

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410185

研究課題名(和文)トリフェニルメタン誘導体を用いたグアニン四重鎖形成の光制御

研究課題名(英文)G-quadruplex formation controlled by irradiation of triphenylmethane derivatives

研究代表者

宇田 亮子 (Uda, Ryoko)

奈良工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：90321463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、光照射により核酸のグアニン四重鎖の形成を促進させることである。光に応答して反応するマラカイトグリーンコポリマーを開発し、ヒトテロメアにみられるd(TTAGGG)₄の配列をもつオリゴヌクレオチドとの相互作用を調べた。光照射によってマラカイトグリーンコポリマーはオリゴヌクレオチドに結合し、1本鎖のコンフォメーションをアンチパラレル型のグアニン四重鎖へ促すことが分かった。さらに、マラカイトグリーンのグアニン四重鎖への結合は選択的であることや、グアニン四重鎖はマラカイトグリーンが結合することで安定化することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Photoresponsive malachite green copolymer has been designed to induce the formation of G-quadruplex by light. The interaction of the copolymer with d[(TTAGGG)₄] oligonucleotide has been investigated by fluorescence analysis. Circular dichroism spectroscopies revealed that irradiation of the mixture of the copolymer and d[(TTAGGG)₄] leads to the formation of antiparallel G-quadruplex. The results of competition dialysis assay indicated that the binding of malachite green to G-quadruplex of d[(TTAGGG)₄] was selective. The G-quadruplex structure was found to be stabilized by the binding of malachite green.

研究分野：有機化学

キーワード：光応答 グアニン四重鎖 トリフェニルメタン

1. 研究開始当初の背景

染色体末端に存在するテロメアは、細胞分裂のたびに短くなり一定長以下になると分裂を停止し細胞老化に至るため、テロメア長が細胞の寿命を決定するといえる。一方がん細胞などでは、テロメアを延伸する酵素テロメラーゼが多量に存在し、がん細胞を不死化させる原因の1つと考えられている。これよりがん治療を目的として、テロメラーゼの活性を抑制する試みが数多くなされてきた。その1つに、グアニン四重鎖を安定化させるものがある(*Nature*, 1991, 350, 718 など)。グアニン四重鎖は1本鎖DNA中で形成され、グアニン4量体がつくる平面が数回重なって構成されており、平面中心にカチオンが存在することで構造が安定化する。テロメラーゼは、テロメア末端の1本鎖DNAに結合してDNA複製を開始するため、この部分のコンフォメーションがグアニン四重鎖へと変化すればテロメラーゼは結合しにくくなり、その活性は抑制されると考えられる。グアニン四重鎖の安定化には、 K^+ や Na^+ などの金属イオンに加えて、近年カチオン性のポルフィリンなども有効であることが明らかとなってきた(*Biophys. J.*, 2007, 92, 2007 など)。

2. 研究の目的

グアニン四重鎖形成をがん治療へ展開するには、ターゲット細胞に限定して治療しなければならない。つまり、グアニン四重鎖の形成を外部から調整・制御する仕組みをつくる必要がある。光は非接触で遠隔操作も可能な外部刺激であり、集光することによってターゲット空間への照射も可能となる。治療へ展開するには、光は最適な手段といえる。そこで光照射により核酸のグアニン四重鎖を安定化させることを本研究の目的とした。グアニン四重鎖の安定化には、光でイオン化するユニークな化合物であるトリフェニルメタン誘導体を用いた(図1)。光照射時にはDNAと相互作用しないが、光照射後に発生するカチオンによって、グアニン四重鎖形成の促進またはグアニン四重鎖を安定化することが期待できる。

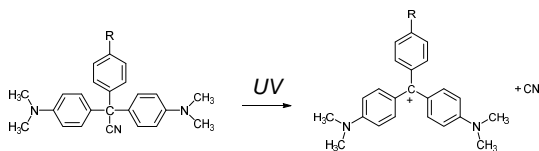


図1 トリフェニルメタン誘導体の光イオン化反応

3. 研究の方法

(1) オリゴヌクレオチドとの相互作用

本研究では、ヒトテロメアに見られる5'-TTAGGG-3'の配列が繰り返されたオリゴヌクレオチド d[(TTAGGG)₄]を用い、トリフェニルメタン誘導体との相互作用を調べた。

このオリゴヌクレオチドを pH 7.4 の TE 緩衝液(トリスヒドロキシメチルアミノメタン(Tris)/Tris-HCl 10mM, エチレンジアミン四酢酸 1 mM)に溶解させた。このオリゴヌクレオチド溶液とトリフェニルメタン誘導体を混合させ3時間 25 °C でインキュベートさせた後、590 nm にて励起させた際の蛍光スペクトルを評価した。

(2) グアニン四重鎖形成の促進

d[(TTAGGG)₄]を pH 7.4 の TE 緩衝液に溶解させたものを 90 °C で5分間加熱し、その後徐々に室温まで冷却した。この溶液をトリフェニルメタン誘導体と混合させ、円二色スペクトルを 25 °C にて測定した。

(3) グアニン四重鎖への選択性

様々な配列のDNAが存在する中でグアニン四重鎖への結合を評価するために、競合透析を行った。用いたDNAは、d[(TTAGGG)₄]、d[A₂₄]、d[T₂₄]、d[G₂₄]、d[C₂₄]、calf thymus DNA (二重鎖)である。これら6種類のDNA 50 μM、500 μL をそれぞれ透析ユニット(Thermo Scientific 社製、Slide-A-Lyzer™, 3500 molecular weight cut-off filter)に入れて100 mLのトリフェニルメタン誘導体溶液(100 μM)に投入し透析を24時間行った。その後、透析ユニット内の溶液を取り出し、ドデシル硫酸ナトリウム溶液(2% (w/v))を等量加え吸収スペクトルを測定することで、透析ユニット内のトリフェニルメタン誘導体濃度を算出した。

(4) グアニン四重鎖の安定性

グアニン四重鎖の安定性を融点測定によって評価した。d[(TTAGGG)₄]を100 mM KClを含むTE緩衝液(pH 7.4)に溶解させ、90 °C で5分間加熱しその後徐々に0 °Cまで冷却した。得られたグアニン四重鎖溶液をトリフェニルメタン誘導体と混合して3時間25 °C でインキュベートさせた後、295 nmにおける吸光度を評価した。測定は20 °C から90 °Cまで0.5 °C/分速度で昇温させて行った。

4. 研究成果

(1) オリゴヌクレオチドとの相互作用

光応答水溶性トリフェニルメタン誘導体として、本研究ではマラカイトグリーン部位を有するポリビニルアルコール(PVAMG、図2)を合成した。合成は *Biomacromolecules*, 2012, 13, 1510 記載の方法に従った。PVAMGにキセノンランプからの紫外光照射を20分間行ったところ、620 nm付近に吸収ピークが表れ、光イオン化反応が進行することが分かった。マラカイトグリーンシュウ酸塩の吸光度と比較することで、620 nmの吸光度からイオン化したマラカイトグリーン濃度を見積もることができる。本研究ではPVAMGの濃度はすべてイオン化マラカイトグリーン(MG⁺)濃度で示した。

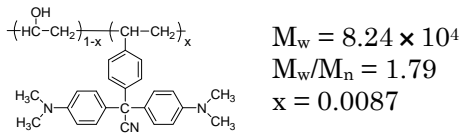


図2 マラカイトグリーン部位を有するポリビニルアルコール (PVAMG)

トリフェニルメタン色素は蛍光を發しないが、低温または粘性度の高い溶媒中や RNA と結合した際には蛍光を示すことが知られている (*J. Phys. Chem. B*, 1998, 102, 4678, *J. Chem. Phys.*, 1977, 67, 2648, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14716)。図3に、 $d[(\text{T TAGGG})_4]$ 濃度を変化させた場合の光イオン化後の PVAMG の蛍光スペクトルを示す。

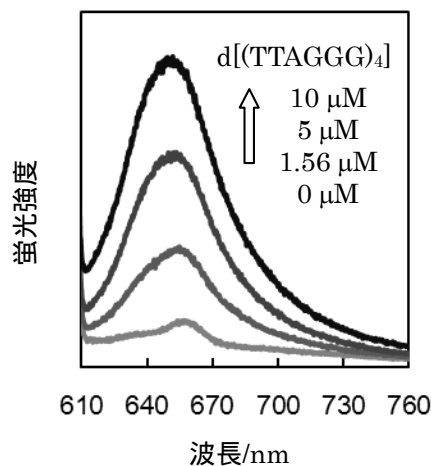


図3 光イオン化後の PVAMG ($[\text{MG}^+] = 1.0 \mu\text{M}$) の蛍光スペクトル
励起波長 590 nm

共存する $d[(\text{T TAGGG})_4]$ 濃度が増加するに伴い、650 nm 付近の蛍光強度が増加しており、光イオン化した PVAMG がオリゴヌクレオチドと相互作用することが示された。

(2) グアニン四重鎖形成の促進

図4に $d[(\text{T TAGGG})_4]$ の CD スペクトルを示す。光イオン化後の PVAMG が共存すると、295 nm 付近に正のピークが出現することが分かる。このピークはアンチパラレル型のグアニン四重鎖に由来するものと考えられる (*J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 21858)。またこの 295 nm のピーク強度の増加は、一本鎖 DNA 由来の 257 nm のピーク強度の減少と良い対応を示していることが分かる。つまり、PVAMG への光照射により一本鎖 DNA の $d[(\text{T TAGGG})_4]$ がアンチパラレル型のグアニン四重鎖へとコンフォメーションを変化させたといえる。また、光未照射時ではこのピークの出現はなかったことから、PVAMG の光照射によりグアニン四重鎖形成の促進に成功したことが示された。

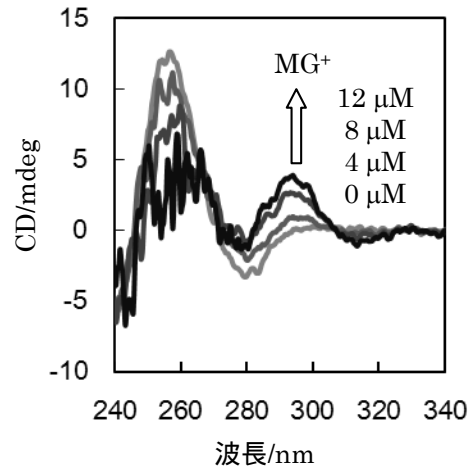


図4 光イオン化後の PVAMG を含む $d[(\text{T TAGGG})_4]$ の CD スペクトル ($8 \mu\text{M}$)

(3) グアニン四重鎖への選択性

染色体には様々な塩基配列の DNA に加えてワトソン - クリック型の二重鎖 DNA もあるため、PVAMG が 5'-TTAGGG-3'配列へ選択的に結合することは、がん治療への応用に不可欠となる。そこで、 $d[(\text{T TAGGG})_4]$ に加えて様々な配列の DNA を用いて競合透析を行った結果を図5A に示す。トリフェニルメタン誘導体には、透析が可能となるように分子量の低いマラカイトグリーンシュウ酸塩を用いた。各3回実験を行い、平均値を示している。競合透析後の濃度は、それぞれの DNA への結合定数を反映して高くなることが知られている。つまり、透析後に濃度が高くなる DNA には選択的に結合するといえる。図5Aの結果から、マラカイトグリーンカチオンは、 $d[(\text{T TAGGG})_4]$ またはグアニンリッチな配列に好んで結合することが分かる。さらに二重鎖である Calf thymus DNA へ結合したマラカイトグリーン濃度は低く、 $d[(\text{T TAGGG})_4]$ への選択的な結合が期待できるといえる。

ところで細胞内にはカリウムイオンが最も高い濃度で存在する。つまり、細胞内での応用を考えるとカリウムイオンが含まれる条件での評価がさらに必要となる。図5Bに 100 mM の KCl を含む TE 緩衝液を用いて競合透析を行った結果を示す。 $d[(\text{T TAGGG})_4]$ に対して最も結合することが示された。ところでカリウムイオンなどの金属イオン存在下では、グアニンを豊富に含むオリゴヌクレオチドが四重鎖を形成することが報告されている (*J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 9439)。つまり図5Bの結果は、カリウムイオンによって形成されたグアニン四重鎖への結合性が他の配列の DNA に比べて高いことを示している。

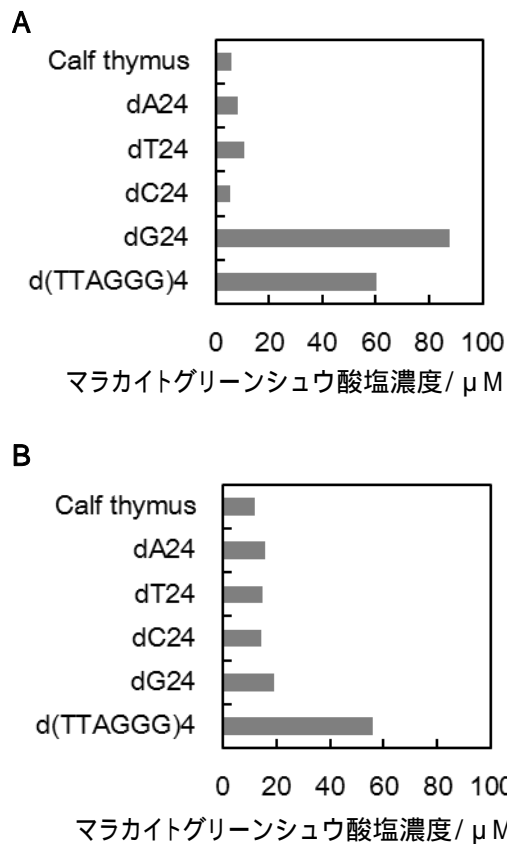


図5 競合透析の結果 A) TE 緩衝液、B) 100 mM KCl を含む TE 緩衝液

(4) グアニン四重鎖の安定性

$d[(TTAGGG)_4]$ は KCl によって一本鎖 DNA からグアニン四重鎖を形成することが知られている (*J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 9439)。KCl 添加により形成したグアニン四重鎖の安定性を融解温度 (T_m) から評価した。図 6 A に $3.6 \mu\text{M}$ の $d[(TTAGGG)_4]$ の 295 nm の吸光度から得られた溶解曲線を示す。この依存性から $d[(TTAGGG)_4]$ グアニン四重鎖の T_m を算出したところ 61 であることが分かった。マラカイトグリーンカチオンがこのグアニン四重鎖の T_m に及ぼす影響を図 6 B に示す。マラカイトグリーンが結合することによって T_m が上昇しており、グアニン四重鎖はより安定となっていることが分かる。この T_m の上昇は他のトリフェニルメチルカチオンでは報告されておらず、マラカイトグリーンはグアニン四重鎖安定化に効果的であることが初めて示された。

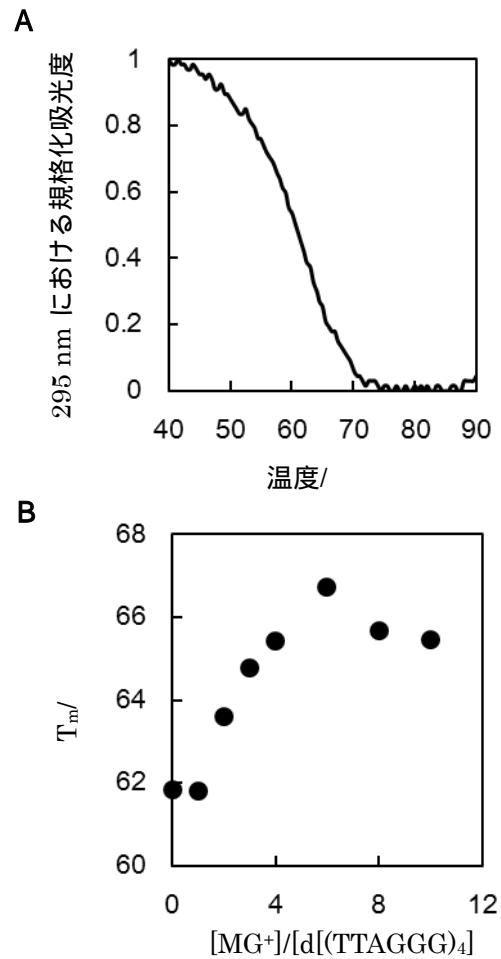


図6 A) 規格化した 295 nm における $d[(TTAGGG)_4]$ の吸光度変化、B) マラカイトグリーンシュウ酸塩が及ぼす T_m への効果
 T_m は 3 回以上測定 の平均値

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 1 件)

Uda, Ryoko M. and Matsui, T. Photoinduced conformational changes in DNA by poly(vinyl alcohol) carrying a malachite green moiety for protecting DNA against attack by nuclease, *Soft Matter* 2015, 査読あり, 11, 8246-8252

〔学会発表〕(計 5 件)

宇田亮子、光イオン化マラカイトグリーン誘導体とオリゴヌクレオチドの相互作用、第 60 回高分子研究発表会(神戸) 2014 年 7 月 24~25 日、兵庫県民会館

西本徳子・宇田亮子、マラカイトグリーンコポリマーへの光照射によるグアニン四重鎖形成、日本化学会第 95 春季年会、2015

年 3 月 28 日講演、日本大学

松井 誉・宇田亮子、マラカイトグリーンコポリマーがもたらす DNase 耐性、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 27 日講演、日本大学

松井 誉・宇田亮子、マラカイトグリーン含有光応答性コポリマーとオリゴヌクレオチドとの相互作用、2015 年光化学討論会、2015 年 9 月 11 日講演、大阪市立大学

松井 誉・宇田亮子、マラカイトグリーンコポリマーの光イオン化反応がもたらすグアニン四重鎖形成の促進、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日講演、同志社大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田 亮子 (UDA RYOKO)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授

研究者番号：90321463

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし