



**Title:** Protocol for the circular dichroism spectral analysis of the thermal stability of CpG-methylated quadruplex structures

(円二色性スペクトル解析法を用いた CpG メチル化四重鎖構造の熱安定性解析法のプロトコール)

**Authors:** Momo Moriya, Taiji Oyama, Masanori Goto, Kazunori Ikebukuro, Wataru Yoshida

(守屋 桃 (東京工科大 大学院生)、大山 泰史 (日本分光株式会社、東京農工大 大学院生)、

後藤 雅典 (東京工科大 大学院生)、池袋 一典 (東京農工大 教授)、吉田 亘 (東京工科大 教授))

**Journal:** STAR Protocols 6 (2025) 103646

**掲載年月:** 2025 年 2 月

**研究概要:** 核酸は二重らせん構造だけでなく、グアニン四重鎖や i-motif 構造などの特殊な高次構造も形成する。この高次構造形成が種々の生命現象の制御に関連していることが報告されているが、その構造形成制御機構は不明な点が多い。本研究では円二色性 (CD) スペクトル法と Python 3 を用い、エピジェネティック修飾が核酸の高次構造形成に与える影響を解析する方法を開発した。

**研究背景:** DNA は通常二重らせん構造を形成するが、グアニン四重鎖や i-motif 構造などの特殊な高次構造も形成し、この構造形成が転写や翻訳、複製等の生命現象の制御に関連している。DNA メチル化とは主にシトシンとグアニンの連続配列 (CpG) 中のシトシンのメチル化され 5-メチルシトシンとなる反応であり、プロモーター中の CpG がメチル化されると、その遺伝子の発現は抑制される。近年、これら核酸の高次構造形成制御に 5-メチルシトシンなどのエピジェネティック修飾が関連していることが報告されており、エピジェネティック修飾が核酸の高次構造形成に与える影響を解析する方法の確立が求められていた。そこで、本研究では CD スペクトル法と Python 3 を用い、正確に核酸の高次構造の熱安定性を評価する方法を開発した。

**研究成果:** 本研究ではモデル系として、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) 遺伝子のプロモーターに含まれる i-motif 構造形成オリゴヌクレオチド (5'-CCCCGCCCGCCCGCCCG-3') を用いた。すべての CpG をメチル化した VEGF i-motif 構造形成オリゴヌクレオチドを合成し、カコシル酸緩衝液 (pH=4.8) 中で 25°C から 95°C まで測定温度を 1°C ずつ上昇させながら、220 nm から 320 nm の CD スペクトルを測定した。このデータセットから i-motif 構造の熱力学的パラメーター ( $T_m$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) を算出できる Python 3 のコードを開発した。実際に得られた CD スペクトルを Python 3 で解析した結果、VEGF i-motif の  $T_m$  は、メチル化により 2.2°C 上昇することが明らかになった。

**社会的・学術的なポイント:** 核酸はグアニン四重鎖構造や i-motif 構造だけでなく、三重鎖、R-loop、D-loop、ステムループ、十字構造など、様々な高次構造を形成する。さらに、エピジェネティック修飾としては 5-メチルシトシン以外にも 5-ヒドロキシメチルシトシンや 5-ホルミルシトシン、5-カルボキシシトシン、N<sup>6</sup>-メチルアデニンなどが同定されている。本研究で開発した手法を用いれば、これら核酸の高次構造形成制御に関与しているエピジェネティック修飾が同定でき新たな生命現象の発見に貢献すると期待される。

#### 用語解説:

**グアニン四重鎖:** 4 つのグアニン間で形成される平面構造 (G カルテット) がスタッキング相互作用により、積み重なって形成される構造

**i-motif 構造:** プロトン化シトシンとシトシン間で形成される塩基対が互い違いに重なって形成される構造

**円二色性 (CD) スペクトル法:** 光学活性物質に左右の円偏光を照射し、その吸収の差から立体構造を解析する手法