

三重鎖核酸形成を基盤とする革新的DNA分析

小比賀 聡

大阪大学大学院薬学研究科

1. 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 配列を手にするようになった。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 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 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。

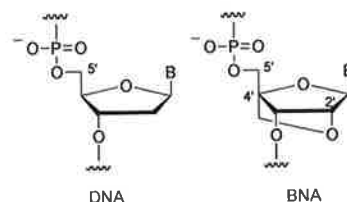


図 1. DNA と BNA の化学構造

2. 研究成果

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 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。

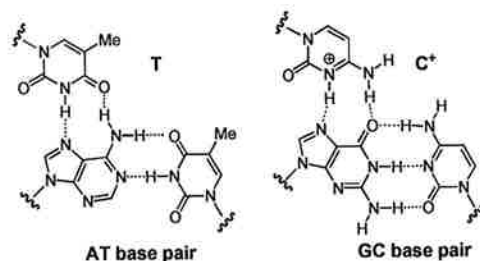


図 2. Hoogsteen 型水素結合

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 3) は、緩やかな酸性条件下、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 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 3) 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 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 4)。これは、当初我々も全く予想していなかった結果であり、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。

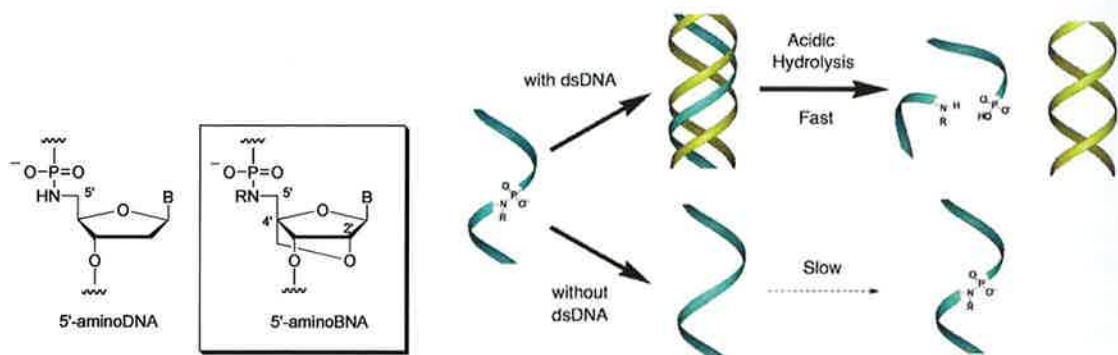


図 3. 5'-aminoDNA と 5'-aminoBNA の化学構造

図 4. 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

3. 主な論文

- ・ S. Obika, M. Tomizu, Y. Negoro, A. Orita, O. Nakagawa and T. Imanishi, Double-stranded DNA-templated Oligonucleotide Digestion Triggered by Triplex Formation, *ChemBioChem*, *in press*.
- ・ S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, K. Miyashita and 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).
- ・ M. Sekiguchi, S. Obika, Y. Harada, T. Osaki, R. Somjing, Y. Mitsuoka, N. Shibata, M. Masaki and T. Imanishi, Synthesis and Properties of *trans*-3',4'-Bridged Nucleic Acids Having Typical S-type Sugar Conformation, *J. Org. Chem.*, **71**, 1306-1316 (2006).
- ・ S. Obika, A. Hiroto, O. Nakagawa and T. Imanishi, Promotion of Stable Triplex Formation by Partial Incorporation of 2',5'-Phosphodiester Linkages into Triplex-forming Oligonucleotides, *Chem. Commun.*, 2793-2795 (2005).

4. その他

特許

- ・ 小比賀 聡、今西武、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、PCT/JP2006/317223、出願人：大阪大学
- ・ 小比賀 聡、今西武、オリゴヌクレオチド類縁体、PCT/JP2006/317224、出願人：大阪大学

受賞

- ・ 平成 17 年度大阪大学教育・研究功績賞受賞「ゲノムテクノロジー基盤素材としての架橋型超機能性人工核酸の開発」(2006 年 2 月)