甲南学園平生太郎基金

科学研究報告書

研 究 課 題　　核酸の構造及び安定性の制御に基づく
新規の脳疾患抑制法の開発

研究代表者　　杉本　直己（先端生命工学研究所・所長・教授）
共同研究者　　遠藤　玉樹（先端生命工学研究所・准教授）
高橋　俊太郎（先端生命工学研究所・准教授）
建石　寿枝（先端生命工学研究所・准教授）

研 究 期 間　　2020 年度（５ヶ年計画の２年目）

助　成　額　　2020 年度　　15,000 千円

１．2020 年度研究の概要

現在、脳疾患により世界で毎年８百万人が死亡しているとされている。この数は、人口増加と長寿命化により益々増えると予想され、解決すべき国際的課題として認識されている。難治性を示す脳疾患に対する有効な治療法の開発は喫緊の課題であるものの、脳という複雑な組織に由来する疾患であるがゆえに、基礎的な疾患発症機構の解明も進んでいないのが現状である。本研究では、脳疾患（特に神経変性疾患と脳腫瘍）の発症機構の解明及びその制御法の開発を目指し、脳疾患発症に関与する「遺伝要因」と「環境要因」を結びつける、「環境要因」に依存した核酸の構造多型（Structured Nucleic Acid Polymorphisms depending on Surrounding: SNAPS, スナップス）という核酸の機能に関する新概念を提唱し、SNAPS を制御する新手法を開発する。そのために、①核酸の非二重らせん構造のトポロジーと安定性を詳細に解析し、疾患の発症に関わる生体反応との相関を解析し、脳疾患の発症に至る分子機構を**「知る」**研究、②特定の疾患発症に関わる核酸構造を制御する人工分子（SNAPS Targeting Artificial Material: STAr Material、スターマテリアル）を**「創る」**研究、③STAr Material を用いて SNAPS の核酸機能を制御し、疾患の発症を抑制する新たな技術（SNAPS Control）を確立し（**「制す」**）、SNAPS Control を臨床応用へ展開する研究を、5 カ年の計画で段階的に展開する。2020 年度は研究計画の２年目に当たり、細胞内環境下における核酸構造の変化を解析し、脳疾患（特に神経変性疾患）の発症機構を「知る」研究に焦点を当てて、研究を遂行した。さらに得られた成果を基に、特定の疾患発症に関わる核酸構造を制御する人工分子を「創る」研究及び「制す」研究にも着手した。

以下に研究結果の概要を記す。

１）悪性腫瘍や神経変性疾患の細胞内環境下における核酸構造の安定性に関する知見が得られた。具体的には、カリウムイオン濃度が変化すると考えられる悪性腫瘍の細胞内での、三重らせん構造安定性に関する知見（***Molecules***, **25**, 387 (2020)）や、脳疾患細胞内の分子環境におけるグアニン四重らせん構造の安定性に関する知見（***Biochemistry***, **59**, 2640 (2020)）を得ることができた。また、実際の神経変性疾患細胞内で産生される RNA が分子環境に応じてゲル化する過程を調べた結果、RNA 構造安定性を制御することで、神経変性疾患の原因となる細胞毒性を制御できる可能性を示した（***Biochemistry,*** **59**, 1972 (2020)）。

２）核酸の二重らせん構造に関するパラメータを拡充することができた。例えば

DNA 二重らせん、RNA/DNA 二重らせん（ハイブリット）構造の安定性を予測するためのより正確なエネルギーパラメータの開発に成功した（***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 117, 14194 (2020)、***Nucleic Acids Res.***, 48, 12042 (2020))。

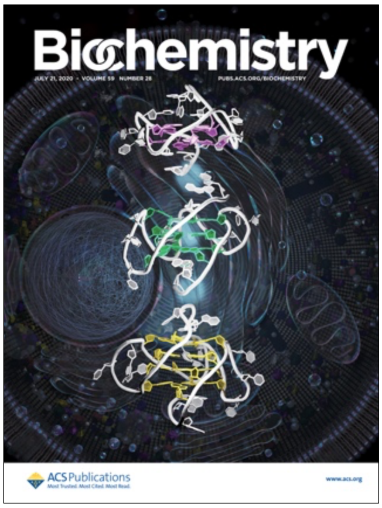
３）STAr Material を「創る」研究に関しての成果も得られつつある。例えば、グアニン四重らせん構造にテトラエチレングリコール（TEG）およびピレンを導入した修飾核酸を設計・構築した。この修飾核酸はグアニン四重らせん構造を大きく安定化するため、グアニン四重らせん構造をもつ標的遺伝子に対して遺伝子発現を制御する STAr Material として有用である（***Molecules***, **25**, 705, (2020)、***Nucleic Acids Res.,*** **48**, 3975-3986 (2020))。また分子クラウディング環境下における RNA 複製反応機構に関する知見も得ることができた（***RSC Adv.***, **10**, 33052 (2020))。

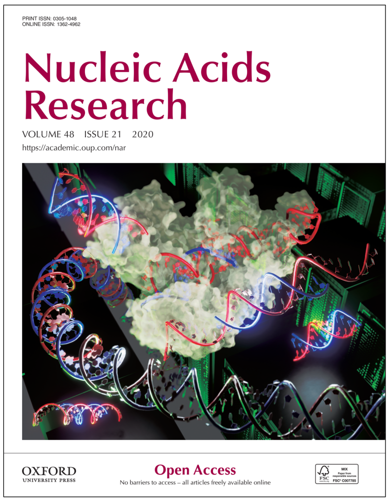
４）さらに、SNAPS Control で疾患発症を「制す」研究に関しても、当初の研究計画に先駆けて成果を得ることが出来た。特定の化合物による刺激で SNAPS に関与する RNA 構造を制御するための手法を開発した。その結果、*S*-アデノシルメチオニン（SAM）に応答した機能変動を示す RNA 配列を簡便に獲得することができた（***Anal. Chem.***, **92**, 7955-7963 (2020))。

このように、「知る」研究による成果が着実に得られており、この成果を元に「創る」研究、さらには「制す」研究にも着手し、成果が得られつつある。

2020 年度の研究成果は学術論文（計 15 報、うち総説 4 報）及び学会発表（計 17 件）として公開することができた。特に 5 件の論文及び総説については国際学術誌の表紙を飾った（下資料）。次年度は、「知る」研究による脳疾患発症に至る分子機構解明をさらに進め、特定の疾患発症に関わる核酸構造を制御する人工分子、STAr Material を「創る」研究を進めていく。またこれらの成果をもとに、「制す」研究を展開していく予定である。

本研究は、本甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金によって遂行されたことを記して、ここに感謝の意を表します。





2020 年度の多くの研究成果が国際学術誌の表紙に取り上げられました。2 年目をむかえた本助成金による研究事業は、学術的に非常に高く評価されています。

２．研究の目的

難治性である脳疾患の罹患率は近年、急激に増加しており、脳疾患に対する有効な治療法の開発は喫緊の課題である。しかしながら、脳疾患に関わるいくつかの遺伝子が同定されてはいるものの、脳疾患は非常に複雑であるため、疾患の「遺伝要因」のみでは疾患発症機構を予測することができず、基礎的な疾患発症機構さえも解明されていない。本研究では、細胞内の化学的環境変化に応じて核酸の構造が変化することに注目し、『「環境要因」に依存した核酸の構造多型（Structured Nucleic Acid Polymorphisms depending on Surroundings: SNAPS, スナップス）が、遺伝子発現の制御や細胞毒性を示すタンパク質凝集体の形成を誘起し、脳疾患の発症に関与している』という新しい機構を提唱・実証する（図１）。

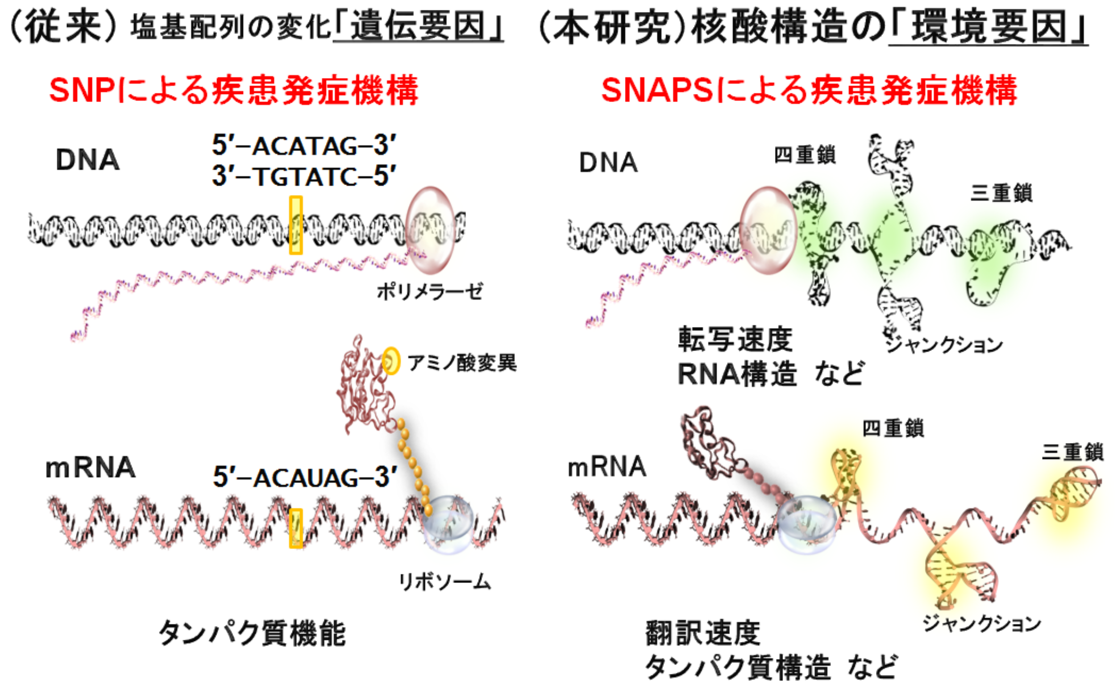


図１　脳疾患発症機構における「遺伝要因」と「環境要因」

そのために、分子環境に応答する核酸の非二重らせん構造のトポロジーと熱安定性を詳細に解析し、疾患の発症段階に特徴的な異常な生体反応との関連を評価することで、脳疾患の発症に至る分子機構を解明する。また、特定の構造を形成した核酸分子を標的とし、その構造のトポロジー（幾何学的描像）や熱安定性を制御し得る人工分子（SNAPS Targeting Artificial Material: STAr Material, スターマテリアル）を創製する。さらに、創製する STAr Material を用いて SNAPS としての核

酸機能を制御し、疾患の発症を抑制する新たな技術（SNAPS control）を確立する。そのために本研究では、以下に示す内容で SNAPS の実証と STAr Material の創製及び SNAPS control の確立を目指す（図２）。

１）　SNAPS から疾患発症機構を「知る」

脳疾患の発症に関与するとされる「遺伝要因」（遺伝子の変異や特定配列の繰り返し数の変化など）を有する DNA や RNA が、細胞内の環境に応答してどのような構造多型を示すのかを定量的に解析する。脳組織内で変動する「環境要因」となる配列が形成する非二重らせん構造のトポロジーと熱安定性、およびタンパク質との相互作用などをエネルギーパラメータとして得る。また、特定の非二重らせん構造の形成により複製・転写・翻訳などの遺伝子の発現過程が変動し、細胞機能（神経細胞の細胞死誘導やがん細胞の悪性化など）の変化が誘導されることを示す。

２）　SNAPS を調節し得る STAr Material を「創る」

非二重らせん構造の SNAPS としての応答を考慮し、疾患発症に関与する特定の非二重らせん構造の形成を抑制する人工分子を創る。①疾患発症に関わるトポロジー以外の非二重らせん構造を安定化させる。②非二重らせん構造周辺の「環境要因」を局所的に変化させる。③非二重らせん構造に優先的に結合して他の疾患関連分子との相互作用を抑制する。といった特性を有する人工分子を、上記の「１」で得られる知見を基に合理的に設計・構築する。創製した分子の機能は「１」で構築する脳組織の「環境要因」を考慮した実験系を用いて細胞外で定量的に解析する。

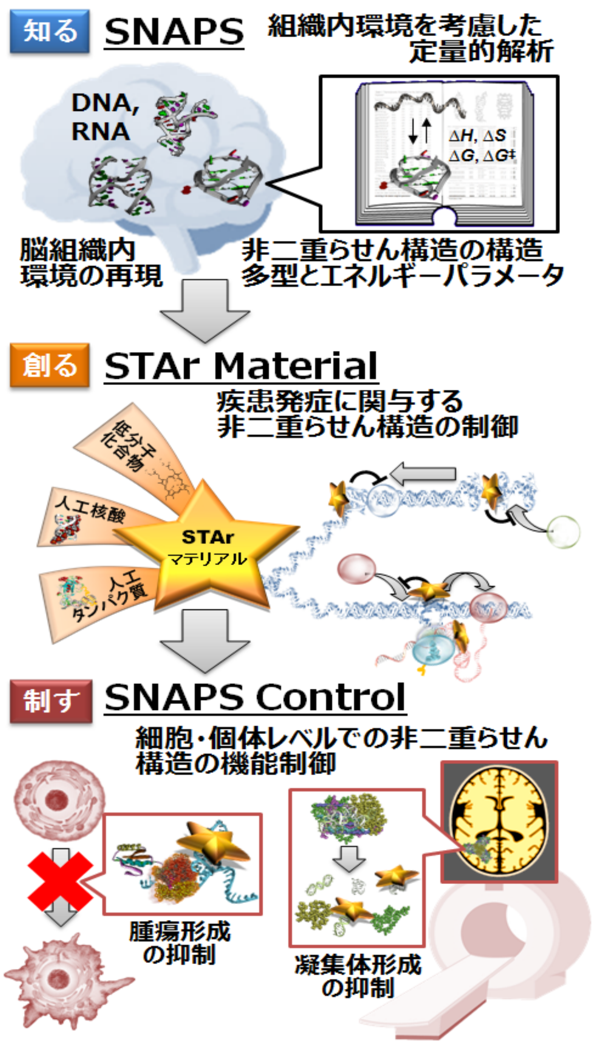


図２　研究計画

３）　SNAPS Control で疾患発症を「制す」

疾患細胞に対して合成した STAr Material を適用し、疾患発症の引き金となる生

体反応（複製反応の抑制や細胞質内封入体の形成など）を制御できることを示す。「１」「２」の知見を基にして、細胞周期や代謝状態に応じた核酸の SNAPS としての機能を任意に調整できる人工分子（拡張型 STAr Material）を新たに合成し、その機能をマウスなどの疾患モデル動物を用いて評価する。これらの実験において良好な結果が得られた分子を臨床分野に適用し、人工分子で非二重らせん構造を制御し、疾患発症を抑制する新たな技術（SNAPS Control）を確立する。

以上、５カ年の研究期間において、段階的に研究展開することで、セントラルドグマや細胞毒と関連する核酸構造体を可逆的かつ短期的に調節するという核酸構造の新たな機能（SNAPS）の存在を明らかにすると共に、その化学的な制御（SNAPS Control）を実行し、臨床応用を目指す。

３．研究の成果

本研究では、脳疾患の発症機構の解明およびその制御法の開発を目指し、脳疾患発症に関与する「遺伝要因」と「環境要因」を結びつける SNAPS という核酸の機能に関する新概念を提唱する。さらに、SNAPS を制御する新手法を開発することを目的としている。

計画２年目に当たる 2020 年度は、「環境要因」に依存したエネルギーパラメータ、および細胞機能の応答を相関させ、脳疾患等の発症に関わる非二重らせん構造のトポロジーとその熱安定性のデータベース化を目指して研究を推進した。基礎となる①SNAPS から疾患発症機構を「知る」研究を中心に、②SNAPS を調節し得る STAr Material を「創る」研究も推進した。また、③SNAPS Control で疾患発症を「制す」研究にも着手しており、その成果も得られつつある。以下に 2020 年度に得られた研究成果の概要を記す。

悪性腫瘍の細胞内では、イオンチャネルの過剰な発現により、正常細胞の細胞内と比較して、イオン環境が異なることが示唆されている。ポリアニオンである核酸はカチオン濃度によりその構造安定性が大きく変化する。本研究では、細胞内の分子クラウディング環境下においてがん遺伝子のプロモータ部位に形成される三重らせん構造に及ぼすイオン濃度の効果を解析した。その結果、生化学実験で用いられる標準水溶液中（100 mM KCl を含む希薄な水溶液）では、三重らせん構造はカリウムイオン濃度の低下によって顕著に不安定化した。一方で、分子クラウディング

環境下では、カリウムイオン濃度が低下しても三重らせん構造はほとんど不安定化しなかった。すなわち、三重らせん構造は悪性の腫瘍細胞内でも安定に形成されていることが示唆された（***Molecules*, 25,** 387 (2020)、Feature Paper に選定）。

さらに、神経変性疾患や悪性腫瘍に関わる遺伝子から転写される RNA およびこれらの遺伝子の発現を制御するノンコーディング RNA はグアニン四重らせん構造を形成することがある。これらの RNA グアニン四重らせん構造は疾患に関わる遺伝子の発現に関与していると考えられるが、細胞内でどのような塩基配列をもつ RNA グアニン四重らせん構造が安定に形成されるか、詳細な機構は明らかではなかった。本研究では、グアニン塩基が２、３または４個連続した配列をもつグアニン四重らせん構造の安定性を分子クラウディング環境下で解析した。その結果、グアニン塩基が３または４個連続した配列からなる四重らせん構造は、クラウディング分子の濃度の増大に伴って安定化した。一方で、グアニン塩基が２個連続した配列をもつ四重らせん構造は、クラウディング分子の濃度を増加させても安定化しなかった。脳疾患細胞内では脳疾患特有のタンパク質の発現により、疾患の進行に伴って細胞内の分子クラウディング状態は変化すると考えられる。本研究で明らかになった脳疾患細胞内の分子環境における塩基配列特異的な安定性制御機構は、脳疾患に関わるグアニン四重らせん構造を標的とするための重要な知見である（***Biochemistry*, 59**, 2640 (2020)、Supplemental Cover に選定）。

実際の神経変性疾患細胞内で産生される RNA（例えば *C9orf72* 遺伝子から転写される GGGGCC の繰り返し配列を有するリピート RNA など）の構造形成に及ぼす分子環境の効果についても解析を進めた。これらのリピート RNA は、RNA 単独またはペプチドと共に集積し、神経変性疾患を引き起こす細胞毒の原因となる。まず、リピート RNA の構造に依存した RNA 集積機構を解析した。その結果、リピート RNA はヘアピンまたはグアニン四重らせん構造を形成することがわかった。さらにリピート RNA が四重らせん構造を形成すると RNA の集積が加速されることが示された。さらにこの RNA の集積はクラウディング分子の添加によって加速された。物理化学的解析の結果、このような RNA 集積の促進には、静電的相互作用による RNA の四重らせん構造の安定化が重要であることが見出された（***Biochemistry*, 59**, 1972 (2020)、**Front Cover に選定**）。**この結果は、RNA の構造安定性を制御することで、神経変性疾患の原因となる細胞毒性を制御できる可能性があるとして注目を集め、米国化学会学術誌「Biochemistry」の 2020 年 6 月号（6 月 2 日号、9 日号、16 日号、23 日号、30 日号）の表紙に選定され、研究成果**

が取り上げられた。

さらに 2020 年度は「知る」研究の一環として、核酸の二重らせん構造に関するパラメータの拡充を進めた。2019 年度の本研究課題において、細胞内の分子環境下における核酸構造に関わる一定の知見を収集できた。そこで 2020 年度は、これらの研究成果を基に、核酸の標準構造である二重らせん構造（DNA 二重らせん、RNA/DNA 二重らせん（ハイブリッド）構造）の構造を予測するためのより正確なエネルギーパラメータの開発を行った。まず、細胞内を模倣した分子クラウディング環境下において、DNA 二重らせん構造形成に伴う熱力学的諸量を算出し、これらの値を基に DNA 二重らせん構造の安定性予測パラメータを構築した。構築したパラメータを用いて細胞核内の核小体での DNA 二重らせんの形成しやすさを算出したところ、既存の手法より約 1 万倍の正確さで DNA 二重らせん構造の安定性を予測することに成功した。ここで開発したエネルギーパラメータを利用することで、設計した核酸分子による二重らせん構造の認識精度を飛躍的に高めることができる。例えば、脳梗塞など重篤な脳疾患との関連する新型コロナウイルス等のウイルス検査で活用されている PCR 反応において、標的遺伝子を正確に検出するためには、DNA 二重らせんの形成を予測することが重要である。しかし、検体に含まれる生体由来の不純物の影響で反応過程における二重らせん DNA の形成が不正確だったり、あるいは不十分だったりすることがあり、このことにより偽陽性や偽陰性と呼ばれる誤った検査結果が生じることが問題となっている。このような問題に対して、**本手法を用いることで DNA の二重らせん構造の安定性を厳密に予測できるため、PCR の精度が向上し、より正確なウイルス検査が可能になると期待できる（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 117, 14194 (2020)）。**

また、RNA/DNA ハイブリッド（RNA と DNA から成る二重らせん構造）の安定性は、核酸医薬として注目されているアンチセンスオリゴヌクレオチドや、2020 年のノーベル化学賞として選定されたゲノム編集技術で注目されている、CRISPR-Cas9 の効率を決める重要な指標となる。そのため、RNA/DNA ハイブリッドの安定性を予測することは非常に重要である。本研究では、RNA/DNA ハイブリッドの安定性に及ぼす分子環境の効果についても解析し、RNA/DNA ハイブリッドの構造予測パラメータを開発した。開発したパラメータを用いて、CRISPR/Cas9 の標的遺伝子との RNA/DNA ハイブリッドの安定性を解析したところ、ゲノム編集で最大の効率を発揮する標的遺伝子の配列を、RNA/DNA ハイブリッドの安定性から予測できることが示された。つまり、**本研究で新たに算出したパラメータを用いて、ゲノム**

編集に用いる目的遺伝子の領域を適切に選択することで、誤ったゲノム編集が行われる確率を激減させることができ、ゲノム編集技術の安全性の向上が期待される（*Nucleic Acids Res.*, 48, 12042 (2020)、Front Cover に選定）。

SNAPS から疾患発症機構を「知る」研究が順調に進展したため、SNAPS を調節し得る STAr Material を「創る」研究を積極的に展開した。

非天然核酸は、核酸の構造安定性を制御し、また遺伝子情報を拡張するために有用である。本研究では、遺伝子発現に関わる生体反応の制御効率が高いグアニン四重らせん構造にテトラエチレングリコール（TEG）およびピレンを導入した修飾核酸を構築した。その結果、これらの修飾核酸はグアニン四重らせん構造を大きく安定化し、TEG とグアニンカルテットは CH-π 相互作用で、ピレンとグアニンカルテットは π-π 相互作用で構造を安定化することが示された（***Molecules***, **25**, 705, (2020)、***Nucleic Acids Res.,*** **48**, 3975 (2020)）。これらの知見から、開発された修飾核酸は標的遺伝子の発現を制御する STAr Material として有用であることが示された。

DNA の複製中、基質ヌクレオチドの取り込みは、鋳型鎖塩基との最適な塩基対形成をするように厳密に制御される必要がある。塩基対相互作用は、塩基対間の水素結合と隣接した塩基同士のスタッキングである。これらの相互作用は、化学環境によって影響を受ける可能性がある。これまで、非天然核酸の開発において、塩基と糖部分の化学構造の最適化は進んできているが、非天然核酸の塩基対形成に対する化学的環境の影響はあまり理解されていない。そこで本研究では、非天然の核酸塩基と糖骨格を含むさまざまなテンプレートを用いた DNA 複製反応に対して、細胞内環境を模した分子クラウディング環境下がどのように影響するかを検討した。その結果、DNA の重合時の一時的な塩基対形成が、溶液の分子クラウディング環境によって影響を受けることが示された（***Molecules***, **25**, E4120 (2020)）さらに、分子クラウディング条件下での RNA 複製反応を測定した結果、分子クラウディングは、ワトソン-クリックの塩基対形成規則に関係なく、RNA 合成酵素（T7 RNA ポリメラーゼ）による rATP および rGTP によるプライマー伸長を優先的に促進した。本研究成果は、分子クラウディングが生命進化や、RNA ウイルスのゲノム変異を促進する可能性があることを示唆している（*RSC Adv.*, 10, 33052 (2020)、HOT article に選出）。例えば、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を含む RNA ウイルスのポリメラーゼは頻繁に重合ミスを生じることでウイルスゲノムに突然変異を引き起こす。それ故、本研究成果は、ウイルスの変異を制御する STAr Material の設計に

活用できる可能性がある。今後は、新型コロナウイルスの複製にも関わる核酸構造の解析を行い、ウイルス複製に重要な、RNA 依存型 RNA 合成酵素による複製機構の詳細な解析を進めていく予定である。

2020 年度は、上述の研究成果を含む最新の研究成果を中心に、非二重らせん構造による遺伝子発現機構を総説としてまとめ、英国王立化学会の Chemical Society Reviews 誌（***Chem. Soc. Rev.***, **49**, 8439 (2020)）や米国化学会の Accounts of Chemical Research 誌（***Acc. Chem. Res.***, **54**, 2110-2120 (2021)）、英国王立化学会の Chemical Communications 紙の Feature Article として発表した（***Chem. Commun.***, **56**, 2379 (2020)）。

さらに、STAr Material による応用展開となる、SNAPS Control で疾患発症を「制す」研究にも着手した。2020 年度は、特定の化合物による刺激で SNAPS に関与する RNA の構造を制御するための指針を得ることを試みた。本研究では、細胞内の特定の分子に応答して RNA の構造を変化させ得る RNA の設計、構築指針を得ることを目的に、RNA 配列の最適化技術の構築を行った。そのために、2 つの分子認識 RNA（アプタマー）ユニットがランダムな配列で連結された RNA のライブラリを設計し、その中から、1 つ目のアプタマーユニットが標的とする分子に応じて、RNA の構造変化と 2 つ目のアプタマーユニットの機能変動を誘起する RNA（シグナリングアプタマー）を簡便に獲得する技術の構築を行った。その結果、細胞内で DNA のメチル化反応の基質となる *S*-アデノシルメチオニン（SAM）に応答した機能変動を示す RNA 配列を簡便に獲得することができた（***Anal. Chem.***, **92**, 7955 (2020)）。**本研究成果は、化合物の外部刺激によって SNAPS Control が可能であることを示しており、本技術を用いることで、細胞内の特定分子に応答して疑似 RNA としての機能を発揮する RNA の最適化にも活用できると考えられる。**

以上のように、2020 年度は SNAPS を「知る」研究を中心に進め、「創る」研究や「制す」研究に関しても一定の成果を挙げ、当初の計画通り順調に研究を遂行できた。これらの研究成果は 15 報の論文および総説として公表し、そのうち雑誌の表紙として計 5 件（***Biochemistry,*** **59**, 21, 1972 (2020)、***Biochemistry***, **59**, 28, 2640 (2020)、***Nucleic Acids Res.***, **48**, 21, 12042 (2020)、***Chem. Soc. Rev.***, **49**, 8439 (2020)、***Acc. Chem. Res.***, **54**, 2110 (2021)）が採択されるなど、いずれの研究成果も学術的に高く評価されている。2019 年度に引き続き 2020 年度の研究においても、脳疾患に関わる非二重らせん構造に及ぼす環境効果や、非二重らせん構造によって変動する生体反応に関する知見を収集することができた。

いずれの研究成果も学術的に高く評価されており、2020 年度の１年間で、Nucleic Acids Research 誌、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 誌など海外の一流学術誌をはじめ、学術論文・著書・総説など 15 報（うち雑誌の表紙 5 件）、学会発表 17 件として研究成果を公表した。代表的な研究成果は次ページから報告する。本研究に関する 2020 年度における成果は、「６．研究成果の公表」にまとめている。以下では、代表的な研究成果についてその詳細を報告する。

１）SNAPS から疾患発症機構を「知る」研究に関する成果

SNAPS という核酸機能が脳疾患発症を引き起こす機構の解明を目指し、核酸二重らせん構造や非二重らせん構造に及ぼす環境要因に関する基礎データの収集を行った。具体的な成果を以下に記す。

(1) Y. Teng, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, and N. Sugimoto
Effect of Potassium Concentration on Triplex Stability under Molecular Crowding Conditions
Molecules, **25**, 387 (2020)

悪性腫瘍の細胞内では、イオンチャネルの過剰な発現により、正常細胞の細胞内と比較して、イオン環境が異なると考えられる。ポリアニオンである核酸はカチオン濃度でその構造安定性が大きく変化する。本研究では、細胞内の分子クラウディング環境下においてがん遺伝子のプロモータ部位に形成される三重らせん構造に及ぼすイオン濃度の効果を解析した。本研究では、さまざまなカリウムイオン（K^+）濃度において異なる C^+*G-C トリプレットを含む（*：Hoogsteen 塩基対; -：Watson-Crick 塩基対）分子内および分子間三重らせん形成配列を設計し、分子クラウディング剤の非存在下および存在下での安定性を測定した。希薄溶液中では、三重らせんの安定性は、K^+の濃度を下げることによって低下した。この減少は、C^+*G-C トリプレットの数が増えるにつれて小さくなった。分子クラウディング環境下では、Watson-Crick 塩基対は不安定化する一方、Hoogsteen 塩基対は安定化した。興味深いことに、K^+濃度が低い場合（≤ 1 M）、K^+濃度の低下による三重らせんの不安定化は、希薄溶液よりも大幅

に小さいことが示された。さらに、C+*G-C 含有量は、分子クラウディング環境下での三重らせんの安定性に大きな影響を与えることが見出された。本研究によって、分子クラウディング環境下での三重らせんの安定性に対する K+濃度の影響に関する定量的な情報が得られた。今後、生体内反応における三重らせんの機能とその制御に関して、更に深く理解されることが期待される。

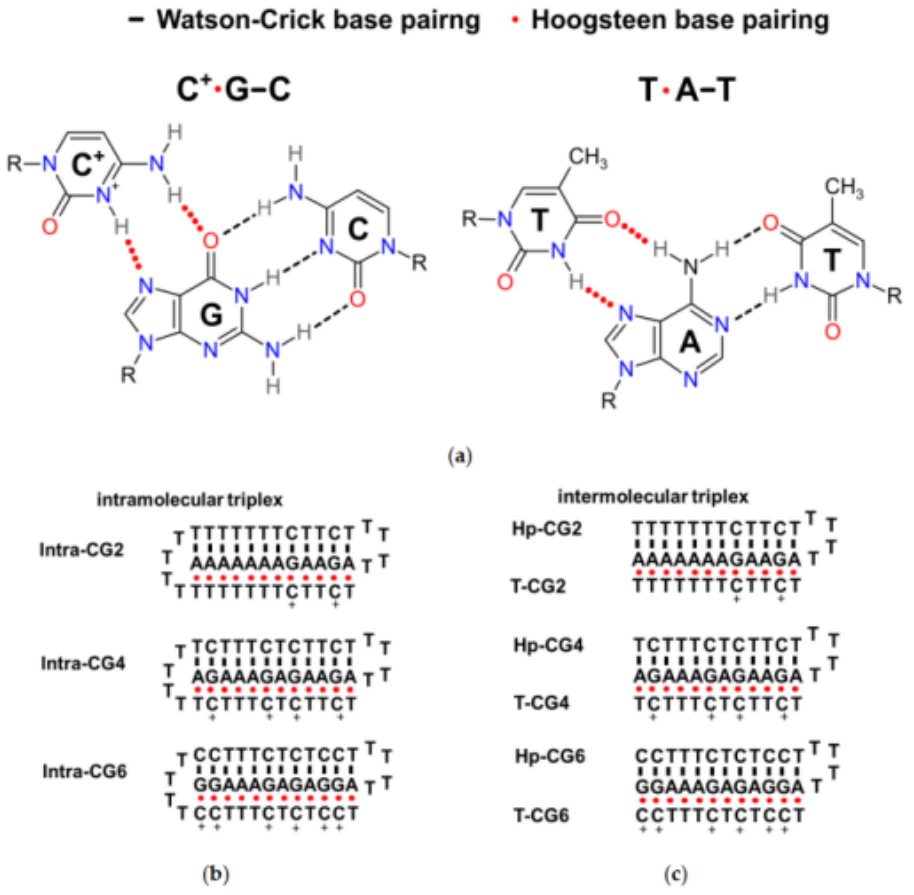


図　(a) 三重らせん構造内のトリプレット構造と (b,c) 三重らせん構造

(2) D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, S. Ghosh, T. Endoh, S. Takahashi, and N. Sugimoto

Improved nearest-neighbor parameters for the stability of RNA/DNA hybrids under a physiological condition

***Nucleic Acids Res.*, 48**,12042-12054 (2020) **（Front Cover に採択）**

核酸はアデニン、チミン（RNA はウラシル）、グアニン、シトシンの四種類の塩基を持つヌクレオチドからなる鎖状高分子で、アデニンとチミン（RNA はウラシ

ル)、グアニンとシトシンがそれぞれ Watson-Crick 型の塩基対を形成し、二重らせん構造を形成する。RNA と DNA から成る二重らせん構造は、RNA/DNA ハイブリッドと呼ばれている。RNA/DNA ハイブリッドの安定性は、核酸医薬として注目されているアンチセンスオリゴヌクレオチドや、2020 年のノーベル化学賞として選定されたゲノム編集技術で注目されている CRISPR-Cas9 の効率を決める重要な指標となるため、標的遺伝子内における RNA/DNA ハイブリッドの安定性の予測する手法が開発されてきた。二重らせん構造の安定性は塩基対の組み合わせとその直近の塩基対の影響によって決まる Nearest-Neighbor モデルが広く受け入れられており、配列情報から安定性を予測することができる。しかしながら、細胞内環境では DNA や RNA の安定性は大きく変化し、これまでの予測法では正確な RNA/DNA ハイブリッド二重らせん構造の安定性を予測することはできなかった。

本研究では、細胞内に近い溶液環境で、RNA/DNA ハイブリッドの安定性を予測する Nearest-Neighbor パラメータを新たに開発した。開発したパラメータを用いて、CRISPR-Cas9 の標的遺伝子との RNA/DNA ハイブリッドの安定性を解析したところ、ゲノム編集で最大の効率を発揮する標的遺伝子の配列を、RNA/DNA ハイブリッドの安定性から予測できることが示された。本研究成果は、生体内環境下で RNA/DNA ハイブリッドがどのように生体機能を制御しているのかを知るための基礎的な基盤となる。また、遺伝子発現を制御する核酸医薬の開発においても、非常に有用である。

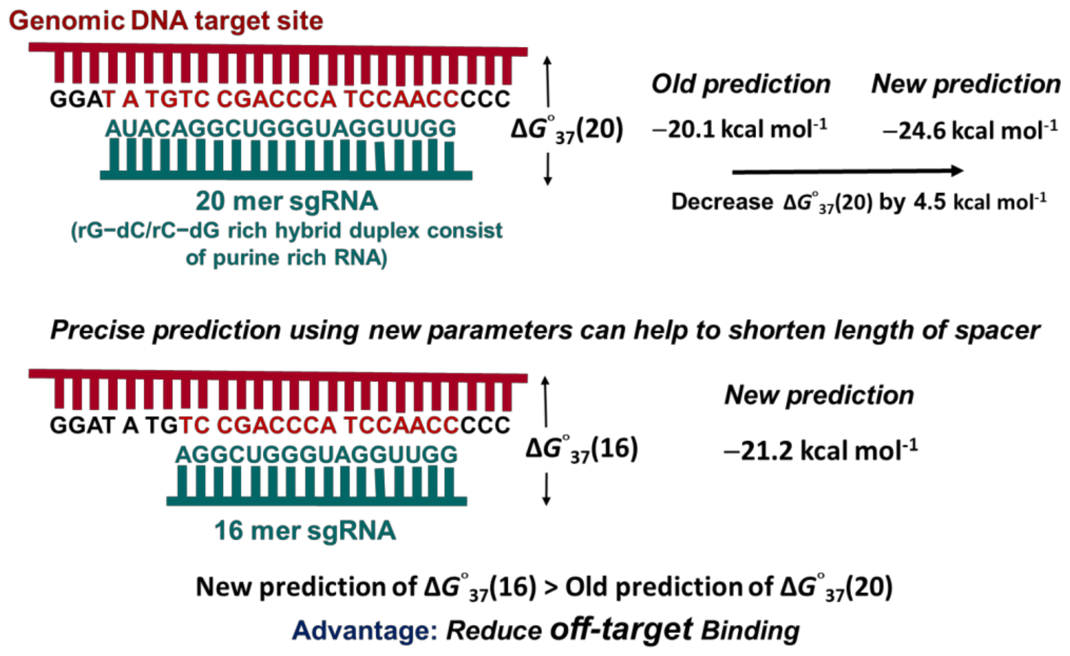


図　CRISPR-Cas9 遺伝子編集技術における RNA/DNA ハイブリッドの安定性予測の優位性を示す模式図

(3) S. Matsumoto, H. Takeishi-Karimata, S. Takahashi, T. Ohyama, and N. Sugimoto
Effect of molecular crowing on the stability of RNA G-quadruplexes with various numbers of quartets and lengths of loops
Biochemistry, **59**, 2640-2649 (2020) **（Supplemental Cover に採択）**

RNA グアニン四重らせん構造は、mRNA やノンコーディング RNA などトランスクリプトーム全体にわたって存在し、細胞内機能に重要な役割を果たしている。安定な RNA グアニン四重らせん構造は mRNA の翻訳や免疫に関わる細胞群の抗原提示などの機能の度合いを調節している。様々な生体分子で混雑した細胞環境においてグアニン四重らせん構造が制御する機能を理解し、制御するためには、分子クラウディング環境下でのグアニン四重らせん構造の安定性を調べることが重要である。本研究では、グアニンカルテットの数やループの長さが異なる RNA グアニン四重らせん構造の熱力学的安定性を系統的に調べた。

RNA グアニン四重らせん構造の安定化に及ぼす分子クラウディングの影響を系統的かつ定量的に解明するために、グアニンカルテットとループの数が異なる RNA 配列を設計した（図）。0-40 wt% PEG 200（平均分子量 200 のポリエチレングリコール）を用いて、希薄溶液条件下および分子クラウディング条件下での熱安定性を調べた。その結果、PEG 200 非存在下での熱安定性と比べて、二枚のグアニンカルテットを有する RNA では 40 wt %の PEG 200 によりその安定性はほとんど変化しなかったのに対し、三、四枚では安定化した（図）。一方、ループ長の異なるグアニン四重らせん構造の熱安定性は PEG 200 の影響を受けなかった。

さらに、得られた RNA グアニン四重らせん構造の分子クラウディング環境下での熱的安定性を基に、RNA グアニン四重らせん形成配列探索のための適切なモチーフを提唱した。新しいモチーフを用いたインフォマティクス解析により、ヒトノンコーディング RNA におけるグアニン四重らせん形成配列の分布は、グアニンカルテットの枚数に応じて異なることが明らかになった。これらの結果は、細胞内の様々な分子クラウディング環境における RNA グアニン四重らせん構造の応答はグアニンカルテットの枚数によって異なることを示しており、同じグアニン四重らせん構造でもグアニンカルテットの枚数によりその役割が異なることが示唆された。この

成果は SNAPS による細胞内の遺伝子発現制御機構を研究する際の重要な知見となる。

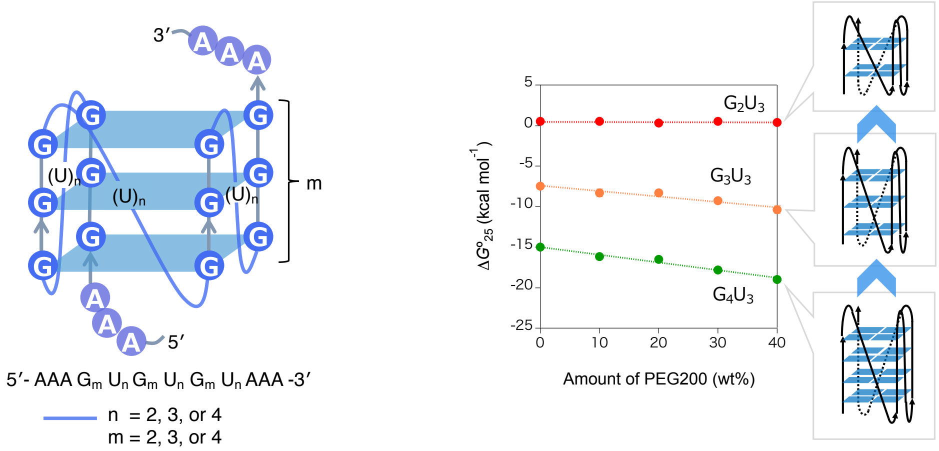


図 本研究で用いた RNA グアニン四重らせん構造の模式図（左）と 0-40 wt% PEG200 存在下における RNA グアニン四重らせんの熱的安定性（$\Delta G°_{25}$）（右）

(4) Y. Teng, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto

RNA G-quadruplexes facilitate RNA accumulation in G-rich repeat expansions

Biochemistry, **59**, 1972–1980 (2020) **（Front Cover に採択）**

筋萎縮性側索硬化症（ALS）やトリプレットリピート病などの神経変性疾患に関与する遺伝子（例えば *C9orf72* 遺伝子）上の繰り返し配列から転写される RNA（(GGGGCC)リピートなど）は、細胞内で集積し、細胞の毒性を示すタンパク質の凝集体と相互作用することが知られている。そのため、細胞内での RNA の集積メカニズムを解明するための研究が世界的に行われている。

核酸の標準的な構造は二重らせん構造である一方、核酸は三重らせん、四重らせん構造のような非二重らせん構造も形成する。本研究では、細胞内を模倣した環境下において、筋萎縮性側索硬化症（ALS）やトリプレットリピート病に関連する遺伝子から産生される RNA の構造を解析した。その結果、RNA が四重らせん構造を形成する環境下では、RNA の集積が促進され、二重らせん（ヘアピン）構造を形成する環境下では、RNA は集積しにくいことが明らかになった。さらに、物理化学的解析の結果、このような RNA 集積の促進には、静電的相互作用による RNA の四重らせん構造の安定化が重要であることを見出した。この結果は、RNA の構造安定性

を制御することで、神経変性疾患の原因となる細胞毒性を制御できる可能性があることを示すものである。

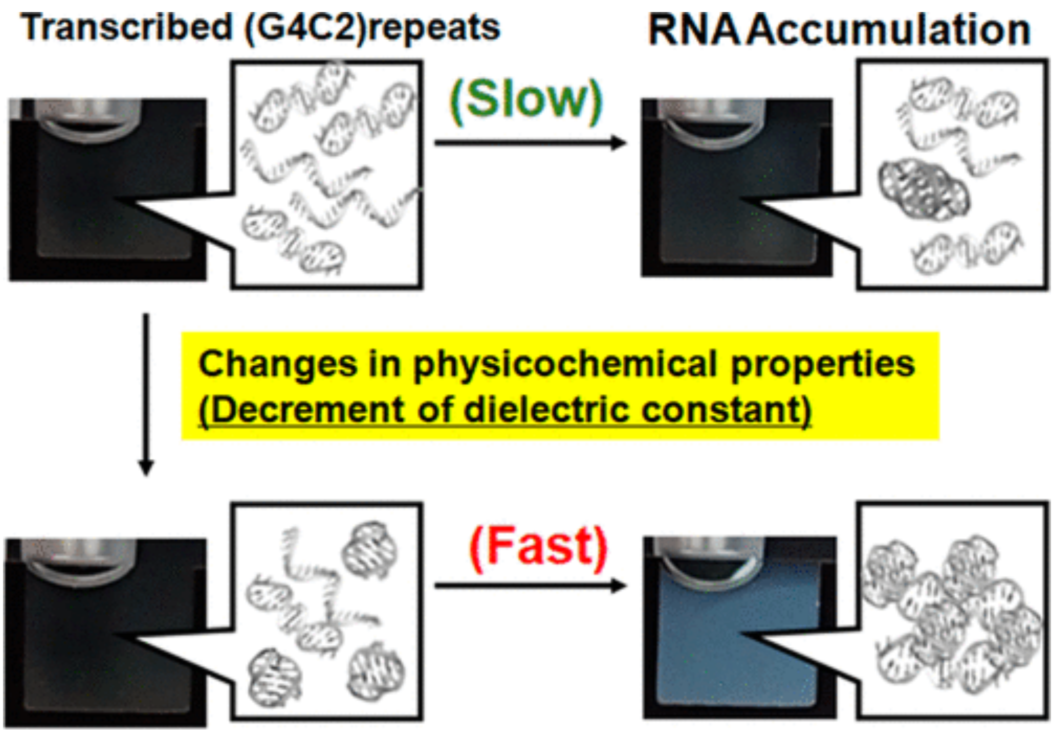


図　細胞内環境の変化に応答して変化する RNA 構造は、その構造によって異なるゲル化能を有する。

(5) S. Ghosh, S. Takahashi, T. Ohyama, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto
Nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability in diverse molecular crowding conditions
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **117**, 14194-14201 (2020)

SNAPS としての核酸機能は細胞内環境に依存した核酸構造の安定性変化に起因すると考えられる。そのような細胞内環境の実際は分子で混雑している（分子クラウディング環境）。核酸の二重らせん構造の熱力学的安定性は、生理食塩水のような希薄溶液環境では予測可能であるが、特定の細胞内条件下で安定性を予測する方法は開発されていなかった。昨年度の研究で、自己相補的な DNA 二重らせんの安定性が、100 mM NaCl 中で平均分子量 200（PEG 200）の 40%ポリエチレングリコールを含む分子クラウディング環境下において、最近接塩基対モデルに基づき決定

されることを示してきた。本研究では、細胞内環境における DNA 二重らせん構造の熱力学を予測するために、分子クラウディング環境下での DNA 二重らせん構造の安定性を配列情報から予測できる最近接塩基対パラメータを決定した。それにより、ヌクレオチドへの優先的な水和が、分子クラウディング環境における最近接塩基対パラメータを決定する重要な要因であることが分かった。決定されたパラメータは、分子クラウディング環境下での DNA 二重らせん構造の熱力学的パラメータ（ΔH°、ΔS°、およびΔG°_{37}）と融解温度（T_m）を高い精度で予測することが示された。さらに、二重らせん構造の安定性と共溶質溶液の水の活量との相関性を明らかにすることで、任意の塩濃度や共溶質濃度における DNA 二重らせん構造の安定性を計算できる予測法へと拡張することができた。本手法は、特定の細胞内の分子クラウディング環境下での SNAPS 現象を解析するための重要な指針を提供する。

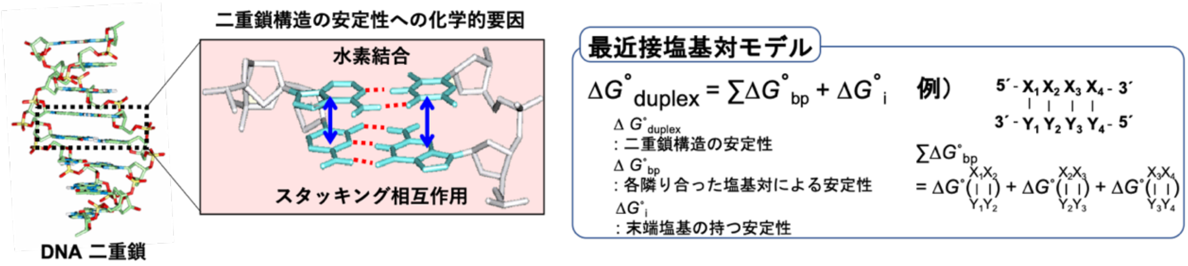


図１　DNA 二重らせん構造の安定性を決定する構造的要因（左）および、その構造安定性の予測法である最近接塩基対モデル（右）

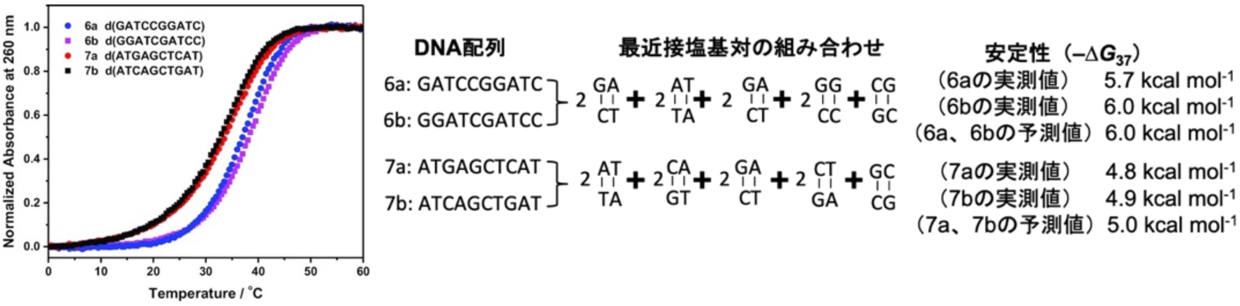


図２　同じ最近接塩基対の組み合わせを持った DNA 配列（6a と 6b、および 7a と 7b）の 40% PEG200 を含む分子クラウディング環境下における紫外吸収-融解曲線（左）および実測値と予測値の比較（右）

(6) M. Kovacic, P. Podbevsek, H. Tateishi-Karimata, S. Takahashi, N. Sugimoto, and J. Plavec

Thrombin Binding aptamer G-quadruplex stabilized by pyrene-modified nucleotides

Nucleic Acids Res., **48**, 3975-3986 (2020)

ヒトゲノムのグアニンに富む領域は、グアニン四重らせん構造を形成する。これらの領域は遺伝子発現を制御する役割を担っており、疾患治療のための有望なターゲットとして認識されている。多環芳香族部分に基づくリガンドは、4つのグアニン塩基の大きな露出表面積と相互作用するサイズの相補性を利用して、グアニン四重らせんを標的とするのに特に適している。多環芳香族官能基の効率的な塩基スタッキングを通じて特定のグアニン四重らせん構造を安定化する方法は、治療戦略の貴重なツールになる可能性がある。本研究では、モデルシステムとして、トロンビン結合アプタマー（TBA）のいくつかの位置に組み込まれたピレン修飾ウリジンヌクレオチドの効果を調べた（図）。その結果、分光学的および生物物理学的方法を使用した特性評価により、ピレン基とグアニン四重らせんコア間の相互作用のモード、およびエンタルピーおよびエントロピーの寄与による（非）安定化に関する重要な知見が得られた。NMRを用いた解析により、TBAなどのグアニンに富んだオリゴヌクレオチドにピレン基を組み込むと、新しい二量体トポロジーの形成など、三次元構造に大きな変化が生じる可能性を示した。また、ピレン基が近くの核酸塩基上にスタックすることで生じる部位特異的な構造変化は、明確なトロンビン結合親和性およびヌクレアーゼ分解に対する耐性の向上につながることが示された。

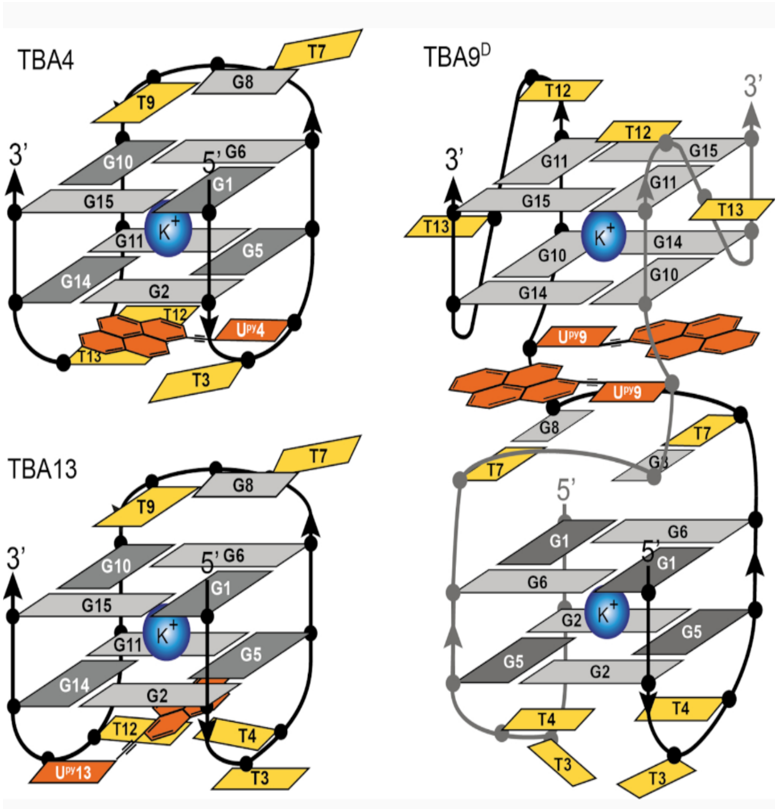


図　本研究で用いたピレン修飾ウリジンヌクレオチドを組み込んだグアニン四重らせん構造

２）　SNAPS を調節し得る STAr Material を「創る」に関する成果

具体的な成果を以下に記す。

(7) S. Takahashi, P. Herdwijn, and N. Sugimoto
Effect of Molecular Crowding on DNA Polymerase Reactions along Unnatural DNA Templates
Molecules, **25**, E4120 (2020)

非天然核酸は、遺伝子情報を拡張するための有望な材料である。DNA の複製中、基質ヌクレオチドの取り込みは、鋳型鎖塩基との最適な塩基対形成をするように厳密に制御される必要がある。塩基対相互作用は、塩基間の水素結合と隣接した塩基同士のスタッキングである。これらの相互作用は、化学環境によって影響を受ける可能性がある。これまで、非天然核酸の開発において、塩基と糖部分の化学構造の最適化は進んできているが、非天然核酸の塩基対形成に対する化学的環境の影響はあまり理解されていない。そこで本研究では、非天然の核酸塩基と糖骨格を含むさ

まざまなテンプレートを用いた DNA 複製反応に対して、細胞内環境を模した分子クラウディング環境がどのように影響するかを検討した。分子クラウディング環境ではない希薄溶液条件下では、クレノウフラグメント（KF）によるピリミジン型デオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）の取り込み効率は高いが、選択性は低い結果であった。一方で、プリン型 dNTP の取り込みはピリミジン型 dNTP と逆に効率が低く、選択性が高い結果となり、dNTP の取り込み効率と選択性に負の相関性が見られた。一方、分子クラウディング環境ではその相関性が弱まり、選択性のみが変化した。これらの結果は、重合時の一時的な塩基対形成が、溶液の分子クラウディング環境によって影響を受けることを示唆するものであり、細胞内環境に応じて遺伝子発現を調節する STAr Material の設計に活用できる。

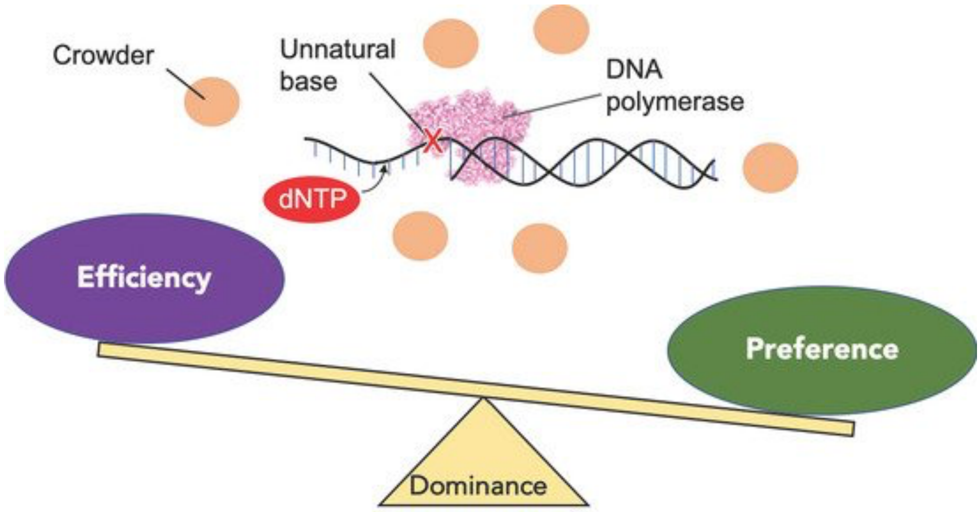


図１　研究の概略。非天然核酸を有する鋳型 DNA に対する DNA ポリメラーゼによる dNTP の取り込みを検討した。その効率と選択性は分子クラウディング環境で変化した。

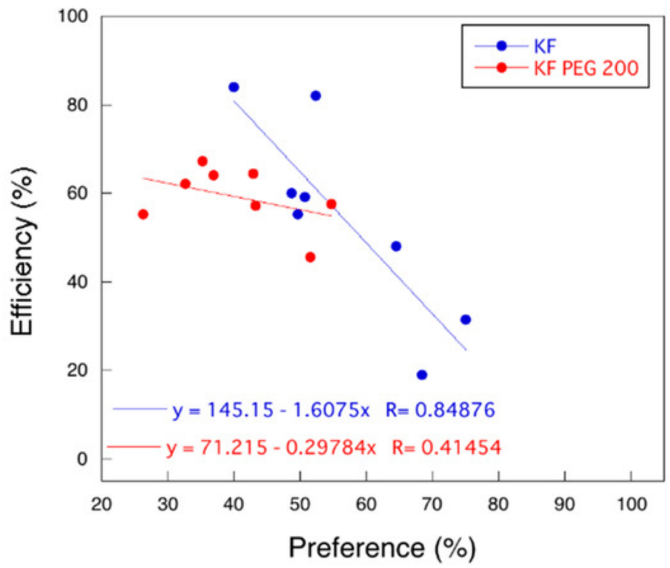


図２　PEG 200 の非存在下（青いプロット）および 20% PEG 200 存在下（赤いプロット）での KF によるプライマー伸長の効率対選択性のプロット

(8) S. Takahashi, H. Okura, P. Chilka, S. Ghosh, and N. Sugimoto
Molecular crowding induces primer extension by RNA polymerase through base stacking beyond Watson–Crick rules
RSC Adv., **10**, 33052-33058 (2020)　**（HOT article に採択）**

核酸の重合は、遺伝情報を次世代に正しくコピーするために不可欠である。その一方で、核酸重合のミスにより遺伝情報の変異が生じることで生命進化につながる遺伝的な多様性を促進する可能性がある。したがって、生命体はポリメラーゼの重合ミスを利用して遺伝子情報の多様化を加速させていた可能性がある。現在においても、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を含む RNA ウイルスのポリメラーゼは頻繁に重合ミスを生じることでウイルスゲノムの突然変異が引き起こされる。本研究では、生命進化初期での反応モデルとして、最も単純なタンパク質構造を有するポリメラーゼの一つである T7 RNA ポリメラーゼを使用して、さまざまな分子クラウディング条件下での RNA 複製反応を測定した。興味深いことに、20 wt%のポリエチレングリコール 2000 を使用した分子クラウディングは、ワトソン-クリックの塩基対形成規則に関係なく、T7RNA ポリメラーゼによる rATP および rGTP によるプライマー伸長を優先的に促進した。これは、分子クラウディング環境下では溶液中の誘電率が低下することにより、プライマーと取り込まれたヌクレオチド間のスタッキング相互作用が強化されたことを示している。これらの発見は、分子クラウディングが生命進化や、RNA ウイルスのゲノム変異を促進する可能性があること

を示唆している。本成果は掲載号の HOT article に選出され、RSC Advance 誌のホームページに掲載された。また、前項の成果と同様に細胞内環境に応じて遺伝子発現を調節する STAr Material の設計に活用できる。

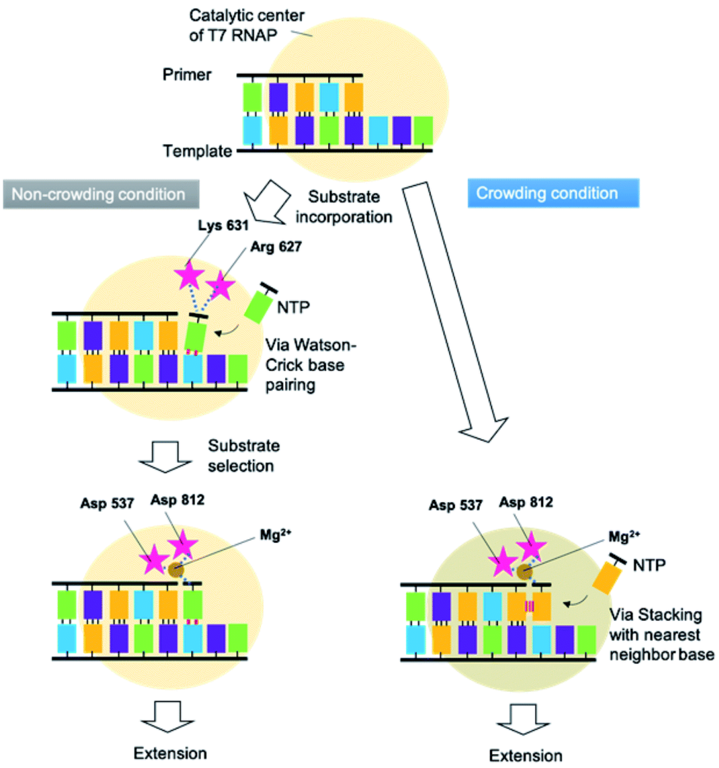


図　本研究で提唱された T7 RNAP によって触媒され、溶液環境によって調節されるプライマー伸長のメカニズム

(9) H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, T. Muraoka, S. Tanaka, K. Kinbara, and N. Sugimoto
New Modified Deoxythymine with Dibranched Tetraethylene Glycol Stabilizes G-Quadruplex Structures
Molecules, **25**, 705, (2020)

安定なグアニン四重らせんの形成は生物学的反応を効率的に阻害する。そのため、グアニン四重らせんを安定化させる方法は、癌治療やその他の生物医学的応用のための有望な治療アプローチである。オリゴおよびポリエチレングリコールは有望な生体適合性化合物であり、我々はこれまで直鎖オリゴエチレングリコールがグアニン四重らせんを安定化できることを示してきた。ここでは、二分岐または三分岐テ

トラエチレングリコール（TEG）を使用した新しい修飾デオキシチミンを開発し、これらの TEG 修飾デオキシチミンをアンチパラレルグアニン四重らせんのループ領域に組み込んだ。修飾されたグアニン四重らせんの安定性を分析したところ、三分岐 TEG は立体障害に伴うエントロピー依存的なグアニン四重らせんの不安定化を示した。興味深いことに、二分岐した TEG 修飾は、エンタルピーの寄与により、グアニン四重らせんの安定性を増加させた。分子動力学計算の結果、二分岐 TEG が水素結合と CH-π 相互作用を介してグアニン四重らせんと相互作用することが示された。さらに、これらの分岐 TEG 修飾デオキシチミンは、DNA オリゴヌクレオチドをヒト血清中のさまざまなヌクレアーゼによる分解から保護した。DNA と分岐 TEG 間のユニークな相互作用を利用することにより、DNA 構造の制御に影響を与える高度な DNA 材料を開発でき、この成果は STAr Material を開発する際に有用である。

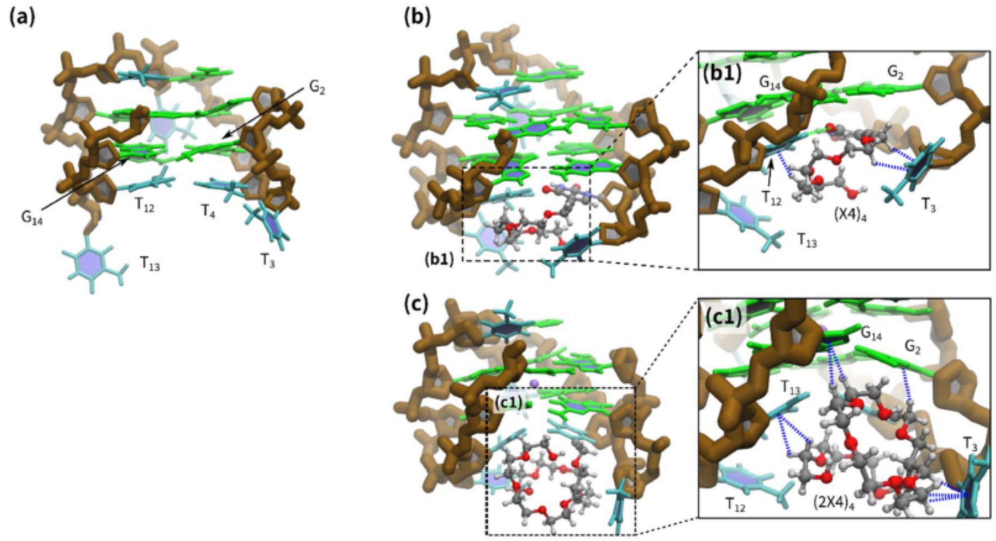


図　天然の(a) グアニン四重らせん構造と(b) TEG 修飾塩基を導入したグアニン四重らせん構造

(10)　S. Lathwal, S. S. Yerneni, S. Boye, U. L. Muza, S. Takahashi, N. Sugimoto, A. Lederer, S. R. Das, P. G. Campbell, and K. Matyjaszewski
Engineering exosome polymer hybrids by atom transfer radical polymerization
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **118**, e2020241118 (2021)

エクソソームは、その生物学的起源と細胞間での貨物輸送能力から、理想的なドラッグデリバリー媒体として注目されている。しかし、体外から導入したエクソソームは体内の循環系から急速に排除されたり、また保存中にエクソソームの凝集や表面タンパク質の脱落が起こったりするなどの理由から、エクソソームの臨床応用は非常に困難である。そこで本研究では、エクソソームベースの治療薬の生体外および生体内での安定性の欠点を解決するべく、ポリマーによる人工エクソソームの構造的レパートリーを拡大するためのプラットフォームを開発した。我々は、コレステロール修飾 DNA をテザーとしてエクソソーム表面に結合させることでエクソソームの迅速かつオンデマンドな機能化を行った。さらに原子移動ラジカル重合（ATRP）技術を組み合わせて、エクソソームポリマーハイブリッド（EPH）を作製した。これらの EPH はエクソソームの物理化学的安定性と薬物動態特性が著しく向上した。本研究では、エクソソームの膜にあらかじめ形成した DNA ブロック共重合体（DNABCP）をテザーリングする方法（「grafting-to」）と、DNA イニシエーターを用いてエクソソームの表面から直接ポリマーをグラフト化する方法（「grafting-from」）のいずれかによる EPH の調製法を検討した。これらの方法では、エクソソーム表面上のポリマーの長さ、組成、および負電荷を正確に制御することができた。その結果、標的デリバリーのターゲットとなる細胞表面タンパク質や他の膜結合性分子へのアクセス性への影響を最小限に抑えることができた。また、ポリマーを機能化しても、ネイティブなエクソソームと薬剤を充填したエクソソームの細胞への取り込みと生物活性が維持されることも示した。作製した EPH は、組織分布のプロファイルを変えることなく、4 倍の血液循環時間を示した。今回の結果は、最新の ATRP 法を用いてエクソソームを精密にナノエンジニアリングすることで、高度な薬物・治療デリバリーシステムを開発できる可能性を示しており、STAr Material を生体内の適切な場所に輸送するための重要な技術となることが期待できる。

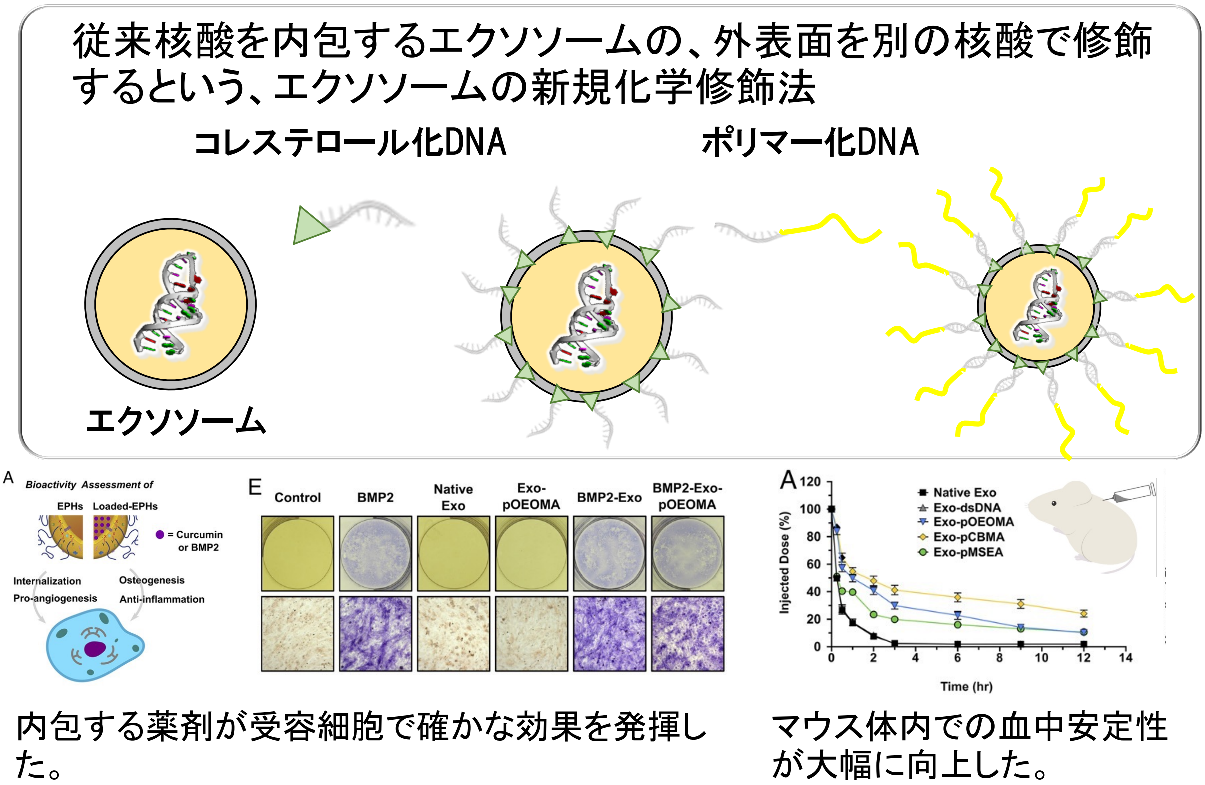


図　エクソソームの新規化学修飾法の概念図。人工エクソソームの大幅な性能の向上を実現した。

(11)　H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto

Chemical biology of non-canonical structures of nucleic acids for therapeutic applications

Chem. Commun., **56**, 2379-2390 (2020)

生体内での核酸の標準的な構造は二重らせん構造である一方、核酸は、三重らせん、四重らせん構造などの非二重らせん構造も形成することができる。非二重らせん構造を形成することができる核酸は、がんや神経変性疾患などの疾患に関連する遺伝子に多く存在することから、非二重らせん構造の細胞内での役割が注目されていた。ここでは、疾患関連遺伝子中に形成された非二重らせん DNA 構造の役割について概説した。疾患関連遺伝子上に非二重らせん構造が形成されると、転写（逆転写）、複製、翻訳を抑制したり、変異を誘導したりすることがわかった。さらに、これらの抑制や変異は非二重らせん構造の安定性やトポロジーに依存することもわかった。このような非二重らせん構造に由来する生体反応の抑制や変異を活用し、

人工核酸や小分子を用いて、非二重らせん構造の構造・解離を制御する手法の開発が進められている。多くの研究では、標的遺伝子に対して特異的に、非二重らせん構造を誘起することができ、疾患に関わる生体反応を制御することが試みられている。ここでは、核酸の構造に注目した新規の治療に関する今後の展望についても議論した。本論文の発刊をきっかけに非二重らせん構造の役割を解明するための研究が、世界中で加速されると期待されている。

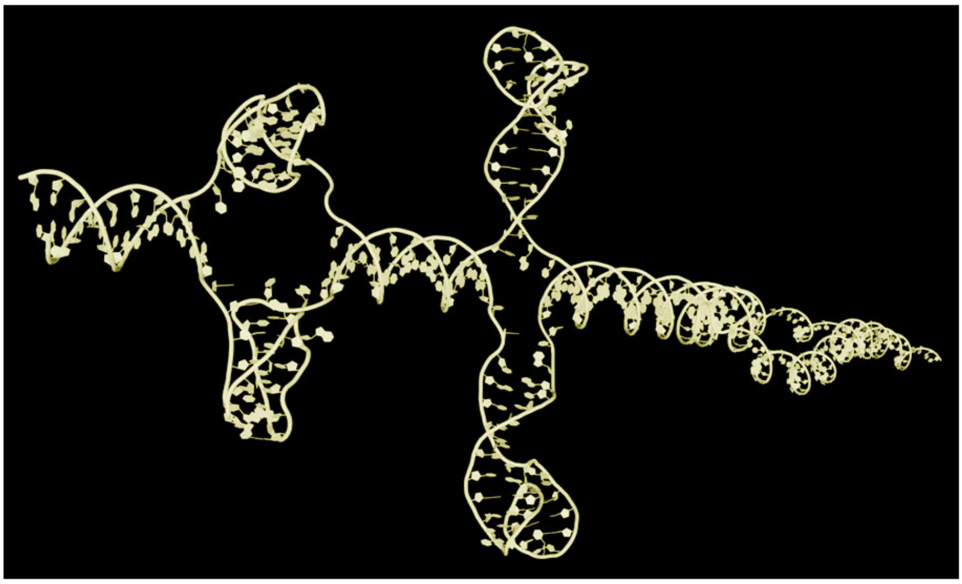


図　DNA 二重らせん中に形成させる非二重らせん構造

(12)　S. Takahashi and N. Sugimoto
Stability in Diverse Molecular Crowding Condition Stability prediction of canonical and non-canonical structures of nucleic acids in various molecular environments and cells
***Chem. Soc. Rev.*, 49**, 8439-8468 (2020)

新型コロナウイルス等のウイルス検査で行う PCR 反応や、昨年（2020 年）のノーベル化学賞の対象となったゲノム編集技術では、核酸二重らせんなどの構造形成の制御が重要である。核酸構造のできやすさ（構造安定性）は周囲の環境によって左右されるため、核酸を対象とする技術は 100%成功しないというのが現状であった。これまで我々は、核酸の構造安定性に対する溶液環境の影響を研究してきた。最近では医薬品添加物などとしても用いられる水溶性高分子であるポリエチレングリコールで調整した人工環境で DNA 二重らせんのできやすさを解析してきた。その結果、細胞内のような分子で混み合った環境（分子クラウディング環境）におけ

る DNA の二重らせんのできやすさを予測することができる新しい予測法の開発に成功しており、SNAPS としての核酸機能の理解と予測への応用が進んでいる。

本総説は、FIBER でこれまで発表してきた研究内容を含めた、核酸構造の安定性予測に関する研究と今後の展望を発表した。本総説はその内容が高く評価され、掲載号の雑誌の表紙として取り上げられた。本誌は化学分野全般において優れた実績のある研究者による総説を発表している。そのため、国際的な注目度が非常に高く、本誌のインパクトファクターは 42.846 (2019 年)であり、Nature 誌（42.778）や Science 誌（41.845）と勝るとも劣らぬほどほど重要視されている。平生基金の助成により実行された FIBER の研究成果の総説がこのような著名な雑誌に掲載されたことから、核酸の新たな機能側面（SNAPS）に対する国際的な注目が高まっていると言える。

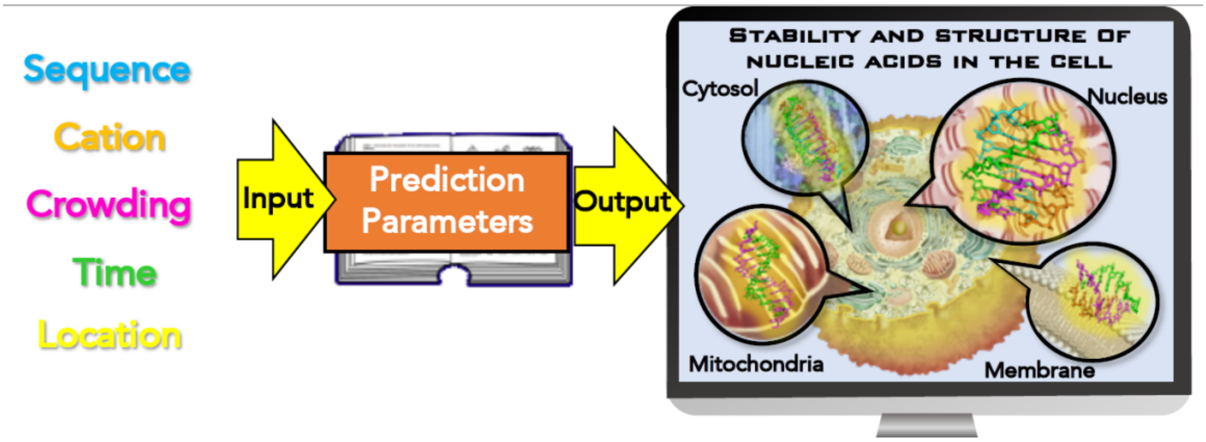


図　本総説で紹介した細胞内の核酸構造安定性予測法の概念図

３）　SNAPS Control で疾患発症を「制す」研究に関する成果

具体的な成果を以下に示す。

(13)　T. Endoh and N. Sugimoto

Signaling Aptamer Optimization through Selection Using RNA-Capturing Microsphere Particles

Anal. Chem., **92**, 7955 (2020)

特定の化合物による刺激で SNAPS に関与する核酸と生体分子との相互作用を調

節できれば、疾患の発症などに対する人為的な制御ツールを提供できると期待される。特に、神経変性疾患を示す細胞内で見られる細胞毒凝集体は、構造を形成したRNAに対し、タンパク質あるいは一部のドメインがRNAに相互作用することで相分離状の構造体が形成されていることが示唆されている。このような細胞毒凝集体の形成を人為的に制御するアプローチとして、凝集体の核となるRNAとタンパク質との相互作用に疑似RNAを競合的に作用させることが有効であると考えられる。特に、神経変性疾患細胞に特異的な分子環境に応答して疑似RNAの構造を制御することで、神経細胞の変性状態に応答して疑似RNAとしての機能を発揮させることができる。

本研究では、細胞内の特定の分子に応答してRNAの構造を変化させ得るRNAの設計、構築指針を得ることを目的に、RNA配列の最適化技術の構築を行った。そのために、2つの分子認識RNA（アプタマー）ユニットがランダムな配列で連結されたRNAのライブラリを設計した。そして、1つ目のアプタマーユニットが標的とする分子に応じて、RNAの構造変化と2つ目のアプタマーユニットの機能変動を誘起するRNA（シグナリングアプタマー）を簡便に獲得する技術の構築を行った。アプタマー自体の配列最適化技術については、2018年度における研究成果として、RNAキャプチャー微粒子群（RNA-capturing microsphere particles: R-CAMPs）を活用した技術を既に報告している（***Small,*** 15, 1805062 (2019)）。本研究では、この技術を基盤とし、ネガティブセレクションとポジティブセレクションを組み合わせてシグナリングアプタマーの最適化を行った。具体的には、細胞内でDNAのメチル化反応の基質となる*S*-アデノシルメチオニン（SAM）を標的とし、SAMを認識するRNAアプタマーと蛍光分子であるDFHBI-1Tを認識するRNAアプタマーの間にランダムな配列を挿入した約20万種類の配列バリエーションを含むRNAライブラリを設計した。このライブラリを用いて得られるR-CAMPsの中から、SAMに応答してRNAの構造変化とDFHBI-1Tとの結合による蛍光シグナルを示すRNAの選別を行った。選別されたR-CAMPsからRNAを再度合成して機能の評価を行った結果、SAMに応答して最も大きな蛍光シグナルの変化を示した2つのサンプルが同じRNA配列であったことを確認した。つまり、約20万種類の配列バリエーションから、SAMに応答した機能変動を示すRNA配列を簡便に獲得することができた。また、得られたRNAを細胞内に導入することで、細胞内のSAM濃度の変動に伴う蛍光シグナルの増減を示すことも明らかとなり、本技術を、細胞内の特定分子に応答して疑似RNAとしての機能を発揮するRNAの最適化にも活用できると

考えられる。

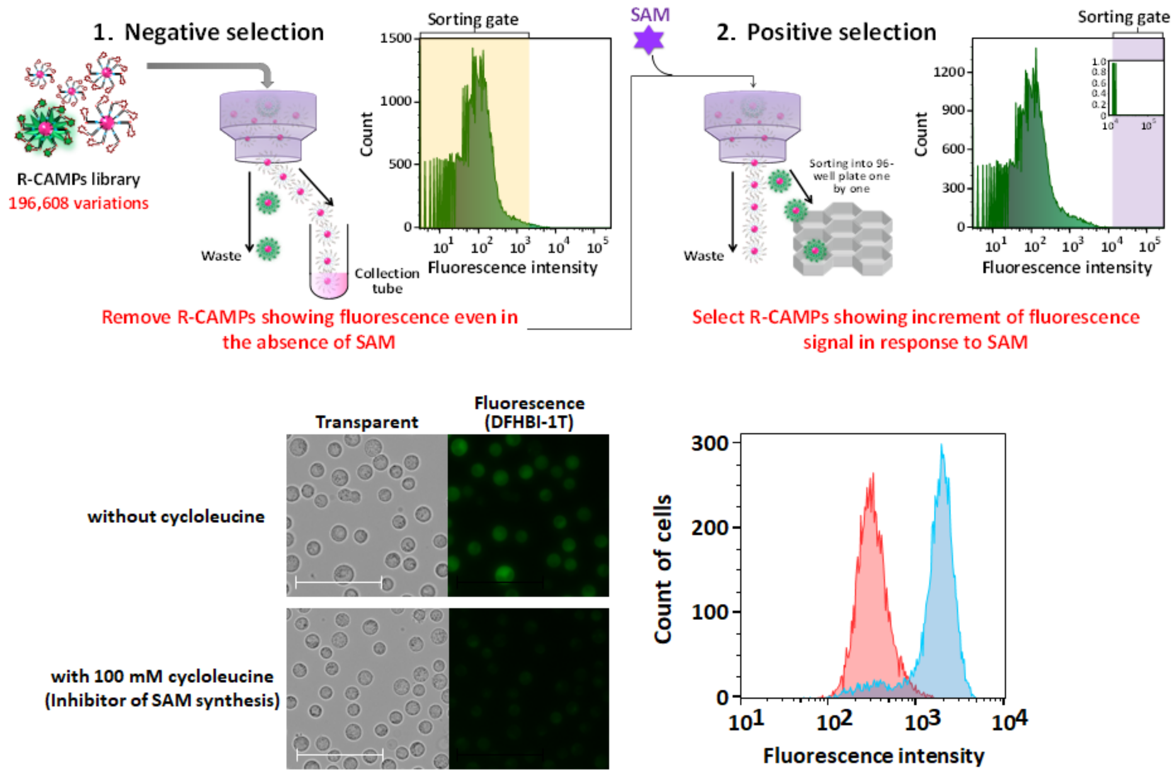


図　R-CAMPs を用いた SAM に応答する機能性 RNA の選別過程（上）、および細胞内における SAM に応答した RNA の機能発現（下）。

４．研究の進捗と今後の方針

2020 年度は本研究課題の５ケ年計画の２年目であり、１年目の 2019 年度の「知る」研究により得られた成果を基に研究を遂行した。2020 年度においても脳疾患に関わる非二重らせん構造に及ぼす環境効果や、非二重らせん構造によって変動する生体反応に関する知見を収集するなど、SNAPS を「知る」研究を中心に成果を挙げることができた。さらに、これまでに得られた「知る」研究による成果を基に、「創る」研究や「制す」研究に関しても一定の成果を挙げ、当初の計画通り順調に研究を遂行できた。これらの研究成果は 15 報の論文および総説として公表し、そのうち雑誌の表紙として計５件（***Biochemistry,*** **59**, 21, 1972 (2020)、***Biochemistry***, **59**, 28, 2640 (2020)、***Nucleic Acids Res.***, **48**, 21, 12042 (2020)、***Chem. Soc. Rev.***, **49**, 8439 (2020)、***Acc. Chem. Res.***, **54**, 2110 (2021)）が採択されるなど、いずれの

研究成果も学術的に高く評価されている。

2021年度においては、非二重らせん構造に関する基礎データベースを基に、細胞内で遺伝子の発現に関与する非二重らせん構造の探索を行う。ゲノム塩基配列のデータベースから、特に安定な非二重らせん構造を形成し得る領域を探索し、非二重らせん構造を形成する候補領域とする。非二重らせん構造の安定化エネルギーに影響する化学的要因（水素結合、スタッキング相互作用、静電相互作用など）を考慮し、相互作用に伴って非二重らせん構造の形成を誘起する人工分子（STAr Material）設計・合成する。また、既存の化合物に対し、核酸塩基あるいはその類縁体を修飾した分子を合成し、非二重らせん構造への親和性を向上させると共に、複合体を形成した時の構造を安定化することを検討する。具体的には、神経変性疾患細胞内で細胞毒性を示す凝集体の構造を解離させるような小分子（人工ペプチド、細胞内代謝産物など）を細胞に添加し、凝集体の構造制御を試みる。また、共同研究先から神経膠腫（グリオーマ）の細胞株を提供いただき、細胞内におけるグアニン四重らせん構造が、がん悪性化に関わる遺伝子発現へ及ぼす影響を網羅的に解析する。得られた知見を夏目准教授の研究グループに提供し、実際のグリオーマ患者の検体における転写産物の解析を行い、構築したSTAr Materialを実際に活用できるかどうかを検討する。

５．謝辞

本研究は、本甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金によって遂行されたことを記して、感謝の意を表します。

６．研究成果の公表

2020年度の成果は、論文15報、学会発表17件として公表した。以下に公表リストを記す。

2020年度　発表論文

1. Y. Teng, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, and N. Sugimoto
Effect of Potassium Concentration on Triplex Stability under Molecular Crowding Conditions

***Molecules*, 25**, 387 (2020) ＜査読有＞

2. H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, T. Muraoka, S. Tanaka, K. Kinbara, and N. Sugimoto
New Modified Deoxythymine with Dibranched Tetraethylene Glycol Stabilizes G-Quadruplex Structures
Molecules, **25**, 705, (2020) ＜査読有＞

3. M. Kovačič, P. Podbevšek, H. Tateishi-Karimata, S. Takahashi, N. Sugimoto, and J. Plavec
Thrombin Binding aptamer G-quadruplex stabilized by pyrene-modified nucleotides
***Nucleic Acids Res.*, 48**, 3975-3986 (2020) ＜査読有＞

4. Y. Teng, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto
RNA G-quadruplexes facilitate RNA accumulation in G-rich repeat expansions
***Biochemistry*, 59**, 1972–1980 (2020) （Front Cover に採択） ＜査読有＞

5. T. Endoh and N. Sugimoto
Signaling Aptamer Optimization through Selection Using RNA-Capturing Microsphere Particles
Anal. Chem., **92**, 7955-7963 (2020) ＜査読有＞

6. S. Ghosh, S. Takahashi, T. Ohyama, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto
Nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability in diverse molecular crowding conditions
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **117**, 14194-14201 (2020) ＜査読有＞

7. S. Matsumoto, H. Takeishi-Karimata, S. Takahashi, T. Ohyama, and N. Sugimoto
Effect of molecular crowding on the stability of RNA G-quadruplexes with various numbers of quartets and lengths of loops
Biochemistry, **59**, 2640-2649 (2020) （Supplementary Cover に採択） ＜査読有＞

8. S. Takahashi, H. Okura, P. Chilika, S. Ghosh, and N. Sugimoto
Molecular crowding induces primer extension by RNA polymerase through base stacking beyond Watson–Crick rules
RSC Adv., **10**, 33052-33058 (2020) （HOT Article に採択）＜査読有＞

9. S. Takahashi, P. Herdwijn, and N. Sugimoto
Effect of Molecular Crowding on DNA Polymerase Reactions along Unnatural DNA Templates
Molecules, **25**, 18, 4120 (2020) ＜査読有＞

10. D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, S. Ghosh, T. Endoh, S. Takahashi, and N. Sugimoto
Improved nearest-neighbor parameters for the stability of RNA/DNA hybrids under a physiological condition
Nucleic Acids Res., **48**, 12042-12054 (2020) （Front Cover に採択） ＜査読有＞

11. H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto
Chemical biology of non-canonical structures of nucleic acids for therapeutic applications
Chem. Commun., **56**, 2379-2390 (2020) ＜査読有＞

12. S. Takahashi and N. Sugimoto
Stability prediction of canonical and non-canonical structures of nucleic acids in various molecular environments and cells
Chem. Soc. Rev., **49**, 8439-8468 (2020) （Front Cover に採択） ＜査読有＞

13. H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto
Effect of chemical environment changes in cell on DNA structures and functions
Impact (Science Impact Ltd), **2020 (7)**, 25-27 (2020) ＜査読有＞

14. S. Lathwal, S. S. Yerneni, S. Boye, U. L. Muza, S. Takahashi, N. Sugimoto, A. Lederer, S. R. Das, P. G. Campbell, and K. Matyjaszewski,
Engineering exosome polymer hybrids by atom transfer radical polymerization
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 118, e2020241118 (2021) ＜査読有＞

15. S. Takahashi and N. Sugimoto
Watson-Crick versus Hoogsteen Base Pairs: Chemical Strategy to Encode and Express Genetic Information in Life
Acc. Chem. Res., **54**, 2110-2120 (2021) （Front Cover に採択） ＜査読有＞

2020 年度　学会発表

1. 第 14 回バイオ関連化学シンポジウム，高橋俊太郎，BHOWMIK Sudipta，杉本直己， フラボノイドによる i-motif DNA の配列選択的な構造変化，(オンライン開催)，2020 年 9 月 7 日～8 日
2. 第 14 回バイオ関連化学シンポジウム，建石寿枝，Ye Teng，大山達也， 田中成典，杉本直己， 神経変性疾患に関わるリピート RNA による相分離機構の解析，(オンライン開催)，2020 年 9 月 7 日～8 日

3. 第14回バイオ関連化学シンポジウム, 遠藤 玉樹, Satpathi Saga, PodbevŠek Peter, Plavec Janes, 杉本 直己, バルジを含むRNA二重鎖と天然アルカロイドとの相互作用解析, (オンライン開催), 2020年 9月 7日～8日
4. 第14回バイオ関連化学シンポジウム, 松本咲, 建石寿枝, 高橋俊太郎, 大山達也, 杉本直己, 異なるGカルテット数とループ長を有するRNAグアニン四重らせんの安定性への分子クラウディングの効果, (オンライン開催), 2020年 9月 7日～8日
5. 第14回バイオ関連化学シンポジウム, GHOSH Saptarshi, 高橋俊太郎, 大山達也, 遠藤玉樹, 建石寿枝, 杉本直己, Stability prediction of DNA duplexes available under diverse molecular crowding conditions, (オンライン開催), 2020年 9月 7日～8日
6. 第14回バイオ関連化学シンポジウム, BANERJEE Dipanwita, 建石寿枝, 大山達也, GHOSH Saptarshi, 遠藤玉樹, 高橋俊太郎, 杉本直己, Development of the prediction method for stability of RNA/DNA hybrids under a physiological condition, (オンライン開催), 2020年 9月 7日～8日
7. 第14回バイオ関連化学シンポジウム, PALLAVI Chilka, 高橋俊太郎, 杉本直己, Empirical rule of i-motif stability regulated by different molecular crowding conditions, (オンライン開催), 2020年 9月 7日～8日
8. 第69回高分子討論会, 高橋俊太郎, GHOSH Saptarshi, 杉本直己, 局所的な細胞内環境における核酸構造の安定性を探る, (オンライン開催) 2020年 9月 16日～18日
9. 第61回高圧討論会, 高橋俊太郎, 杉本直己, cMyc遺伝子のグアニン四重らせんに対する圧力効果とその生物学的意義, (オンライン開催) 2020年 12月 2日～4日
10. 日本化学会第101回春季年会, 遠藤玉樹, SATPATHI Sagar, 大山達也, PODBEVŠEK Peter, PLAVEC Janez, 杉本直己, 脱ワトソン・クリックの核酸化学(65): ベルベリンによるRNAバルジ構造の認識および安定化の微視的解析, (オンライン開催) 2021年 3月 19日～22日
11. 日本化学会第101回春季年会, 高橋俊太郎, Herdwijn Piet, 杉本直己, 脱ワトソン・クリックの核酸化学(66): 非天然DNAの複製反応に及ぼす分子クラウディングの影響, (オンライン開催) 2021年 3月 19日～22日
12. 日本化学会第101回春季年会, 建石寿枝, 川内敬子, 大山達也, 杉本直己, 脱ワ

トソン・クリックの核酸化学(67): DNA 四重らせん構造と転写変異に及ぼすがんの悪性進行に伴う細胞内環境変化の影響, (オンライン開催) 2021 年 3 月 19 日～22 日

13. 日本化学会第 101 回春季年会, 松本咲, 大山達也, 杉本 直己, 脱ワトソン・クリックの核酸化学(68): 老化における細胞内環境変化による CpG アイランドのグアニン四重らせん構造のトポロジー制御, (オンライン開催) 2021 年 3 月 19 日～22 日
14. 日本化学会第 101 回春季年会, 大山達也, 建石寿枝, 田中成典, 杉本直己, ワトソン・クリックの核酸化学(69): 神経変性疾患に関連する RNA 四重鎖ジペプチドリピートの分子シミュレーションによる相互作用の解析, (オンライン開催) 2021 年 3 月 19 日～22 日
15. 日本化学会第 101 回春季年会, Saptarshi Ghosh, Shuntaro Takahashi, Naoki Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond Watson-Crick Double Helix (70): Prediction of DNA duplex stability having biased base composition under molecular crowding conditions, (オンライン開催) 2021 年 3 月 19 日～22 日
16. 日本化学会第 101 回春季年会, Pallavi Chilka, Shuntaro Takahashi, Naoki Sugimoto, Nucleic Acid Chemistry beyond Watson-Crick Double Helix (71): I-motif stability prediction under molecular crowding conditions, (オンライン開催) 2021 年 3 月 19 日～22 日
17. 日本化学会第 101 回春季年会, Dipanwita Banerjee, Hisae Tateishi-Karimata, Tatsuya Ohyama, Marko Trajkovski, Maria Toplishek, Janez Plavec, Naoki Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (72): Prediction of RNA/DNA hybrid stability under a physiological condition and verification of advantage in CRISPR-Cas9, (オンライン開催) 2021 年 3 月 19 日～22 日

７．受賞・新聞記事等

次項以降に、本研究課題に関連する研究発表に対する受賞、本研究成果として刊行した論文で雑誌の表紙等に採択されたものを添付する。

＜雑誌の表紙として採択された研究発表＞

Y. Teng, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto

RNA G-quadruplexes facilitate RNA accumulation in G-rich repeat expansions

Biochemistry, **59**, 1972–1980 (2020)

S. Matsumoto, H. Takeishi-Karimata, S. Takahashi, T. Ohyama, and N. Sugimoto

Effect of molecular crowing on the stability of RNA G-quadruplexes with various numbers of quartets and lengths of loops

Biochemistry, **59**, 2640-2649 (2020)

D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, S. Ghosh, T. Endoh, S. Takahashi, and N. Sugimoto

Improved nearest-neighbor parameters for the stability of RNA/DNA hybrids under a physiological condition

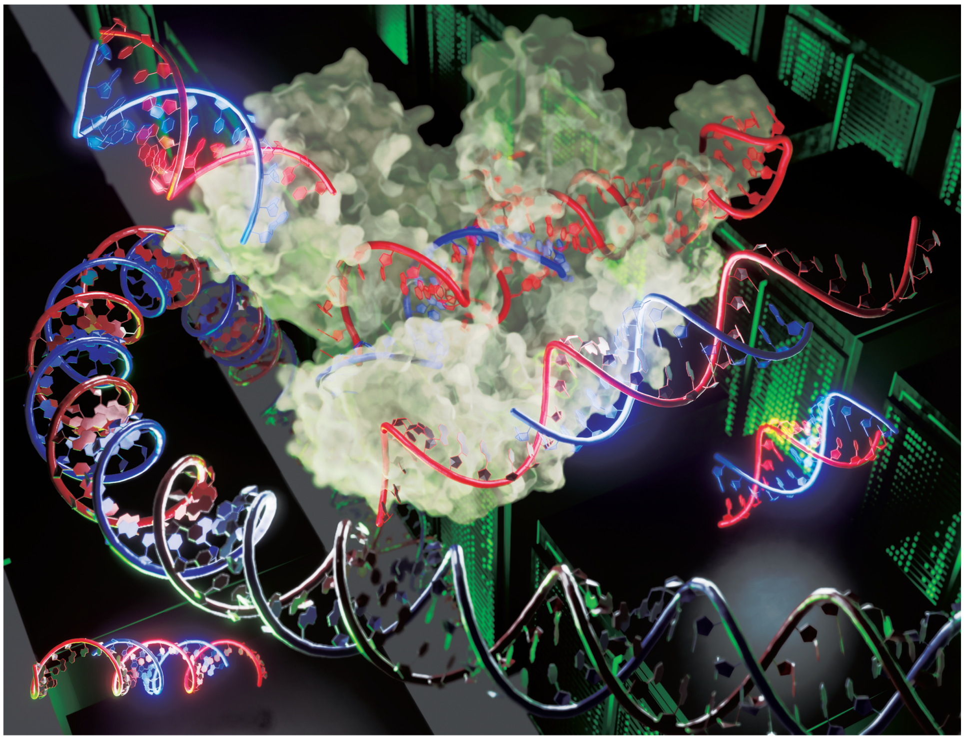
***Nucleic Acids Res.*, 48**,12042-12054 (2020)

PRINT ISSN: 0305-1048
ONLINE ISSN: 1362-4962

Nucleic Acids Research

VOLUME 48 ISSUE 21 2020

https://academic.oup.com/nar



OXFORD UNIVERSITY PRESS

Open Access
No barriers to access – all articles freely available online

MIX Paper from responsible sources FSC® C007785

S. Takahashi and N. Sugimoto

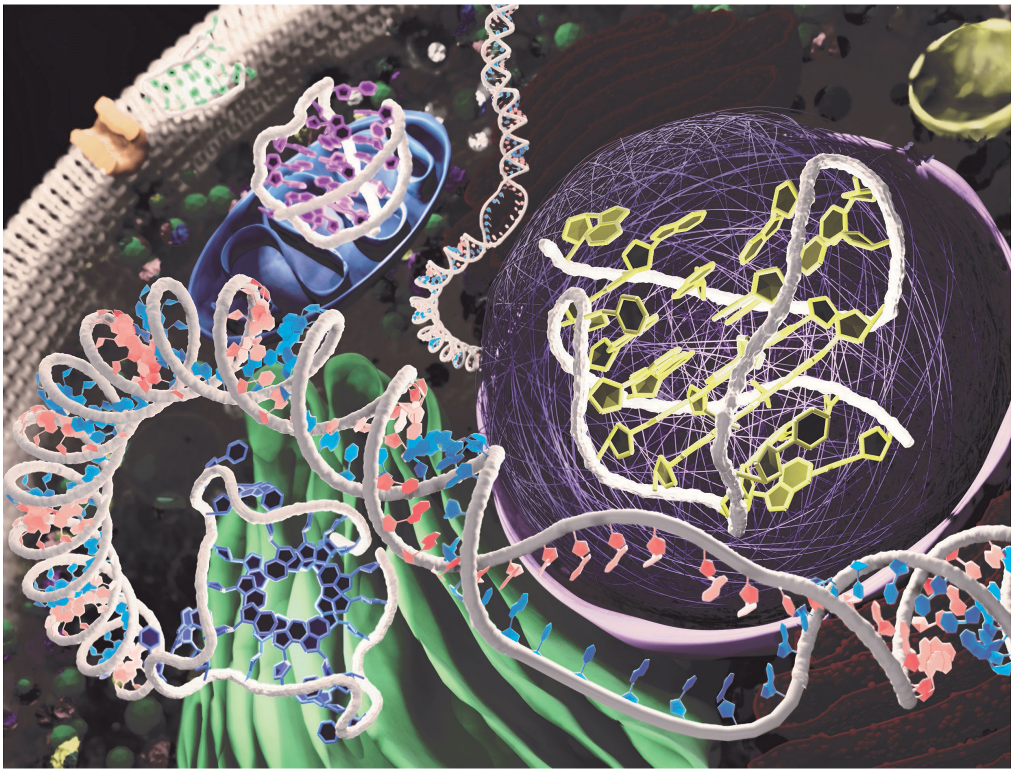
Stability prediction of canonical and non-canonical structures of nucleic acids in various molecular environments and cells

Chem. Soc. Rev., **49**, 8439-8468 (2020)

Volume 49
Number 23
7 December 2020
Pages 8393–8870

Chem Soc Rev

Chemical Society Reviews
rsc.li/chem-soc-rev



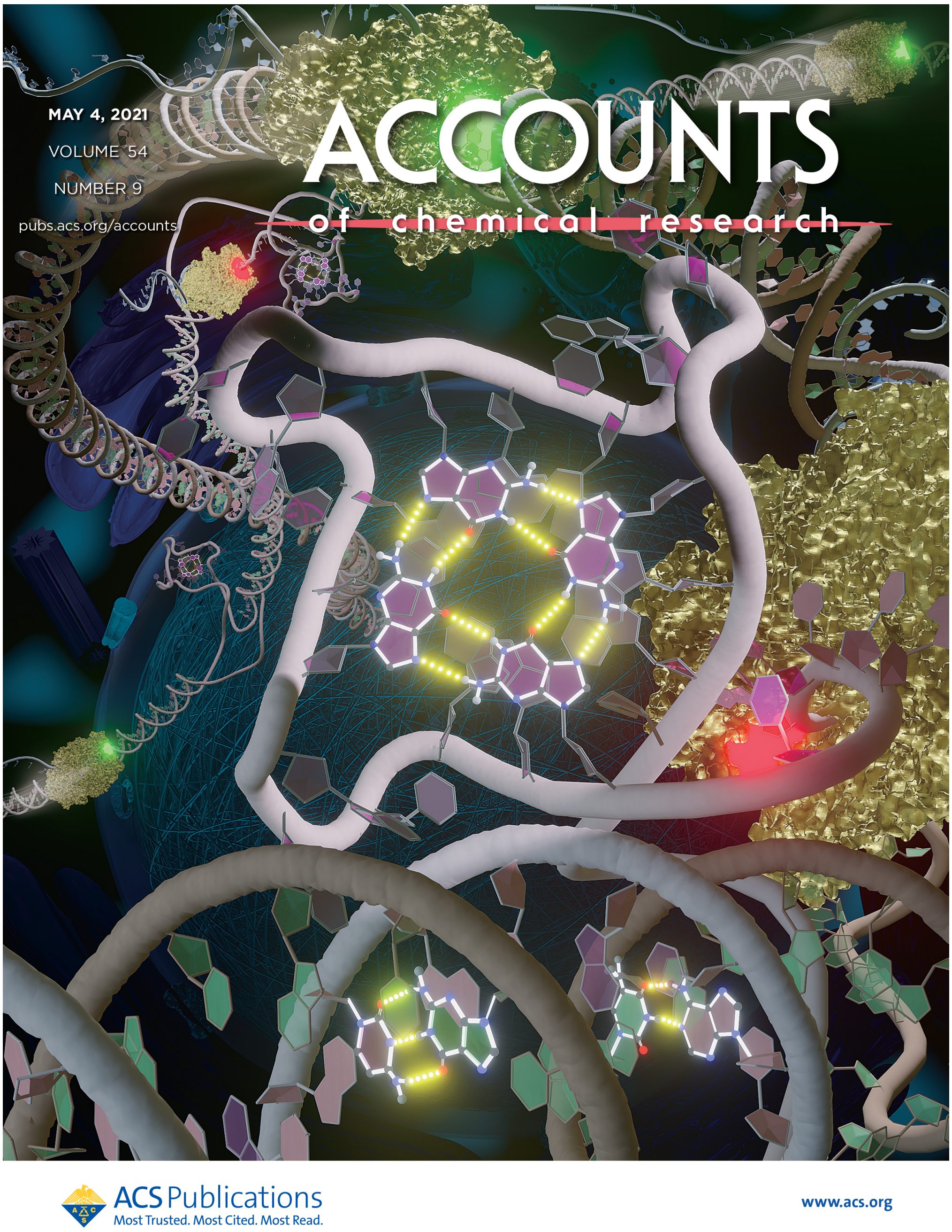
ISSN 0306-0012

ROYAL SOCIETY OF **CHEMISTRY**

REVIEW ARTICLE
Shuntaro Takahashi and Naoki Sugimoto
Stability prediction of canonical and non-canonical structures of nucleic acids in various molecular environments and cells

3 8

S. Takahashi and N. Sugimoto

Watson-Crick versus Hoogsteen Base Pairs: Chemical Strategy to Encode and Express Genetic Information in Life

Acc. Chem. Res., **54**, 2110-2120 (2021)