

令和元年6月21日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05575

研究課題名(和文) イオン液体化合物を利用する核酸テクノロジーの創製

研究課題名(英文) Development of nucleic acid technology using ionic liquid compounds

研究代表者

中野 修一 (Nakano, Shu-ichi)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：70340908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イオン液体を構成するカチオン性分子が核酸構造体に与える影響を調べ、高いカチオン性分子は他の物質では見られない作用メカニズムによって核酸構造の安定性を制御できることを明らかにした。イオン液体を構成するアルキルアンモニウムイオンは、二重鎖構造を不安定化させる一方で長いループ構造(インターナルループ、バルジループ、ヘアピンループ)を安定化させるという、金属イオンにはない性質をもつことを見出した。さらに、この特性を利用して、DNA鎖交換反応(DNA組換え反応)の促進と核酸酵素(リボザイム、デオキシリボザイム)の触媒活性の向上が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは核酸研究にイオン液体を用いることが困難であったが、本研究によって核酸とイオン液体化合物の相互作用が明らかになり、イオン液体を核酸構造の制御や機能性核酸の機能向上に用いることが可能になった。核酸研究におけるイオン液体の有用性が示され、核酸テクノロジーにイオン液体を利用する道筋をつけることができた。また、機能性核酸を非水溶液環境に展開するための知見が得られたことから、本研究によって機能性核酸の用途が広がる可能性がある。核酸の構造と機能をイオン液体化合物によって制御する方法は汎用性が高く、様々な核酸研究に波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of cationic molecules composing ionic liquids on DNA and RNA structures. It was found that large cations have different binding properties from metal ions due to steric exclusion from structured regions. Particularly, large tetraalkylammonium ions, such as tetrabutylammonium and tetrapentylammonium ions, decreased the stability of fully matched duplexes but increased the stability of DNA structures forming a long internal, bulge, or hairpin loop. The large cations also increased the stability of G-quadruplexes with long loops. Analysis of the thermodynamic parameters and the salt concentration dependence suggested binding of large cations to loop nucleotides but excluded from structured regions of DNA. It was also demonstrated that the rate of DNA strand replacement and catalytic rates of ribozymes and DNAzymes increased with the addition of large cations. These results provide insight into the application of ionic liquids for nucleic acid studies.

研究分野：核酸化学

キーワード：DNA RNA リボザイム デオキシリボザイム 構造安定性 カチオン性分子 イオン液体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

グリーンケミストリーの観点からイオン液体が注目を浴びている。この次世代液体がもつ優れた能力をライフサイエンス分野に展開しようという取り組みも始められているが、非水溶液環境下では核酸構造が大きく不安定化してしまうことから、イオン液体を核酸研究に用いるのは容易ではない。2011年にアイオア大学の E. Stellwagen らによって、イオン液体化合物の一種である第四級アンモニウムイオンは、その大きさに依存して DNA のワトソン-クリック塩基対の安定性を変えることが報告された。この有機カチオンがもつ特性をうまく利用できれば、機能性核酸の用途が大きく広がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、イオン液体を構成する様々なカチオン性分子（イオン液体化合物）が核酸の構造形成と分子機能に与える影響を明らかにし、その知見に基づいてイオン液体を用いた新規核酸テクノロジーを開発することを目的とした。従来の核酸研究には水溶液が広く用いられてきたが、本研究では、機能性核酸をイオン液体や有機溶媒などの非水溶液環境に展開するための知見を得ることを試みた。まず、イオン液体化合物が様々な核酸構造に与える影響を明らかにする。そして、イオン液体化合物と核酸の相互作用（結合選択性や構造安定性に対する影響など）に関する知見に基づいて、機能性核酸の制御や機能向上に用いる手法を開発する。とくに、DNA や RNA を使ったバイオセンサーを高感度化する手法を開発するために、DNA 鎖交換反応の促進と、核酸酵素（リボザイム、デオキシリボザイム）の触媒活性の向上に取り組む。さらに、分子クラウディング効果、金属イオンとの競合、有機溶媒などを利用して、イオン液体化合物の効果を高めることも試みる。これらの課題を解決することで、イオン液体を利用した核酸テクノロジーの有用性を示し、基礎科学から産業応用までの広範な分野に役立てられる新しい手法の開発を目指す（図1）。

これまでの問題点

- ① 核酸研究で用いられる溶媒はほぼ水溶液に限られる。
(有機溶媒中では核酸構造が安定に形成されない)
- ② 機能性核酸の再利用(ターンオーバー)が困難である。
(ワトソン-クリック塩基対が非常に安定)

本研究の目的

- ① 核酸研究に使える溶媒のレパートリーを増やす。
- ② DNAとRNAの構造体による鎖交換反応を促進させる。
(分子シャペロン機能)
- ③ 有機溶媒を使ってイオン液体化合物の効果を高め、
様々な機能性核酸の機能を高める。

図1. これまでの問題点と本研究の目的

3. 研究の方法

核酸構造の形成を制御するために利用可能なイオン液体を探索するために、様々な骨格構造をもつイオン液体化合物を準備した。溶解度の制限により使用できなかった化合物もあったが、図2に示すアンモニウム塩、ホスホニウム塩、イミダゾリウム塩（主に塩化物塩）を実験に用いた。様々な核酸構造に対する影響を調べるために、望みの高次構造を形成するオリゴヌクレオチドを設計し、各実験・評価系を構築した。核酸分子との相互作用データを迅速に得るために、マルチセル分光光度計（紫外線吸収または蛍光検出）で核酸構造の熱融解曲線を測定し、熱融解温度 (T_m) や熱力学的パラメータ (ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG°) を解析した。核酸鎖のコンフォメーションに与える影響は円二色性分散計を用いて調べた。

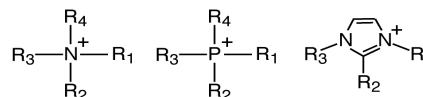


図2. イオン液体化合物の骨格構造の一例

相互作用データに基づいて各実験系に適したカチオン条件を決定し、DNA の鎖交換反応と核酸酵素（リボザイム、デオキシリボザイム）の触媒活性に与える影響を調べた。DNA 鎖交換反応では、蛍光標識化した DNA 鎖を用いて速度解析を行った。核酸酵素の触媒活性は、蛍光標識化した基質分子をゲル電気泳動によって分離し、反応時間ごとの基質の切断量を定量化することで速度定数を算出した。

4. 研究成果

(1) 核酸構造の熱安定性に与える影響

1. 二重鎖構造に対する影響： まず、イオン液体を核酸実験に使う際に生じる問題を検証した。第四級アンモニウムイオンはイオン液体を構成するカチオンの一種であり、様々な大きさのイオンを入手することができる。そこで、第四級アンモニウムイオンと核酸の相互作用に関する知見を得るために、RNA が形成する二重鎖構造の熱安定性に与える影響を調べた。様々なアルキル鎖長のテトラアルキルアンモニウムイオン水溶液の調製を試みたが、テトラヘキシルアンモニウムイオンでは相分離が生じた。このため、メチル基からペンチル基までのテトラアルキルアンモニウムイオン共存下で RNA 二重鎖の構造安定性（熱融解温度）を調べた。ポリマーRNA とオリゴマーRNA の熱融解曲線を解析した結果、これらのカチオン性分子はその大きさによって RNA 構造安定性に与える影響が異なり、テトラ

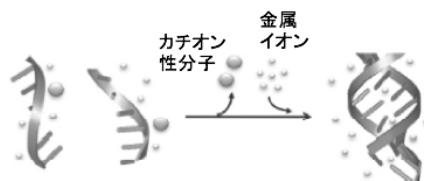


図3. 高いカチオン性分子共存下における核酸の二重鎖構造の形成

ブチルアンモニウムイオンとテトラペンチルアンモニウムイオンは RNA 配列に関わらず二重鎖構造を不安定化させることが示された。この不安定化の程度はイオンの大きさと濃度によって調整することができ、金属イオンとの競合が生じることもわかった (図 3)。テトラペンチルアンモニウムイオンによる効果は、有機溶媒や分子クラウディング剤 (ポリエチレングリコール) の添加によって大きくなることも明らかになった。また、円二色性スペクトルの測定結果から、テトラペンチルアンモニウムイオンの濃度が 100~200 mM を超えると一本鎖 RNA のコンフォメーションが大きく変化してしまうことが示され、RNA 構造の安定性を制御するには 100 mM 以下の濃度が適していることがわかった。さらに、熱力学的パラメータを算出することで RNA 構造を不安定化させる熱力学的な因子が明らかになり、作用メカニズムの解明につながる知見を得ることができた。

2. ループ構造に対する影響: 次に、DNA が形成する二重鎖構造 (フルマッチ構造) と、様々な大きさのループ部位 (インターナルループ、バルジループ、ヘアピンループ) を含む DNA 構造に与える影響を検討した (図 4)。100 mM テトラペンチルアンモニウムイオン存在下で熱安定性を測定した結果、このカチオンは DNA 二重鎖の安定性を低下させるのに対して、ループの大きさが 5 (ヘアピンループ) または 10 (バルジループとインターナルループ) を超える DNA 構造の安定性を上昇させることが見出された。この結果から、嵩高いアルキルアンモニウムイオンは二重鎖構造を不安定化させる一方で、長いループ構造を安定化させるという、金属イオンでは見られない特性をもつことが明らかになった。

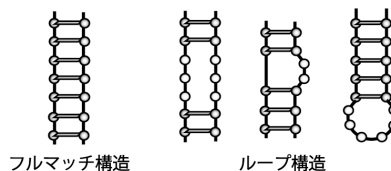


図 4. 本研究で用いた核酸の二次構造

四重鎖構造は遺伝子発現の制御に関わるとともに、様々な種類のアプタマーにも見られる構造体である。そこで、グアニン連続配列が形成する DNA 四重鎖に対する効果についても検討を行った。ループの位置と長さが異なる四重鎖を設計し、その熱安定性を測定したところ、テトラペンチルアンモニウムイオンは長いループを有する四重鎖構造の安定性を上昇させることが示された。興味深いことに、この安定化効果はアンモニウムイオンによる安定化効果よりも大きくなる場合があった。また、熱力学的パラメータを解析することで四重鎖構造を安定化させる熱力学的な因子が明らかになり、ループ部位の役割に関する知見を得ることができた。以上の結果から、イオン液体を構成する嵩高いアルキルアンモニウムイオンは、長いループ部位を有する二重鎖と四重鎖構造を安定化させる作用をもつことが示された。

3. 作用メカニズムの解明: イオン液体化合物の作用メカニズムを解明するために、濃度依存性の分析、熱力学的パラメータの算出、様々なイオン液体化合物が与える影響の比較を行った。こうして得られた結果をもとに、核酸分子との相互作用メカニズムを推測したところ、イオン液体化合物はその嵩高さのために構造形成部位に結合できないが、一本鎖核酸と長いループ部位に結合すると考えられた

(図 5)。この特性により、イオン液体を構成する嵩高いカチオン性分子はループ部位を含む核酸構造を安定化させると推測された。イオン液体化合物を構成する嵩高いカチオン性分子は他の物質では見られない作用メカニズムによって核酸構造の安定性を制御できることから、様々な用途に利用できる可能性が考えられる。

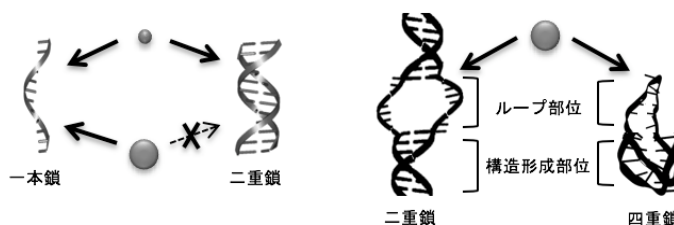


図 5. 核酸構造に対するカチオン性分子の結合

(2) DNA 鎖交換反応への利用

現在、機能性核酸を利用する際に生じる問題の一つが、ワトソン-クリック塩基対を不安定化させるための適切な手段がないことである。一般にワトソン-クリック塩基対は熱力学的に安定であり、このことは機能性核酸の構造形成に有利である一方で、一度結合した核酸分子の解離を妨げてしまうことになる。このため、核酸プローブや機能性核酸の再利用が困難であることが多い。そこで、イオン液体化合物による二重鎖構造の不安定化効果を利用して、核酸プローブの再利用を試みた。DNA チップやモレキュラービーコン等に用いられる核酸プローブを再利用するには、結合した相補鎖 (DNA 二重鎖) を解離させる必要がある。この方法を検討するための実験系として、DNA 鎖交換反応 (DNA 組換え反応) を構築した。標的となる DNA 二重鎖 (蛍光標識化) に対して相補的な塩基配列をもつ DNA 鎖 (非蛍光標識化) を準備し、DNA 鎖の蛍光強度の時間変化を測定す

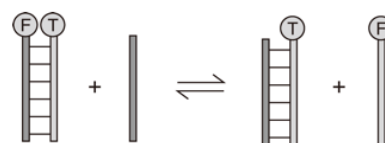


図 6. 蛍光測定による DNA 鎖交換反応の検出 (F = Fluorescein, T = TAMRA)

ることで DNA 鎖が交換する速度と反応効率を算出した (図 6)。通常の条件では標的の二重鎖が安定であるため、DNA 鎖交換反応はほとんど起こらなかったが、テトラペンチルアンモニウムイオンを共存させると交換反応が大きく促進された。さらに、他のイオン液体化合物 (ベンジルトリブチルアンモニウムイオンなど) も同様の作用を示したことから、様々な種類のイオン液体化合物によって DNA 鎖交換反応が促進される可能性がある。この効果は変性剤や有機溶媒 (尿素やアルコールなど) を用いた場合よりも大きく、より少ない量で反応が促進されることも示された。イオン液体化合物は、標的の二重鎖を不安定化させる効果だけでなく、疎水性部位の寄与による反応促進効果も考えられる。このように、DNA チップやモレキュラービーコンの機能を向上させる手法の開発につながる知見を得ることができた。

(3) 核酸酵素への利用

1. 金属イオン応答性の向上： 核酸の一本鎖部位とループ部位では金属イオンの結合とアルキルアンモニウムイオンの結合が競合することを利用して、核酸酵素 (リボザイムとデオキシリボザイム) の金属イオン応答性を向上させる試みを行った。この研究では、バイオセンサーとしての利用が期待されている RNA 酵素 (lead-dependent ribozyme) と DNA 酵素 (17E deoxyribozyme) を検討した。様々な条件で反応速度解析を行ったところ、アルキルアンモニウムイオン存在下では、これらの触媒活性が低下するものの金属イオン応答性が向上することが見出された。この現象を利用することで、核酸酵素を用いた金属イオンセンサーを高感度化することができると考えられる。

2. ターンオーバー活性の向上： 一般に、分子センシング材料として有望なリボザイムのターンオーバー速度は遅く、このことが標的 RNA の高感度検出を困難にしている。これは、RNA 鎖が反応後もリボザイムに強く結合してしまうためである。リボザイムのターンオーバー活性を向上させるには、リボザイム・基質複合体の安定化と、酵素・反応産物複合体の不安定化という、相反する状況をつくり出すことが望まれる (図 7)。ターンオーバーでは RNA 鎖の交換反応 (反応産物と新しい基質分子との交換) が起こることから、DNA 鎖交換反応で得られた結果に基づいて研究を進めた。

基質 RNA の加水分解活性を有するハンマーヘッド型リボザイムの触媒速度を解析した結果、シングルターンオーバー条件ではアルキルアンモニウムイオンの影響はあまり見られなかった。ところが、マルチターンオーバー条件では大きな影響が見られ、ターンオーバーを最大で 100 倍以上加速させることが示された。また、様々な種類のイオン液体化合物についても検討し、ベンジルトリブチルアンモニウムイオンもターンオーバー活性を大きく向上させることが見出された。この効果は分子クラウディング剤 (ポリエチレングリコール) を用いた場合よりも大きく、イオン液体化合物は効果的にハンマーヘッド型リボザイムのターンオーバーを促進することがわかった。このことから、酵素と反応産物の中で形成されるワトソン-クリック塩基対を不安定化する効果とともに、ループ部位を有する活性構造を安定化させる効果も寄与していることが考えられる。

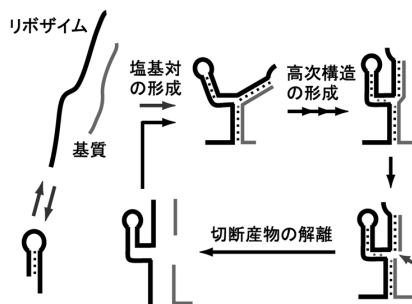


図 7. リボザイムによる基質 RNA の切断過程

3. 様々な種類の核酸酵素に対する影響： リガーゼ活性をもつ RNA 酵素 (R3C ribozyme) と DNA 酵素 (9DB1 deoxyribozyme) を調製し、基質 RNA の連結反応速度に与える影響を解析した。その結果、アルキルアンモニウムイオンはこれらのリガーゼ活性を低下させることが示された。また、ターンオーバー活性も低くなり、アルキルアンモニウムイオンを使ってリガーゼ活性を向上させる条件を見つけることはできなかった。ハンマーヘッド型リボザイムの場合とは逆の効果となり、リガーゼ活性をもつこれらの核酸酵素に対しては高次構造を不安定化させる作用が大きかったと推測された。このことから、核酸酵素の種類 (活性構造の安定性) によっては本手法が適さない場合があることも示された。

(4) 展望

本研究で得られた結果から、イオン液体を構成する高いカチオン性分子は核酸構造に対して結合選択性があり、金属イオンでは見られない特性を有していることが明らかになった。イオン液体化合物は核酸構造に対して分子シャペロンのような機能を発揮し、機能性核酸がもつ様々な分子機能を高めるために利用できることが示された。核酸構造の安定性をイオン液体化合物で制御する手法は汎用性が高く、例えば DNA の自己集合を利用したナノ構造体 (DNA 折り紙や DNA 分子ロボットなど) の形成制御に利用できる可能性がある。本研究では、イオン液体化合物は DNA 鎖交換反応を促進させたり、核酸酵素の触媒活性を向上させることも示された。DNA 鎖交換反応と核酸酵素の触媒反応に関する研究は、遺伝子検査技術やバイオセンサーの開発に役立つと期待される。今後、イオン液体化合物が核酸構造に与える影響とその要因の解明が進めば、核酸酵素の触媒活性を効果的に向上させるイオン液体の種類や量を予測することが可能になり、イオン液体を用いた核酸テクノロジーの開発が一層進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① S. Nakano, M. Horita, M. Kobayashi, and N. Sugimoto
Catalytic activities of ribozymes and DNAzymes in water and mixed aqueous media
Catalysis, **7** (Special issue: Homogeneous Catalysis and Mechanisms in Water and Biphasic Media),
355-348 (2017) 【査読有】
DOI: 10.3390/catal7120355
- ② S. Nakano, T. Watabe, and N. Sugimoto
Modulation of the ribozyme and deoxyribozyme activities using tetraalkylammonium ions
ChemPhysChem, **18**, 3614-3619 (2017) 【査読有】
DOI: 10.1002/cphc.201700882
- ③ S. Nakano, Y. Tanino, H. Hirayama, and N. Sugimoto
Thermal stability of RNA structures with bulky cations in mixed aqueous solutions.
Biophys. J., **111**, 1350-1360 (2016) 【査読有】
DOI: 10.1016/j.bpj.2016.08.031

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① K. Tanabe and S. Nakano
Effects of bulky cations on the thermal stability of DNA G-quadruplexes with a long loop
Konan Research Summit (2018)
- ② M. Horita, R. Morimoto, S. Kagoroku, H. Nakai, Sugimoto, and S. Nakano
Regulation of the structure and function of nucleic acids using bulky cationic compounds
第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)
- ③ K. Tanabe, M. Horita, S. Morita, D. Miyoshi, N. Sugimoto, and S. Nakano
Increment in the thermal stability of G-quadruplexes with a long loop using bulky cations
第 45 回国際核酸化学シンポジウム (2018)
- ④ 堀田政夫、森本隆太、鹿籠六真弘、鮎沢隼哉、杉本直己、中野修一
嵩高いカチオン性分子による核酸の構造と機能の制御
第 12 回バイオ関連シンポジウム (2018)
- ⑤ 堀田政夫、森本隆太、中井大樹、杉本直己、中野修一
細胞内模倣環境が促進させる DNA と塩基性タンパク質の非特異的相互作用
第 40 回日本分子生物学会年会 (2017)
- ⑥ 堀田政夫、森本隆太、中井大樹、杉本直己、中野修一
細胞内模倣環境における核酸と蛋白質の非特異的な相互作用の評価
第 11 回バイオ関連シンポジウム (2017)
- ⑦ 森本隆太、中井大樹、鮎沢隼哉、谷野裕一、杉本直己、中野修一
嵩高いカチオン性物質共存下における核酸の構造安定性
日本化学会年会第 97 春季年会 (2017)
- ⑧ 森本隆太、中野修一
DNA の安定性を評価するための新規モデル実験系の構築
第 7 回生命機能研究会 (2016)
- ⑨ 山下博史、小林未来、田辺和也、杉本直己、中野修一
RNA 酵素の活性を向上させる方法の開発
バイオ関連化学シンポジウム (2016)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.konan-u.ac.jp/hp/FIRST_bmflab/