

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560444

研究課題名(和文) シトシン豊富な領域で形成されるアイモチーフ高次構造を安定化するリガンドの創製

研究課題名(英文) Development of small molecules that stabilize i-motif DNA structures composed in the C-rich regions.

研究代表者

長澤 和夫 (Nagasawa, Kazuo)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10247223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：i-motifは、シトシンが豊富に存在するDNA配列で形成される特殊な高次構造である。これまでにi-motif構造を選択的かつ強力に安定化する低分子化合物が存在せず、その機能はほとんど未解明である。本研究では、i-motifの機能解明を指向し、i-motifを選択的に安定化するリガンドの創製について検討を行った。我々のこれまでの化合物合成ライブラリーおよびイン・シリコドッキング実験により候補化合物を数十種類得た。これらについてFRET融解実験、CDスペクトル解析実験により、i-motifと選択的にかつ強力に相互作用する化合物を見いだすことができた。

研究成果の概要(英文)：i-Motif is one of a non-B DNA structure, which is believed to construct in the C-rich regions in DNA. Since the no i-motif stabilizing compounds have been reported, no information about the function of i-motif has been obtained. In this research we aimed to develop i-motif selective interacting molecules, i.e., i-motif ligands.

Among our synthetic libraries together with the compounds suggested by the in silico docking studies, we started ca. forty compounds as candidates for i-motif ligands. With the evaluations by FRET melting analysis, CD spectra analysis, and EMAS experiments, we found the compound which selectively stabilize i-motifs derived from telomere, c-kit, c-myc and bcl-2, respectively. Stabilizing ability of the ligand is high, and delta Tm value was obtained at 20 °C.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アイモチーフ DNA高次構造 リガンド シトシン インシリコ グアニン四重鎖

1. 研究開始当初の背景

DNAには、よく知られている2重らせん構造の他に、様々な高次構造を形成する。その中の1つにアイモチーフ(以下 i-motif)構造がある。転写調節を担う遺伝子のプロモータには、GCボックスとよばれるグアニンとシトシンが豊富な領域が多数存在する。これらの領域では、DNAの二本鎖が部分的に一本鎖にほどけると、特殊な高次構造、即ちグアニン豊富な配列ではグアニン四重鎖(以下 G4)構造が、その相補鎖であるシトシン豊富な配列では i-motif 構造が、可逆的に形成される(図1)。最近、G4構造が、転写や複製等の制御に大きく関係していることが報告されている。一方 i-motif は最近、いくつかのがん遺伝子のプロモータ領域で、G4と相補的に形成されることが示唆されている。さらにG4と同様、i-motifも転写過程において重要な役割を果たすと考えられている。しかし実際にはその機能は全く解明されていない。これは、i-motif構造を安定化する低分子化合物

(i-motif リガンド)が存在しないことに起因する。そこで現在、i-motif機能解明のための i-motif リガンドの創製が強く望まれている。

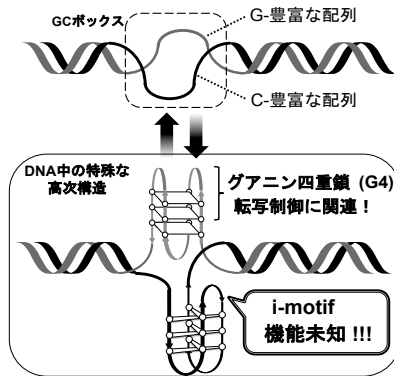


図1 i-motifとG4構造

2. 研究の目的

本研究では、i-motifと選択的に相互作用する低分子化合物(i-motifリガンド)を創製することを目的とした。

私達はこれまで、天然物テロメスタチンを起点としたG4リガンドの創製研究を展開してきている。一方 i-motif は、G4と構造上の類似点を持つ。そこでこれまでのG4リガンド創製研究での構造展開から得られた成果を基盤として、i-motifリガンドの創製を検討することとした。

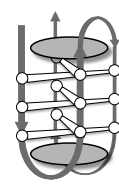
3. 研究の方法

i-motifリガンドはこれまでに報告されていない。従って i-motifリガンドを創製するには、まず i-motifリガンドのリード構造を取得する必要がある。そこでG4の創製成果を基盤に、以下のアプローチを検討することとした。

i-motifとG4は、それぞれシトシンとグアニンが形成する平面が垂直方向に積み重なることで形成される。全体的な形は共によく似ているが、その平面の大きさは、i-motifの方が約60%小さい。

そこで i-motif に特徴的なシトシン-シトシン塩基対(以下、C-C塩基対)平面とπ-πスタッキング可能な分子の設計を行うことを計画した。この際分子設計は、分子の平面性と、C-C塩基対平面と同程度の大きさをもつ分子構造、豊富なπ電子を有する構造、高い平面生構造、の

シトシンが形成する平面とπ-π相互作用できる分子設計



end-stacking

図2 i-motifリガンド創製の戦略

3点に着目して、構造探索を検討することとした(図2)。なお合成した化合物は、①FRET融解実験(i-motif形成配列との相互作用解析)、②CDスペクトル測定(i-motifへの構造誘起を解析)、③EMSA(電気泳動実験:i-motif衛生配列との相互作用解析)を用いて、i-motifリード化合物の探索を計画した。

4. 研究成果

i-motifリード化合物の探索にあたり、これまで私達の研究室で合成を行ってきた化合物ライブラリーの中から、C-C塩基対平面と同程度の大きさをもつ分子構造をもつ化合物を数十種類選抜した。また i-motif との docking シミュレーションを用いた in silico 法から数十種類の候補化合物を選抜した。選抜した化合物に対し、上述した①~③の評価を行い i-motif 形成配列との相互作用について解析を行った。その結果、3種類の化合物が i-motif 構造と顕著に相互作用することが明らかとなった。以下に、取得された化合物の解析結果を示す。

①FRET融解実験

FRET融解実験では、リガンドとDNA配列を混合し昇温させる。この際、より高い相互作用を示す場合には、より大きなΔT<sub>m</sub>値が得られる。Table 1には、リガンドとテロメア、bcl-2、c-kit、c-myc由来の各G4およびi-motifに対するΔT<sub>m</sub>値をまとめた。

Table 1 FRET 融解実験

	G4配列におけるΔT <sub>m</sub> 値(°C)	i-motif配列におけるΔT <sub>m</sub> 値(°C)
telo24	5.1	22.5
bcl-2	2.4	13.8
c-kit	7.6	24.7
c-myc	2.3	21.5

FRET融解実験より、i-motif配列を用いた場合に、いずれも高いΔT<sub>m</sub>値が得られたことから、見いだしたリガンドは、i-motif配列と選択的に相互作用することが明らかとなった。

②CDスペクトル解析

ついで得られたリガンドの i-motif 構造誘起に関する検討を CD スペクトルを用いて検討した(図3)。

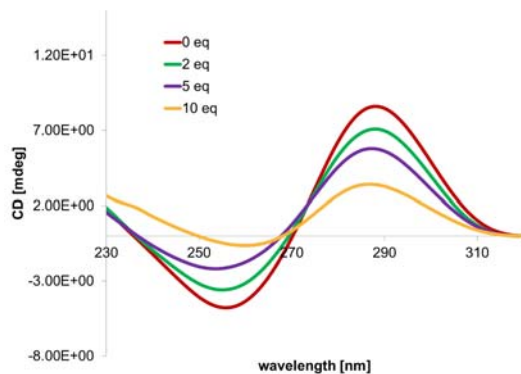


図3 リガンドによる i-motif 配列の CD スペクトル変化

取得した i-motif リード化合物の濃度を 0-5 等量に変化させ CD スペクトルを測定したところ、当該リガンドはオリジナルの i-motif 構造を濃度依存的に他の構造に変化させていることが明らかとなった。どのような構造に変化させているかは現在のところまだ説明できていない。今後の研究課題である。

### ③EMSA による解析

EMSA (電気泳動) によるリガンドとテロメア由来の i-motif 形成配列との相互作用について解析を行った。その結果、以下の泳動バンドを得た (図4)。

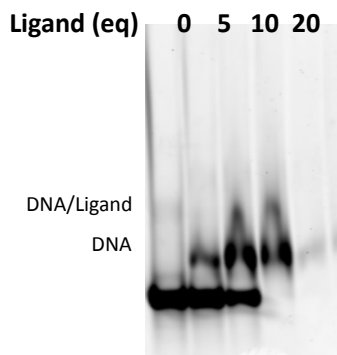


図4 テロメア由来の i-motif 配列とリガンドとの電気泳動結果

図4より、リガンドは濃度依存的に i-motif 形成配列と相互作用していることが明らかとなった。

### まとめと今後の展望

本研究では、i-motif 構造と相互作用する低分子化合物の創製を目的として研究を行った。その結果、i-motif 配列と選択的に相互作用するリガンドの取得に成功した。

今後当該化合物の相互作用様式、当該リガンドをリードにより強力なリガンドの取得およびこれを用いた i-motif 構造の機能解析を検討していく。

## 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)

①Takahiro Nakamura, Yue Ma, Keisuke Iida, Terumi Ohtake, Hiroyuki Seimiya, Kazuo Nagasawa, “Design, Synthesis and Evaluation of an L-Dopa-Derived Macrocyclic Hexaoxazole (60TD) as a G-Quadruplex-Selective Ligand”, *Heterocycles*, **2015**, *92*, 305-315, DOI:10.3987/COM-15-13383. (査読あり)

②Shadi Sedghi Masoud, Tsushima Yamato, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, “Synthesis of Macrocyclic Penta- and Tetraoxazoles as G-Quadruplex Ligands”, *Heterocycles*, **2014**, *90*, 866-873, DOI:10.3987/COM-14-S(K)90. (査読あり)

[学会発表] (計 20 件)

①佐々木捷悟、佐久間麻衣、馬 悦、長澤和夫、「三置換型大環状ヘキサオキサゾール類の合成とグアニン四重鎖構造に対する安定化能の評価」、日本化学会第 96 回春季年会、2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学(京都府、京田辺市)。

②Motoki Shiozawa, Ma Yue, Iida Keisuke, Koji Yasui, Kazuo Nagasawa, “Synthesis of cristatin A derivatives and evaluation of its G-quadruplexes stabilisation ability”, 日本化学会第 96 回春季年会、2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学(京都府、京田辺市)。

③中村貴大、岡部幸子、吉田喜香、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、中野伊知郎、長澤和夫、清宮啓之、“A preferential growth inhibitory activity of a G-quadruplex ligand against glioma stem cells”, The 13th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Aging Research, 2016. February 25-27, Ramada Plaza Hotel Jeju(Jeju, South Korea).

④中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、中野伊知郎、長澤和夫、清宮啓之、“Glioma stem cell-selective antitumor effect of a novel G-quadruplex ligand”, International Symposium on Cancer Chemotherapy, 2015 年 12 月 9-10 日、日本科学未来館(東京都、江東区)。

⑤中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、長澤和夫、清宮啓之、「神経膠腫幹細胞に対するテロメスタチン誘導体の増殖抑制メカニズム」、第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 8-10 日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)。

⑥中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、清宮啓之、長澤和夫、「グアニン四重鎖リガンドが有する神経膠腫幹細胞に対する増殖抑制メカニズム」、平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ、2015 年 9 月 2-5 日、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県、茅野市)。

⑦Mai Sakuma, Yamato Tsushima, Tomomi Yokoyama, Keisuke Iida, Kazunori

Ikebukuro, Kazauo Nagasawa, “Isolation of G-quadruplex forming DNA sequences by the use of macrocyclic polyoxazoles type ligand”, The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2015, 2015年9月23-25日、Egret Himeji(兵庫県、姫路市)。

⑧中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、長澤和夫、清宮啓之、「テロメスタチン誘導体による神経膠腫幹細胞の増殖抑制メカニズム」、第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015年6月10-12日、松山全日空ホテル(愛媛県、松山市)。

⑨佐久間麻衣、對馬大和、横山智美、飯田圭介、池袋一典、長澤和夫、「テロメスタチン誘導体を用いたグアニン四重鎖形成配列の単離法開発」、日本ケミカルバイオロジー学会 第10回年会、2015年6月10-12日、東北大学(宮城県、仙台市)。

⑩Yamato Tsushima, Shadi Sedghi Masoud, Mai Sakuma, Tomomi Yokoyama, Kazunori Ikebukuro, Keisuke Iida, Kazauo Nagasawa, “Isolation of G-quadruplex by pull-down strategy using telomestatin derivatives”, 5th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thring in Bordeaux, 2015. May 26-28, The University of Bordeaux(Bordeaux, France).

⑪Yue Ma, Keisuke Iida, Kazauo Nagasawa, “Synthesis of G-quadruplex ligands by dual interaction strategy and evaluation of their stabilization ability”, 5th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thring in Bordeaux, 2015. May 26-28, The University of Bordeaux(Bordeaux, France).

⑫佐久間麻衣、對馬大和、馬悦、飯田圭介、長澤和夫、「非対称型大環状ヘキサオキサゾール化合物の合成とグアニン四重鎖の安定化野能及びトポロジー誘起能の評価」、日本化学会第95回春季年会、2015年3月26-29日、日本大学(千葉県、船橋市)。

⑬馬悦、飯田圭介、長澤和夫、「二点認識によるグアニン四重鎖の安定化を志向したリガンドの合成と機能評価」、日本化学会第95回春季年会、2015年3月26-29日、日本大学(千葉県、船橋市)。

⑭中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、長澤和夫、清宮啓之、「テロメスタチン誘導体が有するグリオーマ幹細胞選択的な制がん効果」、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25-27日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)。

⑮中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、長澤和夫、清宮啓之、「神経膠腫幹細胞を標的とする新規グアニン四重鎖リガンドの創製」、平成26年度がん若手研究者ワークショップ、2014年9月3-6日、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県、茅野市)。

⑯馬悦、對馬大和、飯田圭介、長澤和夫、「低分子化合物を用いたテロメアグアニン四重

鎖に対するトポロジー制御」、日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会、2014年6月11-13日、大阪大学(大阪府、豊中市)。

⑰對馬大和、飯田圭介、中村貴大、長澤和夫、「Isolation of G-quadruplexes by pull-down strategy using a telomestatin derivative」, The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research、2014年6月19-21日、埼玉県立がんセンター(埼玉県、北足立郡伊那町)。

⑱中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、中野伊知郎、長澤和夫、清宮啓之、「A telomestatin derivave that attacks glioma stem cells」, The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research、2014年6月19-21日、埼玉県立がんセンター(埼玉県、北足立郡伊那町)。

⑲中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、長澤和夫、清宮啓之、「テロメスタチン誘導体の神経膠腫幹細胞選択的な抗腫瘍効果」、第18回日本がん分子標的治療学会学術集会、2014年6月25-27日、TKPガーデンシティ仙台(宮城県、仙台市)。

⑳中村貴大、岡部幸子、飯田圭介、矢守隆夫、新家一男、中野伊知郎、長澤和夫、清宮啓之、「神経膠腫幹細胞に対するテロメスタチン誘導体の選択的な抗腫瘍効果」、化学療法基盤支援活動第3回シンポジウム、2014年5月12日、万国津梁館(沖縄県、名護市)。

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~nagasawa/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長澤 和夫 (NAGASAWA, Kazuo)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10247223

### (3) 連携研究者

広川 貴次 (HIROKAWA, Takatsugu)

独立行政法人産業技術総合研究所・創薬分

子プロファイリング研究センター・研究員

研究者番号：20357867