

報告番号	甲 第 14488 号
------	-------------

## 主論文の要旨

論文題目 **Kinetics of Strand Displacement Reaction with Acyclic Artificial Nucleic Acids, and Its Application to Multiplexed Fluorescent Imaging**  
 (非環状型人工核酸の鎖置換反応の反応速度解析と多分子蛍光イメージングへの応用)

氏 名 牧野 航海

## 論文内容の要旨

DNA は核酸塩基、リボース、リン酸ジエステル結合からなる生体高分子である。T と A、C と G が互いに認識する Watson-Crick 塩基対形成のルールに従って、DNA は相補的な塩基配列を選択的に認識して右巻きの二重らせんを形成する。このような配列特異的な核酸の二重鎖形成を利用して DNA 研究は遺伝情報の担い手としてだけでなく、DNA オリガミをはじめとしたプログラミング可能な核酸ナノテクノロジー研究に発展してきた。その核酸ナノテクノロジーの中で中心技術の一つとなっているのが鎖置換反応である(Figure 1)。鎖置換反応は、ある Input 核酸を添加することによって、相補的な Toehold 部分と二重鎖形成し、二重鎖の組み直しが起こることで、より安定な二重鎖が得られ、それと同時に核酸鎖が放出される反応である。Figure 1 に示したように蛍光色素と消光剤を導入する手法が多く利用されており、蛍光の ON/OFF スイッチによって RNA などの高感度検出手法などが開発されている。しかしながら、ナノマテリアルとしての DNA は、二重鎖の安定性が低い、生体内では核酸分解酵素によって分解されてしまうといった課題が挙げられる。このような課題から、これまでに人工核酸を開発するなどの機能が図られてきた。当研究室でも天然の DNA・RNA

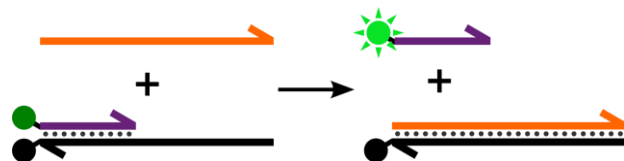


Figure 1. Toehold-mediated strand displacement reaction with fluorescence on/off switch.

とは大きく異なる骨格を有する非環状型人工核酸である SNA, L-*a*TNA, D-*a*TNA を開発してきた(Figure 2)。これらの人工核酸の大きな特長に DNA と比較して非常に安定なホモ二重鎖を形成可能であることが挙げられる。加

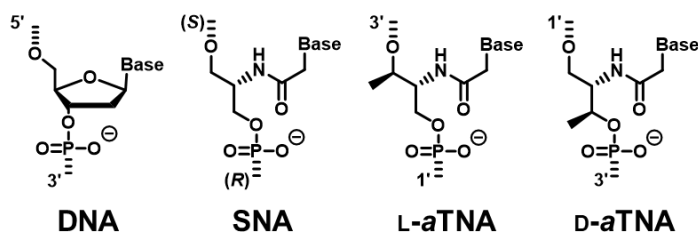


Figure 2. Chemical structures of nucleic acids (DNA, SNA, L-*a*TNA and D-*a*TNA).

えて、酵素分解耐性や生体直交性を有していることから、これらの人工核酸を活用し、鎖置換反応をはじめとした核酸ナノテクノロジーに応用することで、生体内でも安定に存在可能な機能性技術の開発が期待される。

本論文では、上記の新規マテリアルとして有望な非環状型人工核酸を用いた鎖置換反応による多分子同時イメージング技術の開発及び、基礎的な知見を得るための非環状型人工核酸の鎖置換反応の速度論的な解析を行った。全 3 章で構成され、以下に各章の要旨を示す。

## 第 1 章 研究の背景及び目的

本章では、本研究に関連する研究の背景と本研究の目的について示した。はじめに DNA の二重鎖形成能など DNA ナノテクノロジーの基盤となる化学的な性質・特徴についてまとめた。さらに核酸ナノテクノロジーの中心技術である鎖置換反応の応用例を挙げた。また、本論文で利用している非環状型人工核酸について、その特長と利点をまとめた。上記の内容を踏まえ、以下に示す非環状型人工核酸の鎖置換反応を利用した多分子同時イメージング技術の開発及び、非環状型人工核酸の鎖置換反応の速度論的な解析に取り組んだ。

## 第 2 章 生体分子の多分子同時イメージングを目指した核酸蛍光バーコードの開発

本章では、非環状型人工核酸の鎖置換反応の応用として、多分子を同時に蛍光イメージング可能とする新規ラベリングツールの開発を行った。

蛍光分子を用いて細胞内生体分子を可視化する蛍光イメージング技術は高感度かつ汎用性が高いことから幅広い研究に利用され、バイオテクノロジー分野において必要不可欠な技術である。しかしながら、蛍光分子の励起・蛍光波長のオーバーラップのために通常は 5 種類までしか同

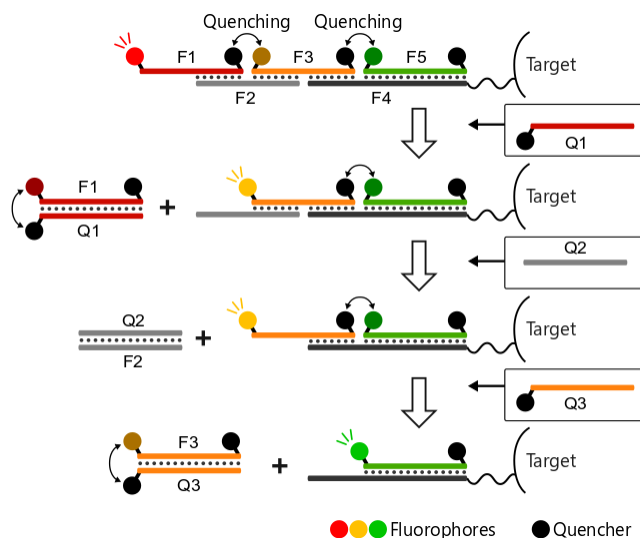


Figure 3. Schematic illustration of fluorescent barcode labeling.

時に区別することができない。従って、同時にラベリング可能な標的分子の種類に大きな制限があり、網羅的に解析する手法への応用は困難であった。そこで本研究では、このような問題点を解決することを目指して、マルチラベリングを可能とする新規蛍光ラベル化剤である核酸蛍光バーコードの開発を行った。

核酸蛍光バーコードとして、鎖置換反応を利用することで蛍光色を任意の順番に変化させることができる設計を考案した(Figure 3)。本手法では、両末端に蛍光色素および消光剤を導入した F 鎖(F1~F5)の二重鎖複合体で標的分子のラベリングを行う。この F 鎖複合体に相補的な Q 鎖(Q1~Q3)を添加することで鎖置換反応を連続的に引き起こし、F 鎖を F1 から順番に引き剥がすことができる。この連続的な鎖置換反応に伴って、発光する蛍光色素を予め並べた順番に変化させることが可能となる。このような設計で、4 種類の蛍光色素を用いて 3 回蛍光変化させることが出来れば、 $4^3 = 256$  種類もの蛍光パターンを作成できる。本手法はさらに拡張することが可能な設計であり、6 回蛍光させれば、1 万種類以上の蛍光バーコードを調製可能であり、従来法を大幅に上回るマルチラベリング・網羅的な解析が実現可能となる。

ここで核酸蛍光バーコードには D-aTNA を利用した(Figure 2)。この D-aTNA は DNA や RNA とは二重鎖形成せず、酵素に認識されず分解耐性を有するため、細胞内夾雑物による擬陽性シグナルの問題を回避することが期待できる。また、これまでに非環状型人工核酸は消光能が高く検出感度を向上することを明らかにしている。以上のような設計で、7 mer ずつずれて相補的に二重鎖形成する D-aTNA の蛍光バーコード配列を合成し、以下に示す機能評価実験を行った。蛍光色素には、蛍光波長が異なる Cy5、Cy3、FAM の 3 種類、消光剤には Dabcyl を用いている。

はじめに、分光蛍光光度計を用いて、蛍光変化が設計通りに起こるのか原理検証を行った。二重鎖形成させた F 鎖複合体に対して、Q 鎖 3 種類(Q1、Q2、Q3)を順番に添加した際の蛍光強度の変化を測定した。その結果、予め配列した蛍光の順番に蛍光変化可能であることを明らかにした。加えて蛍光色素の順序に依らず蛍光変化可能であることも確認した。

そこで続いて、蛍光イメージングへの利用可能性を評価するために蛍光バーコードをビーズ上に固定化し、同様に蛍光変化が観察可能かイメージング実験を行った。Cy5→Cy3→FAM

の順番に蛍光変化するように設計した蛍光バーコードをビオチン-ストレプトアビジン相互作用を利用してビーズに固定化した。続いて、Q 鎖を順番に添加し共焦点レーザー顕微鏡で蛍光変化を観察した(Figure 4)。その結果、設計通りに Cy5→Cy3→FAM の順番に蛍光変化させることに成功した。同様の実験で、3 種類の蛍光色素を用いて、蛍光変化パターンが異なる 9 種類の蛍光バーコード結合ビーズを調製し、同時に存在する状態で Q 鎖添加に伴う蛍光変化を観察した。得られた画像を解

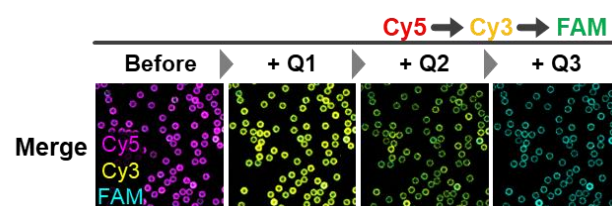


Figure 4. Fluorescent imaging of fluorescent barcode conjugated beads (Cy5→Cy3→FAM).

析し、蛍光変化を解読した結果、9種類のビーズを区別して識別可能であった。つまり、3種類の蛍光色素のみを用いて、その数を上回る9種類の検出に成功した。以上の結果から、開発した蛍光バーコードは従来法では困難な多種類のマルチ蛍光イメージング可能であることが示された。

最後に、蛍光バーコードを用いて細胞内タンパク質のマルチイメージングが可能であるか実験を行った。細胞骨格タンパク質である F-actin に特異的に結合可能な二環性ペプチドである Phalloidin および、二次抗体に蛍光バーコードを結合させ、タンパク質イメージングを試みた(Figure 5)。Phalloidin 及び抗体へのコンジュゲーションはマレイミド-NHS エステルの二官能性クロスリンカーを介して行った。これらの蛍光バーコード結合 Phalloidin・抗体を用いて固定化 HeLa 細胞の F-actin 及び細胞小器官に存在する3種類のタンパク質(ゴルジ体・細胞核・核小体)をイメージングした。その結果、Figure 5 に示す通り、それぞれのタンパク質で予め定めた蛍光変化パターンが観察された。つまり、3色の蛍光色素のみを用いて、3種類を超えた4種類のタンパク質を同時に検出することに成功した。

以上の結果から、開発した蛍光バーコードは多重タンパク質イメージングに応用可能であることが示された。さらに従来法では困難であった空間的かつ網羅的な蛍光解析ツールへの応用が期待される。

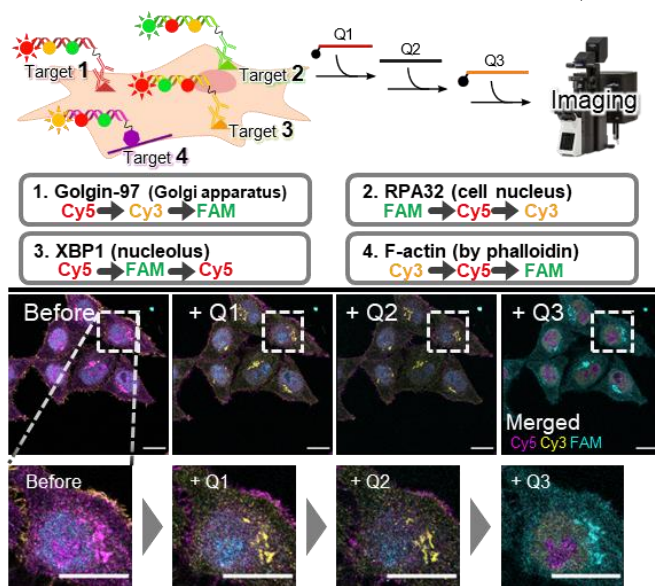


Figure 5. Multiplexed labeling of four proteins in fixed HeLa cells with fluorescent barcodes.

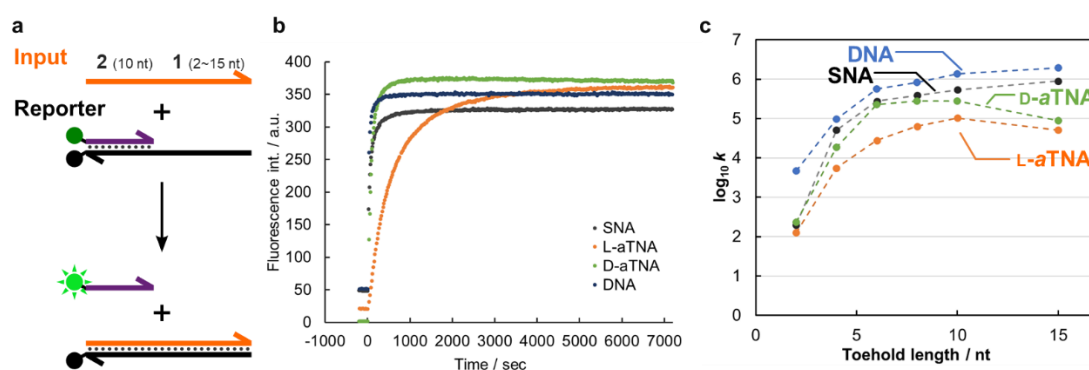
### 第3章 非環状型人工核酸の鎖置換反応の反応速度解析

本章では、非環状型人工核酸 SNA, L-aTNA, D-aTNA の鎖置換反応の反応速度の系統的な解析に取り組んだ。本研究で得られた成果は、非環状型人工核酸の核酸ナノテクノロジーへの応用に展開するための重要な知見に繋がることが期待される。

非環状型人工核酸 SNA, L-aTNA, D-aTNA は、天然の DNA とは大きく異なる骨格を有している(Figure 2)。これらの人工核酸の大きな特長に非常に高い二重鎖形成能を有していることが挙げられる。8塩基対の核酸配列の同条件における融解温度  $T_m$  は、DNA で  $29.0^\circ\text{C}$  であったのに対して、SNA では  $51.1^\circ\text{C}$ 、L-aTNA では  $58.0^\circ\text{C}$ 、D-aTNA で  $62.7^\circ\text{C}$  と大幅に二重鎖安定性が向上する。また、酵素分解耐性、生体直交性を有している。以上のことから、これらの非環状型人工核酸を活用し、鎖置換反応をはじめとして核酸ナノテクノロジーに応用することで、生体内でも安定に存在可能な機能性技術の開発が期待される。しかしな

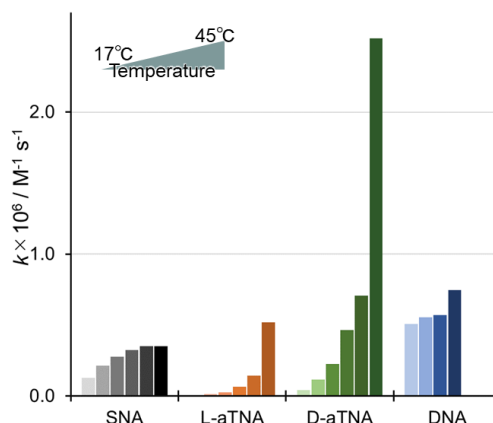
がら、第 2 章の蛍光バーコードの開発を含め、これまでに非環状型人工核酸を用いた鎖置換反応の応用研究は行われてきたが、鎖置換反応の反応速度などの基礎的な研究は検証されてこなかった。そこで、本研究では、Toehold 長さを変更するなど体系的な非環状型人工核酸の鎖置換反応の解析を行った。

反応速度解析を行うために、蛍光で反応をモニターする設計を構築した(Figure 6a)。色素を導入した Reporter 配列に Input を添加することで Toehold を介して鎖置換反応が進行し、それに伴って蛍光強度が増大する。Figure 6b には、SNA、L-aTNA、D-aTNA、DNA それぞれにおける Toehold 長さ 6 nt での 25°C での鎖置換反応による蛍光変化の結果を示す。二次反応で鎖置換反応が進行するとして反応速度定数  $k$  を算出した。これに加えて、同様の測定を Input 配列の Toehold 長さを 2~15 nt に変更して行い、得られた測定結果から算出した反応速度定数  $k$  を Figure 6c にプロットした。その結果から、全ての核酸種において、およそ Toehold 長さが 6 nt まで反応速度が増加し、それ以降の長さでは約  $10^6 [M^{-1} s^{-1}]$  で飽和した。さらに DNA と比較して、非環状型人工核酸では反応速度の低下が確認された。



**Figure 6.** a) Schematic illustration of strand displacement reaction. b) Fluorescent measurement of strand displacement reaction in each oligomer of nucleic acids. c) Summary of strand displacement reaction rate constants  $k$  plotted against the toehold length.

反応速度低下の原因として、非環状型人工核酸の高い二重鎖安定性が考えられた。そこで人工核酸の二重鎖安定化に対して適切な温度にする必要があると考え、Toehold 長さ 6 nt で反応温度(17~45°C)を変更し、反応速度解析を行った(Figure 7)。その結果、DNA では温度を上げても反応速度はあまり変化しなかったのに対して、L-aTNA, D-aTNA では反応速度の上昇に伴って、大きく反応速度が向上する結果が得られた。また、この際の反応速度は DNA と同等またはそれ以上の反応速度であり、反応速度の向上が可能であることが示唆された。以上の結果から、非環状型人工核酸は DNA と同様に鎖置換反応技術への応用が可能であるとともに、温度を適切に設定することで反応速度を向上可能であることを見出した。



**Figure 7.** Thermodependency of strand displacement reaction rate in each nucleic acid.