

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810094

研究課題名(和文) 極限環境におけるDNA相互作用を活用したDNA塩基対形成の制御

研究課題名(英文) Control of the formation for DNA base pairs by DNA interactions under ultimate environments

研究代表者

建石 寿枝 (TATEISHI-KARIMATA, Hisae)

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号：20593495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの特異的な塩基認識能や環境応答性を利用して、薬剤、センサー等を構築するDNAナノテクノロジーが加速している。本研究では、ナノテクノロジー分野で活用されている水和イオン液体中の“超高塩濃度環境”および細胞内の細胞小器官などで混み合った環境を模倣した“超クラウディング環境”などの極限環境下におけるDNA構造安定性を定量的に解析した。その結果、DNAの溝部位へのカチオンの結合により通常の水溶液では形成できないような構造も極限環境下では形成可能であることが示された。さらにこの相互作用を活用し、従来法より標的鎖の誤認識を10000倍低減した三重鎖型DNAセンサー等のDNA材料を構築できた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the stability for DNA duplexes, triplexes, and G-quadruplexes under ultimate environments such as high ionic conditions inducing hydrated ionic liquid (IL) of choline dihydrogen phosphate (choline dhp) and molecular crowding conditions inducing by polyethylene glycols. Our quantitative analysis demonstrated that DNA triplex formation is markedly stabilized in high ionic conditions and molecular crowding conditions compared with aqueous solution. Especially, in choline dhp, the stability of Hoogsteen base pairs in the triplexes is comparable to that of Watson-Crick base pairs. Moreover, a molecular beacon that forms a triplex with a conserved HIV-1 sequence was then designed and tested in choline dhp. The molecular beacon specifically detected the target duplex via triplex formation with 10,000-fold sequence selectivity. The unique behaviors of DNAs under ultimate environments will be useful in the design of oligonucleotides for use in nanomaterials.

研究分野：生命機能化学

キーワード：三重鎖 フーグスティーン塩基対 分子クラウディング イオン液体 センサー

1. 研究開始当初の背景

生体内で DNA は、ワトソン・クリック (W・C) 塩基対やフーグスティーン (H) 塩基対を形成することによって遺伝情報の保持や遺伝子発現の制御を行う。一方で、DNA のその優れた塩基認識能や自己構造形成能は、標的遺伝子を検出するセンサー、機能性分子を配列化させる足場、または薬剤運搬のキャリアとして活用でき、工業的、環境的観点から注目されている。DNA の構造形成は、DNA の塩基対の構造安定性に基づく。この DNA 塩基対の安定性を自在に制御することができれば、DNA の構造体をダイナミックに変化させ、既存の構造体に新規の機能を付与させることができる。DNA の構造安定性は、DNA の塩基配列に由来する相互作用 (水素結合、スタッキング相互作用、構造エントロピー) によって決定されており、これらの相互作用に基づいた DNA 構造の安定性を予測するデータベースが構築されている。しかし、既存の予測プログラムは、生化学的な実験が行われる標準溶液 (0.1~1 M NaCl 溶液) 中で得られたパラメータを用いているため、細胞内環境や DNA をテクノロジーとして使う環境での DNA 構造としばしば一致しない。そのため、環境効果を加味したパラメータの補正が急務である。

DNA が材料として活用される環境は、既存のデータベースが構築された標準環境とは全く異なる非標準的な“極限環境”であり、この環境が DNA 構造を劇的に変化させている。例えば、細胞内の多様な生命分子が可溶物や不溶物として混在して込み合った状態、及び基板またはナノ粒子表面に固定化された DNA そのものによって込み合った“超クラウディング環境” (図 1a) および“イオン液体中などの超高塩濃度環境”である (図 1b)、DNA 構造安定性は環境の効果を大きく受けるが、これまでこのような環境の効果は複雑であるため、環境効果を加味した DNA 構造予測は困難であった。

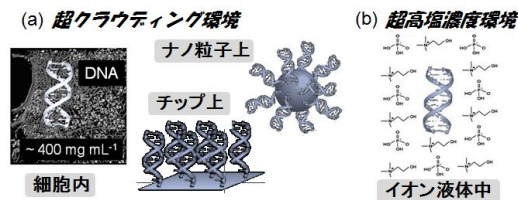


図 1. 極限環境の例。(a) 細胞内やチップ基板及びナノ粒子上の超クラウディング環境。(b) イオン液体中の超高塩濃度環境

2. 研究の目的

本研究では 1) 極限環境の物性変化 (誘電率、水の活量変化など) に着目することによって、複雑な環境をシンプルに解析し、DNA 構造安定性に及ぼす“極限環境”の影響をエネルギーレベルで理解することを試み

る(知る研究)。さらに得られた知見を基に、2) DNA の構造形成の最も基本的な相互作用である塩基対形成能を極限環境によって制御し、DNA 材料の構築を行う(使う研究)。

3. 研究の方法

(1) 極限環境の構築: 細胞内の超クラウディング環境は、核酸と直接相互作用しないポリエチレングリコールや Ficoll と核酸の水和圏と相互作用するグリセロールなど 20~80 wt% を標準溶液 (1 M NaCl 緩衝溶液) に添加することで構築した。リポソームなどの擬生体膜に DNA 及び RNA を固定化させる実験も行う。超高塩濃度環境は、リン酸二水素コリンに少量 (20 wt% 以下) の水を加えた水和イオン液体 (Choline dhp) を用いた。リン酸二水素コリン溶液中では、DNA を長期間安定に保存できるという報告があり DNA 材料の溶媒として適していると考えられる (D. R. MacFrlane et. al, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 1631)。

(2) DNA 構造に及ぼす極限環境の効果のエネルギー的評価: 極限環境下において、紫外可視分光光度計、円二色性分散計により、DNA の融解曲線を測定し、この融解曲線から、DNA の構造形成に伴う熱力学的パラメータを算出した。安定性の評価は核酸の定量的解析において標準溶液とされる NaCl 溶液中での安定性と比較することで行った。特に、イオン液体中での DNA 塩基とカチオンの結合は、DNA 構造安定性に大きく寄与することから、イオン液体中のカチオンと DNA の相互作用を、実験によって算出されるカチオンと DNA 結合エネルギーや、*in silico* で分子動力学計算によって解析した。

4. 研究成果

(1) 極限環境が核酸に及ぼす影響を分子レベルで“知る研究”を遂行した。

まず、細胞内の超クラウディング環境が核酸構造に及ぼす影響として、代謝、ウイルス耐性などに関与する RNA の非塩基対部位であるダングリグエンドに及ぼすポリエチレングリコールによって誘起されるクラウディング環境効果について解析した。本研究結果から、ダングリグ部位はワトソン・クリック (W・C) 塩基対部位と水和構造が異なるため、細胞内の細胞周期などの環境変化 (周辺に存在する分子の濃度や種類) に敏感に応答し、RNA の構造安定性を調整している可能性が示唆された (*ChemMedChem*, 9, 2150, 2014 [中表紙に採択], 2014 年 10 月 2 日神戸新聞掲載)。また、生体膜モデルであるリポソーム上での核酸の非標準構造であるフーグスティーン (H) 塩基対をもつ四重鎖について解析した。その結果、生体膜と DNA の相互作用により、四重鎖は顕著に不安定化することがわかった (*Nucleic Acids Res.*, 42, 12949, 2014)。分子クラウディング環境下における DNA 本鎖及び二重鎖の構造安定性を解

析し、水和構造の重要性を明らかにした (*Chem. Phys. Lett.*, **660**, 250, 2016, *JPS Conf. Proc.* **5**, 011008, 2015)

さらに、Choline dhp によって超高塩濃度環境を構築し、W・C 及び H 塩基に及ぼす超高塩濃度環境の効果を熱力学的手法、核磁気共鳴法、分子動力学計算によって解析した。その結果、標準溶液で最も安定な W・C 型の G-C 塩基対より、不安定な A-T 塩基対の方が、Choline dhp 中では、安定化することを見出した (*Nucleic Acids Res.*, **42**, 8831, 2014, *Biochimie*, **108**, 169, 2015 など)。さらに、H 塩基対から

成る三重鎖の安定性を熱力学解析や分子動力学計算を用いて解析した結果、H 塩基対は標準溶液ではほぼ形成されないほど不安定であるが、Choline dhp 中では、コリンイオンの核酸の溝部位への結合によって、安定に形成されることが示された (図 2, *J. Phys. Chem. B.*, **118**, 9583, 2014)。

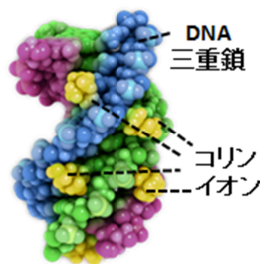


図 2. 分子動力学計算によって得られた DNA 三重鎖 (に結合するコリンイオン (黄色)、三重鎖の溝を補強するように結合するコリンイオンが三重鎖を安定化させていると考えられる。

(2) (1)で得られた知見から機能性 DNA を設計、開発することを試みた (使う研究)。

これまでの研究成果により、Choline dhp 中において H 塩基対を安定に形成できることを活用して、H 塩基対の形成を介した標的配列センシングシステムの構築を試みた。標的配列 (二重鎖) を検出するセンサー-DNA として、ヘアピン構造のループ領域に標的三重鎖と H 塩基対を介して三重鎖を形成する DNA を設計した (図 3a)。このセンサー-DNA は 5' 末端に蛍光色素、3' 末端に消光剤で修飾され、ヘアピン構造形成時には、蛍光色素は消

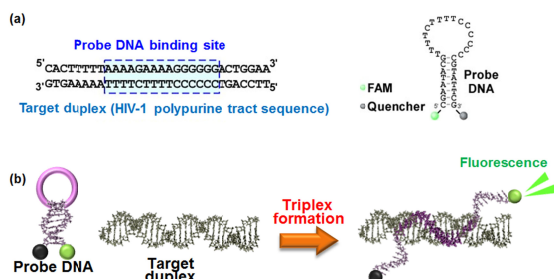


図 3. (a) 標的三重鎖とセンサー-DNA の構造 (b) センサー-DNA による標的三重鎖の検出機構

光剤により消光されるが、標的鎖との結合により蛍光を発するように設計されている (図 3b)。

HIV-1 由来の配列を持つ 2 μM 標的三重鎖に対して、1 μM のセンサー-DNA を添加したところ、NaCl 溶液中においては、H 塩基対を形成できないため、標的三重鎖の有無に関わらず、センサー-DNA に蛍光強度は変化しなかった。一方で、choline dhp 中ではセンサー-DNA が標的三重鎖に結合したことに由来する蛍光スペクトルの変化が観測された。に、W・C 塩基対型の G-T ミスマッチを形成する標的鎖及び H 塩基対型の G*T ミスマッチを形成する標的鎖に対してセンサー-DNA が結合した際の構造安定化エネルギー (G_{25}°) を比較した。その結果、フルマッチ塩基対 (A-T または A*T 塩基対) とミスマッチ塩基対の構造安定化エネルギーは、W・C 塩基対型及び H 塩基対型においてそれぞれ 1.4 及び 6.4 kcal mol⁻¹ 不安定化することがわかった。このことから、W・C 塩基対型では、センサー-DNA は 10% の割合でミスマッチを誤認識するが、H 塩基対型では誤認識を 0.001% まで

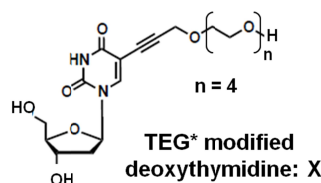


図 4. テトラエチレングリコールにより修飾されたデオキシチミン (X)

で低下できることが示唆された。

また、超クラウディング環境下における H 塩基対の安定化メカニズムを基に、生体反応を効率よく抑制する H 塩基対からなる四重鎖構造を誘起するような人工核酸を設計した。H 塩基対を安定化させたクラウディング分子であるテトラエチレングリコール (TEG) をチミン塩基に共有結合で連結させた人工塩基 (図 4、TEG 修飾塩基、X) を開発した。その結果、TEG 修飾塩基をもつオリゴヌクレオチドは、天然のオリゴヌクレオチドにより四重鎖構造を大きく安定化させた。さらに、TEG 修飾塩基をもちいると HIV-1 の逆転写反応を 70% 以上の効率で抑制することがわかった (*ChemBioChem.*, **17**, 1399, 2016, 表紙に取り上げられた、2016 年 8 月 17 日日刊工業新聞、9 月 17 日神戸新聞に掲載)。

以上より、本研究では、極限環境下で DNA の構造安定性を分子レベルで解析した。さらに、得られた知見を基に DNA 塩基対安定性を調節することで、ダイナミックな DNA の構造形成を合理的に制御し、DNA 材料を構築できた。

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16件)すべて査読あり

A. Pica, I. R. Krauss, V. Parente, H. Tateishi-Karimata, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, N. Sugimoto and F. Sica

Through-bond effects in the ternary complexes of thrombin sandwiched by two DNA aptamers, *Nucleic Acids Res.*, 45, 461-469 (2017)

DOI: 10.1093/nar/gkw1113

H. Tateishi-Karimata, T. Muraoka, K. Kinbara, N. Sugimoto

G-quadruplexes with tetraethylene glycol-modified deoxythymidines are resistant to nucleases and inhibit HIV-1 reverse transcriptase, *ChemBioChem.*, 17, 1399-1402 (2016)

[Selected as a Front Cover]

DOI: 10.1002/cbic.201600162

H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto

Expansion of the DNA 'alphabet' beyond natural DNA recognition

ChemBioChem., 17, 1301-1303 (2016)

DOI: 10.1002/cbic.201600181

M. Nakano, H. Tateishi-Karimata, S. Tanaka, F. Tama, O. Miyashita, S. Nakano, N. Sugimoto

Local thermodynamics of the water molecules around single- and double-stranded DNA studied by grid inhomogeneous solvation theory

Chem. Phys. Lett., 660, 250-255 (2016)

DOI: 10.1016/j.cplett.2016.08.032

J. Zhou, H. Tateishi-Karimata, J.L. Mergny, M. Cheng, Z. Feng, D. Miyoshi, N. Sugimoto, C. Li
Reevaluation of the stability of G-quadruplex structures under crowding conditions

Biochimie. 121, 204-208 (2016)

DOI: 10.1016/j.biochi.2015.12.012.

A. Zhao, C. Zhao, H. Tateishi-Karimata, J. Ren, N. Sugimoto, and X. Qu

Incorporation of O6-methylguanine restricts conformational conversion of human telomere G-quadruplex under molecular crowding

Chem. Commun. 2016, 52, 1903-1906

DOI: 10.1039/C5CC09728B

M. Nakano, H. Tateishi-Karimata, S. Tanaka, F. Tama, O. Miyashita, S. Nakano, and N. Sugimoto
Thermodynamic properties of water molecules in the presence of cosolute depend on DNA structure: A study using grid inhomogeneous solvation theory

Nucleic Acids Res., 43, 10114-10125 (2015)

DOI: 10.1093/nar/gkv1133

H. Tateishi-Karimata, S. Pramanik, and N. Sugimoto

DNA Sensor's Selectivity Enhancement and Protection from Contaminating Nuclease due to Hydrated Ionic Liquid

Analyst., 140, 4393-4398 (2015)

[Selected as a Front Cover]

DOI: 10.1039/C5AN00545K

H. Tateishi-Karimata, M. Nakano, S. Pramanik, S. Tanaka, and N. Sugimoto

i-motifs are more stable than G-quadruplexes in a hydrated ionic liquid

Chem. Commun., 51, 6909-6912 (2015)

DOI: 10.1039/C5CC00666J

[Selected as an Inside Cover]

M. Marušič, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, and J. Plavec

Structural foundation for DNA behavior in hydrated ionic liquid: An NMR study

Biochimie, 108, 169-177 (2015)

DOI: 10.1016/j.biochi.2014.11.015

M. Nakano, H. Tateishi-Karimata, S. Tanaka, and N. Sugimoto

Choline Ions Stabilize A-T Base Pairs by Fitting into Minor Groove

JPS Conf. Proc. 5, 011008 (2015)

DOI: http://dx.doi.org/10.7566/JPSCP.5.011008

H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto

Structure, stability and behavior of nucleic acids in ionic liquids

Nucleic Acids Res., 42, 8831-8844 (2014)

DOI: 10.1093/nar/gku499

H. Tateishi-Karimata, S. Pramanik, S. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto

Dangling ends perturb the stability of RNA duplex responsive to surrounding condition

ChemMedChem, 9, 2150-2155 (2014)

[Selected as an Inside Cover]

DOI: 10.1002/cmdc.201402167

M. Nakano, H. Tateishi-Karimata, S. Tanaka, and N. Sugimoto,

The affinity of molecular ions for DNA structures is determined by solvent accessible surface area

J. Phys. Chem. B., 118, 9583-9594 (2014)

DOI: 10.1021/jp505107g

S. Pramanik, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto

Organelle-mimicking liposome dissociates G-quadruplexes and facilitates transcription

Nucleic Acids Res., 42, 12949-12959 (2014)

DOI: 10.1093/nar/gku998

B. Xu, C. Zhao, Y. Chen, H. Tateishi-Karimata, J. Ren, N. Sugimoto, and X. Qu
Methyl substitution regulates the enantioselectivity of supramolecular complex binding to human telomeric G-Quadruplex DNA
Chem. Eur. J., **20**, 16467-16472 (2014)
DOI:10.1002/chem.201404854

〔図書〕(計 4件)

建石寿枝、杉本直己
特集/ケミカルバイオロジーの新展開「水和イオン液体を使って核酸の機能を制御する」
化学工業(化学工業社) 67, 641-646 (2016)

建石寿枝、遠藤玉樹、杉本直己
先制医薬学における核酸の非二重らせん構造の役割
Antisense, 学術・技術トピックス アンチセンス研究入門 58, **18**, 7-19 (2014)

建石寿枝
DNA 四重鎖は転写の二次情報を保持しているか?
生体機能関連化学部会 ニュースレター(日本化学会), **29**(No.3), 15-18 (2014)

建石寿枝
イオン液体を用いて DNA 塩基対の形成を制御する
生体機能関連化学部会 ニュースレター(日本化学会), **29**(No.1), 11-14 (2014)

〔学会発表〕(計 3 4件)

日本核酸医薬学会 第 2 回年会, 建石寿枝、大山達也、村岡貴博、Peter Podbevsek、田中成典、金原数、Janez Plavec、杉本直己、テトラエチレングリコール修飾塩基をもつ四重鎖構造を用いた逆転写反応制御、東京理科大学 葛飾キャンパス図書館大ホール(東京都葛飾区), 2016 年 11 月 15 日 ~ 17 日

Gordon Research Conference 2016 (Bioanalytical Sensors), H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, Novel DNA sensor developed with hydrated ionic liquid of choline dihydrogen phosphate, Salve Regina University, (Newport, RI, USA), 2016 年 6 月 26 日 ~ 7 月 1 日

日本化学会第 96 春季年会 (2016), H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, J. Plavec, N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (20): Quantitative analysis for effects of cellular condition on the transcription in G-rich sequences of cancer genes, 同志社大学 京田辺キャンパス(京都府京田辺市), 2016 年 3 月 24 日 ~ 27 日

日本化学会第 96 春季年会 (2016) 大山達也、建石寿枝、田中成典、村岡貴博、金原数、杉本直己、脱ワトソン・クリックの核酸化学(21): テトラエチレングリコールによる DNA 四重鎖の安定化メカニズムの解明、同志社大学(同志社大学 京田辺キャンパス(京都府京田辺市)), 2016 年 3 月 24 日 ~ 27 日

28th European Symposium on Applied Thermodynamics (ESAT 2015), H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, Thermodynamic Behaviors of Nucleic Acids in a Hydrated Ionic Liquid, Royal Olympic Hotel, (Athens, Greece), 2015 年 6 月 11 日 ~ 14 日

第 41 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014), H. Tateishi-Karimata, T. Muraoka, K. Kinbara, P. Podbevsek, J. Plavec, N. Sugimoto, Large stabilization of G-quadruplexes by tetra-ethylene glycol modified deoxythymines, 北九州国際会議場(福岡県北九州市), 2014 年 11 月 5 ~ 7 日

等

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 核酸鎖の四重螺旋構造の形成を可能にするデオキシヌクレオシド誘導体
発明者: 杉本直己、建石寿枝、金原数、村岡貴博
権利者: 学校法人甲南学園
番号: 特開 2016-210719
出願年月日: 2015 年 5 月 7 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.konan-fiber.jp/activities/search.php>

6. 研究組織
研究代表者
建石 寿枝 (TATEISHI-KARIMATA, Hisae)
甲南大学・先端生命工学研究所・講師
研究者番号: 20593495