

GGA 反復配列を介したがん遺伝子転写制御機構の解析

Analysis of transcriptional regulation mechanism in oncogene by GGA triplet repeat

岩崎 優果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 : G-quadruplex, GGA リピート, N⁶-メチルアデニン, CD スペクトル

1. 背景・目的

DNA はアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の塩基を含むヌクレオチドが連なった高分子ポリマーである。ヒトゲノム DNA は約 30 億塩基対で構成されており、その配列は 2003 年に解読された。その結果、ヒトゲノム DNA には約 20,000 個の遺伝子が含まれることが明らかになった。また、様々な特徴を持つことが明らかになっており、その特徴の一つに特定の 3 塩基が繰り返された配列(トリプレットリピート)が多数含まれていることが報告されている。これらトリプレットリピートの異常は筋緊張性ジストロフィーなどの疾患と関連しており、トリプレットリピートの機能を解析することが求められている。

GGA が 4 回繰り返されたトリプレットリピート (GGA)₄ はヒトゲノム DNA 中に 18,483 箇所含まれている。(GGA)₄ は G が平面上に 4 つ並んだ G:G:G:G tetrad と、4 つの G と 3 つの A が平面上に並んだ G(:A):G(:A):G(:A):G heptad を含む特殊な構造が二量体を形成することで Tetrad:heptad:heptad:tetrad G-quadruplex (T:H:H:T G4) 構造を形成することが報告されている (Figure 1)。

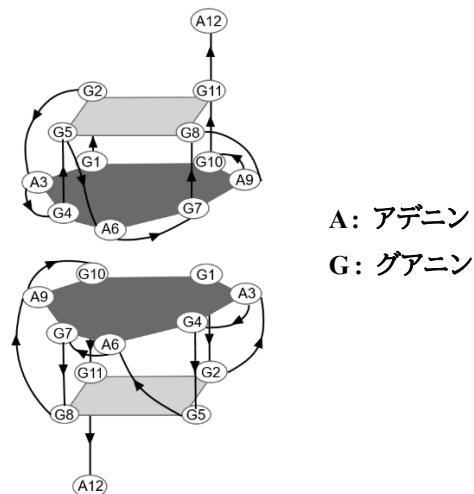


Figure 1 T:H:H:T G4 構造 (GGA)₄ は、上下のそれぞれのユニットがスタッキング相互作用により二量体化している特殊な G4 構造を形成している。

本研究室ではこれまでに cyclin B1 interacting protein 1 (*Ccnb1ip1*) のエンハンサー領域中に GGA トリプレットリピートが含まれることを報告している。さらに、この GGA トリプレットリピートが T:H:H:T G4 構造を形成すると *Ccnb1ip1* の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。また、がん遺伝子である *c-Myb* のプロモーター領域中にも T:H:H:T G4 構造を形成する GGA トリプレットリピートが含まれており、これが *c-Myb* の転写制御に関連していることが報告されている。つまり、T:H:H:T G4 構造形成を制御する因子を明らかにすれば、GGA トリプレットリピートを介した新たな

がん発生機構を解明できると考えられる。

そこで本研究では T:H:H:T G4 構造形成を制御する因子として N^6 -メチルアデニンに着目した。 N^6 -メチルアデニンとはアデニンの 6 位の窒素がメチル化された修飾塩基であり、近年、真核生物のゲノム DNA に N^6 -メチルアデニンが含まれることが明らかになった(Figure 2)。アデニンがメチル化されると、チミンとの塩基対形成が阻害されるため、二重らせん構造が不安定化すること、メチル基は電子供与体であるため近傍の塩基とのスタッキング相互作用が強くなることが知られている。つまり、T:H:H:T G4 構造中のアデニンをメチル化すると、その G4 構造形成に影響を与えるのではないかと考えた。そこで、本研究では(GGA)₄ のアデニンをメチル化し、その構造を解析することを目的とした。

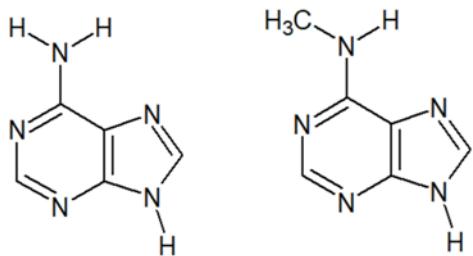


Figure 2 アデニン(左)と N^6 -メチルアデニン(右)

2. 方法

T:H:H:T G4 構造を形成する DNA(5'-(GGA)₄-3') 及びこの DNA のアデニンをそれぞれ 1 か所ずつメチル化した DNA を化学合成した。T:H:H:T G4 構造を形成する核酸は 262 nm にポジティブピークを持つ特有の円二色性(Circular Dichroism: CD)スペクトルを示す。そこで、100 mM K⁺存在下において、合成した DNA の CD スペクトルを測定し、T:H:H:T G4 構造を形成するか検討した。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、そのスペクトルから T:H:H:T G4 構造の熱安定性を解析した。

3. 結果

100 mM K⁺存在下において、非メチル化(GGA)₄ は 262 nm 付近にポジティブピークを示したことから T:H:H:T G4 構造を形成していることが示された。また、6 番目、9 番目、12 番目のアデニンをメチル化した(GGA)₄ も 262 nm 付近にポジティブピークを示したことから、T:H:H:T G4 構造を形成していることが示された。一方、3 番目のアデニンをメチル化した(GGA)₄ は T:H:H:T G4 構造特有の CD スペクトルを示さなかった。つまり、3 番目のアデニンをメチル化すると(GGA)₄ は T:H:H:T G4 構造を形成しないことが示された。3 番目のアデニンのメチル化部分は T:H:H:T G4 構造のダイマー界面に位置していることから、メチル化により立体障害が生じ、二量体形成を阻害することが示唆された。

次に、6 番目、9 番目、12 番目のアデニンをメチル化した(GGA)₄ が形成する T:H:H:T G4 構造の熱安定性を解析した。その結果、6 番目のアデニンをメチル化しても融解温度(Melting temperature: T_m) は変化しなかったが、9 番目のアデニンをメチル化すると T_m 値が 4.5°C、12 番目のアデニンをメチル化すると T_m 値が 3.4°C 上昇することが示された。以上の結果より、(GGA)₄ の 9 番目または 12 番目のアデニンをメチル化すると T:H:H:T G4 構造の熱安定性が上昇することが示された。

4. 結論

(GGA)₄ の 9 番目または 12 番目のアデニンをメチル化すると T:H:H:T G4 構造の熱安定性が上昇することが示された。一方、(GGA)₄ の 3 番目のアデニンをメチル化すると T:H:H:T G4 構造形成が阻害されることが示された。つまり、アデニンのメチル化部位に依存して、T:H:H:T G4 構造形成が制御されていることが示された。今後、アデニンのメチル化を介した T:H:H:T G4 構造形成制御機構が解明されれば、GGA トリプレットリピートを介した新たながん発生機構の解明が期待される。