

化学修飾核酸の酵素認識に基づく
遺伝子発現抑制デバイスの創製

2016

田良島 典子

Abbreviations

A	adenine
Ac	acetyl
ADC	antibody-drug conjugate
AGE	agarose gel electrophoresis
Arg (R)	arginine
bp	base pair
BPB	bromophenol blue
Bz	benzoyl
C	cytosine
CE	cianoethyl
CMV	cytomegalovirus
CPG	controlled pore glass
CuAAC	copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
Da	dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMTr	dimethoxytrityl
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate
dSNTP	2'-deoxy-4'-thionucleoside 5'-triphosphate
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European medicines agency
ER	endoplasmic reticulum
ESI	electrospray ionization
exo	exonuclease
FAB	fast atom bombardment
FBS	fetal bovine serum

略語表

FDA	food and drug administration
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fluc	<i>firefly</i> luciferase
G	guanine
GFP	green fluorescent protein
His (H)	histidine
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	high resolution
IL	interleukin
Im	imidazopyridopyrimidine
INF	interferon
IRK	IL-1 receptor associated kinase
iRed	intelligent shRNA expression device
IVIS	<i>in vivo</i> imaging system
KF	Klenow fragment
K_m	Michaelis constant
LR	low resolution
Lys (K)	lysine
MALDI	matrix assisted laser desorption / ionization
min	minute(s)
MMTr	monomethoxytrityl
MOE	methoxyethyl
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
MPM	malignant pleural mesothelioma
MS	mass spectrometry
MyD	myeloid differentiation marker
Na	naphthyridine
NC	negative control
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
ODN	oligodeoxynucleotide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

略語表

PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDNA	plasmid DNA
PEG	polyethylene glycol
Ph	phenyl
Phe (F)	phenylalanine
ppm	parts per million
PRR	pattern recognition receptors
<i>i</i> Pr	isopropyl
PS	phosphorothioate
Pu	purine
Py	pyrimidine
RISC	RNA-induced silencing complex
Rluc	<i>Renilla</i> luciferase
RNAi	RNA interference
RNase	ribonuclease
ROI	region of interest
s	second(s)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
T	thymine
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TBTA	tris(benzyltriazolylmethyl)amine
TCA	trichloroacetic acid
TEAA	triethylammonium acetate
TEAB	triethylammonium bicarbonate
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TIPS	triisopropylsilyl
TLC	thin layer chromatography
TLR	Toll like receptor
T_m	melting temperature
TNF	tumor necrosis factor

略語表

TOF	time of flight
TRA	TNF receptor-associated factor
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr (Y)	tyrosine
VEGF	vascular endothelial growth factor
V_{max}	maximum velocity

目次

序論.....	1
本論.....	8
第1章 Intelligent RNA expression device (iRed) の開発研究.....	8
第1節 iRed の構築と in vitro における遺伝子発現抑制効果の評価.....	10
第2節 Malignant pleural mesothelioma (MPM) mouse model における in vivo 遺伝子発現抑制効果の評価.....	16
第3節 iRed の自然免疫応答回避能の評価.....	19
第2章 第2世代環状型 iRed の開発研究.....	24
第1節 第2世代 iRed の構築戦略.....	25
第2節 ワトソン-クリック塩基対に続く第3番目の人工塩基対 (ImN ^N :NaO ^O) の開発研究.....	28
第3節 ImN ^N :NaO ^O 塩基対の酵素認識.....	36
第4節 ImN ^N :NaO ^O 塩基対を含む鎖伸張反応の評価.....	45
第5節 ImN ^N :NaO ^O 塩基対を含む PCR の検討.....	47
第6節 ImN ^N :NaO ^O 塩基対を利用したクリックケミストリーによる DNA 二本鎖両末端の環状化法開発.....	53
第7節第2世代環状型 iRed の構築と遺伝子発現抑制効果.....	60
結語.....	65
実験の部.....	68
第1章の実験.....	69
第2章の実験.....	73
引用文献.....	84
謝辞.....	92

序論

1897年、Friedrich Bayer & Co. (現 バイエル社) の Felix Hoffmann により合成されたアセチルサリチル酸 (アスピリン)^{1*}に端を発した低分子医薬は、100年以上の長きに渡り創薬開発の中心を成して来た。しかし、創薬資源の枯渇等が問題となり、現在の新薬開発の中心は抗体医薬に代表されるバイオ医薬品[†]へと移行しつつある (Figure 1a)。Figure 1b に、2013年における世界の医薬品売上高ランキングを示した。上位10品目のうち6品目が抗体医薬 (Fc融合タンパク質を含む) であり、低分子医薬品はわずか3品目にすぎない。抗体医薬は、標的に対して高い特異性を有することから、副作用の少ない医薬品として評価が高い。しかし、その物性から開発できる対象 (ターゲット) が限られており[‡]、抗体医薬に次ぐポスト抗体医薬として、抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate: ADC) の開発²や特殊ペプチド³、細胞および核酸医薬などの次世代型バイオ医薬品のニーズが高まっている。

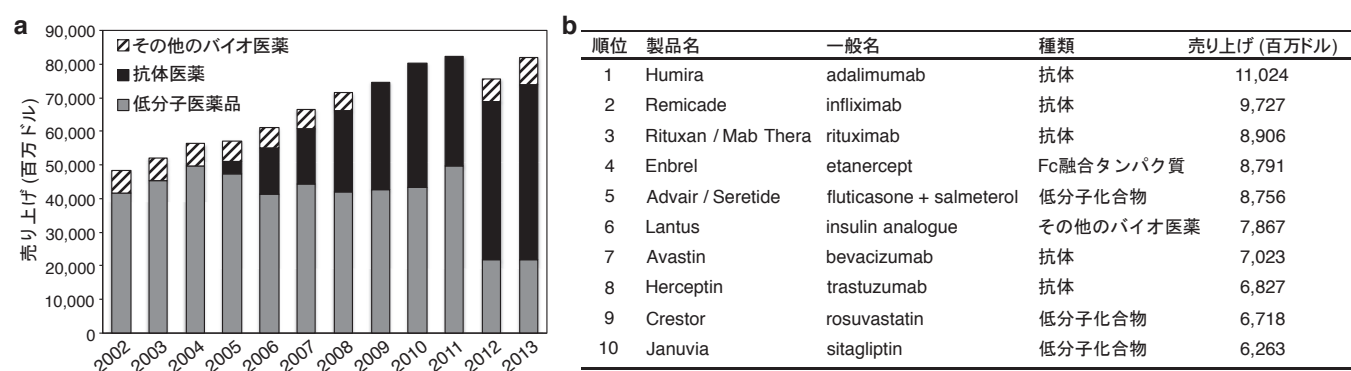


Figure 1 世界の医薬品売上高に占めるバイオ医薬品の割合 (a) 世界の医薬品売上高ランキング上位10位までの合計売上高推移とその内訳; (b) 2013年の世界医薬品売上高ランキング (引用文献4より改変)

ところでごく最近、医薬品の効果に対する個人差について、非常に興味深い報告がなされた (Figure 2)⁵。医薬品売上高の上位を占める医薬品においても、満足な効果を得られる患者の割合は半数にも満たないというものである。例えば、2013年の世界医薬品売上高ランキング第1位を記録した「Humira」でさえ、満足な効果を得られる患者は4人に1人程度である。これは、次世代型バイオ医薬品の開発にあたり、ゲノム情報に基づいたオーダーメイド医療を考慮する必要性を提起している。これまでの医薬品開発は、主にセントラルドグマの下流に位置するタンパク質を標的として開発がなされて来た。上述の抗体医薬においても、その根幹は従来型の低分子医薬と同じである。したがって、セントラルドグマの

* アセチルサリチル酸の化学合成は、1853年、フランスの有機化学者 Charles Frédéric Gerhardt がサリチル酸ナトリウムを塩化アセチルで処理し、得られた化合物が世界初の例であると考えられている¹。後に、Felix Hoffmann により合成法が改良され医薬品としての品質が担保された。アスピリンは、1899年に世界初の合成医薬品として Friedrich Bayer & Co. より上市された。発売当初は粉末状の医薬品であったが、後にアスピリンは世界初の錠剤としても知られることとなる。
[†] バイオ医薬品の定義は複雑であるが、本論では抗体医薬、細胞治療薬、再生医療製品、特殊ペプチド医薬、遺伝子治療薬および核酸医薬等、バイオテクノロジー技術により創出される医薬品のことを指す。
[‡] 実際に、世界医薬品売上高ランキング上位10品に占める抗体医薬6品のうち、半数の3品 (Humira、Remicade および Enbrel) は同一の標的 (抗 TNF- α) を有し、主にリウマチ治療薬として用いられている。

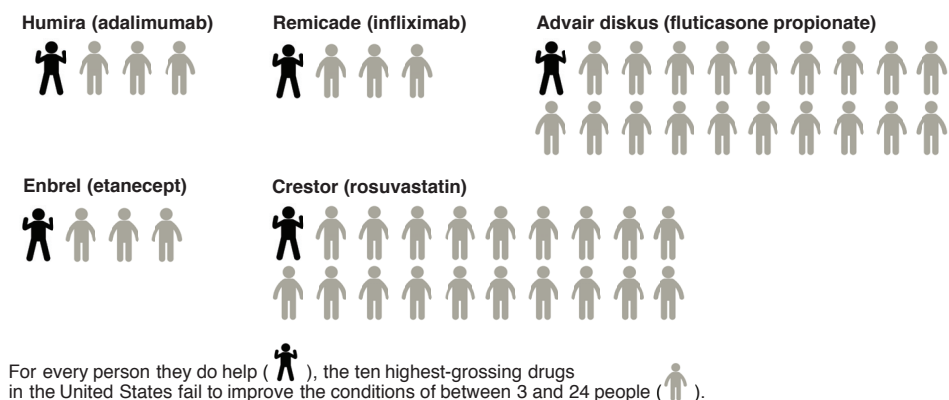


Figure 2 米国売上高の上位を占める医薬品の薬剤感受性における個人差 (引用文献 5 より改変)

上流に位置する遺伝子 (DNA や RNA) のレベルで疾病を制御可能な新しい次世代型バイオ医薬開発手法として、特に核酸医薬には大きな期待が寄せられている。

しかし、これまでに上市された核酸医薬品はわずか 3 例しか知られていない。1998 年、世界初の核酸医薬品として HIV 患者のサイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 感染による網膜炎を治療するアンチセンス医薬*「Vitraven (fomivirsen)」(Figure 3a)⁶ が US food and drug administration (FDA) により承認された。続いて 2004 年、加齢黄斑変性症の治療薬である抗血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) アプタマー†「Macugen (pegaptanib)」(Figure 3b)⁷ が FDA により承認を受けた‡。Macugen は 2008 年、日本初の核酸医薬品としても承認を受け、現在までに唯一日本国内で臨床使用された核酸医薬品である。その後しばらくの間、数多くの臨床試験が実施される一方で上市に至る核酸医薬品はなかったものの、2012 年、世界第三番目の核酸医薬品として家族性高コレステロール血症を治療するアンチセンス医薬「Kynamro (mipomersen)」(Figure 3c)⁹ が承認された。この数少ない事例は、核酸医薬開発の難しさを物語っている。

核酸医薬開発が困難である理由として、大きく以下の 3 つの壁が指摘されている。まず 1 つ目の壁は、核酸分子の生体内安定性の乏しさにある。核酸を医薬品として使用するためには、生体内環境においても安定に存在し、標的的特異的な効果を発揮することが求められる。しかし、天然型の核酸は生体内に普遍的に存在するヌクレアーゼにより容易に分解されるため、非常に不安定である。また 2 つ目の壁として、デリバリーの困難さが挙げられる。核酸はリン酸ジエステル部に由来する負電荷ゆえに細胞膜透過性が低い。また水溶性の高さゆえに毛細血管から漏出し、糸球体ろ過を経て速やかに尿中へ排泄されるという問題点も有している。さらに 3 つ目の壁として、自然免疫応答の賦活化による副作用発現が

* アンチセンス法とは mRNA に対し相補的な配列を有する DNA を細胞内へ導入して mRNA:DNA 二本鎖を形成させ、mRNA を認識するリボソームやスプライソソームなどの結合を阻害するとともに RNase H (DNA:RNA 二本鎖を形成する RNA を切断する非特異的なエンドヌクレアーゼ) 活性を利用して mRNA の分解を引き起こす核酸創薬手法のこと。

† アプタマーとは、特定の分子と特異的に結合する核酸分子のことであり、抗体にかわる分子認識能を有した生体物質として知られている。Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) 法⁸ と呼ばれる分子進化学的手法により獲得される。

‡ Macugen は現在、商業上の理由で販売中止となっている。同じ VEGF を標的とした抗体断片「Lucentis」と比較して効果が劣ると判断されたことがその大きな理由と考えられている。

序論
核酸医薬開発の現状と核酸創薬化学が果たす役割

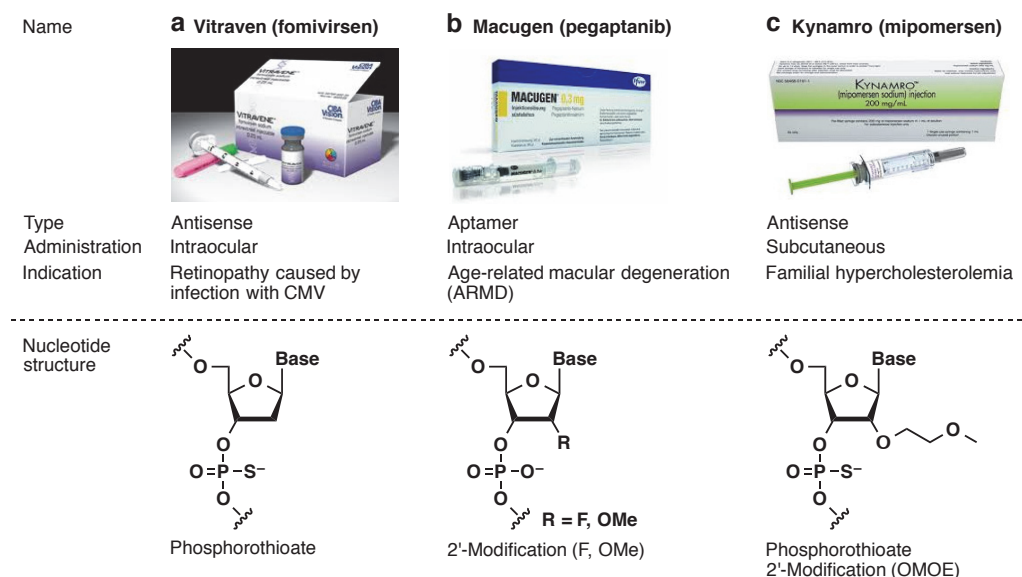


Figure 3 これまでに上市された核酸医薬品の種類と構造

挙げられる。われわれの細胞は絶えずバクテリアやウイルスによる感染症の脅威と戦っている。これは元来生物の生存に必須の機構であるが、核酸医薬開発研究においては自然免疫応答に基づく重篤な副作用の原因となる。ごく最近も Tkemira 社が開発中の TKM-ApoB (高コレステロール血症の small interfering RNA (siRNA) 治療薬) が、自然免疫応答による副作用発現を理由に臨床開発中止に追い込まれており、自然免疫応答の回避もまた核酸医薬開発における喫緊の課題であると言える。

これらの問題を解決するのが、化学修飾核酸の開発である。これまでの低分子医薬開発の歴史も有機合成を基盤とした創薬化学の発展とともにある。世界最初の化学合成医薬品「アスピリン」は、ヤナギの木より見いだされた抗炎症性成分であるサリチル酸が有していた強い苦みや胃粘膜刺激作用を、カルボキシル基のアセチル化により解決している¹。上述の核酸医薬品も化学修飾核酸の存在無くしてその開発は成し得なかった。すなわち、世界初の核酸医薬である「Vitravene」はリン酸ジエステル部位の酸素原子を硫黄原子に置き換えたホスホロチオエート (phosphorothioate: PS) 型 DNA 分子である (Figure 3a)。硫黄原子は創薬化学において酸素原子等価体として扱われる¹⁰。核酸の場合、PS 型のリン酸ジエステル結合とすることによりヌクレアーゼに対する抵抗性が付与され、細胞内における安定性が高まる¹¹。また脂溶性の向上も期待出来るために血中滞留性が改善される¹²。この PS 型核酸の利用により「Vitravene」の開発が可能となったが、依然、デリバリーや副作用発現の問題を解決出来ず、眼内注射という局所投与に限定されていた。

次に開発された「Macugen」は 2'-位化学修飾型 RNA アプタマーである。RNA が有する 2'-位水酸基に由来する不安定性を解決するため、2'-位にアルキル鎖を導入した化学修飾 RNA 分子が利用された (Figure 3b)⁷。Macugen に用いられた 2'-位化学修飾核酸の導入は、近年、先に述べた自然免疫応答の回避にも有効であることが明らかとなっている¹³⁻¹⁷。すなわち 2'-位化学修飾核酸の開発は、生体内安定性の問題だけでなく天然型核酸分子が有する免疫原性の解決にも大きく寄与した。しかし、「Macugen」も先の「Vitravene」と同様、眼内注射薬として承認を得ている。

一方、ごく最近承認された「Kynamro」は、皮下投与すなわち全身投与型の核酸医薬品である。先に世界発の核酸医薬品「Vitravene」の開発に成功し、アンチセンス医薬開発のパイオニアとなった米国 Isis Pharmaceuticals 社 (現 Ionis Pharmaceuticals 社) は、20 年余りの歳月をかけて化学修飾核酸分子を精力的に開発し、その安全性や毒性および薬物動態を徹底的に解析した。その結果、「Kynamro」の分子構造として、アンチセンスオリゴマーの中央部分に PS 型 DNA を配置し、両末端を 2'-*O*-methoxyethyl (MOE) RNA¹⁸⁻²⁰ とするギャップマー構造^{21*}を採用した。先に開発されたアンチセンス医薬である「Vitraven」が PS 型 DNA のみで構成されるのに対して、「Kynamro」は 2'-*O*-MOE 型ギャップマー構造を採用することにより標的特異性ならびにエキソヌクラーゼ抵抗性が飛躍的に向上し、全身投与が可能になったと考えられている⁹。依然、「Kynamro」の副作用に対する懸念が問題視されているものの[†]、全身投与可能な核酸医薬品の開発成功により、今後さらに核酸医薬品開発が加速すると考えられる。このように、化学修飾の導入により、生体内安定性ならびに標的特異性を高めた核酸医薬品の開発は、創薬研究に大きなパラダイムシフトをもたらしつつある。

ところで近年、アンチセンス法やアプタマーに続く新たな核酸創薬手法として RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 法に大きな期待が寄せられている。1998 年の Fire と Mello らによる線虫での RNAi の発見²²は、当時から世界的に大きな注目を集めたが、当初用いられていた長鎖二本鎖 RNA は哺乳動物に投与するとインターフェロン応答を引き起こすため、線虫や植物など特定の生物種においてのみ観察される現象だと考えられていた。しかし 2001 年 Elbashir らは化学的に合成した鎖長 21 mer の siRNA が哺乳動物細胞においてインターフェロン応答を誘起せず配列特異的な遺伝子発現抑制効果を示すことを報告した²³。ヒトをはじめとする哺乳動物において、細胞内に取り込まれた siRNA は、Clip 1 による 5'末端のリン酸化を受けた後²⁴、RNA-induced silencing complex (RISC) を形成する (Figure 4a)。その後センス鎖が取り除かれて成熟型 RISC となった後、アンチセンス鎖に完全相補的な配列を有する mRNA を認識・切断することにより遺伝子発現抑制を引き起こす。siRNA は鎖長約 21 mer の二本鎖 RNA であり、自動合成機を用いて容易に化学合成可能である。したがって化学修飾の導入も比較的容易であるため、生体内安定性と自然免疫応答回避能を兼ね備えた化学修飾 siRNA の分子デザインが精力的に研究されてきた^{25,26}。現在、様々な企業や研究機関で siRNA の医薬応用が検証され、2015 年 12 月現在、40 件もの臨床試験が進められている[‡]。

また、siRNA の他に RNAi を誘起可能な分子として、shRNA 発現プラスミドが知られている。siRNA は RNA 分子であるため、その遺伝子発現抑制効果は一過性にすぎない。これを解決するため、Brummelkamp らは U6 プロモーターから short hairpin RNA (shRNA) を転写可能なプラスミド DNA によ

* ギャップマー構造はアンチセンス法に有用な修飾様式として知られ、中央部分に PS 型 DNA を配置し、両末端部を化学修飾 RNA とする分子構造を指す。中央部分の PS 型 DNA により RNase H の誘導が可能であり、末端部の化学修飾 RNA の導入により標的に対する親和性が向上するとともにエキソヌクラーゼ抵抗性が改善される。

† 肝毒性の問題が懸念され、FDA では 2012 年 10 月 8 日に承認勧告がなされたものの、boxed warning 扱いとしていて、承認後も 4 つの試験実施が指導されている。一方、欧州医薬品庁 (European medicines agency: EMA) では肝毒性に加えて循環器系の副作用も大きく問題視され、2012 年 12 月 13 日、承認拒絶が勧告された。

‡ Clinical Trial.gov (<https://clinicaltrials.gov>) において search for studies 「siRNA」で検索した。

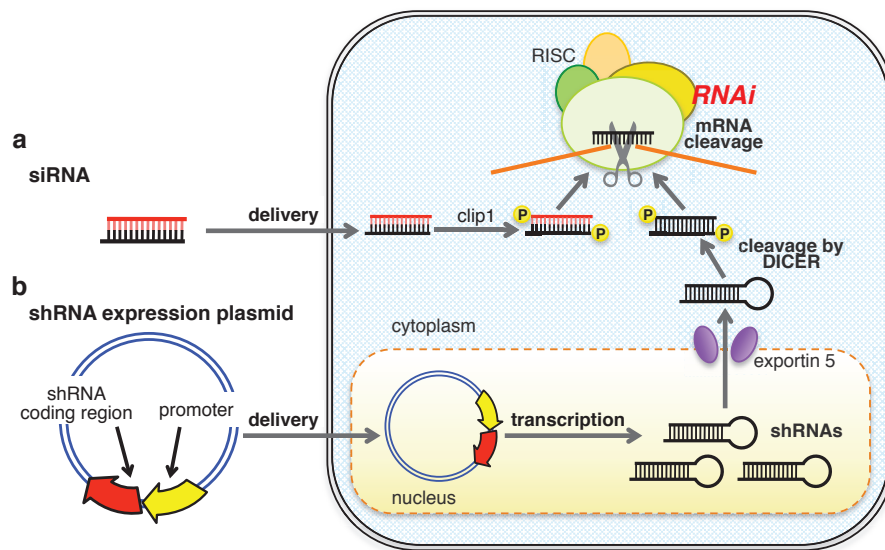


Figure 4 現在用いられている RNAi 誘起法 (a) siRNA; (b) shRNA 発現プラスミド

る持続的な RNAi 誘起法を報告した (Figure 4b)^{27*}。細胞核内に移行したプラスミドは内在性の RNA polymerase III により shRNA を発現する。shRNA は核-細胞質間輸送タンパク質 exportin 5 により細胞質へと輸送された後³¹⁻³³、Dicer により siRNA 様の二本鎖 RNA へと切断され、RNAi を引き起こす。プラスミドは環状の DNA 分子であり、生体内安定性に優れる。さらに、たとえ 1 分子でもプラスミドが細胞核内に移行すれば、理論上 shRNA の産生を介した持続的な遺伝子発現抑制効果が期待出来る。したがって shRNA 発現プラスミドを用いた RNAi 誘導法は主にバイオテクノロジーの分野で汎く利用されている。しかし、プラスミドはその巨大な分子サイズゆえに細胞核内への導入が難しい。さらにプラスミドには、目的の遺伝子発現領域以外に大腸菌内での自己増幅に必要な複製開始点や抗生物質耐性遺伝子をコードする領域が存在し、予期せぬタンパク質の発現に基づく毒性発現が懸念される。さらにこれらの余剰な配列中に複数存在する CpG モチーフ[†]に起因する自然免疫応答の賦活化も大きな問題となり、その医薬応用は大きな困難を伴う。

プラスミドに変わる遺伝子 (≡長鎖 DNA) 導入法としては、ウイルスベクターの利用が挙げられる。Table 1 に、現在用いられているウイルスベクターおよびのプラスミドの特徴をまとめた。ウイルスベクターはプラスミドと比較して高い導入効率を有するものの、染色体組込みによる遺伝子挿入変異や抗原性といった副作用を伴う。したがって、プラスミドやウイルスベクターに代わり、自然免疫応答を惹起することなく高い遺伝子導入効率を獲得可能なデバイスの創製が期待されている。

細胞内で shRNA を発現可能な新規遺伝子導入デバイスとして[‡]、Taki らは、shRNA 発現プラスミドを PCR と数度の酵素反応により最小化した shRNA 発現ダンベル型ベクターを考案している (Figure 5)³⁴。

* ほぼ同時期に、Paddison ら²⁸、Paul ら²⁹、Yu ら³⁰ によってそれぞれ同様の報告がなされた。

† 一般式 RRCGY (where R and Y represent a purine and a pyrimidine, respectively) で表される配列を指す³⁵。一般に、哺乳類の内在性 DNA は CpG 配列中の C 残基ピリミジン環 5 位の炭素原子がメチル化されている。一方、外来性 DNA はメチル化を受けていないことから、内在性 DNA (自己) と外来性 DNA (非自己) の識別に大きく関与する。

‡ 遺伝子導入を目的とした新規デバイスの開発研究はいくつかの報告例があるが、本論では shRNA を発現可能な遺伝子導入デバイスのみを取り挙げる。

序論
核酸医薬開発の現状と核酸創薬化学が果たす役割

Vector	Chromosomal integration	Expression time	Cell type		Toxicity
			Diving	Non-diving	
Retrovirus	○	long	○	×	gene insertion, CpG
Lentivirus	○	long	○	○	gene insertion, CpG, Pathogenicity of HIV
Adenovirus	△	short	○	○	Antigenicity, CpG
Adeno-associated virus (AAV)	△	long (non-diving)	○	○	CpG
Sendai virus	×	short	○	○	Antigenicity, CpG
Plasmid	△	short	△	△	CpG

Table 1 ウイルスベクターおよびプラスミドを用いた遺伝子導入法

shRNA 発現ダンベル型ベクターを構築するためには、まず、shRNA 発現プラスミドのうち細胞内での shRNA 発現に必要最小限の領域 (プロモーター+shRNA 発現領域) を PCR により増幅する (Figure 5a: step 1)。このとき用いるプライマー鎖中へ、ニッキングエンドヌクレアーゼ (*Bpu* I) の認識配列を導入することで、制限酵素処理により、両末端部へ一本鎖領域を露出させる (step 2)。生じる一本鎖領域の塩基配列を適切に設計することで両末端部がヘアピン構造を形成し、T4 ライゲースを用いたライゲーションによりダンベル型 shRNA 発現ベクターが構築可能となる (step 3)。彼らは、このように得られた EGFP 標的 shRNA 発現ダンベル型ベクターがプラスミド同様の遺伝子発現抑制効果を発揮することを報告した。さらに、ダンベル型ベクターは、エキソヌクレアーゼ抵抗性を有するため、直鎖状の二本鎖 DNA より顕著な遺伝子発現抑制効果が明らかとなっている。しかし、配列の最小化が自然免疫応答発現

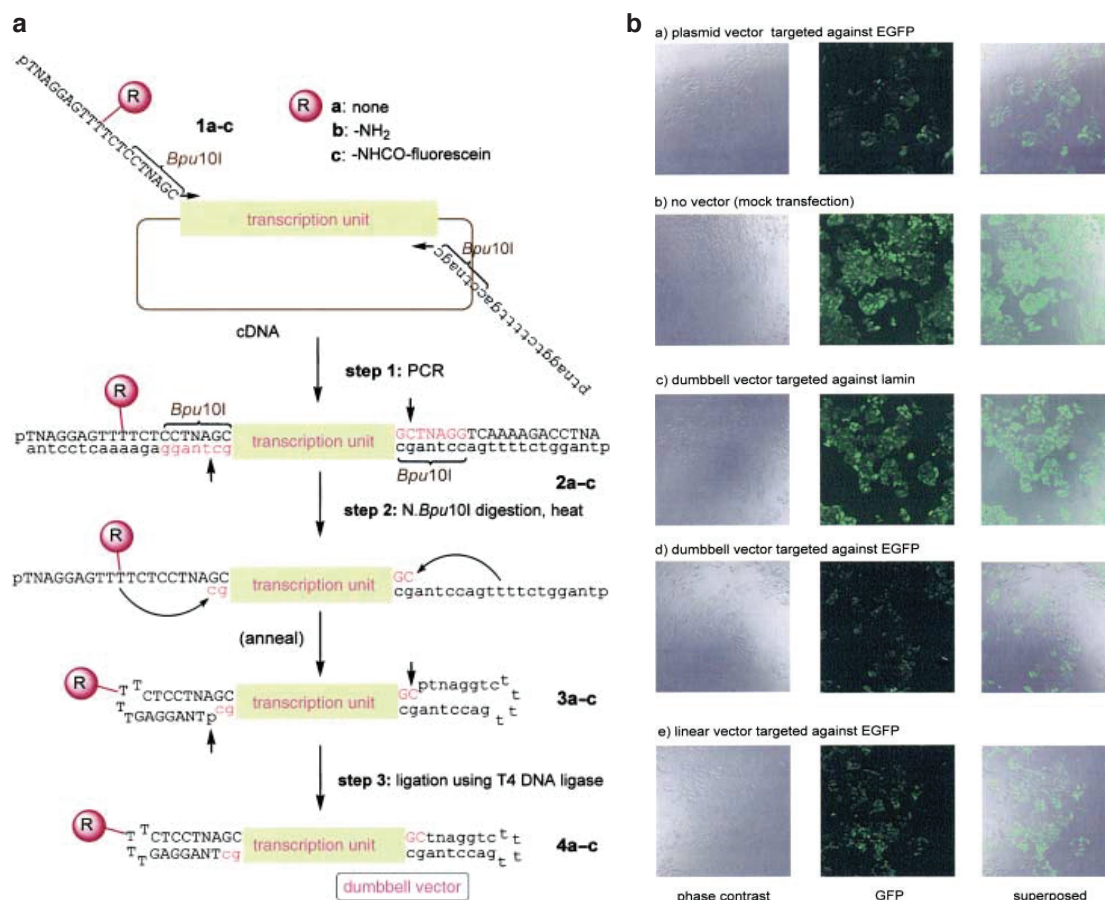


Figure 5 Taki によるダンベル型 shRNA 発現デバイスの開発研究 (a) ダンベル型 shRNA 発現デバイスの構築法; (b) EGFP を標的とした shRNA 発現による遺伝子発現抑制効果 (引用文献 34 より改変)

へ与える影響については議論されておらず、また分子の構築に複数回の酵素反応を必要とすることからも、新しい核酸創薬手法として有用であるとは言い難い。

以上のような背景のもと、著者は化学修飾核酸を利用した新規 shRNA 発現デバイスの開発研究に着手することとした。本論第 1 章では糖部修飾核酸 4'-チオ DNA を利用した shRNA 発現デバイス intelligent shRNA expression device (iRed) の構築と RNAi 効果について述べる³⁶。また、本論第 2 章では塩基部修飾核酸 $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対³⁷⁻³⁹を利用した第 2 世代環状型 iRed の開発研究について述べる。

本論

第1章 Intelligent RNA expression device (iRed) の開発研究

序論において、shRNA 発現プラスミドを用いた RNAi 誘起法は、たとえ 1 分子でも細胞核内へプラスミドを導入することが出来れば、理論上、恒常的に shRNA が発現し、持続的な遺伝子発現抑制効果が期待出来る一方で、i) 分子サイズの大きなプラスミドは細胞核内への導入効率が低い、ii) shRNA 発現に不必要な領域 (大腸菌内での自己増幅に必要な複製開始点や抗生物質耐性遺伝子発現領域) に起因する予期せぬタンパク質発現 および iii) CpG モチーフに由来する自然免疫応答の惹起といった問題点を有することを述べた。Taki らによるダンベル型 shRNA 発現デバイス (Figure 5)³⁴ の開発は、配列の最小化により shRNA 発現プラスミドの欠点を補うものであるが、依然、天然型 DNA 配列により構成される。したがって、これまでの核酸医薬開発の歴史を踏まえると、生体内安定性や免疫原性の問題を克服出来ていないと考えられる。

ところで Inoue、Minakawa らはこれまでに、デオキシヌクレオチド糖部 4'-位酸素原子を同族元素である硫黄原子に置換した 4'-チオ DNA (Figure 6)^{40,41} を開発し、このものが高い二本鎖形成能ならびにヌクレアーゼ抵抗性を有することを報告している^{41,42}。4'-チオ DNA は天然型 DNA との生物学的等価性を期待した分子構造を有するため、化学修飾核酸の合成に汎用されるホスホロアミダイト法による化学合成⁴¹のみならず 2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド三リン酸 (dSNTP) を利用した酵素合成⁴³によっても調製可能である。一般に、化学合成では鎖長 50 mer 以下の鎖長が合成限界*であるのに対して、DNA ポリメラーゼを用いた酵素合成ではより長鎖の DNA を調製可能であり、バイオテクノロジーへの応用範囲が広がる。実際に、dSCTP あるいは STTP を含む PCR により調製された鎖長約 380 bp の 4'-チオ DNA が細胞核内で遺伝情報として機能することも明らかとされている^{43,44}。さらにごく最近 Kojima らは、4 種類 (dSA、dSG、dSC、ST) 全ての dSNTP を含む系においても PCR が進行することを明らかとし、高度に修飾された長鎖 4'-チオ DNA の酵素合成に成功した⁴⁵。これは 4 種類全ての dNTP を化学修飾三リン酸体に置換した場合にも PCR が進行した初めての報告例である。

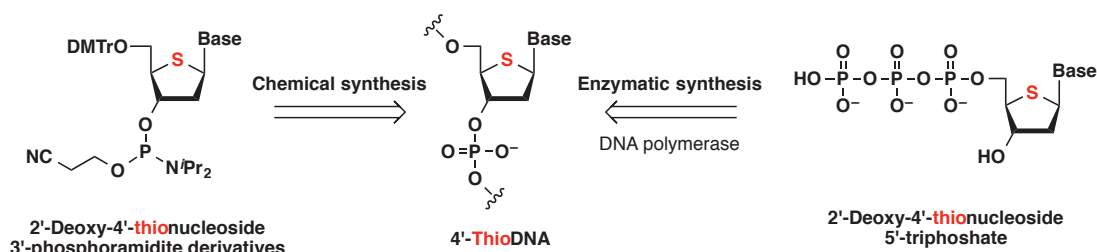


Figure 6 4'-チオ DNA の構造とオリゴヌクレオチドの合成方法

* 技術的には 100 mer 程度の DNA 鎖も化学合成可能ではあるが、特に化学修飾核酸の場合、実用レベルでは 50 mer 程度の合成が純度および収量の面からも限界である。

そこで著者は、プラスミドのうち shRNA 発現に必要最低限の領域 (U6 プロモーター + shRNA コード領域) をテンプレートとし、dSNTP を含む PCR を行なうことにより調製される新規 shRNA 発現デバイス intelligent shRNA expression device (iRed) の開発に取り組むこととした (Figure 7)。仮に、細胞内において 4'-チオ DNA が天然型 DNA 等価体として機能し shRNA が発現すれば、iRed はプラスミドからの分子サイズ低減 (最小化) と 4'-チオ化学修飾の導入により、自然免疫応答を惹起することなく高い遺伝子発現抑制効果を発揮可能な intelligent 核酸分子となることが期待される。また先に述べたように 4'-チオ DNA は高い二本鎖形成能とヌクレアーゼ抵抗性を有する化学修飾核酸であるため、iRed は高い生体内安定性を兼ね備えると考えた。

本章第1節では、iRed の構築と *in vitro* における RNAi 効果の評価について述べる。第2節では *in vitro* 系において最も高い活性を示した dSC 修飾型の iRed について *in vivo* における遺伝子発現抑制効果の評価したので、その結果について述べる。さらに第3節では iRed の免疫原性について述べる。

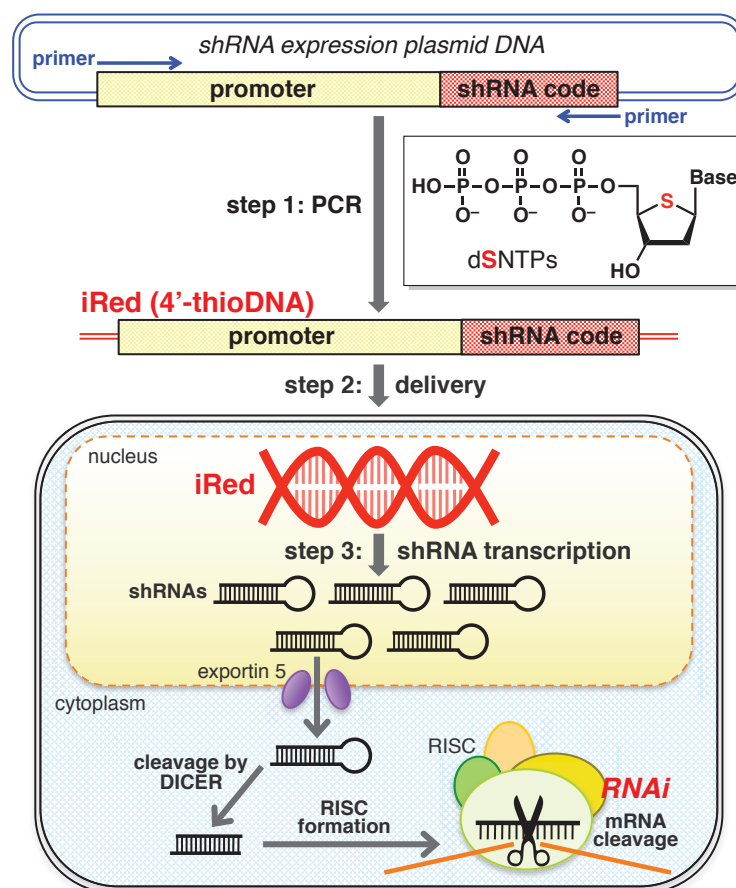


Figure 7 Intelligent shRNA expression device (iRed) のコンセプト Step1: A region of plasmid DNA (pDNA) encoding the U6 promoter and a short hairpin RNA (shRNA) was amplified using PCR in the presence of one type of 2'-deoxy-4'-thionucleoside triphosphate (dSNTP) and three other dNTPs to synthesize an iRed. Step 2: The iRed was delivered into the nucleus. Step 3: Numerous shRNAs were transcribed from the iRed to possess a potent RNA interference (RNAi) activity. (引用文献 36 より転載)

第1節 iRed の構築と *in vitro* における遺伝子発現抑制効果の評価³⁶

Figure 7 に示したように、iRed はプラスミドのうち shRNA 発現に必要な最低限の領域をテンプレートとし、dSNTP を含む PCR を行なうことにより構築される。

Kojima らは、104 bp の増幅産物を与えるモデル系において dSNTP を用いた PCR の最適条件を探索した⁴⁵。その結果、反応液中へ 10% DMSO を添加し*、KOD Dash DNA polymerase を用いて鎖伸張時間を 10 min に延長†した場合に、最も効果的に増幅産物を与えることを報告している。本条件では、4 種類全ての dNTP (天然型) を dSNTP (チオ修飾型) に置き換えた場合にも、天然型と比較して収率 43% で PCR 産物を得ることが可能であり、高度に修飾された長鎖化学修飾 DNA の初の酵素合成例である。

この PCR 条件に従い、pGL2 firefly luciferase (Fluc) を標的とした shRNA 発現プラスミドのうち U6 プロモーターおよび shRNA コード領域とをテンプレートとし、まずは天然型 4 種類の dNTP のうち

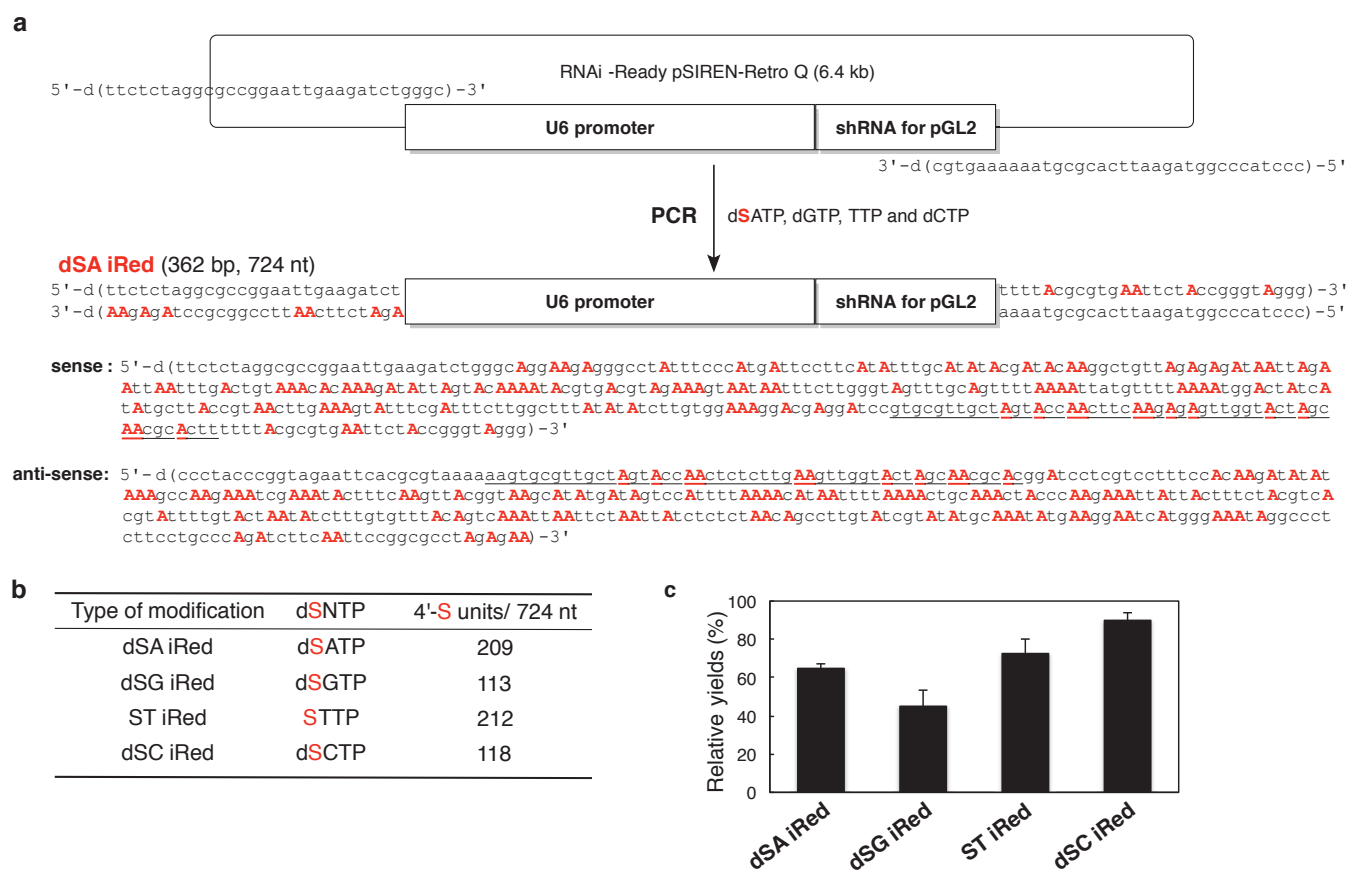


Figure 8 pGL2 標的 shRNA を発現可能な iRed の構築 (a) Schematic of dSA iRed construction and its sequences. Lowercase letters represents natural nucleotides, and bold, red uppercase letters represent 2'-deoxy-4'-thionucleoside residues. The template of the sequence encoding the shRNA sequence is underlined. (b) The numbers of 2'-deoxy-4'-thionucleoside residues in each iRed. (c) Relative amounts of amplified iReds. The y-axis indicates the replication yields relative to that in the presence of natural dNTPs using standard PCR conditions. (引用文献 36 より転載)

* Kojima らの系 (全ての dNTP を dSNTP に置き換え、104 bp の増幅産物を与える PCR) においては 10% DMSO の添加が有効であったが、iRed の構築においては添加時/非添加時において増幅効率に差が見られなかったため、DMSO の添加は行っていない。

† 鎖伸張時間は 30 sec 程度に設定するのが一般的である。

dATP のみを dSATP*に置き換え PCR を行なった (Figure 8)。得られた dSA iRed の鎖長は 362 bp であり、プラスミド (6503 bp) と比較して分子サイズを約 94%低減させることが出来た。また、dSA iRed へ導入された dSA の残基数は 209 であり、分子全体の約 29%が化学修飾ヌクレオチドにより構成される (Figure 8b)。同様に、対応する dNTP を dSNTP へと置換し、dSG iRed、ST iRed ならびに dSC iRed を調製した。各 iRed において導入された 4'-チオヌクレオチド[†]の残基数を Figure 8b に示した。iRed 全鎖長の約 71% を U6 プロモーター領域が占めるため[‡]、dSA iRed および dST iRed の場合、対応する dSNTP を含む PCR により 200 残基以上の 4'-チオヌクレオチドが導入される。一方、dSG iRed および dSC iRed の場合は約 100 残基であり、修飾様式の違いによって導入される 4'-チオ化学修飾の割合は大きく異なる。しかし、いずれの dSNTP を用いた場合にも PCR は効果的に進行し、得られた増幅産物量と dSNTP の導入数には相関が観察されなかった (Figure 8c)。すなわち、dSG iRed および dSC iRed を調製するためには、それぞれ対応する dSNTP の取り込み反応がほぼ同数回必要となるが、得られた増幅産物量は dSG iRed が最も低収率であるのに対して dSC iRed は最高収率を与えた。用いる dSNTP の種類により PCR 効率の違いが生じた要因についてはより詳細な検証が必要と考えている。しかしまずは、1 種類の残基のみを 4'-チオヌクレオチドに置換したこれらの iRed について、*in vitro* における RNAi 効果を評価することとした。

各 iRed および比較対象として shRNA 発現プラスミド、合成 shRNA ならびに iRed と同じ塩基配列を有する天然型二本鎖 DNA (natural device) (final 1.0 nM each) を pGL2 Fluc ならびに補正用として *Renilla luciferase* (Rluc) をコードする 2 種のプラスミドとともに HeLa 細胞へ共導入し、その遺伝子発現抑制効果を観察した (Figure 9a)。shRNA 発現プラスミドは 95%以上の高い RNAi 効果を示し、その効果

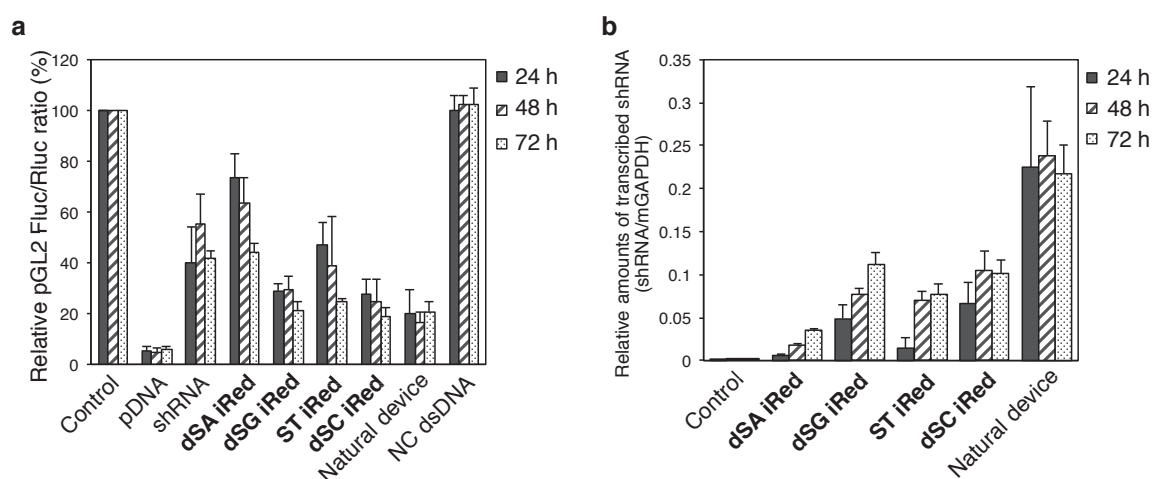


Figure 9 pGL2 標的 iRed の RNAi 効果 (a) RNAi activities of iReds compared with those of pDNA, shRNA, and dsDNA with the same sequence as the iRed (natural device). HeLa cells were transfected with each construct at 1.0 nM. (b) The amounts of shRNAs transcribed from iReds and the natural device. The shRNAs were extracted at the indicated times after transfection (1.0 nM, each construct). (引用文献 36 より転載)

* 本論において用いた dSNTP は Inoue らの報告に従い、別途化学合成した。

† 正しくは 2'-デオキシ 4'-チオヌクレオチドと記載すべきであるが、本論では 4'-チオヌクレオチドと称す。

‡ 一般にプロモータ領域には、TATA Box などの A:T ペアに富む配列が多く観察される。

は 72 時間後も持続することが明らかとなった。同モル濃度条件下、合成 shRNA はプラスミドよりは劣るものの Fluc 遺伝子の発現を抑制した。一方、4'-チオ DNA により構成される iRed は、修飾様式に応じて活性が異なるものの、いずれの iRed も合成 shRNA とほぼ同程度の遺伝子発現抑制活性を有することが明らかとなった。iRed の修飾様式の違いによる活性変化は、導入された 4'-チオヌクレオチドの数 (Figure 7b) と良い一致を示した。すなわち、分子中に 200 残基以上の 4'-チオヌクレオチドを有する dSA iRed および ST iRed ではその活性が中程度であるのに対して、4'-チオヌクレオチドの含有率が低い dSG iRed および dSC iRed では合成 shRNA 以上の高い RNAi 効果を示した。また、いずれの iRed においても、その遺伝子発現抑制効果は時間経過につれて増強することが明らかとなった。

さらに、観察された遺伝子発現抑制効果が、間違いなく iRed (= 4'-チオ DNA) からの shRNA 産生を介したものであることを確認するため、細胞内の shRNA 発現量を評価した (Figure 9b)。その結果、shRNA 量と観察された遺伝子発現抑制効果は非常に良い一致を示し、dSC iRed からの転写効率が最も優れていることが明らかとなった。この時、各 iRed から転写された shRNA 量は natural device と比較して半分以下であるにも関わらず、dSC iRed と natural device はほぼ同等の遺伝子発現抑制効果を発揮した理由として、産生された shRNA から構成される RISC が触媒的に機能することが考えられる。すなわち、dSC iRed から産生される shRNA 量は *in vitro* において RNAi 効果を得るための十分量を満たしており、一方 natural device からは過剰量の shRNA が産生されていると考察した。以上の結果より、4'-チオ DNA により構成される iRed は DNA ポリメラーゼによる複製反応のみならず細胞内 RNA polymerase III による転写反応においても天然型 DNA の等価体として機能し、遺伝情報の複製および伝達を担うことが明らかとなった。詳細は次節で述べるが、細胞内において天然型 RNA を転写可能な化学修飾 DNA の報告例は極めて少なく、糖部修飾型核酸では初めての例である。また、内在性 RNA ポリメラーゼにより認識を受けるプロモーター配列中への化学修飾核酸の導入は報告例がなく、合成生物学の観点からも興味深い知見を与えるものである。

続いて、iRed を利用した遺伝子発現抑制法の一般性を確認するため、新たに pGL3 Fluc を標的とした iRed を作成し、その RNAi 効果を検証することとした。

先と同様に、pGL3 Fluc を標的とした shRNA 発現プラスミドのうち U6 プロモーターおよび shRNA コード領域とをテンプレートとし、1 種類の dNTP のみを対応する dSNTP に置換して PCR を行なった。作成した pGL3 標的 iRed の配列および各 iRed 中に導入された 4'-チオヌクレオチド数を Table 2 に示し

Type of modification	dSNTP	4'-S units/ 730 nt
dSA iRed	dSATP	211
dSG iRed	dSGTP	123
ST iRed	STTP	214
dSC iRed	dSCTP	120

Table 2 各 pGL3 標的 iRed に含まれる 4'-チオヌクレオチド数
(引用文献 36 より転載)

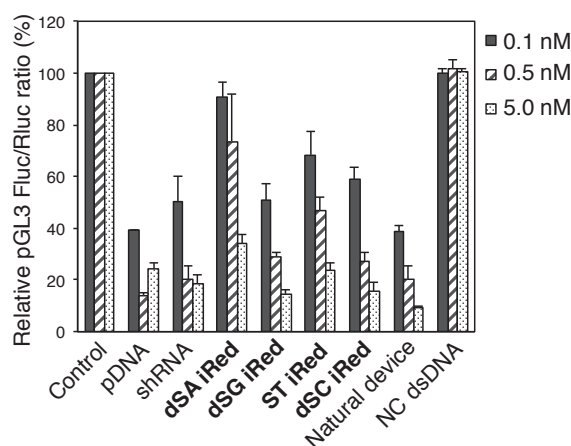


Figure 10 pGL3 標的 iRed の RNAi 効果 HeLa cells were transfected with all samples at the indicated concentrations. (引用文献 36 より転載)

た。pGL3 標的 iRed の場合においても、iRed 全鎖長の約 71%を U6 プロモーター領域が占めるため、修飾様式に応じて導入される 4'-チオ化学修飾の割合は pGL2 標的 iRed の場合と同様の傾向を示し、dSA iRed および ST iRed において高く、dSG iRed および dSC iRed において低くなっている。

Figure 10 に示したように、pGL3 標的 iRed は HeLa 細胞において濃度依存的な RNAi 効果を示した。また、その活性は pGL2 標的 iRed の場合と同様の傾向が観察された。すなわち 4'-チオ化学修飾の割合が高い dSA iRed および ST iRed では中程度の遺伝子発現抑制効果を示したのに対して、4'-チオヌクレオチドの導入数が少ない dSG iRed および dSC iRed では pGL3 Fluc 発光が顕著に抑制されることが明らかとなった。さらに、iRed の標的的特異性を確認するため、先に調製した pGL2 標的 iRed を pGL3 Fluc 発現 HeLa 細胞へ導入し、その RNAi 効果の評価した。その結果、pGL3 Fluc 発光の減弱はほとんど観察され

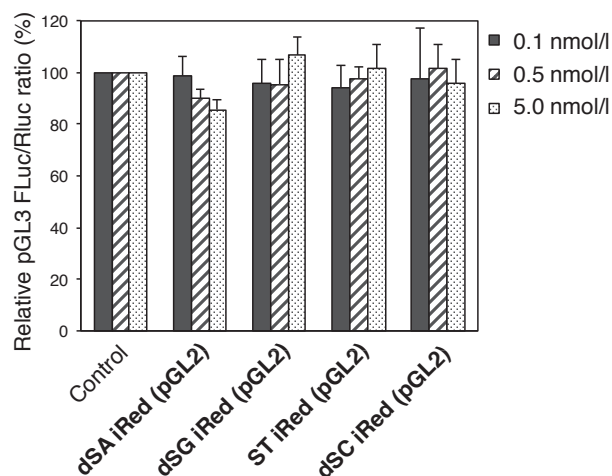


Figure 11 pGL2 標的 iRed の pGL3 iRed に対する遺伝子発現抑制効果 HeLa cells were transfected with all samples at the indicated concentrations. (引用文献 36 より転載)

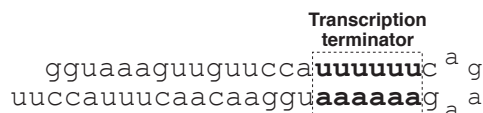


Figure 12 Transcription terminator を有する pGL3 標的 shRNA の構造

なかったことから、iRed を用いた RNAi 誘導法はアミノ酸相同性の高い遺伝子間においても高い配列特異性を有していることが明らかとなった (Figure 11)。

ところで、shRNA 発現プラスミドからの RNA polymerase III による shRNA 転写は、U6 プロモーターにより開始され、5 残基以上の T の連続 (polyT transcription terminator) により終結する。したがって、高い遺伝子発現抑制効果が報告されている shRNA 配列においても、その配列中に 5 残基以上連続する poly-U 配列を有する場合、プラスミドからの転写により RNAi を誘起することは出来ない。著者は、4'-チオ DNA により構成される iRed においてもこの termination rule が保存されるかに興味を持ち、検証することとした。すなわち、配列中に 6 連続の poly-U 配列すなわち transcription terminator を有する pGL3 標的 shRNA (Figure 12) をコードする iRed を作成し、その RNAi 効果を対応する合成 shRNA ならびに shRNA 発現プラスミドのものと比較した (Figure 13)。合成 shRNA は transcription terminator の影響を受けないため、配列特異的な RNAi 効果を示した。等モル濃度条件下、iRed を導入した場合、いずれの修飾様式においても顕著な Fluc 活性の減弱は観察されなかった。すなわち、termination rule が正しく保存されることが明らかとなった。一方、shRNA 発現プラスミドは、理論上、shRNA 産生が起こらないにも関わらず、pGL3 Fluc 発光の減弱が観察された。これは、shRNA の発現によらない非特異的な遺伝子発現抑制効果であると考えられる*。以上のことから、iRed は 4'-チオ化学修飾の導入にも関わらず、正

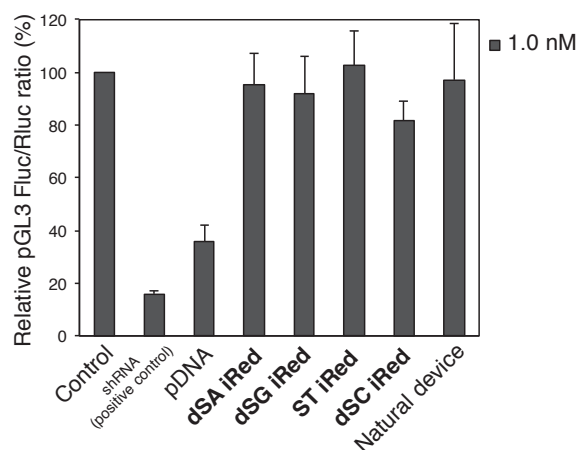


Figure 13 Transcription terminator 配列を有する shRNA をコードする iRed の遺伝子発現抑制効果 (引用文献 36 より転載)

* Figure 9-11 に示した RNAi 効果の評価においては control としてスクランブル RNA 配列をコードする dSC iRed を細胞内導入した場合の Fluc/Rluc 値を用いた。

しく shRNA 配列をコードし、標的特異的な RNAi を誘起することが確認された。

以上述べたように、iRed は 4'-チオ化学修飾の導入にも関わらず、*in vitro* において配列特異的かつ高い RNAi 効果を誘導することが明らかとなった。また、その活性は dSC iRed を用いた場合に最も高く、合成 shRNA 以上の遺伝子発現抑制効果が観察された。iRed の修飾様式の違いによる活性変化やプラスミドと比較して RNAi 効果発現に遅れが生じた要因としては、細胞内での shRNA 発現に大きく関与する U6 プロモーター配列への 4'-チオヌクレオチドの導入による影響^{*}や分子全体の脂溶性向上による細胞核内への導入効率の変化が挙げられるが、その詳細は今後の検討課題である。

^{*} U6 プロモーターの他、内在性の RNA ポリメラーゼに認識を受けるプロモーター配列中への化学修飾の導入は未だ報告例がないものの、試験管内 RNA 転写反応に用いる T7 RNA プロモーターにおいては RNA コード領域と比較してプロモーター領域への化学修飾の導入は RNA 発現に大きな影響を与えることが知られている。

第2節 Malignant pleural mesothelioma (MPM) mouse model における *in vivo* 遺伝子発現抑制効果の評価³⁶

第1節において、4'-チオ DNA により構成される iRed は哺乳細胞内 (*in vitro*) において天然型 DNA と同様に遺伝情報として機能し、shRNA の産生を介して RNAi を誘起することを明らかにした。第2節においては malignant pleural mesothelioma (MPM) mouse model における iRed の *in vivo* 遺伝子発現抑制効果について述べる。

核酸医薬開発においては、核酸分子の生体内安定性の乏しさゆえに、*in vitro* で高い効果を示したにも関わらず、*in vivo* では十分な活性が観察されない場合が数多くある。また哺乳動物 (*in vivo*) において天然型 RNA を転写可能な化学修飾 DNA については報告例がなく、合成生物学的の観点からも iRed の *in vivo* 遺伝子発現抑制効果には興味もたれる。

ルシフェラーゼ恒常発現ヒト悪性胸膜中皮腫細胞 (human pleural mesothelioma cells: MSTO-211H-Luc) を胸腔内に移植した BALB/c *nu/nu* mouse (MPM model mouse) に対して、腫瘍移植後 (Days 8 and 11)、pGL3 標的 dSC iRed ならびに比較対象として等モル量の shRNA、natural device、および negative control dsDNA (NC dsDNA) を胸腔内投与し*、Days 7、10 および 13 に *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて、RNAi 効果を評価した (Figures 14 and 15)。なお、用いた pGL3 標的 dSC iRed、natural device ならびに shRNA の配列は本論第1章第1節 Figure 10 におけるものと同じである。

無処置群 (control) では、Day 13 に最大のルシフェラーゼ発光が観察され、移植した腫瘍細胞の顕著な増殖が確認された。同様の活性変化は NC dsDNA だけでなく shRNA 投与群においても観察された。すなわち天然型 shRNA は、第1節で述べた *in vitro* 評価においては十分な活性を示したにも関わらず (Figure 10)、*in vivo* においては十分な遺伝子発現抑制効果を発揮出来ないことが示された。一方、dSC iRed および natural device 投与群では顕著なルシフェラーゼ活性の減弱が観察された。これは、MPM model mouse においても 4'-チオ DNA が天然型 DNA 等価体として機能し、RNAi を誘起した結果であると考えられる。またこの時、いずれの処置群においても顕著な体重変化が観察されなかったことから (Figure 15c)、dSC iRed は非特異的な副作用を示すことなく高い遺伝子発現抑制効果を発揮したと言える。

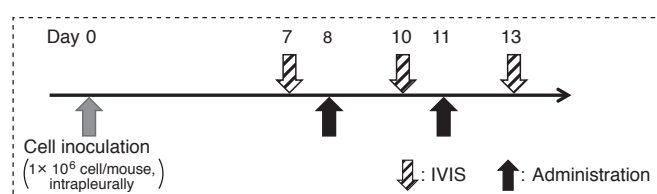


Figure 14 *In vivo* 遺伝子発現抑制評価 投与スケジュール

* 胸腔内投与は、市販されている *in vivo* 用のトランスフェクション試薬「TurboFect Transfection Reagents」を用いて実施した。また、プラスミドは同条件における *in vivo* での細胞内導入が困難であるため、比較対象から除外した。

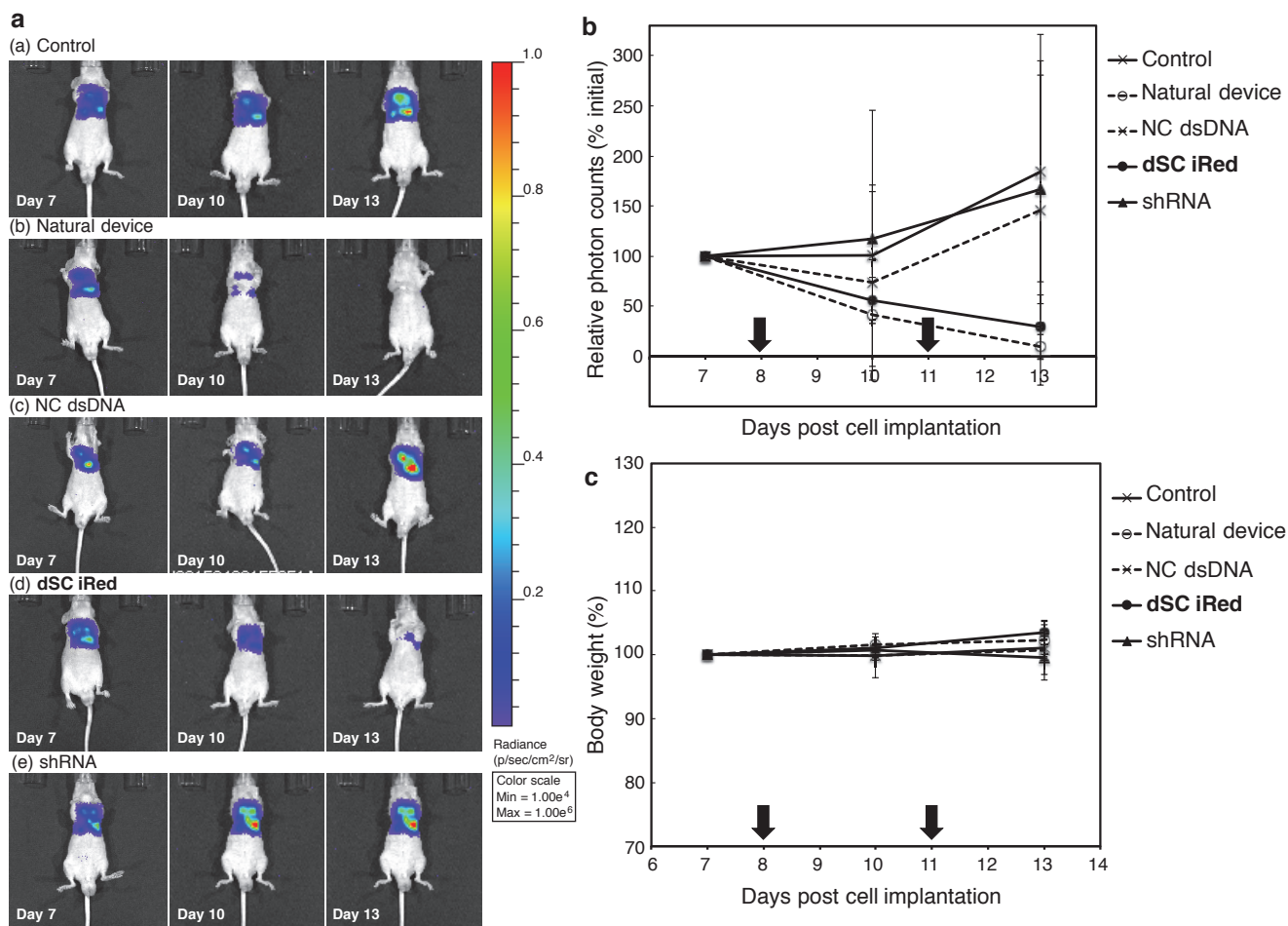


Figure 15 MPM mouse model における iRed の *in vivo* 遺伝子発現抑制効果 (a) IVIS によるルシフェラーゼ発光の観察 (b) 遺伝子発現抑制効果の評価 Data are expressed as the mean of relative photon counts to that of the initial (%) (c) 投与時における体重変化 Data are represented as the mean of % initial body weight \pm standard deviation. The arrows indicate the administration of samples. The error bars indicate the standard deviation of three or more independent experiments. (引用文献 36 より改変)

ところで、*Escherichia coli* (*E. coli*) において天然型 DNA と同様に遺伝情報として機能する化学修飾 DNA はこれまでにわずかながら報告がある。Krueger らは*、天然塩基と同じ水素結合様式を有するが、

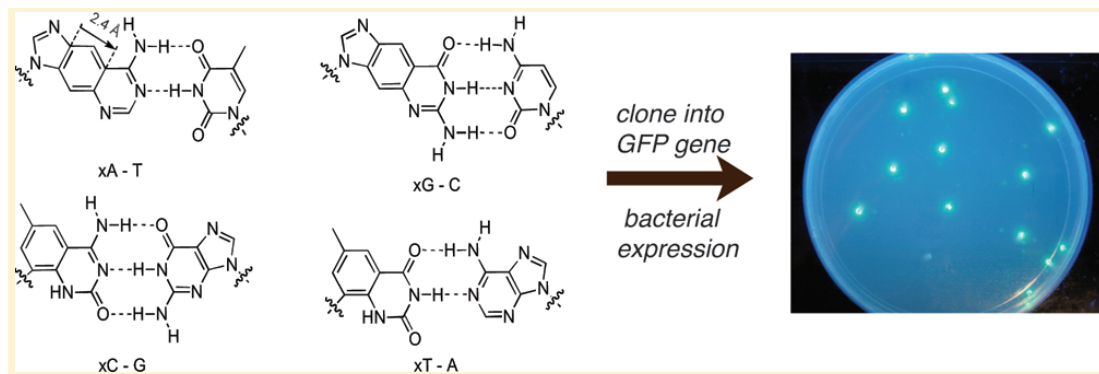


Figure 16 環拡張型塩基対導入プラスミドによる遺伝子発現 (引用文献 46 より転載)

* 本論第2章で述べる Kool らのグループによる報告である。

糖部 1'-位間の距離が天然型 WC 塩基対に比べて大きくなるような環拡張型塩基対 (xDNA) を配列中に数残基含む GFP 発現プラスミドを作成し、このものが *E. coli* の内在性 RNA ポリメラーゼにより、正確に mRNA へと転写され、GFP を発現することを明らかとしている (Figure 16)⁴⁶。

また、Brown らのグループは配列中に 1 箇所、非天然型のトリアゾール結合 (Figure 17) を有するプラスミドを作成し、先と同様に *E. coli* において mRNA への転写が進行することを報告した^{47-49*}。しかし、本研究のように高度に修飾された DNA が哺乳動物において遺伝情報として機能したという例はない[†]。これは 4'-チオ DNA が有する生物学的等価性の高い分子デザインが有利に働いた結果であると考えている。

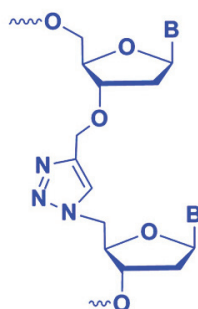


Figure 17 トリアゾール結合を有する DNA の構造
(引用文献 47 より転載)

以上、本章第 1 節ならびに第 2 節では 4'-チオ DNA により構成される iRed が *in vitro* だけでなく *in vivo* においても高い遺伝子発現抑制効果を発揮することを明らかとした。4'-チオ DNA は、DNA ポリメラーゼによる複製反応ならびに細胞内 RNA ポリメラーゼによる転写反応において天然型 DNA の等価体として機能し、遺伝情報の保存・伝達を担うことが示唆された。

* *in vitro* 系ではあるが、哺乳動物細胞においても遺伝情報として機能することが明らかとされている⁴⁹。

† *in vitro* (細胞系) および *in vivo* の両方において報告例はない。

第3節 iRed の自然免疫応答回避能の評価³⁶

我々の細胞は細菌やウイルスによる感染症の脅威に晒されており、免疫機構によって戦っている。これは元来生物の生存に必須の機構であるが、核酸医薬開発においては自然免疫応答に基づく副作用発現の要因となる。自然免疫応答を司る生体防御の最前線には、パターン認識レセプター (pattern recognition receptors: PRRs) が陣取り、外敵のもつ特殊な構造体を認識する。特に、外来性核酸の認識に関与するのは PRRs の一種である Toll 様受容体 (Toll like receptor: TLR) であり、二本鎖 DNA の場合、主に TLR9 がその認識に深く関与していると考えられている⁵⁰。細胞外から二本鎖 DNA がエンドソーム内に取り込まれると、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) から TLR9 がエンドソーム膜表面に提示される (Figure 18)。TLR9 は、エンドソームにてプロセッシングを受けた後、外来性二本鎖 DNA の非メチル化 CpG 配列を認識する。TLR9 のシグナル経路では、myeloid differentiation marker 8 (MyD88) を中心として、IL-1 receptor associated kinase 1 (IRK1)、IRAK4、TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) および IRF-7 がおそらく複合体を形成し、下流のシグナル伝達を活性化すると考えられている。したがって TLR9 は I 型 IFNs を発現する IRF-7 経路と炎症性サイトカインなどの発現を誘導する NF-κB (nuclear factor-kappa B) 経路の二つの経路をともに活性化し、強力な自然免疫応答の引き金となる。

序論で述べたように、自然免疫応答の賦活化に起因する副作用発現を如何に回避するかは核酸医薬開発の大きな課題である。iRed は shRNA 発現プラスミドの最小化と 4'-チオ化学修飾の導入により免疫

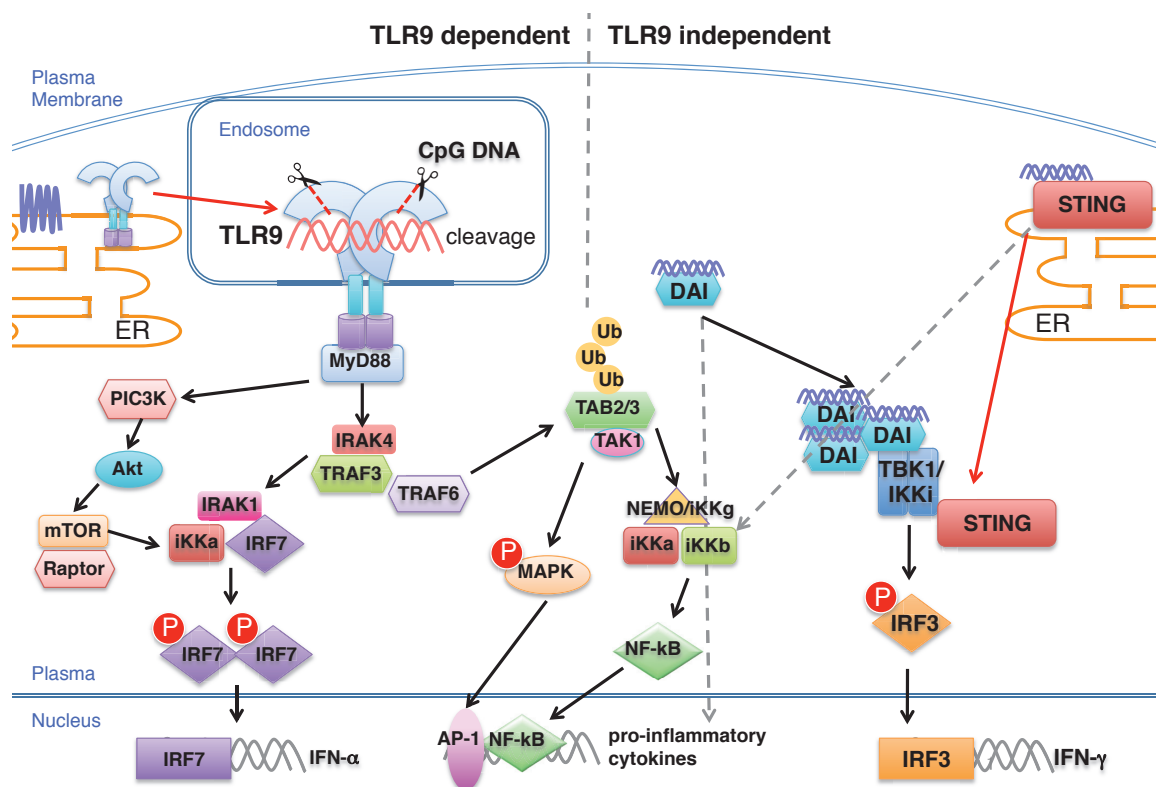


Figure 18 外来性 DNA による自然免疫応答発現機構

原性の低下を期待した分子である。そこで本節では、iRed の投与により誘導される炎症性サイトカインならびに I 型インターフェロンなどの自然免疫応答について評価を行なった。

dC あるいは T 残基が 4'-チオヌクレオチドに置換された shGL2 発現 iRed* を PEG 修飾カチオニックリポプレックス† とし、BALB/c mouse に投与することで、自然免疫応答誘導を評価した。まず、作成したリポプレックスの物理学的性質を同質量の shRNA 発現プラスミドならびに natural device のものと比較したところ、ゼータ電位ならびに粒子径には大きな違いがないことが確認された (Table 3)。

Samples	Particle syze (nm)	Zeta potential (mV)
pDNA	235.3 ± 6.6	18.9 ± 0.3
Natural device	339.1 ± 27.4	35.1 ± 0.3
ST iRed	313.0 ± 11.2	38.1 ± 0.6
dSC iRed	322.5 ± 4.5	37.7 ± 0.4

Table 3 PEG 修飾リポプレックスの物理学的性質評価

このものを BALB/c mouse に尾静脈内投与し、4 時間後の血清中の I 型インターフェロン (INF- α) および炎症性サイトカイン量 (IL-6, INF- γ , TNF- α) を評価した (Figure 19)。まず、プラスミド-PEG 修飾カチオニックリポプレックスを投与した場合、いずれの評価においても強力な自然免疫応答が誘起された。一方、分子サイズの最小化のみを施した natural device-PEG 修飾カチオニックリポプレックスでは、プラスミドと比較して誘導量の減弱が確認された。Table 4 に各 DNA における分子量の比較を示した。Natural device は shRNA 発現プラスミドと比較して分子量が大幅に低下しているにも関わらず、特に INF- α の産生誘導を十分に回避出来ていない。すなわち配列の最小化のみでは自然免疫応答を完全には回避出来ないことが明らかとなった。

Samples	Molecular size	Nucleotide length
pDNA	2006041.7	6503
Natural device	112200.2	362
ST iRed	115607.0	362
dSC iRed	114096.5	362

Table 4 各 DNA サンプルにおける分子量比較

それに対して 4'-チオ化学修飾を導入した iRed では、修飾様式に関わらず、I 型インターフェロンおよび炎症性サイトカイン応答を全く誘起せず、その血清中濃度は無処置群 (non-treatment) と同等であった。

* 本論第1章第1節において作成した pGL2 標的 iRed (Figure 8) に同じ。

† Hashimoto および Ishida らは、免疫原性を有した核酸分子-PEG 修飾カチオニックリポプレックスの生体内投与が、抗 PEG 抗体産生の引き金となることを報告している^{51,52}。

第1章 第3節
iRed の自然免疫応答回避能の評価

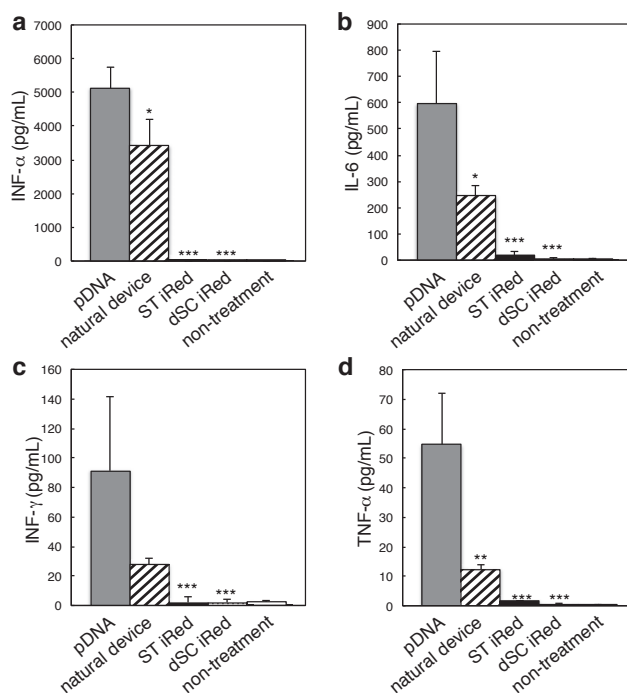


Figure 19 自然免疫応答誘導能の評価 Levels of (a) TNF- α , (b) IL-6, (c) INF- γ , and (d) INF- α induced by PEGylated lipoplexes each containing 20 μ g of the pDNA, natural device, ST iRed, or dSC iRed. Each sample was designed to transcribe a shRNA targeting pGL2 Fluc. Four hours after intravenous injection, the serum level of each molecular was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay. Error bars indicate the standard deviations of three independent experiments. The p-values indicate the statistical difference between the mice treated with pDNA and the mice treated with natural device, ST iRed or dSC iRed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (引用文献 36 より転載)

この結果は、分子サイズの低減と 4'-チオ化学修飾の導入が相乗的に働いたためであると考えられる。ごく最近、Ohto および Shimizu らは、TLR9 による CpG DNA の認識機構を X 線結晶構造解析により明らかとした⁵³。彼らの報告によると、CpG モチーフの認識においては塩基部との相互作用の他に、リン酸部が TLR9 の Lys51 (K51)、Arg74 (R74)、His76 (H76)、His77 (H77) と静電相互作用を形成しているこ

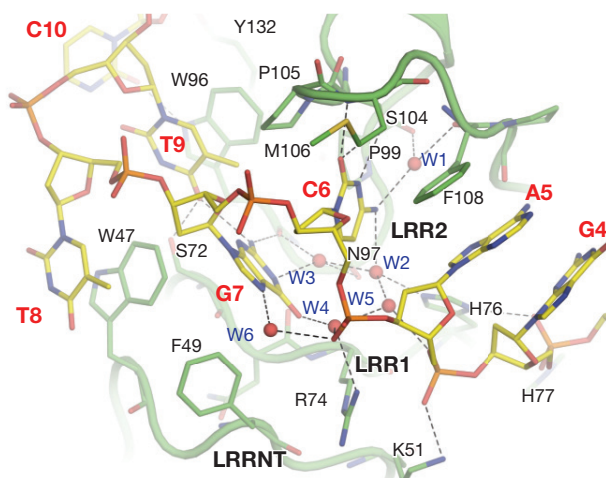


Figure 20 CpG DNA と TLR9 の相互作用様式 (引用文献 53 より転載)

とが明らかとされた (Figure 20)。ヌクレオチド糖部と TLR9 の直接的な相互作用はそれほど大きくないものの、4'-位酸素原子を硫黄原子に置換することにより生じたコンフォメーション変化 (Figure 21)⁵⁴がリン酸部と TLR9 の相互作用へ影響を与え、自然免疫応答の惹起を回避したと考えられる。

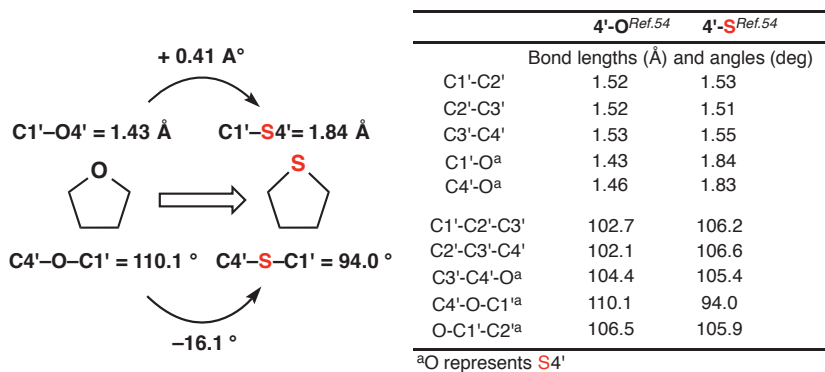


Figure 21 4'位化学修飾の導入による糖部のコンフォメーション変化

すでに我々は、完全化学修飾型として化学合成された 4'-チオ DNA は天然型 DNA とは異なり A 型様の二本鎖構造をとることを報告している (Figure 22)^{41,42}。iRed は部分化学修飾型の 4'-チオ DNA により構成されることから必ずしも A 型様の二本鎖構造を呈するとは限らないが、その CD スペクトル測定し natural device のものと比較したところ、両者の間には何らかの高次構造変化が生じていることが示唆された (Figure 23)*。

このような高次構造変化に基づいて 4'-チオ DNA が単に TLR9 の認識を逃れたのか、あるいはアンタゴニスト様に働いたのかは不明であるが、4'-位酸素原子の硫黄原子への置換は、マクロな分子認識と核酸二重らせん高次構造変化の両面から DNA に起因する自然免疫応答を回避する手法として極めて有効であることが示唆された。

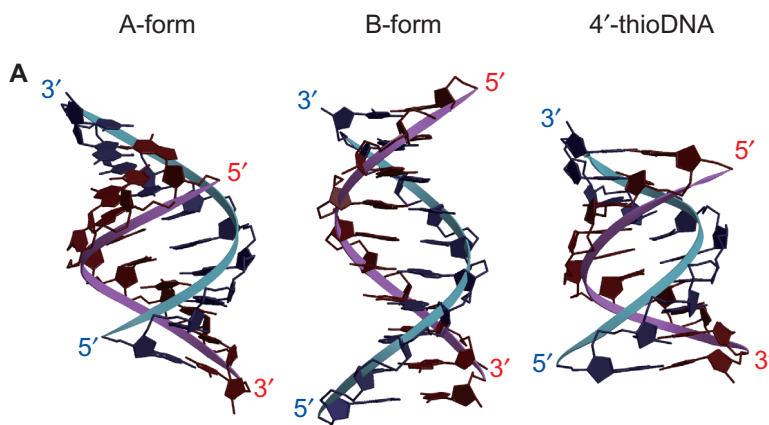


Figure 22 NMR 解析に基づく完全修飾型 4'-チオ DNA の二重らせん構造 (引用文献 42 より転載)

* 両者の CD スペクトルは全くことなるコットン効果を示したが、らせん構造の形を推定することは困難であった。

第1章 第3節
iRed の自然免疫応答回避能の評価

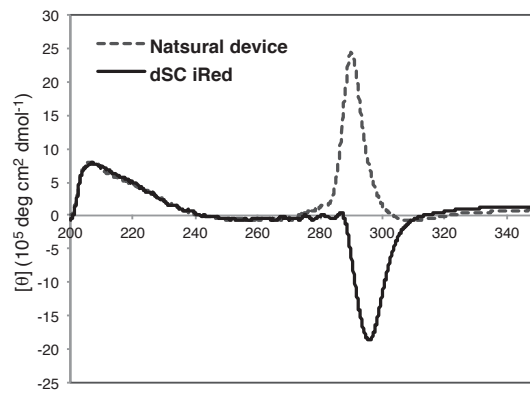


Figure 23 dSC iRed および natural device の CD スペクトル The solution containing samples (1.5 μM each) in a buffer of 10 mM Na cacodylate (pH 7.0) containing 100 mM NaCl was prepared, and the sample spectra were subtracted from the buffer spectrum.

第2章 第2世代環状型 iRed の開発研究

第1章では、糖部修飾型核酸 4'-チオ DNA を利用した新規 shRNA 発現デバイス iRed の開発研究について述べた。

iRed は、shRNA 発現プラスミドのうち shRNA 発現に最小限の領域 (U6 プロモーター+shRNA コード領域) をテンプレートとし、dSNTP を含む PCR により調製される。dSNTP はいずれの残基においても DNA ポリメラーゼの良好な基質となり、dNTP (天然型) と比較して遜色ない効率で対応する iRed を与えた。また得られた iRed を HeLa 細胞へ導入したところ、shRNA の産生を介した配列特異的な RNAi 効果が観察された。また、*in vitro* において最も高い活性を示した dSC iRed について MPM mouse model における *in vivo* 遺伝子発現抑制効果を評価したところ、等モル量の合成 shRNA がほとんど効果を示さなかったのに対し、dSC iRed は高い標的遺伝子抑制活性を發揮した。さらに、iRed は配列の“最小化”と“4'-チオ化学修飾”の導入により、mouse 尾静脈内投与時においても全く自然免疫応答を誘起しないことが明らかとなった。

以上のように、4'-チオ DNA により構成される iRed は分子の構築ならびに遺伝子発現抑制に必須の酵素である DNA ポリメラーゼおよび RNA ポリメラーゼには天然型 DNA 等価体として認識されるにも関わらず、免疫原性の引き金となる TLR9 の認識においては外来性 DNA 分子として認識されない“intelligent”な性質を有する。しかし依然、iRed は二本鎖の DNA 分子に過ぎず、DNA 分子の主要な分解酵素であるエキソヌクレアーゼによる二本鎖両末端部からの分解に対して十分な抵抗性を有しているとは言い難い。そこで第2章では、これらの問題の解決ならびに更なる高機能化を目的とした第2世代環状型 iRed の開発研究について述べる。

第1節 第2世代 iRed の構築戦略

先に述べたように外来より取り込まれた核酸分子は、生体内に普遍的に存在するヌクレアーゼにより速やかに分解を受ける。したがって、核酸分子の医薬開発においては、生体内安定性の付与が極めて重要な検討課題である。4'-チオ DNA のようなヌクレオチドレベルでの化学修飾の導入は有用な解決策の1つであるが、その他に、分子全体の高次構造変換によりヌクレアーゼ抵抗性を付与する試みが知られている⁵⁵⁻⁶¹。

DNA 分子を利用した核酸創薬手法の1つであるデコイ法*において、その成功例の1つが二本鎖 DNA の環状化である。二本鎖 DNA の両末端を架橋することにより得られるダンベル (リボン) 型 DNA (Figure 24) は高い熱的安定性を示すだけでなく、DNA の主要な分解酵素であるエキソヌクレアーゼに対して極めて高い耐性を有する⁵⁵。このダンベル型デコイ分子は *in vivo* においても高い有効性を示すことが明らかとされており、転写因子 NF-κB を標的としたダンベル型デコイオリゴを利用したアトピー性皮膚炎治療薬の開発が進められている[†]。

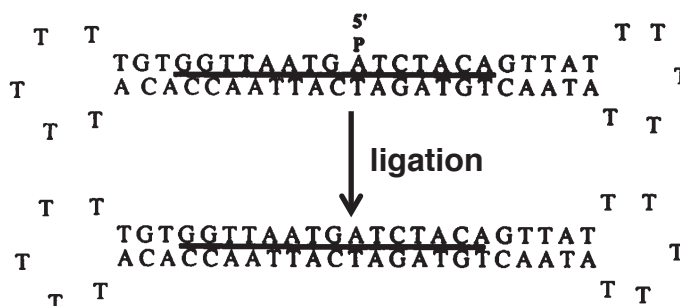


Figure 24 ダンベル型の構造 Depicts the structure and sequence of the oligonucleotides. The position of the nick being indicated by 5'P. (引用文献 55 より改変・転載)

一般的にダンベル型デコイは対応するオリゴヌクレオチドから T4 ライゲースを用いたライゲーションにより構築される。しかし、この方法により得られたデコイ分子は、ループ部分が一本鎖構造であるためにエンドヌクレアーゼに対する切断を受けてしまう。そこで、より効果的な環状 DNA の合成に向けて、化学的手法により二本鎖末端の環状化を行なう試みが報告されている^{56,58,61}。

その一例として Nakane らは Figure 25 に示すような 2 つの T 誘導体を用いて DNA 二本鎖の両末端にアジド基とアルキンを導入し、copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction により両末端を架橋させたダンベル型 DNA の合成を報告した⁵⁸。本方法で形成されるトリアゾール環は強固な結合であり、架橋反応も速やかに進行することが明らかとされている。また、先の酵素的手法により得ら

* 転写因子が認識する特定の塩基配列を有する二本鎖 DNA をおとり (= デコイ) として用いることにより、その結合を阻害する核酸創薬手法の1つ。

† アンジェス MG 社により 2015 年 3 月より国内第三相臨床試験が開始されている。日本初の国産核酸医薬品として期待されている。

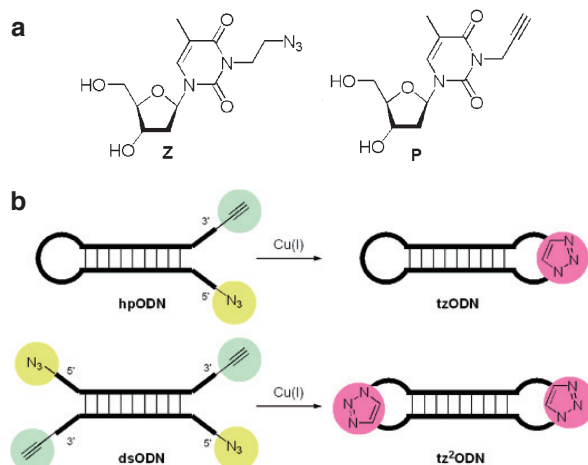


Figure 25 CuAAC 反応に基づくダンベル型 DNA の合成法
 (引用文献 58 より改変)

れるダンベル型 DNA とは異なり一本鎖領域を最小化出来ることからエキソ/エンドヌクレアーゼの両方に高い耐性を有した分子の構築が可能となる。

そこで著者は iRed の両末端部を CuAAC 反応により閉環状とすることでエンドヌクレアーゼに対する抵抗性を高めるとともに、予期せぬゲノム挿入*を回避出来るのではないかと考えた。しかし iRed は PCR により構築される分子であるため、Nakane らの化学合成によるダンベル型 DNA のように任意の位置だけに選択的な反応性官能基 (アジド基とアルキン) の導入を行なうことは困難である。これを実現するため、Figure 26 に、ワトソン-クリック塩基対に続く第3番目の人工塩基対を利用した第2世代環状型 iRed の構築戦略を計画した。

すなわちまず、PCR に用いるプライマーとして 5'末端にアジド基を有する人工塩基対 (ここでは X) を導入したものを、対応する Y 三リン酸体 (dYTP) にエチニル基を導入する。これらの基質を

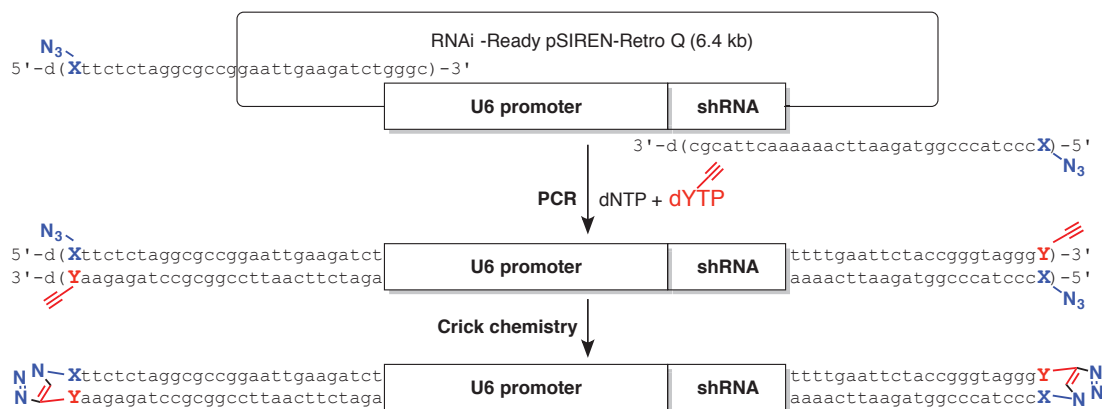


Figure 26 第2世代環状型 iRed の構築戦略

* 序論で述べたように種々の遺伝子導入ベクターの医薬応用において、導入した DNA 分子の染色体への取り込みによる遺伝子変異が問題視されている。iRed の環状化により、ゲノム DNA とのラゲージョン部位となる二本鎖末端が保護されるため、予期せぬゲノム挿入が抑制されると期待される。

用いて PCR を行なうと、エチニル基を有する dYTP はプライマー上の X の相補位置に特異的に取り込まれると考えられる。これにより、iRed の二本鎖両末端部位選択的に反応性残基を導入することが可能となる。続いて、この反応性残基を足がかりとして CuAAC により架橋形成を行なうことで、最小化ならびに環状化により高度に安定化された第2世代環状型 iRed を創製出来ると考えた。

第2節 ワトソン-クリック塩基対に続く第3番目の人工塩基対 (ImN^N:NaO⁰) の開発研究

本章第1節では人工塩基対を足がかりとした第2世代環状型 iRed の構築戦略について述べた。本節では、これを達成するために著者が取り組んだワトソン-クリック塩基対に続く第3番目の人工塩基対 (ImN^N:NaO⁰) の開発研究について述べる。

DNA 二重らせん構造において核酸塩基部は A (アデニン) : T (チミン) および G (グアニン) : C (シトシン) ペアからなるワトソン-クリック塩基対を特異的に形成している (Figure 27a)。このワトソン-クリック塩基対の特徴として、1) 塩基対間の水素結合形成と 2) 形の相補性の二つが挙げられる。すなわち、A:T 塩基対は A が水素結合のドナー、アクセプター (DA)、T がアクセプター、ドナー (AD) の組み合わせからなる二本の水素結合、また G:C 塩基対は G が ADD、C が DAA の組み合わせからなる三本の水素結合によりペアを形成している。A:T と G:C 塩基対では水素結合のドナー (D) とアクセプター (A) の並びが異なっており、これらの組み合わせを入れ替えることは出来ない。また、塩基対は必ず大きいプリン環 (Pu) と小さいピリミジン環 (Py) の組み合わせからなり、これはペアを形成する塩基対どうしの形の相補性と呼ばれている (Figure 27b)。

このような水素結合の組み合わせと形の相補性に基づく特異的な塩基対形成により DNA は B 型の二重らせん構造を維持し、また塩基配列の正確な保存と伝達が可能となる。PCR 法などもこのような塩基対形成の特異性を基本原理としており、バイオテクノロジーの上でも大きな意義を持つ。

近年、DNA に人工的に合成した新たな塩基対を組み込むことで遺伝暗号の拡張を行い*、これをバイオテクノロジーに応用しようとする試みがなされている^{62,63}。

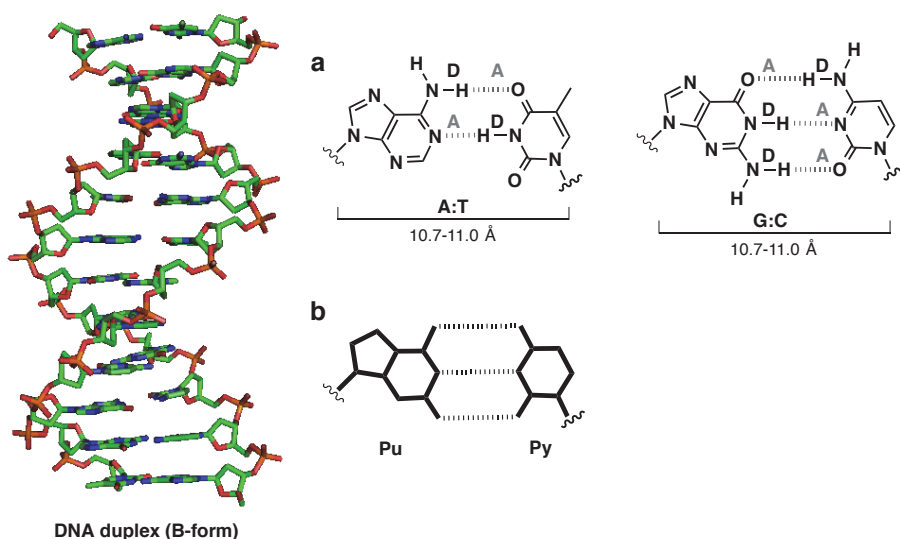


Figure 27 Watson-Crick 塩基対 (a) 水素結合様式; (b) 形の相補性

* ワトソン-クリック塩基対に1組の人工塩基対を組み込むことが出来れば、利用できる核酸塩基は6種類になるため、遺伝暗号は現在の4³(64 枠) から6³(216 枠) まで拡張される。

Benner らのグループは、塩基対間の水素結合に関わるプロトンドナーとプロトンアクセプターの組み合わせが A:T および G:C 塩基対のパターン以外にも設計可能であることに着目し^{*}、種々の人工塩基対の設計・開発を行っている (Figure 28)⁶⁴。例えば、彼らが作り出した isoG:isoC 塩基対 (Figure 28a) は G の 2 位のアミノ基と 6 位のケト基を入れ替えた isoG と、C の 2 位のケト基と 4 位のアミノ基を入れ替えた isoC からなり、DDA:AAD 型の三本の水素結合の組み合わせにより塩基対を形成する⁶⁵。この isoG:isoC 塩基対は大腸菌の I 型 DNA ポリメラーゼである Klenow fragment (exo-) (KF⁻) によって相補塩基として認識され、DNA 鎖に取り込まれることが明らかとなっている⁶⁶。さらに彼らは、水素結合の並びが異なる X:k 塩基対 (ADA:DAD) (Figure 28b)⁶⁷ や P:Z 塩基対 (AAD:DDA) (Figure 28c)⁶⁸ についても研究を展開しており、X:k 塩基対はウイルス由来の HIV-1 reverse transcriptase に、P:Z 塩基対は Deep Vent (exo⁻) ポリメラーゼ[†]によってそれぞれ相補塩基として取り込まれ、鎖伸長が起こることを報告している。また、こうして開発された新規人工塩基対をバイオテクノロジーの技術に利用する試みも行われている。例えば Bain らは、先に挙げた isoG:isoC 塩基対を利用し、試験管内のタンパク質合成系において、非天然型アミノ酸 (3-ヨードチロシン) を導入した短いペプチド鎖を合成することに成功している⁶⁹。またごく最近、A:T ペアおよび G:C ペアからなるワトソン-クリック塩基対に P:Z 塩基対を加えた six-letters synthetic genetic system[‡]を利用した cell SELEX 法[§]により、HepG2 liver cancer cell に対する高活性な DNA アプタマーを取得することにも成功している (Figure 29)⁷⁰。彼らの cell SELEX において、P あるいは Z 塩基を含まない (WC 塩基対によってのみ構成される) DNA アプタマーは十分な結合親和性を発揮しなかったことから、six-letters synthetic genetic system に基づく構造多様性は DNA アプタマーの獲得に有利に働いたと言える。

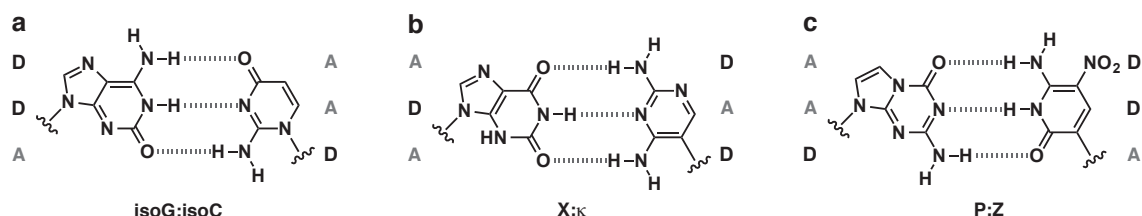


Figure 28 Benner らのグループによる人工塩基対の開発研究

一方、Kool らは DNA の複製過程における特異的な塩基対認識のメカニズム解明を目的として、塩基対間に水素結合を形成しない疎水性の人工塩基対について研究を行っている^{71,72}。

^{*} 塩基対間の水素結合を三本と仮定すれば、理論上 $2^3 = 8$ 通りの水素結合の組み合わせを持つ塩基対ライブラリーを構築出来る。

[†] 他にも Taq ポリメラーゼや Vent (exo⁻) ポリメラーゼなど数多くのポリメラーゼによって相補塩基として認識される。

[‡] Benner らのグループはワトソン-クリック塩基対に P:Z 塩基対を加えた 6 塩基 (A, T, G, C, P and Z) から構成される人工遺伝暗号システムを提唱している。

[§] SELEX 法[§]とは特定の分子標的に強く結合する核酸アプタマーを見いだすための手法。試験管内で標的化合物を取得できることから試験管内選択法 (in vitro selection) とも言う。ランダム配列を持つ核酸ライブラリーに対して標的との親和性に応じたセレクションを実施した後、PCR 法による増幅を行ない、結合強度の高いものを濃縮した次世代ライブラリーを得る。これを繰り返すことで標的と最も強く結合する核酸配列を同定することができる。特に、特定の細胞を標的として実施する SELEX 法を cell SELEX 法と呼ぶ。

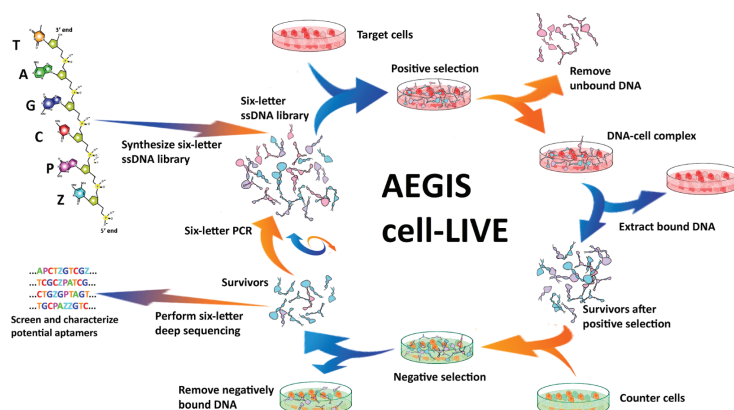


Figure 29 Six-letters synthetic genetic system による cell SELEX 法 (引用文献 70 より転載)

例えば、彼らが開発した Z:F 塩基⁷³や Q:F 塩基対⁷⁴は A:T 塩基対の形を模倣したものであるが、水素結合性の置換基が出来る限り取り除かれている (Figure 30)。彼らはこれらの人工塩基対を組み込んだ系において、DNA ポリメラーゼによる複製反応を検討している。その結果、Z と F は互いに相補塩基として認識されることが明らかとなった。さらに、テンプレート DNA 上の Z に対して T*が、テンプレート DNA 上の F に対して A が取り込まれることを報告している。すなわち、Z:F 塩基対は A:T 塩基対と互換性があり、塩基対間に水素結合を形成しない人工塩基でも相補塩基として取り込まれることが明らかとなった。このことは DNA ポリメラーゼが水素結合を持たなくとも形の相補性だけで塩基対認識を行うことを示しており、生化学的な観点において意義の大きい知見と言える。

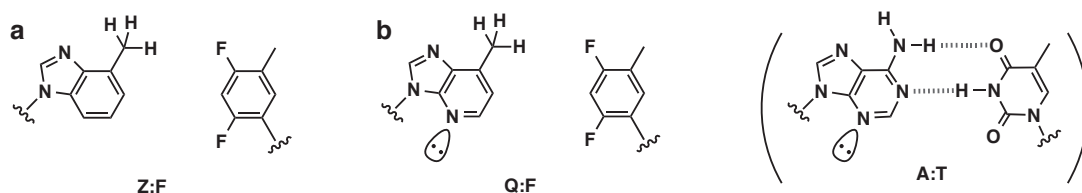


Figure 30 Kool らのグループによる人工塩基対の開発研究

また、本論第1章第3節でも述べたように、Kool らのグループは最近、xA:T 塩基対や A:xT 塩基対と呼ばれる天然塩基と同じ水素結合様式を有するが、糖部 1'-位間の距離が天然型塩基対に比べて大きくなるような環拡張型塩基対を開発し、その二本鎖形成能や蛍光特性などの性質について研究を行っている (Figure 31)^{46,75,76}。またこのうち、xA:T 塩基対に関して KF による複製反応が検討されており、テンプレート上の T に対して xA が、テンプレート上の xA に対して T が相補塩基として取り込まれることを報告している。しかしその取り込み効率はいずれの場合も極めて低く、その理由は xA と T によって形成される塩基対の糖部 1'-位間の距離が拡大することにより、形の相補性が A:T 塩基対とは大きく逸脱

* 本来ならば DNA ポリメラーゼにより取り込まれる基質は三リン酸体であるため dATP や TTP と表記すべきであるが、本論文では簡略化して名前のみを記す。

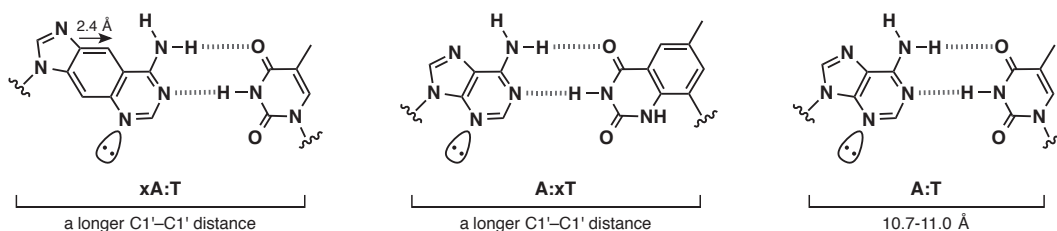


Figure 31 Kool らのグループによって開発された環拡張型人工塩基

することに起因すると彼らは結論付けている。

Kool らが開発した疎水性の人工塩基対を進展させ、Romesberg らは、塩基対間に水素結合を持たず、さらにプリン塩基とピリミジン塩基からなる形の相補性からも大きく逸脱した人工塩基対を網羅的に 100 種類以上設計し、DNA ポリメラーゼによる複製反応について研究を行っている (Figure 32)⁷⁷⁻⁷⁹。例えば彼らは 5SICS:NaM 塩基対について検討を行い、この人工塩基対を含む DNA 二本鎖は、A:T 塩基対を含むものよりも熱的に安定であり、さらに KF を用いた複製反応において相補的に取り込まれることを報告した⁷⁷。さらにごく最近、この塩基対を複製しながら生存する遺伝暗号拡張生物を創製し、大きな注目を集めた⁸⁰。

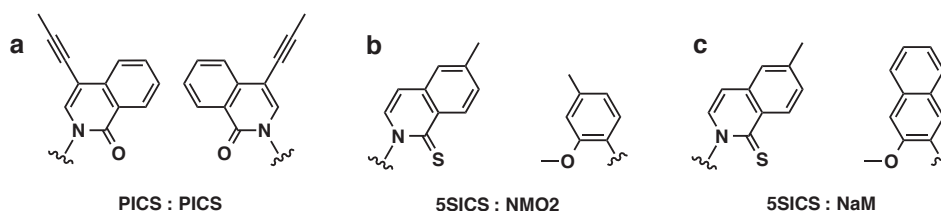


Figure 32 Romesberg らのグループによる人工塩基対の開発研究

一方、Hirao らのグループは Benner らと同様に DNA ポリメラーゼによる複製だけでなく、RNA ポリメラーゼによる転写、さらにはタンパク質への翻訳というセントラルドグマの一連のプロセスにおいて機能する人工塩基対の開発を行っている⁶³。彼らの塩基対は、その選択性を高めるため、立体障害の概念を取り入れている点に特徴がある。すなわち、彼らの開発した s:y 塩基対⁸¹および Ds:Pa 塩基対⁸²などは、プリンヌクレオシドアナログのメジャーグループ側にかさ高い置換基を導入し、ピリミジンアナログのメジャーグループ側からは置換基を排除することにより特異性を獲得している (Figure 33)。このようにして設計された s:y 塩基対は、KF により相補塩基として取り込まれることが報告されている。しかし同時に s に対する C や T の取り込み、y に対する A の取り込みが競合し、その選択性は不十分であった⁸¹。そこで彼らは、さらに選択性を向上させるため、塩基対面の水素結合性の置換基や原子を完全に取り除いた疎水性の人工塩基対 Ds:Pa 塩基対を開発し、DNA ポリメラーゼによる複製反応について研究を進めている。この Ds:Pa 塩基対は、塩基対間に水素結合を持たないというだけでなく、通常のプリン環よりも大きくなった Ds に対して、Pa をピリミジン環より小さい 5 員環構造とすることで全体の形の相補性を維持するように設計されており、実際に s:y 塩基対に比べて選択性が向上し、PCR によっ

て数サイクルの増幅が可能*であることが報告されている⁸²。また最近彼らのグループは、Ds:Pa 塩基対をさらに発展させた Ds:Px 塩基対ならびに Px 塩基上へ種々の置換基を導入したアナログを合成し、天然型 WC 塩基対と遜色ない効率および選択性にて 100 サイクルの PCR を行うことに成功している⁸³。さらに、Ds:diol1-Px 塩基対を含む PCR を利用した SELEX 法により獲得された VEGF 標的 DNA アプタマーは、配列中に 2-3 個の Ds 塩基が含まれているだけでも関わらず天然型と比較して 100 倍以上高い結合親和性を有することが報告されている^{84,85}。

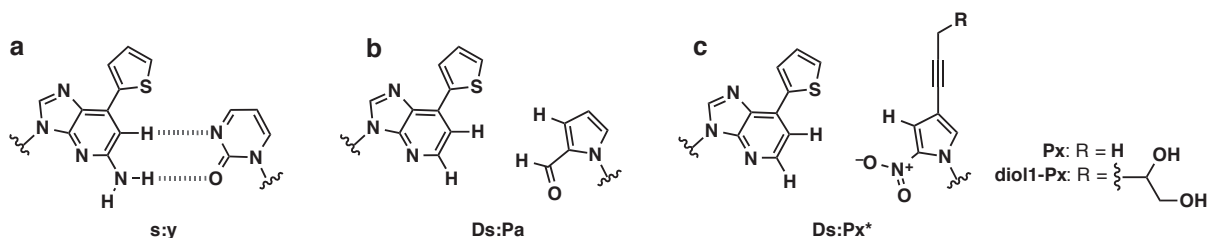


Figure 33 Hirao らのグループによる人工塩基対の開発研究

ところで、ここまで述べてきた人工塩基対に関する研究から、DNA ポリメラーゼによる基質認識には塩基対が形の相補性を満たしていることが重要であり、特に糖部 1'-位間の距離が天然型塩基対に比べて大きくかけ離れている場合、その効率は大きく低下するということが分かる。また、塩基対間の水素結合は疎水性相互作用によって代用出来るが、水素結合をするものに比べて取り込み効率が低下する傾向にある。

一方、当研究室の Minakawa らは、核酸高次構造の安定化を目的として四本の水素結合によって塩基対形成が可能な人工塩基対モチーフの開発研究を行っている (Figure 34)^{86,87}。Kojima ら、Hikishima らはこれまでに、プリン塩基の芳香環を拡張させた三環性のヌクレオシドアナログであるイミダゾ [5',4':,4,5]ピリド[2,3-*d*]ピリミジンヌクレオシド (Im ヌクレオシド; Figure 34a) とピリミジン塩基の芳香環を拡張させた二環性のヌクレオシドアナログである 1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシド (Na ヌクレオシド; Figure 34b) からなる人工塩基対を設計・合成し、これらを化学的に導入した DNA オリゴマーの塩基対形成能について評価を行った[†]。この Im ヌクレオシドと Na ヌクレオシドは、例えば ImN^Oが DADA 型、NaO^Nが ADAD 型の四本の水素結合によって相補的にペアを形成すると考えられる (ImN^O:NaO^N 塩基対)。同様に ImO^N:NaN^O 塩基対も DADA:ADAD の組み合わせからなる四本の水素結合によりペアを形成すると考えられる (Figure 34c)。また、Im:Na 塩基対は大きい環と小さい環がペアを形成するという形の相補性も満たしていると期待出来る。さらにこの Im:Na 塩基対は四本の水素結合を形成するというだ

* 例えば、人工塩基の選択性が 93%程度である場合、20 回の複製により最終的に増幅された DNA 中には人工塩基が $0.93^{20} \times 100 = 23.43\%$ しか残らない。一方、選択性が 98%程度である場合、20 回の複製反応後の増幅産物中には 66.8%の人工塩基が残存すると考えられる。このように PCR においては数%の違いが顕著に反映されるため、より高い選択性が要求される。

† 三環性イミダゾピリドイミダゾピリドピリミジンヌクレオシドは全て「Im」、二環性ナフチリジン-C-ヌクレオシドは「Na」と表記し、芳香環上の置換基によって区別する。例えば、Figure 34c 左側に示すアミノ基が上側、カルボニル基が下側にある化合物は ImN^O、Figure 34c 左側に示す化合物は NaO^Nと表記する。

けでなく、芳香環の広がりによるスタッキング効果の増大によって DNA 二本鎖構造を熱的に安定化出来ると考えられる。実際にこれらを DNA オリゴマーの X、Y の位置に導入し、DNA 二本鎖の熱的安定性を T_m 値 (50%融解温度) により評価したところ、A:T 塩基対が G:C 塩基対、すなわち水素結合の数が二本から三本に増えることによってその値が 1.3 °C 上昇したのに対し、Im:Na 塩基対を導入した場合は 7 °C 以上その値が上昇することが明らかとなった (Table 5)⁸⁷。

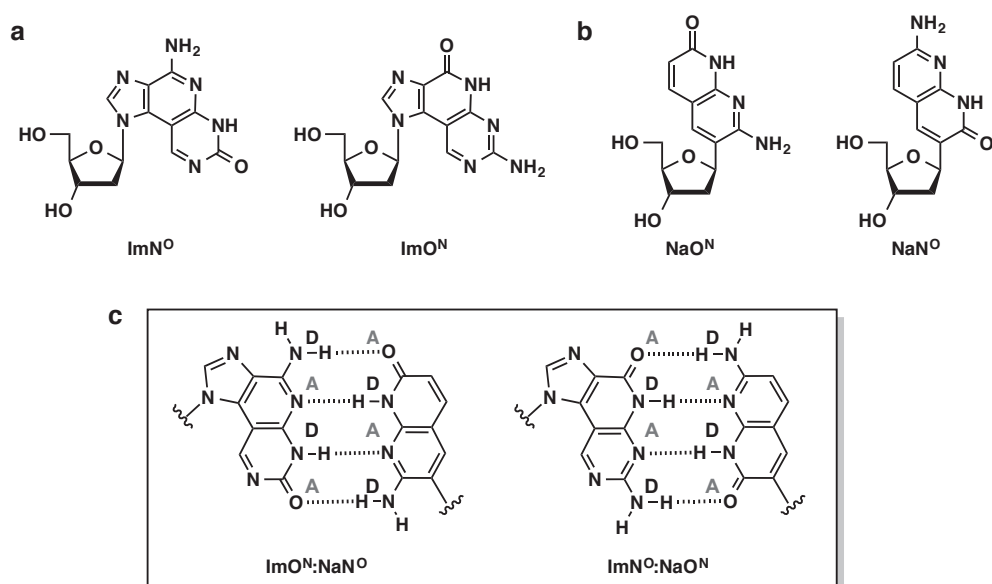


Figure 34 環拡張型ヌクレオシドの構造 (a) Im ヌクレオシド、(b) Na ヌクレオシドおよび (c) Im:Na 塩基対

	X	Y	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
	ImN ^O	NaO ^N	56.1	+7.5
5' -GCACCGAA X AAACCACG-3'	ImO ^N	NaN ^O	56.4	+7.8
3' -CGTGGCTT Y TTTGGTGC-5'	ImN ^N	NaO ^O	60.0	+11.4
	G	C	49.1	+1.3
	A	T	47.8	-

Buffer : 1 mM NaCl, 10 mM sodium cacodylate (pH 7.0)

Table 5 Im:Na 型塩基対の二本鎖融解温度 (T_m 値)

さらに最近 Ogata らは、この環拡張型塩基対の DNA ポリメラーゼによる複製反応についての検討を行っている (Figure 35)^{88,89}。

その結果、テンプレート DNA 上に ImN^O を導入した場合は、天然型塩基である A、G、C、T および ImN^O 自身の取り込みは起こらず (Figure 35b; lanes 2-6)、その相補塩基である NaO^N の取り込みのみが観察された (Figure 35b; lane 7)。一方、テンプレート DNA 上に NaO^N を導入した場合においても、その相補塩基である ImN^O の選択的な取り込みが観察された (Figure 35b; lane 12)。ImO^N:NaN^O 塩基対の場合においても同様の結果が得られており (Figures 35c)、Im:Na 塩基対が四本の水素結合によって熱力学的に安定なペアを形成することは DNA ポリメラーゼによる基質認識において有利に働くことが示唆された。しかし、いずれの場合においてもテンプレート上の Na に対して天然の A のミスインコーポレーション

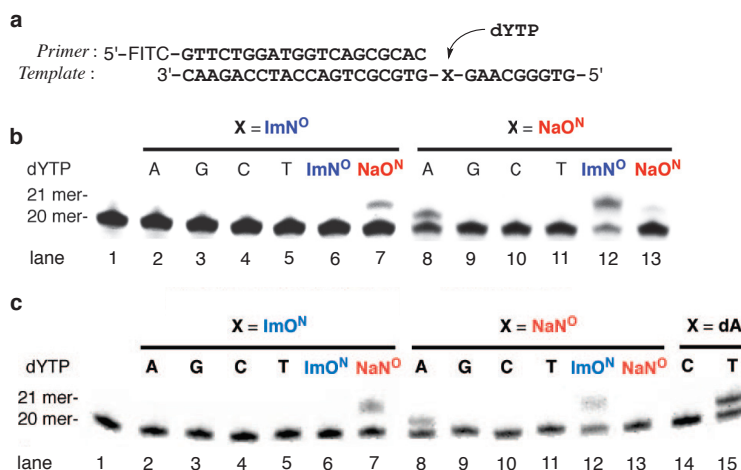


Figure 35 4本の水素結合によりペアを形成する環拡張型人工塩基対の酵素認識 (a) テンプレート-プライマー複合体の配列; (b) $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対の酵素認識; (c) $\text{ImO}^{\text{N}}:\text{NaN}^{\text{O}}$ 塩基対の酵素認識 (引用文献 X より抜粋)

オンが起こっている (Figure 35b; lane 8 and Figure 35c; lane 8)。したがってこれらの塩基対を利用し、Figure 26 に示した戦略により環状型第二世代 iRed を構築するのは極めて困難であり、さらに選択性の高い人工塩基対の開発が必要であると考えた。

そこで、四本の水素結合を有する環拡張型塩基対 ($\text{Im}:\text{Na}$ 塩基対) の DNA ポリメラーゼによる基質認識の選択性の向上を目指し、水素結合のドナーとアクセプターの並びを入れ替えた $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対についてこれを評価することにした (Figure 36)。 $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対は ImN^{N} が DAAD、 NaO^{O} が ADDA 型の組み合わせからなる四本の水素結合によって相補的にペアを形成すると考えられる。

すでに、著者らは $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対を含む DNA 二本鎖の熱的安定性を T_m 値により評価している³⁷。その結果、 $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対を含む DNA 二本鎖は先に述べた $\text{ImO}^{\text{N}}:\text{NaN}^{\text{O}}$ 塩基対および $\text{ImN}^{\text{O}}:\text{NaO}^{\text{N}}$ 塩基対を含むものよりもさらに高い T_m 値を示し、高い熱的安定性を有することが明らかとなった (Table 5)。

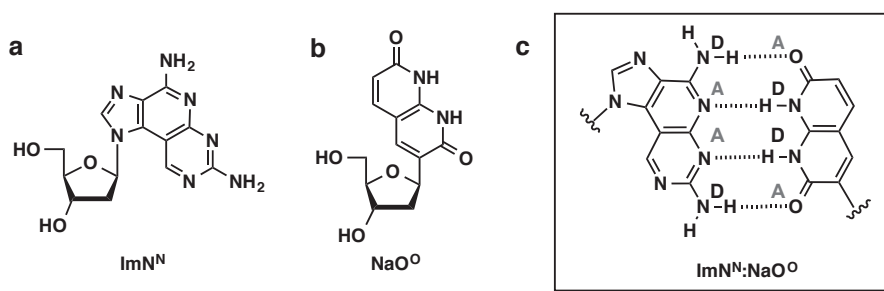


Figure 36 $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対の構造

また、水素結合の並びが ADDA:DAAD からなるこの ImN^N:NaO^O 塩基対は、天然塩基との塩基対形成を排除すると期待された (Figure 37)。すなわち、先に挙げた ImO^N:NaN^O 塩基対の複製反応において問題となった、テンプレート DNA 上の NaN^O に対する A のミスインコーポレーションについて考察すると、Figure 37a に示したような 2 本の水素結合を介した塩基対形成が考えられる。一方、今回新たに検討する NaO^O は、天然の A に対して水素原子の反発を生じることから、このようなミスインコーポレーションを排除出来ると期待した (Figure 37b)。また、ImN^N:NaO^O 塩基対を含む DNA 二本鎖が高い熱的安定性を有していることも、DNA ポリメラーゼによる基質認識においても有利に働くと期待される。そこで著者はまず、DNA ポリメラーゼによる一塩基挿入において、ImN^N:NaO^O 塩基対の選択性を評価することとした。

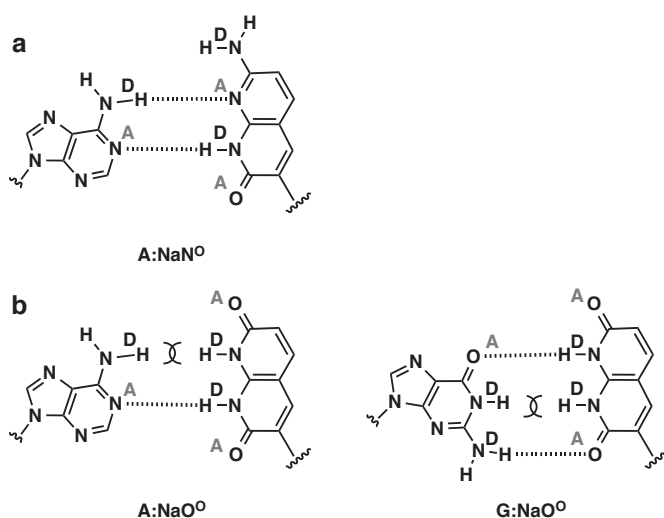
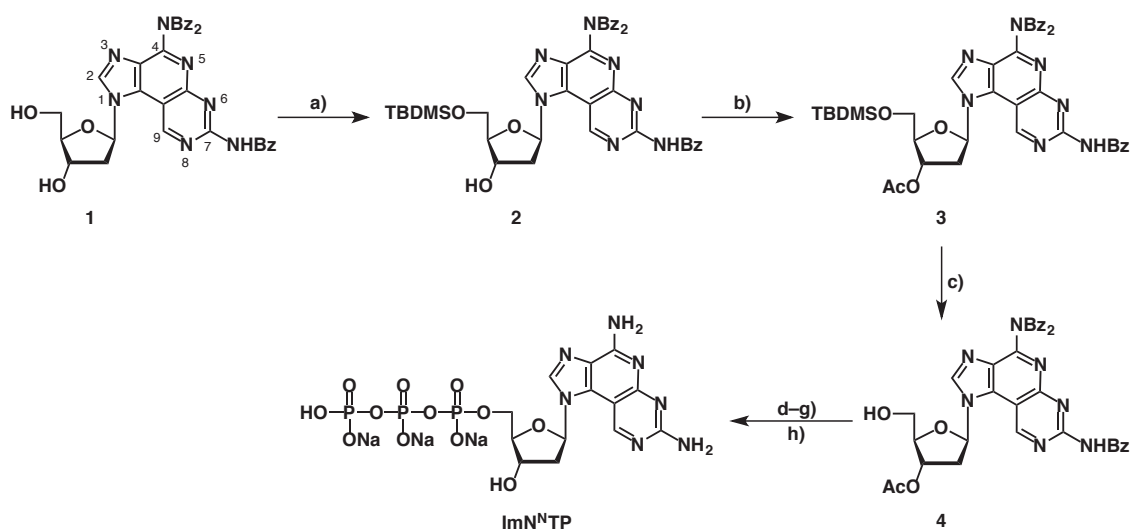


Figure 37 天然型塩基と Na 塩基のミスマッチ塩基対形成
(引用文献 39 より転載)

第3節 ImN^N:NaO⁰塩基対の酵素認識³⁹

DNAポリメラーゼは、テンプレート鎖と短いプライマー鎖によって形成されるDNA二本鎖に対し、ヌクレオシド5'-三リン酸体を基質として鎖伸長反応を引き起こす。したがって本節で述べる実験において目的とする酵素反応を行うためには環拡張型ヌクレオシドをDNAオリゴマーへ導入するとともに、対応する5'-三リン酸体を調製する必要がある。ImN^N三リン酸体(ImN^NTP)の合成は、まず、既に確立済みの方法⁸⁸に従い合成した化合物**1**の糖部5'-位水酸基をTBDMS基で保護することにより化合物**2**を得た。続いて、糖部3'-位水酸基をアセチル基で保護し、得られた化合物**3**をTBAFで処理することによりリン酸化の基質**4**へと導いた。得られた化合物**4**を用いて、Ecksteinらの方法⁹⁰により三リン酸化反応を行った。すなわち、化合物**4**とサリチルホスホクロリダイトと反応させ、続いて用時調整したピロリン酸トリブチルアンモニウム塩で短時間処理し環状リン酸体へと変換した。このものをヨウ素酸化後、濃アンモニア水中にてスチール封管中加熱処理することにより、環状リン酸部の加水分解と保護基の除去を一気に行い、目的の化合物であるImN^NTP(tri-sodium salt)を4工程37%の収率で合成した(Scheme 1)。



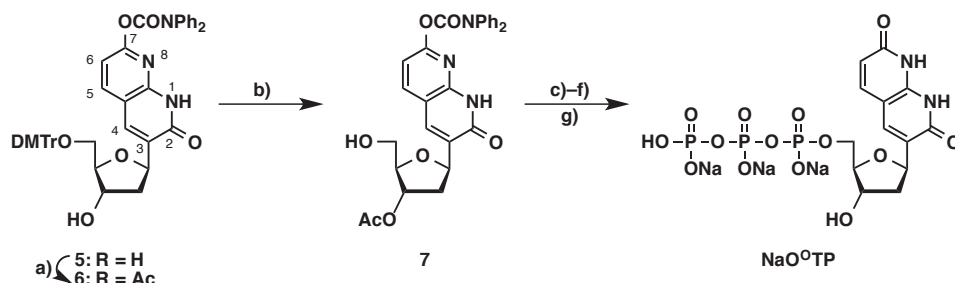
Scheme 1 ImN^NTPの合成

Reagents and conditions: (a) TBDMSCl, imidazole, DMF; (b) Ac₂O, pyridine; (c) TBAF, THF; (d) 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, pyridine, 1,4-dioxane; (e) bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate, tributylamine, DMF; (f) 1% iodine in pyridine-H₂O; (g) NH₄OH, 55 °C; (h) DIAION PK212 and then WK20.

また、NaO⁰誘導体についても同様の方法にて5'-三リン酸体へと変換することが出来た(Scheme 2)。すなわち化合物**5**^{37*}の5'-位水酸基を常法に従ってジメトキシトリチル基で保護した後、糖部3'-位水酸基をアセチル基で保護することで化合物**6**を得た。続いてこれを酢酸水溶液で処理することにより5'-位の保護基を除去し、三リン酸化の基質**7**へと導いた。このものを、先と同様の方法にて環状リン酸体

* 修士論文記載のため詳細は割愛する。

へと変換した後、ヨウ素酸化および濃アンモニア水中にて加熱処理することにより、NaO⁰TP (tri-sodium salt) を4工程42%の収率で合成した。なお、合成したImN^NTPおよびNaO⁰TPの構造は、各種器機測定により確認した。



Scheme 2 NaO⁰TP の合成

Reagents and conditions: (a) Ac₂O, pyridine; (b) 70% AcOH; (c) 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, pyridine, 1,4-dioxane; (d) bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate, tributylamine, DMF; (e) 1% iodine in pyridine-H₂O; (f) NH₄OH, 55 °C; (g) DIAION PK212 and then WK20.

続いて、合成した三リン酸体および別途合成したテンプレート鎖³⁸を用いて、DNAポリメラーゼによる一塩基挿入反応の選択性を検討した。

DNAポリメラーゼはそのアミノ酸配列により六つのファミリーに分類される。その中でFamily Aに属するKlenow fragment (exo⁻) (KF)^{*}がDNAポリメラーゼの機能解析モデルとして頻繁に用いられている。また、これまでに開発された様々な人工塩基対の基質認識において最もよく調べられているDNAポリメラーゼであることから、まずKFを用いた一塩基挿入反応を行うこととした。

実験に用いたプライマー (20 mer) およびテンプレート (30 mer) の配列をFigure 38に示した。テンプレートDNA上のXで示した位置に環拡張型人工塩基 (ImN^NあるいはNaO⁰) を導入し[†]、その相補塩基の三リン酸体 (NaO⁰TPあるいはImN^NTP) または天然塩基の三リン酸体 (dATP, dGTP, dCTPあるいはTTP) を加えて一塩基挿入反応を行い、その選択性について評価した (Figure 38b)[‡]。

その結果、テンプレート上のXの位置にImN^Nを導入した場合は、天然型塩基であるA、G、C、Tの取り込みは全く起こらず (Figure 38b: lanes 2-5)、その相補塩基であるNaO⁰の取り込みのみが観察された (Figure 38b: lane 7)。また、テンプレート上のImN^Nに対して自己塩基のImN^Nの取り込みも全く観察されなかったことから (Figure 38b: lane 6)、テンプレートDNA上のImN^Nに対してはNaO⁰塩基が特異的に挿入されることが明らかとなった。一方、テンプレートのXの位置にNaO⁰を配置した場合は相補塩基であるImN^Nの取り込みが観察されたものの (Figure 38b: lane 12)、天然型AおよびGの取り込みも同様に観察されることが明らかとなった (Figure 38b: lanes 8 and 9)。

^{*} Klenow fragment (exo⁻) (KF) は *Escherichia coli* 由来のDNAポリメラーゼIから5'→3'および3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたDNAポリメラーゼである。

[†] 修士論文記載のため詳細は割愛する。

[‡] プライマーの5'-末端にはFITC (λ_{ex} = 495 nm, λ_{em} = 520 nm)を結合させ、DNAの検出はモレキュラーイメージャーを用いてFITCの蛍光強度を測定することにより行なった。

第2章 第3節
ImN^N:NaO^O塩基対の酵素認識

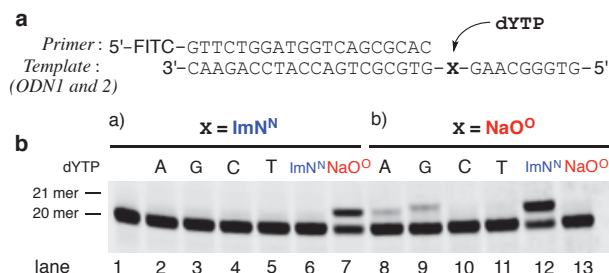


Figure 38 KFによる一塩基挿入反応の検討 (a) Sequences of template and primer. (b) Denaturing gel image of products. (b-a) Incorporation of dYTP against ImN^N in the template (dYTP = 20 μM). (b-b) Incorporation of dYTP against NaO^O in the template (dYTP = 2 μM).

そこで、Figure 38 に示した一塩基挿入反応の結果をより詳細に議論するため、それぞれの反応について、ミカエリス-メンテン式に従った定常状態速度論解析 (steady-state kinetics) を行い、その効率を比較することにした。この定常状態速度論解析の例として、テンプレートの X の位置に ImN^Nを配置したときの NaO^OTP の取り込み反応について説明する。反応に用いる KF の濃度は 0.0025 unit/μL とし、基質である NaO^OTP の濃度を 0.2–2.0 mM*として 37 °Cにて反応を行った。反応開始 1、2、5、20 および 60 分経過後の鎖伸張生成物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (20% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)) にて解析した (Figure 39)。

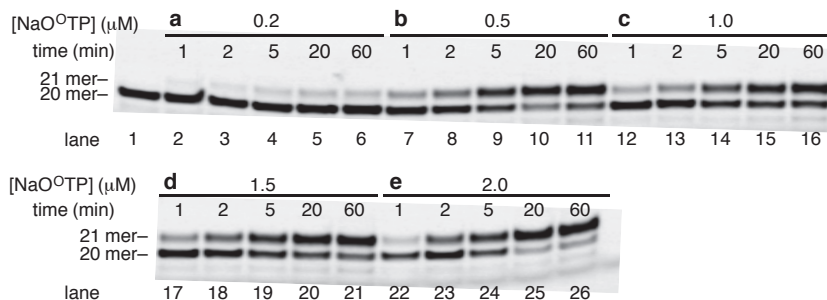


Figure 39 テンプレート上の ImN^N 塩基に対する NaO^OTP の一塩基挿入反応における速度論解析

蛍光ラベル強度を指標に、一塩基鎖伸張反応が進行した 21 mer の生成物の比率 I (%) を算出し[†]、反応時間との関係をグラフに表した (Figure 40a)。また、2 分のサンプリングにおける I (%) の値を反応時間 t (min) で除することにより鎖伸長反応速度 V (%・min⁻¹) を算出し、それぞれの基質濃度 [NaO^OTP] との関係プロットしたグラフを Figure 40b に示した。これらのグラフを用いてミカエリス定数 (K_m) ならびに最大反応速度 (V_{max}) を算出した。なお、本実験において速度論解析を行う場合、鎖伸長効率 I (%) が 25%以下になる値を用いることにした。

* 一般に、K_m および V_{max} の値を求めるときの基質濃度は K_m 値の 0.5–2.0 倍の範囲に設定するのが良いとされる。

† 一塩基鎖伸張反応が進行した 21 mer の生成物の比率 (I%) は、各反応における鎖長 20 mer のバンドにおける蛍光強度と 21 mer の鎖伸張生成物のバンド蛍光強度の和を 100 とし、これに対する 21 mer のバンドにおける蛍光強度の割合を求めることにより算出した。

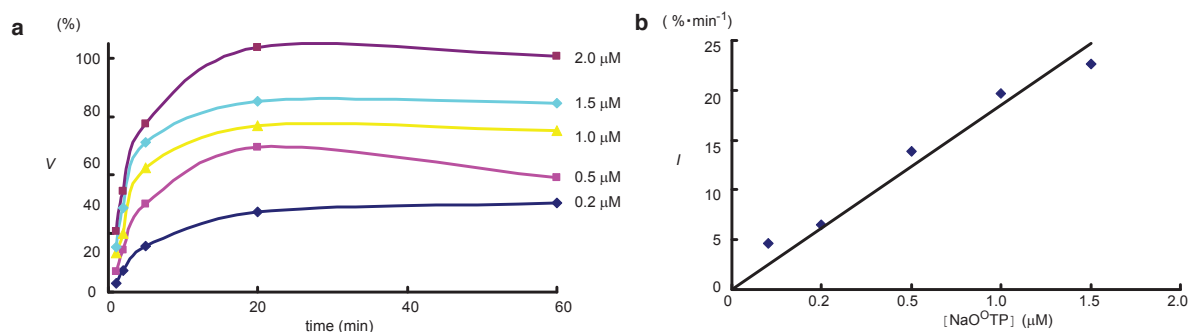


Figure 40 テンプレート上の ImN^N 塩基に対する NaO⁰TP の一塩基挿入反応における速度論解 (a) 時間依存的な反応速度変化; (b) NaO⁰TP 濃度の違いによる単位時間あたりの反応速度変化

K_m および V_{max} 値の算出にはいくつかの方法がある (Figure 41)。これらの速度式に基づき、実験により求められた値をプロットした (Figure 42)。各プロットより求められる近似直線の式から算出した K_m および V_{max} 値は、いずれのプロット法により解析した場合にほぼ同じ値を示した (Table 6)。したがって、以後の解析は、一般に実験操作による誤差が K_m および V_{max} の値に及ぼす影響の最も小さいとされている Hanes-Woolf プロット法を用い*、Figure 38 に示した全ての組み合わせにおいて速度論解析を実施した†。

$$(A) \text{ Lineweaver-Burk Plot : } \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$(B) \text{ Eadie-Hofstee Plot : } V = -K_m \frac{V}{[S]} + V_{max}$$

$$(C) \text{ Hanes Woolf Plot : } \frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{max}} [S] + \frac{K_m}{V_{max}}$$

Figure 41 代表的な K_m および V_{max} 値の算出法

得られた結果を Table 7 に示した。 K_m は酵素-基質間の解離定数であり、この値が小さいほど取り込み反応には有利に働く。また V_{max} は酵素-基質複合体が実際に反応する頻度を表す値であり、大きいほど取り込み反応には有利に働く。実際の取り込み効率は V_{max}/K_m の値によって表され、この値が大きいほど取り込み反応には有利に働く。

まず、テンプレート上の X の位置に ImN^N を配置した時の鎖伸反応の効率 (V_{max}/K_m) は、NaO⁰ が最も高く、 $2.8 \times 10^7 \text{ \%min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ を示した (Table 7, entry 6)。この時、その他の塩基の取り込み効率はいずれも低い V_{max} 値を示し (entries 1-5、NaO⁰TP の取り込みと比較して 10^4 - 10^5 以下)、テンプレート DNA 上

* Lineweaver-Burk プロットは基質濃度が低いとき、その誤差を受けやすいという欠点がある。Eadie-Hofstee プロットは実験誤差や反応系による影響を受けやすく、データの精度が高くなければ直線性が失われることが多い。人工塩基対の複製反応では塩基対間で取り込み効率の差が大きく、実験に用いる酵素濃度やプライマー/テンプレート複合体の濃度を適宜補正する必要がある。したがって、反応の解析には Hanes-Woolf プロットが多く用いられている。

† 各塩基対間の取り込み効率に応じて、酵素濃度およびプライマー-テンプレート複合体の濃度を適宜変更した。ただし、全ての反応における最大反応速度 (V_{max}) は、プライマー/テンプレート複合体の濃度 $0.8 \mu\text{M}$ 、酵素濃度 $0.025 \text{ U}/\mu\text{L}$ における値に補

第2章 第3節
ImN^N:NaO^O塩基対の酵素認識

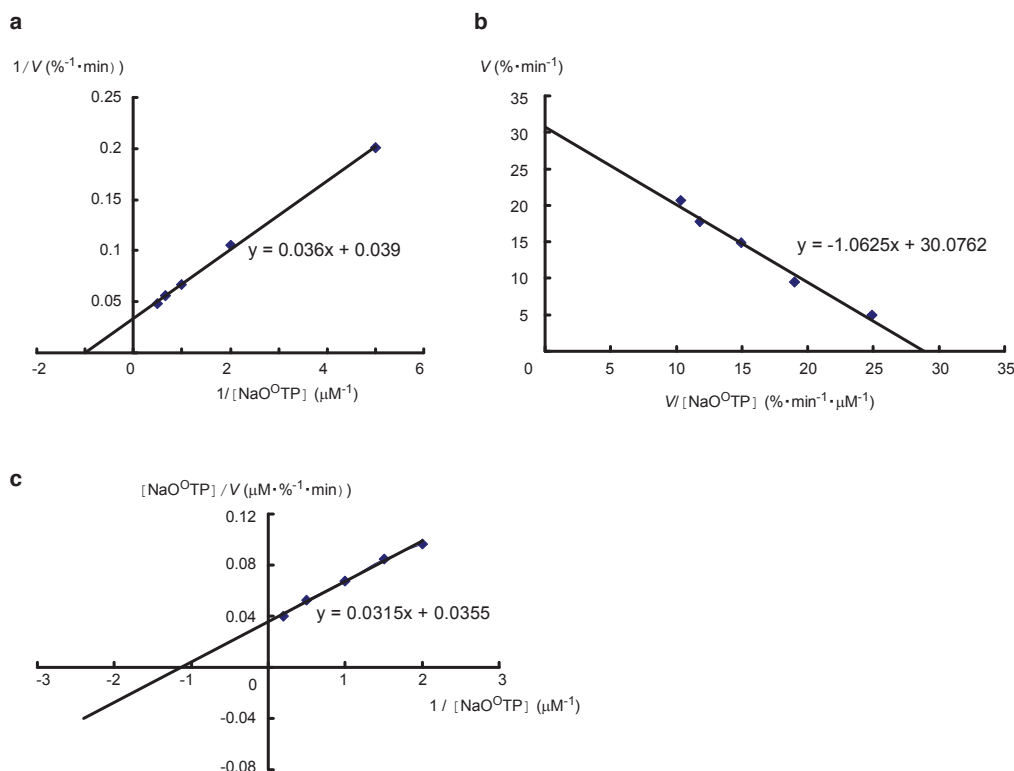


Figure 42 一塩基挿入反応の速度論解析 (a) Linweaver-Burk plot; (b) Eadie-Hofstee plot; (c) Hanes-Woolf plot

	K_m (μM)	V_{max} ($\% \text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Linweaver-Burk	1.08	29.5
Eadie-Hosfee	1.06	30.1
Hanes-Woolf	1.12	28.1

Table 6 一塩基挿入反応の速度論解析

の ImN^N に対しては NaO^O が選択的に認識されていることが明らかとなった。一方、テンプレート上に NaO^O を配置した場合においても、その相補塩基である ImN^N が $8.6 \times 10^7 \% \text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ と最も高い値を示した (entry 12)。また、Figure 38 に示した一塩基挿入反応のゲル電気泳動図から、テンプレート上の NaO^O に対して天然の A および G のミスインコーポレーションが示唆されたが、その効率はいずれも ImN^N に対する NaO^O の取り込みと比較して 10 分の 1 以下であることが明らかとなった (entries 7 and 8)。以上のことより、ImN^N:NaO^O 塩基対は ImN^N あるいは NaO^O のいずれをテンプレートに導入した場合においても、相補塩基の取り込みが最も優先して進行し、その取り込み反応の効率は、天然の A:T 塩基対のものと比較しても遜色ないことが確認された (entries 6 and 11 vs. entries 13 and 14)。

ところで、先に述べたように、Ogata らはすでに、ImO^N:NaN^O および ImN^O:NaO^N 塩基対について KF を用いた一塩基挿入反応の解析を行っている^{88,89}。その結果を要約すると、まず ImN^O:NaO^N 塩基対については、それぞれの相補塩基が一番高い効率で取り込まれるものの、その取り込み効率は天然型 WC 塩

第2章 第3節
ImN^N:NaO^O塩基対の酵素認識

entry	X	dYTP	K_m (μM)	V_{max} (min^{-1})	V_{max}/K_m ($\% \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)
1	ImN ^N	dATP	27 (1.1)	0.13 (0.48)	4.8×10^3
2		dGTP	56 (2.9)	0.11 (0.037)	2.0×10^3
3		dCTP	160 (13)	0.060 (0.018)	3.8×10^2
4		TTP	140 (23)	0.082 (0.023)	5.6×10^2
5		ImN ^N TTP	190 (39)	0.053 (0.0061)	2.7×10^2
6		NaO ^O TTP	1.1 (0.29)	31 (2.7)	2.8×10^7
7	NaO ^O	dATP	4.1 (0.85)	18 (1.6)	4.4×10^6
8		dGTP	3.5 (0.62)	24 (1.2)	6.8×10^6
9		dCTP	140 (35)	0.41 (0.091)	2.9×10^3
10		TTP	130 (14)	0.43 (0.083)	3.3×10^3
11		ImN ^N TTP	0.56 (0.089)	48 (5.3)	8.6×10^7
12		NaO ^O TTP	29 (2.8)	0.12 (0.019)	4.1×10^3
13	A	TTP	0.43 (0.010)	26 (1.4)	6.0×10^7
14	T	dATP	0.30 (0.051)	27 (3.2)	9.0×10^7

Table 7 ImN^N:NaO^O塩基対における一塩基挿入反応の速度論解析
(引用文献 39 より転載)

基対と比較して低い値であった (Table S1*, entries 18 and 23 vs. entries 37 and 38)。一方、ImO^N:NaN^O塩基対においては、テンプレート DNA 上の ImO^Nに対しては、NaN^Oが選択的に取り込まれるものの (entry 30)、テンプレート DNA 上の NaN^Oに対しては、相補塩基である ImO^Nとほぼ同程度に天然型 A の取り込みが進行することが明らかとなっている (entries 31 vs. 35)。

今回、著者は新たに ImN^N:NaO^O塩基対を開発し、一塩基挿入反応の速度論解析を行った。これら3つの塩基対における一塩基挿入反応の速度論解析結果を Figure 43 にグラフでまとめた。まず、テンプレート上の Im 塩基に対しては、いずれの場合にも相補塩基である Na の取り込みが最も優先することが分かる (Figure 43a)。しかし、その効率は ImN^N:NaO^O塩基対が圧倒的に高く、塩基対の熱的安定性 (Table 5) と良い一致を示した。一方、テンプレート上の Na 塩基に対しては、相補塩基である Im の取り込みだけでなく天然型プリン塩基とのミスマッチ塩基対形成が競合する (Figure 43b)。特に ImO^N:NaN^O塩基対の場合、テンプレート上の NaN^O塩基に対しては相補塩基である ImO^Nだけでなく、天然型 A がほぼ同程度の効率で取り込まれる。一方、新たに開発した ImN^N:NaO^O塩基対では、天然型プリン塩基とのミスマッチ塩基対形成は相補塩基である ImN^N:NaO^O塩基対の形成と比較して 1/10 以下であった。すなわち Im:Na 塩基対における四本の水素結合様式の違いは、相補塩基同士の取り込みだけでなく、天然型プリン塩基とのミスマッチ塩基対形成にも大きな影響を与えることが分かる。また、いずれの塩基をテンプレート上においた場合にも、ImN^N:NaO^O塩基対の取り込みが最も高い反応効率を発揮することが明らかとなった。

これらの結果は以下のように考察出来る。まず、先の ImN^O:NaO^N塩基対の基質認識において取り込み効率が顕著に低下した理由としては、塩基対間に形成される水素結合のドナー、アクセプターの並びが DNA ポリメラーゼの基質認識において不利であるということが挙げられる。すなわち、DNA ポリメラーゼの基質認識においては、マイナーグループ側[†]のプロトンアクセプターの存在が重要であるとさ

* 章末参照。

[†] DNA および RNA 二重らせん構造中には、メジャーグループおよびマイナーグループと呼ばれる2つの溝が存在し、その中

第2章 第3節
ImN^N:NaO^O塩基対の酵素認識

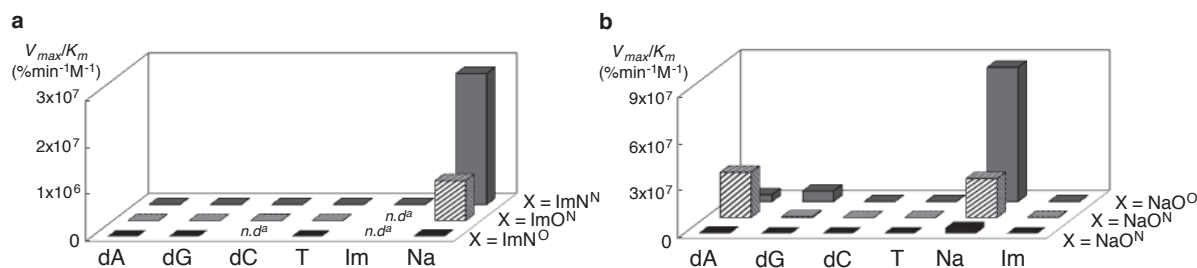


Figure 43 Im:Na 型塩基対における一塩基挿入反応の速度論解析の比較 (a) Incorporation of dYTP against a series of Im bases in the template. (b) Incorporation of dYTP against a series of Na bases in the template. “Not determined.” (引用文献 39 より転載)

れており^{91,92}、天然型のプリン塩基 (A、G) はいずれもその 3 位にプロトンアクセプターである窒素原子を有している (Figure 44d)。また、天然型のピリミジン塩基 (C、T) はいずれもその 2 位にプロトンアクセプターであるケト基を有しているが、ImN^O:NaO^N塩基対のピリミジンアナログにあたる NaO^Nではそれらに相当する位置 (2 位) にプロトンドナーであるアミノ基を有している (Figure 44a)。このことが、ImN^O:NaO^N塩基対において DNA ポリメラーゼによる取り込み効率が顕著に低下した原因であると考えている。

ImO^N:NaN^O塩基対は、いずれの塩基もマイナーグループ側にプロトンアクセプターを有するため (Figure 44b)、ImN^O:NaO^N塩基対と比較して取り込み効率が向上している。しかし、テンプレート DNA

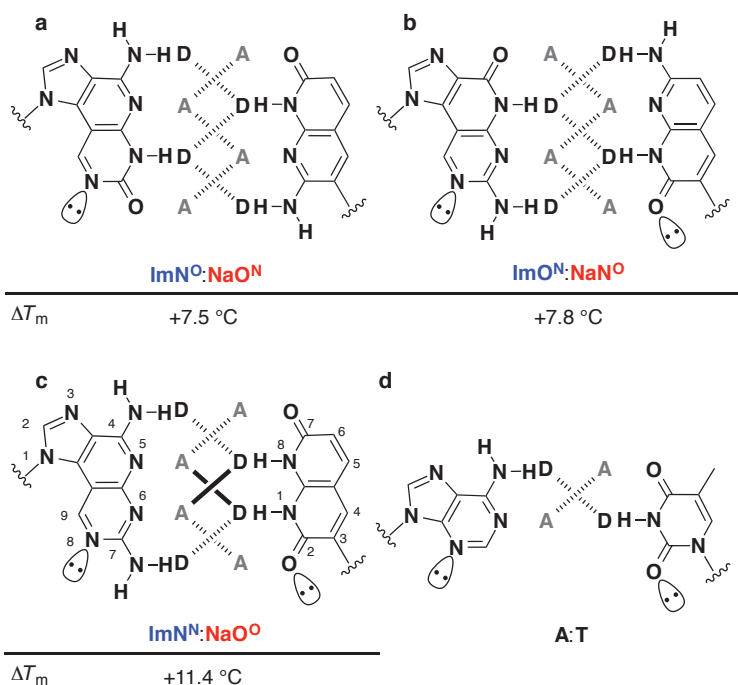


Figure 44 Im:Na 型塩基対におけるマイナーグループ側プロトンアクセプターの比較 (引用文献 39 より転載)

心部に位置する核酸塩基対では紙面下側がマイナーグループ側、上側がメジャーグループ面に位置する。

上の NaN^O に対して天然型 A のミスインコーポレーションが競合してしまう。この理由として、先に述べたように NaN^O が天然の A と 2 本の水素結合を介した塩基対を形成することが挙げられる (Figure 37a)。すなわち、NaN^O は天然の T と類似の水素結合様式をとっており、これが T アナログとして認識されたことによると考えられる。

一方、ImN^N:NaO^O 塩基対は、比較した 3 つの Im:Na 塩基対の中で取り込み効率が最も高かった。ImN^N:NaO^O 塩基対も ImO^N:NaN^O 塩基対と同様にマイナーグループ側のプロトンアクセプターとして ImN^N では 8 位の窒素原子、NaO^O においては 2 位のケト基を有している (Figure 44c)。さらに、ImN^N:NaO^O 塩基対は他の Im : Na 塩基対と比較して熱的に安定な塩基対であり (Figure 44 and Table 5)、このことが DNA ポリメラーゼの基質認識における取り込み効率に対し有利に働いたと考えられる。さらに序論で述べたように、NaO^O は先に述べた NaN^O の場合とは異なり天然のプリン塩基 (A、G) に対して水素原子の反発を生じると期待していた (Figure 37)。実際に、テンプレート DNA 上の NaO^O に対するプリン塩基のミスインコーポレーションは、NaN^O 塩基の場合と比べてその効率が低下しており、このような水素の反発がその理由であると考えている。実際に、ImN^N あるいは NaO^O 塩基と天然型塩基のミスマッチ塩基対形成における DNA 二本鎖の熱的安定性を評価したところ、全てのペアにおいて *T_m* 値の低下が観察された (Table 8)。

	X	Y	<i>T_m</i> (°C)	ΔT_m (°C)
	ImN ^N	A	53.1	-7.4
	ImN ^N	G	58.7	-1.8
	ImN ^N	C	59.7	-0.8
	ImN ^N	T	57.0	-3.5
5' -GCACCGAA X AAAACCACG-3'	A	T	60.5	-
3' -CGTGGCTT Y TTTGGTGC-5'	NaO ^O	A	54.6	-4.2
	NaO ^O	G	56.0	-2.8
	NaO ^O	C	57.2	-1.6
	NaO ^O	T	52.0	-6.8
	T	A	58.8	-

Buffer : 1 mM NaCl, 10 mM sodium cacodylate (pH 7.0)

Table 8 ImN^N あるいは NaO^O 塩基と天然塩基とのミスマッチ塩基対形成における DNA 二本鎖の熱的安定性変化

以上述べてきたように、今回著者が開発した ImN^N:NaO^O 塩基対は、優れた塩基特異性と高い取り込み効率を示すことが明らかとなった。この結果は、塩基対間で形成される水素結合ドナーとアクセプターの組み合わせならびに塩基対の熱的安定性が DNA ポリメラーゼの基質認識において大きな影響を与えることを示唆するものであると考えている。

第2章 第3節
ImN^N:NaO^O塩基対の酵素認識

entry	template (X)	nucleoside triphosphate (dYTP)	K_m (μM)	V_{max} (min^{-1})	V_{max}/K_m ($\% \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	fidelity
1	ImN ^N	dATP	27 (1.1) ^a	0.13 (0.48)	4.8×10^3	0.00017
2		dGTP	56 (2.9)	0.11 (0.037)	2.0×10^3	0.000071
3		dCTP	160 (13)	0.060 (0.018)	3.8×10^2	0.000014
4		TTP	140 (23)	0.082 (0.023)	5.6×10^2	0.00020
5		ImN ^N TTP	190 (39)	0.053 (0.0061)	2.7×10^2	0.000096
6		NaO ^O TP	1.1 (0.29)	31 (2.7)	2.8×10^7	1
7	NaO ^O	dATP	4.1 (0.85)	18 (1.6)	4.4×10^6	0.052
8		dGTP	3.5 (0.62)	24 (1.2)	6.8×10^6	0.079
9		dCTP	140 (35)	0.41 (0.091)	2.9×10^3	0.000034
10		TTP	130 (14)	0.43 (0.083)	3.3×10^3	0.000038
11		ImN ^N TTP	0.56 (0.089)	48 (5.3)	8.6×10^7	1
12		NaO ^O TP	29 (2.8)	0.12 (0.019)	4.1×10^3	0.000048
13 ^b	ImN ^O	dATP	120 (6.4)	0.65 (0.047)	5.4×10^3	0.023
14 ^b		dGTP	43 (10)	0.095 (0.0070)	2.2×10^3	0.0096
15 ^b		dCTP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16 ^b		TTP	16 (4.6)	0.12 (0.019)	7.5×10^3	0.034
17 ^b		ImN ^O TP	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d.
18 ^b		NaO ^N TP	57 (4.1)	13 (1.5)	2.3×10^5	1
19 ^b	NaO ^N	dATP	25 (3.1)	16 (2.1)	6.4×10^5	0.18
20 ^b		dGTP	33 (7.7)	0.15 (0.027)	4.5×10^3	0.0013
21 ^b		dCTP	71 (31)	0.25 (0.051)	3.5×10^3	0.0097
22 ^b		TTP	20 (2.5)	0.13 (0.012)	6.5×10^3	0.0018
23 ^b		ImN ^O TP	8.3 (2.5)	27 (4.7)	3.6×10^6	1
24 ^b		NaO ^N TP	29 (2.9)	2.4 (0.56)	8.3×10^4	0.023
25 ^b	ImO ^N	dATP	19 (10)	0.43 (0.033)	2.3×10^4	0.0027
26 ^b		dGTP	34 (2.6)	0.18 (0.0071)	5.3×10^3	0.00062
27 ^b		dCTP	51 (13)	0.44 (0.044)	8.6×10^3	0.0010
28 ^b		TTP	54 (18)	0.28 (0.034)	5.1×10^3	0.00060
29 ^b		ImO ^N TP	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d.
30 ^b		NaN ^O TP	2.6 (0.49)	22 (0.96)	8.5×10^6	1
31 ^b	NaN ^O	dATP	0.69 (0.22)	20 (3.4)	2.9×10^7	1.2
32 ^b		dGTP	17 (1.8)	9.4 (1.5)	5.5×10^5	0.022
33 ^b		dCTP	25 (5.5)	0.12 (0.010)	4.8×10^3	0.00019
34 ^b		TTP	19 (0.14)	0.11 (0.015)	5.8×10^3	0.00023
35 ^b		ImO ^N TP	0.83 (0.23)	21 (5.3)	2.5×10^7	1
36 ^b		NaN ^O TP	14 (3.8)	0.32 (0.019)	2.3×10^4	0.00092
37	A	TTP	0.30 (0.051)	27 (3.2)	9.0×10^7	—
38	T	dATP	0.43 (0.010)	26 (1.4)	6.0×10^7	—

Table S1 一塩基挿入反応における速度論解析のまとめ ^aStandard deviations are given in parentheses. ^bThese parameters were referred from *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1644–1645. (引用文献 88) ^cNot determined.

