

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26620112

研究課題名(和文) シリカ細孔内におけるRNA3塩基認識の熱力学

研究課題名(英文) Thermodynamic study of RNA trinucleotide recognition within silica mesopores

研究代表者

山口 央 (Yamaguchi, Akira)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：10359531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リボソームなどで見られる3塩基認識の詳細解明を目的として、メソポーラスシリカが持つ均一メソ細孔空間を反応場とする実験系を構築し、以下の研究課題を遂行した。(1) 細孔内過冷却水を利用した短鎖DNA二重鎖の構造安定性評価：シリカメソ細孔内では3塩基認識が効率的に進行することを見いだした。(2) ループ構造を持つヘアピンループ構造の細孔内安定性：ループ部位のわずかな構造変化によって構造安定性が細孔内で低下することを見いだした。(3) 短鎖DNA二重鎖の安定性におよぼす空隙サイズの影響：サイズマッチングによる飛躍的な構造安定化を定量的に評価した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to clarify trinucleotide recognition process occurred inside meso-sized cavities of mesoporous silica. As the results, we found following three characteristics in the trinucleotide recognition: (1) efficient duplex formation of short (3- and 4-mer) DNA fragments could be achieved inside silica mesopores under cryogenic conditions, (2) DNA hairpin structure, on the other hand, was destabilized by the confinement inside the mesopores, (3) the duplex stability was significantly enhanced by size-matching between the pore size and the duplex width.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノ細孔 三塩基認識

1. 研究開始当初の背景

リボソームでのタンパク質合成(翻訳)においては、mRNAとtRNA間での3塩基認識が重要な役割を果たしている。従って、3塩基認識に関する熱力学的パラメーター解析は、翻訳過程の分子論的理解に必要不可欠である。一般に、DNAやRNA二重鎖の熱力学的安定性は、希薄溶液中での二本鎖形成・解離挙動測定に基づいた最隣接(Nearest-Neighbor Model)モデルによって推定できる。しかし、3塩基認識の基づくDNA・RNA二重鎖形成では、協同効果が利用できないために水中で達成することは不可能である。従って、3塩基認識の熱力学的考察はほぼ皆無である。また、3塩基認識はリボソームの微小空隙内で発現するため、認識過程におよぼす空隙の影響も考慮する必要がある。

メソポーラスシリカは、比較的均一な細孔構造を持つ均一メソ多孔体であり、その細孔内では過冷却水が安定的に存在可能であることが分かっている。細孔内水の凝固点は細孔サイズと構造によって変化し、概ね-20°C~-60°Cの範囲に凝固点があることが分かっている。この温度範囲には、最近接塩基対パラメーターから予測される3~5塩基のAn/Tn DNA二重鎖の融解温度がある。また、メソポーラスシリカ細孔は概ね2~10 nmの範囲で均一な円柱状細孔を持つ均一メソ多孔体であり、その細孔空間をリボソームの微小空隙と対応させることで、3塩基認識におよぼす空隙サイズの影響を検証することができる。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ空間の特性(閉じ込め効果による二重鎖安定化と低温水の利用)を利用することで、3塩基認識の熱力学的パラメーターを系統だって精査することを目的とした。具体的には、(1)細孔内過冷却水を利用した短鎖DNA二重鎖の構造安定性評価、(2)ループ構造を持つヘアピンループ構造の細孔内安定性、(3)短鎖DNA二重鎖の安定性におよぼす空隙サイズの影響、について研究を行った。

3. 研究の方法

各研究課題において以下の研究を遂行した。

(1) 細孔内過冷却水を利用した短鎖DNA二重鎖の構造安定性評価

4級アミンである trimethyl aminopropyl (TMAP)を修飾したメソポーラスシリカ(BJH細孔径:2.4 nm)を合成し、この細孔内における3~5塩基DNA二重鎖の構造安定性を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定から観察した。

(2) ヘアピンループ構造をとる(CCG)₄トリプレットリピートについて、TMAP修飾シリカメソ細孔内外での構造安定性を、チアゾールオレンジを蛍光プローブとして評価した。

(3) TMAP修飾したメソポーラスシリカについて、BJH細孔径が1.6~7.4 nmのものを合成

した。ここにおける3~4塩基のDNA二重鎖の構造安定性を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定から観察した。

4. 研究成果

(1) 細孔内過冷却水を利用した短鎖DNA二重鎖の構造安定性評価 [4]

DNA二重鎖形成は、塩基対数が4個以下ではその ΔG は正であり、水溶液中では自発的に進行しない。一方で、メソ細孔内水は安定的に過冷却状態となり、およそ-60°Cまでは不凍水として存在する。従って、メソ細孔内に短鎖DNA断片を導入すれば、-60°Cまでの低温領域で二重鎖形成を発現可能と考えられる。そこで、3~5塩基のDNA二重鎖形成について検討を行った。

