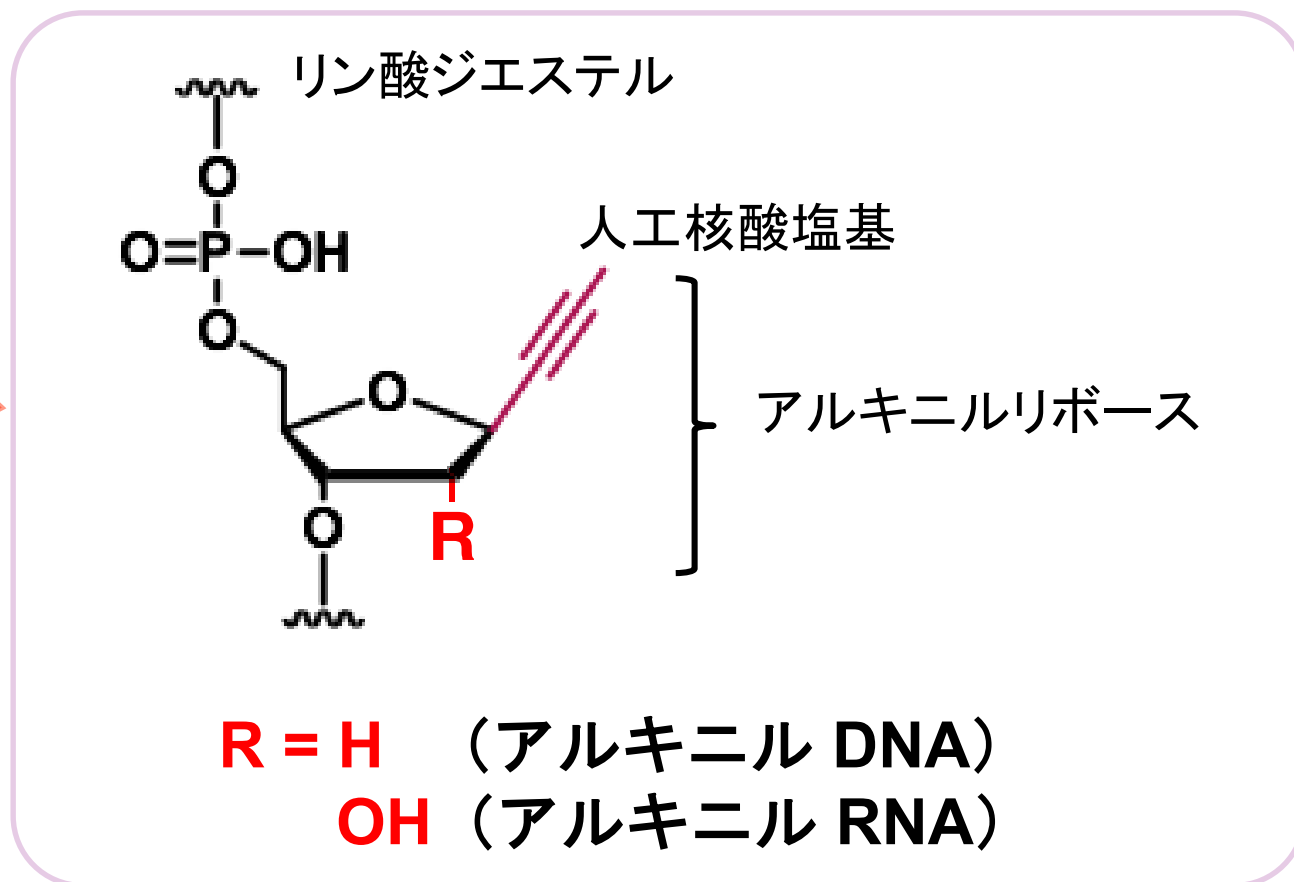
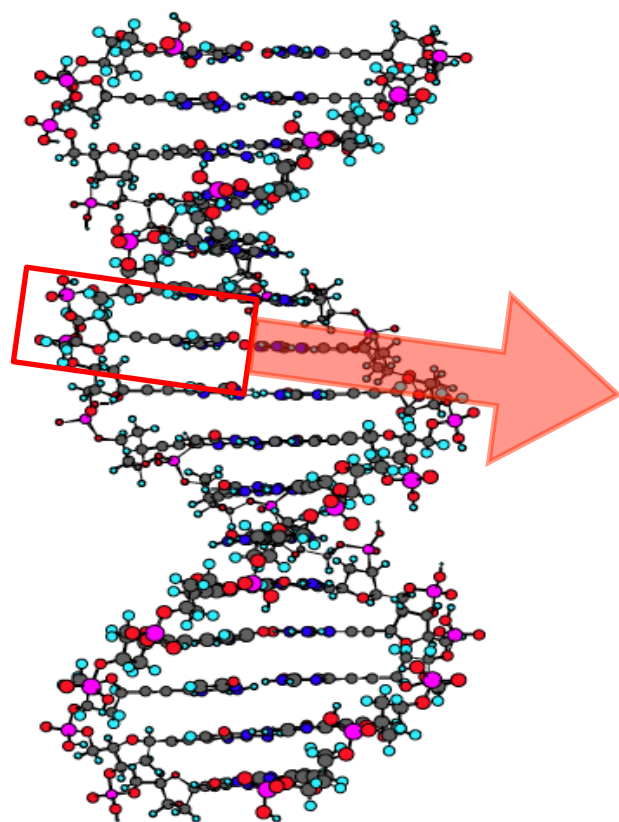


天然核酸に高親和性を示す 人工核酸：アルキニル核酸

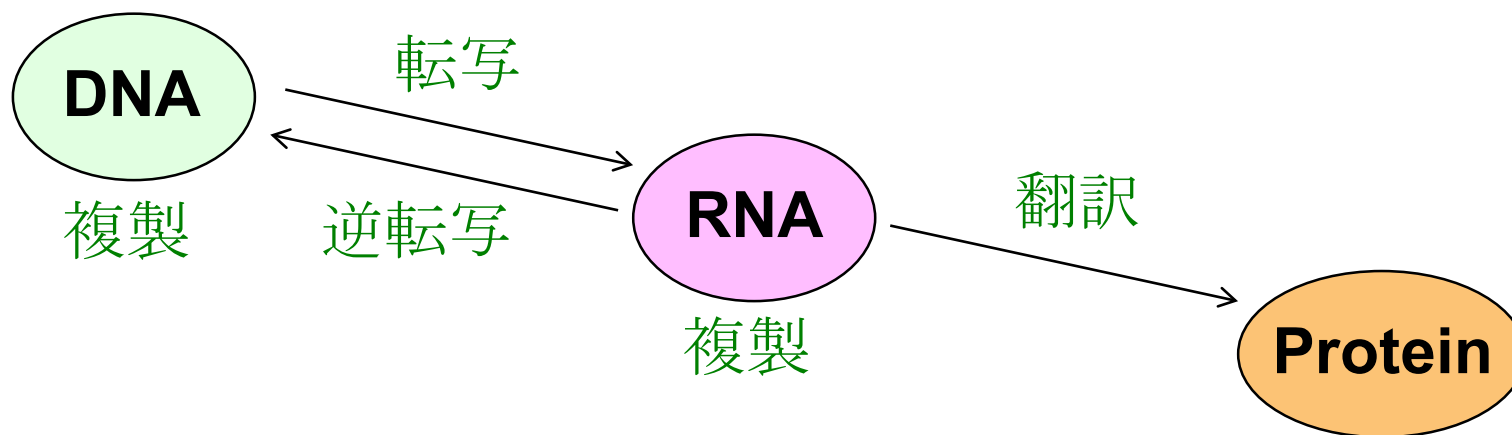
富山大学 学術研究部 薬学・和漢系

准教授 千葉 順哉

新技術(アルキニル核酸)の概要



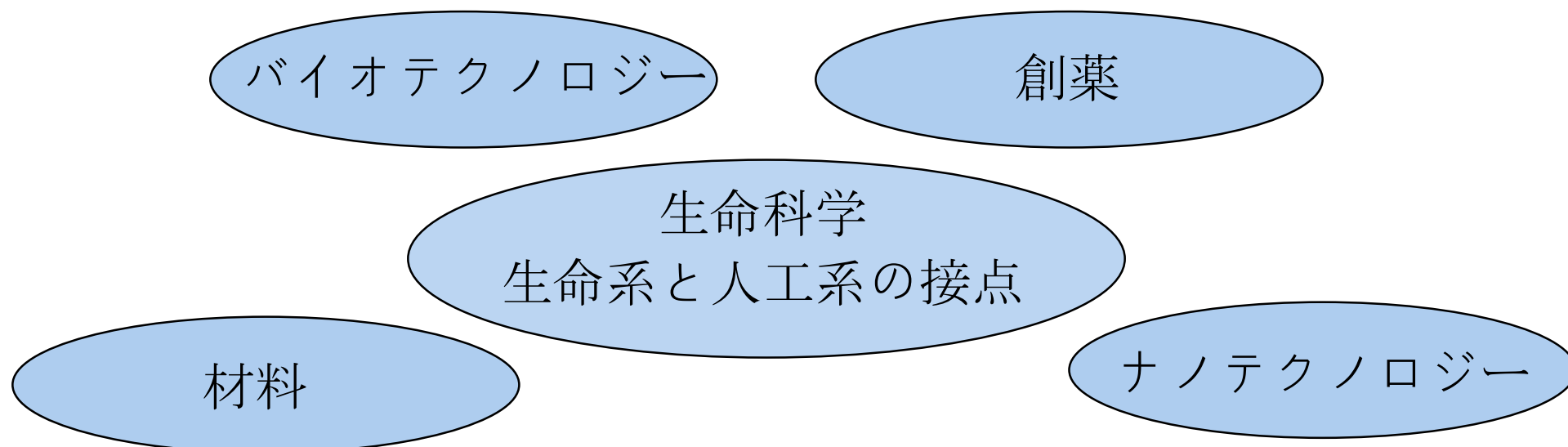
- 人工鎖どうしで安定なハイブリッド形成
- 天然核酸に対しても高い親和性
- アルキニル RNA / 天然 DNA ハイブリッドが最安定



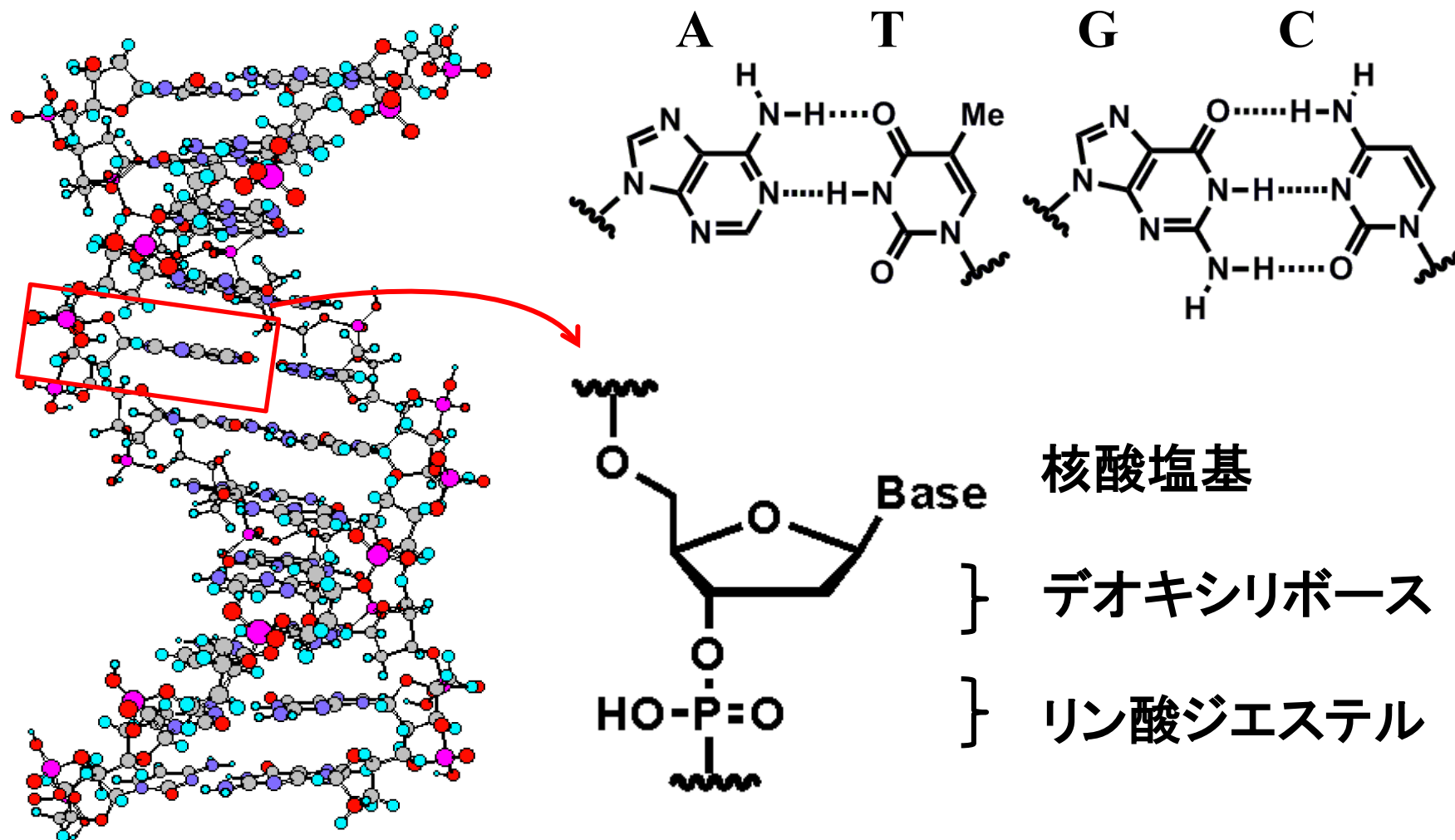
セントラルドグマ



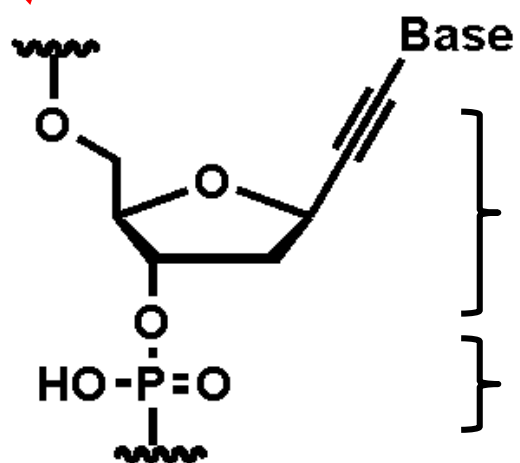
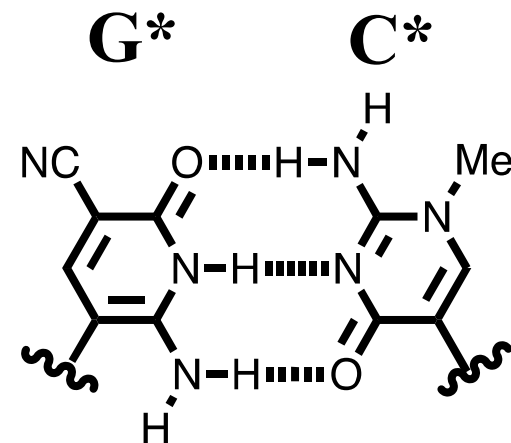
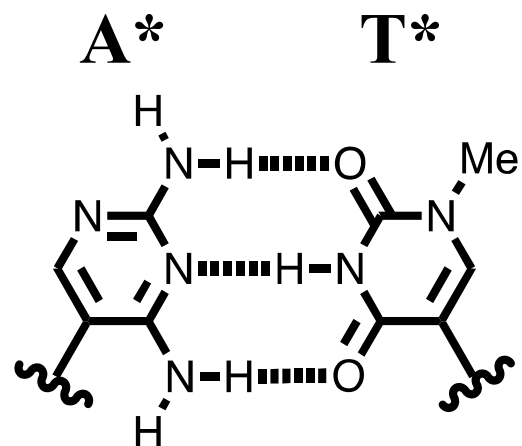
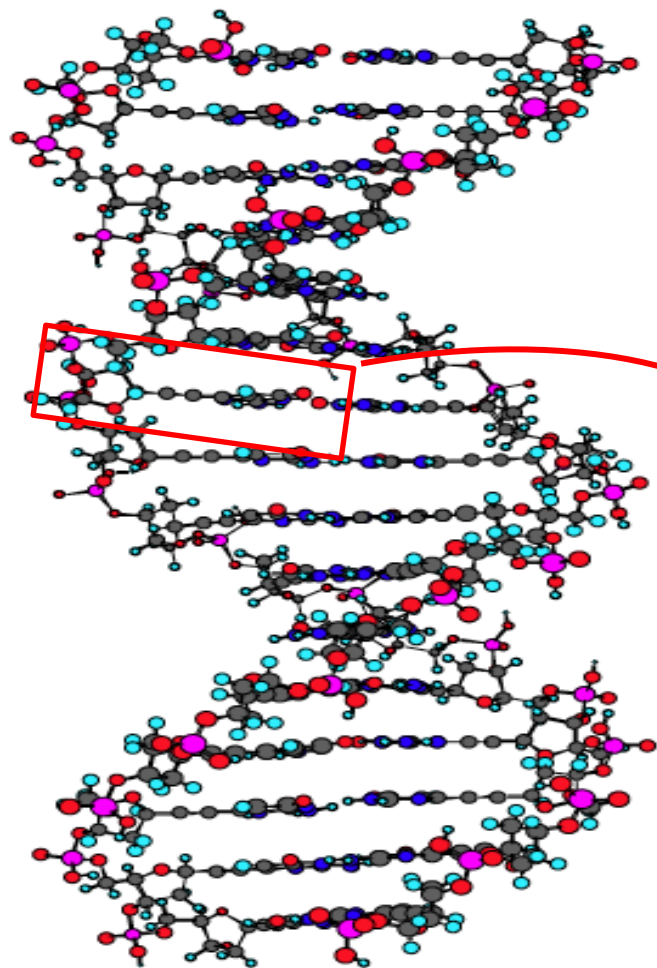
人工骨格の介入



DNA の化学構造



完全人工 DNA の創成



非天然核酸塩基(水素結合性)

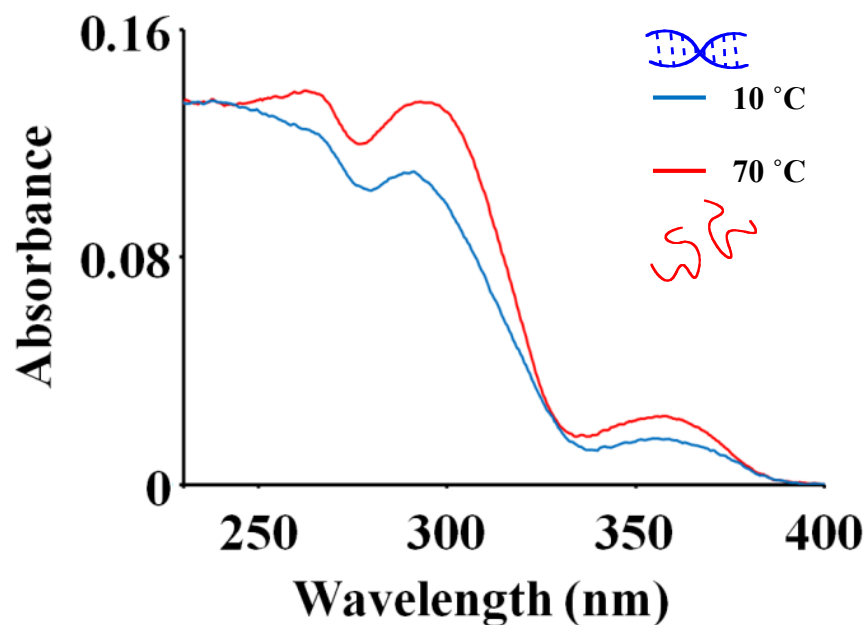
アルキニル
デオキシリボース

リン酸ジエステル

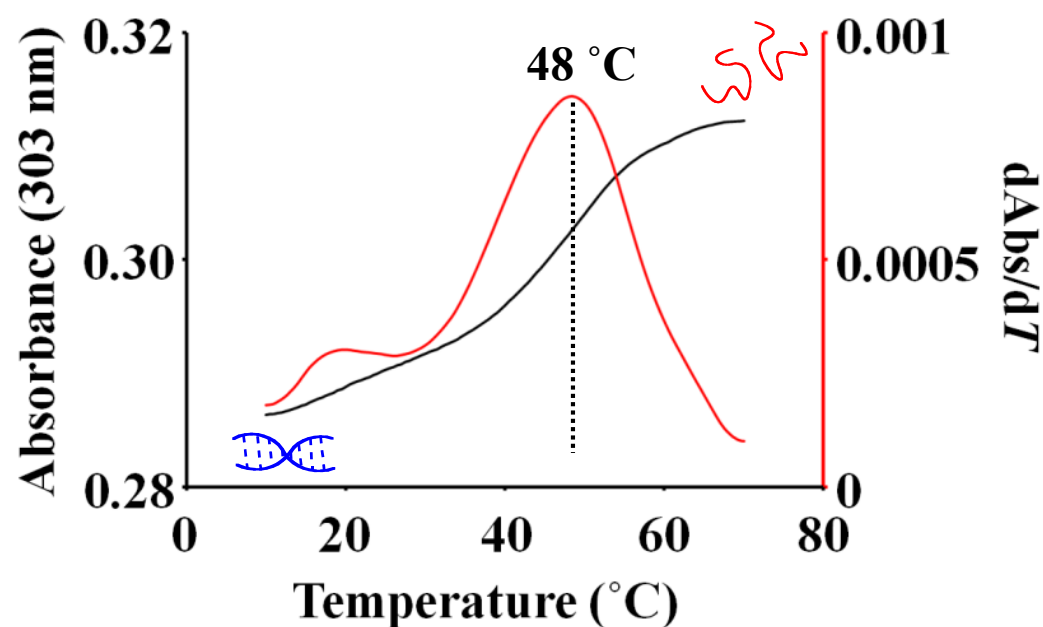
完全人工 DNA

5'-d(T*A*T*T*G*C*T*A*T*T*)/ 3'-d(A*T*A*A*C*G*A*T*A*A*) : アンチパラレル配向

UV-vis スペクトル



T_m 測定 ($\lambda = 303$ nm)



(測定条件: 1.0 μ M duplex, 10 mM Hepes (pH 7.0), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl)

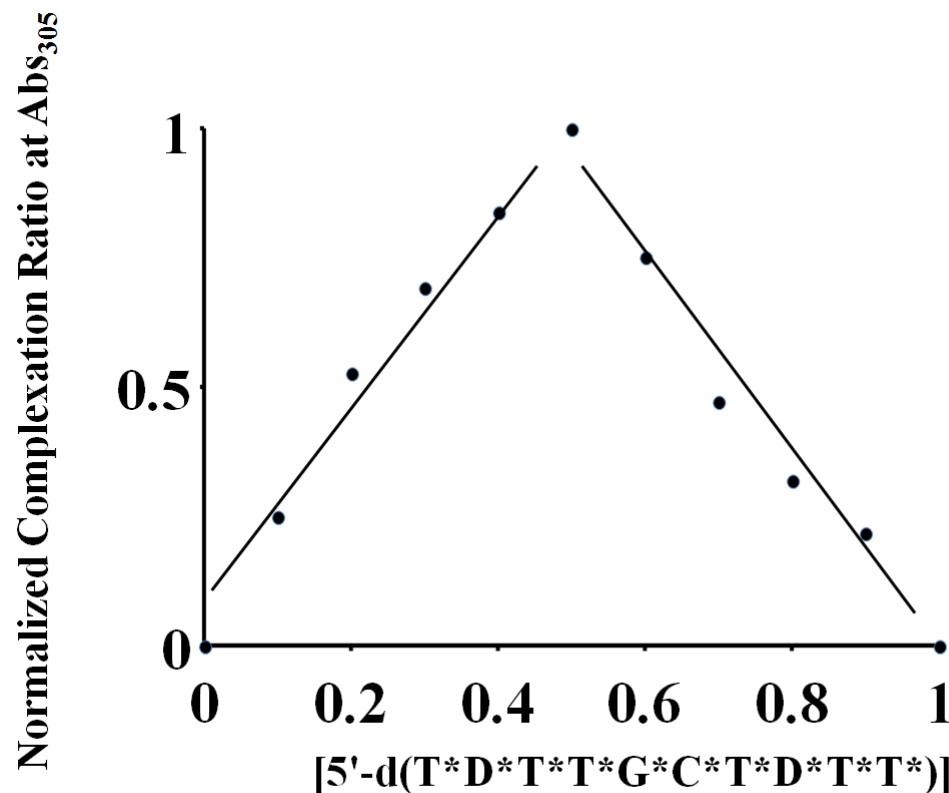
5'-d(T*D*T*T*G*C*T*D*T*T*)/ 5'-d(D*T*D*D*C*G*D*T*D*D*) : パラレル配向

明確な T_m 値を示さず

化学量論比

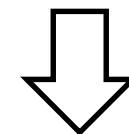
5'-d(T*A*T*T*G*C*T*A*T*T*)/ 3'-d(A*T*A*A*C*G*A*T*A*A*)

Job's plot



[5'-d(T*D*T*T*G*C*T*D*T*T*)] + [3'-d(D*T*D*D*C*G*D*T*D*D*)]

化学量論比 = 1 : 1



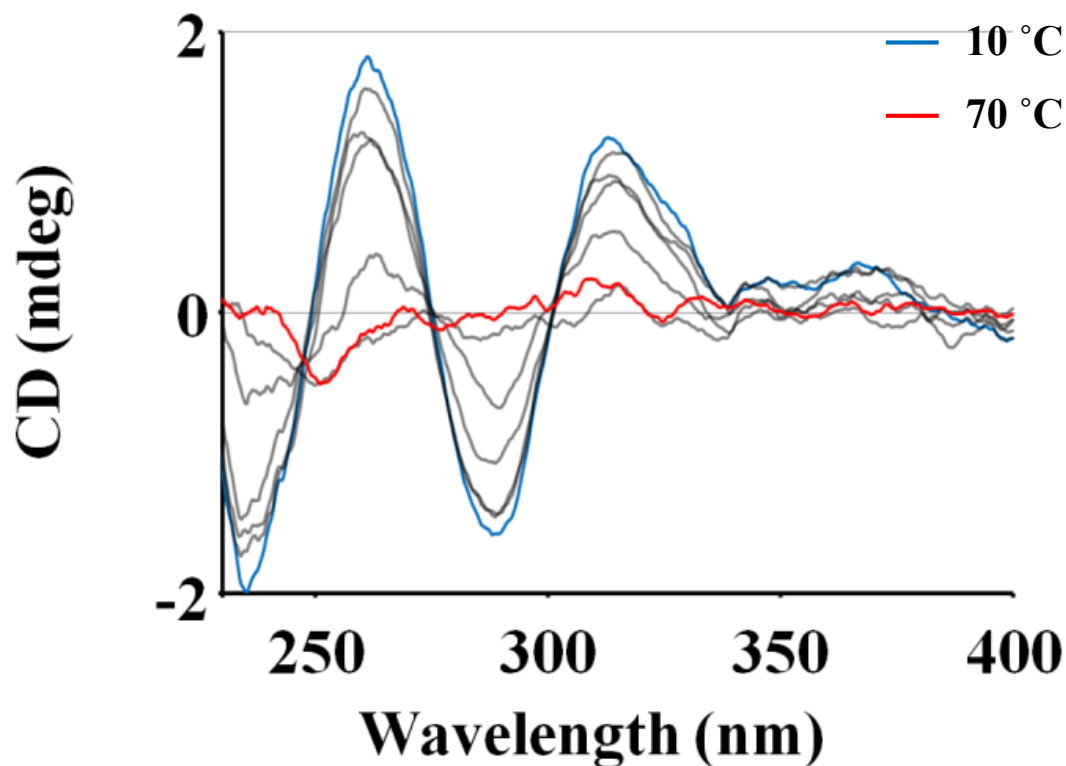
人工 DNA は二重鎖を形成

(測定条件 : [全人工 DNA] = 1.0 μM, 10 mM Hepes (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl)

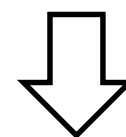
人工 DNA の高次構造の推定

5'-d(T*A*T*T*G*C*T*A*T*T*)/ 3'-d(A*T*A*A*C*G*A*T*A*A*)

CD スペクトル



CD スペクトルで
第 1 コットンが正



右巻き二重らせんの構造を示唆

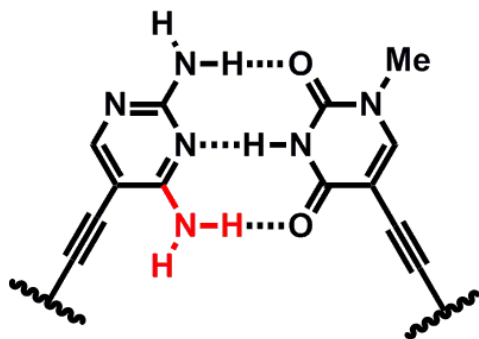
(測定条件: 1.0 μ M duplex, 10 mM Hepes (pH 7.0), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl)

人工 DNA と天然 DNA の T_m 値の比較

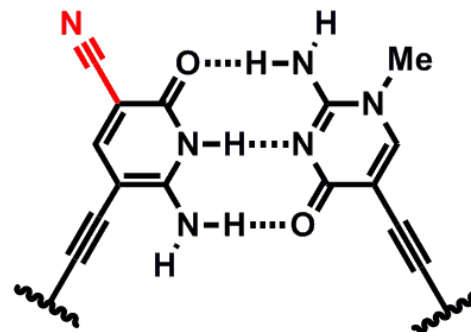
entry	配列	T_m (°C)	天然 DNA の T_m (°C)	ΔT_m (°C)
1	5'-d(T*D*D*T*D*T*D*T*T*D*)	39	12	+27
2	5'-d(T*D*D*T* G*C *D*T*T*D*)	51	31	+20
3	5'-d(T* G *D*T* G*C *D*T* C *D*)	62	40	+22
4	5'-d(T*D*T*T*G*C*T*D*T*T*) / 3'-d(D*T*D*D*C*G*D*T*D*D*)	48	28	+20

(測定条件: 1.0 μ M duplex, 10 mM Hepes (pH 7.0), 10 mM $MgCl_2$, and 100 mM NaCl)

天然 DNA よりも強固な二重鎖を形成した理由の考察



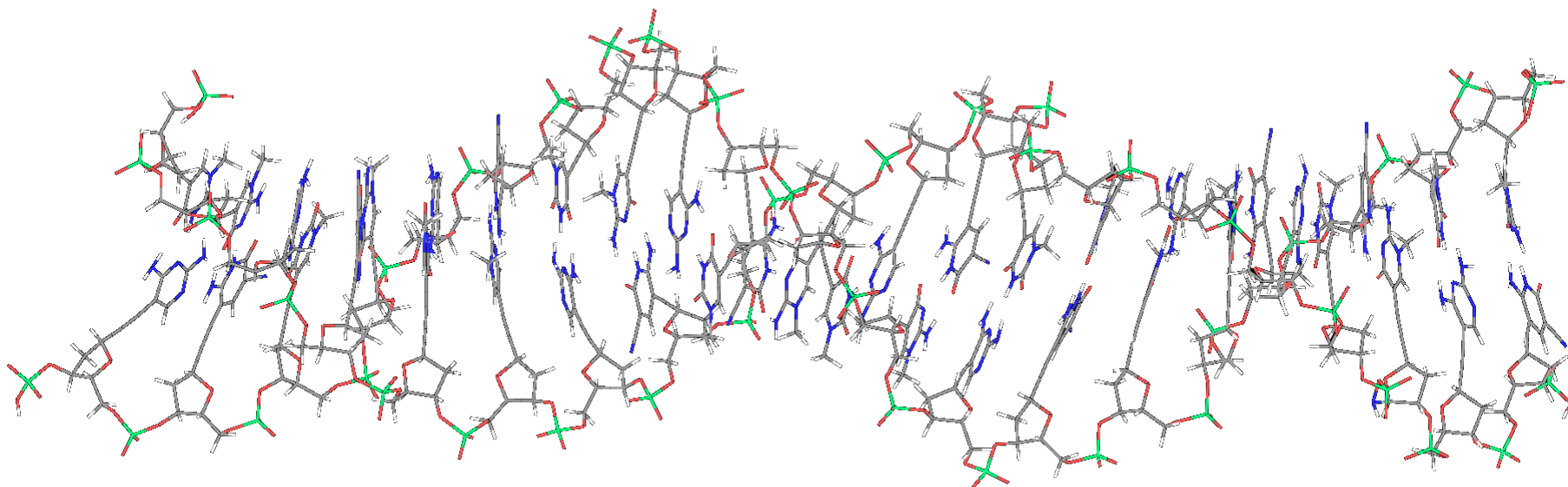
天然 A/T 塩基対にはない3点目の水素結合



シアノ基の π スタッキング

人工 DNA の MacroModel 計算

5'-d(T*C*D*G*)₅/3'-d(D*G*T*C*)₅

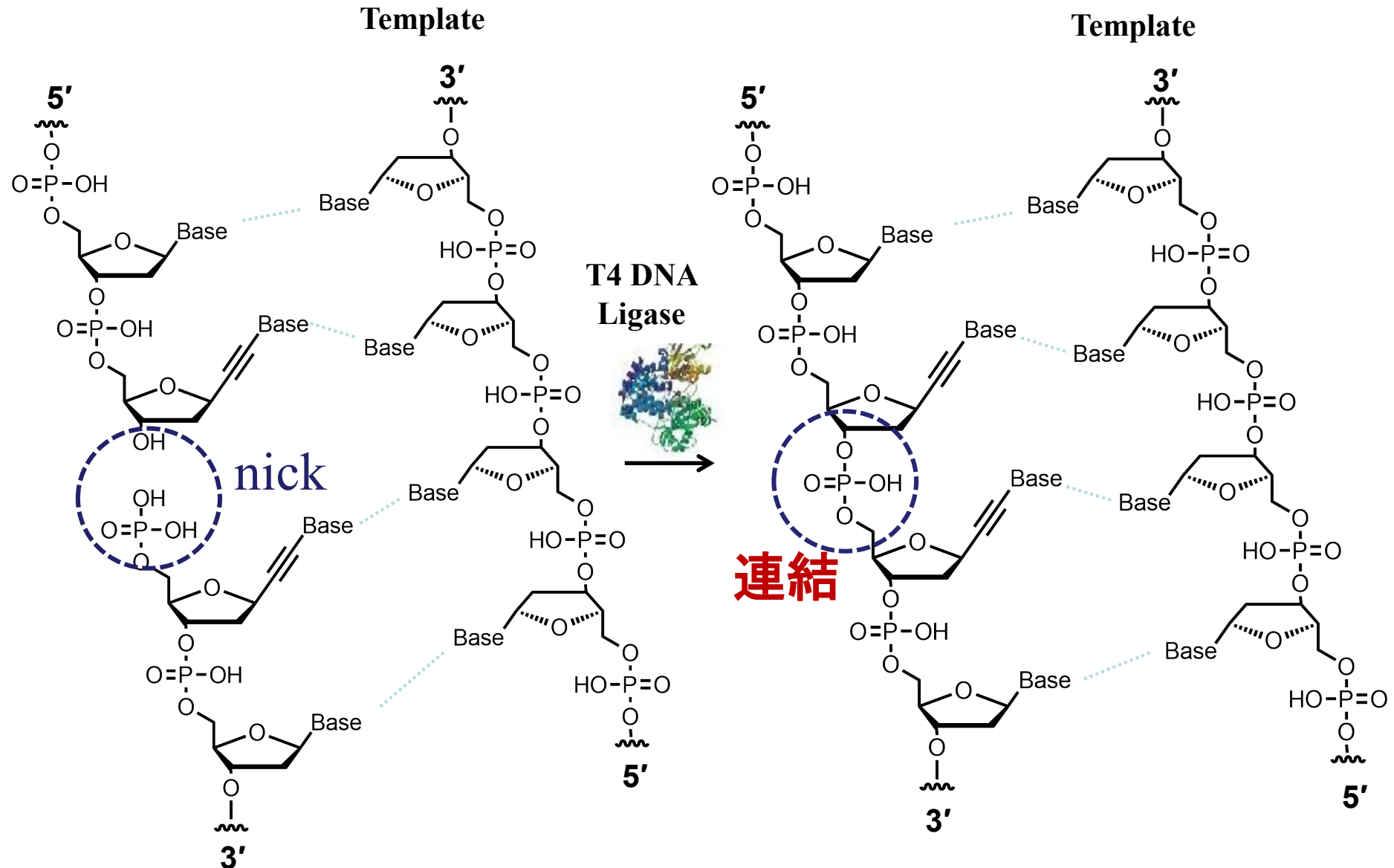


構造上の特徴	人工 DNA	天然 DNA
幅	2.25 nm	2 nm
10 塩基分の長さ	3.65 nm	3.4 nm
一巻きの塩基数	13 bp	10 bp

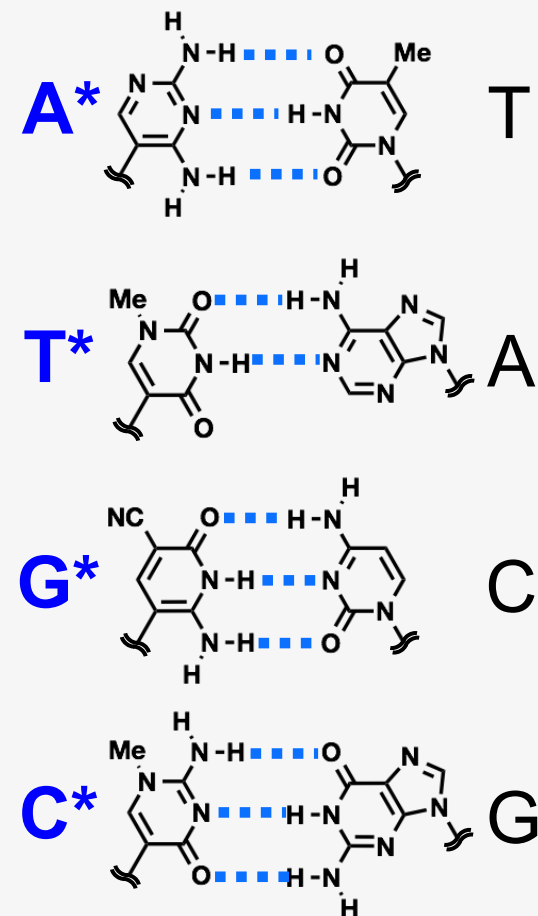
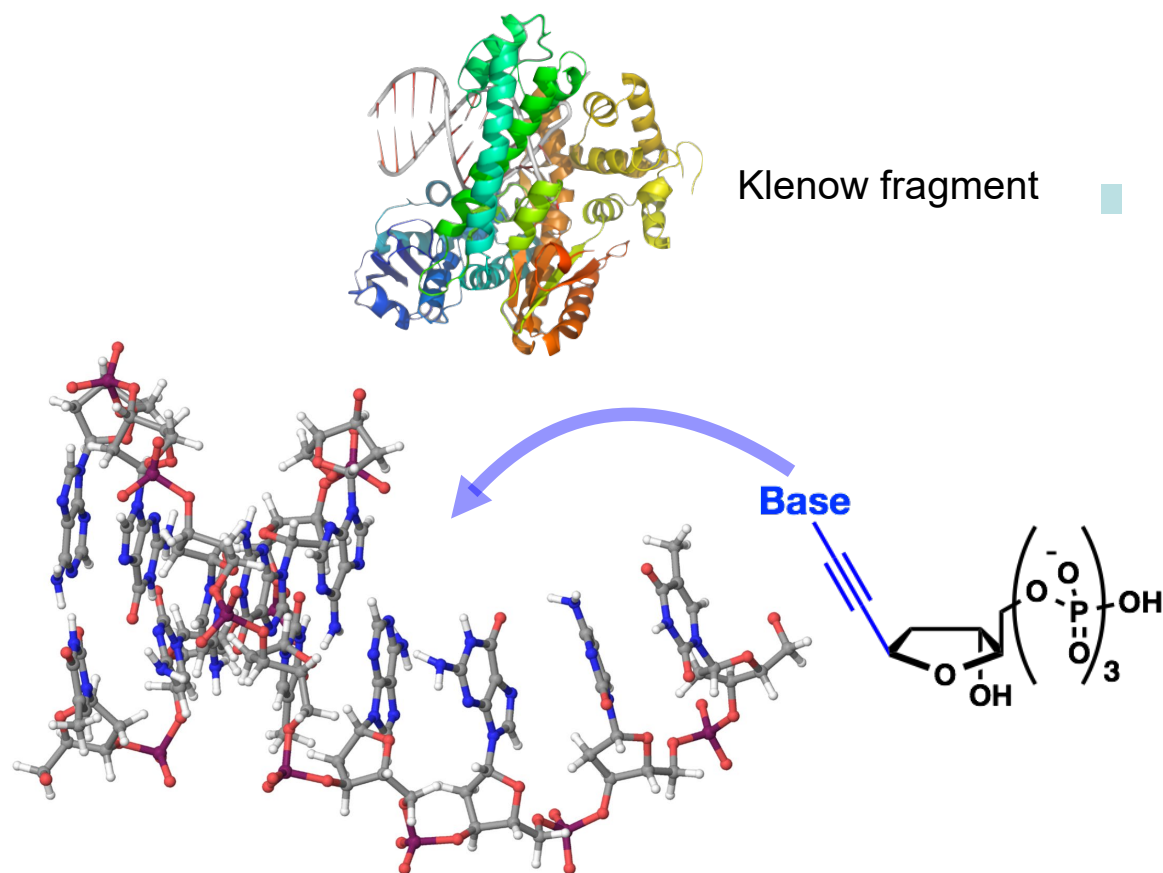
MacroModel (version 9.3 with OPLS2005)

