

実施課題名: 溶液環境がエピゲノム修飾二本鎖DNAの運動性に及ぼす影響の解析

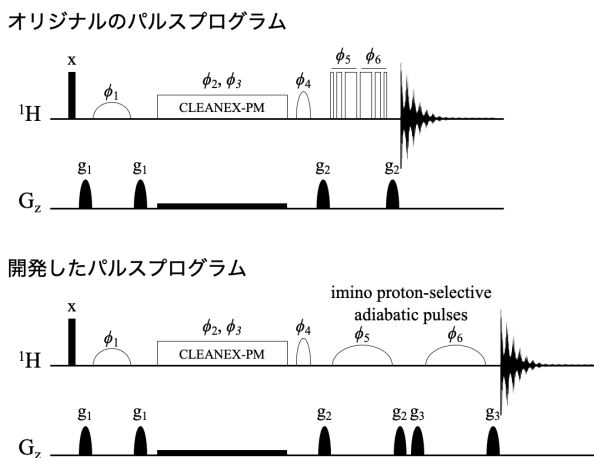
【背景】

報告者は、2021年にNMRを用いて、様々なエピゲノム修飾状態の二本鎖DNAの動的構造を解析し、エピゲノム修飾状態が変わると、修飾部位近辺の塩基対の開閉運動が局所的に変化することを明らかにした(Furukawa et al, *Nucleic Acid Res* 2021)。一方、最近、核内を模倣した環境(PEG200存在化)において、エピゲノム修飾二本鎖DNAの熱安定性が大きく変化することが報告された。そこで、本研究では核内模倣環境におけるエピゲノム修飾二本鎖の運動性を横浜市立大学の950 MHz NMRを用いて解析する。

【実施内容】

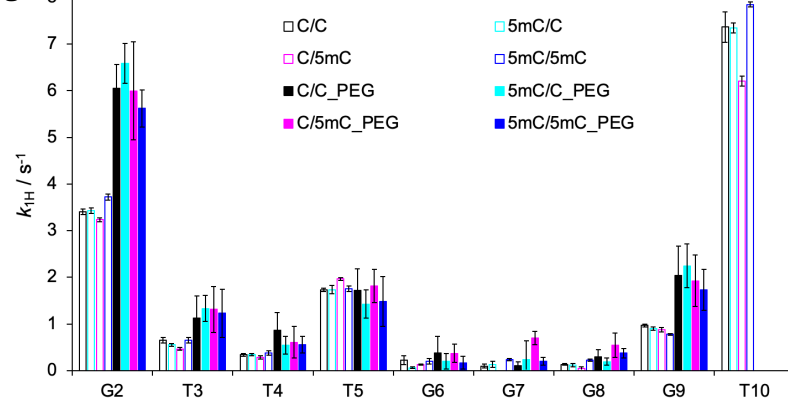
メチル化状態の異なる4つの二本鎖DNAを対象とし(メチル化のないDNA 1つ、ヘミメチル化DNA 2つ、フルメチル化DNA 1つ)、さらに核内を模倣したPEG200がある条件とない条件で(合計8サンプル)、二本鎖DNAの運動性を950 MHz NMR装置を用いて解析した。核酸のイミノプロトンを観測対象とし、塩基対の開閉運動速度を見積もることができる ^1H on-resonance $R_{1\rho}$ dispersion法、および塩基対の開閉運動速度を見積もることができるCLEANEX-PM法を用いた。PEG200を含むサンプルの測定では、両測定ともPEG200由来の大きな ^1H NMRシグナルが測定の妨げになった。そのため、GaGaussと呼ばれるアディアバティックパルスを組み込んでイミノプロトンだけを選択的に励起する新しいパルスプログラムを開発した。CLEANEX-PMのパルスプログラムをFig. 1に示す。解析結果としては、二本鎖DNAの運動性に対するPEG200の効果が非常に大きいことが分かった(Fig. 2)。全体的に塩基対の開閉運動が速くなる傾向にあり、顕著な塩基では開閉運動が薬2倍になっていた。一方、PEG200があってもなくてもほとんど運動性が変わらない塩基もあった。今回の結果は二本鎖DNAの運動性を希薄バッファ中だけで解析するのは不十分であることを示唆する。

Fig. 1



イミノプロトン選択的CLEANEX-PM法

Fig. 2₈



エピゲノム修飾された二本鎖DNAの水素交換速度

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF21-01-037		
利用課題名	溶液環境がエピゲノム修飾二本鎖 DNA の運動性に及ぼす影響の解析		
所属機関	京都大学		
所属部署	大学院農学研究科 応用生命科学専攻		
役職・氏名	役職	教授	氏名 菅瀬 謙治
利用実施時期、及び期間	2022 年 3 月 1 日～2024 年 2 月 29 日 総利用日数:25 日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) off-resonance $R_{1\rho}$ dispersion 測定も計画していたが、水消しが非常に悪かったためこの測定は断念した。		

1. 本課題の概要・目的

報告者は過去に、核酸のイミノプロトンを観測対象として、塩基対の開閉運動速度を見積もることができる ^1H on-resonance $R_{1\rho}$ dispersion 法、および塩基対の開閉運動速度を見積もることができる CLEANEX-PM 法を用いて、エピゲノム修飾状態の異なる6種類の二本鎖 DNA(ヘミメチル化、フルメチル化、ヒドロキシメチル化など)の塩基対の開閉運動を解析した。この結果、ヘミメチル化二本鎖 DNA では塩基対の開閉運動が速くなるが、フルメチル化二本鎖 DNA だと開閉運動が遅くなることを明らかにした(Furukawa et al., *Nucleic Acids Res.* 2021)。この研究の試料にはバッファーが入っていなかったため、本課題では 15 mM リン酸バッファーで同様な測定を行うこととした。さらに核内を模倣した 30% PEG200 がある条件でも同様な測定を行い、溶液環境がエピゲノム修飾された二本鎖 DNA の運動性にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを本課題の目的とした。

2. 成果の概要

実施内容

本課題では、1つの CpG 配列(相補鎖も CpG の回文構造)に対して、全くメチル化されていない二本鎖 DNA、2種類のヘミメチル化二本鎖 DNA、1種類のフルメチル化二本鎖 DNA を測定対象とした。というのも、報告者らの先行研究で解析した6種類の二本鎖 DNA の中で、この4種類の二本鎖 DNA の運動性が比較的大きく異なっていたからである。15 mM リン酸バッファーの試料では先行研究で開発したイミノプロトン用の ^1H on-resonance $R_{1\rho}$ dispersion 法と CLEANEX-PM 法を用いて測定を行い、良質な NMR スペクトルが得られた。一方、30% PEG200 存在化では、PEG200 の ^1H NMR シグナルが非常に大きいため、観測したいイミノプロトンが感度良く測定できなかった。そこで、CaGauss と呼ばれるアディアパティックパルスを組み込み、イミノプロトンだけを選択的に観測する ^1H on-resonance $R_{1\rho}$ dispersion 法と CLEANEX-PM 法を開発した。これらのパルスプログラムを用いると、感度良くイミノプロトンを観測でき、それぞれの二本鎖 DNA の運動性を定量的に解析することができた。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

まず、二本鎖 DNA の運動性に対する PEG200 の効果が非常に大きいことが分かった。全体的に塩基対の開閉運動が速くなる傾向にあり、顕著な塩基では開運動が2倍になっていた。一方で、PEG200 があってもなくてもほとんど運動性が変わらない塩基もあったため、この結果は非常に興味深い。現在のところ、なぜこのような変化が生じたのかはよく分かっていないが、そもそも PEG200 は核内環境を模倣すると言われていたため、今回の結果は二本鎖 DNA の運動性を希薄バッファー中だけで解析するのは不十分であることを示唆する。一方、15 mM リン酸バッファーの試料では、先行研究で観測されたエピゲノム修飾に依存した二本鎖 DNA の運動性の違い（ヘミメチル化二本鎖 DNA で塩基の開閉運動が速くなり、フルメチル化二本鎖 DNA では遅くなる）があまり見られなかった。違いがあることにはあるのだが、バッファーがない条件と比べると顕著ではない。この結果は当初予想していたこととは異なる。いずれにせよ、今回の結果から、二本鎖 DNA の運動性は溶液環境に強く依存することが示唆される。また、二本鎖 DNA の運動性はエピゲノム修飾によっても変化するが、溶液環境の影響のほうが大きいと言える。

成果発表

現在の所該当なし。UV を用いた温度に対する安定性を調べてから論文化する予定。

今後の展開

本課題の成果の1つは、先述したように核内混雑環境を模倣するために試料 PEG を混ぜても感度良く、¹H NMR 測定ができるパルスプログラムを完成させられた点である。イミドプロトンの領域だけを選択的に励起するパルスを組み込むことによって、高感度にイミドプロトンシグナルを観測できた。しかも、定量性が必要な緩和解析までできた点は大きい。

今後の展開としては、DNA に結合するタンパク質を存在させた状態で二本鎖 DNA の運動性がどのように変化するかを、今回開発したパルスプログラムを用いて同様に解析することなどを計画している。他にも、同様な手法を用いて、ミスマッチのある二本鎖 DNA や4重鎖 DNA、RNA などの運動性を解析することも興味深いと考えられる。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題は二本鎖 DNA の運動性を調べるという基礎研究である。そのため、開発したパルスプログラムと得られた結果は基礎研究のものであり、学問的な波及効果はあるが、社会・経済への直接的な波及効果は小さいと考えられる。ただし、シスプラチンのように二本鎖 DNA に作用するような薬剤を開発する場合に、核内模倣環境における相互作用を解析する際などに、開発したパルスプログラムまたは類似のパルスプログラムを用いることができる。また、開発したパルスプログラムは二本鎖 DNA だけにしか適用できないというわけではなく、バッファー由来の大きな NMR シグナルがあった場合に、そこから外れたスペクトル領域のシグナルを選択的に観測できるものである。そのため、¹H NMR シグナルしか観測できない試料に広く適用できる。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

比較的自由に測定させてもらえる点が非常に良かった。改善してほしい点はとくにない。

5. 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待

遠隔操作もできるようになっており、非常に良い制度である。今後も継続すべきである。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

とくになし

8. 利用施設

横浜市立大学

溶液 950MHz

利用期間 1: 2022 年 3 月 20 日～2022 年 3 月 22 日

利用期間 2: 2022 年 8 月 29 日～2022 年 8 月 31 日

利用期間 3: 2022 年 10 月 25 日～2022 年 10 月 28 日

利用期間 4: 2023 年 1 月 17 日～2023 年 1 月 20 日

利用期間 5: 2023 年 3 月 1 日～2023 年 3 月 3 日

利用期間 6: 2024 年 1 月 10 日～2024 年 1 月 17 日

9. その他の利用施設

該当なし