

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 27 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22350071

研究課題名（和文）化学的アプローチによる細胞中のヒトテロメア DNA と RNA 構造の
解明およびその応用研究課題名（英文）Structure elucidation of human telomeric DNA and RNA in cells by
chemical approach and its application

研究代表者

徐 岩 (XU YAN)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：40506763

研究成果の概要（和文）：

(1) ヒトテロメア RNA の構造・機能の解明については、NMR 構造解析により、ヒトテロメア RNA がウラシル 4 分子体を形成する四重鎖構造を発見した。さらに化学蛍光プローブを用いて、生細胞内のヒトテロメア RNA の構造を可視化することに成功した。

(2) 化学手法により、テロメアを別々に取得することに成功した。さらにヒトテロメア制御機構の新しいモデルを提案した。

(3) がん細胞のみを選択的に死滅させる方法を開発した。さらに四重鎖形成を利用して染色体 DNA を選択的に切断することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The researches focus on (1) Understanding the structures and functions of human telomere DNA and RNA by chemical approaches, (2) Developing various chemical methods to targeting human telomeres and telomerase for the treatment of cancer.

The NMR showed that human telomere RNA forms a parallel G-quadruplex structure (*J. Am. Chem. Soc.* 132,7231,2010.). Using a light-switching probe, we found that human telomere RNA forms a parallel G-quadruplex structure in living cells, providing the in vivo evidence for the presence of the G-quadruplex in human (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 14579, 2010.). Furthermore, we demonstrated that small RNA-stabilized mRNA structures inhibit the translation in human cells. We also successfully detected the biomolecules by using DNA Nanomechanics of telomere G-quadruplex structure (*Nature Communications* 2011 2:449 doi:10.1038/ncomms 1452.).

We developed a method for detection of individual telomere lengths (DITL) that uses a chemistry-based approach that accurately measures the telomere lengths from individual chromosomes (*J. Am. Chem. Soc.* 135, 14, 2013.). We have used a model system to provide evidence about the formation of G-quadruplex structures involving telomeric DNA and RNA sequences that have the potential to provide a protective capping structure for telomere ends (*J. Biol. Chem.* 287, 41787, 2012.).

We developed a small 6-mer oligonucleotide with a photo-cross-linking reagent to cause efficient photo-cross-linking to human telomere DNA upon light irradiation (*J. Am. Chem. Soc.* 132, 631, 2010.). We reported the first example of enantioselective recognition of quadruplex DNA by a chiral cyclic helicene (*J. Am. Chem. Soc.* 132, 3778, 2010.). Furthermore, we demonstrated that a single peptide nucleic acid (PNA) effectively targets the G-rich region in double-stranded DNA through formation of a PNA/DNA hybrid G-quadruplex (*Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 7198, 2012.).

We also published three review papers about the researches (*Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 2719 ; *Methods* 57, 100, 2012 ; *Curr. Pharm. Des.* 18,2096,2012.).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学、生体関連化学

キーワード：テロメア DNA・ヒトテロメア RNA・四重鎖構造・化学的アプローチ・抗がん分子・核酸・生体分子

1. 研究開始当初の背景

テロメアは遺伝情報を担う生体物質である染色体の末端に存在する DNA であり、大切な遺伝情報を保護する役目を担っている。特に、テロメアは細胞分裂（老化）・細胞死（がん化）など細胞の生死を左右する“細胞内時計”として注目されている（テロメアについての研究は2009年のノーベル医学生理学賞を受賞）。一方、ヒトテロメア DNA が転写されることはないと考えられてきたが、最近ヒトテロメア配列を持った RNA 分子が生体内に存在することが明らかになった。この発見によって、ヒトテロメア RNA が細胞内において重要な役割を果たすことが示唆された。この RNA は新しいテロメアの構成要素であると考えられている。よって、ヒトテロメア RNA の構造を明らかにすることは、テロメア機能やテロメアに関係する病気の理解に必要不可欠だと考えられる。ヒトテロメア DNA と RNA の分子構造・機能を明らかにすることより、染色体構造の安定化、老化の調節や、がん化といった複雑な生命機構の解明に寄与し、それらの知見に基づいた老化やがん化を標的とした新薬開発の加速にも大きく貢献するものと期待できる。

In vitro におけるヒトテロメア DNA と RNA の構造に関しては、当研究室を含めて、すでにいくつかの研究例がある。しかし、これらは in vitro で再構築されたモデル系での構造であり、細胞内で実際に、どのような時期にどの程度存在しているかは全く解明されていない。このような背景のもとに申請者はヒトテロメア DNA と RNA の分子構造と機能を明らかにすることが緊急の課題であると考えた。一方、これまで開発されたテロメアをターゲットとするがんの抑制手法では、多く

の場合、通常細胞とがん細胞を十分に区別できないために、副作用が避けられなかった。したがって、副作用の少ない抗がん分子の開発が望まれており、本研究はその要請にこたえるものである。

2. 研究の目的

本研究では、化学的アプローチを用いて、細胞内におけるヒトテロメア DNA とヒトテロメア RNA の構造・機能を明らかにすることによって、染色体構造の安定化、老化の調節、がん化などにおけるテロメアの分子作用機構を解明し、得られた基礎情報に基づいてテロメアをターゲットとするがん標的治療の新手法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

本研究は、蛍光プローブなどを利用して細胞内でのテロメア RNA、DNA およびハイブリッドテロメア DNA/RNA の分子構造を解析することが第一段階である。そしてこれを基盤にした第二段階として、そこで得られた情報を、ヒトテロメア DNA と RNA 高次構造の生化学的機能の解明、またテロメア四重鎖構造の形成を利用した光架橋により副作用の少ないがん治療の新手法開発に展開していく。初年度には、化学合成に重点が置かれ、次年度以降には、構造と機能の解明およびテロメアをターゲットとするがん抑制の諸問題に、これらの基礎的な化学手法を応用していくことに研究の重点が移される。

4. 研究成果

(1) ヒトテロメア DNA と RNA の構造・機能の解明については、NMR 構造解析により、ヒトテロメア RNA がウラシル 4 分子体を形成する四重鎖構造を発見した (*J. Am. Chem. Soc.* 132, 7231, 2010.)。この構造は新たな抗がん剤開発のための治療ターゲットとなる可能性が期待されている。さらに化学蛍光プローブを用いて、生細胞内のヒトテロメア RNA の

構造を可視化することに成功した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 14579, 2010.)。またヒトテロメア RNA が mRNA と分子間 RNA 四重鎖構造を形成することにより遺伝子発現を調節することを発見した (*J. Am. Chem. Soc.* 133, 19153, 2011.)。さらにテロメア DNA 四重鎖構造などによる操作する DNA ナノマシンで生体分子などを検出することに成功した (*Nature Communications* 2011 2:449 doi:10.1038/ncomms 1452)。

(2) 最近、化学手法により、それぞれの染色体のテロメアを別々に取得することに成功した。これより、これまで入手不能であった種々のテロメア機構に関する情報の取得が期待される (*J. Am. Chem. Soc.* 135, 14, 2013.)。さらに新たに発見されたテロメア RNA が染色体の末端保護において重要な役割を担っていることを明らかにした。これらの結果に基づいてヒトテロメア制御機構の新しいモデルを提案した (*J. Biol. Chem.* 287, 41787, 2012.)。

(3) がん標的治療の新技术の開発については、光応答性 DNA を用いて、光架橋により有効なテロメラゼ阻害することによるがん細胞のみを選択的に死滅させる方法を開発した (*J. Am. Chem. Soc.* 132, 631, 2010.)。また環状型ヘリセン小分子によるテロメラゼ活性のエナンチオ選択的な阻害することに成功した (*J. Am. Chem. Soc.* 132, 3778, 2010.)。さらに四重鎖形成を利用して染色体 DNA を選択的に切断することに成功した (*Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 7198, 2012)。

(4) これまでのテロメア DNA と RNA の研究結果を総説としてまとめた (*Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 2719; *Methods* 57, 100, 2012; *Curr. Pharm. Des.* 18, 2096, 2012.)。

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 14 件)

- ① YAN XU, M. Komiyama, Evidence for G-Quadruplex DNA in Human Cells, *ChemBioChem*, 査読有、2013、DOI : 10.1002/cbic.201300157
- ② T. Ishizuka, YAN XU, M. Komiyama, A Chemistry-Based Method To Detect Individual Telomere Length at a Single Chromosome Terminus, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、Vol. 135, 2013, pp. 14 - 17, DOI : 10.1021/ja308481c
- ③ YAN XU, T. Ishizuka, J. Yang, K. Ito, H. Katada, M. Komiyama, T. Hayashi, Oligonucleotide Models of Telomeric DNA and RNA Form a Hybrid G-quadruplex Structure as a Potential Component of Telomeres, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有、287, 2012, pp. 41787 - 41796, DOI : 10.1074/jbc.M112.342030
- ④ T. Ishizuka, J. Yang, M. Komiyama, YAN XU, G-Rich Sequence-Specific Recognition and Scission of Human Genome by PNA/DNA Hybrid G-Quadruplex Formation, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有、Vol. 51, 2012, pp. 7198 - 7202, DOI : 10.1002/anie.201201176
- ⑤ YAN XU, Human Telomere RNA: A Potential Target for Ligand Recognition, *Current Pharmaceutical Design*, 査読有、Vol. 18, 2012, pp. 2096 - 2101, DOI : 10.2174/138161212799958378
- ⑥ YAN XU, M. Komiyama, Structure, Function and Targeting of Human Telomere RNA, *Methods*, 査読有、Vol. 57, 2012, pp. 100 - 105, DOI : 10.1002/anie.201201176
- ⑦ N. Mulholland, YAN XU, H. Sugiyama, K. Zhao, SWI/SNF-mediated chromatin remodeling induces Z-DNA formation on a nucleosome, *Cell & Bioscience*, 査読有、Vol. 2, 2012, 3, DOI : 10.1186/2045-3701-2-3
- ⑧ K. Ito, S. Go, M. Komiyama, YAN XU, Inhibition of translation by small RNA-stabilized mRNA structures in human cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、Vol. 133, 2011, pp. 19153-19159, DOI : 10.1021/ja206353c
- ⑨ A. Kuzuya, Y. Yamazaki, T. Sakai, YAN XU, M. Komiyama, Nanomechanical DNA origami 'Single-Molecule Beacons' Directly Imaged by Atomic Force Microscopy, *Nature Communications*, 査読有、Vol. 2, 2011, 449, DOI : 10.1038/ncomms1452
- ⑩ YAN XU, Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/RNA, *Chemical Society Reviews*, 査読有、Vol. 40, 2011, pp. 2719-2740, DOI : 10.1039/C0CS00134A

- ⑪ YAN XU, Y. Suzuki, K. Ito, M. Komiyama, Telomeric Repeat-Containing RNA Structure in Living Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 査読有, Vol. 107, 2010, pp. 14579-14584, DOI : 10.1073/pnas.1001177107/-/DCSupplemental
- ⑫ YAN XU, T. Ishizuka, T. Kimura, M. Komiyama, A U-Tetrad Stabilizes Human Telomeric RNA G-Quadruplex Structure, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 132, 2010, pp. 7231-7233, DOI : 10.1021/ja909708a
- ⑬ K. Shinohara, Y. Sannohe, S. Kaieda, K. Tanaka, H. Osuga, H. Tahara, YAN XU, T. Kawase, T. Bando, H. Sugiyama, A Chiral Wedge Molecule Inhibits Telomerase Activity, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 132, 2010, pp. 3778-3782, DOI : 10.1021/ja908897j
- ⑭ YAN XU, K. Ito, Y. Suzuki, M. Komiyama, A 6-mer Photocontrolled Oligonucleotide as an Effective Telomerase Inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 132, 2010, pp. 631-637, DOI : 10.1021/ja907417r

[学会発表] (計 19 件)

- ① 楊 潔、石塚 匠、徐 岩、ヒトテロメア RNA 四重鎖の構造と安定性、日本化学会第 93 回春季年会、2013 年 3 月 24 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)
- ② 劉泓汕、徐 岩、クリック化学により染色体 DNA のマルチカラーイメージング、日本化学会第 93 回春季年会、2013 年 3 月 23 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)
- ③ 鮑宏亮、徐 岩、 ^{19}F を含むテロメア RNA 四重鎖の構造と安定性、日本化学会第 93 回春季年会 2013 年 3 月 22 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)
- ④ 徐 岩、Structure and Biological Function of Telomere RNA、第 39 回国際核酸化学シンポジウム、2012 年 11 月 15 日、名古屋大学豊田講堂 (愛知県)
- ⑤ 徐 岩、ヒトテロメア DNA と RNA によるハイブリッド四重鎖の形成およびその生化学機能、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 7 日、北海道大学高等教育推進機構
- ⑥ 徐 岩、可動式 DNA origami 構造体の pH センサーへの応用、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 28 日、慶應義塾大学(神奈川県)
- ⑦ 徐 岩、分子間 RNA 4 重鎖構造による遺伝子発現の調節、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 26 日、慶應義塾大学(神奈川県)
- ⑧ 徐 岩、長鎖 DNA 中の四重鎖構造を検出する方法の開発、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、慶應義塾大学(神奈川県)
- ⑨ 徐 岩、ヒトテロメア RNA の構造と生化学機能およびテロメア RNA を標的とする小分子の探索、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 14 日、つくば国際会議場(茨城県)
- ⑩ 石塚 匠、伊藤 健一郎、徐 岩、小宮山 眞、ARCUT による単一染色体のテロメア長測定、日本化学会第 91 回春季年会、2011 年 3 月 27 日、神奈川大学横浜キャンパス (神奈川県)
- ⑪ 徐 岩、小宮山 眞、ヒトテロメア RNA の構造と生化学機能について、日本化学会第 91 回春季年会、2011 年 3 月 27 日、神奈川大学横浜キャンパス (神奈川県)
- ⑫ 徐 岩、To Reveal Telomere's Mysterious by Chemical Approaches, Third International Symposium for Young Organic Chemists (3rd ISYOC)、2011 年 3 月 3 日、物質・材料研究機構 並木地区 (茨城県)
- ⑬ 徐 岩、Elucidation of structure and function of human telomere DNA/RNA and development of novel human telomere-targeted approaches、2010 環太平洋国際化学会会議、2010 年 12 月 15 日、ハワイコンベンションセンター

- ⑭ K. Ito, YAN XU, M. Komiyama, Translational regulation by intermolecular RNA G-quadruplex, 2010 環太平洋国際化学会議、2010年12月15日、ハワイコンベンションセンター
- ⑮ T. Ishizuka, M. Komiyama, YAN XU, G-rich sequence-specific cleaving by PNA/DNA hybrid G-quadruplex formation, 2010 環太平洋国際化学会議、2010年12月15日、ハワイコンベンションセンター
- ⑯ 伊藤 健一郎、徐 岩、小宮山 眞、分子間 G-quadruplex 構造によるタンパク質発現制御、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月25日、つくば国際会議場「エポカルつくば」(茨城県)
- ⑰ 菊池 宏海、倉林 香織、Zeng Huaqiang、徐 岩、小宮山 眞、ヒトテロメア四重鎖RNAに結合する小分子の探索、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月25日、つくば国際会議場「エポカルつくば」(茨城県)
- ⑱ 徐 岩、神長 邦行、鈴木 裕太、伊藤 健一郎、石塚 匠、木村 貴、小宮山 眞、化学的アプローチによるヒトテロメアRNA構造と機能の解析、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月26日、つくば国際会議場「エポカルつくば」(茨城県)
- ⑲ 徐 岩、小宮山 眞、ヒトテロメアRNAの構造と生化学機能、第12回日本RNA学会年会、2010年7月29日、学術総合センター (東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.miyazaki-med.ac.jp/MMCCHEM/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徐 岩 (XU YAN)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：40506763