



上智大学
SOPHIA UNIVERSITY

叡智が世界をつなぐ

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

立体構造情報を活用したDNAものづくり - 医薬品からナノマテリアルまで -

上智大学 理工学部 物質生命理工学科
准教授 近藤 次郎

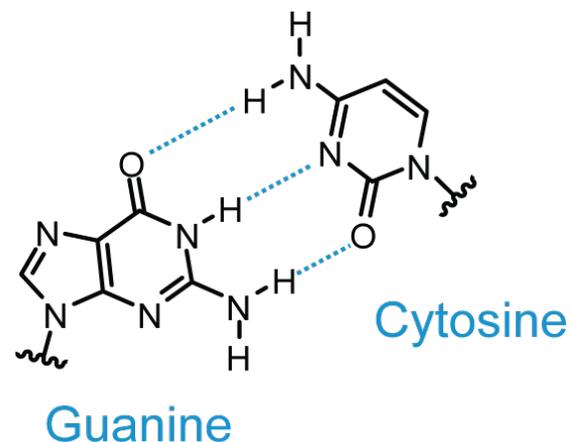
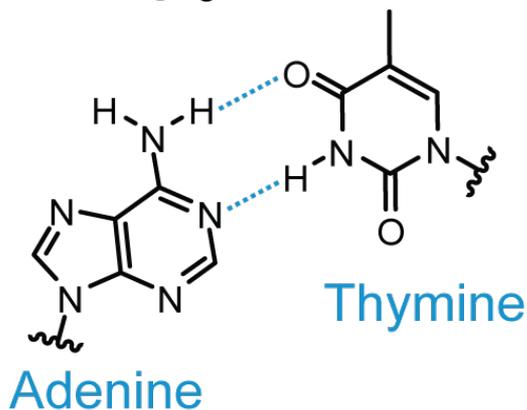
2021年 8月31日

背景

- DNAはバイオ・ナノテクノロジー分野で幅広く応用されている。(例:核酸医薬品、遺伝子診断技術)
- これらの技術はほぼすべて、「塩基対の相補性*」というルールに基づいている。

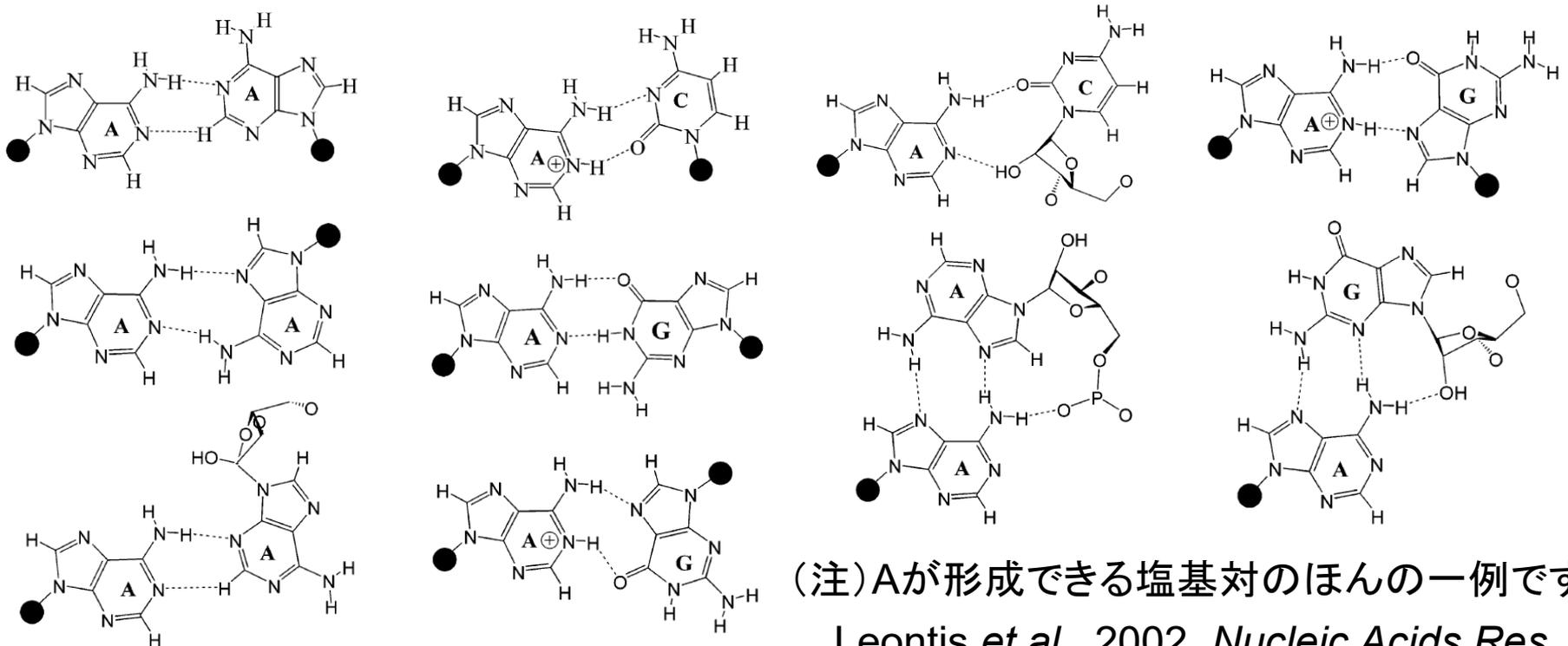
* AとT(RNAではU)、GとCが相補的に塩基対を形成する

- 「塩基配列」という一次元情報のみに頼って設計されている。



新技術の基盤となる知見

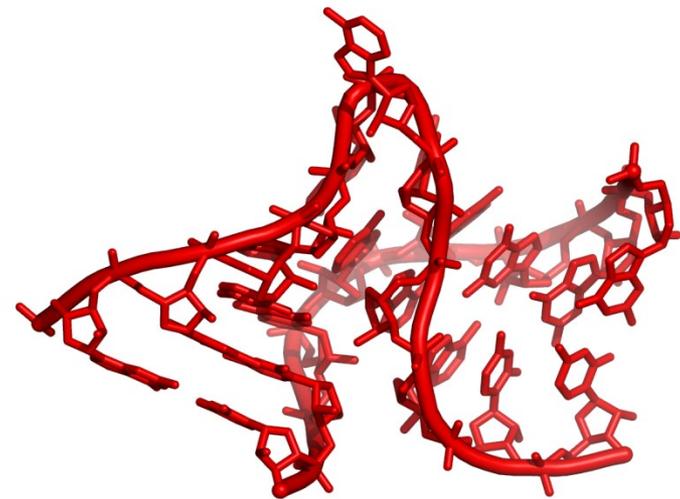
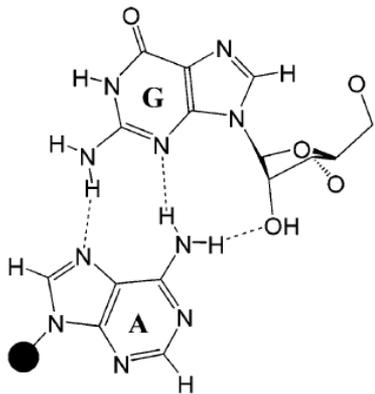
- 約150種類の「非相補的塩基対」が存在する。
- 「非相補的塩基対」は、「二重らせん以外の複雑な立体構造」の形成に関わっている。



(注)Aが形成できる塩基対のほんの一例です
Leontis et al., 2002, *Nucleic Acids Res.*

新技術の基盤となる知見

- 約150種類の「非相補的塩基対」が存在する。
- 「非相補的塩基対」は、「二重らせん以外の複雑な立体構造」の形成に関わっている。



Kink-turnモチーフ

Klein *et al.*, 2001, *EMBO J.*

新技術の特徴

- デザイン手法の階層を高めることで、DNAを使ったものづくりの可能性を広げる

相補的塩基対 ⇒ 非相補的塩基対

塩基配列 ⇒ 立体構造

① 特定の立体構造を誘導する核酸医薬品
トランスフォーマー核酸(XFO)

② 塩基配列特異的な核酸標識プローブ

③ DNA-銀ハイブリッドナノワイヤー

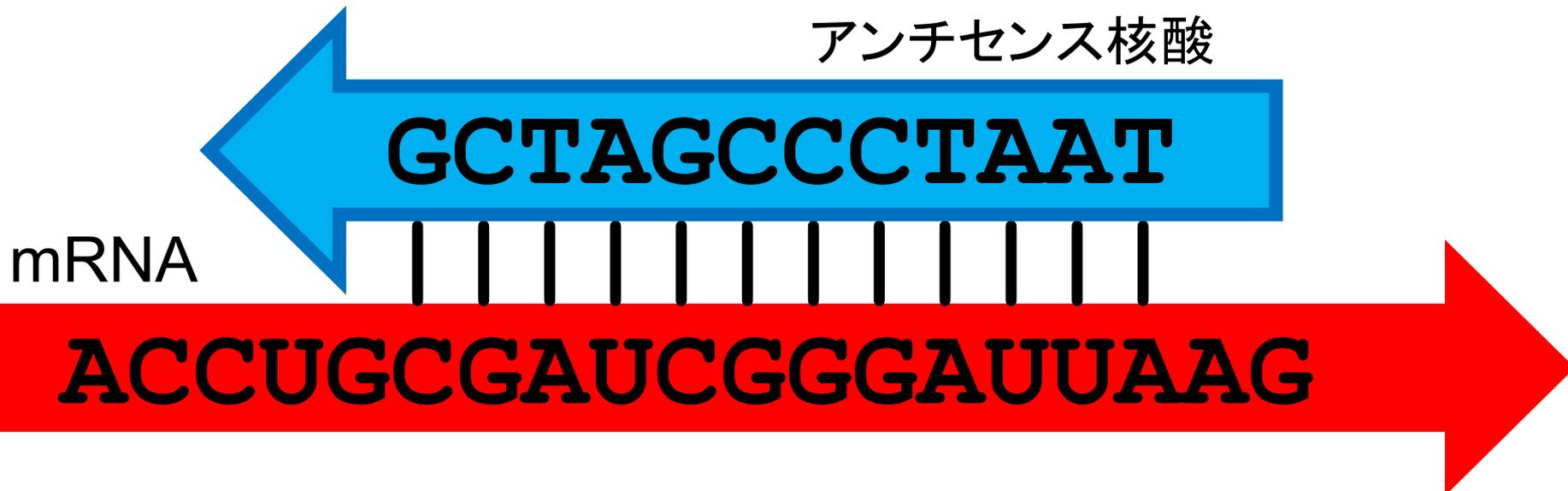
① 特定の立体構造を誘導する核酸医薬品 トランスフォーマー核酸(XFO)

- 特定の立体構造を誘導する人工核酸
- 出願番号： 特願2021-126578
- 出願人： 学校法人 上智学院
- 発明者： 近藤 次郎

従来技術の概要

「塩基対の相補性」に基づいたアンチセンス核酸

- 類似の塩基配列をもつ標的RNAに作用するリスクがある(オフターゲット効果)。
- 変異を含む配列を標的としにくい。



新技術の概要

非相補的塩基対を含む立体構造モチーフの活用



Bulged-G



Kink-turn



Reverse Kink-turn



5S loop E



C-loop

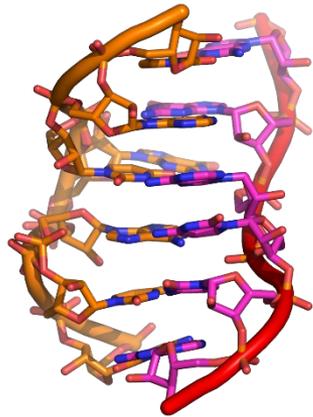


Tandem GA

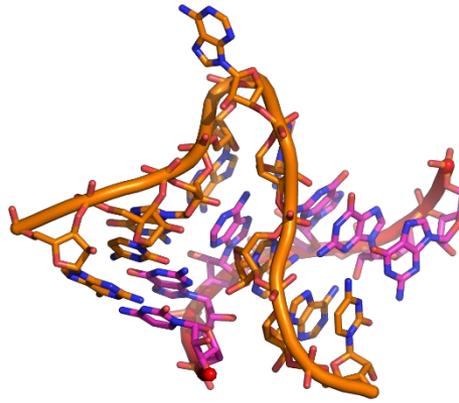
- 太字の塩基は必須。
- 太字の塩基Nは、A, U, G, Cのいずれでもよい。
- 細字の塩基N同士は相補的塩基対を形成する。

新技術の概要

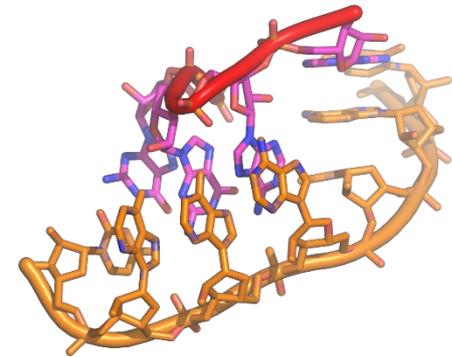
非相補的塩基対を含む立体構造モチーフの活用



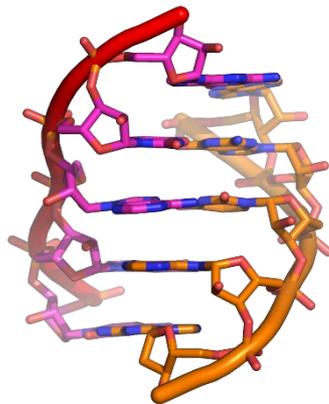
Bulged-G



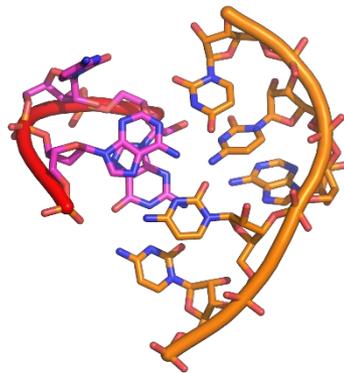
Kink-turn



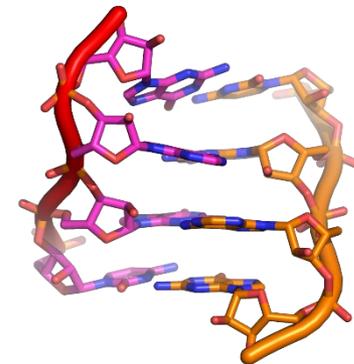
Reverse Kink-turn



5S loop E



C-loop



Tandem GA

新技術の利点

(例) Kink-turnモチーフの場合

標的RNA



核酸医薬品XFO

核酸医薬品XFO



標的RNA

- Kink-turnモチーフそのものが安定な立体構造のため、mRNAとの高い結合安定性が期待できる。
- XFOのNNNバルジの位置に機能を持ったヌクレオチドを導入できる(例: 蛍光性塩基など)。
- 標的RNAのNNNの位置をバルジさせてスキップするようにハイブリダイズさせることができる。

実施例① XFOと標的RNAの親和性

5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3'

3' -GUA CCG AGA ACG UCU ACG CUA CAA CG -5'

①

Antisense (コントロール)

5' -CAU GGC UCU UGC **AGA UGC** GAU GUU GC -3'

3' -GUA CCG AGA ACG **UA** G CUA CAA CG -5'

②

UGAU

Bulged-G

5' -CAU GGC UCU UGC **AGA** UGC GAU GUU GC -3'

3' -GUA CCG AGA ACG **UAG** ACG CUA CAA CG -5'

③

AAG

Kink-turn

5' -CAU GGC UCU UGC **AGA** UGC GAU GUU GC -3'

3' -GUA CCG AGA ACG **UAA** ACG CUA CAA CG -5'

④

ACA

Reverse Kink-turn

実施例① XFOと標的RNAの親和性

5' -CAU GGC UCU UGC **AGA UGC** GAU GUU GC -3'

3' -GUA CCG AGA ACG **UAU GCG** CUA CAA CG -5'

⑤

5S loop E

5' -CAU GGC UCU UGC **AGA UGC** GAU GUU GC -3'

3' -GUA CCG AGA ACG **UAU** CG CUA CAA CG -5'

⑥

CAC

C-loop

5' -CAU GGC UCU UGC **AGA UGC** GAU GUU GC -3'

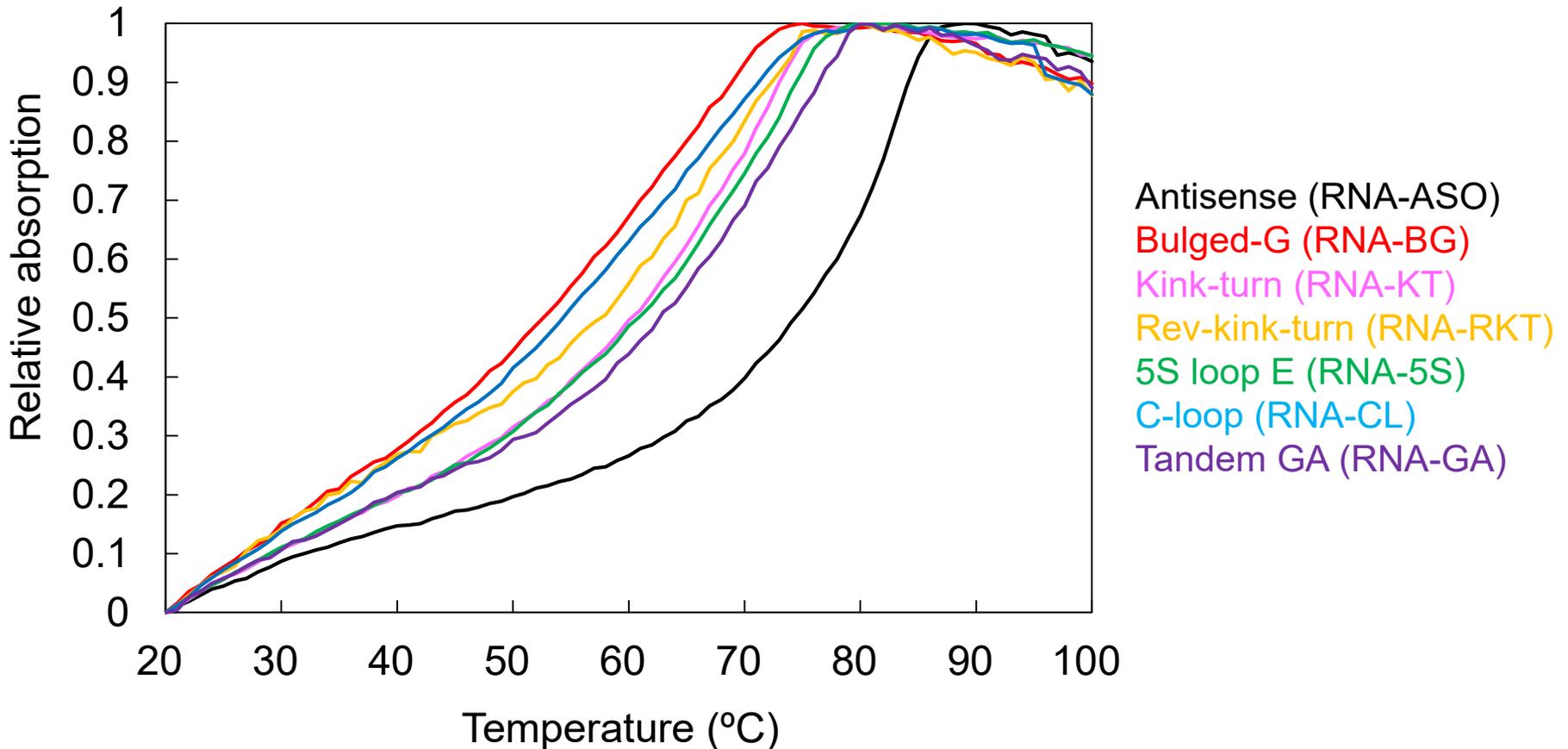
3' -GUA CCG AGA ACG **UAG** ACG CUA CAA CG -5'

⑦

Tandem GA

実施例① XFOと標的RNAの親和性

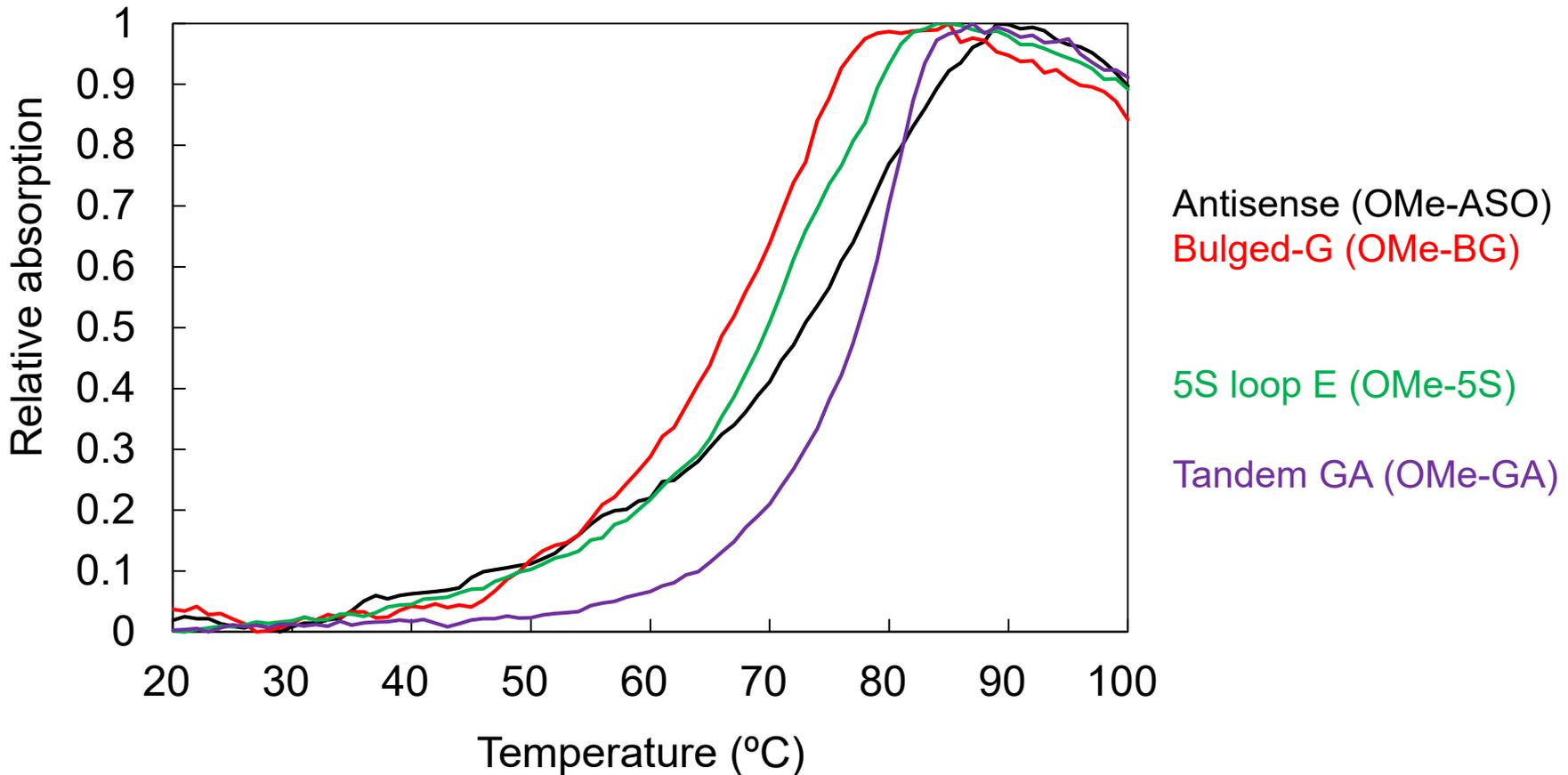
(実験1) RNAでできたXFOを用いた実験



1 μ M XFO (RNA), 1 μ M mRNA, 10 mM Na Cacodylate (pH7), 100 mM NaCl
吸収波長 260 nm, 温度: 20~100 °C

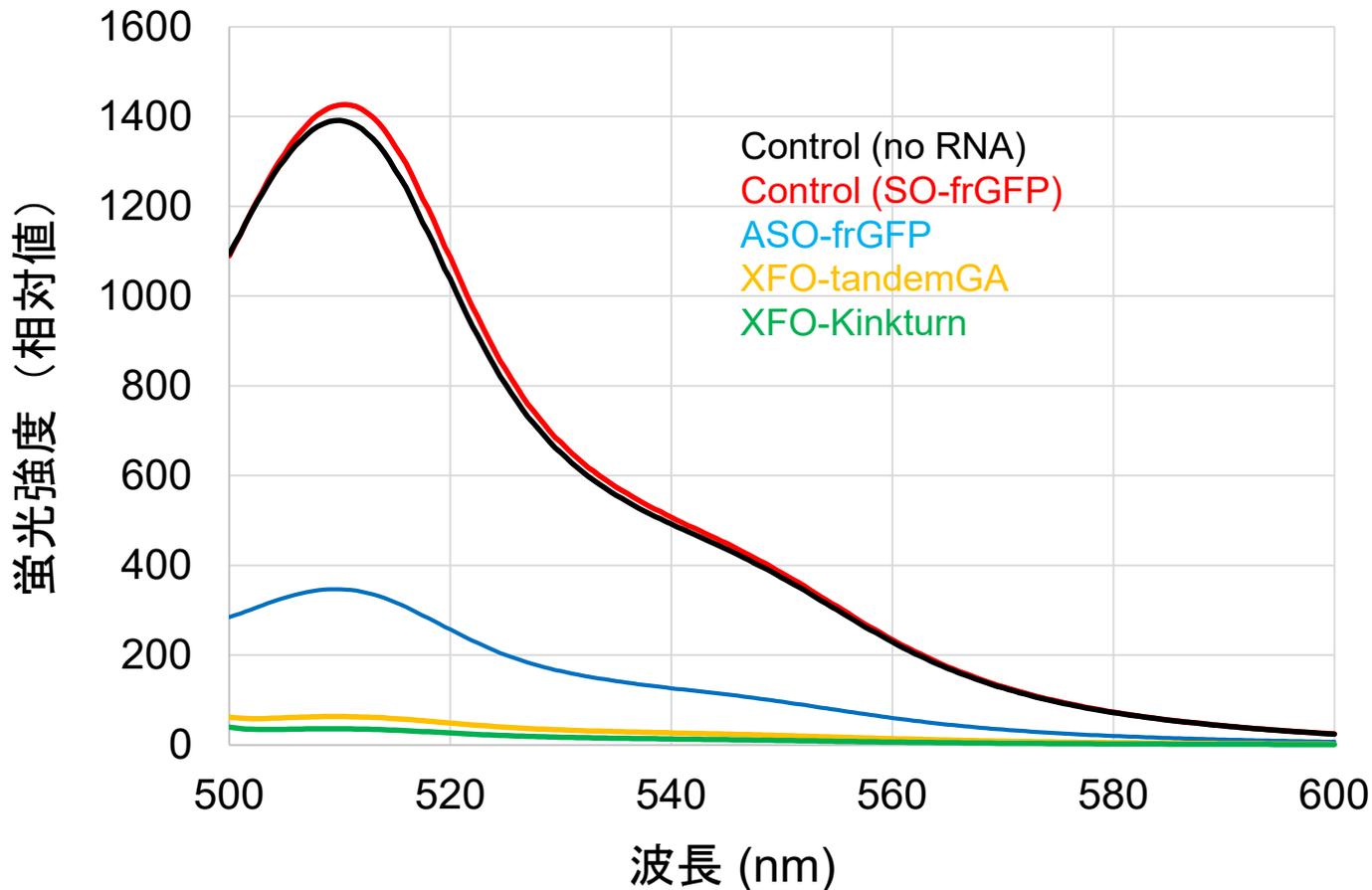
実施例① XFOと標的RNAの親和性

(実験2) 2'-OMe RNAでできたXFOを用いた実験



1 μ M XFO (2'-OMe RNA), 1 μ M mRNA, 10 mM Na Cacodylate (pH7), 100 mM NaCl
吸収波長 260 nm, 温度: 20~100 °C

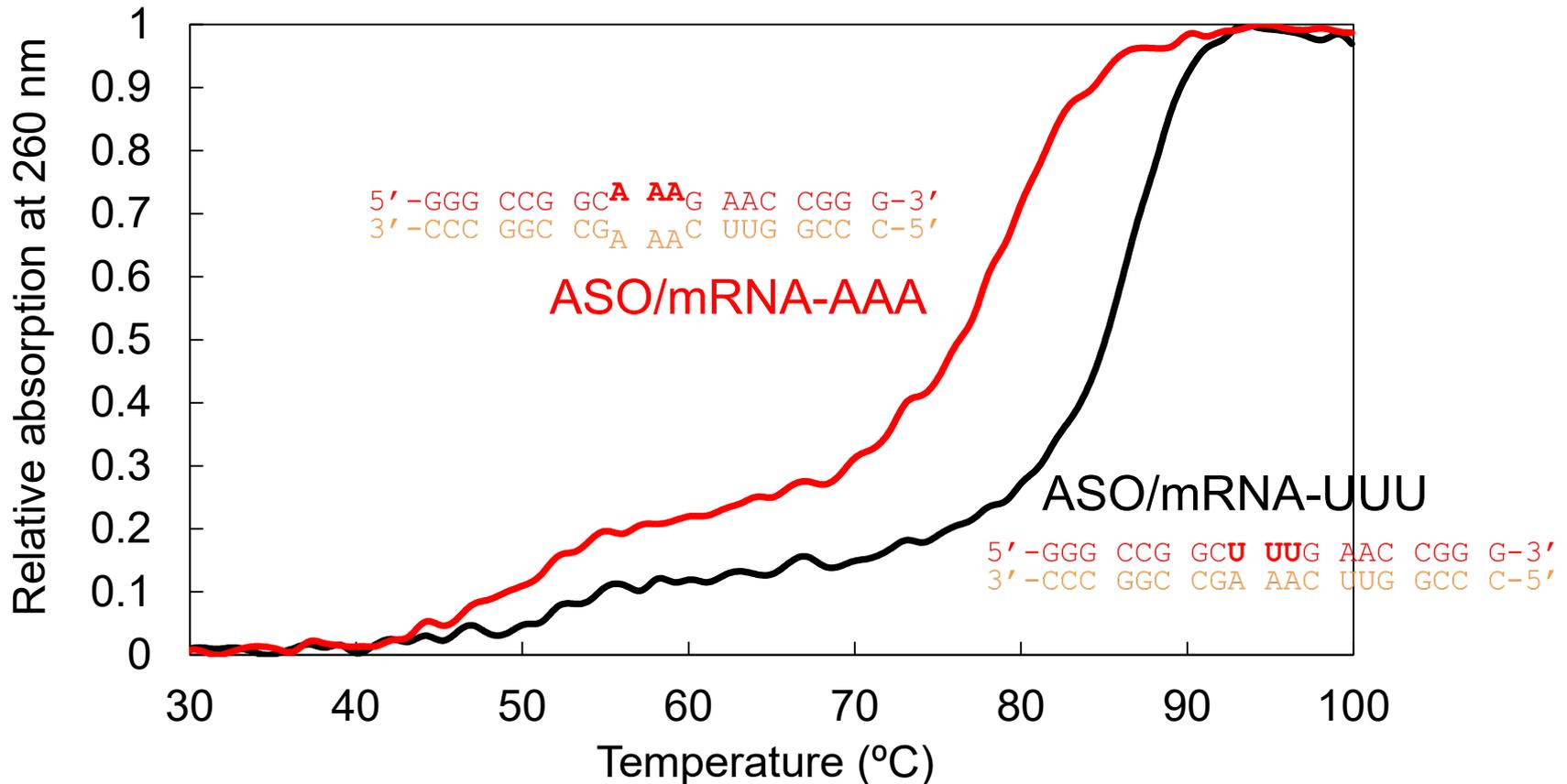
実施例② 無細胞翻訳阻害実験



「無細胞くんN Mini」(大陽日酸)を使用。Premix溶液、pUC-frGFP DNA(終濃度0.5 nM)、RNA(SO-frGFP, ASO-frGFP, XFO-TandemGA, XFO-Kinkturn:それぞれ終濃度20 nM)を含む反応溶液を30℃、90分間インキュベート後、励起波長480nmで測定した。

実施例③ 変異スキップ実験

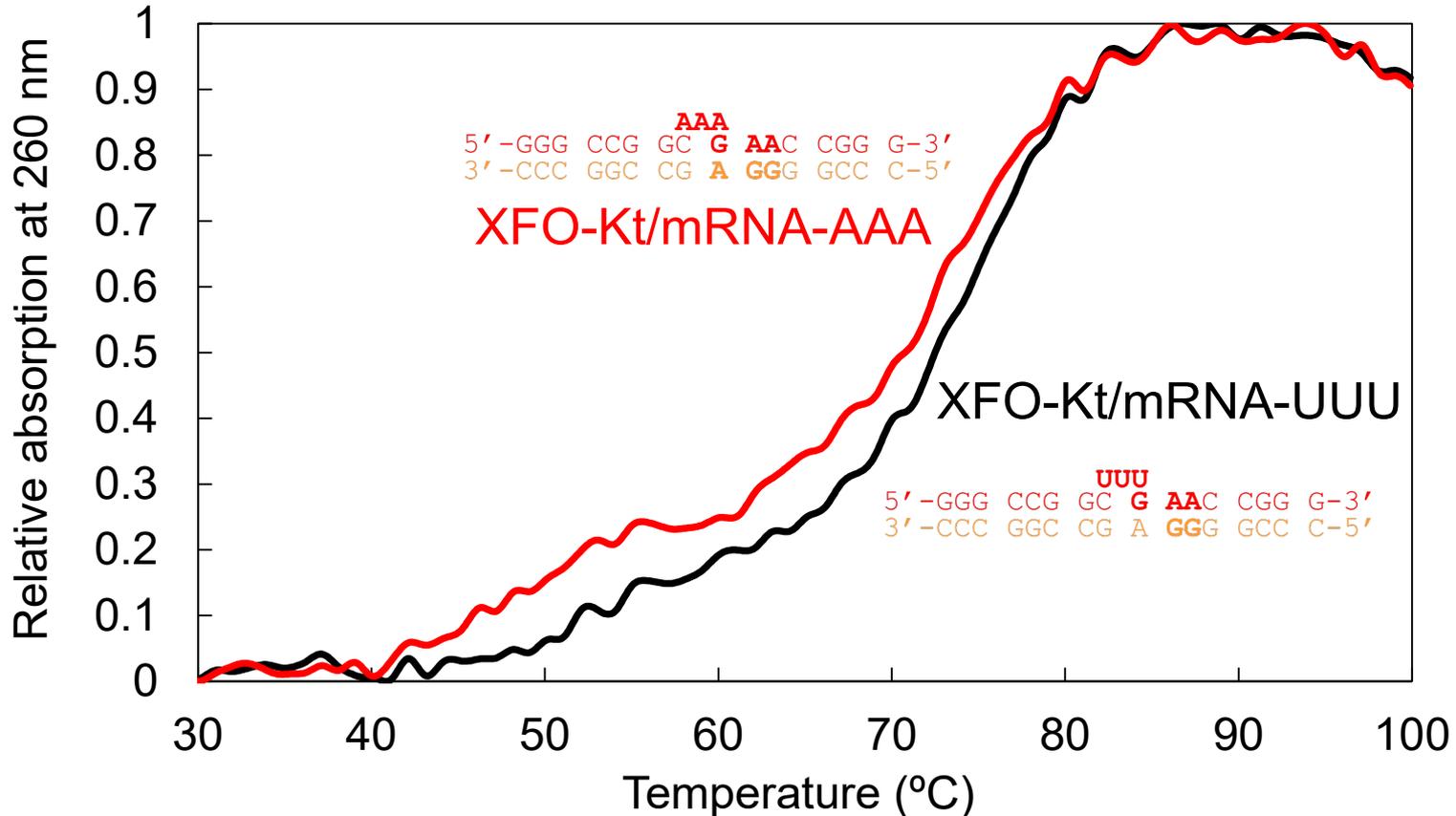
(実験1) ミスマッチをスキップさせなかった場合



1 μ M ASO, 1 μ M target RNA, 10 mM Na Cacodylate (pH7), 100 mM NaCl
吸収波長 260 nm, 温度: 30~100 °C

実施例③ 変異スキップ実験

(実験2) ミスマッチをスキップさせた場合

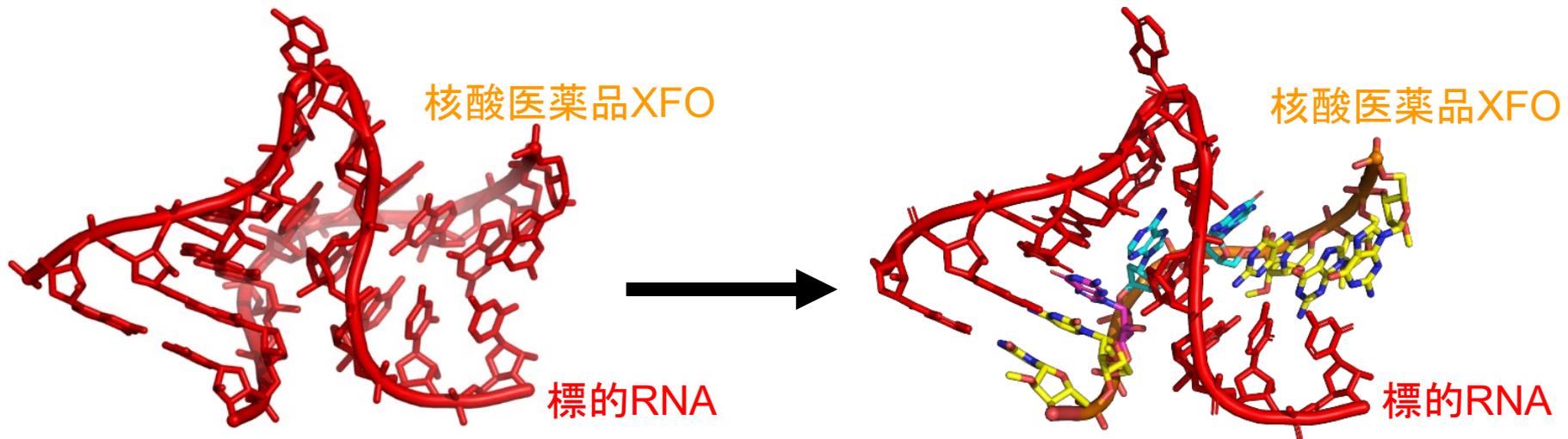


1 μ M XFO-Kt, 1 μ M target RNA, 10 mM Na Cacodylate (pH7), 100 mM NaCl
吸収波長 260 nm, 温度: 30~100 °C

実施例④ X線結晶解析

- X線結晶解析で得られた立体構造を観察
⇒ ルールにしたがって修飾ヌクレオチドを導入
⇒ **標的RNA**に**トランスフォーマー核酸(XFO)**を作用させることで
特定の立体構造モチーフをとらせることができた

(例) Kink-turnモチーフの場合



想定される用途

◆ ハイブリダイゼーション技術全般

PCR、DNAシーケンシング、サザン・ノーザンブロッディング
in situハイブリダイゼーション、核酸センサー
遺伝子ノックダウン法（アンチセンス法・RNA干渉法） etc.

◆ 特に核酸医薬品として

- 数塩基をスキップさせたい場合などに、アンチセンス核酸の代用として利用可能
- バルジ（突出）する塩基部分に任意のヌクレオチド誘導体を導入可能
- タンパク質の結合を誘導する核酸医薬品（アンチセンス核酸とアプタマーを融合）

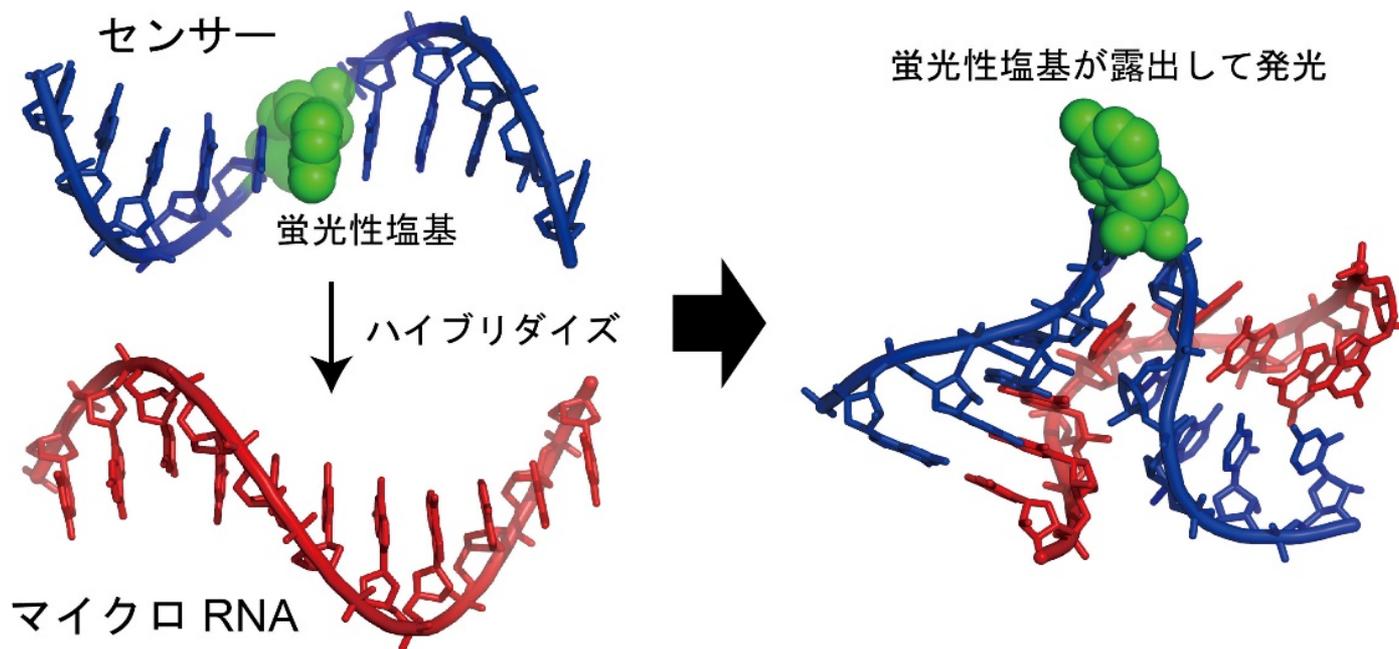
② 塩基配列特異的な核酸標識プローブ

- 蛍光標識核酸プローブ
- 出願番号： 特願2021-126617
- 出願人： 学校法人 上智学院
- 発明者： 近藤 次郎

新技術の概要

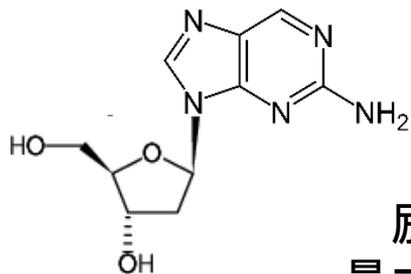
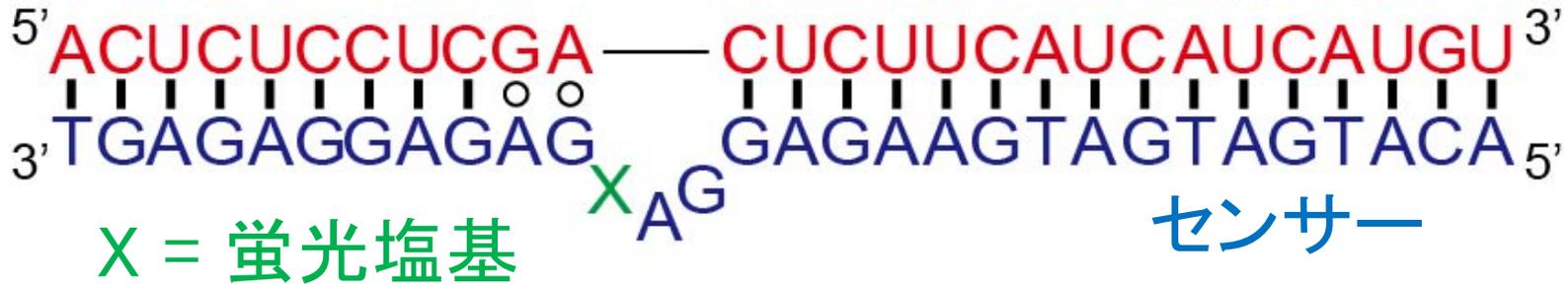
核酸標識プローブ

トランスフォーマー核酸(XFO)の技術を応用して、
核酸を塩基配列特異的に検出する方法



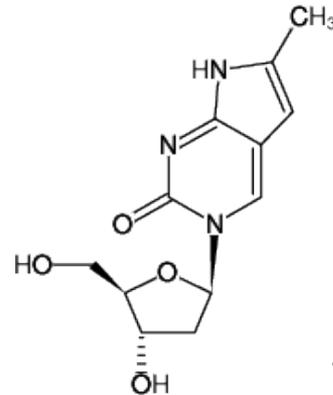
実施例① 一本鎖RNA検出実験

標的RNA



2-アミノプリン
(2AP)

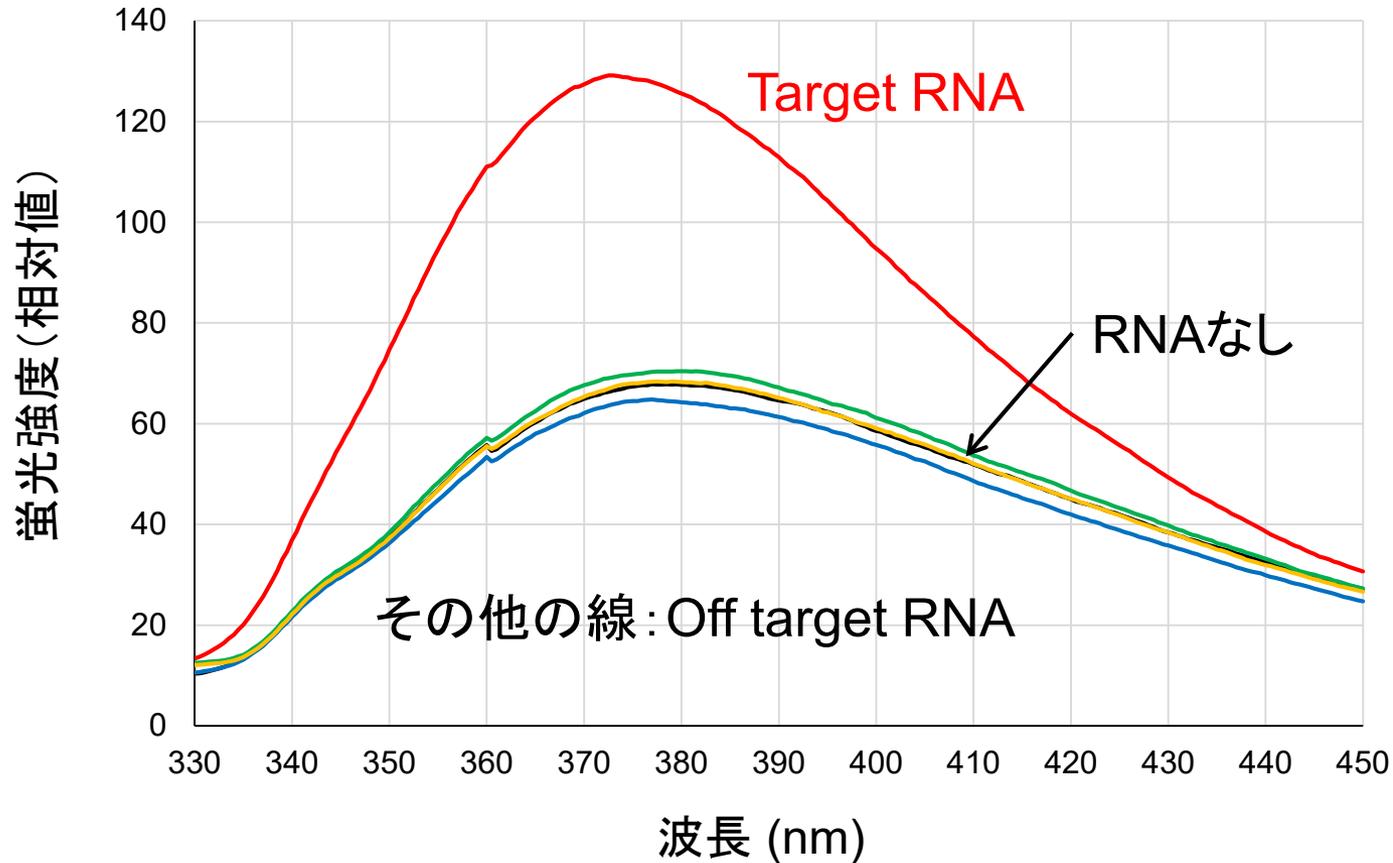
励起波長: 325 nm
最大蛍光波長: 370 nm



ピロロシトシン
(PC)

