

Title	周辺環境を記憶するDNA分子システムの開発
Author(s)	藤本, 健造
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書: 1-4
Issue Date	2016-06-02
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/13689
Rights	
Description	挑戦的萌芽研究, 研究期間: 2014~2015, 課題番号: 26620131, 研究者番号: 90293894, 研究分野: 生物有機化学

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620131

研究課題名(和文) 周辺環境を記憶するDNA分子システムの開発

研究課題名(英文) Development of environment directed intelligent DNA molecular system

研究代表者

藤本 健造 (FUJIMOTO, KENZO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：90293894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA分子のプログラミング能に着目し、これまでDNA分子自体に基本演算素子(AND, OR, NOT等)が実装できることが報告されている。本研究では新規光架橋素子の合成とDNA鎖交換速度の定量評価を行うことで類似配列でありながら光架橋性人工塩基(cnvK, cnvD, cnvG)と対象シトシンの相補塩基(グアニン、イノシン、アミノプリン)を組み合わせることで固有の反応係数を有するDNA鎖交換システムが構築できることを見出した。周辺環境として照射されたエネルギーを反映したDNA鎖交換反応解析系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：The specificity of the A-T and G-C hydrogen bonded Watson-Crick interaction is an emerging scientific discipline that seeks to engineer nanoscale system created out of DNA strand. Based on this DNA specificity, various nanoscale DNA device and DNA structure have been reported. Attempts to design and implement chemical reaction circuits to serve as computational components in DNA computing. However, this approach is not always appropriate, given the physical properties of the actual chemical reactions. In order to introduce intelligence in molecular robots, it is important to explore various chemical reactions that might be more suitable for DNA computing. An oligodeoxynucleotide containing CNVK can photo-cross-link to a pyrimidine base in complementary DNA or RNA molecules within a few seconds of photoirradiation. In this study, we developed construction of intelligence toward DNA computing based on photochemical DNA manipulation.

研究分野：生物有機化学

キーワード：光クロスリンク DNA操作

1. 研究開始当初の背景

DNA 分子のプログラミング能に着目し、これまで DNA 分子自体に基本演算素子 (AND, OR, NOT 等) が実装できることが報告されている。一方で、さらに高度な情報処理を実現するには、過去の入力情報を記憶して、その記憶と現在の入力にもとづいて次の出力を決定する計算機構 (状態遷移機械) を実現することが必須であるが、これまで報告された試験管内の化学反応回路は、ほとんどが記憶能を持たない論理回路であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では「周辺環境を記憶する様な DNA 分子システムの開発」を目指すこととした。我々はこれまでの研究で、[2+2]光環化反応による DNA 光ライゲーション反応ならびに光クロスリンク反応の開発を行い、ビニル基含有ヌクレオシドを組み込んだ合成 DNA が相補的核酸存在下でのみ光ライゲーションならびに光クロスリンク可能であることを見出している (*J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5646, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3227.)。前者の光ライゲーションは鋳型 DNA 上で二つの DNA 分子をつなげる系であるが、この反応を基礎として基本演算素子 (AND, OR, NOT 等) を構築することに成功し、さらにこれらを組み合わせたフルアダー回路を構築することで2進数の計算を DNA 分子で行うことに成功している (*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130(31), 10050)。一方、後者の光クロスリンク反応は秒単位で鋳型 DNA に対して光架橋する系であるが、秒単位で操作できる高速性が特徴であり、最近、この高速光架橋反応を組み込むことで、光照射により DNA の鎖置換反応が **50 倍**程度加速することを見出していた (*J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(43), 16161 及び特願 2013-133163)。この発見に基づき、光によって高速化された鎖置換反応を多段階に組み合わせることで周辺環境 (単位時間辺りに光照射した回数) を記憶できるのではと着想した。

3. 研究の方法

DNA 鎖置換反応速度解析に関しては既に天然の塩基を用いた系で詳細な解析 (Winfree E et al, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17303) が行われており、併せて高精度のシミュレーション事例についても報告されている。これら先行研究を参考に配列を設計し、DNA 鎖置換反応に使用する Oligonucleotide 中に光架橋能を有する人工塩基 3-cyanovinylcarbazole (cnvK) を DNA 合成機により合成する。cnvK を埋め込む際に鋳型核酸上に埋め込むものと、鎖置換するための鎖に埋め込むもの 2 種類の系を準備しておく。また最初の DNA 2 本鎖セットにおいて光架橋しない様にターゲットサイトにはピリミジ

ン塩基ではなくアデニン塩基を配置しておく。置換する側にはチミン塩基を入れておき、実際に置換反応が行われる際には T-T ミスマッチとなる様にしておく。DNA 鎖置換反応速度を解析するため、最初の DNA 2 本鎖セットの片側の平滑末端部位に蛍光剤 (Cy3) および消光剤 (Dabcyl) を導入しておき、蛍光分光器を用いて反応速度を評価する。その際、UV-LED で光架橋させるが、この条件下で蛍光分光器での解析が難しい場合も想定し照射時の DNA 鎖置換反応速度解析については併せて PAGE 解析も行うものとする。DNA 鎖置換反応の速度制御因子として考えられる各種パラメーター (toehold、鎖長、温度、照射時間) に関する実験を行う。Toehold については長ければ長い程、全体的に速度が向上することが予想されるので、バックグラウンドとして考えられる光照射をしない時の DNA 鎖置換反応との加速度について特に留意する。また Toehold は 5' 末端側に用意されているケースと 3' 末端側に用意されているケースを準備し、Toehold の配置位置に関する情報も集める。その他、DNA 鎖長、温度、照射時間といったパラメーターについてそれぞれ蛍光解析ならびに PAGE 解析について実験結果を得る。

4. 研究成果

(1) 新規光架橋素子の合成と DNA 鎖交換速度の定量評価

従来のリボース骨格ではなくアミノ酸骨格 (D-トレオニール骨格) に置換したシアノビニルカルバゾール誘導体 (cnvD) を合成し、DNA 鎖置換反応の加速効果を評価した。その結果、架橋対象ピリミジン塩基がチミンであろうがシトシンであろうがそれぞれ約 2 倍、約 8 倍と鎖置換反応が加速されることを見出した。一方、グリシドール骨格に置換したシアノビニルカルバゾール誘導体 (cnvG) も合成し、同様に DNA 鎖置換反応の加速効果を評価した。その結果、架橋対象ピリミジン塩基がチミンであろうがシトシンであろうがそれぞれ 5 倍程度 DNA 鎖置換反応が減速されることを見出した。高度な DNA 演算の為に必要と考えられる異なった加速効果を有する 3 種類の光架橋性人工塩基 (cnvK, cnvD, cnvG) の作成に成功した。また、それら光架橋性人工塩基がそれぞれ相補鎖 DNA との水素結合様式に応じて異なった加速効果を持つ事を見出した。例えばシトシンへの光架橋を鍵反応とする DNA 鎖置換反応において通常相補塩基はグアニンであるが、イノシンやアミノプリンに変換することで DNA 鎖置換反応を 3 倍から 5 倍程度高速化できることも見出した。類似配列でありながら光架橋性人工塩基 (cnvK, cnvD, cnvG) と対象シトシンの相補塩基 (グアニン、イノシン、アミノプリン) を組み合わせることで固有の反応係数を有する DNA 鎖交換システムが構築できることを見出した。これらの知見は複雑な演算処

理を行う上で重要な基盤技術と位置づけられる (図 1)。

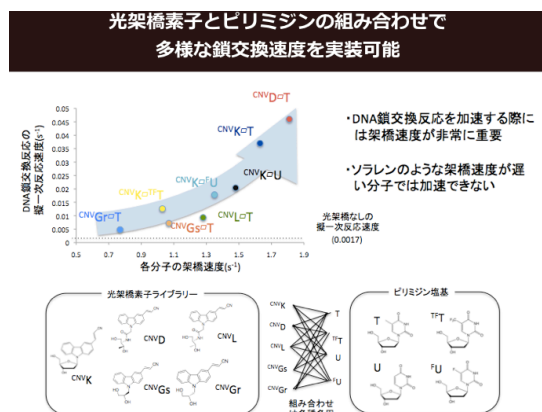


図 1. 多種多様な鎖交換速度を実装可能

(2) 周辺環境として照射されたエネルギーの記憶に関する DNA 鎖交換反応解析

超高速光クロスリンカー (cnvK)、cnvK よりさらに 8 倍程度の高速光架橋能を有する新規光クロスリンカー (cnvD) などを用いた DNA 鎖置換反応を種々の光照射エネルギーの下、光照射を行った。光源は LED (365 nm) を使い、照射エネルギーはそれぞれ 0 mW, 80 mW, 160 mW, 800 mW の 4 条件の下、DNA 鎖置換反応を行っている。その結果、照射エネルギー依存的に高速化が可能であることを見出した。DNA 光架橋反応が早い系であればある程、DNA 鎖交換反応がより加速されることも見出した。Winfree らの状態遷移モデルをもとにした DNA 鎖交換反応のシミュレーションに超高速光クロスリンク反応を組み込んだ計算を行ったところ、先程の光架橋反応と DNA 鎖交換反応の相関を説明することができた。このことは DNA 鎖交換反応において、可逆的なブランチャイグレーションが律速反応であることから、光架橋によって非可逆的な反応へと推移することが加速要因であることを示唆していると考えられる。また DNA 光架橋反応速度と DNA 鎖置換反応速度にはきれいな相関が見受けられることも見出した (図 2)。図 2 から照射エネルギー依存的に鎖交換反応の高速化が進行していることが明らかとなった。即ち DNA 鎖交換解析を行うことで周辺環境の一つとして照射エネルギーを算出することが可能であると考えられる。

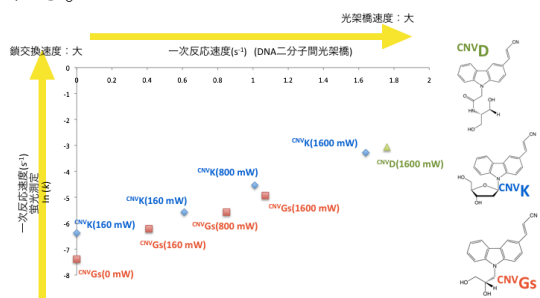


図 2. 周辺環境 (照射エネルギー) に依存した DNA 鎖交換反応

(3) 総括

新規光架橋素子の合成と DNA 鎖交換速度の定量評価を行うことで類似配列でありながら光架橋性人工塩基 (cnvK, cnvD, cnvG) と対象シトシンの相補塩基 (グアニン、イノシン、アミノプリン) を組み合わせることで固有の反応係数を有する DNA 鎖交換システムが構築できることを見出した。これらを用いることで DNA 光架橋反応が早い系であればある程、DNA 鎖交換反応がより加速されることも見出した。周辺環境として照射されたエネルギーを反映した DNA 鎖交換反応解析系の構築に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Shigetaka Nakamura, Hayato Kawabata, Hodaka Muramatsu and Kenzo Fujimoto, The effect of 5-substitution of uracil base in DNA photo-cross-linking using 3-cyanovinylcarbazole, *Chem. Lett.*, 査読有、2016, in press
- ② Takashi Sakamoto, Minako Ooe and Kenzo Fujimoto, Critical Effect of Base Pairing of Target Pyrimidine on the Inter-strand Photo-cross-linking of DNA via 3-Cyanovinylcarbazole Nucleoside, *Bioconjugate Chemistry*, 査読有、26 巻, 2015, 1475-1478, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00352
- ③ Shigetaka Nakamura and Kenzo Fujimoto, Photo-cross-linking using trifluorothymidine and 3-cyanovinylcarbazole induced large shifted 19F MR signal, *Chemical Communications*, 査読有、51 巻, 2015, 11765-11768 DOI: 10.1039/C5CC02972D
- ④ Takashi Sakamoto, Yuya Tanaka and Kenzo Fujimoto, DNA Photo-cross-linking using 3-Cyanovinylcarbazole Modified Oligonucleotide with Threoninol Linker, *Organic Letters*, 査読有、17 巻, 2015, 936-939. DOI:10.1021/acs.orglett.5b00035
- ⑤ Takashi Sakamoto, Atsuo Shigeno, Yuichi Ohtaki and Kenzo Fujimoto, Photo-regulation of constitutive gene expression in living cells by using ultrafast photo-cross-linking oligonucleotides, *Biomaterials Science*, 査読有、2 巻, 2014, 1154-1157 DOI: 10.1039/C4BM00117F
- ⑥ Shigetaka Nakamura and Kenzo Fujimoto, Creation of DNA Array Structure Equipped with heat resistance by Ultrafast Photocrosslinking, *Journal of Chemical*

Technology & Biotechnology, 査読有、89 巻, 2014, 1086-1090、DOI: 10.1002/jctb.4205

- ⑦ Shigetaka Nakamura and Kenzo Fujimoto, Rapid photopolymerization of oligonucleotides by 3-cyanovinylcarbazole mediated DNA photocrosslinking、*Journal of Photopolymer Science and Technology*, 査読有、27 巻, 2014, 485-490、DOI: 10.2494/photopolymer.27.485

[学会発表] (計 13 件)

- ① 藤本健造, 核酸医薬を指向した光化学的 RNA 編集法の開発, 第 55 回日本生体医工学会大会、2016 年 4 月 26-28 日, 富山国際会議場 (富山県富山市)
- ② Kenzo Fujimoto, Development of Photo-triggered RNA Manipulation, International Symposium on Bioscience and Biotechnology in JAIST, March 18, 2016, JAIST (石川県能美市)
- ③ Kenzo Fujimoto, New insight of Engineering Expression System based on ultrafast DNA and RNA photo-cross-linking, PEGS EUROPE 2015, November 3-5, 2015, Lisbon (Portgal)
- ④ 藤本健造, 光化学的な核酸類操作法の開発, 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8-10 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑤ Kenzo Fujimoto and Shigetaka Nakamura, Development about 19F chemical shift imaging of DNA conformation change, World Molecular Imaging Congress (WMIC2015), September 1-3, 2015, Honolulu, USA

[図書] (計 1 件)

- ① Takashi Sakamoto and Kenzo Fujimoto, Springer, *Modified Nucleic Acids*, Chapter 7, 2016, 145-158

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: フォトアンチジーン法
発明者: 藤本健造 中村重孝
権利者: 北陸先端科学技術大学院大学
種類: 特許
番号: 特許願 2016-105622
出願年月日: 平成 28 年 5 月 26 日
国内外の別: 国内
- ② 名称: 光架橋核酸二重鎖の光架橋を光開裂させる方法
発明者: 藤本健造 中村重孝
権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

種類: 特許

番号: 特許願 2014-224574

出願年月日: 平成 26 年 11 月 4 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 健造 (FUJIMOTO Kenzo)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号: 90293894