

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05108

研究課題名(和文) 光を用いたDNAメソスコピック凝縮反応場の機能分析

研究課題名(英文) Optical analysis of mesoscopic DNA condensates as reaction fields

研究代表者

田仲 真紀子 (TANAKA, Makiko)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：90397703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では人工的に作成された分子混雑環境における二本鎖DNAの凝縮場の機能について、光を用いた化学的アプローチで分析した。ポリエチレングリコールによって作製した分子混雑環境下で、二本鎖DNAを液晶とし、このDNA凝縮場におけるDNAの電子移動特性評価したところ、集合することによってDNAを媒体とした電子移動効率が大幅に増大することが示唆された。さらにDNAの配列を変化させたところ、DNAが六角形プレート型に集合することを発見し、その構造と特性について明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAやタンパクの集合が、生命維持機能を担っていることが分子生物学分野の研究から明らかになってきたのはごく最近である。化学的なアプローチでこれまで主に希薄で均一な溶液中で研究されてきたDNAについても、凝縮体でどのような特性を示すようになるのかを調べる必要がある。本研究で得られた成果は、二本鎖DNAの凝縮場における電子移動特性の変化や塩基損傷への新たな知見を与え、またその凝縮体が周囲の環境によって形態を大きく変化させることを明らかにするなど、DNAの関わる生命現象を捉えなおす手がかりとなりうる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of double-stranded DNA condensation in an artificially created molecularly crowded environment using optical approaches. In a molecularly crowded environment created with polyethylene glycol, double-stranded DNA was packed into a liquid crystal, and the electron transfer properties of DNA in this DNA condensation field were evaluated. As a result, it was suggested that the efficiency of electron transfer through DNA was greatly increased by assembly. Furthermore, by changing the DNA sequence, we discovered that DNA assembles into a hexagonal platelet, and clarified its structure and properties.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNA 電子移動 液晶 集合

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命の遺伝情報を担う二重らせん DNA の内部は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンの4種の核酸塩基が積み重なったスタッキング構造を形成しているため、電子が移動する媒体としての可能性が着目されてきた。DNA 内電子移動は、核酸塩基の損傷を誘発するためゲノム損傷や疾病の原因とも密接な関係がある。DNA 内電子移動の詳細は、主に機能性分子を含む DNA を化学合成することで調べられ、2000年代半ばには複数の専門書が発行されるなど膨大な研究例がある。DNA 内機能性分子の光励起によって DNA に注入された正孔（ホール）は、DNA 内の電子移動を介して最終的には DNA 中でもっとも酸化されやすい塩基であるグアニンを酸化し、8-オキソグアニンに代表されるような酸化損傷物を与える。近年では DNA 内電子移動の細胞内での役割も着目され、DNA による電子輸送は、酵素間のシグナル伝達を行なっている可能性も示唆されている。DNA の電子移動研究は、化学的な実験手法によってこれまで主に希薄で均一な水溶液中で進められてきた。しかし細胞内は多数の分子が高密度で共存する分子夾雑・混雑状態にある。これまでに申請者は、人工的な分子混雑モデル環境である高濃度ポリエチレングリコール溶液中で、DNA が凝縮し規則的に並んだ液晶構造を取り、DNA 液晶中での光機能性分子を用いた電子移動によるグアニン酸化損傷は、通常の均一な溶液中と比較して大幅に促進されることを見出している。また DNA とポリアミンによる凝縮体内においても、電子移動に伴うグアニン損傷は大幅に増加した。液晶 DNA は試験管内環境だけでなく、ウイルス頭部や渦鞭毛藻の染色体で観測されている。さらにヒストンタンパク質に DNA が巻きついた構造体であるヌクレオソームが試験管内で液-液相分離により液滴を形成することが観察され、細胞内においても DNA が凝縮した微小場が作り出されることが強く示唆されている。

2. 研究の目的

DNA やタンパクの集合が、生命維持機能を担っていることが分子生物学分野の研究から明らかになってきたのはごく最近であり、DNA 電子移動の凝縮場内における機能はこれまで注目されてこなかった。本研究ではこれまで希薄水溶液中で長年にわたって蓄積されてきた分子レベルでの現象の理解を活かしながら、相分離場が DNA に付与する機能を化学的アプローチによって明らかにし、その生物学的意義を解明することを目的とする。具体的には、これまで試験管内の均一希薄溶液中で調べられてきた分子レベルでの DNA の機能に対し、マクロとミクロの中間領域となるメソスコピック領域の状態変化が与える影響を明らかにすることで、細胞内の酵素による電子移動シグナル伝達のメカニズムや、酸化損傷に対する DNA の防御機構など、生命活動維持のための生体機能について、新たな視点からの解明に挑戦する。

