

「核酸の高次構造による老化促進メカニズムの解明」

甲南大学先端生命工学研究所

松本 咲

1 研究の背景と目的

細胞老化は不可逆な細胞増殖の停止機構であり、抗老化戦略の提唱や老化関連疾患の予防の観点から注目されている。最近、老化した細胞では細胞内の分子の混み合い（分子クラウディング）の度合いが低下していることが報告され、細胞内の化学環境の変化が老化を促進している可能性が示唆されている。DNA の非標準構造であるグアニン四重らせん構造は、分子クラウディングにより安定化することから、申請者は、細胞内の化学環境の変化が DNA の構造変化を誘起し、DNA メチル化や転写などの遺伝子発現機構を制御することで老化を促進しているのではないかと着想した。本研究では、老化に伴う細胞内環境の変化と、それに応じて変化する DNA の構造および熱安定性の変化によって制御される DNA メチル化および転写の機構解明を目的とする。

2 研究方法・研究内容

(1) DNA グアニン四重らせん構造の安定性とトポロジーの評価

様々な熱安定性のグアニン四重らせん構造形成配列を設計した。グアニン四重らせん構造は鎖の方向によりパラレル、アンチパラレル、ハイブリッドの異なるトポロジーを持つため、それぞれのトポロジーのグアニン四重らせん構造について検討した (図1)。また、積層するグアニンカルテット及び塩基対の数とループ長によりその安定性が変わるため、配列設計により安定性を系統的に変化させた DNA を設計した。DNA は受託合成によって取得した。それぞれの構造の DNA は、紫外可視分光光度計 (SHIMADZU 社製 UV-

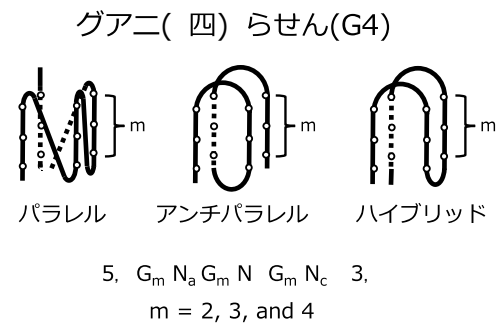


図1 様々なトポロジーを有するグアニン四重らせん構造

1800) により UV メルティング実験を行い、熱力学パラメータ (ΔG° , ΔH° , ΔS°) を算出した。グアニン四重らせん構造のトポロジーは、円偏光二色性スペクトルを測定することにより決定した。ポリエチレングリコール (PEG)、フィコールなどの種々の分子クラウディング剤を用いることにより、分子サイズ、水の活量、誘電率などの溶液の物理化学的パラメータがグアニン四重らせん構造のトポロジーと安定性に及ぼす影響を解析した。

(2) DNA グアニン四重らせん構造の安定性とトポロジーが遺伝子発現へ及ぼす影響の評価

様々なトポロジーと安定性を有するグアニン四重らせん構造が DNA メチル化や転写に及ぼす影響を *in vitro* で調べた。まず、より上流で遺伝子の発現を制御している DNA メチル化について検討した。DNA メチル化反応には、Spiroplasma sp. MQ1 (M.SssI) 株由来の CpG メチル基転移酵素を用いた。設計した DNA の目的のグアニン四重らせん構造形成を促すために熱によるアニーリングを行ったのち、メチル化反応を行った。その後、メチル化サイトと同じ配列を認識して切断する制限酵素、HhaI を用いて DNA 切断反応を行った。これにより、メチル化された DNA は切断されず、メチル化されなかった DNA は切断されるため、DNA の長さを比較することによりメチル化効率を算出することが可能になった。切断後の DNA はゲル電気泳動により分離し、それぞれの DNA によ

るバンド強度を定量することにより、メチル化効率を算出、評価した。

(3) 分子クラウディング環境下における DNA メチル化反応の検討

老化による分子クラウディングの度合いの変化が DNA のメチル化反応に及ぼす影響を調べるため、ポリエチレングリコール (PEG)、Ficoll などの種々の分子クラウディング剤を含む溶液中での DNA メチル化反応を検討した。分子クラウディングによる溶液環境の変化が DNA メチル化反応に及ぼす影響を、DNA 構造の熱安定性の視点から評価した。分子クラウディング剤がメチル基転移酵素自身に与える影響を考慮し、常時構造を形成しない基質 DNA での DNA メチル化反応をコントロールとして比較した。

3 研究成果

グアニン四重らせん構造を形成することが報告されている、トロンビン結合アプタマー (TBA)、およびヒトテロメアに存在するグアニン四重らせん構造配列を基に、種々の安定性とトポロジーを有するグアニン四重らせん構造形成配列を設計した。設計したグアニン四重らせん構造の安定性とトポロジーを調べたところ、予想どおり、グアニンカルテットの枚数が増えるにつれて、グアニン四重らせん構造が安定化した (表 1)。また、設計した DNA は狙い通り、パラレル、アンチパラレル、ハイブリッドと様々なトポロジーのグアニン四重らせん構造を形成することも確認できた (表 1)。

表 1 設計したグアニン四重らせん構造形成配列の安定性 (T_m 、 $-\Delta G_{37}^{\circ}$) とトポロジー

配列	T_m (°C)	$-\Delta G_{37}^{\circ}$ (kcal mol ⁻¹)	G4のトポロジー
TBA2	29.0 ± 1.2	-0.8 ± 0.1	アンチパラレル
TBA3	62.5 ± 1.1	3.6 ± 0.5	パラレル
TBA4	76.0 ± 0.5	6.0 ± 0.2	ハイブリッド
TBA4-1	81.1 ± 3.1	7.8 ± 0.8	ハイブリッド
Htelo2	37.8 ± 0.3	0.1 ± 0.0	アンチパラレル
Htelo3	59.2 ± 0.2	3.5 ± 0.1	ハイブリッド
Htelo4	84.0 ± 0.2	11.4 ± 0.2	アンチパラレル

分子クラウディング環境下における設計したグアニン四重らせん構造 (TBA4) の安定性を、20 wt%のエチレングリコール (EG)、グリセロール、キシリトール、ソルビトール、グルコース、PEG200、PEG8000、デキストラン、フィコール 70 を用いて調べた。その結果、エチレングリコール、グリセロール、キシリトール、ソルビトール存在下ではグアニン四重らせん構造が安定化する一方、グルコース存在下ではわずかに不安定下することが明らかになった。PEG200、PEG8000、デキストラン、フィコール 70 存在下では明確な融解曲線を得ることができなかった。これはグアニン四重らせん構造が安定化しすぎたためであると考えられる。またトポロジーに関しては、PEG200、PEG8000、フィコール 70 のみがハイブリッドからパラレルへのトポロジー変化を誘起することも明らかになった。

次に、設計したグアニン四重らせん構造形成配列を有する DNA を基質として用いてメチル化反応を行った。メチル化効率はメチル化反応後の DNA を HhaI で制限酵素消化した後、ゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、そのバンド強度を定量することで評価した (図 2)。

分子クラウディング剤非存在下においてメチル化反応を検討したところ、安定なグアニン四重らせん構造を有する基質 DNA ほどメチル化効率が低下した (図 3 a)。得られたグアニン四重らせん構造の安定性とメチル化効率をプロットしたところ、アンチパラレル型グアニン四重らせん構造では、ハイブリッド型グアニン四重らせん構造とは異なる相関でグ

アニン四重らせん構造の安定性とメチル化効率の関係が示された。(図 3 b)。それぞれのフィッティング式の切片は構造を形成していないときのメチル化効率を示し、この値はハイブリッド型とアンチパラレル型で近い値を示した。また、構造を形成しないコントロール配列 (Linear) の値とも近い値を示した。一方でフィッティング式の傾きはグアニン四重らせんの安定化によるメチル化阻害の度合いを示しており、ハイブリッド型はアンチパラレル型よりも効率よくメチル化を阻害することが示された。グアニン四重らせん構造のトポロジーによるメチル化阻害効率の違いについてはその機構について今後詳細に検討する予定である。

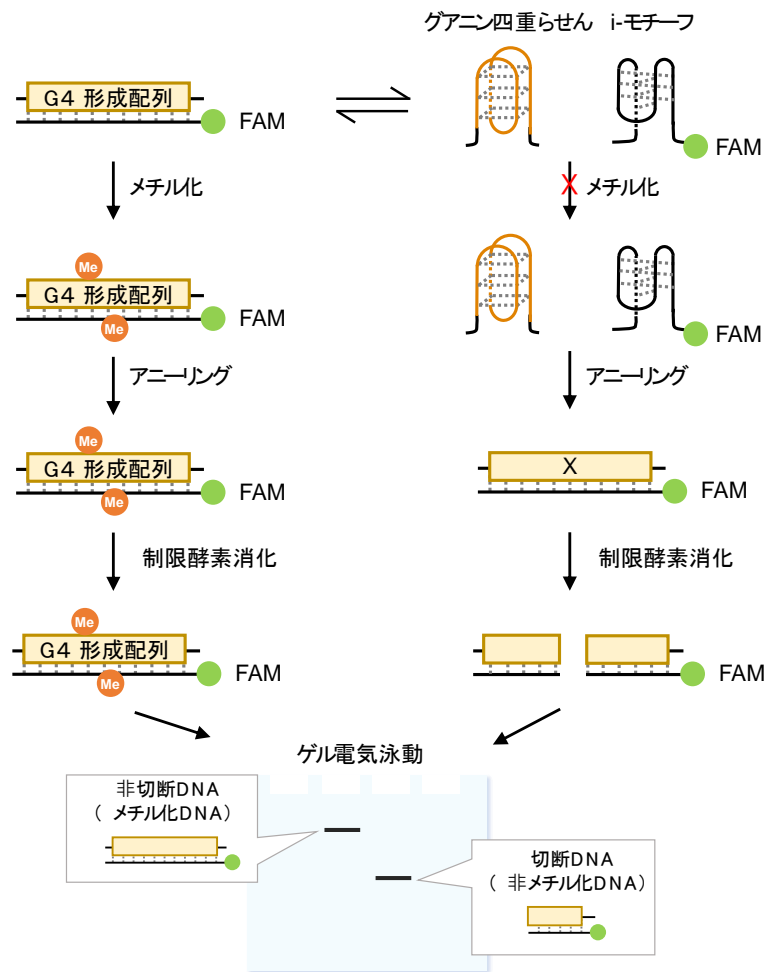


図 2 DNA メチル化効率算出の実験スキーム

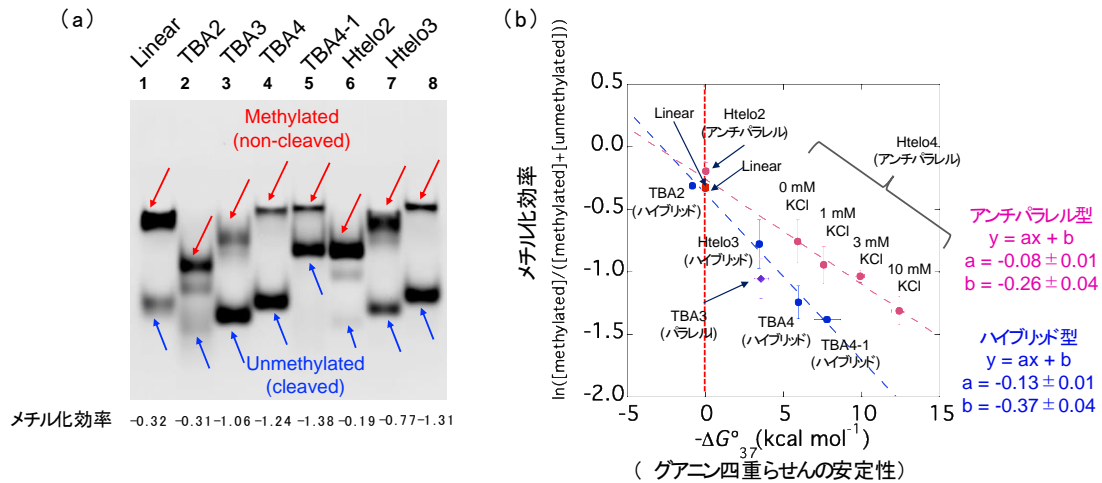


図3 (a)メチル化反応および制限酵素消化後の DNA のゲル電気泳動の結果 (b)メチル化効率とグアニン四重らせん構造の安定性の相関図

分子クラウディング下における DNA のメチル化について、ハイブリッド型グアニン四重らせん構造を形成する TBA4 を用いて検討をおこなった。分子クラウディング剤がメチル化自体に及ぼす影響についても検討するため、構造を形成しないコントロール配列、Linear DNA についても DNA メチル化反応を行った。その結果、エチレングリコール、グリセロール、キシリトール、ソルビトール、グルコースなどの比較的分子量の分子クラウディング剤はメチル化反応自体に大きな影響を及ぼさなかったのに対し、PEG200、PEG8000、デキストラン、フィコール 70 は Linear DNA をメチル化した時にもメチル化効率の大幅な低下が観測され、メチル化反応自体を阻害してしまうことが明らかになった。それぞれの分子クラウディング溶液の物理化学パラメータ（分子量、粘度、誘電率、浸透圧）とメチル化効率の相関を調べたところ、誘電率とメチル化効率とは相関が観測された。今後分子クラウディング下でのメチル化反応制御の機構について詳細を検討する予定である。また、研究課題開始当初予定していた、老化細胞内におけるグアニン四重らせん構造が遺伝子発現に及ぼす影響については、解析に十分な量の核酸を老化が進んだ細胞から抽出することができず、老化細胞へのトランスフェクション条件や核酸抽出条件を現在検討中である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究で検討したグアニン四重らせん構造形成配列は、ヒトゲノム中にも多数存在することが知られている。特に、がん関連遺伝子や、老化促進にかかわる p53 などの遺伝子には多く存在することが報告されており、創薬ターゲットとしても注目されている核酸構造である。本研究でグアニン四重らせん構造によってメチル化反応が制御されていることが明らかになった。これは老化により細胞内の分子クラウディングの度合いが低下することによって、グアニン四重らせん構造の安定性やトポロジーが変化し、その結果下流の遺伝子発現が制御され、老化が促進している可能性を示唆するものである。したがって、細胞内の環境を人為的に変化させることや、グアニン四重らせん構造に結合するリガンドにより、グアニン四重らせん構造の安定性やトポロジーを変化させることができれば、老化関連遺伝子中のグアニン四重らせん構造を標的とした抗老化戦略や老化関連疾患の新しい予防法や治療法の開発へとつながることが期待される。