

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05730

研究課題名（和文）効率的な2本鎖DNA認識を達成するペプチド核酸の開発

研究課題名（英文）Development of peptide nucleic acids recognizing double-stranded DNA with high efficiency

研究代表者

愛場 雄一郎 (Aiba, Yuichiro)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：10581085

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：生体内の2本鎖DNAを自在に認識することが出来れば、遺伝子発現やそれに伴う生命機能の制御が可能となる。つまり、様々な生命現象の解明や遺伝子病の治療など、幅広い応用が期待される。このように、2本鎖DNAを配列選択的に認識する手法は、核酸研究における基盤技術として、その高い応用性が期待されてきた。本研究では、ペプチド核酸（Peptide Nucleic Acid、PNA）と呼ばれる人工核酸を用い、新たな2本鎖DNA認識技術（インベージョン）の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において開発したペプチド核酸（PNA）による2本鎖DNA認識技術は、従来高いDNA認識効率を達成するうえで必要不可欠であったPNAへの化学修飾を不要とし、より簡便なPNA合成を達成している。これにより、付随する様々な障壁を取り払うことで、PNAによる2本鎖DNA認識手法（インベージョン）がより応用研究に適応しやすくなり、その汎用化が期待される。

研究成果の概要（英文）：Sequence-selective recognition of double-stranded DNA in cells will enable the control of gene expression and associated biological functions. Therefore, it is expected to be applied to a wide range of research fields, including the elucidation of various biological processes and the therapeutic treatment of genetic diseases. A new method for sequence-selective recognition of double-stranded DNA has been expected to be developed as a fundamental technology in nucleic acid research because of its high applicability. In this study, we constructed a new double-stranded DNA recognition (invasion) technology using peptide nucleic acid (PNA), a type of artificial nucleic acid.

研究分野：核酸化学

キーワード：DNA PNA ペプチド核酸 インベージョン 核酸 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2本鎖 DNA の配列選択的な認識技術は、生命現象の解明や遺伝子発現制御において非常に重要な技術である。近年 CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術の目覚ましい発展が話題となっているが、これも Cas9 による 2本鎖 DNA 認識という基盤の上に成り立った技術である。このように、2本鎖 DNA 認識技術は高い応用可能性を有するのに対し、これまでは Zinc Finger、TALE、Cas9 などの DNA 結合タンパクによるものがほとんどであった。もし合成分子で DNA を配列選択的に認識することが出来れば、手技の大幅な簡便化だけでなく、従来の DNA 結合タンパクにはない新たな研究展開が期待される。そこで本研究では、ペプチド核酸・Peptide Nucleic Acid (PNA) の「インベージョン」という特徴的な 2本鎖 DNA 認識様式に着目した。

PNA は DNA のリン酸ジエステル結合をアミド結合に置換した人工核酸の 1つであり、リン酸基同士の静電反発が生じず、他の核酸アナログとは一線を画す非常に強い DNA 結合力を示す。その結果、PNA が標的の 2本鎖 DNA 中に潜り込み、2組のより安定な PNA/DNA 2本鎖からなる「インベージョン複合体」を形成する。これにより PNA は、1本鎖状態への変性操作など必要なく、天然に存在する 2本鎖 DNA を直接かつ配列選択的に認識することが可能である。このインベージョンは、数多くの核酸アナログの中でも PNA 唯一の特長である。このように、PNA は高い自由度で特定の 2本鎖 DNA を直接認識することが可能である。さらに、合成分子であることから従来の DNA 結合タンパクとは大きく異なった特性を持つことも重要な要素と言える。

ここで、インベージョンに用いる PNA 同士は必然的に相補的となるが、疑似相補的な塩基 (pseudo-complementary) からなる pcPNA を利用することで、PNA 間の塩基対形成を防いでいる (pcPNA は DNA とは安定に 2本鎖形成する一方で、pcPNA/pcPNA 2本鎖は立体障害により不安定となる)。未修飾の PNA では、より安定な PNA/PNA 2本鎖の形成が優先することでインベージョン効率が低下してしまうため、pcPNA への化学修飾はインベージョンには必要不可欠であるとされた。上記のように魅力的な PNA によるインベージョンであるが、pcPNA を用いるという点では、非常に大きな課題を有していた。まず、pcPNA モノマーは一般に流通しておらず総工程 7 および 9 ステップの化学合成が必要である。加えて、pcPNA は一般的に Boc 法による合成を主としていたことから、自動合成機に適応可能な Fmoc 法とは異なり、その合成は手動合成によって達成されてきた。このような pcPNA の利用に対する障壁から、PNA のインベージョン研究は汎用化が難しく、非常に限定されていた。

2. 研究の目的

本研究では、従来の pcPNA に代わり、核酸塩基への化学修飾を簡素化、また化学修飾に依存しない新たな配列設計に基づくインベージョン系を構築し、PNA をより汎用的かつ効率的な 2本鎖 DNA 認識のツールとして完成させることを目指した。さらに、これまで報告されてこなかった PNA に関する結晶構造解析を達成し、PNA の詳細な構造情報の解明についても検討を行なった。最終的な目標としては、生体内でも効率的に機能する PNA を開発することで、タンパク研究における抗体のように本手法をゲノム DNA の認識技術として確立させ、生体分子認識手法として応用展開を目指した。例えば、抗体を用いた免疫染色、免疫沈降、抗体医薬に対し、生体内の特定 DNA 2本鎖を認識しその動態を観察する生体イメージング技術、標的 DNA/タンパク複合体の選択的な分離精製技術、分子標的薬に代わる遺伝子配列標的薬といった応用展開が期待される。

3. 研究の方法

本研究では、PNA の広範な応用に向けて後述する 3 課題に取り組み、インベージョンを汎用的かつ効率的な 2本鎖 DNA の選択的認識技術へと完成させることを目指した。研究課題「核酸塩基部位への正電荷導入を用いた新規インベージョン系の開発」、研究課題「配列設計を利用した新規インベージョン系の構築」の 2 課題により、より応用展開が容易な新規インベージョン系を構築する。研究課題 においては、グアニンの N7 位をメチル化することで、4 級カチオン化しグアニンへ正電荷を導入する。これにより、負電荷を帯びた DNA との静電相互作用から、より高い DNA 結合力が期待される。一方で、正電荷同士の静電反発により、PNA 間の相互作用は抑制され、トータルとして PNA のインベージョン効率が向上することを期待した。また、研究課題「配列設計を利用した新規インベージョン系の構築」においては、従来疑似相補的 pcPNA を利用する必要があった 2本鎖 DNA 認識 (インベージョン) を、pcPNA への化学修飾を用いずに達成することを目指した。pcPNA への化学修飾は非常に煩雑であるため、pcPNA を必要としないインベ

ージョン系を構築することで、PNA 応用の汎用化へ大きく貢献することが期待される。さらに、研究課題「X線結晶構造解析によるPNAの構造情報の取得」から、PNAの設計に関する構造的側面からの知見を得る。

4. 研究成果

(1) 研究課題「核酸塩基部位への正電荷導入を用いた新規インベーション系の開発」

研究課題「核酸塩基部位への正電荷導入を用いた新規インベーション系の開発」においては、必要となる核酸塩基への化学修飾を簡素化することで、より簡便なPNA合成を達成し、様々な応用研究に適応しやすいインベーション系の構築を目指した。市販のPNAモノマーであるFmoc-G PNAモノマーを利用し、1ステップの非常に

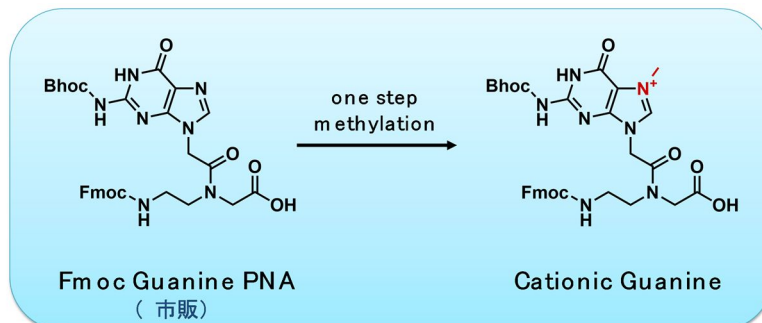


図1 Cationic Guanineの合成

簡便な化学修飾を用いることで、PNAのインベーションの促進を検討した(図1)。具体的には、グアニンのN7位へのメチル化による4級カチオン化を利用し、正電荷を核酸塩基中に導入する。これにより、PNAのDNA結合力の向上および、PNA間の相互作用の抑制を同時に達成し、より高効率なインベーション系の構築に成功した。PNAのインベーション効率はマイクロチップ電気泳動により評価を行い、PNAによるDNAおよびPNAとの相互作用については、UVによる融解温度測定により融解温度 T_m を算出し、正電荷導入PNAが設計通りに機能していることを確認した(図2)。さらに、従来のPNAでは効率的なインベーションが困難であった生理的条件下でも高いインベーション効率を示すことを明らかにした。

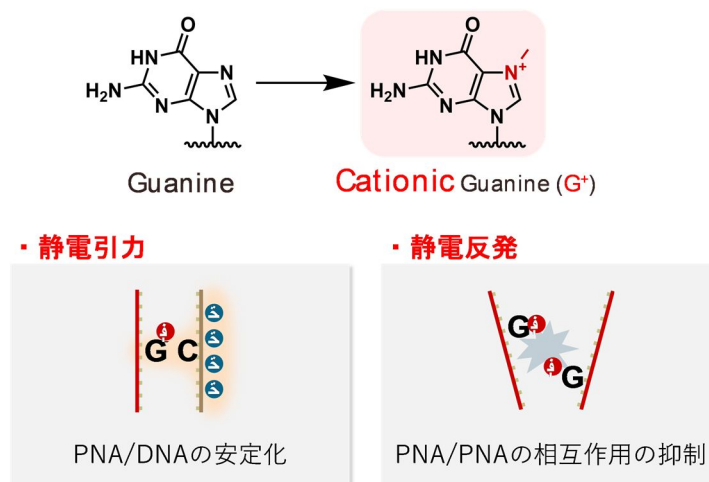


図2 Cationic Guanineによる核酸認識

(2) 研究課題「配列設計を利用した新規インベーション系の構築」

研究課題「配列設計を利用した新規インベーション系の構築」においては、インベーションに必要な核酸塩基への化学修飾(pcPNA)を必要としない新たなインベーション系を構築した。その結果、より簡便なPNA合成を達成し、様々な応用研究に適応しやすいインベーション系の構築のマイルストーンとなったと言える。この新規インベーション系では、pcPNAという制約がないため、Fmoc合成によるPNA合成が可能となり、ペプチド自動合成機の活用も可能となった。これにより、PNAの合成にかかる時間と手間の面でも実験コストは大幅に低減され、様々な検討や応用展開が迅速化されることになった。また、そのPNAの合成の簡便化のために、多量のサンプルを必要とする構造解析を推進するうえでも大きなメリットとなっている。現在、その詳細についてを国際論文誌への投稿を行っている。また、各PNAのDNAおよびPNAとの相互作用を、UVによる融解温度測定により融解温度 T_m から評価し、そのインベーション機構に関する知見を得ている。また、インベーション効率はマイクロチップ電気泳動により評価を行い、PNAの設計がインベーション効率にどのように影響するかについても検討を行なった。

(3) 研究課題「X線結晶構造解析によるPNAの構造情報の取得」

研究課題「X線結晶構造解析によるPNAの構造情報の取得」においては、研究課題に関わるPNA設計について重点的に検討を行なうこととした。各種結晶化条件に対応したスクリーニングキットを用いて検討を行なったところ、いくつかの条件において結晶の取得に成功した。さらに、

その結晶化条件について詳細な検討を行ない、濃度条件などを最適化していくことで、より分解能の高い結晶の取得を試みた。いくつかの対象について検討を起こったところ、全ての構造を明らかにすることは出来なかったが、これまで報告のない PNA と DNA との構造について X 線結晶構造解析に成功した。その測定に際しては、理研 SPring-8 での協力を仰いだ。現在はさらなる構造情報の取得や、より精緻な構造情報の取得に向け、継続して検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aiba Yuichiro, Urbina Gerardo, Shibata Masanari, Shoji Osami	4. 巻 10
2. 論文標題 Investigation of the Characteristics of NLS-PNA: Influence of NLS Location on Invasion Efficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 8663 ~ 8663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app10238663	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hibino Masaki, Aiba Yuichiro, Shoji Osami	4. 巻 56
2. 論文標題 Cationic guanine: positively charged nucleobase with improved DNA affinity inhibits self-duplex formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 2546 ~ 2549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CC00169D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aiba Yuichiro, Shibata Masanari, Shoji Osami	4. 巻 12
2. 論文標題 Sequence-Specific Recognition of Double-Stranded DNA by Peptide Nucleic Acid Forming Double-Duplex Invasion Complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 3677 ~ 3677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12073677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計36件（うち招待講演 6件／うち国際学会 11件）

1. 発表者名 柴田将成、愛場雄一郎、日比野 柁、杉本宏、荘司長三
2. 発表標題 人工核酸PNAの配向性を利用した二本鎖DNA認識手法の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichiro Aiba, Masaki Hibino, Kotaro Nagoshi, Masanari Shibata, Osami Shoji
2. 発表標題 Positively charged nucleobase (G+) for inhibition of self duplex formation and improved PNA invasion efficiency
3. 学会等名 Pacifichem2021 Satellite Symposium -Modified DNA and XNA for therapeutic application- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤公太、柴田将成、愛場雄一郎、日比野 柁、有安真也、荘司長三
2. 発表標題 連続した複数のペプチド核酸 (PNA) を利用した効率的なDNA認識
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬陸杜、愛場雄一郎、柴田将成、有安真也、荘司長三
2. 発表標題 人工核酸PNAを用いたDNAの液-液相分離
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩澤 駿清、愛場 雄一郎、柴田 将成、有安 真也、荘司 長三
2. 発表標題 核酸認識を目指した核酸塩基修飾ペプチドの開発
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 愛場 雄一郎、柴田 将成、伊藤 公太、日比野 柁、有安 真也、荘司 長三
2. 発表標題 ペプチド核酸 (PNA) による2本鎖DNAとのインページョン複合体形成
3. 学会等名 第70回高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 愛場 雄一郎、柴田 将成、伊藤 公太、日比野 柁、有安 真也、荘司 長三
2. 発表標題 天然核酸塩基からなるペプチド核酸 (PNA) による配列特異的な 2本鎖DNA認識
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 愛場 雄一郎、相馬 陸杜、柴田 将成、有安 真也、荘司 長三
2. 発表標題 ペプチド核酸 (PNA) を用いた核酸の液-液相分離
3. 学会等名 第5回LLPS研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 愛場 雄一郎、日比野 柁、柴田 将成、伊藤 公太、有安 真也、荘司 長三
2. 発表標題 ペプチド核酸 (PNA) の化学修飾による効率的な2本鎖DNA認識
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩澤 駿清、愛場 雄一郎、柴田 将成、有安 真也、荘司 長三
2. 発表標題 DNA 認識を目指した核酸塩基修飾 ヘリックスペプチドの開発
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬陸杜、愛場雄一郎、柴田将成、有安真也、荘司長三
2. 発表標題 人工核酸PNAを用いた生体分子の液-液相分離
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田将成、愛場雄一郎、日比野柁、荘司長三
2. 発表標題 ペプチド核酸の配向性に着目した二本鎖DNA認識手法の開発
3. 学会等名 第31回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田将成、愛場 雄一郎、日比野柁、荘司長三
2. 発表標題 核酸の配向に着目したペプチド核酸による新規DNA認識法の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤公太、日比野 柁、柴田将成、有安真也、愛場 雄一郎、荘司長三
2. 発表標題 インページョン複合体の安定化による人工核酸PNAの効率的なDNA認識
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 愛場 雄一郎
2. 発表標題 ペプチド核酸PNAを用いたRNAプローブの開発
3. 学会等名 第11回加藤記念研究助成報告交流会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田将成、愛場 雄一郎、日比野 柁、伊藤公太、荘司長三
2. 発表標題 PNAの配向性を利用した配列特異的な二本鎖DNA認識手法の開発
3. 学会等名 日本化学会第 101 春季年会 (2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Shibata, Y. Aiba, M. Hibino, G. Urbina, Osami Shoji
2. 発表標題 Chemically-modified peptide nucleic acids for their in cellulo applications
3. 学会等名 ASUKA Symposium 2019 A New Phase of Regenerative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田将成、日比野 征、愛場雄一郎、荘司長三
2. 発表標題 ペプチド核酸を用いた二本鎖DNAの配列選択的認識法の開発
3. 学会等名 第32回生物無機化学夏季セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田将成、日比野 征、愛場雄一郎、荘司長三
2. 発表標題 人工核酸PNAを用いた新規二本鎖DNA認識法の開発
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田将成、日比野 征、愛場雄一郎、荘司長三
2. 発表標題 未修飾PNAによる二本鎖DNAの配列選択的認識
3. 学会等名 核酸化学 若手フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Shibata, M. Hibino, Y. Aiba, O. Shoji
2. 発表標題 Sequence-selective Recognition of dsDNA by unmodified PNA
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田将成、日比野 征、愛場雄一郎、荘司長三
2. 発表標題 人工核酸PNAを用いた新規二本鎖DNA認識法の開発
3. 学会等名 統合物質創製化学研究推進機構国内シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Shibata, M. Hibino, Y. Aiba, O. Shoji
2. 発表標題 Sequence-selective recognition of double-stranded DNA
3. 学会等名 The 3rd IRCCS - The 2nd Reaction Infography Joint International Symposium: "Reaction Imaging Meets Materials Science" (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河内奈緒美、日比野 征、愛場雄一郎、荘司長三
2. 発表標題 人工核酸PNAとペプチド・タンパク質との複合化によるDNA認識効率の向上
3. 学会等名 第50回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Hibino, Y. Aiba, O. Shoji
2. 発表標題 Inhibition of Intra- and Intermolecular Interaction between Peptide Nucleic Acids
3. 学会等名 NU-UoE JD and JSPS Core-to-Core Joint-Workshop on "New Horizons in Chemistry and Materials Science" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Hibino, Y. Aiba, O. Shoji
2. 発表標題 Inhibition of Self-duplex Formation by Using Methyl-adducted PNA
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Hibino, Y. Aiba, Y. Watanabe, O. Shoji
2. 発表標題 Sequence Specific DNA Damage Induced by Metal-Complex-PNA Conjugate
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日比野 柁
2. 発表標題 金属錯体配位ペプチド-PNA複合体による配列特異的DNA切断
3. 学会等名 核酸化学 若手フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Hibino, Y. Aiba, O. Shoji
2. 発表標題 PNA with Metal-Coordinating Peptide for Sequence-Specific DNA Cleavage
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 愛場雄一郎、日比野 証、河内奈緒美、柴田将成、 荘司長三
2. 発表標題 生理的条件下で機能する化学修飾ペプチド核酸 (PNA) の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Aiba
2. 発表標題 Peptide Chemistry
3. 学会等名 ASUKA Symposium 2019 A New Phase of Regenerative Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Aiba, M. Shibata, M. Hibino, O. Shoji
2. 発表標題 Effective Sequence-selective Recognition of Double-stranded DNA via Invasion Complex Formation by Peptide Nucleic Acids
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (CISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 愛場雄一郎、柴田将成、日比野 証、 荘司 長三
2. 発表標題 汎用的なDNA認識法に向けた新規PNAインページョンの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 愛場雄一郎
2. 発表標題 化学の力で生物の機能を制御する-人工核酸を利用したDNA認識-
3. 学会等名 岡崎北高校大学講座（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Aiba, M. Shibata, M. Hibino, O. Shoji
2. 発表標題 Double-duplex invasion complex formed by unmodified PNA for the recognition of double-stranded DNA
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 愛場雄一郎
2. 発表標題 ペプチド核酸・PNAによる2本鎖DNA認識
3. 学会等名 核酸化学懇話会 2020 北海道・東地区セミナー（次世代の核酸化学を考える）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 白木 賢太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 400
3. 書名 相分離生物学の全貌（現代化学増刊46）	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 インベージョン複合体の形成方法	発明者 愛場 雄一郎、荘司 長三	権利者 国立大学法人名 古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2021-16321	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ペプチド核酸(PNA)による遺伝子制御
<http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp/research/pna.html>
研究業績
<http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp/publications/paper.html>
Curriculum Vitae
http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp/content/images/CV_aiba.pdf
http://bioinorg.chem.nagoya-u.ac.jp/content/images/CV_aiba_Eng.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	Ocean University of China		