

解 説

細胞内での核酸の挙動を明らかにする熱力学的解析

高橋 俊太郎^a, 杉本 直己^{a,b}^a 甲南大学先端生命工学研究所^b 甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科

(受取日: 2021年10月11日, 受理日: 2021年11月16日)

Thermodynamic Analysis to Elucidate the Behaviors
of Nucleic Acids in CellsShuntaro Takahashi^a, and Naoki Sugimoto^{a,b}^a FIBER (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research), Konan University^b FIRST (Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and
Technology), Konan University

(Received Oct. 11, 2021; Accepted Nov. 16, 2021)

The folding and unfolding of nucleic acids (DNA and RNA) are essential for these functions in cells. These behaviours are also widely used for various technical applications using nucleic acids. To understand the biological mechanism of nucleic acids function and design materials of nucleic acids, the biophysical approach using thermodynamics is highly useful and important. The stability prediction of duplexes of nucleic acids have been developed and widely used. However, it has been also noted that such predictions cannot be always adopted to prediction in various solution conditions, especially the cellular conditions, because the concentrations of cations and cosolutes in the intracellular condition termed molecular crowding are different from those in the standard experimental condition. Moreover, the crowding condition in cells is spatiotemporally variable. Therefore, it is highly demanded to establish the prediction method available in cellular conditions for the stability of various structures of nuclei acids. This article reviews the biophysicochemical background predicting nucleic acids stability and our recent studies for the prediction of these stability in the cellular conditions.

Keywords: nucleic acids, thermodynamics, duplex, stability prediction, molecular crowding, intracellular condition.

1. はじめに

核酸 (DNA や RNA) は遺伝物質として生命体が用いる生体分子である。核酸に関する科学はこの10年で飛躍的に進歩した。特に、クリスパーキャスに代表されるゲノム編集技術や、生物ゲノムの化学合成技術、さらには新型コロナウイルスワクチンに用いられる核酸医薬など、細胞の中で核酸を自在に操る技術開発が著しい。また、ワトソンとクリックが提唱した二重らせん構造とは異なる非二重らせん構造も細胞内で次々と発見されており、細胞内での核酸の複雑な振る舞いも徐々に明らかになりつつある。現在、様々な研究者が核酸研究に参入し、細胞を用いた多くの研究展開がなされている。核酸を化学的に扱う技術は細胞外で非常に精緻に作り上げられている一方、細胞内での核酸の挙動は未だブラックボックスであることが多く、核酸の細胞内挙動を定量的に理解するための物理化学的基盤の構築が待ち望まれている。

核酸は、糖、塩基、リン酸からなるヌクレオチドを単位とするアニオン性高分子である。核酸の挙動を知る上で、

その構造安定性を解析し、定量的に明らかにすることが重要である。ギブス自由エネルギー変化 (ΔG) は構造安定性を定量的に示すパラメータとして最も汎用的に用いられている。細胞内での核酸の挙動を明らかにすることは、細胞内での核酸の構造安定性を ΔG で記述し、その反応を理解することにある。そこで本稿では、我々が近年開発してきた細胞内での核酸の挙動を理解する新たな物理化学的な取り扱いについて解説するとともに、それにより明らかになってきた核酸の細胞内での新しい役割に関する知見も紹介する。

2. 最近接塩基対モデルによる核酸の
二重らせん構造の安定性予測

核酸は、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T: DNA の場合) またはウラシル (U: RNA の場合) の塩基残基を含む直鎖状のアニオン性ポリマーである。AT (または AU) と GC のペアというワトソン・クリック塩基対のルールに基づき、それぞれの相補的な鎖が結合し

て二重らせんを形成する。熱力学の観点からは、5つの要因が二重らせんの安定性に影響を与える (Fig.1)。¹⁾ まず、塩基対は、(i) 塩基対間の水素結合、(ii) 隣接する塩基ペア間のスタッキング相互作用に寄与する。ワトソン・クリック塩基対では、水素結合のドナーとアクセプターを揃えるために塩基が向き合う。このような塩基対間の相補性が、高い選択性と安定性をもたらす。また、塩基対上の芳香環は電子密度が高く、他の芳香環とπスタッキング相互作用を介して相互作用することができる。一方、ランダムなコイル構造から二重らせんを形成すると、エネルギー的には (iii) 構造エントロピーのペナルティを伴う。さらに、(iv) カチオンによるアニオン性電荷の中和や (v) 水は二重らせん構造形成に重要な影響を与える。

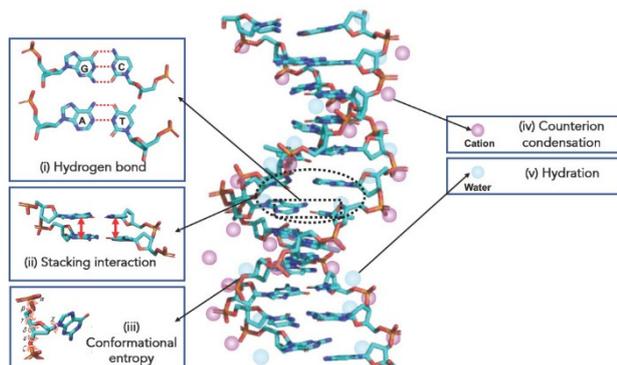


Fig.1 Factors determining the thermodynamic stability of a canonical duplex structure. (Color online).

核酸構造の安定性解析は、温度変化による二重らせん構造から一本鎖への融解挙動を紫外線 (UV) や円偏光二色性 (CD) 分光法などの様々な分光法で観察することで行う。この融解曲線は温度の関数として 260 nm の吸光度がシグモイド曲線を示し、その中間点が融解温度 (T_m) となる。この転移を二重鎖の2状態転移と考えると、 T_m は核酸鎖の濃度によって式 (1) のように変化する。

$$1/T_m = 2.303R(\log(C/n))/\Delta H^\circ + \Delta S^\circ/\Delta H^\circ \quad (1)$$

ここで、 R は気体定数 ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)、 C_t は核酸鎖の総濃度である。 n は、二重鎖が自己相補的であれば 1 に、二重らせんが等濃度で非自己相補的であれば 4 になる。 C_t が異なる複数の T_m 値の測定から、式 (1) を用いたデータ解析により、二重らせん形成時のエンタルピーとエントロピーの変化 (ΔH° と ΔS°) が得られる。さらに ΔG° 値は、式 (2) を用いて求めることができる。

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (2)$$

以上のように、*in vitro* では加熱による構造融解を分光学的に解析する手法が可能であるが、そのような手法を細胞内で適用することは極めて困難である。そこで重要になるのが、細胞内での核酸構造の安定性を予測する手法の開発である。*in vitro* では実験を行わずに二重らせん構造の熱力学的パラメータを予測する手法が開発されている。この手法は最近接塩基対 (Nearest Neighbor: NN) 法と呼ばれ、ある塩基対の安定性が、その塩基対と隣の塩基対との相互作用によって決定されるという概念に基づいている。現在、NN 法は二重らせん構造の熱安定性を予測するために広く用いられている。^{2,4)} 緩衝液条件下では、DNA/DNA、RNA/RNA、RNA/DNA ハイブリッド二重鎖の熱力学的パラメータ (ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG° 、 T_m) を予測する方法がすでに確立されている。^{2,3,5)}

NN モデルによると、二重鎖形成の熱力学的パラメータは3つの項からなる。1つ目は、二重らせんの最初の塩基対を形成するためのらせん開始の自由エネルギー変化である。「開始因子」と呼ばれるこのパラメータは、少なくとも一つの GC 塩基対を有する二重らせんの場合と AT のみで二重らせんが形成される場合で異なる。³⁾ 第2項は、後続の各塩基対形成の合計で反映される、らせん伝播の自由エネルギー変化である。DNA/DNA または RNA/RNA には10個の NN の組み合わせがあり、RNA/DNA ハイブリッドには16個の組み合わせがある。第3項は、自己相補的な鎖のエントロピー項を混合することによる自由エネルギー変化である。したがって、トータルの ΔG°_{37} (37°C での二重鎖形成の自由エネルギー変化) は、式 (3) で与えられる。

$$\Delta G^\circ_{37(\text{total})} = \sum_i n_i \Delta G^\circ_{37, \text{NN}(i)} + \Delta G^\circ_{37(\text{init})} + \Delta G^\circ_{37(\text{sym})} \quad (3)$$

ここで $\Delta G^\circ_{37, \text{NN}(i)}$ は、 i 個 (DNA/DNA の場合 10 個) ある各最近接塩基対形成の標準的な自由エネルギー変化である (例えば、 $\Delta G^\circ_{37, \text{NN}(1)} = \Delta G^\circ_{37}(\text{AA/TT})$, $\Delta G^\circ_{37, \text{NN}(2)} = \Delta G^\circ_{37}(\text{TA/AT})$, など)、 n_i は各最近接塩基対 i の出現回数、 $\Delta G^\circ_{37(\text{init})}$ は開始因子である。また、 $\Delta G^\circ_{37(\text{sym})}$ は、二重鎖が自己相補性の場合には $+0.43 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$) になり、非自己相補性の場合には 0 になる。

NN パラメータを決定するために、NN の組み合わせの頻度に偏りがないように様々な配列を設計し調製し、UV 融解法などで、設計した配列の熱力学的パラメータを算出する。これらの実験値を基に、線形最小二乗法に基づく計算により、パラメータセット (DNA 二重らせんの場合、DNA/DNA の 13 個のパラメータ: 10 個のワトソン・クリック NN 塩基対、末端対の 2 個の開始因子、および自己相補的配列の対称性パラメータ; Table 1) を決定する。

Table 1 Nearest-neighbor parameters ($\Delta G^\circ_{\text{NN}}$) for DNA/DNA duplex formation in different solution conditions at 37°C .

Nearest-neighbor set	1 M NaCl in the absence of cosolute ^a	100 mM NaCl in the presence of 40 wt% PEG 200 ^b
	(kcal mol ⁻¹)	(kcal mol ⁻¹)
d(AA/TT)	-1.00	-0.55
d(AT/TA)	-0.88	-0.28
d(TA/AT)	-0.58	-0.16
d(CA/GT)	-1.45	-1.00
d(GT/CA)	-1.44	-0.89
d(CT/GA)	-1.28	-0.91
d(GA/CT)	-1.30	-0.87
d(CG/GC)	-2.17	-1.38
d(GC/CG)	-2.24	-1.31
d(GG/CC)	-1.84	-1.25
Initiation per GC	0.98	0.76
Initiation per AT	1.03	1.00
Symmetry factor	0.40	0.40

^aData obtained from the report of SantaLucia.⁶⁾ ^bData collected from our recent report.⁷⁾

この NN モデルに基づけば、同じ NN セットと開始因子を持つ異なる配列は、同じ安定性を持つはずである (Fig.2)。例えば、d(ATGAGCTCAT)と d(ATCAGCTGAT)という異なる配列は、同じ NN セットを持ち、二重鎖の開始因子も同じである (Fig.2)。一方、配列 d(AGTCATGACT)は、AT 含有量は同じだが、NN セットが上記の配列と異なるため、

上記の配列と比べて安定性が異なる (Fig.2)。NN パラメータは、我々のグループを含むいくつかのグループによって開発され、様々なタイプの DNA/DNA, RNA/RNA, RNA/DNA ハイブリッド二重鎖、およびペプチド核酸と DNA で形成される二重鎖の安定性を予測するために一般的に使用されてきた。⁸⁻¹⁶⁾ これらの活用例から、NN モデルは、あらゆる種類の二重構造の安定性 ΔG_{37}° および融解温度 (T_m) の正確な予測に一般的に適用できることが示されている。

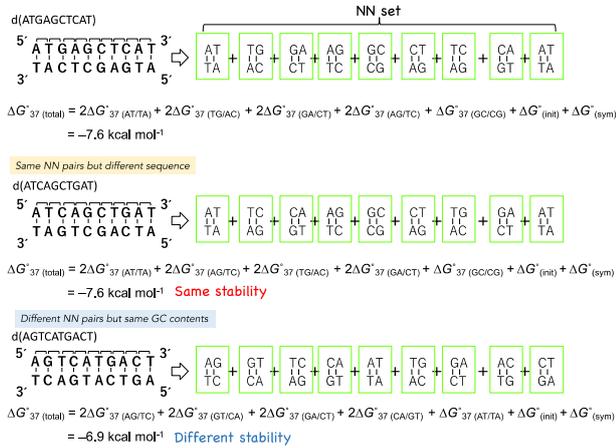


Fig.2 Scheme of prediction of the duplex stability by NN methods. (Color online).

3. 分子クラウディング環境での DNA 二重らせん構造の安定性

上述の予測法は PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) などの条件設計など、試験管で行う核酸技術に幅広く活用されている。しかしながら、細胞内では、この予測が必ずしも一致しない。その原因として考えられるのが、細胞内の分子環境にある。試験管内とは異なり、細胞内には様々な生体高分子が高濃度に混雑した状態である分子クラウディング環境にある (Fig.3(a))。例えば、大腸菌内の生体分子の総量は、タンパク質 200 mg mL⁻¹, RNA 75 mg mL⁻¹, DNA 10~20 mg mL⁻¹ を含めてトータル 300~400 mg mL⁻¹ と推定されている。真核細胞では細胞質内に 50~400 mg mL⁻¹ の生体分子が存在している。また、細胞質に 50~400 mg mL⁻¹, 核に 100~400 mg mL⁻¹, 核小器官に 100~200 mg mL⁻¹, ミトコンドリアマトリックスに 270~560 mg mL⁻¹ の生体分子が含まれているなど、細胞の小器官によっても分子クラウディング環境が異なる。¹⁷⁻²⁴⁾ さらに、細胞の種類や分化段階、細胞の体積などによっても細胞内のクラウディング環境が変化する。核酸の溶液中での物性は、その高分子電解質としての挙動を反映しているため、核酸構造の安定性は、細胞内の分子クラウディングに依存する (Fig.3(b),(c))。試験管内環境と比べて、分子クラウディング環境では、水の活量低下、誘電率の低下や排除体積効果などが顕著に異なる。そのため、前節で示した核酸の安定性を決定する項目の中でも、カチオンと水和に対する影響が、分子クラウディング環境では特に大きい。したがって、核酸に関わる生体反応のメカニズムの解明や、細胞内での遺伝子治療のための材料開発のためには、細胞内の条件(分子クラウディング)を反映した予測法の改良が必要である。

このような細胞内の分子クラウディング環境を模倣するために、我々は中性の水溶性高分子を高濃度に溶かした溶液を用いて核酸構造の物性を解析してきた。²⁵⁾ 例えば、ポリエチレングリコール (PEG) は、分子クラウディング

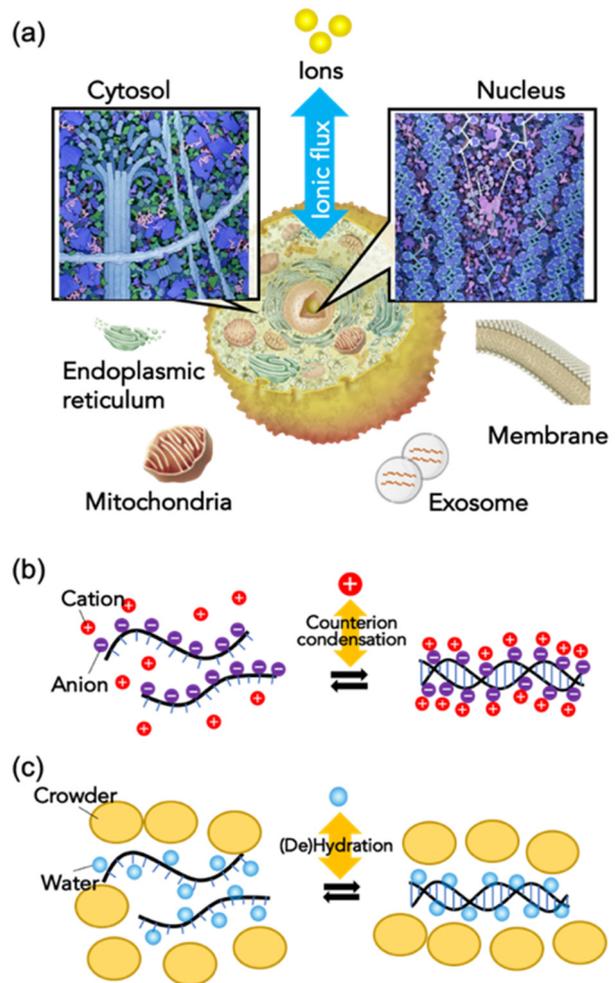


Fig.3 Intracellular environments and helix formation of nucleic acids depending on the solution physical properties. (a) Illustration of intracellular environments related to nucleic acids. The ionic environment is dynamically changed, and numerous macromolecules are present. (b, c) Schematic illustrations of counterion condensation and (de)hydration upon helix formation of nucleic acids. The excluded volume caused by crowders also affects helix stability. Reproduced from Ref. 1 with permission from the Royal Society of Chemistry. (Color online).

状態を模倣するために最も広く使用されている。また、多糖類 (フィコールやデキストラン) もクラウディング試薬として用いられる。これらの非イオン性ポリマーは、水溶液への溶解性が高く、標的核酸との相互作用が少ないと考えられる。さらに、分子量の異なるこれらのポリマーは容易に入手できることも汎用される特徴の一つである。そこで、分子クラウディング環境での核酸構造の安定性予測を開発するために、我々はこれらの水溶性高分子を高濃度に溶かした溶液中での DNA 二重らせん構造の安定性を系統的に解析した。^{7,26)} Fig.4(a)は 100 μM の d(ATGAGCTCAT) の 40 wt% PEG 200 (平均分子量 200) の非存在下および存在下での UV メルティング挙動を示している。融解温度 (T_m) は希薄な溶液で 46.4 °C に対し、クラウディング状態での 34.3 °C に低下した。この結果は、高濃度の PEG200 のような分子クラウディング環境では、DNA 二重らせんは大きく不安定化することを示している。続いて、分子クラウディング環境においても NN モデルが成り立つかどうかを検討するために、異なる配列であるが同じ NN セットを有する DNA 二重らせんの安定性を比較した。Fig.4(b)は、40 wt% の PEG200 存在下での、d(GATCCGATC)(6a)および d(GGATCGATCC)(6b), d(ATGAGCTCAT)(7a) および

d(ATCAGCTGAT)(7b)のUV融解曲線である。6と7のペアの配列の融解曲線はほぼ一致した。 T_m は、6aと6bではそれぞれ37.3と38.2℃、7aと7bではそれぞれ34.3と34.0℃であった。これらの結果から、クラウディング環境下でもNNモデルが成り立つことが示された。

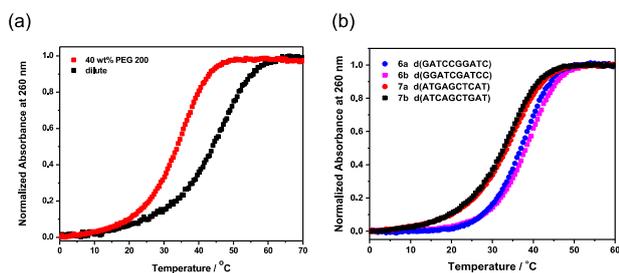


Fig.4 (a) Normalized UV melting curves of d(ATGAGCTCAT) (7a) in 0.1 M NaCl-phosphate buffer in the absence (black) and presence (red) of 40 wt% PEG 200. (b) Normalized UV melting curves of d(GATCCGGATC) (6a), d(GGATCGATCC) (6b), d(ATGAGCTCAT) (7a) and d(ATCAGCTGAT) (7b) in buffer containing 0.1 M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0) and 1 mM Na₂EDTA in the presence of 40 wt% PEG 200. Oligonucleotide sequences are mentioned in the legends. The concentration of these oligonucleotides was 100 μM. (Color online).

4. DNA二重らせん構造の安定性を様々な溶液環境中で予測するための安定性予測の拡張

そこで、PEG200存在下の分子クラウディング環境におけるDNA二重らせんのNNパラメータを算出した (Table 2)。⁷⁾ 希薄溶液中のNNパラメータ (ΔG_{37}°) と比較して、分子クラウディング環境では各NNパラメータが増加し、一様に不安定化したが、塩基対の組み合わせで不安定化の度合いは変化した。中でもGCのみのペアからなるNN (d(CG/GC), d(GC/CG), d(GG/CC))の相対的な不安定化は、他のNNペアよりもかなり高かった。これは、GCペアはATペアに比べて安定化のために多くの水分子を必要とするため、PEG200により水の活量が低下した環境下では、GCのみからなるNNペアはより大きな不安定性を示したためであると考えられる。²⁷⁾ さらに、最も顕著な違いは開始因子に見られ、PEG200を含まない溶液と比較して、分子クラウディング環境下での二重らせん形成開始に対する ΔH° および ΔS° に大きな違いが見られた。

さらに我々は、PEG200の条件で得られたパラメータを拡張し、様々な分子クラウディング環境でも用いることができるNNパラメータの開発に取り組んだ。ここでは、37℃での最近接塩基対あたりの安定性 ($-\Delta G_{37,NN}^{\circ}$)は、塩基対同士の水素結合やスタッキング相互作用や構造エントロピー (①+②+③)、カチオンによる寄与 (④)、および分子クラウディングによる水和などの環境の寄与 (⑤)の総和と考えた (式(4))。

$$\Delta G_{37,NN}^{\circ} = \Delta G_{37,NN}^{\circ}(\text{①+②+③}) + \Delta G_{37,NN}^{\circ}(\text{④}) + \Delta G_{37,NN}^{\circ}(\text{⑤}) \quad (4)$$

実際の実験からは、上記要因①+②+③ (第一項)が④ (第二項)および⑤ (第三項)にそれぞれ含まれた形として得られることから、(5)式を用いることが多い。

$$\Delta G_{37,NN}^{\circ} = \Delta G_{37,NN}^{\circ}(\text{cation}) + \Delta G_{37,NN}^{\circ}(\text{crowder}) \quad (5)$$

任意の濃度のNaClにおける $\Delta G_{37,NN}^{\circ}(\text{cation})$ パラメータは、各NN塩基対の[Na⁺]依存性についてすでに報告されており、希薄溶液環境下での既存のパラメータから算出することが

できる。²⁸⁾ $\Delta G_{37,NN}^{\circ}(\text{crowder})$ パラメータは、クラウディング剤存在下において、DNA二重らせん構造の不安定化が分子クラウディング環境下での水の活量変化と直線的に相関することから (Fig.5)、式(6)の通りに水の活量変化 Δa_w に対する線形関数から求めることができる。

$$\Delta G_{37,NN}^{\circ}[\text{crowder}] = m_{cs} \cdot \Delta a_w \quad (6)$$

ここで m_{cs} はクラウディング剤の構造に依存する係数であり、PEGと1,2-ジメトキシエタン (1,2 DME)は最も大きく (最も不安定化する)、エチレングリコール (EG)とグリセロール (GOL)は最も小さく (あまり不安定化しない)、1,3-プロパンジオール (1,3 PDO)と2-メトキシエタノール (2-ME)は、この2つの中間程度を示した (Fig.5およびTable 2)。水の活量は浸透圧測定で実測することができる。

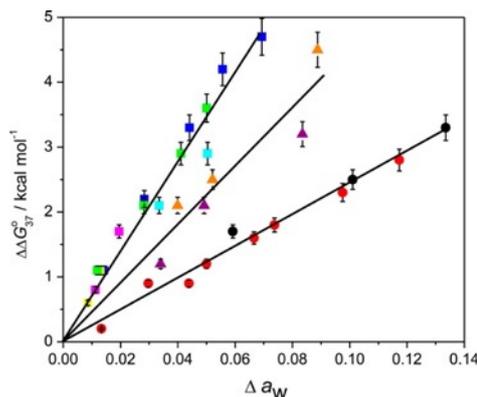


Fig.5 Difference in ΔG_{37}° between crowded conditions and those without cosolute ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ}$) vs. Δa_w for d(ATGCGCAT) with EG (red circles); GOL (black circles); 1,3 PDO (purple triangles); 2-ME (orange triangles); 1,2 DME (cyan squares); PEG 200 (blue squares); PEG 2000 (magenta squares); and PEG 8000 (yellow squares) at 1 M NaCl and with PEG 200 at 100 mM NaCl (green squares).⁷⁾ PEGs of different molecular weights and 1,2 DME belong to the same group. EG and glycerol are also in one group, whereas 1,3 PDO and 2-ME are in another. Reproduced from ref. 7 with permission from the National Academy of Sciences, U. S. A., copyright (2020). (Color online).

Table 2. NN parameters for 100 mM NaCl and 40 wt% PEG 200 with prefactors (m_{cs}) for different cosolutes^a.

NN set	ΔG_{37}° NN, [cation] (kcal mol ⁻¹)	ΔG_{37}° NN, [40wt% PEG 200] (kcal mol ⁻¹)	$m_{\text{PEG}/1,2}$ DME (kcal mol ⁻¹)	$m_{\text{EG/GOL}}$ (kcal mol ⁻¹)	$m_{1,3\text{PDO}/2-ME}$ (kcal mol ⁻¹)
d(AA/TT)	-0.65	0.10	2.0	0.7	1.3
d(AT/TA)	-0.60	0.32	6.4	2.2	4.2
d(TA/AT)	-0.36	0.20	4.0	1.4	2.6
d(CA/GT)	-1.23	0.23	4.6	1.6	3.0
d(GT/CA)	-1.20	0.31	6.2	2.2	4.1
d(CT/GA)	-1.11	0.20	4.0	1.4	2.6
d(GA/CT)	-0.93	0.06	1.2	0.4	0.8
d(CG/GC)	-1.85	0.47	9.4	3.3	6.2
d(GC/CG)	-2.05	0.72	14.4	5.0	9.5
d(GG/CC)	-1.69	0.44	8.8	3.0	5.8
Initiation per GC	0.98	-0.22	-4.4	-1.5	-2.9
Initiation per AT	1.03	-0.03	-0.6	-0.2	-0.4

^aSymmetry factor for ΔG_{37}° is 0.4 kcal mol⁻¹ for all cosolutes as it is independent of the crowding environment.

したがって、カチオン濃度、共溶質の種類、さらには水の活量をパラメータ化することで、様々な分子クラウディング環境における DNA 二重らせんの安定性を予測できる汎用性の高い予測法を開発することができた。

5. 細胞内環境の計測による細胞内環境下での DNA 二重らせんの安定性予測

実際の細胞内での二重らせん構造の安定性予測を行うためには、細胞内環境を調べる必要がある。そのためには溶液中の水の活量に応じて変化するプローブが必要となる。そこで我々が着目したのは DNA のグアニン (G) 四重らせん構造である。G 四重らせん DNA は、溶液環境に応じて異なるトポロジーへと構造変化を起こすことが知られている。²⁵⁾ 蛍光色素で修飾した G 四重らせんのトポロジーの変化を蛍光エネルギー共鳴移動 (FRET) で追跡することで、溶液の物性を解析することができる。²⁹⁾ このような FRET 型プローブとして、ヘアピン構造とヒテロメア由来の G 四重らせん構造を含む配列をデザインし、それぞれの末端に Cy3, Cy5 の蛍光色素で修飾した (Fig.6)。ヒテロメア DNA 配列は NaCl 溶液中でアンチパラレル型、KCl 溶液中でハイブリッド型、さらに KCl に 20 wt% PEG200 を添加した溶液中ではパラレル型を形成する。

調製した蛍光プローブについて各溶液中で Cy3 に対する Cy5 の蛍光強度比を FRET 効率として解析したところ、それぞれ異なる FRET 効率を示した (Fig.7(a))。これらの結果から、環境によって変化する G 四重らせん構造のトポロジーの違いを FRET 効率から評価できることが示された。また、G 四重らせん構造は四重鎖に配位するカチオンによって安定化される。そこで、G 四重らせん構造の安定性を変化させるために FRET 効率の塩濃度依存性を最大 FRET 効率の半分になる塩濃度 ($C_{1/2}$) として比較したところ、KCl+PEG200 中で最も少ない $C_{1/2}$ で FRET 効率が最大となった (Fig.7(a))。また、異なる分子クラウディング剤が存在する溶液では PEG200, Ficoll70, BSA (牛血清アルブミン) の順に $C_{1/2}$ の値が大きくなった (Fig.7(b))。したがって、トポロジーや分子クラウディングの環境に応じて変化する G 四重らせん構造の安定性についても FRET 効率の違いで評価できることを確認した。

続いてプローブ DNA を細胞内に添加し、その FRET 効率の違いを解析することで、プローブ DNA 周囲の分子クラウディング環境を解析した。プローブ DNA を HeLa 細胞内に添加し、共焦点顕微鏡を用いて細胞内各所での FRET 効率を測定した結果、核内の FRET 効率は細胞質よりも高い傾向が観察された。その中でも、核内の核小体では特に

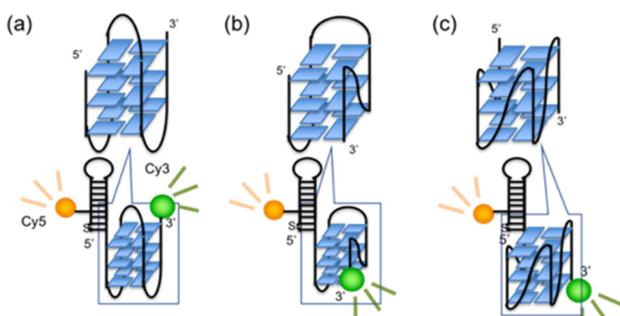


Fig.6 G-quadruplex structures of human telomere sequence and possible conformations of the DNA probe H-telo with the following G4 topology: (a) anti-parallel in NaCl solution, (b) mixed in KCl solution, and (c) parallel in KCl solution with concentrated PEG. (Color online).

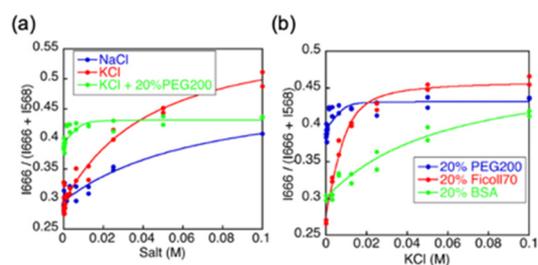


Fig.7 Changes in FRET efficiency of DNA probe in response to (a) salt (NaCl, KCl, and KCl with 20 wt % PEG200); and (b) crowding (20 wt% PEG200, 20 wt% Ficoll70, and 20 wt% BSA). The solution was buffered with 30 mM Tris-HCl (pH 7.0), and the temperature was 37 °C unless otherwise indicated. Reproduced from ref. 29 with permission from the American Chemical Society, copyright (2020). (Color online).

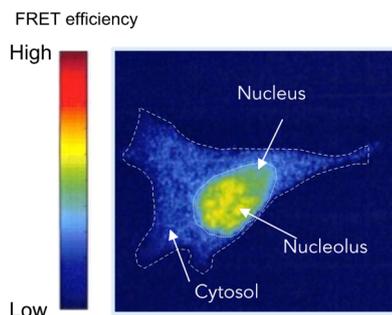


Fig.8 FRET analysis of living HeLa cells injected with DNA probes at 25 °C. Reproduced from ref. 29 with permission from the American Chemical Society, copyright (2020). (Color online).

高い FRET 効率を示した (Fig.8)。したがって、核小体内部は PEG200 を含む溶液の物性で再現できる分子クラウディング環境にあることが推定された。

実際に PEG200 を含む環境で核小体内での核酸の安定性を予測できるか検証するために、前節で解説した汎用型の安定性予測パラメータを用いて、核小体における DNA の安定性を解析した。Nott らは、核小体を模した天然変性タンパク質 Ddx4 が形成する液液相分離構造中での DNA 二重らせん構造の安定性を解析している。³⁰⁾ ここでは、外部の希薄環境と比較して DNA 二重鎖 d(ACTG)₃ および d(ACTG)₄ の不安定化 ($\Delta\Delta G^{\circ}_{25}$) は、それぞれ 3.0 および 2.3 kcal mol⁻¹ であると報告している。そこで、d(ACTG)₃ および d(ACTG)₄ の PEG200 内での不安定化を計算したところ、50 wt%PEG200, 100 mM NaCl での不安定化は、それぞれ 2.0 および 2.8 kcal mol⁻¹ となり、報告されている値とよく一致した。以上のことから、50 wt%PEG200 と 100 mM NaCl を用いた NN パラメータは、核小体内の DNA の安定性を予測するのに適しており、細胞内小器官への適用が可能であることが示唆された。

6. おわりに

本解説では、主に二重らせん DNA 構造の安定性予測についての我々の最近の取り組みを紹介した。二重らせんに関しては DNA だけでなく、RNA 二重らせんや RNA/DNA ハイブリッド二重らせんも存在する。我々は RNA/DNA ハイブリッドに関しても、細胞内環境を考慮した安定性予測パラメータを開発しており、それによりゲノム編集技術の効率を改善できることも報告している。³¹⁾ 一方、二重らせん以外の非二重らせん構造 (三重らせんや四重らせんな

ど)の安定性予測については未だ開発が進んでいないのが現状である。これらの構造は遺伝子発現を制御する働きがあり、がんや神経疾患などの発症に関わることが明らかになりつつある。したがって、非二重らせん構造の細胞内環境での安定性予測の開発は喫緊の課題である。さらに、細胞の環境は、細胞内の局所的な空間軸だけでなく、細胞周期とった時間軸でも変化する。今後はこれらの因子についてもパラメータ化することで、細胞内での核酸の挙動を詳細に予測できるようになると考えられる。昨今の新型コロナウイルスワクチンが一定の成功を収めたことで、今後は核酸を用いた医工学技術が飛躍的に進展し、活用されていくのは間違いない。そのような技術を細胞内で正確に機能させるために、細胞内での核酸の挙動を明らかにする熱力学は、今後益々重要な学問として位置づけられるだろう。

謝 辞

本解説で発表した成果は主に、甲南大学先端生命工学研究所の Ghosh Sarptarshi 特任研究助教をはじめとする所属教員および研究員、並びに北海道大学大学院先端生命科学研究所の金城政孝教授、北村朗講師、および産業技術総合研究所の山本条太郎博士の共同研究によるものである。また本研究は、甲南学園・大学、ならびに科学研究費補助金の支援によるものであり、深く感謝申し上げる。

文 献

- S. Takahashi and N. Sugimoto, *Chem. Soc. Rev.* **49**, 8439-8468 (2020).
- I. Tinoco, Jr. and O. C. Uhlenbeck, and M. D. Levine, *Nature* **230**, 362-367 (1971).
- P. N. Borer, B. Dengler, I. Tinoco, Jr., and O. C. Uhlenbeck, *J. Mol. Biol.* **86**, 843-853 (1974).
- M. Andronescu, A. Condon, D. H. Turner, and D. H. Mathews, *Methods Mol. Biol.* **1097**, 45-70 (2014).
- I. Tinoco, Jr., P. N. Borer, B. Dengler, M. D. Levin, O. C. Uhlenbeck, D. M. Crothers, and J. Bralla, *Nat. New. Biol.* **246**, 40-41 (1973).
- J. SantaLucia, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1460-1465 (1998).
- S. Ghosh, S. Takahashi, T. Ohyama, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 14194-14201 (2020).
- K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 3746-3750 (1986).
- S. M. Freier, R. Kierzek, J. A. Jaeger, N. Sugimoto, M. H. Caruthers, T. Neilson, and D. H. Turner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 9373-9377 (1986).
- N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamuta, T. Ohmichi, M. Yoneyama, and M. Sasaki, *Biochemistry* **34**, 11211-11216 (1995).
- N. Sugimoto, S. Nakano, M. Yoneyama, and K. Honda, *Nucleic Acids Res.* **24**, 4501-4505 (1996).
- J. SantaLucia, H. T. Allawi, and P. A. Seneviratne, *Biochemistry* **35**, 3555-3562 (1996).
- H. T. Allawi and J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry* **36**, 10581-10594 (1997).
- T. Xia, J. SantaLucia, Jr., M. E. Burkard, R. Kierzek, S. J. Schroeder, X. Jiao, C. Cox, and D. H. Turner, *Biochemistry* **37**, 14719-14735 (1998).
- N. Sugimoto, N. Satoh, K. Yasuda, and S. Nakano, *Biochemistry* **40**, 8444-8451 (2001).
- G. A. Hudson, R. J. Bloomingdale, and B. M. Znosko, *RNA* **19**, 1474-1482 (2013).
- R. J. Ellis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 114-119 (2001).
- P. A. Srere, *Trends Biochem. Sci.* **5**, 120-121 (1980).
- P. A. Srere, *Trends Biochem. Sci.* **6**, 4-7 (1981).
- A. B. Fulton, *Cell* **30**, 345-347 (1982).
- S. Cayley, B. A. Lewis, H. J. Guttman, and M. T. Record, Jr., *J. Mol. Biol.* **222**, 281-300 (1991).
- D. S. Goodsell, *Trends Biochem. Sci.* **16**, 203-206 (1991).
- S. B. Zimmerman and S. O. Trach, *J. Mol. Biol.* **222**, 599-620 (1991).
- K. E. Handwerker, J. A. Cordero, and J. G. Gall, *Mol. Biol. Cell* **16**, 202-211 (2005).
- S. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, *Chem. Rev.* **114**, 2733-2758 (2014).
- S. Ghosh, S. Takahashi, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, S. Hazra, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.* **47**, 3284-3294 (2019).
- E. Rozners and J. Moulder, *Nucleic Acids Res.* **32**, 248-254 (2004).
- J. M. Huguet, C. V. Bizarro, N. Forns, S. B. Smith, C. Bustamante, and F. Ritort, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15431-15436 (2010).
- S. Takahashi, J. Yamamoto, A. Kitamura, M. Kinjo, and N. Sugimoto, *Anal. Chem.* **91**, 2586-2590 (2019).
- T. J. Nott, T. D. Craggs, and A. J. Baldwin, *Nat. Chem.* **8**, 569-575 (2016).
- a) D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, S. Ghosh, T. Endoh, S. Takahashi, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.* **48**, 12042-12054 (2020). b) D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, S. Ghosh, T. Endoh, S. Takahashi, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.* **49**, 10796-10799 (2021).



高橋 俊太郎
Shuntaro Takahashi
E-mail: shtakaha@konan-u.ac.jp



杉本 直己
Naoki Sugimoto
E-mail: sugimoto@konan-u.ac.jp