

DNA メチル化が核酸高次構造に与える影響の解析

Effect of DNA methylation on DNA secondary structure formation

武藤 博弥¹⁾

指導教員 吉田 亘^{1),2)}

- 1) 東京工科大学院 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：グアニン四重鎖構造、二重らせん構造、DNA メチル化、VEGF

1. 背景・目的

ゲノム DNA はアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) の 4 種類の塩基から構成されている。さらに、ヒトゲノム DNA には 5-メチルシトシンや 5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ホルミルシトシン、5-カルボキシルシトシンなど様々な修飾塩基が含まれていることが明らかになっている。これらのうち、最も解析されている修飾塩基は 5-メチルシトシンである。シトシンとグアニンが連続している配列は CpG 配列と呼ばれる。CpG のシトシンは CpG メチル化酵素によりメチル化され、5-メチルシトシンとなる (Fig. 1)。CpG 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から、5-メチルシトシンは遺伝子発現を制御するスイッチとして機能している。

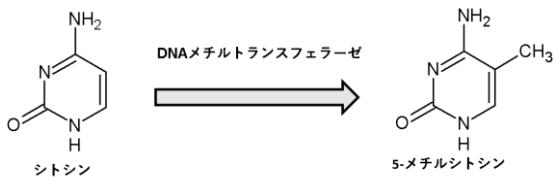


Fig. 1 シトシンのメチル化反応

遺伝子の発現は CpG のメチル化だけでなく、DNA の高次構造形成によっても制御されている。

DNA は細胞内で通常二重らせん構造を形成しているが、グアニン塩基が豊富に含まれる領域ではグアニン四重鎖構造 (G-quadruplex : G4) が形成される。グアニン四重鎖構造は Na^+ や K^+ が中心に配位した 4 つのグアニン間で形成される平面構造が積み重なってできる核酸の高次構造である (Fig. 2)。ヒトゲノム DNA 中ではテロメア領域や多くのプロモーター領域に G4 構造形成配列が含まれている。プロモーター中で G4 構造が形成されると、その遺伝子の発現量が変化する。しかし、二重らせん構造から G4 構造形成を誘起する因子は不明である。

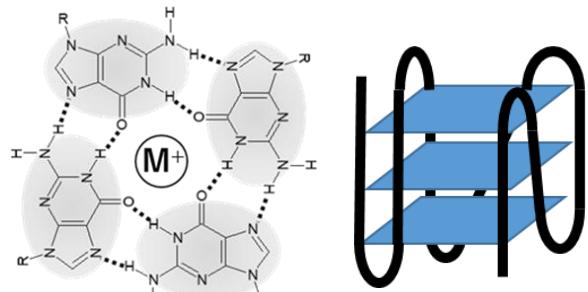


Fig. 2 グアニン四重鎖構造

これまでに、本研究室では VEGF プロモーター中で形成される G4 構造は 11 番目のシトシン (C11) 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た。そのため、VEGF プロモーターは

メチル化されていない場合は、二重らせん構造を形成し、メチル化されている場合は G4 構造を形成するのではないかと考えた。つまり、CpG メチル化が二重らせん構造から G4 構造形成を誘起する因子であると想定した (Fig. 3)。そこで、本研究では CpG メチル化により、二重らせん構造から VEGF G4 構造形成が誘起されるかを検討することを目的とした。

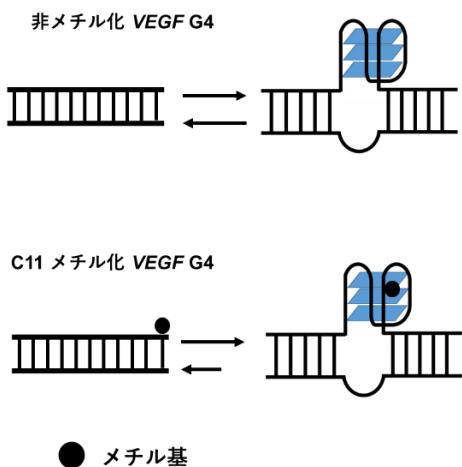


Fig. 3 CpG メチル化が VEGF G4 構造形成に与える影響

2. 方法

本研究では 5' 末端に蛍光を発する Fluorescein (FAM)を、3'末端にその蛍光を消光させる Black Hole Quencher 1 (BHQ-1)を修飾させた VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドを用いれば、メチル化により G4 構造形成が誘起されるか解析できると想定した。これが G4 構造を形成している場合は、5'末端と 3'末端の距離が近くなるため、FAM の蛍光が BHQ-1 により消光される。一方、これが相補鎖配列とハイブリダイゼーションし、二重らせん構造を形成する場合は、5'末端と 3'末端の距離が大きくなるため、FAM の蛍光が観察される (Fig. 4)。つまり、FAM の蛍光強度を指標に、VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドが G4 構造を形成しているか、二重らせん構造を形成しているか解析できると想定した。

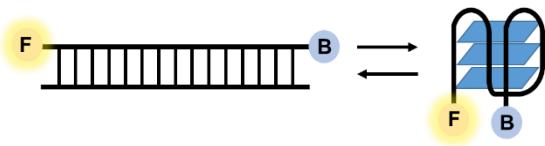


Fig. 4 本研究で用いた核酸が形成する高次構造解析原理

FAM と BHQ-1 を修飾した VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドとその相補鎖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、かつ C11 をメチル化した VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドも化学合成した。VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドと相補鎖オリゴヌクレオチドを 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ 中で混合し、ハイブリダイゼーションさせたのちに、FAM の蛍光強度を測定した。

3. 結果

非メチル化 VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドと比較し、C11 メチル化 VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドの蛍光強度の方が低かった。G4 構造が形成されている場合は、FAM と BHQ-1 が近接するため低い蛍光強度が観察される。つまり、C11 をメチル化すると VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドは二重らせん構造ではなく、G4 構造を優位に形成することが示された。

4. 結論

CpG メチル化によって VEGF G4 構造が安定するため、二重らせん構造から G4 構造形成が誘起されることが示された。今後、細胞内においてメチル化 VEGF G4 構造の転写に与える影響を解析すれば、メチル化 G4 構造による新たな遺伝子発現制御機構が解明されることが期待される。