

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05325

研究課題名(和文) 核酸の非構造部位の機能的役割と分子クラウディング効果の解明

研究課題名(英文) Studies on the functional role of unpaired regions of nucleic acid structures and their effects of molecular crowding

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)：細胞内部のクラウディング環境が核酸の非構造部位に与える影響を *in vitro* 実験により検討した。様々な種類の有機化合物あるいはタンパク質が作り出す分子環境における核酸構造の熱力学的安定性を調べた結果、嵩高いカチオン性物質は、DNAやRNAが形成する構造の非構造部位と優先的に結合し、長鎖の一本鎖ループ部位を有する二重鎖と四重鎖を安定化させることを見出した。さらに、ハンマーヘッドリボザイムの触媒活性を向上させることや、グアニン四重鎖の構造変化を引き起こすことも明らかにした。以上の成果から、細胞内部の分子環境では核酸の非構造部位は構造体形成に積極的に関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カチオン性の有機化合物とタンパク質が大量に存在する分子環境は、核酸の構造形成、とくに長鎖ループ部位を有する非標準構造の形成に大きな影響を与えることを明らかにした。この知見は、細胞内部のクラウディング環境では核酸の非構造部位がこれまで考えられてきた以上に重要な役割をもつことを示唆している。本研究の成果は、核酸の構造と機能に関する分子クラウディング研究を進展させるとともに、細胞内の核酸構造の解明や機能性核酸の開発に役立つデータとしても有意義である。

研究成果の概要(英文)：This study investigates the influences of intracellular crowding environments on nucleic acid structures with unpaired regions. We constructed *in vitro* experimental systems of intracellular media by using various types of organic compounds and proteins, and investigated DNA and RNA oligonucleotide structures and their thermodynamic stability under the conditions. It was shown that bulky cationic molecules, such as large tetraalkylammonium ions and basic proteins, preferentially interact with long unpaired nucleotides in DNA duplex and quadruplex structures and they can greatly stabilize the structures with long loops. Large tetraalkylammonium ions were also found to be able to enhance the turnover activity of hammerhead ribozymes and to induce topological changes of certain G-quadruplexes. We propose functional roles of unpaired regions in the formation of nucleic acid structures in the presence of high concentrations of bulky cationic molecules.

研究分野：生物物理化学

キーワード：DNA二重鎖 グアニン四重鎖 ハンマーヘッドリボザイム 一本鎖ループ 塩基性タンパク質 テトラアルキルアンモニウムイオン ポリアミン 分子クラウディング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸の高次構造とその機能を決定する要因として、細胞内部の分子環境を決定づけている分子クラウディングが注目されている。DNA と RNA が形成する非標準構造には定まった構造をとらない非構造部位が含まれ、ループ部位を有する二重鎖構造や四重鎖構造は遺伝子発現の制御に関わることが知られている。このような非構造部位は、大きな溶媒露出面積と柔軟性のため、構造形成部位よりも分子環境の影響を受けやすいと推測される。従って、核酸構造に対する分子クラウディング効果を解明するには、非構造部位への影響を調べるのが極めて重要になる。クラウディング環境における非構造部位の役割についての解明が進めば、細胞内の核酸構造とその機能の理解が深まると期待できる。

2. 研究の目的

分子クラウディング効果の化学的側面を解明する研究は、インビトロ実験と細胞実験の橋渡しになる貴重なデータを与えると同時に、細胞で機能する核酸性材料の開発に有用な情報をもたらすことができる。クラウディング環境が DNA と RNA の構造体に与える影響は解明されつつあるが、非構造部位の役割に注目した取組みは前例がない。本研究は、系統的な実験・解析手法を用いることによって、DNA と RNA の非構造部位の機能的な役割を明らかにする。この取組みによって、核酸分野における分子クラウディング研究を進展させることを目指す。

3. 研究の方法

細胞内部のクラウディング環境が核酸構造に与える影響を解明するために、様々な種類の水溶性有機化合物と市販のタンパク質を用いて *in vitro* 実験系を構築した。有機化合物やタンパク質の種類や濃度などの実験条件を変えてデータを取得し、共存する分子の電荷、サイズ、構造柔軟性の重要性を検討した。有機化合物は実験系の構築が比較的容易であり、定量的な解析が可能であった。一方、タンパク質を用いた実験には沈殿生成に伴う制限が生じたため、ポリペプチドとオリゴペプチドを用いた検討も並行して行った。

核酸構造として、非構造部位の長さや塩基配列が異なる構造体(一本鎖、二重鎖、インターナルループ、ヘアピンループ、グアニン四重鎖、シトシン四重鎖、リボザイムの触媒活性構造など)を形成する各種オリゴヌクレオチドを設計・入手した。紫外可視分光光度計、蛍光分光光度計、円二色性分散計、ゲル電気泳動などの手法を用いて、核酸構造の熱融解温度、反応速度、高次構造を測定した。そして、得られたデータを解析し、核酸構造の熱力学的安定性、カチオン性物質との結合性、高次構造の変化、リボザイムの触媒活性などを評価した。

4. 研究成果

(1) カチオン性物質によって作り出される分子環境が DNA 構造に与える影響を調べるために、サイズが異なる複数の有機カチオンを用いて比較検討を行った。1 価カチオンであるテトラアルキルアンモニウムイオン存在下で DNA 二重鎖の熱力学的安定性を測定したところ、興味深いことに、テトラブチルアンモニウムイオン (TBA) とテトラペンチルアンモニウムイオン (TPeA) は、長い一本鎖ループ構造 (インターナルループ、バルジループ、ヘアピンループ) を有する二重鎖構造を安定化させる一方で、短いループ構造あるいはループを含まない二重鎖構造を不安定化させることが明らかになった。同様の影響はグアニン四重鎖に対しても観測され、長いアルキル鎖をもつテトラアルキルアンモニウムイオンは DNA 二重鎖や四重鎖のループ長に依存してその熱力学的安定性を変化させることを見出した (図 1)。この結果より、大きな有機カチオンは核酸の非構造部位と優先的に結合する特性をもつと推測された。この結合モデルを確かめるために、有機カチオンがマグネシウムイオンによる RNA-DNA キメラ核酸の加水分解に与える影響を調べた。予想した通り、TBA 及び TPeA は一本鎖キメラ核酸の加水分解を抑制し、マグネシウムイオンの一本鎖核酸への結合を阻害することを見出した。さらに、DNA 鎖交換反応の速度解析によって、TPeA は DNA 塩基対の解離を促進することが示され、TPeA には核酸の一本鎖状態を安定化する働きがあることが確認された。以上の結果から、核酸構造の非構造部位は大きなカチオン性物質と結合する部位として機能すると考えられる。

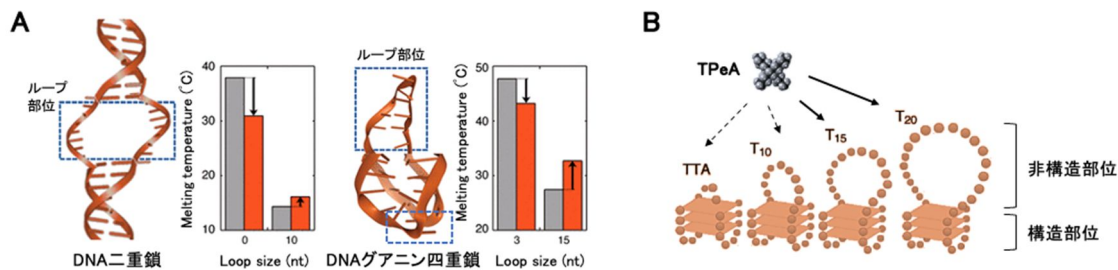


図1 (A) ループ部位を有するDNA二重鎖とグアニン四重鎖の構造と、TPeA非存在下(灰色)と存在下(赤色)における融解温度 (B) グアニン四重鎖に対するTPeAの結合モデル

有機カチオンが一本鎖ループ部位に結合することで、グアニン四重鎖の構造が変化する可能性について調べた。その結果、塩基配列と金属イオンの組み合わせによっては、TBA や TPeA は四重鎖ループの空間配置の変化(トポロジー変化)を引き起こすことを見出した。アルキルアンモニウムイオンの滴定実験により、グアニン四重鎖の形成には金属イオンが不可欠である一方で、大きなアルキルアンモニウムイオンは四重鎖のループ部位に作用すると考えられた。さらに、デキストラン(Dex)が作り出す高濃度クラウディング環境では、このトポロジー変化速度が数倍に向上することが確認された。

RNA 構造への影響について調べるために、ハンマーヘッドリボザイムに対する検討を行った。このリボザイムは3分岐構造を形成し、その連結部位が触媒に重要な働きをすることが知られている。反応速度解析の結果、TPeA などの高高い有機カチオンはリボザイムのターンオーバー速度を大きく向上させることを見出した。この原因を探るために、リボザイムが形成する短鎖ヘアピンループ構造と二重鎖構造の熱力学的安定性を調べたところ、TPeA はリボザイムと基質の間で形成される塩基対を不安定化させたが、触媒活性構造の安定性はあまり変化させなかった(図2)。この特性は尿素(RNA 構造の変性剤)を用いた場合には観測されず、リボザイム活性の向上は大きな有機カチオンが非構造部位に優先的に結合することによってもたらされたと考えられる。

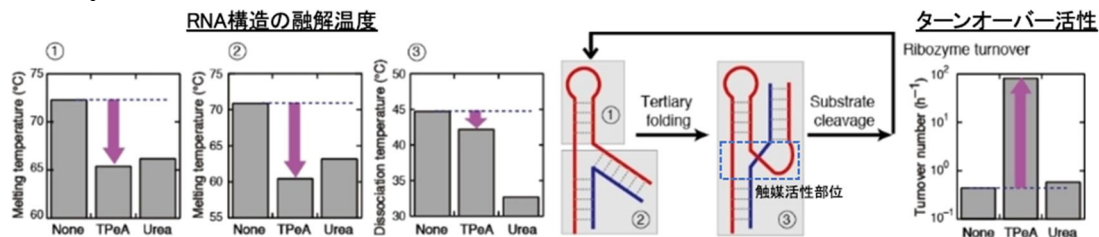


図2 様々な条件で得られたハンマーヘッドリボザイムを構成するRNA構造の融解温度と触媒のターンオーバー活性の比較

(2) タンパク質によって作り出される分子環境の影響を調べるために、比較的安価に入手できる水溶性タンパク質(ウシ血清アルブミン、ラクトアルブミン、リゾチーム、シトクローム c、ヒト血清タンパク質、ヒストンなど)で実験系を構築した。DNA 二重鎖とグアニン四重鎖の熱力学的安定性を測定したところ、数パーセント濃度の塩基性タンパク質は、短いループを有する DNA 構造の安定性にはあまり影響しないが、長いループを有する DNA 構造の安定性を向上させることがわかった。長鎖ループ構造ほど安定化効果が大きかったことから、塩基性タンパク質は構造部位よりも非構造部位に与える影響が大きいといえる。興味深いことに、こうした塩基性タンパク質の効果は TPeA などの高高い有機カチオンの効果と類似しており、DNA のループ部位には様々なタイプのカチオン性物質との結合を介して DNA 構造の形成エネルギーを変化させる働きがあると推測される。この塩基性タンパク質の影響は中性ポリマー(PEG や Dex)が作り出す高濃度クラウディング環境ではさらに顕著になり、長鎖ループ構造の安定性は短鎖ループ構造に匹敵するまでになった。さらに、シトシンに富んだ配列が形成するシトシン四重鎖(imotif 構造)を対象とした検討にも取り組み、塩基性タンパク質はシトシン四重鎖にもループ長に依存した安定化作用を示すことが確かめられた。一方、RNA 構造への影響については、高濃度タンパク質が RNA 鎖を切断してしまうため調べることができなかった。

塩基性アミノ酸の重要性を確認するために、オリゴペプチドを用いた評価も実施した。グアニン四重鎖結合タンパク質の DNA 結合モチーフ配列 (RGG モチーフ) 及び塩基性アミノ酸を多く含む合成ペプチドを用いた検討から、グアニン四重鎖のループ部位と塩基性アミノ酸の間の静電相互作用の重要性を示すデータを得ることができた。また、RGG モチーフペプチドに対する Dex の効果は塩基性タンパク質 (リゾチーム) に対する効果ほど大きくなかったことから、DNA と塩基性タンパク質の相互作用には排除体積効果が影響することが示唆された。さらに、カチオン性物質の構造柔軟性の関わりについて調べるために、塩基性のポリペプチド (プロタミン、ポリリシン) と細胞核に多く存在するポリアミン (スペルミン、スペルミジン) を用いた検討も行なった。これらのカチオン性物質も DNA 二重鎖とグアニン四重鎖を安定化させたが、その安定化効果はループ長にあまり関係せず、構造柔軟性が高いカチオン性物質は塩基性タンパク質とは異なる効果を示すことがわかった (図 3)。

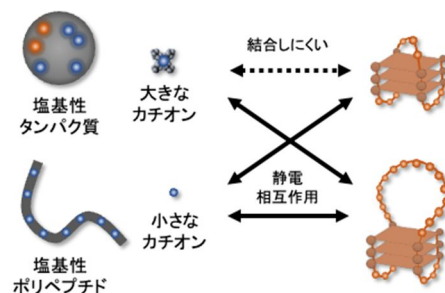


図3 様々なタイプのDNA四重鎖とカチオン性物質の間で生じる相互作用の違い

核酸の非構造部位は構造形成に不利に働くため、その重要性についてはあまり注目されてこなかった。本研究によって、核酸の一本鎖ループ部位とカチオン性物質との間の弱い相互作用が二重鎖や四重鎖の形成エネルギーに大きな影響を与え、ループ部位が存在することによる構造の不安定化が大幅に低減されることが明らかになった。長鎖ループ部位は溶媒に露出し、高い構造柔軟性を有している。このため、有機カチオンや塩基性タンパク質はその高高さに関わらず、非構造部位に結合できると推測される。一方、小さなサイズのカチオンや金属イオンは非構造部位とともに構造部位にも効率的に結合できるため、ループ長の違いによる効果の違いは比較的小さくなると考えられる。このようなカチオン性物質のサイズによる核酸結合性の違いは、細胞における核酸の相互作用を理解するための重要な知見となり、非標準構造の形成機構解明や機能性核酸の設計への波及効果も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 R. Morimoto, M. Horita, D. Yamaguchi, H. Nakai, and S. Nakano	4. 巻 121
2. 論文標題 Evaluation of weak interactions of proteins and organic cations with DNA duplex structures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophys. J.	6. 最初と最後の頁 2873-2881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2022.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中野修一	4. 巻 5
2. 論文標題 核酸医薬の効果に影響する細胞内物質のin vitro評価	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S. Nakano, H. Yamashita, and N. Sugimoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Enhancement of the catalytic activity of hammerhead ribozymes by organic cations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2721-2728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 中野修一	4. 巻 12
2. 論文標題 核酸医薬の配列設計のためのin vitro評価：細胞内物質との弱い相互作用の影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 82-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中野修一	4. 巻 52
2. 論文標題 細胞の内部環境は核酸医薬に用いられるオリゴヌクレオチドにどのような影響を与えるか	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 42-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Nakano, H. Yamashita, K. Tanabe, and N. Sugimoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Bulky cations greatly increase the turnover of a native hammerhead ribozyme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 35820-35824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9RA06797C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 S. Nakano, T. Ayusawa, Y. Tanino, and N. Sugimoto	4. 巻 123
2. 論文標題 Stabilization of DNA loop structures by large cations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 7687-7694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b06074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中野修一、杉本直己	4. 巻 75
2. 論文標題 分子夾雑環境が制御する核酸分子の機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と工業	6. 最初と最後の頁 401-403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 梅野光莉、橋本留奈、中野修一
2. 発表標題 DNAの構造遷移を促進する物質の探索
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅野光莉、宮寄光一、林花莉、中野修一
2. 発表標題 細胞内分子環境は不安定なDNA四重鎖の形成に有利に働く
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shu-ichi Nakano
2. 発表標題 What effects does intracellular environment have on nucleic acid structures?
3. 学会等名 Pacifichem2021（環太平洋国際化学会議）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮寄光一、田辺一也、林花梨、武本満理奈、橋本留奈、梅野光莉、中野修一
2. 発表標題 塩基性タンパク質を含む分子クラウディング環境におけるDNA四重鎖構造の安定化
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shu-ichi Nakano, Masao Horita, Kazuya Tanabe, Ryuta Morimoto, Naoki Sugimoto
2. 発表標題 Stabilization of Noncanonical DNA Structures in the Presence of Bulky Cations
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (CISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野修一
2. 発表標題 細胞内分子環境が核酸の構造と機能に与える影響 モデル実験系を用いた解析
3. 学会等名 新学術領域「分子夾雑の生命化学」第2回関東地区シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田辺和也、森田紗奈、橋本留奈、中野修一
2. 発表標題 細胞内分子環境がDNA四重鎖の形成に与える影響：モデル実験系による検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田紗奈、中野修一
2. 発表標題 カチオン性分子による不安定なDNA四重鎖構造の安定化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shu-ichi Nakano
2. 発表標題 Influence of intracellular conditions on DNA and RNA: Insights from model studies
3. 学会等名 Konan Research Summit (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

甲南大学バイオ分子機能研究室ホームページ
https://www.konan-u.ac.jp/hp/FIRST_bmf1ab/hojyokin.html

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関