

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21245040

研究課題名（和文） 細胞内分子環境で機能する新規核酸マテリアル創製

研究課題名（英文） Development of novel nucleic acid materials that efficiently work in the intracellular molecular environment

研究代表者

杉本 直己（SUGIMOTO NAOKI）

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：60206430

研究成果の概要（和文）：分子クラウディングのモデル実験系を構築することで、細胞で行われる相互作用や化学反応の橋渡しとなる定量データを取得し、核酸の構造と機能に対する分子環境効果を化学的に解明する試みを行った。こうして得られたデータに基づいて、分子環境効果を利用した機能性核酸の開発とその機能解析を行い、細胞反応を理解するための新規実験系や、細胞内部のような特殊環境で機能する種々の核酸マテリアルを開発することに成功した。

研究成果の概要（英文）： We studied nucleic acid interactions and reactions by using a model experimental system that mimics the intracellular molecular environment. This research provided quantitative insights into influences of the molecular crowding medium on nucleic acid folding, a ribozyme activity, and interactions with proteins and peptides. It is supposed that these data can bridge the gap between the results obtained *in vitro* and in cells. Based on results regarding the effects of molecular environment, we developed novel nucleic acid materials and sensing methods that efficiently work under unusual conditions such as in living cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	19,100,000	5,730,000	24,830,000
2010 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2011 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
年度			
年度			
総計	37,200,000	11,160,000	48,360,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸、四重鎖構造、相互作用エネルギー、リボザイム、分子クラウディング、ポリエチレングリコール

1. 研究開始当初の背景

細胞内で使用できる機能性分子や、細胞内分子センシングシステムの開発には、細胞内環境における分子の物理化学的な特性、とくに生命分子の高次構造と相互作用エネルギー

の評価が重要な研究課題となる。通常、*in vitro* 実験で用いられるのは分子濃度 1 g/L 以下の希薄水溶液である。ところが、細胞内部は様々な生命分子が非常に高密度（数百 g/L）に密集した分子クラウディング状態にある。

このような特殊な分子環境において生命分子がどのような振る舞いをするのかは明らかではなく、*in vitro*実験の結果だけで細胞での挙動を予測することは極めて困難である。細胞で利用できる新規核酸マテリアルを開発するには、細胞環境の影響を分子クラウディングという化学的側面から検討し、細胞内での核酸の挙動を予測する方法が必要とされていた。

2. 研究の目的

核酸マテリアルが機能を発揮する特殊な分子環境として、最も応用範囲が広いのは細胞内環境であろう。しかしながら、細胞内での相互作用を実測するための実験系は多いものの、定量的な情報を与えることができる実験系は少ない。細胞内部で利用できる機能性核酸マテリアルを開発するには、細胞の特殊な分子環境が生体分子に及ぼす影響を分子レベルで解明し、分子環境効果を化学的に解明しておく必要がある。本研究では、DNAおよびRNAの構造と機能に対する細胞環境効果、とくに分子クラウディングの化学的側面を明らかにすることで、核酸を使ったナノバイオテクノロジー開発に有用な新規核酸マテリアルの創製を試みた(図1)。

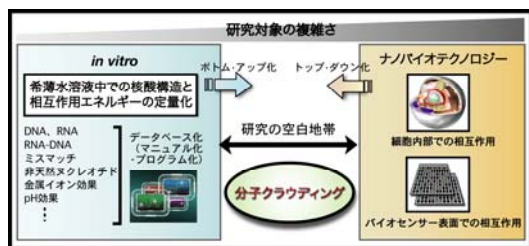


図1. 分子クラウディング研究による *in vitro* 研究とナノバイオテクノロジー研究の橋渡し

3. 研究の方法

核酸の相互作用エネルギーデータを得るために、分子クラウディング環境のモデル実験系を構築した。ポリエチレングリコール(PEG)以外にも、様々な水溶性高分子や有機化合物を広く検討することで、分子間相互作用の立場から分子クラウディング効果を解明する試みを行った。オリゴマー核酸(DNAとRNA)が形成する様々な高次構造とその熱力学的安定性に対する分子クラウディング効果を調べるとともに、長鎖核酸が形成する構造体や修飾核酸の検討も行った。主に、分光学的な測定とゲル電気泳動による解析手法を用いることで核酸の相互作用エネルギーを取得した。

4. 研究成果

(1) 短鎖・長鎖DNAが形成する特殊構造体に及ぼす影響

DNAが形成する逆平行型二重らせん、平行型二重らせん、三重らせん構造の熱力学的安定性を、希薄溶液と分子クラウディング溶液で比較した。その結果、分子クラウディングは、ワトソクリック塩基対を不安定化させるのに対し、フーグスティーン塩基対を安定化させることが見出された。さらに、核酸の高次構造中に頻出する枝分かれ構造に及ぼす影響を調べたところ、3本の二重らせんが連結する枝分かれ構造は、分子クラウディング環境では安定化することが示された。このことを利用すると、分子内で形成される枝分かれ構造と分子間の二重らせん構造の間の構造遷移を制御できることもわかった。また、四重鎖の構造体である*i*-motif構造に対しても分子クラウディングは安定化効果をもたらした。DNA塩基の pK_a (酸解離定数)の変化が安定化の主な要因であることも明らかにした。この他にも、DNAとRNAが形成する四重らせん構造に対する分子クラウディングの効果や、化学修飾されたDNA鎖が形成する構造安定性に及ぼす分子クラウディングの環境因子の効果などについても明らかにした。

(2) 細胞内分子環境で機能する核酸マテリアルの創製

(1)の結果から、核酸の高次構造の形成エネルギーや、金属イオンとの結合性が分子環境の影響を大きく受けることが考えられた。そこで、ハンマーヘッド型のリボザイム(RNA酵素)を用いた検討を行った。このリボザイムは比較的小さく、マグネシウムイオン濃度依存的に基質RNAを高効率で位置選択的に加水分解できることから、遺伝子発現の人工制御やバイオセンサーマテリアルとしての利用が期待されている。リボザイム活性は希薄溶液中よりも分子クラウディング環境の方が高く、低マグネシウムイオン濃度における高い酵素活性、至適温度の上昇、ターンオーバー数が増大するといった現象が見出された。さらに、リボザイムが活性化するのに必要なマグネシウムイオン濃度が、分子クラウディング環境下ではおよそ1/10にまで低下することも明らかにした。この結果は、細胞環境ではRNAは効率よく金属イオンと結合できることを示唆しており、分子環境によってリボザイム活性や核酸の構造形成反応を制御できることが明らかになった。

一方で、細胞で効率よく機能発現する新規リボザイムの*in vitro*選択を行った。その結果、細胞内の塩濃度条件で、アミノ酸を補酵素とする自己切断RNA分子を得ることができた。得られた自己切断RNAの機能評価を行ったところ、数十mMのアミノ酸存在下で、ハンマーヘッド型リボザイムと同程度の反応速度定数で自己切断することがわかった。この自己切断RNAは二価金属イオンを必要としない新

たな機構で切断反応が進行していることも明らかとなった。この他にも、相互作用エネルギーデータに基づいて、DNAやRNAが形成する高次構造とその熱力学的安定性を制御することで、細胞外で有用なナノ構造体や、細胞内で遺伝子発現を制御できるリボスイッチとして機能する分子なども開発することができた。

(3) タンパク質との相互作用を定量化するための実験系の構築

細胞の核と細胞質に特徴的な分子環境効果を明らかにするために、核酸とタンパク質の相互作用に与える影響について検討を行った。核DNAの分子環境として、ヒストンタンパク質が及ぼす効果について調べた。ヒストンタンパク質のDNA結合部位として知られているN末端部位（ヒストンテール）のモデルペプチドを化学合成し、DNAの構造安定性に及ぼす効果を検討した。その結果、ヒストンペプチドは、三重らせん構造や四重らせん構造のような特殊構造を安定化することがわかった。一方で、二重らせん構造の熱力学的安定性にはほとんど影響を及ぼさなかったことから、分子クラウディング効果とヒストンタンパク質との結合による効果によって、核内においては、DNAの非標準構造が強く安定化されていることが示唆された。

タンパク質とRNAの結合は、細胞の遺伝子発現の起点になる相互作用である。そこで、人工的な化合物を用いて、遺伝子発現を制御可能にする新規な機能性核酸マテリアルの構築を試みた。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）由来のTatタンパク質は、HIV mRNAの転写における初期段階で産生されるTAR-RNAに対して相互作用し、mRNAの転写反応を大きく促進させる。そこで、TAR-RNAに対して、低分子の化合物（テオフィリン）を認識するRNA配列（アプタマー）を付加した人工RNAを設計した。設計した人工RNAとTatとの相互作用は、テオフィリンの濃度依存的に抑制されることが*in vitro*での実験から示され、ヒト細胞内でのテオフィリンによる遺伝子発現の抑制を可能にした。この成果は、細胞内での核酸と化学物質との相互作用を評価する実験システムとしても利用可能である。

細胞質のタンパク質-RNA相互作用を解析するための実験系として、*in vitro*と*in vivo*双方で非常に安定な高次構造を形成するRNA分子の構築も試みた。相互作用エネルギーを簡便に定量化できる実験系を構築するために、RNAの二次構造形成の核として利用可能な2種類の熱安定なペンタループに関して詳細な熱力学的解析を行い、二次構造予測のためのパラメータを算出した。熱力学的安定性を算出した安定な5塩基ループ構造（boxBへアピン）は、生体内でタンパク質と特異的に相互作用をすることが知られていることから、生体内

での相互作用解析に適している。そこで、ここで算出されたパラメータを用いてmRNAの構造を予測し、生体内でboxBへアピンループ構造を形成する非翻訳領域（boxB領域）の塩基配列を設計した。このboxB領域配列を利用して、大腸菌内で新規機能性核酸を選択するための、細胞内相互作用解析系の構築を試みた。まず、細胞内でのタンパク質-RNAの複合体形成によって転写終結阻害が起こるλファージ由来のNタンパク質-boxB RNAの系をベクターへ組み込んだ。Nタンパク質を発現する制御プラスミドDNAと、レポータータンパク質mRNAの5'非翻訳領域にboxB領域配列を組み込んだレポータープラスミドDNAを構築した。レポータープラスミドDNAのboxB配列下流に蛍光ルシフェラーゼを導入した。ルシフェラーゼタンパク質の発現量は、mRNA量をリアルタイムPCRで、タンパク質量を酵素活性で定量化することで、細胞内におけるアルギニンリッチモチーフとRNAペンタループの相互作用を評価できる実験システムを構築した。

(4) バイオセンシングマテリアルの創製

分子環境の違いが与えるタンパク質-核酸相互作用への影響を評価するために、上記のboxB RNAとアルギニンリッチモチーフを用いてその結合性を測定した。希薄溶液（蛍光消光を指標とした滴定実験）、バイオセンサー表面（BIAcore）、大腸菌内のそれぞれで得られた相互作用エネルギーを比較したところ、天然型のNタンパク質モデルペプチドおよび変異型ペプチドのいずれも、直接算出される結合定数は測定系ごとに異なっていた。ところが、boxB RNAに対する天然型と変異体の親和性の違いを結合に伴う自由エネルギーの差（ ΔG° ）として表すと、その値はどのような測定系においてもほぼ一致することが見出された。つまり、大腸菌内での相互作用解析系で得られた $\Delta\Delta G^\circ$ の値と、溶液中あるいは固相上の*in vitro*実験で得られた $\Delta\Delta G^\circ$ は近い値となった。このことから、分子環境が希薄溶液から細胞環境、あるいは液相から固相に変わっても、タンパク質-核酸の相対的な親和性は維持されており、希薄溶液を使ってこれまで蓄積されてきた相互作用データを適切に補正することで、細胞環境やバイオセンサー表面での相互作用を予測できるものと考えられる。

バイオセンサーで行われるタンパク質-DNA相互作用に対する分子クラウディング効果に着目した研究も行った。バイオセンサーとして広く用いられるDNAチップの利便性を向上させることを目的として、固相表面における分子クラウディング効果の影響について検討を行った。ここでは、DNA mismatches結合タンパク質であるMutSを使った、DNA mismatches検出のためのDNAチップを作製した。MutSは約90 kDaという大きなサイズであり、MutSがDNAと

結合するには、その周辺に十分なスペースが確保されている必要がある。2種類のDNA混合溶液を使った新規手法を用いると、チップ表面における分子クラウディング状態を容易にコントロールできることが示され、このDNAチップを用いると、MutSによるDNAミスマッチ検出の感度と応答速度が改善された。こうして作製されるDNAチップは繰り返し利用が可能であり、MutS以外の様々なDNA結合タンパク質の結合解析やバイオセンシングに利用できると考えられる。

(5) 本研究成果の波及効果

分子クラウディング環境における核酸の構造と機能を化学的に解明するという試みは世界的にも前例がなく、分子クラウディング実験系とその評価系を構築し、*in vitro*と細胞における核酸構造と相互作用エネルギーの違いを定量的に解明する試みはとても重要である。本研究で構築した細胞内相互作用解析系から得られる定量データは、これまで蓄積されてきた膨大な希薄溶液と細胞データの橋渡しとなるもので、細胞で行われる相互作用の実態を知り、予測するための手法を与えるものになる。

本研究成果は、細胞機能の解明にとどまらず、医療分野や工学分野でも必要とされており、社会的インパクトが非常に高いものである。核酸化学や分子生物学などの基礎研究分野から、核酸医薬や機能性ナノマテリアル開発までの幅広い領域への波及効果が期待される。本研究では世界に先駆けて核酸の分子物性に対する分子環境効果の重要性を提唱し、現在では、米国、中国、ドイツ、シンガポールなど世界中の研究者が参画する新しい研究分野を開拓するに至り、今後さらなる研究の進展が期待される。

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 27 件)

- ① L. Feng, L. Wu, J. Wang, J. Ren, D. Miyoshi, N. Sugimoto, and X. Qu
Detection of a prognostic indicator in early-stage cancer using functionalized graphene-based peptide sensors.
Adv. Mater., 査読有, 24, 2012, 125-131.
DOI: 10.1002/adma.201103205
- ② X. Wang, L. Wu, J. Ren, D. Miyoshi, N. Sugimoto, and X. Qu
Label-free colorimetric and quantitative detection of cancer marker protein using noncrosslinking

aggregation of Au/Ag nanoparticles induced by target-specific peptide probe.

Biosensors and Bioelectronics, 査読有, 26, 2011, 4804-4809.

DOI: 10.1016/j.bios.2011.06.012

- ③ S. Nakano, T. Kanzaki, M. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto

Measurements of the binding of a large protein using a substrate density-controlled DNA chip.

Anal. Chem., 査読有, 83, 2011, 6368-6372.

DOI: 10.1021/bi200477g

- ④ J. Bhattacharyya, S. Maiti, S. Muhuri, S. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto

Effect of locked nucleic acid modification on thermal stability of non-canonical DNA structure.

Biochemistry, 査読有, 50, 2011, 7414-7425.

DOI: 10.1021/bi200477g

- ⑤ M. Tokui, T. Yamauchi, D. Miyoshi, H. Kamiya, A. Nishimura, and N. Sugimoto

Rational design of a new IMP aptamer based on a TPP riboswitch and a hypoxanthine aptamer.

Chem. Lett., 査読有, 40, 2011, 1313-1314.

DOI: 10.1246/cl.2011.1313

- ⑥ S. Nagatoishi, D. Miyoshi, and N. Sugimoto

Effects of protein binding on DNA G-quadruplex structures.

Int. Rev. Biophys. Chem., 査読有, 2, 2011, 129-134.

http://www.praiseworthyprize.com/IREBIC-latest/IREBIC_vol_2_n_4.html#Effects_of_protein_binding_on_DNA_G-quadruplex_structures

- ⑦ T. Endoh and N. Sugimoto

Gene regulation system with an artificial RNA switch operating in human cell.

ChemBioChem, 査読有, 12, 2011, 1174-1178.

DOI: 10.1002/cbic.201100093

- ⑧ S. Pramanik, K. Nakamura, K. Usui, S. Nakano, S. Saxena, J. Matsui, D. Miyoshi, and N. Sugimoto

Thermodynamic stability of Hoogsteen and Watson-Crick base pairs in the presence of histone H3-mimicking peptide.

Chem. Commun., 査読有, 47, 2011, 2790-2792.

DOI: 10.1039/C0CC05776B

- ⑨ S. Saxena, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Sole and stable RNA duplexes of G-rich sequences located in the 5' -untranslated region of protooncogenes.
Biochemistry, 査読有, 49, 2010, 7190-7201.
DOI: 10.1021/bi101093a
- ⑩ D. Zhang, T. Fujimoto, S. Saxena, H. Yu, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors.
Biochemistry, 査読有, 49, 2010, 4554-4563.
DOI: 10.1021/bi1002822
- ⑪ K. Dutta, T. Fujimoto, M. Inoue, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Development of new functional nanostructures consisting of both DNA duplex and quadruplex.
Chem. Commun., 査読有, 46, 2010, 7772-7774.
DOI: 10.1039/C0CC00710B
- ⑫ H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Anionic phthalocyanines targeting G-quadruplexes and inhibiting telomerase activity in the presence of excessive DNA duplexes.
Chem. Commun., 査読有, 46, 2010, 5740-5742.
DOI: 10.1039/C0CC00956C
- ⑬ X. Wang, J. Geng, D. Miyoshi, J. Ren, N. Sugimoto, and X. Qu
A rapid and sensitive "add-mix-measure" assay for multiple proteinases based on one goldnanoparticle-peptide-fluorophore conjugate.
Biosensors and Bioelectronics, 査読有, 49, 2010, 743-747.
DOI: 10.1016/j.bios.2010.06.046
- ⑭ X. Wang, C. Wang, K. Qu, Y. Song, J. Ren, D. Miyoshi, N. Sugimoto, and X. Qu
Ultrasensitive and selective detection of a prognostic indicator in early-stage cancer using graphene oxide and carbon nanotubes.
Adv. Funct. Mat., 査読有, 20, 2010, 3967-3971.
DOI: 10.1002/adfm.201001118
- ⑮ Y. Sasaki, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Utilization of salmon milt DNA against UV damage.
Applied Biochem. Biotech., 査読有, 160, 2010, 4554-4563.
DOI: 10.1007/s12010-009-8697-6
- ⑯ S. Nakano, H. Oka, Y. Uotani, K. Uenishi, M. Fujii, and N. Sugimoto
Stacking interaction in the middle and at the end of a DNA helix studied with non-natural nucleotides.
Mol. BioSyst., 査読有, 6, 2010, 2023-2029.
DOI: 10.1039/C0MB00002G
- ⑰ A. Rajendran, S. Nakano, and N. Sugimoto
Molecular crowding of the cosolutes induces an intramolecular i-motif structure of triplet repeat DNA oligomers at neutral pH.
Chem. Commun., 査読有, 46, 2010, 1299-1301.
DOI: 10.1039/B922050J
- ⑱ S. Nakano, H. T. Karimata, Y. Kitagawa, and N. Sugimoto
Facilitation of RNA enzyme activity in the molecular crowding media of cosolutes.
J. Am. Chem. Soc., 査読有, 131, 2009, 16881-16888.
DOI: 10.1021/ja9066628
- ⑲ J. Matsui, J. Nagano, D. Miyoshi, K. Tamaki, and N. Sugimoto
An approach to peptide-based ATP receptors by a combination of random selection, rational design, and molecular imprinting.
Biosensors and Bioelectronics, 査読有, 25, 2009, 563-567.
DOI: 10.1016/j.bios.2009.01.031
- ⑳ S. Muhuri, K. Mimura, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Stabilization of three-way junctions of DNA under molecular crowding conditions.
J. Am. Chem. Soc., 査読有, 131, 2009, 9268-9280.
DOI: 10.1021/ja900744e
- ㉑ D. Miyoshi, K. Nakamura, H. T. Karimata, T. Ohmichi, and N. Sugimoto
Hydration of Watson-Crick base pairs and dehydration of Hoogsteen base pairs inducing structural polymorphism under molecular crowding conditions.
J. Am. Chem. Soc., 査読有, 131, 2009, 3522-3531.
DOI: 10.1021/ja805972a

