

整理番号	2020-J-078	報告者氏名	松島 綾美
------	------------	-------	-------

研究課題名

テロメア反復塩基配列を応用した分子ツールとしての新規環状二本鎖 DNA 設計合成

<代表研究者> 機関名：九州大学 職名：准教授 氏名：松島 綾美

<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>

本研究では、遺伝情報を分解などから物理的に保護する役割を担うテロメアの核酸塩基配列を利用して、高機能な生体機能解析ツールや医用材料の開発を目指した。

生物の遺伝情報の源はゲノムである。このゲノムにおいて、実際にメッセンジャーRNA (mRNA) として転写され、タンパク質として翻訳されるコーディング領域は、ごく僅かである。例えば、ヒトゲノムの約 33 億塩基対には、26,000 種のタンパク質がコードされている。しかし、これは全体のわずか 2% である。その他はノンコーディング領域とよばれ、長い間、特に機能はないと考えられてきた。テロメアは、染色体の末端のノンコーディング領域に存在する核酸塩基配列である。多くの生物で、チミン (T) とグアニン (G) が多く含まれる反復配列となっている。例えば、哺乳類では TTAGGG (A はアデニン) の 6 核酸塩基が合計 50-100 回も繰り返されている。現在では、染色体の末端に存在するテロメアが、遺伝情報を保護する役割を担うことなどが次々に明らかにされている。申請者は、受容体結合領域を検索する中で、染色体の末端のみならず、内部に短いテロメア反復塩基配列が存在することに気がついた。染色体末端に存在するテロメア反復塩基配列が障壁となり染色体を分解から保護するように、遺伝子内部でも転写翻訳の障壁として働くと考えに至った。そこで、この障壁となる核酸塩基配列を利用して、輸送薬剤の保護や、バックグラウンドを下げ生体機能解析の高感度化などに利用できる、高機能な環状二本鎖塩基配列 (プラスミド) の開発を目指した。16 回繰り返し配列についてルシフェラーゼを発現するレポーター試験を構築して活性を試験したところ、遺伝子内部に存在するテロメア反復配列は転写応答配列として機能するという驚くべき成果が得られた。これを詳細に解析するために、ゲノム上に確認できた 12 回および 16 回繰り返し配列以外に、1 回から 17 回繰り返し配列までの新規環状二本鎖 DNA を系統的に作成することを計画し、まず、これらの繰り返し配列をもつレポータープラスミド構築法を確立した。具体的には、3 回や 6 回などの繰り返し配列の一本鎖 DNA を用意し、それらを適切な塩濃度で二本鎖を形成させ、ルシフェラーゼを発現するレポーターベクターに組み込むことで、様々な繰り返し回数をもつレポータープラスミドの構築に成就した。これらを用いて転写活性を試験したところ、2 回以上の繰り返し配列が必要であることが判明した。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

[ 誌上 ]

Iwamoto, M., Masuya, T., Hosose, M., Tagawa, K., Ishibash, T., Suyama, K., Nose, T., Yoshihara, E., Michael Downes, M., Evans, R.M., and **Matsushima, A.**\* :Bisphenol A derivatives act as novel coactivator binding inhibitors for estrogen receptor  $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*, **297**(5), 101173 (2021). DOI:10.1016/j.jbc.2021.10117

(This work was supported in part by a grant from Izumi Science and Technology Foundation. を明記)

[ ポスター（オンラインのため口頭形式で発表） ]

石橋知佳、松島綾美：エストロゲン受容体とエストロゲン関連受容体が結合するリピート配列と転写活性（BC-5-0058）、第58回化学関連支部合同九州大会、令和3年(2021年)7月3日、ポスター（日本語）、オンライン開催

石橋知佳、白根共太、細瀬摩利、伊藤琴音、松島綾美：エストロゲン応答配列として機能するゲノム上の新規反復配列、第94回日本生化学会大会、令和3年(2021年)11月3日-11月5日、ポスター（日本語）、パシフィコ横浜 ノース（横浜市）

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

ヒトゲノム解析により、ヒトゲノムの塩基配列がドラフト版として 2000 年に発表され、ゲノム情報が自由に利用できるようになった。当初は、ゲノム解析により、生命の仕組みが全てが明らかになるかのように期待された。しかし、現在も不明な点が数多く残ったままである。ヒトでは、このゲノムにおいて、実際にメッセンジャーRNA (mRNA) として転写され、タンパク質として翻訳されるコーディング領域は、ごく僅かである。例えば、ヒトゲノムの約 33 億塩基対には、26,000 種のタンパク質がコードされている。しかし、これは全体のわずか 2% である。その他はノンコーディング領域とよばれる。この領域位には、長い間、特に生理的な機能はないと考えられてきた。しかし、近年、これらのノンコーディング領域が担う生理的な機能が注目されている。一例として、ノンコーディング領域から miRNA とよばれる短鎖の RNA がつくられ、転写調節に関わることなどが明らかになっている。本研究で取り上げるテロメアは、染色体の末端のノンコーディング領域に存在する核酸塩基配列である[図 1]。多くの生物で、チミン (T) とグアニン (G) が多く含まれる反復配列となっている。例えば、哺乳類では TTAGGG (A はアデニン) の 6 核酸塩基が合計 50-100 回も繰り返されている。現在では、染色体の末端に存在するテロメアが、遺伝情報を保護する役割を担うことなどが次々に明らかにされている。申請者は、ゲノム解析データを用いてエストロゲン受容体の結合領域を検索する中で、染色体の末端のみならず、内部に短いテロメア反復塩基配列が存在することに気がついた。このテロメアの 6 核酸塩基の繰り返しは、染色体末端だけではなく、染色体内部にも存在することは過去に論文でも指摘されていたが、これらに生理的な機能があるのか、それともないのか、現在なお不明のままである。そこで、申請者は、染色体末端に存在するテロメア反復塩

基配列が障壁となり染色体を分解から保護するように、遺伝子内部でも転写翻訳の障壁として働くと考えるに至った。そこで、この障壁となる核酸塩基配列を利用して、輸送薬剤の保護や、バックグラウンドを下げ生体機能解析の高感度化などに利用できる、高機能な環状二本鎖塩基配列 (プラスミド) の開発ができるのではないかと考えた。こうして、遺伝情報を分解などから物理的に保護する役割を担うテロメアの核酸塩基配列を利用して、高機能な生体機能解析ツールや医用材料の開発を行うことを目的として、本研究を開始した。

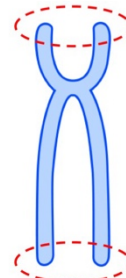


図 1  
染色体末端に存在する  
テロメア

まず、申請者が見出した、エストロゲン受容体の標的遺伝子であり乳癌にも関わる遺伝子の近傍に、16 個のみのテロメア反復塩基配列に注目した。染色体末端に存在するテロメアは、TTAGGG の核酸塩基配列の 50-100 回もの反復により構成される。一定間隔でグアニンが繰り返されることにより、テロメア反復塩基配列は、グアニン四重鎖とよばれる特異な高次構造を形成できる。これは局所的には 4 個の反復配列から構成される。グアニン四重鎖の内部には、金属イオンを介した G-カルテット構造[図 2 : 次ページ]が構築され、これが主に 3 層に集積する。これが一本に長く繋がった染色体の DNA において、近隣の遺伝子との障壁となると考えるに至った。そこで、エストロゲン受容体の転写活性化能の評価試験に用いる、ルシフェラーゼを転写活性の指標としたレポーターベクターを導入し、レポーターであるルシフェラーゼの発現量により、障壁として働くか? を調べることにした。そこで、このレポーターベクターの構築のために、繰り返し配列を持つ二本 DNA をつくるための効率的な条件を検討した。そのために、このテロメア反復配列の 16 回繰り返しの一本鎖 DNA とこれに相補的な一本鎖 DNA を設計合成した。末端には、レポーターベクターに組み込むための制限酵素 *KpnI* と *BgIII* の認識部位を導入した。これらをまず単独で、トリス緩衝液中で、低い塩

濃度下で、94°Cで3分間加熱し、高次構造を破壊した。すぐにこれらを混合し、70°Cで10分間インキュベートすることにより二本鎖DNAを構築させることとした。テロメア反復配列は、高次構造を作りやすいことから、加熱して一本鎖となった後に迅速に混合すること、さらに、二本鎖を構築するために生理条件よりも高い温度で保持した後に自然に冷却することにより、効率よく二本鎖ができる条件となるように工夫した。これを電気泳動で確認したところ、確かに目的の大きさに、二本鎖DNAのバンドが確認された[図3]。一方で、高分子量にも二本鎖DNAと考えられるバンドも薄く検出された。これは、互い違いに一本鎖DNAが重なったものではないかと考えられた。

次に、これをレポーターベクターに導入した。具体的には、制限酵素 *KpnI* と *BglII* で切断したレポーターベクターに、得られた二本鎖DNAをDNAリガーゼでリン酸エステル結合を構築させた。これを大腸菌に形質転換し、得られたクローンを大量培養した。これらを集菌し、アルカリSDS法により、プラスミドDNAを精製した。このプラスミドDNAの塩基配列解析をしたところ、目的の16回繰り返しのほか、19回繰り返されているものなども得られた。これは、電気泳動で検出された高分子量の二本鎖DNAに由来するものと考えられた。

目的の16回反復配列をもつレポータープラスミドが得られたので、これを用いて転写活性がみられるかを調べるために、レポーター遺伝子試験を行った[図4：次ページ]。レポーター試験では、導入したテロメア反復配列にホルモン受容体が結合し、実際に転写活性を發揮するのか、それともテロメア反復配列にはホルモン受容体は結合せず、転写活性は生じないのかが試験できる。レポーター遺伝子試験には、この試験に通常用いられるヒト子宮頸癌細胞由来のHeLa細胞を用いた。常法に従い、10%血清を用いてHeLa細胞を培養した。培養に用いた血清は、デキストラン被膜活性炭処理により、内在性の低分子化合物を取り除いて用いた。これに、ホルモン受容体を発現するための発現ベクターを用いて、一過性の強制発現を行った。同時に、今回作成したテロメア反復配列を含有するレポーターベクターも導入した。細胞への発現プラスミドの導入には、高効率でプラスミドが導入可能な lipofectamineLTX とプラス試薬を用いた。なお、受容体の発現プラスミドの導入量と、レポータープラスミドの導入量は、複数回の実験を実施して最適化し、最終的に6cmの培養ディッシュに対して、受容体の導入量を1 $\mu$ g、レポーター遺伝子の導入量を1.5 $\mu$ gになるように最適化した。24時間培養後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに24時間後、細胞を可溶化し、内在するルシフェラーゼ活性を蛍光気質を用いて測定し、テロメア反復配列による転写活性を評価した。その結果、テロメア反復配列は転写活性はなく、遺伝子の仕切り役として働くという作業仮説とは異なり、転写活性が観察されるという興味深い結果が得られた。19回繰り返しの配列でも、同様に転写活性が観察された。

そこで、この活性をさらに解析するために、テロメア反復配列の数の異なるレポータープラス

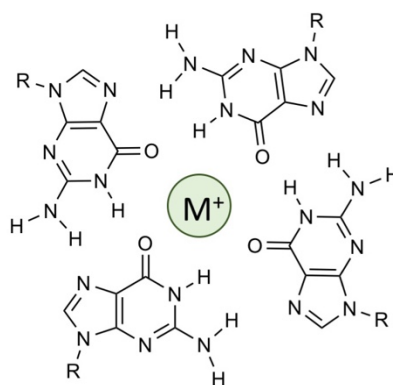


図2

グアニン4個からなる  
G-カルテット構造。

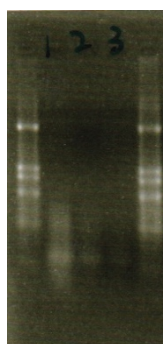


図3

電気泳動で確認された  
16回反復配列の二本鎖  
DNA (赤矢印)

ミドの構築を系統的に実施することとした。まずは、ゲノム解析データに存在するテロメア反復配列には、12および16個のように、4の倍数のものが多く見られた。そこで、まずはテロメア反復塩基配列の反復回数を4、8、12、16個と4の倍数の繰り返し数をもつレポータープラスミドの構築を目指した。16回反復配列と同様の条件で、4、8、12回の反復配列をもつ一本鎖DNAから、それぞれ二本鎖を形成させた。その結果、10回反復配列など、さまざま反復配列も得られたため、1回から順にひとつずつ繰り返し配列を増やしたレポータープラスミドを系統的に、網羅的に用意し、それらの転写活性を比較することとした。17回の繰り返し配列は、複数回の二本鎖DNAの作製の施行でも得られなかった。そのために、人口遺伝子として購入し、発現プラスミドに導入した。

これら全てについてレポーター遺伝子試験によりホルモン受容体による転写活性を調べたところ、活性発現には2回以上の反復配列があれば良いことが判明した。さらに、反復回数の増大に従い、転写活性も増大するという興味深い活性が観察された。すなわち、反復回数にほぼ比例する活性増強効果が見られた。この要因としては、これが、繰り返し回数が多いことによる確率論としての衝突頻度の増大に由来するものである可能性や、それとも、複数のホルモン受容体が結合することによる、なんらかの活性増強機構がある可能性などが考えられる。こうした効果が、繰り返し数依存的に大きくなるのか、あるいは閾値が存在するのかなどの検討が必要である。こうした情報に基づき、さらに高効率に標的を転写できる「転写制御プラスミド」の構築が可能となる。閾値が存在する場合はその繰り返し配列を基盤として、そして濃度依存的に転写活性が増加する場合には、通常の薬理的応答とは異なる転写活性化メカニズムの存在も示唆される。その場合には、その転写活性化メカニズムの解析を進め、転写制御プラスミドとして高機能な制御を行うツールとして開発を進めることも視野に入る。

申請者は、これまでに、免疫沈降シーケンス法によりホルモン受容体が結合する標的部位を解析してきた。データベース検索を進める中で、染色体の末端に存在するテロメア反復塩基配列が、ホルモン受容体の標的遺伝子の近傍に存在することに気付いた。そこで、文献を精査した。その結果、染色体上にはテロメア反復塩基配列だけではなく、さまざまな反復配列が複数存在することが報告されていた。しかし、その機能は意義については明らかではなく、ノンコーディング領域として無意味であると考えるのが主流であった。しかし、現在まで残っていることを考えると、遺伝子としてではなく、化学的、物理的に、反復塩基配列が遺伝子制御に関わるに違いないという本研究を実施した。このような研究の例はこれまでない。

テロメア反復配列に応答するホルモン受容体は、複数ある可能性も考えられる。本研究で得られた成果を基盤として、テロメア反復塩基配列を利用した高機能な転写制御のための解析ツールや、転写制御を利用した、核酸をもちいた将来の新しい医用材料の開発に繋がると強く期待される。

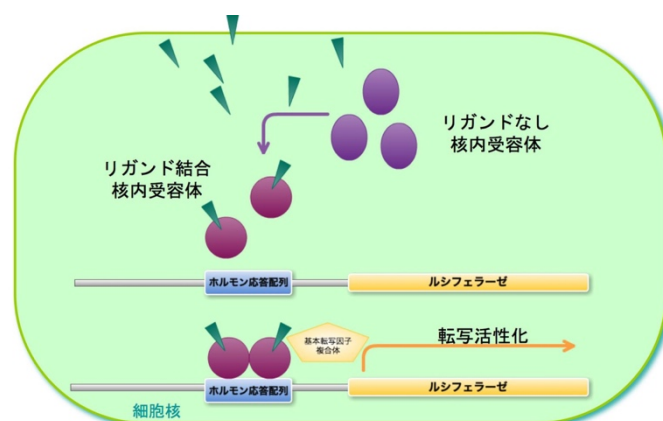


図4

レポーター遺伝子試験の原理