

核酸を機能制御するバイオマテリアルデザイン

丸山 厚

東京工業大学大学院生命理工学研究科 助教授

科学技術振興事業団 さきがけ研究21

要旨

テラーメイドされたカチオン性高分子で、核酸ハイブリッドの安定化や、2重鎖と単鎖との交換反応の促進が可能となった。一塩基変異の有無を迅速かつ簡便に解析する方法としてこの高分子を利用した鎖交換法を応用した。この高分子は、ハイブリッド形成の中間体生成を促進し、核酸のホールディングを媒介する DNA シャペロンとして振る舞うと考えられる。

1. はじめに

核酸ハイブリッドの形成や解離あるいは相同鎖との置換などハイブリッドの構造転移は、生命活動の基幹となるプロセスである。生体内においてこれらハイブリッドの構造転移は、種々のタンパク質が媒介することで速やかに行われている。たとえば、ハイブリッドをほどくヘリケース活性は、複製、転写、翻訳に関わるタンパク群に見いだされるし、リナチュレーションつまり相補鎖間のハイブリッド形成を促すタンパク質として RecA および hnRNP などが知られている。また、2重鎖と相同鎖との置換は、相同組み換えや遺伝子修復の際にみられるが、これらも RecA あるいは Rad51 およびそのホモログによって媒介されている。一方で、核酸の構造転移を制御し得る化合物は、遺伝子タイピング法や核酸を利用したアンチセンス、アンチジーンなどの核酸医薬の機能向上に有用と考えられる。さらに、近年特に注目されている核酸を利用した様々なナノデバイス、たとえばナノマシーン、ナノロボット、ナノ組織体などの将来への発展には欠かせないキーテクノロジーとなろう。筆者らは、このような観点から、核酸の構造転移を制御しうる合成高分子の設計に興味を抱いている。本講義では、筆者らの研究を交え、合成高分子の核酸工学分野における新たな可能性を考えてみたい。

2. ハイブリッド形成をより早く、より安定に

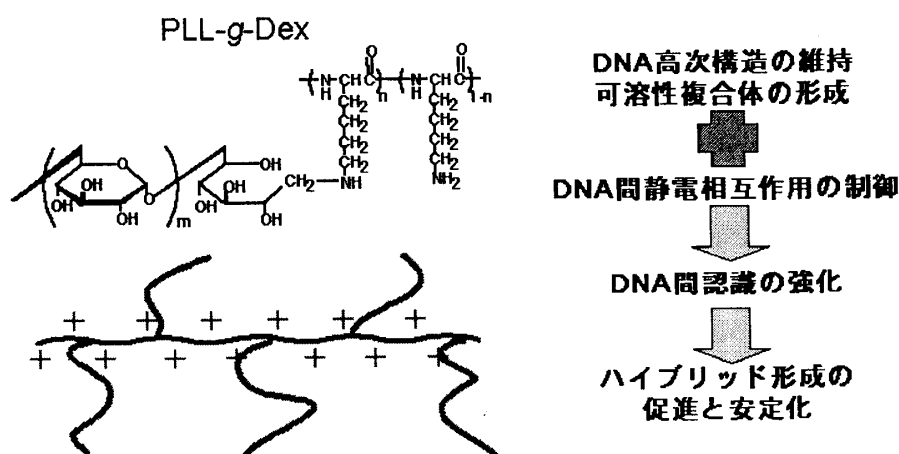
核酸は安定な2重鎖を形成するが、この安定性は利用目的によっては十分なものでない場合がある。たとえば、アンチセンス法がその一つである。アンチセンス法は mRNA に対して相補的なアンチセンス核酸を細胞内に導入し mRNA とのハイブリッド形成を介してタンパク質への翻訳を阻害する方法である。mRNA は単鎖の RNA だが、頻繁に分子内で自己構造を形成するため、アンチセンス核酸が思うように mRNA に結合しない場合が多い。同様に、ゲノム2重鎖を標的として、細胞外部から3重鎖形成性単鎖を導入することでゲノム上に3重鎖 DNA を形成させるアンチジーン法においても、3重鎖 DNA の安定性の向上が課題となっている。そこで、より強固なハイブリダイゼーションを目的として

様々な研究戦略がとられている。大別すると、核酸分子の化学構造を合成化学的改変する非天然型核酸のデザイン、核酸ハイブリッドに結合し安定化するインターカレータ類などの安定化剤の設計などである¹。

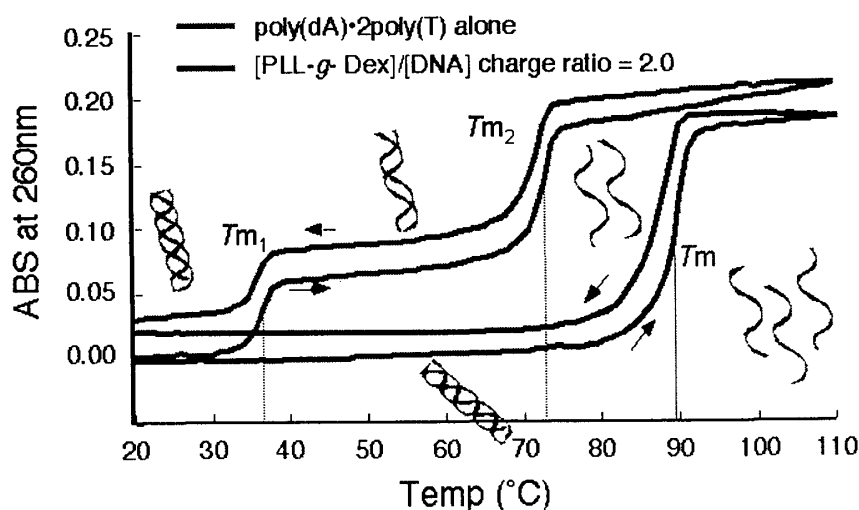
核酸は、リン酸ジエステル結合でヌクレオシド単位が結合した多価のアニオン性の高分子である。単鎖の核酸が相補鎖と2重鎖を形成すると、リン酸基の空間密度が増大する。つまり、静電反発が強くなる。従って、核酸は静電的反発に逆らってハイブリダイゼーションしていることになる。リン酸基間の静電的な反発を緩和するには、塩濃度を高めるあるいは多価のカチオン性の化合物を共存させることが有効である。生理的条件では、たとえばスペルミンなどのオリゴカチオンが安定化剤として利用されたが、その効果は小さくかつ高濃度で使用する必要があった。著者らは、ポリアニオンである核酸と安定な複合体形成をする高い正電荷密度を持つポリカチオンに着目して、安定化剤として利用することを考えた。

ポリリシンなどのカチオン性高分子は、生理条件下でポリアニオンと互いの電荷をうち消す形で極めて強く相互作用し、いわゆる高分子電解質複合体を形成する。従って、より低濃度で効率よく核酸間の静電的反発を弱めハイブリッドを強化する安定化剤として有利と考えられた。事実、カチオン性ポリアミノ酸であるポリリシンと2重鎖 DNA から高分子電解質複合体を形成させると、2重鎖の融解温度 (T_m) が著しく高まることが、古くから知られている。一方で、高分子電解質複合体は、実質的な電荷の減少とそれに伴う疎水化により、溶存形態が凝縮 (コンパクション) すると共に複合体同士が凝集しながら不溶化する。したがって、相補的な単鎖にそれぞれポリカチオンを混合しても、各々が不溶化しハイブリッド形成は困難となる。このことは、DNA 医薬や遺伝子解析等、ハイブリッド形成過程が重要となる応用にはポリカチオンが適用し難いことを意味する。

そこでポリカチオンに見られる欠点を克服するために、ポリカチオンに側鎖として親水性の高分子鎖を結合させたくし型共重合体 (図1) を設計した。親水性側鎖の導入により、DNA とポリカチオンとの相互作用を制御し、DNA に及ぼす構造変化を抑制しつつ、複合体の溶解性を高める目論見である。実際に、親水鎖の長さや導入密度を制御することで、DNA の凝縮や2次構造変化を抑えながら可溶性の複合体を形成できることが見いだされた²。

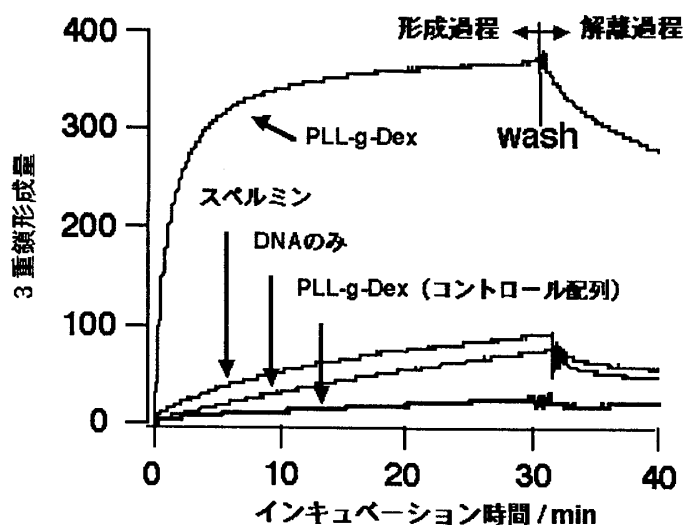


共重合体により形成されるこのような複合体は、DNA ハイブリダイゼーションに伴う静電反発を抑制することで、DNA の塩基配列に基づく認識を高めると考えられる。そこで、先ずモデル核酸としてポリデオキシアデノシン、poly(dA)、と2当量のポリチミジン、poly(T)、から形成される3重鎖DNAの融解挙動に及ぼす共重合体の効果を検討した。図2は poly(dA)・2poly(T)3重鎖の熱融解を260 nm における吸光度変化により調べた UV- T_m 曲線である。生理的な塩濃度において poly(dA)・2poly(T)3重鎖は、2段階からなる転移を示す。37℃における一段階目の融解は、poly(dA)・2poly(T)3重鎖→poly(dA)・poly(T)2重鎖+poly(T)単鎖への融解を示す。72℃の二段階目の転移は poly(dA)・poly(T)2重鎖→poly(dA)+poly(T)の融解を表している。これに DNA のアニオン総量に対してカチオン総量が2倍(チャージ比=2)となるように共重合体を加え同様に測定した。その結果、共重合体存在下では、約90℃で poly(dA)・2poly(T)は一段の転移を示した。転移に伴う吸光度変化は、共重合体不在下で観察された二つの転移の和に一致することから、共重合体存在下では約90℃で3重鎖→単鎖に直接融解していることが示唆された。実際に、円二色性スペクトルからもこの転移温度以下では3重鎖を形成していることが確認された。従って、共重合体は poly(dA)・2poly(T)3重鎖の融解温度を37℃から90℃に約50℃高めることがわかった。同様にして poly(dA)・poly(T)2重鎖の融点も約18℃高めることも確認された。すでに、スペルミンなどのオリゴカチオンが3重鎖 DNA の安定化に有用であることが知られている。スペルミンの効果を同一条件下で比較した結果、チャージ比で30倍過剰のスペルミンでも3重鎖の融解温度を20℃高めるに過ぎず、共重合体が極めて効果的に3重鎖DNAを安定化することが明らかにされた。



共重合体は既に形成されている2重鎖や3重鎖を安定化することがわかったが^{2,3}、一方で DNA と共重合体間の相互作用がハイブリッドの形成を妨げることが懸念される。図2には、降温測定による2重鎖および3重鎖の形成過程も記されているが、共重合体存在下でも、不在下同様に可逆的なハイブリッド形成が観察される。ハイブリッド形成過程に及ぼす共重合体の効果を、表面プラスモンセンサーを用いてさらに定量的に評価した。ここでは、3重鎖形成の速度論的解析を行った結果を図3に示

す³。3重鎖形成の標的となる2重鎖をセンサーのセル表面に固定し、セル内に3番目のDNA鎖となる単鎖を加えた後の3重鎖形成量を経時的に測定した結果である。DNAのみでの3重鎖形成は非常に遅い。またスperlミンを加えることで、3重鎖形成は促されるものの、それほど大きな効果は見られない。同等の条件下、共重合体を共存させると著しく3重鎖形成が促進され、形成量も多くなった。種々の単鎖濃度で測定を繰り返すことで2重鎖+単鎖 $\rightleftharpoons$ 3重鎖の形成速度定数および解離速度定数を算出した。その結果、形成速度定数をスperlミンが約4倍しか高めないのに対して共重合体は約50倍高めることが見いだされた。一方で、解離速度に対してはスperlミンが10分の9、共重合体で3分の2に遅くさせる程度であった。



さらに、より実際のDNA配列を用いた3重鎖形成も、共重合体が約100倍安定化することが、アクリルアミドゲル電気泳動によるアッセイおよび恒温滴下型マイクロカロリーメリー測定によっても明らかにされた⁴。速度論的解析と併せて考察すると、主に3重鎖の形成速度を速めることで共重合体はハイブリッドを安定化すると言える。このことは、非天然型核酸によるハイブリッド安定化と対照的であり、共重合体の特筆すべき特徴である。なぜならば、非天然型核酸による安定化は、多くの場合解離速度を低くすることが主な速度論的機構とされているからである。

3. ハイブリッドの組み換えを加速する

DNA ハイブリッドの生体内での挙動には、形成、解離に加え相同鎖との交換がある。とりわけ、この交換は相同組み換え時の素反応として重要な反応である。2重鎖と相同的単鎖との鎖の交換反応もDNAのみでは生起しにくく、生体内ではリコンビナーゼ、たとえば大腸菌のRecAや酵母のRad51などのタンパクが鎖交換を媒介している。

先に述べたように、共重合体は3重鎖DNA形成を早めることが見いだされた。2重鎖あるいは3重鎖形成の律速段階は、数塩基が塩基対を形成するいわゆる核形成過程と言われている。従って、共重合体はこの核形成を促すことでハイブリッド形成を早めると予測される。同様な核形成が、2重鎖と

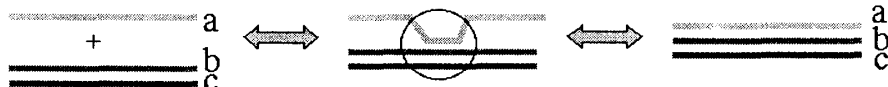
相同的単鎖との鎖の組み換え時の遷移中間体として考えられる(図4)。したがって、共重合体の2重鎖と相同鎖間の鎖交換反応も加速することが予測された。

図5に示すように一方の鎖に蛍光ラベルをした20塩基対の2重鎖を準備し、これと蛍光ラベルのない相同単鎖とを37℃でインキュベートした後、ポリアクリルアミド電気泳動により解析した。DNAのみで反応を行った場合、6時間経過後も交換率は20%程度であり、20塩基対と比較的短い2重鎖であっても鎖の交換が起こりにくいことを示している(図5)。一方、同じ反応を共重合体共存下(チャージ比 = 2)で行った結果、驚くべきことに5分で反応が完了することがわかった⁵。ゲル電気泳動によるアッセイでは短時間での反応を追跡できないので、2重鎖の双方を FITC および TAMRA でラベルし、蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)を利用し、連続的に反応を追った。その結果、共重合体は鎖の交換反応を3〜5万倍加速していることが見いだされた^{6, 7}。

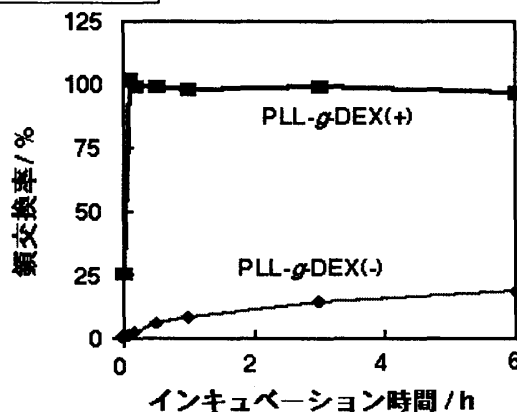
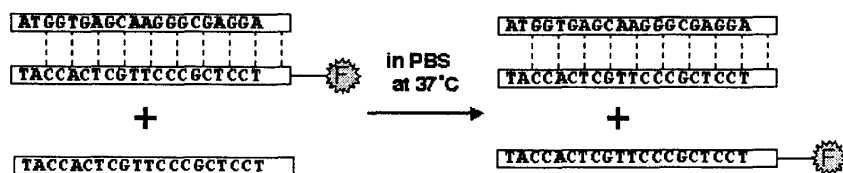
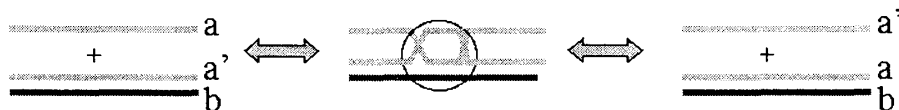
2重鎖形成

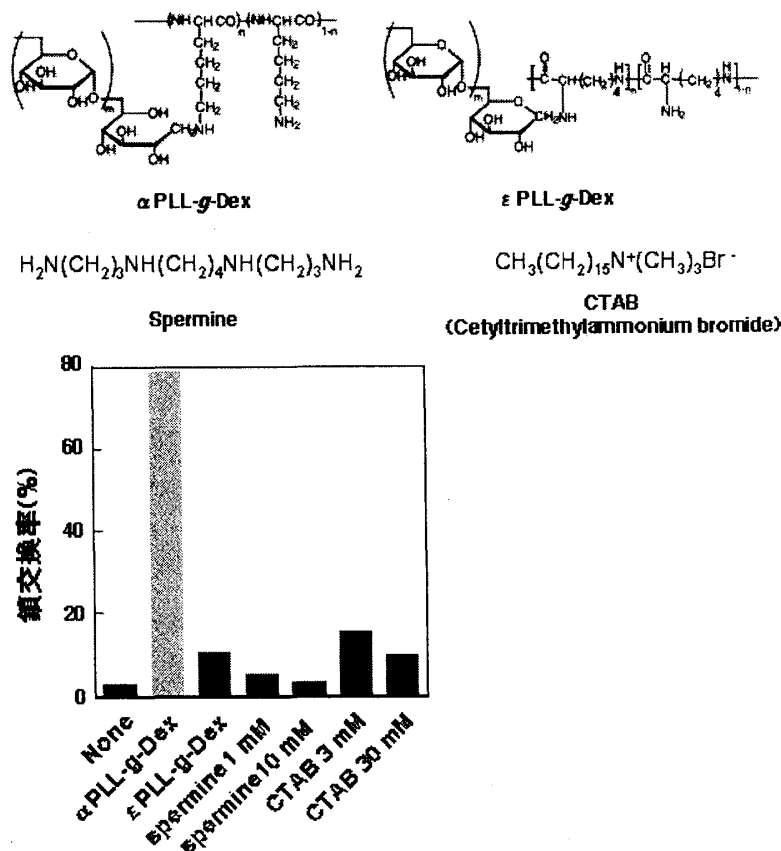


3重鎖形成



鎖交換





次に、図6に示す他のカチオン性化合物との比較を行った⁵。その結果、弱いながらも3重鎖を安定化するスペルミンは、ほとんど鎖交換を加速しなかった。また、カチオン性の界面活性剤である CTAB も効果は僅かであった。CTAB は、解離した相補鎖間の2重鎖形成を著しく速めることが知られているが、鎖の交換にはあまり強い活性を示さないことがわかる。一方、リシンの ϵ -アミノ基と α -カルボキシル基間でアミド結合し高分子主鎖を構成する ϵ -ポリリシンから作成したグラフト共重合体でも効果は僅かであった。 ϵ -ポリリシンは、通常の α -アミノ基と α -カルボキシル基間で縮合したポリリシンに比べて、高分子鎖に沿ったカチオン基の密度が低い。おそらく、ポリカチオン鎖のカチオン基密度が、鎖交換加速効果の発現に強く関与していると考えられる。

さて、2重鎖形成や3重鎖形成では、反応前後で構成するハイブリッド種が変化するが、図5に示したような鎖交換では反応前と反応後で構成される分子種の変化を伴わない(蛍光ラベルの影響が無視できるとして)。つまり、平衡反応系でのダイナミクスを観測していることになる。従って、図5の鎖交換反応を加速することは、鎖交換の活性化エネルギーを小さくしていることに他ならない。従って、予想したように、共重合体は、鎖交換の遷移中間体である核形成過程を促すことで、反応を著しく速めたと思われる。図4に示したように、鎖交換の核形成では、3本の DNA 鎖が近接しなければならない。従って、この核形成もリン酸基間の静電的反発により抑制されていることが想像される。そこで、このことを確かめるために、共重合体の不在下、鎖交換の塩濃度依存性を解析した。塩濃度が高くなるほど

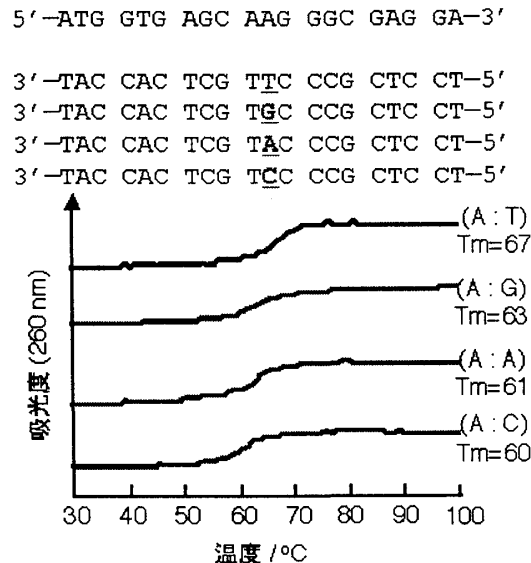
鎖交換速度も高くなり、1M NaCl 中では0.15M NaCl 中より約150倍速度が向上した^{6,7}。つまり、鎖交換の遷移中間体形成がイオン反発による抑制を受けていることを直接的に示している。詳細に検討すると、鎖交換の遷移中間体形成時には2重鎖形成の遷移中間体よりも強い静電的相互作用が働いており、この事が鎖交換を困難にする一因であると考えられた。一方、共重合体共存下で塩濃度依存性を解析すると、共重合体の加速効果は塩濃度の上昇に伴って顕著に低下した。高塩濃度下で共重合体とDNAとのイオンの相互作用が弱められた結果、加速効果が低下すると考えられる。これらの知見を併せて考慮すると、共重合体はDNA鎖間の静電反発を緩和し核形成を促すことで、交換反応を加速していると結論される。つまり、共重合体はハイブリッド形成における遷移中間体を安定化し、DNAのフォールディングを媒介する分子シャペロンとしての機能を持つと位置づけられよう。

4. 鎖の交換を利用した一塩基変異解析

ヒトゲノムの配列情報がほぼ明らかにされ、遺伝子機能の解明が進むにつれて、遺伝子タイピングの有用性が一段と増しつつある。とりわけ、一塩基多型 (SNPs) は、疾患に対する罹患率や薬物代謝および薬物効果の個人差をタイピングする上で、昨今特に注目されている。SNPsのデータベース化もすさまじい勢いで進んでおり、遺伝子機能に与えるSNPsの解明が今後進展すれば、医療の現場で患者のSNPsタイプに基づいたテーラーメイド医療が実現する日もそう遠くないと期待される。未知のSNPsの同定には、質量分析装置を用いる手法を中心に進められている。一方で、既知のSNPsに対する検体DNAのタイピングは、当初、プローブ鎖とサンプルDNAとのハイブリダイゼーションに原理をおく手法が種々試みられたが信頼性の高い結果を得るには至らないケースが多く見られた。現在では、リガーゼ、ポリメラーゼ、クリパーゼなどDNAに作用する酵素を利用する手法、つまり酵素の基質認識能に頼る手法に注目が移っている。しかしながら、数の多いSNPsと遺伝子機能との関連を多くの検体で検討するには、より早く、より低コストにSNPsを解析する必要があり、これらの条件を満足する新しい手法の開発には依然強い要望がある。

一塩基変異の有無をプローブDNAとのハイブリダイゼーションを利用して区別する手法は、基本的には一塩基ミスマッチを含む2重鎖とフルマッチ2重鎖の安定性の差を利用している。当然ながら、一塩基ミスマッチがハイブリッドの安定性に与える影響は、DNA鎖が長くなるほど小さくなる。たとえば8塩基中の一塩基の変異は、プローブDNA鎖とのハイブリッドの安定性に強い影響を与えるが、DNA鎖が12残基、16残基と長くなるにつれ、一塩基ミスマッチがハイブリッドの安定性に与える影響は小さくなる。図7は、20bp 2重鎖中の一塩基ミスマッチが融解挙動に与える影響を示す。フルマッチ2重鎖の T_m が67°Cであるのに対して、中央にミスマッチを持つ2重鎖の融点は60°C〜63°Cであり、その差は大きくても7°Cである。さらに、これらの転移は相互に重なっており、フルマッチ体のみを完全にハイブリダイゼーションさせる温度を設定することは、原理上不可能なことがわかる。実際に同等の配列を用いて、フルマッチ体とミスマッチ体を競合的にハイブリダイゼーションさせても、形成されるフルマッチハイブリッドとミスマッチハイブリッドの量は2割程度の差しかなく、通常のハイブリダイゼーション法では検出が困難なことが確認された。さらに、複数の配列を同時に解析する手法では、各配列に対する

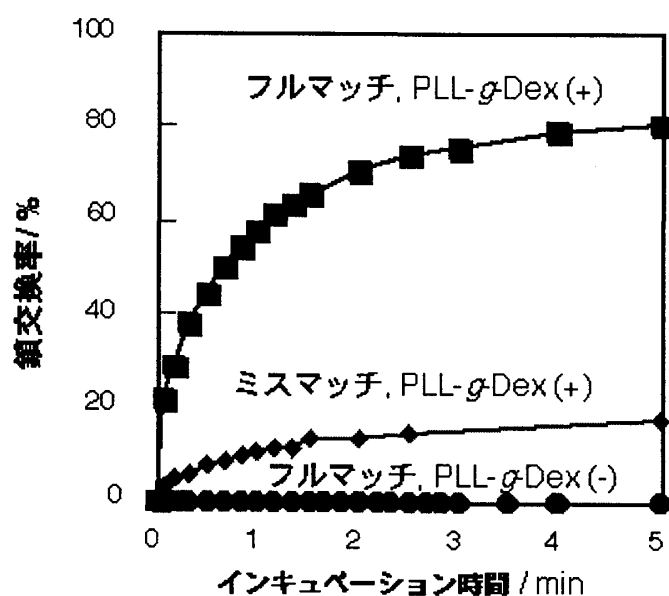
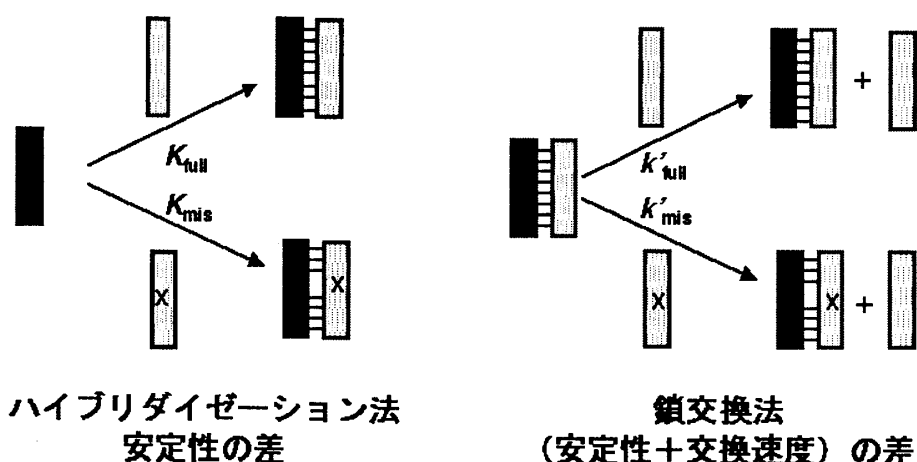
ハイブリダイゼーション温度を共通にする必要があり、プローブ DNA の設計に留意が必要となる。とりわけ、DNA チップのように多数の配列を同時に検出しようとする、それぞれに共通のハイブリダイゼーション温度を設定することは現実には不可能と言ってよい。



このように、ハイブリッドの安定性の差異のみを検出原理とする手法は、分解能を高めたりハイスループット化を行う上で、克服すべき難題が多い。そこで筆者らは、あらたに、2重鎖をプローブとし、サンプル単鎖配列との鎖交換速度の差を利用した一塩基変異解析手法に着眼した。その検出フォーマットを図8に示すが、たとえばプローブとなる2重鎖に蛍光ラベルを導入し、サンプル単鎖配列との交換の速度をFRETにより検出する手法である。従来のハイブリダイゼーション法は、上述したように形成されるハイブリッドの安定性のみに依存するが、鎖交換法ではハイブリッドの安定性に加え、鎖交換の速度の差が加味される分、変異の影響が強調されるはずである。とりわけ、鎖の置き換え過程においてミスマッチ部位が強い影響を与えることは、想像しやすい。一方で、鎖交換反応は通常極めて遅い緩慢な反応であるが、前節で述べたように、これはポリカチオンくし型共重合体を利用することで克服できるはずである。

実際に図7で利用した配列で T_m の差が4°Cともっとも検出が困難と思われる T→G の変異体を例に、鎖交換法による解析を行った。図9に示すように、2重鎖プローブと完全に相補的なサンプル配列でも、共重合体がない場合は鎖交換がほとんど進まない。一方で、共重合体を共存させると速やかに進行し5分で8割ほど交換が完了する。しかし、サンプル配列として一塩基のミスマッチを含む配列では共重合体共存下でも、交換があまり進行しない。結果的には、1〜3分後の蛍光光度を測るだけでも、ミスマッチ配列とフルマッチ配列が約5倍の蛍光強度の差として充分区別できることがわかる。さらに他の2種のミスマッチ体において鎖交換法を適用した結果、鎖交換速度はより大きく低下し、2重鎖プローブと共重合体の鎖交換加速機能を組み合わせることで、短時間で比較的高い分解能で変異の有無が検出できることが確認された。ここで用いた FRET では1 pmol の検体 DNA で検出可能であったが、

昨今の新しい定量技術との組み合わせにより、さらなる高感度化も可能と考えている。



この鎖交換法の特徴の一つは、検出温度が比較的広い範囲に設定できることである。実際に、10℃程度検出温度を下げても同等な検出が可能であった。さらに、融解温度が異なる他の配列に対する一塩基変異の有無も、鎖交換法では同一温度での検出が可能であった。これらの事実から、多数の配列を同時に解析する上で、この手法が有用であると期待している。

5. まとめ

DNA をポリアニオンとして捕らえ、カチオン性高分子との複合体形成を制御することで、DNA のハイブリッドの安定化や形成促進ができることがわかった。ハイブリッド形成つまり DNA のフォールディング過程を促す共重合体は、いわばテーラーメイドされた人工 DNA シャペロンと呼ぶこともできよう。元

来、分子生物学において「分子シャペロン」という言葉は、遺伝子のクロマチン形成を媒介するタンパク質に使われ始めた言葉である。そこにも DNA とヒストン間のイオンの相互作用を制御する機能が含まれると考えると、共重合体との機能の類似性に興味を抱く。一方で、共重合体の鎖交換加速機能を利用することで、新しい一塩基変異解析法の可能性が広がってきた。DNA 鎖の正しいフォールディングを助ける上でも、共重合体は何らかの役割をしているかもしれない。ここで用いた共重合体は、構造を最適化したものとはほど遠い第一世代である。合成高分子材料の利点は様々に構造をいじれる点であり、今後、官能基の種類や分子量などの高分子構造を改変することでより機能の高い材料へ進化させることができよう。尚、本稿で取り上げた研究は多くの共同研究者の努力の賜であることを記し、感謝の意を表したい。

(丸山厚、核酸シャペロン機能を持つ高分子設計と SNPs 解析への応用、*Bio Industry*, 19, 38-46 (2002)より一部改訂して転載)

引用文献

- ¹ 参考書として、Pharmaceutical aspects of oligonucleotides, P. Couvreur, C. Malvy, eds., Taylor & Francis, London (2000).
- ² A. Maruyama, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, Comb-type polycations effectively stabilize DNA triplex, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 3-6 (1997), A. Maruyama, H. Watanabe, A. Ferdous, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, Characterization of interpolyelectrolyte complexes between double-stranded DNA and polylysine comb-type copolymers having hydrophilic side chains, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 292-299 (1998).
- ³ H. Torigoe, A. Ferdous, H. Watanabe, T. Akaike, A. Maruyama, Poly(L-lysine)-graft-dextran copolymer promotes pyrimidine motif triplex DNA formation at physiological pH. Thermodynamic and kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6161-6167 (1999).
- ⁴ A. Ferdous, H. Watanabe, T. Akaike, A. Maruyama, Poly(L-lysine)-graft-dextran copolymer: Amazing effect on triplex stabilization under physiological relevant conditions (in vitro), *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3949-3954 (1998), A. Ferdous, H. Watanabe, T. Akaike, A. Maruyama, Comb-type copolymer: Stabilization of triplex DNA and possible application in antigene strategy, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1400-1405 (1998).
- ⁵ W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, A. Maruyama, Comb-type cationic copolymer expedites DNA strand exchange while stabilizing DNA duplex, *Chem. Eur. J.*, **7**, 176-180 (2001).
- ⁶ W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, Polycation graft copolymers accelerating DNA strand exchange: involvement of ionic interaction, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, No. 1, 151-152, (2001).
- ⁷ W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, DNA strand exchange stimulated by spontaneous complex formation with cationic comb-type copolymer, *J. Am. Chem. Soc.*, Accepted.