

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17888

研究課題名(和文)新規修飾核酸による核酸四重鎖形成の制御と遺伝子発現の化学的制御技術の開発

研究課題名(英文)Artificial quadruplex formation by novel modified nucleic acids for chemical regulation of gene expression

研究代表者

藤井 大雅(FUJII, Taiga)

甲南大学・先端生命工学研究所・助教

研究者番号：40735338

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)：近年、四重鎖構造による遺伝子発現過程の制御の報告が相次ぎ、種々の疾患発症と核酸構造の関連が議論され始めている。本研究では、任意の遺伝子特異的に分子間四重鎖を形成させる修飾核酸を開発し、それを用いた遺伝子発現の人為的制御を試みた。グアニン四重鎖では、開発した修飾核酸により配列設計で四重鎖のトポロジーと安定性が制御でき、標的配列の特異的な四重鎖形成とその遺伝子発現制御能が確認できた。一方、シトシン四重鎖では、ループ間の相互作用が熱安定性に重要なことを明らかにできたが、合成した修飾塩基の安定化効果が小さく、標的的特異的な四重鎖形成による遺伝子発現制御については改善が必要ながわかった。

研究成果の概要(英文)：Recently, regulation of gene expression by quadruplex formation of DNAs and RNAs had been reported, and relationship between the kinds of disease initiation and nucleic acid structures is beginning to be discussed. In this project, novel modified oligo nucleotides which recognize target genes specifically by formation of intermolecular quadruplex were developed in order to regulate gene expression artificially. In the case of G-quadruplexes, developed modified oligo nucleotides enabled to control topologies and stability of the quadruplexes by their sequence design, and their controlling ability of gene expression by target specific formation of quadruplex was confirmed. In the case of quadruplex of cytosines, we clarified the importance of interactions between loop bases for their thermodynamic stabilities. Although synthesized modified bases stabilized the quadruplex structures, the stabilization effect was not sufficient to control gene expression by the quadruplex formation.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：四重鎖 イオン 修飾核酸 遺伝子発現制御 分子間構造形成 熱力学的安定性 酸解離定数 水素結合 金属

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の担い手である DNA や RNA などの核酸分子は、標準的な構造である二重らせん構造(標準構造)を形成し、その構造は遺伝情報を正確に保持・伝達するのに重要である。一方、その情報を使い機能を果たす上では、標準構造よりも三重らせん構造や四重らせん構造、分岐構造などの非標準的な構造(非標準構造)のほうが重要であることが、近年示されている。例えば、細胞内の環境を模倣した「分子クラウディング環境」下では、標準構造である二重らせんは不安定化する一方、非標準構造は全て安定化されることがこれまで見出されてきた(N. Sugimoto et al., Chem. Rev., 2014, 114, 2733)。実際に、細胞内でもこのような非標準構造が形成されることが報告されている(M. L. Bochman et al., Nat. Rev. Genet., 2012, 13, 770; S. Balasubramanian et al., Nat. Rev. Drug Discov., 2011, 10, 261)。このように細胞内では、標準構造だけでなく非標準構造が多く形成されており、様々な機能を果たしていると考えられる。この様々な機能を有する非標準構造の中で四重鎖は遺伝子発現反応過程を制御する重要な機能を持っていることが明らかにされつつある。例えば、鋳型 DNA 鎖で四重鎖が形成されると転写の伸長反応の減速及び停滞が起こること、mRNA 上で四重らせん構造が形成されると翻訳の伸長反応の停滞が起こり、翻訳されるタンパク質の分解に影響することなどが報告されている(H. Tateishi-Karimata et al., PLoS ONE, 2014, 9, e90580; T. Endoh et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2013, 52, 5522; T. Endoh et al., Nucleic Acids Res., 2013, 41, 6222)。このように、生体内では遺伝子内で形成される四重鎖構造によってその遺伝子発現が調節されている。

この遺伝子発現制御に重要な構造である四重鎖には、グアニン(G)で構成される四重鎖(G四重鎖)とシトシン(C)で構成される四重鎖(C四重鎖)の2種類の構造がある。このどちらの構造も遺伝子内で主に形成される分子内の四重鎖だけでなく、分子間でも四重鎖を形成することが可能である。そのため、生体内で形成される四重鎖が遺伝子発現を制御するように、外部から加えた核酸(外部鎖)と異種分子間四重鎖(ヘテロ四重鎖)を形成させれば、遺伝子発現の人為的な制御が可能となる。しかしながら、天然のDNAやRNAを外部鎖としてヘテロ四重鎖での遺伝子発現制御に用いた場合、外部鎖同士の間種分子間四重鎖(ホモ四重鎖)も安定であるため、標的遺伝子と外部鎖によるヘテロ四重鎖の量が減り、クリアカットな制御が困難であった。そこで、もしこのヘテロ四重鎖を安定化しつつ、外部鎖間のホモ四重鎖を不安定化させれば、遺伝子発現のクリアカットな制御が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、新規修飾核酸により四重鎖形成を制御することで遺伝子発現の化学的制御技術の構築を目指した。

(1) 2種類の四重鎖それぞれに対してヘテロ四重鎖を特異的に形成させる新規修飾核酸(Hetero Intermolecular Quadruplex Inducer: HIQI)を創製する。

(2) 開発したHIQIを活用することで人為的に遺伝子発現を制御する。以上の課題を段階的に遂行することで、人為的な遺伝子発現の制御技術の実現を目指した。

3. 研究の方法

本研究は、下記の二つの段階を経て研究を遂行した。

(1) 分子間特異的に四重鎖を安定化可能な手法のシーズを開発した。

合理的な設計に基づいた新規修飾核酸を創製し、HIQIに必要な機能を満たすか分子内四重鎖で評価した。また、HIQIに含まれる天然塩基の部位での安定化効果についても検討した。

(2) (1)で開発した修飾核酸が分子間四重鎖を安定化させるHIQIとして機能するか検討し、遺伝子発現反応が制御可能か確かめた。

合成した修飾核酸を有するHIQIが標的核酸とのヘテロ四重鎖を安定化させ、HIQI同士のホモ四重鎖を不安定化させるか評価した。その際、ホモ及びヘテロ四重鎖の特性を物理化学的に解析することで評価した。また、HIQIによる2種類それぞれの四重鎖を利用した遺伝子発現反応の制御能と、得られた物理化学的データとを比較することで、遺伝子発現反応に四重鎖が与える影響を解析した。

4. 研究成果

2種類の四重鎖に対して「3.」で示した二つの段階で研究を進めたため、下記の(1)~(4)に分けて研究成果を記載する。

(1) [分子内G四重鎖内で機能する修飾核酸の開発]

まずG四重鎖内で機能し且つヘテロ四重鎖を安定化可能な修飾塩基の開発を行った。具体的には、図1に示すキサントシン(X)と8-オキソグアノシン(O)を塩基対としてG四重鎖に組み込むため、設計・合成し、その機能を評価した。これらの塩基対は、4つのGで形成されるカルテット(Gカルテット)内での相対的な位置により、安定なカルテットを形成できる場合とそうでない場合がある。その効果により分子内G四重鎖のトポロジーの制御が期待できる。また本研究では、それを用いたG四重鎖の特定のトポロジーにおける溶液環境の効果についても検証した。

配列には、溶液条件によりそのトポロジーがバスケット型(アンチパラレル)、ハイブリット型、パラレル型と変化するヒトテロメ

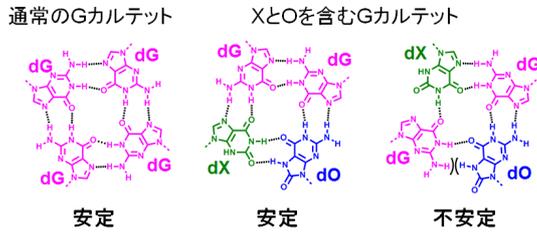


図1 キサントシンと8-オキソグアニンを含むGカルテットの水素結合パターン

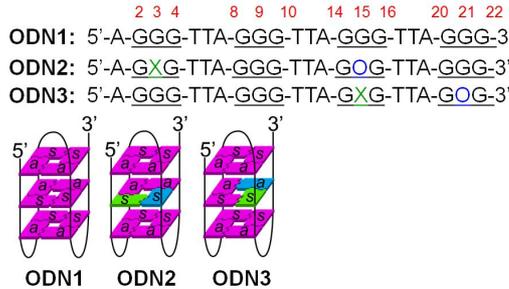


図2 使用した分子内G四重鎖を形成するDNA配列

ア配列の一部 (ODN1) を使用した。ODN2 は、カルテット内に導入したXとOにより、そのトポロジがバスケット型のみ安定になるように設計し、ODN3 ではいずれのトポロジでも安定になるように設計した (図2)。

まず各配列の各種溶液条件下 (分子クラウディング剤の有無での NaCl あるいは KCl 含有溶液の4条件) でのトポロジを調べるため、CD (円二色性偏向) スペクトル及び NMR スペクトル、変性ゲル電気泳動実験を行った。その結果、報告されている通り天然配列である ODN1 は、NaCl を含む2条件下でバスケット型、KCl 希薄溶液中でハイブリット型及びバスケット型の混合物、KCl を含むクラウディング条件下で全てのトポロジの混合物であることが確認された。同様にトポロジを制限しない ODN3 でも ODN1 と同じ挙動を示した。一方、ODN2 ではいずれの条件下でも、バスケット型しか形成していないことが確認できた。ゆえに、XとOを配列の適切な位置に導入することでG四重鎖のトポロジを制御できることが明らかとなった。

表1 各種溶液条件下でのG四重鎖の融解温度¹⁾

配列	T_m [°C]			
	(1)	(2)	(3)	(4)
	NaCl	NaCl with 20 wt% PEG200	KCl	KCl with 20 wt% PEG200
ODN1	57.3±1.0	62.2±0.0	67.1±0.0	74.8±1.0
ODN2	56.7±0.2	58.4±0.3	51.3±0.2	51.8±0.2
ODN3	48.5±0.3	57.6±0.7	59.5±1.4	66.8±1.7

1) pH7.0 バッファ (20wt%ポリエチレングリコール 200を含む) あるいは含まない 10 mM Na₂HPO₄ と 1 mM Na₂EDTA、あるいは 10 mM K₂HPO₄ と 1 mM K₂EDTA 含有溶液) を使用。DNAの濃度は異なる3条件 (5, 20, and 40 μM) で行った。

次に、溶液環境の効果を調べるために、各

種溶液条件下で融解温度測定を行った (表1)。ODN1 と ODN3 の結果を比較すると、その溶液条件下でも ODN3 のほうが値はわずかに小さく、少しだけ不安定であった。ODN2 では同じトポロジを持つ NaCl 含有溶液の条件下でその安定性はあまり変わらなかった。つまり、XとOの導入は、その導入位置によりG四重鎖をわずかに不安定化させるか変化させないことが分かった。一方、ODN2 を用いて同じトポロジでの異なる溶液条件下での四重鎖の安定性を比較した。その結果、バスケット型ではNa⁺のほうがK⁺よりも安定化し、クラウディング剤の効果はNa⁺を含む条件のほうが強いことが分かった。これまでK⁺のほうが一般的にG四重鎖の安定化作用が強いとされていたが、バスケット型では異なることがトポロジを制御できる本研究より明らかにできた。また、クラウディング剤の効果についてもイオンへの水和水の数が多いNa⁺のほうが大きいことを実証できた。

以上のより、XとOは配列によりそのトポロジを制御できることが分かった。この性質を分子間G四重鎖に利用すれば、ホモG四重鎖を不安定化しつつ、標的特異的なヘテロG四重鎖形成の達成が期待できる。

(2) [修飾核酸を含む分子間G四重鎖の転写反応制御]

(1) で開発した修飾塩基XとOを用いて分子間G四重鎖に適応可能であることを調べ、遺伝子発現の一つである転写反応が制御できるか確かめた。

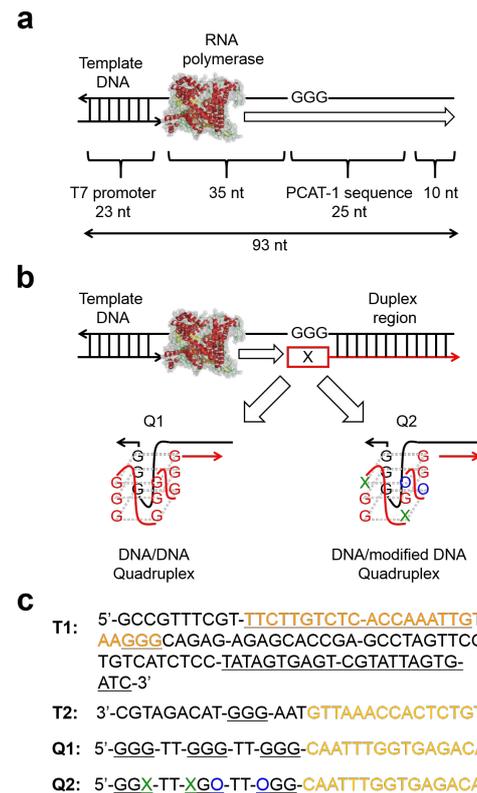


図3 ターゲット鑄型配列上で分子間G四重鎖を形成する様子と用いたDNA配列

HIQ1 は、ターゲットを認識する部位と四重鎖を形成する部位から構成されるように設計した(図3)。ターゲット配列には三つの連続したGを含み、それを認識する部位はGGGを除くすぐ隣の部位と二重鎖を形成するように設計した。また前立腺ガンに関わる non-coding RNA をコードした遺伝子 PCAT1 (prostate cancer associated transcript 1) をターゲットとした。

まず短い配列のターゲット T2 を用いて Q1 及び Q2 が設計通り安定な二重鎖/四重鎖複合体を形成するか CD スペクトルでの融解温度測定で確認した。G 四重鎖形成での T_m を示す 285 nm での値を算出したところ、KCl を含む転写用バッファ中(40 mM Tris-HCl (pH 8.0) と 8 mM MgCl₂, 2 mM スペルミジン、100 mM KCl を含む)で、天然配列の Q1 で 56.4 °C、X と 0 を含む Q2 で 56.6 °C となった。以上より、X と 0 の導入は四重鎖部位の安定性に影響がないことが分かった。

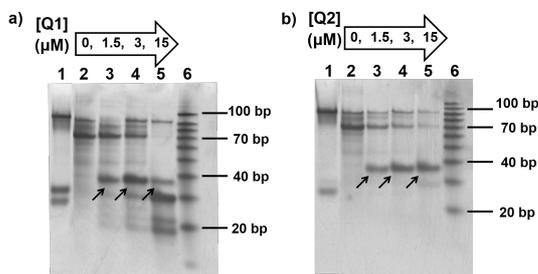


図4 T7 ポリメラーゼを用いた転写反応の結果: Q1 及び Q2 が鑄型配列上で形成する二重鎖/四重鎖複合体による転写反応の影響(転写反応時間は2時間行い、反応バッファは上記本中で記載した KCl 含有バッファを使用。電気泳動は7M尿素を含む10%ポリアクリルアミドゲルを使用)

次に、転写用のターゲット配列 T1 を用いて Q1 及び Q2 の有無による転写反応への効果を調べた。図4のポリアクリルアミド電気泳動の結果から、Q1 及び Q2 とともに 35mer の短い転写産物が得られていることから、転写反応を抑制できていることがわかる。興味深いことに、Q2 は濃度が増加するほど制御能が良くなるのに対し、Q1 は 15 μM の時点で短い転写産物が減少していることがわかる。このことから、X よ 0 を含む Q2 では、自分自身で形成されるホモ G 四重鎖形成が抑えられた結果、濃度依存的に転写反応の抑制効果が上昇したが、天然の Q1 ではホモ G 四重鎖形成が濃度依存的に促進されたため、転写反応の抑制効果が下がったことが示唆される。

以上の結果より、G 四重鎖の系では X と 0 を用いて適切に配列設計することで、転写反応のクリアカットな制御可能であることが示された。

(3) [C 四重鎖のループ塩基の安定化効果の解明]

C 四重鎖は、C-C⁺塩基対同士がインターカレートすることで形成される四重鎖であり、酸性条件下(pH4.5-6.0)で安定に形成される。

近年、弱酸性から中性条件下(pH6.5-7.2)でも C 四重鎖形成が報告されており、細胞内でのその役割について注目されている。このように細胞内の液性条件に近い弱酸性領域で形成される C 四重鎖の安定化の要因を検討することは重要である。本研究では C 四重鎖のループ間で形成される塩基対に着目し、その弱酸性条件下での熱安定性を定量解析した。用いた DNA は分子内で C 四重鎖を形成する配列(5' -C₃NTTNC₃T₃C₃NTTNC₃-3')を基本とし、5' 側から一番目と三番目のループ間で塩基対形成するように配列設計し(図5)、それらの UV 融解曲線を追跡した。

その結果、ループ領域でアデニン-グアニン(A-G)を組み合わせた DNA よりも G-G を組み合わせた DNA のほうが四重鎖は大きく安定化した(表2)。これは G 同士が C 四重鎖ループ内で Hoogsteen 塩基対を形成したため

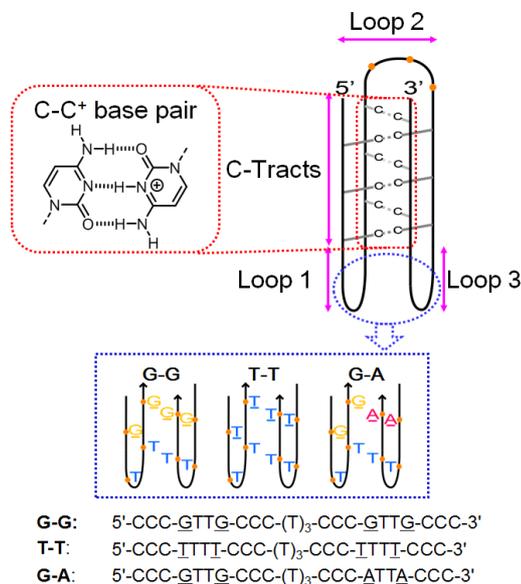


図5 使用した C 四重鎖を形成する DNA の配列とその設計

あると考えられる。さらに、既に塩基対形成が報告されているチミン同士(T-T)の場合と比較して、G-G の場合は同定との安定化効果があることが分かった(表2)。

表2 pH6.5 における C 四重鎖の融解温度と熱力学的パラメータ¹⁾

配列	$-ΔG_{25}^{°}$ ²⁾ [kcal mol ⁻¹]	$-ΔΔG_{25}^{°}$ ²⁾³⁾ [kcal mol ⁻¹]	T_m [°C]	$ΔT_m$ [°] [°C]
G-G	1.51±0.28	1.83	31.3±1.2	+7.8
T-T	1.56±0.38	1.88	30.7±1.2	+7.2
G-A	-0.32±0.17	0	23.5±0.8	0

1) pH6.5 リン酸バッファ(10 mM Na₂HPO₄ と 0.1 mM Na₂EDTA 含有)を使用。DNA の濃度は異なる3条件(1, 5, and 50 μM)で行った。

2) $-ΔG_{25}^{°}$ の計算は 298 K (25 °C)で行った。

3) $-ΔΔG_{25}^{°}$ と $ΔT_m$ は G-A の値の相対値を使用。

これらの結果から、ループ領域での塩基対形成による C 四重鎖構造の安定化を定量的に解析することができた。また、この知見は分

子間 C 四重鎖を利用した HIQI を設計する上で重要な指針を与えるものである。

(4) [修飾 C による C 四重鎖の安定化]

C 四重鎖は部分電荷を持つ C-C⁺塩基対形成をコアとした構造であり、系中の約 50%の C がプロトン化する弱酸性付近 (pH 4.5-6.0) でないと構造が安定でない。そこで本研究では、電子供与基を C に導入することで、C の pKa をあげ、C 四重鎖の安定化を目指した。具体的には、C の 5 位に電子供与基であるメトキシ基を導入することで、C 四重鎖の安定化を試みた。

