

報告番号	甲 第 1359 号
------	------------

主論文の要旨

論文題目 Study on Photo-regulation of Duplex Formation and Dissociation by SNA modified with Photo-responsive Nucleobases
(光応答性核酸塩基導入 SNA による二重鎖形成と解離の光制御に関する研究)

氏名 山野 雄平

論文内容の要旨

遺伝情報を担う生体高分子である DNA は、相補的な DNA 配列を認識して二重鎖を形成する超分子的な性質を有しており、この二重鎖形成能を利用した DNA ナノ構造体やナノマシンも数多く開発されている。しかし、天然の DNA をナノマテリアルとして捉えた場合には、二重鎖の安定性が低い、生体内では核酸分解酵素に速やかに分解されてしまう、刺激応答性がない（機能を自由に制御できない）といった多くの問題点を有し、必ずしも最適化されているとは言えない。これに対し、近年では DNA の Ribose 骨格を非天然の分子に完全に置き換えることで、DNA よりも高機能な人工核酸 XNA を創製する研究が盛んに行われている。この中で、当研究室でも非環状分子である Serinol を骨格とする人工核酸 SNA : Serinol Nucleic Acid を開発している (Figure. 1 right) SNA は、相補的な SNA とだけでなく天然核酸である RNA や DNA とともに配列特異的に二重鎖を形成でき、高い核酸分解酵素耐性と親水性を有する。さらに、オリゴマーの化学合成や修飾も容易であるため、SNA は細胞内の RNA を標的とした検出プローブや医薬品、ナノマシンといった DNA の機能を凌駕する様々な核酸ツールへの応用が期待されている。本論文では SNA の更なる機能化を図り、人工核酸ツールの機能を時空間的に制御するために、光刺激を用いて SNA の二重鎖形成・解離を可逆的に制御する新手法を開発した。

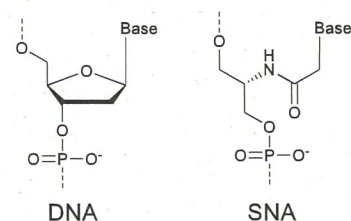


Figure 1. Chemical structures of DNA and SNA

本論文は全3章で構成されている。以下に各章の要旨を示す。

Chapter 1. General Introduction

本章では、本研究を行うにあたって関連する研究について記した。はじめに DNA の化学構造や特徴、およびナノマテリアルとしての DNA の応用例と問題点について述べた。次に、DNA の機能化を目指し開発された修飾核酸塩基・疑似塩基対についてまとめた。さらに、これまでに開発された代表的な骨格改変型人工核酸 XNA の特徴と問題点について記した。

Chapter 2. Development of photo-crosslinkable nucleobase analogue for photo-controlling hybridization ability of SNA

本章では、SNA の二重鎖形成を光制御するための光架橋型核酸塩基の開発について記した。当研究室では、Azobenzene 誘導体 (Azo) を D-Threosinol リンカーを介して二重鎖に付加的に導入し、二重鎖内で *cis-trans* 光異性化させることで、DNA や RNA の二重鎖形成・解離を光制御することに成功している。しかし、Azo を SNA の鎖に導入した場合には、Azo の異性化状態に寄らず SNA の二重鎖形成が阻害されることがわかり、二重鎖形成能力の光制御には至らなかった。これに対し、我々は核酸塩基に光応答性の修飾を施す形で SNA に適した新しい光制御法の開発を試みた。一般に核酸塩基 Adenine の 8 位への修飾は二重鎖の安定性や構造に大きな影響を与えないことが知られている。そこで、この部位に可逆的な光架橋が可能な Pyrenylvinyl 基を導入した修飾塩基 PVA: 8-Pyrenylvinyl adenine を設計した (Figure. 2a)。PVA を Adenine の代わりに 2 残基導入した修飾 SNA と相補鎖とを二重鎖形成させた状態で波長 455 nm の可視光を照射すると、PVA 残基同士が鎖内で架橋 ([2+2] 環化付加反応) し、SNA 鎖の構造が歪むことで二重鎖が解離する。さらに、続けて 340 nm の紫外光を照射すれば、PVA の架橋体が開裂し、歪みが解消されることで二重鎖が再形成する設計である (Figure. 2b)。

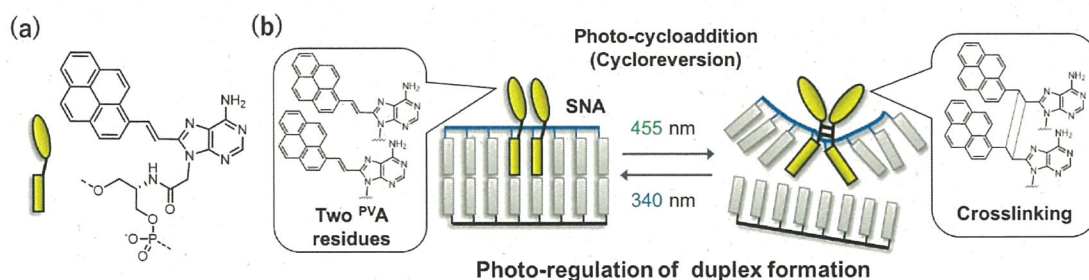


Figure 2. (a) Chemical structures of 8-pyrenylvinyl adenine (PVA). (b) Scheme and illustration of reversible photo-regulation of duplex formation via photo-crosslinking of PVAs in the SNA strand. Irradiation with 455 nm blue light induces dissociation of the duplex through [2 + 2] photo-cycloaddition, whereas irradiation with 340 nm UV light causes reformation of the duplex via cycloreversion.

SNA に導入された PVA の反応性を検証するために、SNA-P2P (Table. 1) に対して一本鎖状態で可視光を照射した。結果、PVA の吸収は速やかに減少し、350 nm 付近に架橋体に対応する Alkylpyrene 様の吸収が現れた (Figure. 3 (a) green line)。さらに 340 nm の紫外光を照射すると PVA の吸収が極めて効率的に回復した (Figure. 3 (a) blue line)。

このことから PVA 残基は意図した可逆的な架橋反応を起こすことが明らかとなった。同反応の進行は HPLC、蛍光スペクトルの結果からも確認され、この反応は副反応を伴わずに 10 サイクルにわたって繰り返し進行することが示された。一方、SNA-P2P とその架橋体は極めて高い熱安定性を有し、SNA 鎖中の PVA は光刺激に対してのみ応答することが確認された。また、2 残基の PVA の導入間隔を変えても光反応性は大きく変化しないことも確認された。特に PVA を連続で導入した SNA-P0P (Table. 1) は光照射前には相補鎖 RNA と安定に二重鎖形成し ($T_m = 35.1\text{ }^\circ\text{C}$)、PVA の導入自体が二重鎖の全体構造を大きく乱さないことも CD スペクトルの結果から確認された。二重鎖を形成した状態でも SNA-P0P の架橋反応は効率的に進行した。光照射後の SNA-P0P/RNA 二重鎖の融解温度を測定した結果、可視光照射後にはシグモイドが観測されず、ほぼ完全に二重鎖が解離していることが示唆された (Fig.3 (b) green line)。一方、紫外光照射後には融解曲線は光照射前と同様のシグモイドを描き、二重鎖が再形成していることが示された (Fig.3 (b) blue line, $T_m = 36.2\text{ }^\circ\text{C}$)。末端に蛍光色素 Cy3 と消光剤 Q: Anthraquinone を導入した SNA-P0P-Q/RNA-Cy3 二重鎖に対して同様の光照射を行うことで、架橋・開裂反応に伴う二重鎖解離・再形成を、Cy3 の発光強度の変化によって可視化することにも成功した。(Figure. 3 (c))。加えて、PVA 導入 SNA の相補鎖を SNA などの非環状型人工核酸に変えた場合にも二重鎖形成の光制御が可能であることも確認した。

Table. 1 Sequences of Synthesized SNAs

	Sequence (SNA)
SNA-P2P	(S)-GC ^{PVA} ATT ^{PVA} AGC-(R)
SNA-P1P	(S)-TCG ^{PVA} AT ^{PVA} AGA-(R)
SNA-P0P	(S)-GCT ^{PVA} P ^{PVA} ATGC-(R)
SNA-P0P-Q	(S)-Q-GCT ^{PVA} P ^{PVA} ATGC-(R)

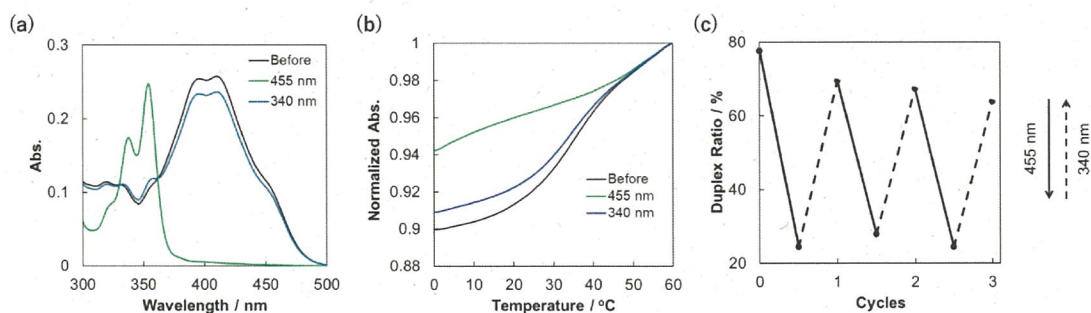


Figure 3. (a) UV-Vis spectra of SNA-P2P (b) Melting profiles of SNA-P0P/RNA duplex (c) Duplex ratio after multiple photo-switching cycles calculated from fluorescence intensity of Cy3. Conditions: 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 20 °C. [Oligonucleotide] = 5.0 μM .

以上のように、PVA の可逆的な光架橋反応を用いて、SNA の二重鎖形成・解離を効率的かつ可逆的に制御することに成功した。

Chapter 3. Orthogonal photo-control of SNA/RNA duplexes by dual crosslink type photo-switches

本章では、2つの架橋型光スイッチを利用した SNA/RNA 二重鎖形成の直交制御について記した。

PVA よりも短波長側に吸収を有する修飾核酸塩基 NVA : 8-Naphtylvinyladenine を新たに設計・合成し (Figure. 4)、2 残基の NVA を導入した SNA 配列 (SNN) と 1 残基の PVA と NVA を導入した SNA 配列 (SPN) を合成した (Table. 2)。SNN は NVA の吸収に対応する 405-340 nm の波長の光で架橋し、SNN の架橋体は 300 nm 以下の波長の光で開裂することが期待される。一方、 PVA と NVA を含む SPN は 465-405 nm の光でヘテロな架橋体を形成し、この架橋体は 340 nm 以下の波長の光を照射することで開裂すると考えた。すなわち、4 種類の波長 (465 nm, 405 nm, 340 nm, 300 nm) の光を使い分けることで、SNN/RNA と SPN/RNA の二重鎖形成・解離を直交的に制御できると予想した (Figure. 5)。

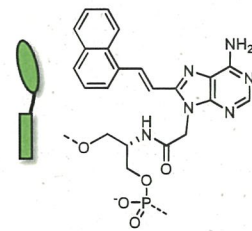


Figure 4. Chemical structures of 8-naphthylvinyl adenine (NVA).

Table 2 Sequences of Synthesized SNAs

	Sequence (SNA)
SNN	(S)-GCT NVA NVA ATGC-(R)
SPN	(S)-GCT PVA NVA ATGC-(R)

各修飾 SNA/RNA 二重鎖の融解温度を測定した結果、どちらも安定に二重鎖形成することがわかり ($T_m > 39^\circ C$)、修飾塩基の導入が二重鎖形成を阻害しないことが確認された。SNN/RNA 二重鎖に 405 nm の光を照射したところ、 NVA の吸収は消失し、架橋反応の進行が示された (Figure. 6a black lines)。続けて 300 nm の光を照射すると、元の吸収は回復したことから架橋開裂反応の進行も確認された。一方、SPN/RNA 二重鎖に 465 nm の光を照射した際には、 PVA と NVA に対応する吸収が共に消失し、Alkylpyrene 様の吸収が出現した (Figure. 6a, gray lines)。これは SPN 中の NVA と PVA が異種修飾塩基間でも光架橋反応を起こしたことを示唆している。ここに 300 nm 光を照射すると両修飾塩基の吸収が回復したことから、SPN 架橋体の開裂も示唆された。それぞれの光架

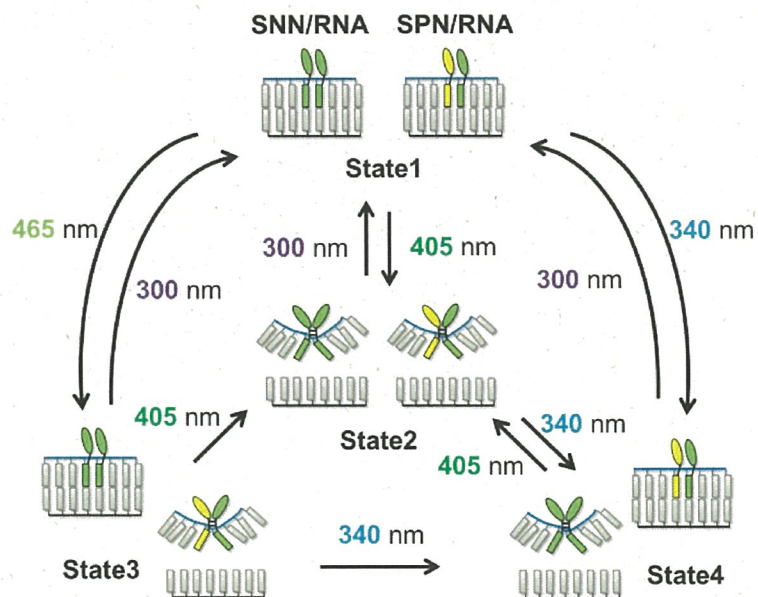


Figure 5. Illustration of controlled hybridization of two SNA/RNA duplexes. Four possible states of SNA/RNA duplexes can be realized by irradiating with four different wavelengths of light (465 nm, 405 nm, 340 nm, and 300 nm).

橋・開裂反応は繰り返し効率的に進行することも確認された。また、架橋反応後の融解温度を測定した結果、どちらの系でも $T_m < 10^\circ\text{C}$ となり、二重鎖の解離が示された。さらに、300 nm 光照射後には融解温度は光照射前と同程度まで回復し ($T_m > 37^\circ\text{C}$)、 $^{NV}A/^{NV}A$ や $^{PV}A/^{NV}A$ の光架橋・開裂を用いても二重鎖形成・解離を光制御できることが示された。

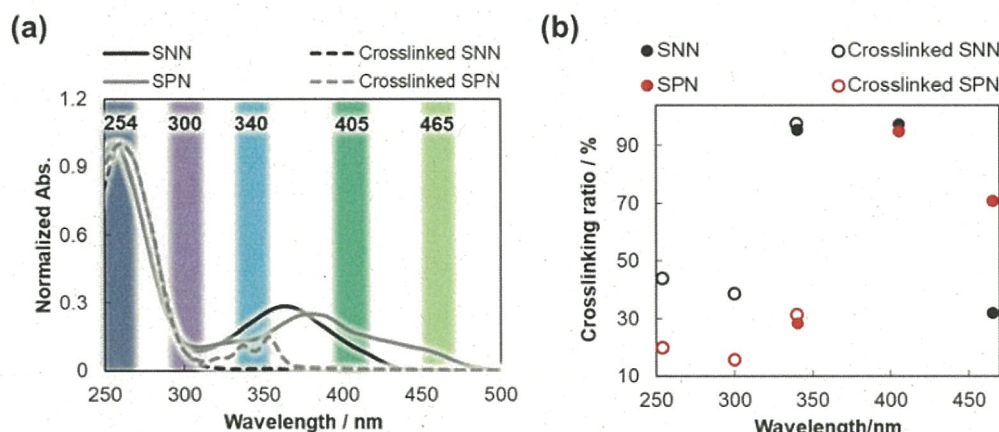


Figure 6. (a) Relationship between the wavelength of photo-irradiation and absorption spectra of SNN and SPN before and after crosslinking. (b) Relationship between the percent of crosslinked chromophores of SNN (black) and SPN (red) and irradiation wavelength. Open circles are percent crosslinking of chromophores in SNN and SPN first irradiated with 405 nm light and then with the indicated light of wavelength. Solution conditions were 5.0 μM oligonucleotide, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0).

続いて、架橋・開裂反応の波長依存性を調べるために SNN/RNA、SPN/RNA、および両架橋体に対し様々な波長の光を照射し、架橋率を比較した (Figure. 6b)。結果、両配列は 405 nm 光で架橋し、両架橋体は 300 nm 以下の波長の光で開裂することがわかった。一方、340 nm 光は SNN の選択的な架橋と SPN 架橋体の選択的な開裂を引き起こした。両配列に 465 nm の光を照射した際には SPN が SNN よりも優先的に架橋されることが示された。すなわち、これらの 4 種類の光を使い分けることで二種類の SNA/RNA 二重鎖の形成を選択的に制御できることが示された。

また、実際に (Figure. 5 に示すように) 二つの SNA/RNA 二重鎖を混合した状態で、4 種類の光を様々な順で照射した場合にも、SNN と SPN の光架橋・開裂反応は選択的に進行することも吸収スペクトルと HPLC の結果から明らかとなった。

以上のように、二つの修飾核酸塩基の架橋反応を利用することで、SNA / RNA の二重鎖形成を直交的に制御することに成功した。