

アセチレンユニットをリン酸部に導入した人工核酸の特性評価 及びクリック反応による機能化

1. 緒言

近年、バイオナノテクノロジーへの応用を目指し、様々な機能を付与した修飾 DNA が盛んに開発されている。¹こうした修飾 DNA は新たな機能を示すとともに DNA が本来持つハイブリダイゼーション機能を保持することから、遺伝子治療やバイオセンサー、DNA の特性解明などへの応用が期待されている。このような背景の中で様々な DNA の機能化が進められ、特に DNA 自動合成に容易に応用可能な DNA 塩基部と糖部の化学修飾が行われてきた。本研究では、二重鎖形成部から離れた部位であるリン酸部の化学修飾法の確立と機能化を目的として、リン酸部にアセチレン部を持つ DNA オリゴマー(T_{ac} -ODN)を合成し、その特性を評価した。 T_{ac} -ODN はアセチレン部でのクリック反応とアルカリ処理を用いて着脱可能な機能性分子の導入が可能であった。また、リン酸部へのアセチレン部の導入による疎水性の向上によって、 T_{ac} -ODN は両親媒性を示し、水溶液中で会合体を形成した。クリック反応による会合体の機能化を試みたところ、ベンジル基の導入によって会合体形成特性が向上することを見出した。

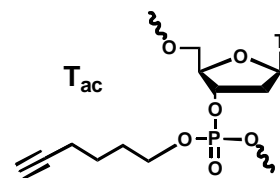
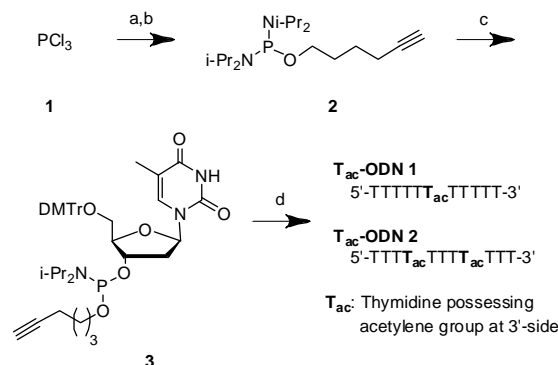


Figure 1. Chemical structure of T_{ac} .

2. 結果と考察

2-1-1 アセチレン部をもつ DNA の合成

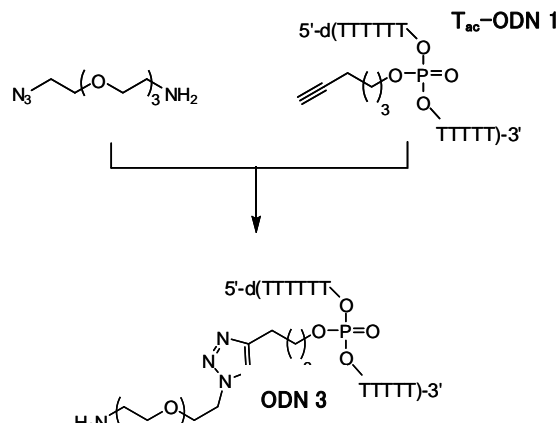
リン酸部修飾 DNA の合成ルートを Scheme 1 に示す。三塩化リンを Diisopropylamine 及び 5-hexyn-1-ol で処理し、アミダイト化用試薬 **2** を得た。²続いて、5'側水酸基を DMTr 基で保護したチミジン誘導体と **2** を縮合した後、DNA 自動合成機を用いて求めるリン酸部修飾 DNA オリゴマー (T_{ac} -ODN)を合成した。



Scheme 1. ^aReagents and conditions: (a) N,N-diisopropylamine; (b) 5-Hexyn-1-ol, iPr_2NEt ; (c) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxythymidine, DMAP, iPr_2NEt , 65% (3 steps) (d) automated DNA synthesis.

2-1-2 クリック反応による官能基導入

T_{ac} -ODN のクリック反応による化学修飾を試みた。まず、Scheme 2 に示したようにアセチレン部を一箇所もつ T_{ac} -ODN **1** とアジド基をもつアルキルアミンを銅触媒と混合し、反応を HPLC で追跡した。Figure 2 に示したように、2 時間反応させると保持時間 19 分付近の原料 T_{ac} -ODN **1** のシグナルがほぼ消失し、18 分付近に生成物 ODN **3** が確認された。ODN **3** を分取し、MALDI-TOF MASS を測定したところ、クリック反応によりアミノアルキル基が DNA リン酸部に導入されたことがわか



Scheme 2. Click reaction of T_{ac} -ODN **1** in the presence of azide compound.

った。また、収率は 80%であった。続いて、アセチレン部を二箇所もつ T_{ac}-ODN 2 に同様の反応を行ったところ、両方のアセチレン部にアミノアルキル基が 90%の収率で導入された修飾 DNA (ODN 4)が生成することを確認した。これらの結果から、クリック反応を用いて高効率で複数個の機能性分子を導入できることがわかった。

次に、異なる機能性分子の導入を試みた。上述と同じ条件を用いて、アジド基をもつ蛍光色素 Azide Fluor585 のクリック反応を T_{ac}-ODN 1 に対して行ったところ、65%の収率で DNA に導入できた。生成物はオレンジ色の強い蛍光発光を示したことから、機能を損なうことなく本手法によって DNA リン酸部を修飾できることがわかった。

2-1-3 メチルアミンによる修飾リン酸部位の脱離

リン酸トリエステルはアルカリ性条件で加水分解され、リン酸へと変換されることが知られている。そこで次に、リン酸部に導入した機能性分子のアルカリ処理による除去を試みた。クリック反応により修飾リン酸部にアミノアルキル基を導入した ODN 3 に 40%メチルアミン水溶液を加え、40 °Cで静置した。HPLC にて反応を追跡したところ、20 時間後に原料のピークは大きく減少し、17 分付近に生成物のピークを確認した。この生成物のピークを分取後、MALDI-TOF MASS を測定し、修飾リン酸部が加水分解された通常の DNA オリゴマーODN 5 であることを確認した(Figure 3)。なお、反応の収率は 63%であった。同様の実験を修飾リン酸部を二つ持つ ODN 4 についても行い、同じように修飾リン酸部位が脱離することを確認した。以上のことから前述のクリック反応による官能基導入とメチルアミンによる修飾リン酸部位の脱離を組み合わせることで、修飾リン酸部での可逆的なポストモディフィケーションが可能であることが示された。³

2-2-1 リン酸部修飾による両親媒性 DNA の合成と会合体形成

両親媒性化合物は水溶性で会合体を形成するナノ材料として活用されている。DNA リン酸部は DNA の高い親水性の要因となる一方、T_{ac}のようなリン酸トリエステル部はアルキル基の効果により疎水性を示すため、通常のリン酸部と T_{ac}部を共存させることにより両親媒性を示す DNA が構築できる。本研究では、DNA 型ナノ材料の構築法の確立をめざし、連続する T_{ac}部をもつ DNA オリゴマーを合成し、その特性を調べた。

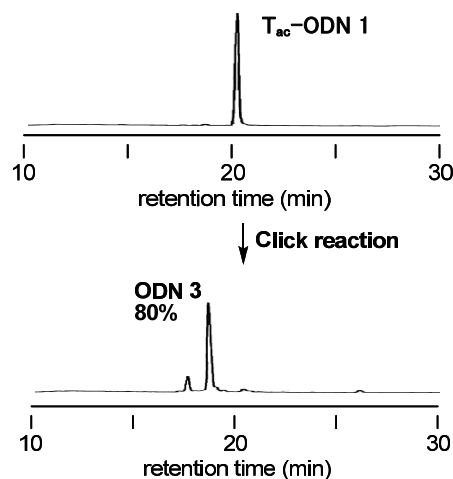
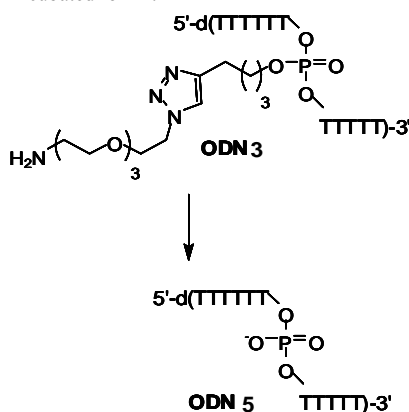


Figure 2. HPLC profiles for Click reaction. Click reaction between T_{ac}-ODN 1 (50 μM) and azide compound (300 μM) was performed in the presence of CuSO₄ (10 μM), Na ascorbate (50 μM) and TBTA (10 μM). The reaction mixture was incubated for 2h.



Scheme 3. Treatment of ODN 3 with methylamine to form ODN 5.

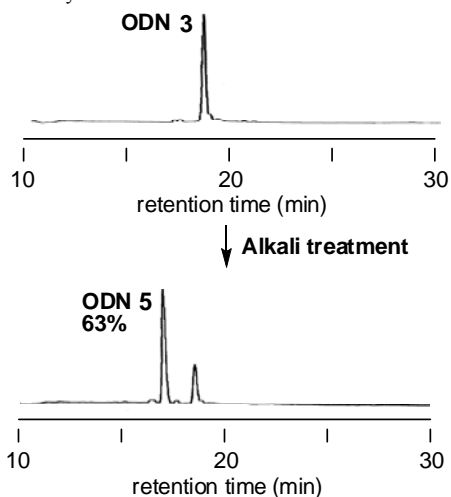


Figure 3. HPLC profiles for treatment of ODN 3 (50 μM) with 40% methylamine.

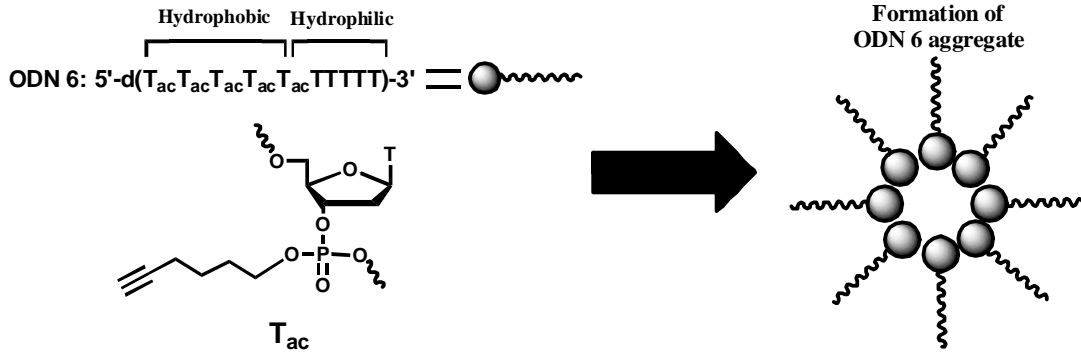


Figure 4. Aggregation of oligodeoxynucleotides possessing consecutive T_{ac}.

2-2-2 ODN 6 会合体のナイルレッド内包実験

前述の DNA 合成法に従って、5'末端から5つ連続で T_{ac}をもつ DNA オリゴマー(ODN 6, Figure 4)を合成し、疎水性蛍光色素ナイルレッドを用いて会合体形成能の有無を調べた。ナイルレッドは単独では水中で沈殿し、蛍光を発しない。一方、両親媒性化合物と共存させると、両親媒性化合物の会合体形成に伴い、ナイルレッドが会合体内部の疎水部に取り込まれる結果、水溶液中に可溶化されて蛍光を発する。この特性を活用して、ナイルレッドの蛍光の有無を指標に ODN 6 の会合体形成能を評価した。ナイルレッドの濃度を 10 μM と一定にした上で各種濃度の ODN 6 共存下で蛍光スペクトルを測定したところ、Figure 5 に示したように ODN 6 の増加とともにナイルレッドの発光強度が増加した。このことから、ODN 6 は疎水部をコアとする会合体を形成したことがわかった。参照実験として、修飾リン酸部を持たない通常の DNA オリゴマー(ODN 5)を用いて同様の実験を行ったところ、ODN 5 の濃度が増えてもナイルレッドの発光強度は増加しなかったことから、ODN 6 の T_{ac} 部は会合体形成に必須のユニットであることが示された。

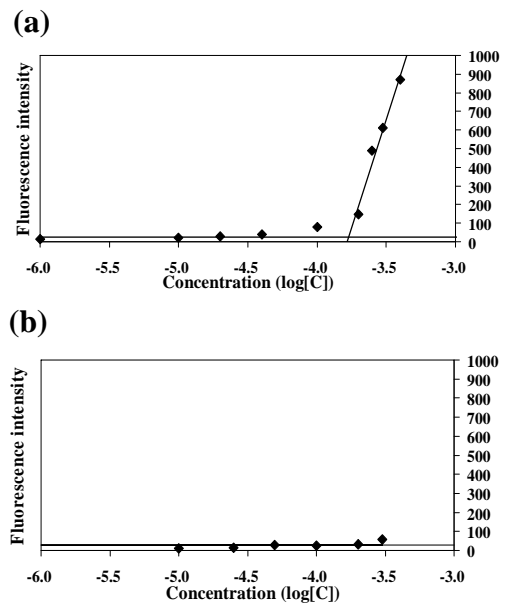


Figure 5. Plot of fluorescence intensity of Nile red vs concentration of ODN 6 (a) or ODN 5(b) to determine critical aggregation concentration (CAC).

2-2-3 TEM, DLS による会合体形成確認

ODN 6 の更なる会合体形成確認のため、transmission electron microscope (TEM)と dynamic light scattering (DLS)を用いて形状分析を行った (Figure 6)。TEM 測定を行ったところ、球状の会合体が多数確認された。他方、DLS の結果から ODN 6 の会合体は大きさの異なる二種類の会合体を形成し、小さい会合体の直径は 2.8 ± 1.0 nm、大きい会合体の直径は 219.6 ± 126.4 nm であった。

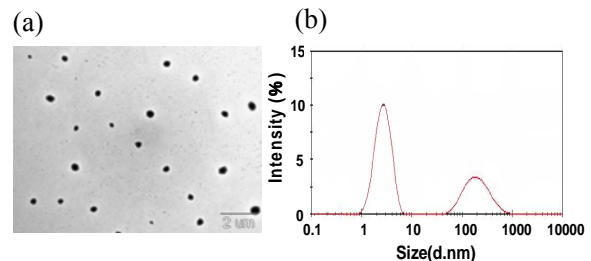


Figure 6. (a) TEM image of aggregate consisted of ODN 6 (3 mM). (b) Size of the aggregate consisted of ODN 6 (200μM) determined by DLS experiment.

2-2-4 クリック反応による会合体形成能の向上

次に、クリック反応による ODN 6 アセチレン部の化学修飾を用いて、会合体形成能の向上を試みた。両親媒性を持つ ODN 6 にクリック反応を用いて、疎水性のベンジル基を導入し、会合体形成能の変化を評価した(Figure 7a)。ODN 6 にベンジルアジドを銅触媒と混合し、反応を HPLC で追跡した。Figure 7b に示したように、反応開始から 21 時間後に保持時間 20 分付近の原料のピークは減少し、22 分付近に生成物 ODN 7 が確認された。ODN 7 を分取後、ESI MASS を測定した結果、5 つ全てのアセチレン部にベンジル基が導入されていることが分かった。続いて、ODN 7 を用いてナイルレッドの内包実験を行った(Figure 7c)。ナイルレッド濃度を 10 μM に固定した上で、ODN 7 の濃度を増加させた結果、ナイルレッドの蛍光強度が増加した。ODN 7 の CAC を算出すると 146 μM であり、ODN 6 の CAC より 23 μM 小さい値を示した。これらの結果からクリック反応によって、ODN 6 アセチレン部に疎水性のより高いベンジル基を導入することで、会合体形成能を向上させ得ることがわかった。

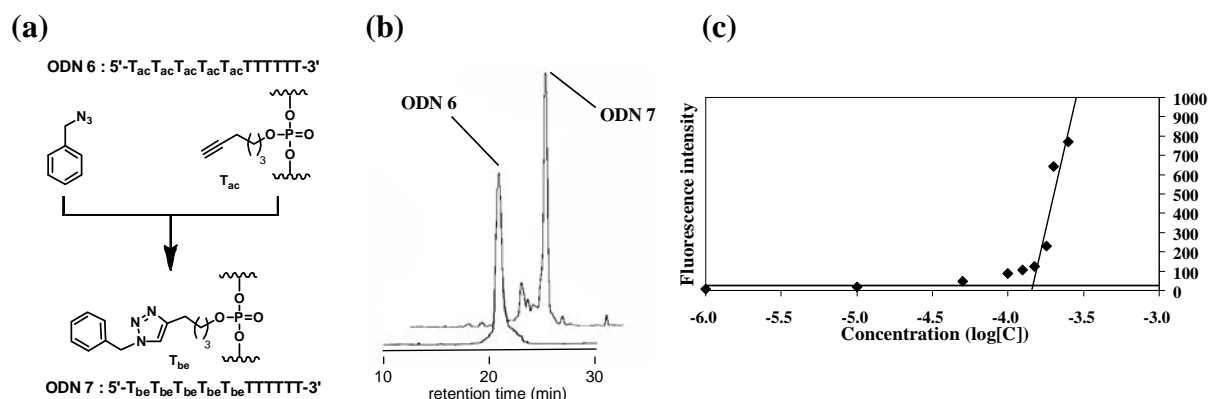


Figure 7. (a) Click reaction of ODN 6 with benzyl azide. (b) HPLC profile for the click reaction of ODN 6 (50 μM) with benzyl azide (500 μM). The reaction was conducted in the presence of CuSO_4 (30 μM), sodium ascorbate (50 μM), and TBTA (30 μM). (c) Plot of fluorescence intensity of Nile red vs concentration of ODN 7 to determine CAC.

3. 結言

以上のように、本研究ではアセチレン部をリン酸部にもつ DNA オリゴマー(T_{ac} -ODN)を開発し、リン酸部の可逆的修飾法の確立と両親媒性 DNA の会合体形成評価を進めた。 T_{ac} -ODN を用いると、クリック反応による DNA への機能性分子の導入とアルカリ処理による除去が可能であることを明らかにした。また、連続した T_{ac} 部をもつ修飾 DNA オリゴマーは両親媒性を示し、水溶液中で会合体を形成することを見出した。得られた会合体の疎水性をクリック反応を用いて高め、より効果的に会合体を形成するように改良できることを見出した。本研究で得られた知見は、高機能性人工核酸の創出に有用であり、今後、リン酸部を修飾した全く新しい DNA 類縁体を用いたテクノロジー開発が期待される。

参考文献

- 1) Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 30, 4900-4921.
- 2) Seela, F.; Pujari, S. S. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 1629-1641
- 3) Tanabe, K.; Ando, Y.; Nishimoto, S. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 7135-7137