

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22510123

研究課題名(和文) 1分子DNAの高次構造制御と環境ストレス応答

研究課題名(英文) Controlling the higher order structure of single DNA molecule with attention to environmental stress

研究代表者

吉川 祐子 (Yoshikawa, Yuko)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：80291871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：1.フラボノイド類の抗酸化作用に注目し、ガンマ線照射や光誘起による長鎖DNAの二重鎖切断がどの程度抑制されるかを比較した。2. *in vivo*で顕著な抗がん活性を有するテトラゾラト架橋白金(II)二核錯体は、DNAに対して特異的な高次構造変化と二次構造変化を引き起こすことを明らかにした。3. 南極由来極限環境微生物からメガ塩基対サイズの巨大ゲノムDNAを抽出することに成功し、DNAサイズに応じた折り畳み転移特性を比較検討した。4. キラルな4価のポリアミンの立体異性体(4種類)を合成し、長鎖DNAに作用させたときの凝縮能を比較した。

研究成果の概要(英文)：1. The protective effects of water-soluble derivatives of flavonoids on photo- and gamma ray-induced DNA double-strand breaks were evaluated in a quantitative manner. This observation demonstrated the dependence of the antioxidant potentials of these compounds on the source of irradiation. 2. It was found that tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes induced the irreversible compaction of large genomic DNA, which was accompanied by a change in the secondary structure from the B to C form. 3. The appearance of the phase-segregated state in megabase-size DNA is markedly different from the all-or-none characteristics on the folding transition in a single sub-megabase-size DNA. 4. Novel stereoisomers of tetravalent polyamines were examined their ability to induce the compaction of single DNA molecules. It was found that Isomer (R,S-R,S) is more potent at inducing both DNA compaction and changes in the secondary structure.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：1分子計測 環境応答 長鎖DNA DNA損傷 蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の急速な発展に伴い、DNA の塩基配列に関する情報が飛躍的に増大しつつあるが、一方で、塩基配列の特異性のみでは、細胞分化やがん化などの本質に迫ることが出来ないことも明らかになってきている。このようなエピジェネティクスと称される生命科学上の基本的な問題には、ゲノム情報を担っている染色体 DNA の高次構造変化が密接に関係しているものと期待される。数 100kbp を越えるような長鎖 DNA の高次構造の決定には、数 bp から数十 bp を認識するような特異的な因子よりも、むしろ、特異性の弱い、あるいは非特異的な因子が関わっている可能性が高い。多くの抗がん剤や、変異原物質、さらには、放射線なども、DNA に対する非特異的な相互作用が重要な役割を果たしていると予想される。本申請者は、これまでに、水溶液中での DNA 1 分子のコンフォメーション変化を、高感度高倍率の蛍光顕微鏡でリアルタイム観察することにより、(1)DNA の折り畳み転移は、on/off 型の不連続な転移であること、(2)さらに、on/off 的に折り畳まれた DNA は、自己組織的に多様なナノ構造体を形成することを報告してきている。

2. 研究の目的

本研究課題では上記に示したような変異原物質や放射線等を環境ストレスとして総体的に捉え、従来研究の遅れていた巨大 DNA 分子の高次構造変化と関連させてその影響を定量的に調べることを目的とした。

3. 研究の方法

100kbp を超える長鎖 DNA を対象として、1 分子レベルで DNA の高次構造変化を計測することを中核的な方法論とした。各種抗がん剤や環境変異原物質等の環境ストレスによって引き起こされる DNA の高次構造変化を計測し、その結果を、二次構造変化とも対比させて解析を進めた。さらに、各種放射線など、様々な環境因子によって引き起こされる DNA 損傷の中でも最も重篤であると考えられる二重鎖切断反応の効率を、その高次構造との関連で定量的に解析することも、重要な課題として位置づけた。

4. 研究成果

(1) 蕎麦の実に多く含まれるルチンや柑橘類の皮に多く含まれるヘスペリジンのグルコース誘導体である G ルチンと G ヘスペリジンの抗酸化作用に注目し、ガンマ線照射や光誘起による長鎖 DNA の二重鎖切断がどの程度抑制されるのかを、蛍光顕微鏡による単一分子観察法を活用して調べた。その結果、光照射に対しては、G ルチンは、G ヘスペリジンの 2 倍の二重鎖切断抑制作用を示したが、ガンマ線照射においては、両化合物による抑制作用は同程度であることが明らかとなった。線源が違えば抗酸化能の程度も異

なることを示した(図 1、図 2)。

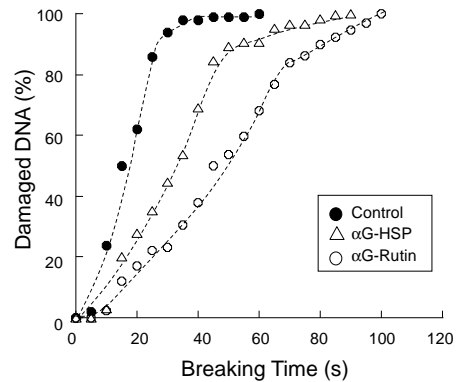


図1. フラボノイドによる DNA 光切断抑制作用

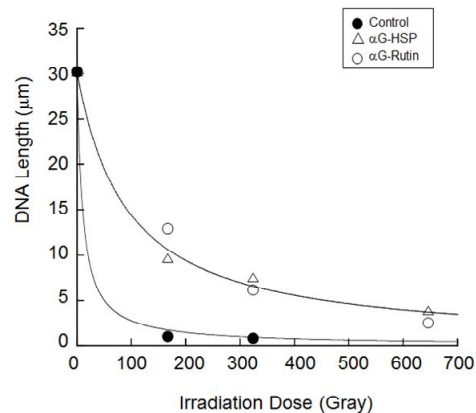
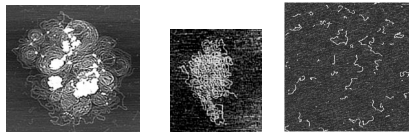


図2. フラボノイドによる DNA ガンマ線切断抑制作用

(2) 既に精子核タンパク質であるプロタミンによって高度に凝縮した DNA では、放射線による二重鎖切断が著しく抑制されていることを明らかにしているが、平成 22 年度は、塩濃度に依存した、プロタミンによる DNA の高次構造変化の特性を実験・理論両面から考察した。

(3) *in vivo* で高い抗腫瘍活性を有する新規テトラゾラト架橋白金(II)二核錯体を長鎖 DNA に作用させると、不可逆的、かつ特徴的な DNA 凝縮を誘起することが明らかとなった。さらに CD スペクトル解析から、二次構造変化(B 型 C 型)も引き起こされることが明らかとなった。これらの高次構造変化の特性を、生体ポリアミンによる作用と比較した。

(4) メガ塩基対サイズの DNA を南極由来微生物から抽出し、スペルミジンを用いたときの DNA の折り畳み転移特性を実験・理論両面から考察した。本結果を、これまで明らかにしてきた 100 キロ塩基対サイズの DNA での折り畳み転移と比較したところ、DNA のサイズが大きくなる程、ポリアミンに対する感受性が高くなることが明らかとなった(図 3)。



[メガ塩基対] [100 キロ塩基対] [数千塩基対]

図3. 同濃度の凝縮剤 存在下におけるDNA サイズに依存した折り畳み構造の違い (AFM 像)

(5) *in vivo*で抗腫瘍活性を有する新規アゾラト架橋白金(II)二核錯体によって引き起こされるDNAの二次構造変化を、経時的にCDスペクトルにより測定し、二段階反応からなる相互作用機構を提唱した。

(6) キラルな4価のポリアミンの立体異性体4種類(RS-RS, SR-SR, RS-SR, SR-RS)を合成し、長鎖DNAに作用させたときの凝縮能を比較した。DNAはキラルな分子であることから、凝縮剤のキラリティーがDNAの折りたたみ転移に重要な影響を与えることが期待される。蛍光顕微鏡を用いたDNA分子の高次構造変化の直接観察により、凝縮能は、RS-RSが他の異性体に比べて4倍程度高いことを明らかにした。さらにCDスペクトル測定によりDNAの二次構造変化を調べたところ、RS-RSが他の異性体と比べて顕著に高い活性を示した。また、電子顕微鏡による凝縮DNAの微細構造観察から、4価のスペルミンを用いた場合とは異なる特徴的なミニトロイド構造をとることが明らかとなった。ヒストンタンパク質に代表されるような核タンパク質は、全てキラルな分子であることを考えると、今後ゲノムDNAの構造や機能がキラル相互作用とどのように関連しているかを明らかにしていくことは興味ある研究課題と思われる(図4、図5)。

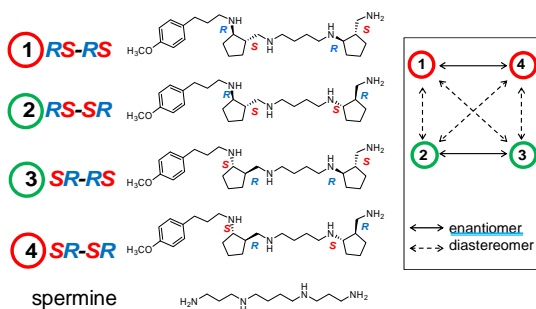


図4. 光学活性のある4個のポリアミン異性体とスペルミンの化学構造

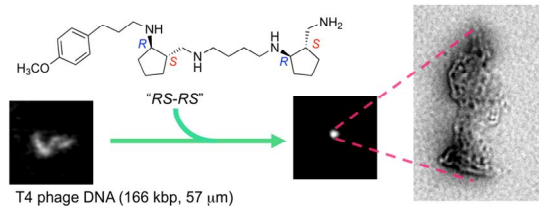


図5. キラルポリアミンによって引き起こされる DNA の高次構造変化と凝縮体の微細構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

著者名: Y. Yoshikawa, N. Umezawa, Y. Imamura, T. Kanbe, N. Kato, K. Yoshikawa, T. Imanaka, T. Higuchi, 論文表題: Effective chiral discrimination of tetravalent polyamines on the compaction of single DNA molecules, 雑誌名: Angew. Chem. Int. Ed., 査読: 有、巻: 52, 発行年: 2013, ページ: 3712-3716

DOI: 10.1002/anie.201209144

著者名: M. Uemura, Y. Yoshikawa, T. Sato, Y. Mino, K. Yoshikawa, M. Chikuma, S. Komeda, 論文題目: Second- and higher-order structural changes of DNA induced by antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with different types of 5-substituent, 雑誌名: J. Inorg. Biochem. 査読: 有、巻: 127, 発行年: 2013, ページ: 169-174

著者名: Y. Yoshikawa, Y. Suzuki, K. Yamada, W. Fukuda, K. Yoshikawa, K. Takeyasu, T. Imanaka, 論文題目: Critical behavior of megabase-size DNA toward the transition into a compact state, 雑誌名: J. Chem. Phys. 査読: 有、巻: 135, 発行年: 2011, ページ: 225101 (1-7)

DOI: 10.1063/1.3666845

著者名: Y. Yoshikawa, T. Mori, M. Suzuki, T. Imanaka, K. Yoshikawa, 論文題目: Comparative study of kinetics on DNA double-strand break induced by photo- and gamma-irradiation: Protective effect of water-soluble flavonoids, 雑誌名: Chem. Phys. Lett., 査読: 有、巻: 501, 発行年: 2010, ページ: 146-151

[学会発表](計8件)

発表者名: Yuko Yoshikawa, 発表標題: Single molecule real-time observation of DNA interacting with dinuclear platinum antitumor drugs, 学会名等:

XXIInd International Symposium on Medicinal Chemistry, 発表年月日:2012年9月3日、発表場所:Berlin (Germany)
発表者名: Yuko Yoshikawa, 発表標題: Direct observation of large-scale conformational transition in megabase-size DNA, 学会名等: 第34回日本分子生物学会年会、発表年月日: 2011年12月13日、発表場所: パシフィコ横浜 (神奈川県)
発表者名: Yuko Yoshikawa, 発表標題: Real-time observation of platinum anticancer drug-DNA interactions at the single-molecule level, 学会名等: 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes, 発表年月日: 2011年9月11日、発表場所: Strasbourg (France)
発表者名: 吉川祐子、発表標題: 光およびガンマ線によるDNA二重鎖切断の定量解析: 水溶性フラボノイドによる保護作用、学会名等: 日本放射線影響学会第53回大会、発表年月日: 2010年10月20日、発表場所: 京都テルサ (京都府)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 祐子 (YOSHIKAWA, YUKO)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号: 80291871