

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間	2021～2025
課題番号	21H05025
研究課題名	非環状型人工核酸による人工遺伝システムの創成とその進化分子工学への応用
研究代表者氏名（ローマ字）	浅沼 浩之（ASANUMA Hiroyuki）
所属研究機関・部局・職	名古屋大学・工学研究科・教授
研究者番号	20282577

研究の概要：

代表者の浅沼らはアミノ酸由来の非環状型人工核酸を独自に開発した。本研究では、L-aTNA を”ゲノム”に見立てた自己複製(L-aTNA→L-aTNA)・転写(L-aTNA→DNA(RNA))・逆転写(DNA(RNA)→L-aTNA)という人工遺伝システムを非酵素的に実現することで、L-aTNA が Pre-RNA ワールド仮説の候補になりうる原始核酸であることを実証し、さらに L-aTNA 人工アダプター創成へと展開する。

研究分野：生体関連化学、核酸化学

キーワード：人工核酸、SNA、L-aTNA、RNA ワールド、Pre-RNA

1. 研究開始当初の背景

RNA ワールド仮説が 1980 年代に受け入れられてから生命の起源に注目が集まるようになり、原始生命の誕生を化学的に再現する前生物的研究 (Prebiotic Chemistry) が勃興した。その一環として、RNA の鋳型依存的自己複製を、原始地球に存在していたと想定される単純な有機分子や無機物のみで化学的に再現する研究が開始され、RNA (DNA) の非酵素的鋳型複製が研究されている。しかし RNA のライゲーション効率が低いことに加え 3'-OH の選択的ライゲーションが不十分など、RNA ワールド成立のシナリオにおいて未解決の問題が山積していた。そのため、RNA よりも単純な構造を持った“原始核酸” (=Pre-RNA ≡ 人工核酸) による遺伝システムからなる Pre-RNA ワールドが存在し、その後に遺伝物質としての役割が RNA へ委譲されたと考えられるようになった。Pre-RNA ワールド仮説に適合する“原始核酸”は少なくとも、1) RNA よりも構造が単純かつ合成も容易である、2) RNA・DNA と配列特異的に安定な二重鎖形成が可能である (RNA・DNA との間で配列情報の変換が可能)、3) 鋳型依存的オリゴマー合成が非酵素的に実現できる、という条件を満たさなければならない。しかし pre-RNA ワールド仮説に合致した原始核酸は未だに発見されていなかったため、Pre-RNA ワールド仮説の研究は停滞していた。

2. 研究の目的

代表者の浅沼らは、合成が容易なセリノール誘導体を骨格に持つ非環状型人工核酸 SNA と L-aTNA を独自に開発し (図 1)、これらが安定なホモ二重鎖を形成するだけでなく、天然の DNA および RNA とともに安定な二重鎖形成が可能であることを見出した。さらにシアノイミダゾールと金属イオン (Mn^{2+} , Zn^{2+}) を組み合わせた化学ライゲーション法で、天然のリガーゼを凌駕する極めて高効率な L-aTNA の鋳型依存的化学ライゲーションが可能であることを見出した (*Nat. Commun.*, 2021, 12, 804)。すなわち L-aTNA は、Pre-RNA ワールド仮説に適合する“原始核酸”の 3 条件を満たしていた。そこで本申請では、L-aTNA を“ゲノム”に見立て、化学ライゲーションによる 1) L-aTNA 鎖の鋳型依存的複製 (自己複製・自己増幅)、2) L-aTNA 鎖→DNA 鎖 (あるいは RNA 鎖) への“転写”、3) DNA 鎖 (あるいは RNA 鎖) →L-aTNA 鎖への“逆転写”を実現する。このような人工遺伝システムが実現すれば、DNA のシーケンシングを通じて間接的に L-aTNA 配列の解釈が可能になる。さらに PCR 増幅後の DNA を L-aTNA に逆転写すれば、人工核酸でも DNA と同様の進化分子工学が可能になる。そこで人工遺伝システムの応用の一環として、(2) DNA の進化分子工学を模倣した、L-aTNA 人工アダプターの取得へと展開する。

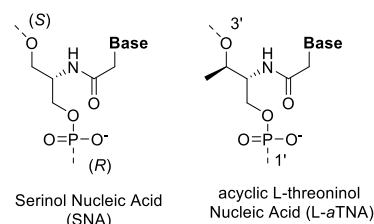


図 1 非環状型人工核酸の構造

3. 研究の方法

代表者の浅沼のグループは主に化学ライゲーションによる人工遺伝システムの構築を行う。まず L-aTNA で高速ライゲーションが起こる機構を解析し、さらなる効率化の指針を得て、それを元に図 2 に示すように、プライマー鎖と XNA3 量体のランダムプール (64 種類) のフラグメントを用いた鋳型鎖の非酵素的伸長反応を非酵素的に実現する。L-aTNA アダプター取得は、進化分子工学が専門の根本らのグループが主体となって行う。進化サイクルを回す上で最もお現状で最も困難が予想されるのが、L-aTNA への転写である。転写効率が不十分の場合

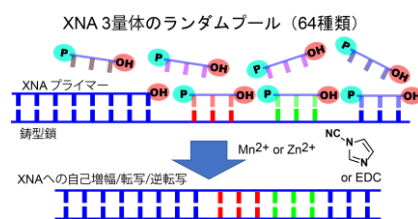


図 2 自己複製・転写・逆転写の模式図

に備え、DNA ランダムプールから L-aTNA 鎖に相補的な DNA のみを釣り上げてくる方法をオプションとして検討する。

4. これまでの成果

化学ライゲーションでは二級水酸基よりも一級水酸基の求核攻撃が 10 倍以上速かった (K. Murayama and H. Asanuma et al., *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 804)。そこで両末端が一級水酸基の SNA (図 1 参照) と L-aTNA 鎖の連結反応の比較したところ、SNA の連結反応は L-aTNA の 1/10 程度であることが判明し、連結部位における L-aTNA の骨格構造が主に連結効率の向上に寄与していることを明らかにした。さらに、連結部位の水酸基側が L-aTNA の場合に比べ、リン酸基側が L-aTNA の場合に加速の効果が大きいことも明らかとなった。このことから、一級水酸基による求核性より二級水酸基がリン酸化されていることの重要性が示唆された。そこで L-aTNA の鎖伸長においてはプライマー(反応開始鎖)の連結部位にリン酸基が存在する場合の方が反応がより加速されるのではないかと考え、2 級水酸基がリン酸化されたプライマーが伸長するよう伸長方向が 1'→3' になるよう変更し、さらに Mn²⁺ から Cd²⁺ に変更したところ連結速度が 10 倍向上し、ランダムプールを用いた 17-mer の伸長反応が 4°C 4 時間で 86%、8 時間で 97% とほぼ完全に複製できた。この最適化した条件下で長鎖 L-aTNA の合成を目指して、29-mer の L-aTNA 鋳型鎖上で 8-mer の L-aTNA プライマーと 3-mer の L-aTNA 断片のランダム配列プール (T3 mix) を用いて逐次的な連結反応を行ったところ、反応開始から 4 h 後で 29-mer の鋳型鎖で 71% で目的の完全伸長産物が得られた。次に鋳型鎖を DNA および RNA に代えて連結反応 (逆転写反応) を行った。鋳型鎖が DNA の場合は L-aTNA 4 mer のランダム配列プールを用い 16 mer の DNA 鋳型鎖と 8 mer の L-aTNA プライマーで連結反応を行ったところ、PEG6000 との併用で 4°C 24 時間で完全長の L-aTNA 鎖が収率 30% で逆転写産物が得られた。一方 RNA を鋳型に用いた場合は、L-aTNA の複製と同じ 3-mer のランダム配列プールを使用しても 4°C 24 時間で収率 59% で逆転写産物が得られた。以上のように、図 2 に示すような L-aTNA の自己複製と逆転写を実現した。さらに DNA ランダムプールから L-aTNA 鎖に相補的な DNA を釣り上げる方法も実現し、L-aTNA 鎖を DNA 鎖に配列転写できた。

5. 今後の計画

令和 5 年度以降は研究計画に沿って 1) L-aTNA 二重鎖の自己増幅、2) 金属錯体化による連結反応の高速化、3) L-aTNA アプタマー取得に注力する。なお進化サイクルを回すための各技術はできたので、特に 3) の L-aTNA アプタマー取得を目指す。研究計画ではトロンビンアプタマーを計画しているが、トロンビンと同様に比較的短い配列でアプタマー取得が報告されている ATP も標的とする。具体的には、① L-aTNA のランダムプールの調製→②標的分子との錯形成・フィッシング→③DNA ランダムライブラリーとの二重鎖形成による DNA への配列転写・PCR 増幅→④RNA ポリメラーゼによる RNA への転写→⑤ RNA→L-aTNA への逆転写→② という進化サイクルを回したのちに、DNA 転写後の配列を次世代シーケンサーで読み取る。こうして L-aTNA アプタマーを取得する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. "Methyl group configuration on acyclic threoninol nucleic acids (aTNAs) impacts supramolecular properties"
*Murayama, K.; Kashida, H.; *[Asanuma, H.](#) (査読有)
Org. Biomol. Chem., **2022**, *20*, 4115-4122. DOI: 10.1039/d2ob00266c **Selected as a "Front Cover"**
2. "Orthogonal amplification circuits composed of acyclic nucleic acids enable RNA detection"
Chen, Y.; Nagao, R.; *Murayama, K.; *[Asanuma, H.](#) (査読有)
J. Am. Chem. Soc., **2022**, *144*, 5887-5892. DOI: 10.1021/jacs.1c12659 **Selected as a "Supplementary Cover"**
3. "Color-Changing Fluorescent Barcode Based on Strand Displacement Reaction Enables Simple Multiplexed Labeling" (査読有)
Makino, K.; Susaki, E.; Endo, M.; *[Asanuma, H.](#); *Kashida, H.
J. Am. Chem. Soc., **2022**, *144*, 1572-1579. DOI: 10.1021/jacs.1c09844
4. "Xeno nucleic acids (XNAs) having non-ribose scaffolds with unique supramolecular properties"
*[Asanuma, H.](#); Kamiya, Y.; Kashida, H.; Murayama, K. (査読有)
Chem. Commun., **2022**, *28*, 3993-4004. DOI: 10.1039/d1cc05868a **Selected as a "Front cover"**
5. "Comprehensive analysis of transglutaminase substrate preference by cDNA display coupled with next-generation sequencing and bioinformatics", Damnjanović, J., (5 名省略), [Nemoto, N.](#), Hitomi, K., *Nakano, H. *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, 13578. DOI.org/10.6084/m9.figshare.20252976.v1. (査読有)
6. "RNA 以前に非環状型 XNA が Pre-RNA として存在したか?"
*[浅沼浩之](#), 沖田ひかり, 村山恵司 (査読有)
Viva Origino, **2021**, *49*, 9. DOI: https://doi.org/10.50968/vivaorigino.49_9

他、論文発表 19 件、学会発表 66 件、図書 2 件、産業財産権 4 件

7. ホームページ等

<http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioanal3/index.html>