

ヒトテロメアDNAとRNAおよびその応用

Human telomere DNA/RNA and their applications

医学部機能制御学 物質科学

徐岩(XuYan)

(1) テロメア ~ 謎のエンド (Telomere: Mysterious end)

(2) 化学の目で、テロメア謎を解く

(To reveal telomere's mysterious by chemical approaches)

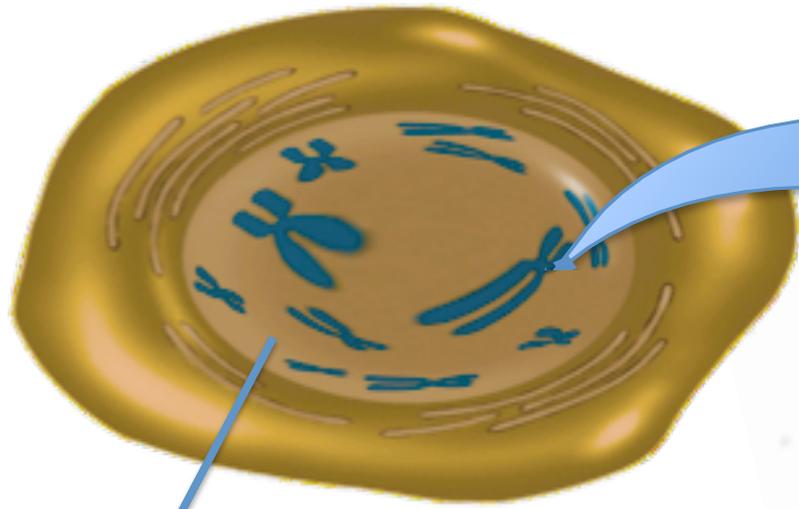
ヒトテロメアDNAとRNAの分子構造

1. 短鎖ヒトテロメアDNA4重鎖構造の発見
2. 長鎖テロメアDNA高次構造の発見
3. ヒトテロメアRNA4重鎖構造の発見
4. 細胞内のヒトテロメアRNA4重鎖構造を可視化することに成功

(3) 応用 (applications)

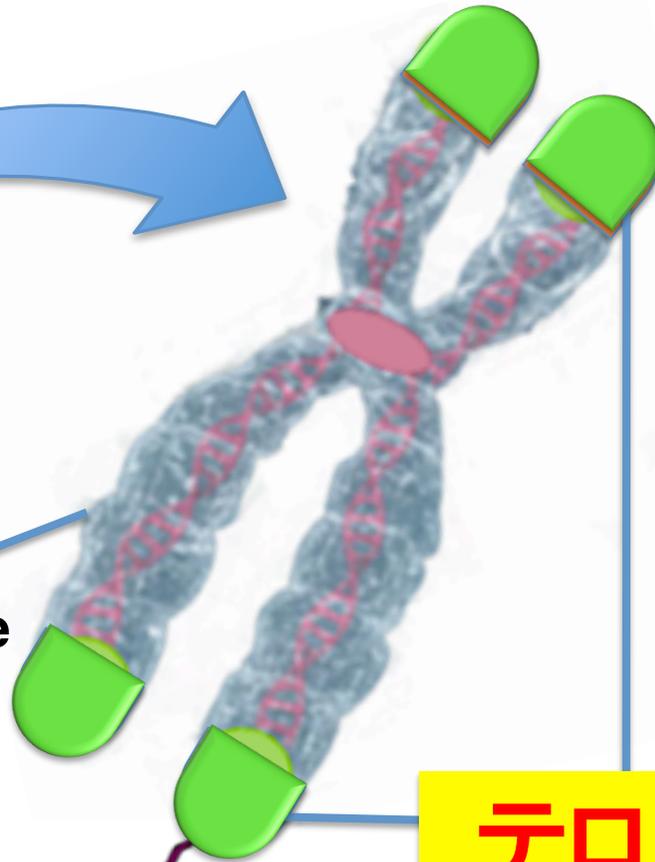
1. テロメアをターゲットとするがん標的治療の新手法を開発
2. テロメアDNA構造による操作するDNAナノマシンで生体分子の検出

(1) テロメア ~ 謎のエンド
(Telomere: Mysterious end)



細胞核
Cell nucleus

染色体
Chromosome



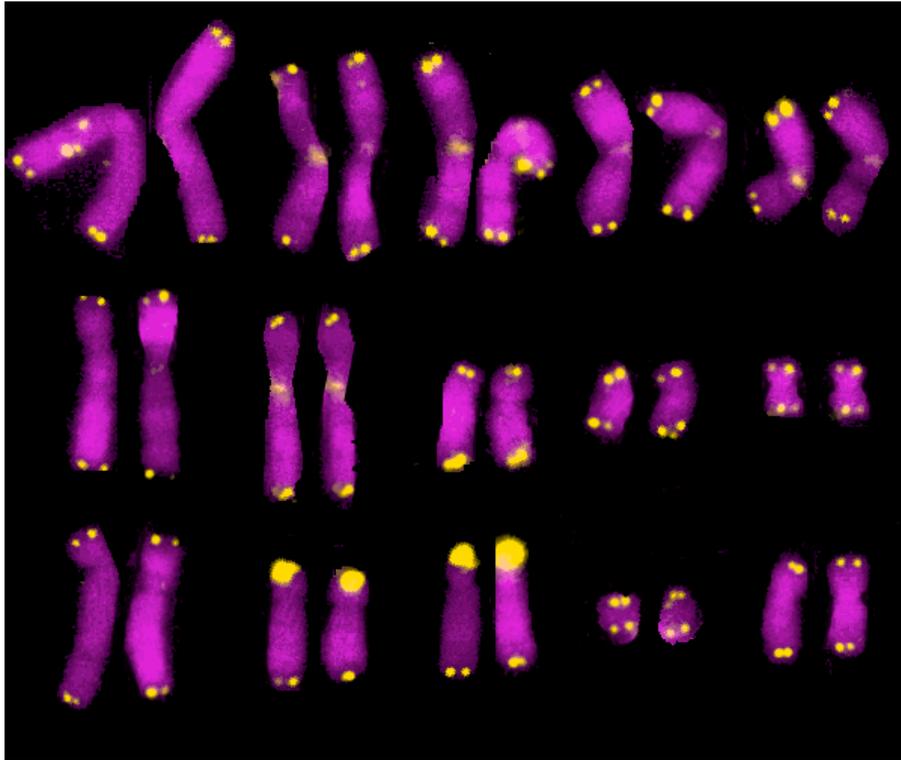
テロメア

Telomere



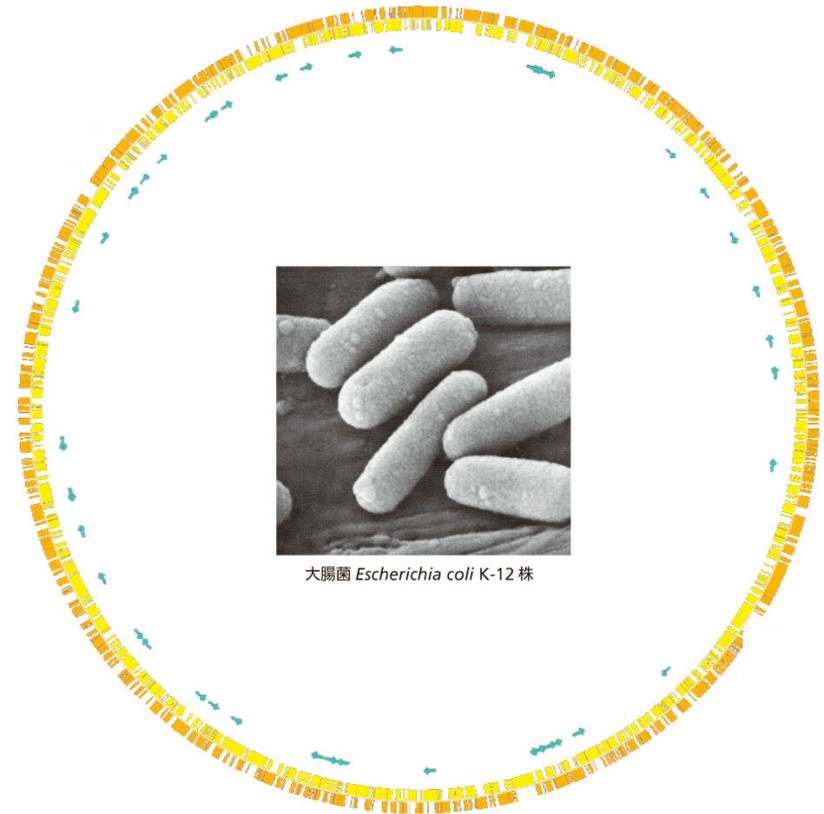
染色体の末端
Telomere end

End



ヒト染色体は直線状であり、DNAには末端が存在する。

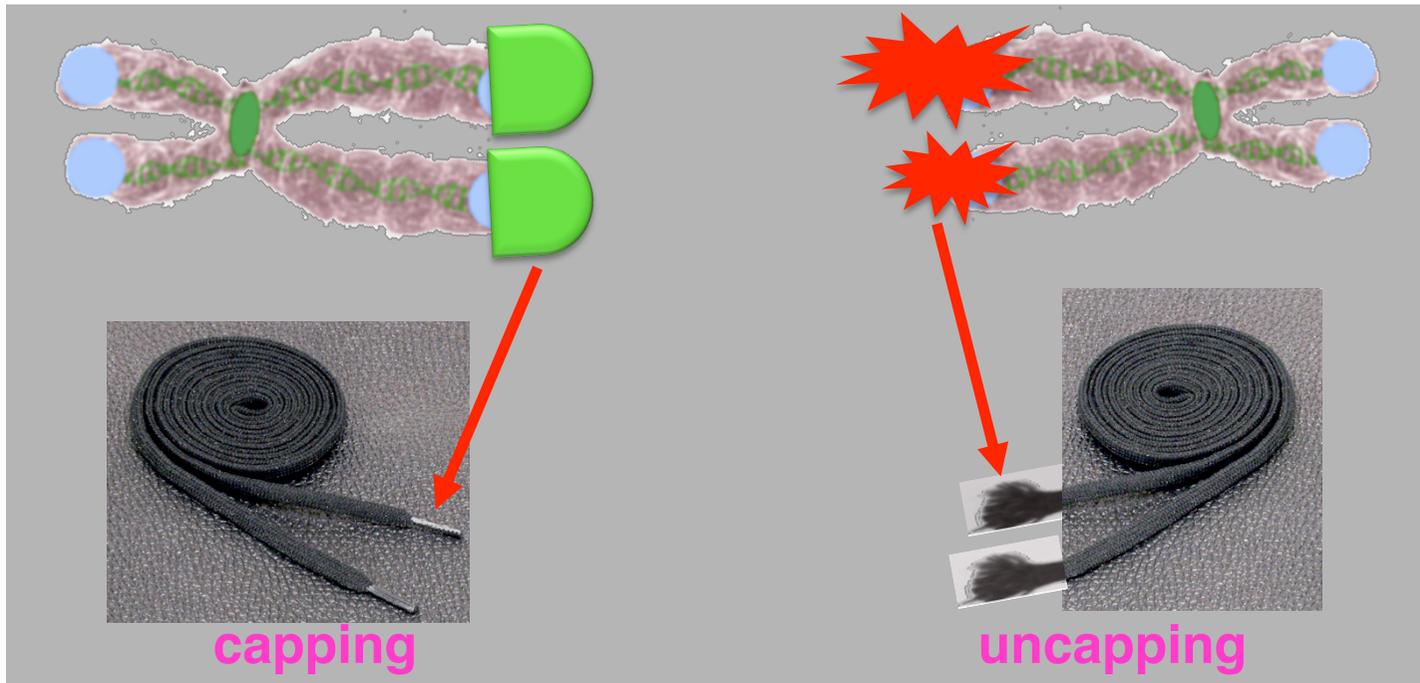
Telomeres are DNA sequences located at the termini of linear chromosomes.



大腸菌 *Escherichia coli* K-12 株

テロメアなし

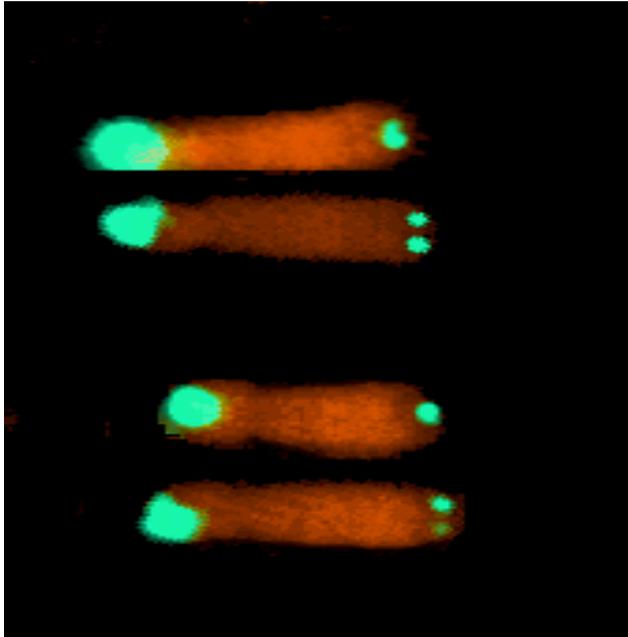
テロメアはなぜ重要なのか？ Why are telomeres important ?



テロメアの役割は靴ひもの
端にあるカバーと似ている

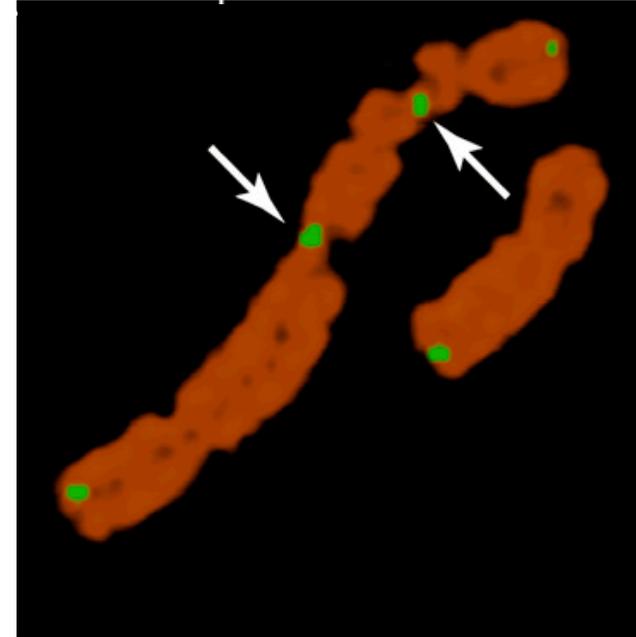


正常な染色体



Normal chromosome

異常な染色体



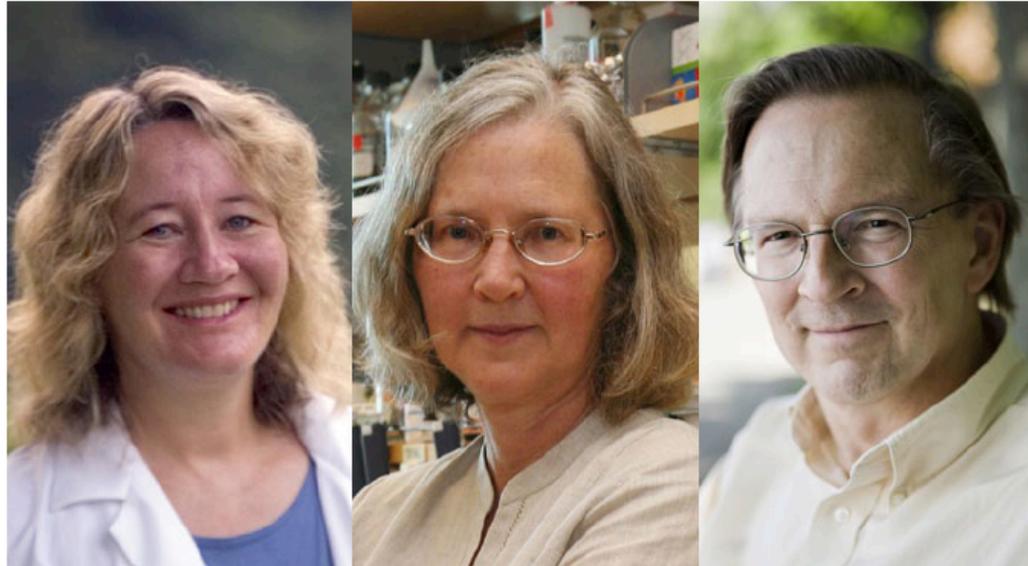
Abnormal chromosome

テロメア：“染色体のカバー”

テロメアを欠いた染色体は、染色体末端どうしの融合が起こる。このような異常な染色体ができてしまうと、細胞は正常なはたらきができなくなり、細胞老化・細胞死の原因となる。

The function of a telomere might depend on its state : whether it is a “capping” or an “uncapping” structure.

2009年度ノーベル医学生理学賞は染色体の末端にある テロメアを研究する3人の研究者に決定した

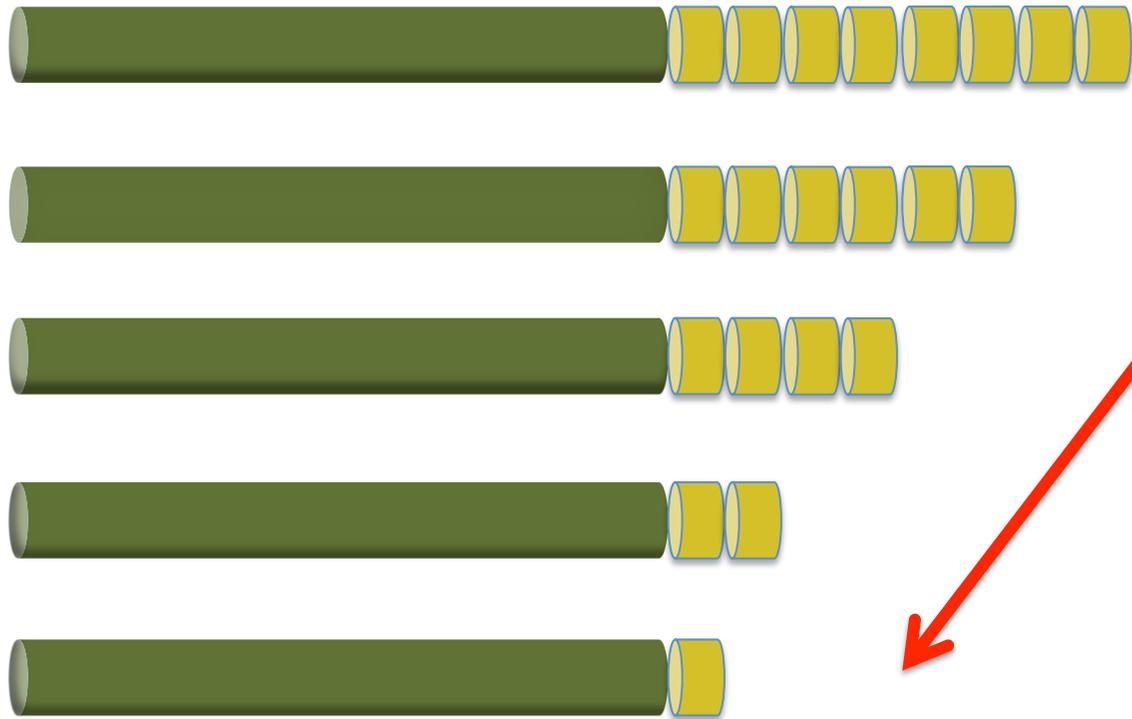


共同受賞の3氏。左から Carol Greider、Elizabeth Blackburn、Jack Szostak。

米カリフォルニア大サンフランシスコ校エリザベス・ブラックバーン教授
米ジョンズホプキンス大のキャロル・グライダー教授
米ハーバード大のジャック・ショスタク教授
師弟2人は女性で、自然科学3賞で女性2人の同時受賞は初めて

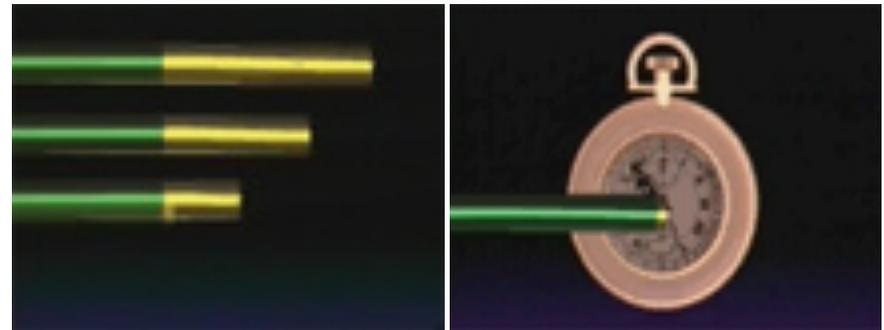
Elizabeth Blackburn, Carol Greider, and Jack Szostak were awarded the 2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine for the discovery of telomerase and subsequent work on telomerase.

細胞の生死を左右する"細胞内時計"



細胞が分裂のたびに
テロメアが短くなる。

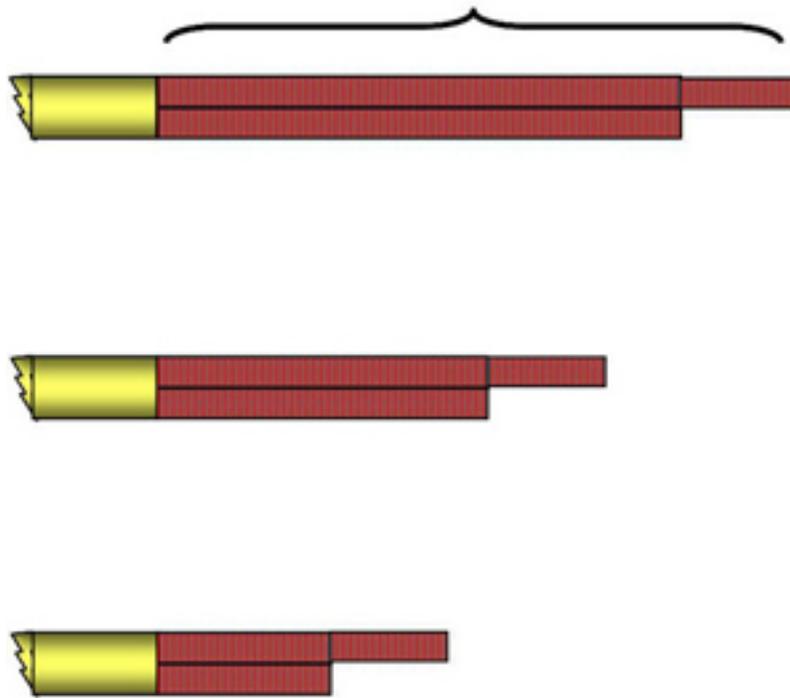
細胞老化・細胞死
cell senescence, death



テロメアは“molecular clock”である

“生命を左右する“生命時計”

telomere



テロメアが
短くなる。

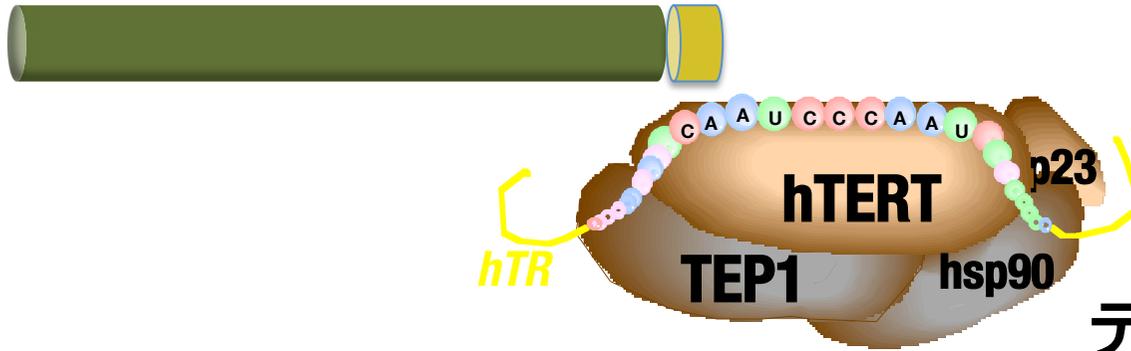


5日

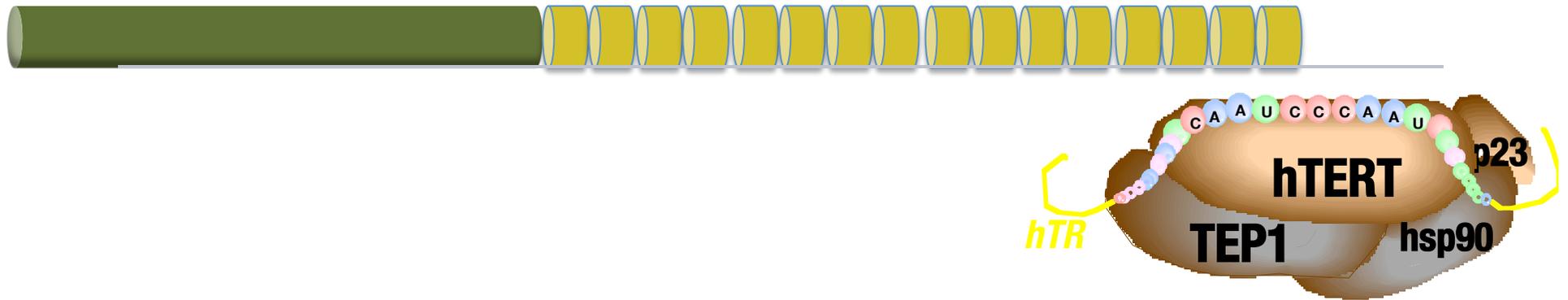
14日

おとな

年をとると
テロメアが
短くなる!



テロメラーゼ ([Telomerase](#))



テロメラーゼ

(2) 化学の目で、テロメア謎を解く

(To reveal telomere's mysterious by chemical approaches)

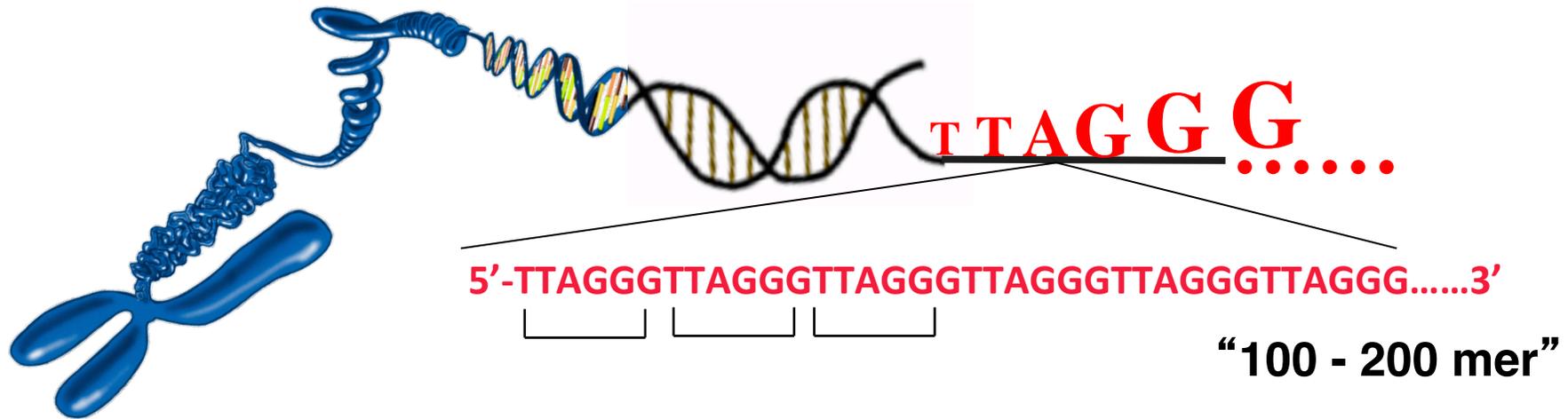
ヒトテロメアDNAとRNAの分子構造

1. 短鎖ヒトテロメアDNA4重鎖構造の発見
2. 長鎖テロメアDNA高次構造の発見
3. ヒトテロメアRNA4重鎖構造の発見
4. 細胞内のヒトテロメアRNA4重鎖構造を可視化することに成功

(3) 応用 (applications)

1. テロメアをターゲットとするがん標的治療の新手法を開発
2. テロメアDNA構造による操作するDNAナノマシーンで生体分子の検出

ヒトテロメアDNA



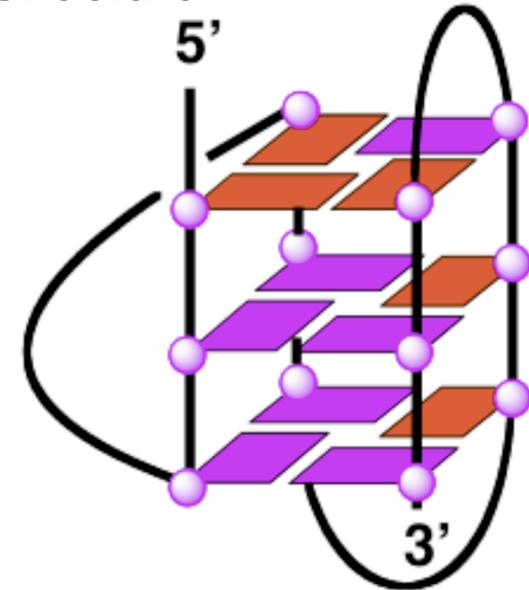
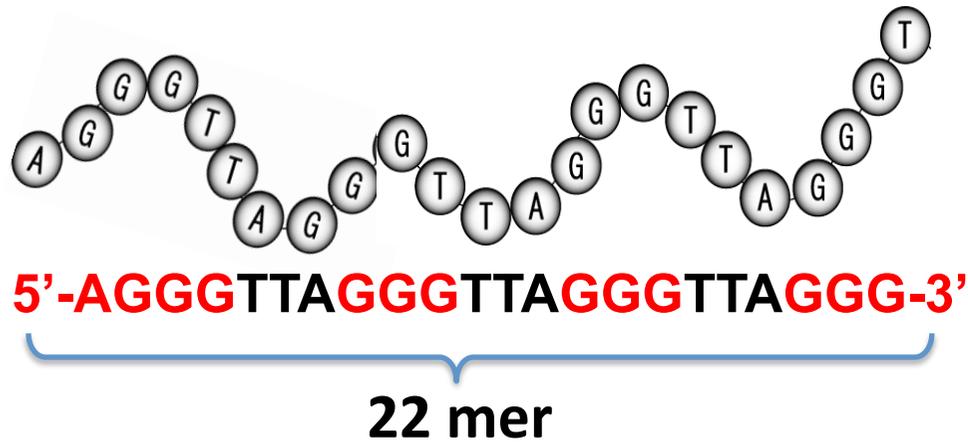
ヒトテロメアは、染色体末端に存在する単純なTTAGGG繰り返しDNAであり、生体内で重要な役割を担っている。

“染色体のカバー” → “テロメアの構造”

Structure of Telomere ?

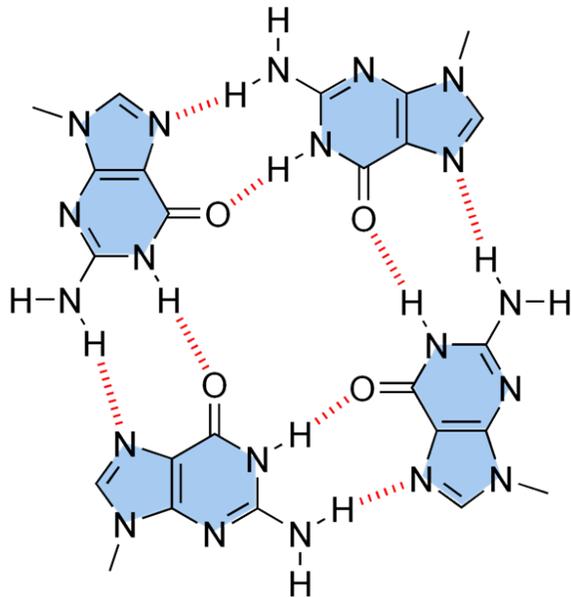
短鎖ヒトテロメアDNA4重鎖構造の発見

Human telomeric DNA forms the G-quadruplex structure

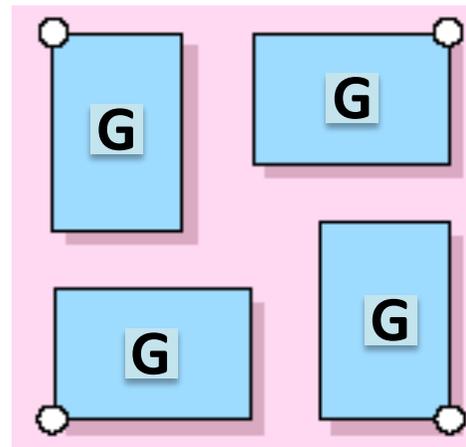


ヒトテロメアDNA
4重鎖構造

Nature Protoc. 2007.

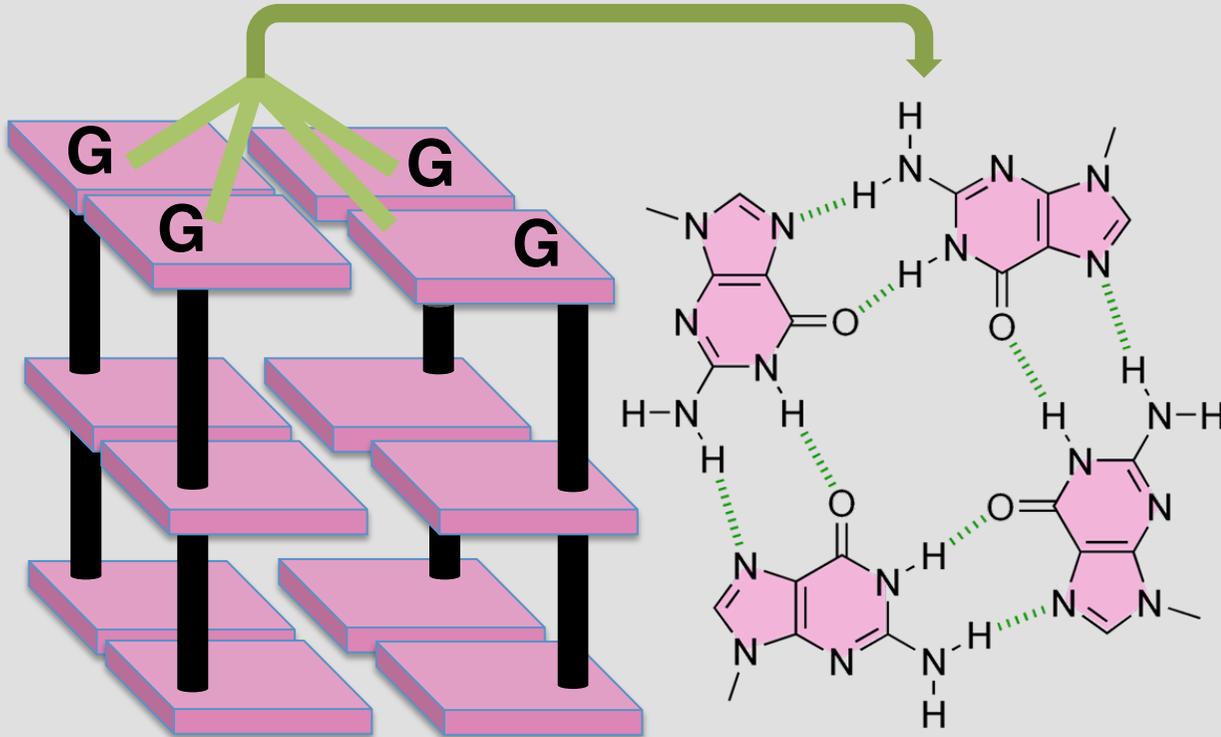


=



4量体G-カルテット

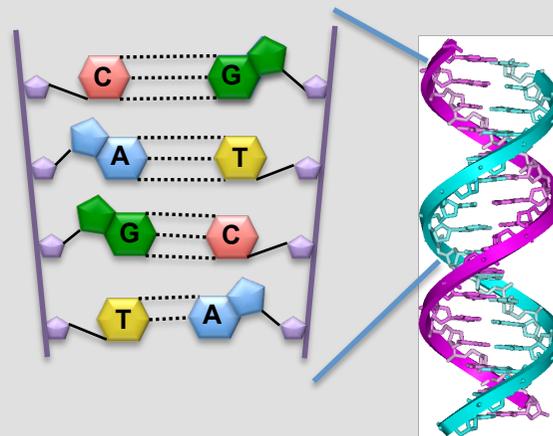
安定な4重鎖構造



Stable G-quadruplex

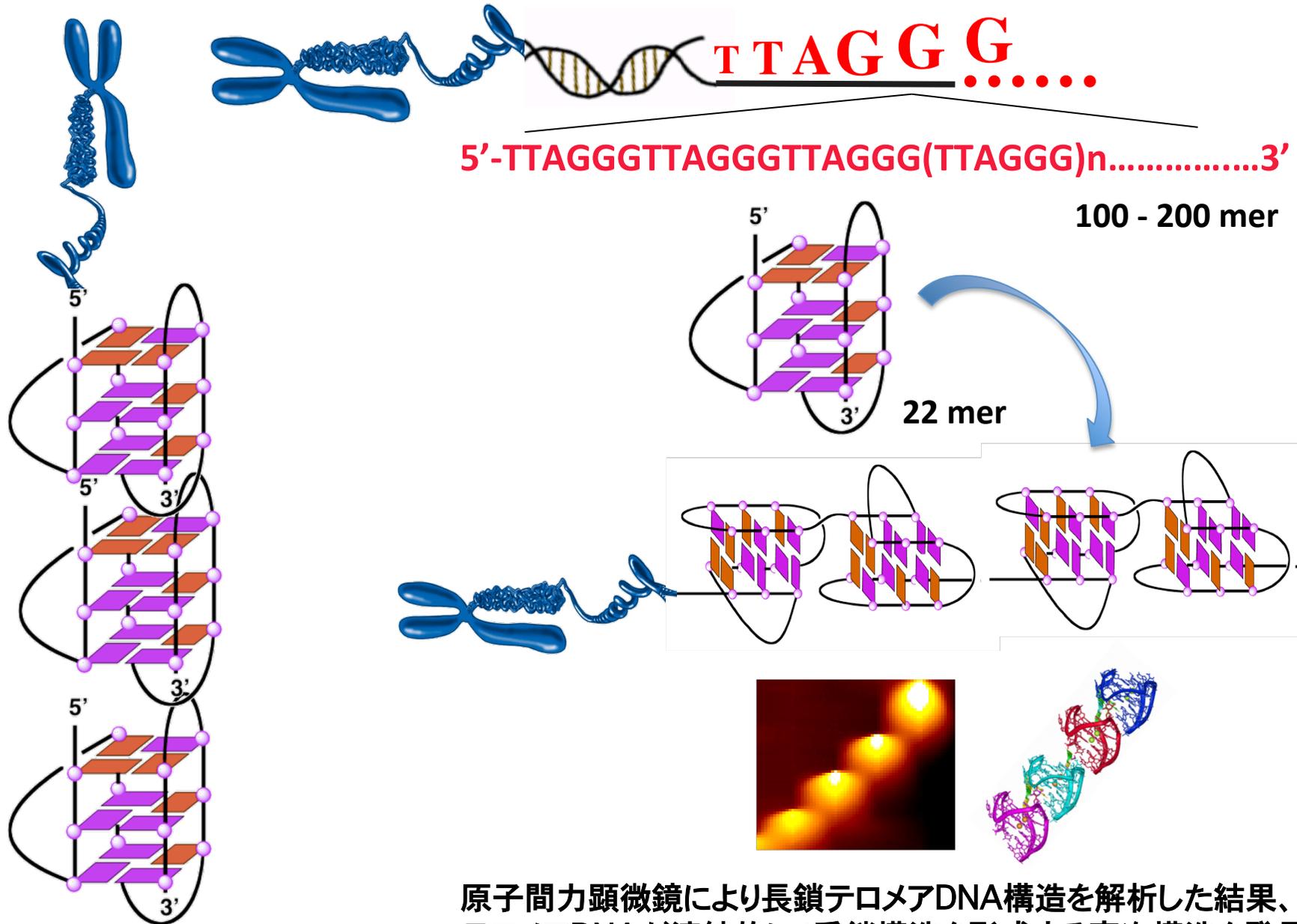


2本鎖構造



DNA duplex

長鎖テロメアDNAが連続的に4重鎖構造を形成する高次構造の発見



原子間力顕微鏡により長鎖テロメアDNA構造を解析した結果、長鎖テロメアDNAが連続的に4重鎖構造を形成する高次構造を発見した。

Biomaterials and biosensors

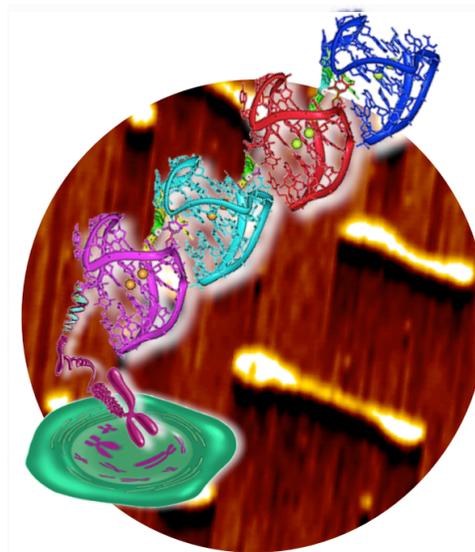
DNA STRUCTURES: MYSTERIOUS END**Human telomeres are composed of a series of G-quadruplexes protecting the chromosome ends.**

Published online 16 November 2009

Angew. Chem. Int. Ed. | The superhelix structure of long human telomeric DNA has been revealed for the first time by scientists working at the University of Tokyo's Research Center for Advanced Science and Technology¹. Yan Xu and his colleagues were interested in learning more about the protective structures, or telomeres, present on the ends of chromosomes.

Telomeres are regions of DNA right at the end of the chromosome and are important for genome stability. "Much like the plastic tips on shoe laces, telomeres prevent the long strands of chromosomal DNA from unraveling and protect chromosome ends from being recognized as double-strand breaks," says Xu. Mammalian telomeric DNA is composed of the repeating TTAGGG nucleotide unit, but the overall structure of these important cellular components is not sufficiently understood.

Although various human telomeric DNA structures have been proposed, there has been no experimental proof until now. Xu and his colleagues used a combination of atomic force microscopy (AFM), fluorescent



Schematic representation of the four linked G-quadruplex structure and AFM image of a length of DNA with telomeres at either end.

resonance energy transfer and circular dichroism measurements to make images of the telomere ends (pictured). They were able to show that telomeres are wrapped up into a series of structures known as G-quadruplexes, which according to Xu look rather like "skewered dumplings." An image of four such units was produced from a chain of 96 nucleotides, with 21 nucleotides required for each G-quadruplex.

As DNA is replicated during cell division,

small bits of the telomere break off. Over time this leads to aging of the cell. Damaged telomeres are recognized by the cell as double-strand breaks, which can lead to genome instability resulting in cell senescence or apoptosis (cell death). Knowledge of the overall molecular structure of telomeres could lead to the structure-based design of anti-cancer therapies targeting telomeres.

One way that scientists hope to maintain a sufficient length of telomeric DNA is by harnessing nature's own technique: targeting the enzyme (telomerase) responsible for elongating the telomere. One of the 2009 Nobel prizes was awarded for discovering how chromosomes are protected in this way. However, most studies now focus on developing molecules that target the G-quadruplex itself. The structural information provided by Xu's research team will be invaluable in this endeavor.

Reference

1. Xu, Y., Ishizuka, T., Kurabayashi & K. Komiyama, M. Consecutive formation of G-quadruplexes in human telomeric-overhang DNA: A protective capping structure for telomere ends. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 7833 (2009).

Vol. 7

長鎖テロメアDNAが連続的に4重鎖構造を形成している
高次構造を発見した (NPG Nature Asia-Pacific Top Ten
Research Highlightsで第1位を獲得しました)。

9

CHEMICAL

& Engineering News

Science & Technology

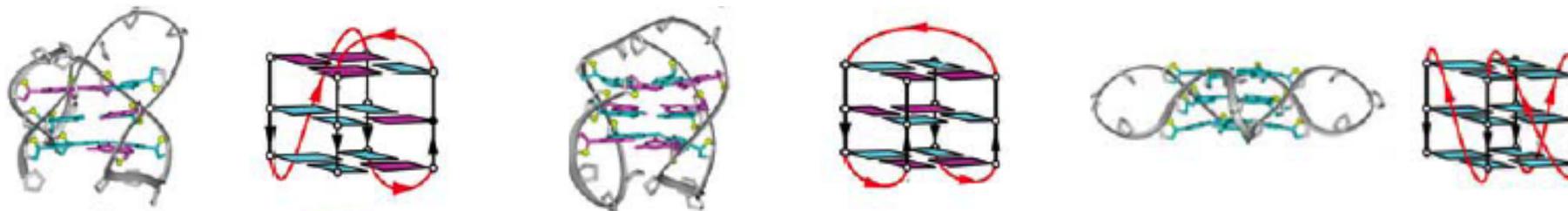
July 31, 2006

Volume 84, Number 31

p. 46

Quadruplex In Its Element

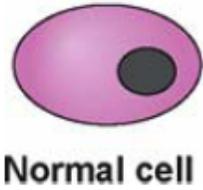
Structures of human telomeric quadruplex in cell-like solution have implications for anticancer therapeutics



Now three groups have determined the folding pattern, or topology, of the human telomeric

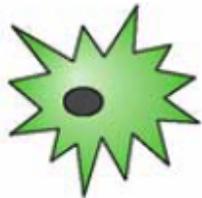
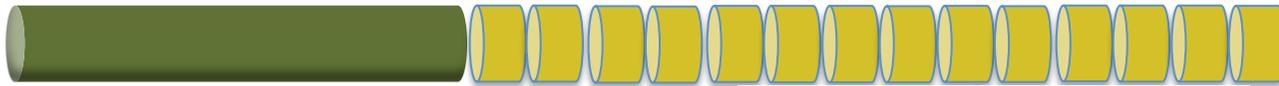
発見したテロメア高次構造は、新しい抗がん剤のターゲットとなることが期待されている (米国化学会 ACS の Chem. & Eng. News で ニュースとして報道)。

before in human telomeric quadruplexes.



Normal cell

正常細胞では、テロメアDNAは細胞分裂のたびに短縮することで、染色体が不安定になり、細胞老化、細胞死が起こる。



Cancer cell

ガン細胞の90%では、テロメラーゼによりテロメアが伸長され、不死化し、その結果、ガン細胞が増殖を繰り返すことが可能になったと考えられる。



テロメラーゼ



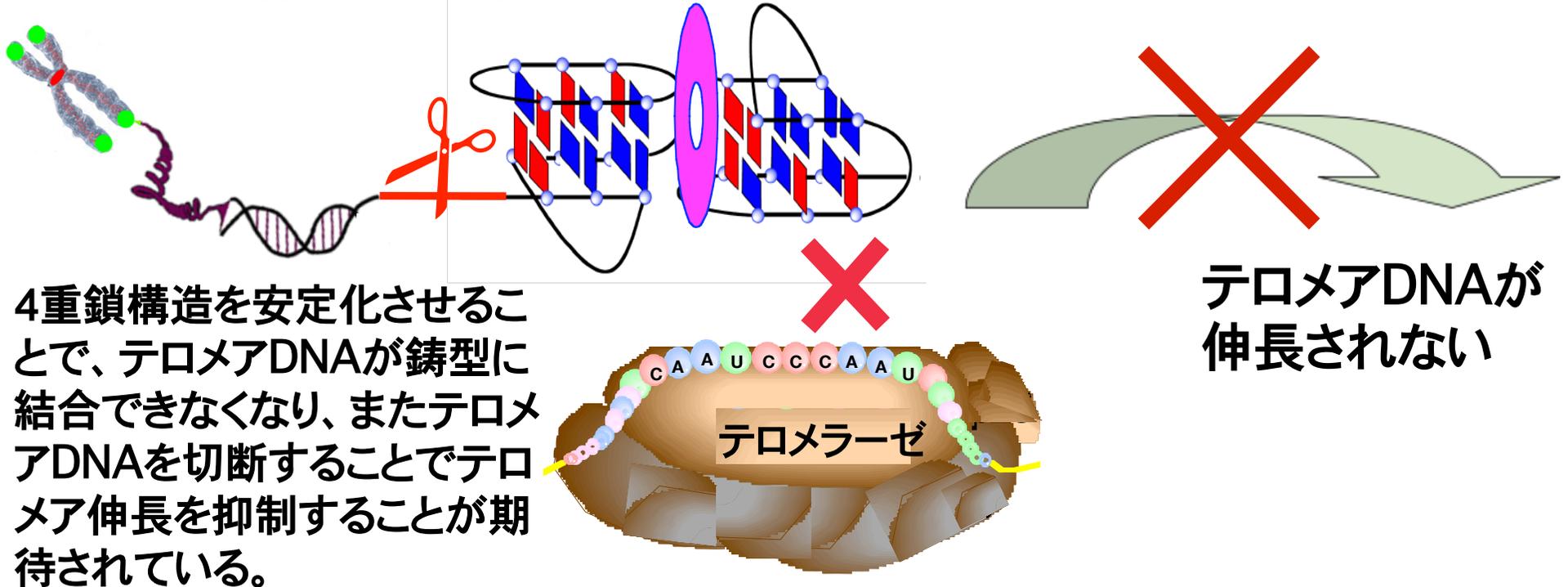
テロメラーゼ

テロメア伸長を抑制 = 抗ガンの可能性

テロメアは抗ガン剤のターゲットとなっている。最近、テロメア伸長を抑制する抗ガン剤が盛んに検討され、新しいガン治療法の開発が期待されている。

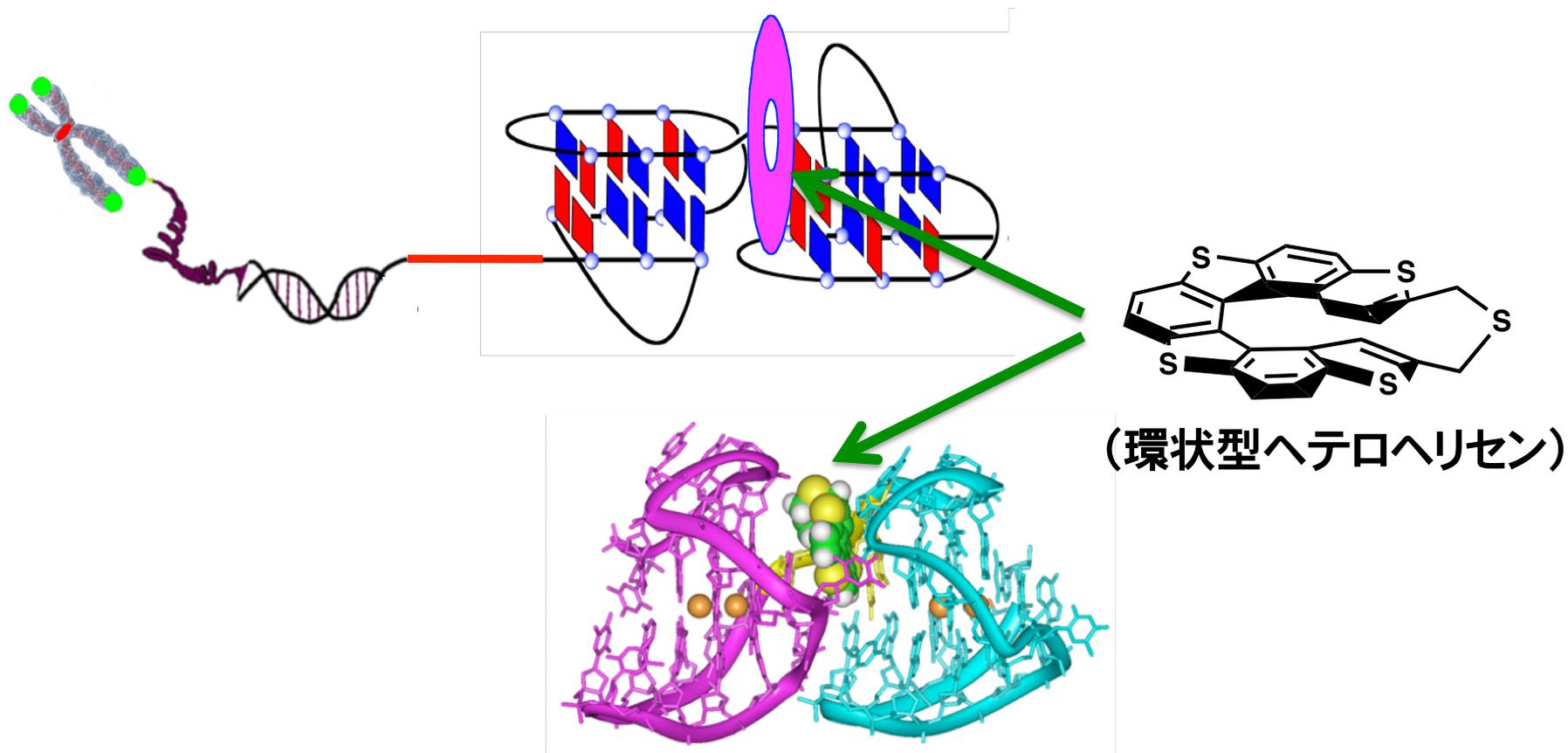
ガン細胞を選択的に死滅する新手法の開発

Anticancer agents



テロメラーゼ活性を阻害する新規小分子の開発

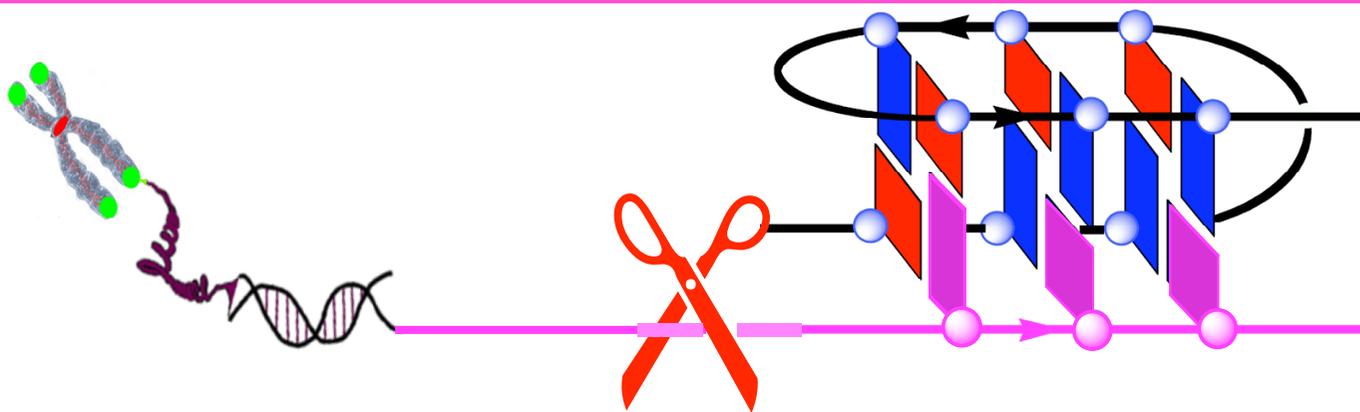
Targeting telomere DNA



4重鎖を安定化することにより、テロメラーゼ活性を阻害する小分子を開発した。

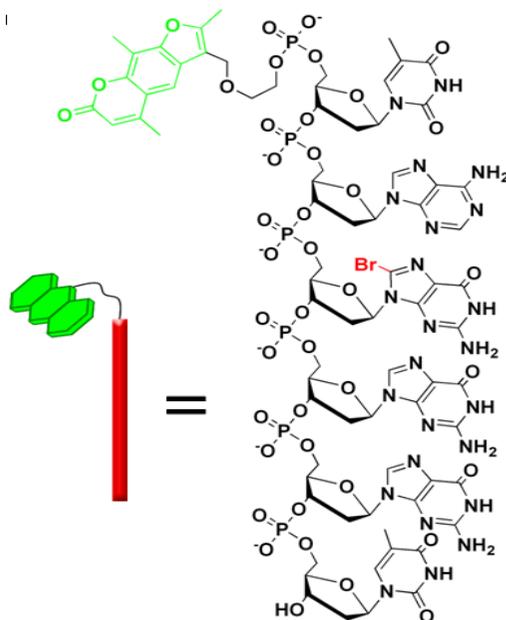
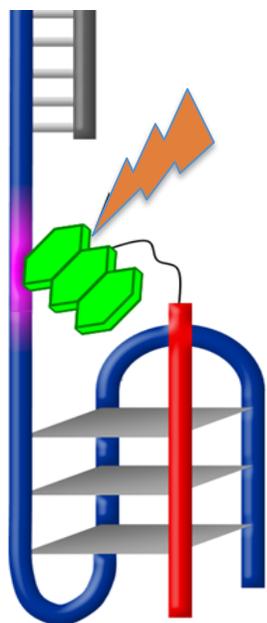
J. Am. Chem. Soc. 2010.

ガン細胞のテロメアDNAを選択的に破壊する分子の設計と合成



4重鎖構造の形成を利用することにより、
テロメアDNAの特異的切断に成功。

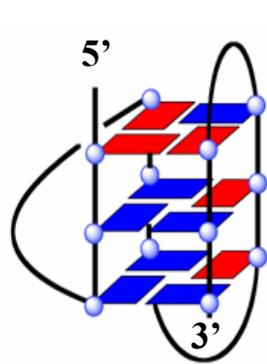
J. Am. Chem. Soc. 2009.



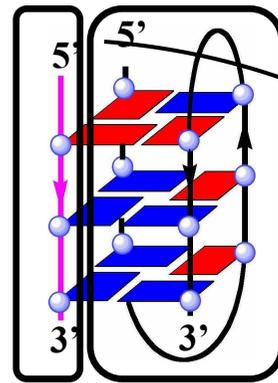
4重鎖構造の形
成を利用するこ
とによるテロメア
DNAの選択的
光架橋に成功。

J. Am. Chem. Soc. 2010.

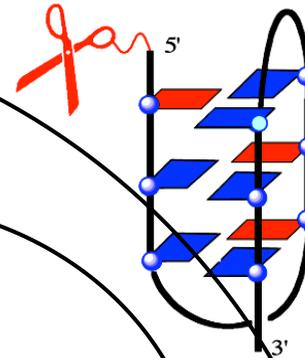
4重鎖構造の形成を利用したテロメアをターゲティングする新手法の開発



4重鎖構造

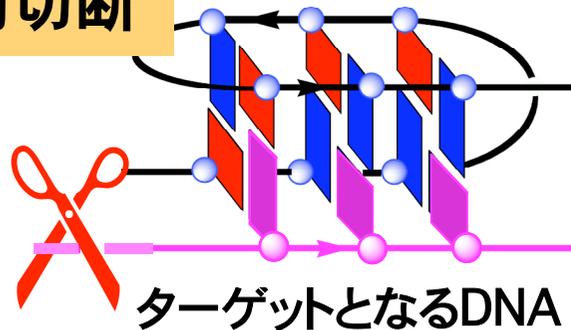
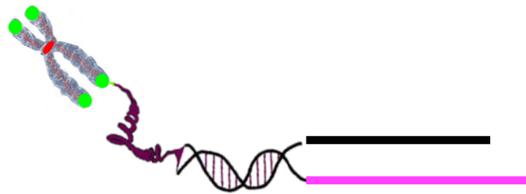


4重鎖構造の形成を利用する

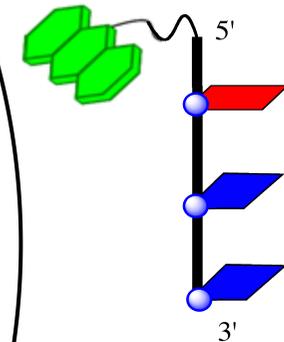


DNAを切断する
分子を含む
プローブ

(i) テロメアDNAを特異的切断

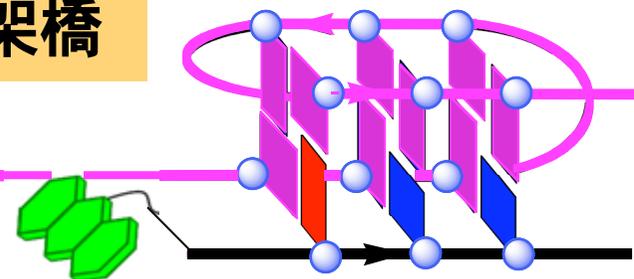
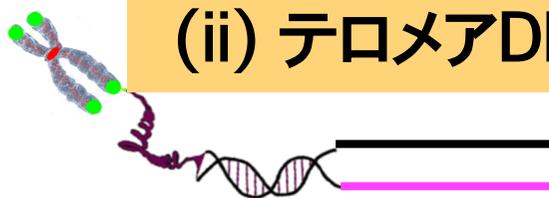


ターゲットとなるDNA



光架橋性分子を
導入したプローブ

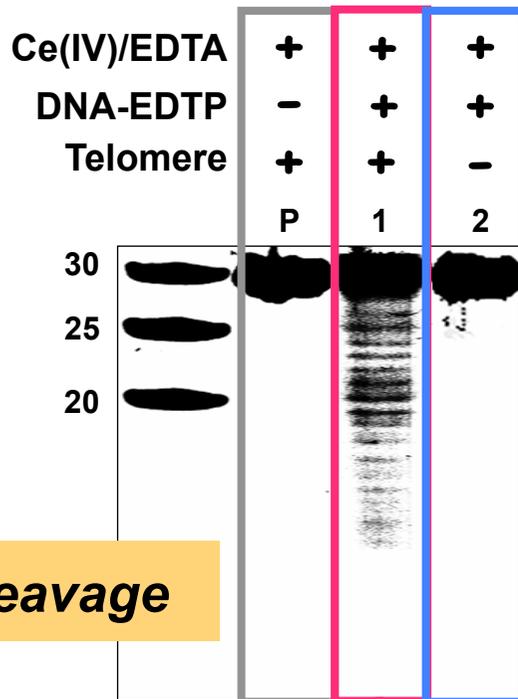
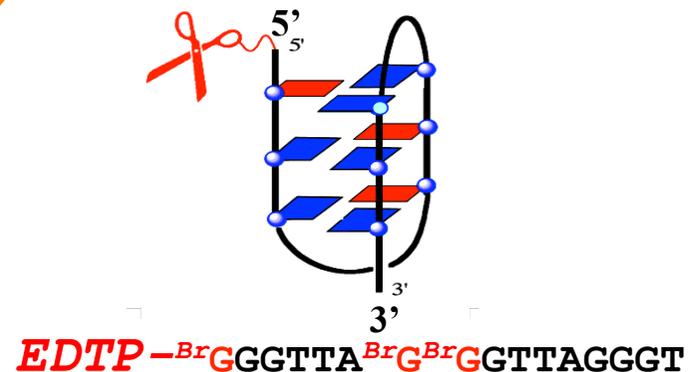
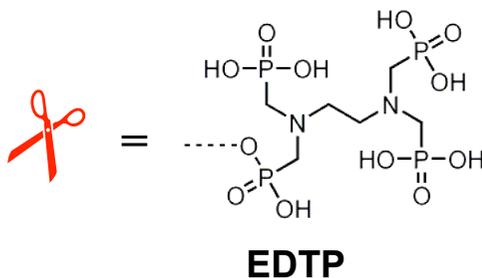
(ii) テロメアDNAを選択的光架橋



テロメアDNAを特異的に切断

Sequence-specific cleaving of telomere DNA

DNA切断
近傍のDNAを加水分解



Conditions: 50°C, 50 h, pH 7.0

Ce(IV)/EDTA 10 μM

テロメアDNAの特異的
切断に成功

HEPES 5 mM

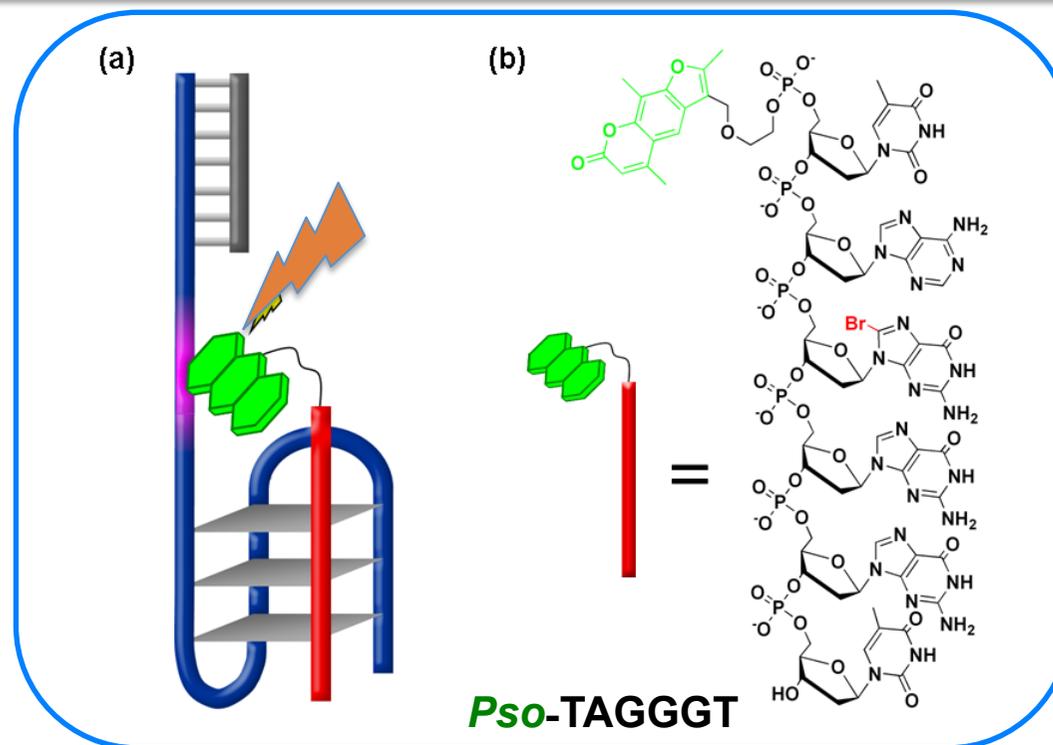
no cleavage

no cleavage

lane 1 : Telomere (+) DNA *FAMCAATTAGAATCAGGAATGGCAGTTAGGGT*

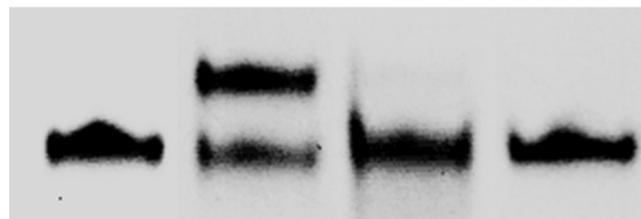
lane 2 : Telomere (-) DNA *FAMCAATTAGAATCAGGAATGGCAGCGTACAG*

4重鎖構造の形成によるテロメアDNAの選択的光架橋



T-1	+	+
$h\nu$	-	+
	1	2

4重鎖構造の形成を利用することにより、
テロメアDNAの選択的光架橋に成功

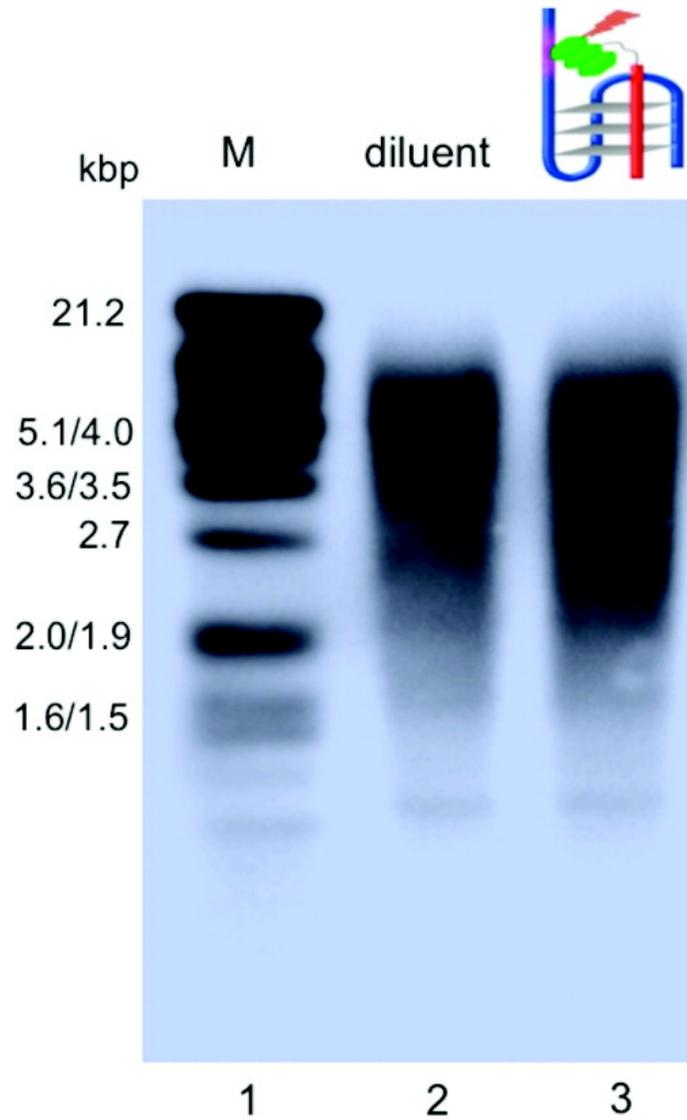


+ 365 nm + 254 nm + T-2

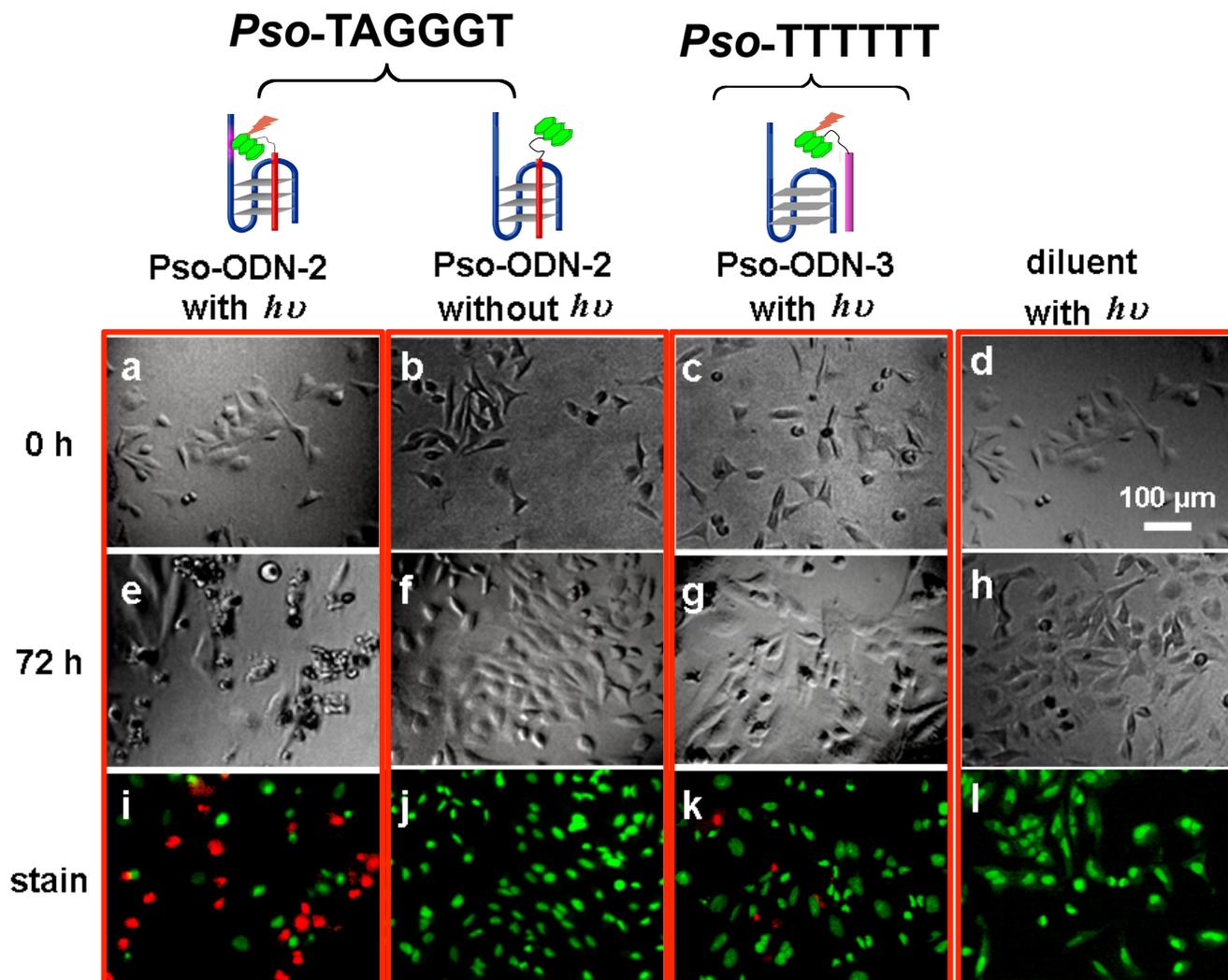
Lane 2: FAM-CAATTAGAATCAGGAATGGC**ATTAGGGTTAGGGTTAGGGT**

Lane 4: FAM-CAATTAGAATCAGGAATGGCAGTGCAGATGTCGACCTAAG

Telomere Length Assay



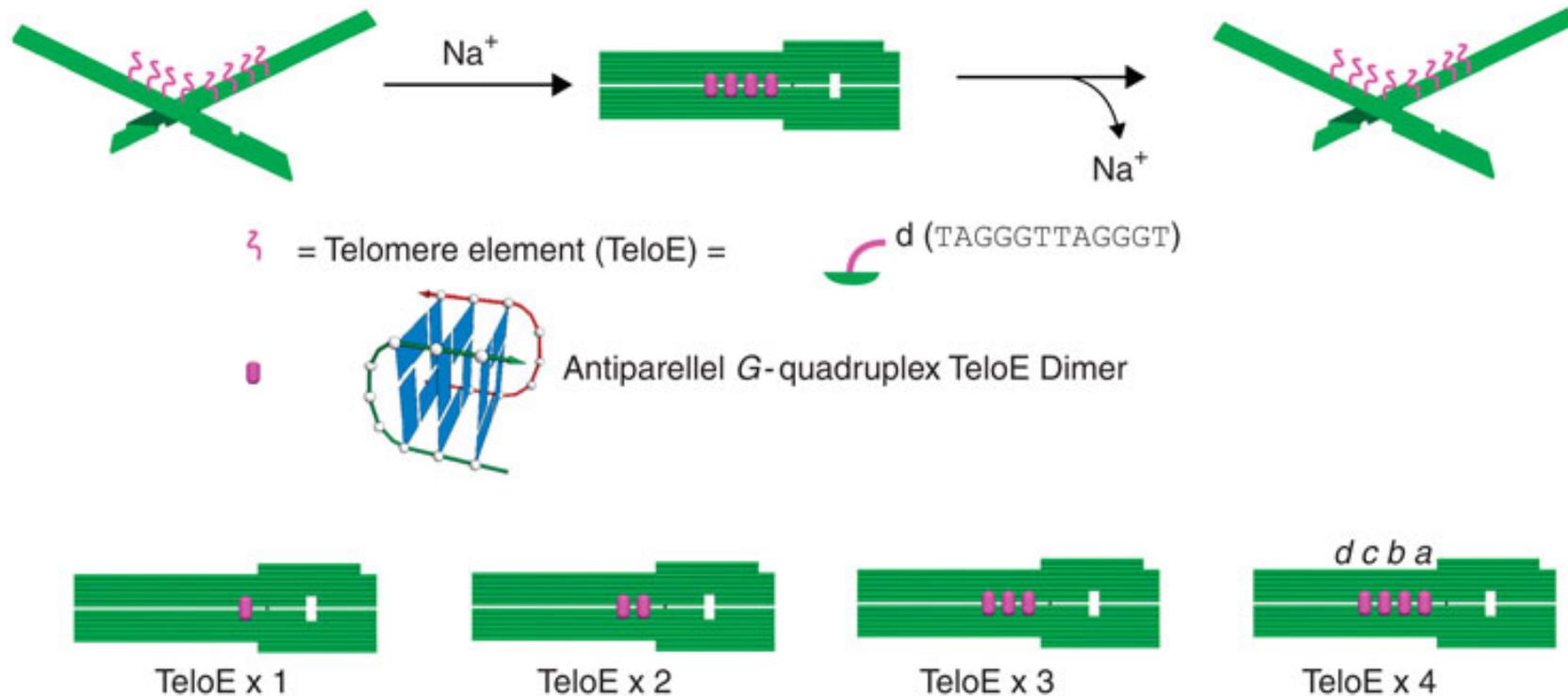
テロメアの光架橋によるガン細胞死の誘導

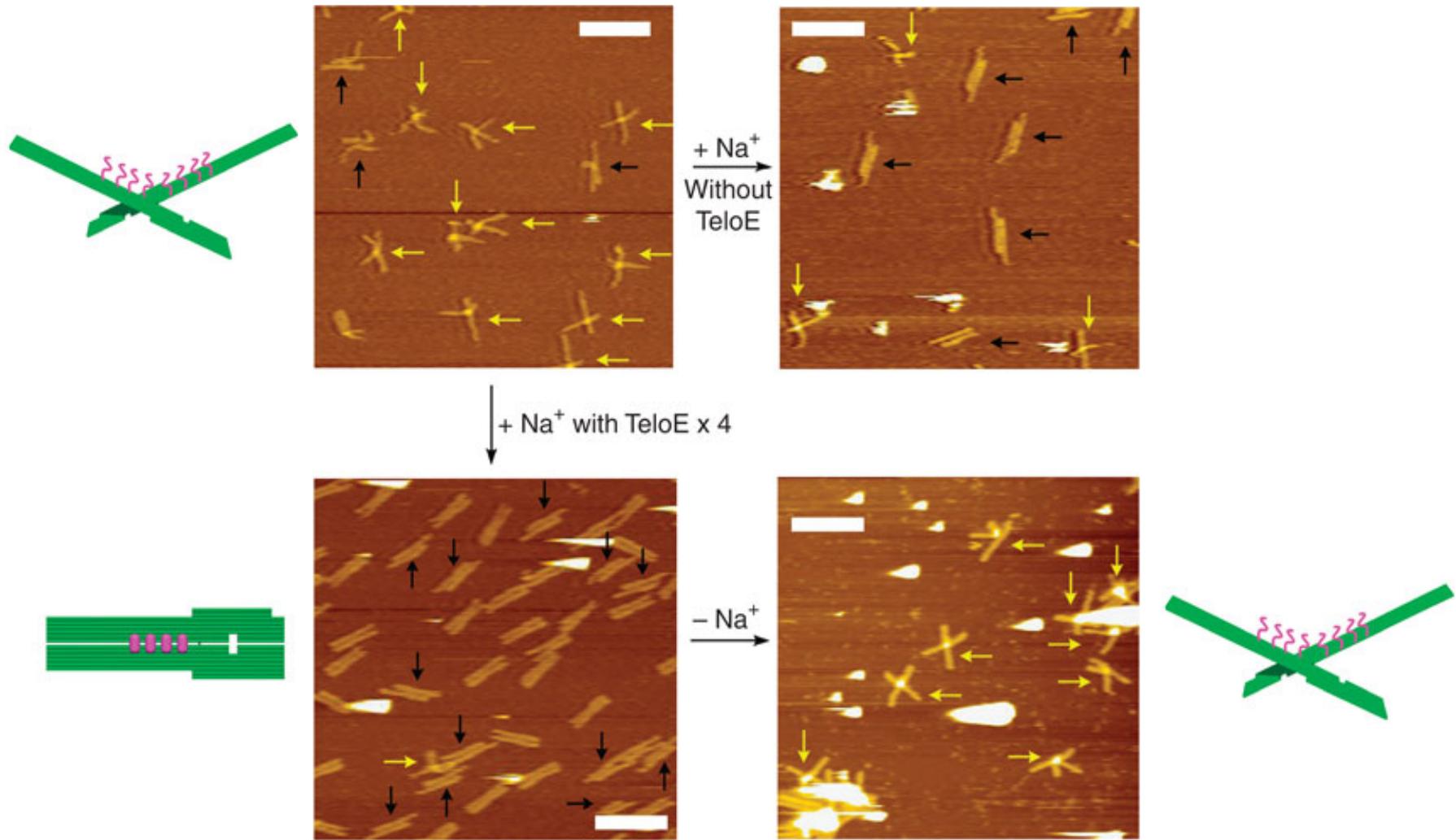


ガン細胞に光を照射すると、当該細胞内だけで光架橋が進行する。その結果、テロメラーゼによるテロメアDNAの異常伸長が阻害され、ガン細胞死が誘導される。

J. Am. Chem. Soc. 2010.

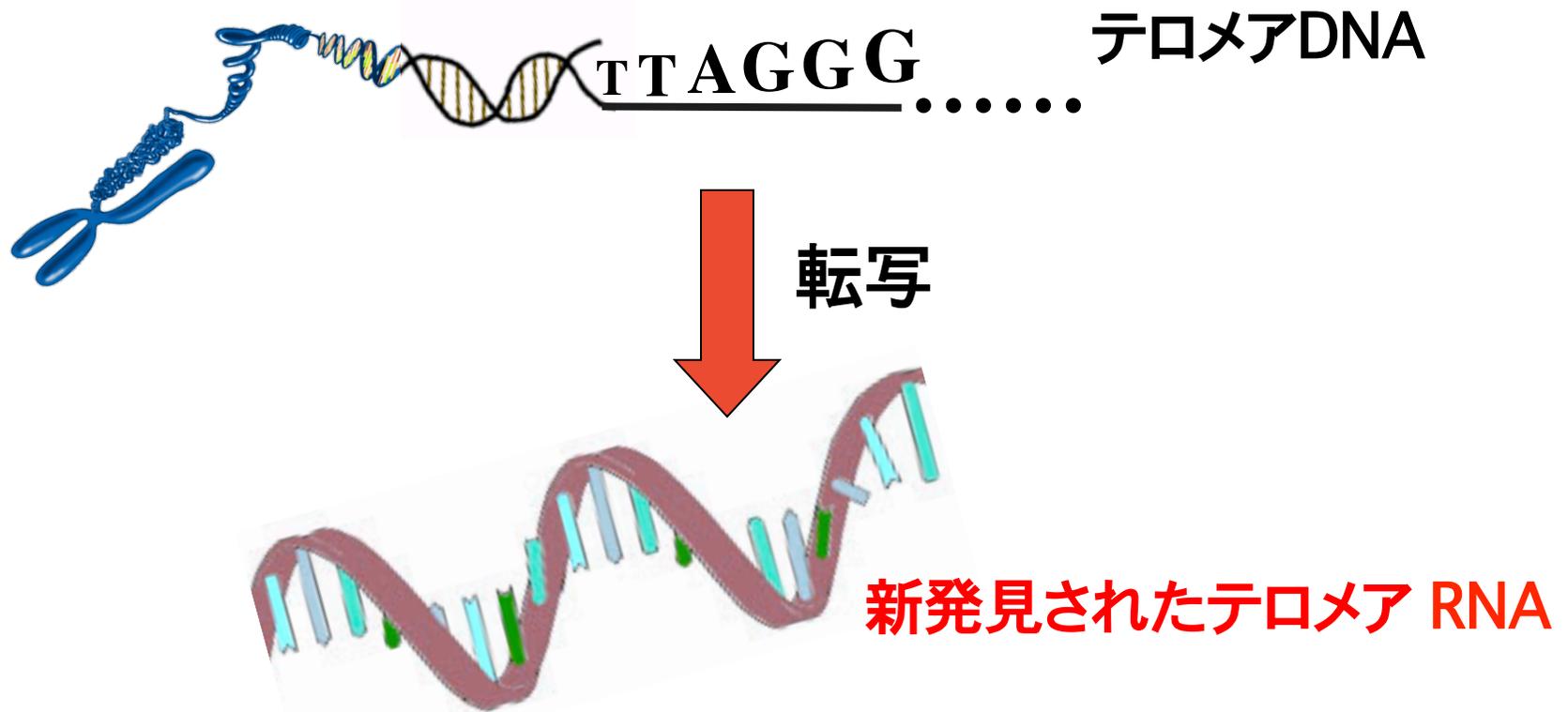
テロメアDNA構造による操作するDNAナノマシンで 生体分子の検出





Nature Commun. 2011 2:449

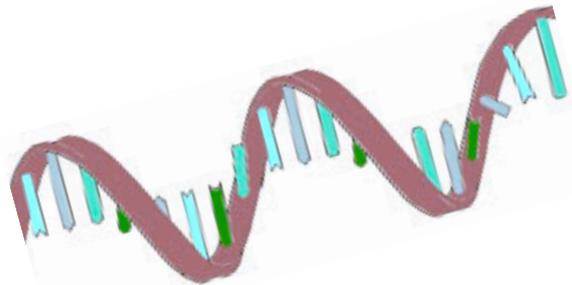
ヒトテロメアRNA



ヒトテロメアRNA(新プレイヤー)の構造と機能？

最近ヒトテロメアRNA分子が生体内に存在することが明らかになった。この発見によって、テロメアRNAが細胞内において重要な役割を果たすことが示唆された。

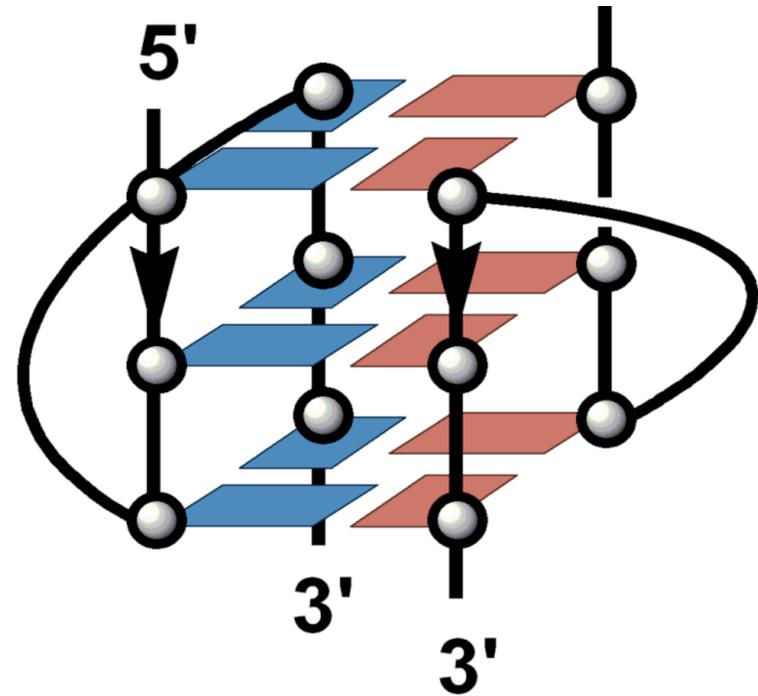
ヒトテロメアRNA4重鎖構造の発見



RNA: r(UAGGGUUAGGGU)

Science 318, 798, 2007.

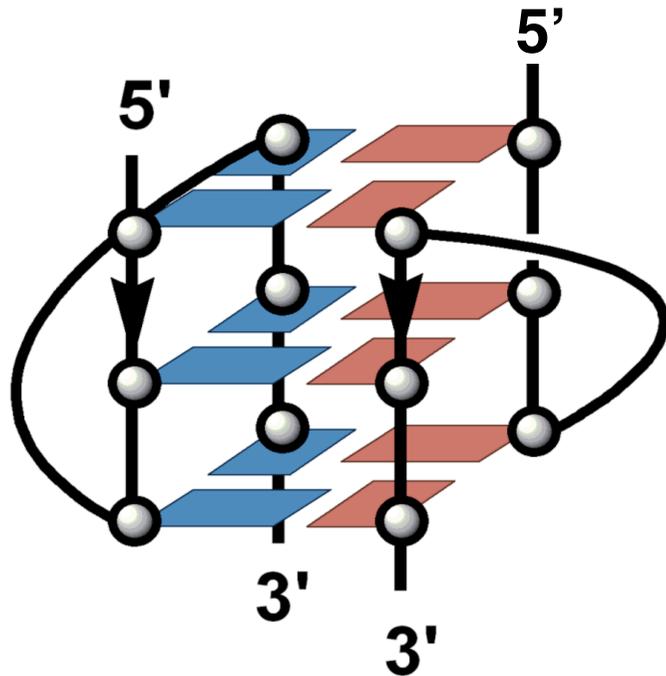
Nat Cell Biol 10, 228, 2008.



ダイマーヒトテロメアRNA4重鎖構造

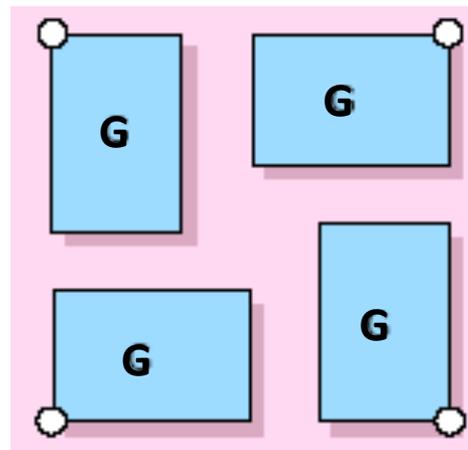
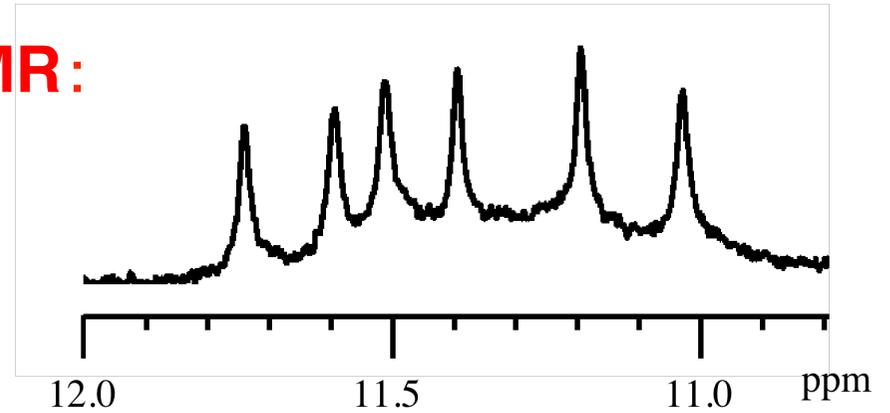
J. Am. Chem. Soc. 2008.

RNA: 5'-r(UAG₁G₂G₃UUAG₄G₅G₆U)-3'

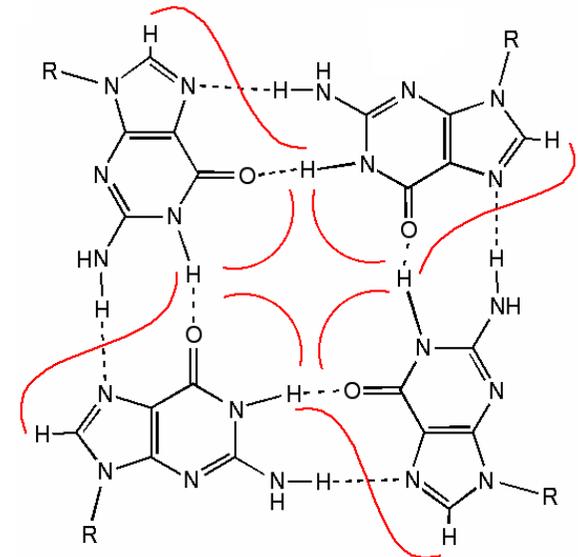


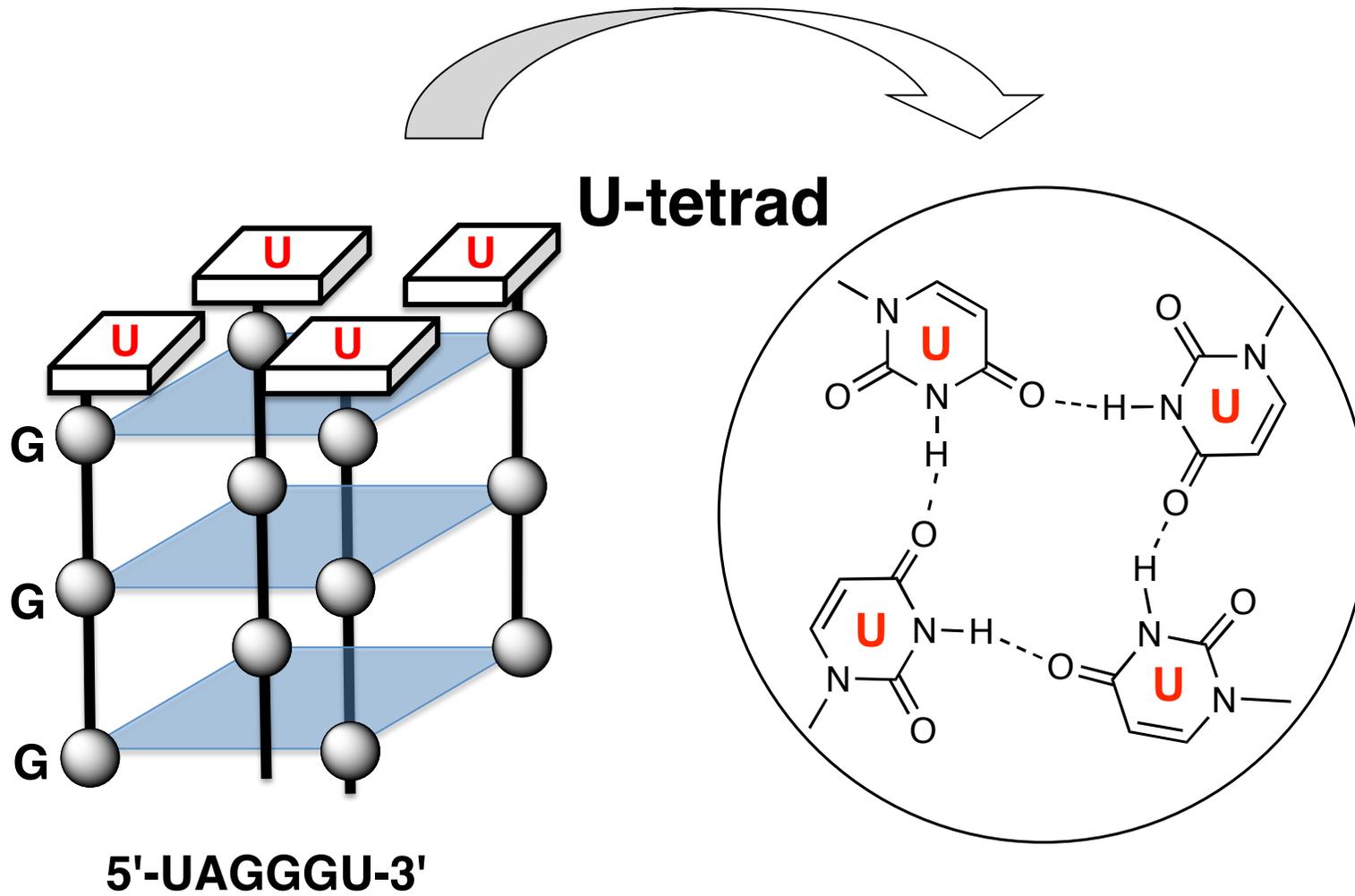
ヒトテロメアRNA
四重鎖構造

NMR:

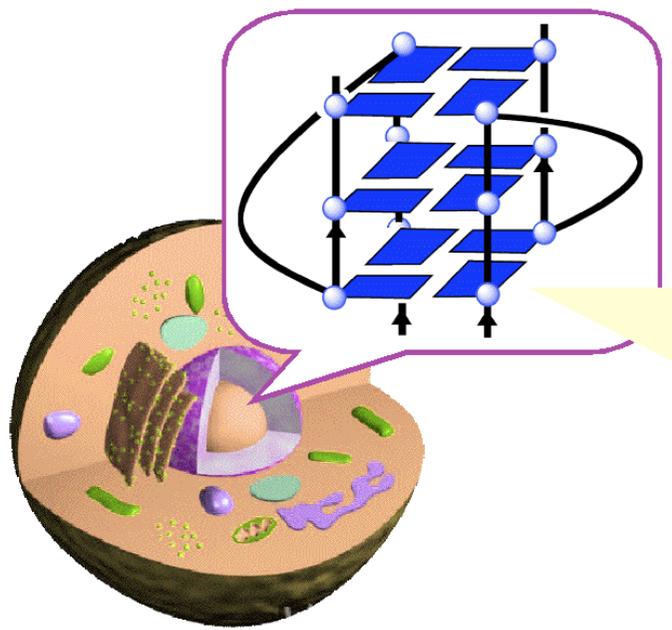


4量体G-カルテット

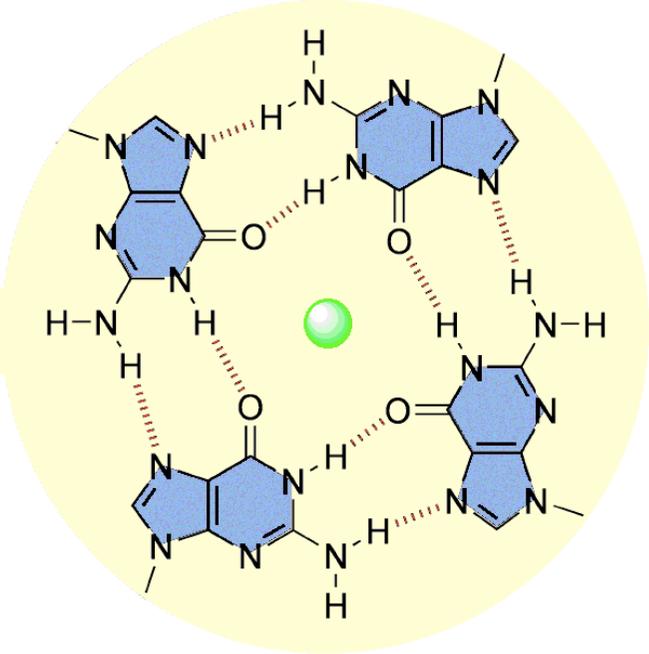




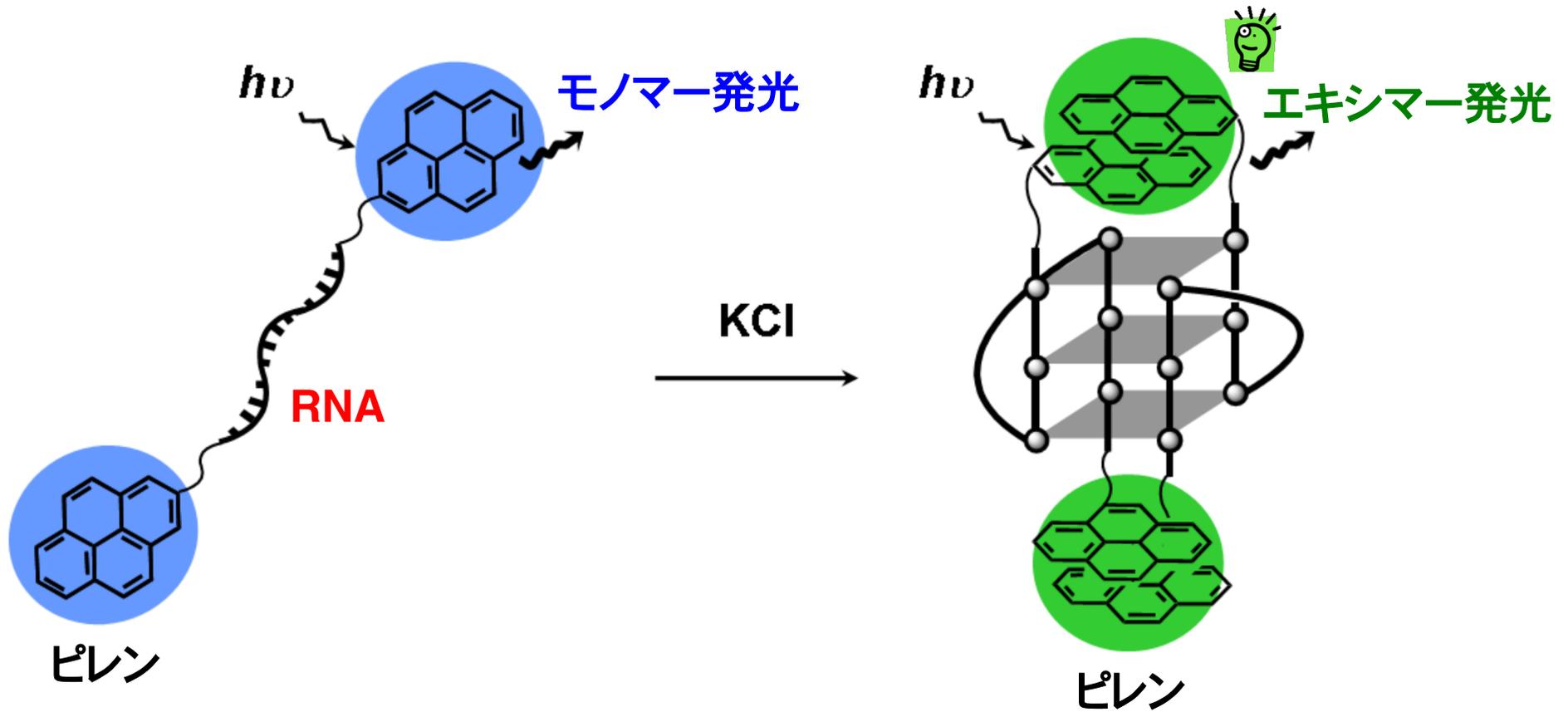
細胞内のヒトテロメアRNAの構造?



細胞

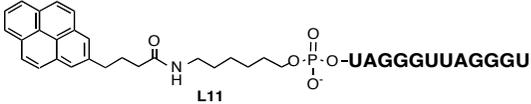
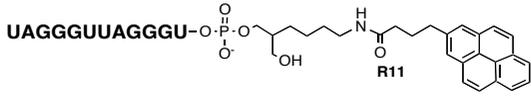
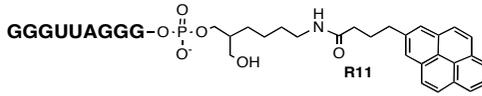


蛍光プローブを用いて、細胞内のテロメアRNA構造の解析

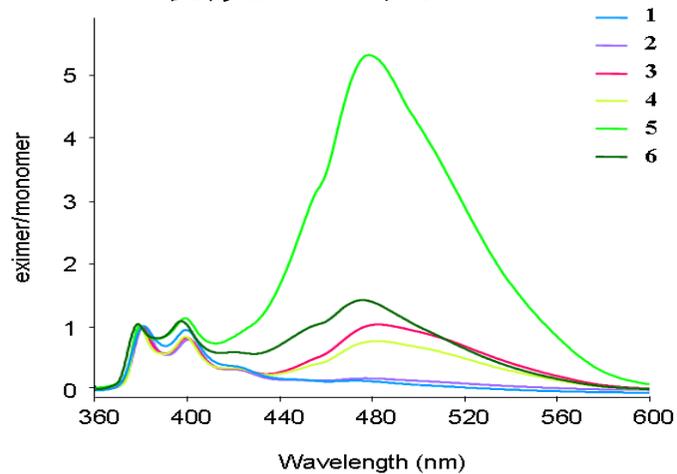


テロメアRNAの5'および3'末端にピレンを修飾した。テロメアRNAが4重鎖構造を形成すると、ピレンがスタッキングしてエキシマー発光を発する。これをプローブとして細胞内における4重鎖構造を可視化した。

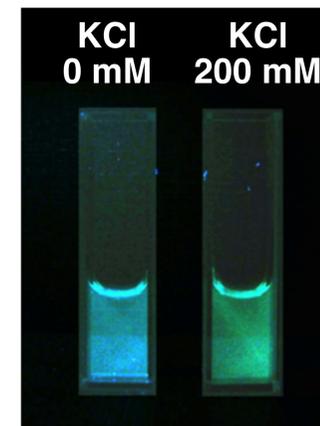
蛍光プローブ分子構造

Name	Structure and Sequence	E/M
1		0.141
2		0.189
3		1.08
4		0.782
5		5.30
6		1.40

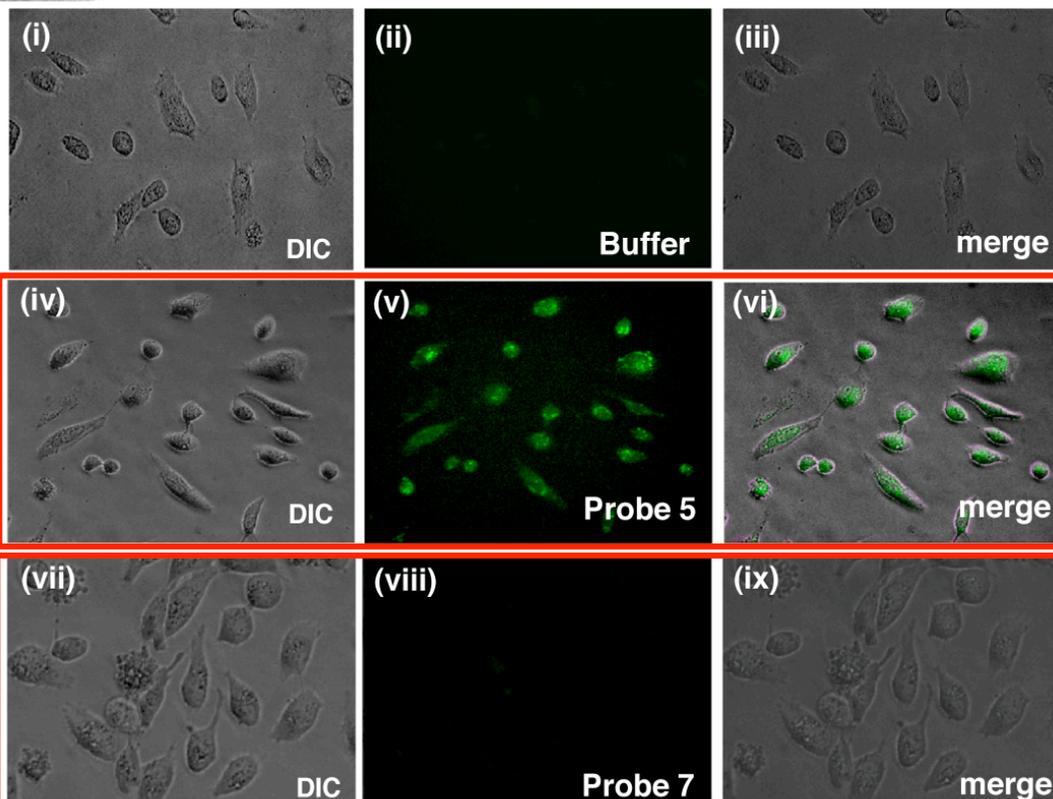
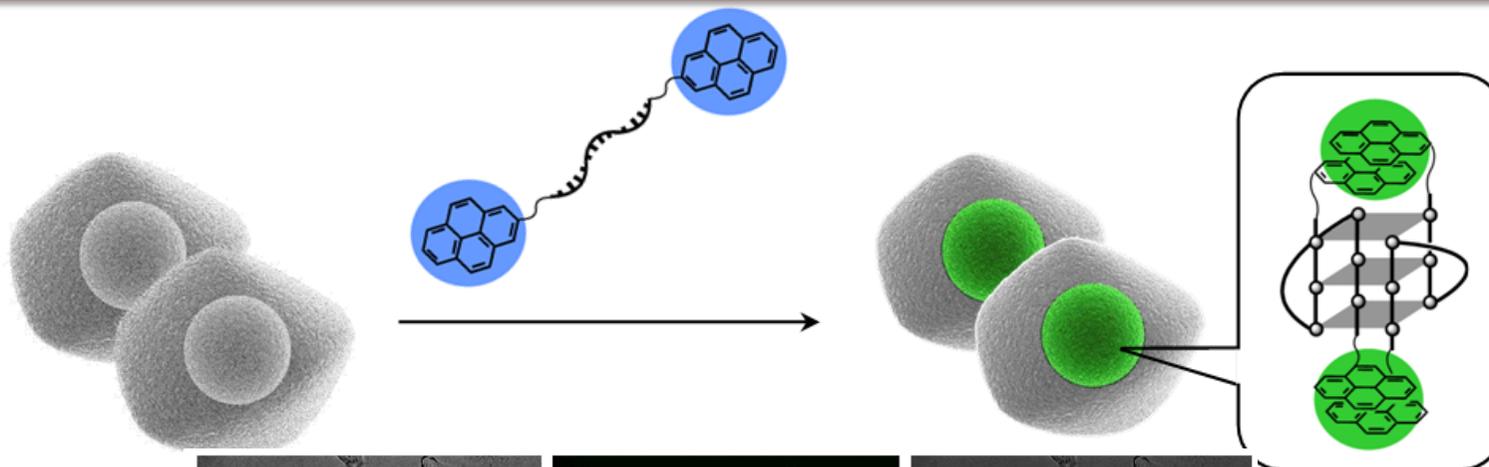
<< 蛍光スペクト >>



<< 蛍光イメージング実験 >>

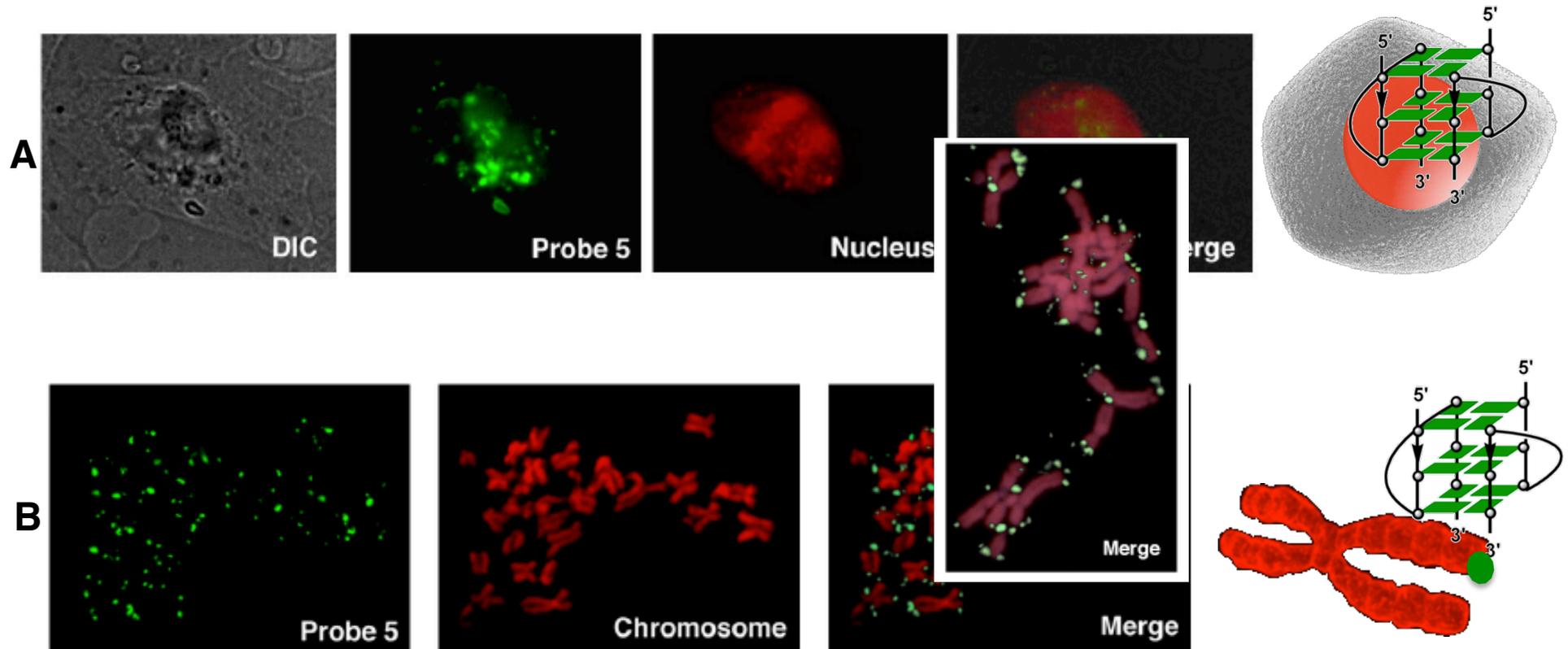


蛍光プローブを用いて細胞内のヒテロメアRNA4重鎖構造を可視化に成功



<<テロメアRNAが細胞内で四重鎖構造をとることを示した>>

細胞内のテロメアRNA4重鎖が存在する位置について

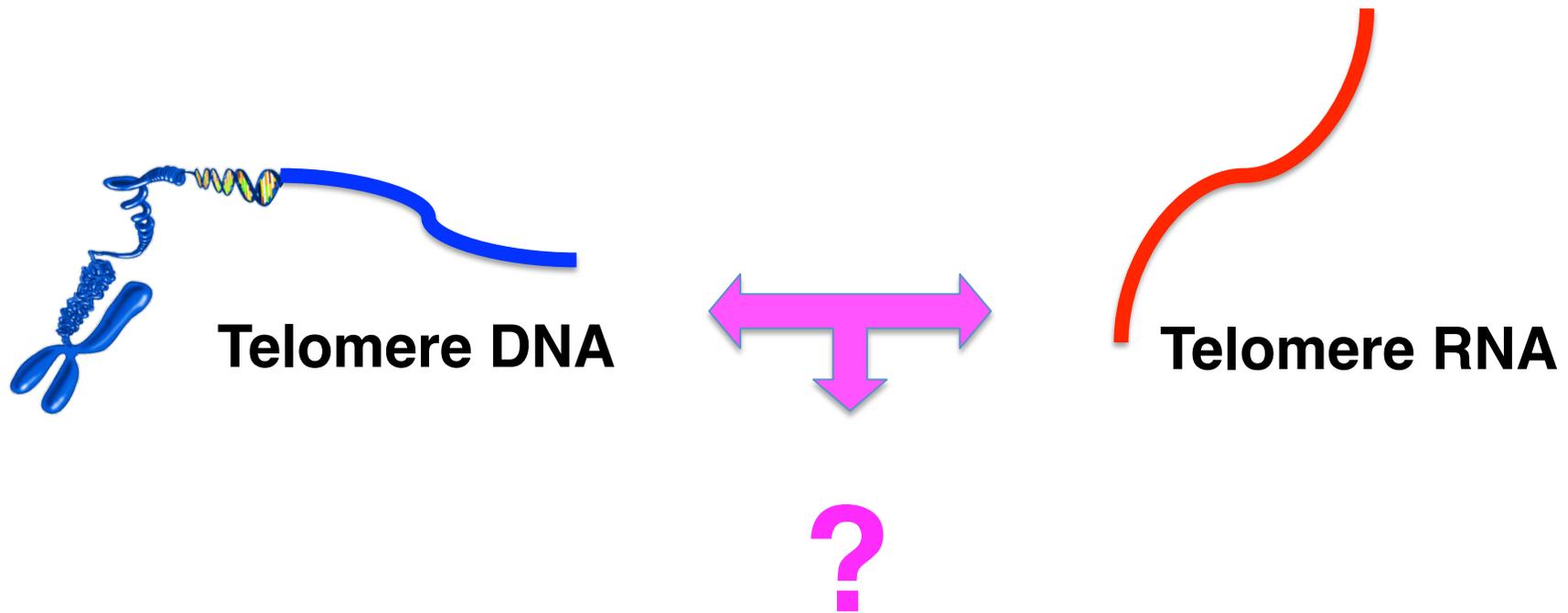


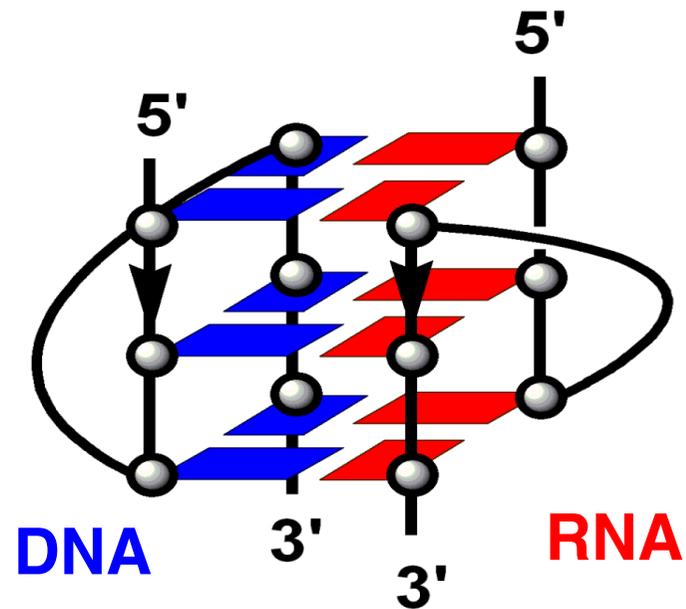
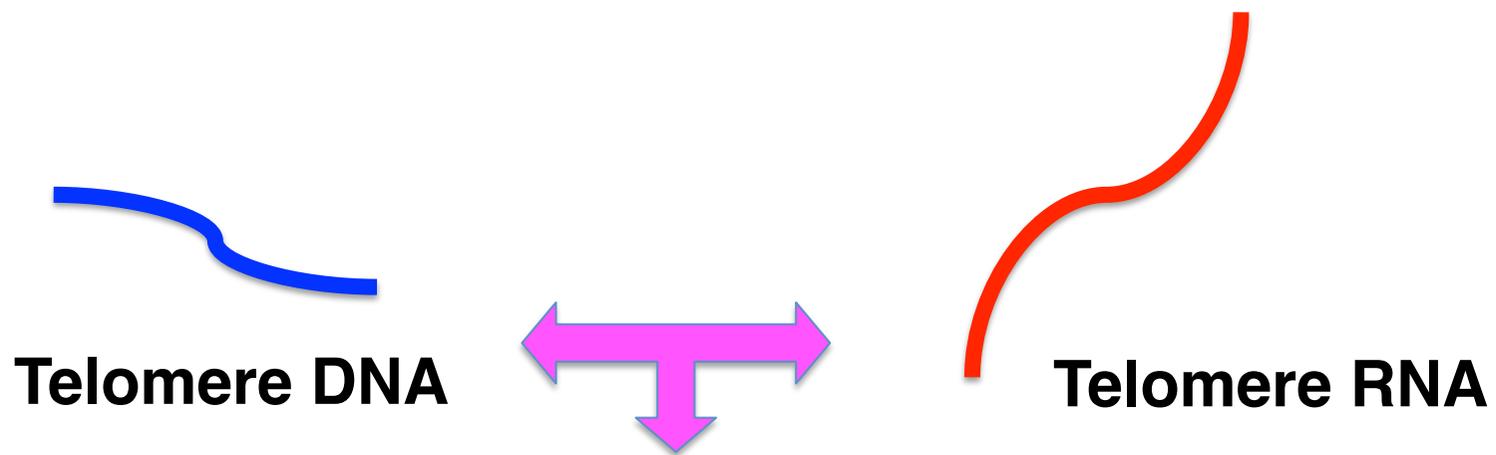
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010.

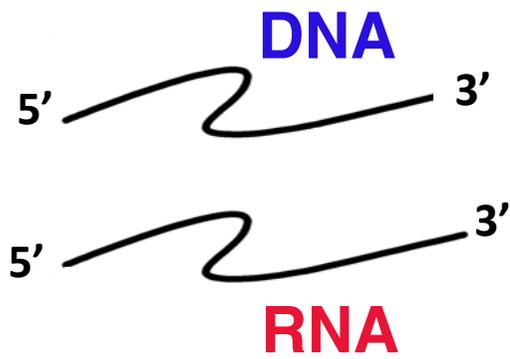
ヒトテロメアRNA四重鎖が細胞核に局在することを明らかにした。さらに染色体末端のテロメアDNAに存在することもわかった。

テロメアRNAはテロメアDNAとどのように関連している？

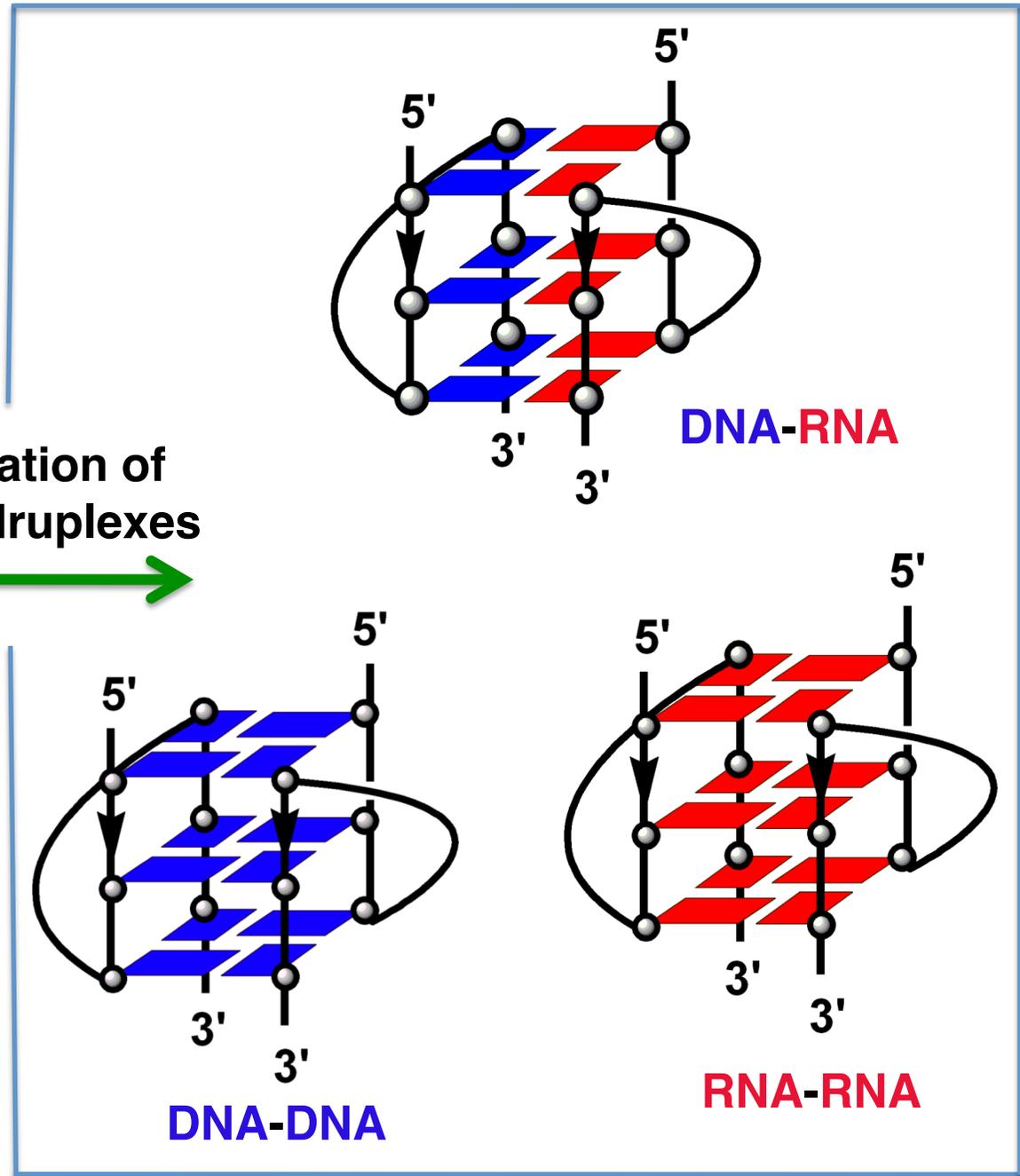
How does telomeric RNA associate with telomeric DNA ?

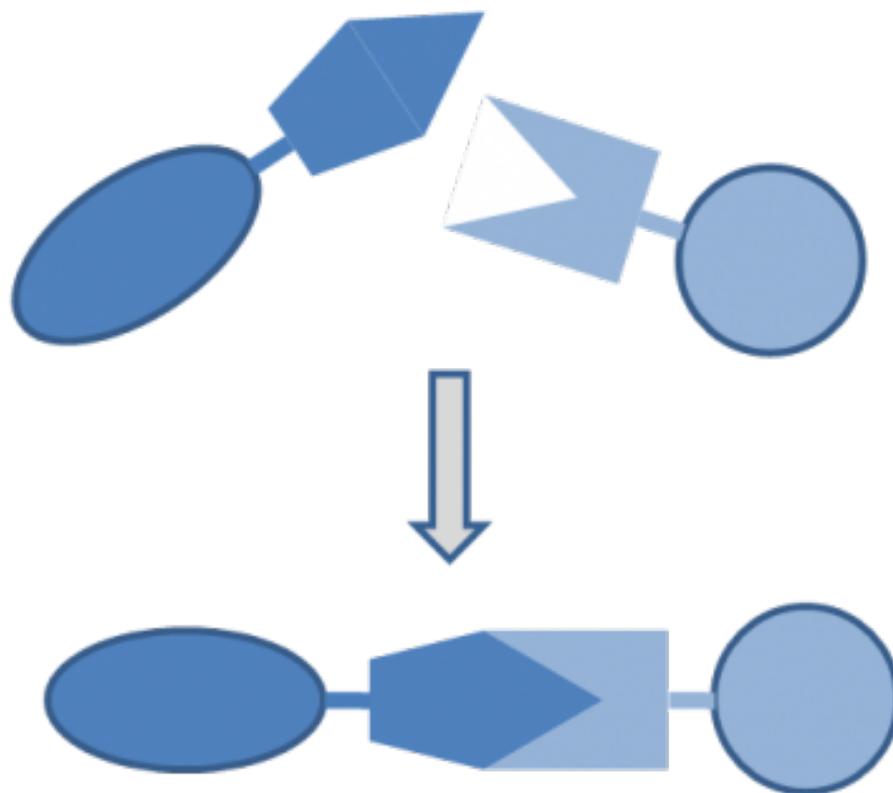
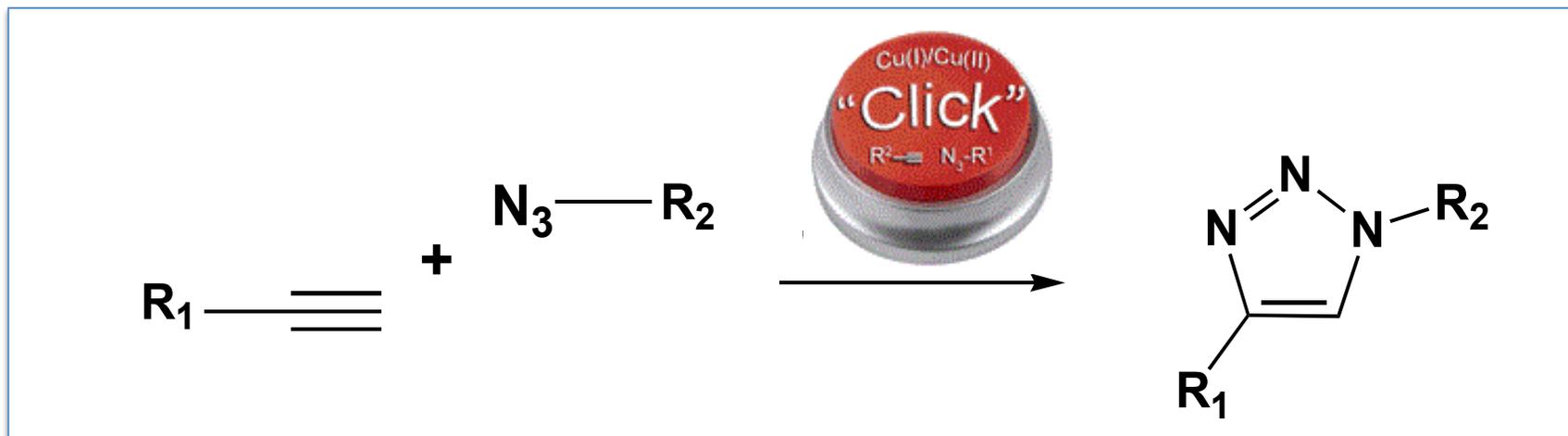






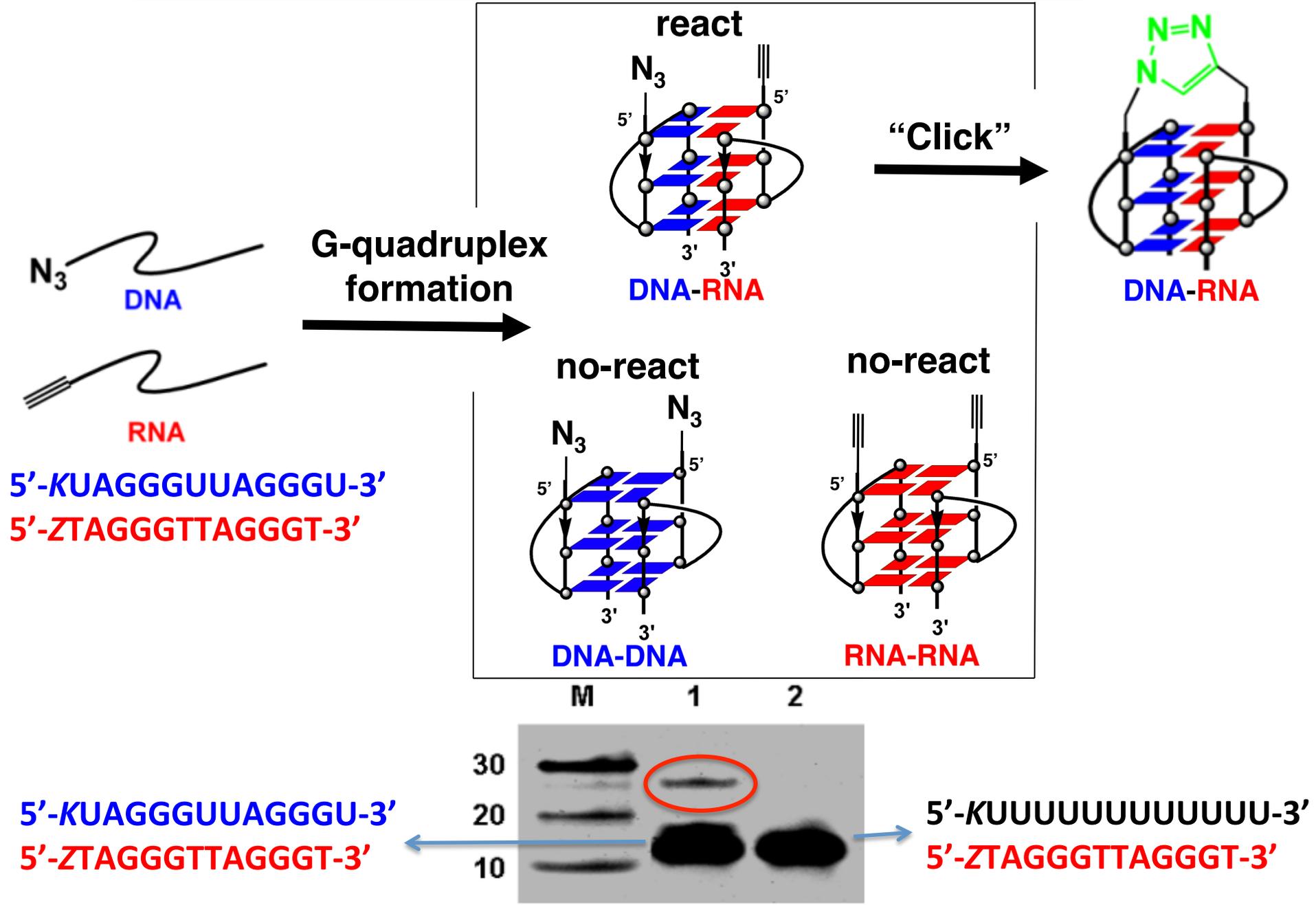
Formation of
G-quadruplexes



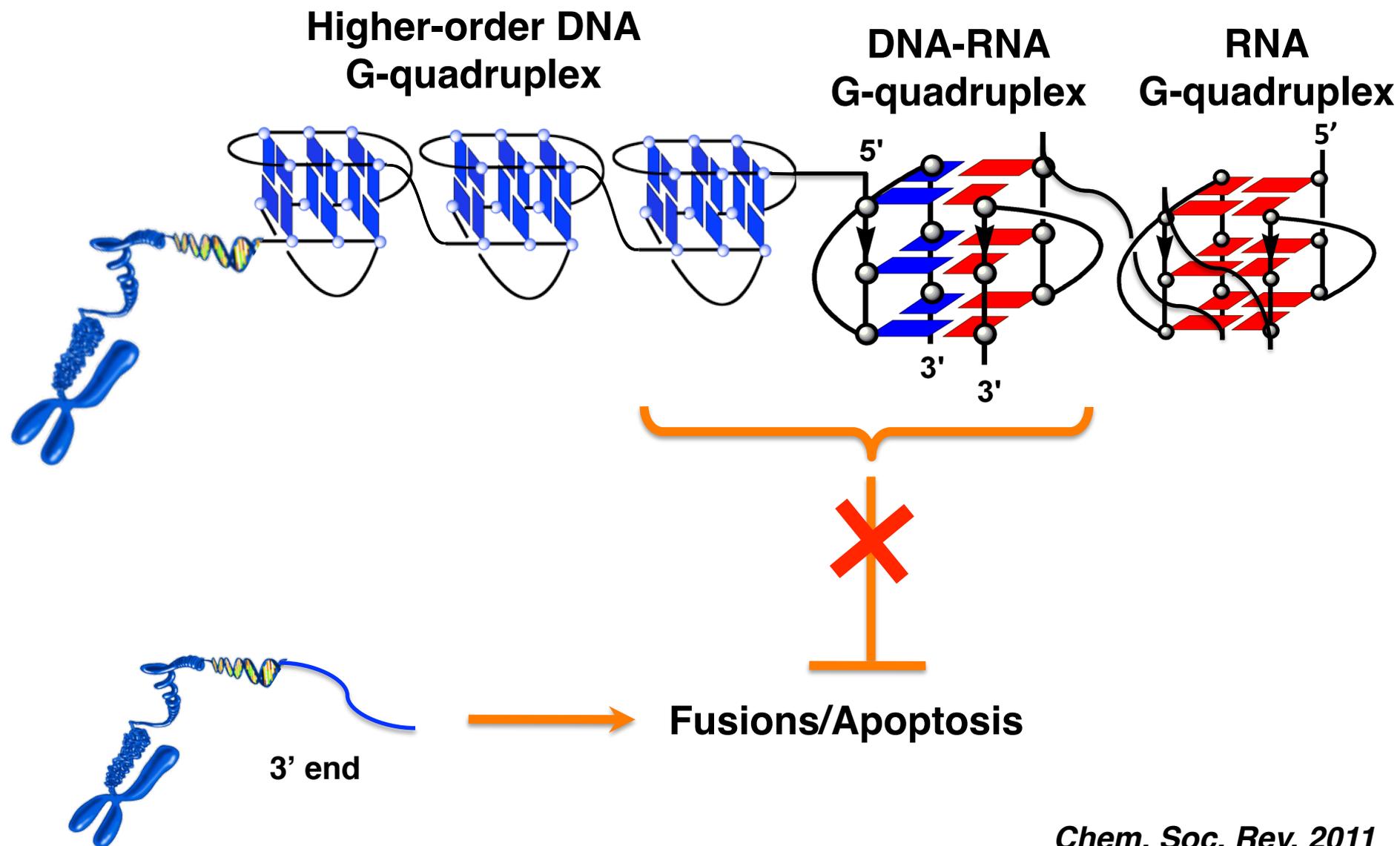


Click !

ヒトテロメアDNA/RNAハイブリッド4重鎖構造

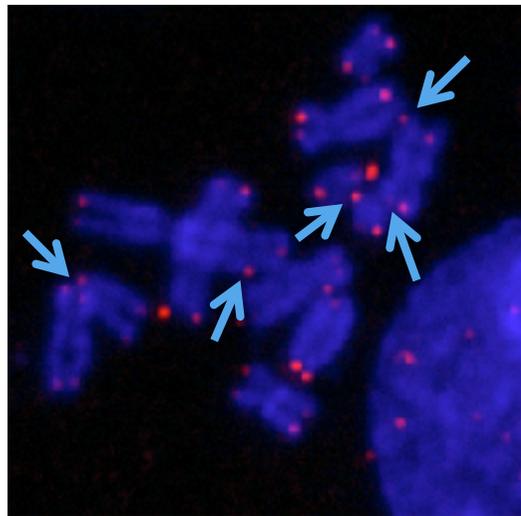


ヒトテロメアモデルの提案

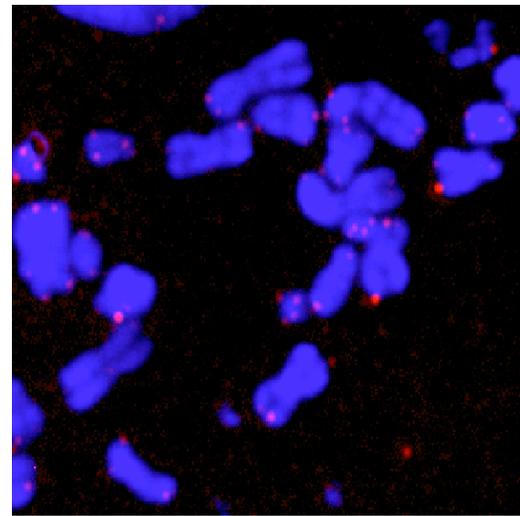


テロメアRNAが染色体末端の融合を防ぐ

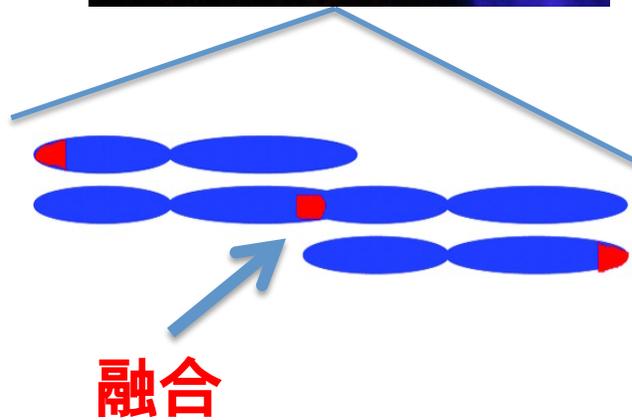
TRF2 Δ B Δ M



TRF2 Δ B Δ M + RNA

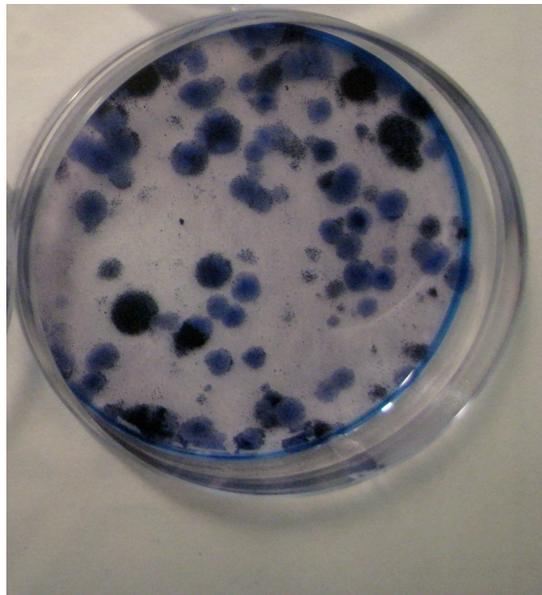


r(UGGGUUAGGGU)

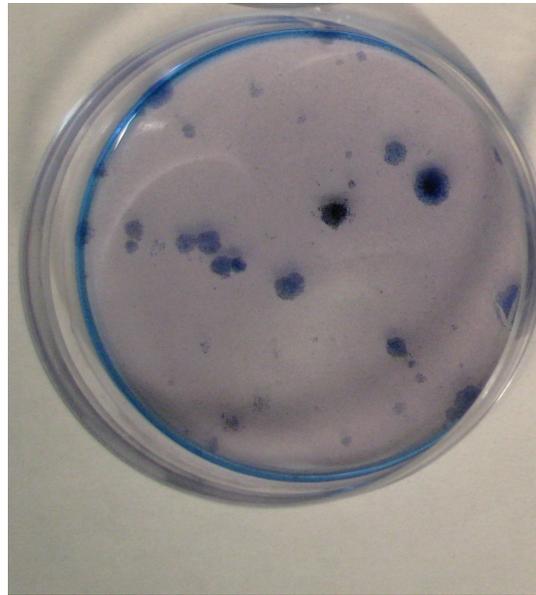


テロメアRNAが細胞増殖に影響する

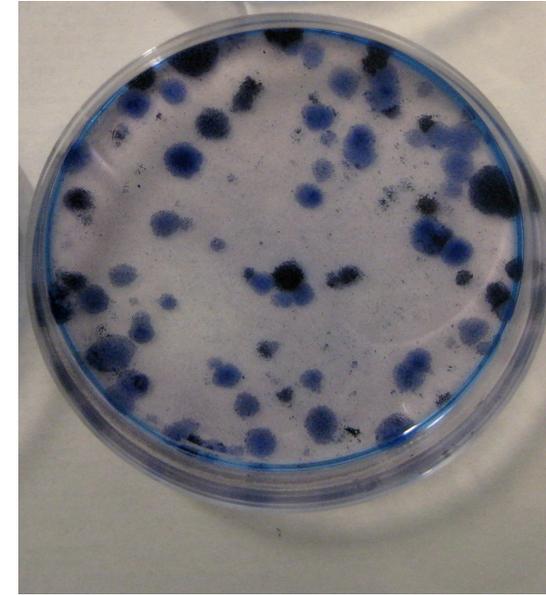
<<細胞増殖アッセイ>>



Buffer



DNA :
d(TAGGGTTAGGGT)



DNA/RNA:
d(TAGGGTTAGGGT)/
r(UGGGUUAGGGU)

まとめ:

(1) ヒトテロメアDNAとRNA4重鎖構造の発見

生体有機化学的アプローチを用いることにより、世界で初めて

1. ヒトテロメアDNA4重鎖構造を発見した
2. 長鎖テロメアDNAが連続的に4重鎖構造を形成する高次構造を発見した
3. ヒトテロメアRNA4重鎖構造を発見した
4. 細胞内のヒトテロメアRNA4重鎖構造を可視化することに成功した

1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 14579, 2010.
2. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 7231, 2010.
3. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 7833, 2009.
4. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 3281, 2009.
5. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 11179, 2008.
6. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 16470, 2008.
7. *FEBS Journal* 274, 3545, 2007.
8. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 1275, 2007.
9. *Nature Protocols* 2, 78, 2007.
10. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5584, 2006.
11. *Nucleic Acids Res.* 34, 949, 2006.
12. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 3281, 2006.
13. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 44, 2005.
14. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6274, 2004.
15. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 13519, 2003.
16. *J. Biol. Struct. & Dyn.* 20, 437, 2002.

(2) ヒトテロメアDNAとRNA高次構造の応用

1. テロメアDNAの4重鎖を安定化することで、テロメラーゼ活性を阻害する小分子を開発した
2. ガン治療のターゲットとして注目されているヒトテロメアDNAの特異的切断に成功した
3. 光架橋を利用することで、ヒトテロメアDNAの選択的光架橋に成功した
4. テロメアDNA構造による操作するDNAナノマシンで生体分子の検出に成功した

1. *Nature Commun.* 2:449, 2011.
2. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 631-637, 2010.
3. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 3778-3782, 2010.
4. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 2871-2874, 2009.
5. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6566-6567, 2004.
6. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11017-11023, 2004.