

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750179

研究課題名(和文)非コードデオキシリボ核酸とリボ核酸の高次構造に関する定量的研究

研究課題名(英文)Quantitative analysis of high-order structures of non-coding DNA and non-coding RNA sequences

研究代表者

三好 大輔(Daisuke Miyoshi)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：50388758

研究成果の概要(和文):

遺伝情報を保持していない RNA (非コードリボ核酸) は、高次構造を形成して機能を発現する。これと同様に、遺伝情報をコードしていない DNA (非コードデオキシリボ核酸) の高次構造も、遺伝子の発現制御などに関与している可能性がある。そこで本研究では、非コードデオキシリボ核酸の高次構造とその熱力学的安定性を定量的に検討した。その結果、代表的な非コードデオキシリボ核酸である、グアニンに富んだ DNA 鎖の形成する高次構造は、細胞内環境因子によって劇的に変化するのに対し、同様の配列をもつ RNA 鎖の構造は、細胞内環境因子によらず単様で高い熱安定性をもつことが示された。

研究成果の概要(英文):

As shown in the on-coding RNAs such as ribozymes and riboswitches, DNA sequences, involving telomeric DNA and untranslated regions which do not possess genetic information, should have regulatory roles in gene expression. Here we investigated structure and thermodynamics of such non-coding DNAs under molecular crowding conditions. It was found that the guanine-rich RNA sequences, derived from telomere sequences, were only able to fold into a parallel-stranded G-quadruplex, and this folding was almost independent of sequence and surrounding factors. In contrast, corresponding DNAs formed various G-quadruplexes depending on the sequence and surrounding factors. These results suggest importance of non-canonical structures of the non-coding DNA sequences which may participate various biological processes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学、non-coding RNA、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

約半世紀前に、DNAの二重らせん構造の解明と、遺伝情報の流れを示すセントラルドグマが提案された。以来、「核酸 = 情報を担う分子、タンパク質 = 機能を担う分子」という概念が確立した。しかし近年では、遺伝情報をコードしていないRNA配列 **non-coding RNA (非コードリボ核酸)** から、リボザイム、RNAi、リボスイッチなどの機能性RNAが相次いで発見されている。このような non-coding RNAの機能とその発現機構においては、その高次構造が重要な役割を担う。

RNAの高次構造が注目されているのに対して、DNAは配列(一次構造)のみが注目されてきた。例えば、ゲノムプロジェクトやポストゲノムプロジェクトの多くは、DNAの配列と種々の疾患や生体反応との相関を解明するものである。これらは、DNA鎖が常に相補鎖と共に標準構造(二重らせん構造)を形成するという概念に基づいた研究方法である。しかし、DNAにおいても、二重らせん以外の高次構造の重要性も明らかになりつつある。特に、遺伝子をコードしていない **非コードデオキシリボ核酸** (本研究では、**non-coding DNA**とよぶ)には、比較的短い塩基配列のユニットが繰り返された配列が多い。そのような non-coding DNAの代表が染色体末端に存在するテロメアDNAである。ヒトのテロメアDNAでは、グアニンに富んだ配列である $(GGGTTA)_n$ とその相補鎖である $(TAACCC)_n$ (n は繰り返し回数)が繰り返されている。テロメアDNAの構造は細胞のがん化や加齢に関与することから、多くの研究がなされている。研究者は、細胞を模倣した環境下(分子が非常に高濃度に存在する分子クラウディング状態)において、テロメアDNAの構造を検討した。その結果、分子クラウディング状態における核酸の高次構造が、試験管内環境である希薄溶液中と全く異なることを見いだした。さらに、その熱力学的安定性を検討したところ、二重らせん構造は分子クラウディングで不安定化するのに対し、四重らせん構造が安定化することが示された。実際に、相補的なテロメアDNA鎖は、希薄溶液中で二重らせん構造を形成するが、分子クラウディング条件下ではそれが解離して四重らせん構造を形成することも見出した。このような研究から、DNAは情報保持のために強固な二重らせん構造を形成すると考えられてきたが、分子クラウディングの効果を詳細に検討することで、周辺環境に依存して非常に多様な構造が形成される可能性が示され

た。

2. 研究の目的

以上のように、non-coding DNAが形成する四重らせん構造などの高次構造も、non-coding RNAと同様に、遺伝子の発現や様々な生体反応に関与している可能性がある。そこで本研究では、non-coding DNAの高次構造とその熱力学的安定性を定量的に検討する。さらに、得られた結果を non-coding RNAの物性と比較した。

具体的には、以下の二点について注目して研究を進めた。

- (1) 様々な配列の non-coding DNAの形成する四重らせん構造、三重らせん構造、平行型二重らせん構造、ジャンクション構造とその熱力学的安定性を解明する。
- (2) 高次構造を形成する non-coding DNAに関して、対応する non-coding RNAの高次構造と熱力学的安定性を詳細に検討し、non-coding DNAの物性と比較する。

3. 研究の方法

Non-coding DNA配列の特徴として、プリン・ピリミジンの偏在、繰り返し配列の頻出、連続配列の頻出、などがある。そこで、プリン・ピリミジン配列が形成する三重らせん構造、平行型二重らせん構造、グアニンに富んだ鎖の四重らせん構造、シトシンに富んだ鎖の二重らせん構造、回文配列をもつジャンクション構造などを、分子クラウディング環境下で検討した。さらに、がん細胞や炎症細胞で pHが低下するように、pH、一価金属イオン、二価金属イオンなどの細胞内環境因子が、多様な疾患発症で重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。そこで、分子クラウディングと pHや金属イオン細胞内環境因子を組み合わせることで、細胞の状態や細胞周期に依存してダイナミックに変化する細胞内環境を化学的に模倣した条件下での DNAの高次構造と熱力学的安定性を解明することを試みた。

DNA及びRNAの構造決定には、円二色性分光光度測定、未変性ゲル電気泳動測定などを用いた。DNA及びRNAの熱力学的安定性の算出には、可視紫外吸光光度測定や浸透圧測定を用いた。

4. 研究成果

Non-coding DNAが形成するジャンクション構造に及ぼす細胞内環境因子の影響

まず最初に細胞内環境因子の重要性を確認するために、細胞の中に近い分子クラウディング環境を試験管内で再現し、そのような化学的溶液環境下でnon-coding DNAの構造の熱力学的安定性を調べることを試みた。具体的には、二重らせん構造などの二次構造を連結するジャンクション（枝分かれ：図1）を形成するDNAを設計し、その構造と熱力学的安定性に及ぼす分子クラウディングの効果を検討した。同時に、核酸の高次構造を形成するために必要であることが知られている Mg^{2+} の効果も検討した。

その結果、DNAの標準的な構造である二重らせん構造が、試験管内の希薄溶液状態よりも大幅に不安定になることがわかった。これとは逆に、二重らせん構造を連結することでDNAの複雑な構造を作り出すジャンクション構造が大きく安定化することが示された。すなわち、細胞内ではDNAの高次構造が安定化されることが示唆された。そこでさらに、 Mg^{2+} とDNAの高次構造の関係を検討した。 Mg^{2+} が存在しない条件でジャンクション構造がされず二本のDNA鎖が結合した状態になってしまうのに対し、分子クラウディング状態ではDNA鎖がジャンクション構造を形成することが明らかになった。すなわち、分子クラウディングが核酸の高次構造を作り出す手助け役（シャペロン）として働いていることが世界で初めて明らかになった。これによって、試験管内で核酸の高次構造を安定化し、より詳細な研究が進められるようになった。また、細胞内で安定化されるジャンクション構造は医薬品の標的としても非常に有用であると期待される。

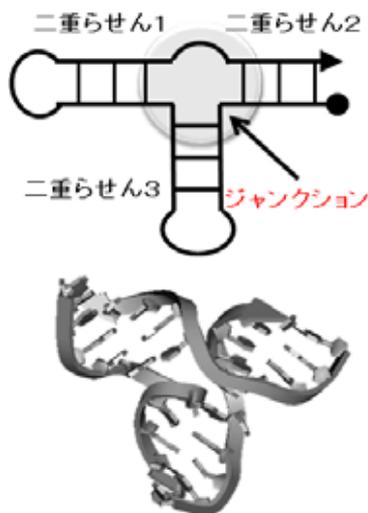


図1 DNAのジャンクション

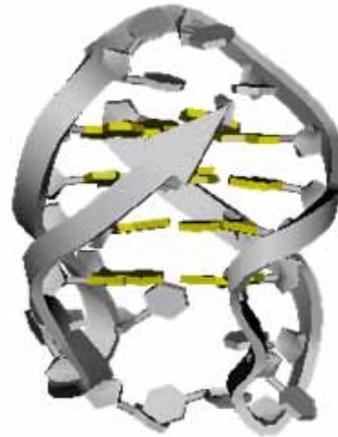


図2 グアニンに富んだ核酸鎖が形成する四重らせん構造

グアニンに富んだ non-coding DNA と non-coding RNAが形成する構造に及ぼす分子クラウディング効果

近年、ゲノム中のみならず、多くの coding RNA や non-coding RNA において、グアニンに富んだ塩基配列が存在することが明らかになった。これらの RNA 鎖は、グアニンに富んだ DNA 鎖のように四重らせん構造（図2）を形成すると考えられている。しかし、四重らせんの構造やその熱力学的安定性は、DNA を中心に検討が進められており、RNA 四重らせん構造の物性はほとんど明らかでない。そこで本研究では、テロメア配列およびアポトーシス関連遺伝子上流に存在するグアニンに富んだ RNA 鎖と DNA 鎖の構造とその熱力学的安定性を系統的に比較した。

その結果、DNA 鎖は、塩基配列と周辺環境に依存して、逆平行型・平行型・ミックスタイプ四重らせん構造など、極めて多様な構造を形成することが示された。一方、RNA 鎖は、塩基配列や周辺環境に依存せず、単様な平行型四重らせん構造を形成することが示された（図3）。さらに、グアニンに富んだ RNA 鎖が形成する平行型四重らせん構造と同配列をもつ DNA 鎖の四重らせん構造の熱力学的安定性を比較した。その結果、全ての検討条件において、RNA 四重らせん構造は DNA 四重らせん構造よりも安定性が高いことが示された。すなわち、RNA 四重らせん構造は、単様で熱力学的安定性が高い。一方、DNA 四重らせん構造は、多様で熱力学的安定性が比較的低いことが示唆された。

また、テロメア領域以外のゲノム DNA には、常に相補鎖が存在する。一方、RNA は一本鎖であり、相補鎖が存在しない。そのため、グアニンに富んだ塩基配列をもつ DNA 鎖と RNA 鎖を比較した場合、RNA 鎖のほう

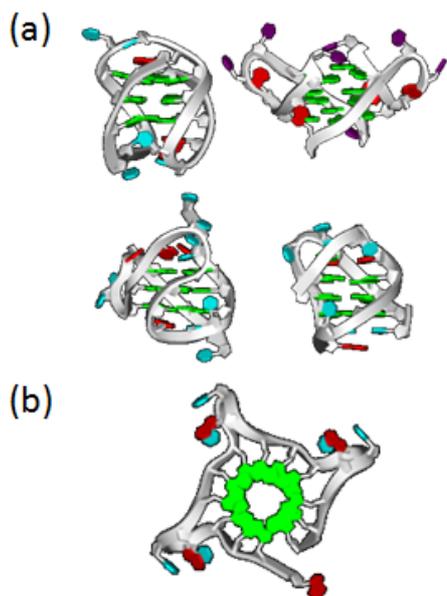


図3 non-coding DNA が形成する多様な構造 (a)と non-coding RNA が形成する単一な構造 (b)

が四重らせん構造を形成できる可能性が高いと考えられている。しかし RNA では、分子内での塩基対形成や分子間での多量体形成の可能性がある。そこで本研究では、グアニンが特に高い頻度で出現することが知られているがん関連遺伝子の上流部分 (5'-UTR) の塩基配列を解析した。その結果、がん関連遺伝子 5'-UTR には、グアニンのみならずシトシンが高頻度に観測されることが示された。グアニンと共にシトシンが頻出するため、分子内・分子間で二重らせん構造が形成される可能性がある。この二重らせん構造は、グアニンに富んだ領域が形成する四重らせん構造と競合する可能性がある。そこで、がん関連遺伝子 5'-UTR で見出されたグアニン・シトシンに富んだ配列をもつ RNA 鎖と DNA 鎖の構造を検討した。その結果、DNA は周辺環境に依存して、二重らせん構造や四重らせん構造などの多様な構造を形成した。これに対して、RNA 鎖は、周辺環境に依存せず、二重らせん構造を形成した。これらの結果より、RNA 鎖の構造単形性と DNA 鎖の構造多様性が示された。

これらの成果に加えて、non-coding DNA が形成する四重らせん構造を特異的に認識できる低分子化合物の開発や、細胞核内を模倣した環境下で、non-coding DNA が形成する非標準構造が安定化することを見出した。

以上のような結果から、研究の目的 (1) 様々な配列の non-coding DNA の形成する構

造とその熱力学的安定性を解明する、(2)高次構造を形成する non-coding DNA に関して、対応する non-coding RNA の高次構造と熱力学的安定性を詳細に検討し、non-coding DNA の物性と比較する を十分に達成できたと言える。

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 14 件)

1. S. Pramanik, K. Nakamura, K. Usui, S. Nakano, S. Saxena, J. Matsui, D. Miyoshi, N. Sugimoto, Thermodynamic Stability of Hoogsteen and Watson-Crick Base Pairs in the Presence of Histone H3-Mimicking Peptide, *Chem. Commun.*, 47, 2011, 2790-2792. 査読有

2. X. Wang, C. Wang, K. Qu, Y. Song, J. Ren, D. Miyoshi, N. Sugimoto, X. Qu, Ultrasensitive and Selective Detection of a Prognostic Indicator in Early-Stage Cancer Using Graphene Oxide and Carbon Nanotubes, *Adv. Funct. Mat.*, 20, 2010, 3967-3971. 査読有

3. K. Dutta, T. Fujimoto, M. Inoue, D. Miyoshi, N. Sugimoto, Development of new functional nanostructures consisting of both DNA duplex and quadruplex, *Chem. Commun.*, 46, 2010, 7772-7774. 査読有

4. S. Saxena, D. Miyoshi, N. Sugimoto, Sole and stable RNA duplexes of G-rich sequences located in the 5'-untranslated region of protooncogenes, *Biochemistry*, 49, 2010, 4554-4563. 査読有

5. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto, Anionic Phthalocyanines Targeting G-quadruplexes and Inhibiting Telomerase Activity in the Presence of Excessive DNA Duplexes, *Chem. Commun.*, 46, 2010, 5740-5742. 査読有

6. S. Muhuri, K. Mimura, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, Stabilization of Three-Way Junctions of DNA under Molecular Crowding Conditions, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 2009, 9268-9280. 査読有

[学会発表](計 32 件)

1. 三好 大輔, 細胞内環境因子に応答する核酸デバイスの開発, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 29 日, 神奈川大学.

2. 三村 健太, 三好 大輔, 中野 修一, 杉本 直己, 生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(19) RNAスリーウェイジャンクションの構造と熱力学的安定性に及ぼすランチポイント近傍の塩基対の影響, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26 日, 神奈川大学.

3. D. Miyoshi, D. Zhang, T. Fujimoto, S. Saxena, H. Yu, and N. Sugimoto, Monomorphic structure of G-rich RNA sequences and polymorphic structure of G-rich DNA sequences responding to cellular environmental factors, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010 年 12 月 17 日, Hawaii, USA.

4. K. Dutta, T. Fujimoto, M. Inoue, D. Miyoshi, N. Sugimoto, A New Functional Nanostructure Containing Both DNA Duplex and G-Quadruplex, International Symposium on Advances in Nanomaterials (ANM 2010), 2010 年 12 月 5 日, Kolkata, India.

5. 三村 健太, 三好 大輔, 中野 修一, 杉本 直己, ジャンクションポイント近傍の塩基対が制御するRNAスリーウェイジャンクションの形成, 第 20 回アンチセンスシンポジウム, 2010 年 12 月 3 日, 神戸.

6. T. Fujimoto, D. Miyoshi, S. Nakano, N. Sugimoto, Unpaired region affecting hydration state of duplexes, The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, 2010 年 11 月 11 日, Yokohama.

7. 三好 大輔, 外部刺激に応答するDNAの構造多様性を利用した機能性素子の開発, 第 3 回ChemBioハイブリッドレクチャー, 2010 年 11 月 6 日, 東京大学.

8. 三村 健太, 三好 大輔, 中野 修一, 杉本 直己, RNAスリーウェイジャンクション構造における配列の重要性, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 2010 年 9 月 25 日, 大阪大学.

9. D. Miyoshi, K. Nakamura, H. Karimata, T. Ohmichi, N. Sugimoto, Characters of Watson-Crick and Hoogsteen Base Pairs

Inducing Structural Polymorphism under Molecular Crowding Conditions, Gordon Research Conference (Biopolymers) 2010 年 6 月 1 日, Newport, RI, USA.

10. サクセナ サリカ・三好 大輔・杉本 直己, Effect of molecular environments on the behaviors of biomolecules (9) Duplex formation of G-rich RNA sequences found in the 5'-untranslated region of protooncogenes, 日本化学会第 90 回春期年会, 2010 年 3 月 28 日, 大阪.

11. 三村 健太・サンジュクタ ムフリ・三好 大輔・杉本 直己, 生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(8) RNAスリーウェイジャンクション構造に及ぼす分子クラウディングの影響, 日本化学会第 90 回春期年会, 2010 年 3 月 26 日, 大阪.

12. D. Miyoshi, Structural polymorphism of DNA induced by cellular environmental factor, International workshop on "DNA manipulation with cosolutes", 2010 年 1 月 13 日, Kerala, India.

13. D. Miyoshi, S. Muhuri, K. Mimura, and N. Sugimoto, DNA Junction Structure Stabilized by Molecular Crowding Conditions, 第 6 回国際核酸化学シンポジウム (第 36 回核酸化学シンポジウム), 2009 年 10 月 1 日, 岐阜.

14. 三村 健太, サンジュクタ ムフリ, 三好 大輔, 杉本 直己, 分子クラウディング環境におけるDNAスリーウェイジャンクション構造の熱力学的安定性, 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009 年 9 月 14 日, 福岡.

15. D. Miyoshi, K. Nakamura, H. Tateishi-Karimata, T. Ohmichi, and N. Sugimoto, Stability of Watson-Crick and Hoogsteen base pairs of DNA under molecular crowding conditions, 42nd IUPAC Congress, 2009 年 8 月 5 日, Glasgow, UK.

17. 三好大輔, Hai-Quing Yu, 杉本直己, 共存溶質によるテロメラーゼ活性の制御, 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会, 2009 年 5 月 18 日, 神戸.

{ 図書 } (計 3 件)

1. D. Miyoshi, N. Sugimoto, Springer Chapter 7: G-quartet, G-quadruplex, and G-wire Regulated by Chemical Stimuli in

DNA, *Nanotechnology (Methods in Molecular Biology series)*, eds. G. Zuccheri and B. Samorì, 2011, in press. 査読無

研究者番号：

2. 杉本直己、三好大輔, エヌ・ティー・エス **超分子サイエンス&テクノロジー** (機能性核酸のテーラーメイド設計), 2009, 921-929. 査読無

3. 三好大輔, 杉本直己, シーエムシー出版 **核酸医薬の最前線** (セントラルドグマに学ぶセントラルドグマの制御方法), 2009, 1-13. 査読無

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.pi.konan-u.ac.jp/miyoshi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好大輔 (甲南大学フロンティアサイエンス学部)

研究者番号：50388758

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()