

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18719001
 研究課題名（和文） ナノ粒子による長鎖DNAの折り畳み：人工クロマチンモデルの構築
 研究課題名（英文） Long chain DNA folding by nanoparticles: Construction of Artificial Chromatin Model
 研究代表者
 A. A. Zinchenko（ジンチェンコ アナトーリ）
 名古屋大学・大学院環境学研究科・講師
 研究者番号：00432352

研究成果の概要：

細胞内のゲノムDNAはヒストン蛋白質との複合体を形成し、高次構造へ階層的に折り畳まれている。このDNAとヒストンの複合体状態が変化することでDNA遺伝子活性が自然制御されている。本研究では、DNAとヒストンサイズのナノ粒子からなる「人工クロマチン」という単純なモデルを化学的構築し、DNAとナノ粒子との相互作用および自己組織化の制御へアプローチを開発した。そこで、人工クロマチン高次構造と人工クロマチン中のDNAの生物学的活性の関係を明らかにした。人工クロマチン系の展開により、将来の遺伝子治療の新技术としてDNAバイオ活性を化学的制御が可能になると期待されている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	240,000	3,740,000

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料、ナノバイオサイエンス

キーワード：DNA、ナノ粒子、クロマチン、ナノ構造、転写活性、生体模倣モデル、自己組織化、単一分子観察

1. 研究開始当初の背景

細胞内のゲノムDNAはヒストン蛋白質と数十ナノメートルオーダーのコンプレックスを形成し、規則正しい高次構造へ階層的に折り畳まれている。このようなDNAとヒストンのコンプレックス高次構造が変化することでDNA遺伝子活性等が自然制御されている。ヒストンの人工類似体としてシリカナノ粒子を使用することにより、人工クロマ

チンの構築を目指し、本研究は、長い二重鎖DNAの高分子と正帯電シリカナノ粒子(NP)との複合体に形成することで、人工クロマチン(人工染色体)モデルとしての新しい生体模倣ナノ構造システムを開発できると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、二重らせん長鎖DNAとカ

チオン性ナノ粒子と間の反応による、人工クロマチン（人工染色体）モデルとしての新しい生体模倣ナノシステムを組み立てることを目的するものである。また、ナノ粒子とコンプレックスすることによりDNA高次構造変化およびDNAのバイオ活性制御のメカニズムを解明しようとする研究である。

3. 研究の方法

(1) 人工クロマチンモデルは、Figure 1 であるように化学的修飾されたナノ粒子および長鎖DNAから構成されている。10-100 nm のシリカナノ粒子はポリリシンまたはポリメトキシシランにより修飾した。

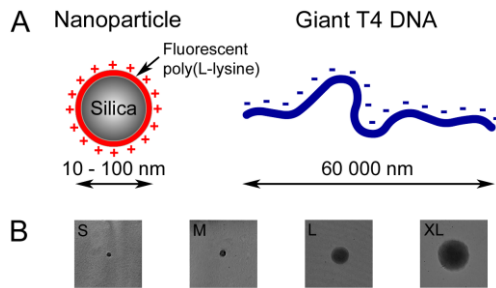


Figure 1. (A) 実験系：カチオン性ナノ粒子とバクテリオファージT4のDNA, 166 kbp; (B) 10-100 nmサイズナノ粒子の電子顕微鏡写真

(2) ナノ粒子とDNAと間の相互作用やコンプレックス形成を主に単一分子レベルにおいて蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡等により観測および解析を行った。

(3) 転写活性は、RNA合成量を蛍光強度の増大で測定する方法（人工ヌクレオチドであるUTP- γ AmNSを使用する方法）を使用し、RNAの蛍光分光測定および蛍光顕微鏡観測を行った。

4. 研究成果

(1) DNA-ナノ粒子相互作用観測。DNAとコンプレックスするナノ粒子は、シリカナノ粒子（直径 10-100 nm）の表面上に正電荷高分子により修飾した。DNA溶液にカチオン性ナノ粒子を付加すると、様々なDNA-ナノ粒子コンプレックスが形成することを単一DNA分子観測した（Figure 2）。ナノ粒子の濃度が上がるとDNAと結語するナノ粒子数が増えており、最終的、全長のDNA鎖がナノ粒子と付着し、コンパクト状のコンプレックスになる。

(2) DNAと結合するナノ粒子のサイズにより、ナノ粒子のDNA凝縮転移効率およびDNA相互作用メカニズムが大きく異なっ

ている。

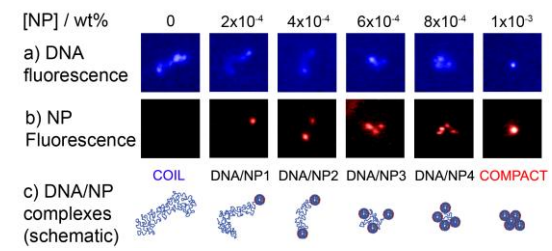


Figure 2. 蛍光顕微鏡観察によりDNA-ナノ粒子コンプレックス形成：(上) DNA蛍光像、(中) ナノ粒子の蛍光像、(下) DNA-ナノ粒子コンプレックスのイメージ

このようなDNA-ナノ粒子コンプレックスの電子顕微鏡観察により、直径 15 nm の小さいナノ粒子に対しては、ナノ粒子との複合体形成によるDNA分子の凝縮は、様々な形態の“beads-on-a-ring”構造の形成を通して進行する（Figure 3a）。

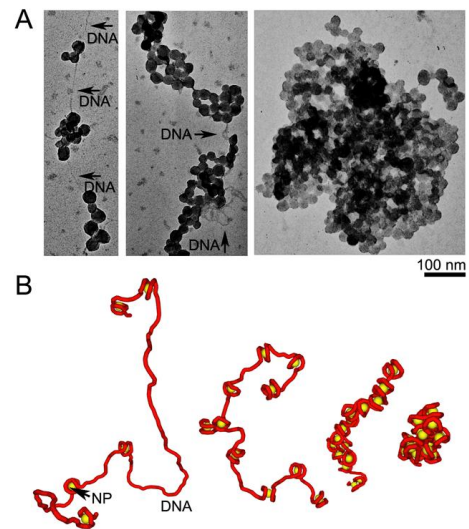


Figure 3. (A) ナノ粒子濃度の上昇によりDNAとナノ粒子コンプレックス形成 (B) 分子シミュレーションによりDNA-ナノ粒子複合体の構造変化

(2) DNA-ナノ粒子相互作用メカニズム。ナノ粒子のサイズにより、DNA-ナノ粒子複合体を三種類に分けられる。

① □大きいナノ粒子の場合(100nm と 40nm)は、DNA鎖がナノ粒子の表面に吸着して、タイプ1 (adsorption) 複合体が形成する。しかし、二重鎖DNAの半屈曲性の高分子であるため、ナノ粒子のサイズが縮小する際に、タイプ1のメカニズムが実現しない。

② □15 nm のナノ粒子の場合は、DNA鎖が

各ナノ粒子の円周線に沿って巻き付け、タイプ2 (wrapping) 複合体が形成する。タイプ2のDNA-ナノ粒子複合体構造が生体クロマチンのナノ構造 (beads-on-a-string) を最も模倣し、同様な物理性質をもつ (塩濃度依存性等)。

③最後に、最も小さいナノ粒子 (10nm) にDNA鎖が巻き付けず、DNA鎖に沿って、DNA鎖上に多数のナノ粒子が集まったようなタイプ3 (collection) 複合体が生成する。

この三つメカニズムの発生が分子動力学計算法により確認された。(Figure 4)

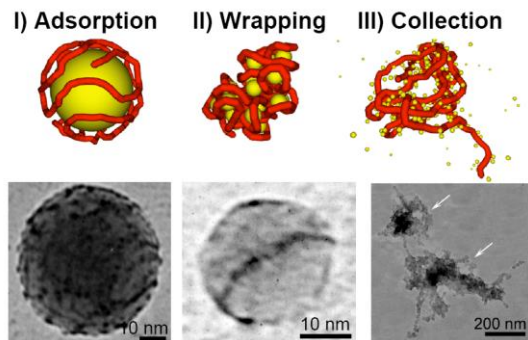


Figure 4. DNA-ナノ粒子相互作用メカニズム: adsorption, collectionとwrapping

人工クロマチン構築について以上の結果の中、最も大事な発見は、DNAが簡単な無機テンプレートと自己組織化により生体ヌクレオソームとよく似ているコンプレックスを形成する (Figure 5)。さらに、約 10 nm ヌクレオソームにおいて実現する wrapping モードが、より大きいナノ粒子 (15-20 nm) の場合も可能であることを明らかにした。

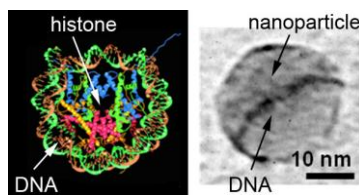


Figure 5. (左) ヌクレオソーム構造と (右) 20 nm の粒子に巻き付いたDNA断片

(3) 1価と2価カチオンがDNA-ナノ粒子相互作用へ与える影響。細胞内、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムのカチオンが重要な役割を果たしており、様々な細胞内の過程へ影響与える。本研究では、DNA・ナノ粒子ナノ構造体の形成効率に影響を与えるファクターの一つとして、Na⁺とK⁺の一価カチオンの影響を調べた。その結果

は、大きいナノ粒子の場合は、ナトリウムとカリウムの影響が同じだったが、小さい (10 nmと15 nm) ナノ粒子の場合は、ナトリウムの溶液ではDNA凝縮がより低い濃度のナノ粒子により起こる。さらに、2価カチオンのMg²⁺とCa²⁺の中も、ナトリウム、カリウムと同じようにより小さいマグネシウムイオンの溶液では、DNA凝縮が起こりやすい。

(4) ナノ粒子表面電荷がDNA-ナノ粒子相互作用に与える影響。人工クロマチンに対して、ナノ粒子の表面電荷影響を調べるために、ナノ粒子の表面を化学的に修飾行って、負荷電シリカナノ粒子から完全に正電荷の修飾されたナノ粒子にかけて、DNAとの相互作用を研究した。ナノ粒子の正電荷は、DNA-ナノ粒子複合体の生成効率へ影響を与え、ナノ粒子の正電荷が上昇すると、DNAの凝縮が少量のナノ粒子によりできます。また、溶液条件等に関係せず、凝縮されたDNAナノ粒子の複合体が負電荷のコンプレックスであり、すなわち、正電荷表面のナノ粒子に過剰量のDNAが吸着する。以上のように、ナノ粒子がDNA鎖で逆電化されることは明らかにした。さらに、ナノ粒子の正味電荷が負の場合においても、ナノ粒子表面上は両電荷があれば、ナノ粒子と負電荷のDNA鎖との反応により、DNA鎖の凝縮が起こる。

次は、10-100 nm サイズのナノ粒子の修飾条件を変えて、ナノ粒子サイズごとに表面電荷が異なる粒子群を合成し、DNA-ナノ粒子相互作用を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡により観察した。表面電荷の低いナノ粒子はDNAとほとんど強い結合しないが、高濃度の条件下はDNAがナノ粒子に折り畳まれる。従って、ナノ粒子の正味電荷が負の場合でも、ナノ粒子の表面上のDNAと結合する機能基がある場合、ナノ粒子がDNAに対して折り畳む働きをすることが明らかになった。より多くカチオン機能基を有するナノ粒子はDNAと結合し、高効率的にDNAを折り畳む。一方は、より高い正電荷のナノ粒子のDNA凝縮効率が減少する。従って、DNA凝縮転移においては、ナノ粒子の最適表面電荷密度があることが分かりました。

(5) ヒストンキラリチの影響。生体内でのDNAを折り畳むヒストンはキラルタンパク質であるが、そのキラリティーの役割はまだはっきり分かっていない。本研究では、キラリティーの役割を明らかにするため、人工クロマチンモデルを用いて検討した。粒子表面をキラルポリリシン (ポリ-L-リシンまたはポリ-D-リシン) で修飾し、粒子表面に

吸着させたポリリシンのキラリティーのみで異なる 100 nm および 10 nm ナノ粒子を合成した。キラルナノ粒子のDNA凝縮効率を調べ、いずれの場合においても、DNA凝縮効率に対してキラリティーの影響が与えられていない。従って、実際のヌクレオソームの場合でも、DNA折り畳み過程へのキラリティー寄与率が低いと考えられる。

(6) DNA-ナノ粒子コンプレックスにおけるDNAのバイオ活性。最後に、DNA-ナノ粒子複合体におけるDNAバイオ活性を調べた。10-40 nm のナノ粒子を用いて、ナノ粒子サイズによりDNA転写活性度を測定及び観察を行った。全種類のナノ粒子が転写活性阻害を及ぼすが、ナノ粒子のサイズにより転写活性阻害の変化が大きく異なる。(Figure 6)

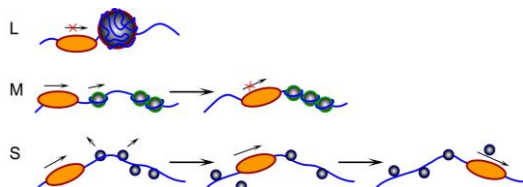


Figure 6. ナノ粒子サイズに依存するDNAポリメラーゼ抑制のメカニズム：L (40nm)、M(15nm)とS(10nm)ナノ粒子とのDNAとコンプレックス

大きいナノ粒子 (L, 40 nm) の場合は、微量付加においてもDNA転写活性を効率的抑制する。より小さいナノ粒子は (M, 15 nm) 閾値濃度まで転写活性へ影響が、高濃度のナノ粒子を付加すると転写活性が完全に阻害される。小さいナノ粒子 (S, 10 nm) の高濃度の条件においても、DNA転写活性がほとんど変化しない。この研究の主な成功としては、ナノ粒子サイズ変化により、DNA転写反応の制御が可能になった。特に、小さいナノ粒子を用いると、生体クロマチンと、同じようにDNAが凝縮する際にも、転写活性が多く残っている。以上のDNA-ナノ粒子複合体 (人工クロマチン) による転写活性制御に関する研究は、Biophysical Journal 誌に掲載されたが (Zinchenko et al. 2007)、同誌において”New and Notable” で取り上げられた (S. Lindsay, “Chromatin Control of Gene Expression: The Simplest Model”, Biophys. J. 92, 1113-1113, 2007))

(7) 結論 本研究の結果により、単純な人工クロマチンの実験モデルが組み立てられた。このようなモデルを展開すれば、人工クロマチンを用いた細胞内のDNAバイオ活性コントロールへ新しいアプローチが見出されると考えられる。

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 8 件、査読あり)

- Hibino K., Yoshikawa Y., Murata S., Saito T., Zinchenko A. A., Yoshikawa K., Na⁺ more strongly inhibits DNA compaction by spermidine (3+) than K⁺, Chem. Phys. Lett. 2006, 426, 405-409.
- Zinchenko A. A., Sakaue T., Araki S., Yoshikawa K., Baigl D., Single-Chain Compaction of Long Duplex DNA by Cationic Nanoparticles: Modes of Interaction and Comparison with Chromatin, J. Phys. Chem. B. 2007, 111, 3019-3031.
- Zinchenko A. A., Luckel F., Yoshikawa K., Transcription of Giant DNA Complexed with Cationic Nanoparticles as a Simple Model of Chromatin, Biophys. J. 2007, 92, 1318-1325.
- Ayoubi M. A., Zinchenko A. A., Philippova O. E., Khokhlov A. R., Yoshikawa K., Visualization of Different Pathways of DNA Release from Interpolyelectrolyte Complex, J. Phys. Chem. B. 2007, 111, 8378-8378.
- Liu L., Takenaka T., Zinchenko A. A., Chen N., Inagaki S., Asada H., Kishida T., Mazda O., Murata S., Yoshikawa K. Cationic Silica Nanoparticles are Efficiently Transferred into Mammalian Cells, 2007 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, 11-14 November, 2007, p. 281-285.
- Huang W.-H., Zinchenko A. A., Pawlak C., Chen Y., Baigl D., Dynamic Conformational Behavior and Molecular Interaction Discrimination of DNA/Binder Complexes by Single-Chain Stretching in a MicroDevice, ChemBioChem 2007, 8(15), 1771-1774.
- Li L., Takenaka T., Zinchenko A., Ning C., Yue M., Yoshikawa, K. A Novel Type Cationic Silica Nanoparticles and its Potential Application in Biomedicine International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering 2008, ICBBE 2008, 16-18 May, 2008, p. 1539-1542.
- Zinchenko A. A., Baigl D, Chen N., Pyshkina O. A., Endo K., Sergeyev V. G., Yoshikawa K. Conformational Behavior of Giant DNA through Binding with Ag⁺ and Metallization, Biomacromolecules 2008, 9, 1981-1987.

〔学会発表〕（計 1 件）

1. ジンチェンコ アナトーリ、「簡単なクロマチンモデルとしてDNA-カチオン性ナノ粒子複合体の形成」、第 38 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（三重・2007 年 11 月）

〔図書〕（計 2 件）

1. Zinchenko A. A., Pyshkina O. A., Lezov A. V., Sergeev V. G., Yoshikawa K. Single DNA molecules: Compaction and decompaction. in DNA Interactions with Polymers and Surfactants, ed. Lindman B., Dias R., Willey-VCH, 2008, 59-88.

2. Zinchenko A. A., Baigl D., Yoshikawa K. “Nanostructures and organizations of compacted single chains of polyelectrolytes” (Chapter 17) in Polymeric nanostructures and their applications, Ed. Nalwa H. S., American Scientific Publishers, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ジンチェンコ アナトーリ (Anatoly Zinchenko)

名古屋大学・大学院環境学研究科・講師
研究者番号：00432352