

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23651128

研究課題名（和文）

人工核酸を用いた新規ストランドインベーターの開発

研究課題名（英文）

Development of a new strand-invader with artificial nucleotides

研究代表者

浅沼 浩之 (ASANUMA HIROYUKI)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：20282577

研究成果の概要（和文）：本研究では、D-Threoninol に色素などの機能性分子を導入したヌクレオチド・アナログ=Threoninol-Nucleotide (TN)を導入した DNA (TN-DNA) と、通常の未修飾の PNA を組み合わせた新たなストランドインベーターの開発を目指した。DNA 二重鎖へのインベーション活性を示すためには、二重鎖の安定性の序列が DNA/PNA, TN-DNA/DNA > DNA/DNA > TN-DNA/PNA を満たす必要がある。そこでこのような安定性の序列を満たすための機能性分子と TN の導入方法を検討した。その結果、電子吸引性基を導入した平面構造のインターカレーターが DNA 二重鎖を大きく安定化することを見出した。また TN を天然のヌクレオチド2 残基毎に導入すると、PNA の二重鎖を阻害しつつ DNA との二重鎖形成を促進することも明らかにした。これらの結果に基づき、PNA と機能性分子としてアントラキノンを導入した TN-DNA の組み合わせることで、実際に DNA 二重鎖にストランドインベーションすることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed at developing a new strand-invader by combining unmodified peptide nucleic acid (PNA) and modified DNA (TN-DNA) involving new base-surrogate=Threoninol-Nucleotide (TN) that tethers a functional molecule such as intercalator on D-threoninol. As a possible strand-invader, the duplex stability should be in the following order; DNA/PNA, TN-DNA/DNA > DNA/DNA > TN-DNA/PNA. First, we searched a functional molecule and optimum way of introducing TN into DNA that satisfies above requisites. We found that planar molecule (intercalator) with electron-withdrawing group could significantly stabilize the DNA duplex. Furthermore, introduction of TN at every two nucleotides into DNA remarkably facilitated the duplex formation with DNA and retarded hybridization with PNA. On the basis of these results, we combined unmodified PNA and TN-DNA involving anthraquinone as a strand-invader, which was successfully invaded into the target DNA duplex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：核酸有機化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：DNA、ストランドインベーション、インターカレーター、PNA、D-Threoninol

1. 研究開始当初の背景

ストランドインベーターとは配列特異的に DNA 二重鎖中に直接挿入する人工核酸のこ

とであり、一本鎖ではなく DNA 二重鎖を認識して挿入可能なことから、遺伝子を直接マニピュレート可能なツールとして期待でき

る。一般にストランドインバーダーとして機能するためには、1) インバーダーと DNA が、DNA/DNA 二重鎖よりも強く複合体 (二重鎖) 形成する、2) インバーダー同士は複合体 (二重鎖) を形成しない、という条件を満たす必要がある。この条件を満たす人工核酸は現状では、アデニンの代わりにジアミノプリンを、チミンの代わりにチオウラシルを導入した pcPNA のみである (図 1 参照)。しかし pcPNA をストランドインバーダーとして使用する場合、1) ターゲットとなる DNA 二重鎖は A-T 対を 50%以上含む必要がある、2) pcPNA 合成が煩雑である、3) 色素など他の機能性分子を pcPNA に導入することが困難、といった問題点があった。

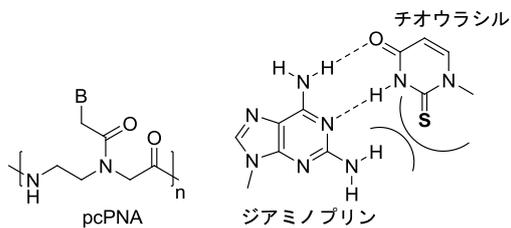
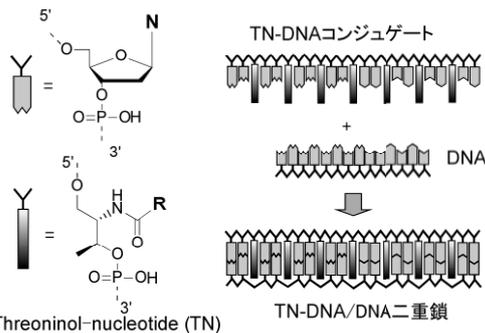


図 1 インバーダーとして機能する pcPNA



Threoninol-nucleotide (TN)

図 2 TN-DNA による DNA の配列特異的認識

一方本申請者は、これまでに D-Threoninol に色素などの機能性分子を導入したヌクレオチド・アナログ =Threoninol-Nucleotide(TN:図 2 左下参照)を開発し、TN を天然のヌクレオチドに導入した TN-DNA コンジュゲート (TN-DNA) が天然の DNA を配列特異的に二重鎖形成することを明らかにしてきた。更に興味深い事に、適切な機能性分子を導入した TN-DNA/DNA 二重鎖の熱安定性は天然の DNA/DNA 二重鎖を遥かに凌駕した。従って、もし TN-DNA が相補的な配列を持つ PNA と二重鎖形成しなければ、TN-DNA と PNA との組み合わせは、DNA 二重鎖へインバージョンを起こす条件を満たすことになる。この PNA/TN-DNA の組み合わせは、pcPNA の持つ欠点や配列制限を克服できるので、画期的なストランドインバーダーとして機能することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ストランドインバージョンを起こす条件 (図 3a) を満たす TN を設計・合成し、未修飾の PNA と TN-DNA を組み合わせた新たなストランドインバーダー (図 3b 参照) の開発を目指す。

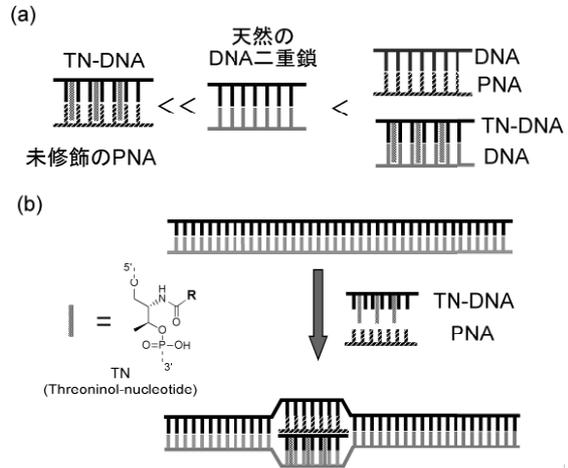


図 3 TN-DNA・PNA の組み合わせによる (a) ストランドインバージョンを起こすための条件と、(b)ストランドインバージョンの模式図。

3. 研究の方法

TN に導入する機能性分子としては、二重鎖の安定化を目的としていることから、インターカレーター能を持つ平面性の高い色素類を選択した。TN に対応するアミダイトモノマーはこれまでの方法に従い合成し¹⁾、12mer あるいは 15mer の DNA 中に TN を導入した。インバージョンの基質に使用する DNA 二重鎖には、ターゲットとなる塩基配列を中央あるいは末端に含む 50 塩基対の二重鎖を使用した。ストランドインバージョンは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた。

4. 研究成果

4. 1 DNA 二重鎖を安定化するインターカレーターの探索

TN に導入したインターカレーターを図 4 に示す。インターカレーター能を持つ平面性の高い色素類として、アゾベンゼン誘導体、ペリレン誘導体、およびアントラキノンを検討した。まず 12mer の DNA の中央に TN 化した色素を 1 残基導入し、対応する相補鎖 (12mer DNA) と二重鎖を組ませ、その融解温度 (T_m) を測定した。その結果を表 1 に示す。未修飾のアゾベンゼンは、TN を含まない天然の DNA 二重鎖と比較して、僅かだが二重鎖を安定化した。一方主鎖から遠い側のベンゼン環をメチル基で修飾したところ、 p 位は T_m を低下させたのに対し、 o 位は T_m を上昇させた。 p 位のメチル基修飾が二重鎖を

不安定化させたのは、色素の長軸方向のサイズが大きくなり相補鎖との立体障害が生じたためである。それに対し *o* 位修飾が安定化したのは、隣接する塩基対と *o* 位のメチル基との Van der Waals 力に基づくと考えられる。すなわち色素の長軸方向のサイズは、相補鎖

5'-GGTATCXGCAATC-3'/3'-CCATAGCGTTAG-5'

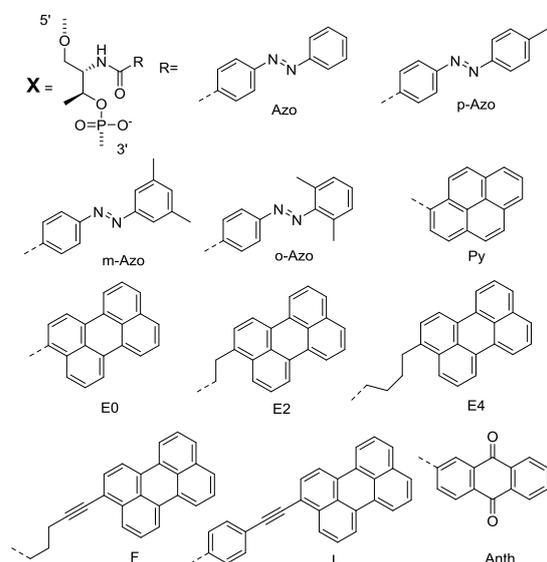


図4 本研究で検討したインターカレーター

表1 TN に導入するインターカレーターの種類が二重鎖の融解温度に与える影響
インターカレーター^{a)} T_m (°C)^{b)} ΔT_m (°C)^{c)}

インターカレーター ^{a)}	T_m (°C) ^{b)}	ΔT_m (°C) ^{c)}
Azo	48.9	+1.2
<i>o</i> -Azo	50.9	+3.2
<i>m</i> -Azo	49.0	+1.3
<i>p</i> -Azo	46.8	-0.9
Py	50.8	+3.1
E0	53.2	+5.5
L	37.8	-9.9
E2	46.1	-1.6
E4	45.3	-2.4
F	49.7	+2.0
Anth	54.5	+6.8

- a) 図4参照
b) [NaCl] = 100 mM, [DNA] = 5 μ M, pH 7.0 (10 mM phosphate buffer)
c) X 残基を含まない Native の DNA 二重鎖の T_m (47.7°C) との差

との立体障害を生じない 11 Å 以下が適していることが示唆された。このサイズに収まるインターカレーターなら、短軸方向を適切に化学修飾すれば Van der Waals 力による二重鎖の安定化が見込めることが示唆された。

そこで長軸方向のサイズが 11 Å 以下のピレン(Py)およびペリレン(E0)を TN に導入したところ、期待通り二重鎖が安定化した。長軸方向のサイズが 11 Å を遥かに超えるペ

リレン誘導体(L)では二重鎖を大きく不安定化した。またペリレンと主鎖の間に柔軟なメチレン鎖を導入すると不安定化が見られたことから(E2, E4)、インターカレーターをアミド結合で直接 D-Threoninol に導入することが二重鎖の安定性に大きく寄与することが分かった。さらに F2 と E2,E4 との比較から、電子吸引性を持つ官能基の導入も DNA 二重鎖の安定化に寄与することが分かった。

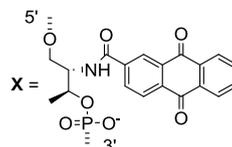
以上の結果より、DNA 二重鎖の安定化に寄与する TN (インターカレーター) の分子設計は、

- 1) 長軸方向のサイズが 11 Å 以下である
- 2) 柔軟なメチレン鎖を介さずにインターカレーターと D-Threoninol をアミド結合で直接つなぐ
- 3) インターカレーターを電子吸引性の官能基で修飾する

であることが、示唆された。事実、これらの条件全てを満たしたアントラキノン (Anth) は、ここで検討したインターカレーターの中で最も二重鎖を安定化した。

4. 2 TN を複数導入した TN-DNA による二重鎖の更なる安定化と、PNA との二重鎖形成の阻害

DNA 二重鎖の安定化効果の最も大きかった Anth を TN に導入し、その複数導入による 1) DNA 二重鎖の更なる安定化、2) PNA との二重鎖形成の阻害 を検討した。これまでの知見から TN 間に天然のヌクレオチドを 2 残基以上導入すると二重鎖の不安定化を伴わ



TN-DNA

TN0: 5'-GTT-ACT-GAT-GAT-GAA-3'
TN1: 5'-GTT-ACT-GAXT-GAT-GAA-3'
TN2: 5'-GTT-ACTX-GAXT-GAT-GAA-3'
TN3: 5'-GTT-ACTX-GAXT-GXAT-GAA-3'
TN4: 5'-GTT-ACXT-GXAT-XGAXT-GAA-3'
TN5: 5'-GTT-AXCTX-GAXT-GXAT-XGAA-3'
TN6: 5'-GTTX-ACXT-GXAT-XGAXT-GXAA-3'

Cy3TN5: Cy3-GTT-AXCTX-GAXT-GXAT-XGAA-3'

C-DNA: 3'-TTC-ATC-ATC-AGT-AAC-5'

C-PNA: NH₂-kk-CAA-TGA-CTA-CTA-CTT-k-H k: L-Lysine

Target(t): 5'-TTCATCATCAGTAACCCGATCGTG-AGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTA-3'
C-Target(t): 3'-AAGTAGTAGTCATTGGCCATAGCAC TCGTAGGAGAGAGCAAAGTAGCCAT-5'

Target(c): 5'-TCCAGTAACCGGGCATGTTCATCATCAGTAAC-CCGTATCGTGAGCATCCT-3'
C-Target(c): 3'-AGGTATTGGCCCGTACAAAGTAGTAGTCATTGGCATAGCACTCGTAGGA-5'

図5 TN-DNA および関連するオリゴヌクレオチドの配列

ないことが分かっている。そこで図5に示したように、TN間を天然のヌクレオチドで2残基離れたTN-DNAコンジュゲートを設計・合成した。

表2にTN-DNA/C-DNAおよびTN-DNA/C-PNAとの二重鎖形成の T_m を示す。NativeのDNA二重鎖(TN0/C-DNA)の T_m は47.2°Cだったのに対し、TN導入数の増加に伴いほぼ単調に T_m が上昇した。Anthを6残基含むTN6では T_m が66.9°Cに達し、未修飾の二重鎖と比べて20°C近く上昇した。このように、TN-DNA/C-DNA二重鎖はAnthを含むTN1残基あたり約3°C安定化した。一方TN-DNA/C-PNA二重鎖の T_m は、DNAの場合とは逆にTNの導入に伴い低下した。例えばTNを1残基含むTN1とC-PNAとの T_m は64.0°Cと、未修飾のDNA(TN0)の場合と比較して約5°C低下した。TNの導入数の増加に伴い T_m は低下したが、4残基導入したところで T_m は58°C付近で下げ止まった。すなわちAnthを持つTNを4残基以上導入すれば、二重鎖の安定性の序列がDNA/PNA, TN-DNA/DNA > DNA/DNA > TN-DNA/PNAとなり、インベージョンを起こす条件を満たすことが判明した。

表2 TN-DNA/C-DNA および TN-DNA/C-PNA 二重鎖の融解温度^{a)}

TN-DNA	DNA ^{°C}		PNA ^{°C}		T_m の差 ΔT_m ^{°C} ^{d)}
	T_m	ΔT_m ^{b)}	T_m	ΔT_m ^{c)}	
TN0	47.2	-	68.9	-	-21.7
TN1	49.6	+2.3	64.0	-4.9	-14.4
TN2	52.6	+5.4	60.3	-8.6	-7.6
TN3	57.5	+10.3	59.4	-9.5	-1.8
TN4	59.9	+12.7	57.8	-11.1	+2.2
TN5	62.7	+15.5	57.8	-11.1	+5.5
TN6	66.9	+19.7	57.5	-11.4	+9.4

[NaCl] = 100 mM, [DNA], [PNA] = 5 μ M, pH 7.0 (10 mM phosphate buffer)

- a) X残基を含まないNativeのTN0/C-DNA二重鎖の T_m (47.2°C) との差
 b) X残基を含まないNativeのTN0/C-PNA二重鎖の T_m (68.9°C) との差
 c) TN-DNA/DNAとTN-DNA/C-PNAの T_m の差

4-3 TN-DNAとC-PNAの組み合わせによるストランド・インベージョンの検討

以上のようにTNを4残基以上導入したTN-DNAがインベージョンの条件を満たすことが分かったので、実際にターゲット配列を持つDNA二重鎖に対してインベージョンするかどうか調べた。鋳型二重鎖としては、末端にターゲット配列を持つ50塩基対のTarget(t)/C-Target(t)および中央部分にターゲット配列を持つTarget(c)/C-target(c)を用いた(図5参照; 下線部がターゲット配列)。こ

こではインベージョンを起こす条件を満たしているTN5の5'末端を蛍光色素Cy3でラベルしたCy3TN5とC-PNAを組み合わせ、これを鋳型DNA二重鎖に加えてインベージョンの有無を解析した。

図6aに示したように、末端にターゲット配列を持つ鋳型DNA二重鎖に対しては、

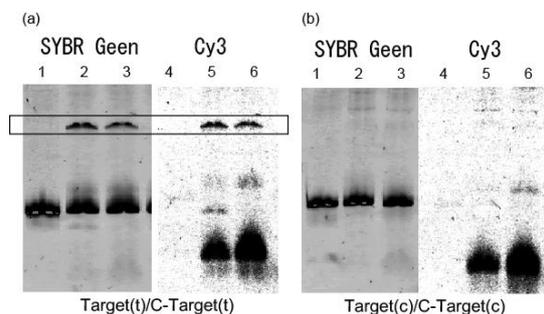


図6 Cy3TN5とC-PNAの鋳型DNA二重鎖(a: Target(t)/C-Target(t), b: Target(c)/C-Target(c))へのインベージョン。

Lane 1-3; SYBR Greenの検出

Lane 4-6; Cy3の検出

Lane 1,4; 鋳型二重鎖のみ(200 nM)

Lane 2,5; Cy3TN5/C-PNA 10等量

Lane 3,6; Cy3TN5/C-PNA 20等量

インベージョン条件;室温8時間

pH 7.0 (5 mM HEPES buffer), NaCl 100 mM

Cy3TN5とC-PNAを共存させると、SYBR Green側で検出できる新たなバンド(黒枠で示した部位)が上方に現れた(図6a, lane 2,3参照)。このバンドはCy3側でも同じ位置に検出できたことから(図6a, lane 5,6参照)、インベージョンに基づくバンドであることが判明した。このように、ターゲット配列が末端にある場合にはインベージョン可能なことが判明した。

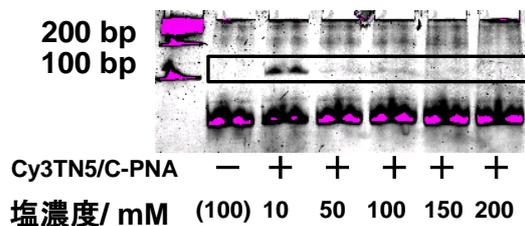


図7 塩濃度がインベージョンに与える効果
鋳型DNA二重鎖: Target(c)/C-target(c)

蛍光検出: SYBR Green

インベージョン条件;室温8時間

pH 7.0 (5 mM HEPES buffer)

一方中央部にターゲット配列を持つ鋳型DNA二重鎖(図6b)では新たなバンドは見られなかった。そこで中央部へもインベージョン可能な条件を探索するため、バッファ中の塩濃度を系統的に変化させた。その結果

図7に示すように、低塩濃度条件 (NaCl 濃度が 10 mM) の場合に、新たなバンドが上側に出現した (黒枠で囲った部位)。Cy3 を励起した場合でも同じ場所にバンドが観察されたことから、これはインベージョンに基づくバンドであることが確認できた。同様の塩濃度依存性を末端にターゲット配列を持つ鋳型 DNA 二重鎖でも行ったところ、10-200 mM いずれの条件でもインベージョンが観察されたが、Target(c)/C-Target(c) の場合と同様に NaCl 濃度が 10 mM で最も効率良くインベージョンした。

以上のように、TN-DNA と未修飾の PNA を組み合わせてバッファー条件を最適化することで、DNA 二重鎖へのインベージョンを実現した。

(参考文献)

- 1) H. Asanuma et al., *Nat. Protoc.*, **2007**, *2*, 203-212.

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 2 件)

- 1) "Coherent Interactions of Dyes Assembled on DNA" (Review)" Asanuma, H.; Fujii, T.; Kato, T.; Kashida, H., *J. Photochem. Photobiol. C*, **2012**, *13*, 124-135. (査読有)
- 2) "Quencher-free linear probe with multiple fluorophores on acyclic scaffold" Asanuma, H.; Akahane, M.; Kondo, N.; Osawa, T.; Kato, T.; Kashida, H. *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 3165-3169. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 「二重鎖の不安定化を伴わない高感度リニアプローブの設計」、赤羽真理子、丹羽理恵、大澤卓矢、加藤智博、榎田啓、浅沼浩之、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22-25 日 (草津)
- 2) 「ステム構造が不要なリニア型核酸プローブによる DNA・RNA の高感度検出」、赤羽真理子、近藤展代、大澤卓矢、加藤智博、榎田啓、浅沼浩之、第 61 回高分子討論会、2012 年 9 月 19-21 日 (名古屋)
- 3) 「ステム構造を必要としない高感度リニアプローブの設計」、浅沼浩之、赤羽真理子、近藤展代、大澤卓矢、加藤智博、榎田啓、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25-28 日 (神奈川)
- 4) 「DNA 二重鎖内部における蛍光色素のエネルギー移動に関する研究」、加藤智博、榎田啓、浅沼浩之、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25-28 日 (神奈川)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/seigyol/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅沼浩之 (ASANUMA HIROYUKI)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20282577

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし