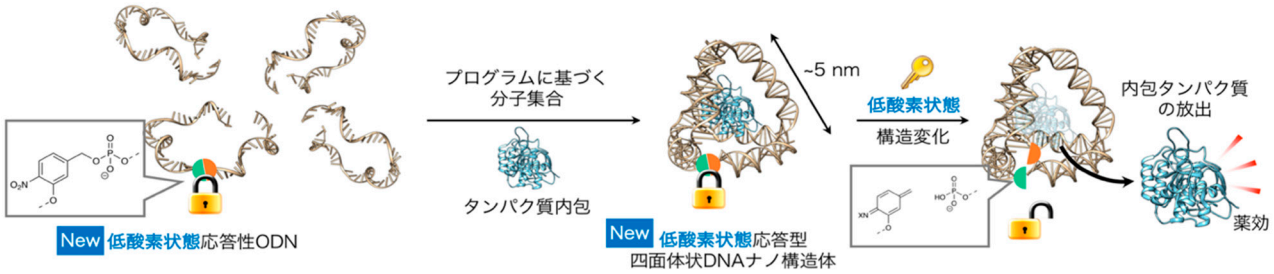
72　低酸素状態に応答する新たなDNAナノ構造体の創製	池田　将

【目的】本研究の目的は、低酸素状態に応答して精密な構造変化を示す新規な DNA ナノ構造体の創製である。DNA ナノ構造体に関する研究は、ナノテクノロジーの中核分野へと発展し、DNA 鎖の長さ・配列・組み合わせ等を設計することによって新たな形状の DNA ナノ構造体が創出され続けている。近年、このような DNA ナノ構造体は、生体・医療用ナノ材料としての活用が期待されている。しかしながら、狙った刺激に応答する DNA ナノ構造体の構築やそのための化学的な方法論の開発は、ほぼ未着手のまま残されている。本研究では、低酸素状態に関連する還元的な環境に応答する DNA 構造体の構築を目的とし、新たな分子の設計・開発を行い、その有用性を検証した。DNA ナノ構造体に特定の疾病に関係する生体内環境を刺激として応答する機能を搭載できれば、バイオナノテクノロジー分野のブレークスルーとなる可能性があり、生命科学・医療分野において大きな意義がある。

【方法】本研究の目的を達成するために、ニトロアリール基を組み込んだ ODN を、核酸自動合成装置によって構築するためのモノマー分子の有機合成法を確立した。合成したモノマー分子を用いて核酸自動合成装置によって ODN を構築した。構築した低酸素状態応答性の新規 ODN は、HPLC によって精製し、MALDI-TOF MS によって同定した。次に、低酸素状態に関連する還元刺激に応答した ODN 鎖の切断が、設計通りに進行することを PAGE および MALDI-TOF MS によって実証した。次に、低酸素状態応答性 ODN からなる DNA 構造体を創製し、その還元応答性を評価した。得られた構造体のサイズや形状は、蛍光顕微鏡観察および電子顕微鏡観察によって評価した。

【結果】上記の分子設計指針に基づき合成した ODN が還元応答性を有していることを明らかにした。さらに、サーマルアニーリング操作によるハイブリダイゼーションによって、球状の DNA 構造体を構築した。構築した球状の DNA 構造体が還元環境に応答して崩壊することを各種測定により実証した。以上の結果から、ODN、および ODN からなる DNA 構造体に還元応答性を付与できる新たな分子設計指針を確立することに成功した。

低酸素状態に応答する新たな DNA ナノ構造体の創製



72. 低酸素状態に応答する新たなDNAナノ構造体の創製

池田　将

岐阜大学 工学部 化学・生命工学科 生命化学コース

Key words：低酸素状態，還元環境，DNA構造体，ナノ構造体，自己組織化

緒　言

近年、DNAナノ構造体に関する研究はナノテクノロジーの中核分野へと発展し、DNA鎖の長さ・配列・組み合わせ等を設計することによって新たな形状のDNAナノ構造体が創出され続けている。このようなDNAナノ構造体は、生体・医療用ナノ材料としての活用が期待されている。しかしながら、狙った刺激に応答するDNAナノ構造体の構築やそのための化学的な方法論の開発は、ほぼ未着手のまま残されている。本研究では、低酸素状態に関連する還元的な環境に応答するDNA構造体の構築を目的とし、新たな分子の設計・開発を行い、その有用性を検証した。DNAナノ構造体に特定の疾病に関係する生体内環境を刺激として応答する機能を搭載できれば、バイオナノテクノロジー分野のブレークスルーとなる可能性があり、生命科学・医療分野において大きな意義がある。

本研究では、低酸素状態に応答する新たなDNA構造体を創製した。本研究期間内に進めた研究成果は、以下の学術論文に発表済みである。

【発表論文】Higashi SL, Isogami A, Takahashi J, et al. Construction of a Reduction-responsive DNA Microsphere using a Reduction-cleavable Spacer based on a Nitrobenzene Scaffold. Chemistry, an Asian Journal. 2022 Mar. DOI: 10.1002/asia.202200142. PMID: 35338588.

方　法

1. 還元応答性スペーサー（RCS）の設計と合成

図 1 に示す合成スキームによって、ホスホロアミダイト法によるオリゴ核酸に利用可能な還元応答性スペーサー（RCS）の合成を行った。後述するように、ニトロアリール基からなるRCSは、還元に応答したオリゴ核酸の選択的な切断を可能にすると期待される。具体的には、市販されている化合物**1**を原料に、化合物**2**と反応させることで、収率61%で化合物**3**を得た。次に、化合物**3**にホスホロアミダイト化試薬（CEP-Cl）を作用させ、RCSホスホロアミダイト体である化合物**4**を収率80%で得た。化合物**4**は、^{1}H NMR、^{13}C NMR、^{31}P NMRおよびHRMS測定によって同定した。

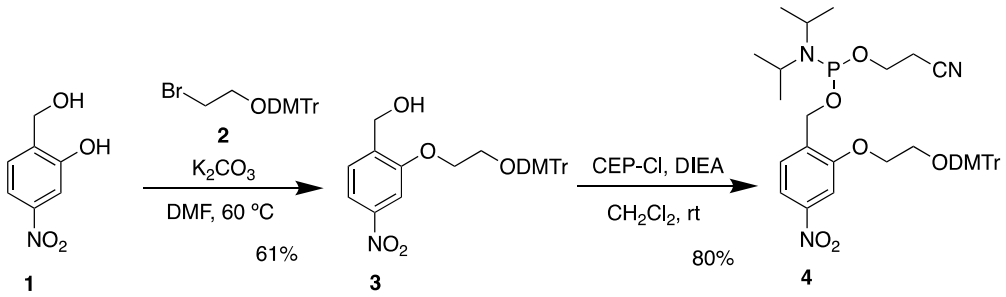


図 1. 還元応答性スペーサー（RCS）のホスホロアミダイト体の合成スキーム
化合物**1**からホスホロアミダイト法による核酸合成に利用可能な化合物**4**を合成する経路。

2. RCS を組み込んだオリゴ核酸（DNA）$s1^{RCS}$ の合成

表 1 に配列を示すオリゴ核酸（DNA）$s1^{RCS}$ の合成を、核酸自動合成機（HTS H-Series H-6 G8A）によるホスホロアミダイト法に従い 1 μmol スケールで行った。天然型塩基のホスホロアミダイトは 50 mM、合成したホスホロアミダイト（化合物 **4**）は 75 mM になるように乾燥アセトニトリルに溶解した。CPG 樹脂は活性に基づき 1.0 μmol をカラムに秤量し、核酸自動合成機に取り付けた。なお、5'-末端は DMTr 基を脱保護せずに合成を終了した。

合成終了後、CPG 樹脂をサンプルストックチューブに移し、28%アンモニア水（1.0 mL）を加え、55℃で 15 時間静置した。冷蔵庫で 1 時間静置した後、樹脂と上清を分け、上清を減圧濃縮し、1.5 mL エッペンチューブに移し、以下に示す条件で IP-HPLC にて精製した。図 2 には精製後の $s1^{RCS}$ の HPLC チャートおよび MALDI-TOF MS スペクトルを示した。

表 1. 本研究で用いたオリゴ核酸の配列

DNA マイクロスフェアを構築するオリゴ核酸（**s1**、**s2**、**s3**）、**s1** に RCS を組み込んだ $s1^{RCS}$、および **s1** の還元応答切断後に生成するオリゴ核酸（**pSE**、$s1^{w/o\ SE}$）。

Abbreviations	Sequences (from 5′ to 3′)
s1	GGCGTGGTAGACCGCACTCGAAAAATTTTT: 30 nt
s2	CGAGTGCGGTGACGATGCCTAAAAATTTTT: 30 nt
s3	AGGCATCGTCCTACCACGCCAAAAATTTTT: 30 nt
$s1^{RCS}$	GGCGTGGTAGACCGCACTCG/**RCS**/AAAAATTTTT: 30 nt
pSE	pAAAAATTTTT: 10 nt
$s1^{w/o\ SE}$	GGCGTGGTAGACCGCACTCG: 20 nt

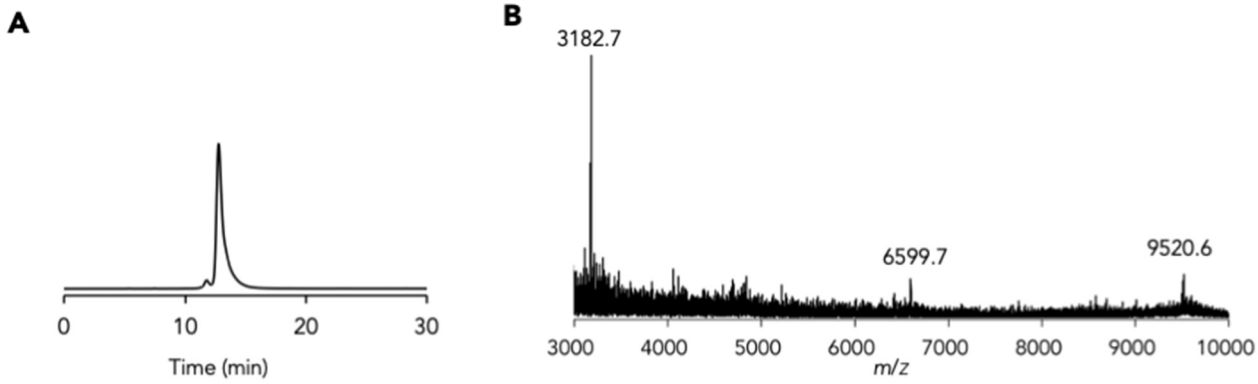


図 2. 精製後の $s1^{RCS}$ の HPLC チャートおよび MALDI-TOF MS スペクトル

a) HPLC 分析条件（IP-HPLC: GL Science Inertsil ODS-3 column（150 mm × 10 mm I.D.）, linear gradient from A : B＝100＊0（A : 0.1 M TEAA containing 5% acetonitrile、B : acetonitrile] to 50 : 50 over 30 min was used with a flow rate of 3.0 mL/min, detection wavelength = 260 nm）。

b) MALDI-TOF MS 測定条件（matrix : 3-hydroxypicolinic acid（3-HPA）、negative mode）。

3. $s1^{RCS}$ を用いた還元応答性 DNA マイクロスフェアの構築

図 3 に示す概念図に基づき還元応答性 DNA マイクロスフェアを構築した。具体的には、3 種類のオリゴ核酸（**$s1^{RCS}$**、**s2**、**s3**）の 10 μM の水溶液（10 mM Tris-acetate（pH 8.3）containing 25 mM $Mg(OAc)_2$ and 1.0 mM EDTA）を 1.5 mL のチューブ内に調製し、サーマルサイクラーT-100TM Thermal Cycler（Bio-Rad）を用いて、70℃から 10℃まで、1℃/min の速度で冷却した。得られた溶液を評価に用いた。

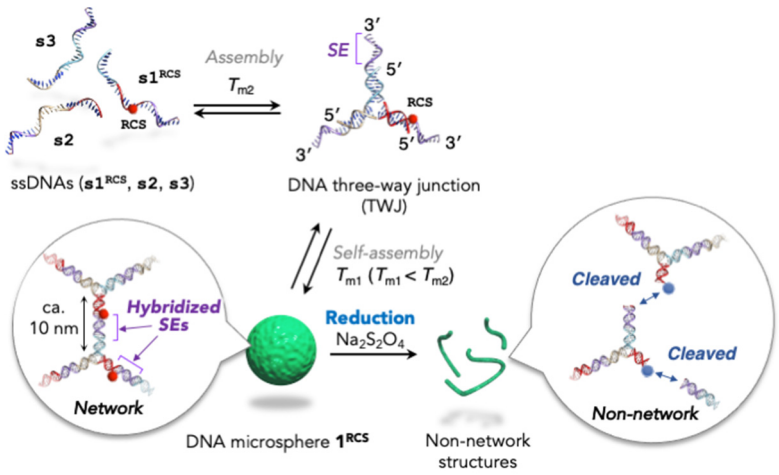


図 3. **$s1^{RCS}$** を用いた還元応答性 DNA マイクロスフェア **1^{RCS}** の構築
3 種類のオリゴ核酸 （**$s1^{RCS}$**、**s2**、**s3**）から構築される DNA マイクロスフェア **1^{RCS}** の生成と還元刺激に応答した崩壊の概念図。

結果および考察

1. 還元応答性 DNA マイクロスフェアの構築

上記の方法 3 によって得られた溶液を、CLSM を用いた蛍光顕微鏡観察することによって、構造体の構築を検証した。その結果、図 5A に示すように期待通り球状の構造体が観察され、図 4 の概念図に示す設計通り DNA マイクロスフェアが生成したことが示された。さらに、図 5B に示すように、還元剤（$Na_2S_2O_4$）を添加したところ、球状構造体が消失した。一方で、同濃度の中性の塩（$Na_2S_2O_4$）の添加では消失はみられず（図 5D）、また、チオール系の還元剤である GSH でも消失しなかった（図 5E）。さらに、DNA 分解酵素である DNase I を添加すると消失したことから（図 5C）、観察された球状の構造体が設計通りに DNA から構築されていることも示された。

以上の結果から、RCS を組み込んだオリゴ核酸 **$s1^{RCS}$** から、還元刺激に応答する DNA 構造体の構築が可能であることが実証された。

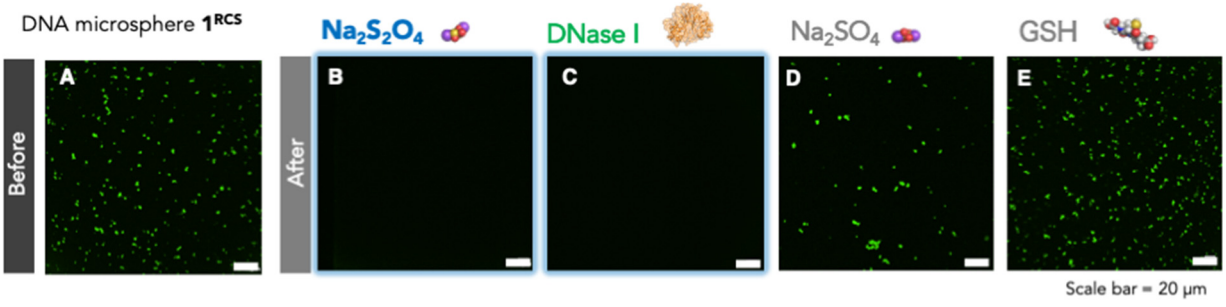


図 5. 還元応答性 DNA マイクロスフェア **1^{RCS}** の CLSM 観察
a） 刺激添加前の観察画像。
b～e） 各刺激添加後の観察画像。

2. オリゴ核酸 s1^{RCS} の還元応答による切断の検証

オリゴ核酸 **s1**^{RCS} が還元剤添加によって切断されていることを PAGE 分析により評価した結果を図 6 に示している。還元剤（$Na_2S_2O_4$）の濃度が上昇するにしたがって、RCS の部位で切断されたことを示す新たなバンドが確認され、20 mM 以上で原料の **s1**^{RCS} のバンドが消失していることが確認できた。この結果は、図 5 で示した DNA マイクロスフェア **1**^{RCS} の還元応答性が、それを構築しているオリゴ核酸 **s1**^{RCS} の切断に起因することを支持している。

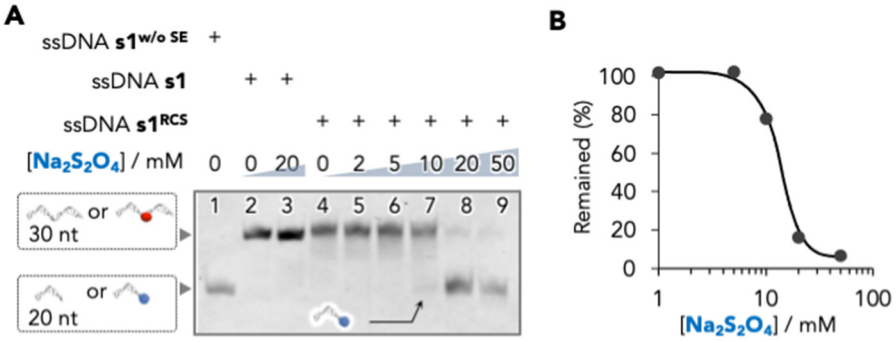


図 6. オリゴ核酸 **s1**^{RCS} の還元応答

a) PAGE（20%、denatured、SYBR Green Ⅱ）分析結果。

b) バンド強度から見積もった切断効率の $Na_2S_2O_4$ に対する濃度依存性。

本研究で確立した新たな分子設計指針［1］は応用性と普遍性が高く、これまでに当研究室で開発した還元応答性グアニン［2～4］とも組み合わせることで、核酸の配列設計次第で多様な環境応答性の DNA 構造体を創製する手法に適用可能であり、有用性が高いと期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜大学糖鎖生命コア研究所（iGCORE）の鈴木健一教授、名古屋工業大学大学院工学研究科生命・応用化学専攻の築地真也教授、澤田隼佑博士、鳥取大学大学院工学研究科の松浦和則教授、岐阜大学化学・生命工学科の柴田綾助教、東小百合特別協力研究員、磯上彩夏、高橋順子である。

文　献

1) Higashi SL, Isogami A, Takahashi J, et al. Construction of a Reduction-responsive DNA Microsphere using a Reduction-cleavable Spacer based on a Nitrobenzene Scaffold. Chemistry, an Asian Journal. 2022 Mar. DOI: 10.1002/asia.202200142. PMID: 35338588.

2) Ikeda M, Kamimura M, Hayakawa Y, Shibata A, Kitade Y. Reduction-Responsive Guanine Incorporated into G-Quadruplex-Forming DNA. Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology. 2016 Jul;17(14):1304-1307. DOI: 10.1002/cbic.201600164. PMID: 27124306.

3) Hayakawa Y, Banno A, Kitagawa H, et al. Reduction-Responsive DNA Duplex Containing *O*^{6}-Nitrobenzyl-Guanine. ACS Omega. 2018 Aug;3(8):9267-9275. DOI: 10.1021/acsomega.8b01177. PMID: 31459058; PMCID: PMC6645092.

4) Banno A , Higashi S , Shibata A , Ikeda M . A stimuli-responsive DNAzyme displaying Boolean logic-gate responses. Chemical Communications (Cambridge, England). 2019 Feb;55(13):1959-1962. DOI: 10.1039/c8cc09345h. PMID: 30681683.