- ① T. Fujimoto, S. Nakano, N. Sugimoto, and D. Miyoshi
Quantitative analysis of adsorption and desorption of DNA secondary structures on graphene oxide.
The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 北海道大学 (北海道)、2011年11月10日
- ② T. Endoh, and N. Sugimoto
Control of gene expression through an allosteric interaction of transactivator protein and its target RNA
The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, はまぎんホール・ヴィアマーレ (横浜)、2010年11月11日
- ③ H. Hirayama, S. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Evaluation of the cation binding for the RNA dimerization under molecular crowding condition.
The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, はまぎんホール・ヴィアマーレ (横浜)、2010年11月11日
- ④ N. Sugimoto
Molecular crowding effect on functional nucleic acids.
The 1st Asian Chemical Biology Conference (ACBC2010), ソウル大学(韓国)、2010年6月26日
- ⑤ N. Sugimoto
Stabilization and function of nucleic acids under molecular crowding conditions.
Symposium on Nucleic Acid Chemistry (Structure and Interactions), Nova Gorica (スロベニア), 2010年5月30日
- ⑥ Y. Tanaka, K. Kishimoto, N. Sugimoto, and J. Kawakami
Thermodynamic parameters for reliable prediction of RNA structures.
Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium, 九州大学(福岡)、2009年11月5日
- ⑦ S. Muhuri, D. Miyoshi, and N. Sugimoto
Formation of three-way junctions of DNA under molecular crowding conditions.
Gordon Research Conference (Nucleosides, Nucleotides & Oligonucleoties), Newport (アメリカ)、2009年7月7日

- ⑧ 三好大輔, Hai-Quing Yu, 杉本直己
共存溶質によるテロメラーゼ活性の制御
日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、神戸市産業振興センター (神戸)、2009年5月18日

[図書] (計9件)

- ① D. Miyoshi and N. Sugimoto
G-quartet, G-quadruplex, and G-wire regulated by chemical stimuli DNA. Nanotechnology (Methods in Molecular Biology series), vol. 749, 2011, 93-104.
- ② 杉本直己, 三好大輔
機能性核酸のテーラーメイド設計
超分子サイエンス&テクノロジー
エヌ・ティー・エス、2009, 921-929.
- ③ S. Nakano and N. Sugimoto
Chapter 8. Energy of Nucleic Acid Self-Assemblies: From Sequence to Function through Structure.
Bottom-up Nanofabrication: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films
American Scientific Publishers, vol. 3, 2009, 191-215.

[その他]

ホームページ等
<http://www.konan-fiber.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 直己 (SUGIMOTO NAOKI)
甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授
研究者番号: 60206430

(2) 研究分担者

川上 純司 (KAWAKAMI JUNJI)
甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授
研究者番号: 40289012
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
三好 大輔 (MIYOSHI DAISUKE)
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: 50388758