

2P121

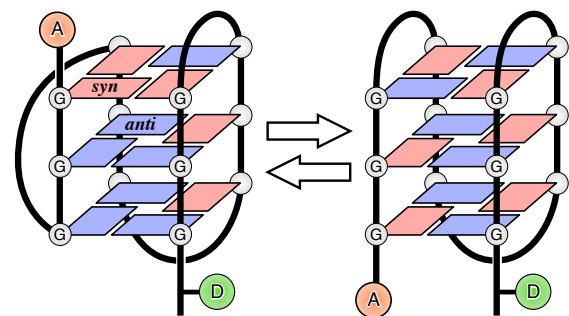
Br 修飾によるヒトテロメア DNA 立体構造変化の単一分子 FRET 計測

(京大院・理) ○岡本 憲二, 三戸 祐太, 真下 知子, 杉山 弘, 寺嶋 正秀

染色体末端には、遺伝情報を持たない単純な塩基配列が繰り返されている、テロメアと呼ばれる領域がある。テロメアは DNA が複製される度に短くなり、細胞の寿命を決定するはたらきを持っている。テロメラーゼと呼ばれる酵素はテロメアを伸長することで修復するはたらきを司り、正常な細胞内ではそのはたらきは抑制されているが、ガン細胞では活発にはたらくことが知られており、ガン細胞の異常増殖に寄与していると考えられている。健康な細胞でテロメラーゼの活動が抑制されるメカニズムは、抗ガン剤開発等への応用が期待できるとして興味を持たれている。

ヒトの場合、テロメアは [GGGTTA] を単位として繰り返す塩基配列を持ち、これまでの研究から、二重らせんではなく立体的な構造をとることでテロメラーゼの結合を阻害していることが知られている。立体構造についても研究は進んでおり、4本の [GGG] が平行に並び、4つのグアニンで構成される G-quartet 平面構造の3層構造からなる G-quadruplex 構造をとると考えられている。2006年には、生理条件に近い K⁺ 溶液中で安定に存在する

G-quadruplex 構造が3つのグループからそれぞれ独立に報告され[1-3]、“mixed-chair”構造と呼ばれている(図1)。しかし図中の“mixed-chair”以外の安定構造が存在することが示唆されており[4]、複数種の構造の間で平衡状態にあるとも考えられている。したがってそれらの混成比や構造変化ダイナミクスを明らかにすることが求められているが、複数種の分子が混在する状況が多分子アンサンブル計測を困難にしている。そこで本研究では単一分子計測手法を用いて、ヒトテロメア DNA の分子構造を調べる実験をおこなった。



“mixed-chair”構造

“chair”構造

図1：テロメア DNA 分子構造

そこで本研究では単一分子計測手法を用いて、ヒトテロメア DNA の分子構造を調べる実験をおこなった。

実験に用いたDNA分子は基本配列を4周期分含むテロメア部分と、相補鎖と2重らせんを構成する幹部分からなる。テロメア部の末端にアクセプタ色素が、相補鎖にドナー色素が標識され、テロメア構造の変化を FRET 効率の変化として検出することができる。2重らせん側の末端にはビオチンが標識され、アビジン-ビオチン結合を利用したガラス基板上への固定を可能とした。溶媒には 100mM の KCl を含む 5mM カコジル酸溶液を用いた。溶液中で試料分子をカバーガラス上に分散して固定し、試料走査型コンフォーカル顕微鏡により蛍光イメージを得た。それぞれの色素からの蛍光はダイクロイックフィルタで波長分離され、2台の APD フォトンカウンティング検出器で計測される。得られる2枚の蛍光イメー

ジから、FRET 効率の分布を示すイメージを構成する (図2)。図中の各輝点がそれぞれ1分子に相当する。それぞれの分子ごとに蛍光信号を積算してFRET 効率を計算し、その分布をヒストグラムにまとめた (図3 (a))。FRET 効率 $E = 0$ に見られる大きい分布は、アクセプタ色素が褪色した分子が多く含まれると考えられ、分子構造の情報を含まない。 $E = 0.8$ に見られる分布が、 K^+ 溶液中の安定構造である “mixed-chair” 構造を表すと考えられる。

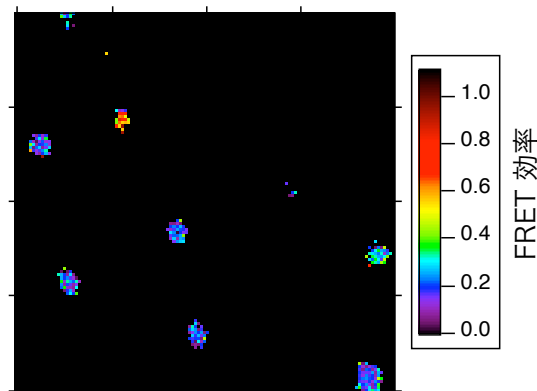


図2：1分子イメージングから得た FRET 効率分布

実験では、一部のグアニンを Br で修飾したミュータント DNA 分子 [5] を用いた比較実験をおこなった。Br 修飾されたグアニンでは、塩基がとる2種類の配糖体構造間の平衡が *anti* (図1中で青で表示) から *syn* (赤で表示) へと大きく傾く。それに伴い、G-quadruplex 構造の平衡状態も変化することが示されている[1,5]。たとえば図1で “mixed-chair” および “chair” 構造が平衡状態にあるとき、テロメア側末端から2番目のグアニン (G2) に Br 修飾を施すことで、平衡は “chair” 側へ大きく傾くことになる。Br 修飾の位置や数を変化させることで、安定構造や平衡状態を探ることができる。

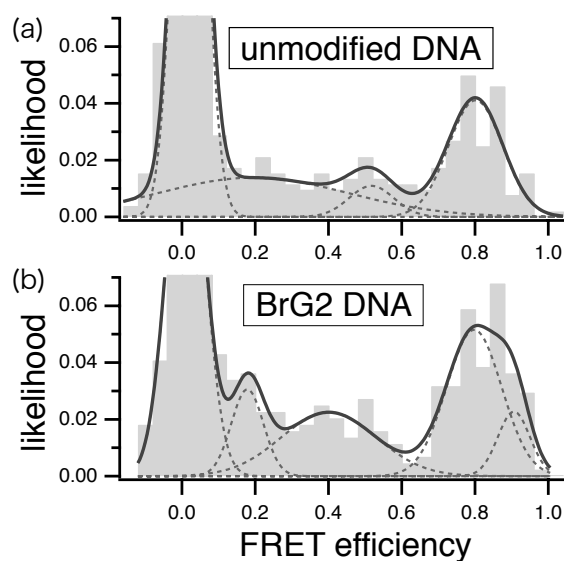


図3：FRET 効率ヒストグラム (a)天然配列 (b) 2番目の G に Br 修飾あり

天然配列の DNA と、G2 に Br 修飾を施した変異体 (BrG2) とで FRET ヒストグラムを比較すると、天然配列で見られた $E = 0.8$ の分布の他に、BrG2 ではより高 FRET 側に新たな分布が形成されることが分かった。これは、平衡条件の変化により “chair” 構造が形成されたためと考えられる。

References

- [1] Y. Xu, Y. Noguchi, H. Sugiyama, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 5584.
- [2] A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 2723.
- [3] K. N. Luu, A. T. Phan, V. Kuryavyi, L. Lacroix, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9963.
- [4] A. T. Phan, K. N. Luu, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 5715.
- [5] Y. Xu, H. Sugiyama, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 949.