

《様式B》

研究テーマ

「人工核酸 L-aTNA の非酵素的鎖伸長反応を利用した配列転写・逆転写法の開発」

研究責任者 所属機関名 名古屋大学

官職又は役職 助教

氏 名 村山 恵司 メールアドレス murayama@chembio.nagoya-u.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏 名

(令和3年度募集) 第34回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

本研究では、人工核酸 L-aTNA の配列複製及び DNA・RNA への配列転写・逆転写反応を目指し、様々な検討を行った。人工核酸の複製・転写・逆転写においては非酵素的鎖伸長反応が基本となるため、まずはこの反応について L-aTNA 鋳型配列と、相補的な L-aTNA 断片をモデル配列として用いることで反応条件を検討した。これまで *N*-Cyanoimidazole と Mn^{2+} を用いて鎖の連結を行っていたが、金属イオンとして Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} などを用いることで、反応が大幅に加速され収率も向上することが明らかとなった。また、この条件で DNA のケミカルライゲーションを行った結果、既存の手法に比べ、非常に高効率な鎖連結反応が確認されたことから、本手法が DNA の連結にも適用できることを明らかにした。反応速度を詳細に解析した結果、鎖の連結反応においてはリン酸の活性化段階が律速であることを明らかにした。L-aTNA の連結反応の場合には、連結される鎖のリン酸基末端側が鋳型配列と二重鎖形成する際に、活性化が加速されることが見出された。これまでの条件では3残基のフラグメント3つから9-merの伸長が可能であったが、上記の結果をもとに配列設計及び反応条件を見直したところ、3残基のフラグメント7つを鋳型上で連結し、21-merの長鎖伸長が可能となった。以上のように、L-aTNA の非酵素的鎖伸長反応の高効率化に成功し、人工核酸の複製・転写・逆転写をより実現に近づけることができた。更に、L-aTNA 配列に相補的な RNA 合成（逆転写）にも成功している。

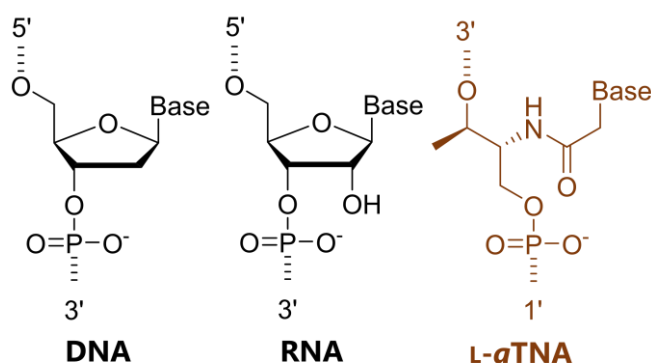
続いて、非酵素的な複製を目指し、L-aTNA 鋳型配列と、相補的な L-aTNA 断片2種をモデルとして用いて、熱サイクルによる L-aTNA 配列複製を試みた。用いている *N*-Cyanoimidazole が熱に弱いいため、毎サイクルにおいて追加で試薬を添加する必要がある

ことが明らかとなった。現状は 1.5 倍程度の増幅にとどまっており、理想の増幅を実現するためには更に検討が必要である。今後、配列複製・転写・逆転写が実現した暁には、人工核酸の分子進化法への適用によって、新たな創薬技術としての展開が期待できる。また、DNA の高効率な連結にも利用できることが明らかとなったため、DNA 構造体の高強度化や人工遺伝子合成にも応用できる可能性がある。

2. 実施内容および成果の説明

背景

人工核酸は DNA を模した非天然分子であり DNA 同様に 4 種類の核酸塩基 AGCT が配列したバイオポリマーである。高い酵素耐性を持つため生物学的ツールとしての幅広い応用が展開されている反面、有用な酵素にも認識されないため、DNA とは異なり PCR や



SELEX 等へ応用は困難であった。本研究では、我々が独自に開発した人工核酸 L-aTNA に対して酵素反応に相当するライゲーシオン反応系を構築することで、人工核酸 L-aTNA の配列複製・DNA への配列転写反応を目指し研究を行った。もしこの手法が実現すれば、人工核酸のみで構成される核酸アプタマー（標的物質に選択的に強固に結合する核酸配列）を SELEX 法で獲得することが可能となり、有望な薬剤候補となり得る。また、人工生命・原始生物システムのモデルとしても極めて興味深い。

