

# 国際共同研究事業 令和 2 (2020) 年度実施報告書

令和 3 年 3 月 31 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[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]

所長 正井 久雄

1. プログラム名 スイスとの国際共同研究プログラム (JRPs)

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 6 名

(2) 相手国側参加者 4 名

5. 主要な物品明細書 (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。

※再委託先/共同実施先における支出である場合は、備考欄にその旨を記載してください。

7. 渡航実施状況

(1) 当該年度に相手国又は相手国以外の国を訪問した日本側参加者（委託費から支出した出張のみ記載。相手国以外の国における用務先には下線を付すこと。）

氏名	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
計 名 (延べ人数)		

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日」（旅行開始日～旅行終了日）

(2) 当該年度に受入れた相手国側参加者

氏名	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
計 名 (延べ人数)		

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月10～19日」（旅行開始日～旅行終了日）

## 8. 研究実施状況

- 1) 新規 G4 リガンドの合成 : FRET アッセイによる G4 安定化能測定の結果、安定化能が最も高かった NT151, NT100, NT154, NT153 を元に、G4 安定化能を高める設計をおこなった (相手国側)。
- 2) G4 ライブラリーの更新 : 前年度までに作製した G4 基質ライブラリーに加えて G4 構造を形成する RNA 配列、さらに転写により RNA-DNA hybrid 上に G4 を形成する配列を加え、これらの G4 構造を試験管内で作製した。
- 3) 結合アッセイ : 1) の G4 リガンドの G4 結合能を前年度と同様、以下の方法で評価する。  
ゲルシフトアッセイ : NT100, 123, 128, 130, 131 について T6G24(パラレル型), CEB1(パラレル型), Htelo1(ハイブリッド型), Htelo4(アンチパラレル型) の G4 配列を用いてこれらのリガンドの G4 への結合を検討したが、このアッセイでは安定な結合は観察されなかった。これに対して、PhenDC3, Pyridostatin, L2H2-6OTD などの既存の G4 リガンドでは結合が観察された。今回合成している化合物の構造に類似している TmPyP4 も同じ条件で結合を示さなかったため、Cationic porphyrin 型の化合物は、ゲルシフトの条件では安定に結合を示さないと推定された。
- 4) 安定化アッセイ :
  - a. FRET アッセイ : FAM-TAMRA 二重標識した G4 DNA を用いて G4 構造の安定化能を qPCR にて評価した。その結果、NT151, NT100, NT154, NT153 が高い安定化能を示した。
  - b. CD による測定 : CD(円偏光二色性; circular dichroism)により、G4 リガンドによる安定化の評価を現在進めている。
- 5) photocleavage(光切断)に及ぼす影響 : 合成された G4 リガンドが G4 特異的な photocleavage(光切断)に及ぼす影響を評価した。Control として用いた TmPyP4 とともに NT98, 100, 123, 128, 130, 131, 153 は、Green light による CEB25(パラレル型), Htelo4(アンチパラレル型) の G4 DNA の切断を誘導した。変異により G4 形成しない CEB25, Htelo4 変異体は切断されないことから、G4 構造特異的な切断である。また、反応液に NADH を添加すると切断は阻害された。
- 6) 転写への影響の評価 : G4 配列を含む k-Ras 遺伝子のプロモーターを、および G4 配列を欠失したプロモーター変異配列を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより、合成された G4 リガンドの転写活性への影響を調べた。どのリガンドでも G4 配列の存在特異的に活性が増加させた。特に、NT123 および NT130 では顕著に活性化した。また構造の類似する TmPyP4 によっても G4 構造依存的な活性化が観察された。この結果は、KRAS プロモーターの G4 構造の安定化は、その転写活性を増加させることを示唆するが、他の安定化リガンド L2H2-6OTD は影響を示さなかった。したがって、リガンド特異的な影響が示唆された。
- 7) 細胞毒性アッセイ : がん細胞株 U2OS, HeLa 細胞を用いて、合成された G4 リガンドを 2 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 200 $\mu$ M の濃度で添加し、細胞増殖を WST アッセイにより、また細胞周期に及ぼす影響を継時的に FACS 解析した。その結果、20 $\mu$ M、2 日目までは、顕著な増殖阻害、あるいは細胞周期への影響は観察されなかった。全体的に合成された化合物は、安全性の高いリガンドと考えられる。
- 8) ゲノム不安定性誘導アッセイ : PARP3, RTEL1, Bloom, ATRX など、G4 を介したゲノム不安定性誘導に関与することが知られている因子の発現を抑制した状態で、合成された G4 リガンドが、細胞に及ぼす影響を調べるため、これらの因子の siRNA による発現抑制系の確立、及び CRISPR-Cas9 によるノックアウト細胞株を樹立した。
- 9) G4 結合タンパク質または断片の合成 : 60 種類近く存在することが知られている DDX ヘリカーゼ群のタンパク質は RNA-DNA ハイブリッド、G4 構造を認識する可能性が示唆されている。これまで、DDX3, 5, 11, 17, 21 をクローニングし安定発現細胞株を樹立した。
- 10) 細胞内 G4 局在の解析 :
  - a. 蛍光顕微鏡による定量 : G4 認識抗体として知られている BG4 に加えて、新しい G4 プローブの G4P を入手し、これを精製あるいは、蛍光分子融合体として細胞内で安定に発現した。
  - b. G4 結合タンパク質による G4 局在との比較 : 9) で作製した RNA-DNA ハイブリッド/G4 結合タンパク質の核内局在、結合部位の解析を開始した。
- 11) DNA/RNA hybrid G4 抗体の作製と評価 : DNA/RNA hybrid G4 構造を認識する抗体作製のため大量に DNA/RNA hybrid G4 核酸を調製する方法を確立した。
- 12) 協働方法 : 本年度は、新型コロナウイルス蔓延のため、物理的な訪問は不可能であったが、on line 会議を定期的に行い、進捗状況の確認、情報交換を行なった。

9. 研究発表（当該年度の研究成果）

【雑誌論文】 計（ 3 ）件    うち査読付論文 計（3）件

通番	共著の有無*1	論文名、著者名等*2
1	◎	Fracassi A, Cao J, <u>Yoshizawa-Sugata N</u> , Toth E, Archer C, Groninger O, Ricciotti E, S-Y Tang, Handschin S, Bourgeois J-P, <u>Ray A</u> , Liosi K, Oriana S, Stark W, <u>Masai H</u> , Zhou R, <u>Yamakoshi Y</u> (2020) “LDL-mimetic lipid nanoparticles prepared by surface KAT ligation for in vivo MRI of atherosclerosis” <i>Chem Sci</i> in press
2		Masai, H. and Tanaka, T. (2020) “G-quadruplex DNA and RNA: Their roles in regulation of DNA replication and other biological functions.” <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 531:25-38.
3		<u>Masai, H</u> , <u>Kanoh, Y</u> , Kakusho, N, Fukatsu, R (2020) "Detection of cellular G-quadruplex by using a loop structure as a structural determinant." <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 531:75-83

【学 DS 会発表】 計（ 3 ）件    うち招待講演 計（3）件

通番	共著の有無*1	標題、発表者名等*2
1		Chi-Chun Yang and <u>Hisao Masai</u> “Claspin, a key regulator of replication checkpoint, is differentially regulated in cancer and non-cancer cells.” 11th international symposium on DNA Damage Response & Human Disease (isDDRHD-2020), November 5~6. 2020 (online) (Invited Lecture)
2		<u>正井久雄</u> 「グアニン4重鎖/RNA-DNA ハイブリッド構造による DNA 複製の制御機構」第 93 回日本生化学会大会 シンポジウム『ゲノム反応中間体としての非 B 型核酸:その構造と生物学的意義』 2020 年 9 月 14-16 日 on line（オーガナイザー、招待講演）
3		<u>正井久雄</u> 、 <u>田中卓</u> 、 <u>鷺明子</u> 、 <u>深津 理乃</u> 、 <u>関 由美香</u> 「G4/RNA-DNA ハイブリッドに依存する環状染色体 DNA の複製機構」第 43 回日本分子生物学会年会 MBSJ2020 ワークショップ『核様体 DNA の複製と品質維持の最前線研究』2020 年 12 月 2~4 日 on line（招待講演）

【図書】 計（ 0 ）件

通番	共著の有無*1	題名、著者名等*2
1		

- \*1 相手国側参加者との共著（共同発表）がある場合は○、相手国側参加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。
- \*2 当該発表等を同定するの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）。相手国側参加者との共著となる場合は、著者名が複数であっても省略せず、その氏名を記入し下線を付すこと。
- \*3 足りない場合は適宜行を追加すること。