

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20570108

研究課題名(和文) ラジカル反応により誘起されるテロメア DNA の構造変化

研究課題名(英文) Structural change of telomere DNA induced by radical reaction

研究代表者

金折 賢二 (KANAORI KENJI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：30273543

研究成果の概要(和文)：

真核生物の染色体末端に存在するテロメアは、グアニン塩基に富む反復配列をもつテロメア DNA とこれに結合するタンパク質から構成される。このテロメア部位をストップフロー ESR および NMR を使用して研究し、スーパーオキシドアニオンラジカルや一重項酸素を発生させて、テロメア配列の損傷を検証した。さらに、平行して、亜硝酸によるテロメア DNA の損傷についても研究を行ない、タンパク質との架橋反応についても研究した。

研究成果の概要(英文)：

Telomere that exists in eukaryote's chromosome terminus is composed of telomeric DNA with the repetitive sequence to which the guanine base is abundant and of telomere binding proteins. The damage of the telomere sequence was verified by researching this telomeric site by using stopped-flow-ESR and NMR and generating superoxide anion radical and singlet oxygen. In addition, telomere DNA damage with the nitrous acid was concurrently studied, and the cross-linking reaction with the protein was also examined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：生物科学 ・ 構造生物化学

キーワード：ラジカル、核酸、損傷、NMR、ESR

## 1. 研究開始当初の背景

テロメアは真核生物の染色体末端に存在し、G塩基に富む反復配列をもつテロメア DNA とこれに結合するタンパク質から構成される。通常の体細胞などでは、テロメア DNA が細胞分裂の度に短くなり、限界まで短縮すると細胞が分裂を停止し、細胞老化を迎えることから、テロメア DNA の長さは寿命や老化との関連が強く示唆されている。ま

た、テロメア部位を伸長する酵素テロメラーゼは、体細胞にはほとんど存在しないが、無限に細胞分裂するガン細胞には多く存在することから、テロメア部位は細胞死や細胞のガン化とも密接に関係していると考えられている。テロメア部位の連続したGを含む DNA 配列は、3' 末端に張出し領域と呼ばれる一本鎖の領域がある。この張出し領域の配列を持つ DNA オリゴマーは特異なG四重鎖

構造（Gカルテット，図1）を形成することが90年代に報告された。もし、張出し領域が四重鎖構造を形成するならば、テロメアーゼのテロメア DNA 伸長活性は阻害されると考えられている。このテロメア DNA 構造をほどくことのできるタンパク質がいくつか報告され、これらのタンパク質は、四重鎖構造をほどくことでテロメアーゼ活性を誘導することが示唆された。これらの結果は、テロメア DNA が損傷を受けて四重鎖構造を形成できなくなると、テロメアーゼ活性が誘発される可能性を示唆しており、国内外の多くのグループが精力的に研究している。

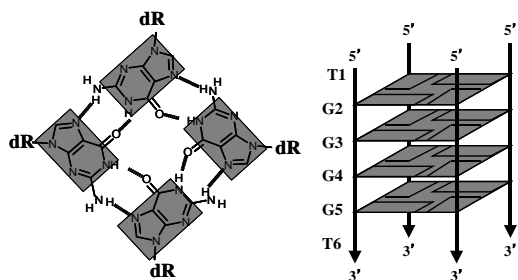


図1 Gカルテット平面と平行G四重鎖

## 2. 研究の目的

活性酸素ラジカルとテロメアは、ともに「老化」というキーワードで強く結びついている。テロメア張出し領域の一本鎖部分の塩基は、塩基対を形成していないため、核酸塩基が活性酸素ラジカルなどの攻撃を受けやすい部位と考えられる。我々は、テロメア DNA の構造を構造化学的、熱力学的に理解することを目標とし、活性酸素ラジカル等によるテロメア構造の損傷反応について研究をした。可視光照射によりスーパーオキサイドアニオンラジカル ( $\cdot O_2^-$ ) や一重項酸素 ( $^1O_2$ ) を発生させて、テロメア配列の損傷とその損傷による構造変化を検証することが目的である。また、亜硝酸によるグアニン塩基の損傷についても研究することで、テロメア DNA 損傷についてトータルに理解することを目指した。

## 3. 研究の方法

テロメアDNAオリゴマーを合成し、また、核酸をラジカル化するための安定ラジカルとして、様々な反応性を持つニトロン系試薬やフレミー塩などの無機ラジカル試薬を合成した。また、これらのラジカル試薬と核酸オリゴマーとの反応解析については、ストップフロー装置（日本電子社製）を新たに購入し、ESR分光測定機器に装着した（図2）。

核酸をラジカル化するためのラジカルとして、生体系で重要な意味を持つスーパーオキサイドラジカルの発生系を構築した。スーパーオキサイドラジカルは、従来からの酵素による発生系ではなく、リボフラビンに可視

光を照射して発生させた。それらを用いて核酸オリゴマーをはじめとする生体関連物質との反応解析を行った。安定ラジカルとの反応を様々な条件下（塩濃度、温度、pH）で観測し、その条件において、定量的かつ最適反応条件下で損傷反応をNMRでリアルタイムで観測した。ラジカル損傷テロメア DNA オリゴマーは、三次元 HPLC で分取して、質量分析（MS）、NMRなどで損傷部位の個数や配列位置を同定した。を用いて、円二色性分光法や NMR を用いてそれらの損傷オリゴマーと四重鎖形成能の変化、四重鎖と一本鎖の構造転移を評価した。

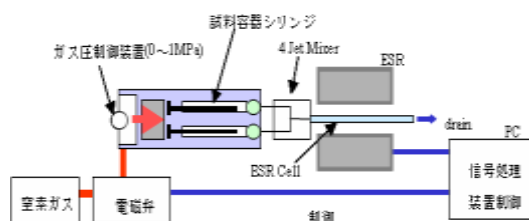


図2 ストップフロー装置の概略

ESR本体は、日本電子社製 JEOL-RE X-バンド（9.5 GHz）電子スピン共鳴装置

## 4. 研究成果

(1) DNA オリゴマーのラジカル化反応について解析する前段階として、ラジカルの発生系とストップフロー装置の改良を行なった。新規のラジカル発生系のシステムとして、可視照射光により、 $\cdot O_2^-$  と  $^1O_2$  をそれぞれ選択的に発生させるシステムを開発した。それらを HPLC に連結することにも成功した。また、ストップフローについても、少容量かつ、デッドタイムを短くする改良をおこなった。これらのシステムを評価するために、様々な生体関連物質の反応を解析し、十分なラジカルに対しての感度があることが判明した。

ESR および光吸収を使用して研究を開始して、従来からの  $\cdot OH$  や  $\cdot O_2^-$  を用いて、核酸の他にも、さまざまな芳香族化合物に対しての二次反応速度を決定した。

(2) テロメア配列のラジカル損傷の解析と亜硝酸によるテロメア DNA の損傷について平行して研究を行なった。フロー法やストップフロー測定法を用いるため、大量の DNA を合成して精製した。これらのテロメア DNA の構造である Gカルテットは、結合するアルカリ金属イオンの違いにより構造変化が生じ、ラジカル反応が変化する可能性があるため、様々なアルカリ金属イオンについて、その損傷状況を NMR で測定した。

核酸をラジカル化するためのラジカルとして、生体系で重要な意味を持つ  $\cdot O_2^-$  に加えて、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) についても研究をお

こなった。<sup>1</sup>O<sub>2</sub>はリボフラビンに可視光を照射して発生させた。それらを用いて核酸オリゴマーをとの反応解析を行った。ストップフロー法もしくはフロー法を用いるためオリゴマー量としてはかなり必要であったため、*Oxytrica*と*human*テロメア配列を対象とした核酸オリゴマーを合成した。上記のストップフローESRの結果から安定ラジカルと核酸オリゴマーの最適反応条件を取得した後、ラジカルとDNAオリゴマーを反応させて、NMRを用いて損傷部位の個数や配列位置をいくつか同定した。予想されたよりも、損傷部位の構造特異性は低かった。 $\cdot\text{O}_2^-$ に加えて、一重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) と核酸とのラジカル反応による生成物解析を試みた結果についても学会で報告した。

また、グアニンと反応してキサントシンやオギザノシンを与える亜硝酸と、G四重鎖との反応についても、NMRを用いて研究を進めた。G四重鎖の指標であるHoogsteen型水素結合に関与しているG塩基のイミノプロトンシグナルを1次元NMRで観測し、同時に、オギザノシンを導入したDNAオリゴマーについてその構造を解析した。かなり複雑なスペクトルとなったため、キサントシンのモデルとしてイノシンを導入したオリゴマーを多種類準備し、これらのNMRスペクトルを測定解析した。2次元NMRを用いて損傷DNAが構造解析し、構造転移の詳細や安定性の変化の由来を原子レベルで解明した。G四重鎖構造のNMRデータが蓄積されたので、分子モデリングソフトと分子動力学計算を用いてテロメアのG塩基の損傷とG四重鎖の不安定化についても研究をおこなった。四重鎖の状態で外側の塩基が損傷を受けて、キサントシンへと変化することが示唆された。また、二重鎖中での損傷についても、NMRと分子動力学計算を組み合わせる明らかにしつつある。現在、最終的な生成物については、三次元液体クロマトグラフィーにより分取した後、質量分析やNMRにより同定中である。ESRの結果と併せてテロメアDNAのラジカル反応の構造特異性が明らかになりつつある。

(3) テロメアDNAの損傷とタンパク質の架橋体をおもに研究した。テロメアはDNAとタンパク質の複合体であることから、タンパク質側鎖と損傷核酸の反応を研究することは生理学的にも重要である。まずアミノ酸残基による特異性を検討していくために、アミノ酸や短鎖ペプチドと損傷塩基との反応について検討した。テロメアDNAのグアニン塩基が酸化して生じるオギザニン塩基を用いて研究を進めた。アミノ酸であるシステインとの生成

物をHPLC、MS、NMRで分析してその反応生成物を確認した。その結果、システインのチオール基との反応性が高くさらに転移反応が確認できたので、チオールとオギザニン塩基との反応をさらに研究するために、チオール基やジスルフィド基をもつタンパク質へと対象を広げた。1つは、髪の毛のタンパク質である線状タンパク質である $\alpha$ ケラチンであり、もう1つはその立体構造がよくわかっていて、反応性の高いチオールをただ1つ持つヘモグロビンである。 $\alpha$ ケラチンについては、まずジスルフィドアニオンラジカル ( $-\text{S}-\text{S}^{\cdot-}$ ) およびトリスルフィド中性ラジカルの生成とその消失機構およびチールラジカル ( $-\text{S}^{\cdot}$ ) の生成と反応性の基礎的データを取得した。ヘモグロビンについても研究を進めて、チオール基と損傷核酸との反応について研究し、T構造とR構造での架橋反応の違いを調べた。また、光励起と遷移金属イオンを含むペプチドを組み合わせた反応についても研究を行い報告した。

(4) この研究は、将来的には、テロメアが関与すると考えられている老化やガン化のメカニズムの解明につながる知見を与えると考えている。テロメア DNA 鎖の研究に関しては、我々は四重鎖の構造解析のみならず、その構造多形性を熱力学見地から詳細に研究報告してきており、レビュー誌でも紹介されている。DNA は RNA と違って生体内でほとんど二重鎖を形成しているため、末端で一本鎖になっているテロメア部位はラジカル反応や酸化反応の格好のターゲットであり、損傷を構造化学的に研究する意義は大きい。テロメアには特異的に結合するタンパク質の集合体があり、このテロメア DNA-タンパク質複合体は遺伝子の複製において重要な役割を果たしている。これらの結合タンパク質は、テロメア DNA の張出し領域とも緊密な相互作用をしており、ラジカル反応などによりDNA 損傷が生じると、テロメアへの関与するテロメア伸長反応などに大きな影響が生じると考えられる。しかし、ラジカル反応により選択的に同じ箇所に損傷塩基を持つオリゴマーを準備することや、損傷核酸-タンパク質架橋体を準備することが非常に難しいので損傷プロセスの構造解析などの研究はほとんどなされていなかった。今後も、我々は、定量的なラジカル反応システムの開発し、テロメアのラジカル損傷とその影響について明確にしていく。

#### 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)

- ① T. Omata, K. Takahashi, S. Hashimoto, Y. Maeda, K. Nose, S. Otsuka-Yao-Matsuo, K. Kanaori, UV luminescent organic-capped ZnO quantum dots synthesized by alkoxide hydrolysis with dilute water, *J. Colloid. Interface Sci.* (査読有) 355 (2011) 274-281.
- ② N. Yanagi, M. Niwa, Y. Sakurai, A. Nakajima, K. Kanaori, K. Tajima, ESR spectrum attributed to trisulfide Neutral Radical [RSS(R)S.R] of protein observed for  $\alpha$ -keratin present in white human hair, *Chem. Lett.* (査読有) 39 (2010) 756-757.
- ③ N. Yanagi, M. Niwa, Y. Sakurai, A. Nakajima, K. Kanaori, K. Tajima, ESR study of disulfide neutral radical of  $\alpha$ -keratin present in dried white human hair exposed to near-UV radiation, *Chem. Lett.* (査読有) 39 (2010) 340-341.
- ④ D. Shiga, D. Nakane, T. Inomata, Y. Funahashi, H. Masuda, A. Kikuchi, M. Oda, M. Noda, S. Uchiyama, K. Fukui, K. Kanaori, K. Tajima, Y. Takano, H. Nakamura, T. Tanaka, Creation of a type 1 blue copper site within a de novo coiled-coil protein scaffold, *J. Am. Chem. Soc.* (査読有) 132 (2010) 18191-18198.
- ⑤ S. Yamazaki, H. Abe, T. Tanimura, Y. Yamasaki, K. Kanaori, K. Tajima, Effect of thermal treatment on the photocatalytic degradation of ethylene, trichloroethylene, *Res. Chem. Intermed.* (査読有) 35 (2009) 91-101.
- ⑥ R.-K. Watanabe, C. Morimoto, S. Sakamoto, A. Nakajima, K. Kanaori, K. Tajima, Development of a HPLC-ESR spin-trapping system for post-column on-line detection of superoxide radical scavenging ability of column eluates, *Chem. Lett.* (査読有) 39 (2009) 340-341.
- ⑦ Y. Sakurai, H. Sanuki, R.K.-. Watanabe, T. Ideguchi, N. Yanagi, K. Kawai, K. Kanaori, K. Tajima, Kinetic investigation of reaction of ascorbate and hydroxyl radical adduct of DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-Oxide) studied by stopped-flow ESR, *Chem. Lett.* (査読有) 37 (2008) 1270-1271.
- ⑧ R.-K. Watanabe, Y. Sakurai, C. Morimoto, S. Sakamoto, K. Kanaori, K. Tajima, Quantitative spin-trapping ESR investigation on reaction of hydroxyl radical and selected scavengers by a newly developed flow-injection ESR System, *Chem. Lett.* (査読有) 37 (2008) 612-613.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 金折賢二、能勢健史、テロメア四重鎖におけるグアニン塩基の損傷反応、日本化学会第 91 春季年会、2011.03.27、神奈川大学
- ② 金折賢二、小池洋平、オキザノシン塩基とシステインとの反応、日本化学会第 91 春季年会、2011.03.27、神奈川大学

- ③ 田嶋邦彦、金折賢二、Applications of Flow-ESR Technique for Mechanistic Study of Biological Radical Reaction、7th Asia-Pacific EPR/ESR Symposium (招待講演)、2010.10.13、大韓民国、済州島国際コンベンションセンター
- ④ 櫻井康博、金折賢二、田嶋邦彦、HPLC-ESR 法によるフェノール誘導体およびコーヒーの無機ニトロキシドラジカル (NDS, nitrosodisulfonate) 消去活性のオンライン評価、第 57 回日本食品科学工学会、2010.09.03、東京農業大学
- ⑤ 金折賢二、田尻祐介、T quaternary state of oxy haemoglobin in the presence of heterotropic effectors、日本生物物理学会、2010.09.20、東北大学
- ⑥ 櫻井康博、金折賢二、田嶋邦彦、Flow-injection spin-trapping-ESR 法によるスーパーオキシドラジカルとフェノール性抗酸化物質の二次反応速度定数の解析、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010.06.24、神奈川県民ホール
- ⑦ 櫻井康博、金折賢二、田嶋邦彦、Flow-Injection ESR によるスーパーオキシドラジカルと生体関連分子の 2 次反応速度定数の評価、日本化学会第 90 春期年会、2010 年 3 月 26 日、近畿大
- ⑧ 柳直樹、金折賢二、田嶋邦彦、ジスルフィドラジカルを経由する  $\alpha$ -ケラチン-SS 結合の光酸化反応機構の ESR 研究、日本化学会第 89 春期年会、2009 年 3 月 30 日、船橋日大
- ⑨ 金折賢二、梅木慎吾、テロメア四重鎖におけるグアニン塩基の脱アミノ化反応、日本化学会第 89 春期年会、2009 年 3 月 29 日 船橋日大
- ⑩ 金折賢二、森本寛久、オキザニン：チミン塩基対を含む DNA 二重鎖の構造、日本化学会第 89 春期年会、2009 年 3 月 29 日、船橋日大
- ⑪ 櫻井康博、金折賢二、田嶋邦彦、Flow-Injection ESR によるヒドロキシルラジカルとアミノ酸の 2 次反応速度の評価と構造活性相関、日本化学会第 89 春期年会、2009 年 3 月 27 日、船橋日大
- ⑫ 佐貫穂高、金折賢二、田嶋邦彦、ストップフロー ESR 法によるフラボノイド由来セミキノラジカルの生成消失機構解析、日本化学会第 89 春期年会、2009 年 3 月 27 日、船橋日大

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金折賢二 (KANAORI KENJI)  
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・  
 准教授  
 研究者番号：30273543

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

田嶋 邦彦 (TAJIMA KUNIHICO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・

教授

研究者番号 : 50163457