

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13749

研究課題名(和文)化学的スプライシングによる機能性核酸および細胞機能の制御

研究課題名(英文)Chemical splicing for regulation of functional nucleic acids and cells

研究代表者

井原 敏博 (Ihara, Toshihiro)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・教授

研究者番号：40253489

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 特定の化学的、物理的刺激により、互いに結合する分子構造をDNA骨格中に複数個導入する。このDNAは、刺激によりこの箇所同士が結合することで全体の“かたち”(グローバルな構造)を劇的に変化させる。一次構造では互いに離れた鎖中の2カ所を繋ぎ留めて、型の構造を作ることができれば、それは連結箇所の外側の2つのシーケンスを繋ぎ合わせたことになり、これを(酵素を使わない)DNA“塩基配列の化学的編集”、あるいは“化学的スプライシング”とみなすことができる。ターピリジン、およびアントラセン構造をDNAに組み込み、それぞれ金属錯体形成、および光二量化反応により構造を形成させることに成功した。

研究成果の概要(英文): Two terpyridine units were built into the distal sites of a DNA backbone to obtain the conjugates. The conjugate formed an intramolecular 1:2 complex with some transition metal ions such as Fe<sup>3+</sup> and Ni<sup>3+</sup> to take an  $\alpha$ -shaped structure. The two sequences located outside of two terpyridine units were connected directly with each other to provide a new sequence. That is, the continuity of distal segments was controlled by metal ion-induced  $\alpha$ -shaped conformation. We succeeded in the activity control of a split DNAzyme using this technique of metal ion-directed reversible sequence editing. Two anthracene units were built into the DNA backbone to obtain the conjugates. The conjugate formed an  $\alpha$ -shaped structure through intramolecular dimerization of anthracene by photoirradiation in the presence of the template DNA carrying the sequence complementary to flanking two sequences of anthracene units. This could be regarded as photo-switchable techniques of reversible sequence editing.

研究分野：生物分析化学、核酸化学

キーワード：DNA conjugate terpyridine anthracene sequence edition metal ion photo dimerization  $\alpha$ -shaped structure chemical splicing

## 1. 研究開始当初の背景

生体中では転写制御（転写前複合体形成など）、複製など多くの生命現象において、DNAの曲がりの制御が利用されている。また、曲がった DNA に特異的に結合するタンパクも知られている。代表者はこれまで、グルタミン酸、EDTA、フェナントロリンなどの金属配位子を導入した DNA を調製し、適当な金属イオンとの錯生成を利用して特定の DNA 複合体の形成制御が可能であることを示している (*Anal. Biochem.* 2006; *J. Inorg. Biochem.* 2008; *Anal. Sci.* 2011 (front cover, Hot article); *Dalton Trans.* 2013; *CL* 2014 など)。また、アントラセンを末端に導入した DNA 同士がその光二量化により可逆的に連結されることを示している (*JACS* 2004; *Org. Biomol. Chem.* 2009 (front cover) など)。これらの研究から、この DNA 鎖を繋ぎ留める技術により DNA の“かたち”や“曲がり”を劇的に制御して、これを機能性核酸の制御、延いては生命現象の制御に利用したいと考えた。

DNA の一部を外部刺激により繋ぎ留めて特殊な構造を作った例は、少ないながら代表者らの研究 (*JACS* 2001, *JACS* 2004; *Org. Biomol. Chem.* 2010 (front cover)) を含めて幾つか報告されている。これらの研究では、意図した構造の形成を報告するにとどまっておらず、その“かたち”と関連づけられた“機能”にフォーカスした研究は皆無である。

## 2. 研究の目的

特定の化学的、物理的刺激により、互いに結合する分子構造を DNA 骨格中に複数個導入する。この DNA は、刺激によりこの箇所同士が結合することで全体の“かたち”(グローバルな構造)を劇的に変化させる。例えば、一次構造では互いに離れた鎖中の2カ所を繋ぎ留めてΩ型の構造を作ることができれば、それは連結箇所の外側の2つのシーケンスを繋ぎ合わせたことになり、これを(酵素を使わない)DNA“塩基配列の化学的編集”、あるいは“化学的スプライシング”とみなすことができる(図1)。この反応を、アプタマーや DNAzyme などの機能性核酸の機能制御、鎖交換反応に基づくシグナル増幅のスイッチング、および転写系と組み合わせることで、画期的なバイオセンシングおよび遺伝子発現制御法を提案する。

バイオセンシングおよび遺伝子制御を意識して、酵素に依存しない人工 DNA のスプライシングに挑戦する。具体的には、以下の3つの反応系を確立する。

1. 金属錯体形成によるシーケンス編集  
: 錯形成 DNA スプライシング
2. 光二量化反応によるシーケンス編集  
: 光化学 DNA スプライシング
3. 脱水縮合反応によるシーケンス編集  
: 縮合型 DNA スプライシング

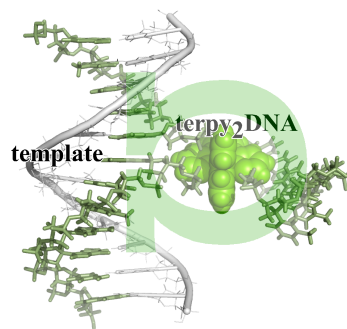


図1 2つの terpy を組込んだコンジュゲート  $Fe^{2+}$  との分子内錯生成によりΩ型構造をとり、新しい一続きのシーケンスを与える。

## 3. 研究の方法

### ① システム設計の基本方針

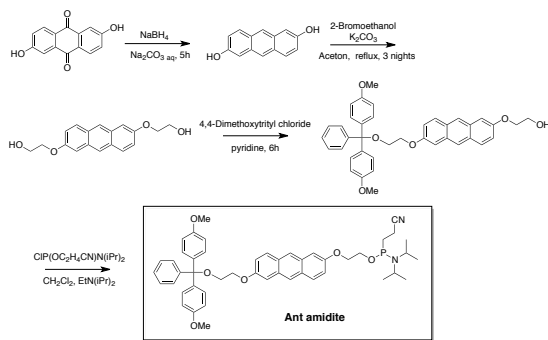
骨格中に (1) ターピリジン (terpy)、(2) アントラセン (ant)、および (3) アシルベンジルアミン (aba) を2個組込んだ DNA、**terpy<sub>2</sub>DNA**、**ant<sub>2</sub>DNA**、および **aba<sub>2</sub>DNA** を合成することにした。これら DNA コンジュゲートは、適当な金属イオンとの分子内錯生成、分子内光架橋、および縮合環化により、導入位置によって、Ω型、σ型、o型などのかたちをとる。用途によって作り分けることができるが、本研究ではΩ型構造形成を中心に研究を進める。

錯生成反応、光二量化反応、および縮合反応の反応性を考慮すると、1の系においてはコンジュゲートは鑄型(相補鎖)の有無に依らずΩ型構造を形成するが、2と3の系でΩ型を形成するには対応する鑄型が必要になる。おもに1、2は機能性核酸の活性制御や遺伝子発現制御に、3はその生成物(各種ジフェニルピラジン誘導体)の蛍光性を利用してセンシングに利用することとする。

### ② 実験方法

#### DNA コンジュゲートの合成

非天然の構造を DNA 骨格中に組込むためには、まずそれらの構造を基体とするアミダイト試薬を合成する必要がある。代表して、スキーム1に ant アミダイトの合成スキームを示す。terpy アミダイトも同様にジオール体を合成し、その片方をジメトキシトリチル化、残るひとつをアミダイト化することで得た。両者とも異なるリンカー長の数種類のを合成した。これらアミダイト試薬を使用して、DNA 自動合成装置にて対応する DNA コンジュゲートを合成した。**terpy<sub>2</sub>DNA** の合成は、既に前年度から合成に着手しており、基礎的な検討を始めているが、シーケンスを変更して追加合成を行なう必要があった。鎖中にその組み込むための aba アミダイトの合成も行なったが、合成は困難であったので、末端修飾を意図した構造とし、aba を末端に一つだけ導入した DNA コンジュゲート **abaDNA** を合成した。合成したすべての DNA コンジュゲートは、常法にしたがって逆相 HPLC で精製し、MALDI-TOF MS で同定した。



