

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

三重鎖核酸形成を基盤とする革新的DNA分析

### 2. 氏名

小比賀 聡

### 3. 研究のねらい

ヒトゲノム計画も終了し、我々は約 30 億塩基対ものヒトゲノムの DNA 配列を手にする事となった。この莫大な量の DNA 配列情報を如何に活用すべきかという点が、我々科学者に課せられた大きな課題であるといえる。迅速、簡便でかつ一度に多くの一塩基多型(SNP)について網羅的に解析できる新たな手法の確立は、次世代のテーラーメイド医療を実現するために必要不可欠なものであるばかりか、幅広いゲノム関連科学の更なる発展にも大きく貢献するものである。我々はこれまでに、天然の DNA に比べ、標的 RNA との結合親和性が 10 万倍以上、二重鎖 DNA との三重鎖形成能が数百倍以上という新たな架橋型人工核酸 BNA (Bridged Nucleic Acid) の開発に成功している(図1)。これらの研究成果に立脚し、本研究では、標的となる二重鎖 DNA の配列を三重鎖核酸形成によって厳密に認識し、さらに、その三重鎖核酸形成をトリガーとして自己分解反応を引き起こすインテリジェントな人工核酸分子の開発を目的としている。これにより、PCR増幅を行わず簡便且つ迅速にそして高感度に DNA 配列を分析することが可能となる。医師が診察の傍らで、或いは外科手術の最中でさえも即座に必要な DNA 情報を手にできるというレベルの新しい分析技術を確立することで、これからの医療の質を飛躍的に向上させることが期待できる。

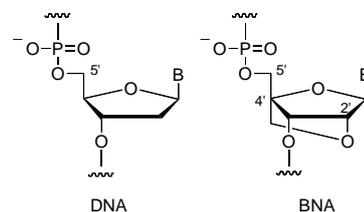


図1. DNA と BNA の化学構造.

### 4. 研究成果

#### [1] 任意の配列に三重鎖形成可能な核酸塩基の開発

一般に、三重鎖核酸は図2に示すような Hoogsteen 型水素結合を介して形成されるが、生理的条件下(中性条件下)において安定性が十分ではないとされてきた。また、三重鎖を形成できる配列にも大きな制約が存在する。すなわち、三重鎖核酸形成には標的二重鎖 DNA 中にアデニン(A)やグアニン(G)といったプリンが連続する領域が必要であり、このホモプリン配列中に一カ所でもチミジン(T)やシトシン(C)といったピリミジ

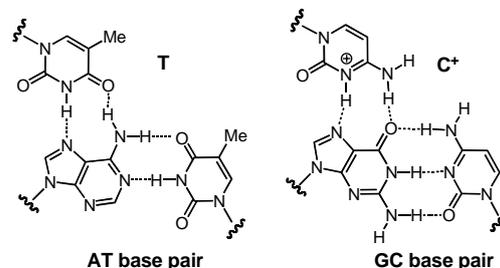


図2. Hoogsteen 型水素結合.

ンが存在するとその安定性は極端に低下してしまうことが知られている。三重鎖の安定性が低いという第一の問題に関しては、既に図1に示す架橋型人工核酸BNAを用いることで解決が可能である。そこで、第二の問題である三重鎖形成における配列の制約を解決すべく、様々な非天然核酸塩基を設計・合成しその機能評価を行った。その結果、BNAの核酸塩基部分にピリドン或いはピリジン類縁体を導入することで、従来極めて困難であったホモプリン・ホモピリミジン配列中のC-G塩基対認識を達成した。また、これらの知見を基に新たにT-A塩基対を認識する非天然塩基を設計・合成したところ、フェノールやインドールを有するBNAがT-A塩基対との親和性に優れていることを見いだした。これらフェノール、インドール類は当初の設計通り、T-A塩基対のTの4位カルボニル基を水素結合にて認識していることが示唆された。さらに、チアゾール類などの新規な複素環を核酸塩基に持つBNAの設計・合成を行った(図3)。その結果、これら新規核酸塩基を持つBNA類がT-A塩基対の形状を認識し、高い親和性を示すことが明らかとなった。

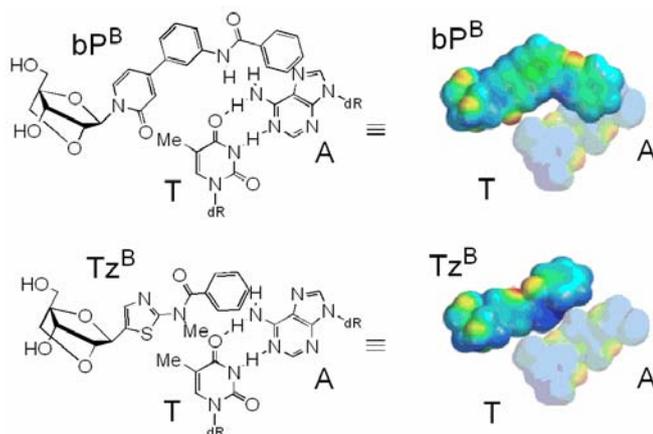


図3. 新規な複素環を塩基に有するBNAとT-A塩基対との相互作用図。右図は対応する静電ポテンシャルマップ。

## [2] 5'位窒素原子上に置換基を有する5'-amino-2',4'-BNAの合成

このように、三重鎖核酸の安定性向上、並びにホモプリン・ホモピリミジン配列以外の塩基配列認識に関して満足いく結果が得られたため、次に三重鎖核酸形成をトリガーとした自己分解反応の実現に向けた検討を行った。核酸の5'位酸素原子を窒素原子に置換した5'-aminoDNA(図4)は、緩和な酸性条件下、部位特異的に酸加水分解を受けるという非常に興味深い特徴を有していたが、同時にこの5'-aminoDNAは標的三重鎖DNAとの結合親和性を大きく低下させることも知られていた。そこで、5'-aminoDNAとBNAのハイブリッド型分子である5'-aminoBNA(図4)を新たに合成し、その機能評価を行ったところ、当初の予想通り、5'-aminoBNAは5'-aminoDNAの優れた酸加水分解特性を維持したまま、標的三重鎖DNAとの結合親和性の大幅な向上を示した。次に、この5'-aminoBNAを導入したオリゴヌクレオチドの酸分解反応に与える標的三重鎖DNAの影響について精査した。まず、5'-aminoBNAを含むオリゴヌクレオチドを標的三重鎖DNAと三重鎖形成させた後、酸処理を行い反応物のHPLC分析を行ったところ、非常に興味深いことに三重鎖を形成することによってオリゴヌクレオチドの酸分解が飛躍的に加速されることがわかった(図5)。5'-Amino-DNA(図5a)と

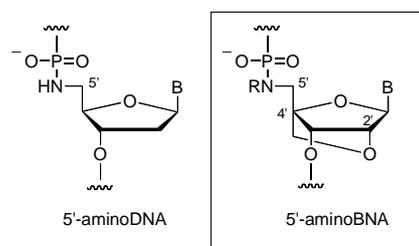


図4. 5'-aminoDNAと5'-aminoBNAの化学構造。

5'-amino-2',4'-BNA (R = H) (図5b) の場合には、いずれも三重鎖形成によって、60 分間で半分以上のオリゴヌクレオチドが分解した(pH3条件下)。これに対して、同条件下における一本鎖状態での酸加水分解速度はどちらも有意に低下した。特に、5'-amino-2',4'-BNA (R = H) (図5b) では4時間後でも約80%のオリゴヌクレオチドが残存していた。また、5'位窒素原子上の置換基が反応性に与える影響は大きく、特に5'位窒素原子上にメチル基を有する5'-amino-2',4'-BNA (R = Me) では、三重鎖形成により、pH3条件下わずか10分間で80%ものオリゴヌクレオチドの分解が観測された(図5c)。さらに、より緩和なpH4条件下においても5'-amino-2',4'-BNA (R = Me) は、三重鎖形成した場合に20分間で約半分のオリゴヌクレオチドが分解を受けている(図5d)。この結果から、5'-amino-2',4'-BNA (R = Me) を導入したオリゴヌクレオチドを用いることで、標的となる二重鎖DNAの迅速な検出が可能であると考えられた。

この結果を基にして、本反応の反応性向上を目指し5'-aminoBNAの化学構造を種々変換したところ、わずか数秒から数十秒の半減期で三重鎖核酸形成をトリガーとしたオリゴヌクレオチドプローブの自己分解反応が進行するという結果につながった。さらに、本原理に基づくDNA配列の蛍光分析についても検討を加えた。酸によって分解を受ける5'-aminoBNAの近傍に蛍光基、消光基を導入したオリゴヌクレオチドプローブを合成し、三重鎖形成に伴う酸加水分解反応を行ったところ、反応の前後で蛍光強度が大きく変化するという良好な結果を与えた。これらの結果から、本法は迅速簡便なSNP解析法、遺伝子検出法として極めて有望であることがわかった。

## 5. 自己評価

本研究は迅速で簡便かつ高感度なDNA分析手法の開発を目指したもので、これを実現するための当初目標として、(1)任意の配列に三重鎖形成可能な核酸塩基の開発、(2)三重鎖形成時に自己分解を起こす人工核酸の開発を掲げてきた。まず、第1の目標である任意の配列に三重

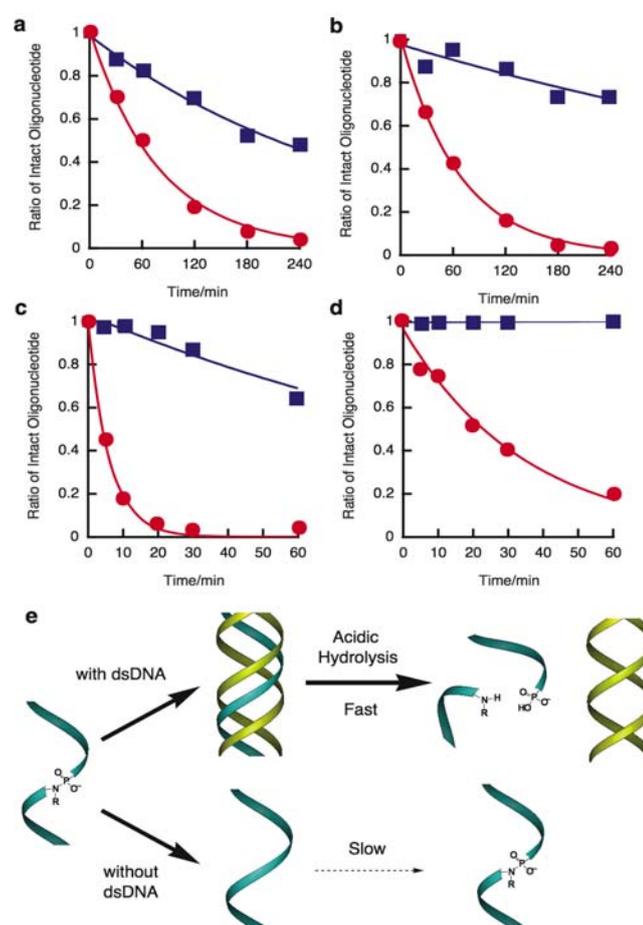


図5. 三重鎖形成をトリガーとしたオリゴヌクレオチドの自己分解反応。  
a) 5'-amino-DNA, pH3; b) 5'-amino-2',4'-BNA (R = H), pH3; c) 5'-amino-2',4'-BNA (R = Me), pH3; d) 5'-amino-2',4'-BNA (R = Me), pH4. いずれも青線はプローブのみ、赤線は三重鎖形成時; e) 本反応の概念図。

鎖形成可能な核酸塩基の開発については、様々な非天然型核酸塩基を合成し、その物性評価を行うことで、CG 塩基対を厳密に認識する人工核酸塩基の開発に成功している。また、極めて困難であった TA 塩基対の認識についても、生体での分子認識メカニズムを利用した手法、及びコンピュータモデリングを利用した理論的手法といった複数の戦略でアプローチすることにより目標を達成することができた。一方、第2の目標である三重鎖形成時に自己分解を起こす人工核酸の開発についても順調に研究が進展し、自己分解を起こす結合周りの化学構造の変換や隣接するヌクレオチド残基の綿密な化学修飾の結果、研究開始当初には1時間程度であった反応の半減期を、わずか数秒程度にまで短縮することに成功した。このように、概ね設定した目標通りの成果が得られたと考えている。さらに、これらの成果をもとに、三重鎖核酸形成による遺伝子発現制御という当初目標にはなかった興味深い知見を得ることに成功した。このように、三重鎖核酸形成により標的 2 重鎖 DNA の配列を認識し、連鎖的な化学反応を DNA 上で誘導させるという従来に無い方法を実現できたことで、今後の DNA 分析手法の開発にも大きく貢献できると考えている。

## 6. 研究総括の見解

標的となる 2 重鎖 DNA と結合して三重鎖らせん構造を形成し、かつ連鎖的な化学反応を DNA 上で誘導する人工核酸を開発し、極微量の DNA を配列特異的に検出することを目的とした研究である。PCR 増幅を行わずに簡便かつ迅速に DNA 配列の分析を可能とする実用性の高い研究である。主たる成果は次の 2 点である。

1) 架橋型人工核酸塩基を開発し、三重鎖核酸形成における課題であった C-G, T-A 塩基対の認識に成功した。

2) 三重鎖核酸形成をトリガーとして半減期約 30 秒以内に自己分解するオリゴヌクレオチドプロンプトの開発に成功した。また、蛍光基と消光基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、標的 DNA を短時間で検出できることを示した。

独自性の高い方法でこれらの成果を得たことは高く評価できる。検出感度数十アトモレベルの迅速な診断の見通しも得ており、SNP 解析や特定遺伝子の解析法において幅広く応用が進展することが期待される。また、目的外の成果として、三重鎖核酸形成による遺伝子発現制御の可能性を見出している。

研究成果は 18 篇の原著論文、3 件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許 4 件を出願している。またこれらの成果により「平成 17 年度大阪大学教育・研究功績賞」を受賞している。

迅速で簡便かつ高感度な DNA 分析手法の確立は、これからのテーラーメイド医療実現の大きな鍵となる研究分野であり、本研究成果が実用化できれば計測法としてのインパクトは非常に大きい。実用化に向けたさらなる改良と幅広い評価実験の積み重ねが必要である。

## 7. 主な論文等

### (A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

## 論文(国際)

- ・ S. Obika, A. Hiroto, O. Nakagawa, T. Imanishi, “Promotion of stable triplex formation by partial incorporation of 2',5'-phosphodiester linkages into triplex-forming oligonucleotides”, Chem. Commun., 2793–2795 (2005)
- ・ S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, K. Miyashita, T. Imanishi, “Highly stable pyrimidine-motif triplex formation at physiological pH values by a bridged nucleic acid analogue”, Angew. Chem. Int. Ed., 46, 4306–4309 (2007)
- ・ S. Obika, M. Tomizu, Y. Negoro, A. Orita, O. Nakagawa, T. Imanishi, “Double-stranded DNA-templated oligonucleotide digestion triggered by triplex formation”, ChemBioChem, 8, 1924–1928 (2007)
- ・ S. Obika, H. Inohara, Y. Hari and T. Imanishi, “Recognition of T·A interruption by 2',4'-BNAs bearing heteroaromatic nucleobases through parallel motif triplex formation”, Bioorg. Med. Chem., in press
- ・ S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, H. Yoshikawa, K. Miyashita, T. Imanishi, “Design, synthesis and properties of 2',4'-BNA<sup>NC</sup>: A bridged nucleic acid analogue”, J. Am. Chem. Soc., in press

## (2)特許出願

発明者:小比賀 聡、今西 武

発明の名称:オリゴヌクレオチド類縁体

出願人:大阪大学

出願日:2005.08.31

出願番号:特願 2005-252034

発明者:小比賀 聡、今西 武

発明の名称:人工核酸プローブを用いた三重鎖核酸形成を基盤とした標的核酸の検出

出願人:大阪大学

出願日:2005.08.31

出願番号:特願 2005-251992

発明者:小比賀 聡、今西 武

発明の名称:人工核酸プローブを用いた三重鎖核酸形成を基盤とした標的核酸の検出

出願人:大阪大学

出願日:2006.08.31

出願番号:PCT/JP2006/317223

発明者:小比賀 聡、今西 武

発明の名称:オリゴヌクレオチド類縁体  
 出願人:大阪大学  
 出願日:2006.08.31  
 出願番号:PCT/JP2006/317224

### (3)学会発表

#### 口頭発表(国際)

- ・小比賀 聡、戸水 真治、根来 佳憲、折田 文子、尾崎 朋久、今西 武、“三重鎖形成核酸を利用した迅速・簡便な SNP 検出”、日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、2007
- ・小比賀 聡、戸水 真治、根来 佳憲、今西 武、“三重鎖核酸形成を基盤とする革新的 DNA 分析”、日本薬学会第 127 年会、2007

#### ポスター発表(国際)

- ・ S. Obika, M. Tomizu, Y. Negoro, T. Osaki, A. Orita, Y. Ueyama, O. Nakagawa, T. Imanishi, “Acid-mediated cleavage of oligonucleotide P3'→N5' phosphoramidates triggered by sequence specific triplex formation”、XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Bern)、2006
- ・ M. Tomizu, O. Nakagawa, S. Obika, T. Imanishi, ” Promotion of acid-mediated cleavage of oligonucleotide P3'→N5' phosphoramidates by triplex formation: A novel approach to sequence-specific DNA detection”、4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、2005

#### ポスター発表(国内)

- ・小比賀 聡、戸水 真治、根来 佳憲、今西 武、“三重鎖核酸形成を基盤とする革新的 DNA 分析”、日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会、2006

### (4)招待講演

#### 招待講演(国内)

- ・小比賀 聡、“迅速簡便な SNP 検出法の開発 –DNA 三重らせんの利用–”、第 8 回地域研究交流フォーラム、2007
- ・小比賀 聡、“架橋型人工核酸 BNA の開発とその応用”、第 10 回生命化学研究会シンポジウム・熊本、2008
- ・小比賀 聡、“遺伝子の発現制御と解析に向けた機能性人工核酸 BNA の開発”、日本薬学会第 128 年会、2008

### (B) その他の主な成果

なし