

CpG メチル化によるグアニン四重鎖構造形成制御機構の解析

Regulation of G-quadruplex structures formation by CpG methylation

原島 慎大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 : CpG メチル化, グアニン四重鎖構造, 二重らせん構造, *c-kit*

1. 背景・目的

生物の遺伝情報はゲノム DNA 中に含まれており、ゲノム DNA はアデニン、チミン、グアニン、シトシンの 4 種類の塩基から構成されている。ゲノム DNA 中で、シトシンとグアニンが連続して存在する CpG 配列では、シトシンの 5 位の炭素が CpG メチル化酵素によりメチル化されることがある。プロモーター領域の CpG がメチル化されると、その遺伝子の発現が抑制されることから、CpG のメチル化は遺伝子発現を制御するスイッチとして機能している。

ゲノム DNA は通常二重らせん構造を形成するが、グアニンが豊富に存在する領域では、二本鎖 DNA が一本鎖 DNA に解離し、その一本鎖 DNA でグアニン四重鎖(G-quadruplex : G4)構造が形成されることが報告されている。G4 構造とは、ナトリウムイオンやカリウムイオンが中心に配位した 4 つのグアニン間で形成される平面構造が複数重なり合っている核酸の高次構造である(Fig. 1)。ヒトゲノム DNA 中には 70 万箇所以上の G4 構造形成配列が含まれており、G4 構造形成により、転写など種々の生命現象が制御されている。しかし、二重らせん構造から G4 構造形成を誘起する機構は不明である。

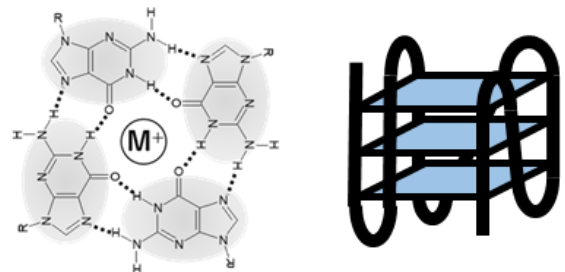


Fig. 1 G4 構造の平面図(左)と G4 構造(右)

チロシンキナーゼレセプターをコードする *c-kit* のプロモーターにおいて G4 構造形成配列が同定されている。本研究室では、*c-kit* G4 構造は 1 番目のシトシン(C1)をメチル化すると、その熱安定性が低下し、5 番目のシトシン(C5)をメチル化すると、その熱安定性が上昇することを報告している。この結果から、*c-kit* プロモーターでは C5 をメチル化すると、二重らせん構造から G4 構造形成が誘起され、C1 をメチル化すると G4 構造から二重らせん構造形成が誘起されることが示唆された(Fig. 2)。

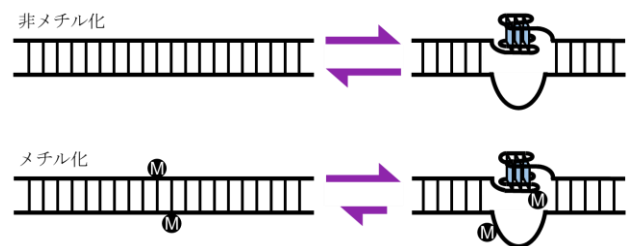


Fig. 2 CpG メチル化による G4 構造形成と二重らせん構造形成の平衡状態の変化

そこで、本研究では *c-kit* プロモーター中の G4 構造形成が CpG メチル化により制御されているか解析することを目的とした。その解析方法を Fig. 3 に示す。*c-kit* G4 構造形成オリゴヌクレオチドとその相補鎖配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成する。その際に、*c-kit* G4 構造形成オリゴヌクレオチドの 5' 端に蛍光色素 Fluorescein (FAM) を、3' 端に消光剤 Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) を修飾する。*c-kit* G4 構造形成オリゴヌクレオチドと相補鎖配列を持つオリゴヌクレオチドが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、FAM と BHQ-1 の距離が離れるため、FAM の蛍光が観察される。一方、*c-kit* G4 構造形成オリゴヌクレオチドが G4 構造を形成する場合は、FAM と BHQ-1 の距離が近接するため、FAM の蛍光が BHQ-1 により消光され、蛍光が観察されない。つまり、これらオリゴヌクレオチドを用い、FAM の蛍光強度を測定することによって、二重らせん構造が形成されているか、G4 構造が形成されているか解析することが可能となる。そこで、*c-kit* G4 構造形成オリゴヌクレオチドの C1 もしくは C5 をメチル化したオリゴヌクレオチドを合成し、その相補鎖配列存在下における蛍光強度を測定することを試みた。

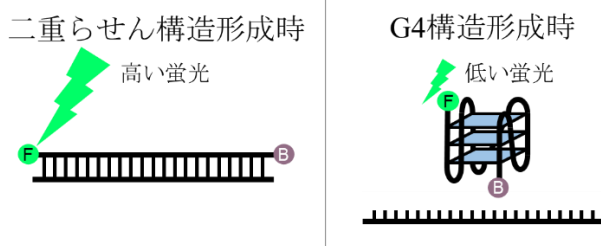


Fig. 3 想定される二重らせん構造形成時
または G4 構造形成時における蛍光強度

2. 方法

c-kit G4 構造形成配列の 5' 端に FAM を 3' 端に BHQ-1 を修飾させたオリゴヌクレオチドと、その相補鎖配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。さらに、FAM と BHQ-1 を修飾した *c-kit* G4 構造形成オリゴヌクレオチドの C1 または C5 をメチル化したオリゴヌクレオチドも化学合成した。

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ 存在下で非メチル化、C1 メチル化または C5 メチル化 *c-kit* 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等モル量混合した。調製した溶液を 95°C で 3 分間加熱したのちに 30 分間かけて 25°C に冷却させた。その後、FAM の蛍光強度 (励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm) を測定した。

3. 結果

非メチル化 *c-kit* G4 構造形成オリゴヌクレオチドを用いた場合と比較し、C1 をメチル化させたオリゴヌクレオチドを用いた方が FAM の蛍光強度が高く、C5 をメチル化させたオリゴヌクレオチドを用いた方が FAM の蛍光強度が低かった。二重らせん構造が形成されている場合は、FAM の蛍光強度が高く、G4 構造が形成されている場合は FAM の蛍光強度が低くなることが想定される。そのため、C1 をメチル化すると *c-kit* G4 構造が不安定するため、二重らせん構造形成が誘起され、C5 をメチル化すると *c-kit* G4 構造が安定化するため、G4 構造形成が誘起されることが示された。

4. 結論

c-kit プロモーター中には G4 構造形成配列が含まれるが、その G4 構造形成配列の C5 をメチル化すると、二重らせん構造から G4 構造形成が誘起され、C1 をメチル化すると G4 構造から二重らせん構造形成が誘起されることが示された。プロモーター中で形成される G4 構造はその遺伝子の発現制御に関連している。今後、細胞内において、メチル化により *c-kit* G4 構造形成が制御されていることが示されれば、メチル化 G4 構造を介した新たな転写制御機構が解明される。