

メチル化と酸化が *VEGF* グアニン四重鎖構造形成に与える影響

Effect of DNA methylation and oxidation on *VEGF* G-quadruplex structure formation

池田 優乃¹⁾

指導教員 吉田 亘^{1),2)}

1) 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、8-オキソグアニン、DNA メチル化、*VEGF*

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 はアデニン(Adenine: A)、チミン(Thymine: T)、グアニン(Guanine: G)、シトシン(Cytosine: C)の4種類の塩基から構成されている。ヒトゲノム DNA には約2万個の遺伝子が含まれており、遺伝子の発現はCG配列中のCのメチル化によって制御されている(Fig. 1a)。CGがメチル化されている場合はその遺伝子の発現は抑制されるが、メチル化されていない場合はその遺伝子は発現する。

転写や複製などの生命現象の制御にDNAの高級構造が関連することが報告されている。グアニン四重鎖構造(G-quadruplex: G4)とは4つのGが水素結合を介して形成する平面構造が複数重なって形成される四重鎖構造であり、ヒトゲノム DNA にはG4構造を形成する配列が約70万箇所含まれている(Fig. 2)。しかし、通常DNAは二重らせん構造を形成するため、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。つまり、G4構造形成を誘起する機構を解明すれば、それを介した生命現象を制御する新たな機構を提唱することができると考えた。

ゲノム DNA は呼吸の過程で発生する活性酸素によって酸化され、がん化や細胞死の原因になる。最も酸化されやすい塩基はGであり、Gが酸化されることで8-オキソグアニン(8-oxoG)が生じる(Fig. 1b)。*VEGF* (Vascular endothelial growth factor)のプロモーターに存在するG4構造はG4構造中のGが酸化されると、その熱安定性が低下すること

が報告されている。一方、本研究室では*VEGF* G4構造中のCGのC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。そこで、本研究では*VEGF* G4のGを酸化し、かつCGをメチル化したDNAを合成し、酸化とメチル化が*VEGF* G4形成に与える影響を解析することを目的とした。

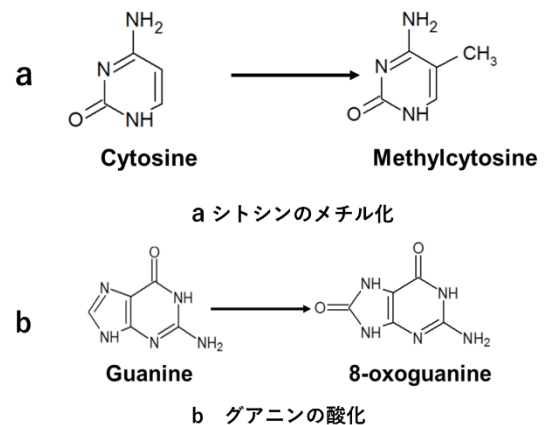


Fig. 1 シトシンのメチル化とグアニンの酸化

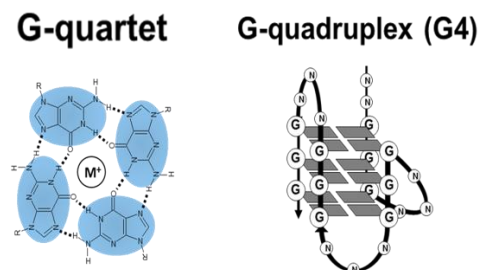


Fig. 2 グアニン四重鎖構造

2. 方法

VEGF G4 構造形成 DNA、*VEGF* G4 構造形成 DNA 中のシトシンをメチル化した DNA、*VEGF* G4 構造形成 DNA 中のグアニンを酸化した DNA、および *VEGF* G4 構造形成 DNA 中のシトシンをメチル化しグアニンを酸化した DNA の以上 4 種類の DNA を化学合成した(Table)。

Table 化学合成した DNA

Name	Sequence (5' to 3')
Unmethylated	CGGGGCGGGCCGGGGGCGGGG
C11 methylated	CGGGGCGGGC ^{5m} CGGGGCGGGG
G14 oxidized	CGGGGCGGGCCGG ^{8o} GGCGGGG
G14oxidized C11 methylated	CGGGGCGGGC ^{5m} GGG ^{8o} GGCGGGG

5m: メチル化
8o: 酸化

VEGF G4 構造の熱安定性は円二色性(circular dichroism: CD)測定法により解析した。*VEGF* G4 構造は 260 nm 付近にポジ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 スペクトルを測定し、各温度における 260 nm の CD 値より、G4 構造の熱安定性解析が可能である。熱安定性は CD 値をもとに算出した熱融解温度(Melting temperature: T_m)により評価した。 T_m 値は 25°C の CD 値を 100%、95°C における CD 値を 0% として標準化した場合、標準化した CD 値が 50% のときの温度として算出される。そのため、 T_m 値が高いほど熱安定性は高く、 T_m 値が低いほど熱安定性は低いと評価できる。

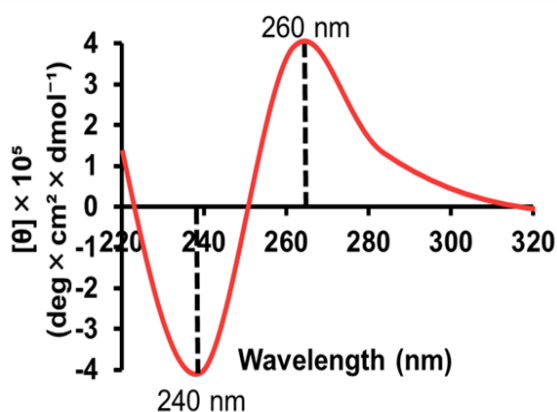


Fig. 3 *VEGF* G4 構造の CD スペクトル

本研究では 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 の条件で table に示した 4 種類の *VEGF* G4 構造をもつ DNA の CD スペクトルを 25°C から 95°C まで 1°C ずつ上昇させながら測定し、 T_m 値を算出した。

3. 結果

50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 条件下において、4 種類の *VEGF* G4 構造形成 DNA は G4 構造特有の CD スペクトルを示した。つまり、これらは G4 構造を形成していることが示された。261 nm の CD 値を用い、非メチル化、C11 メチル化 *VEGF* G4 構造、G14 酸化 *VEGF* G4 構造、および C11 メチル化 G14 酸化 *VEGF* G4 構造の熱安定性を解析した。その結果、G14 を酸化すると *VEGF* G4 構造の熱安定性が低下することが示された。さらに、C11 をメチル化すると、G14 を酸化した *VEGF* G4 構造の熱安定性が上昇することが示された。つまり、8-oxoG を含む *VEGF* G4 構造もシトシンのメチル化によって熱安定性が上昇することが示された。

4. 結論

シトシンのメチル化は、酸化された *VEGF* G4 構造の熱安定性を上昇させることが示された。この結果は、8-oxoG が含まれる *VEGF* G4 構造形成配列中のシトシンがメチル化されると G4 構造形成を誘起することを示唆している。細胞内では、8-oxoG は塩基除去修復機構により G へと修復される。しかし、*VEGF* G4 構造形成配列中の 8-oxoG は、それが G4 構造を形成すると塩基除去修復機構により G へと修復されないことが報告されている。つまり、メチル化により *VEGF* G4 構造形成が誘起されると、*VEGF* G4 構造中の 8-oxoG が修復されないことが示唆される。今後、細胞内における詳細な解析を行うことにより、8-oxoG の修復機構におけるメチル化の影響が明らかになると期待される。