具体的には、アデニン、およびチミンの三~五量体であるDNA(AAA/TTT, AAAA/TTTT, AAAAA/TTTTT)をTMAP修飾したシリカ細孔内(実効細孔径:2.4 nm)に閉じ込めて、30°C~-50°Cの温度範囲で二重鎖形成率をFRET測定から推測した。用いたDNA断片はFRET測定のための色素(FAM, TAMRA)が各末端に修飾されている(図1)。

塩基数の異なる各DNAペアについて観測されたドナー発光とアクセプター発光の比(F_A/F_D)の温度依存性を計測した。その結果、いずれの塩基数のDNAペアについても F_A/F_D は、温度低下とともに増大することが分かった(図2)。また、塩基数が大きいほど F_A/F_D は相対的に大きくなっている。以上の結果は、Watson-Click塩基対による短鎖DNA二重鎖(A_n/T_n)の形成を示唆している(図1)。また、非相補的なDNAペア(AAA/AAA)、および非対称な塩基配列のDNAペア(TTG/AACなど)、一塩基置換したDNAペア(AAA/TATなど)などでFRET測定を行った結果、Watson-Click塩基対によるanti-parallel二重鎖が細孔内で形成していることが示された。

FRET応答の解析から二重鎖形成の熱力学定数の算出を試みた。ここでは、FRET応答から二重鎖形成の平衡定数を求め、そのvan't Hoff解析から二重鎖形成エンタルピーを算出

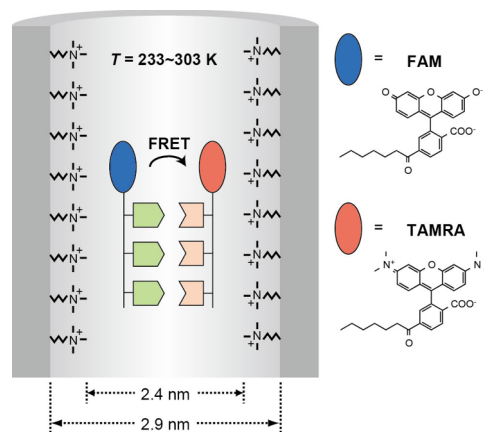


図1 TMAP修飾シリカ細孔内における色素修飾3塩基DNA二重鎖の模式図

した(図3)。AAA/TTT 二重鎖形成エンタルピーは、 $-5.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。このエンタルピー値は、一塩基変異を有する TAA/TTT ($-5.6 \text{ kcal mol}^{-1}$)、ATA/TTT ($-3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$)、AAT/TTT ($-4.2 \text{ kcal mol}^{-1}$)とほぼ同程度であった。WC 塩基対が一個無い変異系において二重鎖形成エンタルピーが大きく変化しない要因としては、幾何学的な閉じ込め効果が重要な役割を果たしていると考えられる。一般的に変異部位の核酸塩基は二重らせん構造の外側にフリップアウトすることがある。一方、二重らせんの直径とほぼ一致したアミン修飾シリカメソ細孔 (2.4 nm) では、変位部位の核酸塩基がフリップアウトできずらせん構造内部に強制的にたたみ込まれ、T:T 塩基対を形成する。このように、サイズマッチした空間内での閉じ込め効果により、二重鎖形成エンタルピーは、ミスマッチの有無に大きく依存しなかったと考えられる。

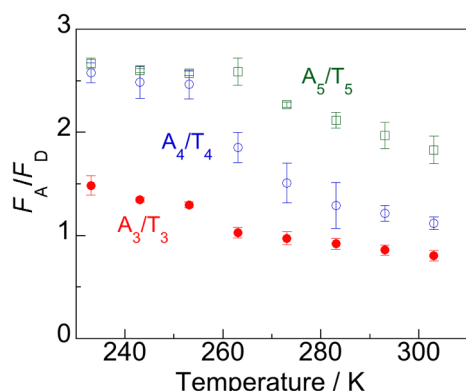


図2 3~5 塩基 DNA ペア (細孔内) における FRET 応答の温度依存性

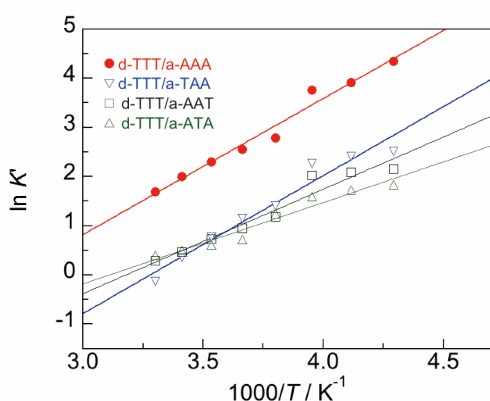


図3 ミスマッチを含む3 塩基 DNA 二重鎖形成の van't Hoff plot。赤はミスマッチ無しの結果。

nm レベルの微細孔内では、バルク水溶液系で不安定な短鎖 DNA 二重鎖形成が効率的に進行することを本研究で初めて見いだした。また、細孔空間と DNA 二重鎖のサイズマッチングによる構造安定化が示唆された。このサ

イズマッチング効果については、研究課題(3)でより詳細に検証した。

(2) ループ構造を持つヘアピンループ構造の細孔内安定性 [2]

前述の通り、短鎖 DNA 二重鎖が TMAP 修飾シリカ細孔内で形成すること、つまり構造安定性がバルク溶液系に比べて細孔内で飛躍的に増大することが示された。一方で、DNA・RNA の高次構造においては、複数の二次構造がループ部位で連結された複雑な構造をとることが多い。そこで、二重鎖形成におよぶループ部位の検証を行った。具体的には、ステム部位とループ部位からなる $(CCG)_4$ のヘアピンループ構造をモデルとしてその構造安定性を検証した。DNA に C や G が存在すると、FRET 測定で使用する FAM や TAMRA の発光が消光してしまうため、本課題においては蛍光性インターカラーターであるチアゾールオレンジ (TO) を蛍光プローブとして用いた。

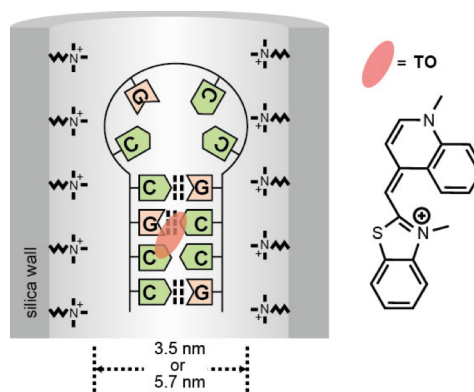


図4 TMAP 修飾シリカ細孔内における $(CCG)_4$ ヘアピンループ構造の模式図

図4に TMAP 修飾したシリカ細孔内における $(CCG)_4$ のヘアピンループ構造の模式図を示す。図5は、蛍光測定から得られた $(CCG)_4$ のヘアピンループ構造に対する TO の結合率の温度依存性である。TO 結合率は、ヘアピンループ構造の存在割合を示すものである。バルク溶液系において得られた曲線はシグモイダルであり、その一次微分の極大値は別途決定した変性温度 (ca. 50°C) と一致した。従って、図5はヘアピンループ構造の熱変性を示すものである。細孔系においてもシグモイダル曲線が得られたが、得られた曲線はおよそ 10°C 程度高温側にシフトしている。この結果は、ヘアピンループ構造は TMAP 修飾シリカ細孔内において不安定化することを示すものである。

ステム部位の構造については、一塩基ミスマッチがあるものの、前研究課題で実証したとおり、その構造安定性は細孔内で大きいと考えられる。従って、ループ部位の存在がヘアピンループ構造の細孔内不安定化の要因と言える。

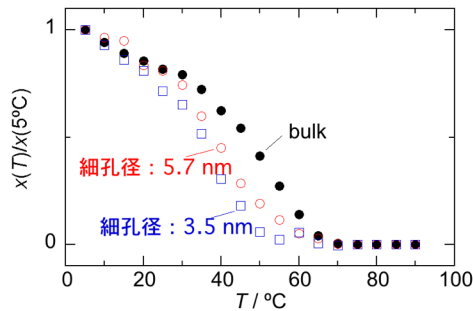


図5 バルク溶液系, および TMAP 修飾シリカ細孔内における(CCG)₄ヘアピンループ構造に対する TO の結合率

DNA は、細孔内で正に帯電した TMAP 単分子層と強く静電相互作用している。TMAP 単分子層は、ステム部位を取り囲んでおり、電荷中和と揺らぎ抑制からそれらの構造安定性が細孔内で増大する。一方で、ループ部位の構造は TMAP との相互作用により歪み、このループ部位の構造歪みがステム構造を変化させたと考えられる。熱変性挙動から推定される形成エンタルピーの差 (バルク溶液系と細孔内系の差: $\Delta\Delta H$) は $0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ と小さな値である。従って、ループ部位と TMAP との静電相互作用による構造歪みは小さなものと言える。これは、ヘアピンループ構造の構造安定性に細孔サイズが影響していない (図 5) 結果からも示唆されるものである。

(3) 短鎖 DNA 二重鎖の安定性におよぼす空隙サイズの影響

短鎖 DNA 二重鎖が、TMAP 修飾シリカ細孔内で安定化することが研究課題(1)より示された。しかし、細孔内過冷却水を利用した系では、実現可能な温度範囲において完全な DNA 二重鎖形成/融解曲線を得ることは難しい。これは、二重鎖構造の極めて大きな細孔内安定化に起因する。そこで、DNA 二重鎖の安定性を低下させつつ、低温測定も可能な水/エタノール混合溶媒を用いて、完全な二重鎖形成曲線の取得と、それに基づく二重鎖安定性におよぼす空隙サイズの影響について検証した。具体的には、1.6~7.4 nm の細孔直径を有する TMAP 修飾メソポーラスシリカを合成し、そこでの 3, 4 塩基 DNA 二重鎖形成を FRET 測定から観察した。

その結果、細孔直径が DNA 二重鎖直径と同程度である「サイズマッチング条件」において、飛躍的な安定性向上が発現することが明らかとなった (図 6)。また、細孔直径をわずか 1 nm 変化させるだけで、「サイズマッチング」による構造安定性向上が消失することも分かった。サイズマッチング条件においては、二重鎖形成平衡定数が 2 桁大きい。以上の結果は、空隙サイズのわずかな変化によって 3

塩基認識挙動が調整されることを意味する。

以上のサイズマッチング効果については、enthalpic な構造安定化が要因である。一方で、水やエタノールなどの溶媒分子が存在する場合は、脱水和を含む entropic な効果も大きく寄与すると考えられる [3]。本課題では、実験的に細孔空間サイズ効果を定量化した。この結果を基にした分子動力学計算などによって、構造安定化の詳細が議論できるだろう。

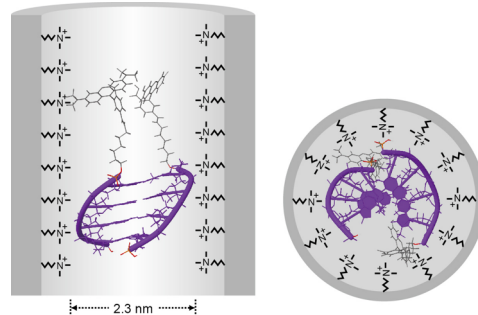


図6 サイズマッチした細孔空間における色素修飾 4 塩基 DNA 二重鎖の模式図

以上、本研究においては短鎖 DNA 二重鎖形成に関わる、塩基配列、構造、空隙サイズの影響について系統的に解明した。得られた成果は、3 塩基認識など、タンパク質の微小空隙における核酸分子の高次構造の理解 [4]、およびナノ空隙における超分子集合体の学理に寄与するものである。

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 4 件)

- (1) T. Itoh, A. Yamaguchi, T. Kyotani, T. Hanaoka, F. Mizukami, "High-performance bio-sensor with enzymes immobilized on mesoporous membranes: Nanosized pores just corresponding to the size of an enzyme improve the stability of the sensor drastically", *Adv. Porous Mater.*, **4**, 157-165 (2016).
- (2) A. Yamaguchi, K. Nasu, N. Wakaume, Y. Shibuya, J. Kijima, T. Itoh, "Stability of hairpin structure of (CCG)₄ trinucleotide repeats inside amine-functionalized silica mesopores", *Chem. Lett.*, **45**, 1425-1427 (2016).
- (3) T. Suzuki, Y. Shibuya, T. Sato, S. Nishizawa, I. Sato, A. Yamaguchi, "Thermodynamic of complexation between thiourea-based receptor and acetate in water/acetonitrile mixture", *Anal. Sci.*, **32**, 741-744 (2016).
- (4) H. Arafune, A. Yamaguchi, M. Namekawa, Y. Sato, T. Itoh, R. Yoshida, N. Teramae, "Trinucleotide duplex formation inside a confined nanospace under supercooled

conditions”, *Nat. Commun.* **5**, 5151 (2014).

〔学会発表〕(計 13 件)

国内外での学会・学術講演会における招待・特別講演

- (1) A. Yamaguchi, “Optical waveguide spectroscopy for study of biological events inside inorganic nanopores”, PACIFICHEM 2015, Hawaii, 19 Dec. 2015.
- (2) 山口 央, 「アルミナナノ細孔を利用したバイオセンサー」, 第31回ARS足柄コンファレンス, いこいの村あしがら, 2014年11月20日

〔その他〕

ホームページ等

<http://anal.sci.ibaraki.ac.jp/yama/yamalab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 央 (YAMAGUCHI AKIRA)

研究者番号: 10359531

茨城大学・理学部・准教授