

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05283

研究課題名(和文) ミトコンドリア内環境に依存したDNA複製阻害の定量的解析と化学的制御

研究課題名(英文) Quantitative analysis and chemical regulation of DNA replication stall depending on mitochondrial environments

研究代表者

高橋 俊太郎 (Takahashi, Shuntaro)

甲南大学・先端生命工学研究所・准教授

研究者番号：40456257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ミトコンドリア内の化学環境変化によってミトコンドリアDNA(mtDNA)の変異が生じる化学的メカニズムを定量的に解明することを目的とする。そのために、四重らせんDNA構造による複製反応の制御機構について定量的な解析を行うと共に、特定の四重らせん構造を制御する小分子化合物の探索・設計・合成を行った。さらに、ミトコンドリア内環境の評価計の開発により、HeLa細胞でミトコンドリア内の四重らせん形成解析を行った。これらの業績は米国化学会誌Journal of the American Chemical Society誌などはじめとする国際誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、物理的な環境の効果と生物学的な遺伝子変異を定量的に結びつけるという特色がある。本研究を基盤として、ミトコンドリア内の溶液物性、四重鎖構造の安定性、および複製阻害効果を統合したデータベースを構築することができる。それにより、ミトコンドリア内の環境変化とmtDNAの変異発生を定量的に結びつける。このようなデータベースを活用することで今後新しい医工学技術の創出が期待できる。例えば、細胞内環境から生活習慣病の発症リスクを評価する診断技術の確立や、mtDNAの四重鎖構造を制御して複製阻害を抑える薬剤の合目的な開発などに貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to quantitatively elucidate the chemical mechanisms by which mtDNA mutations are caused by changes in the chemical environment within mitochondria. To this end, we quantitatively analyzed the control mechanism of the replication reaction by the quadruplex DNA structure, and explored, designed, and synthesized small molecular compounds that regulate specific quadruplex structures. Furthermore, by developing an instrument to evaluate the intramitochondrial environment, we analyzed the formation of intramitochondrial quadruplexes in HeLa cells. These achievements have been published in international journals, including the Journal of the American Chemical Society.

研究分野：生体関連化学

キーワード：グアニン四重鎖 i-motif 熱力学 遺伝子複製 分子クラウディング ミトコンドリア 圧力 リガンド

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。

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物の細胞小器官の一つで、高エネルギー分子 (ATP、アセチル CoA など) を生産し、細胞の恒常性を維持する役割を担う。エネルギー産生に関する遺伝子は核内 DNA (nDNA) ではなくミトコンドリア固有の DNA (mtDNA) にコードされている。mtDNA の変異は、高エネルギー分子の産生を変動させ、nDNA のメチル化などのエピジェネティックな化学修飾の変化を生じさせる。その結果、代謝に関わる様々な遺伝子発現が変動することで生活習慣病と呼ばれる癌や糖尿病などの後天的疾患が引き起こされる。近年、このような mtDNA の変異は、細胞内外の環境変化の影響をミトコンドリアが受けることが原因であることが明らかになってきた (A. Latorre-Pellicer et al., *Nature*, 535, 561 (2016))。しかしながら、環境変化によって mtDNA の変異が引き起こされる化学的なメカニズムの解明は未だ進んでいない。申請者は以前より、グアニン (G) 四重らせんなど、DNA が形成する非標準核酸構造の化学的特徴について、物理化学的手法を用いて解析することでその生体内の役割を研究してきた (S. Takahashi, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 13774 (2013), *PCCP*, 17, 31004 (2015) など (以下申請者が筆頭著者の文献は著者を略す))。最近になり、四重らせんの生体内での働きの一つとして、DNA ポリメラーゼの進行を阻害し、DNA 複製を停止させることを明らかにした (PNAS, 114, 9605 (2017))。その際、DNA 周囲の分子クラウディング環境 (高濃度の共溶質が存在する分子で混み合った環境) で四重らせんのトポロジーが変化し、その構造が安定化することで、DNA 複製が強く阻害された。このような四重らせん構造の安定化は特定の小分子化合物が結合することによっても生じた (JACS, 140, 5774 (2018))。したがって、ミトコンドリア内に局所的に生じる化学環境変化によって、mtDNA の四重らせん構造が安定化し、mtDNA の複製が阻害される可能性がある。CRISPR/Cas によるゲノム編集でも利用されているように、DNA 複製阻害で生じた DNA 鎖の切断は、その修復過程においてミスが生じ、DNA 変異が発生する。したがって、ミトコンドリア内の化学環境変化とそれに対応した mtDNA の変異発生の関連性を明らかにすることは極めて重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア内の化学環境変化によって mtDNA の変異が生じる化学的メカニズムを定量的に解明することを目的とする。そのために、本研究ではミトコンドリア内の溶液環境を解析し、その物理化学的な物性を決定する。続いて、決定された溶液物性と同等の物性を有する擬似的なミトコンドリア環境を調整する。その中で四重らせん形成の熱力学的安定性や複製反応の動力学を解析することで、ミトコンドリア内環境での複製阻害効果を定量的に評価する。さらに、溶液の物性を変化させることで、四重らせん構造による複製阻害が生じる化学的環境を系統的に調べ、ミトコンドリア内の化学環境変化に伴う mtDNA の変異発生の関連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ミトコンドリア内環境と同等の水の活量と排除体積効果を有するミトコンドリア擬似環境を、分子量の異なるポリエチレングリコール等を用いて調整した。調整したミトコンドリア擬似環境中で四重らせんを形成した DNA の複製反応速度 ( $k$ ) を定量的に解析した。四重らせんは mtDNA に存在するものの他、ヒトテロメアなどヒトの遺伝子に存在する配列を中心に解析した。続いて、UV メルティング法で算出した四重らせんの熱安定性 ( $-\Delta G$ ) と  $k$  の相関性を評価した。本手法を基盤として、四重らせんに結合する化合物を探索し、特定の四重らせん構造を安定化し、複製反応を効率よく制御するリガンド分子の設計、合成を行った。さらに、ミトコンドリア細胞内環境で四重らせん構造がどのような挙動を調べるための、四重らせんベースの分子プローブの開発を行った。そのために、基礎的なデータ収集のための四重らせん周囲の水和環境を定量化する物理化学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

まず、ヒトテロメア由来のグアニン四重らせんをモデルとして、グアニン四重らせんの構造安定性と複製阻害効果の定量的解析法を確立した。このような効果を定量的に解析するために、「Quantitative Study of Topology-dependent Replication (QSTR)」と呼ばれる独自の手法を開発した (図 1)。QSTR は、複製速度とグアニン四重らせんの安定性の関係性から、グアニン四重らせんのトポロジー依存的に働く、結合分子を系統的に分類できる。それにより、グアニン四重らせんに結合する分子が複製の中間状態やグアニン四重らせんの巻き戻しの速度をどのように制御しているかを定量的に判断する指標 (インデックス) が得られる。本手法を用いて複製を効率的に阻害するリガンド分子を評価し、ナフタレンジイミド化合物を合理的に新規化合物を設計・合成した。この化合物は、特定のトポロジーを有するグアニン四重らせんを安定化する性質を持ち、初期に開発されたテロメア結合性化合物 (TMPyP4) と比較して、100 倍以上の効率でテロメア DNA の複製を阻害することができた (*J. Am. Chem. Soc.*, 143, 16458-16469 (2021))。こ

の成果は雑誌の表紙として掲載された。

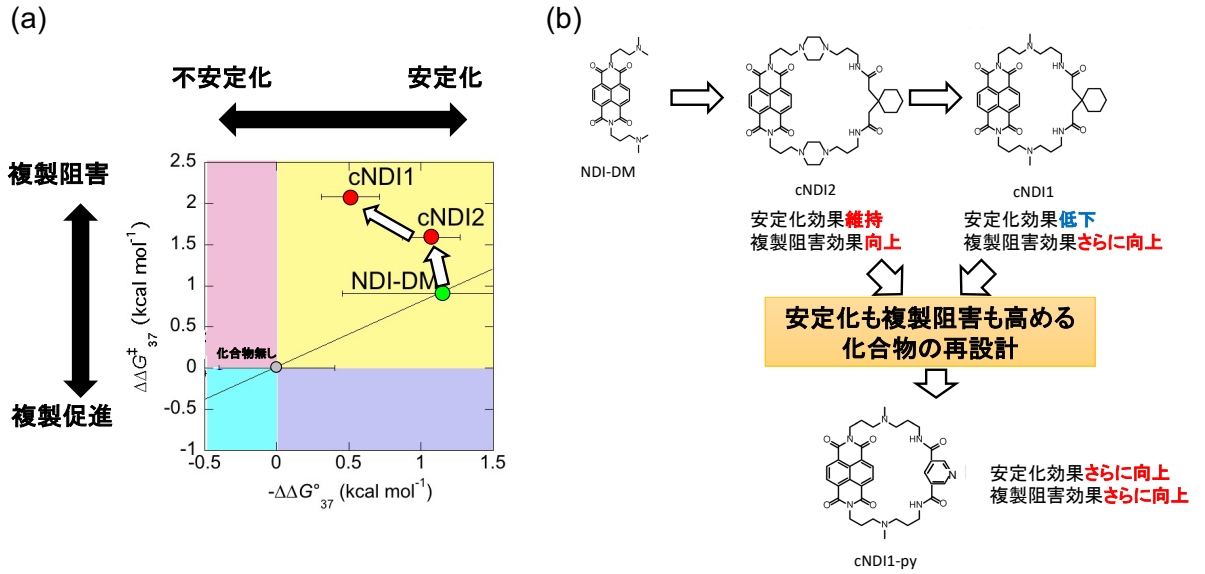
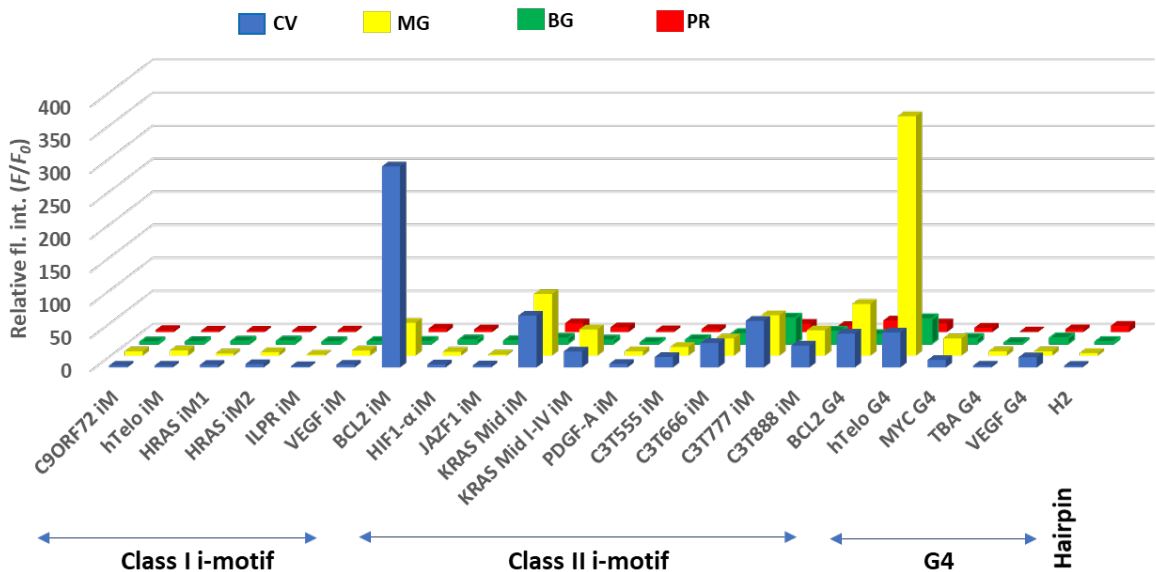


図 1. 本研究で開発したテロメアグアニン四重らせん構造に強力に結合する分子の設計指針。(a)複製速度とグアニン四重らせんの安定性の相関関係を評価するためのQSTRのプロット。(b)ナフタレンジイミド誘導体(NDI-DM)を基準とし、グアニン四重らせん構造の安定化効果と複製阻害効果の双方を高めた新規分子(cNDI1-py)の開発に成功した。

さらに本手法を活用することで、英国 Reading 大学のグループと共同で、ヒトテロメア由来のグアニン四重らせんに特異的に結合するルテニウム錯体を合成し、その複合体の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定することができた(*J. Am. Chem. Soc.*, 144, 5956-5964 (2022))。これらの研究に加え、DNA 上に形成される四重らせん構造の形成を調節してミトコンドリア DNA の変異発生を化学的に制御する技術の開発を進めた。その中で、i-motif 型の四重らせん構造に対し、配列選択的に結合するリガンド分子を見出すことに成功した。一例として、クリスタルバイオレットがヒト Bcl2 遺伝子のプロモーター領域由来の i-motif に選択的に結合し、その転写活性を抑制することを示した(図 2)。得られた結果は、i-motif のループ領域がアダプターのように配列に応じて様々な低分子化合物の結合サイトになり得る事を示唆しており、今後はミトコンドリア特有の i-motif 配列をターゲットとする低分子化合物を開発することで、ミトコンドリア DNA の変異発生を化学的に制御できることが期待される。



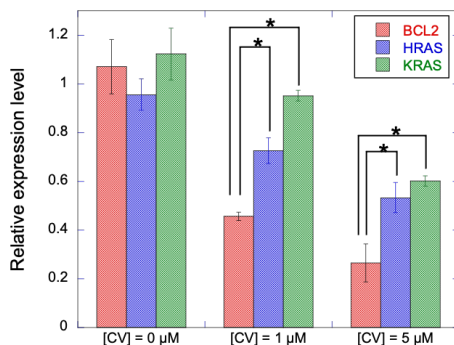


図 2. (上) 様々な遺伝子に由来する非二重らせん構造を形成する DNA と各種トリフェニルメタン化合物と混合した際の蛍光強度測定の結果。(下) 濃度の異なるクリスタルバイオレット (CV) 添加 24 時間後の  $\beta$ -アクトリン mRNA に対する MCF-7 細胞内の BCL2、HRAS、KRAS mRNA の相対発現量を qRT-PCR で測定した結果。

続いて、ミトコンドリア内の分子クラウディング環境を計測するための核酸プローブの開発を進めた。プローブのコアとしてとして G 四重らせん構造を用いるために、G 四重らせん構造の分子クラウディング環境下での挙動を定量的に解析した。圧力変化による体積値測定と分子動力学計算を用いることで、G 四重らせん構造の配列に依存して変化する周囲の水和水の定量化に成功した (*Anal. Chem.* 94, 7400 (2022))。それにより、溶液中の水の活量変化を核酸プローブで測定するための基礎的データを収集することができた (図 3)。各四重らせん構造をコアとした核酸プローブを調製し、溶液中の水の活量変化と排除体積効果を定量的に解析できることを *in vitro* の実験系で確認し、現在は細胞内での解析を進めている。

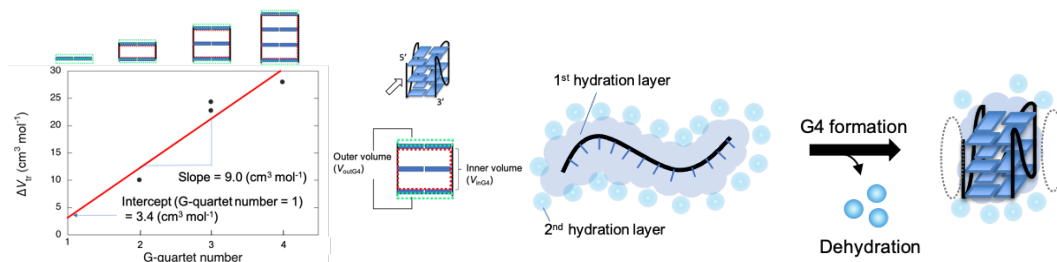
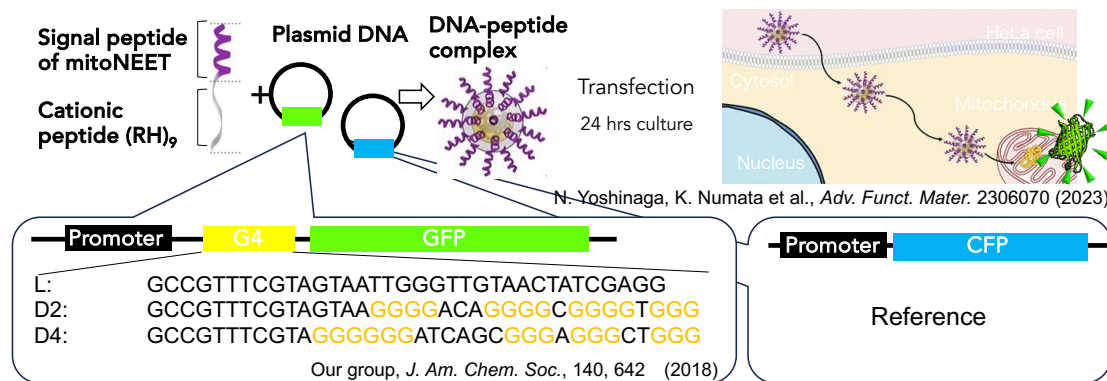


図 3. 圧力によるグアニン四重らせんの水和研究。G4 の外側の体積と内側の体積の割合を求めることで、グアニン四重らせん形成に伴う水と量変化を算出できる。

さらに本研究では、細胞中のミトコンドリア内環境が四重らせん構造に及ぼす影響を観察するために、ミトコンドリア内あるいは核内で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するレポーター系を構築した (図 4)。プロモーター下流に四重らせん配列を導入したところ、ミトコンドリア内で GFP の発現量が減少した配列が得られた。以上から、ミトコンドリア内は核内とは異なる溶液環境により四重らせん構造の形成が制御されており、その解明がミトコンドリア DNA の変異発生を理解する上で重要であることを示した (日本化学会第 104 春季年会で発表)。



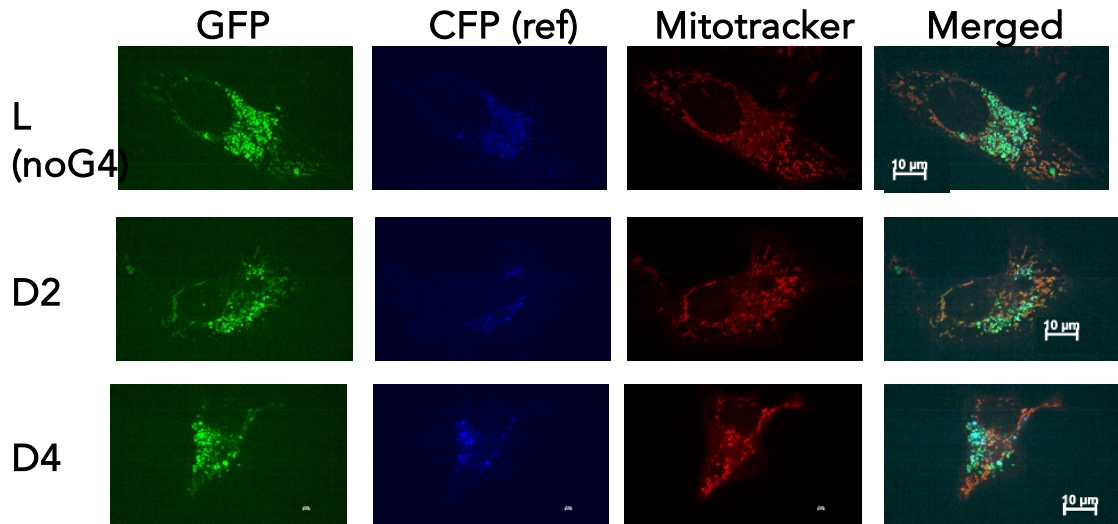


図 4. ミトコンドリア遺伝子発現のための mitoNEET-(RH)9 と G4 レポータープラスミド DNA との複合体によるトランスフェクト HeLa 細胞の共焦点顕微鏡像。

本研究を進める上で、DNA 複製反応制御の検討を進める過程で、本研究のアプローチが様々な核酸複製反応の制御法開発に活用できるという予期していなかった結果を見いだした。その一例として、新型コロナウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの反応を、細胞内の G 四重らせん構造を形成する RNA で RNA 複製が阻害できることを発表した (*Chem. Commun.*, 59, 872 (2023))。さらに、高温にすることで低下する複製反応の効率を、圧力を上げることでその低下を抑制できることを明らかにした (*Biophys. Chem.* 292, 106914 (2023))。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumoto Saki, Takahashi Shuntaro, Bhowmik Sudipta, Ohyama Tatsuya, Sugimoto Naoki	4. 巻 94
2. 論文標題 Volumetric Strategy for Quantitatively Elucidating a Local Hydration Network around a G-Quadruplex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 7400 ~ 7407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c01075	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
1. 著者名 Takahashi Shuntaro, Sugimoto Naoki	4. 巻 292
2. 論文標題 Pressure-temperature control of activity of RNA polymerase ribozyme	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysical Chemistry	6. 最初と最後の頁 106914 ~ 106914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpc.2022.106914	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Endoh Tamaki, Takahashi Shuntaro, Sugimoto Naoki	4. 巻 59
2. 論文標題 Endogenous G-quadruplex-forming RNAs inhibit the activity of SARS-CoV-2 RNA polymerase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 872 ~ 875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc05858h	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Takahashi Shuntaro, Kotar Anita, Tateishi-Karimata Hisae, Bhowmik Sudipta, Wang Zi-Fu, Chang Ta-Chau, Sato Shinobu, Takenaka Shigeori, Plavec Janez, Sugimoto Naoki	4. 巻 143
2. 論文標題 Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 16458 ~ 16469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c05468	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

1. 著者名 Takahashi Shuntaro, Matsumoto Saki, Chilka Pallavi, Ghosh Saptarshi, Okura Hiromichi, Sugimoto Naoki	4. 巻 12
2. 論文標題 Dielectricity of a molecularly crowded solution accelerates NTP misincorporation during RNA-dependent RNA polymerization by T7 RNA polymerase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05136-8	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 McQuaid Kane T., Takahashi Shuntaro, Baumgaertner Lena, Cardin David J., Paterson Neil G., Hall James P., Sugimoto Naoki, Cardin Christine J.	4. 巻 144
2. 論文標題 Ruthenium Polypyridyl Complex Bound to a Unimolecular Chair-Form G-Quadruplex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 5956 ~ 5964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c00178	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 該当する

1. 著者名 Takahashi Shuntaro, Bhowmik Sudipta, Sato Shinobu, Takenaka Shigeori, Sugimoto Naoki	4. 巻 12
2. 論文標題 Replication Control of Human Telomere G-Quadruplex DNA by G-Quadruplex Ligands Dependent on Solution Environment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 553 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12040553	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 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 S. Takahashi
2. 発表標題 High pressure study of dynamics of non-canonical nucleic acid structures
3. 学会等名 The 11th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊太郎, S. Ghosh, P. Chilka, 大山達也, 杉本直己
2. 発表標題 i-motif 型 DNA 構造に対する分子クラウディング効果の定量的解析
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊太郎, 松本咲, 建石寿枝, Byeang Hyeon Kim, 杉本直己
2. 発表標題 SARS-CoV-2由来RNA依存性RNAポリメラーゼの複製反応におけるグアニン四重鎖の効果とその制御
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Takahashi
2. 発表標題 Volumetric study for the functions of non-canonical nucleic acids structures
3. 学会等名 Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2022 “ANNA2022” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Takahashi, N. Sugimoto
2. 発表標題 Thermodynamics approach for the fidelity of RNA-dependent RNA polymerase of SARS- CoV-2 under molecular crowdings
3. 学会等名 第49回国際核酸化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 高橋 俊太郎、松本 咲、大山 達也、Sudipta Bhowmik、杉本 直己
2. 発表標題 脱ワトソン・クリックの核酸化学 (87): 高圧力を用いたグアニン四重鎖の水和解析によるリガンド結合予測
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊太郎, 建石寿枝, 佐藤しのぶ, 竹中繁織, J. Plavec, 杉本直己
2. 発表標題 トポロジー依存的なリガンド結合でグアニン四重鎖のDNA複製を制御する
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋俊太郎
2. 発表標題 細胞内での核酸の挙動を明らかにする熱力学解析
3. 学会等名 第57回熱測定討論会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Takahashi, A. Kotar, H. Tateishi-Karimata, S. Bhowmik, Zi-Fu Wang, Ta-Chau Chang, S. Sato, S. Takenaka, J. Plavec, N. Sugimoto
2. 発表標題 Chemical modulation of DNA replication by topology- dependent ligand binding on guanine quadruplexes
3. 学会等名 第48回国際核酸化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Takahashi, T. Ohyama, S.-B. Chen, J.-H. Tan, N. Sugimoto
2. 発表標題 Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (78) : Analysis of structural dynamics of c-Myc G-quadruplex DNA using high pressure
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Ghosh, L. Liu, S. Takahashi, T. Endoh, N. Yoshinaga, K. Numata, N. Sugimoto
2. 発表標題 New Data Science in Nucleic Acids Chemistry (5): Effect of local environments on the stability of nucleic acids in mitochondria
3. 学会等名 日本化学会第104回春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋俊太郎、松本咲、大山達也、S. Bhowmik、杉本直己
2. 発表標題 高圧力を用いたグアニン四重鎖DNAへのリガンド結合解析
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

甲南大学先端生命工学研究所  
<https://www.konan-fiber.jp>  
 甲南大学先端生命工学研究所ホームページ  
<http://www.konan-fiber.jp/indexb/>

## 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
--	---------------------------	-----------------------	----

## 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			
インド	カルカッタ大学			
英国	Reading大学			
インド	マハトマ・ガンジー医学先端研究所			
スロベニア	国立NMRセンター			