

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15399

研究課題名(和文) 光応答性修飾核酸塩基を用いたSNA光ライゲーション法の開発

研究課題名(英文) Photo-ligation of SNA via photo-responsive nucleobases

研究代表者

村山 恵司 (Murayama, Keiji)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：70779595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸のライゲーション反応は鋳型鎖に二重鎖形成した相補的な断片配列同士を選択的に連結する手法であり、遺伝子組み換えにおいて必須の技術であるだけでなく、核酸構造体の安定化や核酸配列検出への応用も盛んに行われている重要な技術である。本研究では光照射で人工核酸SNAをRNA鋳型上で連結する光ライゲーション反応を新たに開発した。本反応は鋳型RNA存在下で選択的に進行し、高効率で連結産物が得られることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した光ライゲーション反応は特定のRNA配列存在下でのみSNA鎖を連結する反応であるため、RNAを標的とする新たなRNA検出システムや核酸医薬としての応用が期待できる。また、本研究の過程で新たに開発した光応答性核酸塩基NVAは、過去に報告しているPVAと同様の二重鎖光制御を、より短波長の光照射で行うことができるため、PVAとNVAを併用することで複雑な核酸分子マシンを構築することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Ligation of nucleic acids generates complementary strand for template from fragment strands via formation of phosphodiester bond, which is significantly important for various biological technology including genetic recombination, nucleic acid architecture, and nucleic acid detection. In this project, we have newly developed photo-ligation of SNA, artificial nucleic acid, on a template RNA strand. SNA fragments carrying photo-responsive nucleobase can be effectively ligated on RNA template by the irradiation of 365 nm light.

研究分野：生物有機化学

キーワード：SNA 光架橋 ライゲーション RNA 人工核酸

### 1. 研究開始当初の背景

核酸のライゲーション反応は鑄型鎖に二重鎖形成した相補的な断片配列同士を選択的に連結する手法であり、遺伝子組み換えにおいて必須の技術であるだけでなく、核酸構造体の安定化や核酸配列検出への応用も盛んに行われている重要な技術である。種々の化学修飾によって核酸をライゲーションする手法も報告されてきた(*Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775-3789)。また、照射光によって核酸ライゲーションを行う手法も報告されている(例として T. Ihara et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8880-8881, K. Fujimoto et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16161-16167)。一方、これまでに報告されているライゲーション反応はほぼ全てが産物と template の二重鎖を安定化する設計であった。そこで、照射光によりライゲーションを行い、ライゲーション後に二重鎖を不安定化させ自発的な二重鎖解離を誘発する全く新しい反応系を設計した。

我々はこれまでに、新規人工核酸 SNA を開発しており、SNA のみで構成される配列が RNA と二重鎖形成することを見出している(Fig. 1)。更に、修飾核酸塩基 8-pyrenylvinyl adenine (PVA) の可逆的光二量化反応を利用することで、SNA/RNA 二重鎖の形成と解離を光で制御することに成功した(Fig. 2)。具体的には、SNA に PVA を 2 残基導入した場合、照射前には二重鎖形成を阻害しないが、可視光を照射すると鎖内の PVA 同士の光二量化反応によって構造が歪み二重鎖が大幅に不安定化、一本鎖に解離することを発見した(*J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 9485-9489)。

もし、この光二量化反応をライゲーションの連結点に利用すれば、光二量化により二重鎖の不安定化を誘発するため、連結反応後自発的に一本鎖に解離し template が再生する新たな光制御系が構築できると考えた(Fig. 3)。これは、架橋で二重鎖を安定化する従来のライゲーションとは異なる反応系であり、これまでに発想し得なかった応用が実現できる。そこで本申請研究では、PVA を用いた SNA の光ライゲーション法の構築とその応用を目指すこととした。具体的には、SNA の光ライゲーション法を確立し、**(i)シグナル増幅による RNA 高感度検出、(ii)核酸ポリカテナン作成、(iii)新規修飾核酸塩基の開発**に応用することを計画していた。

### 2. 研究の目的

RNA(DNA)を template とした PVA 導入 SNA の光ライゲーション法を確立し、template が触媒的に作用し連続的に SNA ライゲーションが起こる条件を探索する。この系を利用することで、**(i)シグナル増幅による RNA 高感度検出システムを構築し、微量 RNA を配列特異的に検出することを目指す。**更に、全く新しいナノ構造体として**(ii)核酸ポリカテナン作成を試みる。**加えて、**(iii)新規修飾核酸塩基の合成を行い、PVA とは異なる波長の光を用いた光二量化反応を目指す。**

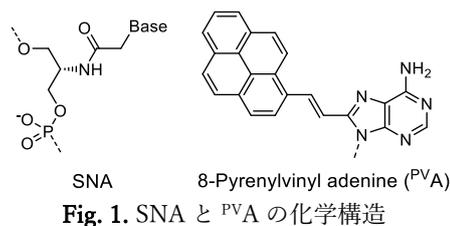


Fig. 1. SNA と PVA の化学構造

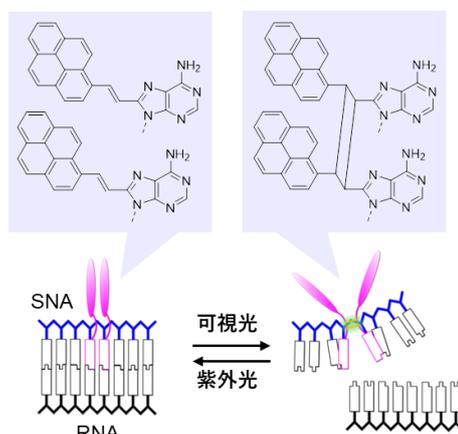


Fig. 2. PVA を用いた SNA/RNA の二重鎖形成と解離の可逆的光制御

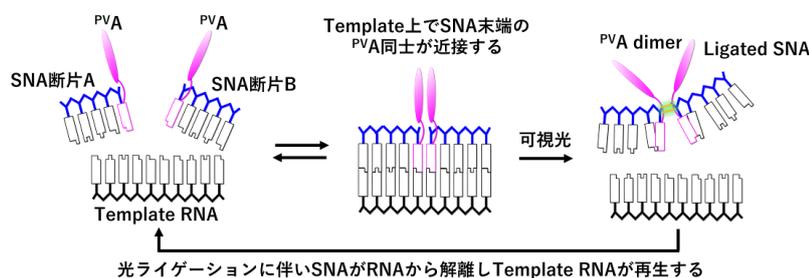


Fig. 3. PVA を用いた SNA の光ライゲーション

### 3. 研究の方法

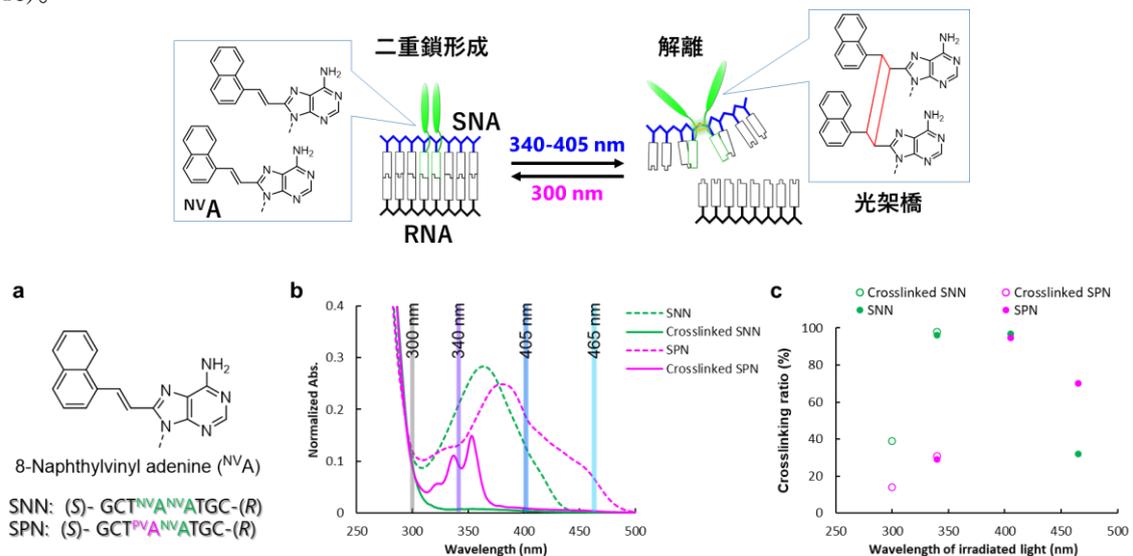
**研究方針の変更：** RNA 配列に対し、PVA を含む SNA 断片配列 2 本を二重鎖形成させ照射による連結反応を試みた結果、断片 SNA 鎖の高効率な連結が確認された。しかし予想に反し、鋳型 RNA 非存在下でも光による連結反応が進行することも明らかとなり、設計通りの鋳型特異的な反応ではないことが確認された (data not shown)。PVA 同士のスタッキングが強すぎるため、鋳型が無い状態でも断片 SNA 鎖の PVA 同士が会合してしまうことで、架橋反応が進行したと考えられる。そこで、計画を変更し、先に新規光応答性塩基の開発を行うことにした。

**新規光応答性核酸塩基の開発：** 新たな光応答性核酸塩基 NVA を設計し、有機合成にてホスホアミダイトモノマーを合成した。DNA 合成機を用いてこのモノマーを SNA 配列中に導入し、HPLC にて精製・MALDI TOF-MS にて目的配列を確認した。照射後の産物に対し、吸収スペクトル・HPLC・融解温度測定を行うことで機能評価を行った。

**SNA の光ライゲーション法の開発：** NVA を末端に導入した SNA 鎖フラグメントを鋳型 RNA 上で連結させることを試みた。鋳型 RNA 存在下・非存在下で照射を行い、反応産物の解析を行った。

### 4. 研究成果

**新規光応答性核酸塩基の開発：** ビニルナフタレンを導入した 8-naphthylvinyl adenine (NVA) を新たに設計した (Fig. 4a)。NVA は PVA に比べ短波長の光で制御が可能となるため、PVA と NVA は互いに異なる波長の光で直交的に制御できることを期待した。また、光ライゲーションにおいては芳香族環が小さくなることで、鎖間の非特異なスタッキング相互作用を抑制できると考えた。NVA のモノマーを合成し、SNA に導入して光反応の評価を行った。NVA を 2 残基導入した SNA (SNN) は 405~340 nm の照射で光架橋反応が進行し、300 nm の照射で開裂反応によりモノマー状態に戻ることが可能であった (Fig. 4b,c)。一方で PVA が架橋反応を起こす波長である 465 nm 光を照射しても SNN の架橋は顕著に遅かった (Fig. 4c)。



**Fig. 4.** (a) NVA の構造と合成した SNA 配列. (b) SNN と SPN の照射前後における吸収スペクトル. (c) SNA/RNA 二重鎖に対し各波長の光を照射した際の光架橋産物生成割合. Closed circle は照射前のサンプルに照射した結果, open circle は架橋産物に照射した結果を示す. Conditions: [SNA] = [RNA] = 5.0  $\mu$ M, [NaCl] = 100 mM, pH = 7.0 (10 mM phosphate buffer), 465 nm (LED), 405 nm (LED), 340 nm (Xenon), 300 nm (Xenon) irradiated at 20  $^{\circ}$ C.

更に融解温度測定によって、光架橋後には二重鎖が一本鎖に解離しており、架橋開裂後には元の二重鎖が再生していることが確認された (data not shown)。また、<sup>NVA</sup> と <sup>PVA</sup> を 1 残基ずつ導入した SNA (<sup>SPN</sup>) は <sup>PVA</sup> を 2 残基導入した場合と同じく、400 nm より長波長の光で架橋、340 nm 以下の波長の光照射で開裂が確認された。つまり、照射波長に応じて異なる二重鎖の形成・解離を独立に制御できることを示しており (Fig. 5)、実際に 2 つの二重鎖が共存する条件下でそれぞれ独立に光制御することに成功した (Y. Yamano, K. Murayama, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.*, **2021**, *27*, 4599)。この結果をふまえ、<sup>NVA</sup> を導入した SNA を用いて光ライゲーションを試みた。

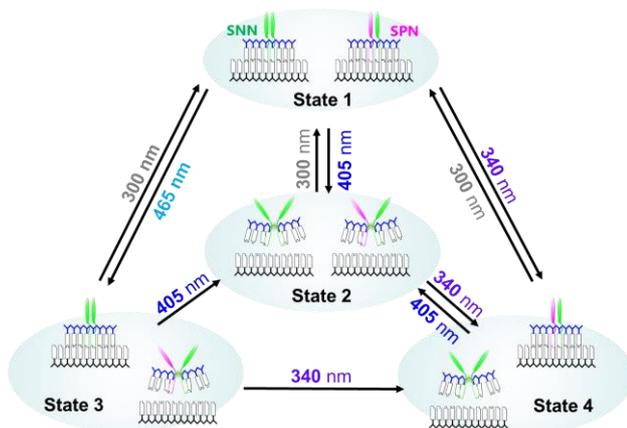


Fig. 5. 照射波長と二重鎖形成・解離の関係

### SNA の光ライゲーション法の開発：

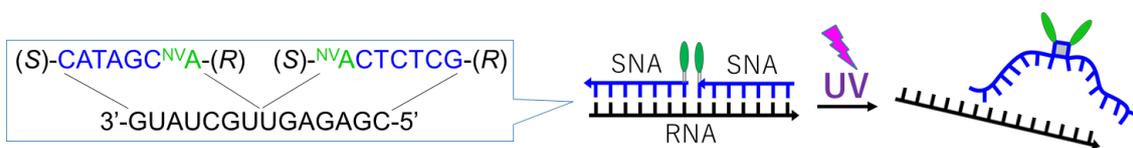


Fig. 6. <sup>NVA</sup> を用いた SNA の光ライゲーションの配列設計

中央に UU 配列を持つ 14-mer の RNA 配列をモデル template として、それに相補的な 7-mer の断片 SNA を合成し、SNA の連結する側の末端に <sup>PVA</sup> を導入した (Fig. 6)。光照射前の融解温度 ( $T_m$ ) は 41.4°C であり、室温で二重鎖を形成していることが確認された。ここに 365 nm の光を照射した結果、<sup>NVA</sup> に対応する吸収が減少したことから架橋反応の進行が示唆された (Fig. 7)。反応前後のサンプルを HPLC にて解析した結果、照射前の SNA 断片に対応する 2 つのピークは完全に消失し、単一の新たなピークが確認された。したがって設計通り、鋳型 RNA 上で光連結反応が進行したことが示され、その反応が極めて高効率であることが確認された。

この反応の鋳型特異性を確認するために、RNA 非存在下、SNA 断片のみが存在する条件下で光照射を行った。UV-Vis スペクトル及び HPLC での解析の結果、<sup>NVA</sup> の *trans-cis* 異性化と SNA 鎖間での <sup>NVA</sup> の非特異的な架橋反応が進行していることが明らかとなった (data not shown)。吸収スペクトルの結果から <sup>NVA</sup> の *trans* 体、*cis* 体、架橋体それぞれの存在比を各照射時間で算出した結果 (Fig. 8)、RNA 非存在下に比べ RNA 存在下での架橋反応は圧倒的に進行が速く、光照射時間が十分に短い範囲においては鋳型特異的な光ライゲーションが進行していることを明らかにした。

そこで、触媒的な鋳型利用を実現できるかを検証するため、光ライゲーション産物の  $T_m$  を測定した結果、46.3°C となり、予想に反し架橋前 (41.4°C) に比べ高温となった。これ

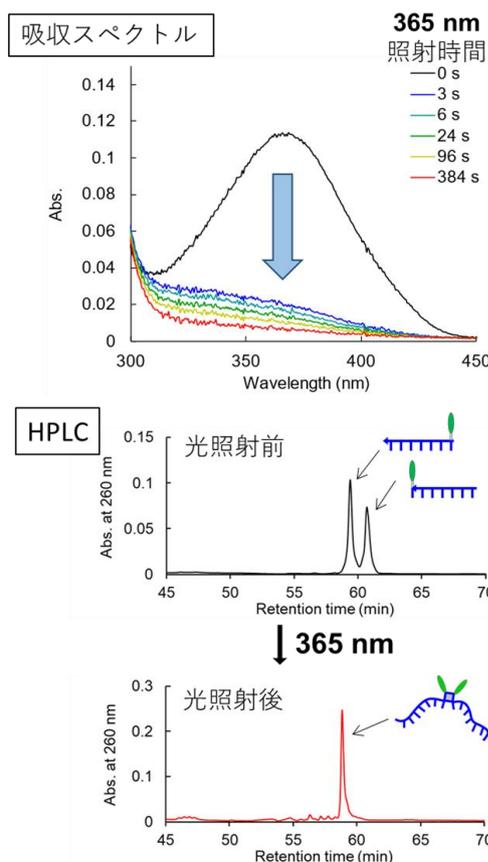


Fig. 7. 光ライゲーション反応の解析  
Conditions: [SNA] = [RNA] = 2  $\mu$ M, 10 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.0, 20 °C, 365 nm LED.

は、架橋による二重鎖の不安定化よりも鎖長が長くなることによる安定化が大きいことが原因と考えた。そこで、RNA を 12-mer、10-mer と短鎖に代えて検証を行ったが、いずれの場合にも光架橋後の  $T_m$  が照射前を下回ることにはなかった。

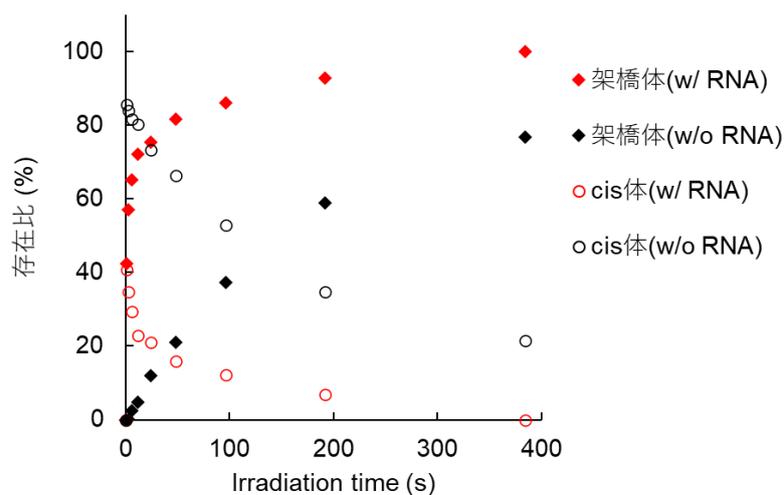


Fig. 8. 鋳型存在下・非存在下での光照射後の架橋体及び cis 体の存在比 (吸収スペクトルから算出)

以上のように、本研究では新規光応答性塩基<sup>NVA</sup>の設計と合成に成功し、PVAとは異なる波長の光を用いてSNAの光制御に成功した。また、これを用いることでRNAを鋳型とする高効率なSNA光ライゲーションを実現した。しかし一方で、鋳型RNAを触媒的に使用する当初の設計は実現できなかった。これを達成するためには、架橋産物の二重鎖安定性をより低下させるために、光応答性核酸塩基にさらなる修飾が必要であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3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 Ishii Satsuki, Murayama Keiji, Sada Kazuki, Asanuma Hiroyuki, Kakugo Akira	4. 巻 51
2. 論文標題 Unexpected Dissociation of Photoresponsive UV-ON DNA Carrying p-tert-Butyl Azobenzene under UV Light Irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 292 ~ 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210788	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 Chen Yanglingzhi, Murayama Keiji, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 51
2. 論文標題 Signal Amplification Circuit Composed of Serinol Nucleic Acid for RNA Detection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 330 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210813	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 Tamba Masaaki, Murayama Keiji, Asanuma Hiroyuki, Nakakuki Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Renewable DNA Proportional-Integral Controller with Photoresponsive Molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 193 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi13020193	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 Chen Yanglingzhi, Nagao Ryuya, Murayama Keiji, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 144
2. 論文標題 Orthogonal Amplification Circuits Composed of Acyclic Nucleic Acids Enable RNA Detection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 5887 ~ 5892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c12659	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 -
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 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D20B00266C	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 Ikeuchi Nao, Komachi Takuya, Murayama Keiji, Asanuma Hiroyuki, Maruyama Atsushi, Shimada Naohiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Light-Regulated Liquid-Liquid Phase Separation for Spatiotemporal Protein Recruitment and Cell Aggregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 5652 ~ 5659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.0c22314	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, Okita Hikari, Kuriki Takumi, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Nonenzymatic polymerase-like template-directed synthesis of acyclic l-threoninol nucleic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21128-0	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 Yamano Yuuhei, Murayama Keiji, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Dual Crosslinking Photo Switches for Orthogonal Photo Control of Hybridization Between Serinol Nucleic Acid and RNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 4599 ~ 4604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202003528	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 Kamiya Yukiko, Satoh Tadashi, Kodama Atsuji, Suzuki Tatsuya, Murayama Keiji, Kashida Hiromu, Uchiyama Susumu, Kato Koichi, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Intrastrand backbone-nucleobase interactions stabilize unwound right-handed helical structures of heteroduplexes of L-aTNA/RNA and SNA/RNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-020-00400-2	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 Akter Mousumi, Keya Jakia Jannat, Kabir Arif Md. Rashedul, Asanuma Hiroyuki, Murayama Keiji, Sada Kazuki, Kakugo Akira	4. 巻 56
2. 論文標題 Photo-regulated trajectories of gliding microtubules conjugated with DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 7953 ~ 7956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc03124k	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11件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 村山恵司, 近藤修斗, 沖田ひかり, 浅沼浩之
2. 発表標題 DNAおよび人工核酸L-aTNAにおける鑄型特異的ケミカルライゲーションの高速化
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiji Murayama, Zehua Liu, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Serinol nucleic acid (SNA) based fluorescent probe for highly sensitive detection of RNA
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiji Murayama, Yuuhei Yamano, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Photoregulation of Artificial Nucleic Acid via Photo-Cycloaddition of Modified Adenine Residues for Chemical AI
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiji Murayama, Hikari Okita, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Nonenzymatic polymerase-like elongation of acyclic L-threoninol nucleic acid via chemical ligation
3. 学会等名 ISNAC2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山恵司
2. 発表標題 化学AI構築に向けた光応答性人工核酸の設計と非酵素的鎖伸長反応の開発
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会14.0 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山恵司, 山野雄平, 浅沼浩之
2. 発表標題 異なる波長で独立に制御可能な光応答性人工核酸の開発
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 村山恵司
2. 発表標題 安定な二重鎖を形成する非環状型人工核酸の設計と高機能化
3. 学会等名 2021年度 北海道高分子若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山恵司
2. 発表標題 非環状型人工核酸の鋳型重合による配列複製と機能化
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山恵司, 飯塚洋平, 横山純也, 浅沼浩之
2. 発表標題 L-aTNAを基本構造とする新たな非環状型人工核酸骨格の開発
3. 学会等名 第69会高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山恵司, 沖田ひかり, 栗木琢実, 浅沼浩之
2. 発表標題 非酵素的ケミカルライゲーション法を用いたL-aTNAの配列複製・転写法の開発
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 村山恵司
2. 発表標題 人工生命の創製を目指した非環状型人工核酸の開発と鋳型特異的な鎖伸長反応への応用
3. 学会等名 第174回東海高分子研究会講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院工学研究科 浅沼研究室 メンバー紹介 村山恵司 <a href="http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioanal3/m_murayama.html">http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioanal3/m_murayama.html</a>
--

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
---------	---------