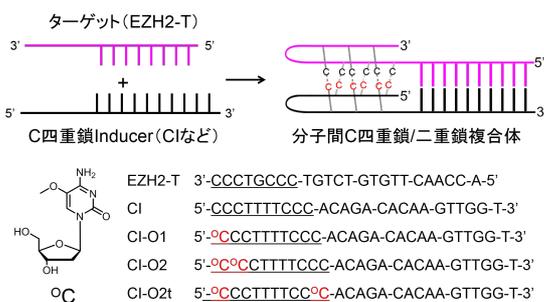


図 6 ターゲットと分子間 C 四重鎖を形成する様子と用いた DNA 配列

合成した修飾塩基及び DNA 配列を図 6 に示す。ターゲットには、過剰発現が様々なガンに関連するヒストンメチル化酵素をコードする EZH2 の配列を用いた。また C 四重鎖を誘起する配列 (CI) と CI の C 四重鎖形成部位にメトキシシトシン (^oC) を含む配列 (CI-O1, CI-O2, CI-O2t) を合成した。これらを用いて、CI とターゲット EZH2-T で形成される四重鎖及び二重鎖の安定性を融解温度測定で評価した。表 3 に示すように、^oC を含まない CI では、四重鎖部位の T_m は pH7.0 で 18.9 °C と低いですが、^oC を含む配列ではいずれも安定化していることが分かる。特に、CI-O2t では、 T_m が +2.5 °C 安定化した。これは電子供与基である ^oC の効果であると示唆される。一方で、二重鎖部位の T_m はいずれも 55 °C 程度と四重鎖部位よりも大幅に安定であった。つまり、電子供与基の効果で四重鎖は安定化したもののその効果は小さく、転写反応を抑制できるほど高くはなかった。

表 3 pH7.0 における分子間 C 四重鎖と二重鎖の融解温度¹⁾

Name	T_m (°C) at 295 nm (C 四重鎖)	T_m (°C) at 260 nm (二重鎖)
EZH2-T + CI	18.9	55.1
EZH2-T + CI-O1	20.1	53.8
EZH2-T + CI-O2	19.5	56.8
EZH2-T + CI-O2t	21.4	56.9

1) pH7.0 リン酸バッファ (10 mM Na₂HPO₄ と 1 mM Na₂EDTA 含有) を使用。DNA の濃度は 1.5 μM で行った。

以上より、合成した ^oC のみでは C 四重鎖の十分な安定化は難しいことが分かった。別の

効果を用いた C 四重鎖の安定化が今後の課題である。

以上より、本研究課題において、G 四重鎖では修飾塩基による分子間 G 四重鎖の標的的特異的な転写反応制御が達成された。一方、C 四重鎖では、ループ塩基の安定化効果を明らかに出来たものの、C 四重鎖を十分に安定化する修飾塩基の開発に課題が残った。

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 2 件)

1. T. Fujii, P. Podbevšek, J. Plavec, N. Sugimoto
“Effects of metal ions cosolutes on G-quadruplex topology”
J. Inorg. Biochem. 166, 190-198 (2017).
査読あり
2. T. Fujii, N. Sugimoto
“Loop nucleotides impact the stability of intrastrand i-motif structures at neutral pH”
Phys. Chem. Chem. Phys., 17, 16719-16722 (2015).
査読あり

[学会発表](計 3 件)

1. T. Fujii, P. Podbevšek, J. Plavec, N. Sugimoto, N.
“Regulation mechanism of G-quadruplex topologies by metal ions and molecular crowding”
The 66th Japan Society of Coordination Chemistry Symposium, Fukuoka University, Fukuoka, September 10th, 2016
2. T. Fujii, N. Sugimoto
“Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (27) : Effect of solution environment on G-quadruplexes elucidated by novel methodology to control their topologies”
日本化学会第 9 6 回春季年会、204-29、同志社大学 (京都府京田辺市)、2016 年 3 月 25 日
3. T. Fujii, N. Sugimoto
“Topology control of G-quadruplexes by substitution of modified bases for guanines”
The 42th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2015), Egret Himeji, Himeji, September 23rd, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 大雅 (FUJII, Taiga)

甲南大学・先端生命工学研究所・助教

研究者番号：40735338