

メチル化グアニン四重鎖構造を介した転写制御機構の解明

Elucidation of transcriptional regulation via methylated G-quadruplex structure

武藤 博弥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：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

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が、ヒトゲノム DNA には 5-メチルシトシンなど様々な修飾塩基が含まれている。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、CpG 配列中のシトシンは DNA メチルトランスフェラーゼによりメチル化され、5-メチルシトシンとなる。プロモーター中の CpG がメチル化されること、その遺伝子の発現が抑制される。そのため、CpG のメチル化は遺伝子発現のスイッチとして機能している。

細胞内では、通常ゲノム DNA は二重らせん構造を形成する。他方、グアニンが豊富に含まれる領域では核酸の高次構造であるグアニン四重鎖構造 (G-quadruplex : G4) が形成される。G4 構造とは 4 つのグアニンが形成する G カルテット平面が複数積み重なってできる高次構造である (Fig. 1)。

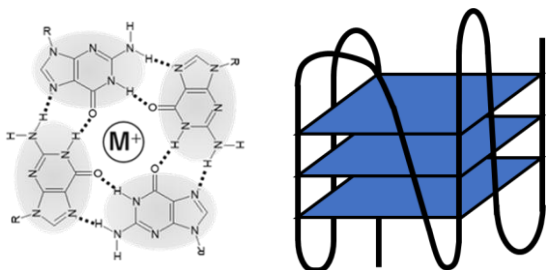


Fig. 1 G カルテット(左)とグアニン四重鎖(右)
4 つのグアニン塩基が水素結合を介して G カルテット構造を形成し、それが積み重なることでグアニン四重鎖構造が形成される。

ヒトゲノム DNA には約 70 万個の G4 構造形成配列が含まれており、多くのプロモーター領域にも G4 構造形成配列が含まれている。通常二重らせん構造を形成しているプロモーターにおいて、G4 構造が形成されると、その遺伝子の発現量が変化する (Fig. 2)。そのため、G4 構造形成が遺伝子の発現制御に関連していると考えられるが、二重らせん構造から G4 構造形成が誘起される機構は不明である。

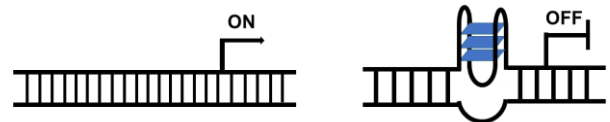


Fig. 2 G4 構造形成による遺伝子発現制御機構
ヒトゲノム DNA は通常二重らせん構造を形成するが、プロモーター中で G4 構造が形成されると、その遺伝子の発現は抑制される。

これまでに本研究室では血管内皮細胞増殖因子 (*VEGF*) 遺伝子中に含まれる G4 構造 (5' - CGGGCCGGGCCGGGGCCGGGG-3') 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報告している。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、二重らせん構造が形成され、メチル化されている場合は G4 構造が形成されると考えた。つまり、CpG メチル化が二重らせん構造から G4 構造形成が生じ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 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。

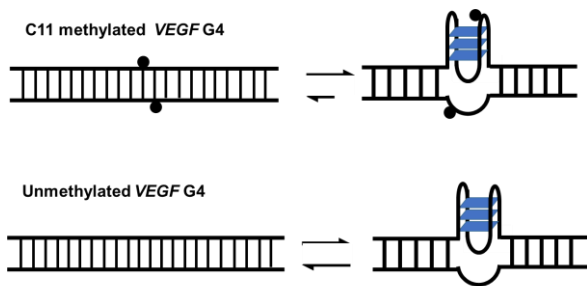


Fig. 3 CpG メチル化による G4 構造形成の影響

2. 方法

本研究では 5' 末端に蛍光色素である 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使用すれば、CpG メチル化により二重らせん構造から G4 構造が誘起されるか解析できると想定した。蛍光修飾された VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドがその相補鎖オリゴヌクレオチド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、FAM と BHQ-1 の距離が離れるため、蛍光が観察される。一方、蛍光修飾された VEGF 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 が近接するため、蛍光が消光される。つまり、この蛍光強度を指標に、C11 メチル化によって G4 構造が優位に形成されるか解析できると想定した (Fig. 4)。

FAM と BHQ-1 修飾メチル化もしくは非メチル化 VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドを終濃度が 500 nM になるように 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)、40 mM NaCl、2 mM MgCl₂、60 mM LiCl 中で調製した。その後、終濃度 500 nM の相補鎖オリゴヌクレオチドを VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドに添加し、30°C で FAM の蛍光強度を 1 分毎に 2 時間測定し、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のハイブリダイゼーション

を測定し、その速度を算出した。

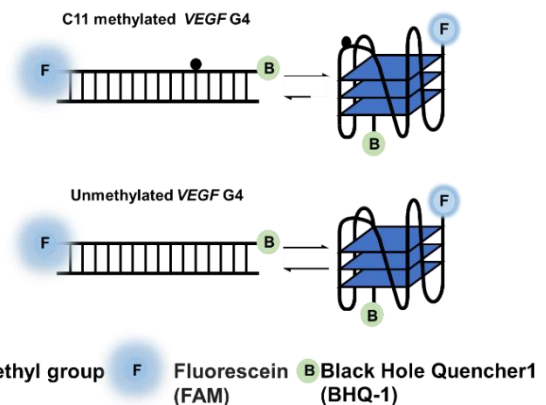


Fig. 4 本研究で用いた G4 構造形成を解析する手法 G4 構造が形成される場合は、FAM と BHQ-1 が近接するため、蛍光強度は低くなるが、二重らせん構造を形成する場合は FAM と BHQ-1 の距離が離れるため、蛍光強度は高くなる。

3. 結果

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がハイブリダイゼーションする速度を測定した結果、VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドの C11 をメチル化することにより、その速度が低下することが示された。つまり、VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドは C11 メチル化により、熱安定性が上昇し、その結果、相補鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションする速度が低下することが示された。

4. 結論

VEGF G4 構造形成オリゴヌクレオチドは CpG メチル化により、その相補鎖オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションする速度が低下することが示された。つまり、メチル化すると二重らせん構造より G4 構造が優位に形成されることが示唆された。今後、細胞内において、メチル化により VEGF G4 構造形成が誘起されることを示せば、メチル化 G4 構造を介した新たな転写制御機構が解明できると期待される。