synthesis of artificial DNA for functional materials”(invited) OIIB Summer School 2017 2017 年
- ⑦ 服部悠平, 田添佳歩, 井上直, 榎田啓, 浅沼浩之 “人工塩基導入 aTNA を用いた新規超分子モチーフの開発” 第27回 バイオ・高分子シンポジウム 2017 年
- ⑧ Hiromu Kashida “Molecular design of pseudo base pairs for functionalization of DNA”(invited) Annual Spring Meeting of Polymer Society of Korea 2017 年
- ⑨ 服部悠平, 田添佳歩, 井上直, 榎田啓, 浅沼浩之 “人工塩基導入 aTNA による多重鎖形成能の評価” 日本化学会第97 春季年会 2017 年
- ⑩ 榎田啓 “非環状骨格を持つ機能性疑似塩基対の開発” 第47 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2016 年
- ⑪ 田添佳歩, 井上直, 丸山諒子, 榎田啓, 浅沼浩之 “多重鎖形成を目指した新規人工塩基導入 aTNA の開発” 第10 回バイオ関連化学シンポジウム 2016 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔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

榎田 啓 (KASHIDA, Hiromu)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30452189

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし