

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26288083

研究課題名(和文) テロメアRNA四重鎖構造分子基盤の解明を目指したケミカルバイオロジー

研究課題名(英文) Chemical biology for elucidation of molecular basis of telomeric RNA  
G-quadruplex structure

研究代表者

徐 岩 (XU, YAN)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40506763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：19F NMRを用いて、生細胞内のヒトテロメアRNA構造の解明や、タンパク質およびリガント分子とどのような様式で相互作用するのかを明らかにした(Nucleic Acids Res. 45, 5501, 2017; Nature Protocols 13, 652, 2018)。また、いままで存在しないと考えられていた逆平行型のRNA四重鎖構造を世界に先駆けて発見した。さらに四重鎖構造を検出するための多機能グアニン誘導体を開発することに成功した。またクリック反応という新しい化学反応を利用することにより、細胞内のDNA-RNA hybrid四重鎖構造の解析やテロメアDNAの検出にも成功した。

研究成果の概要(英文)：(1) In 19F NMR analysis of the structure of human telomeric RNA in living cells and in what manner interacts with proteins and ligand molecules (Nucleic Acids Res. 45, 5501, 2017; Nature Protocols 13, 652, 2018.) (ChemistrySelect, 2, 4170, 2017; JACS. 139, 7533, 2017; Molecules 23, 237, 2018). (2) We have discovered the antiparallel RNA quadruplex structure which was thought not to exist until now (Sci. Rep. 7, 6695, 2017; Chem. Commun. 54, 3944, 2018.). (3) We succeeded in developing multifunctional guanine derivatives for detecting G-quadruplex structure (Analyst 142, 4083, 2017; ACS Omega 2, 8843, 2017). (4) We succeeded in analyzing DNA-RNA hybrid quadruplex structure in the cell and detection of telomere DNA by utilizing the click reaction (Bioorg. Med. Chem. 135, 44191, 2014; J. Nat Sci. 2: e 237, 2016; Sci. Rep. 6, 33217, 2016.).

研究分野：生体関連化学

キーワード：テロメアRNA高次構造 ケミカルバイオロジー 生体分子 核酸 有機化学

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトテロメアは、染色体末端に存在する単純な GGGTTA 繰り返し配列であり、生体内で多様な役割を担っている。特に、テロメアは細胞分裂(老化)・細胞死(がん化)など細胞の生死を左右する“細胞内時計”として注目されている(テロメアについての研究は2009年のノーベル生理学・医学賞を受賞)。一方、ヒトテロメア DNA が転写されることはないと考えられてきた。ところが最近になり、このテロメア DNA が RNA に転写されているという意外な事実が明らかになった。この発見によって、テロメア RNA が細胞内において重要な役割を果たすことが示唆された。しかしテロメア RNA の構造と機能は全く解明されていない。この RNA はテロメアの新しい構成要素であると考えられている。よって、ヒトテロメア RNA の構造を明らかにすることは、テロメア機能やテロメアに関係する疾患の理解に必要不可欠だと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)ヒトテロメア RNA 分子機構の解明に利用できるケミカルバイオロジーツールの創製を目指して、(2)細胞内において化学的手法を駆使したテロメア RNA 高次構造を任意のタイミングでモニタリングするとともに、(3)テロメア RNA とテロメア DNA の関連性を捉えることにより新たに発見されたテロメア RNA の分子構造・機構を解明する。(4)さらにテロメア RNA に関与する未知のタンパク質を発見する。(5)それらの知見に基づいて、ヒトテロメア RNA 高次構造が染色体構造の安定化や細胞生死の制御にどのように寄与しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究は、有機合成によるテロメア RNA 分子機構の解明に利用できるケミカルバイオロジーツールの創製、およびそれを駆使して細胞内のテロメア RNA 四重鎖構造位置の同定が第一段階である。そしてこれを基盤にした第二段階として、そこで得られた情報を、細胞内においてテロメア RNA とテロメア DNA 関連性の解明、またヒトテロメア RNA 四重鎖構造に結合するタンパク質の探索に展開していく。最終的にこれらの知見に基づいてテロメア RNA 高次構造による染色体の安定化や細胞生死に対する制御機構の解明に取り組んでいく。

### 4. 研究成果

<sup>19</sup>F NMR を用いて、生細胞内のヒトテロメア RNA 構造の解明や (*Nucleic Acids Res.* 45, 5501, 2017; *Nature Protocols* 13, 652, 2018.)、タンパク質およびリガント分子とどのような様式で相互作用するのかを明らかにした (*ChemistrySelect*, 2, 4170, 2017; *JACS*, 139, 7533, 2017; *Molecules* 23, 237, 2018.)。また、

いままで存在しないと考えられていた逆平行型の RNA 四重鎖構造を世界に先駆けて発見した (*Sci. Rep.* 7, 6695, 2017; *Chem. Commun.* 54, 3944, 2018.)。さらに四重鎖構造を検出するための多機能グアニン誘導体を開発することに成功した (*Analyst* 142, 4083, 2017; *ACS Omega* 2, 8843, 2017)。またクリック反応という新しい化学反応を利用することにより、細胞内の DNA-RNA hybrid 四重鎖構造の解析やテロメア DNA の検出にも成功した (*Bioorg. Med. Chem.* 135, 44191, 2014; *J. Nat. Sci.* 2:e237, 2016; *Sci. Rep.* 6, 33217, 2016.)。

### 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16件)

Xiao, C. D., Shibata, T., Yamamoto, Y., Xu, Y. “An intramolecular antiparallel G-quadruplex formed by human telomere RNA” *Chem. Commun.* 54, 3944-3946, 2018.(雑誌の裏表紙に採用) 査読有り  
DOI: 10.1039/C8CC01427B

Liu, X., Xu, Y. “HnRNPA1 specifically recognizes the base of nucleotide at the loop of RNA G-quadruplex” *Molecules*, 23, 237, 2018. 査読有り  
DOI: 10.3390/molecules23010237

Bao, H. L., Xu, Y. “Investigating higher-order RNA G-quadruplex structures in vitro and in living cells by <sup>19</sup>F NMR spectroscopy” *Nature Protocols*, 13, 652-665, 2018. 査読有り  
DOI: 10.1038/nprot.2017.156

Ishizuka, T., Yamashita, A., Asada, Y., Xu, Y. “Studying DNA G-quadruplex aptamer by <sup>19</sup>F NMR” *ACS Omega*, 2, 8843-8848, 2017. 査読有り  
DOI: 10.1021/acsomega.7b01405

Ishizuka, T., Zhao, P. Y., Bao, H. L., Xu, Y. “A Multi-functional Guanine Derivative for Studying DNA G-quadruplex Structure” *Analyst*, 142, 4083-4088, 2017.(雑誌の裏表紙に採用) 査読有り  
DOI: 10.1039/C7AN00941K

Xiao, C. D., Ishizuka, T., Zhu, X. Q., Li, Y., Sugiyama, H., Xu, Y. “Antiparallel RNA G-quadruplex Formed by Human Telomere RNA Containing 8-Bromoguanosine”

Scientific Reports, 7, 6695, 2017. 査読有り

DOI: 10.1038/s41598-017-07050-w

Liu, X., Ishizuka, T., Bao, H. L., Wada, K., Takeda, Y., Iida, K., Nagasawa, K., Yang, D., Xu, Y.

“Structure-dependent Binding of hnRNP1 to Telomere RNA” J. Am. Chem. Soc., 139, 7533-7539, 2017. 査読有り  
DOI: 10.1021/jacs.7b01599

Bao, H. L., Ishizuka, T., Iwanami, A., Oyoshi, T., Xu, Y. “A Simple and Sensitive <sup>19</sup>F NMR Approach for Studying the Interaction of RNA G-Quadruplex with Ligand Molecule and Protein” ChemistrySelect, 2, 4170-4175, 2017.

(雑誌の表紙に採用) 査読有り  
DOI: 10.1002/slct.201700711

Xiao, C. D., Ishizuka, T., Zhu, X. Q., Li, Y., Sugiyama, H., Xu, Y. “Unusual Topological RNA Architecture with an Eight-Stranded Helical Fragment Containing A-, G-, and U-Tetrads” J. Am. Chem. Soc., 139, 2565-2568, 2017. 査読有り

DOI: 10.1021/jacs.6b12274

Bao, H. L., Ishizuka, T., Sakamoto, T., Fujimoto, K., Uechi, T., Kenmochi, N., Xu, Y. “Characterization of Human Telomere RNA G-Quadruplex Structures in vitro and in Living Cells using <sup>19</sup>F NMR Spectroscopy” Nucleic Acids Research, 45, 5501-5511, 2017. 査読有り

DOI: 10.1093/nar/gkx109

Xu, Y. “Human Telomere RNA Structure and Function” Telomere and Telomerase, 3, e1455, 2016. 査読有り

DOI: 10.14800/tt.1455

Ishizuka, T., Xu, Y. “Click Chemistry Takes a Snapshot of DNA-RNA Hybrid G-Quadruplex in Living Cells” Journal of Nature and Science, 2, e237, 2016. 査読有り

<http://www.jnsoci.org/files/html/2016/e237.htm>

Ishizuka, T., Liu, H. S., Ito, K., Xu, Y. “Fluorescence Imaging of Chromosomal DNA using Click Chemistry” Scientific Reports, 6:33217, 2016. 査読有り  
DOI: 10.1038/srep33217

Zhang, W., Chen, M., Wu, Y. Ling., Tanaka, Y., Xu, Y. “Formation and stabilization of the telomeric antiparallel G-quadruplex and inhibition of telomerase by novel benzothioxanthene derivatives with anti-tumor activity” Scientific Reports, 5:13693, 2015. 査読有り  
DOI: 10.1038/srep13693

Ishizuka, T., Xu, Y., Komiyama, M. “Clipping of Telomere from Human Chromosomes using Chemistry-based Artificial Restriction DNA Cutter” Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem., Unit6.13, 1-13, 2015. 査読有り  
DOI: 10.1002/0471142700.nc0613s61

Xu, Y., Suzuki, Y., Ishizuka, T., Xiao, C. D., Liu, X., Hayashi, T., Komiyama, M. “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., 22, 4419-4421, 2014. 査読有り  
DOI: 10.1016/j.bmc.2014.05.053

[学会発表](計25件)

1. ISHIZUKA, Takumi; XU, Yan, Chemical probing of G-quadruplex structures by modified nucleosides, 日本化学会第98春季年会(2018)、2018年
2. 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(2018)、2018年
3. 石塚 匠、大立目 真臣、徐 岩, 四重鎖構造を解析するケミカルプローブの開発、第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年
4. 徐 岩、石塚 匠、肖 潮達、劉 曉、鮑 宏亮、ヒトテロメア RNA の構造及び生化学機能、第19回日本 RNA 学会年会、2017年
5. Yan Xu, Takumi Ishizuka, Balasubramaniyam Thananjeyan, Development of New Chemical Modification Method for Analysis of Unique G-Quadruplex Structures, 日本化学会第97春季年会(2017) 2017年

6. Yan Xu, Takumi Ishizuka, Bao Hongliang, Liu Xiao, Balasubramaniyam Thananjeyan, Xiao Chaoda, Conformationally Restricted Guanosine Analogues Induce Topological Change in Human Telomeric DNA G-Quadruplexes, The 43th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2016 年
7. 徐 岩, 石塚 匠, 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, 2016 年
8. 徐 岩, 石塚 匠, 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, 2016 年
9. 石塚 匠, 劉 曉, 竹田 悠馬, 徐 岩, ヒトテロメア RNA 四重鎖と hnRNPA1 の相互作用解析, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年
10. Takumi Ishizuka, Yan Xu, A Fluorine-labeled method for the investigation of G-quadruplex structure, The 42th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2015 年
11. Chao-da Xiao, Takumi Ishizuka, Yan Xu, Elucidation of human telomeric RNA G-quadruplex by chemical approach, The 42th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2015 年
12. Hong-Liang Bao, Takumi Ishizuka, Yan Xu, Characterization of human telomere RNA and RNA/DNA hybrid G-quadruplex structures in vitro and in living cells using <sup>19</sup>F NMR spectroscopy, The 42th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2015 年
13. Xiao Liu, Takumi Ishizuka, Kei Wada, Yan Xu, Specific binding of hnRNPA1 to human telomere RNA G-quadruplexes: a structure-dependent manner is required for telomere RNA and hnRNPA1 regulated telomere function, The 42th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2015 年
14. 徐 岩, 石塚 匠, 肖 潮達, 劉 曉, 夏 岩, 鮑 宏亮, 劉 泓汕, Thananjeyan Balasubramaniyam, 化学的アプローチを活用したケミカルバイオロジー, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015 年
15. 石塚 匠, 徐 岩, 化学修飾核酸による四重鎖構造の解明, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015 年
16. 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, 2015 年
17. LIU, Hongshan; ISHIZUKA, Takumi; XU, Yan, Multiple chemical approaches control cell adhesion, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年
18. LIU, Xiao; ISHIZUKA, Takumi; XIAO, Chaoda; IIDA, Keisuke; NAGASAWA, Kazuo; XU, Yan, Macrocyclic Polyoxazoles as telomere RNA and DNA G-Quadruplexbinding Ligands, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年
19. BAO, Hongliang; ISHIZUKA, Takumi; XU, Yan, <sup>19</sup>F NMR for probing human telomere RNA G-quadruplex structure, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年
20. Takumi Ishizuka, XU, Yan, Effects of 8,2'-O-cycloguanosine on G-quadruplex structure, The 41st International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2014 年
21. BAO, Hongliang; ISHIZUKA, Takumi; XU, Yan, To probe human telomere RNA G-quadruplex structure by <sup>19</sup>F NMR, The 41st International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2014 年
22. LIU, Xiao; ISHIZUKA, Takumi; XIAO, Chaoda; IIDA, Keisuke; NAGASAWA, Kazuo; XU, Yan, Recognition of telomere RNA G-quadruplex by small molecule, The 41st International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2014 年
23. LIU, Hongshan; ISHIZUKA, Takumi; XU, Yan, Cell-cell connection by multiple chemical approaches, The 41st International Symposium on Nucleic

Acid Chemistry, 2014 年

24. 徐 岩、石塚 匠、肖 潮達、劉 晔、  
夏 岩、鮑 宏亮、劉 泓汕、ヒトテロ  
メア RNA の構造および生化学機能、第 8  
回バイオ関連化学シンポジウム、2014  
年
25. 石塚 匠、徐 岩、<sup>19</sup>F-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、2014 年

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：細胞標識剤及び細胞標識キット  
発明者：徐岩、石塚匠、趙珮妍  
権利者：国立大学法人宮崎大学  
種類：特許権  
番号：特願 2018-018172  
出願年月日：2018 年 2 月 5 日  
国内外の別：国際特許

〔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

徐 岩 (XU, Yan)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号：40506763