

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24550200

研究課題名(和文)細胞で行われる核酸反応を解明するための新規モデル実験システムの構築と利用

研究課題名(英文)Development of new model experimental systems for investigating nucleic acid interactions in the intracellular environment

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞で行われる核酸反応を解明するための新規モデル実験系を構築した。化学的アプローチが可能な実験系を用いて、従来の分子クラウディング研究では解明できなかった様々な環境要因(繊維状構造体、細胞内物質、溶媒物性)が、核酸の構造と機能に与える影響を明らかにした。とくに、核酸の静電相互作用に関わる分子環境(荷電分子や誘電率)が大きく影響することが見出された。本研究によって、従来の分子クラウディング研究を飛躍させるモデル実験系が構築され、今後の研究の進展に役立つ知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Model studies under biomimetic conditions are important to understand the effects of the cellular environment on nucleic acid interactions. Neutral water-soluble polymers, such as polyethylene glycol and polysaccharides, are often used as cosolutes in the study of molecular crowding. The present research has developed new model experimental systems for investigating nucleic acid interactions in the intracellular environment. The model systems enabled to evaluate the effects of various environmental factors, including confined condition, cellular molecules, and altered solvent properties, on the structures and catalytic activities of nucleic acids. The quantitative analysis revealed that the environmental factors that contribute to electrostatic interactions have large impact on the stability of nucleic acid interactions. The observations demonstrate the significance of the model studies for the understanding of the behavior of nucleic acids in the intracellular environment.

研究分野：生体物理化学

キーワード：核酸 リボザイム 構造安定性 分子クラウディング 混合溶媒 モデル実験

### 1. 研究開始当初の背景

細胞にはタンパク質をはじめとする様々な分子が高濃度で存在している。この環境は分子クラウディングと呼ばれ、通常の *in vitro* 実験で用いられる水溶液とは大きく異なっている。細胞内部の特殊な分子環境は、遺伝子発現をはじめとする様々な生体反応に影響を与えていると考えられている。

細胞の分子環境は様々な要素によって作り出されるため、モデル実験系から得られる定量データは分子環境効果の解明に役立つ。これまでは、細胞の分子クラウディング環境が生体分子に与える影響を調べるために、ポリエチレングリコール(PEG)や多糖類などの水溶性ポリマーを溶解させた水溶液が広く用いられてきた。しかし、中性ポリマーを用いる従来の実験系は細胞モデルとしては単純化されすぎているため、細胞環境により近い実験系による評価が必要とされていた。

### 2. 研究の目的

細胞内分子環境が生体分子に与える影響を明らかにするには、化学的アプローチによる研究が有効である。本研究は、細胞で行われる核酸反応を解明するための新規モデル実験系を構築し、従来のモデル研究では解明できなかった様々な環境要因の影響を明らかにすることを目的とした。そこで、排除体積効果以外の環境要因として、繊維状構造体による閉じ込め効果 (confinement)、細胞内物質 (アニオン性低分子化合物とタンパク質) の影響、溶媒物性の影響を調べるための実験系を構築した。さらに、中性ポリマーを用いる従来の実験系と融合させたハイブリッド実験系による評価も試みた。本研究によって分子クラウディング効果の化学的側面を明らかにし、核酸反応の理解を進めるとともに、様々な分子環境において望みの機能を発揮する機能性核酸の設計に有用なデータを得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、次の (1) ~ (3) の新規モデル実験系の構築を試みた。

#### (1) 繊維状構造体の影響を評価するためのモデル実験系の構築

細胞では、細胞骨格フィラメントなどの繊維状構造体によって分子クラウディング環境が作り出されている。このモデルとして、アガロースゲル (網目サイズ: 数十 nm ~ 数百 nm) とポリアクリルアミドゲル (網目サイズ: 数 nm ~ 数十 nm) を調製した。これらのゲルは光吸収が大きく、そのままでは分光法による核酸分子の測定が困難であった。そこで、分光測定が可能な高品質ゲルを作製するために、ゲルの調製条件 (溶液組成や温度、操作時間など) を検討した。ポリアクリルアミドゲルでは、固化させたゲルを緩衝溶液で洗浄して UV (紫外線) 吸収を減らす方法を確

立した。また、洗浄したゲルを一度乾燥させた後に緩衝溶液で膨潤させることで、ゲル作製後に核酸分子をゲル繊維に閉じ込める実験手順も開発した。脱水ゲルは、高張液 (平均分子量 2 万の PEG 水溶液) による浸透圧法によって調製し、高張液に晒す時間を変えることでゲルの水分量を調節した。

アガロースゲルのゾル-ゲル転移温度は可視分光測定によって得た。核酸の構造安定性 (熱融解温度:  $T_m$ ) は、紫外線吸収または蛍光強度の熱融解曲線から算出した。蛍光測定には、FAM (蛍光物質) と Dabcyl (消光物質) で蛍光標識化されたオリゴマー-DNA を用いた。核酸構造に対する影響は円偏光二色性 (CD) スペクトルによって調べた。

#### (2) 様々な細胞内環境要因の影響を評価するためのモデル実験系の構築

排除体積効果以外の環境要因として、アニオン性化合物と溶媒物性の影響を調べるための実験系を構築した (図 1)。まず、アニオン性化合物が金属イオン-核酸相互作用に与える影響を調べるために、排除体積効果が小さいオリゴマー核酸による評価系 (ハイブリダーゼーションとハンマーヘッドリボザイム) を利用した。一本鎖あるいはヘアピン構造の核酸分子のハイブリダーゼーションに対しては、ゲル電気泳動あるいは熱融解曲線から得られる熱力学的パラメータを解析した。リボザイムに対しては、反応速度解析から RNA 切断反応の速度定数を得た。また、様々な種類の水/有機溶媒 (アルコール、PEG、グリセロール、アミド化合物、非プロトン性溶媒など) の混合溶液を用いて同様の評価を行い、溶媒の物性データ (誘電率、水の活量、粘度など) との関連性を調べた。

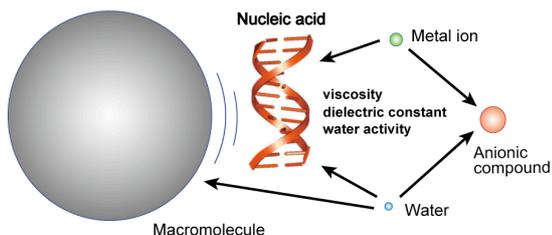


図 1. 核酸の相互作用に影響する細胞内環境因子

#### (3) タンパク質による分子クラウディング効果を検討するためのモデル実験系の構築

タンパク質が共存する分子環境の影響を解明するために、図 2 に示すタンパク質を用いた。市販のタンパク質であるウシ血清アルブミン、ヘモグロビン、ミオグロビン、リゾチームは、スピンカラムによる精製を行った。脂肪酸結合タンパク質 (FABP) は、大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株と pET ベクターによる発現系を用いて調製した。FABP の精製には、イオン交換カラム (Hi-Trap カラム) とアフィニティカラム (His-tag カラム) を用いた。

タンパク質の熱変成温度は CD スペクトル

の熱融解曲線から得た。タンパク質による DNA 加水分解の有無は変性ゲル電気泳動によって調べた。また、二重鎖 DNA の構造安定性は、蛍光測定によって得られる熱融解曲線から算出した。

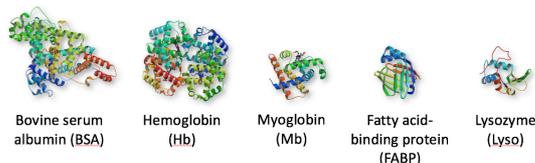


図 2. 本研究で用いたタンパク質

#### 4. 研究成果

(1) 繊維状構造体による閉じ込め効果を調べるために、ハイドロゲルを用いた実験系を構築した。ポリアクリルアミドゲルに閉じ込められた核酸構造の熱安定性を正確に評価するには、ゲル内部の不純物（未反応のアクリルアミドや重合開始剤など）を除去しておくことが不可欠であることが示された。そこで、洗浄を施したゲルを使って、ポリマー-DNA 二重鎖の  $T_m$  を UV 融解曲線から算出した。その結果、10~15%を超える濃度のゲルに閉じ込められると DNA 構造の安定性は上昇することが見出された。さらに、CD スペクトル測定によって、ゲル内部では二重鎖構造が変化することも示された。一方で、10%以下のポリアクリルアミドゲルや、UV 測定が可能な数パーセント濃度のアガロースゲルを用いた場合は、二重鎖の構造と安定性に変化は見られなかった。

さらに、核酸の分子サイズの影響を調べるために、オリゴマー-DNA による検討を試みた。オリゴマー-DNA に対しては紫外分光測定が困難であったため、蛍光測定による評価を行った。様々な DNA 配列の  $T_m$  を測定したところ、オリゴマー-DNA が形成する構造体の安定性は、高濃度ポリアクリルアミドゲルやアガロースゲル内部でも水溶液中と変わらなかった。このことから、オリゴマー核酸に対しては数ナノメートルの網目サイズによる閉じ込め効果は小さいことが明らかになった。さらに、PEG を共存させたハイブリッド実験系による評価も試みた。アガロースゲルに PEG を加えると白濁したため、実験に用いることはできなかった。一方で、ポリアクリルアミドゲルは白濁せず、蛍光融解曲線から、DNA 二重鎖に対する PEG 効果は繊維状構造体の影響を受けないことが示された。

次に、このハイドロゲル実験系を利用して、水分量が核酸構造の安定性に与える影響を調べた。高張液を用いると、ゲル内部に低水分量の環境をつくり出すことができる。この脱水ゲルを用いた実験から、脱水の程度に応じて DNA 二重鎖の  $T_m$  が低下し、核酸構造の安定性には水の活量が大きく影響することが見出された。この実験は予定されていなかったものであり、当初の研究計画を超える展開となった。

(2) 細胞には様々な種類のアニオン性化合物が存在する。このような環境では金属イオンの多くが結合した状態にあり、核酸が利用できる金属イオンの量は限られる。アニオン性分子による金属イオン局在化の影響を調べるために、様々なアニオン性分子 (DNA、RNA、アミノ酸、リン酸化合物、脂肪酸など) の共存下でハンマーヘッドリボザイムの酵素活性を測定した。リボザイムによる基質 RNA の切断速度は金属イオン濃度に依存するので、酵素活性から RNA が利用できる金属イオン (マグネシウムイオン) 濃度を見積もることができる。速度解析の結果、アニオン性分子はリボザイム反応に大きな影響を与え、多価アニオンの共存下では酵素活性が著しく低下することが示された。多くのアニオン性化合物は、未結合状態のマグネシウムイオンの量から期待される程度の抑制効果を示したが、核酸分子が共存する環境 (核酸による分子クラウディング環境) では、その電荷から予想される以上の阻害が見られた。同様に、脂肪酸を用いた場合 (脂肪酸ミセルの共存環境) も予想以上の大きな阻害であった。これらの結果は、アニオン性分子の高分子電解質としての作用 (対イオン濃縮効果とイオン雰囲気形成) が原因であると考えられる。興味深いことに、アニオン性分子によって抑制されたリボザイム活性は、PEG による分子クラウディング環境では回復することが見出された。

新しい分子環境効果の評価系として、非水溶液環境の影響についても検討を行った。様々な水/有機溶媒の混合溶液を調製し、ハンマーヘッドリボザイムの酵素活性に与える影響を速度解析および FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 測定により調べた。その結果、混合溶液中では RNA のフォールディングと基質の切断反応が促進されることが見出された。このリボザイム活性の促進効果と溶媒物性の関連性を解析したところ、溶媒の誘電率が大きく影響していることが明らかになった (図 3A)。同様の検討を、ヘアピン構造あるいは一本鎖核酸によるハイブリダイゼーションに対して行ったところ、混合溶液中ではハイブリダイゼーション効率が向上し、この効果は溶液の誘電率と関連していた (図 3B および 3C)。一方で、水の活量や粘度、あるいは有機溶媒の分子量との関連性は見られなかった。細胞内部の比誘電率の値は 60 以下であると報告されており、この条件では水中 (比誘電率は約 80) と比べて金属イオンの結合力が数倍から数十倍に向上することも見出された。この混合溶液を用いた定量評価によって、従来の分子クラウディング実験系では解明できなかった核酸の静電的相互作用に対する影響を明らかにすることができた。

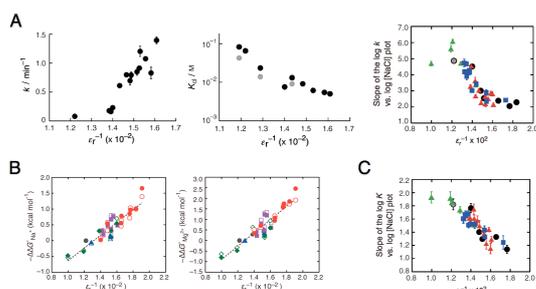


図3. 溶液の誘電率と様々な核酸反応との相関性：(A) ハンマーヘッドリボザイムのRNA切断活性、(B)ヘアピン構造によるハイブリダイゼーション、(C)RNA二重鎖の形成反応

(3) タンパク質による分子クラウディング環境の影響を検討するために、市販されているタンパク質に加えて、脂肪酸結合タンパク質 (FABP) を用いた (図2)。FABP は、大量のエネルギー消費を必要とする心臓や神経細胞において、細胞の全可溶性タンパク質の数%~10%を占める細胞内タンパク質である。実際に細胞で分子クラウディング環境をつくり出している FABP を使った評価は前例がなく、細胞内部の分子環境効果を解明するための重要な実験である。これらのタンパク質を数%含む水溶液 (溶解度の限界のため最大5 wt%) を調製した。全てのタンパク質は実験中にDNA鎖を分解することなく、その熱変成温度は60 °C以上と比較的高いことが確認された。DNAの蛍光融解曲線 (60 °C以下の温度) を解析した結果、タンパク質が共存するとDNA二重鎖の $T_m$ が変化することが明らかになった。一方で、PEGやデキストランの場合は高濃度 (最大20 wt%) であっても、 $T_m$ への影響は小さかった。また、電荷をもたないPNA (ペプチド核酸) に対しては、タンパク質共存の影響はほとんどなかった。これらの結果は、細胞の分子環境効果を理解するには、タンパク質を用いた分子クラウディング研究が重要であることを示している。

高濃度の分子クラウディング環境をつくり出すために、タンパク質とPEGを共存させたハイブリッド実験系を構築した。PEGを共存させるとタンパク質の溶解度は低下したが、タンパク質とPEGを合わせて20 wt%の分子クラウディング溶液を調製することができた (タンパク質濃度は1~3 wt%)。この実験系を用いてDNAの $T_m$ を測定したところ、リゾチームのみがDNA二重鎖の $T_m$ を上昇させることが見出された。この現象はタンパク質による排除体積効果や溶媒物性 (粘度、水の活量、誘電率など) で十分に説明することができず、塩基性タンパク質であるリゾチーム特有の性質によって生じたものと考えられる。リゾチームはループ構造を有するDNA配列の $T_m$ も大きく上昇させ、この安定性の変化は塩濃度が低いほど顕著であった。さらに、PEGの分子量が大きいほど $T_m$ の上昇が大きかったことから、分子クラウディング環境では

DNAと塩基性タンパク質の静電的相互作用が顕著になった可能性がある。これは細胞の分子環境が核酸に与える影響を理解する上で重要な知見である。

以上(1)~(3)の実験から、細胞では排除体積効果以外の環境要因として、核酸の静電相互作用に関わる荷電分子や誘電率が大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。このように、本研究によって分子環境効果を調べるための実験手法が増え、分子クラウディング研究の新たな展開を迎えることができた。本研究結果は、様々な分子環境において望みの機能を発揮する機能性核酸の設計にも有用であり、分子環境効果を考慮した核酸の分子設計が可能になりつつある。

## 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 S. Nakano, N. Sugimoto. The structural stability and catalytic activity of DNA and RNA oligonucleotides in the presence of organic solvents. *Biophys. Rev.*, 8, 1-13 (2016) [査読有り]  
DOI: 10.1007/s12551-015-0188-0
- ② S. Nakano, Y. Kitagawa, D. Miyoshi, N. Sugimoto. Effects of background anionic compounds on the activity of the hammerhead ribozyme in  $Mg^{2+}$ -unsaturated solutions. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 20, 1049-1058 (2015) [査読有り]  
DOI:10.1007/s00775-015-1286-y
- ③ S. Nakano, Y. Kitagawa, H. Yamashita, D. Miyoshi, N. Sugimoto. Effects of cosolvents on the folding and catalytic activities of the hammerhead ribozyme. *ChemBioChem*, 16, 1803-1810 (2015) [査読有り]  
DOI: 10.1002/cbic.201500139
- ④ S. Nakano, M. Yoshida, D. Yamaguchi, N. Sugimoto. Preparation of hydrogels for the study of the effects of spatial confinement on DNA. *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* 39, 435-438 (2014) [査読有り]  
DOI: org/10.14723/tmrsj.39.435
- ⑤ S. Nakano, N. Sugimoto. Roles of the amino group of purine bases in the thermodynamic stability of DNA base pairing. *Molecules*, 19, 11613-11627 (2014) [査読有り]  
DOI:10.3390/molecules190811613
- ⑥ S. Nakano, Y. Kitagawa, D. Miyoshi, N. Sugimoto. Hammerhead ribozyme activity and oligonucleotide duplex stability in mixed solutions of water

- and organic compounds. *FEBS Open Bio*, 4, 643-650 (2014) [査読有り]  
DOI:10.1016/j.fob.2014.06.009
- ⑦ S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto. Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids. *Chem. Rev.*, 114, 2733-2758 (2014) [査読有り]  
DOI: 10.1021/cr400113m
- ⑧ H. Tateishi-Karimata, S. Nakano, N. Sugimoto. Quantitative analyses of nucleic acid stability under the molecular crowding condition induced by cosolute. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* Chap. 53, Unit 7.19 (2013) [査読有り]  
DOI: 10.1002/0471142700.nc0719s53
- ⑨ S. Nakano, H. Hirayama, D. Miyoshi, N. Sugimoto. Dimerization of nucleic acid hairpins in the conditions caused by neutral cosolutes. *J. Phys. Chem. B*, 116, 7406-7415 (2012) [査読有り]  
DOI: 10.1021/jp302170f
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 中井大樹, 山口大輔, 杉本直己, 中野修二、生体分子を含んだクラウディング環境が DNA に与える安定性変化のメカニズム、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日、同志社大学 (京都府京田辺市)
- ② H. Nakai, D. Yamaguchi, N. Sugimoto, S. Nakano、Effects of protein crowding on the thermal stability of DNA、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ③ H. Nakai, D. Yamaguchi, N. Sugimoto, S. Nakano、Comparison of the effects of PEG, dextran and proteins on the thermal stability of a DNA duplex、第 42 回国際核酸化学シンポジウム、2015 年 9 月 23-24 日、Egret Himeji (兵庫県姫路市)
- ④ K. Iwaki, H. Sangen, N. Sugimoto, S. Nakano、Effect of molecular crowding on ion binding to DNA G-quadruplexes studied by isothermal titration assay、第 42 回国際核酸化学シンポジウム、2015 年 9 月 23-24 日、Egret Himeji (兵庫県姫路市)
- ⑤ 中井大樹, 中野修二、タンパク質を用いた細胞内環境が DNA に与える影響、第 6 回生命機能研究会、2015 年 9 月 12 日、龍谷大学梅田キャンパス (大阪府大阪市)
- ⑥ 岩木研太, 中野修二、細胞内模倣環境が DNA 四重鎖のイオン結合におよぼす影響、第 6 回生命機能研究会、2015 年 9 月 12 日、龍谷大学梅田キャンパス (大阪府大
- 阪市)
- ⑦ S. Nakano, D. Yamaguchi, M. Yoshida, N. Sugimoto、Studies on the effects of intracellular crowding environment on nucleic acids using model experimental systems、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑧ 中野修二、山口大輔, 吉田将敏, 杉本直己、モデル実験系による核酸に対する細胞内分子クラウディング効果の解明、第 37 回日本分子生物学会年会 ワークショップ、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑨ 中野修二、モデル実験だからわかるこんなこと ~核酸分子に対する分子環境効果~、第 5 回生命機能研究会、2014 年 11 月 23 日、甲南大学 (兵庫県神戸市)
- ⑩ 中野修二、細胞内分子環境が核酸分子に与える影響 -モデル実験系を使った物理化学的アプローチから言えること-、生化学若い研究者の会 秋のセミナー、2014 年 11 月 15 日、大阪大学 (大阪府吹田市)
- ⑪ Y. Tanino, H. Yamashita, S. Tanaka, N. Sugimoto, S. Nakano、Effects of mixed solutions with organic compounds on cation binding to RNA、第 41 回国際核酸化学シンポジウム、2014 年 11 月 5 日、北九州国際会議場 (福岡県北九州市)
- ⑫ S. Nakano, M. Yoshida, D. Yamaguchi, N. Sugimoto、Preparation of hydrogels for the study of the effects of spatial confinement on DNA、The IUMRS International Conference in Asia 2014、2014 年 8 月 25 日、福岡大学 (福岡県福岡市)
- ⑬ 吉田将敏, 山口大輔, 杉本直己, 中野修二、生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(54) ゲル繊維に閉じ込められた DNA 分子の構造安定性の評価、日本化学会第 93 春季年会、2014 年 3 月 27 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- ⑭ H. Hirayama, S. Nagatoishi, N. Sugimoto, S. Nakano、Screening of the FABP-binding ligands using delipidated protein、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑮ 中野修二、平山英伸, 三好大輔, 杉本直己、分子クラウディング環境における RNA 相互作用の解明と予測に向けた取り組み、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013 年 9 月 28 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- ⑯ H. Hirayama, Y. Kitagawa, D. Yamaguchi, H. Sangen, N. Sugimoto, S. Nakano、

Model study for the molecular crowding effects on nucleic acid interactions、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

- ⑰ D. Yamaguchi, H. Oka, M. Fujii, N. Sugimoto, S. Nakano、Molecular crowding study using nucleotide analogs、第 39 回国際核酸化学シンポジウム、2012 年 11 月 16 日、名古屋大学（愛知県名古屋市）
- ⑱ 山口大輔、中野修一、新規分子クラウディングモデル実験系を用いた DNA 二重鎖構造の熱的安定性の評価、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 7 日、北海道大学（北海道札幌市）
- ⑲ 中野修一、細胞の分子環境を模倣したモデル実験系からわかったこと、第 3 回生命機能研究会、2012 年 9 月 6 日、甲南大学（兵庫県神戸市）
- ⑳ 平山英伸、中野修一、自己相補的な RNA の二量化反応における細胞内環境の役割、第 3 回生命機能研究会、2012 年 9 月 6 日、甲南大学（兵庫県神戸市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kcc.zaq.ne.jp/konanlst\\_bmflab/](http://www.kcc.zaq.ne.jp/konanlst_bmflab/)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし