

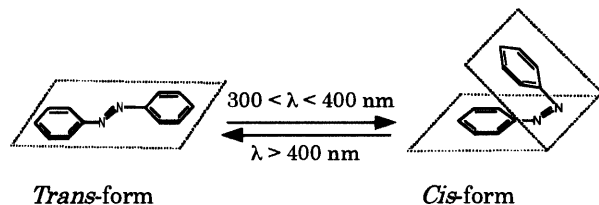
## 論文の内容の要旨

論文題目 Studies on the Photo-Regulation of DNA Duplex and Triplex Formation  
(DNA 二重鎖および三重鎖形成の光制御に関する研究)

氏名 梁 興 国

### 1. 序論

外部刺激によって核酸機能を人工的に制御することは、バイオテクノロジーの更なる発展のみならず、生命現象の基礎的解析から医療への応用といった広範な分野への適用が可能な極めて重要な技術である。しかし、外部環境に敏感な生体系に対する可逆的な制御は困難な課題であり、これまで様々な方法が提案されているものの、未だに不十分である。また、温度や pH、イオン強度など影響を与えやすい条件を変化させると、制御を乗り越して細胞系の機能が損なわれてしまうこともある。本研究では、外部刺激としてもっとも扱いやすく反応系を汚染しない「光」に注目し、核酸機能の可逆的な光制御を目指した。光照射により極性と立体構造が大きく変化する光応答性分子のアゾベンゼン (Scheme 1) を DNA オリゴヌクレオチドに導入し、DNA 二重鎖および三重鎖の形成と解離の光制御に、世界で初めて成功した。さらに、NMR 解析によりアゾベンゼンを導入した修飾 DNA 二重鎖の構造を決定した。また、円二色性 (CD)、紫外吸収 (UV) スペクトルおよび熱力学分析の結果に基づき、光制御の機構を明らかにした。

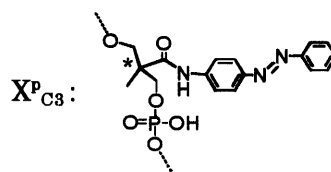


Scheme 1. Photo-isomerization of azobenzene.

*Trans*-azobenzene is planar, while *cis*-azobenzene is non-planar.

## 2. アゾベンゼンの *cis-trans* 光異性化による DNA 二重鎖の形成と解離の光制御

様々な形で、アゾベンゼンをオリゴヌクレオチドに組み込んだ。まず、3 炭素リンカーとする光応答性分子  $X^{P_{C3}}$  (Scheme 2) を使用し、DNA 二重鎖形成と解離の光制御を検討した。修飾 DNA の 5'-CGAX $^{P_{C3}}$ GTC-3' と相補鎖 DNA (3'-GCTCAG-5') との融解曲線を図 1 に示す。



Scheme 2. Structure of *para*-aminoazobenzene unit ( $X^{P_{C3}}$ ) in modified oligonucleotides.

UV 照射前のアゾベンゼンは、ほとんど (>90%) が *trans* 体として存在し、二重鎖の  $T_m$  は 37.1°C であった。(同じ配列の天然 DNA 二重鎖 5'-CGAGTC-3' / 3'-GCTCAG-5' の  $T_m$  は 30.1°C である。) これに UV 光 (300 nm <  $\lambda$  < 400 nm) を照射すると、アゾベンゼンが *cis* 体に異性化すると共に、二重鎖の  $T_m$  は 10.0°C に下がった (図 1)。つまり、*cis-trans* 異性化による  $T_m$  の変化 ( $\Delta T_m$ ) は 27.1°C に達した。上記の変化は可逆的であり、可視光 ( $\lambda > 400$  nm) を照射することにより再び *trans* 体に戻った。次に *trans* 体と *cis* 体の  $T_m$  の中間温度に保ちつつ、光照射 (UV 光或いは可視光) をすると、二重鎖の形成と解離に基づく 260 nm の吸光度の可逆的な変化が観察された。即ち、これらの事実から、温度、pH、イオン強度等の要因を一切変化させずに、特定波長の光照射のみで二重鎖の形成と解離を可逆的に制御できることが明らかとなった (図 2)。DNA 二重鎖の形成と解離を制御する際に、温度、イオン強度など生化学反応に影響を与えやすいパラメーターを変化させなければならぬ従来法と比べ、この方法は極めて簡便である。

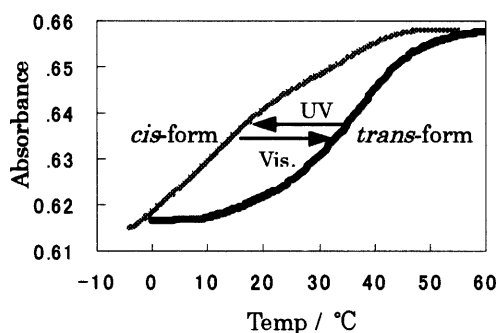


Figure 1.  $T_m$  curves of duplex 5'-CGAX $^{P_{C3}}$ GTC-3' / 3'-GCTCAG-5'. (*trans*-form: black line,  $T_{m,trans} = 37.1^\circ\text{C}$ ; *cis*-form: gray line,  $T_{m,cis} = 10.0^\circ\text{C}$ .) DNA 50  $\mu\text{M}$ , NaCl 1 M, pH 7.0

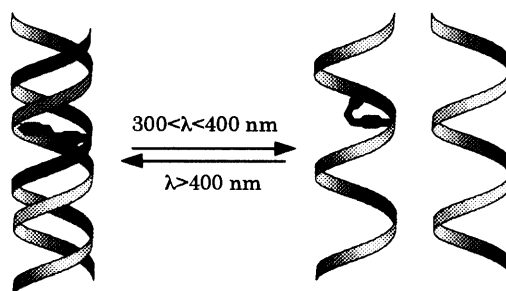


Figure 2. Schematic illustration of the photoregulation of duplex formation by using *cis-trans* photoisomerization of azobenzene moiety

次に、アゾベンゼンを様々な DNA 配列に導入し、*trans* 体と *cis* 体のそれぞれの二重鎖の  $T_m$  を測定した。その結果、すべての配列に対し、(1) *trans* 体の  $T_m$  は *cis*-体より 5~27°C 高い；(2) アゾベンゼンをピリミジン塩基間 (例：...TXC...) に導入する場合の方が、プリン塩基間 (例：...AXG...) に導入するより、 $\Delta T_m$  が大きいということが分かった。

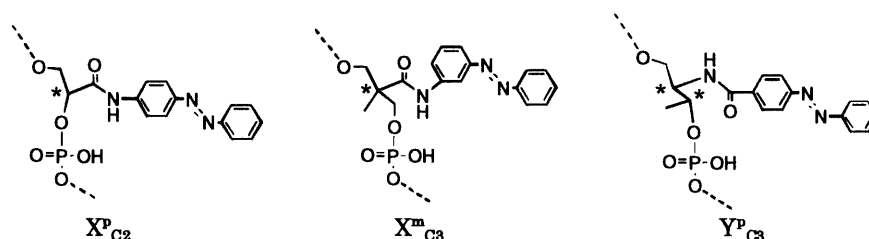
## 3. NMR 等による二重鎖形成の光制御機構の解明

アゾベンゼンを導入した DNA の構造を解明するために、二重鎖

5'-CGAX<sup>P</sup><sub>C3</sub>GTC-3'/3'-GACX<sup>P</sup><sub>C3</sub>TCG-3'の NOESY、COSY、および HOHAHA の測定を行った。その結果、X<sup>P</sup><sub>C3</sub> と隣接する塩基対のイミノプロトンのシグナルと *trans*-X<sup>P</sup><sub>C3</sub> のシグナルとの間に強い NOE が観察され、二重鎖形成により *trans*-アゾベンゼンは隣接する塩基対の間にインターカレートしていることが分かった。NMR 解析に加え、UV、CD、熱力学パラメターの測定および Insight II / Discover 98 による二重鎖構造の Simulation を行い、光制御の機構を解明した。平面構造を持つ *trans*-アゾベンゼンは、DNA 塩基対の間にインターカレートし、スタッキングにより二重鎖を安定化する。一方、*cis*-アゾベンゼンは、非平面の構造を持つので、立体障害により二重鎖を不安定化する。従って、温度一定の条件下で UV 光を照射すると、DNA 二重鎖は解離し、再び可視光を照射すると、二重鎖は形成する。

#### 4. より効率的な光制御を目指した光応答性 DNA の設計

本章では、3 章の知見をもとに、さらに優れた光応答性を示す修飾 DNA を設計した。合成した新規の光応答性 DNA の構造を Scheme 3 に示す。



Scheme 3. Structures of the azobenzene units in modified oligonucleotides.

今までの設計では、アゾベンゼンをインターカレーターとして DNA に導入したため、修飾 DNA が相補鎖より一塩基分長い。例えば、修飾 DNA の 5'-CCGA X<sup>P</sup><sub>C3</sub>GTCG-3' (9 mer) は、相補鎖の 3'-CGACACGG- 5' (8mer) より長い。そこで、より短いリンカーのグリセリン酸を介し、X<sup>P</sup><sub>C2</sub> (Scheme 3) を DNA に導入した。その光制御能を調べた結果、X<sup>P</sup><sub>C2</sub> は X<sup>P</sup><sub>C3</sub> と比べ、光異性化による  $\Delta T_m$  が 4~12°C 増大し、より効率的な光制御が実現した。

厳密に光制御するためには、アゾベンゼンの *cis*→*trans* 熱異性化を抑制する必要がある。そこで、*meta*-アミノアゾベンゼン (X<sup>m</sup><sub>C3</sub>, Scheme 3) を *para*-アミノアゾベンゼン (X<sup>P</sup><sub>C3</sub>) の代わりに DNA に導入した。その結果、*cis*-X<sup>P</sup><sub>C3</sub> の熱異性化の半減期 (37°C) が 1 時間であったのに対し、*cis*-X<sup>m</sup><sub>C3</sub> の半減期は 64 時間となり、熱異性化を顕著に抑えることに成功した。しかし、 $T_m$  を測定した結果、X<sup>m</sup><sub>C3</sub> の光制御能は、X<sup>P</sup><sub>C3</sub> より若干低くなった。キラルなトレオニノールリンカーとカルボキシルアゾベンゼン (Y<sup>P</sup><sub>C3</sub>, Scheme 3) を使用することによって、熱に安定で (37°C で、*cis* 体の半減期は約 30 時間)、しかも、光制御効率の良い光応答性 DNA の合成に成功した。

#### 5. RNA/DNA 二重鎖の形成と解離の光制御

Antisense 法による遺伝子発現の光制御を目指し、アゾベンゼンを導入した光応答性 DNA と native の RNA を用いて、RNA/DNA 二重鎖の光制御を行った。その結果、二重鎖：5'-TT X<sup>P</sup><sub>C3</sub>TTTTT-3'/rA<sub>8</sub> の場合は、アゾベンゼンの *cis*→*trans* 光異性化により最大 21.6°C

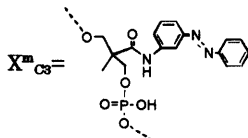
の $\Delta T_m$  が得られた。即ち、RNA/DNA 二重鎖の形成と解離の光制御にも成功した。また、RNA/DNA 二重鎖の場合、修飾 DNA の光制御能は、DNA 二重鎖の場合と比べ、配列に大きく依存することも分かった。

## 6. DNA 三重鎖形成と解離の光制御

アゾベンゼンを DNA 三重鎖の third strand に導入し、その三重鎖形成の光制御能を調べた。修飾 DNA と Duplex target の配列を図 3 に示す。*trans* 体の *m*-アゾベンゼンを含む三重鎖  $X^m_{C3}T_{13}/a/t$  の  $T_m$  は 30.2°C であるに対し、*cis* 体の  $T_m$  は 10.7°C であった (native の三重鎖  $T_{13}/a/t$  の  $T_m$  は 22.5°C である)。アゾベンゼンの *cis-trans* 光異性化による三重鎖の  $T_m$  変化 ( $\Delta T_m$ ) は、19.5°C であった (図 3)。このように、可逆的な DNA 三重鎖の形成と解離の光制御にも成功した。

Duplex target a/t:

a: 5'-CGTCGGTTT-aaaaaaaaaaaa-TTTCGTGGC-3'  
t: 3'-GCAGCCAAA-tttttttttttt-AAAGCACCG-5'



Modified third strands: a)

$X^m_{C3}T_{13}$ : 5'- $X^m_{C3}$ TTTTTTTTTTTTTT-3'

$T_6X^p_{C3}T_7$ : 5'-TTTTTT $X^p_{C3}$ TTTTTT-3'

$X^p_{C3}T_6X^p_{C3}T_7$ : 5'- $X^p_{C3}$ TTTTTT $X^p_{C3}$ TTTTTT-3'

a) Structures of them are shown in Scheme 1, and 3.

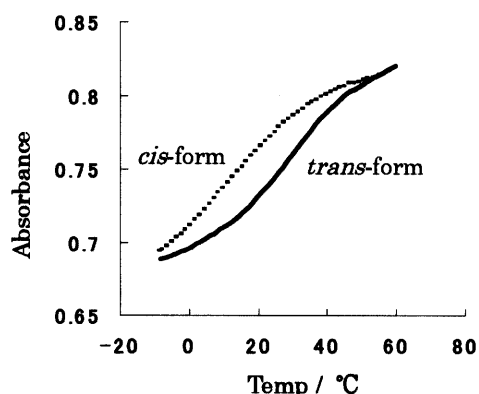


Figure 3. Sequences of duplex target and some modified oligonucleotides (Left) and the melting curves of triplex *trans*- $X^m_{C3}T_{13}/a/t$  (—) and *cis*- $X^m_{C3}T_{13}/a/t$  (···) (Right). 2.0  $\mu$ M DNA, 0.2 M  $MgCl_2$ , pH 7.0 (10 mM HEPES).  $T_m$ (s) of *trans*- $X^m_{C3}T_{13}/a/t$  and *cis*- $X^m_{C3}T_{13}/a/t$  are 30.2 °C and 10.7 °C, respectively ( $\Delta T_m = 19.5$  °C).

より効率的な光制御 (より大きい $\Delta T_m$ ) のために、種々の検討を行った。パラアゾベンゼン ( $X^p_{C3}$ ) の場合は、導入位置が DNA 配列の 5' から遠くなる程、 $\Delta T_m$  が大きくなった。即ち、アゾベンゼンを DNA 配列の真中に導入する場合 (例:  $T_6X^p_{C3}T_7/a/t$ )、 $\Delta T_m$  は 30°C を越え、最も大きくなった。また、二つアゾベンゼンを導入した  $X^p_{C3}T_6X^p_{C3}T_7/a/t$  三重鎖の $\Delta T_m$  は約 50°C もあった。さらに、アゾベンゼンの代わりに、フェニルアゾナフタレンを使用することで、ほぼ完全な三重鎖の形成と解離の光制御に成功した。最後に、三重鎖形成の光制御の機構および  $X^p_{C3}$ 、 $X^m_{C3}$ 、 $X^n_{C3}$  などの光制御能の違いの原因についても検討した。

## 7. 結論

アゾベンゼンなどを導入した光応答性核酸を用いて、*cis-trans* 光異性化により二重鎖あるいは三重鎖の形成と解離を光照射のみで制御することに成功した。また、*trans* 体アゾベンゼンは Stacking により二重鎖 (三重鎖) を安定化し、*cis* 体は立体障害により二重鎖 (三重鎖) を不安定化するという光制御機構を NMR、CD、UV などの解析により解明した。また既に、この現象を利用することで、ポリメラーゼ反応の光制御にも成功している。