

アカデミックプログラム [A講演] | 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー：口頭A講演

📅 2025年3月29日(土) 13:00 ~ 15:30 🏢 [A]D401(第3学舎 4号館 [4階] D401)

[[A]D401-4pm] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー

座長：河崎 泰林、北村 裕介

📌 日本語

13:00 ~ 13:10

[[A]D401-4pm-01]

トリオキシサレン誘導体と DNA 二重鎖の光反応

○藤本 和久¹、Md Amin²、大吉 崇文² (1. 九産大、2. 静大)

📌 日本語

13:10 ~ 13:20

[[A]D401-4pm-02]

生体内安定性の向上を志向した人工核酸型Staple核酸の開発

○松本 愛優¹、勝田 陽介^{1,2}、木田 朋輝¹、佐藤 慎一^{1,2}、北村 裕介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)

📌 日本語

13:20 ~ 13:30

[[A]D401-4pm-03]

Staple核酸によるRNA hacking技術を基盤とした心肥大進行抑制作用の評価

○嘉藤 美来¹、勝田 陽介^{1,2}、木田 朋輝¹、萩原 正規³、佐藤 慎一^{1,2}、北村 裕介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院 先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio、3. 弘前大学 理工学部)

📌 日本語

13:30 ~ 13:40

[[A]D401-4pm-04]

DNAグアニン四重らせん構造が誘起する液-液相分離における1,6-hexanediolの阻害機構の解明

○吉川 美咲¹、鶴田 充生¹、高宮 渚¹、川内 敬子¹、三好 大輔¹ (1. 甲南大FIRST)

📌 日本語

13:40 ~ 13:50

[[A]D401-4pm-05]

KOD DNAポリメラーゼ変異体による5'位アルキル修飾チミジン誘導体を含むオリゴ核酸の酵素合成

○石田 健太¹、星野 秀和¹、山口 卓男²、小比賀 聡^{2,3}、笠原 勇矢^{1,2} (1. 医薬健栄研、2. 阪大院薬、3. 阪大先導)

📌 日本語

13:50 ~ 14:00

[[A]D401-4pm-06]

海底超臨界CO₂-水二相想定環境における核酸塩基，糖，リン酸からのヌクレオチド様分子合成○森野 航平^{1,2}、田川 翔大朗^{1,2}、藤島 皓介^{1,3} (1. 地球生命研究所、2. 東京科学大学、3. 慶應義塾大学)

14:00 ~ 14:10

休憩

📌 日本語

14:10 ~ 14:20

[[A]D401-4pm-07]

DNA修復機構の理解に向けた光増感剤による傷導入法の開発と修復の評価

○金森 功吏¹、河添 好孝²、小澤 雅史¹、吉田 七唯¹、杜 瑶瑶¹、柳沼 佑真¹、湯浅 英哉¹ (1. 東京科学大、2. 九大)

◆ 日本語

14:20 ~ 14:30

[[A]D401-4pm-08]

細胞内環境におけるPNA/DNA複合体形成の確立

○中澤 和那¹、須磨岡 淳¹、松井 毅¹ (1. 東京工科大学)

◆ 日本語

14:30 ~ 14:40

[[A]D401-4pm-09]

核酸集合技術による細胞機能制御を誘導する核酸の化学修飾の探索

○相場 瑶子¹ (1. 東京大学)

◆ 英語

14:40 ~ 14:50

[[A]D401-4pm-10]

Development of a nucleobase-recognition site-conjugated donor-acceptor complex catalyst for base selective trifluoromethylation.

○Haoran Zheng¹, Harunobu Mitsunuma¹, Motomu Kanai¹ (1. The University of Tokyo)

◆ 英語

14:50 ~ 15:00

[[A]D401-4pm-11]

フッ素修飾DNAのナノ集合体構造と細胞内送達

○成田 美菜子¹、木幡 愛¹、影山 泰一¹、渡邊 ほの香¹、相川 光介¹、森廣 邦彦¹、岡本 晃充¹、岡添 隆^{1,2}、川口 大輔¹ (1. 東京大学、2. AGC株式会社)

◆ 日本語

15:00 ~ 15:10

[[A]D401-4pm-12]

フィンガードメインにおけるDNAポリメラーゼの変異が修飾ヌクレオチドの取り組みに及ぼす効果

○田澤 駿¹、片岡 由佳¹、星野 秀和²、石田 健太²、笠原 勇矢^{2,3}、小比賀 聡^{3,4}、栗原 正靖¹ (1. 日大院総合基、2. 医薬健栄研、3. 阪大院薬、4. 阪大先導)

◆ 日本語

15:10 ~ 15:20

[[A]D401-4pm-13]

チオフラビンTの多量化によるグアニン四重鎖への結合選択性改変の検討

○中村 友昭¹、片岡 由佳¹、栗原 正靖¹ (1. 日大院総合基)

◆ 英語

15:20 ~ 15:30

[[A]D401-4pm-14]

核酸化学のNew Data Science (17): 細胞内の分子クラウド環境を制御した擬似細胞システムの開発

○高津 正子¹、建石 寿枝^{1,2}、杉本 直己¹ (1. 甲南大学FIBER、2. 甲南大学FIRST)

トリオキシサレン誘導体と DNA 二重鎖の光反応

(九産大生命¹・静大院理²・静大院創造³・静大グリーン研⁴) ○藤本 和久¹・Amin Md Al³・大吉 崇文^{2,3,4}

Photoreaction of trioxsalens derivatives for DNA duplexes (¹*Faculty of Life Science, Kyushu Sangyo University*, ²*Graduate School of Science*, ³*Graduate School of Integrated Science and Technology*, ⁴*Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University*) ○Kazuhisa Fujimoto,¹ Amin Md Al,³ Takanori Oyoshi^{2,3,4}

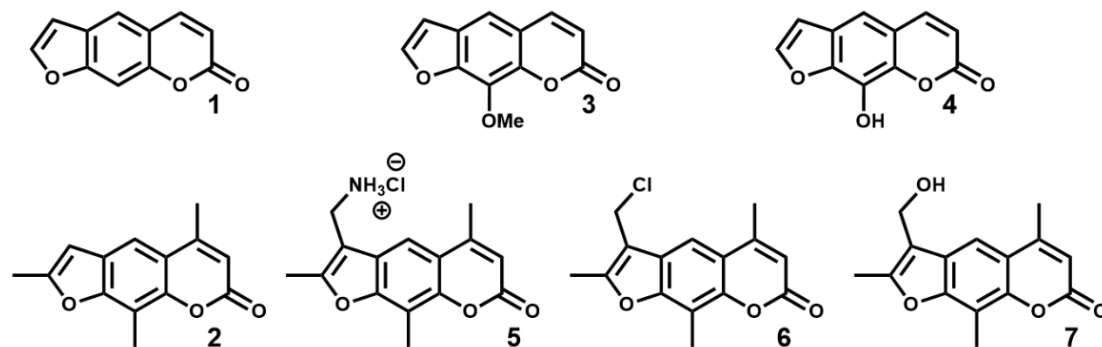
Psoralen **1** photoreact with thymine residues in DNA duplexes. In case that DNA duplexes contain AT/TA moieties, **1** cross-links the double strands at the AT/TA residues. Trioxsalen (4,5',8-trimethylpsoralen) **2** has three methyl groups in a psoralene skeleton, which has been reported to display a good photoreactivity for DNA duplexes more than psoralen itself. Here, we synthesized a series of trioxsalen derivatives including **5** with an amino methyl group and analyzed their photoreactions for DNA duplexes.

Each of trioxsalens **2** and **5-7** and psoralens **1**, **3**, and **4** was added to a DNA duplex solution, and the solutions were photoirradiated for 60 s at 365 nm. Their HPLC analyses showed that trioxsalens had higher photoreactivities for DNA duplexes than psoralens. Among the trioxsalens, **5** hardly photoreacted with DNA duplexes. We are investigating the photoreaction of trioxsalen derivatives for plasmid DNAs and will also report the details.

Keywords : Psoralen, Trioxsalen, Photoreaction, DNA, Cross-linking reaction

ソラレン **1** は DNA 二重鎖中のチミンと光反応し、AT/TA 塩基対間では架橋反応する。ソラレン骨格に三つのメチル基を有するトリオキシサレン **2** も同様の光反応し、ソラレンよりも優れた光反応性を示す。今回、アミノメチル基を有するトリオキシサレン誘導体 **5** をはじめとする幾つかの誘導体を用意し、DNA 二重鎖との光反応を検証した。

トリオキシサレン **2** とその誘導体 **5-7** と参照化合物としてのソラレン **1** とその誘導体 **3-4** と DNA 二重鎖を混ぜ、365 nm の光を 60 秒照射し、HPLC で解析した。総じてトリオキシサレン誘導体の方が高い光反応性を示したが、アミノメチル基を有する **5** は他のトリオキシサレン誘導体に比べて光反応性が低かった。現在、プラスミド DNA を対象とした光反応を行っており、その詳細も併せて報告する。



生体内安定性の向上を志向した人工核酸型 Staple 核酸の開発

(熊本大学大学院先端科学研究部¹・株式会社 StapleBio²) ○松本 愛優¹・勝田 陽介^{1,2}・木田 朋輝¹・佐藤 慎一^{1,2}・北村 裕介¹・井原 敏博¹

Enhancing the in vivo stability of Staple oligomers by using artificial nucleic acids (¹*Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University*, ²*StapleBio Inc.*) ○Ayu Matsumoto¹, Yousuke Katsuda^{1,2}, Tomoki Kida¹, Shin-ichi Sato^{1,2}, Yusuke Kitamura¹, Toshihiro Ihara¹

The RNA G-quadruplex (rG4) is an extremely stable structure that suppresses ribosome translation reactions. Recently, we reported an RNA hacking (RNAh) technology with a short oligonucleotide termed Staple oligomer, to induce rG4 formation on specific target RNAs. Applying this RNAh technology, we have developed a new translational inhibition strategy with a mechanism of action distinct from that of siRNA and antisense oligonucleotides. The unique gene regulation technology permits the straightforward development of fully artificial nucleic-acid-based Staple oligomers without compromising their effectiveness. In this presentation, we will highlight advancements in RNAh technology utilizing Staple oligomers composed of artificial nucleic acids with significantly enhanced in vivo stability. Additionally, we will introduce evaluation results of translational inhibition of TRPC6, a gene associated with cardiac hypertrophy, and the inhibition of disease progression in a mouse cardiac hypertrophy model.

Keywords : nucleic acid medicine; RNA G-quadruplex; RNA hacking; Staple oligomer

RNA G-quadruplex (rG4)は極めて安定な構造のため、リボソームの進行を阻害してタンパク質発現を抑制する。近年、我々は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸により、標的 mRNA 上に rG4 構造を人為的に誘起する RNA hacking (RNAh)技術を報告した(Fig. 1)。RNAh 技術は、siRNA や ASO とは異なる作用機序を持つ新たな核酸医薬技術になり得る。

核酸医薬の医薬品化に際しては、生体内安定性向上のために人工核酸化が必須である。しかし、siRNA や ASO は薬効を発揮するために生体内酵素との協働が必要であるため、人工核酸化による薬効低下の懸念がある。一方、RNAh 技術による遺伝子発現制御は生体内酵素と協働する必要がなく、人工核酸化による薬効低下の懸念は無い。本発表では、人工核酸型 Staple 核酸を用いた心肥大関連遺伝子 TRPC6 の翻訳抑制評価および心肥大モデルマウスの病態進行抑制評価の結果を報告する。

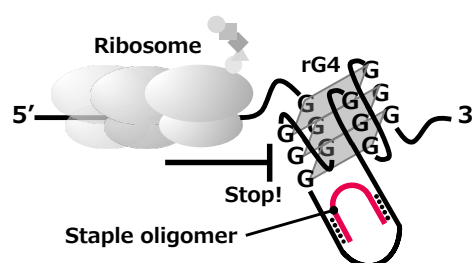


Fig. 1 RNA hacking 技術を応用した翻訳抑制機構の概念図。Staple 核酸が標的 mRNA 中の離れたグアニン連続配列を近接させ、rG4 構造を誘起する。誘起された rG4 構造はリボソームの進行を阻害し、翻訳反応を抑制する。

Staple 核酸による RNA hacking 技術を基盤とした心肥大進行抑制作用の評価

(熊本大学大学院先端科学研究部¹・株式会社 StapleBio²・弘前大学大学院理工学部³)
○嘉藤 美来¹・勝田 陽介^{1,2}・木田 朋輝¹・萩原 正規³・佐藤 慎一^{1,2}・北村 裕介¹・井原 敏博¹

Inhibitory effect of RNA hacking technology with Staple oligomers on cardiac hypertrophy progression (¹*Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University*, ²*StapleBio Inc.*, ³*Faculty of Advance Science and Technology, Hirosaki University*) ○Miko Kato¹, Yousuke Katsuda^{1,2}, Tomoki Kida¹, Masaki Hagihara³, Shin-ichi Sato^{1,2}, Yusuke Kitamura¹, Toshihiro Ihara¹

In recent years, nucleic acid-based therapeutics, such as siRNA and antisense nucleic acids, have garnered significant attention as innovative pharmaceutical technologies. However, addressing off-target effects remains a major challenge in their development. We have recently developed an RNA hacking (RNAh) technology that can address this issue through a unique mechanism of action distinct from conventional nucleic acid therapeutics. RNAh technology utilizes a short oligonucleotide, termed the Staple oligomer, to artificially induce the formation of a thermodynamically stable RNA G-quadruplex (rG4) structure on target mRNAs. This induced rG4 structure effectively inhibits ribosome progression, thereby suppressing protein expression with high specificity and significantly reducing off-target effects. In this presentation, we will talk about the successful delivery of Staple oligomers to mouse cardiac tissue via adeno-associated virus (AAV) vectors, leading to the suppression of TRPC6 protein expression, a causative gene for cardiac hypertrophy.

Keywords : nucleic acid medicine; RNA G-quadruplex; RNA hacking; Staple oligomer

近年、siRNA やアンチセンス核酸といった核酸医薬は新しい医薬技術として大きな注目を集めている。これらの技術はタンパク質の発現を効果的に抑制するが、標的以外の mRNA にも作用することで引き起こされる副作用への懸念が指摘されている。これまでに我々は、既存の核酸医薬と異なる作用機序でタンパク質の発現を抑制する RNA hacking (RNAh) という技術を開発した。RNAh は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を用い、RNA G-quadruplex(rG4) という極めて安定な高次構造を人為的に誘導する。標的 mRNA 選択的に誘導された rG4 はリボソームの進行を阻害し、標的タンパク質の発現のみを抑制するので、オフターゲット効果を大幅に抑えることができる。本発表では AAV vector を用いてマウス心臓に Staple 核酸を送達し、心肥大の原因となる TRPC6 タンパク質の発現抑制に成功した結果について報告する。

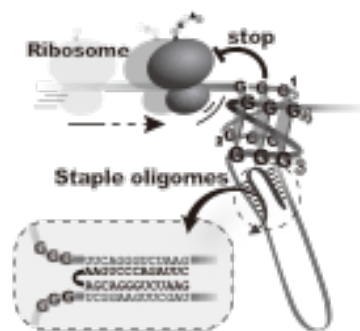


Fig. 1 RNA hacking 技術の概念図。Staple 核酸は標的 mRNA の 2 箇所に結合し rG4 構造を誘起する。rG4 は極めて安定な構造のためリボソームの進行を阻害し、タンパク質の発現を抑制する。

DNA グアニン四重らせん構造が誘起する液-液相分離における 1,6-hexanediol の阻害機構の解明

(甲南大 FIRST) ○吉川 美咲・鶴田 充生・高宮 渚・川内 敬子・三好 大輔
DNA G-quadruplex liquid-liquid phase separation inhibition mechanism by 1,6-hexanediol
(*Frontiers of Innovative Research in Science and Technology FIRST, Konan University*)
○Misaki Yoshikawa, Mitsuki Tsuruta, Nagisa Takamiya, Keiko Kawauchi, Daisuke Miyoshi

One of the typical hydrotropes, 1,6-hexanediol, has been widely used to demonstrate the reversibility of biomolecular droplets formation via liquid-liquid phase separation (LLPS) and to distinguish them from similar molecular assemblies such as gels and aggregates (Fig. 1).¹⁾ In this study, we investigated LLPS inhibitory ability of various diols using the LLPS model system induced by G-quadruplex (G4) DNA that we have developed.²⁾ It was found that the addition of diols with longer carbon chain inhibited more effectively the droplet formation. On the other hand, it was found that both 1,6-hexanediol, which inhibits LLPS, and 2,5-hexanediol, which has no effect, equally stabilized G4 DNA, indicating that 1,6-hexanediol inhibits G4 DNA and peptide interactions.

Keywords : Liquid-liquid phase separation; droplet; 1,6-hexanediol; G-quadruplexes; hydrotrope

生体分子の液-液相分離(LLPS)とそれによる液滴の形成に関する研究では、1,6-hexanediol の添加により液滴を溶解することで液滴のもつ可逆性を証明し、ゲルや凝集体などの類似した分子集合体と区別する手法が広範に用いられている (Fig. 1)。¹⁾ 本研究では、我々が開発してきた DNA のグアニン四重らせん構造が誘起する LLPS モデルシステム²⁾を用いて種々のジオールを液滴に添加した際の LLPS 阻害能を検討した。その結果、鎖長が長いほど LLPS 阻害能が高いことが分かった。また、LLPS を阻害する 1,6-hexanediol とその効果がない 2,5-hexanediol はどちらも DNA のグアニン四重らせん構造を安定化させたことから、1,6-hexanediol は DNA とペプチドの相互作用を阻害する可能性が示唆された。

1) S. Elbaum-Garfinkle *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2019**, 294, 7160.

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

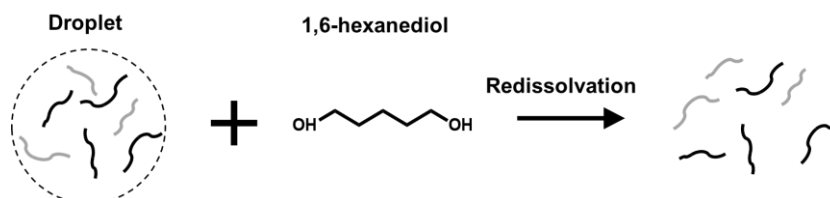


Fig. 1 Schematic illustration for redissolution of droplets by 1,6-hexanediol.

KOD DNA ポリメラーゼ変異体による 5'位アルキル修飾チミジン誘導体を含むオリゴ核酸の酵素合成

(医薬健康研¹・阪大院薬²・阪大先端³) ○石田 健太¹・星野 秀和¹・山口卓男²・小比賀 聡^{2,3}・笠原 勇矢^{1,2}

Enzymatic Synthesis of Oligonucleotide with 5'-C-Alkylthymidines by KOD DNA Polymerase Mutants (¹*National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition*, ²*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University*, ³*Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University*) ○Kenta Ishida,¹ Hidekazu Hoshino,¹ Takao Yamaguchi,² Satoshi Obika,^{2,3} Yuuya Kasahara^{1,2}

5'-C-Alkyl-modified oligonucleotides have high nuclease resistance¹. However, because polymerases strictly recognize the sugar structure, the enzymatic synthesis of sugar-modified oligonucleotides remains a significant challenge. Previously, we developed KOD DNA polymerase mutants that were capable of synthesizing oligonucleotides with sugar-modifications such as LNA and 2'-MOE^{2,3}. In this study, we attempted to enzymatically synthesize oligonucleotides with 5'-C-alkylthymidines (5'-C-methylthymidine, 5'-C-dimethylthymidine, or 5'-C-cyclopropylthymidine) by the KOD DNA polymerase mutants.

