

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550041

研究課題名(和文) トリアゾリウムカチオンを架橋部にもつ水易溶性人工核酸の創製

研究課題名(英文) Post-modification of triazole-linked analogues of DNA for positively charged variants

研究代表者

藤野 智子 (Fujino, Tomoko)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70463768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：DNAのリン酸部を排除した人工核酸は高い安定性をもつことから注目されている。我々はクリック化学を活用したトリアゾール連結型人工核酸(TLDNA)を開発している。TLDNAの安定性や錯形成能を活用した機能展開を行うにあたり、中性のオリゴマーに不可避の溶解性の問題を克服することが重要な課題となっていた。本研究ではトリアゾール連結部をメチル化し、主鎖に正電荷を付与することで水易溶性人工核酸を開発した。水への溶解性が800倍以上向上しただけでなく、負電荷をもったDNAに対し優れた錯形成能を示すことを明らかとした。さらに生命科学分野・材料科学分野における独自の機能展開を行った。

研究成果の概要(英文)：One of the most common problems accompanied with non-phosphorus, electroneutral DNA analogues is the low solubility of the oligomers. Despite the chemical and biological stability benefited from the absence of the negatively charged phosphate linkages, the electroneutral strand lacks electrostatic supports for the solubility. This solubility issue also arose, when we prepared long oligomers of TL DNA. Specifically, unique functions of TLDNA congeners such as lure substrates for reverse-transcriptase prompted us to explore further applications with longer oligomers, but the solubility problem became severe as the oligomers lengthened. We reported a concise post-modification method for the preparation of positively charged variants, TLDNA+. A one-step methylation of oligothymine TLDNA successfully afforded TLDNA+ with an improved solubility in high yield. The pentamer TLDNA+ formed a triple helix with natural oligoadenine DNA in addition to a mercury-mediated self-duplex.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・有機化学

キーワード：DNA 人工核酸 トリアゾリウム トリアゾール 酵素

### 1. 研究開始当初の背景

[研究の学術的背景] DNA はフラノース環・リン酸ジエステル部位からなる比較的単純な骨格に核酸塩基を配列した構造をもっており、生体内において遺伝情報を担う重要な高分子である。遺伝情報は4つの核酸塩基の配列により記述され、その配列は相補的な配列をもつ核酸鎖との二重らせん形成に必須である。近年、ペプチド核酸(PNA)の例に見られるように非天然型主鎖に核酸塩基を配列させることで二重らせんを形成し、それにより遺伝子発現を人為的に操作できることが報告されている。しかし、このような中性骨格をもつ人工核酸は、水に対する溶解性が乏しく、アンチセンス・アンチジーン分子などの遺伝子発現制御をはじめとした機能の開発にあたり、溶解性の克服が重要な課題となっている。

我々は研究開始当初、官能基許容性の高い付加環化反応を利用し、トリアゾール環を連結部位にもつ人工核酸<sup>TL</sup>DNAを開発した(Isobe, H. *et al. Org. Lett.* **2008**, *10*, 3729)。核酸伸長反応に高効率なアルキンとアジドとの銅触媒 [3 + 2] 型付加環化反応を利用することで、必要最小限の反応工程による簡便な合成法を実現し、ポリチミン型<sup>TL</sup>DNA多量体は、天然核酸と安定な二重らせんを形成することを見いだしていた。この<sup>TL</sup>DNAの高い安定性と天然核酸への高い錯形成能を生かした機能を探るにあたり、長鎖<sup>TL</sup>DNAの水溶液への溶解性の問題に直面した。本研究は、この問題を解決し、<sup>TL</sup>DNAの遺伝子発現制御への展開を指向した機能性を開拓することを目指したものである。

### 2. 研究の目的

本研究は、<sup>TL</sup>DNAの溶解性低下の問題を、トリアゾール環のアルキル化という汎用性が高く簡便な手法により解決することに着目したものである。トリアゾール環は高い塩基性をもつために、窒素上にアルキル基を導入することで正電荷を帯びたトリアゾリウムカチオンへ変換される。この高効率・高選択的な反応を利用することでトリアゾリウムカチオンを連結部位にもつ水易溶性人工核酸<sup>TL</sup>DNA+を開発し、その機能を開拓することを目指した。<sup>TL</sup>DNA+は負電荷を帯びた天然核酸に対し高い結合能力をもつことが予想され、これにより、遺伝子発現制御への展開を指向した機能を開拓することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1) トリアゾール環のアルキル化を利用した水易溶性人工核酸<sup>TL</sup>DNA+ (図1)の合成法を確立し、(2) 天然核酸への錯形成能の評価により機能性人工核酸を開発することを目指した。(1)に関しては、<sup>TL</sup>DNA+の合成のための反応条件を最適化し、量的供給を可能とする合成経路の確立を行

った。(2)に関しては、研究開始当初から、SD計算により<sup>TL</sup>DNA+が天然DNA相補鎖と錯形成することが示唆されており、これを実験的に証明し、その特性を明らかにすることを目指した。これらにおいては、構造の多様化も視野にいれ、RNA(<sup>TL</sup>RNA)や環状二量体構造(c-di-GMP<sup>TL</sup>, c-di-AMP<sup>TL</sup>)などの類縁体の開発も同時に行った。さらにこれら人工核酸の生命科学分野および材料科学分野における機能を模索し、その機能性の拡張を行った。

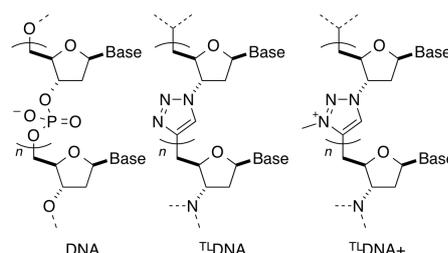


図1. DNA, <sup>TL</sup>DNA, <sup>TL</sup>DNA+の構造

### 4. 研究成果

#### (1) <sup>TL</sup>DNAの第二世代合成法の開発

<sup>TL</sup>DNA+を開発するにあたり、まずはその原料となる<sup>TL</sup>DNAオリゴマーの合成効率を分子設計の見直しにより改善することとした。固相合成では、効率的な伸長反応に加え、保護基とリンカーの設計が、成否の鍵を握っている。<sup>TL</sup>DNAの固相合成法では、脱保護段階および伸長段階を繰り返すことでオリゴ

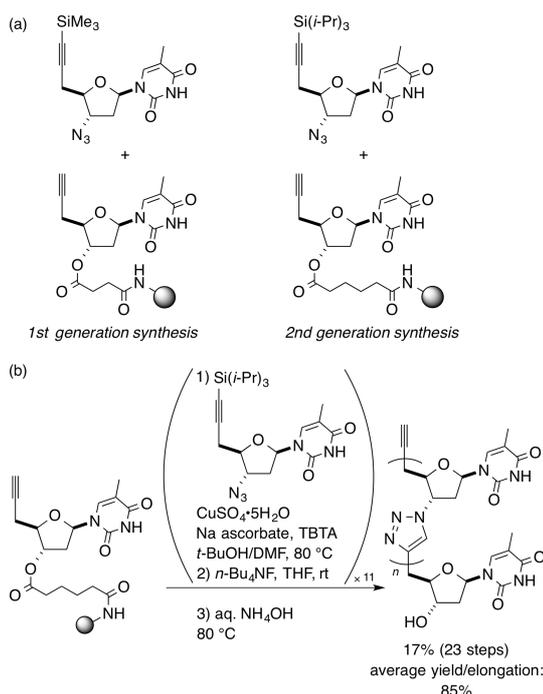


図2. <sup>TL</sup>DNAオリゴマーの第二世代合成法

マーの合成を行うが、どちらの反応も1価の銅を用いており、アセチレン保護基であるTMS基が、伸長段階でも一部脱保護されてしまっていた。そこで、保護基をトリイソプロピルシリル (TIPS) 基へと変えた (図 2a)。この変更により脱保護にはTBAFを用いることとなり、必然的にコハク酸リンカーの変更も必要となった。いくつかの候補を検討した結果、アジピン酸リンカーが最適であることを見いだした。単量体の合成は、従前の経路により行うことができ、4種の核酸塩基をもつデオキシリボヌクレオシド類縁体を合成している。新しいTIPS/アジピン酸リンカー法の効果は目覚ましく、固相合成12量体オリゴヌクレオチド dT(tdT)<sub>10</sub>tdT の合成は、23工程後の総収率が17%であった (図 2b)。一伸長段階あたりの平均収率も85%まで向上した。これにより、天然DNAの自動合成やペプチド伸長反応を活用したPNAの合成に匹敵する合成効率を実現した。将来、十分に量的供給可能なオリゴヌクレオチドが開発できていると考えている。

### (2) <sup>TL</sup>DNA+ の開発

<sup>TL</sup>DNA の連結部であるトリアゾール環をメチル化することで、主鎖に正電荷をもつトリアゾリウムカチオン連結型人工核酸<sup>TL</sup>DNA+を開発した。はじめに<sup>TL</sup>DNAオリゴチミンを出発原料とした<sup>TL</sup>DNA+の合成法を開発した。<sup>TL</sup>DNAのメチル化反応は過剰量のヨウ化メチル存在下で良好に進行し、<sup>TL</sup>DNA+ 2量体, 4量体および5量体をそれぞれ96%, 71%, 99%の収率で得ることができた (図 3a)。いずれも粗生成物をヘキサンなどの有機溶媒で洗浄することで精製でき、一度に数十ミリグラムスケールでの合成を行うことができた。<sup>TL</sup>DNA+ 5量体は主鎖に正電荷を持つため、水への溶解性が中性の

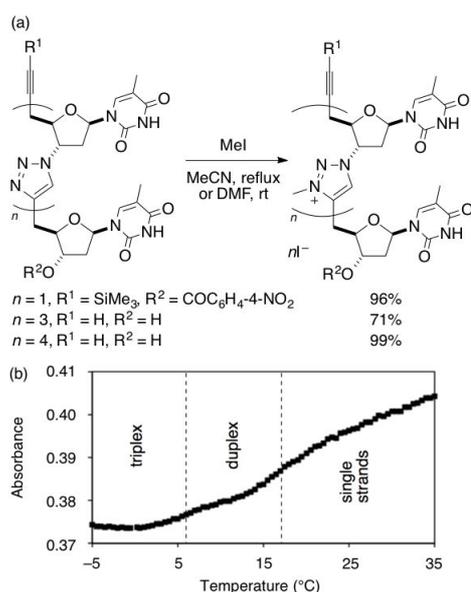


図 3 (a) <sup>TL</sup>DNA+ の合成 . (b) <sup>TL</sup>DNA+ オリゴチミン 5 量体と DNA ポリアデニン dA<sub>20</sub> との三重鎖の融解温度 .

<sup>TL</sup>DNA 5 量体と比べて約 800 倍向上したのみならず、負電荷を帯びた天然核酸 ((dA)<sub>20</sub>) に対して高い錯形成能をもち、5 量体という短鎖でありながらも安定な三重鎖を形成することを見いだした (図 3b)。本成果により、当初の研究目標であった、高い水溶性と錯形成能を併せ持つ人工核酸の簡便かつ大量供給可能な合成法を開発することができたと考えている。

### (3) <sup>TL</sup>RNA の開発

<sup>TL</sup>DNA・<sup>TL</sup>DNA+ の分子設計をそのまま用いて RNA 型人工核酸を開発できるとの着想のもと、トリアゾール連結型 RNA の開発を行った。DNA と RNA の構造上の違いは 2'位ヒドロキシ基の有無のみであるが、この差が機能上では大きな違いとなる。人工核酸でもヒドロキシ基による機能性の違いが期待されるが、RNA 類縁体はこのヒドロキシ基の存在が合成上の制約となるため報告例は数例しかない。我々はクリック伸長法の官能基許容性の高さに着目し、この手法を<sup>TL</sup>RNA合成へと展開した。まず D-キシロースから合成したオキセタンをジアセテートへ誘導した (図 4)。ジアセタートのグリコシル化は、擬 2'位アセトキシ基の隣接基関与によりβ選択的に進行し各種核酸塩基を合成し、各種保護基を導入することができた。<sup>TL</sup>DNA と比べ、選択性・効率とも良好な経路となった。クリック伸長反応は、想定通り 2'-ヒドロキシ基に影響を受けず良好に進行した。<sup>TL</sup>RNA の固相合成法では、これまでに 10 量体の合成まで展開できており、1 伸長あたりの平均収率でも 80% を超える効率を実現している。<sup>TL</sup>RNA は、<sup>TL</sup>DNA と同様長鎖になるにつれ溶解性が低下することが示唆されるが、<sup>TL</sup>DNA+ と同様の手法で、連結部をメチル化し水易溶性 RNA 類縁体を開発できると考えている。

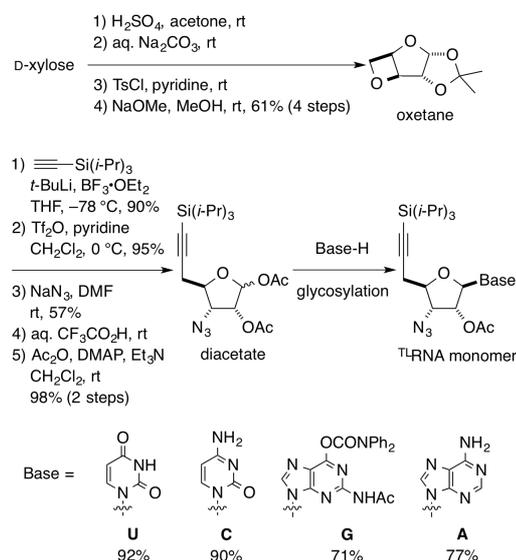


図 4. <sup>TL</sup>RNA 単量体の合成

#### (4) 環状二量核糖核酸の開発

<sup>TL</sup>RNA 合成における単量体を分子内で連結すれば、簡便に環状二量核糖核酸(c-di-GMP, c-di-AMP)類縁体を合成できるとことに着目し、トリアゾール連結型の環状二量核糖核酸を開発した。環状二量核糖核酸は、柔軟な十二員環骨格を有するため多様なタンパクと相互作用することで細菌の様々な機能を制御する二次情報伝達物質である。2004年に早川らによりその大量合成法が開発されて以来、ますます注目を集めている。この合成法は二種類のリボヌクレオシド類縁体をホスホアミダイト法により連結する7工程を要するものであった。我々はクリック伸長法を用いることで、環状二量核糖核酸類縁体をわずか2工程で大量に合成できる手法を開発した。<sup>TL</sup>RNA単量体から一段階で誘導したりボヌクレオシド類縁体の二分子間の付加環化反応を高希釈条件下で行い、その後保護基を一挙に脱保護することでc-di-GMP<sup>TL</sup>、c-di-AMP<sup>TL</sup>を簡便に得ることができた(図5)。これらは、その内部にシクロファン構造を導入したことで配座が固定化されており、今後構造多型性の制御による機能展開が期待できる。

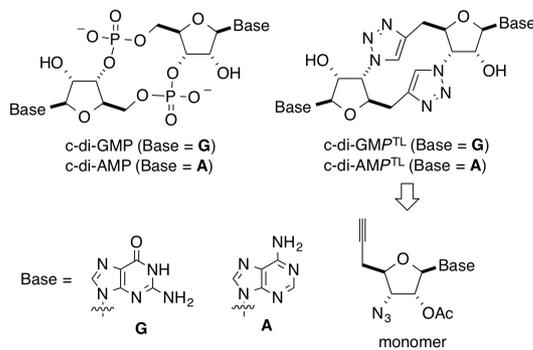


図5. c-di-GMP/c-di-AMP および c-di-GMP<sup>TL</sup>/c-di-AMP<sup>TL</sup>の構造。

#### (5) 生命科学への応用：<sup>TL</sup>DNAの酵素基質化

<sup>TL</sup>DNA および <sup>TL</sup>DNA+ を活用した遺伝子発現制御への展開を指向するなかで、今回中性の <sup>TL</sup>DNA を活用した独自の機能開発を行った。<sup>TL</sup>DNAの最大の特徴は連結部以外の構造が天然DNAと全く同じであることである。核酸の3'末端は転写・複製過程における反応点であるが、我々は<sup>TL</sup>DNAの3'末端も逆転写酵素により反応点として認識されることを見いだした。逆転写酵素は、成熟mRNAの情報を相補的DNA(cDNA)として入手する際に活用されている。mRNAには3'末端にポリアデニン配列が存在し、DNAオリゴチミンを開始鎖とした逆転写反応を行えば、細胞抽出後の全RNAから選択的にmRNAの情報を写し取ることができる。この逆転写反応に<sup>TL</sup>DNAオリゴチミンを添加すると、これが開

始鎖基質となり、逆転写生成物である長鎖DNAが得られた(図6)。その生成量はDNAオリゴチミン生成物の1.5倍であり、効率的な開始鎖基質となったことが示唆された。生成したDNAがcDNAであったことは、そのPCRにより細胞由来β-アクチン遺伝子が増幅されたことから確認している。さらにこのcDNA上流には加水分解を受けない<sup>TL</sup>DNA部が存在することを活用し、5'-エキソヌクレアーゼ反応によりcDNA合成において副生する非mRNA由来の雑音配列を除去できることを見いだした(図6c)。今後高純度cDNAの簡便生成法への展開が期待される。

