

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 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510239

研究課題名（和文）DNA 架橋化試薬の開発と、その応用に関する研究

研究課題名（英文）Development of DNA-interstrand cross-linking compounds and application to DNA scaffold.

研究代表者

小松 康雄（KOMATSU YASUO）

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：30271670

研究成果の概要（和文）：

DNA の向かい合った 2 つの塩基を糖部より取り除き、新たに生成する 2 つのアルデヒド基同士を 2 価の架橋化試薬によって連結する反応を開発した。本架橋化反応では、芳香環を有する架橋化試薬が高い架橋化効率を示し、さらに隣接塩基間とスタッキングを維持することで高度に DNA を安定化させることを見出した。本研究では、架橋化 DNA を用いて酵素を基盤表面に固定化し、酵素反応用の安定な足場を架橋化 DNA で作製可能であることも証明した。

研究成果の概要（英文）：We have found that a single molecule containing bis(aminoxy) groups is capable of linking two AP sites, which are produced on “complementary” positions of double-stranded oligonucleotides. The aromatic molecule having two aminoxy groups showed much higher conjugation efficiency than the cross-linker with a straight alkyl chain. The interstrand cross-link (ICL) along with the stacking effect of the aromatic residue could stabilize the ICL duplex. We conducted two kinds of enzymatic reactions on the ICL-DNAs and showed that they have the potential to become stable nanosized scaffolds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：核酸化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：架橋、DNA、RNA、アミノオキシ

1. 研究開始当初の背景

合成 DNA は、遺伝子検出用のプローブをはじめ DNA 増幅のプライマーなど多くの技術に活用されている。また最近では、DNA の配列を制御することで複数の DNA 分子を規則的に

会合させた複雑な構造の DNA 高分子体も作製されている。さらに 2 本鎖 DNA に金属を付着（メッキ）させ、電導ワイヤーとして用いる技術や、任意のタンパク質に結合してその機能を抑制する DNA 分子も報告されるなど、DNA

の活用法は工学的、医薬的な発展とも相まって年々拡大されている。こうした活用法では、DNA の相補性と其二重らせん構造が利用されているが、この2本鎖構造は高温状態では、内部の塩基対は破壊され、それと共に2本鎖構造特有の機能も失われる。例えば塩基対間のスタッキングは、DNA の構造を安定化するばかりではなく、電気伝導性の本質的役割を担っている。しかしながら、塩基対の不安性からくるスタッキングの消失は、DNA が有する本来の機能を妨げる。そのため、DNA を工学的、医薬的な目的に活用する場合には、その安定化を図るために数十～100塩基以下の鎖長のDNAが化学合成され用いられている。しかしながら、長鎖分子ほど合成収量も低下して高価となるばかりではなく、類似配列との間で誤った塩基対が形成されるといった問題も生じ、取扱いも困難になる。そこで、2本鎖同士を不可逆的に連結することが可能となれば、鎖長に依存しない安定な2本鎖構造の構築を可能とし、種々のDNAの活用法に役立つと考えた。これまでも2本鎖DNA間を連結する方法として、チオール基間の結合(S-S結合)、あるいは人工塩基を活用した塩基間の共有結合法などが開発されてきた。しかしながら、これらの手法では、連結部の塩基対形成は可逆的な状態であるか、たとえ塩基同士が連結されている場合でも、塩基平面は回転が可能であった。そのため、高温状態や水素結合を破壊するような過酷な条件下では、従来法で架橋された2本鎖DNAは、分子全体は架橋状態にあっても塩基間の水素結合とスタッキング効果は破壊される。さらに従来法では、架橋化反応の進行を制御することも困難であり、架橋化DNAを用いた応用は限定されていた。

2. 研究の目的

本研究では、鎖長に依存せずに恒常的に2本鎖DNAを維持させることを可能にする2本鎖DNAの架橋化試薬の合成と、それを用いた2本鎖DNAの新たな活用法の開発を目指した。

本研究で開発する架橋化試薬は、一つの芳香族基に2価の反応性基が結合し、2本鎖間を架橋するようデザインした。この試薬による架橋化によって、連結部の塩基対が解離するという問題は解消され、さらに架橋後にも芳香族基と隣接塩基との間で強いスタッキング効果が発揮され、2本鎖DNAは高度に安定化されると考えた。こうした試薬の構造上の特性に加え、本架橋化反応は、連結部位の向かい合った塩基を取り除いた後に試薬によって2本鎖間を架橋するという、これまではない方法をとった(図1)。そのため本架橋化反応では、反応の制御も可能になる。さらに、同架橋化試薬とDNAを用いた物質固定化法の開発も進めることでDNAの新しい活用法にも応用することを目指した。

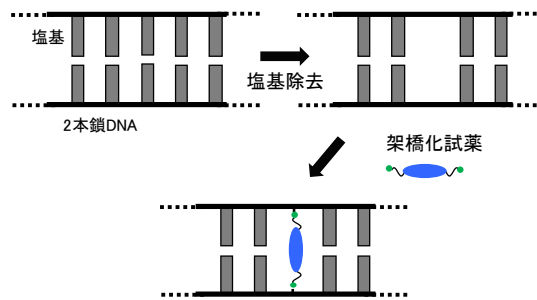


図1 DNA架橋化反応のスキーム

3. 研究の方法

(1) 2本鎖DNA間を架橋する新規な化学試薬の合成とその性能評価

本課題の架橋化反応では2本鎖DNAの向かい合った2つの塩基を脱塩基処理した後に糖部に生成する2つのアルデヒド基を連結させるため、アルデヒド基と高効率で反応し、還元反応を必要としないアミノオキシ基を反応性基に選択した。また、合成された試薬が水に溶解する必要があることから、分子全体の疎水性を抑えるために、芳香族基にはベンゼン環またはナフタレン環を選択した。最終的に、芳香族基に2つのアミノオキシ基が結合した、**アミノオキシ基-linker-芳香族基-linker-アミノオキシ基**と、芳香族部分を直鎖のプロピル基で置換した試薬を合成した。

DNA中の脱塩基部の生成には、デオキシウリジン(以下dU)とその脱塩基反応を選択的に触媒するウラシルDNAグリコシラーゼ(以下UDG)を用いた。初めにdUを向かい合った部位に有する相補的な2本鎖DNAを合成した。このとき2本鎖の一方の5'末端には、ゲル電気泳動の解析に利用するためにフルオレセインを導入した。合成した2本鎖DNAを会合させた後にUDGで処理し、次いで架橋化試薬を添加して、変性ポリアクリルアミド電気泳動によって生成物を分析した。反応温度、試薬の等量を変えて架橋化効率を評価し、最適な試薬の構造と反応条件を調べた。また、架橋されたDNAを精製して分子量を測定し、さらに核酸分解酵素を用いて完全水解し、架橋化DNAの架橋部位の構造を調べた。

続いて、架橋化反応の効率に与える連結部位周辺の構造の影響を調べるために、dUに隣接する塩基対がミスマッチとなる2本鎖、またdUの導入部位がずれたDNA、さらに1本鎖DNAなどへの反応効率についても調べた。また、反応性と安定化効果が最も高かった試薬を用い、2本鎖DNA中の架橋化部位を、2箇所増加させた場合の反応を行い、複数の鎖の連結が可能であるかも調べた。

(2) 架橋化DNAの安定性の評価

合成した架橋化試薬の性能は、反応効率に加えて架橋化 DNA の安定性も重要な因子となる。そこで、各試薬によって架橋された 2 本鎖 DNA を高速液体クロマトグラフィーによって精製した後、それぞれの融解曲線を測定して熱的安定性を調べた (T_m 測定)。

(3) 架橋化 DNA を利用した酵素の基板表面への固定化

ビオチンおよびフルオレセインを末端にそれぞれ有する DNA を合成し、補的な DNA と架橋化させた。同様にそれら 2 種類の DNA と相補的配列を有する一本の鋳型 DNA と塩基対を形成させて架橋化し、3 本鎖からなる架橋化 DNA も合成した。それら架橋化 DNA と架橋化していない DNA とを金基板上に固定化し、続いて Horseradish peroxidase-ストレプトアビジン融合タンパク質 (HRP-SA) と alkaline phosphatase-抗フルオレセイン抗体

(ALP-Ab) を DNA に結合させた。HRP-SA、ALP-Ab それぞれの基質を金基板上に添加した後、酵素反応によって生じた生成物を走査型電気化学顕微鏡で評価し、それぞれの DNA 上での酵素反応の程度を調べた。

4. 研究成果

(1) 試薬の合成と反応性の評価

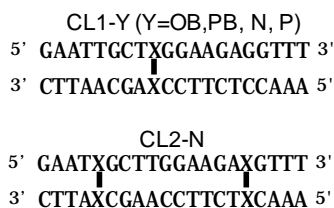
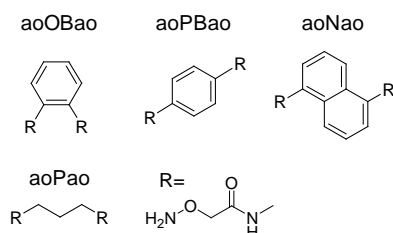


図2 合成した試薬の構造と配列
太線は架橋部位を示す。

ベンゼン、ナフタレン、直鎖プロピル基を有する架橋化試薬 (aoPBao, aoOBao, aoNao, aoPao; 図2) の中で、ベンゼン架橋化試薬に関しては、アミノキシ基の結合部位をオルト (aoOBao) およびパラ位 (aoPBao) それぞれに有する構造を合成した。2 本鎖 DNA を UDG で処理した後に架橋化試薬を添加して反応を行い、反応産物を変性ポリアクリルアミドゲルによって分析した。その結果、予想通り 2 本鎖が架橋化された DNA が全ての架橋化試薬で形成されることを確認した。配列を種々

検討して反応を行ったところ、架橋化効率は向かい合った部位での連結が最適であること、また架橋部位周辺にミスマッチ構造がある場合は架橋化効率が低下することなどを明らかにした。また、架橋化試薬の構造活性相関に関しては、アミノキシ間の空間的な距離が最も短い aoOBao と、芳香環を持たない aoPao の反応性が最も低く、ついで aoPBao、aoNao の順で高くなることが示された (図3)。

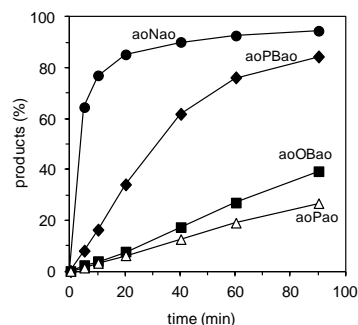


図3
一箇所架橋 (CL-1-Y) の生成効率

架橋に必要な配列と試薬の構造活性相関の実験から得られた結果は、2 本鎖間の連結には、①2 つのアミノキシ間が離れていること、②塩基対とのスタッキング効果の高い芳香環が必要であること、が重要な因子であることを示している。

1 分子中の相補的な部位に dU:dU 対を 2 箇所有する 2 本鎖 DNA を合成し、複数箇所での同時架橋が可能かどうかを調べた。その結果、2 箇所が aoNao によって架橋された DNA も同反応によって簡便に形成可能であることが明らかになった。

(2) 架橋部位の構造決定

架橋化 DNA 中に形成される架橋部位の構造を決定する実験を行った。架橋化 DNA を作製後、2 種類の核酸分解酵素 (Nuclease P1, snake venom phosphodiesterase) によって完全分解し、逆相 HPLC によって分析したところ、未知ピークが溶出された。この未知ピークを解析した結果、2 分子のデオキシリボースが 1 分子の架橋化試薬に結合しており、予想した構造であることを確認した。また、この架橋部位には試薬と糖との共有結合の様式 (*cis*, *trans*) に応じ、3 種類の幾何異性体が存在することを見出した。この架橋部位は還元によって 1 種類の構造に変換できることも確認した。

(3) 架橋化 DNA の安定性の評価

架橋化 DNA を精製した後、pH4, pH7, pH9 の緩衝溶液中で架橋化 DNA を加温して安定性を評価した。その結果、50°C ではいずれの pH においても安定であったが、90°C に加熱した場合には pH4 と pH9 では架橋部位において DNA 鎖の切断が生じることが明らかになった。

(4) 複数の DNA 鎖の架橋と、酵素の基板

表面への固定化への応用

DNA は金表面など種々の固相上に固定化可能なため、DNA に酵素を結合させることで酵素の位置選択的な固定化が可能になる。しかしながら、DNA の解離は酵素の固定化効率を低下させることから、架橋化した DNA が酵素反応の足場として有効かどうかを調べる実験を行った。

架橋化 2 本鎖 DNA と通常の非架橋の 2 本鎖 DNA を金表面に固定化後、HRP-ストレプトアビジン融合タンパク質と、ALP 結合抗フルオレセイン抗体それぞれを DNA に結合させた。酵素の DNA への結合は、あらかじめ DNA に導入したビオチンとフルオレセインを介して行った。また、2 種類の酵素を同一 DNA 分子上に配置する 3 本鎖からなる架橋化 DNA も構築し、2 種類の酵素の固定化を試みた(図 4)。

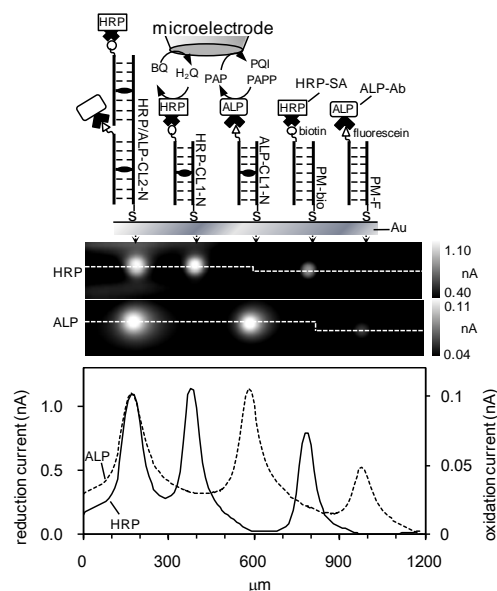


図 4 金基板上に固定化した HRP, ALP の酵素は反応の解析 走査型電気化学顕微鏡で評価したイメージング図(中央)と各酵素反応の生成物量(グラフ)

各酵素の基質を金表面上に添加し、反応の進行を走査型電気化学顕微鏡によって評価した。反応の結果、通常の 2 本鎖 DNA 上で行った酵素反応では生成物が極め少量であったが、架橋化 DNA を用いた場合には十分な生成物量が確認された。これは、金表面への DNA の固定化から酵素反応の過程で、架橋化 DNA では 1 本鎖への解離が抑制されて十分な酵素量を基板表面に保持できたことが要因であると考えている。この結果は、架橋化 DNA が酵素反応の有効な足場になり得ることも示した。

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 12 件)

- ① Ichikawa, K., Kojima, N., Hirano, Y., Takebayashi, T., Kowata, K. and Komatsu, Y. Interstrand cross-link of DNA by covalently linking a pair of abasic sites. *Chem. Commun. (Camb)*, 査読有, **48**, (2012) 2143-2145.
DOI: 10.1039/C2CC16785A
- ② Mie, Y., Kojima, N., Kowata, K. and Komatsu, Y. End-tether Structure of DNA Alters Electron-transfer Pathway of Redox-labeled Oligo-DNA Duplex at Electrode Surface. *Chemistry Letters*, 査読有, **41**, (2012) 62-64.
DOI: 10.1246/cl.2012.62
- ③ Ikegami, M., Mie, Y., Hirano, Y., Suzuki, M. and Komatsu, Y. Size-controlled fabrication of gold nanodome arrays and its application to enzyme electrodes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 査読有, **384**, (2011) 388-392.
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.04.024
- ④ Mie, Y., Ikegami, M. and Komatsu, Y. Gold sputtered electrode surfaces enhance direct electron transfer reactions of human cytochrome P450s. *Electrochem. Comm.*, 査読有, **12**, (2010) 680-683.
DOI: 10.1016/j.elecom.2010.03.005
- ⑤ Kojima, N. and Komatsu, Y. Hydroxylamine, Oxime and Hydroxamic Acid Derivatives of Nucleic Acids. *Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids*, 査読有, **2**, (2010) 807-851.
DOI: 10.1002/9780470682531.pat0514
- ⑥ 小松 康雄, DNA, RNA の末端および内部に対する化学修飾法の開発 生化学, 査読有, **82**, (2010)1141-1145.
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jbiochem/magazine/82-12-10.pdf>
- ⑦ Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Ohtsuka, E. and Komatsu, Y. Construction of highly reactive probes for abasic site detection by introduction of an aromatic and a guanidine residue into an aminoxy group. *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **131**, (2009) 13208-13209.

DOI: 10.1021/ja904767k

- ⑧ **Kojima, N., Takebayashi, T., Mikami, A., Ohtsuka, E. and Komatsu, Y.** Efficient synthesis of oligonucleotide conjugates on solid-support using an (aminoethoxycarbonyl) aminoethyl group for 5'-terminal modification. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, **19**, (2009) 2144-2147.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.02.121

[学会発表] (計 11 件)

- ① **三重 安弘、小島 直、小綿恵子、小松康雄**、Effect of End-tether Structure of Redox-DNA on its Electron Transfer Pathway at Electrode Surface. 第 38 回国際核酸化学シンポジウム、2011/11/10、北海道大学 (北海道)
- ② **平野 悠、市川康平、小島 直、小松康雄**、Electrochemical monitoring of enzyme reactions promoted on double stranded DNA. 第 38 回国際核酸化学シンポジウム、2011/11/10、北海道大学 (北海道)
- ③ **小松康雄**、核酸中のアルデヒド基に反応する試薬の開発と応用、核酸・核タンパク機能性研究会学術集会、2011/8/8、恵庭リサーチ・ビジネスパーク (北海道)
- ④ **小松康雄**、核酸の活用技術の開発、大通りサテライトセミナー、2011/4/26、R & B パーク札幌大通サテライト (北海道)
- ⑤ **小松康雄**、2 本鎖構造の安定化を目的とした架橋化試薬の開発、第 20 回アンチセンスシンポジウム、2010 年 12 月 3 日、甲南大学 (神戸)
- ⑥ **小松康雄**、核酸の利用技術、産総研本格研究ワークショップ、2010 年 7 月 14 日、全日空ホテル (北海道)
- ⑦ **小松康雄**、遺伝子解析に活用する試薬の開発、日本化学会第 90 年会、2010 年 3 月 27 日、近畿大学 (大阪府)
- ⑧ **小松康雄**、遺伝子解析に用いる試薬の開発、バイオチップコンソーシアム、2010 年 2 月 23 日、新宿 (東京都)
- ⑨ **小島 直、竹林知志恵、三上暁子、大塚 榮子、小松康雄**、Development of novel chemical probes to detect abasic sites in DNA、第 6 回国際核酸化学シンポジウム、2009 年 9 月 29 日、高山 (岐阜県)
- ⑩ **小松康雄**、Recent research on chemical reagents used for genetic analyses. Franco-Japanese Workshop in Life Sciences、2009 年 9 月 22 日、CNRS (パ

リ)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
小松 康雄 (KOMATSU YASUO)
独立行政法人産業技術総合研究所・生物
プロセス研究部門・研究グループ長
研究者番号: 30271670
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし