

# 博士論文の要約

論文題目 Sequence-Specific Recognition and Cleavage of Double-Stranded DNA by Peptide Nucleic Acid (ペプチド核酸による二本鎖 DNA の配列特異的な認識と切断)

氏名 日比野 柁

本研究では、生体内における核酸の機能制御を目指し、人工核酸と金属錯体の複合化による高効率な DNA 配列の認識および、選択的な切断技術の開発を行った。任意のゲノム DNA を認識し、自由にその機能を制御する技術は、生物学・生化学的な研究に限らず、食品改良や医薬を始めとした幅広い応用分野における強力なツールとなる。これまで、二本鎖 DNA を高効率に認識・制御するためには、制限酵素や転写制御因子などのタンパク質を用いる必要があった。人工核酸は化学的に合成可能であるため、認識配列を自由に設計することができ、配列特異性も高いことが知られている。もし、人工核酸によってゲノム DNA の認識・制御が可能となれば、認識配列の制限や標的 DNA 以外へのオフターゲット効果が低減し、保存や取り扱いの容易さからも高い実用性が期待される。

そこで、人工核酸である「ペプチド核酸」(PNA) が二本鎖 DNA の配列を直接認識する「インベージョン」に着目した。インベージョンはワトソン-クリック塩基対を介して DNA を認識するため、PNA の塩基配列を設計するだけで、任意の配列を特異的に認識できる。しかし、生理的な塩濃度では PNA の DNA 結合力が低下し、DNA 二本鎖は逆に安定化するため、インベージョンがほとんど進行しないという問題があった。

第二章では、PNA のグアニン塩基に正電荷を導入することで、インベージョン効率の向上を目指した。PNA を含む多くの人工核酸は高い DNA 結合力を有するが、同時に人工核酸同士の二本鎖や分子内高次構造体といった「自己二本鎖」の形成も促進してしまい、有効濃度が著しく低下する問題が報告されている。インベージョンには二本の相補的な PNA が必要なため、DNA 認識効率の向上にはこの自己二本鎖形成の抑制が必須となる。そこで、グアニン塩基に正電荷を導入した PNA ( $G^+$ -PNA) を考案し、静電反発によって自己二本鎖の形成抑制に成功した。 $G^+$ -PNA は負電荷を有する DNA とは静電相互作用を生じ、DNA 結合力も向上させることが可能である。正電荷を有するグアニンは、市販のグアニン PNA モノマーから一段階のメチル化反応と簡易な精製のみで調製でき、合成的に低コストで PNA への導入を達成した。導入箇所や個数を検討した結果、従来インベージョンが進行しない生理的な条件でも高効率な DNA 認識に成功した。

第三章では、DNA の切断に向け、PNA と機能性金属錯体の複合化について検討した。錯体には DNA と相互作用する  $[Ru(phen)_3]^{2+}$  の誘導体を用い、DNA 結合力も向上するように設計した。しかし、PNA と DNA が形成するインベージョン複合体の構造は明らかにされておらず、錯体の修飾によってインベージョンが阻害されてしまう可能性があった。実際に、錯体の修飾により DNA 結合力が低下した

という報告もあったため、錯体の修飾箇所やリンカー長の最適化を行った。検討の結果、PNAの主鎖ではなく側鎖に錯体を修飾することで、インベーション効率を大きく向上させることに成功した。比較的嵩高い金属錯体の修飾が PNA のインベーションを妨げないことを初めて確認し、機能性分子の修飾による PNA の応用範囲の拡大が期待される。さらに、構造を最適化した複合体と DNA の二本鎖の熱安定性から、錯体が PNA の結合部位の外側で DNA と相互作用していることが示唆された。

第四章では、第三章で最適化した Ru 錯体と PNA の複合体 (Ru-PNA) を用い、二本鎖 DNA の切断を試みた。これまで、酵素に依らない DNA の切断には主に金属錯体が用いられてきたが、金属錯体を用いて二本鎖 DNA を切断するためには、DNA に対して大過剰の錯体が必要であり、配列選択的な切断は困難であった。PNA によって錯体を標的 DNA の近傍のみに固定し、錯体の局所濃度を上げれば、従来不可能であった化学的な配列特異的 DNA 切断が可能になると期待される。第三章で用いた Ru 錯体は光照射を行うことで、DNA を切断したり、配位子交換によって DNA と安定な錯体を形成したりすることが知られている。PNA の配列認識に加え、外部刺激による制御も可能であるため、高い特異性が期待される。そこで、Ru-PNA によってインベーション複合体を形成させ、光照射による DNA への損傷を評価した。電気泳動の結果、Ru-PNA に認識された DNA のみに光照射による損傷が確認された。さらに、PNA の標的配列を持たない DNA を同時に加えたところ、長時間光照射を行った場合でも一切非特異的な損傷は見られず、標的 DNA へ選択的に損傷を与えることに成功した。一般に Ru 錯体による DNA の切断は活性酸素種 (ROS) に由来するが、ROS のスカベンジャー存在下でも光損傷が進行することを確認した。Ru-PNA による DNA の損傷は、Ru 錯体による DNA の直接酸化や DNA との錯形成といった、フリーの Ru 錯体とは異なる反応機構で進行することが示唆された。また、反応後に PNA を取り除き、インベーション複合体を解消させた場合でも、DNA に与えた損傷は回復せず、Ru-PNA が DNA に不可逆的な損傷を与えることを確認した。

第五章では、銅錯体と PNA の複合体 (CuPNA) を利用し、DNA の特異的な切断を達成した。第四章で DNA の切断を試みたが、明確な切断断片は観測されず、DNA に対して不可逆な損傷を与えるに留まった。しかし、Ru-PNA が長時間の反応でも標的 DNA とのみ反応したことから、より切断効率が高い銅錯体でも配列特異性は維持されると期待された。そこで、DNA 切断活性を示す銅錯体を形成する短鎖ペプチドを PNA へ導入した。紫外可視分光測定の結果、銅イオンを加えると、PNA 上で銅錯体の形成が確認された。電気泳動によって切断効率を評価すると、CuPNA に認識されたインベーション複合体が減少し、二本鎖のうち一方の鎖が切断されたと考えられる DNA 断片が確認された。さらに、予測された切断断片に一致する長さの DNA も同時に観測された。これまでにも化学的に二本鎖 DNA の特定の配列を切断した例はあったが、放射性同位体ラベルなどを利用した高感度な検出法で切断を確認したものが多かった。本研究では、一般的に用いられる DNA 染色でも切断を確認できる、非常に高効率な DNA 切断に成功した。

本研究では、 $G^+$ -PNA によって生理的条件下でも高効率に二本鎖 DNA を認識できる手法を開発した。さらに、機能性分子の PNA 修飾方法を最適化し、錯体を修飾して配列特異的な DNA の損傷・切断に成功した。DNA の損傷は抗がん剤に応用されるほど高い細胞毒性を示す。そのため、光制御可能で、配列特異性も高い Ru-PNA の DNA 損傷は、抗がん剤に限らず、抗生剤が効かないウイルスや世界中で問題となっている多剤耐性菌の特異的な殺菌への応用が期待される。また、近年注目を浴びているゲノム編集は主に DNA の切断によって相同組み換えを誘発するため、CuPNA による化学的な DNA 切断はゲノム編集の医薬応用を実現する可能性を秘めていると言える。