

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19760557

研究課題名（和文） 特殊な分子環境で行われる核酸の分子認識と構造形成の解明

研究課題名（英文） Molecular recognition and structure formations of nucleic acids under unusual molecular environments

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・准教授

研究者番号：70340908

研究成果の概要（和文）：

バイオテクノロジーでは DNA が様々な状況下で利用されるが、細胞やバイオチップ表面という特殊な環境下で DNA の機能をいかに高めるかがバイオテクノロジーを成功に導く要である。本研究では、周辺環境が DNA と RNA に大きな影響を与え、特殊な環境下では遺伝子発現の制御に関わる DNA 構造体が形成されることや、RNA の酵素活性が向上することなどが見出された。この成果は、バイオテクノロジーで利用される DNA と RNA の設計に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：

DNA is widely used in biotechnology, and the DNA properties under unusual conditions, such as in living cells and on biochips, are the critical issue for the success of biotechnology. Due to the polyelectronic nature of DNA and RNA, significant influences of molecular environment on their functions, including molecular recognitions and structure formations, are expected. Here, we have found facilitations of unusual structure formations of DNA relevant to gene regulations, and enhancements of the catalytic activity of an RNA enzyme. These finding could lead to applications as monitoring molecular environment and design of functional oligonucleotides that efficiently function under unusual conditions applied for biotechnology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,900,000	0	1,900,000
20年度	500,000	150,000	650,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：核酸化学

科研費の分科・細目：分科：プロセス工学 細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：分子クラウディング、ポリエチレングリコール、金属イオン、DNA 構造、ヘアピン構造、ハンマーヘッドリボザイム、結合エネルギー

## 1. 研究開始当初の背景

生体分子を利用した機能性材料は、工学、化学、医学、薬学などで用いられるテクノロジーで高い注目を集めている。とくに、核酸がもつ高い分子認識能力は、遺伝子発現制御や遺伝子診断などの医療関連分野だけでなく、分子センサーやナノ構造体などの分子材料開発にも利用されるようになった。しかし、*in vitro* 実験系（均一希薄水溶液を用いた実験系）で高評価を得た DNA 分子を、テクノロジー分野に利用しても望みの機能が発揮されないことも多い。これは細胞への導入や材料化によって、核酸の分子環境が大きく変わってしまうことが主要因であると考えられる。例えば、核酸を使った DNA チップや分子センサー開発では、無機、あるいは有機材料表面に核酸分子が固定化される。これにより、核酸分子は高密度に混み合った状況（分子クラウディング）となり、核酸分子の運動性が大きく制限されるとともに、水溶液中と比べて誘電率や水の活量が低い分子環境で核酸が機能することになる。また、遺伝子発現制御や細胞内分子センシングを目的とした機能性核酸を設計する場合、全体積の 30～40% が生体分子に占有された細胞内部の分子環境による影響を考慮する必要がある。このような *in vitro* とは大きく異なった分子環境では、核酸の分子間相互作用が大きく変化してしまうことが知られているものの、その複雑性のため、分子環境に着目して核酸の分子認識や構造形成を解明する研究はほとんど行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究開始前に我々は、ポリエチレングリコール (PEG) などの中性分子を用いて分子クラウディング環境を再現し、分子環境が DNA 構造の安定化エネルギーを大きく変化させることを報告していた。本研究は、定量解析が可能なこのモデル実験系を使って、分子環境の変化による DNA および RNA 機能への影響を定量的に明らかにすることを目指した。

核酸の構造安定性が分子環境の影響を大きく受けることを利用して、本研究では、分子環境に応答する機能性核酸の設計も目標に掲げた。具体的には、分子環境に応じて構造変化する DNA および RNA 配列を開発し、その塩基配列を基に設計される“構造安定性が厳密にコントロールされた核酸分子群”を得る。そして、この分子群をセンシング分子として利用することで、DNA と RNA に対する分子環境効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 研究に用いたオリゴマー DNA と RNA は固相合成法、あるいは酵素合成法を利用して得た。核酸構造と構造安定性の測定には、UV 分光光度計システム、円二色性分散計、電子スピン共鳴測定装置、ゲル電気泳動法による定量化手法などを用いた。塩基対の形成・解離速度は、温度ジャンプ法に基づくデータ解析によって得た。

(2) 分子クラウディング環境を再現できる実験系として、高濃度の中性溶質（高分子 PEG、低分子 PEG、多糖鎖、アルコール類、エチレングリコール類縁体など）を溶解させた水溶液を用いた。溶質の種類や分子量、濃度を変えることで溶液環境が変化し、必要に応じてカチオン（金属イオン、ポリアミン、塩基性ペプチド）やアニオン性分子（ヌクレオチド誘導体、酸性アミノ酸など）を共存させた。核酸に対する分子環境効果を決定する因子（エントロピーエネルギー、誘電率、水の活量など）の特定を図るために、核酸構造の熱力学的安定性、溶液の誘電率・浸透圧・粘度測定を行った。

(3) ハンマーヘッドリボザイムは、マグネシウムイオン存在下で基質 RNA を切断する RNA 酵素の一つである。5'末端をフルオロセインでラベル化した基質 RNA を使って、マグネシウムイオン存在・非存在下におけるリボザイムによる基質 RNA の切断反応速度を追跡した。反応の経時変化はポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べ、フルオロイメージャーによるゲルの画像解析から反応速度、あるいは反応速度定数定数を算出した。

## 4. 研究成果

(1) 特殊な分子環境における核酸の構造と構造安定性の検討

PEG などの中性分子を高濃度（数十重量パーセント）で溶解させた溶液を使って分子クラウディング環境を再現し、様々な核酸構造とその熱力学的安定性を系統的に調べた。その結果、分子クラウディング環境は DNA と RNA の塩基対構造に大きな影響を与えない一方で、構造安定化エネルギーは大きく変化させることが見出された (*Mol. BioSyst.*, **2008**, *4*, 579-588)。さらに、塩基配列によっては Z 型構造への二次構造遷移が誘起されたり (図 1)、四重鎖構造 (i-モチーフ構造) が中性 pH で形成されることも明らかになった (*Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 1299)。細胞では重要な働きを担っているが、通常の水溶液中では形成されにくいこれらの DNA 構造体が、分子ク

クラウド環境では安定に存在できるという知見は、細胞内分子環境が核酸機能や遺伝子発現を決定する重要な要因であることを示唆するものとして興味深い。

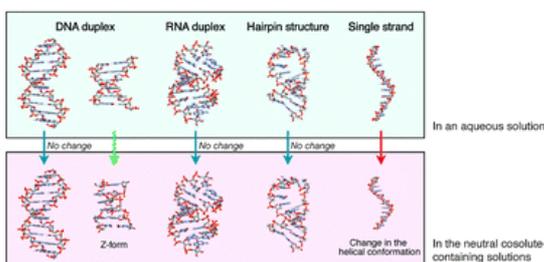


図1 分子環境の変化に伴って生じる核酸構造の変化

分子クラウド環境において、DNAの構造安定性を決定する相互作用因子についても検討を行った。PEGはヌクレオチドと直接的な相互作用をするとは考えにくい。そこで、共存物質の影響を系統的に調べた結果、DNAの構造安定性を決定する主たる相互作用因子として、ヌクレオチドに結合するカチオンと水和水の重要性を明らかにした (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2007**, *80*, 1987)。さらに、熱力学的な検討だけでなく、DNAの構造形成と解離に対する速度論的な影響についても調べ、PEGが及ぼす核酸構造の熱力学的・速度論的な知見も得られた (*Chem. Commun.*, **2007**, 2750)。

## (2) DNA—カチオン相互作用を簡便に検出できる実験系の構築と分子環境効果の検討

一般に、核酸の構造形成には金属イオンの結合が不可欠である。このため、分子クラウド環境がDNAと金属イオンの相互作用に及ぼす影響を明らかにしておく必要がある。金属イオンは主にDNAリン酸近傍に結合するが、比較的弱い結合力のため定量的な測定は容易ではない。そこで、我々はまず、ヘアピンDNAの性質を利用してDNA塩基対とカチオンの結合を簡便に調べることができる実験系を構築した。これは、自己相補的配列DNAの二量化反応が、ループ部位への金属イオンの結合に伴うエネルギーレベルの変化によってもたらされることを利用した新しい手法である (図2)。この実験系では、ゲル電気泳動実験によってDNAと金属イオンの結合力を簡便に調べることができ、細胞内に存在する様々なカチオン (金属イオン、ポリアミン、塩基性ペプチド) のとDNAの結合エネルギーを評価することに成功した (*Chem. Commun.*, **2008**, 700)。

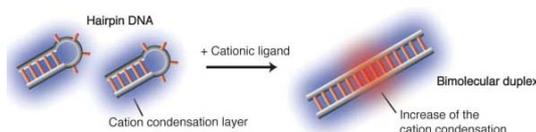


図2 DNAとカチオンの結合反応を簡便に検出できる実験系

次に、この実験系をDNAとカチオンの結合反応に対する分子環境効果を調べるために利用した。まず、分子環境の変化に応答するヘアピンDNAの構築を試みた (*Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 486-494)。ヘアピン構造はループ配列や鎖長、あるいは非塩基対部位の導入によって構造体の安定性をコントロールできるという利点がある。様々な塩基配列を検討した結果、金属イオン (ナトリウムイオン) 濃度あるいは分子環境の変化 (PEGの添加) に応答して構造変化するヘアピンDNA配列を得ることができた。このDNAを用いて検討したところ、PEG存在下では金属イオンとの結合が起こりやすくなることが示唆された。

## (3) 構造安定性が厳密に制御された核酸分子群の創製

DNA—カチオン相互作用に対するPEG効果の一般性を明らかにするために、多様な構造安定性をもつヘアピンDNA分子群の開発を試みた。ヘアピンDNAがもつ分子環境変化への応答領域 (ダイナミックレンジ) が、ループ配列と鎖長を変えることで簡単に調整することができる。様々な塩基配列を検討した結果、構造安定性が厳密にコントロールされたヘアピン分子群を得ることができた (*Chem. Commun.*, **2008**, 700)。さらに、DNA配列設計技術に基づいて、ヘアピンRNA分子群の取得にも成功した。

そこで、DNAおよびRNA分子群を用いて、細胞内部に特徴的な分子クラウド環境、カチオン性分子が共存する環境、あるいはアニオン性分子が共存する環境下における核酸構造と機能を検討した。これらの分子群に含まれるDNAおよびRNAは構造安定性が少しずつ異なるため、金属イオンやカチオン性分子に対して異なる応答領域 (ダイナミックレンジ) を示す。分子群の中から各種カチオン (一価金属イオン、二価金属イオン、ポリアミン、塩基性ペプチドなど) の結合測定に適した塩基配列を選び、PEGや多糖類の添加に伴うカチオン結合の変化を検討した。その結果、DNAとRNAともに高分子PEGを用いた場合に顕著な結合エネルギーの増大が観測され、分子クラウド環境ではヌクレオチドへのカチオンの結合が高められることが明らかになった (*Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2009**, *53*, 519-520)。

(4) ハンマーヘッドリボザイムの酵素活性に及ぼす影響

ヌクレオチドと金属イオンの結合性が分子環境によって大きく変化することが明らかになったことから、さらにハンマーヘッドリボザイムを用いた検証を行った。このリボザイムに関しては立体構造と反応機構が詳しく調べられており、マグネシウムイオン存在下で基質 RNA の切断活性を示すことが知られている。リボザイム活性が RNA のマイクロスコピックな金属イオン濃度と pH に敏感であることを利用して、RNA 加水分解反応の速度論的解析によって、分子クラウディングが及ぼす金属イオン濃度と pH への影響を明らかにする試みを行った。

PEG や多糖類、アルコール誘導体などの中性共存溶質によってリボザイム活性は数倍～数千倍に向上し、RNA とマグネシウムイオンの結合エネルギーが PEG によって高められることがその原因であることを見出した (*J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 16881)。さらに、活性構造の安定化、低マグネシウムイオン濃度下での活性の維持、ミスフォールディングの抑制効果なども見られ (図 3)、ハンマーヘッドリボザイムの活性は PEG の添加によって大きく向上することを明らかにした。また、共存するアニオン性分子 (塩基性アミノ酸、アデニンヌクレオチドなど) の影響についても調べたところ、アニオン性分子によって低下したリボザイム活性が、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。これらの結果は、特殊環境におけるリボザイム活性に関する知見を与えるとともに、細胞内部で機能する機能性核酸の設計に役立つと期待される。また、リボザイム反応を高めるための添加剤としての PEG の利用が考えられる。

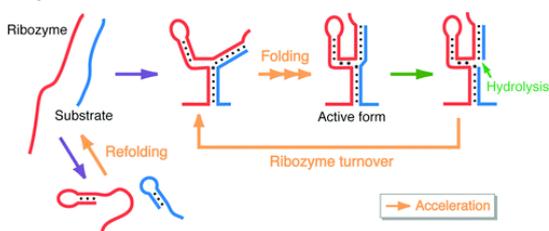


図3 ハンマーヘッドリボザイムが触媒する基質 RNA 切断反応に対する PEG の効果

以上のような化学の立場から分子環境効果を数値化し、特殊環境下でも有効に機能する DNA あるいは RNA の設計のための指標となるデータは分子環境効果の解明にとどまらず、医療分野や工学分野、そして生物機能解明にも役立つことが期待される。

## 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 10 件)

① Molecular crowding of the cosolutes induces an intramolecular i-motif structure of triplet repeat DNA oligomers at neutral pH.

A. Rajendran, S. Nakano, and N. Sugimoto *Chem. Commun.*, 46, 1299-1301 (2010) 査読有

② Facilitation of RNA enzyme activity in the molecular crowding media of cosolutes.

S. Nakano, H. T. Karimata, Y. Kitagawa, and N. Sugimoto

*J. Am. Chem. Soc.*, 131, 16881-16888 (2009) 査読有

③ Conformation and the sodium ion condensation on DNA and RNA structures in the presence of a neutral cosolute as a mimic of the intracellular media.

S. Nakano, L. Wu, H. Oka, H. T. Karimata, T. Kirihata, Y. Sato, S. Fujii, H. Sakai, M. Kuwahara, H. Sawai, and N. Sugimoto

*Mol. BioSyst.*, 4 (Emerging investigators issue), 579-588 (2008) 査読有

④ Capture of cationic ligands bound diffusely to base pairs during the DNA refolding.

S. Nakano, T. Kirihata, and N. Sugimoto *Chem. Commun.*, 700-702 (2008) 査読有

⑤ Effects of polyethylene glycol on a DNA duplex stability differed by the NaCl concentration.

H. Karimata, S. Nakano, and N. Sugimoto *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 80, 1987-1994 (2007) 査読有

⑥ Influence of cationic molecules on the hairpin to duplex equilibria of self-complementary DNA and RNA oligonucleotides.

S. Nakano, T. Kirihata, S. Fujii, H. Sakai, M. Kuwahara, H. Sawai, and N. Sugimoto *Nucleic Acids Res.*, 35, 486-494 (2007) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① 生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果  
(3) 核酸に対する分子環境効果を調べるためのモデル研究

中野修一・平山英伸・北川雄一・杉本直己  
日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、  
近畿大学

② Investigations of the cation binding to nucleotides by monitoring the hairpin-duplex

equilibrium of a self-complementary sequence.

S. Nakano, H. Hirayama, and N. Sugimoto

第 6 回国際核酸化学シンポジウム (第 36 回核酸化学シンポジウム)、2009 年 9 月 29 日、岐阜

③ RNA の機能に及ぼす中性溶質の影響

中野修一・北川雄一・平山英伸・杉本直己

第 32 回溶液化学シンポジウム、2009 年 11 月 18 日、新潟

④ Nucleic acid interaction revisited: Cation and water binding to nucleotides.

中野修一・杉本直己

日本化学会第 89 会春季年会 (アジア国際シンポジウム)、2009 年 3 月 29 日、日本大学

⑤ 分子クラウディング環境によってもたらされる核酸とカチオンの結合性の向上とその生物学的意義

中野修一・桐畑俊正・平山 英伸・杉本直己

第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008 年 9 月 18 日、東京工業大学

⑥ DNA and RNA structures in the presence of a neutral cosolute.

中野修一・Lei Wu・岡裕人・狩俣寿枝・桐畑俊正・佐藤雄一・藤井敏司・酒井宏・桑原正靖・澤井宏明・杉本直己

Gordon Research Conference on Nucleic Acids、2008 年 6 月 5 日、Newport, RI, USA

[図書] (計 3 件)

① 第一節 DNA チップの基礎 1 ハイブリダイゼーション

杉本直己・中野修一

バイオチップ実用化ハンドブック (金子周一、堀池靖浩 監修、エヌティーエス) 13-19 (2010)

② 生体シグナル解析用の機能性核酸センサーの定量的デザイン

中野修一・杉本直己

シングルセル解析の最前線 (神原秀記、松永是、植田充美 監修、シーエムシー出版) 9-16 (2010)

③ Chapter 8. Energy of Nucleic Acid Self-Assemblies: From Sequence to Function through Structure.

S. Nakano and N. Sugimoto

Bottom-up Nanofabrication: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films (Eds. By K. Ariga and H. S. Nalwa, American Scientific Publishers), Vol. 3, pp. 191-215 (2009)

[その他]

ホームページ等

<http://www.konan-first.jp/database/search.php>

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・准教授

研究者番号：70340908

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし