

令和 7 年 6 月 23 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021 ~ 2024

課題番号：21K05235

研究課題名 (和文) 酸化セリウムナノ粒子を触媒としたゲノム解析キットの開発

研究課題名 (英文) Development of a Genome Analysis Kit Using Cerium Oxide Nanoparticles as a Catalyst

研究代表者

須磨岡 淳 (Sumaoka, Jun)

東京工科大学・工学部・教授

研究者番号：10280934

交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要 (和文)：目的に応じてゲノムDNAを迅速に解析するためには、解析対象となる特定のDNA領域をゲノムDNAから簡便に切り出すことが重要である。本研究では、数種の希土類酸化物を用いてプラスミドDNAの切断活性を検討した結果、酸化セリウムが最も高い活性を示すことが明らかとなった。さらに、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた解析の結果、これまで報告されているDNA加水分解触媒として最も高活性な硝酸二アンモニウムセリウム(IV)に匹敵する活性を示すことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個別化医療では病気に関連する遺伝子の情報を調べることが不可欠である。しかし、ゲノムDNAを直接調べるには高価な機器や専用の設備が必要となる。もし、ゲノムDNAから特定領域を簡便に切り出すことができれば、検査にかかる時間や費用を抑えることが可能となる。本研究で見出した酸化セリウムは、ゲノムDNAから特定の領域を切り出すための化学的な「はさみ」として非常に有望であり、今後の応用が期待される。

研究成果の概要 (英文) : To rapidly analyze genomic DNA according to specific objectives, it is important to conveniently excise the target DNA regions from the genomic DNA. In this study, we examined the DNA cleavage activity of several rare earth oxides using plasmid DNA, and found that cerium oxide exhibited the highest activity. Furthermore, analysis using high-performance liquid chromatography (HPLC) confirmed that cerium oxide shows a cleavage activity comparable to that of diammonium cerium(IV) nitrate, which has been reported as the most active DNA hydrolysis catalyst to date.

研究分野：生物化学

キーワード：酸化セリウム ナノ粒子 核酸 ゲノム 加水分解 ペプチド核酸

1. 研究開始当初の背景

酸化セリウムナノ粒子は、スーパーオキシドラジカルや過酸化水素のような反応性酸素種の分解を触媒することが報告され、オキシターゼやカタラーゼのような酵素活性を持つナノエンザイムとしての研究が広く行われていた。また、酸化還元に関する触媒作用だけではなく、p-二トロフェニルリン酸やアデノシン三リン酸(ATP)などの活性化されたリン酸エステルやリン酸トリエステルが酸化セリウムナノ粒子により加水分解されることも明らかにされつつあった。さらに、比較的加水分解に対する安定性の高い環状のリン酸ジエステル結合を有するアデノシン3',5'-環状リン酸(cAMP)の加水分解活性が報告され、酸化セリウムナノ粒子はDNA加水分解触媒への応用も可能であることが期待される状況にあった。また、我々は、予備的な実験によって、DNAのモデル化合物(チミジリル(3'→5')チミジン、チミジンの二量体)が、市販の酸化セリウムナノ粒子により切断されることを見出していた。

さらに、核酸塩基を一部修飾したペプチド核酸(核酸塩基のアデニンを2,6-ジアミノプリン、チミンを2-チオウラシルに置き換えたペプチド核酸でpcPNAと呼ばれている)とCe(IV)/EDTAを併用することで、二本鎖DNAを塩基配列特異的に切断する化学ツールの開発(図1)に成功しており、その応用を検討している状況にあった。

2. 研究の目的

研究代表者がDNA切断触媒として利用してきたCe(IV)/EDTAは均一系の触媒であり、DNA切断断片にCe(IV)/EDTAがどうしても混入し、これを除去することが難しいという問題があった。ゲノムDNAから所定断片を回収できるようなキットを開発し、回収後にDNAを解析する際には、このような触媒の混入は大きな問題となってくる。そこで、反応溶媒に不溶である金属酸化物ナノ粒子のような触媒を用いれば、ろ過や遠心分離などの比較的簡単な操作で触媒を取り除くことができる期待される。また、これまでの研究から、従来のpcPNAではインベージョン効率(図1の(a)のインベージョン複合体を形成する効率)が不十分であり、キット化するためにはより高い効率でインベージョンするpcPNAの開発が必要であることも明らかとなっている。そこで、本研究では、高いDNA切断能を有するナノ粒子の探索ならびに二本鎖DNAへ高効率でインベージョンするpcPNAの開発をそれぞれ行い、細胞外環境においてゲノムDNAから所定の断片を回収できるようなキットの開発へと発展させることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 酸化セリウムナノ粒子のDNA切断活性の評価

基質としてチミジリル(3'→5')チミジン(TpT)を、CeO₂ナノ粒子として市販のナノ粒子(Cerium(IV) Oxide Nanoparticle 10 nm, Wako 356-34501)を用いた。切断反応は、50°C、pH 7(HEPES緩衝液)で、Eppendorf社 ThermoMixer® Cを用いて激しく振とうしながら行った。CeO₂ナノ粒子によるTpTの切断は、ODSカラムを用いた逆相HPLCにより評価した。

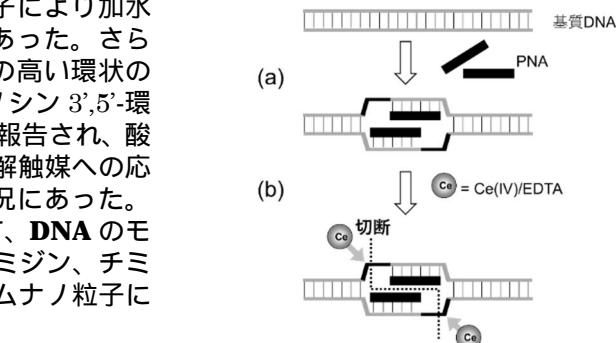


図1 Ce(IV)/EDTAとPNAの併用による二本鎖DNAの塩基配列特異的切断。

(a) PNAが基質DNAに入り込み基質DNA中に一本部分を形成し、(b)一本鎖DNA切断活性を持つCe(IV)/EDTAの添加により一本鎖部位が切断される。

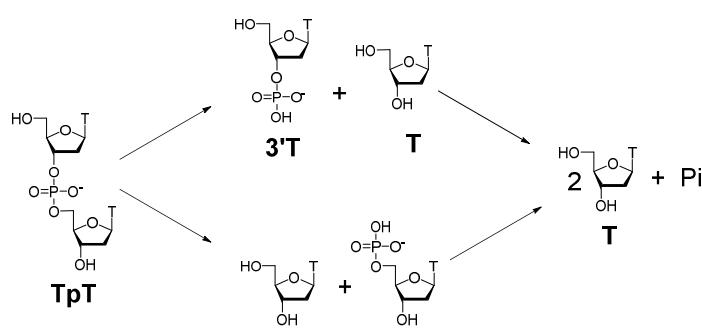


図2 チミジリル(3'→5')チミジン(TpT)の加水分解

(2) 酸化セリウムナノ粒子および他の希土類酸化物粒子によるプラスミドDNAの切断活性の評価

各種の希土類酸化物(酸化セリウム(IV)(CeO₂)、酸化ランタン(IV)(La₂O₃)、酸化プラセオジム(III, IV)(Pr₆O₁₁)、酸化サマリウム(IV)(Sm₂O₃)、酸化テルビウム(III, IV)(Tb₄O₇)を純水に加え、各金属原子が20 mMに相当するような溶液を調製した。その後、調製した各溶液を等量のHEPESバッファー(50 mM, pH 7.4)に加え、各種の金属原子が10 mMに相当する希土類酸化物溶液を調製した。

4 μL の市販のプラスミド **DNA** (pBR322, DNA, 0.41 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を 36 μL の純水に加え、プラスミド **DNA** 溶液 (**DNA** 濃度 0.041 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を調製した。5 μL の **HEPES** 緩衝液 (**50 mM**, **pH 7.4**) を 5 μL のプラスミド **DNA** 溶液に加えて、希土類酸化物を含まない **DNA** 溶液 (コントロール) とした。

調製した市販の各種希土類酸化物溶液 5 μL を調製したプラスミド **DNA** 溶液 5 μL に加えて各種希土類酸化物の反応溶液とし、37°Cで激しく振とうさせながら 30 分間および 2 時間反応させた。切断結果はアガロースゲル電気泳動で評価した。

(3) ペプチド核酸の修飾によるインベージョン効率の向上

これまでの研究で、ある種のシアニン色素が系に共存すると、インベージョン複合体 (二本鎖 **DNA** に **pcPNA** がインベージョンした **図 1(a)** の状態) が安定化することを示唆するデータを得ていた。そこで、**図 3** に示すシアニン色素を新たに合成し、**pcPNA** の N 末端にアミド結合で導入した。**pcPNA** への導入は、**Boc** 法による

pcPNA の合成に引き続き固相上で通常のモノマーの導入と同様の条件で行った。定法にしたがい固相からシアニン色素修飾 **pcPNA** を切り出し、**ODS** カラムを用いた逆相 **HPLC** で精製後に **MALDI-TOF MS** によりシアニン色素修飾 **pcPNA** の合成を確認した。

インベージョン実験で用いた基質 **DNA** は、プラスミド **DNA** (**pBR322**) をテンプレートとして **PCR** を用いて調製した。インベージョン効率の評価は、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるゲルシフトアッセイを用いた。

4. 研究成果

(1) 酸化セリウムナノ粒子の **DNA** 切断活性の評価

TpT のリン酸ジエステルが加水分解されると、チミジン 3' - モノリン酸 (**3'T**) とチミジン (**T**) あるいはチミジンとチミジン 5' - モノリン酸 (**5'T**) が生じる (**図 1**)。さらに、**3'T** や **5'T** のリン酸モノエステル結合の加水分解が進行し、最終的に 1 分子の **TpT** から 2 分子の **T** が生成する。基質 **TpT** のピークの面積から、**CeO₂** ナノ粒子 **1.4 mg/mL** における擬一次反応速度定数を求めたところ (**表 1**) **6.9 x 10⁻² h⁻¹** (半減期 **10 h**) となり、**Ce(NH₄)₂(NO₃)₆** を用いた場合の反応速度 **1.9 x 10⁻¹ h⁻¹** (半減期 **3.6 h**) と遜色ない活性を有することが明らかになった。

5'T の加水分解について同様に擬一次速度定数を求める、**8.6 x 10⁻¹ h⁻¹** であった。**3'T** や **5'T** のリン酸モノエステルは **TpT** のリン酸ジエステルより約 10 倍早く加水分解されるため、**HPLC** 上では **3'T** や **5'T** ピークはほとんど観測されなかった。

表 1 チミジリル(3' 5')チミジン (**TpT**) および **5'T** の加水分解に対する擬一次速度定数

基質	触媒	擬一次速度定数(h ⁻¹)	半減期
TpT ²⁾	CeO₂ ナノ粒子	6.9×10^{-2}	10 h
	Ce(NH₄)₂(NO₃)₆	1.9×10^{-1}	3.6 h
5'T	CeO₂ ナノ粒子	8.6×10^{-1}	48 min
	Ce(NH₄)₂(NO₃)₆	2.8	15 min

a) **CeO₂** 1.4 mg / mL, [基質]₀ = 0.1 mM, pH 7, 50

b) [Ce(NH₄)₂(NO₃)₆] = 10 mM, [基質]₀ = 0.1 mM, pH 7, 50

(2) 酸化セリウムナノ粒子および他の希土類酸化物粒子によるプラスミド **DNA** の切断活性の評価

図 4 に酸化セリウムナノ粒子 (**CeO₂**) を用いた場合の切断結果を示す。**DNA** のみ (**DNA only**) では、スーパーコイル状の **Form I** およびニックが入った少量の **Form II** が観測された。溶液を調製後すぐに反応を止めた場合 (**0 min**) では、溶液の調製処理などのためか **Form II** が増加しているが、直鎖状の **Form III** はほとんど観測されていない。しかし、反応後 30 分 (**30 min**) では、**Form I** はほとんど観測されず、**Form II** および **Form III** が観測された。さらに時間が経過すると (**2 h**) スメアなバンドが得られた。これは、**DNA** の断片化がさらに進んでいることを示唆している。

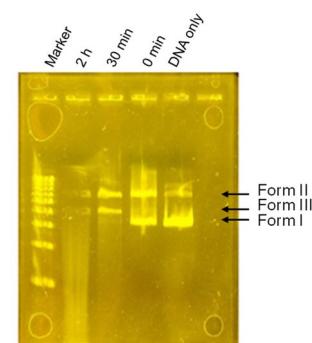


図 4 酸化セリウムナノ粒子によるプラスミド **DNA** (**pBR322**) の切断。

次に、酸化ランタン(La_2O_3) (La₂O₃)、酸化プラセオジム(Pr_6O_{11}) (Pr₆O₁₁)、酸化サマリウム(Sm_2O_3) (Sm₂O₃)、酸化テルビウム(Th_4O_7) (Th₄O₇)をそれぞれ用いて、同様のプラスミド **DNA** の切断実験を行ったが、酸化セリウムの活性を超える希土類酸化物は見いだせなかった。

(3) ペプチド核酸の修飾によるインベージョン効率の向上

図5に用いた基質 **DNA** および **pcPNA** の配列を示す。50 で 4 時間 20 分基質 **DNA** と **pcPNA** をインベージョンし、その後に NaCl 加えて(終濃度を 100 mM とした)さらに 50 で 45 分間インキュベートした結果を図6に示す。**pcPNA** を **DNA** に加えると移動度の少ないバンドがそれぞれの **PNA** の組み合わせで観測された。また、この新たに生じたバンドの強度は、**cypcPNA1+cypcPNA2** > **cypcPNA1+pcPNA2**, **pcPNA1+cypcPNA2** > **pcPNA1+pcPNA2** の順で高くなっている。さらに、ミスマッチを導入した化学合成 **DNA** (130 bp) を用いて、**cypcPNA** および **pcPNA** のミスマッチ認識能を評価したところ、ミスマッチを導入すると新たなバンドは生じなかった。これらの結果は、新たに生じたバンドがインベージョン複合体のバンドであること、さらに、インベージョン複合体がシアニン色素の効果で安定化していることを強く示唆している。しかしながら、NaCl 存在下でのインベージョン効率は十分ではなく、さらに何らかの修飾を加える必要があることも明らかになった。

(a)

```
TGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCGTGGAA
CACCTACATCTGTATTAAACGAAGCGCTGGCATTGACCCCTGAGTGATTTCTCTG
GTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTACCCCTCACAAACGTTCCAGTAACCGG
GCATGTTCA TCATCAGTAA CCCGTATCGTGAGCATCCTCTCGTTCATCGGTA
TCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAAACA
GGAAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTT
CTGGAGAAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGC
TTCACGACCACGCTGATGAGCTT
```

(b)

pcPNA1	N末端----- (Lys) UUDCUGDUGD (Lys) (Lys) - C末端
cypcPNA1	N末端- cyanine (Lys) UUDCUGDUGD (Lys) (Lys) - C末端
pcPNA2	N末端----- (Lys) UCDUCDGUDD (Lys) (Lys) - C末端
cypcPNA2	N末端- cyanine (Lys) UCDUCDGUDD (Lys) (Lys) - C末端

図5(a) 基質 **DNA** (408 bp) の配列(斜体の部分が **pcPNA** の標的となる領域) および、(b)合成した **pcPNA** の配列。**D** は核酸塩基が 2,6-ジアミノプリン、**U** は核酸塩基が 2-チオウラシルであることを示す。また、シアニン色素修飾 **pcPNA** は **cypcPNA** と表記する。

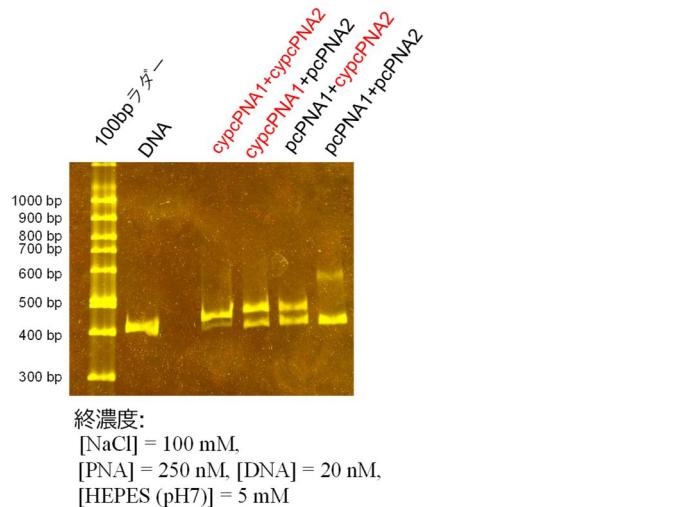


図6 シアニン色素修飾 **pcPNA** による二本鎖 **DNA** へのインベージョン。
50 で 4 時間 20 分インベージョン後に NaCl を加えて(終濃度 100 mM)
さらに 45 分間インキュベートした結果。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 計0件

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名

尾身 勇輝、須磨岡 淳

2. 発表標題

シアニン色素修飾PNAによる二本鎖DNAへのインベージョン

3. 学会等名

日本化学会 第103春季年会

4. 発表年

2023年

1. 発表者名

中込雅仁、須磨岡淳

2. 発表標題

酸化セリウムナノ粒子を用いたDNAの切断

3. 学会等名

第38回 希土類討論会

4. 発表年

2022年

1. 発表者名

岩井 蓮、須磨岡 淳

2. 発表標題

double-duplex invasion の高効率を目指した -pcPNAの合成

3. 学会等名

日本化学会 第105春季年会

4. 発表年

2025年

[図書] 計0件

[産業財産権]

[その他]

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

[国際研究集会] 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------