We chemically synthesized 5'-C-alkylthymidine triphosphates. We found that all of 5'-C-alkylthymidine triphosphates were incorporated into oligonucleotide by KOD DNA polymerase mutants. Steric hindrance between the alkyl modification at the 5'-C-alkyl-modification and the metal ion coordinate with the phosphate moiety of 5'-C-alkylthymidine triphosphates at the active site reduced the incorporation efficacy. In this presentation, we will report on the effect of 5'-C-alkyl-modification on enzymatic oligonucleotide synthesis.

Keywords : *Enzymatic oligonucleotide synthesis; Aptamers; Nucleic acid enzymes; XNA*

核酸糖部 5'位のアルキル修飾はオリゴ核酸の酵素耐性能を向上させる¹。一方で、ポリメラーゼは糖部構造を厳密に認識しているため、糖部修飾を含むオリゴ核酸の酵素合成は容易ではない。これまで我々は、LNA や 2'-MOE などの糖部修飾を含むオリゴ核酸の酵素合成が可能な KOD DNA ポリメラーゼ変異体を複数開発してきた^{2,3}。本研究では、それらポリメラーゼ変異体を活用し、5'-C-アルキル修飾チミジン誘導体(5'-C-メチルチミジン, 5'-C-ジメチルチミジン, 5'-C-シクロプロピレンチミジン)を含むオリゴ核酸の酵素合成を試みた。

まず、各 5'-C-アルキル修飾チミジン誘導体について三リン酸体へと誘導化した。そして、全ての 5'-C-アルキル修飾チミジン三リン酸が KOD DNA ポリメラーゼ変異体によって取り込み可能であることを見出した。活性中心にある金属イオンと 5'位の修飾との立体障害が大きいと予測される修飾ほど伸長効率は低かった。本発表では 5'-C-アルキル修飾が酵素合成に与える影響について報告する。

本研究の一部は AMED (JP22gm1610010, JP23ak0101207) および JSPS 科研費 (19K15702, 21K14743) の支援を受けて実施した。

1) A. V. Kel'in, *et al.*, *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 2261. 2) H. Hoshino, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 21530. 3) K. Ishida, *et al.*, *Molecules* **2023**, 28, 7911.

海底超臨界 CO₂-水二相想定環境における核酸塩基，糖，リン酸からのヌクレオチド様分子合成

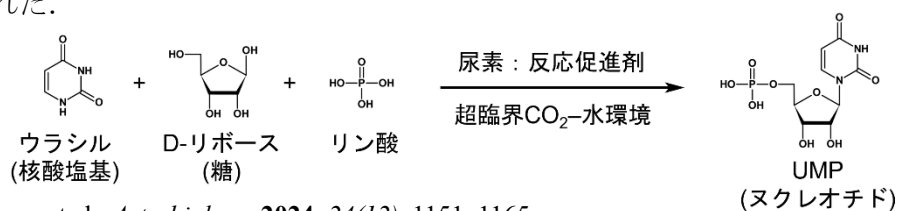
(地球生命研究所¹・東京科学大学²・慶應義塾大学³) ○森野 航平^{1,2}・田川 翔大朗^{1,2}・藤島 皓介^{1,3}

Synthesis of Nucleotide-like Molecules from Nucleobases, Sugars, and Phosphates in Deep Marine Subsurface Supercritical CO₂-Water Two-Phase Environment (¹*Earth-Life Science Institute*, ²*Institute of Science Tokyo*, ³*Keio University*) ○Kohei Morino,^{1,2} Shotaro Tagawa,^{1,2} Kosuke Fujishima^{1,3}

Recently, supercritical CO₂-water two-phase environments in deep marine subsurface have attracted attention as a potential birthplace for the origin of life. Dehydration proceeds in this environment, and is highly likely for creating biomolecules. Previous studies have shown that nucleotides can be synthesized in this environment through phosphorylation of nucleosides¹⁾. However, no previous research has simultaneously realized phosphate ester bonds and glycosidic bonds in this environment. In this study, we achieved the synthesis of nucleotide-like molecules containing a phosphate ester bond and a glycoside bond in their structures through the dehydration-condensation of three molecules (nucleobase, sugar, and phosphate) in a supercritical CO₂-water two-phase environment reproduced in an experimental setup. The synthesis was confirmed using a mass spectrometer, which detected the same mass peak for each nucleotide when uracil, and its related substance, orotic acid, was used as the starting material.

Keywords : *Astrobiology, Origin of Life, Chemical evolution, Supercritical CO₂*

近年，生命起源の場として海底の超臨界 CO₂-水二相環境が注目されている．水が豊富な反応場では熱力学的に不利な脱水反応が，当環境では水が超臨界 CO₂ 側に移動し基質が濃縮することで進行し，生体関連分子が合成できる可能性が示唆された．我々の先行研究において当環境で，核酸塩基と糖がグリコシド結合を形成しているヌクレオシドのリン酸化によって，現在の生命に必須な RNA の構成分子たるヌクレオチドが合成できることが明らかとなった¹⁾．しかし，リン酸エステル結合とグリコシド結合を同時に，当環境で実現した例は無い．本研究では，実験装置内に再現した超臨界 CO₂-水二相環境において，核酸塩基，糖，リン酸の 3 分子が脱水縮合することによってリン酸エステル結合とグリコシド結合を構造に含むヌクレオチド様分子の合成を達成した．サンプルは質量分析装置を用いて分析し，核酸塩基であるウラシルとその関連物質であるオロト酸を出発物質とした際に，ヌクレオチドの質量ピークが検出された．



1) S. Tagawa et al., *Astrobiology*. **2024**, 24(12), 1151–1165.

DNA 修復機構の理解に向けた光増感剤による損傷導入法の開発と修復の評価

(東京科学大生命理工¹・九大院理²) ○金森功吏¹・河添好孝²・小澤雅史¹・吉田七唯¹・杜瑤瑤¹・柳沼佑真¹・湯浅英哉¹

Development of a method for introducing damage using a photosensitizer to understand DNA repair mechanisms and evaluation of repair (¹*School of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo*, ²*Faculty of Science, Kyushu University*) ○Takashi Kanamori,¹ Yoshitaka Kawasoe,² Masashi Ozawa,¹ Nanai Yoshida,¹ Yaoyao Du,¹ Yuma Yaginuma,¹ Hideya Yuasa¹

DNA is routinely damaged by oxidative stress but robustly protected by repair mechanisms. In the genome editing that has been conducted recently, repairs involving recombination are also at work. Thus, an accurate understanding of the repair mechanism is important. Although DNA repair has been studied extensively, most biochemical analyses of DNA repair have used DNAs pre-incorporated with damaged bases,¹ which are very different from the intracellular environment. For example, it has been difficult to study repair mechanisms in the context of chromatin. Therefore, our laboratory has been developing plasmid DNAs modified with photosensitizers² to incorporate site-specific damages to DNA after chromatin formation for the accurate understanding of intracellular repair. Using a repair system based on a nucleoplasmic extract of African clawed frog eggs, we have achieved region-selective introduction of damage and repair by photoirradiation. In addition, light irradiation experiments after chromatin formation suggested that chromatin may inhibit damage induction. Next, to introduce damages to endogenous DNA, we synthesized peptide nucleic acids modified with photosensitizers and evaluated their oxidative properties using a model duplex DNA.

Keywords : oxidative damage; photosensitizer; gene regulation; PNA

DNA は酸化ストレスにより日常的に損傷を受けているが、修復機構により堅牢に守られている。近年行われているゲノム編集においても、組換えを伴う修復が機能しており、修復機構の正確な理解は重要である。DNA 修復は多数研究されているが、その生化学的解析の多くは損傷塩基を予め組み込んだ DNA 等を用いており¹、細胞内環境とは大きく異なる。例えば、クロマチン形成下での修復機構を詳細に調べることは困難であった。そこで当研究室では細胞内での修復の正確な理解を目指し、光増感剤²を導入したプラスミド DNA を合成し、クロマチン形成後に DNA の局所に損傷導入する方法の開発を進めている。我々は、ツメガエル卵の核質抽出液を用いた修復系を用い、光照射による領域選択的な損傷導入と修復を達成した。予備的ながら、クロマチン形成後の光照射実験からクロマチン形成は損傷導入または修復を阻害する可能性が示唆された。つづいて、内在性の DNA への損傷導入を目指し、ゲノム DNA に結合可能なペプチド核酸への光増感剤修飾とモデル二重鎖 DNA を用いた酸化特性評価を行った。³これらの詳細について報告する。

- 1) Kawasoe, Y.; Tsurimoto, T.; Nakagawa, T.; Masukata, H.; Takahashi, T. S. *eLife*. **2016**, *5*, e15155.
- 2) Kanamori, T.; Kaneko, S.; Hamamoto, K.; Yuasa, H. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 288.
- 3) Du, Y.; Kanamori, T.; Yaginuma, Y.; Yoshida, N.; Kaneko, S.; Yuasa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2024**, *114*, 129988.

細胞内環境における pcPNA/DNA 複合体形成の確立

(東京工科大院工¹・東京工科大院・バイオ・情報メディア²)○中澤 和那¹・須磨岡 淳¹・松井 毅²

Establishment of pcPNA/DNA complex formation in the intercellular environment

(¹Graduate School of Engineering, Tokyo University of Technology, ²Graduate School of Bionics, Computer and Media Science, Tokyo University of Technology)

○Yasuna Nakazawa¹, Jun Sumaoka¹, Takeshi Matsui²

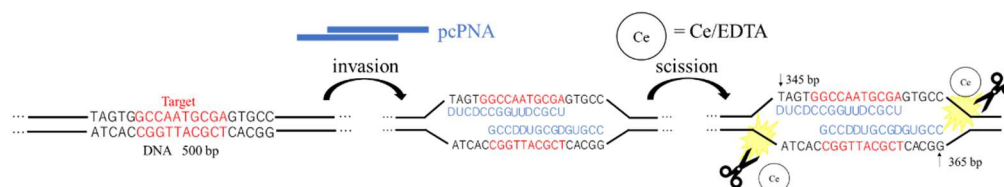
PNA is known to form stable PNA/DNA double-strands with DNA. Furthermore, among the forms of dsDNA recognition by PNA, double-duplex invasion, in which two PNAs invade dsDNA, recognizes a wide range of sequences. However, the problem is that PNA/PNA is preferentially formed because the two PNAs are complementary. Therefore, pcPNA was developed by replacing bases A and T with 2,6-diaminopurine (D) and 2-thiouracil (U) to make PNA/DNA more stable. Ce(IV)/EDTA was found to hydrolyze ssDNA much faster than dsDNA. By combining pcPNA and Ce(IV)/EDTA, we have succeeded in developing an artificial restriction endonuclease (ARCUT) that selectively cleaves dsDNA in vitro experiments.

In this study, we aimed to make ARCUT functional in cells. If ARCUT can function in vivo, it is expected to contribute to the elucidation of various biological phenomena. In this presentation, we will report the cleavage reaction of ARCUT targeting the human SASPase gene in vitro, and the results of administration of pcPNA and ARCUT to cells using lipofection and electroporation methods.

Keywords : PNA, double-duplex invasion, Ce(IV)

ペプチド核酸(PNA)は、DNA と安定な PNA/DNA 二本鎖を形成することが知られている。さらに、PNA による dsDNA 認識形態の中でも dsDNA に二本の PNA が侵入する double-duplex invasion は広範な配列を認識する。しかし二本の PNA は相補的な配列のため PNA/PNA が優先して形成されることが問題である。そこで PNA/DNA がより安定となるように塩基 A と T を 2,6-diaminopurine(D)と 2-thiouracil(U)に置き換えた pcPNA が開発された。また Ce(IV)/EDTA は dsDNA よりも ssDNA を圧倒的に速く加水分解することが見出された。以上の pcPNA と Ce(IV)/EDTA を併用することで、*in vitro* の実験において dsDNA を選択的に切断する人工制限酵素(ARCUT)の開発に成功している¹⁾。

本研究では、細胞内において ARCUT を機能させることを目的とした。もし、ARCUT を *in vivo* で機能させることが出来れば、様々な生命現象の解明に貢献できると期待される。発表では、ヒト SASPase 遺伝子を標的とする ARCUT の *in vitro* における切断反応、リポフェクション法やエレクトロポレーション法を用いた pcPNA および ARCUT の細胞への投与結果について報告する。



1) Artificial restriction DNA cutter for site-selective scission of double-stranded DNA with tunable scission site and specificity. M. Komiyama, Y. Aiba, Y. Yamamoto and J. Sumaoka, Nat Protoc, **2008**, 3, 655-662

核酸集合技術による細胞機能制御を誘導する核酸の化学修飾の探索

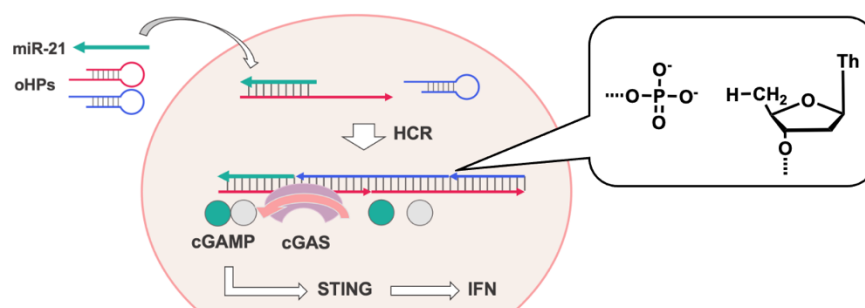
(東大院工) ○相場瑤子・岡本晃充

Exploration of Chemical Modifications of Nucleic Acids for Inducing Cell Function Regulation through Nucleic Acid Assembly Technology (Graduate School of Engineering, Tokyo University) ○Tamako Aiba, Okamoto Akimitsu

Exogenous double-stranded DNA has long been regarded as effective in cancer immunotherapy because it activates innate immune responses through various DNA sensors inside and outside the cell. However, low specificity toward cancer cells remains problematic, often leading to systemic immunotoxicity. To address this issue, our laboratory developed oncolytic hairpin probes (oHPs) that selectively induce cell death in cancer cells overexpressing the oncogenic microRNA-21 (miR-21).^[1] These oHPs form long double-stranded DNA via a miR-21-triggered Hybridization Chain Reaction (HCR),^[2] thereby inducing type I interferon expression through the cGAS–STING pathway and inhibiting tumor growth. In the present study, we sought to enhance the binding affinity between oHPs and cGAS by exploring optimal modifications—specifically, synthesizing a 5'-deoxythymidine modification at the 5' terminus of thymidine. This modification alleviates steric hindrance in the HCR products and is expected to improve cGAS-binding activity (Figure).

Keywords : DNA; cGAS; HCR

外部由来の二本鎖 DNA は細胞内外の DNA センサーによって自然免疫反応を活性化させることから、がん免疫療法に有効と考えられてきたが、がん細胞特異性の低さに伴う全身的な免疫毒性が課題であった。そこで当研究室では、発がん性 miR-21 を多量に発現するがん細胞を標的に、選択的に細胞死を誘導する腫瘍溶解性ヘアピンプローブ (oHPs) を開発した。^[1] oHPs は、miR-21 を引き金とする Hybridization Chain Reaction (HCR)^[2] により長鎖 DNA 二重鎖を形成し、cGAS-STING 経路を介して 1 型インターフェロンを発現させ腫瘍増殖を抑制する。本研究では cGAS の DNA 二重鎖との結合を効率化するため、oHPs の 5'末端に 5'-デオキシチミジン修飾を合成した (Figure)。HCR 産物にできるニックの立体干渉が緩和し、cGAS がリン酸バックボーンを認識しやすくなることが期待される。



1) Morihira, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 135–142. 2) Dirks, R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, *101*, 15275–15278.

Development of a nucleobase-recognition site-conjugated donor-acceptor complex catalyst for base selective trifluoromethylation

(Graduate School of Pharmaceutical Science, The University of Tokyo,) ○Zheng Haoran, Harunobu Mitsunuma, Motomu Kanai

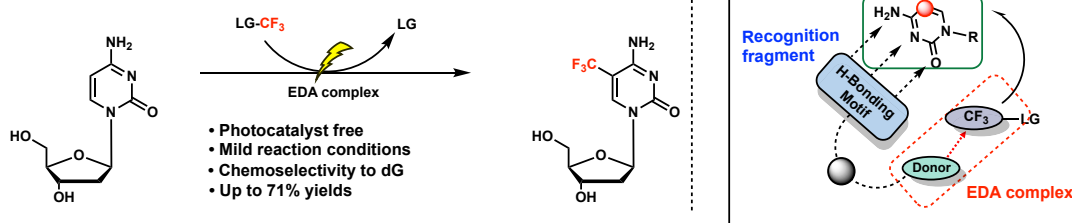
Keywords: DNA modification; Trifluoromethylation; Base recognition; EDA complex; Site selectivity

Chemical modification of DNA molecules, a key mechanism in epigenetic regulation, plays crucial roles in gene expression and disease development. Among various DNA modifications, trifluoromethylation has gained significant attention due to its unique electronic effects, steric properties, and lipophilicity. These modifications not only alter DNA's physicochemical properties but also modulate protein interactions. However, traditional synthesis of such nucleoside analogs requires multiple steps of chemical modifications from protected nucleosides. Therefore, developing efficient, mild, and water-compatible methods for direct or late-stage functionalization of nucleosides and oligonucleotides remains highly desirable.¹⁻³

Herein, we present a novel selective trifluoromethylation system featuring a dual functional design that combines base recognition with radical generation capabilities. The system employs an organic catalyst that forms electron donor acceptor (EDA) complex with CF_3 sources.⁴ Under visible light irradiation, the complex undergoes controlled radical generation through single-electron transfer processes. Guided by the base recognition, the targeted nucleosides undergo selective radical modification followed by catalyst-mediated oxidation to achieve trifluoromethylation.

This process utilizes commercially available and an inexpensive CF_3 donor as the trifluoromethyl source and operates under mild conditions. The rigid linkage connecting the base recognition module, significantly enhancing reaction efficiency and the selectivity towards different nucleosides

Deoxycytidine photoinduced trifluoromethylation



1) Y. Ito, Y. Hari, *Chem. Pharm. Bull.* **2017**, 65, 982. 2) R. Xie, G Chen, *Nat. Commun.* **2024**, 15, 2549. 3) K. Podskoczyj, G. Leszczynska, *Org. Biomol. Chem.* **2023**, 21, 2809. 4) Y. Huang, C. Y. He, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 13662.

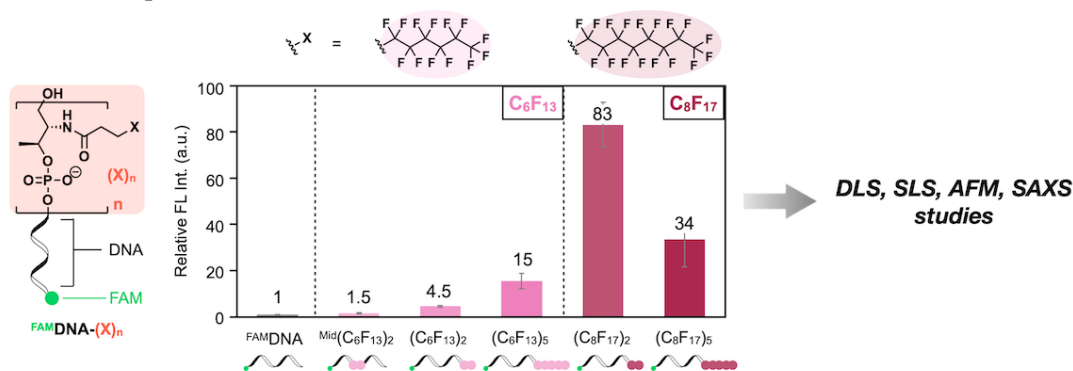
Nano-assembled structures and cellular delivery of fluorocarbon-DNA conjugate

(¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, ²Yokohama Technical Center, AGC Inc.) ○ Minako Narita¹, Ai Kohata¹, Taiichi Kageyama¹, Honoka Watanabe¹, Kohsuke Aikawa¹, Kunihiro Morihiro¹, Akimitsu Okamoto¹, Takashi Okazoe^{1,2}, Daisuke Kawaguchi¹

Keywords: DNA conjugate, Perfluoroalkyl, Self-assembly, Cellular delivery

Nucleic acid therapeutics face challenges in crossing cellular membranes due to their negatively charged backbone, necessitating the development of efficient intracellular delivery technologies.¹ Amphiphilic DNA conjugates self-assemble in an aqueous medium and internalize into cells via energy-dependent endocytosis, which makes them a promising tool for intracellularly delivering negatively charged DNA. High DNA contents in the nano-assembly enhance the cellular uptake efficiency through the interaction with cellular membrane receptors², although there are no reports on effective molecular design of DNA conjugates based on a structural aspect of the nano-assembly.

The perfluoroalkyl (R_F) group, which is chemically stable and biologically inert, is a promising candidate as a hydrophobic part in DNA conjugates.³ In this work, we synthesized a series of R_F -appended DNA conjugates (R_F -DNA conjugates) by conventional solid-phase DNA synthesis, each carrying a threoninol structure in its backbone. The cellular uptake efficiencies of R_F -DNA conjugates varied with the lengths, positions, and numbers of the R_F groups. We systematically investigated the physicochemical properties of R_F -DNA conjugates by dynamic and static light scattering (DLS and SLS), atomic force microscopy (AFM), and small-angle X-ray scattering (SAXS), aiming to elucidate the relationship between R_F structure and cellular uptake.⁴



1) A. Gupta, J. L. Andresen, R. S. Manan, R. Langer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2021**, 178, 113834. 2) a) P. C. Patel, D. A. Giljohann, W. L. Daniel, D. Zheng, A. E. Prigodich and C. A. Mirkin, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2250–2256. b) C.-J. Kim, G.-H. Kim, E. H. Jeong, H. Lee and S.-J. Park, *Nanoscale* **2021**, 13, 13758–13763. 3) a) M. A. Miller and E. M. Sletten *ChemBioChem* **2020**, 21, 3451–3462. b) K. Aikawa and T. Okazoe, *The Royal Society of Chemistry*, **2022**, pp 477–515. 4) M. Narita, A. Kohata, T. Kageyama, H. Watanabe, K. Aikawa, D. Kawaguchi, K. Morihiro, A. Okamoto, T. Okazoe, *ChemBioChem* **2024**, 25, e202400436.

フィンガードメインにおける DNA ポリメラーゼの変異が修飾ヌクレオチドの取り組みに及ぼす効果

(日大院総合基¹・医薬健栄研²・阪大院薬³・阪大先端⁴) ○田澤 駿¹・片岡 由佳¹・星野 秀和²・石田 健太²・笠原 勇矢^{2,3}・小比賀 聡^{3,4}・栗原 正靖¹

Effect of DNA polymerase mutations in the fingers domain on incorporation of modified nucleotides (¹*Grad. Sch. Integrated Basic Sci., Nihon Univ.*, ²*NIBIOHN*, ³*Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.*, ⁴*OTRI, Osaka Univ.*) ○Shun Tazawa¹, Yuka Kataoka¹, Hidekazu Hoshino², Kenta Ishida², Yuuya Kasahara^{2,3}, Satoshi Obika^{3,4}, Masayasu Kuwahara¹

It is known that the linker structure at the modification site has a significant effect on DNA polymerase's recognition of base-modified nucleotides as substrates¹. Some DNA polymerases can accept modified nucleotides as substrates, but depending on the chemical structure of the modification group introduced; this can be hindered by the substrate specificity of the polymerase². On the other hand, modifications such as the fingers domain can enable efficient incorporation of modified substrates³. Previous studies have shown that the fingers domain retains the phosphate group of nucleoside triphosphates with modifications at the sugar moiety and induces a conformational change, thereby improving the substrate delivery ability to the active center³. Mutations of this domain may have a significant effect on the incorporation efficiency of base-modified substrates. Therefore, in this study, we investigated the introduction efficiency of three types of base-modified nucleoside triphosphates with slightly different chemical structures of the linker arms using *KOD* DNA polymerase variants.

Keywords : *KOD DNA polymerase; Fingers domain; Linker arm*

DNA ポリメラーゼが塩基修飾ヌクレオチドを基質として認識する上で、修飾部位のリンカー構造が大きな影響を及ぼすことが分かっている¹。ある種の DNA ポリメラーゼは、修飾ヌクレオチドを基質とすることが可能であるが、導入する修飾基の化学構造によっては、ポリメラーゼの基質特異性に阻まれる²。一方、フィンガードメインなどの改変により、効率的に修飾基質を取り込めるようになることがある³。これまでの研究でフィンガードメインは、糖部位に修飾をもつヌクレオシド三リン酸のリン酸基を保持しコンフォメーション変化を導くことで活性中心への基質送達能力を向上させることが分かっている³。このドメインの改変は、塩基修飾基質の取り込み効率に大きな効果を及ぼす可能性がある。そこで本研究では、リンカーアームの化学構造がわずかに異なる 3 種類の塩基修飾ヌクレオシド三リン酸を用いて、*KOD* DNA ポリメラーゼ改変体による導入効果を検討した。

1. Lee SE, Sidorov A, Goullain T, Mignet N, Thorpe SJ, Brazier JA, Dickman MJ, Hornby DP, Grasby JA, Williams DM. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29, 1565–73.
2. Kuwahara M, Nagashima J, Hasegawa M, Tamura T, Kitagata R, Hanawa K, Hososhima S, Kasamatsu T, Ozaki H, Sawai H. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 5383–94.
3. Hoshino H, Kasahara Y, Kuwahara M, Obika S. *J Am Chem Soc.*, **2020**, 142, 21530–7.

