

「極限環境により誘起される DNA 特殊構造を活用した DNA スイッチの開発」

甲南大学先端生命工学研究所 建石 寿枝

1 研究の背景と目的

生体内で DNA の標準構造は二重鎖であるが、DNA は溶液環境の変化に応じて三重鎖、四重鎖といった特殊構造も形成する。DNA の構造変化は、ナノテクノロジーに活用でき、工業的、環境的観点から注目されている。例えば、DNA によって作られたナノ構造をダイナミックに且つ可逆的に制御できる“DNA スイッチ”を構築できれば、バイオセンサーや DNA コンピュータ、薬剤運搬のキャリア、機能性分子アレイの足場などを構築できる。DNA ナノスイッチの形成は、ワトソン・クリック (W・C) 塩基対やフーグスティーン (H) 塩基対から成る最安定な構造を、その配列や環境に応じて DNA が自発的に形成することに基づく。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）が重要であると考えられてきた。我々の研究室では、細胞内などの特殊な環境においては分子環境に由来する相互作用（クーロン相互作用、溶媒和）が DNA 構造安定性を調節していることを見出してきた (H. Tateishi-Karimata et al., *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.*, 7, Unit 19 (2013) など。以後、研究代表者のグループの論文は著者名を省略する)。さらに、近年、イオン液体（100℃以下に融点を持つ塩）という“超高塩濃度”の極限環境を用いれば、リン酸二水素多コリン (Choline dhp) が高濃度になると DNA 塩基と特異的に相互作用し、DNA 塩基対の安定性を劇的に変化させることを見出した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 1416)。これらの知見から、イオン液体を用いれば、DNA の構造安定性を簡便に制御し、“DNA スイッチ”の構築できる可能性がある。

本研究では、DNA 構造に及ぼすイオン液体の効果を定量的に解析し、さらに、得られた知見を基に、イオン液体と DNA の相互作用を活用した DNA ナノスイッチを基にした DNA センサーを構築することを試みた。

2 研究方法・研究内容

DNA がどのような構造を形成するかは、DNA 塩基対の安定性に依存する。そこで本研究では、(a) 極限環境であるイオン液体中における DNA 塩基対の安定性を解析し、イオン液体が DNA に及ぼす影響を“知る”。そして、(b) 得られた知見を“使う”ことで、DNA の塩基対の安定性を制御し DNA ナノスイッチを構築することを目指す。

(a) DNA 構造に及ぼす分子環境の

効果の定量的解析

核酸構造は DNA 二重鎖、三重鎖、四重鎖を対象とした。紫外可視分光光度計、円二色性分散計により、核酸構造の融解曲線を測定した。この融解曲線から、当研究所 (FIBER) で開発された手法 (*J. Am. Chem. Soc.*, 131, 9268 (2009)、*Nucleic Acids Res.*, 126, 14330 (2004)) を用いて、

DNA 構造形成時の熱力学的パラメータを算出した。これらの知見を基に、分子環境が核酸構造に及ぼす影響をエネルギー的 (ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG_{25}°) に解析した。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。

また、核酸は負電荷をもつためイオン液体のカチオンは、核酸と積極的に結合すると考えられる。そこで、カチオンと核酸構造の相互作用を微視的に明らかにするために、*in silico* での分子動力学計算によってカチオン-核酸の相互作用を解析した。分子動力学計算は、

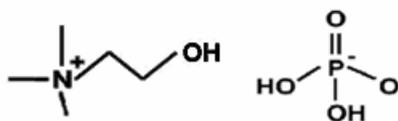


図 1. リン酸二水素コリンの化学構造式。

AMBER12 software package を用いて行い、力場は AMBERff03.r1 force field を用いた。

(b) 溶液環境にตอบสนองする DNA ナノスイッチの構築

本研究によって得られた種々の分子環境下における核酸構造の定量的知見を基に、choline dhp 中で機能する HIV 遺伝子を検出する DNA センサーの構築を試みた。このセンサーとなる DNA は 5'末端に蛍光色素、3'末端に消光剤で修飾され、W・C 塩基対によりヘアピン構造を形成する。ヘアピン構造形成時には、蛍光色素は消光剤により消光されるが、標的鎖共存下では、H 塩基対によりヘアピン構造が開き (DNA 構造スイッチ)、蛍光を発するように設計されている。センサー-DNA の蛍光変化は、蛍光光度計によって測定した。

3 研究成果

(a) DNA 構造に及ぼす分子環境の効果の定量的解析

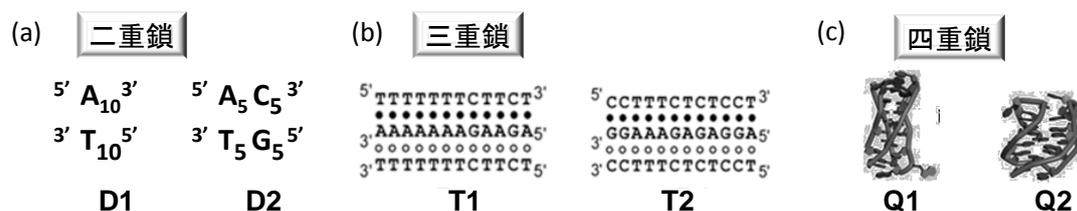


図2. DNA 構造(a) 二重鎖、(b) 三重鎖 [ワトソン・クリック塩基対 (●)、フーグスティーン塩基対 (○)]、(c) 四重鎖

(1) イオン液体環境下における核酸構造安定性の解析

choline dhp によるイオン液体環境中において核酸の標準構造である二重鎖の安定性を解析した。A-T 塩基対の含有量が異なる 10 塩基対の DNA 二重鎖 Ds1、Ds2 (図 2a) の熱安定性を測定した結果、標準溶液である NaCl 溶液における DNA 二重鎖の融解温度 (T_m) の値は、二重鎖内の A-T 塩基対の含有量の増加に伴い 45.3°C (Ds2) から 30.7°C (Ds1)まで低下し、DNA 二重鎖が不安定化することがわかった。一方で、4 M choline dhp 中では、二重鎖内の A-T 含有量の増加に伴って、 T_m 値は 33.3 °C(Ds2) から 53.3°C (Ds1)まで増大し、choline dhp 中では G-C 塩基対よりも A-T 塩基対が安定であることが示された。

次に、choline dhp が特殊構造である三重鎖及び四重鎖構造に及ぼす影響についても解析を行った。三重鎖の構造は W・C 塩基対と H 塩基対によって形成される (図 2b)。標準水溶液において G*C 塩基対 (H 塩基対を*で表す) は非常に不安定であるため、G*C 塩基対の含有量が増加すると H 塩基対は形成されない。本研究では、まず、G*C 含有量の異なる 30 μ M DNA 三重鎖 [T1、T2 (図 2b)] の 260 nm における UV 融解挙動を測定した。標準溶液である NaCl 溶液における融解温度 (T_m) の値は、T1 : 39.4 及び T2 : 51.6°Cとなった。H 塩基対の解離を確認するために 295 nm における UV 融解挙動も測定した結果、Ts1 においてのみ H 塩基対の解離に由来する融解挙動が観測された (T_m 値は、Ts1 : 38.8°C) が、T2 では H 塩基対由来の融解挙動は観測されなかった。このことから、三重鎖の解離において T1 は W・C 塩基対が同時に解離し、T2 では H 塩基対の形成は確認されないほど不安定であるため W・C 塩基対のみ解離していることがわかった。一方で、choline dhp 溶液中では、T1 および T2 三重鎖において W・C 塩基対と H 塩基対が同時に解離した。これらの結果より、choline dhp 中では H 塩基対が W・C 塩基対と同程度まで安定化されることがわかった。

さらに、四重鎖であるシトシンを豊富に含む i-motif (Q1)、グアニンを豊富に含む G-四重鎖 (Q2) に対する choline dhp の影響を解析した。その結果、Q1 は choline dhp で大きく安定化するが Q2 は大きく不安定化し、四重鎖構造でも構成される塩基の組成によって

choline dhp の影響は大きくことなることが示された (*ChemComm*, **51**, 6909 - 6912 (2015) [裏表紙に選定]、2015 年 4 月 8 日 日刊工業新聞に取り上げられた)。さらに上記の choline dhp 中において安定化した DNA 構造に対して構造形成時の熱力学的パラメータを算出した結果、choline dhp 中における DNA 構造の安定化は、構造形成時のエンタルピー変化に由来した。このことから、NaCl 溶液中では起こらない新しい相互作用が、DNA-choline dhp の間で生じていることが示唆された (*Sci. Rep.*, **4**, 3593 (2014))。

さらに、choline dhp のコリンイオンの類似体である生体膜成分を使って Q2 の安定性を解析した結果、生体膜近傍では Q2 構造が不安定化することがわかった (*Nucleic Acids Res.*, **42**, 12949-12959 (2014))。また、Q2 のような安定な四重鎖構造が生体反応に及ぼす影響を知るために、重要な生体反応の 1 つである転写反応に及ぼす四重鎖の影響を解析した。その結果、鋳型となる DNA 二重鎖の一部が四重鎖に構造スイッチすると転写変異が誘起されることが示された。(生体機能関連化学部会 ニュースレター (日本化学会) 29, 2014 年、第 7 回バイオ関連化学シンポジウムにおいて発表)。

(2) 分子動力学計算及び NMR (核磁気共鳴) 法によるコリンイオンと DNA 構造の相互作用解析

Choline dhp 中において構造が顕著に安定化された ODN1 及び Ts1、i-motif を対象にナトリウムイオン及びコリンイオンの DNA 構造の結合様式を 20 ns の分子動力学計算によって解析した。DNA 構造から 3.5 Å 以内に滞在しているカチオンを解析した結果、ナトリウムイオンは DNA の負電荷を遮蔽するようにリン酸基近傍に結合するのに対して、コリンイオンは、リン酸基近傍に結合するだけでなく、ODN1 及び Ts1 は二重構造の、及び三重鎖構造のグループ部位に(*JPS Conf. Proc.* **5**, 011008 (2015))、i-motif 構造にはループ部位に結合することがわかった (図 3) (*ChemComm*, **51**, 6909 - 6912 (2015))。コリンイオンは水酸基を持つため、核酸構造のグループを形成する塩基や糖などと水素結合を形成し、核酸への部位特異的に結合する。このようなコリンイオンの部位特異的な結合が核酸構造を安定化させていることが示された。

さらに、このようなコリンイオンによる DNA 構造の安定化機構は、スロベニア国立 NMR センター所長である Janez Plavec 教授との共同研究により、NMR によっても明らかにされた (*Biochimie*, **108**, 169-177 (2015))。

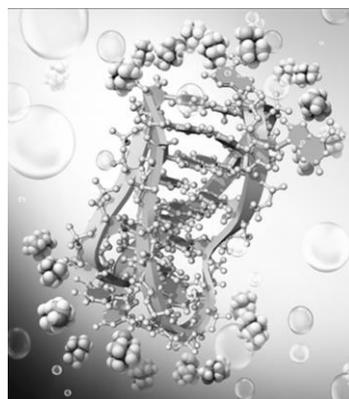


図 3. i-motif 構造のループ部位に結合するコリンイオンのイメージ。2015 年 *ChemComm* 誌 51 号に掲載された

b) 極限環境が DNA に及ぼすエネルギーパラメータを“使う”

H 塩基対は標準溶液中で非常に不安定であるが、塩基認識能が優れていることから、choline dhp 中で H 塩基対を安定に形成できることを活用し、W・C 塩基対 (ヘアピン二重鎖構造) から H 塩基対 (三重鎖構造) の構造スイッチによる標的配列のセンシングシステムの構築を試みた (図 5)。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配列と H 塩基対を介して三重鎖を形成する DNA を設計した (図 4)。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 4)。

HIV-1 由来の配列を持つ $2 \mu\text{M}$ 標的鎖に対して、 $1 \mu\text{M}$ 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 が標的鎖に結合したことに由来する蛍光スペクトルの増大が観測された。さらに、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 (ΔG_{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 $6.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ 不安定化することがわかった。本センシングシステムでは、従来の W・C 塩基対の形成を介したセンサーDNA と比較して標的配列の選択性を 10000 倍向上させることができた (第 5 回イオン液体討論会において発表、2014 年 11 月、論文投稿中)。

以上、本研究結果から、イオン液体である Choline dhp と DNA の相互作用を化学的観点から解明することにより、W・C 塩基対から H 塩基対の DNA 構造スイッチを活用した DNA センサーの構築が可能となった。

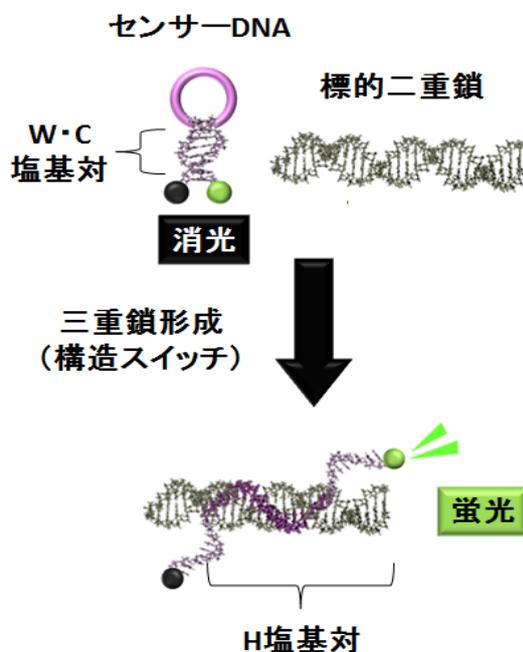


図 4. センサーDNA による標的鎖の検出機構

4 生活や産業への貢献および波及効果

近年、イオン液体は、不揮発、不燃の特性を持つため、安全性や環境に優しい点で優れた“Green” solvent としてナノテクノロジー分野で活用されている。しかし、イオン液体は一般的に生命分子を変性 (失活) させると考えられており、ナノバイオテクノロジーへの応用は困難であるという“常識”があった。しかし、裏を返せば、溶液中の不要な汚染物 (核酸分解酵素など) を特別な処理なしに失活させることができる。このような観点から、イオン液体は核酸を使ったテクノロジーにおいて有用な液体であると考えられる。

本研究ではイオン液体中での DNA の特性を相互作用のエネルギー・パラメータで評価し、このパラメータを基に塩基対安定性の制御法を確立した。このパラメータを用いて、様々な DNA ナノスイッチを構築できれば、バイオ材料開発や創薬・病理診断システムの開発の研究分野に対しても有用な情報を与える。例えば、スイッチ機能を持つ DNA ナノ構造体は金属ナノ粒子などを整列させる“アレイ”技術に活用できる。金属ナノ粒子近傍の電場増強効果は、ナノ粒子間の磁気的な相互作用に強く影響されるため、ナノ粒子間の間隔を目的に応じて適切に制御する必要がある。DNA ナノ構造体を構造スイッチできれば、機能性分子の配置を自在に制御できる。このような技術は、例えば、一分子計測法やバイオセンサーに使われる表面増強ラマン分光の基板の開発や、構造変化に伴って信号を発信するような DNA コンピュータとしても活用可能であると期待できる。