

Journal of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry

日本核酸化学会誌

Vol. 5, 2021

巻頭言

進化を続ける核酸分子と核酸化学

和田 猛

総合論文

講演賞受賞者 (2019) の最新研究

村山恵司/Saptarshi Ghosh/P. K. Hashim

研究室紹介

和歌山の端っこで核酸化学をつぶやく？

坂本 隆



JSNAC

Contents

目次

- 巻頭言 進化を続ける核酸分子と核酸化学／和田 猛 **1**
- 総合論文 光応答性 XNA
–アゾベンゼンに頼らない新たな光制御–／村山恵司 **2**
- Prediction parameters for DNA duplex stability
under crowding conditions
–DNA stability prediction–／Saptarshi Ghosh **8**
- Genomic medicine: Ultra-small Nanocaplets
for drug delivery applications
–siRNA-templated polymerization–／ P. K. Hashim **15**
- 研究室紹介 和歌山の端っこで核酸化学をつぶやく？／坂本 隆 **20**

巻頭言

進化を続ける核酸分子と核酸化学

東京理科大学薬学部 和田 猛

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の拡大が続く中、第二期会長に就任し、大変気の引き締まる思いです。まずはじめにCOVID-19によりお亡くなりになられた方々のご冥福を心からお祈りいたします。また、罹患された方々に心よりお見舞い申し上げるとともに、治療や対応にあたられている医療従事者の方々に深く感謝申し上げます。

人類の歴史は感染症や自然災害との格闘史であるとも言えます。約100年前のスペイン風邪は、今や治療法が確立した季節性インフルエンザとなりました。今回の新型コロナウイルスも次々と変異株が出現しているものの、早晩、治療薬や予防法が確立されることでしょう。現に、mRNAワクチンという核酸分子を用いる新しい医薬が驚くべきスピードで開発・承認され、我々を窮地から救いました。

生物の進化の過程を分子レベルでみると、遺伝の本質を担う核酸分子＝DNAの進化の過程であるとも言えます。そして、その進化を加速したのがウイルスであるという仮説があります。生物が進化してウイルスに対抗できるようになると、ウイルスも突然変異により、それに対抗する手段を獲得し、勢力を拡大します。ウイルスと宿主となる生物の数十億年にわたる格闘が双方の進化を促してきたと言えます。動物界に存在する遺伝子にはウイルス由来と考えられるものが数多く知られています。生物は時としてウイルスから遺伝子を受け取り、自身を進化させてきたのでしょう。

近年盛んに応用研究が行われているゲノム編集技術では、CRISPR/Cas9システムが用いられますが、CRISPR/Cas9は、本来、微生物が有する外来性ウイルスやプラスミドへの適応免疫システムとして発見されました。また、近年医薬として実用化されたsiRNAは、RNA干渉 (RNAi) を引き起こす二本鎖RNAですが、RNAi 機構は多くの生物種で保存されていて、その生物学的な意義としてはウイルスに対する防御機構として進化してきたという仮説が提唱されています。すなわち、これらのシステムは、生物がウイルスとの戦いにおいて進化の過程で獲得した核酸分子が主役として働くシステムであると言えます。

生命の起源をRNA分子に帰するRNAワールド仮説は、40億年前の原始地球において、触媒活性をもつRNA分子 (リボザイム) が生命誕生の鍵を握るというものです。RNAという核酸分子が長い年月をかけて分子進化して生命誕生に至るというシナリオを科学的に証明することは困難ですが、極めて魅力的な仮説です。今、我々は、試験管内分子進化法 (SELEX法) を用いて、短時間で分子を進化させ、望みの機能をもつ核酸分子を獲得することが可能な時代になりました。一方、冒頭に述べたmRNAワクチンをはじめとする核酸分子を医薬として用いる研究の中でも、人間が核酸分子を化学修飾により体の中で薬として働く分子に“進化”させています。これらの核酸分子の進化は“核酸化学の進化”の氷山の一角に過ぎません。私は生命の本質である核酸を対象とするサイエンスの進化が人類の明るい未来を拓くものと確信しています。



光応答性 XNA

～アゾベンゼンに頼らない新たな光制御～

名古屋大学大学院工学研究科

村山恵司

(murayama@chembio.nagoya-u.ac.jp)



Abstract: Photo-regulation of duplex formation between serinol nucleic acid (SNA) and RNA was achieved using a novel photo-responsive nucleobase 8-pyrenylvinyl adenine (^{PV}A). Introduction of 8-naphthylvinyl adenine (^{NV}A) into SNA strand also enabled photo-control of duplex formation with shorter wavelength of light. Such modified SNA have potential for use in photo-controllable biological tools targeting endogenous RNAs in cells as well as photo-driven SNA machines.

1. 緒言

XNA (Xeno Nucleic Acid)は骨格改変型人工核酸の総称であり、DNAのリボース環部分が非天然構造に置き換えられた構造を持つ¹⁻⁵。この非天然な構造により高い酵素耐性を獲得したXNAは、様々な生物学的アプリケーションへと展開されている。特にDNAとは構造が大きく異なる非環状型骨格のXNAは、非常に優れた分解酵素耐性を持つため、細胞や生体試料への応用に適している一方、エントロピーロスにより安定な二重鎖形成が困難とされていた⁶。我々は幸いにも、新規非環状型XNAとしてアミノ酸誘導体の非環状型ジオールを骨格とする α TNA (acyclic Threoninol Nucleic Acid)^{7,8}やSNA (Serinol Nucleic Acid)⁹がDNAに比べ極めて熱的に安定なホモ二重鎖を形成することを明らかにした。更に興味深いことに、L体の α TNA及びSNAは、天然核酸とのヘテロ二重鎖も形成することが可能であることを見出した。一方で、光による核酸の機能制御は核酸の応用範囲を広げる非常に重要な技術であり、これまでに様々なシステムが開発されてきた¹⁰⁻¹⁹。非環状型XNAの二重鎖形成を光照射によって制御することができれば、XNAを用いた種々の生物学的ツールの時空間的な制御が実現できると考えた。

2. 8-Pyrenylvinyl adenine (^{PV}A)の光二量化反応を用いたXNAの光制御

我々の研究室では、アゾベンゼンを用いてDNA二重鎖形成・解離の光制御を実現している¹⁹。DNA鎖に非環状型リンカーを介してアゾベンゼンを付加的に導入すると、アゾベンゼンが平面構造の*trans*体の場合DNA二重鎖内部にインターカレートし安定化するが、UV照射で非平面の*cis*体に変化すると、立体障害により二重鎖が一本鎖に解離する。まずはSNAにもアゾベンゼンを導入する手法で光制御を試みたが、この手法では二重鎖の光制御が不可能であった。非環状型XNAはインターカレーターを受け付けず、アゾベンゼンが*trans*体の場合においてもフリップアウトし、不安定化してしまったことが原因である。つまり非環状型XNAを光制御するためには、全く新しい制御手法が必要となる。そこで、非環状型骨格は核酸塩基

への修飾が比較的容易である点に着目し、光照射で反応する修飾核酸塩基を導入することにした。光で反応する仕組みとしては、[2+2]光環化付加反応(光架橋反応)を利用した。

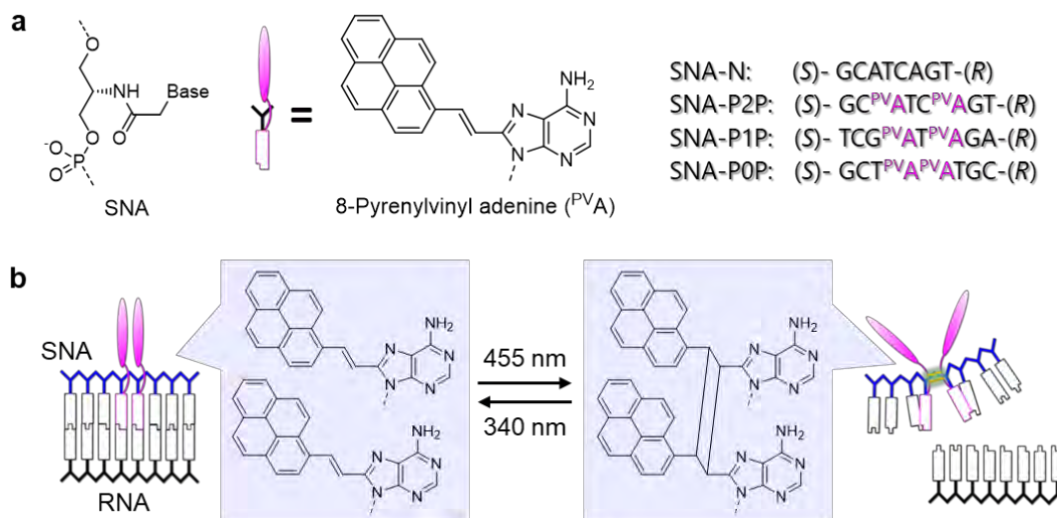


Figure 1. (a) SNA 及び ^{PVA} の構造と合成した SNA 配列. (b) ^{PVA} の[2+2]光環化付加反応を利用した SNA/RNA 二重鎖の光制御スキーム.

具体的には、アデニンの8位に pyrenylvinyl 基を導入した 8-pyrenylvinyl adenine (^{PVA})を新たに合成し、SNA鎖に2残基導入する(Fig. 1a)。光照射前の状態では ^{PVA}がアデニン同様、相補鎖のチミンやウラシルと塩基対を形成するが、455 nm光照射により同一鎖内の^{PVA}間で光架橋反応が進行すれば、^{PVA}周辺の構造が乱れるため二重鎖が一本鎖に解離する。この光架橋産物に340 nmのUV光を照射すれば、逆反応である光開裂反応によってもとの状態が還元され、再度二重鎖を形成する設計となっている(Fig. 1b)。^{PVA}を様々な間隔で2残基含むSNA鎖を合成し、光照射による架橋反応の進行を吸収スペクトル・HPLC測定によって解

析した。一本鎖状態で455 nmの光を照射すると、いずれの配列においても^{PVA}の吸収が減少し、光架橋産物に対応する吸収帯が新たに観測された(Fig. 2a)。このことから、^{PVA}間の光架橋反応が進行していることが示された。また、この光架橋産物に340 nmの光を照射すると、速やかに元の^{PVA}の吸収スペクトルに戻ることが確認され、逆反応の進行が示された(Fig. 2b)。また、455 nmと340 nmの光を繰り返し照射してもほとん

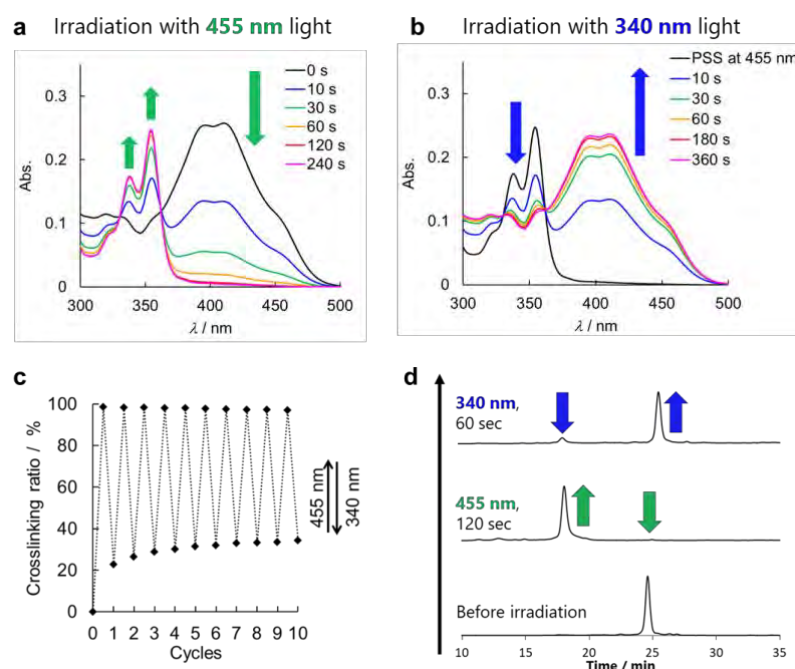


Figure 2. SNA-P2P 一本鎖の光反応解析. (a) 455 nm 照射前後の吸収スペクトル. (b) 光反応産物への 340 nm 照射による吸収スペクトル変化. (c) 繰り返し照射した場合の架橋効率変化. (d) HPLC による光反応産物の解析. Conditions: [SNA-P2P] = 5.0 μ M, [NaCl] = 100 mM, pH = 7.0 (10 mM phosphate buffer), 455 nm (LED), 340 nm (Xenon), irradiated at 20 $^{\circ}$ C.

ど劣化なく制御が可能であった(Fig. 2c)。HPLCで反応を追跡した場合においても、455 nm照射後には元のピークが消失し、光架橋産物に帰属される単一の新たなピークが確認されたのに対し、340 nm照射でこのピークは減少し、元のピークが回復する様子が見られた(Fig. 2d)。以上から、設計通りSNA鎖内のPV A同士が光架橋・開裂反応を起こしていることを明らかにした。一方で、二重鎖形成能は配列に応じて大きく異なることが明らかとなった。すなわち、PV Aの間に核酸塩基が存在する場合(SNA-P2P, SNA-P1P)、二重鎖は不安定化したのに対し、PV Aが連続する場合(SNA-POP)には二重鎖形成能が維持されていた(Table 1)。これは、PV Aのスタッキング相互作用が強いために、一本鎖状態でもPV A同士がスタッキングすることでPV Aが遠くにあるほど一本鎖の構造が乱れ二重鎖形成能が低下したと考えられる。

また、SNA鎖中に1残基のみPV Aを導入した場合には、芳香族ビニル基を導入したグアニン¹⁴と同様、cis体への異性化反応が観測された(data not shown)。今回の設計では、2分子のPV Aが鎖内で近接しスタッキングできる状況を設計したことで、cis体への異性化よりも[2+2]光付加環化が優先的に進行したと考えられる。以降の実験では、二重鎖の安定性が制御可能なPV Aが連続する配列(SNA-POP)で検証を行った。

相補鎖RNAとの二重鎖形成状態で光照射を行い、吸収スペクトルを測定した結果、反応速度は低下するものの、一本鎖同様の光架橋反応の進行が確認された(Fig. 3a)。更に、融解温度(T_m)測定を行った結果、光照射前に比べ、455 nmの光照射後にはシグモイド型の吸光度変化は観測されず、室温付近では二重鎖を形成できなくなっていることが示された(Fig. 3b)。ここに340 nmの光を照射した後は、再度元のシグモイド型の吸光度変化が観測され、二重鎖状態が復元されていることが示唆された。

Table 1. 光照射前の PV A 導入 SNA/RNA 二重鎖の融解温度

	Complementary RNA	T_m of SNA/RNA duplexes (Before irradiation)
SNA-N	5'-ACUGAUGC-3'	35.0 °C
SNA-P2P	5'-ACUGAUGC-3'	< 10 °C
SNA-P1P	5'-AAUCUAUCGAAA-3'	< 10 °C
SNA-POP	5'-AAGCAUUAGCAA-3'	35.1 °C

Conditions: [SNA] = [RNA] = 5 μ M, [NaCl] = 100 mM, pH = 7.0 (10 mM phosphate buffer).

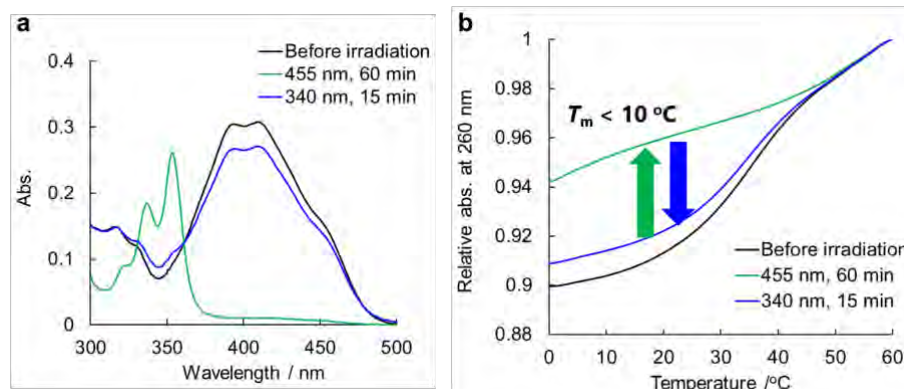


Figure 3. (a) SNA-POP/RNA 二重鎖の光照射前後の吸収スペクトル. (b) 光照射前後の融解曲線. Conditions: [SNA] = [RNA] = 5.0 μ M, [NaCl] = 100 mM, pH = 7.0 (10 mM phosphate buffer), 455 nm (LED), 340 nm (Xenon), irradiated at 20 °C.

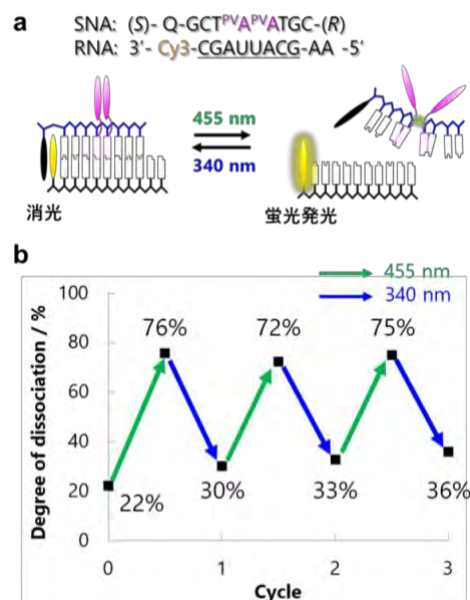


Figure 4. (a) 蛍光による二重鎖形成・解離の検出システム模式図. (b) 蛍光強度から算出した光照射による SNA-POP/RNA 二重鎖の形成割合変化. Conditions: [SNA] = [RNA] = 5.0 μ M, [NaCl] = 100 mM, pH = 7.0 (10 mM phosphate buffer), 455 nm (LED), 340 nm (Xenon), irradiated at 20 °C, Ex. = 530 nm.

より直接的に二重鎖状態を観測するために、末端に蛍光色素と消光剤のペアを導入し、蛍光の強度変化で二重鎖の形成割合を評価できるシステムを構築した。蛍光色素としてCy3、消光剤としてanthraquinone (Q)を導入しており、一本鎖状態では蛍光発光が見られるのに対し、二重鎖状態では消光するため、蛍光強度から二重鎖形成率を見積もることができる(Fig. 4a)。照射前は8割程度が二重鎖となっていたのに対し455 nm照射後には8割が一本鎖状態に解離した。更に340 nm照射により7割が二重鎖の状態にまで回復した(Fig. 4b)。反応は3cycle繰り返しても高い制御効率を維持していた。(蛍光色素と消光剤を導入したことでPV Aから色素へのエネルギー移動が生じ、反応効率が低下している。色素修飾がなければほぼ100%の制御が可能であると推定される。) 以上のように、新たな光応答性核酸塩基^{NV}AをSNA鎖に導入することで、全く新たな手法で二重鎖の形成と解離を照射のみで制御することに成功した²⁰。

3. 2種類のアデニン誘導体を用いた複数波長でのXNAの直交的制御

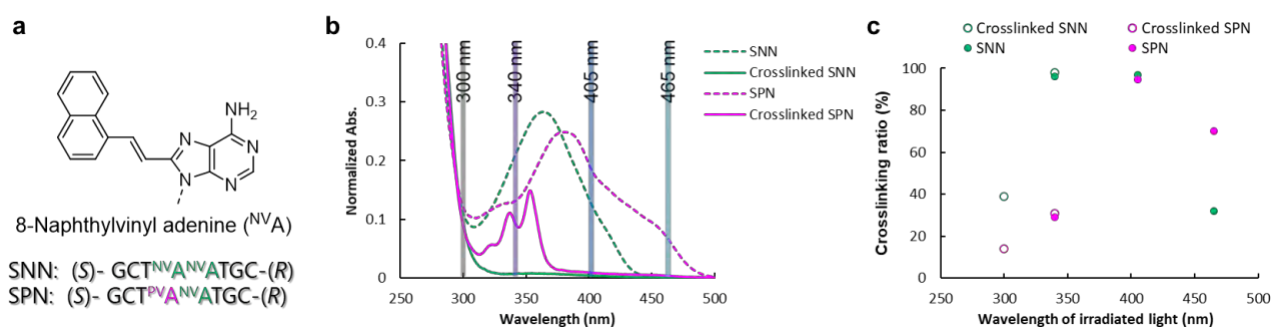


Figure 5. (a) ^{NV}Aの構造と合成したSNA配列. (b) SNNとSPNの照射前後における吸収スペクトル. (c) SNA/RNA二重鎖に対し各波長の光を照射した際の光架橋産物生成割合. Closed circleは照射前のサンプルに照射した結果, open circleは架橋産物に照射した結果を示す. Conditions: [SNA] = [RNA] = 5.0 μ M, [NaCl] = 100 mM, pH = 7.0 (10 mM phosphate buffer), 465 nm (LED), 405 nm (LED), 340 nm (Xenon), 300 nm (Xenon) irradiated at 20 $^{\circ}$ C.

