

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17938

研究課題名(和文) 特殊な四重鎖構造の解析を可能とする新規化学修飾法の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and application of novel chemical modification method for analysis of unusual G-quadruplex structures

研究代表者

石塚 匠 (ISHIZUKA, TAKUMI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：50700085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、テロメアRNAが関与する特殊な四重鎖構造の解析を可能とするフッ素基を応用した化学修飾法の開発し、テロメアRNAの高次構造に関する新たな知見を得ることに成功した。具体的には、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた細胞環境下におけるテロメアRNAの高次構造は、四重鎖構造の形成に加え、二量体が優先的に形成することがIn-cell 19F-NMRにより明らかとなった。さらに、テロメアRNAとテロメアDNAの分子間の特殊な四重鎖構造の形成を19F-NMRにより簡便に検出し、従来法では観測できない熱安定性についても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel chemical modification method to analyze unusual G-quadruplex structures in living cells. Specifically, in-cell 19F NMR spectroscopy was employed to investigate the structural features of human telomere RNA in *Xenopus laevis* oocytes. Only one signal was observed in the in-cell 19F NMR spectrum, for which the chemical shift is identical to that observed for the corresponding higher-order G-quadruplex in the in vitro 19F NMR spectrum. We further showed that 19F-NMR can detect DNA/RNA hybrid G-quadruplex structure. We performed a temperature dependent experiment to investigate the stability of the DNA/RNA hybrid G-quadruplex. The result indicated that 19F-NMR can be used to directly observe the melting process of the DNA/RNA hybrid G-quadruplex, which was not easily accessed by traditional methods, such as CD or UV spectroscopy.

研究分野：生体関連化学

キーワード：四重鎖構造 核酸 ヒトテロメアRNA 化学修飾 19F-NMR フッ素 グアニン ヒトテロメアDNA

## 1. 研究開始当初の背景

寿命を司るテロメアは染色体の末端部位であり、老化およびガンに深く関与している。また、このテロメア DNA から転写され生成するテロメア RNA の存在が明らかとなつて以来、その構造や生体機能の解明に関する研究が盛んになされている。

申請者らはテロメア RNA とテロメア DNA の関連性において、両者が分子間の特殊な四重鎖構造を形成することを二分子を選択的に結合させる反応(クリック反応)を駆使して明らかにし(Xu, Suzuki, Ishizuka et al. BMC 2014) また細胞内における検討からこの特殊な四重鎖構造がテロメア末端の保護に関与している知見を得た(Xu, Ishizuka et al. JBC 2012)。しかしながら、このような構造体が細胞内でどのように構造を形成しているか、どのようなタンパク質と相互作用し機能を発現しているかに関しては全く不明であり、解明が急務となっている。

RNA/DNA 四重鎖構造の解析の場合では、溶液中で DNA のみ、RNA のみの四重鎖構造が共存し3つの四重鎖構造が形成してしまい、目的の RNA/DNA 四重鎖構造のみを検出することはできない。即ち、従来、四重鎖構造の形成確認に用いられる円二色性(CD)スペクトルは重ね合わせとなり目的の四重鎖構造の熱安定性も評価できず、タンパク質の結合の有無などの評価も不可能である。従来手法のひとつである核磁気共鳴(NMR)分光法での測定においてもシグナルが煩雑となり目的のシグナルを追跡することは不可能である。

以上のように、テロメア RNA で構成される特殊な四重鎖構造の新たな機能の解明には解析する手法がこれまでになく、それらの解析を可能とする有効な技術の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来法では解析不可能な特殊なテロメア RNA 四重鎖構造を解析可能とするフッ素基を応用した化学修飾法を開発し、その手法を用いて、テロメア RNA の新たな構造と機能について解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、テロメア RNA で構成される特殊な四重鎖構造の機能解析を可能とする化学修飾法を確立するため、フッ素基の修飾導入位置を有機合成化学的に検討する。その検討した導入法を用いてテロメア RNA を  $^{19}\text{F}$  標識し、特殊な四重鎖構造の解析を行い、どのような化学的特性を有する構造体であるかを調査する。また本手法を四重鎖構造とタンパク質の相互作用に応用し、特殊な四重鎖

構造に結合するタンパク質の探索を行う。さらに  $^{19}\text{F}$  標識 RNA を生細胞中に導入し、細胞環境下では特殊な四重鎖構造にどのような影響を及ぼすかを In-cell  $^{19}\text{F}$ -NMR により検討する。こうして、テロメア RNA の四重鎖構造と機能の新たな関連性を明らかにする。

## 4. 研究成果

初年度では、当初予定していたテロメア RNA へのフッ素基の導入方法について検討した。その結果、フッ素基修飾を 3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル基とし、修飾位置を 5'末端とした場合が最も高感度かつ高精度な化学修飾法であることを見出した。

本手法と  $^{19}\text{F}$  NMR を用いることで、一本鎖と四重鎖構造の構造変化を観測でき、簡便に解析できることが明らかとなった(図1)。従来法の  $^1\text{H}$  NMR との比較も行い、異なる構造体を正確に識別していることを確かめた。また、 $^{19}\text{F}$  NMR のピークより、熱力学的パラメーターも算出可能であることを示した。

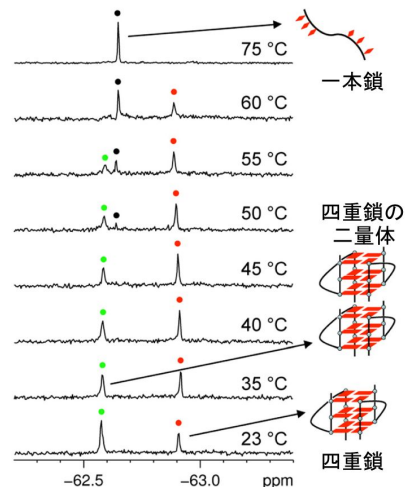


図1 異なる温度における  $^{19}\text{F}$  修飾テロメア RNA の  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトル。

●は一本鎖、●は四重鎖、●は四重鎖の二量体、また ●は、グアニン塩基を示す。

また、細胞環境下ではテロメア RNA 四重鎖構造にどのような影響を及ぼすかを検討するために、 $^{19}\text{F}$  修飾のテロメア RNA をアフリカツメガエルの卵母細胞にマイクロインジェクション法で導入し、In-cell  $^{19}\text{F}$ -NMR 測定により直接観測を行った(図2)。その結果、四重鎖構造の二量体の形成が優先して起こることを明らかにした(Nucleic Acids Res. 2017, 45, 5501.)

次年度では、本手法によるテロメア RNA 四重鎖構造と相互作用する小分子やタンパク質の検出に成功した。また、テロメア RNA とテロメア DNA の分子間の特殊な四重鎖構造の形成を  $^{19}\text{F}$ -NMR により簡便に検出し、その熱安定性も明らかとした(ChemistrySelect 2017, 2, 4170.)

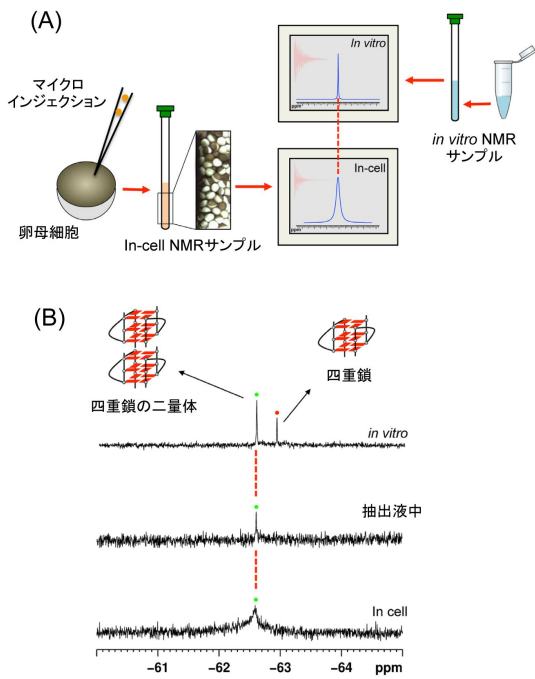


図2 (A) In-cell  $^{19}\text{F}$  NMR 実験の概要 (B) *in vitro*、抽出液中および In-cell における  $^{19}\text{F}$  NMR の比較。

さらに開発したフッ素基修飾法を DNA 四重鎖構造へ応用し、 $^{19}\text{F}$ -NMR での検出のみならず、蛍光検出も可能で、さらに従来の四重鎖構造を安定化させることもできる機能性核酸塩基  $^8\text{F}_d\text{G}$  (図3) を合成し、本手法を拡張することにも成功した (*Analyst* **2017**, *142*, 4083.)

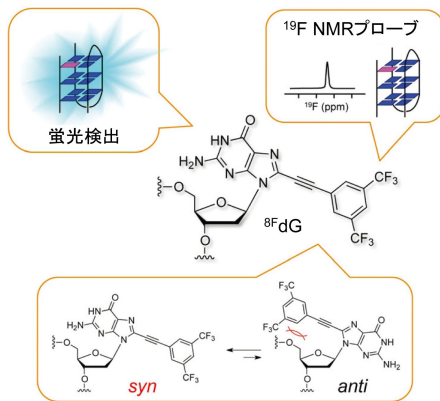


図3 グアニンの8位への修飾は四重鎖構造の安定化に寄与し、 $^{19}\text{F}$  プローブおよび蛍光検出としても応用可能。

本手法の精度を調査するために、チミジンの5位に  $^{19}\text{F}$  修飾を施した  $^5\text{F}_d\text{U}$  を合成し、トロピン結合アプタマーのループ部位に導入した (図4)。その結果、熱力学的および速度論的現象を簡便に解析できるのみならず、従来法では観測できない微小な構造変化を捉えることができることを実証した (*ACS Omega* **2017**, *2*, 8843.)

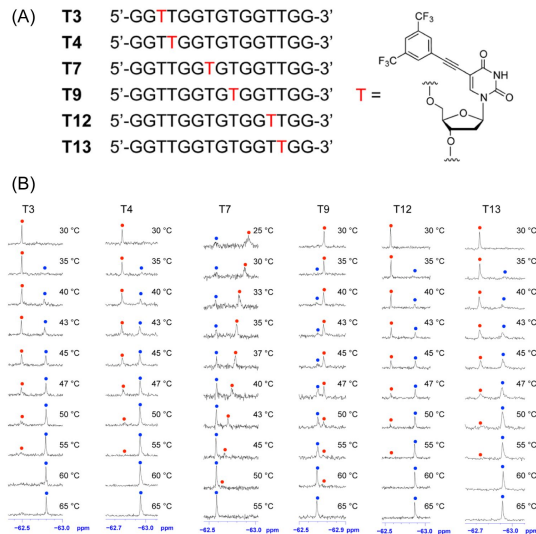


図4 (A) トロピン結合アプタマーの配列と  $^{19}\text{F}$  修飾位置。 (B) 異なる温度における  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトル。●は一本鎖、●は四重鎖を示す。

本手法で得られた知見から、テロメア RNA に関する発展的な結果も得ることもできた。ひとつは、テロメア関連タンパク質である hnRNPA1 がテロメア RNA 四重鎖構造依存的に結合することを見出した (*J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7533.)。また、これまで報告のないアンチパラレル型のテロメア RNA 四重鎖構造を修飾核酸塩基により形成可能であることも示した (*Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6695.)。さらに図5に示すように r(GUUAGGGU) のテロメア RNA が、4つの G-tetrad、2つの U-tetrad および1つの A-tetrad を介し、中心部に八重鎖構造を有する極めて熱安定性の高い構造体を形成することを明らかにした (*J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2565.)

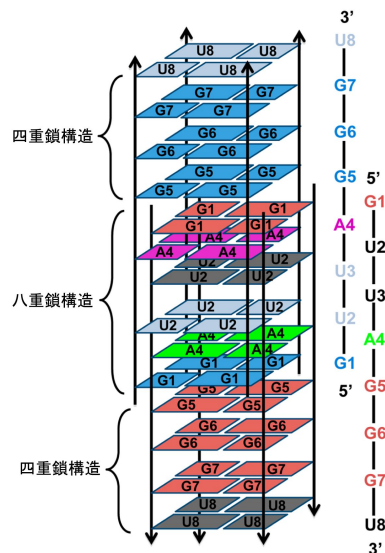


図5 テロメア RNA の r(GUUAGGGU) で形成される熱安定性の高い構造体の模式図。

## 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9件)

Takumi Ishizuka, Atsushi Yamashita, Yujiro Asada, Yan Xu  
“Studying DNA G-Quadruplex Aptamer by <sup>19</sup>F NMR”  
*ACS Omega* **2017**, 2, 8843-8848.  
[査読有], DOI: 10.1021/acsomega.7b01405

Takumi Ishizuka, Pei-Yan Zhao, Hong-Liang Bao, Yan Xu  
“A Multi-Functional Guanine Derivative for Studying the DNA G-Quadruplex Structure”  
*Analyst* **2017**, 142, 4083-4088.  
[査読有], DOI: 10.1039/C7AN00941K  
[Selected as a Back Cover]

Chao-Da Xiao, Takumi Ishizuka, Yan Xu  
“Antiparallel RNA G-Quadruplex Formed by Human Telomere RNA Containing 8-Bromo guanosine”  
*Sci. Rep.* **2017**, 7, 6695.  
[査読有], DOI: 10.1038/s41598-017-07050-w

Xiao Liu, Takumi Ishizuka, Hong-Liang Bao, Kei Wada, Yuma Takeda, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Danzhou Yang, Yan Xu  
“Structure-Dependent Binding of hnRNPA1 to Telomere RNA”  
*J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 7533-7539.  
[査読有], DOI: 10.1021/jacs.7b01599

Hong-Liang Bao, Takumi Ishizuka, Ayaka Iwanami, Takanori Oyoshi, Yan Xu  
“A Simple and Sensitive <sup>19</sup>F NMR Approach for Studying the Interaction of RNA G-Quadruplex with Ligand Molecule and Protein”  
*ChemistrySelect* **2017**, 2, 4170-4175.  
[査読有], DOI: 10.1002/slct.201700711  
[Selected as a Cover Picture]

Chao-Da Xiao, Takumi Ishizuka, Xiao-Qing Zhu, Yue Li, Hiroshi Sugiyama, Yan Xu  
“Unusual Topological RNA Architecture with an Eight-Stranded Helical Fragment Containing A-, G-, and U-Tetrads”  
*J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 2565-2568.  
[査読有], DOI: 10.1021/jacs.6b12274

Hong-Liang Bao, Takumi Ishizuka, Takashi Sakamoto, Kenzo Fujimoto, Tamayo Uechi, Naoya Kenmochi, Yan Xu  
“Characterization of Human Telomere RNA G-Quadruplex Structures *in vitro* and in Living Cells Using <sup>19</sup>F NMR Spectroscopy”  
*Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 5501-5511.  
[査読有], DOI: 10.1093/nar/gkx109

Takumi Ishizuka, Yan Xu

“Click Chemistry Takes a Snapshot of DNA-RNA Hybrid G-Quadruplex in Living Cells”  
*J. Nat. Sci.* **2016**, 2, e237. [査読有]

Takumi Ishizuka, Hong Shan Liu, Kenichiro Ito, Yan Xu  
“Fluorescence Imaging of Chromosomal DNA Using Click Chemistry”  
*Sci. Rep.* **2016**, 6, 33217.  
[査読有], DOI: 10.1038/srep33217

[学会発表](計19件)

石塚 匠, 徐 岩  
Chemical Probing of G-Quadruplex Structures by Modified Nucleosides  
日本化学会第 98 春季年会, 4D5-16, 日本大学 (2018 年 3 月 23 日, 口頭発表)

大立目 真臣, 石塚 匠, 徐 岩  
RNA 四重鎖構造を解析する化学プローブの開発  
日本化学会第 98 春季年会, 2PB-084, 日本大学 (2018 年 3 月 21 日)

竹田 悠馬, 劉 暁, 石塚 匠, 徐 岩  
hnRNPA1 のヒトテロメア RNA への構造特異的な結合  
日本化学会第 98 春季年会, 2PB-103, 日本大学 (2018 年 3 月 21 日)

Hong-Liang Bao, Takumi Ishizuka, Yan Xu  
Studying G-Quadruplex Structures by <sup>19</sup>F NMR  
日本化学会第 98 春季年会, 4D5-08, 日本大学 (2018 年 3 月 23 日)

Thananjeyan Balasubramaniam, Takumi Ishizuka, Yan Xu  
Investigation of the Thermodynamic Stability and Structure of Oligonucleotides Containing 2'-O-Methyl-8-methylguanosine by CD and NMR  
日本化学会第 98 春季年会, 4D5-42, 日本大学 (2018 年 3 月 23 日)

Takumi Ishizuka, Masaomi Otatsume, Yan Xu  
Chemical Probe for Studying Human Telomere RNA G-Quadruplex  
The 44th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Tokyo, Japan (Nov. 15, 2017, Poster Presentation)

Chao-Da Xiao, Takumi Ishizuka, Yan Xu  
Novel RNA Architecture Formed by Eight RNA Strands Containing Fourteen G- A- and U-tetrads  
The 44th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Tokyo, Japan (Nov. 15, 2017)

Hong-Liang Bao, Takumi Ishizuka, Yan Xu  
To Investigate Human Telomere DNA  
G-Quadruplexes Structures by <sup>19</sup>F NMR  
The 44th International Symposium on Nucleic  
Acid Chemistry, Tokyo, Japan (Nov. 15, 2017)

石塚 匠, 大立目 真臣, 徐 岩  
RNA 四重鎖構造を解析するケミカルプロ  
ブの開発  
第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 1PB-22,  
東京大学 (2017 年 9 月 7 日, ポスター発表)

徐 岩, 石塚 匠, 肖 潮達, 劉 暁, 鮑 宏  
亮  
ヒトテロメア RNA の構造及び生化学機能  
第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2-02A,  
東京大学 (2017 年 9 月 8 日)

Takumi Ishizuka, Yan Xu  
A Multi-Functional Guanine Derivative for  
Studying DNA G-Quadruplex Structure *in vitro*  
and in Living Cells  
6th International Meeting on Quadruplex Nucleic  
Acids, Prague, Czech Republic (May. 31, 2017,  
Poster Presentation)

石塚 匠, 徐 岩  
Development of New Chemical Modification  
Method for Analysis of Unique G-Quadruplex  
Structures  
日本化学会第 97 春季年会, 1C4-12, 慶應義塾  
大学 (2017 年 3 月 16 日, 口頭発表)

Takumi Ishizuka, Yan Xu  
Conformationally Restricted Guanosine  
Analogues Induce Topological Change in Human  
Telomeric DNA G-Quadruplexes  
The 43th International Symposium on Nucleic  
Acid Chemistry, Kumamoto, Japan (Sep. 27,  
2016, Poster Presentation)

Chao-Da Xiao, Takumi Ishizuka, Yan Xu  
An Anti-parallel RNA G-Quadruplex Induced by  
Specific Incorporation of 8-Bromoguanosine  
The 43th International Symposium on Nucleic  
Acid Chemistry, Kumamoto, Japan (Sep. 27,  
2016)

Thananjeyan Balasubramaniam, Takumi  
Ishizuka, Yan Xu  
Investigation of Stabilization and Z $\alpha$  Protein  
Interaction of Z-DNA Induced by  
2'-O-Methyl-8-methylguanosine as a Z-DNA  
Stabilizer  
The 43th International Symposium on Nucleic  
Acid Chemistry, Kumamoto, Japan (Sep. 27,  
2016)

Hong-Liang Bao, Takumi Ishizuka, Yan Xu  
Structure and Stabilization of Human Telomere

RNA G-Quadruplex in Molecular Crowding  
Conditions  
The 43th International Symposium on Nucleic  
Acid Chemistry, Kumamoto, Japan (Sep. 28,  
2016)

Xiao Liu, Takumi Ishizuka, Kei Wada,  
Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, Yan Xu  
Interaction of Human Telomere RNA  
G-Quadruplex and hnRNPA1  
The 43th International Symposium on Nucleic  
Acid Chemistry, Kumamoto, Japan (Sep. 28,  
2016)

石塚 匠, 徐 岩  
修飾グアノシン誘導体により形成する核酸  
高次構造  
第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 1-09B,  
石川県金沢市 (2016 年 9 月 7 日, 口頭発表)

石塚 匠, 徐 岩  
光架橋反応を用いたヒトテロメア RNA 四重  
鎖と hnRNPA1 の相互作用解析  
第 38 回日本光医学・光生物学会, 京都リサ  
ーチパーク (2016 年 7 月 22 日, 口頭発表)

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/MMCCHEM/i  
ndex.html](http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/MMCCHEM/index.html)

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
石塚 匠 (ISHIZUKA TAKUMI)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号: 50700085