

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02858

研究課題名(和文)人工核酸によるキラル増幅を利用した生体分子検出

研究課題名(英文) Detection of biomolecules by using chiral amplification system composed of artificial nucleic acids

研究代表者

榎田 啓 (Kashida, Hiromu)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30452189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では申請者らが開発したセリノール核酸(SNA)を利用したキラル増幅系の開発、及びそれを利用した生体分子検出を目指した。まず、アキラルなSNA一次元構造体を調製した。この構造体に対し、キラル人工核酸を少量添加した際にCD強度が大幅に増大したことから、核酸の二重鎖形成を利用したキラル増幅系の開発に初めて成功した。また、ナノ構造体を蛍光色素で修飾することで、CDだけではなく円偏光発光(CPL)を発現させることにも成功した。更に、DNAをキラル源として利用したキラル増幅系を構築した。以上のように、核酸の二重鎖形成を利用したキラル増幅系を開発し、それを利用した生体分子検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子はほぼ全てキラルであるため、キラリティに基づいた検出法を開発することが出来れば、生体分子を検出する非常に汎用性の高い手法となることが期待できる。本研究では、核酸のキラリティを増幅し、円二色性や円偏光発光によって検出する全く新しい手法を開発した。今後、これを利用した天然核酸検出や他の生体分子検出への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a chiral amplification system utilizing serinol nucleic acid (SNA). First, we prepared a one-dimensional nano structure by hybridizing achiral SNA strands. When chiral nucleic acid was added, CD intensity drastically increased. Thus, chiral amplification system triggered by duplex formation was successfully developed for the first time. Then we modified SNA nano structures with pyrene. The structure expressed circularly polarized luminescence (CPL) upon the addition of chiral nucleic acids. We also succeeded to develop a chiral amplification system triggered by DNA.

研究分野：生体関連化学

キーワード：キラル増幅 人工核酸 円偏光発光 円二色性

1. 研究開始当初の背景

超分子キラル増幅系はアキラルな超分子構造体に対し、少量のキラルモノマーを添加した際にそのキラル性が大幅に増幅する現象である。これを利用すれば、キラル分子検出が可能であることから非常に注目されている。これまでに、有機小分子や高分子を利用したキラル増幅系が数多く報告されている。しかしながら、従来の系では構造体の設計・制御が困難であるという問題点があった。また、多くの場合有機溶媒を使用していたため、水溶性キラル分子検出への展開が困難であるという問題もある。一方、DNA や RNA といった核酸は水溶性が高く、任意の形状のナノ構造体を調製可能であるという利点がある。しかしながら、天然核酸や大半の人工核酸はキラル性を持つためアキラルな構造体を調製できないという問題点があった。また、アキラルな人工核酸としてペプチド核酸 (PNA) が知られている。しかしながら、PNA は高い疎水性を持つため、PNA を利用したナノ構造体は報告されていない。これらの理由から、研究開始時には核酸の二重鎖形成を利用した超分子キラル増幅系は報告されておらず、キラル増幅を利用した生体分子検出法に関する報告例は限られているのが現状であった。

2. 研究の目的

それに対し、我々は人工核酸であるセリノール核酸 (SNA) を報告した (図 1a)。この SNA は単純な化学構造を持つにもかかわらず天然核酸 (DNA, RNA) と安定な二重鎖を形成できることを明らかにした。また、SNA は対称な化学構造を持つため、オリゴマーの配列を対称化することでキラル性を“消す”ことが出来るという極めてユニークな性質を持つ (図 1b)。

そこで、本研究ではこの SNA によるナノ構造体を利用することで核酸の二重鎖形成を利用したキラル増幅系の開発、及びそれを利用した生体分子検出への展開を目指した。

3. 研究の方法

図 2 に開発したキラル増幅系の概略を示す。まず、対称配列をもち、半分ずれて相補的な SNA を二重鎖形成させることでアキラルな一次元ナノ構造体を調製した。このナノ構造体はアキラルであるため CD を示さない。一方、同じ配列をもつキラル核酸 (D-トレオニノール核酸; D-aTNA) を添加した際には D-aTNA がナノ構造体に取り込まれ、キラル性が発生する。更に、D-aTNA によって誘起されたらせん構造が SNA ナノ構造体にも伝播することで CD が大幅に増大することを期待した。これが実現できれば、核酸のキラル性を SNA ナノ構造体によって増幅することが期待できる。本研究では更に、ナノ構造体を蛍光色素で修飾することによる円偏光発光 (CPL) シグナル発現や天然核酸によるキラル増幅について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 人工核酸によるキラル増幅系の開発

まず、図 2 に示すキラル増幅系を調製し、そのキラル増幅能を評価した。まず、SNA による一次元ナノ構造体形成を AFM 及び SEC によって評価した。その結果、SEC においてナノ構造体形成に伴う大きなピークシフトが観察された。また、液中 AFM イメージングにおいては、平均長 53.6nm のナノ構造体形成が確認された (図 3)。

そこで、次に SNA ナノ構造体に対して D-aTNA を添加し、CD 測定を行った。その結果、SNA ナノ構造体単独では CD を示さないことがわかった (図 4a)。これは設計通り SNA がアキラルであることを示している。一方、D-aTNA を添加した際には CD が誘起された。CD 強度

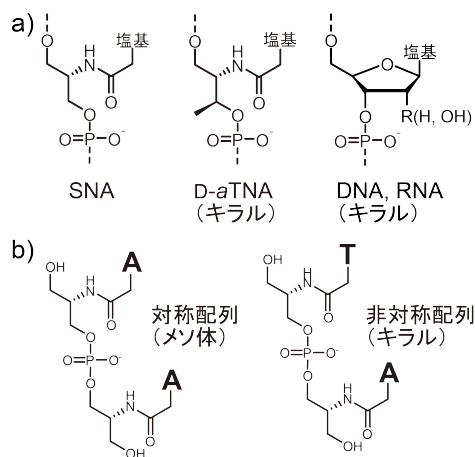


図 1. (a)天然及び人工核酸の化学構造、及び(b)SNA オリゴマーの配列設計によるキラル性制御の模式図

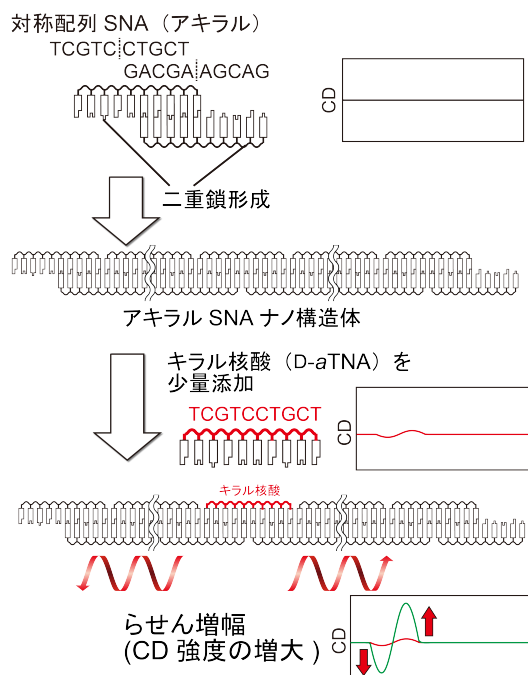


図 2. SNA ナノワイヤー構造体形成、及びキラル核酸によるキラル増幅の模式図

(ΔCD) を *D-aTNA* の当量に対してプロットした結果を図 4b に示す。その結果、*D-aTNA* の当量に対して非線形的に CD 強度が増大する挙動が観察された。このことは少量の *D-aTNA* 添加に伴い大幅に CD が増大したことを示しており、設計通りキラリティが増幅されたことがわかった。一方、コントロールとして完全に相補的な *SNA* 二重鎖に対して *D-aTNA* を添加し、 CD スペクトルを測定した (図 4b の青線)。その結果、 CD 強度の増大は観察されたものの、*D-aTNA* の当量に対して線形的に CD 強度が増大することがわかった。このことは、キラリティを増幅させるためには *SNA* ナノ構造体形成が必須であることを示している。以上のことから、核酸の二重鎖形成を利用したキララル増幅系の開発に初めて成功した。

