

c-kit2 グアニン四重鎖構造形成制御機構の解析

Analysis of regulatory mechanism of *c-kit2* G-quadruplex structure formation

原島 慎大¹⁾

指導教員 吉田 亘^{1),2)}

- 1) 東京工科大学大学院 バイオ情報メディア研究科 バイオニクス専攻 エピジェネティック工学研究室
- 2) 東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 エピジェネティック工学研究室

キーワード: G4 構造, 二重らせん構造, CpG メチル化, *c-KIT*, *c-kit2*

1. 背景・目的

ゲノム DNA 中で、シトシンとグアニンが連続して存在する配列のことを CpG 配列という。この領域では、シトシンの 5 位の炭素が CpG メチル化酵素によりメチル化される反応が起こることがあり、これを CpG メチル化という。CpG メチル化により遺伝子の発現が抑制されることから、CpG メチル化は遺伝子発現を制御するスイッチと呼ばれている。

ゲノム DNA 中でグアニンが豊富に存在する領域では、二本鎖を形成している DNA が一本鎖 DNA に解離し、その一本鎖 DNA でグアニン四重鎖 (G-quadruplex : G4) 構造が形成されることが報告されている。G4 構造とは 4 つのグアニンが Hoogsteen 塩基対を介して形成した平面構造が複数重なり合ってできる DNA の高次構造である (Fig. 1)。G4 構造を特異的に認識する転写因子が同定されていることから、G4 構造の形成により遺伝子が発現する可能性があることが示唆されている。しかし、G4 構造が形成されるメカニズムについては、まだ明らかになっていない。

受容体型チロシンキナーゼをコードする遺伝子として、*c-KIT* が同定されている。チロシンキナーゼは細胞のシグナル伝達に関与し、正常細胞の成長に重要な役割を果たしている。消化管間質腫瘍では *c-KIT* が異常に発現していることから、*c-KIT* の発現を制御するメカニズムを解明すれば新たな

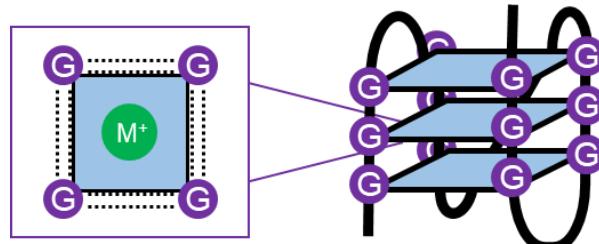


Fig. 1 G4 構造の平面図と G4 構造

抗がん剤の標的になることが期待されている。*c-KIT* プロモーター中には *c-kit2*, *c-kit**, *c-kit1* の 3 種類の G4 構造形成配列が同定されており、本研究室では、*c-kit2* G4 構造は 1 番目のシトシン (C1) をメチル化すると、G4 構造が不安定化し、5 番目のシトシン (C5) をメチル化すると、G4 構造が安定化することを報告している。この結果から、C1 メチル化が G4 構造から二重らせん構造形成を誘起させ、C5 メチル化が二重らせん構造から G4 構造形成を誘起させる因子であることが示唆された。

そこで、本研究では CpG メチル化が *c-kit2* G4 構造を形成させる因子であるか解析すること目的とした。その解析方法を Fig. 2 に示す。5' 端に蛍光を発する Fluorescein (FAM) を、3' 端にその蛍光を消光させる Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) を修飾させた *c-kit2* G4 構造形成オリゴヌクレオチドと、その完全な相補鎖配列を持つオリゴヌクレオチドを用いた。二重らせん構造形成時では、

FAM と BHQ-1 が離れるため、FAM の蛍光が観察される。一方、G4 構造形成時では、FAM と BHQ-1 が近接するため、FAM の蛍光が BHQ-1 により消光され、蛍光が観察されない。*c-kit2* G4 構造形成オリゴヌクレオチドの C1 がメチル化された場合では、*c-kit2* G4 構造がメチル化されていない場合と比較し二重らせん構造を形成しやすくなることで、ハイブリダイゼーションする速度が速くなることが想定される。つまり、メチル化されていない場合と比較し、高い割合で蛍光強度が増加すると想定される。対照的に、C5 がメチル化された場合では、*c-kit2* G4 構造が安定化する。よって、*c-kit2* G4 構造がメチル化されていない場合と比較し G4 構造を形成しやすくなることで、ハイブリダイゼーションする速度が遅くなることが想定される。つまり、メチル化されていない場合と比較し、低い割合で蛍光強度が増加すると想定される。そこで、*c-kit2* G4 構造形成オリゴヌクレオチドの C1 もしくは C5 をメチル化したオリゴヌクレオチドを合成し、その相補鎖配列を持つオリゴヌクレオチド添加後の蛍光強度の時間変化を測定することで、ハイブリダイゼーションする速度を測定することを試みた。

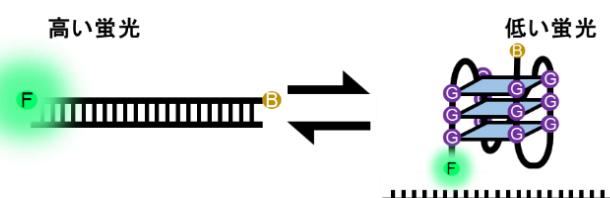


Fig. 2 想定される二重らせん構造または G4 構造の形成による蛍光強度の変化

2. 方法

c-kit2 G4 構造形成配列の 5' 端に FAM を 3' 端に BHQ-1 を修飾させたオリゴヌクレオチドと、その相補鎖配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。さらに、FAM と BHQ-1 を修飾した *c-kit2* G4 構造形成オリゴヌクレオチドの C1 または C5 をメチル化したオリゴヌクレオチドも化学合成した。50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 40 mM NaCl, 5

mM MgCl₂, 60 mM LiCl 存在下で非メチル化、C1 メチル化または C5 メチル化 *c-kit2* G4 構造形成オリゴヌクレオチドを調製し、95° C で 3 分間加熱したのちに 30 分間かけて 25° C に冷却させた。その後、等モル量の相補鎖オリゴヌクレオチドを加え、FAM の蛍光強度 (励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm) を 1 分おきに 2 時間測定した。

3. 結果

非メチル化 *c-kit2* G4 構造形成オリゴヌクレオチドを用いた場合と比較し、C1 をメチル化させたオリゴヌクレオチドを用いた場合では FAM の蛍光強度が高く、測定開始から 10 min から 20 min の傾きが大きくなつた。対照的に、C5 をメチル化させたオリゴヌクレオチドを用いた場合では FAM の蛍光強度が低く、測定開始から 10 min から 20 min の傾きが小さくなつた。

そのため、C1 をメチル化すると G4 構造が不安定化することで、相補鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションする速度が速くなることが示された。また、C5 をメチル化すると G4 構造が安定化することで、相補鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションする速度が遅くなることが示された。

4. 結論

c-kit2 G4 構造の C1 をメチル化すると、G4 構造が不安定化することで、相補鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションする速度が速くなることが示された。対照的に、C5 をメチル化すると G4 構造が安定化することで、相補鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションする速度が遅くなることが示された。これらより、*c-kit2* G4 構造形成が、CpG メチル化により制御されていることが示唆された。