次に上記の光制御システムを応用し、異なる波長での光制御を目指した。新たな修飾核酸塩基として8-naphthylvinyl adenine (^{NV}A)を設計した(Fig. 5a)。naphthylvinyl基はpyrenylvinyl基に比べ短波長の光を吸収するため、^{PV}Aに比べ短波長の光で制御が可能となることを期待した。^{NV}Aを2残基導入したSNA (SNN)と、^{NV}Aと^{PV}Aを1残基ずつ導入したSNA (SPN)を合成し、光反応性を吸収スペクトルで評価した。その結果、SNNは照射前と光反応産物ともにSPNに比べ短波長シフトしており、405~340 nmの照射で光架橋反応が進行し、300nmの照射で開裂反応によりモノマー状態に戻ることが可能であった(Fig. 5b,c)。一方で^{PV}Aが架橋反応を起こす波長である465 nm光を照射してもSNNの架橋は顕著に遅かった(Fig. 5c)。更に融解温度測定によって、光架橋後には二重鎖が一本鎖に解離しており、架橋開裂後には元の二重鎖が再生していることが確認された(data not shown)。また、SPNは^{PV}Aを2残基導入した場合と同じく、400 nmより長波長の光で架橋、340 nm以下の波長の照射で開裂が確認された。つまり、照射波長に応じてSNNとSPNの二重鎖形成を独立に制御できることを示している(Fig. 6)。

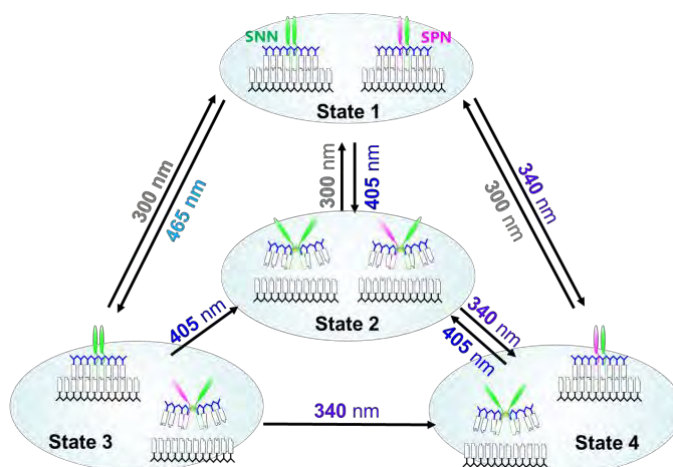


Figure 6. 照射波長と二重鎖形成・解離の関係

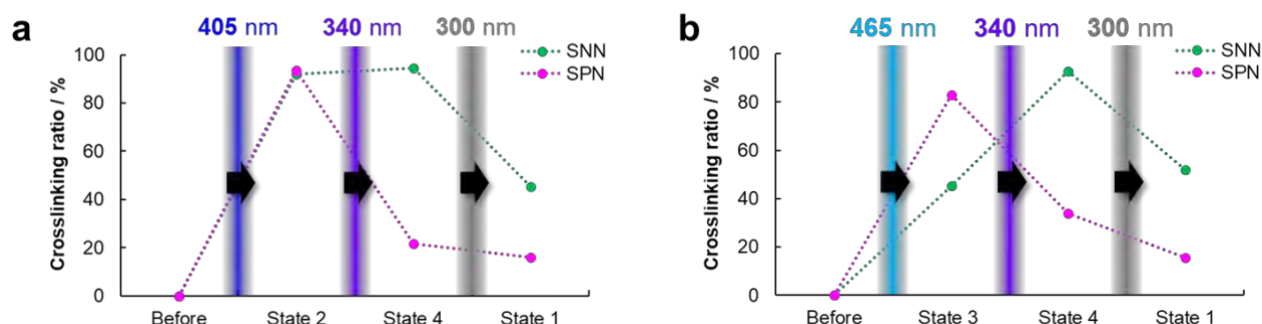


Figure 7. SNN/RNA 二重鎖とSPN/RNA 二重鎖の直交的制御の検証. 架橋の割合は HPLC のピーク強度から算出した. Conditions: [SNA] = [RNA] = 5.0 μ M, [NaCl] = 100 mM, pH = 7.0 (10 mM phosphate buffer), 465 nm (LED), 405 nm (LED), 340 nm (Xenon), 300 nm (Xenon) irradiated at 20 $^{\circ}$ C.

そこで実際に、SNN/RNA二重鎖とSPN/RNA二重鎖が混在する溶液に光照射を行い、それぞれの二重鎖を独立に制御できるかを検証した(Fig. 7)。まず、405 nm、340 nm、300 nmの順に光照射した結果、405 nm照射後にはSNNとSPNともに架橋が進行し一本鎖状態となり(State 2)、340 nm照射でSPNのみ架橋開裂が進行し二重鎖を形成(State 4)、300 nm光を照射すると、両方の開裂反応が進行し、二重鎖状態が再生した(State 1) (Fig. 7a)。また、照射順を465 nm、340 nm、300 nmに変えた場合、465 nm光照射でSPNが優先的に解離(State 3)、ここに340 nm光を照射すると架橋の割合が逆転し、SNNが一本鎖状態、SPNが二重鎖状態となり(State 4)、300 nm光を照射すると、State 1に戻ることが確認された(Fig. 7b)。以上のように、2つの二重鎖の形成・解離をそれぞれ独立に制御できることが示された²¹。

4. 結言

新規修飾核酸塩基^{PVA}をSNA鎖に2残基連続で導入することで、SNA/RNA二重鎖の光制御に成功した。反応は高効率に進行し、繰り返し制御も可能であった。また、アゾベンゼンに比べると熱安定性が高く、高温条件でも光架橋産物は安定に存在できる。更に、別の波長に応答する^{NVA}の設計にも成功し、^{PVA}を含むSNA配列と^{NVA}のSNA配列が共存する条件でそれぞれのSNA鎖を独立に光制御できることを確認した。このXNA光制御システムは光応答性ナノマシンの構築に利用できるだけでなく、XNAを用いた核酸医薬や核酸検出プローブに組み込むことで、任意の場所、任意の時間に機能のON・OFFを切り替えられる有用な生物学的ツールとしての応用が期待される。最近我々は、非酵素的ライゲーションを用いることで非環状型XNAの鑄型特異的鎖伸長反応にも成功しており²²、これを用いた人工核酸の転写・逆転写反応にも着手している。今後も様々な方向から研究を進め、非環状型XNAの応用範囲を幅広く拡張していきたい。

5. 謝辞

本研究はJSPS科研費 若手研究 (JP20K15399) の助成を受けたものです。また本研究は全て名古屋大学大学院工学研究科 浅沼研究室で行われました。ご指導・ご助言をくださった浅沼浩之教授、樫田啓准教授、神谷由紀子准教授、実際に実験を行ってくれた学生の皆様にこの場を借りて感謝申し上げます。

References

1. C. J. Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 841 (2002).
2. J. C. Chaput, P. Herdewijn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 11570 (2019).
3. V. B. Pinheiro, P. Holliger, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 245 (2012).
4. R. Krishnamurthy, *Isr. J. of Chem.*, **55**, 837 (2015).

5. S. Zhang, C. Switzer, J. C. Chaput, *Chem. Biodivers.*, **7**, 245 (2010).
6. K. Murayama, H. Asanuma, *ChemBioChem*, **22**, 2507 (2021).
7. H. Asanuma, T. Toda, K. Murayama, X. G. Liang, H. Kashida, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 14702 (2010).
8. K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Commun.*, **51**, 6500 (2015).
9. H. Kashida, K. Murayama, T. Toda, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **123**, 1321 (2011).
10. C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 8446 (2012).
11. Q. Liu, A. Deiters, *Acc. Chem. Res.*, **47**, 45 (2014).
12. A. S. Lubbe, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 1025 (2017).
13. Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org Lett.*, **10**, 3227 (2008).
14. S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 8839 (2008).
15. P. Arslan, A. Jyo, T. Ihara, *Org. Biomol. Chem.* **8**, 4843 (2010).
16. S. Barrois, H. A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.*, **8**, 905 (2012).
17. K. Morihira, T. Kodama, R. Waki, S. Obika, *Chem. Sci.*, **5**, 744 (2014).
18. K. Onizuka, K. Ishida, E. Mano, F. Nagatsugi, *Org. Lett.*, **21**, 2833 (2019).
19. Y. Kamiya, H. Asanuma, *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1663 (2014).
20. K. Murayama, Y. Yamano, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 9485 (2019).
21. Y. Yamano, K. Murayama, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.*, **27**, 4599 (2021).
22. K. Murayama, H. Okita, T. Kuriki, H. Asanuma, *Nat. Commun.*, **12**, 804 (2021).

2021年 7月28日 受領

2021年 9月30日 採択



Prediction parameters for DNA duplex stability under crowding conditions

DNA stability prediction

Saptarshi Ghosh



*Frontier Institute for Biomolecular Engineering
Research (FIBER), Konan University
(ghosh_s@konan-u.ac.jp)*

Abstract: Prediction of DNA duplex stability in solutions that closely resemble the intracellular environments is required to understand biological reactions in cells and improve biotechnologies like antisense therapy and gene editing. Although predictive model for DNA duplex stability in the dilute condition is available, quantitative estimation of stability in the crowded environment in cells is yet to be known. Therefore, we studied the thermodynamic behavior of oligomeric DNA duplexes in the crowding environments of synthetic cosolutes in order to obtain the prediction method for DNA stability in cell-like conditions. Analyzing the thermodynamic data for dozens of sequences, we determined prediction parameters for the duplex stability and other thermodynamic parameters in the crowding conditions of different cosolutes. The parameters were shown to mimic the crowding environment of specific cellular compartments, indicating the utility of the parameters to study biological processes *in vitro*.

1. Introduction

Watson-Crick base paired duplex structure of DNA carries and transfers the genetic information in a cell through replication and transcription reactions. Efficiencies of these important reactions largely depend on the stability of the involved DNA duplexes. Moreover, major improvements of modern biotechnologies like DNA origami and gene therapy can be achieved with the knowledge of DNA stability under cellular conditions. Therefore, estimation of DNA duplex stability in a cell is crucial for understanding important biological reactions and technological applications. The intracellular environment is occupied by a high concentration of various biomolecules, leading to a crowded environment known as ‘molecular crowding’.¹ DNA stability depends on the solution conditions, and it shows a drastic difference in crowding conditions from the dilute solutions.¹ Stability of DNA duplexes in dilute solutions is usually estimated by using the well-known nearest-neighbor (NN) model, as proposed by Tinoco’s group.² According to the model, stability (ΔG°_{37}) of a DNA duplex can be predicted from its base sequence by adding the individual NN parameters present in that duplex.

However, the applicability of the model has not been verified in molecular crowding conditions. We confirmed that the NN model is valid for DNA duplexes even in the crowding condition induced by 40 wt% poly(ethylene glycol) having an average molecular weight of 200 (PEG 200) in a physiological buffer condition.³ From the thermodynamic data of dozens of DNA sequences having different lengths and base composition, we determined NN parameters in the crowding condition that predicted the thermodynamics of DNA duplex formation in close agreement with experimental values. Since the crowding condition inside the cell is dynamic and heterogeneous, we proposed a general method to obtain parameters in the solutions of different cosolutes based on the relationship between DNA stability and the water activity of the cosolute solutions.⁴ Prediction of stabilities by the reported NN parameters will be useful for investigating biological processes controlled by local crowding regions within the cell and also for the application of DNA-based technologies in various crowding conditions.

2. Nearest-neighbor model for DNA stability prediction

DNA stability mainly consists of two major contributors; one is hydrogen bonding in the base pair, and another one is stacking interaction between the neighboring bases. Since both these interactions are present in a set of two adjacent base pairs, the thermodynamics of the formation of nucleic acid duplexes can be obtained in a sequence-dependent manner, which is termed the nearest-neighbor (NN) model (Fig. 1). According to the model, thermodynamic parameters (ΔH° , ΔS° , and ΔG°_{37}) for a duplex can be predicted by adding three terms: (i) a free energy change for helix initiation to form a first base pair in the double helix, (ii) a free energy change for helix propagation as the sum of each subsequent base pair, and (iii) a free energy change of mixing entropy term for self-complementary strands (Fig. 1). NN parameters for predicting the thermodynamics of DNA hybridization are available but only in the dilute solutions,⁵ that can not be applied in crowding conditions.

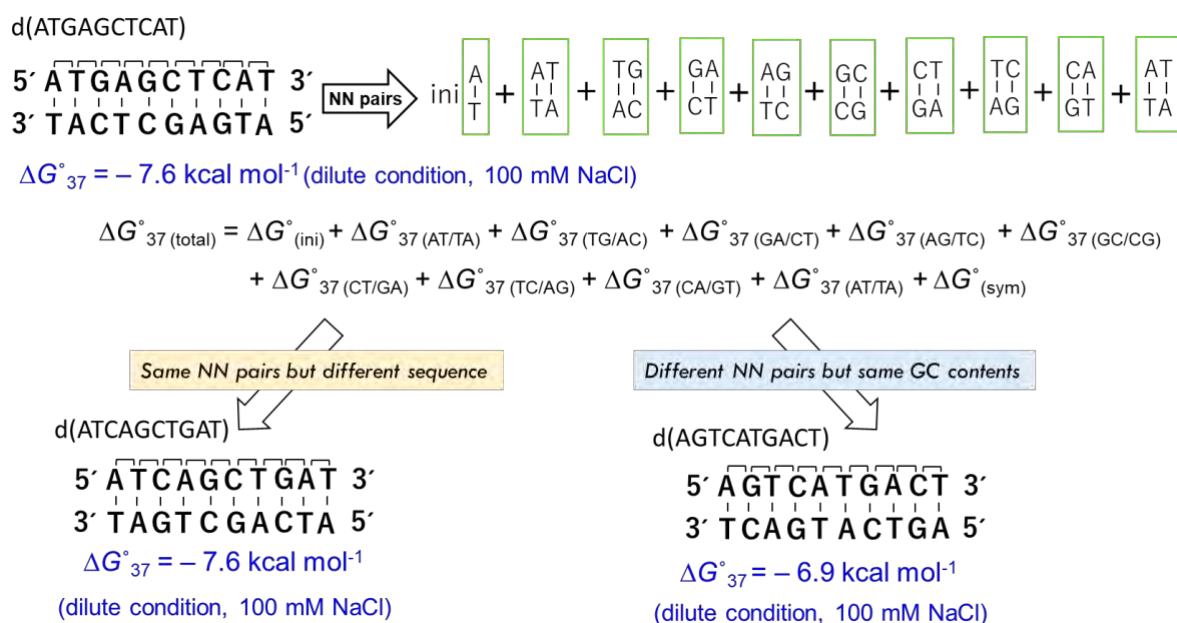


Figure 1. Scheme of prediction of DNA duplex stability by nearest-neighbor model.

3. Thermodynamics of DNA duplexes in crowding condition and validity of the NN model

High concentrations of synthetic cosolutes are generally used to simulate the intracellular crowding conditions *in vitro*. Polyethylene glycols (PEGs) are one of the most used ones due to their inertness towards nucleobases, high water solubility, and the availability of many molecular sizes. To check the validity of the NN model in crowding conditions, we measured the thermodynamic parameters for DNA duplex formations by the UV melting study in the presence of 40 wt% PEG 200 at 100 mM NaCl. Thermodynamic parameters were determined from the melting profiles using T_m^{-1} vs. $\ln(C_t)$ plots following the standard practice. Thermal stabilities of all the duplexes were found to be decreased in the crowded environment compared to dilute

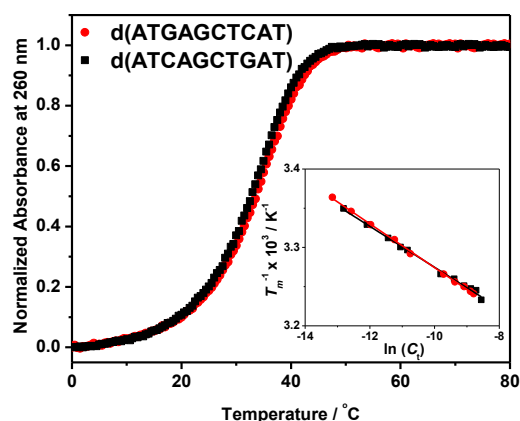


Figure 2. UV melting curves for 100 μ M d(ATGAGCTCAT) and d(ATCAGCTGAT) in 40% PEG 200 at 100 mM NaCl. Inset shows T_m^{-1} vs. $\ln(C_t)$ plots for these sequences.

solution as the water activity of the solution decreased.⁶ We obtained similar melting profiles and T_m^{-1} vs. $\ln(C_t)$ plots for sequences having identical NN pairs (Fig. 2). The thermodynamic parameters obtained from the T_m^{-1} vs. $\ln(C_t)$ plots were also close for sequences with the same NN pairs. On the other hand, sequences having the same GC content but different NN pairs showed different stabilities. The observation indicated the validity of the model in the crowding condition since the model assumes similar thermostabilities and thermodynamic parameters for oligonucleotides having identical nearest-neighbors (Fig. 1). Since PEG 200 is considered as a small cosolute, we verified the applicability of the model in the presence of larger cosolutes like dextran 70 and Ficoll 70 in a similar manner. As a result, the generality of the validation of the NN model has been established in molecular crowding conditions.

4. Determination of the NN parameters in crowding condition

To obtain reliable NN parameters, it is required to obtain thermal data for dozens of DNA duplexes of various lengths and base compositions. We applied linear least square fitting to the measured thermodynamic parameters of the 36 DNA duplexes in 40 wt% PEG 200 with 100 mM NaCl using the computer program to obtain the 10 NN pairs and two initiation factors (Table 1). All the 10 NN base pairs were destabilized compared with the dilute solution having the same NaCl concentration, although at different extents. The relative destabilization of NN with only GC pairs was considerably higher than that of other NN pairs. This might be because in the environment with low water activity caused by PEG 200, NN pairs comprising only GC are destabilized more as GC pairs require more water molecules for stabilization than AT pairs.⁷ Interestingly, initiation parameters were stabilized in the crowding condition compared to dilute solution due to preferential hydration around the duplex terminal in the crowding condition. Cosolute molecules disrupt the ordered water network around a DNA duplex. Nucleotides in the terminal pairs can interact more with these disordered water molecules via hydrogen bonding as they remain more exposed to the surrounding environment compared to the nucleotides of other propagating base pairs, resulting in a favorable ΔH° for helix

initiation. However, the accumulation of water molecules around terminal pairs resulted in an unfavorable ΔS° for helix initiation under the crowded condition. A larger contribution of unfavorable ΔS° than of favorable ΔH° rendered the ΔG°_{37} for helix initiations unfavorable. However, the magnitude was reduced as compared to dilute solution. The determined NN parameters (Table 1) predicted the measured thermodynamic parameters for 36 DNA duplexes with an average error of 5.7%, 6.3%, 4.3% and 1.0 °C for ΔH° , ΔS° , ΔG°_{37} , and T_m , respectively, suggesting that these parameters can precisely predict thermodynamics of DNA duplexes in molecular crowding condition from the sequence information.

Table 1. NN parameters for DNA duplex formation in 40 wt% PEG 200 and 100 mM NaCl at 37 °C.

NN set	ΔH° (kcal mol ⁻¹)	ΔS° (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG°_{37} (kcal mol ⁻¹)
d(AA/TT)	-6.5 ± 0.3	-19.2 ± 0.8	-0.55 ± 0.07
d(AT/TA)	-9.4 ± 0.3	-29.4 ± 0.8	-0.28 ± 0.05
d(TA/AT)	-4.3 ± 0.5	-13.3 ± 1.3	-0.16 ± 0.14
d(CA/GT)	-13.1 ± 0.1	-38.8 ± 0.1	-1.00 ± 0.05
d(GT/CA)	-9.2 ± 0.1	-26.8 ± 0.1	-0.89 ± 0.01
d(CT/GA)	-3.4 ± 0.6	-7.9 ± 1.6	-0.91 ± 0.11
d(GA/CT)	-4.9 ± 0.7	-13.0 ± 2.1	-0.87 ± 0.06
d(CG/GC)	-6.4 ± 0.7	-16.1 ± 2.0	-1.38 ± 0.12
d(GC/CG)	-4.2 ± 0.7	-9.3 ± 2.0	-1.31 ± 0.06
d(GG/CC)	-4.0 ± 0.6	-8.9 ± 2.0	-1.25 ± 0.03
Initiation per GC	-10.1 ± 0.2	-35.1 ± 0.5	0.76 ± 0.06
Initiation per AT	-2.9 ± 0.3	-12.7 ± 0.9	1.00 ± 0.07
Symmetry factor	0	-1.4	0.40

5. Determination of universal NN parameters for diverse crowding conditions

Since the cellular conditions are different in each timing and local area within the cell, it is highly important to predict the duplex stability in different crowding conditions. Based on the NN parameters in 40% PEG 200, we expanded them to be applicable for different cosolutes at their varied concentrations. Among the physicochemical factors affected by the molecular crowding, water activity mainly affects the stability of short DNA duplexes, whereas factors like dielectric constant and viscosity have a nominal contribution.⁸ The relationship between duplex destabilization ($\Delta\Delta G^\circ_{37}$) under crowded conditions and change in water activity (Δa_w) is shown as a simple linear correlation. The plot of $\Delta\Delta G^\circ_{37}$ ($\Delta\Delta G^\circ_{37} = \Delta G^\circ_{37, \text{cosolute}} - \Delta G^\circ_{37, \text{no cosolute}}$) against Δa_w ($\Delta a_w = a_w \text{ no cosolute} - a_w \text{ cosolute}$) in different cosolute solutions of varying concentrations for a test sequence (d(ATGCGCAT)) having equal GC and AT contents showed different linear correlations depending on the number and position of the hydroxyl groups present in the cosolutes (Fig. 3).

The stability parameters for each NN base pair under crowded conditions can be expressed as follows:

$$\Delta G^\circ_{37 \text{ NN}} = \Delta G^\circ_{37 \text{ NN, [cation]}} + \Delta G^\circ_{37 \text{ NN, [crowder]}} \quad (1)$$

where $\Delta G^\circ_{37 \text{ NN, [cation]}}$ and $\Delta G^\circ_{37 \text{ NN, [crowder]}}$ represent the portion of NN parameters determined by cation and crowder concentrations, respectively. Since destabilization is linearly related with water activity, we assumed that $\Delta G^\circ_{37, \text{NN [crowder]}}$ and initiation factors are linear functions of Δa_w as follows

$$\Delta G^\circ_{37 \text{ NN, [crowder]}} = m_{\text{cs}} \cdot \Delta a_w \quad (2)$$

where m_{cs} is a prefactor for cosolutes, which is equivalent to the energy parameter for NN base pairs in the presence of a cosolute, that depends on the NN pair and the nature of cosolute. Fig. 3 revealed that PEGs and 1,2-dimethoxyethane (1,2 DME) maximally destabilized, whereas ethylene glycol (EG) and glycerol (GOL)

minimally destabilized, and 1,3-propanediol (1,3 PDO) and 2-methoxyethanol (2-ME) destabilized to an extent between these two. We calculated the contribution of different classes of cosolutes to each NN parameter. Subtracting $\Delta G^{\circ}_{37\text{ NN, [cation]}}$ from the parameters shown in Table 1 provided $\Delta G^{\circ}_{37\text{ NN, [crowder]}}$ for 40 wt% PEG 200 (Table 2). The m_{cs} values for PEGs and 1,2 DME ($m_{\text{PEG/1,2 DME}}$) were calculated from the $\Delta G^{\circ}_{37\text{ NN, [crowder]}}$ values using equation 2 (Table 2). The m_{cs} values for the other two types of cosolutes were calculated as follows

$$m_{\text{cs}} = m_{\text{PEG}} \cdot (S_{\text{CS}}/S_{\text{PEG}}) \quad (3)$$

where S_{CS} and S_{PEG} are the slopes for the cosolute of interest and PEG, respectively, in the $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ vs. Δa_{w} plot (Fig. 3). The $\Delta G^{\circ}_{37\text{ NN, [crowder]}}$ for different cosolutes at their different concentrations can be calculated by multiplying m_{cs} (Table 2) and Δa_{w} . Water activities under different crowded conditions can be found in the literature or determined by osmometric measurements. Parameters for any other cosolute can be also determined following the similar procedure as we shown here. Thus, the parameters listed in Table 2 may be considered as universal parameters for the DNA duplex stability as the parameters can predict DNA stability in any crowding condition of cosolutes from their base sequence.

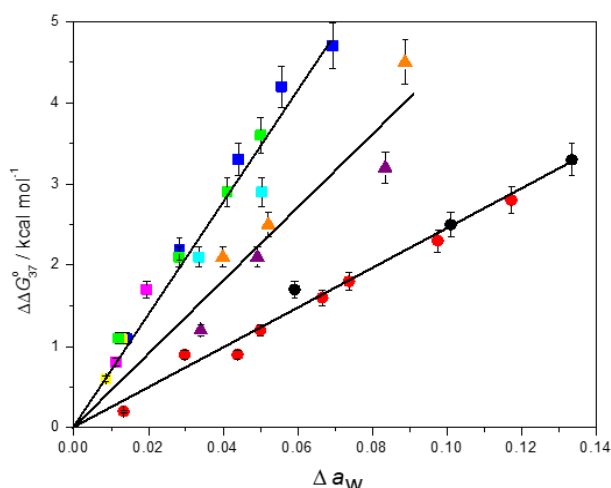


Figure 3. Plots of $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ vs Δa_{w} for d(ATGCGCAT) in the presence of EG (red circles), GOL (black circles), 1,3 PDO (purple triangles), 2-ME (orange triangles), 1, 2 DME (cyan squares), PEG 200 (blue squares), PEG 2000 (magenta squares), and PEG 8000 (yellow squares) at 1 M NaCl and in the presence of PEG 200 at 100 mM NaCl (green squares).

Table 2. NN parameters for 100 mM NaCl and 40 % PEG 200 with prefactors (m_{cs}) for different cosolutes^a.

NN set	$\Delta G^{\circ}_{37\text{ NN, [cation]}}$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta G^{\circ}_{37\text{ NN, [40wt\% PEG 200]}}$ (kcal mol ⁻¹)	$m_{\text{PEG/1,2 DME}}$ (kcal mol ⁻¹)	$m_{\text{EG/GOL}}$ (kcal mol ⁻¹)	$m_{\text{1,3PDO/2-ME}}$ (kcal mol ⁻¹)
d(AA/TT)	-0.65	0.10	2.0	0.7	1.3
d(AT/TA)	-0.60	0.32	6.4	2.2	4.2
d(TA/AT)	-0.36	0.20	4.0	1.4	2.6
d(CA/GT)	-1.23	0.23	4.6	1.6	3.0
d(GT/CA)	-1.20	0.31	6.2	2.2	4.1
d(CT/GA)	-1.11	0.20	4.0	1.4	2.6
d(GA/CT)	-0.93	0.06	1.2	0.4	0.8
d(CG/GC)	-1.85	0.47	9.4	3.3	6.2
d(GC/CG)	-2.05	0.72	14.4	5.0	9.5
d(GG/CC)	-1.69	0.44	8.8	3.0	5.8
Initiation per GC	0.98	-0.22	-4.4	-1.5	-2.9
Initiation per AT	1.03	-0.03	-0.6	-0.2	-0.4

^aSymmetry factor for ΔG°_{37} is 0.4 kcal mol⁻¹ for all cosolutes as it is independent of the crowding environment.

6. Validation of the universal NN parameters *in vitro* and cellular conditions

To verify the predictive nature and versatility of the universal parameters, we predicted the measured stabilities of several DNA duplexes in the presence of different concentrations of NaCl and cosolutes using parameters in

Table 2. The average difference between the predicted and measured stabilities for the studied 9 sequences was only 4.4%, indicating accuracy of the parameters in predicting stabilities in diverse crowding conditions. We then investigated whether these parameters could be used to estimate DNA stability in cellular compartments also. Nott *et al.* reported destabilization of DNA duplexes d(ACTG)₃ and d(ACTG)₄ to be 3.0 and 2.3 kcal mol⁻¹, respectively, in the crowded medium of disordered Ddx4 protein that mimics the nucleolus (membraneless compartment of the nucleus).⁹ Using DNA quadruplex sensor our group recently shown that molecular environment in nucleolus is similar to PEG 200.¹⁰ We calculated destabilization for d(ACTG)₃ and d(ACTG)₄ in different PEG 200 conditions using the universal parameters and found that in 50% PEG 200 at 100 mM NaCl destabilizations were 2.0 and 2.8 kcal mol⁻¹, respectively, that agreed well with the reported values. Reported lower destabilization for d(ACTG)₄ may be due to greater stabilization by excluded volume effect for longer sequence. Therefore, the NN parameters in 50% PEG 200 with 100 mM NaCl are suitable for predicting DNA stabilities inside the nucleolus, suggesting applicability of the parameters for intracellular organelles.

7. Summary

We determined the universal NN parameters for DNA duplex stability applicable for diverse crowding conditions. Our results indicated that thermodynamic parameters in any target region of a cell could be estimated using our universal NN parameters in the presence of a cosolute that can simulate the target region. Therefore, our developed parameters will be useful not only for developing novel technologies but also for investigating biological reactions controlled by specific intracellular crowded conditions.

Acknowledgement

I would like to thank JSNAC for providing me the opportunity to share my research in the Journal of JSNAC. I am thankful to Professor Naoki Sugimoto and all the members of FIBER, Konan University, for their valuable suggestions and help during my research. Finally, I appreciate JSPS International Fellowship (19F19337).

References

1. S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2733.
2. I. Tinoco Jr., P. N. Borer, B. Dengler, M. D. Levine, O. C. Uhlenbeck, D. M. Crothers, J. Gralla, *Nat. New Biol.* **1973**, *246*, 40.
3. S. Ghosh, S. Takahashi, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, S. Hazra, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 3284.
4. S. Ghosh, S. Takahashi, T. Ohyama, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 14194.
5. J. SantaLucia Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 1460.
6. S. Nakano, H. Karimata, T. Ohmichi, J. Kawakami, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14330.
7. E. Rozners, J. Moulder, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 248.

8. C. H. Spink, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1999**, 38, 496.
9. T. J. Nott, T. D. Craggs, A. J. Baldwin, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 569.
10. S. Takahashi, J. Yamamoto, A. Kitamura, M. Kinjo, N. Sugimoto, *Anal. Chem.* **2019**, 91, 2586.

2021年7月28日 受領

2021年9月27日 採択



Genomic medicine: Ultra-small Nanocaplets for drug delivery applications

~siRNA-templated polymerization~

P. K. Hashim

The University of Tokyo

(hashim@macro.t.u-tokyo.ac.jp)



Abstract: A novel and versatile approach of biomolecule-templated oxidative polymerization to prepare ultra-small nanocaplets for delivery application is discussed in this commemorative review article. A water-soluble Gu^+ monomer bearing two thiol termini undergoes disulfide polymerization upon oxidation in the presence of a biomolecule (e.g., siRNA, protein)-template to form polymer-siRNA/protein complexes (nanocaplets). The disulfide polymers obtained by oxidative polymerization can be cleaved in a reductive medium. Due to their small size, the nanocaplets can enter into living cells and release the payload in glutathione (GSH)-rich cell cytoplasm. The nanocaplets also can be functionalized with targeting ligands for site-selective delivery applications.

1. Introduction

Disaster diseases such as cancers, viral infections, and Alzheimers affect millions of people worldwide accounting for several million deaths [1]. Sadly, treatment strategies and drugs available for treating these diseases are highly limited and also have several limitations, for instance, widely used chemotherapy via administration of a small-molecule-based drug causes hair loss of the patient due to non-targeted interactions of the drug with hair follicles. Genomic medicine is an excellent alternative that uses a 'gene fragment' as a pharmaceutical agent and applies to any disease. However a 'delivery carrier' is essential to protect the gene from enzymatic degradation upon *in vivo* administration [2]. Importantly, the 'carriers' can be manipulated artificially either by biological or chemical methods considering few factors such as adhesiveness, surface charge, size (nanometer range), and degradability (pH, reductive, enzyme etc). The outstanding discovery of small interfering RNA (siRNA), which selectively cleave target gene during protein transcription, lighten up the research area of RNA drug [3]. This brief review discusses the design and construction of polymer-siRNA complexes (siRNA-nanocaplets) smaller than 10 nm, which have the characteristics (size, charge, and degradability) of a 'small molecule drug'. A 'template-assisted oxidative polymerization' approach, where a water-soluble Gu^+ monomer bearing two thiol termini undergoes disulfide polymerization upon oxidation in the presence of a siRNA-template to form polymer-siRNA complexes (siRNA-nanocaplets) (Figure 1) [4]. The

disulfide polymers obtained by oxidative polymerization can be reductively cleaved in glutathione (GSH)-rich media such as cytoplasm. The nanocaplets can be functionalized with targeting ligands for site-selective delivery applications. I also discuss the generality of the 'template-assisted oxidative polymerization' approach to prepare nanocaplets using any templates having an anionic surface.

2. Synthesis of reductively cleavable siRNA-nanocaplets via 'template-assisted oxidative polymerization'

For the siRNA delivery purpose, carriers based on lipids, polymers, or capsids have been developed [5, 6], however, the siRNA/carrier conjugate was mostly in the size range of 100–200 nm. This size regime may be good for enhanced permeation and retention effect, which is one of the biological methods of drug/carrier accumulation at a diseased site. Small size drug/carrier conjugate is advantageous for tissue/cellular internalization especially to a remote area such as brain, however, the design of a small size drug/carrier conjugate is extremely challenging. I recently developed a method 'template-assisted oxidative polymerization' that can produce siRNA/carrier conjugate with a size of 7 ± 2 nm [4]. Previously, template polymerization has been exploited to prepare molecular weight-controlled polymers. For template polymerization, the monomer units are organized on a template by non-covalent interaction and they are polymerized in the presence of an initiator.

The key design in this approach is a water-soluble telechelic dithiol monomer ($^{\text{TEG}}\text{Gu}_4$) carrying multiple guanidinium ions (Gu^+) [7]. In the presence of siRNA as a template $^{\text{TEG}}\text{Gu}_4$ monomer can form multiple 'salt-bridges' with the phosphate ion parts of siRNA and undergo a disulfide-mediated polymerization via terminal thiol moieties resulting in a thin layer of polymer around the siRNA template. The alkoxy spacer between two adjacent Gu^+ ions, number of Gu^+ in a monomer, and ethylene glycol segment of the monomer are important to achieve the 'template' effect. Gu_4 monomer without the ethylene glycol segment, $^{\text{HEG}}\text{Gu}_2$ with only one heptaethylene glycol moiety between two Gu^+ ions did not adhere to the siRNA template to form nanocaplet. The nanocaplet contains multiple disulfide bonds that can be cleaved by reductants. In the presence of glutathione or dithiothreitol, siRNA was quickly released from the nanocaplet due to the breakage of disulfide bonds.

The average diameters of siRNA-containing 'nanocaplets' were 7 ± 2 nm as evidenced from the dynamic light scattering, fluorescence correlation spectroscopy and transmission electron microscopy experiments (Figure 1). The small size of the nanocaplets was advantageous for their cellular uptake. To visualize, a dye-appended siRNA-nanocaplet was incubated with Hep3B cancer cells and imaged by using confocal laser

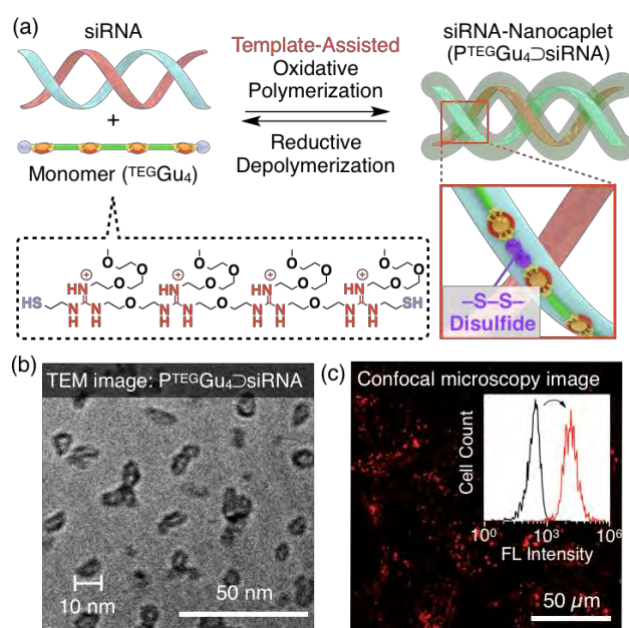


Figure 1. (a) Oxidative polymerization of $^{\text{TEG}}\text{Gu}_4$ with siRNA as the template. TEGGu₄ adheres to siRNA via salt bridge interaction and undergoes oxidative polymerization to form siRNA-nanocaplet. P^{TEG}Gu₄ depolymerizes under reductive conditions. (b) A cryogenic TEM image of siRNA-nanocaplet. (c) A confocal laser scanning microscopy image of Hep3B cells after a 24-h incubation of siRNA-nanocaplet at 37 °C in culture medium.

scanning microscopy, where it showed intense fluorescence originating from the dye (Figure 3c). As the intracellular environment is highly reductive due to the presence of glutathione (8 mM), the nanocaplet can be cleaved off inside the cells to release siRNA for knocking down a target gene expression. An experiment using Luciferase expressing Hep3B cells confirmed the knockdown activity of a target luciferin gene by the delivered siRNA. The small size siRNA/carrier conjugates have huge potential for delivering siRNA into place where conventional drug delivery system cannot access. Towards this direction, one plausible design is glucose-containing siRNA-nanocaplet that can target glucose receptors on blood brain barrier (BBB).

3. Synthesis of transferrin-appended nanocaplet for transcellular siRNA delivery into deep tissues

Tissue-permeable nanocarriers for small interfering RNA (siRNA) are essential for the realization of RNA interference (RNAi)-based gene therapy for diseases that develop in deep tissues at depth of $>40 \mu\text{m}$ from the vascular endothelium. For instance, metastatic cancers often spread over tissues at depth of up to $\sim 300 \mu\text{m}$ from blood vessels [8]. For the purpose of achieving transcellular delivery of siRNA into deep tissues, the carrier is preferred to be as small as possible and needs to be reductively cleavable in the cytoplasm. Furthermore, it should be active for transcytosis (consecutive endocytosis/exocytosis events). Combining all these characteristics into a single delivery system and achieving siRNA delivery into tissues deeper than $40 \mu\text{m}$ is extremely challenging. For this purpose, together with a student colleague, I developed a siRNA-containing nanocaplet appended with transferrin (Tf) units ($\text{Tf}^{\text{Nanocaplet}}$), which can deeply deliver siRNA into tissues at depth of up to nearly $70 \mu\text{m}$, unprecedentedly (Figure 2) [9].

To synthesize $\text{Tf}^{\text{Nanocaplet}}$, we first prepared a siRNA-containing reactive nanocaplet ($\text{Az}^{\text{Nanocaplet}}$) by oxidative polymerization of AzGu , an azide (N_3)-appended telechelic monomer (Figure 2). Then, $\text{Az}^{\text{Nanocaplet}}$ was allowed to react with a guanidium (Gu^+)-appended bioadhesive dendron (Glue-alkyne) followed by a benzophenone (BP) derivative (BP-alkyne) to obtain an intermediate conjugate. Subsequently, this conjugate was incubated with Tf and exposed to UV light for covalent immobilization of the attached Tf units by reacting with the BP units. siRNA encapsulation within the nanocaplet and its release in responds to a reducing agent were confirmed by agarose gel electrophoresis. The average hydrodynamic size obtained from DLS and electron microscopy was $\sim 20 \text{ nm}$ (see TEM image in Figure 2).

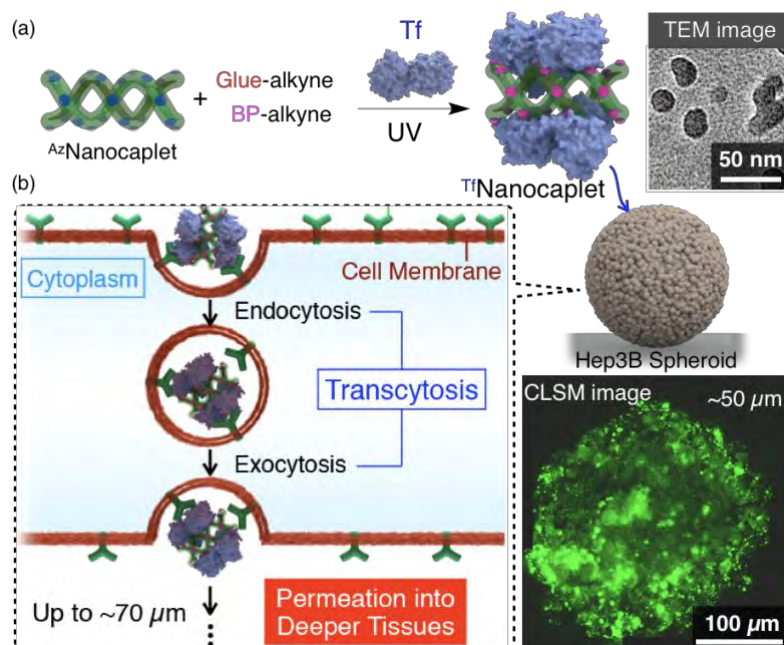


Figure 2. (a) Synthesis of a siRNA-containing nanocaplet appended with transferrin (Tf) units ($\text{Tf}^{\text{Nanocaplet}}$). (b) Permeation of $\text{Tf}^{\text{Nanocaplet}}$ into cells located in a deep area of Hep3B spheroid via Tf-mediated transcytosis. CLSM image of the spheroid after incubation for 3 days with $\text{Tf}^{\text{Nanocaplet}}$.

Tf Nanocaplet efficiently entered living cells as evident from the confocal imaging of Tf Nanocaplet-treated Hep3B cells with an Alexa 488 dye labeled Tf Nanocaplet (Tf Nanocaplet^{A488}). When the Tf units in Tf Nanocaplet^{A488} were replaced with bovine serum albumin (BSA), the fluorescence emission from Hep3B cells was negligibly weak despite its comparable size and surface charges of BSA or Transferrin appended on the nanocaplet, indicating the transferrin receptor-mediated endocytosis mechanism for the cellular entry. To investigate transcytosis mechanism, we prepared a 3D-cultured Hep3B spheroid with an average diameter of $\sim 500 \mu\text{m}$ (Figure 2) and incubated with Tf Nanocaplet^{A488}. After 3 days of incubation, the spheroid fluoresced throughout its cross sections of microscopy (CLSM) imaging at depth of $50 \mu\text{m}$ (Figure 2). Importantly, even at depth of $70 \mu\text{m}$, Tf Nanocaplet^{A488} reached the central part of the cross section, indicating the deep permeation of Tf Nanocaplet^{A488}. Moreover, Tf Nanocaplet eventually transfers siRNA into cytoplasm and causes RNA interference and gene knockdown, as evidenced from the suppression of target luciferase gene expression in Hep3B cells.

4. Generality of the 'template-assisted oxidative polymerization' method

a) Polymer coating of a DNA-origami template

'DNA origami' involves the programmed folding of single-stranded deoxyribonucleic acid (DNA) into ordered nanostructures using smaller staple strands via Watson-Crick base pairing. Nanostructures derived from DNA origami can potentially be used as drug delivery systems (DDS) for diagnostics and therapeutics applications because of their tunable three-dimensional (3D) shape and excellent biocompatibility [10]. In principle, hydrophilic or hydrophobic drugs can be encapsulated during the origami process and released at the diseased site. However, recent reports heavily discuss the instability of DNA origami nanostructures in the presence of biological enzymes [11]. Hence the poor structural integrity of nanostructures in physiological conditions must be addressed for the practical application of DNA origami as DDS. As discussed above, water-soluble telechelic dithiol monomer carrying multiple Gu^+ can form multiple 'salt-bridges' with the anion such as phosphate ion/carboxylate ion of a template. DNA origami nanostructures have several exposed phosphate ions, hence the method of 'template-assisted oxidative polymerization' method could be applicable to prepare a polymer layer on their surface. We have tested 'template-assisted oxidative polymerization' of a Gu^+ ion monomer by using a 6-helix DNA bundle and found interesting results.

b) Polymer coating of a protein template

Many of the diseases are directly associated with protein malfunctions [12]. One plausible way is to deliver active forms of proteins that replace the diseased one [13]. However, most of the protein's surface is highly anionic and cannot permeate across the negatively charged cell membrane. Hence for the delivery applications, proteins first need to be conjugated with a molecular component, for instance, lipids or polymers that cover the protein surface and helps its migration into the cells [14]. We investigated whether protein could act as a template for oxidative polymerization of Gu^+ -appended monomers bearing thiol termini. After careful optimization of monomer design, we succeeded in the synthesis of a polymer shell around a target protein (protein-nanocaplet) [15].

5. Summary

I have briefly discussed the design strategy of 'template-assisted oxidative polymerization' to prepare ultra-

small nanocaplets for the delivery of siRNA. The strategy comprised of non-covalent adhesion of a water-soluble Gu^+ monomer onto anion surface of the template that undergoes disulfide polymerization in the presence of an oxidizing agent. The polymer/template conjugate was a nano-sized caplet, and the polymer layer was able to protect the siRNA template against enzymatic cleavage. The nanocaplet containing siRNA was efficiently internalized into cancer cells, underwent depolymerization by cellular glutathione thereby deliver siRNA for gene knockdown via RNA interference. The nanocaplet was functionalized with transferrin targeting ligand for deep tissue penetration via transcytosis mechanism. Moving forward, 'template-assisted oxidative polymerization' method can be potentially used for several applications that cannot be achieved by other methods such as brain targeting delivery carriers, DNA-origami coating etc.

6. Acknowledgment.

This work could not be conducted without the fruitful discussion with Professor Takuzo Aida, Associate Professor Kou Okuro, and the hard work of graduate student Ai Kohata. I am also very grateful to many co-researchers and technical expertise. I greatly appreciate the financial support from Grant-in Aid for Early-Career Scientists.

7. References

1. World Cancer Report 2014
2. Miyata, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2562.
3. Fire, A.; Xu, S. Q.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391*, 806.
4. Hashim, P. K.; Okuro, K.; Sasaki, S.; Hoashi, Y.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15608.
5. Wagner, E. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1005.
6. Sykes, E. A.; Chen, J.; Zheng, G.; Chan, W. C. W. *ACS Nano* **2014**, *8*, 5696.
7. Mogaki, R.; Hashim, P. K.; Okuro, K.; Aida, T. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6480.
8. Nacev, A.; Kim, S. H.; Rodoriguez-Canales, J.; Tangrea, M. A.; Shapiro, B.; Emmert-Buck, M. R. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 2907.
9. Kohata, A.; Hashim, P. K.; Okuro, K.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2862.
10. He, L.; Mu, J.; Gang, O.; Chen, X. *Adv. Sci.* **2021**, *8*, 2003775.
11. Hahn, J.; Wickham, S FJ.; Shih, WM.; Perrault, SD. *ACS Nano* **2014**, *9*, 8765–8775.
12. Uversky, V. N., Iakoucheva, L. M. and Dunker, A. K. *Protein Disorder and Human Genetic Disease. eLS*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester 2012.
13. Z. Gu, A. Biswas, M. Zhao, Y. Tang *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 3638–3655.
14. K.Y Lee, S. H Yuk, *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 669–697.
15. Hashim, P. K et al. *to be submitted*

2021年 10月10日 受領

2021年 10月28日 採択

和歌山の端っこで核酸化学をつぶやく？

和歌山大学大学院 システム工学研究科 坂本 隆

本年10月に和歌山大学よりテニユアをいただき、とりあえず和歌山に根を下ろすことが確定いたしました。この場を借りて、これまでお世話になった先生方に心より御礼申し上げます。また、本稿執筆の機会をいただきました編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

まずは自己紹介を。私の核酸化学との出会いは約25年前(・・・四半世紀？びっくりします。そりゃあ薄くも白くもなるはず)、大学3年生の頃の村上章先生(現・京都工芸繊維大学 名誉教授)(図1)の講義でした。当時、「核酸」などには全く興味のなかった私が、後の四半世紀にわたって核酸研究に携わるきっかけとなったのがこの講義でした。

「核酸ってすげえ。研究やるなら村上研以外ありえん！」

そう考えた私は、研究室配属で村上研にスベリ込み、なんとか核酸の研究(立体制御されたホスホロチオエート型オリゴDNAとタンパク質との相互作用を調べる研究)を始めることができました。当時、村上研には山岡哲二先生(当時講師)(現・国立循環器病センター研究所 部長)と岩瀬礼子先生(当時助手)(現・帝京科学大学 教授)に加え、偉大な先輩方(木村剛先生(当時M2きむっち)(現・東京医科歯科大学(岸田研) 准教授)、嶋田直彦先生(当時M2しまりん)(現・東京工業大学(丸山研) 助教)、山吉麻子先生(当時M1よっさん)(現・長崎大学 教授)、馬原淳先生(当時M1まはこ)(現・国立循環器病センター研究所 室長)(図1)がおられ、研究も含めて本当に多くのことを学ぶことができました。当然、楽しすぎたので自然と博士後期課程に進み、4年かけて2005年になんとか学位をいただくことができました。暖かくも厳しい村上先生のご指導により、研究者としての心得を会得できたものと深く感謝しております。また何より上記の先輩方が育ったような「新しい才能を育む場」を作り出されていたことに、研究室を主宰する立場となった今、改めて「すごい。どうやってはったんやろ？」と思っております。



図1. まはこ(馬原先生)と筆者で開発した遺伝子検出装置 OMUPy(オムピー)の完成を喜ぶ3人。左から、馬原先生、村上先生、筆者(約18年前)

さらに2年間、博士研究員として村上研で働いた後、一旦、核酸を離れてみることにし、当時助教をされていた小堀哲生先生(現・京都工芸繊維大学 教授)のススメもあり、浜地格先生(京都大学 教授)の研究室の王子田彰夫先生(当時講師)(現・九州大学 教授)のグループで、博士研究員として神経変性疾患の原因タンパク質に対する低分子蛍光プローブの開発研究に携わりました。浜地研ではガンガンに有機合成を行うので、浅い有機合成の経験しかなかった私は大変苦労しました。当時M1だった野中洋先生(現・京都大学(浜地研) 准教授)や、同じくM1だった高岡洋輔先生(現・東北大(上田研) 准教授)にフラッシ

ユカラムのやり方を教わったほどです。浜地研での2年間は本当にいろんな経験をしました。脳組織切片の免疫染色や、遺伝子工学を用いたタンパク質合成、ラットの脳血管の灌流手術(1度だけ成功したが会得するには至らなかった)など、有機合成以外にもたくさんを学ぶことができました。ご存知の通り、当時から勢いのあった浜地研(築地真也先生(現・名古屋工業大学 教授)がポスドク、池田将先生(現・岐阜大教授)が助教として在籍)ですが、今はさらにビッグな研究室になり、独自の細胞内有機化学のテクニックを使い、脳機能解明へと繋げる研究に取り組まれているようです。非常にアクティビティーの高い研究室での2年間の経験は、技術的な面だけではなく、自身の後の人脈形成や研究姿勢に大きく影響を与えたように思います。

2年後の2009年6月、藤本健造先生(北陸先端科学技術大学院大学 教授)に拾っていただき、助教として人工核酸の光化学反応の研究に取り組みました。大学入学から13年間京都に暮らしていた私は、北陸(特に北陸先端大周辺)の「田舎っぷり」に驚愕したことを覚えております。単線の揺れの激しい電車を終着駅の「鶴来駅」(北陸先端大の最寄り駅)で降りると、眼前には山、やま、ヤマ。たまにイノシシも出るというド田舎でした。ただ、田舎には田舎の良さところがありまして、否応なく自動車運転免許も取得できましたし、雪道でスリップしながらカーブを曲がる腕も磨かれました。何より、他に遊ぶところのない山深い立地の大学ですので、研究に集中できます。装置が充実しており、何より自由に研究をさせていただいたこともあって、オリジナルの仕事(フッ素NMRを用いた、核酸をはじめとする生体分子の同時一斉検出系の開発)も、6報ほどの論文にすることができました。

そして5年前の2016年10月にテニュアトラック准教授として和歌山大学に着任し、現在、独立した研究室を運営するに至っております。振り返ると、村上研での人との出会いや、浜地研での多様な経験、藤本研で自由に研究に取り組めたことが、今の環境に繋がっているのだなと感慨を覚えるとともに、諸先生方への感謝の念が沸き上がってまいります。

さて、現在の研究室も立ち上げてから5年が経過しました。前職の北陸先端大・藤本研から移設させていただいた装置や、前任の教員が残していったくれた装置のおかげもあり(図2)、なんとか研究を進められる環境を整えることができました。また、真面目で素直な学生(これは良いことなのか?)が多く、昨年度は初めてとなるM2(2名)を無事に送り出すことができました(新型コロナの影響で、お祝いの酒宴を催せな



図2. 現在の研究室の様子。狭いながらもドラフトが3台あり、一般的な有機合成なら十分行えます。また、吸収・蛍光スペクトル解析や T_m 測定、ゲル電気泳動、PCR など、核酸研究を行える最低限の環境を整えることができました。写真には写っていませんが、オートクレーブ、ディープフリーザー、冷却遠心機、凍結乾燥機なども揃っています。

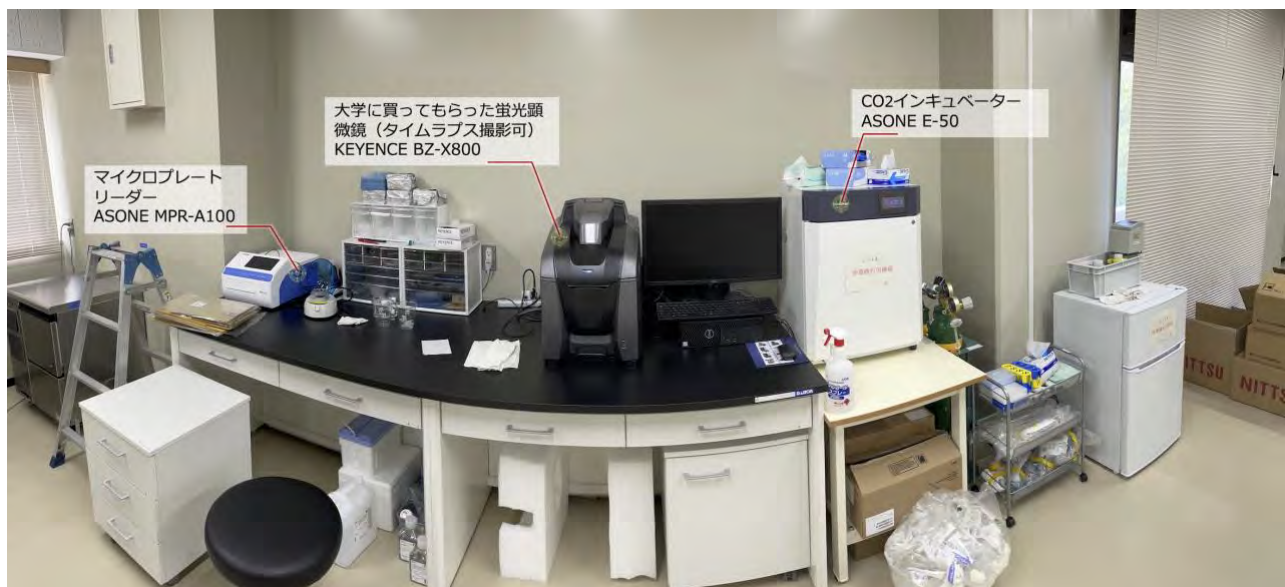


図3. 半ば強引に間借り(占拠?)している食農総合研究教育センターの実験室の一面。最近、耐震補強工事が完了した教育学部の建物内にある実験室なので、とてもキレイです。映ってはいませんが右方向に10メートルほど移動するとクリーンベンチがあり、そこで細胞を取り扱う実験を行っています。

かったのが残念です)。現在、核酸をターゲットとする低分子蛍光プローブの開発に取り組んでおり、まだ世の中になく新発想の蛍光プローブを生み出そうと努めております。最近ようやく結果が出始めまして、2重鎖DNAに結合した場合と4重鎖DNAに結合した場合で、異なる波長の蛍光で応答するスイッチオン型の蛍光プローブを見出すことができました。しばらくはこのヘンテコな蛍光プローブを軸に、核酸研究を展開できればと考えています。

和歌山大学はまさに和歌山県の「北の端」。ほぼ大阪との境目に立地しております(図4)。また和歌山大学には生物系の化学をやっている教員はほぼ皆無で、山吉先生のように核酸化学を叫んだとて(「長崎の中心で核酸化学を叫ぶ」日本核酸化学会誌 Vol. 2 (2018 November) 31-34)、残念ながら誰にも届きそうにありません。Twitterでも始めて、「和歌山の端っこで核酸化学をつぶやく」のも良いかな?と考える今日この頃です。



図4. 和歌山県における和歌山大学の位置。本学は和歌山県の最北部に位置することもあって、大阪から来る学生が半分近くになるようです。県内でのプレゼンス向上のためにも、地域に密着した研究も模索しているところです。

日本核酸化学会誌, Vol. 5 (2021)

2021年11月10日 発行

発行人 日本核酸化学会

編集委員 杉山 弘、中谷和彦、井川善也、井原敏博、山吉麻子

事務局 和田健彦（東北大学多元科学研究所）

E-mail: hiko@tohoku.ac.jp

Tel: 022-217-5608

問合せ 山吉麻子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

E-mail: asakoy@nagasaki-u.ac.jp

Tel & Fax: 095-819-2438

* 本誌掲載記事の無断複製・転載を禁じます。