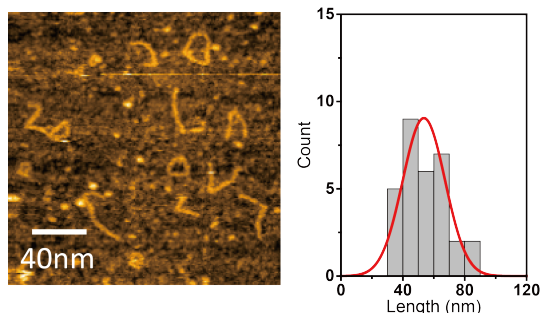


図 3. *SNA* ナノ構造体の AFM イメージング結果。構造体の長さ解析結果も併せて載せる。

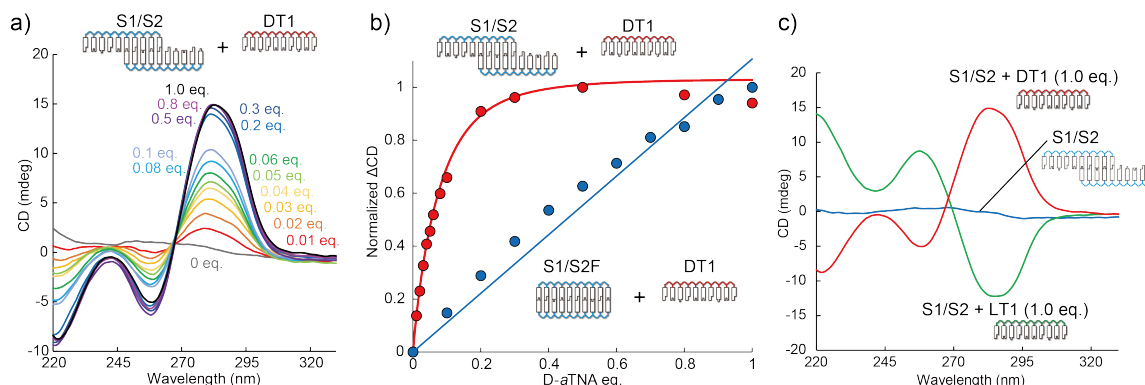


図 4. 開発したキララル増幅系についての (a) CD 測定結果、(b) キララル増幅結果、及び (c) キララル核酸のキラリティが CD に与える影響。(b) 完全相補二重鎖を利用したコントロール実験の結果も示す (青線)。

更に、このキララル増幅系について詳細に検討を行った。まず、*D-aTNA* の代わりにその鏡像異性体である *L*-トレオニール核酸 (*L-aTNA*) を添加したところ、 CD シグナルが反転した (図 4c)。このことは添加する核酸のキラリティに応じて、らせん構造が反転したことを示している。また、*D-aTNA* 添加時と同様のキララル増幅能を示した。一方、*SNA* ナノ構造体にミスマッチを導入したところ、キララル増幅能の顕著な低下が観察された。更に、*SNA* ナノ構造体にギャップ構造を導入したところ、ほぼ線形的な挙動が観察された。このことは、キララル核酸添加時のらせん構造の伝播が塩基対間のスタッキング相互作用を介していることを示唆している。更に、*SNA* 鎖長の影響について検討を行った。その結果、キララル増幅能は *SNA* 鎖長にほとんど影響されることがわかった。このことは、*SNA* ナノ構造体中のニック (切れ目) の数がらせん増幅能を決定していることを示唆している。

以上のように、核酸の二重鎖形成を利用したキララル増幅系の開発に成功した。本研究成果は *Chem. Sci.* 誌に掲載された。

(2) 蛍光色素修飾による円偏光発光発現

(1) の系ではキララル増幅した際に核酸塩基吸収部位の CD 強度が増大するため、ON-OFF 制御が困難であるという問題がある。そこで、蛍光色素であるピレンを *SNA* に導入した。ピレンは核酸塩基と比較して、より長波長側に吸収を持つ。また、会合した際にエキシマー発光するという特徴がある。更に、キララルな会合体を形成した際に CPL を発現するということが報告されている。そこで、図 5 に示すキララル増幅系を開発した。ピレンで修飾したナノ構造体自体は CD を示さないのに対し、*D-aTNA* 添加時にはキララル増幅が期待される。また、核酸塩基部位に誘起されたらせん構造がピレン部位に伝播することで、色素吸収領域における CD 、及び CPL を発現することを期待した。これが実現できれば、核酸のキラリティを増幅し、 $CD \cdot CPL$ シグナルへと変換する全く新しい材料の開発が期待できる。