核酸関連酵素反応への展開

核酸連結反応

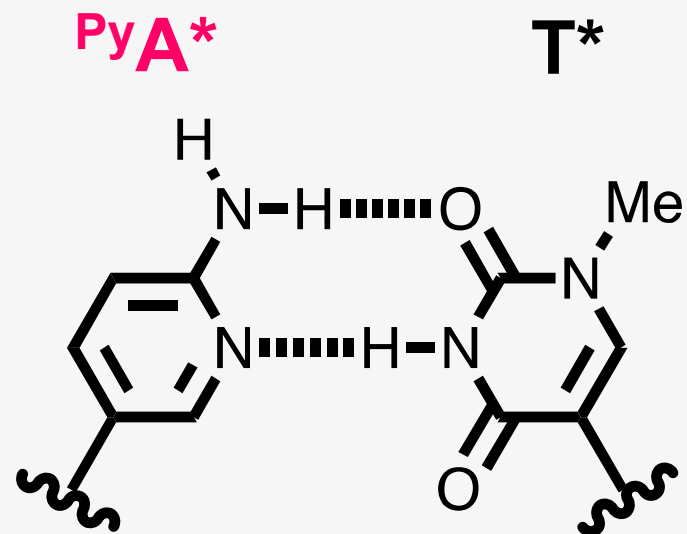
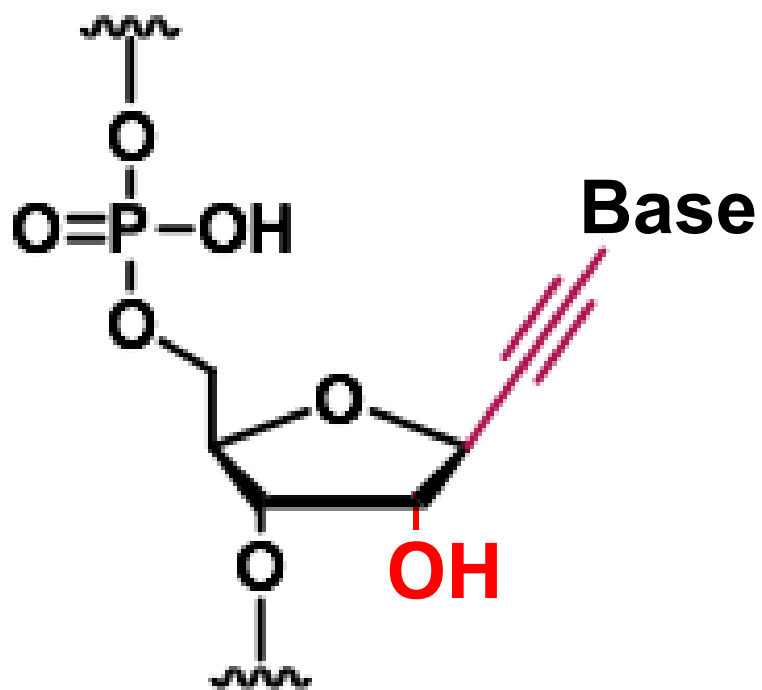


一塩基伸長反応

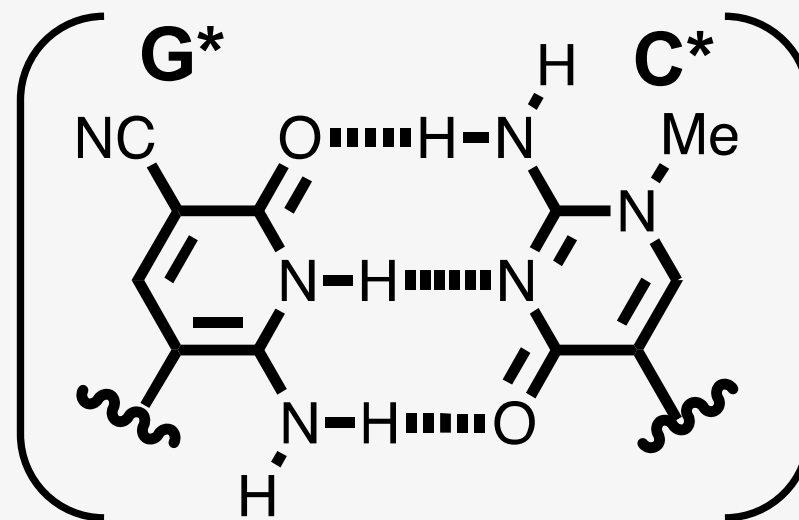


アルキニル C-ヌクレオチドは DNA ポリメラーゼに基質として認識された

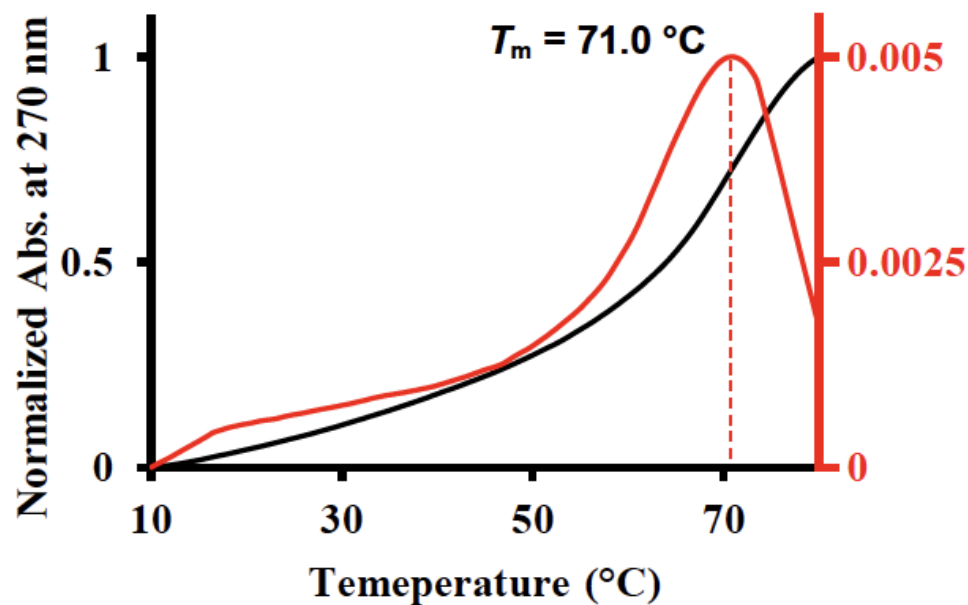
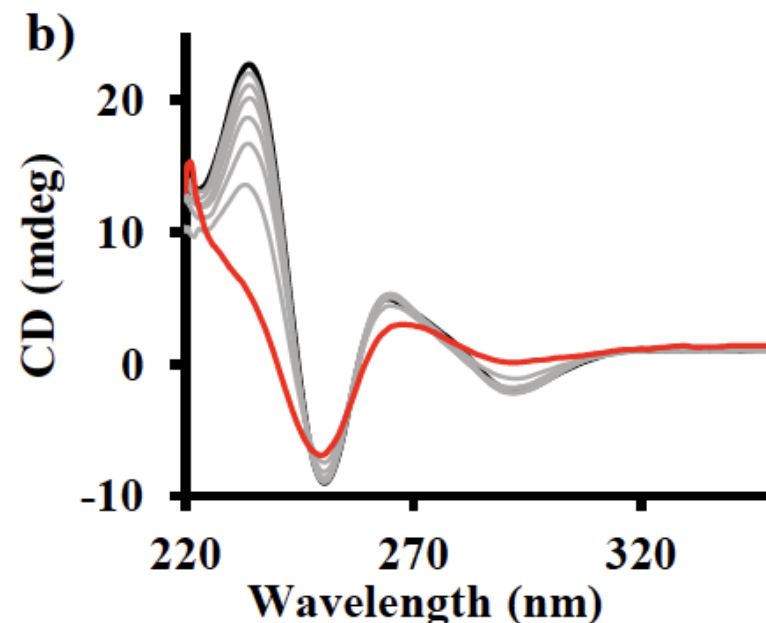
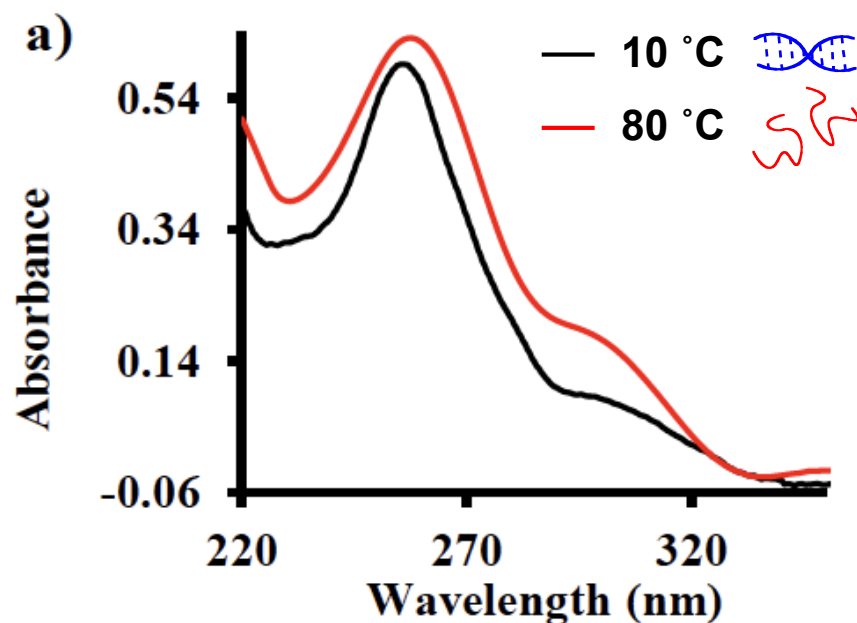
アルキニル RNA への展開



天然ATと同様な
二点水素結合



$$r(T^*)_{16} / d(A)_{16}$$



測定条件 : [Duplex] = 2 μM ,
10 mM HEPES, 10 mM MgCl_2 ,
100 mM NaCl, Ramp rate = 1.0 $^{\circ}\text{C}$

(人工 / 天然) 型と (天然 / 天然) 型の比較

	Duplexes	T_m (°C)
	$r(\text{T}^*)_{16} / d(\text{A})_{16}$	71.0
人工 / 天然	$r(\text{T}^*)_{16} / r(\text{A})_{16}$	49.5
	$d(\text{T}^*)_{16} / d(\text{A})_{16}$	40.5
天然 / 天然	$r(\text{U})_{16} / d(\text{A})_{16}$	39.0
	$d(\text{T})_{16} / d(\text{A})_{16}$	48.5

測定条件 : [Duplex] = 2 μM , 10 mM HEPES, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, Ramp rate = 1.0 °C

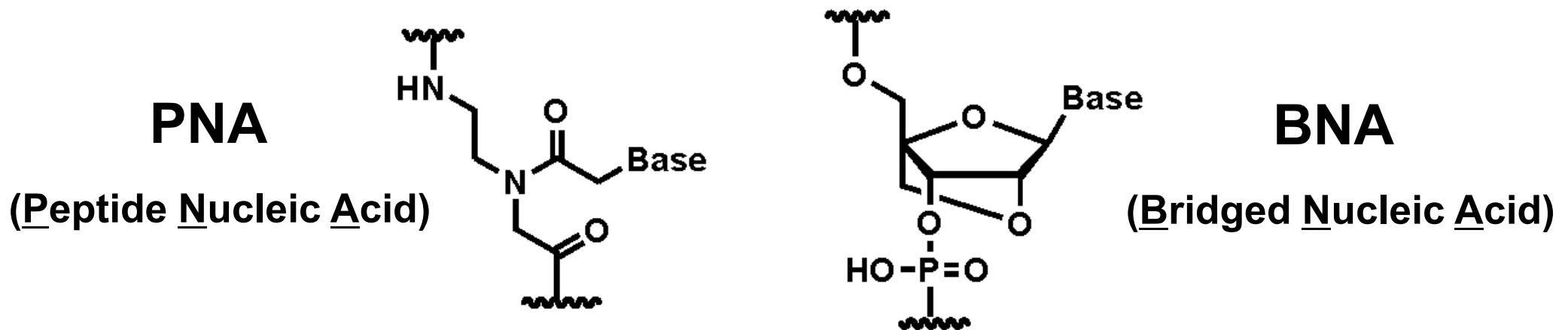
人工二重鎖の T_m 値

	Duplexes	T_m (°C)
	$r(\text{T}^*)_{16} / r(\text{PyA}^*)_{16}$	55.0
人工 / 人工	$r(\text{T}^*)_{16} / d(\text{PyA}^*)_{16}$	34.0
	$d(\text{T}^*)_{16} / d(\text{PyA}^*)_{16}$	24.5
人工 / 天然	$r(\text{T}^*)_{16} / d(\text{A})_{16}$	71.0 (再掲)
	$r(\text{T}^*)_{16} / r(\text{A})_{16}$	49.5 (再掲)

測定条件 : [Duplex] = 2 μ M, 10 mM HEPES, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, Ramp rate = 1.0 °C

従来技術では

天然核酸に高い親和性を示す人工核酸として PNA や BNA (LNA) などが挙げられる。



- 人工核酸鎖どうしのハイブリッドが最安定
- PNA は長鎖で水に難溶性
- BNA は天然 RNA に高い親和性

新技術の特徴・従来技術との比較

- アルキニル核酸は、人工核酸鎖どうしのハイブリッド形成だけでなく、天然核酸鎖との二重鎖形成においても高い親和性を示した。
- アルキニル核酸は、通常の合成機でオリゴマーが得られた。また、いくつかの核酸関連酵素に適用可能であった。
- アルキニル RNA では、人工核酸鎖どうしのハイブリッドよりも、天然核酸鎖（特に DNA 鎖）とのハイブリッドが安定であった。

想定される用途

- 基板上での天然核酸鎖の捕捉・検出
- 溶液内での核酸検出・診断
- アンチジーン・アンチセンスなどの核酸医薬
- 核酸医薬におけるオフターゲット検出技術
- モノマーレベルでのポリメラーゼ阻害剤など
への展開

今後の課題

- 膜透過性, 細胞内安定性評価
- 血中安定性, 動態評価
- 自己免疫に対する評価
- アルキニル RNA の人工塩基 4 種達成

企業への期待

- 基板上や溶液内での、核酸検出・診断技術
- 核酸医薬や核酸系抗ウイルス剤の評価系
- 核酸系材料としての評価系

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 人工核酸
- 出願番号 : 特願2020-036320
- 出願人 : 富山大学
- 発明者 : 千葉順哉, 井上将彦, 黒崎史大

産学連携の経歴

- 2015年-2016年
JST A-STEP事業 FS 探索タイプに採択
「新規クリック反応(スルホニルアジドと
チオアミド)を用いる試薬開発」
- 2016年-2018年
研究成果有体物提供および試薬の製品化
: 東京化成工業株式会社にて

お問い合わせ先

国立大学法人 富山大学
研究推進機構 学術研究・産学連携本部
及川 信三

T E L 076－445 －6936

F A X 076－445 －6397

e-mail t-sangyo@adm.u-toyama.ac.jp