

1. 研究課題名: 光応答型インテリジェント核酸を用いた遺伝子操作法の開発

2. 研究者氏名: 藤本健造

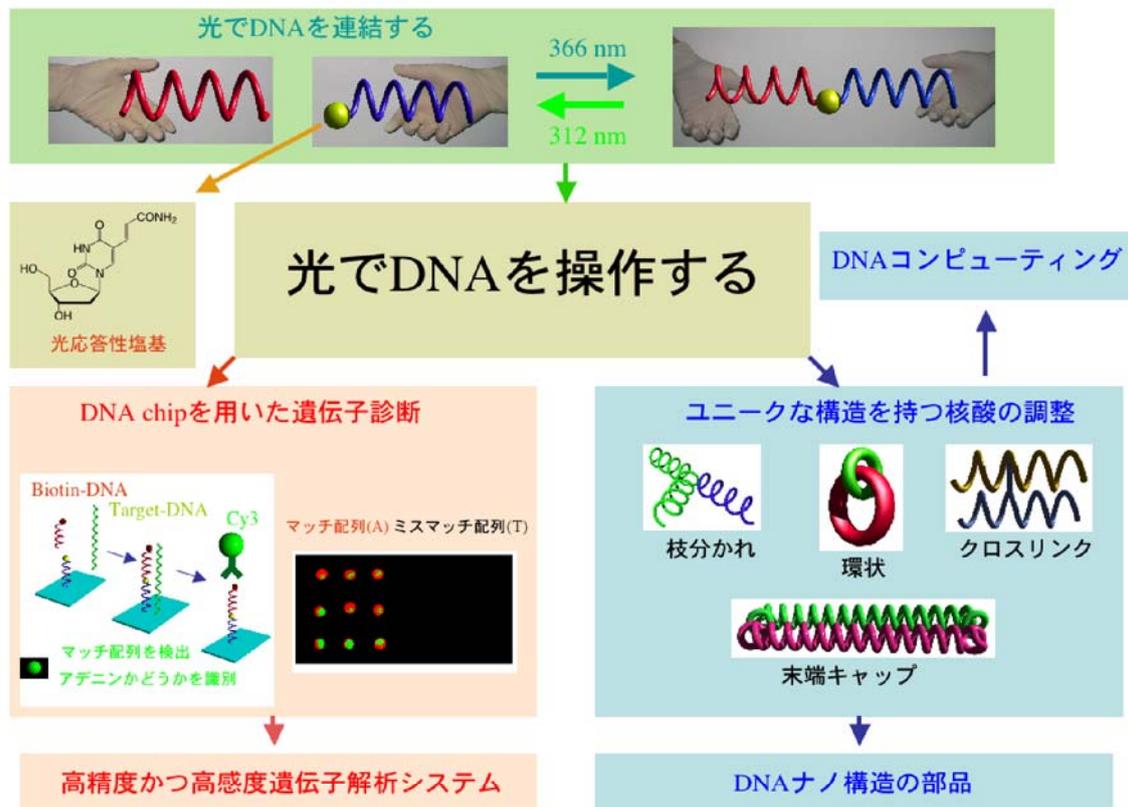
研究員: 吉村嘉永 (研究期間 H. 15. 4~ H. 18. 3)

研究員: 野口悠紀 (研究期間 H. 17. 4~ H. 18. 3)

3. 研究のねらい: 遺伝子操作の「脱酵素化」に取り組み、光応答型遺伝子操作という新しい方法論の開発を行う。現代の遺伝子工学は酵素を用いた遺伝子操作に基づくものであり、生体内細胞中での操作、マイクロマシン上での操作には限界があるとされてきた。光応答型遺伝子操作法を開発することで、これらの問題を解決し、細胞内での遺伝子治療、マイクロチップ上での遺伝子診断、バイオコンピューティング等へ展開することを目的とした。

4. 研究成果: 図にまとめると下図の通りである。以下の通り成果を分類し、順に報告する。

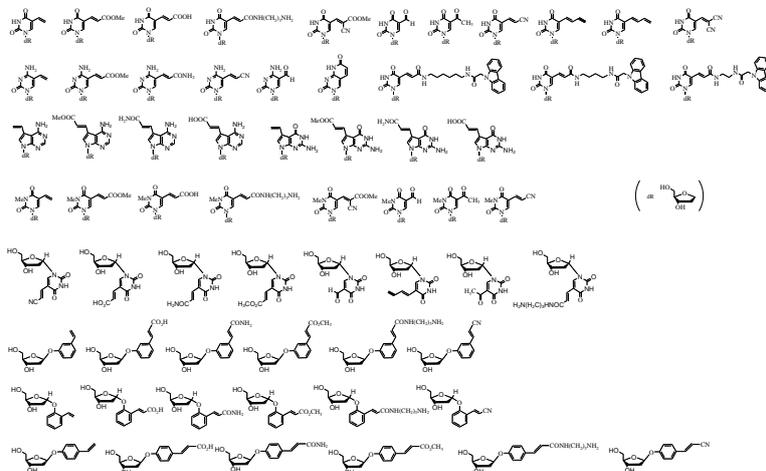
- 1) 「脱酵素化」を可能にする光応答性人工核酸を設計し人工核酸ライブラリーを作製
- 2) それらを用いて今まで作ることの出来なかったユニークなナノ構造の構築に成功
- 3) DNA チップ上での光遺伝子診断への応用に成功(今までにない高い S/N 比)
- 4) DNA コンピューティングへの応用に成功



1) 「脱酵素化」を可能にする光応答性人工核酸ライブラリーを作製

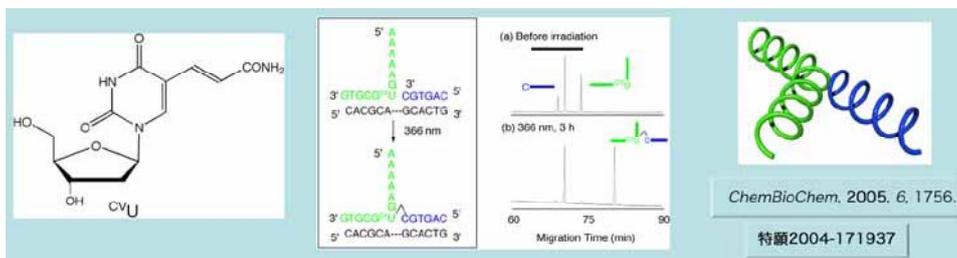
述べ100種類の人工核酸塩基及びヌクレオチドを合成した(下図参照)。

Modified Nucleosides Library for DNA Photoligation

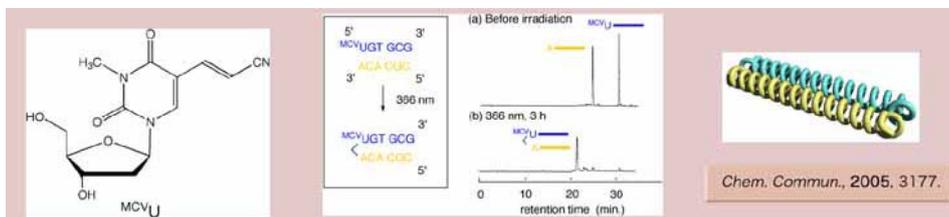


2) ユニークなナノ構造の構築に成功

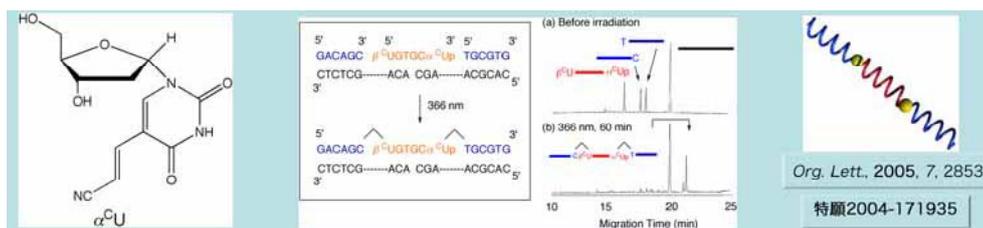
- 2-1 枝分かれ核酸の合成 —CVUを用いることで任意の位置で枝分かれ構造を導入することが可能となった。 *ChemBioChem*, 2005, 6, 1756. 特願 2004-171937



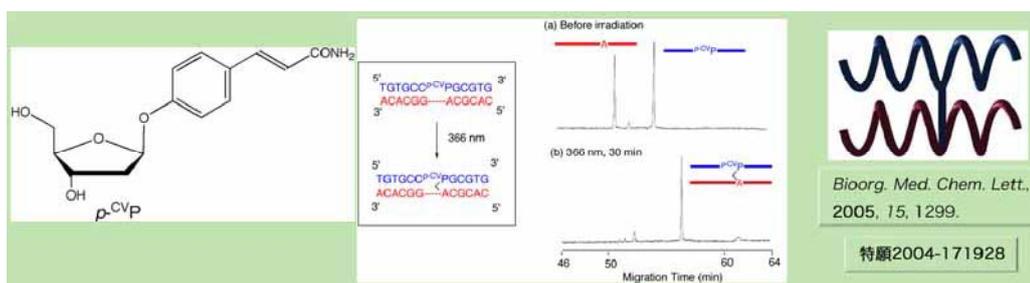
- 2-2 キャップされた核酸の合成 —MCVUを用いることによりDNA末端部位でキャッピング構造を導入することが可能となった。またキャッピングされることで酵素耐性を獲得することを見出した。 *Chem. Commun.*, 2005, 3177.



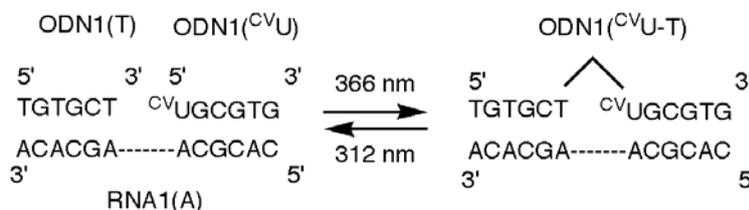
- 2-3 キャップされた核酸の合成 — α^{O} Uを用いることによりDNA3'末端側で連結することが可能となった。また両末端での連結が可能となり天然のDNA断片同士を連結することに成功した。 *Org. Lett.*, 2005, 7, 2853. 特願 2004-171935



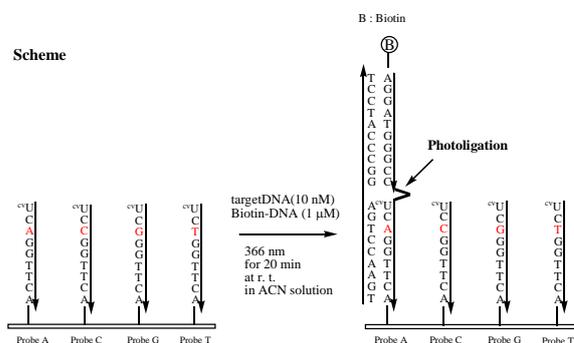
- ・2-4 相補鎖DNAへのクロスリンク核酸の合成 —p-CVPを用いることで相補鎖DNAへの光クロスリンク核酸が合成できることを見出した。Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, 15, 1299. 特願 2004-171928



- ・2-5 RNA を鋳型とした DNA 光連結 —具体的なナノ構造構築とまで進んでいないが、鋳型が RNA であってもこれら上記の反応が進行することを見出した。RNA を鋳型にして DNA 同士を連結することはリガーゼでは難しいので非常に有意な反応開発に成功したと考えている。ChemBioChem, 2006, in press



3) DNAチップ上での光遺伝子診断への応用に成功。(今までにない高いS/N比)



Biotin ODN : 5'-Biotin-AGGATGGGCC-3'

Target ODN

Wild-type : 5'-TGAACCTGAGGCCATCCT-3'

Mutant (G) : 5'-TGAACCGGAGGCCATCCT-3'

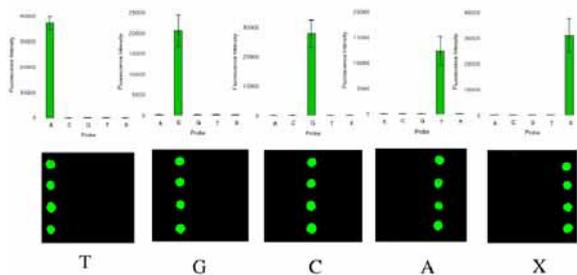
Mutant (C) : 5'-TGAACCCGAGGCCATCCT-3'

Mutant (A) : 5'-TGAACAGGAGGCCATCCT-3'

Mutant (X) : 5'-TGAACC--GAGGCCATCCT-3'

X: deleted

酵素が苦手とする基盤上での遺伝子操作への展開を狙い、DNAチップ上での可逆的光連結を行った。表面がアルデヒド処理されたマイクロアレイスライドに対し5'末端にCVUを3'末端にアミン基を有する光応答性核酸を固定化させた。溶液中で行ってきた鋳型DNA上での光連結をDNAチップ上で行った。連結対象DNAにはあらかじめBiotin基を導入しており、未反応DNAを洗浄後、Cy3がつながったStreptavidineと後処理するこ

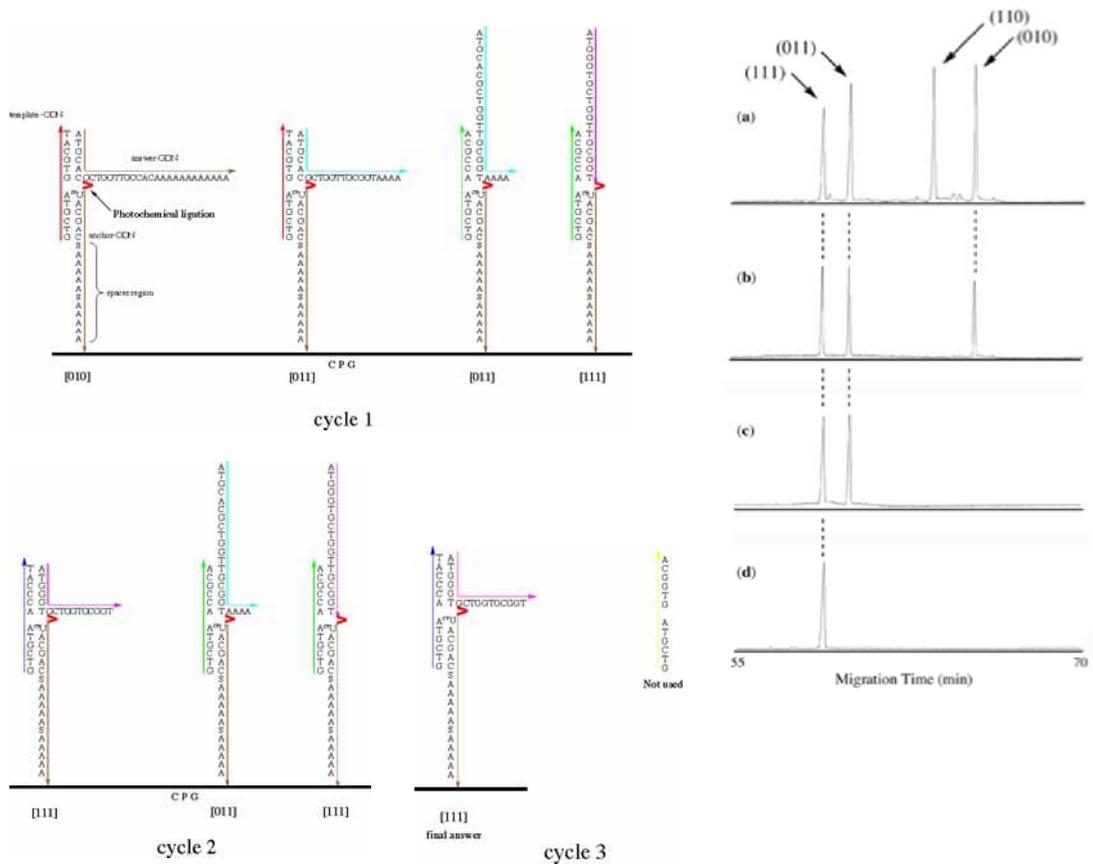


とでDNAチップ上の核酸と光連結された場合にのみ、スポット上に蛍光が現れるシステムを評価系として採用した(Scheme)。その結果、溶液中と同様に配列選択的な光連結がDNAチップ上でも可能であることや、増感剤と組み合わせることで光可逆的操作も可能であることを

を見いだした。このDNAチップ上での光連結反応をSNPs解析へと応用できないかp53 遺伝子を対象遺伝子として遺伝子解析を行った結果、目的の遺伝子のスポット上に強い蛍光を有することを見いだした(左図)。4種類全ての塩基に対して特異的に選別可能であるだけでなく1塩基欠損したものについても正確に選別できることを見出した。特願 2005-332424

4) DNAコンピューティングへの応用に成功

$$(\bar{x} \vee z) \wedge (x \vee z) \wedge (x \vee \bar{z}) = 1$$



^{cv}Uを含むODN、鋳型ODN及び連結対象ODNの混合溶液への 366 nmの光照射により^{cv}Uのビニル基と連結対象ODNのピリミジン環の二重結合が光[2+2]環化反応し連結する。そして、その連結体ODNに 312 nmの光を照射すると結合部位が開裂を起こす。この特性を応用し酵素を使わずにDNAを連結、切断することでコンピューティングを行った。DNAコンピューティングは任意の情報を塩基配列で表し演算を行う。その過程でODNはソフトウェア、入力、出力を担い、光源はハードウェアの役割を果たす。本研究では情報をランダムな数個の塩基配列に置き換えるのではなく、将来への応用を見据えコドンを模範し 3 塩基で 1 つの情報を表し、その組み合わせをもって解ODNとした。このようにして設計したODN群を用い 2SAT問題(式1)を解いた。3 回の演算後、解となる一本のODNを導くことに成功した(上図)。 *Chem. Lett.* 2005. 34 (3) 378.

5. 自己評価: 当初の最大の目的である遺伝子操作の「脱酵素化」に取り組み光応答型遺伝子操作という独自の手法論の発展的開発に成功したと考えている。酵素では今まで作ることが出来なかったナノ構造を容易に調整することが出来る様になった。特にマイクロチップ上での遺伝子診断は計画以上に進んだ。既に報告されているどの手法よりも高い S/N 比を有しており実用化が期待できる反応開発に成功したと考えられる。また、DNA コンピューティングへの展開も予想以上に良好な成果が得られた。ただ、目標の一つであった生体内細胞中の操作に関しては、生体に適合したより長波長での光応答分子の開発が難しかった為、開発途中の段階で終了時期を迎えた。

6. 研究統括の見解

遺伝子操作の脱酵素化というオリジナルな目標を掲げて、チミンダイマー修復用のカルバゾールを含有するインテリジェント核酸を創出し、光応答性を利用した様々な遺伝子操作技術の開発を行った。チミンダイマーの修復や SNP 検出など実用化テーマにも取り組み、マイクロチップ上での遺伝子診断実験に成功したことなどが高く評価できる。

7. 主な論文等:

論文 18件(総説4件含む)

1) Shinzi Ogasawara and Kenzo Fujimoto

“A Novel Method to Synthesize Versatile Multiple-Branched DNA (MB-DNA) by Reversible Photochemical Ligation”

ChemBioChem 2005 10(6), 1756–1760

2) Masayuki Ogino, Yoshinaga Yoshimura, Akio Nakazawa, Isao Saito and Kenzo Fujimoto

“Template-directed DNA photoligation via a 5-cyanovinyldeoxyuridine”

Org. Lett. **2005** 14. 2853-2856

- 3) Kenzo Fujimoto, Yoshinaga Yoshimura, Tadayoshi Ikemoto, Akio Nakazawa, Masayuki Hayashi and Isao Saito

“Photoinduced DNA end capping via N3-methyl-5-cyanovinyl-2-deoxyuridine”

Chemical Communication **2005** 25, 3177-3190

- 4) Yoshinaga Yoshimura, Yoshiaki Ito and Kenzo Fujimoto

“Interstrand Photocrosslinking of DNA via p-Carbamoylviny Phenol Nucleoside”

Bioorg.Med.Chem.Lett. **2005**, 15(5), 1299-1232

- 5) Yoshinaga Yoshimura, Yuuki Noguchi, Hideaki Sato and Kenzo Fujimoto

“Template-directed DNA photoligation in rapid and selective detection of RNA point mutations”

ChemBioChem **2006** in press

特許 4件

- 1) 「フェノール骨格を有する光応答性ヌクレオシド」

藤本健造、吉村嘉永、伊藤義朗、特願2004-171928

- 2) 「3'末端側で可逆的に光連結できる光応答性ヌクレオシド」

藤本健造、吉村嘉永、荻野雅之、特願2004-171935

- 3) 「特定位置より光化学的に枝分かれ核酸構造を作る方法」

藤本健造、吉村嘉永、小笠原慎治、特願2004-171937

- 4) 「特定の塩基配列の標的核酸類を検出する方法、及び検出のための核酸類セット」

藤本健造、吉村嘉永、小笠原慎治、特願2005-332424

招待講演 6件

- 1) 「酵素ではなく光を用いて DNA を連結する」

学振 151 委員会ナノバイオフィュージョン分科会「先端バイオチップとポリマーテクノロジー」

2004年7月28日

- 2) 「光を用いて可逆的に遺伝子を連結する」

平成16年生物工学会若手会

2004年7月30日

- 3) 「酵素を使わず光で DNA を操作する。-DNA ナノアーキテクチャー創製-」

第2回ナノ総合シンポジウム「JST ナノテクノロジー分野別バーチャルラボセッション」

2004年3月17日

4)「光応答性核酸による遺伝子操作法の開発及びナノ構造構築への応用」

第54回高分子討論会(山形)

2005年9月20日

5)「Photochemical ODN manipulation based on reversible DNA photoligation mediated by modified photoresponsive base」

The 22nd Conference of Photopolymer Science and Technology, The International Symposium 2005 Materials & Processes for Advanced Microlithography and Nanotechnology

2005年6月23日

6)「光応答性核酸を用いた新規遺伝子操作法の開発」

第8回生命化学研究会シンポジウム

2006年1月13日