

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288075

研究課題名(和文) 三重鎖核酸を利用して制御可能な化学修飾遺伝子の開発

研究課題名(英文) Chemically modified DNAs controlled by triplex forming oligodeoxynucleotides

研究代表者

清尾 康志 (Seio, Kohji)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：20313356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では三重鎖形成核酸との三重鎖形成により機能を制御することのできる人工DNAを開発した。まず、DNAの遺伝子としての性質を制御することを考え、メジャーグループ側に水素結合供与部位をもった修飾ピリミジン塩基をDNAに導入し、T7-RNAポリメラーゼによる転写と三重鎖形成反応による転写制御を行った。その結果、上記DNAは予想通り、修飾ピリミジンと水素結合を形成する三重鎖形成核酸を用いることで転写が阻害された。また、水素結合に替わる分子間相互作用として、芳香環のスタッキング相互作用が期待される5位置換蛍光塩基をDNAに導入したところ、予想どおり三重鎖形成により蛍光特性を制御することができた。

研究成果の概要(英文)：We developed artificial DNAs whose function could be controlled by triplex formation. First we developed artificial genes incorporating pseudouracil and pseudoisocytosine which had hydrogen bond donor in their minor groove sides. The modified DNAs can be transcribed by T7-RNA polymerase and the transcription was inhibited by the addition of triplex forming oligonucleotides incorporating artificial bases which can form hydrogen bond with pseudouracil or pseudoisocytosine. We also developed fluorescent DNAs having aromatic groups in their minor groove. The spectroscopic analyses revealed that the fluorescence of the DNAs can be enhanced by addition of triplex forming oligonucleotides.

研究分野：核酸有機化学

キーワード：三重鎖DNA 人工遺伝子 蛍光核酸

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖に一本鎖 DNA (TFO)が結合する DNA 三重鎖のアンチジーン法や人工遺伝子の制御などへの応用が期待されていた。しかし、天然型 DNA により形成されるパラレル型三重鎖では、二重鎖中のプリンと TFO 中のピリミジンが Hoogsteen 塩基対で結合するため、TFO の配列はホモピリミジンに、DNA 二重鎖はホモプリン ホモピリミジン配列に限定され、DNA 三重鎖の幅広い応用の障害になっていた。

この問題を解決するための方法は、DNA 三重鎖をどのような分野に応用するかにより異なる。

まず、アンチジーン法では細胞内に粗存在する天然型の DNA に結合する TFO が必要となるため、A-T 塩基対中の T や G-C 塩基対中の C に結合する新しい人工塩基の開発が必要であった。

一方、人工遺伝子への応用では、天然型の塩基対にとらわれず、非天然型の塩基をもつ人工遺伝子やそれに結合する TFO など、より多彩な構造と分子認識能をもつ人工核酸の開発が必要とされていた。

2. 研究の目的

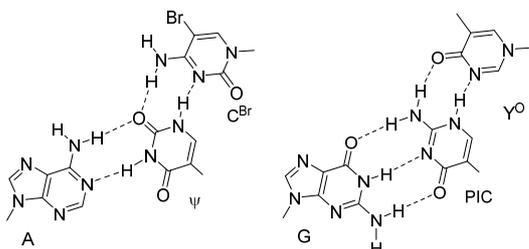
以上の問題点を解決するために本研究ではふたつのアプローチによる検討を行った。まず、

人工遺伝子として有用な人工核酸の開発を目指し、天然型核酸塩基とは異なる相互作用様式で DNA 三重鎖を形成する人工核酸の開発を行った。さらに開発した人工核酸の人工遺伝子や蛍光核酸プローブとしての性質も評価した、具体的には以下の ~ を行った。また、アンチジーン法への応用を目指し、天然型の DNA を認識する TFO の開発については以下の、 を実施した。

3. 研究の方法

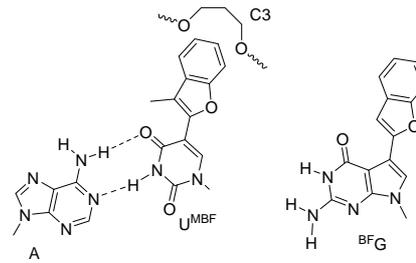
メジャーグループに水素結合供与部位を有する人工 DNA 二重鎖とそれに結合する TFO の開発。

人工 DNA 二重鎖に組み込むピリミジン塩基として、メジャーグループ側に水素結合供与部位を含むシュードウラシル(ψ)、シュードイソシチジン(PIC)を設計した。これらの DNA 実際に合成し、T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応および、下記 C^{Br}、Y^Oを導入した TFO による転写阻害反応について検討した。



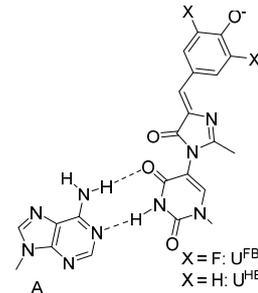
マイナーグループ側に芳香環のスタッキングサイトを有する新規三重鎖核酸の開発

マイナーグループ側に水素結合サイトではなく、芳香環を有するウラシル誘導体およびグアニン誘導体を設計した。実際にこれらの誘導体を DNA に組み込み、下記 C3 との三重鎖形成反応および DNA タンパク質との相互作用を調べた。また、合成した核酸塩基が蛍光特性を有していたことも見出したため、それらについても評価した。



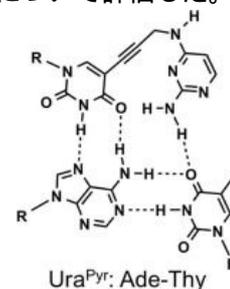
マイナーグループ側に GFP クロモフォアを有する新規蛍光核酸の開発

上記の結果をさらに発展させるために、ウラシル環 5 位から緑色蛍光タンパク質(GFP)のクロモフォアを有する蛍光ウラシル誘導体を合成し、その三重鎖結合能と蛍光特性を調べた。



5 位にピリミジン残基を有する新規ウラシル誘導体の開発

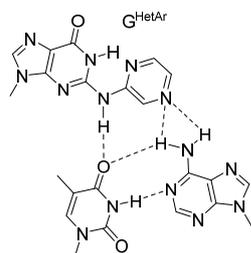
5 位にピリミジン環を有し、DNA 二重鎖中の A-T 塩基対の A と T を同時に認識することのできる人工塩基を設計した。実際にこの人工塩基を含む TFO を合成し、三重鎖形成能と塩基対識別能について評価した。



2 位のアミノ基にヘテロ環を有する新規グアニン誘導体の開発

二重鎖 DNA 中の T-A 塩基対を同時に認識する人工核酸塩基の開発を目指し、グアニン環 2 位にヘテロアリアル基を有する人工核酸

塩基を設計した。設計した人工核酸塩基を含む DNA を実際に合成し、三重鎖結合能と塩基対識別能について評価した。



4. 研究成果

メジャーグループに水素結合供与部位を有する人工 DNA 二重鎖とそれに結合する TFO の開発。

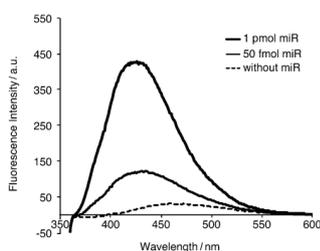
G-C、A-T、 ψ -A、PIC-G の 4 種類の塩基対を含む DNA 二重鎖を合成しそれに対し、Py \cdot G-C、T \cdot A-T、C^{Br} \cdot ψ -A、Y^O \cdot PIC-G を形成するように配列を設計した TFO を合成し、三重鎖形成能を評価した。その結果、上記 TFO と DNA 二重鎖は配列選択的に三重鎖 DNA を形成することが分かった。

また、T7-プロモーター配列部位に上記修飾塩基対を有する DNA 二重鎖を別途合成し、T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応を行ったところ、転写産物の生成が確認された。また、この修飾プロモーター部位と三重鎖を形成するように設計した TFO を添加すると転写が阻害された。以上の結果から、開発した修飾 DNA は RNA を生成しうる鋳型 DNA となることができ、かつこの転写反応は TFO により阻害されることが分かった。

マイナーグループ側に芳香環のスタッキングサイトを有する新規三重鎖核酸の開発

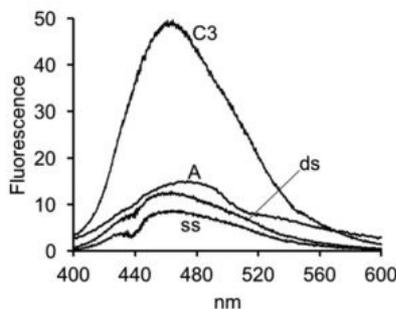
上記 U^{MBF} を合成し DNA 二重鎖中に化学合成法により合成した。また、合成した DNA 二重鎖に対し、U^{MBF} の位置にアベシックサイト C3 を含む TFO を作用させたところ、三重鎖を形成することが分かった。また、この三重鎖形成に伴い、U^{MBF} の蛍光が大きく増大することも分かった。

この結果を RNA 検出に応用するため、miRNA をローリングサークル増幅法により増幅し、増幅により生成する一本 DNA に対し二重鎖を形成する U^{MBF} 修飾 DNA ならびに C3 を含む TFO を添加したところ、miRNA の存在量依存的に蛍光が増大した。これにより、U^{MBF} を含む三重鎖形成反応が RNA 検出に有用であることが分かった。



マイナーグループ側に GFP クロモフォアを有する新規蛍光核酸の開発

上記の結果をさらに発展させ新規構造をもつ蛍光三重鎖核酸の開発を目指し、ウラシル環 5 位に GFP のクロモフォアの基本骨格をもつ U^{HBI} を設計し、これを含む DNA 二重鎖を合成した。また、この二重鎖に対しと同様に U^{HBI} に相当する位置に C3 を含む TFO を添加したところ、予想どおり蛍光が増大することが分かった。また、ベンゼン環上にフッ素原子を含む U^{FBI} も同様に合成しその性質を調べたところ、U^{FBI} を含む DNA 三重鎖はより強い蛍光を示したものの、U^{FBI} を含む TFO 単独(ss)の場合も比較的大きな蛍光を示した。これらの結果から、GFP のクロモフォアを有する人工核酸は三重鎖形成依存的に蛍光強度が増大し、かつその挙動はクロモフォア上の置換基により変化することが分かった。



5 位にピリミジン残基を有する新規ウラシル誘導体の開発

5 位にアルキンを介してピリミジン残基を有する上記ウラシル誘導体(Ura^{Pyr})を設計し、実際にこの人工塩基を含む TFO を合成した。合成した TFO と、Uar^{Pyr} が Hoogsteen 塩基対を形成する位置に A-T、G-C、T-A、C-G 塩基対を含む DNA 二重鎖を混合し、形成される三重鎖の安定性を Uar^{Pyr} の代わりに T を含む三重鎖の安定性と比較した。その結果、Uar^{Pyr} \cdot A-T を含む三重鎖は T \cdot A-T を含む三重鎖よりも熱融解温度が 7 高く、ピリミジン残基の存在により三重鎖が安定化されていることが分かった。その一方で、Uar^{Pyr} \cdot T-A、Uar^{Pyr} \cdot G-C、Uar^{Pyr} \cdot C-G 塩基対を含む三重鎖は Uar^{Pyr} \cdot A-T を含む三重鎖よりも熱融解温度が各々、11、15、15 低く、Uar^{Pyr} は二重鎖 DNA 中の A と選択的に結合することが分かった。

2 位のアミノ基にヘテロ環を有する新規グアニン誘導体の開発

2 位のアミノ基にヘテロ環を導入するために種々反応を検討し、Hartwig-Buchward 反応を用いることで、種々の含窒素ヘテロ環をデオキシグアノシンの 2 位のアミノ基に導入することができた。また、合成したデオキシグアノシン誘導体を TFO に導入し、三重鎖形成能を調べたところ、ピラジン-2-イルを導入した誘導体に関しては、天然型のデオキシグアノシンを導入した誘導体と同様、T-A 塩基対の T を最も強く認識することが分かった。一方

その他の A-T、G-C、C-G 塩基対に対する認識能を比較すると、天然型のデオキシグアノシン誘導体と比べてその選択性は低下していた。これらの結果からグアニン 2 位のアミノ基に導入されたヘテロ環はその物理化学的特性や構造の違いにより、グアニン塩基の三重鎖形成能に影響を与えることが分かった。

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 8 件)

1. Fluorescence enhancement of oligodeoxynucleotides modified with green fluorescent protein chromophore mimics upon triplex formation. (2017) Kanamori Takashi, Takamura Akihiro, Tago Nobuhiro, Masaki Yoshiaki, Ohkubo Akihiro, Sekine Mitsuo, Seio Kohji *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2017, 15, 1190-1197. doi:10.1039/c6ob01278g (査読有)
2. Enzymatic synthesis and reverse transcription of RNAs incorporating 2'-O-carbamoyl uridine triphosphate. (2016) Masaki Yoshiaki, Ito Hyugo, Oda Yuki, Yamazaki Kazufumi, Tago Nobuhiro, Ohno Kentaro, Ishii Nozomi, Tsunoda Hirotsuke, Kanamori Takashi, Ohkubo Akihiro, Sekine Mitsuo, Seio Kohji. *Chemical Communications*, 52, 12889-12892. (査読有)
3. Photo-controlled binding of MutS to photo-caged DNA duplexes incorporating 4-O-(2-nitrobenzyl) or 4-O-[2-(2-nitrophenyl)propyl]thymidine. (2016) Seio Kohji, Ohno Yurie, Ohno Kentaro, Takeshita Leo, Kanamori Takashi, Masaki Yoshiaki, Sekine Mitsuo. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 26, 4861-4863. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.07.075 (査読有)
4. 7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazadeoxyguanosine as a fluorescence turn-ON probe for single-strand DNA binding protein. (2016) Tokugawa Munefumi, Masaki Yoshiaki, Canggadibrata J. Christian, Kaneko Kazuhei, Shiozawa Takashi, Kanamori Takashi, Grøtli Morten, Wilhelmsson L. Marcus, Sekine Mitsuo, Seio Kohji. *Chemical Communications*, 52, 3809-3812. doi:10.1039/c5cc09700b. (査読有)
5. Synthesis of responsive fluorescent nucleobases 7-(benzofuran-2-yl)-7-deazahypoxanthine and 7-(Benzofuran-2-yl)-7-deazaguanine using cross-coupling reaction. (2015) Tokugawa Munefumi, Kaneko Kazuhei, Saito Masanori, Kanamori Takashi, Masaki Yoshiaki, Ohkubo Akihiro, Sekine Mitsuo, Seio Kohji *Chemistry Letters* 44, 64-66. Doi:10.1246/cl.140879. (査読有)
6. Synthesis of 5-[3-(2-aminopyrimidin-4-yl)aminopropyn-1-yl]uracil derivative that recognizes Ade-Thy base pairs in double-stranded DNA. (2015) Ito Yu, Masaki Yoshiaki, Kanamori Takashi, Ohkubo Akihiro, Seio Kohji, Sekine Mitsuo. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 194-196. doi:10.1016/j.bmcl.2015.11.003. (査読有)
7. Synthesis of peptide nucleic acids containing pyridazine derivatives as cytosine and thymine analogs, and their duplexes with complementary oligodeoxynucleotides. (2015) Tomori Takahito, Miyatake Yuya, Sato Yuta, Kanamori Takashi, Masaki Yoshiaki, Ohkubo Akihiro, Sekine Mitsuo, Seio Kohji. *Organic Letters*, 17, 1609-1612. doi:10.1021/acs.orglett.5b00522. (査読有)
8. Controlling the fluorescence of benzofuran-modified uracil residues in oligonucleotides by triple-helix formation. (2015) Kanamori Takashi, Ohzeki Hiroki, Masaki Yoshiaki, Ohkubo Akihiro, Takahashi Mari, Tsuda Kengo, Ito Takuhiro, Shirouzu Mikako, Kuwasako Kanako, Muto Yutaka, Sekine Mitsuo, Seio Kohji. *Chembiochem*. 16, 167-76. doi: 10.1002/cbic.2014023 (査読有)

[学会発表](計 16 件)

1. スルホンアミド結合で連結された人工核の新規合成法 関谷彰太 北川諒 田胡信広 正木慶昭 清尾康志 第97日本化学会春季年会 (慶応大学日吉キャンパス) 2017-03-19
2. スルホニル基の α 炭素をフッ素置換した2',5'-ジデオキシ-5'-スルホメチルヌクレオシドの合成 北川諒 田胡信広 関谷彰太 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 第97日本化学会春季年会 (慶応大学日吉キャンパス) 2017-03-19
3. プリダジン-3-オンを核酸塩基部に有する核酸の核酸合成酵素による合成 岡健斗 友利貴人 竹下玲央 宮武佑弥 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 第97日本化学会春季年会 (慶応大学日吉キャンパス) 2017-03-19
4. DNAポリメラーゼによる取り込み能向上を目指した光ケージドヌクレオシド三リン酸の合成と性質 竹下玲央 大野健太郎 長岡健斗 正木慶昭 清尾康志 第97日本化学会春季年会 (慶応大学日吉キャンパス) 2017-03-19
5. Deformability analysis of chemically modified RNA and its applicability for estimation of RNA duplex stability. Masaki

- Yoshiaki, Miyasaka Ryuta, Yamamoto Keishi, Yoshida Keita, Ohkubo Akihiro, Sekine Mitsuo, Seio Kohji The 43rd International symposium on Nucleic Acids Chemistry (Kumamoto University) 2016-11-27.
6. Chemical and enzymatic synthesis of photo-caged DNA containing N1-nitrobenzyl-2'-deoxypseudouridine for UV dependent regulation of transcription. Takeshita Leo, Ohno Kentaro, Masaki Yoshiaki, Sekine Mitsuo, Seio Kohji The 43rd International symposium on Nucleic Acids Chemistry (Kumamoto University) 2016-11-27.
 7. Synthesis and enzymatic properties of C-nucleoside triphosphate containing pyridazin-3-one as a uracil analog. Tomori Takahito, Ngaoka Kento, Miyatake Yuya, Masaki Yoshiaki, Sekine Mitsuo, Seio Kohji The 43rd International symposium on Nucleic Acids Chemistry (Kumamoto University) 2016-11-27.
 8. Base pair recognition of alpha-deoxyribonucleosides with unmodified nucleobase and 8-oxo-adenine antiparallel DNA triplex. Inde Takeshi, Masaki Yoshiaki, Sekine Mitsuo, Seio Kohji The 43rd International symposium on Nucleic Acids Chemistry (Kumamoto University) 2016-11-27.
 9. ASO のコントロールリリースを指向したシス-1,2-ジオールの非対称ジタン s 何エステルリンカーの合成 岸村智太 正木慶昭 清尾康志 日本核酸医薬学会第 2 回年会 (東京理科大学葛飾キャンパス) 2016-11-15
 10. 2'位に種々のカルバモイルエチル型修飾を有するオリゴヌクレオチドの合成と性質 吉田圭汰 正木慶昭 山本恵士 入山友輔 中島宏之 金木達朗 関根光雄 清尾康志 日本核酸医薬学会第 2 回年会 (東京理科大学葛飾キャンパス) 2016-11-15
 11. プリダジン-3-オンを核酸塩基部に有する C-ヌクレオシドの合成と性質 友利貴人 長岡健斗 宮武佑弥 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 日本化学会第 9 6 春季年会 (同志社大学京田辺キャンパス) 2016-03-27
 12. 塩基部 5 位に 3-メチルベンゾフラン誘導体を導入した 2'-デオキシウリジンの合成と蛍光特性 宮村大地 金森功史 正木慶昭 関根光雄 清尾康志 日本化学会第 9 6 春季年会 (同志社大学京田辺キャンパス) 2016-03-27
 13. Synthesis of deoxyuridine derivatives modified with 2,4-diaminopyrimidine moiety for the development of high affinity triplex forming oligodeoxynucleotides. Ito Yu, Kanamori Takahi, Masaki Yoshiaki, Ohkubo Akihiro, Seio Kohji, Sekine Mitsuo The 42nd International symposium on Nucleic Acids Chemistry (I-mssae hall, Himeji) 2015-09-23.
 14. Synthesis of oligodeoxynucleotides containing 2'-deoxy-pseudocytidine for the development of chemically modified DNA duplexes and triplexes. Ayano Yamazaki, Yamaguchi Kei, Kanamori Takashi, Masaki Yoshiaki, Sekine Mitsuo, Seio Kohji The 42nd International symposium on Nucleic Acids Chemistry (I-mssae hall, Himeji) 2015-09-23.
 15. プリダジン骨格を核酸塩基部に有する新規ペプチド核酸の合成および性質 友利貴人 宮武佑弥 金森功史 正木慶昭 大窪章寛 清尾康志 第 44 回複素環化学討論会 (札幌市民ホール) 2014-09-10 09-12
 16. Synthesis and hybridization properties of peptide nucleic acids containing aminopyridazine derivatives as cytosine surrogates. Tomori Takahito, Miyatake Yuya, Satou Yuta, Kanamori Takashi, Masaki Yoshiaki, Ohkubo Akihiro, Sekine Mitsuo, Seio Kohji XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Poznan Poland) 2014-08-24 08-28.
- [図書](計 0 件)
[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
6. 研究組織
(1)研究代表者
清尾康志 (SEIO Kohji)
東京工業大学・生命理工学院・准教授
研究者番号: 20313356