

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05349

研究課題名(和文) グアニン四重鎖を標的としたAXLの抑制と、可視化プローブを用いた作用機構の検証

研究課題名(英文) Development of a Novel Light-up G-quadruplex Binding Compound

研究代表者

飯田 圭介(Keisuke, iida)

千葉大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：70719773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン豊富な核酸上ではグアニン四重鎖(G4)と呼ばれる特殊な高次構造の形成が確認されている。このG4はヒトゲノム上に70万箇所以上存在する事が示され、細胞内で重要な機能を担っている。しかし、いまだG4の細胞内での本質的な機能は解明されておらず、それを可能にするためのG4リガンドの開発が望まれている状況である。そこで本研究では、ケミカルツールとして細胞内でのG4の検出を可能にする蛍光G4リガンドの開発を目的とした。その結果、合成した化合物が、実際にG4と結合し、蛍光で検出可能であることを実証した。さらに、細胞内で当該化合物はストレス顆粒のマーカーとしても利用可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した化合物はG4に結合することで蛍光を発するLight-up型の蛍光化合物であることが明らかとなり、感度の高い検出を可能とした。これにより細胞内でG4の実用的なマーカーとして使用可能である。また、今回G4リガンドにより細胞を刺激するとストレス顆粒が誘導されることを明らかとしたが、これは新たなG4リガンドの薬理作用解明のための一助となる可能性がある。今後、化合物の更なる機能化の実装に加えて、ストレス顆粒中でのG4の働きを調査していくことで新たなG4による生体機能調節メカニズムが明らかになっていくことに期待する。

研究成果の概要(英文)：G-quadruplexes (G4s) are higher-order structures of nucleic acids formed from Hoogsteen base pairs in guanine-rich sequences. G4s regulate a wide variety of biological processes such as stress granule formation. G4-binding small molecules (G4 ligands) have been played a key role in the progress of this field. Notably, light-up G4 ligands whose fluorescence is selectively enhanced when interacting with G4s are useful for high-sensitivity detection. Herein, we present a fluorescent light-up probe with the ability to selectively stabilize G4s and enhance fluorescence upon G4 binding.

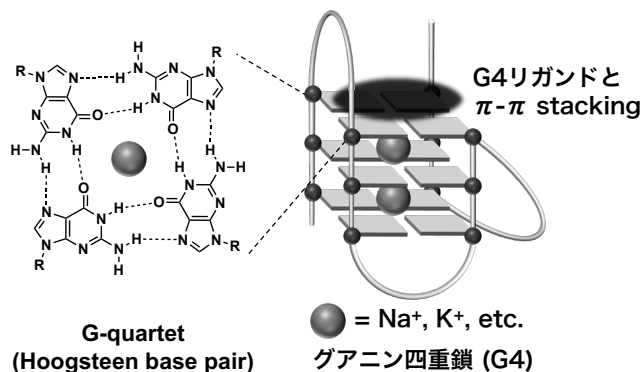
The foci of the probe were mainly observed in the nucleoli. These were co-localized with anti-fibrillarin antibodies and anti-G4 antibodies (BG4). Moreover, we tested detection of G4 in stress granules using the developed probe. We present a practical light-up probe for G4s in stress granules, providing potential targets for G4 ligands.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：グアニン四重鎖 核酸 蛍光化合物 G4

1. 研究開始当初の背景

(1) グアニン四重鎖 (G4) は一本鎖のグアニン豊富な核酸上で動的に形成される特殊な高次構造である。G4 は Na^+ 、 K^+ などの一価のカチオン存在下、四つのグアニン同士が G-quartet と呼ばれる平面構造を形成し、これらが互いに π - π 相互作用により積み重なることで形成される (図左上)。G4 に特徴的な構造である G-quartet は、二本鎖核酸における Watson-Crick 塩基対の二塩基からなる構造とは大きく異なる。そのため大きな芳香族骨格を有する化合物 (G4 リガンド) によって G4 を特異的に認識、安定化することが可能である。

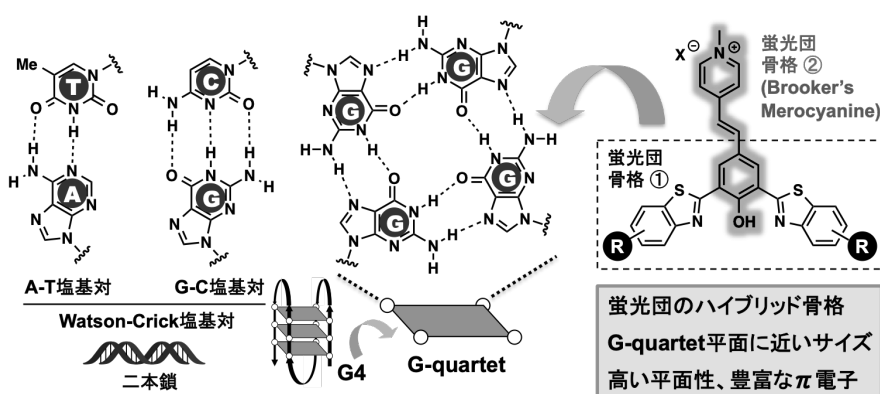


(2) G4 に共通な配列モチーフに着目した相

同性検索によって、当該モチーフはプロモータ、5'-UTR などに濃縮されていることが明らかとなり、さらに近年では、次世代シーケンサーを基盤とした G4 を直接かつゲノムワイドに検出可能な新技術が開発された。その結果ゲノム上には 70 万箇所以上の G4 が存在し、ゲノム上の至る所で形成されるとともに、重要な遺伝子発現調節部位に偏在していることが明らかとなった。また、最近まで生物系の研究者にとって細胞内での G4 形成は懐疑的であったが、2013 年に G4 の抗体が開発され、細胞内の G4 が可視化されて以来、少しずつ細胞内の G4 は認知されるとともに G4 のさらなる機能解明のためのマーカーの開発が求められている状況にある。

2. 研究の目的

蛍光 G4 リガンドは G4 の高い特異性を示しつつ蛍光団としての性質を兼ね備えている必要がある。高い G4 への特異性を獲得するためには、G4 を構成する G-quartet と同程度の大きさの芳香族骨格が π - π 相互作用するのに適している。これは G-quartet の π 平面が二本鎖を形成する Watson-Crick 塩基対とは顕著に大きいことに起因する (約二倍)。そこで、ごく最近その蛍光特性が見出された bis-benzothiazolyl phenol (蛍光団 ①)、と Brooker's Merocyanine (蛍光団 ②)、の両者を内包する骨格を設計した。当該骨格をもとにベンゾチアゾール上の R に核酸との静電相互作用が期待できるアミノ基をはじめとした置換基を系統的に導入することで高い特異性をもつ蛍光 G4 リガンドを創製する。

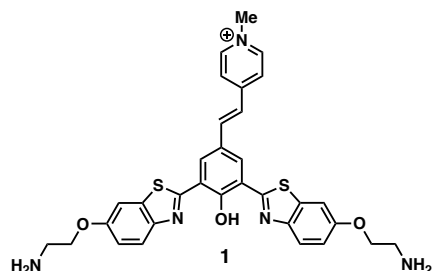


3. 研究の方法

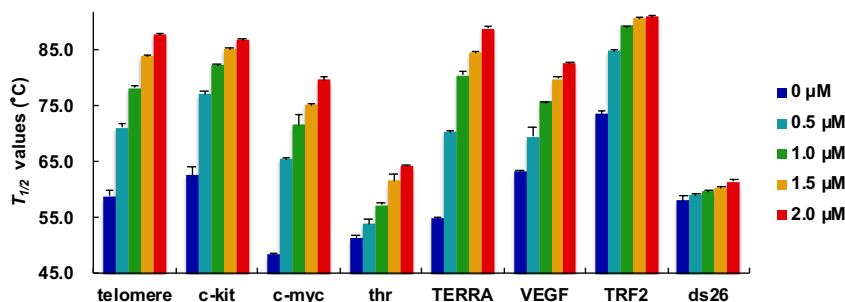
FRET 融解実験で G4 安定化能を評価し、化合物に対する G4 の蛍光滴定を行うことで Light-up 特性を評価する。これにより *in vitro* での化合物と G4 の結合能ならびに G4 の蛍光検出が可能かどうかを確認する。細胞内の局在については固定化した細胞に対して細胞免疫染色を実施する。

4. 研究成果

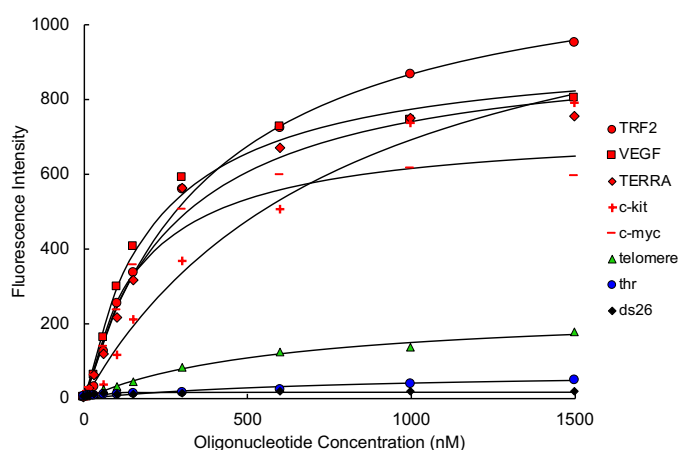
側鎖、ピリジニウム部位について種々の検討を行ったが、側鎖については核酸との静電相互作用を起こすと考えられるアミン側鎖が好適であった。ピリジニウム部位についてはより強い G-quartet との π - π 相互作用を期待して、ピリジンよりも大きな芳香族としてキノリニウム、ベンゾチアゾリニウムの導入も行ったが蛍光特性が低下し、結論として化合物 1 が最適な G4 リガンドとしての特性を示した。



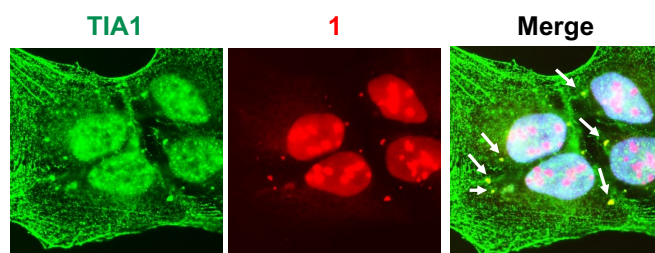
まず、FRET 融解実験を行い化合物 **1** の G4 安定化能を評価した。その結果、化合物 **1** は既知の G4 に対し DNA (telomere, c-kit, c-myc and thr), RNA (TERRA, VEGF and TRF2) の両者に渡って G4 を広く安定化することが示された。また、この際、コントロールとして用いたステムループ配列 (ds26) は安定化しないことも示され、G4 を選択的に強く安定化する事が明らかとなった。



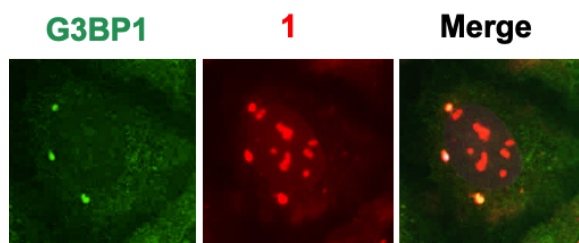
次に、蛍光スペクトル測定によって G4 存在下において化合物 **1** の蛍光強度が増大することが明らかとなった。そこでピークトップの 575 nm の蛍光強度を y 軸に G4 の滴定実験を行った。その結果、telomere や thr では蛍光の増大は中程度にとどまったものの、多くの G4 との結合の前後で顕著な蛍光の増大が確認された。さらに、コントロール配列では殆ど蛍光の増大が確認されなかったことから、化合物 **1** は細胞内の G4 の検出に適した特性を有していることが明らかとなった。



さらに、タプシガルギン (ストレス顆粒を誘導する化合物) で処理した細胞を化合物 **1** で染色した。その結果、化合物 **1** はストレス顆粒マーカーである TIA1 と共局在していることが確認された。これにより、化合物 **1** はストレス顆粒中の G4 を可視化出来ることが示された。



最後に、G4 リガンドにより、ストレス顆粒を誘導できるか調査した。これまでに G4 を解消するヘリカーズのノックアウトや、G4 のトランスフェクションによって細胞内における G4 の存在量が増加するとストレス顆粒が形成されることが報告されていたが、化合物、すなわち G4 リガンドによるストレス顆粒の誘導は報告されていない。そこで、pyridostatin 処理した細胞にて先と同様に細胞を化合物 **1** で染色した。その結果、化合物 **1** はストレス顆粒マーカーである G3BP1 と共局在していることが確認された (TIA1 も確認済み)。これにより、G4 リガンドによってストレス顆粒が誘導され、これを化合物 **1** で検出可能なことが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ma Yue, Iida Keisuke, Nagasawa Kazuo | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Topologies of G-quadruplex: Biological functions and regulation by ligands | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.103 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Namiki Kozue, Wongsirisin Pattama, Yokoyama Shota, Sato Motoi, Rawangkan Anchalee, Sakai Ryo, Iida Keisuke, Suganuma Masami | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 (-)-Epigallocatechin gallate inhibits stemness and tumorigenicity stimulated by AXL receptor tyrosine kinase in human lung cancer cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 2444 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59281-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Masai Hisao, Fukatsu Rino, Kakusho Naoko, Kanoh Yutaka, Moriyama Kenji, Ma Yue, Iida Keisuke, Nagasawa Kazuo | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Rif1 promotes association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 8618 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44736-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Iida Keisuke, Ishida Shunsuke, Watanabe Takamichi, Arai Takayoshi | 4. 巻 84 |
| 2. 論文標題 Disulfide-Catalyzed Iodination of Electron-Rich Aromatic Compounds | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry | 6. 最初と最後の頁 7411 ~ 7417 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b00769 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ma Yue, Iida Keisuke, Sasaki Shogo, Hirokawa Takatsugu, Heddi Brahim, Phan Anh, Nagasawa Kazuo | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Synthesis and Telomeric G-Quadruplex-Stabilizing Ability of Macrocyclic Hexaoxazoles Bearing Three Side Chains | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecules | 6. 最初と最後の頁 263 ~ 263 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24020263 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Jonchhe Sagun, Ghimire Chiran, Cui Yunxi, Sasaki Shogo, McCool Mason, Park Soyung, Iida Keisuke, Nagasawa Kazuo, Sugiyama Hiroshi, Mao Hanbin | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Binding of a Telomestatin Derivative Changes the Mechanical Anisotropy of a Human Telomeric G-Quadruplex | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition | 6. 最初と最後の頁 877 ~ 881 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201811046 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Iida Keisuke, Tsushima Yamato, Ma Yue, Sedghi Masoud Shadi, Sakuma Mai, Yokoyama Tomomi, Yoshida Wataru, Ikebukuro Kazunori, Nagasawa Kazuo | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Model studies for isolation of G-quadruplex-forming DNA sequences through a pull-down strategy with macrocyclic polyoxazole | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry | 6. 最初と最後の頁 1742 ~ 1746 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.02.056 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Shiozawa Motoki, Iida Keisuke, Odagi Minami, Yamanaka Masahiro, Nagasawa Kazuo | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 Synthesis of 2,6,7-Trisubstituted Prenylated indole | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry | 6. 最初と最後の頁 7276 ~ 7280 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.7b03273 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Rawangkan Anchalee, Wongsirisin Pattama, Namiki Kozue, Iida Keisuke, Kobayashi Yasuhito, Shimizu Yoshihiko, Fujiki Hirota, Suganuma Masami | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Green Tea Catechin Is an Alternative Immune Checkpoint Inhibitor that Inhibits PD-L1 Expression and Lung Tumor Growth | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Molecules | 6. 最初と最後の頁 2071 ~ 2071 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23082071 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Masai Hisao, Kakusho Naoko, Fukatsu Rino, Ma Yue, Iida Keisuke, Kanoh Yutaka, Nagasawa Kazuo | 4. 巻 293 |
| 2. 論文標題 Molecular architecture of G-quadruplex structures generated on duplex Rif1-binding sequences | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 17033 ~ 17049 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005240 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ma Yue, Tsushima Yamato, Sakuma Mai, Sasaki Shogo, Iida Keisuke, Okabe Sachiko, Seimiya Hiroyuki, Hirokawa Takatsugu, Nagasawa Kazuo | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Development of G-quadruplex ligands for selective induction of a parallel-type topology | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry | 6. 最初と最後の頁 7375 ~ 7382 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ob01702f | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 石田 俊亮、荒井 孝義、飯田 圭介 |
| 2. 発表標題 グアニン四重鎖 (G4) を蛍光検出する新規G4リガンドの開発 |
| 3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 2)石田 俊亮、木村英嗣、飯田 圭介、渡邊 孝道、荒井 孝義 |
| 2. 発表標題 ジスルフィドが促進する芳香族ヨウ素化反応の開発とその展開 |
| 3. 学会等名 第78回有機合成化学協会関東支部シンポジウム - 新津シンポジウム - |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keisuke Iida, Shunsuke Ishida, Ayano Sasaki |
| 2. 発表標題 Recognition and Fluorescence Detection of G-quadruplex by ESIPT based ligand |
| 3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 若林 勇樹、馬 悦、飯田 圭介、齋藤 良太、長澤 和夫 |
| 2. 発表標題 大環状ヘキサオキサゾール誘導体を用いたグアニン四重鎖を標的とするLight-up型蛍光リガンドの創製 |
| 3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 石田 俊亮、飯田 圭介、渡邊 孝道、荒井 孝義 |
| 2. 発表標題 ジスルフィド触媒による芳香族ヨウ素化反応 |
| 3. 学会等名 日本化学会第99春季年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 若林 勇樹、馬 悦、飯田 圭介、齋藤 良太、長澤 和夫 |
| 2. 発表標題 グアニン四重鎖を標的としたLight-up型蛍光リガンドの創製研究 |
| 3. 学会等名 日本化学会第99春季年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keisuke Iida, Shunsuke Ishida, Takayoshi Arai |
| 2. 発表標題 Diphenyl Disulfide Catalyzed Iodination of Aromatic Compounds |
| 3. 学会等名 28th International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--|-----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 ジスルフィドを触媒とする芳香族ヨウ素化合物の製造方法 | 発明者 荒井孝義、飯田圭介、石田俊亮 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2018-153079 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |