

甲南大学 博士学位論文

がん悪性化を惹起する  
RAS シグナルに対する制御法の探索と解析

甲南大学大学院  
フロンティアサイエンス研究科 生命化学専攻

杉本 渉

2022 年 2 月

## 目次

第1章 要旨 .....	1
第2章 緒言 .....	2
第3章 RAS が惹起する細胞の浸潤・転移に関わるアクチン動態の制御機構の解明 ...	5
3-1 序論	
3-2 実験方法	
3-2-1 細胞培養とレトロウイルス感染	
3-2-2 プラスミドおよび抗体と試薬調製	
3-2-3 ウェスタンブロッティング	
3-2-4 蛍光免疫染色	
3-2-5 ミトコンドリア膜電位の解析	
3-3 結果と考察	
3-3-1 がん遺伝子 <i>RAS</i> 発現細胞におけるラメリポディア形成および $\beta$ -アクチン切断 に対する NF- $\kappa$ B の役割	
3-3-2 がん遺伝子 <i>RAS</i> による $\beta$ -アクチン切断に関わる p38 MAPK のミトコンドリア 移行に対する NF- $\kappa$ B の役割	
3-3-3 がん遺伝子 <i>RAS</i> が制御する $\beta$ -アクチン切断に対するミトコンドリアに局在す る NF- $\kappa$ B の役割	
3-4 結論と展望	
第4章 RAS が惹起する細胞の浸潤・転移に関わる <i>TMPRSS2/ERG</i> の新たな遺伝子発現 制御機構の解明 .....	15
4-1 序論	
4-2 実験方法	
4-2-1 試薬調製	
4-2-2 蛍光スペクトル測定	
4-2-3 円二色性スペクトル測定	
4-2-4 T7 ポリメラーゼを用いた <i>in vitro</i> 転写反応	
4-3 結果と考察	
4-3-1 <i>TMPRSS2</i> 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される核酸の二次構造	

4-3-2	<i>TMPRSS2</i> 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される G4 が転写に与える影響	
4-3-3	<i>TMPRSS2</i> 遺伝子の鋳型鎖が形成する二次構造の分子内競合とその役割	
4-4	結論と展望	
第5章	フタロシアニン誘導体を用いた <i>RAS</i> の遺伝子発現制御法の確立	30
5-1	序論	
5-2	実験方法	
5-2-1	試薬調製	
5-2-2	円二色性スペクトル測定	
5-2-3	吸収スペクトル測定	
5-2-4	解離定数の算出	
5-2-5	細胞培養	
5-2-6	光照射実験	
5-2-7	ROS の検出	
5-2-8	蛍光顕微鏡	
5-2-9	蛍光スペクトル測定	
5-2-10	ZnAPC によるオリゴヌクレオチドの分解	
5-2-11	ZnAPC による DIG 修飾 RNA の分解	
5-2-12	蛍光寿命の算出	
5-2-13	定量的逆転写 PCR	
5-2-14	ウェスタンブロッティング	
5-3	結果と考察	
5-3-1	G-quadruplex を標的としたフタロシアニン誘導体の結合選択性	
5-3-2	ZnAPC を用いた <i>NR4S</i> mRNA の光分解とタンパク質発現抑制	
5-3-3	ZnAPC の RNA 光分解メカニズムの解明とその応用	
5-4	結論と展望	
第6章	結言	54
6-1	総括	
6-2	本研究の意義	
参考文献		59
謝辞		63
業績リスト		64

## 第1章 要旨

様々なシグナル経路を活性化するハブとして機能し、細胞の生存や増殖を制御する RAS は、多くのがん細胞で恒常的に活性化し、がんの悪性を誘導する。そのため、RAS の分子標的薬は有効性の高いがん治療薬になると考えられており、世界中で研究開発が行われてきた。しかし、タンパク質の構造的な特徴などから開発が進まず、RAS は現在“Undruggable”なタンパク質であることが広く認知されている。そこで、RAS シグナル経路の上流や下流で作用する分子を標的とした薬剤の開発が進められてきたが、RAS は多様なシグナル経路を活性化するため、単一のシグナル経路を阻害しても、他のシグナル経路が活性化し、がん細胞が薬剤耐性を獲得することが喫緊の課題となっている。そのため、RAS を直接標的にできる薬剤の開発は依然として強く望まれている。一方、RAS シグナルを標的とした分子標的薬などの多剤併用療法は、がんに対して高い治療効果をもつことがわかってきており、RAS シグナル経路を制御する薬剤の開発および新規創薬標的分子の同定への期待も大きい。

そこで本研究では、RAS シグナル経路における新規創薬標的分子の同定を目的として、RAS が惹起するがん細胞の浸潤・転移において重要な役割を果たす細胞移動に直接的に関わるアクチン動態制御機構の解明、また浸潤・転移の前に引き起こる上皮間葉転換に関わる *TMPRSS2/ERG* の発現制御機構の解明を試みた。さらに、分子標的が困難な RAS の活性を制御する新たな手法として、RAS をコードする mRNA に選択的に結合するフタロシアニン誘導体を用いた RAS の発現抑制方法について検討した。

第3章では、RAS による浸潤・転移に関わるアクチン動態の制御機構の解明を目的として、がん抑制因子 p53 の不活性化にともないがん遺伝子 *RAS* が誘導するアクチン線維構造の一つであるラメリポディアの形成機構において、NF- $\kappa$ B が重要な分子であることを同定した。第4章では、*TMPRSS2/ERG* の発現制御において、*TMPRSS2* 遺伝子のエクソン2で形成される四重鎖構造が、転写活性を制御するスイッチとして機能している可能性を明らかにした。第5章では、光増感能を有するフタロシアニン誘導体 zinc phthalocyanine tetrasulfonate (ZnAPC) が、光照射依存的に RAS の発現を抑制することを明らかにした。ZnAPC は、*RAS* mRNA の 5'UTR 領域で形成される四重鎖構造に選択的に結合し、結合した ZnAPC は、光照射によって *RAS* mRNA を分解し、それによって RAS タンパク質の発現を抑制するとともに、細胞死を誘導した。

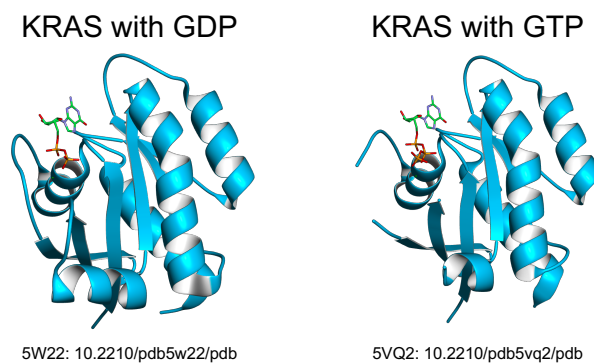
以上のように本研究では、がんの治療に極めて重要である RAS シグナル経路に関して、新たな治療標的分子を同定し、シグナル分子の遺伝子発現機構を解明することができた。さらに、これまで困難とされてきた RAS の発現を制御できる分子標的薬候補の開発にも成功した。これらの結果は、がん治療における新たな標的タンパク質を提示するだけでなく、タンパク質をコードする DNA や RNA の四重鎖構造を狙った創薬も可能であることを示している。これらの知見は、創薬の標的やモダリティーを拡張することで、新しいがん治療法の確立につながると期待される。



## 第2章 緒言

日本人の死因の第一位は、1981年から現在に至るまで悪性新生物（がん）である<sup>[1]</sup>。分子生物学の研究の発展に伴い、分子標的薬が次々と開発されている。一方で、未だにがんに起因する死亡者は増え続けており、がんの根治に向けた新たな治療法の開発は急務である。がん治療の標的として特に注目されているタンパク質にRASがある。RASは、多くのがん細胞で恒常的に活性化しており、この異常な活性化は、細胞の無秩序な増殖を誘導するなど、がんの発生やがん細胞の悪性化に深く関与している<sup>[2-6]</sup>。これらのことから、RASやRASシグナル経路の阻害は極めて有望ながん治療方法になると考えられている。

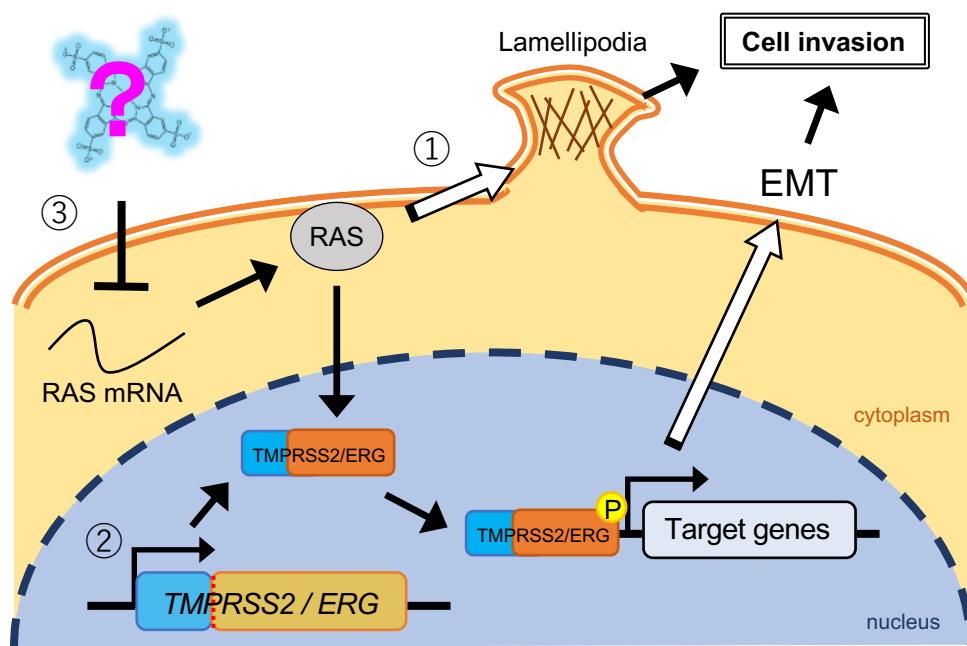
RASは、低分子量Gタンパク質型のGTPaseであり、不活性型（GDP結合型）と活性型（GTP結合型）の状態で存在している（Figure 2-1）<sup>[7-10]</sup>。GDP結合型のRASとGTP結合型のRASは、ヌクレオチド結合ポケットに隣接しているリン酸結合ループ（10-17残基）、スイッチI（30-38残基）、スイッチII（60-76残基）および塩基結合ループ（116-120残基）の4つの領域のコンフォメーションが変化することが知られている。GTPと結合したRASはGTPの $\gamma$ -リン酸が、スイッチIに位置するスレオニン35とスイッチIIに位置するグリシン60と水素結合を形成することでRASをコンパクトな構造に保持し、RAFやPI3Kなどの下流分子やRASの活性分子であるSOSのアロステリック部位との相互作用を可能にするため、RASが活性化する<sup>[11, 12]</sup>。正常細胞におけるRASのGTP/GDP結合状態は、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF: Guanine nucleotide exchange factor）とGTPase活性化タンパク質（GAP: GTPase-activating protein）により制御されている。しかしながら、RAS遺伝子の特定部位の変異は、アミノ酸置換を生じることでRASとGTPの結合が保持されるためRASの恒常的な活性化を引き起こす。恒常的に活性化したRASはMAPKシグナル経路やPI3Kシグナル経路などの細胞増殖や上皮間葉転換（EMT: epithelial mesenchymal transition）を制御する経路にシグナルを送り続けてしまうため、無秩序な細胞増殖やEMTを引き起こし、細胞のがん化やがん悪性化の要因となる<sup>[13, 14]</sup>。そこで、がん細胞の悪性化に重要な分子であるRASを標的とした治療薬として、GTP結合部位を標的にした阻害剤の開発が試みられてきた。しかし、RASとGTPの結合親和性は非常



**Figure 2-1 Conformational change of KRAS by binding with GNP.**  
The structure of KRAS binding GDP (left, PDB ID: 5W22) and GTP (right, PDB ID: 5VQ2).

に高く、GTP よりも高い親和性をもつ化合物の開発は困難であった<sup>[15]</sup>。一方、GTP 結合部位以外を標的とした創薬も研究が進められてきたが、RAS は平滑な球状構造を形成するため、化合物の探索は困難である<sup>[16]</sup>。長年に渡って世界中で研究が進められているにもかかわらず、このような理由から RAS は標的化が困難な“Undruggable”な分子として認知されている。2020 年によりやく、RAS のアイソフォームの一つである KRAS の 12 番目のグリシンがシステインに変化する変異体（KRAS G12C 変異体）において、変異したシステイン残基との共有結合性阻害剤の開発が達成された<sup>[17]</sup>。しかし、この変異の頻度は非小細胞肺がんにおいて 13%であるが、他のがんではそれより低い確率である<sup>[18]</sup>。さらに、この変異体以外には化合物が共有結合できないため、汎用性の高い創薬方法とはなりがたい。このように、RAS を狙った分子標的薬の開発は多くの課題を抱えているのが現状である<sup>[19]</sup>。

RAS を直接標的とするのではなく、RAS シグナル経路を標的とした創薬研究も進められている。RAF や MEK といった MAPK シグナル経路に関わる分子や、p110 や AKT といった PI3K シグナル経路に関わる分子など、RAS の下流のシグナル経路に関わる分子に対する分子標的薬などがその代表である<sup>[20,21]</sup>。前述の通り、RAS は多くのシグナル経路を活性化するハブとして機能する<sup>[22]</sup>。また、RAS の恒常的な活性化には、RAS 遺伝子の変異以外にも、がんで高頻度にみられる受容体型チロシンキナーゼ EGFR などの RAS の上流分子の恒常的な活性化も関与する<sup>[23]</sup>。そのため、一つの経路を薬剤で阻害・抑制することに成功した場合でも、別の経路が活性化することが頻繁に観測される<sup>[24]</sup>。別経路の活性化は、シグナル経路阻害剤に対して耐性をもつがん細胞の出現と、それに伴うがんが再発することにつながり、大きな問題となっている<sup>[25]</sup>。その対処法の一つとして、分子標的薬などの多剤併用療法が高い治療効果をもつことが期待されており、さらなる RAS シグナル経路における創薬標的分子の同定、および新規治療薬の探索が強く望まれている。以上のような理由から、RAS の新しいシグナル伝達機構の解明と、RAS の活性そのものを制御する方法が、新たながん治療薬の開発において強く希求されている。さらに、がんの病態として最も大きな問題である浸潤・転移能を促進する RAS の新しいシグナル伝達機構の解明は、予後の改善につながると考えられる。そこで本研究では、① RAS が惹起するがん細胞の浸潤・転移で重要な役割を果たすアクチン動態の制御機構の解明<sup>[26]</sup>、② RAS が惹起するがん細胞の浸潤・転移で重要な EMT に関わる *TMPRSS2/ERG* 遺伝子の新たな発現制御機構の解明を行った<sup>[27]</sup>。これらの研究成果を第 3 章と第 4 章に記す。また、③ 構造的な特徴から分子標的が困難であった RAS 分子に対して、*RAS*mRNA を標的とした新規治療法の開発に関する研究成果<sup>[28]</sup>を第 5 章で記す（Figure 2-2）。



**Figure 2-2 Aims of this study**

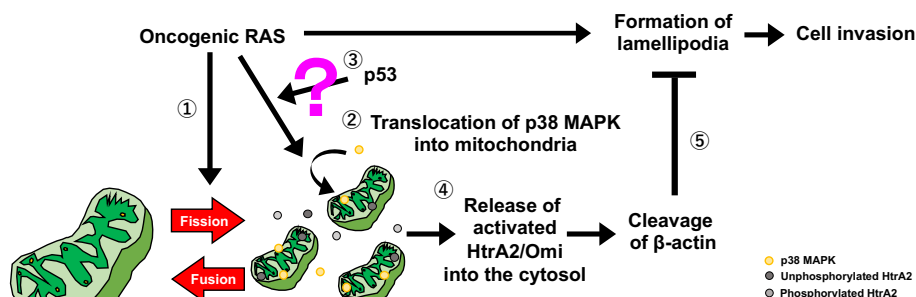
The three aims of this study are indicated as ①-③ in the figure. ① Identification of a novel molecule that promotes oncogenic RAS-driven cell invasion by inducing the formation of lamellipodia. ② Elucidation of the expression mechanism of the *TMPRSS2/ERG* gene encoding TMPRSS2/ERG, which is activated by oncogenic RAS and induces EMT. ③ Development of a novel cancer therapeutic method for targeted RAS by the inhibition of its mRNA expression.

## 第3章 RAS が惹起する細胞の浸潤・転移に関わる アクチン動態の制御機構の解明

### 3-1 序論

細胞のがん化は、複数の遺伝子に変異し、段階的に進行していくという「多段階発がんモデル」が、ワインバーグ博士らによって提唱されている<sup>[29]</sup>。大腸がんや膵臓がんなどでは、*RAS* 遺伝子に変異が生じた後に、がん抑制遺伝子 *p53* の変異が生じることが多く、それによって悪性度の高いがん細胞へと性質を変える<sup>[30]</sup>。がん細胞の悪性化の基準の一つとして、浸潤・転移能の獲得があり、これにはアクチン線維構造が深く関与している<sup>[31]</sup>。哺乳類におけるアクチンのアイソフォームとして6つのアイソフォームがあり、その中で  $\beta$  と  $\gamma 1$  は、ほとんど全ての細胞で発現している<sup>[32]</sup>。アクチンは、重合と脱重合を繰り返しており、フォルミンや Arp などのアクチン重合因子に依存してアクチン線維 (F-アクチン) の構造が決定され、細胞骨格の一員として機能する<sup>[33,34]</sup>。当研究室では、がん遺伝子産物として機能する *RAS* アイソフォームの Ha-RAS の恒常的活性型変異体 (Ha-RASV12) によりがん化した細胞において、*p53* が機能していると浸潤能が低い、*p53* の機能が欠損していると、F-アクチン構造の一つである葉状仮足 (ラメリポディア) の形成が促進され、浸潤能が高いことを明らかにしてきた (Figure 3-1) <sup>[35]</sup>。この分子機構として、① Ha-RASV12 で細胞のがん化を誘導すると、ミトコンドリアの断片化が引き起こされ、それに伴い  $\beta$ -アクチンのプロテアーゼとして働く HtrA2/Omi<sup>[36]</sup>がミトコンドリアから細胞質に遊離する。② Ha-RASV12 は *p53* の細胞質局在を促進する。③ *p53* の活性依存的にミトコンドリアの膜電位が低下し、それに伴いミトコンドリア内で HtrA2/Omi を活性化する *p38 MAPK*<sup>[37]</sup>が細胞質からミトコンドリアに移行する。④ *p38 MAPK* により活性化された HtrA2/Omi はミトコンドリアから細胞質へ移行し、 $\beta$ -アクチンを切断する。⑤  $\beta$ -アクチンの切断に依存してF-アクチンの量が減少し、ラメリポディアの形成に重要な Rho ファミリーGTPase である Rac の活性化を誘導するアダプター分子 *p130Cas* の活性<sup>[38]</sup>が低下する。それによって、ラメリポディアの形成が阻害され、細胞の浸潤が抑制されることを明らかにした。つまり、Ha-RASV12 によって誘導される細胞の浸潤能は、*p53* の活性依存的なミトコンドリア膜電位の低下に伴う *p38 MAPK* のミトコンドリア移行の促進と、それにより活性化した HtrA2/Omi が  $\beta$ -アクチンを切断することで低下することが示された<sup>[35]</sup>。これらの結果から、*RAS* の恒常的な活性化、および *p53* の機能が欠損した悪性度の高いがん細胞においても、 $\beta$ -アクチンを切断することができれば、細胞の浸潤や転移を抑制できる可能性が示された。つまり、*p53* の活性依存的なミトコンドリア膜電位の低下、および *p38 MAPK* のミトコンドリア移行に関する詳細な分子機構を明らかにすることで、 $\beta$ -アクチン切断に関わる新たな標的分子を同定することができる可能性がある。そこで本研究では、この分子機構の解明を目的として、Ha-RASV12 を発現させた *p53* ノックアウトマ

ウス胎児線維芽細胞 ( $p53^{-/-}$  MEF:  $p53$  knock out mouse embryonic fibroblast) を用いて、 $\beta$ -アクチンの切断に関与する分子の同定を試みた。



**Figure 3-1 Molecular mechanism of p53-mediated prevention of oncogenic RAS-driven cell invasion.**

This model has been shown in our previous study (Reference No.26). The purpose of this study was to identify a/the molecule(s) that regulate the mitochondrial translocation of p38 MAPK promoted by p53 (the point is shown as “?”). The explanation is marked ①-⑤ and indicated in the text.

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 細胞培養とレトロウイルス感染

$p53^{-/-}$  MEF は、Taconic から購入した  $p53^{-/-}$  マウスと野生型 (WT) のマウス (C57BL/6J) を交配させて生まれた  $p53$  ヘテロマウス同士を交配させ、胎生 12.5 日目の胎仔から調製したものを使用した。293T 細胞および MEF は、カナマイシン (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む 10% FBS を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (ニッスイ) 中で、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37°C で培養した。レトロウイルス感染は、3 継代後の MEF を用い、感染後はハイグロマイシン (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) とピューロマイシン (1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む培地で 3 日間培養することで、感染細胞のセレクションを行った。長期培養による遺伝子変異を回避するために、2 週間以内に全ての実験を行った。

### 3-2-2 プラスミドおよび抗体と試薬調製

pSuper retro p65 は p65 の標的配列、5'-GAAGAAGAGTCCTTCAAT-3' を pSuper retro (Oligoengine) に組み込むことで構築した。Mito-DsRed は Clontech Laboratories Inc. から購入した。Flag タグ付き p65 発現プラスミド pcDNA3-Mito-Flag-p65<sup>[39]</sup> の Flag-p65 の 5' 末端にヒトチトクロム c オキシダーゼのサブユニット VIII のミトコンドリア移行シグナル配列を組み込むことで、pcDNA3-Mito-Flag-p65 を構築した。抗 p38 ウサギポリクローナル抗体 (C-20, Santa Cruz Biotechnology)、p38 ウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 HtrA2 / Omi ヤギポリクローナル抗体 (V-17, Santa Cruz Biotechnology)、抗  $\beta$ -Actin マウスモノクローナル抗体 (ACTBD11B7, Santa Cruz Biotechnology)、抗 VDAC ウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology)、および抗  $\alpha$ -tubulin マウスモノクローナル抗体 (DM1A, Sigma-Aldrich) をウェスタンブロットティングの解析に使用し、抗 Flag マウスモノクローナル抗体 (M2, Sigma-Aldrich) をウェスタンブ

ロットティングおよび蛍光免疫染色での解析に使用した。蛍光免疫染色には、抗 cortactin ウサギポリクローナル抗体 (H-191, Santa Cruz Biotechnology) を使用した。

### 3-2-3 ウェスタンブロットティング

細胞を回収し、氷冷した細胞溶解バッファー(50 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、1% Triton X-100、0.5% SDS、10 mM EDTA、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、10 mM NaF、protease inhibitor cocktail [PIC, Nacalai Tesque])中で、超音波処理を行い、細胞を破壊した。その後、20,000×g で 15 分間遠心し、得られた上清を細胞抽出物として使用した。ミトコンドリア画分および細胞質画分を分離するために、ミトコンドリア分離キット (QIAGEN) を付属のプロトコルに従って使用した。単離したミトコンドリア画分を氷冷した SDS を含まない細胞溶解バッファー (50 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、1% Triton X-100、10 mM EDTA、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、10 mM NaF、PIC) で溶解し、20,000×g で 15 分間遠心後、得られた上清をミトコンドリアタンパク質として使用した。 $\beta$ -アクチンの検出では、回収した細胞を 0.5% SDS を含む細胞溶解バッファーで溶解した細胞抽出液を使用した。これらのタンパク質抽出物を用いて、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後、タンパク質を PVDF メンブレンに転写し、5% スキムミルク (Sigma-Aldrich) / TBS-T もしくは 2% Blocking agent/ TBS-T で 30 分間ブロックした。2% BSA/TBS-T もしくは 2% Blocking agent/ TBS-T で希釈した一次抗体中で、4°C で一晩、または室温で 1 時間インキュベートした。その後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合二次抗体 (Sigma-Aldrich) を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。その後、HRP 化学発光試薬 (Perkin Elmer) を添加し、X 線フィルム (Fujifilm) に露光することによって検出した。

### 3-2-4 蛍光免疫染色

ガラスボトムディッシュで培養した細胞を 4% PFA で固定後、0.2% Triton X-100 を用いて細胞膜透過処理を行い、2% BSA/PBS でブロッキングした。その後、一次抗体を反応させ、抗ウサギ IgG- Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) および抗マウス IgG- Alexa Fluor 546 を二次抗体として反応させた。F-アクチンの染色には、ファロイジン- Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) を用いた。画像は、共焦点顕微鏡 (LSM700, Zeiss) を使用して取得し、Image J software (NIH) で解析した。

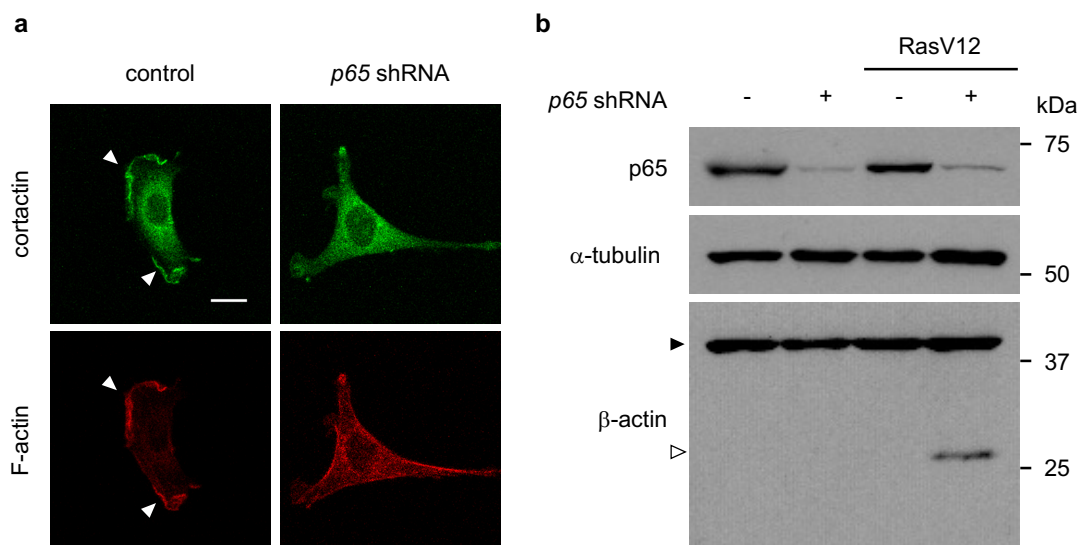
### 3-2-5 ミトコンドリア膜電位の解析

ミトコンドリア膜電位のモニタリングは、ガラスボトムディッシュで培養している細胞の培地中に、ミトコンドリアに蓄積するカチオン性色素である 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', tetraethylbenzimidazolocarbo-cyanine iodide (JC-1, 2  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes) を加えて 37°C で 15 分間培養し、PBS で洗浄後、培地を加えて観察を行なった。画像は、共焦点顕微鏡 (LSM700, Zeiss) で撮影し (Ex= 488 nm / Em=<545 nm, Ex= 555 nm / Em=>575 nm)、Image J software (NIH) を使用して蛍光強度を定量化した。

### 3-3 結果と考察

#### 3-3-1 がん遺伝子 *RAS* 発現細胞におけるラメリポディア形成および $\beta$ -アクチン切断に対する NF- $\kappa$ B の役割

当研究室では、p53 の機能を欠損した細胞に Ha-RASV12 を発現させると、F-アクチン構造の一つであるラメリポディアの形成が促進されることを明らかにしている<sup>[35]</sup>。p53 の機能欠損は、転写因子 NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化を誘導する<sup>[39-41]</sup>。NF- $\kappa$ B は多くのがん細胞で活性化されており、がんの悪性を促進することが知られている<sup>[42-44]</sup>。そこで、Ha-RASV12 を発現した *p53*<sup>-/-</sup> MEF におけるラメリポディアの形成には、NF- $\kappa$ B の活性化が関与しているのではないかと考えた。NF- $\kappa$ B は、NF- $\kappa$ B ファミリーと呼ばれる p50、p52、p65/RelA、c-Rel、RelB の 5 種類のタンパク質のホモダイマーもしくはヘテロダイマーからなるタンパク質複合体である。なかでも、p65/RelA と p50 のヘテロダイマーは、ほとんどの種類の細胞で存在しており、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路において最も主要な複合体であると言われている<sup>[45]</sup>。p65/RelA と p50 は、どちらも N 末端に Rel ホモロジドメインと呼ばれる DNA の結合や二量体形成に必要なドメインを有しているが、C 末端の転写活性化ドメインは p65/RelA のみが有している<sup>[46, 47]</sup>。そのため、*p65/RelA* の発現を抑制することで NF- $\kappa$ B による転写を低下させることができる。そこで、ラメリポディアの形成において NF- $\kappa$ B の関与を確認することを目的として、*p65/RelA* に対する shRNA を発現するレトロウイルスを用いて *p65/RelA* のノックダウンを行った。ラメリポディアの形成は、ラメリポディアマーカーとして抗 Cortactin 抗体、および抗 F-actin 抗体を用いた二重蛍光免疫染色を行うことで確認した。その結果、コントロールの Ha-RASV12 を発現した *p53*<sup>-/-</sup> MEF ではラメリポディアの形成が確認されたが (Figure 3-2a 左、白矢尻)、*p65/RelA* のノックダウンによって、ラメリポディアの形成は抑制された (Figure 3-2a 右)。次に、*p65/RelA* をノックダウンすることで、 $\beta$ -アクチン切断が誘導されるのかについて、ウェスタンブロッティングで確認した。 $\beta$ -アクチンは、375 アミノ酸からなる 42 kDa のタンパク質である。HtrA2/Omi は、 $\beta$ -アクチンの 106 番目のスレオニン (T) 残基の前と 107 番目のグルタミン酸 (E) 残基の前を切断するため、切断断片は 30 kDa と 12 kDa となる<sup>[35, 36]</sup>。用いた抗体は、 $\beta$ -アクチンの C 末認識抗体であるため、30 kDa のバンドが検出されれば、HtrA2/Omi による  $\beta$ -アクチンの切断が誘導されたと考えられる。ウェスタンブロッティングの結果から、*p65/RelA* をノックダウンした Ha-RASV12 を発現している *p53*<sup>-/-</sup> MEF においてのみ  $\beta$ -アクチンの切断断片のバンドが検出された (Figure 3-2b)。以上の結果から、p53 欠損細胞において、NF- $\kappa$ B を抑制することで、Ha-RASV12 による HtrA2/Omi を介した  $\beta$ -アクチンの切断を誘導できることが推察された。



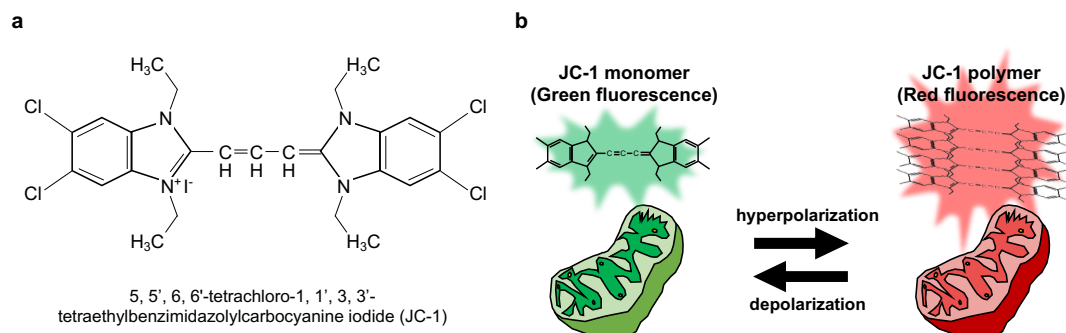
**Figure 3-2 Oncogenic Ras induces  $\beta$ -actin cleavage in  $p53^{-/-}$  MEFs expressing  $p65/RelA$  shRNA.**

Cells were infected with a control or Ha-RasV12-expressing retrovirus together with or without a  $p65/RelA$  shRNA-expressing retrovirus. (a) Confocal images of the cells stained for cortactin (green) as an indicator of lamellipodia or F-actin (red) are shown. Scale bars, 20  $\mu$ m. Z-stack images with an interval of 1.0  $\mu$ m were obtained using a confocal microscope, and projected images are shown. The white arrowheads point to the edge of the lamellipodia. (b) The levels of p65/RelA and the cleavage of  $\beta$ -actin were evaluated by immunoblot analysis. Black arrowheads indicate full-length  $\beta$ -actin, and white arrowheads indicate cleaved fragment.  $\alpha$ -tubulin used as a loading control.

### 3-3-2 がん遺伝子 *RAS* による $\beta$ -アクチン切断に関わる p38 MAPK のミトコンドリア移行に対する NF- $\kappa$ B の役割

Ha-RASV12 による p53 依存的な HtrA2/Omi の活性化には、ミトコンドリア膜電位の低下とそれに伴う p38 MAPK のミトコンドリア移行が必要であることを示してきた<sup>[35]</sup>。そこで次に、 $p65/RelA$  のノックダウンがミトコンドリア膜電位に与える影響について、カチオン性色素である JC-1 (Figure 3-3a) を用いて解析を行なった。JC-1 は、単量体状態では緑色蛍光を発するが、その濃度に応じて凝集体を形成し、凝集体状態では赤色蛍光を発するようになる<sup>[48, 49]</sup>。JC-1 がもつカチオン性の電位は、ミトコンドリア内膜の電位と親和性が高いため、細胞内に取り込まれた JC-1 はミトコンドリアの膜電位に応じてミトコンドリア内に蓄積する。ミトコンドリア内で蓄積された JC-1 の濃度が低いと JC-1 は単量体で存在するため、緑色蛍光を発し、濃度が高いと色素が凝集するため赤色蛍光を示すようになる。そのため、JC-1 はミトコンドリアの膜電位が低いと緑色蛍光、高いと赤色蛍光を示す<sup>[50, 51]</sup> (Figure 3-3b)。

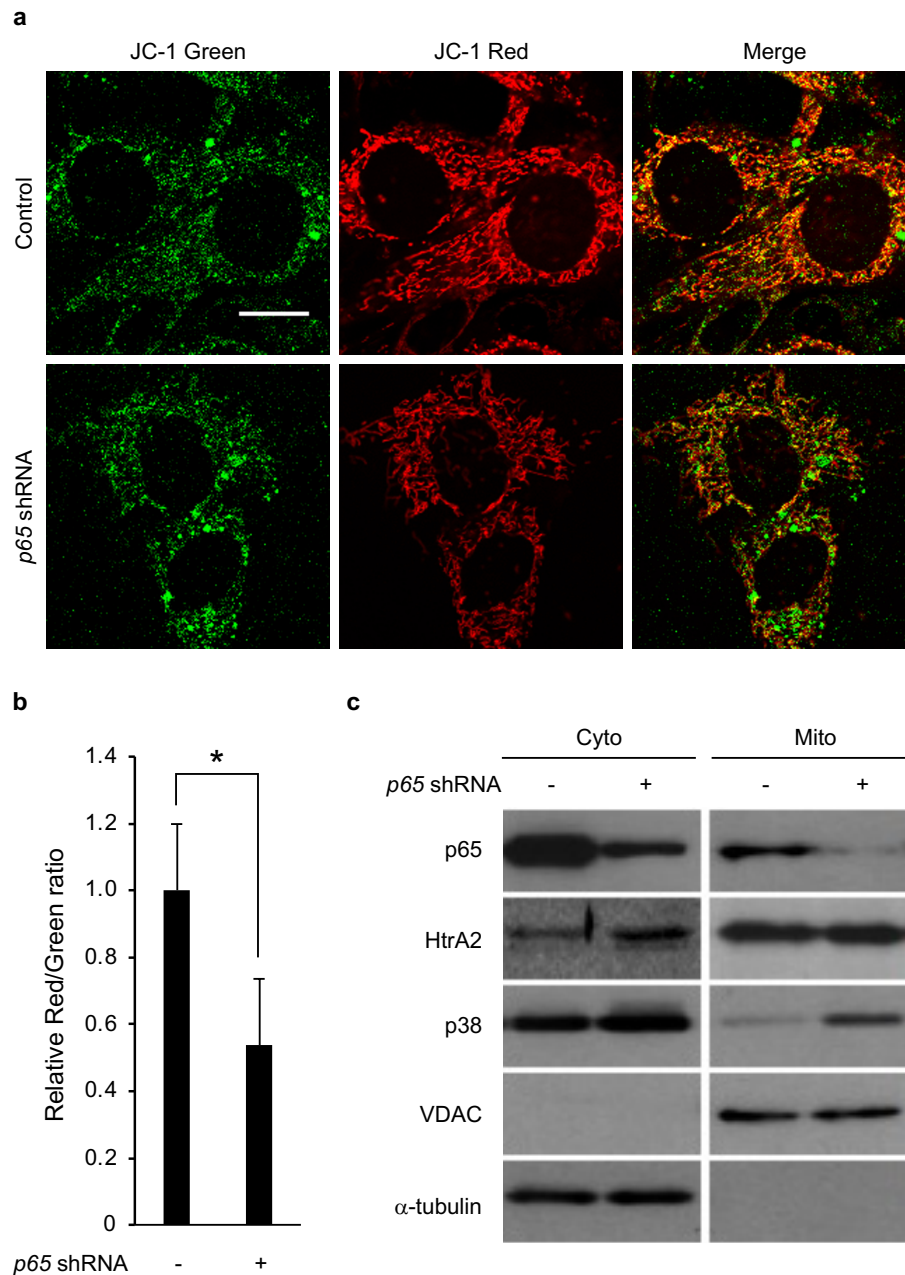




**Figure 3-3 Model diagram of the potential measurement of a mitochondrial membrane using JC-1.**

(a) Chemical structure of JC-1. (b) JC-1 monomers and polymers emit green and red fluorescence, respectively. Monomeric JC-1 accumulates mitochondria and hyperpolymerizes when the outer mitochondrial membrane potential is high.

JC-1 を用いて解析を行なったところ、Ha-RASV12 が発現した *p53*<sup>-/-</sup>MEF において、*p65/RelA* をノックダウンすることにより、緑色蛍光が赤色蛍光よりも高くなるミトコンドリア、つまり膜電位が低くなったミトコンドリアが部分的に増えることが示された (Figure 3-4 a)。JC-1 の赤色蛍光強度を緑色蛍光強度で割った値を定量的に解析したところ、*p65/RelA* をノックダウンすることで有意にミトコンドリアの膜電位が有意に低下するということが明らかとなった (Figure 3-4 b)。野生型 *p53* を発現している不死化したマウス線維芽細胞において、Ha-RASV12 の発現によりがん化を誘導した際にみられるミトコンドリア膜電位の低下も、部分的に引き起こる<sup>[35]</sup>。細胞内のすべてのミトコンドリアで膜電位の低下が引き起こると細胞死が誘導されることから<sup>[52]</sup>、膜電位の低下が起こる一方で、ミトコンドリア膜電位を維持する機構が働いていると考えられる。部分的に誘導されるミトコンドリア膜電位の低下と相関して、p38 MAPK のミトコンドリア移行が引き起こされることが HtrA2/Omi の活性化に重要である<sup>[35]</sup>。そこで次に、それぞれのタンパク質の局在を確認するために、細胞質画分とミトコンドリア画分のタンパク質を抽出し、これら抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、p65/RelA は細胞質だけでなく、ミトコンドリアにも局在することが確認された。細胞質、ミトコンドリア両画分において、p65/RelA の発現量は *p65/RelA* のノックダウンによって減少していた。細胞質およびミトコンドリアに局在する HtrA2/Omi の量は、*p65/RelA* shRNA の発現の有無にかかわらず一定であった。一方で、ミトコンドリアに局在する p38 MAPK の量は、*p65/RelA* のノックダウンによって顕著に増加していた (Figure 3-4 c)。これらの結果から、*p65/RelA* のノックダウンは HtrA2 / Omi の局在には影響を与えないものの、ミトコンドリア膜電位の低下を引き起こし、p38 MAPK のミトコンドリア移行を促進させることがわかった。そのため、NF- $\kappa$ B はミトコンドリア膜電位を維持することによって p38 MAPK のミトコンドリア移行を抑制し、HtrA2 / Omi を介した  $\beta$ -actin の切断を抑制している可能性が考えられた。

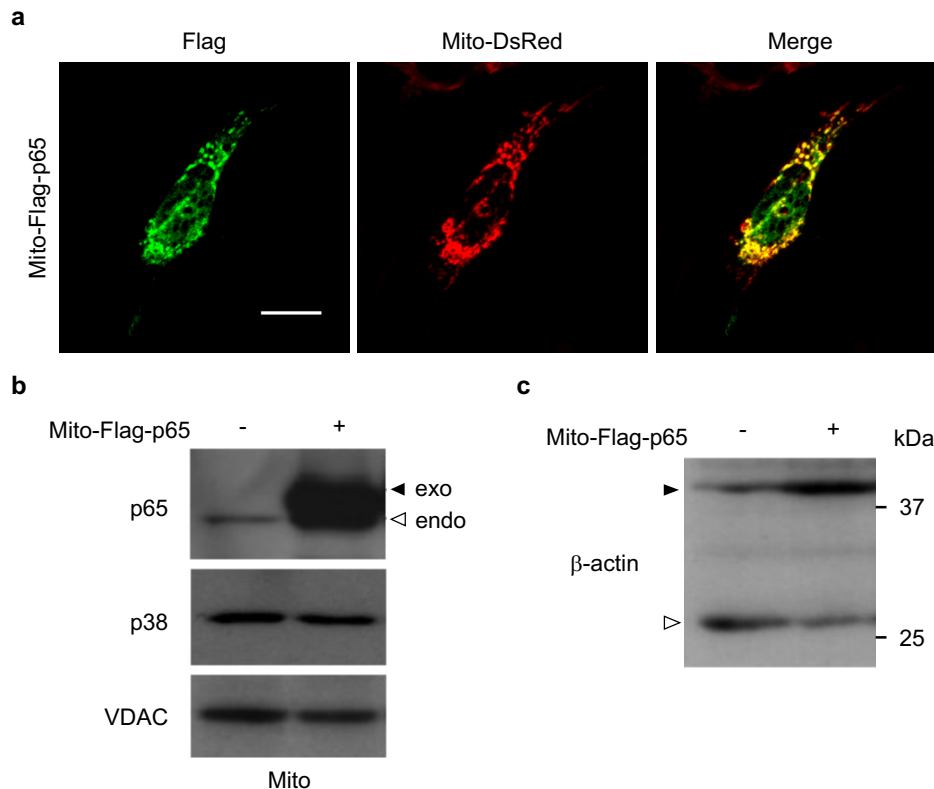


**Figure 3-4 *p65/RelA* knockdown enhances mitochondrial translocation of p38 MAPK in *p53*<sup>-/-</sup>MEFs expressing Ha-RasV12.**

Cells were infected with Ha-RasV12-expressing retrovirus together with or without a *p65/RelA* shRNA-expressing retrovirus. (a) Confocal images of cells stained with JC-1. Red fluorescence (J-aggregate) and green fluorescence (monomer) are shown. Scale bars, 20  $\mu$ m. (b) The ratio of red fluorescence to green fluorescence, which is correlated with mitochondrial membrane potential, at peripheral mitochondria was quantified from images in a. (c) Following subcellular fractionation of the cytosol (Cyto) and mitochondria (Mito), the distribution of *p65/RelA*, p38 MAPK, and HtrA2/Omi was evaluated by immunoblot analysis. VDAC and  $\alpha$ -tubulin were used as mitochondrial and cytosolic markers, respectively.

### 3-3-3 がん遺伝子 *RAS* が制御する $\beta$ -アクチン切断に対するミトコンドリアに局在する NF- $\kappa$ B の役割

ミトコンドリアに局在する NF- $\kappa$ B は、ミトコンドリアのダイナミクス、アポトーシス、呼吸制御など、その機能は多岐にわたる<sup>[53, 54]</sup>。NF- $\kappa$ B のミトコンドリア移行には、ミトコンドリア分子シャペロンとして働くモルタリンとの結合が重要であるが、p53 は NF- $\kappa$ B とモルタリンの結合を阻害することによって、NF- $\kappa$ B のミトコンドリア移行を抑制することが報告されている<sup>[41, 55]</sup>。このことから、p53 が欠損することで、NF- $\kappa$ B のミトコンドリア移行が促進され、ミトコンドリアに局在する NF- $\kappa$ B が p38 MAPK のミトコンドリア移行ならびに  $\beta$ -actin の切断を抑制しているのではないかと考えた。このことを確認するために、ミトコンドリア移行シグナルを付加し、なおかつ shRNA の標的配列に変異を有する p65 (Mito-Flag-p65) の発現プラスミドを構築した。レトロウイルス感染によって、Ha-RASV12 および *p65/RelA* shRNA を発現させた p53<sup>-/-</sup> MEF に、構築した Mito-Flag-p65 発現プラスミドとミトコンドリアマーカーとして Mito-DsRed 発現プラスミドをコトランスフェクションした後、細胞を固定し、抗 Flag 抗体を用いて免疫染色を行うことで Mito-Flag-p65 の局在を確認した。その結果、抗 Flag 抗体で検出された Mito-Flag-p65 は、Mito-DsRed と共局在していたことから、Mito-Flag-p65 はミトコンドリアに局在することが確認できた (Figure 3-5 a)。次に、*p65/RelA* のノックダウンで促進する p38 MAPK のミトコンドリア移行、ならびに  $\beta$ -actin の切断が、Mito-Flag-p65 により抑制されるのかどうかを検証するため、ミトコンドリア分画および全細胞抽出液を用いたウェスタンブロッティングを行った。ミトコンドリア分画を抗 p65 抗体を用いて検出したところ、*p65/RelA* shRNA の発現だけでは内在性の p65/RelA の発現を完全には抑制できないため、内在性の p65/RelA バンド (Figure 3-5 b 白矢尻 endo) と Mito-Flag-p65 のバンド (Figure 3-5 b 黒矢尻 exo) が検出された。しかし、Mito-Flag-p65 を発現させた細胞ではコントロールの細胞と比較して、ミトコンドリアに局在する p65 の量が顕著に増加していた。一方で、ミトコンドリアに局在する p38 MAPK の量は、予想に反して、Mito-Flag-p65 を発現させても、コントロールと比較して差がなかった (Figure 3-5 b)。一方で、切断された  $\beta$ -actin の量は Mito-Flag-p65 を発現させることにより減少することが明らかになった (Figure 3-5 c)。以上の結果をまとめると、ミトコンドリアに局在している NF- $\kappa$ B は、p38 MAPK のミトコンドリア移行を制御するのではなく、p38 MAPK の活性化、または別の分子を介して HtrA2/Omi の活性を低下させることで、 $\beta$ -actin の切断を抑制していることが考えられた。



**Figure 3-5 Expression of p65/RelA, localized in the mitochondria, attenuates  $\beta$ -actin cleavage in *p65/RelA*-knockdown *p53*<sup>-/-</sup> MEFs expressing Ha-RasV12.**

Cells were infected with Ha-RasV12-expressing retrovirus together with a *p65/RelA* shRNA-expressing retrovirus. (a) The cells were transfected with Mito-Flag-p65 expression vector together with Mito-DsRed expression vector to visualize mitochondria. Confocal images of cells stained with anti-Flag antibody for Mito-Flag-p65 (green) and Mito-DsRed (red) are shown. Z-stack images with an interval of 1.0  $\mu$ m were obtained using a confocal microscope, and projected images are shown. Scale bars, 20  $\mu$ m. (b) and (c) The cells were transfected with control or Mito-Flag-p65 expression vector. (B) Following subcellular fractionation of the mitochondria (Mito), the distribution of p38 MAPK was evaluated by immunoblot analysis. VDAC was used as a mitochondrial marker. Black arrows indicate exogenous p65/RelA, and white arrow indicates endogenous p65/RelA. (c) The cleavage of  $\beta$ -actin was evaluated by immunoblot analysis. Black arrowheads indicate full-length  $\beta$ -actin, and white arrowheads indicate the cleaved fragment.

### 3-4 結論と展望

本章では、*p53*<sup>-/-</sup> MEF にがん遺伝子 Ha-RASV12 と *p65/RelA* shRNA を発現させることで、p38 MAPK の細胞質からミトコンドリアへの移行が亢進し、 $\beta$ -actin の切断が誘導されることを明らかにした。さらに、ミトコンドリアでの p65/RelA の過剰発現は、p38 MAPK のミトコンドリア移行を阻害することなく、 $\beta$ -actin の切断を抑制した。これらのことから、NF- $\kappa$ B は細胞の浸潤や移動に対して抑制的に働く  $\beta$ -actin の切断を、2 つ以上の分子機構で抑制している可能性が考えられた。1 つは、ミトコンドリアに局在している NF- $\kappa$ B が、p38 MAPK または HtrA2/Omi の活性化を阻害することで  $\beta$ -actin の切断を抑制している可能性である。

また、それ以外の分子機構として、核内の NF- $\kappa$ B が標的遺伝子の発現を介して、p38 MAPK のミトコンドリア移行を阻害し、 $\beta$ -actin の切断を抑制している可能性である。その他にも、細胞質の NF- $\kappa$ B が p38 MAPK のミトコンドリア移行に関与している可能性も否定できない。 $\beta$ -actin の切断によるラメリポディア形成の阻害は、がん細胞の浸潤や転移の抑制につながる<sup>[35]</sup>。そのため、この分子機構に関してより詳細な解析を行うことで、新たながん治療の標的分子が同定できるかもしれない。また、当研究室の先行研究では、野生型 p53 を発現しているヒト乳がん由来 MCF-7 細胞において、p53 のノックダウンを行うと NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化が誘導され、その結果 NF- $\kappa$ B の標的遺伝子である細胞接着分子インテグリン  $\beta$ 3 の発現が上昇し、ラメリポディアの形成が促進されることも明らかにしている<sup>[56]</sup>。Ha-RASV12 が発現した p53<sup>-/-</sup>MEF においても MCF-7 と同様に、NF- $\kappa$ B がインテグリン  $\beta$ 3 の発現上昇を誘導することでラメリポディアの形成を促進している可能性もある。

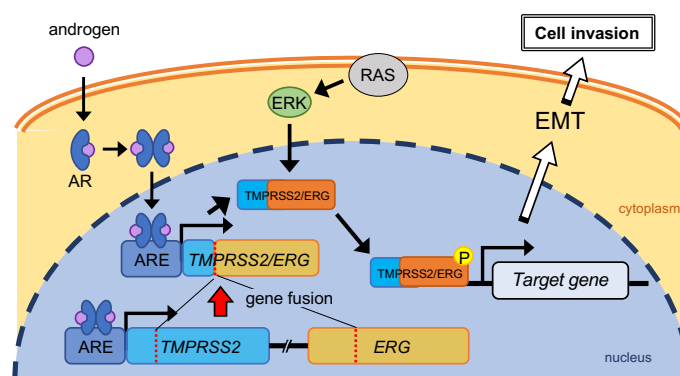
Ha-RASV12 による p53<sup>-/-</sup>MEF のがん化には NF- $\kappa$ B が必要である<sup>[39]</sup>。そのため、p65/RelA shRNA と Ha-RASV12 を発現した p53<sup>-/-</sup>MEF はがん化抑制された状態の細胞であり、このときに、 $\beta$ -actin の切断がみられるということになる。野生型 p53 を発現する不死化した MEF やマウス線維芽細胞 NIH3T3 では、Ha-RASV12 の発現によってがん化するが、これら細胞でも  $\beta$ -actin の切断が誘導される<sup>[35]</sup>。したがって、 $\beta$ -actin の切断は、がん化のプロセスには関与せずに、がん細胞の浸潤を抑制する要因となると考えられる。

本研究の成果から、p53 の機能欠損および RAS の恒常的な活性化によりがん化している悪性度の高いがんにおいても、NF- $\kappa$ B 阻害剤が奏功する可能性を示すことができた。NF- $\kappa$ B は、がん細胞で恒常的に発現しており、腫瘍の形成や悪性化に関わるため、これまでにがん治療の治療標的分子として治療薬の開発が進められてきた分子である。NF- $\kappa$ B が、発現を制御する可能性のある遺伝子は 200 以上あり、細胞の生存と死のバランスを調節している分子とも言われている<sup>[57]</sup>。そのため、NF- $\kappa$ B を標的とするような治療薬は標的外の薬効や毒性について注意深く検討する必要があるものの、臨床応用が期待されている薬剤も多い<sup>[46,58]</sup>。今回明らかにした、NF- $\kappa$ B が制御する  $\beta$ -アクチンの切断において、NF- $\kappa$ B は標的遺伝子の発現を介して  $\beta$ -アクチンの切断を制御している可能性がある。そのため、NF- $\kappa$ B の発現依存的に活性が変化し、 $\beta$ -アクチンの切断に関与する分子を同定することで、がん遺伝子 RAS が惹起する細胞の浸潤や転移を抑制できる新たながん治療薬が開発できるかもしれない。

## 第4章 RASが惹起する細胞の浸潤・転移に関わる TMPRSS2/ERGの新たな遺伝子発現制御機構の解明

### 4-1 序論

日本人男性において、罹患数が最も多いがん種は前立腺がんである<sup>[59]</sup>。前立腺がんでは、その発生や進行において、男性ホルモンのアンドロゲンが寄与していることが知られている<sup>[60]</sup>。アンドロゲンは、細胞質でアンドロゲン受容体（AR: Androgen receptor）と結合し、核内に移行する。その後、AR 転写補助因子などとともに、標的遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に存在するアンドロゲン受容体結合配列（ARE: AR responsive elements）に結合することで標的遺伝子の発現を調節する<sup>[61]</sup>。前立腺細胞のほとんどで AR が活性化しており、治療前の前立腺がんの約 90%では、アンドロゲン依存的な増殖能を有することが報告されている<sup>[62-64]</sup>。セリンプロテアーゼである TMPRSS2 をコードする *TMPRSS2* 遺伝子は、代表的なアンドロゲン応答性の遺伝子である。*TMPRSS2* 遺伝子は、転座によって *ERG* 遺伝子と融合して *TMPRSS2/ERG* 遺伝子となることが知られている。*TMPRSS2/ERG* への転座は、前立腺がん患者の約 50%で観測されている<sup>[65-73]</sup>。転写因子である ERG は、ALK1 や FZD4 などの標的遺伝子の発現を介してがん細胞の浸潤・転移などに寄与する<sup>[74, 75]</sup>。*TMPRSS2/ERG* 遺伝子産物である TMPRSS2/ERG は、ERG の転写因子としての機能を保持しているため、ERG と同様に ALK1 や FZD4 などの標的遺伝子の発現を介して、がん細胞の浸潤・転移において重要な EMT を促進することが報告されている（Figure 4-1）<sup>[76-78]</sup>。*TMPRSS2/ERG* 遺伝子の発現は、アンドロゲンに応答する *TMPRSS2* のプロモーター活性と相關するため、アンドロゲンに応答して上昇し、標的遺伝子の発現を介して EMT を促進させる。TMPRSS2/ERG の活性化には、がん遺伝子 RAS の活性化が寄与しているため、前立腺がんの治療において、TMPRSS2/ERG は RAS シグナル経路



**Figure 4-1 Mechanism of RAS-promoted EMT by TMPRSS2/ERG activation in prostate cancer cells.**

Fusion of the *TMPRSS2* and *ERG* genes was induced by DNA break and ligation. Binding of androgen induces a conformational change in the androgen receptor (AR), resulting in the translocation of AR to the nucleus. AR binds to androgen response elements (AREs) in the promoter or enhancer regions of androgen-regulated genes, including *TMPRSS2* and *TMPRSS2/ERG*. Oncogenic RAS induces activation of the MAPK/ERK signaling pathway, resulting in the activation of *TMPRSS2/ERG*. Activated *TMPRSS2/ERG* promotes cellular EMT through targeted gene expression.

における治療標的分子として期待されている<sup>[79-81]</sup>。現在、前立腺がんの治療では、AR シグナル阻害薬の使用や前立腺の摘出が行われているが<sup>[82]</sup>、これらの治療が奏功しない際の治療法は確立されていない。そのため、AR シグナル阻害とは異なる機序によって *TMPRSS2/ERG* 遺伝子の発現を抑制する治療法の開発が求められているが、成功例はない。そこで本研究では、*TMPRSS2/ERG* の新たな発現制御機構を明らかにすることを目的として、*TMPRSS2* の遺伝子配列で形成される DNA の高次構造に注目して研究を行なった。

## 4-2 実験方法

### 4-2-1 試薬調製

DNA オリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト法により固相合成し、逆相カートリッジカラムで精製、凍結乾燥したものをユーロフィンジェノミクス株式会社、およびサーモフィッシュャーサイエンティフィックス株式会社より購入した。実験に用いた DNA オリゴヌクレオチドの配列は Table 4-1 にまとめた。濃度は、オリゴヌクレオチドを蒸留水で溶解し、UV-1800 分光光度計（Shimadzu）を用いて 260 nm における 90°C での吸光度を測定し、各オリゴヌクレオチドのモル吸光係数  $\epsilon$  ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) から算出した。

Table 4-1 DNA sequences used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5' → 3')
WT	CCTCCGGGCGGGGAGGGGGCATCGCGGGTCCCAGGCGCCAGGTTCCCTCCCCAGC CCGGACCCCGAGCCGGGACCC
MT1	CCTCCGGGCGGGGAGGGGGCATCGCGGGTCTCAGGCGCTCAGGTTCTCTCTCCAGCT CGGACTCTGAGCCGGGACTC
MT2	CCTCCGAGCGGAGCAGAAGGCATCGGCGAGTCTCAGGCGCTCAGGTTCTCTCTCCAGCT CGGACTCTGAGCCGGGACTC
MT3	CCTCCAGACGCGCCAGCGCGCATCAGCGGGTCCCAGGCGCTCAGGTTGCGTGCGCAGTC TGGACCCCGAGCCGGGACCC
MT4	CCTCGGCGCGGCCAGCGCGCATCGCGGGTCCCAGGCGCCAGGTTGCGTGCGCAGC GCCGACCCCGAGCCGGGACCC
Temp-WT (template)	CCTCCGGGCGGGGAGGGGGCATCGCGGGTCCCAGGCGCCAGGTTCCCTCCCCAGC CCGGACCCCGAGCCGGGACCCAGAGAGAGCACCAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAG TGAGTCGATTATATAGTGAGTCGATTAGTG
Temp-MT1 (template)	CCTCCGGGCGGGGAGGGGGCATCGCGGGTCTCAGGCGCTCAGGTTCTCTCTCCAGCT CGGACTCTGAGCCGGGACTCCAGAGAGAGCACCAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAGT GAGTCGATTATATAGTGAGTCGATTAGTG
Temp-MT2 (template)	CCTCCGAGCGGAGCAGAAGGCATCGGCGAGTCTCAGGCGCTCAGGTTCTCTCTCCAGCT CGGACTCTGAGCCGGGACTCCAGAGAGAGCACCAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAGT GAGTCGATTATATAGTGAGTCGATTAGTG
Temp-MT3 (template)	CCTCCAGACGCGCCAGCGCGCATCAGCGGGTCCCAGGCGCTCAGGTTGCGTGCGCAGTC TGGACCCCGAGCCGGGACCCAGAGAGAGCACCAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAGT GAGTCGATTATATAGTGAGTCGATTAGTG
Temp-MT4 (template)	CCTCGGCGCGGCCAGCGCGCATCGCGGGTCCCAGGCGCCAGGTTGCGTGCGCAGC GCCGACCCCGAGCCGGGACCCAGAGAGAGCACCAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAG TGAGTCGATTATATAGTGAGTCGATTAGTG
85WT (template)	TCCCAGGCGCCAGGTTCCCTCCCCAGCCGACCCGAGCCGGGACCCAGAGAGAGC ACCGAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAGTGAGTCGATTATATAGTGAGTCGATTAGTG
85MT (template)	TCTCAGGCGCTCAGGTTCTCTCTCCAGCTCGGACTCTGAGCCGGGACTCCAGAGAGAGCA CCGAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAGTGAGTCGATTATATAGTGAGTCGATTAGTG
95WT (template)	CATCGGCGGGTCCCAGGCGCCAGGTTCCCTCCCCAGCCGACCCGAGCCGGGACCC CAGAGAGAGCACCAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAGTGAGTCGATTATATAGTGA- GTCTGATTAGTG
95MT (template)	CATCGGCGAGTCTCAGGCGCTCAGGTTCTCTCTCCAGCTCGGACTCTGAGCCGGGACTCC AGAGAGAGCACCAGCCTAGTTCGTGTCATCTCCTATAGTGAGTCGATTATATAGTGA- GTCTGATTAGTG
T7 promoter (non-template)	CACTAATACGACTCACTATAATACGACTCACTATAGG

#### 4-2-2 蛍光スペクトル測定

Thioflavin T (ThT)および *N*-Methyl mesoporphyrin (NMM)の蛍光スペクトル測定は、0.3 cm × 0.3 cm の石英セルと FP-8200 分光蛍光光度計 (JASCO) を用いて行った。40 mM Tris-HCl (pH 7.2 at 37°C)、150 mM KCl および 8 mM MgCl<sub>2</sub> からなる緩衝液中で、0、1.0、2.5、3.0、10、30 μM DNA オリゴヌクレオチド (Table 4-1) 存在下における 1 μM ThT (Ex = 450 nm, Em = 470-600 nm) もしくは 1 μM NMM (Ex = 399 nm, Em = 550-750 nm) の蛍光スペクトルを、測定前に各試料を 93°C で 5 分間加熱し、0.5°C/min で 25°C まで穏やかに冷却した後、25°C で測定した。

#### 4-2-3 円二色性スペクトル測定

円二色性 (CD: Circular Dichroism) スペクトルの測定は、0.1 cm の光路長を有する石英セルを用いて J-820 分光光度計 (JASCO) で行った。40 mM Tris-HCl (pH 7.2 at 37°C)、150 mM KCl および 8 mM MgCl<sub>2</sub> からなる緩衝液中での、20 μM オリゴヌクレオチド各試料を 93°C で 5 分間加熱し、0.5°C/min で 25°C まで穏やかに冷却した後、CD スペクトルを測定した。265 nm と 290 nm における CD 融解曲線測定は、の 20°C から 90°C まで 0.5°C/min で加熱し、0.5°C おきに測定を行った。

#### 4-2-4 T7 ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写反応

転写反応は、40 mM Tris-HCl (pH 7.2 at 37°C)、150 mM KCl および 8 mM MgCl<sub>2</sub> (添加する場合は 10% PEG) からなる緩衝液中で、2.5 μM の鋳型 DNA 各試料を 93°C で 5 分間加熱し、0.5°C/min で 25°C まで穏やかに冷却した後、1 mM NTP、5 mM DTT、および 100 unit の T7 ポリメラーゼ (Takara Bio) を加え、37°C で 0、10、30、60、90、120 分間インキュベートした。その後、10 unit の DNaseI を加えて、20 分間 37°C で反応し、10 倍量の転写停止溶液 (80 wt% ホルムアミド、10 mM Na<sub>2</sub>EDTA、0.01% ブルーデキストラン) を加えて 93°C で 5 分間加熱した後、急速に氷冷することで転写反応を停止した。転写反応後の試料は、7M 尿素を含む 12% ポリアクリルアミドゲルを用いて、70°C で電気泳動を行なった後、SYBR Gold (PerkinElmer Life Sciences) で染色した。蛍光の検出には、FLA-5100 (GE Healthcare) を用い、蛍光強度の測定および定量解析は ImageJ (NIH: National Institutes of Health) で行った。

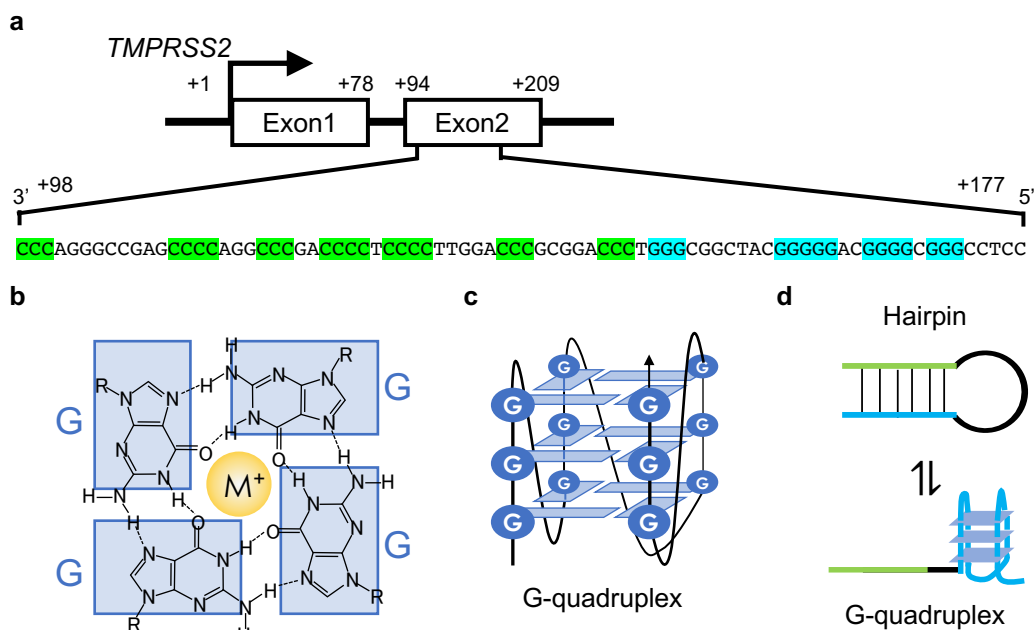
### 4-3 結果と考察

#### 4-3-1 *TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される核酸の二次構造

*TMPRSS2/ERG* の新たな発現制御機構を探索すべく、融合後にも含まれる *TMPRSS2* 遺伝子の配列を解析した。その結果、エクソン 2 領域の鋳型鎖に核酸の非標準型構造である四重鎖構造 (G4: G-quadruplex) 形成推定配列が存在していることを見出した (Figure 4-2 a)。G4 は、グアニンリッチな配列が形成する核酸の非標準型の二次構造である。4 つの平面的に並んだグアニン塩基がフーグスティーン塩基対によって G-



quartet と呼ばれる構造を形成し (Figure 4-2 b)、G-quartet 間の  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用と中心部へのカチオンの配位により、熱的に安定な G4 が形成される (Figure 4-2 c) [83]。そのため G4 の熱安定性は、配位するカチオンに依存し、 $K^+ > Na^+ >> Li^+$  の順となることが知られている [84]。この共存カチオン種依存的な構造安定性は、他の核酸構造では見られない特徴であることから、G4 形成の一つの実験的確認方法としても利用されている。スタッキング相互作用による熱安定性は、G-quartet が 3 枚以上積層することで高くなるため、グアニンが 3 つ並んだ配列が 4 回繰り返される配列において G4 が形成される [85]。そのため、一般的には  $[G_3+N_{1-7} G_3+N_{1-7} G_3+N_{1-7} G_3+]$  (ここでは N は任意のヌクレオチドであり、G の連続部分を連結するループとして機能する) を満たす配列が G4 形成推定配列として考えられている。このような配列は、ヒトだけではなく酵母 [86, 87] や細菌 [88]、ウイルス [89] などの様々な生物種のゲノムで見られる。さらに興味深いことに、ヒトゲノムにおける G4 形成推定配列は、テロメアやがん関連遺伝子のプロモーターや 5'UTR などといった生物学的に重要な領域で数多く同定されており [83]、G4 の生理学的意義について精力的な研究が進められている [90]。これまでの生物学的解析によって、G4 が DNA の複製や転写、エピジェネティクス、RNA の代謝といった、生物の生命現象にとって非常に重要な役割をもつことが示されている [91, 92]。TMPRSS2 遺伝子内において、遺伝子発現制御に関与する G4 形成配列が見出されたことから、TMPRSS2 遺伝子の転写においても G4 が重要な役割を果たす可能性があると考えられる。さらに興味深いことに、TMPRSS2 遺伝

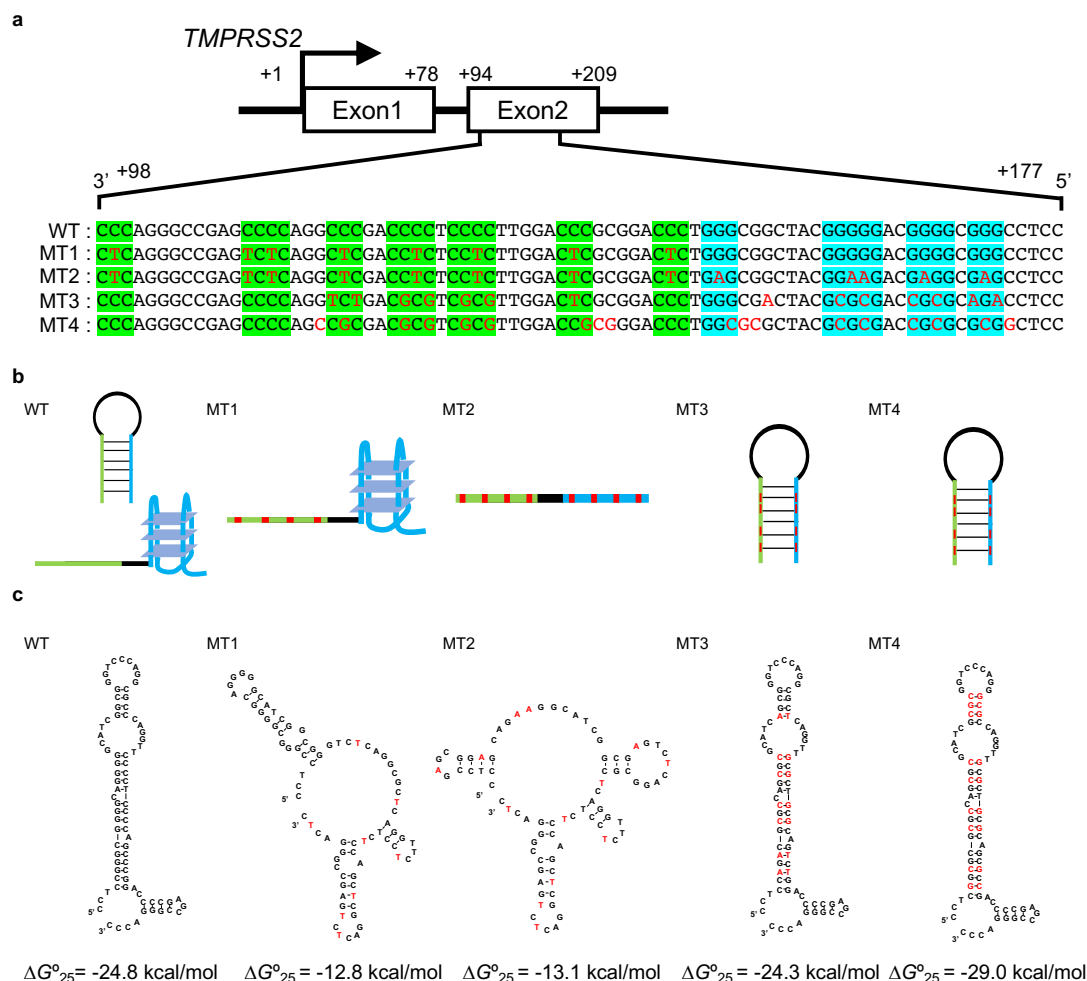


**Figure 4-2 GC-rich region within exon 2 of *TMPRSS2* gene has a putative G4-forming sequence.**

(a) Schematic showing the location of the GC-rich region in the *TMPRSS2* gene. The guanine and cytosine stretches are highlighted in blue and green, respectively. (b) Four guanine bases can form a G-quartet with Hoogsteen base pairs. (c) Two or three G-quartets were stacked to form a stable G-quadruplex structure. (d) The GC-rich region within exon 2 of the *TMPRSS2* gene may form hairpin and G-quadruplex structures. The guanine and cytosine stretches are highlighted in blue and green, respectively.

子においては、G4 形成配列 (Figure 4-2 a 青色部分) に隣接して、シトシンリッチな配列 (Figure 4-2 a 緑色部分) が存在することを見出した。このシトシンリッチな配列は、グアニンリッチな G4 形成配列と G-C 塩基対を介した分子内ヘアピン構造を形成できる。すなわち、*TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域は、環境などに応じて G4 とヘアピン構造間で構造スイッチが生じている可能性がある (Figure 4-2 d)。このような G4 とヘアピン構造間の構造スイッチは、これまでに報告例がなく、G4 が関与する遺伝子発現制御における新機構となる可能性がある。さらに、この G4 とヘアピン構造間の構造スイッチが、*TMPRSS2* の発現を制御している可能性があるため、*TMPRSS2* 遺伝子で形成される G4 や構造スイッチを標的とすることで、AR シグナル以外による *TMPRSS2/ERG* 遺伝子の発現制御が可能になると期待される。そこで本研究では、*TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域で見いだされたグアニンとシトシンリッチな配列で形成される二次構造を検討し、その形成が転写に与える影響について説明することを試みた。

まず、シトシンとグアニンリッチな配列の二次構造を説明することを試みた。本配列は、比較的長い鎖長 (80 塩基) を有するため、NMR や結晶構造解析などで、直接的に構造を決定することは困難である。そこで、G4 と分子内ヘアピン構造のどちらも形成しうる *TMPRSS2* 遺伝子由来の配列 (+98~+177) を WT として、G4 および分子内ヘアピン構造のそれぞれの構造のみを形成する変異配列と、どちらの構造も形成しない変異配列を、m-fold<sup>[93]</sup>の構造予測によって得られる二次構造の熱安定性 ( $\Delta G^{\circ}_{25}$ ) をもとに設計した。分子内ヘアピン構造を形成せず G4 のみを形成する配列を MT1、G4 ならびに分子内ヘアピンどちらも形成しない配列を MT2、G4 は形成せず WT と同程度の安定性の分子内ヘアピン構造のみを形成する配列を MT3、G4 は形成せず WT よりも安定性の高い分子内ヘアピン構造のみを形成する配列を MT4 として、各々のオリゴ DNA を設計した (Figure 4-3 a, b : 赤文字が変異箇所)。MT2、MT3 および MT4 は、G4 の形成に関与するグアニンの連続配列に変異を導入することで G4 を形成できないように設計した。m-fold<sup>[93]</sup>による構造予測からは、WT、MT3 および MT4 では分子内ヘアピン構造を形成する可能性が示唆され、算出された  $\Delta G^{\circ}_{25}$  は、WT が  $-24.8$  kcal/mol、MT1 が  $-12.8$  kcal/mol、MT2 が  $-13.1$  kcal/mol、MT3 が  $-24.3$  kcal/mol、MT4 が  $-29.0$  kcal/mol と予測された (Figure 4-3 c)。

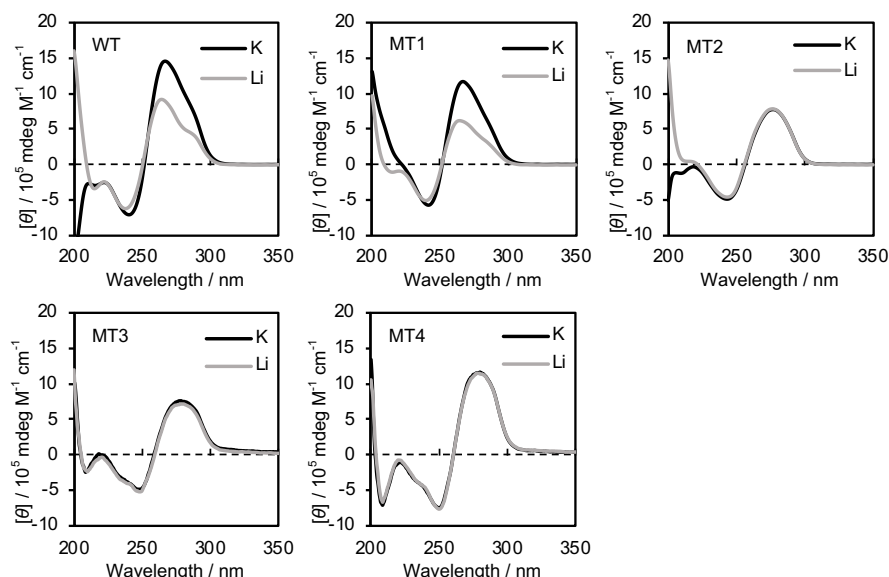


**Figure 4-3 Schematic diagram showing the location of the GC-rich region in the *TMPrSS2* gene.**

The guanine and cytosine stretches are highlighted in blue and green, respectively. WT is a wild-type sequence. MT1 has C-to-T mutations. MT2 has C-to-T and the G-to-A mutations. MT3 has the same secondary structure and thermodynamic stability ( $\Delta G_{25}^{\circ}$ ) as the WT. MT4 is designed as MT3 but has a higher thermodynamic stability than the WT. Note that MT3 and MT4 do not have any guanine stretch and thus cannot form G4. The mutation sites are indicated by the red letters. The Sequences of WT, MT1 and MT2 are shown for comparison. (b) Possible WT, MT1, MT2, MT3 and MT4 structures. (c) Possible WT, MT1, MT2, MT3 and MT4 structures and their thermodynamic stability at 25°C. These structures were predicted using m-fold. The mutation sites are indicated by the red letters.

これらのオリゴ DNA の構造を検討するために、20  $\mu$ M のオリゴ DNA を 150 mM LiCl 存在下、および G4 が安定化する 150 mM KCl 存在下で CD スペクトルを測定した。その結果、WT および MT1 においては、150 mM LiCl 存在下では 240 nm 付近に負のピーク、260 nm 付近に正のピーク、および 290 nm 付近にショルダー型のピークが確認できた。150 mM KCl 存在下では、290 nm のピークが減少するとともに 260 nm のピークが増強された。上述したように G4 の構造安定性は、共存カチオン種に依存することから、WT と MT1 は、カリウムイオン依存的にスペクトルの変化が確認されたため、G4 を形成していることが示唆された。一方、MT2、MT3 および MT4 では、150 mM LiCl 存在下と 150 mM KCl 存在下どちらにおいても、

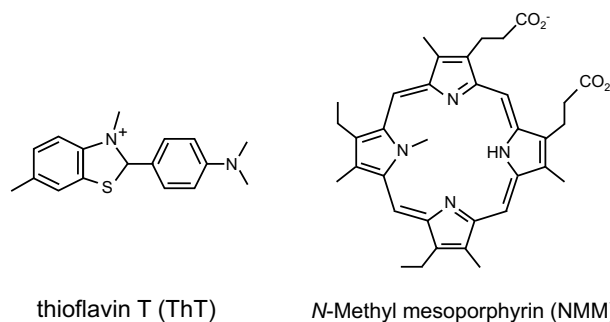
240 nm 付近に負のピーク、280 nm 付近に正のピークを示した。また、MT2、MT3 および MT4 は、共存イオンに依存した CD スペクトルの変化が観察されなかったため、本実験条件では G4 を形成していないことが示唆された (Figure 4-4)。



**Figure 4-4 Tmprss2 WT and MT1 changed conformation in the presence of potassium ion.**

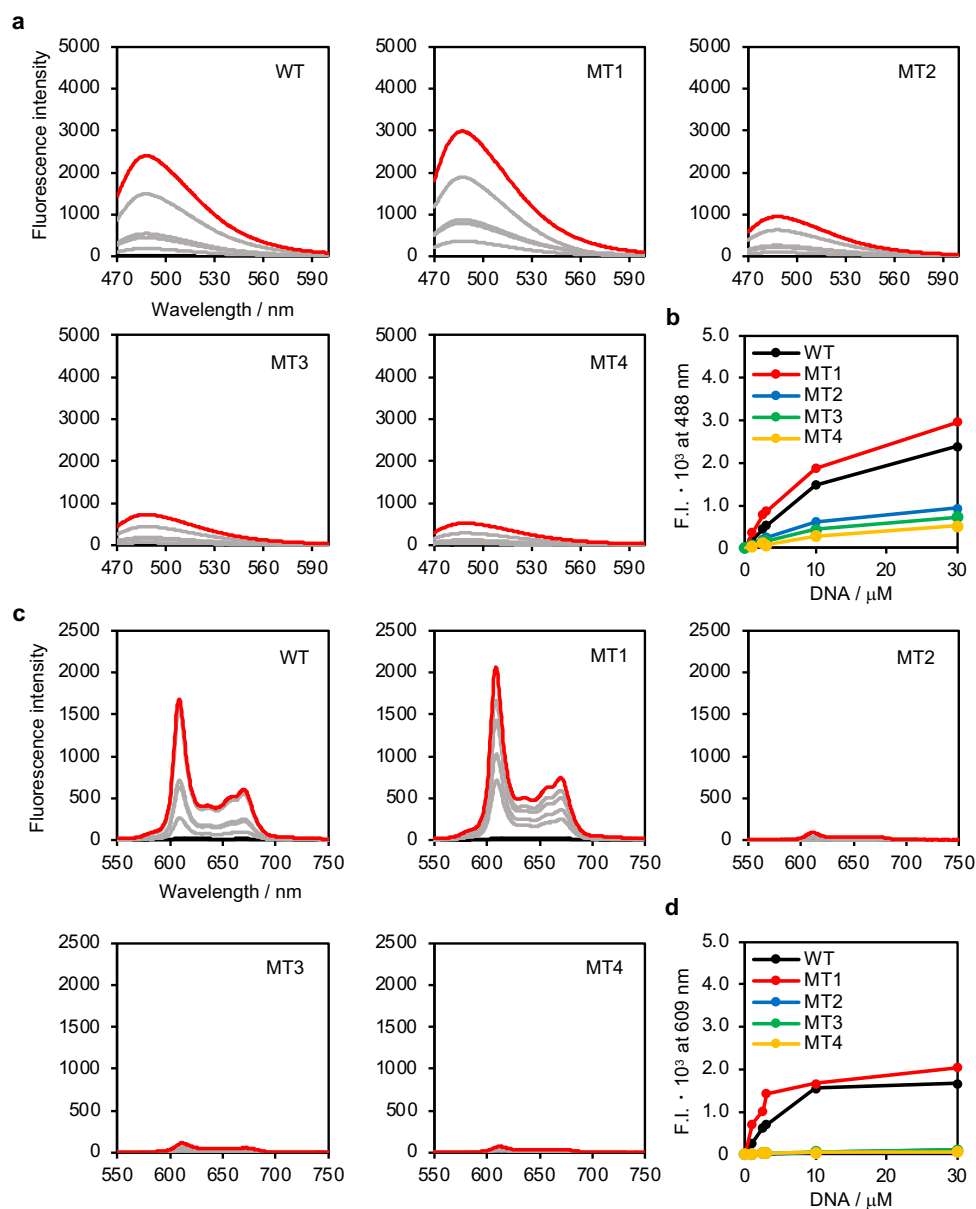
CD spectra of 20  $\mu$ M WT, MT1, MT2, MT3 or MT4 in buffers containing 150 mM KCl (black line) or 150 mM LiCl (gray line), 40 mM Tris-HCl (pH 7.2), and 8 mM  $MgCl_2$  at 25°C.

そこで、WT、MT1~4 が G4 構造を形成しているのかどうか確認することを目的として、G4 に結合することで蛍光が増強することが報告されている ThT<sup>[94]</sup>、および NMM<sup>[95]</sup> (Figure 4-5) とオリゴヌクレオチドの結合解析を行った。ThT との結合実験においては、WT と MT1 では ThT が発する波長 488 nm 蛍光が DNA の濃度依存的に顕著に増大した。一方、MT2、MT3 および MT4 では蛍光の増大が観察されなかった (Figure 4-6 a)。同様に NMM との結合実験においても、WT と MT1 においては DNA の濃度依存的に波長 610 nm の蛍光が顕著に増大したのに対し、MT2、MT3 および MT4 では蛍光の増大が観測されなかった。ThT と NMM の蛍光挙動は一致しており、WT と MT1 が G4 を形成するのに対して、MT2、MT3 および MT4 にお



**Figure 4-5 Chemical structure of thioflavin T (ThT) and N-Methyl mesoporphyrin (NMM).**

いては G4 を形成しないことが確認された (Figure 4-6 b)。また、ThT と NMM のいずれにおいても、WT よりも MT1 の蛍光強度の増大が大きいことも示された。これは、WT では G4 とヘアピン構造の二つの構造が競合するのに対して、MT1 では当初の設計通りにヘアピン構造が形成されず、G4 の形成が促進されたことを示している。これらのことから WT は、実験条件によって G4 とヘアピン構造の二つの構造がスイッチしている可能性が示された。

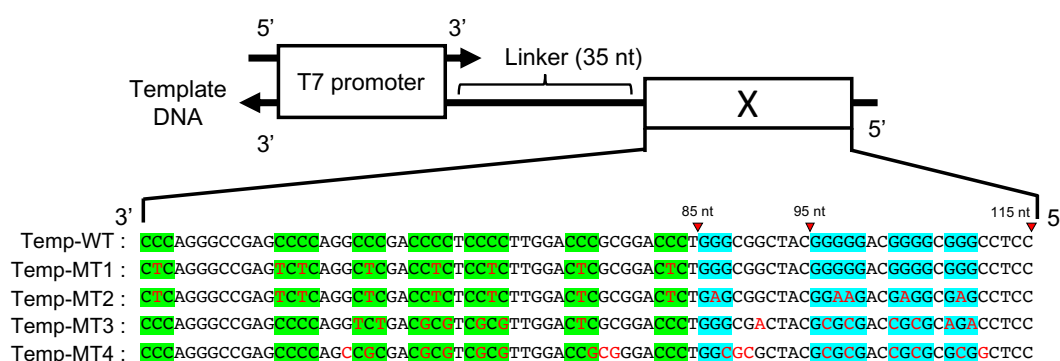


**Figure 4-6 TMRSS2 WT and MT1 increase fluorescence of ThT and NMM in the presence of potassium ion.**

Fluorescence spectra for 1 μM ThT (a, b), or 1 μM NMM (b, c) in the presence of 0-30 μM WT, MT1, MT2, MT3, MT4 DNA oligonucleotides in buffer containing 150 mM KCl, 40 mM Tris-HCl (pH 7.2), and 8 mM MgCl<sub>2</sub> at 25°C (ThT: Ex = 450 nm, Em = 470-600 nm, NMM: Ex = 399 nm, Em = 550-750 nm). Fluorescence intensity of ThT at 488 nm (b) or NMM at 609 nm (d) in the presence of various concentrations of WT (black), MT1 (red), MT2 (blue), MT3 (green), MT4 (yellow).

#### 4-3-2 *TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される G4 が転写に与える影響

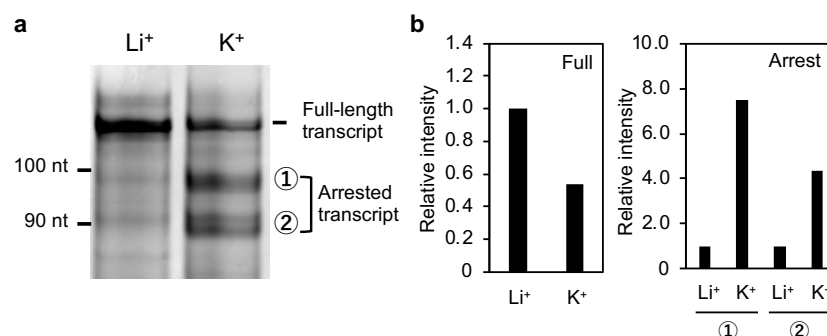
*TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域で確認された二次構造スイッチが転写に与える影響について検討した。転写活性の検討のため、T7 ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写システムで鋳型となる DNA 鎖を設計した<sup>[96]</sup> (Figure 4-7)。鋳型鎖には、T7 ポリメラーゼが結合して転写を開始するために必要な T7 プロモーターと *TMPRSS2* 遺伝子由来の配列を導入した。また、標的配列の二次構造の形成を阻害しないために、T7 プロモーターと標的配列の間には 35 nt のスペーサー配列を組み込んだ。



**Figure 4-7 Design of the template strand for the T7 transcription experiments.**

Temp-WT, Temp-MT1, Temp-MT2, Temp-MT3 and Temp-MT4 contain WT, MT1, MT2, MT3 and MT4, respectively. The T7 RNA polymerase-binding site is separated from the GC-rich region by a linker sequence with a length of 35 nucleotides. The cytosine- and guanine-stretches are shown in green and blue, respectively. The 85th, 95th, and 115th nucleotides from transcription start site are highlighted by red arrows. The total length of all templates is 152 nucleotides.

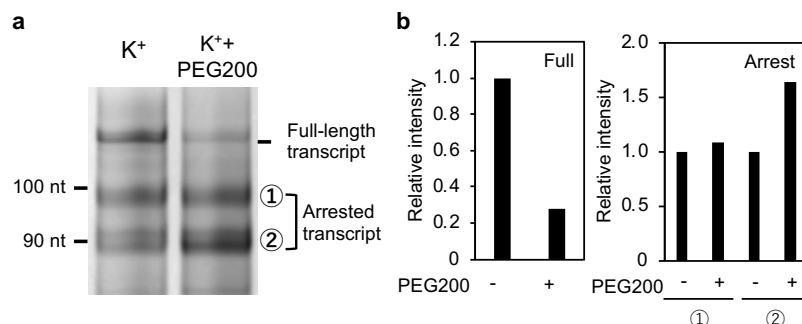
分子内ヘアピンと G4 のどちらの構造も形成しうる Temp-WT を用いて、G4 を安定化しない 150 mM LiCl 存在下、および G4 を安定化する 150 mM KCl 存在下で転写反応を行なった。反応後に、転写産物を変性ゲル電気泳動で分離し、定量化することで、鋳型鎖の構造が転写に及ぼす影響を検討した。その結果、150 mM LiCl 存在下で、Temp-WT から、100 nt のマーカーよりも産物の鎖長が長く、全長が転写された転写産物に由来するバンドが一つ検出された (Figure 4-8 a)。一方、150 mM KCl 存在下では、全長が転写された転写産物由来のバンドと共に、100 nt よりも短く転写が途中で停止した転写産物に由来するバンドが二つ検出された。これらのバンドの蛍光強度を定量的に解析したところ、150 mM KCl 存在下では 150 mM LiCl 存在下と比較して、全長の転写産物量は 0.54 倍に減少しており、転写が途中で停止した短い転写産物について、鎖長が長いものと短いものがそれぞれ 7.5 倍と 4.4 倍に増加した (Figure 4-8 b)。150 mM KCl 存在化においてのみ、転写反応が途中で停止していることから、Temp-WT を用いた転写反応では、G4 の形成によって転写が停止している可能性が示唆された。



**Figure 4-8 Transcription of TMPRSS2 is arrested by the formation of G-quadruplex**

(a) Transcripts from Temp-WT in the presence of Li<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>. (b) Relative amounts of full and arrested transcripts observed in panel (a), respectively.

この転写反応の停止が、G4 の形成によるものであることを確認するために、核酸の二次構造の安定性に影響を及ぼすことが知られている PEG200 存在下での転写反応を行った。PEG200 によって誘起される分子クラウディング環境は、希薄溶液環境と比較して、Watson-Crick 型の二重鎖構造を不安定化するのに対して、G4 を安定化することが知られている<sup>[97]</sup>。そこで 10% PEG200 存在下で Temp-WT を用いて転写反応を行ったところ、150 mM KCl 存在下で転写を行った時と同様に、完全長の転写産物の他に、転写が途中で停止することで産生される二つの短い転写産物が確認された (Figure 4-9 a)。各バンドの蛍光強度を定量的に解析したところ、PEG200 の存在下では非存在下と比較して、全長の転写産物量は 0.28 倍に減少しており、転写が途中で停止した短い転写産物について、鎖長が長いものと短いものがそれぞれ 1.08 倍と 1.64 倍に増加した (Figure 4-9 b)。このように、PEG200 による分子クラウディングによって、完全長の転写産物量がさらに減少するのに対し、不完全長の転写産物量は増大した。PEG200 存在下では、G4 の直前で転写が停止したと考えられる、鎖長が短い転写停止産物の割合がより顕著に増加したことからも、これは PEG200 が G4 を安定化し、ヘアピン構造を不安定化した事に起因すると考えることができる。これらのことから、TMPRSS2 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される G4 が転写を抑制することが確認された。さらに、G4 とヘアピン間の構造スイッチが転写活性を制御していることも示された。

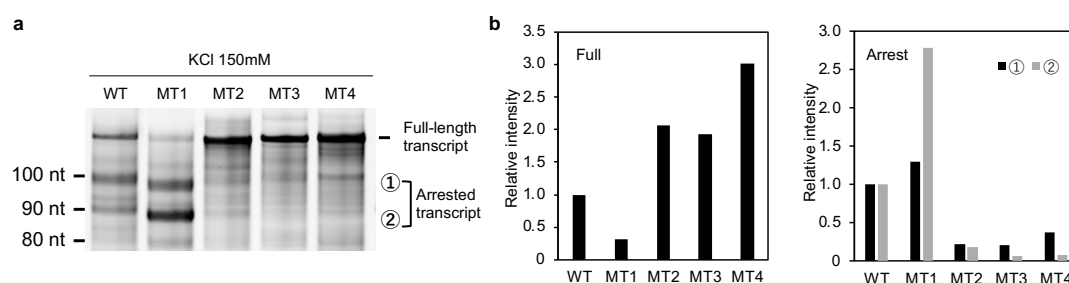


**Figure 4-9 Stabilization of G-quadruplex by PEG200 more arrests transcription.**

(a) Transcripts from Temp-WT in the presence of K<sup>+</sup> at 0 and 10 wt% PEG200. (b) Relative amounts of full and arrested transcripts observed in panel (a), respectively.

### 4-3-3 *TMPRSS2* 遺伝子の鋳型鎖が形成する二次構造の分子内競合とその役割

*TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される G4 は転写を阻害することが示された。興味深いことに、この領域は G4 だけでなくヘアピン構造も形成しうるため、分子内で二つの構造が競合している状態にあることが G4 の蛍光プローブを用いた検討と CD スペクトルによる検討により示された。そこで、これらの二次構造が転写に与える影響について検討するため、WT の配列に変異を導入した MT1、MT2、MT3 および MT4 (Figure 4-3) の配列を鋳型鎖に組み込んだ Temp-MT1、Temp-MT2、Temp-MT3 および Temp-MT4 (Figure 4-7) を設計した。前述の Temp-WT と同様に、G4 を安定化する 150 mM KCl 存在下で *in vitro* 転写反応を行った。その結果、G4 のみを形成する Temp-MT1 では、不完全長の転写産物が確認された。一方、G4 とヘアピン構造のどちらも形成しない Temp-MT2、ヘアピン構造のみを形成する Temp-MT3 と Temp-MT4 では、全長の転写産物のみが確認された (Figure 4-10 a)。Temp-WT と Temp-MT1 の比較から、短い転写産物が G4 の形成により誘起されることが確認された。また、Temp-MT3 と Temp-MT4 の結果からは、ヘアピン構造が鋳型際に形成された場合でも、転写反応が停止しないことも示された。さらに、Temp-MT1 は Temp-WT と比較して全長の転写産物量が 0.31 倍に減少した (Figure 4-10 b)。一方、転写が途中で停止した不完全長転写産物は、鎖長が長いものと短いものがそれぞれ 1.30 倍と 2.79 倍に増加した。転写停止産物において、鎖長の短いものは G4 の直前、鎖長の長いものは G4 構造の途中で転写が停止しており、より安定な G4 を形成している場合において、G4 の直前で停止する割合が増加することが考えられる。Temp-MT1 は、Temp-WT と比較して G4 の直前で停止する転写産物量が顕著に増加した。これは、Temp-WT はヘアピン構造と G4 が競合してどちらの構造も形成されている可能性があるが、Temp-MT1 はシトシンリッチ領域に変異をもちヘアピン構造を形成せず、G4 のみをより安定的に形成していることに起因していると考えられる。またこのことは、G4 を形成する配列近傍に存在するシトシンリッチな配列領域は、G4 を形成しうるグアニンリッチな配列領域とヘアピン構造を形成することによって、G4 形成による転写阻害効果を抑制する機能をもつ可能性があることを示している。Temp-MT2、Temp-MT3、Temp-MT4 においては、Temp-WT



**Figure 4-10 Transcription is not arrested in the formation of hairpin structures.**

(a) Transcript production from Temp-WT, Temp-MT1, Temp-MT2, Temp-MT3 and Temp-MT4. Reaction mixtures contains 100 units T7 polymerase, 2.5  $\mu$ M DNA template in the buffer of 150 mM KCl, 40 mM Tris-HCl (pH 7.2), 8 mM MgCl<sub>2</sub>. Denaturing gel electrophoresis were carried out at 70°C of transcription reaction products after 120 min at 37°C. (b) Relative amounts of full and arrested transcripts observed in panel (a), respectively.



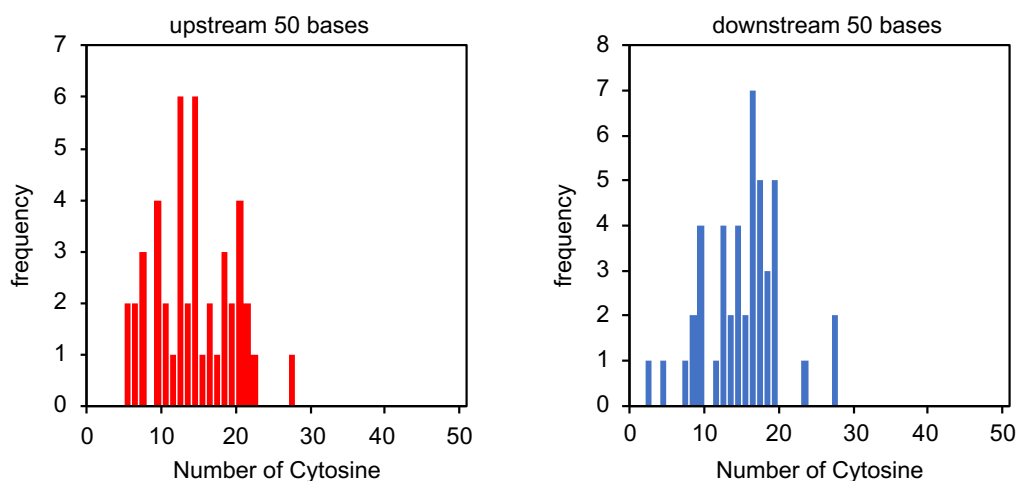
と比較して全長の転写産物量が 2.07 倍、1.92 倍、3.01 倍といずれも増加した。一方、不完全長の転写産物は、鎖長が長いものが 0.22 倍、0.21 倍、0.38 倍、鎖長が短いものが 0.18 倍、0.07 倍、0.08 倍といずれも顕著に減少していた。これらのことから、Temp-MT2、Temp-MT3、Temp-MT4 は、Temp-WT と比較すると、転写が途中で停止した短い転写産物が顕著に減少しており、全長の転写産物がより多く産生された。Temp-MT2、Temp-MT3、Temp-MT4 が形成するヘアピン構造は異なる熱力学的安定性となるように配列が設計されている。これらのことから、G4 を形成しない鋳型鎖において形成される二次構造がヘアピンである場合、その熱力学的な安定性に関わらず、転写は阻害されないことが確認された。これは G4 が形成されている場合とは対照的であり、シトシンリッチな配列はグアニンリッチな配列が形成する G4 の転写阻害効果を周辺環境に応じて制御していることを示唆している。

大変興味深いことに、*TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される G4 の近傍に存在するシトシンリッチ領域は、G4 形成配列とヘアピン構造を形成することで、G4 の形成、ならびにそれによる転写の阻害効果を制御する機能が示された。これまで行われてきた G4 に関する研究の多くは、G4 の形成配列のみに注目して行われているものが多い。しかしながら、今回得られた結果を踏まえると、G4 を形成する配列の前後にシトシンリッチな領域が存在する場合は、ヘアピン構造を形成することによって G4 の形成が抑制されている可能性がある。そこで、*TMPRSS2* 以外のプロテアーゼをコードする遺伝子において、G4 を形成推定配列[G<sub>3</sub>N<sub>1-7</sub>G<sub>3</sub>N<sub>1-7</sub>G<sub>3</sub>N<sub>1-7</sub>G<sub>3</sub>]を有する遺伝子の G4 形成推定配列と、G4 形成配列の前後 50 bp における、シトシンの含有数を網羅的に解析した。さらに同定されたグアニンリッチとシトシンリッチ領域で形成可能なヘアピン構造の熱力学的安定性 ( $\Delta G^{\circ}_{25}$ ) を m-fold<sup>[93]</sup>を用いて算出したものを Table 4-2 に記した。すべてではないものの、多くのプロテアーゼには G4 形成推定配列が同定された。さらに、すべてではないものの同定された遺伝子には、G4 形成推定配列に隣接する上流と下流領域にシトシンが多く含まれていることがわかった。さらに、その配列が形成するヘアピン構造の  $\Delta G^{\circ}_{25}$  からは、熱力学的に安定なヘアピン構造を形成可能であることが示された。

**Table 4-2 Putative quadruplex sequences (PQS) and number of cytosines at upstream or downstream 50 bases from PQS in some proteases.**

Name	Mathcd sequence (anti-sense: 5'→3')	up	$\Delta G_{25}^{\circ}$	down	$\Delta G_{25}^{\circ}$
CAPN2	GGGCCGAGGGGATGGCCGGGAAGGACGGG	20	-17.1	17	-14.8
CAPN9	GGGTGATCCGGGCGTCTTGGAACCGGG	14	-13.7	16	-14.2
CAPN10	GGGAGGGATCCTGGGAAGCTCTGGGATCCTGGGG	20	-15.0	14	-16.3
CTSA	GGGATGTACAGGGCTCTGGGAAGGGGG	14	-9.6	16	-14.9
CTSD	GGGTGTGTGTGGGAGGGGCCGCTGGGCCAGGGG	19	-16.8	14	-15.8
Furin_1	GGGGGCATGGGGCCGAGACGGGCAGGGCTCGGGAGGG	6	-11.4	19	-18.5
Furin_2	GGGACTTGGGCCCTGACGGGAGAGGCGGG	10	-11.9	17	-12.5
Furin_3	GGGCCAGGGCAGCCAGGGAGGAGCAGGG	12	-10.4	23	-13.0
Furin_4	GGGCAGGGGGATGGGAGAGGAGGGGGCACCCCTGGG	7	-13.0	19	-17.4
MMP3	GGGTACCAGGGGGGTCTCAGGGGAGTCAGGGGG	7	-9.3	12	-14.6
MMP19_1	GGGCTGCCCGGGCTGTGTGGGGTGAAGGGTGGAGGG	12	-9.6	12	-11.6
MMP19_2	GGGGCCATGAGGGCCTGGGAATATCGGG	17	-18.4	14	-12.4
MMP19_3	GGGACTGGGTTCTGTGGGCACTGGGGGCACAGTGGG	19	-6.0	17	-15.8
TPSB2_1	GGGACGGGGGGACCGGGGTGGG	14	-16.6	8	-7.9
TPSB2_2	GGGCCTGGCCGGGCCTCACAGGGCAGGGCTGGGGG	6	-16.1	12	-16.5
TPSB2_3	GGGAGTGGGGGTTGGGGGGCGGGGGCGGGGACAGGCGGGG	20	-14.5	16	-12.4
TPSB2_4	GGGCAGGGGAGGGCCGGAGGG	10	-8.9	16	-10.2
ADAM12	GGGCGCGGGCGGGGGACACGGGCAGCGGG	21	-25.1	17	-19.3
MMP15_1	GGGGGTTGAAGGGCGGCCGGGCCACGTCGGGCCATCGGGGG	18	-25.0	27	-22.1
MMP15_2	GGGCGGGGCAGACAGGGTGTGTGAGGGCTGAGAGGGG	18	-17.9	9	-7.9
MMP15_3	GGGCCAAGGGGAGGTGGGAGCTGGGGG	13	-15.2	12	-12.8
MMP17	GGGGGCTCTGGGCGGGGTAGCCGGGG	14	-9.0	19	-18.0
MMP25_1	GGGCCTGGGCAGGGTGGGG	12	-8.1	16	-7.1
MMP25_2	GGGGGTCGCTTTGGGGGGCCTGGGGGCGCGGGG	15	-15.1	16	-11.4
MMP25_3	GGGAAGGGGTTCTTGGGGATAGAAGGG	12	-12.1	11	-6.9
TMPRSS2_1	GGGCGGGGCAGGGGGCATCGGCGGG	27	-19.0	27	-17.0
TMPRSS2_2	GGGGCGTACTGGGGCACGGGGACGGG	12	-11.0	13	-13.8
TMPRSS5	GGGGCAGGGAGGGGAGAGGGCAGAAGGG	21	-16.3	18	-12.3
TMPRSS6_1	GGGCAGAGGGGGCGGGATCGGGG	11	-10.5	9	-8.9
TMPRSS6_2	GGGGAAGGGGAGAGGCTGGGTAGGG	12	-12.0	7	-4.0
TMPRSS6_3	GGGAATCAGGGCATGGGACGGG	5	-4.2	9	-6.1
TMPRSS6_4	GGGCCCCCAGGGGAGGGGTATATGGGGAGGG	16	-18.1	17	-18.8
TMPRSS6_5	GGGCTGGGCAGGGGAGCCGGTGGGG	20	-13.0	16	-17.8
TMPRSS6_6	GGGCTGGGCTCTGGGAGGGGAGTGGCAGGGAGGG	9	-9.3	15	-13.2
TMPRSS6_7	GGGTGCCAAGGGGAGAGGGCAGGGAGGGGTGAGGGGCAGAGGGGAG	9	-9.0	18	-12.8
TMPRSS6_8	GGGCAGGTGGGCAGGCAGGGTGGGG	9	-9.6	18	-9.3
TMPRSS6_9	GGGCACCTGGGAGGGAGGAGCGGG	16	-19.8	15	-9.4
TMPRSS6_10	GGGAAGAGAGGGAGGGGGAGGG	7	-8.6	9	-4.1
TMPRSS6_11	GGGATGGGCAGGGAGAGGGATGCGCGGGCGGG	18	-13.0	8	-9.7
TMPRSS6_12	GGGTGGATGGGTGGGTGGGTAGATGGGTGGG	5	-2.4	2	0.3
TMPRSS6_13	GGGACAGAGGGGATGGGGGCAGGG	13	-10.2	19	-12.0
TMPRSS6_14	GGGTCTAGTGGGGAGCGGGTGGG	9	-11.7	14	-9.7
TMPRSS6_15	GGGGTGGGTTGGGGTGGGGTGGGGTGGGG	14	-12.6	19	-14.5
TMPRSS6_16	GGGCTGGGTGTGGGCCTGGGTCTCAGGGG	22	-12.2	4	-5.7
TMPRSS9	GGGGGAGACATGGGAAGGGGCTGGG	14	-9.5	13	-13.1

そこで、G4 形成推定配列の上流および下流 50 bp 内に含まれるシトシンの数を横軸、頻出度を縦軸にしたグラフを作成した (Figure 4-11)。G4 形成配列前後 50 bp 以内に含まれるシトシンの数の平均は上流が  $13.8 \pm 5.2$ 、下流が  $14.6 \pm 5.1$  であり、有意にその数が多いことが示された。この結果は、今回明らかにした G4 形成配列近傍のシトシンリッチ配列が *TMPRSS2* に限らず、多くのプロテアーゼをコードする遺伝子において、G4 の形成と転写の調節により遺伝子発現を制御している可能性を示している。ヘアピン構造は熱力学的に安定な構造を形成していても転写には影響を与えないため<sup>[98]</sup>、G4 を形成する配列を有する遺伝子の近傍に C リッチな配列領域がある場合は、ヘアピンと G4 の安定性を化合物などで制御することができれば、遺伝子の発現をオンにもオフにもすることができる、新しい遺伝子発現制御方法を確立できる可能性が示された<sup>[27]</sup>。



**Figure 4-11** Frequency graphs of the number of cytosine bases 50 bases upstream or downstream from the putative quadruplex sequences.

#### 4-4 結論と展望

本研究では、*TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域にグアニンリッチ領域がシトシンリッチ領域と隣接して存在することを見出した。この領域では、G4 とヘアピン間で構造がスイッチしており、G4 が形成されることで転写が阻害されることを明らかにした。このことから、この G4 に結合し、構造を安定化できる薬剤を見つけ出すことによって、RAS シグナルの下流でがんの悪性化に寄与する *TMPRSS/ERG* の発現を抑制できる可能性がある。*TMPRSS2/ERG* は、AR の結合によって *TMPRSS2* 遺伝子と *ERG* 遺伝子の共通配列部分が切断され、再結合の際に転座が生じる<sup>[99]</sup>。*TMPRSS2* 遺伝子に存在する転座に重要な共通配列は、G4 形成配列よりも下流に存在しているため、G4 の形成は転座後の *TMPRSS2/ERG* の遺伝子発現にも同様に寄与していると考えられる。*TMPRSS2* 遺伝子の G4 を安定化する薬剤を開発し、*TMPRSS2* の発現を抑制することができれば、AR シグナル阻害剤とは異なる経路でのがん治療に期待ができる。

さらに本研究では、*TMPRSS2* 遺伝子の G4 形成配列の近傍に存在するシトシンリッチ領域が、G4 を形成するグアニンリッチな領域との間で G-C 塩基対を形成し、G4 とヘアピン構造の分子内競合をすることによって、G4 形成による転写抑制効果を低下させている可能性について示すことができた。同時に、*TMPRSS2* 遺伝子以外にも G4 形成配列の近傍にシトシンリッチな領域をもつ遺伝子が多く存在することも明らかにした。そのため、G4 形成配列近傍に存在するシトシンリッチな領域は、*TMPRSS2* 遺伝子だけでなく様々な遺伝子上で G4 の形成に影響を与え、転写制御に関与している可能性がある。これまで行われてきた G4 の研究は、G4 形成配列のみに注目しているものがほとんどであった。しかしながら、本研究結果が示すように、G4 形成配列だけでなくその近傍に存在する配列の転写活性制御における重要性は極めて高い。本研究によって、G4 に関する研究では近傍の配列に関して改めて考慮する必要性があることを提示することができた。

## 第5章 フタロシアニン誘導体を用いた *RAS* の遺伝子発現制御法の確立

### 5-1 序論

*RAS* の上流や下流の分子を標的としたがんの治療薬は、一つの分子を標的としてその活性を抑制できても、その他の経路が活性化し、薬剤耐性を獲得することが多々報告されており、様々な薬剤の掛け合わせなどにより治療効果を高めているのが現状である。そのため、それらの経路のハブとして機能する *RAS* 分子を直接標的とした治療薬の開発が求められている<sup>[100]</sup>。*RAS* にはアミノ酸配列が類似した三つのアイソフォーム *KRAS*、*HRAS*、*NRAS* が存在する。中でも *KRAS* と *NRAS* は、多くのがん種において、その悪性化に関与することが知られている<sup>[101]</sup>。本章では、*NRAS* をコードする *NRAS* mRNA を標的分子とすることで、*NRAS* の発現を抑制することを試みた。*NRAS* mRNA は、G4 を形成する配列を 5'UTR に有している<sup>[102]</sup>。G4 を標的とした化合物は、がんなどの治療薬として研究されており<sup>[85,103]</sup>、第4章では、*TMPRSS2/ERG* の発現制御において G4 結合分子 (リガンド) の探索が有効なアプローチであることを示した。そこで、*NRAS* mRNA が形成する G4 に選択的に結合する G4 リガンドの探索を行った。さらに本研究では、光増感能をもった光感受性 G4 リガンドを探索した。光感受性物質が G4 リガンドとしても機能するのであれば、低侵襲ながん治療方法である光線力学療法 (PDT: Photodynamic therapy) を分子標的型へと応用することが可能になる。PDT は、光増感剤を腫瘍部位に取り込ませたのちに、光を腫瘍部位に照射することで活性酸素種 (ROS: Reactive oxygen species) を発生させることで、がん細胞を死滅する治療方法である<sup>[104,105]</sup>。本研究で開発を試みる分子標的型 PDT が達成できれば、既存の PDT における作用機序が不明であること、術後の長期間にわたる暗所での滞在、正常細胞への副作用などの問題としてあげられる点について回避できる可能性が期待される。

### 5-2 実験方法

#### 5-2-1 試薬調製

DNA 及び RNA オリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト法により固相合成し、逆相カートリッジカラムで精製、凍結乾燥したものをシグマアルドリッチ株式会社 (Sigma-Aldrich) および北海道システムサイエンス株式会社 (Hokkaido System Science) より購入した。これらの分子の濃度は、オリゴヌクレオチドを蒸留水で溶解し、UV-1800 分光光度計 (Shimadzu) を用いて 260 nm における 90°C での吸光度を測定し、各 DNA または RNA オリゴヌクレオチドのモル吸光係数  $\epsilon$  ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) から算出した (Table5-1)。ZnAPC [Zinc (II) phthalocyanine 3,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid, tetrasodium salt] は Frontier Scientific より購入した。FeAPC [Iron (III) phthalocyanine-4,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid, monosodium salt, compound with oxygen, hydrate]、NiAPC

[Nickel (II) phthalocyanine-tetrasulfonic acid tetrasodium salt]、CuAPC [Copper (II) phthalocyanine-3,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid, tetrasodium salt] は Sigma-Aldrich より購入した。濃度は、99 w/w% ジメチルホルムアミド (DMF) / H<sub>2</sub>O で溶解後、波長 680 nm における 25°C での吸光度を測定し、波長 680 nm におけるモル吸光係数 ( $\epsilon=2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) <sup>[106]</sup> から算出した。緩衝溶液には 50 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) (富士フイルム和光純薬) を用いた。塩化カリウム (富士フイルム和光純薬) を添加後、塩酸 (富士フイルム和光純薬) または水酸化リチウム (富士フイルム和光純薬) を用いて pH 7.0 に調製した。アクチノマイシン D および N - アセチルシステイン (NAC: N - acetyl cysteine) は、富士フイルム和光純薬から購入した。ヒドロキシフェニルフルオレセイン (HPF) は、五稜化薬株式会社から購入した。抗 N-Ras マウスモノクローナル抗体 (sc-31, Santa Cruz Biotechnology) および抗  $\beta$ -アクチンマウスモノクローナル抗体 (A1978, Sigma-Aldrich) を一次抗体として用いた。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗マウス IgG 抗体 (NXA931V, Amersham Pharmacia) を二次抗体として用いた。

Table 5-1 Sequences of oligonucleotides in this study

Oligonucleotide	Sequence (5' → 3')
NRAS RNA	GGGAGGGGCGGGUCUGGG
dsRNA	AGUUCAAGGCGCCUUGAACU
VEGF RNA	GGAGGAGGGGAGGAGGA
BCL2 RNA	GGGGGCGGUGGGGUGGGAGCUGGGG
NRAS MT1 RNA	GGGAGGAGGGGGAGGGAGGG
NRAS MT2 RNA	GGGCGGUGGGGUGGGAGCUGGG
NRAS MT3 RNA	GGAGGGCGGUCUGG
NRAS MT4 RNA	GGGGAGGGGCGGGUCUGGGG
NRAS MT5 RNA	UGGGAGGGGCGGGUCUGGGU
NRAS DNA	GGGAGGGGCGGGTCTGGG

## 5-2-2 円二色性スペクトルの測定

円二色性 (Circular Dichroism: CD) スペクトルの測定は、0.1 cm の光路長の石英セルを用いて J-820 分光光度計 (JASCO) で行った。50 mM MES-LiOH (pH7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝液中での、20  $\mu\text{M}$  オリゴヌクレオチド各試料を 90°C で 5 分間加熱し、0.5°C / min で 25°C まで穏やかに冷却した後、25°C でスペクトルを測定した。

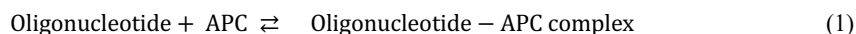
## 5-2-3 吸収スペクトル測定

吸収スペクトルの測定は、光路長が 1 cm の石英セルを用いて UV-1800 分光光度計 (Shimadzu) で行った。50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝溶液中で 0 - 20  $\mu\text{M}$  の RNA 存在下での 2  $\mu\text{M}$  の

フタロシアニンの吸収スペクトルを、測定前に各試料を 90°C で 5 分間加熱し、0.5°C / min で 25°C まで穏やかに冷却した後、測定間隔を 0.5 nm とし、25°C で 550 nm から 750 nm まで測定した。

#### 5-2-4 解離定数の算出

50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝液中で、2  $\mu$ M ZnAPC, FeAPC, NiAPC, CuAPC に対して 0 - 20  $\mu$ M RNA または DNA を滴下した際の吸収スペクトルを、25°C で 550-750 nm で測定した。測定は、各試料を 90°C で 5 分間加熱後、0.5°C / min で 25°C まで穏やかに冷却し、1 cm の光路長を有する石英セルと温度コントローラー-TMSPC-8 (Shimadzu) に接続した分光光度計 UV-1800 (Shimadzu) を用いて行った。得られた吸収スペクトルの 680 nm の吸光度 ( $Abs_{680}$ )を RNA および DNA のモル濃度に対してプロットし、Kaleida Graph (Synergy software) を用いて、25°C における、各フタロシアニン誘導体 (APC) と RNA または DNA オリゴヌクレオチドとの解離定数 ( $K_d$ ) を算出した。オリゴヌクレオチドとフタロシアニン誘導体の結合比率が 1:1 であると仮定すると、複合体形成は以下のように表すことができる。



(1)式の反応において、任意のオリゴヌクレオチド濃度における のときの波長 680 nm における吸光度  $Abs$  は、(2) 式で示される。

$$Abs = \Delta Abs \times [\text{Oligonucleotide}] / (K_d + [\text{Oligonucleotide}]) + Abs_0 \quad (2)$$

(2) 式において、 $\Delta Abs$  は吸光度の最大変化量、 $Abs_0$  はオリゴヌクレオチド非存在下での吸光度である。(2) 式を用いて得られたデータをカーブフィッティングすることで、25°C における解離定数 ( $K_d$ ) を算出した。

#### 5-2-5 細胞培養

American Type Culture Collection (ATCC) から購入した MCF-7 ヒト乳癌由来細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS, Sigma-Aldrich) および 1%のペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (富士フィルム和光純薬) を添加した Dullbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 日水製薬) 中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### 5-2-6 光照射実験

試験管内での光照射では、50 mM の MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝液中で、ZnAPC、FeAPC、NiAPC または CuAPC に対して、ピーク発光波長が 615 nm の LED 光 (PFBR-150RD-MN, 141.1 J cm<sup>-2</sup>, CCS) を照射した。

細胞を用いた実験系における光照射では、細胞を 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cm<sup>2</sup> で播種し、一晚培養後、培地を 10% FBS 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液を添加した CO<sub>2</sub>-independent medium (Gibco) と交換し、ZnAPC

または FeAPC で前処理し (37°C, 30 分もしくは 1 時間)、630 nm のピーク発光波長を有する LED 光 (TH-160×120RD, 5.5 J cm<sup>-2</sup>, CCS) を照射した。

### 5-2-7 ROS の検出

試験管での実験においては、50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝液中で 2 μM ZnAPC、FeAPC、NiAPC または CuAPC に対して光照射を行った際に産生される ROS を 10 μM HPF を用いて検出した。各試料を 90°C で 5 分間加熱し、0.5°C / min で 25°C まで穏やかに冷却した後、0.3 cm × 0.3 cm の石英セルと温度コントローラーに接続された FP-8200 分光蛍光光度計 (JASCO) を用いて、HPF の蛍光を測定した (25°C, Ex=490 nm, Em=500-700 nm)。細胞内での ROS の産生の検出は、35 mm ガラスボトムディッシュ (Matsunami) 上で培養した細胞に 30 分間 ZnAPC または FeAPC を添加して、30 分間 10 μM HPF を添加し、60 分間光照射を行い、その後細胞を PBS で洗浄し、共焦点顕微鏡 (LSM700, Zeiss) を用いて 488 nm のレーザーを照射すること画像を得た。得られた画像から HPF の平均蛍光強度を ImageJ (NIH) で定量した。

### 5-2-8 蛍光顕微鏡

細胞を 35 mm のガラスボトムディッシュ (Matsunami) 上で培養し、終濃度が 10 μM になるよう ZnAPC を添加した、ZnAPC の細胞内での蛍光を共焦点顕微鏡 (LSM700, Zeiss) を用いて検出し (Ex=488 nm, Em=>630 nm)、撮影した画像は ImageJ を用いて解析した。

### 5-2-9 蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトルの測定は、0.3 cm × 0.3 cm の石英セルを用いて、FP-8200 分光蛍光光度計 (JASCO) で行った。50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝液中で 0 - 20 μM RNA 存在下における 2 μM ZnAPC の蛍光スペクトルを、測定前に各試料を 90°C で 5 分間加熱し、0.5°C / min で 25°C まで穏やかに冷却した後、測定した (Ex = 620 nm, Em = 650-750 nm)。

### 5-2-10 ZnAPC によるオリゴヌクレオチドの分解

50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝液中の 2 μM ZnAPC または FeAPC と 0.1 μM RNA または DNA の混合物を 90°C で 5 分間加熱し、0.5°C / min で 25°C まで穏やかに冷却した。混合物を光路長 0.1 cm の石英セルに移し、光照射を行った。光照射後の溶液に、1.5 倍量の Stop solution (80 wt% ホルムアミド, 10 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 0.01% ブルーデキストラン) を添加し変性させたのちに変性ゲル電気泳動で全長を保持している割合を算出した。0.6 pmol の RNA または DNA を含む試料を、10%もしくは 15% 変性ポリアクリルアミドゲル (7 M 尿素) を用いて、70°C で電気泳動を行った。その後、ゲルを SYBR®Gold (Invitrogen) で染色し、蛍光シグナルを Typhoon FLA-9500 (GE Healthcare) を用いて検出した。



好気的および嫌気的条件下での RNA 光分解の効率を比較する実験では、2  $\mu\text{M}$  の ZnAPC および 0.1  $\mu\text{M}$  の RNA の混合物を緩衝液に溶解する前に凍結乾燥した。その後、好気的条件下で反応を行う試料を緩衝溶液で溶解し、光路長 0.1 cm の石英セルに移した。嫌気的条件下で反応を行うものは、緩衝溶液をアルゴンガスで 5 分間パージし、液体窒素で凍結後、減圧を行うという操作を 3 回繰り返すことで溶液中の酸素をアルゴンに置換した緩衝溶液を用いて、アルゴンで充満させたグローブボックス中で凍結乾燥した試料を溶解し、光路長 0.1 cm の石英セルに移した。その後、90°C で 5 分間加熱し、0.5°C / min で 25°C まで穏やかに冷却し、光照射を行った試料を (5-2-6) の方法で検出を行った。

#### 5-2-11 ZnAPC による DIG 修飾 RNA の分解

T7 プロモーターの下流に *NRAS* mRNA の 5'UTR 全長をコードする配列 (NRAS F-RNA) をもたせた pUC57 NRAS F-RNA ベクタープラスミドを構築した (GenScript)。プラスミドを制限酵素 *EcoR* V で切断し、得られた DNA 断片を 1% アガロースゲルを用いて電気泳動により分離後、*NRAS* mRNA の 5'UTR をコードする DNA を含む断片を GenElute™ Agarose Spin Columns (Sigma-Aldrich) を用いてアガロースゲルから抽出した後、エタノール沈殿によって精製した。この精製した DNA を鋳型として DIG RNA 標識キット (Roche Biochemicals) を用いて、DIG-11-UTG および RNase 阻害剤を含む反応混合溶液中で T7 RNA ポリメラーゼにより 42°C、1 時間の転写反応を行った。その後、37°C、15 分間の DNase I 処理を行い、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿により RNA を精製した。精製した RNA に 1.5 倍量の Stop solution (80 wt% ホルムアミド, 10 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 0.01% ブルーデキストラン) を添加し、混合物を 7 M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミドゲルを用いて、70°C で電気泳動を行った。泳動後、NRAS F-RNA に対応する約 260 塩基のバンドを切り出し、Tris-EDTA (TE) 緩衝溶液中にゲルを浸漬し、4°C で 2 時間振とうさせることにより目的 RNA を抽出した後、エタノール沈殿により精製した。50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl からなる緩衝溶液中に 2  $\mu\text{M}$  ZnAPC および 0.1  $\mu\text{M}$  NRAS F-RNA を混合し、90°C で 5 分間加熱後、0.5°C min<sup>-1</sup> で 25°C まで穏やかに冷却した。その後、光路長 0.1 cm の石英セルに移し、光照射した後、1.5 倍量の Stop solution を加えた。その後、0.6 pmol の RNA を含有する試料を、7 M 尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて 70°C で電気泳動を行い、ゲル中の RNA を 4°C、100 mA で 1 時間、Hybond N+ membrane (Amersham Biosciences) に転写した。その後、0.5×TBE (Tris-Borate-EDTA) に浸漬し、3 分間 UV 照射を行うことで RNA をメンブレン上に固定した。メンブレンを Washing Buffer で洗浄し、Blocking Buffer で 30 分間ブロッキングを行い、抗 DIG-AP (12039672910, Roche Biochemicals) を加えて、室温で 30 分間インキュベートした。その後、メンブレンを再度 Washing Buffer で洗浄し、Detection Buffer 中で 30 分間インキュベートした後、化学発光基質である CDP-Star (Roche Biochemicals) を滴下し、X 線フィルム (Fujifilm) に暴露し、検出を行った。

### 5-2-12 蛍光寿命の算出

10  $\mu$ M NRAS RNA または NRAS DNA の存在下、非存在下における 2  $\mu$ M ZnAPC または FeAPC の蛍光減衰曲線を photon counting unit (TDC unit, M12977-01, Hamamatsu Photonics) を搭載した蛍光寿命分光計 (Quantaaurus-Tau, C11567, Hamamatsu Photonics) で測定した。蛍光寿命の測定は、室温で 30 wt% の DMF 含有、不含の 50 mM の MES-LiOH (pH 7) および 100 mM KCl からなる緩衝液中で行い、(3)式を使って curve-fitting system (U11487-01, Hamamatsu Photonics) により解析した。

$$F(t) = F_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3)$$

ここで、 $F_0$  は  $t=0$  における蛍光強度、 $\tau$  が蛍光寿命である。

### 5-2-13 定量的逆転写 PCR

NucleoSpin RNA Plus kit (Takara Bio) を用いて細胞から Total RNA を回収し、Prime Script™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) を用いて、プロトコルに従って cDNA を合成した。得られた cDNA を、Thunderbird SYBR qPCR mix (Toyobo) と Step One Plus™ PCR system (Applied Biosystems) を用いて、定量的逆転写 PCR (RT-qPCR: Quantitative real time-PCR) を行うことで遺伝子の発現量を解析した。PCR は最初に 95°C で 1 分間、その後 95°C で 15 秒、55°C で 1 分間の反応を 40 サイクル行った。それぞれの遺伝子の発現は、以下の配列のプライマーを使用して解析を行った。human NRAS forward 5'- CAGAGGCAGTGGAGCTTGA -3'、reverse 5'- GCTTTTCCCAACACCACCT -3'、human B2M forward 5'- GCATTCCTGAAGCTGACA -3'、reverse 5'- CGTGAGTAAACCTGAATCTTT -3'。

### 5-2-14 ウェスタンブロッティング

60 mm ディッシュで培養した細胞を細胞溶解バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 1%SDS, 10 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{O}_4$ , 10 mM NaF, protease inhibitor cocktail [Nacalai Tesque]) を用いて溶解させた。その後、超音波処理を行い 15000 rpm で遠心し、上清を細胞タンパク抽出物とした。これをドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で泳動後、タンパク質を PVDF メンブレンに転写し、5% スキムミルク / TBS-T (Sigma-Aldrich) で 30 分間ブロックした。4°C で一晩、または室温で 1 時間インキュベートした後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、HRP 結合二次抗体を添加し、30 分間インキュベートした。その後、HRP 化学発光試薬 (Perkin Elmer) を添加し、X 線フィルム (Fujifilm) に暴露することによって検出した。

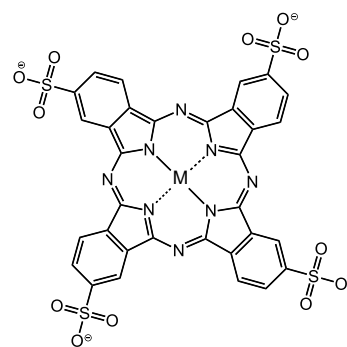
## 5-3 結果と考察

### 5-3-1 G-quadruplex を標的としたフタロシアニン誘導体の結合選択性

NRAS mRNA の 5'UTR で G4 を形成することが知られているオリゴヌクレオチド (NRAS RNA: GGGAGGGGCGGGUCUGGG)<sup>[102]</sup> と結合する化合物として、強い  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用が期待でき、なおかつ非特異的な結合を減弱させる効果が期待される負電荷をもつ化合物として、四つのスルホ基を有するフタロシアニン誘導体 [アニオンックフタロシアニン (APC)] を検討した (Figure 5-1)。APC は水溶液中では多量体の状態で存在し、DMF などの有機溶媒中では単量体状態で存在する。APC は、多量体 (最大吸収波長 = 640 nm) と単量体 (680 nm) で異なる吸収ピークをもつことが知られている<sup>[107-109]</sup>。多量体状態の

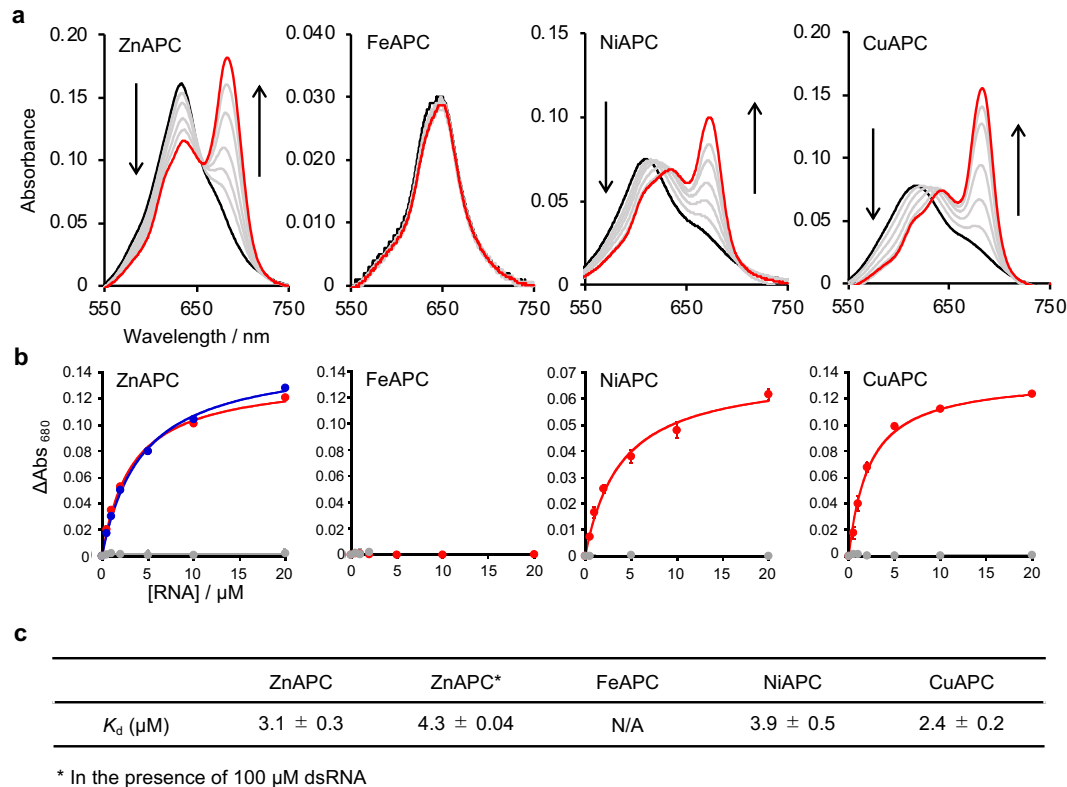
APC は G4 との結合によって、個々の分子が G4 と結合することによって単量体化が誘導され、吸収スペクトルがシフトすることが期待される。そこで、APC の吸収スペクトルを測定することにより、APC とヌクレオチドの結合親和性について検討した。

APC として、中心に亜鉛が配位した ZnAPC、鉄が配位した FeAPC、ニッケルが配位した NiAPC、銅が配位した CuAPC の四つの化合物を検討した。50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl 条件下で、2  $\mu$ M の APC に対して 0-20  $\mu$ M の NRAS RNA を添加した際の吸収スペクトルを測定した。その結果、ZnAPC、NiAPC、CuAPC の吸収スペクトルは RNA の濃度依存的に 640 nm 付近の多量体由来のピークが減少し、680 nm 付近の単量体由来のピークが増加した (Figure 5-2a)。このことから、これらの APC は NRAS RNA との結合により単量体化することが示された。一方で、FeAPC は RNA を添加しても吸収スペクトルが変化しなかったため、RNA と結合しないことが示された。FeAPC では、配位した鉄イオンが垂直方向に配位子と結合する状態で存在することから<sup>[110, 111]</sup>、FeAPC と G-quartet 間の  $\pi$ - $\pi$  相互作用が阻害されたことによるものだと考えられる。それぞれの APC と NRAS RNA の結合親和性を定量化するために、NRAS RNA の濃度増大に伴う 680 nm における吸光度の変化を RNA の濃度に対してプロットし、25°C における解離定数 ( $K_d$ ) を算出した。 (Figure 5-2 b, c) その結果、ZnAPC、NiAPC、CuAPC の各 APC と NRAS RNA の 25°C における  $K_d$  値は、ZnAPC が 3.1  $\mu$ M、NiAPC が 3.9  $\mu$ M、CuAPC が 2.4  $\mu$ M と同程度であることが示された。FeAPC は算出不可能であった。このことから、ZnAPC、NiAPC、CuAPC は NRAS RNA と同程度の結合親和性を有することが示唆された。細胞内には二本鎖 RNA (dsRNA) が豊富にあることを考えると、dsRNA と APC



**Figure 5-1 Chemical structure of anionic phthalocyanine (APC).**  
The M at the center indicates a metal ion.

の結合を確認する必要がある。そこで、それぞれの APC と dsRNA (AGUUCAAGGCGCCUUGAACU) の結合を確認したところ、いずれの APC においても吸光度の変化はほとんど観察されず、全ての APC が dsRNA と結合しないことが示された(Fig.5-2c)。さらに、ZnAPC は過剰量 (100  $\mu\text{M}$ ) の dsRNA 存在下でも NRAS RNA との 25°C における  $K_d$  が 4.3  $\mu\text{M}$  と算出された。この値は、dsRNA 非存在下と同等であり、細胞内のように dsRNA が多く存在するよう分子環境においても、G4 に対する結合親和性を保持できることが示された。これらのことから、ZnAPC は NRAS RNA に対して高い選択性を有する可能性が示された。

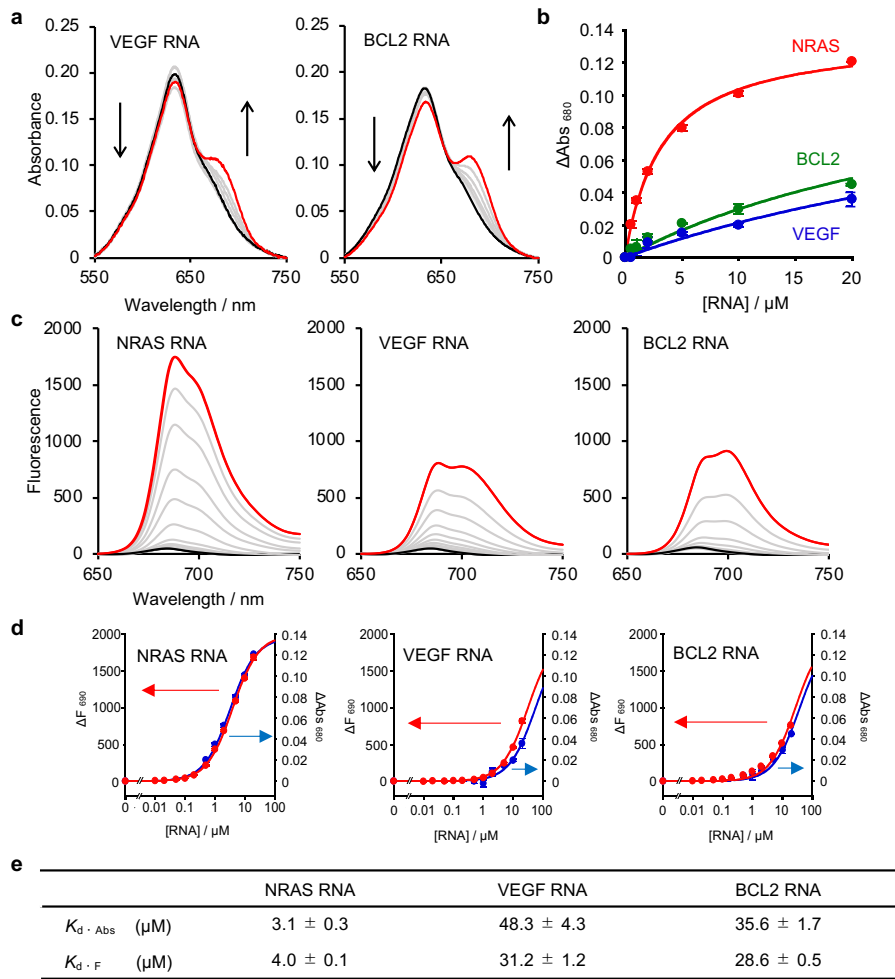


**Figure 5-2 ZnAPC, NiAPC and CuAPC bind to the NRAS RNA G-quadruplex.**

(a) VIS absorbance spectra of 2  $\mu\text{M}$  ZnAPC, FeAPC, NiAPC or CuAPC with 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 or 20  $\mu\text{M}$  NRAS RNA at 25°C. The spectra with 0 and 20  $\mu\text{M}$  NRAS RNA are highlighted in black and red, respectively. (b) Plots of  $\Delta\text{Absorbance}$  at 680 nm ( $\Delta\text{Abs}_{680}$  = absorbance with NRAS RNA minus absorbance without NRAS RNA) of ZnAPC, FeAPC, NiAPC or CuAPC vs. the concentration of NRAS RNA (red) or dsRNA (grey). The plots of  $\Delta\text{Absorbance}$  in the presence of 100  $\mu\text{M}$  dsRNA are also given with blue color for the ZnAPC (the left column, panel b). Error bars represent mean  $\pm$  SD; n = 3. (c)  $K_d$  values of the APCs with NRAS RNA at 25 °C.

NRAS RNA と結合し、ROS の産生効率が高いと考えられる ZnAPC に関して、結合選択性をさらに検討した。NRAS と同様に、G4 を形成することが知られている VEGF と BCL2 の mRNA 由来で G4 を形成することが知られている配列を用いた<sup>[112, 113]</sup>。NRAS RNA を用いた実験と同様に、VEGF RNA (GGAGGAGGGGAGGAGGA) あるいは、BCL2 RNA (GGGGCGGUGGGGUGGGAGCUGGGG) を滴下した際の ZnAPC の吸収スペクトルの変化を測定した。滴下した RNA の濃度に対して 680 nm の吸光度をブ

ロットすることで 25°C における  $K_d$  を算出した (Figure 5-3 a, b, e)。ZnAPC は VEGF RNA と BCL2 RNA のどちらの RNA を添加した場合においても、わずかに吸収スペクトルがシフトしており、単量体化が誘導されていたため、どちらの RNA ともわずかながら結合することが示唆された。しかしながら 25°C における  $K_d$  値を比較すると、NRAS RNA に対する  $K_d$  が 3.1  $\mu\text{M}$  に対して VEGF RNA が 48.3  $\mu\text{M}$ 、BCL2 RNA が 35.6

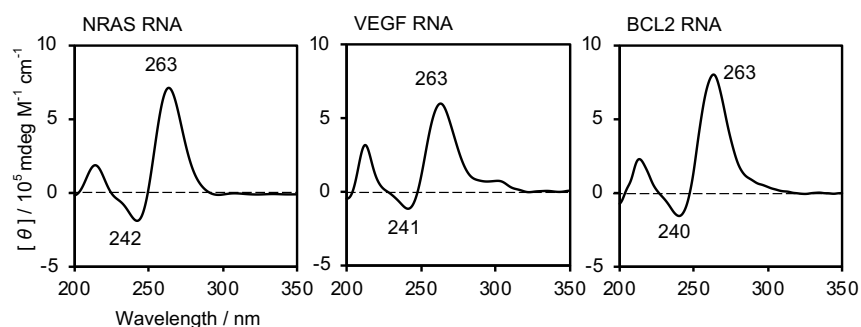


**Figure 5-3 ZnAPC does not bind VEGF RNA and BCL2 RNA.**

(a) VIS absorbance spectra of 2  $\mu\text{M}$  ZnAPC with 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, or 20  $\mu\text{M}$  VEGF RNA or BCL2 RNA at 25°C. The spectra with 0 and 20  $\mu\text{M}$  RNA are highlighted in black and red, respectively. (b) Plots of  $\Delta$ absorbance at 680 nm ( $\Delta\text{Abs}_{680}$  = absorbance with RNA minus absorbance without RNA) of ZnAPC in comparison with the concentration of NRAS RNA (red), VEGF RNA (blue), or BCL2 RNA (green). NRAS RNA data were duplicated from Figure 5-2 for comparison. Continuous curves are the results of curve-fitting to a theoretical equation, and the estimated  $K_d$  values are also shown. (c) Fluorescence spectra of 2  $\mu\text{M}$  ZnAPC with 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, or 20  $\mu\text{M}$  NRAS RNA, VEGF RNA, or BCL2 RNA at 25°C. The spectra with 0 and 20  $\mu\text{M}$  are highlighted in black and red, respectively. (d) Plots of  $\Delta$ fluorescence intensity at 690 nm ( $\Delta F_{690}$  = fluorescence intensity with RNA minus fluorescence intensity without RNA) of ZnAPC vs. the concentration of NRAS RNA, VEGF RNA, or BCL2 RNA. Data on  $\Delta$ absorbance at 680 nm shown as the Y2 axis are also illustrated to compare these data with the changes in the  $\Delta$ fluorescence intensity at 690 nm. Continuous curves denote results of curve-fitting to a theoretical equation. (e)  $K_d$  values of ZnAPC with the RNAs evaluated from the titration results traced by  $\Delta$ absorbance at 680 nm ( $K_d \cdot \text{Abs}$ ) and  $\Delta$ fluorescence intensity at 590 nm ( $K_d \cdot F$ ).

$\mu\text{M}$  となり、ZnAPC の結合親和性が NRAS RNA と比較して、10 分の 1 以下になることが明らかとなった。ZnAPC と RNA との結合親和性を ZnAPC の蛍光特性を利用することでさらに確認することも試みた。水溶液中で、多量体状態で存在する ZnAPC は蛍光が自己消光により顕著に減弱するが、有機溶媒中や RNA との結合によって単量化した ZnAPC は、波長 690 nm 付近に蛍光を発することが知られている<sup>[114,115]</sup>。そのため、RNA を添加した際の ZnAPC が発する蛍光スペクトルを測定することで、ZnAPC と RNA との結合親和性を評価できる。NRAS RNA、VEGF RNA、BCL2 RNA をそれぞれ添加した際の ZnAPC の蛍光スペクトルを測定し、添加した RNA の濃度と蛍光強度のプロットから 25°C における  $K_d$  を算出した (Figure 5-3 c, d, e)。いずれの RNA を添加した場合でも蛍光強度は増大したが、その値は RNA によって大きく変化した。20  $\mu\text{M}$  の RNA を添加したときの 690 nm における蛍光強度は、NRAS が 1687、VEGF が 818、BCL2 が 762 であり、NRAS RNA を添加した場合の蛍光強度の増大が最も顕著であった。算出した 25°C における  $K_d$  値も、NRAS が 4.0  $\mu\text{M}$ 、VEGF が 31.2  $\mu\text{M}$ 、BCL2 が 28.6  $\mu\text{M}$  であることから、蛍光スペクトルの変化を用いた結合親和性の評価においても、ZnAPC は選択的に NRAS RNA と結合することが確認された。また、蛍光スペクトルの変化から算出した 25°C における  $K_d$  値 (4.0  $\mu\text{M}$ ) は吸光度の変化から算出した 25°C における  $K_d$  値 (3.1  $\mu\text{M}$ ) と比較してほとんど差異がないことから、ZnAPC の単量化と蛍光増強が互いに相関していることが示された。

ZnAPC が、NRAS RNA に選択的に結合することが示唆されたため、その結合選択性に関わる因子についてさらに検討した。G4 は鎖の配向性によって、パラレル型、アンチパラレル型、ミックス型の三つに分類することができる<sup>[116-118]</sup>。この配向性の違いが、ZnAPC との結合親和性に影響を与えている可能性がある。そこで、各オリゴヌクレオチドが形成する G4 の配向性について CD スペクトルを測定することで確認した。パラレル型 G4 の CD スペクトルは、260 nm に正のピーク、240 nm に負のピークを示す。アンチパラレル型 G4 の CD スペクトルは、295 nm に正のピーク、260 nm に負のピークを示す。ミックス型 G4 の

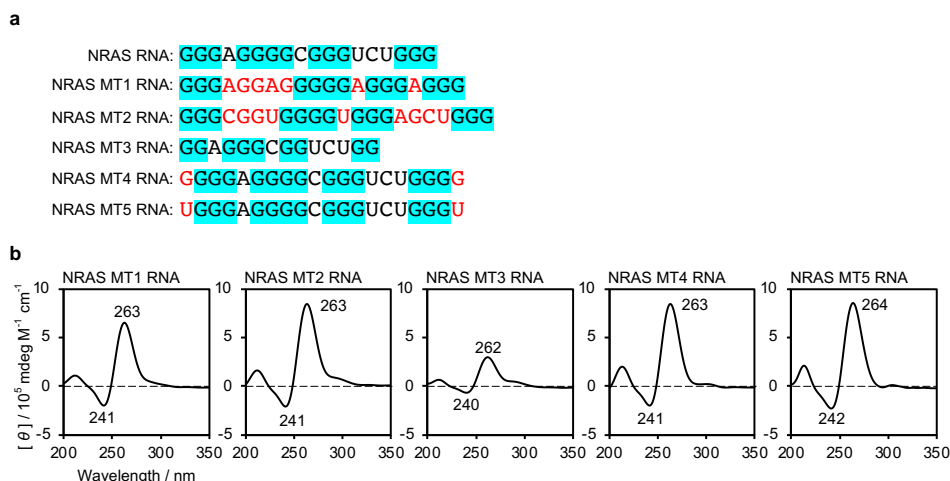


**Figure 5-4 CD spectra of RNA oligonucleotides**

CD spectra of 20  $\mu\text{M}$  NRAS RNA, VEGF RNA, BCL2 RNA at 25°C. All the CD spectra show positive and negative peaks around 260 nm and 240 nm, respectively, which are a signature of a parallel G-quadruplex. CD spectra of oligonucleotides were measured for 20  $\mu\text{M}$  oligonucleotide in the buffer consisting of 50 mM MES-LiOH (pH 7.0) and 100 mM KCl with a quartz cell with 0.1 cm path length at 25°C. Before measurement, each sample was heated to 90 °C for 5 min and gently cooled to 25°C at 0.5°C min<sup>-1</sup>.

CD スペクトルは、295 nm と 260 nm に正のピークを示す。このような CD スペクトルの違いから、G4 構造内の鎖の配向性を決定できる<sup>[119-122]</sup>。NRAS RNA、VEGF RNA、BCL2 RNA をそれぞれ 50 mM MES-LiOH (pH 7.0) および 100 mM KCl 条件下で CD スペクトルを測定した。その結果、全てのオリゴヌクレオチドにおいて 260 nm に正のピーク、240 nm に負のピークを示した (Figure 5-4)。このことから、NRAS RNA、VEGF RNA、BCL2 RNA は、いずれもパラレル型の G4 を形成することが示された。そのため、ZnAPC の結合選択性には G4 の鎖配向以外の要素が重要である可能性が考えられた。

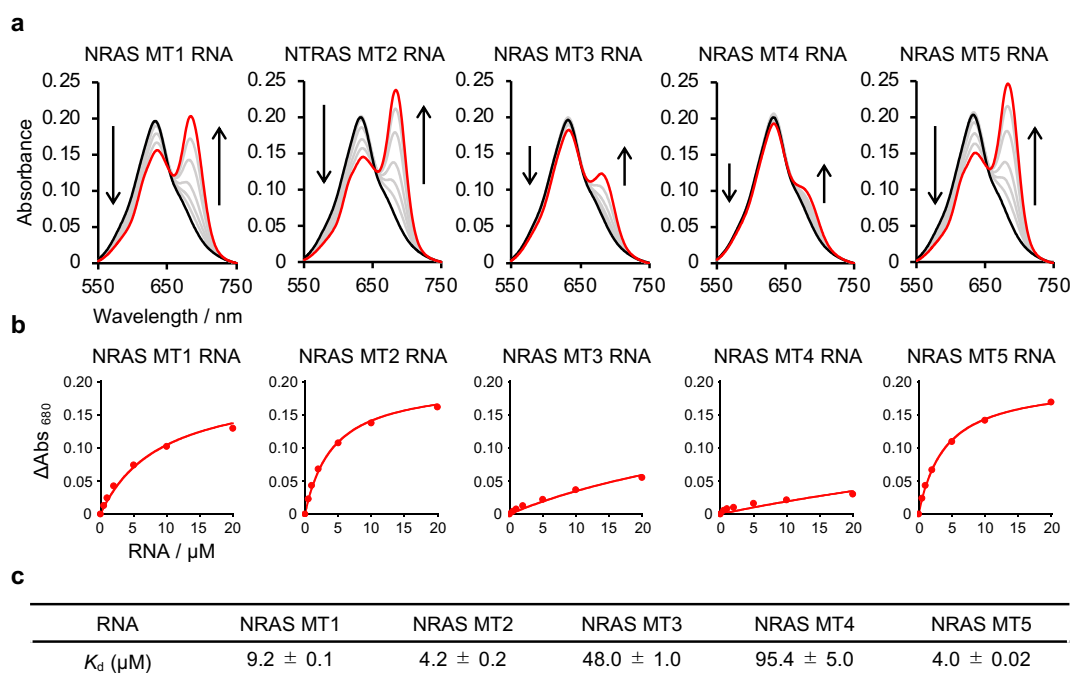
そこで次に、NRAS RNA、VEGF RNA、BCL2 RNA の配列をもとにして、変異を導入した 5 種類の RNA 配列を用いて検討を行った (Figure 5-5 a)。一つ目は、NRAS RNA の連続したグアニン領域を連結するループ部位を VEGF RNA の配列由来のものに変えた配列 (NRAS MT1 RNA) である。二つ目は、NRAS RNA の配列のループ部位を BCL2 RNA の配列由来のものに変えた配列 (NRAS MT2 RNA) である。三つ目は、NRAS RNA の G4 の形成に必要なグアニンの数を一つずつ減らし、G-quartet が二枚になるように変えた配列 (NRAS MT3 RNA) である。四つ目は、NRAS RNA の配列の両末端にグアニンを付加した配列 (NRAS MT4 RNA) である。五つ目は、NRAS RNA の配列の両末端に NRAS の配列由来である U を付加した配列 (NRAS MT5 RNA) である。まず、各 RNA ヌクレオチドの G4 の配向性を確認するため、CD スペクトルを測定した。その結果、NRAS MT1、NRAS MT2、NRAS MT3、NRAS MT4、NRAS MT5 のいずれの RNA オリゴヌクレオチドも、260 nm に正のピーク、240 nm に負のピークを示し、パラレル型の G4 を形成していることが示された (Figure 5-5 b)。



**Figure 5-5 CD spectra of NRAS MT RNA oligonucleotides**

(a) Sequences of NRAS MT1~5 RNAs, as well as NRAS RNA. The mutation sites are indicated by the red letter. The guanine stretches are highlighted in blue. See the main text for details of the sequence design. (b) CD spectra of NRAS MT1~5 RNA oligonucleotides were measured for 20  $\mu$ M oligonucleotide in the buffer consisting of 50 mM MES-LiOH (pH 7.0) and 100 mM KCl with a quartz cell with 0.1 cm path length at 25°C. Before measurement, each sample was heated to 90°C for 5 min and gently cooled to 25°C at 0.5°C min<sup>-1</sup>.

すべての RNA オリゴヌクレオチドがパラレル型 G4 を形成することが確認できたことから、これらの RNA オリゴヌクレオチドに対する ZnAPC の結合親和性を検討した。結合親和性の評価は、RNA オリゴヌクレオチドと ZnAPC を混合した際の、ZnAPC の吸収スペクトルを測定することにより行った。その結果、スパーサー部位に変異を入れた NRAS MT1 RNA、NRAS MT2 RNA はいずれも RNA の濃度増加に伴って、ZnAPC の単量体の吸収ピークが増加したため、ZnAPC と結合することが示唆された (Figure 5-6 a, b)。しかしながら、25°C における  $K_d$  は NRAS MT2 RNA (4.2  $\mu\text{M}$ ) は、NRAS RNA (3.1  $\mu\text{M}$ ) と同程度であったが、NRAS MT1 RNA (9.2  $\mu\text{M}$ ) は 3 倍近く増加した (Figure 5-6 c)。このことから、G4 のループ部位の配列は、ZnAPC との結合に関与していることが考えられた。さらに、G-quartet が二枚になるように変異導入した NRAS MT3 RNA (48.0  $\mu\text{M}$ ) では、NRAS RNA と比べると 25°C における  $K_d$  が 10 倍以上大きく、その結合親和性が著しく低下することが明らかとなった。このことから、ZnAPC と RNA との結合において G-quartet の枚数が非常に重要であることが示唆された。次に、末端にウラシルを付加した NRAS MT5 RNA (4.0  $\mu\text{M}$ ) と ZnAPC の 25°C における  $K_d$  は NRAS RNA と同程度であったが、グアニンを付加した NRAS MT4 RNA (95.4  $\mu\text{M}$ ) は 30 倍以上に増大した。このことから、ZnAPC との結合において G4 形成配列に隣



**Figure 5-6 The binding affinity of ZnAPC for NRAS RNA mutants.**

(a) VIS absorbance spectra of 2  $\mu\text{M}$  ZnAPC with 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, or 20  $\mu\text{M}$  NRAS MT1 RNA, NRAS MT2 RNA, NRAS MT3 RNA, NRAS MT4 RNA, or NRAS MT5 RNA at 25°C. The spectra with 0 and 20  $\mu\text{M}$  RNA are highlighted in black and red, respectively. (b) Plots of  $\Delta\text{absorbance}$  at 680 nm ( $\Delta\text{Abs}_{680}$  = absorbance with NRAS RNA minus absorbance without NRAS RNA) of ZnAPC vs. the concentration of the RNAs. Error bars represent mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ . Continuous curves are results of curve-fitting to a theoretical equation to evaluate the  $K_d$  values of ZnAPC with the RNAs. (c) The calculated values in panel b at 25°C.

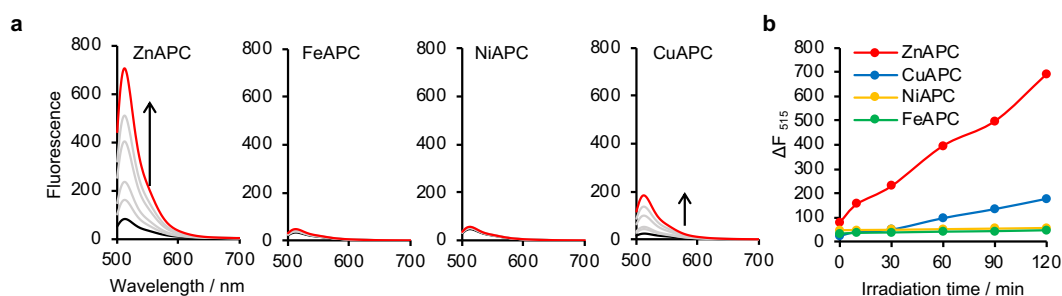


接する配列が非常に重要であるとともに、G4 形成に関わるグアニンの連続配列の両末端がウラシル (U) である NRAS RNA において、より長い RNA でも ZnAPC と結合することが可能であることが示された。これらのことをまとめると、ZnAPC と RNA の結合には G-quartet の枚数が非常に重要であり、スパーサー部位の配列においても、わずかながら配列選択性があることが明らかとなった。また、G4 形成部位の配列の 5' と 3' の両末端の付加配列が無い、もしくはウラシル (U) である必要があり、これらの条件をすべて満たさなければ ZnAPC との結合親和性が著しく低下することが明らかとなった。このような配列の効果により、ZnAPC は非常に高い配列選択性によって NRAS RNA と結合している可能性が示された。

### 5-3-2 ZnAPC を用いた NRAS RNA の光分解とタンパク質発現制御

フタロシアニンは光感受性を有し、特定の波長の光を照射することで活性酸素種 (ROS) を産生する。ROS の産生が光線力学的治療において重要であるため、APC を光照射した際の ROS の産生について、ROS 検出試薬である HPF を用いて検討した。HPF は ROS との反応によって構造が変化し、波長 515 nm の蛍光を発するようになるため、蛍光強度を測定することで ROS の産生量を評価することができる<sup>[123]</sup>。

2  $\mu$ M の APC に 10  $\mu$ M の HPF を加え、光を照射した後 (0, 10, 30, 60, 90, 120 分)、HPF の蛍光を測定した (25°C, Ex= 490 nm, Em= 500-700 nm) (Figure 5-7 a)。光照射時間に対して波長 515 nm の HPF の蛍光強度をプロットした (Figure 5-7 b)。その結果、ZnAPC と CuAPC は光照射に伴って HPF の蛍光スペクトルが増大したため、ROS を産生することが示された。なかでも ZnAPC の蛍光スペクトルは顕著に増大したため、ROS の産生効率が他の APC と比較して最も良いことがわかった。一方で、FeAPC と NiAPC に関しては



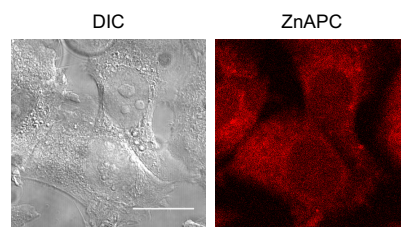
**Figure 5-7 ZnAPC induces ROS production in test tubes.**

(a) Fluorescence spectra of 10  $\mu$ M HPF as a ROS indicator in the presence of 2  $\mu$ M ZnAPC, FeAPC, NiAPC or CuAPC at 25°C. Excitation wavelength was 490 nm. The spectra at irradiation time points 0 and 120 min are highlighted in black and red, respectively. (b) The fluorescence intensity of 10  $\mu$ M HPF at 515 nm during the photo-irradiation for 2  $\mu$ M ZnAPC, FeAPC, NiAPC or CuAPC at 25°C.

HPF の蛍光スペクトルに変化がなく、ROS を産生しないことが示された。

次に、この ZnAPC が細胞内においても、試験管での実験と同様に光照射によって ROS を産生することができるのかどうか検討を行った。まず初めに、ZnAPC の細胞内への移行性を確認した。NRAS の発現量

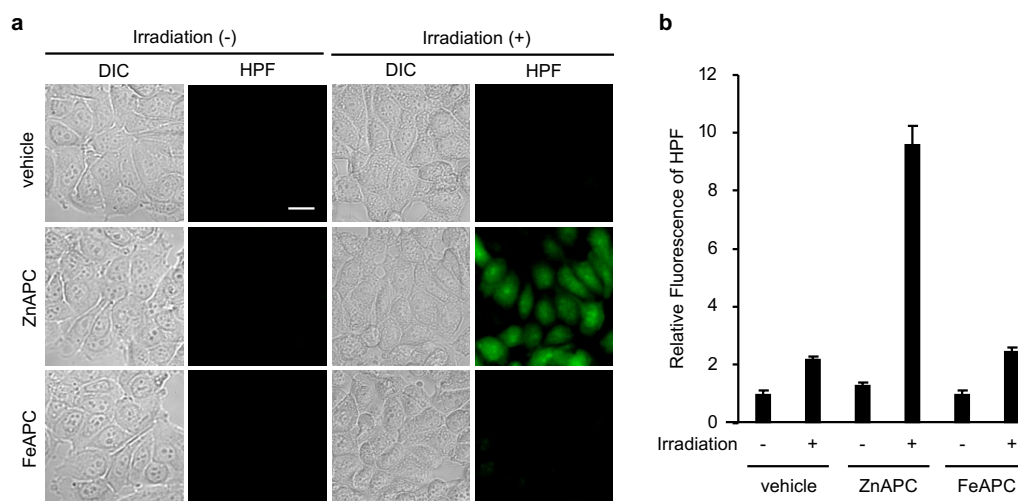
が高いことが知られている、乳がん由来の MCF-7 細胞<sup>[124]</sup>に ZnAPC を添加し、ZnAPC のもつ蛍光特性を利用して、細胞内に取り込まれた ZnAPC を共焦点顕微鏡によって観察した。その結果、ZnAPC は培地中に添加するだけで細胞内に取り込まれ、細胞質内に局在することが明らかとなった (Figure 5-8)。



**Figure 5-8 ZnAPC diffuses throughout the cytosol in the cells.**

Distribution of ZnAPC in cells was evaluated by its autofluorescence (Ex.= 488 nm, Em=>630 nm). Cells were treated with 10  $\mu$ M ZnAPC for 3 h. DIC image and fluorescence image of ZnAPC are shown. Scale bar, 20  $\mu$ m

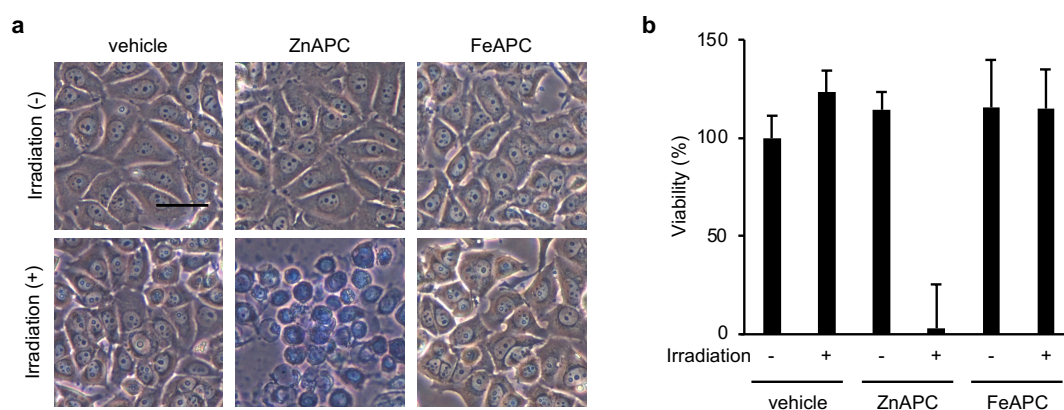
ZnAPC が細胞内に取り込まれることが確認できたため、細胞内での ROS 産生能について HPF を用いて確認した。その結果、試験管での実験においてほとんど ROS が産生されなかった FeAPC は、細胞内においても光照射の有無にかかわらず、ほとんど HPF の蛍光が検出されず、ROS が産生されていないことがわかった。一方、ZnAPC を添加した細胞においては、光照射によって HPF の蛍光強度が顕著に増大し、ROS を産生することが確認された (Figure 5-9 a)。HPF の蛍光強度を定量的に解析したところ、APC を添加せず光照射のみを行った細胞と比較すると、HPF の蛍光強度は FeAPC を添加した細胞では 1.1 倍とほとんど変化が見られなかったのに対し、ZnAPC を添加した細胞では、4.3 倍と顕著に増加していることがわかった (Figure 5-9 b)。これらのことから、試験管内での ROS の産生と同様に、ZnAPC は MCF-7 細胞内においても、光照射時のみに ROS を産生できることが示された。



**Figure 5-9 ZnAPC induces ROS production in cells.**

(a) Evaluation of ROS levels by means of 10  $\mu$ M HPF in MCF-7 cells treated with 10  $\mu$ M ZnAPC or 10  $\mu$ M FeAPC after photo-irradiation for 1 h. DIC images of cells and fluorescent images of HPF are presented. Scale bar, 20  $\mu$ m. (b) The mean fluorescence intensity of HPF was quantified. Relative fluorescence intensities are shown, and each bar represents mean  $\pm$  SD for 10 images.

細胞内での ROS の産生は、細胞死を誘導することが知られているため、ZnAPC の添加と光照射が細胞の生存率に与える影響について確認した。細胞生存率は、トリパンプブルー色素排除法を用いて測定を行った<sup>[125]</sup>。FeAPC を添加した細胞は、添加や光照射を行ってもトリパンプブルーの取り込みは見られず、ほとんど変化がなかった。一方、ZnAPC を添加した場合には、添加だけでは変化がなかったが、添加と光照射によって、細胞のほとんどがトリパンプブルーを取り込んでおり、細胞が死滅していることが確認された (Figure 5-10)。生細胞数の割合を算出したところ、コントロールの細胞の生細胞数を 100%としたとき、APC 非添加の細胞に光照射を行ったものは 123%、FeAPC を添加した細胞に光照射を行ったものは 115%であり、光照射も FeAPC も細胞の増殖を抑制することはなかった。一方で、ZnAPC を添加した細胞においては、光照射を行うことで生存率が 3%まで減少しており、ほとんど全ての細胞が死滅していることが示された。これらの結果は、ZnAPC が光照射時に ROS を産生すると同時に、細胞死を強く誘導することを示している。

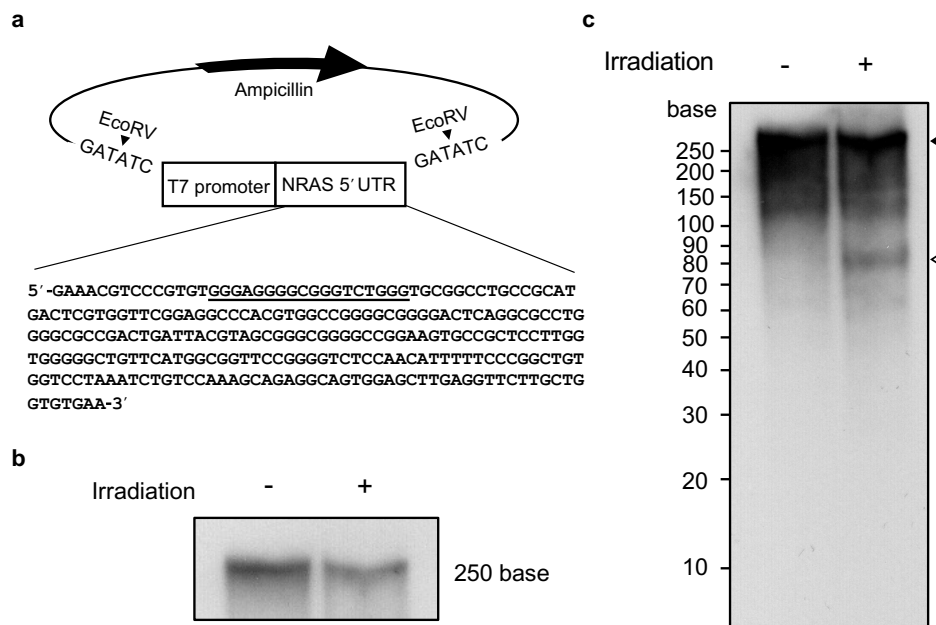


**Figure 5-10 ZnAPC induces cell death**

(a) Cells pre-treated with 10  $\mu$ M ZnAPC or 10  $\mu$ M FeAPC for 1 h were incubated for 24 h after photo-irradiation for 2 h. Phase contrast images of cells stained with Trypan Blue to identify dead cells are presented. Scale bar, 50  $\mu$ m. (b) The number of viable cells was determined by Trypan Blue exclusion-based cell staining. The number of treated cells was normalized to that of untreated cells. Each bar represents mean  $\pm$  SD; n = 3.

DNA やタンパク質と同様に、RNA は ROS によって分解されることが広く知られている<sup>[126, 127]</sup>。そこで次に、ZnAPC と光照射による NRAS RNA の光分解について検討した。APC と RNA を混合させたものに光照射を行い、ゲル電気泳動によって RNA の全長の残存量を確認した。その結果、ZnAPC と混合した NRAS RNA は、光照射時間依存的に有意に減少していた (Figure 5-11 a)。ゲル電気泳動後のバンド強度から、RNA の残存量を定量的に解析したところ、ZnAPC は光照射 120 分後に約 60%の NRAS RNA を分解することが示された (Figure 5-11 b)。重要なことに、ZnAPC と結合しない dsRNA、VEGF RNA、BCL2 RNA においては、RNA の残存量にほとんど変化が見られず、分解されないことが示された (Figure 5-11 a)。また、ROS を産生しない FeAPC、NiAPC、ならびにわずかに産生する CuAPC においても、NRAS RNA の残存量に変化がなく、RNA を分解しないことが示された (Figure 5-11 b)。これらのことから ZnAPC は、直接結合した RNA のみを光分解することが示された。



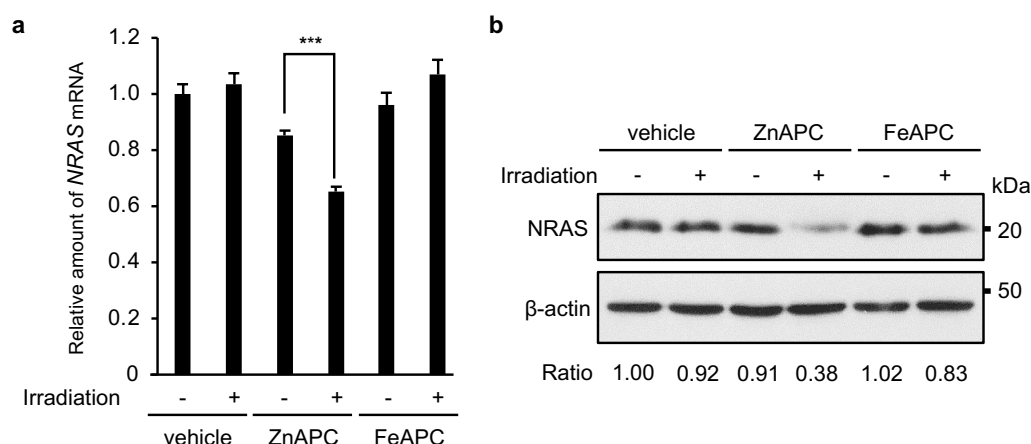


**Figure 5-12 ZnAPC decreases the amount of NRAS F-RNA labelled with DIG.**

(a) The plasmid map of the pUC57 NRAS F-RNA vector containing sequence encoding the 5' UTR of NRAS mRNA following the T7-promoter. The sequence of 5' UTR in NRAS mRNA. The underlining indicates a G-quadruplex-forming sequence. (b) 0.1  $\mu$ M NRAS F-RNA labelled with DIG in the presence of 2  $\mu$ M ZnAPC before and after photo-irradiation for 120 min were analyzed by electrophoresis in a 15% denaturing polyacrylamide gel. The RNA was detected with antibody against DIG. (c) A long-exposure full image of the membrane shown in (b) for NRAS F-RNA. Black and white arrow heads indicate the full-length and cleaved fragment of NRAS F-RNA, respectively.

そこで、細胞内に存在する *NRAS* mRNA に対する ZnAPC の効果を検討した。HPF を用いた活性酸素の産生量を確認した実験と同様に、*NRAS* の発現量の多い乳がん由来 MCF-7 細胞を用いて、ZnAPC を培地に添加し、光照射を行った後、RNA を回収し、RT-qPCR によって *NRAS* mRNA の発現量を解析した。その結果、ZnAPC の添加のみを行ったものが 0.85 倍、FeAPC 添加のみを行ったものが 0.96 倍と、ZnAPC を添加するだけでは *NRAS* mRNA の発現量にほとんど影響を与えなかった。光照射を行ったものに関しては、APC 無添加のものは 1.0 倍、FeAPC を添加したものは 0.96 倍と、これも *NRAS* mRNA の発現にはほとんど影響を与えなかった。一方で、ZnAPC を添加したものにおいては、光照射を行うことで *NRAS* mRNA の量が約 35%減少していた (Figure 5-13 a)。このことから、ZnAPC は NRAS F-RNA と同様に *NRAS* mRNA も分解することが示された。次に、この *NRAS* mRNA の発現量の低下が NRAS のタンパク質量に及ぼす影響について検討した。タンパク質の発現量は、光照射後 5 時間培養した細胞から全抽出液を回収してウェスタンブロットティングによって解析を行った。その結果、mRNA と同様に APC 添加のみを行ったものは ZnAPC、FeAPC それぞれ 0.91 倍、1.02 倍と NRAS の発現量にほとんど変化はなかった。また、光照射を行ったものに関しても、APC 無添加のものは 0.92 倍、FeAPC を添加したものは 0.83 倍と、NRAS の発現にはほとんど影響を与えなかった。対照的に、ZnAPC の添加と光照射により、NRAS の量が約 62%減少した (Figure

5-13 b)。この結果は、同じ条件下での mRNA 発現量の変化と一致しており、ZnAPC は細胞内においても、光照射によって *NRAS* mRNA が形成する G4 を分解し、それに伴ってタンパク質の発現を抑制できることが示された。*NRAS* は、細胞の生存や増殖を制御する重要な遺伝子であるため、*NRAS* のタンパク質発現量の低下は、細胞の増殖を抑制し、ZnAPC から産生される ROS と共同的に細胞を死滅させているということが考えられる。



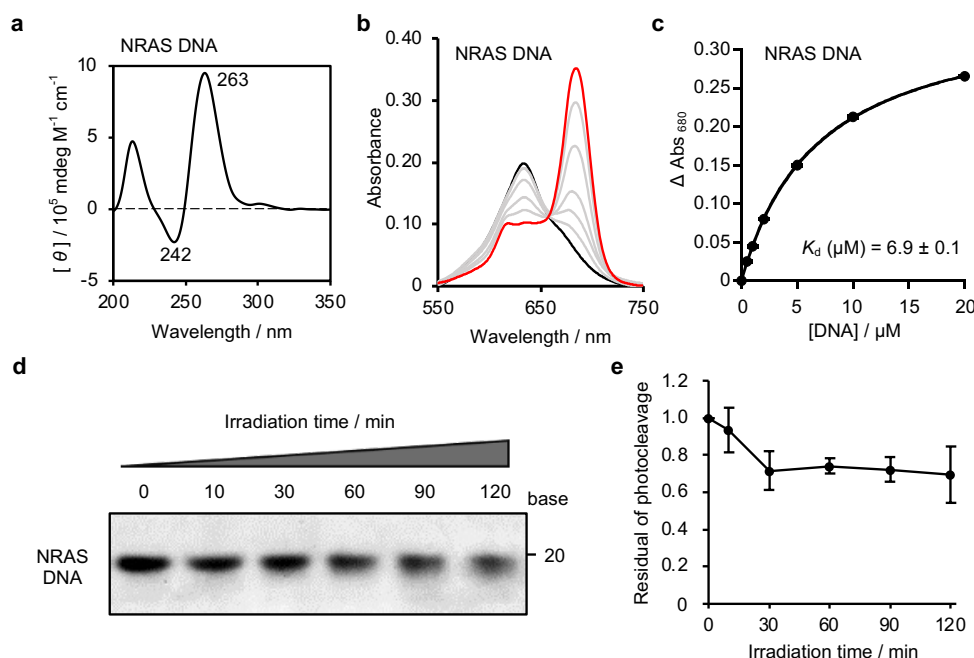
**Figure 5-13 ZnAPC decreases the amount of NRAS mRNA in MCF-7 cells.**

Cells pre-treated with 10  $\mu\text{M}$  ZnAPC or FeAPC together with 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  actinomycin D, which inhibits de novo mRNA synthesis, for 1 h were photo-irradiated for 2 h. (a) The amount of NRAS mRNA was evaluated by real-time PCR. Each bar represents mean  $\pm$  SD; n = 3. For statistical significance, an unpaired t-test was performed. \*\*\*p < 0.0001. (b) The cells were incubated for 5 h after photo-irradiation. The cell extracts were subjected to immunoblot analysis with antibodies against NRAS;  $\beta$ -actin served as a loading control. Blots of NRAS and  $\beta$ -actin were quantified, and the relative values of NRAS are shown.

### 5-3-3 ZnAPC の RNA 光分解メカニズムの解明とその応用

DNA の G4 を標的とした薬剤は、DNA 損傷や染色体異常を引き起こすことが懸念されている<sup>[128-130]</sup>。そこで、ZnAPC が *NRAS* mRNA だけでなく、*NRAS* 遺伝子 (*NRAS* DNA) に対してどのような影響を与えるのか検討した。初めに、*NRAS* DNA が形成する G4 の鎖配向について、CD スペクトル測定で確認した。その結果、*NRAS* DNA は、260 nm に正のピーク、240 nm に負のピークを示した (Figure 5-14 a)。このことから、*NRAS* RNA と同様にパラレル型の G4 を形成することが示された。次に、ZnAPC と *NRAS* DNA の結合親和性を検討するために、*NRAS* DNA を滴下した際の ZnAPC の吸光度を測定した。その結果、*NRAS* DNA の濃度依存的に ZnAPC の 680 nm における吸光度が増大し、ZnAPC が *NRAS* DNA との結合によって単量体化することがわかった (Figure 5-14 b)。添加した DNA 濃度と ZnAPC の波長 680 nm における吸光度のプロットから 25°C における  $K_d$  は 6.9  $\mu\text{M}$  と算出された (Figure 5-14 c)。この値は、*NRAS* RNA との 25°C における  $K_d$  (3.1  $\mu\text{M}$ ) と同程度である。興味深いことに *NRAS* DNA 存在下で ZnAPC に光照射を行なっても、ZnAPC は *NRAS* DNA を 30%程度しか分解しなかった (Figure 5-14 d, e)。*NRAS* RNA が 60%程度分解

されたことを考えると (Figure 5-11)、ZnAPC は NRAS DNA を RNA の半分程度しか分解しなかった事になる。加えて、ZnAPC が細胞内で、細胞質に局在することも踏まえると、ZnAPC は遺伝子毒性が低い可能性が示された。



**Figure 5-14 ZnAPC slightly decreases the amount of NRAS DNA.**

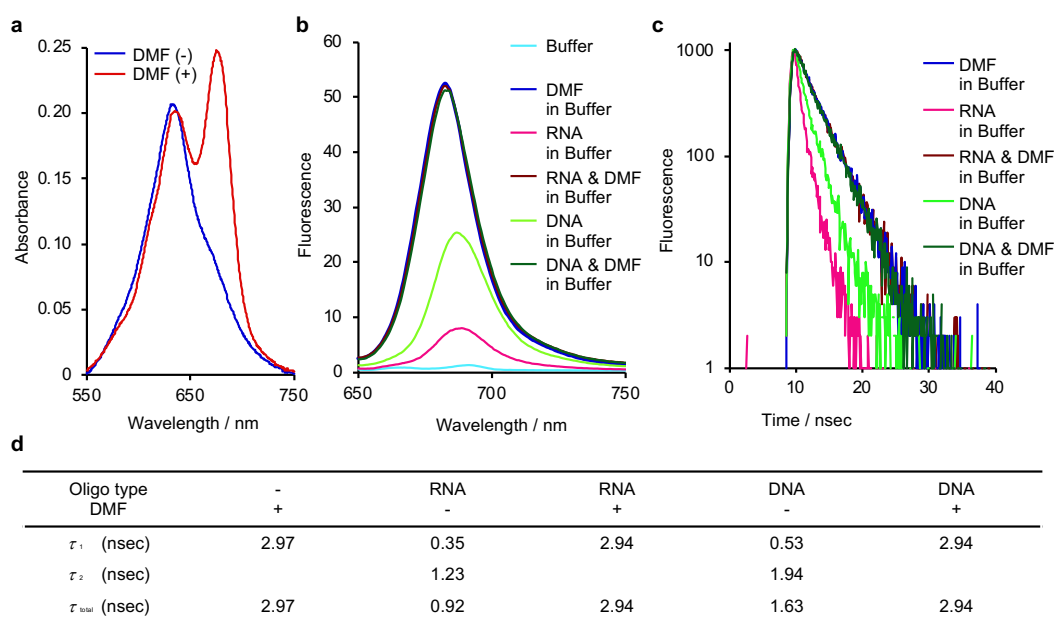
(a) CD spectra of NRAS DNA were measured for 20 μM oligonucleotide in the buffer consisting of 50 mM MES-LiOH (pH 7.0) and 100 mM KCl with a quartz cell with 0.1 cm path length at 25°C. Before measurement, each sample was heated to 90 °C for 5 min and gently cooled to 25°C at 0.5°C min<sup>-1</sup>. (b) VIS absorbance spectra of 2 μM ZnAPC with 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 or 20 μM NRAS DNA in the buffer consisting of 50 mM MES-LiOH (pH 7.0) and 100 mM KCl at 25°C. The spectra with 0 and 20 μM NRAS DNA are highlighted in black and red, respectively. (c) Plots of ΔAbsorbance at 680 nm (ΔAbs<sub>680</sub> = absorbance with NRAS DNA minus absorbance without NRAS DNA) of 2 μM ZnAPC with 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 or 20 μM NRAS DNA at 25°C. Continuous lines are curve-fitting results with a theoretical equation, and the estimated K<sub>d</sub> of ZnAPC with NRAS DNA is also indicated. (d) Electrophoresis of 0.1 μM NRAS DNA (in a 10% denaturing polyacrylamide gel) in the presence of 2 μM ZnAPC after photo-irradiation for the indicated periods. (e) Residual intact DNA after the photo-cleavage. Error bars represent mean ± SD; n = 3

ZnAPC は、結合する NRAS RNA は分解したものの、結合しない dsRNA や VEGF RNA、BCL2 RNA に対しては、光照射を行っても分解しなかった (Figure 5-11)。さらに、NRAS DNA は NRAS RNA と同程度に ZnAPC と結合するものの、光照射による分解量は RNA と比較して減少していた。このことは、ZnAPC によるヌクレオチドの分解には、ヌクレオチドとの高い結合親和性だけでなく、2' 位のヒドロキシ基が必要であると推察される。つまり、ZnAPC は結合している RNA のみを光分解する可能性があることが示された。結合した RNA G4 のみを光分解するのであれば、PDT における薬効の向上や副作用の低減が期待される。そこで、次に ZnAPC の RNA 光分解機構について検討を行った。

これまでに、ラジカルによる RNA の光分解は、DNA よりも効率が高く、その理由が 2' 位のヒドロキシ基にあることが報告されている<sup>[131]</sup>。そのため ZnAPC は、光照射によって得たエネルギーを 2' 位のヒドロ



キシ基を介して直接的に RNA に遷移させることで RNA を分解している可能性が考えられた。ZnAPC は蛍光を有しているため、NRAS RNA の存在下と非存在下における蛍光寿命を測定することで、光照射を行った際のエネルギー遷移について確認することができる。ZnAPC は単量体状態でしか蛍光を発しないため、まず、ZnAPC の単量体化を誘導できる条件の検討を行った。非プロトン性極性溶媒であるジメチルホルムアミド (DMF) を 30% 混合した緩衝溶液で ZnAPC を溶解した際の ZnAPC の吸収スペクトルを測定したところ、この溶液環境で ZnAPC は単量体として存在することが示された (Figure 5-15 a)。次に、緩衝溶液のみ、30% DMF 存在下、NRAS RNA 存在下、30% DMF+NRAS RNA 存在下、NRAS DNA 存在下、30% DMF+NRAS DNA 存在下における ZnAPC の蛍光スペクトルを測定した。その結果、緩衝溶液のみの実験条件を除く全ての条件で蛍光が観測された (Figure 5-15 b)。次に、これらの条件下における、蛍光寿命を測定することで、ZnAPC のエネルギー遷移について確認した (Figure 5-15 c)。その結果、反応溶液中に NRAS RNA を含まない 30% DMF 存在下、NRAS RNA と 30% DMF 存在下、NRAS DNA と 30% DMF 存在下における ZnAPC の蛍光寿命 ( $\tau$ ) は、単一の指数関数的減衰を表す理論式によってそれぞれ 2.97 ns、2.94 ns、2.94 ns と算出された。一方で、NRAS RNA 存在下および NRAS DNA 存在下における ZnAPC の蛍光寿命は、単一



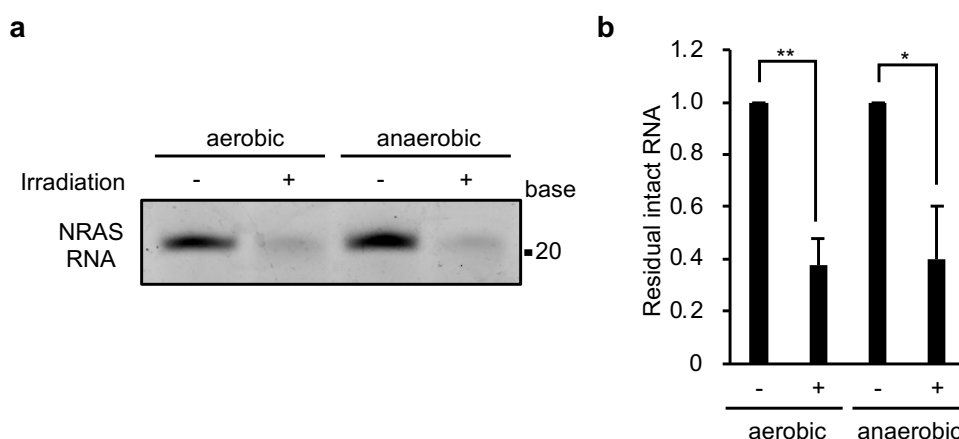
**Figure 5-15 Energy transfer from ZnAPC to NRAS RNA is greater than that to NRAS DNA.**

(a) VIS absorbance spectra of 2  $\mu$ M ZnAPC in the buffer consisting of 50 mM MES-LiOH (pH 7.0) and 100 mM KCl at 25°C in the absence or presence of 30 wt% DMF. The addition of 30 wt% DMF monomerises ZnAPC. (b) Fluorescence spectra of 2  $\mu$ M ZnAPC under the following experimental conditions: in the absence of NRAS RNA in the buffer (right blue) and in the buffer containing 30 wt% DMF (dark blue), in the presence of NRAS RNA in the buffer (red) and in a buffer containing 30 wt% DMF (brown), in the presence of NRAS DNA in the buffer (light green), and in the buffer containing 30 wt% DMF (dark green). (c) Fluorescence decay of ZnAPC under the experimental conditions listed in b. Fluorescence decay in the buffer is not shown because of the insufficient fluorescence intensity. All the experiments were conducted with 2  $\mu$ M ZnAPC, 10  $\mu$ M NRAS RNA, and 10  $\mu$ M NRAS DNA. (d) Fluorescence lifetime,  $\tau$ , was evaluated with a theoretical equation of single or double exponential decay for the fluorescence decay obtained in c.



指数関数的減衰には当てはまらず、二重指数関数的減衰の理論式からそれぞれ  $\tau_1$  (0.35 ns) と  $\tau_2$  (1.23 ns)、 $\tau_1$  (0.53 ns) と  $\tau_2$  (1.94 ns) と算出された (Figure 5-15 d)。フタロシアニン誘導体において、1 ns 以上の  $\tau$  は励起状態 (S1) から基底状態 (S0) への変換に対応することが報告されている<sup>[132-135]</sup>。そのため、DMF 中の ZnAPC の  $\tau$  (2.97 ns) と、NRAS RNA と結合している ZnAPC の  $\tau_2$  (1.23 ns) は、励起状態から基底状態への変換に対応していると考えられる。一方で、NRAS RNA と結合している ZnAPC の蛍光寿命の  $\tau_1$  (0.35 ns) という 1 ns よりも速い成分は、ZnAPC から NRAS RNA へ直接進行する光誘起電子移動を反映している可能性が示された。

これらの結果から、ZnAPC による RNA に対する光分解は、直接的なエネルギー移動によるもので、ROS 非依存的な反応である可能性が示された。そこで、反応溶液中の酸素ならびに光照射反応中の空気をアルゴンで置換し、活性酸素の産生を完全に抑制した環境下で NRAS RNA の光分解反応を検討した。その結果、ZnAPC は活性酸素が産生されない条件下においても、酸素存在下と同程度の約 60% の NRAS RNA を分解した (Figure 5-16)。このことは、ZnAPC の RNA に対する光分解が、ROS 非依存的に進行する反応であることをより強く示唆している。



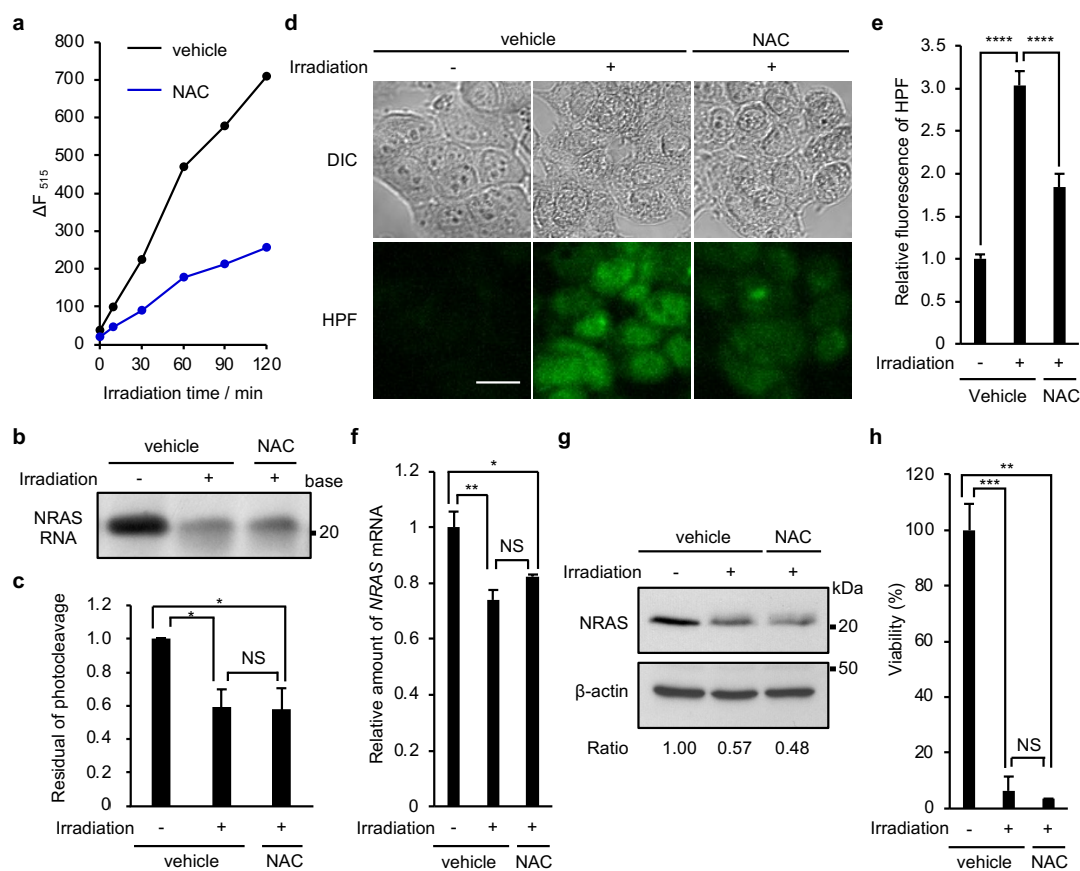
**Figure 5-16 ZnAPC cleaves NRAS RNA under both aerobic and anaerobic conditions upon photo-irradiation.**

(a) Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of 0.1  $\mu$ M NRAS RNA in a 10% gel in the presence of 2  $\mu$ M ZnAPC with or without photo-irradiation for 2 h under aerobic or anaerobic conditions. (b) Residual intact RNA after the photo-cleavage of NRAS RNA. Each bar represents mean  $\pm$  SD; n = 3. For statistical significance, an unpaired t-test was performed. \*p < 0.01; \*\*p < 0.001.

これまでに、ヒドロキシルラジカルによる RNA からのプロトンの引き抜きは、還元剤との反応よりもはるかに速いことが報告されており、還元剤は RNA からのプロトン引き抜きを阻害できないといわれている<sup>[136]</sup>。つまり、ZnAPC の RNA に対する光分解反応は、還元剤では抑制されない可能性がある。そこで、還元剤である N-アセチルシステイン (NAC) 存在下で光照射実験を行い、ZnAPC の RNA に対する分解反応への影響を確認した。NAC の存在下では、ROS が産生されたとしても NAC により還元されて酸化力を保

持できない。ZnAPC の RNA に対する光分解反応が ROS による酸化反応により進行している場合には、NAC の添加によって分解反応が抑制されると考えられる。まず、HPF を用いて NAC の存在下と非存在下における ROS の産生量を検出した。その結果、NAC 存在下において HPF の蛍光は顕著に減少し、NAC は ROS による酸化反応を強く抑制することが分かった (Figure 5-17 a)。次に、NAC 存在下における、ZnAPC の RNA に対する光分解反応を確認した。その結果、NAC の存在下においても NRAS RNA は顕著に減少していた (Figure 5-17 b)。残存全長 RNA のバンド強度を定量したところ、ZnAPC は還元剤の有無にかかわらず RNA を 50%程度分解することが示された (Figure 5-17 c)。これは ROS が産生されない条件下での RNA 分解反応実験の結果と一致しており、ZnAPC が、ROS 非依存的に RNA を分解することがより確認された。

この試験管内の結果は、還元剤 NAC の添加を行なった細胞内においても ZnAPC は NRAS mRNA を分解できる可能性を示している。この可能性を検討するために、NAC 存在下、非存在下における ZnAPC 添加ならびに光照射を行なった際の細胞内の ROS 産生量を比較した。その結果、NAC 非存在下では ZnAPC 添加と光照射によって細胞内での HPF の蛍光強度の顕著な増大が確認されたが、NAC 存在下では HPF の蛍光強度の増大が顕著に抑制された (Figure 5-17 d)。定量解析を行なったところ、NAC 非存在下では HPF の蛍光強度が 3.0 倍に増加していたが、NAC 存在下では 1.8 倍まで抑えられていた (Figure 5-17 e)。NAC 存在下において、細胞内での ROS の産生が抑制されることが確認できたことから、NAC 存在下で ZnAPC の添加ならびに光照射を行った細胞の NRAS mRNA と NRAS のタンパク質の発現量を RT-qPCR とウェスタンブロッティングによって解析した。その結果、ZnAPC は光照射によって NAC 添加の有無に関わらず、NRAS mRNA の発現量を 20%程度減少させ、NRAS タンパク質の発現量を 50%程度減少させた (Figure 5-17 f, g)。さらに重要なことに、光照射から 24 時間後の細胞の生存率を測定したところ、NAC の有無に関わらず生存率が 10%以下まで低下した (Figure 5-17 h)。悪性度の高いがん細胞などでは、還元剤として機能するグルタチオンの産生を誘導することで活性酸素への抵抗性を獲得している細胞も存在する<sup>[137, 138]</sup>。さらに、グルタチオン産生による ROS 抵抗性だけでなく、がん細胞は腫瘍組織の深部など、ROS が産生されないような低酸素条件下においても生育が可能であることが知られている<sup>[139]</sup>。現在、がん治療に使用される光増感剤では、ROS の産生によってがん細胞を死滅させるため、ROS が産生されないような環境下では高い効果が期待できない<sup>[140]</sup>。これは、PDT の適用範囲を外科的手術後に残存した腫瘍などに限定する要因となっている。一方で、本研究で用いた ZnAPC は試験管での実験において、酸素が完全に排除された条件下でも NRAS RNA を分解することを確認しており、NAC の添加により還元状態が維持された細胞においても、ROS の産生非依存的に NRAS の発現を抑制し、細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、ZnAPC は ROS 抵抗性を獲得したがん細胞や腫瘍深部のがん細胞に対しても高い効果を発揮する新しい光感受性物質として利用できる可能性が示された。

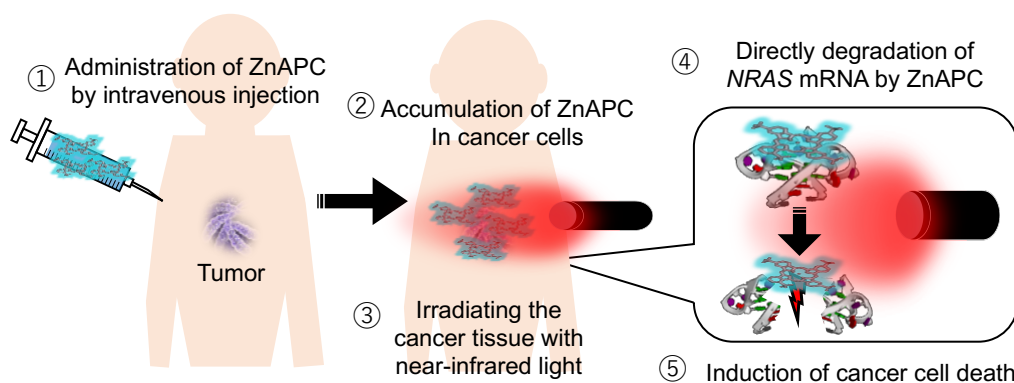


**Figure 5-17 NAC does not inhibit downregulation of NRAS expression by ZnAPC.**

(a) Fluorescence spectra of 10  $\mu$ M HPF in the presence of 10 mM NAC with 2  $\mu$ M ZnAPC after photo-irradiation were acquired at 25°C. Fluorescence intensities of HPF at 515 nm after photo-irradiation (0-120 min) are shown. (b, c) Cells pre-treated with 10  $\mu$ M HPF together with 10 mM NAC for 30 min were treated with 10  $\mu$ M ZnAPC for 30 min and subsequently photo-irradiated for 1 h. (b) DIC images of cells and fluorescent images of HPF. Scale bar, 20  $\mu$ m. The mean fluorescence intensity of HPF was quantified. (c) Relative fluorescence intensities are shown, and each bar represents mean  $\pm$  SD of 10 images. (d) Electrophoresis (in a 10% denaturing polyacrylamide gel) of 0.1  $\mu$ M NRAS RNA in the presence of 2  $\mu$ M ZnAPC with or without 10 mM NAC, followed by photo-irradiation for 2 h. (e) Residual intact RNA after the photo-cleavage of NRAS RNA. Each bar represents mean  $\pm$  SD; n = 3. (f, g) Cells pre-treated with 10  $\mu$ M ZnAPC together with 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> actinomycin D and 10 mM NAC for 1 h were photo-irradiated for 2 h. (f) The amount of NRAS mRNA was evaluated by real-time PCR. Each bar represents mean  $\pm$  SD; n = 3. (g) The cells were incubated for 5 h after photo-irradiation. The cell extracts were subjected to immunoblot analysis with antibodies against NRAS;  $\beta$ -actin served as a loading control. Blots of NRAS and  $\beta$ -actin were quantified, and the relative values of NRAS are shown. (h) Cells pre-treated with 10  $\mu$ M ZnAPC together with 10 mM NAC for 1 h were incubated for 24 h after photo-irradiation for 2 h. The number of viable cells was determined by Trypan Blue exclusion-based cell staining. The number of treated cells was normalized to that of untreated cells. Each bar represents mean  $\pm$  SD; n = 3. For statistical significance, an unpaired t-test was performed. \*p < 0.01; \*\*p < 0.001; \*\*\*p < 0.0001; \*\*\*\*p < 0.00001; NS not significant, p > 0.05

## 5-4 結論と展望

*NRAS* mRNA を標的とした分子標的型 PDT を可能とする光増感剤として、ZnAPC を同定した。ZnAPC による *NRAS* mRNA の分解には酸素が必要なく (Figure 5-16,17)、化学療法や放射線治療に対して抵抗性を獲得したがん細胞は、酸化ストレス耐性のものが多いことを鑑みると、ZnAPC を用いた光線力学療法は従来の治療法とは一線を画す治療効果が期待できる。通常、フタロシアニン化合物は、がん細胞に高発現している低密度リボタンパク質レセプターと親和性が高いため、腫瘍集積性が高い<sup>[141]</sup>。しかしながら、担癌マウスを用いた実験結果から、マウスの尾静脈に注射した ZnAPC は、接種部位に凝集してしまうことが分かっている (データ未掲載)。これは、ZnAPC が有するアニオン性のスルホ基が、カチオニックなタンパク質と凝集しやすいためであると考えている。フタロシアニン誘導体を用いた光線力学療法では、近年、ケイ素が中心金属に配位した水溶性のフタロシアニン誘導体に抗体を結合させた IR700 という光増感剤 (抗体-IR700 結合体) の開発が進められている。IR700 は、がん細胞で高発現・高活性な細胞膜上のタンパク質に対する抗体を付加することで、腫瘍集積性を向上させることに成功している<sup>[142-144]</sup>。一方で、ZnAPC は *NRAS* mRNA G4 を標的としているため、細胞内への導入ならびに核酸への結合能を維持しなければならないため、サイズの大きいタンパク質などを付加することは適していないと考えられる。したがって、ZnAPC の応用にはアニオン性を維持することで G4 との結合親和性を高く維持した上で、腫瘍集積性を向上させることのできるキャリアやデリバリーシステムの開発が必要である。フタロシアニン誘導体を用いた、ナノキャリアとして、フタロシアニンの自己組織化をうまく利用して腫瘍集積性を向上させている研究もある<sup>[145]</sup>。今後、このような技術も参考にしながら、ZnAPC が *NRAS* mRNA を標的とできる点を活かしつつ、腫瘍組織集積性を向上させることのできるキャリアを開発することで、RAS を標的とした分子標的型の光線力学療法という新しいがん治療法の確立が可能になると期待される (Figure 5-18) <sup>[146]</sup>。



**Figure 5-18 Schematic illustration of molecular targeted photodynamic therapy for cancer using ZnAPC.**

① ZnAPC is administered to the body by intravenous injection. ② ZnAPC accumulates in cancer cells and then it is selectively binds to G-quadruplex in *NRAS* mRNA. ③ Irradiating the cancer tissue with near-infrared light. ④ ZnAPC directly degrades *NRAS* mRNA and generates ROS. ⑤ ZnAPC induces cancer cell death even under hypoxic condition.

## 第6章 結言

### 6-1 総括

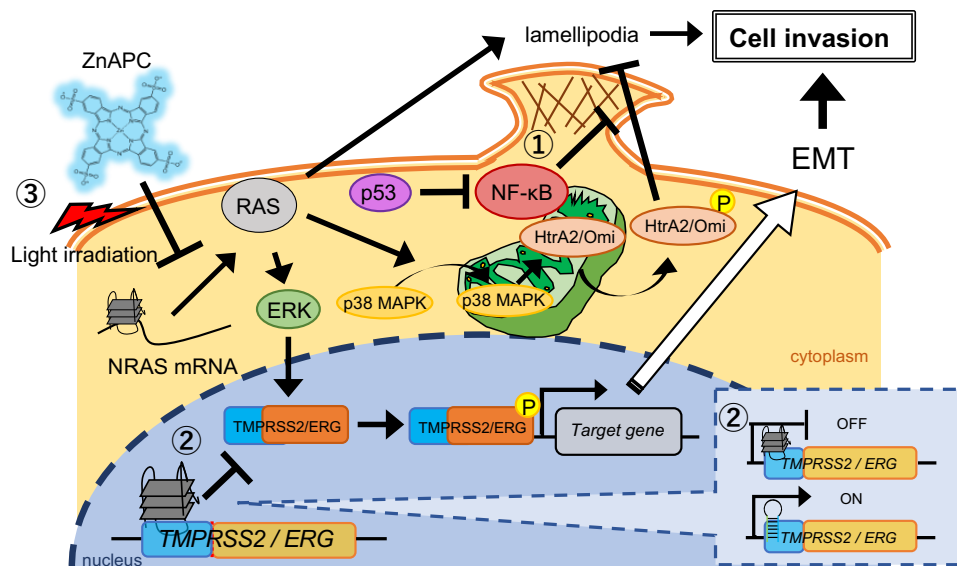
RAS シグナル経路は、多くのがん細胞で恒常的に活性化しており、がんの発生や悪性化に深く関与していることから、RAS シグナル経路を標的としたがん治療は極めて有望であると考えられている。なかでも、RAS シグナルにおいてハブとして機能する RAS 分子に対する分子標的薬は高い効果が期待されてきた。しかし、RAS タンパク質は、創薬が非常に困難な“Undruggable”なタンパク質であり、未だに有効な分子標的薬はほとんど開発されていない。RAS シグナル経路に関わるその他の分子を標的とした分子標的薬も多く開発されてきたが、シグナル経路の煩雑さが要因となり、一つの分子を標的としても、別の経路の活性化によって薬剤耐性を獲得するなど、再発が問題となっている。近年では、さまざまな抗がん剤や分子標的薬を組み合わせた、多剤併用療法が行われており、がん種によっては高い効果を示すことがわかってきている。そのため、がんを治療するためには、RAS 分子および RAS シグナル経路における新たな治療標的となる分子の同定と分子標的薬の開発が急務である。そこで本研究では、RAS シグナル経路の新たな治療標的候補分子の同定と RAS 分子を標的とした新規分子標的薬の開発を目的として研究を行い、以下のよう

1. がん遺伝子 RAS が活性化し、p53 の欠損した細胞の浸潤・転移に関わるラメリポディアの形成には、NF- $\kappa$ B が寄与していることを明らかにした。ミトコンドリアに局在している NF- $\kappa$ B は、p38 MAPK の活性および局在の制御に関わっており、それにより HtrA2/Omi の活性を抑制することで  $\beta$ -actin の切断を抑制している可能性が示された。また、活性化により核内に移行した NF- $\kappa$ B は、他の遺伝子の発現を介して、 $\beta$ -actin の切断抑制に寄与している可能性が示された。二つの可能性が示唆されたが、いずれにおいても RAS シグナル経路の活性化に伴う細胞のがん悪性化において、NF- $\kappa$ B およびその標的遺伝子が新たながん治療標的分子となる可能性について示すことができた。
2. *TMPRSS2* 遺伝子のエクソン 2 領域で形成される G4 は、転写を阻害することを明らかにした。この G4 を標的とした G4 リガンドは、*TMPRSS2* の転写を阻害することができるだけでなく、RAS シグナルの下流で前立腺がんの悪性化に寄与する融合タンパク質 *TMPRSS2/ERG* においても同様に転写を阻害することが期待される。*TMPRSS2* 遺伝子で形成される G4 を標的とした G4 リガンドは、AR シグナル阻害剤とは異なる経路で *TMPRSS2/ERG* の発現を抑制できる可能性があるため、AR シグナル阻害剤抵抗性を獲得したがんにおいても治療効果が期待できる。また、G4 の近傍に存在するシトシンリッチ領域は、G4 形成配列とヘアピン構造を形成することで、G4 の形成、ならびにそれによる転写の阻害効果を抑制することを明らかにした。*TMPRSS2* 遺伝子以外にも、多くの遺伝子の G4 形成配列の前後に、シトシン

リッチな領域が存在することも明らかにしており、ヘアピン構造と G4 の安定性を薬剤などで制御することができれば、新しい遺伝子発現制御方法の確立に繋がるかもしれない結果が得られた。

3. 光増感剤である ZnAPC が *NRAS* mRNA で形成される G4 に選択的に結合し、光照射によって *NRAS* の発現抑制、ならびに細胞死を誘導することを明らかにした。ZnAPC の *NRAS* mRNA の切断反応には酸素が必要ないため、低酸素環境となっているサイズの大きな腫瘍や、グルタチオンの発現によって還元状態となっている悪性度の高いがんなど、これまで行われている治療に対する抵抗性を獲得したがん細胞に対しても高い効果を発揮する可能性がある。ZnAPC の腫瘍集積性を改善し、ZnAPC を治療に用いることができれば、RAS 分子を標的とした分子標的型の光線力学療法という新しいがん治療法の確立につながるかもしれない (Figure 6-1)。

以上のように本研究では、がんの治療に極めて重要な RAS シグナル経路に関して新たな治療標的分子を同定と、シグナル分子の遺伝子発現機構の解明に成功した。さらに、これまで困難とされてきた RAS の発現を制御できる分子標的薬の候補となる化合物の探索にも成功した。本研究の結果は、がん治療における新規標的タンパク質の提示だけでなく、タンパク質をコードする DNA や RNA の G4 を狙った創薬も可能であることを示している。これにより得られた新たな知見を活用し、創薬の標的やモダリティを拡張することで、新しいがん治療法の確立につながると期待される (Figure 6-1)。



**Figure 6-1 Proposal of novel mechanism of RAS-driven cell invasion and its control methods.**

- ① NF-κB suppresses p53-induced inhibition of lamellipodia formation.
- ② Expression of the *TMPPSS2* gene regulated by a switch between G-quadruplex and hairpin structure formation.
- ③ ZnAPC, a phthalocyanine derivative, may be a novel drug for treating cancer suppressing the expression of *NRAS* by targeting its mRNA G-quadruplex.

## 6-2 本研究の意義

RAS シグナルの新たな制御方法の構築を目指した本研究では、新しい遺伝子発現制御機構や、核酸を狙った新規創薬モダリティなどを提唱することができた。そこで本節では、RAS シグナルの制御よりも広範な観点から本研究で得られた知見について議論する。

はじめに、第4章に記した G4 とヘアピン構造間の構造スイッチによる遺伝子発現制御について述べる。DNA や RNA のグアニンリッチ領域が G4 を形成することで転写や翻訳を制御することは広く知られている (Figure 6-2 a)。本研究ではそれに加えて、G4 形成配列の近傍に存在するシトシンリッチ領域が、G4 を形成するグアニンリッチ領域との間で G-C 塩基対を形成し、G4 とヘアピン構造の分子内競合によって、G4 形成による転写抑制効果を低減させることを示した (Figure 6-2 b)。

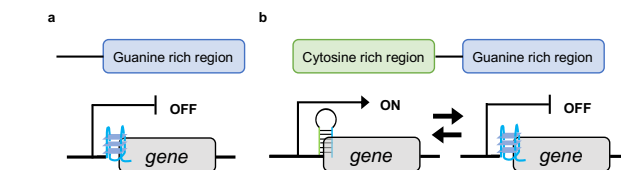


Figure 6-2 Model of transcriptional control of the cytosine-rich region near the G4 formation region.

G4 形成推定配列は、ヒトゲノムにおいて 150 万ヶ所以上あると言われており、プロモーター、5'-UTR、ファーストエクソン、複製起点などの位置と相関していることが報告されている<sup>[147-151]</sup>。G4 形成推定配列近傍に存在するシトシンリッチな領域は、*TMPRSS2* 遺伝子のみならず、G4 形成推定配列を有する種々のプロテアーゼ遺伝子上でも見出された。そのため、プロテアーゼをコードする遺伝子に限らず、より広範な遺伝子の G4 形成推定配列の近傍において、シトシンリッチな領域が存在している可能性が高い。実際に、その他の遺伝子の一例として、真核細胞で普遍的に発現しており、「ハウスキーピング遺伝子」としても知られる *GAPDH* 遺伝子には、エクソン 1 とエクソン 2 の間のイントロン領域の鋳型鎖に G4 形成推定配列が存在しており、その上流 50 bp 中には 20 個のシトシンが含まれていた (Figure 6-3 a)。さらに、m-fold<sup>[93]</sup> による構造予測から、G4 だけでなくヘアピン構造も形成する可能性があることが確認できた (Figure 6-3 b)。この結果から、*GAPDH* の遺伝子発現において、G4 とヘアピン構造の形成が遺伝子発現の制御等を行

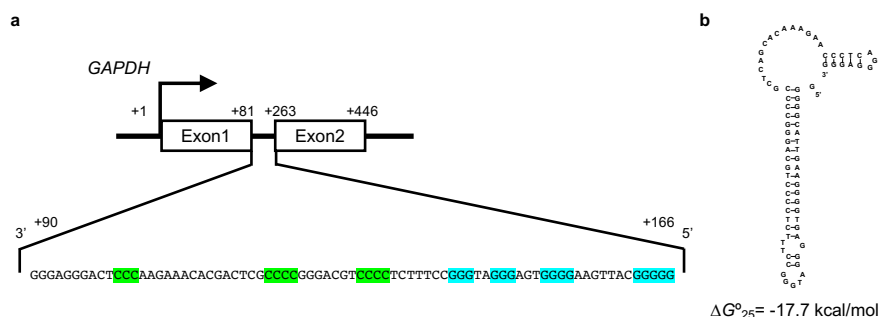


Figure 6-3 Schematic diagram showing the location of the GC-rich region in the *GAPDH* gene.

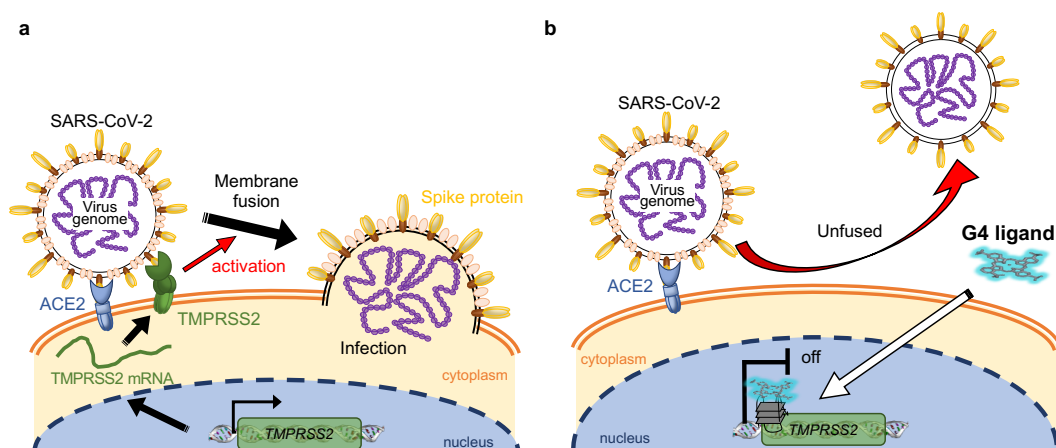
(a) The guanine and cytosine stretches are highlighted in blue and green, respectively. (b) Possible structures and its thermodynamic stability at 25°C. These structures were predicted using m-fold.

っている可能性が考えられた。また、*GAPDH* 遺伝子だけでなく、*ACTB* 遺伝子などにおいても G4 形成推定配列が多く存在することが確認できた。そのため、G4 形成推定配列近傍に存在するシトシンリッチな領域は、*GAPDH* や *ACTB* といったハウスキーピング遺伝子と呼ばれるような、高発現を維持している遺伝子において、G4 の形成を阻害することで遺伝子発現の制御に関与している可能性が考えられた。

G4 は、DNA の複製や転写、エピジェネティクス、RNA の代謝といった、生物の生命現象にとって重要な役割をもつことが示唆されているが、その形成は G4 形成配列の近傍に存在しているシトシンリッチ領域によって制御されている可能性がある。これまで行われてきた G4 の研究は、G4 形成配列のみに注目しているものがほとんどであった。しかし、本研究によって G4 に関する研究では、G4 形成配列だけでなく近傍の配列に関しても考慮する必要性があることを提示することができた。このことは、G4 を狙った化合物のみならず、ヘアピン構造を狙った化合物によっても、種々の遺伝子発現の制御が可能であることを示唆しており、新たな創薬標的としても有用な知見であるといえる。

次に、第 4 章で提案した *TMPRSS2* 遺伝子で形成される G4 を標的とした G4 リガンドが、前立腺がんの治療のみならず、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染抑制や治療につながる可能性があることを述べる。*TMPRSS2* は RAS が惹起する EMT への関与だけでなくインフルエンザウイルスや SARS-CoV-2 の感染に重要なタンパク質であることが知られている (Figure 6-3 a) [152-156]。

*TMPRSS2* 遺伝子は、エクソンだけでなくプロモーター領域でも G4 を形成する。この *TMPRSS2* のプロモーター領域で形成される G4 に結合する化合物は、*TMPRSS2* の発現を抑制し、インフルエンザ A ウイルスの感染を抑制することが明らかにされている<sup>[157]</sup>。さらに、カモスタットやナファモスタットなどのプロ



**Figure 6-3 Model of a novel therapeutic method for COVID-19 using a G4 ligand.**

(a) COVID-19 is caused by the SARS-CoV-2 virus. In the process of infection of infecting human cells with the virus, *TMPRSS2* is required to activate the viral spike protein following its binding to the ACE2 receptor in human cells. (b) The G4 ligand, which selectively stabilizes G4 in the *TMPRSS2* gene, inhibits *TMPRSS2* expression. Therefore, the G4 ligand has potential as a therapeutic agent for COVID-19.



テアーゼ阻害剤を用いて *TMPRSS2* の活性を抑制した細胞では、SARS-CoV-2 の感染が有意に抑制されることが報告されている<sup>[158, 159]</sup>。そのため、*TMPRSS2* 遺伝子で形成される G4 を標的とした G4 リガンドを用いて、*TMPRSS2* の発現を抑制することができれば、SARS-CoV-2 の感染を抑制できる可能性がある。mRNA ワクチンは、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の mRNA を体内に取り込み、体内で SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質を発現させることで抗体や T 細胞を介した免疫を誘導し、SARS-CoV-2 に対する免疫を獲得する。しかしながら、SARS-CoV-2 はデルタ株やオミクロン株といった、遺伝情報に変異が入った様々な変異株が出現しており、現在は mRNA ワクチン接種による予防効果が低下することが大きな問題となっている。一方で、*TMPRSS2* 遺伝子で形成される G4 を標的とした G4 リガンドは、宿主のヒトのタンパク質である *TMPRSS2* の発現を抑制するため、mRNA ワクチンとは別の経路・機序によって変異株を含む SARS-CoV-2 の感染を防ぐ可能性がある (Figure 6-3 b)。そのため、*TMPRSS2* 遺伝子で形成される G4 を標的とした G4 リガンドの開発が、SARS-CoV-2 の脅威からの解放につながるかもしれない (Figure 6-4) <sup>[27, 160]</sup>。



**Figure 6-4** Illustration showing the relationship between regulation of *TMPRSS2*-expression and SARS-CoV-2 infection. <sup>[26]</sup>

## 参考文献

- [1] 厚生労働省政策統括官（統計・情報政策担当）酒光一章, 平成 30 年 我が国の人口動態, 2018.
- [2] A. Fernandez-Medarde and E. Santos, *Genes Cancer*, 2011, **2**, 344-358.
- [3] P.M. Campbell and C.J. Der, *Semin. Cancer Biol.*, 2004, **14**, 105-114.
- [4] C.J. Der, T.G. Krontiris and G.M. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, **79**, 3637-3640.
- [5] K.L. Bryant, J.D. Mancias, A.C. Kimmelman, *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 2014, **39**, 91-100.
- [6] A.R. Moore, S.C. Rosenberg, F. McCormick, *et al.*, *Nat Rev Drug Discov*, 2020, **19**, 533-552.
- [7] A.R. Kinjo, G.J. Bekker, H. Suzuki, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2017, **45**, D282-D288.
- [8] A.R. Kinjo, G.J. Bekker, H. Wako, *et al.*, *Protein Sci.*, 2018, **27**, 95-102.
- [9] B.E. Hall, D. Bar-Sagi and N. Nassar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 12138-12142.
- [10] S. Xu, B.N. Long, G.H. Boris, *et al.*, *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2017, **73**, 970-984.
- [11] J.M. Ostrem and K.M. Shokat, *Nat Rev Drug Discov*, 2016, **15**, 771-785.
- [12] D. Kessler, M. Gmachl, A. Mantoulidis, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, **116**, 15823-15829.
- [13] I.A. Prior, P.D. Lewis and C. Mattos, *Cancer Res.*, 2012, **72**, 2457-2467.
- [14] X. Liu and D. Fan, *Curr. Pharm. Des.*, 2015, **21**, 1279-1291.
- [15] B. Ford, S. Boykevich, C. Zhao, *et al.*, *Biochemistry*, 2009, **48**, 11449-11457.
- [16] M.R. Arkin and J.A. Wells, *Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**, 301-317.
- [17] J. Liu, R. Kang and D. Tang, *Cancer Gene Ther.*, 2021, DOI: 10.1038/s41417-021-00383-9.
- [18] D. Kim, J.Y. Xue and P. Lito, *Cell*, 2020, **183**, 850-859.
- [19] A.D. Cox, S.W. Fesik, A.C. Kimmelman, *et al.*, *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**, 828-851.
- [20] T. Brummer and C. McInnes, *Oncogene*, 2020, **39**, 4155-4169.
- [21] B. Vanhaesebroeck, M.W.D. Perry, J.R. Brown, *et al.*, *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**, 741-769.
- [22] R.C. Gimple and X. Wang, *Front. Oncol.*, 2019, **9**, 965.
- [23] H. Ji, J.H. Lee, Y. Wang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 644-649.
- [24] A.B. Keeton, E.A. Salter and G.A. Piazza, *Cancer Res.*, 2017, **77**, 221-226.
- [25] J. Kohler, Y. Zhao, J. Li, *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2021, **20**, 641-654.
- [26] W. Sugimoto, K. Itoh, T. Kotari, *et al.*, *International Journal of Cancer & Cellular Biology Research*, 2017, **2**, 014-018.
- [27] W. Sugimoto, N. Kinoshita, M. Nakata, *et al.*, *Chem. Commun. (Camb.)*, 2022, **58**, 48-51.
- [28] K. Kawauchi, W. Sugimoto, T. Yasui, *et al.*, *Nat Commun*, 2018, **9**, 2271.
- [29] D. Hanahan and R.A. Weinberg, *Cell*, 2011, **144**, 646-674.
- [30] G. Smith, F.A. Carey, J. Beattie, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 9433-9438.
- [31] H. Yamaguchi and J. Condeelis, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1773**, 642-652.
- [32] B.J. Perrin and J.M. Ervasti, *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2010, **67**, 630-634.
- [33] L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, *et al.*, *Physiol. Rev.*, 2014, **94**, 235-263.
- [34] T.D. Pollard, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2016, **8**.
- [35] S. Yamauchi, Y.Y. Hou, A.K. Guo, *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2014, **204**, 1191-1207.
- [36] L. Vande Walle, P. Van Damme, M. Lamkanfi, *et al.*, *J. Proteome Res.*, 2007, **6**, 1006-1015.
- [37] H. Plun-Favreau, K. Klupsch, N. Moiso, *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2007, **9**, 1243-1252.
- [38] S.J. Pratt, H. Epple, M. Ward, *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2005, **168**, 813-824.
- [39] K. Kawauchi, K. Araki, K. Tobiume, *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2008, **10**, 611-618.
- [40] G.A. Webster and N.D. Perkins, *Mol. Cell. Biol.*, 1999, **19**, 3485-3495.
- [41] G. Carra, M.F. Lingua, B. Maffeo, *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2020, **77**, 4449-4458.
- [42] W.E. Naugler and M. Karin, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2008, **18**, 19-26.
- [43] Y. Lin, L. Bai, W. Chen, *et al.*, *Expert Opin. Ther. Targets*, 2010, **14**, 45-55.

- [44] M.A. Huber, N. Azoitei, B. Baumann, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2004, **114**, 569-581.
- [45] J. Caamano and C.A. Hunter, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, **15**, 414-429.
- [46] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, *et al.*, *Signal Transduct Target Ther*, 2017, **2**.
- [47] J. Napetschnig and H. Wu, *Annu Rev Biophys*, 2013, **42**, 443-468.
- [48] M. Reers, T.W. Smith and L.B. Chen, *Biochemistry*, 1991, **30**, 4480-4486.
- [49] S.T. Smiley, M. Reers, C. Mottola-Hartshorn, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, **88**, 3671-3675.
- [50] V.C. Keil, F. Funke, A. Zeug, *et al.*, *Pflugers Arch.*, 2011, **462**, 693-708.
- [51] A. Perelman, C. Wachtel, M. Cohen, *et al.*, *Cell Death Dis.*, 2012, **3**, e430.
- [52] J.D. Ly, D.R. Grubb and A. Lawen, *Apoptosis*, 2003, **8**, 115-128.
- [53] D. Capece, D. Verzella, B. Di Francesco, *et al.*, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2020, **98**, 118-128.
- [54] B.C. Albensi, *Front Cell Dev Biol*, 2019, **7**, 154.
- [55] R.F. Johnson, Witzel, II and N.D. Perkins, *Cancer Res.*, 2011, **71**, 5588-5597.
- [56] A.K. Guo, Y.Y. Hou, H. Hirata, *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 2014, **229**, 696-704.
- [57] P. Godwin, A.M. Baird, S. Heavey, *et al.*, *Front. Oncol.*, 2013, **3**, 120.
- [58] V. Baud and M. Karin, *Nat Rev Drug Discov*, 2009, **8**, 33-40.
- [59] 全国がん登録, 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」).
- [60] C. Dai, H. Heemers and N. Sharifi, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2017, **7**.
- [61] K. Fujita and N. Nonomura, *World J Mens Health*, 2019, **37**, 288-295.
- [62] A. Hobisch, Z. Culig, C. Radmayr, *et al.*, *Prostate*, 1996, **28**, 129-135.
- [63] W.D. Tilley, S.S. Lim-Tio, D.J. Horsfall, *et al.*, *Cancer Res.*, 1994, **54**, 4096-4102.
- [64] T.H. van der Kwast and B. Tetu, *Eur. Urol.*, 1996, **30**, 265-268.
- [65] C. Lin, L. Yang, B. Tanasa, *et al.*, *Cell*, 2009, **139**, 1069-1083.
- [66] S.A. Tomlins, D.R. Rhodes, S. Perner, *et al.*, *Science*, 2005, **310**, 644-648.
- [67] B.G. Barwick, M. Abramovitz, M. Kodani, *et al.*, *Br. J. Cancer*, 2010, **102**, 570-576.
- [68] R.K. Nam, L. Sugar, W. Yang, *et al.*, *Br. J. Cancer*, 2007, **97**, 1690-1695.
- [69] L. Bonaccorsi, G. Nesi, F. Nuti, *et al.*, *J. Endocrinol. Invest.*, 2009, **32**, 590-596.
- [70] R.K. Nam, L. Sugar, Z. Wang, *et al.*, *Cancer Biol. Ther.*, 2007, **6**, 40-45.
- [71] K. Rostad, O.J. Hellwinkel, S.A. Haukaas, *et al.*, *APMIS*, 2009, **117**, 575-582.
- [72] R. Mehra, S.A. Tomlins, R. Shen, *et al.*, *Mod. Pathol.*, 2007, **20**, 538-544.
- [73] S. Perner, M.A. Svensson, R.R. Hossain, *et al.*, *Urology*, 2010, **75**, 762-767.
- [74] B.S. Carver, J. Tran, A. Gopalan, *et al.*, *Nat. Genet.*, 2009, **41**, 619-624.
- [75] O. Klezovitch, M. Risk, I. Coleman, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 2105-2110.
- [76] O. Leshem, S. Madar, I. Kogan-Sakin, *et al.*, *PLoS One*, 2011, **6**, e21650.
- [77] L. Ratz, M. Laible, L.A. Kacprzyk, *et al.*, *Oncotarget*, 2017, **8**, 25115-25130.
- [78] S. Gupta, K. Iljin, H. Sara, *et al.*, *Cancer Res.*, 2010, **70**, 6735-6745.
- [79] M. Yoshimoto, A.M. Joshua, I.W. Cunha, *et al.*, *Mod. Pathol.*, 2008, **21**, 1451-1460.
- [80] A.A. Mohamed, C.P. Xavier, G. Sukumar, *et al.*, *Cancer Res.*, 2018, **78**, 3659-3671.
- [81] J.M. Lucas, C. Heinlein, T. Kim, *et al.*, *Cancer Discov.*, 2014, **4**, 1310-1325.
- [82] P. Lavaud, C. Dumont, C. Thibault, *et al.*, *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2020, **12**, 1758835920978134.
- [83] J. Spiegel, S. Adhikari and S. Balasubramanian, *Trends Chem*, 2020, **2**, 123-136.
- [84] D. Bhattacharyya, G. Mirihana Arachchilage and S. Basu, *Front Chem*, 2016, **4**, 38.
- [85] J. Carvalho, J.L. Mergny, G.F. Salgado, *et al.*, *Trends Mol. Med.*, 2020, **26**, 848-861.
- [86] S.G. Hershman, Q. Chen, J.Y. Lee, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 144-156.
- [87] J.E. Johnson, J.S. Smith, M.L. Kozak, *et al.*, *Biochimie*, 2008, **90**, 1250-1263.
- [88] M. Bartas, M. Cutova, V. Brazda, *et al.*, *Molecules*, 2019, **24**.
- [89] E. Lavezzo, M. Berselli, I. Frasson, *et al.*, *PLoS Comput. Biol.*, 2018, **14**, e1006675.

- [90] D. Varshney, J. Spiegel, K. Zyner, *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, **21**, 459-474.
- [91] N. Kosiol, S. Juranek, P. Brossart, *et al.*, *Mol. Cancer*, 2021, **20**, 40.
- [92] D. Rhodes and H.J. Lipps, *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**, 8627-8637.
- [93] M. Zuker, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 3406-3415.
- [94] V. Gabelica, R. Maeda, T. Fujimoto, *et al.*, *Biochemistry*, 2013, **52**, 5620-5628.
- [95] A. Kreig, J. Calvert, J. Sanoica, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**, 7961-7970.
- [96] H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 642-651.
- [97] S. Nakano, D. Miyoshi and N. Sugimoto, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 2733-2758.
- [98] H. Tateishi-Karimata, N. Isono and N. Sugimoto, *PLoS One*, 2014, **9**, e90580.
- [99] M. Scaravilli, S. Koivukoski and L. Latonen, *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**, 623809.
- [100] F.M. Healy, I.A. Prior and D.J. MacEwan, *Br. J. Pharmacol.*, 2021, DOI: 10.1111/bph.15420.
- [101] G.A. Hobbs, C.J. Der and K.L. Rossman, *J. Cell Sci.*, 2016, **129**, 1287-1292.
- [102] S. Kumari, A. Bugaut, J.L. Huppert, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, **3**, 218-221.
- [103] E. Cadoni, L. De Paepe, A. Manicardi, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2021, **49**, 6638-6659.
- [104] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, *et al.*, *CA Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 250-281.
- [105] M. Tampa, M.I. Sarbu, C. Matei, *et al.*, *Oncol. Lett.*, 2019, **17**, 4085-4093.
- [106] F. Ghani, J. Kristen and H. Riegler, *J. Chem. Eng. Data*, 2012, **57**, 439-449.
- [107] H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**, 2605-2614.
- [108] H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, *et al.*, *Chem. Commun. (Camb.)*, 2010, **46**, 5740-5742.
- [109] H. Yaku, T. Murashima, H. Tateishi-Karimata, *et al.*, *Methods*, 2013, **64**, 19-27.
- [110] U. Isci, A.S. Faponle, P. Afanasiev, *et al.*, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 5063-5075.
- [111] E. Bletsa, M. Solakidou, M. Louloudi, *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 2016, **649**, 48-52.
- [112] A. Cammas, A. Dubrac, B. Morel, *et al.*, *RNA Biol.*, 2015, **12**, 320-329.
- [113] R. Shahid, A. Bugaut and S. Balasubramanian, *Biochemistry*, 2010, **49**, 8300-8306.
- [114] A. Segalla, C.D. Borsarelli, S.E. Braslavsky, *et al.*, *Photochem Photobiol Sci*, 2002, **1**, 641-648.
- [115] B. Brozek-Pluska, A. Jarota, K.E. Kurczewski, *et al.*, *J. Mol. Struct.*, 2009, **924**, 338-346.
- [116] A. Randazzo, G.P. Spada and M.W. da Silva, *Top. Curr. Chem.*, 2013, **330**, 67-86.
- [117] M. Vlasenok, O. Levchenko, D. Basmanov, *et al.*, *Data Brief*, 2018, **18**, 348-359.
- [118] R. Del Villar-Guerra, J.O. Trent and J.B. Chaires, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2018, **57**, 7171-7175.
- [119] M. Vorlickova, I. Kejnovska, J. Sagi, *et al.*, *Methods*, 2012, **57**, 64-75.
- [120] A.I. Karsisiotis, N.M. Hessari, E. Novellino, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, **50**, 10645-10648.
- [121] S. Masiero, R. Trotta, S. Pieraccini, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 2683-2692.
- [122] S. Paramasivan, I. Rujan and P.H. Bolton, *Methods*, 2007, **43**, 324-331.
- [123] K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 3170-3175.
- [124] O. Fasano, D. Birnbaum, L. Edlund, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1984, **4**, 1695-1705.
- [125] W. Strober, *Curr. Protoc. Immunol.*, 2015, **111**, A3 B 1-A3 B 3.
- [126] W. Martinet, G.R. de Meyer, A.G. Herman, *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 2004, **34**, 323-327.
- [127] Q. Kong and C.L. Lin, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010, **67**, 1817-1829.
- [128] J. Zimmer, E.M.C. Tacconi, C. Folio, *et al.*, *Mol. Cell*, 2016, **61**, 449-460.
- [129] H. Xu, M. Di Antonio, S. McKinney, *et al.*, *Nat Commun*, 2017, **8**, 14432.
- [130] A. De Magis, S.G. Manzo, M. Russo, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, **116**, 816-825.
- [131] R. Paul and M.M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 596-599.
- [132] M.Y. Berezin and S. Achilefu, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2641-2684.
- [133] R. Ashokkumar, A. Kathiravan and P. Ramamurthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 1015-1021.
- [134] M. van Leeuwen, A. Beeby, I. Fernandes, *et al.*, *Photochem Photobiol Sci*, 2014, **13**, 62-69.
- [135] E.A. S. Tombe, T. Nyokong *New J. Chem.*, 2013, **37**, 679-689.

- [136] J. Barciszewski, M.Z. Barciszewska, G. Siboska, *et al.*, *Mol. Biol. Rep.*, 1999, **26**, 231-238.
- [137] L. Kennedy, J.K. Sandhu, M.E. Harper, *et al.*, *Biomolecules*, 2020, **10**.
- [138] N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, *et al.*, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013, **2013**, 972913.
- [139] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, *et al.*, *Hypoxia (Auckl)*, 2015, **3**, 83-92.
- [140] Q.M. Zijun Shen, Xinyu Zhou, Guimin Zhang, Guizhou Hao, Yong Sun, Jie Cao *NPG Asia Materials*, 2021, **13**.
- [141] J. Rak, P. Pouckova, J. Benes, *et al.*, *Anticancer Res.*, 2019, **39**, 3323-3339.
- [142] J. Maczynska, C. Da Pieve, T.A. Burley, *et al.*, *Cell Death Dis.*, 2020, **11**, 886.
- [143] H. Kobayashi, A. Furusawa, A. Rosenberg, *et al.*, *Int. Immunol.*, 2021, **33**, 7-15.
- [144] M. Mitsunaga, M. Ogawa, N. Kosaka, *et al.*, *Nat. Med.*, 2011, **17**, 1685-1691.
- [145] S.Y. Xingshu Li, Yoonji Lee, Tian Guo, Nahyun Kwon, Dayoung Lee, Su Cheong Yeom, Yejin Cho, Gyoungmi Kim, Jian-Dong Huang, Sun Choi, Ki Taek Nam, Juyoung Yoon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 1366-1372.
- [146] K. Kawauchi, W. Sugimoto and D. Miyoshi, *ATLAS of Science another view on science*, 2019.
- [147] J.L. Huppert and S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 2908-2916.
- [148] A.K. Todd, M. Johnston and S. Neidle, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 2901-2907.
- [149] X.M. Li, K.W. Zheng, J.Y. Zhang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, **112**, 14581-14586.
- [150] S. Xiao, J.Y. Zhang, K.W. Zheng, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2013, **41**, 10379-10390.
- [151] J.Y. Gong, C.J. Wen, M.L. Tang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2021, **118**.
- [152] H. Limburg, A. Harbig, D. Bestle, *et al.*, *J. Virol.*, 2019, **93**.
- [153] L.W. Shen, H.J. Mao, Y.L. Wu, *et al.*, *Biochimie*, 2017, **142**, 1-10.
- [154] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, *et al.*, *Cell*, 2020, **181**, 271-280 e278.
- [155] D. Bestle, M.R. Heindl, H. Limburg, *et al.*, *Life Sci Alliance*, 2020, **3**.
- [156] S. Matsuyama, N. Nao, K. Shirato, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2020, **117**, 7001-7003.
- [157] L.W. Shen, M.Q. Qian, K. Yu, *et al.*, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 7635.
- [158] J. Koch, Z.M. Uckelely, P. Doldan, *et al.*, *EMBO J.*, 2021, **40**, e107821.
- [159] R. Hashimoto, A. Sakamoto, S. Deguchi, *et al.*, *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, **26**, 1107-1114.
- [160] <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/CC/D2CC90001G#!divAbstract>, (accessed 17/1, 2022).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として長い間、適切なお指導およびご助言を頂きました甲南大学フロンティアサイエンス学部 川内 敬子 准教授に心よりお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり適切なお指導、ご助言を頂き、本論文の精読と批評をして頂きました三好 大輔教授に心よりお礼申し上げます。

本論文の精読と批評をして頂きました神戸大学大学院工学研究科 大谷 亨 准教授および甲南大学フロンティアサイエンス学部 西方 敬人 教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、丁寧かつ的確なお助言を頂きました甲南大学先端生命工学研究所 建石 寿枝 准教授に心よりお礼申し上げます。無酸素条件下での光切断反応実験と蛍光寿命測定において、熱心かつ丁寧にご指導頂きました甲南大学フロンティアサイエンス学部 赤松 謙祐 教授および鶴岡 孝章 准教授に厚くお礼申し上げます。G4 形成配列の解析をサポートして頂きました甲南大学先端生命工学研究所 大山 達也 博士に深く感謝致します。本研究の遂行にあたって、有用なお助言を頂きました甲南大学先端生命工学研究所 杉本 直己 教授、名古屋大学大学院医学系研究科 平田 宏聡 特任講師および Duke-NUS Medical School, Senior Research Fellow, Dr. Alvin Kunyao Guo に厚くお礼申し上げます。本実験で用いたプラスミド DNA を譲渡して頂き、適切なお助言を頂きました日本医科大学大学院医学研究科 田中 信之 教授、中嶋 亘 講師、阿部 芳憲 助教および上原 郁野 助教に深く感謝致します。共同研究者として、TEM 試料の作成・観察において親切にご指導頂きました国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学センター細胞場構造研究チーム 岩根敦子 チームリーダーおよび一ノ瀬 孝子 氏に厚くお礼申し上げます。光照射実験において、LED の作成等でサポートして頂きました日本医科大学 Wolf Alexander 講師に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、適切かつ有用なお助言を頂きました甲南大学 腫瘍分子生物学研究室（川内研）卒業生 江畑 貴弘 氏、神足 俊也 氏、前田 美穂 氏、三井 靖雅 氏、伊藤 功彦 氏、安井 貴俊 氏に深く感謝致します。いつも議論に加わり、有用な助言を頂きました川内研 取井 猛流 氏、木下 菜月 氏に感謝致します。心の支えとなりいつも研究室を明るく盛り上げてくれた川内研 浦野 諒人 氏、桑本 慎氏に感謝致します。川内研皆様の益々のご活躍を祈っております。本研究を遂行するにあたり、共同研究者として有用なお助言を頂きました甲南大学 分子設計化学研究室（三好研）卒業生 村田 耕平 氏、松野 仁志 氏、高木 一樹 氏に深く感謝致します。有用な助言を頂きました三好研 鶴田 充生 氏、橋本 佳樹 氏、高宮 渚 氏、中田 実紀 氏に感謝致します。科学の面白さを教えて頂いた（旧姓）坂井 智子 氏に心より感謝致します。研究を遂行するにあたって、心の支えとなった岸上 和矢 氏、土屋 浩美 氏、川口 桜子 氏に感謝致します。さらに、本大学の先生方、事務員の方々など関わりのあった全ての皆様に感謝致します。

本研究は JSPS 特別研究員奨励費（19J21096）の助成を受け遂行しました。深く感謝いたします。

最後になりましたが、父、母、姉、兄がいなければ、こんなにも長い間、学生として研究生活を送ることができなかったと思います。長い間勉強をする機会を与えて頂いたこと、どんな時も暖かく見守り心の支えてくれたことに心から感謝致します。

2022 年 2 月

杉本 渉

## 業績リスト

### 公表論文（副論文）リスト

1. W. Sugimoto, N. Kinoshita, M. Nakata, T. Ohyama, H. Tateishi-Karimata, T. Nishikata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, K. Kawauchi, Intramolecular G-quadruplex-hairpin loop structure competition of a GC-rich exon region in the TMPRSS2 gene, *Chem. Commun.*, 58(1), 48-51. (2022)
2. K. Kawauchi, W. Sugimoto, T. Yasui, K. Murata, K. Itoh, K. Takagi, T. Tsuruoka, K. Akamatsu, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, An anionic phthalocyanine decreases NRAS expression by breaking down its RNA G-quadruplex, *Nat. Commun.*, 9(1), 2271 (2018)
3. W. Sugimoto, K. Itoh, T. Kotari, A.K. Guo, T. Ebata, H. Hirata, K. Kawauchi, NF- $\kappa$ B prevents oncogenic Ras-induced  $\beta$ -actin cleavage in p53-deficient cells. *Int. J. Cancer Cell Biol. Res.*, 2(1), 014-018 (2017)

### 参考論文リスト

1. W. Sugimoto, D. Miyoshi, K. Kawauchi, Detection of Intracellular Reactive Oxidative Species Using the Fluorescent Probe Hydroxyphenyl Fluorescein, *Methods Mol. Biol.*, **2274**, 207-215. (2021)
2. T. Torii, W. Sugimoto, K. Kawauchi, D. Miyoshi, Novel Strategy of Photodynamic Therapy Targeting RAS mRNA with G-Quadruplex Ligands for Cancer Treatment, *J. Data Mining Genomics Proteomics.*, **11**, 226. (2020)
3. W. Sugimoto, K. Itoh, H. Hirata, Y. Abe, T. Torii, Y. Mitsui, Y. Budirahardja, N. Tanaka, K. Kawauchi, MMP24 as a Target of YAP is a Potential Prognostic Factor in Cancer Patients, *Bioengineering*, 7(1), 18. (2020)
4. K. Itoh, T. Ebata, H. Hirata, T. Torii, W. Sugimoto, K. Onodera, W. Nakajima, I. Uehara, D. Okuzaki, S. Yamauchi, Y. Budirahardja, T. Nishikata, N. Tanaka, K. Kawauchi, DMPK is a New Candidate Mediator of Tumor Suppressor p53-Dependent Cell Death, *Molecules*, 24(17), 3175. (2019)
5. K. Araki, K. Kawauchi, W. Sugimoto, D. Tsuda, H. Oda, R. Yoshida, K. Ohtani, Mitochondrial protein E2F3d, a distinctive E2F3 product, mediates hypoxia-induced mitophagy in cancer cells, *Commun. Biol.*, **2**, 3. (2019)
6. W. Sugimoto, K. Itoh, Y. Mitsui, T. Ebata, H. Fujita, H. Hirata, K. Kawauchi, Substrate rigidity-dependent positive feedback regulation between YAP and ROCK2, *Cell Adh. Migr.*, 12(2), 101-108. (2018)
7. T. Ebata, Y. Mitsui, W. Sugimoto, M. Maeda, K. Araki, H. Machiyama, I. Harada, Y. Sawada, H. Fujita, H. Hirata, K. Kawauchi, Substrate Stiffness Influences Doxorubicin-Induced p53 Activation via ROCK2 Expression, *Biomed. Res. Int.*, **2017**, 5158961. (2017)

### 総説リスト

1. 鶴田充生、取井猛流、杉本渉、川内敬子、三好大輔  
核酸の化学修飾と構造や相分離能の相関  
月刊「細胞」～エピトランスクリプトミクス～, 53(14), 42(910)-45(913). (2021)
2. 杉本渉、橋本佳樹、川内敬子、三好大輔  
がん関連 RNA を破壊する分子標的型光線力学療法  
BIO Clinica～疾患ゲノム研究の最前線～, 36(5), 65(457)-67(458). (2021)
3. 杉本渉、川内敬子、三好大輔  
RAS mRNA を狙った分子標的型光線力学療法  
Medical Science Digest～RNAサイレンシングと疾患～, 46(9), 26(566)-27(567). (2020)

## 学会発表リスト

1. G-quadruplex on ribosomal DNA form the aggregation in nucleolus  
○ 取井 猛流、杉本 渉、建石 寿枝、鶴田 充生、月生 雅也、村嶋 貴之、西方 敬人、杉本 直己、三好 大輔、川内 敬子  
第 44 回 日本分子生物学会年会、神奈川、2021 年 12 月
2. リボソーム DNA に由来する G-quadruplex は核小体で LLPS を誘起する  
○ 取井 猛流、杉本 渉、建石 寿枝、村嶋 貴之、西方 敬人、杉本 直己、三好 大輔、川内 敬子  
若手支援技術講習会、Zoom オンライン、2021 年 9 月
3. The novel mechanism of TMPRSS2 gene expression by formation of non-canonical structure  
○ 杉本 渉  
International Cooperation Meeting for Biology (ICMB)、Zoom オンライン、2021 年 9 月（口頭発表）
4. The role of ribosomal DNA in formation for nucleolar caps  
○ 取井 猛流、杉本 渉、建石 寿枝、村嶋 貴之、西方 敬人、杉本 直己、三好 大輔、川内 敬子  
International Cooperation Meeting for Biology (ICMB)、Zoom オンライン、2021 年 9 月
5. Establishment of cancer cell line with constitutive cell fusion  
○ 浦野 諒人、取井 猛流、杉本 渉、荒木 啓吾、川内 敬子  
International Cooperation Meeting for Biology (ICMB)、Zoom オンライン、2021 年 9 月
6. The role of G-quadruplex derived from ribosomal DNA in Liquid Liquid Phase Separation  
○ 取井 猛流、杉本 渉、建石 寿枝、西方 敬人、村嶋 貴之、杉本 直己、三好 大輔、川内 敬子  
FIBER 日本核酸化学会若手フォーラム、Zoom オンライン、2021 年 7 月
7. Novel Mechanism of Cell Fusion in Cancer Cells  
○ 浦野 諒人、取井 猛流、杉本 渉、荒木 啓吾、川内 敬子  
FIBER 日本核酸化学会若手フォーラム、Zoom オンライン、2021 年 7 月
8. 細胞融合により多核化した HeLa 細胞の特性解析  
○ 浦野 諒人、取井 猛流、杉本 渉、荒木 啓吾、川内 敬子  
超異分野学会 大阪大会 2021、Zoom オンライン、2021 年 4 月
9. DNA 高次構造による TMPRESS2 遺伝子の発現制御  
○ 木下 菜月、中田 実紀、杉本 渉、建石 寿枝、杉本 直己、川内 敬子、三好 大輔  
超異分野学会 大阪大会 2021、Zoom オンライン、2021 年 4 月
10. 核小体ストレスにより形成する rDNA G-quadruplex 集合体とその機能  
○ 杉本 渉、桑本 慎、建石 寿枝、岩根 敦子、高橋 宏隆、三好 大輔、川内 敬子  
日本薬学会第 141 年会、広島（Zoom オンライン）、2021 年 3 月（口頭発表）
11. 核小体ストレスにより形成する rDNA G-quadruplex 凝集体とその機能  
○ 杉本 渉  
International joint meeting for biosystems-連携大学国際合同ミーティング、Zoom オンライン、2020 年 12 月（口頭発表）  
**※最優秀発表賞受賞**
12. 恒常的に融合するがん細胞の特性の解析  
○ 浦野 諒人、取井 猛流、杉本 渉、荒木 啓吾、川内 敬子  
第 43 回 日本分子生物学会年会、Zoom オンライン、2020 年 12 月



13. 静水圧における細胞移動の分子機構の解明  
○ 谷口 慎也、木下 菜月、取井 猛流、杉本 渉、西方 敬人、平田 宏聡、吉野 大輔、川内 敬子  
第 43 回 日本分子生物学会年会、Zoom オンライン、2020 年 12 月
14. DMPK の新たな発現機構の解明  
○ 取井 猛流、江畑 貴弘、伊藤 功彦、平田 宏聡、杉本 渉、小野寺 恵吾、中嶋 亘、上原 郁野、奥崎 大介、山内 翔太、Yemima Budirahardja、西方 敬人、三好 大輔、田中 信之、川内 敬子  
第 43 回 日本分子生物学会年会、Zoom オンライン、2020 年 12 月
15. カチオン性ペプチドと G4 形成 RNA との相互作用によって誘起される液液相分離現象  
○ 鶴田 充生、小島 一起、取井 猛流、杉本 渉、川内 敬子、三好 大輔  
第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020、オンライン、2020 年 10 月
16. The molecular mechanism of hydrostatic pressure-induced cell migration  
○ Shinya Taniguchi, Natsuki Kinoshita, Takeru Torii, Wataru Sugimoto, Yemima Budirahardja, Takahito Nishikata, Hiroaki Hirata, Daisuke Yoshino, Keiko Kawauchi  
From Molecules to Organs: The Mechanobiology of Morphogenesis、Zoom オンライン、2020 年 10 月
17. RNA とタンパク質が誘起する液液相分離現象の最小モデルシステムの構築  
○ 鶴田 充生、小島 一起、取井 猛流、杉本 渉、川内 敬子、三好 大輔  
第 14 回 バイオ関連化学シンポジウム 2020、福岡（オンライン）、2020 年 9 月
18. rRNA 転写阻害による核小体崩壊メカニズムの解明  
○ 杉本 渉、豊田 駿、建石 寿枝、杉本 直己、岩根 敦子、三好 大輔、川内 敬子  
日本薬学会第 140 年会国立京都国際会館、京都、2020 年 3 月（口頭発表）
19. 短鎖 G4 RNA と RGG ペプチドの相互作用による液-液相分離現象  
○ 小島 一起、杉本 渉、川内 敬子、杉本 直己、三好 大輔  
日本化学会第 100 春季年会 2020、千葉、2020 年 3 月
20. Liquid – Liquid Phase Separation Induced by RNA G-Quadruplexes and Cationic Peptides  
○ Kazuki Kohata, Wataru Sugimoto, Keiko Kawauchi, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi  
ISNM2019 13th International Symposium on Nanomedicine、兵庫、2019 年 12 月
21. リボソーム RNA 転写阻害による核小体崩壊メカニズムの解明  
○ 杉本 渉  
甲南大学リサーチフェスタ 2019、兵庫、2019 年 12 月（ポスター発表）  
※ **ビッグデータ賞受賞**
22. 核小体における熱刺激応答性の新規アクチン構造体形成機構の解明  
○ 豊田 駿、杉本 渉、川内 敬子  
甲南大学リサーチフェスタ 2019、兵庫、2019 年 12 月
23. p53 によるアクトミオシンの制御を介したアポトーシス誘導機構の解明  
○ 取井 猛流、伊藤 功彦、杉本 渉、田中 信之、平田 宏聡、三好 大輔、川内 敬子  
甲南大学リサーチフェスタ 2019、兵庫、2019 年 12 月
24. ストレス応答における核酸四重鎖構造形成意義の解明  
○ 杉本 渉、建石 寿枝、杉本 直己、三好 大輔、川内 敬子  
第 3 回 ナノバイオ交流会、兵庫、2019 年 9 月（ポスター発表）  
※ **優秀講演賞受賞**

25. p53 による核内アクチン動態の制御とその意義の解明
  - 伊藤 功彦、平田 宏聡、杉本 渉、島本 勇太、岩根 敦子、川内 敬子
 第3回ナノバイオ交流会、兵庫、2019年9月
  
26. 細胞死を誘導する p73 新規標的遺伝子の同定
  - 取井 猛流、伊藤 功彦、江畑 貴弘、平田 宏聡、杉本 渉、小野寺 恵吾、中嶋 亘、上原 郁野、奥崎 大介、山内 翔太、Yemima Budirahardja、西方 敬人、田中 信之、川内 敬子
 第3回 ナノバイオ交流会、兵庫、2019年9月
  
27. ストレス応答における核酸四重鎖構造形成の意義の解明
  - 杉本 渉、川内 敬子
 第5回 幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート、兵庫、2019年8月（ポスター発表）
  
28. p53 によるアクチン細胞骨格の制御を介した細胞死誘導機構
  - 取井 猛流、伊藤 功彦、江畑 貴弘、平田 宏聡、杉本 渉、小野寺 恵吾、中嶋 亘、上原 郁野、奥崎 大介、山内 翔太、Yemima Budirahardja、西方 敬人、田中 信之、川内 敬子
 第5回 幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート、兵庫、2019年8月
  
29. p53 機能欠損細胞における DNA 損傷刺激誘導性のアクチン構造の変化とその意義
  - 取井 猛流、伊藤 功彦、江畑 貴弘、杉本 渉、平田 宏聡、田中 信之、川内 敬子
 第3回合同プログレスミーティング、大阪、2019年3月
  
30. Development of a novel cancer therapy based on targeting NRAS mRNA G-quadruplex
  - Wataru Sugimoto, Keiko Kawauchi, Takatoshi Yasui, Kohei Murata, Katsuhiko Itoh, Kazuki Takagi, Takaaki Tsuruoka, Kensuke Akamatsu, Hisae Tateishi - Karimata, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi
 KONAN Research Summit、兵庫、2018年12月（Poster presentation）  
 ※ **KRS Poster Presentation Award 受賞**
  
31. The role of actin in DNA-damage response mediated by tumor suppressors
  - Katsuhiko Itoh, Takeru Torii, Wataru Sugimoto, Takahiro Ebata, Keiko Kawauchi
 KONAN Research Summit、兵庫、2018年12月
  
32. DNA 損傷応答におけるアクチンの役割
  - 川内 敬子、杉本 渉、伊藤 功彦
 第41回 日本分子生物学会年会、神奈川、2018年11月
  
33. An anionic phthalocyanine downregulates NRAS expression by cleavage of its RNA G-quadruplex
  - Wataru Sugimoto, Keiko Kawauchi, Takatoshi Yasui, Kohei Murata, Katsuhiko Itoh, Kazuki Takagi, Takaaki Tsuruoka, Kensuke Akamatsu, Hisae Tateishi - Karimata, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi
 第41回 日本分子生物学会年会、神奈川、2018年11月（Oral Presentation）
  
34. p53 による p73 制御機構の解明
  - 伊藤 功彦、江畑 貴弘、杉本 渉、取井 猛流、平田 宏聡、田中 信之、川内 敬子
 第41回 日本分子生物学会年会、神奈川、2018年11月
  
35. 細胞外の足場の硬さに応答して変化する MMP 遺伝子発現機構の解明
  - 取井 猛流、杉本 渉、伊藤 功彦、江畑 貴弘、三井 靖雅、平田 宏聡、川内 敬子
 第41回 日本分子生物学会年会、神奈川、2018年11月
  
36. The regulate of nuclear actin filaments by p53
  - Katsuhiko Itoh, Takeru Torii, Wataru Sugimoto, Alvin Kunyao Guo, Hiroaki Hirata, Keiko Kawauchi
 Fiber International Summit for Nucleic Acid (FISNA2018)、兵庫、2018年7月

37. 脱ワトソン・クリックの核酸化学 (47): RNA 四重らせん構造リガンドを用いた分子標的型光線力学療法の構築
  - 高木 一樹, 安井 貴俊, 伊藤 功彦, 杉本 渉, 川内 敬子, 杉本 直己, 三好 大輔
 日本化学会第 98 回春季年会、千葉、2018 年 3 月
38. YAP-ROCK2 の発現を介した物理的環境の変化による抗がん剤感受性への影響
  - 杉本 渉, 江畑 貴弘, 三井 靖雅, 前田 美穂, 伊藤 功彦, 平田 宏聡, 川内 敬子
 生命科学系学会合同年次大会(第 40 回 日本分子生物学会年会)、兵庫、2017 年 12 月 (ポスター発表)
39. Ras 誘導性細胞老化における ROCK2 の重要性
  - 前田 美穂, 伊藤 功彦, 杉本 渉, 江畑 貴弘, 平田 宏聡, 川内 敬子
 生命科学系学会合同年次大会(第 40 回 日本分子生物学会年会)、兵庫、2017 年 12 月
40. がん遺伝子 RAS 発現細胞のラメリポディア形成における NF- $\kappa$ B の役割
  - 伊藤 功彦, 杉本 渉, 神足 俊也, Alvin Kunyao Guo, 江畑 貴弘, 平田 宏聡, 川内 敬子
 生命科学系学会合同年次大会(第 40 回 日本分子生物学会年会)、兵庫、2017 年 12 月
41. グアニン四重鎖の形成にプロリンが与える影響
  - 安井 貴俊, 杉本 渉, 三好 大輔, 川内 敬子
 生命科学系学会合同年次大会(第 40 回 日本分子生物学会年会)、兵庫、2017 年 12 月
42. The role of the extracellular matrix stiffness in p53-mediated tumor suppression
  - Wataru Sugimoto, Takahiro Ebata, Yasumasa Mitsui, Miho Maeda, Katsuhiko Ito, Hiroaki Hirata, Keiko Kawauchi
 The 17th International p53 workshop、Biopolis, Singapore、2017 年 7 月 (Poster presentation)
43. A novel photosensitizer targeting NRAS RNA G-quadruplex
  - Wataru Sugimoto, Kohei Murata, Kazuki Takagi, Hitoshi Matsuno, Daisuke Miyoshi, Keiko Kawauchi
 Fiber International Summit for Nucleic Acid (FISNA2017)、兵庫、2017 年 7 月 (Poster presentation)
44. A novel mechanism of p53-dependent apoptosis
  - Takahiro Ebata, Itoh Katsuhiko, Yasumasa Mitsui, Wataru Sugimoto, Miho Maeda, Daisuke Okuzaki, Keigo Onodera, Ikuno Uehara, Wataru Nakajima, Nobuyuki Tanaka, Hiroaki Hirata, Keiko Kawauchi
 Fiber International Summit for Nucleic Acid (FISNA2017)、兵庫、2017 年 7 月
45. Effects of ECM stiffness on anticancer drug sensitivity in human breast cancer cells
  - Miho Maeda, Takahiro Ebata, Wataru Sugimoto, Katsuhiko Itoh, Yasumasa Mitsui, Hideaki Fujita, Hiroaki Hirata, Keiko Kawauchi
 Fiber International Summit for Nucleic Acid (FISNA2017)、兵庫、2017 年 7 月
46. The molecular mechanism of oncogene Ras-induced invasion in p53 deficient cells
  - Katsuhiko Itoh, Wataru Sugimoto, Toshiya Kotari, Alvin Kunyao Guo, Takahiro Ebata, Hiroaki Hirata, Keiko Kawauchi
 Fiber International Summit for Nucleic Acid (FISNA2017)、兵庫、2017 年 7 月
47. 脱ワトソン・クリックの核酸化学 (33): mRNA の形成する四重らせん構造を標的とした亜鉛フタロシアニンによる光切断
  - 村田 耕平, 杉本 渉, 高木 一樹, 杉本 直己, 川内 敬子, 三好 大輔
 日本化学会第 97 回春季年会、神奈川、2017 年 3 月
48. アニオン性亜鉛フタロシアニンを用いた RNA 四重らせん構造標的型光増感剤の開発
  - 村田 耕平, 杉本 渉, 川内 敬子, 三好 大輔
 ナノメディシンセミナー2017、兵庫、2017 年 2 月

49. RNA 四重鎖構造を標的とする低分子化合物の抗がん作用
  - 杉本 渉、村田 耕平、松野 仁志、安井 貴俊、三好 大輔、川内 敬子
  - 第 39 回 分子生物学会年会、兵庫、2016 年 11 月（ポスター発表）
50. 亜鉛フタロシアニンによるがん関連 mRNA の光切断
  - 村田 耕平、杉本 渉、高木 一樹、松野 仁志、杉本 直己、川内 敬子、三好 大輔
  - 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川、2016 年 9 月
51. 核酸の四重鎖構造を標的としたがん光線力学的治療法の開発
  - 杉本 渉、村田 耕平、松野 仁志、安井 貴俊、三好 大輔、川内 敬子
  - 第 7 回 生命機能研究会、京都、2016 年 8 月（ポスター発表）
52. Targeting mRNA G-quadruplex with the metal phthalocyaninederivative for treatment of cancer
  - Wataru Sugimoto, Kohei Murata, Hitoshi Matsuno, Daisuke Miyoshi, Keiko Kawauchi
  - FISNA2016、兵庫、2016 年 7 月（Poster presentation）
53. mRNA が形成する四重らせん構造を狙った分子標的型光線力学療法
  - 村田 耕平、松野 仁志、杉本 渉、川内 敬子、杉本 直己、三好 大輔
  - 日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、京都、2016 年 6 月
54. 核酸の四重鎖構造形成による遺伝子発現調節
  - 杉本 渉、江畑 貴弘、三好 大輔、川内 敬子
  - 『幹細胞・癌・エピゲノム』に関する合同リトリート、滋賀、2016 年 3 月（ポスター発表）
55. 非標準構造を有する核酸を用いた光線力学的治療法の開発
  - 杉本 渉
  - ナノメディシンセミナー2017、兵庫、2016 年 2 月（口頭発表）

## その他

1. 2015 年 7 月 甲南 90 周年記念荣誉特待生 平生拾芳奨励金
2. 2017 年 6 月～ 甲南大学フロンティアサイエンス研究科岡田奨学金特待生（2019 年 3 月まで）
3. 2018 年 12 月 KONAN Research Summit KRS Poster Award 受賞
4. 2019 年 4 月～ 日本学術振興会 特別研究員【DC1】（2022 年 3 月まで）
5. 2019 年 4 月～ 特別研究員奨励費（2022 年 3 月まで）
6. 2019 年 5 月 日本学生支援機構 特に優れた業績による大学院第一種奨学金免除認定【全額免除】
7. 2019 年 7 月 甲南大学フロンティアサイエンス研究科教育振興募金特待生
8. 2019 年 9 月 ナノバイオ交流会 優秀講演賞受賞
9. 2019 年 12 月 甲南リサーチフェスタ 2019 ビッグデータ賞受賞
10. 2020 年 7 月 甲南大学フロンティアサイエンス研究科教育振興募金特待生
11. 2021 年 7 月 甲南大学フロンティアサイエンス研究科教育振興募金特待生