チオフラビン T の多量化によるグアニン四重鎖への結合選択性改変の検討

(日大院総合基¹⁾) ○中村 友昭¹・片岡 由佳¹・栗原 正靖¹

Modification of the binding selectivity to G-quadruplexes by Thioflavin T oligomerization

(¹Graduate School of Integrated Basic Science, Nihon University) ○Tomoaki Nakamura,¹ Yuka Kataoka,¹ Masayasu Kuwahara¹

The expression control region (promoter region) of genes and telomeres at the ends of chromosomes contain consecutive G4 sequences. An example of the former is the promoter region of *hTERT*, where mutations (C→T) are frequently observed in urothelial carcinoma and melanoma¹. An example of the latter is its transcript, telRNA, which is known to be involved in the inhibition of telomerase activity². In general, thioflavin T (ThT) is known to be useful as a fluorescent probe for detecting amyloid fibrils, G4s, and poly(A)³⁻⁵. Previous studies have revealed that ThT derivatives with a substituent at the N³ position selectively fluoresce in parallel G4s. Taking advantage of this phenomenon, we have recently constructed a detection system for divalent metal ions using a ThT dimer conjugated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)⁶. In this study, we synthesized analogs by linking plural ThT derivatives and evaluated their fluorescence properties for the following oligo-DNAs (GGG GAG GGG CTG GGA GGG CCC GGA GGG GGC TGG GCC GGG GAC CCG GGA GGG GTC GGG ACG GGG CGG GG) and (GGG GAG GGG CTG GGA GGG CCC GGA GGG GGC TGG GCC GGG GAC CCG GG), (GGG GAG GGG CTG GGA GGG), etc.

Keywords : Thioflavin T, G-quadruplex, Bioprobe, Amyloid fibrils

遺伝子の発現制御領域（プロモーター領域）や染色体末端のテロメアには、グアニン四重鎖（G4）配列が連続する部分がある。前者の例としては *hTERT* のプロモーター領域があり、尿路上皮癌や黒色腫にこの部位おける変異（C→T）が頻繁にみられる¹。また、後者の例としては、その転写物である telRNA があり、テロメラーゼ活性の阻害に関与していることが知られている²。一般に、チオフラビン T (ThT) は、アミロイド線維やグアニン四重鎖 (G4)、ポリ A を検出する蛍光プローブとして有用であることが知られている³⁻⁵。これまでの研究で、N³位に置換基を導入した ThT 誘導体は、特に、パラレル型の G4 に対して選択的に蛍光を示すことを明らかにした。この現象を利用し、近年さらに、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) とコンジュゲート化した ThT ダイマーを用いた二価金属イオンの検出系を構築している⁶。本研究では、ThT 誘導体を複数連結したアナログを合成し、次のオリゴ DNA (GGG GAG GGG CTG GGA GGG CCC GGA GGG GGC TGG GCC GGG GAC CCG GGA GGG GTC GGG ACG GGG CGG GG) および (GGG GAG GGG CTG GGA GGG CCC GGA GGG GGC TGG GCC GGG GAC CCG GG), (GGG GAG GGG CTG GGA GGG) 等に対する蛍光特性等を評価した。

1) Martadinata H, Phan T A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 7, 2570.

2) Schoeftner S, Blasco MA. *Nat Cell Biol.* **2008**, *10*, 228.

3) Kataoka Y, Fujita H, Kasahara Y, Yoshihara T, Tobita S, Kuwahara M. *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 12078.

4) Kataoka Y, Fujita H, Afanaseva A, Nagao C, Mizuguchi K, Kasahara Y, Obika S, Kuwahara M. *Biochemistry*, **2019**, *58*, 493.

5) Kataoka Y, Fujita H, Endoh T, Sugimoto N, Kuwahara M. *Molecules* **2020**, *25*, 4936.

6) Wariishi T, Kataoka Y, Nakamura T, Kasahara Y, Kuroda M, Obika S, Kuwahara M. *Anal Biochem.* **2024**, *690*, 115525.

New Data Science in Nucleic Acids Chemistry (17): Development of a pseudo-cellular system with different molecular crowding environments

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

○Masako Takatsu¹, Hisae Tateishi-Karimata^{1,2}, Naoki Sugimoto¹

Keywords: Nucleic acids, G-quadruplex, Pseudo-cellular system (SHELL), Intracellular environment, Molecular crowding

Non-canonical structures of nucleic acids, especially G-quadruplexes, play critical roles in regulating gene expression and are known to exhibit dynamic changes in response to cellular environments.¹ To investigate how cellular environments influence nucleic acid structures and gene expression, we have developed a pseudo-cellular system termed SHELL (System for Highlighting the Environments Inside the Cell), which replicates intracellular molecular conditions.² We found that cellular environments in mild cancer cells facilitate the stable G-quadruplex formation, even with fluctuating K⁺ concentrations.² Therefore, changes in cellular environments can influence significantly nucleic acid structures. However, no studies have investigated systematically the effects of cellular environments on nucleic acid stability.

In this study, we constructed SHELLs with different molecular crowding environments (total protein amounts and ion concentrations) by modifying the fixation and permeabilization conditions described in Figure 1. Specifically, we adjusted the concentrations of methanol or PFA for fixation and Triton X-100 for permeabilization to create SHELLs with different total protein amounts. In this presentation, we will discuss the correlation between the total protein amounts in SHELLs and the stability of G-quadruplex formation.

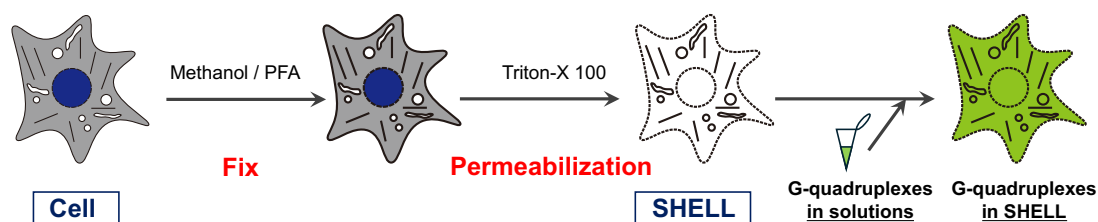


Figure1.

Figure 1. Schematic illustration of the SHELL preparation and experimental outline.

Living cells are fixed with methanol or PFA to preserve intracellular structures. Subsequently, the cells are permeabilized with diluted TritonX-100, creating perforated cells that allow small molecules to leak out. This cell state is defined as SHELL. In this experiment, the target molecule (G-quadruplex) is introduced into the SHELL to observe its behavior under pseudo-cellular systems with different protein levels.

1) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 642.

2) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, S. Takahashi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*, 8005.