

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14041

研究課題名(和文) 分子クラウディングワールドを活用した変異導入不要の酵素機能変換システムの開発

研究課題名(英文) Development of the system to change enzymatic functions without mutational approaches by using molecular crowding

研究代表者

杉本 直己 (SUGIMOTO, Naoki)

甲南大学・先端生命工学研究所・教授

研究者番号：60206430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリメラーゼによるDNAやRNA重合反応において、分子クラウディング環境が変化することで、重合するDNAやRNAの量や質が変わってくることを明らかにした。これらの現象はタンパク質を介さない遺伝子発現制御であることから、タンパク質が無かったRNAワールドでは鋳型核酸の構造が遺伝子発現制御を司っていたことが示唆された。さらに、細胞内解析により、鋳型核酸の構造による遺伝子発現制御が現在の細胞システムでも活用されていることを見出した。したがって、RNAワールドからDNAワールドに移り変わる過程で、その制御システムがRNAからDNAに引き継がれた可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of molecular crowding on DNA or RNA polymerization reactions and found that changes in molecular crowding caused the quantity and quality of polymerized products. These phenomenon were the process of gene regulations without protein. Thus, the structure of template nucleic acids played a role for gene expression in the RNA world where there was no protein. Furthermore, we identified that the regulation system is utilized in the modern cells by analysis of living cells. Therefore, in the process of transition from RNA world to DNA world, the gene regulation system by the structure of the template was took over form RNA to DNA.

研究分野：生命分子化学

キーワード：分子クラウディング 核酸 酵素 複製 転写

1. 研究開始当初の背景

生命は進化の過程において細胞膜によるコンパートメント化や、種々の機能性高分子、さらには細胞小器官の誕生があり、細胞内の分子環境は進化と共に混み合った環境、いわゆる分子クラウディング環境になっていったと考えられる。申請者はこれまで定量的な解析により、分子クラウディングは核酸構造の安定性を大きく変化させることを報告してきた。(最近では N. Sugimoto et al., *Chem. Rev.*, 2014, **134**, 20060, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 963 等。以降、申請者の論文は著者名を略して記載する)。また、水和イオン液体中では AT 塩基対が GC 塩基対よりも安定化することや、高圧力下では二重らせん以外の非標準核酸構造の安定性が大きく変わることを見いだしてきた (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 1416, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **53**, 13774)。このような特殊な環境下ではリボザイムやタンパク質酵素の触媒活性が変化する (*J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**, 14330, *Biophys. J.* 2012, **102**, 2808, A. Minton et al., *Ann. Rev. Biophys.* 2008, **37**, 375)。核酸関連酵素はたった一つの OH 基の差から RNA と DNA を区別する。これはわずかな静電的相互作用と分子体積の化学的性質の変化が酵素の活性部位での物性変化と一致するからである。しかしこのような化学的特徴はクラウディング環境による水の活量変化、誘電率の変化、排除体積効果の変化等によって容易に変化すると考えられる。そこで申請者は酵素反応に直接関わらない分子のクラウディングによって酵素の活性が変換され、生命が進化した「クラウディングワールド」が実在したと考えた。そして、本原理を活用することで、変異導入なしに酵素が基質を変換する新規な工学的手法が開発できると着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子クラウディング環境の変化が生命進化をもたらしたとする「クラウディングワールド仮説」を提唱し、酵素活性が分子クラウディング環境によって変換するかどうかを検証することである。それにより、変異導入不要の酵素機能変換システムの開発をめざし、医薬・工学分野への応用展開を目指す。

3. 研究の方法

本研究では生命の誕生や進化に欠かせない DNA や RNA を合成する反応(複製および転写)をターゲットに分子クラウディング環境の影響を定量的に解析した。鋳型となる核酸(DNA や RNA)は化学合成で調製した。酵素としては DNA ポリメラーゼ(大腸菌やファージ由来)や RNA ポリメラーゼ(ファージ由来)を用いた。鋳型核酸と酵素、及び基質となる核酸モノマー(dNTPs や NTPs)を加え、ポリエチレングリコール(PEG)などの分子クラウディング剤を一定濃度存在下において、反応を開始させ

た。反応はゲル電気泳動により反応産物の時間変化を観察した。反応速度は鋳型核酸の構造安定性と相関付けるなど、分子クラウディング環境の影響を定量的に解析した。

4. 研究成果

1) DNA 複製反応に対する分子クラウディング環境の影響について

核酸は遺伝情報を保持するための分子であると同時に、様々な構造を形成することができる特徴を持つ。このことが進化的に核酸に様々な機能を付与してきた可能性がある。四重らせん構造の特徴としてそのトポロジーの違いが挙げられる。グアニン四重鎖にはアンチパラレル、ハイブリッド、パラレルの3種類、別の四重らせんである i-motif 構造には少なくとも2種類のトポロジーが現在まで知られている。これらの構造安定性やトポロジーは分子クラウディング環境の影響によって変化する。四重らせん構造は複製反応を阻害し、遺伝情報にエラーを引き起こすため、生命進化における四重らせん構造と分子クラウディングの関係性が注目されている。しかし、このような四重らせん構造のトポロジーの違いが複製反応に及ぼす影響についてはこれまで明らかになっていなかった。

そこで、四重らせん構造を含めた DNA の特徴的な構造の熱安定性と複製反応速度の相関性を定量解析し、各構造のトポロジーに依存して複製反応が阻害される仕組みを調べた。弱酸性の溶液中で、Klenow Fragment DNA ポリメラーゼによる複製反応を行いゲル電気泳動で解析した。その結果、ヒトのがん関連遺伝子であるテロメア由来ハイブリッド型グアニン四重らせんと Hif1a 遺伝子由来の i-モチーフ構造の複製反応では、完全に複製された反応産物の他に、短い不完全な反応産物が観察された(図1)。不完全な反応産物は、Klenow Fragment が鋳型 DNA 上の四重らせん構造を乗り越えられずに、複製が停止していることを示す。続いて、UV メルティング法を用いて各 DNA 構造の熱安定性($-\Delta G_{37}^{\circ}$)を算出し、Klenow Fragment が DNA 構造を乗り越える複製速度を比較した。その結果、熱安定性は同程度であったにもかかわらず、複製速度は i-モチーフ構造とパラレル型グアニン四重らせんが最も遅く、続いてアンチパラレル型グアニン四重らせん、ハイブリッド型グアニン四重らせんの順に速くなることが分かった。つまり、DNA 構造の違いによって複製反応の阻害効果が異なることが見出された。

複製速度と熱安定性の相関性解析(図2)から、活性化エネルギーの比として、i-モチーフ構造の複製は、ハイブリッド型グアニン四重鎖の約3倍のエネルギー障壁があった。一方、パラレル型およびアンチパラレル型グア

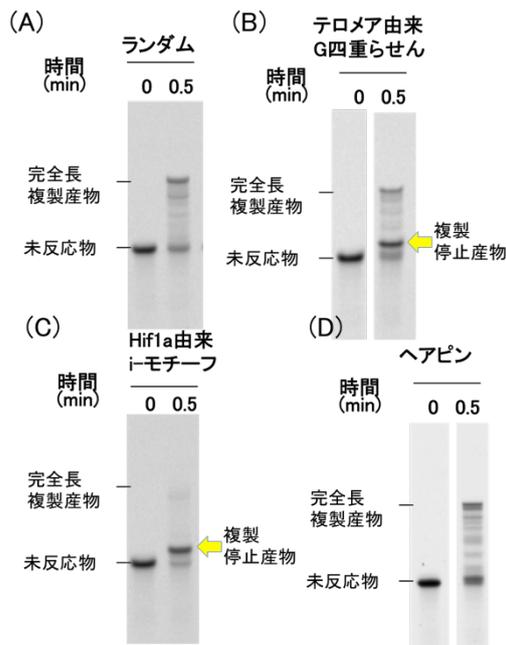


図1 特殊 DNA 構造の複製反応のゲル電気泳動結果

(A) 特殊構造を持たない DNA の複製、(B) ヒトテロメア由来の G 四重らせんを形成する DNA の複製、(C) Hif1a 配列由来の i-モチーフ構造を形成する DNA の複製、および (D) ヘアピン構造を形成する DNA の複製。四重らせん構造の影響で、複製が途中で停止した産物が観察される。

ニン四重らせんに関しては i-モチーフ構造と同様の高い複製阻害効果を示したことから、複製反応はトポロジーの違いによっても影響を受けることが明らかになった。これらの結果は、i-モチーフやパラレル型およびアンチパラレル型のグアニン四重らせんの形成が、複製反応を強く阻害することで、がんの発生を引き起こす可能性を示す。四重らせん構造のトポロジーは、溶液の環境によっても変化する。実際、ポリエチレングリコールを高濃度添加すると、i-モチーフやパラレル型グアニン四重らせんの構造形成が促進され、複製反応速度のさらなる低下が観察された。これは、細胞内の環境変化で複製阻害効果が強まり、がんが発生するメカニズムを示唆する重要な結果と考えられる。本研究から、四重らせんの形成やトポロジーの変化によって遺伝子変異が起こる可能性が明らかになった。これらの現象は、タンパク質を介さない遺伝子発現制御であることから、タンパク質が無かった RNA ワールドでは鋳型核酸の構造が遺伝子発現制御を司っていたことが示唆された。また、ここで得られた知見を医工学的に活用することで、四重らせん構造の形成を人為的に抑え、異常停止する DNA 複製反応を正常化できる技術の開発に貢献できると考えられる。今後、四重らせんの安定性や巻き方を変え、複製反応を制御できる化合物を探索・設計することで、がんの予防・治療ができる新薬の開発が期待できる。本研究成果は PNAS 誌に掲載され、2018 年 10 月 25 日付けの神戸新聞

に取り上げられた。

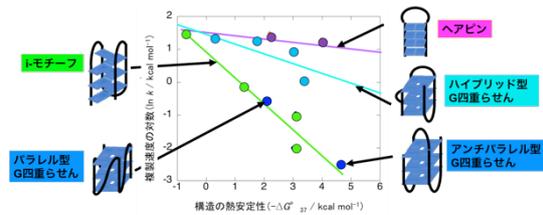


図2 特殊 DNA 構造の複製速度とその安定性の相関性解析

i-モチーフ (緑)、ハイブリッド型 G 四重らせん (水色)、ヘアピン構造 (紫) のそれぞれのプロットを直線回帰した。傾きが大きいほど複製に必要なエネルギー障壁が高いことを示す。同じ G 四重らせんでもパラレル型やアンチパラレル型 (青) ではハイブリッド型より複製に必要なエネルギー障壁が高い。

2) DNA 転写反応に対する分子クラウディング環境の影響について

DNA 情報から RNA を合成する転写反応についても分子クラウディングの影響を検討した。これまでの研究によって、試験管内で四重らせん構造が鋳型 DNA 上に形成されると転写反応が阻害されることが知られている。さらに分子クラウディング環境により四重らせんの安定性が強まることによって、転写阻害効果は強まる。このような四重らせん構造の形成はがん関連遺伝子で多く報告されていたが、細胞のがん化やその進行過程において、四重らせん構造がどのような役割を持つかはわかっていなかった。

そこで、四重らせん構造をもつ DNA から転写される RNA の生産量を正常細胞、がん細胞、悪性がん細胞内で比較した。その結果、四重らせん構造をもたない DNA と比べて、正常細胞内では四重らせん構造をもつ DNA から転写される RNA は非常に少なく、四重らせん構造によって転写が抑制されていることがわかった。一方で、がん細胞、悪性がん細胞中では、四重らせん構造をもつ DNA からの転写量が徐々に増大することを見出した。さらに、細胞内で形成される四重らせん構造は、がんの悪性化によって減少することも見出した (図 3)。これまでの申請者の研究成果からカリウムイオン濃度が低下した溶液では四重らせん構造が大きく不安定化することが明らかになっている。がん細胞内においてカリウムイオン濃度を低下させるカリウムチャンネルの発現量を解析した結果、悪性がん細胞ほどカリウムチャンネルの発現量は増大し、四重らせん鎖構造をもつ DNA からの転写量も増大することがわかった。このことから、正常細胞において四重らせん構造は転写を阻害するが、悪性がん細胞では、四重らせん構造が不安定化され、がん関連遺伝子の転写が促進されると考えられる (図 4)。

以上の結果から、鋳型核酸の構造による遺伝子発現制御が現在の細胞システムでも活用されていることが確認できた。したがって、本研究成果は、RNA ワールドから DNA ワールドに移り変わる過程で、その制御システムが RNA から DNA に引き継がれた可能性を示す重要な知見となる。

以上の研究成果は、がんの活性化に関わる新規の機構が解明されると注目され、JACS 誌に掲載され、掲載号の表紙を飾った。また、1月29日付けの毎日新聞および2月21日付けの神戸新聞に取り上げられた。

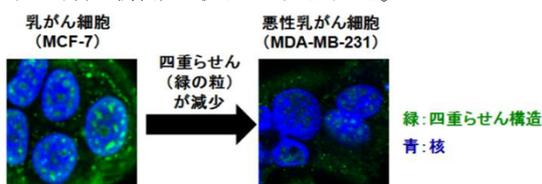


図3 がんの悪性化による四重らせん構造の減少

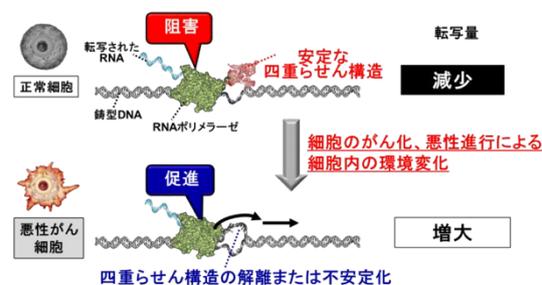


図4 四重らせん構造によって制御される転写機構

3) RNA ポリメラーゼの酵素活性に対する分子クラウディング環境の影響について

分子クラウディング環境の変化が生命進化をもたらしたとする「クラウディングワールド仮説」を検証するために、RNA ワールドから DNA ワールドへに移る過程を分子クラウディング環境の変化によって実現できるかどうかを検討した。鋳型核酸として特に構造を形成しない RNA を用い、プライマー-RNA からの RNA および DNA 重合反応を各種酵素を用いて観察下。まず、RNA ワールドのモデルとして RNA 重合活性を有するリボザイム酵素である tC9Y を用いて反応を行ったところ、添加するポリエチレングリコール (PEG) の分子量にかかわらず PEG の濃度が上がるにつれ RNA および DNA 重合反応が促進した。一方 RNA ワールドから DNA ワールドへの移行時期のモデルとして T7 RNA polymerase を用いて反応を行った場合、平均分子量 200 の PEG200 を添加するにしたがい、RNA 重合反応は低下する一方、DNA 重合反応が促進した (図5)。分子量の小さいエチレングリコールでは添加量に応じて RNA も DNA 重合も促進した。一方、平均分子量 8000 の PEG8000 を用いた場合は、RNA、DNA 重合両方とも抑制された。さらに、DNA ワールドのモ

デルとして、DNA ポリメラーゼである Klenow Fragment では RNA 重合は一切観察されず、DNA 重合反応は各種 PEG 濃度が上がるにつれ促進した。以上の結果から、T7 RNA ポリメラーゼは PEG200 の添加濃度に応じてその基質特異性が NTP から dNTP に変換することが見出された。これらの結果から、RNA ワールドから DNA ワールドへに移る過程において、PEG200 と同じような分子によるクラウディング環境が RNA ポリメラーゼに影響することで、DNA 重合が行われていたことが示唆された。

分子クラウディング環境によって酵素活性を転換できることを活かして、分子クラウディングによる核酸重合反応の調節を工学的に活用することも検討した。その結果、T7 RNA ポリメラーゼの反応系内に高濃度の PEG200 を添加することで、DNA の 2' 位が F や OMe に修飾されたモノマーを重合できるように酵素活性が変化することを見出した。以上の成果に関して、現在論文投稿準備中である。

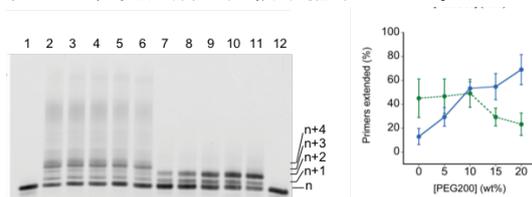


図5 T7 RNA ポリメラーゼの RNA および DNA 重合活性に対する PEG200 濃度の効果。(左) 反応産物の電気泳動結果。Lane 2-6 が基質を NTP にした際の RNA 重合活性。Lane 7-11 が基質を dNTP にした際の DNA 重合活性。PEG200 濃度はそれぞれ 0, 5, 10, 15, 20% で反応を行った。(右) 電気泳動結果から解析した反応効率。緑が RNA、青が DNA 重合活性。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① N. Sato, S. Takahashi, H. Tateishi-Karimata, M. E. Hazemi, T. Chikuni, K. Onizuka, N. Sugimoto, and F. Nagatsugi
Alkylating Probes for G-Quadruplex Structure and Evaluation of the Properties of the Alkylated G-Quadruplex DNA

Org. Biomol. Chem., 16, 1436-1441 (2018)

② H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, and N. Sugimoto
Destabilization of DNA G-quadruplexes by chemical environment changes during tumor progression facilitates transcription

J. Am. Chem. Soc., 140, 642-651 (2018) [Selected as a Supplementary Cover]

③ S. Takahashi, J. A. Brazier, and N. Sugimoto
Topological impact of noncanonical DNA structures on Klenow fragment of DNA polymerase

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 114, 9605-9610

(2017)

④ S. Takahashi and N. Sugimoto
Volumetric contributions of loop regions of G-quadruplex DNA to the formation of the tertiary structure

Biophys. Chem., 231, 146-154 (2017)

⑤ S. Takahashi and N. Sugimoto
Quantitative analysis of nucleic acid stability with ligands under high pressure to design novel drugs targeting G-quadruplexes

Curr. Protoc. Nucleic. Acid Chem., 70, 17.9.1-17.9.17. (2017)

⑥ S. Takahashi and N. Sugimoto
Pressure effect on the folding of G-quadruplex DNA modified with hexaethylene glycol

Mol. Enz. Drug Targ., 2, 3 (2016)

⑦ H. Tateishi-Karimata, T. Muraoka, K. Kinbara, and N. Sugimoto

G-quadruplexes with tetraethylene glycol-modified deoxythymidines are resistant to nucleases and inhibit HIV-1 reverse transcriptase

ChemBioChem., 17, 1399-1402 (2016)

[Selected as a Front Cover]

⑧ A. B. Rode, T. Endoh, and N. Sugimoto
tRNA shifts the G-quadruplex-hairpin conformational equilibrium in RNA towards the hairpin conformer

Angew. Chem. Int. Ed., 55, 14315-14319 (2016) [Selected as an Inside Back Cover]

⑨ S. Takahashi, S. Bhowmik, and N. Sugimoto

Volumetric analysis of formation of the complex of G-quadruplex DNA with hemin using high pressure

J. Inorg. Biochem., 166, 199-207 (2017)

[学会発表] (計 8 件)

① S. Takahashi, P. Podbevsek, J. Plavec, B. H. Kim, and N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (39) : Control of replication of G-quadruplex containing oxidative lesion, 日本化学会第 98 回春季年会, 2018 年

② S. Takahashi, J. A. Brazier, N. Sugimoto, Topological effect of non-canonical DNA structures on DNA replication, 第 44 回国際核酸化学シンポジウム(国際学会), 2017 年

③ 高橋 俊太郎, 杉本 直己, ヘミン - ググアニン四重鎖 DNA からなる DNAzyme の反応解析における高圧力の活用, 第 58 回高圧討論会, 2017 年

④ N. Sugimoto, "To B or not to B" in Nucleic Acids Chemistry, Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2017 (国際学会), 2017 年

⑤ H. Tateishi-Karimata, C. Annoni, A. B. Rode, T. Endoh, S. Takahashi, and N. Sugimoto, Regulation of gene expressions using the formation of non-canonical structures of nucleic

acids, ANNA2016 (Advances in Noncanonical Nucleic Acids) (招待講演、国際学会) 2016 年

⑥ H. Okura, S. Takahashi, and N. Sugimoto, Does a helicase assist the replication of G-quadruplex DNA?, The 22th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXII IRT) (国際学会) 2016 年

⑦ S. Takahashi, T. Endoh, A. B. Rode, and N. Sugimoto, High pressure in RNA world: High pressure dominates the aptamer ligand binding of flavin mononucleotide riboswitch, The 9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2016) (国際学会) 2016 年

⑧ N. Sugimoto, Stability and function of nucleic acids under molecular crowding conditions, BIT's 7th World Gene Convention 2016 (国際学会) 2016 年

[図書] (計 1 件)

① 高橋 俊太郎, 杉本 直己, 化学同人, 「化学」分子クラウドイングワールドによる疾患や分子進化の化学的制御, 2017 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 核酸合成法

発明者 : 杉本 直己、高橋 俊太郎、大倉 裕道
権利者 : 学校法人甲南学園

種類 : 特許

番号 : 特願 2017-120802

出願年月日 : 2017 年 6 月 20 日

国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.konan-fiber.jp/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 直己 (SUGIMOTO, Naoki)

甲南大学先端生命工学研究所・所長、教授
研究者番号 : 60206430

(2) 研究分担者

高橋 俊太郎 (TAKAHASHI, Shuntaro)

甲南大学先端生命工学研究所・講師
研究者番号 : 40456257