

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05013

研究課題名(和文) DNA四重鎖の形成に伴うDNAの高次構造変化の一分子観察と理論による研究

研究課題名(英文) Single molecule observation and theoretical study of higher order structural change of DNA accompanied by DNA quadruplex formation

研究代表者

谷川 雅人(TANIGAWA, Masato)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90332890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：G-quadruplexなどの非二重鎖構造をとる配列の生体内での役割はほとんど判っていない。RNAはさまざまな構造をとることにより、多くの生理活性を持つことから、我々は、DNAもこれらの構造をとることにより生理活性を持つ可能性を検討することにした。DNAとタンパク質等との相互作用はDNAアプタマーなどの研究として、活発に行われているが、この研究では、DNAの構造変化による生体分子の活性化を調べる。生体分子が反応する際、分子間相互作用とその結果として、分子の構造変化が活性に重要な役割を果たしている。この研究では、まず、小分子を対象として、DNAの四重鎖構造がどのように変化するのかを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸の医薬応用が実現し、広く使われるようになり、今後、主流となる可能性が高まっている。しかし、これまで、特にDNAは情報分子としての役割のみに注目され、構造やその変化にはほとんど注意が向けられていなかった。また、最近、G-quadruplexが酵素相互作用することにより活性を変化させることが明らかになり、DNAが情報伝達物質としてではなく、直接分子の活性を変化させ、生理活性に影響を及ぼすことがわかり始めている。この研究は、非二重鎖構造をとるDNAの他の分子との相互作用による構造変化を明らかにし、結果として、どのように活性変化に影響を及ぼすのかを調べたもので、今後の研究の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：Almost nothing is known about the role of non-duplex sequences such as G-quadruplex in vivo. We decided to investigate the possibility that DNA may also have physiological activities by forming these structures, because RNA has many physiological activities by forming various structures. Research on the interaction of DNA with proteins and other molecules has been actively pursued, including the development of DNA aptamers. In this study, we investigate the activation of biomolecules by conformational changes of non-duplex structured nucleic acids. During the reaction of biomolecules, intermolecular interactions and the resulting conformational changes of the molecules play an essential role in their activity. In this study, we started by clarifying how the quadruplex structure of DNA changes for small molecules.

研究分野：生物物理学

 キーワード：G-quadruplex 非二重鎖構造 円変光二色性 反応速度論的解析 全反射照明蛍光顕微鏡 分子動力学
高分子溶液物性 Rouse Zimm model

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体中の DNA の構造は様々に変化し発現を制御し生体機能に影響をおよぼしている。ヒトを含む多くの生物のテロメア領域にはグアニン塩基が偏在し、部分的にほどけて四重鎖(G-quadruplex などの)構造をとることが知られている。これらの構造は生体内でも形成されることが知られており、構造の安定性やリガンド分子との相互作用が *in vitro* では調べられてきたが、*in vivo* における機能との関係は未だ十分には分かっていない。この四重鎖構造はガンをはじめとする様々の疾病に関与しており、この部分と相互作用する薬の研究も進められている。この時点で、我々は、208kbp(約 70 μ m)の DNA が環状の場合と直鎖状の場合について、どのような挙動を示すかを蛍光による DNA 一分子観察と数値計算シミュレーションによって調べ、環状の場合には自己相関関数が 1 秒程度で相関がなくなるのに対して、直鎖状ではこの 10 倍以上に大きくなることを明らかにしていた。また、これまでに DNA の周りのイオンの挙動を緩和時間を Hermite 関数、DNA の回転運動を Legendre 陪関数をそれぞれ用いて表したモデルによって実験結果を説明できることを明らかにした。この理論を用いて解析した結果、DNA の周りでは、イオンは静電的相互作用のため動きが制約され、緩和時間がマイクロ秒程度と非常に長くなることも明らかにした。特に、2 価イオンでは制約が強くなり、緩和時間が長くなることも明らかにした。さらに、円偏光二色性スペクトル(CD)およびストップフローによって G-quadruplex と小分子との複合体を形成する際の反応中間体の有無や活性化エネルギーの大きさなどの詳細を明らかにしてきた。これらの成果をもとに、本研究では、G-quadruplex が形成されることに伴い、その近くの DNA 鎖の構造がどのように変化するかを明らかにするために、まず、G-quadruplex の形成過程を実験とシミュレーションによって明らかにし、形成段階に応じた周囲の DNA の変化を一分子観察によって調べる。また、さまざまな小分子を加えた場合について、この変化にどのような影響を及ぼすかを調べ、薬剤候補を調べるとともに、作用機序についても検討する研究を計画した。

2. 研究の目的

現在、核酸の医薬応用が実現し、広く使われるようになり、今後、ますます重要になる可能性が高まっている。しかし、これまで、核酸、特に DNA は情報分子としての役割のみに注目され、構造やその変化にはほとんど注意が向けられていなかった。しかし、最近、G-quadruplex が酵素相互作用することにより活性を変化させることが明らかになり、DNA が情報伝達物質としてではなく、直接分子の活性を変化させ、生理活性に影響を及ぼすことがわかり始めている。また、ゲノム中に多く存在する非二重鎖構造をとることのできる配列には、この情報分子としての役割はなく、どのような役割を担っているのかが不明であった。この研究では、この非二重鎖構造をとる DNA が他の分子との相互作用により構造変化し、機能発現を助けたり、強めることを明らかにすることや、この結果として、どのように生理活性変化に影響を及ぼすのかを調べることを目的としている。また、細胞内は非常に多くの分子があるため *in vitro* の実験環境とは著しく異なっている。この環境中では特に高分子 DNA の挙動が希薄溶液系とは異なる可能性が高くなる。このことが、G-quadruplex の形成能や形成されたときの高分子の捩れなどの構造にどのように影響するのかを明らかにすることも目的としている。

3. 研究の方法

(1) 円偏光二色性スペクトル(CD)の経時変化から DNA の構造変化を明らかにする。

tel22 とよばれる 22 塩基の DNA (AGGGITAGGGTTAGGGTTAGGG) は、これまでによく研究されてきた G-quadruplex を形成する配列である。この tel22 はナトリウムイオン溶液では通常の二重鎖構造をとるが、カリウムイオンが添加されると四重鎖の G-quadruplex 構造となる。この形成過程で 3 つの中間体があり、初めの中間体形成は非常に速いが、それ以外の中間体の形成の緩和時間は秒単位から時間単位であることがわかっている。本研究では、温度を変えて CD のストップフロー測定を行い、各中間段階の活性化エネルギーを明らかにする。

(2) 小分子との相互作用による G-quadruplex 安定性変化を CD のストップフローによって明らかにする。

TMPyP に加えて、Idarubicin や irinotecan などテロメラーゼ阻害剤やトポイソメラーゼ阻害剤が G-quadruplex と相互作用し安定性を変化することを明らかにした薬剤について、温度を変えて CD のストップフロー測定を行い、中間段階の活性化エネルギーや反応機序を明らかにする。また、NMN などの G-quadruplex と弱く相互作用することを見出した核酸関連試薬は、これまで全く G-quadruplex との相互作用が調べられていないが、これらについて同様に反応中間段階の活性化エネルギーや反応機序を明らかにする。

(3) 長鎖 DNA の自己相関関数や緩和時間を調べ、DNA の構造変化を明らかにする。

スーパーヘリックスについて観察方法と解析方法の両面から改善法を検討し、蛍光顕微鏡を使って行っていた、長鎖 DNA の 1 分子観察を線状、環状およびスーパーヘリックスの 208kbp

の BAC DNA について全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF)を用いて 1 分子観察を詳細に行い、スーパーヘリックス構造をとる場合についても自己相関関数を明らかにする。

(4) G-quadruplex を含む長鎖 DNA について、TIRF で 1 分子観察を行い、自己相関関数を調べ、緩和時間が含まない場合と比較する。

長鎖 DNA に G-quadruplex を形成する tel22 配列を組み込んだ DNA を作成し、G-quadruplex を形成しないカリウムを含まない溶液中と、G-quadruplex を形成するカリウムを含む溶液中でスーパーヘリックス構造をとる長鎖 DNA の自己相関関数や緩和時間がどのように変化するかを明らかにする。

(5) G-quadruplex を含む長鎖 DNA について、相互作用する小分子を加え、TIRE で 1 分子観察を行い、自己相関関数および緩和時間への影響を明らかにする。

長鎖 DNA に TMPyP、Idarubicin や irinotecan などのトポイソメラーゼ阻害剤を加え、緩和時間などにどのような影響を及ぼすのかを調べる。また、この試料にトポイソメラーゼを加え、スーパーヘリックス構造変化の 1 分子観察を行う。この構造変化が G-quadruplex を含む場合と含まない場合で変わるかどうかを明らかにする。NMN などの G-quadruplex と弱く相互作用する核酸関連試薬を G-quadruplex を形成する長鎖 DNA に加え、スーパーヘリックスの構造変化がトポイソメラーゼ阻害剤とどのように異なるのかを調べる。

(6) 分子動力学 (MD) による G-quadruplex 形成過程 MD 計算によるシミュレーション計算によって再現する。

DNA に適した力場のパラメーターを用いて、G-quadruplex 形成過程の MD シミュレーション計算を行う。特に、対イオンが Na⁺の場合と K⁺の場合によって DNA 塩基との相互作用がどのように変化するかを詳細に調べる。また、線状および環状に加えてスーパーヘリックスについても適用できるようにし、シミュレーション計算を行う。また、長鎖 DNA のモデルを用いたシミュレーション計算結果より得られる自己相関関数と実験結果を比較しモデルの検討を行う。

4. 研究成果

DNA のような高分子電解質は、希薄溶液系では高分子をビーズがつながったモデルとしたとき、それぞれのビーズ間の流体力学的相互作用

粘度 [mPa・s]	緩和時間 [s]	指数 (対数グラフの傾き)
1.0	0.81	0.67 ± 0.04
1.2	2.7	0.60 ± 0.02
1.6	4.8	0.55 ± 0.04
3.7		0.52 ± 0.01

を考慮した Zimm モデルに従うと考えられており、我々のこれまでの結果もこのことを示していた。しかし、今回の研究では細胞中のモデルとして粘性の高い溶液中での挙動を調べたところ、粘性の低い溶液では、Zimm モデルで予想される値を示した、粘性が高くなるに従って、それぞれのビーズ間の流体力学的相互作用を考慮しない Rouse モデルで説明することのできる値に近づいていくことが示された。このことは高分子 DNA は、粘性の高い溶媒中では、隣り合った部分からの束縛条件のみによって、ブラウン運動に基づく運動をすることを考えることができ、このことをシミュレーションのモデルに使うと、計算量を格段に少なくすることができ、この条件下におけるシミュレーション研究をする際、非常に多くのことを調べることができることを見出した。

G-quadruplex を形成する tel22 配列 (AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) を用いて、様々の条件下における四重鎖形成過程を円偏光二色性スペクトル測定およびストップフロー測定により、これまで詳しく調べられてきた TMPyP₄ だけではなく、種々の anti-cancer drug をはじめ様々の分子との相互作用を調べ、これらの中で G-quadruplex と相互作用する分子について、各分子の活性化エネルギーや複合体形成時の G-quadruplex の安定性の変化などを明らかにした。また、G-quadruplex 構造を取ることのできる配列の DNA がタンデムに複数あるときの相互作用を調べ、同じ鎖の中にこの配列が複数あるとき、1 か所が四重鎖構造をとると近傍の DNA に擦れ応力が伝搬し、一気にすべての配列部位で四重鎖構造を取るとを示唆する結果を得た。これまでに我々が発表してきた直鎖 DNA と環状 DNA における挙動の違いと併せて考えるため、208kbp の BACDNA に G-quadruplex 構造を取ることのできる配列とこの構造を取ることのできない配列を複数導入し、それぞれの DNA でカリウムイオンを含まないときにどのような挙動を示すかを TIRF 顕微鏡による 1 分子観察と円偏光二色性 (CD) スペクトルの経時変化測定により、配列による有意の差が無いことも確認した。また、カリウムイオンが存在する溶媒を用いて同様の実験も行ったが、CD では長鎖中に部分的にある G-quadruplex は全体の二重鎖構造のスペクトルによって見えなくなってしまうが、TIRF 顕微鏡による 1 分子観察では、相関時間に有意な差が現れた。このことは、G-quadruplex を形成する際部分的に二重鎖構造がほどこけるため DNA の擦れ応力が変化し、DNA の高次構造に変化を及ぼしているためであると考えられる。

これらの結果をシミュレーションの結果と比較するために、特に、長鎖 DNA の高分子の挙動を調べることのできる粗視的モデルが、これまでなかったことから、この研究において、新たにモデルを構築し計算を行ない、実験結果との比較し検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masato Tanigawa, Takafumi Iwaki.	4. 巻 120
2. 論文標題 How the Circular and Linear Conformational Fluctuations of Giant DNA Molecules Change with the Viscosity of the Solvent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 221a ~ 221a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2020.11.1480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masato Tanigawa, Takafumi Iwaki.
2. 発表標題 DNA の構造の揺らぎへの溶媒粘性の影響 Effect of solvent viscosity on configuration fluctuations of DNA
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takafumi Iwaki, and Masato Tanigawa
2. 発表標題 Long-time observations of linear/circular DNA in a good solvent by TIRF to measure a correlation time of configuration fluctuations.
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷川雅人, 岩城貴史
2. 発表標題 G-quadruplexがさまざまな小分子と相互作用することによる構造変化の反応速度論による研究
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masato Tanigawa, Takafumi Iwaki.
2. 発表標題 How the Circular and Linear Conformational Fluctuations of Giant DNA Molecules Change with the Viscosity of the Solvent
3. 学会等名 65th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩城 貴史 (Iwaki Takafumi) (60416419)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------