

学位審査報告書

（ふりがな） 氏名	ましも ともこ 眞下 知子
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	理博第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科 化学専攻
（学位論文題目） Folding Pathways of Human Telomeric G-quadruplex Structures （ヒトテロメアグアニン四重鎖構造のフォールディング経路）	
論文調査委員	（主査） 杉山 弘 教授 三木 邦夫 教授 秋山 芳展 教授

理学研究科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	眞下 知子
論文題目	Folding Pathways of Human Telomeric G-quadruplex Structures (ヒトテロメアグアニン四重鎖構造のフォールディング経路)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒトの染色体末端には TTAGGG の繰り返し配列からなるテロメア領域があり、その 3'末端側は single strand となっている。Single strand は、G-quadruplex 構造を形成すると考えられており、この構造を形成すると酵素テロメラーゼの働きが阻害される。そのため、G-quadruplex 構造の研究は抗がん剤の魅力的なターゲットとなっており注目を集めている。</p> <p>ヒトテロメアについてはコア配列 5'-A(GGGTTA)₃GGG-3'について研究され、これまでにさまざまな構造が報告されている。Na⁺溶液中では、対角ループをもつ antiparallel 構造が NMR により決定され、K⁺存在下での結晶構造ではプロペラループをもつ parallel 構造であることが示された。一般に、細胞中では K⁺濃度が Na⁺濃度よりも高いため、K⁺溶液中の構造が重要である。当研究室をはじめ 2つの研究グループによって、K⁺溶液中で 5'-XA(GGGTTA)₃GGGY-3'配列は (3+1)の特異な GGG (G-tract) をもつ type-1 や type-2 構造を形成することが示されている。さらに、d[(GGGTTA)₃GGGT]という配列において、2つの G-tetrads 平面から形成されるバスケットタイプの新しい type-3 構造が NMR によって明らかにされている。しかしながら、Type-1 や type-2 構造の形成に関する中間体の構造や全体のフォールディング機構は不明であった。</p> <p>そこで、申請者はフォールディングの経路について計算化学的検討を行った。Random coil からのフォールディングはまず GG Hoogsteen 塩基対の形成から開始されると考えた。GG 塩基対の安定性を検討するため、GG 塩基対の量子化学計算を行った。その結果、GG Hoogsteen 塩基対は AT 塩基対と同程度の安定性があることが明らかになった。すなわち、random coil からまず GG 塩基対が形成すると考えれば、エントロピー的に有利な近接した G-tract が hairpin 構造を形成することによって、3種の hairpin 構造を形成することができると考えた。実際に、G-tract 1, 2 から形成される hairpin は、<i>syn</i>, <i>anti</i> コンフォメーションの組み合わせ方により 8通り考えられる。同様に、G-tract 2, 3 から 8通り、G-tract 3, 4 から 8通り考えられ、計 24通りの hairpin が形成可能である。申請者は次に、hairpin が triplex にフォールドする過程を検討した。特に、K⁺のグアニンへの配位によってフォールディングが開始され、triplex 構造が形成されると考察した。実際に Hairpin 構造内のグアニン 6 位酸素と K⁺との配位状態を、水中での 5'-TTAG(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)G(<i>anti</i>)TTA-3' / 5'-TAAG(<i>syn</i>)G(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)TAA-3'の大規模分子動力学計算によって解析した。その結果、5'-G(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)-3'/5'-G(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)-3'中の 4つのグアニン 6 位酸素は、ほぼ同一円周上に配置することが判明し、K⁺が配位しやすいことを発見した。興味深いことに K⁺が配位した二量体ユニット 5'-G(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)-3'/5'-G(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)-3'について量子化学計算を行うと、グアニンの 6 位酸素がほぼ平面状に正方形に並び、K⁺が配位しやすい最適構造に収束した。G-tract 1-2 から形成される 8 種類の hairpin 1-2 のうち、5'-G(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)-3'/5'-G(<i>syn</i>)G(<i>anti</i>)-3'のコンフォメーションをもつものは 4種類である。同様に hairpin 2-3 から 4種類、hairpin 3-4 から 4種類、計 12種類が考えられる。</p> <p>また、これまでのデオキシグアノシンの <i>syn</i>, <i>anti</i> コンフォメーションの安定性の検討によって、<i>syn</i> より <i>anti</i> の方が安定であることが示されている。従って、フォールディングは、デオキシグアノシンの <i>syn</i> を減らすように進むと考えられ、<i>syn</i> が 4つの triplex 構造が選択された。尚、フォールドする際に、K⁺がフォールドするループの近くに配位する方がエントロピー的に有利と考えて、4種の triplex 構造が選択された。それぞれの triplex が G-quadruplex 構造を形成したと仮定し、G-quadruplex の安定性を比較した。G-tetrad の重なり方は、同じ方向の重なり方と反対方向の重なり方の二種類のスタッキングの仕方が考えられる。FMO 計算を行ったところ、同じ重なり方の方が 9.1 kcal/mol 程安定であった。G-quadruplex 構造へのフォールディングは、同じ方向の G-tetrad の重なりが少なくとも一つ必要と考えた。以上のことより、今回、ランダムコイルから type-1, type-2 G-quadruplex 構造への新しいフォールディング経路を提案した。また、5'末端側に周辺配列がなく G から始まる d[(GGGTTA)₃GGGT]配列において考えられている Type-3 構造へのフォールディング経路についても提案した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

今回、申請者は計算化学的手法を駆使して、ヒトテロメア配列の四重鎖構造のフォールディング過程について検討したものである。染色体末端に存在するテロメア領域はグアニンに富む繰り返し配列をもっており、細胞分裂の度に短縮される。そのため細胞分裂の回数を計るカウンターの役割を果たし、無軌道な分裂を防ぐ役割を果たしている。80%のがん細胞ではテロメラーゼを発現することにより、テロメアの短縮を防ぎ、不死化を獲得している。正常細胞では一部の細胞を除いてテロメラーゼの発現量はすくないため、テロメラーゼは抗がん剤の新しいターゲットとして注目されている。2000年に東京大学の瀬戸、新家らによって放線菌が産生するテロメスタチンが強いテロメラーゼ阻害活性を示すことが明らかにさせている。驚くべきことに、その作用点はテロメラーゼ自身ではなくDNA四重鎖構造であることが明らかになった。そのためヒトテロメア配列の形成する四重鎖構造について研究が精力的に行われた。2006年に申請者のグループの他、米国の2グループがその構造がType-1、type-2と呼ばれる特異な3+1のハイブリッド構造であることを明らかにした。

申請者は *ab initio* やフラグメント MO 法などの最新の量子化学計算や、水中での大規模分子動力学計算を駆使し、ヒトテロメア配列の四重鎖構造のフォールディング過程について詳細に検討を行った。まず、グアニン(G)の形成する Hoogsteen 塩基対についてダイマー、トリプレット、カルテットについて *ab initio* 計算を行い、G-G 塩基対が Watson-Crick A-T 塩基対程度の安定性があることを確認し、まず G-G 塩基対形成により隣接する GGG 配列でヘアピン形成が起こることを考えた。また、GGG 配列を含む DNA の水中での分子動力学計算により *syn-anti* のコンフォメーションをとると G の 6 位酸素がほぼ平面にならび、K⁺が結合しやすいことが明らかにした。実際、*ab initio* 計算においても GG₂ 量体ユニットに K⁺が結合した最安定化構造が得られることを示した。また次に形成すると考えられる三重鎖構造において *anti* コンフォメーションが少なくなるように、また金属が近いサイトで形成がおこることを仮定することによって、4種類の三重鎖構造が得られることを明らかにした。またフラグメント MO 法を用いて 3+1 のハイブリッド構造について検討することによって、同じ配向の G-カルテットで大きなスタッキング相互作用が存在することを明らかにした。これら計算化学的手法を駆使し、得られた結果を総合することによって、Type 1 と Type 2 の構造のフォールディング経路が論理的に導き出すことに成功した。

以上、本論文はヒトテロメア配列の四重鎖構造のフォールディング過程について、最新の計算化学的手法で解析を行ったものであり、オリジナリティーの高い優れた研究である。また、得られた結果は、分子生物学や細胞生物学などの研究分野にも波及する新たな知見である。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成23年1月19日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。