3. 研究の方法

本研究では、液晶および液滴など DNA 凝縮場での電子移動特性を、核酸塩基損傷を指標として解析し、均一な希薄水溶液中での DNA のデータと比較することで、凝縮場が DNA に与える機能を明らかにする。また、生体分子の微小分離場としての DNA 凝縮体の性質を調べ、可逆な凝縮場の形成によるシグナル伝達特性への影響を調べる。研究計画の項目を以下に記載する。

(1) 凝縮場におけるグアニン損傷の分析

DNA 内電子移動の結果、最終的にグアニン塩基、特にその連続配列が DNA 内の酸化損傷を受けるターゲットになることが、希薄水溶液中での実験および理論の両面から明らかにされている。DNA 液晶や液-液相分離した DNA 液滴中でも場の性質に応じて、塩基損傷効率および損傷生成物の種類が変化することが考えられる。すでに予備実験により各種の集合体の形成が観測されており、具体的な次のステップとして、光機能性分子を修飾した DNA を用いて集合体を作製し、光照射による電子移動をスタートさせ、塩基の酸化損傷を誘発する。高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析による損傷量の定量と分析を行い、凝縮場での酸化の効率と損傷物の同定を行う。

(2) 凝縮場における電子移動効率と距離依存性

凝縮場中では核酸塩基の酸化還元電位の変化、スタッキング、熱揺らぎなど DNA の電子移動に影響する複数の特性が変化するため、電子移動の効率が大きく変わることが予想される。グアニンが一電子酸化を受けることで生成するラジカルカチオンの水や酸素との反応速度は、最終的な酸化損傷物の生成量に影響するため、グアニン損傷量から電子移動の効率を詳細に見積もることは難しい。そこで効率の良いホール捕捉により開環反応を起こすことが知られているシクロプロパン環をもつ核酸塩基類縁体を含む DNA 鎖を固相合成により準備することで、液晶および液滴中での DNA 内電子移動効率の解析を行う。

(3) 生体分子の微小分離場としての機能解明

申請者らの予備実験では、液晶凝縮体は異なる二種類の DNA によっても形成され、液晶中では異なる DNA 間での電子移動によるグアニン損傷が起こったことが示唆されている。しかし一方で DNA 凝縮体が一種類の DNA のみを含むといった報告例もある。このように DNA がどういった条件で集合し、共存分子を含有するのか、まだ知られていないことが多い。DNA の凝縮によって、混在する多種の生体分子の区画化による損傷特性の変化、電子移動によるシグナル伝達経路の変化などが予想される。そこで蛍光分子修飾 DNA を用い集合体の顕微鏡観測を行うことで、DNA が凝縮体に含まれる条件を精査し、種々の分子が混み合った状態での生体分子の微小分離場としての凝縮体の性質を調べ、区画化と機能との相関を探索し、そのシグナル伝達機構および制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 液晶内における DNA の電気伝導性

申請者らは DNA 中の光増感剤として、デオキシウリジンの 5 位にエチニルリンカーによってピレン分子を修飾したデオキシウリジン (5-(pyrenylethynyl)-2-deoxyuridine; PyU) を用い、一電子酸化によりすみやかな開環反応を起こすシクロプロパン環を有するグアニン (cpG) を、DNA 液晶中のホール捕捉塩基として使用した。修飾塩基 PyU と cpG を両方含む 42 塩基長の平滑末端の配列をデザインし、固相合成により cpG を含むオリゴヌクレオチドを準備し、DNA にホールを注入する光増感剤 PyU を含むオリゴヌクレオチドとアニーリングすることにより二本鎖を形成させた。分子混雑環境を作製するためにポリエチレングリコール (PEG1540) を加え、塩として NaCl を 100 mM とした条件を用いた。PEG が 40 % となる条件で二本鎖 DNA が凝縮し、ねじれたコレステリック液晶を形成することを CD スペクトル測定により確認した。液晶形成は共焦点蛍光顕微鏡観測からも確認された。PyU への選択的な光照射によって引き起こされる cpG の分解量を評価したところ、液晶 DNA 中では大幅な cpG 分解の促進が観測され、液晶中で効率的な電子移動が起こることが示唆された。さらに、PyU のみを含む二本鎖 DNA と、cpG のみを含む二本鎖 DNA を別に準備し、PEG を高濃度として溶液を混合したところ、よりサイズの大きなコレステリック液晶が形成されることが共焦点蛍光顕微鏡観測より確認された。この溶液に光照射を行うと、cpG の効率的な分解が観測された。PEG が低濃度で DNA が集合体を形成せず液晶が存在しない条件では cpG の分解は見られない。cpG を含む二本鎖 DNA には光増感剤が存在しないため、cpG の分解は二本鎖 DNA の末端同士が液晶内で積層して繋がることで、異なる二本鎖 DNA 内の PyU から注入されたホールが、cpG まで伝達されたことが考えられた。DNA が集合して液晶となることで、均一希薄水溶液中では起こらなかった異なる DNA 鎖への電子 (ホール) の伝達が観測されたのではないかと期待される。

(2) 二本鎖 DNA の六角形プレート型集合体形成

二本鎖 DNA は上述のようなねじれたコレステリック型液晶相だけでなく、ヘキサゴナルカルラムナー相 (六方柱状相) を取るということが報告されている。申請者らは、化学合成した一種類の二本鎖 DNA を溶解させた溶液中で、PEG を高濃度としたところ、一般的な顕微鏡で容易に観測可能な大きさのユニークな正六角形プレート型の DNA 液晶の形成を観測した。主に使用した短鎖の二本鎖 DNA は 25 塩基が連なった長さであり、23 塩基分が相補となり、末端 2 塩基ずつが互いに水素結合によってワトソン・クリック塩基対を組むことが可能な粘着末端となるデザインである。蛍光顕微鏡観測では、DNA 塩基対の間にインターカレートして蛍光を発する SYBR Green I を染色に使用している。DNA 液晶の内部構造の評価のために偏光顕微鏡による観測を行った結果、屈折率の異方性から六角形のプレート型液晶内で、二本鎖 DNA は六角形面に垂直に隣り合って並んでいることが強く示唆された。さらに DNA 分子の末端を変更して塩を含む水溶液中で PEG を高濃度とした場合の集合体の顕微鏡観測を行ったところ、末端配列の違いによる集合体形成の相違が得られたことから、六角形プレート型液晶の形成には、短鎖 DNA の末端同士の積層が関連していることが明らかとなった。さらに温度変化による集合体形成過程の観測を行い、そのメカニズムを調査した。PEG の共存によって DNA 分子同士に枯渇相互作用が働くことが、水平方向の集合の要因であることが考えられる。このようにごくシンプルで精密な設計の必要のない短鎖の二本鎖 DNA が、分子混雑環境においてユニークな形態に自己集合するという現象が見出された。二本鎖 DNA の六角形プレート型液晶もまた、集合による長距離かつ高効率の電子伝達の機能を持つことが期待される。DNA 集合体には化学合成によって様々な機能を付与することが可能であり、二本鎖 DNA の融解温度より低い温度領域で集合の解消が起こるといった特徴もある。自己集合した DNA 液晶を利用した医薬品やドラッグデリバリーなど、今後の医療面への応用ができる可能性も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tetsunao Makino, Makiko Tanaka	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 Various Forms of Self-Assembled DNA and Their Properties	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Accounts of Materials & Surface Research	6. 最初と最後の頁 107-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Makino Tetsunao, Nakane Daisuke, Tanaka Makiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Self Assembled Micro Sized Hexagons Built from Short DNA in a Crowded Environment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D10B01669E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taketomi Yuuki, Yamaguchi Yuuki, Sakurai Shunsuke, Tanaka Makiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Evaluation of DNA-mediated electron transfer using a hole-trapping nucleobase under crowded conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 2043 ~ 2047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D10B01669E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 牧野 哲直、田仲 真紀子
2. 発表標題 六角形型DNA集合体の形成におけるDNA配列と共溶質の影響
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makiko Tanaka
2. 発表標題 Formation and Properties of DNA Liquid Crystalline Phase in Crowded Environment
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry Kota Kinabalu 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsunao Makino, Daisuke Nakane, Makiko Tanaka
2. 発表標題 Formation of micro-sized hexagonal DNA assemblies in aqueous-salt PEG solution
3. 学会等名 The 49th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野 哲直, 田仲 真紀子
2. 発表標題 光学顕微鏡観察可能なマイクロメートルサイズの六角形型DNA構造体の形成
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下 晴弥, 山口 湧暉, 田仲 真紀子
2. 発表標題 光照射によるDNA集合体の形態変化
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野哲直, 山口湧暉, 田仲真紀子
2. 発表標題 分子混雑環境における二本鎖DNAの集合体形成とその特性
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武富 祐樹、山口 湧暉、櫻井 俊亮、田仲 真紀子
2. 発表標題 ホールトラップ核酸塩基を用いた分子混雑環境におけるDNA内電子移動効率の評価
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makiko Tanaka
2. 発表標題 Micro-sized liquid crystals composed of short double-stranded DNA
3. 学会等名 The 6th Asian Chemical Biology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makiko Tanaka
2. 発表標題 Self-assembly of double-stranded DNA into hexagonal liquid crystal
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) Bali 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牧野 哲直, 田仲 真紀子
2. 発表標題 分子混雑環境下で形成する六角形DNA集合体の形成メカニズムの探索
3. 学会等名 第13回 CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牧野哲直, 田仲真紀子
2. 発表標題 二本鎖DNAのマイクロメートルサイズのH型構造体への自己集合
3. 学会等名 日本化学会第104回春季年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【ニュースリリース】二本鎖DNAが自己集合により六角形型液晶を形成することを発見 https://www.uec.ac.jp/news/announcement/2022/20221104_4914.html</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------