

「圧力変動に伴う転写反応調節の機構解明」

甲南大学先端生命工学研究所 高橋 俊太郎

1 研究の背景と目的

細胞内部の圧力は細胞分裂や伸展などで絶えず生じている。しかし、圧力が与える生体分子、特に核酸への影響はこれまでほとんど注目されていなかった。申請者は最近、DNA の非標準構造であるグアニン (G) 四重鎖構造は圧力に応じて大きく不安定化し、その不安定化効果が周囲の溶媒環境に大きく影響することを見出した。G 四重鎖等の DNA 非標準構造の形成は、転写においてその反応効率を大きく変化させ、遺伝子発現が調節される要因となる。そこで申請者は、圧力変動をもたらす細胞内の DNA 非標準構造の形成変化が、細胞内の遺伝子発現調節の一つの機構ではないかと着想した。本研究では、高圧力下での核酸の構造安定性と複製や転写反応効率の相関性を定量的に解析し、細胞内で生じる圧力変動による遺伝子発現調節メカニズムの解明を目的とする。

2 研究方法・研究内容

(1) 高圧下における G 四重鎖構造を形成する核酸の安定性解析

紫外可視分光光度計 (Shimadzu 社製 UV-1700) に耐圧セル (シン・コーポレーション社製 PCI-500) を接続し、高圧力をかけながら試料の UV 吸収を追跡するシステムを構築した (図 1A)。温調は接続するサーキュレーターを用い、PC で温度制御と UV 測定を同時に行った。温度変化に伴う設定圧力のずれは圧力維持装置 (シン・コーポレーション社製 PV-400) を用いた。本計測システムを用いて G 四重鎖構造を形成する配列 (AGG)_n およびヘアピン構造を形成する (CCG)_n 配列の各種 DNA の熱安定性の圧力依存性を系統的に解析した (図 1B)。UV メルティング実験により、これら DNA の熱力学パラメータ (ΔG , ΔH , ΔS) を算出した。また、融解温度 (T_m) とエンタルピー変化 (ΔH) から G 四重鎖形成に伴う体積変化 (ΔV) を算出し、構造変化に伴う圧力の感受性を定量評価した。円二色性スペクトル解析により、(AGG)₁₀ 配列は G 四重鎖構造を、(CCG)₁₀ 配列はヘアピン構造を形成することを確かめた。

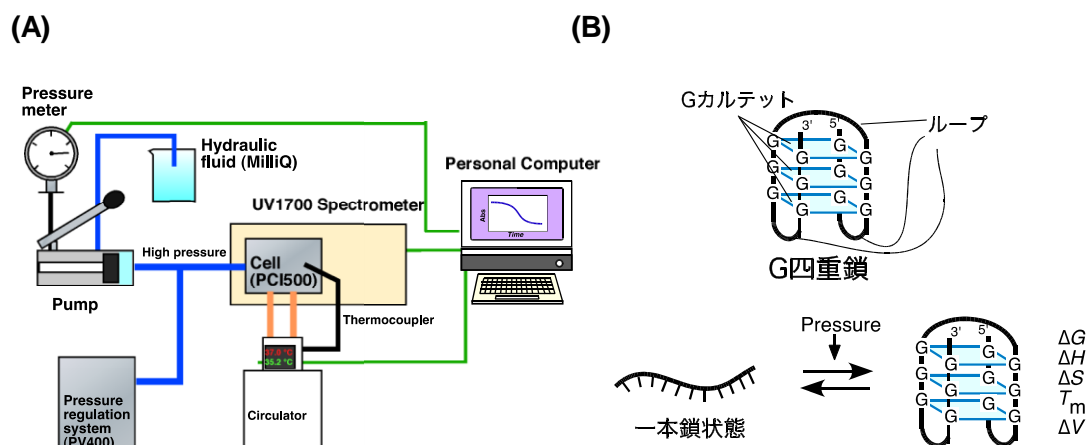


図 1

(A) 本研究で構築する圧力可変紫外分光光度計の概略図。

(B) G 四重鎖の模式図。本研究では G 四重鎖構造に与える圧力の影響を熱力学パラメータから評価した。

(2) 高圧力下における複製・転写反応の解析

本研究では遺伝子発現過程において転写の前段階である DNA を合成する複製反応に関する圧力効果をまず検討した。複製反応は鋳型となる DNA と伸長されるプライマー-DNA の二種類の DNA を調製した。鋳型 DNA は (AGG)₁₀ および (CCG)₁₀ 配列を含むように設計し、プライマー-DNA の 5' 末端には蛍光色素 (Fluorescein) 修飾を施した。大腸菌由来の DNA ポリメラーゼの Klenow Fragment を過剰発現する大腸菌株を構築し、Klenow Fragment を大腸菌から抽出、精製した。精製した Klenow Fragment を用い、基質となる DNA とデオキシリボ三リン酸を混合し、37 °C で所定の時間を反応させた。反応は PCI-500 内で行い、常圧から 200 MPa まで圧力を変化させて反応を行った。反応後は直ちに試料を回収し、EDTA、ホルムアミドを含む溶液で反応を停止させ、変性ポリアクリルアミド電気泳動で反応産物を分離した。ゲル電気泳動は蛍光イメージャーで観察し、DNA の伸長がどのくらい進んだかを定量的に解析した。複製反応の圧力依存性と先に求めた構造の熱力学安定性を比較し、複製反応に与える圧力効果を定量的に評価した。

転写反応に関しては、転写酵素として T7 RNA ポリメラーゼを用い、転写反応の鋳型 DNA は T7 プロモータ配列とその下流に各種 G 四重鎖形成をする配列を含むものを設計した。複製反応と同様に、反応液を調整後、所定の圧力をすぐに加え一定時間インキュベートした。反応後、ゲル電気泳動で転写産物を観察し、バンドの強度から生成量を評価した。

3 研究成果

各配列の熱安定性の圧力依存性を解析したところ、G 四重鎖構造を形成する (AGG)₁₀ 配列は圧力を上げるにつれ熱安定性 ($-\Delta G^{\circ}_{37}$) が低下した (表 1)。一方で、ヘアピン構造を形成する (CCG)₁₀ 配列は逆に熱安定性が圧力を上げるにつれ増加した。 T_m 値の圧力依存性から Crapeyron 式により解析することで ΔV 値を算出したところ、(AGG)₁₀ 配列では $16.9 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ 、(CCG)₁₀ 配列からは $-22.7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ であった。これらの値は一般的な二重鎖構造の ΔV 値と比べ、それぞれ絶対値が大きい ΔV 値であった。したがって、これらの高次構造の安定性は二重鎖と比較して圧力によって大きく変化することが見出された。

表 1 (AGG)₁₀ および (CCG)₁₀ 配列の高圧下における熱力学的パラメータ

Pressure [MPa]	(AGG) ₁₀				Pressure [MPa]	(CCG) ₁₀			
	ΔH° [kcal mol ⁻¹]	$T\Delta S^{\circ}$ [kcal mol ⁻¹]	ΔG°_{37} [kcal mol ⁻¹]	T_m^b [°C]		ΔH° [kcal mol ⁻¹]	$T\Delta S^{\circ}$ [kcal mol ⁻¹]	ΔG°_{37} [kcal mol ⁻¹]	T_m^b [°C]
0.1	-61.4	-58.8	-2.6	50.5	0.1	-48.0	-43.6	-4.4	68.3
100	-47.3	-44.1	-1.8	49.5	100	-55.7	-49.8	-6.0	74.3
200	-36.3	-35.5	-0.8	43.8	200	-65.9	-58.3	-7.6	77.3

続いて、各配列を鋳型 DNA とした際の複製反応の圧力効果を検討した。はじめに、常圧下では、コントロールのランダム配列からの複製反応は、反応開始 30 分後に 80 mer 付近にバンドが確認できた (図 2A)。蛍光色素でゲルを染色し全 DNA を観察したところ、鋳型鎖の完全長と長さが一致したため、このバンドは最後まで反応が進んだ複製産物と考えられる。一方で、(AGG)₁₀ 配列を用いた場合、30 分後に同じ完全長に相当するバンドは観察されず、その代わりに途中で停止したバンドが観察された (図 2B)。このことから (AGG)₁₀ 配列の複製反応は反応途中で抑制されたと考えられる。また、(CCG)₁₀ 配列では反応開始 30 分後に完全長よりも非常に長いバンドが観察された。これはプライマー鎖の伸長に伴い、途中でヘアピン構造ができ、スリッページが起こり長い複製産物が生成されたと考えられる (図 2C)。また短い複製産物も確認できたことから、複製反応が一旦途中で停止してい

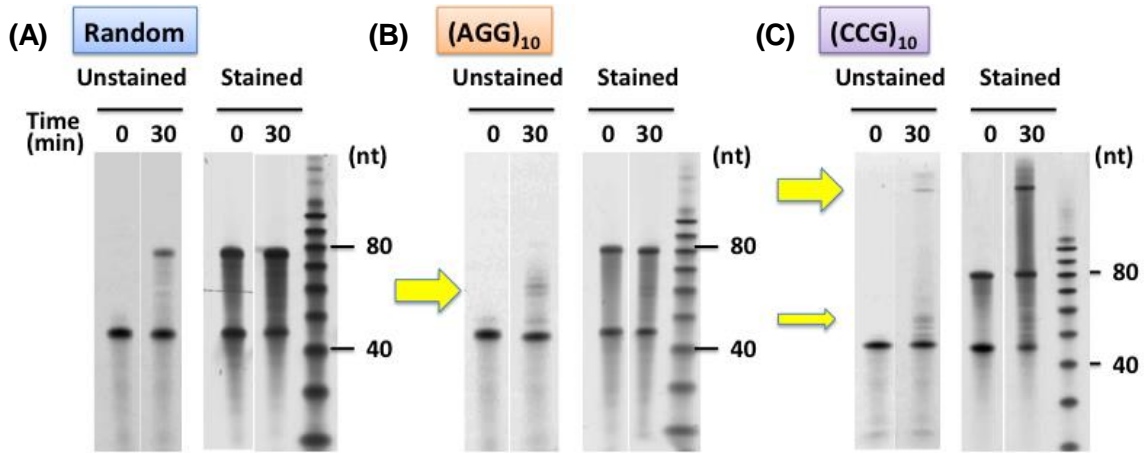


図2 典型的な常圧時での複製反応前および反応後(30分)の結果。
 (A) ランダム配列、(B) (AGG)₁₀配列、および (C) (CCG)₁₀配列。条件は 1 uM DNA, 0.1 uM Klenow Fragment, 250 uM dNTPs, 40 mM MES pH 6.0, 8 mM MgCl₂, at 37 ° C。

ることが観察された。

続いて各圧力下での複製反応を観察したところ、ランダム配列ではほとんどバンドの変化は観察されなかった(図3A)。それに対し、(AGG)₁₀配列は圧力を上げるにつれ徐々に完全長のバンドが増加していくことが観察された(図3B)。したがって、圧力に応じて ΔV 値が正である G 四重鎖構造が不安定化し、反応が進みやすくなったと考えられる。一方で (CCG)₁₀配列では圧力を上げるにつれスリッページに伴う長いバンドが少なくなり、一方で短い複製産物に伴うバンドが増加した。したがって (AGG)₁₀配列とは逆に圧力に応じてヘアピン構造が安定化し、複製反応が阻害されたと推測されます。このことは、ヘアピン構造の ΔV 値は負であること一致する。

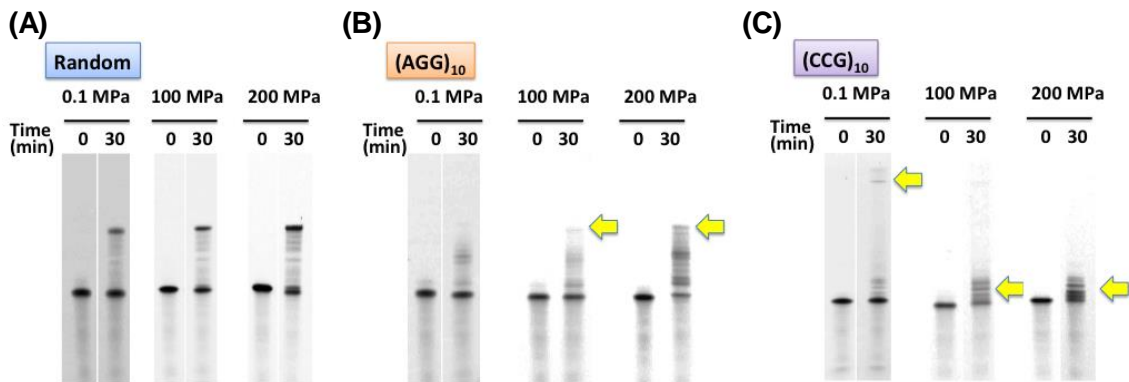


図3 典型的な高圧時(100 MPa, 200 MPa)での複製反応前および反応後(30分)の結果。
 (A) ランダム配列、(B) (AGG)₁₀配列、および (C) (CCG)₁₀配列。条件は 1 uM DNA, 0.1 uM Klenow Fragment, 250 uM dNTPs, 40 mM MES pH 6.0, 8 mM MgCl₂, at 37 ° C。

得られた各圧力下での鋳型鎖の安定性 ($-\Delta G^{\circ}_{37}$ 値) と 30 分後の複製反応率をプロットした(図4)。その結果、(AGG)₁₀配列の場合圧力に応じて反応率が向上し、逆に (CCG)₁₀配列は反応率が減少する事が確認できる。効果的な幅はおおよそ等しいため、この幅が体積変化の値の違いを反映していると考えられる。ランダム配列からの反応率を基準として各プロットを比較すると、それぞれの配列において反応率と安定性の間で相関性があることが

推測される。しかし、鋳型鎖の種類によってその相関性は異なることも推測される。つまり Klenow Fragment がこれらの二次構造を融解していくメカニズムがそれぞれ異なるということが分かる。この相関性の定量的な解明に関しては現在反応の素過程に対する圧力効果を検討しており、各律速段階に及ぼす体積の効果を今後明らかにしていきたい。

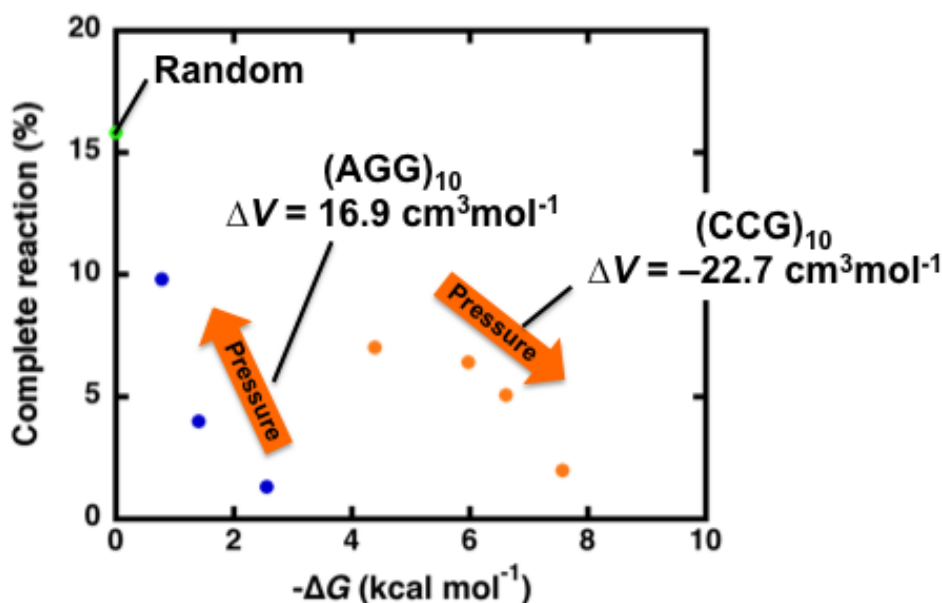


図4 反応効率と各配列の熱安定性の関係性

以上の内容は、第9回バイオ関連シンポジウムと第56回高圧討論会で発表し、現在論文投稿準備中である。転写反応に対する圧力効果に関する研究に関しては、現在のところ複製反応のような圧力効果が顕著に観察できていない。T7 RNAポリメラーゼによる転写反応の効率自体が圧力で大きく影響を受けたことから、用いる酵素の立体構造などを考慮した実験系のデザインを現在検討している。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究で評価した配列はトリプレットリピート病と呼ばれる疾患の原因配列に含まれる。脆弱X症候群はAGGやCCG配列の繰り返しが異常伸長することで、知的障害や、身体の異常がおこるが、現在治療法はない。本研究で明らかになったように、トリプレットリピートの複製反応は圧力に対して大きく影響を受けることから、トリプレットリピート病の発病メカニズムには核酸構造の体積が大きく変化するようなダイナミクスが大きく寄与している可能性がある。したがって、体積パラメータをより小さくなるような化学的手法が実現できれば、トリプレットリピート病の新しい治療法の開発へとつながることが期待される。

基礎的な研究の今後の発展に関しては、県内では主に導電材料開発研究における高圧力の効果が、Spring8の放射光による構造解析を通じて進められている。将来的には高圧力下における核酸の構造を放射光を用いて解析することで、高圧力下での転写反応の詳細なメカニズムを決定できる。また本研究成果の応用展開としては、細胞内圧力の変調が原因の一つであるストレスや高血圧など生活習慣病の新しい診断、治療法の開発や、再生医療における新技術の開発が期待される。