

報告番号	※ 甲 第 11067 号
------	---------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 Study on Novel Artificial Nucleic Acids Composed of  
Acyclic Linkers (非環状リンカーを有する新規人工核酸  
に関する研究)

氏 名 村山 恵司

## 論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、非環状骨格を有する新たな人工核酸の設計、合成及び機能評価を行った。

第1章では、本研究を行うにあたって関連する研究について述べた。人工核酸は環状骨格と非環状骨格に分類される。環状骨格の人工核酸は基本的に一本鎖状態の構造を二重鎖状態に近づけることを目標としており、その結果、環状骨格の人工核酸は安定な二重鎖を形成する。しかし、DNAとRNAに似た構造となるため、核酸分解酵素への耐性が比較的低い。また、合成が煩雑であるという問題点もある。そこで近年非環状型人工核酸が注目されている。非環状型人工核酸は合成が容易であり、核酸分解酵素への耐性も高い。しかし、環状骨格とは逆に二重鎖の安定性は低く、特に天然核酸と二重鎖を形成できるものは特殊な例を除き報告されていない。

第2章では、新規人工核酸 Serinol Nucleic Acid (SNA) の開発を行った。近年、合成の容易さと高い酵素耐性を持つことから非環状骨格の人工核酸が注目を集めている。しかし、主鎖構造の柔軟性により、安定に二重鎖を形成できる非環状型人工核酸は例が少なく、特に天然核酸であるDNAやRNAを認識できるものは報告例がほとんどない。我々はこれまでに、非環状型の新規人工核酸である acyclic D-threoninol nucleic acid (D-aTNA) を合成しており、D-aTNA が相補的な D-aTNA と極めて安定な二重鎖を形成することを見いだしている。しかし、D-aTNA は天然のDNA及びRNAとは二重鎖を形成しなかった。これに対しD-aTNAの主鎖骨格からメチル基を除去した構造の Serinol Nucleic Acid (SNA) を新たに合成した。アデニン、グアニン、シトシン、チミンを導入した4種類のキラルなアミダイトモノマーユニットをそれぞれ合成し、DNA合成機でoligomer化することでSNAを合成した。8-merのSNAを合成し、二重鎖形成能の評価とらせん構造の解析を行った。D-aTNA同様、SNAは相補的なSNAと極めて安定な二重鎖を形成することが明らかとなった。一方で、D-aTNAとは異なり、SNAは相補的なDNAやRNAとも二重鎖を形成することが見いだされた。以上のように、主鎖骨格のメチル基一つの存在が二重鎖形成能を大きく変化させることが明らかとなった。またSNAは、天然核酸同様リン酸ジエステル結合を有する非環状型人工核酸の中で、天然核酸を認識できる初めての例となった。従って、SNAは

DNA や RNA をターゲットとする様々な生物学的ツールとして応用することができると考えられる。加えて SNA は主鎖骨格が対称性を持つため、既知の核酸にはない特殊なキラリティの特徴があらわれる。具体的には、ある SNA 配列と、その配列を反転させた SNA は互いに鏡像異性体の関係となる。この特徴を利用し、塩基配列で SNA 二重鎖のらせん構造を制御することを試みた。その結果、配列設計によって、互いに逆巻きのらせん構造を有する SNA 二重鎖の構築に成功した。

第 3 章では、これまでに開発した非環状人工核酸同士の比較を行うことで、二重鎖の安定性の決定要因の解明を目指した。我々はこれまでに D-aTNA と SNA という二種類の非環状型新規人工核酸を開発してきた。D-aTNA と SNA は構造上メチル基一つという小さな違いしかないにも関わらず、明らかに異なる二重鎖形成能を示した。この二重鎖の安定性の違いが何に由来するのかを検討するため、様々な核酸の二重鎖の安定性の比較、CD スペクトルによる構造解析、二重鎖の熱力学的パラメータ算出を行った。ホモ二重鎖の安定性を比較した結果、その安定性はおおよそ、D-aTNA > PNA & # 8776; GNA & # 8805; SNA >> RNA > DNA となり、D-aTNA は天然核酸や既知の人工核酸に比べても明らかに高い安定性を示した。熱力学的解析の結果、D-aTNA と SNA は DNA、RNA に比べエンタルピー的な安定化を受け二重鎖が安定化していることが示された。SNA/SNA 二重鎖の分子構造計算の結果、この安定化は塩基対のスタッキング相互作用の最適化、二重鎖の立体障害の緩和、主鎖のアミドとリン酸基との水素結合に由来する可能性が示唆された。また、D-aTNA は SNA に比べるとエンタルピー的に安定化していることが示された。CD スペクトルの結果、D-aTNA は SNA に比べ剛直な構造を持つことが示された。以上の結果から、D-aTNA は余分なメチル基によって一本鎖状態でとりうる構造が制限された結果、D-aTNA ホモ二重鎖形成の場合にはエンタルピーロスの緩和により二重鎖が安定化したと考えられる。一方でヘテロ二重鎖については、D-aTNA は DNA 及び RNA と二重鎖形成しないのに対し、SNA は DNA、RNA と二重鎖を形成した。従って、D-aTNA のメチル基による剛直性は DNA 及び RNA に適していなかったと考えられる。一方でメチル基を除去した SNA はより柔軟であるために天然核酸に合わせた構造をとることができ、エンタルピーロスを犠牲に二重鎖を形成したと考えられる。以上のように主鎖骨格のメチル基の影響を考察することに成功した。

第 4 章では、SNA に様々な色素を導入することで SNA の機能化を目指した。当研究室ではこれまでに、色素を D-threoninol を介して DNA に導入することで機能を付与することに成功している。そこで、SNA に色素を導入することでその機能化を試みた。まず、SNA 二重鎖に光制御能を付与するためアゾベンゼンを導入した。SNA 二重鎖の片側に導入した場合、SNA 二重鎖は大幅に不安定化し、光照射によって二重鎖の安定性は変化しなかった。吸収スペクトル測定の結果、アゾベンゼンが二重鎖外部にフリップアウトしていることが示唆された。そこで、アゾベンゼンの向かい側にスペーサーを導入しインターカレートできる空間を設計したが、アゾベンゼンのインターカレーションは観測されなかった。そこで、SNA 二重鎖の両側にアゾベンゼンを導入することで対称性を高め、インターカレーションを狙った。その結果、片側のアゾベンゼンはインターカレートしたが、向かい側のアゾベンゼンはフリップアウトしてしまった。アゾベンゼンとスペーサーを互い違いに向かい合わせて導入した結果、両側のアゾベンゼンがインターカレートし、高効率な二重鎖の光制

御に成功した。また、異なるリンカー構造を有するアントラキノンを導入することで、色素導入時の不安定化は主鎖骨格のアミドと色素が直接結合していることが原因であり、間にグリシンを導入することで不安定化が緩和できることを見出した。次にピレンを SNA 二重鎖両側に導入することで、二重鎖形成によるエキシマー発光の制御を試みた。アゾベンゼンの場合と同様、単に両側に導入しただけではピレンが片側しかインターカレートしないためエキシマー発光が弱かったと考えられる。一方で、スペーサーとピレンを互い違いに導入すると、ピレン同士の会合に由来する強いエキシマー発光が観測された。以上のように色素とスペーサーを互い違いに向かい合わせて導入することで色素が SNA にインターカレートし付加的な機能を発現させることに成功した。

第5章では、人工核酸 SNA を骨格として有する検出プローブを設計した。生きた細胞内の RNA の可視化は生物学的な現象の正しい理解には必要不可欠である。最も一般的な蛍光性核酸検出プローブとしてモレキュラービーコン (MB) が挙げられる。MB は DNA で構成され、Target 存在下でのみ蛍光を発する設計を持つが、DNA の末端塩基対のブリージング現象によってその検出感度は低い。また、DNA の骨格であるために、細胞内に導入した場合には核酸分解酵素により容易に分解されてしまい、蛍光色素が単離して発光してしまう。これに対し我々は SNA のみで構成される MB (SNA-MB) を設計した。蛍光色素としてペリレン、消光剤としてアントラキノンを導入した SNA-MB は SNA 二重鎖の高い安定性によりブリージングが抑制され、従来の MB に比べ極めて高い検出感度を示した。また、細胞抽出液中に SNA-MB を添加した場合にも分解は観測されず、SNA-MB が細胞内でも分解されずに存在できることが示された。更に SNA-MB は 200 pM の Target RNA を有意に検出可能であり、フルマッチの Target 以外の配列に対してはほとんど蛍光を発しないことが確認できた。また、より一般的に用いられる蛍光色素である Cy3 を導入した場合にも SNA-MB は従来の MB よりも高い検出感度を示した。この SNA-MB を用いて、固定化した細胞内の RNA の可視化を試みた。まず、プラスミドによって細胞内で強制発現させた eGFP をコードする mRNA の検出を行った。その結果、SNA-MB は Target の mRNA が存在する場合にのみ Cy3 の蛍光が観測され、Target を特異的に可視化できることが確認できた。また、細胞内在性の mRNA も選択的に可視化できることが明らかとなった。以上のように高い検出感度と酵素耐性を併せ持つ SNA-MB はこれまでの核酸検出プローブに取って代わる存在となることが示された。

第6章では、新たに acyclic L-threoninol nucleic acid (L-aTNA) を合成し、二重鎖形成能の評価を行った。これまでに我々は、唯一天然核酸と二重鎖形成ができる、リン酸ジエステル結合を持つ非環状人工核酸として SNA を開発した。SNA は確かに DNA 及び RNA と二重鎖を形成したが、その安定性はこれまでに報告されている LNA や PNA といった一部の人工核酸には及んでいない。そこで、SNA よりも安定な二重鎖を形成する人工核酸の開発を目指した。ここで我々は、D-aTNA の CD スペクトルに注目した。ある人工核酸の解析において、D-aTNA/ D-aTNA に特徴的な CD スペクトルは左巻きであると帰属されていた。そこで、L-aTNA を合成した。L-aTNA は D-aTNA の鏡像異性体であるため、D-aTNA/ D-aTNA が左巻きであれば L-aTNA/ L-aTNA は右巻きを示すはずであり、L-aTNA に右巻きの正しい剛直性を誘発できると考えた。二重鎖形成能の評価を行った結果、L-aTNA は DNA や RNA と二重鎖を形成し、その二重鎖は SNA に比べ安定であることが明らかとなっ

た。これは設計通り、L-aTNA が右巻きの正しい剛直性を持ったことで二重鎖形成時のエントロピーロスが緩和された結果であると考えられる。また、SNA は逆平行型の二重鎖を形成したが、L-aTNA は DNA 及び RNA と平行型二重鎖を形成した。これは、主鎖骨格から出るアミド基のキラリティが二重鎖の方向性を決定していることを強く示唆している。以上のように、D-aTNA の鏡像となる L-aTNA を合成し、右巻きを誘発することで天然核酸との二重鎖の安定化に成功した。この結果から、L-aTNA はアンチセンス医療などの応用が期待できる。