

国際共同研究事業 平成 3 1 年度実施報告書

令和 2 年 3 月 31 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者

所属機関・部局 公益財団法人東京都医学総合研究所・

ゲノム医科学研究分野

職・氏名 ^(ふりがな) 所長 正井 久雄 ^{まさい ひさお}

1. 事業名 国際共同研究事業 スイスとの国際共同研究プログラム (JRPCs)

2. 研究課題名

(和文) 新規 MRI プローブを用いた四重鎖 DNA の可視化によるがん細胞の検出技術の開発

(英文) Porphyrin-based imaging probe for the detection of oncogene promoter quadruplex DNA

3. 共同研究実施期間 (全採用期間)

令和元年 7 月 1 日 ~ 令和 4 年 6 月 30 日 (3 年 0 ヶ月)

4. 研究参加者 (代表者を含む)

(1) 日本側参加者 5 名 (2) 相手国側参加者 4 名

5. 主要な物品購入状況 (単価 (一品又は一組) 若しくは一式の価格が 50 万円以上のものを購入した場合は記載)

物品名	仕様 型・性能等	数量	単価(円)	金額(円)	設置研究機関名	備考

※本事業の委託費と他の経費とを合算使用する際は、合算使用した旨を備考欄に記載した上で、金額は本事業の委託費で負担した額のみ記載してください。

8. 研究実施状況

1) G4 リガンド合成 (スイス国側) : ポルフィリンコア構造に加え側鎖の配置、炭化水素鎖長、末端基 (カルボキシル基またはヒドロキシル基)、配位金属の異なる計 11 種の化合物を合成した。(構造は未発表)

a. ESR による一重項酸素測定 : Gd^{3+} 配位化合物では NT116、NT131 の順で高かった。 Mn^{3+} 配位化合物は NT116 より弱かったが既存の G4 リガンドである TmPyP4 に比べ NT154、NT130 は顕著に高かった。NT107 は TmPyP4 と同程度であり NT128 はこれより弱かった。

b. リラクシビティ : Mn^{3+} 配位化合物のうち NT154 は最も高い活性 (最大 $r_1=14mM^{-1}s^{-1}$) を示し、次いで NT130、NT107、TmPyP4、NT128 の順であった。 Gd^{3+} 配位化合物の活性は低かった。

2) 新規 G4 プローブの準備 :

a. 基質 :

a-1. ゲルシフトアッセイ : には以下の基質を $[^{32}P]$ ATP にて標識し、5 頁論文 3 の方法にて G4 構造を形成させて用いた : s1, T_6G_{24} (オリゴマー, パラレル型) ; s2, CEB1 (ダイマー, パラレル型) ; s3, Htelo1 (ハイブリッド型) ; s4, Htelo4 (アンチパラレル型) ; s5, CEB1_TA (パラレル型) ; s6, CEB1_TTA (パラレル型) ; s7, Htelo1_no_spacer_2 (アンチパラレル, ミックス型) ; s8, Htelo4_3nt_spacer (アンチパラレル型) ; s9, Htelo4(GGGGGG) (アンチパラレル型) ; s10, Htelo4(GGGGGG)_3nt_spacer (ハイブリッド型) ; s11, $T_6(GA)_{12}$ (コントロール非 G4 型)

a-2. FRET アッセイ : 以下の DNA の 5'末端に FAM(6-carboxyfluorescein)、3'末端に TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) を標識した DNA を合成し、G4 構造を形成させて用いた。s8~10 については本年度、オリゴマー パラレル型 G4 を形成することを同定した (9. 論文 3) : s12, c-KIT (パラレル型) ; s13, c-MYC (パラレル型) ; s14, K-RAS (パラレル型) ; s15, Rif1-1: CAGGTGGGATGGGTATCTAGGAA ; s16, Rif1-2: AAGGCAATGTGGGGGATAGTGGGCA ; s17, Rif1-3: TTGGGTCTAAGTGGGGATGTGGGAT (S15-17, オリゴマー, パラレル型)

a-3. 新規 G4 および G4 結合ポリペプチドの作製など

① G4 結合タンパク質 Rif1 の機能解析 : 分裂酵母 Rif1 の欠失変異体を用いた生化学的解析より、C 端の保存されたモチーフおよび N 端の HEAT リピート構造の両者が独立に G4 に結合すること、C 端 91 アミノ酸は単独で多量体形成できることを見出した。遺伝学的解析から、両モチーフが Rif1 による複製起点抑制活性に重要な機能を持つことを見出した。(9. 論文 2)

② マウス Rif1 欠失 ES 細胞でのクロマチン構造解析 : G4 結合タンパク質 Rif1 の欠失によりクロマチン構造がどのように変化するかを調べるため ATAC-seq を委託した。FASTQ データを現在解析中である。

③ DNA/RNA hybrid G4 の解析 : G4 形成配列を含むプラスミド DNA を用いて試験管で転写を行い、DNA/RNA hybrid G4 が実際に形成されることを生化学的に実証した。(論文投稿準備中)

b. 市販 G4 リガンド : Pyridostatin、PhenDC3、L1H1-70TD、TMPyP4 など (3)、5) の解析用に準備した。

3) 結合アッセイ : 1) の G4 リガンドの G4 結合能を 2) a-1、a-1、b を用いて評価した。

a. ゲルシフトアッセイ : NT154 は基質 s1、s5-10 に結合能を示したが、非 G4 DNA s11 にも結合した。今回の解析条件では強い特異的結合をもつリガンドを検出できなかった。

b. プルダウンアッセイ : a の結果に基づき、今回はこの方法は実施しなかった。

c. FRET アッセイ : ヒドロキシル基末端を含むメタ位に側鎖を持つ化合物では NT100 および同 Mn^{3+} 配位型の NT128 が強い G4 安定化能を持つことがわかった。もっとも高い安定化能を持つのはパラ位にヒドロキシル基末端を含む側鎖を持つ化合物 NT153 および同 Mn^{3+} 配位型 NT154 であり、NT153 は既知のリガンド TmPyP4 に準ずる安定化能を示した (G4 濃度 $0.2\mu M$ に対して $0.4\mu M$ で最大効果の 50% の安定化を示した)。いずれの化合物も従来型の G4 (s12~14) に比べオリゴマー型パラレルタイプ G4 (s15~17) の安定化にはより高い濃度 ($1.5\mu M$ 以上) が必要とされた。

4) G4 リガンド細胞内局在解析法の確立 :

a. 蛍光特性の計測 : 合成した G4 リガンドは最大吸収 $420-460\text{ nm}$ で $628-579\text{ nm}$ の蛍光を示した。既存の蛍光顕微鏡蛍光では計測が難しいため、細胞内局在解析のためのソフトウェア (実験計画書 7. 研究経費 設備備品費) は購入しなかった。来年度はカスタムフィルターセットの購入を検討する。

b. DNA/RNA hybrid G4 抗体の作製 : 抗原の大量精製を現在行っており来年度に再度検討を行う。

5) 細胞増殖アッセイ : HeLa、U2OS に新規化合物を添加し、WST-1 試薬を用いて細胞増殖を計測した。その結果、G4 安定化能の高かった NT153、NT154 を含め、 $20\mu M$ までは増殖抑制はみられなかった。 $200\mu M$ では NT153 は 61% (U2OS)、32% (HeLa) と 2 日後に増殖が抑制された。MCF-7 細胞でも $20\mu M$ ではほとんど影響なく、 $200\mu M$ では NT153 は 37%、NT154 は 28% と 2 日後に増殖が抑制された。

6) 協働行事 :

6-1. Web 会議 : これまでの結果と今後の協同作業について討論を行った。(2019 年 8 月 28 日 ; 参加者 正井久雄、吉沢直子、Yoko Yamakoshi、Tamas Nemeth)

6-2. 相手国研究代表者との会議 : 相手国研究代表者の訪問を受け、G4 リガンドの新たな機能アッセイ方法に関する情報交換やプローブの *in vivo* アッセイの計画について討議を行った。(2019 年 12 月 17 日)

9. 研究発表（平成 31 年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（4）件 うち査読付論文 計（4）件

通番	共著の有無*1	論文名、著者名等*2
1		Masai, H and Tanaka, T. (2020) "G-quadruplex DNA and RNA: their roles in regulation of DNA replication and other biological functions." Biochem. Biophys. Res. Commun., in press
2		Kobayashi, S., Fukatsu, R., Kanoh, Y., Kakusho, N., Matsumoto, S., Chaen, S. and Masai, H. (2019) "Both a unique motif at the C terminus and N-terminal HEAT repeat contribute to G4 binding and origin regulation by Rif1 protein." Mol. Cell. Biol., 39 (4) e00364-18. (cover figure)
3		Masai, H., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kanoh, Y., Moriyama, K., Ma, Y., Iida, K., Nagasawa, K. (2019) "Rif1 promotes self-association of G-quadruplex (G4) by its specific G4 binding and oligomerization activities." Sci. Rep., 9 (1):18622.
4		Yang, C-C., Kato, H., Shindo, M. and Masai, H. (2019) "Cdc7 activates replication checkpoint by phosphorylating the Chk1 binding domain of Claspin in human cells." eLife, 8. e50796.

〔学会発表〕 計（3）件 うち招待講演 計（2）件

通番	共著の有無*1	標題、発表者名等*2
1		正井 久雄、加納 豊、田中 卓、吉沢 直子、伊藤 さゆり、森山 賢治、加藤 宏幸、井口 智弘、松本 清治、Zhiying You、深津 理乃、覺正 直子、鷺 朋子、小林 駿介、楊 基駿、堀 かりん、高沢 佳芳、富樫 育子、上野 勝、長澤 和夫、Yue Ma "DNA 複製の正と負の制御に関わるグアニン 4 重鎖構造 (In search of a universal mode of DNA replication)" ワークショップ『染色体 DNA 複製研究のニューフロンティア』第 42 回 日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 3~6 日、福岡 (招待講演)
2		正井久雄、加納豊、田中卓、伊藤さゆり、深津理乃、森山賢治、鷺朋子、覺正直子、吉沢直子、井口智成、加藤宏幸 "新しいゲノムシグナチャーとしての RNA-DNA ハイブリッドとグアニン 4 重鎖" 第 92 回日本生化学会大会 (2019 年 9 月 18~20 日) シンポジウム『新しいゲノムの姿とその維持機構のフレキシビリティ』2019 年 9 月 18 日、横浜 (招待講演)
3		吉沢直子、正井久雄 複製タイミング制御因子 Rif1 の欠失が誘導する 2 細胞期胚様細胞のエンハンサー構造 (Unique enhancers structures in 2-cell zygote-like mouse ES cells induced by loss of replication timing regulator Rif1.) 第 42 回 日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 3~6 日、福岡

〔図 書〕 計（0）件

通番	共著の有無*1	題名、著者名等*2
1		

* 相手国研究代表者との共著（共同発表）がある場合は○、相手国研究代表者との共著であり謝辞等に事業名を明記している場合は◎と記入。

** 当該発表等を同定するに十分な情報を記載すること。例えば学術論文の場合は、論文名、著者名、掲載誌名、巻号や頁等、発表年（西暦）、学会発表の場合は標題、発表者名、学会等名、発表年（西暦）、著書の場合はその書誌情報、など（順番は入れ替わってもよい）。

*** 足りない場合は適宜行を追加すること。

1. この報告書は、最終年度を除く毎年度提出してください。
2. 本会の事業報告等に記載するための適当な図・写真等があれば、説明を付して添付してください。
3. この報告書は、本共同研究の成果として本会ウェブサイトに掲載します。また、この報告書を本会の事業報告として刊行する場合、内容に影響しない範囲で修正を行うことがあります。
4. 知的財産権等の事情で本報告書の一部の公開を希望しない場合は、対応についてあらかじめ本会担当者に相談してください。