

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390038

研究課題名(和文) ゲノムDNAの高次構造制御を軸とする動的生命機能と薬物応答の解明

研究課題名(英文) Controlling the higher-order structure of genomic DNA in relation to its genetic activity

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では100kbpを超える長鎖DNAを対象とし、蛍光顕微鏡によるDNAの高次構造変化の単一分子観察法を活用して以下のような成果が得られた。

1. 直鎖型、分岐型、さらに環状構造を有するポリアミン誘導体によって引き起こされるDNAの高次構造変化を調べたところ、DNAに対する凝縮力は、ポリアミン構造に依存して顕著に異なることが明らかとなった。
2. 光励起やガンマ線及び超音波によって引き起こされるDNA二重鎖切断に対するアスコルビン酸の抑制作用を定量的に比較したところ、超音波照射による二重鎖切断は物理的せん断によるもので、アスコルビン酸のような活性酸素消去剤では抑制効果がないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Through the use of single-molecule observation with fluorescence microscopy, we studied the higher-order structural change of a giant DNA molecule. Results obtained are as follows. (1) The effects of linear, branched and cyclic polyamines on the higher-order structure of giant DNA were examined. These polyamines showed distinct activities, thus highlighting the importance of polyamine backbone structure. (2) The protective effect of ascorbic acid (AsA) against double-strand breaks in DNA was evaluated. Samples were exposed to three different irradiations: visible light, gamma-ray and ultrasound. It was found that AsA had almost no protective effect against the damage caused by ultrasound.

研究分野：生物物理化学

キーワード：長鎖DNA 単一分子観察 高次構造 二重鎖切断

1. 研究開始当初の背景

過去半世紀の生命科学研究は、一つ一つの生体分子の構造や機能に関する知見を飛躍的に増大させ、21世紀は、ヒトのDNAの全塩基配列を、個々人の免疫や体質と関連させて論じることが可能な時代となってきている。一方、iPS細胞やES細胞研究でもみられるように、同一の遺伝情報・塩基配列であっても、細胞は環境や履歴に応じて異なった形態や機能を示すことから、塩基配列の特異性のみでは、細胞分化やがん化の本質に迫ることができないことも明らかになっている。ヒトの染色体DNAは細胞中に46分子存在し、それらの全長を足し合わせると2mにもなる。一つのDNA分子の長さは数cmにもおよび、従来の生化学あるいは分子生物学的手法では、このような巨大なDNA分子を非破壊的に操作したり、その性質を解析することは不可能であった。実際、PCRやDNAチップなどの有力な実験手法も長鎖DNA分子に対しては、残念ながら無力である。申請者らはこれまでの研究で、100kbpを越えるサイズの長鎖DNAの折り畳み転移は、数千倍以上の密度変化を伴うon/off型の不連続な転移であることや、DNA凝縮構造は環境条件に応じて自己組織的に多様なナノ構造を形成することを明らかにしている。また、折り畳み転移を制御することにより、二重鎖切断反応を顕著に抑制できることなど、細胞の生命機能とDNAの高次構造が密接に関連していることも示唆されるような実験結果が得られてきている。細胞内に存在し遺伝情報を担っているゲノムDNAは、数十kbp以上の巨大分子であり、一方、kbp以下の短鎖DNA分子では、on/off型の折り畳み転移特性が失われていることを考えると、このような長鎖DNA固有の高次構造特性に関する研究には大きな意義があると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、従来の分子生物学的な実験の方法論では適用が困難であった100kbpを超える長鎖DNAを対象として、1分子レベルでのDNAの動的な高次構造変化のリアルタイム計測・操作の実験手法を発展・活用して、(1)ゲノムDNAを標的とする薬物の作用機序の解明と、(2)ゲノムDNAの高次構造と放射線損傷との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

蛍光顕微鏡による1分子DNA計測法を活用することにより、以下の3つの課題に取り組む。

- (1)100kbp以上の長鎖DNAの高次構造特性を網羅的に解析する。
- (2)ゲノムDNAを標的とする種々の抗がん剤や光学あるいは構造異性体の低分子化合物等との相互作用を通じて、DNAの高次構造への影響を調べる。その際、CD測定も併用して、

高次構造と二次構造との間の相互相関を解明することを重視する。さらに、遺伝子機能への影響を調べるために、遺伝子発現実験の検討も行う。

(3)上記(1)と(2)の課題とも連動させて、DNAの高次構造とガンマ線や重粒子線、超音波などの異なる線源によって引き起こされるDNA損傷との関係を系統的に追究する。

4. 研究成果

上記の3課題共に、着実に期待した成果が得られてきている。以下に主たる成果の概要を説明する。

(1)ゲノムDNAの高次構造相転移

大腸菌の核様体タンパク質FisとDpsによるゲノムDNAの高次構造変化を調べた。Fisは対数増殖期、Dpsは定常期に多く発現することが知られているが、本研究でもDNAの高次構造への作用の違いが認められた。本研究成果は、遺伝子発現制御に「おける核様タンパク質の役割についての新たな知見になることが期待される。

エタノール溶液中でのDNAの高次構造変化を調べたところ、エタノール濃度に依存して、コイル凝縮コイルと変化した。このような高次構造のリエントラント転移現象は、本研究での長鎖DNAを用いた実験で初めて見出された。一方、二次構造変化は、B型C型A型と変化した。二次構造変化が高次構造変化と対応していることも明らかとなった(図1)。

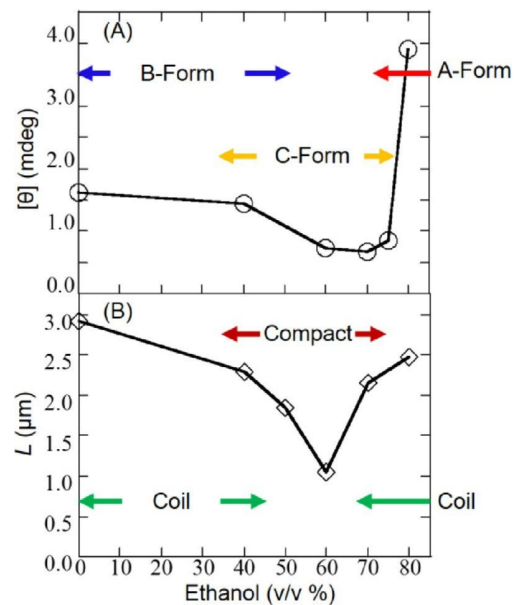


図1. エタノール濃度に依存した長鎖DNAの二次構造変化(上段グラフ)と高次構造変化(下段グラフ)

(2)ゲノムDNAを標的とする種々の抗がん剤や低分子化合物等との相互作用  
シスプラチン耐性がんにも有効な新規抗がん剤候補として開発されたプラチナ二核

錯体による DNA の二次構造及び高次構造への影響を調べ、その特性を明らかにした(図 2)。

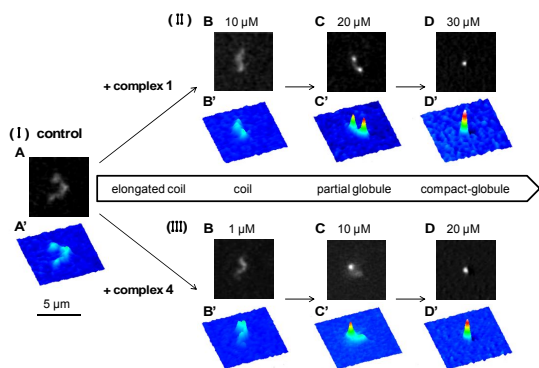


図 2. プラチナ二核錯体による DNA の高次構造への作用

直鎖型、分岐型、さらに環状構造を有するポリアミン誘導体によって引き起こされる DNA の高次構造変化を調べたところ、DNA に対する凝縮力は、ポリアミン構造に依存して顕著に異なることを明らかにした(図 3)。

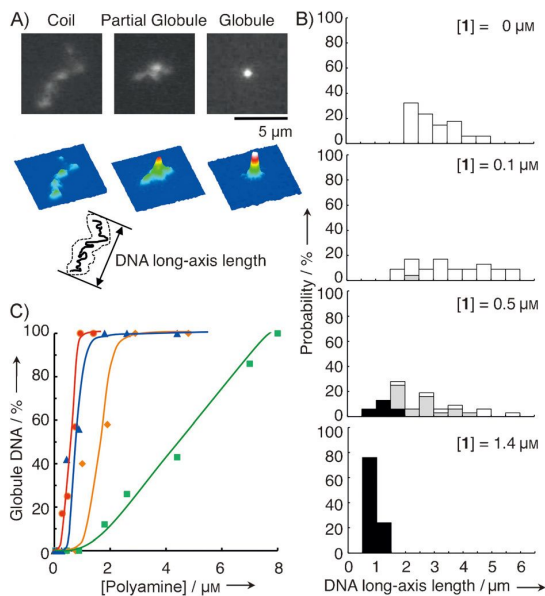


図 3. ポリアミン誘導体による DNA に対する凝縮力の比較

(3) DNA の高次構造とガンマ線や重粒子線、超音波などの異なる線源によって引き起こされる DNA 損傷との関係

クロマチンの凝縮・脱凝縮とガンマ線および重粒子線に対する感受性との関連性を調べ、凝縮することが放射線による損傷を顕著に抑制することを見出した。

超音波照射による DNA 鎖切断について、照射量と切断の程度を定量的に解析し、切断が起こらない照射量領域(閾値)の存在を確認した(図 4)。本研究結果は、超音波技術の安全性を考える上で、重要な知見と成り得る。

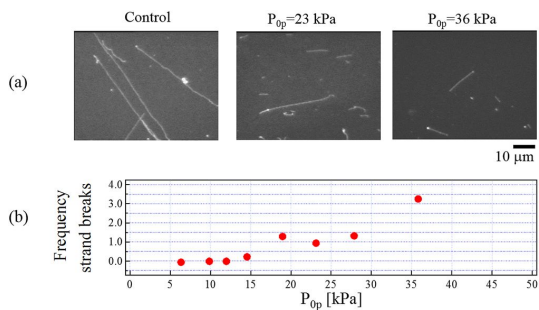


図 4. 超音波照射量に依存した DNA 二重鎖切断頻度

アスコルビン酸による DNA 二重鎖切断の保護作用を、光励起・ガンマ線・超音波で比較した結果、光励起及びガンマ線に対しては、二重鎖切断を抑制したが、超音波に対しては顕著な抑制作用は認められなかった(図 5、図 6)。本結果から、超音波によるキャビテーションが引き起こす二重鎖切断の場合は、アスコルビン酸のような活性酸素消去剤では抑制効果がないことが明らかとなった。

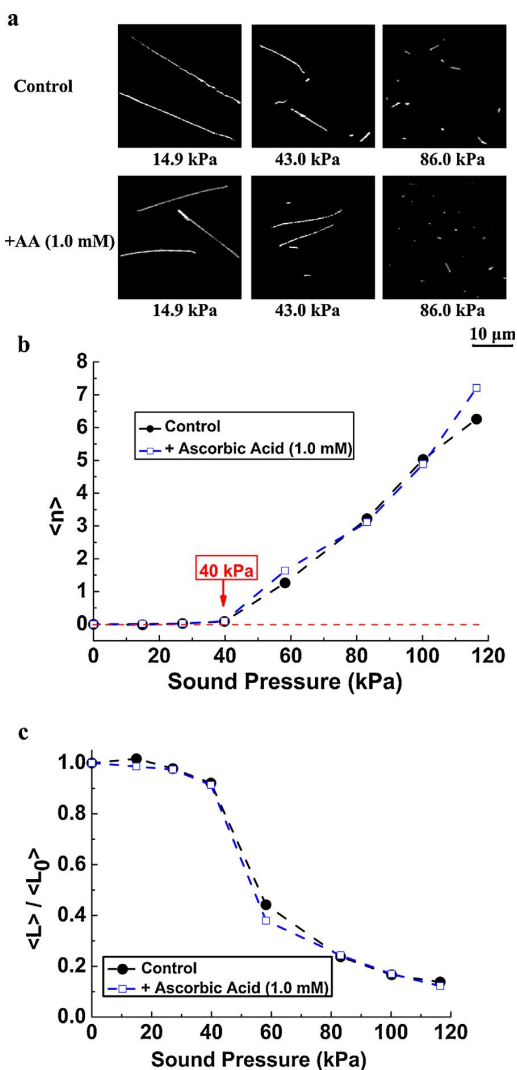


図 5. アスコルビン酸存在下における超音波照射量に依存した DNA の二重鎖切断の程度

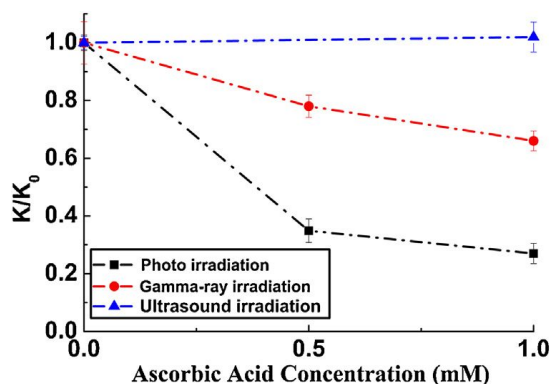


図 6 . アスコルビン酸による切断抑制効果の比較 (光励起、ガンマ線、超音波)

## 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 8 件)

Y. Oda, K. Sadakane, Y. Yoshikawa, T. Imanaka, K. Takiguchi, M. Hayashi, T. Kenmotsu, K. Yoshikawa, "Highly Concentrated Ethanol Solution Behaves as a Good Solvent for DNA as Revealed by Single-Molecule Observation" *ChemPhysChem*, 17, 2016, 471–473. (査読有)  
DOI: 10.1002/cphc.201500988

Y. Ma, N. Ogawa, Y. Yoshikawa, T. Mori, T. Imanaka, Y. Watanabe, K. Yoshikawa, "Protective Effect of Ascorbic Acid against Double-strand Breaks in Giant DNA: Marked Differences among the Damage Induced by Photo-irradiation, Gamma-rays and Ultrasound" *Chem.Phys.Lett.*, 638, 2015, 205–209. (査読有)  
doi:10.1016/j.cplett.2015.08.054

N. Umezawa, Y. Horai, Y. Imamura, M. Kawakubo, M. Nakahira, N. Kato, A. Muramatsu, Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, T. Higuchi, "Structurally Diverse Polyamines: Solid-Phase Synthesis and Interaction with DNA" *ChemBioChem*, 16, 2015, 1811–1819. (査読有)  
DOI: 10.1002/cbic.201500121

K. Okada, R. Hidese, W. Fukuda, M. Niitsu, K. Takao, Y. Horai, N. Umezawa, T. Higuchi, T. Oshima, Y. Yoshikawa, T. Imanaka, S. Fujiwara, "Identification of a novel aminopropyltransferase involved in the synthesis of branched-chain polyamines in hyperthermophiles" *J. Bacteriol.*, 196, 2014, 1866–1876. (査読有)  
DOI:10.1128/JB.01515-14

H. Takata, T. Hanafusa, T. Mori, M. Shimura, Y. Iida, K. Ishikawa, K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa, K. Maeshima, "Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage" *PLoS ONE*, 8, 2013, e75622.

(査読有)

DOI:10.1371/journal.pone.0075622

K. Yoshida, N. Ogawa, K. Yukihiro, H. Tabata, Y. Watanabe, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, "Effect of low-frequency ultrasound on double-strand breaks in giant DNA molecules" *Appl. Phys. Lett.*, 103, 2013, 063705. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4818125>

Y. T. Sato, S. Watanabe, T. Kenmotsu, M. Ichikawa, Y. Yoshikawa, J. Teramoto, T. Imanaka, A. Ishihama K. Yoshikawa "Structural change of DNA induced by nucleoid proteins: Growth phase-specific Fis and stationary phase-specific Dps" *Biophys. J.* 105, 2013, 1037–1044. (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.025>

M. Uemura, Y. Yoshikawa, T. Sato, Y. Mino, K. Yoshikawa, M. Chikuma, S. Komeda, "Second- and higher-order structural changes of DNA induced by antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with different types of 5-substituent" *J. Inorg. Biochem.* 127, 2013, 169–174. (査読有)  
doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.05.004

[学会発表] (計 3 件)

村松晃、吉川祐子、福田青郎、藤原伸介、梅澤直樹、神戸敏夫、今中忠行、吉川研一 “超好熱菌由来の分岐型ポリアミンが引き起こすゲノム DNA の特異な高次構造変化” 第 37 回分子生物学会年会、2014/11/27、横浜 (神奈川) パシフィコ横浜

Y. Yoshikawa, A. Muramatsu, S. Komeda, W. Fukuda, T. Kanbe, K. Yoshikawa, T. Imanaka "Structural changes of DNA induced by antitumor tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex with different alkyl chain lengths" 第 36 回分子生物学会年会、2013/12/5、神戸 (兵庫) 神戸ポートアイランド

Y. Yoshikawa, N. Umezawa, Y. Imamura, T. Kabe, N. Kato, K. Yoshikawa, T. Imanaka, T. Higuchi "Chiral preference of tetravalent polyamines in DNA compaction" The International Conference on Medical Physics, 2013/9/1-9/4, Brighton, UK

[その他]

ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/skbiot/imanaka/HPindex.html>

## 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