



細胞内の DNA 二重鎖の形成を高精度に予測する手法を開発 ～PCR 検査の飛躍的な改善が期待される～

【概要】

甲南大学先端生命工学研究所（FIBER）の杉本直己 所長・教授、高橋俊太郎 准教授、GHOSH Saptarshi 特別研究員（JSPS 外国人特別研究員）らの研究グループは、分子夾雑環境にある細胞内の DNA 二重鎖構造の安定性を高精度に予測する手法を開発しました。この研究成果によって、DNA 二重鎖形成を利用した PCR 等の遺伝子検査の精度を飛躍的に向上できる可能性があります。この研究成果は、米国科学アカデミー紀要「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)誌」で発表されました。

新型コロナウイルス等のウイルス検査では、PCR 反応とよばれる手法が用いられます。これにより、ウイルスにとって固有である遺伝物質である核酸（DNA:デオキシリボ核酸、RNA:リボ核酸）を検出することができます。PCR 検査では非常に微量しか含まれていない核酸を PCR 反応によって増幅させることで、ウイルスの存在を確認します。PCR 反応において、最も重要なのが DNA 二重鎖を形成させる過程です。しかし、検体に含まれる生体由来の不純物の影響で反応過程における二重鎖 DNA の形成が不正確だったり、あるいは不十分だったりすることがあり、このことにより偽陽性や偽陰性と呼ばれる誤った検査結果が生じることが問題となっています。そのため、溶液の環境が DNA 二重鎖の形成に及ぼす影響を正しく考慮して検査することが極めて重要です。

DNA は塩基と呼ばれるアデニン、チミン、グアニン、シトシンの四種類を単位として連なった直鎖状の分子です。アデニンとチミン、グアニンとシトシンがそれぞれペア（塩基対）を組むことで 2 本の DNA から二重鎖が形成されます。二重鎖のできやすさは塩基対の組み合わせで決まることが知られており、その予測法も確立されていました。しかし、通常実験を行う食塩水のような溶液環境と異なり、細胞内のような生体環境は高濃度に分子で混み合った分子夾雑な溶液環境です。そのため、このような環境での二重鎖構造のできやすさを予測することはこれまで困難でした。

今回、杉本教授らのグループは、医薬品添加物などとしても用いられる水溶性高分子であるポリエチレングリコールを用いることで、細胞内の混み合った環境を人工的に再現しました。調整した人工環境で DNA 二重鎖のできやすさを解析することで、細胞内の DNA の二重鎖のできやすさを予測することができる新しい予測法の開発に成功しました。実際に、細胞核内の核小体での DNA 二重鎖の形成しやすさを求めたところ、既存の手法より約 1 万倍の正確さで精度予測することに成功しました。したがって、本研究成果により PCR 検査条件が改善されることで、新型コロナウイルス等の正確な診断が期待できます。

【論文タイトルと著者】

“Nearest-Neighbor Parameters for Predicting DNA Duplex Stability in Diverse Molecular Crowding Conditions”
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)

【内容説明】

背景

生体内で遺伝子として用いられる核酸（DNA:デオキシリボ核酸、RNA:リボ核酸）の標準的な構造は、二重鎖構造です。DNA はアデニン（A）、チミン（T）、グアニン（G）、シトシン（C）の四種類の塩基を持つヌクレオチドと呼ばれる分子が連なってできる鎖状高分子です。2本のDNA鎖間の、アデニンとチミン、グアニンとシトシンがそれぞれワトソン-クリック型の塩基対（※1）を形成することで二重鎖構造を形成します。二重鎖構造の形成されやすさを示す安定性（※2）は、塩基対に働く相互作用に依存します。アデニンとチミン間には2本、グアニンとシトシンの間には3本の水素結合が形成されます。そのため、グアニンとシトシンの塩基対の方がアデニンとチミンの塩基対よりも安定に形成されます。一方、二重鎖構造の安定性は塩基対同士は分子の重なり合いで働くスタッキング相互作用でも安定化されます。分子の重なり合いは塩基の分子の大きさに依存するので、前後の配列の組み合わせで相互作用の大きさは異なります。以上のように塩基の並び（配列）で二重鎖構造の形成しやすさが決まります。そこで塩基対の組み合わせとその直近の塩基対の影響によって決まる最近接塩基対モデルが考案され、配列情報から二重鎖形成を安定性を予測することができます（図1）。しかし、既存の予測法は標準的な実験環境（例えば1M（モル/リットル）NaCl溶液中）のみに適用できるもので、分子夾雑環境（※3）にある細胞内環境での二重鎖構造の安定性予測はこれまで困難でした。

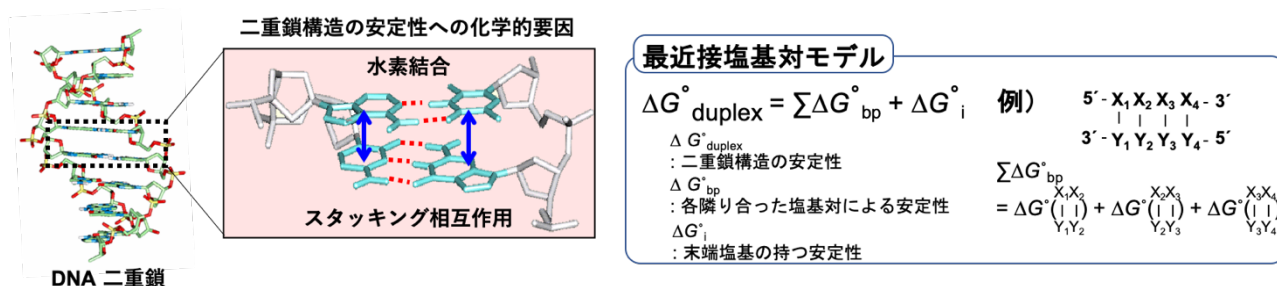


図1 DNA二重鎖の安定性を決定する構造的要因（左）および、その構造安定性の予測法である最近接塩基対モデル（右）。

研究手法と成果

細胞内の分子夾雑環境を再現するために、平均分子量 200 のポリエチレングリコール（PEG200）（※4）を高濃度含んだ溶液を作成しました。ポリエチレングリコールは医薬品添加物などとしても用いられる水溶性高分子で、私たちの実生活で幅広く用いられています。これらの分子夾雑環境において、様々なDNA二重鎖の安定性を紫外吸収-融解曲線（※5）を解析することで網羅的に算出しました（図2）。その結果、分子夾雑環境でDNA二重鎖構造の安定性を予測できるパラメータを決定することができました（表1）。さらに、本研究では分子量の異なるポリエチレングリコールや他の水溶性高分子を含んだ様々な溶液でのDNA二重鎖の安定性を測定することで、DNA二重鎖の安定性が溶液中の陽イオン濃度と水の活量の二つの因子の総和で近似できることを見出しました。最終的に任意の陽イオン濃度および任意の水の活量を有する分子夾雑環境におけるDNA二重鎖の安定性を予測できる手法の開発に成功しました。細胞内の分子夾雑環境は一様に混み合っているの

はなく、細胞の状態や局所的な場所によって環境が異なります。そのため、特定の分子環境でのみ成り立つ予測法は汎用性に欠けます。今回開発した予測法は、はじめて分子夾雑環境での DNA 二重鎖構造の安定性予測を実現できただけでなく、あらゆる分子夾雑環境で活用できるように拡張されています。すなわち、本手法は画期的かつ実用的な細胞内環境での DNA 二重鎖構造の安定性予測法といえます。実際に、この予測法でリボソームの合成が行われている細胞核内の核小体（※6）内における DNA 二重鎖の安定性を既存の手法より精度よく予測することができました（図 3）。既存の手法と比較するとエネルギー値で $7.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ の予測精度が向上しました。エネルギー値から二重鎖を形成する分子数の偏り（平衡定数 K ）に換算し、形成する DNA 二重鎖の数として測定誤差を計算したところ、従来と比べて測定誤差が約 1 万倍改善しました。このことから、本研究によりに細胞内での二重鎖形成の予測精度を飛躍的に向上させることができました。

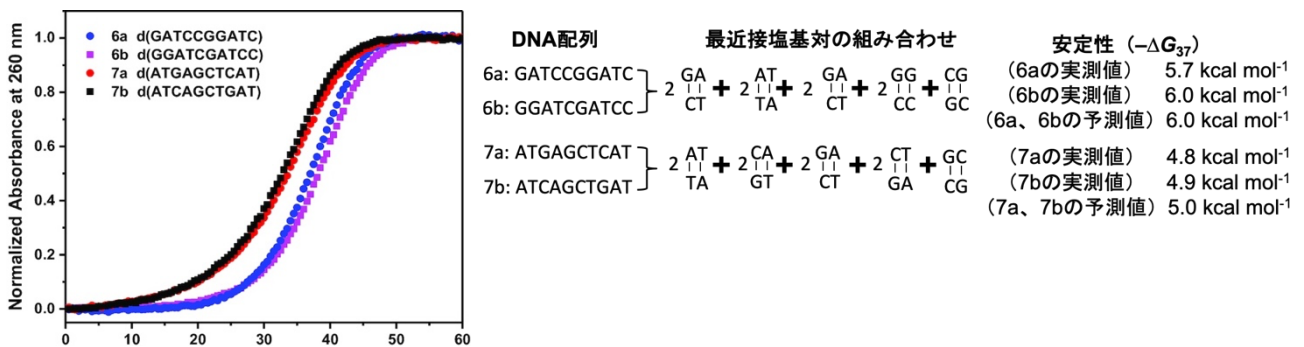
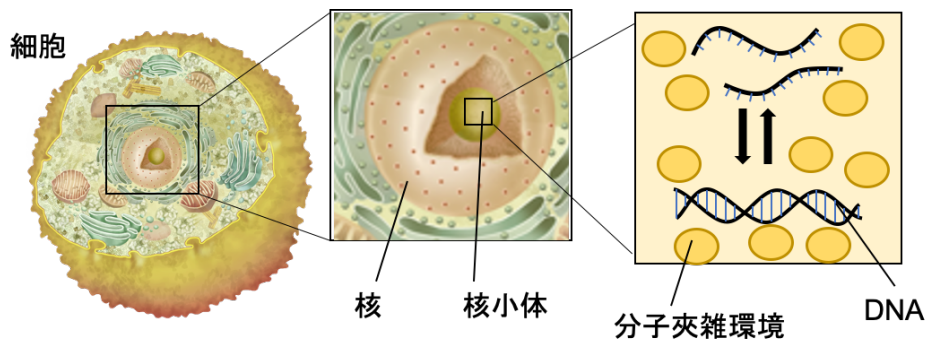


図 2 同じ最近接塩基対の組み合わせを持った DNA 配列 (6a と 6b、および 7a と 7b) の 40% PEG200 を含む分子夾雑環境下における紫外吸収-融解曲線 (左) および実測値と予測値の比較 (右)。



核小体内の DNA 二重鎖 ACTGACTGACTG / TGACTGACTGAC の安定性

実測値 $= 19.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ \Rightarrow 平衡定数 $K = 5.3 \times 10^{10}$
Nott et al., *Nat. Chem.*, 8, 569 (2016)

従来法による予測値 $= 10.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ \Rightarrow 平衡定数 $K = 4.0 \times 10^7$
Huguet et al., *PNAS*, 107, 15431 (2010)

本研究による予測値 $= 18.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ \Rightarrow 平衡定数 $K = 4.7 \times 10^9$

$$\text{DNA 二重鎖数の誤差の改善度} = \frac{K_{\text{実測}} - K_{\text{予測 (本研究)}}}{K_{\text{実測}} - K_{\text{予測 (従来)}}} \cong 10000$$

$$K = \exp(-\Delta G_{37}^{\circ} / RT)$$

二重鎖を形成する DNA 数の偏りを意味する平衡定数 K 、 R は気体定数 ($1.99 \text{ cal mol}^{-1}$)、 T は絶対温度

図 3 核小体における DNA 二重鎖の構造安定性の実測値と予測値。

展望・研究の波及効果

本研究成果によって、DNA 二重鎖の形成を利用した技術の性能向上が期待できます。例えば、現在の新型コロナウイルスの検査で用いられる PCR 法では度々偽陽性や偽陰性と呼ばれる、誤った結果が得られることが問題となっています。ウイルスの検出にはウイルス中のゲノム RNA を DNA に逆転写し、定量 PCR 法で逆転写した DNA を増幅し、ウイルスの検出を行います。この際に、検体に含まれる生体由来の分子夾雑環境の影響で、PCR 反応中で期待通り DNA 二重鎖が形成できないことが起こります。これがウイルス検査における PCR 法の信頼性を低下させる原因の一つです。本手法を用いて分子夾雑環境を正確に考慮することができれば、反応中の DNA 二重鎖形成を向上させ、PCR 検査の精度を高めることが期待できます。

【用語解説】

1、ワトソン-クリック型塩基対（※1）

1953 年に英国の研究者であるジェームズ・ワトソンとフランシス・クリックが提唱した二重鎖を形成する塩基対構造のこと。

2、安定性（※2）

DNA 等の分子構造は形成と解離の平衡状態にある。DNA 二重鎖構造は加熱することで解離する。この解離に必要な温度が高ければ高いほど、その DNA 二重鎖構造は“安定”である。安定性をエネルギー値として示したのが自由エネルギー (ΔG) である。本研究ではヒトの生体内反応が行われる、大気圧、37°Cでの自由エネルギー値 ($-\Delta G_{37}^{\circ}$) を安定性の指標として用いた。単位は 1 mol 当たりの熱量として kcal mol⁻¹ を用いることが多い。

3、分子夾雑環境（※3）

細胞内は核酸、タンパク質などの分子がおおよそ 400 mg/mL にも及ぶ高濃度溶液にある。このような溶液環境は通常実験条件で用いられる生理食塩水環境とは異なり、生体分子の物性に大きな影響を及ぼす。核酸二重鎖構造も分子夾雑環境によりその構造安定性が低下する。

4、ポリエチレングリコール（※4）

エチレングリコールの重合体で、水溶性の高い高分子。細胞内の生体高分子の濃度は 400 g/L にもおよびとされ、擬似的な細胞環境を再現するために用いられる高分子材料の一つ。薬剤の分解防止や、保湿効果などを与えるなど、医薬品添加物、洗剤、化粧品など幅広く用いられている。

5、紫外吸収-融解曲線（※5）

加熱や冷却によって分子構造が変化することで生じる分子の光吸収の変化を追跡する方法。DNA はらせん構造が解離すると 260 nm の吸収が増加する濃色効果を示す。構造転移の温度依存性を解析することで、構造の安定性 ($-\Delta G_{37}^{\circ}$ 値) を得ることができる。

6、核小体（※6）

細胞核内に存在する非膜性の細胞構成体で、DNA からリボソームの合成反応が起こる領域である。リボソームはタンパク質を合成する分子複合体で、遺伝子からタンパク質を合成する生命現象の根幹となる反応を行う。したがって、核小体はDNA が関与する生体内反応で極めて重要な細胞内器官の一つとして考えられている。