

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26282214

研究課題名(和文) 低分子化合物を用いた全ゲノム中のグアニン四重鎖の網羅的探索と特異的安定化

研究課題名(英文) Selective detection and stabilization of G-quadruplexes in genome using G4 ligands

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) 12,700,000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、遺伝子の転写制御等に関係し、その探索は新たな創薬標的の発見につながる。また各G4の選択的な安定化により、当該G4機能の選択的制御が可能となる。我々が開発してきた大環状ポリオキサゾール型G4リガンド(60TD, 70TD)を基に、ビオチン化した新規70TDを創製した。本リガンドを用いて作製したG4アフィニティカラムを用い、ゲノム中からG4形成配列のみを探索する手法を確立した。またG4の代表的な3構造中から、2構造をそれぞれ選択的に誘起する60TD誘導体の創製に成功した。

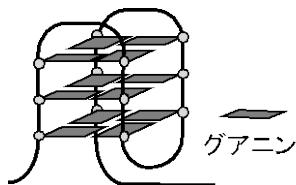
研究成果の概要(英文)：G-quadruplex (G4), a higher order structure of DNA, is involved in transcriptional regulation of genes, and detection of G4s in genome leads to the discoveries of new drug targets. Furthermore, selective stabilization of each G4 would become the selective control of the corresponding G4 function. Based on our macrocyclic polyoxazole type G4 ligand (60TD, 70TD), we have developed a new 70TD analog attached with biotin-function. With the new ligand, we prepared a G4 affinity column, which enable us to detect the G4-forming DNA sequences in genome. In addition, we have developed new 60TD derivatives for stabilizing two out of three representative topologies in G4 selectively.

研究分野：有機合成化学

キーワード：グアニン四重鎖 テロメア 大環状ポリオキサゾール ビオチンプローブ G4アフィニティカラム トポロジー

1. 研究開始当初の背景

グアニン四重鎖構造 (以下 G4、図 1) は、DNA 中の高次構造の 1 つであり、グアニン豊富な一本鎖 DNA で形成される。これは通常、二本鎖または鎖状一本鎖 (テロメアなど) との動的平衡にある。G4 は、グアニン四分子と一価カチオン (K^+ , Na^+ 等) から成る G-quartet 平面が、 $\pi-\pi$ 相互作用を介して通常 2~3 層が積層することで安定化し形成される。



G-quadruplex (G4)

図1 グアニン4重鎖 (G4) 構造

これまで生体内における G4 の機能は未知であった。2002 年、Hurley らは、*c-myc* 遺伝子のプロモーターで形成される G4 (*c-myc* G4) を低分子化合物で安定化すると、*c-myc* の転写が抑制されることを見出した。それ以後、*c-kit* や *k-ras* 等のがん関連遺伝子のプロモーター領域で形成される十数種の G4 についても、転写因子様の遺伝子発現調節機能が見いだされ、現在、G4 は「生命現象を制御する新たな因子」として捉えられている。また機能を有する G4 類は新たな創薬標的であり、これらをそれぞれ特異的に安定化する低分子化合物 (G4 リガンド) は、創薬リードや機能解明のための分子プローブとなる。

G4 形成配列はこれまで十数種しか知られていなかった。しかし配列相同性解析から、G4 を形成する可能性のある配列は、ヒト遺伝子プロモーターの約 40% に存在することが示唆された。最近我々は、独自に開発した G4 リガンド (OTD、後述) に蛍光基を導入した蛍光 G4 リガンドを創製し、これを DNA マイクロアレイ解析に付すことで、CpG アイランド領域中の DNA 配列 (約 90,000 配列) のから、約 2,000 配列もの新規 G4 の探索に成功し、G4 がゲノム中に広く分布していることを実験的に明らかとした。

これらの背景から、ゲノム中に存在する G4 を網羅的に探索し、見いだされた G4 の中から創薬標的になり得る、生物機能を有する G4 を同定し、同定した機能性 G4 を特異的に安定化するリガンドの創製が求められている。しかしこれまでに既知の G4 リガンドの中で、G4 への特異的結合能 (二本鎖 DNA 等と G4 との選択性) を示すのは、我々が開発した OTD 系統化合物を含んだ 3 系統のみである。また G4 間で特異的な安定性を示す G4 リガンドは見出されていない。

2. 研究の目的

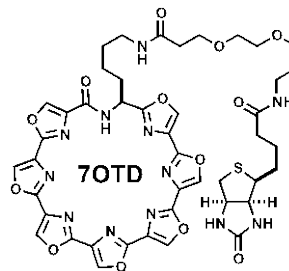
我々はこれまでに、天然の G4 リガンドで

あるテロメスタチンをリードに、ポリオキサゾールからなる大環状化合物 OTD 類 (6 つのオキサゾールからなる 6OTD および 7 つのオキサゾールからなる 7OTD) を G4 リガンドとして開発してきている。そこで本研究では、これらの構造をもとにした新規化学プローブを創製し、(1)ゲノム中における G4 の網羅的探索手法の確立、(2)機能を有する G4 を選択的に安定化することを志向し、G4 が形成する特徴的な 3 つのトポロジー (アンチパラレル、ハイブリッド、パラレル) と特異的に相互作用するリガンドの創製、を目的とすることとした。

3. 研究の方法

(1) ゲノム中における G4 の網羅的探索手法の確立

ゲノム中の G4 形成配列を、低分子リガンドを用いて網羅的に探索する手法の確立を目的とし、様々な G4 形成配列と普遍的に相互作用することを見出している 7OTD 骨格をもとに、どう骨格にビオチン官能基を導入した新規リガンド (図 2) を合成することを計画した。これを用いて、以下図 3 に示す方法により、G4 の網羅的探索手法を検討することとした。



ビオチン化した 7OTD 型 G4 リガンド (1)

図2 ビオチンをコンジュゲートした新規 7OTD 型 G4 リガンド(1)の構造

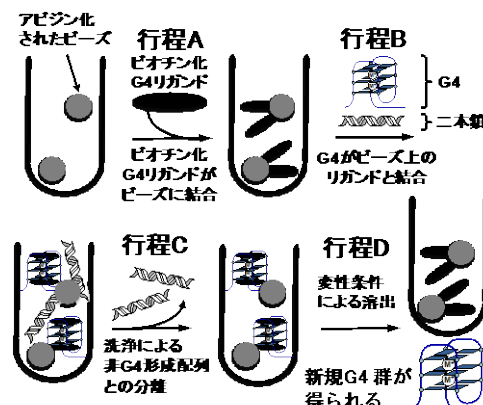


図3 G4 リガンド 1 を用いた G4 形成配列の探索計画

すなわち、①ビオチンを結合した 7OTD (1) をアビジン化したビーズに担持し (行程 A)、超音波処理で断片化した DNA とインキュベーションする (行程 B)。これにより G4 形成

配列が G4 リガンドと結合する。②結合しなかった DNA (G4 非形成配列) を洗浄操作により除去後 (行程 C)、ビーズ上から G4 リガンド **1** に結合した DNA を変性条件により溶出させ、G4 形成配列を回収する (行程 D)。

なお本 pull-down 実験により得られる G4 形成配列は、FRET 実験、EMSA、CD/UV、DMS foot printing によりその G4 形成能を確認する。また得られた配列を次世代シーケンサーで解析し、ゲノム中における G4 の存在領域、配列の同定を行う。

(2) G4 の各トポロジーを特異的に安定化する G4 リガンドの創製

機能を有する G4 を選択的に制御するためには、各 G4 を特異的に安定化するリガンドが必要である。一方、多様な構造を形成する G4 は大きく、アンチパラレル型、ハイブリッド型、パラレル型に分類することができる (図 4)。そこで G4 配列特異的なリガンド創製を志向し、まずこれら各トポロジーと選択的に相互作用するリガンドの創製を OTD 骨格の誘導体を用いて計画する。

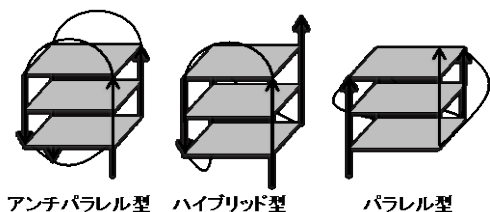


図 4 G4 が形成する代表的な 3 種のトポロジーの模式図

G4 は、G-quartet 平面が 2~3 層積層した共通構造を持つが、G4 の各トポロジーは、固有のループ構造を持つ。従ってトポロジー特異的なリガンド創製のためには、ループ構造やループにより形成されるグループを標的とする必要がある。

これまでに創製した、3,3-型 L2H2-6OTD (2) は、テロメアで形成される配列においてアンチパラレル型と選択的に相互作用する (図 5)。

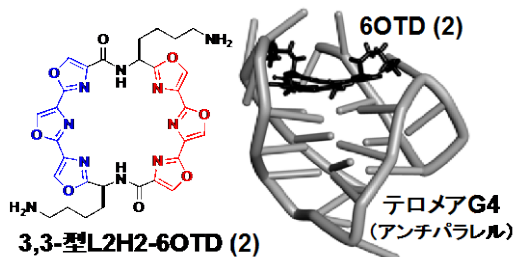


図 5 3,3 型 L2H2-6OTD (2) とアンチパラレル型テロメア G4 とのドッキングモデル

これらのドッキング計算結果から、環構造に導入されたアミノブチル基の側鎖の位置を変化させることで、各トポロジーとの相互

作用能が変化することが示唆された。そこで図 6 に示す、側鎖の方向が異なる 4,2 型 L2H2-6OTD (3)、5,1 型 L2H2-6OTD (4) をそれぞれ合成し、これらの各トポロジーとの相互作用能について CD 測定を行うことで評価することを計画した。

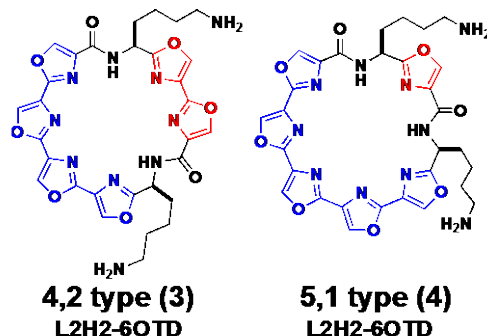


図 6 設計した 4,2 型 L2H2-6OTD (3)、5,1 型 L2H2-6OTD (4) の構造

4. 研究成果

(1) ゲノム中における G4 の網羅的探索手法の確立

我々の研究室で確立した合成法をもとにリシン由来の側鎖を有する 7OTD を合成し、これにビオチンを結合することで新規 G4 リガンド **1** を合成した。合成した **1** は、これまで合成を行ってきた 7OTD 類と同様、基地の G4 と普遍的に相互作用することを、FRET、EMSA、CD の測定により確認した。

そこで **1** を用い、まずテロメア配列をモデル配列とし、当該配列の選択的 pull-down について検討を行った (図 7)。なおコントロールとして 2 本鎖 DNA を用いた。

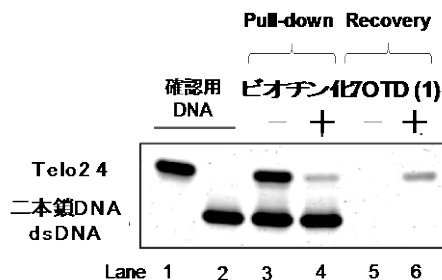


図 7 ビオチン化 7OTD (1) を用いたテロメア配列の pull-down 実験結果

その結果、ビーズに固定したビオチン化 7OTD (1) を加えることで、テロメアモデル配列が選択的にビーズと結合し、反応系から消失することがわかった (lane 4)。一方取り出したビーズを DNA 変性条件下にするとリガンドと結合していた DNA が溶出され、テロメア配列を回収することができた (lane 6)。

そこで次にテロメア以外の G4 形成既知配列、H-telo(21)、bcl-2、c-kit1、c-kit2、K-ras、について、それぞれ pull-down 実験を検討した (図 8)。

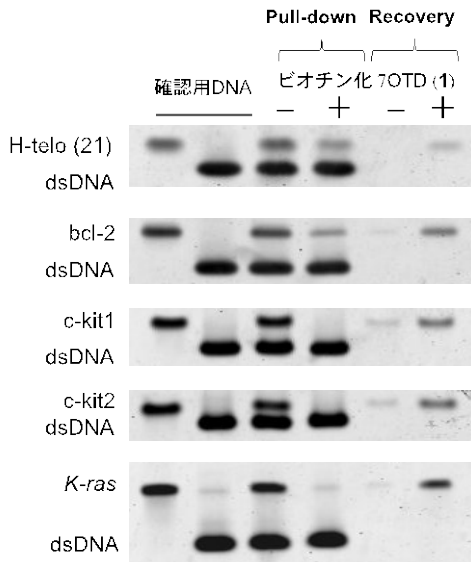


図8 ビオチン化 7OTD (1)を用いた G4 形成 既知配列 (5 種) の pull-down 実験結果

その結果いずれの場合においても、G4 を形成する配列が選択的に pull-down されることがわかった。

そこで次に、実際のゲノム中から G4 形成配列の探索を想定し、これら既知 G4 形成配列と dsDNA との混合物から G4 形成配列のみの pull-down について検討することとした。その結果、ビオチン化 7OTD (1)の濃度に依存して G4 形成配列が選択的に pull-down されることがわかった (図9)。現在これらの知見をもとに、ビオチン化 7OTD (1)を用い、ゲノム中からの G4 形成配列探索について検討を行っている。

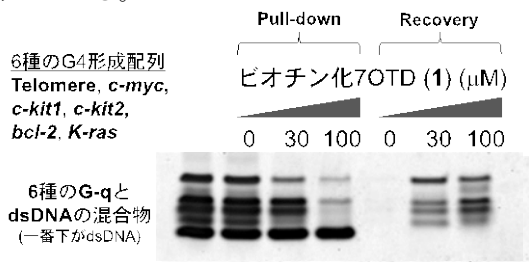
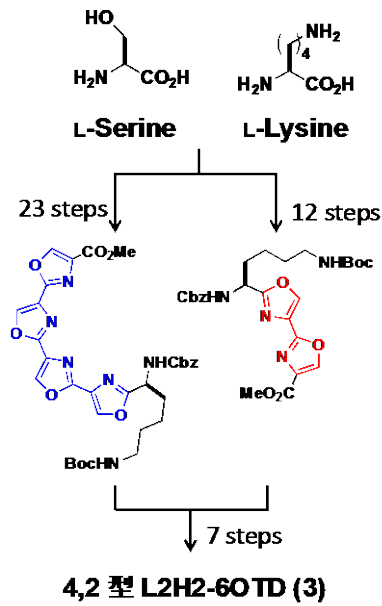


図9 ビオチン化 7OTD (1)を用いた G4 形成 既知配列 (6 種) と dsDNA 混合物からの pull-down 実験結果

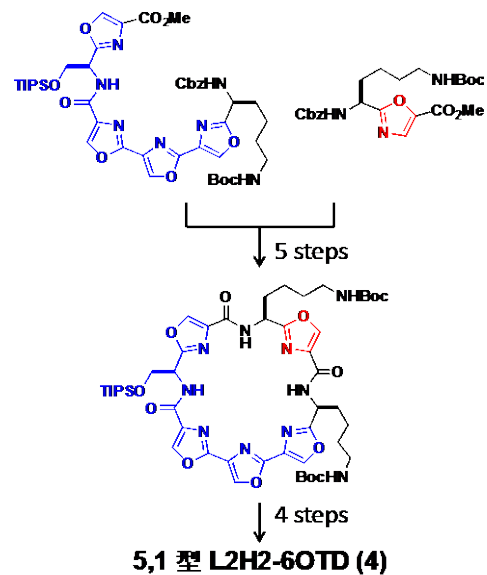
(2) G4 の各トポロジーを特異的に安定化する G4 リガンドの創製

4,2 型 L2H2-6OTD (3)、および 5,1 型 L2H2-6OTD (4)の合成について、それぞれ Scheme 1、Scheme 2 に示した。

4,2 型 L2H2-6OTD (3)の合成は、L-serine、L-lysine からそれぞれ 4 環性オキサゾール化合物、2 環性オキサゾール化合物をそれぞれ合成し、これらの縮合、大環状化をへて合成することができた。同様に、5,1 型 L2H2-6OTD (4)も合成することができた。



Scheme 1 4,2 型 L2H2-6OTD (3)の合成



Scheme 2 5,1 型 L2H2-6OTD (4)の合成

そこで得られた 3、4 について、テロメアモデル配列を用い、FRET 融解実験により G4 構造の安定化能について評価を行った。その結果、3 および 4 の ΔT_m 値はそれぞれ 12.3、7.1 °C であり、他の配列と比べて G4 形成配列を優位に安定化することがわかった。そこで次にこれらのリガンドによる G4 構造のトポロジー選択性について、CD 測定により評価を行った。

テロメア配列 telo24 に対し、イオン非存在下 4,2 型 L2H2-6OTD (3)を 5 当量加えたところ、アンチパラレル型を誘起することがわかった。しかしその誘起能は 3,3 型 L2H2-6OTD (2)よりも弱いことがわかった。一方 5,1 型 L2H2-6OTD (4)の場合、テロメア配列 telo24 をハイブリッド型に強力に誘起することが

明らかとなった。

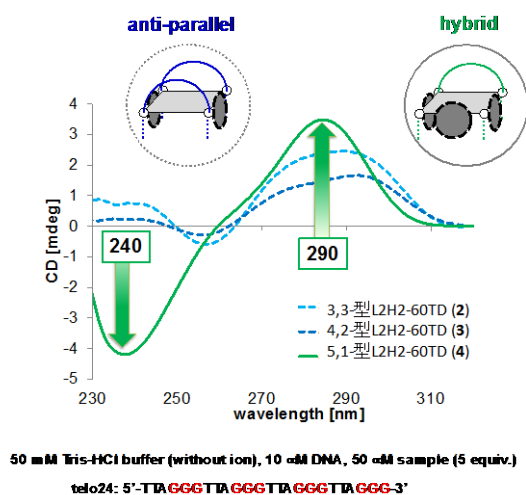


図 10 CD による化合物 2-4 の telo24 に対するトポロジー誘起能の評価

これらのことから、60TD に導入される側鎖（アミノブチル基）の位置がトポロジー誘起に大きく影響する事が明らかとなった。現在、3,3 型 60TD 構造を基本骨格として、これに側鎖の導入位置を変換した誘導体を合成し、そのトポロジー誘起能についてさらなる検討を行っている。

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 16 件）

- ① Yoshida Wataru, Saikyo Hiroki, Nagasawa Kazuo, Karube Isao (11 名 10 番目), Identification of G-quadruplex clusters by high-throughput sequencing of whole-genome amplified products with a G-quadruplex ligand, *Scientific Reports*, 査読有、8, 2018, 3116, 10.1038/s41598-018-21514-7
- ② Porro Antonio, Berti Matteo, Nagasawa Kazuo, Jiricny Josef (10 名, 8 番目), FAN1 interaction with ubiquitylated PCNA alleviates replication stress and preserves genomic integrity independently of BRCA2, *Nature Communications*, 査読有、8, 2017, 1073, 10.1038/s41467-017-01074-6
- ③ Bay Daniyah H., Busch Annika, Nagasawa Kazuo, Karube Isao, Yoshida

Wataru (8 名, 6 番目), Identification of G-quadruplex structures that possess transcriptional regulating functions in the Dele and Cdc6 CpG islands, *BMC Molecular Biology*, 査読有、18, 2017, 17, 10.1186/s12867-017-0094-z

④ Liu Xiao, Ishizuka Takumi, Nagasawa Kazuo, Xu Yan (9 名, 7 番目), Structure-Dependent Binding of hnRNPA1 to Telomere RNA, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有、139, 2017, 7533 ~ 7539, 10.1021/jacs.7b01599

⑤ Abraham Punnoose Jibin, Ma Yue, Nagasawa Kazuo, Mao Hanbin (7 名, 6 番目), Adaptive and Specific Recognition of Telomeric G-Quadruplexes via Polyvalency Induced Unstacking of Binding Units, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有、139, 2017, 7476 ~ 7484, 10.1021/jacs.7b00607

⑥ Nakamura Takahiro, Okabe Sachiko, Nagasawa Kazuo, Seimiya Hiroyuki (11 名 10 番目), Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole, *Scientific Reports*, 査読有、7, 2017, 3605, 10.1038/s41598-017-03785-8

⑦ Mitsuko Fukuhara, Yue Ma, Kazuo Nagasawa, Fumiko Toyoshima, A G-quadruplex structure at the 5' end of the H19 coding region regulates H19 transcription, *Sci. Rep.*, 査読有、8, 2017, 45815, 10.1038/srep45815

⑧ Parastoo Maleki, Yue Ma, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Hamza Balci, A Single Molecule Study of a Fluorescently Labeled Telomestatin Derivative and G-Quadruplex Interactions, *Nucl. Acid. Res.*, 査読有、45, 2016, 288-295, 10.1093/nar/gkw1090

⑨ Kaori Tsukakoshi, Yuri Ikuta, Kazuo Nagasawa, Kazunori Ikebukuro (9名、7番目), Structural regulation by a G-quadruplex ligand increases binding abilities of G-quadruplex-forming aptamers, Chem. Comm., 査読有、52, 2016, 12646-12649, 10.1039/c6cc07552e

⑩ Mai Sakuma, Yue Ma, Kazuo Nagasawa (6名6番目), Design and synthesis of unsymmetric macrocyclic hexaoxazole compounds with ability to induce distinct G-quadruplex topologies in telomeric DNA, Org. Biomol. Chem., 査読有、14, 2016, 5109-5116, 10.1039/C6OB00437G

⑪ Takahiro Nakamura, Yue Ma, Kazuo Nagasawa (6名6番目), Design, Synthesis and Evaluation of an L-Dopa-Derived Macrocyclic Hexaoxazole (6OTD) as a G-Quadruplex-Selective Ligand, Heterocycles, 査読有、92, 2015, 305-315, 10.3987/COM-15-13383

⑫ Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Kazuo Nagasawa, Hisao Masai(11名、9番目), Rif1 binds to G-quadruplex and suppresses replication over a long distance, Nat. Struct. Mol. Biol., 査読有、22, 2015, 889-897, 10.1038/nsmb.3102

⑬ Adrien Marchand, Anton Granzhan, Kazuo Nagasawa, Vale'rie Gabelica (8名、6番目), Conformational changes and cation ejection upon ligand binding to human telomeric DNA G-quadruplexes, J. Am. Chem. Soc., 査読有、137, 2015, 750-756, 10.1021/ja5099403

⑭ Shadi Sedghi Masoud, Yamato Tsushima, Keisuke Iida and Kazuo Nagasawa, Synthesis of Macrocyclic Penta- and Tetraoxazoles as G-Quadruplex Ligands, Heterocycles, 査読有、90, 2014, 866-873, 10.3987/COM-14-S(K)90

⑮ Chiran Ghimire, Soyung Park, Kazuo Nagasawa, Hanbin Mao (9名、7番目), Direct Quantification of Loop Interaction and π - π Stacking for G-quadruplex Stability at the Sub-molecular Level, J. Am. Chem. Soc., 査読有、136, 2014, 15537-15544, 10.1002/ja503585h

[学会発表] (計 43 件)

- ① 長澤和夫、中分子が拓くがん化学療法、CSJ 化学フェスタ (招待講演)、2017
- ② 長澤和夫、非B型 DNA のケミカルバイオロジー研究、東京都医学総合研究所シンポジウム (招待講演)、2016
- ③ 長澤和夫、Identification and Selective Stabilization of G-quadruplex by Small Molecules, 第 39 回日本分子生物学会大会 (招待講演)、2016
- ④ Kazuo Nagasawa, Chemical Biology in G-Quadruplex and Telomestatin, 3rd International Symposium of Chemical Biology and Natural Products (招待講演)、2014
- ⑤ 長澤和夫、DNA グアニン四重鎖を標的とするケミカルバイオロジー、農芸化学会中部支部例会 (招待講演)、2014
- ⑥ Kazuo Nagasawa, Development of Topology-Selective Small Molecules for Telomeric G-quadruplex, 5th International Conference on Development of Biomedical Engineering, Vietnam (招待講演)、2014

[その他]

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~nagasawa/>

6. 研究組織

(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