

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310158

研究課題名(和文) 低分子化合物を用いるグアニン四重鎖の検出及び結合タンパク質同定法の開発

研究課題名(英文) Development of high throughput screening method of G-quadruplexes using small molecules

研究代表者

長澤 和夫 (Nagasawa, Kazuo)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10247223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの高次構造であるグアニン四重鎖(G4)は、遺伝子の転写制御に関係し、その探索は新たな創薬標的の発見につながる。我々は大環状ポリオキサゾール化合物(60TD, 70TD)がG4に強力かつ選択的に結合することを見いだしている。本研究では70TDへ蛍光団を導入した蛍光プローブの合成を行い、DNAマイクロアレイへ応用することで、未同定のG4を検出する手法開発を検討した。70TDに蛍光団としてCy5を導入し、G4蛍光プローブを合成した。これを用い、DNAマイクロアレイによるハイスループットスクリーニング実験を行った。その結果、約2,000の新規G4形成配列を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：G-Quadruplexes (G4s) are three-dimensional structures that are formed in guanine-rich polynucleotides. Relatively few G4-forming oligonucleotides (GFOs) have been identified so far, but they are important because they play significant roles in regulation of gene expression and replication. Computational analysis suggests huge numbers of GFOs are present in the genome. However, there has been no simple and direct screening methodology for large-scale screening of GFOs. In this project, we have developed a high-throughput screening method for GFOs by using the fluorescent G4 ligand L1Cy5-70TD with a DNA microarray. With this method, we found 1,998 novel GFOs in a CpG island (CGI) microarray bearing 88,737 targets. Gene Ontology (GO) analysis suggests that these GFOs were mainly associated with metabolic processes, transcriptional regulation, biosynthetic processes and developmental processes. The present method would be easily applicable to other DNA microarrays.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：グアニン四重鎖 テロメア DNAマイクロアレイ テロメスタチン 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

染色体末端に存在するテロメアに代表されるように、グアニン残基を豊富に含む DNA の一本鎖配列では、1価カチオン(K^+ , Na^+ 等)の存在下、4分子のグアニン残基が G-quartet と呼ばれる平面構造を形成し、それがさらに $\pi-\pi$ 相互作用により重なることで、グアニン四重鎖(以下 G4)と呼ばれる高次構造を形成する。G4 を形成する可能性のある DNA 配列は、配列相同性解析の結果から、ヒト遺伝子プロモーターの約 40%以上に存在することが示唆されている。しかし実際に見いだされているのは、テロメアを含む、*c-myc*, *c-kit*, *bcl-2* 遺伝子プロモーターなど約 10 種類のみである。またこれらが形成する G4 の機能については、殆ど知られていなかった。

一方 Hurlley 等は 2009 年、*c-myc* 癌遺伝子のプロモーターで形成される G4 構造(*c-myc* G4)が、ヌクレオリタンパク質と結合し、*c-myc* の転写が抑制されることを見出した。これは、「G4 が、遺伝子の転写調節を制御する」ことを意味する。即ち、G4 やそれを介在するタンパク質は新たな転写制御因子として捉えることができ、新規な G4 形成配列やそれに結合タンパク質の発見は、新たな創薬標的に直結する。しかし、新規 G4 形成配列の探索は困難な状況にある。

現在、任意の DNA 配列に対する、直接的な G4 形成の有無を確認する方法は、NMR である。NMR による解析は、多数のシグナルの重なりから常に困難を極め、多大な時間を要する。一方、間接的な確認法として用いられるのが、ジメチル硫酸(DMS)を用いた Footprinting 法である。これは、対象 DNA 配列において、G-quartet を形成するグアニンが DMS によるメチル化を受けないことに基づく検出方法である。本手法は、DNA メチル化 DNA 切断電気泳動による断片の検出、の工程を含み、多大な時間を要する。

したがって現在、G4 の簡便かつ確実な検出法が求められている。

2. 研究の目的

最近我々は、開発した 2 種類の大環状ポリオキサゾール化合物(60TD および 70TD)を G4 リガンドとして開発した。そこで本研究では、これらの知見を基に、70TD に蛍光官能基を導入した、「新規蛍光型 G4 リガンド」を合成し、これを用いることで、新規 G4 形成配列の簡便な検出法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

70TD 骨格に蛍光官能基を導入した蛍光型 G4 リガンドを用い、GFM の G4 形成を、蛍光で検出することを検討することとした。そこでまず以下の実験を計画した。

1. 新規蛍光型 G4 リガンドが、既知の G4 形成配列(*c-myc*, *c-kit*, *bcl-2*, *k-ras*, *n-ras*, *VEGF*)に対し、G4 へ構造誘起し、それを安定

化することを、Footprinting 法を用いて評価する。

2. 既知の G4 形成配列について、蛍光型 G4 リガンドによる G4 構造の可視化を、電気泳動法にて確認したのち、蛍光偏光法への適用を検討する。

3. G4 形成配列の変異型配列(G4 を形成しない)について、蛍光型 G4 リガンドと相互作用せず蛍光検出されないことを、項目 1、2 の実験より確認する。(蛍光型 G4 リガンドの G4 への選択的相互作用に関する評価)。

これら上述の実験により、新規蛍光型 G4 リガンドを用いた蛍光による G4 の簡便な検出法を確立する。

確立した手法を基に、蛍光 G4 リガンドと DNA マイクロアレイを用いることで、網羅的な G4 形成配列の探索手法の開発を行うことを計画する。

4. 研究成果

まず、DNA マイクロアレイに適用可能な蛍光 G4 プローブとして L1Cy5-70TD を合成した(Figure 1)。

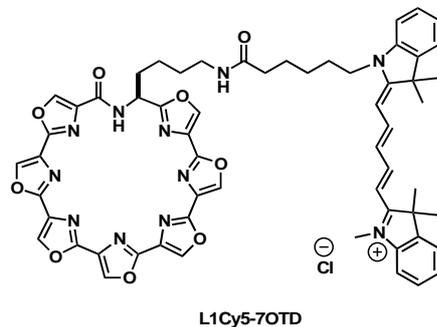


Figure 1 L1Cy5-70TD の構造

L1Cy5-70TD を得ることができたので、次に L1Cy5-70TD が新規 G4 同定法のためのプローブとしての特性を有していることを評価するため、G4-FID(G-quadruplex fluorescent intercalator displacement)を行った。本手法により、DNA の塩基対に結合した thiazole orange(TO)の追い出し効率を G4 安定化能の指標として評価することができる。その結果、L1Cy5-70TD は G4 形成配列として知られる 5 種の G4(*telo24*, *c-myc*, *c-kit*, *bcl-2*, *K-ras*)を強力に安定化する一方、二本鎖配列とは相互作用しないことが明らかとなった(Table 1)。なお、このときの追い出し効率(DC₅₀: 50%TO が追い出される濃度)は、DNA が 0.25 μ M、TO が 0.5 μ M 存在下において、5 種の G4 形成配列が 0.31-0.67 μ M、二本鎖が 2.5 μ M 以上であった。

L1Cy5-70TD が新規 G4 同定法のプローブとして有効であることが示されたので、実際に DNA マイクロアレイ上での G4 同定を検討することとした。DNA マイクロアレイは、CpG アイランドに G4 が多数存在することが示唆されていたため、マウス CpG アイランド

Table 1 G4-FID

DNA	DC ₅₀ (μM)
telo24	0.31 ± 0.07
bcl-2	0.34 ± 0.08
c-kit 1	0.36 ± 0.13
c-kit 2	0.21 ± 0.07
c-myc	0.47 ± 0.10
k-ras	0.67 ± 0.05
dsDNA	> 2.5

microarray を用いた。この DNA 上マイクロアレイ上に、KCl (100 mM) 存在下、L1Cy5-70TD (10 nM) を滴下し、室温で 1.5 時間静置後、5 分間バッファーで洗浄し、スキャナーで読み取りを行った。その結果、シグナル強度が高い配列群の中から 1,998 配列を新規分子内 G4 形成配列として同定した。

本手法で得られた 1,998 配列が L1Cy5-70TD と結合し、G4 を形成していることを確かめるため、10 配列をランダムに選抜して G4 形成を評価することとした。まず、L1Cy5-70TD と 10 配列の結合を確かめるため、10 種の DNA に対し、10 当量の L1Cy5-70TD 存在下、EMSA を行った。その結果 10 配列すべての DNA は L1Cy5-70TD と、確かに結合していることが確かめられた (Figure 2)。

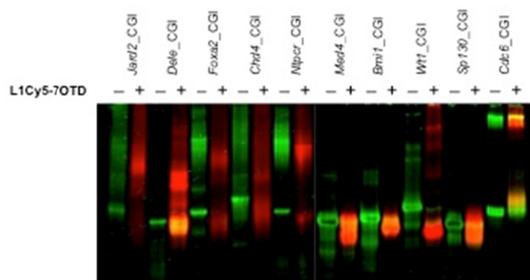


Figure 2 EMSA の結果

次いで、これら 10 種の DNA と L1Cy5-70TD の結合が示されたので、10 種の DNA が G4 を形成していることを種々の CD スペクトル解析により確認した。その結果 10 配列全てのスペクトルに G4 形成に由来するピークが確認された (Figure 3)。

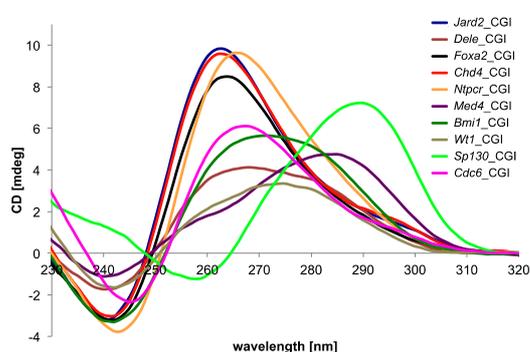


Figure 3 CD スペクトルの結果
また、より直接的に G4 形成を確かめるた

め、10 種の DNA に対し DMS Footprinting を行った。その結果、本手法においても全ての DNA が K⁺ 存在下において、G4 を形成していることが明らかとなった (Figure 4)。

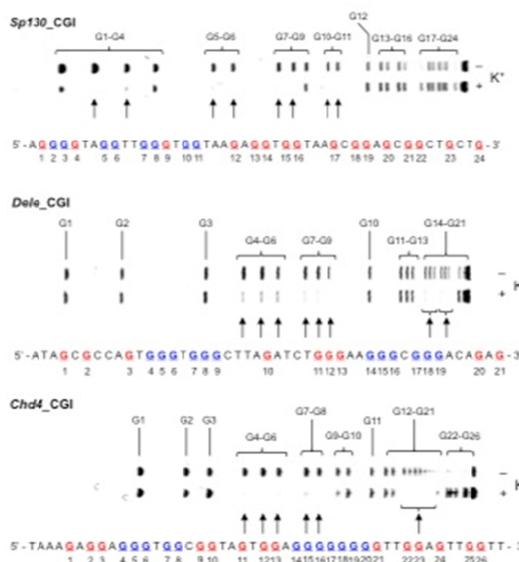


Figure 4 DMS Footprinting の結果

以上により、DNA マイクロアレイ実験で同定した 1,998 配列からランダムに選抜した 10 配列が G4 を形成していることが確認されたため、1,998 配列は G4 形成配列であることが示唆された。最後に、同定した 1,998 配列の近傍に位置する 1,578 の遺伝子を生物学的プロセスカテゴリーの遺伝子オントロジーにより解析した。その結果、これらの 1,578 の遺伝子は代謝、転写調節、生合成、発生等に関与していることが明らかとなり、これらの遺伝子調節に今回同定した G4 が関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[[雑誌論文](計 13 件)

Keisuke Iida, Gen Tsubouchi, Takahiro Nakamura, Kazuo Nagasawa, "SYNTHESIS OF MACROCYCLIC DIMER OF CYCLIC HEXAOXAZOLE AND EXAMINATION OF ITS INTERACTION WITH TELOMERIC OLIGONUCLEOTIDE", *Heterocycles*, **2014**, *88*, 1287-1298, DOI: 10.3987/COM-13-S(S)97. (査読あり)

Keisuke Iida, Takahiro Nakamura, Wataru Yoshida, Masayuki Tera, Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro Hata, Kazunori Ikebukuro and Kazuo Nagasawa, "Fluorescent ligand-mediated screening of G-quadruplex structure using a DNA microarray", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 12052-12055, DOI: 10.1002/anie.201305366 (査読あり)

Tarek Shalaby, Giulio Fiaschetti, Kazuo Nagasawa, Kazuo Shin-ya, Martin Baumgartner, Michael Grotzer, " G-Quadruplexes as a Potential Therapeutic Target for Embryonal Tumors ", *Molecules*, **2013**, *18*, 12500-12537, DOI: 10.3390/molecules181012500. (査読あり)

Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, " Macrocylic Polyoxazoles as G-Quadruplex Ligands ", *Chem. Rec.*, **2013**, *13*, 539-548, DOI: 10.1002/tcr.201300015. (査読あり)

Wan Jun Chung, Brahim Heddi, Masayuki Tera, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa and Anh Tuan Phan, " Solution structure of an intramolecular (3+1) human telomeric G-quadruplex bound to a telomestatin derivative " *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 13495-13501, DOI: 10.1021/ja405843r. (査読あり)

Keisuke Iida, Satoki Majima, Takahiro Nakamura, Hiroyuki Seimiya and Kazuo Nagasawa, " Evaluation of the Interaction between Long Telomeric DNA and Macrocylic Hexaoxazole (60TD) Dimer of a G-quadruplex Ligand ", *Molecules*, **2013**, *18*, 4328-4341, DOI: 10.3390/molecules18044328. (査読あり)

Keisuke Iida, Gen Tsubouchi, Takahiro Nakamura, Satoki Majima, Hiroyuki Seimiya, and Kazuo Nagasawa, " Interaction of long telomeric DNAs with macrocylic hexaoxazole as a G-quadruplex ligands ", *Med. Chem. Commun.*, **2013**, *4*, 260-264, DOI: 10.1039/C2MD20234D. (査読あり)

Takahiro Nakamura, Keisuke Iida, Masayuki Tera, Kazuo Shin-ya, Hiroyuki Seimiya, and Kazuo Nagasawa, " A Caged Ligand for a Telomeric G-Quadruplex ", *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 774-777, DOI: 10.1002/cbic.201200013. (査読あり)

Keisuke Iida, Satoki Majima, Terumi Ootake, Masayuki Tera, Kazuo Shin-ya, and Kazuo Nagasawa, " Design and Synthesis of G-Quadruplex Ligands Bearing Macrocylic Hexaoxazoles with Four-Way Side Chains " *Heterocycles*, **2012**, *84*, 401-404, DOI: 10.3987/COM-11-S(P)88. (査読あり)

Yo Morita, Wataru Yoshida, Nasa Savory, Sung Woong Han, Masayuki Tera, Kazuo Nagasawa, Chikashi Nakamura, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, " Development of a novel biosensing system based on the structural change of a polymerized guanine-quadruplex DNA nanostructure ", *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, *26*, 4837-4841, DOI: 10.1016/j.bios.2011.05.050. (査読あり)

Yosuke Amemiya, Yui Furunaga, Keisuke Iida, Masayuki Tera, Kazuo Nagasawa,

Kazunori Ikebukuro, and Chikashi Nakamura, " Analysis of unbinding force between telomestatin derivatives and human telomeric G-quadruplex by atomic force microscopy ", *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 7485-7487, DOI: 10.1039/C0CC05781A. (査読あり)

Takayuki Doi, Kazuaki Shibata, Masahito Yoshida, Motoki Takagi, Masayuki Tera, Kazuo Nagasawa, Kazuo Shin-ya, and Takashi Takahashi, " (S)-Stereoisomer of telomestatin as a potent G-quadruplex binder and telomerase inhibitor ", *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 387-393, DOI: 10.1039/C0OB00513D. (査読あり)

Satoki Majima, Masayuki Tera, Keisuke Iida, Kazuo Shin-ya, and Kazuo Nagasawa, " Design and Synthesis of Telomestatin Derivatives Containing Methyl Oxazole and Their G-Quadruplex Stabilizing Activities " *Heterocycles*, **2011**, *82*, 1345-1357, DOI: 10.3987/COM-10-S(E)85. (査読あり)

[学会発表] (計 2 3 件)

對馬大和、飯田圭介、中村貴大、長澤和夫、「テロメスタチン誘導体を用いた新規グアニン四重鎖の単離」、日本化学会第 94 回春季年会、2014 年 3 月 27-30 日、名古屋大学 (名古屋)

Keisuke Iida, Satoki Majima, Takahiro Nakamura, Kazuo Nagasawa, " Interaction analysis of long telomeric G-quadruplex and macrocylic polyoxazole ligands ", Fourth International Meeting on G-Quadruplex Nucleic Acids, 2013. July 1-4, Nanyang Technological University (Singapore).

Takahiro Nakamura, Keisuke Iida, Wataru Yoshida, Masayuki Tera, Ikebukuro Kazunori, Kazuo Nagasawa, " Fluorescent Ligand-Mediated Screening of G-Quadruplex Structure Using a DNA Microarray ", Fourth International Meeting on G-Quadruplex Nucleic Acids, 2013. July 1-4, Nanyang Technological University (Singapore).

對馬大和、飯田圭介、中村貴大、真島聡芸、大竹輝美、清宮啓之、長澤和夫、「グアニン四重鎖を安定化する四置換型大環状ヘキサオキサゾールの合成と活性評価」、日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会、2013 年 6 月 19-21 日

對馬大和、飯田圭介、中村貴大、真島聡芸、大竹輝美、清宮啓之、長澤和夫、「グアニン四重鎖を安定化する四置換型大環状ヘキサオキサゾールの合成と活性評価」、日本薬学会第 133 回年会、2013 年 3 月 27-30 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

大竹輝美、飯田圭介、中村貴大、清宮啓之、長澤和夫、「フェノール性水酸基を側鎖に有

する大環状ヘキサオキサゾールの合成とグアニン四重鎖との相互作用解析」、日本薬学会第 133 回年会、2013 年 3 月 27-30 日、パシフィコ横浜（神奈川）。

飯田圭介、中村貴大、吉田亘、横山智美、寺正行、中林一彦、清宮啓之、秦健一郎、池袋一典、長澤和夫、「特異的蛍光リガンドと DNA マイクロアレイを基盤とした新規グアニン四重鎖形成配列の網羅的検出法の開発」、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22-25 日、立命館大学（滋賀）。

大竹輝美、飯田圭介、中村貴大、長澤和夫、「Synthesis of macrocyclic hexaoxazole (60TD) and evaluation of its G4 stabilization」、The 11th International Symposium on Advanced Technology (ISAT-Special)、工学院大学（東京）、2012 年 10 月 30 日。

中村貴大、飯田圭介、新家一男、清宮啓之、長澤和夫、「テロメアグアニン四重鎖に対するケージドリガンドの合成と活性評価」、第 71 回日本癌学会学術集会、2012 年 9 月 19-21 日、札幌市教育文化会館。

Takahiro Nakamura, Keisuke Iida, Terumi Ohtake, Masayuki Tera, Hiroyuki Seimiya, Kazuo Nagasawa, "Synthesis and evaluation of telomestatin derivatives of macrocyclic polyoxazoles and application to a caged G4 ligand", The 11th Korea-Japan-Germany Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2012. July 5-7, Gyeongju Hilton hotel (Gyeongju, South Korea).

中村貴大、飯田圭介、大竹輝美、新家一男、清宮啓之、長澤和夫、「フェノール性水酸基を側鎖に有するグアニン四重鎖リガンドの創製」、第 16 回日本がん分子標的治療学会、2012 年 6 月 27-29 日、西日本総合展示場（福岡）。

飯田圭介、寺正行、広川貴次、新家一男、長澤和夫、「長鎖テロメア G-quadruplex を安定化する大環状ヘキサオキサゾール誘導体の合成とその活性評価」、日本薬学会第 132 回年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学（北海道）。

中村貴大、飯田圭介、寺正行、清宮啓之、新家一男、長澤和夫、「ケージドグアニン四重鎖リガンドの創製と活性評価」、日本薬学会第 132 回年会、2012 年 3 月 28-31 日、北海道大学（北海道）。

飯田圭介、寺正行、広川貴次、新家一男、長澤和夫、「大環状ヘキサオキサゾール二量体化合物と長鎖テロメア G-quadruplex との相互作用解析」、日本化学会第 92 回春季年会、2012 年 3 月 25-28 日、慶應義塾大学（東京）。

中村貴大、飯田圭介、寺正行、清宮啓之、新家一男、長澤和夫、「グアニン四重鎖に対するケージドリガンドの合成」、日本化学会第 92 回春季年会、2012 年 3 月 25-28 日、慶應義塾大学（東京）。

大竹輝美、飯田圭介、中村貴大、真島聡芸、新家一男、長澤和夫、「グアニン 4 重鎖構造を安定化する 4 置換型大環状ヘキサオキサゾールの合成」、日本化学会第 92 回春季年会、2012 年 3 月 25-28 日、慶應義塾大学（東京）。

飯田圭介、坪内源、真島聡芸、中村貴大、大竹輝美、長澤和夫、「グアニン四重鎖を安定化する大環状ポリオキサゾール誘導体の合成と活性評価」、電通大・農工大第 8 回合同シンポジウム「ナノ未来材料とコヒーレント光科学」、2011 年 12 月 10 日、東京農工大学（東京）。

Keisuke Iida, Masayuki Tera, Kazuo Shin-ya, Kazuo Nagasawa, "Synthesis and Evaluation of Macrocyclic Hexaoxazole Dimers as G-quadruplex Ligands", 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of Medicinal Science" (AIMECS11), 2011. November 29-December 2, keio plaza hotel (Tokyo, Japan)

Takahiro Nakamura, Keisuke Iida, Masayuki Tera, Hiroyuki Seimiya, Kazuo Shin-ya, Kazuo Nagasawa, "Synthesis and Evaluation of the Caged G-quadruplex Ligand", 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of Medicinal Science" (AIMECS11), 2011. November 29-December 2, keio plaza hotel (Tokyo, Japan).

Keisuke Iida, Masayuki Tera, Kazuo Shin-ya, Kazuo Nagasawa, "Synthesis of macrocyclic hexaoxazole dimers as a G-quadruplex", Third International Meeting on G-Quadruplex and G-assembly, 2011. June 28-July 1, Grand Hotel Vesuvio (Naples, Italy).

② Takahiro Nakamura, Keisuke Iida, Masayuki Tera, Hiroyuki Seimiya, Kazuo Shin-ya, Kazuo Nagasawa, "Development of the Caged G-Quadruplex Ligand", Third International Meeting on G-Quadruplex and G-assembly, 2011. June 28-July 1, Grand Hotel Vesuvio (Naples, Italy).

② 中村貴大、飯田圭介、寺正行、清宮啓之、新家一男、長澤和夫「グアニン四重鎖を安定化するケージド低分子化合物の創製」第 15 回日本がん分子標的治療学会、2011 年 6 月 22-24 日、ホテル日航（東京）。

③ 中村貴大、飯田圭介、寺正行、新家一男、長澤和夫「グアニン四重鎖を安定化する大環状ヘキサオキサゾールを母核骨格に有するケージド G4 リガンドの創製と活性評価」日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26-29 日、神奈川大学（神奈川）。

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tuat.ac.jp/~nagasawa/>

(1)研究代表者

長澤 和夫 (NAGASAWA KAZUO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10247223