

令和元年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13094

研究課題名(和文) 生細胞内のグアニン四重鎖を可視化するライトアップ型リガンドの創製

研究課題名(英文) Development of Light-up type G-quadruplex ligand for live cell imaging

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン四重鎖(以下G4)は核酸の高次構造の一つであり、グアニンが豊富な一本鎖領域で過渡的に形成されると考えられている。本研究では生細胞内でのG4形成を明らかにすることを目標とし、G4構造形成時に相互作用し、同時に蛍光特性が変化するリガンド(ライトアップ型リガンド)の創製を目的とした。

私達は、G4と選択的かつ強力に相互作用する大環状ヘキサオキサゾール型G4リガンド(60TD)を報告している。そこで60TD骨格にビニルナフチル基を導入した新規リガンドを創製した。その結果、本リガンドはG4と相互作用することで蛍光特性が大きく変化するライトアップ型リガンドであることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

G4は近年、DNAの複製、遺伝子の転写調節など様々な生命現象を直接的に制御することが報告されている。またG4は、がんなどの難治性疾患の分子標的としても知られている。今回、形成されたG4を可視化するリガンドの開発に成功した。これにより、生細胞内でG4が形成されるタイミング、形成される箇所を検出することが可能となり、G4形成に伴う生物機能を解析することが可能となる。またがん等の疾患とG4形成の関連についても生細胞レベルで解析することができ、G4リガンドをリードとする創薬研究への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：G-quadruplex (G4) is one of a higher-order structures of nucleic acids, and it is considered to be formed stochastically in a guanine-rich region with a single strand. In this study, we examined to develop light-up type G4 ligand, which shows fluorescence by only the interaction with G4. This ligand would be useful to analyze the G4 behaviors in living cell. In our group, we have synthesized a series of macrocyclic hexaoxazoles (60TDs) as G4 specific ligands. In this research, novel G4 ligands bearing vinylnaphthyl type substituents in the side chain of 60TD core structure were developed. We evaluated their fluorescence property effected by interaction with G4 forming DNA sequences, and we found that fluorescence spectrums of these ligands were drastically changed by interacting with G4.

研究分野：ケミカルバイロオジー、有機合成化学、天然物化学

キーワード：グアニン4重鎖 ライトアップ リガンド 大環状ポリオキサゾール 蛍光リガンド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グアニン四重鎖 (G4) 構造とその生物学的意義

グアニン四重鎖 (以下 G4) は、グアニンが豊富な核酸の 1 本鎖領域で形成される、特殊な高次構造である。G4 は、4 つのグアニンで形成される G-カルテット平面が積層することで形成される。G4 を形成し得る DNA 配列は、テロメア領域や、がん関連遺伝子 (*c-myc*, *c-kit* 等) のプロモーター領域を中心に、数十万種見いだされている。最近これらのうち数種の配列では、G4 が形成されることで、DNA の複製、遺伝子の転写調節、がん細胞のアポトーシス誘導などの生命現象が、直接的に制御されることが報告されている (図 1)。一方、本研究を開始した当初、生細胞内での G4 の形成を直接的に確認した報告はなく、G4 を介した生命現象は、*in vitro* での観察にとどまっていた。

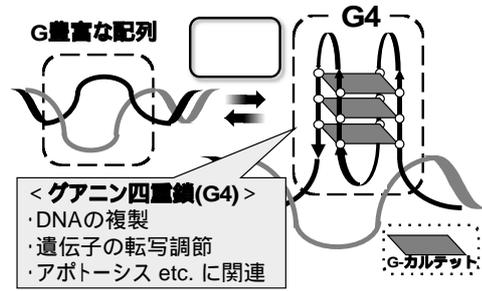


図 1 G4形成と関連生命現象

生細胞内での G4 の形成を直接的に観察するための手法の一つとして、リガンドを用いた蛍光検出手法が考えられる。これまでに蛍光低分子化合物を用いて G4 を可視化する試みが、我々の研究グループを含め、数グループから報告されている。これらは、G4 構造と選択的に相互作用する低分子化合物に蛍光基を導入することで、蛍光 G4 リガンドを創製し (常時蛍光を発するパーマメント型 G4 リガンド) これを用いることで G4 構造を形成する DNA 配列を可視化している。またリガンドの、細胞や核内への移行も観察している (ただしリガンド常時蛍光を発するためこれが G4 と相互作用している確証はない)。これらの実験では、細胞抽出液や固定化細胞を用いていることから、*in vitro* で安定的 (静的) に形成されている G4 の観察にしか用いることはできなかった。生命現象に関連して動的に形成されると考えられている G4 の生細胞中での形成とその機能はいまだ未解明なことが多く、これらの課題を解決するためには、G4 と相互作用した時にのみ蛍光を発するリガンド (蛍光特性が大きく変化するライトアップ型 G4 リガンド) の開発が求められていた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、大環状ヘキサオキサゾール化合物 (6OTD) が、極めて高い選択性で 1 本鎖の G4 形成 DNA 配列と相互作用し、強力にこれを安定化することを見いだしている。また 6OTD 骨格に蛍光基を導入することで、パーマメント型 G4 リガンドの創製に成功し、これを用いることで、G4 を形成し得る配列の網羅的探索に成功している。

そこで本研究ではこれらの知見をもとに、ライトアップ型 G4 リガンドの創製を目標とした。

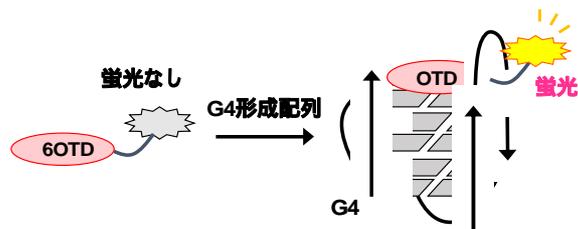


図 2 ライトアップ型G4リガンド設計コンセプト

3. 研究の方法

ライトアップ型 G4 リガンドの創製を計画する上で、G4 を構成する G-カルテット平面の活用を考えた。G4 は、グアニン 4 分子からなる平面 (G-カルテット平面) が 2 ~ 3 枚積層することで形成される (図 1)。そこで、リガンドが G-カルテット平面と相互作用することで蛍光を発する、または蛍光波長が変化する仕組みを利用し、以下を計画した。

すなわち同一分子中で、互いにねじれ関係にある芳香族ユニットは、構造変化により平面になることで、蛍光を発する化合物群が知られている。そこで、G4 を構成する G-カルテット平面との - 相互作用を介してねじれを解消し、平面構造を形成することで蛍光を発する化合物を設計し合成することとした。具体的には、6OTD に対してビニルナフチル基類を導入した誘導

体 **1** を設計した。化合物 **1** は、リガンド単体ではビニル基の単結合が回転しているのに対し、G-カルテット平面との π - π 相互作用を駆動源として G4 と相互作用することでリガンドが同一平面に固定され、蛍光特性が変化すると考えられる。

誘導体 **1** を用いて、G4 形成配列との相互作用に関する配列選択性、G4 形成配列と相互作用した際の蛍光特性の変化を解析することで、化合物 **1** のライトアップ特性を評価することとした。

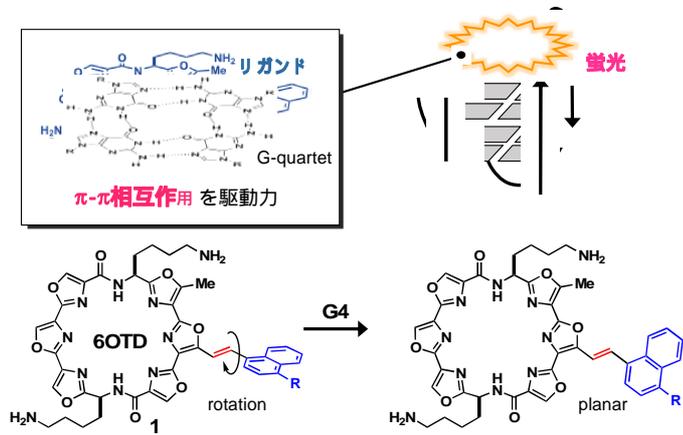
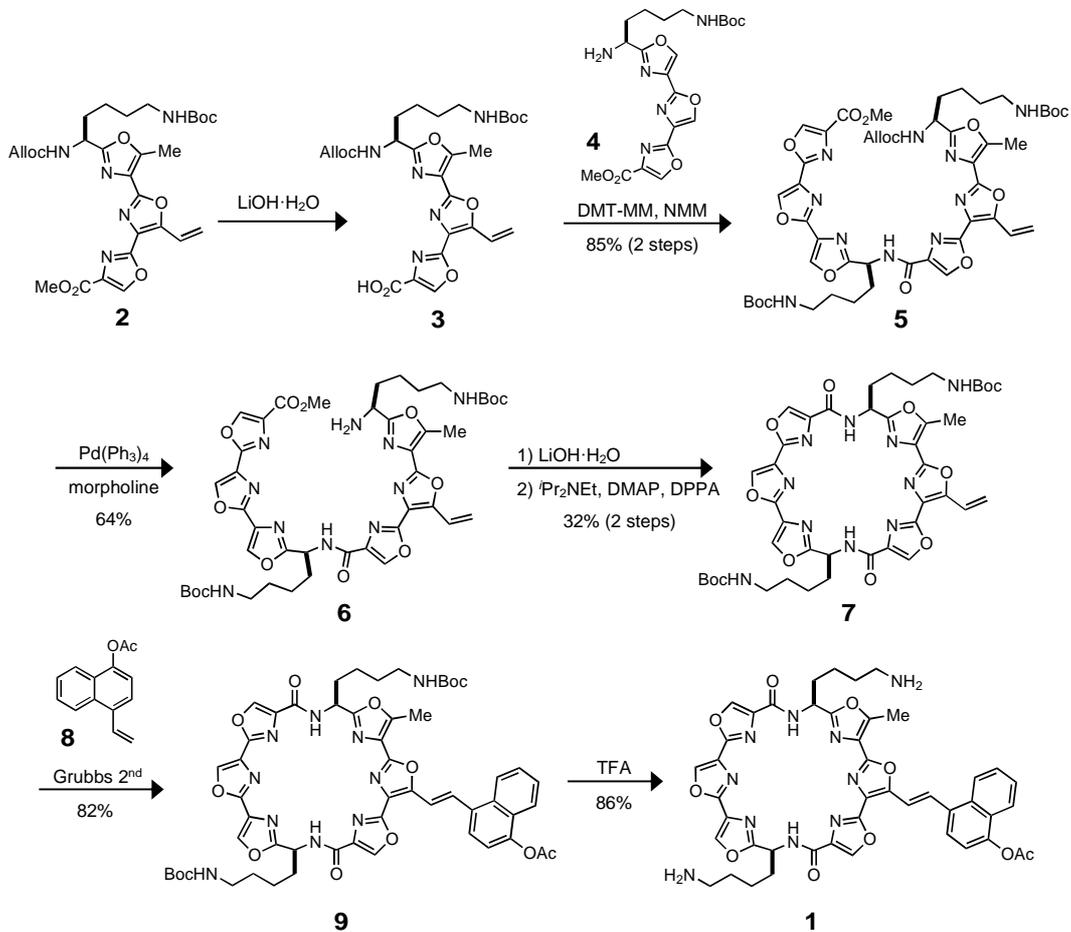


図3 計画したライトアップ型G4リガンド**1**の構造

4. 研究成果

化合物 **1** (R = OAc) の合成は、これまでに我々の研究室で確立された 6OTD の合成手法を基盤に以下の通り行った (Scheme 1)。



Scheme 1 化合物 **1** の合成

アミノ酸 (セリン、リシン) を原料に数行程を経て、ビニル基が置換したオキサゾールを一つ含むオキサゾール環が三環連続して結合したエステル **2** を合成した。三環性オキサゾール **2** のメチルエステルを水酸化リチウムを用いて加水分解を行いカルボン酸 **3** とした後、これに対し DMT-MM を縮合剤として別途合成した **4** とのアミド化を行い **5** を 85% (2行程) で得た。**5** の Alloc 基を Pd 触媒存在下、モルホリンを用いて選択的に脱保護しアミンを得 (64%)、ついでエステルの加水分解を行いアミノ酸を得た。さらに高希釈度条件下、DPPA を縮合剤として分子内マクロラクタム化を行うことで、大

環状化合物 **7** を 32% (2行程) で得た。**7** に対し、第二世代グラブス触媒を用い、別途合成したナフチル **8** とのオレフィンメタセシス反応を行い側鎖にビニルナフチル基を導入することができた(82%)。最後に得られた **9** の Boc 基を、TFA を用いて脱保護することで目的とする化合物 **1** を合成することができた(86%)。

そこで次に合成した化合物 **1** について、(1) G4 形成配列との相互作用能、(2) 蛍光特性、に関して以下それぞれ評価を行った。

(1) 化合物 **1** の G4 形成配列との選択的相互作用能に関する評価

化合物 **1** について、G4 形成配列との選択的な相互作用能を評価することを目的として、telo24 (G4 形成モデル配列 : (TTAGGG)₄) および dsDNA (G4 非形成配列 : TATAGCTATATTTTTTTTATAGCTATA) を用い、これらの配列との相互作用能を電気泳動により検討した。その結果化合物 **1** は、G4 形成配列 (telo24) 存在下で泳動した時のみバンドのシフトが観察された(図4)。このことから、合成した化合物 **1** は、これまで合成してきた 6OTD 誘導体と同様に、G4 形成配列と選択的に相互作用することを確認した。

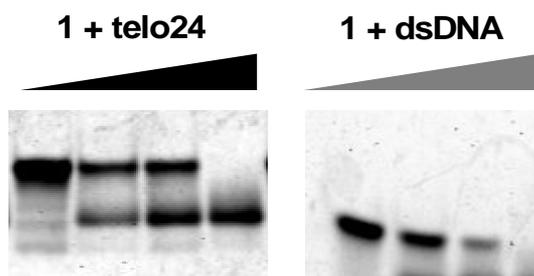


図4 DNA 配列 (telo24 および dsDNA) に対し化合物 **1** を添加した際の電気泳動

(2) 化合物 **1** の蛍光特性に関する評価

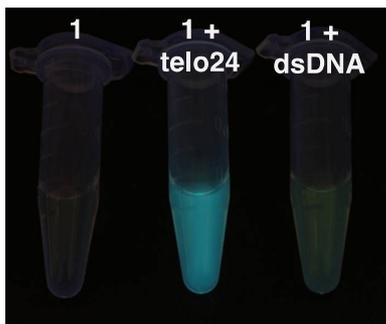


図5 化合物 **1** に対してそれぞれ DNA 配列を添加した際の蛍光変化
左から **1** のみ、**1** に G4 形成配列を添加、**1** に G4 非形成配列を添加

化合物 **1** に対して、G4 形成配列および G4 非形成配列存在下における蛍光特性を調べた。すなわち、telo24 (G4 形成モデル配列 : (TTAGGG)₄) および dsDNA (G4 非形成配列 : TATAGCTATATTTTTTTTATAGCTATA) を用い、これらをそれぞれ化合物 **1** と混合させ、蛍光特性を観察した(図5)。

その結果、化合物 **1** は、G4 形成配列である telo24 を添加した時のみ、蛍光を発することわかった。**1** は、リガンドのみでは蛍光が見られず、G4 非形成配列を添加した際も蛍光を発していないことから、合成した誘導体 **1** は、G4 存在下のみ、すなわち G4 と相互作用し、選択的に蛍光を発するライトアップ型蛍光リガンドであることがわかった(図4)。

図5から観察された蛍光特性について、蛍光スペクトル測定により確認することとした。すなわち、化合物 **1** に対し、G4 形成配列 (telo24) および G4 非形成配列 (dsDNA) を添加した際の蛍光スペクトルを測定した。その結果、G4 形成配列を添加したときのみ蛍光を発し、かつその強度は DNA の等量依存的に強くなることが観察された。一方、dsDNA を添加した場合には、蛍光特性の変化が見られなかった(図6)。このことから、図4で観測された蛍光特性を確認することができた。

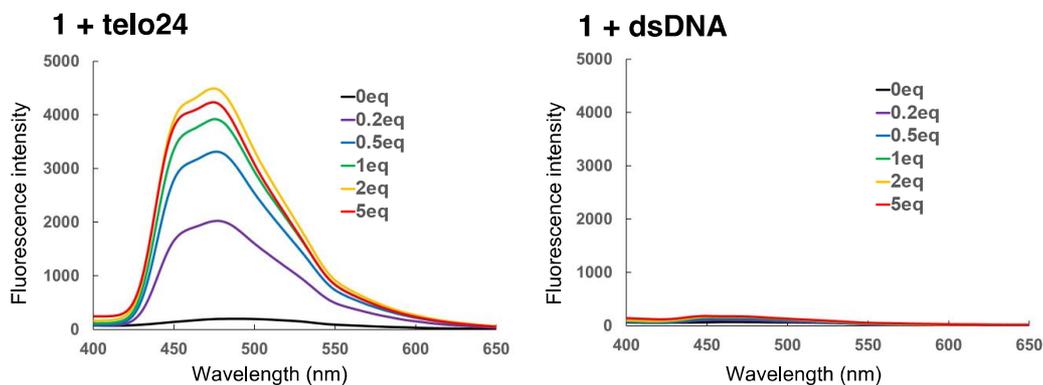


図6 化合物1に対してそれぞれDNA配列を添加した際の蛍光スペクトル
左から、1にG4形成配列を添加、1にG4非形成配列を添加

そこで次に化合物1を細胞内でのG4検出に適応した。生細胞に対して化合物1を添加し、蛍光染色を行った。その結果化合物1由来の蛍光を生細胞内にて観察することができた。今後、観察された蛍光に関してより詳細な解析（G4形成の有無の確認と形成のタイミング）を計画する。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

1. K. Iida, Y. Tsushima, Y. Ma 他6名、9番目, "Model studies for isolation of G-quadruplex-forming DNA sequences through a pull-down strategy with macrocyclic polyoxazole", *Bioorg. Med. Chem.*, **27**, 1742-1746, 査読あり, 2019年, DOI:10.1016/j.bmc.2019.02.056
2. Y. Ma, K. Iida, S. Sasaki 他4名、7番目, "Synthesis and Telomeric G-quadruplex-stabilizing Ability of Macrocyclic Hexaoxazoles bearing Three Side Chains", *Molecules*, **24**, Article number:263., 査読あり, 2019年, DOI:10.3390/molecules24020263
3. S. Jonchhe, C. Ghimire, Y. Cui 他5名、6番目, "Binding of a Telomestatin Derivative Changes Mechanical Anisotropy of Human Telomeric G-quadruplex", *Angew. Chem., Int. Ed.*, **58**, 877-881, 査読あり, 2019年, DOI:10.1002/anie.201811046
4. J. A. Punnoose, Y. Ma, M. E. Hoque 他5名、7番目, "Random formation of G-quadruplexes in human telomere overhangs leads to a kinetic folding pattern with targetable vacant G-tracts", *Biochemistry*, **57**, 6946-6955, 査読あり, 2018年, DOI:10.1021/acs.biochem.8b00957
5. H. Masai, N. Kakusho, R. Fukatsu 他4名、7番目, "Molecular architecture of G-quadruplex structures generated on duplex Rif1 binding sequences", *J. Biol. Chem.*, **293**, 17033-17049, 査読あり, 2018年, DOI:10.1074/jbc.RA118.005240
6. S. S. Masoud, Y. Yamaoki, Y. Ma 他6名、9番目, "Analysis of interaction between telomeric i motif DNA and a cyclic tetraoxazole compound", *ChemBioChem*, **19**, 2268-2272, 査読あり, 2018年, DOI:10.1002/cbic.201800425
7. Y. Ma, Y. Tsushima, M. Sakuma 他6名、9番目, "Development of G-quadruplex ligand for selective induction of parallel-type topology", *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 7375-7382, 査読あり, 2018年, DOI:10.1039/C8OB01702F
8. A. Porro, M. Berti, J. Pizzolato 他5名、6番目, "FAN1 acts in concert with ubiquitylated PCNA to alleviate replication stress and preserve genome integrity", *Nature Commun.*, **8**, Article number:1073, 査読あり, 2017年, DOI:10.1038/s41467-017-01074-6
9. D. H. Bay, A. Busch, F. Lisdat 他5名、6番目, "Identification of G-quadruplex structures that possess transcriptional regulating functions in the Dele and Cdc6 CpG islands", *BMC Mol. Biol.*, **18**, 17, 査読あり, 2017年, DOI:10.1186/s12867-017-0094-z
10. X. Liu, T. Ishizuka, H. L. Bao 他6名、7番目, "Structure-dependent binding of hnRNP A1 to telomere RNA", *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 7533-7539, 査読あり, 2017年, DOI:10.1021/jacs.7b01599
11. J. A. Punnoose, Yue Ma, Y. Li 他4名、6番目, "Adaptive and Specific Recognition of Telomeric G-quadruplexes via Polyvalency Induced Unstacking of Binding Units", *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 7476-7484, 査読あり, 2017年, DOI:10.1021/jacs.7b00607
12. T. Nakamura, S. Okabe, H. Yoshida 他8名、10番目, "Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole", *Sci. Rep.*, **7**, Article number:3605, 査読あり, 2017年, DOI:10.1038/s41598-017-03785-8
13. M. Fukuhara, Y. Ma, K. Nagasawa, F. Toyoshima, "A G-quadruplex structure at the 5' end of the H19 coding region regulates H19 transcription", *Sci. Rep.*, **7**, Article number:45815, 査読あり, 2017年, DOI:10.1038/srep45815

14. P. Maleki, Y. Ma, K. Iida, K. Nagasawa, H. Balci, "A Single Molecule Study of a Fluorescently Labeled Telomestatin Derivative and G-Quadruplex Interactions", *Nucl. Acids Res.*, **45**, 288-295, 査読あり, 2016年, DOI:10.1093/nar/gkw1090
15. K. Tsukakoshi, Y. Ikuta, K. Abe 他6名、7番目, "Structural regulation by a G-quadruplex ligand increases binding abilities of G-quadruplex-forming aptamers", *Chem. Commun.*, **52**, 12646-12649, 査読あり, 2016年, DOI:10.1039/c6cc07552e
16. W. Yoshida, H. Yoshioka, D. H. Bay 他4名、6番目, "Detection of DNA methylation of G-quadruplex and i-motif-forming sequences by measuring the initial elongation efficiency of PCR", *Anal. Chem.*, **88**, 7101-7107, 査読あり, 2016年, DOI:10.1021/acs.analchem.6b00982
17. M. Sakuma, Y. Ma, Y. Tsushima 他3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.*, **14**, 5109-5116, 査読あり, 2016年, DOI:10.1039/C6OB00437G

〔学会発表〕(計24件)

1. 安田瑞穂、馬悦、岡部幸子、Young-Tae Chang、清宮啓之、長澤和夫, "In situ Click 反応を基盤とする生細胞中での G4 の可視化", 第36回メディスナルケミストリーシンポジウム, 2018
2. 馬悦、飯田圭介、齋藤良太、長澤和夫, "グアニン四重鎖選択的に蛍光特性の変化するリガンドの創製", 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会, 2018
3. 安田瑞穂、馬悦、佐々木捷悟、清宮啓之、Young-Tae Chang、長澤和夫, "グアニン四重鎖構造の可視化を志向した大環状ヘキサオキサゾール化合物の合成", 日本化学会第98回春季年会, 2018
4. 馬悦、飯田圭介、長澤和夫, "グアニン四重鎖と相互作用する大環状オキサゾール型蛍光リガンドの創製", 日本化学会第98回春季年会, 2018
5. S. Sasaki, Y. Ma, K. Nagasawa, "Synthesis and evaluation of a linear hexaoxazole as G-quadruplex stabilizing ligands", 6th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thering in Prague, 2017
6. Y. Ma, S. Sasaki, K. Nagasawa, "Synthesis and evaluation of ligand for selective induction of topologies in telomeric G-quadruplex", G4thering (6th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thering in Prague), 2017
7. 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, 2016
8. 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, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: グアニン四重鎖結合性リガンド

発明者: 長澤和夫、馬悦

権利者: 東京農工大学

種類: 特許

番号: 特願2019-080809

出願年: 2019年4月22日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。