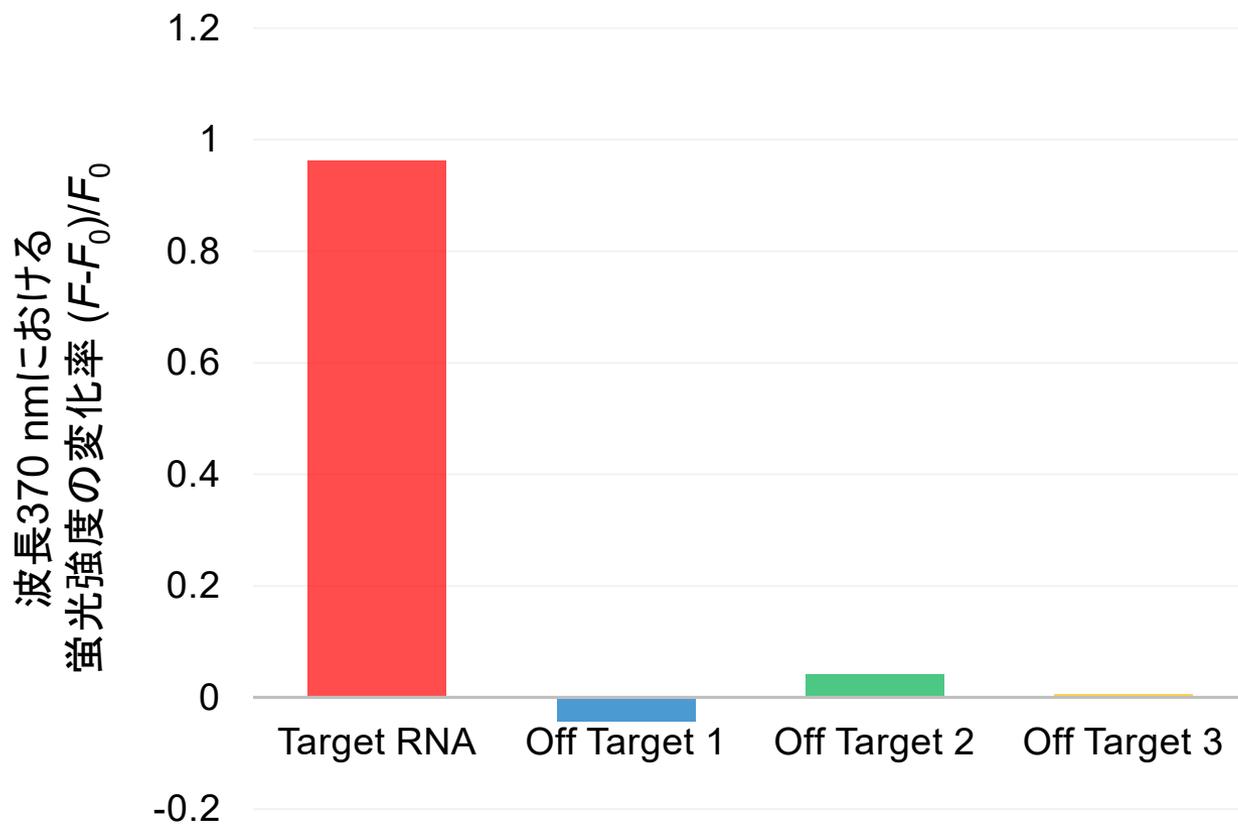
励起波長: 270 nm
最大蛍光波長: 445 nm

実施例① 一本鎖RNA検出実験



0.01 mM センサー, 0.01 mM Target or Off target RNA
10 mM Na Cacodylate (pH7), 100 mM NaCl, 励起波長 305 nm

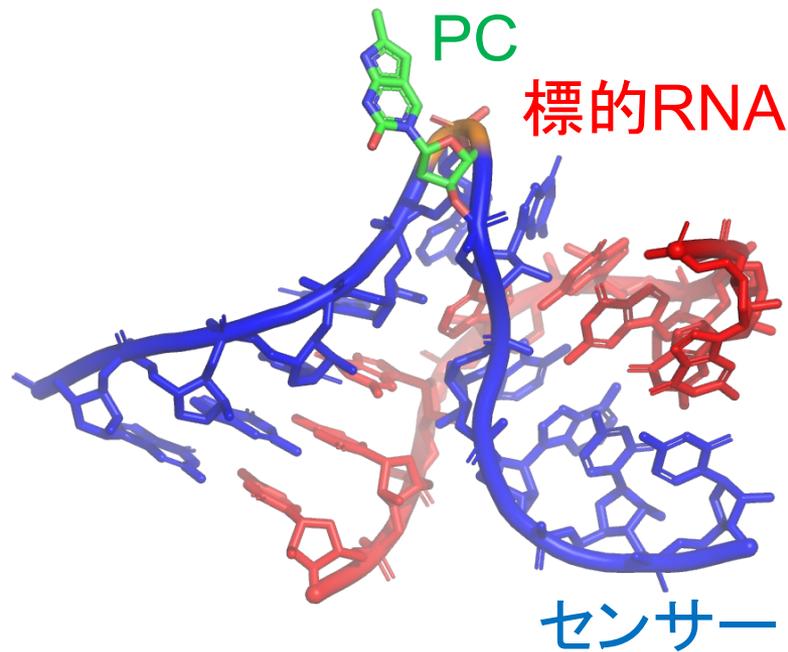
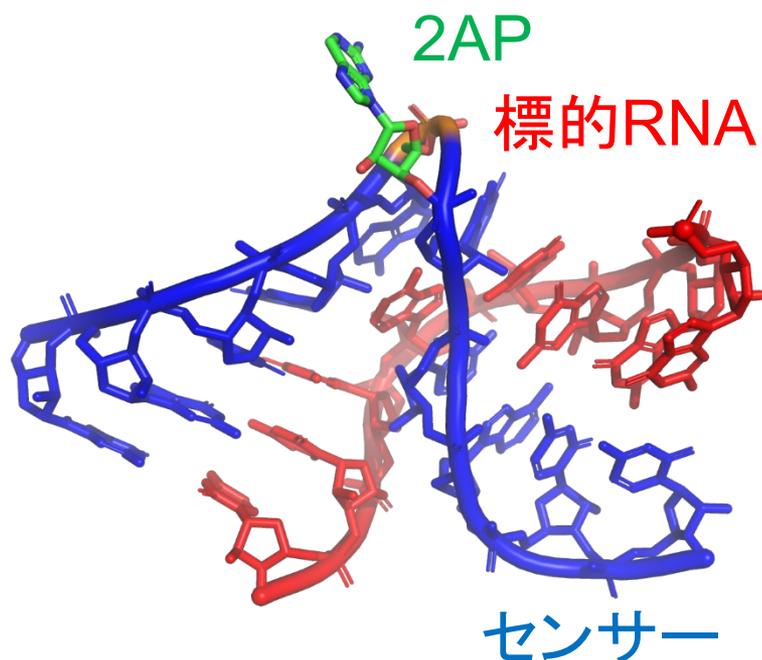
実施例① 一本鎖RNA検出実験



0.01 mM センサー, 0.01 mM Target or Off target RNA
10 mM Na Cacodylate (pH7), 100 mM NaCl, 励起波長 305 nm

実施例② X線結晶解析

センサーと標的RNAの複合体の立体構造



導入した蛍光塩基が分子の外側に露出していることが確認できた

想定される用途

miRNAやmRNAを塩基配列特異的に高感度に検出

⇒ **ガンなど疾病の早期発見**
RNAウイルス感染の検査

- ◆ 脳腫瘍: miR-21
- ◆ 食道がん: miR-184a
- ◆ 肺がん: miR-25, miR-223, miR-21, miR-17-3p, miR-155
- ◆ 乳がん: miR-195
- ◆ 肝臓がん: miR-500
- ◆ 大腸がん: miR-17-3p, miR-92
- ◆ 卵巣がん: miR-141, miR-200
- ◆ 前立腺がん: miR-141
- ◆ 白血病: miR-98
- ◆ リンパ腫: miR-21

③ DNA-銀ハイブリッドナノワイヤー

- DNA-金属ハイブリッドナノワイヤーおよびその製造方法
- 特許番号： 特許第6860132号
- 出願人： 学校法人 上智学院
- 発明者： 近藤 次郎、多田 能成

新技術の概要

PRESS RELEASE



上智大学
SOPHIA UNIVERSITY

上智大学 SOPHIA UNIVERSITY

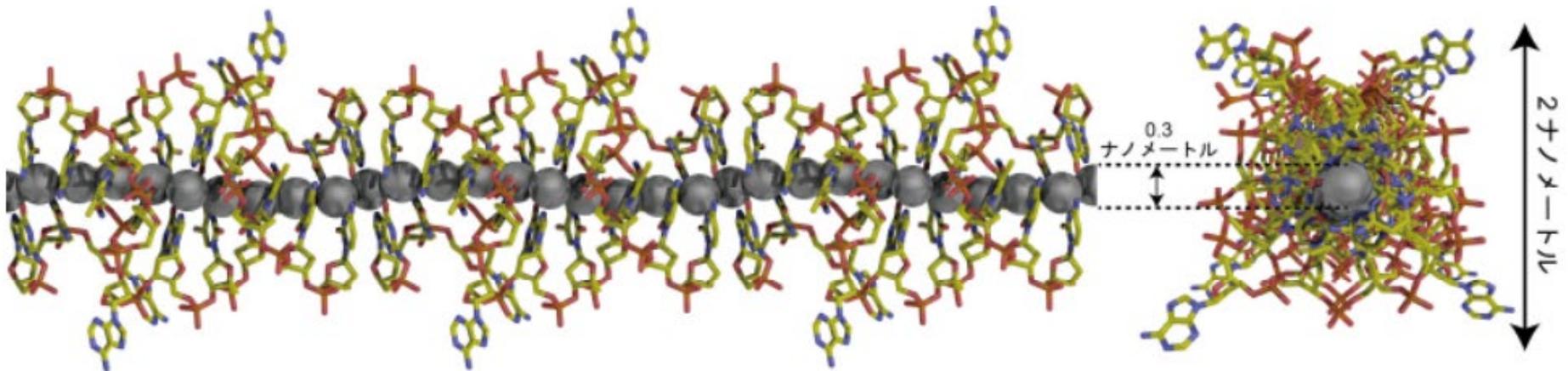
〒102-8554 東京都千代田区紀尾井町 7-1

www.sophia.ac.jp

2017年7月3日

報道関係各位

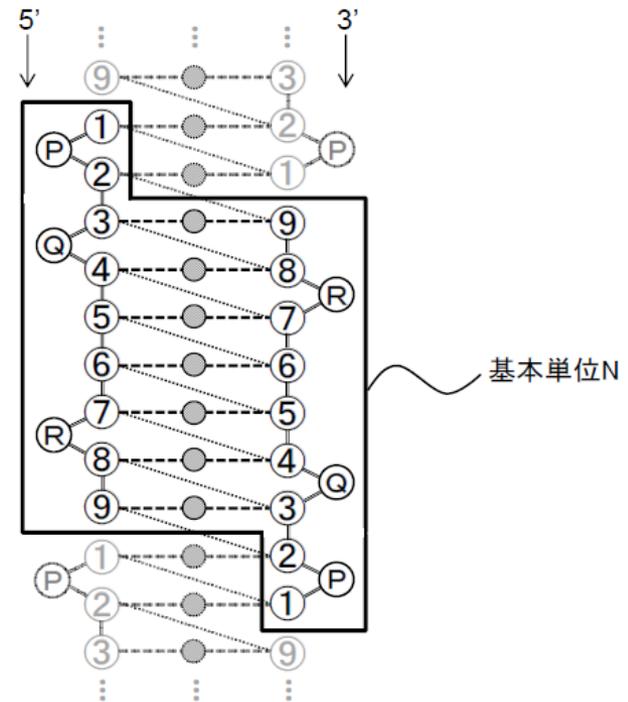
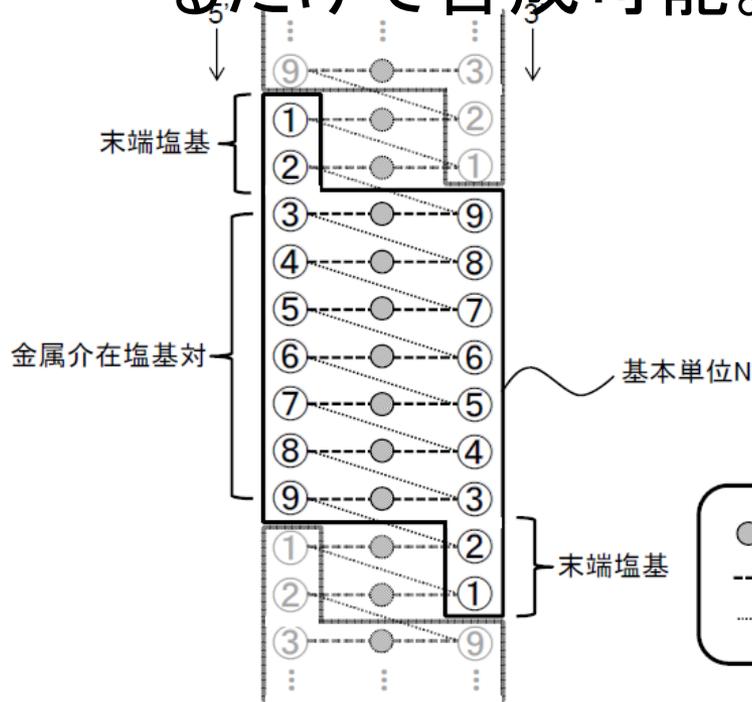
DNAと銀でできた世界最細のワイヤーの作製に成功
ナノサイズの集積回路などに用いる分子電線としての応用に期待
～Nature Chemistry（ネイチャー・ケミストリー）で発表～



Kondo *et al.*, 2017, *Nature Chemistry*

新技術の概要

- 「重金属仲介塩基対」を活用したナノマテリアル。
- 特定の塩基配列をもつDNAと硝酸銀を混合するだけで合成可能。



想定される用途

- 透明導電フィルム
 - * 既存の銀ナノワイヤーの一般的な用途
(大日本印刷、東レ、日立化成など)
- DNAインク
 - * 特殊な塩基対を含むDNAの用途
(大日本印刷・タグシクスバイオ)
- 微細電子回路
 - * 将来的な用途
- ナノスケールの抗菌繊維
 - * 銀の抗菌性とDNAの生体適合性を利用した素材

企業への期待

- 立体構造を活用した新しいタイプの核酸医薬品の開発に関する共同研究
- DNA-銀ハイブリッドナノワイヤーの実用化に向けた共同研究
- 当研究室の「DNAものづくりプラットフォーム」の設備面での拡充、およびその積極的活用

本技術に関する知的財産権

① 特定の立体構造を誘導する人工核酸

- 出願番号： 特願2021-126578
- 出願人： 学校法人 上智学院
- 発明者： 近藤 次郎

② 蛍光標識核酸プローブ

- 出願番号： 特願2021-126617
- 出願人： 学校法人 上智学院
- 発明者： 近藤 次郎

③ DNA-金属ハイブリッドナノワイヤーおよびその製造方法

- 特許番号： 特許第6860132号
- 出願人： 学校法人 上智学院
- 発明者： 近藤 次郎、多田 能成

お問い合わせ先

上智大学 学術情報局
研究推進センター

TEL: 03-3238-3173

FAX: 03-3238-4116

g_rant-co@sophia.ac.jp