

86. 人工遺伝子を発現調節可能な塩基対スイッチの開発

岡村 秀紀

東北大学 多元物質科学研究所 生命機能分子合成化学研究分野

Key words : 人工遺伝子, 人工塩基対, 可逆制御, ホスト-ゲスト相互作用

緒言

DNA に保存した遺伝情報を転写・翻訳する遺伝子発現は、最も基本的な生命現象の一つであり、その理解と制御は医療技術やバイオテクノロジーの開発において大きな意義を持つ。2000 年代初頭に完了したゲノムプロジェクトによる遺伝情報の解読は、遺伝子発現機構の網羅的な解明に大きく貢献した。そして、得られた分子生物学的知見と合成化学・生化学の技術革新が融合した結果、近年、人工的に合成した長鎖 DNA を用いる合成生物学が遺伝子発現の基礎及び応用研究に大きな潮流を生み出している。

これら人工遺伝子を用いる研究において、遺伝子発現をオンデマンドに調節できる技術は、強力なツールとなり得る。例えば、人工遺伝子の発現を内在性遺伝子とは区別しつつ活性化ならびに不活性化できれば、生命現象の解明や安全な遺伝子治療の開発につながると期待される。これまでに、光応答性分子を用いることによって、人工遺伝子の発現を光制御する手法が数多く報告されてきた [1~3]。しかし、光は生体透過性に乏しいため、生体深部における利用が限定的である。人工遺伝子を基盤とする合成生物学の応用研究を進展させるためにも、人工遺伝子の発現を自在に調節できる新規方法論の開拓は必要不可欠といえる。

そこで本研究では、人工遺伝子の発現を調節するための新たな方法論の創出を目的として、「特異的かつ可逆的な複合体形成を駆動力とする塩基対スイッチ」の開発を目指した。具体的には、核酸塩基に対して本来の機能を損なわないように置換基を導入し、その置換基を足場として DNA 上で可逆的な複合体を形成することを考えた (図 1)。複合体形成にもとづいて塩基対形成を可逆制御できれば、転写の開始に必要なタンパク質と DNA の相互作用を双方向に調節するための基盤技術になり得る。また、生体適合性の複合体形成分子を用いることで、従来困難であった生体深部での発現調節も可能になると考えられる。

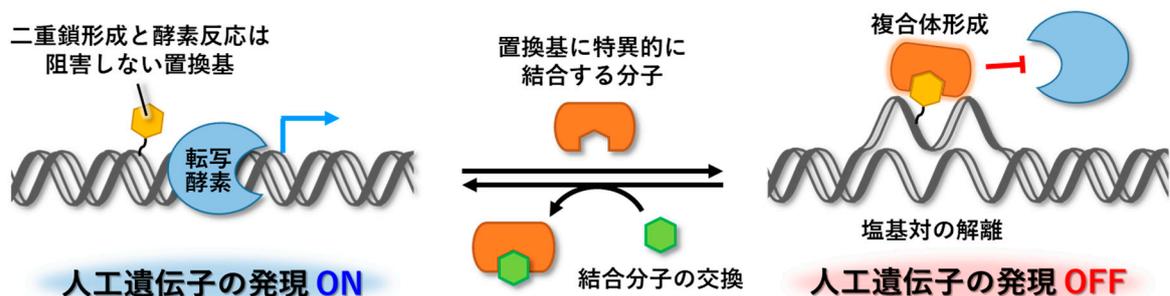


図 1. 特異的かつ可逆的な複合体形成を駆動力とする塩基対スイッチの設計概念

DNAの構造と機能に影響を与えないような置換基とその置換基に特異的な結合性分子間の複合体形成に基づいて、二重鎖形成および遺伝子発現を可逆的に制御できると考えた。

方法

DNA 上における可逆的な複合体形成を駆動力とする塩基対スイッチを開発するにあたり、ククルビットウリル (CB[7]) とアダマンタンのホスト-ゲスト相互作用に着目した。本相互作用は、生理的条件下で非常に高い親和性を示すほか、CB[7]に結合性を示す別のゲスト分子の存在下ではゲスト交換反応が進行する [4, 5]。このような CB[7]のユニークな結合特性に加え、分子サイズが複合体形成前後で大きく変化する特徴に発想を得て、ホスト-ゲスト相互作用の駆動力として塩基対形成能を変化させるゲスト修飾アデノシン (GuestdA) を設計した (図 2)。GuestdA は、アデノシンの N6 位にアルキルリンカーを介してゲスト分子を修飾した構造をもち、CB[7]の非存在下では相補的なチミジン (T) と水素結合し、熱的に安定な塩基対を形成する。一方で、CB[7]を添加すると、嵩高い複合体の形成を介して塩基対を解離する。さらに、競合する別のゲスト分子を添加すると、ゲスト交換反応によって CB[7]が解離し、塩基対が再形成する。このような設計概念に基づき、二重鎖 DNA の形成さらには遺伝子発現を可逆制御できると考えた。本研究では、GuestdA と CB[7]のホスト-ゲスト相互作用に基づく二重鎖形成の可逆制御、ならびに T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応の可逆調節を検証したので、以下報告する。

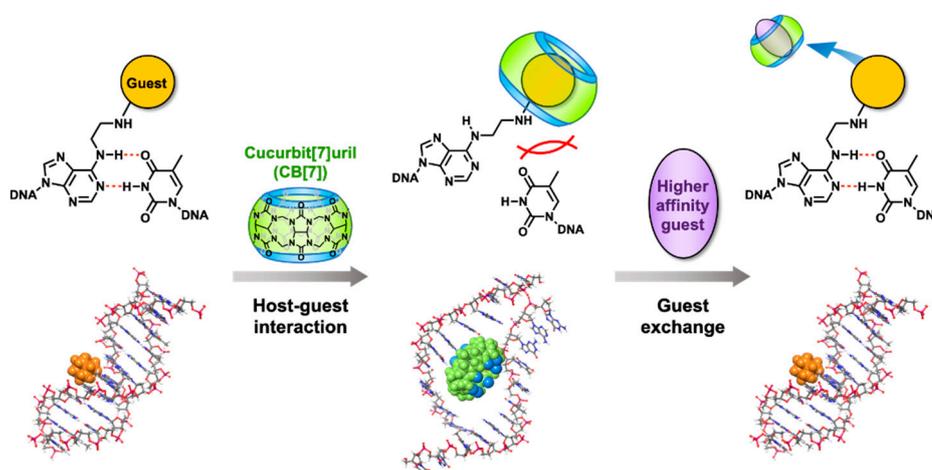


図 2. ホスト-ゲスト相互作用を介して塩基対の形成と解離を制御するアデノシン誘導体 (GuestdA) の設計
GuestdAは、CB[7]の非存在下では相補的なチミジン (T) と水素結合し、熱的に安定な塩基対を形成する。
一方、CB[7]を添加すると、嵩高い複合体の形成を介して塩基対を解離する。また、競合する別のゲスト分子を添加すると、ゲスト交換反応によってCB[7]が解離し、塩基対が再形成する

結果および考察

1. GuestdA を組み込んだ DNA の合成と二重鎖 DNA 形成の可逆制御

概念実証にあたり、CB[7]と強力に結合するアダマンタンアミンを、C2、C3、C4 リンカーを介して導入した Am2dA、Am3dA、Am4dA をそれぞれ設計した。各 GuestdA を組み込んだ DNA は、6-ヨードプリンヌクレオシド (³Pu) を含む DNA を固相合成したのち、対応するアミン化合物を反応させることで合成した。得られた DNA の純度及び構造は、HPLC および MALDI-TOF MS 測定により確認した。

合成した GuestdA の塩基選択性は、二重鎖 DNA の UV 融解温度 (T_m) 測定により評価した (図 3a)。その結果、いずれの誘導体も相補塩基が T の場合に T_m 値が最も高く、アデノシンアナログとして機能していることを確認した。特に、C2 リンカーを持つ Am2dA は、天然の dA と同等の T_m 値を示した。これは、Am2dA が、アダマンタンの根元のアミノ基が T のカルボニル基と追加の水素結合を形成し、塩基対形成を安定化したためと考えている。次に、ホストゲスト相互作用による二重鎖形成の可逆制御を検証した (図 3b)。dA、Am2dA、Am3dA、Am4dA

をそれぞれ組み込んだ二重鎖 DNA に CB[7] を添加した後、 T_m 測定を行った。その結果、天然の dA では T_m 値に変化が見られなかったのに対し、Am²dA、Am³dA、Am⁴dA では T_m 値の低下が確認され、CB[7]-ゲスト複合体の形成に基づく二重鎖の解離が示唆された。また、顕著な二重鎖の不安定化が確認された Am²dA について、CB[7] の結合に伴う二重鎖の解離をストップフロー測定により解析した結果、反応速度定数は 2.0×10^4 ($M^{-1}s^{-1}$) と算出された。次に、CB[7] を添加後の DNA 溶液に交換用ゲストとして Ad^Eda を追加し、再度 T_m を測定した。その結果、いずれの DNA においても T_m 値が CB[7] 添加前の値に回復した。また、Am²dA を含む二重鎖 DNA の再形成速度定数は、 2.0×10^{-5} (s^{-1}) と算出された。

以上のように、ホスト-ゲスト相互作用によって二重鎖構造を可逆制御できることを確認した。しかし同時に、ゲスト交換反応に伴う Am²dA からの CB[7] の解離が非常に遅いことが明らかとなった。そこで、反応速度の向上を目指すために、アダマンタンよりも小さいノルアダマンタンならびにビスクロオクタンを修飾した Nad^dA と Bic^dA を新たに設計・合成した。これらの誘導体の塩基対形成能を調べたところ、Am²dA と同様、T 選択的かつ安定な二重鎖形成を確認した (図 3c)。一方、二重鎖形成の可逆制御については、Am²dA と比較して、Nad^dA は 37 倍、Bic^dA は 380 倍反応速度が向上した。これは、ゲスト分子を小さくしたことにより、CB[7] との相互作用が減弱したためと考えている。

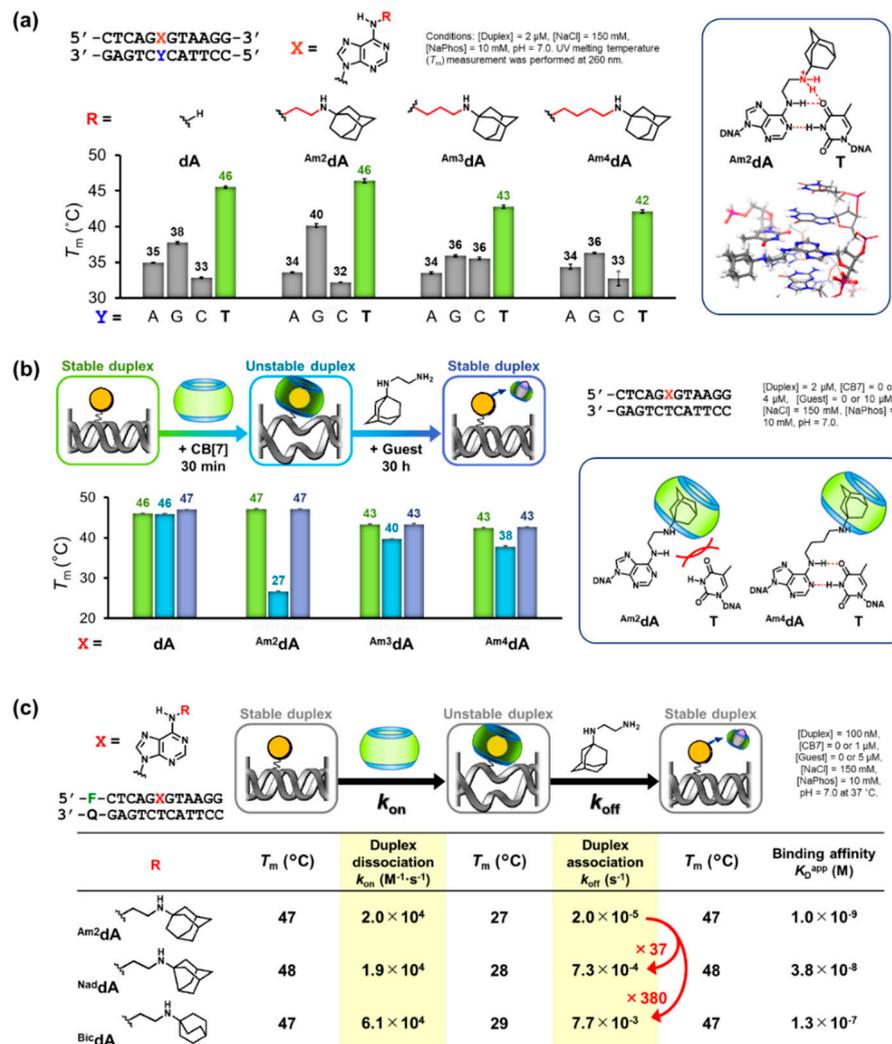


図 3. Guest^dA の塩基選択性の評価とホスト-ゲスト相互作用に基づく二重鎖形成能の可逆制御

(a) Am²dA、Am³dA、Am⁴dA を組み込んだ二重鎖 DNA の T_m 値と予想認識構造。

(b) Am²dA、Am³dA、Am⁴dA を組み込んだ二重鎖 DNA の CB[7] および Ad^Eda 添加後の T_m 値。

(c) CB[7] および Ad^Eda 添加時の Am²dA、Nad^dA、Bic^dA の T_m 値ならびに反応速度定数。

2. ホスト-ゲスト相互作用に基づく転写の可逆制御

次に、T7 プロモーター配列に Nad^{dA} を導入した DNA を用いて、転写の可逆制御を検証した。 Nad^{dA} を組み込んだ T7 プロモーター配列は、通常時は T7 RNA ポリメラーゼに認識されて RNA を生成する一方、CB[7]の結合時には転写が抑制され、 Ad^{Eda} の添加によって転写が再活性化すると期待した。転写実験では、蛍光性の Squash アプタマーをコードした 100 bps の DNA (SqDNA) を用い、転写活性を蛍光測定によって定量的に評価することにした。

初めに、T7 プロモーター中の A を 1 カ所ずつ Nad^{dA} に置き換えた SqDNA-1~7 を合成し、転写活性を評価した (図 4a)。CB[7]の非存在下では、SqDNA-4 を除くすべての配列で Squash アプタマーの生成に基づく蛍光シグナルが確認された。このことから、プロモーター配列への化学修飾が概ね許容されていることがわかる。一方、CB[7]添加時には、未修飾の SqDNA-native では転写活性が変化しなかったのに対し、 Nad^{dA} を修飾した SqDNA-1~3、5~7 では転写活性が低下した。特に、 Nad^{dA} を AT rich 領域に組み込んだ SqDNA-5~7 について、CB[7]あり・なしの条件間で有意な差が見られた。本領域では、T7 RNA ポリメラーゼとプロモーター配列がマイナーグループで相互作用することが知られている [6]。したがって、RNA ポリメラーゼは、CB[7]非存在下では Nad^{dA} -T 塩基対を認識できたのに対し、CB[7]存在下では認識できず、転写効率が低下したと予想した。そこで、AT rich 領域に Nad^{dA} を二カ所修飾した SqDNA-8 を設計し、CB[7]および Ad^{Eda} の添加に基づく転写制御を検証した (図 4b)。その結果、CB[7]の添加によって転写活性がほぼ完全に抑制された。さらに、CB[7]添加後の SqDNA-8 に対して Ad^{Eda} を加えたところ、転写活性が添加前と同じレベルにまで回復した [7]。

以上、ゲスト修飾アデノシンを用いることで、転写活性を可逆制御できることを明らかにした。CB[7]のホスト-ゲスト相互作用は、生体条件下でも進行することが報告されている。本研究で開発した塩基対スイッチは、生体深部における人工遺伝子の発現制御にも応用できると考えられ、安全性の高い遺伝子治療技術の開発につながる と期待される。

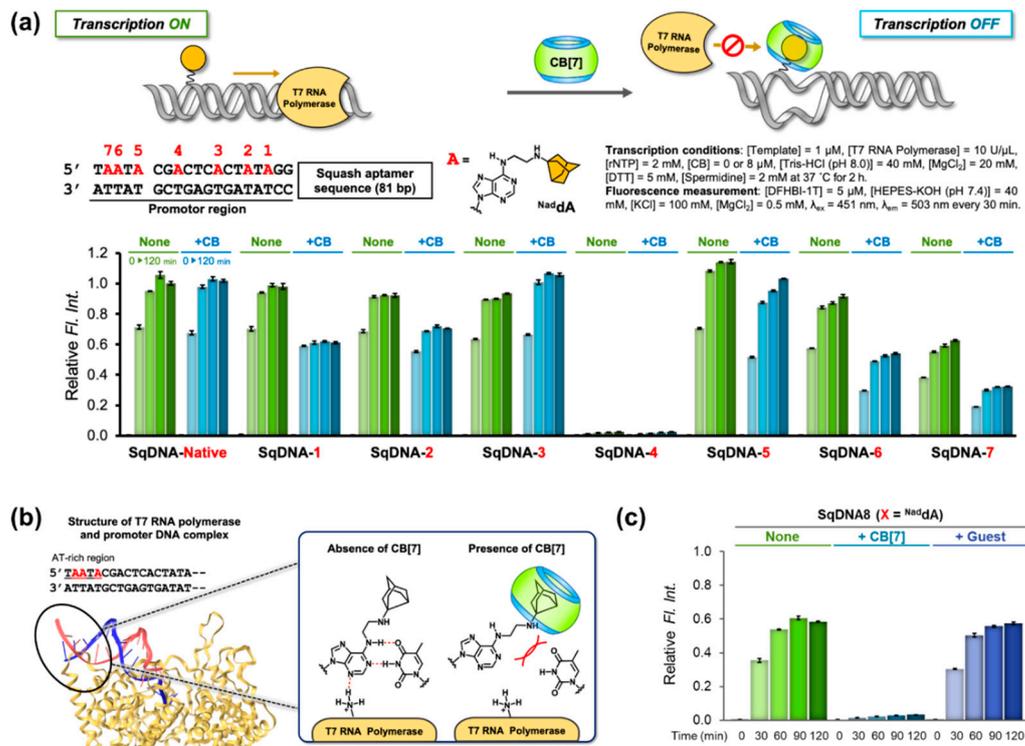


図 4. T7 プロモーター配列に Nad^{dA} を修飾した SqDNA の設計とホスト-ゲスト相互作用に基づく転写制御実験

- CB[7]非存在下および存在下における SqDNA-1~7 の相対転写量。
- Nad^{dA} 修飾プロモーターの AT-rich 領域と T7 RNA ポリメラーゼの予想相互作用様式。
- CB[7]および Ad^{Eda} 添加時の SqDNA-8 の相対転写量。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学多元物質科学研究所生命機能分子合成化学研究分野の永次史教授と矢尾健行修士である。東北大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室の西澤精一教授、佐藤雄介准教授、Chioma Uche Okeke 博士にはストップドフロー測定で多大なご助力をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hemphill J, Govan J, Uprety R, Tsang M, Deiters A. Site-Specific Promoter Caging Enables Optochemical Gene Activation in Cells and Animals. *J. Am. Chem. Soc.* 2014 May 14; 136(19):7152–7158. Epub 2014 Apr 27. PMID: 24802207 DOI: 10.1021/ja500327g
- 2) Kamiya Y, Takagi T, Ooi H, Ito H, Liang X, Asanuma H. Synthetic gene involving azobenzene-tethered T7 promoter for the photocontrol of gene expression by visible light. *ACS Synth. Biol.* 2015 Apr 17;4(4):365-70. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25144622 DOI: 10.1021/sb5001092.
- 3) Mazzotti G, Hartmann D, Booth M. J. Precise, Orthogonal Remote-Control of Cell-Free Systems Using Photocaged Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 2023 May 3;145(17):9481-9487. Epub 2023 Apr 19. PMID: 37074404 DOI: 10.1021/jacs.3c01238
- 4) Liu S, Ruspic C, Mukhopadhyay P, Chakrabarti S, Zavalij P. Y, Isaacs L. The cucurbit[n]uril family: prime components for self-sorting systems. *J. Am. Chem. Soc.* 2005 Nov 16;127(45):15959-67. PMID: 16277540 DOI: 10.1021/ja055013x
- 5) Uzunova V. D, Cullinane C, Brix K, Nau W. M, Day, A. I. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory *in vitro* and *in vivo* study. *Org. Biomol. Chem.* 2010 May 7;8(9):2037-42. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20401379 DOI: 10.1039/b925555a
- 6) Cheetham G. M, Jeruzalmi D, Steitz T. A. Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature.* 1999 May 6;399(6731):80-3. PMID: 10331394 DOI: 10.1038/19999
- 7) Okamura, H, Yao, T, Nagatsugi, F. Reversible Control of Gene Expression by Guest-Modified Adenosines in a Cell-Free System via Host–Guest Interaction *J Am. Chem. Soc.* 2024 Jul 10;146(27):18513-23. PMID: 38941287 DOI: 10.1021/jacs.4c04262