

メチル化 *VEGF* グアニン四重鎖の熱安定性解析

Thermal stability analysis of methylated *VEGF* G-quadruplex structure

ラダチョト サワラク
指導教員 吉田 亘

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

キーワード： DNA メチル化, グアニン四重鎖, 熱安定性

1. 背景・目的

本研究では、DNA メチル化により *VEGF* G4 構造の熱安定性を解析することを目的とした。DNA メチル化とは、ゲノム中の CpG 領域のシトシン塩基にメチル基が付加する反応であり、プロモーター中の CpG 領域がメチル化されるとその遺伝子の発現は抑制される。

一方、グアニン四重鎖(G4)とはグアニンに富んだ配列が4つのグアニン塩基で平面構造を形成し、それが二つ以上重なり合っできる核酸の高次構造である。平面構造内部には陽イオンが存在し、G4 の安定化能はその陽イオンの種類と濃度に依存する。イオンの種類と配列により、トポロジーが変化することが報告されている。つまり、イオンの種類に依存して G4 のトポロジーが変われば、転写制御に影響を与えられとされる。円二色性(circular dichroism: CD)測定法により、G4 はストランドの向きによって、parallel 構造、antiparallel 構造、mix/hybrid 構造が存在する(Fig. 1)。parallel 構造は 260 nm 付近にポジティブピークを示す。antiparallel 構造は 240 nm 付近にポジティブピークを示す。そして mix/hybrid 構造は 260 nm 付近及び 290 nm 付近にポジティブピークを示すことが報告されている。

これまでに *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor), *RET* (REarranged during Transfection)遺伝子領域中の DNA 四重鎖はメチル化されると、定量 PCR の結果は伸長反応が阻害されることが報告されている。つまり、*VEGF* と *RET* G4 はメチル化さ

れるとその G4 構造が安定化することが示唆された。この時の定量 PCR 溶液には Na^+ と Mg^{2+} が含まれている。そこで、本研究では CD 測定法により、メチル化 *VEGF* G4 の熱安定性を解析することを目的とした。

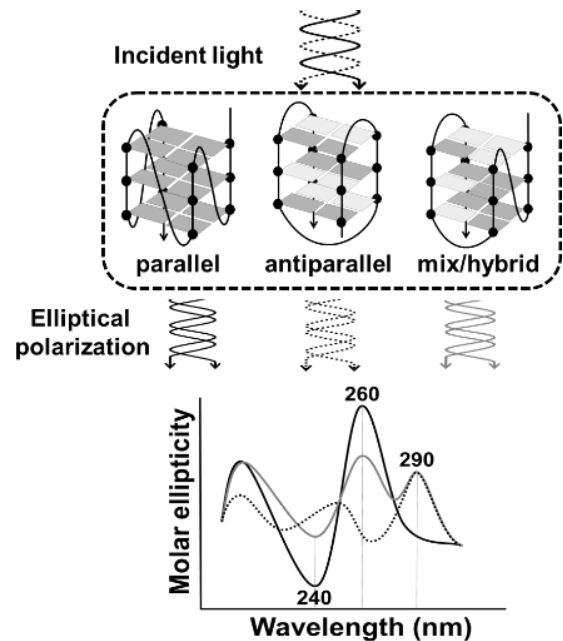


Fig.1 CD 測定法による G4 構造解析

2. 方法

VEGF G4 形成配列中には 4 つの CpG が含まれる(Table)。そこで、それぞれの CpG 領域をメチル化した DNA 及びすべての CpG をメチル化した DNA を化学合成した。この DNA を使って、実験をした。

Table 1 VEGF G4 を形成するオリゴヌクレオチド

Name	Sequence (5' to 3')
Unmethylated	CGGGGCGGGCCGGGGCGGGG
Fully methylated	^{5m} CGGGG ^{5m} CGGGC ^{5m} CGGGG ^{5m} CGGGG
C1 methylated	^{5m} CGGGGCGGGCCGGGGCGGGG
C6 methylated	CGGGG ^{5m} CGGGCCGGGGCGGGG
C11 methylated	CGGGGCGGGC ^{5m} CGGGGCGGGG
C17 methylated	CGGGGCGGGCCGGGG ^{5m} CGGGG

^{5m}: メチル化

1. Na⁺と Mg²⁺存在下の条件

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM NaCl + 2 mM MgCl₂ 存在下において、各 DNA サンプルを調製し、Folding (95°C 3 min, 95°C → 25°C 30 min) をかけた。その後、25°C から 95°C まで測定温度を上昇させながら、CD スペクトルを測定した。CD 値を用い、 T_m 値を算出した。25°C の CD 値を 100%、95°C における CD 値を 0% としてノーマライズし、50% にあたる温度は T_m 値を呼ぶ。

2. Na⁺存在下の条件

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM NaCl 存在下において、各 DNA サンプルを調製した。その後、方法 1 と同様に実験を行った。

3. K⁺存在下の条件

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM KCl 存在下において、各 DNA サンプルを調製した。その後、方法 1 と同様に実験を行った。

3. 結果

1. Na⁺と Mg²⁺存在下の条件

20 mM NaCl + 2 mM MgCl₂ 存在下で各 DNA の CD スペクトルの結果は 263 nm にポジティブピークを示したことから、parallel 構造を形成することが示された (Table 2)。また、263 nm の CD 値から T_m 値を解析した結果、C11 をメチル化すると VEGF G4 構造の熱安定性が上昇することが示された (Table 3)。

Table 2 各イオン条件における VEGF G4 構造形成

Condition of ion	Topology
20 mM NaCl + 2 mM MgCl ₂	parallel
20 mM NaCl	mix/hybrid
20 mM KCl	parallel

2. Na⁺存在下の条件

20 mM NaCl 存在下で各 DNA の CD スペクトルの結果は 263 nm と 290 nm にポジティブピークを示したことから、mix/hybrid 構造を形成することが示された (Table 2)。290 nm の CD 値から T_m 値を解析した結果、全てのシトシンをメチル化すると VEGF G4 構造の熱安定性が上昇することが示された。

3. K⁺存在下の条件

20 mM KCl 存在下で各 DNA の CD スペクトルの結果は 263 nm にポジティブピークを示したことから、parallel 構造を形成することが示された (Table 2)。また、263 nm の CD 値から T_m 値を解析した結果、C1 または C11 をメチル化すると VEGF G4 構造の熱安定性が上昇することが示された。

Table 3 Na⁺と Mg²⁺存在下の VEGF G4 の T_m 値

Name	$T_m \pm SD$ (°C)
Unmethylated	68.1 ± 1.0
Fully methylated	73.8 ± 0.9
C1 methylated	68.7 ± 1.2
C6 methylated	69.0 ± 0.4
C11 methylated	74.0 ± 0.4
C17 methylated	68.2 ± 0.8

4. 結論

20 mM NaCl + 2 mM MgCl₂ 存在下において、C11 をメチル化すると VEGF G4 構造の熱安定性が上昇することが示された。20 mM KCl 存在下において、C1 または C11 をメチル化すると VEGF G4 構造の熱安定性が上昇することが示された。