

Journal of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry

日本核酸化学会誌

Vol. 6, 2022

巻頭言

無限の可能性を求めて

関根光雄

寄稿

核酸化学会賞受賞者（2021）からの記念寄稿

北出幸夫／篠塚和夫

総合論文

講演賞受賞者（2021）の最新研究

岡村秀紀／橋谷文貴／Jie Xu

学会報告

第48回国際核酸化学シンポジウム（ISNAC 2021）
／日本核酸化学会第5回年会 開催報告

中谷和彦



Contents

目次

- 巻頭言 無限の可能性を求めて
／関根光雄 **1**
- 寄稿 糖鎖リガンド架橋型 RNA ライブラリーの創製
／北出幸夫 **3**
- 核酸をめぐる旅 (アンチセンス研究事始め)
／篠塚和夫 **9**
- 研究論文 メジャーグループで互いを認識する人工塩基対の創製
／岡村秀紀 **16**
- 化学を基盤としたゲノムスケール DNA 合成手法の開発
／橋谷文貴 **22**
- Exploring the Dynamics of Nucleic Acids at the Single-Molecule Level
Using Triplet-Triplet Energy Transfer Kinetics
／Jie Xu **28**
- 学会報告 第 48 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2021) /
日本核酸化学会第 5 回年会 開催報告
／中谷和彦 **35**

巻頭言

無限の可能性を求めて

東京工業大学名誉教授 関根光雄

2019年に発生した新型コロナウイルス感染は、今年もまだまだ相変わらず収束せず3年目を迎えようとしている。このウイルスの本体は一本鎖の RNA である。思いがけなく、核酸化学の重要性がこのウイルスのパンデミックによって改めて喚起されたと言えよう。mRNA ワクチンも人工的に合成されたスパイクタンパク質をコードした修飾 mRNA が活用されている。

核酸の化学合成に長年携わってきた筆者としては、核酸をいかにして効率よく、より機能強化したものを創出するという研究がようやく花開いたことに万感の思いを抱く限りである。最近、遅ればせながら、「東工大でのメッセンジャー RNA の化学合成の歴史」というものを大学博物館に寄稿した (http://www.cent.titech.ac.jp/Publication_Archives/pg702.html から DL 可能)。本学会の前身である核酸化学シンポジウムが創立された頃から私の恩師の畑辻明先生の研究室から引き続いて私の研究室でも実施してきた様々な基礎研究の歴史をまとめたものであるが、何かの参考になればと思い一読をお勧めする。

この mRNA の化学合成では、できるだけ自前で開発した合成技術を駆使することを念頭に行ってきたものである。この精神は恩師の恩師である向山光昭先生から受けた薫陶によるところが大きい。向山先生は日頃、“ひとのモノマネはするな。明るく、情熱をもってとことん研究をしていれば自ずとアイデアは無限大に浮かんでくる。”というような言葉をよく言っていた。悩んでいる時間があれば、ちょっと条件を変えて少しでも多く実験をすればその結果に基づき、次の実験の段取りがでてくるものであるとの趣旨である。私も、この行動原理にもとづき、どんどん実験を重ねると、ある日突然何か新しい事象に辿り着くことが多く、その度に有機化学の醍醐味を満喫した覚えがある。

重要なのは、うまくいった実験結果ではなく、ネガティブデータの積み重ねを有効に次の実験に生かす失敗を恐れない柔軟な思考力である。失敗ばかりしてがっかりしている学生さんには、そのネガティブデータは世界中で本人しか知りえない貴重な知見で、次の実験の備えのために役立つものと捉えれば、決して無駄ではないと言いたい。私の学会デビューは学部や修士課程の学生のときでなく、博士課程1年生のときであった。それまでの3年間は、ネガティブデータの山で実験ノートも6冊を超えていた。初めて口頭発表したのは、第2回核酸化学シンポジウムであった。実に遅咲きである。

筆者は、退職間際まで生命理工学研究科長をして、当時大学の研究教育改革の真只中であつたこともあり、退職年度の3月31日の夜10時頃まで教員選考委員会の都合で実務をせざるをえなかった。そのため、退職記念会ではよくある研究をまとめたような冊子を作る時間が全くなかった。そのため、今頃、この核酸化学での人生をまとめようと思い立ち、昔の実験ノートを開けてみると、とくにネガティブデータとなった実験はほとんどすべて覚えている。何故か、うまくいった実験を論文にしたものの方がかえって忘れてる。

若い研究者の皆さん、何か目標があれば、常に前向きに研究を進めることが肝要である。決して諦めなければ、蓄積されたネガティブデータからでも新しい違った研究の可能性も引き出せるかもしれない。柔軟に考えれば、研究には無限大の可能性がある。安直に新しい戦術が報告され、それに直ぐに飛びつくよりも、根気よいねばりで、オリジナルな戦略を見つけて欲しいと思う。

筆者は、退職後、後輩の邪魔をしたくない思いもあり、核酸化学とは縁もゆかりもない 180°正反対の研究をしようと考え、現在古文書解読研究を本格的に楽しんでいる。今年で8年目を迎えるが、学生で言えば博士課程2年生に相当する。真面目にやっているのだから、早期卒業できそうである。この分野は退職という概念がないので、後の人生はプロフェッショナルとしてこの異次元分野で活動する予定である。

核酸化学の方はいつの間にか忘れそうであるが、幸い今でも企業の研究コンサルタントをしたり、大学の非常勤講師として有機化学を教えているので、まだまだ何かのお役に立てればと思っている。古文書解読作業は、脳細胞を繰り返し刺激するので、自分でも意外と記憶力は現役のときと同じように維持しているように思う。したがって、当分は核酸化学と古文書解読の二刀流でいこうと決意している次第である。

この古文書解読は一見、核酸化学に無関係に見えるが、やってみると核酸の構造を IR や NMR などのスペクトルをとったとき、そのピークが何に帰属するのか解析することがあるが、まさに、くずし字のわけの分からない字形をその色々な要素をみて解析することは、基本的に従前の分析化学とよく似ている。しかも、最近では人工知能で古文書を自動解析することが盛んに研究されている。これもある意味で HPLC-MS による核酸のマイナーピークの自動構造解析と相通じるところがある。解析のための手段としてどのようなことが可能であるかが私の取り組んでいる課題でもある。なかなか手ごたえのある分野である。

さて、どうしてこのような畑違いの分野に興味をもったかであるが、筆者が助手の頃、国際天然物化学という会議がオランダのハーグ市で開催され、そのとき阪大理学部化学科の芝哲夫先生とご一緒になり、先生が阪大で緒方洪庵の適塾の古い資料を研究されていてその関係でライデン大学のシーボルトが持ち帰った日本の物品の展示室に出入り自由ということを知ったことが最初の切っ掛けである。先生のお話は大変おもしろく、筆者も機会があったら、このようなこともやってみたいなと臆げながら考えていた。この覚えを退職半年前に思い出し、恐る恐る行動に至った次第である。

最後に、日本で初めて「実験」という言葉を使った幕末の開国論者で先見の明があった佐久間象山のような人材が本学会に出現することを心待ちにしている。この人物、顔はちょっと怖いので誤解されることが多いのであるが、中身は論理的かつ世界を俯瞰して見える卓越した眼力がある。当時、西洋からの科学に関する洋書を集め独学で読みこなし、日本では誰も見たことのない地震計や電気衝撃器を自分の手で作り出している。研究に対する探究心と門人を育てる圧倒的な人材育成力は向山先生ばりである。このような心意気を感じるような研究者が日本核酸化学会でも是非欲しいところである。これは兎も角、日本核酸化学会がオリジナルの研究発表の場として、益々世界に認められ発展することをひたすら祈念して筆を置く。

糖鎖リガンド架橋型 RNA ライブラリーの創製

愛知工業大学 北出幸夫

ヒトゲノムプロジェクトは1990年に開始され2003年に終了したが、ヒトの遺伝子数は予想に反して22,000程度であることが判明した。これは、ヒトゲノムのわずか2%であり、残りの98%は不用である non-coding 領域と考えられていた。しかし、近年の研究により、non-coding 領域の大部分が RNA に転写され、non-coding RNA (ncRNA) 自身が生体内で様々な生体機能をもつことが明らかになってきた^{1), 2)}。その中で、small interfering RNA (siRNA)は、RNA 干渉 (RNA interference) による遺伝子発現抑制機構であり、生体外から導入された siRNA が生体内で相補的な配列を含む mRNA の遺伝子発現を抑制する。核酸医薬は、疾患に関わるタンパク質を標的とする抗体医薬と異なり、mRNA を標的とする。そのため、標的とする遺伝子配列さえ分かれば容易に核酸医薬を分子設計することができ、抗体医薬の次にくる新たなモダリティとして期待されている。核酸には、細胞膜透過性や細胞選択性が低いという問題があるため、それらを解決する新たなドラッグ・デリバリー・システム (DDS) の開発が求められている。

受容体の特異的に認識する機能性分子を用いることで、選択性を付与するデリバリー法がある。中でも、細胞膜表面には特定の糖類を認識する受容体が多数存在しており、これら受容体を利用した核酸のデリバリーが研究されている。しかし、糖類と受容体の結合様式は、ほとんど明らかになっていない。そのため、核酸デリバリー分子の探索には、リガンド分子である糖類を架橋した RNA ライブラリーを用いたスクリーニングが有用と考える。そこで本稿では、糖鎖リガンド架橋型 RNA ライブラリーを用いる標的細胞に選択性を有する核酸デリバリー分子の探索法について解説する。

RNA 干渉は、標的遺伝子と相同な二本鎖 RNA (dsRNA)を細胞内に導入すると、標的遺伝子の転写産物である mRNA が特異的に分解されて遺伝子発現が抑制される現象である³⁾。この現象は、米国の A. Fire と C. Mello により1998年に数百塩基対の dsRNA を用いた線虫の実験で初めて発見された⁴⁾。RNAi が発見された当初、約30塩基以上の dsRNA を哺乳動物の細胞内に導入すると、インターフェロン応答によりアポトーシスを誘発するとされ、哺乳動物細胞での RNA 干渉の利用は困難と考えられていた。しかし、2000年 K. Ui-Tei は、ハムスター由来細胞 (CHO-K1) でも RNA 干渉が起こること報告し、哺乳動物の細胞においても RNA 干渉が存在することを示した⁵⁾。その後、2001年に S. M. Elbashir は、21塩基の長さの二本鎖 RNA を導入した場合でも、長鎖の二本鎖 RNA と同様 RNA 干渉が起こることを報告した⁶⁾。これらの発見は、ヒトゲノム研究の分野に変革をもたらし、RNA 干渉が臨床治療に利用可能であることを強く示唆した。

RNA 干渉には、siRNA 経路とマイクロ(mi)RNA 経路の2種類がある。生体外分子である siRNA の二本鎖は完全に相補鎖であるのに対して、生体内分子である miRNA は標的 mRNA との相補性が低くミスマッチ部位やループ部位を有する点に大きな相違点がある。そのため1つの miRNA-RISC 複合体で複数個所の mRNA を標的とすることが可能な点が特徴である。1本鎖に解離した miRNA が mRNA の3' 非翻訳領域 (3'-UTR) を配列特異的に認識することで翻訳を阻害し、遺伝子の発現を調節する^{7), 8)}。これらの siRNA や miRNA の RNA 干渉能を治療へ応用する動きが活発になってきた。

核酸医薬の実現には、細胞膜透過性の改善が必要であるため、様々なデリバリーシステムが開発されている。核酸のデリバリー方法は、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの2つに大別される。ウイルスベクターは、ウイルスが本来もつ細胞への進入機構を利用し、細胞内に遺伝子を導入する方法である。非ウイルスベクターに比べ、遺伝子導入効率が

受容体	糖類	標的細胞	備考
デスミン、 ビメンチン	N-アセチルグルコサ ミン	肝非実質細胞	HeLa細胞でも発現している
CD44	ヒアルロン酸	造血系細胞(リンパ球/ 顆粒球など)、線維芽 細胞、肝細胞など	がん肝細胞において 高頻度で発現亢進し ている
アシアロ糖タンパ ク質受容体	ガラクトース N-アセチルガラクト サミン	肝実質細胞	HuH7細胞、HepG2細胞 など
マンノース-6-リン 酸受容体	マンノース	線維芽細胞	
フコース受容体	フコース	膵がん細胞	腫瘍マーカーCA19-9 に陽性細胞は標的候 補になりうる
グルコース トランスポーター	グルコース	脳内皮細胞 上皮細胞	GLUTは3種に分類 I:グルコース、II: グルコース、フルク トース、III:グルコ ース、イヌリン

表1 各種の糖受容体とグルコーストランスポーター

高いという利点を有する。核酸のデリバリーに用いられるウイルスベクターには、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターなどがある。これら遺伝子導入法では、ウイルスを利用しているため免疫原性等の問題を抱えている^{9), 10)}。

一方、非ウイルスベクターには、カチオン性リポソームやカチオン性高分子などの脂質ナノ粒子 LNP (Lipid Nano Particle) がある。例えばリポフェクタミンで知られるカチオン性ポリマーは、負の電荷をもつ DNA または RNA の周りに正の電荷をもつカチオン性ポリマーが結合して複合体を形成する。次いで、エンドサイトーシスによって細胞表から細胞内に取り込まれる¹¹⁾。これらの脂質ナノ粒子は生体膜の構成成分であるリン脂質を主成分としているため、毒性や抗原性が低い。そのため、ウイルスベクターのもつ免疫原性や細胞毒性などの問題を解決できる利点がある。新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチンの誕生で LNP が一般にも知られるようになった。選択性を付与するデリバリー方法として、受容体を特異的に認識する機能性リガンド分子を用いる方法が検討されている。葉酸受容体は、卵巣や腎臓、脳、肺などのヒト腫瘍細胞に過剰発現しており、正常細胞にはほとんど発現していない。2017年、A. Ohyama らは β -シクロデキストリンと葉酸-PEG (Fol-P α C)、血中安定性を付与するための硫酸化多糖類サクラン (44,889 Da-1,488,281 Da) からなる複合体 (Fol-P α C/siRNA/sacran) を開発し、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん細胞) に選択的に取り込まれて遺伝子発現を抑制することを報告している¹²⁾。

細胞膜表面には特定の糖類を認識する受容体などが多数存在しており、これらの糖類の認識を利用した核酸のデリバリー法が研究されている。各種糖類を認識する受容体やグルコーストランスポーターを表1に示した。糖類の受容体としては、肝非実質細胞や線維芽細胞などに分布するデスミンやビメンチンが N-アセチルグルコサミンを、造血細胞系の CD44がヒアルロン酸を、肝実質細胞のアシアロ糖タンパク質受容体がガラクトースや N-アセチルガラクトサミンを、線維芽細胞のマンノース-6-リン酸受容体はマンノースを、膵癌細胞のフコース受容体はフコースを認識する。一方、グルコーストランスポーター (GLUT) は大きく3種に分類できる。また、多くのアイソフォームが存在し、GLUT1,2は脳、GLUT3は神経、GLUT4,12は心臓、GLUT5は小腸に分布していることが知られている。

我々は、2012年に siRNA の 3'-末端にグルコサミン誘導体の導入に成功した。図1にあるように12段階の合成ステップを経て、グルコサミン誘導体の導入用 CPG 樹脂 (12) を合成した。また同様の手法でグルコサミン6位にチミン塩基を導入した CPG 樹脂 (13) も開発した。それらから誘導したグルコサミン置換 RNA はヌク

レアーゼ耐性やトランスフエクシオン効率の増強を示した。しかし本合成法は多段階を要するため、糖鎖リガンドを核酸医薬の3'-末端に導入には更なる改善が必要であると考えた¹³⁾。

一方、S. J. Kimらは2013年に、ポリエチレンジアミンの側鎖に*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を修飾した複合体 (糖修飾ナノ粒子) を開発した。この複合体は、肝星状細胞 (HSC)

においてのみ高い送達能および遺伝子発現抑制能を示すと報告している¹⁴⁾。核酸に糖類を架橋する方法には、更なる検討が加えられた。J. K. Nairらは2014年に、*N*-アセチルガラクトサミン誘導体を修飾した三分岐型RNAがアジア糖タンパク質受容体を介して肝実質細胞へ選択的に取り込まれることを報告した¹⁵⁾。これにより、糖類を核酸に直接架橋することで組織選択性の付与が可能であることが確認されたが、リガンド分子の探索には未だ解決すべき問題点が残る。

そこで我々は、siRNAやmiRNAなどの核酸医薬の3'-末端に糖鎖リガンドを導入したライブラリーの構築を進めるため、核酸合成の最終段階で糖鎖リガンドの導入が可能なクリック反応に着目した。クリック反応は、操作が非常に簡便で、水を含むような条件下でも効率よく進行する。これは2001年にスクリプス研究所のK. B. Sharplessにより提唱された¹⁶⁾。これには、1) 縮合反応 (カルボニル化合物とヘテロ原子を有する化合物との縮合反応)、2) 求核付加開環反応 (ひずみのかかったエポキシドやアジリジンに対するヘテロ原子求核剤による開環反応)、3) Huisgen付加環化反応 (アセチレンとアジドとの1, 3-双極子付加環化反応によるトリアゾール生成反応) の3種類がある。この中で銅触媒を用いた3) のHuisgen環化付加反応が広く利用されている。Huisgen環化付加反応は、1価の銅原子が反応に関与する反応である。2価の銅を用いる場合、銅を1価に還元するために、アスコルビン酸を必要とする。また、1価の銅原子を安定化するため、Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) などの配位子を銅原子に配位させることにより、より効率的に反応が進行すると報告されている。

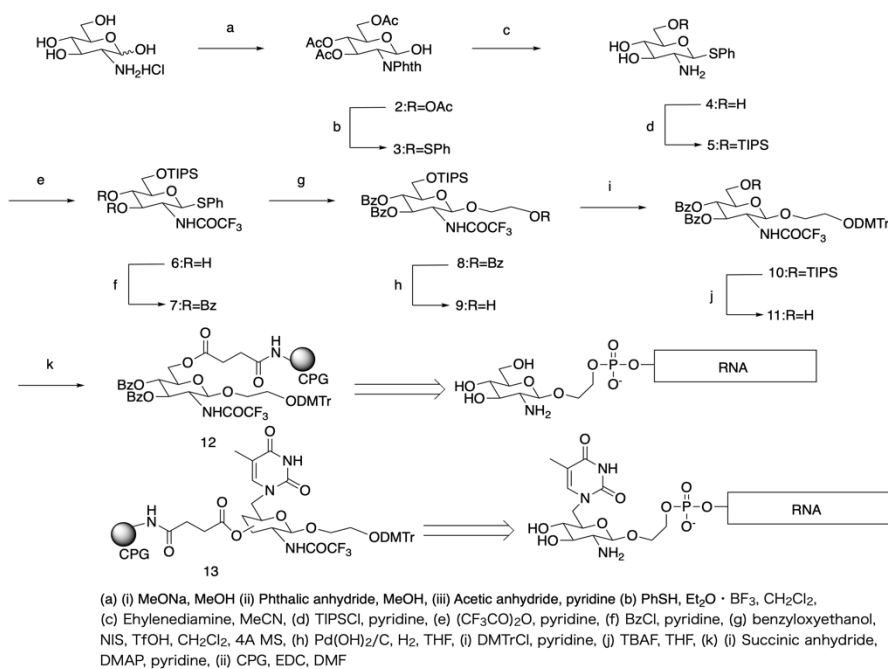


図1 3'-末端にグルコサミン類 (GluN & TGU N) を有するRNAの合成法

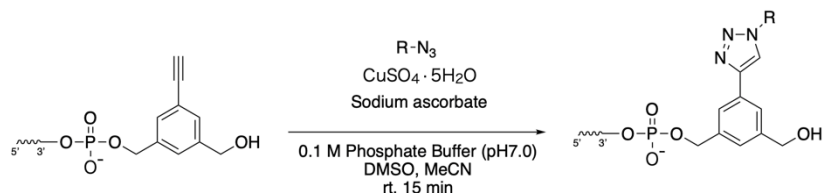


図2 エチニルベンゼン骨格BE修飾RNAのPETラベル化反応

一方、我々は、高価な配位子TBTAを用いることなく、0.1M リン酸 buffer (pH 7.0) を用いることで効率的に ethynylbenzene 基を有する RNA 鎖とフッ素原子を有するアジドベンゼン誘導体とのクリック反応によりトリアゾール架橋体を高収率で合成することに成功した(図2)¹⁷⁾。本法を用いれば核酸医薬の F¹⁸-PET 標識が可能で医薬候補分子の体内分布や代謝を明らかにすることができる。さらに、オリゴペプチドやタンパク質の PET ラベル化を可能とするコハク酸イミド(SI)またはマレイミド(MI)を有するエチニルベンゼン誘導体の開発にも成功した。本法は分子内にジスルフィド結合を有する生体分子にも適応可能であった(図3)¹⁸⁾。

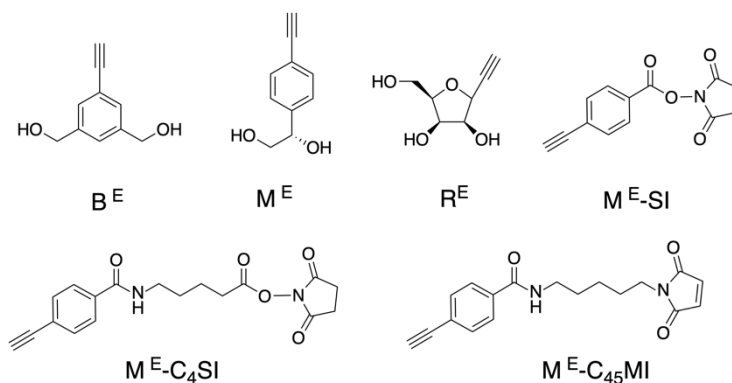


図3 エチニルベンゼン誘導体の構造

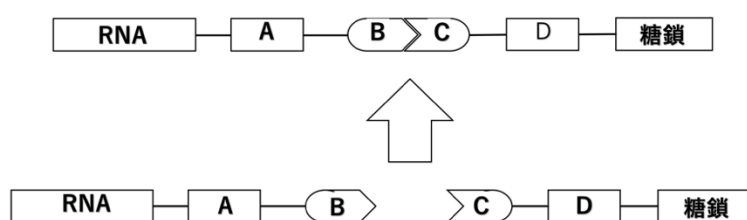


図4 糖鎖リガンド架橋型RNAライブラリーの構造

我々は、アジド基を置換した生体分子とクリック反応が効率的に進行するエチニルベンゼン骨格B^Eに加えてエチニルベンゼン置換型グリコール体(M^E)¹⁹⁾やエチニルリボース体(R^E)²⁰⁾も開発している。ここでは、エチニルベンゼン骨格B^Eを用いたアジド糖類とのクリック反応について紹介する。図4には、ポスト修飾を用いる糖鎖リガンド架橋型RNA創製の概念図を示した。クリック反応の場合、B部にアセチレン残基(エチニル基)を、C部にはアジド基を有することになる。A部およびD部には、多種多様な機能性分子の導入が可能である。

図5には、核酸オリゴマーの3'末端にエチニル基(エチニルベンゼン骨格B^E)を有する4種のRNA3'-末端の構造を示した。すなわち、チミン塩基を2つ導入したTTB^E、1つ導入したTB^E及び3'末端エチニル体B^Eの自由度を向上させるためブタンジオールリンカーを1つ導入したL_{C4}B^E、2つ導入したL_{C8}B^Eを合成した。ここには、ほんの一部の構造式を示したが、実際にはリンカーも含めると多種多様な基を導入可能である。クリック反応に用いたアジド修飾した糖鎖リガンドの一部を図6に示した。

3'末端にエチニル体B^Eを修飾したRenilla Luciferaseセンス鎖にクリック反応を行ったところ、リガンド架橋RNAを好収率で得た。ここでは、40種以上のクリック成績体とCy5でラベル化した相補鎖RNA (Renilla Luciferaseアンチセンス鎖)をアニーリングし、得られたCy5ラベル糖修飾2本鎖RNAを用いて細胞識別能を評価した。まず、糖鎖修飾2本鎖RNAを培養細胞に添加し4時間インキュベートした。細胞を固定化した後、In Cell Analyzerで蛍光強

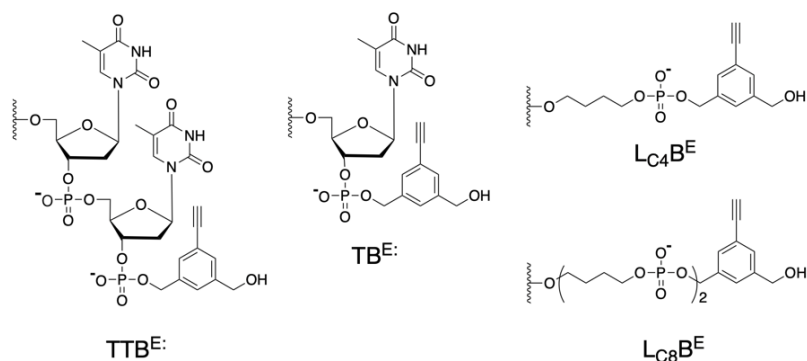


図5 RNA3'-末端エチニル誘導体の構造

度を測定した。蛍光量が高いデリバリー分子は細胞との相互作用が強いことを示し、デリバリー分子の候補といえる。細胞は、MCF7細胞、HuH7細胞、T98G細胞、HeLa細胞を用いた。各細胞のCy5の蛍光量の比較は、ここでは省略したが、ヒートマップで表すと容易である。このライブラリーを用いて調べた結果、特定の糖鎖リガンドの選択により細胞選択性に120倍以上の改善が見られた²¹⁾。

ここでは誌面の都合もあり我々の取組みの一端を紹介したが、実際

には先に示したA～D部に様々な機能性分子を導入することで数百種のリガンド修飾体の合成を可能とした。糖鎖で示した箇所にその他のリガンド分子(一価或多価の生体分子など)を導入したライブラリーの構築にも成功している²²⁾。細胞内への取込みやRNA干渉能に及ぼす影響に関する詳細は別途報告する予定である。

謝辞

本研究プロジェクトは、私が所属した岐阜大学の喜多村徳昭博士、柴田綾博士、愛知工業大学の宮本寛子博士を始めとする多くの教職員、学部学生・大学院生諸氏のご協力のもとに実施されました。本稿の作成には岐阜大学大学院工学研究科生命工学専攻に所属された川出桃歌氏の修士論文を参考にさせて頂きました。また、本稿の作図にご協力頂きました愛知工業大学の川瀬文月さんにお礼申し上げます。

参考文献

- 1) E. Pennisi, *Science*, 2001, **291**, 1177-1180.
- 2) F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.*, 1968, **38**, 367-379.
- 3) Y. Tomari, P. D. Zamore, *Genes Dev.*, 2005, **19**, 517-529.
- 4) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature*, 1998, **391**, 806-811.
- 5) K. Ui-Tei, S. Zenno, Y. Miyata, K. Saigo, *FEBS Letters*, 2000, **479**, 79-82.
- 6) S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.*, 2001, **15**, 188-200.
- 7) G. J. Hannon, J. J. Rossi, *Nature*, 2004, **431**, 371-378.
- 8) D. P. Bartel, *Cell*, 2004, **116**, 281-297.
- 9) S. Hacein-Bey-Abina, C. Von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, *N. Engl. J. Med.*, 2003, **348**, 255-256.
- 10) S. H. B. Abina, C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. S. Lyonnet, S. Romana, I. R. Weiss, F. Gross, L.

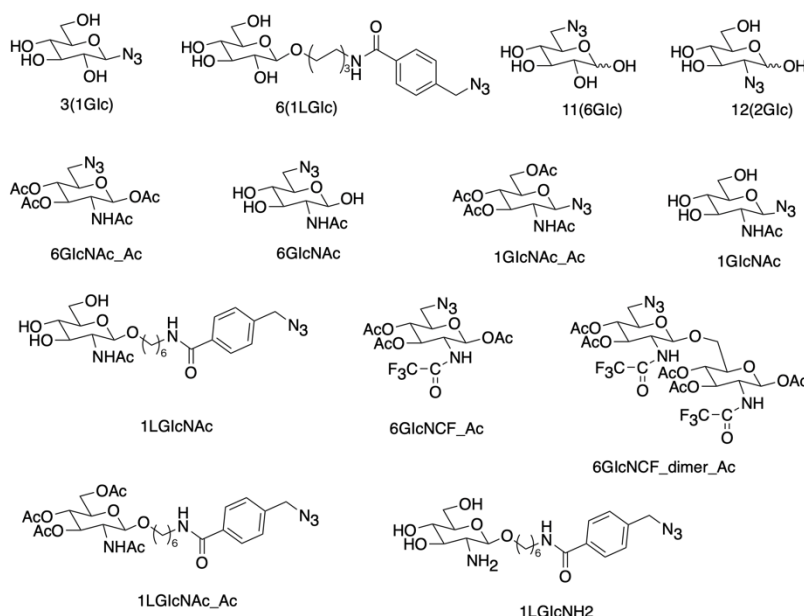


図6 アジド修飾された糖類

- E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, M. C. Calvo, *Science*, 2003, **302**, 415-419.
- 11) D. Zhi, Y. Zhao, S. Cui, H. Chen, S. Zhang, *Acta Biomater.*, 2016, **36**, 21-41.
 - 12) A. Ohyama, T. Higashi, K. Motoyama, H. Arima, *J. Biol. Macromol.*, 2017, **99**, 21-28.
 - 13) X. Luo, T. Sugiura, R. Nakashima, Y. Kitamura, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **23**, 4157-4161.
 - 14) S. J. Kim, H. Ise, E. Kim, M. Goto, T. Akaike, *Biomaterials*, 2013, **34**, 6504-6514.
 - 15) J. K. Nair, J. L. S. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, M. R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V. Kel'in, S. Milstein, N. Taneja, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R. J. van der Sluis, M. E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T. J. C. van Berkel, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 16958-16961.
 - 16) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596-2599.
 - 17) T. Shiraishi, Y. Kitamura, Y. Kitade, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 2691-2693.
 - 18) Y. Kitamura, R. Sakamoto, T. Shiraishi, H. Oguri, S. Ohno, Y. Kitade, *Tetrahedron*, 2016, **72**, 4016-4021.
 - 19) Q. Ren, K. Tsunaba, Y. Kitamura, R. Nakashima, A. Shibata, M. Ikeda, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 1519-1522.
 - 20) Y. Kitamura, K. Edayoshi, Y. Kitade, *Tetrahedron Letters*, 2012, **53**, 6987-6989.
 - 21) A. Shibata, M. Kawade, T. Sobajima, M. Mizoguchi, Y. Kitamura, M. Ikeda, Y. Kitade, 投稿準備中
 - 22) RNAライブラリー作成に関するお問合せ先は株式会社 e-NA Biotec : info@e-nabio.co.jp ,
HP : <https://e-nabio.co.jp>

核酸をめぐる旅(アンチセンス研究事始め)

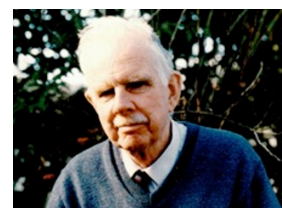
群馬大学特任教授 篠塚和夫

【まずは熊本から】 筆者が核酸化学と本格的に出会うのは、オーストラリアでの博士課程を終え、米国アトランタで最初のポスドク修行を始めた時であった。実はそれより以前、熊本大学薬学部において、故米田文郎先生の指導の元でビタミンB₂の補酵素部分であるフラビン化合物の研究をしていた修士の時代に、一度だけ核酸化学とのニアミスがあった。「リン酸トリエステル法」を開発され、“DNA合成化学の父”(2014年にPNAS誌に掲載された、Marvin Caruthersによる追悼文のタイトル¹)とも称された故R. Letsinger 教授を米田先生が熊本に招かれ、そのセミナーを伺う機会があったのだ。しかし、不勉強で英語もあまり得意でなかった筆者は、正直セミナーの内容をほとんど理解できなかった。その際に医学部から参加されていた若手の先生が流暢な英語で質問されていたのが、妙に格好良く映ったのを覚えている。



米田先生(右)と筆者

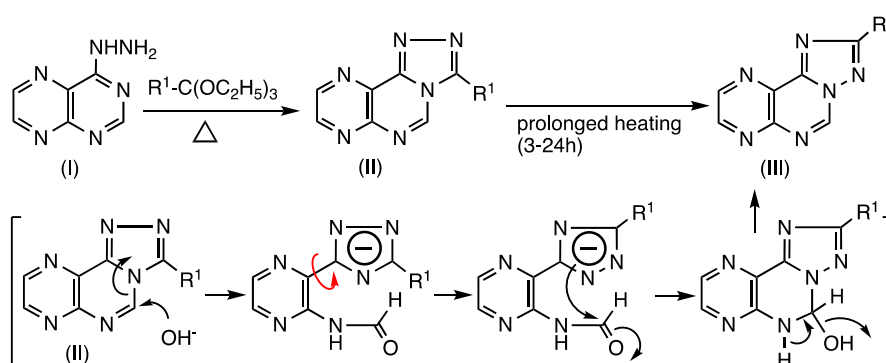
【オーストラリアで博士号】 1979年に修士課程を修了した後に、米田先生のご命令(?)でオーストラリアの首都キャンベラにあるオーストラリア国立大学(ANU)ジョーンカーティン医学研究校のPh.Dコースに入学した。ここではピリミジン化学の大家であり米田先生とも旧知の故D. J. Brown教授の指導の元で、*s*-Triazolo-pteridineや*s*-Triazolopurineといった、一連の*s*-Triazolo化合物の合成研究に従事した²。これらの化合物は面白い性質を持っていて、例えばFig. 1に



D. J. Brown 先生

示す4-Hydorazinopteridine (I)をトリエチルオルソホルメートのようなオルソエステルと加熱還流すると*s*-Triazolo[4,3-*c*]pteridine (II)が生成する。しかし、この反応を長時間行ったりすると、トリアゾール環の窒素が移動したような*s*-Triazolo[1,5-*c*]pteridine (III)へと変化する。

そのカラクリは、先ず(I)の閉環では速度論的に優勢な(II)が生成するが、その後に開環と閉環を伴って(Fig. 1の下段)、熱力学的により安定な(III)へと変化する機構によると考えられる(ジムロート転位)。転位生成物(III)は別途unambiguousな合成

Fig. 1 Dimroth 転移を利用した *s*-Triazolopteridine 類の合成

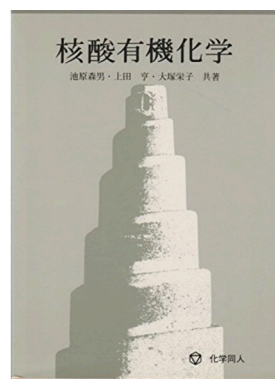
によってその構造に間違いがないことを確認しなければならない。詳細は省くが、これは結構面倒で長い反応経路であり、毎日ひたすらこうした合成を行っていた。

【ディープサウスで取り敢えず核酸合成に挑戦】 Ph.Dコース終了後、1982年の6月からはアトランタのEmory大学化学科のL. G. Marzilli先生の元で、ポスドクとしての修行を始めた。Marzilli先生はCo錯体であるコバラミンなどのビタミンB₁₂誘導体を主な対象として、主にNMRを用いた生物無機化学的研究を行っていたが、さらにDNAと金属イオンとの相互作用についても研究を進めていた。筆者がMarzilli研のポスドクとなる経緯は、Marzilli先生がとある国際会議でBrown先生に出会った際、合成ができる適当な(?)人間は居ないか?とBrown先生に聞かれた事がきっかけで、この時に筆者を紹介して下さったことによる。ちなみに、Marzilli先生もANUでPh.Dを取得されている。



Marzilli 先生と筆者

というわけで、アトランタではDNA関連物質の合成がメインの仕事になりそうだと感じた筆者は、渡米前に神田の本屋街に出かけて核酸化学の成書を探して回ったが、その時に出会った一冊が化学同人から出ていた「核酸有機化学」だった。池原森男先生・上田 享先生・大塚榮子先生共著のこの本には、ヌクレオシドからモノヌクレオチド、さらにオリゴヌクレオチドまで、その合成法や基本的性質などが網羅的に記されており、しかも各章の末尾には長大な参考文献リストがついていて、必要な際にはすぐに原著に当たれることが何よりも有り難かった。今日この本は大学図書館などに所蔵されているのを別にすれば、市中で目にするのは殆ど不可能だが、この本と出会えたことは、核酸化学をキチンと学んだことがなかった筆者にとっては実に大きな幸運だったと、今でもつくづく感じる。



Marzilli研では、当時注目を集めていた*cis*-PlatinとDNAとの結合様式解明のために、*cis*-Platin のターゲットと考えられていたグアニン塩基の誘導體や、その2量体のモデルとして様々なBis-purine誘導體の合成を行なった。さらに液相法によるオリゴ核酸合成も行なったが、その際に威力を発したのが先の「核酸有機化学」であった。研究室には有機合成化学者は一人もいないし、化学科全体でも核酸化学研究者はいなかったのも、勉強は全てこの本か、そこに載っている原著を図書館でコピーして、という状況だった。無保護ヌクレオシドから始まり、様々な核塩基の組み合わせを持つdimerから、octamerくらいまでのオリゴ核酸の合成を行なった。それまでの複素環化合物と違い、どれも再結晶では精製できないものばかりで、非常にやりにくい一と感じたが、最初にdimerがそこそこの収率で合成できた時には正直非常に嬉しかった。

確かMarzilli研での2年目の夏だったと記憶しているが、先生の勧めでGordon Conferenceに参加する機会を持つことができた。実は当時、Gordonについてよく知らなかった筆者は、ネクタイに革靴・スーツというフォーマルな出立ちが必要と勘違いして、うう〜、面倒だ!などとボヤいていたら、研究室の大学院生から「Kazu、何考えてんだ? Gordonって完全にカジュアルなスタイルの会議なんだぞ」と言われて、アセったのとホッとしたのを覚えている。

この時のConferenceでは核酸有機化学がメインテーマの一つだったが、前述の池原先生も講演者の一人として招待されており、Memorial Sloan Kettering Cancer Centerに居られた渡辺恭一先生と共に参加されていた。池原先生は英語での講演は余り得意では無い様子だったが、私にとっては外国人ばかりの聴衆が、あたかも授業中の(昔の?)日本人学生のように皆シンと静まりかえって、一言も聞き漏らすまいといった感じで先生の講演を緊張して聞いている様子が、とても印象的だった。英語の上手い下手よりは話す中身が一番大事、と感じ入った次第だった。また、渡辺先生とはその後1997年にドイツのUlmで開かれた核酸の国際会議で再びお会いし、変わらぬ気さくなお人柄で暖かく接していただいた。この時の講演者の

中には、アンチセンス核酸研究のパイオニアとも言うべき、Johns Hopkins大学のP. S. Millerも招かれていた。独特の訥々とした口調で、メチルホスホネート(Fig. 2)と言う無電荷の人工核酸分子が化学合成できることや、それがmRNAの機能を阻害し得る、という発表であったが、その時には、言わば人工のDNAモドキを合成し、それによって遺伝情報の発現が制御できるという内容、すなわち「アンチセンス核酸研究」に、そんなことが出来るんだと心底びっくりした。それにしても、まさか数年後に自分もそうした研究に関わることになる、などとはその時には夢にも思わなかったが。もう一つこの時のConferenceで印象に残ったのが、後にノーベル医学・生理学賞を受賞するG. B. Elionを見ることができたことだ。数々の修飾核塩基や修飾ヌクレオシド医薬品の合成・開発で高名だったElionだが、不覚にもこの時まで女性であることは知らなかった。論文での著者名がG. B. Elionと記される事が多く、GがGertrudeであることを筆者が知らないためであった。小柄でチャームングで親しみやすい雰囲気ながら、一方で凜としたところを感じさせる方であった。

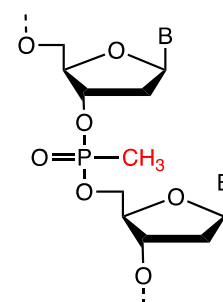


Fig. 2 メチルホスホネート DNA

アトランタでの3年目の終わり頃に、Marzilli先生が当てにしていた研究費(=私の給料)が入らないことになってしまい、急に次の職探しをすることになった。先生や研究室の院生たちにも手伝ってもらいながら幾つかの研究室に問い合わせの手紙を出したところ、ブレオマイシン研究などで有名な某先生のところから来て良いと言う返事をいただいた。実はその手紙が届くほんの数時間前に、兼ねてからMarzilli先生とも共同研究をしていた、FDAのG. Zon先生からも来て良いという電話が入っており、そちらにお世話になる旨Marzilli先生を通じて返事をしていたので、こちらは正にタッチの差でお断りすることになった。



G. Zon 先生

【ベセスダでアンチセンス】 こうしてディーブサウスのアトランタから、ワシントンD.C.のすぐ隣、メリーランド州ベセスダにやって来て、広大なNIHの敷地内にあるFDAの研究部門、Molecular Pharmacology Lab.のチーフ、G. Zon先生の前で本格的な核酸研究を始めた時には、学位取得から4年目となる1985年の8月になっていた。Zon先生の研究室には、それまでのリン酸トリエステル法ではなく、亜リン酸トリエステル法を用いる最新のABI(現サーモフィッシュャーサイエンティフィック)のDNA自動合成機や、オートサンプラーを備えたHPLCも有しており、NIHやFDAの様々な部門から、プローブDNAの合成依頼が連日山のように寄せられている状況であった。しかし、実験室の作りは化学合成ができる仕様にはなっておらず、またプローブ合成は研究室のテクニシャンの担当なので、ここで自分は一体どんな内容の仕事をするようになるのかと最初は少々とまどったが、Zon先生は前述のP. S. Millerが開拓した「非天然型 DNAによるアンチセンス核酸研究」に踏み込もうとしており、その要員として呼ばれたらしいことが分かってきた。Zon先生は律儀な方で、Millerに電話してこの分野に参入することの断りを入れていた。

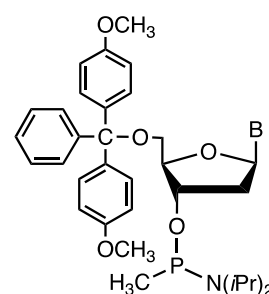


Fig. 3 メチルホスホネート DNA誘導体

改めてMillerらの最新の論文を読み込んでメチルホスホネートDNA(M-DNA)について勉強したが、当時Millerの研究室でAkira Murakamiと言う日本人研究者がこうした研究に参加して、重要な論文に名を連ねている事が強く印象に残った³。後の京都工芸繊維大学の村上章先生のことである。Millerらのリン酸トリエステル法に対して、片や我々は亜リン酸トリエステル法でM-DNAを合成しようと言うのであるが、FDAの研究室では化学合成実験ができないので、Zon先生の以前の職場である、ワシントンDC郊外のカトリック大学の実験室を使わせてもらうことにした。今ではとても想像つかないが(ひょっとして、当時でもご法度だったかもしれ

ないが) 精製した溶媒や試薬、ガラス器具等をリュックに詰め、ラッシュ時間を外してメトロールと呼ばれる首都圏地下鉄でカトリック大学まで通い、夕方のラッシュ前には研究室に戻るという生活を数ヶ月続けて、Fig. 3に示すようなmethylphosphonamidite類を合成し、これを用いてM-DNAの合成に取り掛かった⁴。古い

ことなので正確には覚えていないが、合成そのものは大きな問題もなく進んだ記憶がある。但し脱保護ではエチレンジアミン・無水エタノール混合液を用いるため、HPLC精製前にこれらを除き去しなければならないなど、結構扱いが面倒であった。また、この時にはM-DNAだけでなく、同様にバックボーンに電荷を持たない非天然型DNAとし

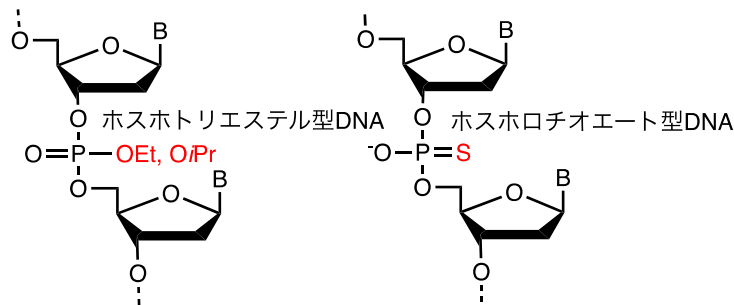


Fig. 4 ホスホトリエステル型 DNA 及びホスホロチオエート型 DNA

て、Fig. 4に示すようなホスホトリエステル型インターヌクレオチド結合を一つおきを持つDNA (Alternating phosphotriester DNA) や、ホスホロチオエートDNA (S-DNA) 等も合わせて合成し⁴、これらの生物効果を検証・比較することにした。この時のS-DNA合成では、少し前にZon先生がPolish Academy of ScienceのW. J. Stec教授らとの共同研究で合成したやり方⁵を参考に、スライダックに繋がったヒートテープをDNA合成カラムに巻き付け、さらにスライダックを自動合成機にリレーして、通常のI₂/H₂O酸化反応のタイミングに合わせてヒートテープに通電することで、カラムを加温(60 °C)するという乱暴なものだった。もっとも、この自動合成機との連結はABIのサービスエンジニアにやってもらったが、バックボーン中に硫黄を導入するためのS化試薬には当初ピリジンとトリエチルアミンの混合液中に飽和させた硫黄(S₈)を用いた⁴。こちらは合成後の後処理手順が天然型DNAとあまり変わらないので、主観的にはメチルホスホネートよりも取り扱いが楽、と感じた。

生物効果(アンチセンス効果)の検証研究は、同じFDAのC. J. Marcus-Sekura博士のグループと共同で、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ、いわゆるCATアッセイにより、M-DNAを中心に行った。結果については、先ず、M-DNAではその水への難溶性もあって、最も高いアンチセンス効果を示したのは15量体であった。さらに各アンチセンスの鎖長を15で全て揃えて比較すると、ホスホトリエステル型は予想通りさほどの効果を示さない事や、S-DNAがM-DNAを超えて、最も高いアンチセンス効果を示す事などが分かってきた(Table 1)。実は当初S-DNAには取り立てて期待をしていた訳では無かったので、これは少々意外かつ嬉しい結果であった⁶。

こうした結果が出つつある中、アジドチミジン(AZT)がHIVに有効な世界で初めての薬剤であることが確認されたくらいのタイミングで、更なる抗HIV薬の開発を大車輪で進めていたNIHのグループから共同研究の申し入れがあった。相手はそのAZTの有効性を証明した満屋裕明先生が所属する、国立がん研究所(NCI)のS. Broderのグループだった。後にNCIのDirectorとなるBroder本人と満屋先生、それにアンチセンス核酸のHIVへの応用の直接の担当者である松倉誠先生が研究室に来てディスカッションを行い、その後直ぐに具体的な研究が始まった。アンチセンス核酸やレファレンスとなる各種核酸の選択・配列などについて

Table 1 アンチセンスによる CAT Activity 阻害効果⁵

オリゴマーの種類	CAT 活性阻害効果 (%)
None	0
Alternating isopropyl triester	0
Normal phosphodiester	35
Alternating ethyl triester	51
Alternating methylphosphonate	60
Oligo-methylphosphonate	65
Oligo-phosphorothioate	84

用いたアンチセンス核酸の鎖長は15量体、濃度は30 μM

て色々打ち合わせを重ねるうちに、松倉先生が(満屋先生も)熊本大学医学部の出身であることが分かり、急に会話が熊本弁になったり(もっとも、筆者は実は埼玉出身なのだが)、海外生活で初めて研究上で日本人との身近な付き合いが始まった。

NIHはご承知のように様々な国立研究機関が集まった一大複合研究機構だが、恐らく研究者の間での情報の伝わりも早いらしく(風通しがよく)、アンチセンス核酸は遺伝情報の発現制御に有望そうだという情報が流れたのか、実はこの時期色々なグループから共同研究の申し入れがあった。中には、ロックビル・パイクを挟んだ反対側の、軍の総合医療系大学であるUniformed Services University of the Health Scienceのグループから、がん遺伝子の発現制御に向けた共同研究の申し入れもあった。尚、この敷地内にはトランプ前大統領やレーガン元大統領らも治療を受けた、ウォルター・リード米軍医療センターもあり、時折軍用ヘリコプターも発着していた。余談だが、ある晩遅くに研究室からアパートに帰る途中、NIHの広大で薄暗い駐車場を歩いていたら、ウォルター・リード方向から飛んできたヘリにいきなり上空からライトを浴びせられた事がある。夜中に不審者、とても思われたのかもしれないが、撃たれるか、とあって非常に怖かった。

【ひょんなことから連邦職員として宣誓を】 こうして、アンチセンス研究が進み始めた頃、ベセスダに来て1年もしないうちに何とZon先生がFDAを退職してしまうという、筆者にとっては実に大きな出来事があった。Zon先生からは、前から研究室運営やスタッフの扱いに関して研究所長に色々申し入れをしていたのが、どうやらそれらは実現しそうもない、と言うことでの決断だと伺った。同時に私の身柄は、Zon先生の計らいでBroderが統括するNCIのグループの中で引き受けるということになった。また、すでにこの時筆者のアメリカでのポストドク生活が通算3年を超えていたため、それまでと同じポストドク身分、いわゆるFogarty Fellowでは居られず、移籍に際して任期付の連邦職員(Visiting Associate)に身分変えになった。この時、生まれて初めて聖書の上に手を置いての宣誓と言うものをさせられることになった。同時に両手全部の指の指紋も取られたので、筆者が何かアメリカで悪い事をしでかすと直ぐに身元が割れてしまうことになっている。

【ホスホロチオエートDNAはHIVにも有効】 松倉先生らとの共同研究では、先ず満屋先生が開発した、ATH8細胞によるアッセイ系⁷での抗エイズ活性について検証した(抗エイズ薬の探索が世界的に急務な中で、こうした簡便かつ

迅速なアッセイ系を開発した事は、満屋先生の最大の業績の一つであると筆者は思う)。用いたアンチセンス核酸の配列をFig. 5に、得られた結果をTable 2に示す。S-DNAはN-メチルチミジンを含むN-Me-ODN-1を除いて、いずれの配列でも(!)濃度依存的に抗

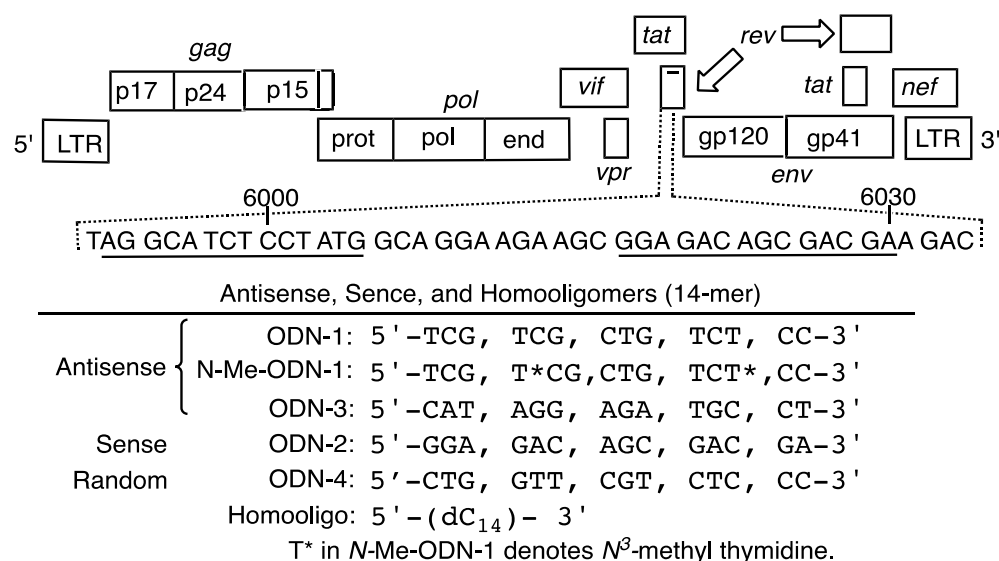


Fig. 5 ATH-8細胞での抗 HIV 効果の検証で使用したアンチセンス核酸の配列⁸

HIV活性を示し、一方当初心配された細胞毒性は、配列によって差はあるもののさほど高いものでは無いという結果になった。但し、この時の実験で一番高い抗HIV活性を示したのは通常のアンチセンス配列ではなくdCのホモポリマーであり、その活性も28量体程度まで鎖長に応じて活性が強まる等、どうもS-DNAの生物効果は単純なアンチセンス効果だけでは無いらしいことも示された。一方、残念ながらメチルホスホネートDNAはこの実験でも有効な効果を示さなかった⁸。

こうした中、突然S-DNAの合成が全く進行しないという日が続いた。溶媒を念入りに精製しても、試薬の純度をきちんと確認しても、反応温度を正確にモニターしても、とにかく何をやっても合成ができない。一体どうなっているのか？と首を捻る日が続いたが、ある時急に原因が判明した。当時の亜リン酸トリエステル法で繁用されたのは、現在でも標準的な試薬であるシアノエチルホスホロアミダイト試薬 (Fig. 9a) と、現在はあまり見られないメキシホスホロアミダイト試薬 (Fig. 9b) である。S-DNA合成ではS-化の際にトリエチルアミンを含む試薬を用い、しかも加熱までしているの、リンの保護基(シアノエチル基)の脱離の懸念の無い9bの試薬を使わねばならない。ところが、うっかりと9aの試薬を使ってしまったのが、合成がうまくいかない原因であった。S-化試薬については当初のピリジン・トリエチルアミン・S₈の組み合わせから、より硫黄の濃度が稼げるCS₂・トリエチルアミン・S₈の組み合わせに変更した所、³¹P-NMRでの確認ではこちらの方がS-化の効率が良いという結果であった。

HIVの持続感染細胞H-9を用いた更なる実験の結果、HIVゲノムに対するS-DNAアンチセンス核酸のみが、持続感染細胞におけるHIVタンパクの合成を濃度依存的に阻害している事が明らかになり、これでS-DNAがどうやらアンチセンス核酸として有望であることが明らかになった⁹。一方、先のdCホモポリマーは、細胞におけるHIVウイルスDNAのde novo合成を阻害することから、その抗HIV効果はウイルス感染を阻害する事によるものであるらしいことが明らかとなった。また、効果と鎖長の関係では鎖長が長い程効果が高いものの、27量体くらいではほぼ頭打ちとなることも分かった^{9,10}。

この時期にはその他にも、核酸分解酵素に対するS-DNAの優れた抵抗性の確認や¹¹、S-DNAやM-DNAによるras p21蛋白の合成阻害効果と配列特異性の検証¹²、5'-末端にアクリジンをもつS-DNAの合成とその化学的・生化学的性質の解明研究など¹³、S-DNAを巡る初期の研究の幾つかに関わる事ができた。

【終わりに】

Table 2 ATH-8細胞によるオリゴ核酸の抗 HIV 効果と細胞毒性⁸

オリゴマー	抗ウイルス活性 (%)				細胞毒性 (%)			
	1 μM	5 μM	10 μM	25 μM	1 μM	5 μM	10 μM	25 μM
S-ODN-1	0	43	72	95	0	0	0	20
n-ODN-1	3	2	9	4	35	22	27	14
M-ODN-1	8	20	13	10	20	27	20	20
S-ODN-2	11	56	100	78	0	0	0	6
n-ODN-2	11	9	0	11	18	28	35	32
S-ODN-3	0	6	44	94	0	0	0	13
S-ODN-4	0	53	78	100	0	0	0	0
S-dC ₁₄	25	100	100	100	0	0	0	0

n-ODNは天然型、M-ODNはメチルホスホネートDNA。
N-Me-ODN-1はこのアッセイでは全く抗 HIV 活性を示さなかった。

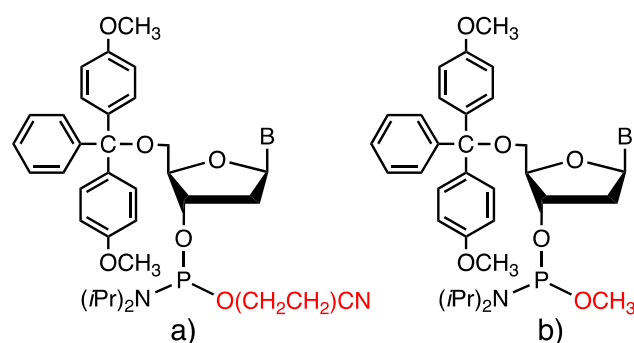


Fig. 9 シアノエチルホスホロアミダイト(a)と、メキシホスホロアミダイト(b)。

こうして、そもそも核酸研究とは縁の無かった筆者は、海外留学がきっかけで核酸と関わり合いを持つ事になり、その後世界的にもブームといえる状況になったアンチセンス研究の創成期に幸運にも立ち会う事ができた。日本に帰国後は色々な理由からしばらくはこうした研究を行う事ができなかったが、その代わり、一時期特別研究員としてお世話になった三菱化成(現三菱化学)生命科学研究所での研究で、RIを使った遺伝子生化学実験の手法を学んだり¹⁴、フェロモン研究の一環でゴキブリのオスとメスの見分けが一目で付くようになったりした。その後、群馬大学工学部(現在の理工学部)に助手として採用され、再び核酸の化学にも携われるようになり、幸いにも定年までこうした研究を続けることができた。振り返ってみると、留学機会を与えて下さった米田先生に始まり、Marzilli先生を紹介して下さったBrown先生、Zon先生の元での研究機会を作ってくださったMarzilli先生、NIHへの移籍を取り計らって下さったZon先生というように、出会った先生方にお世話になりっぱなしの海外生活の中で、核酸研究に巡り合った研究人生であった。

この間、博士課程から通算での海外生活も8年間と、過ぎて仕舞えばあつという間だが、確かにそれなりに長い年月で、ここには書き切れない色々な事を経験した日々であった。最近では海外での研究経験を持つ若手研究者が減っているとも聞かすが、我が事として振り返ってみると、海外での生活は勿論色々としんどい事も多いが、研究上でも、(大袈裟だが)人生の上でも得るところが非常に多いと思う。皆さんにはもし機会があれば、仮に短期間でも是非そうした留学の機会を逃さないようにしていただければと思う。ひょっとして思いも寄らない、あるいは掛け替えの無い出会いが、皆さんを待ち受けて居るかもしれませんよ!

References

1. M. H. Caruthers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, 18098 (2014).
2. K. Shinozuka, Ph. D. Thesis, The Australian National University, 1982.
3. 例えば A. Murakami, K. R. Blake, P. S. Miller, *Biochemistry*, **24**, 4041 (1985).
4. K. Shinozuka, G. Zon, unpublished results.
5. W. J. Stec, G. Zon, W. Egan, B. Stec, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6077 (1984).
6. C. J. Marcus-Sekura, A. M. Woerner, K. Shinozuka, G. Zon, V. Quinan Jr., *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5749 (1987).
7. H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 7096 (1985).
8. M. Matsukura, K. Shinozuka, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 7706 (1987).
9. M. Matsukura, G. Zon, K. Shinozuka, C. A. Stein, H. Mitsuya, J. S. Cohen, S. Broder, *Gene*, **72**, 343 (1988).
10. M. Matsukura, G. Zon, K. Shinozuka, M. Rovert-Guroff, T. Shimada, C. A. Stein, H. Mitsuya, F. Wong-Staal, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 4244 (1989).
11. C. A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J. S. Cohen, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3209 (1988).
12. E. H. Chang, Z. Yu, K. Shinozuka, W. D. Wilson, A. Streckowska, G. Zon, *Anti-Cancer Drug Design*, **4**, 221 (1989).
13. C. A. Stein, K. Mori, S. L. Loke, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J. S. Cohen, L. M. Neckers, *Gene*, **72**, 333 (1988).
14. K. Shinozuka, Y. Kikuchi, C. Nishino, S. Tawata, *Experientia*, **44**, 882 (1988).

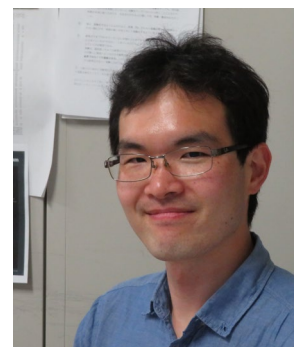


メジャーグループで互いを認識する 人工塩基対の創製

Creation of unnatural base pairs which recognize
each other in the DNA major groove

東北大学多元物質科学研究所
東北大学大学院理学研究科化学専攻
岡村 秀紀

*Institute of Multidisciplinary Research for
Advanced Materials,
Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Tohoku University
Hidenori Okamura
(hidenori.okamura.b8@tohoku.ac.jp)*



Abstract: Unnatural base pairs (UBPs) provide a powerful tool for development of DNA-based technologies. Here we describe new design concept for the UBP in which the pairing selectivity is achieved by isolating the recognition units from the canonical Watson-Crick position. The validity of this concept was demonstrated with the alkynylated purine and pyridazine nucleosides bearing additional hydrogen-bonding units ('pseudo-nucleobases'). We confirmed that the alkynylated nucleosides exhibit selective and stable pairing through the hydrogen bonding between the spatially separated pseudo-nucleobases in the DNA major groove. Moreover, consecutive incorporations of these UBPs dramatically increased thermal stability of the duplex DNA. The present study showcases the separation of the recognition modules as a promising strategy for developing new types of UBPs.

1. はじめに

DNAに保存された遺伝情報はmRNAへと転写され、タンパク質へと翻訳される。この生物学のセントラルドグマにもとづく遺伝子発現の根幹をなすのが、核酸塩基間の塩基対形成である。DNAの場合、4種類の核酸塩基A, T, G, Cの並び方が遺伝情報を規定すると同時に、AとT、GとCがそれぞれ相補的な水素結合を形成することによって配列特異的な二重鎖を形成する。また、塩基間の相補性は、他の高分子には類を見ないDNAの酵素複製を可能とする。このような相補的な塩基対形成がもたらす配列特異的な二重鎖DNA形成やDNAの酵素複製は、今日見られる様々なバイオテクノロジーの分子基盤となっている。その中で、これらの2対4種類の天然型塩基に、人工的な塩基対を加えることにより、遺伝情報を拡張した生命システムや高機能性核酸を創り出す研究が急速に進展している。本総合論文では、既存の人工塩基対を紹介しつつ、我々が開発を進める新たな設計概念に基づく人工塩基対について報告する。

2. これまで開発されてきた人工塩基対の構造

人工塩基対とは、二重鎖DNA形成やDNAの酵素複製において、A-T、G-C塩基対形成とは独立して機能する化学合成された塩基対である。既存の人工塩基対は、相互作用様式に基づいて、水素結合型塩基対、疎水性塩基対、金属錯体型塩基対に大別される(図1)。水素結合型塩基対は、天然塩基とは非相補的な水素結合パターンを示す核酸アナログで構成される。例えば、BennerらのP-Z塩基対は、二重鎖形成および酵素複製において、天然型塩基対とは直交的に機能する¹。また、松田・南川らは、水素結合のドナー・アクセプターパターンが異なる4点水素結合性の環拡張型人工塩基を開発し、熱的に安定な塩基対を形成させることに成功している²。さらに、岡本らのごく最近、プリン塩基のアンチ-シン配向性に着目した水素結合型の人工塩基対を報告している³。一方で、疎水性塩基対は、疎水性相互作用と形状相補性を利用することで、天然塩基に対する直交性を発現する。平尾らのDs-Px塩基対⁴とRomesbergらのdTPT3-dNaM塩基対⁵は、その代表例であり、酵素複製において非常に高い直交性を示すことが報告されている。最後に、金属錯体型塩基対は、金属イオンに対する配位結合を駆動力とした人工塩基対である。塩谷らやCarellらによって開拓され、例えば、銅(II)イオンの存在下で対形成する人工塩基対が開発されている⁶。これらの人工塩基対は、アプタマーやデオキシリボザイムの機能改変や、遺伝暗号の拡張に有用であることが実際に示されている⁷。しかし、既存の人工塩基対は、塩基対形成の選択性や熱的安定性、ならびに酵素伸長反応における配列依存性などにおいて、課題を残している。そこで、本研究では新たな人工塩基対の創製を目指すことにした。

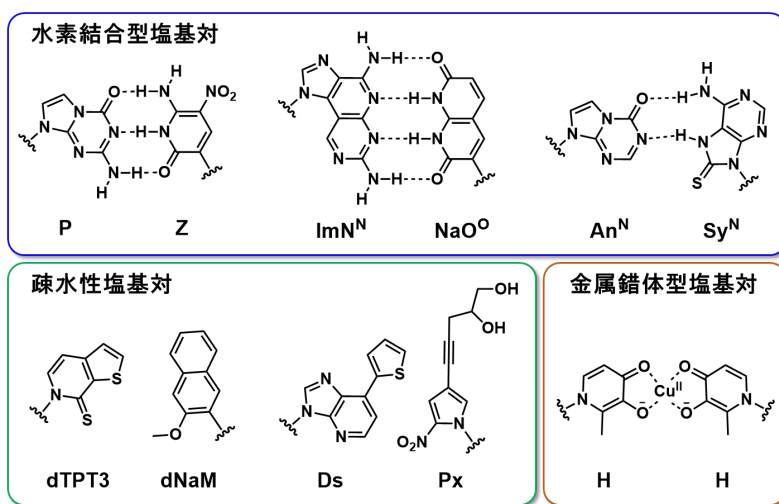


図1 代表的な人工塩基対の構造と分類

3. メジャーグループに擬塩基を導入したPu-Pz塩基対の設計概念

既存の人工塩基対の分子設計に着目すると、いずれもWatson-Crick面における相互作用様式を工夫することによって、天然塩基との塩基対形成を防いでいることがわかる。これらに対し、我々は、人工塩基が相互に水素結合する部位を、Watson-Crick面とは離れた場所に配置することを考えた。このような設計によって、人工塩基と天然塩基が安定な水素結合を形成することを本質的に防ぐことが可能となり、塩基選択性を発現できると予想した。本概念の実証を目的として、アルキニルプリン(Pu)-アルキニルピリダジン(Pz)塩基対を設計した(図2)。PuおよびPzは、1)塩基対間のスタッキング相互作用を維持するための

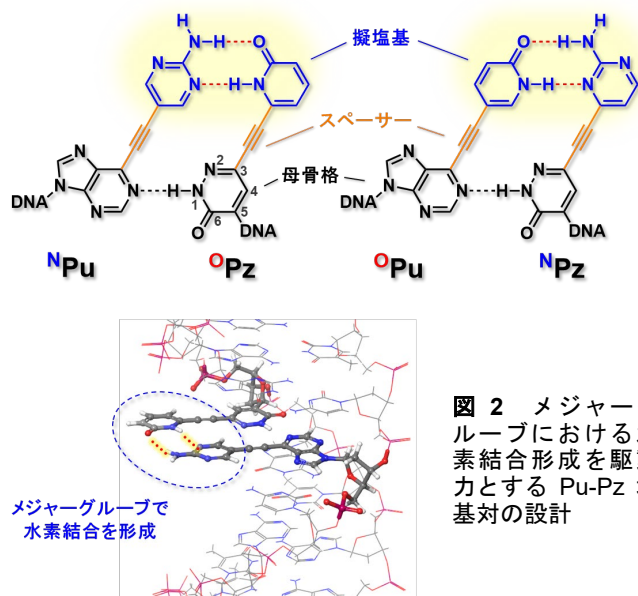
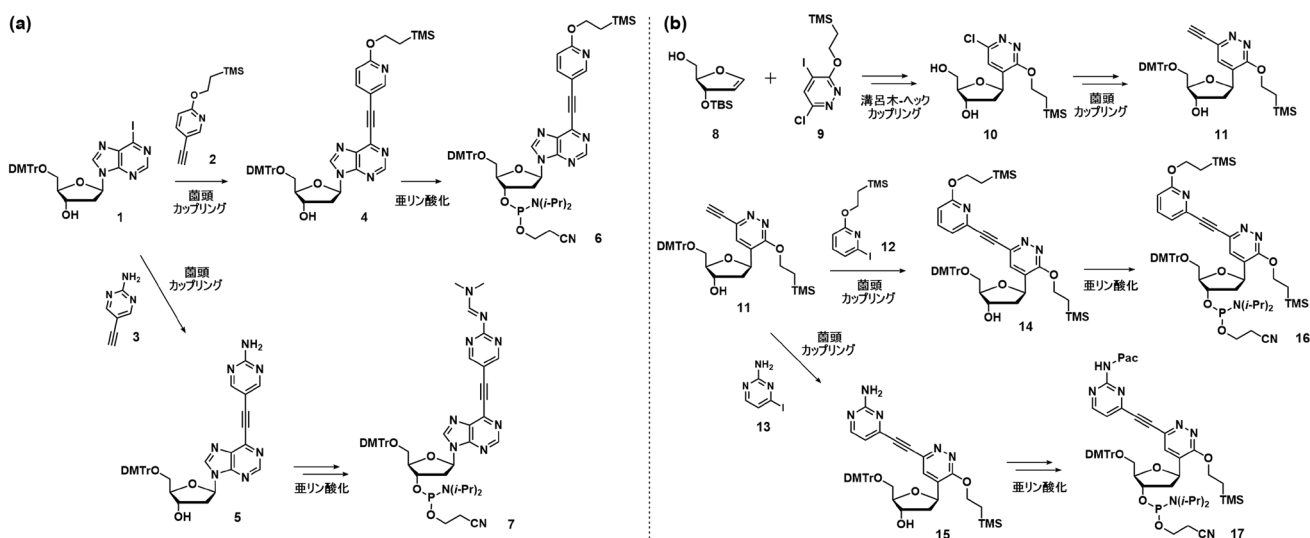


図2 メジャーグループにおける水素結合形成を駆動力とするPu-Pz塩基対の設計

プリン・ピリダジン母骨格、2) 水素結合を介して互いを認識するための擬似的な核酸塩基 (擬塩基)、そして3) 擬塩基をメジャーグループに配置するためのアルキンスペーサーで構成される。このような分子設計とすることで、熱的安定性と塩基選択性を両立できると考えた。なお、擬塩基をDNAのメジャーグループに配置した理由は、置換基を許容する空間的な余裕があるほか、酵素伸長反応への影響が比較的小さいためである。擬塩基には、核酸塩基アナログとして機能することが報告されている2-ピリドンおよび2-アミノピリミジンを用いることにした^{8,9}。これらPu誘導体 (^NPu, ^OPu)とPz誘導体 (^NPz, ^OPz)の水素結合相補性に基づく塩基対形成を検証することで、メジャーグループにおける水素結合形成と設計概念の有効性を確認できると期待した。

4. Pu・Pz誘導体を組み込んだDNAの合成

まず、Pu、Pz誘導体のアミダイト体を合成した。Pu誘導体は、2'-デオキシアデノシンから合成したヨードプリン誘導体 (**1**)と、エチニル基で置換された2-ピリドン (**2**)および2-アミノピリミジン誘導体 (**3**)を菌頭カップリング反応に附すことにより構築した (スキーム1a)。得られた化合物 (**4**)と (**5**)をそれぞれアミダイト化することで、^NPuと^OPuの DNA合成前駆体 (**6**)および (**7**)を合成した。一方、Pz誘導体の合成には、グリカール (**8**)とヨードピリダジン化合物 (**9**)から合成したC-ヌクレオシド (**10**)を鍵中間体として用いた (スキーム1b)。この化合物をエチニルピリダジン化合物 (**11**)へと変換後、ヨウ素置換された2-ピリドン (**12**)ならびに2-アミノピリミジン (**13**)を菌頭カップリング条件下で反応させることにより、^NPzと^OPzの基本構造をもつ化合物 (**14**)および (**15**)を構築した。その後、それぞれアミダイト化することで、DNA合成前駆体 (**16**)ならびに (**17**)とした。合成した4種類のアミダイト体は、DNA固相合成法を用いてDNAに組み込んだ。



スキーム 1 (a) Pu 誘導体及び (b) Pz 誘導体のアミダイト体の合成経路

5. Pu・Pz誘導体の塩基対形成能の評価

合成したPu、Pz誘導体の塩基対形成能は、各誘導体を組み込んだ二重鎖DNAの T_m 値を比較することで評価した (図3)。二重鎖DNA中のX-Yが天然型のG-C塩基対の場合、 T_m 値は36.6 °Cであった。これに対し、擬塩基が相補的な水素結合を形成可能な^NPu-^OPzおよび^OPu-^NPzの場合、二重鎖DNAの T_m 値はそれぞれ37.8 °Cと36.1 °Cとなり、天然型塩基対に匹敵する熱的安定性をもつことを確認した。一方で、擬塩基が非相補的な^NPu-^NPzおよび^OPu-^OPz場合には、 T_m 値が低下した。これらの結果より、擬塩基間の水素結

合形成によって、人工塩基対が安定化している可能性が示唆された。次に、天然塩基に対する選択性を評価した(図4)。Pu誘導体である^NPuと^OPuは、いずれの天然塩基に対しても T_m 値が低下し、相補的なPz誘導体に対して高い選択性を示した。一方で、Pz誘導体である^NPzと^OPzも、Aに対する親和性がやや高いものの、相補的なPu誘導体に選択的な塩基対形成を示した。これらの結果より、認識部位をWatson-Crick面から離すことによって塩基選択性を発現するという設計概念が機能していることを確認した。

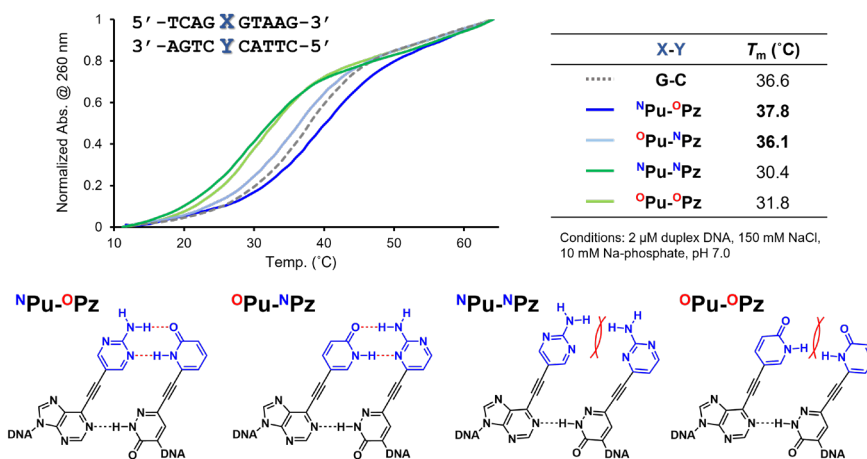


図3 Pu, Pz 誘導体を組み込んだ二重鎖 DNA の T_m 値と予想相互作用様式

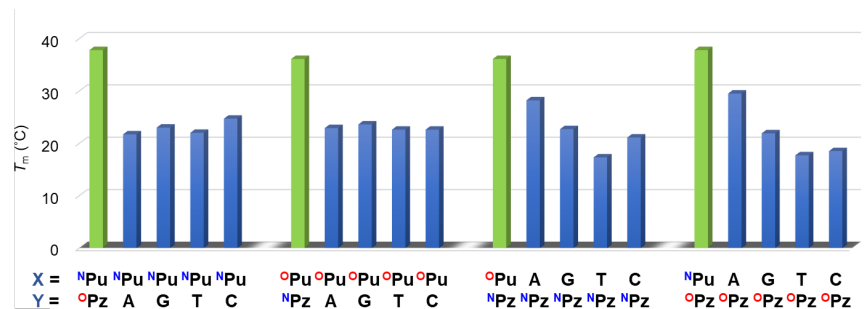


図4 Pu, Pz 誘導体の天然型塩基に対する T_m 値

6. Pu-Pz塩基対の認識様式の解明

新たに設計した人工塩基対の認識様式の解明を目的として、^NPu-^OPz塩基対を組み込んだ自己相補的な二重鎖DNAの二次元NMRを測定した。図5には、NOESYスペクトルの低磁場領域の拡大図を示した。この領域には、水素結合したNH基由来のイミノプロトンのシグナルが観測される。解析の結果、配列中に存在する3つのGのNH基に由来するシグナルとは別に、2つのNH基由来のシグナルが観察された。これらのうち、^OPz3-H1は、ピリダジン環の1位NH基由来のシグナルであり、化学シフト値より、相補的な^NPuのプリン環1位窒素原子と水素結合していることが示唆された。また、^OPz3-H1と隣接するG塩基のイミノプロトン間で強いNOEが観測されたことから、^NPu-^OPz塩基対は隣接塩基との連続したスタッキング相互作用を維持していることが支持され

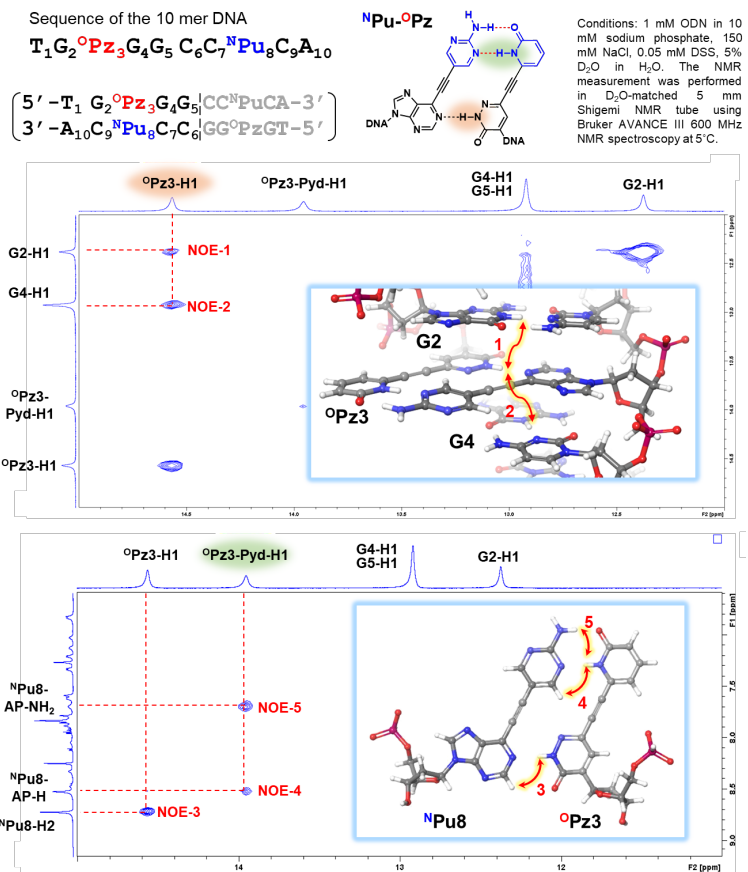


図5 ^NPu-^OPz 塩基対を含む二重鎖 DNA の NOESY スペクトル

た。一方、 $^{\circ}\text{Pz3-Pyd-H1}$ は、 $^{\circ}\text{Pz}$ のピリドン性NH基に由来するピークである。このピークについてNOEを解析したところ、 $^{\text{N}}\text{Pu}$ のアミノピリミジン環上のC-H基とNH₂基に対する明確なクロスピークが観測され、2-アミノピリミジンと2-ピリドン間の水素結合形成が強く示唆された。

NMRに基づく構造解析を補完する目的で、人工塩基を組み込んだ二重鎖DNAのMD計算も行った。その結果、相補的な組み合わせである $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ および $^{\circ}\text{Pu-}^{\text{N}}\text{Pz}$ を組み込んだ場合には、擬塩基間の距離が水素結合形成の範囲内に常時保たれることが分かった。このことは、擬塩基間に安定な水素結合が形成されていることを示唆する。一方、 $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\text{N}}\text{Pz}$ および $^{\circ}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ を組み込んだ場合、擬塩基間の距離は常時変動した。以上の結果より、 Pu-Pz 間の選択的な塩基対形成の駆動力は、メジャーグループにおける擬似塩基間の水素結合であると結論付けた。

7. Pu-Pz塩基対を複数導入したDNAの二重鎖形成の評価

最後に、 Pu-Pz 塩基対が二重鎖DNA形成に及ぼす影響を調べるために、人工塩基を複数導入した二重鎖DNAの熱的安定性を評価した。まず、人工塩基を非連続的に2か所もしくは3か所組み込んだ二重鎖DNAの T_m 値を測定した(図6a)。その結果、 $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ 塩基対を組み込んだ二重鎖DNAは、同じ位置にA-T塩基対を組み込んだ場合と同等もしくはより安定な二重鎖DNAを形成することが確認された。一方で、非相補的な $^{\circ}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ もしくはA- $^{\circ}\text{Pz}$ 塩基対を組み込んだ場合、二重鎖DNAは大幅に不安定化した。このことから、 $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ 塩基対は、天然型塩基対と同様、配列特異的な二重鎖形成が可能であることが示された。

次に、人工塩基を連続させた配列を用いて T_m 測定を行った(図6a)。その結果、相補的な $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ を2か所もしくは3か所連続させると、 T_m 値はそれぞれ45.7 °C, 63.8 °Cと大幅に上昇し、二重鎖DNAを劇的に安定化することを見出した。一方で、非相補的な $^{\circ}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ もしくはA- $^{\circ}\text{Pz}$ を連続させた場合には、 T_m 値が大きく低下した。この安定化の理由を考察するために、CDスペクトル測定を行った(図6b)。すると、 $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ を連続させた場合、核酸塩基由来の220-300 nmのシグナルに加えて、300-400 nmに励起子カップリングを示唆する強いCDシグナルが確認された。このことから、 $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ 塩基対間には強いスタッキング相互作用が働いていることが示唆された。水素結合形成によって擬塩基間の平面性が高まったことが理由と考えられる(図6c)。以上のように、 Pu-Pz 塩基対は、配列特異的な二重鎖形成を示すと同時に、天然型塩基対と同等あるいはそれ以上の熱的安定化効果を示すことを明らかとした¹⁰。

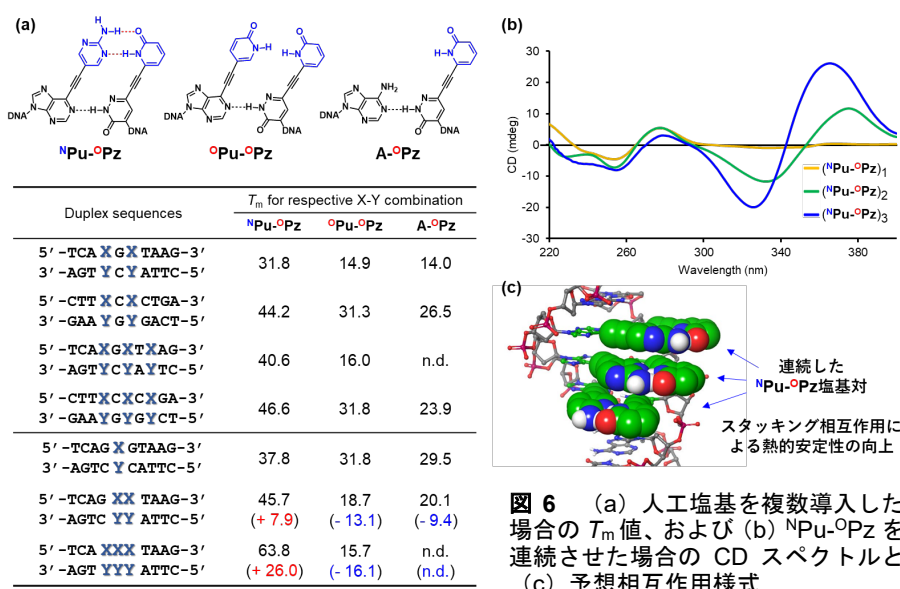


図6 (a) 人工塩基を複数導入した場合の T_m 値、および(b) $^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ を連続させた場合のCDスペクトルと(c) 予想相互作用様式

8. 結語

本研究では、塩基間の認識部位を二重鎖DNAのメジャーグループへと空間的に隔離するという人工塩基対の新たな設計概念を提案し、その有効性を Pu-Pz 塩基対($^{\text{N}}\text{Pu-}^{\circ}\text{Pz}$ 、 $^{\circ}\text{Pu-}^{\text{N}}\text{Pz}$)を用いて実証することに

成功した。これらPu-Pz塩基対は、選択的かつ安定な塩基対を形成すると同時に、連続導入することで二重鎖DNAの熱的安定性を大幅に増加することを見出した。このような高い配列特異性と二重鎖安定化能は、高精度かつ安定な二重鎖構造の形成が必要とされるDNAナノテクノロジーの開発に有用と考えられる。さらに、本人工塩基対は、メジャーグループに付加的な水素結合ユニットを有することから、核酸の構造多様性を向上できると期待される。そのため、進化分子工学的手法に応用できれば、アダマーやデオキシリボザイムをはじめとする機能性核酸の高機能化につながる可能性がある。現在、塩基選択性の向上とDNAポリメラーゼによる複製研究を進めている。今後、本人工塩基対を組み込んだ機能性核酸の獲得に挑戦し、メジャーグループに水素結合ユニットを付与することの有用性を示していきたい。

9. 謝辞

本研究は、東北大学多元物質科学研究所にて、科研費及び東北大学学際科学フロンティア研究所領域創成研究プログラムの支援のもと遂行されました。MD 計算では東京工業大学の正木慶昭助教と清尾康志教授に、NMR 測定では東北大学多元物質科学研究所の海原大輔氏に多大なご助力をいただきました。この場を借りて深く感謝いたします。また、人工核酸の合成と機能評価を進めていただいた研究室所属の学生諸氏に感謝いたします。また、研究の遂行にあたり、永次史教授と鬼塚和光准教授に数多くのご助言をいただきました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

References

1. Z. Yang, F. Chen, J.B. Alvarado, S.A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15105.
2. S. Hikishima, N. Minakawa, K. Kuramoto, Y. Fujisawa, M. Ogawa, A. Matsuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 596; N. Tarashima, Y. Komatsu, K. Furukawa, N. Minakawa, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10688.
3. K. Morihira, Y. Moriyama, Y. Nemoto, H. Osumi, A. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 14207.
4. M. Kimoto, R. Yamashige, K. Matsunaga, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nat. Biotech.* **2013**, *31*, 453.
5. Y. Zhang, B.M. Lamb, A.W. Feldman, A.X. Zhou, T. Lavergne, L. Li, F.E. Romesberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2017**, *114*, 1317.
6. K. Tanaka, G. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 190; T. Nakama, Y. Takezawa, D. Sasaki, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 10153.
7. M. Kimoto, I. Hirao, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 7602.
8. M. Minuth, C. Richert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10874.
9. Y. Doi, J. Chiba, T. Morikawa, M. Inouye, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8762.
10. H. Okamura, G.H. Trinh, Z. Dong, Y. Masaki, K. Seio, F. Nagatsugi, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 3042.

2022年8月15日受領

2022年9月10日採択

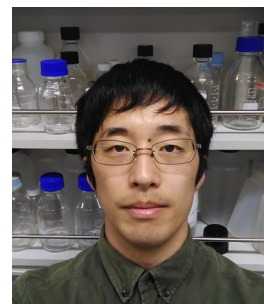


化学を基盤としたゲノムスケール DNA 合成手法の開発

Genome scale DNA synthesis exploiting
chemically modified nucleotides

名古屋大学 物質科学国際研究センター
橋谷 文貴

*Research for Materials Science,
Nagoya University
Fumitaka Hashiya
(f.hasha@chem.nagoya-u.ac.jp)*



Abstract: Genome scale DNA synthesis can be performed by high fidelity PCR amplification and subsequent PCR products assembly. We have developed dNTP analogues which improve PCR fidelity and chemically modified primers which generate sticky end DNA fragment to achieve accurate assembly. Deoxynucleotide tetraphosphate analogue suppressed incorporation of mismatch base and successfully improved PCR fidelity with Taq DNA polymerase. Two chemically modified primers, post cleavable primer which generates 3' sticky end and stop primer which generates 5' sticky end, were synthesized in the present work. Both primers could perform DNA assembly and plasmid construction as accurate as conventional golden gate assembly (GGA). Stop primer achieved DNA assembly with two folds higher efficacy than GGA. Furthermore, it could generate 50 nt overhang sticky end on DNA fragments longer than 10 kbp and assemble them to construct lambda phage genome.

1. 研究背景

分子生物学、生化学研究において長大なDNA断片を調製し連結する作業はたびたび必要となる。例えば複数の遺伝子が関与する酵素反応を調べる際には、それらを個別にPCRで増幅、連結しゲノムスケールのDNAクローニングを行うことで研究を進めやすくなる。この時、増幅するDNAが長くなるにつれて配列の正確性が、連結する断片が多くなるにつれて連結の精度と効率が問題となる。PCRによる増幅ではDNAポリメラーゼ(DNAP)の正確性の問題から一定確率で塩基の変異が起こる。タンパク質工学の活用により種々の高正確性DNAPが開発されてきたが、変異発生率は 10^{-5} ~ 10^{-6} で頭打ちとなっており、増幅されたDNA断片は5,000~50,000塩基対(bp)に1個程度の割合で変異が入る。また一般的なDNA断片の連結反応では制限酵素によって突出末端を作成し、突出部分同士の相補性によって断片を連結する。しかしながら制限酵素が作る末端は4塩基突出であることが多く、特に多断片連結を行う際に正確性の面で不安が残る。加えて制限酵素の多くは特定の6 bpの配列を標的としてDNAを切断し突出末端を作る。6 bpの特異性は

それほど高くなく4096 bpに1個の確率で現れるため、長鎖DNAの連結反応では制限酵素を使いにくい。以上のような背景からゲノムスケールのDNA合成達成にはPCRの正確性向上と任意の突出末端形成技術が必要とされている。

筆者らはこれらの課題を解決するためにdNTP誘導体によるPCR正確性の向上、および化学修飾プライマーによる突出末端形成の研究を行っている。既存の高正確性DNAPは変異発生後にこれを修正する活性を向上させることで高い正確性を実現している。そこでdNTP誘導体を用いて変異の発生そのものを抑えることで相乗的にPCRの正確性を向上できると考えた。また化学修飾プライマーは修飾位置を起点にして突出末端を形成するため、任意の突出末端を設計できる。このようなプライマーはメカニズムの違いからポスト切断プライマーとstopプライマーの2種類に大別できる。ポスト切断プライマーはPCRによる増幅の後に処理を行うことでDNA鎖を切断し、3'突出末端を形成する。一方でStopプライマーはPCRの途中でDNAポリメラーゼ(DNAP)の伸長を停止し、5'突出末端を形成する。本研究ではDNAの糖部、もしくはリン酸部に化学修飾を導入した新規ポスト切断プライマー、およびStopプライマーの合成と評価を行った。この新規プライマーの修飾は塩基への依存性がなく、あらゆる位置に導入可能である。よってPCRにおいてこれらをプライマーとして用いることで任意の長さ、配列をもつ突出末端を作成できる。以下ではこれらの技術について詳細な仕組みと得られた結果を報告する。

2. dNTP誘導体によるPCR正確性の向上

DNAPの基質であるdNTPはヌクレオシドにリン酸が3つ連結した構造をしているが、DNAに上に残るのは α 位のリン酸のみである。よって α 位以外のリン酸に化学修飾を施しても合成されるDNAに影響はない。実際、 β リン酸と γ リン酸間の酸素を置換したdNTP誘導体($O_{\beta\gamma}$ 修飾体、図1-a)が報告されており、DNAPの反応解析に利用されている¹。興味深いことに一部のdNTP誘導体では間違っただ塩基取り込み時にリン酸ジエステル結合形成速度の著しい低下が報告されており、化学修飾を施したdNTPによって正確性を向上できることが示唆されている^{1,2}。しかしながらこれらの報告は真核細胞のDNA polymerase β を用いた一塩基取り込み実験の結果であり、耐熱性のDNAPを用いた連鎖反応であるPCRにおいて適用できるかどうかは未知数であった。

まず筆者らは既報の $O_{\beta\gamma}$ 修飾体がPCRで扱うDNAPの基質として利用可能かどうか調べた。その結果、一塩基取り込みは確認できたもののPCRによるDNAの増幅は起こらなかった。全体的な反応速度の低下が原因と分かったため、より影響が少ないと思われる γ リン酸部に修飾を施したdNTP誘導体(P_{γ} 修飾体、図1-b)をいくつか合成し、評価を行った。その結果、 γ リン酸部に新たにリン酸を導入したテトラリン酸

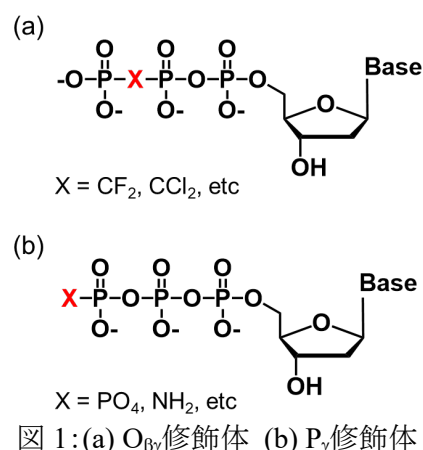


図1: (a) $O_{\beta\gamma}$ 修飾体 (b) P_{γ} 修飾体

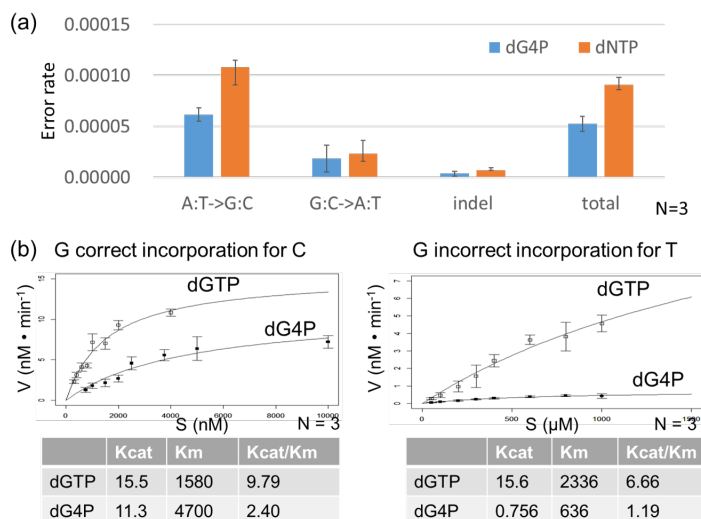


図2: (a) Taq DNAP による PCR の各種変異発生確率 (b) 一塩基取り込み実験による酵素反応解析結果

体がTaq DNA polymeraseを用いたPCRの正確性に影響を与えることが分かった。Taq DNAPの特徴としてA:TからG:Cへの塩基変異を起こしやすいことが知られている³。グアニンのテトラリン酸体であるdG4Pを用いることで、この変異発生率を低減し、2倍程度のPCR正確性向上を達成した(図2-a)。

続いて一塩基取り込み実験によりdG4Pの基質としての特性を詳しく調べてみた。正しい塩基取り込み、つまり鋳型鎖のCに対してGが取り込まれる場合、dG4Pの K_m はdGTPと比べて3倍程度大きなものであり、DNAP-DNA複合体に取り込まれる効率は低いことが示唆された。しかし k_{cat} はそれほど変わらないことから、一度複合体に取り込まれればその後のリン酸ジエステル結合形成はdGTPと同様に進行すると思われる(図2-b左)。一方で鋳型鎖のTに対してGが挿入される間違っただ塩基取り込みの場合、dG4Pの k_{cat} はdGTPと比較して著しく低下しており、A:T→G:C変異を起こしにくいことが分かった(図2-b右)。本研究はdNTP誘導体を用いてPCRの正確性を向上した初めての例である。この手法ではdNTPがDNAPに取り込まれる際の正確性を向上させるため、間違っただ塩基取り込み後にこれを修正する機能をもつ市販の高正確性DNAPと組み合わせることで相乗的な正確性の向上が期待できる。

3. ポスト切断プライマーによる3' 突出末端形成

ポスト切断プライマーはPCR後に特定の処理によって片側のDNA鎖を切断し、3'突出末端を形成する(図3-a)。

現在、ポスト切断プライマーは損傷塩基を用いるものと、ホスホロチオエート修飾を用いるものの2種類が報告されている。DNAの損傷塩基であるウラシルや8-oxoGはそれぞれチミンやグアニンとして塩基対を形成する。これらの損傷塩基はそれぞれ Uracil DNA

glycosylase や 8-oxoGuanine DNA

glycosylaseによって除去され、AP endonucleaseによって鎖切断を誘導できる。よってこれらを含むプライマーでPCRを行い、除去酵素で処理することで3'突出末端を作成できる^{4,5}。損傷塩基を利用するポスト切断プライマーは切断箇所がチミンとグアニンに限定されるため、適用できる配列に制限がある点が課題となる。一方でホスホロチオエートを用いる手法は4種類全ての塩基に適応可能であるため配列に制限は無い。しかし、ヨウ素酸化によって切断を行うためDNAの損傷が懸念される⁶。

そこで筆者らは糖鎖部分に化学修飾を導入し、PCR後の光照射によってDNA鎖を切断する新規ポスト切断プライマーを開発した。このポスト切断プライマーは2'位にSe修飾と光保護基を含んでいる。光照射によって保護基が除去されるとSe基が3'位を攻撃し鎖切断が誘起される(図3-a)。この際、5'末端側にリン酸を残すため、切断されたDNAはそのままライゲーション

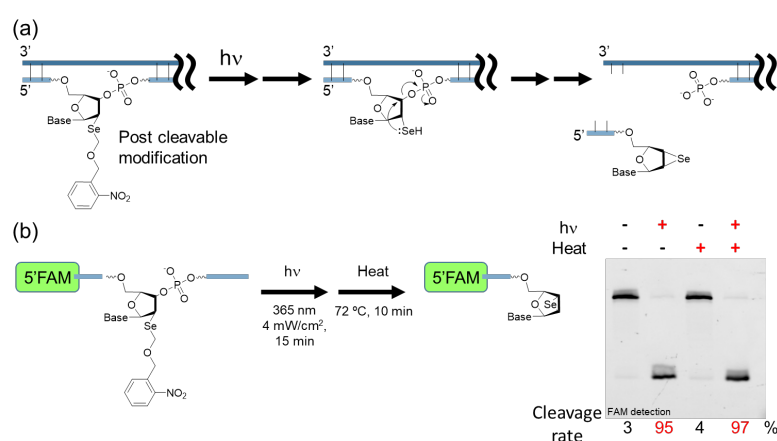
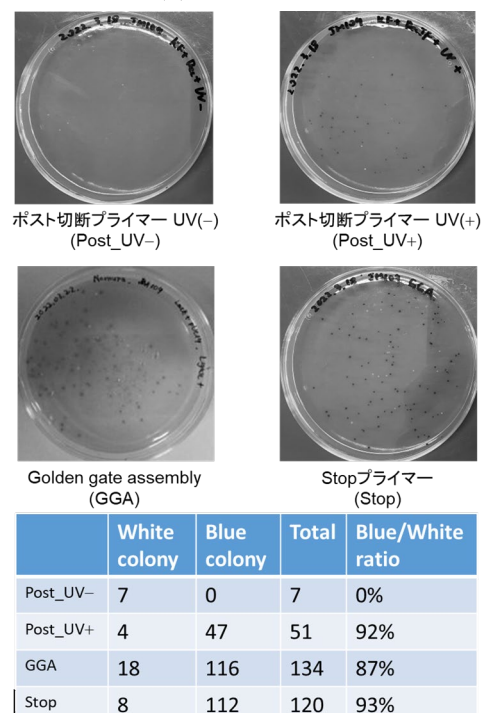


図 3: (a)ポスト切断プライマー概要 (b)光切断効率



ン反応の基質となる。本修飾を含む20 merのポスト切断オリゴを合成し、365 nm光照射を行うことで定量的な鎖切断が確認できた。72 °C、10分での熱処理を行っても鎖切断が全く起こらなかったことから、光照射前の本修飾は熱に対して安定であり、PCRで利用可能であることが示された(図3-b)。糖鎖部分への修飾であるため塩基を選ばずに導入可能であり、DNAへの損傷がほとんどない365 nmの光照射で定量的に切断を起こせる。以上のような特性から有用なポスト切断プライマーであると言える。また細胞内での光切断にも対応可能であり、FRETによってHEK293細胞内での切断が確認できている。

続いて本プライマーによる3'突出末端形成がプラスミド構築に利用できるかどうか確認した。本実験ではプラスミド構築の効率と正確性を青白判定法によって調べた。以下では生じた青いコロニーと白いコロニーの総和が効率を、青いコロニーの割合が正確性を示すものとして評価している。15 ntの突出末端を形成するようにポスト切断プライマーを設計し、PCRによってベクターとインサートを作成した後、光照射による突出末端形成を経て連結を行った。光照射をしていないサンプル(UV-)では突出末端の形成が起こらないため、ほとんどコロニーが生じなかった。また目的のプラスミド構築を示す青いコロニーは全く確認できなかった。一方で光照射を行ったサンプル(UV+)では50個のコロニーが生じ、そのうち9割以上が青コロニーであった。比較対象として行ったGolden Gate Assembly (GGA)によるプラスミド構築では130個のコロニーと9割近い青コロニーが確認できた(図4)。本結果からポスト切断プライマーによるプラスミド構築はGGAと比べて効率の面では劣るが、正確性の点では同等であると評価できる。GGAの突出末端は4 ntで固定されているのに対し、ポスト切断プライマーでは長さや配列を自由に設定できる。よって特異性の高い突出末端を作成可能であり、多断片連結においては有利に働くと思われる。本修飾と光照射を用いることで細胞内外を問わず、任意のタイミングで接着末端の形成を誘導できる。これを利用することで、細胞内においてゲノムDNAビルドアップを行う系の構築を現在進めている。

4. Stopプライマーによる5' 突出末端形成

StopプライマーはPCRにおけるDNA鎖伸長反応を停止させることで5'突出末端を形成する。この手法の特徴として長い突出末端を作りやすい点が挙げられる。DNA断片の連結では突出部分が長い方が特異性とハイブリダイゼーションの安定性が高くなるため有利に働くと思われる。しかしながらポスト切断プライマーでは切断されたDNA鎖を剥がす必要があるため、長い突出末端の作成では複数個所に修飾を導入しなくてはならない。一方でstopプライマーの場合、突出末端の相手鎖がそもそも合成されないため一カ所に修飾を導入すれば事足りる。現在Stopプライマーはチミンに対する修飾導入体のみが報告されているため、損傷塩基を利用したポスト切断プライマーと同様に適用できる配列に制約がある^{7,8}。また光照射による修飾除去によって生じる天然型DNAの収率は40%程度とされており、半分以上の塩基において修飾が残ることが課題となる⁷。

そこで筆者らはリン酸部分に光感受性の化学修飾を導入し、DNAPによる伸長を停止する新規stopプライマーを開発した(図5)。本修飾は塩基の種類に依らず導入可能であり光照射によ

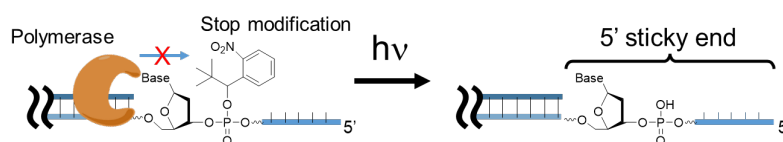


図 5: Stop プライマー概要

って定量的に除去できるため、確実に天然型の5'突出末端を作成できる。また熱に対して安定であり、PCR反応液中で熱サイクルをかけても分解しないことを確認している。まず初めに高正確性PCR酵素として知られている6種類のポリメラーゼを用いて本修飾の停止効率を評価した。二ヶ所連続で修飾を配置することで

6種類全てのポリメラーゼの停止と5'突出末端形成が確認できており、高い汎用性が示された。

続いて本プライマーを用いてプラスミド構築実験を行った。ポスト切断プライマーと同じ15 ntの突出末端を形成するようにプライマーを設計し、PCRによってベクターとインサートを作成した。これらを用いて形質転換と青白判定を行うと120個のコロニーが生じ、9割以上が青コロニーであった(図4)。このことからstopプライマーによるプラスミド構築はGGAと同等の効率で、なおかつ高い正確性をもつと評価できる。同じ15 ntの突出末端配列を持つはずのポスト切断プライマー産物と比べて2倍超のプラスミド構築効率を示したのは突出末端の生成方式によるものと考えられる。ポスト切断プライマーでは切断処理後も15 ntの相補鎖が残っており、これが連結反応を競合的に阻害する。よって長い突出末端作成ではstopプライマーを利用したほうが高い連結効率を期待できる。

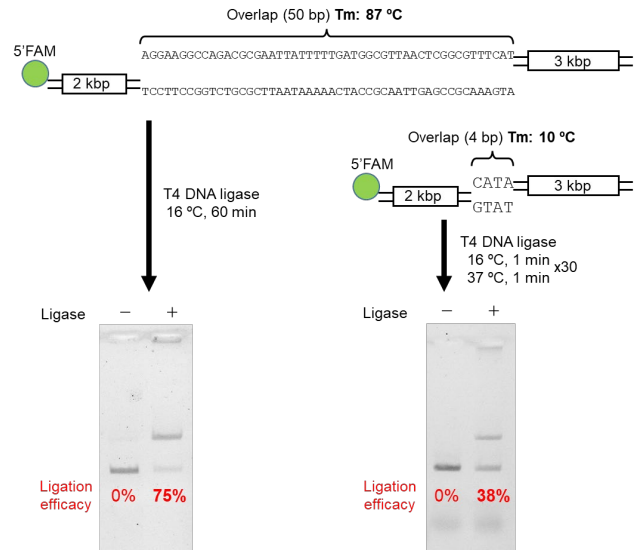


図 6: Stop プライマー(左)および GGA(右)による DNA 連結

さらに長い突出末端の形成も可能であることを示すために、50 ntの突出末端をもつDNA断片の形成を試みた。2,000 bpと3,000 bpのDNA断片について突出末端を形成し、ゲル電気泳動によって調べたところ8割近い連結効率が確認できた。一方でGGAを利用した連結反応を同様に評価すると、その効率は4割程度であった(図6)。Stopプライマーによって作成した50 ntの突出部分のTmは87 °Cであるのに対し、GGAで作成した4 nt突出部分のTmは10 °C以下となる。この高いTmが突出部分のハイブリダイゼーションを安定化し、連結効率の向上に繋がったと考えられる。なお本実験では連結反応後、strand displacement活性をもつポリメラーゼであるKlenow fragmentでサンプルを処理し、ハイブリダイゼーションを起こしているDNA鎖同士を引きはがしている。よってリガーゼによってリン酸ジエステル結合を形成したDNAのみが連結産物として効率評価に使われている。

前述の通り制限酵素による突出末端形成は4,000 bpを超えるDNA断片では困難となる。一方でstopプライマーではPCRによる増幅が可能であればあらゆる配列、長さの突出末端を形成できる。そこで10 kbp超のDNA断片を複数用意し、これを連結することで48 kbpのラムダファージゲノムDNAの作成を試みた。本実験ではラムダファージゲノムDNAを9 kbp, 12 kbp, 13 kbp, 14 kbpの4断片に分割し、stopプライマーによりそれぞれが50 ntの突出末端を持つように設計した。2,000 bpと3,000 bpの連結実験の時と同様の高い連結効率を期待したが、2断片の連結産物は確認できたものの3断片以上が連結した産物は確認できなかった(図7左)。断片長が長くなり分子量が大きくなるにつれて突出末端の相対的な濃度は低くなる。こ

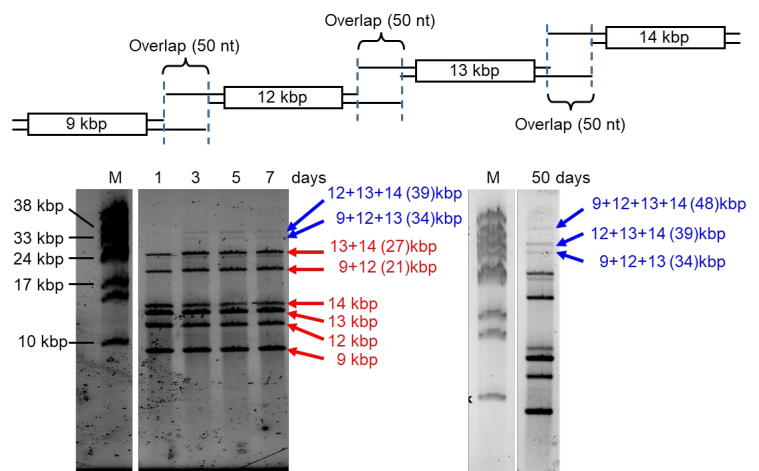


図 7: 4断片連結によるラムダファージゲノム DNA 作成

れが原因でハイブリダイゼーションが起りにくくなっていると考え、断片同士の混合物を室温で長時間放置した。すると3日間放置したサンプルからは3断片の連結産物が、50日間放置したサンプルからわずかながら4断片が連結したサンプルが確認できた(図7右)。このことから長鎖DNAの低い連結効率は突出末端形成ではなく、断片同士のハイブリダイゼーションに課題あると示唆された。現在Rad52といったssDNAのハイブリダイゼーションを促進するタンパク質の添加によって解決を試みている。

5. 総括

本研究ではヌクレオチド修飾体を用いることでPCR正確性の向上、および突出末端形成手法の確立を試みた。dNTP誘導体であるdN4PはDNAPへの取り込み時の正確性を上げる基質であり、高正確性DNAPとの相乗的な効果が期待できる。また本研究で開発した糖部もしくはリン酸部に修飾を施した新規ポスト切断プライマーとstopプライマーを用いることであらゆる配列、および長さの突出末端を5'側、3'側を問わず作成できる。特にstopプライマーは長い突出末端の形成が可能であり、従来法よりも高いDNA断片連結効率を達成した。これらを組み合わせることで正確性が高く、かつ任意の突出末端をもつPCR産物を調製し、ゲノムスケールのDNA合成手法を確立することで分子生物学および生化学研究の促進につなげたいと思う。

6. 謝辞

本研究は日本科学技術振興機構(JST)の研究推進事業、CRESTの助成[JPMJCR18S1]の元遂行した。また一部修飾ヌクレオチドの合成は岐阜大学岡教授のグループに、stopプライマーの配列設計には東京大学浅井教授のグループに協力を頂いた。ここに記して深く感謝の意を示したい。

References

1. C. A. Sucato, T. G. Upton, B. A. Kashemirov, J. Osuna, K. Oertell, W. A. Beard, S. H. Wilson, J. Florian, A. Warshel, C. E. McKenna, M. F. Goodman, *Biochemistry*, **2008**, 47(3), 870.
2. K. Oertell, B. T. Chamberlain, Y. Wu, E. Ferri, B. A. Kashemirov, W. A. Beard, S. H. Wilson, C. E. McKenna, M. F. Goodman, *Biochemistry*, **2014**, 53(11), 1842.
3. V. Potapov, J. L. Ong, *PLoS One*, **2017**, 12(7), e0181128.
4. C. Meyer, D. Meyer, T. A. Bickle, B. Giese, *ChemBioChem*, **2003**, 4(7), 610.
5. J. Bitinaite, M. Rubino, K. H. Varma, I. Schildkraut, R. Vaisvila, R. Vaiskunaite, *Nucleic Acids Res*, **2007**, 35(6), 1992.
6. M. Blanusa, A. Schenk, H. Sadeghi, J. Marienhagen, U. Schwaneberg, *Analytical BioChem*, **2010**, 406(2), 141.
7. A. Kuzuya, F. Okada, M. Komiyama, *Bioconjugate Chem*, **2009**, 20(10), 1924.
8. A. Kuzuya, K. Tanaka, H. Katada, M. Komiyama, *Molecules*, **2012**, 17(1), 328

2022年8月16日受領

2022年9月9日採択



Exploring the Dynamics of Nucleic Acids at the Single-Molecule Level Using Triplet-Triplet Energy Transfer Kinetics

Jie Xu



SANKEN (The Institute of Scientific and Industrial Research), Osaka University
(xujie45@sanken.osaka-u.ac.jp)

Abstract: As is generally known that nucleic acids are molecules with highly dynamic movement, to track their dynamic movements at the single-molecule level remains an issue for numerous studies, although the super-resolution localization fluorescence spectroscopy has brought optical microscopy into the nanoscale and revolutionized our ability to image biomolecules over the past decades. Herein, we demonstrated a potent method that enables tracking the dynamics of nucleic acids at the single-molecule level in the time range from μ s to ms. We developed this method on the basis of a methodology termed Kinetic Analysis based on the Control of fluorescence Blinking (KACB). By controlling the triplet blinking of ATTO 647N with 1,3,5,7-cyclooctatetraene (COT) through triplet-triplet energy transfer (TTET) reaction occurring between two distinctive sites in nucleic acids, we can gain an understanding of the corresponding nucleic acids' dynamic movements by measuring the TTET kinetics.

1. Introduction

Nucleic acids are highly dynamic molecules. As the carriers of genetic information, inside the eukaryotic nucleus, the long threads of DNA wrap around histone proteins and form nucleosomes with an appearance of a string of beads. Nucleosomes further interact with each other and lead to 30-nm compact chromatin fibers. They are organized into hierarchical structures through loops and topologically-associating domains (TADs) by an active loop extrusion process mediated by structural maintenance of chromosomes (SMC) protein complexes.^[1] During the interphase of cell cycle, chromatin is dynamically reeled and extruded as loops by cohesin to contribute to the genomic functions. In the mitotic phase, the highly condensed chromatin fibers called chromosomes is organized by condensin to ensure the proper separation of sister chromatids. The hierarchical chromatin organization is vital for gene transcription, expression, regulation and recombination. Chromosome 3D organization and the mechanism behind the highly dynamic structural changes have been foregrounded and long fascinated scientists. The combinations of biological, biochemical, and biophysical

techniques especially single-molecule measurement have been proven to be a powerful approach for more-in-depth study in the near future.^[2-4]

On the other hand, RNAs are known to fold into different 3D structures ranging from secondary stem-loop structure to complex tertiary and quaternary structures for achieving diverse cellular functions like catalysis, comprising the building blocks of ribosomes, and gene regulation, in addition to the primary role of maintaining the genetic information in protein synthesis. Once triggered by specific effectors and/or the change of the surrounding environment, RNAs dynamically transform between different conformations to perform discrete biological functions.^[5] The dynamic sampling of proper conformations is therefore of great significance for RNAs to function properly.

By measuring the 3D structures of nucleic acids at high (atomic) resolution, the corresponding static structures can be decrypted, which can provide valuable knowledge on nucleic acids' functional and regulatory mechanism. However, in contrast to proteins, the intrinsic heterogeneity of nucleic acids gives rise to great challenges to the measurement of their structures using techniques such as X-ray crystallography with high resolution and NMR for longer sequences (over 100 nucleotides).^[6] Meanwhile, the static structural characterization cannot reflect the dynamics of conformational transitions. This is because, usually, the captured structure images represent a specific state or different conformational states of the same biomolecule. It should be noted that some methods that aim to both sort the static structure snapshots and extract information about dynamics by connecting different conformational states are emerging.^[7] The above-mentioned challenges of measuring nucleic acids' 3D structures and the incapability of static structures to revealing conformational transition dynamics necessitate imaging the real-time conformations and tracking the dynamics of nucleic acids. Real-time fluorescence assays accommodate the needs. The super-resolution localization spectroscopy has brought optical microscopy into the nanoscale and revolutionized our ability to image biomolecules. However, the localization-based super resolution methods are mainly applied to resolve intracellular structures and spatial information of labelled biomolecules in tissues at a resolution below the diffraction limit. To track the dynamics of biomolecules including conformational changes and the intra- and intermolecular interactions, the techniques of total-internal reflection fluorescence (TIRF) spectroscopy, Förster resonance energy transfer (FRET), and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) would be good fits. These techniques performed at the single-molecule level enable an understanding of the dynamics of individual molecules that would otherwise be hidden in the ensemble measurement.

It is a universal characteristic in real-time fluorescence assays that the fluorescence signal blinks. The blinking is commonly undesirable. While in the FCS measurement, fluorescence blinking can be adopted to reflect the intrinsic properties of biomolecules. This is developed based on the concept that the blinking emitted from a single fluorophore can be controlled in such a way that the blinking pattern is governed by the intrinsic properties of biomolecules and at the same time it can be readily detected even under a background fluorescence. Over the past decade, Prof. Kawai and coworkers have been developing such a methodology that utilizes the kinetics of photo-induced reactions to extract the information of nucleic acids' conformations and the corresponding changes. The photo-induced reactions occur between a fluorophore introduced into nucleic acids and a control molecule. The changes in nucleic acids' conformations or the microenvironment would cause changes in the kinetics of photo-induced reactions. Therefore, a correlation between the both would be

established. Since the kinetics of photo-induced reaction between a fluorophore and a control molecule is measured by fluorescence blinking, the methodology is called kinetic analysis based on the control of fluorescence blinking (KACB). Prof. Kawai gave a thorough explanation of it in this journal, vol. 1, 2017. This methodology has shown success in studying the local conformations and conformational switching dynamics of single-stranded, double-stranded, hairpin-loop, mismatch, bulge, and triple-helix nucleic acids, and antigen-antibody interactions.^[8–17] In these studies, the fluorescence blinking is controlled by redox reactions (rKACB) or *trans-cis* isomerization reactions (iKACB). In this work, we expand the KACB methodology and supply an additional choice—kinetics of triplet-triplet energy transfer (TTET) reaction—to accessing the dynamics of nucleic acids.^[18]

2. Method Development

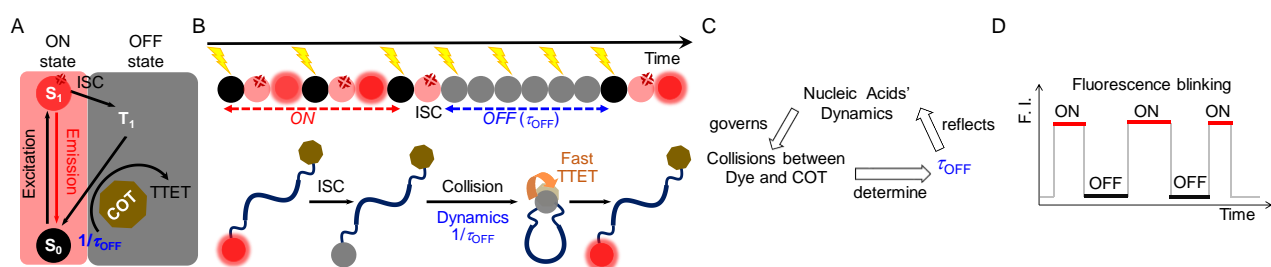
1,3,5,7-cyclooctatetraene (COT) is chosen as the triplet energy acceptor herein. This is due to the following reasons: 1) COT reacts with the triplet (T_1) state of the fluorophore through TTET and generates no charge-separated products; 2) COT has a relaxed T_1 state and the energy level is only 0.8 eV; 3) COT's T_1 state has a short lifetime, and it dissipates its energy as heat; 4) The intermolecular TTET reaction between COT and the T_1 states of normal fluorophores are very fast. The reported TTET constants of COT with some representative triplet donors such as biphenyl, naphthalene, acridine, pyrene, and anthracene in benzene are on the order of 10^8 – $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. As a result, COT is such an efficient triplet energy acceptor that depopulates T_1 and thereby enhances the photostability of fluorophores.

Apart from for fluorophores' photostability enhancement, COT herein is also used for controlling the triplet blinking of fluorophores by TTET. This is achieved through the dynamics of biomolecules (*vide infra*).

The triplet blinking is measured by FCS. As shown in Scheme 1, when a fluorophore is excited to the singlet-excited (S_1) state, it emits. While the fluorophore repetitively emits upon excitation, it is in the ON state. Occasionally, via intersystem crossing (ISC) the fluorophore enters the T_1 state and hence stops emitting, the state of which is called the OFF state. The T_1 -involved reactions such as TTET can depopulate T_1 and brings the fluorophore back to the emissive state, i.e., the ON state. The transitions between the ON and OFF states cause the fluorophore to blink, and this is called fluorescence blinking. T_1 -induced fluorescence blinking is called triplet blinking. Once introducing a fluorophore and COT simultaneously into nucleic acids, when the system enters the OFF state via ISC, if the conformational dynamics of nucleic acids brings the fluorophore in its T_1 state into collisions with COT, fast TTET reaction would occur, and this would make the system re-emit immediately. Therefore, the conformational dynamics of nucleic acids governs the collision between the fluorophore and COT and thereby the OFF time, τ_{OFF} . The measurement of τ_{OFF} would reflect the dynamics of nucleic acids. By deciphering the fluorescence blinking pattern, i.e., the ON-OFF pattern, τ_{OFF} can be obtained.

Herein, T_1 -involved TTET reaction is utilized to control the fluorescence blinking. However, most studies that take advantages of photo-induced reactions to track the dynamics of biomolecules employ the electron or energy transfer reactions occurring on the S_1 state of a fluorophore. The S_1 state normally has a lifetime in the ns timescale. In sharp contrast, because of the difference in electronic state from the ground state S_0 , the lifetime of the T_1 state is much longer. It is in the range from μs to ms timescales, which is approximately four to six orders of magnitude longer than the S_1 state. Therefore, the long lifetime of T_1 state enables the measurement

of nucleic acids' conformational dynamics in a wider time range than that S_1 state does.



Scheme 1. (A) Schematic illustration of ISC-triggered and TTET-controlled triplet blinking of a fluorophore by COT. It should be noted that under the adopted deoxygenated conditions, T_1 is mainly depopulated by COT, rather than by other pathways such as radiationless decay and energy transfer with molecular oxygen (O_2). (B) Schematic illustration of how to use TTET kinetics to access the dynamics of nucleic acids. (A and B are adapted from ref. 18 with permission from *Angew. Chem. Int. Ed.*) (C) The relationships among nucleic acids' conformational dynamics, collisions between the fluorophore and COT, and τ_{OFF} . (D) Representative illustration of the observed fluorescence blinking pattern.

3. Experiments and Results

First, we verified whether in the presence of COT the triplet blinking of a fluorophore can be controlled by having collisions with COT. In order to accomplish this, a double-stranded DNA (dsDNA) platform is applied. In this platform, COT and a fluorophore are spatially separated with each other by a single-stranded DNA (ssDNA) spacer, poly dA ((dA) $_n$) or poly dT ((dT) $_n$), ($n = 3, 6, \text{ or } 12$) (Figure 1A).

Using ATTO 647N as the fluorophore, we measured the fluorescence blinking of (dA) $_{12}$ -spacer dsDNA in the presence and absence of COT. The observed 5-fold higher count rate in the presence of COT than that in the absence of COT demonstrated the role of COT as a triplet acceptor which depopulates ATTO 647N in its triplet excited state ($^3\text{ATTO 647N}^*$) (Figure 1B). Moreover, the noticeable triplet blinking component in the presence of COT corroborated the control of the triplet blinking of ATTO 647N by COT (Figure 1C).

We then investigated how the spacer between ATTO 647N and COT affects the triplet blinking. The results of fluorescence blinking measurement (Figure 2) indicated that the TTET kinetics between ATTO 647N and COT is correlated with the conformational dynamics of the ssDNA spacer. As the increase in the length of the spacer, the increase in the value of OFF time (τ_{OFF}) was observed. τ_{OFF} also shows a dependency on the sequence composition of the spacer. Therefore, the TTET kinetics measured by the triplet blinking of ATTO 647N herein reflects the length- and sequence-dependent conformational dynamics of ssDNA spacer.

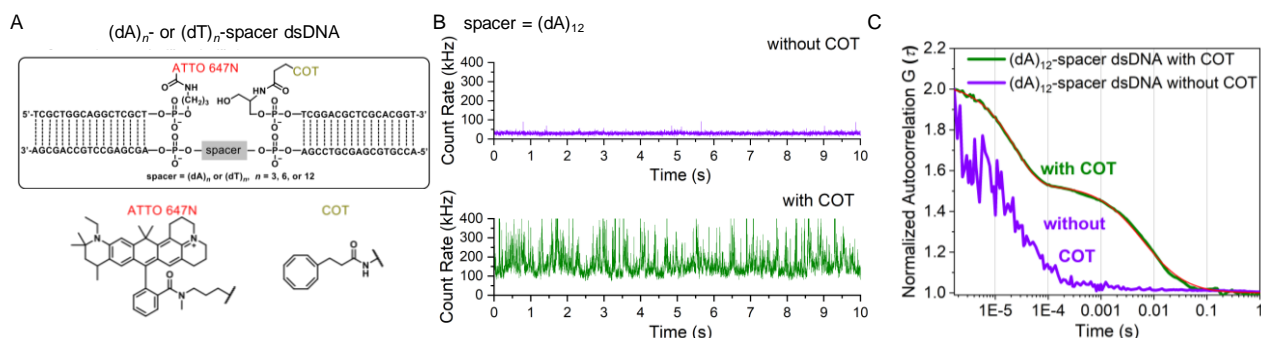


Figure 1. (A) The dsDNA platform. (B) Typical fluorescence time traces and (C) FCS autocorrelation curves of (dA) $_{12}$ -spacer dsDNA without and with COT. (Adapted from ref. 18 with permission from *Angew. Chem. Int. Ed.*)

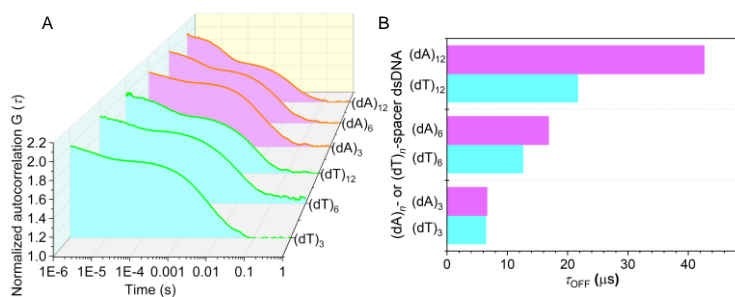


Figure 2. (A) FCS autocorrelation curves of $(dA)_n$ - and $(dT)_n$ -spacer ds DNA ($n = 3, 6, \text{ or } 12$). (B) Bar graphs of τ_{OFF} obtained in A. (Adapted from ref. 18 with permission from *Angew. Chem. Int. Ed.*)

Using the dsDNA platform, we also tested the triplet blinking when employing other fluorophores including Cy5, tetramethylrhodamine (TAMRA), Alexa 568, and Alexa 633 as the triplet energy donors. The average number of photons emitted in each ON state before the formation of T_1 is a characteristic for a given fluorophore, while it varies for different fluorophores. In addition, the redox potential and other properties of T_1 state differ from one fluorophore to another. The results suggest that ATTO 647N is the optimum choice under the employed conditions.

Considering that COT is not only a triplet energy acceptor but also a photo-stabilizer that improves the photostability of ATTO 647N, the triplet blinking controlled by COT was further monitored at the single-molecule level. Specifically, we extended the method for the detection of a microRNA biomarker—mir-155. As shown in Figure 3A, a molecular beacon probe is used. It bears ATTO 647N and COT in the hairpin loop region. More importantly, it undergoes a conformational change upon binding to the target. The conformational change can be monitored by measuring TTET kinetics between ATTO 647N and COT. We observed a marked difference in the distribution of τ_{OFF} value in the presence and absence of the target molecule **2** (Figure 3C). In the presence of target molecule **2**, the τ_{OFF} value is about one-half of that in its absence. This suggests the validity of using the TTET kinetics for the detection of this miRNA biomarker at the single-molecule level.

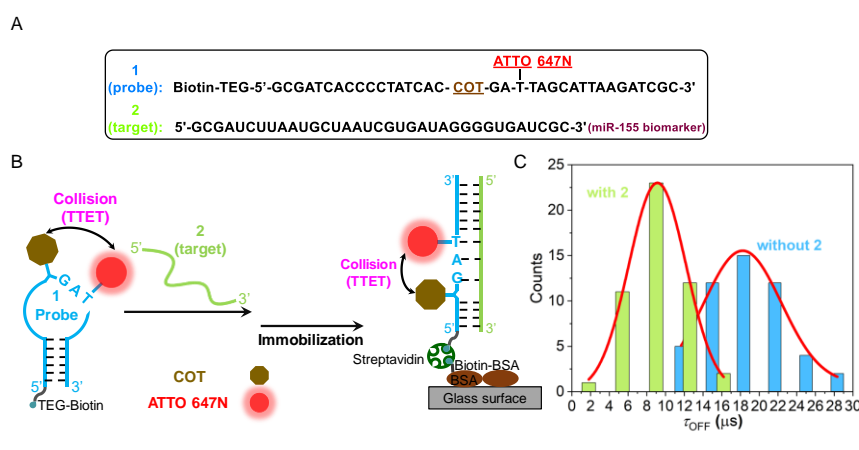


Figure 3. (A) The molecular beacon probe (**1**, probe) and the microRNA biomarker (**2**, target). (B) Schematic illustration of using TTET kinetics to detect target molecule **2** at the single-molecule level. (C) Histograms of τ_{OFF} value measured without and with target molecule **2**. (Adapted from ref. 18 with permission from *Angew. Chem. Int. Ed.*)

4. Conclusion

In Summary, we herein explored controlling the triplet blinking of a fluorophore with COT through TTET reaction and employ the measurement of TTET kinetics for accessing the conformational dynamics of nucleic acids. We offer a potent method for studying the conformational dynamics of nucleic acids and detecting the cancer RNA biomarker at the single molecule level in the time range from μs to ms .

TTET reaction requires a Van der Waals contact between the triplet energy donor and triplet energy acceptor.

This is different from the widely-adopted FRET reaction. FRET is a singlet-singlet energy transfer process, and it is applicable to the conformational dynamics occurring within 10 nm. Instead, the method of using TTET kinetics allows studying the dynamics with a smaller distance change in the angstrom scale. Therefore, the method offered here serves as a complementary method to the widely adopted FRET technique for the study of conformational dynamics of nucleic acids.

Multi-color single-molecule FRET (smFRET) has been used for studying the dynamics of DNA and proteins.^[19,20] This makes it possible to study the complex dynamics of biomolecules or biological systems that involves multiple sites and occurs simultaneously. It is envisioned that our method of using TTET kinetics can also be extended to multi-color single-molecule measurement using FCS. Compared with multi-color smFRET, the fact that COT does not need extra excitation might provide some simplicity. To clarify this and for the practical application of this method, for example, in the study of chromosome 3D organization and the mechanism of DNA loop extrusion, further exploration is expected.

5. Acknowledgements

I would like to thank Prof. Kiyohiko Kawai for his invaluable guidance and patience. I could not have undertaken this journey nor made it through this challenge without his expert help. I am also grateful to Prof. Mamoru Fujitsuka and Prof. Atsushi Maruyama who generously provide knowledge and expertise. I would also like to express my sincere thanks to Shuaya Fan and Lei Xu for the experimental and emotional support. Additionally, my thanks should also go to MEXT for the financial support to my study in Japan. At last, this work was financially supported by MEXT/JSPS KAKENHI Grant (16H01429, 17H03088, 19K22256) and the Research Program "Five-star Alliance" in "NJRC Mater. & Dev".

References

- 1 I. F. Davidson, J.-M. Peters, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 445–464.
- 2 M. Ganji, I. A. Shaltiel, S. Bisht, E. Kim, A. Kalichava, C. H. Haering, C. Dekker, *Science*. **2018**, *360*, 102–105.
- 3 I. F. Davidson, B. Bauer, D. Goetz, W. Tang, G. Wutz, J.-M. Peters, *Science*. **2019**, *366*, 1338–1345.
- 4 Y. Kim, Z. Shi, H. Zhang, I. J. Finkelstein, H. Yu, *Science*. **2019**, *366*, 1345–1349.
- 5 L. R. Ganser, M. L. Kelly, D. Herschlag, H. M. Al-Hashimi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 474–489.
- 6 H. Ma, X. Jia, K. Zhang, Z. Su, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 58.
- 7 A. Doerr, *Nat. Methods* **2022**, *19*, 29.
- 8 K. Kawai, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 3590–3594.
- 9 K. Kawai, T. Majima, A. Maruyama, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1430–1433.
- 10 K. Kawai, E. Matsutani, A. Maruyama, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15568–15577.
- 11 K. Kawai, M. Fujitsuka, A. Maruyama, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 1001–1010.
- 12 K. Kawai, T. Miyata, N. Shimada, S. Ito, H. Miyasaka, A. Maruyama, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 15329–15333.
- 13 T. Miyata, N. Shimada, A. Maruyama, K. Kawai, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 6755–6761.
- 14 K. Kawai, A. Maruyama, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 7740–7746.
- 15 K. Kawai, T. Koshimo, A. Maruyama, T. Majima, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10478–10481.
- 16 K. Kawai, T. Majima, A. Maruyama, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1430–1433.

- 17 K. Kawai, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 4861–4864.
- 18 J. Xu, S. Fan, L. Xu, A. Maruyama, M. Fujitsuka, K. Kawai, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2021**, 60, 12941–12948.
- 19 J. Yoo, J.-Y. Kim, J. M. Louis, I. V Gopich, H. S. Chung, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 3336.
- 20 A. Sabantsev, R. F. Levendosky, X. Zhuang, G. D. Bowman, S. Deindl, *Nat. Commun.* **2019**, 10, 1720.

2022年8月18日受領

2022年9月9日採択

第48回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2021) 日本核酸化学会第5回年会 開催報告 — 幻の新潟開催、初のオンライン開催 —

大阪大学 理事・副学長、産業科学研究所 中谷和彦

はじめに 2021年(令和3年)11月10日から12日まで、ISNAC2021と JSNAC 第5回年会をオンラインにて開催した。前年開催予定であった ISNAC2020と第4回年会は中止されたので、2年ぶりの開催となった。当初、新潟市朱鷺メッセでの現地開催を目指していたが、COVID-19感染拡大への対応のため、泣く泣くオンライン開催とした。核酸化学で研究させていただき30年。お世話になった諸先輩方、同輩や後輩の皆さんへの恩返しと、これから核酸化学を背負って立つ中堅や若手の皆さんを少しでも元気づけたい。「核酸化学の普及と発展」と「おもてなし」を第一に考えた新潟開催だが、幻に終わった。今回ご報告の機会を頂いたので、何を考えて新潟開催を計画したのか、実行委員会の活動と苦渋の判断、そして、少しでも核酸化学の普及と発展を目指したオンラインシンポジウムを、記録に残させていただきたい。

新潟開催を思い立つ 2021年の ISNAC 開催をお引き受けしたのがいつ頃だったか定かではないが、「大阪で開催するのは面白くないな」とぼんやり考えていた。故今西武先生が核酸化学シンポジウムを大阪大学吹田キャンパスで開催されたことは、記憶に残っていた。私自身、日本ケミカルバイオロジー学会を大阪大学豊中キャンパスの大阪大学会館で開催していたので、阪大の中で開催するのは気が進まなかった。と言って、予算の関係で大阪市内での開催などは到底実現できそうになかった。つらつら考えていたとき、確か新潟のコンベンションから届いていたダイレクトメールに、新潟での学会開催には補助金がたっぷりであると書いてあったことを思い出した。

ご縁を感じて 少し前から、ご縁を頂いて新潟の企業さんとの共同研究で何度か新潟を訪問したこともあり、おおよその地理は把握していた。それと同時に、新潟駅の「ぼんしゅ館」や美味しい食事が頭をよぎった。新潟に行くまで知らなかったことだが、新潟は案外近い。東京からなら新幹線で大阪に来るよりも近いし、大阪—新潟の空路は一日11便(当時)もあり、1時間で着く。これなら大阪にお越しいただくより、新潟に集まっていたら、皆さんに美味しいお酒と食事のおもてなしができそうに思えた。誰から聞いたのかは忘れたが、ホテル日航新潟での懇親会では、コシヒカリのおにぎりに真っ先に列ができるらしい。ああ楽しみ。

本来の趣旨 いやいや、酒と肴ありきで学会の場所を選定したのでは、怖い諸先輩、後輩から、きっと、ずっと、会うたびに、いじられ続けられるに違いない。思い直して、新潟で開催する正当な理由を探してみると、日本海側では ISNAC はおろか、核酸シンポジウムを含めても過去10数年開催されていないではないか。

これだ！核酸化学を日本全国に普及するために、開催実績のない日本海側で開催しようという、誰も反対できそうにない理由を見つけた。実行委員をお願いしていた阪大の岩井成憲先生、小比賀聡先生に相談したところ、お二人ともご賛同くださり、新潟開催の準備が進み始めた。さらに心強いことに、「新潟愛にあふれる」新潟薬科大学の梨本正之先生と気心知れた京大齋藤研出身の新潟大学の田井中一貴先生にも実行委員としてご参画を頂き、新潟開催に向けて万全の体制を整えた。

準備をすすめる 岩井さん、小比賀さんには新潟をご訪問されたことがなかったことから、2020年1月23、24日に、私と3人で新潟を訪問しました。梨本先生のご手配で、会場として予定していた朱鷺メッセの下見や、懇親会会場のホテル日航新潟との打ち合わせ、そして、新潟コンベンション、新潟県観光企画課の方々との補助金申請のご相談など、一挙に準備が進んだ一日でした。帰阪してすぐに補助金の申請書を作成し、後日、新潟県、新潟コンベンションからの補助も確定した。もちろん、おもてなしの予行演習として、みんなでぼんしゅ館と美味しい食事も堪能させていただきました。このまま、新潟での ISNAC2021開催が順調に進むものと、誰もが思っていたのですが。

新潟開催は幻に 2020年3月ごろからの新型コロナウイルス COVID-19の感染拡大を受け、5月後半には ISNAC2020の開催中止が発表され、にわかには新潟開催が怪しくなってきた。朱鷺メッセの収容人数の制限とそれに伴う補助の減額など、現地開催か、オンラインか、それとも現地とオンラインのハイブリッド開催か、なかなか判断がつかず無駄に時間が流れていきました。和田猛会長、和田健彦幹事長に開催延期もご検討願いましたが、前年の ISNAC を中止にしているので、ぜひとも開催してほしいとのご返事。開催方法は実行委員会に任せるとのこと。具体的な準備に入るタイムリミットとなる2021年3月初旬に、泣く泣く完全オンライン開催にすることを決断しました。ハイブリッド開催では、手間が倍かかる上に費用が賄えないこと、現地開催しても懇親会の開催は難しいこと、そうすると、実際に新潟にお越しくださる方の数が読めないことなどが理由。ホテル日航新潟での懇親会、真っ白なコシヒカリのおにぎりを頬張る皆さんの嬉しそうな顔が、目の前から消えていきました。

初のオンライン開催に向けて 完全オンラインに切り替えると判断した後は、ISNAC2021をいかに本来の開催趣旨の通り、核酸化学の普及と発展につなげるかに取り組みました。これまで ISNAC の前日に開催されていた核酸化学若手フォーラムを ISNAC の初日に位置づけ、初学者むけに日本語で講演を提供。また、講演を聞くそれぞれの方のロールモデルを見つけていただければと思い、講演者としてジュニア、ミドル、シニア層各一人の3人一組としたチュートリアルセッションを組み、研究の面白さを世代別にお話していただいた。前年度の開催が中止されたことから、池原賞受賞者の先生4名のご講演を、ご希望に沿って若手フォーラムと本会議に分散させていただきました。結果的には、参加者総数329名で、収支もプラマイゼロ、海外からの招待講演を含めてトラブルもなく、無事に ISNAC2021を開催することができた。当初の目標であった核酸化学の普及と発展にどの程度お役に立てたかは定かではないが、実行委員会として出来得る限りのことはさせていただいたと思う。

人間万事塞翁が馬 ISNAC の実行委員長を務めさせていただけるのは、一生に一度の大変光栄な、そして、貴重な機会である。その機会に、初めてのオンライン開催ではあったものの、現地開催で仲間との大切な時間を対面で共有できなかったことは、大変残念であった。なぜこのタイミングでと思っても仕方のないこ

とではあるのだが。東北や熊本の震災後の開催にご尽力された先生方、そして、昨年中止を決断された先生方から比べると、オンライン開催などたいしたことはないのかもしれない。でも、煩惱を振り切れない私にはあまりにも悔しくて残念な判断であったので、二日目の途中で私一人だけ大阪から新潟に移動してオンライン懇親会は新潟のホテルから参加した。もちろん、ぽんしゅ館で買ってきた新潟のお酒と「ポ」のお猪口が、手元にはあったことは言うまでもない。幻に終わるかと思ったコシヒカリのおにぎりは、梨本先生の奥様から手作りのおにぎりを頂戴した。帰りの新潟空港のベンチでひとり頂いたが、涙がでるほど美味しかった！



感謝を込めて 最後に、新潟開催に向けた準備にご協力をいただきました、新潟県観光企画課、新潟コンベンション、朱鷺メッセ、ホテル日航新潟の関係者の皆様に、心よりお礼申し上げます。また、オンライン開催を無事に進めていただいたJTBの関係者の皆様、実行委員会の皆様、実施担当を引き受けていただいた先生方、そして、ISNAC2021にご参加いただいた全ての皆様に、厚くお礼申し上げます。尚、日本海側での ISNAC は2025年に富山で開催が予定されている。核酸化学の益々の発展を心より祈念しています。(2022年8月、大阪にて)

日本核酸化学会誌, Vol. 6 (2022)

2022年11月2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 井川善也（富山大学大学院学術研究部理学系）

E-mail: yikawa@sci.u-toyama.ac.jp

Tel: 076-445-6599

* 本誌掲載記事の無断複製・転載を禁じます。