スキーム 1 ant アミダイトの合成スキーム

### 構造形成に関する検討

**terpy<sub>2</sub>DNA**、および **ant<sub>2</sub>DNA** については、それぞれ金属イオン添加前後、照射前後で HPLC、および MALDI-TOF MS で生成物解析を行った。さらに、相補鎖との間で形成される二本鎖構造の熱安定性を UV 融解実験より観測した。

### 機能性核酸の活性制御

**terpy<sub>2</sub>DNA** に関しては、ペルオキシダーゼ活性を有する DNAzyme を使用し、その活性制御を検討することにした。まず、DNAzyme を 2 つに分割 (スプリット) して不活性化する。図 2 のとおり、金属イオンによる Ω 型構造形成 (スプライシング) によりはじめて有効なテンプレートが生じ、これにより活性な DNAzyme が再構成されることを期待した。酸化されて発色する ABTS の色をモニターすることでペルオキシダーゼ活性を測定した。

**ant<sub>2</sub>DNA** に関しては、種々リンカー長、置換位置の異なる構造を合成し、**ant** の両側の配列に相補的な DNA、および **ant** 間のループに結合する分子存在下、照射に伴うその Ω 型構造形成の効率、速度を HPLC により検討した。**abaDNA** に関しては、C<sub>2</sub> 配列を有する二本鎖 DNA を標的として、三本鎖形成によってふたつの **abaDNA** が向かい合うように結合して、その中央部で **aba** が対向する状態とした。**abaDNA** 同士の縮合連結を HPLC によりモニターした。

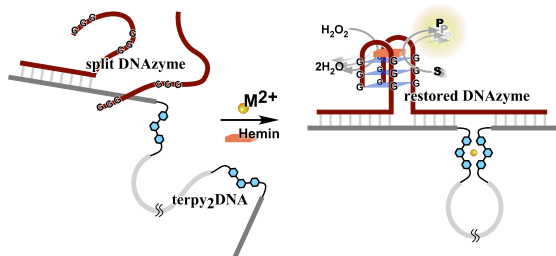


図 2 スプリット DNAzyme 活性の制御 錯生成による動的スプライシングにより **terpy<sub>2</sub>DNA** が Ω 型構造となり、これがテンプレートになって DNAzyme が再構築される。触媒 (酸化) 反応により呈色する基質、あるいは蛍光を発する基質を用いて反応を追跡した。

## 4. 研究成果

### DNA コンジュゲートの合成

**terpy** アミダイト、および **ant** アミダイトの合成に成功した。一方、**aba** アミダイトの合成は難航した。光をトリガーとして縮合反応を進行させたいと考え、アミノ基を光反応性の NVOC で保護した。合成途中のケン化の際にこの構造の分解を避けることができなかつたためである。そこで、DNA の鎖中に **aba** を挿入することを断念し、代わって末端に修飾するためのアミダイト試薬を合成した。これらの非天然構造を与えるアミダイト試薬のカップリングに関しては、合成機のプログラムを操作し反応時間を長くすることで高収率を確保することができた。

DNA 末端に導入した **ant** 同士の光二量化は非常に速く、適当な構造において数秒の照射で環化し **o** 型構造を与えるが、後述するように、ここで合成した **ant<sub>2</sub>DNA** に導入した鎖中の **ant** 同士の光二量化により Ω 型構造を与える反応は極めて遅いことがわかった。構造の最適化に向けて、**ant** と DNA を繋ぐリンカー長、および置換位置の異なる数種類の **ant<sub>2</sub>DNA** を合成した。当初はスキーム 1 に示す 2,6-位で置換した **ant** 構造を用いたが、二量化反応の際の立体障害が軽減されることを期待して 1,4-置換体も追加して合成した。

