

Academic Program [Oral A] | 17. Biofunctional Chemistry, Biotechnology : Oral A

📅 Wed. Mar 26, 2025 1:00 PM - 3:40 PM JST | Wed. Mar 26, 2025 4:00 AM - 6:40 AM UTC 🏛️
[A]D401(D401, Bldg. 4, Area 3 [4F])

[[A]D401-1pm] 17. Biofunctional Chemistry, Biotechnology

Chair: Hisae Tateishi-Karimata, Tatsuya Nishihara

🇯🇵 Japanese

1:00 PM - 1:10 PM JST | 4:00 AM - 4:10 AM UTC

[[A]D401-1pm-01]

Liquid-liquid phase separation induced by i-motif structure under cell-mimicking conditions

○Ryosuke Suzuki¹, Mitsuki Tsuruta¹, Keiko Kawauchi¹, Daisuke Miyoshi¹ (1. FIRST, Konan University)

🇯🇵 Japanese

1:10 PM - 1:20 PM JST | 4:10 AM - 4:20 AM UTC

[[A]D401-1pm-02]

Liquid-liquid phase separation and liquid-solid phase separation induced by DNA G-quadruplex

○Naoki Kosaka¹, Minoru Nakata¹, Mitsuki Tsuruta¹, Keiko Kawauchi¹, Daisuke Miyoshi¹ (1. FIRST, Konan University)

🇯🇵 Japanese

1:20 PM - 1:30 PM JST | 4:20 AM - 4:30 AM UTC

[[A]D401-1pm-03]

Regulation of liquid-liquid phase separation with G-quadruplex ligands

○Mizuho Aya¹, Tsuruta Mitsuki¹, Kawauchi Keiko¹, Miyoshi Daisuke¹ (1. FIRST, Konan University)

🇯🇵 Japanese

1:30 PM - 1:40 PM JST | 4:30 AM - 4:40 AM UTC

[[A]D401-1pm-04]

Interaction of zinc(II) pheophorbide a with G-quadruplex DNA

○Atsuya Momotake¹, China Okamoto^{1,2}, Masami Kobayashi¹, Yasuhiko Yamamoto¹ (1. Univ. of Tsukuba, 2. The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), National Metrology Institute of Japan (NMIJ))

🇬🇧 English

1:40 PM - 1:50 PM JST | 4:40 AM - 4:50 AM UTC

[[A]D401-1pm-05]

New Data Science in Nucleic Acids Chemistry (16): Cellular compartment size as a critical factor in the stability and function of nucleic acids

○Sunipa Sarkar¹, Hisae Tateishi-Karimata^{1,2}, Kazunori Matsuura^{3,4}, Naoki Sugimoto¹ (1. FIBER, Konan University, 2. FIRST, Konan University, 3. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tottori University, 4. Centre for Research on Green Sustainable Chemistry, Tottori University)

🇬🇧 English

1:50 PM - 2:00 PM JST | 4:50 AM - 5:00 AM UTC

[[A]D401-1pm-06]

New Data Science in Nucleic Acids Chemistry (18): Comparison of the stability of DNA duplexes among normal and cancer cells

○Kun Chen¹, Hisae Tateishi-Karimata^{1,2}, Shuntaro Takahashi^{1,2}, Naoki Sugimoto¹ (1. Konan University FIBER, 2. Konan University FIRST)

◆ Japanese

2:00 PM - 2:10 PM JST | 5:00 AM - 5:10 AM UTC

[[A]D401-1pm-07]

Construction of artificial viral capsid encapsulating quadruplex DNA and its intracellular delivery

○Kazunori Matsuura¹, Motono Ishii¹, Hiroshi Inaba¹, Tamaki Endoh², Hisae Karimata Tateishi², Naoki Sugimoto² (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. The Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research, Konan University)

2:10 PM - 2:20 PM JST | 5:10 AM - 5:20 AM UTC

Break

◆ Japanese

2:20 PM - 2:30 PM JST | 5:20 AM - 5:30 AM UTC

[[A]D401-1pm-08]

Synthesis of stimuli-responsive artificial oligodeoxynucleotides bearing phenylazothiazole groups and their application to gene regulation

○Kouki Tamura¹, Tatsuya Nishihara¹, Kazuhito Tanabe¹ (1. Aoyama Gakuin University)

◆ Japanese

2:30 PM - 2:40 PM JST | 5:30 AM - 5:40 AM UTC

[[A]D401-1pm-09]

Design of oligodeoxynucleotides that selectively accumulated in hypoxic cells: Synthesis and functional evaluation

○Yusuke Sakurano¹, Reina Kainuma¹, Daigo Maehara¹, Tatsuya Nishihara¹, Kazuhito Tanabe¹ (1. Aoyama Gakuin University)

◆ Japanese

2:40 PM - 2:50 PM JST | 5:40 AM - 5:50 AM UTC

[[A]D401-1pm-10]

Development and application of target responsive tetrahedral oligodeoxynucleotide with i-motif structure.

○Yui Kurozumi¹, Tatsuya Nishihara¹, Kazuhito Tanabe¹ (1. Aoyama Gakuin University)

◆ Japanese

2:50 PM - 3:00 PM JST | 5:50 AM - 6:00 AM UTC

[[A]D401-1pm-11]

Function of nitrobenzyl group-tethered oligodeoxynucleotides with hypoxic cell accumulation properties

○Airi Kanayama¹, Daigo Maehara¹, Tatsuya Nishihara¹, Kazuhito Tanabe¹ (1. Aoyama Gakuin University)

◆ Japanese

3:00 PM - 3:10 PM JST | 6:00 AM - 6:10 AM UTC

[[A]D401-1pm-12]

Exploring of Lipid Modification Unit to Improve Cell Membrane Permeability of Nucleic Acids

○Tento Sugiura¹, Akimitsu Okamoto¹ (1. The Univ. of Tokyo)

◆ Japanese

3:10 PM - 3:20 PM JST | 6:10 AM - 6:20 AM UTC

[[A]D401-1pm-13]

Exploration of Nucleic Acid Design Methods Oriented to Induce Selective Cytotoxicity Using miRNAs as Biomarkers

○Hiroki Oiwa¹, Akimitsu Okamoto¹ (1. The Univ. of Tokyo)

◆ Japanese

3:20 PM - 3:30 PM JST | 6:20 AM - 6:30 AM UTC

[[A]D401-1pm-14]

Effects of Spermidine and DNA topology for LLPS

○RYOTARO BUNYA¹, RYUSEI SENDA², RYU TASHIRO³, TAKANORI OYOSHI^{1,2,4,5} (1. Faculty of science, Shizuoka University, 2. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science, 4. Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 5. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

◆ Japanese

3:30 PM - 3:40 PM JST | 6:30 AM - 6:40 AM UTC

[[A]D401-1pm-15]

Analysis of a novel G-quadruplex binding protein, hexokinase 1

○Takumi Nakashima¹, Toshifumi Yamanaka², Wakana Matsudaira¹, Ahmed Mostafa Abdelhady^{3,4}, Shinichi Sato⁵, Kazumitsu Onizuka^{3,4}, Fumi Nagatsugi^{3,4}, Takanori Oyoshi^{1,2,6,7} (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 2. Faculty of Science, Shizuoka University, 3. IMRAM, Tohoku University, 4. Graduate School of Science, Tohoku University, 5. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, 6. Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 7. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

細胞模倣環境下で i-motif 構造が誘起する液液相分離

(甲南大 FIRST¹) ○鈴木涼介¹・鶴田充生¹・川内敬子¹・三好大輔¹

Liquid-liquid phase separation induced by DNA i-motif structure under cell-mimicking conditions (¹*Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University*)

○Ryosuke Suzuki¹, Mitsuki Tsuruta¹, Keiko Kawauchi¹, Daisuke Miyoshi¹

Nucleic acids, in addition to the standard double-helix structure, form various secondary structure structures. It is known that nucleic acid cytosine-rich sequences fold into cytosine quadruplex (i-motif)¹⁾. Although the i-motif is stable only in acidic conditions, of which pH is lower than physiological conditions (~ pH 7.2), it has been suggested that i-motifs can be formed at promoter region of cancer-related genes and telomere region²⁾. Furthermore, i-motif has the potential to induce liquid-liquid phase separation (LLPS)³⁾. Biomolecular LLPS regulates various biological processes such as metabolism and gene expression. Therefore, it is considerable that the i-motif formed within cells undergoes LLPS to regulate gene expression. However, there is no report of i-motif LLPS at physiological pH. In this study, we investigated the LLPS ability of i-motifs under conditions that mimic the molecularly crowded environment of cells. Systematic studies showed that i-motifs can form even at slightly basic pH under molecular crowded environments. Moreover, molecular crowders accelerate the i-motif LLPS under the physiological condition.

Keywords : i-motif, Liquid-liquid phase separation, molecular crowding, DNA

標準的な二重らせん構造に加えて、核酸は種々の立体構造を形成できる。シトシンに富んだ核酸鎖は、シトシン四重らせん構造(i-motif)を形成することが知られている¹⁾。i-motifは、生理的 pH (~ pH 7.2) より低い環境下で安定し、がん関連遺伝子のプロモータ領域やテロメア領域で形成される可能性が示唆されている²⁾。

さらに、i-motif は液-液相分離 (LLPS) を誘起することも報告されている³⁾。LLPS は、代謝や遺伝子発現などの生物学的プロセスを制御している。そのため、細胞内で形成する i-motif が LLPS を誘導することで、遺伝子発現の制御に関与している可能性がある。しかしながら、生理的 pH で i-motif が形成し、LLPS を誘起することは報告されていない。そこで本研究では、細胞の分子夾雑環境を模倣した条件で、i-motif の LLPS 能を検討した。その結果、分子夾雑環境では生理学的 pH より高い条件下においても、i-motif が形成され、LLPS が促進されることが示された。

1) C. H. Kang, *et al.*, *Nature*, **1993**, 363, 561-565.

2) H. J. Kang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 4172-4185.

3) M. Mimura, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 9849-9857.

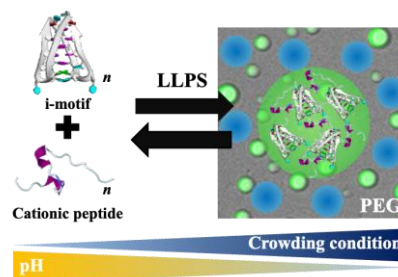


Fig. Effect of i-motif on inducing LLPS under physiological pH

DNA のグアニン四重らせん構造が誘起する液-液相分離と液-固相分離

(甲南大 FIRST) ○小坂 直暉・中田 実紀・鶴田 充生・川内 敬子・三好 大輔

Liquid-liquid phase separation and liquid-solid phase separation induced by DNA G-quadruplex
(*Frontiers of Innovative Research in Science and Technology FIRST, Konan University*)

○Naoki Kosaka, Minori Nakata, Mitsuki Tsuruta, Keiko Kawauchi, Daisuke Miyoshi

G-quadruplex (G4) is one of the non-canonical structures of nucleic acids formed from guanine-rich sequences. G4-forming DNA sequences are enriched in regulatory region of genes as well as telomere region¹⁾. Recently, they have also been shown to be involved in the regulation of gene expression via liquid-liquid phase separation (LLPS) in cells and may also be involved in liquid-solid phase separation (LSPS), which lead to aggregate formation^{2, 3)}. However, factors of G4 dominating LLPS and LSPS are totally unclear yet. Here, we studied LLPS and LSPS of G4s with various topologies and loop structures. As a result, it was found that the structuring of the loop region and the associated topology changes affect the G4 LLPS and LSPS (Fig. 1).

Keywords : *G-quadruplex; Liquid-liquid phase separation; Liquid-solid phase separation; loop region, Topology*

DNA の配列内で形成されるグアニン四重らせん構造(G4)は、テロメア伸長や転写などの遺伝子発現の調整に関与している¹⁾。近年では細胞内における液-液相分離(LLPS)を介した遺伝子発現の調整にも関与することが明らかになりつつある。報告例としてはLLPS を介したクロマチンの凝縮を促進することで転写活性を阻害することが挙げられる²⁾。また、凝集体の形成につながる液-固相分離(LSPS)にもG4 が関与する可能性があることが報告されている³⁾。しかし、LLPS や LSPS を決定する G4 の因子については未だに解明されていない。そこで本研究では、G4 のトポロジーやループ領域の構造の変化が LLPS に与える影響を検討した。その結果、ループ領域の構造化やそれに伴うトポロジーの変化が G4 の LLPS や LSPS に影響を及ぼすことが明らかとなった(Fig.1)。

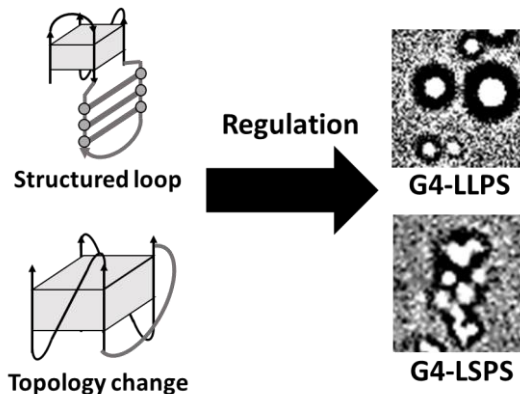


Figure 1. Loop region structuring and topology changes regulate G4 LLPS and LSPS.

1) M. H. Hu, et al., *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, 2447-2459.

2) M. Mimura, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 9849-9857.

3) Y. Yabuki, et al., *J. Biol. Chem.*, **2024**, Online 107971.

グアニン四重らせん構造リガンドによる液 - 液相分離の制御

(甲南大 FIRST¹) ○綾 瑞穂¹・鶴田 充生¹・川内 敬子¹・三好 大輔¹

Regulation of liquid-liquid phase separation with G-quadruplex ligands

(¹*Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University*)

○Mizuho Aya,¹ Mitsuki Tsuruta,¹ Keiko Kawauchi¹, Daisuke Miyoshi¹

Nucleic acids and proteins have recently been shown to undergo liquid-liquid phase separation (LLPS) to form liquid droplets. Biomolecular LLPS plays an important role in the control of biological processes such as gene expression. Moreover, LLPS is associated with neurodegenerative diseases. It is believed that regulation of LLPS is promising for treatment of these diseases. In this study, we attempted to control RNA G4-LLPS by using a series of G4 ligands. It was found that the G4 ligands accelerate and inhibit RNA G4-LLPS in a ligand concentration dependent manner (Fig. 1).

Keywords: RNA, G-Quadruplex, Liquid-liquid phase separation, Ligand

核酸やタンパク質の液-液相分離 (LLPS) による液滴形成が細胞内反応の制御に重要であることが明らかにされつつある。さらに、その破綻は神経変性疾患などの発症要因となることも報告されている。そのため、LLPS を選択的に制御することは、細胞内反応の制御のみならず、新たな創薬標的の提示にもつながることが期待される。これまで、低分子化合物を用いた LLPS の制御が試みられてきた¹⁾。しかしながら、それらの化合物は天然変性領域 (IDR) をもつタンパク質を標的とするため選択的な制御が困難であった。この点に関して、我々は核酸のグアニン四重らせん構造 (G4) が LLPS に重要であることを報告し²⁾、新たな標的として G4 の重要性を提示した。そこで本研究では、標的となる G4 に結合する低分子化合物群の RNA G4 が誘起する LLPS の制御能を検討した。その結果、本研究で使用したすべての G4 リガンドは、リガンド濃度依存的に RNA G4-LLPS を制御できることが示された (Fig. 1)。

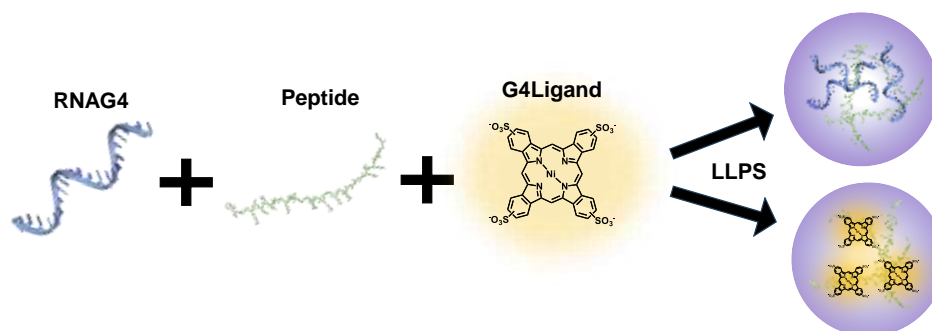


Figure 1. Schematic illustration of RNA G4-LLPS regulated by a G4 ligand.

1) W. M. Babinchak, *et al.*, *Nat. Commun.*, **2020**, 11, 5574.

2) M. Tsuruta, *et al.*, *Chem. Commun.*, **2022**, 58, 12931.

亜鉛(II)フェオフォルバイド *a* と四重鎖 DNA との相互作用

(筑波大数理¹・産総研²) ○百武 篤也¹・岡本 千奈²・小林 正美¹・山本 泰彦¹
 Interaction of Zinc(II) Pheophorbide *a* with G-quadruplex DNA (¹ *Institute of Pure and Applied Sciences, Univ. of Tsukuba*, ² *The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), National Metrology Institute of Japan (NMIJ)*) ○Atsuya Momotake,¹ China Okamoto,² Masami Kobayashi,¹ Yasuhiko Yamamoto¹

Zn-substituted pheophorbide *a* (ZnPhed *a*) has emerged as a promising photosensitizer for photodynamic therapy (PDT) due to its enhanced water solubility compared to its metal-free counterpart, pheophorbide *a* (Phed *a*). This study explores ZnPhed *a*'s interaction with all-parallel-stranded G-quadruplex DNA (d[(TTAGGG)]₄ (6mer)) using fluorescence and NMR spectroscopies. Fluorescence titration indicated that ZnPhed *a* binds to 6mer with considerably higher affinity than Phed *a*, binding constants are $1.8 \pm 0.39 \times 10^7$ and $0.3 \pm 0.01 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, respectively. NMR analysis showed that ZnPhed *a* selectively stacks onto the G6 G-quartet of 6mer to form a ZnPhed *a*-6mer complex. Irradiation of the ZnPhed *a*-6mer complex (680 nm) caused DNA degradation under not only aerobic conditions, but also anaerobic ones, demonstrating its oxygen-independent DNA photodegradation ability. These findings offer insights for designing advanced photosensitizers in PDT.

Keywords : Photodynamic therapy; G-quadruplex DNA; Molecular recognition; Photosensitizer; Zinc(II) pheophorbide *a*

Zn 置換フェオフォルバイド *a* (ZnPhed *a*) は、金属を含まないフェオフォルバイド *a* (Phed *a*) (Fig. 1A) と同様に、光線力学療法 (PDT) の光増感剤として有望であると考えられる。本研究では、ZnPhed *a* と平行型四重鎖 DNA (d[(TTAGGG)]₄ (6mer), Fig 1B) の相互作用を蛍光および NMR を用いて解析した。蛍光滴定の結果、ZnPhed *a* と 6mer の結合定数 ($1.8 \pm 0.39 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) は、Phed *a* との値 ($0.3 \pm 0.01 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) を大きく上回ることが明らかとなった。さらに、ZnPhed *a* の添加が 6mer のイミノプロトンに由来する NMR シグナルに誘起する特徴的なシフト変化から、ZnPhed *a* は 6mer の G6-G カルテットに選択的に結合して複合体を形成することが示された。また、ZnPhed *a* と 6mer の複合体に光 (680 nm) を照射したところ、酸素の有無にかかわらず DNA が分解した。したがって、ZnPhed *a* は、Phed *a* と同様に、酸素非依存的 DNA 光分解能¹を有することが実証された。本研究は、PDT 向け光増感剤設計における ZnPhed *a* の新たな可能性を示唆するものである。

¹ Okamoto, C.; Kotani, H.; Kojima, T.; Yamamoto, Y.; Momotake, A. *ChemBioChem* **2024**, 202400781 (C), 1–6.

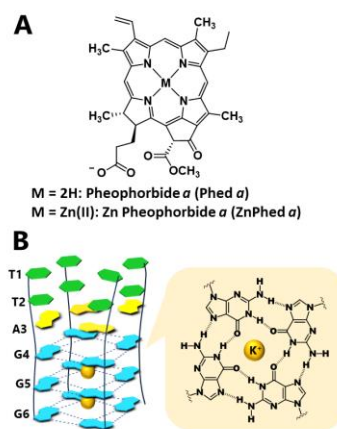


Fig 1. Chemical structures of pheophorbide *a* and Zn-substituted pheophorbide *a* (A). Schematic representation of all-parallel G-quadruplex DNA, [d(TTAGGG)]₄ (6mer), formed from d(TTAGGG) (B, left) and G-quartet (B, right).

New Data Science in Nucleic Acids Chemistry (16): Cellular Compartment Size as a Critical Factor in the Stability and Function of Nucleic Acids

(¹FIBER, Konan Univ. ²FIRST, Konan Univ., ³Department of Chemistry and Biotechnology, Tottori Univ., ⁴Centre for Research on Green Sustainable Chemistry, Tottori Univ.)

○Sunipa Sarkar,¹ Hisae Tateishi-Karimata,^{1,2} Kazunori Matsuura,^{3,4} Naoki Sugimoto¹

Keywords: Organelle size, Vesicles, G-quadruplex, Gene expression, Nucleic acids therapeutics

In living cells, organelles create compartments of varying sizes, effectively isolating specific biomolecules from the rest of the cell.¹ This physical separation provides a controlled microenvironment, enabling more efficient regulation of biological processes. For these processes, G-quadruplex (G4) structures play a crucial role, with their stability being highly influenced by the surrounding environment.² Given that organelles range in size from 30 nm to 7.0 μm , we explored whether compartment size affects directly the stability of G4s in these distinct microenvironments.

To explore the impact of compartmentalization, we mimicked organelle sizes using large unilamellar vesicles (LUVs) and giant unilamellar vesicles (GUVs) to generate compartments ranging from 0.1 μm to 10 μm in diameter (Figure 1), which are widely used for creating artificial cells and mimicking viral membranes.³ The vesicles contained an aqueous layer enriched with K^+ ions to replicate physiological conditions (Figure 1). Thermal melting studies revealed that the melting temperature (T_m) of G4 inside vesicles with a diameter of 0.1 μm (LUV) was decreased compared to dilute conditions. The decrement became more pronounced in GUV-sized vesicles. These findings demonstrated that compartment size affects strongly G4 DNA stability, highlighting the potential role of compartmentalization in regulating the gene expression efficiency of nucleic acids.

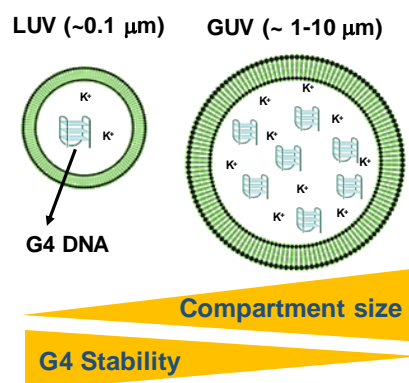


Figure 1. Schematic illustration of different sizes of vesicles ranging from 0.1 μm to 10 μm . The vesicles were formed using a 2:1 ratio of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) and cholesterol to ensure stability and effective encapsulation of G4 DNA.

1) S. Pramanik, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **2014**, *42*, 12949. 2) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, S. Takahashi N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 8005. 3) H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *Chem. Comm.* **2020**, *56*, 7092.

New Data Science in Nucleic Acids Chemistry (18): Comparison of the stability of DNA duplexes among normal and cancer cells

(¹FIBER, Konan Univ., ²FIRST, Konan Univ.)

○Kun Chen,¹ Hisae Tateishi-Karimata,^{1,2} Shuntaro Takahashi,^{1,2} Naoki Sugimoto¹

Keywords: Nearest-neighbor (NN) parameters, DNA duplex, Cancer cell, DNA stability, Cellular environments

Accurate prediction of DNA duplex stability using nearest-neighbor (NN) model is crucial for advancing molecular biology and therapeutic applications.¹ However, the complexity of intracellular environments has limited their applicability in living cells. In this study, we investigate the behavior of DNA duplexes across various cell types to validate the NN model under physiologically relevant conditions.

To avoid the complexity of the effect of the total DNA concentration on the melting temperature (T_m) of the duplex formation, we designed two DNA hairpin sequences (HpNs1a and HpNs1b) with identical NN base pairs in the stem and hexa-ethylene glycol (EG₆) linker was used as a loop (Figure 1A). UV melting analysis of each 10 μ M hairpin sequence *in vitro* in the non-crowding condition showed that both hairpin sequences exhibited similar T_m values (HpNs1a: 52.3 $^{\circ}$ C, HpNs1b: 52.0 $^{\circ}$ C), validating the NN rule (Figure 1B). To further investigate detailed thermal stability in the intracellular environment, we employed a pseudo-cell system called SHELL in which the intracellular molecular environment of cells including proteins and organelles has been immobilized but small molecules removed (Figure 1C).² We prepared SHELLs using normal cell (NIH3T3), mild cancer cell (MCF-7), and aggressive cancer cell (MDA-MB-231) to evaluate the T_m of hairpins within these SHELLs. The hairpins with identical NN base pairs showed similar melting behavior in the SHELL, however, the T_m values of the hairpins varied depending on the type of cell preparing the SHELL, highlighting the influence of cell-type-specific intracellular environments on DNA duplex stability.

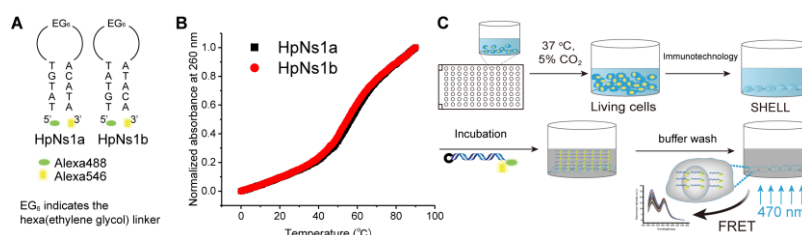


Figure 1. A) Schematic representation of hairpin structures designed with same NN sets. B) Melting curve of the HpNs1a and HpNs1b (10 μ M) obtained in 100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0 at 37 $^{\circ}$ C) and 1 mM Na₂EDTA. C) Schematic illustration for the preparation of SHELL and estimation of thermodynamic parameters to simulate intracellular conditions.

1) S. Ghosh, S. Takahashi, T. Ohya, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2020**, *117*, 14194. 2) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, S. Takahashi and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 8005.

四重鎖 DNA 内包人工ウイルスキャプシドの構築と細胞内導入

(鳥取大院工¹・甲南大学 FIBER²) ○松浦和則¹・石井楽乃¹・稲葉央¹・遠藤玉樹²・建石寿枝²・杉本直己²・

Construction of artificial viral capsid encapsulating quadruplex DNA and its intracellular delivery (¹Graduate School of Engineering, Tottori University, ²The Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research, Konan University) ○Kazunori Matsuura¹, Motono Ishii¹, Hiroshi Inaba¹, Tamaki Endoh², Hisae Karimata Tateishi², Naoki Sugimoto²

G-quadruplex DNA (G4) is known to be involved in regulating the gene expression of tumor-related genes, but the details of the structure and function of G4 in response to the intracellular environment have not been clarified. Therefore, there is a demand for technology to deliver G4 into cells.¹ We have previously created artificial viral capsids by self-assembly of β -annulus peptide derived from TBSV, which can be encapsulated various guest molecules.² In this study, we created artificial viral capsids encapsulated G4 DNA via disulfide bond as a material for intracellular delivery of G4. Co-assembly of G4 DNA-SS- β -Annulus and NLS-modified β -Annulus peptides in 10 mM potassium phosphate buffer (pH7.5) afforded spherical assemblies with the size of about 100 nm, suggesting the construction of G4 DNA-encapsulated NLS-modified artificial viral capsids. The G4 DNA-encapsulated capsid was effectively internalized into HepG2 cells and released G4 by the reducing environment in cell.

Keywords: G-quadruplex DNA; Artificial viral capsid; Intracellular delivery

グアニン四重鎖 DNA(G4)は、癌関連遺伝子のバイオマーカーおよび治療の標的としての可能性を持っているが、細胞内環境に応じた G4 の構造や機能は明らかになっておらず、G4 を細胞内の目的の場所に送達する技術が求められている¹⁾。我々は、 β -Annulus ペプチドの自己集合により人工ウイルスキャプシドを構築することに成功している²⁾。本研究では、ジスルフィド結合を介して β -Annulus ペプチドの N 末端に G4 を連結した G4 DNA-SS- β -Annulus を合成し、核局在シグナル(NLS)修飾した β -Annulus ペプチドと共集合させることで、G4 DNA 内包・NLS 修飾人工ウイルスキャプシドを創製し、HepG2 細胞への導入を検討した。CLSM 観察の結果、未修飾キャプシドと比較して NLS 修飾キャプシドは 3.8 倍程度細胞内取り込み効率が高いことがわかった(Fig.1)。また、細胞内の還元環境によりジスルフィド結合が切断され、ある程度の G4 が細胞質に放出されていることがわかった。

1) R. H. Hertsch, M. D. Antonio, S. Balasubramanian, , *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18, 279-284 (2017).

2) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944-8959 (2018).

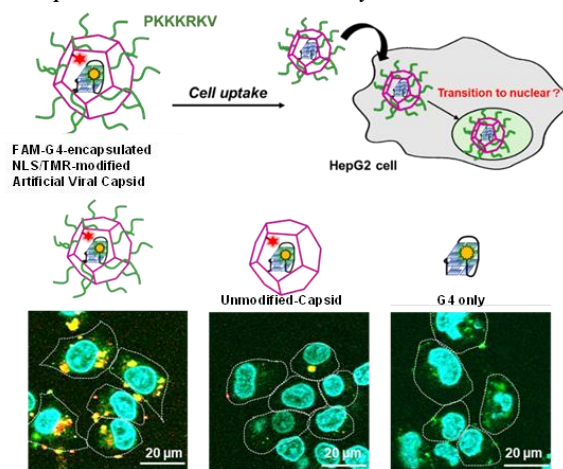


Fig. 1. FAM-G4 内包 NLS/TMR 修飾人工ウイルスキャプシドの HepG2 細胞への導入と CLSM 像

フェニルアゾチアゾール基を導入した人工核酸の合成と外部刺激による遺伝子制御

(青山学院大理工¹) ○田村 洸樹¹・西原 達哉¹・田邊 一仁¹

Synthesis of stimuli-responsive artificial oligodeoxynucleotides bearing phenylazothiazole groups and their application to gene regulation (¹*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*) ○Kouki Tamura,¹ Tatsuya Nishihara,¹ Kazuhito Tanabe¹

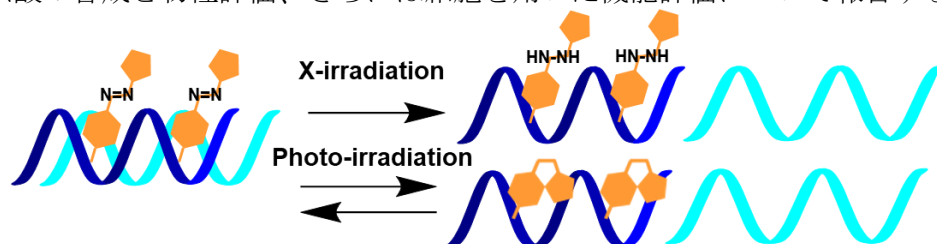
Nucleic acid drugs inhibit disease-causing protein expression by forming duplexes with target genes. This study aimed to develop a system for controlling mRNA expression using photo- or X- irradiation. We designed artificial oligodeoxynucleotides (ODNs) bearing phenylazothiazole (PAT) group, an azobenzene derivative. Upon photoirradiation, the PAT group undergoes isomerization, altering steric hindrance and enabling control of duplex formation. X- irradiation generates hydrated electrons by radiolysis of water molecules, reducing the PAT group to promote duplex dissociation. This dual mechanism is expected to achieve controlling duplex formation of ODNs.

ODNs with PAT units (P-ODNs) were synthesized via the phosphoramidite method and identified using MALDI-TOF MS. Melting temperature (T_m) measurements revealed that incorporation of multiple PAT units resulted in a increase of T_m value. We also confirmed that T_m value was changed by photo- or X-irradiation. In this presentation, we report the synthesis and reaction properties of P-ODNs and their applications to gene regulation in living cells.

Keywords : Photo-irradiation; X-irradiation; Phenylazothiazole; Oligodeoxynucleotides;

核酸医薬品は、標的遺伝子と二重鎖を形成することで、疾病原因のタンパク質発現を阻害する。今回我々は、光照射およびX線照射といった外部刺激を利用して、遺伝子発現を制御するシステムの構築を目指した。本研究では、アゾベンゼン誘導体 Phenylazothiazole 基 (PAT) 基を導入した人工核酸の反応を活用した。すなわち、光照射下では、PAT 基が光異性化し、構造が大きく変化する結果、二重鎖の安定性が変化する。他方、X線照射下では水の放射線分解で発生する水和電子が PAT 基を還元し、インターカレート能が低下することによって、二重鎖が不安定化する。これら反応により、光照射あるいはX線照射により、核酸二重鎖形成を制御し、標的遺伝子との相互作用制御と薬効制御を実現できると考えた。

PAT 基含有人工核酸(P-ODN)はホスホロアミダイト法を用いて合成した。二重鎖融解温度 (T_m) を測定したところ、P-ODN とその相補鎖から成る二重鎖の T_m は、PAT 基の導入数に応じて T_m 値に差が生じ、PAT 基を3つ導入すると 8.5 °C上昇した。また、 T_m 値は、光照射あるいはX線照射により変化することを確認した。本発表では、人工核酸の合成と物性評価、さらには細胞を用いた機能評価について報告する。



低酸素細胞に選択集積する人工核酸：分子設計と機能評価

(青山学院大理工) ○櫻野 優輔・貝沼 玲菜・前原 大悟・西原 達哉・田邊 一仁
 Design of oligodeoxynucleotides that selectively accumulated in hypoxic cells: Synthesis and functional evaluation (*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*)
 ○Yusuke Sakurano, Reina Kainuma, Daigo Maehara, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

To create functional oligonucleotides (ODNs) for cancer diagnosis and treatment, we have developed artificial nucleic acids that selectively accumulate in hypoxic cells that are formed in solid tumors. In this study, we designed alkyl chain-modified uridine bases ($d^{\text{alkyl}}\text{U}$) that accumulated on the cell membrane by hydrophobic interactions, and nitrobenzyl group-modified thymidine derivatives ($d^{\text{NB}}\text{T}$) that accumulated on hypoxic cells, respectively. These modified nucleobases were incorporated into ODNs by standard automatic DNA synthesis. The evaluation using Nile Red revealed that the ODNs formed aggregates in aqueous solution. We also confirmed that the aggregates consisted of these ODNs accumulated in hypoxic cell membrane in a selective manner.

Keywords : *Oligodeoxynucleotides; Hypoxic cells; Cell membrane*

固形がんで形成される低酸素環境に選択的に集積し、駆動する人工核酸は、がん診断や治療に資する機能性薬剤として注目される。本研究では、低酸素細胞の細胞膜に集積し、機能する人工核酸の開発を目指した。細胞膜に集積するウリジン誘導体 ($d^{\text{alkyl}}\text{U}$) と、低酸素細胞に蓄積するニトロベンジル基をもつチミジン誘導体 ($d^{\text{NB}}\text{T}$) の両方を備えた DNA 会合体を開発した (Figure 1)。これらの核酸誘導体を含む各修飾 DNA オリゴマーは、水溶液中で疎水性部位を内包する会合体を形成した。次に、この会合体を酸素濃度 0.3 % または 21 % の条件下においた A549 細胞に投与したところ、酸素濃度 0.3 % の条件下の低酸素細胞に選択集積することがわかった。また、会合体上の修飾塩基の数を増やしたところ、低酸素細胞の細胞膜に集積する挙動が確認できた。本発表では、DNA 会合体の物性と挙動詳細について発表する。

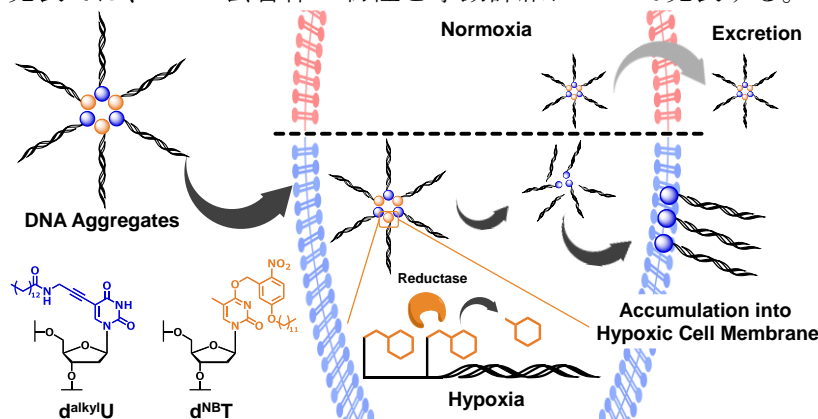


Figure 1. Accumulation of DNA aggregates bearing $d^{\text{alkyl}}\text{U}$ and $d^{\text{NB}}\text{T}$ into hypoxic cell membrane.

標的依存性 i-motif を備えた四面体 DNA の開発と応用

(青山学院大理工) ○黒住結生・西原達哉・田邊一仁

Development and application of target responsive tetrahedral oligodeoxynucleotide with i-motif structure. (*Collage of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*) ○Yui Kurozumi, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Tetrahedral DNA have been employed for the DDS because of its high stability. Although the tetrahedral DNA can recognize the tumor tissue by incorporating the functional molecules such as the DNA aptamer, it is difficult to control the ability to recognize the target cell depending on the microenvironment. In this study, we attempted aimed to develop tetrahedral DNA that accumulate in tumor cells by controlling their hydrophobicity through target-responsive i-motif formation. Indeed, we found that the DNA labeled with dimethoxybenzyl (DMB) group, which is released from DNA by the reaction with hydroxyl radicals, inhibited the formation of the quadruplex structure. In this presentation, we will report on the design and synthesis of target-responsive tetrahedral DNA by using DMB-labeled i-motif.

Keywords : *i-motif; cell recognition*

DNA 四面体は、生体内における安定性に優れ、DDS への応用をはじめとして、様々な応用がなされている。例えば、DNA 四面体にアプタマーや疎水性ドメインを導入することにより、標的細胞選択的な認識が実現されている。一方で、DNA 四面体の細胞集積性を外部環境依存的に制御することは難しく、その解決策が求められている。

そこで、本研究では、がん組織の周辺環境因子に依存し、細胞集積性が変化する特性を DNA 四面体に付与することを検討した。がん組織は、低酸素、弱酸性、酸化ストレスなど特徴的な微小環境を形成する。これまでに我々は、i-motif 形成に伴う疎水性構造の近接を利用することで、弱酸性環境下において、DNA 四面体の細胞への集積性が向上する現象を見出してきた。更なる機能性付与に向け、弱酸性条件に加え、酸化ストレスの 2 条件が揃った際に、細胞集積性が向上する設計に試みた (Figure 1)。具体的には、i-motif 配列のリン酸部位に対して、活性酸素種との反応性部位を導入し、反応前後での i-motif 形成能を変化させる分子設計となる。実際に、ヒドロキシラジカルに対する反応点であるジメトキシベンジル (DMB) 部位を複数個導入することにより、i-motif 形成能が阻害されることを確かめた。現在、DMB 修飾 i-motif を導入した四面体による細胞集積性制御に向けた検証を進めており、本発表ではそれらの詳細について、報告する。

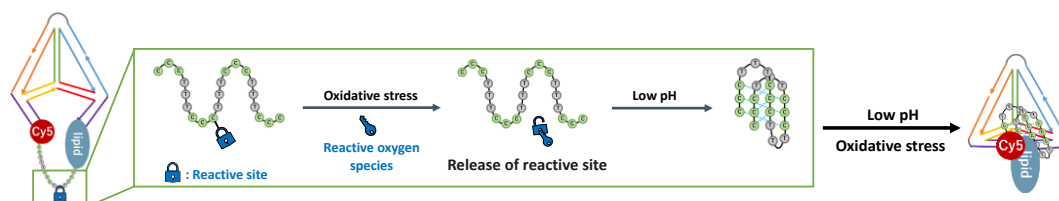


Figure 1. Tetrahedral DNA using DMB labeled i-motif to accumulate on the cell surface under the condition of low pH and oxidative stress.

低酸素細胞蓄積性ニトロベンジル基修飾 DNA オリゴマーの機能開拓

(青山学院大院理工¹⁾) ○金山 愛里¹・前原 大悟¹・西原 達哉¹・田邊 一仁¹

Function of nitrobenzyl group-tethered oligodeoxynucleotides with hypoxic cell accumulation properties (¹College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○Airi Kanayama,¹ Daigo Maehara,¹ Tatsuya Nisihara,¹ Kazuhito Tanabe,¹

Recently, we have shown that oligodeoxynucleotides (ON-ODNs) with o-nitrobenzyl groups on thymidine base tend to accumulate in hypoxic cells. In this study, the position of the nitro group on aromatic ring was changed to the para position, and changes in accumulation properties in hypoxic cells were investigated. PN-ODN and ON-ODN were hybridized with fluorophore-labeled complementary strands and administered to A549 human lung cancer cells, that were cultured under hypoxic or aerobic conditions. Bright fluorescence emission was observed in both PN-ODN and ON-ODN-administered hypoxic cells. In comparison, the emission intensity of PN-ODN was stronger than that of ON-ODN, indicating that PN-ODN tends to accumulate in hypoxic cells in a selective manner. In this presentation, we will report the preparation, reaction characteristics and function of modified ODNs in hypoxic cells.

Keywords : Nucleic acid; Hypoxic cells; Nitroreductase; DNA aggregates; Amphiphilic oligonucleotides

固形がんでは急速な細胞増殖と血管形成の不均衡から低酸素細胞が生じる。この低酸素細胞はがんの悪性化の一因になると同時に治療抵抗性があるため治療法の確立が求められている。当研究グループではアルキル基を備えた o-ニトロベンジル基を修飾した DNA オリゴマー(ON-ODN)が同細胞に蓄積する性質を持つことを明らかにしてきた。本研究では、ニトロ基の位置をより反応性が高い p 位¹に変更した DNA(PN-ODN)を合成し、その反応性および機能を調べた。

合成した PN-ODN と ON-ODN を蛍光色素で標識した相補鎖と二重鎖形成させた後、低酸素と正常酸素で培養したヒト肺がん細胞 A549 に投与した。その結果、PN-ODN、ON-ODN とともに低酸素細胞で強い蛍光が観察できた。また発光強度を比較した結果、PN-ODN を投与した場合により強い発光が観察されたことから、PN-ODN の方が低酸素細胞に蓄積しやすいことが示唆された。本発表では、DNA オリゴマーの低酸素細胞内での遺伝子制御および殺細胞効果について報告する予定である。

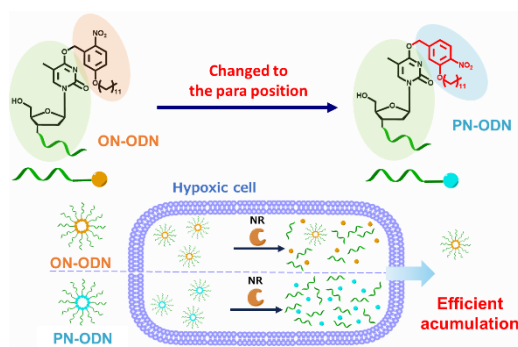


Figure 1 Molecular design of nitrobenzyl substituted ODNs and accumulation in hypoxic cells.

1) S. M. Hecht et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 37, 12009–12012

核酸の細胞膜透過性を向上させる脂質修飾ユニットの探索

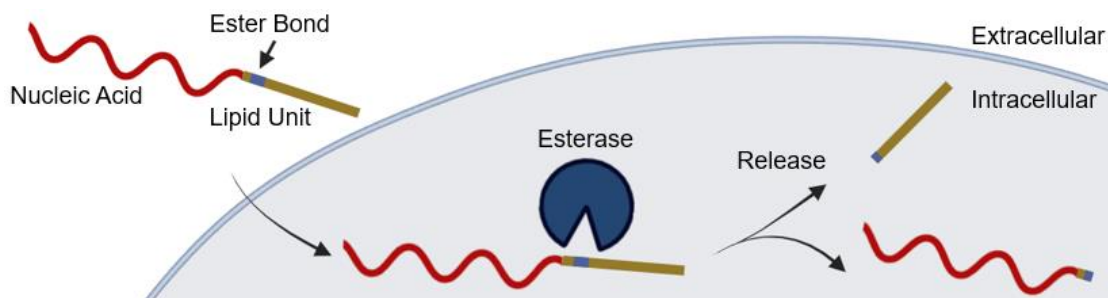
(東大工) ○杉浦 天斗・岡本 晃充

Exploring of Lipid Modification Unit to Improve Cell Membrane Permeability of Nucleic Acids (*Faculty of Engineering, The University of Tokyo*) ○Tento Sugiura, Akimitsu Okamoto

Currently, lipids with high affinity to cell membranes are often used as carriers for nucleic acids. The high affinity of lipids facilitates the uptake of lipid-nucleic acid complexes into cells. Many lipid-nucleic acid complexes, such as lipid nanoparticles, are formed using electrostatic interactions. However, these methods may cause nucleic acids to leak out of the lipid-nucleic acid complex. In this study, we aim to realize a highly efficient delivery system by combining lipids and nucleic acids through covalent bonding. Lipids remain stably bound even in the physiological environment, promoting cellular uptake of nucleic acids. A problem is that covalently bound lipid modification may interfere with the function of nucleic acids. Therefore, we designed the ester bonds in the lipid modification structure so that the bonds are cleaved by intracellular esterase and the lipid modification moiety is released. Experimental results showed that the ester bonds within the lipid modification were cleaved by esterase. We also synthesized the nucleic acids that were modified in their ends with several types of lipids via ester bonds. The cellular uptake of these modified nucleic acids will be reported.

Keywords : Nucleic Acid; Drug Delivery System

現在核酸医薬のキャリアとして、細胞膜との高い親和性をもつ脂質が多く用いられている。脂質の親和性の高さにより、脂質と核酸の複合体は細胞に取り込まれやすくなる。脂質と核酸の複合体形成には、脂質ナノ粒子など、静電相互作用を利用したものが多い。しかし、これらの方法では核酸が脂質-核酸複合体から漏出することがある。本研究では、脂質と核酸を共有結合により結合し、高効率のデリバリーシステムの実現を目指す。脂質が体内環境下でも安定に結合し続けることで、核酸の細胞内取り込みを効率的に促進することができる。問題として、共有結合された脂質修飾ユニットが核酸の機能を阻害する可能性があることがあげられる。そこで、脂質修飾構造内にエステル結合を導入することで、細胞内エステラーゼにより結合が切断され、脂質修飾部位が脱離するように設計した。実験の結果、脂質修飾内のエステル結合はエステラーゼにより切断された。また、数種類の脂質を、エステル結合を介して末端に修飾した核酸を合成した。この修飾核酸の細胞内取り込みについても報告する予定である。



miRNA をバイオマーカーとした選択的細胞毒性の誘導を志向した核酸設計法の探索

(東大工) ○大岩 洋輝・岡本晃充

Exploration of Nucleic Acid Design Methods Oriented to Induce Selective Cytotoxicity Using miRNAs as Biomarkers (*Faculty of Engineering, The University of Tokyo*) ○Hiroki Oiwa, Akimitsu Okamoto

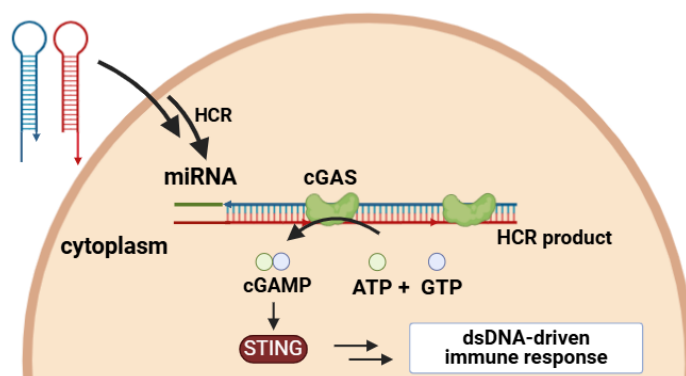
This study aims to develop a nucleic acid that selectively induces cell death in various cancer cells by applying oligonucleotides that are reported to selectively target cancer cells using a pair of hairpin DNAs that trigger chain reactions with specific miRNAs in the cytoplasm to form double-stranded DNA (= hybridization chain reaction, HCR)^[1].

While previous research utilized a pair of hairpin DNAs targeting miR-21, which is known to be overexpressed in cancer cells, in this study, we conducted a microarray analysis to identify miRNAs that are overexpressed in specific cancer cells compared to normal cells. New hairpin DNA pairs were then designed to target the identified miRNAs. These designed hairpin DNA pairs were confirmed to trigger HCR in the presence of their target miRNAs in vitro.

Keywords : HCR; DNA; miRNA; Cancer

2 種類のヘアピン DNA が細胞質内の特定の miRNA を起点に、連鎖的に反応して二重鎖 DNA を形成する反応(=ハイブリダイゼーション連鎖反応、HCR)を利用してがん細胞選択的に細胞死を引き起こすオリゴヌクレオチド^[1]を応用し、様々ながん細胞を特異的に攻撃する核酸を設計することによって、薬効や選択性の向上を目指す。

先行研究においては、がん細胞で過剰発現していることが知られている miR-21 を標的としたヘアピン DNA ペアが用いられていたが、本研究では miRNA マイクロアレイによって特定のがん細胞において正常細胞と比較して過剰発現している miRNA を新たに特定し、特定した miRNA に対して適当なヘアピン DNA ペアを設計した。設計したヘアピン DNA ペアは、miRNA の存在下において HCR を引き起こすことが in vitro の実験で確認された。



[1] Oncolytic Hairpin DNA Pair: Selective Cytotoxic Inducer through MicroRNA-Triggered DNA Self-Assembly. Morihiro, K., et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*(51), 23298–23308.

液-液相分離におけるスperlミジンと DNA トポロジーの効果

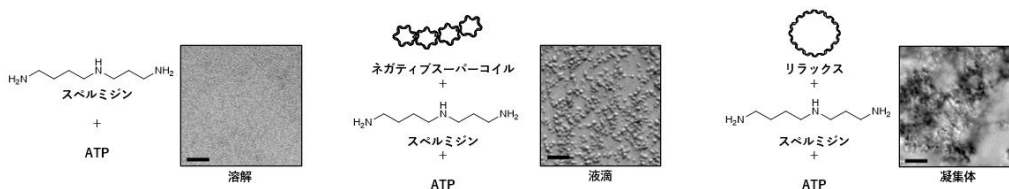
(静大理¹、静大院理²、鈴鹿医療科学大薬³、静大院創造⁴、静大グリーン研⁵) ○文屋諒太郎¹・千田隆誠²・田代竜³・大吉崇文^{1,2,4,5}

Effects of Spermidine and DNA topology for LLPS(¹ Faculty of Science, Shizuoka Univ., ² Graduate School of Science, Shizuoka Univ., ³ Faculty of Pharmacy, Suzuka Univ. of Medical Science, ⁴ Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., ⁵ Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.) ○Ryotaro Bunya¹, Ryusei Senda², Ryu Tashiro³, Takanori Oyoshi^{1,2,4,5}

Transcriptional activity in the cell increases when transcription factors assemble at promoters to form droplets. On the other hand, DNA regions of high transcriptional activity form negative supercoiling with a loosened double helix. To investigate the relationship between droplets formation and negative supercoiling, negative supercoiled plasmid DNA and the biomolecules spermidine and ATP were mixed *in vitro* and observed with a microscope. As a result, droplets were formed. On the other hand, a similar experiment using relax DNA which has altered DNA topology by Topoisomerase I resulted in aggregation. These results indicate that the droplets formation ability in the presence of spermidine differs depending on the topology of the DNA. To investigate the nature of the formed droplets, we observed them in the presence of various concentration of NaCl and in the presence of 1,6-hexanediol.

Keywords : liquid-liquid phase separation(LLPS), Supercoiled DNA, DNA Topology, Spermidine, Polyamine,

細胞内の転写活性は、転写因子がプロモーターに集合して液滴を形成することで上昇する。一方で、転写活性の高い DNA 領域は二重らせんが緩んだネガティブスーパーコイルを形成している。液滴形成とネガティブスーパーコイルの関係を調べるために、ネガティブスーパーコイルを形成している環状二本鎖 DNA と生体分子であるスperlミジンと ATP を試験管で混合して顕微鏡で観察した。その結果、液滴を形成した。一方で、トポイソメラーゼ I によってネガティブスーパーコイルをリラックスにした DNA を用いて同様な実験を行った結果、凝集体を形成した。これらの結果より、スperlミジン存在下において DNA のトポロジーの違いによって液滴形成能が異なることがわかった。形成された液滴の性質を調べるために様々な濃度の NaCl 存在下、また 1,6 ヘキサンジオール存在下において観察したので、それらの結果を報告する。



- 1) *Cell*, 2018, 175, 1842-55, 2) *Cell*, 2016, 165, 357-71

新規グアニン四重鎖結合タンパク質ヘキソキナーゼ 1 の解析

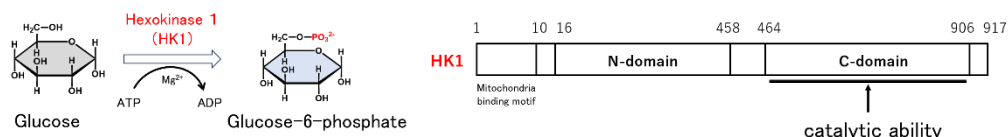
(静大院理¹・静大理²・東北大多元研³・東北大院理⁴・東北大学際研⁵・静大院創造⁶・静大グリーン⁷) ○中島 匠¹, 山中 俊史², 松平和佳奈¹, Ahmed Mostafa Abdelhady^{3,4}, 佐藤 伸一⁵, 鬼塚 和光^{3,4}, 永次 史^{3,4}, 大吉 崇文^{1,2,6,7}

Analysis of a novel G-quadruplex binding protein, hexokinase 1 (¹Graduate School of Science, Shizuoka Univ., ²Faculty of Science, Shizuoka Univ., ³IMRAM, Tohoku Univ., ⁴Graduate School of Science, Tohoku Univ., ⁵FRIS, Tohoku Univ., ⁶Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., ⁷Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.) Kensuke Kiyokawa,¹ ○Takumi Nakashima¹, Toshifumi Yamanaka², Wakana Matsudaira¹, Ahmed Mostafa Abdelhady^{3,4}, Shinichi Sato⁵, Kazumitsu Onizuka^{3,4}, Fumi Nagatsugi^{3,4}, Takanori Oyoshi^{1,2,6,7}

In normal cells, energy is generated via the glycolytic system, the TCA circuit, and the electron transfer system, whereas in cancer cells, energy is generated mainly by the glycolytic system alone. The generation of glucose-6-phosphate from glucose, which is the first step of the reaction in the glycolytic system, is catalyzed by hexokinase 1¹⁾. Therefore, functional analysis of hexokinase 1 has been conducted worldwide, but its nucleic acid binding properties remain unknown. We have already identified hexokinase 1 as a novel G-quadruplex (G4) binding protein. In this study, we analyzed the G4-binding properties of hexokinase 1 in detail. As a result, we found that hexokinase 1 binds more strongly to G4 DNA and G4 RNA than to double-stranded DNA and single-stranded RNA. In this presentation, we also compare the binding properties of hexokinase 1 to various G4 DNA and RNA.

Keywords : G-quadruplex; Hexokinase; Nucleic acid-binding protein;

正常細胞では解糖系と TCA 回路及び電子伝達系を介してエネルギーを生成するのに対して、ガン細胞では主に、解糖系のみによってエネルギーが生成される。解糖系の反応の第一段階である、グルコースからグルコース-6-リン酸を生成する反応は、ヘキソキナーゼ 1 によって触媒される¹⁾。そのため、ヘキソキナーゼ 1 の機能解析が世界中で行われているが、核酸結合性に関しては不明である。我々は、新規グアニン四重鎖(G4)結合タンパク質としてヘキソキナーゼ 1 をすでに見出している。そこで本研究では、ヘキソキナーゼ 1 の G4 結合性を詳細に解析した。その結果、ヘキソキナーゼ 1 は二本鎖 DNA や一本鎖 RNA に対して、G4 DNA や G4 RNA により強く結合することが分かった。また本発表では、ヘキソキナーゼ 1 と様々な G4 核酸との結合性の比較も行ったので、その結果についても報告する。



1) *Nature*, **576**, 482-486 (2019)