

新規抗がん剤開発へ向けたテロメア DNA の機能解析

Structural analysis of telomeric DNA for anti-cancer drug development

和田 亮平
指導教員 吉田 亘

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：グアニン四重鎖、テロメア、アデニンメチル化、CD スペクトル

1.背景・目的

本研究では抗がん剤の標的として着目されているヒトゲノム DNA の末端領域の DNA 構造を解析することを目的としている。ヒトゲノム DNA は A(アデニン)・T(チミン)・C(シトシン)・G(グアニン)の 4 つの塩基によって構成されており、通常はアデニンとチミン、シトシンとグアニンが結合し二重らせん構造を形成している。一方、ヒトゲノム DNA の末端領域はテロメアと呼ばれ、テロメア領域は二重らせん構造ではなく、4 つのグアニンで形成される四重鎖構造を形成することが知られている。この四重鎖構造は 4 つのグアニンが互いに結合して形成された平面構造が 2 つ以上重なり合って形成される DNA の特殊構造であり、グアニン四重鎖(G-quadruplex: G4)構造と呼ばれる。ヒトゲノム DNA は複製されるたびに、このテロメア領域が短くなり、一定の長さまで短くなると、細胞死が誘導される。つまり、テロメアの長さにより細胞の寿命が決まると考えられている(Fig.1)。

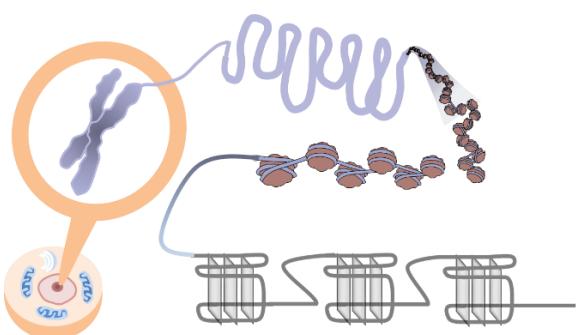


Fig.1 ヒトゲノム DNA の末端構造

一方、がん細胞では短くなったテロメアを伸長させる酵素が活発に働いていることが知られている。そのため、がん細胞ではテロメアが短くならないため、細胞死が誘導されず、がん細胞は無限に増殖する。そのため、テロメア G4 構造に結合し、テロメアを伸長する活性を阻害できる分子は抗がん剤として利用できることが期待されている。テロメア G4 構造に結合し、テロメア伸長反応を阻害する分子を創製するためには、テロメア G4 構造を詳細に解析する必要がある。

ヒトテロメアは 5'-TTAGGG-3' の反復配列で構成されており、この反復配列中の配列 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3' が G4 構造を形成する。一方、ヒトゲノム DNA 中のシトシンとアデニンはメチル化されることが知られている。シトシンがメチル化されると近傍の遺伝子の発現が抑制されることが知られているが、アデニンのメチル化の機能に関する報告は少ない。そこで、本研究ではアデニンをメチル化したテロメア G4 重鎖の詳細な構造を解析することを目的とした。(Fig.2)

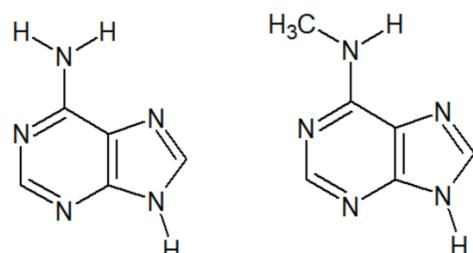


Fig.2 アデニン(左)とメチル化アデニン(右)

2.方法

ヒトテロメア G4 構造形成 DNA (5'-AGGG(TTAGGG)₃-3')と、ヒトテロメア G4 構造形成 DNA 中のアデニンをすべてメチル化した DNA(5'-mAGGG(TTmAGGG)₃-3')を化学合成した。G4 構造は 1 個の陽イオンにより安定化し、その陽イオンの種類によってトポロジー(パラレル構造、アンチパラレル構造、ハイブリッド構造)が変化する。G4 構造のトポロジーは円二色性(circular dichroism: CD)スペクトルを測定することにより解析できる。パラレル型 G4 構造は 260nm 付近にポジティブピークを、アンチパラレル型 G4 構造は 290nm 付近にポジティブピークを、ハイブリット型 G4 構造は 260nm 付近と 290nm 付近の両方にポジティブピークを示す。

そこで、本研究では 100 mM Na⁺もしくは 100 mM K⁺存在下における非メチル化テロメア G4 構造形成 DNA とアデニンメチル化テロメア G4 構造形成 DNA の CD スペクトルを測定し、そのトポロジーを解析した。さらに、25°Cから 95°Cまで 1°Cずつ温度を上昇させながら CD スペクトルを測定し、その熱安定性を測定した。

3.結果

100 mM Na⁺存在下におけるヒトテロメア G4 構造形成 DNA の CD スペクトルを測定した結果、290nm 付近でポジティブピークが観察された。つまり、ヒトテロメア G4 構造形成 DNA は Na⁺存在下ではアンチパラレル型 G4 構造を形成することが示された(Fig.3)。一方、100 mM Na⁺存在下におけるアデニンメチル化ヒトテロメア G4 構造形成 DNA の CD スペクトルを測定した結果、G4 構造特有のピークは観察されなかった。つまり、ヒトテロメア G4 構造形成 DNA は Na⁺存在下では、アデニンをメチル化すると G4 構造が形成されなくなることが示された。

次に、100 mM K⁺存在下において、ヒトテロメア G4 構造形成 DNA とアデニンメチル化ヒトテロメア G4 構造形成 DNA の CD スペクトルを測定した。その結果、両方の DNA において 290nm 付近でポ

ジティブピークが観察された。つまり、K⁺存在下においては、アデニンのメチル化の有無関わらずヒトテロメア G4 構造形成 DNA はアンチパラレル型 G4 構造を形成することが示された。

そこで、100 mM K⁺存在下におけるヒトテロメア G4 構造形成 DNA とアデニンメチル化ヒトテロメア G4 構造形成 DNA の熱安定性を測定した。その結果、アデニンをメチル化すると、その融解温度(Melting temperature: T_m)が 5.2°C上昇することが示された。つまり、K⁺存在下ではヒトテロメア G4 構造形成 DNA のアデニンをメチル化すると、その G4 構造が安定化することが示された。

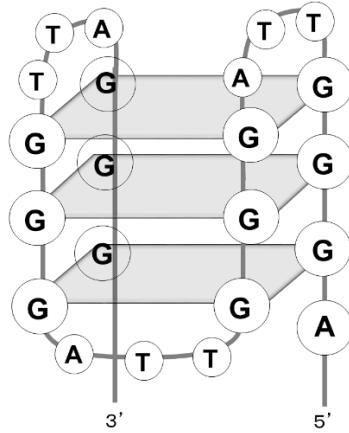


Fig.3 アンチパラレル型 G4 構造

4.結論

100 mM Na⁺存在下ではヒトテロメア G4 構造形成 DNA はアンチパラレル型 G4 構造を形成するが、アデニンをメチル化すると G4 構造が形成されなくなることが示された。一方、100 mM K⁺存在下では、ヒトテロメア G4 構造形成 DNA はアンチパラレル型 G4 構造を形成し、アデニンをメチル化するとその G4 構造が安定化することが示された。がん細胞においてヒトテロメアの伸長反応を阻害する分子を設計するためには、ヒトテロメア G4 構造の形成メカニズムやその安定性に関する知見が必須である。今後、本研究で得られた知見を基に、ヒトテロメアを標的とした抗がん剤が開発されることが期待される。