

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18105006

研究課題名（和文） ミスマッチ塩基対安定化を基盤とした核酸構造制御による機能発現調節

研究課題名（英文） Functional Control by Modulating the Nucleic Acid Structure Based on Mismatch Base Pair Stabilization

研究代表者

中谷 和彦（NAKATANI KAZUHIKO）

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：70237303

研究成果の概要（和文）：DNAのミスマッチ塩基対に選択的に結合し、安定化する分子を基盤として用い、DNA一本鎖/二本鎖構造の光による可逆的な制御を実現した。さらにこの概念を、より高次なDNA構造や4本鎖構造、ステムループ構造などへ拡張出来ることを示した。DNA二本鎖会合によって創出されるさまざまな機能（蛍光発光特性、スピン集積、タンパク質発現、ナノ構造構築）を低分子によって制御する分子系を構築した。

研究成果の概要（英文）：We have established novel concept that small synthetic ligand, which selectively binds to DNA mismatch, could control higher order structures of DNA. DNA hybridization could be reversibly controlled by newly developed photoresponsive mismatch binding ligand, which allowed us to modulate various DNA-based functions depending on the ligand-specified DNA structures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	23,700,000	7,110,000	30,810,000
2007年度	35,300,000	10,590,000	45,890,000
2008年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2009年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	87,000,000	26,100,000	113,100,000

研究代表者の専門分野：ゲノム化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸、光制御、ミスマッチ、分子認識、DNAナノ構造、ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

整然としたDNA二重らせん構造は、ワトソン・クリックに遺伝子の謎を解く手がかりを与えた。それから50年、DNAは遺伝物質としての役割だけでなく機能性物質の基盤材料として大きく注目されている。二重らせんの発見以来、DNAのもつ高精度な分子認識能とB型と呼ばれる右巻き二重らせんの精緻な構造から、科学者はDNAを機能性材料として利用する可能性を強く意識してきた。過去10年のゲノム科学の急速な進展に伴った核酸化学、特に核酸自動合成技術の普及と化学修飾手法の成熟を待って、DNAを機能材料とした研究を進める環境が整ってきた。今や試薬会社の

カタログには、様々な化学修飾を施した、いわゆる「機能性DNA」が掲載され、注文すれば数日後には手にすることが可能となった。このように研究環境の整備が進むにつれ、現在の「機能性DNA」研究が内包する次の課題が浮き彫りにされて来た。DNAを用いる機能性材料創成研究は、DNAの2大特徴である「高精度な分子認識能」と「二重らせん形成能」に依存している（DNA in a Material World, Seeman N. C., Nature 2003, 421, 427-431）。即ち、自発的に二重らせんを形成する相補的なDNA鎖上に種々の官能基を搭載し、二重鎖形成による官能基周辺の環境変化により新たな物理的性質を発現させている。しかし、材

料には必ずその機能発現を調節するメカニズムを必要とするが、現在の機能性 DNA には発現した機能を「調節」する手法、即ち二重らせん形成を自在に操る手法が全く欠如している。DNA を用いた機能材料開発における次のブレイクスルーには、二重鎖の形成、解離を自在に制御する手法が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでのミスマッチ塩基対安定化研究の成果と長年蓄積してきた合成化学、光化学、DNA 科学、分子生物学に関する知識、技術、ノウハウを、DNA を基盤とした材料開発研究に集約し、二重鎖の形成、解離を自在に操る「核酸構造制御分子」の開発と「低分子による核酸高次構造制御」に基づいた「核酸機能発現の調節」を目的とする。具体的には以下の4課題の達成を目指す。

- (1) 光応答性ミスマッチ安定化分子の開発
- (2) 低分子による核酸構造制御法の確立
- (3) 核酸規制空間へのナノ組織体形成の分子制御
- (4) 遺伝子発現の光スイッチング

3. 研究の方法

(1) 光応答性ミスマッチ安定化分子の開発

課題(1)ではミスマッチを安定化出来る構造(オン状態)と出来ない構造(オフ状態)を光に応答してスイッチングする分子を開発する。具体的には、これまでもっとも研究が進んでいるグアニン-グアニン(GG)ミスマッチを標的として選び、塩基認識部位(ナフチリジン)と光応答性部位(アゾベンゼン)とを接合した分子を合成する。それぞれをつなぐリンカーの構造、アゾベンゼン部位の置換様式の最適化を精査、検討し、光感応性ミスマッチ安定化分子を開発する。

(2) 低分子による核酸構造制御法の確立

課題(2)では、低分子の結合をトリガーとする核酸構造制御法を確立する。標的とするDNAの特異構造それぞれに対して、新たな低分子リガンドの開発を行うほか、並行して研究を進める課題(1)の光応答性ミスマッチ安定化分子を組み合わせにより、核酸構造の光制御を実現する。具体的には①低分子の結合をトリガーとする、一本鎖から二本鎖への構造変換、②繰り返し配列を標的とする構造変換、すなわち、トリプレットリピート配列、テロメア配列(G四本鎖構造)における特異構造の低分子による制御、③DNAナノ構造、DNA折り紙など、高次のDNAナノ構造構築の制御、を実現する。

(3) 核酸規制空間へのナノ組織体形成の分子制御

DNAの配列・構造選択的なミスマッチ安定化分子の配置、およびその結合に伴うDNAの構造変換に基づく機能創発を行う。具体的に

は蛍光性修飾核酸を用いて、二本鎖会合制御による出力光の可逆的制御を実現する。また、ミスマッチ安定化分子自体にスピラベル等の機能付加することにより、DNAテンプレート上への機能分子の精密分子配置を実現し、制御された分子配置に基づく新機能の発現を目指す。

(4) 遺伝子発現の光スイッチング

我々の開発した核酸構造を制御する低分子を用いて、遺伝子の発現を光スイッチング可能な低分子-DNAペアを創成する。ミスマッチ安定化分子が選択的に結合する部位を、転写あるいは翻訳の開始に係る配列前後に挿入することにより、低分子リガンドの有無およびその光応答性に応じた遺伝子発現制御を目指す。

4. 研究成果

(1) 光応答性ミスマッチ安定化分子の開発とDNA二本鎖会合制御

① 熱分解性ミスマッチ安定化分子によるDNA二本鎖会合制御

ミスマッチ安定化分子により誘起された二本鎖構造は、一旦生成すると一定温度条件下で解離することはできない。昇温により定量的に熱分解するミスマッチ安定化分子TDを開発し、双方向性のDNA二本鎖会合制御を実現した(*ChemBioChem* 2007)。TDを用いることにより、金ナノ粒子の凝集、解離を制御することができる(図1)。本手法は熱分解という不可逆反応を含むため、完全な可逆性を持たない。以下に述べる光応答性ミスマッチ安定化分子では、可逆的制御を実現するため光応答性部位の導入を行った。

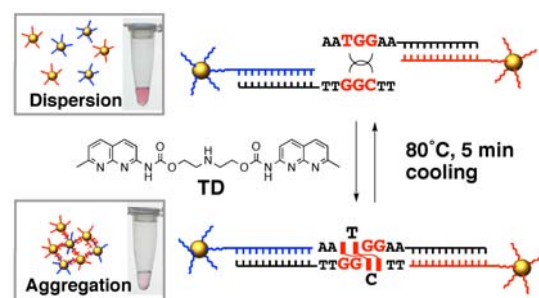


図1. 熱分解性ミスマッチ安定化分子による金ナノ粒子の凝集制御

② 光応答性ミスマッチ安定化分子の開発

ミスマッチ安定化分子を基本骨格として、光応答性ミスマッチ安定化分子の開発を行った。ミスマッチ安定化分子は2つの塩基認識部位をリンカー分子で連結した構造を有しており、例えばGGミスマッチを認識する安定化分子(NCD)は2つのナフチリジン部位を有する。この既存のGGミスマッチ安定化分子のリンカー部位に光応答性のアゾベンゼンを導入したものを光応答性ミスマッチ安定化分子(NCDA)

として合成した(図2)。NCDAは近紫外光(360nm)、可視光(430nm)を照射することにより、可逆的にアゾベンゼンのシス-トランス構造変換が進行する。NCDAの存在下、様々なDNAの安定性を二本鎖融解温度測定により評価した結果、XGG/XGG配列(中央に一ヶ所のGGミスマッチ)を含むDNAにおいて光照射前後におけるDNA二本鎖の安定性が大きく変化することを見出した。シス体のNCDAは、トランス体に比べ大きな二本鎖安定化能を有しており、360nmと430nmの光を組み合わせることでDNA二本鎖の安定性を可逆的に制御することが可能である。コンピューター計算による分子モデリングにより、トランス体ではその剛直な構造から安定な複合体を形成できないが、360nmの光照射により折れ曲がったシス体に変換することによって、GGミスマッチを含むDNAへの結合に適した構造をとることが出来るものと示唆された。

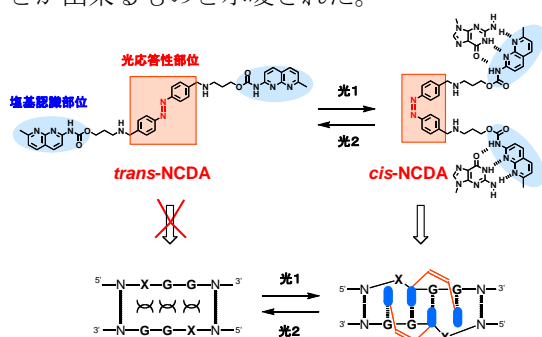


図2. 光応答性ミスマッチ安定化分子によるDNA二本鎖会合制御

実際にNCDAによるミスマッチ安定化能を用いて、一本鎖DNA/二本鎖DNA間の構造変化を等温条件下、光によって可逆的に制御することに成功した(*J. Am. Chem. Soc.* 2007)。さらに、より高い光スイッチングを実現に向け光応答性ミスマッチ安定化分子の構造最適化および、塩基認識部位の再設計による標的配列の拡張を行ったが、以上は初めての光応答性ミスマッチ安定化分子NCDAの開発成功を基盤としている(*Bioorg. Med. Chem.* 2009, *Eur. J. Org. Chem. Med.* 2009)。人工小分子によるDNAの構造制御はこれまでに例がなく、本研究成果は核酸構造制御の新たな方法論を提示した。光応答性ミスマッチ安定化分子を用いると標的となる核酸そのものに対する化学修飾は不要であり、長鎖核酸や細胞中での機能制御など幅広い応用が可能となる。

(2) 低分子による核酸構造制御法の確立
課題(1)で光応答性ミスマッチ安定化分子によるDNA一本鎖二本鎖構造変化制御を実現した。DNAの他の特異構造を制御できる新規合成低分子リガンドの開発を行ったほか、ここまでに開発したミスマッチ結合分子を用いてより高次のDNA構造制御への応用を試みた。

①テロメア結合性小分子の開発研究
ヒトゲノム配列が明らかとなり、遺伝子変異の迅速検出や、疾病原因遺伝子の発現制御の実現が今後の課題となっている。ヒト染色体末端にはテロメア繰り返し配列と呼ばれる領域が存在し、細胞の恒常性維持やがん化とも密接に関連していると考えられている。テロメア領域に結合し、その生物学的活性を制御する化合物は、細胞のガン化を解明するためのツールとして、あるいは治療薬としての可能性を秘めている。本研究では、テロメア繰り返し配列に全く異なる構造変化を引き起こす小分子化合物の結合評価を行った。

(a) 合成小分子「ナフチリジンテトラマー(NT)」がテロメア四重鎖構造と呼ばれる特徴的なDNA構造を破壊して、ヘアピンループ構造を誘起することを明らかにした(*ChemBioChem.* 2007, 2008) (図3)。

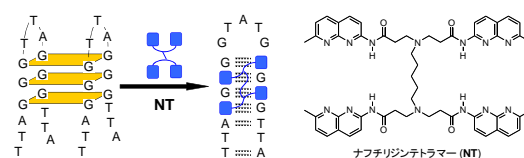


図3. NTが誘起するテロメア配列内のヘアピン構造

(b) ケシ科植物に存在するSanguinarineが、連続的に形成されたテロメア四重鎖間に入り込み、安定な新奇テロメア高次構造体を形成することを明らかにした(*ChemBioChem.* 2008) (図4)。本研究は香港パプティスト大学のJiang教授との共同研究成果である。

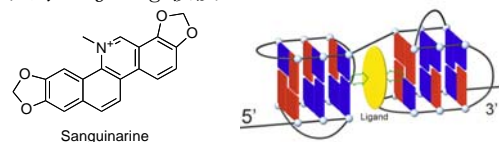


図4. Sanguinarineによる新奇テロメア高次構造体の誘起

②トリヌクレオチド繰り返し配列結合性小分子の開発研究
ヒトゲノム中に存在する繰り返し配列が過度に伸長することにより、重篤な遺伝性疾患が発症することが知られている。現在のところ、根本的な治療法や進行を防止する治療法は確立されていない。本研究では、小分子「ナフチリジン-アザキノロン(NA)」「メチルカーバモイルナフチリジンダイマー(MCND)」を合成し、それぞれCAG、GAAリピートに選択的に結合する様子を、酵素化学的手法、分光学的手法を組み合わせて明らかにした(*Chem. Eur. J.* 2009, *ChemBioChem.* in press) (図5)。両化合物は、繰り返し配列に対してユニークなヘアピンループ構造を誘起して結合し、DNAポリメラーゼによるDNA複製を阻害した。繰り返し配列に選択的に結合する化合物は、疾患

の治療・診断薬のリード化合物として、さらに遺伝子疾患の原因となる繰り返し配列伸長の分子機構解明のツールとして利用できると期待される。

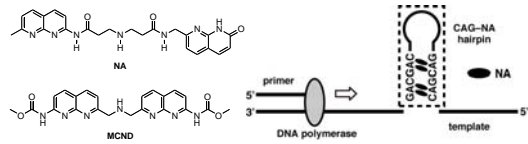


図5. トリヌクレオチドリPEAT結合分子によるヘアピン構造誘起とDNA複製阻害

③ 小分子化合物を介したループ間相互作用の人為的制御

HIV ウイルスは、ゲノム配列内の特定のループ領域間の塩基対形成が起点になり、二量体を形成し増殖する。このようなループ間相互作用様式は、リボスイッチ機構においても認められ、核酸の機能発現において重要な役割を果たしている。本研究では、「ナフチリジンカーバメートテトラマー(NCT)」がDNAのループ内に存在するCGG繰り返し配列を認識し、2つのループを連結させることを明らかにした (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2011) (図6)。小分子を介した核酸構造の制御法は、人為的な遺伝子調節素子の開発や核酸を利用したナノ組織体形成の分子制御法の開発につながるものと期待される。

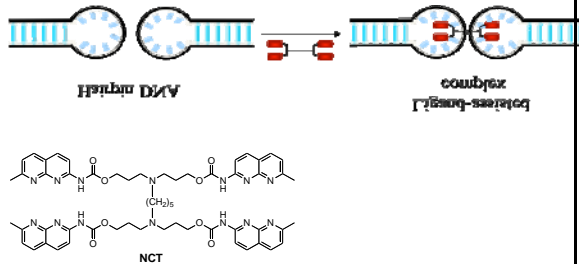


図6. 小分子リガンド(NCT)を介したDNAループ間相互作用の誘起

④ DNAナノ構造構築

DNAの高精度な分子認識能を利用すれば、配列設計を十分に行うことによって、精密なナノスケールの構造体を構築することができる。さらにミスマッチ安定化分子によるDNA構造制御を用いれば、さまざまなナノ構造体形成を任意のタイミングで誘起することができ、静的なナノ構造に動的な要素を付加することが可能になる。DNAナノ構造として、比較的単純な構造を有するDNA四面体を選択し、ミスマッチ安定化分子によるナノ構造構築の制御を行った。

新たに設計したDNA四面体は、GGミスマッチ配列を含むため、自発的に四面体構造を形成できない。ミスマッチ結合リガンドNCDを添加すると、ミスマッチ領域での二本鎖形成が促進され、四面体構造への自己会合が進行する(図7)。低分子DNA結合リガンドによっ

て、DNAナノ構造構築が誘起できることを、ゲル電気泳動と原子間力顕微鏡を用いた観察により明らかにした。 (*Chem. Commun.* 2011)。

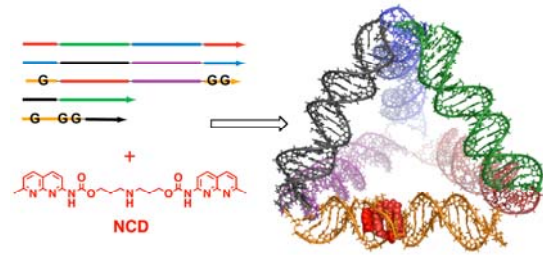


図7. ミスマッチ安定化分子により誘起される3D-DNAナノ構造

(3) 核酸規制空間へのナノ組織体形成の分子制御

ミスマッチ結合分子を用いたDNA二本鎖形成制御を用いて、DNAを基盤とする機能発現制御への応用を試みた。

① DNA光学デバイス

Bern大学のHäner教授らとの共同研究を行い、光応答性ミスマッチ安定化分子NCDを用いて、図8に示すような光駆動型の超分子光学デバイスを構築した。

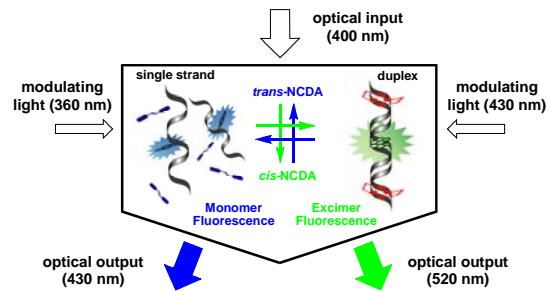


図8. 光駆動型DNAスイッチの模式図

NCD存在下、蛍光性修飾核酸の二本鎖形成を光によって可逆的に制御することにより、その光学特性(青色・緑色蛍光)を自在に制御することに成功した。小分子リガンドと修飾核酸により構築した本超分子系は、入力情報として外部刺激である光を用いて、出力情報として異なる波長の蛍光を与える。本成果は、このような光で制御される光変換デバイスを、DNAを用いて作成した最初の例である。このDNAデバイスは、機能部位とスイッチング部位が完全に分離されているので、別の機能部位と融合させることが容易であり、DNAスイッチングデバイスへ幅広く応用できる (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2009)。

② 有機スピンのDNA上への集積

DNAはその配列情報により、アドレスを指定して正確に分子を配置できるテンプレートであり、DNAナノ構造を用いれば2、3次元空間への精密配置も可能である。電子スピンの制御された空間配置の実現を指向して、GGミス

マッチ安定化分子に有機安定ラジカルを導入した分子 **NCD-NN** を開発した (図 9)。本分子は、GG ミスマッチ部位に選択的に結合するため、塩基配列を設計することにより、DNA の任意の位置に電子スピンを導入することが可能である (*Chem. Commun.* **2010**)。さらに、ミスマッチ安定化分子とスピン分子の組み合わせを設計することで、DNA の異なる位置に異なるスピンを導入することができ、DNA をテンプレートとしたスピンの自在な配置への道を拓いた (*Chem. Lett.* **2010**, editor's choice)。

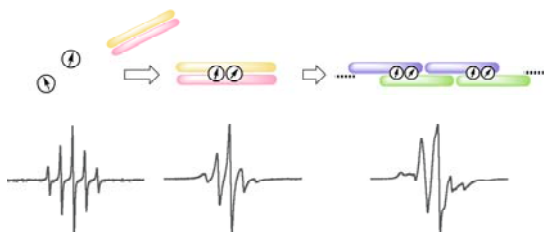


図 9. ミスマッチ安定化分子を用いた DNA 上への有機スピンの集積

(4) 遺伝子発現の光スイッチング

近年、生体内の特定の代謝産物が mRNA の構造変化を引き起こし、その結果タンパク質の発現を制御するリボスイッチ機構が明らかになった。外部からの刺激や、外部要因により遺伝子発現を制御出来れば、人為的遺伝子発現制御に基づいた遺伝子治療の実現へと期待できる。

① RNA ミスマッチ安定化分子による遺伝子発現制御

RNA の GG ミスマッチに結合する低分子リガンドの開発を行った。ナフチリジン 4 量体を基盤骨格とする本分子は、mRNA の 5' 非翻訳領域に結合することにより、mRNA の構造変化を誘起し、翻訳過程を抑制できることが明らかになった (論文準備中)。

② 光による結合の制御可能な RNA-小分子ペアの開発

光照射により構造が変化するアゾベンゼン含有ペプチド (RAzR) の合成と、光照射により低分子との結合が制御される RNA を、*in vitro* セレクション法により探索した。セレクション法により得られた RNA と RAzR との結合は、360 nm および 430 nm の光照射により可逆的に制御可能であった (図 10)。

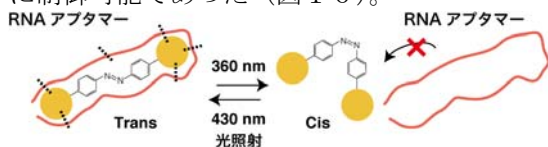


図 10. ペプチド-RNA 間相互作用の光スイッチング

得られた RNA-小分子ペアを遺伝子発現制御領域と融合させることにより、光応答性遺伝子発現素子へと展開できると期待できる (*J.*

Am. Chem. Soc. **2007**, *Chem. Eur. J.* **2009**)。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 39 件) (全て査読有)

- ① Control of DNA hybridization by photoswitchable molecular glue. Dohno, C.; Nakatani, K. *Chem. Soc. Rev. in press.* (総説)
- ② Ligand-Assisted Complex of Two DNA Hairpin Loops. Hong, C.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4390-4393.
- ③ Ligand Inducible Assembly of a DNA Tetrahedron. Dohno, C.; Atsumi, H.; Nakatani, K. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3499-3501.
- ④ Antisense-Induced Guanine Quadruplexes Inhibit Reverse Transcription by HIV-1 Reverse Transcriptase. Hagihara, M.; Yamauchi, L.; Seo, A.; Yoneda, K.; Senda, M.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11171-11178.
- ⑤ Non-covalent assembly of TEMPO radicals pair-wise embedded on a DNA duplex. Atsumi, H.; Maekawa, K.; Nakazawa, S.; Shiomi, D.; Sato, K.; Kitagawa, M.; Takui, T. and Nakatani, K. *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 556-557. (Editor's Choice).
- ⑥ Fluorescent Indicator-Displacement Assay for Ligand-RNA Interactions, Zhang, J.; Umemoto, S.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3660-3661.
- ⑦ Programmed Assembly of Organic Radicals on DNA. Maekawa, K.; Nakazawa, S.; Atsumi, H.; Shiomi, D.; Sato, K.; Kitagawa, M.; Takui, T.; Nakatani, K. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1247-1249.
- ⑧ Recognition of Mismatched Base Pairs in DNA, Nakatani, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, *82*, 1055-1069. (総説)
- ⑨ Secondary Structure-Inducible Ligand Fluorescence Coupled with PCR, Takei, F.; Igarashi, M.; Hagihara, M.; Oka, Y.; Soya, Y.; Nakatani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7822-7824.
- ⑩ A Light-Driven, Supramolecular Optical Switch, Uno, S.; Dohno, C.; Bittermann, H.; Malinovskii, V. L.; Häner, R.; Nakatani, K.

Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, *48*, 7362-7365.

- ⑪ Small molecule affecting the replication of trinucleotide repeat d(GAA)_n, He, H.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10641-10648.
- ⑫ Photoswitchable Unsymmetrical Ligand for DNA Hetero-Mismatches, Dohno, C.; Yamamoto, T.; Nakatani, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4051-4058.
- ⑬ RNA Aptamers That Reversibly Bind Photoresponsive Azobenzene-Containing Peptides, Hayashi, G.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 424-432.
- ⑭ Photoswitchable Molecular Glue for DNA, Dohno, C.; Uno, S.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11898-11899.
- ⑮ Photoregulation of a Peptide-RNA Interaction on a Gold Surface, Hayashi, G.; Hagihara, M.; Dohno, C.; Nakatani, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8678-8679.
- 他 2 4 件 全て査読有

[学会発表] (計 1 5 8 件)

- ① 中谷和彦 「DNA・RNA に結合する小分子現状と課題」第 13 回生命化学研究会「分子で拓く生命化学」, 仙台, 2011.1.8, 招待講演
- ② Nakatani, K. A Light-Driven, Light-switching DNA Device, DNA Photonics Symposium at the PacifiChem2010, Honolulu, USA, 2010.12.17, 招待講演
- ③ Nakatani, K. Small molecules binding to the hairpin secondary structure of trinucleotide repeat sequences, Nucleic Acid Based Therapeutics Symposium at the PacifiChem2010, Honolulu, USA, 2010.12.16, 招待講演
- 他 1 5 5 件 (うち招待講演 3 0 件)

[図書] (計 1 件)

- ① 齋藤烈、杉山弘、中谷和彦編、化学同人「ゲノム化学」2007年 全214ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

- ①名称：一塩基多型を検出する方法および一

塩基多型を検出するための試薬キット

発明者：中谷和彦、武井史恵、萩原正規
権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2010-054658.

出願年月日：2010 年 3 月 11 日

国内外の別：国内

②名称：核酸と被験物質との結合親和性を測定するための組成物及びその利用

発明者：中谷和彦、張 錦華、梅本詩織、笹岡眞一、和崎隆博

権利者：大阪大学、日東化成株式会社

種類：特許

番号：特願 2009-519347

出願年月日：2008 年 7 月 30 日

国内外の別：国内

③名称：DNA 二本鎖形成制御

発明者：中谷和彦、Peng Tao、堂野主税

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2006-162265.

出願年月日：2006 年 6 月 12 日

国内外の別：国内

他、国内特許 2 件

[その他]

ホームページ

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/rbc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 和彦 (NAKATANI KAZUHIKO)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：70237303

(2) 研究分担者

堂野 主税 (DOHNO CHIKARA)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：60420395

萩原 正規 (HAGIHARA MASAKI)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：40403000

武井 史恵 (TAKEI FUMIE)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：30252711

周 大揚 (ZHOU DA-YANG)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：00324848

(平成 18 年度～平成 21 年度)