

刺激応答性 DNA ナノ構造体の構築

岐阜大学工学部

池田 将

Nucleic acids have been employed as programmable building blocks in the construction of various DNA nanostructures through self-assembly, which is based on Watson–Crick base pairing. DNA nanostructures with stimuli-responsive properties have been used in various applications such as sensors, controlled release and delivery, and actuators. Here, we describe the design and synthesis of a new reduction-cleavable spacer (RCS) based on a nitrobenzene scaffold for constructing reduction-responsive oligonucleotides according to standard phosphoramidite chemistry. In addition, we demonstrate that the introduction of the RCS in the middle of an oligonucleotide (30 nt) enables the construction of a self-assembled microsphere capable of exhibiting a reduction-responsive disassembly. Since the preparation of RCS-based phosphoramidite reagent for the construction of oligonucleotides containing RCS is straightforward, the RCS could allow for the introduction of the reduction-responsiveness into various functional oligonucleotides and nucleic acid-based architectures toward therapeutic and diagnostic applications in near future.

1. 緒言

本研究の目的は、新規な刺激応答性DNAナノ構造体の創製である。特定の疾病に関係する生体内環境や外部環境を刺激として応答する機能をDNAナノ構造体に搭載できれば、バイオナノテクノロジー分野のブレークスルーの一つになる可能性がある。1953年に生命の遺伝情報を保存する重要な役割を担うDNAが二重らせん構造であるという発見以来、着実に精密化された原子・分子レベルの構造知見を基に、世界初の人工的に設計された立方体状DNAナノ構造体が創出されたのは1991年とされている¹⁾。近年では、DNAナノ構造体に関する研究は、ナノテクノロジーの中核分野へと発展し、DNA鎖の長さ・配列・組み合わせなどを設計することによって新たな形状の構造体が創出され続けている。しかしながら、その一方、狙った刺激に応答するDNAナノ構造体の構築とそのための化学的な方法論の開発は、ほぼ未着手のまま残されている。

近年、DNAナノ構造体には、トランスフェクション試薬を用いる必要がなく、そのまま細胞内に移行する性質を示すものがあると報告されている。ごく最近では、DNAナノ構造体が、経皮投与でのドラッグデリバリーにおけるキャリアとしても利用可能であることが示されている²⁾。したがって、DNAナノ構造体に狙った刺激に対する応答機能の付与が可能になれば、経皮投与でのドラッグデリバリーをより精密に達成できる可能性があり(図1)、ひいて

は、DNAナノ構造体の美容・医療応用につながり、コストロジ分野の進歩・発展に寄与できると期待される。加えて、DNAナノ構造体は、毒性が低い(生体適合性が高い)ことが期待され、本研究で開発する刺激応答性DNAナノ構造体はバイオ応用展開するうえで魅力的な素材といえる。

2. 方法

本研究では、低酸素状態依存的なオリゴDNA (ODN) の切断反応を可能にする新たな分子として、ニトロアリアル基³⁾を組み込んだスペーサ型モノマー分子 (RCS) を設計し、その有機合成手法を確立することから研究を計画した。ニトロアリアル基は、低酸素状態においてアミノ基などに還元されることが知られており、このことを利用することで、低酸素状態依存的なODNの切断反応が可能になると期待される。

2.1. 還元反応に応答して切断されるスペーサ型モノマー分子4 (Reduction cleavable spacer: RCS)の有機合成

図2に示す合成スキームにしたがって化合物4 (RCS) を合成した。得られた化合物4は、¹H, ¹³C, ³¹P NMRスペクトル、およびESI-TOF-HRMSスペクトルにより同定した⁴⁾。

2.2. RCSを組み込んだODN (s1^{RCS})の構築

合成したモノマー分子(化合物4, RCS)を用いて、核酸自動合成装置 (HTS H-Series H-6 G8A) によってRCSを組み込んだODN (s1^{RCS}) を構築した。具体的には、ホスホロアミダイト法の標準的条件にて、1 μmolスケールで合成を行い、天然型塩基のホスホロアミダイトは50 mM、合成したホスホロアミダイト化合物4 (RCS) は75 mMになるように乾燥アセトニトリルにそれぞれ溶解した。CPG



Construction of stimuli-responsive DNA nanostructures

Masato Ikeda

Faculty of Engineering, Gifu University

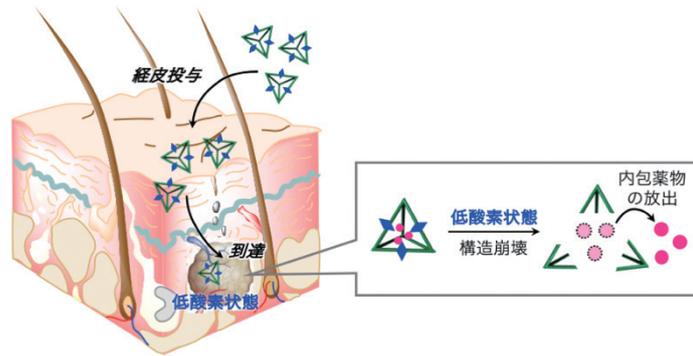


図1 低酸素状態に関連する還元刺激で構造崩壊する DNA ナノ構造体

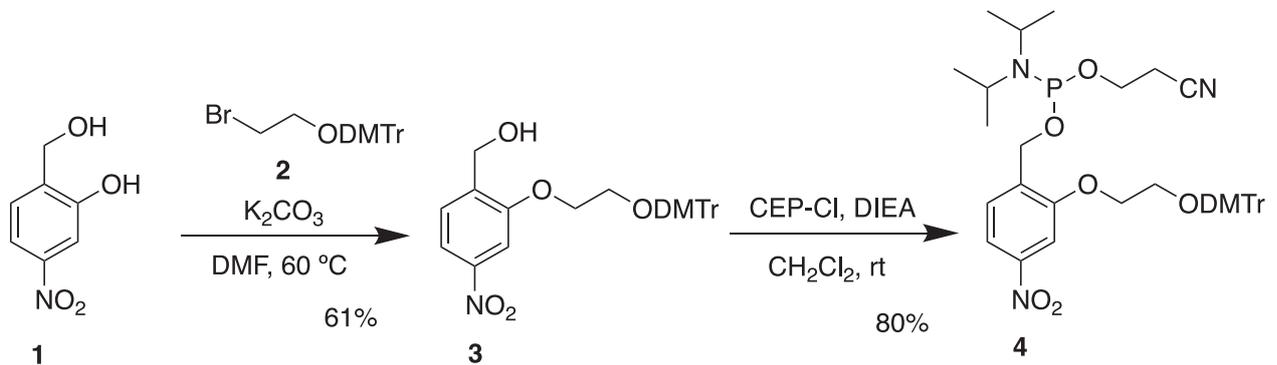


図2 還元反応に応答して切断されるスペーサ型モノマー分子4 (Reduction cleavable spacer: RCS)の合成スキーム

樹脂は活性に基づき1 μ molをカラムに量り取り、核酸自動合成機に取り付けた。なお、5'-末端のDMTr基を脱保護せずに合成を終了させた。合成終了後、CPG樹脂をサンプルストックチューブに移し、28%アンモニア水：40%メチルアミン水溶液=1：1 (1.5mL)を加え、65 $^{\circ}$ Cで20分静置した。冷蔵庫で1時間静置した後、樹脂と上清を分け、上清を減圧濃縮し、1.5mLエッペンチューブに移し、IP-RP-HPLCにて精製した。分取したサンプルを減圧濃縮した後、80%酢酸 (500 μ L)を加え、37 $^{\circ}$ Cで加熱した。15分後、3.0M酢酸ナトリウム (50 μ L)および、イソプロパノール (500 μ L)を加え反転攪拌し、-80 $^{\circ}$ Cで15分間静置した。その後、15分間遠心 (15000rpm, 4 $^{\circ}$ C)した。沈殿物と上清液を分け、沈殿物に70%エタノール (1.0mL)を加え、15分間遠心 (15000rpm, 4 $^{\circ}$ C)した。沈殿物と上清液を分け、沈殿物に滅菌水 (1.0mL)を加え、溶解させ、IP-RP-HPLCにて精製した。溶媒を減圧濃縮した後、1.5mLエッペンチューブに移した。図3に示すように、IP-RP-HPLCの分析により、精製したs1^{RCS}が十分な純度であることを確認した。さらに、MALDI-TOF-MSによって同定し、s1^{RCS}に帰属

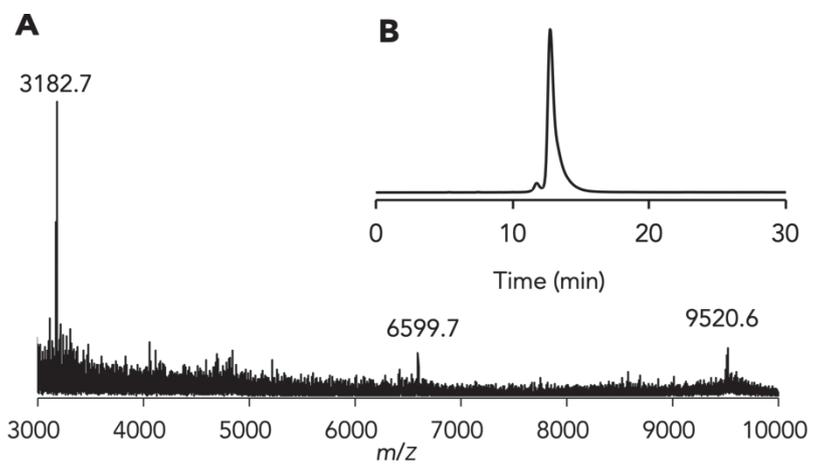


図3 s1^{RCS}の(A) MALDI-TOF-MS (linear, negative, matrix: 3-HPA) スペクトルと(B) IP-RP-HPLC チャート

できるピーク ($m/Z=9520.6$)を検出した。また、イオン化に用いるUVレーザー光によって切断されたと想定されるピーク ($m/Z=3182.7$)も確認された。

2.3. 球状DNA構造体1^{RCS}の構築と機能評価

図4に示した設計指針に沿って、また、水溶液中の3種類のオリゴDNA濃度 (s1^{RCS}, s2, s3)とMg²⁺濃度を変化させ、球状DNA構造体1^{RCS}の構築条件を検討した。具体的

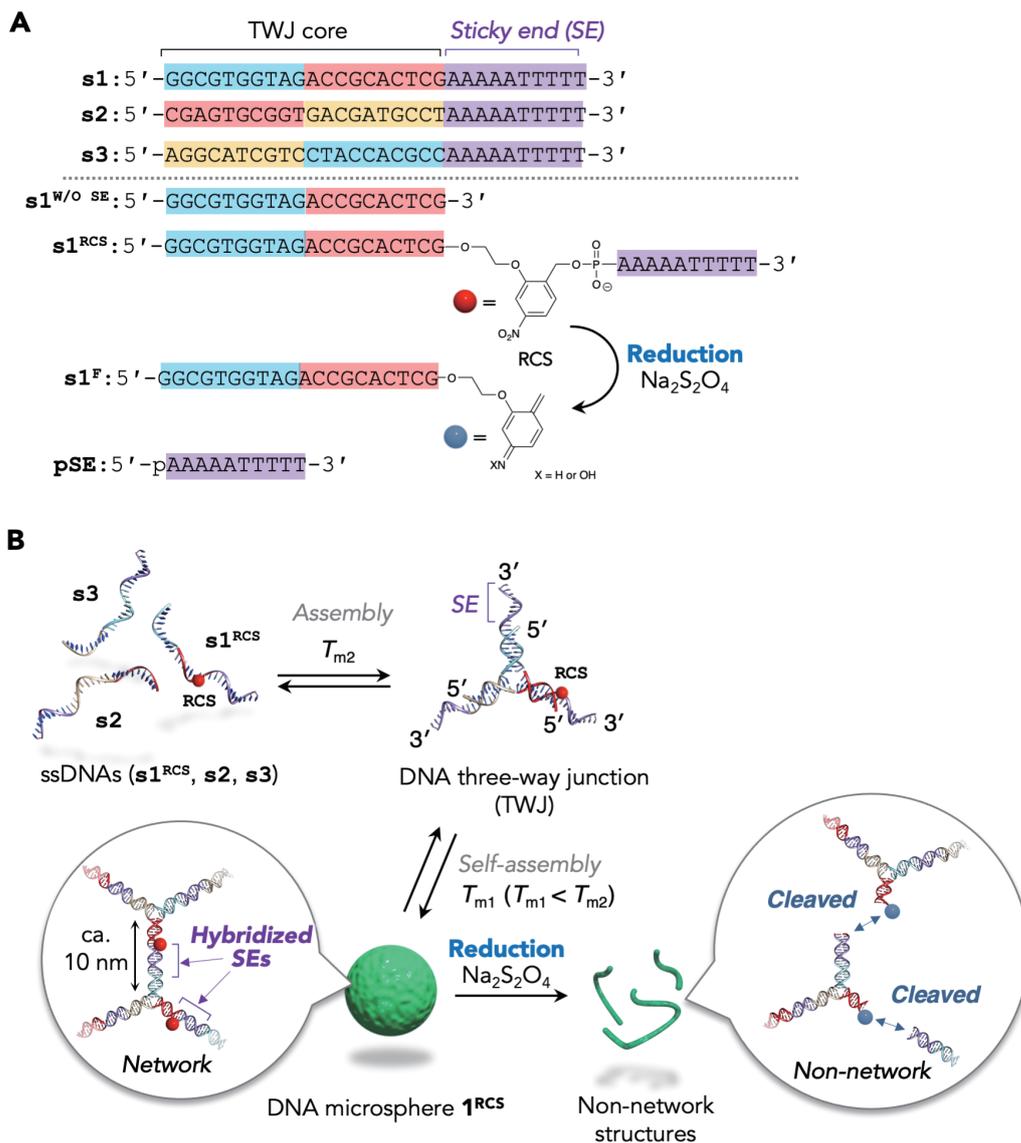


図4 低酸素状態に関連する還元反応にตอบสนองして構造が崩壊する球状 DNA 構造体 1^{RCS} の設計指針

には、3種類のオリゴDNA水溶液を混合し、加熱-冷却操作（サーマルアニーリング；70℃から10℃，冷却速度：1℃/min）を実行した。サーマルアニーリング後、蛍光性核酸染色剤（EvaGreen）を添加し、CLSM（confocal laser scanning microscopy）を用いて観察を行った。さらに、得られた球状DNA構造体1^{RCS}の還元応答機能の評価を行った。

3. 結果と考察

3.1. 球状DNA構造体1^{RCS}の構築

上記(2.3.)に記載した設計指針と方法に従ってCLSM観察を行った。その結果得られた画像を図5に示す。過去に報告⁵⁾されている3種類のオリゴDNA (s1, s2, s3)の組み合わせからなる球状DNA構造体1は、DNA濃度が2.5μMおよび10μMのいずれの条件においても球状構造体が観察された(図5B)。一方で、今回新たに設計した3

種類のオリゴDNA (s1^{RCS}, s2, s3)の組み合わせにおいては、DNA濃度が10μMかつMg²⁺濃度が25mMにおいて球状構造体が観察された(図5A)。この結果は、RCSがスペーサ部位として組み込まれることで、図4に設計指針を示すような球状構造を形成するために必要なネットワーク構造形成の安定性が低下したためであると考えられる。以降の実験では、球状構造体の形成が確認できた条件において評価を進めた。

3.2. RCSを組み込んだODN(s1^{RCS})および球状DNA構造体1^{RCS}の還元応答性の評価

RCSを組み込んだODN (s1^{RCS})の還元反応にตอบสนองした切断効率をPAGE分析によって評価した。図6Aに示すように、水中においてもニトロ基を還元できる還元剤であるNa₂S₂O₄を添加すると、低分子量側にシフトしたバ

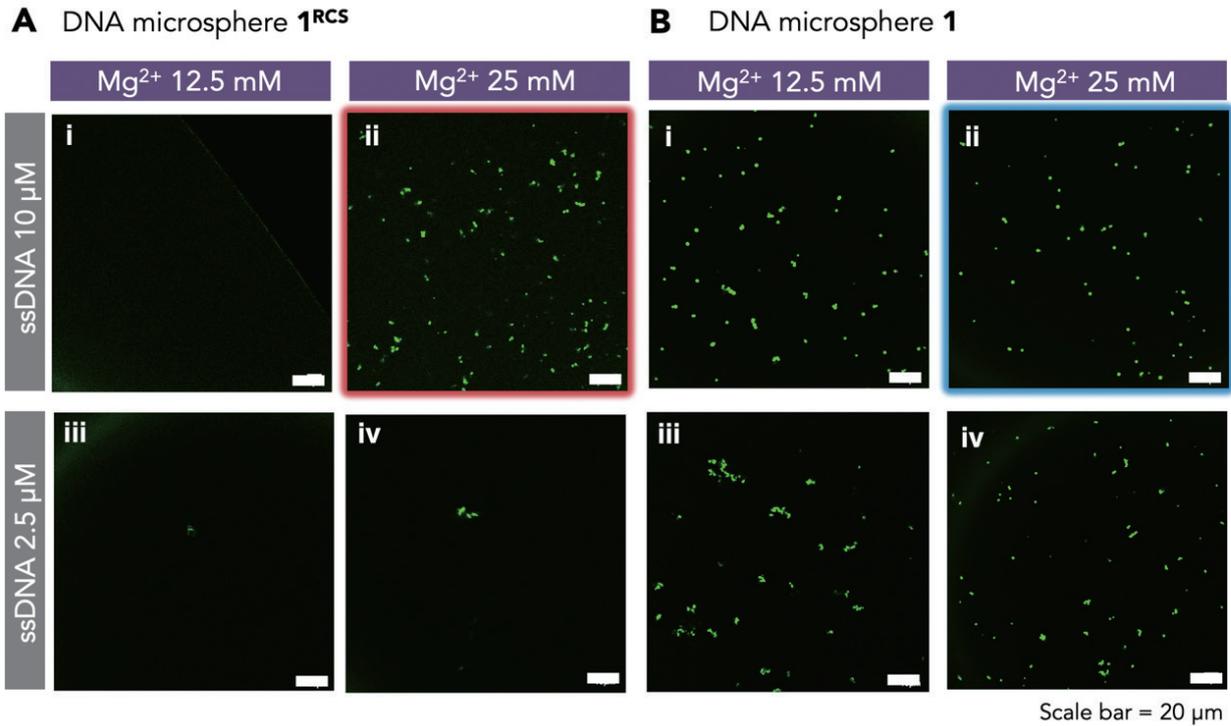


図5 球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} の形成を評価した CLSM 画像

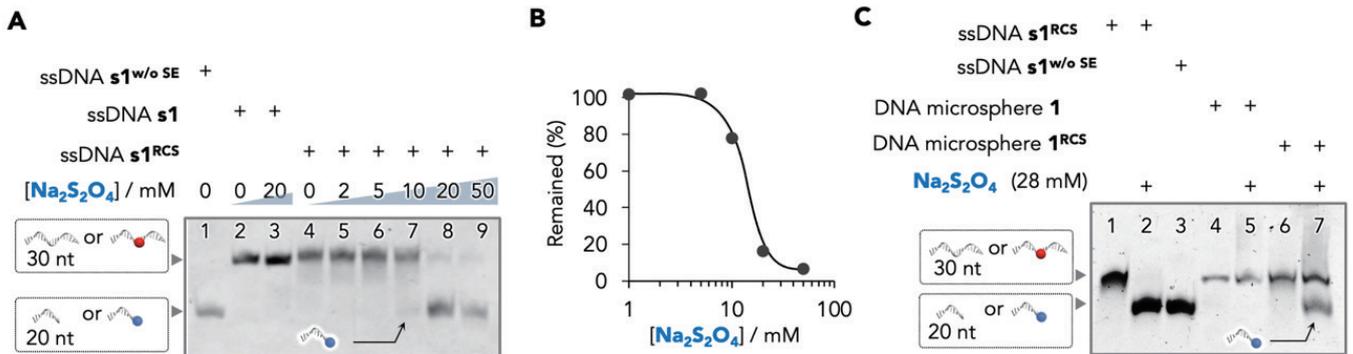


図6 s1^{RCS} および球状 DNA 構造体 1^{RCS} の還元応答性を評価した変性 PAGE 分析の結果

ンドが新たに観察された。その移動度は、RCS 部位で切断が進行したと想定される塩基数の ODN (20nt) と良い一致を示したことから、設計どおり (図 4) に切断反応が進行していることが示唆された。また、Na₂S₂O₄ の濃度依存性 (図 6B) から、切断を十分に進行させるためには、終濃度として約 30mM の Na₂S₂O₄ が必要であることも明らかになった。さらに、上記 (3. 1.) の実験によって明らかにした球状 DNA 構造体 1^{RCS} を形成している条件においても、Na₂S₂O₄ の効果 (終濃度として 28mM の Na₂S₂O₄ を添加) を調べたところ、s1^{RCS} 単独の結果と同様に低分子両側に新しいバンドが確認された (図 6C)。以下の CLSM 観察の還元応答性の評価においても、28mM になるように Na₂S₂O₄ を添加した。

3. 3. 球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} の還元応答性の評価

球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} が存在している水溶液に、還元剤である Na₂S₂O₄ とそのコントロール実験となる Na₂SO₄、DNA 加水分解酵素である DNase I、ニトロ基を還元する能力が不十分と考えられるチオール型の還元剤 GSH を、それぞれ添加した後に CLSM 観察を行った。図 7A に示すように、球状 DNA 構造体 1^{RCS} は、Na₂S₂O₄ の添加後に消失することが明らかになった。一方で、同濃度の還元力を持たない塩 Na₂SO₄ や GSH の添加では、球状構造体の消失は確認されなかった。これに対して、球状 DNA 構造体 1 は Na₂S₂O₄ の添加後も消失しなかった (図 7B)。また、いずれの球状構造体も DNase I の添加によって消失した。以上の結果は、球状 DNA 構造体 1^{RCS} が、設

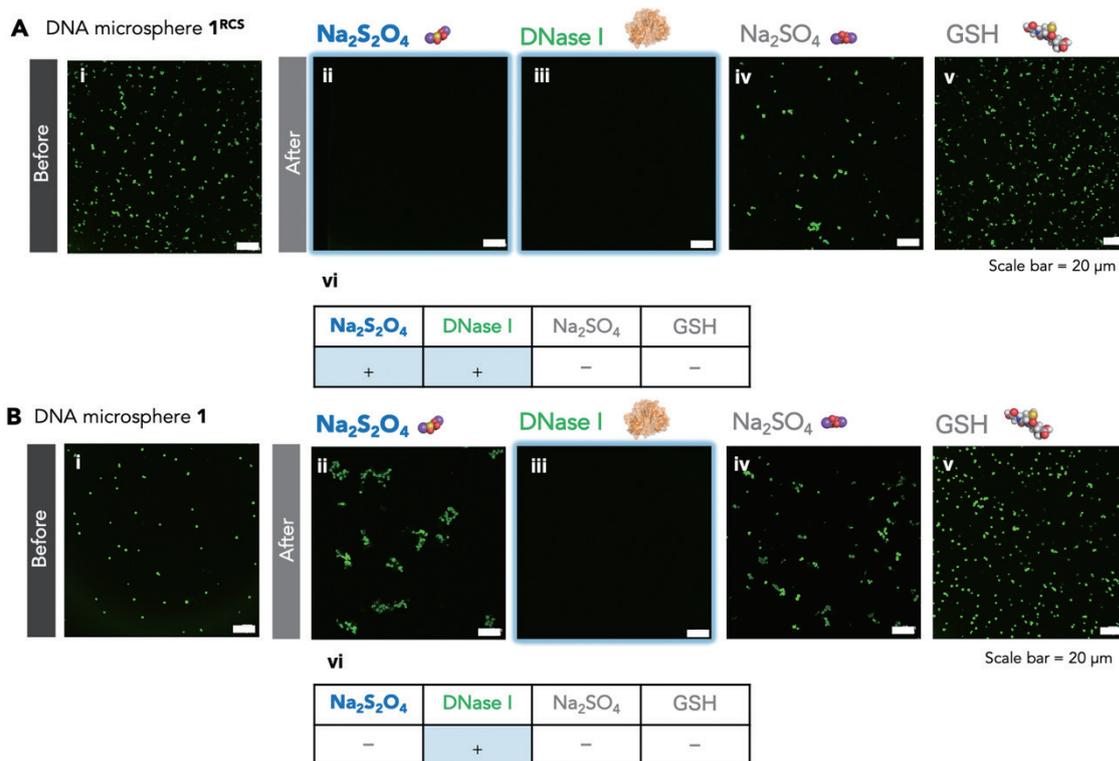


図7 球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} の環境応答性を評価した CLSM 画像

計通りに、RCSの還元反応に反応した切断によって崩壊したことを強く支持している。

4. 総括

以上のように、低酸素状態に関連した還元反応によって切断反応が進行するODN (s1^{RCS}) の開発と、そのためのモノマー分子 (RCS) を独自に設計・開発した。開発したモノマー分子を組み込んだODNから球状DNA構造体 1^{RCS} の構築が可能であることを実証し、さらに、構築した球状DNA構造体が還元環境に選択的に反応した崩壊を示すことを明らかにした。以上の研究成果は、本研究の分子設計指針の妥当性と高い応用性を支持している。今後、さらなる研究を進めることで多様な形態とサイズのDNA構造体を構築できる可能性がある。今後の研究で構築する新たな還元刺激応答性DNAナノ構造体の機能を評価し、必要に応じて分子設計 (例えば、スパーサの導入や配列の最適化) にフィードバックすることで各課題を合理的に解決することも可能である。そのような研究を通して、還元刺激応答性DNAナノ構造体の経皮投与でのドラッグデリバリー機能を追求できる。今後もそのような研究に力を尽くし、還元刺激応答性DNAナノ構造体の美容・医療応用を目指し、コスメトロジー分野の進歩・発展に寄与したいと考えている。

謝辞

本研究にご支援を頂きました公益財団法人コーセーコス

メトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) J. Chen, N. C. Seeman, Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature*, **350**, 631-633 (1991).
- 2) C. Wiraja, Y. Zhu, D. C. S. Lio, D. C. Yeo, M. Xie, W. Fang, Q. Li, M. Zheng, M. V. Steensel, L. Wang, C. Fan, C. Xu, Framework nucleic acids as programmable carrier for transdermal drug delivery. *Nat. Commun.*, **10**, 1147 (2019).
- 3) M. Ikeda, M. Kamimura, Y. Hayakawa, A. Shibata, Y. Kitade, Reduction-responsive guanine incorporated into G-quadruplex-forming DNA. *ChemBioChem*, **17**, 1304-1307 (2016).
- 4) S. L. Higashi, A. Isogami, J. Takahashi, A. Shibata, K. M. Hirose, K. G. N. Suzuki, S. Sawada, S. Tsukiji, K. Matsuura, M. Ikeda, Construction of a reduction-responsive DNA microsphere using a reduction-cleavable spacer based on a nitrobenzene scaffold. *Chem. Asian J.*, **17**, e202200142 (2022).
- 5) K. Matsuura, K. Masumoto, Y. Igami, T. Fujioka, N. Kimizuka, In situ observation of spherical dna assembly in water and the controlled release of bound dyes. *Biomacromolecules*, **8**, 2726-2732 (2007).