これまで、いくつもの人工核酸が開発されてきたが、DNA と同様の配列複製・転写反応を達成したものは極めて限定的である。α-L-threose nucleic acid や 1,5-anhydrohexitol nucleic acid などの DNA に構造が類似した環状骨格ものは、改変した酵素を利用することで転写や逆転写反応に成功しているが、当研究で扱う非環状型人工核酸のように DNA と構造の大きく異なる人工核酸での配列複製・転写は一切報告がない。もし、非環状型人工核酸 L-aTNA の短鎖断片を鋳型配列上で効率的にライゲーシオン（連結）することが可能となれば、配列複製・DNA への配列転写が実現できる。これを利用することで、人工核酸 L-aTNA のシーケンシングが可能となり、人工核酸のみで構成されるアプタマーや触媒活性を持つ人工核酸配列の取得など、これまで成し得なかった魅力的

な応用が期待できる。非環状型の骨格は DNA とは全く異なる構造であるため、これまでに報告された核酸アプタマーが標的とする分子とは系統が異なる分子にも適用できる可能性があるだけでなく、核酸分解酵素に対する耐性も飛躍的に向上が見込まれ、薬剤としての高いポテンシャルを持っている。また酵素を用いずに核酸の効率的な配列複製・転写反応を実現した例は無く、実現できれば、RNA world 仮説に代表される原始生物モデルや人工生命のモデルとしても大きな価値がある。



成果

①ケミカルライゲーション・鎖伸長反応の高効率化

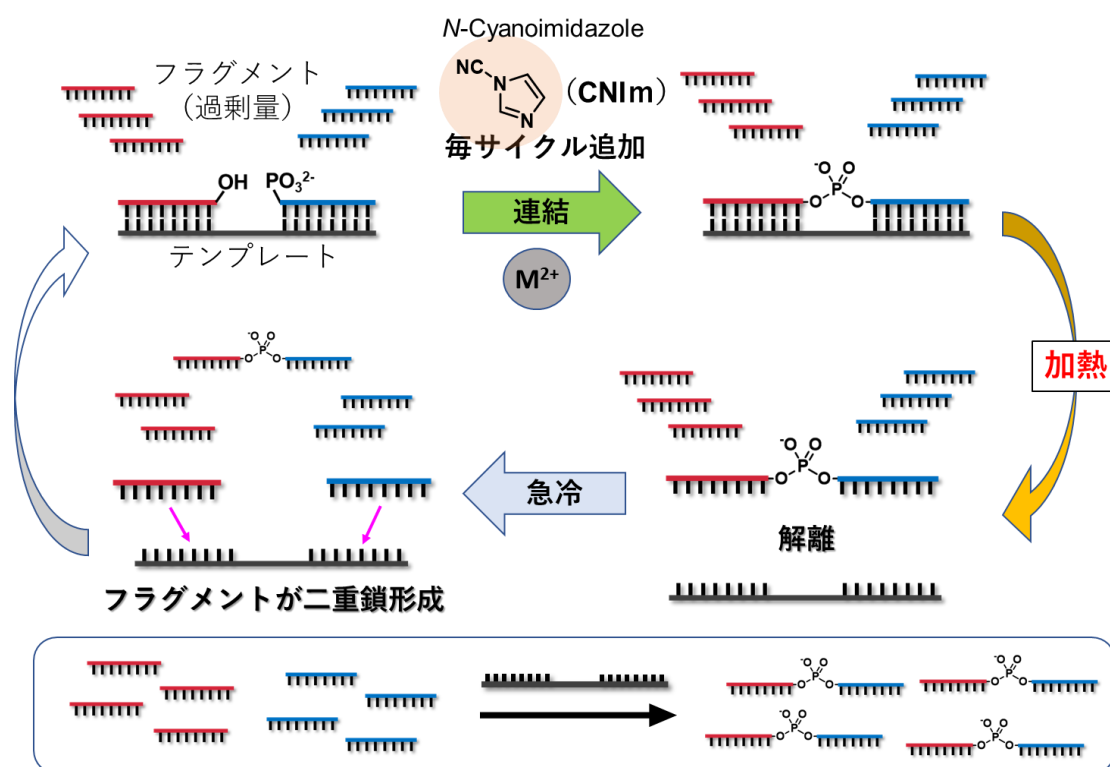
人工核酸 L-aTNA の配列複製及び DNA・RNA への配列転写・逆転写反応を実現させるため、基本となる非酵素的鎖伸長反応について詳細に検討を行った。16mer の L-aTNA 鋳型配列と、相補的な 8mer の L-aTNA 断片 2 種をモデルとして用いることで反応条件を検討した。これまで *N*-Cyanoimidazole と Mn^{2+} を用いて鎖の連結を行っていたが、金属イオンとして Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} などを用いることで、反応が大幅に加速され収率も向上することが明らかとなった。具体的には、 k_{obs} は 5.0 h^{-1} から 27 h^{-1} に向上し、10 min でほぼ定量的な反応進行が確認された。このケミカルライゲーションは DNA では進行が遅く ($k_{obs} = 0.44\text{ h}^{-1}$)、応用に適していなかったが、今回見出した条件で DNA のケミカルライゲーションを行った結果、高速化に成功し、 k_{obs} は 3.1 h^{-1} にまで上昇した。DNA のケミカルライゲーションとしては既存の手法に比べ、非常に高速かつ高効率な反応であり、本手法が DNA の連結反応として幅広く応用できることを明らかにした。

更に L-aTNA ライゲーションの反応速度を詳細に解析した結果、リン酸の活性化段階が反応律速であることを明らかにした。この活性化段階は、連結される鎖のリン酸基末端側が鋳型配列と二重鎖形成しているかつ断片配列が L-aTNA の場合に、加速されることが見出された。これまでの条件では 3 残基のフラグメント 3 つから 9-mer の伸長が可能であったが、上記の結果をもとに配列設計及び反応条件を見直したところ、3 残基のフラグメント 7 つを鋳型上で連結し、21-mer の長鎖伸長が可能となった。以上のように、L-aTNA の非酵素的鎖伸長反応の高効率化に成功し、人工核酸の複製・転写・逆転写をより実現に近づけることができた。更に、L-aTNA 配列に相補的な RNA 合成 (逆

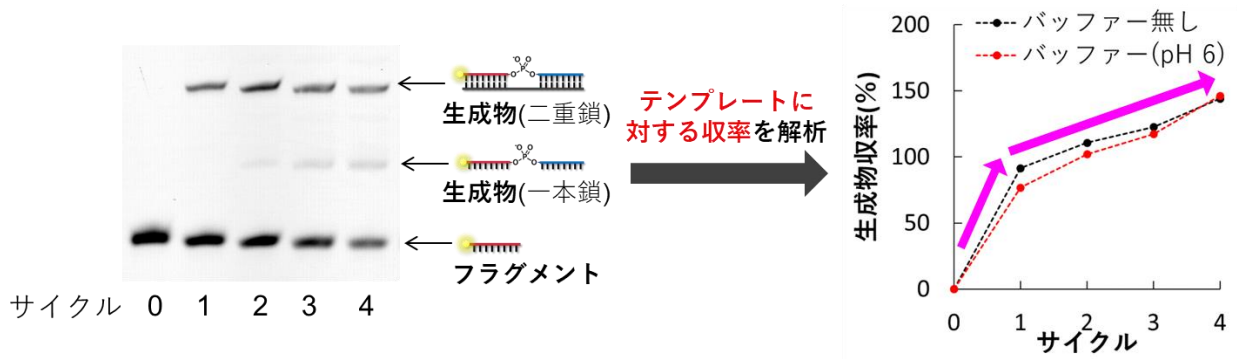
転写)にも成功している。

② L-aTNA の自己複製の検討

非酵素的な L-aTNA 配列複製を目指し、L-aTNA 鋳型配列と、相補的な L-aTNA 断片 2 種をモデルとして用いて、熱サイクルによる配列複製を試みた。DNA の PCR 同様、高温にすることで生成物（連結後の鎖）と鋳型の二重鎖を一本鎖に解離させ、急冷することで新たな断片と鋳型を二重鎖形成させライゲーションさせる設計であり、鋳型を触媒的に機能させることで配列の増幅が可能になると考えた。



反応に用いている *N*-Cyanoimidazole が熱に弱いため、毎サイクルにおいて追加で試薬を添加する必要があることが明らかとなった。条件検討後、1.5 倍程度の増幅は達成したものの、理想的な配列複製を実現するためには今後さらなる検討が必要である。



増幅効率が低かった原因として、反応サイクル数の増加に伴う副生成物の影響が考えられる。*N*-Cyanoimidazole の熱分解によりイミダゾール誘導体が生成するが、これが金属と錯体形成することで反応が阻害されている可能性が高い。今後はサイクルごとに副生成物を除去する簡易精製を行うことで高効率化を狙う。

以上、本研究では特定の金属イオンを利用することでケミカルライゲーション・鎖伸長反応の高効率化を実現し、新たに様々な応用が可能な基礎技術開発に成功した。特に、DNA の高効率な連結にも本手法が利用できることが明らかとなったため、DNA 構造体の高強度化や人工遺伝子合成への応用も進める予定である。今後、配列複製・転写・逆転写の実現を目指し研究を進展させ、人工核酸の分子進化法への適用による新たな創薬・分子ツール開発技術として展開したい。