

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05615

研究課題名(和文) DNA高次構造と遺伝子活性のON/OFFスイッチング：実験・理論・計算による探求

研究課題名(英文) Contribution of higher-order structure transition of giant DNA on gene expression efficiency

研究代表者

剣持 貴弘 (KENMOTSU, Takahiro)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：10389009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、長鎖DNAの高次構造転移が遺伝子発現活性に直接的に寄与することを明らかにした。すなわち、長鎖DNAが凝縮する直前のDNAセグメントの平行配列が多い構造が最も遺伝子活性が促進され、さらに凝縮度が進んだ硬く折り畳まれた状態で遺伝子活性が完全に阻害されることを明らかにした。本研究の結果から、長鎖DNAの高次構造転移が遺伝子発現活性のON/OFFスイッチング機構の働きをすることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、長鎖DNAの高次構造転移が遺伝子発現活性にどのように寄与しているのかについては明らかにされいなかったが、本研究によって、DNA高次構造転移が遺伝子発現活性のON/OFFスイッチング機構として働くことを明らかにした。本研究で明らかとなった知見は、がんの発生メカニズムなど、生命科学および医学の基礎的な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：I have studied a contribution for gene expression efficiency by higher-order structure transition of giant DNA. I have found that an enhancement of gene expression efficiency result in a conformation of giant DNA just before globule state. This mean that the enhancement is due to the parallel ordering of DNA segments. Meanwhile, an inhibition on gene expression is caused by the compaction of DNA into a tightly packed state. Based on experimental and theoretical results, I have revealed that higher-order transition of giant DNA work as a switch on gene expression efficiency, enhancement and inhibition.

研究分野：生命物理

キーワード：長鎖DNA 遺伝子発現活性 高次構造転移 DNA一分子観察 蛍光顕微鏡 ポリアミン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトに関するすべての遺伝情報を細胞内にある DNA が担っており、ヒトの体内の各場所で適切な遺伝子を間違えずに発現し、生命活動を維持している。これまでのところ、鍵と鍵穴的な特異的な制御因子の作用により遺伝子発現の自己調節が行われているとの考えに基づいて説明しようとする研究が多数を占めていたが、2 万個余りの遺伝子について、細胞分化にみられるようなロバスタな ON/OFF のスイッチングについては、細胞内に各特定の遺伝子はほぼ全てが単一であり、制御因子の数ゆらぎを考慮すると、このような従来の考えでは説明が困難である。そのため、近年になり、鍵と鍵穴的なメカニズム以外の遺伝子発現機構の可能性が指摘され始めている。

2. 研究の目的

近年の研究で、DNA の高次構造が、遺伝子の転写・翻訳、および遺伝子発現に直接的に関与する可能性が指摘され始めているが、ゲノム DNA のような長鎖高分子の高次構造について知見が極めて不足しており、遺伝子発現の ON/OFF スイッチ機構の解明に至っていない。本研究は、DNA の高次構造転移が遺伝子発現のロバスタな ON/OFF を引き起している可能性について検証することが目的である。

3. 研究の方法

蛍光顕微鏡を用いた DNA 一分子観察の方法論および原子間力顕微鏡観察を適用し、長鎖 DNA 高次構造転移の研究を進める。本研究では、長鎖 DNA として、166 kbp の T4 GT7 DNA を用いる。また、ルシフェラーゼ・アッセイにより遺伝子発現量を測定し、遺伝子発現量と DNA 高次構造の関係を定量的に評価する。ゲノム DNA の構造転移に関しては、著しく知見が不足しており、実験的なアプローチだけでなく、理論、およびモンテカルロシミュレーションによる解析も行う。本研究では、実験・理論・計算によるアプローチにより、長鎖 DNA の高次構造転移が遺伝子発現にどのように寄与しているかを明らかにする。

