

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05267

研究課題名（和文）細胞内のグアニン四重鎖を可視化するLight-up型蛍光リガンドの開発

研究課題名（英文）Development of light-up G4 ligands.

研究代表者

飯田 圭介（Iida, Keisuke）

千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：70719773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：グアニン四重鎖（G4）は、グアニン豊富な核酸上で形成される高次構造であり、細胞内において核酸が担う多岐にわたる機能の起点となるだけでなく、疾患の創薬標的としても注目を集めている。これらG4の機能解明にあたってはG4と特異的に結合する化合物、G4リガンドが重要な役割を果たしてきた。申請者はこれまでにG4リガンドとして白金サルフェン錯体や大環状ピリドンペンタマーを合成してきた。特に白金サルフェン錯体についてはG4を強力かつ選択的に安定化するだけでなく、結合時に蛍光を増大するLight-up特性、高い抗腫瘍活性を併せ持ち、G4リガンドとして理想的な特性を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白金サルフェン錯体は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。更にはがん細胞に対して高い増殖抑制活性も確認されたため、創薬への応用へと展開する。大環状ピリドンペンタマーについては、興味深いことに細胞内でDNA G4を検出可能であった。これは、既存のG4リガンドは細胞内においてRNA G4を検出することが多いことを踏まえ、特異な物性を持っていることを示す。今後、こちらについても詳細を検討していく。

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, which are therapeutic target. 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 platinum (II) sulfen complexes and macrocyclic pyridone pentamers as novel G4 ligands.

研究分野：有機合成化学

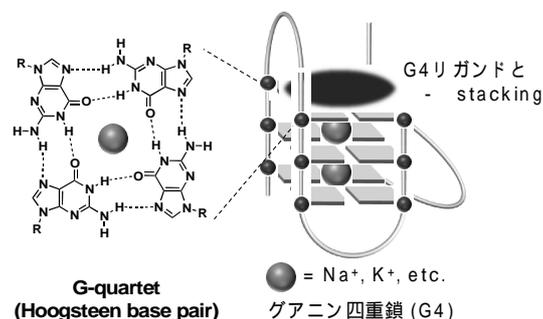
キーワード：G4 G4リガンド G-quadruplex

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

G4 と G4 リガンド

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。

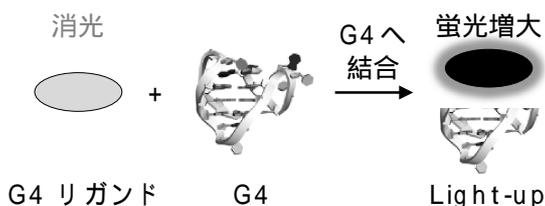


G4 分野の発展

細胞内において核酸が担う複製、転写、スプライシング、翻訳など多岐にわたる機能の起点となるだけでなく、がんや筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの疾患の創薬標的としても注目を集めている。これら G4 の機能解明にあたっては、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、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、2013 年に G4 の抗体 (BG4) 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こと、加えて G4 と特異的に結合する化合物、G4 リガンドが重要な役割を果たしてきた。

2. 研究の目的

細胞内で圧倒的に過剰に存在する二本鎖存在下で形成される G4 を検出するためには、G4 に対する高い特異性と蛍光検出感度を併せ持つ化合物が必要となる。特異性については後述するが、感度を高めるために特に効果的なのは Light-up 型の蛍光 G4 リガンドである。Light-up 型のリガンドとは、標的へ結合してはじめて蛍光を示すリガンドのことで、部分的でもこの現象が起こればバックグラウンドの蛍光が減少するので検出の際の利点となる。そこで本研究では Light-up 型の蛍光 G4 リガンドの開発と細胞内 G4 のイメージングを目的とした。



3. 研究の方法

FRET 融解実験による G4 安定化能の評価と、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

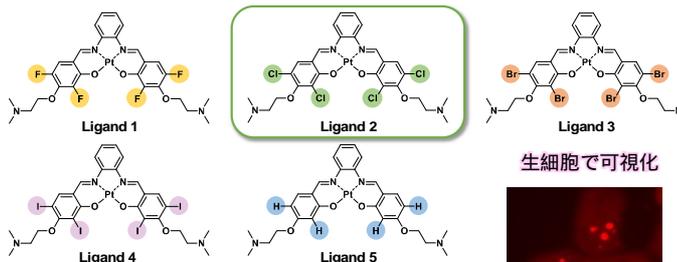
Pt サルフェン錯体

当研究室では金属錯体を G4 リガンドとして種々検討しており、蛍光を示す化合物として Pt サルフェン錯体に着目した。側鎖の最適化とハロゲンの導入などを種々検討した結果、いくつかの Pt サルフェン錯体は Light-up 特性、高い G4 安定化能 (FRET Melting Assay)、加えて重要なことに高い細胞透過性を示し、生細胞での G4 の可視化、がん細胞に対する細胞毒性 (MTS Assay) と、G4 リガンドとして理想的な特性を備えていた (右図: たとえば緑で示した Ligand 2)。そこで本研究では現時点で有望である 1, 2, 5 (F 体、Cl 体、H 体) をさらに修飾し、G4 の機能解明のためのケミカルツールや創薬への応用へと展開する予定である。

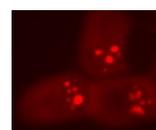
FRET Melting Assay (数値が大きい方が G4 安定化 = 強く G4 と結合)

G4	Ligand*				
	1 (F)	2 (Cl)	3 (Br)	4 (I)	5 (H)
c-myc (DNA G4)	15.3	16.9	12.9	10.8	15.1
TERRA (RNA G4)	27.0	27.5	21.0	15.5	26.0
ds (non G4)	3.6	0.6	0.3	0.5	1.6

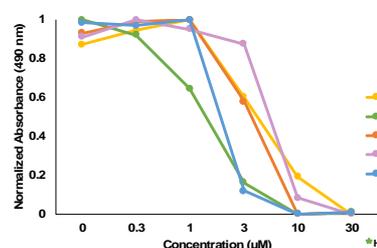
*5 eq of ligands were used.



生細胞で可視化



MTS Assay (細胞毒性: IC₅₀が小さい方が抗がん作用が高い)

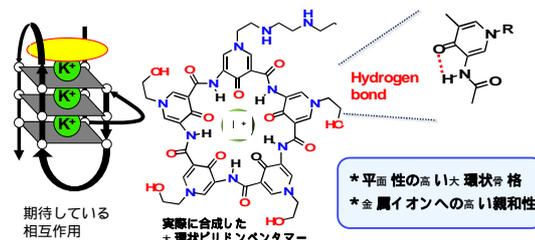


Ligand	IC ₅₀ (μM)
1 (F)	5.64 ± 0.82
2 (Cl)	1.80 ± 0.15
3 (Br)	5.05 ± 0.79
4 (I)	6.92 ± 0.92
5 (H)	2.18 ± 0.12

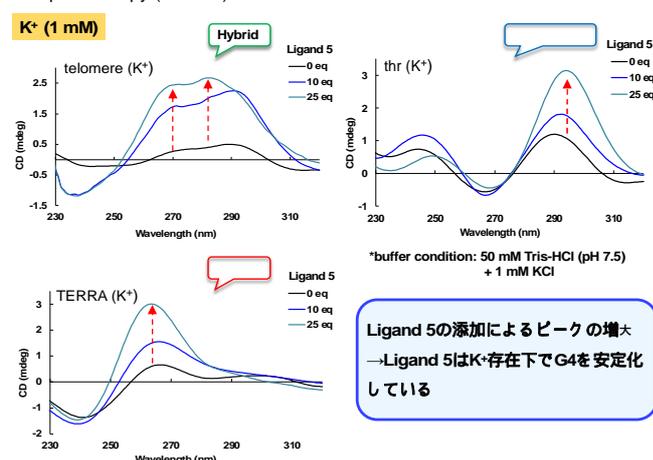
*H1299 cells (Human non-small cell lung carcinoma cell line) were used.

大環状ピリドンペンタマー

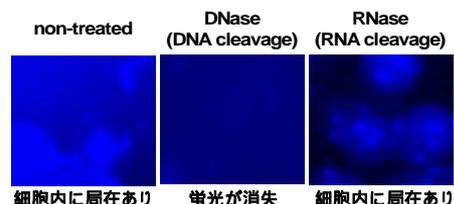
当研究室では、さらに異なる骨格として大環状ピリドンペンタマーの開発も進めている。こちらは元々金属キレーターとして報告されている分子であるが¹⁾、我々は当該骨格の平面性と K⁺との親和性に着目し (図のように G4 は細胞内に豊富に存在する K⁺によってサンドイッチ型に安定化されるので、高い結合能が期待できる)、構造活性相関を行っている。検討の結果、右図に示した化合物は FRET 融解実験において化合物 25 当量存在下、テロメア DNA と RNA の G4 に安定化能を示した (テロメア DNA G4, T_m = 41.7 °C 74.1; テロメア RNA G4, T_m = 50.7 °C 84.9)。さらに CD スペクトル解析を行った結果、当該化合物は K⁺中で G4 に由来するスペクトル変化が確認され



CD spectroscopy (Results)



れた一方で、Na⁺中では変化しなかった。このことより K⁺中で結合能が増強されていることが示された。最後に、蛍光顕微鏡により細胞内の局在を観察したところ、化合物は小胞体に局在し、また興味深いことに細胞の DNA G4 を可視化できることが確認された。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Iida Keisuke, Suzuki Natsumi, Sasaki Ayano, Ishida Shunsuke, Arai Takayoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a novel light-up probe for detection of G-quadruplexes in stress granules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17230-y	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 Iwasaki Yuka, Ookuro Yurino, Iida Keisuke, Nagasawa Kazuo, Yoshida Wataru	4. 巻 597
2. 論文標題 Destabilization of DNA and RNA G-quadruplex structures formed by GGA repeat due to N6-methyladenine modification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 134 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.123	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 佐々木 彩乃、石田 俊亮、荒井 孝義、飯田 圭介
2. 発表標題 新規蛍光G4リガンドを用いたストレス顆粒中のG4の検出
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsumi Suzuki, Takayoshi Arai, Keisuke Iida
2. 発表標題 Structure-Activity Relationships of Cytotoxic Platinum(II)-Salphen Complexes as G-Quadruplex Ligands
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayano Sasaki, Shunsuke Ishida, Takayoshi Arai, Keisuke Iida
2. 発表標題 Visualization of Cellular G-quadruplexes using a Novel Fluorescent G-quadruplex Ligand
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Iida
2. 発表標題 Development of a Novel Light-up G-quadruplex Binding Compound
3. 学会等名 15th International Conference on Cutting-edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-15) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯部えみな, 荒井孝義, 飯田圭介
2. 発表標題 グアニン四重鎖(G4)リガンドとしての大環状ピリドンペンタマーの合成と活性評価
3. 学会等名 第84回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (東京農工大シンポジウム)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 グアニン 4 重鎖(G4)リガンドとしての新規白金サルフェン錯体の合成と活性評価
2. 発表標題 中村彩莉, 鈴木なつみ, 荒井孝義, 飯田圭介
3. 学会等名 第84回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (東京農工大シンポジウム)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 磯部 えみな, 荒井 孝義, 飯田 圭介
2. 発表標題 グアニン四重鎖 (G4) リガンドとしての新規大環状ピリドンペンタマーの開発
3. 学会等名 日本化学会 第104春季年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------