

# Feature Article

特集論文

## 第1回 堀場雅夫賞 受賞者論文

# DNAをセンシング素材として用いた細胞内pH測定法の開発

杉本直己, 大道達雄

本研究では、DNA(デオキシリボ核酸)が形成する二重らせん構造の安定性とpHの関係を検討し、得られた熱力学的データを基に生体には存在しないと考えられていた新規pH感受性のDNA構造を見いだした。更に、新たに見いだしたpH感受性DNAをpHセンシングのための新規素材としてとらえ、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET: fluorescence resonance energy transfer)と組み合わせることで、DNAを検出媒体とした世界でも類のない、細胞内のpHを測定できるpHセンサを開発した。本稿では、核酸を材料として用いたpHセンサの原理及び応用例を紹介する。

## はじめに

核酸はナノサイズで正確な分子認識ができるため、核酸をセンサ素材として用いようとする研究が、ナノテクノロジーやバイオテクノロジーの分野で注目されつつある。センサとして機能する核酸の高次構造は、溶液中の金属イオンやpHなどの環境変化や小分子に敏感であるため、核酸を検出媒体として用いることができれば、環境変化や小分子の高感度センサの開発が可能になると期待されている。しかしながら、核酸が多様な高次構造を形成することから、試行錯誤的に目的の構造を探索しなければならず、研究の進展は容易ではない。核酸の高次構造は、ワトソン-クリック塩基対によって形成される二重鎖以外にも、非ワトソン-クリック塩基対部位(フーグスティーン塩基対など)や多重鎖構造からなっている。もし核酸の高次構造に対する化学的(熱力学的)性質を十分に理解することができれば、核酸をセンサの目的に応じて自由にデザイン(設計)でき、停滞している核酸のセンサの活用の飛躍的な促進を期待できる。

そこで著者らは、核酸のセンサの開発の一例として、核酸の高次構造を熱力学的に解析して、その得られた熱力学的データに基づく、新規のpH感受性DNAの創製とそのDNAによる新規pHセンサの開発を行った。

## 核酸の高次構造

核酸の高次構造と言えば、ワトソン-クリック塩基対からなる二重鎖構造が思い浮かぶ。しかし、核酸分子はワトソン-クリック塩基対からなる二重鎖以外の非ワトソン-クリック塩基対部位や多重鎖を持ち、それらの構造は核酸の未知の機能と深い関わりを持っている。非ワトソン-クリック塩基対部位は、塩基対を形成していない状態の部位と、ワトソン-クリック塩基対以外の組み合わせで塩基対を形成している部位に分類できる。前者には、バルジ(bulge)、インターナルループ(internal loop)、ターミナルミスマッチ(terminal mismatch)、ヘアピンループ(hairpin loop)、ダングリングエンド(dangling end)などが含まれる(図1)。後者には、ミスマッチ(mismatch)やフーグスティーン塩基対などが含まれる。このような非ワトソン-クリック塩基対部位とワトソン-クリック塩基対が組み合わさり、核酸の高次構造が形成されている。例えばtRNAでは、非ワトソン-クリック塩基対部位として、ダングリングエンド、ミスマッチ、ヘアピンループが存在し、これら非ワトソン-クリック塩基対部位がtRNAの高次構造形成とその安定性を決定している。また、核酸高次構造安定性への寄与以外にも非ワトソン-クリック塩基対部位は(1)タンパク質の認識部位(2)金属イオンの配位部位(3)核酸切断・連結反応の触媒活性部位などに存在

し、機能の観点からも生体内で多くの役割を担っている<sup>[1][14]</sup>。つまり、バイオテクノロジー分野での核酸分子の材料や検出媒体として利用するには、核酸の高次構造とそれに伴う機能の分子レベルでの解明が重要となってくる。

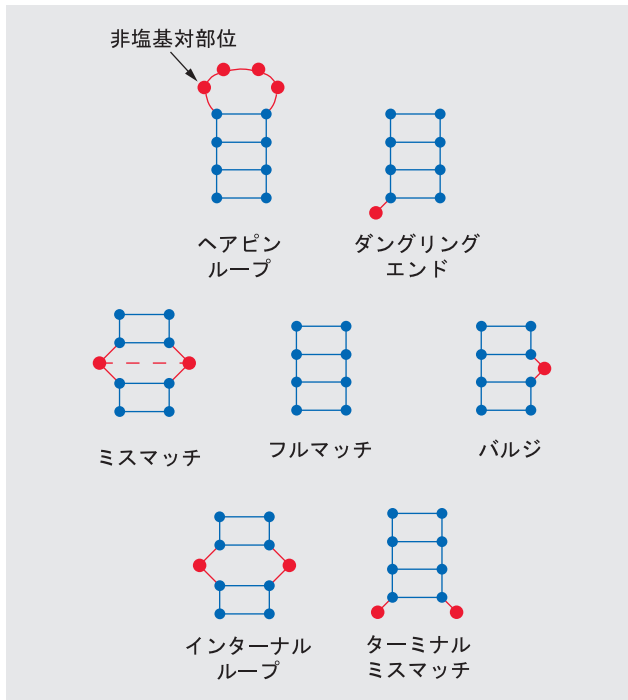


図1 核酸の非ワトソン-クリック塩基対部位や多重鎖構造

## pH に対する新規核酸構造遷移の構築

多数の非塩基対部位の中でも、フーグスティーン塩基対から成り立つ多重鎖は、既知の高次構造の理解や予測だけではなく、新規機能を有する核酸分子のデザインに利用できる。例えば、フーグスティーン塩基対により  $T \times A \cdot T$  ( $\times$  はフーグスティーン塩基対を、 $\cdot$  はワトソン-クリック塩基対を示す) 及び  $C^+ \times G \cdot C$  塩基対を形成する平行型三重鎖は、安定な塩基対を形成のため、シトシン塩基の N3 位のプロトン化が必要である(図2)<sup>1)</sup>。シトシン塩基のプロトン化<sup>2)</sup>の  $pK_a^{*3}$  は 5.5 である。そのため、低 pH 条件でのみ安定に平行型の三重鎖が形成される。つまり、シトシン塩基のプロトン化を含んだフーグスティーン塩基対を利用することによって、環境因子である pH 変化に依存した新規核酸構造遷移の構築ができると考えられる。

\*1: A はアデニン (Adenine), T はチミン (Thymine), G はグアニン (Guanine), C はシトシン (Cytosine) を示す。

\*2: 分子にプロトン ( $H^+$ ) が付加してイオンになること。

\*3: 解離指数 (解離定数  $K_a$  の逆数の常用対数)。

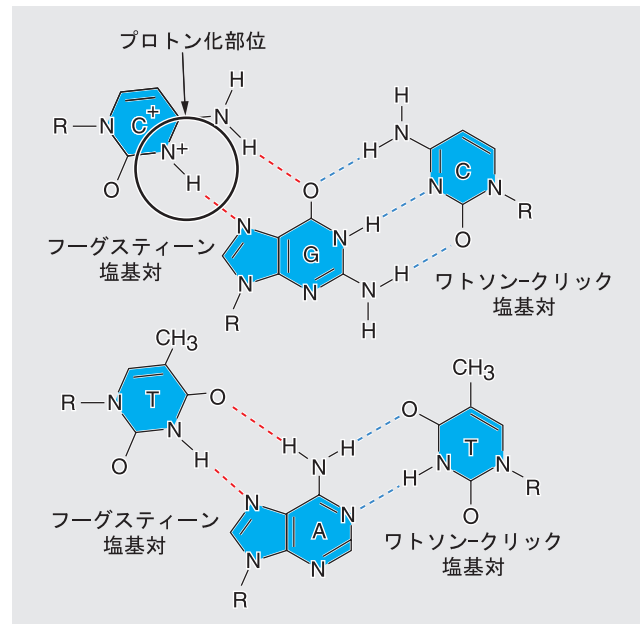


図2 平行型三重鎖におけるフーグスティーン塩基対及びワトソン-クリック塩基対

そこで 新規機能を有する核酸分子の開発に向けて、まず、フーグスティーン塩基対から成り立つDNA多重鎖に注目して、フーグスティーン塩基対の詳細な安定性とpHの関係を検討した。その結果、ワトソン-クリック塩基対からなるアンチパラレル型二重鎖の安定性と、フーグスティーン塩基対により三本鎖目が二重鎖に結合する安定性は、pH5.0ではほぼ同程度であることがわかった<sup>[8]</sup>。そこで、得られた熱力学的諸量に基づいて、フーグスティーン塩基対からのみ形成されるパラレル型二重鎖 (5'-TCTTTCTCTTCT-3' / 5'-AGAAAGAGAAGA-3')<sup>4</sup>をデザインした。pHによる構造遷移を検討した結果、この2本のDNA鎖はpH7.0ではバルジ塩基<sup>5</sup>を有するアンチパラレル型二重鎖であるがpH5.0では、フーグスティーン塩基対からのみ形成されるパラレル型二重鎖であることを見いだした(図3)。このpH依存性の構造遷移は、pH5.0ではシトシン塩基のプロトン化が起こり、フーグスティーン塩基対のパラレル型二重鎖が形成され、pH7.0では塩基のプロトン化がないため、パラレル型二重鎖が不安定になり、ワトソン-クリック型塩基対によってバルジ塩基を有するアンチパラレル型二重鎖が形成することによるものである。

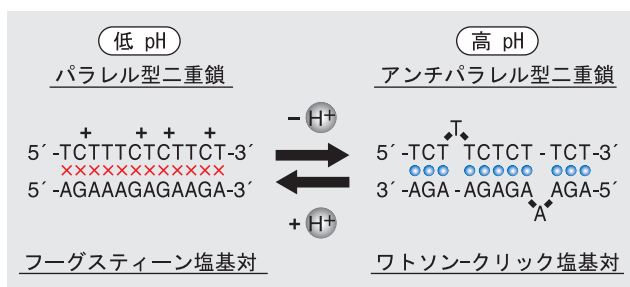


図3 フーグスティーン塩基対のみで形成されるパラレル型二重鎖と、バルジ塩基を持つワトソン-クリック塩基対のアンチパラレル型二重鎖のpHによる構造遷移

\*4: 環状の5炭糖とリン酸と塩基が結合したヌクレオチドは、5炭糖の炭素位置の5'と3'の間をリン酸が繋げる形で連なって、ポリヌクレオチド鎖を構成する。ATGC塩基は、いずれも窒素を含む複素環で、この複素環と糖の番号体系がまぎらわしくないように、糖の炭素位置にプライム(')を付ける。ここでの5'と3'は、ポリヌクレオチド鎖の末端位置を示す。なお、ATGC塩基は、プリン(purine 5員環と6員環が結合したもの)とピリミジン(pyrimidine 6員環)の2つの型に分かれる。AG塩基はプリンで、TC塩基はピリミジンである。

\*5: 塩基対にならずに二重鎖から突出している塩基。

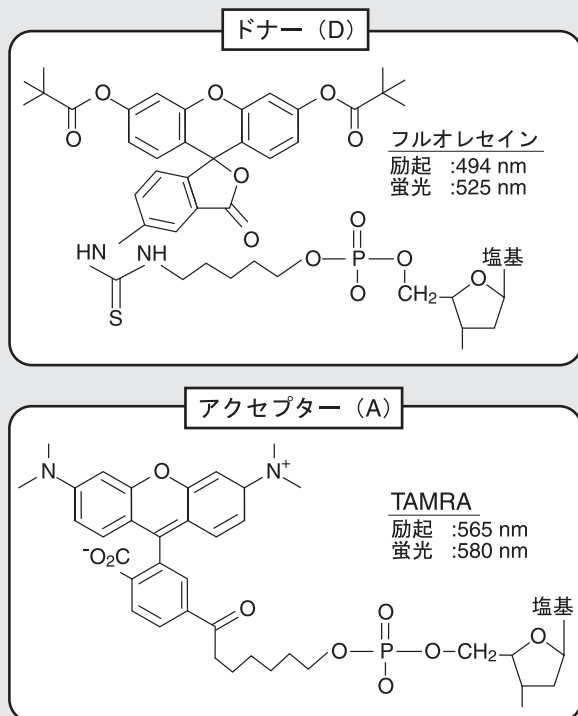
## 試験管内で作用するpHセンサの開発

次に FRET( Fluorescence Resonance Energy Transfer: 蛍光共鳴エネルギー移動)と 新たに見いだされたpH変化に依存した核酸構造遷移を組み合わせることで、試験管内のpHを測定できるpHセンサの開発を行った。まず、pH変化によるDNAの構造変化が起こると2つの蛍光分子が近づき、蛍光の色の変化の観測ができるシステム(第一世代)を構築した。FRETとは、蛍光分子間で起こる共鳴によるエネルギー移動であり、エネルギーの供与体(ドナー)-受容体(アクセプター)の距離が近づくほどエネルギー移動効率が増し、受容体蛍光強度が強くなる。この蛍光強度は、分子間の距離の6乗に反比例するため、生体分子の高次構造や分子間の相互作用を解析する時に用いられる。pH変化による構造変化が起こると、2つの蛍光分子が近づき、蛍光強度の変化が期待される。

図4のように、1本のDNA鎖の5'末端にドナーとして作用する蛍光分子のフルオレセイン( Fluorescein )を、もう1本のDNA鎖の5'末端にアクセプターとして作用する蛍光分子のTAMRAを付加させると、pH7.0では緑色蛍光を呈し、pH5.0ではオレンジ色の蛍光を呈することが見いだされた。pH感受性DNAを用いなかった場合、オレンジと緑の色調の変化は観測されなかった。この色調の変化は期待したように、pH7.0ではワトソン-クリック型塩基対によってバルジ塩基を有するアンチパラレル型二重鎖が形成されるため、蛍光色素の距離が離れ、ドナーのフルオレセインの緑色蛍光のみが観測されることに由来する。一方、pH5.0ではパラレル型の二重鎖を形成するため、蛍光分子間でのエネルギー移動が起こり、アクセプターのオレンジ色の蛍光が観測されたためと考えられる。このように、DNAを検出媒体とすることで、色の変化としてpHの変化を簡易に識別できるシステムを構築することができた。

## 細胞内のpHを測定できるpHセンサの開発

(a) FRETに使用した蛍光色素



(b) pHに依存した2分子間の核酸構造遷移に伴う蛍光変化

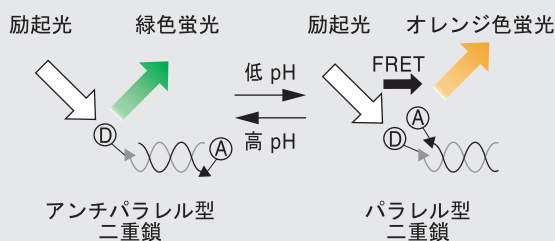
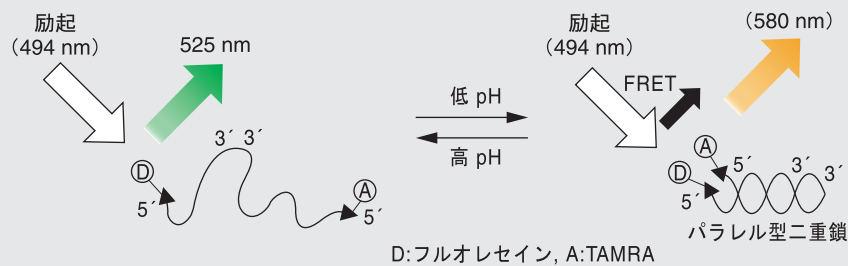


図4 試験管内で作用するpHセンサ

次に 核酸をセンサとして利用するターゲットとして細胞内pHに注目した。細胞内のpH変化は、癌や細胞死と関連するため、それらの診断の指標とすることができ。有機化合物が今のところ細胞内pH検出試薬として用いられている例があるが、細胞内への正確なデリバリーができず、細胞内のpHを簡便に測定することは困難である。また、検出に細胞内の酵素反応を利用する有機化合物では、検出が不可逆となり連続測定に不向きである。一方、核酸は細胞内へのデリバリーが有機化合物よりも容易で、外部因子による核酸の高次構造変化は可逆であり、かつ高速反応であるという利点もある。このように、もし核酸を細胞内のpH検出媒体として活用できれば、有機化合物よりも優れたpH測定手法になりえる可能性がある。

細胞内で新規に開発したpHセンサを用いる場合、第一世代のセンサは、2分子のDNAを用いるため、細胞内での反応性及び感度が低下する弱点があった。それゆえ、2本のDNA鎖の3'末端を4つのT塩基で繋いだ、ヘアピン型のセンサを第二世代センサとして構築した(図5(a))。第一世代のセンサ同様に、片方の5'末端にドナーとして作用する蛍光分子のフルオレセインを、残りの5'末端にアクセプターとして作用する蛍光分子のTAMRAを付加させた結果、pH7.0では緑色蛍光を呈し、pH5.0では第一世代よりも強いオレンジ色の蛍光を呈することが見いだされた(図5(b))。第一世代よりも強い色の変化は、分子内でのヘアピン型の平行型二重鎖の構造により、2つの色素間距離が近くなったためと考えられる。

(a) 第二世代のpHセンサにおけるpHに依存した核酸構造遷移に伴う蛍光変化



(b) 各pHにおけるDNA pHセンサの蛍光変化

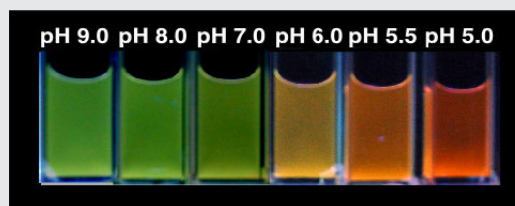


図5 2本のDNA鎖を繋いだ第二世代のpHセンサ

更に、DNA pHセンサを細胞内に導入し、アポトーシスにより起こる細胞内のpHの低下の測定を試みた。その結果、図6のように正常細胞ではpHセンサは緑色蛍光を呈し、アポトーシス誘導ペプチドを添加して人為的に

アポトーシスを起こさせた異常細胞では、オレンジ色の蛍光を呈することが見いだされた。このように新たに開発したpHセンサを用いると試験管内の系だけでなく、細胞内でのpH検出もできることを見いだした。

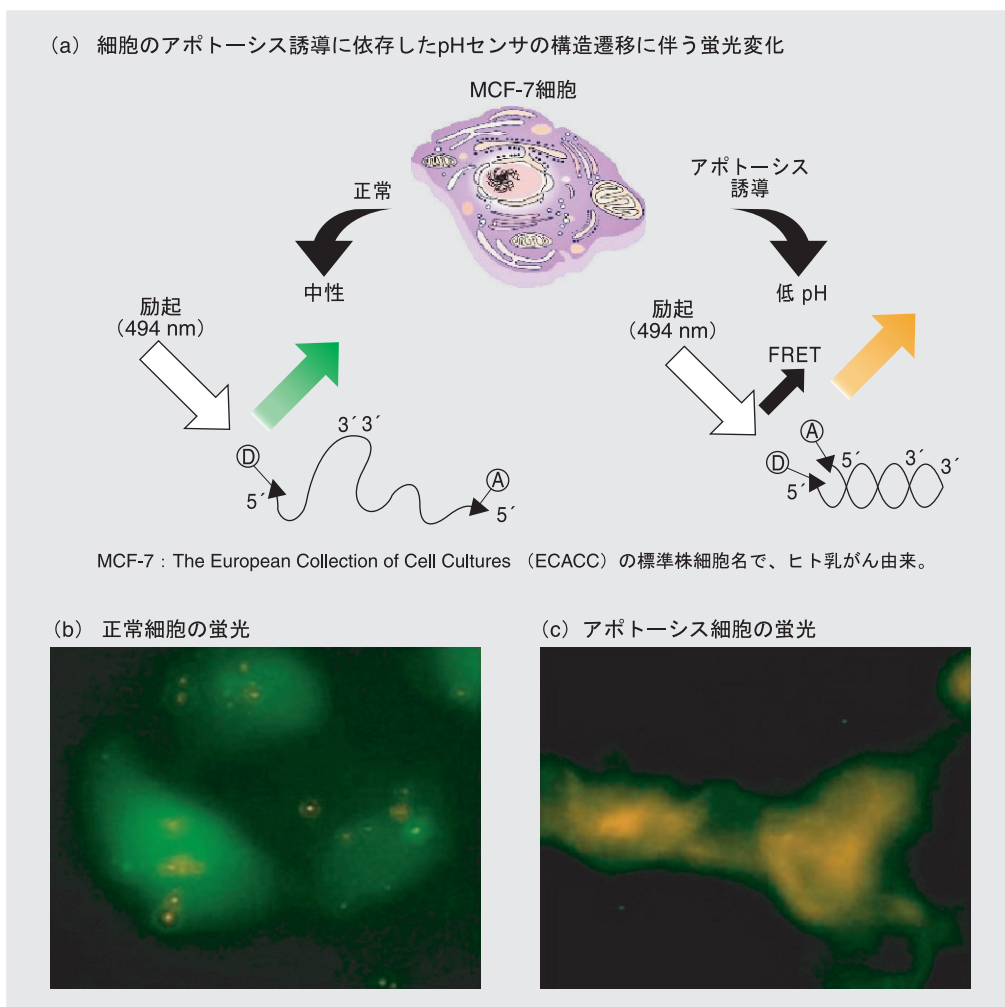


図6 アポトーシスによる細胞内pH低下の測定

## おわりに

このように、熱力学的データを基にして設計されたDNAの特異構造を利用して、pH変化を測定できる機能性核酸を開発した。核酸を素材として利用しようとする研究は国内外で始められているが、pHの検出媒体にDNAの構造遷移を活用した例は皆無であり、本pHセンサは非常に独創性の高いpHセンサであると考えられる。また本pHセンサは、視覚的にpHを観察できる点で

現在用いられているバイオセンサよりも優れており、簡便に細胞内のpH測定ができるため、癌の早期診断やアポトーシス検出のための新しい診断システムの開発に発展すると期待される。今後は、pHだけではなく、金属イオン<sup>[15][16]</sup>やモレキュラー・クラウディング (Molecular Crowding)<sup>[17][19]</sup>などの環境因子の変化に基づく核酸構造の遷移を詳細に検討することにより、あらゆる環境変化に応答する核酸センサが開発される可能性がある。

## 参考文献

- [ 1 ] S. Nakano, Y. Uotani, K. Uenishi, M. Fujii, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 518-519 ( 2005 )
- [ 2 ] S. Nakano, Y. Uotani, S. Nakashima, Y. Anno, M. Fujii, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8086-8087 ( 2003 )
- [ 3 ] Y. Okumoto, Y. Tanabe, and N. Sugimoto, *Biochemistry*, **42**, 2158-2165 ( 2003 )
- [ 4 ] D. Miyoshi, A. Nakao, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1156-1163 ( 2003 )
- [ 5 ] T. Ohmichi, S. Nakano, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10367-10372 ( 2002 )
- [ 6 ] Y. Okumoto, T. Ohmichi, and N. Sugimoto, *Biochemistry*, **41**, 2769-2773 ( 2002 )
- [ 7 ] W. Li, P. Wu, T. Ohmichi, and N. Sugimoto, *FEBS Lett.*, **526**, 77-81 ( 2002 )
- [ 8 ] N. Sugimoto, P. Wu, H. Hara, and Y. Kawamoto, *Biochemistry*, **40**, 9396-9405 ( 2001 )
- [ 9 ] J. Kawakami, H. Kamiya, K. Yasuda, H. Fujiki, H. Kasai, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3289-3296 ( 2001 )
- [ 10 ] D. Miyoshi, A. Nakao, T. Toda, and N. Sugimoto, *FEBS Lett.*, **496**, 128-133 ( 2001 )
- [ 11 ] N. Sugimoto, and I. Yasumatsu, *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, **1**, 95-112 ( 2001 )
- [ 12 ] T. Ohmichi, N. Nakamuta, K. Yasuda, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11286-11294 ( 2000 )
- [ 13 ] N. Sugimoto, M. Nakano, and S. Nakano, *Biochemistry*, **39**, 11270-11281 ( 2000 )
- [ 14 ] P. Wu, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4762-4768 ( 2000 )
- [ 15 ] W. Li, D. Miyoshi, S. Nakano, and N. Sugimoto, *Biochemistry*, **42**, 11736-11744 ( 2003 )
- [ 16 ] D. Miyoshi, A. Nakao, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1156-1163 ( 2003 )
- [ 17 ] D. Miyoshi, A. Nakao, and N. Sugimoto, *Biochemistry*, **41**, 15017-15024 ( 2002 )
- [ 18 ] D. Miyoshi, S. Matsumura, S. Nakano, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 165-169 ( 2004 )
- [ 19 ] S. Nakano, H. Karimata, T. Ohmichi, J. Kawakami, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14330-14331 ( 2004 )



杉本 直己

Naoki Sugimoto

甲南大学先端生命工学研究所 ( FIBER ) 所長  
甲南大学理工学部機能分子化学科 教授  
理学博士



大道 達雄

Tatsuo Ohmichi

株式会社 I.S.T  
メディカル・バイオサイエンス事業部  
リサーチマネージャー  
甲南大学先端生命工学研究所 ( FIBER )  
特別研究員  
理学博士