

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05618

研究課題名（和文）末端スタッキング駆動型DNAリン酸化プローブの創出と機能検証

研究課題名（英文）Molecular Design and Characterization of DNA Phosphorylation Probes Driven by Surface-assisted Blunt-end Stacking

研究代表者

金山 直樹（Kanayama, Naoki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：80377811

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、固液界面でブラシ状に集積したオリゴDNA鎖（DNAブラシ）におけるDNA二重鎖間の末端構造選択的なスタッキング促進現象を基に、サンプルDNA鎖末端のリン酸化を評価するプローブ材料の新原理を確立することを目的とした。基本原理の検証として、ラテックス粒子表面に形成したDNAブラシを対象に、高塩濃度環境の平滑末端間で生じるスタッキング相互作用が末端リン酸基により顕著に抑制されることを光ピンセット法により確認した。次いで、この現象をDNAブラシで覆われた金ナノ粒子分散系に展開し、その分散・発色特性と組み合わせることで、DNA鎖末端のリン酸化を可視情報として検知できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で開発したプローブ材料が対象とするDNA鎖末端のリン酸化は、DNAの修復・代謝などの生命プロセスに関与し、その異常発生と疾患発症の関連性に近年注目が集まっている。DNA末端のリン酸化・脱リン酸化を司る関連酵素の活性評価には、放射性同位体 ^{32}P 標識がしばしば用いられ、実施施設の制限や作業被ばくの危険性に加え、スルーバック性にも課題が残る。本課題で実証した原理は、 ^{32}P 標識を用いることなく一般的なラボ環境で安全かつ簡便にDNAリン酸化・脱リン酸化を評価するツールの提供に繋がるものである。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to examine a new principle for the assessment of phosphorylation/dephosphorylation of sample DNA terminals based on the terminal-structure-selective stacking phenomenon between DNA brush layers at the solid-liquid interface. As a verification of the basic principle, we confirmed with the optical tweezers that the stacking interactions between the blunt ends of DNA duplex in high salt conditions are significantly suppressed by the terminal phosphate group. We then applied this phenomenon to a gold nanoparticle dispersion system covered with DNA brushes and demonstrated that the phosphorylation/dephosphorylation of the DNA terminals can be discriminated as visible information.

研究分野：高分子材料化学

キーワード：DNAブラシ リン酸化 平滑末端 スタッキング 光ピンセット 金ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

固液界面に DNA 鎖がブラシ状に集積した「DNA ブラシ」では、相補鎖認識能や DNA 二重鎖の熱安定性の向上、核酸分解酵素の特異な感受性など、一般的な溶液状態の DNA 鎖とは異なる性質を示すことが報告されている。研究代表者はこれまでに、DNA 二重鎖ブラシの界面特性が表層配列の僅かな差を反映して明敏に変化する事例を報告してきた。例えば、DNA ブラシで覆われたナノ粒子 (DNA ナノ粒子) は、表層が相補的塩基対 (平滑末端: G-C, A-T ペア) の場合、高塩濃度 (≥ 250 mM NaCl) の水溶液中で速やかに凝集・沈殿するが、表層がミスマッチ配列や一塩基突出などの非平滑末端である場合は安定に分散する。これは、DNA ブラシ表層の僅かな構造の違いによる界面特性の差が、DNA ナノ粒子の分散・凝集というマクロスコピックな現象に反映される一例である。

研究代表者は最近、高塩濃度の水溶液中で向かい合う 2 つの DNA ブラシ間に発生する力が、最表層の塩基対合の有無を反映して、引力 (平滑末端: 塩基対合あり) / 斥力 (非平滑末端: 塩基対合なし) と明瞭に異なることをコロイドプローブ AFM 法による界面間力計測から突き止めた。水溶液中の塩濃度の上昇に伴って、負に帯電している DNA 鎖間の静電反発が低減され、さらに塩濃度が上昇すると DNA 鎖の部分的な脱水が誘起される。平滑末端構造の DNA ブラシが高塩濃度環境に晒された場合、DNA 二重鎖末端の対合した核酸塩基 (G-C, A-T ペア) 部位が脱水和し、互いに重なり合うスタッキング相互作用 (所謂, Blunt-end stacking) が促進されることが考えられる。これが向かい合う 2 つの DNA ブラシ間の複数の DNA 二重鎖末端ペア間で誘起された結果、引力的な相互作用に繋がったという分子メカニズムを提案した。さらに、この DNA ブラシ間相互作用が従来、DNA ナノ粒子で報告されてきた表層配列選択的な分散・凝集挙動の主たる要因であると結論付けた。

2. 研究の目的

DNA 鎖末端のリン酸化・脱リン酸化は、DNA の修復・代謝などの生命プロセスに関与し、その異常発生と疾患発症の関連性に近年注目が集まっている。DNA 末端のリン酸化・脱リン酸化に関連する酵素群の活性評価には、放射性同位体 RI (^{32}P) 標識がしばしば使用されるが、実施環境の制限や作業被ばくのリスク、スループット性などに課題が残る。そのため、 ^{32}P 標識を必要としない DNA リン酸化・脱リン酸化関連酵素の活性評価手法が、様々な観点から検討されてきている。

本課題では、DNA 鎖末端のリン酸化・脱リン酸化に伴う局所的な水和構造の変化に着目した。リン酸基は比較的強く水分子と結合することから、リン酸基が表層に提示された DNA ブラシは高塩濃度環境下であっても表層部位の脱水和が進行しにくく、平滑構造の DNA 二重鎖末端間におけるスタッキング相互作用が抑制される可能性が考えられる。そこで本課題では、DNA ブラシ間相互作用に与える末端リン酸基の影響を評価し、 ^{32}P 標識を用いない DNA リン酸化・脱リン酸化関連酵素の活性評価を行う新原理としての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光ピンセットによる DNA 末端スタッキングの評価

本課題のベースとなる DNA ブラシにおける末端構造選択的なスタッキング現象に関して、溶液の金属イオンの価数や DNA ブラシ構造の影響等について知見を得るため、ラテックス粒子 (直径: 2 マイクロ・メートル) 表面に形成させた DNA ブラシを対象に光ピンセットによる粒子間力計測に基づく評価を実施した。

(2) サンプル DNA 末端のリン酸化状態を可視化するプローブ材料の評価

プローブ材料として、平均粒径が 15 ナノ・メートルの金コロイドの表面に、一本鎖オリゴ DNA (プローブ DNA) をブラシ状に化学固定した ssDNA-AuNPs 分散液を採用した。プローブ DNA と相補配列をもつオリゴ DNA 鎖をサンプル DNA とし、サンプル DNA 末端がリン酸化されたもの (P(+)) 鎖とされていないもの (P(-)) 鎖を用意した。ssDNA-AuNPs 分散液に P(+)) 鎖、あるいは P(-)) 鎖を添加し、金コロイド表面で二重鎖を形成させた。P(+)) 鎖においては、二重鎖形成後に DNA ブラシ表層にリン酸基が提示されるよう配列を設計した。二重鎖形成後の分散液に NaCl を段階的に添加し、粒子凝集に伴う発色の変化が見られる臨界凝集塩濃度を評価した。

4. 研究成果

(1) 光ピンセットによる DNA 末端スタッキングの評価

ラテックス粒子表面に形成させた DNA ブラシ層を対象に、光ピンセット法による粒子間力計測を実施した。ラテックス粒子表面の DNA ブラシ層における二重鎖形成率を蛍光ラベル法により評価したところ、僅か数パーセント程度のオリゴ DNA 鎖が二重鎖を形成しているに留まり、ラテックス粒子表面には一本鎖と二重鎖が混在した DNA ブラシ層が形成されていることが確認された。

この DNA ラテックス粒子 (dsDNA-MP(X)) 2 個を光ピンセットで別々に捕捉し、片方の粒子を 0.1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速度で近づける過程で観測された粒子間力 (F) と粒子間距離 (D) の相関 (F - D 曲線) を右図に示す。DNA 二重鎖末端が平滑構造 (G-C ペア, dsDNA-MP(G)) の場合のみ、引力的な相互作用を示す下向きのピークが確認された。このような平滑末端の DNA 二重鎖を含む DNA ブラシ間における末端スタッキング促進現象は、比較的高濃度の 1 価金属イオン共存下 (例えば、300 mM 以上のナトリウムイオン) で確認され、2 価金属イオン (例えば、マグネシウムイオン) では臨界塩濃度が 30 mM 程度まで大幅に低下することを確認した。また、2 価の金属イオン共存下で誘起される DNA ブラシ間相互作用についても、DNA ブラシ表層構造の高い構造選択性を確認した。以上の結果から、DNA ブラシを構成する DNA 鎖のうち二重鎖が僅か数パーセント程度であっても、二重鎖末端が平滑構造であれば臨界塩濃度以上で末端間のスタッキング相互作用が誘起され、その力を光ピンセット法により評価できることを明らかにした。

次いで、平滑末端にリン酸基が付加された DNA 二重鎖を DNA ブラシ内で形成させ、光ピンセット法により DNA 二重鎖の末端間で生じる相互作用を評価した。末端リン酸化 DNA ブラシで覆われたラテックス粒子間に生じる相互作用について塩濃度依存性を評価したところ、末端リン酸基を付与していない場合と比較して、 F - D 曲線上で粒子間引力が確認される臨界塩濃度が有意に上昇することを確認した。この結果は、末端リン酸基の付与により DNA 二重鎖末端間におけるスタッキング相互作用が抑制されることを示しており、本課題で提案する DNA ブラシ間で促進される平滑末端同士のスタッキング相互作用を利用する DNA リン酸化プローブの設計原理の妥当性を支持するものである。

(2) DNA 鎖末端のリン酸化状態を可視化するプローブ材料の評価

DNA ブラシにおいて、平滑構造の DNA 二重鎖末端間で促進されるスタッキング相互作用が末端リン酸基によって抑制されるというこれまでの知見をもとに、これを動作原理とする発色型リン酸化プローブを作成し、その動作を検証した。具体的なプローブ材料として、平均粒径が 15 ナノ・メートルの金コロイドの表面に、一本鎖オリゴ DNA (プローブ DNA) をブラシ状に化学固定した ssDNA-AuNPs 分散液を採用した。この分散液は、分散状態の金ナノ粒子に起因する表面プラズモン共鳴により 520 nm 付近に吸収極大をもつ赤色を呈する。

この分散液に、プローブ DNA と相補的な塩基配列をもつサンプル DNA (P(-)鎖) を添加して二重鎖形成させ段階的に塩濃度を上昇させると、特定の塩濃度 (臨界塩濃度: C1) 以上で金コロイド表面の DNA 二重鎖末端間のスタッキングが促進されて粒子が凝集し、分散液は赤色から紫色に変化した。一方、サンプル DNA の片末端にリン酸基が付与された P(+)-鎖の場合、分散液の凝集に伴う色変化が誘起される臨界塩濃度 (C2) が有意に上昇した。この結果は、二重鎖末端のリン酸基が末端間スタッキングを抑制するという (1) の知見と矛盾しない。以上の結果を踏まえ、ssDNA-AuNPs 分散液の塩濃度 C を予め、 $C1 < C < C2$ となるよう設定することで、サンプル DNA 末端のリン酸化状態 (P(+)-鎖 or P(-)-鎖) に応じて明瞭な色変化を示す (P(-)-鎖: 赤色, P(+)-鎖: 紫色) 発色型 DNA リン酸化プローブとして動作することを確認した。

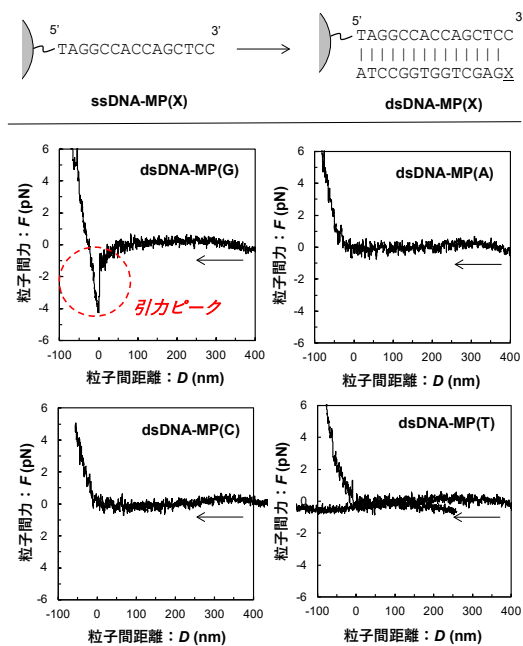


図 dsDNA-MP(X)の塩基配列および F - D 曲線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroya Nakauchi, Mizuo Maeda, Naoki Kanayama	4. 巻 37
2. 論文標題 Terminal Sequence-Specific Interparticle Attraction between DNA Duplex-Carried Polystyrene Microparticles in Aqueous Salt Solutions Assessed by Optical Tweezers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5573-5581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.1c00349	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 金山直樹	4. 巻 70
2. 論文標題 光ピンセットで測るDNAコロイド粒子間力	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 高分子	6. 最初と最後の頁 557-558
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 Naoki Kanayama, Satomi Kishi, Tohru Takarada, Mizuo Maeda	4. 巻 56
2. 論文標題 Photo-Switching of Blunt-End Stacking between DNA Strands Immobilized on Gold Nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 14589-14592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC05085G	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 Hiroya Nakauchi, Mizuo Maeda, Naoki Kanayama	4. 巻 37
2. 論文標題 DNA Terminal-Specific Dispersion Behavior of Polystyrene Latex Microparticles Densely Covered with Oligo-DNA Strands Under High-Salt Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 461-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCP04	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金山直樹、中内宙弥、前田瑞夫
2. 発表標題 光ピンセットを用いたDNA末端間スタッキングのピコ力学解析
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山直樹、宝田徹、前田瑞夫
2. 発表標題 光刺激によるDNA二重鎖末端間スタッキングの可逆的制御
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 金山直樹・前田瑞夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社サイエンティフィク	5. 総ページ数 5
3. 書名 核酸科学ハンドブック 第11部 28. DNA修飾金ナノ粒子を用いた遺伝子診断法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------