

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 の末端領域であるテロメア領域の 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、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る平面構造で、この四重鎖構造が層になり重なることで形成される DNA の特殊構造をグアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) 構造という (Figure 1)。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。

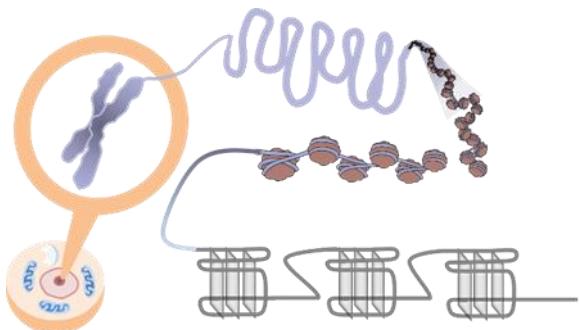


Figure 1. ヒトゲノム DNA の末端構造 ヒトゲノム DNA の末端はグアニン四重鎖構造と呼ばれる特殊な構造が形成されている。

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 (Figure 2)。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。

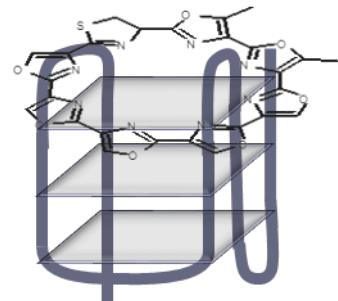


Figure 2. テロメアのグアニン四重鎖構造とその構造を安定化させる分子 グアニン四重鎖構造を安定化させる分子は、テロメアを伸長させる酵素の活性を阻害するため抗がん剤として期待されている。

ヒトテロメアは 5'-TTAGGG-3' の反復配列で構成されており、G4 構造を形成する。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 G4 構造が変化をする。テロメア G4 構造はアンチパラレル型 G4 構造、ハイブリッド 1 型

G4 構造、ハイブリッド 2 型 G4 構造とテロメア DNA 配列の長さによって多数の構造を形成する。以前に本研究室では、アンチパラレル型 G4 構造を形成するテロメア DNA 配列の解析を行った。そこで、本研究では、ハイブリッド 1 型 G4 構造を形成する DNA 配列(5'-AAA(GGGTTA)₃GGGAA-3')を用いて熱安定性の解析を行った。また、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 DNA 配列の構造を解析することを目的とした(Figure 3)。

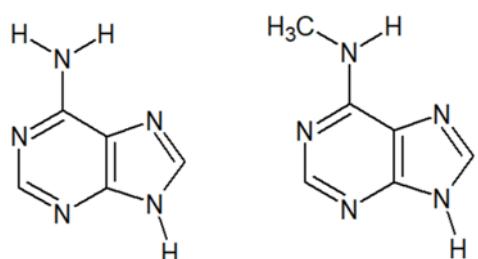


Figure 3. アデニン(左)とメチル化アデニン(右)
本研究ではテロメアグアニン四重鎖のアデニンをメチル化した核酸の熱安定性を解析することを目的とした。

2. 方法

ハイブリッド 1 型 G4 構造を形成する DNA 配列(5'-AAA(GGGTTA)₃GGGAA-3')及びこの DNA 配列のアデニンをそれぞれ 1 か所ずつメチル化した DNA 配列を化学合成した。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。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、ハイブリッド型 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 K⁺存在下におけるハイブリッド 1 型 G4 構造形成 DNA 配列及びアデニンメチル化 G4 構造形成 DNA 配列の 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 K⁺存在下でハイブリッド 1 型 G4 構造を形成する DNA 配列の CD スペクトルを測定した結果、268 nm 及び 288 nm でポジティブピークを示したことから、ハイブリッド 1 型 G4 構造を形成していることが示された。また、アデニンを 1 か所ずつメチル化した結果も 260 nm 及び 290 nm 付近でポジティブピークを示したことから、ハイブリッド 1 型 G4 構造を形成していることが示された。次に、熱安定性を測定した結果、15 番目のアデニンをメチル化するとその融解温度(Melting temperature: T_m)が 2.2°C上昇、21 番目のアデニンをメチル化すると 1.5°C上昇することが示された(Table 1)。つまり、K⁺存在下でハイブリッド 1 型 G4 構造を形成する DNA 配列の 15 番目のアデニン及び 21 番目のアデニンをメチル化すると、安定化することが示された。

Table 1. メチル化アデニンにより変化した T_m 値

	ΔT_m (°C)
methylated adenine 3	-0.2
methylated adenine 9	0.1
methylated adenine 15	2.2
methylated adenine 21	1.5

4. 結論

ハイブリッド 1 型 G4 構造を形成する DNA 配列はアデニンを 1 か所ずつメチル化してもハイブリッド 1 型 G4 構造を形成することが示された。また、15 番目のアデニン及び 21 番目のアデニンをメチル化すると G4 構造が安定化することが示された。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。