

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22850004

研究課題名（和文） PNA/DNA インベージョン複合体の固定化を利用した  
ゲノムDNA 高次構造の解析研究課題名（英文） Construction of stabilized PNA/DNA invasion complex  
for the analysis of higher-order structure of DNA

研究代表者

愛場 雄一郎 (AIBA YUICHIRO)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：10581085

研究成果の概要（和文）：

人工核酸の一つであるペプチド核酸 PNA は、他の核酸アナログとは一線を画す非常に高い DNA との親和性を有しており、インベージョン（2 本鎖 DNA 中に潜り込み、新たに 2 組の PNA/DNA 2 本鎖を形成する現象）という特徴的な DNA 認識が可能となっている。本研究では、PNA によるインベージョンの生体内応用を志向し、化学的なアプローチからインベージョンをより効率的かつ、安定化するための新規修飾 PNA の設計・開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

Peptide Nucleic Acid (PNA) is a one of DNA analogues and it can form stable duplex with its complementary DNA. Furthermore, PNA can “invade” a double-stranded DNA sequence-selectively (formation of invasion complex) and this special recognition mode of double-stranded DNA is called “strand invasion”. In this study, we developed a strategy to stabilize the invasion complex for the analysis of higher-order structure of DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,250,000	375,000	1,625,000
総計	1,250,000	375,000	1,625,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：核酸、バイオテクノロジー、遺伝子、ゲノム、PNA

## 1. 研究開始当初の背景

ペプチド核酸（Peptide Nucleic Acid: PNA）は、DNA の主鎖骨格をペプチド結合に置き換えた人工核酸であり、リン酸の負電

荷による反発がないことから、他の核酸アナログと比べ非常に安定に DNA との相補鎖形成を行う。さらに PNA はこの高い安定性から、ストランド・インベージョン（2 本鎖 DNA に配列特異的に潜り込み、ターゲット部分の

DNA 2 本鎖を解離させ、より安定な 2 組の PNA/DNA 2 本鎖を新たに形成する現象) と呼ばれる非常に特徴的な DNA 認識が行えることが知られている (図 1)。これにより、PNA は他の核酸アナログでは困難な、変性操作などを必要としない「直接的な 2 本鎖 DNA 認識」が可能となっている。このように、インベージョンは非常に特徴的かつ魅力的であるが、生体内などで応用する場合にはその安定性に改善の余地があった。

そこで本研究では、PNA によるインベージョンの生体内応用を志向し、インベージョンをより効率的かつ、安定化するための新規修飾 PNA の設計・開発を目指した。

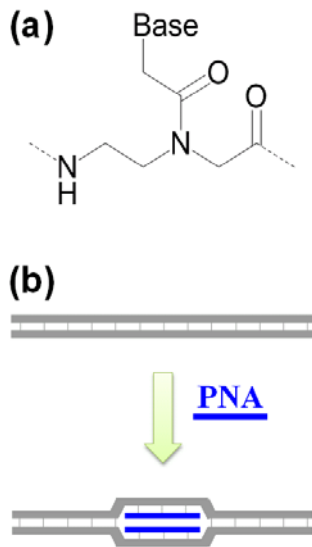


図 1. (a) PNA の構造 (b) PNA によるインベージョン

## 2. 研究の目的

1. 研究背景で述べたように、PNA はストランド・インベージョンという特徴的な DNA 認識様式を有し、これによって他の核酸アナログでは困難な 2 本鎖 DNA の直接的な認識が可能となっている。このインベージョンは、直鎖状 DNA とスーパーコイル DNA とでその効率が変化するなど、DNA の高次構造に応じて挙動が変化することが知られている。もし、PNA を細胞内に導入し生体内のゲノム DNA を対象としたインベージョンが行うことができれば、その効率の変化などを利用して DNA の構造情報を得るためのプローブとしての応用などが期待できる。しかしながら、*in vitro* に比べ生体内では PNA のインベージョン複合体の安定性の低下が予想され、より簡便な生体内 PNA インベージョンの応用に向けては、新たな設計が必要であった。

そこで本研究では、化学的なアプローチからインベージョンをより効率的かつ、安定化

するための新規 PNA の設計・開発を目指し研究を行った。上記のことが達成されれば、構造を反映したインベージョン効率の変動を利用し、生体内での DNA 高次構造を直接的に観察するプローブの開発など、様々な応用が期待される。

## 3. 研究の方法

具体的には、(1) 付加的リンカー導入による新規 PNA 修飾法の開発、(2) カチオニックペプチドを用いたインベージョン複合体の安定化および、(3) ビオチン化 PNA とストレプトアビジンとの相互作用を利用したインベージョン複合体の固定化という 3 つのアプローチから検討を進めた。ここで、各種 PNA による DNA へのインベージョンは、gel-shift アッセイ (electrophoretic mobility shift assay) やケミカルプロービングを用いて評価した。

### (1) 付加的機能性リンカー導入による新規 PNA 修飾法の開発

修飾 PNA を開発するうえで、様々な官能基やタグなどを導入しようとした際に、合成上の問題から末端に導入するのが一般的である。しかし設計によっては末端以外への導入が必須かつ非常に重要となる場合もある。そこで、本研究では簡便な PNA 修飾法開発に向けて、PNA 骨格中に足場となるリンカーを付加的に導入し、その DNA 認識能が保持されるかについて検討した。まず、10 残基の PNA の中央に様々な長さのリンカーを導入し、相補鎖 DNA との 2 本鎖形成能および、インベージョン実験からその評価を行った。

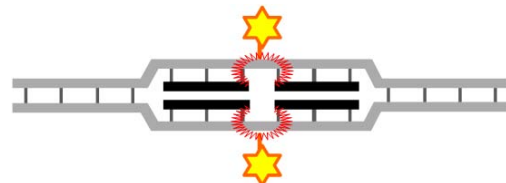


図 2. 付加的リンカー導入による新規 PNA 修飾法の開発

### (2) カチオニックペプチドとのコンジュゲーションによるインベージョン複合体の安定化

PNA はその骨格がアミド結合からなっており、様々なアミノ酸やペプチドを導入することが容易である。そこで、カチオニックペプチドを PNA に導入することで、その静電引力を利用した安定化を試みることにした。この際最終的な生体内応用を志向し、カチオニックペプチドとして NLS (Nuclear Localization Signal・核移行シグナル; PKKKRKV) を選択した。

(3) ビオチン化 PNA とストレプトアビジンとの相互作用を利用したインベージョン複合体の固定化

インベージョンした後に、PNA 部分を何かしらのリンカー等で連結すれば、トポロジ的にインベージョン複合体が固定化され、安定に保持されることが期待できる (図3)。そこで、PNA 中にビオチン残基を導入し、ストレプトアビジンとの強力な相互作用を利用して、インベージョン複合体の固定化を試みることにした。



図3. インベージョン複合体の固定化

4. 研究成果

(1) 検討の結果、いずれの場合でも PNA のもつ高い配列認識能が保持されていることが分かった。図4に一例を示す。フルマッチでは、修飾 PNA に由来するインベージョン複合体が上部に確認されるが、ミスマッチ配列を用いた場合はそのバンドが消失していることがわかる。また、今回の検討では特に、PEG 系のリンカーが有効であることが分かり、さらに詳細に検討したところ様々な濃度域でも修飾 PNA が有効に機能していることが確認できた。

このように付加的な導入方法では、従来の骨格修飾法とは異なり、それぞれのモノマー合成も必要とせず、非常に簡便かつ有力な手法である。

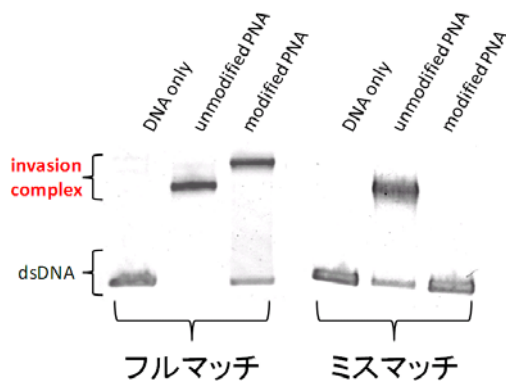


図4. リンカー導入 PNA によるインベージョン実験

(2) NLS 導入 PNA を用いたところ、通常の PNA に比べ DNA との親和性が向上していることが示唆された。さらに興味深いことには、従来は安定なインベージョン複合体のために PNA が 2 本必要であったが、NLS 修

飾することで 1 本の PNA 単独でのインベージョンも可能となることが明らかとなった (図5)。本系は従来のインベージョン複合体と異なるものであるため、インベージョン時に形成される 1 本鎖領域を対象としたケミカルプロービングによってその認識能について評価を行った。

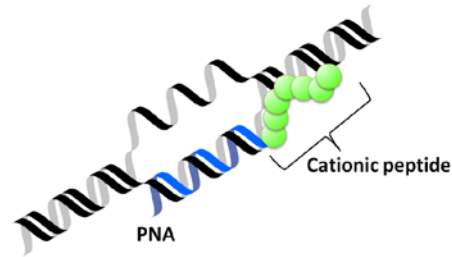


図5. NLS 導入 PNA によるインベージョン

このように、従来系に比べ構成要素を少なくし系を簡素化することは、*in vitro* でも重要であるが、それ以上に細胞内応用を行う上では非常に重要な知見である。また、生体内のゲノムを直接ターゲットとするまでは及ばなかったが、予備的検討として NLS 導入 PNA をヒト培養細胞内に導入し、PNA とコンジュゲートしても NLS が有効に機能するかについて確認を行った。図6を見ると、核染色した青色の領域と、色素標識した赤色の領域がよく一致しており、NLS-PNA が核に局在していることが示唆された。

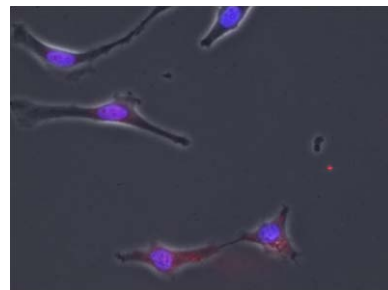


図6. NLS 導入 PNA の細胞内導入 (青: 核染色、赤: 色素標識 NLS-PNA)

(3) PNA の両末端にビオチンを導入したものに、コントロールとして何も修飾を行っていない通常の PNA を用いてインベージョン実験を行った。まず、DNA と PNA とを混合しインキュベートさせ、インベージョン複合体を形成させる。その後、ストレプトアビジンを加え、さらにインキュベートを行い gel-shift アッセイによって評価を行った。図7を見ると、ストレプトアビジンを加えない場合には、未修飾・修飾 PNA とともにバンドが上方にシフトしており、きちんとインベージョン複合体が形成されていることが分かる。そこへ、ストレプトアビジンを加えた

ころ、ビオチン修飾 PNA を用いた場合では、先程までのインベージョン複合体に由来するバンドが消失し、ウェル直下にバンドが見られている。通常の PNA を用いた場合では、ストレプトアビジンを添加してもこのような現象は確認できず、PNA 上のビオチンがストレプトアビジンと相互作用し、インベージョン複合体が固定化されているものと考えられる。

(1) ~ (3) の結果は、今後細胞内 PNA プロブを開発する上で非常に重要な知見であると言える。

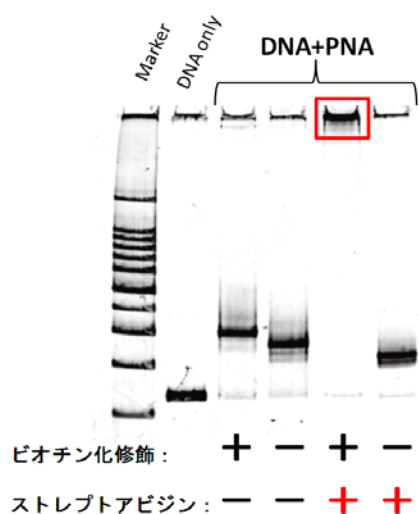


図 7. ビオチン化 PNA による

## 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 2 件)

- ① Y. Aiba, T. Lönnberg, M. Komiyama  
“Manipulation of Single-Stranded DNA Using Artificial Site-Selective DNA Cutter Composed of Ce(IV)/EDTA and Phosphonate-Oligonucleotide Conjugates”  
*Chemistry – An Asian Journal*, [査読有] 2011, accepted.
- ② Y. Aiba, J. Sumaoka and M. Komiyama  
“Artificial DNA Cutters for DNA Manipulation and Genome Engineering”  
*Chemical Society Reviews*, [査読有] 2011, 10.1039/C1CS15039A.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 愛場 雄一郎・濱野 悠也・亀島 渡・Accetta, Alessandro・Sforza, Stefano・Marchelli, Rosangela・Corradini, Roberto・小宮山 眞  
“PNA-peptide conjugate による 2 重鎖 DNA 位置選択的切断への応用”  
第 60 回高分子討論会  
2011 年 09 月発表予定、岡山大学
- ② 愛場 雄一郎・濱野 悠也・本田 祐太・亀島 渡・菊池 宏海・嶋 成美・須磨岡 淳・小宮山 眞  
“細胞内応用を志向した人工 DNA カッター (ARCUT) の開発”  
第 21 回バイオ・高分子シンポジウム  
2011 年 7 月口頭発表予定、関西大学
- ③ 愛場 雄一郎・濱野 悠也・Accetta, Alessandro・Sforza, Stefano・Marchelli, Rosangela・Corradini, Roberto・小宮山 眞  
“Ce(IV)/EDTA とペプチド核酸・ペプチドコンジュゲートによる位置選択的 DNA 切断”  
第 28 回希土類討論会  
2011 年 5 月 12 日口頭発表、タワーホール船堀
- ④ 愛場 雄一郎・濱野 悠也・Accetta Alessandro・Sforza Stefano・Marchelli Rosangela・Corradini Roberto・小宮山 眞  
“PNA-Peptide conjugate を利用した DNA 位置選択的切断”  
日本化学会第 91 春季年会  
2011 年 3 月 29 日口頭発表、神奈川大学
- ⑤ Y. Aiba・M. Komiyama  
“Strict recognition of double-stranded DNA by chemically modified PNA (Peptide Nucleic Acid).”  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies  
2010 年 12 月 17 日ポスター発表、Honolulu, Hawaii, USA
- ⑥ Y. Aiba・Y. Hamano・A. Accetta・S. Sforza・R. Marchelli・R. Corradini・M. Komiyama  
“Site-selective scission of double-stranded DNA by Ce(IV)/EDTA and only one mixed-base PNA.”  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies  
2010 年 12 月 16 日ポスター発表、Honolulu, Hawaii, USA
- ⑦ Y. Aiba・Y. Nishiyama・M. Komiyama  
“Incorporation of a flexible linker into pseudo-complementary PNA for the strict recognition of DNA.”

The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010  
2010年11月10日ポスター発表、  
Yokohama, Japan

- ⑧ 愛場 雄一郎・濱野 悠也・Accetta Alessandro・Sforza Stefano・Marchelli Rosangela・Corradini Roberto・小宮山 眞

“単一の PNA-peptide コンジュゲートを利用した位置選択的 DNA 切断”  
第4回バイオ関連化学シンポジウム  
2010年9月26日ポスター発表、大阪大学

- ⑨ 愛場 雄一郎・濱野 悠也・Accetta Alessandro・Sforza Stefano・Marchelli Rosangela・Corradini Roberto・小宮山 眞

“単一の PNA-peptide コンジュゲートを利用した位置選択的 DNA 切断”  
第25回生体機能関連化学シンポジウム  
「若手フォーラム」  
2010年9月23日ポスター発表、大阪大学

- ⑩ 愛場 雄一郎・小宮山 眞  
“機能性リンカー導入による新規 PNA 修飾法の開発”  
第22回生体機能関連化学部会 若手の会サマースクール  
2010年7月16日ポスター発表、三重県

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mkomi.rcast.u-tokyo.ac.jp/member/aiba.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

愛場 雄一郎 (AIBA YUICHIRO)

東京大学・先端科学技術研究センター・

特任助教

研究者番号：10581085