

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03840

研究課題名(和文) DNA・ヒストン・オズモライトの三元効果による遺伝子発現人工制御系の構築

研究課題名(英文) Gene regulation system by ternary chemical modifications of DNA, histone, and osmolyte

研究代表者

三好 大輔 (MIYOSHI, Daisuke)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：50388758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA、ヒストン、化学環境を決定する浸透圧調節分子の三元的な効果を定量することを目的とした。ヒストンタンパク質を模倣した合成高分子やペプチドとその化学修飾体とTMAOや尿素などの代謝産物存在下におけるDNA構造安定性を検討した。その結果、模倣高分子が、DNAの重らせん構造をB型からA型へ遷移させることや、DNAの三重らせん構造を特異的に安定化することが示された。また、TMAOがDNAの二重らせん構造を直接相互作用することも示唆された。このように、細胞核内におけるDNAの構造やその熱力学的安定性を予測するために有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In cell nucleus, DNA exists with histone proteins, which form nucleosome complex. Binding affinity between DNA and the histone proteins is one of the critical factors for epigenetic regulation of gene expression. Moreover, there are highly concentrated osmolytes inside cells, which may also affect the binding affinity of DNA with the histone proteins. Therefore, to elucidate the epigenetics, it is important to study combination effects of the epigenetic modifications on the histone proteins and on DNA, and osmolytes, on DNA structures and their thermodynamic stability. In this project, we utilized peptides and synthetic polymers to mimic the histone tails, and TMAO and urea to mimic the osmolytes. It was found that histone-mimicking polymers drastically change DNA structures and thermodynamics. Moreover, it was found for the first time that TMAO directly binds and stabilizes DNA duplex at lower concentration, whereas it destabilizes it because of dehydration from DNA structure.

研究分野：生体関連化学

キーワード：オズモライト ヒストン 分子クラウディング DNA 熱力学

1. 研究開始当初の背景

DNA の構造と熱力学的安定性は、(1)水素結合、(2)スタッキング相互作用、(3)溶媒(水和水) (4)対イオン濃縮によって決定される。タンパク質の場合は、これに種々の相互作用が加わる。(1)(2)の項目は、核酸の塩基配列によって決定される。一方、(3)(4)は、活量、誘電率、粘度等に依存する。すなわち、(1)(2)は分子がもつ官能基によって、(3)(4)は近傍の化学環境によって決定される。このように、生体分子の構造や機能は、その生体分子の官能基と生体分子近傍の化学環境の両者によって決定される。

特に遺伝子発現を制御するエピジェネティクス機構では、タンパク質と DNA の官能基が決定的な役割を果たす。エピジェネティクスの機能ユニットは、146 塩基対の DNA とヒストン八量体からなるヌクレオソームである(図 1)。ヌクレオソームでは、DNA の化学修飾とヒストンの化学修飾の組み合わせによって DNA-ヒストンの親和性が変化し、遺伝子の発現が制御される。

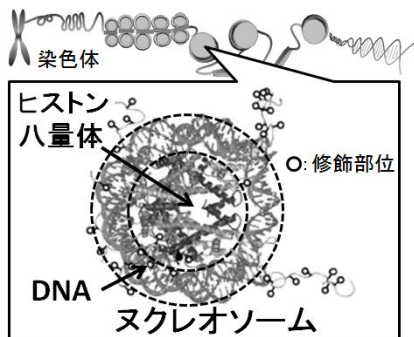


図 1. ヌクレオソームの結晶構造

一方、細胞内の分子環境は、体積の 40% が生体分子に占められる分子クラウディング状態にある(図 2 参照 Miyoshi et. al. Chem.Rev. 114, 2733 (2014)以下申請者らの文献には著者名を示さない)。細胞内で、特に高濃度に存在するのが、オズモライト(浸透圧調節分子)である。オズモライトの細胞内での総濃度は、数 mol/L にも達する。さらにオズモライトは代謝産物としても産生され、遺伝子発現の調節を介して、細胞のアポトーシスやがん化等の細胞運命決定に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。

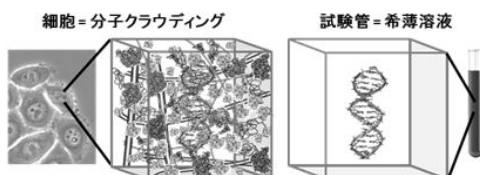


図 2. 細胞内と試験管内の化学環境

2. 研究の目的

負電荷をもつ DNA と正電荷をもつヒストンのポリイオンコンプレックスであるヌクレオソームは、ヒストンと DNA の化学修飾、ヌクレオソーム近傍の化学環境に依存して、その構造や熱力学的安定性が変化する。本研究では、ヌクレオソームの構造安定性とその変化に伴うエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の化学的理解を目的とし、DNA、ヒストン、化学環境を決定する浸透圧調節分子の三元的な効果を定量することを目的とした。具体的には、次の三点の研究の目的として定めた。

(1) ヒストンを化学的に模倣した合成高分子と DNA のポリイオンコンプレックスにおける DNA の構造と安定性の検討。

(2) ヒストンや DNA に見られるエピジェネティックな化学修飾(メチル化やアセチル化)を前述の人工高分子や DNA 鎖に導入した際の DNA の構造安定性の評価。

(3) オズモライト依存的な DNA の構造安定性や、ヒストン模倣高分子の複合効果についての解明。

3. 研究の方法

DNA とポリイオンコンプレックスを形成するヒストン模倣合成高分子として、ポリ L リシンとポリアリルアミンを用いた。ポリイオンコンプレックス形成時の水溶性を確保するために、それぞれの高分子には、デキストラン側鎖をグラフト重合で導入した。以下では、それぞれを PLL-g-Dex、及び PAA-g-Dex と記す。用いた DNA は、定法に従い固相合成したものを精製した。DNA は目的に従って様々な二次構造を形成するように設計した

測定に関しては、主に分光学的な方法を用いた。熱力学的諸量は、核酸の熱力学的安定性は、温度変性に伴う吸光度変化を測定することで、融解曲線を得て、理論式でカーブフィッティングすることで評価した。

4. 研究成果

上記の目的別に得られた成果を記す。

(1) ヒストンを化学的に模倣した合成高分子と DNA のポリイオンコンプレックスにおける DNA の構造と安定性の検討: PLL-g-Dex と PAA-g-Dex が及ぼす核酸構造安定性に対する効果を系統的に検討した。様々な GC 割合の塩基配列を有する 10 塩基対の DNA 二重らせん構造に対して、上記高分子を添加して、構造を同定したところ、GC リッチな配列は、PAA-g-Dex によって、B 型二重らせん構造から、A 型二重らせん構造へと構造が遷移することが示された(次項図 3)。さらに、負電荷の高分子を添加することで、この構造遷移を化学的に繰り返すことも可能であった。これは、細胞核内を模倣した環境では、DNA 鎖が A 型の二重らせん構造を形成する可能性を示唆するものである。本成

果は、英国王立化学会誌 Chem. Commun. 誌の表紙に掲載され、新聞紙上でも紹介されるなど、科学的・社会的インパクトの強い成果となった。これ以外にも、PAA-g-Dex が DNA の三重らせん構造を特異的に安定化すること（図 4）また、DNA と RNA 四重らせん構造における熱力学的安定性と周辺環境の相関を解明するなど、多くの成果が得られた。



図 3 . DNA の B-A 構造遷移

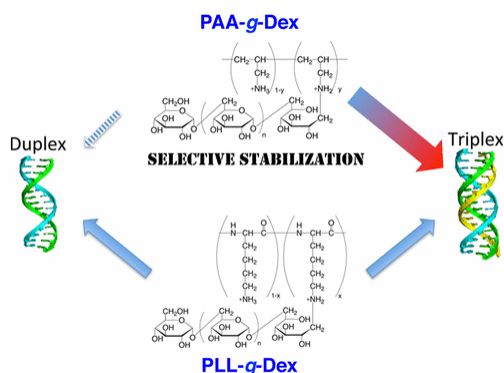


図 4 . PAA-g-Dex による三重らせん構造の安定化

(2) ヒストンや DNA に見られるエピジェネティックな化学修飾（メチル化やアセチル化）を前述の人工高分子や DNA 鎖に導入した際の DNA の構造安定性の評価：上述の PLL-g-Dex 及び PAA-g-Dex に、アセチル化、トリメチル化を施した修飾高分子を合成した。DNA の二重らせん構造の熱力学的安定性に対するこれらの修飾高分子の効果を検討したところ、エピジェネティック修飾が、高分子の DNA 二重らせん構造安定化能を抑制することが示された。エピジェネティック修飾の効果に関する初めての定量的知見として、細胞核内の DNA 構造安定性を予測するために有用な成果であると言える。

(3) オズモライト依存的な DNA の構造安定性や、ヒストン模倣高分子の複合効果についての解明：細胞質や細胞核内に高濃度に存

在するオズモライトとその参照物質として、トリメチル N オキシド (TMAO)、グリシンベタイン、グリセロール、尿素による分子クラウディング環境下における DNA 二重らせん高騰と四重らせん構造の熱力学的安定性を検討した。その結果、低濃度の TMAO は DNA 二重らせん構造と結合し構造を安定化させた。一方、高濃度の TMAO の添加が二重らせん構造の水和を阻害することで構造を不安定化することが示された（図 5）。このような非線形の効果は、オズモライト依存的な特異な効果として、細胞核内における DNA 構造安定性を検討する上でも重要な知見となる。

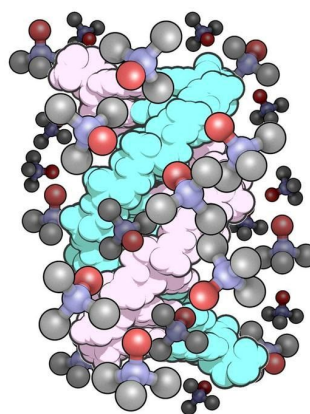


図 5 . DNA 二重らせん構造と TMAO の相互作用

上述のような、細胞内、細胞核内での核酸構造とその熱力学的安定性に関する知見をもとに、展開研究にも取り組んだ。例えば、過剰の正常細胞内に存在するたった二つの子宮がん細胞を検出することが可能となった。さらに、核酸構造安定性に関する定量的知見をもとに、核酸の四重らせん構造を細胞内環境でも特異的に識別できる化合物を同定し、それをを用いることで、がん細胞内で過剰に発現し、がん細胞の分裂や悪性化に中心的な役割を果たすタンパク質の機能を抑制することにも成功した。

以上のように、本研究課題では、当初の細胞核内の分子環境を化学模倣し、ヒストン、DNA、オズモライトの三元的な効果を定量的に解析した。さらに、その展開研究に関しても、実サンプルからの子宮がん細胞の検出や、がん細胞に対する非侵襲的治療法につながる成果を得ており、当初の目的を十分に達成したと言える。

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 11 件)

An anionic phthalocyanine decreases

NRAS expression by breaking down its RNA G-quadruplex

Keiko Kawauchi, Wataru Sugimoto, Takatoshi Yasui, Kohei Murata, Katsuhiko Itoh, Kazuki Takagi, Takaaki Tsuruoka, Kensuke Akamatsu, Hisae Tateishi-Karimata, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi

Nat. Commun. **9**, 2271 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-04771-y

Metal sensitive and DNA concentration dependent structural rearrangement of short oligonucleotide into large suprastructures, J. Shankaraswamy, Shikhar Tyagi, Anju Singh, Daisuke Miyoshi, Sarika Saxena, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, in press (2018).

細胞環境化学模倣実験系における DNA の構造とその熱力学的安定性, 三好大輔
日本核酸化学会誌(創刊号), **1**, 13-19(2017)

DNA G-Wire Formation Using an Artificial Peptide is Controlled by Protease Activity, Kenji Usui, Arisa Okada, Shungo Sakashita, Masayuki Shimooka, Takaaki Tsuruoka, Shu-ichi Nakano, Daisuke Miyoshi, Tsukasa Mashima, Masato Katahira and Yoshio Hamada
Molecules, **22**, 1991 (2017). DOI: 10.3390/molecules22111991

Selective and Robust Stabilization of Triplex DNA Structures Using Cationic Comb-type Copolymers, A. Yamayoshi, D. Miyoshi, Y. Zouzumi, Y. Matsuyama, J. Ariyoshi, N. Shimada, A. Murakami, T. Wada, A. Maruyama
J. Phys. Chem. B. **121**, 4015-4022 (2017). DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b01926

Highly Sensitive Telomerase Assay Insusceptible to Telomerase and Polymerase Chain Reaction Inhibitors for Cervical Cancer Screening Using Scraped Cells, H. Yaku, Y. Yoshida, H. Okazawa, Y. Kiyono, Y. Fujita, D. Miyoshi
Anal. Chem., **89**, 6948-6953 (2017). DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04777

Unexpected Position-Dependent Effects of Ribose G-Quartets in G-Quadruplexes, J. Zhou, S. Amrane, F. Rosu, G.F. Salgado, Y. Bian, H. Tateishi-Karimata, E. Largy, D. N. Korkut, A. Bourdoncle, D. Miyoshi, J. Zhang, H. Ju, W. Wang, N. Sugimoto, V. Gabelica, and J. Mergny
J. Am. Chem. Soc., **139**, 7768-7779 (2017). DOI: 10.1021/jacs.7b00648

Cell and Molecular Mechanics in Health and Disease, Keiko Kawauchi, Hideaki Fujita, Daisuke Miyoshi, Evelyn K. F. Yim, and Hiroaki Hirata, *BioMed Research International*, 2017, Article ID 2860241 (2017). DOI: 10.1155/2017/2860241

Effects of trimethylamine N-oxide and urea on DNA duplex and G-quadruplex, Y. Ueda, Y. Zouzumi, A. Maruyama, S. Nakano, N. Sugimoto, D. Miyoshi
Sci. Tech. Adv. Mater. **17**, 753-759 (2016). DOI: 10.1080/14686996.2016.1243000

A reversible B-A transition of DNA duplexes induced by synthetic cationic copolymers, Nonoka Yamaguchi, Yu-ki Zouzumi, Naohiko Shimada, Shuichi Nakano, Naoki Sugimoto, Atsushi Maruyama, Daisuke Miyoshi
Chem. Commun., **52**, 7446-7449 (2016). (Highlighted as the cover) DOI: 10.1039/C6CC02237E

Reevaluation of the stability of G-quadruplex structures under crowding conditions, Jun Zhou, Hisae Tateishi-Karimata, Jean-Louis Mergny, Mingpan Cheng, Zhaochi Feng, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto, Can Li
Biochimie. **121**, 204 - 208 (2016). DOI: 0.1016/j.biochi.2015.12.012.

[学会発表](計36件)

DNA and RNA G-quadruplexes: structure, function, and ligand under cell-mimicking molecular crowding conditions, Daisuke Miyoshi, International Conference on Current Trends in Materials Science and Engineering (CTMSE 2018), N. Bose National Centre for Basic Sciences, Kolkata, India, 2018/1 (招待講演)

What is the canonical structure of nucleic acids in cells? Daisuke Miyoshi Institute Seminar, National Institute of Technology, Nagaland, Nagaland, India, 2018/1 (招待講演)

DNA and RNA G-quadruplexes under molecular crowding conditions, Daisuke Miyoshi IGIB seminar, Institute of Genomics & Integrative Biology, Delhi, India, 2018/1(招待講演)

Cell nucleus-mimicking system with synthetic cationic polymers, Daisuke

Miyoshi

1st Minisymposium on Material Biology,
Tokyo Institute of Technology Suzukakedai
campus, 2017/10 (招待講演)

DNA and RNA G-quadruplexes:
Structure, Stability, Function, and Ligand
under Cell-mimicking Molecular Crowding
Conditions, Daisuke Miyoshi, Yu-ki
Zouzumi, Yoshiki Imagawa, Wataru
Sugimoto, Takatoshi Yasui, and Keiko
Kawauchi

A3 Foresight 9th Meeting, Hotel Monterey
Yokohama, 2017/9 (招待講演)

細胞夾雑模倣系の構築と細胞内活性分子
設計指針の構築, 三好大輔・杉本 直
分子夾雑の生命化学 第一回公開シンポジウ
ム, 東京大学 鉄門記念講堂, 2017/9 (招待
講演)

細胞の分子クラウディング環境における
核酸の四重らせん構造とそれを標的にした
機能性分子の開発, 三好大輔
49th Seminar, Japanese Association of
Scientists in Singapore, JST シンガポール,
2017/8 (招待講演)

核酸の高次構造を標的にする機能性分子
の医療展開, 三好大輔
神戸医療産業都市クラスター交流会, 甲南大
学, 2017/7 (招待講演)

細胞の分子クラウディング環境が制御す
る核酸の構造多様性 ナノメディシン
セミナー2017, 三好大輔
甲南大学ポートアイランドキャンパス,
2017/2 (招待講演)

核酸の高次構造を標的とした新しい機能
性分子の開発 ~医薬品、イメージング、機
能性食品~, 三好大輔
メディカル ジャパン 2017 大阪 関西広域連
合研究成果企業化促進セミナー, インテック
ス大阪, 2017/2 (招待講演)

Pseudo-cellular environmental systems
for design of functional molecules, D.
Miyoshi

10th Anniversary International
Symposium on Nanomedicine (ISNM2016),
Auditorium at National Institute of
Advanced Industrial Science and
Technology (AIST), Tsukuba, 2016/11 (招
待講演)

細胞の分子クラウディングによって誘起
される核酸の構造多様性, 三好大輔
先端ケミカルバイオロジー研究会, 京都大学
物質-細胞統合システム拠点, 2016/6 (招待

講演)

〔図書〕(計1件)

Chapter 6. Assays for Telomerase
Activity toward Applications of Cancer
Diagnosis G-Quadruplex
Structures, Formation and Role in Biology
Hidenobu Yaku, Daisuke Miyoshi
Nova Science Publishers (2016). ISBN:
978-1-63485-550-1

〔その他〕

報道関連等:2018年6月11日~14日ごろ
の朝日新聞、毎日新聞、産経新聞、日本経済
新聞、日刊工業新聞、神戸新聞、The
Japantimes、等国内外の新聞紙で研究成果が
紹介された

[https://www.asahi.com/articles/ASL6C6TH
PL6CPLBJ003.html](https://www.asahi.com/articles/ASL6C6TH
PL6CPLBJ003.html)

[https://mainichi.jp/articles/20180612/k00/0
0m/040/152000c](https://mainichi.jp/articles/20180612/k00/0
0m/040/152000c)

[https://www.sankei.com/west/news/180611/
wst1806110063-n1.html](https://www.sankei.com/west/news/180611/
wst1806110063-n1.html)

[https://www.nikkei.com/article/DGXMZO3
166076012062018CR8000/](https://www.nikkei.com/article/DGXMZO3
166076012062018CR8000/)

[https://www.nikkan.co.jp/articles/view/004
76939](https://www.nikkan.co.jp/articles/view/004
76939)

[https://www.kobe-np.co.jp/news/iryuu/2018
06/0011344595.shtml](https://www.kobe-np.co.jp/news/iryuu/2018
06/0011344595.shtml)

[https://www.japantimes.co.jp/news/2018/06
/18/national/science-health/konan-universi
ty-team-effectively-curbs-production-cance
r-linked-protein/#.WyyXkaf7QuU](https://www.japantimes.co.jp/news/2018/06
/18/national/science-health/konan-universi
ty-team-effectively-curbs-production-cance
r-linked-protein/#.WyyXkaf7QuU)

など他多数

研究成果を社会に向けて発信した
核酸の高次構造を標的にする機能性分子の
医療展開, 三好大輔
神戸医療産業都市クラスター交流会, 甲南大
学, 2017/7

研究成果を社会に向けて発信した
核酸の高次構造を標的とした新しい機能性
分子の開発 ~医薬品、イメージング、機能
性食品~, 三好大輔
メディカル ジャパン 2017 大阪 関西広域連
合研究成果企業化促進セミナー, インテック
ス大阪, 2017/2

報道関連等: Web site「BIO IMPACT」で
研究成果が紹介された
<http://bioimpact.jp/news/detail/459904>

報道関係等: 神戸新聞で研究成果が紹介さ
れた

2016年6月11日神戸新聞

[http://www.kobe-np.co.jp/news/iryuu/20160
6/0009175660.shtml](http://www.kobe-np.co.jp/news/iryuu/20160
6/0009175660.shtml)

研究成果が王立化学会 Chem. Commun.誌

の表紙として掲載された
Issue 47, 2016
Chem. Commun., 2016,52, 7411-7411
10.1039/C6CC90253G

研究代表者ホームページ
<http://www.pi.konan-u.ac.jp/miyoshi/>

研究代表者データベース
http://researchers.adm.konan-u.ac.jp/html/91_ja.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三好 大輔 (MIYOSHI, daisuke)
甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授
研究者番号：50388758

(2)研究分担者

川内 敬子 (KAWAUCHI, Keiko)
甲南大学・フロンティアサイエンス学部・講師
研究者番号：40434138