

# ヒトゲノム DNA の末端構造を標的とした抗がん剤の開発

## Development of anticancer drugs targeting the end structure of human genomic DNA

木村 洋介<sup>1)</sup>

指導教員 吉田 亘<sup>1), 2)</sup>

- 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 : i-motif, 四重鎖構造, テロメア,  $N^6$ -メチルアデニン, CD スペクトル

### 1. 背景・目的

生物の遺伝情報はゲノム DNA に保持されており、DNA は A(アデニン)・T(チミン)・C(シトシン)・G(グアニン)で構成されている。真核生物の染色体末端はテロメアと呼ばれ、ゲノム DNA の末端を保護する役割を持つ。ヒトテロメアの DNA 配列は 5'-TTAGGG-3' の反復配列で構成されている。正常な細胞ではゲノム DNA が複製されるごとに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引き起こされる。一方、がん細胞では短くなったテロメアを伸長するテロメラーゼが活発に働いているため、テロメアが短くならない。そのため、がん細胞では細胞死が引き起こされず、がん細胞は無限に増殖する (Fig.1)。

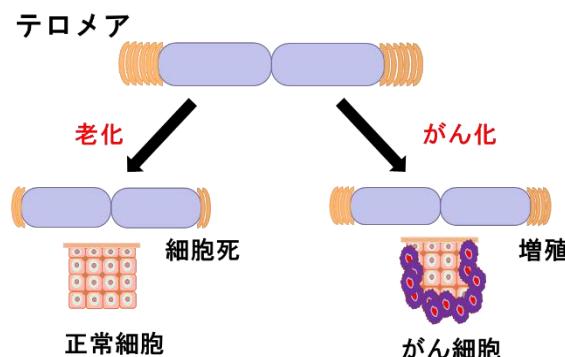


Fig. 1 ヒトテロメア構造

正常な細胞では、テロメアが一定の長さまで短くなると細胞死を引き起こす。がん細胞では、短くなったテロメアを伸長するテロメラーゼが活発に働いているため、細胞死が引き起こされず、がん細胞が無限に増殖する。

ヒトテロメアではグアニンが多く含まれる鎖でグアニン四重鎖構造 (G-quadruplex : G4) が形成される。G4 構造とは 4 つのグアニンによって形成される平面構造が折り重なってできた核酸の構造のことである。テロメア領域中で安定な G4 構造が形成されるとテロメラーゼによる伸長反応を阻害することから、G4 構造は抗がん剤のターゲットとして注目されている。本研究室ではテロメア G4 構造中のアデニンをメチル化すると、その熱安定性が上昇することを明らかにしている。つまり、ゲノム編集技術を改良し、ヒトテロメア領域をメチル化する分子を開発すれば、それが新たな抗がん剤となることが期待される。

一方、ヒトテロメアの G4 構造を形成する鎖の相補鎖はシトシンが豊富な配列であり、そこで intercalated motif (i-motif: iM) が形成される (Fig.2)。iM 構造とはシトシンとプロトン化 ( $H^+$ ) したシトシンが塩基対を形成することによりつくられる核酸の構造である。ヒトテロメア領域をメチル化する分子を用いてヒトテロメア領域をメチル化するとヒトテロメア G4 構造中のアデニンだけでなく、ヒトテロメア iM 構造中のアデニンもメチル化されることが想定される。つまり、ヒトテロメア G4 構造と同様に、メチル化アデニンが iM 構造形成に与える影響を明らかにする必要がある。

そこで、本研究ではアデニンをメチル化したヒ

ヒトテロメア iM 構造の熱安定性解析を目的とした。

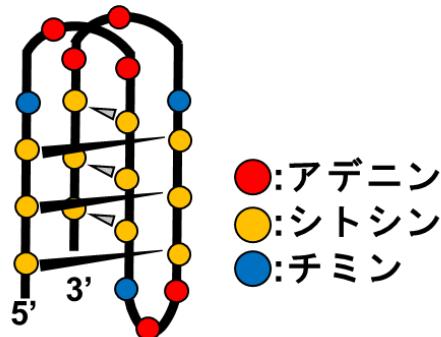


Fig. 3 ヒトテロメア iM 構造

シトシンとプロトン化( $H^+$ )したシトシンが塩基対を形成することによりつくられる。

## 2. 方法

ヒトテロメア iM 構造形成 DNA と、ヒトテロメア i-motif 構造形成 DNA 中のアデニンをそれぞれメチル化した DNA を化学合成した(Table.)。

Table. ヒトテロメア iM 構造形成 DNA

Name	Sequence (5' to 3')
Unmethylated	CCCTAACCTAACCTAACCT
A5 methylated	CCCT <sup>6m</sup> AACCTAACCTAACCT
A6 methylated	CCCTA <sup>6m</sup> ACCCTAACCTAACCT
A11 methylated	CCCTAACCC <sup>6m</sup> ACCCTAACCT
A12 methylated	CCCTAACCTAAC <sup>6m</sup> CCCTAACCT
A17 methylated	CCCTAACCC <sup>6m</sup> CTAACCC <sup>6m</sup> ACCCT
A18 methylated	CCCTAACCC <sup>6m</sup> CTAACCC <sup>6m</sup> ACCCT

<sup>6m</sup>A : N<sup>6</sup> メチルアデニン

ヒトテロメア iM 構造の熱安定性を解析する方法として円二色性(circular dichroism: CD)測定法を用いた。iM 構造は 288 nm 付近にポジティブピークを 260 nm 付近にネガティブピークを持つ CD スペクトルを示す(Fig.3)。つまり、25°C から 95°C まで 1°C ずつ温度を上昇させながら CD スペクトルを測定することで、各温度における 288 nm の CD 値より、iM 構造の熱安定性解析が可能である。

iM 構造は酸性条件下で形成されるため、本研究ではリン酸水素ナトリウム緩衝液(pH 5.3)を用い、非メチル化ヒトテロメア iM 構造とメチル化ヒトテロメア iM 構造の CD スペクトルを 25°C から

95°C まで 1°C ずつ温度を上昇させながら測定した。

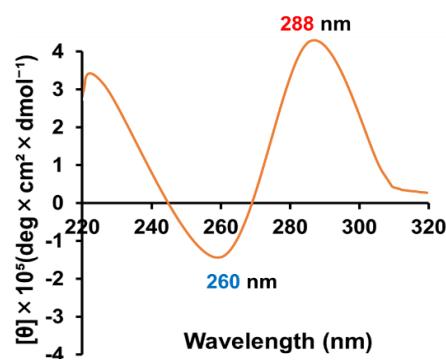


Fig. 2 iM 構造の CD スペクトル

iM 構造は、288 nm にポジティブピーク、260 nm にネガティブピークの CD スペクトルを示す。

## 3. 結果

リン酸水素ナトリウム緩衝液(pH 5.3)下における非メチル化及びそれぞれのアデニンをメチル化したヒトテロメア iM 構造形成 DNA は iM 構造特有の CD スペクトルを示した。つまり、ヒトテロメア iM 構造のアデニンをメチル化しても、そのトポロジーに変化を与えないことが示された。287 nm の CD 値を用い、非メチル化及びそれぞれのアデニンをメチル化したヒトテロメア iM 構造の融解温度(Melting temperature:  $T_m$ )を解析した。その結果、それぞれのアデニンをメチル化したヒトテロメア iM 構造の  $T_m$  値は非メチル化 iM 構造の  $T_m$  値と同等であった。つまり、ヒトテロメア iM 構造中のアデニンをメチル化してもその熱安定性に影響を与えないことが示された。

## 4. 結論

ヒトテロメア iM 構造中のアデニンをメチル化しても、そのトポロジーと熱安定性に影響を与えないことが示された。つまり、ヒトテロメア領域をメチル化すると、ヒトテロメア iM 構造形成には影響を与えないが、ヒトテロメア G4 構造の熱安定性を上昇させることが示された。そのため、ヒトテロメア領域をメチル化する分子を用いればヒトテロメア G4 構造を特異的に安定化させることが可能であり、この分子は新たな抗がん剤としての利用が期待される。