

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25888019

研究課題名(和文)ヒトテロメアRNA分子における修飾の探索

研究課題名(英文)Investigation of modification for human telomeric RNA

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では8,2'-環状グアノシンおよび5',8-環状グアノシンのような核酸塩基の自由度を制限したヌクレオシドを導入したヒトテロメアRNAを合成し、このRNAで形成される四重鎖構造中の修飾の影響を調査した。主な成果として、核酸塩基の自由度を制限したヌクレオシドの導入が四重鎖構造の巻きやトポロジーの変化を誘起することを見出した。これらの成果はヒトテロメアRNAの新たな構造と機能を解析する上で重要な知見と期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, human telomeric RNA oligonucleotides incorporating a conformationally restricted nucleoside such as 8,2'-O-cycloguanosine and 5',8-cycloguanosine were synthesized and evaluated for their structural properties to find out new functions on the G-quadruplex structure. As main results, we found that introductions of the conformationally restricted nucleosides into human telomeric RNA oligonucleotides induced the helicity and topology changes on the G-quadruplex structure. These results would be valuable to analyze the structures and function of the human telomeric RNA.

研究分野：化学

キーワード：テロメアDNA ヒトテロメアRNA 四重鎖構造 核酸 ねじれ角 トポロジー 8,2'-環状グアノシン 5',8-環状グアノシン

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、老化およびがんに関与している。これに関して、近年テロメア DNA が転写されテロメア RNA が生体内に存在しているということが明らかとなった。この発見によりテロメア RNA がテロメアの機能あるいは制御に関与している可能性が考えられ、盛んに研究がなされている。

このテロメア RNA はテロメア部位の新たな構成要素のひとつと考えられ、このテロメア RNA の分子構造やテロメア DNA や関連タンパク質との関連性を明らかにすることにより、染色体構造の安定化、老化の調節およびがん化の生命現象の理解につながり、それらの知見に基づいた老化やがん化に対する新薬開発に寄与するものと期待できる。このような生物学的に重要なヒトテロメア RNA の構造と機能に関して解明するため、当研究室では化学的アプローチにより、その本質に迫ってきた。

当研究室を含めた過去の報告から、テロメア RNA (および関連タンパク質) がグアニン四重鎖構造を形成し、テロメア末端の保護を制御している可能性が示唆された。さらに重要なことは、そのテロメア RNA 自身が高次構造を形成することによって生物学的な機能を発揮していると予想されることである。そこでテロメア RNA 自身が形成する高次構造を研究の対象とすることとした。

現在まで数多くの修飾された RNA が細胞内に存在し、機能していることが知られており、一例にプリン骨格の 5',8-環状化核酸は生体内に存在することが同定され、核酸への損傷に関して重要な機能を果たしていることが報告されている。また通常ではリボースの 3'位と 5'位がホスホジエステル結合で連結された 3',5'-結合型が 2',5'-結合型となっているアデノシン核酸が生体内で機能していることも確認されている。

本研究では、テロメア RNA の高次構造に影響を及ぼすような上記のような修飾を化学的に導入した修飾核酸を用いて、その高次構造の評価を行なった。

具体的に着目したのは、先に述べたグアニンの 8 位とリボースの 5'位が共有結合を介して環状となっている 5',8-環状グアニン (図 1a) およびグアニンの 8 位とリボースの 2'位が酸素を介して環状となっている 8,2'-環状グアニンを含む核酸である (図 1b)。グアニン四重鎖構造形成にはグアニン塩基の空間的配置が非常に重要な要素となっており、今回着目した環状化体の最大の特徴は、環状となることでグアニン塩基の配置が *anti* または *syn* 型とも異なる配置となり、核酸塩基の方向が固定されることである。このような特殊な核酸で形成される四重鎖構造は新規な情報を提供し得る。また核酸塩基の方向性に関するもののみならず、ホスホジエス

テル結合が 2',5'-結合型となっている修飾核酸にも注目した (図 1c)。核酸の主鎖がグアニン四重鎖のような高次構造形成に及ぼす影響について理解できる。

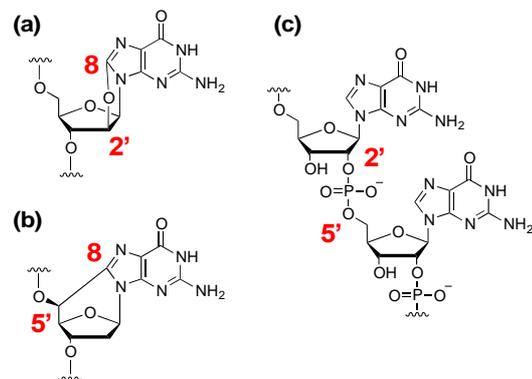


図 1. 修飾体の化学構造 (a) 8,2'-環状グアニン修飾核酸、(b) 5',8-環状グアニン修飾核酸、(c) 2',5'-結合型 RNA

2. 研究の目的

本研究では背景で述べたテロメア部位における新たな構成要素であるテロメア RNA の高次構造を核酸塩基の自由度を制限した種々の修飾核酸を用いて解析し、新規な機能を解明することを目指す。

3. 研究の方法

具体的には、5',8-環状グアニンを含む修飾核酸 (1)、8,2'-環状グアニンを含む修飾核酸 (2) および 2',5'-結合型 RNA (3) の 3 種類の修飾核酸を化学合成し、その修飾核酸がグアニン四重鎖形成にどのような影響を及ぼすのかを天然型と比較しながら検討を進めた。ここで四重鎖構造の評価は円偏光二色性 (CD) 測定、¹H-NMR によるグアニンのイミノプロトンの観測およびゲルシフトアッセイを用いた。また四重鎖構造の熱安定性および熱力学パラメーターは CD および紫外線吸収 (UV) スペクトルを用いて算出した。

4. 研究成果

(1) 8,2'-環状グアニンを含む修飾核酸について

核酸塩基の自由度の制限が四重鎖構造にどのような影響を及ぼすのかを検証するため、図 2 に示す合成スキームにより、8,2'-環状グアニンのホスホロアミダイト体を合成した。出発原料のグアニンの 8 位の臭素化の後、2'位水酸基の選択的なトシル化を施し、酢酸ナトリウム存在下で環化反応を行ない、8,2'-環状グアニンヌクレオシドを合成

した。2 位のアミノ基のイソブチリル化および 5' 位水酸基の DMT 化の後、3' 位水酸基をホスホロアミダイト化した。その後、DNR/RNA 合成機によりオリゴヌクレオチドを合成すると同時に所定の位置に修飾を施した。合成された修飾核酸は、逆相 HPLC を用いて単離精製し、質量分析 (MALDI TOF MS) により目的生成物を同定した。

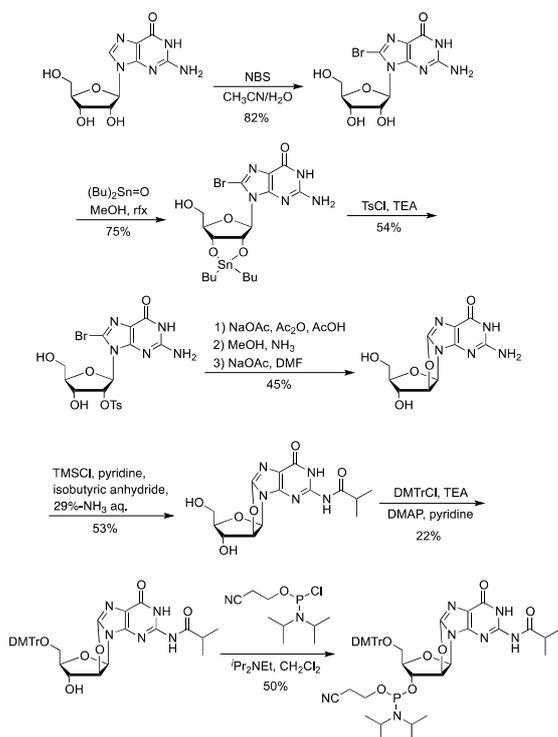


図 2. 8,2'-環状グアノシンのホスホロアミダイト体の合成スキーム

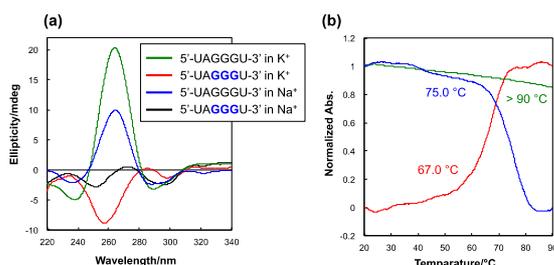


図 3. 8,2'-環状グアノシン修飾 RNA により形成される四重鎖構造の CD スペクトル (a) と熱安定性 (b) の評価

次いで、合成したオリゴヌクレオチドの四重鎖形成能を CD スペクトルの測定により評価した (図 3)。通常、4 本の鎖の方向が全て同じ向きで形成された四重鎖構造 (パラレル型) は 260 nm 付近に正のコットン効果を示す。またこの 260 nm のシグナルの温度変化を観測することでこの四重鎖構造の熱安定性 (T_m) が評価できる。検討の結果、天然の 6 量体 RNA の場合には既報と同様の正のコットン効果が観測され、その T_m も値も妥当

であることが確認された。一方で、8,2'-環状グアノシンを含む 6 量体の修飾 RNA (配列は 5'-UAGGGU-3') のカリウムイオン存在下における CD スペクトルは興味深いことに 260 nm 付近に負のシグナルを示した。その T_m 値は天然の T_m 値と比較すると低い値であった。CD スペクトルの強度から考察しても妥当である値である。CD スペクトルが対称的になるということは、四重鎖構造の巻きやねじれが天然のものと反対であることが示唆される。これまで L-体の DNA を用いて四重鎖構造の巻きやねじれを反対とした報告はあるが、D-体の核酸を用いた報告はない。即ち、D-体の核酸を用いた場合でも核酸塩基の回転方向を制限することで四重鎖構造の巻きやねじれを変化させることができるといった新たな報告となる。

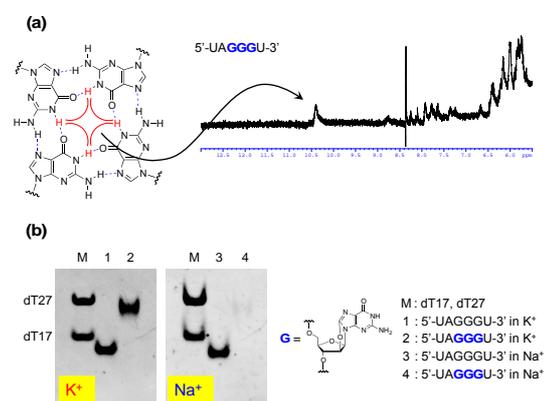


図 4. 8,2'-環状グアノシン修飾 RNA により形成される四重鎖構造の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (a) とゲル電気泳動図 (b)

これに関しては、 $^1\text{H-NMR}$ による解析を試みた (図 4 a)。四重鎖構造を形成した場合、グアニン塩基のイミノプロトンは 11 ppm 付近に特徴的なピークとして観測されるためである。測定の結果、10.5 ppm 付近にブロードなピークが観測され、四重鎖構造の形成が確認された。しかしながら、構造の詳細は明らかとなっていない。また、ゲル電気泳動による解析も行なった (図 4 b)。天然の RNA および修飾 RNA をカリウムイオン中またはナトリウムイオン中で四重鎖構造を形成させたものを解析した。その結果、修飾 RNA の四重鎖構造の移動度は天然のものと比較して小さいことから、修飾 RNA の四重鎖構造が単純な鏡像体ではなく、かさ高い構造体となっているか、もしくは四重鎖構造が複数個相互作用した高次構造体となっていることが示唆された。

以上のように、8,2'-環状グアノシン修飾の核酸塩基の自由度の制限は四重鎖構造の巻きやねじれを変化させることが可能であることを見出した。これはテロメア RNA とテロメア関連タンパク質の相互作用を解析する上で重要な知見となり得る。

表1. 本研究で使用した 8,2'-環状グアノシン修飾核酸の配列と T_m 値

		T_m (°C)	
		Na ⁺	K ⁺
RNA	5'-UAGGGU-3'	75.0	> 90
	5'-UA G GGU-3'	n.d.	n.d.
	5'-UA GGG U-3'	n.d.	67.0*

DNA	5'-AGGG(TTAGGG) ₃ -3'	56.2	66.8
	5'-A GGG (TTAGGG) ₃ -3'	57.1	53.5
	5'-AG G (TTAGGG) ₃ -3'	38.5	37.7

n.d. = not detected

* = negative cotton effect at 260 nm

さらに RNA のみならず、DNA の四重鎖構造上でどのような影響を及ぼすのかについても検討した。配列と T_m 値は表1にまとめた。結果はいずれの修飾位置においても熱安定性は低下した。しかしながら注目すべき点は、形成される四重鎖構造のトポロジーについてである。カリウム存在下での結果は、図5a に示すように天然の CD スペクトルと比較して修飾核酸ではそのスペクトルに違いがある。265 nm 付近に負のコットン効果、また 245 nm 付近に正のコットン効果を示している。これは図5の模式図にあるようなハイブリッド型の四重鎖構造からアンチパラレル型の四重鎖構造に構造変化を誘起していることが示された。このように 8,2'-環状グアノシン修飾を導入することで DNA の四重鎖構造のトポロジーを変化させることを見出した。

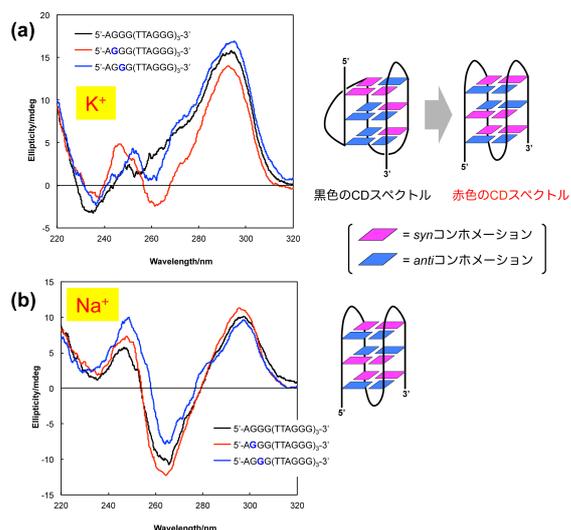


図5. カリウムイオン(a)およびナトリウムイオン(b)存在下における 8,2'-環状グアノシン修飾 DNA により形成される四重鎖構造の CD スペクトル

(2) 5',8-環状グアノシンを含む修飾核酸について

8,2'-環状グアノシンの結果から、グアノシンの O1'-H1'-N9-C8 でなすねじれ角()に着目した。過去の知見から 8,2'-環状グアノシンのねじれ角は 120°であり、5',8-環状グアノシンのねじれ角は 30°であることが X 線結晶構造解析から見積もられている。一方、核酸の高次構造を支配する要因のひとつであるグアノシンのグリコシド結合まわりのコンホメーションである *anti* 型のは 10~80°、また *syn* 型のは 170~260°であることが知られている。またパラレル型の四重鎖構造中のグアノシンのコンホメーションはすべて *anti* である。従って、30°のねじれ角を有する 5',8-環状グアノシンを四重鎖構造の *anti* コンホメーションを有するグアノシンの位置に導入することで四重鎖構造の安定性を向上させることができると考えられる。これはテロメア RNA の生体内機能を模索する上で有用な手法となり得る。

出発原料を 2-デオキシグアノシンとし、既報の合成法を参考にして光環化反応を介して 5',8-環状グアノシンのホスホロアミダイト体を合成した(図6)。その後、(1)と同様に所定の位置に修飾を施した目的生成物を合成・精製した後、同定した。

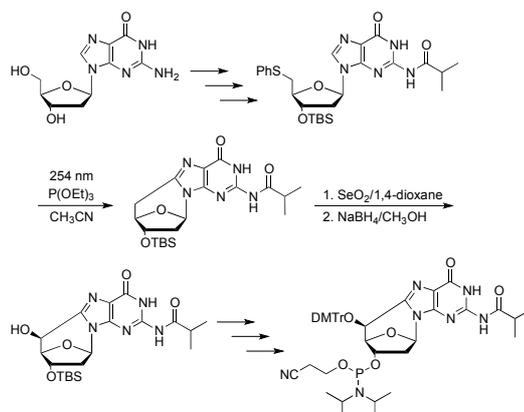


図6. 5',8-環状グアノシンのホスホロアミダイト体の合成スキーム

表2. 本研究で使用した 5',8-環状グアノシン修飾核酸の配列と T_m 値

	Sequence	T_m (°C)	
		Na ⁺	K ⁺
RNA	5'-UAGGGU-3'	75.0	> 90
	5'-UA G GGU-3'	n.d.	n.d.

DNA	5'-TGGGGT-3'	63.9	> 90
	5'-T G GGGT-3'	39.1	79.5
	5'-AGGG(TTAGGG) ₃ -3'	56.2	66.8
	5'-AG G (TTAGGG) ₃ -3'	48.0	54.2

n.d. = not detected

検討の結果、当初の予想に反してこの修飾 RNA で形成された四重鎖構造の熱安定性は天然のものとは比べて低かった (表 2)。さらに、カリウムイオン存在下では、この修飾 DNA で形成された四重鎖構造は 8,2'-環状グアノシン修飾 DNA と同様にトポロジーを変化させることが明らかとなった。

(3) 2',5'-結合型 RNA について

次に RNA のホスホジエステル結合が 2',5' の結合となっている RNA の四重鎖構造について検討した。配列と T_m 値は表 3 にまとめた。修飾位置は 5' 末端のウリジンもしくは RNA 鎖中のグアノシンとした。結果は 5' 末端修飾の場合は、天然と比較すると、その熱安定性は全く同じ値であった。一方で鎖中のグアノシンを修飾した RNA では、四重鎖構造の形成を確認できなかった。

表 3. 本研究で使用した 2',5'-結合型 RNA の配列と T_m 値

	Sequence	T_m (°C)	
		Na ⁺	K ⁺
RNA	5'-UAGGGU-3'	75.0	> 90
	5'- U AGGGU-3'	75.0	> 90
	5'-UAG G GU-3'	n.d.	n.d.

n.d. = not detected

(4) 6 量体のテロメア RNA が 16 量体のテロメア DNA とハイブリッドのグアニン四重鎖を形成することを報告した (*Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 4419)

(5) テロメア研究において重要となる単一染色体のテロメア長さを測定する技術に関してプロトコル化した (*Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2015**, in press.)

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 2 件)

Takumi Ishizuka, Yan Xu, Makoto Komiyama
 “Clipping of Telomere from Human Chromosomes using Chemistry-based Artificial Restriction DNA Cutter”
Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. **2015**, in press. [査読有], DOI: 10.1002/0471142700.

nc0613s61

Yan Xu, Yuta Suzuki, Takumi Ishizuka, Chao-Da Xiao, Xiao Liu, Tetsuya Hayashi, Makoto Komiyama

“Finding a Human Telomere DNA-RNA Hybrid G-Quadruplex Formed by Human Telomeric 6-mer RNA and 16-mer DNA using Click Chemistry: A Protective Structure for Telomere End”

Bioorg. Med. Chem. **2014**, 22, 4419–4421.

[査読有], DOI: 10.1016/j.bmc.2014.05.053.

[学会発表] (計 5 件)

Takumi Ishizuka, Yan Xu

“Effects of 8,2'-O-Cycloguanosine on G-Quadruplex Structure”

The 41th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Kitakyushu, Fukuoka, Japan (Nov. 5, 2014, Poster Presentation)

Takumi Ishizuka, Yan Xu

“Chromosome Painting by Using Click Chemistry: A Light-Up Approach”

The 40th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Yokohama, Kanagawa, Japan (Nov. 13, 2013, Poster Presentation)

石塚 匠, 徐 岩

シクログアノシンの四重鎖構造での影響
 日本化学会第 95 春季年会, 3J6-05, 日本大学 (2015 年 3 月 28 日, 口頭発表)

石塚 匠, 徐 岩

¹⁹F-NMR による DNA 四重鎖の構造変化の観測

第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 2P-064, 岡山大学 (2014 年 9 月 12 日, ポスター発表)

石塚 匠, 徐 岩

DNA 四重鎖構造を解析する機能性プローブの開発

日本化学会第 94 春季年会, 2G1-17, 名古屋大学 (2014 年 3 月 28 日, 口頭発表)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<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・特任助教

研究者番号：50700085

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし