



Title	細胞レベルでRNA切断活性を示す化学修飾を施した8-17 DNAzymeの開発研究
Author(s)	千葉, 幸介
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96134
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

細胞レベルで RNA 切断活性を示す
化学修飾を施した 8-17 DNAzyme の開発研究

2024 年

大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻

生物有機化学分野

千葉 幸介

略語表

A	adenine
ASO	antisense oligonucleotide
ANOVA	analysis of variance
C	cytosine
CAVP	crotalus adamanteus venom phosphodiesterase
cDNA	complementary DNA
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DNAzyme	deoxyribozyme
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FAM	fluorescein
FANA	2'-fluoro-arabinonucleic acid
FBS	fetal bovine serum
G	guanine
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hepes	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
I	inosine
LNA	locked nucleic acid
mC	5-methylcytosine
MALAT-1	metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1
Me	methyl
MOE	methoxyethyl
mRNA	messenger RNA
ncRNA	non-coding RNA
2'-OMe	2'-O-methyl ribonucleic acid
PO	phosphodiester
PS	phosphorothioate
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PO	phosphodiester
PS	phosphorothioate

RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNase H1	ribonuclease H1
siRNA	small-interfering RNA
SOD1	superoxide dismutase 1
SRB1	scavenger receptor B1
T	thymine
TBE	Tris-borate-EDTA
TNA	threose nucleic acid
U	uracil
UV	ultraviolet

目次

序論	1
本論	6
第一章 8-17 DNAzyme の修飾設計と活性評価	6
第一節 X線結晶構造に着目した触媒コアの修飾	6
第二節 アンチセンス核酸設計に基づいた結合アームの修飾.....	12
第三節 修飾 8-17 DNAzyme の速度論的解析	15
第四節 修飾 8-17 DNAzyme の酵素耐性評価	17
第二章 8-17 DNAzyme の細胞内への応用可能性検討	19
第一節 金属イオンと相補鎖 (DNA/RNA)の違いによる 8-17 DNAzyme 活性への影響.....	19
第二節 修飾 8-17 DNAzyme による長鎖 RNA の切断活性評価.....	23
第三節 修飾 8-17 DNAzyme による細胞中の内在 RNA 切断活性評価.....	27
第四節 修飾 8-17 DNAzyme による内在 RNA 切断の機構解析.....	30
結論	32
謝辞	33
実験項	34
参考文献	41

序論

核酸医薬は、低分子医薬や抗体医薬では治療が困難であった、遺伝性疾患や希少疾患に対してアプローチできる新たな創薬モダリティとして注目を集めている。核酸医薬の種類としては、標的 RNA の切断を誘導する siRNA やアンチセンス核酸 (ASO)、ASO の別の作用機序として RNA のスプライシングを制御するスプライシング制御型核酸、さらにタンパク質を標的とする RNA アプタマーなどが挙げられる¹。このように様々な作用機序を有した核酸医薬について多くの臨床試験が行われており、本論文を執筆時点で 20 品目が医薬品として承認されている²。2023 年には、特定の遺伝子 (SOD1) の変異を標的とする ASO が、筋萎縮性側索硬化症に対する治療薬として承認され大きな注目を集めた³。核酸医薬は、今後さらなる治療薬の開発が期待される創薬モダリティである。

本研究では、siRNA や ASO と同じく RNA 切断型の新たな核酸医薬として期待される、デオキシリボザイム (DNAzyme) に注目した。DNAzyme は 1994 年、DNA ライブラリーを用いた試験管レベルでのスクリーニングによって初めて見いだされた⁴。さらに 1997 年には、現在も広く研究がなされる 10–23 DNAzyme と 8–17 DNAzyme の 2 種類のサブタイプが報告された⁵。DNAzyme は 30 塩基ほどから成る DNA であり、標的 RNA と塩基対を組み二重鎖を形成する結合アーム (binding arm) (Fig. 1a, shown in black) と、 Pb^{2+} や Mg^{2+} などの金属イオンを固定化する触媒コア (catalytic core) (Fig. 1a, shown in light blue) で構成される。標的 RNA との二重鎖形成によって金属イオンが RNA 切断部位近傍 (Fig. 1a, shown in red) に位置することで、金属イオンとの静電相互作用および触媒コアの核酸塩基との水素結合を介し、RNA の分子内加水分解反応 (2'-3'環化反応) が進行し RNA が切断される (Fig. 1b)。なお、Fig. 1b では 8–17 DNAzyme を例に、近年報告された X 線結晶構造から想定される反応機構を示した⁶。DNAzyme は最初に報告されて以来、医薬応用研究が盛んに進められてきた^{7,8}。また、特定の金属イオン存在下でその触媒反応が起こる点に注目した、金属イオンセンサーとしての応用研究や、新たなスクリーニングにより、RNA 切断ではなく RNA ライゲーション反応など多様な生体反応を触媒する DNAzyme の探索も行われている^{9–11}。

RNA 切断型の siRNA、ASO と比較して、DNAzyme は (1) 生体酵素を用いずに RNA 切断できる、(2) RNA 切断部位の塩基選択性が高い、という 2 点を大きな特徴として持つ。それぞれの特徴について詳細を下記に示した。

- (1) 従来の RNA 切断型の核酸医薬は、相補鎖となる標的 RNA を生体酵素に認識させることで、酵素による RNA の切断を引き起こす (siRNA; RNA-induced silencing complex, ASO; ribonuclease H1 (RNase H1))。たとえば、ASO は標的 RNA と DNA–RNA 二重鎖を形成し、その二重鎖を認識した RNase H1 が標的 RNA の切断・分解を行う (Fig. 1c)。一方で、DNAzyme は生体酵素を用いることなく RNA 切断を行うことが可能であるため、たとえば目的とする生体酵素が発現しない、または発現低下が起こっているような

環境 (がん細胞、感染細胞、など) に対する核酸医薬として期待される。

- (2) DNAzyme による RNA 切断部位はその 2~4 塩基配列に対して高い選択性を有している。たとえば 10-23 DNAzyme というサブタイプでは、切断部分が A-U ジヌクレオチドである場合に高い切断活性を示す (Fig. 1b)。これは一塩基多型 (SNPs) で一塩基のみの変異によって疾患の表現型を示すような RNA に対して非常に有力である。ASO や siRNA は標的 RNA の一塩基だけ異なるもの (1 ミスマッチ) に対する選択性は低く、しばしば 1 ミスマッチの RNA を切断するオフターゲット効果により毒性を示すことがあるため、SNPs 選択的な切断を考えたとき、DNAzyme は有用な選択肢となる。

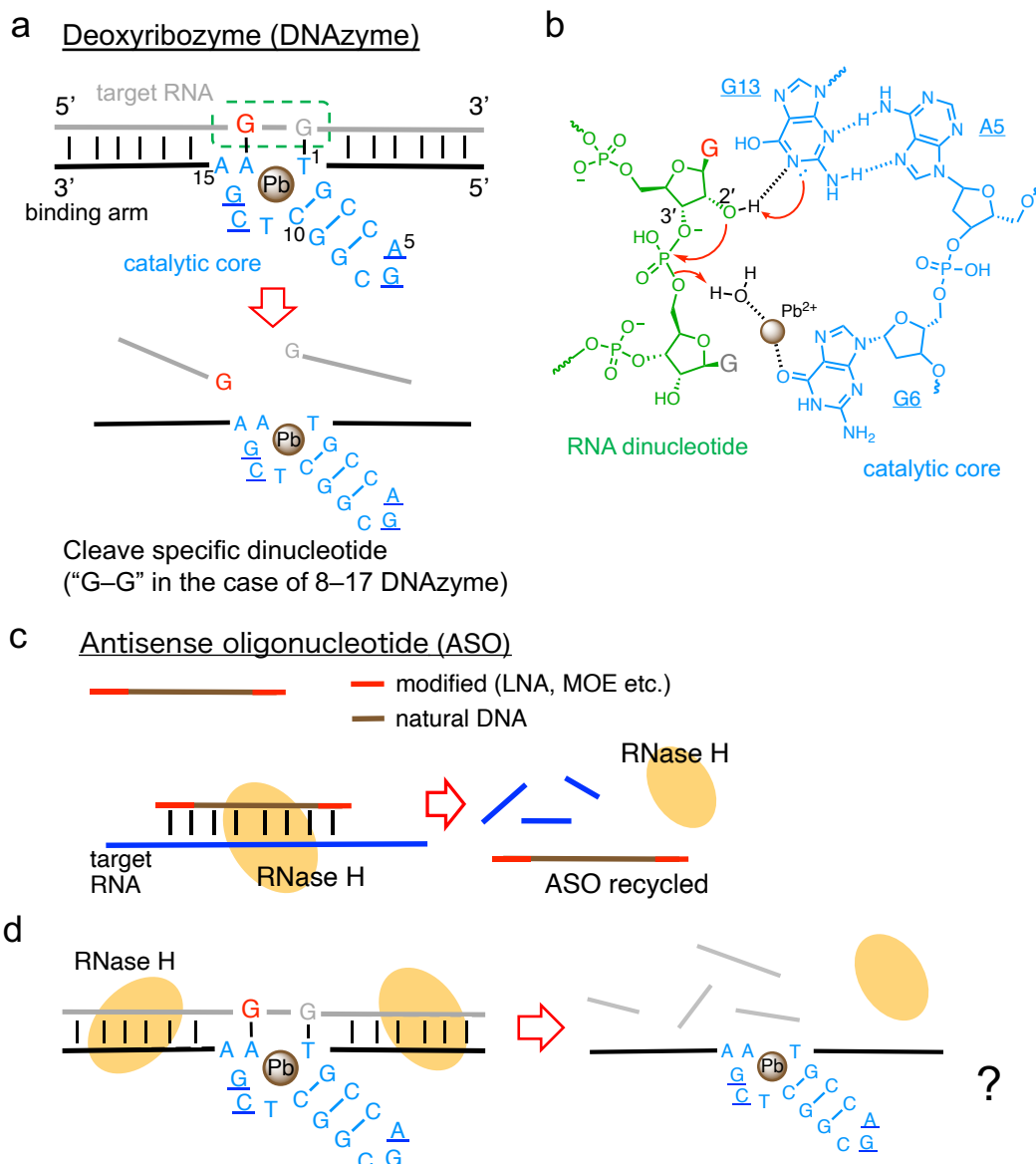


Fig. 1 Overview of DNAzyme. (a, b) An example of DNAzyme, 8-17 DNAzyme, which cleaves target RNA by catalyzing intra molecular hydrolysis reaction. RNA cleavage is catalyzed by its catalytic core with metal ion (Pb^{2+} in this case). The cleavage is only occurred at specific dinucleotide shown as green. The nucleotides in the catalytic core were numbered from 5' end, such as G6, which is sixth guanosine in the catalytic core shown in (a). There

are base pairings between A5 and G13, G6 and C12 (shown in blue bar). (c) Brief description about ASO, which cleaves RNA via RNase H1 recruitment. (d) Suspected RNA-cleaving mechanism of DNAzyme by recruiting RNase H1 as well as ASO.

このように創薬モダリティとしての魅力と、ユニークな分子メカニズムを有している一方で、DNAzyme は細胞や動物において RNA 切断活性を明確に示すものはほとんど見出されておらず、活性が不十分であるという問題がある。そのため、DNAzyme は触媒コアと金属イオンによる RNA 切断という DNAzyme の機能ではなく、ASO と同じように RNase H1 によって RNA が酵素的に切断されただけではないかという研究も報告されている (Fig. 1d, 結合アームが ASO と同様に機能した可能性)¹²。臨床試験が進められた DNAzyme も報告されているが、これらの DNAzyme 研究においても、RNase H1 ではなく DNAzyme による RNA 切断であることが明確に示されてはいなかった^{13, 14}。

近年、2つのグループより、DNAzyme の細胞内での RNA 切断活性を明確に示した研究が相次いで報告された。1つはカリフォルニア大学アーバイン校の John Chaput らのグループである。彼らは広く研究されてきたサブタイプである 10–23 DNAzyme に対し、2'-fluoro-arabinonucleic acid (FANA) と threose nucleic acid (TNA) を適切に導入することで DNAzyme の RNA 切断活性、および酵素耐性 (核酸分解酵素や血漿中での安定性) を向上させ、細胞内でも高い活性を示すことに成功した^{15, 16}。重要なこととして、彼らは触媒コアの塩基配列を反転することで DNAzyme 活性を消失させたネガティブコントロール (3'-5'-inverted) を用いることで、細胞内での RNA 切断活性が RNase H1 による効果ではなく DNAzyme の触媒的な RNA 切断によると示した点が挙げられる。もう1つのグループは MRC 分子生物学研究所の Philipp Holliger と Alexander Taylor らのグループである。彼らは改変ポリメラーゼを用い、すべて非天然の FANA で構成された DNAzyme をスクリーニングによって見出した。彼らはネガティブコントロールとして、3'-5'-inverted に加え、活性を消失させる一塩基変異を触媒コアに導入したものを用意した。一塩基のみの変異のため、使用する DNAzyme からの塩基配列の変化は小さく、より厳密なネガティブコントロールと考えられた。彼らはこれら2種類のネガティブコントロールと比較し、見出した DNAzyme が細胞内で明確に RNA 切断することを示した^{17, 18}。いずれの報告も修飾核酸の導入によって DNAzyme の活性・酵素耐性を向上させ、細胞内での RNA 切断活性の取得に至っていることから、修飾核酸の適切な導入は DNAzyme の創薬応用に重要であることが分かる。

このように修飾核酸の導入によって細胞レベルで活性を示す DNAzyme は見出されつつあるが、触媒コアに対して修飾核酸を効果的に導入する方法は十分に確立されていない。前述の Chaput らは触媒コアの各位置に FANA 導入したものを 5'側から 3'側まですべて用意し、FANA を導入しても活性が低下しない2ヶ所を見出すスクリーニング的な方法を取っている¹⁴。シンプルな方法ではあるが、各位置に FANA を導入したオリゴ核酸を用意する必要があり、さらに FANA 以外の修飾核酸を考えた場合にはさらに膨大な数を用意することとなる。また、結果として2ヶ所にしか修飾を導入できなかったため、酵素耐性は十分に

はないことが懸念される。なお、触媒コアを含めてすべて FANA で構成された DNAzyme を得る Holliger らのアプローチを前述したが、標的 RNA 配列が変わるたびに毎回スクリーニングが必要であるとともに、高活性配列を毎回取得できるかは不透明である。

本研究では、大量のオリゴ核酸合成が必要となる従来のスクリーニングとは異なり、DNAzyme の理論的な修飾方法を新たに構築し、修飾した DNAzyme で細胞レベルでの RNA 切断活性を示すことを目指して研究を行った。修飾方法の構築にあたり、10–23 DNAzyme と同じく初期に報告された汎用的なサブタイプで、基質を切断する直前の活性化状態 (pre-catalytic) と考えられている X 線結晶構造が唯一報告された 8–17 DNAzyme に注目した^{5, 6}。この pre-catalytic な X 線結晶構造中の各ヌクレオチドの立体構造情報に基づくことで、これまで手探りで修飾検討されてきた触媒コアに対し、修飾核酸の種類や導入位置を理論的に設計する可能性を検証したい。また、標的 RNA と二重鎖を形成する結合アームは、ASO に求められる特性と似通っていると考え、当研究室の ASO に関する修飾知見を活用して適切に DNAzyme を修飾できるか検証したい。上記戦略によって 8–17 DNAzyme を理論的に修飾し、8–17 DNAzyme では報告のなかった細胞レベルでの RNA 切断活性を示すことができれば、DNAzyme の新たな修飾アプローチとして医薬応用に向けた進展に貢献できると考えた。

第一章第一節では、触媒コアについて X 線結晶構造に基づく修飾アプローチを行った結果を示す。8–17 DNAzyme の各ヌクレオチドの立体構造情報に基づき、その特徴 (糖部配座など) に適した修飾核酸を選択して導入できるか検証を行った。これまでに数多くの修飾核酸が報告されており、本アプローチは拡張性も高いと期待される。第二節では結合アームに対して ASO の修飾知見を活用することを試みた検討についてまとめる。結合アームに求められる特性は ASO と同様、核酸分解酵素などに対する安定性と、標的 RNA との適切な二重鎖形成能であると考えた。その場合、実際に臨床化合物の ASO に搭載されている locked nucleic acid (LNA)、2'-O-methyl ribonucleic acid (2'-OMe)、phosphorothioate (PS) bond が有力な修飾核酸と考えた (Fig. 2)。第三節では修飾を導入した 8–17 DNAzyme の速度論的な活性評価によりその触媒としてのターンオーバーを理解するとともに、第四節では核酸分解酵素に対する安定性の評価を行ったのでこれら結果を示す。

第二章では、第一章で見出した修飾 8–17 DNAzyme を用いて細胞内での RNA 切断活性取得を目指した。第一節で、細胞内に存在する金属イオンに変更したときの RNA 切断活性への影響などを精査した上で、第二章では細胞内に存在する RNA に対して 8–17 DNAzyme の配列を再設計した内容を示す。第三節では、実際に生細胞内に修飾 8–17 DNAzyme を処理することで、標的 RNA を切断することができるか検証した。最後に、第四節では RNase H1 を介したものではなく、DNAzyme の機能で細胞内 RNA を切断したことを検証した結果を示す。

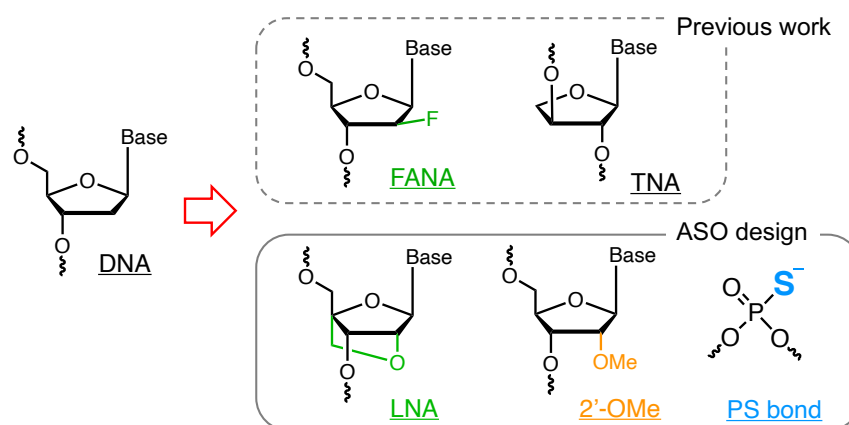


Fig. 2 Various modified nucleic acids used in previous work and ASO design.

本論

第一章 8-17 DNAzyme の修飾設計と活性評価

第一節 X線結晶構造に着目した触媒コアの修飾

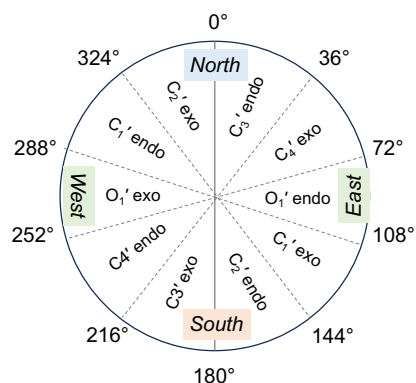
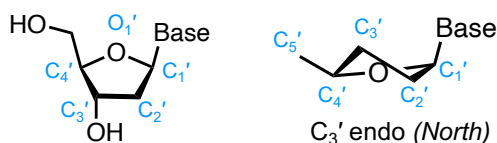
2017年に報告された 8-17 DNAzyme の X 線結晶構造は、RNA を切断する直前の状態 (precatalytic 状態) を高解像度にとらえた最初の事例である (Fig. 3a, Protein Data Bank accession: 5XM8)⁶。なお、10-23 DNAzyme も X 線結晶構造は報告されているが、活性状態を反映した構造ではなく、解像度が低かったため (3.0 Å)、修飾の導入位置を考えるには適していなかった¹⁹。

8-17 DNAzyme の X 線結晶構造に基づくと、8-17 DNAzyme は標的 DNA と両側の結合アームで二重鎖を形成し (Fig. 3a, shown in orange)、結合アームの間で触媒コア (15 塩基長) を形成していることが分かる (Fig. 3a, shown in light blue)。また触媒コアは内部で塩基対形成をしながら複雑な高次構造をとっていることも分かる。こうした触媒コアの中で、(i) *North* 型^{注1}あるいは *East* 型^{注1}の糖部配座を取るヌクレオチド (擬回転位相角^{注1} (P): 0°–108°, position: G2, G6, G9, C10, T11) および (ii) 塩基対形成をしておらず、二重らせんを組むような本来の立体構造とは異なるヌクレオチド (position: C7, T11) に注目した (Fig. 3b)。それぞれに対し、下記に示す修飾核酸に置き換えることによって、天然の DNA よりも pre-catalytic 状態 (X 線結晶構造の糖部構造) を安定化することによる活性の向上、また修飾による酵素耐性の向上が期待できると考えた。

(i) 2'-OMe, LNA: 糖部配座を *North* 型に誘導する修飾であるため、X 線結晶構造で明らかになった pre-catalytic 状態の糖部配座へと誘導する目的に適切であると考えた。

(ii) unlocked nucleic acid (UNA), C3 spacer: 本来の立体構造とは異なるヌクレオチドは構造としてひずみがあると考え、リボース環を有さないこれら修飾によりひずみの解消、そして pre-catalytic 状態の安定化に有利に働くと考えた。C3 spacer は 3'位から 5'位までの原子間距離をリンカーで置き換えるものである。

注1 核酸糖部の立体配座は擬回転位相角 P で表すことができる。 P は環内 5 つのねじれ角 ($\nu_0 \sim \nu_4$) を用いて計算することにより求められる (実験項参照)。 P が 0° 近傍の配座を *North* 型、90° 近傍を *East* 型、180° 近傍を *South* 型とよぶ。天然の DNA の立体配座は *North* 型と *South* 型間でゆらぎを持った状態である。



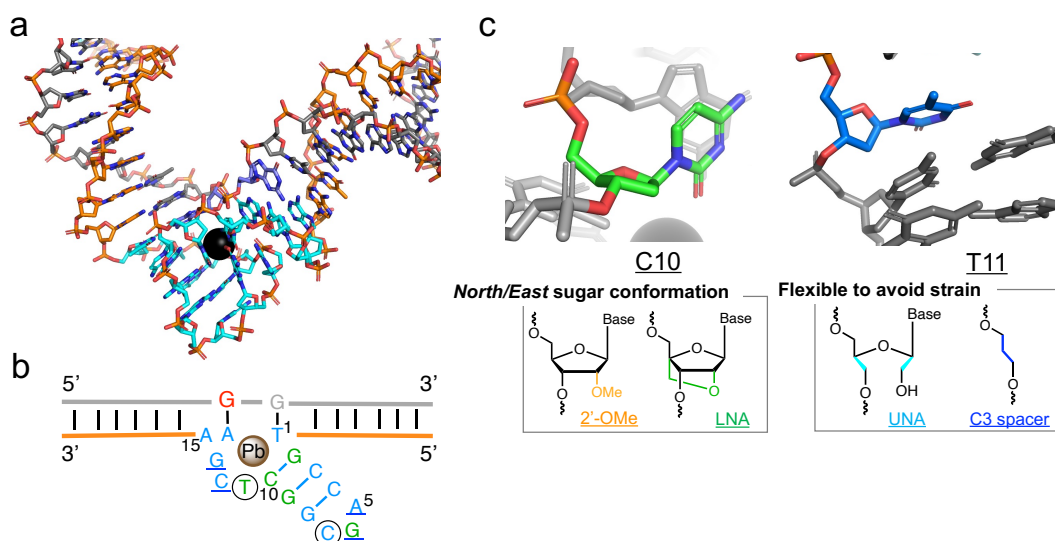


Fig. 3 X-ray crystal structure-based chemical modification. (a) X-ray crystal structure of the 8–17 DNAzyme. Orange: binding arm, blue: catalytic core, grey: DNA substrate, black ball: Pb^{2+} . (b) Scheme of 8–17 DNAzyme. Nucleotides which form *North/East* conformation among the catalytic core were shown in green (G2, G6, G9, C10, and T11) and strained nucleotides without base-pairing were surrounded in a circle (C7 and T11). (c) Crystal structure-based chemical modification on the catalytic core; *North/East* conformation nucleotide (left, C10 shown in light green) and strained nucleoside without base-pairing (right, T11 shown in blue).

いずれの修飾核酸も核酸分解酵素に対する耐性を高めることにより、細胞内などでの安定性を高めることが報告されたものである^{20–23}。なお、本X線結晶構造は相補鎖がRNAではなくDNA（切断部分のみRNA）であり、中心金属も鉛イオン（ Pb^{2+} ）のため、生体内に存在する金属を用いてRNAを切断する創薬としての目的とは異なっている。本節では、X線結晶構造に基づき適切な修飾核酸を導入したときに、活性が維持または向上できることを示すため、まずはX線結晶構造が取得された条件（相補鎖: DNA、金属イオン: Pb^{2+} ）にて検討を進めた。なお、創薬としての検討として相補鎖をRNA、金属イオンを Mg^{2+} や Zn^{2+} に変更する検討は第二章 第一節に示す。

X線結晶構造に基づいた修飾アプローチの有効性を示すために、DNAzymeの切断活性評価系として、5'末端にフルオレセインを修飾し、切断部位であるG–Gの5'側のGのみをRNAに置換した標的DNA基質(Dz-Ds)を作製した(Fig. 4a)。Dz-Dsの塩基配列はX線結晶構造を取得するのに使われた配列と同じである。同様に、結晶構造で用いられた未修飾8–17 DNAzymeをDz36と定義した(36塩基長)。まず、DNAzymeの活性評価としてマルチプルターンオーバー(Dz36 : Dz-Ds=1 : 10)の条件でDz36が約50%の基質Dz-Dsを切断する条件を設定した。具体的には、Hepes buffer (pH 7.3) 中 0.25 mM $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ 存在下で37°C 10分間反応させる条件である(実験項参照)。なお、X線結晶構造は Pb^{2+} を金属イオンとして利用しているため $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ を使用した。また、本節で利用したDNAzymeおよび基質の詳細についてはTable 2にまとめて本節末尾に記載した。

上記評価系を用い、触媒コアへの修飾核酸の導入検討を行った。期待した通り、*North/East*

型の糖部配座の箇所 (G2, G6, G9, C10, T11) に 2'-OMe を導入したところ、5ヶ所のうち4ヶ所で切断活性を維持することが明らかになった (Fig. 4b)。触媒コアの5'側から6番目のG (G6)に 2'-OMe を導入した Dz36-omG6 は完全に活性を消失したが、先行研究で報告され、Fig. 1b に示したように G6 は Pb^{2+} との静電相互作用を担い、DNAzyme が RNA を切断するイベントに極めて重要なため、わずかな立体構造の変化が許容されなかったと考えられる⁶。具体的には、Table1 に示した G6 の擬回転位相角 P は 18.8° であるのに対し、2'-OMe は 24.8° 付近になることが推定されるため適切な糖部配座に誘導できなかった可能性と、導入検討した際は X 線結晶構造では立体的に空いていると推定していたが、2'位へのメトキシ基の導入による立体障害が生じた可能性が考えられる。また、C10 に 2'-OMe を導入した Dz36-C10 は評価条件において 53%の基質を切断しており、Dz36 の切断率 47%を基準値とすると、およそ 13%活性が向上した。一方、同じ位置へ LNA 修飾を導入したところ、G9 の位置 (Dz36-lnG9) を除き活性が消失することが明らかとなった。この結果は、LNA が *North* 型に強く固定する修飾であるため、各ヌクレオチドの糖部配座を X 線結晶構造の *pre-catalytic* な活性化状態とは異なる形 (より強い *North* 型) に固定してしまったために、RNA 切断を引き起こすことができず、活性が消失したと考えられる。本考察については本節の後半で詳細に検討する。

次に塩基対を形成していないヌクレオチド (C7, T11) に対して UNA および C3 spacer を導入したところ、T11 の位置に修飾したものは活性を維持することが明らかになった (Fig. 4c, Dz36-unT11 [UNA], Dz36-spT11 [C3 spacer])。C3 spacer も許容であったことから、糖

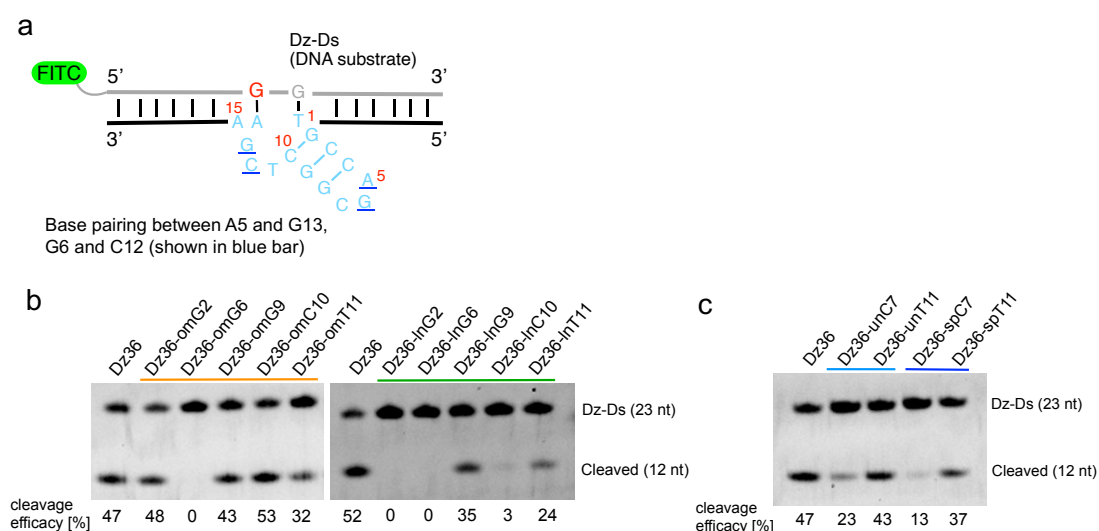


Fig. 4 Cleavage assay of 8–17 DNAzymes modified at the catalytic core. (a) Scheme of the cleavage assay of 8–17 DNAzyme. The DNA substrate was modified with FITC at the 5' end, and only its cleavage site comprised RNA (guanine, shown in red). Urea-PAGE analysis revealed the substrate-cleavage activity under multiple-turnover conditions. The results were shown for (b) *North*/*East* conformation-induced modification and (c) modification to induce nucleoside flexibility. The cleavage reactions were performed in buffer containing 0.25 mM $Pb(OAc)_2$ at 37 °C for 10 min with 100 nM substrate and 10 nM DNAzymes.

構造および核酸塩基が必要ないことが明らかとなった。一方で、先行研究では T11 ヌクレオチドを完全に欠失させると活性が約 20 倍低下したと報告されていることから⁶、欠失ではなく修飾核酸によって置換した本研究の戦略は、DNAzyme 活性を維持する上で有用であることが示唆された。

上記で示した、*North/East* 型の糖部配座について、X 線結晶構造をもとに各ヌクレオチドの糖部配座を詳細に検討した (Table 1)。なお、各ヌクレオチドに修飾導入した活性評価の結果 (Fig. 4b) を未修飾 Dz36 に対する相対値として Table 1 の右側に示した。擬回転位相角 P を算出したところ、いずれも 0° – 108° であり、*North/East* 型であることが確認された。ここで LNA と 2'-OMe の報告されている X 線結晶構造に基づいて P を算出し、LNA は 2'-OMe よりも強く *North* 型 (0° に近いほど強い) を誘起していることを確認した (Table 1 bottom)。すなわち LNA は触媒コアの各ヌクレオチドを、X 線結晶構造が取得された pre-catalytic 状態とは異なる、より強い *North* 型に固定してしまったため、DNAzyme 活性を消失させたと考えられる。

Table 1 Calculation of sugar pucker for each nucleotide in the catalytic core of the 8–17 DNAzyme. Five nucleotides (G2, G6, G9, C10 and T11) with the *North/East* type conformation were selected and their conformations were confirmed using the respective pseudorotation phase angle (P) and puckering amplitude ($v_{\max}$) based on the X-ray crystal structure (PDB ID: 5XM8). Relative activity was calculated using the result in Fig. 4b and c. The activity of the unmodified 8–17 DNAzyme (Dz36) was set as 1.0. For LNA and 2'-OMe sugar pucker calculations, one representative was selected from the X-ray structure in each case (PDB ID: 1HHW, an LNA–RNA hybrid; PDB ID: 1I7J, the dsRNA of 2'-OMe).

Position in Catalytic Core	P [$^{\circ}$]	$v_{\max}$ [$^{\circ}$]	Preferred Conformation	Relative Activity	
				2'-OMe	LNA
G2	24.5	13.3	C3' <i>endo</i>	1.0	< 0.1
G6	18.8	42.3	C3' <i>endo</i>	< 0.1	< 0.1
G9	79.3	39.8	O4' <i>endo</i>	0.9	0.7
C10	59.4	18.4	C4' <i>exo</i>	1.1	< 0.1
T11	46.9	39.5	C4' <i>exo</i>	0.7	< 0.1

LNA	16.3	57.5	C3' <i>endo</i>	<u>1HHW</u> ²⁴	
2'-OMe	24.8	49.8	C3' <i>endo</i>	<u>1I7J</u> ²⁵	

ここまでの検討で触媒コアに対する有効な修飾を見出してきた。ここで、2'-OMe 修飾について、同じ 2'位修飾で立体的・電子的な性質が異なる 2'-methoxyethyl (MOE)、2'-fluoro (F) を用いたときの DNAzyme 活性に与える影響を評価した (Fig. 5 left)。これら 2'修飾も汎用的な修飾であり、酵素耐性を高め、かつ *North* 型配座をとりやすいことが知られている。評価結果を Fig. 5 の lanes 2–4 に示したが、少なくとも C10 の位置では大きな差はなくいずれも活性は同等であり、本修飾位置においては修飾核酸の違いによる立体的・電子的な影響は見られなかった。次に、Fig. 4 で良好な結果を示した UNA、C3spacer も含めて修飾を 2 つ入れる検討も実施した。2'-OMe を 2 つ、または 2'-OMe と 2'-F (Fig. 5, lanes 5, 6)、さらに 2'-OMe と UNA または C3 spacer を組み合わせた場合 (Fig. 5, lanes 7, 8)、いずれも 1 つ導入した場合に比べて活性は減弱したが、30~38%の切断活性は保持していることが明らかになった。

本研究では、未修飾の Dz36 に比べて基質の切断活性がおよそ 13%向上した、2'-OMe を一つ導入した Dz36-omC10 を触媒コアの修飾として採用した。

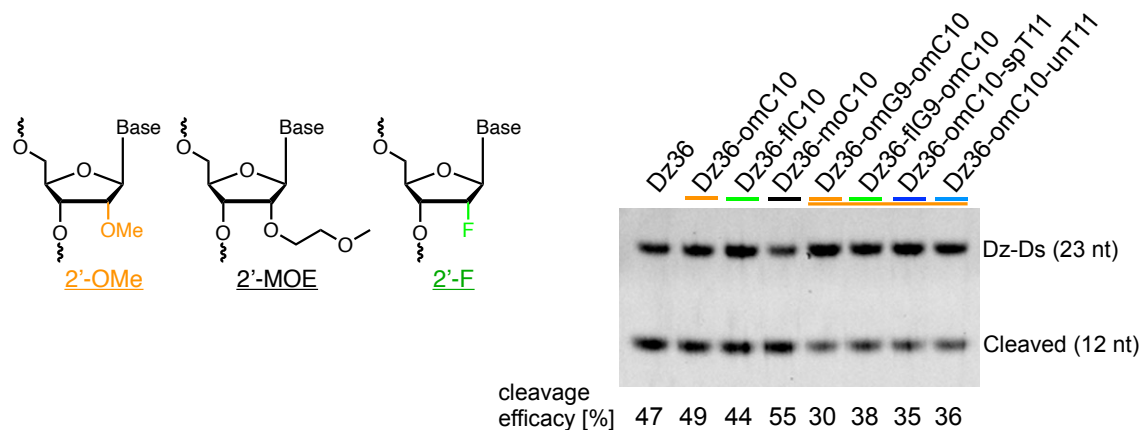


Fig. 5 Differences between 2'-modifications and two-point modifications in the catalytic core. The modifications at C10, using 2'-fluoro (Dz36-flC10) and 2'-O-methoxyethoxy (Dz36-moC10), had comparable effects on activity as those observed in Dz36-omC10. For the two-point modifications (lanes 5–8), while cleavage activity was retained, it was slightly less than that of the unmodified 8–17 DNAzyme (Dz36). Cleavage reaction conditions were same as Fig. 4.

Table 2. DNAzymes and substrates (oligonucleotides) used in this section (1-1).

Oligonucleotide Name	Sequence (5'–3')
(Numbering)	tgtaacgcac– 1-3 tgc– 4-6 cag– 7-9 cgg– 10-12 ctc– 13-15 gaa–atctctctcgt
Reported 8–17 DNAzyme X-ray crystal structure sequence ¹ (Dz)	
Dz36	tgtaacgcac–tgccagcggctcgaa–atctctctcgt
Dz-Ds	(5'-FITC) acgagagagatGggtgcgttaca
Catalytic core modification	
Dz36-omG2	tgtaacgcac–t ^{G^M} c–cag–cgg–ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-omG6	tgtaacgcac–tgc–ca ^{G^M} –cgg–ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-omG9	tgtaacgcac–tgc–cag–cg ^{G^M} –ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-omC10	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–c ^{G^M} tc–gaa–atctctctcgt
Dz36-omT11	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–c ^{T^M} c–gaa–atctctctcgt
Dz36-lnG2	tgtaacgcac–t ^{G^L} c–cag–cgg–ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-lnG6	tgtaacgcac–tgc–ca ^{G^L} –cgg–ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-lnG9	tgtaacgcac–tgc–cag–cg ^{G^L} –ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-lnC10	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–5 ^L tc–gaa–atctctctcgt
Dz36-lnT11	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–c ^{T^L} c–gaa–atctctctcgt
Dz36-unC7	tgtaacgcac–tgc–cag–C ^U gg–ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-unT11	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–c ^{T^U} c–gaa–atctctctcgt
Dz36-spC7	tgtaacgcac–tgc–cag–(sp)gg–ctc–gaa–atctctctcgt
Dz36-spT11	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–c(sp)c–gaa–atctctctcgt
Dz36-flC10	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–C ^F tc–gaa–atctctctcgt
Dz36-moC10	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–5 ^m tc–gaa–atctctctcgt
Dz36-omG9-omC10	tgtaacgcac–tgc–cag–cg ^{G^M} –C ^M tc–gaa–atctctctcgt
Dz36-flG9-omC10	tgtaacgcac–tgc–cag–cg ^{G^F} –C ^M tc–gaa–atctctctcgt
Dz36-omC10-unT11	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–C ^M T ^U c–gaa–atctctctcgt
Dz36-omC10-spT11	tgtaacgcac–tgc–cag–cgg–C ^M (sp)c–gaa–atctctctcgt

Lower cases letters: DNA residues; Upper case letters: RNA residues; ^{N^L}: LNA; ^{N^M}: 2'-OMe RNA; ^{N^U}: UNA; (sp): C3 spacer; ^{N^F}: 2'-F DNA; ^{N^m}: 2'-MOE RNA; "5": 5-methylcytidine; "∧": phosphorothioate (PS) bonds. **Blue font**: DNA at the catalytic core of 8–17 DNAzyme. **Red font**: cleavage site of the substrate, or a critical mutation for 8–17 DNAzyme.

第二節 アンチセンス核酸設計に基づいた結合アームの修飾

8-17 DNAzyme を用いて、細胞レベルで RNA 切断活性を示すような高い活性と細胞内における安定性を得るために、次に Dz36 の結合アームの修飾検討に着手した。序論で述べた通り、結合アームの役割は ASO と似通っていると仮定した。すなわち、適切なターンオーバーで基質である相補鎖に結合することと、細胞内で容易に分解されない高い安定性が必要と考えた。そこで、ASO で一般的に行われる修飾デザインを適用していくことにした。Fig. 1c に示したように、ASO は 5' と 3' の両末端に糖部修飾核酸を使用し、核酸分解酵素に対する耐性と、相補鎖への結合力を高めている。本研究ではその修飾核酸として、幅広く用いられる LNA を主に検討した²⁶。また、ASO はほぼ全ての PO (リン酸ジエステル) 結合を PS (ホスホロチオエート) 結合に置換している。PS 結合は、PO 結合の酸素原子を硫黄原子に変えたものであり、核酸分解酵素耐性を大幅に向上する²⁷。なお、本節で使用した DNAzyme およびその基質について配列などの詳細は、本節末尾の Table 3 に示した。

まず、Dz36 の結合アームに対して LNA と PS の修飾を導入し、DNAzyme 活性の評価を行った。導入パターンは ASO と同じように LNA を両末端 3 つずつ導入し、ほぼすべて PS 結合に置換した (Fig. 6a)。なお、触媒コアは修飾の導入が難しかったため、触媒コアおよびその近傍の結合アームは未修飾としている (詳細は第二章で後述)。期待した通り、LNA と PS を導入した配列 (Dz36-Inps) は未修飾 Dz36 と同等の活性を示し、修飾導入可能であることが明らかになった (Fig. 6b, lane 1, 3)。一方で、PS 結合を導入せずに LNA のみを修

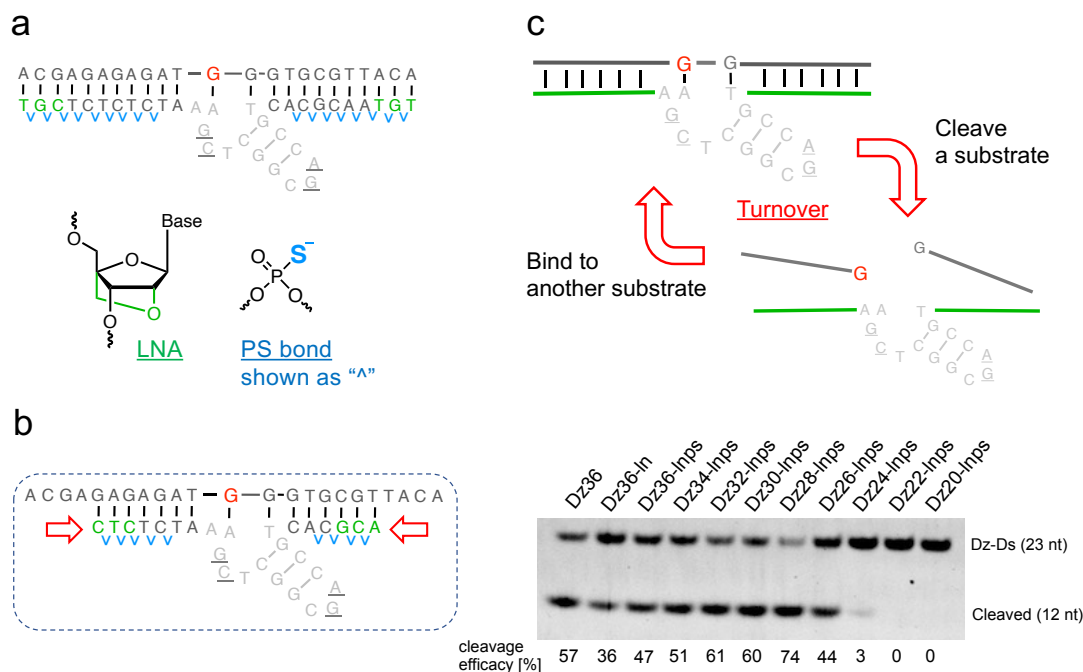


Fig. 6 Optimizing the binding arms of Dz36, using modifications generally used for ASO design. (a) ASO-based design of the binding arms using LNA and PS modifications for binding affinity and biostability. (b) Activity of the 8-17 DNAzymes with modified binding arms. The ASO-based design and the length of the binding arms were tested under the cleavage condition shown in Fig. 4. (c) Image of DNAzyme-mediated catalytic turnover.

飾したもの (Dz36-In) は活性が減弱した (Fig. 6b, lane 2)。

さらに高い活性を得るために、結合アームの長さに注目した。DNAzyme は相補鎖を切断した後、その切断断片から乖離し、新たに別の RNA と結合・切断するターンオーバーによって活性を示す (Fig. 6c)。RNA との結合力は相補なオリゴ核酸の塩基長に相關するため、ASO では塩基長を変えることで RNA との結合力およびターンオーバーを調整しており、DNAzyme の結合アームについてもこの戦略が応用できると考えた。この検証のため、Dz36-Inps の両末端を 1 塩基ずつ短くした DNAzyme を作成した (Dz34-Inps, Dz32-Inps.....Dz20-Inps)。これらを評価した結果、arm 長さを短くするに従って活性が向上し、Dz28-Inps で最大活性である 74% の切断率を示し、Dz36-Inps の 47% を基準として 57% も活性が向上することが明らかになった (Fig. 6b, lanes 3–11)。

Fig. 6 で検討した結果について、相補鎖との結合力と切断活性との相関性を示すため、各 DNAzyme と相補鎖との二重鎖の熱的安定性 (T_m) について測定を実施した (Fig. 7)。その結果、 T_m 値 (purple plot) は Fig. 7 に示した切断活性 (green bar) と逆相関することが明らかになった。このことは、結合アームを短くすることで相補鎖への結合力が低下し、ターンオーバーが改善され切断活性の向上につながったことを示している。なお、結合アームを Dz26-Inps よりも短くすると、 T_m 値は 37°C を下回り切断活性も消失することが分かった。相補鎖 DNA (Dz-Ds) の切断活性は 37°C 条件で評価していることから、Dz24-Inps、Dz22-Inps、および Dz20-Inps は十分に二重鎖形成できなかつたため、相補鎖切断が行えなかつたと考察できる。以上の結果は、 T_m 値ができる限り評価温度付近、ただしそれ以上であることが

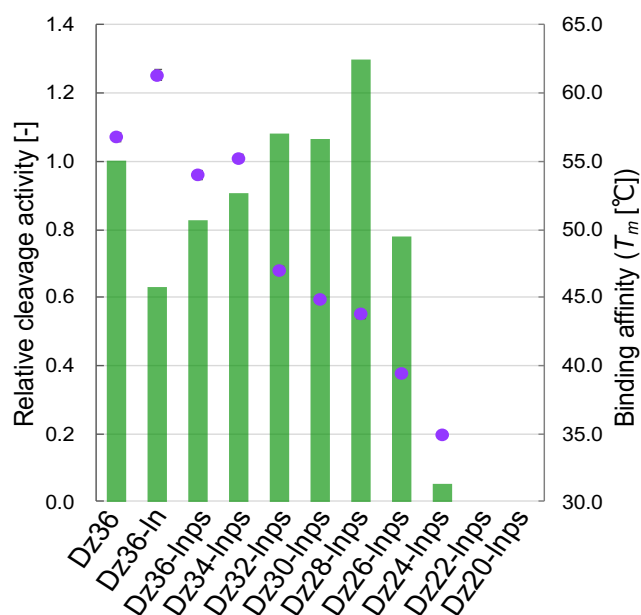


Fig. 7 Relationship between the cleavage activity and binding affinity (T_m value). Cleavage activity (green bar) was calculated relative to that of Dz36 (based on the results in Fig. 6b). Purple dots: T_m values.

望ましいとする先行研究に一致する²⁸。なお、Dz36-ln の T_m 値は Dz36-lnps よりも 5 °C 高いことが明らかとなった。この結果から、Dz36-ln の相補鎖との熱的安定性が向上し、相補鎖とのターンオーバーが低下したために、Dz36-lnps よりも低い活性を示したと考えられる。また、この T_m 値の差は、LNA が相補鎖との結合力を向上する一方、PS 結合はわずかに低下することから説明できる^{29, 30}。すなわち、Dz36-lnps は PS 結合の導入によって LNA による T_m 値上昇を低減した。

Table 3. DNAzymes and substrates (oligonucleotides) used in this section (1-2).

Oligonucleotide Name	Sequence (5'–3')
(Numbering)	tgtaacgcac– 1-3 tgc-cag- 7-9 cgg-ctc- 13-15 gaa–atctctctcgt 4-6 10-12
Dz36	tgtaacgcac–tgccagcgggctcgaa–atctctctcgt
Dz-Ds	(5'-FITC) acgagagagatGggtgcgttaca
Dz-Ds- T_m	acgagagagatgggtgcgttaca
Binding arm modification	
Dz36-ps_full	t^g^t^a^a^c^g^c^a^c^t^g^c^c^a^g^c^g^c^t^c^g^a^a^a^t^c^t^c^t^c^t^c^g^t
Dz36-ps	t^g^t^a^a^c^g^c^a^c^ac–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^g^t
Dz36-ln	T^LG^LT^L aacgcac–tgccagcgggctcgaa–atctctct 5^LG^LT^L
Dz36-lnps	T^L^G^L^T^L^ a^a^c^g^c^a^c^ac–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^ 5^L^G^L^T^L
Dz34-lnps	G^L^T^L^A^L^ a^a^c^g^c^a^c^ac–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^ T^L^5^L^G^L
Dz32-lnps	T^L^A^L^A^L^ c^g^c^a^c^ac–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^ 5^L^T^L^5^L
Dz30-lnps	A^L^A^L^5^L^ g^c^a^c^ac–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^ T^L^5^L^T^L
Dz28-lnps	A^L^5^L^G^L^ c^a^c^ac–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^ 5^L^T^L^5^L
Dz26-lnps	5^L^G^L^5^L^ ac–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^ T^L^5^L^T^L
Dz24-lnps	G^L^5^L^A^L^ c–tgccagcgggctcgaa–at^c^t^c^t^c^t^c^ 5^L^T^L^5^L
Dz22-lnps	5^L^A^L^5^L^ –tgccagcgggctcgaa–a T^L^5^L^T^L
Dz20-lnps	A^L^5^L^–T^L gccagcgggctcgaa– A^L^T^L^5^L
Dz36-om	T^MG^MT^M aacgcac–tgccagcgggctcgaa–atctctct C^MG^MT^M

Lower cases letters: DNA residues; Upper case letters: RNA residues; **N^L**: LNA; **N^M**: 2'-OMe RNA; **N^U**: UNA; **(sp)**: C3 spacer; **N^F**: 2'-F DNA; **N^m**: 2'-MOE RNA; “5”: 5-methylcytidine; “^”: phosphorothioate (PS) bonds. **Blue font**: DNA at the catalytic core of 8–17 DNAzyme. **Red font**: cleavage site of the substrate, or a critical mutation for 8–17 DNAzyme.

第三節 修飾 8–17 DNAzyme の速度論的解析

第一節では触媒コア、第二節では結合アームに対して修飾検討を実施し、それぞれで高活性な 8–17 DNAzyme を得ることに成功した。一方で、これまでの評価は一時点での切断活性を評価したのみであり、より詳細な速度論的な評価は実施していなかった。そこで、修飾体の候補である Dz36-omC10、および Dz28-Inps について時間依存的、濃度依存的な切断活性を評価することにより、未修飾 Dz36 からの向上効果を詳しく評価することにした。

まずはこれまでと同じ評価条件で 1、3、5、10、15、30 分後の基質 Dz-Ds 切断率を評価することで、時間依存的な切断活性を確認した (Fig. 8)。その結果、第一節で見出した触媒コアの C10 に 2'-OMe を導入した Dz36-omC10 は、Dz36 に対してわずかに速度定数 (k_{obs}) が向上することが明らかになった (Fig. 8a)。第二節で見出した結合アームの修飾は、およそ 4 倍まで k_{obs} が向上 ($0.12 \rightarrow 0.45 \text{ min}^{-1}$) しており、切断活性が向上することが明らかとなった (Fig. 8b)。以上の検討から、見出した修飾 8–17 DNAzymes は速度論的評価においても高活性であることが示された。

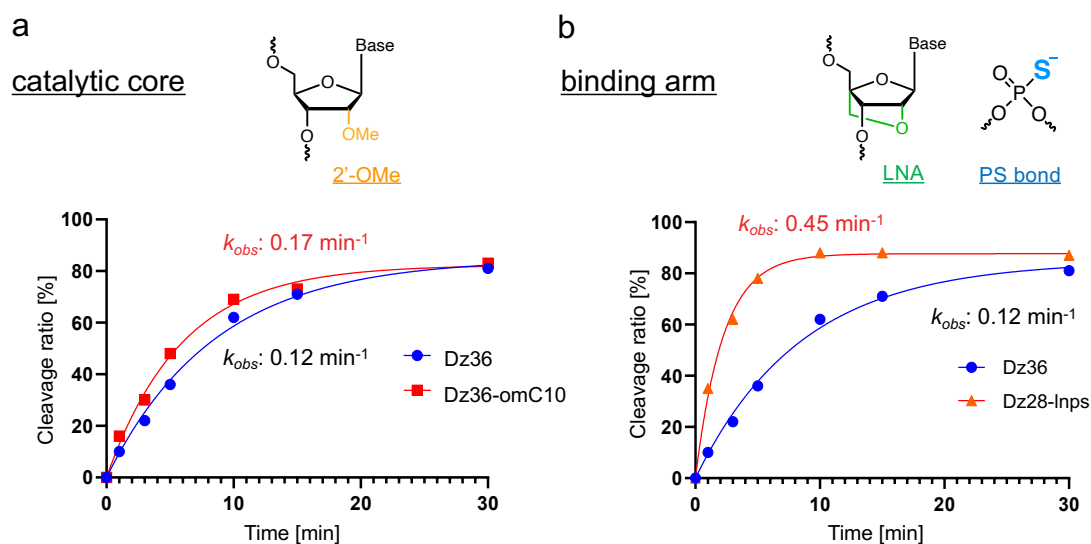


Fig. 8 Time-dependent cleavage analysis of Dz36, Dz36-omC10, and Dz28-Inps. The observed pseudo first-order rate constant (k_{obs}) is shown. These results were tested under the standard cleavage condition shown in Fig. 4, but the incubation time was changed.

8-17 DNAzyme への修飾導入による活性向上について速度論的な考察を進めるため、Dz-Ds 濃度を変更したときの初期切断速度 (V_0) を評価し、ミカエリスメンテン式に基づき K_m 値、 k_{cat} 値を算出した (Fig. 9)。まず、触媒コアを修飾した Dz36-omC10 は k_{cat} 値が Dz36 に比べてわずかに向上し、 K_m 値が低下したことから、修飾によって Dz-Ds に対する親和性および切断活性 (ターンオーバー) が向上したと考えられる。さらに、結合アームを修飾した Dz28-Inps は k_{cat} 値が他に比べて 2.3 倍以上も大きかった。これは、Dz-Ds との結合力を調整することで顕著にターンオーバーが向上したためと考えられ、結合力 (T_m 値) を調整する本アプローチが有効であることを示す結果である。

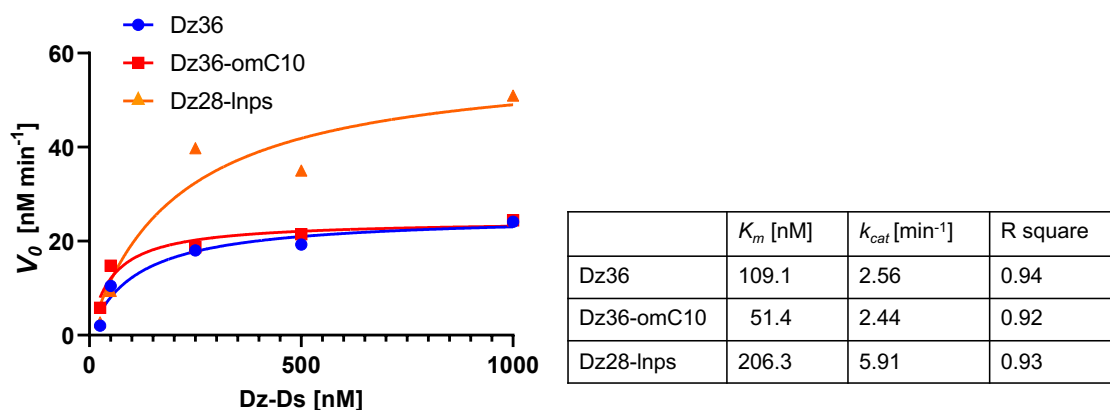


Fig. 9 Michaelis–Menten curves of Dz36, Dz36-omC10, and Dz28-Inps. Each curve reflects the initial velocity (V_0) plotted against the DNA substrate (Dz-Ds) concentration. The Michaelis–Menten constant (K_m) and k_{cat} of each DNAzyme were calculated from the plot and showed in table.

第四節 修飾 8–17 DNAzyme の酵素耐性評価

第三節までは DNA 基質 (切断部位のみ RNA) の切断活性を議論してきたが、生体への応用を考えた際、核酸分解酵素などが存在する細胞内で安定であることも非常に重要である。そこで次に、修飾した 8–17 DNAzyme の酵素耐性について評価を行った。核酸は末端からの切断が生じやすいことや、修飾の導入数の観点から、結合アームに修飾を行った Dz36-Inps を主に検討した (Fig. 10a)。50%ウシ胎児血清 (FBS)の培地中または 3'-エキソヌクレアーゼ (crotalus adamanteus venom phosphodiesterase (CAVP)) 中で一定時間処理した後、残存する完全長の DNAzyme の量を SYBR gold 染色により評価した (Fig. 10b)。未修飾の Dz36 は 30 分後にはほとんどが分解した一方で、Dz36-Inps は 120 分後にも安定であり、ASO と同様の LNA および PS 修飾が核酸の安定性を向上させることが明らかになった。また、結合アームの長さを短くすることで、活性が 4 倍程度向上した Dz28-Inps についても同様の検討を行い、Dz36-Inps に比べて分解が進行したが、未修飾の Dz36 と比較して十分に高い酵素耐性を示すことを確認した (Fig. 10c)。

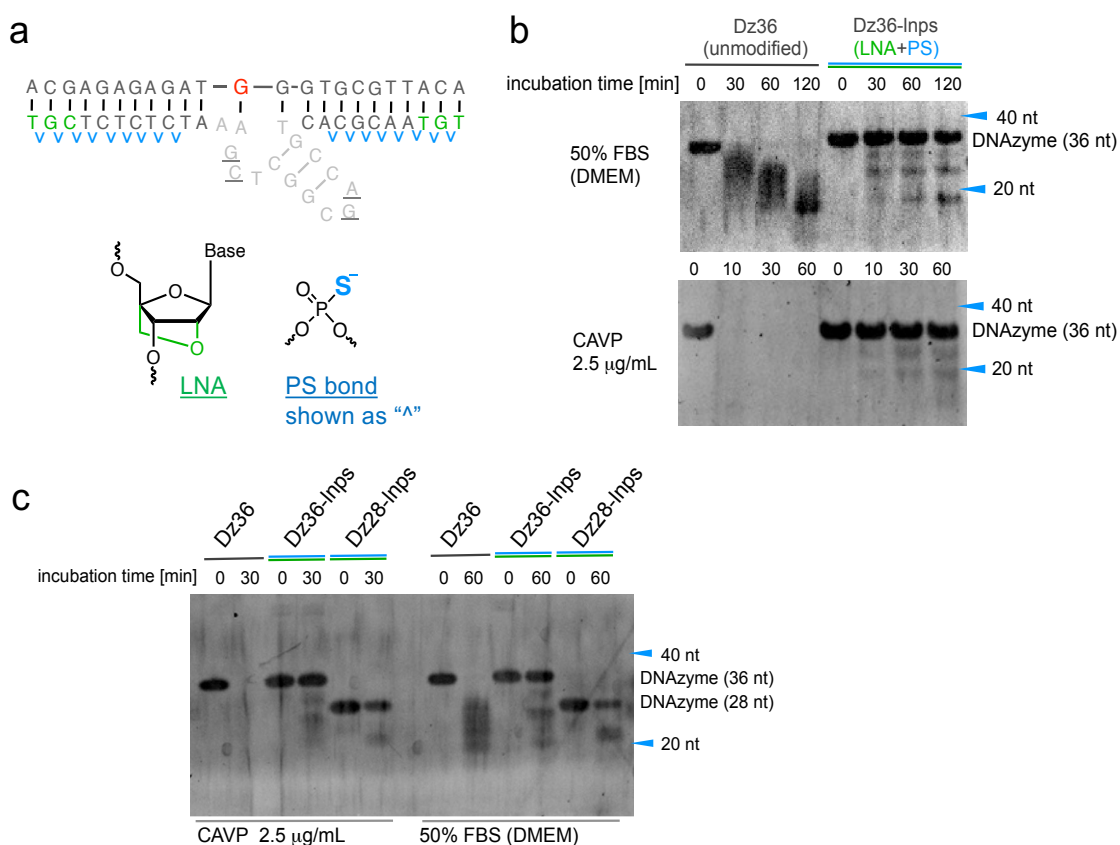


Fig. 10 Biostability of Dz36, Dz36-Inps and Dz28-Inps. (a) The design of Dz36-Inps. Dz28-Inps was only shortened the binding arm from Dz36-Inps. (b) Time-dependent biostability of Dz36 and Dz36-Inps in 50% FBS (top) or 2.5 µg/mL Crotalus adamanteus venom phosphodiesterase (CAVP) (bottom). (c) Additional biostability assay to clarify the biostability of Dz28-Inps. Dz36-Inps and Dz28-Inps, exhibited substantially improved stability in 50% FBS or in the presence of CAVP. However, the fluorescence intensity of Dz28-Inps after incubation was slightly lower than that of Dz36-Inps, potentially owing to insufficient staining

with SYBR Gold, as Dz28-Inps is shorter. SYBR Gold stains DNA via DNA intercalation.

Fig. 10 では FBS または CAVP 存在下で 30~120 分処理した結果を示したが、細胞または動物での評価を考えたとき、さらに長時間の安定性が求められる。そこで次に、最大 24 時間まで FBS 中で処理した評価を実施した (Fig. 11a)。その結果、Dz36 は 6 時間後には完全に消失した一方で、Dz36-Inps は 30%程度残存していることが明らかになった。さらに、Fig. 10b および Fig. 11a の結果を定量してプロットし、FBS 中の時間依存的な DNAzyme の安定性を Fig. 11b に示した。Dz36 に対し、修飾を導入した Dz36-Inps は明らかに安定性が向上しており、細胞系での RNA 切断活性を観測することが期待された。

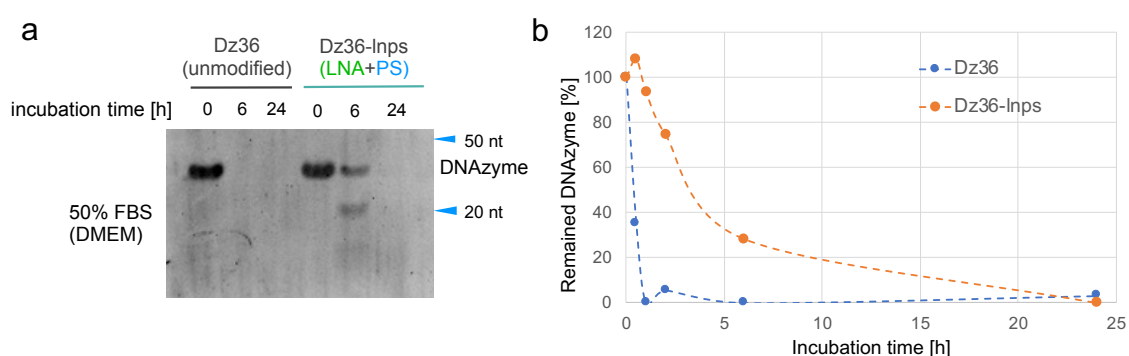


Fig. 11 Expansion of biostability in FBS. (a) Biostability assays for unmodified Dz36 and Dz36-Inps. The incubation time was extended to 6 h or 24 h in 50% FBS and DMEM solution at 37 °C. The samples were analyzed using urea-PAGE followed by SYBR Gold staining. (b) Time-dependent biostability in 50% FBS, showing relative levels of remaining Dz36 and Dz36-Inps. The results are based on data shown in Fig. 10b and Fig. 11a. Dz36 had decomposed completely within 1 h, whereas 30% of the Dz36-Inps was remaining after 6 h.

第二章 8-17 DNAzyme の細胞への応用可能性検討

第一節 金属イオンと相補鎖 (DNA/RNA) の違いによる 8-17 DNAzyme 活性への影響

第一章では 8-17 DNAzyme の触媒コアと結合アームそれぞれに修飾アプローチを検討し、候補となる修飾パターンを見出した。相補鎖の切断活性、および酵素耐性の観点では十分に細胞内でも機能することが期待される。そこで細胞内での RNA 切断活性評価に先立ち、実際に標的とする RNA 基質、および生体内に一定量存在する金属イオンである Mg^{2+} や Zn^{2+} 存在下において上記修飾パターンが適用できるか確認することとした (第一章: X 線結晶構造に基づいた DNA 基質・ Pb^{2+} 存在条件で評価)。

最初に、 Pb^{2+} から Mg^{2+} または Zn^{2+} 存在下の条件に変えたときの活性変化について評価を行った (Fig. 12; green bar: Pb^{2+} , blue bar: Zn^{2+} , red bar: Mg^{2+})。触媒コアに修飾を導入した場合、2'-OMe 修飾の場合に限っては金属イオンを変更しても高い活性を維持した一方で、別の修飾 (LNA, UNA, C3 spacer) については活性が減弱し、特に Mg^{2+} 条件では著しく活性低下し、金属イオンの違いによる影響は強いことが明らかになった (Fig. 12a)。先行研究では、 Mg^{2+} または Zn^{2+} の存在下では 8-17 DNAzyme はより折り畳まれコンパクトな構造になることが報告されている^{31,32}。このことを踏まえると、上記結果は Mg^{2+} または Zn^{2+} 存在下で触媒コアが折り畳まれることで、 Pb^{2+} 存在下で取得された X 線結晶構造とは異なる立体構造となったために、Fig. 4 で検討した、X 線結晶構造に基づいて導入した修飾核酸の一部は許容されなくなったと考えられる。

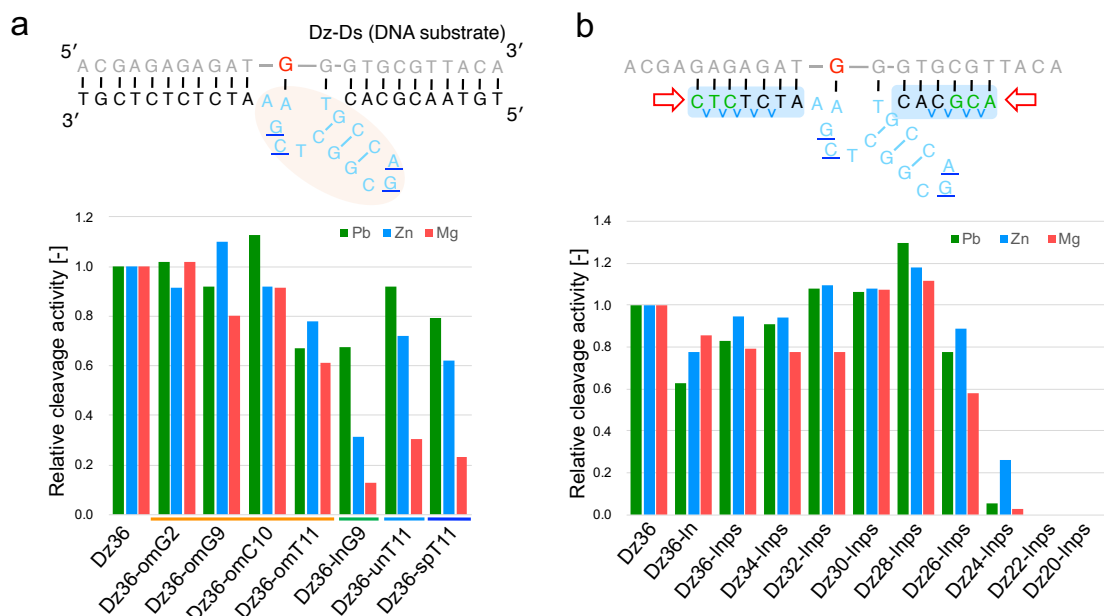


Fig. 12 The effect of metal ions on Dz36 modification for (a) catalytic core, (b) binding arm. Substrate-cleavage reactions were performed under standard condition with either Pb^{2+} : 0.25 mM $Pb(OAc)_2$, 10 min; Zn^{2+} : 2.5 mM $ZnCl_2$, 20 min; Mg^{2+} : 2.5 mM $MgCl_2$, 60 min. Cleavage

activity was normalized by setting the activity of Dz36 to 1.0. The results for Pb^{2+} were analyzed using the data in Figs. 4b, c, and Fig. 6b.

触媒コアとは対照的に、結合アームへの修飾は金属イオンの影響をほとんど受けないことが分かった (Fig. 12b)。LNA および PS 修飾の導入、さらに結合アームの短鎖化も Pb^{2+} 条件と同じ傾向であり、いずれの金属イオンにおいても Dz28-Inps が最大活性を示した。

次に、PS 修飾の導入量、および結合アームに導入する修飾核酸の種類について追加検討を行った (Fig. 13)。酵素耐性を高めるためには、触媒コアに対しても PS 修飾を導入するのが望ましいが、すべて PS 結合に置換した Dz36-ps_full では Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 存在下で活性が大きく減弱した (Fig.13, lane 2)。PS 結合は PO 結合に比べて疎水的であり、また X 線結晶構造から 8–17 DNAzyme 上の PO 結合は外側（水側）に面していることから、PS 結合にした際に触媒コアは不安定になると想定される⁶。さらに Mg^{2+} や Zn^{2+} 存在下の場合、8–17 DNAzyme が折り畳まれることから、Dz36-ps_full は、たとえば内側に向けて PS 結合との疎水性相互作用が生じるなどにより、活性を示す構造ではなくなったと考えられる。一方で、結合アームのみに導入した Dz36-ps はいずれの条件でも Dz36 に近い活性を示したことから、PS 修飾は結合アームのみに導入したものを採用している (Fig.13, lane 3)。また、結合アームを LNA から 2'-OMe に変えても活性を維持することも確認した (Fig.13, lane 4)。本研究では、より核酸分解酵素耐性が高いとされる LNA を採用している。

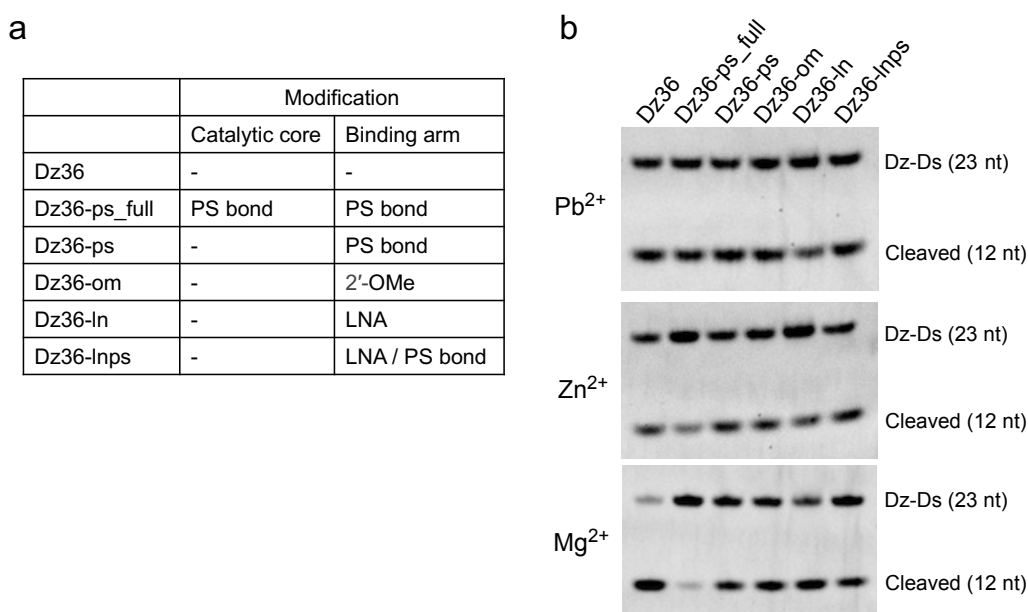


Fig. 13 Effect of PS and LNA/2'-OMe modifications on the binding arm. (a) Modifications of assessed samples. The detailed sequences are summarized in Table 2. b) Cleavage activity in the presence of divalent metal ions (Pb^{2+} , Zn^{2+} , or Mg^{2+}). For Dz36-ps_full, the PS modifications for all nucleotides, including the catalytic core, exhibited reduced activity under Zn^{2+} and Mg^{2+} conditions; however, PS modifications at only the binding arm (Dz36-ps) was tolerated, as were other modified species, such as those with LNA and PS (Dz36-lnps). We chose LNA/PS as the binding arm modification, based on its expected high stability against nucleases. PS modification alone at the catalytic core was not used for further investigations.

The cleavage assay was conducted under the same conditions as in Fig. 12.

細胞内で RNA 切断活性を示すためには、8–17 DNAzyme は DNA 基質ではなく RNA 基質を切断する必要がある。そこで、RNA 基質 (Dz-Rs) の切断活性について Mg^{2+} 存在下で評価した (Fig. 14a, b)。なお、 Mg^{2+} は生細胞中に単独で最も多く存在する金属イオンのため (数 mM)、細胞評価に近い条件として設定している。金属イオンを変化させた Fig. 12 の場合と同様、触媒コアでは 2'-OMe 修飾が、そして結合アームの修飾・短鎖化も DNA 基質と同様に活性を減弱することなく適用可能であった。さらに、結合アームについては Dz-Rs を用いた場合の T_m 値を測定した (Fig. 15)。二重鎖の熱的安定性 (T_m 値) と RNA 切断活性は、最大活性を示す Dz28-Inps にかけて逆相関しており、Dz-Ds の場合 (Fig. 7) と同様の傾向であることも明らかになった。

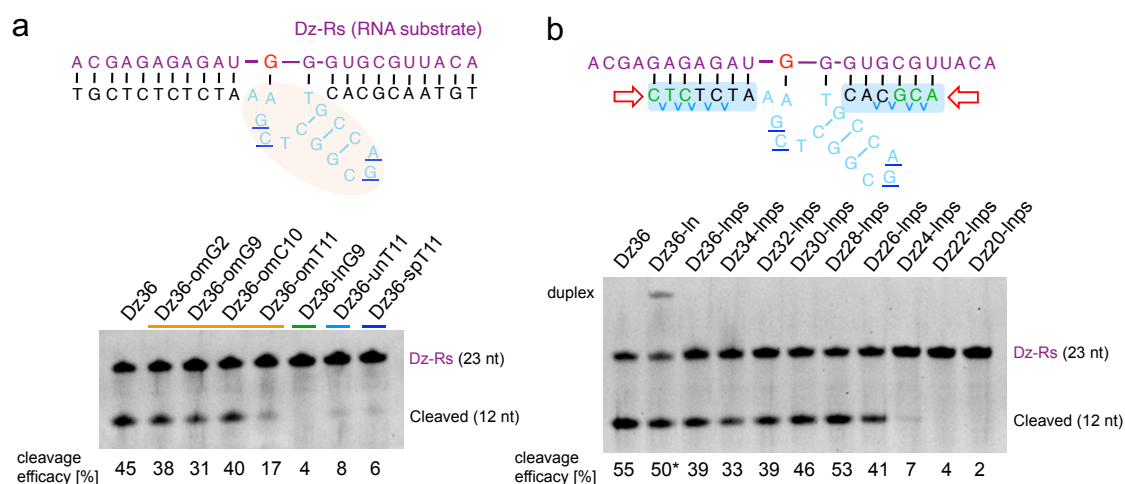


Fig. 14 The cleavage assay used an RNA substrate in the presence of 2.5 mM $MgCl_2$. Modifications at (c) the catalytic core and (d) the binding arms were applied to the RNA substrate. Dz36-In cleavage activity was used as the reference value (represented by *) because of its insufficient dissociation of the duplex. Dz-Rs: RNA substrate. Cleavage reaction conditions: 0.025 μM DNAzyme, 0.1 μM RNA substrate in 100 mM HEPES buffer (pH 7.3) with 2.5 mM $MgCl_2$, 400 mM KCl, and 100 mM NaCl. The solution was incubated for 60 min at 37 °C.

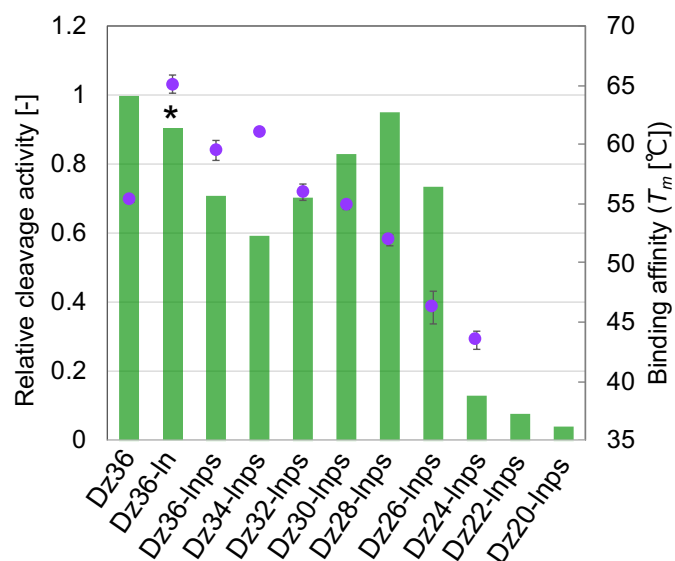


Fig. 15 The association between cleavage activity and binding affinity for the RNA substrates. The effect of modification and length on cleavage activity is shown for RNA substrates, analyzed using the data in Fig. 14b (bar). The dots indicate binding affinity (T_m). For the LNA modifications without PS (Dz36-In), the cleavage activity represents the reference value, owing to insufficient duplex dissociation (represented by *).

第二節 修飾 8–17 DNAzyme による長鎖 RNA の切断活性評価

細胞内での 8–17 DNAzyme の RNA 切断活性を示すため、ASO 研究で汎用的に用いられる non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (*MALAT-1*) ncRNA および scavenger receptor B1 (*SRB1*) mRNA を標的 RNA として選択し、それぞれに対する 8–17 DNAzyme の設計を行った (Fig. 16, 17)^{33, 34}。8–17 DNAzyme は切断するジヌクレオチドが G–G または A–G のときに最大活性を示すことから、すでに報告されている ASO の標的部分であり、かつ上記ジヌクレオチドを含む箇所に対して 8–17 DNAzyme を設計した³⁵。なお、本節で設計・検討を行った DNAzyme およびその基質の配列情報は本節末尾 Table 4 に示した。

MALAT-1 ncRNA について、まずは 21 塩基長の RNA 基質 (M-Rs-1) および 5' と 3' の両側に伸長した 70 塩基長の M-Rs-2 を作成した。より長い塩基長である M-Rs-2 は塩基対を形成し、二次構造をとりやすいために、細胞系での全長 RNA により近いものと考えられる。Fig. 6a と同様に結合アームに対して LNA と PS 修飾を施した M34-3 を設計し、アーム長さを短くした M32-3、M30-3 も同様に設計し M-Rs-1 を用いて評価したところ、M34-3 が最も高活性であり、X 線結晶構造が取得された塩基配列とは適したアーム長さが異なることが明らかになった (Fig. 16b, left gel)。これは、塩基配列中の G, C 塩基の比率によって標的 RNA との結合力が異なるため、活性が適切となる塩基長も異なっていたためと考えられる (G–C 塩基対は水素結合が多いため結合力が高い)。さらに、M34-3 の触媒コアに対して C10 塩基に 2'-OMe 修飾を導入した M34-2 は活性がさらに向上することも明らかになった (Fig. 16b, right gel, lane 2)。

ここで M34-2 の結合アームを、LNA と 2'-OMe とを組み合わせさせた M34-1 を新たに設計した (Fig. 16c)。ここまでの結合アームの設計 (Fig. 6a) は末端に LNA を導入し、残りは PS 修飾のみであったため、ASO と同様に細胞内の RNase H1 に認識されてアンチセンス効果としての RNA 切断を生じる懸念があった^{36, 37}。そこで、LNA の数を減らし、代わりに 2'-OMe を交互に加え、RNase H1 に認識されるような連続した DNA 配列を回避することにしたデザインが M34-1 である。なお、LNA は 1 つ導入すると T_m 値がおおよそ 4–6 °C 上昇することが報告されており、2'-OMe は 0.5–1.5 °C 上昇であることから、LNA 修飾を 1 つ減らし、2'-OMe を 3 つ加えるデザインが妥当と考えた^{29, 38}。このデザインされた M34-1 の活性は、従来の M34-3、M34-2 の切断活性と大きく変わらないことが明らかになった (Fig. 16b, right gel, lanes 1–3)。また、M34-1 は 70 塩基長の M-Rs-2 に対しても、標的とする A–G を選択的に RNA 切断することを確認した (Fig. 16d)。

さらに、細胞評価で用いるネガティブコントロールとして、Chaput らと同様に触媒コアの配列の 5'–3' を逆転させたもの (M34-1_inv)、および Holliger らと同様に、触媒コアに変異を導入し活性を消失させたネガティブコントロール (M34-1_mut) を用意した。8–17 DNAzyme は 2 つ変異を加えることで活性が消失することが報告されており、これら 2 つの変異を M34-1_mut に導入した⁶。M34-1_inv および M34-1_mut はいずれも電気泳動での評

価で RNA 切断が観測されず、DNAzyme 活性がないネガティブコントロールとして機能することを確認した (Fig. 16b, right gel, lanes 4, 5)。

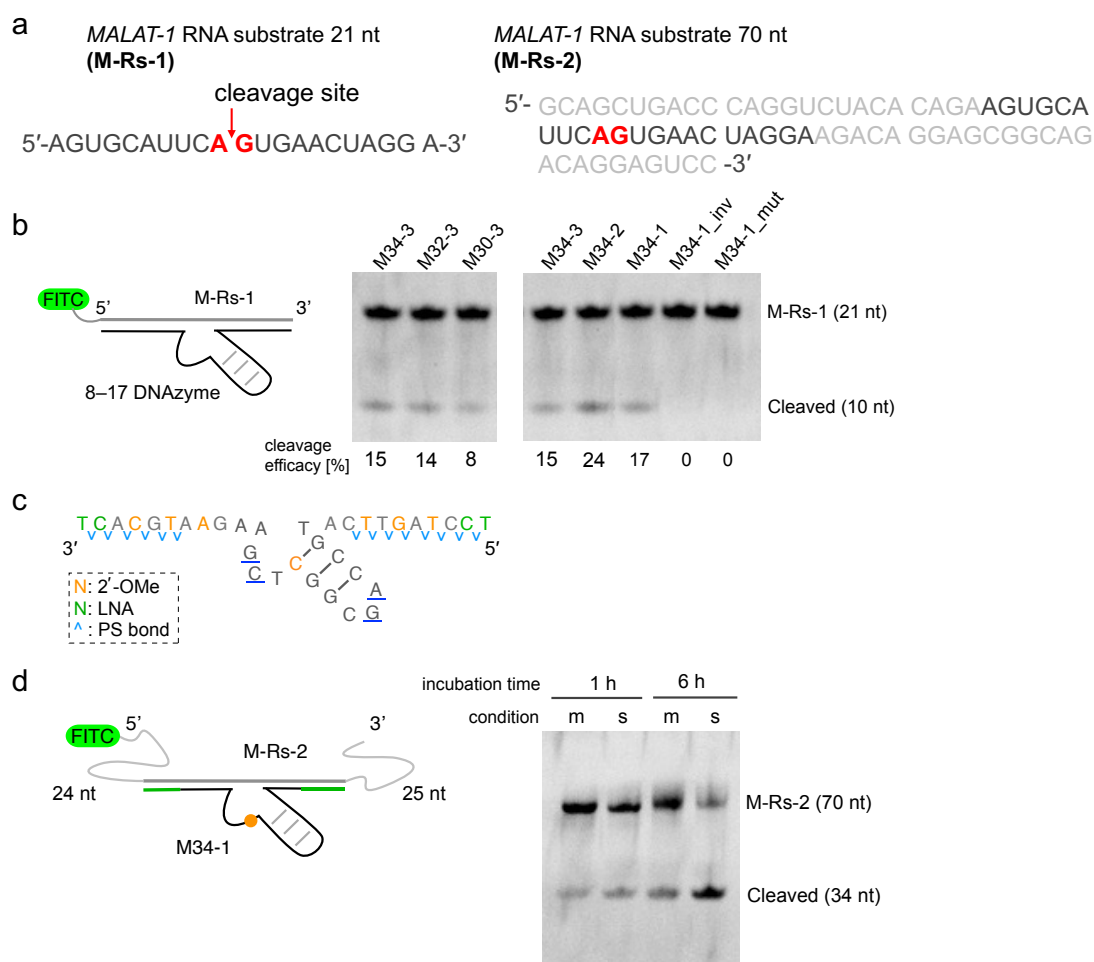


Fig. 16 8-17 DNAzyme mediated *MALAT-1* ncRNA partial sequence cleavage. (a) *MALAT-1* ncRNA partial sequence was used for the assay. Fluorescein isothiocyanate (FITC) was conjugated to its 5' end. RNA substrates of 21 nt and 70 nt were prepared. The cleavage site is indicated in red. (b) Cleavage assay. The binding arm was modified with LNA and PS bonds, and its length gradually reduced from both ends (M34-3, M32-3, and M30-3; left gel image). We next modified OMe-C10 in the catalytic core (M34-2) and altered the design of the binding arm (LNA and 2'-OMe modified, termed M34-1) to avoid RNase H recognition. Both designs worked well for the *MALAT-1* ncRNA partial sequence, M-Rs-21nt (right gel image, lanes 2 and 3), while the negative controls (M34-1_inv and M34-1_mut) did not exhibit cleavage activity. (c) The detailed design of M34-1. (d) Cleavage assay using 8-17 DNAzyme against the longer substrate (70 nt, termed M-Rs-70nt). A site-specific cleavage product (34 nt) was clearly observed under both multiple-turnover (m) and single-turnover (s) conditions. The cleavage assay was conducted under the same conditions as those mentioned in Fig. 14 but with a different 8-17 DNAzyme concentration under single-turnover (0.2 μ M 8-17 DNAzyme was incubated with 0.1 μ M substrate).

次に、*SRB1* mRNA に対しても同様の検討を実施した。*MALAT-1* ncRNA と同様に、短い RNA 基質 (S-Rs-1) と 70 塩基に伸長した RNA 基質 (S-Rs-2) を設計した (Fig. 17a)。なお、*SRB1* mRNA は ASO が標的とする RNA 配列周辺に G–G (site 1) と A–G (site 2) が存在していたため、それぞれに 8–17 DNAzyme を設計している。今回は、*MALAT-1* ncRNA で良好な活性を示した M34-1 の結合アーム長と同じ S34-1 と S34-2 のみを設計し、活性の差はあるが、いずれも切断活性を有することを S-Rs-1 を用いて確認した (Fig. 17b, lanes 1, 3)。なお、結合アームの修飾は前述の通り LNA と 2'-OMe を組み合わせたものである。また、ネガティブコントロールである S34-1_mut、S34-2_mut は活性を消失することも確認した (Fig. 17b, lanes 2, 4)。さらに、今回設計した S34-1 および S34-2 は、70 塩基長の S-Rs-2 に対しても十分に切断活性をもつことも確認された (Fig. 17c)。すなわち、2 次構造を形成するような長鎖 RNA に対しても活性を持つことから、細胞内でも RNA 切断活性を示すことが期待された。

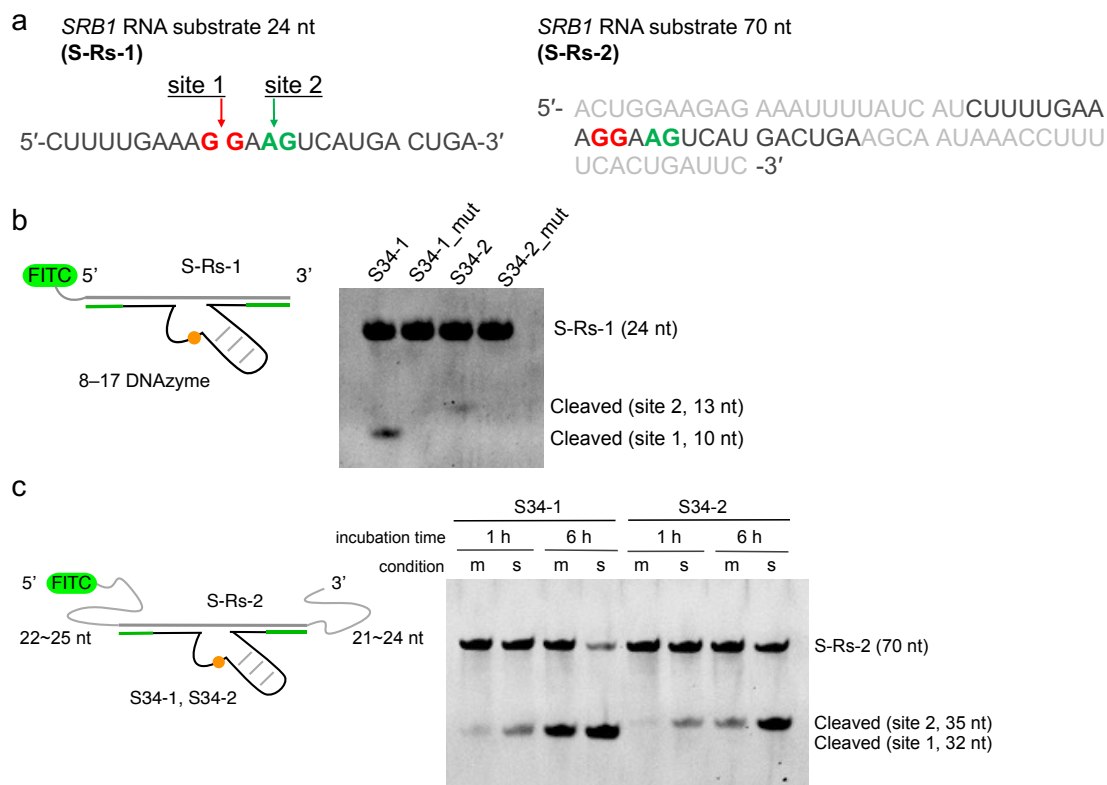


Fig. 17 *SRB1* mRNA cleavage assay analyzed using Urea-PAGE. a) *SRB1* mRNA partial sequences used for the assay. RNA substrates of 24 nt and 70 nt were prepared to confirm the site-specific cleavage and the effects of the more structured substrate (secondary structure). FITC was conjugated to its 5' end. Cleavage sites are shown in red and green. b) 8–17 DNAzyme cleavage assay. S34-1 and S34-2 cleaved the substrate, indicated by the cleaved products (10 and 13 nt), as expected. For the negative controls (S34-1_mut and S34-2_mut), cleaved products were not observed. c) Cleavage assay of 8–17 DNAzyme against the longer substrate (70 nt). Site-specific cleavage products (32 nt and 35 nt) were clearly observed under both multiple-turnover (m) and single-turnover (s) conditions. The cleavage assay was conducted under the same conditions as in Fig. 16.

Table 4. DNAzymes and substrates (oligonucleotides) used in this section (2-2).

Oligonucleotide Name	Sequence (5'–3')
mouse <i>MALAT-1</i> targeting DNAzyme (M)	
M34-1	T ^L ^5 ^L ^c^T ^M ^a^G ^M ^t^T ^M ^catgccagcggC ^M tcgaagA ^M a^T ^M ^g^C ^M ^a^5 ^L ^T ^L
M34-1_inv	T ^L ^5 ^L ^c^T ^M ^a^G ^M ^t^T ^M ^caaagctcggcgaccgtgA ^M a^T ^M ^g^C ^M ^a^5 ^L ^T ^L
M34-1_mut	T ^L ^5 ^L ^c^T ^M ^a^G ^M ^t^T ^M ^catgccacggC ^M ttgaagA ^M a^T ^M ^g^C ^M ^a^5 ^L ^T ^L
M34-2	T ^L ^5 ^L ^5 ^L ^t^a^g^t^t^catgccagcggC ^M tcgaagaa^t^g^c^A ^L ^5 ^L ^T ^L
M34-2_inv	T ^L ^5 ^L ^5 ^L ^t^a^g^t^t^caaagctcggcgaccgtgaa^t^g^c^A ^L ^5 ^L ^T ^L
M34-3	T ^L ^5 ^L ^5 ^L ^t^a^g^t^t^catgccagcggctcgaagaa^t^g^c^A ^L ^5 ^L ^T ^L
M32-3	5 ^L ^5 ^L ^T ^L ^a^g^t^t^catgccagcggctcgaagaa^t^g^5 ^L ^A ^L ^5 ^L
M30-3	5 ^L ^T ^L ^A ^L ^g^t^t^catgccagcggctcgaagaa^t^G ^L ^5 ^L ^A ^L
ASO-M	5 ^L ^T ^L ^A ^L ^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T ^L ^G ^L ^5 ^L
M-Rs-1	(5'-FITC) AGUGCAUUC <u>AG</u> UGAACUAGGA
M-Rs-2	(5'-FITC) GCAGCUGACCCAGGUCUACACAGAAGUGCAUUC <u>AG</u> UGAACUA GGAAGACAGGAGCGGCAGACAGGAGUCC
mouse <i>SRB1</i> targeting DNAzyme (S)	
S34-1	G ^L ^T ^L ^c^A ^M ^t^G ^M ^a^C ^M ^ttgccagcggC ^M tcgaatT ^M t^C ^M ^a^A ^M ^a^A ^L ^G ^L
S34-1_mut	G ^L ^T ^L ^c^A ^M ^t^G ^M ^a^C ^M ^ttgccacggC ^M ttgaatT ^M t^C ^M ^a^A ^M ^a^A ^L ^G ^L
S34-2	T ^L ^5 ^L ^a^G ^M ^t^C ^M ^a^T ^M ^gatgccagcggC ^M tcgaatC ^M c^T ^M ^t^T ^M ^c^A ^L ^A ^L
S34-2_mut	T ^L ^5 ^L ^a^G ^M ^t^C ^M ^a^T ^M ^gatgccacggC ^M ttgaatC ^M c^T ^M ^t^T ^M ^c^A ^L ^A ^L
ASO-S	G ^m ^5 ^m ^T ^m ^T ^m ^5 ^m ^a^g^t^5 ^a ^t^g^a^5 ^a ^t^T ^m ^5 ^m ^5 ^m ^T ^m ^T ^m
S-Rs-1	(5'-FITC) CUUUUGAAAG <u>GGAAG</u> UCAUGACUGA
S-Rs-2	(5'-FITC) ACUGGAAGAGAAAUUUUAUCAUCUUUUGAAAG <u>GGAAG</u> UCAUG ACUGAAGCAAUAAACCUUUUCACUGAUUC

Lower cases letters: DNA residues; Upper case letters: RNA residues; **N^L**: LNA; **N^M**: 2'-OMe RNA; **N^U**: UNA; **(sp)**: C3 spacer; **N^F**: 2'-F DNA; **N^m**: 2'-MOE RNA; "5": 5-methylcytidine; "^": phosphorothioate (PS) bonds. **Blue font**: DNA at the catalytic core of 8–17 DNAzyme. **Red font**: cleavage site of the substrate, or a critical mutation for 8–17 DNAzyme.

第三節 修飾 8–17 DNAzyme による細胞中の内在 RNA 切断活性評価

8–17 DNAzyme の細胞内 RNA 切断活性を示すため、Hepa1c1c7 細胞を用いて *MALAT-1* ncRNA の切断活性評価を行った。第二節の M34-1 およびネガティブコントロール、さらに *MALAT-1* ncRNA を標的とする ASO 配列 (ASO-M) を細胞内へトランスフェクションし、RT-qPCR によって RNA 切断 (発現量低下) を定量した (Fig. 18a)。RNA 定量にあたり、*GAPDH* mRNA をハウスキーピング遺伝子として、 $\Delta\Delta C_t$ 法によって *MALAT-1* ncRNA の発現量を調べている。また、ネガティブコントロールや ASO の模式図を Fig. 18b に記載した。

細胞内での *MALAT-1* ncRNA 切断活性評価の結果を Fig. 18c に示した。8–17 DNAzyme (M34-1) は濃度依存的な *MALAT-1* ncRNA の切断に成功し、さらにネガティブコントロールと比較して有意差があることも確かめられた。一方で、ネガティブコントロール (M34-1_inv、M34-1_mut) も 100 nM では一定の RNA 切断が観測された。これはアンチセンス効果により RNase H が RNA 切断をしたものと考えられる。すなわち、M34-1 の RNA 切断活性も、DNAzyme の活性に加えて、一定のアンチセンス効果も含んだものと推察される。

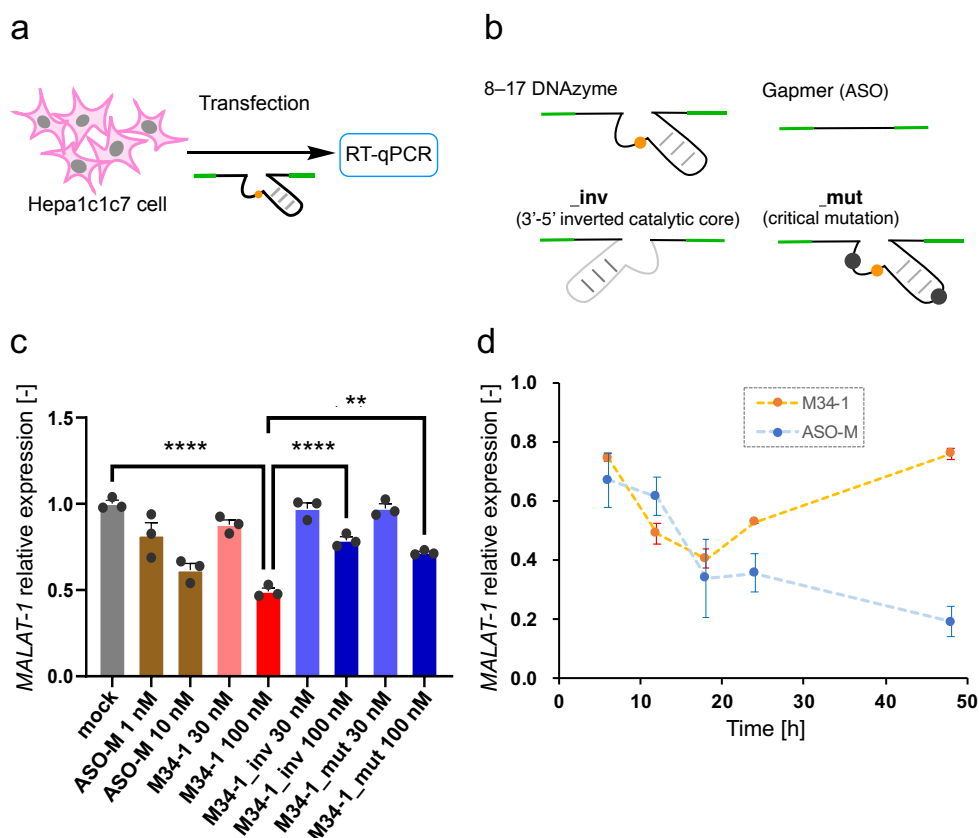


Fig. 18 Assay of endogenous *MALAT-1* ncRNA knockdown by 8–17 DNAzymes. (c) Scheme of an endogenous RNA knockdown assay. (d) Images of 8–17 DNAzymes and their negative controls “inv” and “mut”, and of the ASO gapmer. (c) Endogenous *MALAT-1* ncRNA knockdown assay, 12 h after transfection, using one-way ANOVA and Dunnett's test (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$). Error bars: mean $\pm$ standard deviation for $n = 3$ independent samples. (d) Time-dependent knockdown activity of M34-1 from 6 to 48 h post-transfection. The knockdown assay results of ASO-M (10 nM) and M34-1 (100 nM) were shown.

さらに、M34-1 の細胞内 RNA 切断活性は、処理時間が長くなるほど弱くなることも明らかになった (Fig. 18d)。これは 8–17 DNAzyme の酵素耐性を反映したものと考察される。実際に現行の設計は、未修飾に比べて大幅に安定性を改善したものの、FBS 中 24 時間後ではほとんどが分解されていた (Fig. 11)。この安定性の結果は、触媒コアに対しては PS 結合を導入できていないために、エンドヌクレアーゼによって触媒コアから分解されたためと考えられる。なお、全長に PS 修飾を導入した ASO-M は時間依存的に活性が向上していることが分かる。

また、M34-1 と同様に M34-2 についても細胞内での RNA 切断活性を評価した。LNA と PS のみで ASO と同じように結合アームを修飾した M34-2 は、RNase H1 によって認識されやすい PS 修飾のみの長い DNA 鎖を有している (Fig. 19a)。その結果、M34-1 よりも強い RNA 切断活性を示したが、ネガティブコントロール (M34-2_inv) と有意差がつかない結果となり、その活性は RNase H1 によるアンチセンス効果が大部分を占めることが示された (Fig. 19b)。すなわち、LNA と 2'-OMe を組み合わせた M34-1 の設計は、RNase H による認識を低減し、DNAzyme による RNA 切断を示すことに成功したと考えられる。

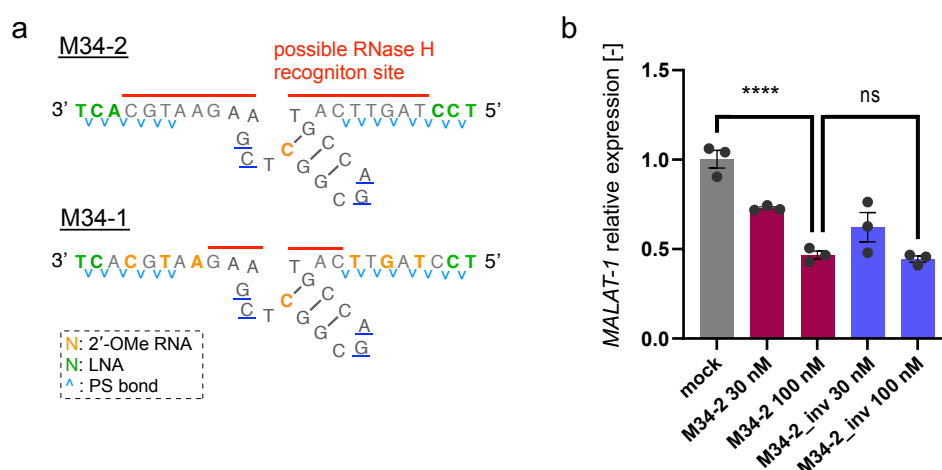


Fig. 19 MALAT-1 ncRNA knockdown assay of 8–17 DNAzymes. a) The binding arm was designed similarly to the gapmer structure of ASOs (M34-2). As a reference, M34-1 (used in Fig. 18) is shown. M34-2 was long enough to recruit RNase H (red bar). b) The result of the knockdown assay using Hepa1c1c cells. M34-2 and its negative control (M34-2_inv) exhibited comparable knockdown activity, indicating that mainly RNase H-mediated knockdown (antisense effect) occurred. The results of the experiment were analyzed using one-way ANOVA and Dunnett's test (ns, not significant, **** $P < 0.0001$).

次に、*SRB1* mRNA を用いて、8–17 DNAzyme による細胞内 RNA 切断活性の一般性を示すことにした。細胞内活性評価は *MALAT-1* ncRNA と同様の方法を用いて *SRB1* mRNA の発現量を定量し、S34-1、S34-2 およびネガティブコントロールと、*SRB1* mRNA 標的の ASO (ASO-S) を横並びで評価した (Fig. 20a)。その結果、S34-1 と S34-2 のいずれにおいても濃度依存的な *SRB1* mRNA 切断が観測された。さらに、2 塩基変異を施した S34-1_mut、S34-2_mut は発現量低下がほとんど起きておらず、*MALAT-1* ncRNA に対して設計した 8–17 DNAzyme 以上に、DNAzyme による RNA 切断を明確に示すことができた。また、時間依存性についても評価を行い、S34-1 は評価した範囲 (8–18 時間) では活性の上昇が見られたが、S34-2 は 18 時間で活性低下していることから、Fig. 18d の結果と同様に 8–17 DNAzyme が酵素耐性に課題を持つことが示唆された (Fig. 20b)。

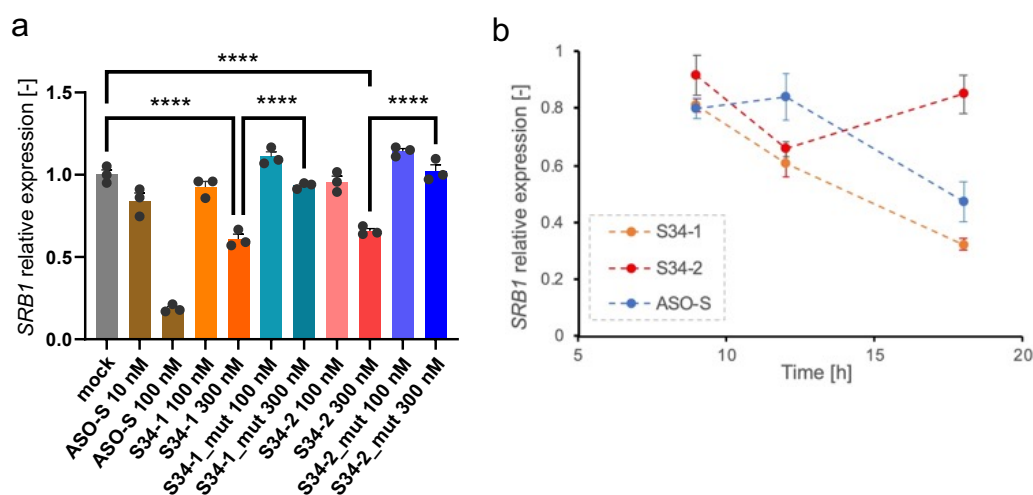


Fig. 20 Assay of endogenous *SRB1* mRNA knockdown by 8–17 DNAzymes. (a) Endogenous *SRB1* mRNA knockdown assay at 12 h post-transfection, via one-way ANOVA and Tukey's test (**** $P < 0.0001$). (b) Time-dependent knockdown of *SRB1* mRNA in Hepa1c1c7 cells. The relative expression of *SRB1* mRNA was calculated via the $\Delta\Delta C_t$ method with GAPDH mRNA as a housekeeping gene. The figures show changes in knockdown activity of 8–17 DNAzymes for *SRB1* mRNA (S34-1 and S34-2, at 100 nM each) and ASO targeting *SRB1* mRNA (ASO-S, at 10 nM) with the incubation time after transfection. (a, b) Error bars: mean $\pm$ standard deviation for $n = 3$ independent samples.

第四節 修飾 8–17 DNAzyme による内在 RNA 切断の機構解析

第三節で得た細胞内での RNA 切断活性についてより詳細に考察するため、リコンビナント RNase H1 を用いて各 DNAzyme のアンチセンス効果を評価した (Fig. 21, 22)。

まず *MALAT-1* ncRNA 標的 DNAzyme の存在下、70 塩基長の M-Rs-2 が RNase H1 によって切断されるか評価を行った (Fig. 21a)。M34-1 の場合、DNAzyme による RNA 切断バンドが RNase H1 有無に関わらず 40 nt 付近に観測された (Fig. 21b, lanes 2, 3)。一方で、RNase H1 の存在条件のみ、M-Rs-2 のすぐ下 (50–70 nt) にもバンドが現れた (lane 3)。バンド強度に差はあるものの、M34-1_mut においても同じバンドが観測された (lane 7)。この結果から、M34-1 と M34-1_mut は RNA 基質である M-Rs-2 の別の箇所にオフターゲットとして二重鎖を形成し、その部分で RNase H1 に切断された可能性が示唆された (Fig. 21c, blue filled square)。すなわち、Fig. 18 における細胞内切断活性評価での M34-1 の活性は、DNAzyme による RNA 切断と、RNase H1 による RNA 切断が合わさった活性を観測していると考えられた。なお、M34-1_inv の場合、RNase H1 存在下で DNAzyme による切断部位付近 (40 nt) にバンドが現れた (Fig. 21b, lane 5)。これは、触媒コアの配列を変更し

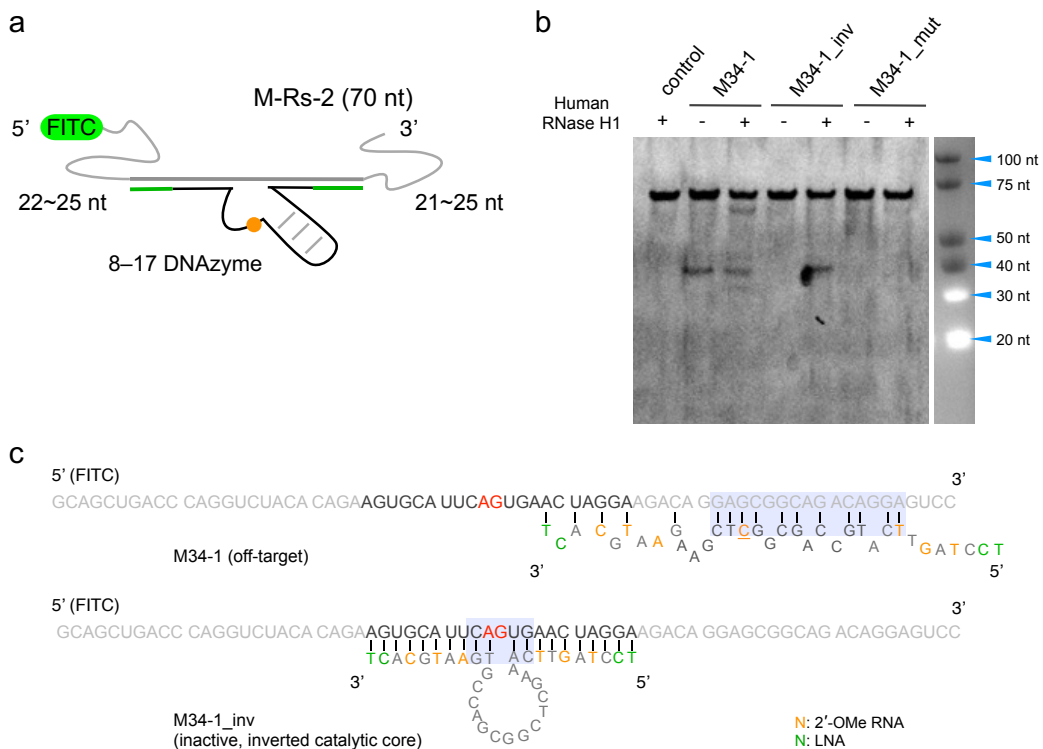


Fig. 21 RNase H-mediated cleavage of *MALAT-1* ncRNA in the presence of 8–17 DNAzymes and their negative controls. (a) 8–17 DNAzymes and long substrates (M-Rs-2) were used in this study. (b) Human RNase H1 assay with *MALAT-1* ncRNA targeting 8–17 DNAzymes and their substrate. (c) We hypothesize that M34-1 and M34-1_mut were bound to the different site of the substrate via their catalytic-core sequence (upper figure, off-target effect) and that M34-1_inv was canonically bound to the cleavage site (lower figure, via A-T base-pairing caused by sequence inversion). Blue filled squares: potential RNase H recognition sites.

たことで、切断部分である A に対して A-T の塩基対形成をし、RNase H によって強く認識されたと考えられる (Fig. 21c bottom, blue filled square)。

同様に *SRB1* mRNA 標的 DNAzyme についても評価を行った (Fig. 22a)。S34-1、S34-2 では RNase H1 の有無に限らず DNAzyme による RNA 切断バンドが 30–40 nt 付近に観測された (Fig. 22b, lanes 1, 2, 5, 6)。また、S34-1 と S34-1_mut は 40 nt 付近 (lanes 2, 4)、S34-2 と S34-2_mut では 40–50 nt (lanes 6, 8)に RNase H1 存在下で共通の切断バンドが観測された。この結果は、DNAzyme による切断塩基の G が T と不安定ながら塩基対を形成 (wobble pair) し、RNase H1 が認識・RNA 切断できたためと考えられる (Fig. 22c)。一方で、細胞内切断活性評価では、S34-1_mut と S34-2_mut は活性をほとんど示しておらず (Fig. 20)、RNase H1 による切断が生じたこの結果と一致しない。本評価に使用した RNase H1 は、細胞内で想定される濃度 (0.5–2.5 ng/μL)³⁹ に対して 4 倍以上の濃度になっているため (10 ng/μL)、より RNA 切断が生じやすかったと考察している。

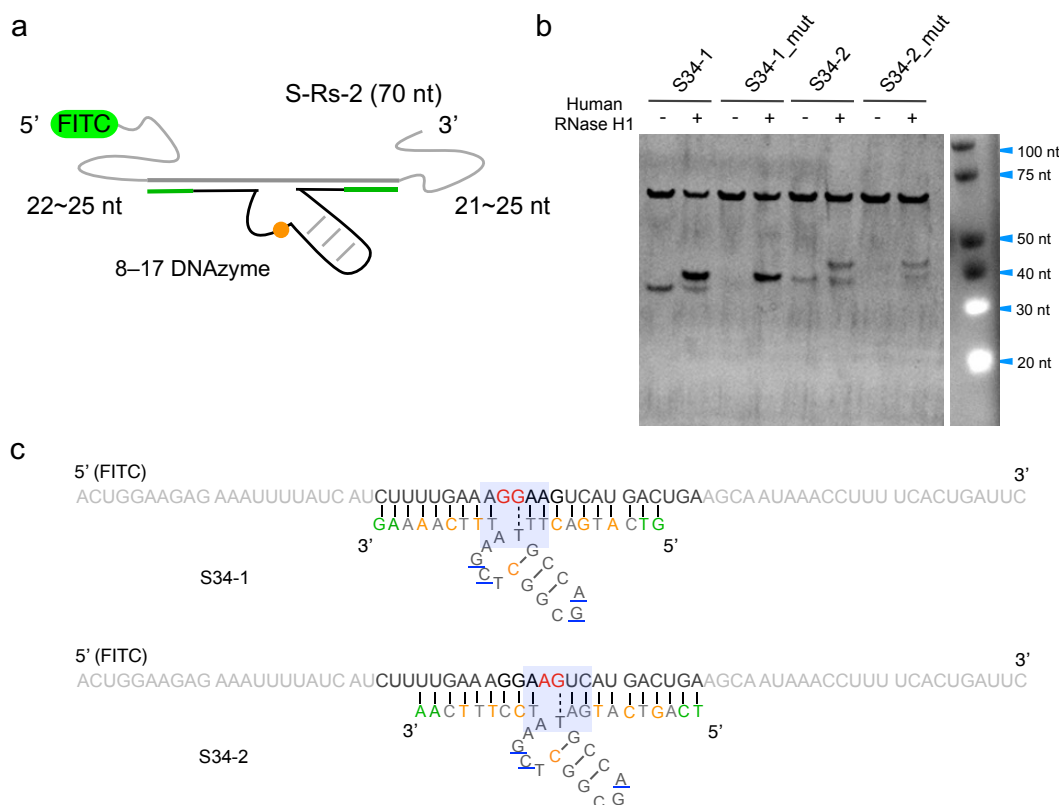


Fig. 22 RNase H-mediated cleavage of *SRB1* mRNA in the presence of 8–17 DNAzymes and their negative controls. (a) 8–17 DNAzymes and long substrates (S-Rs-2) were used in this study. (b) Human RNase H1 assay with *SRB1* mRNA targeting 8–17 DNAzymes and their substrate. (c) We hypothesized that S34-1 and S34-2, and their negative controls, were recognized by RNase H at DNAzyme-mediated cleavage sites with G–T wobble base-pairing (blue square). Importantly, the difference in RNase-mediated bond cleavage between 8–17 DNAzymes and their negative controls were negligible.

結論

本研究では、8–17 DNAzyme の X 線結晶構造に注目することで、活性を損なうことなく触媒コアに多様な修飾核酸を導入することができた。また、ASO での知見をもとに結合アームを修飾することで、酵素耐性の向上、さらには活性の向上まで達成できることが明らかになった。これら修飾を導入した 8–17 DNAzyme は、細胞内の内在 RNA の切断にも成功し、また RNase H1 を介したアンチセンス効果ではなく DNAzyme による RNA 切断であることも示すことができた。これらの研究成果は、DNAzyme の新たな修飾アプローチを提案するものであり、また合理的に化学修飾を導入することの有用性を示唆するものになったと考えている。さらに、8–17 DNAzyme を用いて細胞内での内在 RNA 切断を明白に示すのは本研究が初めての報告となる。

本研究で明らかになった課題についても 2 つ述べる。まず、本研究で用いた修飾 8–17 DNAzyme の RNA 切断活性は、細胞系で ASO 活性に対して 10 倍近く弱いことが挙げられる。MALAT-1 ncRNA と SRB1 mRNA に設計した DNAzyme は、元の配列である Dz36 に対して活性は大きく低下していることから、各塩基配列に対する結合アームの長さ・修飾核酸の数の最適化は活性向上に必須であると考えている (Fig. 14, 16, 17)。2 つ目は酵素耐性である。Fig. 18、20 でも述べたが現状の修飾 DNAzyme は 24 時間後には FBS 中で分解してしまい、実際に細胞内での活性も 24 時間後は失われてしまった。核酸分解酵素などに対して安定性を向上するには、ほとんどが天然の DNA であった触媒コアに対する修飾が必須であり、PS 結合がその第一候補になると考えている。Fig. 13 で、すべて PS 結合にすると活性が大きく減弱してしまったが、部分的に導入することで活性と安定性を両立する可能性がある。

本研究をまとめるとほぼ同時に、Chaput らのグループから触媒コアに対する新たな修飾アプローチが報告された³⁹。糖部修飾として MOE や 2'-OMe、および PS 修飾を組み合わせることで大幅な活性な向上を達成しており、さらなる修飾導入が進むと考えられる。今後、本研究をさらに発展させる上で、前述した PS 修飾に留まらずに、多様な修飾核酸を組み合わせることが必要になるだろう。そのための効率的なデザイン方法を考えていきたい。また、序論でも述べた通り、DNAzyme は切断するジヌクレオチドに対して選択性が高いことから、変異 RNA のみを選択的に切断する創薬モダリティとしても注目されている。8–17 DNAzyme は N–G ジヌレオチドを切断し (N は 4 塩基のいずれか。G > A > C > U の順に切断しやすい)、10–23 DNAzyme や、Holliger の開発した FANA で構成される DNAzyme とは異なる選択性である。すなわち、8–17 DNAzyme によって新たな変異を標的とした創薬アプローチも可能になるだろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました
大阪大学大学院薬学研究科 小比賀 聡 教授に深く感謝いたします。

本研究に関して全面的なご指導ならびに数多くのご助言を賜りました
大阪大学大学院薬学研究科 山口 卓男 講師に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に関して、多大なるご協力、ご助言を賜りました
大阪大学大学院薬学研究科 大澤 昂志 助教、下條 正仁 特任准教授、永田 龍 特任准教授
医薬基盤・健康・栄養研究所 笠原 勇矢 博士に心から御礼申し上げます

研究生生活において親しくしていただき、本研究に関しても多大なご協力をいただきました
大阪大学大学院薬学研究科 生体有機化学分野の皆様には感謝いたします。

本学博士後期課程への進学に快く送り出してくださった
ルクサナバイオテック株式会社 佐藤 秀昭 CEO に深く感謝いたします。

また、常日頃からサポートをいただきました
ルクサナバイオテック株式会社の皆さまに感謝申し上げます。

最後に、3年間にわたる社会人博士としての大学院生活において
精神的、経済的に支えてくださった両親そして妻の泉に心より感謝いたします。

2024 年 春
千葉幸介

実験項

Materials

The oligonucleotide sequences used in the study are shown in Table 5 (end of this section). The DNA and RNA oligonucleotides (including DNA primers and complementary strands) were manufactured by GeneDesign Inc. (Osaka, Japan) or Hokkaido System Science Co., Ltd. (Sapporo, Japan). The oligonucleotides were synthesized through standard β -cyanoethyl phosphoramidite chemistry using an oligonucleotide-auto synthesizer in a 0.2 or 1.0 μ mol scale. The oligonucleotides were purified using a reverse-phase LC system, and the products were analyzed by a liquid chromatography or by gel electrophoresis; their molecular mass was determined by MALDI-ToF MS or ESI MS (described in Table 5).

DNAzyme activity in vitro

Each DNAzyme was first annealed to its 5'-FITC labeled complementary strand (substrate) for 3 min at 90 °C in 100 mM Hepes buffer (pH 7.2) and gradually cooled to 26 °C for 2 h. DNAzyme cleavage assay was performed in 100 mM Hepes buffer (pH 7.3) containing 400 mM KCl, 100 mM NaCl, and 0.25 mM Pb(OAc)₂ (or 2.5 mM ZnCl₂, or 2.5 mM MgCl₂) at 37 °C. The cleavage reaction was quenched by adding loading buffer (90% formamide, 40 mM EDTA, 0.01% xylene cyanol) at each time-point and was heated for 3 min at 95 °C. For the determination of the pseudo first-order rate constant, multiple time points (0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 min) were collected by quenching 5 μ L of the reaction using 5 μ L (1 equiv., v/v) of the loading buffer and was heated for 3 min at 95 °C. The samples were analyzed using 4 M urea and 15% PAGE in 0.5× TBE buffer. The FITC-labeled substrates were visualized using the iBright FL1500 imaging system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and quantified using ImageJ 1.53 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). For the DNA substrate (in which the cleavage site was substituted with an RNA substrate), the DNAzyme concentration was 10 nM and 25 nM in the case of the RNA substrate. In each case, 100 nM of substrate was used. k_{obs} was calculated by fitting the amount of cleaved substrate as the percentage of the total substrate and the reaction time (min), using the Prism 9.5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) (equation 1):

$$R_t = R_{\infty}(1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (1)$$

where R_t is the percentage of the cleaved substrate at time t and R_{∞} is the apparent reaction plateau.

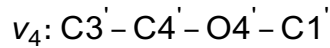
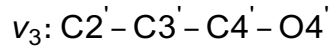
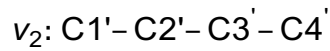
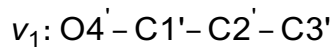
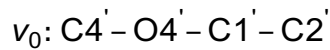
Sugar puckering assessment

Sugar puckering was calculated based on the reported X-ray crystal structure²⁷ using Pymol 2.4.0 (Schrödinger, New York, NY). Pseudorotation phase angle (P) and $\nu_{\max}$ were calculated using equations 2 and 3, respectively:

$$\tan P = \frac{(\nu_4 + \nu_1) - (\nu_3 + \nu_0)}{2\nu_2(\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \quad (2)$$

$$\nu_{\max} = \nu_2 / \cos P \quad (3)$$

where ν_0 , ν_1 , ν_2 , ν_3 , and ν_4 are the endocyclic torsion angles of the five-membered ring (sugar structure of the nucleotide) defined as follows:



T_m analysis

T_m was measured using the UV-1650PC and UV-1800 spectrometers (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a T_m analysis accessory. Each DNAzyme and its complementary DNA (acgagagagatgggtgcgttaca) or RNA (ACGAGAGAGAUgGGUGCGUUACA) strand (lower case: DNA, upper case: RNA) was dissolved in 100 mM Hepes buffer (pH 7.3) containing 400 mM KCl and 100 mM NaCl to a final concentration of 2 μ M. Absorbance was measured at 260 nm from 20 to 95 $^\circ$ C at a scan rate of 0.5 $^\circ$ C/min. T_m was obtained from the melting curve as the temperature of the half-dissociation of the formed duplexes.

Biostability assay

Each DNAzyme (1 μ M) was incubated in 50% FBS and Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) solution at 37 $^\circ$ C and was collected 2 μ L at each time-point (0.5, 1, 2, 6, and 24 h) by quenching with 18 μ L of stop and loading buffers (9 equiv. v/v) (90% formamide, 40 mM EDTA, and 0.01% xylene cyanol), followed by denaturing for 5 min at 95 $^\circ$ C. The samples were analyzed using 15% denaturing PAGE with urea, and the gels were stained using SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific), as per the manufacturer's instructions. The stained gels were visualized using the iBright FL1500 system. For the nuclease stability assay, each DNAzyme (1 μ M) was dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 10 mM $MgCl_2$ and 2.5 μ g/mL *Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase at 37 $^\circ$ C; the same procedure was followed as for the 50% FBS experiment.

Cell culture and 8–17 DNAzyme transfection

Hepa1c1c7 cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured in low-glucose DMEM (WAKO Chemicals, Osaka, Japan) containing 10% FBS and 1× antibiotic–antimycotic solution for cell culture and were maintained in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. For 8–17 DNAzyme transfection, the cells were seeded 1 day before transfection, at a density of 5,000 to 12,000 cells/well in Iwaki 96-well plates (AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan), depending on the incubation time. After 24 h, the cells were transfected with 8–17 DNAzymes or ASOs, using Lipofectamine 3000, as per the manufacturer's instructions, and were further grown in high-glucose DMEM containing 10% FBS and 1× antibiotic–antimycotic solution. After transfection and incubation, the cells were harvested and used for assays.

Quantification of *MALAT-1* ncRNA

After 8–17 DNAzyme transfection for each time-period, total RNA was isolated from the samples using the SuperPrep II Cell Lysis Kit (Toyobo, Osaka, Japan), according to the manufacturer's instructions. Next, total RNA was reverse transcribed using the SuperPrep II RT Kit (Toyobo). For qRT-PCR, the obtained cDNA and specific primer sets were used, along with the PowerTrack SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). qRT-PCR was performed using StepOnePlus (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific), and the amplification specificity of the PCR products was assessed by analyzing the melting temperature curve of the qRT-PCR products. The forward and reverse primers for *MALAT-1* ncRNA were 5'-ACATTCCTTGAGGTCGGCAA-3' and 5'-CACCCGCAAAGGCCTACATA-3', respectively. The housekeeping gene *GAPDH* mRNA was used as an internal control. The forward and reverse primers for *GAPDH* mRNA were 5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3' and 5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA, respectively. For each experimental sample, three replicates were performed. The fold reduction of *MALAT-1* was calculated using $\Delta\Delta C_t$ with *GAPDH* copy number. Data were statistically analyzed using Prism 9.5.0 (GraphPad Software).

Quantification of *SRB1* mRNA

After 8–17 DNAzyme transfection for each time-period, *SRB1* mRNA was assessed using the same procedure as for *MALAT-1* RNA estimation. Next, the obtained cDNA and specific TaqMan primer sets were mixed with the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific), followed by qRT-PCR. The TaqMan probes for *GAPDH* mRNA (Mm99999915_g1) and *SRB1* mRNA (Mm00450234_m1) were purchased from Thermo Fisher Scientific. For each experimental sample, three replicates were performed. The fold reduction of *SRB1* was calculated using $\Delta\Delta C_t$ with *GAPDH* copy number.

Data were statistically analyzed using Prism 9.5.0 (GraphPad Software).

Initial velocity determination for Michaelis–Menten curve

The Michaelis–Menten curves for DNAzyme were determined by determining the initial velocity (V_0 [nM/min]). V_0 was calculated from a linear fit of the DNAzyme-mediated cleavage reaction within the 10–25% cleavage range, using equation 4:

$$V_0 = \frac{(Y_f - Y_0)[S_0]}{(t_f - t_0)} \quad (4)$$

where Y_f is the percent cleavage at time t_f in the 10–25% cleavage range, Y_0 is the percent cleavage at t_0 , and $[S_0]$ is the initial substrate concentration (in nM). Values of V_0 were obtained at five concentrations of Dz-Ds (the DNA substrate) (25, 50, 250, 500, and 1000 nM) ($[S]$) with 10 nM DNAzyme ($[E_0]$) in the presence of 0.25 mM $\text{Pb}(\text{OAc})_2$. K_m and k_{cat} were then calculated by fitting V_0 and $[S]$, using Prism 9.5.0 (GraphPad software) (equations 5 and 6):

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_0]} \quad (6)$$

RNase H1 assays

Co-annealed 0.13 μM 8–17 DNAzymes and 0.13 μM long substrate (70 nt) was incubated with 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ human RNase H1 (Abcam, Cambridge, UK) in 100 mM Hepes buffer (pH 7.3) containing 400 mM KCl, 100 mM NaCl, and 1 mM MgCl_2 for 1 h at 37 °C. The reactions were quenched by adding an excess of loading buffer (90% formamide, 40 mM EDTA, 0.01% xylene cyanol) and heating for 5 min at 95 °C. The samples were analyzed using 4 M urea and 15% PAGE in 0.5× TBE buffer. The FITC-labeled substrates were visualized using the iBright FL1500 imaging system.

Table 5. DNazymes and substrates (oligonucleotides) used in this study.

Oligonucleotide Name	Sequence (5'–3')	[M-H] [–] Calcd.	[M-H] [–] found
(Numbering)	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-ctc-gaa –atctctctcgt 1-3 7-9 13-15 4-6 10-12		
Reported 8–17 DNzyme X-ray crystal structure sequence ¹ (Dz)			
Dz36	tgtaacgcac– tgccagcggctcgaa –atctctctcgt	10972.15	10970.36
Dz-Ds	(5'-FITC) acgagagagat G ggtgcgttaca	7760.21	7758.85
Dz-Rs	(5'-FITC) ACGAGAGAGAU G GGUGCGUUACA	8026.39	8027.72
Dz-Ds- <i>T_m</i>	acgagagagatgggtgcgttaca	7177.74	7178.26
Dz-Rs- <i>T_m</i>	ACGAGAGAGAUgGGUGCGUUACA	7472.93	7472.94
Catalytic core modification			
Dz36-omG2	tgtaacgcac– tG^Mc-cag-cgg-ctc-gaa –atctctctcgt	11002.17	11002.00
Dz36-omG6	tgtaacgcac– tgc-caG^M-cgg-ctc-gaa –atctctctcgt	11002.17	11002.73
Dz36-omG9	tgtaacgcac– tgc-cag-cgG^M-ctc-gaa –atctctctcgt	11002.17	11004.66
Dz36-omC10	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-C^Mtc-gaa –atctctctcgt	11002.18	11005.03
Dz36-omT11	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-cT^Mc-gaa –atctctctcgt	11002.18	11003.00
Dz36-lnG2	tgtaacgcac– tG^Lc-cag-cgg-ctc-gaa –atctctctcgt	11000.14	11000.00
Dz36-lnG6	tgtaacgcac– tgc-caG^L-cgg-ctc-gaa –atctctctcgt	11000.14	11003.64
Dz36-lnG9	tgtaacgcac– tgc-cag-cgG^L-ctc-gaa –atctctctcgt	11000.14	10999.56
Dz36-lnC10	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-5^Ltc-gaa –atctctctcgt	11014.18	11014.23
Dz36-lnT11	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-cT^Lc-gaa –atctctctcgt	11000.15	11000.00
Dz36-unC7	tgtaacgcac– tgc-cag-C^Ugg-ctc-gaa –atctctctcgt	11014.20	11011.88
Dz36-unT11	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-cT^Uc-gaa –atctctctcgt	10999.18	10996.88
Dz36-spC7	tgtaacgcac– tgc-cag-(sp)gg-ctc-gaa –atctctctcgt	10821.03	10820.12
Dz36-spT11	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-c(sp)c-gaa –atctctctcgt	10806.01	10805.64
Dz36-flC10	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-C^Ftc-gaa –atctctctcgt	10990.15	10992.36
Dz36-moC10	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-5^mtc-gaa –atctctctcgt	11060.26	11063.27
Dz36-omG9-omC10	tgtaacgcac– tgc-cag-cgG^M-C^Mtc-gaa –atctctctcgt	11032.20	11033.91
Dz36-flG9-omC10	tgtaacgcac– tgc-cag-cgG^F-C^Mtc-gaa –atctctctcgt	11020.17	11024.51
Dz36-omC10-unT11	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-C^MT^Uc-gaa –atctctctcgt	11005.18	11010.47
Dz36-omC10-spT11	tgtaacgcac– tgc-cag-cgg-C^M(sp)c-gaa –atctctctcgt	10836.04	10837.56

Table 5–Continued

Reported 8–17 DNAzyme X-ray crystal structure sequence ¹ (Dz)				
Binding arm modification				
Dz36-ps_full	t ^g t ^a a ^c g ^c a ^c t ^g c ^c a ^g c ^g g ^c t ^c g ^a a ^t c ^t c ^t c ^t c ^g t	11534.60	11535.18	
Dz36-ps	t ^g t ^a a ^c g ^c ac–tgccagcggctcgaa–at ^c t ^c t ^c t ^c g ^t	11245.34	11244.59	
Dz36-ln	T ^L G ^L T ^L aacgcac–tgccagcggctcgaa–atctctct5 ^L G ^L T ^L	11182.15	11176.15	
Dz36-lnps	T ^L G ^L T ^L a ^a c ^g c ^g ac–tgccagcggctcgaa–at ^c t ^c t ^c t ^c 5 ^L G ^L T ^L	11427.35	11428.85	
Dz34-lnps	G ^L T ^L A ^L a ^c g ^c ac–tgccagcggctcgaa–at ^c t ^c t ^c t ^c T ^L 5 ^L G ^L	10786.81	10783.57	
Dz32-lnps	T ^L A ^L A ^L c ^g c ^g ac–tgccagcggctcgaa–at ^c t ^c t ^c 5 ^L T ^L 5 ^L	10110.30	10107.77	
Dz30-lnps	A ^L A ^L 5 ^L g ^c ac–tgccagcggctcgaa–at ^c t ^c t ^c T ^L 5 ^L T ^L	9484.78	9483.83	
Dz28-lnps	A ^L 5 ^L G ^L c ^g ac–tgccagcggctcgaa–at ^c t ^c 5 ^L T ^L 5 ^L	8849.25	8849.48	
Dz26-lnps	5 ^L G ^L 5 ^L ac–tgccagcggctcgaa–at ^c T ^L 5 ^L T ^L	8214.72	8215.16	
Dz24-lnps	G ^L 5 ^L A ^L c–tgccagcggctcgaa–at ⁵ L ^T 5 ^L	7589.20	7592.51	
Dz22-lnps	5 ^L A ^L 5 ^L –tgccagcggctcgaa–aT ^L 5 ^L T ^L	6938.68	6937.57	
Dz20-lnps	A ^L 5 ^L –T ^L gccagcggctcgaa–A ^L T ^L 5 ^L	6299.13	6299.96	
Dz36-om	T ^M G ^M T ^M aacgcac–tgccagcggctcgaa–atctctctC ^M G ^M T ^M	11152.31	11155.61	
mouse <i>MALAT-1</i> targeting DNAzyme (M)				
M34-1	T ^L 5 ^L c ^a T ^M a ^g M ^a t ^a T ^M catgccagcggC ^M tcgaagA ^M a ^T M ^g C ^M a ⁵ L ^T L	10978.04	10980.48	
M34-1_inv	T ^L 5 ^L c ^a T ^M a ^g M ^a t ^a T ^M caaagctcggcgaccgtgA ^M a ^T M ^g C ^M a ⁵ L ^T L	10948.01	10947.80	
M34-1_mut	T ^L 5 ^L c ^a T ^M a ^g M ^a t ^a T ^M catgccaa ^c ggC ^M tgaagA ^M a ^T M ^g C ^M a ⁵ L ^T L	10977.06	10976.00	
M34-2	T ^L 5 ^L 5 ^L t ^a g ^t t ^a catgccagcggC ^M tcgaagaa ^t g ^c A ^L 5 ^L T ^L	10867.90	10869.66	
M34-2_inv	T ^L 5 ^L 5 ^L t ^a g ^t t ^a caaagctcggcgaccgtgaa ^t g ^c A ^L 5 ^L T ^L	10837.87	10840.21	
M34-3	T ^L 5 ^L 5 ^L t ^a g ^t t ^a catgccagcggctcgaa ^g g ^c A ^L 5 ^L T ^L	10198.32	10198.63	
M32-3	5 ^L 5 ^L T ^L a ^g t ^t catgccagcggctcgaa ^g g ^c 5 ^L A ^L 5 ^L	9572.79	9571.91	
M30-3	5 ^L T ^L A ^L g ^t t ^a catgccagcggctcgaa ^g g ^c G ^L 5 ^L A ^L	8933.23	8932.16	
ASO-M	5 ^L T ^L A ^L g ^t t ^c a ^c t ^a g ^a a ^T L ^G 5 ^L	5288.50	5293.00	
M-Rs-1	(5'-FITC) AGUGCAUUC <u>AG</u> UGAACUAGGA	7296.76	7298.55	
M-Rs-2	(5'-FITC) GCAGCUGACCCAGGUCUACACAGAAGUGCAUU C <u>AG</u> UGAACUAGGAAGACAGGAGCGGCAGACAG GAGUCC	23254.93	–	

Table 5—Continued

mouse <i>SRBI</i> targeting DNAzyme (S)			
S34-1	$G^L \wedge T^L \wedge c \wedge A^M \wedge t \wedge G^M \wedge a \wedge C^M \wedge ttgcccagcggC^M tgaatT^M \wedge C^M \wedge a \wedge A^M \wedge a \wedge A^L \wedge G^L$	10986.98	10987.00
S34-1_mut	$G^L \wedge T^L \wedge c \wedge A^M \wedge t \wedge G^M \wedge a \wedge C^M \wedge ttgccaacggC^M tgaatT^M \wedge C^M \wedge a \wedge A^M \wedge a \wedge A^L \wedge G^L$	10986.00	10985.00
S34-2	$T^L \wedge S^L \wedge a \wedge G^M \wedge t \wedge C^M \wedge a \wedge T^M \wedge gatgccagcggC^M tgaatC^M c \wedge T^M \wedge t \wedge T^M \wedge c \wedge A^L \wedge A^L$	10939.00	10939.00
S34-2_mut	$T^L \wedge S^L \wedge a \wedge G^M \wedge t \wedge C^M \wedge a \wedge T^M \wedge gatgccaacggC^M tgaatC^M c \wedge T^M \wedge t \wedge T^M \wedge c \wedge A^L \wedge A^L$	10938.02	10937.00
ASO-S	$G^m \wedge S^m \wedge T^m \wedge T^m \wedge S^m \wedge a \wedge g \wedge t \wedge S^m \wedge a \wedge t \wedge g \wedge a \wedge S^m \wedge T^m \wedge S^m \wedge S^m \wedge T^m \wedge T^m$	7164.28	7163.00
S-Rs-1	(5'-FITC) CUUUUGAAAGGAAGUCAUGACUGA	8237.97	8240.07
S-Rs-2	(5'-FITC) ACUGGAAGAGAAAUUUUAUCAUCUUUUGAAAG GAAGUCAUGACUGAAGCAAUAAACCUUUUCAC UGAUUC	22937.32	—

Lower cases letters: DNA residues; Upper case letters: RNA residues; N^L : LNA; N^M : 2'-OMe RNA; N^U : UNA; (sp): C3 spacer; N^F : 2'-F DNA; N^m : 2'-MOE RNA; "5": 5-methylcytidine; " $\wedge$ ": phosphorothioate (PS) bonds. Blue font: DNA at the catalytic core of 8–17 DNAzyme. Red font: cleavage site of the substrate, or a critical mutation for 8–17 DNAzyme.

参考文献

1. Sasso J. M., Ambrose B. J. B., Tenchov R., Datta R. S., Basel M. T., DeLong R. K., Zhou Q. A. The progress and promise of RNA medicine—an arsenal of targeted treatments. *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 6975–7015.
2. Egli M., Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2023**, 51, 2529–2573.
3. Biogen HP press release: FDA Grants Accelerated Approval for QALSODY™ (tofersen) for SOD1-ALS, a Major Scientific Advancement as the First Treatment to Target a Genetic Cause of ALS (<https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/fda-grants-accelerated-approval-qalsodytm-tofersen-sod1-als>)
4. Breaker R. R., Joyce G. F., A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.* **1994**, 1, 223–229.
5. Santoro S. W., Joyce G. F. A general purpose RNA cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 4262–4266.
6. Liu H., Yu X., Chen Y., Zhang J., Wu B., Zheng L., Haruehanroengra P., Wang R., Li S., Lin J., Li J., Sheng J., Huang Z., Ma J., Gan J. Crystal structure of an RNA-cleaving DNAzyme. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 2006.
7. Wang Y., Liu E., Lam C. H., Perrin D. M. A densely modified M^{2+} -independent DNAzyme that cleaves RNA efficiently with multiple catalytic turnover. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 1813–1821.
8. Gavitt T. D., Hartmann A. K., Sawant S. S., Mara A. B., Szczepanek S. M., Rouge J. L. A GATA3 targeting nucleic acid nanocapsule for in vivo gene regulation in asthma. *ACS Nano* **2021**, 15, 11192–11201.
9. McGhee C. E., Yang Z., Guo W., Wu Y., Lyu M., DeLong C. J., Hong S., Ma Y., McInnis M. G., O'Shea K. S., Lu Y. DNAzyme-based lithium-selective imaging reveals higher lithium accumulation in bipolar disorder patient-derived neurons. *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7, 1809–1820.
10. Lu C. H., Wang F., Willner I. Zn^{2+} -ligation DNAzyme-driven enzymatic and nonenzymatic cascades for the amplified detection of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 10651–10658.
11. Zhou C., Avins J. L., Klauser P. C., Brandsen B. M., Lee Y., Silverman S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 2106–2109.
12. Young D. D., Lively M. O., Deiters A. Activation and deactivation of DNAzyme and antisense function with light for the photochemical regulation of gene expression in mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6183–6193.
13. Cho E. A., Moloney F. J., Cai H., Au-Yeung A., China C., Scolyer R. A., Yosufi B., Raftery M. J., Deng J. Z., Morton S. W., Hammond P. T., Arkenau H. T., Damian D. L., Francis D. J., Chesterman C. N., Barnetson R. S., Halliday G. M., Khachigian L. M. Safety and tolerability of an intratumorally injected DNAzyme, Dz13, in patients with nodular basal cell carcinoma: a phase 1 first-in-human trial (DISCOVER). *Lancet* **2013**, 381, 1835–1843.
14. Krug N., Hohlfeld J. M., Kirsten A. M., Kornmann O., Beeh K. M., Kappeler D., Korn S.

- Ignatenko S., Timmer W., Rogon C., Zeitvogel J., Zhang N., Bille J., Homburg U., Turowska A., Bachert C., Werfel T., Buhl R., Renz J., Garn H., Renz H. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNAzyme. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 372, 1987–1995.
15. Wang Y., Nguyen K., Spitale R. C., Chaput J. C. A biologically stable DNAzyme that efficiently silences gene expression in cells. *Nat. Chem.* **2021**, 13, 319–326.
 16. Nguyen K., Wang Y., England W. E., Chaput J. C., Spitale R. C. Allele-specific RNA knockdown with a biologically stable and catalytically efficient XNAzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 4519–4523.
 17. Taylor A. I., Wan C. J. K., Donde M. J., Peak-Chew S. Y., Holliger P. A modular XNAzyme cleaves long, structured RNAs under physiological conditions and enables allele-specific gene silencing. *Nat. Chem.* **2022**, 14, 1295–1305.
 18. Gerber P. P., Donde M. J., Matheson N. J., Taylor A. I. XNAzymes targeting the SARS-CoV-2 genome inhibit viral infection. *Nat. Commun.* **2022**, 13, 6716.
 19. Nowakowski J., Shim P. J., Prasad G. S., Joyce G. F. Crystal structure of an 82-nucleotide RNA-DNA complex formed by the 10-23 DNA enzyme. *Nat. Struct. Mol.* **1999**, 6(2), 151–156.
 20. Braasch D., Corey D. R. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1–17.
 21. Inoue H., Hayase Y., Imura A., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E. Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 6131–6148.
 22. Itkes A. V., Karpeisky M. Y., Kartasheva O. N., Mikhaliyov S. N., Moiseyev G. P., Pfeleiderer W., Charubala R., Yakovlev G. I. A route to 2',5'-oligoadenylates with increased stability towards phosphodiesterases. *FEBS Lett.* **1988**, 236, 325–328.
 23. Lennox K. M., Owczarzy R., Thomas D. M., Walder J. A., Behike M. A. Improved performance of anti-miRNA oligonucleotides using a novel non-nucleotide modifier. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2013**, 2, e117.
 24. Adamiak D. A., Rypniewski W., Milecki R., J., Adamiak R. W. The 1.19 Å X-ray structure of 2'-O-Me(CGCGCG)₂ duplex shows dehydrated RNA with 2-methyl-2,4-pentanediol in the minor groove. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 4144–4153.
 25. Petersen M., Bondensgaard K., Wengel J., Jacobsen J. P. Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5974–5982.
 26. Lennox K. M., Owczarzy R., Thomas D. M., Walder J. A., Behike M. A. Improved performance of anti-miRNA oligonucleotides using a novel non-nucleotide modifier. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, 2, e117.
 27. Crooke S. T., Bennett C. F. Progress in antisense oligonucleotide therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, 36, 107–129.
 28. Schubert S., Gül D. C., Grunert H. P., Zeichhardt H., Erdmann V. A., Kurreck J. RNA cleaving

- '10-23' DNAzymes with enhanced stability and activity. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 5982–5992.
29. Obika S. Nanbu D., Hari Y., Andoh J., Morio K., Doi T., Imanishi T. Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methyleneribonucleosides. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5401–5404.
 30. Stein C. A., Subasinghe C., Shinozuka K., Cohen J. S. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 16, 3209–3221.
 31. Kim H. K., Liu J., Li J., Nagraj N., Li, M., Pavot C. M. B., Lu Y. Metal-dependent global folding and activity of the 8–17 DNAzyme studied by fluorescence resonance energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6896–6902.
 32. Kim H. K., Rasnik I., Liu J., Ha T., Lu Y. Dissecting metal ion-dependent folding and catalysis of a single DNAzyme. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 763–768.
 33. Hung G. Xiao X., Peralta R., Bhattacharjee G., Murray S., Norris D., Guo S., Monia B. P. Characterization of target mRNA reduction through in situ RNA hybridization in multiple organ systems following systemic antisense treatment in animals. *Nucleic Acids Ther.* **2013**, 23, 369–378.
 34. Murray S. Ittig D., Koller E., Berdeja A., Chappell A., Prakash T. P., Norrbom M., Swayze E. E., Leuman C. J., Seth P. P. TricycloDNA-modified oligo-2'-deoxyribonucleotides reduce scavenger receptor B1 mRNA in hepatic and extra-hepatic tissues—a comparative study of oligonucleotide length, design and chemistry. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 6135–6143.
 35. Schlosser K., Gu J. Sule L., Li Y. Sequence-function relationships provide new insight into the cleavage site selectivity of the 8–17 RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 1472–1481.
 36. Lima W. F., Wu H., Nichols J. G., Prakash T. P., Ravikumar V., Crooke S. T. Human RNase H uses one tryptophan and two lysines to position the enzyme at the 3'-DNA/5'-RNA terminus of the heteroduplex substrate. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 49860–49867.
 37. Nowotny M., Gaidamakov S. A., Ghirlando R., Cerritelli S. M., Crouch R. J., Yang W. Structure of human RNase H complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription. *Mol. Cell* **2007**, 28, 264–276.
 38. Lesnik E. A., Guinosso C. J., Kawasaki A. M., Sasmor H., Zounes M., Cummins L. L., Ecker D. J., Cook P. D., Freier S. M. Oligodeoxynucleotides containing 2'-O-modified adenosine: Synthesis and effects on stability of DNA:RNA duplexes. *Biochemistry* **1993**, 32, 7832–7838.
 39. Nguyen K., Malik T. N., Chaput J. C. Chemical evolution of an autonomous DNAzyme with allele-specific gene silencing activity. *Nat. Commun.* **2023**, 14, 2413.