第4節 ImN^N:NaO⁰塩基対を含む鎖伸張反応の評価³⁹

第3節で述べたように、ImN^N:NaO⁰塩基対はKFを用いた一塩基挿入反応において、高い特異性ならびに反応効率を示すことが明らかとなった。本節では、ImN^N:NaO⁰塩基対の取り込み反応後にさらなる鎖伸張反応が進行するか評価した。本章第2節で述べたように、これまでも数多くの人工塩基対が開発されてきたが、それらの中には人工塩基対形成後の鎖伸張反応が進行しないものが数多くある⁹³⁻⁹⁷。したがって、人工塩基対形成後の鎖伸張反応の評価は意義深い。

本章第3節で用いたものと同様の配列を有するテンプレート-プライマー複合体に対して、対応するNaTP存在下および非存在下にて鎖伸張反応を行なった (Figure 45)。なお、鎖伸張反応の検討においては、配列の正確性を高めるため、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するKF、すなわちKF⁺を用いて⁸²反応を実施した。

まず、天然型テンプレート (X = A) に対して4種のdNTP存在下鎖伸張反応を行なったところ、完全に鎖伸張反応が進行した30 merの生成物が観察された (lane 2)。一方、テンプレート上のXの位置にImN⁰またはImO^Nが存在する場合、対応するNaO^NTPあるいはNaN⁰TPの有無に関わらず鎖伸張生成物は観察されなかった* (lanes 3-6)。一方、ImN^Nを含むテンプレートを用いた場合は、対応するNaO⁰TP非存在下では鎖伸張反応の進行が全く観察されないのに対して (lane 7)、NaO⁰TP存在下では天然型の場

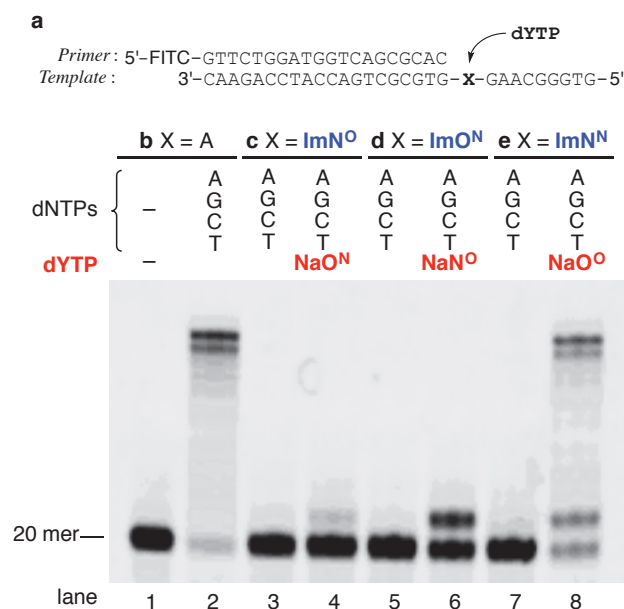


Figure 45 Im:Na塩基対を含む鎖伸張反応の検討 (a) Sequences of template and primer. (X = A, ImN⁰, ImO^N or ImN^N). The reactions were carried out in the presence or absence of dYTP (NaO^NTP, NaN⁰TP or NaO⁰TP) along with dNTPs. (b) The control reactions indicating the initial primer length (lane 1) and the fully elongated length (lane 2). (c) The reactions involving the ImN⁰:NaO^N, (d) ImO^N:NaN⁰, and (e) ImN^N:NaO⁰ base pairs.

* Ogataらは、KFを用いた場合にも、これらの塩基対を含む鎖伸張反応が進行しないことを報告している^{88,89}。

合と同様の鎖伸張生成物を与えることが明らかとなった (lane 8)。この結果は、テンプレート上 X の位置で ImN^N:NaO^O塩基対が形成された後、さらなる鎖伸張反応が進行したことを示唆している。

まず、ImN^O:NaO^N塩基対において鎖伸張反応が進行しなかった要因としては、本章第3節でも述べたように人工塩基対の取り込み効率の低さが挙げられる。一方、人工塩基対間の取り込み効率が改善された ImO^N:NaN^O塩基対においても鎖伸張生成物が観察されなかったのは、テンプレート上の天然塩基に対して NaN^Oのミスインコーポレーションが進行したためであると考えられる。すなわち、DNAポリメラーゼによる取り込みにより ImO^N:NaN^O塩基対が形成された後、その後の鎖伸張反応、すなわち WC塩基対の形成において NaN^Oの取り込みが競合し⁸⁸、鎖伸張効率が低下したためである⁸²。一方、ImN^N:NaO^O塩基対においては、相補塩基間の取り込み効率が高いことに加え、NaO^Oと天然型塩基とのミスマッチ塩基対形成が大きく低減しているために、完全鎖長生成物が観察されたと考えている。

以上のように ImN^N:NaO^O塩基対が有する水素結合様式は、一塩基挿入反応だけでなく、その後の鎖伸張反応においても有利に働くことが明らかとなった*。

* 鎖伸張生成物における塩基配列正確性には議論の余地を残すが、これについては次節にて解析する。

第5節 ImN^N:NaO⁰塩基対を含む PCR の検討³⁹

第4節では、ImN^N:NaO⁰塩基対形成後の鎖伸張反応について述べた。本節では、一連の鎖伸張反応を複数回繰り返す PCR の検討結果について述べる。

DNA ポリメラーゼにより触媒される PCR において、テンプレート DNA 中の X に対して対応するヌクレオシド三リン酸体 (dYTP) が 99.0%の選択性で取り込まれると仮定すると (残りの 1%は天然型塩基が誤って取り込まれた場合)、15 回の PCR サイクルにより増幅された DNA (2¹⁵ 倍に増幅) 中には人工塩基対 (X:Y) が 86% 保存されていることになる。すなわち 1 回の複製反応における選択性が 99.0%であったとしても、わずか 1.0%のミスインコーポレーションが指数関数的に蓄積される PCR においては十分な精度とは言えない。天然型 WC 塩基対の場合、DNA ポリメラーゼの種類にも依存するが、その精度は 99.9999%であると言われており、例えば KF の場合、テンプレート DNA 上の塩基に対して間違っただけの塩基を 1 万回に 1 回程度しか取り込まない⁹⁸。したがって、PCR により増幅可能な人工塩基対には、極めて高い基質選択性が求められる。

Hirao らの実験方法⁸³を参考に、中心付近に ImN^Nを有するテンプレート (55 mer) および 2 種のプライマー鎖 (40 mer および 24 mer) を合成した (Figure 46a)³⁸。これにより得られる増幅産物の鎖長 75 bp となる。まず、汎用される熱耐性 DNA ポリメラーゼである *Taq* DNA polymerase を用いて 15 サイクルの PCR を行なったところ、ImN^NTP、NaO⁰TP および dNTP 存在下、目的の増幅産物を得ることに成功した (Figure 46b, lane 4)。しかし、NaO⁰TP 非存在下においても同様の PCR 産物が観察された (lane 3)。これは増幅の過程で、テンプレート中の ImN^Nに対して NaO⁰が取り込まれた後、複製された新しいテン

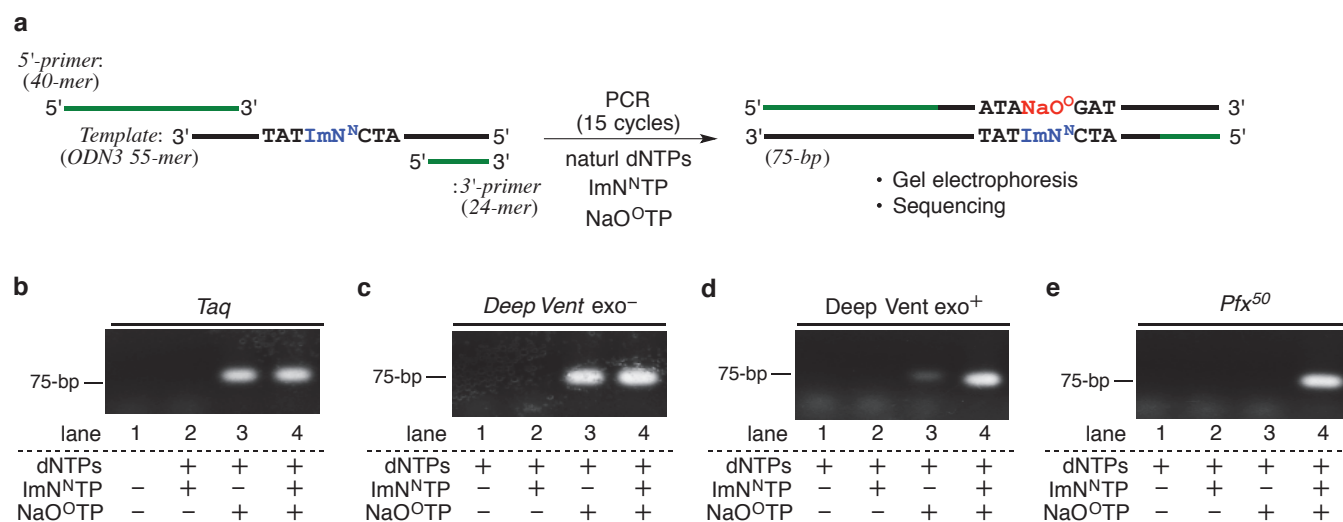


Figure 46 ImN^N:NaO⁰塩基対を含む PCR の検討 (a) Schematic representation of template and primers, and the resulting amplified product. Gel electrophoresis of PCR products obtained by using (b) *Taq* DNA polymerase, (c) 3'→5' exonuclease-deficient Deep Vent (*Deep Vent exo⁻*) DNA polymerase, (d) 3'→5' exonuclease-proficient Deep Vent (*Deep Vent exo⁺*) DNA polymerase, and (e) *Pfx⁵⁰* DNA polymerase under various dNTP conditions. (引用文献 39 より転載)

第2章 第5節
ImN^N:NaO⁰塩基対を含む PCR の検討

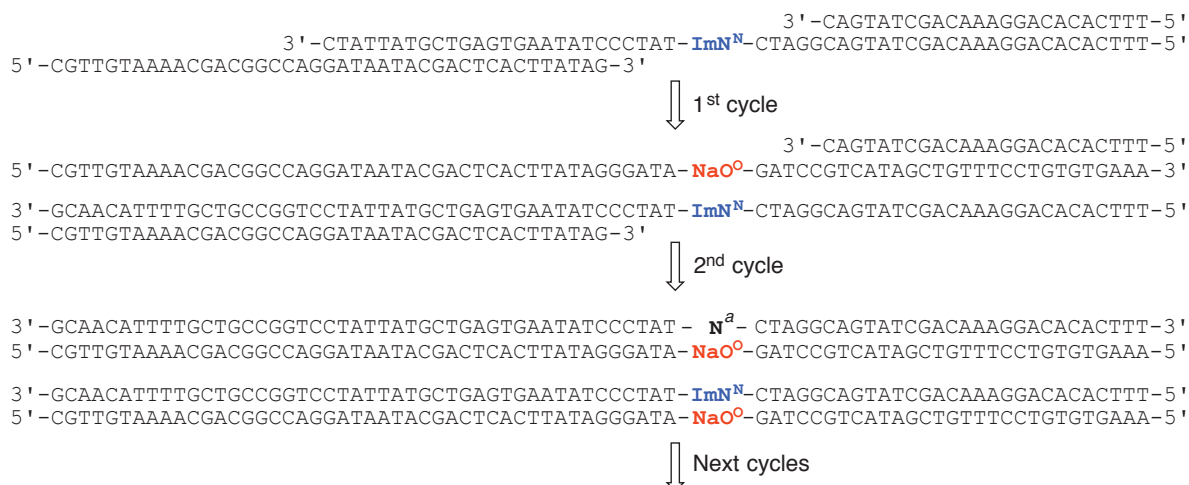


Figure 47 ImN^NTP 非存在下において PCR 産物が得られる理由 “N indicates natural nucleoside unit.

プレート中の NaO⁰に対して天然型塩基 (N)^{*}が間違っ取り込まれることにより以降の増幅反応が進行した結果であると考えられる (Figure 47)。

配列の正確性を維持したまま PCR が進行した場合、ImN^NTP、NaO⁰TP および dNTP の全てが存在する lane 4 の条件においてのみ増幅産物が観察されると予想される。これを指標に、更なる熱耐性 DNA ポリメラーゼのスクリーニングを実施した (Figure S2[†])。検討した 13 種の熱耐性 DNA ポリメラーゼのうち、代表的な結果を Figure 46c-e に示した。一般に、人工塩基対の取り込み反応においては family B に属し、かつ 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持たない DNA ポリメラーゼを用いた場合に複製反応の効率が向上する傾向にある^{83,92‡}。そこでまず、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を欠損した exonuclease deficient Deep Vent DNA polymerase (Deep Vent⁻) を用いて PCR を行なったところ、望みとする lane 4 の条件下の他に lane 3 に示す条件下においても増幅産物が観察された (Figure 46c)。すなわち、配列正確性の改善は見られなかった。一方、同種の酵素でありながら 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有した Deep Vent DNA polymerase (Deep Vent⁺) を用いた場合には、lane 4 の条件においてのみ十分な増幅産物を与える結果となった (Figure 46d)。同様の傾向は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する全ての酵素において観察され (Figure S2j-m)、最も正確な増幅産物を与えると推定されたのは、Pfx⁵⁰ DNA polymerase を用いた場合であった (Figure 46e)。一般に、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は DNA ポリメラーゼによる複製反応において塩基配列の校正機能を担うとされている。これまでに開発されてきたいくつかの人工塩基対を含む PCR においても、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が塩基対認識に有利に働くものが報告されている^{63,84}。天然型 WC 塩基対において A:T 塩基対は二本の水素結合により、G:C 塩基対は三本の水素結合形成によりその特異性を維持している。ImN^N:NaO⁰塩基対間での四本の水素結合形成は DNA ポリメラーゼによる校正過程において正しい塩基対であると認識され、A:NaO⁰あるいは G:NaO⁰といった

* 本論第2章第3節で述べた一塩基挿入反応の結果から A または G がミスインコーポレーションを引き起こしたと推定される。

† 章末参照。

‡ 複製反応の効率が向上する傾向にはあるが、選択性の面では必ずしも最適な結果が得られるという意ではない。

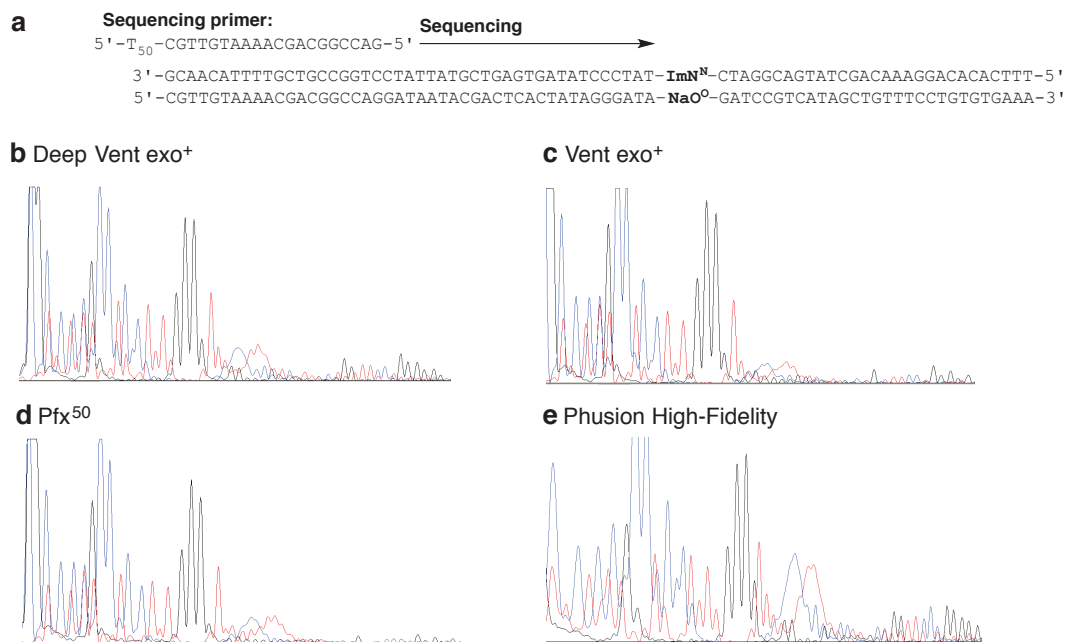


Figure 48 ImN^N:NaO^O塩基対を含む PCR 産物のシーケンス解析 (a) Sequence of sequencing primer and PCR product. (b) The read-through peaks of PCR products obtained by Deep Vent exo⁺, (c) Vent exo⁺, (d) Pfx⁵⁰ and (e) Phusion High-Fidelity (引用文献 39 より転載)

望まない塩基対形成を排除した結果であると考えられる。

さらに、配列正確性を確認するため、15 サイクルの PCR により得られた増幅産物のシーケンス解析を実施した。ImN^N:NaO^Oが正しく保存されている場合、サンガー法*による一般的なシーケンス解析では対応する三リン酸体が存在しないため、read through peak の停止が確認される。実際に、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼを用いた PCR により得られた増幅産物のシーケンス解析の結果、得られた read through peak は ImN^N塩基に相当する位置で停止していることが明らかとなった (Figure 48)[†]。

* サンガー法 (ジデオキシ法)では、目的の1本鎖 DNA をテンプレートとして DNA ポリメラーゼと dNTP を用いて相補 DNA 鎖を合成する際、ジデオキシヌクレオチド三リン酸体 (ddNTP) を加えて複製反応を停止させ、様々な長さのフラグメント DNA 鎖を合成する。得られた反応生成物をキャピラリー電気泳動装置にかけて分離し、DNA 配列を明らかにする。

[†] シーケンスプライマーに付与した polyT タグに由来するノイズの影響を避けるため、ddA の取り込みに由来する read through peak は解析から除外した。

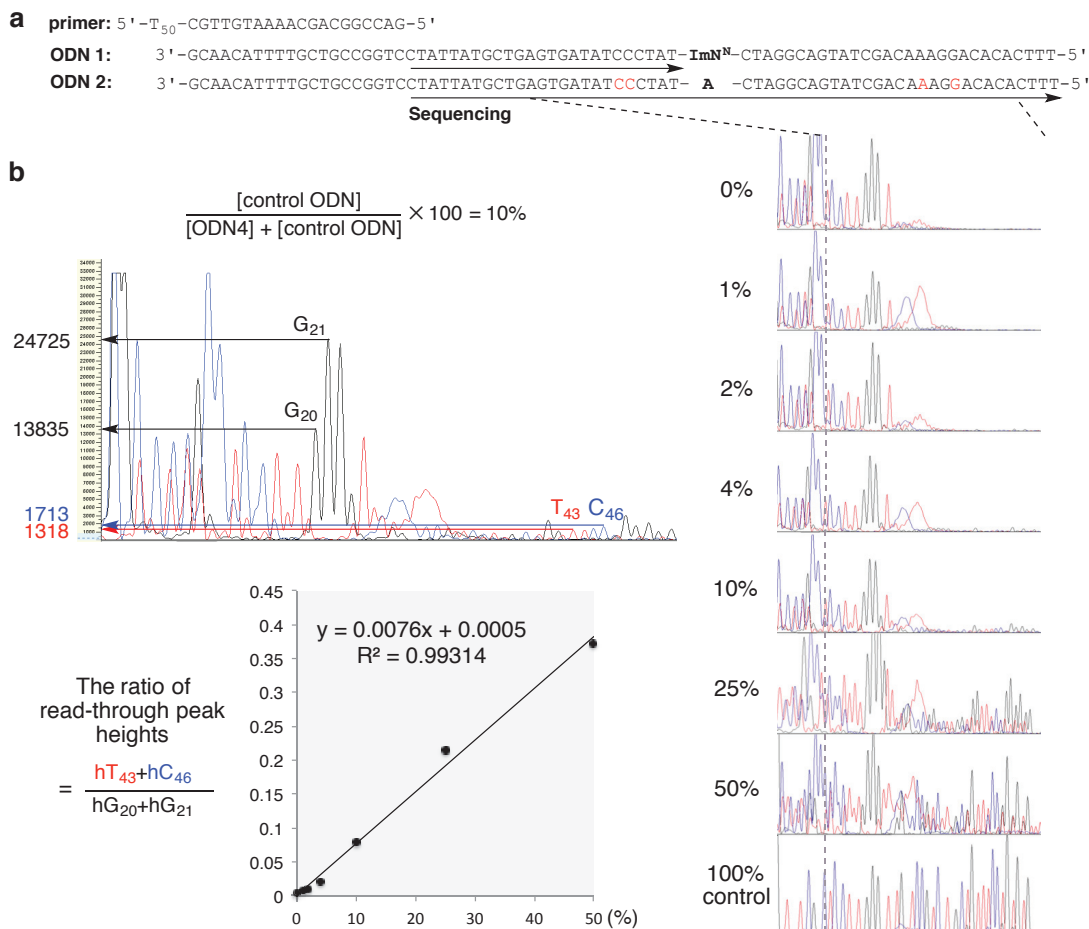


Figure 49 シーケンス解析に基づく total mutation rates の算出 (a) Sequence of sequencing primer and ODNs for calibration, (b) The read-through peaks of ODN4 containing 0%, 1%, 2%, 4%, 10%, 25%, and 50% control ODN, (c) Representative data of peak height quantification at four nucleotide positions in a sequencing pattern (10% ratio). The sequencing peak heights at the G20, G21, T43 and C46, in the sequencing data was used to prepare the calibration plot. (d) The standard curve used for the calculation of the total mutation rates. (引用文献 39 より転載)

さらに、各 read through peak におけるピーク高さを天然型のものと比較することにより、15 サイクルの PCR における ImN^N:NaO⁰塩基対の total mutation rate を算出した^{77,83}。すなわちまず、PCR 産物と同様の配列を有する 75 mer の ImN^N含有テンプレート (ODN1) ならびに、ImN^Nを天然型 A に置き換えた天然型テンプレート (ODN2) を化学合成した (Figure 49)。ImN^Nを含む ODN1 に対して天然型 ODN2 を 0%、1%、2%、4%、10%、25%、50%の割合で添加して 15 サイクルの PCR を行なった後、得られた増幅産物のシーケンス解析を行い、T43 および C46 におけるピーク高さの平均値を G20 および G21 におけるピーク高さの平均値で除した値を縦軸に、添加した ODN2 の割合を横軸にとったグラフ (calibration plot) を作成した。これを用いて先のシーケンス結果 (Figure 48) を解析したところ、ImN^N:NaO⁰塩基対は 15 サイクルの PCR 後も 84%以上正しく保存されていることが明らかとなった (Table 9)。最も良好な結果を与えた Pfx⁵⁰ DNA polymerase の場合その精度は 94%であり、1 サイクルあたりの精度は 99.5%以上であると算出された。

また、天然型 ODN2 をテンプレートとして用い、ImN^NTP、NaO^OTP および dNTP 存在下 PCR を行なうことにより得られた増幅産物のシーケンス解析においては上述のような read through peak の停止が観察されなかった。すなわち、天然塩基配列に対する ImN^Nあるいは NaO^Oのミスインコーポレーションも生じていないことが確認された (data not shown)。

entry	DNA polymerase	Total mutation rate	Fidelity per doubling
1	Deep Vent exo ⁺	< 13%	> 99.0%
2	Vent exo ⁺	< 7%	> 99.5%
3	<i>Pfx</i> ⁵⁰	< 6%	> 99.5%
4	Phusion High-Fidelity	< 18%	> 98.6%

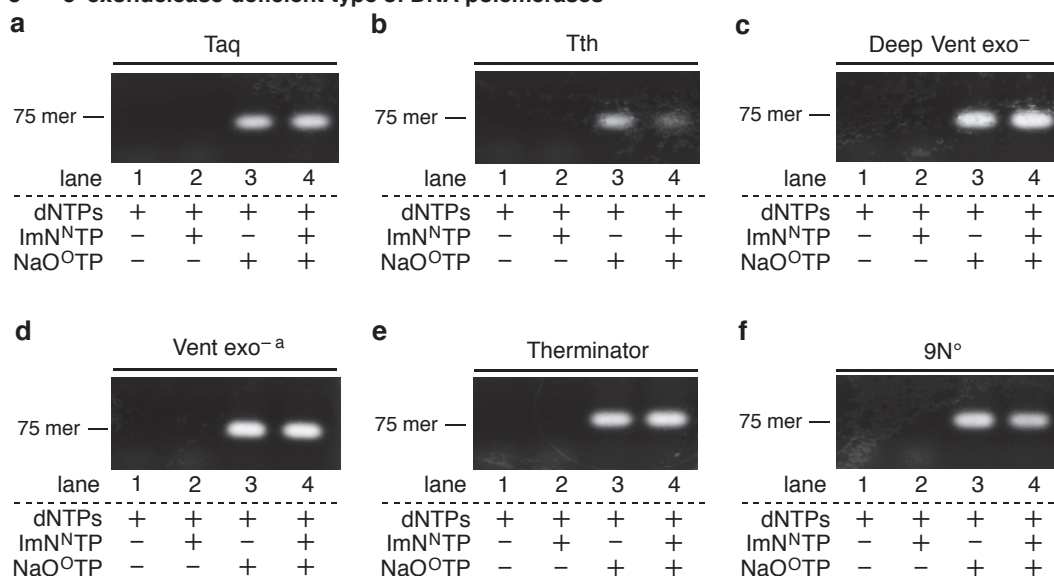
Table 9 ImN^N:NaO^O塩基対を含む PCR における配列正確性の評価 (Total mutation rates)
(引用文献 39 より転載)

これまでに、Benner ら、Romesberg ら、および Hirao らのグループにより PCR においても 1 サイクルあたり 99%以上の選択性を示す人工塩基対が報告されている (Figures 32c and 33bc^{*})^{77,83,84,99-103}。塩基対間に水素結合を有さない疎水性塩基対においてその精度はより高まる傾向にあるものの⁶³、四本の水素結合によりペアを形成する人工塩基対では前例がなく、その選択性もこれらに匹敵するものである^{84,99,100†}。以上のことから著者は、二本あるいは三本の水素結合により形成される WC 塩基対に加えて、新たに四本の水素結合によってペアを形成する人工塩基対 (ImN^N:NaO^O) の開発に成功した。すなわち ImN^N:NaO^O塩基対を用いれば、Figure 26 に示した戦略に基づいて、第 2 世代環状型 iRed の構築が可能となることが示された。

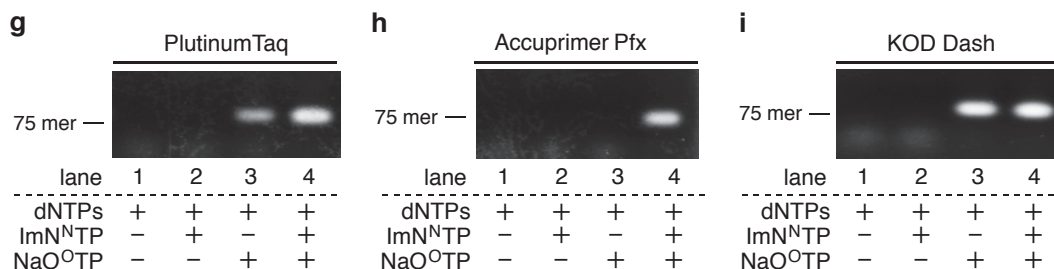
* 一例の構造を示した。詳細については引用文献 63 参照。

† 引用文献として特に水素結合によりペアを形成する人工塩基対を挙げた。

• 3'→5' exonuclease-deficient type of DNA polymerases



• mix type of DNA polymerases



• 3'→5' exonuclease-proficient type of DNA polymerases

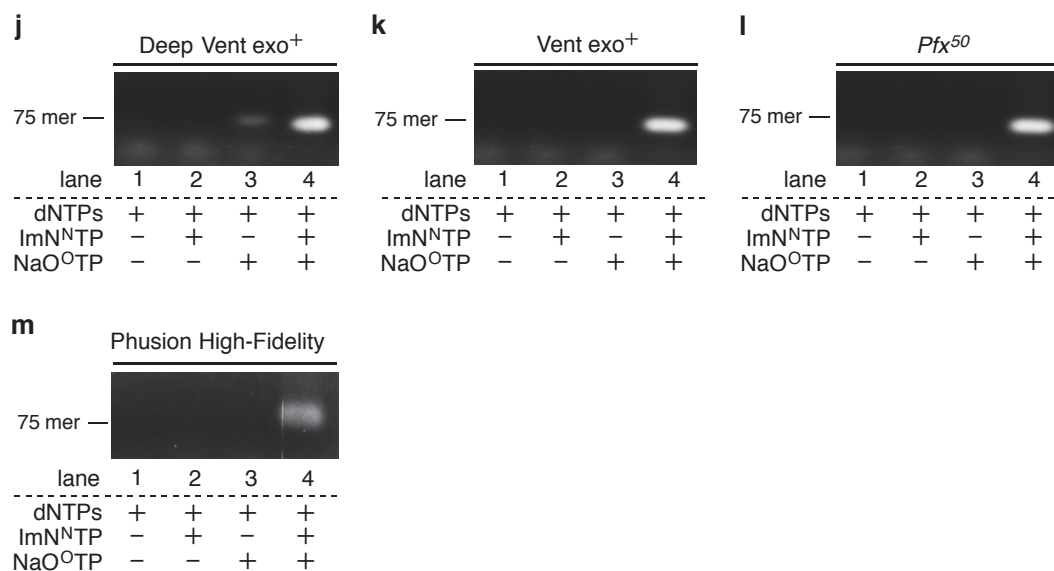


Figure S2 ImN^N:NaO⁰塩基対を含むPCRにおけるDNAポリメラーゼのスクリーニング Analysis by denaturing gel electrophoresis and sequencing of PCR products after 15 cycles of PCR under different conditions. (a)–(f) are types of 3'→5' exonuclease-deficient DNA polymerases, (g)–(i) are mix types of 3'→5' exonuclease-deficient and 3'→5' exonuclease-proficient DNA polymerases, and (j)–(m) are types of 3'→5' exonuclease-proficient DNA polymerases. (引用文献 39 より転載)

第6節 ImN^N:NaO^O塩基対を利用したクリックケミストリーによる DNA 二本鎖両末端の環状化法開発

第5節では、第2世代環状型 iRed 構築のため、PCR により増幅可能な第3番目の人工塩基対 (ImN^N:NaO^O塩基対) の開発研究について述べた。本節では、ImN^N:NaO^O塩基対を利用したクリックケミストリーによる DNA 二本鎖両末端部での選択的な環状化反応について述べる。

Figure 26 に示した戦略に従い、PCR により DNA 二本鎖両末端部へ導入する ImN^N:NaO^O塩基対を足がかりとして CuAAC 反応による環状化を実現するためには、それぞれの人工塩基へアジド基およびエチニル基を導入する必要がある。

ところで一般に、DNA ポリメラーゼと基質であるヌクレオシド 5'-三リン酸体との間の相互作用においては、ポリメラーゼ中のアミノ酸側鎖と基質の塩基間におけるスタッキングや CH- π 相互作用が重要であると考えられている。Figure 50 に X 線結晶構造解析により明らかとされた *Bacillus* DNA polymerase と新しく取り込まれる dNTP における酵素-基質間の相互作用を示した⁹¹⁾。次に取り込まれる dNTP の塩基部はメジャーグループ側において、DNA ポリメラーゼの O-ヘリックスに存在する Phe710 (F710)、Tyr714 (Y714) およびプライマー鎖の 3'-末端に位置する塩基とスタッキング相互作用を示している。これは人工塩基対の複製反応においても重要な相互作用を担う。本論第2章第2節でも述べたように、Hirao らのグループにより開発された人工塩基対 (Ds:Px 塩基対) において、塩基部メジャーグループ側への共役系官能基の導入 (Ds:diol1-Px 塩基対) は、DNA ポリメラーゼによる取り込み反応の効率ならびに選択性向上に有利に働くことが明らかとされている (Figure 33)。

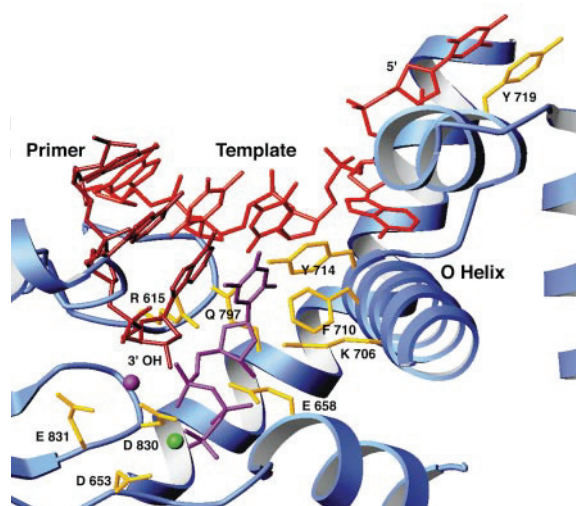
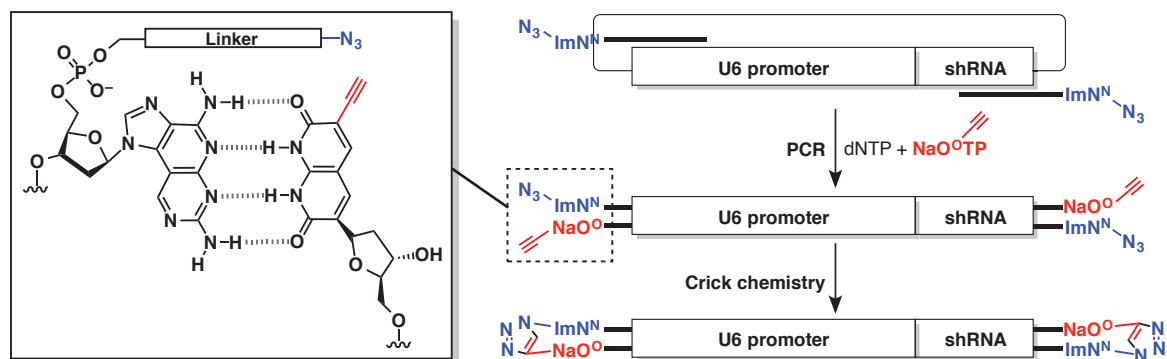


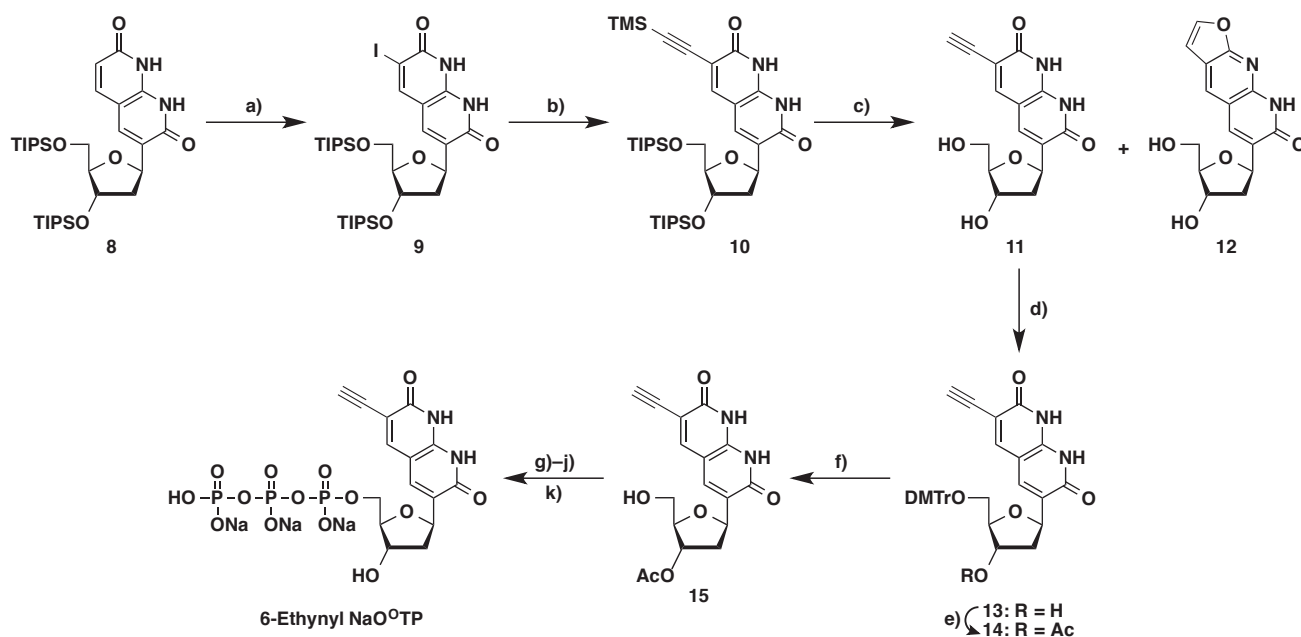
Figure 50 *Bacillus* DNA polymerase と新しく取り込まれる dNTP における酵素-基質間の相互作用 (引用文献 104 より転載)

* 相互作用に関与するアミノ酸残基は DNA ポリメラーゼ一般に汎く保存されている。

Figure 51 ImN^N:NaO^O 塩基対を利用したクリックケミストリーによる第2世代環状型 iRed の構築戦略

そこで著者は Figure 51 に示したように*、プライマー鎖へ ImN^N 塩基ならびにリンカーを介してアジド基を導入し、PCR により取り込まれる 5'-三リン酸体として NaO^OTP 上へエチニル基を導入することとした†。

エチニル基を有する NaO^OTP (6-ethynyl NaO^OTP) の合成は、まず、NaO^Oヌクレオシド誘導体 **8**³⁷ を出発原料とし、NIS を用いて 6 位へのヨード基の導入を行なった (Scheme 3)。続いて、得られた化合物 **9** と TMS-acetylene とを菌頭カップリングの条件に附すことによりエチニル基を導入し、化合物 **10** を得た。このものを TBAF で処理することにより TMS 基ならびに糖部水酸基の TIPS 基を除去し、6-ethynyl

Scheme 3 6-Ethynyl NaO^OTP の合成

Reagents and conditions: (a) NIS, DMF; (b) TMS acetylene, PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, MeCN, Et₃N; (c) TBAF, THF; (d) DMTrCl, pyridine; (e) Ac₂O, pyridine; (f) 3% TFA; (g) 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, pyridine, 1,4-dioxane; (h) bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate, tributylamine, DMF; (i) 1% iodine in pyridine-H₂O; (j) NH₄OH; (k) DIAION PK212 and then WK20.

* すなわち、Figure 26 に示した戦略において人工塩基 X を ImN^N、YTP を NaO^OTP とした。

† 合成戦略上、NaO^O 塩基へエチニル基の導入が ImN^N 塩基上への導入と比較して容易であることから、NaO^O を三リン酸として用いることとした。

NaO⁰ヌクレオシド誘導体 **11** を得た*。続いて、化合物 **11** の糖部水酸基を先と同様に適切に保護†すること
で 5'-三リン酸化の基質 **15** へと導いた。化合物 **15** を三リン酸化の条件⁹⁰に付した後、最後に濃アン
モニア水中にて糖部 3'-位のアセチル基を除去することで所望の 6-ethynyl NaO⁰TP (tri-sodium salt) を合
成することが出来た。

一方、Im^N塩基およびアジド基を有するプライマーの設計は、以下のように立案した。すなわち、
プライマー鎖の 5'-末端部へ Im^N塩基を導入し、さらに 5'-末端側へリン酸ジエステル結合を介してア
ジド基含有リンカーを延長するという戦略である (Figure 51)。

ところで本研究に先立って著者らのグループでは、四本の水素結合によりペアを形成する Im:Na 塩
基対のうち ImO^N:NaN^O塩基対を両末端部に有する短鎖二本鎖 DNA において、塩基対間での結合形成に
おいて必要なリンカー鎖長の検討を行なっている¹⁰⁴。その結果、Figure 52 に示したリンカーを介して
CuAAC 反応による架橋形成が進行することを明らかとした。このものと類似のリンカー鎖長であれば、
Im^N:NaO⁰塩基対においても CuAAC 反応が進行すると期待される。しかし、第2世代環状型 iRed の構
築では PCR (酵素反応) により Im^N:NaO⁰塩基対を導入するため、リンカー構造へのスチルベン基の導
入は正確な塩基対形成の妨げになることが懸念された‡。

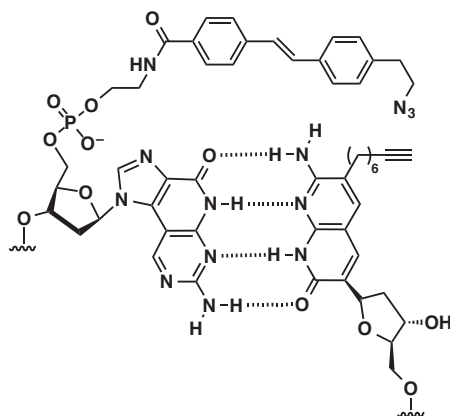


Figure 52 ImO^N:NaN^O塩基対間でのリンカーを介した CuAAC 反応

また Furuita、著者らは、ImO^N:NaN^O塩基対を含む DNA 二本鎖の高次構造を NMR により解析して
いる (Figure 53)^{105§}。その結果、四本の水素結合を形成する Im:Na 塩基対を介した CuAAC 反応による架
橋形成を可能とするリンカー鎖長は、最低でも 12 Å 程度を必要とすることが推測された。以上のこと
から本研究では、プライマー鎖へ導入するリンカーとして末端にアジド基を有した PEG 鎖を選択し、
Figure 54 に示したように設計した。

* 化合物 **12** の副生を防ぐため、7 位カルボニル基の保護を検討したが、選択的に導入かつ脱保護可能な保護基の選択は困難であ
った。

† Schemes 1 および Scheme 2 に示した 5'-三リン酸体の合成を参照のこと。

‡ 実際に、ImO^N:NaN^O塩基対を両末端部に有する化学合成の短鎖二本鎖 DNA での検討において、リンカー部が DNA 二本鎖へ
インターカレートすることが示唆された。

§ Im^N:NaO⁰塩基対においても NMR による高次構造解析を試みたが解析が困難であった。

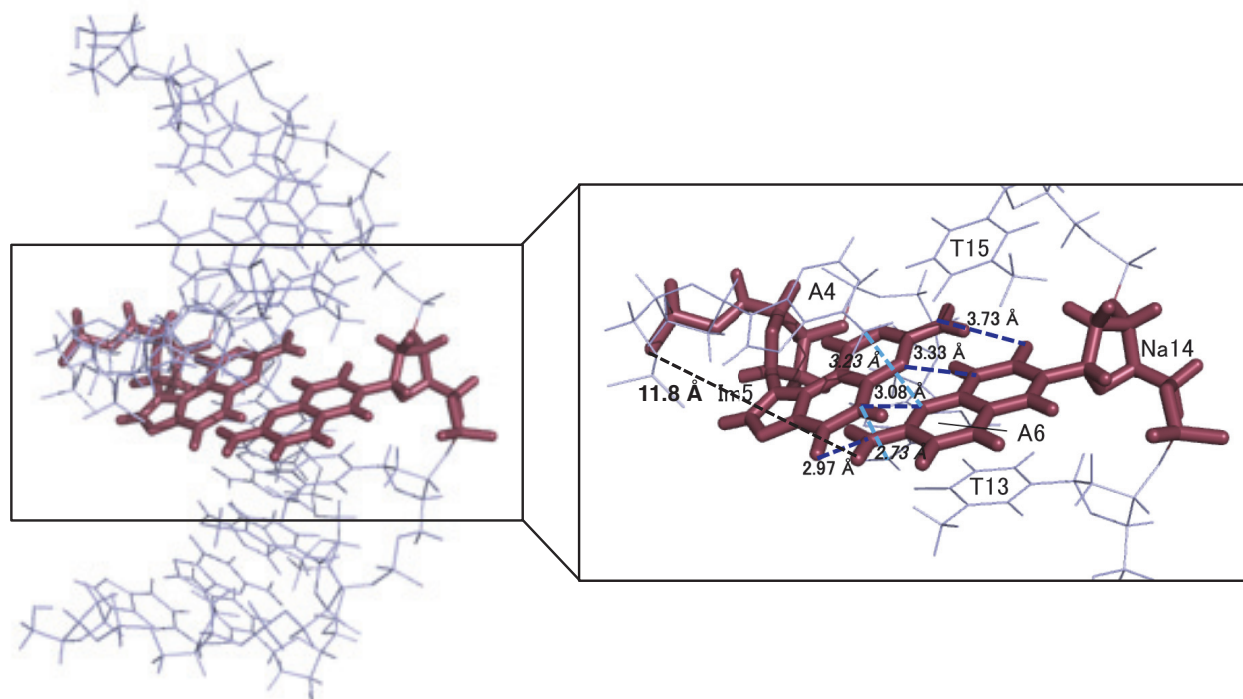


Figure 53 ImO^N:NaN^O 塩基対を含む DNA 二本鎖の NMR 高次構造解析 The lowest energy structure of the DNA duplex containing ImO^N:NaN^O base pair. DNA duplex was formed with 5'-d(CGAA-ImO^N-AACC)-3' and 5'-(GGTT-NaN^O-TTCG)-3'. (引用文献 106 より改変)

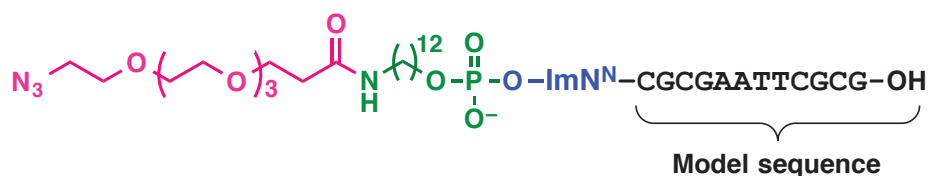
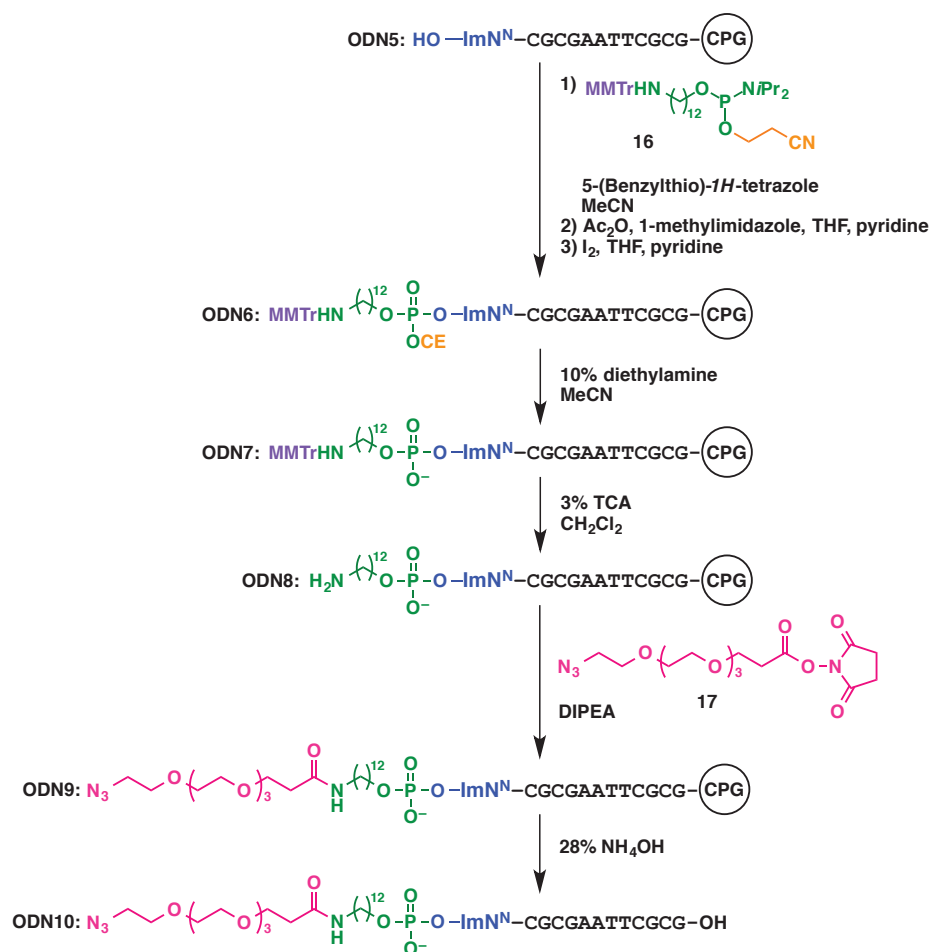


Figure 54 ImN^N を含むプライマー鎖に導入するリンカーの設計

まず始めに、本アジド PEG リンカーを介して ImN^N:NaN^O 塩基対間での CuAAC 反応が進行するかを明らかとするため、短鎖モデル配列 (Figure 54) において検討を行なうこととした。5'-末端に ImN^N を有する ODN5 を合成した後、ホスホロアミダイト法により C12 アミノリンカー¹⁶ を縮合することで ODN6 (CPG bound) を得た (Scheme 4)。一般的な ODN の固相合成では、続く濃アンモニア水中での加熱処置により CPG 樹脂上からの切り出しと塩基部保護基ならびリン酸部シアノエチル (CE) 基の脱保護を行なう。しかし、本法ではさらに ODN 上へのリンカー鎖の延長を行なうため、まず、10% ジエチルアミン処理により CPG 樹脂上にてリン酸部の CE 基のみ脱保護を行ない ODN7 (CPG bound) を得た。続いて、トリクロロ酢酸を用いて 5'-末端アミノ基上のモノメトキシトリチル基を除去することで ODN8 (CPG bound) とした後、5'-末端部のアミノ基と NHS エステルアジド PEG リンカー¹⁷ を縮合させ、ODN9 (CPG bound) を合成した。最後に、得られた ODN9 (CPG bound) を濃アンモニア水中加熱処理することで、5'-末端部に ImN^N 塩基およびリンカーを介してアジド基を有する短鎖モデル配列 (ODN10) の合成を達成した。



Scheme 4 5'-末端部に ImN^N 塩基およびアジド PEG リンカーを有する ODN 合成

得られた **ODN10** は自己相補配列であり、Figure 55 に示したような DNA 二本鎖を形成する。そこで、両末端部の ImN^N 塩基に対して、先に合成した 6-ethynyl NaO⁰TP の一塩基挿入反応を行い、続く CuAAC 反応により両末端部での結合形成を確認することとした。

ところで、DNA のような高極性生体高分子において CuAAC 反応を行なう際には、用いた銅触媒の除去が困難となる場合が多い。したがって、得られた CuAAC 生成物を細胞内へ導入する場合、これに由来する毒性発現が問題視されている。これを解決するため、Chan らは固相ポリマー上に担持した銅触媒による CuAAC 反応を報告している (Figure 56)¹⁰⁶。彼らの銅触媒では、ODN 上の CuAAC 反応において汎用されるリガンドである tris(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA)^{107,108} とのキレート形成を利用して固相への担持を行なっている。したがって、本検討では彼らのポリマー担持型銅触媒の利用が反応効率ならびに反応後の精製過程の両面から有益であると考えた*。

まず、合成した **ODN10** をアニーリング条件に附すことで自己相補の DNA 二本鎖を形成させ、Pfx⁵⁰ DNA polymerase を用いた 6-ethynyl NaO⁰TP の一塩基挿入反応を行なった (Figure 55a)。反応を HPLC により追跡したところ、1 時間後には **ODN10** に由来するピークが完全に消失し、鎖伸長生成物 (**ODN11**)

* Ichikawa らにより同様のポリマー担持型銅触媒を用いた ODN 上での CuAAC 反応が報告されている¹⁰⁹。

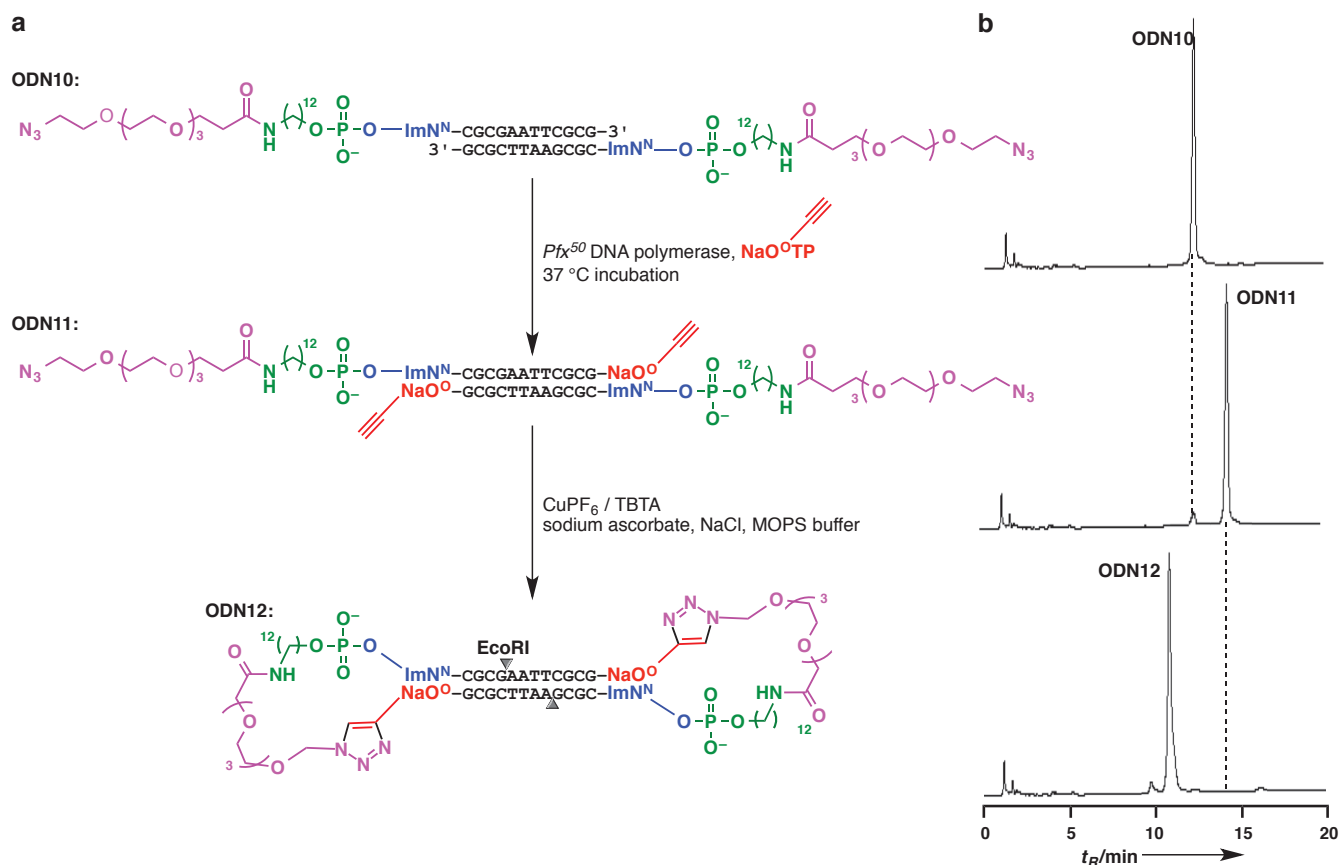


Figure 55 ImN^N:NaO⁰ 塩基対を含むモデル配列を用いた環状型 ODN の合成 (a) Schematic of the dumbbell-shaped ODN synthesis with ImN^N:NaO⁰ using CuAAC reaction. (b) HPLC analyses. The samples were analyzed on μ -BONDASPHERE (Waters, 150 \times 3.9 mm), eluted with linear gradient from 18.5% to 27.5 % CH₃CN in 0.1 N TEAA buffer (pH 7.0) (1 mL/min for 20 min).

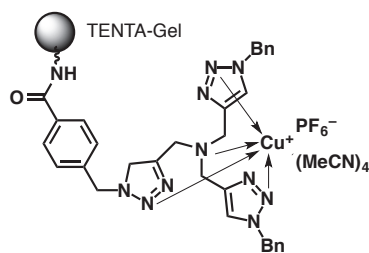


Figure 56 ポリマー担持型同触媒の構造

に対応するピーク*が観察された (Figure 55b)。続いて、このものを別途調製したポリマー担持型銅触媒存在下、CuAAC 反応の条件に付した。その結果、反応開始 1 時間後には **ODN11** に由来するピークの消失ならびに新たなピークの存在が確認出来た。しかし、CuAAC 反応においては反応前後の分子量変化が生じないため、新たに得られたピークが環状体 (**ODN12**) に対応するものであることを明らかにすることは困難であった。また、反応が必ずしも分子間かつ両末端部で進行しているとは限らない。そこで、得られた生成物を制限酵素 EcoR1 で処理し、得られた生成物の分子量が両末端部での環上体由来する

* MS 解析により 6-ethynyl NaO⁰TP の取り込みが進行したことを確認している (実験の部参照)。

ものであることを確認した (Figure S3)*。

以上のことから、著者はまず、短鎖モデル配列において ImN^N:NaO^o 塩基対を足がかりとした CuAAC 反応による DNA 二本鎖の環状化に成功した。

* 望み通り両末端部での結合形成が進行している場合、制限酵素処理により **ODN12** は2つのフラグメントに切断される。一方、仮に CuAAC 反応が片側でしか進行していない場合には3つのフラグメントに切断されるため、両者を区別することが可能となる。MS 測定により観察された分子量値については実験の部 Figure S3 参照。

第7節第2世代環状型 iRed の構築と遺伝子発現抑制効果

第6節では、短鎖モデル配列において $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対を足がかりとした DNA 二本鎖両末端部位選択的なアジド基およびエチニル基の導入と CuAAC 反応による環状化について述べた。第7節では、PCR による $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 基の導入とこれを利用した第2世代環状型 iRed の構築および遺伝子発現抑制効果について述べる。

まず、第6節で述べたモデル配列と同様の方法にて、pGL3 Fluc 標的の第2世代環状型 iRed*を構築可能なプライマー鎖2種を合成した。すなわち、forward 側および reverse 側に結合可能なプライマー配列の各 5'-末端に ImN^{N} 塩基を導入し、さらにアジド PEG リンカーを延長した (Figure 57a, ODNs 13 and 14)。続いて、本論第2章第5節で最適化した PCR 条件に従い、pGL3 Fluc を標的とした shRNA 発現プラスミドのうち U6 プロモーターおよび shRNA コード領域とをテンプレートとし、合成したアジド PEG リンカー付 ImN^{N} プライマー鎖2種ならびに 6-ethynyl NaO^{O} TP を用いて PCR を行なった (Figure 57a)。この時、得られた増幅産物の量は天然型のプライマーならびに dNTP を用いた場合と同等であり、反応系中に 6-ethynyl NaO^{O} TP を含む場合にも問題なく PCR が進行することが明らかとなった (Figure 57b)。また別途、得られた増幅産物のシーケンス解析を実施ところ、塩基配列の変異は確認されなかったことから、天然型 WC 塩基対形成領域における 6-ethynyl NaO^{O} TP のミスインコーポレーションは生じていないことが示唆された (data not shown)†。

* 配列設計は、本論第1章 第1節 Figure 10 に同じ。

† 鎖長 369 bp からなる増幅産物のため、シーケンス解析データは掲載しない。

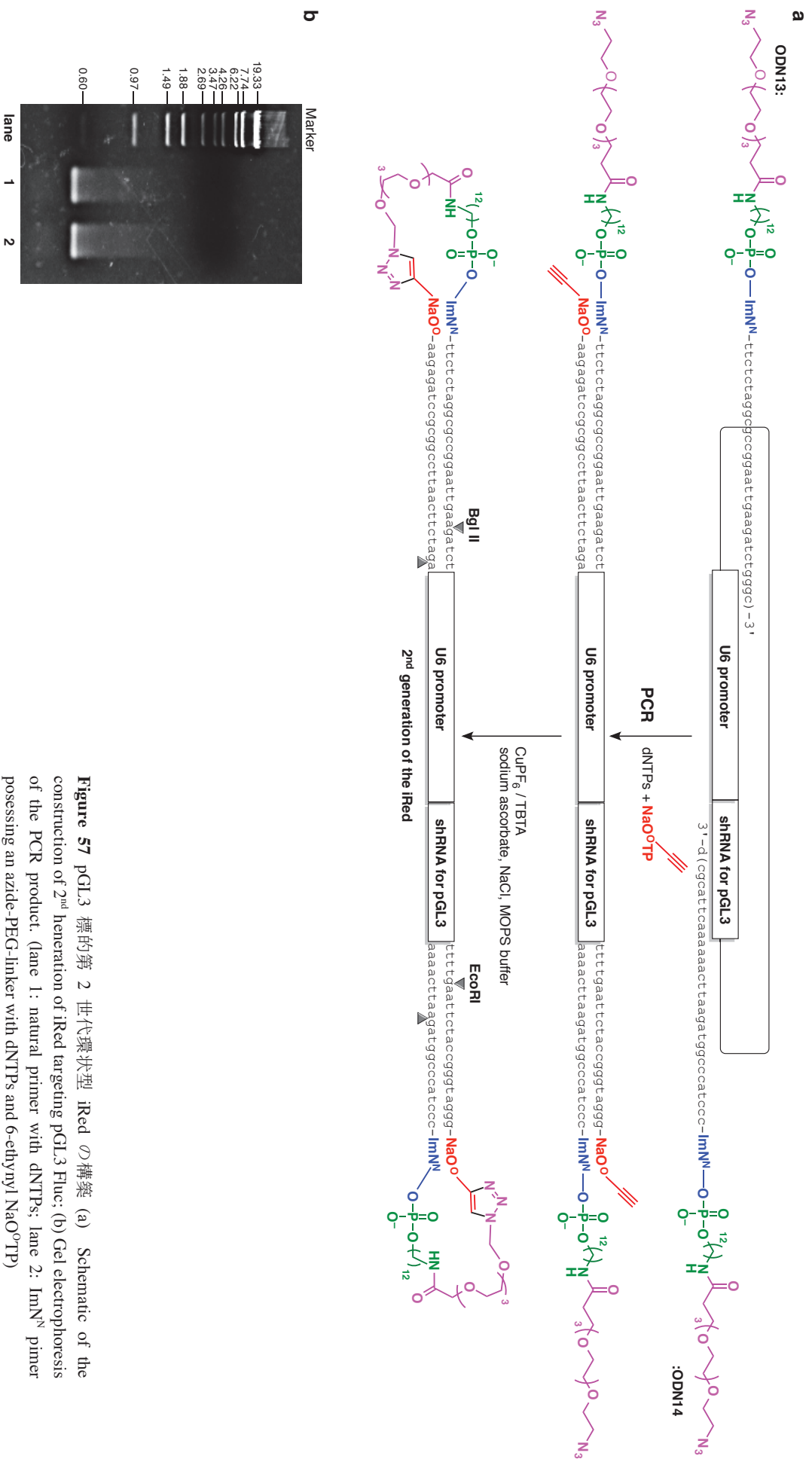


Figure 57 pGL3 標的 第 2 世代環状型 iRed の構築 (a) Schematic of the construction of 2nd generation of iRed targeting pGL3 Fluor; (b) Gel electrophoresis of the PCR product. (lane 1: natural primer with dNTPs; lane 2: ImN^N primer possessing an azide-PEG-linker with dNTPs and 6-ethynyl NaO^oTP)

得られた増幅産物を精製後、本論第2章第6節で述べたモデル系と同様の条件にて CuAAC 反応を行なった。得られる産物の分子量は約 220 kDa であるため MS および HPLC による反応の追跡は困難であった*。そこでより詳細に構造を解析するため、Figure 57 に示した位置でそれぞれ制限酵素処理を行い、得られたフラグメントの MS 解析を実施した。すなわちまず、得られた第2世代環状型 iRed を Bgl II で処理したところ、センス鎖[†]5'-末端側 (左側部分) での環状化が進行したことを示す 16053.8 (MH⁻) の分子量ピークが観察された (Figure 58a)。同様に、EcoRI で処理することによりセンス 3'-末端側 (右側部分) でも CuAAC 反応が進行したことを示す 10542.9 (MH⁻) の分子量ピークが確認された (Figure 58b)。

以上のことから、鎖長 369 bp の PCR 増幅産物においても ImN^N:NaO⁰塩基対を利用した二本鎖両末端部での CuAAC 反応が進行し、第2世代環状型 iRed を構築することに成功した。

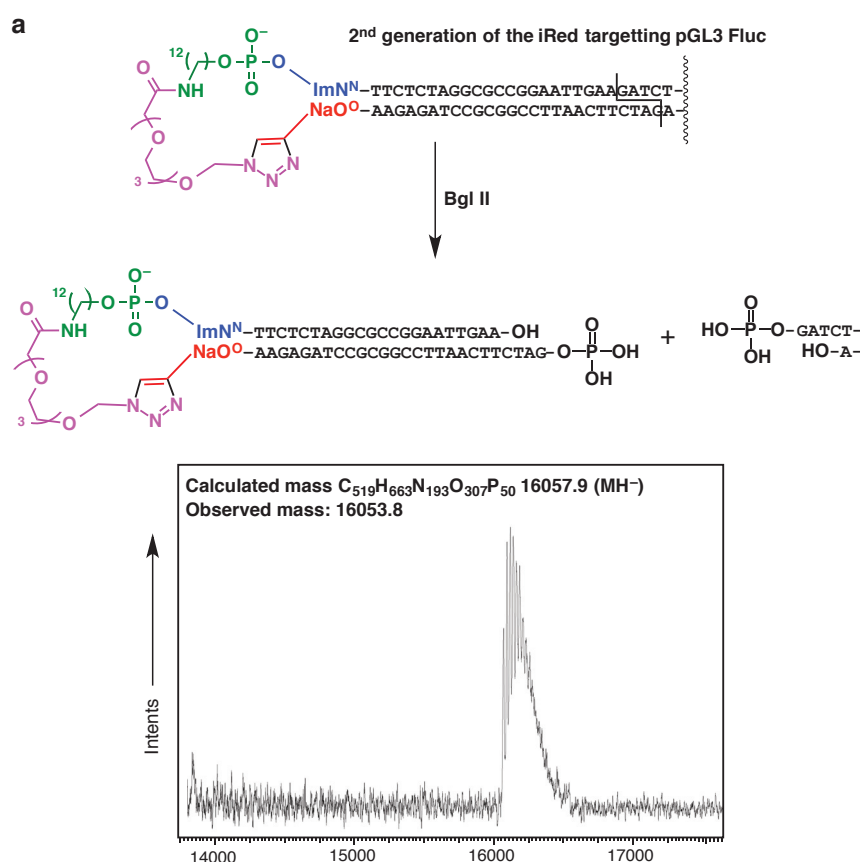


Figure 58a pGL3 標的 pGL3 Fluc 標的の第2世代環状型 iRed の制限酵素処理による切断と MALDI-TOF/MS による構造解析 (a) Digestion of left fragment of the 2nd generation of iRed targeting pGL3 Fluc using Bgl II

* 反応の追跡は 3%変性 PAGE により実施したが、369 bp からなる生成物ではあるため十分な移動度が得られず、必ずしも CuAAC 反応の進行を示唆するものでは無かった。

[†] shRNA のコード配列を有する鎖をセンス鎖と呼ぶ。

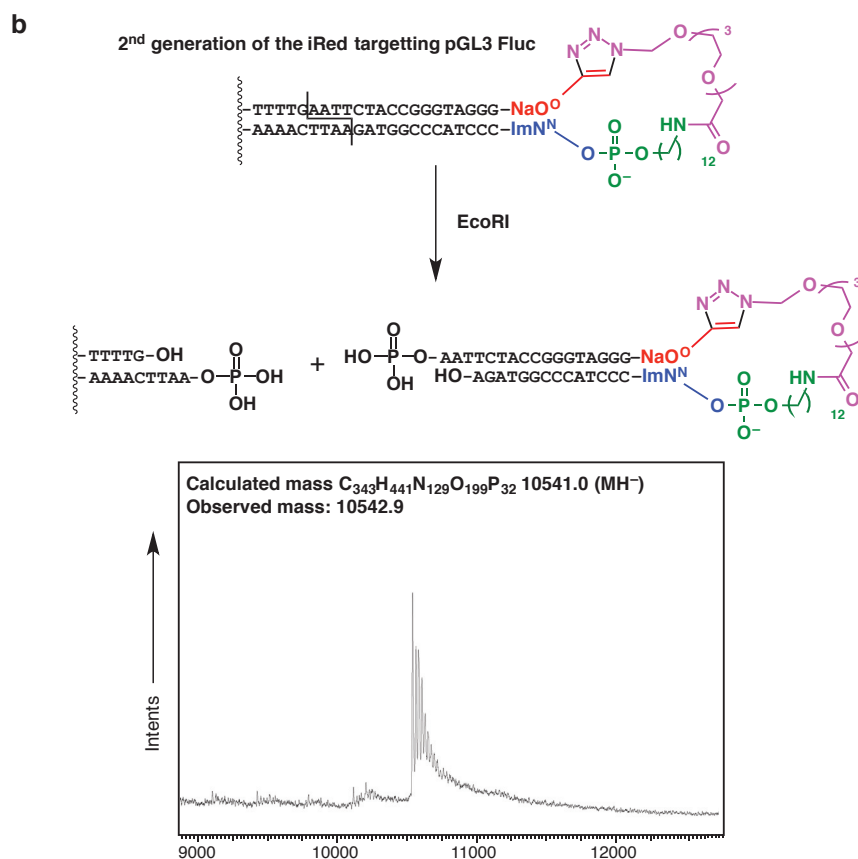


Figure 58b pGL3 標的 pGL3 Fluc 標的の第2世代環状型 iRed の制限酵素処理による切断と MALDI-TOF/MS による構造解析 (b) Digestion of right fragment of the 2nd generation of iRed targeting pGL3 Fluc using EcoRI.

続いて、得られた pGL3 Fluc 標的の第2世代環状型 iRed の遺伝子発現抑制効果を評価した。すなわち、構築した pGL3 Fluc 標的の第2世代環状型 iRed および比較対象として shRNA 発現プラスミド、合成 shRNA、iRed と同じ塩基配列を有する天然型二本鎖 DNA (natural device) および第1世代 dSC iRed を pGL3 Fluc ならびに補正用として Rluc をコードする2種のプラスミドとともに HeLa 細胞へ共導入した。24 時間後にその遺伝子発現抑制効果を観察したところ、shRNA 発現プラスミドは 95% 以上の高い RNAi 効果を示した (Figure 59)。同モル濃度条件下、合成 shRNA はプラスミドよりは劣るものの pGL3 Fluc 発光の現弱が確認された。一方、第2世代環状型 iRed は等モル条件下、第1世代 dSC iRed よりも高い遺伝子発現抑制効果を発揮した。観察された第2世代環状型 iRed の遺伝子発現抑制効果は、細胞内導入後 24 時間の時点において natural device とほぼ同等であるが、今後さらに長期での RNAi 効果の評価するとともに、両末端部の環状化が自然免疫応答発現に与える影響^{*}について評価したい。

* 短鎖 DNA 分子により誘起される自然免疫応答において、DNA 分子 5'-末端部の構造が認識の鍵となることが報告されており¹¹⁰、DNA 二本鎖両末端部の環状化もまた自然免疫応答の回避に有利に働く可能性が高い。

第2章 第7節
第2世代環状型 iRed の構築と遺伝子発現抑制効果

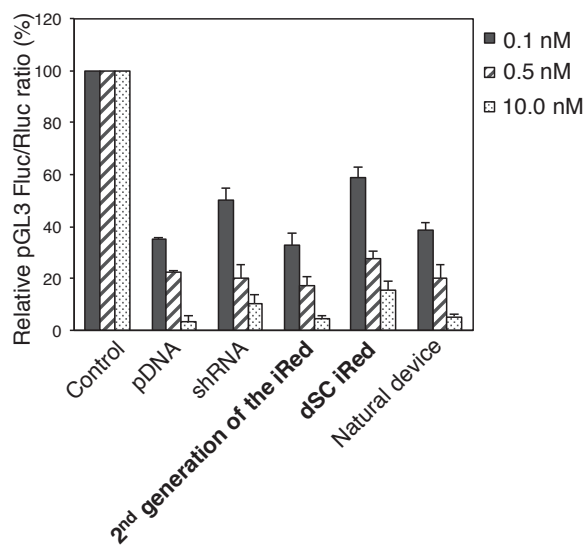


Figure 59 第2世代環状型 iRed の遺伝子発現抑制効果

結語

- 1) PCRにより増幅可能な 4'-チオ DNA を利用して新規遺伝子発現抑制デバイス intelligent shRNA expression device (iRed) を開発した。
 - a) shRNA 発現プラスミドのうち shRNA 発現に必要最小限の領域 (U6 プロモーター + shRNA コード領域) をテンプレートとし、用いる dNTP のうち 1 種類の残基を dSNTP に置換して PCR を行なうことにより iRed を構築した。
 - b) *In vitro* において iRed を利用した RNAi を誘起することに成功した。また、iRed による遺伝子発現抑制効果は 4'-チオヌクレオチドの導入割合と相関を示し、化学修飾の導入割合が高い dSA iRed および ST iRed では活性が中程度であるものの、導入割合が低い dSG iRed および dSC では合成 shRNA 以上の高い遺伝子発現抑制効果を発揮することを明らかとした。
 - c) 4'-チオ DNA により構成される iRed から転写された shRNA 量を定量し、iRed が細胞内で間違いなく遺伝情報として機能していることを明らかとした。さらに、4'-チオ化学修飾の導入にも関わらず iRed は配列正確な shRNA 転写のテンプレートとして機能し (termination rule の保存)、非特異的な遺伝子発現抑制を示さないことを明らかとした。
 - d) *In vivo* において、dSC iRed が高い遺伝子発現抑制効果を発揮することを明らかとした。
 - e) *In vivo* において、dSC iRed および ST iRed が自然免疫応答を全く誘起しないことを明らかとした。配列の“最小化”と“4'-チオ化学修飾の導入”という iRed のコンセプトが相乗的に働き、外来性 DNA により誘起される自然免疫応答に関与する PRRs の認識を逃れたためであると考えている。

以上著者は、4'-チオ DNA により構成される iRed は DNA ポリメラーゼおよび内在性 RNA ポリメラーゼ III の基質認識においては天然型 DNA 等価体として機能するにも関わらず、自然免疫応答発現の鍵を担う PRRs (おそらく TLR9) には認識されないことを明らかとした。これらの性質に基づいて、iRed は自然免疫応答を全く誘起することなく RNAi を誘起可能な新規遺伝子発現抑制デバイスであることが示された。また理論上、iRed は shRNA の他にも miRNA や mRNA の発現デバイスとして利用可能であると考えられ、化学修飾 DNA を利用した新しい核酸創薬手法として期待が寄せられる。

- 2) 第 2 世代環状型 iRed 構築のため、DNA 複製において機能する WC 塩基対に続く第 3 番目の人工塩基対 ($\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対) を開発した。
 - a) $\text{ImN}^{\text{N}}\text{TP}$ ならびに $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$ を合成した。
 - b) DNA 複製反応における $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ ペアの塩基対形成を評価するため、KF による一塩基挿入反応ならびにその速度論解析を行なった。その結果、 $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対は他の $\text{Im}:\text{Na}$ 型塩基対 ($\text{ImN}^{\text{O}}:\text{NaO}^{\text{N}}$ および $\text{ImO}^{\text{N}}:\text{NaN}^{\text{O}}$) と比較して高い反応効率ならびに特異性を発揮することが明らかとなった。これらの結果は、人工塩基対間に作用する四本の水素結合のパターン (ドナーとアクセプターの並び) が DNA ポリメラーゼの基質認識において重要な役割を果たすこ

とを示唆している。

- c) DNA 複製反応において $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対形成後もさらなる鎖伸張反応が進行することを明らかとした。これにより、 $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対は天然型 WC 塩基対形成と干渉することなく特異的な複製が可能であることが示唆された。
- d) $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対を含む DNA 二本鎖が PCR により増幅可能であることを明らかとした。この時、DNA ポリメラーゼが有する 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性 (校正能) は四本の水素結合によりペアを形成する $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対を正しい塩基対として認識し、天然型塩基とのミスマッチ塩基対形成を排除することを明らかとした。また、*Pfx*⁵⁰ DNA polymerase を用いた PCR における $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対の複製精度は 1 サイクルあたり 99.5% 以上であることが示された。

天然型 WC 塩基対は二本あるいは三本の水素結合による特異的な塩基対形成により遺伝情報の正確な保存と伝達を担う。著者はこの WC 塩基対に加えて、新たに四本の水素結合によってペアを形成する人工塩基対 ($\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$) の開発に成功し、このものが DNA ポリメラーゼの複製反応においても特異的に増幅可能であることを明らかとした。これらの結果は、第 2 世代環状型 iRed の構築といったバイオアプリケーションへの展開だけでなく DNA ポリメラーゼの基質認識を理解する生化学的な見地からも意義深いと言える。

- 3) $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対の複製反応を利用した第 2 世代環状型 iRed の構築法を開発し、これを用いた遺伝子発現抑制効果を得ることに成功した。
 - a) $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対の特異的な複製反応を利用した位置選択的な反応性官能基導入が可能であることを明らかとし、これを利用したクリックケミストリーにより DNA 二本鎖両末端の環状化法を開発した。すなわち、 $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$ の塩基部 6 位にエチニル基を導入したヌクレオシド 5'-三リン酸誘導体 (6-ethynyl $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$) と、5'-末端にアジド PEG リンカーを導入した ODN を用いた複製反応により DNA 二本鎖両末端選択的にアジド基およびエチニル基を導入した。さらに導入したアジド基とエチニル基の間で CuAAC 反応を行なうことにより環状型 DNA 分子の合成に成功した。
 - b) 6-ethynyl $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$ およびアジド PEG リンカー含有 ImN^{N} プライマーを利用した PCR に続く CuAAC 反応により、第 2 世代環状型 iRed を構築することに成功した。
 - c) *In vitro* において、第 2 世代環状型 iRed を用いた遺伝子発現抑制効果を観察することに成功した。

以上著者は、糖部修飾核酸 4'-チオ DNA あるいは塩基部修飾人工塩基 $\text{ImN}^{\text{N}}:\text{NaO}^{\text{O}}$ 塩基対の酵素認識を利用した新規遺伝子発現抑制デバイスの開発に成功した。今後さらに第 2 世代環状型 iRed における遺伝子発現抑制効果を精査するとともに両末端部の環状化が自然免疫応答発現に与える影響を評価する。現在、核酸創薬開発の主翼はアンチセンス、アプタマーあるいは siRNA などの RNA 分子が担っている。

結語

本研究が RNA を標的とした化学修飾 DNA による新しい核酸創薬手法を提起するものであることを願う。

実験の部

General methods

Physical data were measured as follows: ^1H , ^{13}C , and ^{31}P NMR spectra were recorded at 400 MHz (Bruker AV 400N) instruments, respectively, in CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ or D_2O as the solvent with tetramethylsilane or phosphoric acid as an internal standard. Chemical shifts are reported in parts per million (δ), and signals are expressed as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), or br (broad). Mass spectra were measured on Waters LCT Premier 2695 (ESI), JEOL JMS-700TZ (FAB) or Bruker microflex (MALDI). TLC was done on Merck Kiesel gel F₂₅₄ precoated plates. Silica gel used for column chromatography was KANTO Chemical silica gel 60 or KANTO Chemical silica gel 60N (neutral).

Natural dNTPs were purchased from GE Healthcare, Japan. 2'-Deoxy-4'-thionucleoside triphosphates (dSNTPs) were prepared according to our previous reports.^{43,45} The concentrations of $\text{ImN}^{\text{N}}\text{TP}$ and $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$ were determined based on the extinction coefficients of each nucleosides.^{37,88}

The following DNA polymerases were purchased: KF exo^- , KF exo^+ , Tth DNA polymerases from Promega; *Taq* DNA polymerase from TaKaRa; Deep Vent exo^- , Deep Vent exo^+ ; Vent exo^- ; Vent exo^+ ; Terminator; 9N $^\circ$; Phusion High-Fidelity DNA polymerases from New England Biolabs; KOD Dash DNA polymerase from TOYOBO (Osaka, Japan); Platinum *Taq*, Accuprim *Pfx*, *Pfx*⁵⁰ DNA polymerase from Invitrogen.

The natural ODNs were purchased from SIGMA and FASMAC.

1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*n*-[methoxy-(PEG)-2000] (mPEG₂₀₀₀-DSPE) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) were generously donated by the NOF Corporation. The animal and ethics review committee of Tokushima University approved the experiments using mice.

HPLC was required for analytical studies and monitoring reactions. It was performed using a Prominence 10A or 20A HPLC system equipped with LCsolution software. Acetonitrile for HPLC was obtained from KANTO Chemical (HPLC grade) and ultrapure waters using Simplicity UV (SimFilter 0.2 μm , UV, MERCK MILLIPORE). TEAA buffer (10 mM, pH 7.0) was used for buffering.

Natural nucleoside phosphoramidite derivatives and reagents for ODN synthesis were purchased from Glen Research.

第1章の実験

Construction of shRNA expression pDNA.

ODNs having shRNA and terminator coding sequences were ligated into the BamHI and EcoRI sites of an shRNA expression cassette containing the U6 promoter (RNAi-Ready pSIREN-RetroQ, Clontech) according to the manufacturer's instructions. The inserted sequences are summarized in Table S2.

ODNs	Sequence
pU6-pGL2, sense	5'-d(gatccgctgctgttgctagtagtaccacttcaagagagttggtactagcaacgcacttttttacgcgtg)-3'
pU6-pGL2, antisense	5'-d(aattcacgcgtaaaaaagtgctgttagtagtaccactctcttgaagttggtactagcaacgg)-3'
pU6-pGL3_1, sense	5'-d(gatcccttacgctgagtagtacttcgatagtgctgctcctggttgtcgaagtaactcagcgttaagttttttg)-3'
pU6-pGL3_1, antisense	5'-d(aattcaaaaaacttacgctgagtagtacttcgacaaccaggagcagcactatcgaagtaactcagcgttaagg)-3'
pU6-pGL3_2, sense ^a	5'-d(gatccggtaaaagttgttccatTTTTTcaagagaaaaatggaacaactttacctttttttg)-3'
pU6-pGL3_2, antisense ^a	5'-d(aattcaaaaaaggtaaaagttgttccatTTTTTctcttgaaaaatggaacaactttaccg)-3'
pU6-NC, sense	5'-d(gatccgtcttaatcgcgtataaggctagtgctcctggtggccttatacgcgattaagattttttg)-3'
pU6-NC, antisense	5'-d(aattcaaaaaatcttaatcgcgtataaggccaaccaggagcactagccttatacgcgattaagacg)-3'

Table S2 ^apU6-pGL3_2 is the pDNA having a terminator in the middle of shRNA coding sequence.

Preparation of an intelligent shRNA expression device (iRed) and the natural device.

The iReds were prepared using the shRNA expression pDNA as a template for PCR as follows. The sequences encoding the U6 promoter and shRNA in pDNA were amplified in 20 μ L of KOD buffer containing KOD Dash DNA polymerase (0.05 unit/ μ L), pDNA template (0.1 fmol/ μ L), 0.2 mM dNTPs, and 0.5 μ M of primers. The reaction mixture was gently vortexed, and the DNA was amplified using a thermal cycler. PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 15 s, 15 cycles of denaturation/amplification (94 °C, 30 s; 62 °C, 30 s; 72 °C, 30 s), and final extension at 72 °C for 15 min. Amplicons were purified using 1% agarose gel electrophoresis (AGE), and the DNAs were further purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and used as templates for the next round of PCR. The second PCR amplification was performed in 100 μ L of reaction buffer containing KOD Dash DNA polymerase (0.1 unit/ μ L), a template (0.2 fmol/ μ L), 0.2 μ M of a nucleoside 5'-triphosphate mixture containing one type of dSNTP and three types of dNTPs, and 1.25 μ M of primers. The reaction mixture was gently vortexed, and the DNA was amplified using a thermal cycler. PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 15 s, 30 cycles of denaturation/amplification (94 °C, 30 s; 62 °C, 30 s; 72 °C, 10 min), and final extension at 72 °C for 15 min. The iRed amplicons were purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

The natural device was prepared using this same protocol but with unmodified dNTPs.

Cell culture.

HeLa cells were cultured at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, BioSource International, Inc.), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (ICN Biomedicals) in an atmosphere containing 5% CO₂.

A human pleural mesothelioma cell line (MSTO-211H) expressing pGL3 firefly luciferase (MSTO-211H-Luc) generated by stable transfection with the *firefly* luciferase (Fluc) gene (pGL3 Basic plasmid, Promega) was generously supplied by Dr. Masashi Kobayashi (Department of Thoracic Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University). MSTO-211H-Luc was in RPMI-1640 medium (Wako Pure Chemical) supplemented with 10% of heat-inactivated FBS (Corning), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. The cells were regularly passaged to maintain exponential growth.

In vitro luciferase reporter assay.

HeLa cells were seeded in a 96-well plate (1 × 10⁴ cells/100 mL per well) in DMEM. After incubation for 24 h, the cells were co-transfected with equimolar amounts of reporter pDNAs (0.2 µg per well, pGL2-control or pGL3-control, and pRL-TK; Promega), and iRed, shRNA expression pDNA, synthetic shRNA, or the natural device in equimolar amounts using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Each well contained a total volume of 100 µL of Opti-MEM I (Invitrogen). After incubation for 1 h at 37 °C, the medium was replaced with 100 µL of fresh culture medium containing 10% serum, and the cells were incubated at 37 °C. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with Passive Lysis Buffer (Promega) at the indicated times after transfection, and Fluc and *Renilla* luciferase (Rluc) activities of the cell lysates were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) with an Infinite 200 PRO (TECAN) according to the manufacturer's instructions. Fluc signals were normalized to those of Rluc. The results were expressed as the Fluc/Rluc ratios compared with those of untreated cells. All experiments were performed in triplicate, and the data represent the mean values from at least three assays.

Quantification of shRNA in HeLa cells.

The iRed or natural device (1.0 nM each) was used to transfect the HeLa cells in the presence of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. At the indicated times after transfection, the cells were washed with PBS, and small RNAs were isolated and resuspended in 50 µL of elution buffer using a mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription reactions were performed in 25 µL of First Standard Buffer containing an annealed specific primer (0.05 µM) and extracted small RNAs (2.0 µM/ total 50 µL) mixture, dNTPs (1.0 mM), Super Script III (2.5 unit/µL, Invitrogen), dithiothreitol (8.5 µM), and RNaseOUT (0.1 unit/µL, Invitrogen). The cDNAs were synthesized as follows: 16 °C for 30 min; 60 cycles of synthesis (30 °C, 30 s; 42 °C, 30 s; 50 °C, 1 min); and 85 °C for 15 min.¹¹¹ Next, quantitative PCR reactions were performed in 20 µL of reaction mixture containing

FASTStart Universal Probe Master (Rox) (Roche), Universal Probe Library (#21) (Roche), and primers (each 900 nM) using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The reaction was performed under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 10 s, and 60 °C for 1 min. The data are expressed as shRNA/mGAPDH. All experiments were performed in triplicate, and the data were analyzed using StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts). Primers sequences are summarized in Table S3.

ODNs	Sequence
stem-loop primer for reverse transcription of shRNA	5'-d(gttggctctggtgcaggggtccgaggtattcgaccagagccaacaagtgc)-3'
oligo dT(20) primer for reverse transcription of mGAPDH	5'-d(tttttttttttttttttttttt)-3'
forward primer for quantitative PCR of cDNA from shRNA	5'-d(cgcgcgttggtactagcaac)-3'
reverse primer for quantitative PCR of cDNA from shRNA	5'-d(gtgcaggggtccgaggt)-3'
forward primer for quantitative PCR of cDNA from mGAPDH	5'-d(ctctgctcctcctgttcgac)-3'
reverse primer for quantitative PCR of cDNA from mGAPDH	5'-d(acgaccaaattccgttgactc)-3'

Table S3

Preparation of an orthotopic mouse model of mesothelioma.

BALB/c *nu/nu* mice (male, five weeks old), which were purchased from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) were allowed free access to water and mouse chow and were housed under a constant temperature, humidity, and 12-h dark–light cycle. An orthotopic mouse model of mesothelioma was prepared by the direct injection of MSTO-211H-Luc cells (1×10^6 cells per mouse) into the left pleural cavity of the mice. The tumor was monitored using an *in vivo* imaging system (IVIS, Xenogen, Advanced Molecular Vision, Lincolnshire, United Kingdom). For *in vivo* imaging, the mice were intraperitoneally injected with 100 μ L of 7.5 mg/mL D-luciferin potassium salt and were subsequently anesthetized using isoflurane inhalation. Three minutes after injection, bioluminescence was recorded using a charge-coupled device camera (1 min exposure). The bioluminescent region of interest (ROI) was calculated and shown as photon counts (photons/s/cm²/steradian).

In vivo luciferase reporter assay.

An orthotopic model mouse of mesothelioma was prepared by the inoculation of MSTO-211H-Luc cells into the pleural cavity. On days 8 and 11 after inoculation, the tumor-bearing mice (four mice per group) were intrapleurally injected with two doses of either the natural device (1 mg/kg), NC dsDNA (1 mg/kg), dSC iRed (1 mg/kg), or synthetic shRNA (0.077 mg/kg). Each sample was complexed with a transfection reagent designed for use *in vivo* (TurboFect Transfection Reagents, Life Technologies) and used according to the manufacturer's instructions. On days 7, 10, and 13 after the inoculation, the luciferase activity of the pleural tumor was observed using IVIS as described in the section "Preparation of an orthotopic mouse model of mesothelioma".

Preparation of PEGylated lipoplex of iRed, pDNA and the natural device.

Briefly, the lipids DOPE, POPC, cholesterol (Wako Pure Chemical), and *O,O'*-ditetradecanoyl-*N*-(*a*-trimethylammonioacetyl)diethanolamine chloride (DC-6-14, Sogo Pharmaceutical Co., Ltd.) were dissolved in chloroform and mixed at molar ratios of 3:2:3:2. After evaporating chloroform, the thin lipid films were rehydrated with 9% sucrose at 37 °C, and the suspensions were sized by repeated extrusion through polycarbonate membrane filters (Nucleopore) with consecutive pore sizes of 400, 200, and 100 nm and mixed with 5 mol% of mPEG₂₀₀₀-DSPE at 37 °C. The phospholipid concentrations of the resulting PEGylated cationic liposomes were quantified using the Fiske and Subbarow phosphate assay.¹¹² To form a lipoplex, equal volumes of PEGylated cationic liposomes (1.2 μmol total lipids) and DNA solution (20 μg) were mixed and vortexed for 15 min at room temperature.

Particle size and z-potential measurement.

Size and z-potentials were measured using a NICOMP 370 HPL submicron particle analyzer (Particle Sizing System). Lipoplexes were diluted with 9% sucrose, and measurements were performed at 25 °C and repeated independently three times.

Cytokine assays.

BALB/c mice (male, 5 weeks old, Japan SLC) were intravenously injected with 20 mg each DNA sample formulated with a lipoplex. Four hours after the injection, peripheral blood was collected from the retro-orbital plexus while the mice were anesthetized. To obtain serum, the blood was stored for 30 min at room temperature and then centrifuged at 3000 rpm at 4 °C for 15 min. The serum levels of IL-6, INF-γ, and TNF-α were quantified using Quantikine Immunoassay Kits (R&D Systems), and INF-α was quantified using a VeriKine Mouse Interferon Alpha ELISA Kit (PBL interferon source). Experiments were performed in triplicate at room temperature.

Statistical analysis.

Differences in a group were evaluated via analysis of variance (ANOVA) testing using the Tukey *post-hoc* test.

Structural aspect of duplexes based on CD spectra.

CD spectra were obtained at 25 °C on a Jasco J1500. The solution containing samples (1.5 μM each) in a buffer of 10 mM Na cacodylate (pH 7.0) containing 100 mM NaCl was prepared, and the sample spectra were subtracted from the buffer spectrum. The molar ellipticity was calculated from the equation $[\theta] = \theta/cl$, where θ is the relative intensity, c means the sample concentration and l is the cell path length in centimeters.

第2章の実験

Chemistry

***N*⁴-Dibenzoylamino-*N*⁷-benzoylamino-1-(2-deoxy-5-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl)imidazo[5',4':4,5]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine (2).**

To a solution of **1**⁸⁸ (156 mg, 0.25 mmol) in DMF (3.0 mL) containing imidazole (41 mg, 0.60 mmol) was added TBDMSCl (45 mg, 0.30 mmol), and the whole mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was quenched by addition of ice, and the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between CHCl₃ and H₂O. The separated organic layer was further washed with saturated aqueous NaHCO₃, followed by brine. The organic layer was dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column, eluted with 0–3% MeOH in CHCl₃ to give **2** (176.0 mg, 95% as a white foam): ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.96 (1 H, s), 9.03 (1 H, brs, exchangeable with D₂O), 8.38 (1 H, s), 7.93–7.30 (15H, m), 6.81 (1 H, dd, *J* = 5.1, 8.5 Hz), 4.81 (1 H, m), 4.39 (1 H, m), 3.90 (1 H, dd, *J* = 2.8, 11.4 Hz), 3.79 (1 H, dd, *J* = 3.8, 11.4 Hz), 2.80 (1 H, m), 2.65 (1 H, m), 0.84 (6 H, s), 0.01 (3 H, s) and –0.01 (3 H, s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.72, 165.11, 157.12, 156.12, 156.01, 154.89, 141.47, 135.13, 134.46, 134.00, 133.85, 133.03, 132.98, 129.73, 129.13, 128.84, 127.65, 107.50, 89.30, 87.37, 72.77, 63.77, 40.89, 26.11, 18.53, –5.16, –5.39; ESI-LRMS *m/z* 744 (MH⁺); ESI-HRMS calcted for C₄₀H₄₂N₇O₆Si 744.2966, found 744.2943.

***N*⁴-Dibenzoylamino-*N*⁷-benzoylamino-1-(2-deoxy-3-*O*-acetyl-5-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl)imidazo[5',4':4,5]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine (3).**

To a solution of **2** (176 mg, 0.24 mmol) in dry pyridine (3.0 mL) was added Ac₂O (27 ml, 0.29 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction was quenched by addition of ice, and the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned between AcOEt and H₂O. The separated organic layer was further washed with saturated aqueous NaHCO₃, followed by brine. The organic layer was dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column, eluted with hexane/AcOEt (1:3–1:5), to give **3** (185 mg, quant as a white foam): ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.00 (1 H, s), 8.92 (1 H, brs, exchangeable with D₂O), 8.30 (1 H, s), 7.96–7.31 (15H, m), 6.57 (1 H, dd, *J* = 5.0, 9.0 Hz), 5.48 (1 H, m), 4.35 (1 H, m), 3.92 (1 H, dd, *J* = 2.3, 11.6 Hz), 3.80 (1 H, dd, *J* = 2.8, 11.6 Hz), 2.85 (1 H, m), 2.77 (1 H, ddd, *J* = 1.3, 5.0, 12.8 Hz), 2.20 (3 H, s), 0.85 (9 H, s), –0.02 (3 H, s) and –0.02 (3 H, s), ¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.66, 170.61, 164.82, 157.19, 156.48, 156.29, 154.93, 140.81, 135.31, 134.49, 134.16, 133.84, 133.04, 132.87, 129.73, 129.13, 128.85, 127.68, 107.23, 86.74, 86.68, 75.20, 63.34, 38.00, 26.08, 21.23, 18.49, –5.19, –5.44; ESI-LRMS *m/z* 808 (MNa⁺); ESI-HRMS calcted for C₄₂H₄₃N₇NaO₇Si 808.2891, found 808.2892.

***N*⁴-Dibenzoylamino-*N*⁷-benzoylamino-1-(2-deoxy-3-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)imidazo[5',4':4,5]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine (4).**

To a solution of **4** (185 mg, 0.24 mmol) in THF (5.0 mL) was added TBAF (1M in THF solution, 0.29 mL, 0.29 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. After addition of AcOH (17 mL, 0.29 mmol), the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column, eluted with 0–5% MeOH in CHCl₃ to give **4** (141 mg, 89% as a white foam): ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.93 (1 H, s), 9.04 (1 H, brs, exchangeable with D₂O), 8.39 (1 H, s), 7.94–7.82 (15 H, m), 6.54 (1 H, br t, *J* = 5.7 Hz), 5.47 (1 H, br d, *J* = 4.7 Hz), 4.32 (1 H, m), 3.83 (2 H, m), 2.96 (1 H, m), 2.71 (1 H, m), 2.04 (3 H, s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.76, 170.68, 164.94, 157.22, 156.38, 156.09, 154.61, 141.54, 135.31, 134.37, 134.01, 133.61, 133.09, 132.77, 129.69, 129.01, 128.85, 127.71, 107.09, 86.65, 86.55, 74.92, 62.20, 37.69, 21.15; ESI-LRMS *m/z* 694 (MNa⁺); ESI-HRMS calcd for C₃₆H₂₉N₇NaO₇ 694.2026, found 694.1997.

4,7-Diamino-1-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)imidazo[5',4':4,5]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine 5'-triphosphate (ImN^NTP) trisodium salt.

To a solution of **4** (134 mg, 0.20 mmol) in dry pyridine (200 μ L) and 1,4-dioxane (600 μ L) was added 1 M solution of 2-chloro-4*H*-1,2,3-dioxaphosphorin-4-one in 1,4-dioxane (0.21 mmol, 210 μ L). After 15 min, a 0.5 M solution of bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate in dry DMF (0.35 mmol, 700 μ L) and tri-*n*-butylamine (230 μ L) were added, and the reaction mixture was stirred for 10 min. A solution of 1% iodine in pyridine/water (98/2, v/v) (ca. 3 mL) was then added. After 5 min, excess iodine was decomposed by adding 5% aqueous solution of Na₂S₂O₃ (ca. 2 mL), and the reaction mixture was stirred for 10 min. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in methanolic ammonia (saturated at 0 °C, 20 mL), and the reaction mixture was heated at 55 °C for 10 h in a steel container. The solvent was removed *in vacuo*, and the residue was dissolved in water (300 mL). The solution was applied to a DEAE Sephadex column, which was eluted with a linear gradient of 700 mL each of water and 1.0 M TEAB buffer. Fractions containing **S5** were concentrated *in vacuo*, and the residue was coevaporated with EtOH. The residue was dissolved in water (5 mL), which was applied to a column of DIAION PK 212 (H⁺ form), then DIAION WK 20 (Na⁺ form), and the fractions containing ImN^NTP were concentrated *in vacuo* to give ImN^NTP as a Na salt (40 mg, 37% as a white solid): ¹H NMR (D₂O) δ 9.13 (1 H, s), 8.43 (1 H, s), 6.65 (1 H, d), 4.69 (1 H, m), 4.56 (1 H, m), 4.27 (1H, m), 3.80 (1 H, brd, *J* = 11.7 Hz), 3.70 (1 H, 1 H, *J* = 2.5, 11.7 Hz), 3.00 (1 H, m), 2.77 (1 H, m); ³¹P NMR (D₂O) δ -19.03, -10.67, -5.27; FAB-LRMS *m/z* = 623.2 (MH⁻+3Na).

7-Diphenylcarbamoyloxy-2-hydroxy-3-[2-deoxy-3-*O*-acetyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-1,8-naphthyridine (6).

To a solution of **5**³⁷ (388 mg, 0.50 mmol) in dry pyridine (5 mL) was added Ac₂O (71 μ L, 0.75 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 9 h. The reaction was quenched by addition of ice. The reaction

mixture was partitioned between AcOEt and H₂O. The separated organic layer was further washed with H₂O, followed by saturated aqueous NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by a silica gel column, eluted with hexane/AcOEt (2:1–1:1), to give **6** (327 mg, 80% as a white foam): ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.16 (br s, 1 H, exchangeable with D₂O), 8.00 (1 H, s), 7.66 (1 H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.46–7.18 (14 H, m), 6.91 (1 H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.80 (4H, dd, *J* = 1.1, 9.0 Hz), 5.32 (1 H, dd, *J* = 1.3, 6.3 Hz), 5.27 (1 H, ddd, *J* = 5.7, 6.3, 10.1 Hz), 4.21 (1 H, ddd, *J* = 3.8, 4.1, 6.3 Hz), 3.76 (6 H, s), 3.39 (1 H, dd, *J* = 3.8, 10.1 Hz), 3.33 (1 H, dd, *J* = 4.1, 10.1 Hz), 2.70 (1 H, ddd, *J* = 1.3, 5.7, 13.6 Hz), 2.08 (3 H, s), 1.98 (1 H, ddd, *J* = 6.3, 10.1, 13.6 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.73, 161.59, 158.67, 158.28, 151.85, 147.53, 144.93, 141.94, 139.47, 136.12, 136.04, 135.35, 132.81, 130.25, 129.37, 128.34, 128.01, 127.03, 113.30, 112.97, 111.19, 86.46, 83.86, 76.80, 75.62, 64.11, 55.38, 39.56, 21.33; ESI-LRMS *m/z* = 840 (MNa⁺); ESI-HRMS calcd for C₄₉H₄₄N₃O₉ 818.3078, found 818.3042.

7-Diphenylcarbamoyloxy-2-hydroxy-3-(2-deoxy-3-*O*-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-1,8-naphthyridine (7).

A solution of **6** (327 mg, 0.4 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added TFA (250 μL, 3.3 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 15 min. After addition of triethylamine (450 mL, 3.3 mmol), the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column, eluted with 0–5% MeOH in CHCl₃ to give **7** (190 mg, 92% as a white foam): ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.94 (1 H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.91 (1 H, s), 7.40–7.26 (10 H, m), 7.00 (1 H, d, *J* = 8.3 Hz), 5.30 (1 H, d, *J* = 6.2 Hz), 5.17 (1 H, dd, *J* = 5.3, 10.9 Hz), 4.17 (1 H, m), 3.90 (1H, m), 2.46 (1H, dd, *J* = 5.3, 13.6 Hz), 2.28 (1H, ddd, *J* = 6.2, 10.9, 13.6 Hz), 2.12 (3H, s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.12, 162.18, 158.83, 151.77, 147.41, 141.78, 139.82, 135.81, 132.18, 127.12, 112.74, 111.81, 86.11, 63.32, 38.13, 21.26; ESI-LRMS *m/z* = 538 (MNa⁺); ESI-HRMS calcd for C₂₈H₂₅N₃NaO₇ 538.1590, found 538.1593.

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-1,8-naphthyridine 5'-triphosphate (NaO⁰TP) trisodium salt.

In the similar manner as described for **ImN^NTP**, **7** (103 mg, 0.2 mmol) was treated with 1 M solution of 2-chloro-4*H*-1,2,3-dioxaphosphorin-4-one in 1,4-dioxane, followed by 0.5 M solution of bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate and tri-*n*-butylamine to give **NaO⁰TP** as Na salt (98 mg, 0.126 mmol, 63% as a white solid): ¹H NMR (D₂O) δ 8.08 (1H, s), 7.93 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.40 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 5.32 (1H, dd, *J* = 6.0, 10.0 Hz), 4.56 (1H, m), 4.19 (1H, m), 4.15 (2H, m), 2.38 (1 H, ddd, *J* = 2.5, 6.0, 13.6 Hz), 2.08 (1 H, ddd, *J* = 6.0, 9.8, 13.6 Hz); ³¹P NMR (D₂O) δ -21.94, -10.83, -7.16; FAB-LRMS *m/z* = 582.9 (MH⁺+3Na).

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy-3,5-di-*O*-(triisopropylsilyl)-β-D-ribofuranosyl)-6-iodo-1,8-naphthyridine (9).

To a solution of **8** (1.1 g, 1.86 mmol) in DMF (20 mL) was added NIS (502 mg, 2.23 mmol), and the mixture was stirred for 15 h at room temperature. The reaction mixture was partitioned between CHCl₃ and 5% aqueous Na₂S₂O₃, followed by H₂O, saturated aqueous NaHCO₃ and brine. The residue was purified by a silica gel column, eluted with

CHCl₃/MeOH (0%–5%), to give **9** (1.27 g, 95% as a pale brown foam): ¹H NMR (CDCl₃) δ 15.29 (1H, br s, exchangeable with D₂O), 12.98 (1H, br s, exchangeable with D₂O), 8.31 (1H, s), 8.03 (1H, s), 5.36 (1 H, dd, *J* = 5.5, 10.6 Hz), 4.60 (1H, d, *J* = 5.0 Hz), 4.10–4.09 (1H, m), 3.90 (1H, dd, *J* = 3.8, 10.5 Hz), 3.78 (1H, dd, *J* = 5.0, 10.5 Hz), 2.59–2.54 (1 H, m), 1.76 (1 H, ddd, *J* = 5.0, 10.6, 12.3 Hz), 1.20–1.16 (42 H, m); ESI-LRMS *m/z* = 717 (MH⁺); ESI-HRMS calcd for C₃₁H₅₃IN₂NaO₅Si₂ 739.2435, found 739.2388.

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy-3,5-di-*O*-(triisopropylsilyl)-β-D-ribofuranosyl)-6-trimethylsilanylethynyl-1,8-naphthyridine (10).

To a solution of **9** (552 mg, 0.77 mmol) in MeCN (8 mL) and Et₃N (8 mL) was added TMS acetylene (0.32 mL, 2.31 mmol), Pd₂Cl₂(PPh₃)₂ (108 mg, 0.154 mmol) and CuI (15 mg, 0.077 mmol), and the mixture was stirred for 5 h at 80 °C. The solvent was evaporated, and the residue was purified by a silica gel column, eluted with CHCl₃/MeOH (0%–5%), to give **10** (486 mg, 92% as a brown foam): ¹H NMR (CDCl₃) δ 15.22 (1H, br s, exchangeable with D₂O), 13.05 (1H, br s, exchangeable with D₂O), 7.99 (1H, s), 7.93 (1H, s), 5.34 (1 H, dd, *J* = 5.0, 9.2 Hz), 4.61 (1H, d, *J* = 5.0 Hz), 4.10–4.08 (1H, m), 3.89 (1H, dd, *J* = 4.1, 10.7 Hz), 3.77 (1H, dd, *J* = 5.0, 10.7 Hz), 2.57 (1H, dd, *J* = 5.0, 12.7 Hz), 2.01–1.75 (1 H, m), 1.20–1.16 (42 H, m), 0.29 (9H, s); ESI-LRMS *m/z* = 710 (MNa⁺); ESI-HRMS calcd for C₃₆H₆₂N₂NaO₅Si₃ 709.3864, found 709.3866.

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-6-ethynyl-1,8-naphthyridine (11).

To a solution of **10** (420 mg, 0.6 mmol) in THF (10 mL) were added TBAF (1 M THF solution, 1.8 mL, 1.8 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred for 3 h at same temperature. The reaction was quenched by addition of AcOH (103 μL, 1.8 mmol). The residue was purified by a silica gel column, eluted with CHCl₃/MeOH (5%–25%), to give **11** (123 mg, 68% as a pale yellow solid) and **12** (49 mg, 27% as a white solid): ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.05 (1H, s), 7.84 (1H, s), 5.01 (2 H, m, exchangeable with D₂O), 4.74 (1 H, t, *J* = 8.0 Hz), 4.19 (1H, s), 4.14 (1H, m), 3.79 (1H, ddd, *J* = 2.3, 5.6, 10.0 Hz), 3.50 (1 H, dd, *J* = 2.3, 11.5 Hz), 3.43 (1 H, m), 2.30 (1 H, dd), 1.65 (1 H, m); ESI-LRMS *m/z* = 303 (MH⁺); ESI-HRMS calcd for C₁₅H₁₅N₂O₅ 303.0981, found 303.0980.

Compound **12**: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.27 (1H, br s, exchangeable with D₂O), 8.43 (1H, s), 8.08 (1H, d, *J* = 1.3 Hz), 8.04 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 5.07 (1H, dd, *J* = 5.7, 9.8 Hz), 5.03 (1H, d, *J* = 4.1 Hz), 4.78 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 4.74 (1 H, t, *J* = 8.0 Hz), 4.19–4.16 (1H, m), 3.83–3.80 (1H, m), 2.30 (1H, ddd, *J* = 1.9, 5.7, 12.6 Hz), 1.68 (1 H, ddd, *J* = 5.7, 10.1, 12.6 Hz); ESI-LRMS *m/z* = 303 (MH⁺); ESI-HRMS calcd for C₁₅H₁₅N₂O₅ 303.0981, found 303.0985.

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-6-ethynyl-1,8-naphthyridine (13).

To a solution of **11** (100 mg, 0.33 mmol) in pyridine (5 mL) was added DMTrCl (122 mg, 0.36 mmol), and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of ice. The reaction mixture was partitioned between CHCl₃ and H₂O, followed by brine. The organic layer was dried (Na₂SO₄), and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by a neutral silica gel column, eluted with CHCl₃/MeOH (5%–15%), to give **13** (186 mg, 87% as a pale yellow solid): ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.99 (s, 1 H), 7.68 (s, 1 H), 7.47–7.22 (m, 9 H), 6.83 (d, 4 H, *J* = 8.8 Hz), 5.30 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 4.42 (m, 1 H), 4.10 (dd, 1 H, *J* = 4.4, 8.2 Hz), 3.79 (s, 6 H), 3.39 (dd, 1 H, *J* = 4.4, 10.0 Hz), 3.35 (dd, 1 H, *J* = 4.7, 10.0 Hz), 3.24 (br s, 1H), 2.54 (ddd, 1 H, *J* = 3.2, 6.3, 13.2 Hz), 1.99 (ddd, 1 H, *J* = 6.0, 8.5, 13.2 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 165.14, 163.94, 158.60, 144.82, 143.75, 139.49, 135.96, 135.94, 134.72, 130.17, 129.15, 128.25, 127.93, 126.97, 113.23, 108.50, 86.37, 85.57, 82.79, 77.59, 74.44, 73.85, 64.18, 55.34, 41.64, 29.70; ESI-LRMS *m/z* = 627 (MNa⁺); ESI-HRMS calcd for C₃₆H₃₃N₂O₇ 605.2288, found 605.2292.

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy-3-O-acetyl-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-6-ethynyl-1,8-naphthyridine (14).

To a solution of **11** (90 mg, 0.15 mmol) in pyridine (5 mL) was added Ac₂O (22 μ L, 0.225 mmol), and the mixture was stirred at room temperature. After being stirred for 5 h, the reaction mixture was added Ac₂O (22 μ L, 0.225 mmol), and stirred for 9 h at same temperature. The reaction was quenched by addition of ice. The reaction mixture was partitioned between CHCl₃ and H₂O, saturated aqueous NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried (Na₂SO₄), and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by a neutral silica gel column, eluted with CHCl₃/MeOH (3%–5%), to give **14** (72 mg, 74% as a pale yellow solid): ¹H NMR (CDCl₃) δ 15.28 (1H, br s, exchangeable with D₂O), 13.14 (1H, br s, exchangeable with D₂O), 8.07 (1H, s), 7.74 (1H, s), 7.46–7.23 (9H, m), 6.83 (4H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.36–5.34 (1H, m), 5.29 (1 H, dd, *J* = 5.5, 9.8 Hz), 4.23 (1H, dd, *J* = 3.6, 6.4 Hz), 3.79 (6H, s), 3.43–3.39 (2H, m), 3.36 (1H, s), 2.66 (1H, dd, *J* = 5.3, 13.8 Hz), 2.10 (3H, s), 2.07–1.98 (1 H, m); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.54, 165.42, 164.06, 157.61, 146.58, 144.75, 143.79, 135.92, 130.15, 129.16, 128.25, 127.90, 126.97, 113.20, 108.64, 86.42, 83.81, 82.86, 74.96, 64.05, 55.25, 39.58, 21.17; ESI-LRMS *m/z* = 647 (MH⁺); ESI-HRMS calcd for C₃₈H₃₅N₂O₈ 647.2393, found 647.2389.

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy-3-O-acetyl-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-6-ethynyl-1,8-naphthyridine (15).

In the similar manner as described for **7**, **14** (72 mg, 0.11 mmol) was treated with TFA (150 μ L, 2.0 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) to give **15** (38 mg, quant as a pale yellow solid): ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.03 (1H, brs, exchangeable with D₂O), 8.07 (1H, s), 7.90 (1H, s), 5.17 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.98 (1H, s, *J* = 5.3, 10.5 Hz), 4.21 (s, 1 H), 3.97–3.95 (m, 1 H), 3.58 (1H, dd, *J* = 4.5, 11.7 Hz), 5.30 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 4.42 (m, 1 H), 4.10 (dd, 1 H, *J* = 4.4, 8.2 Hz), 3.79 (s, 6 H), 3.39 (dd, 1 H, *J* = 4.4, 11.7 Hz), 3.52 (dd, 1 H, *J* = 5.0, 11.7 Hz), 2.35 (dd, 1 H, *J* = 5.3, 13.6 Hz), 1.89–1.81 (1H, m);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 170.16, 158.08, 158.01, 143.09, 133.63, 128.96, 112.82, 84.79, 84.02, 79.30, 76.44, 74.93, 61.89, 45.82, 38.09; ESI-LRMS m/z = 345 (MH^+); ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6$ 345.1087, found 345.1088.

2,7-Dihydroxy-3-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-ethynyl-1,8-naphthyridine 5'-triphosphate (6-ethynyl $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$) trisodium salt.

In the similar manner as described for $\text{ImN}^{\text{N}}\text{TP}$ and $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$, **15** (38 mg, 0.11 mmol) was treated with 1 M solution of 2-chloro-4*H*-1,2,3-dioxaphosphorin-4-one in 1,4-dioxane, followed by 0.5 M solution of bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate and tri-*n*-butylamine to give **6-ethynyl $\text{NaO}^{\text{O}}\text{TP}$** as Na salt (17 mg, 0.027 mmol, 26% as a yellow solid): ^1H NMR (D_2O) δ 8.06 (1H, s), 7.96 (1H, s), 5.27 (1H, dd, J = 6.0, 9.7 Hz), 4.54–4.51 (1H, m), 4.17–4.16 (1H, m), 4.15–4.10 (2H, m), 3.56 (1H, s), 2.34 (1H, ddd, J = 2.5, 6.0, 13.6 Hz), 2.06 (1H, ddd, J = 6.0, 9.7, 13.6 Hz); ^{31}P NMR (D_2O) δ -22.57, -11.11, -8.09; ESIB-LRMS m/z = 606.9 ($\text{MH}^- + 3\text{Na}$).

Synthesis of ODNs.

Support bound ODNs prepared in this study were synthesized on an H-6 DNA/RNA synthesizer (Nihon Techno Service) using the corresponding phosphoramidite units and CPG resin at a 0.4 μmol scale, according to the procedures previously reported.^{37,38} Each phosphoramidite unit was prepared as 0.1 M in dry acetonitrile. After completion of the synthesis, the CPG support was treated with ammonium hydroxide (2 mL) for 17 h at 55 $^{\circ}\text{C}$. The resulting mixture was diluted in 0.1M TEAA (2 mL, pH 7.0) and purified on a C18 cartridge column (YMC Dispo SPE C18). The eluted solution was further purified by reversed-phase HPLC on a m-Bondasphere (3.9 \times 150 mm; Waters) with a 5–25% linear gradient of acetonitrile in TEAA (0.1n, pH 7.0).

The structure of ODNs were confirmed by measurement of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass (MALDI-TOF/MS) spectrometry: **ODN1**,³⁸ calculated mass $\text{C}_{295}\text{H}_{367}\text{N}_{124}\text{O}_{174}\text{P}_{29}$ 9331.0 (MH^-), observed mass: 9336.2; **ODN2**, calculated mass $\text{C}_{295}\text{H}_{366}\text{N}_{119}\text{O}_{176}\text{P}_{29}$ 9291.7 (MH^-), observed mass: 9294.2; **ODN3**, calculated mass $\text{C}_{541}\text{H}_{678}\text{N}_{205}\text{O}_{327}\text{P}_{43}$ 16956.9 (MH^-), observed mass: 16952.2; **ODN4**, calculated mass $\text{C}_{734}\text{H}_{924}\text{N}_{273}\text{O}_{450}\text{P}_{74}$ 23051.8 (MH^-), observed mass: 23044.3. ODN sequences are summarized in Table S4.

use	length (nt)	sequence	
ODN1 ^a	template possessing ImN ^N for single-nucleotide insertion	30	5'-GTGGGCAAG-ImN ^N -GTGCGCTGACCATCCAGAAC-3'
ODN2	template possessing NaO ^O for single nucleotide insertion	30	5'-GTGGGCAAG-NaO ^O -GTGCGCTGACCATCCAGAAC-3'
ODN3	template possessing ImN ^N for PCR amplification	55	5'-TTTCACACAGAAACAGCTATGACGGATC-ImN ^N -TATCCCTATAGTGAGTCGTATTATC-3'
ODN4	template possessing ImN ^N for sequence calibration	75	5'-TTTCACACAGAAACAGCTATGACGGATC-ImN ^N -TATCCCTATAGTGAGTCGTATTATCCTGGCCGTCCTTTACAACG-3'

Table S4

Steady-state kinetics for the single-nucleotide insertion experiment with KF *exo*⁻.

A primer labeled with FITC at the 5'-end (20 mer; 5'-FITC-GTTCTGGATGGTCAGCGCAC-3') was annealed with a template (30 mer, ODN1 or ODN2, see Table S4) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) buffer containing 10 mM MgSO_4 and 0.1 mM DTT. The primer-template duplex solution (final 0.1–0.8 μM , 7 μL) was mixed with

each dYTP solution (2 μL). The mixture was incubated for more than 2 min, and then the reactions were initiated by adding an enzyme solution (1 μL) to each duplex–dYTP mixture at 37 °C. The amount of enzyme used (final 0.0025–0.1 unit/ μL), the reaction time (2–10 min), and the gradient concentration of dYTP (final 0.2–600 μM) were adjusted to give reaction extents of 25% or less. The reactions were quenched with 10 mL of a stop solution (0.1% (w/v) BPB, 10 M urea and 50 mM EDTA), and the mixtures were immediately on ice for more than 5 min. The diluted products were resolved by electrophoresis on a 20% polyacrylamide gel containing 8 M urea, and the gels were visualized with Molecular Imager FXpro system WOM (BioRad) equipped with *Quantity One* software. Relative velocities (v_0) were calculated as the extents of the reaction divided by the reaction time and were normalized to the duplex and enzyme concentration (0.4 mM, 0.02 unit/ μL) for the various concentrations used. The kinetic parameters (K_m and V_{max}) were obtained from Hanes-Woolf plots of $[\text{dYTP}]/v_0$ against $[\text{dYTP}]$.

Primer extension.

A primer (20 mer) labeled with FITC at the 5'-end was annealed with a template (30 mer) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) buffer containing 10 mM MgSO_4 and 0.1 mM DTT. The primer-template duplex solution (final 0.4 μM , 7 μL) was mixed with dNTPs or each dYTP and dNTPs mixture solution (final 50 μM for dNTPs and final 10 μM for dYTP, 2 μL). The mixture was incubated for more than 2 min, and then the reactions were initiated by adding an enzyme solution (final 0.0025 unit/ μL , 1 μL) to each duplex–dYTP mixture at 37 °C. After 2 min, the reactions were quenched with 10 μL of a stop solution (0.1% (w/v) BPB, 10 M urea and 50 mM EDTA), and the mixtures were immediately on ice for more than 5 min. The diluted products were resolved by electrophoresis on a 20% polyacrylamide gel containing 8 M urea, and the gels were visualized with Molecular Imager FXpro system WOM (BioRad) equipped with *Quantity One* software.

PCR Amplification of the DNA fragment containing ImN^N:NaO^O pair.

The PCR amplification of the 55 mer DNA template (ODN3, see Table S4) was performed with each 5'-primer (40 mer; 5'-CGTTGTAAAACGACGGCCAGGATAATACGACTCACTATAG-3') and 3'-primer (24 mer; 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'). The PCR mixture was prepared in a total volume of 25 μL by adding 2.5 μL of 10 \times DNA reaction buffer accompanying each DNA polymerase, each DNA polymerase at the following concentration (*Taq*, 0.5 units; *Tth*, 1.0 units; Deep Vent exo^- , 0.5 units; Deep Vent exo^+ , 0.5 units; Vent exo^+ , 0.5 units; Vent exo^- , 0.5 units; Terminator, 0.5 units; 9N^o, 0.5 units; Platinum *Taq*, 1.0 units; AccuPrime Pfx, 1.25 units; KOD Dash, 0.625 units; *Pfx*⁵⁰, 1.25 units; Phusion High-Fidelity, 0.5 units), 55-mer DNA template (12.5 pM), 1.0 μM of primers, 100 μM dNTPs, 200 μM ImN^NTP and 200 μM NaO^OTP. The following PCR conditions were used: [(94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 68 °C, 4 min)/cycle; 68 °C, 5 min]. Upon the completion of PCR, a 4 μL aliquot was analyzed on 3 % AGE and stained with ethidium bromide. The remaining solution was purified the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and sequenced with each of PCR primer by a ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (see next section).

DNA sequencing.

The sequencing reaction was carried out with sequencing primer (70 mer; 5'-T₅₀-CGTTGTAACGACGGCCAG-5', 4 pmol) and 2 ng (40 fmol) of amplicon by a ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer according to a manufacture's procedure.

Sequencing calibration.

Sequencing calibration was carried out for synthetic ODN having ImN^N (ODN4, see Table S4) using control ODN (5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGACGGATCATATCCCTATAGTGAGTCGTATTATCCTGGCCGTCCTTTTACAACG-3') that is fully natural templates identical to ImN^N template in all but X position was replaced with A. The mixtures containing 0%, 1%, 2%, 4%, 10%, 25% and 50% of the control ODN were prepared and sequenced. Data were analyzed by first adjusting the start and stop points for the Sequencing Analysis software (Applied Biosystems) and then determining the average signal intensity individually for each channel (C, G and T, the channel of A was ignored because of noise peaks arising from 5'-poly-dT-tailed sequencing primer) for peaks within those defined points (Figure S4 in the Supporting Information). This was done separately for the parts of the sequencing data before and after the unnatural nucleotide. This ratio over the percentage of the natural template was plotted and was fitted by linear regression. The values of total mutation rates in amplified products were calculated from the obtained standard curve.

Synthesis of ODNs with azide-PEG linker.

In the reservoir tube (3 mL of Bond Elut Empty Reservoir, GL Science) containing CPG bound ODNs with 5'-amino-Modifier C12 (Glen Research) (0.4 μmol), 10% diethylamine in CH₂Cl₂ (500 μL) was added, and the reaction mixture was kept for 180 s (repeated twice) at room temperature. The solution was removed, and the remaining resin was washed with CH₃CN (1 mL × 5) and dried well. Then, a 3% TCA in CH₂Cl₂ solution (500 μL) was added to the tube, and the whole was allowed to stand for 5 min at same temperature. After being removed the reaction solution, the remaining resin was washed with CH₃CN (1 mL × 5) and dried well. For capping of NHS-PEG linker, the resin was treated with a mixture of azide-PEG4-NHS ester (6.5 mg, TCI) and DIPEA (18 μL) in anhydrous DMSO (500 μL) for 1h at same temperature. Then the reaction solution was removed, and the resin was washed with CH₃CN (1 mL × 5) and dried well. Finally, the resin was treated with ammonium hydroxide (2 mL) for 17 h at 40°C, and an aliquot of the filtrate was purified by using reversed-phase HPLC on a m-Bondasphere (3.9×150 mm; Waters) with a 5–50% linear gradient of acetonitrile in TEAA (0.1n, pH 7.0).

The structure of ODNs were confirmed by measurement of MALDI-TOF/MS spectrometry: **ODN10**, calculated mass C₁₅₂H₂₀₅N₅₇O₈₃P₁₃ 4559.0 (MH⁻), observed mass: 4563.5; **ODN13**, calculated mass C₃₃₉H₄₃₉N₁₂₈O₁₉₉P₃₂ 10477.0 (MH⁻), observed mass: 10473.2; **ODN14**, calculated mass C₃₅₆H₄₆₃N₁₃₅O₂₀₅P₃₄ 10961.1

(MH⁻), observed mass: 10957.8. ODN sequences are described in Scheme 4 for **ODN10**, Figure 57 for **ODN13** and **ODN14**.

Synthesis of dumbbell-shaped ODNs with ImN^N:NaO^O pair using CuAAC reaction (ODN11).

ODN 10 was annealed in polymerase buffer for *Pfx*⁵⁰ DNA polymerase. The duplex solution (final 12 μM, 8 μL) was mixed with a 6-ethynyl NaO^OTP solution (1 mM, 1 μL), and then the reactions were initiated by adding an *Pfx*⁵⁰ DNA polymerase (0.625 unit, 1 μL). The elongated products were purified by phenol/chloroform extraction (phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), Wako Pure Chemical), followed by ethanol precipitation to give **ODN11**. An aliquot of the **ODN11** was analysed by using reversed-phase HPLC on a μ-Bondasphere (3.9×150 mm; Waters) with a 5–50% linear gradient of acetonitrile in TEAA (0.1n, pH 7.0).

To a solution of **ODN11** (12 nmol) in 2 mM MOPS-NaOH buffer (pH 7.0) containing 50 mM sodium chloride and 20 mM sodium ascorbates (100 μL) was added a complex of CuPF₆-TBTA on Tenta-Gel (0.17 μmol/mg, 1 mg, 170 nmol), and the mixture was incubated for 1 h at room temperature. The reaction mixture was centrifuged, and an aliquot of supernatant was analysed by using reversed-phase HPLC on a μ-Bondasphere (3.9×150 mm; Waters) with a 5–50% linear gradient of acetonitrile in TEAA (0.1n, pH 7.0), and purified by ethanol precipitation to give **ODN12**.

The structure of ODNs were confirmed by measurement of MALDI-TOF/MS spectrometry: **ODN11**, calculated mass C₁₆₇H₂₁₈N₅₉O₉₀P₁₄ 4923.1 (MH⁻), observed mass: 4926.6; **ODN12**, calculated mass C₃₃₄H₄₃₇N₁₁₈O₁₈₀P₂₈ 9847.1 (MH⁻), observed mass: 9842.9.

Structure elucidation of dumbbell-shaped ODNs with ImN^N:NaO^O pair by restriction enzyme.

To a solution of ODN (200 nmol) in each manufacturer's recommended reaction buffer (20 μL) was added the restriction enzyme at the following concentration; (EcoRI, 15 units; Bgl II, 10 units), and the reaction mixture was incubated for 3 h at 37 °C. The reaction mixture was purified by phenol/chloroform extraction (phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), Wako Pure Chemical), followed by ethanol precipitation. And then a sample was analysed by measurement of MALDI-TOF/MS spectrometry. The structure of digested products and analytical data were summarized in Figures S3 and 58.

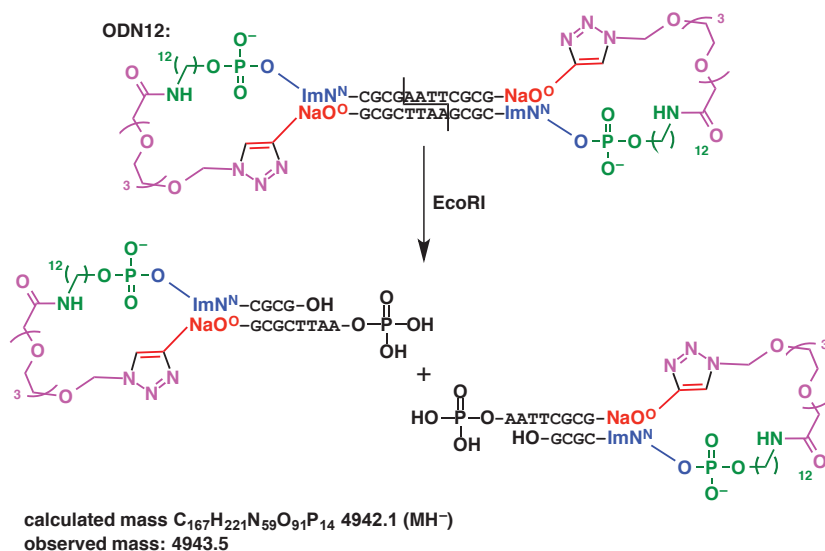


Figure S3 EcoRI による ODN12 の切断と MALDI-TOF/MS による構造解析

Synthesis of CuPF₆-TBTA on Tenta-Gel.

Synthesis of CuPF₆-TBTA on Tenta-Gel was prepared as previously described¹⁰⁶. Briefly, in the reservoir tube (3 mL of Bond Elut Empty Reservoir, GL Science) containing TG-TBTArésin (0.1 g, 0.17 mmol/g loading, 0.017 mmol, SIGMA) was swelled with CH₂Cl₂ (1 mL × 3 washes). Cu(MeCN)₄PF₆ (6.8 mg, 0.0425 mmol) was added as a solution in 10% MeCN/CH₂Cl₂ (1 mL) and vortexed for 5 min. The resin was filtered, and washed with MeOH (1 mL × 3). The resin was then treated with a MeOH (1 mL) solution of hydroquinone (18 mg) and vortexed for 1 min. After filtration, the resin was finally washed with MeOH (1 mL × 3), CH₂Cl₂ (1 mL × 3), and dried *in vacuo*.

Synthesis of 2nd generation of iRed using CuAAC reaction.

The 2nd generation of iRed was prepared using the shRNA expression pDNA as a template for PCR as follows. The sequences encoding the U6 promoter and shRNA in pDNA were amplified in 20 μL of Pfx⁵⁰ buffer containing Pfx⁵⁰ polymerase (0.065 unit/μL), pDNA targeting pGL3 Fluc template (0.1 fmol/μL), 0.2 mM dNTPs, 0.3 mM 6-ethynyl NaO^{TP}, and 0.5 μM of primers (ODN13 and ODN14). The reaction mixture was gently vortexed, and the DNA was amplified using a thermal cycler. PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 15 s, 15 cycles of denaturation/amplification (94 °C, 30 s; 64 °C, 30 s; 70 °C, 60 s), and final extension at 72 °C for 15 min. Amplicons were purified using 1% AGE, and the DNAs were further purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Following CuAAC reaction was carried out in the similar manner as described in the section “Synthesis of dumbbell-shaped ODNs with ImN^N:NaO^O pair using CuAAC reaction” to give the 2nd generation of iRed.

Cell culture

It was performed as similar to that described in a section “*Cell culture*” for HeLa cells in the experimental section of chapter 1.

In vitro luciferase reporter assay.

It was performed as similar to that described in a section “*In vitro luciferase reporter assay*” in the experimental section of chapter 1.

引用文献

1. Sneader, W., The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ* **2000**, *321*, 1591–1594.
2. Chari, R. V. J.; Miller, M. L.; Widdison, W. C., Antibody–Drug Conjugates: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3796–3827.
3. Hipolito, C. J.; Suga, H., Ribosomal production and *in vitro* selection of natural product-like peptidomimetics: The FIT and RaPID systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 196–203.
4. 特許庁「平成26年度 特許出願技術調査報告書 (概要) 抗体医薬」平成27年3月
5. Schork, N. J., Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature* **2015**, *520*, 609–611.
6. Mulamba, G. B.; Hu, A.; Azad, R. F.; Anderson, K. P.; Coen, D. M., Human cytomegalovirus mutant with sequence-dependent resistance to the phosphorothioate oligonucleotide fomivirsen (ISIS 2922). *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 971–973.
7. Ruckman, J.; Green, L. S.; Beeson, J.; Waugh, S.; Gillette, W. L.; Henninger, D. D.; Claesson-Welsh, L.; Janjic, N., 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20556–20567.
8. Ellington, A. D.; Szostak, J. W., *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
9. Crooke, S. T.; Geary, R. S., Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *76*, 269–276.
10. Meanwell, N. A., Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.* **2011**, *5*, 2529–2591.
11. Stein, C. A.; Subasinghe, C.; Shinozuka, K.; Cohen, J. S., Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3209–3221.
12. Srinivasan, S. K.; Iversen, P., Review of *in vivo* pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate oligonucleotides. *J. Clin. Lab. Anal.* **1995**, *9*, 129–137.
13. Judge, A. D.; Bola, G.; Lee, A. C. H.; MacLachlan, I., Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing *in vivo*. *Mol. Ther.* **2006**, *13*, 494–505.
14. Hornung, V.; Guenther-Biller, M.; Bourquin, C.; Ablasser, A.; Schlee, M.; Uematsu, S.; Noronha, A.; Manoharan, M.; Akira, S.; de Fougerolles, A.; Endres, S.; Hartmann, G., Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 263–270.
15. Sioud, M., Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: A central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 1222–1230.
16. Cekaite, L.; Furset, G.; Hovig, E.; Sioud, M., Gene Expression Analysis in Blood Cells in Response to

- Unmodified and 2'-Modified siRNAs Reveals TLR-dependent and Independent Effects. *J. Mol. Biol.* **2007**, *36*, 90–108.
17. Manoharan, M.; Akinc, A.; Pandey, R. K.; Qin, J.; Hadwiger, P.; John, M.; Mills, K.; Charisse, K.; Maier, M. A.; Nechev, L.; Greene, E. M.; Pallan, P. S.; Rozners, E.; Rajeev, K. G.; Egli, M., Unique Gene-Silencing and Structural Properties of 2'-Fluoro-Modified siRNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2284–2288.
 18. Martin, P., Ein neuer zugang zu 2'-O-alkylribonucleosiden und eigenschaften deren oligonucleotide. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486–504.
 19. Manoharan, M., 2-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression* **1999**, *1489*, 117–130.
 20. Egli, M.; Minasov, G.; Tereshko, V.; Pallan, P. S.; Teplova, M.; Inamati, G. B.; Lesnik, E. A.; Owens, S. R.; Ross, B. S.; Prakash, T. P.; Manoharan, M., Probing the influence of stereoelectronic effects on the biophysical properties of oligonucleotides: Comprehensive analysis of the RNA affinity, nuclease resistance, and crystal structure of ten 2'-O-ribonucleic acid modifications. *Biochemistry* **2005**, *44*, 9045–9057.
 21. Wu, H.; Lima, W. F.; Crooke, S. T., Properties of cloned and expressed human RNase H1. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 28270–28278.
 22. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
 23. Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
 24. Weitzer, S.; Martinez, J., The human RNA kinase hC1p1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature* **2007**, *447*, 222–226.
 25. Watts, J. K.; Deleavey, G. F.; Damha, M. J., Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 842–855.
 26. Shukla, S.; Sumaria, C. S.; Pradeepkumar, P. I., Exploring Chemical modifications for siRNA therapeutics: A structural and functional outlook. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 328–349.
 27. Brummelkamp, T. R.; Bernards, R.; Agami, R., A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **2002**, *296*, 550–553.
 28. Paddison, P. J.; Caudy, A. A.; Bernstein, E.; Hannon, G. J.; Conklin, D. S., Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 948–958.
 29. Paul, C. P.; Good, P. D.; Winer, I.; Engelke, D. R., Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 505–508.
 30. Yu, J. Y.; DeRuiter, S. L.; Turner, D. L., RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6047–6052.

31. Yi, R.; Qin, Y.; Macara, I. G.; Cullen, B. R., Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 3011–3016.
32. Bohnsack, M. T.; Czaplinski, K.; Gorlich, D., Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **2004**, *10*, 185–191.
33. Lund, E.; Güttinger, S.; Calado, A.; Dahlberg, J. E.; Kutay, U., Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **2004**, *303*, 95–98.
34. Taki, M.; Kato, Y.; Miyagishi, M.; Takagi, Y.; Taira, K., Small-interfering-RNA expression in cells based on an efficiently constructed dumbbell-shaped DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3160–3163.
35. Krieg, A. M.; Yi, A.-K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **1995**, *374*, 546–549.
36. Tarashima, N.; Ando, H.; Kojima, T.; Kinjo, N.; Hashimoto, Y.; Furukawa, K.; Ishida, T.; Minakawa, N., Gene silencing using 4'-thioDNA as an artificial template to synthesize short hairpin RNA without inducing a detectable innate immune response. *Mol. Ther. Nucl. Acids* **2016**, *5*, e274.
37. Kuramoto, K.; Tarashima, N.; Hirama, Y.; Kikuchi, Y.; Minakawa, N.; Matsuda, A., New imidazopyridopyrimidine:naphthyridine base-pairing motif, ImNN:NaOO, consisting of a DAAD:ADDA hydrogen bonding pattern, markedly stabilize DNA duplexes. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10818–10820.
38. Tarashima, N.; Higuchi, Y.; Komatsu, Y.; Minakawa, N., A practical post-modification synthesis of oligodeoxynucleotides containing 4,7-diaminoimidazo[5',4':4,5]pyrido[2,3-d]pyrimidine nucleoside. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 7095–7100.
39. Tarashima, N.; Komatsu, Y.; Furukawa, K.; Minakawa, N., Faithful PCR amplification of an unnatural base-pair analogue with four hydrogen bonds. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10688–10695.
40. Inoue, N.; Kaga, D.; Minakawa, N.; Matsuda, A., Practical synthesis of 2'-deoxy-4'-thioribonucleosides: Substrates for the synthesis of 4'-thioDNA. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8597–8600.
41. Inoue, N.; Minakawa, N.; Matsuda, A., Synthesis and properties of 4'-thioDNA: unexpected RNA-like behavior of 4'-thioDNA. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3476–3483.
42. Matsugami, A.; Ohyama, T.; Inada, M.; Inoue, N.; Minakawa, N.; Matsuda, A.; Katahira, M., Unexpected A-form formation of 4'-thioDNA in solution, revealed by NMR, and the implications as to the mechanism of nuclease resistance. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1805–1812.
43. Inoue, N.; Shionoya, A.; Minakawa, N.; Kawakami, A.; Ogawa, N.; Matsuda, A., Amplification of 4'-thioDNA in the presence of 4'-thio-dTTP and 4'-thio-dCTP, and 4'-thioDNA-directed transcription in vitro and in mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15424–15425.
44. Maruyama, H.; Furukawa, K.; Kamiya, H.; Minakawa, N.; Matsuda, A., Transcription of 4'-thioDNA templates to natural RNA *in vitro* and in mammalian cells. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7887–7890.
45. Kojima, T.; Furukawa, K.; Maruyama, H.; Inoue, N.; Tarashima, N.; Matsuda, A.; Minakawa, N., PCR amplification of 4'-thioDNA using 2'-deoxy-4'-thionucleoside 5'-triphosphates. *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*,

529–536.

46. Krueger, A. T.; Peterson, L. W.; Chelliserry, J.; Kleinbaum, D. J.; Kool, E. T., Encoding phenotype in bacteria with an alternative genetic set. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18447–18451.
47. El-Sagheer, A. H.; Sanzone, A. P.; Gao, R.; Tavassoli, A.; Brown, T., Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11338–11343.
48. Sanzone, A. P.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Tavassoli, A., Assessing the biocompatibility of click-linked DNA in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 10567–10575.
49. Birts, C. N.; Sanzone, A. P.; El-Sagheer, A. H.; Blaydes, J. P.; Brown, T.; Tavassoli, A., Transcription of click-linked DNA in human cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2362–2365.
50. Kawai, T.; Akira, S., The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 373–384.
51. Hashimoto, Y.; Uehara, Y.; Abu Lila, A. S.; Ishida, T.; Kiwada, H., Activation of TLR9 by incorporated pDNA within PEG-coated lipoplex enhances anti-PEG IgM production. *Gene Ther.* **2014**, *21*, 593–598.
52. Hashimoto, Y.; Abu Lila, A. S.; Shimizu, T.; Ishida, T.; Kiwada, H., B cell-intrinsic toll-like receptor 7 is responsible for the enhanced anti-PEG IgM production following injection of siRNA-containing PEGylated lipoplex in mice. *J. Control. Release* **2014**, *184*, 1–8.
53. Ohto, U.; Shibata, T.; Tanji, H.; Ishida, H.; Krayukhina, E.; Uchiyama, S.; Miyake, K.; Shimizu, T., Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **2015**, *520*, 702–705.
54. Koole, L. H.; Plavec, J.; Liu, H.; Vincent, B. R.; Dyson, M. R.; Coe, P. L.; Walker, R. T.; Hardy, G. W.; Rahim, S. G.; Chattopadhyaya, J., Conformation of two 4'-thio-2'-deoxynucleoside analogs studied by 500-MHz proton NMR spectroscopy and x-ray crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9936–9943.
55. Clusel, C.; Ugarte, E.; Enjolras, N.; Vasseur, M.; Blumenfeld, M., *Ex vivo* regulation of specific gene expression by nanomolar concentration of double-stranded dumbbell oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3405–3411.
56. Osborne, S. E.; Völker, J.; Stevens, S. Y.; Breslauer, K. J.; Glick, G. D., Design, Synthesis, and analysis of disulfide cross-linked DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11993–12003.
57. Abe, N.; Abe, H.; Ito, Y., Dumbbell-shaped nanocircular RNAs for RNA interference. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15108–15109.
58. Nakane, M.; Ichikawa, S.; Matsuda, A., Triazole-linked dumbbell oligodeoxynucleotides with NF- κ B binding ability as potential decoy molecules. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1842–1851.
59. Abe, N.; Abe, H.; Ohshiro, T.; Nakashima, Y.; Maeda, M.; Ito, Y., Synthesis and characterization of small circular double-stranded RNAs. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2125–2127.
60. Abe, N.; Abe, H.; Nagai, C.; Harada, M.; Hatakeyama, H.; Harashima, H.; Ohshiro, T.; Nishihara, M.; Furukawa, K.; Maeda, M.; Tsuneda, S.; Ito, Y., Synthesis, structure, and biological activity of

- dumbbell-shaped nanocircular RNAs for RNA interference. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2082–2092.
61. Wei, L.; Cao, L.; Xi, Z., Highly potent and stable capped siRNAs with picomolar activity for RNA Interference. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6501–6503.
62. Benner, S. A., Redesigning genetics. *Science* **2004**, *306*, 625–626.
63. Hirao, I.; Kimoto, M., Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2012**, *88*, 345–367.
64. Benner, S. A., Understanding nucleic acids using synthetic chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 784–797.
65. Switzer, C.; Moroney, S. E.; Benner, S. A., Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8322–8323.
66. Switzer, C. Y.; Moroney, S. E.; Benner, S. A., Enzymic recognition of the base pair between isocytidine and isoguanosine. *Biochemistry* **1993**, *32*, 10489–10496.
67. Piccirilli, J. A.; Krauch, T.; Moroney, S. E.; Benner, S. A., Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet. *Nature* **1990**, *343*, 33–37.
68. Yang, Z.; Sismour, A. M.; Sheng, P.; Puskar, N. L.; Benner, S. A., Enzymatic incorporation of a third nucleobase pair. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4238–4249.
69. Bain, J. D.; Switzer, C.; Chamberlin, R.; Bennert, S. A., Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code. *Nature* **1992**, *356*, 537–539.
70. Sefah, K.; Yang, Z.; Bradley, K. M.; Hoshika, S.; Jiménez, E.; Zhang, L.; Zhu, G.; Shanker, S.; Yu, F.; Turek, D.; Tan, W.; Benner, S. A., *In vitro* selection with artificial expanded genetic information systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1449–1454.
71. Kool, E. T.; Morales, J. C.; Guckian, K. M., Mimicking the Structure and function of DNA: Insights into DNA stability and replication. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990–1009.
72. Kool, E. T., Synthetically modified DNAs as substrates for polymerases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 602–608.
73. Guckian, K. M.; Krugh, T. R.; Kool, E. T., Solution structure of a DNA duplex containing a replicable difluorotoluene-adenine pair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 954–959.
74. Morales, J. C.; Kool, E. T., Minor groove interactions between polymerase and DNA: More essential to replication than Watson–Crick hydrogen bonds? *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2323–2324.
75. Liu, H.; Gao, J.; Lynch, S. R.; Saito, Y. D.; Maynard, L.; Kool, E. T., A four-base paired genetic helix with expanded size. *Science* **2003**, *302*, 868–871.
76. Krueger, A. T.; Lu, H.; Lee, A. H. F.; Kool, E. T., Synthesis and properties of size-expanded DNAs: Toward designed, functional genetic systems. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 141–150.
77. Malyshev, D. A.; Seo, Y. J.; Ordoukhanian, P.; Romesberg, F. E., PCR with an expanded genetic alphabet. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14620–14621.
78. Li, L.; Degardin, M.; Lavergne, T.; Malyshev, D. A.; Dhimi, K.; Ordoukhanian, P.; Romesberg, F. E.,

- Natural-like replication of an unnatural base pair for the expansion of the genetic alphabet and biotechnology applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 826–829.
79. Dhami, K.; Malyshev, D. A.; Ordoukhanian, P.; Kubelka, T.; Hocek, M.; Romesberg, F. E., Systematic exploration of a class of hydrophobic unnatural base pairs yields multiple new candidates for the expansion of the genetic alphabet. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 10235–10244.
80. Malyshev, D. A.; Dhami, K.; Lavergne, T.; Chen, T.; Dai, N.; Foster, J. M.; Correa, I. R., Jr.; Romesberg, F. E., A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature* **2014**, *509*, 385–388.
81. Fujiwara, T.; Kimoto, M.; Sugiyama, H.; Hirao, I.; Yokoyama, S., Synthesis of 6-(2-thienyl)purine nucleoside derivatives that form unnatural base pairs with pyridin-2-one nucleosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2221–2223.
82. Hirao, I.; Kimoto, M.; Mitsui, T.; Fujiwara, T.; Kawai, R.; Sato, A.; Harada, Y.; Yokoyama, S., An unnatural hydrophobic base pair system: site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 729–735.
83. Yamashige, R.; Kimoto, M.; Takezawa, Y.; Sato, A.; Mitsui, T.; Yokoyama, S.; Hirao, I., Highly specific unnatural base pair systems as a third base pair for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2793–2806.
84. Kimoto, M.; Yamashige, R.; Matsunaga, K.-i.; Yokoyama, S.; Hirao, I., Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat. Biotech.* **2013**, *31*, 453–457.
85. Matsunaga, K.-i.; Kimoto, M.; Hanson, C.; Sanford, M.; Young, H. A.; Hirao, I., Architecture of high-affinity unnatural-base DNA aptamers toward pharmaceutical applications. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18478.
86. Minakawa, N.; Kojima, N.; Hikishima, S.; Sasaki, T.; Kiyosue, A.; Atsumi, N.; Ueno, Y.; Matsuda, A., New base pairing motifs. The synthesis and thermal stability of oligodeoxynucleotides containing imidazopyridopyrimidine nucleosides with the ability to form four hydrogen bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9970–9982.
87. Hikishima, S.; Minakawa, N.; Kuramoto, K.; Fujisawa, Y.; Ogawa, M.; Matsuda, A., Synthesis of 1,8-naphthyridine C-nucleosides and their base-pairing properties in oligodeoxynucleotides: thermally stable naphthyridine:imidazopyridopyrimidine base-pairing motifs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 596–598.
88. Minakawa, N.; Ogata, S.; Takahashi, M.; Matsuda, A., Selective recognition of unnatural imidazopyridopyrimidine:naphthyridine base pairs consisting of four hydrogen bonds by the Klenow fragment. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1644–1645.
89. Ogata, S.; Takahashi, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A., Unnatural imidazopyridopyrimidine:naphthyridine base pairs: selective incorporation and extension reaction by Deep Vent (exo⁻) DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5602–5609.
90. Ludwig, J.; Eckstein, F., Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one. *J.*

- Org. Chem.* **1989**, *54*, 631–635.
91. Kiefer, J. R.; Mao, C.; Braman, J. C.; Beese, L. S., Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature* **1998**, *391*, 304–307.
92. Lund, T. J.; Cavanaugh, N. A.; Joubert, N.; Urban, M.; Patro, J. N.; Hocek, M.; Kuchta, R. D., B family DNA polymerases asymmetrically recognize pyrimidines and purines. *Biochemistry* **2011**, *50*, 7243–7250.
93. Guo, M.-J.; Waring, M. J.; Hildbrand, S.; Leumann, C. J.; McLaughlin, L. W., Inhibition of DNA polymerase reactions by pyrimidine nucleotide analogues lacking the 2-keto group. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1863–1869.
94. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marlière, P.; Herdewijn, P., Enzymatic incorporation in DNA of 1,5-anhydrohexitol nucleotides. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757–12765.
95. Jäger, S.; Rasched, G.; Kornreich-Leshem, H.; Engeser, M.; Thum, O.; Famulok, M., A Versatile toolbox for variable DNA functionalization at high density. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071–15082.
96. Veedu, R. N.; Vester, B.; Wengel, J., Polymerase chain reaction and transcription using locked nucleic acid nucleotide triphosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8124–8125.
97. Hwang, G. T.; Romesberg, F. E., Unnatural substrate repertoire of A, B, and X family DNA polymerases. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14872–14882.
98. Kunkel, T. A.; Bebenek, K., DNA Replication Fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497–529.
99. Johnson, S. C.; Sherrill, C. B.; Marshall, D. J.; Moser, M. J.; Prudent, J. R., A third base pair for the polymerase chain reaction: inserting isoC and isoG. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1937–1941.
100. Yang, Z.; Sismour, A. M.; Sheng, P.; Puskar, N. L.; Benner, S. A., Enzymatic incorporation of a third nucleobase pair. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4238–4249.
101. Hirao, I.; Mitsui, T.; Kimoto, M.; Yokoyama, S., An Efficient unnatural base pair for PCR amplification. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15549–15555.
102. Kimoto, M.; Mitsui, T.; Yamashige, R.; Sato, A.; Yokoyama, S.; Hirao, I., A New Unnatural Base Pair System between Fluorophore and quencher base analogues for nucleic acid-based imaging technology. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15418–15426.
103. Yang, Z.; Chen, F.; Alvarado, J. B.; Benner, S. A., Amplification, mutation, and sequencing of a six-letter synthetic genetic system. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15105–15112.
104. Higuchi, Y.; Furukawa, K.; Miyazawa, T.; Minakawa, N., Development of a new dumbbell-shaped decoy DNA using a combination of the unnatural base pair ImO^N:NaN^O and a CuAAC Reaction. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1360–1369.
105. Furuita, K.; Tarashima, N.; Minakawa, N.; Komatsu, Y.; Matsuda, A.; Kojima, C., NMR study of the duplex containing a thermally stable base-pairing motif. The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2010).

106. Chan, T. R.; Fokin, V. V., Polymer-supported copper(I) catalysts for the experimentally simplified azide-alkyne cycloaddition. *Qsar Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1274–1279.
107. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
108. Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M.; Hammond, D. M.; Carell, T., Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
109. Ichikawa, S.; Ueno, H.; Sunadome, T.; Sato, K.; Matsuda, A., Tris(azidoethyl)amine Hydrochloride; a versatile reagent for synthesis of functionalized dumbbell oligodeoxynucleotides. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 694–697.
110. Kandimalla, E.; Agrawal, S., Modulation of endosomal Toll-like receptor-mediated immune responses by synthetic oligonucleotides. *Adv. Polym. Sci.* **2012**, *249*, 61–94.
111. Chen, C.; Ridzon, D. A.; Broomer, A. J.; Zhou, Z.; Lee, D. H.; Nguyen, J. T.; Barbisin, M.; Xu, N. L.; Mahuvakar, V. R.; Andersen, M. R.; Lao, K. Q.; Livak, K. J.; Guegler, K. J., Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e179.
112. Bartlett, G. R., Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 469–471.

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 生物有機化学分野 南川 典昭 教授に心より感謝致します。

本研究を行なうにあたり、有益なる御指導ならびに御討論をして頂きました徳島大学大学院ヘルスバイオ研究部 生物有機化学分野 古川 和寛 助教授に篤く御礼申し上げます。

本研究を行なうにあたり、有益なる御指導を賜りました産業技術研究所 北海道センター 生物プロセス研究部門 生体分子工学研究グループ 小松 康雄 博士に深く感謝致します。

本研究を行なうにあたり、有益なる御指導ならびに御討論を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 石田 竜弘 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究に際し、有益なる御指導・御討論を行なって頂くとともに動物実験の実施にご協力頂きました徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 安藤 英紀 特任助教に心より感謝致します。

本研究に際し、動物実験を行なって頂きました徳島大学大学院薬科学教育部 薬物動態制御学分野 金城 望 学士および橋本 洋佑 修士に篤く御礼申し上げます。

本研究を行なうにあたり、有益なる御指導ならびに御助言を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬物治療学分野 山崎 尚志 准教授に深く感謝致します。

本研究ならびに参考論文研究を行なうにあたり、多大なるご尽力を賜りました徳島大学大学院薬科学教育部 生物有機化学分野の皆様には深く感謝致するとともに、彼らの今後の御活躍と御多幸を祈念致します。

各種機器分析にご協力頂きました徳島大学薬学部 中央機器室 北池 秀次 氏に深く感謝致します。

本研究に際し、ご支援下さいました日本学術振興会 特別研究員 (DC 1) 奨励費 (Grant Number: 25-6728) に篤く御礼申し上げます。

実験の部
第1章の実験

本研究に際し、ご支援下さいました徳島大学薬学部「エキソソームの機能・理化学的性質の薬学的解析に基づく革新的薬物送達システム (DDS) の創製を通じた実践型人材育成事業」に深く感謝するとともに、今後も同学部の教育支援により多くの“創薬/操薬”研究者が育つことを切に願います。

最後に、著者の学生生活を支えて頂きました、かけがえのない家族・友人の皆様に心より感謝致します。

田良島 典子

