

酸化損傷塩基を特異的に認識しシーケンシングを可能にする人工核酸の開発

九州大学薬学府 博士後期課程 2年 (助成時)

同上 博士後期課程 3年 (現在)

宮原 涼

【当該分野の状況】

DNAは生命情報を維持する極めて重要な物質である。一方で、放射線・紫外線・化学物質などの外的要因や細胞の代謝過程で発生する活性酸素などの内的要因により絶えず損傷を受けている。中でも酸化により損傷を受けた酸化損傷塩基は、DNA複製の際に塩基置換型の変異を誘発し、非常に強い遺伝毒性を示す。そのため、酸化損傷部位は通常修復されるが、修復されにくい配列では突然変異を引き起こし、**発がんや老化に関与する**と考えられている。従って、この配列を特定することができれば、疾患発生メカニズムの解明、及び治療・診断薬への展開が期待できる。しかし、酸化損傷塩基の配列特異的な検出法は未だに確立されておらず、DNA配列中での**酸化損傷塩基の発生位置を正確に特定する新たな手法の開発**が求められている。

【着想の経緯】

現在、代表的な酸化損傷塩基として8-オキシデオキシグアノシン(8-oxo-dG、以下oG)や2-オキシデオキシアデノシン(2-oxo-dA、以下oAと称する)が知られている。これまでの検出方法では、DNAを加水分解する必要があるため、損傷塩基を定量的に測定することはできるが、酸化損傷塩基の発生位置を特定することはできていない(T.Hofer, et al.2006)。さらに、**酸化損傷塩基の発生量が少ない**こともその発生位置特定を困難にしている。発生位置を正確かつ高精度に解読するためには、損傷塩基を含む微量なDNA情報を**増幅させる**必要がある。しかし、酸化損傷塩基を含むDNAをそのまま増幅しようとする、他の天然塩基と置き換わるため、**損傷部位の位置情報は失われてしまう**。そこで、DNA配列中の**損傷位置の情報を保持した状態で、効率よく増幅させて検出する方法**が、当該分野の技術革新になると考えた。

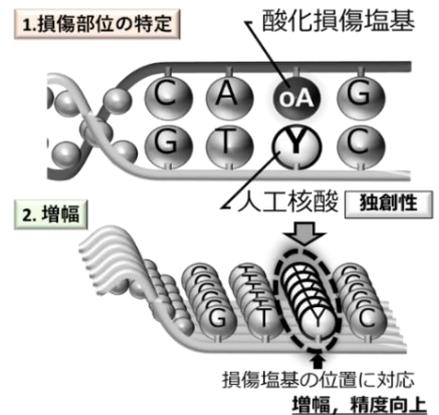


図1 酸化損傷部位の特定と増幅

【新提案】

oAと相補的に塩基対を形成する**人工核酸Y**を創成し、図1に示すように、**存在量が少ないoAの位置を特定**する。これにより、これまで出来なかった一塩基レベルの損傷位置の特定が可能になる。次に、人工核酸を含んだ配列を**増幅**させることで損傷位置検出を高感度化する。これらを2つの戦略を組み合わせることで、新たな検出系を考案し、目的達成を目指した。

【結果・考察】

1. oA認識可能な人工核酸の分子設計・合成

酸化損傷塩基 oA を認識可能な人工核酸として、5-Methyliso-dC が報告されている(図2 上部)。しかし、5-Methyliso-dC は N-グリコシド結合が開裂しやすく、化学的に不安定なことが報告されている(K. Jana, et al. 2016)。そこでまず、図2 下部に示すように、5-Methyliso-dC と同様に oA と水素結合を形成でき、かつ**安定な C-グリコシド結合**を有している **1-Methyl pseudo-dC(以下、Me-ψdC)**を設計した。一方、oA は複数の互変異性体をとる。そのため、このアミノ-イミノ互変異性体にも対応可能な、**Pseudo-dC(以下ψdC)**も認識分子として設計し、合成した。

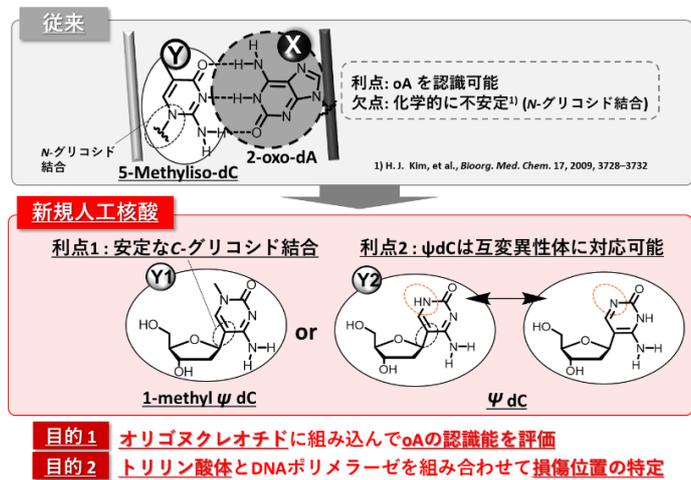


図2 開発した人工核酸の特徴

2. 目的1：人工核酸と oA の塩基対形成を評価 (T_m 測定)

oA への認識能を評価するため、人工核酸と oA をそれぞれ組み込んだオリゴヌクレオチドを調整し、溶解温度(T_m 値)を測定した。図3に示してあるように、 ψ dC と oA の T_m 値(57.1°C)は ψ dC と天然塩基 (A)の T_m 値(48.8°C)よりも高いことから、oA と非常に高い選択性で塩基対を形成することがわかった。この時の T_m 値は天然塩基対である dG : dC と同等の値を示しており、この塩基対が非常に安定であることが示唆された。実際に、各熱力学パラメーターを算出したところ、3本の水素結合を介して塩基対を形成していることが示唆された。一方で、Me- ψ dC は oA の他にも A と同程度 T_m 値を示し、選択性が低いことが確認された。これらのことから、oA を特異的に認識する人工核酸として ψ dC が利用できると考えた。

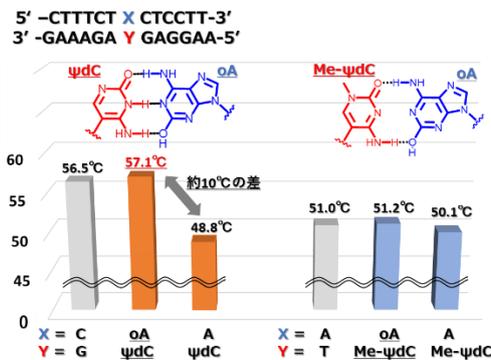


図3. 塩基対の熱安定性と選択性の評価

3. 目的2：シーケンシングに向けた人工核酸の利用

ψ dC は oA に対して高い選択性が確認されたため、トリリン酸体(以下、 ψ dCTP)を合成して、oA 位置特定法の開発を目指した。そのために、まず (1) ψ dCTP が oA の相補的な位置に取り込まれるのか、検討する必要がある(図4,上部)。そこで、oA を含む DNA 鎖に FAM で蛍光標識されたプライマー、 ψ dCTP を加えて DNA 合成酵素により一塩基伸長反応を行った。その結果、 ψ dCTP は、配列中に oA が含まれる配列のみ伸長反応が進行した。従って、 ψ dCTP は DNA 合成酵素の基質となり、oA の相補的な塩基として取り込まれることが明らかとなった。

次に、シーケンシングを可能にするためには、(2)他のヌ

クレオチド(dNTPs)存在下でも oA に対して人工核酸が選択的に取り込まれる必要がある(図4下部)。そこで、oA を含む DNA に dNTPs と ψ dCTP を加え、伸長反応を行った。その結果、dNTPs のみ(図4 Lane1)では伸長反応が進まなかったが、 ψ dCTP を混合しておくことで伸長反応が進んだ(図4 Lane 2)。従って、得られた配列(図4 Lane 2)の ψ dC の位置を解析することで相補的に oA の位置情報が得られることが示唆された。すなわち、 ψ dCTP を利用することで、oA の位置情報を保持しながら増幅させる検出系を開発できる可能性が期待された。

【結言】

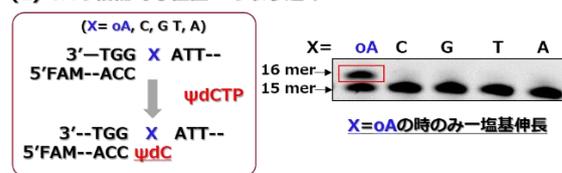
本研究では、代表的な酸化損傷塩基の一つである oA を認識する新規人工核酸(1 methyl ψ dC, ψ dC)の開発に成功した。特に、 ψ dC はオリゴヌクレオチドに組み込むことで選択的、かつ安定に oA と塩基対を形成した。そこで、シーケンシング解析に向けて、 ψ dC のトリリン酸体と酵素反応を組み合わせたとこ、 ψ dC の位置情報から oA の位置を特定できることが示唆された。

【今後の展望】

損傷位置検出の高感度化を行うため、 ψ dC の含まれた DNA 鎖を PCR 様増幅反応で増幅する。増幅した配列はシーケンシング解析することで、シグナルが検出されない位置に人工核酸があることを指標にし、損傷塩基 oA の発生位置を明らかにする。また、本研究により DNA 配列中の酸化損傷塩基の発生しやすい箇所の特が可能になれば、配列中の損傷を受けやすい部位・頻度が明らかとなり、がんや老化など様々な病気の発症メカニズムの解明につながる。さらに、人工核酸をガイド RNA に組み込み、CRISPR-Cas9 と組み合わせることで、世界初の酸化損傷部位の配列特異的な遺伝子治療に貢献できるものと確信している。

【研究業績】 R. Miyahara, Y. Taniguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2022 144, 35, 16150–16156

(1) oAの相補的な位置への取り込み



(2) dNTPs混合条件下でのψdCTPの取り込み

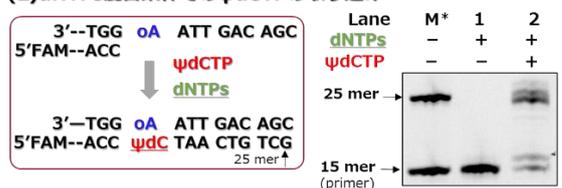


図4. oA の位置特定