ウェブサイト公開用

(様式10)

(海外特別研究員事業)

令和元年10月15日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018 受付番号 201860214 氏 名 河本 佑介

.

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。 なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名)<u>用務地:サンディエゴ (国名:アメリカ合衆国</u>)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

遺伝子発現制御を蛍光核酸塩基で追跡・解明する手法の開発

3. 派遣期間:平成30年7月1日 ~ 令和元年9月24日 .

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルアニ大学サンディエゴ校・Department of Chemistry and Biochemistry

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

DNA、RNA 中のグアニンが多い配列2重らせん構造とは異なり、グアニン四重鎖(GQ)と呼ば れる non-canonical な構造を取りうることが知られている。この構造は遺伝子発現の制御など生体 内で重要な役割を有し、その異常が疾患の原因になることが近年報告されている。しかしその根 本的なメカニズムは構造も含め明らかにされていないものが多い。そのため、遺伝子発現制御の メカニズムの全体を分子レベルで解き明かす研究が求められている。

一方、研究代表者の派遣先である Yitzhak Tor 研究室では蛍光ヌクレオシド "N を報告している。¹この核酸塩基は通常の塩基によく似た構造を有しするため酵素の基質になり、また2重らせん DNA を構築するワトソン・クリック塩基対および GQ を構築するフーグスティーン型塩基対を形成することが予想される。その一方で強い蛍光を発するため、酵素反応やタンパク質などの結合を、波長や異方性など蛍光特性の変化により追跡できる。

本研究で研究代表者は、GQ が遺伝子発現制御などに寄与するメカニズムを解明するため、蛍 光性グアノシン ^{LA}G を組み込んだ GQ の構築を試みた。まず研究代表者は、オリゴデオキシヌク レオチドに組み込み DNA GQ を構築する、蛍光性デオキシグアノシン d^{LA}G の合成法の開発及び その蛍光特性評価を行った。



Scheme 1. 蛍光性デオキシグアノシン類縁体 d^{tz}G、及びその phosphoramidite 化体 7、三リン酸 d^{tz}GTP の合成。

蛍光性デオキシグアノシン d^uG の合成スキームを上記 scheme 1 に示す。研究代表者は以前に 報告されている ^uG¹から合成を始めた。まず核酸塩基上のアミノ基を保護することで化合物 1 を 得て、続けてリボース上の 3'位と 5'位を保護した化合物 2 を得た。次に 2'位で *O*-Phenyl chlorothionoformate を反応させることで 3 を合成し、Barton-McCombie 脱酸素化を行うことで 2'位 にヒドロキシ基を有しない、化合物 4 の合成に成功した。続けて 3'位と 5'位の脱保護を行い、得 られた化合物 5 に対して、塩基性条件下で核酸塩基上のアミノ基の脱保護を行うことで、蛍光性 デオキシグアノシン d^uG を得ることに成功した。

同時に、研究代表者はオリゴデオキシヌクレオチドの固相合成に d^uG を組み込むため、d^uG の phosphoramidite 化体 7 の合成を行った。これは化合物 5 の 5'位のヒドロキシ基を DMTr 基で保護 した化合物 6 を、2-Cyanoethyl *N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidite と 3'位のヒドロキシ基で反応 させることで得られた。また一方で、酵素による d^uG の DNA 鎖中への導入を目指し、酵素の基 質である三リン酸 d^uGTP の合成も行った。

次に得られた蛍光性デオキシグアノシン d^{ia}G の蛍光特性評価を行った。水溶液中、及びジオキ サン中で得られた吸収、蛍光スペクトルを figure 1 に、またその蛍光特性を示すパラメータを table 1 に示す。

Solvent	λ _{abs} (ε)	λ_{em} (Φ)	Фє	Stokes	Polarity	pKa (abs)	pKa (em)
				shift	sensitivity		
water	333	455	1187	8.14±0.16	103.9±12.0	3.53±0.12	8.43±0.24
	(4.37±0.03)	(0.271±0.001)				8.61±0.14	
dioxane	341	424	584	5.76±0.08			
	(4.87±0.19)	(0.120±0.003)					

Table 1. d^{tz}G の蛍光特性。 λ_{abs} , ϵ , λ_{em} , Stokes shift の単位はそれぞれ、nm, 10^3 M⁻¹ cm⁻¹, nm, 10^3 cm⁻¹ である。



Figure 1. d^{tz}G の水溶液中(緑)、及びジオキサン中(赤)の吸収(点線)、蛍光(実線)スペクトル。

蛍光性デオキシグアノシン d[™]G の光化学的性質は、多くの点において蛍光性グアノシン [™]G¹と 一致していたが、[™]G とは異なりジオキサン溶液中のモル吸光係数が水溶液中の値より大きくな った。これは 2[•]位のヒドロキシ基と塩基部位との相互作用が関与しているからと考えられる。

続いて研究代表者は 7 を用いて GQ を形成するテロメア繰り返し配列 Telomere 10 (5'-dTTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG-3')の固相合成を行った。その後、LiCl (一本鎖 DNA 形成)、NaCl (antiparallel 型 GQ 形成)、及び KCl (hybrid 型 GQ)存在下で、Telomere 10 が "G を含まない 通常の配列²と同様の構造を取ることを CD スペクトルで確認し、Telomere 10 及び d"G の蛍光特 性を調べた(figure 2)。



Figure 2. a) 各塩存在下で **Telomere 10** が取る構造。b) **Telomere 10** 及び d^{tz}G の吸収(点線)、蛍光 (実線)スペクトル。 c) b)を拡大した物。

d[™]Gの蛍光強度は単体で存在する時と比べて、DNAの中に存在する時の方が大きく減少した。 これは隣接する核酸塩基との相互作用によって、蛍光がクエンチされたからだと考えられる。一 方、塩の種類よって d[™]G の吸収、蛍光スペクトルに大きな差は見られなかった。同様に Telomere 10 の吸収、蛍光スペクトルも塩の種類を変えて構造を変化させても大きく変わらなっ た。



Figure 3. a) d^{tz}G、b) Telomere 10 の励起スペクトル。

蛍光スペクトルと同様に d^uG の励起スペクトルは塩の種類を変えても大きく変化しなかった。 しかし Telomere 10 については GQ 形成時、特に KCl 存在下で 290 nm に新たなピークが見られる ようになり、また既に 360 nm に見られていたピークが KCl 存在下では長波長側にシフトした。 これは KCl 存在下で hybrid 型 GQ を形成している DNA 中では d^uG の電子特性が、他の条件とは 異なるものになり、またこれによって励起時に 360 nm に現れた S₀から S₁へのエネルギー遷移の みならず、S₀から S₂への遷移も起こるようになり、それが励起スペクトルの 290 nm にピークと して現れたからだと考えられる。

以上のように d^{te}G を含む DNA の蛍光特性は GQ 形成時に変化することが分かり、現在他の配 列についても同様に調べている。ここまでに記した成果の一部は Methods and Applications of Fluorescence で発表した。

本研究課題については残念ながら、研究代表者が日本国内のポジションが決まったことにより

本年9月で帰国したため、海外特別研究員の期間中に完了させられなかった。しかしサンディエ ゴで Tor 研究室の大学院生と訪問研究者が本研究に必要な実験を引き継いで行っている。近日中 に彼らのデータを含めた論文を発表する予定である。

1, Rovira, A. R.; Fin, A.; Tor, Y. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 14602-14605.

2, Rezler, E. M.; Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Kim, M.; White, E.; Wilson, W. D. Hurley, L. H. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 9439–9447.