

研究報告書

「疎水領域を有する核酸を用いた機能創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 堂野 主税

1. 研究のねらい

生体内において細胞膜は、外部と内部を分け隔てる障壁としてのみではなく、その間の情報伝達や物質輸送など重要な仕事が行われる場として機能する。生体内で精密に制御された脂質膜上での機能性分子集積、膜間分子輸送や膜変形は、細胞機能に必須であり、その作用機序の解明と制御は、分子レベルでの細胞システム、病理の理解から、ドラッグデリバリーへの応用につながり非常に有用である。これまでに脂質膜で機能する分子として、天然由来あるいは分子設計されたタンパク質やペプチド、合成小分子が用いられてきたが、今なお意図する機能を組み込むことは容易ではない。本研究では、高精度な自己組織化能や分子認識能を有し、ナノスケールでの構造設計が容易な DNA を、脂質二重膜の表面から内部まで膜の3次元空間全てで機能する基盤分子として着目した。

DNA は、相補配列間の二本鎖会合による制御された自己組織化により、ボトムアップ型のナノ構造構築が可能な機能性分子である。近年の DNA ナノテクノロジーの発展は、望みの形状をもつ二次・三次元のナノ構造体構築を実現しつつある。また、標準的な B 型二重らせん構造のほか、様々な特殊らせん構造、部分構造の形成が可能であり、特定の配列や構造に固有の機能(分子認識、触媒活性、金属配位、電荷移動)を持たせることもできる。これらは全て DNA の塩基配列の設計により実現でき、様々な望みの構造を精緻に設計できることは、他の機能性分子にはない DNA のユニークな特性である。一方で、DNA はポリアニオン性の親水性分子であるため、その利用は親水的な環境下に限定される。

本研究は、これらの優れた特性を疎水領域でも発揮することのできる新規両親媒性 DNA を創製することにより、脂質膜を舞台とする多様な機能発現を DNA 配列設計から実現することを目指している。具体的には、脂質膜と自在に相互作用(膜表在型、膜貫通型)することのできる

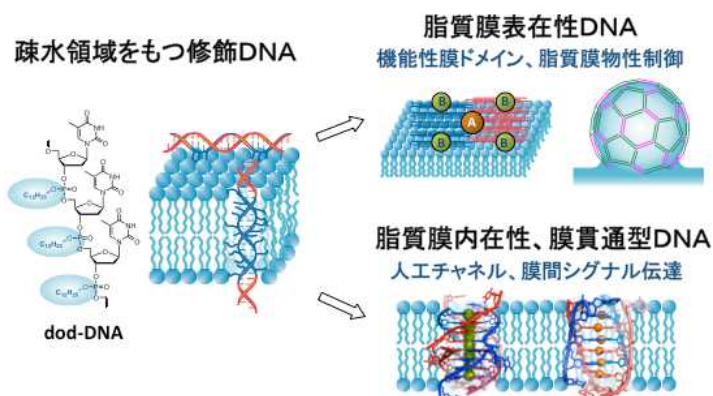


図1. 両親媒性 DNA を用いた脂質膜機能のデザイン.

る両親媒性 DNA を用いて、機能性分子の精密配置による機能性膜ドメインの構築、脂質膜の物理特性(形状、固さ)の制御、シグナル伝達・認識、イオン・小分子輸送などを実現する核酸を基盤とした分子技術の構築を目指す(図1)。

2. 研究成果

(1) 概要

DNA は、配列情報に基づく精密な自己会合能力により、二次構造から高次ナノ構造まで自在に設計することのできる機能性分子である。本研究では、脂質膜の物性や機能を制御する新たな機能性分子として、化学修飾により疎水領域を導入した新奇両親媒性 DNA (dod-DNA) の開発を行なった。ドデシルトリエステル骨格を疎水領域としてもつ dod-DNA は、導入した疎水領域の配列や大きさ、化学構造により、脂質膜との結合親和性や結合様式を調節することが可能である。DNA の単一面側に疎水領域を導入することにより脂質膜表面に強く結合する dod-DNA を設計し、膜表面上での DNA ナノ構造の構築に成功した。また、連続した疎水性修飾を導入した dod-DNA を用いることで、脂質膜内部に埋め込まれ、疎水性環境下で四本鎖構造を形成する疎水性 DNA の創製を実現した。本研究で実施した4つの課題、脂質膜と自在に相互作用可能な(1)疎水領域をもつ新規人工核酸の創製、(2)疎水領域を有する核酸と脂質二重膜との結合評価、それを用いた(3)脂質二重膜表面上での DNA ナノ構造の構築、膜貫通型機能性チャネルを指向した(4)脂質膜内在性四本鎖 DNA の創製、について、以下それぞれ詳細を述べる。

(2) 詳細

2-1) 疎水領域をもつ新規人工核酸 (dod-DNA) の創製

DNA は、ポリアニオニックなリン酸ジエステル骨格からなる親水的な生体高分子である。本研究では、疎水性を有する人工修飾核酸として、電荷を持たないリン酸トリエステル型構造を選択した(図2)。リン酸トリエステル部に導入する置換基の化学構造により疎水性を調節でき、また、らせん形成時に最外縁に位置することで効果的な脂質膜との相互作用が期待できる。疎水性官能基としてまず長鎖アルキルであるドデシル基を選び、CGTA4種類のヌクレオシドアミダイト体を合成した(図2)。

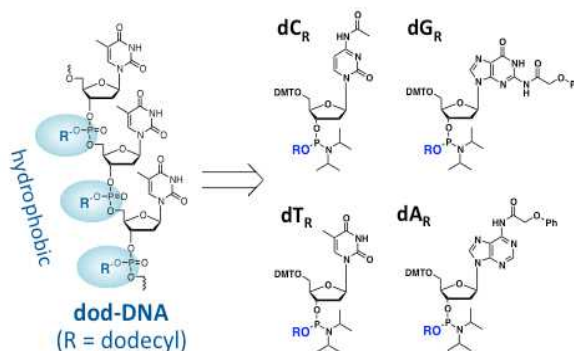


図2. dod-DNA の合成.

一般的な自動固相合成法により、4種の修飾アミダイト体いずれもが定量的に DNA に組み込まれ、任意の位置、配列に疎水領域をもつ DNA (dod-DNA) を良好な収率で得た。⁽¹⁾逆相 HPLC やゲル電気泳動解析から、予測されるようにドデシル基導入数に応じて、疎水性が向上することが示唆された。二本鎖形成時に対面になるよう疎水性修飾を行うと、塩基対形成の選択性は減少するものの、“疎水性ジッパー”の形成により水溶液中での二本鎖安定性が大きく向上することが確認された。本合成法は様々な置換基 R に対して適用可能であり、疎水性の異なる DNA を合成することができる。非常に大きな疎水性をもつと考えられるドデシル基 (dod, C12) の他、より疎水性の小さなオクチル基 (C8)、ブチル基 (C4)、親水性ジエチレングリコールリンカーを含む DEG-dod 基を有する DNA も同様な手法により合成し、様々な疎水性、両親媒性核酸の合成方法を確立した。

2-2) 疎水領域を有する核酸と脂質二重膜との結合評価

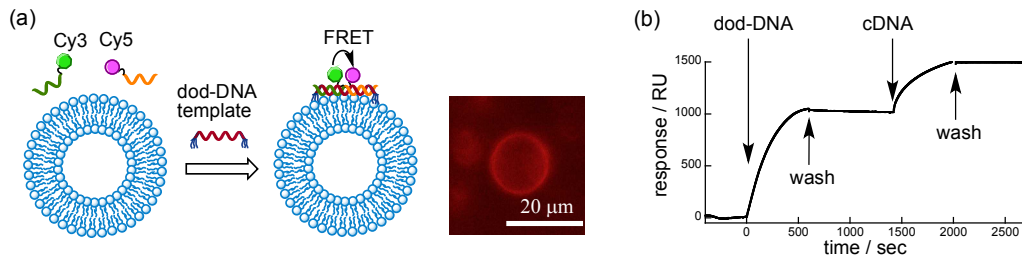


図3. dod-DNA の脂質二重膜表面への結合. (a) リポソーム表面での蛍光分子配置. (b) SPR による結合評価.

種々の疎水領域を有する dod-DNA と脂質二重膜との様々な結合様式の評価を行なった(図3)。鎖末端に疎水領域をもつ dod-DNA を用いると、予測されるようにその導入数に応じて脂質二重膜との結合能が向上する。SPR を用いた解析により、一箇所では結合がほぼ観測されないが、連続 2 ヶ所導入すると速い結合と解離、3 ヶ所導入すると解離が観測できないほどの強く結合することが明らかになった。脂質膜の極性構造や厚みを考慮に入れて再設計した DEG-dod 基(親水性のジエチレングリコール挿入ドデシル基)を、ドデシル基と置換して用いると、より良好な脂質膜表面への結合と相補鎖 DNA の結合が確認された(図 3b)。両親媒性の α ヘリックスの結合様式を模倣し、DNA 二重らせんの一方の表面にのみ疎水領域(10 塩基間隔)を導入すると、脂質膜表面に DNA らせんが倒れた配向で強固に結合させることができる(図 3a)。両親媒性 dod-DNA を一次元テンプレートとして用いた脂質膜表面での精密分子配置が可能であることを、リポソーム表面で起こる蛍光共鳴エネルギー移動を観測することにより確認した。

2-3) 脂質二重膜表面上での DNA ナノ構造の構築:

脂質膜表面に強く結合する両親媒性 dod-DNA 配列をもとに、脂質膜表面上での DNA ナノ構造構築を行なった。まず、簡易な平面繰り返し構造を形成する DNA タイルの検討を行なった。⁽²⁾ DNA タイルの片側の面にのみ疎水性修飾を施した両親媒性領域をもつ DNA タイルを調製、マイカ表面に展開した POPC 平面二重膜に添加し、液中 AFM により観測した(図4)。両親媒性 DNA タイルを用いることにより、未修飾 DNA タイルが結合しえない低い金属イオン濃度条件下においても、膜表面上に構造体を観測することができ、

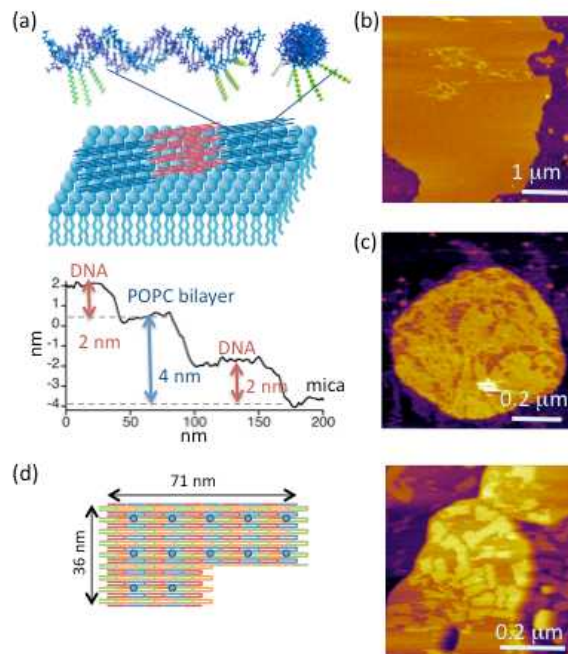


図4. 脂質膜表面への疎水修飾 DNA ナノ構造の結合. (a) 疎水修飾 DNA タイル. (b, c) AFM 像. 疎水修飾なし、および有り. (d) L字型二次元 DNA ナノ構造.

その形状、高さ、フォースカーブ測定より、DNA タイルが脂質膜表面に結合していることが確認できた(図4b,c)。100 塩基対あたり 1 ヶ所の疎水性修飾で、脂質膜との結合に優位性がみられ、疎水領域の導入量により、親和性の制御が可能である。構造を厳密に規定した、より小さな DNA ナノ構造体(図4d、71x36 nm)を用いると、同条件では膜の流動性のためナノ構造を可視化できないが、脂質として DPPC を用い二重膜の流動性を低下させると L 型のナノ構造を確認することができる(図4d)。適切に疎水性修飾を加えることにより、様々な DNA ナノ構造体を高い親和性で脂質膜表面上に設置できることを明らかにした。

2-4) 脂質膜内在性四本鎖 DNA の創製:

脂質二重膜厚さに相当する程度まで疎水領域を拡大し(9塩基)、大きな疎水性表面をもつ dod-DNA は、脂質二重膜に対して膜貫通型の結合様式が期待できる。このような dod-DNA は、環境応答性の蛍光分子プローブを用いた解析から、脂質二重膜と強く結合し、非常に疎水的な環境下に埋め込まれていることが示唆された。これら膜内在性の dod-DNA の結合データをもとに、G-rich な配列をもつ dod-DNA(dod-TG₄T)を設計し、G 四本鎖構造の脂質二重膜内への導入を検討した(図5a)。(3) G 四本鎖構造は、らせん軸に金属イオンが結合する細孔をもち、類似の構造を有するイオンチャネルタンパク質様の機能が期待される。dod-TG₄T は、水に不溶であるが、クロロホルムのような有機溶媒に可溶である。金属イオンを含む水層と混和すると、水層から金属イオンを選択的(K⁺>Na⁺,Rb⁺>>Li⁺,Cs⁺)に取り込み、四本鎖構造を形成することが明らかになった(図5b,c)。質量分析(ESI-MS)により、有機溶媒中において四本の dod-TG₄T 鎖と3つの K⁺イオンからなる四本鎖複合体構造が同定された。dod-TG₄T からなる四本鎖は、リポソーム溶液に添加することで脂質二重膜の疎水性コア部分に埋め込むことが可能である(図5d)。同様にしてプロトン依存的な四本鎖構造である i-motif の脂質膜内への導入にも成功した。本研究は、脂質膜疎水環境下に DNA 二次構造を導入した初めての実施例である。脂質膜に埋め込んだ疎水性四本鎖構造は、膜間イオン移動の促進効果を示し、チャネル活性が期待される。

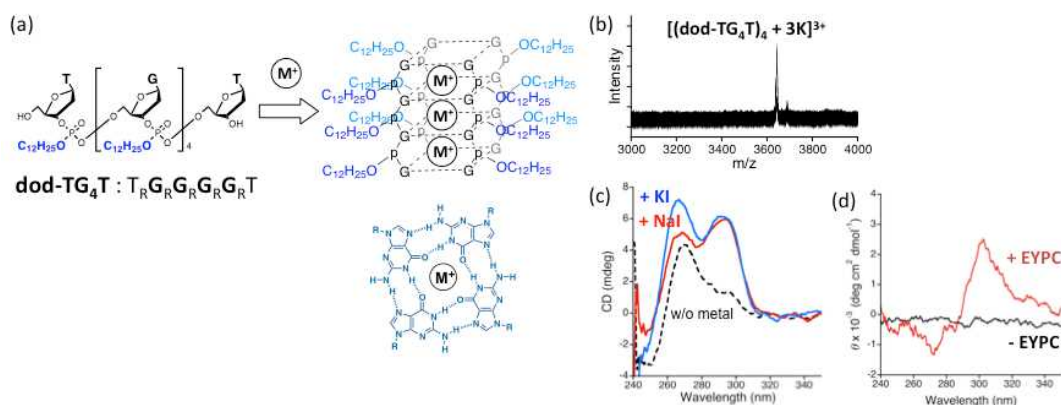


図5. 疎水性 G 四本鎖 DNA の創製。(b) 質量分析。(c, d) クロロホルム中、および EYPC リポソーム存在下における CD スペクトル。

3. 今後の展開

DNA は、配列情報に基づいて様々な二次三次構造や機能構造の設計が容易であり、さらに DNA ナノテクノロジー研究の進展により、任意の DNA ナノ構造の構築が可能になりつつある。本さがけ研究では、これら DNA ナノテクノロジーと脂質膜を繋ぐ分子技術構築を指向して、脂質膜とさまざまな結合様式、親和性で結合できる新規人工 DNA の創製を行なった。dod-DNA の疎水性領域のデザインによって、様々な DNA 高次構造と脂質膜の結合特性を調節・設計できる基盤技術を提示できたと考えている。今後は、DNA ナノ構造のほか、RNA 機能構造を加えた合理配列設計から、細胞膜・脂質膜を舞台とするより直接的な機能発現を目指して研究をすすめる。

脂質膜表面への結合親和性と結合配向を制御することのできる dod-DNA の特性を活かして、脂質膜やリポソームの諸物理特性(形状、固さ、大きさ)を DNA のつくる構造によって制御することを目指す。脂質膜の特性やダイナミクスは、細胞の物質輸送やシグナル伝達などに決定的な役割を果たしており、その現象理解に寄与する技術へと繋げる。また、脂質膜に深く結合する疎水性四本鎖 DNA については、イオンチャンネル特性と作用機序を精査するとともに、核酸の分子認識能(相補配列、アプタマー、金属イオン配位)を付与することで、特定の条件下に応答して開閉する人工チャンネルへの展開を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

本さがけ研究では、疎水性環境下、特に脂質膜で用いることのできる DNA を新規に設計・合成し、それをを用いた脂質膜に関わる機能創発を指向した。まず本研究の基盤となる疎水領域をもつ新規核酸の合成方法を確立し、導入する疎水性領域の大きさや配向により、脂質膜との結合様式(脂質膜表面、脂質膜内在)や親和性の制御できる両親媒性 DNA の創製に成功した。脂質膜表面での DNA ナノ構造構築に関しては、概ね当初の研究計画において期待した成果を得たと考える。脂質膜貫通型 DNA の創製では、両親媒性 DNA の水系における特性の理解(溶解性、凝集)と構造最適化に労力を要し、研究計画に遅れを生じたが、疎水性 DNA 四本鎖構造の脂質膜内への導入に成功した。さがけ研究以前には使用する機会のなかった脂質膜や両親媒性分子の取り扱い・解析手法に関して、本さがけ研究下での研究者交流を通じ、習熟する機会を与えられたのは非常に有益であった。一方で、この研究計画の遅れのため、研究期間内に研究のねらいに記載する脂質膜に結合する DNA 構造に依存した機能創出の十分な実証には至らなかった。本研究において確立した脂質膜と多様な相互作用を可能にする DNA 分子技術は、「DNA 配列設計に基づく脂質膜の機能設計」の実現に向けての基盤となる成果であり、今後の発展に繋がるものとする。

(2) 研究総括評価

脂質膜と自在に相互作用することのできる両親媒性 DNA を合成し、その精密配置(膜表在型、膜貫通型)による DNA 機能性膜ドメインの構築、脂質膜の物理特性(形状、固さ)の制御、シグナル伝達・認識、イオン・小分子輸送などを実現する核酸を基盤とした分子技術の構築を目指している。具体的には、(1)疎水領域をもつ新規人工核酸の創製、(2)疎水領域を有する核酸と脂質二重膜との結合評価、(3)脂質二重膜表面上での DNA ナノ構造の構築、(4)膜

貫通型機能性チャネルを指向した脂質膜内在性四本鎖 DNA の創製 の4課題を設けて研究した。その結果、疎水領域をもつ新規核酸の合成法を確立し、導入する疎水性領域の大きさや配向により、脂質膜との結合様式(脂質膜表面、脂質膜内在)や親和性の制御できる両親媒性 DNA の創製に成功した。また、脂質膜表面での DNA ナノ構造体も構築することに成功し、概ね当初の研究計画どおりの成果を得たと考えられる。一方、脂質膜貫通型 DNA の創製に関しては、疎水性 DNA 四本鎖構造の脂質膜内への導入に成功したものの、研究のねらいのひとつである、脂質膜に結合する DNA 構造に依存した機能創出までには至らなかった。本研究において確立した脂質膜と相互作用を可能にする DNA 分子技術は、「DNA 配列設計に基づく脂質膜の機能設計」の実現に向けての基盤になる基本成果になるものと評価され今後の発展に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Dohno, C.; Shibata, T.; Okazaki, M.; Makishi, M.; Nakatani, K. <i>Eur. J. Org. Chem</i> , 2012 , 5317–5323. |
| 2. Atsumi, H.; Nakazawa, S.; Dohno, C.; Sato, K.; Takui, T.; Nakatani, K. <i>Chem. Commun.</i> 2013 , 49, 6355–6458. |
| 3. Shibata, T.; Dohno, C.; Nakatani, K. <i>Chem. Commun.</i> 2013 , 49, 5501–5503. |
| 4. Dohno, C.; Kohyama, I.; Kimura, M.; Hagihara, M.; Nakatani, K. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2013 , 52, 9976–9979. |

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- | |
|---|
| 1. Shibata, T.; Makishi, S.; Dohno, C.; Nakatani, K. “Fluorescence-based binding assay of hydrophobic DNA to the lipid bilayer membrane”, 243rd American Chemical Society National Meeting. |
| 2. Shibata, T.; Dohno, C.; Nakatani, K. “Synthesis and evaluation of hydrophobic G-quadruplex”, International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC) 2012. |
| 3. Makishi, S.; Shibata, T.; Matsuzaki, K.; Contera, A. S.; Dohno, C.; Nakatani, K. “Physical properties of 2D-DNA nanostructures on lipid bilayer membrane”, International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC) 2013. |
| 4. Dohno, C.; Kohyama, I.; Kimura, M.; Hagihara, M.; Nakatani, K. “An artificial riboswitch driven by a synthetic RNA-binding ligand”, International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC) 2013. |
| 5. 大阪大学総長奨励賞(2013研究部門) |