様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2012
課題番号：22750155
研究課題名（和文） 光応答性ヘアピン型核酸を用いた転写制御法の確立

研究課題名（英文） Development of a method for regulating transcription by light sensitive hairpin-type peptide nucleic acid

研究代表者
開發 邦宏（KAIHATSU KUNIHIRO）
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：70419464

研究成果の概要（和文）：標的核酸配列に対して、ワトソン－クリック塩基対、フーグスティン塩基対を形成する２つのペプチド核酸を可視光応答性のアゾベンゼンにより架橋したヘアピン型ペプチド核酸を合成し、標的核酸への会合をアゾベンゼンの幾何異性を用いて制御することを目指した。その結果、ヘアピン型ペプチド核酸の架橋部位にアゾベンゼンを導入すると相補鎖への会合特性が高くなり、アゾベンゼンに加えてスペーサー分子を導入すると、相補 DNA 鎖に対して効果的に１：１の会合体を形成することがわかった。
また、ヘアピン型ペプチド核酸の架橋部位のアゾベンゼンのアゾ骨格を光異性化させたところ、シス型に比べてトランス型の方が相補 DNA 鎖に効果的に結合すること、さらにインフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）蛋白質と緑色蛍光蛋白質（GFP）をコードするプラスミドの転写開始領域にヘアピン型ペプチド核酸を作用させ HeLa 細胞中での転写発現を蛍光顕微鏡にて解析したところ、シス型では転写に影響作用を与えず、トランス型では転写を抑制することが明らかになった。以上のことから、ヘアピン型ペプチド核酸のユニットの構造を制御することで、細胞内の遺伝子発現を光制御することも可能になると期待された。

研究成果の概要（英文）：We synthesized a hairpin-type peptide nucleic acid-AZO(hairpin-type PNA-AZO) that tethers a Watson-Crick strand and a Hoogsteen strand with visible light-sensitive azobenzene linkers. We confirmed the azobenzene linkers enhanced the affinity to its complementary DNA sequence and afforded a 1:1 complex formation with its target DNA sequence. Visible light irradiation to the hairpin-type PNA-AZO altered its binding property to the target DNA and the trans-isoform exhibited higher binding affinity compared to the cis-isoform. We further examined if hairpin-type-PNA-AZO can regulate transcription of plasmid encoding hemagglutinine(HA) protein of influenza A/H1N1 virus and green fluorescence protein(GFP) of Aequorea victoria in HeLa cell by fluorescence microscopy. As a result, the trans-form of hairpin-type PNA-AZO reduced the expression of HA-GFP protein in cells, while the cis-form didn't interfer the expression. From these results, we can regulate transcription of DNA in cells by controlling the configuration of azobenzene unit of hairpin-type PNA-AZO via visible light irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	1, 200, 000	360, 000	1, 560, 000
２０１１年度	900, 000	270, 000	1, 170, 000
２０１２年度	900, 000	270, 000	1, 170, 000
総　計	3, 000, 000	900, 000	3, 900, 000

研究分野：核酸化学（系・分野・分科・細目表における分野ではなくても構わない）
科研費の分科・細目：複合科学・生体関連科学
キーワード：転写制御、バイオテクノロジー、核酸、遺伝子、有機化学

１．研究開始当初の背景
(1) ペプチド核酸（PNA）はDNAやRNAの糖とリン酸ジエステル骨格が電荷的に中性である2−エチルアミノグリシンに置換したものであり、相補核酸塩基に静電反発なく結合することができる。特に相補核酸配列に対して、ワトソン-クリック塩基対、およびフーグスティン塩基対を形成する2本のPNA鎖をリンカー分子で架橋したヘアピン型ペプチド核酸は、1本のワトソン-クリック鎖からなるＰＮＡに比べて2ケタ以上高い会合特性を示すことが報告されている。とりわけ、この架橋部位の分子構造により、相補鎖会合特性が変わることも報告されており、その分子構造を制御することで、標的遺伝子の発現を制御する手法が望まれた。
　本研究では、独自開発した可視光応答性と核酸塩基挿入活性を兼ね揃えた新規チオアゾベンゼンアミノ酸をヘアピン型ペプチド核酸の架橋分子として利用し、その補鎖に対する会合特性を調べるとともに、遺伝子発現を制御するための手法の開発を目指した。

２．研究の目的
(1) ヘアピン型ペプチド核酸分子の架橋部位（リンカーユニット）に種々の構造と長さをもつアゾベンゼン分子を導入したhairpin-type PNA-AZOを合成し、その架橋部位の構造と相補DNA鎖に対する会合特性を評価する。

(2) hairpin-type PNA-AZOの相補DNA鎖に対する会合体の形成における、結合能、配列選択性および会合比に関する知見を明らかにするとともに、hairpin-type PNA-AZOのリンカーユニットのアゾベンゼンのアゾ骨格を光異性化させることで、相補DNA鎖に対する会合能を光制御することを目指す。

(3) インフルエンザウイルスのヘマグルチニン蛋白質およびGFP蛋白質をコードするプラスミドDNAの転写開始領域に、hairpin-type PNA-AZOの標的配列を挿入し、相補鎖に対する会合を光制御し、細胞内における蛋白質の発現を制御する。

３．研究の方法
(1) ヘアピン型ペプチド核酸のリンカーには図1に示すような可視光応答性のあるチオアゾベンゼンアミノ酸を用いた。また、リンカー長調整のためにグリシン、β-アラニンなどを伸長することとした。各リンカー構成分子はFmoc固相合成法によりPNA分子内へ導入した。ヘアピン型ペプチド核酸の精製と確認はHPLCおよびMALDI-TOF-MSにて行った。
　Hairpin-type-PNA-AZOと相補DNA鎖との会合特性評価には､蛍光ラベル化したDNAを用い、ゲルモビリティーシフトアッセイによりPNA/DNA間の会合を評価した。

(2) 相補DNAに対して効率的に会合するHairpin-type-PNA-AZOのうち､その配列選択性および会合比をゲルシフトアッセイにて評価したり、PNA/DNA会合比をマススペクトルにて解析したりする。

(3) GFPをコードするプラスミドに対して、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)蛋白質をコードする遺伝子配列を挿入し、さらに転写開始領域にHairpin-type-PNA-AZOの標的配列を導入する。このプラスミドにHairpin-type-PNA-AZOをあらかじめ作用させ、HeLa細胞内にトランスフェクションしたのち、プラスミドからのGFP発現を蛍光顕微鏡によりモニターする。

４．研究成果
(1) Hairpin-type-PNA-AZOのリンカーユニットにチオアゾベンゼンとβ−アラニン（下図のbisPNA L4-AZO）を導入し、リンカー長を18Åにしたとき(図１、表１)、相補鎖との会合特性高くなることが明らかなった(図２)。

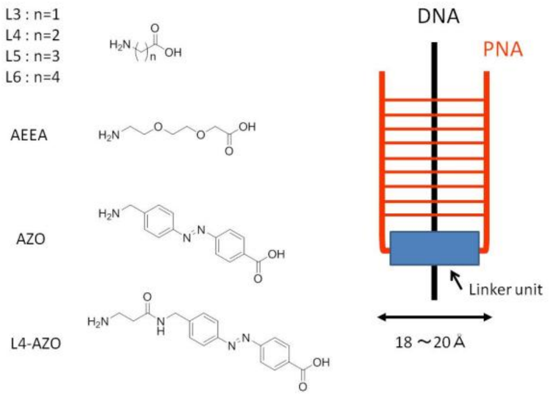

図１．Hairpin-type-PNA-AZOの分子設計

表１．Hairpin-type PNA-AZO の分子設計

Compounds (N to C)	
Anti-H1N1(NS) PNA	
PNA **12W**	TCTCCCTTCTTT-Lys
PNA **12W-Azo**	AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **L0-AZO**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **AEEA**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **(AEEA)$_2$**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **(AEEA)$_3$**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **L0-AZO**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **L3-AZO**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **L4-AZO**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **L5-AZO**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **L6-AZO**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys
bisPNA **L8-AZO**	H-(Lys)$_3$-CCTCT-AZO-TCTCCCTTCTTT-Lys

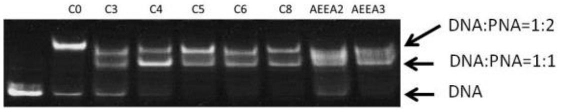

図２．ゲルシフトアッセイによる Hairpin-type PNA-AZO と相補 DNA 鎖との会合能評価

(2) Hairpin-type PNA-AZO のリンカーユニットが短く、ワトソンークリック鎖が長い場合には、相補 DNA 鎖に対して、PNA:DNA=2:1 の会合体を形成することが明らかとなった。鋭意検討の結果、リンカーには C4-AZO を用い、ワトソンークリック鎖には 9 塩基、フーグスティン鎖には 5 塩基の分子を設計したときに Hairpin-type PNA-AZO の相補配列選択性が最も高く、効果的に PNA:DNA=1:1 の会合体のみを与えることがゲルシフトアッセイ(図３)、およびマススペクトル解析（図４）により明らかとなった。

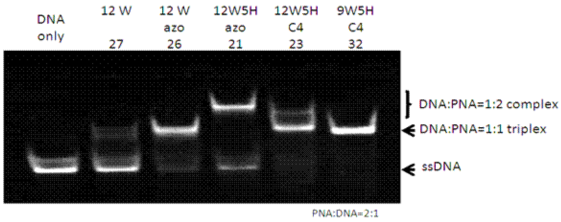

図３．ゲルシフトアッセイによる Hairpin-type PNA-AZO のワトソンークリック鎖の核酸塩基数の最適化検討

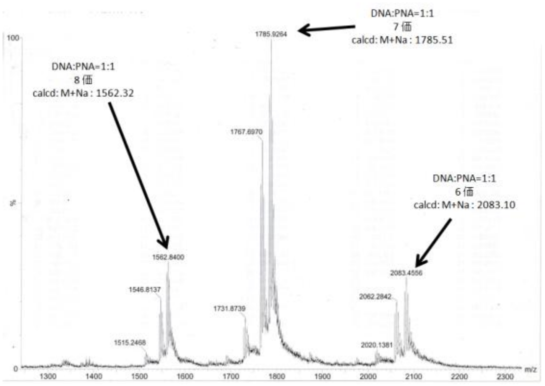

図４．マススペクトルによる Hairpin-type PNA-AZO/DNA 間の会合比の解析

(3) インフルエンザウイルスの HA 蛋白質をコードするゲノムをウイルス粒子から抽出し、これを MLuV（マウス白血病ウイルス）の逆転写酵素を用いて cDNA へと変換し、さらに PCR により二重鎖 DNA へと増幅した。この DNA フラグメントを制限酵素にて GFP 発現プラスミド(Ac-EGFP)に導入した（図５）。

プラスミドに対して hairpin-type PNA-AZO のトランス体、又はシス体を作用させ、リポフェクション法により HeLa 培養細胞内へトランスフェクションした後に、同細胞内における HA＋GFP の転写反応を蛍光顕微鏡により追跡した。その結果、hairpin-type PNA-AZO のトランス体を用いた場合に、標的遺伝子の発現が顕著に抑制されることが明らかになった(図５)。

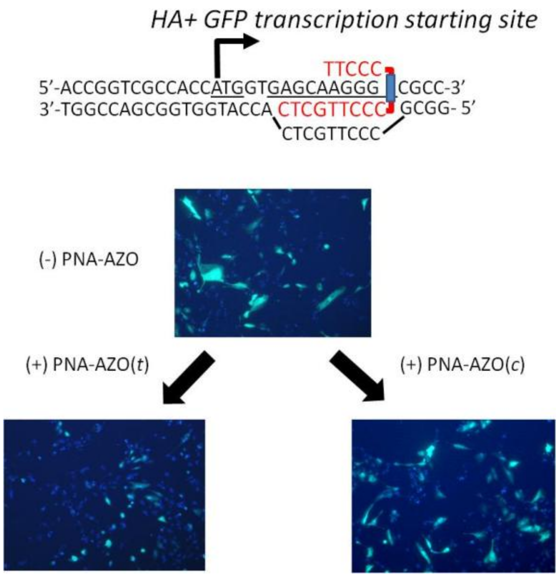

図５．ヘマグルチニン(HA)蛋白質および GFP をコードしたプラスミド DNA 上における hairpin-type PNA-AZO の標的配列と HeLa 細胞内における HA＋GFP 発現の解析

以上のことから、本研究成果をもとにhairpin-type PNA-AZO のリンカーユニットの立体構造を制御することで、対象の遺伝子発現を制御できる可能性が示唆された。今後は、細胞内における遺伝子発現を可視光応答型のhairpin-type PNA-AZO と光照射により制御する研究の発展が期待される。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計３件）

① K. Kaihatsu, S. Sawada, S. Nakamura, T. Nakaya, T. Yasunaga, N. Kato. Sequence-specific and visual identification of influenza virus gene by azobenzene-tethered bis-peptide nucleic acid, ***PLoS ONE,*** (2013) **8**, e64017. DOI: 10.1371/journal.pone.0064017. （査読有）

② S. Sawada, N. Kato, K. Kaihatsu, Synthesis and application of visible light sensitive azobenzene. ***Current Pharm. Bio.***, (2012) 13, 2642-8.（査読有）

③ K. Kaihatsu, N. Kato, Genome Specific Diagnosis of Influenza Virus Strains by Hairpin-type Peptide Nucleic Acid, Antiviral Res., (2011) Vol. 90, A70. DOI: 10.1016/j.antivira1.2011.03.148.（査読無）

〔学会発表〕（計７件）

① 開發邦宏、澤田慎二郎、早矢仕恬子、加藤修雄、ペプチド核酸のDNA、 RNA識別に及ぼす化学修飾の影響、第９回バイオオプティクス研究会、2012 年 12 月 7−8 日、山口大学、山口県（招待講演）

② 開發邦宏、菅野尭、澤田慎二郎、中村昇太、後藤直久、安永照雄、中屋隆明、加藤修雄、ペプチド核酸を用いたインフルエンザウイルスの効率的増殖阻害、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、2012 年 9 月 24−26 日、仙台市民会館、宮城県

③ 澤田慎二郎、加藤修雄、開發邦宏、ウイルスゲノムの迅速診断を目指した新規三重鎖形成型ペプチド核酸の開発、日本化学会第 92 春季年会(2012)、2012 年 3 月 27 日、慶応大学、横浜市

④ S. Sawada, N. Kato, K. Kaihatsu, High sensitive detection of virus genome RNA by azobenzene linked bis-peptide nucleic acid, The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Nov. 8-11, 2011, Sapporo University, Sapporo City

⑤ K. Kaihatsu, Inhibition of reverse transcription of influenza A virus genome RNA by peptide nucleic acids, International Conference & Exhibition on Virology-2011, September, 5-7, 2011, Baltimore, MA, USA（招待講演）

⑥ S. Sawada, K. Kaihatsu, N. Kato, Regulation of cellular uptake and duplex DNA displacement by visible sensitive peptide analogue, Th 14th Sanken International Symposium, The 9th Sanken Nanotechnology Symposium, January 25-26 2011, Royal Oak Hotel, Otsu, Japan

⑦ K. Kaihatsu, S. Nakamura, N. Goto, T. Nakaya, T. Yasunaga, N. Kato, Application of peptide nucleic acid for the inhibition and detection of influenza viruses. Pachifichem2010, Dec. 15-19, 2010, Hawaii, USA

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）

名称：アゾベンゼン化合物
発明者：開發邦宏、澤田慎二郎、中村昇太、後藤直久、安永照雄、中屋隆明、加藤修雄
権利者：開發邦宏
種類：特許
番号：特願 2012−081288
出願年月日：平成 24 年 3 月 30 日
国内外の別：国内

６．研究組織

(1)研究代表者

開發　邦宏 (KAIHATSU KUNIHIRO)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：70419464

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

加藤　修雄(KATO NOBUO)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：50150537

澤田　慎二郎(SAWADA SHINJIRO)
大阪大学大学院・理学研究科・博士後期課程 (2012 年 3 月修了)
研究者番号：該当なし