4. 研究成果

図 1 と図 2 に原子間力顕微鏡を用いて観察した T4 GT7 DNA のスペルミジンおよびスペルミン添加による高次構造転移を示す。スペルミジンとスペルミンは生体ポリアミンの一種であり、細胞分裂やタンパク質合成に関与する成長因子である。スペルミジンおよびスペルミンの濃度が高くなるにつれて、T4 GT7 DNA がコイル状態からグロブユール状態に凝集することが分かる。

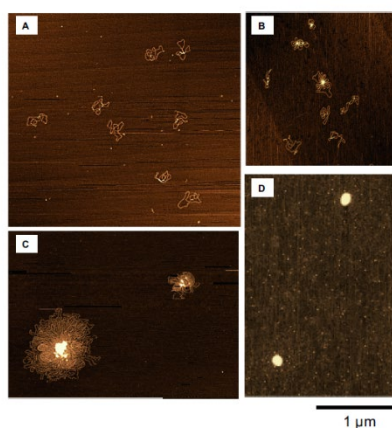


図 1 スペルミジンによる T4 GT7 DNA の高次構造転移 (A) 0.004 mM (B) 0.1 mM (C) 0.3 mM (D) 2 mM.

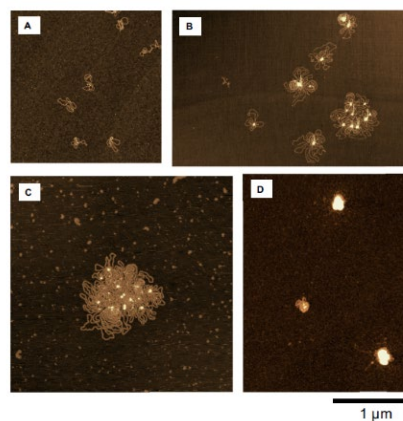


図 2 スペルミンによる T4 GT7 DNA の高次構造転移 (A) 0.004 mM (B) 0.006 mM (C) 0.07 mM (D) 0.6 mM.

図 3 にルシフェラーゼ・アッセイ法を用いて、スペルミジンおよびスペルミン添加濃度によって、遺伝子発現活性がどのように変化するかを調査した結果を示す。縦軸は、添加前の遺伝子発現量によって規格化した。スペルミジンとスペルミンのどちらも、ある濃度まで遺伝子発現量が促進され、ピークを越えると発現量が減少していき、最終的には遺伝子発現活性が完全に阻害されることが分かる。原子間力顕微鏡観察と遺伝子発現実験から、DNA が凝集する直前の構造をもつとき (図 1(C)、図 2 (C))、遺伝子発現が 4 倍~6 倍程度促進され、硬く凝集した構造をもつとき (図 1(D)、図 2 (D))、遺伝子発現が完全に阻害されることが分かる。これらの実験結果か

ら、本実験グループでは、長鎖 DNA の高次構造転移が遺伝子発現活性の ON/OFF スwitching 機構の働きをすることを明らかにし、図 4 に示す物理モデルを提案した。図 4 (B) に示すように、ポリアミン添加によって、DNA の負電荷が中和され数%となり、さらに DNA セグメント同士の平行配列することによって、RNA ポリメラーゼによる DNA 遺伝情報の読み込みが容易になり、遺伝子発現活性が促進される。一方、図 4 (C) のように、DNA が固く凝集した構造では、RNA ポリメラーゼが DNA の遺伝情報を読み込むことが出来ず、遺伝子発現が完全に阻害される。

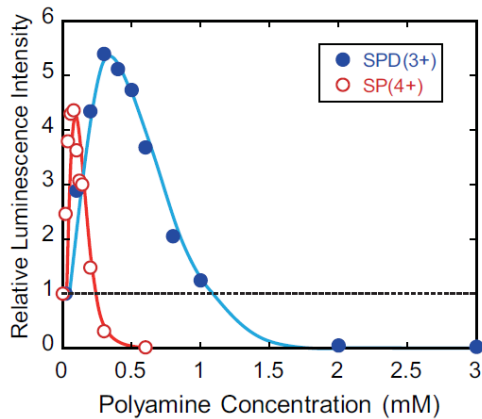


図 3 スペルミンおよびスペルミン添加による遺伝子発現活性への寄与

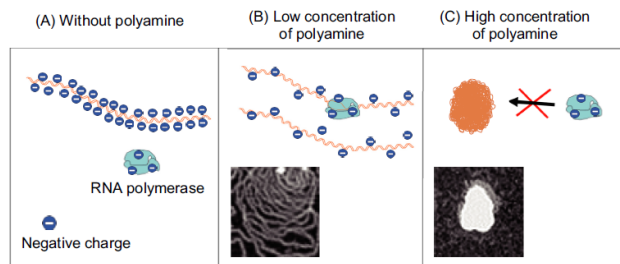


図 4 DNA 高次構造による遺伝子発現の ON/OFF スwitching 機構 (A) ポリアミンない場合 (B) DNA セグメントの平行配列 (遺伝子発現を促進する) (C) 硬く凝集 (遺伝子発現を完全に阻害する)

図 5 にポリアミンの炭素鎖長が遺伝子発現にどのような寄与するのかについて、ルシフェラーゼ・アッセイ法を用いて調査した結果を示す。ポリアミン添加によって、遺伝子発現活性の促進と阻害が観測された。

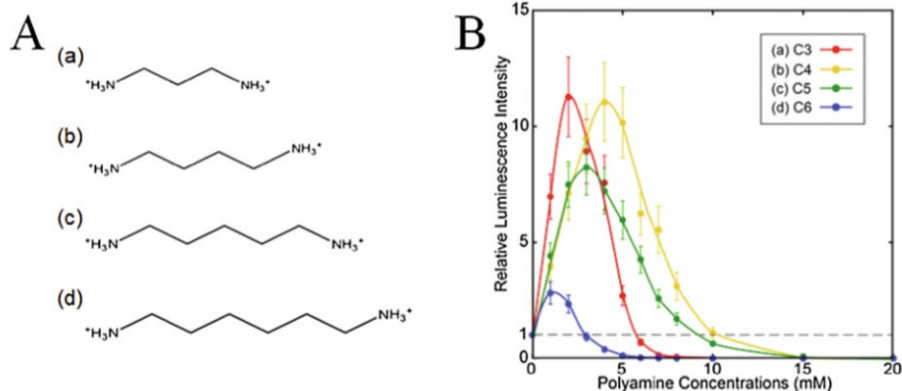


図 5 ポリアミン添加による遺伝子発現活性への寄与 (A) ポリアミンの化学構造 (B) ポリアミン添加による遺伝子発現活性への寄与

図 6 に二価ポリアミン $[\text{NH}_3(\text{CH}_2)_n\text{NH}_3]^{2+}$ ($n = 1 - 6$) (C3 - C6) 添加による DNA の高次構造を原子間力顕微鏡で観察した結果と蛍光顕微鏡による DNA 一分子計測結果を示す。C3 - C5 存在下では、環状 DNA は単一または複数のループ構造をとり、C3 - C5 間での DNA 構造に顕著な違いは見られなかった。一方、C6 の低濃度条件 0.2 mM (図 5 (d-1)) では環状 DNA の一部は凝縮し、その他の部分はループ構造をとった。また、1 mM より大きい濃度領域では、C6 は DNA のペアリング構造という顕著に異なる構造を引き起こすことが分かった。さらに遺伝子発現が完全に阻害されたときの DNA 構造を調べるため、40 mM の各ポリアミン存在下の DNA 構造を原子間力顕微鏡によって観察した結果を図 6 に示す。図 5 より、C3 - C5 存在下では DNA の完全な凝縮構造が観察された。一方で、C6 存在下では図 5 の (d-2) - (d-4) と同様の DNA のペアリング構造が観察された。これより、炭素鎖長の長い C6 は DNA の凝縮構造を引き起こさないことが明らかとなった。

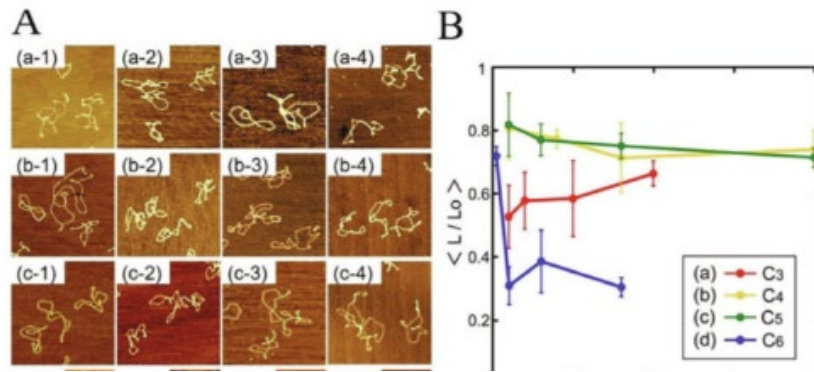


図5 ポリアミン添加による DNA 高次構造転移 (A) C3: (a-1) 1; (a-2) 2; (a-3) 5; (a-4) 10. C4: (b-1) 1; (b-2) 4; (b-3) 8; (b-4) 20. C5: (c-1) 1; (c-2) 3; (c-3) 8; (c-4) 20. C6: (d-1) 0.2; (d-2) 1; (d-3) 3; (d-4) 8. 単位:mM (B) DNA 長軸長のポリアミン濃度変化

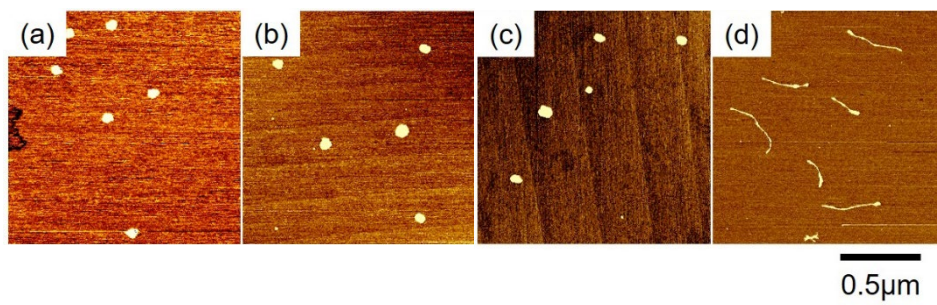
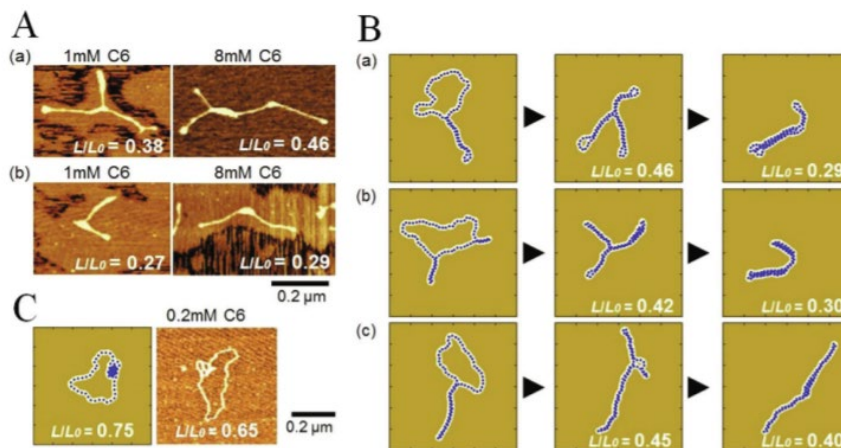


図6 40 mM ポリアミン添加による DNA 高次構造の AFM 観察 (a) C3, (b) C4, (c) C5 (d) C6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanemura Ai, Yoshikawa Yuko, Fukuda Wakao, Tsumoto Kanta, Kenmotsu Takahiro, Yoshikawa Kenichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Opposite effect of polyamines on In vitro gene expression: Enhancement at low concentrations but inhibition at high concentrations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0193595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroko Tanaka, Chwen-Yang Shew, Yuko Yoshikawa, Takahiro Kenmotsu, Kenichi Yoshikawa,	4. 巻 745
2. 論文標題 Low-efficiency of gene expression with a long diamine is attributable to the effect on DNA zipping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 137253-137259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.137253	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takahiro Kenmotsu, Yuko Yoshikawa, Kenichi Yoshikawa
2. 発表標題 Biphasic effect of polyamine, enhancement and inhibition, on gene expression in vitro: Experimental observation and theoretical modeling
3. 学会等名 BIT's 9th World Gene Convention-2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Kenmotsu, Yue Ma, Moe Usui, Yuko Yoshikawa, Kenichi Yoshikawa
2. 発表標題 ouble-strand breaks in genome-size DNA caused by photo-irradiation, gamma-rays and ultrasound
3. 学会等名 The 37th JSST Annual International Conference on Simulation Technology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 剣持 貴弘, 吉川 祐子, 吉川 研一
2. 発表標題 多価カチオンによるDNAの折り畳み転移: 2価と3価の拮抗的作用の謎に迫る
3. 学会等名 理論化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 寛子, 吉川 祐子, 梅澤 直樹, 剣持 貴弘, 吉川 研一
2. 発表標題 種々のポリアミンによる遺伝子発現活性制御
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ai Kanemura, Yuko Yoshikawa, Takahiro Kenmotsu, Wakao Fukuda, Kenichi Yoshikawa
2. 発表標題 Dual effect of polyamines on gene expression: Acceleration and inhibition
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroko Tanaka, Ai Kanemura, Yuko Yoshikawa, Naoki Umezawa, Takahiro Kenmotsu, Kenichi Yoshikawa
2. 発表標題 Structure and function of DNA in the presence of linear-chain polyamines with a valency from 2+ to 5+
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金村愛, 吉川祐子, 福田青郎, 湊元幹太, 剣持貴弘, 吉川研一
2. 発表標題 遺伝子発現におけるポリアミンの促進と阻害の二面性
3. 学会等名 日本ポリアミン学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Kenmotsu, Yuko Yoshikawa, and Kenichi Yoshikawa
2. 発表標題 Biphasic effect of polyamine, enhancement and inhibition, on gene expression in vitro: Experimental observation and theoretical modeling
3. 学会等名 BIT's 9th World Gene Convention-2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 寛子, Chwen-Yang SHEW, 吉川 祐子, 剣持 貴弘, 吉川 研一
2. 発表標題 2価ポリアミンが引き起こす遺伝子発現の促進と抑制: アミノ基間の炭素鎖長の重要性
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川智規, 西尾天志, 吉川祐子, 剣持貴弘, 梅澤直樹, 吉川研一
2. 発表標題 ポリアミンによる遺伝子発現の促進・抑制の二面性: D NA 高次構造変化との相関
3. 学会等名 ポリアミン学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 剣持貴弘、吉川祐子、吉川 研一
2. 発表標題 多価カチオンによるDNAの折り畳み転移：2価と3価の拮抗的作用の謎に迫る
3. 学会等名 理論化学討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

同志社大学 生命医科学部 生命物理科学研究室 http://dmpi.doshisha.ac.jp/

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
連携研究者	吉川 研一 (YOSHIKAWA Kenichi) (80110823)	同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員 (34310)	
連携研究者	吉川 祐子 (YOSHIKAWA Yuko) (80291871)	同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員 (34310)	