

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05314

研究課題名(和文)細胞内RNA四重鎖を標的とする構造プローブ法の開発

研究課題名(英文)Structural probing of RNA G-quadruplex structures in vivo

研究代表者

石塚 匠 (Ishizuka, Takumi)

宮崎大学・医学部・学部講師

研究者番号：50700085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNA四重鎖構造(rG4)は生物学的に重要な役割を担っていると考えられ、創薬のターゲットとして期待されている。本研究では、Ce(IV)/EDTA錯体が、rG4中の特定のヌクレオチド位置を効果的かつ選択的に切断できる分子ハサミであることを見出した。また、rG4のループ部位がCe(IV)/EDTA錯体によって特異的に切断されることを示した。この切断はrG4における構造依存的な切断であり、rG4をヌクレオチドの分解能でプローブする有用な方法である。本手法はRNA構造の塩基配列分解能での解析を容易にし、疾患に関連するrG4を標的とするためのコンセプトを提供するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

rG4は神経疾患に関与しており、今回開発したrG4解析法は、形成メカニズムをはじめとした未解明の機能の理解が進むものと期待される。Ce(IV)/EDTA錯体の生体親和性を考慮するとin vivoでのrG4の解析が可能であり、本手法を利用した診断法への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：RNA G-quadruplexes (rG4) have important biological roles and are expected as an attractive therapeutic target for drug design. The structural analysis of rG4 provides significant information for a better understanding of the function of rG4. We found that Ce(IV)/EDTA complex as a molecular scissor that can be effectively and selectively cleaved specific position of nucleotides in rG4. We demonstrated that the loop regions of rG4 are specifically cleaved by the Ce(IV)/EDTA complex. This strategy provides a useful method to probe rG4 at nucleotide resolution. The current study is the first step in providing insight into the structure-dependent Ce(IV)/EDTA reactivity in rG4. The method will likely make possible facile nucleotide resolution analysis of RNA structures and provides a concept for targeting rG4 related to disease.

研究分野：核酸化学

キーワード：グアニン四重鎖 RNA セリウム

1. 研究開始当初の背景

多くの高次構造を形成する RNA 分子は、転写、スプライシング、細胞内局在化、翻訳、ターンオーバーなど、細胞内の様々な活動に寄与している。その中でも RNA グアニン四重鎖 (rG4) は、グアニン塩基が富む配列中に G-テトラッドが形成された高次構造であり、ヒトの疾患や癌に関連し (Varshney *et al. Nat Rev Mol Cell Biol* 2020)、治療標的としても期待されている (Kharel *et al. WIREs RNA* 2020)。先行研究では、GGGGCC リピート配列によって形成された rG4 が、RNA-RNA 相互作用や転写停止を介して蓄積を誘導し、神経変性疾患の発症に寄与していることが示唆された (Haeusler *et al. Nature* 2014)。従って、rG4 構造を *in vitro* や *in vivo* で解析することに注目が集まっている。2'-水酸基のアシル化による検出 (Kwok *et al. ACIE* 2016) や逆転写酵素の stalling による検出 (Kwok *et al. Nat Methods* 2016) などが報告されているが、rG4 だけではなく他の高次構造も検出してしまふ、熱安定性の低い rG4 の場合には stalling が起こらず検出できない、といった課題が両者に見られる。このように rG4 構造の解析方法はいくつか報告されているが、rG4 をより効率的に標的とする化学的方法が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、ランタノイド金属イオンであるセリウム(IV)を rG4 構造の強力なプローブとして用いることで、rG4 構造をより効率的に標的とする新しい解析方法の開発を目的とした。戦略はセリウム(IV)と配位子である EDTA を用い、rG4 ハサミとして働く Ce(IV)/EDTA 金属錯体を使用する。これまで Ce(IV)/EDTA による位置選択的な DNA プローブ (切断) に成功している。具体的には Ce(IV)/EDTA を用いた PNA (ペプチド核酸)/DNA ハイブリッド四重鎖形成によるヒトゲノムの G-rich 配列特異的切断 (Ishizuka *et al. ACIE* 2012) や、単一染色体末端のテロメア長の検出 (Ishizuka *et al. JACS* 2013) を実現している。この Ce(IV)/EDTA による位置選択的切断は、二本鎖 DNA の切断速度は極めて遅いが、一本鎖 DNA の切断速度は非常に速い、という特性を生かしている。RNA 鎖においては効率的ではないことは検討済みである。しかしながら、rG4 のループ部位にあたる一本鎖を標的的可能であると考え。それは申請者のグループが、テロメア関連タンパク質がテロメア配列で形成される rG4 のループ部位に”構造依存的に結合する”という報告に基づく (Liu, Ishizuka, Xu *et al. JACS* 2017)。種々の検討から単純な一本鎖 RNA には結合しなかったため、四重鎖内のループ部位の一本鎖 RNA は単純な一本鎖 RNA とは異なることが明らかとなった。即ち、ループ部位の一本鎖 RNA が擬似的に活性化されたような環境下であれば、RNA 鎖においては切断が効率的ではない Ce(IV)/EDTA でも標的にできる。こうした考えのもと、rG4 構造内のループ部位にあたる一本鎖を標的とした構造解析法を開発した。

3. 研究の方法

本研究では、rG4 構造内のループ部位にあたる一本鎖を標的とした構造解析法を開発し、テロメア RNA 配列や神経変性疾患に關与するリピート配列の rG4 構造において応用可能かを検討した。

(1) rG4 構造解析法の開発

Ce(IV)/EDTA を用いて rG4 構造内のループ部位にあたる一本鎖 RNA を標的とすることができると検討した (図 1)。また、条件の最適化に加え、Ce(IV)/EDTA の作用機序を NMR および反応速度などの物理化学的データの取得により解析した。さらに四重鎖に特異的かどうかを評価するため RNA 配列中の rG を四重鎖形成能に乏しい 7-デアザグアノシンに置換した合成オリゴを用いて検討した。

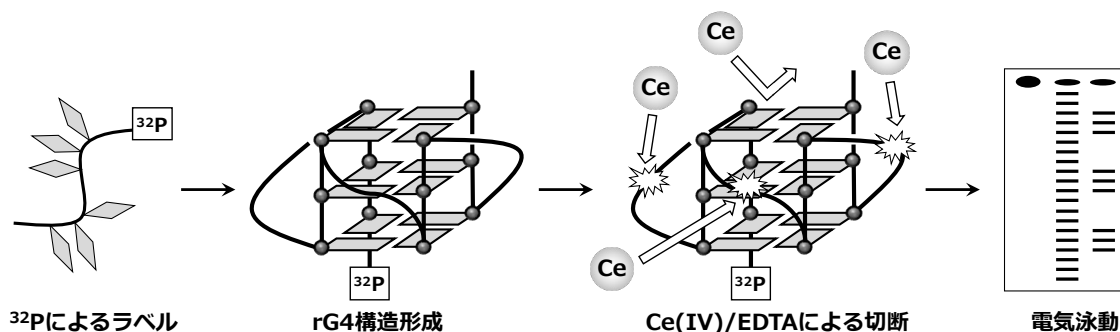


図 1 Ce(IV)/EDTA による rG4 構造の解析技術の概要

(2) 開発した rG4 構造解析法の汎用性の検証

現在まで報告がなされている rG4 構造すべてにおいて本技術を応用し、その汎用性を実証した。テロメア RNA 配列や神経変性疾患におけるリピート配列、mRNA および 5'-UTR における配列で形成される rG4 構造が該当する。また、rG4 構造に加え、ヘアピンやバルジ、インターナルループ構造が共存した長鎖 RNA 配列においても検討し、rG4 構造選択性を検証した。

4. 研究成果

(1) rG4 構造解析法の開発

Ce(IV)/EDTA をテロメア RNA 配列で形成される rG4 に作用させると、rG4 の構造中のループ部位にあたる一本鎖 RNA が効率的に切断された。UUAGGG の 6-mer で形成される rG4 にはループ部位がないため、特異的な切断断片が確認されない一方で、ループ部位が存在する 12-mer、18-mer および 24-mer では UUA のループ部位の切断に由来する断片が確認された (図 2 a)。rG4 に Ce(IV)/EDTA を作用させることで rG4 内のループ部位にあたる一本鎖 RNA を標的可能であることが明らかとなった。切断活性が最大となる条件を決定し、Ce(IV)/EDTA の作用機序を反応速度の物理化学的データの取得による解析も行った。さらに、Ce(IV)/EDTA による rG4 の部位特異的切断の切断機構を明らかにするため、質量分析法により切断断片を調査した。その結果、ホスホジエステル結合は、加水分解的に 3' および 5' 側の両側で起こることが確認された (図 2 b)。こうして、rG4 をヌクレオチドレベルの分解能で検出可能な技術の開発に成功した。

(2) 開発した rG4 構造解析法の汎用性の検証

開発した rG4 を標的とする構造解析法の実用性および汎用性を評価するため、テロメア RNA 配列や神経変性疾患におけるリピート配列、mRNA および 5'UTR における配列で形成される rG4 構造に対して本手法を応用した。また、rG4 選択性を検証するため、ヘアピン、バルジやインターナルループ構造を有する RNA 配列においても検討した。その結果、形成される構造により切断効率が異なることが明らかとなり、rG4 選択的に解析できることを実証した。

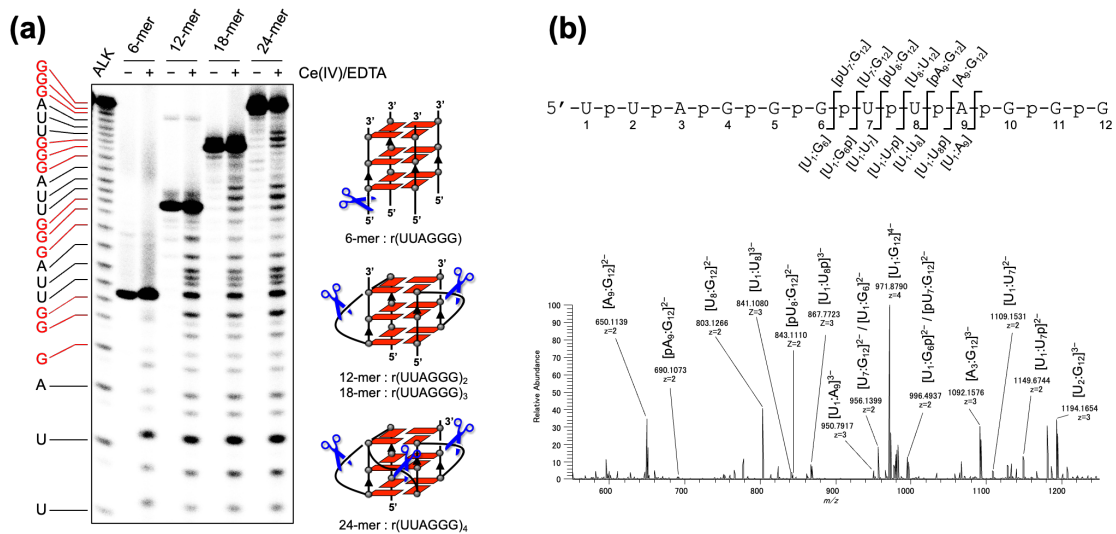


図 2 (a) テロメア RNA 配列 (6-mer, 12-mer, 18-mer および 24-mer) で形成される rG4 に対して Ce(IV)/EDTA を作用させた後の電気泳動図 (b) rG4 (12-mer のテロメア RNA 配列) に Ce(IV)/EDTA を作用させた後、質量分析により切断断片を解析した結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Zhiyong He, Takumi Ishizuka, Yoshitaka Hishikawa, Yan Xu | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Click chemistry for fluorescence imaging via combination of a BODIPY-based 'turn-on' probe and a norbornene glucosamine | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Communications | 6. 最初と最後の頁 12479-12482 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2CC05359D | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Narantsog Choijookhuu, Yasuaki Shibata, Takumi Ishizuka, Yan Xu, Takehiko Koji, Yoshitaka Hishikawa | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 An Advanced Detection System for In Situ Hybridization Using a Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Molecular Beacon Probe | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA | 6. 最初と最後の頁 119-128 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.22-00075 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Shinichiro Shirouzu, Naohiro Sugita, Narantsog Choijookhuu, Yu Yamaguma, Kanako Takeguchi, Takumi Ishizuka, Mio Tanaka, Fidy, Kengo Kai, Etsuo Chosa, Yoshihiro Yamashita, Chihiro Koshimoto, Yoshitaka Hishikawa | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Pivotal role of High-Mobility Group Box 2 in ovarian folliculogenesis and fertility | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Ovarian Research | 6. 最初と最後の頁 133 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13048-022-01071-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yu Yamaguma, Naohiro Sugita, Narantsog Choijookhuu, Koichi Yano, Deokcheol Lee, Makoto Ikenoue, Fidy, Shinichiro Shirouzu, Takumi Ishizuka, Mio Tanaka, Yoshihiro Yamashita, Etsuo Chosa, Noboru Taniguchi, Yoshitaka Hishikawa | 4. 巻 157 |
| 2. 論文標題 Crucial role of high-mobility group box 2 in mouse ovarian follicular development through estrogen receptor beta | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 359-369 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-022-02074-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Fidya, Narantsog Choijookhuu, Makoto Ikenoue, Koichi Yano, Yu Yamaguma, Shinichiro Shirouzu, Kengo Kai, Takumi Ishizuka, Yoshitaka Hishikawa | 4. 巻 161 |
| 2. 論文標題 Protective role of estrogen through G-protein coupled receptor 30 in a colitis mouse model | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 81-93 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-023-02235-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Makoto Ikenoue, Narantsog Choijookhuu, Koichi Yano, Fidya, Nobuyasu Takahashi, Takumi Ishizuka, Shinichiro Shirouzu, Yu Yamaguma, Kengo Kai, Kazuhiro Higuchi, Akira Sawaguchi, Atsushi Nanashima, Yoshitaka Hishikawa | 4. 巻 161 |
| 2. 論文標題 The crucial role of SETDB1 in structural and functional transformation of epithelial cells during regeneration after intestinal ischemia reperfusion injury | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 325-336 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-023-02263-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Narantsog Choijookhuu, Koichi Yano, Baljinnyam Lkham-Erdene, Shinichiro Shirouzu, Toshiki Kubota, Fidya, Takumi Ishizuka, Kengo Kai, Etsuo Chosa, Yoshitaka Hishikawa | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 HMGB2 Promotes De Novo Lipogenesis to Accelerate Hepatocyte Proliferation During Liver Regeneration | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry | 6. 最初と最後の頁 245-264 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/00221554241241569 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 石塚 匠, Narantsog Choijookhuu, 柴田 恭明, 小路 武彦, 菱川 善隆 | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用した高感度 in situ hybridization | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 顕微鏡 | 6. 最初と最後の頁 117-122 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.58.3_117 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚 匠, Narantsog Choijookhuu, 矢野 公一, 池ノ上 実, 山隈 優, 白水 慎一郎, Fidya, 田中 美緒, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 肝再生モデルマウスを用いたグアニン四重鎖構造の機能解明 |
| 3. 学会等名 第39回分子病理学研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山隈 優, Narantsog Choijookhuu, 矢野 公一, 池ノ上 実, 甲斐 健吾, Fidya, 白水 慎一郎, 田中 美緒, 石塚 匠, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 マウス卵巣におけるHMGB2の卵胞形成への関与 |
| 3. 学会等名 第39回分子病理学研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石塚 匠, Narantsog Choijookhuu, 柴田 恭明, 徐 岩, 小路 武彦, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した in situ hybridization 法 |
| 3. 学会等名 第64回日本顕微鏡学会九州支部集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fidya, Narantsog Choijookhuu, Makoto Ikenoue, Koichi Yano, Yu Yamaguma, Shinichiro Shirouzu, Kengo Kai, Takumi Ishizuka, Yoshitaka Hishikawa |
| 2. 発表標題 Estrogen signaling inhibits intestinal epithelial remodeling through G-Protein Coupled Receptor 30 in DSS-induced colitis in mice |
| 3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山隈 優, Narantsog Choijookhuu, 甲斐 健吾, Fidya, 白水 慎一郎, 石塚 匠, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 マウス卵巣における HMGB2 の卵胞形成への関与 |
| 3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 菱川 善隆, Narantsog Choijookhuu, 石塚 匠, 柴田 恭明, 小路 武彦 |
| 2. 発表標題 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)を利用したin situ hybridizationの実際 |
| 3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚 匠, Narantsog Choijookhuu, 白水 慎一郎, Fidya, 甲斐 健吾, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 マウス肝再生過程におけるDNA四重鎖構造の肝細胞周期への関与 |
| 3. 学会等名 第65回日本顕微鏡学会九州支部集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚 匠, Narantsog Choijookhuu, 白水 慎一郎, Fidya, 甲斐 健吾, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 肝再生過程におけるグアニン四重鎖構造の肝細胞増殖への関与 |
| 3. 学会等名 日本解剖学会 第79回 九州支部学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚 匠, Narantsog Choijookhuu, 白水 慎一郎, Fidya, 甲斐 健吾, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 マウス肝再生過程におけるグアニン四重鎖構造の発現動態研究 |
| 3. 学会等名 第64回日本組織細胞化学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石塚 匠, Narantsog Choijookhuu, 白水 慎一郎, Fidya, 甲斐 健吾, 菱川 善隆 |
| 2. 発表標題 肝再生過程におけるDNA四重鎖構造の肝細胞周期への関与 |
| 3. 学会等名 第129回 日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 菱川 善隆, Narantsog Choijookhuu, 石塚 匠, 柴田 恭明, 小路 武彦 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 中西印刷 | 5. 総ページ数 258 |
| 3. 書名 In situ hybridization法 | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 菱川 善隆, Narantsog Choijookhuu, 石塚 匠, 柴田 恭明, 小路 武彦 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 文光堂 | 5. 総ページ数 424 |
| 3. 書名 病理と臨床 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 菱川 善隆, Narantsog Chojookhuu, 石塚 匠, 柴田 恭明, 小路 武彦 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 中西印刷 | 5. 総ページ数 246 |
| 3. 書名 In situ hybridization法 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|