

三重鎖 DNA の構造, 形成機構ならびに生物学的役割

Structure and mechanism of triplex DNA, and its biological role

代表研究者 東京薬科大学薬学部助手

Res. Assoc., Tokyo College of Pharmacy
Mitsuhiro SHIMIZU

清水 光弘

An intramolecular DNA triplex, which consists of a triple-stranded stem and a single-stranded region, is formed at a polypurine · polypyrimidine (Pur · Pyr) tract under supercoiled stress. Pur · Pyr sequences are overrepresented in eukaryotic genomes and often are proximal to regulatory regions and recombination hot-spots. Recently, *in vivo* existence of triplexes and their function in gene expression processes have been reported, suggesting potential biological functions of DNA triplexes.

Two isomers exist for an intramolecular triplex: one with 3'-half of Pyr strand as the third strand (H-y3) and the other with the 5'-half of Pyr strand as the third strand (H-y5). Interestingly, most of Pur · Pyr sequences analyzed to date form H-y3 isomers. It was demonstrated by chemical probes and two-dimensional agarose gel electrophoresis that the DNA sequence in the triplex loop region (the center of Pur · Pyr tracts) is a crucial determinant for the isomerization of intramolecular triplex, and divalent metal ions and negative supercoiling modulate it. A novel model for the mechanism of the triplex formation was proposed.

The nucleosome is a fundamental subunit structure in eukaryotic chromatin. Recent studies revealed that nucleosomes play roles in not only the package of DNA in nuclei but also in gene expression processes. Since Pur · Pyr sequences are overrepresented in eukaryotic genomes, the triplex may function to organize chromosome structure. To this end, the effects of non-B DNA structures such as triplexes, Z-DNA and cruciforms on the nucleosome positioning were evaluated. Biological implications of high-order structures of DNA were discussed.

研究目的

DNA はその塩基配列, トポロジー, 環境などに依存してワトソン-クリックの右巻 B 型二重鎖とは異なるさまざまな non-B 型構造を形成する。左巻 Z-DNA, 十字型構造, 湾曲 DNA などはその例である。これらに加えて, 最近著者らは, スーパーコイルプラスミドにおいて, ポリプリン・ポリピリミジン (Pur · Pyr) 配列が分子内三重鎖構造 (図 1) を形成することを実証した。この Pur · Pyr 配列は, 真核生物ゲノムに広く見いだされてきており, しばしば遺伝子の調節領域や組換えのホットスポットなどに位置している。このことから, 三重鎖 DNA の構造と機能に強い興味を持たれている。事実, 極めて最近, 三重鎖構造の *in vivo* での形成や DNA の複製, 転写における機能

が報告されはじめた。また, 三重鎖結合蛋白質やポリピリミジン配列単鎖結合蛋白質が同定された。従って, 三重鎖 DNA 構造が生体内で DNA の活性を制御していることが十分に考えられる。本研究は, この三重鎖 DNA に注目して, 三重鎖 DNA の構造, 特に二重鎖から三重鎖への構造転移の機構, さらにその生物学的意義について明らかにすることを目的とした。以下の二つを本助成期間における主要研究課題とした。

(1) 図 2 に示したように, 分子内三重鎖構造には二つの構造異性体が存在する: ピリミジン鎖の 3' 側半分が 3 番目の鎖となる H-y3 構造とピリミジン鎖の 5' 側半分が 3 番目の鎖となる H-y5 構造である。興味深いことには, 今日までに調べられた Pur · Pyr 配列のほとんどは H-y3 構造を

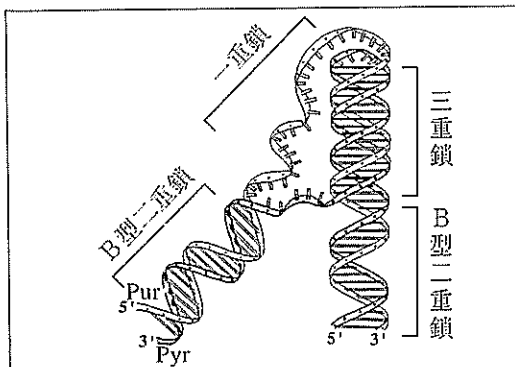


図1. 分子内三重鎖 DNA 構造のモデル。白抜き鎖はポリプリン鎖、影ぬりの鎖はポリピリミジン鎖を示している。

選択的に形成し、その理由は未だ明らかではない。また、転写、複製の際に DNA は局所的に動的なスーパーコイルのドメインを形成し、DNA のトポロジーがダイナミックに変化することが近年明らかになってきた。分子内三重鎖は負のスーパーコイルで安定化されるので、細胞内の生物学的過程に依存して、Pur・Pyr 配列の DNA 鎖では二重鎖と三重鎖との間で構造変換していることが予想される。このことを理解するために、三重鎖構造異性体の選択的形形成機構について検討した。

(2) 真核生物に普遍的なクロマチンの基本構造であるヌクレオソームは、DNA を核内に秩序的に折りたたむのみならず、遺伝子発現機構にも積極的に関与していることが明らかになってきた。Pur・Pyr 配列が真核生物ゲノムに広く分布していることに注目して、三重鎖をとりうる Pur・Pyr 配列のクロマチン・染色体構造の構築における役割について検討した。

研究経過

1) 分子内三重鎖 DNA の形成機構

著者は、二重鎖から分子内三重鎖構造への転移には、Pur・Pyr 配列中央の opening が重要であろうと考え、Pur・Pyr 配列中央の塩基組成が分子内三重鎖構造形成に及ぼす影響についてケミカルプローブ法 (OsO₄ と diethyl pyrocarbonate (DEPC と略)) と 2 次元アガロースゲル電気泳動法によって調べた。まず、(GA)₆N₈(AG)₆ のよう

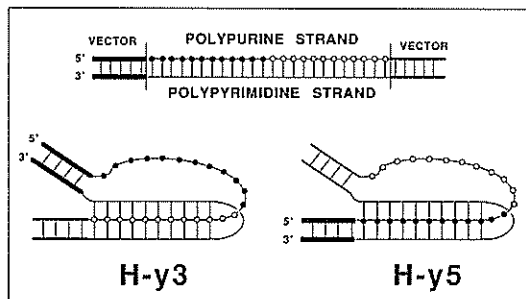


図2. 分子内三重鎖の二つの構造異性体。

に、中央の塩基配列の異なる 12 種の GA の繰り返し配列を化学合成し、pUC19 プラスミドにクローニングした。ケミカルプローブ法は non-B 型構造の研究に広く用いられている方法であり、OsO₄ と DEPC はそれぞれ 1 本鎖領域のピリミジン塩基 (T>>C) とプリン塩基 (A>G) と反応する。したがって、分子内三重鎖構造の場合 (図1参照)、1 本鎖となるプリン鎖半分、ヘアピンループとなるピリミジン鎖中央、そして分子内三重鎖とベクター二重鎖との接合部などが特異的にこれらの試薬によって修飾される。H-y3 と H-y5 の構造では、それぞれプリン鎖の 5' 側半分と 3' 側半分が 1 本鎖となり (図2) DEPC によって修飾されるので、H-y3 と H-y5 の構造異性体の形成を区別することができた。さらに、2 次元アガロースゲル電気泳動法によって二重鎖から三重鎖への転移の起こるスーパーコイル密度と DNA のトポロジーの変化を解析した。これらの結果から次のような結論が導かれた。(1) Pur・Pyr 配列中央 4 bp の塩基組成が構造異性体の選択的形形成に重要であり、この領域の A+T 含量が高いと H-y3 構造が、G+C 含量が高いと H-y5 構造が優勢的に形成する。(2) Mg²⁺ のような二価金属イオンは H-y5 構造を安定化する。(3) H-y3 と H-y5 構造はトポロジー的に、それゆえエネルギー的に非等価である。(4) 中央の塩基配列の G+C 含量が高くなるほど、構造転移に必要なスーパーコイルエネルギーは高くなる。(5) プラスミドのスーパーコイルの度合いもまた構造異性体の選択的形形成に影響を及ぼす。

これらの結果に基づき、図3のような分子内三

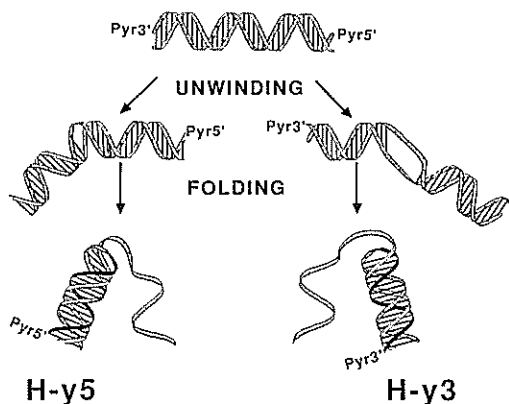


図3. 分子内三重鎖における二つの構造異性体の形成機構。白抜きの鎖はポリプリン鎖、影ぬりの鎖はポリピリミジン鎖、黒ぬりの鎖は3番目の鎖を示している。

重鎖構造の形成機構に関するモデルを提出した。分子内三重鎖構造異性体のトポロジーの考察から、H-y3型構造を形成する時、二重鎖から三重鎖への転移の nucleation の過程では、図3に示したように比較的広い範囲で中央部分が opening しなければならないと考えられる。このことは中央が A+T rich の配列は H-y3 を形成するという結果をよく説明できる。また、H-y3 の形成には H-y5 に比較してより多くのスーパーコイルの巻戻しが起こり、二つの構造がトポロジー的に非等価であるという実験結果とよく一致する。主として三つのエネルギー項が三重鎖形成の nucleation の過程に関与すると考えられる。

(1) Pur・Pyr 配列中央の塩基対の opening における速度論的障害、(2) 分子内三重鎖形成に伴うスーパーコイルの緩和、(3) ヘアピンループ構造の安定性。(1) の速度論的障害が主要因であると考えられるが、H-y3 構造の場合、より広い領域の opening が必要であることは、エネルギー的に不利ではある。しかし、これは H-y3 構造形成によるスーパーコイルの緩和が H-y5 のそれよりも大きいことによって克服される。また、Pur・Pyr 配列中央が G+C rich であるとき、 Mg^{2+} 存在下で二重鎖構造が安定化されるときは、中央の opening しにくくなるので、H-y5 構造形成が促進される。これらは図3のモデルに

よって矛盾なく説明できた。

2) クロマチン構造に及ぼす non-B 型 DNA 構造の影響

最近著者らは、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の接合型特異的遺伝子の発現を制御する転写因子の一つである α_2 repressor がその operator に隣接してヌクレオソームをポジショニングすること、そしてこのヌクレオソームポジショニングが α_2 repressor による転写抑制機構に積極的に関与していることを報告した。 α_2 repressor がヌクレオソームをポジショニングする事実を利用して、分子内三重鎖、Z-DNA、十字型構造など non-B 型構造がクロマチン構造に及ぼす影響について検討した。

まず、STE 6 遺伝子上流に存在する α_2 operator 配列を化学合成し、酵母プラスミドにクローニングした。この α_2 operator に隣接してポジショニングしたヌクレオソームの中央または端に $A_{32}, G_{32}, (GA)_{16}, (CG)_{16}, (AT)_{16}$ などの non-B 型構造配列をクローニングすることができた。ついで、これらの構築したプラスミドを酵母 1 倍体 α 細胞に形質転換した。現在、部分精製したこれらのミニクロモソームを micrococcal nuclease で限定消化し、アガロースゲル電気泳動、サザンブロット、間接末端標識法によって、クロマチン構造の詳細を解析しているところである。まだ予備的な結果の段階ではあるが、(1) α_2 operator の有無によって酵母プラスミドにおけるクロマチン構造に大きな差異が見られる、(2) いくつかの non-B 型構造配列がヌクレオソームの形成に影響を及ぼす、という知見が得られた。さらに、著者がすでに確立した方法である *Taq* polymerase を用いる多サイクルプライマー伸長法によって、塩基対レベルの高分解能でヌクレオソーム構造、non-B 型構造のマッピング解析を現在行っている。

研究成果

以下の新しい知見が得られた。

(1) 分子内三重鎖異性体の選択的形成には、Pur・Pyr 配列中央約 4 bp 塩基配列が極めて重要である。また、この選択性は二価金属イオンや

スーパーコイルの度合いなどによって調節される。

(2) 二重鎖から分子内三重鎖への構造転移は Pur・Pyr 配列中央の opening が重要なステップである。分子内三重鎖構造の形成機構に関して新しいモデルを提出した。

(3) 特殊な DNA の高次構造がヌクレオソーム形成に影響を及ぼす因子の一つであることが示唆された。

本研究において、1987-88年に分子内三重鎖構造が実証されて以来不明だった H-y3 型構造異性体形成が優勢的に選択される理由を明らかにすることができた。この構造異性体の選択性は、DNA の転写や複製の際に生物学的役割を持つことが期待され、次節で述べるような可能性が十分考えられ、今後の課題である。また、今日までにヒトをはじめとする高等生物から細菌などの下等生物にいたるまで、それらの遺伝子またはゲノムの塩基配列に関する情報が急速に蓄積されてきている。これらの DNA の一次構造から二次構造を予測する際に、(1) と (2) の知見は重要な基礎的情報を提供する。(3) の成果から、三重鎖 DNA の生物学的機能に関して新しい手掛かりをもたらすことが期待される。以上の結果は、真核生物の遺伝子発現と制御における DNA の高次構造の役割の解明に役立つものと考えられる。

今後の課題と発展

助成期間の 1 年では計画したすべてのプロジェクトを完遂するには至らなかったが、DNA のトポロジー変化と分子内三重鎖構造の形成機構に関して新しいモデルを提出することができた。また、ポジショニングしたヌクレオソームを含む酵母ミニクロモソームを用いるという新しいアプローチによって DNA の高次構造がクロマチンの構築に及ぼす影響について基礎的な結果が得られてきた。本研究の結果から、さらに今後なすべき課題、発展性が下記のように具体化されてきた。

近年、DNA のトポロジーが遺伝子の発現と制御に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。分子内三重鎖構造の二つの異性体形成によってスーパーコイルの緩和の度合いが異なる

ことは、塩基対レベルでのコンフォメーションの違いだけではなく、グローバルな DNA のトポロジーのダイナミックな変化も異なることを意味している。三重鎖形成による DNA トポロジーの変化と遺伝子発現との関係は重要な検討課題であり、本研究によって提出された三重鎖形成機構はこの研究の基礎となる。また、近年 Pur・Pyr 配列二重鎖を認識する蛋白質が同定されてきているが、三重鎖に構造変化することによってこれらの蛋白質の結合が阻害されることが考えられる。一方では、分子内三重鎖構造は三重鎖結合蛋白質やポリピリミジン配列単鎖結合蛋白質などの認識部位として機能していることも考えられ、DNA-蛋白質相互作用の制御に関与しているかも知れない。蛋白質因子と分子内三重鎖との特異的相互作用についても急務な課題である。以上のように、三重鎖構造の転写、複製、組換えの諸過程における役割について多方面から検討しなければならない。

また、本研究において得られたクロマチン構造に及ぼす non-B 型構造の影響についての基礎的知見から、染色体が構築される過程において、DNA は秩序的に折りたたまれなければならない、DNA の高次構造がその調節に機能している可能性が考えられる。細胞核内に DNA を詰め込むことがクロマチンの機能であると従来考えられてきたが、最近、ヌクレオソームやクロマチン構造が遺伝子発現の調節に積極的に関与しているという実験結果が相次いで報告されている。したがって、真核細胞において DNA の高次構造、クロマチン構造、遺伝子発現という関連性について研究を展開していくことは重要と考える。また、多くの DNA の高次構造に関する研究は、合成 DNA や大腸菌プラスミドを用いて行われている。本研究において開発した *S. cerevisiae* の系が DNA 高次構造の生物学機能について研究するための新しい実験系となることを期待している。

謝辞 本研究を展開するにあたり、ご援助を賜りました(財)日産科学振興財団に衷心より感謝いたします。

発表論文リスト

- 1) 清水光弘, 神藤平三郎, 松本 潮 (1993): 三重鎖 DNA. 生物物理, 33(No. 2), 68-73.
- 2) Shimizu, M., Kubo, K., Matsumoto, U. and Shindo, H. (1993): The loop sequence plays crucial roles for isomerization of intramolecular DNA triplexes in supercoiled plasmids. *J. Mol. Biol.*, in press.
- 3) 清水光弘, 神藤平三郎, 松本 潮 (1994): 三重鎖 DNA の化学と生物学. フェルマシア, 印刷中.
- 4) 久保京子, 清水光弘, 松本 潮, 神藤平三郎 (1993): DNA の高次構造とクロマチンの構築: 酵母ミニクロモソームを用いた実験系の開発. 第 16 回日本分子生物学会年会講演要旨 p. 398.