

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	2021 年度 （2019 年度～2023 年度の 5 ヶ年計画の 3 年目）	
助成額	2021 年度	13,000 千円

1. 研究成果の概要

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、脳疾患発症に関する「遺伝要因」と「環境要因」を関係づけるために、「環境要因」に依存した「遺伝要因」の核酸の構造多型（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 年間の計画で段階的に展開する。2021 年度は研究計画の 3 年目に当たり、これまでの「知る」研究により得られたパラメータを活かし、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」研究に着手した。

以下に 2021 年度の主な研究結果の概要を記す。

- 1) 「知る」研究の成果として、細胞内環境を模倣した溶液環境下における DNA 二重らせん構造と四重らせん構造間の構造変化に関する重要な知見が得られた。例えば、老化細胞を模倣した環境下における、DNA メチル化やヒドロキシメチル化などの修飾が DNA の構造変化に及ぼす影響を調べた。その結果、老化細胞模倣環境下では非修飾 DNA よりも修飾 DNA の方が二重らせん構造を形成しやすいことを明らかにした（*RSC Adv.*, 11, 37205-37217 (2021)）。また、新型コロナウイルスのゲノム中に存在する、グアニンに富んだ配列が形成する核酸構造について解析した。その結果、グアニン四重らせん構造を形成しやすい配列の周辺にはシトシンに富んだ領域が存在し、周辺の環境変化に応答して核酸の構造を変化させ、遺伝子発現を制御している可能性が示された（*Chem.*

Commun., 58, 48-51 (2022))。

さらに、これまでの「知る」研究により得られた成果を総説として発表した。細胞内のような混み合った環境下（分子クラウディング環境下）では二重らせん構造が不安定化する一方で非二重らせん構造が安定化し、これらの核酸構造の変化が遺伝子発現を制御しているという新たな遺伝子発現制御機構の解明についてまとめた (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 94, 1970-1998 (2021))。また、そのような核酸の構造変化ががんや神経変性疾患の発症や進行に及ぼす影響についてもその重要性を概説した (*Nucleic Acids Res.*, 49, 7839-7855 (2021))。

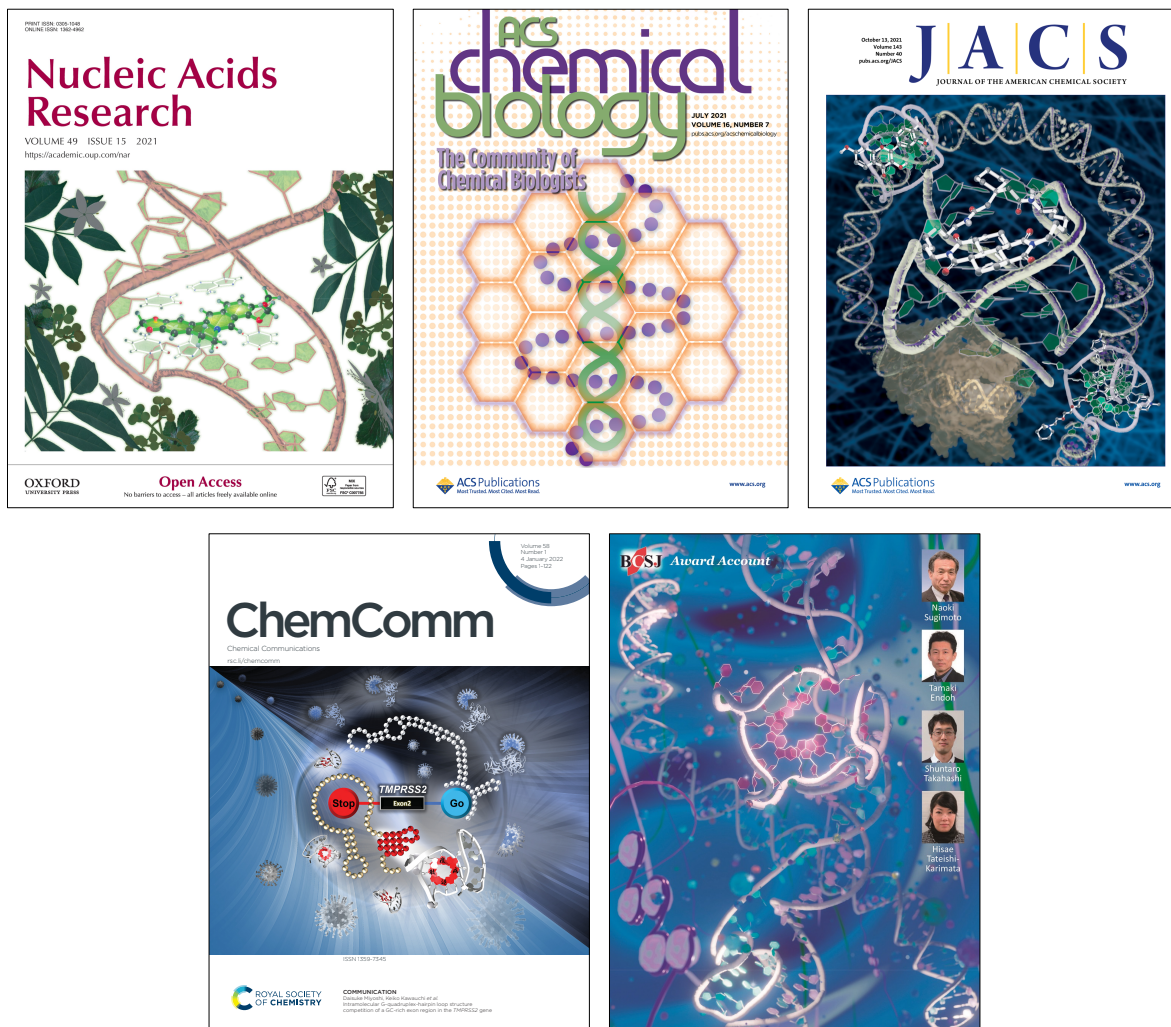
2) STAr Material を「創る」研究の成果としては、核酸の非二重らせん構造に特異的に結合する分子の創製に成功した。まず、グアニン四重らせん構造に結合するリガンドを評価するための手法を開発した。これにより同じグアニン四重らせんでもトポロジーの異なるグアニン四重らせんに特異的に結合する分子の開発が可能になった (*J. Am. Chem. Soc.*, 143, 16458-16469 (2021))。さらに、特定の RNA 構造に結合する分子の開発にも成功した。開発した分子と RNA の相互作用の詳細な解析により得られた知見は、今後 RNA により強く結合して SNAPS を調節する STAr Material の合理的設計に活用できると期待される (*Nucleic Acids Res.*, 49, 8449-8461 (2021))。

3) SNAPS Control で疾患発症を「制す」研究に関しては、RNA に配列特異的に結合するペプチド核酸(PNA)を用いて、細胞内で miRNA 前駆体(pre-miRNA)から miRNA への成熟反応の制御を達成できた。Pre-miRNA から miRNA の成熟反応は遺伝子発現制御を司る翻訳よりも上流に位置する遺伝子発現調節機構であり、がん細胞の増殖などとも関連している。そのため、この手法を活用し、任意の miRNA の成熟反応を制御する技術は疾患の発症や進行を抑制する SNAPS control の開発につながると考えられる (*ACS Chem. Biol.*, 16, 1147-1151 (2021))。

このように、前年度までの成果に引き続き、「知る」研究による成果が十分に蓄積された。また、これまでの「知る」研究による成果を元に、「創る」研究、さらには「制す」研究も着実に進行し、成果が得られつつある。

2021 年度の研究成果は学術論文（計 9 報、うち総説 2 報）及び学会発表（計 26 件）として公開することができた。特に 5 件の論文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」研究をさらに遂行することはもちろん、これまでの「創る」研究により得られた人工分子を用いて特定の疾患発症に関わる核酸

構造を制御する研究、「制す」研究を進めていく予定である。



2021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。3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。

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。

2. 研究成果の学術的意義や社会的意義

老化により発症率が上昇するとされている脳疾患、とくに神経変性疾患患者数は、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。特に、アルツハイマー型認知症に代表される神経変性疾患の罹患率が急増しており、2050年には神経変性疾患が世界的にも主な死因になると考えられている。脳疾患は多様であり、脳の構成要素である神経細胞やグリア細胞、あるいはそれらを結合するシナプスの異常によって引き起こされる。例えば、神経膠腫（グリオーマ）に代表される脳の悪性腫瘍は100種類以上が存在し、悪性度の高いものは5年生存率が10%以下と、全ての悪性腫瘍の中でも最も予後が悪い。このような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。

これまで、多数の患者を対象とした比較ゲノム解析から、脳疾患の発症に関与する「遺伝要因」として、遺伝子の配列変化（一塩基レベルでの多型（Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs, スニップス）や数塩基からなる配列の繰り返し数の上昇などが見出されつつある。例えば、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）では *SOD1* 遺伝子、パーキンソン病では *SNCA* 遺伝子の変異が疾患発症のリスクを向上させることが知られ始めている。また、脳腫瘍においては、*p53* 遺伝子の変異が腫瘍の悪性進行を促進することが示唆されている。

一方で近年、疾患の発症に関わる SNPs を有していたとしても、疾患を発症するか否か、発症するとしてもいつ発症するのかなどは個人によって異なることも見出されつつある。このことは、脳疾患は遺伝子の配列に依存する「遺伝要因」と、その遺伝子の発現に影響を与える後天的な「環境要因」とが複雑に関与しつつ発症することを示している。このような「遺伝要因」と「環境要因」を結びつけるものとして本研究では、核酸構造が周辺環境に鋭敏に応答して変化し、遺伝子の発現やタンパク質の凝集を調節する SNAPS という独創的な概念を提唱する。これは、環境に応答した一時的な核酸構造の変化が、難治性の疾患発症の起点となっている可能性があるというこれまではない仮説を提唱するものである。本研究課題を遂行することにより、**脳疾患の発症に「遺伝要因」と「環境要因」がどのように関連しているのかを SNAPS という新たな概念に基づいて詳細に解析することで、将来的な脳疾患治療法の開発につながる社会的意義の極めて高い研究成果を発信できると**

考えられる。

疾患に関連する「遺伝要因」に対する治療戦略としては、近年、遺伝子を核酸分解酵素等によって編集し、疾患発症を抑える技術（ゲノム編集技術、CRISPR/Cas9（クリスパー・キャス9））が見出された（E. Charpentier et al., *Science*, 2012、P. Mali et al., *Science*, 2013 等）。ゲノム編集技術は、治療法がない遺伝性疾患を治療できると期待され、実応用を目指した研究が世界的に行われている。例えば、CRISPR/Cas9 を用いて免疫抑制に関わる遺伝子をゲノム編集したがん治療薬が、臨床試験段階(phase 1)であると発表された（C. H. June, et al., *Science*, 2020）。また、ゲノム編集技術は創薬だけでなく診断技術にも応用され、2020年5月にはゲノム編集を活用した新型コロナウイルス検出キット（CRISPR SARS-CoV-2 キット、米 Sherlock Biosciences 社）が米食品医薬品局の緊急使用許可（EUA）を承認された。さらに CRISPR/Cas9 は、遺伝性疾患の治療のみならず、創薬、診断分野など様々な分野での活用が期待される革新的な技術であるとして、2020年ノーベル化学賞に選定されている。最近では、神経変性疾患の発症リスクを上昇させる老化に影響を与える遺伝子が、CRISPR/Cas9 をベースとしたゲノムワイドなスクリーニングにより同定されており、老化を制御する技術の開発が期待されている（W. Wang et al., *Sci. Transl. Med.*, 2021）。しかしながら、ゲノム編集された細胞は発がん性が高く（R. J. Ihry, et al., *Nat. Medicine*, 2018、E. Haapaniemi, et al., *Nat. Medicine*, 2018）、また目的外のゲノムが大きく欠損するという問題点があり、遺伝子発現制御技術の安全性の向上は喫緊の課題である（M. Kosicki, et al., *Nat. Biotech.*, 2018）。このような背景において、本研究では、「遺伝要因」に対する「環境要因」の影響を考慮し、核酸構造の解離・形成を調節できる人工分子を開発し、「任意の位置で任意の時に任意の量」の遺伝情報の発現を制御できる技術の開発を目指す。これは、『ゲノム“非”編集』によって疾患に関わる遺伝子の発現を制御する技術となり、CRISPR/Cas9 を超越する、医工学分野における待望の新規技術になると期待される。

3. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、遺伝子である核酸分子（DNA および RNA）の構造、およびその熱安定性に対する周辺環境の影響を定量的に解析してきた。その成果の一例として、同じ塩基配列を有する核酸であっても、周囲の分子環境の変化に応答して高次

構造を多様に変化させ得ることを見出している。例えば、標準的な核酸構造である二重らせん構造から局所的に立体構造が変化し、非二重らせん構造（三重らせん、四重らせん、十字構造など）が形成される。それに加え、分子間の相互作用が促進され、非二重らせん構造の集合体（四重らせん構造が積み重なった G-ワイヤーなど）が形成されることも見出している。また、複製、転写、翻訳などの遺伝子発現に重要な各反応の効率や速度が、非二重らせん構造の形状（トポロジー）と熱安定性、およびそのダイナミックな分子挙動によって影響を受けることも示している。さらに、その結果としてタンパク質の構造（凝集体形成など）にも影響が及ぶことを細胞内外で明らかにした。これらの成果は、「**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、複製異常に伴う遺伝子の配列変化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可能性を示している(図 1)。

(従来)塩基配列の変化「**遺伝要因**」 (本研究)核酸構造の「**環境要因**」

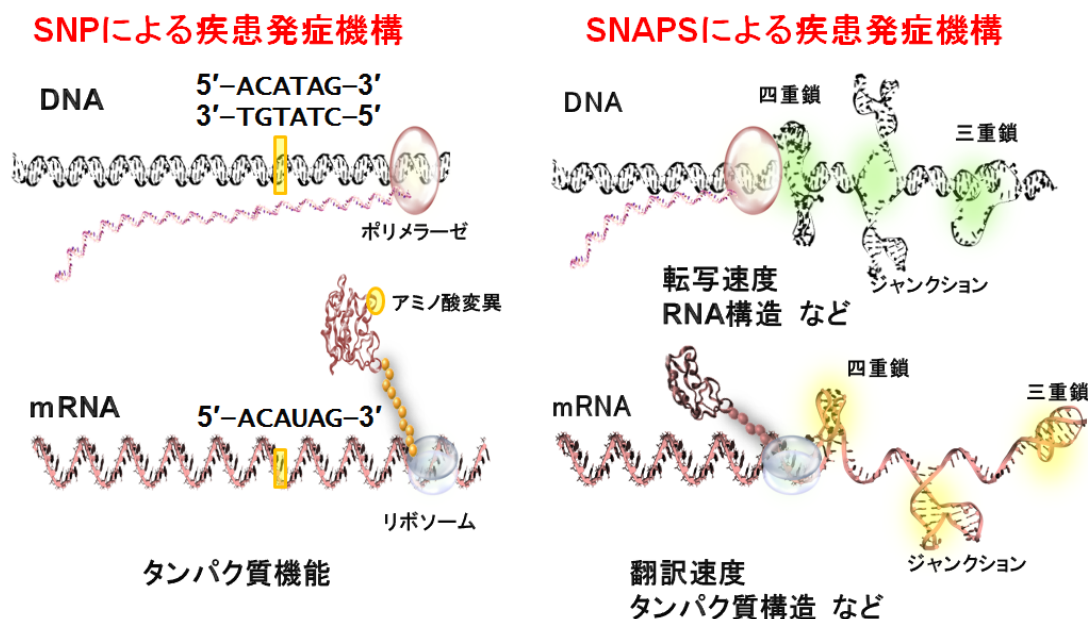


図 1. 脳疾患発症機構における「**遺伝要因**」と「**環境要因**」

近年、脳疾患の発症に関わる遺伝子の配列変化と核酸構造との関わりが明らかになりつつある。例えば、グリオーマの悪性度に関与する SNPs が、癌細胞で高発現するテロメラーゼの遺伝子にある四重らせん構造を形成する領域に存在することが示されている (G. N. Parkinson, et. al., *Nature*, 2002、M. L. Bondy et. al., *Cancer*

Epidemiol. Biomark. Prev., 2018)。また、遺伝子の複製反応途中で DNA の十字構造が形成されることで、神経変性疾患に関わる特定配列の繰り返し数が増加する機構も提唱されている (A. R. La Spada and J. P. Taylor, *Nat. Rev. Genet.*, 2010、A. C. Elden, et al., *Nature*, 2018)。さらに興味深いことに、ALS に関与する *C9orf72* 遺伝子などでは、繰り返し数が増加した配列が RNA として転写され、四重らせん構造としてタンパク質凝集の核となることで細胞毒性を示す凝集体 (細胞質内封入体) が形成されることが示されている (A. R. Haesle, et al., *Nature*, 2014、A. Jain, et al., *Nature*, 2017、Y. Zhang, et al., *Science*, 2019、K. M. Creamer et al., *Mol. Cell*, 2021)。

この細胞質内封入体は、脂質二重膜で覆われた細胞内小器官とは異なり、溶液環境から相分離された半溶液状態として存在する。そのため、封入体の内外で分子の出入りが常に起こっており、溶液環境に反応して細胞質内封入体はダイナミックに変動する。我々のこれまでの研究成果を加味すると、繰り返し配列を持つ RNA が、溶液環境 (特に溶液の誘電率の変化) に依存して凝集体の形成を調節している可能性がある。

このような学術的知見に基づくと、**本研究で提唱する SNAPS という核酸機能の新たな概念により、複雑な脳疾患の疾患発症機構を分子レベルで解明できると考えられる。さらに脳疾患発症機構を明らかにできれば、疾患発症に関わる分子反応を効果的に抑制する技術を確立できると期待される。**

4. 研究の目的

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 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 を制御する新手法の開発を目指す。**

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。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 (SNAPS) が、遺伝子発現の制御や

細胞毒性を示すタンパク質の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・実証し、その制御法を開発する。

5. 研究の方法

本研究では、脳疾患の発症に関与する「遺伝要因」と「環境要因」を結びつける SNAPS という核酸機能に関する新概念を提唱する。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相関させて評価することで、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 が司る機能を制御し、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、5カ年の研究期間(2019-2023年度)で以下の研究課題を段階的に遂行する（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

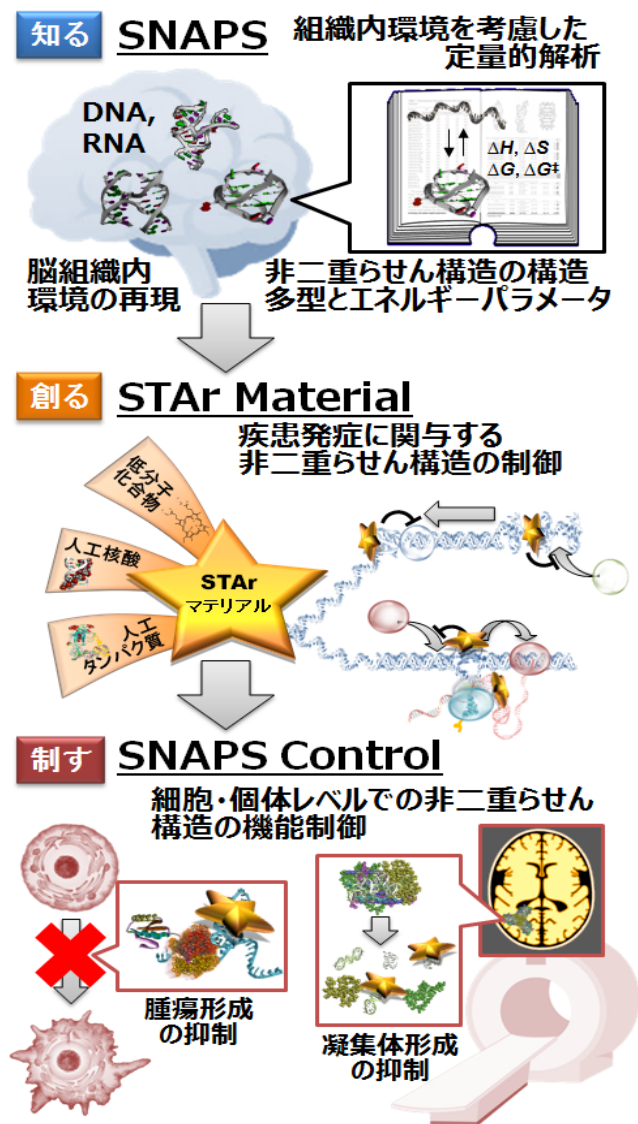


図 2. 研究計画

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。

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。

これまでに得られた主な成果と今後の展望を図3に示す。2019年度から2021年度までは研究計画が順調に進展している。2022-2023年度では引き続き「創る」研究を遂行し、新たな STAr Material の開発を行う。また、「制す」研究として、これまで得られた STAr Material の有効性を疾患細胞で評価し、SNAPS Control の臨床応用を目指した研究に発展させる（図3）。

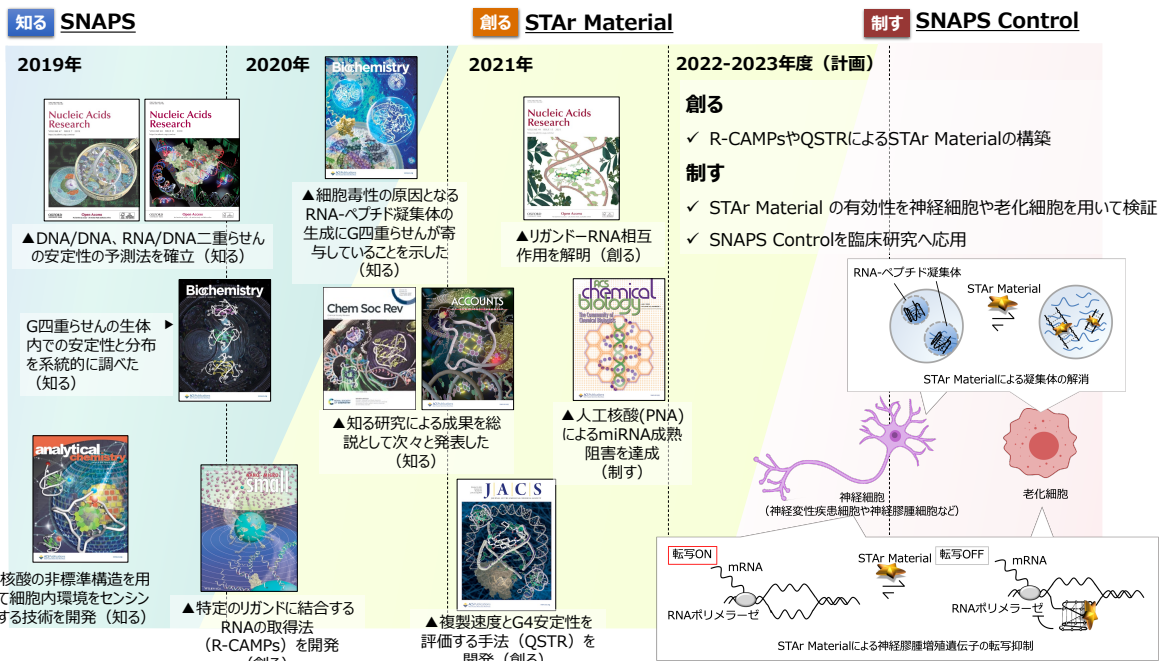


図 3. これまでに得られた主な成果と今後の計画

6. 研究成果

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」を関連づける、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。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解析し、脳疾患発症に至る分子機構を「知る」研究、②脳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、③人工分子を用いて核酸機能を制御し、疾患の発症を抑制する新たな技術を確認し（「制す」）、臨床へ応用する研究を、5カ年の計画で展開している。

計画3年目に当たる2021年度は、「知る」研究として、疾患細胞の分子環境を模倣した環境下での核酸の安定性や構造に関する知見を得た。また、「創る」研究として、特定の配列を持つRNAと特異的に結合する分子や、グアニン四重らせんのトポロジー依存的に複製を制御する分子を見出した。これらの研究は、SNAPSを制御する人工分子の設計に有用である。さらに、「制す」研究として、miRNAに特異的に結合する人工分子を創成し、この分子によるmiRNAの成熟反応の抑制を細胞内で実証した。以上の成果は学術的にも高く評価され、発表した論文は雑誌を代表する研究として掲載号の表紙に採択された。以上のように、2021年度はSNAPS

を「知る」研究に加え、「創る」研究及び「制す」研究に関連する成果を得ており、当初の計画通り順調に研究を遂行できた。以下に 2021 年度に得られた研究成果の概略を記す。

細胞老化は脳疾患発症の要因になることが示唆されている。老化細胞内では、正常細胞と比較して、分子クラウディングの度合いが低下していることやイオンチャネルの発現異常によりカリウム濃度が低下していることが知られている。また老化細胞では CpG アイランドと呼ばれる遺伝子の上流に位置する領域が過剰にメチル化され、遺伝子発現が低下していることも示唆されている。本研究では、メチル化などの修飾が起こる CpG アイランドがグアニン四重らせんを形成しやすいグアニンに富んだ配列を有することに着目した。老化細胞内環境を模倣した溶液条件下で、DNA 修飾が CpG アイランド上の DNA 構造変化に及ぼす影響を調べた。その結果、老化細胞環境下では非修飾 DNA は四重らせんと二重らせんの両方を形成する一方、修飾 DNA は二重らせん構造を優位に形成することが明らかになった。すなわち、**正常細胞では構造形成により転写因子などのタンパク質の結合が阻害され、遺伝子発現制御に関与できていなかった DNA 修飾が、老化により転写因子などに認識されるようになり、遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。この成果により、脳疾患の一因になる老化が SNAPS により制御されている可能性が示唆された (*RSC Adv.*, 11, 37205-37217 (2021))。**

また、グアニンに富んだゲノム配列上に形成される核酸構造は、老化だけでなくウイルス感染機構においても重要であることが示された。新型コロナウイルスなどのウイルスがヒトに感染する際に重要なタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）TMPRSS2 の遺伝子配列を解析した。その結果、グアニン四重らせん構造を形成しやすいグアニンに富んだゲノム領域の周辺にはシトシンに富んだ領域が存在し、グアニン四重らせん構造とヘアピン構造の両方を形成し得ることが明らかになった。この結果は、グアニンに富んだ配列によって形成される核酸構造が、隣接するシトシンに富んだ配列と相互作用し、環境に応じて構造を変化させることにより遺伝子発現を制御している可能性を示すものである。**この成果により、ウイルス感染機構においても SNAPS が重要であることが示唆された (*Chem. Commun.*, 58, 48-51 (2022)、Front Cover に選定)。**

ウイルス感染症の慢延において、ウイルスの変異株の出現は重要な問題である。ウイルスの変異は遺伝子（DNA や RNA）がポリメラーゼによって誤って複製され

ることに起因する。そこで、生体内を模倣した分子クラウディング環境下でのポリメラーゼによる核酸伸長反応について調べた。その結果、分子クラウディング環境下では RNA のミスマッチ伸長が下流の重合にも伝播していくことが明らかになった。さらに、分子クラウディングを引き起こす PEG は、主に溶液の誘電率を低下させることにより、非相補的なりボヌクレオシド三リン酸の重合を促進することを明らかにした。この結果はタンパク質の改変なしに遺伝子の多様性を高めることができる可能性を示している。**この成果は SNAPS のウイルスなどにおける RNA 伸長反応への役割を明らかにしており、ウイルスの変異の出現機構や生命の進化のメカニズムの解明に繋がるものである (Sci. Rep.,12, 1149 (2022))。**

2021 年度までに得られた「知る」研究による研究成果を、最新の研究成果を含め総説としてまとめた。細胞内は、核酸 (DNA や RNA)、タンパク質などの生体分子で混み合った環境である。これを分子クラウディング環境と呼ぶ。これまでの研究成果により、このような分子クラウディング環境下では核酸の二重らせん構造が不安定化する一方、グアニン四重らせん構造などの非二重らせん構造は安定化することが示されている。本研究課題ではさらに、周辺環境に応答した核酸の構造変化が転写や翻訳などの遺伝子発現制御、および複製などのゲノム安定性制御に関わることを見出した。**このような成果および世界の核酸化学を先導した功績により、研究代表者の杉本は、「分子クラウディング環境における非二重らせん核酸の化学」の研究で、2019 年度第 72 回「日本化学会賞」を受賞した。本受賞内容と非二重らせん核酸に関するこれまでの研究や近年の研究動向を Award Accounts としてまとめた (Bull. Chem. Soc. Jpn., 94, 1970-1998 (2021))。**また、**分子クラウディングと呼ばれる細胞内条件下における核酸の二重らせん構造の安定性予測に関する最新の研究成果について、核酸の安定性を予測する生物物理化学的背景とともに概説した (熱測定, 49, 14-19 (2022))。**さらに、細胞内環境に応答した核酸の構造変化は、がんや神経変性疾患の発症や進行にも寄与していることが明らかになりつつある。例えば神経変性疾患に関連する遺伝子の繰り返し配列から産生する転写産物は、非二重らせん構造を形成し、タンパク質の輸送や毒性のある凝集体の形成に関与している。凝集体形成にも関わる相分離と呼ばれる現象は、核酸構造によって制御されている転写やタンパク質の会合を促進し、がんや神経変性疾患の進行に影響を与えている。**このような最新の研究成果を含め総説としてまとめ、核酸の非二重らせん構造の形成が、疾患の発症や進行に及ぼす影響について概説した (Nucleic Acids Res., 49, 7839-7855 (2021))。**

SNAPS から疾患発症機構を「知る」研究が順調に進展し、非二重らせん構造に関する知見が十分に蓄積したため、SNAPS を調節し得る STAr Material を「創る」研究を積極的に展開した。

グアニン四重らせん構造は、転写や翻訳、複製などを制御することが知られている。グアニン四重らせん構造に特異的に結合し、構造を安定化させる分子は、脳腫瘍や神経変性疾患などの脳疾患の治療薬となる可能性がある。グアニン四重らせんにはいくつかのトポロジーが存在しているため、その特定のトポロジーの構造に結合する分子は、より選択的に特定の遺伝子の複製を制御できる可能性がある。DNA 上のグアニン四重らせん構造のトポロジーに応じて、グアニン四重らせんに結合する分子が複製を阻害することを見出した。複製の抑制効果はグアニン四重らせんの安定性だけでなく、グアニン四重らせん結合性分子がグアニン四重らせんと相互作用する結合様式に基づいて、トポロジー選択的に作用することを明らかにした。さらに、複製速度とグアニン四重らせんの安定性を、「Quantitative Study of Topology-dependent Replication (QSTR)」という我々が開発した手法により評価した。これにより、トポロジー依存的な結合に基づき、分子を系統的に分類することが可能になった。 **QSTR を用いることで、トポロジー依存的に SNAPS を制御できる STAr Material を設計できると考えられる (J. Am. Chem. Soc., 143, 16458-16469 (2021))。本研究は、グアニン四重らせん構造による遺伝子発現を制御する分子開発において新規の概念を提唱しており、脳疾患の合理的な薬剤設計にも活用できると期待されることから、掲載号の表紙 (Supplemental Cover) としても採択された。**

ファイトケミカルは植物に由来する化合物群であり、ヒト細胞内では作り出すことのできない特徴的な化学構造を持つものも多い。ファイトケミカルの中には、生物活性を示すものも存在しており、歴史的に創薬のリード化合物として活用されてきた。近年、一部のファイトケミカルが示す生物活性が、細胞内の RNA に結合することで発揮されている可能性が示唆されている。どのようなファイトケミカルがどのような RNA 分子と相互作用するのかを解析することにより、ファイトケミカルが示す生物活性の分子機構を解明し、SNAPS を調節し得る STAr Material の開発に活用することを試みた。モデルとなるファイトケミカルとしてベルベリンに着目し、ベルベリンと相互作用する RNA を、本研究課題でこれまでに開発した RNA キャプチャー微粒子群 (R-CAMPs) により探索した。その結果、ベルベリンが「UCG」と「UA」の塩基配列が向き合って形成される RNA の二次構造領域に選択的に結合

することを見出した。この研究成果により、ファイトケミカルによる RNA への直接的な相互作用が示され、ファイトケミカルが SNAPS を制御できる可能性が示唆された。本研究によりベルベリンと RNA の複合体構造が明らかになったことにより、**ベルベリンの化学構造を基に、より強く RNA に結合し、SNAPS を調節する STAR Material を合理的に設計できるようになると期待される。本研究成果は次世代の RNA 構造を標的とした創薬研究にもつながるとして注目され、英国核酸化学誌「Nucleic Acids Research 誌」に掲載されるとともに、掲載号の表紙に採択された (Nucleic Acids Res., 49, 8449–8461 (2021))。**

以上のように、SNAPS を調節し得る STAR Material を「創る」研究により、人工分子の開発も進んできた。さらに 2021 年度は、「制す」研究にも着手しており、成果が得られつつある。

細胞の中に存在する機能性 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) は、遺伝子発現を制御するなど、生体内で重要な役割を果たしている。miRNA は個体の発生などの生命現象に重要な役割を果たすだけでなく、がんや神経変性疾患などの発症および進行に関わることも示唆されているため、疾患発症抑制や治療のための創薬標的として注目されている。miRNA は細胞内で miRNA 前駆体 (pre-miRNA) からタンパク質による切断を受けて成熟する。pre-miRNA はそのほとんどがステムループ型の二次構造を有しており、この構造が miRNA へ成熟する際にタンパク質に認識される。個々の pre-miRNA のステム領域にはそれぞれに特徴的な塩基対の並びが存在している。この塩基対の並びを特異的に認識して強く結合できる分子を構築できれば、特定の pre-miRNA の機能を阻害することができると考えられる。そこで、miRNA の二重らせん領域 (ステム領域) を特異的に認識して三重らせん構造を形成する人工核酸 (Peptide Nucleic Acid (PNA)) を開発した。具体的には、癌細胞の増殖や炎症性の皮膚疾患などとの関連性が報告されている miRNA (miR-197) を標的に三重らせん構造を形成する PNA の設計、合成を行い、細胞内で pre-miR-197 から miR-197 への成熟反応を抑制できることを実証した。近年、miRNA 自身の構造多型が、その機能発現に影響を及ぼし得ることも報告されつつある。つまり、miRNA は SNAPS としての特性を示し、疾患の発症などに関与していると考えられる。**本研究成果を活用し、人為的に miRNA の構造多型 (ステムループ型と三重らせん構造との間での構造多型) を誘起することで、任意の miRNA の成熟反応とその機能を特異的に制御する汎用性の高い創薬技術へ研究を展開できると期待される。本研究成果は、新たな miRNA の制御技術への展開が注目され、米国**

化学会誌「ACS Chemical Biology 誌」に掲載され、掲載号の Supplementary Cover にも採択された (ACS Chem. Biol., 16, 1147-1151 (2021))。

以上のように、2021 年度は SNAPS を「知る」研究のみならず、「創る」研究や「制す」研究に関する研究成果も得ることができ、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 9 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 (*Nucleic Acids Res.*, 49, 8449-8461 (2021)、*ACS Chem. Biol.*, 16, 1147-1151 (2021)、*J. Am. Chem. Soc.*, 143, 16458-16469 (2021)、*Chem. Commun.*, 58, 48-51 (2022)、*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 94, 1970-1998, (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。2020 年度に引き続き 2021 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だけでなく、非二重らせん構造に特異的に結合する分子の開発や、非二重らせん構造結合分子を用いた細胞内での機能制御も達成することができた。

いずれの研究成果も学術的に高く評価されており、2021 年度の 1 年間で、Journal of the American Chemical Society 誌、Nucleic Acids Research 誌など国際的な一流学術誌をはじめ、**学術論文・著書・総説など 9 報 (うち雑誌の表紙 5 件)、学会発表 26 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詳細を報告する。また、本研究に関する 2021 年度における成果一覧は、「6. 研究成果の公表」にまとめている。

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) S. Matsumoto, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, and N. Sugimoto

Effect of DNA modifications on the transition between canonical and non-canonical DNA structures in CpG islands during senescence

RSC Adv., **11**, 37205-37217 (2021)

細胞老化は神経変性疾患などの脳疾患の発症の一因にもなることが示されている。また、老化細胞の特徴として、分子クラウディングの度合いが低下していることや、イオンチャネルの発現異常によりカリウム濃度が低下することなどが報告されている。老化の過程では、DNAの修飾のパターンと修飾の度合いにより遺伝子の発現が精密に制御されている。DNAの主要なエピジェネティック修飾である5-メチルシトシン(5mC)と5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)は、CpGサイトを標的とする。重要なことは、CpGアイランドには、GCリッチな配列が含まれており、i-モチーフやグアニン四重らせん構造のようなDNAの非標準構造を形成する可能性があることである。本研究では、5mCおよび5hmCの修飾が、二重らせんとi-モチーフおよびグアニン四重らせん構造の間の遷移に及ぼす影響について、老化細胞内を模倣した環境下で調べた(図1-1)。まず、老化した細胞内のモデル溶液として、100mM NaCl及び0 wt% PEG200、正常細胞内のモデル溶液として100mM KCl及び40 wt% PEG200を採用し、それぞれの環境下におけるi-モチーフとグアニン四重らせんの安定性と構造を調べた。その結果、修飾は安定性にほとんど影響を与えないことがわかった。しかし、興味深いことに、修飾によって、分子クラウディング剤とカチオンによるグアニン四重らせんの(不)安定化効果が弱まることを見出された。円偏光二色性分析の結果、分子クラウディングやカチオンの種類などの周辺環境がグアニン四重らせんのトポロジーを制御していることがわかったが、5mCも5hmCもほとんど影響を与えなかった。

その一方で、修飾によって二重らせんと四重らせんの間の遷移が変化した。老化細胞内を模倣した環境下では、非修飾DNAは四重らせんと二重らせんの両方を形成する一方で、5mCや5hmC修飾をもつDNAは二重らせんを優位に形成す

ることが明らかになった（図 1-2）。一方、修飾の有無にかかわらず、正常細胞を模倣した環境下では四重らせん構造を形成しやすいことが見出された（図 1-2）。

さらに、老化過程で高メチル化または低メチル化状態になる CpG アイランドの配列中の四重らせん形成配列を探索し、四重らせん形成配列の有無でその CpG アイランドを持つ遺伝子の機能を調べたところ、CpG 領域に四重らせん形成配列を持つ遺伝子と持たない遺伝子の間に機能の違いが見られた。これらの結果は、老化過程でのエピジェネティックな修飾による遺伝子発現制御を理解するためには、DNA の標準構造と非標準構造との間の遷移を考慮することが重要であることを示している。**この成果は神経変性疾患などの脳疾患の一因になる老化を、SNAPS がどのように促進しているのかを理解するための基礎的な知見を示したものである。**

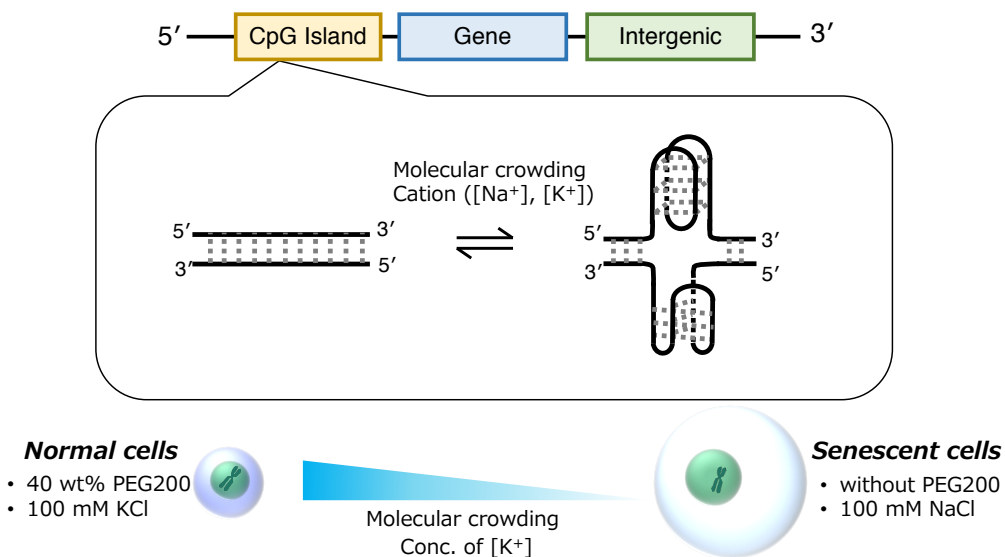


図 1-1. 老化によって引き起こされる細胞内環境の変化による CpG アイランド上での二重らせん構造と四重らせん構造間の遷移

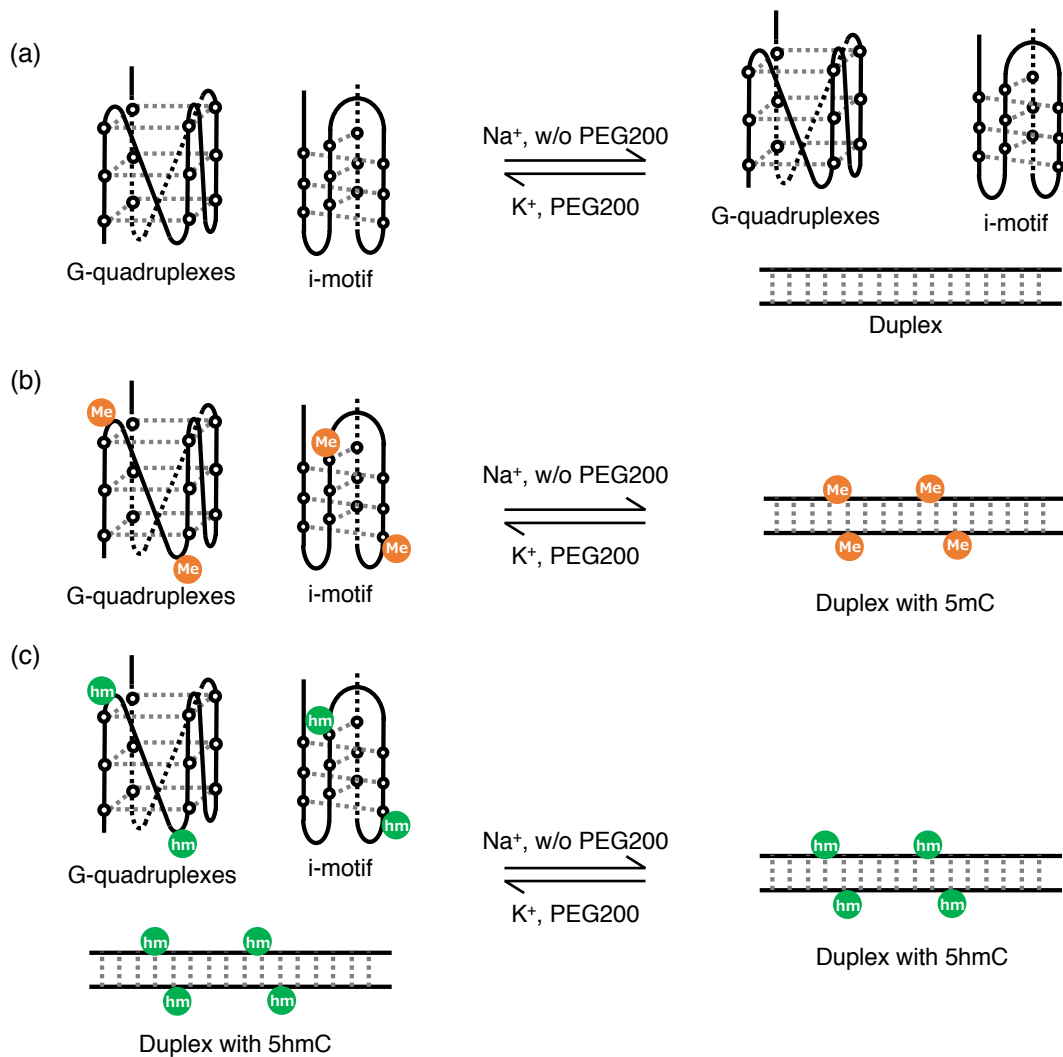


図 1-2. 正常細胞および老化細胞を模倣した環境下における(a)非修飾 DNA、(b)メチル化 DNA、(c)ヒドロキシメチル DNA の二重らせん構造と四重らせん構造間の遷移

(2) W. Sugimoto, N. Kinoshita, M. Nakata, T. Ohyama, H. Tateishi-Karimata, T. Nishikata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, and K. Kawauchi

Intramolecular G-quadruplex-hairpin loop structure competition of a GC-rich exon region in the TMPRSS2 gene

Chem. Commun., **58**, 48-51 (2022) (Front Cover に採択)

新型コロナウイルス (SARS CoV-2) やインフルエンザウイルスなど、ウイルスがヒトに感染する際には、ヒト細胞表面にあるタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) TMPRSS2 によって、ウイルスのスパイクタンパク質が分解される。本研

究では、核酸構造がウイルス感染に及ぼす影響を解明するために、*TPRSS2* を含むプロテアーゼのゲノム上のグアニン四重らせん形成配列とその周辺の配列を解析した。グアニンに富んだ (G-rich) 配列は、4 つのグアニン塩基の間に Hoogsteen 塩基によってグアニンカルテットを形成し、四重らせん構造を形成する。テロメアの 3' 末端を除いて、ゲノム上のグアニン四重らせん形成配列はすべて相補的な配列を持ち、二重らせん構造を形成している。そのため、G-rich 配列のグアニン四重らせん構造と C-rich 配列から成る i-motif 四重らせんは、分子間二重らせん構造と競合する。まず、我々は、プロテアーゼ遺伝子において、G-rich 領域に隣接する C-rich 領域を同定した。*TPRSS2* 遺伝子に由来する典型的な GC リッチ配列を解析した結果、グアニン四重らせん構造とヘアピンループの構造的競合が見られ、分子クラウディングやイオン濃度変化など、細胞内の環境変化に応じて構造を変化させることがわかった。さらに、このような構造変化は、*TPRSS2* 遺伝子の転写効率に大きく影響していた。これらの結果を基にヒトプロテアーゼの遺伝子上のグアニン四重らせん構造形成可能な配列と、その周辺の C-rich な塩基配列を解析した。その結果、多くのヒトプロテアーゼ遺伝子のグアニン四重らせん構造形成可能な配列の周辺には C-rich な領域が存在していることがわかった。この結果は、G-rich 配列の構造は、隣接する C-rich 配列との相互作用し、環境に応じて構造を変化させ、遺伝子発現に影響していることを示唆している (図 2)。本研究成果により、**ウイルス感染機構においても SNAPS が重要な役割を果たしていることが示された。**

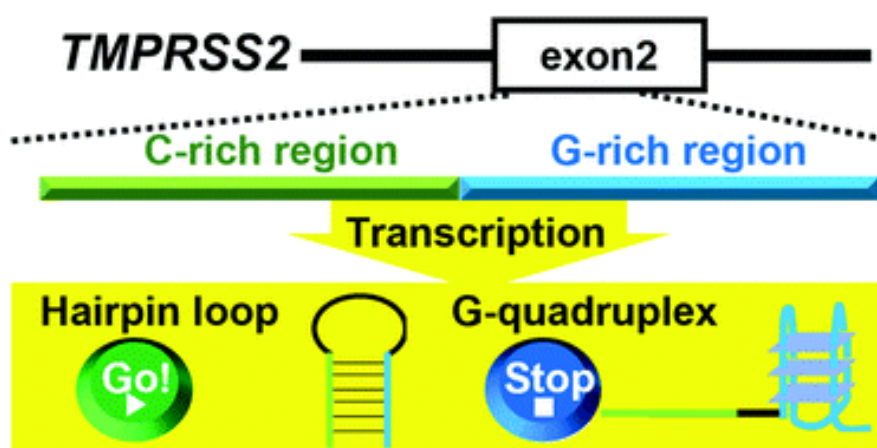


図 2. *TPRSS2* 遺伝子中の GC-rich 配列は、グアニン四重らせん構造とヘアピンループの間の構造競合を示し、この競合は転写効率に影響を及ぼす。

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

Roles of non-canonical structures of nucleic acids in cancer and neurodegenerative diseases

Nucleic Acids Res., 49, 7839–7855 (2021)

がんや神経変性疾患は、遺伝的および環境的な要因によって引き起こされる。腫瘍抑制遺伝子の発現は、突然変異やエピジェネティックサイレンシングによって抑制される。一方で、神経変性疾患関連遺伝子は、核酸の塩基変異による誤ったタンパク質配列によるタンパク質機能の喪失や、疾患遺伝子の反復配列からの転写変異や毒性ペプチドの産生により神経変性疾患の発症や進行に関与する。これらの疾患は、生活習慣や放射線被曝などにより損傷を受けた遺伝子やタンパク質が引き金となって発症する場合もある。最近の研究では、周辺の環境変化に応答した核酸の非二重らせん構造の形成が、疾患関連遺伝子の発現を制御することが明らかにされつつある。非二重らせん構造は、転写や翻訳による遺伝子発現の制御、クロマチンのエピジェネティックな制御、DNAの組み換えなど、多くの細胞機能に関わっている。

例えば、がん遺伝子の発現にかかわる転写を開始する領域の DNA に非二重らせん構造が形成されると、転写が阻害される。また、転写途中の領域に非二重らせん構造が形成されると転写変異が誘発される。また、このような非二重らせん構造による阻害は翻訳反応においても行われている（図 3-1）。一方で、神経変性疾患に関わる遺伝子上でも、転写開始領域や翻訳領域における非二重らせん構造の形成が、翻訳を阻害することが見出されている。さらに、複製途中における非二重らせん構造の形成は、異常な配列の伸長を引き起こし、細胞毒性を有するタンパク質やペプチド、RNAの生産を増大させる。さらに、神経変性疾患に関わる遺伝子から転写された RNA はペプチドなどと凝集体を形成して細胞毒性を示すが、凝集体の形成にも RNA の構造が重要である（図 3-2）。これらのように、非二重らせん構造は、がんや神経変性疾患の進行過程に関わっている。それゆえ、核酸の非二重らせん構造を制御できれば、疾患に関わる生体反応を制御できると考えられ、創薬分野から非二重らせんを制御する技術の開発が注目されている。本総説ではこのような、疾患関連遺伝子における核酸の非二重らせん構造が、疾患の発症や進行に及ぼす影響について概説した。

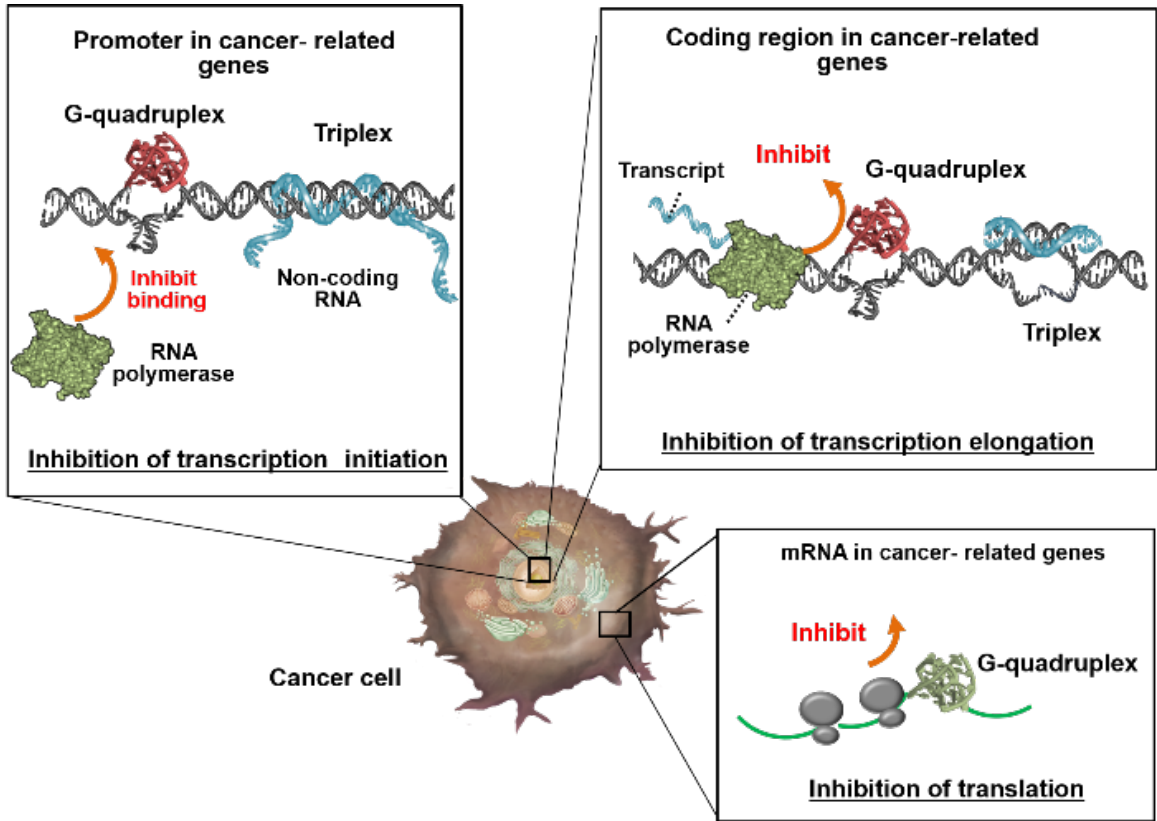


図 3-1. 非二重らせん核酸によって制御されるがん細胞内の生体反応

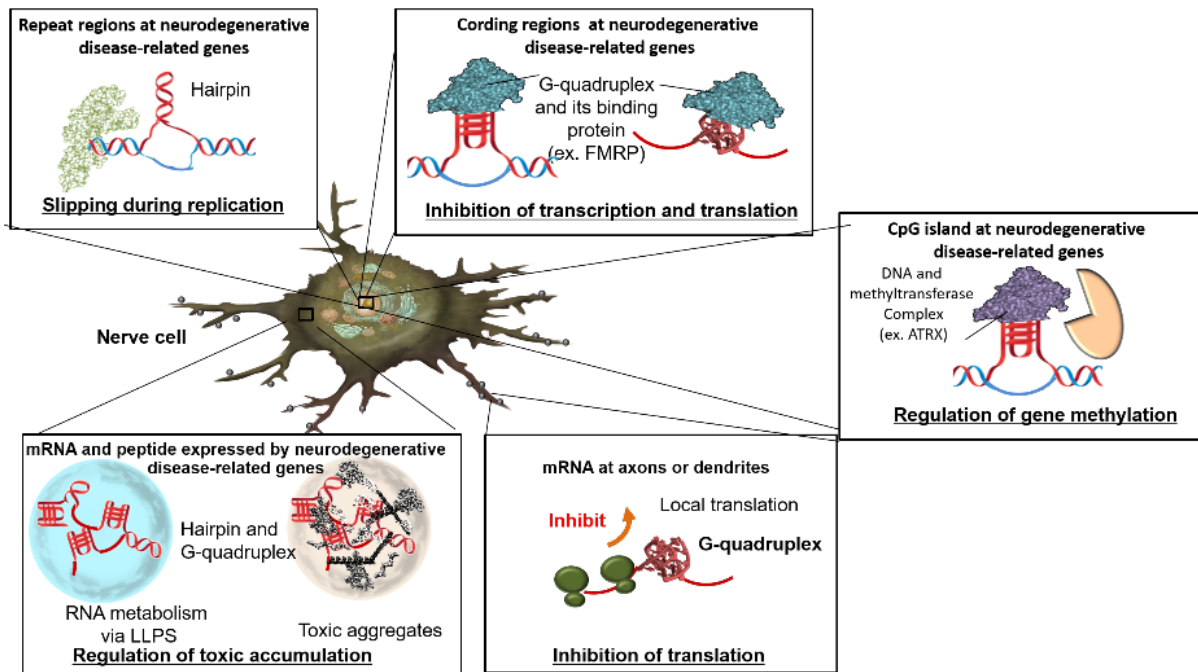


図 3-2. 非二重らせん核酸が神経変性疾患細胞内の生体反応や細胞毒性に及ぼす影響

(4) N. Sugimoto, T. Endoh, S. Takahashi, and H. Tateishi-Karimata

Chemical Biology of Double Helical and Non-Double Helical Nucleic Acids: “To B or Not To B, That Is the Question”

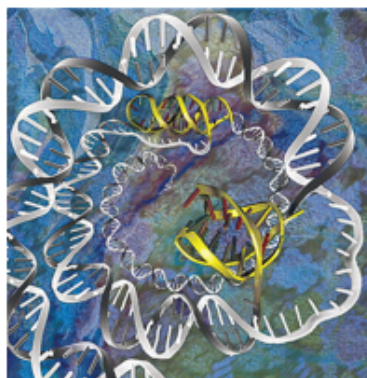
Bull. Chem. Soc. Jpn., **94**, 1970-1998 (2021) (Back Cover に採択)

核酸は、標準的な構造である二重らせん構造だけでなく、三重らせん、グアニン四重らせん、i-モチーフなどの非二重らせん構造も形成する。細胞は、核酸 (DNA や RNA)、タンパク質などの生体分子を細胞内環境で機能化させることで高度な生命活動を行っている。細胞内は、核やミトコドリアなどの細胞小器官、可溶・不溶のタンパク質が混在した分子クラウディング環境下である。研究代表者である杉本は、細胞内の特殊な分子クラウディング環境が生体分子の機能化において重要な役割を担っているのではないかという独自の仮説の下で研究を遂行してきた。その結果、細胞内の分子クラウディング環境は、核酸の二重らせん構造を不安定化させ、非二重らせん構造の形成を誘起することが示された。さらに、これらの核酸構造変化は、遺伝子発現を制御しているという新規の遺伝子発現調節機構を見出した。また、これらの成果を基に、非二重らせん核酸を標的とした新しい遺伝子発現制御法を開発し、世界の核酸化学を先導した。これらの功績を基に、研究代表者は、「分子クラウディング環境における非二重らせん核酸の化学」の研究で、2019 年度第 72 回「日本化学会賞」を受賞した。本総説では、本受賞内容と非二重らせん核酸に関するこれまでの研究や近年の研究動向を Award Accounts としてまとめた (図 4)。

Chemical Biology of Double Helical and Non-Double Helical Nucleic Acids: “To B or Not To B, That Is the Question”

Naoki Sugimoto, Tamaki Endoh, Shuntaro Takahashi, and Hisae Tateishi-Karimata

<https://doi.org/10.1246/bcsj.20210131>



Nucleic acids store genetic information in canonical B-type double helices and direct biological functions through non-B-type highly-ordered structures. We described historical attempts, involving physicochemical analyses of structure and stability of nucleic acids, and our attempts to understand biological functions of nucleic acids, to explain underlying mechanisms based on their behaviors, considering that their dynamics depend on the surrounding molecular environment.

図 4. *Bull. Chem. Soc. Jpn* 誌において Award Accounts として取り上げられた。

(5) S. Takahashi, S. Matsumoto, P. Chilka, S. Ghosh, H. Okura, and N. Sugimoto

Dielectricity of a molecularly crowded solution accelerates NTP misincorporation during RNA-dependent RNA polymerization by T7 RNA polymerase

Sci. Rep., **12**, 1149 (2022)

新型コロナウイルスをはじめ、ウイルスの変異株の出現は現在大きな問題となっている。変異は遺伝子である核酸（DNA や RNA）がポリメラーゼによって誤って複製されることで生じる。この複製反応は、ワトソンとクリックが 1953 年に発見した核酸の化学的相補性という基本原理に基づいて行われているが、変異が生じるメカニズムは未だ明らかにされていない。

生体内では様々な環境下で、DNA や RNA などの核酸の合成がポリメラーゼにより触媒されている。ポリメラーゼが示す基質特異性はアミノ酸残基の化学的性質に由来するため、溶液環境の擾乱によって合成反応の忠実度が変化する可能性がある。そこで本研究では、様々な分子量のポリエチレングリコール（PEG）を用いて溶液の物性を系統的に変化させ、溶液の物性がポリメラーゼ伸長反応の忠実度に及ぼす影響を調べた。PEG 存在下で T7 RNA ポリメラーゼ（T7 RNAP）による RNA 伸長反応を検討した（図 5-1）。その結果、PEG 存在下では RNA の

ミスマッチ伸長が下流の重合にも伝播していくことが明らかとなった (図 5-2)。さらに、PEG は主に溶液の誘電率を低下させることにより、非相補的なヌクレオシド三リン酸 (NTP) の重合を促進することも明らかになった。これらの結果から、T7 RNAP による RNA 依存性 RNA 伸長反応のミスマッチ伸長は、プライマー末端の塩基と基質となる NTP の間の塩基対形成ではなく、スタッキング相互作用によって駆動されていることが示された。このように、RNA ポリメラーゼは、分子クラウディング条件による誘電率の変化で異なる基質特異性を示す。すなわち、ウイルスはポリメラーゼの変異による基質特異性を変化させることなく、環境で遺伝子の多様性を高めている可能性がある。この成果はウイルスなどにおける RNA 伸長反応が周辺環境に影響を受けることで生じる、SNAPS 現象を明らかにするものであり、ウイルスの変異の出現機構や生命の進化のメカニズムの解明が期待される。

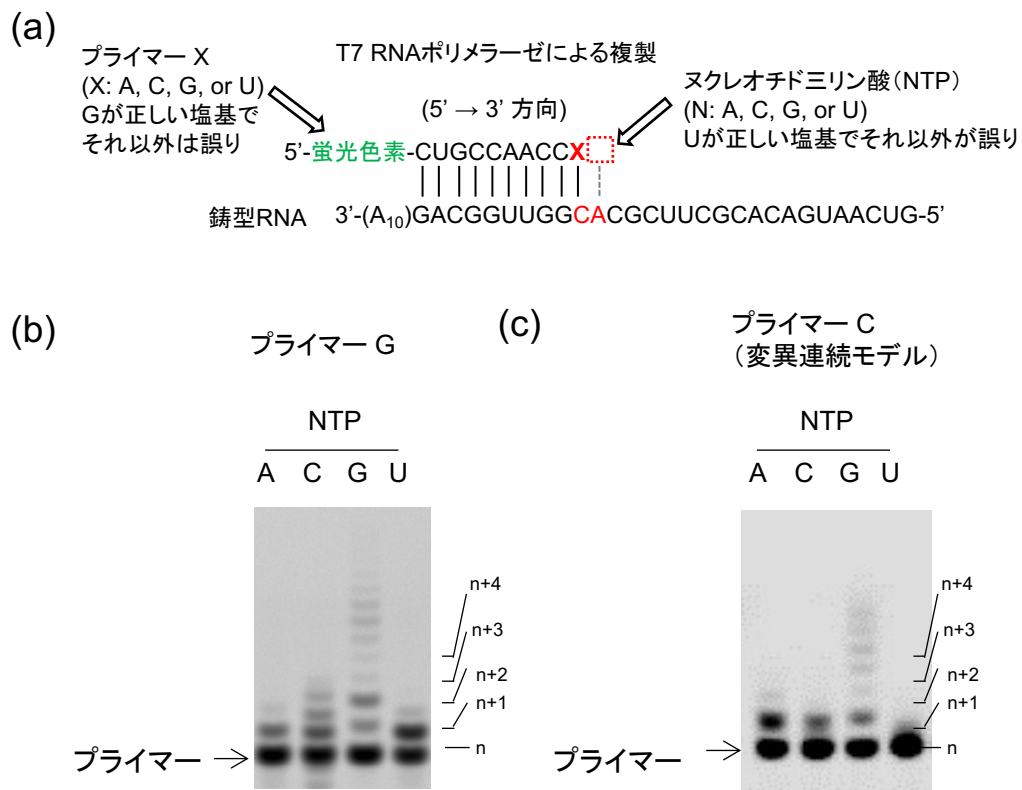


図 5-1. 本研究で用いた RNA 伸長反応の概要図と結果。(a) プライマーと鋳型 RNA の二重らせん構造を予め形成し、ポリメラーゼ (T7 RNAP) とヌクレオシド三リン酸 (NTP) 1 種類を添加することによりプライマーからの RNA 伸長反応を開始する。(b) 20 wt% の PEG200 存在下での RNA 伸長反応をプライマー G を

用いて行った結果及び(c) 20 wt%の PEG200 の存在下での RNA 伸長反応をプライマーCで行なった結果。

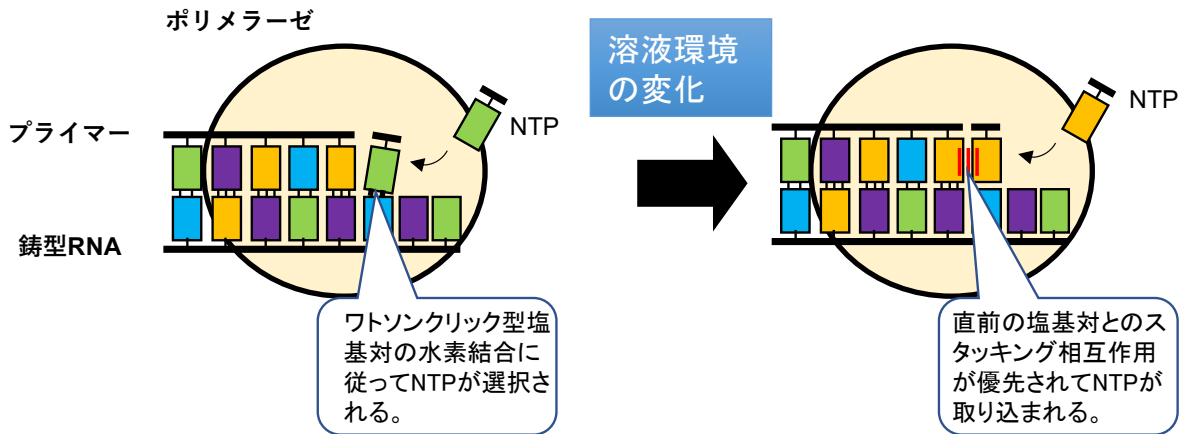


図 5-2. ポリメラーゼによる遺伝子複製エラーが生じるメカニズムの概略図

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。

- (6) S. Takahashi, A. Kotar, H. Tateishi-Karimata, S. Bhowmik, Z. Wang, T. Chang, S. Sato, S. Takenaka, J. Plavec, and N. Sugimoto

Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding

J. Am. Chem. Soc., **143**, 16458-16469 (2021) (Supplementary Cover に採択)

がん細胞では寿命を司る染色体 DNA 末端のテロメア領域が異常に伸長されることで、不死化状態にある。そのため、テロメアの伸長を抑える分子の開発は、がんの進行を抑制する薬剤になると期待されている (図 6-1)。テロメア領域はグアニンに富んだ配列を有し、グアニン四重らせん構造を形成することが知られている。グアニン四重らせんに結合して安定化させ、DNA の伸長反応 (複製) を制御する分子は、がんの治療薬として期待されている。グアニン四重らせんにはいくつものトポロジーがあるため、その特定のタイプに結合する分子は、特定の遺伝子のみの複製を優先的に制御する能力を持つと考えられる。ここでは、グアニン四重らせん構造に結合する分子が、鋳型 DNA 上のグアニン四重らせん構造の

異なるトポロジーに応じて、鋳型 DNA の複製を阻害することを実証した。例えば、ナフタレンジイミド誘導体は、ヒトテロメア由来のハイブリッド型のグアニン四重らせんに対して、G カルテットへの結合に加え、ループ領域との間に追加的な相互作用が形成して効率的に複製を抑制することができた。このような効果を定量的に解析するために、「Quantitative Study of Topology-dependent Replication (QSTR)」と呼ばれる独自の手法を開発した (図 6-2)。QSTR は、複製速度とグアニン四重らせんの安定性の関係性から、グアニン四重らせんのトポロジー依存的に働く、結合分子を系統的に分類できる。それにより、グアニン四重らせんに結合する分子が複製の中間状態やグアニン四重らせんの巻き戻しの速度をどのように制御しているかを定量的に判断する指標 (インデックス) が示された。このように、**QSTR インデックスは、SNAPS をグアニン四重らせんのトポロジー依存的に制御できる STAr Material の設計を容易にするものであり、脳疾患の合理的な薬剤設計として期待される。本研究は、グアニン四重らせん構造による遺伝子発現を制御する結合分子の開発において新規の概念を提唱するものと評価され、掲載号の表紙 (Supplemental Cover) としても採択された。**

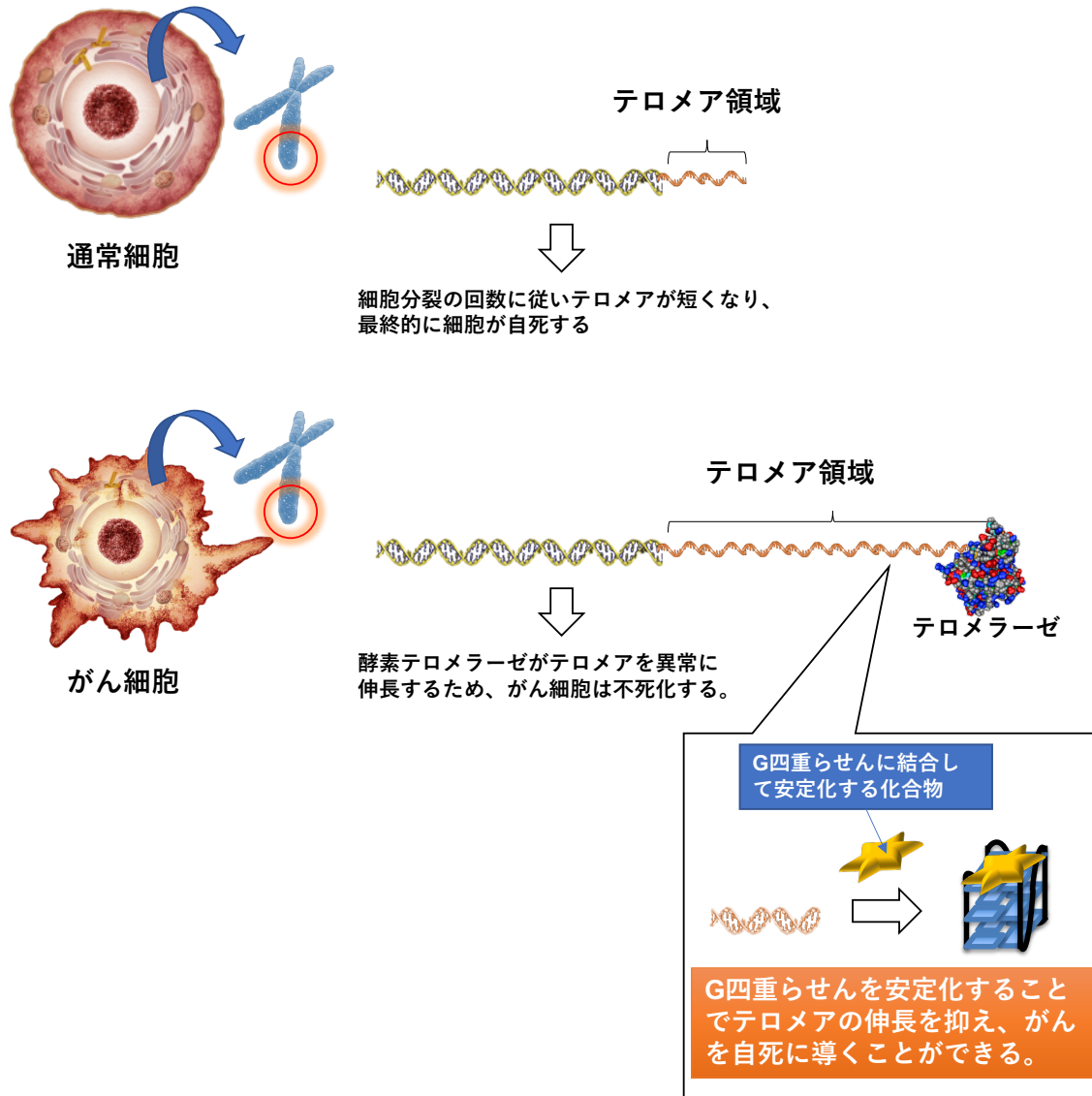


図 6-1. がん細胞における染色体末端のテロメア領域の異常伸長。化合物でグアニン四重らせんを安定化し、テロメア伸長を阻害することでがん細胞のアポトーシスを誘導できると期待される。

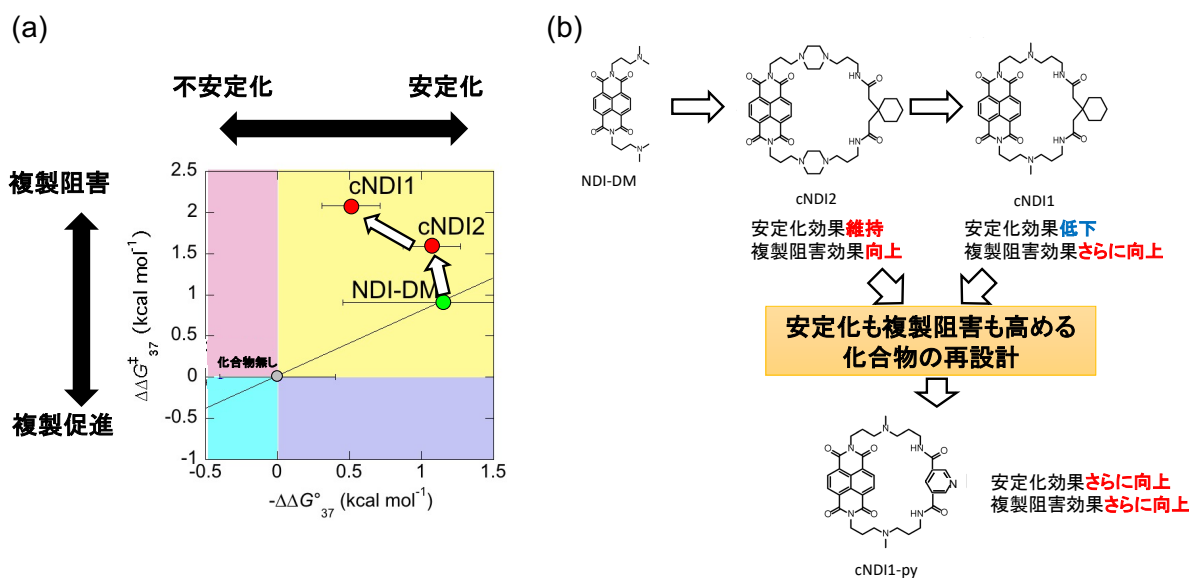


図 6-2. 本研究で開発したテロメアグアニン四重らせん構造に強力に結合する分子の設計指針。(a)複製速度とグアニン四重らせんの安定性の相関関係を評価するための QSTR のプロット。(b)ナフタレンジイミド誘導体 (NDI-DM) を基準とし、グアニン四重らせん構造の安定化効果と複製阻害効果の双方を高めた新規分子 (cNDI1-py) の開発に成功した。

(7) S. Satpathi, T. Endoh, P. Podbevšek, J. Plavec, and N. Sugimoto

Transcriptome screening followed by integrated physicochemical and structural analyses for investigating RNA-mediated berberine activity

Nucleic Acids Res., 49, 8449–8461 (2021) (Cover に採択)

ファイトケミカルと呼ばれる植物に由来する化合物群には、ヒトには作り出すことが出来ない特徴的な化学構造を持ったものが多く存在している。ファイトケミカルの中には、ヒトの健康状態などにも影響を与える生物活性を有するものが存在しており、歴史的に創薬のリード化合物として活用されてきた。近年、一部のファイトケミカルが示す生物活性が、細胞内の核酸分子である RNA に直接的に結合することで引き起こされている可能性が議論され始めている。ファイトケミカルが核酸分子の構造を認識して相互作用するのであれば、化学修飾などを行うことで、特定の核酸構造を誘起したりその安定性を変動させたりする人工分子へ拡張できると考えられる。そのため、どのようなファイトケミカルがどのような RNA 分子と相互作用する可能性があるのかを解析していくことは、ファイト

ケミカルが示す生物活性の分子機構を解明するだけでなく、SNAPS を調節し得る STAr Material の開発に活用できると期待される。

本研究では、モデルとなるファイトケミカルとして、抗菌活性、抗炎症作用などを示すことが知られるベルベリンに着目し、ベルベリンが相互作用する RNA をヒト由来の RNA の中から選別することを試みた。本研究課題で開発された RNA キャプチャー微粒子群 (R-CAMPs) を活用し、ベルベリンが結合する RNA の選別を行った (図 7-1)。具体的には、ヒトのがん細胞株に由来する RNA (トランスクリプトーム) を基に、断片化された RNA が個別に固定化された R-CAMPs を調製した。そして、R-CAMPs とベルベリンを混合し、ベルベリンの蛍光シグナルに基づいて、ベルベリンが相互作用する RNA を固定化した R-CAMPs の選別を行った。得られた RNA の配列を解析し、ベルベリンの相互作用領域の絞り込みを行った。その結果、ベルベリンが「UCG」と「UA」の塩基配列が向き合って形成されるシンプルな RNA の二次構造領域に選択的に結合することを見出した。また、その結合定数は 25 °C で $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上で、RNA を 2 kcal mol^{-1} ほど安定化することも明らかにした。さらに、国際共同研究を行い、RNA とベルベリンが結合した状態の構造解析を行った。その結果、シトシン (C) がはみ出して形成されるバルジ構造にはまり込むようにベルベリンが結合することを明らかにした。この研究成果により、ベルベリンが RNA に直接相互作用することで生物活性を発現している可能性を示すことができた (図 7-2)。つまり、ファイトケミカルによる RNA への直接的な相互作用が、SNAPS の一端を担っている可能性がある。さらに、本研究によりベルベリンと RNA の複合体構造が明らかになったことから、**ベルベリンの化学構造を基に、より強く RNA に結合して SNAPS を調節する STAr Material を合理的に設計できるようになると期待される。本研究成果は、次世代の RNA 構造を標的とした創薬研究にもつながる研究成果として注目され、英国核酸科学誌「Nucleic Acids Research 誌」に掲載されるとともに、掲載号の表紙に採択された。**

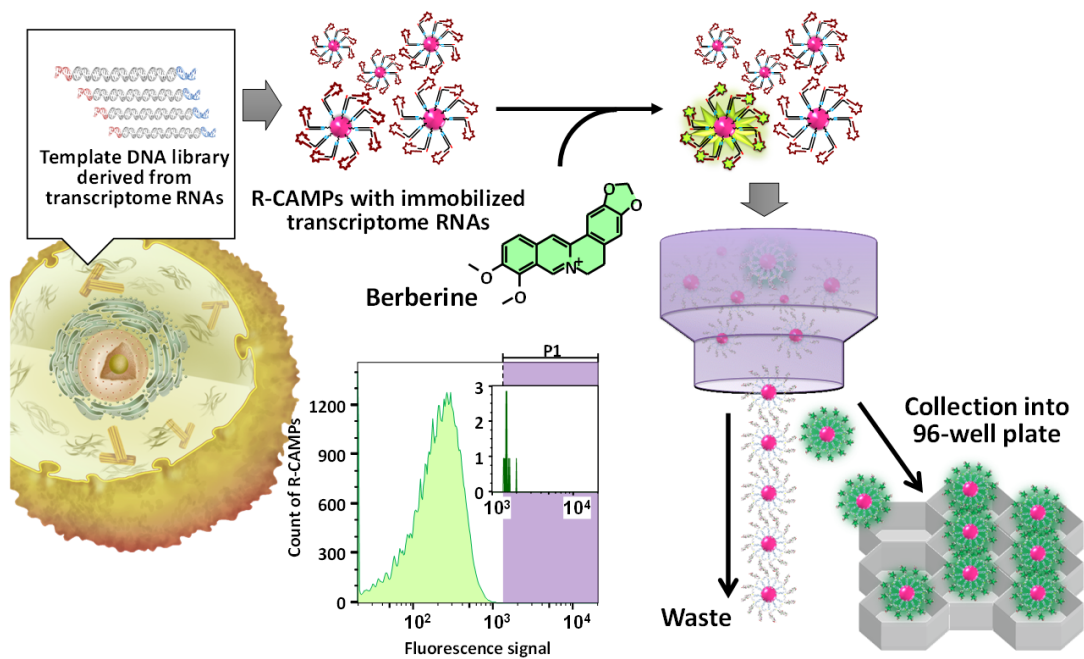


図 7-1. R-CAMPs を用いたベルベリンが結合する RNA のセレクション

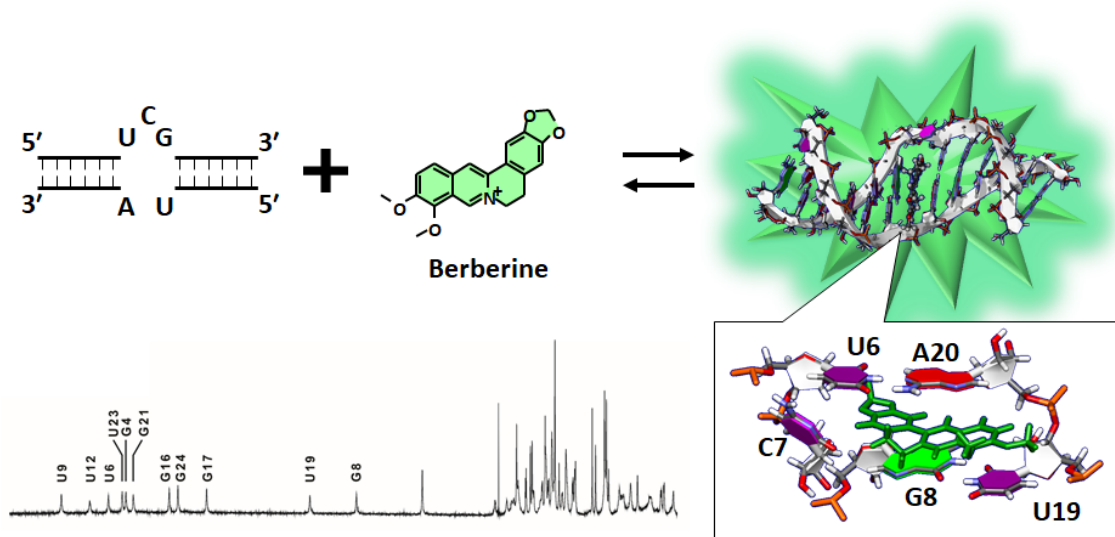


図 7-2. NMR 分光法によるベルベリン/RNA 複合体の 3 次構造

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。

(8) T. Endoh, N. Brodyagin, D. Hnedzko, N. Sugimoto, and E. Rozners

Triple-Helical Binding of Peptide Nucleic Acid Inhibits Maturation of Endogenous MicroRNA-197

細胞の中には、マイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる機能性 RNA が存在しており、ヒトに限っても現在までに 2000 種類以上の miRNA がデータベースに登録されている。miRNA は、生物としての機能 (個体の発生など) に重要な役割を果たしているだけでなく、がんや神経疾患などの発症と進行とも関連していることが示されている。そのため、疾患の発症を抑制したり、治療したりするための新たな創薬標的として、miRNA が注目を集めている。miRNA の構造特性として、細胞内で合成される miRNA 前駆体 (pre-miRNA) のほとんどが、ステムループ型の二次構造を形成することが挙げられ、pre-miRNA から miRNA への成熟反応に関わるタンパク質による認識にも必要な基本構造となっている。個々の pre-miRNA のステム領域には、それぞれに特徴的な塩基対の並びが存在しているため、この塩基対の並びを特異的に認識して強く結合できる分子を構築できれば、特定の pre-miRNA の機能を阻害することができると想定される (図 8-1)。

本研究では、米国ニューヨーク州立大学ビンガムトン校の Eriks Rozners 教授のグループとの国際共同研究を行い、miRNA の二重らせん領域 (ステム領域) を特異的に認識して三重らせん構造を形成する人工核酸 (Peptide Nucleic Acid (PNA)) を開発した。具体的には、がん細胞の増殖や炎症性の皮膚疾患などとの関連性が報告されている miRNA (miR-197) を標的に三重らせん構造を形成する PNA の設計、合成を行った (図 8-2A)。合成した PNA と pre-miR-197 の二重らせん領域との相互作用を細胞外で評価したところ、その結合定数は $2.76 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ で、非常に高い親和性を有することが示された (図 8-2B)。また、miRNA の成熟に関与するタンパク質による pre-miR-197 の切断活性を評価したところ、PNA が三重らせん構造を形成することで切断反応が阻害されることを見出した (図 8-2C)。さらに、細胞内で pre-miR-197 から miR-197 への成熟を抑制できることを実証した。具体的には、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞に PNA をエレクトロポレーションで導入し、内在性の成熟型 miR-197 の発現量を定量的に解析した。その結果、PNA を導入することで、細胞内で成熟 miR-197 の存在量を低下させることができた。近年、miRNA 自身の構造多型が、その機能発現に影響を及ぼし得ることも報告されつつある。つまり、miRNA は SNAPS としての特性を示し、疾患の発症などに関与していると考えられる。 **本研究成果を活用し、人為的に miRNA の構造多型 (ステムループ型と三重らせん構造との間での構造多型)**

を誘起することで、任意の miRNA の成熟と機能を特異的に制御する汎用性の高い創薬技術へ研究を展開できると期待される。本研究成果は、新たな miRNA の制御技術への展開が注目され、米国化学会誌「ACS Chemical Biology 誌」に掲載され、掲載号の Supplementary Cover にも採択された。

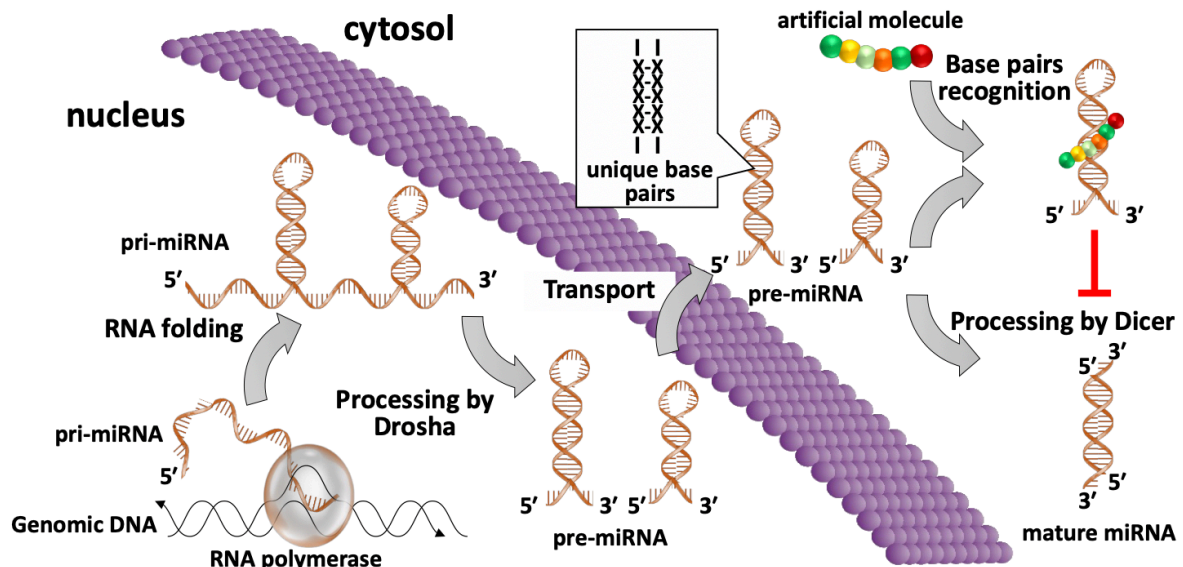


図 8-1. ペプチド核酸を用いた三重らせん形成による miRNA 成熟阻害の模式図

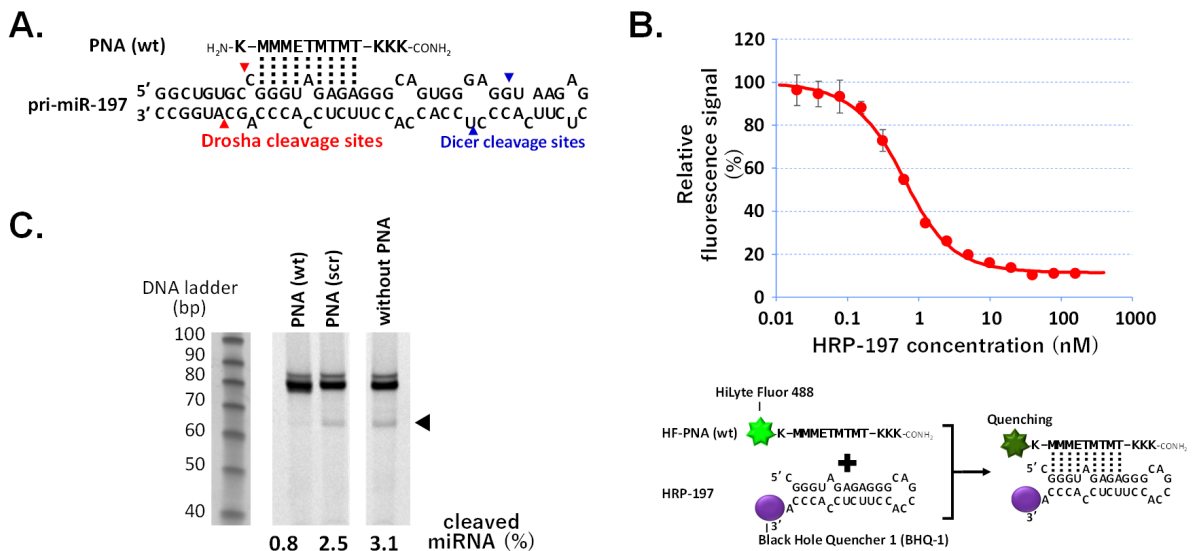


図 8-2. miR-197 に三重らせん形成による PNA の設計と miRNA の成熟阻害能の評価

7. 主な発表論文等

【雑誌論文】

計 9 件（うち査読付き論文 9 件／うち国際共著 3 件／うちオープンアクセス 2 件）

1. S. Satpathi, T. Endoh, P. Podbevšek, J. Plavec, and N. Sugimoto
Transcriptome screening followed by integrated physicochemical and structural analyses for investigating RNA-mediated berberine activity
Nucleic Acids Res., **49**, 8449–8461 (2021) **(Front Cover に採択)** < 査読有 >
2. T. Endoh, N. Brodyagin, D. Hnedzko, N. Sugimoto, and E. Rozners
Triple-Helical Binding of Peptide Nucleic Acid Inhibits Maturation of Endogenous MicroRNA-197
ACS Chem. Biol., **16**, 1147-1151 (2021) **(Supplementary Cover に採択)** < 査読有 >
3. S. Takahashi, A. Kotar, H. Tateishi-Karimata, S. Bhowmik, Z.-F. Wang, T.-C. Chang, S. Sato, S. Takenaka, J. Plavec, and N. Sugimoto
Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding
J. Am. Chem. Soc., **143**, 16458-16469 (2021) **(Supplementary Cover に採択)**
< 査読有 >
4. S. Matsumoto, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, and N. Sugimoto
Effect of DNA modifications on the transition between canonical and non-canonical DNA structures in CpG islands during senescence
RSC Adv., **11**, 37205-37217 (2021) < 査読有 >
5. W. Sugimoto, N. Kinoshita, M. Nakata, T. Ohyama, H. Tateishi-Karimata, T. Nishikata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, and K. Kawauchi
Intramolecular G-quadruplex-hairpin loop structure competition of a GC-rich exon region in the Tmprss2 gene
Chem. Commun., **58**, 48-51 (2022) **(Supplementary Cover に採択)** < 査読有 >
6. H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto
Roles of non-canonical structures of nucleic acids in cancer and neurodegenerative diseases
Nucleic Acids Res., **49**, 7839-7855 (2021) < 査読有 >

7. N. Sugimoto, T. Endoh, S. Takahashi, and H. Tateishi-Karimata
Chemical Biology of Double Helical and Non-Double Helical Nucleic Acids: “To *B* or Not To *B*, That Is the Question”
Bull. Chem. Soc. Jpn., **94**, 1970-1998 (2021) < 査読有 >
8. 高橋俊太郎、杉本直己
細胞内での核酸の挙動を明らかにする熱力学的解析
熱測定, **49**, 14-19 (2022) < 査読有 >
9. S. Takahashi, S. Matsumoto, P. Chilka, S. Ghosh, H. Okura, and N. Sugimoto
Dielectricity of a molecularly crowded solution accelerates NTP misincorporation during RNA-dependent RNA polymerization by T7 RNA polymerase
Sci. Rep., **12**, 1149 (2022) < 査読有 >

[学会発表]

計 26 件（うち招待講演 3 件／うち国際学会 11 件）

1. 分子夾雑の生命科学 第 5 回領域会議, 杉本直己, 細胞夾雑模倣系の構築と細胞内活性分子設計指針の構築 (4), アクロス福岡 (オンライン参加), 2021 年 4 月 15 日～17 日
2. 第 70 回高分子討論会, 高橋俊太郎, 杉本直己, Mg^{2+} イオンによるグアニン四重鎖 DNA の構造ダイナミクス制御, オンライン開催, 2021 年 9 月 6 日～8 日
3. 第 15 回バイオ関連化学シンポジウム, 高橋俊太郎, 建石寿枝, 佐藤しのぶ, 竹中繁織, J. Plavec, 杉本直己, トポロジー依存的なリガンド結合でグアニン四重鎖の DNA 複製を制御する, オンライン開催, 2021 年 9 月 8 日～10 日
4. 第 15 回バイオ関連化学シンポジウム, 建石寿枝, 大山達也, 田中成典, 杉本直己, 神経変性疾患に係るリピーター RNA とペプチドの相互作用解析, オンライン開催, 2021 年 9 月 8 日～10 日
5. 第 15 回バイオ関連化学シンポジウム, 遠藤玉樹, N. Brodyagin, D. Hnedzko, E. Rozners, 杉本直己, 非天然塩基含有 PNA による三重らせん構造を介した miRNA の成熟阻害, オンライン開催, 2021 年 9 月 8 日～10 日
6. 第 62 回高圧討論会, 高橋俊太郎, 松本咲, 杉本直己, 高圧力を用いた RNA グアニン四重らせん構造の水和特性の解析, オンライン開催, 2021 年 10 月 18 日～20 日
7. 第 57 回熱測定討論会, 高橋俊太郎, 細胞内での核酸の挙動を明らかにする熱力

- 学解析, オンライン開催, 2021年10月27日 (依頼講演)
8. Nucleic Acid Secondary Structures G4s and Beyond, G4 webinar series Round VI, H. Tateishi-Karimata, Roles of G-quadruplexes in cancer cells on multi-dimensional response genome, オンライン開催, 2021年11月11日
 9. 第48回国際核酸化学シンポジウム, S. Ghosh, S. Takahashi, N. Sugimoto, Hydration parameters in nearest-neighbor model enables stability prediction for compositionally biased DNA duplexes in molecular crowding conditions, オンライン開催, 2021年11月10日～12日
 10. 第48回国際核酸化学シンポジウム, P. Chilka, S. Takahashi, N. Sugimoto, Application of nearest-neighbor model to the stability prediction of i-motif DNAs, オンライン開催, 2021年11月10日～12日
 11. 第48回国際核酸化学シンポジウム, T. Ohyama, H. Tateishi-Karimata, S. Takahashi, N. Sugimoto, Changes in the atomic-level behavior of G-quadruplex under high pressure conditions, オンライン開催, 2021年11月10日～12日
 12. 第48回国際核酸化学シンポジウム, S. Satpathi, T. Endoh, Y. Chen, S. Matsumoto, T. Ohyama, P. Podbevšek, J. Plavec, K. Onizuka, F. Nagatsugi, N. Sugimoto, Structure-based derivatization of berberine to improve its RNA binding affinity, オンライン開催, 2021年11月10日～12日
 13. 第48回国際核酸化学シンポジウム, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, G-quadruplex formation in cancer cells with different expression level of ion channels, オンライン開催, 2021年11月10日～12日
 14. 第48回国際核酸化学シンポジウム, T. Endoh, N. Brodyagin, D. Hnedzko, E. Rozners, N. Sugimoto, Triplex-forming peptide nucleic acid inhibits maturation of endogenous miRNA, オンライン開催, 2021年11月10日～12日
 15. 第48回国際核酸化学シンポジウム, S. Takahashi, A. Kotar, H. Tateishi-Karimata, S. Bhowmik, Zi-Fu Wang, Ta-Chau Chang, S. Sato, S. Takenaka, J. Plavec, N. Sugimoto, Chemical modulation of DNA replication by topology-dependent ligand binding on guanine quadruplexes, オンライン開催, 2021年11月10日～12日
 16. 第21回東北大学多元物質科学研究所研究発表会, S. Satpathi, T. Endoh, Y.

- Chen, S. Matsumoto, T. Ohyama, P. Podbevšek, J. Plavec, K. Onizuka, F. Nagatsugi, N. Sugimoto, Structure-based derivatization of berberine to improve the potency for targeting RNA structures, 東北大学片平さくらホール & Zoom ミーティング, 2021 年 12 月 9 日～10 日
17. International Conference on Chemical and Environmental Sciences 2021 (ICCAES 2021), S. Matsumoto, H. Tateishi-Karimata, O. Tatsuya, N. Sugimoto, Effect of DNA modifications on the changes of DNA structure in CpG islands, オンライン開催, 2021 年 12 月 17～19 日
 18. International Conference on Chemical and Environmental Sciences 2021 (ICCAES 2021), H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, Roles of non-canonical DNA structures in cancer cells on mechanism of dimensional response genome, オンライン開催, 2021 年 12 月 17～19 日
 19. Pacificchem2021, H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, N. Sugimoto, Regulation transcription by DNA structures responsive chemical stimulus in cells, オンライン開催, 2021 年 12 月 16～21 日
 20. 日本化学会第 102 回春季年会, 大山 達也・高橋 俊太郎・建石 寿枝・田中 成典・杉本 直己, 脱ワトソン・クリックの核酸化学 (77):高圧環境が DNA 非二重らせん構造に与える影響, オンライン開催, 2022 年 3 月 23 日～26 日
 21. 日本化学会第 102 回春季年会, S. Ghosh, S. Takahashi, T. Ohyama, T. Endoh, N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (80): Validation of the nearest-neighbor model for Watson-Crick RNA duplexes under molecular crowding condition, オンライン開催, 2022 年 3 月 23 日～26 日
 22. 日本化学会第 102 回春季年会, P. Chilka, S. Takahashi, N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (79): Application of the nearest-neighbor model for the stability prediction of intramolecular i-motif DNAs, オンライン開催, 2022 年 3 月 23 日～26 日
 23. 日本化学会第 102 回春季年会, S. Satpathi, T. Endoh, Y. Chen, S. Matsumoto, T. Ohyama, P. Podbevšek, J. Plavec, K. Onizuka, F. Nagatsugi, N. Sugimoto, Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (76): Structure-based Derivatization of Berberine to Improve the Potency for Targeting RNA Structures, オンライン開催, 2022 年 3 月 23 日～26 日

24. 日本化学会第 102 回春季年会, H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, T. Ohyama, H. Masaki, A. Natsume, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (73): Effect of G-quadruplex stability change on transcriptional repression in cancer cells*, オンライン開催, 2022 年 3 月 23 日～26 日
25. 日本化学会第 102 回春季年会, S. Matsumoto, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (74): Effect of DNA modifications on the transition between canonical and non-canonical DNA structures in CpG island*, オンライン開催, 2022 年 3 月 23 日～26 日
26. 日本化学会第 102 回春季年会, T. Endoh, J.-H. Tan, S.-B. Chen, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Chemistry beyond the Watson-Crick Double Helix (75): Development of RNA-ligand pairs for multicolor RNA imaging in cells*, オンライン開催, 2022 年 3 月 23 日～26 日

【図書】

計 1 件

1. N. Sugimoto, *Chemistry and Biology of Non-canonical Nucleic Acids*, **WILEY**, **288** (2021)

【産業財産権】

該当なし

[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>

S. Satpathi, T. Endoh, P. Podbevšek, J. Plavec, and N. Sugimoto

Transcriptome screening followed by integrated physicochemical and structural analyses for investigating RNA-mediated berberine activity

Nucleic Acids Res., 49, 8449–8461 (2021)

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

Nucleic Acids Research

VOLUME 49 ISSUE 15 2021

<https://academic.oup.com/nar>



OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Open Access

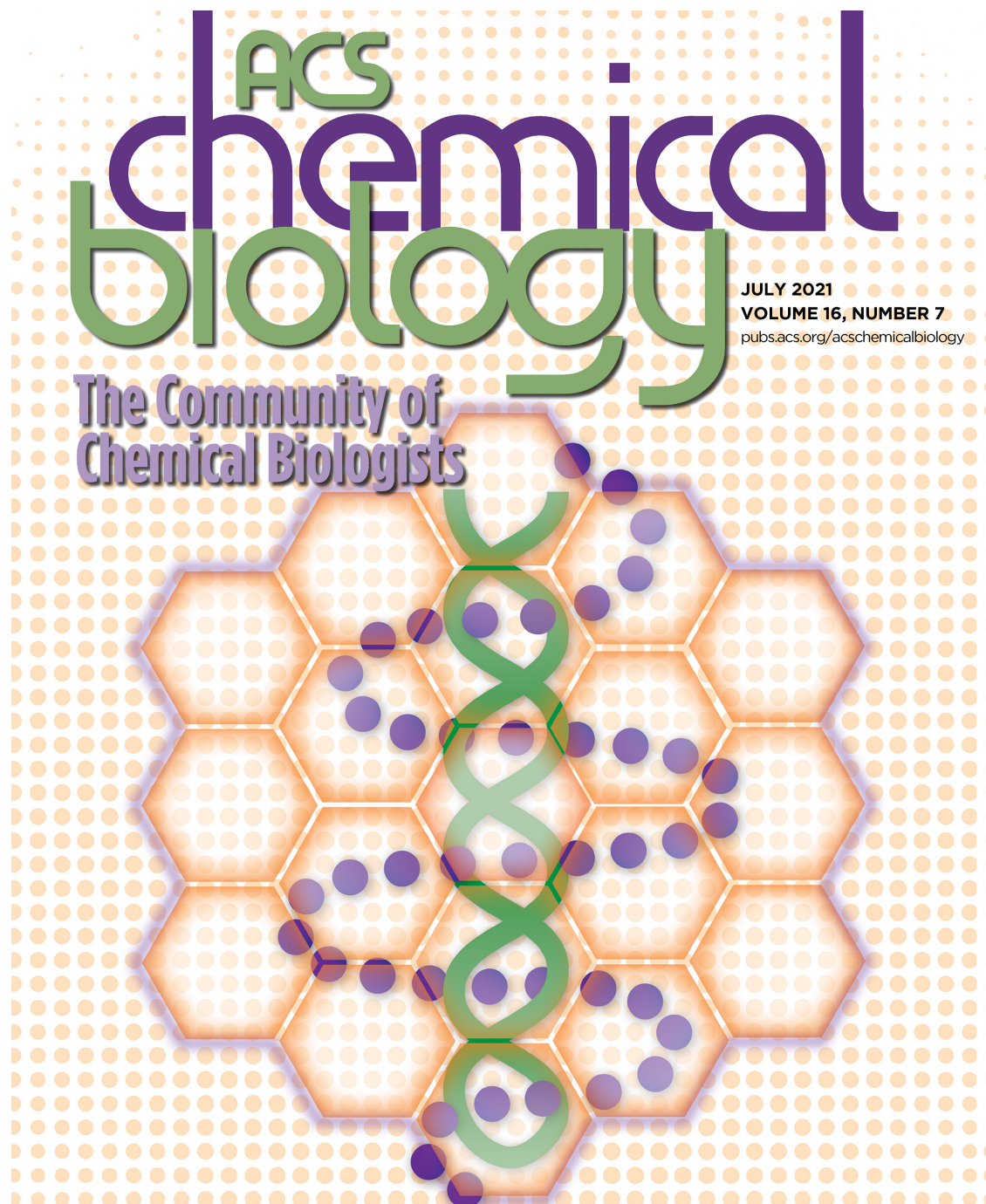
No barriers to access – all articles freely available online



T. Endoh, N. Brodyagin, D. Hnedzko, N. Sugimoto, and E. Rozners

Triple-Helical Binding of Peptide Nucleic Acid Inhibits Maturation of Endogenous MicroRNA-197

ACS Chem. Biol., 16, 1147-1151 (2021)



 ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

www.acs.org

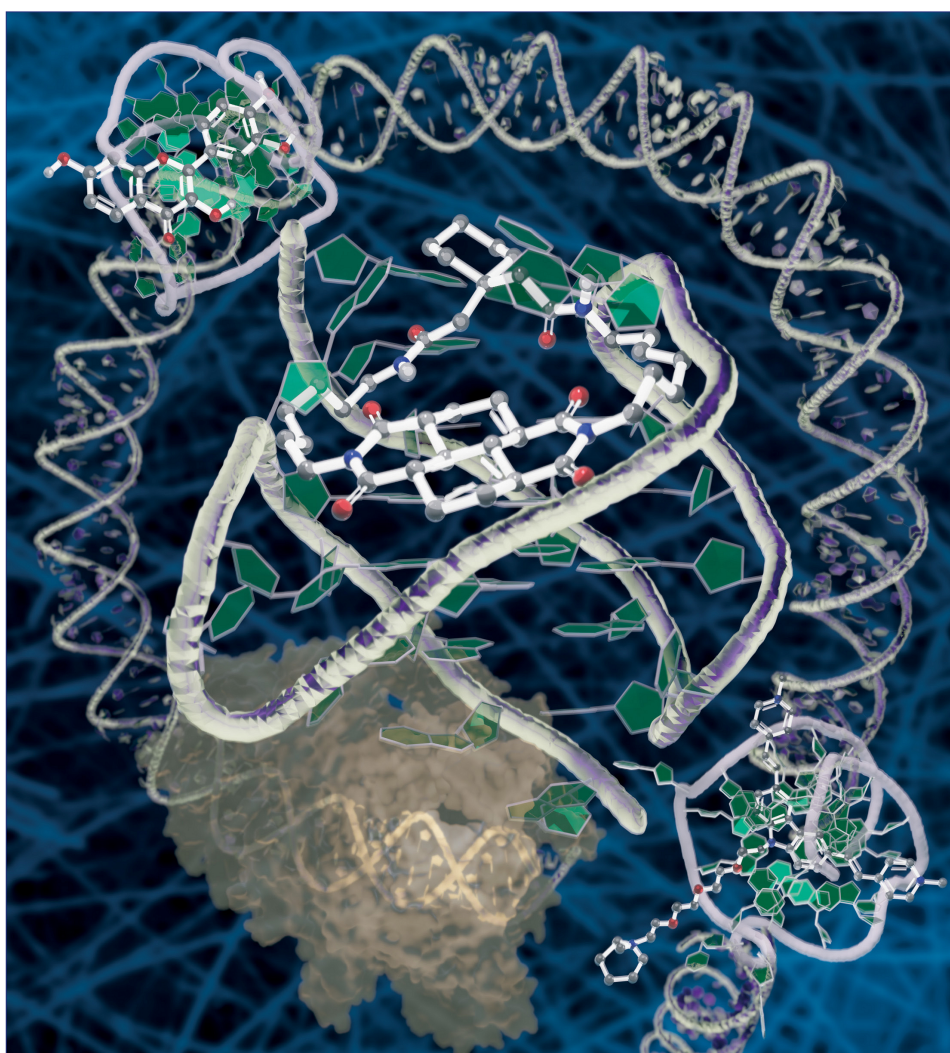
S. Takahashi, A. Kotar, H. Tateishi-Karimata, S. Bhowmik, Z.-F. Wang, T.-C. Chang, S. Sato, S. Takenaka, J. Plavec, and N. Sugimoto

Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding

J. Am. Chem. Soc., **143**, 16458-16469 (2021)

October 13, 2021
Volume 143
Number 40
pubs.acs.org/JACS

J | A | C | S
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY



 ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

www.acs.org

W. Sugimoto, N. Kinoshita, M. Nakata, T. Ohyama, H. Tateishi-Karimata, T. Nishikata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, and K. Kawauchi

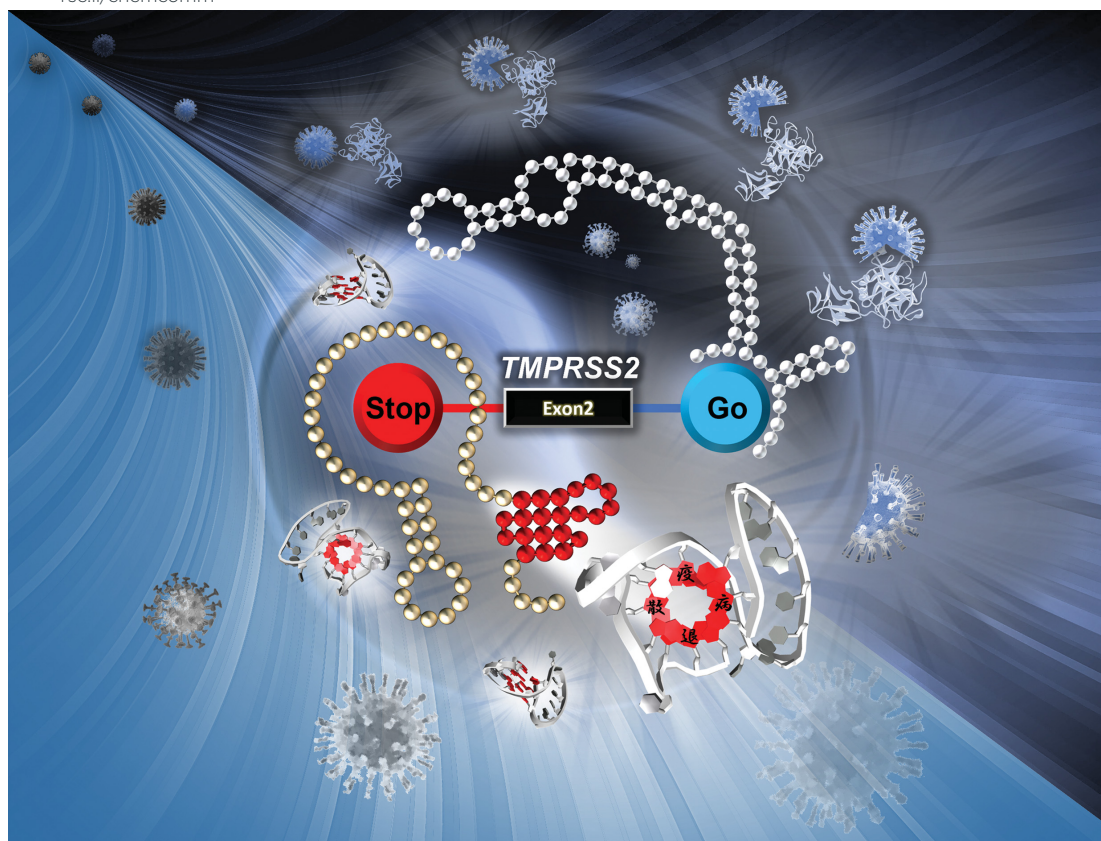
Intramolecular G-quadruplex-hairpin loop structure competition of a GC-rich exon region in the *TPRSS2* gene

Chem. Commun., 58, 48-51 (2022)

Volume 58
Number 1
4 January 2022
Pages 1-122

ChemComm

Chemical Communications
rsc.li/chemcomm



ISSN 1359-7345



ROYAL SOCIETY
OF CHEMISTRY

COMMUNICATION

Daisuke Miyoshi, Keiko Kawauchi *et al.*
Intramolecular G-quadruplex-hairpin loop structure
competition of a GC-rich exon region in the *TPRSS2* gene

N. Sugimoto, T. Endoh, S. Takahashi, and H. Tateishi-Karimata

Chemical Biology of Double Helical and Non-Double Helical Nucleic Acids: “To *B* or Not To *B*, That Is the Question”

Bull. Chem. Soc. Jpn., **94**, 1970-1998, (2021)