### 金属錯体形成によるシーケンス編集

**terpy<sub>2</sub>DNA** については、金属イオン添加前後、相補鎖との間で形成される 2 本鎖構造の熱安定性の向上を UV 融解実験により確認することができた。このことは、**terpy<sub>2</sub>DNA** が金属イオンとの相互作用により Ω 型となり、それによって相補鎖との 2 本鎖形成が促進されたことを示唆している。これを金属イオンをトリガーとする鎖交換反応に利用できないか検討した。結果として金属イオンにより鎖交換反応を進行させることはできなかった。同じ長さ、塩基配列のステムを有する未修飾 2 本鎖 DNA と比較すると、金属イオン存在下でさえも **terpy<sub>2</sub>DNA** とその相補鎖の 2 本鎖の熱安定性はかなり低いためにそもそも鎖交換が起こりにくく、さらにターピリジン部分で 2 本鎖構造の連続性が切れてしまうことが原因と考えられた。

次に **terpy<sub>2</sub>DNA** を金属イオンをトリガーとするペルオキシダーゼ活性を持つ DNAzyme の活性制御を行った。いくつかの遷移金属イオンに関して検討したが、中でも Cu<sup>2+</sup> や Ni<sup>2+</sup> を添加した際に著しい活性の増大を確認することができた。また、EDTA の添加、およびターピリジンに挟まれたシーケンスに相補的な DNA を添加した際にはその活性は完全に失われることもわかった。これはターピリジンの錯生成能を反映したものであり、意図したとおり DNA の構造を制御して DNAzyme の活性をコントロールできたことを示している。

### 光二量化反応によるシーケンス編集

代表者は、DNA 末端に導入した **ant** の光二量化反応 (4π-4π) が高効率、可逆的に進行し、チミンの関与する 2π-2π 型の光架橋とは直交

する選択性の高い反応であることを既に報告している (*JACS* 2004 など多数)。**ant<sub>2</sub>DNA** については、ふたつの ant の外側に位置する配列に対して相補的な DNA を鋳型として、366 nm の光照射を行った。その結果、HPLC を用いた生成物解析によって、照射に伴って新たな複数の成分が生じていることが明らかになった。これらの生成物の分子量はすべて反応前の **ant<sub>2</sub>DNA** と同一であり、また 312 nm の光照射により HPLC の保持時間は照射前の **ant<sub>2</sub>DNA** のものに戻ることが確認された。鋳型となる DNA が存在しない時にはこのような反応は確認されなかった。これらのことから、鋳型との間で形成された  $\Omega$  型の二本鎖構造が分子内の ant の光二量化により共有結合により固定化されたと判断した。ふたつの ant 同士の相対的な関係、DNA の極性などから多くの異性体を生じる可能性があるが、観測された複数の成分は、可能な異性体のうちのどれかと考えられる。

しかしながらこの光二量化は、代表者がこれまで取り組んできた末端修飾 ant の反応と比べると著しく遅かった。そこで、リンカー長を C2、C4、C6 で比較した。その結果、C6 の反応が飛び抜けて最も速く、鎖の途中に挿入された ant は複合体の構造中、前後の DNA 構造によって立体的にかなり規制された環境下にあることが示唆された。C2 や C4 の短いリンカーだとふたつの ant が二量化するために有効なスタッキングが生じ難いと考えられる。今後は、さらに C8、C10 の反応性も確認する必要がある。また、ループ部分と相補的な配列を共存させると二量化はほぼ完全に阻害されることが分かった。ant の置換位置を 2,6-から 1,4-に変更して同じ実験を行っているが、現在のところ、反応性の劇的な向上はみられていない。

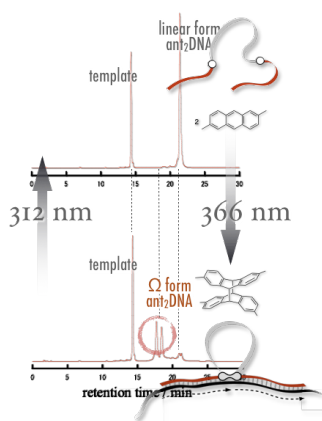


図3 **ant<sub>2</sub>DNA** の光による  $\Omega$  型構造形成 鋳型となる DNA 存在下、366 nm の光を照射して生成物を HPLC で追跡した。その結果、複数の  $\Omega$  型 DNA を同定することができた。これらは ant 二量体の構造に基づく異性体と考えられる。

#### 脱水縮合反応によるシークエンス編集

C<sub>2</sub> 対称の配列を持つ二本鎖 DNA に対して 5' 末端に aba を修飾した二分子の **abaDNA** が、その aba を互いに内側に向けた状態で結合した三本鎖 DNA 複合体を形成させた。この条件で光を照射し、アミノ基の保護基である NVOC を脱保護して反応をスタートさせた。

しかしながら、数十時間経過後も新しい成分を観測することはできなかった。脱水反応を触媒するイリジウム錯体を添加しても結果は変わらず、二つの **abaDNA** が繋がったような新しい生成物を確認することはできなかった。ここで、利用した三本鎖複合体における二つの第三鎖の対峙する 5' 末端同士の距離はかなり長く、連結反応には決して良い環境ではない。想定している縮合 (シッフ塩基形成) → 環化 (シッフ塩基形成) → 自然酸化では、まず段階的に 2 回のシッフ塩基形成が進行する必要がある。aba 同士の距離が遠くて可逆的なシッフ塩基形成が連続して 2 回進行することがなかったと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. T. Ihara, H. Ohura, C. Shirahama, T. Furuzono, H. Shimada, H. Matsuura, Y. Kitamura, “Metal Ion-directed Dynamic Splicing of DNA through Global Conformational Change by Intramolecular Complexation” *Nat. Commun.*, **6**, 6640 (2015). 10.1038/ncomms7640
2. Y. Kitamura, T. Miyahata, H. Matsuura, K. Hatakeyama, T. Taniguchi, M. Koinuma, Y. Matsumoto, T. Ihara, “Graphene Oxide-based Amplified Fluorescence Sensor for Nucleic Acid Detection through Target-catalyzed Hairpin Assembly” *Chem. Lett.*, **44**, 1353-1355 (2015). 10.1246/cl.150564
3. K. Nishiyama, K. Tsuruta, M. Ikeda, S. Yoshimoto, H. Shimada, Y. Kitamura, T. Ihara, “Sensitive Electrochemical Detection of Nereistoxin by Reductive Desorption from Au(111) and Au(100)” *Electrochemistry*, **84**, 349-353 (2016). 10.5796/electrochemistry.84.349
4. H. Shimada, S. Noguchi, M. Yamamoto, K. Nishiyama, Y. Kitamura, T. Ihara, “Electrochemical Sensing of Neurotoxic Agents Based on Their Electron Transfer Promotion Effect on an Au Electrode” *Anal. Chem.*, **89**, 5742-5747 (2017). 10.1021/acs.analchem.6b04229

[学会発表] (計 20 件)

1. K. Yoshimura, T. Wasano, Y. Kitamura, T. Ihara, “Electrochemical signal amplification for DNA detection in homogeneous solution” 8th Asian Cyclodextrin Conference 2015年4月, 熊本
2. B. Ikeda, C. Imoto, K. Mishio, R. Nakatake, Y. Kitamura, T. Ihara, “Design of electrochemical molecular beacon and its application to DNA detection” 8th Asian Cyclodextrin Conference

- 2015年4月, 熊本
3. 井原敏博, “DNA 構造の動的プログラミングに基づくバイオセンシング”  
第52回化学関連支部合同九州大会  
2015年6月, 北九州, 依頼講演
  4. 井原敏博, “核酸の構造制御およびバイオセンシングへの応用”  
核酸化学最前線フォーラム FIBER未来大学シリーズSeries 17  
2015年7月, 神戸, 招待講演
  5. T. Ihara, “Metal Complexation on DNA -For DNA Structure Control and Biosensing-”  
16th IUPAC International Symposium on MacroMolecular Complexes (MMC-16)  
2015年8月, Wroclaw, Poland, 基調講演
  6. 井原敏博, 古谷英長, 松尾朋弥, 成合裕哉, 北村裕介, “可逆的  $\Omega$  型構造形成に基づく DNA の機能制御”  
第64回高分子討論会  
2015年9月, 仙台, 依頼講演
  7. Y. Kitamura, R. Ozaki, K. Yoshimura, Y. Azuma, T. Ihara, “Nucleic Acid Sensor Amplified with DNA Circuit”  
The 42nd International Symposium on Nucleic Acid Chemistry  
2015年9月, 姫路
  8. 井原敏博, “DNA 上での錯生成反応 -核酸の構造制御および分析系への応用-”  
鳥取大学大学院講演会  
2015年11月, 鳥取, 招待講演
  9. 井原敏博, “DNA 上での錯生成反応 -核酸の構造制御および分析系への応用-”  
第4回熊本和光ライフサイエンスフォーラム  
2015年11月, 鳥取, 招待講演
  10. 井原敏博, “核酸上での錯生成反応 -核酸の構造制御およびバイオ分析への応用”  
第一回産学・分子組織シンポジウム  
2016年1月, 福岡, 招待講演
  11. 井原敏博, “核酸の構造制御およびバイオ分析への応用 -核酸上での錯生成反応-”  
生体機能関連化学部会第二回国際シンポジウムミニワークショップ  
2016年5月, 東京, 依頼講演
  12. T. Ihara, Y. Azuma, R. Ozaki, A. Nozaki, T. Miyahata, Y. Kitamura, “Nucleic Acid Sensor Amplified with DNA Circuit”  
Rare Earths 2016 in Sapporo  
2016年6月, 札幌, 依頼講演
  13. T. Ihara, “Metal Complexation on DNA -For DNA Structural Control and Biosensing-”  
FIBER International Summit for Nucleic Acids 2016  
2016年7月, 神戸, 依頼講演
  14. 井原敏博, “DNA 上での錯生成反応 -バイオ分析・機能制御を目指して-”  
名古屋大学大学院物質制御工学専攻セミナー  
2016年12月, 名古屋, 招待講演
  15. 井原敏博, “核酸を基体とするバイオセンシング”  
高分子学会九州支部有機材料研究グループ研究会  
2017年3月, 熊本, 招待講演
  16. T. Ihara, “Target Recognition by Global DNA Structural Control”  
FIBER International Summit for Nucleic Acids 2017  
2017年7月, 神戸, 依頼講演
  17. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御 -バイオ分析・機能制御を目指して-”  
九州大学大学院工学研究府応用化学部門 (分子) 教室セミナー  
2017年7月, 福岡, 招待講演
  18. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御 -バイオ分析・機能制御を目指して-”  
大阪府立大学大学院理学系研究科セミナー  
2017年9月, 大阪, 招待講演
  19. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御”  
第50回歯工連携講演会  
2017年10月, 北九州, 招待講演
  20. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御を利用したバイオ分析・機能制御”  
先端分析・機能創発研究会2017  
2017年11月, 福岡, 依頼講演
- [図書] (計2件)
1. S. Obata, K. Saiki, T. Taniguchi, T. Ihara, Y. Kitamura, Y. Matsumoto, “Graphene Oxide: A Fertile Nanosheet for Various Applications”  
*J. Phys. Soc. Jpn.*, **84**, 121012–121018 (2015).  
10.7566/JPSJ.84.121012
  2. 井原敏博, 北村裕介, “酸化グラフェンの生体への応用”  
酸化グラフェンの機能と応用 (2016)  
監修 松本泰道, シーエムシー出版
  3. T. Ihara, “Organometallic complexes for biosensing”  
*Advances in Bioorganometallic Chemistry*, Elsevier, in press
- [その他]  
ホームページ  
<http://www.analyticalchemistry-ihara.com>
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
井原 敏博 (IHARA, Toshihiro)  
熊本大学大学院先端科学研究部・教授  
研究者番号: 40253489