

**【目的】**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。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。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期待した。

**【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。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-ゲスト相互作用を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 (Guest<sub>dA</sub>) を設計した。これら Guest<sub>dA</sub> 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することで、設計概念の実証を目指した。

**【結果】**まず、アダマンタンを導入した種々の Guest<sub>dA</sub> を組み込んだ DNA を合成し、塩基選択性を UV 融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価した。その結果、C2 リンカーを持つ Am<sub>2</sub>dA が、天然の dA と同等の  $T_m$  値を示すことを確認した。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。Am<sub>2</sub>dA を組み込んだ二重鎖 DNA に CB[7]およびゲスト交換用分子 Ad<sup>E<sub>da</sub></sup>を交互に添加し、 $T_m$ 測定を行った。その結果、CB[7]-ゲスト複合体の形成と解離によって、二重鎖 DNA の解離と再形成を制御できることを確認した。さらに、ゲスト分子をノルアダマンタンならびにビスクロオクタンに替えた Nad<sub>dA</sub> と Bic<sub>dA</sub> を設計・評価したところ、ゲスト交換反応の速度をチューニングできることを見出した。次に、T7 プロモーター配列に Nad<sub>dA</sub> を導入した DNA を用いて、転写の可逆制御を検証した。転写実験では、蛍光性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した。初めに、T7 プロモーター中の A を 1 か所ずつ Nad<sub>dA</sub> に置き換えた SqDNA を合成し、転写活性を評価した。その結果、CB[7]の非存在下では、一部の配列を除き、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。一方、CB[7]添加時には、これらの配列の転写活性が低下した。特に、Nad<sub>dA</sub> を T7 プロモーターの AT rich 領域に組み込んだ配列において、CB[7]あり・なしの条件間で有意な差が見られた。そこで、AT rich 領域に Nad<sub>dA</sub> を二か所修飾した SqDNA を設計し、CB[7]および Ad<sup>E<sub>da</sub></sup>の添加に基づく転写制御を検証した。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<sup>E<sub>da</sub></sup>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。これらの結果より、Guest<sub>dA</sub> 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。今後は、細胞レベルにおける遺伝子発現制御へと展開していきたいと考えている。

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 (Guest<sub>dA</sub>) の設計概念

