



クリックケミストリーにより細胞内 G4 の可視化を行なった(成果①)。その結果、生細胞内において OTD は、細胞質に局在する RNA 配列で形成される G4 と相互作用した可能性が示唆された。一方、この研究の過程で用いた蛍光プローブはバックグラウンド蛍光の課題があったことから、並行して turn-on 型、すなわち G4 を認識した時のみ蛍光を発する蛍光 OTD の開発も行なった(成果②)。その結果、明確なトポロジー選択性は確認できなかったが、G4 構造選択的な turn-on 型 OTD を取得することができた。また研究テーマ B では、トポロジーを変化させる OTD に対して、そのトポロジー変化能を維持したまま蛍光プローブと反応させるためのアジド基をもつリガンドの合成を検討した。これまで環状の OTD 誘導体を中心に展開してきたが、環を開いた鎖状型の化合物(Linear Consecutive Oxazole; LCO)が OTD と同様に強力な G4 安定化能を示すことを見出した。これを構造展開したところ、LCO 誘導体がテロメア G4 をアンチパラレル型に変化させることを見出した(成果③)。

## (2) 詳細

### 【研究テーマ A: 生細胞における G4 の各トポロジー可視化およびその手法の確立】

#### <成果①> クリックケミストリーによる抗腫瘍活性を持つ OTD の標的探索とその可視化

G4 はゲノムワイドに存在しており、G4 が形成されると転写因子や RNA ポリメラーゼの結合が阻害されることで、がん関連遺伝子や疾患関連遺伝子の発現が抑制されることが知られている。すなわち、G4 を安定化することにより、がん細胞の増殖抑制や、疾患に対する治療効果を期待することができる。このことから、近年 G4 を安定化することが可能なりガンドの開発が盛んに行われており、細胞内における G4 の局在や、G4 を介した活性の作用機序を解明することが望まれている。

我々は、G4 リガンドとして OTD と呼称する化合物群を合成してきているが、中でも、カチオン性のアミノ基を側鎖にもつ L2H2-6OTD は G4 に対して強力な安定化能を示し、かつがん細胞増殖抑制活性を示すことを見出している。そこで、L2H2-6OTD が抗腫瘍活性を示す際の作用機序解明を志向し、L2H2-6OTD に対して蛍光プローブと反応させるための足がかりとなるアジド基を導入した L2H2-Az(1)を合成し、これと歪みアルキンをもつ蛍光プローブである CO-1 との Husigen 環化反応を検討した。これにより、銅触媒非存在下において G4 の局在を蛍光により検出した。

合成した 1 の G4 安定化能およびがん細胞増殖抑制活性を評価したところ、アジド基を持たない L2H2-6OTD と同様の結果を示した。これを用いてまず固定細胞においてヌクレアーゼ処理を行い、DNA または RNA をそれぞれ分解することで、1 の標的を探索した。その結果、ヌクレアーゼ未処理細胞および DNase 処理細胞では CO-1 由来の蛍光が検出されたのに対し、RNase 処理細胞では格段の蛍光強度が減弱した。このことから、1 は RNA 配列

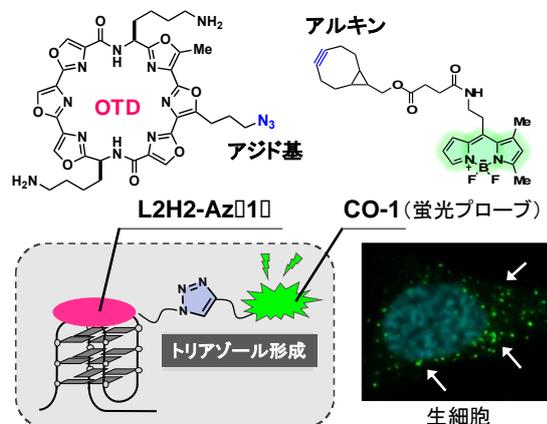


図2 生細胞内におけるG4の可視化

を標的としていることが示唆された。また、OTDと同様に G-quartet 平面と $\pi$ - $\pi$ スタッキングして G4 を安定化するリガンドの一つである Phen-DC3 を用いて、OTD との競合実験を行った。その結果、Phen-DC3 を前処理した細胞では Phen-DC3 の濃度依存的に蛍光強度が減弱した。すなわち、1 の標的は Phen-DC3 と同様に G4 であることがわかった。最後に生細胞にて G4 の可視化実験を行ったところ、1 処理細胞において細胞質にて顆粒状の蛍光が検出された(図2)。以上のことから、1 は細胞質に局在する RNA G4 を標的として、がん細胞増殖抑制活性に寄与している可能性が示唆された(研究成果リスト・論文1)。以上の結果から、生細胞内で OTD による G4 可視化の手法を確立した。

## <成果②>turn-on 型蛍光 OTD の開発

①の研究過程で、CO-1 のバックグラウンド蛍光を減弱させるために実験条件に検討を要したことから、G4 と相互作用した時のみ蛍光を発する1分子の蛍光リガンド、すなわち turn-on 型の蛍光リガンドの開発を行った。OTD は $\pi$ 電子豊富な平面構造であり、これに対して $\pi$ 共役が繋がるように、メチン結合を介して芳香族化合物を連結させることで、このリガンドが平面になった時に蛍光を発する、という作業仮説を立案した。この時、OTD は G-quartet との $\pi$ - $\pi$ 相互作用を駆動力として、OTD 骨格だけではなく共役を延ばしたビニル基やその先の芳香族化合物まで平面性が延長され、当該化合物が平面に固定されることを期待した。

この分子設計の下、実際にビニルナフタレン誘導体を、ビニル基を持つ OTD に対してオレフィンメタセシス反応により導入した OTD-VN-H(2)を合成した(図3-A)。さらに、ハメット則と呼ばれる有機分子の反応性を定量化した経験則に基づいて、ナフタレン上の電子密度を系統的に変換した4種類の誘導体も合成した。それぞれの化合物を G4 と混合したところ、ナフタレン上の電子供与性が大きくなるほど長波長側に蛍光を示すことがわかった。また、核酸配列として G4 を形成する telo24 または G4 を形成しない二本鎖配列である dsDNA の存在下において、各化合物の蛍光強度および蛍光量子収率を測定した(図3-B、)。その結果、

いずれの化合物も dsDNA 存在下では蛍光強度の変化は見られず、telo24 の濃度依存的に蛍光強度および蛍光量子収率の増大を確認することができた。また、これらの誘導体の中でもナフタレン上にジメチルアミノ基を持つ 3 は、水素結合によりその量子収率及び輝度は弱いですが、G4 存在下においてストークスシフトが

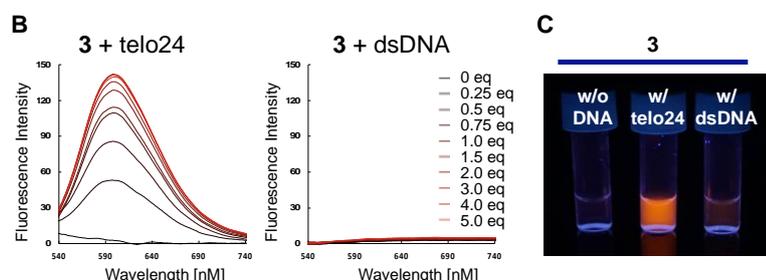
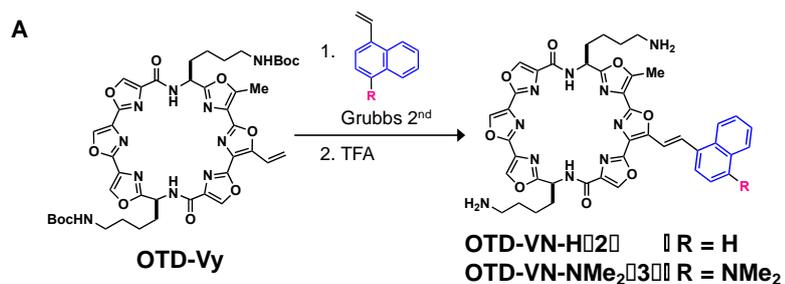


図3 A) OTD-VN誘導体の合成法、核酸存在下における B) 蛍光スペクトル、及び C) 蛍光画像

200 nm 以上ある化合物であり、イメージングに適した化合物を見出した。3 を用いて、数種類の核酸配列に対する蛍光特性を評価した。その結果、G4 形成配列に対しては、そのトポロジーの違いにより若干の差異は見られるものの、いずれの配列に対しても蛍光強度の増大が見られた。なお、telo24 に変異を加え G4 を形成させない変異配列や、G4 の相補鎖のシトシン豊富な配列で形成される核酸高次構造であるアイモチーフに対しては、いずれも蛍光強度の増加は見られなかった。最後に、当該化合物は G4 を認識して蛍光を示すため、G4 と 3 が複合体を形成し蛍光が観察される状態で、相補鎖であるシトシン豊富な配列を添加した。その結果、G4 は二本鎖を形成することで、3 は結合しなくなり、3 由来の蛍光強度の減少が確認された。このことから、3 は G4 構造を動的に検出できることが示唆された(研究成果リスト・特許1)。

### 【研究テーマ B:トポロジーの違いが影響する生物機能の解析】

#### ＜成果③＞アンチパラレル型に変化させる鎖状リガンドの開発

環状の OTD 誘導体を中心にトポロジー制御リガンドの開発を試みたが、生体条件(イオン存在下)においてアンチパラレル型に変化させるリガンドの開発には至らなかった。この構造展開の過程で、環を開いた鎖状化合物(LCO:4)が OTD と同様に G4 形成配列特異的に安定化能を持つことがわかった。そこで、当該化合物を添加した際の G4 のトポロジーを測定したところ、カリウムイオン存在下において、テロメア G4 はハイブリッド型からアンチパラレル型に強力に変化させることを見出した。また、<sup>19</sup>F ラベル化したテロメア配列の <sup>19</sup>F NMR を測定したところ、リガンド存在下において単一のピークが観察された。このことから、G4 と 4 との複合体は単一であり、そのトポロジーはアンチパラレル型であることがわかった。また、アンチパラレル型はその折りたたまれ型の違いにより、バスケット型とチェア型にさらに分類することが可能である。我々は、4 と G4 との複合体がどちらの構造を形成しているか確認するために、バスケット型の G4 を形成することが報告されているテロメア G4 の 13 番目のアデニンを 2-アミノプリンへ変換した修飾配列を用いて、リガンド存在下または非存在下における蛍光スペクトル測定を行った。2-アミノプリンは、G-quartet との相互作用により蛍光強度が変化するため、トポロジーによって異なる環境下におかれる G4 の 2 番目のループにアミノプリンを導入することで、その蛍光強度の差異から形成するトポロジーを推定できると考えられる。実際に、カリウム存在下で 4 を添加したところ、その蛍光強度はハイブリッド型よりは強く、バスケット型よりは弱い結果が

得られた。このことから、4 はハイブリッド型の G4 をアンチパラレル型、特にチェア型のトポロジーへ変化させるユニークな化合物であることが示唆された(図4)。この結果は、計算化学を用いたドッキングスタディからも支持されている(研究成果リスト・論文2)。現在、本化合物を用いてトポロジーの違いにより影響される生物機能について解析中である。

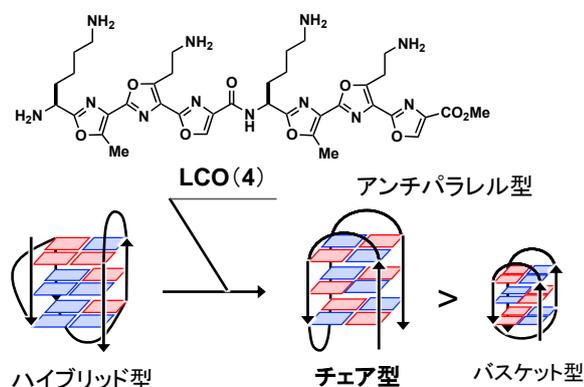


図4 鎖状リガンドLCOの構造と、トポロジー変化

### 3. 今後の展開

本 ACT-X にて確立した生細胞内における G4 可視化手法は、G4 だけではなくその他の核酸高次構造(アイモチーフや三重鎖など)に対しても適用することが可能である。近年、これらの高次構造は、転写調節を中心とする生物機能を担うことが多数報告されているため、当該手法は各高次構造に対して特異的なリガンドを用いることで、G4 と同様にこれら高次構造特異的な可視化に応用することが期待できる。一方、turn-on 型蛍光リガンドは、動的なイメージングを行う上で重宝されるリガンドである。現存の化合物をさらに構造展開することで、輝度が高く蛍光寿命の長いリガンドの創製が必要であると考えられる。

また、生命現象にはタンパク質の関与が不可欠であるが、G4 由来の生物機能も同様にそれを認識するタンパク質に由来することが考えられる。そのため、それぞれの形状が異なるトポロジーは、それに結合するタンパク質との結合親和性が互いに異なることが考えられ、発現する G4 由来の生物機能に大きな影響を与える。そのため本研究提案で開発した G4 リガンドを足掛かりとし、これに対して様々なラベル化(ビオチン、光反応基、蛍光基)を行うことで、トポロジー選択的な G4 結合タンパクの同定が可能となる。これにより、トポロジーとそれに由来する生物機能との関連がより明らかになることが期待される。

### 4. 自己評価

#### <研究目的の達成状況>

研究テーマ A では、抗腫瘍活性を持つ OTD を用いて、生細胞内において G4 を可視化することができた。しかし、トポロジーを選択的に認識するリガンドを取得することに難航し、当初計画していたトポロジー選択的な可視化には至らなかった。一方で、研究を開始してから計画した turn-on 型の蛍光 OTD は、実用性の高いものであり、それを開発したことは価値があると考えている。実際に当該化合物は特許を取得し、市販化や共同研究に関してお声がけを頂いた。現在市販化へ向けて調整中であり、また当該化合物を用いた共同研究もすでに進行している。また、turn-on 型リガンドの開発過程で得られた知見から、今後の構造展開次第でトポロジー選択性を見出す可能性が十分にあり、その創製が期待される。

研究テーマ B では、イオンの影響を受けることなく G4 のトポロジーをアンチパラレル型へ変化させるリガンドを創製することができた。G4 のトポロジーはイオンなどの周辺環境に影響を受けやすいため、イオンの条件に依存せずに特定のトポロジーへ変化させ、かつそれが単一の複合体であることは非常に重要である。また、アンチパラレル型をさらに分類した時の構造のうち一つに変化させたりガンドは当該化合物以外に例がなく、その構造をリガンドによって制御できたことは意義があると考えられる。また、当初計画していたマイクロアレイ解析を達成することはできなかったが、現在当該化合物を用いて G4 由来の生物機能についてトポロジーの違いによる機能変化を検証し、トポロジーの違いによりその機能が変化する結果を得ている。

#### <研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)>

本研究は、東京農工大学 大学院グローバルイノベーション研究院(長澤和夫教授研究室)にて実施した研究である。研究実施体制としては、研究代表者が研究の計画・とりまとめを行い、教室に所属する大学院生2名とともに実施した。また、細胞イメージング実験は、がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部の清宮啓之部長ら、<sup>19</sup>F NMR の測定は、宮崎大学医学部の



徐岩教授ら、計算化学によるドッキングスタディは、産業技術総合研究所生命工学領域の広川貴次チーム長、との共同研究成果である。

研究費は、有機合成にかかる試薬や溶媒、ガラス器具等の他、核酸との相互作用評価を行うための分光学的実験用消耗品の他、細胞実験のための分子生物学実験用消耗品の他、共同実験や学会発表のための旅費の他、英文校閲費や機器分析費用として使用した。

#### <研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果>

G4 の蛍光検出は、BG4 と呼ばれる G4 特異的な抗体による検出が一般的に用いられているが、抗体による検出では生細胞におけるイメージングを行うことができない。また、turn-on 型リガンドについては市販化の検討があり、turn-on 型リガンドを用いた G4 の検出は G4 研究分野に対する波及効果は高いと考えられる。また、G4 のトポロジーに関して注目する研究者が増えてきており、今後トポロジー選択性の高いリガンドを取得することができれば、当該研究者たちとの共同研究へ発展させることが可能である。特に、G4 はがんや難知性疾患に関わることが知られていることから、本研究で見出した化合物類を用いることで、G4 のトポロジーとこれら疾患との関連に関する新たな知見が得られることが期待される。

また、本研究提案で確立した可視化手法は、G4 以外の核酸構造(アイモチーフや三重鎖など)に対しても適用することが可能である。近年、これらの高次構造は、転写調節を中心とする生物機能を担うことが多数報告されているため、当該手法は各高次構造に対して特異的なリガンドを用いることで、G4 と同様にこれら高次構造特異的な可視化に応用することが期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:4件

1. Mizuho Yasuda, Yue Ma, Sachiko Okabe, Yuki Wakabayashi, Dongdong Su, Young-Tae Chang, Hiroyuki Seimiya, Masayuki Tera, Kazuo Nagasawa, "Target identification of a macrocyclic hexaoxazole G-quadruplex ligand using post-target-binding visualization." *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 12905-12908.

抗腫瘍活性をもつ OTD と G4 との複合体を、生細胞内において蛍光により検出した。アジド基をもつ OTD を細胞内に添加し、その後に歪みアルキンをもつ蛍光プローブを添加することで、細胞内における Huisgen 環化反応を行った。その結果、OTD は細胞内において RNA 配列で形成される G4 を標的としていることが示唆された。本成果により、生細胞内で OTD による G4 可視化の手法を確立することができた。

2. Shogo Sasaki, Yue Ma, Takumi Ishizuka, Hong-Liang Bao, Takatsugu Hirokawa, Yan Xu, Masayuki Tera, Kazuo Nagasawa, "Linear Consecutive Hexaoxazoles as G4 Ligands Inducing Chair-type Anti-parallel Topology of Telomeric G-Quadruplex." *RSC Adv.*, **2020**, *10*, 43319-43323.

鎖状のヘキサオキサゾール骨格をもつリガンド(LCO)が、イオンの影響を受けずに G4 のトポロジーの一つであるアンチパラレル型へ強力に変化させることを見出した。アミノプリン

修飾核酸を用いてイオン条件の違いによりリガンドと G4 との複合体の蛍光スペクトルを測定したところ、LCO はアンチパラレル型をさらに分類した時の2つの構造のうち、チェア型へ特異的に変化させることがわかった。
3. Yue Ma, Keisuke Iida, Kazuo Nagasawa, “Topologies of G-quadruplex: Biological functions and regulation by ligands.”, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , <b>2020</b> , 531, 3-17.
G4 のトポロジーについて、それに影響する生物活性とリガンドによる制御を中心に要約した。G4 の構造的特徴、3つのトポロジー、トポロジー同定法、構造決定されている G4 のトポロジー、G4 リガンドによるトポロジー変化、についてまとめた。

## (2)特許出願

研究期間累積件数:1 件(特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	馬 悦、長澤 和夫
	発 明 の 名 称	グアニン四重鎖結合性リガンド
	出 願 人	国立大学法人 東京農工大学
	出 願 日	2020/02/12
	出 願 番 号	特願 2020-021316
	概 要	G4 と選択的に相互作用する OTD リガンドを用いて、G4 形成配列を特異的に検出する手法を発明した。従来の蛍光リガンドと異なり、G4 と相互作用して蛍光を発する turn-on 型のリガンドの開発により、G4 存在下と非存在下の蛍光を区別することが可能となった。 ※特開 2020-176108

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### <学会発表>

1. 綿谷 成恭、若林 勇樹、寺 正行、馬 悦、長澤 和夫、“オキサゾール骨格を有するグアニン四重鎖特異的 turn-on 型リガンドの開発”、日本化学会 第 101 回春季年会(オンライン)、2021 年 3 月 19-22 日
2. 石川 遼、安田 瑞穂、馬 悦、長澤 和夫、寺 正行、“リガンド相互作用が及ぼすグアニン四重鎖の S1 ヌクレアーゼ活性への影響”、日本化学会 第 101 回春季年会(オンライン)、2021 年 3 月 19-22 日
3. 佐々木 捷悟、鮑 宏亮、石塚 匠、徐 岩、寺 正行、馬 悦、長澤 和夫、“鎖状型ポリオキサゾールリガンドの合成とテロメアグアニン四重鎖との相互作用解析”、日本化学会 第 100 回春季年会(千葉)、2020 年 3 月 22-25 日
4. 若林 勇樹、綿谷 成恭、齋藤 良太、寺 正行、馬 悦、長澤 和夫、“大環状ヘキサオキサゾール化合物の側鎖構造展開によるグアニン四重鎖に及ぼす蛍光特性の解析”、日本化学会 第 100 回春季年会(千葉)、2020 年 3 月 22-25 日

### <著作物>

1. 飯田 圭介、馬 悦、長澤 和夫、“核酸四重鎖結合分子(第 II 部 4 項)”、核酸科学ハンドブック(日本核酸化学会監修、杉本直己編)、講談社、p.380-384(2020)
--