

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550188

研究課題名(和文)細胞内でのnon-B DNAの構造変化のダイナミクス研究

研究課題名(英文)Conformational dynamics of non-B DNA in vivo

研究代表者

Choi Jungkweon (Choi, Jungkweon)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：00574328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：Non-B DNAの代表的構造であるi-motifとG-四重鎖の構造安定性と構造変化のダイナミクスを解明し、ナノ生命工学への応用するためにi-motifとG-四重鎖中の電荷分離を研究した。その結果、i-motif四重鎖がワイヤ(電子キャリア)として有用であり、G-四重鎖のG-カルテットの優れた正孔捕獲能によって効率的に進行することを見出し、G-四重鎖のG-カルテットが、G一つや2・3つ連続したGより低い酸化電位を有するがわかった。更に、DNAの相同組換えを触媒するタンパク質RecAに注目し、ヒテロメア配列との相互作用をバルクレベル、単一分子レベルの両面から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The charge transfer in i-motif and G-quadruplex DNA, which have a tetraplex structure, has been investigated by various time-resolved spectroscopies. The result showed that i-motif and G-quadruplex DNA can act as a good electron carrier or hole captor in DNA-based electronic devices. Meanwhile, the RecA@ssDNA filament, which is formed by the interaction between RecA protein and G-rich sequence, was dissociated by the addition of K⁺ ions and the dissociated G-rich sequence was quickly folded to G-quadruplex structure. The conformation of G-quadruplex is converged to the specific G-quadruplex with one double-chain-reversal loop upon association of RecA protein. Furthermore, I found that the folding reaction of G-rich sequence (37htel) may undergo with two-state mechanism without any detectable intermediate and that the global structure is still occurring even after the formation of a secondary structure.

研究分野：Biophysics

キーワード：Non-B DNA i-motif G-quadruplex Charge transfer Folding RecA protein

1. 研究開始当初の背景

最近、希釈溶液 (in vitro) で生体分子のダイナミクスに関する研究結果をもとに、それらの細胞内で起こる構造変化と機能について類推してきたのは異なり、細胞内で直接に生体分子のダイナミクスを研究したり、細胞内とできるだけ同じような環境を構築した分子 crowding 状態での研究が活発に展開されている。細胞内は核酸、タンパク質、および様々な高分子の代謝物質が、比較的高濃度で存在し、その濃度は約 400g/l であり、これらの生体分子が占める体積は細胞全体の 20-40% 程度で、様々な分子が共存している。このような様々な分子の高濃度の共存状態を意味する分子 crowding 状態で起こる分子の構造変化やダイナミクスは、希釈溶液 (in vitro) での観測される分子の挙動とは全く異なると報告されている。しかし、生体分子の構造と安定性に対する分子 crowding 効果は解明されておらず、さらに詳細な研究が必要である。

2. 研究の目的

細胞内では核酸、蛋白質などの様々な物質が高濃度で存在し、その濃度は約 400g/l であり、それらが細胞内で占める体積は細胞全体の 20~40% 程度で、様々な分子が共存する (分子 crowding 状態)。そのため、分子 crowding 状態で起こる分子の構造変化やダイナミクスは、希釈溶液 (in vitro) で観察される分子の挙動とは全く違う。したがって、より複雑な生命現象全体を正確に究明するためには、細胞内で生体分子の構造変化やダイナミクスの研究が非常に重要である。本研究では、様々なレーザー分光システムと高い空間と時間分解能を持つ共焦点蛍光顕微鏡を利用して分子の crowding 状態 (in vitro) と細胞内 (in vivo) での non-B DNA (i-motif と Z-DNA) の構造変化のダイナミクスを研究する。

3. 研究の方法

本研究では、様々なレーザー分光法 (蛍光、円偏光二色性 (CD)、transient absorption、etc) を使用して、non-B DNA の構造変化のダイナミクスを in vitro の分子 crowding 状態での研究と高空間分解能 (数 nm~数十 nm) と時間分解能 (<50 ps) を備えた共焦点蛍光顕微鏡を用いた細胞内での研究を行う。平成 24 年度には、分子 crowding 状態で、non-B DNA の代表的構造の一つである i-motif 四重体構造の安定性と構造変化のダイナミクスを研究して得られた結果をもとに細胞内での i-motif 四重体存在の可能性と構造変化ダイナミクスを解明する。平成 25 年度 fast mixing が搭載された単一分子分光装置を使用して B-DNA から Z-DNA への構造変化を明らかにする。

4. 研究成果

Non-B DNA の代表的構造である i-motif と G-四重鎖の構造安定性と構造変化のダイナミクスを解明し、ナノ生命工学への応用す

るために i-motif と G-四重鎖中の電荷分離を研究した。その結果、テロメア配列である d(5'-(CCCTAA)₂CCC-PyUAA-CCC-AQU-3') の DNA 22-mer 一本鎖中に、ピレン(Py)とアントラキノ(AQ)をそれぞれ電子供与体(D)と電子受容体(A)として修飾し、二重らせん構造の DNA と i-motif 四重体での光誘起電子移動を観察したところ、前者では D と A 間の電子移動が起こらないが、i-motif 四重体では電子移動が速く効率的に起こった。これは、i-motif 四重鎖がワイヤ (電子キャリア) として有用であることを示す。

グアニン(G)を多く含む G-四重鎖にリボフラビンを修飾し、リボフラビンと G 塩基間の電荷分離が、平面構造を有する G-カルテットの優れた正孔捕獲能によって効率的に進行することを見出し、G-四重鎖の G-カルテットが、G一つや 2・3 つ連続した G より低い酸化電位を有するがわかった。この結果は G-四重鎖ワイヤの開発につながる。

更に、DNA の相同組換えを触媒するタンパク質 RecA に注目し、ヒトテロメア配列との相互作用をバルクレベル、単一分子レベルの両面からしらべた。RecA@G-四重鎖複合体の形成が示唆された。さらに、RecA の G-四重鎖への結合に関する FRET 効率の Job plot から、G-四重鎖 1 つに対して RecA が 2 つ結合することが示された。RecA 1 つは DNA の 3 塩基に対して結合し、DNA に巻きつくように連なることで螺旋状のフィラメントを形成することが知られている。そこで、Cy3-25htel-Cy5 に RecA を添加して RecA@単鎖 DNA 複合体を形成させた後に K⁺を加えたところ、Cy3-25htel-Cy5 は G-四重鎖を形成することが分かった。このことは K⁺存在下において、RecA@単鎖 DNA 複合体より G-四重鎖の方がより形成されやすいことを示す。また、このときの遷移濃度は ~11 mM であった。

次に、RecA@G-四重鎖の形成を単一分子レベルで確認するため、共焦点蛍光顕微鏡を用いて FRET 測定を行った (図 3)。今回用いた 25htel は K⁺存在下において G-四重鎖は 2 種類の構造 (major 体と minor 体) をとることが報告されているが⁵、FRET 効率の統計分布からもその 2 種類の構造が確認された。しかし、興味深いことに、これに RecA を添加すると FRET 効率 0.86 を示す minor 体が消え (major 体に変化)、major 体だけになった。この結果は、RecA の G-四重鎖への結合が G-四重鎖の構造変化を誘起し、major 体の G-四重鎖との複合体を形成することを示唆している。さらに、FCS 測定によって RecA@G-四重鎖の流体力学半径を求めたところ (図 4)、その大きさは G-四重鎖の 1.5 倍であり、G-四重鎖が RecA と複合体を形成することを示している。ただし、1.5 倍は質量変化に基づく理論値 (2.1 倍) よりも小さく、これは電荷分布あるいは構造の変化によると考えられる。

以上の結果より、あらかじめ RecA@単鎖

DNA を形成しておいた状態からでも K⁺によってヒテロメア配列が G-四重鎖を形成することから、K⁺存在下においては G-四重鎖構造がより有利な構造であることが示された。さらに、ヒテロメア配列における G-四重鎖は RecA 2 つと結合して複合体を形成し、その G-四重鎖は特異的に major 体構造をとることが明らかになった。

一方、ヒテロメア鎖が *in vitro* で形成する G 四重鎖の構造に関して、これまで主に 4 つの GGG 配列を含む 22~26mer のヒテロメア鎖を対象とした研究が多く行われてきたが、GGG 配列 5 つ以上のヒテロメア鎖での G 四重鎖形成とその構造についてはあまり知られていない。ヒテロメア 3' 末端では TTAGGG の繰り返しで 150 塩基以上続くため、理論的にはどの位置でも G 四重鎖を形成しうるが、実際にどの位置で優先的に形成されるかは明確でない。また、このような比較的長鎖のヒテロメア鎖が形成する G 四重鎖の構造多様性についてもほとんど知られていない。

これらを明らかにするため、我々は各種分光学的手法によって GGG 配列を 6 つ含むヒテロメア鎖の K⁺存在下での G 四重鎖形成に関する研究をおこなった。まず観測対象として蛍光標識単鎖 DNA (3'-FAM-TAGGG(TTAGGG)₅TT-TAMRA-5', 37*htel*) と、その一部の G をイノシン(I)に置換した単鎖 DNA を合成した。GGG の中心の G を I に置き換えた GIG 連続配列は G 四重鎖形成の構成要員でなくなるため、形成しうる G 四重鎖の種類を減らすことができる。これを利用してそれぞれ主に 1 つの G 四重鎖を形成するように設計した 5 種類の G-I 置換ヒテロメア配列と 37*htel* を熱力学的に解析することによって、比較的長鎖のヒテロメア鎖の K⁺存在下における構造と安定性を明らかにした。

しかし、研究目的である細胞内 (*in vivo*) での non-B DNA の構造変化のダイナミクスに対する研究はできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1) J. Choi*, S. Tojo, M. Fujitsuka, and T. Majima* 'Dynamics in the Heme Geometry of Myoglobin Induced by the One-electron Reduction' *Int. J. Radiat. Biol.* 2014, 90(6), 459-467.

2) J. Choi*, A. Tanaka, D. W. Cho, M. Fujitsuka, and T. Majima* 'Efficient Electron Transfer in i-motif DNA with a Tetraplex Structure' *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 12937-12941.

3) A. Tanaka, J. Choi*, S. K. Kim and T. Majima* 'Interaction of G-quadruplex with RecA Protein Studied in Bulk Phase and at the Single-Molecule Level' *J. Phys. Chem. B* 2013, 117, 6711-6717.

4) J. Choi and T. Majima* 'Reversible Conformational Switching of i-motif DNA

Studied by Fluorescence Spectroscopy' *Photochem. Photobiol.* 2013, 89, 513-522.

5) J. Choi, J. Park, A. Tanaka, M. J. Park, Y. J. Jang, M. Fujitsuka, S. K. Kim* and T. Majima* 'Hole trapping of G-quartets in G-quadruplex' *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 1134-1138.

6) J. Choi, M. Fujitsuka, S. Tojo and T. Majima* 'Folding Dynamics of Cytochrome c Using Pulse Radiolysis' *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 13430-13435.

〔学会発表〕(計 12 件)

1) 崔正権、藤塚守、藤乗幸子、真嶋哲朗 'シトクロム c の折り畳み過程の研究' 第 34 回日本光医学・光生物学会, 2012

2) 崔正権、藤塚守、藤乗幸子、真嶋哲朗 'シトクロム c の折り畳み過程の研究' 第 17 回日本光生物学協会年会, 2012.

3) 金水縁、崔正権、藤塚守、藤乗幸子、真嶋哲朗 'pH 変化による i-motif DNA の構造変化のダイナミクス' 第 17 回日本光生物学協会年会, 2012.

4) 崔正権、金水縁、真嶋哲朗 '単一分子レベルでのポリアデニンの自己集合に関する研究' 光化学討論会, 2012.

5) Jungkweon Choi, Tetsuro Majima 'Folding/Unfolding Dynamics of Cytochrome c.' KCS 110th National Meeting, BEXCO, Busan, Korea. 2012.

6) Jungkweon Choi, Mamoru Fujitsuka, Sachiko Tojo, and Tetsuro Majima 'Electron Transfer-triggered Folding Dynamics of Cytochrome c' 7th Asian Photochemistry Conference in Osaka, 2012.

7) Jungkweon Choi, Mamoru Fujitsuka, Sachiko Tojo, Tetsuro Majima 'Folding dynamics of cytochrome c investigated by pulse radiolysis' 産研国際シンポ The 16th SANKEN International Symposium, 2013

8) Jungkweon Choi 'Dynamics of non-B DNA: G-quadruple, i-motif and A-motif' 日本化学会, 2012.

9) 崔正権、田中敦志、藤塚守、真嶋哲朗 'G-四重鎖の G-カルテットにおける正孔捕獲' 日本化学会第 93 春季年会, 2012.

10) 崔正権、田中敦志、Man Jae Park, 藤塚守、真嶋哲朗 'G-四重鎖の G-カルテットにおける正孔捕獲' 第 35 回日本光医学・光生物学会, 2013.

11) Jungkweon Choi, Atsushi Tanaka, Mamoru Fujitsuka, Tetsuro Majima 'Charge transfer in Non-B DNA with a tetraplex structure' 産研国際シンポ The 17th SANKEN International Symposium, 2013.

12) Atsushi Tanaka, Jungkweon Choi, Tetsuro Majima 'GGG 配列を 6 つ有するヒテロメア鎖の G 四重鎖形成とその構造多様性' 第 36 回日本光医学・光生物学会, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者：崔 正権
大阪大学 産業科学研究所（特任助教）
研究者番号： 00574328