

整理番号	2018-J-100	報告者氏名	高橋 俊太郎
------	------------	-------	--------

研究課題名 高圧力を活用した核酸四重鎖リガンドの合理的創製

<代表研究者> 機関名：甲南大学先端生命工学研究所 職名：講師 氏名：高橋俊太郎

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

核酸 (DNA や RNA) は標準的な二重鎖構造以外に四重鎖などの非標準構造を形成する。その中でもグアニン (G) 四重鎖は、様々ながん遺伝子の発現に関わっている。そのため、G 四重鎖を安定化してがん遺伝子の発現を調節することのできるリガンド分子が非常に注目されている。現在、様々な G 四重鎖結合性リガンドが見つかっているが、種々の異なる G 四重鎖構造を見分けるリガンドはほぼ皆無である。理由の一つとして、合理的にリガンドのターゲットへの結合適合性を改良する手法が無いことがあげられる。申請者は、以前から高圧力を用いた核酸挙動の研究を行ってきており、圧力変化から得られる体積情報が、核酸とリガンド分子間の結合適合性に依存することを見出してきた。そこで本研究では高圧力を用いてリガンドの結合適合性を評価し、効率的かつ合理的に新規リガンド分子を開発できる新しい手法の開発を目指した。

その結果、ヒトテロメア由来の G 四重鎖に結合して蛍光を発するチアゾールオレンジの蛍光値が高圧力を加えることで増強することを見出した。一方、異なる蛍光性 G 四重鎖リガンドを用いた場合同様の圧力効果は観察されなかった。したがって、今回観察された効果は、h-telo の構造に適合するようなチアゾールオレンジの励起構造が圧力増加によって容易に形成されたことによるものであった。

本研究によって、高圧力を用いた G 四重鎖 DNA に対して結合するリガンドの結合適合性を評価する技術の開発に成功した。今後は、圧力による構造適合化の分子メカニズムを推定し、リガンドの構造適合性を向上する化学合成を合理的に行い、より結合選択性の高い G 四重鎖リガンドの開発が期待できる。

本研究の成果は、3 件の口頭発表として学会発表した。そのうちの一件は G 四重鎖に関する国際シンポジウムである The 7th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids (中国長春、2019 年 9 月) において招待講演として発表した。また原著論文として、ACS Omega 誌に成果を発表した。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭発表

- 1) 高橋 俊太郎, 遠藤 玉樹, BHOWMIK Sudipta, 杉本 直己, 高圧力を用いた遺伝子発現を制御する核酸構造遷移の反応解析, 第 59 回高圧討論会, 岡山理科大学, 2018/11/26
- 2) S. Takahashi, Analysis of ligand binding on G-quadruplex using high pressure, The 7th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids, Chinese Academy of Sciences, Changchun, China, 2019/9/8 (海外招待講演)
- 3) 高橋 俊太郎, BHOWMIK Sudipta, 杉本 直己, DNA グアニン四重鎖に結合する蛍光性リガンドの高圧力による発光増強効果, 第 60 回高圧討論会, かでる 2・7 北海道立道民活動センター, 2019/10/23

原著論文

- 1) S. Bhowmik, S. Takahashi, and N. Sugimoto, Lighting up of thiazole orange on G-quadruplex DNA by high pressure, *ACS Omega*, **4**, 4325-4329 (2019)

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

【緒言】核酸（DNA や RNA）は標準的な二重鎖構造以外に四重鎖などの非標準構造を形成する。その中でもグアニン（G）四重鎖は、様々ながん遺伝子の発現に関わっている。そのため、G 四重鎖を安定化してがん遺伝子の発現を調節することのできるリガンド分子が非常に注目されている。現在、様々な G 四重鎖結合性リガンドが見つかったが、種々の異なる G 四重鎖構造を見分けるリガンドはほぼ皆無である。したがって、特定の遺伝子の G 四重鎖に対し、極めて高い選択性と結合性を示す高度機能を有する G 四重鎖リガンドの開発が不可欠である。分子同士の結合の理解には、立体構造の決定が有効であるが、X 線結晶構造解析や核磁気共鳴分光（NMR）法は時間とコストがかかり現実的ではない。そのため、立体構造の情報を定量的かつ簡便に得ることは、合理的なリガンド開発として非常に有効な手段となる。申請者は、以前から高圧力を用いた核酸挙動の研究を行ってきており、構造変化の定量的解析から得られる体積値が核酸とリガンド分子間の形状適合性を表すことを見出してきた。したがって、リガンド分子の構造適合性として体積値を定量的に評価しながらリガンド分子の改良を進めることができれば、効率的かつ合理的に新規リガンド分子を開発できると考えられる。そこで本研究では、特定の G 四重鎖構造に対して極めて高い特異性を有するリガンドを圧力変化で得られる分子の体積情報から開発する手法の開発を目的とした。そのために、本研究では G 四重鎖構造に対して構造適合性の高い分子をスクリーニングするための高圧力技術の開発を行った。

【実験手法】モデルとなるリガンドとしてチアゾールオレンジ（TO）を用いた（図 1）。G 四重鎖はヒトテロメア由来の DNA として h-telo（（5' -dAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG）-3'）を用いた（図 1）。DNA は K⁺バッファー（100 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 1 mM K₂EDTA, pH = 7.0）に溶解し、予め 95°C で 3 分間加熱し、1°C/min で室温まで冷却し、G 四重鎖構造を形成させた。高圧システムは、圧力制御システム（Syn Corporation 社製）を接続した PCI-500 光学ユニット（Syn Corporation 社製）を JASCO FP-6500 蛍光分光計に導入した。光学ユニット内の温度は F-25-ME（Julabo 社製）サーキュレーターを使用して制御した。圧力については、PV-400 圧カリザーバー（Syn Corporation 社製）を使用して、±0.1 MPa 以内の一定圧力を維持した。サンプルの温度と想定される光学ユニット内の温度は、熱電対を使用して測定した。蛍光値は、所定の圧力温度で一定になったのを確認してから計測した。全ての実験は K⁺バッファー条件（100 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 1 mM K₂EDTA, pH = 7.0）で行った。励起波長は 501 nm とし、510~650 nm の範囲で蛍光スペクトルを測定した。

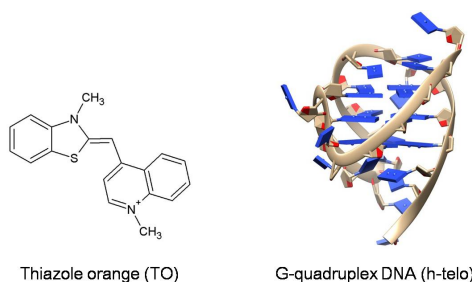


図 1. TO の化学構造と h-telo G 四重鎖の立体構造

【結果と考察】まず、0.5 μM の TO と 0.25 μM の h-telo を使用し、通常の大気圧（0.1 MPa）で TO の蛍光スペクトルを測定したところ、540 nm 付近に極大を持つ蛍光スペクトルが観察された。TO は、G 四重鎖のよく知られた蛍光プローブの 1 つで、G 四重鎖に結合して蛍光を発する。TO およびその誘導体を含むこのタイプのリガンドは、自由回転する蛍光部分を持ち、平面構造が G 四重鎖 DNA への結合に固定されると蛍光を発する。続いて静水圧を加えていくと、h-telo の存在下での TO の蛍光が圧力の増加とともに増加することが観察された（図 2a）。0.1 MPa での結果と比較して、

200 MPa で約 4.5 倍の蛍光強度が観察された。一方、h-telo を加えない場合 TO の蛍光は変化せず、圧力が上昇しても蛍光値の変化は観察されなかった (図 2b)。また、同じ濃度の二本鎖 DNA (dx) の存在下で TO の蛍光の挙動を評価したところ、圧力の増加に伴う h-telo の存在下での TO の蛍光増加は、dx の存在下での TO の蛍光増加よりもはるかに大きいことが確認できた (図 2a および 2c)。したがって、圧力は、h-telo に結合する TO の蛍光を特異的に高めることが明らかになった。

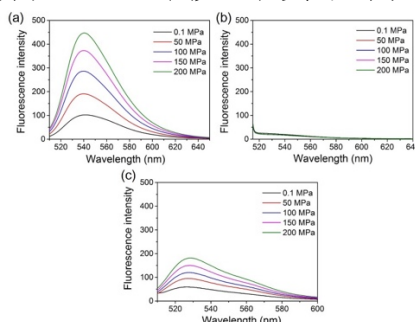


図 2. 蛍光スペクトル変化 (a) 0.5 μM TO, 0.25 μM of h-telo, (b) 0.5 μM TO (c) 0.5 μM TO, 0.25 μM dx

圧力の増加に伴う h-telo の存在下での TO の蛍光が増強したことから、高圧力によって TO の結合親和性が促進した可能性がある。そこで、0.1 MPa および 200 MPa において、TO に対する h-telo の滴定実験を行い、それぞれの条件での結合定数 (K_a) を求めた (図 3)。その結果、 K_a 値は、0.1 MPa で $5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、200 MPa で $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ となった。これらの結果は、圧力によって TO の結合が促進されることを示唆しているが、 K_a 値のわずかな増加は 200 MPa での蛍光シグナルの大幅な増加を説明するのに十分ではなかった。また、pH は圧力の影響も受けるため、TO の pH 依存性も確認した。リン酸緩衝液の pH は 0.65 / 200 MPa で圧力を上げるとわずかに低下していた。一方、h-telo 存在下における TO の蛍光強度は、pH の増加 (pH 3.2 から 9.0) に伴って増加することがわかりました。TO のみを含む溶液の蛍光は、pH の変化にほとんど応答しなかった。これらの結果は、圧力の増加に伴う蛍光の増加が、pH の増加に伴う結果と反対であることを示唆している。これらの結果から、親和性と pH 変化だけでは、高圧下で h-telo の存在下で TO の蛍光増加を説明することができないことが分かった。したがって、高圧による TO の蛍光増加のもっともらしいメカニズムは、TO の励起構造が圧力増加によって容易に形成されたことであると考えられる。TO 蛍光は、2 つの平面芳香環の間で形成される角度に依存する。この角度は、G 四重鎖の G カルテット平面によって支えられている。高圧では、h-telo の構造が乱されてその体積が減少し、TO の励起された構造により適したプラットフォームになる可能性がある。

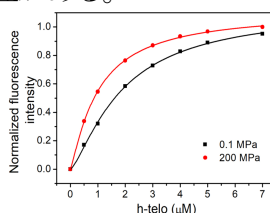


図 3 TO に対する h-telo の滴定実験

TO の蛍光増強が圧力による構造適合化であることを確かめるために、他の G 四重鎖リガンドである tetrakis-(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrin (TMPyP4) を検討した。TMPyP4 は、G 四重鎖 DNA のよく知られたリガンドの一種であり、TO 同様 G 四重鎖に結合すると蛍光を発するが、その際に化学構造は変化しない。蛍光測定の結果、圧力を高めるとむしろ蛍光は減少した。TMPyP4 の化学構造は TO (平面構造および正電荷) と同じ特性を共有しているため、G 四重鎖 DNA に結合するこれらのリガンドの結合駆動力は等しい。したがって、圧力変化に対する TO の蛍光応答は、リガンドの G 四重鎖への結合の強化によるものではなく、むしろ蛍光発光のための TO の構造適合化のためであると考えられる。

上記の結果に基づいて、TO と G 四重鎖によるロジックゲートの構築を試みた。ここでは、h-telo G 四重鎖と外部圧力を入力とし、540 nm での TO の蛍光発光の強度を出力とする。h-telo 非存在下および大気圧 (0.1 MPa) の場合[入力 (0,0)]、TO の蛍光信号は非常に低い [出力 0]。h-telo 存在下で大気圧の場合[入力 (1,0)]、TO の蛍光強度は依然低い状態にある[出力 0]。さらに、h-telo 非存在下で 200 MPa の場合においても[入力 (0,1)]、TO の蛍光強度は低い[出力 0]。一方、h-telo と高圧力 (200 MPa) 両方が入力された場合[入力 (1,1)]、TO の蛍光シグナルが高まり、出力は 1 になる (図 4)。以上から AND 型のロジックゲートを構築することができた。このように、圧力を制御することで、蛍光特性の変化をシグナル化することにより、結合適合性が変化するリガンド分子を見つけることができる。様々なリガンドや配列の組み合わせで同様の評価を行うことで、結合適合性を評価できるスクリーニングシステムへの応用ができると考えられる。

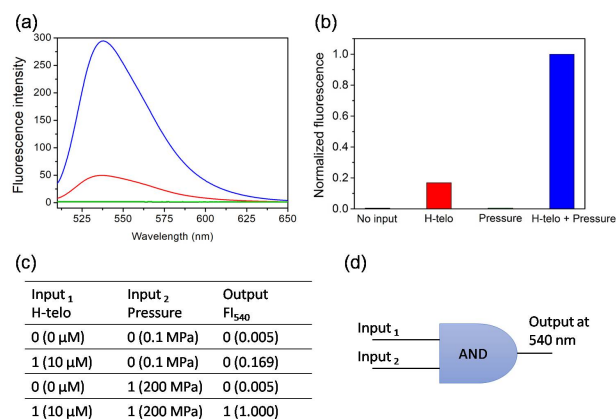


図 4. (a) 大気圧 (0.1 MPa) および 200 MPa で $10 \mu\text{M}$ h-telo を含む $1 \mu\text{M}$ TO の蛍光スペクトル、0.1 MPa、h-telo 非存在下 (黒線) 0.1 MPa、h-telo 存在下 (赤)、200 MPa、h-telo 非存在下 (緑)、200 MPa、h-telo 存在下 (青)。 (b) 540 nm で規格化された TO の蛍光強度。 (c) 0.1 および 200 MPa での TO と h-telo 間相互作用の真理値表 (d) 今回作成した AND 回路のロジックゲート。

【結言】 本研究によって、高圧力を用いた G 四重鎖 DNA に対して結合するリガンドの結合適合性を評価する技術の開発に成功した。今後は、圧力による構造適合化の分子メカニズムを推定し、リガンドの構造適合性を向上する化学合成を合理的に行い、より結合選択性の高い G 四重鎖リガンドの開発が期待できる。

【謝辞】

本研究において、泉科学技術振興財団の助成金による支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。