

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550243

研究課題名(和文) 1塩基認識を増幅する高分子型人工核酸の設計と生化学的機能評価

研究課題名(英文) Preparation and biofunctional evaluation of PNA-PEG conjugates that can be applied to the genetic diseases caused by single nucleotide mutations.

研究代表者

櫻井 敏彦 (SAKURAI, Toshihiko)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10332868

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)：生体内で1塩基認識能をもつ人工核酸の設計・機能評価を目的として、PEGの両末端にペプチド核酸を配する系統的なPNA-PEGコンジュゲートを調製し、無細胞タンパク質合成システムを用いた遺伝子発現を評価した。この結果、PNA-PEGコンジュゲートはアンチセンスRNAとして作用しており、1塩基の違いを明確に認識した発現制御が可能であることが示された。また、熱力学パラメーターを算出した結果、PEGの両末端にPNAを配する分子構造が1塩基を認識しており、各PNA部分の $T_m$ 値の差がこの1塩基認識機構に大きく寄与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We synthesized the PNA-PEG conjugate and tried to regulate a gene expression using the cell free protein expression systems. As a result, the PNA-PEG conjugate inhibited the protein expression effectively and recognized the difference of the one base in vivo, compared with homo PNA oligomer. This was caused by the thermal stability at 30 degree, and this type of PNA-PEG conjugate was transported with macropinosytosis, but couldn't release to cytosol. with peptide signal (Q7-G-HSP), PNA-PEG conjugate was released to cytosol from mcropinosome, but it showed cytotoxicity that can not be ignored.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・高分子・繊維材料

キーワード：人工核酸 ペプチド核酸 遺伝子発現制御 1塩基認識

1. 研究開始当初の背景

ペプチド核酸(PNA)は、1991年 P. E. Nielsen らによって開発された合成核酸モデルの1種である。アミノエチルグリシンを基本骨格とし、1) 天然核酸と比較してDNA/RNA に対し高い相同性を示す、2) 核酸分解酵素やプロテアーゼに対する耐性をもつ、3) 塩強度やpHに依存しない等の特性に加え、近年では2本鎖DNA/RNAへのインベージョンにより特異複合構造を形成することも報告されたが、1) 細胞内蛋白質との非特異吸着、2) 塩基の伸長に伴う不溶化・自己凝集性など分子特性に問題が残る。上述の問題点を解消した分子設計により、従来のアンチセンスによるサイレンシングシステムに加え、アンチジーンとしても作用する遺伝子発現制御システムの構築が可能となる。

2. 研究の目的

本研究ではアンチジーン・アンチセンス・ncRNA 阻害を可能とする多様な高分子型人工核酸の設計と機能評価を目的とする。特に、ゲノム配列中において、1塩基だけが違う多様化を生じる1塩基多型(SNPs)は、薬剤効果や疾病・疾患の罹患程度など固体の性質に関与することが指摘されている。このSNPsを標的とした解析技術・遺伝子発現制御技術の確立は、今後のテーラーメイド医療として高く期待されている。既に、人工核酸モデルであるペプチド核酸(PNA)をプローブとしたSNPsタイピングが報告されているが、PNAとDNA、RNAとの高い相補鎖形成能が問題となり、生体内での1塩基認識は困難とされてきた。

本申請では、生体内における1塩基認識を可能とする人工核酸モデルを設計し、この認識メカニズムおよび遺伝子発現制御について検討することを目的とする。具体的には特定の鎖長を有する polyethyleneglycole (PEG)の両末端に8 baseのPNAを配した呼応分子型人工核酸(PNA-PEGコンジュゲート)を調製し、

1) 融解曲線による熱力学パラメーターの算出、

2) 無細胞タンパク質合成システムを用いた遺伝子発現制御、

ならびに

3) 細胞内輸送挙動について検討した。

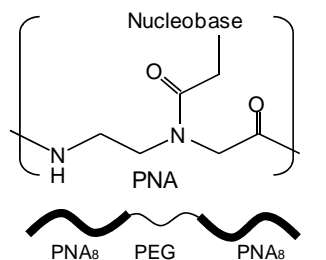


Fig. 1 Chemical structure of PNA and schematic illustration of PNA-PEG conjugate.

3. 研究の方法

PNAの塩基配列を設計するにあたり、遺伝子発現系を構築した。無細胞タンパク質発現系は、タンパク質をコードするDNAもしくはmRNAと転写・翻訳に必要な要素を混合して、チューブ内でタンパク質を合成するこ

とが可能であり、遺伝子発現系の評価系として用いることができる。この発現系(5 Prime社製 RTS 100 E.coli HY kit)に最適化したルシフェラーゼ発現プラスミド(pIVEX2.3d luc+)を作製し、この塩基配列をもとにT7プロモーターならびに開始コドンターゲットとしたPNA-PEGコンジュゲートの塩基配列を決定した。これらの配列を持ったPNA-PEGコンジュゲートおよびPNAオリゴマーをFmoc固相法により合成し、HPLCで精製して遺伝子発現制御系に所定量加え、最終的に発現するルシフェラーゼを定量(promega社製 ONE-Glo Luciferase Assay system)して遺伝子発現抑制効果の評価した。得られたPNA化合物と相補鎖を形成する合成DNAの融解温度(Tm)を測定(Jasco V-630 Bio, scan speed: 1°C/min in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0, 10 mM NaCl))し、熱力学的パラメーターを算出した。

Table 1 PNA-PEG conjugates and PNA oligomers.

	Sequence
PP_T7	(C) ATTATGCT-PEG <sub>12</sub> -TATCCCTC (N)
PP_T7_MM	ATTATGCT-PEG <sub>12</sub> -TATCACTC
PP_ATG01	TACCTTCT-PEG <sub>12</sub> -TTTGTATTT
PP_ATG01_MM	TACATTCT-PEG <sub>12</sub> -TTTGTATTT
PP_ATG01_MM2	TACCTTCT-PEG <sub>12</sub> -TTTATATTT
PNA <sub>16</sub> -PEG	TACCTTCTGCGGTTTT-PEG <sub>12</sub>
PNA <sub>16</sub> -PEG_MM	TACCTTATGCGGTTTT-PEG <sub>12</sub>
PNA <sub>16</sub>	TACCTTCTGCGGTTTT
PNA <sub>16</sub> _MM	TACCTTATGCGGTTTT
PNA-C	TACCTTCT
PNA-N	TTTGTATTT

4. 研究成果

T7プロモーター領域と開始コドンターゲットとしたPNA-PEGコンジュゲート(PP\_T7, PPATG01)によるルシフェラーゼ発現量を比較したところ、開始コドン近傍で顕著に発現が抑制されることがわかった。この結果を踏まえ、開始コドンターゲットにしたPNA-PEGコンジュゲートの1塩基認識能を、PEGの片末端に16残基のPNAを配するコンジュゲート(PNA<sub>16</sub>-PEG)、さらに16残基からなるhomo PNA(PNA<sub>16</sub>)および各々のミスマッチ配列(MM)によるルシフェラーゼ発現量から評価した。その結果、PNA-PEG

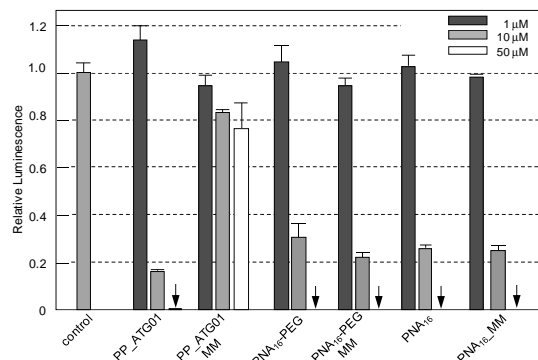


Fig. 2 Luminescence intensity ratio of luciferase in cell free protein synthesis system with PNA-PEG conjugates and PNA oligomers.

コンジュゲートはフルマッチ塩基配列の際に発現を抑制したのに対し、ミスマッチ配列ではルシフェラーゼの発現を優位に抑制しなかった。一方で、PNA16-PEG や PNA16 ではフルマッチ、ミスマッチいずれの配列においても添加量に伴いルシフェラーゼ発現量が低下することが示された (Fig. 2)。この結果は、PNA-PEG コンジュゲートが発現温度 (30°C) で 1 塩基を認識して遺伝子発現を制御していることを意味している。このメカニズムは、合成 DNA との相補鎖形成に関する熱力学パラメーターより、C, N 両末端に配された PNA の T<sub>m</sub> 値による熱化学的な安定性が誘起していることが示された (Fig. 2)。また、この他にも擬似的な長鎖モデルとして、より効果的に遺伝子発現を抑制することもあわせて示された。

Table 2 T<sub>m</sub> and thermodynamic constants of PNA-PEG conjugates and PNA oligomer.

	T <sub>m</sub> <sup>1</sup> (°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)	ΔG <sub>30°C</sub> (kcal/mol)
PP_T7	42.8	-92.30	-259.58	-12.45
PP_T7_MM	N.D.	-	-	-
PP_ATG01	39.5	-82.80	-238.98	-10.34
PP_ATG01_MM	29.1	-97.41	-296.38	-7.54
PP_ATG01_MM2	41.0	-64.66	-180.15	-10.04
PNA <sub>16</sub> -PEG	74.2	-121.91	-325.44	-23.24
PNA <sub>16</sub> -PEG_MM	63.3	-150.54	-421.96	-22.60
PNA <sub>16</sub>	73.2	-97.89	-256.96	-19.98
PNA <sub>16</sub> _MM	62.0	-106.83	-292.97	-18.00
PNA-C	43.9	-49.08	-129.12	-9.93
PNA-N	20.6	-40.20	-110.71	-6.63

\*1 Total concentration : 10 μM.

以上の結果より、PNA-PEG コンジュゲート生体内温度近傍で、1 塩基を認識することがわかったため、細胞内での遺伝子発現制御が可能かを検討することを目的として、PNA-PEG コンジュゲートの細胞内輸送挙動について検討した。分子鎖末端に蛍光官能基 (sulforhodamine B; SRB) を有する PNA-PEG コンジュゲートを合成し、輸送マーカーとの共局在法により細胞内輸送経路について検討した結果、マクロピノサイトーシス局在マーカーであるデキストラン (FITC-Dx) と共局在したことからマクロピノサイトーシス経路を主とした細胞内輸送が可能であることが示された。一方で、細胞内取り込み後の細胞質へのリリースは観察されず、マクロピ

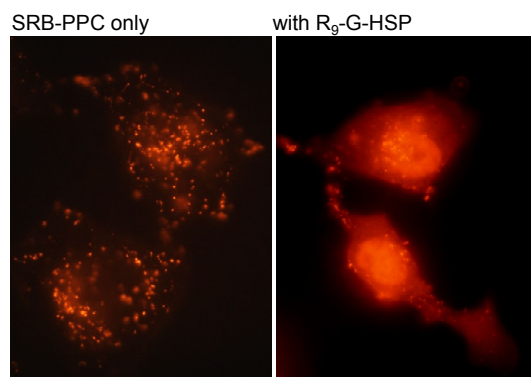


Fig. 3 Intercellular transport of PNA-PEG conjugate with signal peptide (R9-G-HSP).

ノソームからのリリースが困難であることが同時に示された。このため、ヘマグルチニンサブユニット由来ペプチド (HSP) にマクロピノサイトーシスを誘起するアルギニンペプチド (R9) を付加したシグナルペプチド (R9-G-HSP) を固相法で合成し、このシグナルペプチド存在下における SRB PNA-PEG コンジュゲートの細胞内輸送を試みたところ、細胞質への PNA-PEG コンジュゲートのリリースが観察された (Fig.3)。今後、細胞内での 1 塩基認識を可能とした遺伝子発現制御が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Electroreductive intermolecular coupling of 3-methoxycarbonylindoles with ketones, Kise, N., Sueyoshi, A., Takeuchi, S., Sakurai, T., *Organic Letters*, 15(11), 2746-2749 (2013). (査読有)

DOI: 10.1021/ol4010799

Electroreductive intramolecular coupling of aliphatic cyclic imides with α,β-unsaturated esters and ketones: unusual methyl-alkoxy exchange in silyl ketene acetals. Kise, N., Inoue, Y., Sakurai, T., *Tetrahedron Letters*, 54, 3281-3285 (2013). (査読有)

DOI:org/10.1016/j.tetlet.2013.04.047

Reductive Coupling of Aliphatic Imides with Benzophenones by Low-valent Titanium. Kise, N., Kinameri, S., Sakurai, T., *Tetrahedron Letters*, 54, 6944-6948 (2013). (査読有)

DOI:org/10.1016/j.tetlet.2013.04.047

Metallo-regulation of the bimolecular triplex formation of a peptide nucleic acid. Shimada, H., Sakurai, T., Kitamura, Y., Matsuura, H., Ihara, T., *Dalton Transaction*, 42(45), 16006-13 (2013). (査読有)

DOI: 10.1039/c3dt5138f

櫻井敏彦, Inchworm 型分子の機能, 生命科学 Research Letter, 38, (2012). (査読無)

http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/FBCmember/Member.html

Electroreductive five- and six-membered cyclization of aromatic β- and γ-imino esters derived from (S)-aspartic acid and (S)-glutamic acid. Takenaga, Y., Umetsaki, Y., Sakurai, T., Kise, N., *Tetrahedron*, 68(12), 2579-2589 (2012). (査読有)

DOI: 10.1016/j.tet.2012.01.100

Reductive coupling of N-methoxycarbonyl lactams with benzophenone and 9-fluorenone by low-valent titanium. Kise, N., Takenaga, Y., Ishikawa, Y., Morikami, Y., Sakurai, T., *Tetrahedron Letters*, 53(15), 1940-1945 (2012). (査読有)

DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.02.001

櫻井敏彦, 核酸モデル化合物の発展, 化学と工業, 64-9, 698-699 (2011). (査読無し)

Evaluation of A $\beta$  fibrillization inhibitory effect by a PEG-peptide conjugate based on an A $\beta$  peptide fragment with intramolecular FRET, Sakurai, T., Iwasaki, T., Okuno, T., Kawata, Y., Kise, N., *Chemical Communications*, 47(16), 4709-4711 (2011). (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c0cc05668e>

〔学会発表〕(計 14 件)

櫻井敏彦, 高分子型人工核酸の設計と生化学的機能評価, 高分子学会九州支部材料フォーラム2014, 2014年2月27-28日, 熊本大学 (招待講演).

舩山涉, 山内翠, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, 非変成コラーゲン-プロテオグリカン構造体を用いた3次元細胞培養, 平成25年度中国四国支部高分子若手研究会, 2013年11月14-15日, 岡山.

櫻井敏彦, 1塩基認識を増幅する人工核酸の設計と遺伝子発現制御, 文部科学省生命動態システム科学推進拠点「核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点」, 2013年7月26-27日, 広島 (招待講演).

櫻井敏彦, 柴田崇弘, 木瀬直樹, 奥野貴士, 1塩基認識を増幅する人工核酸の設計と遺伝子発現制御, 蛋白質科学会, 2013年6月12-14日, 鳥取.

有馬悠介, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, ペプチドシグナルを用いたPNA-PEGコンジュゲートの細胞内輸送, 蛋白質科学会, 2013年6月12-14日, 鳥取.

藤田有紀, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, Peptide-PEGコンジュゲートによるアミロイド線維化学動の評価, 蛋白質科学会, 2013年6月12-14日, 鳥取.

櫻井敏彦, 機能性生体高分子によるバイオマテリアルの創成, 中国四国地区におけるバイオマテリアル研究, 2013年4月1日, 広島大学 (招待講演).

有馬悠介, 柴田崇弘, 木瀬直樹, 奥野貴士, 櫻井敏彦, 1塩基認識能を誘起するPNA-PEGコンジュゲートの細胞内輸送, 平成24年度中国四国支部高分子若手研究会, 2012年11月8-9日, 山口.

櫻井敏彦, 遺伝子配列の1塩基の違いを見つけ出す人工遺伝子, JST 新技術説明会, 2012年7月13日, 東京.

櫻井敏彦, 柴田崇弘, 木瀬直樹, 奥野貴士, PNA-PEGコンジュゲートによる遺伝子発現制御の機構解明, 高分子学会年次会, 2012年5月29-31日, 神奈川.

櫻井敏彦, 1塩基認識能を増幅するPNA-PEGコンジュゲートの設計と遺伝子発現制御, バイオアカデミックフォー

ラム, 2012年4月25-27日, 東京.

Sakurai, T., Shibata, T., Kawata, Y., Okuno, T., Kise, N., Molecular design of the PNA-PEG conjugate as an antisense nucleic acid model and the regulation of gene expression. ISNAC2011, 2011/11/10, Hokkaido Univ.

櫻井敏彦, 柴田崇弘, 木瀬直樹, 奥野貴士, 細胞内におけるPNA-PEGコンジュゲートの機能評価, 高分子討論会, 2011年9月29-30日, 岡山.

櫻井敏彦, 柴田崇弘, 河田康志, 木瀬直樹, 奥野貴士, 1塩基認識能を増幅する人工核酸モデル設計と遺伝子発現制御, 第60回高分子年次大会, 2011年5月27-29日, 大阪.

〔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〕

<http://www.bio.tottori-u.ac.jp/~sakurai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 敏彦 (SAKURAI, Toshihiko)

鳥取大学・工学研究科・准教授

研究者番号: 10332868