CD 測定結果を図 6a に示す。*SNA* ナノ構造体自体は CD を示さなかったことから、アキララルであることが確認された。一方、*D-aTNA* 添加時には核酸塩基吸収領域だけではなく、色素吸収領域にも CD が誘起された。このことは核酸塩基部位だけではなく、ピレン部位もキララルな会合体を形成したことを示している。更に、*D-aTNA* 当量に対して CD 強度をプロットした結果を図 6b に示す。核酸塩基吸収領域の CD 強度が非線形的に増加していることから、キララル増幅が起

きたことがわかった。更に、色素吸収領域の CD が同様の挙動を示すことがわかった。これは、核酸塩基部位に誘起されたらせん構造がピレン部位に効率的に伝播したことを示している。

更に、このキラル増幅系について CPL 測定を行った。結果を図 6c に示す。まず、アキラルな SNA ナノ構造体単独では CPL を示さないことがわかった。一方、D-aTNA 添加時には 500 nm 付近に負の CPL シグナル、L-aTNA を添加した際には正の CPL シグナルが観察された。それぞれの異方性因子は D-aTNA 添加時において -2.3×10^{-3} 、L-aTNA 添加時に 1.9×10^{-3} と算出された。従って、添加する核酸のキラルティに応じて CPL シグナルが反転することがわかった。この結果は蛍光色素修飾 SNA ナノ構造体を利用すれば、キラル核酸のキラル情報を CPL として読み取り可能であることを示している。

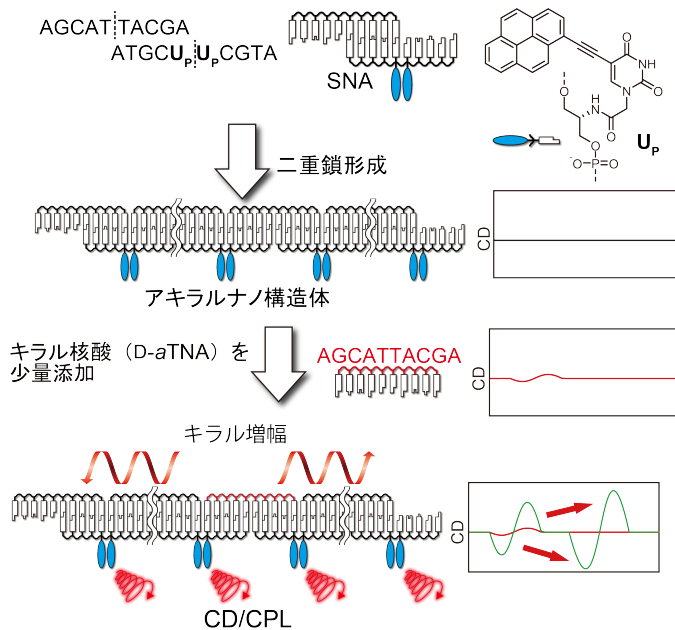


図 5. ピレン修飾 SNA を利用したキラル増幅の模式図。

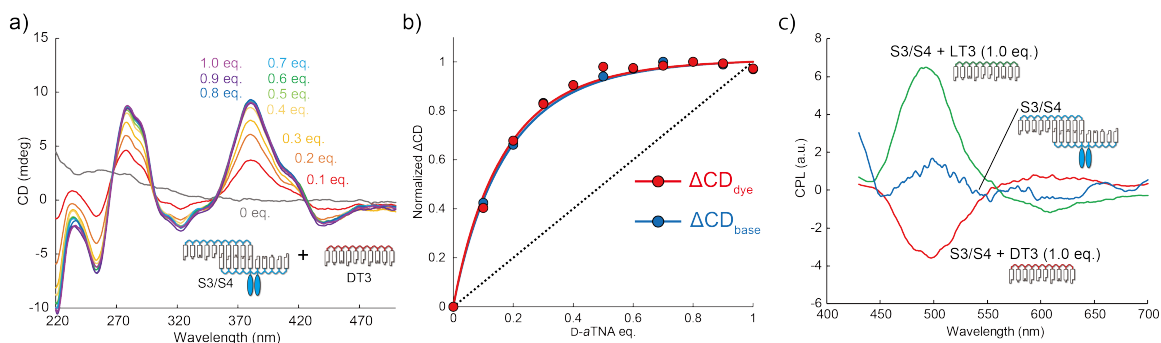


図 6. ピレン修飾 SNA を用いたキラル増幅系についての (a) CD 測定結果、(b)キラル増幅結果及び (c) CPL 測定結果。(b)色素吸収領域 (赤線) 及び核酸塩基吸収領域 (青線) の CD 強度を示す。

以上のように、蛍光色素修飾 SNA を利用することで核酸のキラル情報を CD や CPL といったキロプティカルシグナルに変換する材料の開発に成功した。生体分子はほぼ全てキラルであるため、本系を拡張することで汎用性の高いキラル分子検出法としての応用が期待できる。本研究成果は *Chem. Eur. J.* に掲載された。

(3) 天然核酸をキラル源として利用したキラル増幅系の構築

上記のように、人工核酸 (トレオニノール核酸) をキラル源として利用したキラル増幅系の開発に成功した。そこで、人工核酸の代わりに天然核酸をキラル源として利用したキラル増幅系の構築を目指した。これが実現できれば、キラル増幅を利用した天然核酸検出という全く新しい核酸検出法の開発が期待できる。しかしながら、SNA/DNA 及び SNA/RNA 二重鎖の安定性は SNA/SNA 二重鎖と比較して低いため、そのままではキラル増幅を行うことが出来ない。実際、図 2 に示すナノ構造体に対し、DNA や RNA を添加してもキラル増幅が起きないことを明らかにしている。そこ

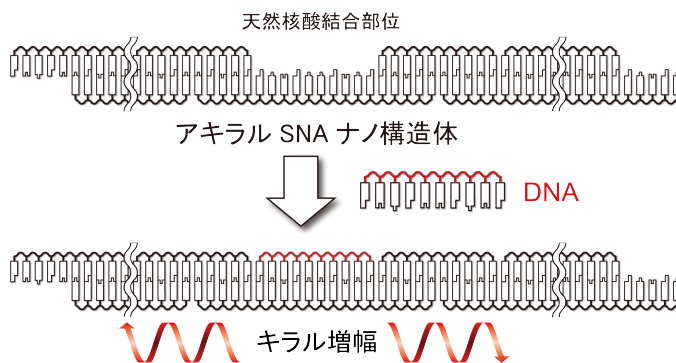


図 7. DNA をキラル源としたキラル増幅系の設計。

で、天然核酸結合部位を持つ SNA を混合することで天然核酸のキラリティを増幅させることを目指した (図 7)。

CD スペクトル測定の結果、添加する DNA 当量の増加とともに CD 強度の増大が観察された (図 8a)。CD 強度を DNA 当量に対してプロットした結果を図 8b に示す。SNA と完全に相補的なフルマッチ DNA を添加したところ、非線形挙動が観察された。このことから、DNA をキラル源として利用したキラル増幅系の開発に成功した。一方、中央にミスマッチを持つ DNA (ミスマッチ 1) を添加したところ、線形的に CD 強度が増大した。更に、末端部位にミスマッチを持つ DNA (ミスマッチ 2) を添加したところ、非線形挙動が観察されたものの、CD 強度がフルマッチと比較して大幅に低下することがわかった。これらのことは、本キラル増幅系が高いミスマッチ識別能を持つことを示している。以上のことから、天然核酸をキラル源として利用したキラル増幅系の構築が可能であることがわかった。天然核酸を用いたキラル増幅系については、今後更に検討を進める予定である。

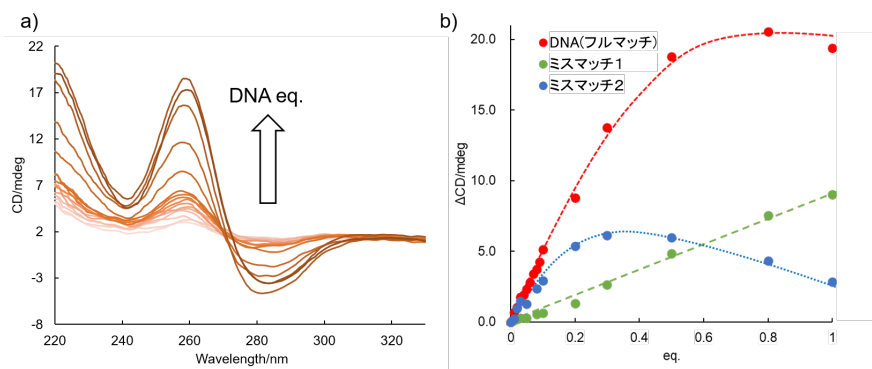


図 8. DNA をキラル源としたキラル増幅系の a)CD 測定結果、及び b)キラル増幅結果。b)ミスマッチを含む DNA を添加した際の結果も併せて載せる。

以上のように、人工核酸 SNA を利用した超分子キラル増幅系の開発に成功した。また、人工核酸のキラリティをキロプティカルシグナルに変換する材料を開発した。更に、天然核酸をトリガーとしたキラル増幅系を構築した。本研究成果を拡張すれば、CD や CPL によって DNA や RNA を検出する材料の開発が期待できる。また、タンパク質など他の生体分子に結合するアダプター配列を結合させれば、他の生体分子検出への展開が期待できる。ほぼ全ての生体分子はキラルであるため、本手法が更に発展することで極めて汎用性の高い生体分子検出法としての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kashida Hiromu, Nishikawa Keiji, Ito Yuka, Murayama Keiji, Hayashi Ichiyo, Kakuta Takahiro, Ogoshi Tomoki, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 A Pyrene Modified Serinol Nucleic Acid Nanostructure Converts the Chirality of Threoninol Nucleic Acids into Circularly Polarized Luminescence Signals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 14582 ~ 14585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202102333	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 Kawai Hayato, Doi Tetsuya, Ito Yuka, Kameyama Tatsuya, Torimoto Tsukasa, Kashida Hiromu, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Perylene Cy3 FRET System to Analyze Photoactive DNA Structures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 12845 ~ 12850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202101738	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 Makino Koki, Susaki Etsuo A., Endo Motomu, Asanuma Hiroyuki, Kashida Hiromu	4. 巻 144
2. 論文標題 Color-Changing Fluorescent Barcode Based on Strand Displacement Reaction Enables Simple Multiplexed Labeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 1572 ~ 1579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c09844	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 Kashida Hiromu, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 79
2. 論文標題 Pseudo Base Pairs that Exhibit High Duplex Stability and Orthogonality through Covalent and Non-covalent Interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1013 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaisi.79.1013	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 Asanuma Hiroyuki, Kamiya Yukiko, Kashida Hiromu, Murayama Keiji	4. 巻 58
2. 論文標題 Xeno nucleic acids (XNAs) having non-ribose scaffolds with unique supramolecular properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3993 ~ 4004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc05868a	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 Kashida Hiromu, Nishikawa Keiji, Shi Wenjing, Miyagawa Toshiki, Yamashita Hayato, Abe Masayuki, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 A helical amplification system composed of artificial nucleic acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1656 ~ 1660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0sc05245k	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 Kashida Hiromu, Kawai Hayato, Azuma Hidenori, Araki Yasuyuki, Wada Takehiko, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Quantitative Analyses of Forster Resonance Energy Transfer between Identical Pyrene Chromophores (Homo FRET) In DNA Scaffolds.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 167 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptc.202000199	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 Makino Koki, Hattori Yuhei, Kashida Hiromu, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Preparation of Artificial Hexaplex Composed of Non Natural Nucleic Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Protocols	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpz1.106	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 Kashida Hiromu, Ito Yuka, Kakuta Takahiro, Ogoshi Tomoki, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Orientational Control of Circularly Polarized Luminescence from Pyrene Clusters by Using a DNA Scaffold	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202300182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202300182	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 Murayama Keiji, Kashida Hiromu, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Methyl group configuration on acyclic threoninol nucleic acids (aTNAs) impacts supramolecular properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 4115 ~ 4122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob00266c	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hiromu Kashida
2. 発表標題 Development of fluorescent probes detecting RNA
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromu Kashida
2. 発表標題 Precise control of dye interaction by using D-threoninol scaffold
3. 学会等名 11th International Conference on Porphyrins & Phthalocyanines (ICPP-11) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎田 啓
2. 発表標題 核酸の化学修飾とその応用
3. 学会等名 第69回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎田 啓, 西川慧史, 角田貴洋, 生越友樹, 浅沼浩之
2. 発表標題 人工核酸SNAナノ構造体を利用したキラル増幅
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 榎田 啓, 西川慧史, 林 一陽, 角田貴洋, 生越友樹, 浅沼浩之
2. 発表標題 人工核酸を利用したキラル増幅系の開発
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会（開催中止）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎田 啓
2. 発表標題 核酸の多様化を目指した人工核酸の開発
3. 学会等名 第9回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎田啓
2. 発表標題 人工核酸を利用した機能性材料の開発
3. 学会等名 第4回発動分子科学サロン（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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