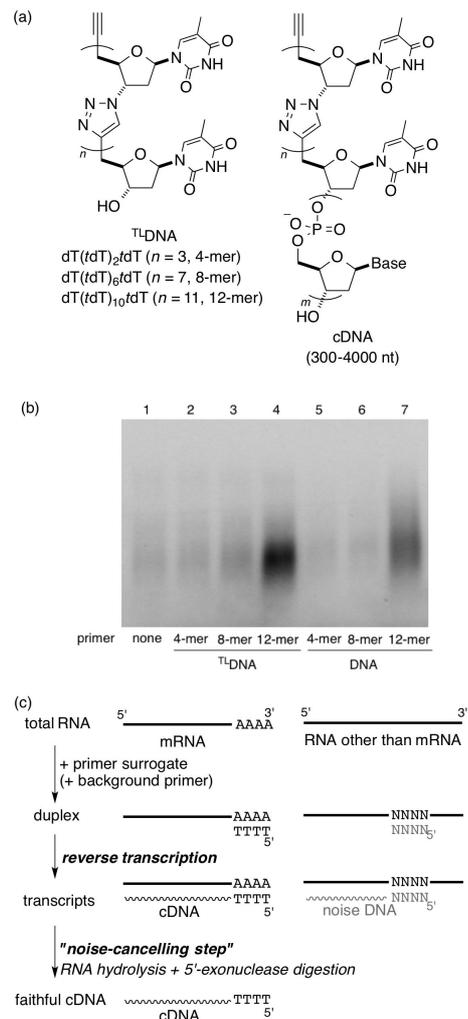


図6 (a) <sup>TL</sup>DNAオリゴチミン上に伸長した第一鎖cDNAの構造。(b) 逆転写反応後の電気泳動図。(c) <sup>TL</sup>DNAの酵素耐性を活用した第一鎖cDNA合成におけるノイズキャンセル法。

#### (6) 材料科学への応用：水銀架橋型<sup>TL</sup>DNAの電荷移動特性

生命科学への応用と平行して、<sup>TL</sup>DNA・<sup>TL</sup>DNA+を活用した材料科学への応用も行った。<sup>TL</sup>DNAおよび<sup>TL</sup>DNA+同士の二重鎖がチミン塩基間を水銀架橋することで金属ナノワイヤーを構築可能であることに着目した

ものである。<sup>TL</sup>DNA および <sup>TL</sup>DNA+オリゴチミンに水銀イオンを添加すると、想定通りの二重らせんが組み上がった(図7)。通常の塩基対からなる天然 DNA なら二重鎖形成は検出できないほどの短鎖のオリゴヌクレオチドであったが、質量分析・CD スペクトル解析から、二重らせん形成を確認できた。さらに、水銀架橋型 <sup>TL</sup>DNA 二重鎖の溶液を水晶基盤上に展開・乾固することで薄膜を作製し、時間分解マイクロ波吸収伝導度測定(TRMC)を行うと、薄膜内での電子移動が検出された。この測定から得られるキャリア移動度は  $1.3 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{Vs}$  であり、塗布型の有機半導体と同程度であった。天然 DNA 二重らせん中のキャリア移動は正孔であることが知られており、将来、<sup>TL</sup>DNA および <sup>TL</sup>DNA+を利用した魅力的な高安定・高性能な短鎖オリゴヌクレオチドが設計可能となることが期待される。

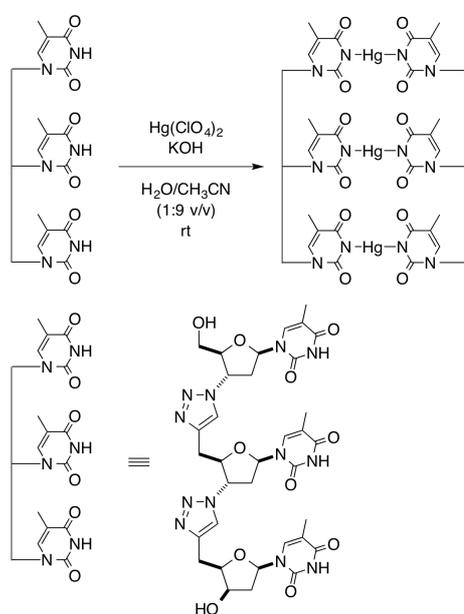


図7. 水銀架橋型二重鎖の合成

## 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 8件)

Fujino, T.; Okada, K.; Isobe, H., Conformational Restriction of Cyclic Dinucleotides with Triazole-linked Cyclophane Analogues, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 (16), 2659-2661 (doi: 10.1016/j.tetlet.2014.03.026).

Isobe, H.; Fujino, T., Triazole-linked Analogues of DNA and RNA (<sup>TL</sup>DNA and <sup>TL</sup>RNA): Synthesis and Functions, *Chem. Rec.* (Invited Account, Mukaiyama Aldol Memorial Issue), **2014**, 14 (1), 41-51 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tcr.20>

1300023/abstract;jsessionid=57C16F393240D057BC30E15B07F101DC.f01t02).

Fujino, T.; Miyauchi, Y.; Tsunaka, N.; Okada, K.; Isobe, H., Post-modification of Triazole-linked Analogue of DNA for Positively-charged DNA, *Heterocycles* **2013**, 87 (5), 1023-1028 (doi:10.3987/COM-13-12697).

磯部寛之, 藤野智子, トリアゾール連結人工核酸の化学, *有機合成化学協会誌*, **2012**, 70, 821-830 (doi: 10.5059/yukigoseikyokaishi.70.821).

Fujino, T.; Endo, K.; Yamazaki, N.; Isobe, H., Synthesis of Triazole-linked Analogues of RNA (<sup>TL</sup>RNA), *Chem. Lett.* **2012**, 41 (4), 403-405 ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/cl/41/4/41\\_4\\_403/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cl/41/4/41_4_403/_article)).

Fujino, T.; Yamazaki, N.; Hasome, A.; Endo, K.; Isobe, H., Efficient and Improved Synthesis of Triazole-Linked DNA (<sup>TL</sup>DNA) Oligomers, *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53 (7), 868-870 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403911021563>).

Fujino, T.; Yasumoto, K.; Yamazaki, N.; Hasome, A.; Sogawa, K.; Isobe, H., Triazole-Linked DNA as a Primer Surrogate in the Synthesis of First-Strand cDNA, *Chem.—Asian. J.* **2011**, 6 (11), 2956-2960 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/asia.201100712>).

Isobe, H.; Yamazaki, N.; Asano, A.; Fujino, T.; Nakanishi, W.; Seki, S., Electron Mobility in a Mercury-mediated Duplex of Triazole-linked DNA (<sup>TL</sup>DNA), *Chem. Lett.* **2011**, 40 (3), 318-319 (<http://dx.doi.org/10.1246/cl.2011.318>).

[学会発表](計 22件)

うち招待講演 1件

藤野智子, Triazole-linked DNA as a primer surrogate in the synthesis of first-strand cDNA, H25年9月28日-9月30日, 平成25年度化学系学協会東北大会及び日本化学会東北支部70周年記念国際大会(招待講演), 仙台市

藤野智子, 安元研一, 山崎直美, 羽染愛, 十川和博, 磯部寛之, Triazole-linked DNA as a primer surrogate in the synthesis of first-strand cDNA, H24年6月26日-6月29日, 13th Tetrahedron Symposium, アムステルダム, オランダ

藤野智子, 山崎直美, 羽染愛, 安元研一, 十川和博, 磯部寛之, Triazole-linked DNA: Synthesis and Function, H23年6月13日-6月16日, Gordon Research Conference, アンドー

バーNH, アメリカ  
ほか

〔図書〕(計 1件)

磯部寛之, 藤野智子 『 $\pi$ 電子豊富分子の生体内化学: クリック化学人工核酸』, 高次 $\pi$ 空間の創発と機能開発, シーエムシー出版, pp208-212 (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 4件)

名称: トリアゾール連結型環状ジヌクレオチド類縁体

発明者: 磯部寛之, 藤野智子, 岡田滉大

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2013-001994

出願年月日: 2013年1月9日

国内外の別: 国内

名称: Triazole-Linked Analogue of Cyclic Dinucleotide

発明者: Hiroyuki Isobe, Tomoko Fujino, Koudai Okada

権利者: 同上

種類:

番号: PCT/JP2013/85042

取得年月日: 2013年12月27日

国内外の別: 外国

名称: アジド基を有するリボヌクレオシド類縁体及びその製造方法, ならびに該類縁体から形成されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体

発明者: 磯部寛之, 藤野智子, 古樫加奈子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2014-046396

取得年月日: 2014年3月10日

国内外の別: 国内

名称: チオフェン系化合物の誘導体、チオフェン系化合物及びそれらの製造方法

発明者: 磯部寛之, 藤野智子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2014-048234

取得年月日: 2014年3月11日

国内外の別: 国内

○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.orgchem2.chem.tohoku.ac.jp/Main/Top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤野 智子 (FUJINO, TOMOKO)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 70463768

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし