2版

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月 １６ 日現在

機関番号： ３４５０６
研究種目： 基盤研究(C)（一般）
研究期間： 2014～2016
課題番号： ２６４１０１８８
研究課題名（和文） 遺伝子複製速度を制御するDNA高次構造と化学環境の効果

研究課題名（英文） Effect of DNA secondary structures and chemical environments on the regulation of rate of gene replication

研究代表者
高橋　俊太郎（TAKAHASHI, Shuntaro）

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号：４０４５６２５７

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DNA複製反応の経時的な観察を行い、鋳型核酸の安定性および周囲の分子環境によって複製速度が制御されるメカニズムを定量的に解明することである。鋳型DNAの熱力学的安定性と複製反応の相関性を定量的に解析することを中心に研究を推進した結果、DNA複製反応速度は鋳型核酸のもつ熱力学的安定性だけでなく、鋳型DNAが形成する二次構造のトポロジーに大きく依存したことを見出した。さらに分子クラウディング環境に応じてトポロジーが変化する事でも複製速度が変化した。以上の成果は、生体反応が核酸構造によって制御される新たなメカニズムを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we observed DNA repliation reaction in time and quantitatively investigated the replication rate depending on the stabiity of the template DNA and surronding chemical environments. As a result of analysis of the collerations between the stability of the template DNA and the replication rate, we found that the replication rate depended on not only the stability of the template DNA but also the topology of the structure of the template DNA. Furthermore, we identified that the changing the topology by molecular crowding conditions also affected the replication rate. These results imply the novel mechanism of the regulatino of biological reactions by the structures of nucleic acids.

研究分野： 生体関連化学

キーワード： DNA　複製　グアニン四重鎖　分子クラウディング　i-motif

１．研究開始当初の背景

遺伝子を子孫へ引き継いでいくためにDNA複製は生命の最も基本的な現象である。そのため複製反応の異常停止は細胞にとって致命的で、ガン等の疾患の原因になる。その一方で、複製速度の変調が染色体構造や細胞分化が制御に深く関わっていることが分かってきた（C. Alabert et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13. 153 (2013)等）。このように細胞の運命を決定づける複製の制御は、DNA上をコピーしながら進行する複製酵素群（DNA ポリメラーゼ等）の動きが抑制されることがトリガーとなっている。原因としては DNA の損傷以外では DNA の高次構造が影響することが示唆されている。DNA の高次構造は化学環境変化で安定性が変化することを考慮すると、ストレスや細胞分化等、時々刻々変わる細胞内の化学環境変化が、DNA構造依存的な複製速度調節を変調させ、結果的に細胞の運命を決定している可能性がある。したがって、複製速度を DNA 安定性と種々の化学環境条件をパラメータとして定量的に評価することは非常に重要である。しかしながら、複製反応がシングルターンオーバーで終了する性質から、詳細なDNA配列依存的な複製速度を解析することはこれまで困難であった。そのため、複製速度をDNA 高次構造安定性と周囲の分子環境の化学的観点から定量的に研究した例はこれまで報告されていなかった。そこで申請者は、得られる複製速度パラメータと核酸構造の安定性パラメータを定量的かつ系統的に解析し相関性を評価できれば、細胞機能の制御を促す複製反応のメカニズムを物理化学的観点から理解することが可能になるのではないかと着想した。

２．研究の目的

本研究では、種々の核酸高次構造を持つDNA 上での複製反応を異なる化学環境でリアルタイム計測することで、細胞内の遺伝子複製において核酸構造の熱安定性や速度論が関与する反応メカニズムを明らかにしていくこと目的とする（図 1）。

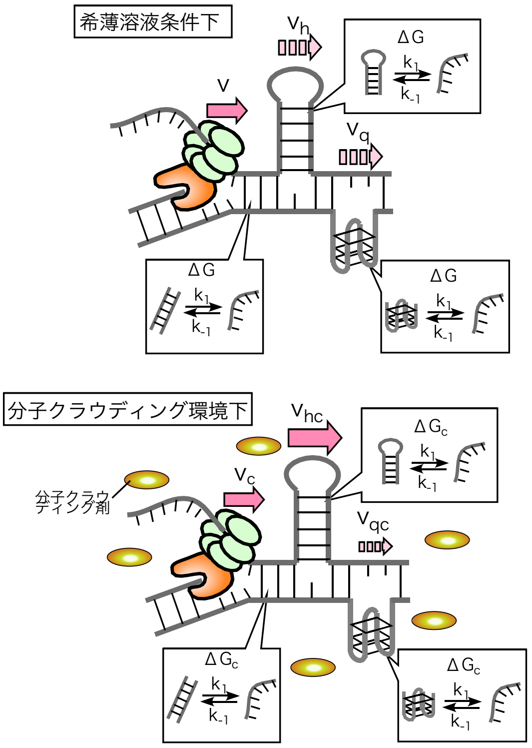

図 1　本研究では複製反応で障害となるヘアピンや四重鎖構造といった DNA 高次構造の安定性（Δ*G*）を、それぞれに要する複製速度と相関付ける。さらに異なる化学環境における安定性および速度パラメータも算出する。分子クラウディング環境のように異なる分子環境では高次構造の安定性が変化するため各複製速度も影響を受けることが考えられる。

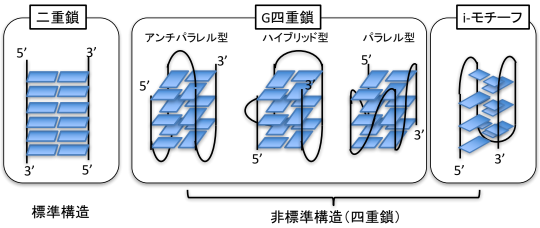

図 2　核酸高次構造の模式図。

３．研究の方法

本研究では全て in vitro での複製実験を対象に行った。まず、これらの反応に対して、基質 dNTP 存在下、鋳型核酸上に形成したグアニン四重鎖構造などの各種非標準的核酸構造（図 2）が与える影響を常圧下で解析した。ポリメラーゼは大腸菌 DNA ポリメラーゼ由来の Klenow Fragment を用いた。反応産物の合成はゲル電気泳動によって評価した。プライマーの 5'末端にはフルオロセインを導入することで、複製反応による DNA 伸長過程を蛍光検出で行った（図 3）。蛍光イメージングは FLA-5000（GE ヘルスケア）を用いて行い、バンドの強度を定量化した。核酸構造の熱安定性（Δ*G* 値）は UV メルティング法から算出した。

高圧力下での測定には、シンコーポレーション社製の高圧セル（PCI-500）を用い、高圧ポンプ（HP-500）で加圧した（最大 400 MPa）。各種非標準核酸構造の熱安定性の解析は、高圧セルを分光光度計に接続し、UV メルティング法で測定した。温度変化による圧力変動は圧力容器（PV-400）を接続することで、影響を抑えた。

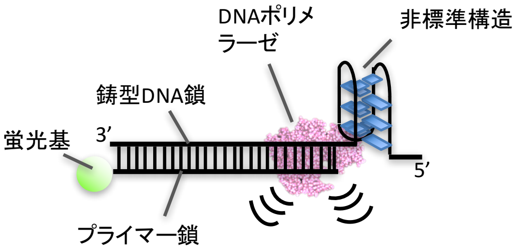

図３　複製実験の模式図.

４．研究成果

１）常圧下の複製反応における鋳型 DNA 構造の影響に関する定量解析

非標準核酸構造（図 2）として、ハイブリッド型の G 四重鎖を形成するヒトテロメア G 四重鎖($(T_2AG_3)_4$)、パラレル型の ILPR、アンチパラレル型の Q6、i-motif を形成するヒトテロメア C リッチ配列($(C_3TA_2)_4$)、cILPR（ILPR の相補鎖）、cBcl2（Bcl2 遺伝子の C リッチ鎖）。Hif1a、さらに 9 bp のヘアピン構造を用いた。ハイブリッド型のヒトテロメア G 四重鎖を形成した鋳型 DNA の複製では、DNA ポリメラーゼが G 四重鎖の手前で複製を一時停止したことに由来する複製産物が観察された（図 5）。G 四重鎖の安定性依存性を

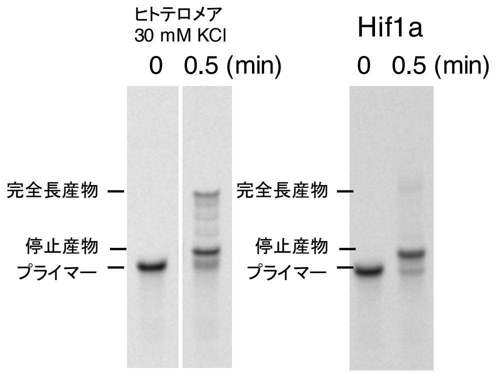

図５　反応産物のゲル電気泳動写真。

調べるために、G 四重鎖を安定化させる K^+濃度を系統的に増加させたところ、複製反応速度が徐々に低下した。安定性（$-\Delta G^\circ_{37}$）と複製反応速度の対数（ln$k$）が直線的に減少したことから、複製阻害効果は四重鎖の安定性に依存していることが見出された（図 6)）。以前の研究から、同一の構造をとる核酸が解離する際の活性化自由エネルギー（$\Delta G^\ddagger$）は、その核酸構造の安定性ΔG に比例することが報告されている。また、アレニウスの式から考慮すると､反応速度 ln$k$ は$\Delta G^\ddagger$ と比例する。以上二つの関係性から、ln$k$ と$-\Delta G^\circ_{37}$ の直線関係が説明できる。一方、i-モチーフを形成する Hif1a DNA の複製の場合、完全長の複製産物は確認されず、その阻害効果はヒトテロ

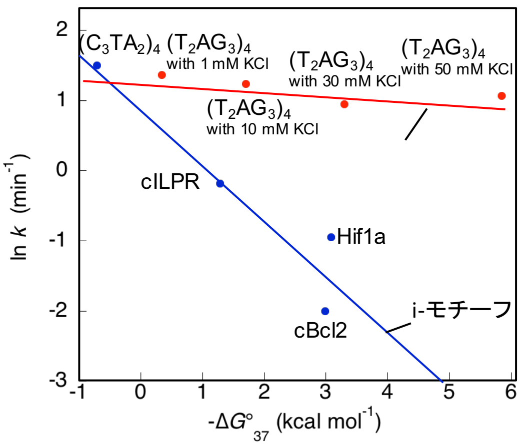

図 6　各構造を有する複製反応における構造安定性($-\Delta G^\circ_{37}$)と複製反応速度定数(ln$k$)のプロット。

メアG四重鎖より高い傾向にあった(図2(c))。他にも、がん関連遺伝子である Bcl2 遺伝子由来の i-モチーフは同程度の安定性を示すハイブリッド型のG四重鎖より複製阻害効果が極めて高かった。ヒトテロメア配列や cILPR も同様に解析を行い、各構造安定性$-\Delta G^\circ_{37}$と各複製反応の ln$k$のプロットから良い直線関係が得られた。直線の傾きは反応後との活性化自由エネルギー違いに由来する。傾きから計算すると、i-モチーフの方がハイブリッド型G四重鎖より約 14 倍の$\Delta G^\ddagger$ を構造の融解に要していたことが明らかになった。このエネルギー差はトポロジーの違いによると考えられる。同程度の安定性を持つヘアピン構造では複製抑制がほとんどかからず、また異なるG四重鎖のトポロジーを示す ILPR や Q6 で得られた ln$k$ と$-\Delta G^\circ_{37}$の関係は、ハイブリッド型G四重鎖の直線関係には沿わないことからも、複製反応は鋳型核酸の持つ安定性だけでなく高次構造にも大きく影響を受けることが明らかになった。二重鎖やG四重鎖と異なる i-モチーフ構造の特徴は、二つの $C:C^+$塩基対からなる二重鎖が互いに逆平衡にインターカレートして四重鎖を形成していることである。そのため、末端の塩基対が解離しても次の塩基対を解離する方向が逆方向であり、ジッパーのように連続的な塩基対の解離が起こらない。また i-モチーフのループ領域がポリメラーゼの進行に対して立体障害となる。そのため、同程度の安定性を持つハイブリッド型G四重鎖より i-モチーフの複製阻害効果が大きかったと考察される（図 7）。

さらに、トポロジー変化を引き起こす 20 wt%の PEG1000（平均分子量 1000）を加えたクラウディング環境で同様の解析を行うと、i-モチーフの構造安定性がより大きくなり阻害効果がさらに高まった。その一方で、ヒトテロメア G 四重鎖の複製阻害も高くなり、i-モチーフの複製阻害の大きさに近づいた。トポロジーを調べると、PEG1000 の効果でヒ

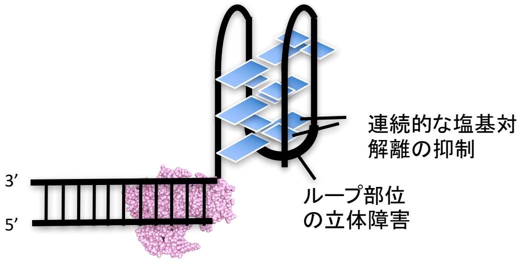

図 7　i-motif が複製を効率的に抑制する原因の説明図。

トテロメア G 四重鎖はパラレル型へと変化していた。したがって、G 四重鎖のトポロジーが変化することで構造の融解機構が変わり、i-モチーフと同程度の複製阻害になったと考えられる。実際に G 四重鎖のトポロジーによって、構造融解のメカニズムが異なることが報告されている。前述の通り、G 四重鎖と i-モチーフではクラウディングによる安定化および構造変化のメカニズムが異なる。したがって、細胞内の時空間的に異なるクラウディング環境では、異なる四重鎖のトポロジーとその安定性の変化によって複製反応が制御されている可能性がある。

２）高圧力を用いた G 四重鎖の構造ダイナミクスのトポロジー依存性解析

　複製速度が構造安定性とトポロジーに依存するという以上の知見から、トポロジーの違いによる G 四重鎖の解消ダイナミクスが複製反応の速度を調節し、特定の四重鎖の遺伝子の複製制御が起こっている可能性がある。構造ダイナミクス、すなわち構造の揺らぎの大きさの影響を調べるために、高圧力を利用した DNA 構造安定性解析を行った。圧力を変化させることで、熱力学パラメータである体積変化（ΔV）を得ることができる。このパラメータを定量的に扱うことで構造変化や水和のダイナミクスを定量的に評価することができる。ここでは、モデル実験として、DNA グアニン（G）四重鎖と鉄含有ポルフィリンであるヘミン（hemin (iron(III)-protoporphyrin IX)）の相互作用を解析した。これらは複合体を形成し、酸化反応を触媒する特徴がある。この触媒活性は G 四重鎖の配列によって異なるため、G 四重鎖のトポロジーの違いが影響している反応の一つである。その結果、ヒトテロメア G 四重鎖がアンチパラレル型の構造を形成する Na^+イオン存在下において、ヒトテロメア G 四重鎖に対するヘミンの結合がもたらす体積変化は 2.5 mL mol^{-1} であったのに対し、ハイブリッド型を形成する K^+イオン存在下では -41.7 mL mol^{-1} であった。この結果はヘミンがハイブリッド型の構造のヒトテロメア G 四重鎖に対しより構造適合性が高いことを示している。酸化反応に関して K^+イオン存在下の方が Na^+イオン存在下より高い活性を示したことから、ヘミンの触媒反応にヒトテロメア G 四重鎖との構造適合性が大きく寄与していることが明らかになった。さらに、水和の影響を調べるために PEG200 を用いた分子クラウディング環境において解析したところ、ヘミンの結合に伴う体積変化が増加し、ヘミンの結合に水和が伴うことが示された。以上から、高圧力を用いた熱力学測定により G 四重鎖の形成に伴うダイナミクスが、そのトポロジーと溶媒環境によって変化し、そのため、G 四重鎖上で生じる様々な酵素反応が制御されていることが明らかになった。

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　4 件）

1. S. Takahashi, S. Bhowmik, and N. Sugimoto
Volumetric analysis og formation of the complex of G-quadruplex DNA with hemin using high pressure
J. Inorg. Biochem., 166, 199-207 (2017) doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.08.011, 査読有
2. S. Takahashi and N. Sugimoto
Pressure effect on the folding of G-quadruplex DNA modified with hexaethylene glycol
Mol. Enz. Drug Targ., 2, 3 (2016) doi: 10.21767/2572-5475.10013, 査読有、オープンアクセス
3. S. Takahashi and N. Sugimoto
Pressure-dependent formation of i-motif and G-quadruplex DNA structures
Phys. Chem. Chem. Phys., 17, 31004-31010 (2015) doi: 10.1039/ c5cp04727g, 査読有
4. 高橋俊太郎、杉本直己
核酸構造の熱力学的安定性に及ぼす分子環境と高圧力の効果
高圧力の科学と技術, **25**, 116-125 (2015), 査読有

〔学会発表〕（計　18 件）

1. 日本化学会第 97 春季年会（2017）S. Takahashi, T. Endoh, A. B. Rode, N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (29): Analysis of structural dynamics of RNA aptamer using high pressure, 慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川・横浜市）, 2017 年 3 月 16 日～19 日
2. 第 56 回高圧討論会、高橋俊太郎、大倉裕道、杉本直己、RNA ポリメラーゼリボザイム活性の P-T 依存性、筑波大学大学会館（茨城・つくば市）、2016 年 10 月 26 日～28 日
3. 第 43 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2016), S. Takahashi H. Okura, S. Sato, S. Takenaka, and N. Sugimoto, Effect of cyclic naphthalene diimide on the

topology dependent replication reaction, 工学部黒髪南地区キャンパス(熊本・熊本市), 2016 年 9 月 27～29 日
4. 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 高橋俊太郎、P. Podbevsek、藤井大雅、J. Plavec、杉本直己, がん関連遺伝子のグアニン四重鎖構造に対する酸化損傷の影響, 石川県立音楽堂(石川・金沢市), 2016 年 9 月 7 日～9 日
5. ANNA 2016 (Advances in Noncanonical Nucleic Acids)、S. Takahashi, N. Sugimoto, Pressure control of the formation of G-quadruplex and i-motif DNA, Liubljana, Slovenia, 2016 年 5 月 18 日～20 日（招待講演）
6. 日本化学会第 96 春季年会（2016）S. Takahashi, J. Brazier A., N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (16): Replication reaction of DNA regulated by the formation of i-motif structure, 同志社大学京田辺キャンパス（京都・京田辺市）, 2016 年 3 月 24 日～27 日
7. 第 56 回高圧討論会、高橋俊太郎、杉本直己、トリプレット病関連遺伝子の複製反応における圧力効果、JMS アステールプラザ（広島・広島市）、2015 年 11 月 10 日～12 日
8. 第 38 回溶液化学シンポジウム　プレシンポジウム、高橋俊太郎、杉本直己、分子クラウディングと高圧力が与える核酸の非標準型構造への影響、高知市文化プラザカルポート（高知・高知市）、2015 年 10 月 20 日（依頼講演）
9. 第 42 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2015), S. Takahashi and N. Sugimoto, Role of poly(ethylene glycol) during the formation of G-quadruplex under high pressure, イーグレひめじ あいめっせホール（兵庫・姫路市）, 2015 年 9 月 23～25 日
10. 第 65 回錯体化学会討論会、S. Takahashi, N. Sugimoto, Analysis of the formation of G-quadruplex DNA with hemin under high pressure, 奈良女子大学（奈良・奈良市）, 2015 年 9 月 22 日～24 日
11. 第 64 回高分子討論会、高橋俊太郎、杉本直己、高圧力が拓く核酸の新たな可能性、東北大学川内キャンパス（宮城・仙台市）、2015 年 9 月 15 日～17 日
12. 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 高橋俊太郎、杉本直己, 二次構造を形成する DNA の複製反応を圧力で制御する, 熊本大学工学部黒髪南地区キャンパス(熊本・熊本市), 2015 年 9 月 10 日～12 日
13. 日本化学会第 95 春季年会（2015）, H. Okura, S. Takahashi, N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (7): Molecular Crowding Effect on Ribozyme- or Protein-based Polymerase Reactions, 日本大学船橋キャンパス（千葉・船橋市）, 2015 年 3 月 26 日～29 日
14. 日本化学会第 95 春季年会（2015）, S. Takahashi, S. Bhowmik, N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (6): Binding Mechanism of G-quadruplex and Its Ligands Elucidated by Pressure Effect, 日本大学船橋キャンパス（千葉・船橋市）, 2015 年 3 月 26 日～29 日
15. 第 55 回高圧討論会, 高橋俊太郎, 杉本直己, テロメア DNA 配列の P-T 依存的構造変化, 徳島大学常三島キャンパス（徳島・徳島市）, 2014 年 11 月 22 日～24 日
16. 第 55 回高圧討論会, 杉本直己, 高橋俊太郎, 核酸の挙動に及ぼす分子クラウディングと圧力の影響, 徳島大学常三島キャンパス（徳島・徳島市）, 2014 年 11 月 22 日～24 日（依頼講演）
17. 第 41 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014), S. Takahashi, S. Bhowmik, and N. Sugimoto, Pressure and temperature stability diagram of human telomeric DNA, 北九州国際会議場（福岡・北九州市）, 2014 年 11 月 5～7 日
18. 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、高橋俊太郎、杉本直己, 高圧力で誘起される i-motif DNA の構造安定化効果、岡山大学津島キャンパス（岡山・岡山市）, 2014 年 9 月 11 日～13 日

〔図書〕（計　1 件）
1. 高橋俊太郎、杉本直己
化学同人, 高圧下での核酸の挙動
極限環境の生命化学（CSJ カレントレビュー）, 110-118 (2014)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.konan-fiber.jp/index.php

６．研究組織
(1)研究代表者
高橋　俊太郎（TAKAHASHI, Shuntaro）
甲南大学・先端生命工学研究所・講師
研究者番号：40456257