

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

■ 2026年3月17日(火) 9:00 ~ 11:40 | 会場 H935 (9号館 [3階] 935)

[H935-1am] 口頭A講演

座長：西原 達哉、川井 清彦

◆ 日本語

9:00 ~ 9:10

[H935-1am-01] ジアルキルニトロベンジル基を有するオリゴデオキシヌクレオチドによる低酸素細胞での遺伝子制御

○佐藤 瞭¹、田邊 一仁¹、西原 達哉¹ (1. 青山学院大学)

◆ 日本語

9:10 ~ 9:20

[H935-1am-02] miRNAをイニシエーターとしたハイブリダイゼーション連鎖反応による選択的な細胞死誘導を実現する最適な核酸設計法

○大岩 洋輝¹、岡本 晃充¹ (1. 東大院工)

◆ 日本語

9:20 ~ 9:30

[H935-1am-03] 大規模RNAライブラリの作製とSELEXによるRNAアプタマーの選抜

○橋山 遼¹、林 剛介¹、村上 裕¹ (1. 名古屋大学)

◆ 日本語

9:30 ~ 9:40

[H935-1am-04] DNAナノ構造体を用いた集光性アンテナ複合体の再構築

○近藤 隆之介¹、小松原 風汰¹、Peng Lin¹、Arivazhagan Rajendran¹、中田 栄司¹ (1. 京都大学)

◆ 日本語

9:40 ~ 9:50

[H935-1am-05] 核酸の細胞内取り込みを促進する多価脂質修飾法の探索

○杉浦 天斗¹、猿渡 峻正¹、岡本 晃充¹ (1. 東大院工)

◆ 日本語

9:50 ~ 10:00

[H935-1am-06] RNAi医薬を志向したマンノース-6-リン酸-siRNAコンジュゲートの設計と合成

○佐藤 仁昂¹、上野 義仁^{1,2,3,4}、坂本 修一⁵ (1. 岐阜大学大学院連合科農学研究、2. 岐阜大学応用生物科学部、3. 岐阜大学大学院自然科学技術研究科、4. One Medicine 創薬シーズ開発・育成研究教育拠点、5. 微生物化学研究所)

◆ 日本語

10:00 ~ 10:10

[H935-1am-07] 生理条件下におけるアセトアルデヒド由来DNA変異誘発の1分子蛍光計測

○磯谷 友孝¹、近藤 洋平¹、川井 清彦¹ (1. 東京科学大学)

10:10 ~ 10:20

休憩

◆ 日本語

10:20 ~ 10:30

[H935-1am-08] 塩基部修飾型4'-チオヌクレオチドを導入した化学修飾mRNAの開発

○黒田 知優¹、柏原 優太²、月本 準²、田良島 典子²、南川 典昭² (1. 徳島大薬、2. 徳島大院薬)

◆日本語

10:30 ~ 10:40

[H935-1am-09] 金仲介塩基対を含む核酸のX線構造解析

○小杉 海¹、菅原 彩乃¹、岩瀬 襟伽¹、藤原 章司²、金澤 宏樹¹、小野 晶²、近藤 次郎¹ (1. 上智大学、2. 神奈川大学)

◆日本語

10:40 ~ 10:50

[H935-1am-10] カチオン性タグ修飾オリゴDNAによる生体反応のMS Imaging

○小野 優佳¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

◆日本語

10:50 ~ 11:00

[H935-1am-11] 塩基部修飾ヌクレオシドを含むsiRNAのmiRNA様オフターゲット抑制

○井上 武刀¹、戎井 綾乃²、野木 悠平¹、八幡 眞²、月本 準¹、田良島 典子¹、南川 典昭¹ (1. 徳島大院薬、2. 徳島大薬)

◆日本語

11:00 ~ 11:10

[H935-1am-12] NMR滴定実験に基づくミスマッチ結合分子中間体の平衡論的解析

○蒔苗 秀隆¹、櫻林 修平^{1,3}、宮ノ入 洋平²、堂野 主税³、中谷 和彦³、児嶋 長次郎¹ (1. 横浜国立大学、2. 阪大蛋白研、3. 阪大産研)

◆日本語

11:10 ~ 11:20

[H935-1am-13] DNA i-motifの液-液相分離能決定因子の探索

○鈴木 涼介¹、川内 敬子¹、三好 大輔¹ (1. 甲南大FIRST)

◆英語

11:20 ~ 11:30

[H935-1am-14] Nearest-neighbour parameters for stability prediction of 2'-MOE RNA duplex in cancer cells

○Kun Chen¹, Hisae Tateishi-Karimata^{1,2}, Shuntaro Takahashi^{1,2}, Saki Matsumoto¹, Naoki Sugimoto¹ (1. Konan University FIBER, 2. Konan University FIRST)

◆日本語

11:30 ~ 11:40

[H935-1am-15] がん微小環境に応答するANDゲート型細胞膜集積性人工核酸の開発

○黒住 結生¹、山田 梨沙¹、岡 大陸¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

ジアルキルニトロベンジル基を有するオリゴデオキシヌクレオチドによる低酸素細胞での遺伝子制御

(青学大院理工) ○佐藤 瞭・西原 達哉・田邊 一仁

Gene regulation in hypoxic cells by oligodeoxynucleotides bearing dialkylnitrobenzyl units
(Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○Ryo Sato, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

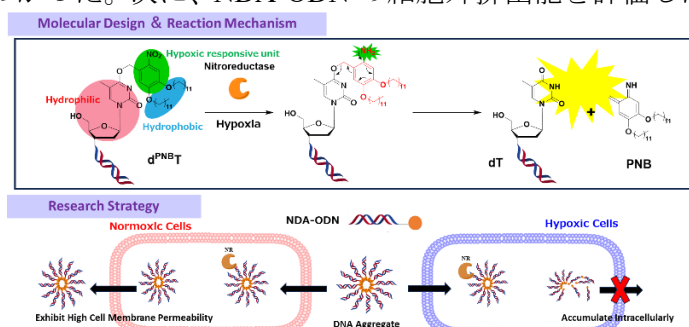
Hypoxic cells are associated with cancer invasion and therapeutic resistance. We have attempted to develop an artificial oligodeoxynucleotides (ODNs) with the ability to selectively accumulate in hypoxic cells to effectively treat these cells. Here, we report nitrobenzyl-modified artificial oligonucleotides (NDA-ODN) that selectively accumulate in hypoxic cells for gene regulation in these cells. NDA-ODN was designed as an amphiphilic DNA incorporating a nitrobenzyl group with two alkyl chains (d^{PNBT}), enabling self-assembly and efficient cellular uptake. In aerobic cells, the NDA-ODNs were rapidly extruded from cells. In contrast, in hypoxic cells, NDA-ODN was reduced by nitroreductase to form native ODNs without any modification to be remained in the cells. We found that NDA-ODN showed enhanced uptake in hypoxic A549 cells in a selective manner. At present, we are trying to evaluate gene regulation in hypoxic cells by NDA-ODN.

Keywords : Hypoxic Cells, Nitrobenzyl Groups, Oligodeoxynucleotides

低酸素細胞は、がんの浸潤や転移、治療抵抗性に深く関与する重要な病的細胞である。当研究グループでは、低酸素細胞を効果的に治療することを目的に、この細胞に選択的に集積する機能を備えた人工核酸の開発を進めてきた。

本研究では、低酸素環境下で選択的に集積するニトロベンジル基修飾人工核酸の開発を進めた。チミン塩基上に 2 本のアルキル鎖を有するニトロベンジル基 (d^{PNBT}) を導入した人工核酸 (NDA-ODN) を設計した。 d^{PNBT} を疎水部、DNA を親水部とする両親媒性構造を有する NDA-ODN は、水溶液中で会合体を形成し、高い細胞膜透過性を示す。細胞が低酸素細胞の場合は、NDA-ODN はニトロリダクターゼの基質となり、ニトロベンジル基が除去される結果、会合体は崩壊する。すなわち、膜透過性を失い、細胞内に集積する。他方、有酸素細胞では還元反応が進行せず、会合体構造を維持したまま速やかに細胞外へ排出される。

NDA-ODN はホスホロアミダイト法により合成した。また、臨界会合体形成濃度は $7.62\ \mu\text{M}$ と算出された。A549 細胞を用いて、蓄積特性を調べたところ、低酸素細胞内に選択的に蓄積することがわかった。次に、NDA-ODN の細胞外排出能を評価したところ、低酸素細胞内には 24 時間後においても細胞内に留まる一方、有酸素細胞では、速やかに排出されることがわかった。以上のように、NDA-ODN は高い低酸素細胞蓄積特性を持つことが示された。



miRNA をイニシエーターとしたハイブリダイゼーション連鎖反応による選択的な細胞死誘導を実現する最適な核酸設計法

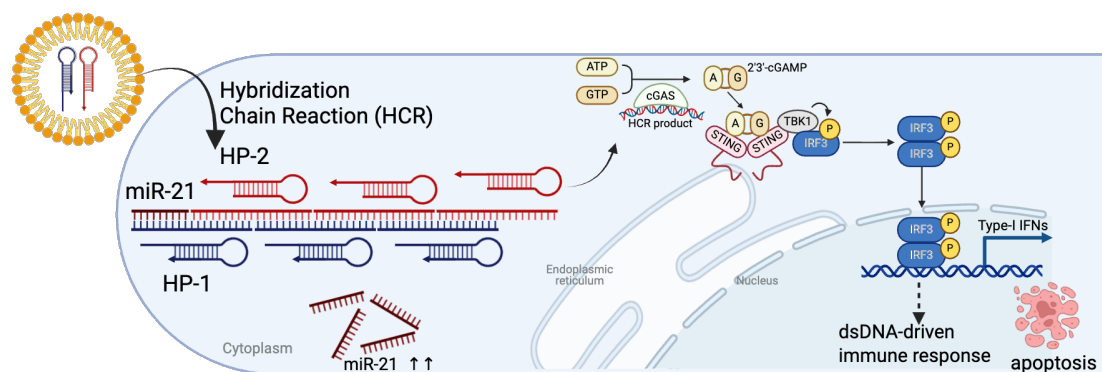
(東大院工¹) ○大岩 洋輝¹・岡本 晃充¹

Optimized Nucleic Acid Design Methods for Selective Cytotoxicity Using miRNAs as an initiator of Hybridization Chain Reaction (¹*Graduate School of Engineering, The University of Tokyo*) ○Hiroki Ooiwa,¹ Akimitsu Okamoto¹

Hybridization chain reaction (HCR), initiated by a short RNA, yields extended double-stranded nucleic acid assemblies. We utilized HCR to induce cancer-selective cytotoxicity by introducing the DNA hairpin pairs, which trigger HCR initiated by microRNAs overexpressed in tumors. Candidate miRNAs were identified through miRNA Sequencing (miR-Seq) miRNAs of tumor and normal cell lines. We explored nucleic acid design methods for cell-selective HCR by varying toehold and loop lengths (5-9 nt and 6-9 nt, respectively) and evaluating the HCR efficiency *in vitro* and in cells. DNA hairpin pairs with shorter loops and toeholds balanced initiation kinetics with low unintended HCR both *in vitro* and in cells.

Keywords : Nucleic Acid Therapeutics; DNA; Hybridization Chain Reaction; miRNA

ハイブリダイゼーション連鎖反応 (Hybridization Chain Reaction : HCR) は、短鎖 RNA を起点として長い二本鎖核酸集合体を形成する反応である。本研究では、腫瘍において過剰発現する miRNA を起点として HCR を誘導する DNA ヘアピンのペアを導入することで、がん選択的な細胞毒性の誘導を試みた。候補となる miRNA は、腫瘍細胞株および正常細胞株を対象とした miRNA シーケンシング (miR-Seq) により同定した。細胞選択的な HCR を実現するため、ヘアピン DNA のトーホールドおよびループ領域の長さ (それぞれ 5-9 nt、6-9 nt) を変化させ、*in vitro* および細胞内における HCR 効率を評価した。その結果、短いループおよびトーホールドを有する DNA ヘアピンペアは、HCR の開始効率と非特異的な HCR の抑制とのバランスが良好であり、*in vitro* および細胞内の両条件において高い選択性を示すことが明らかとなった。



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

大規模 RNA ライブラリの作製と SELEX による RNA アプタマーの選抜

(名大院工¹) ○橋山 遼¹・林 剛介¹・村上 裕¹

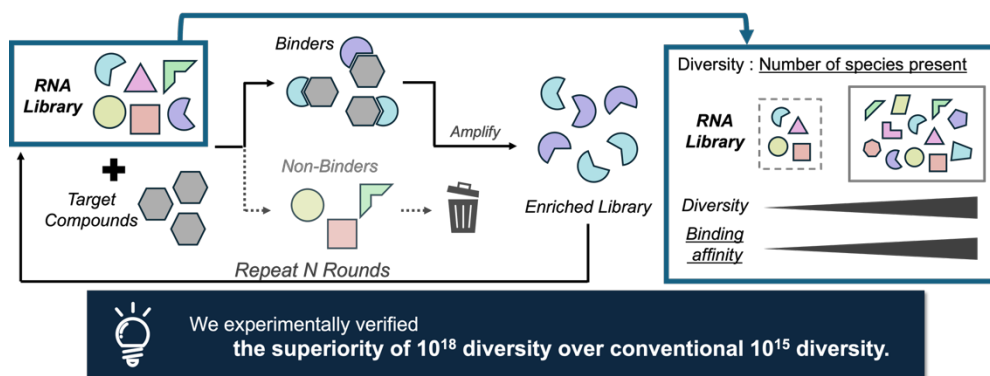
Construction of Large-Scale RNA Libraries and Discovery of RNA Aptamers Using SELEX
(¹Graduate School of Engineering, Nagoya University) ○Ryo Hashiyama¹, Gosuke Hayashi¹, Hiroshi Murakami¹

In the evolutionary molecular engineering method, it is thought that greater number of ligand candidates explored, the higher the binding affinity of the ligands found. This has recently been experimentally proven, using the diversity of $10^6 \sim 10^{12}$ in mRNA display method¹⁾. Therefore, in this study, we constructed the RNA initial library with the diversity of 10^{18} , which is larger than that of the conventional libraries by about 1,000 times. Furthermore, perform the SELEX using those RNA libraries, we considered the importance of the diversity of RNA library.

Keywords : Evolutionary molecular engineering; Directed evolution; Aptamer

進化分子工学的手法において、標的に対して高い結合親和性のリガンドを取得するためには、より多くのリガンド候補の結合能を調査することが重要であると考えられている。最近では、mRNA 提示法において、 $10^6 \sim 10^{14}$ の多様性のライブラリを用いて選択が行われ、ライブラリの多様性と得られる大環状ペプチドリガンドの結合能に相関があることが示されている¹⁾。そこで本研究では、RNA ライブラリの多様性を一般的な 10^{15} から、約 1,000 倍となる 10^{18} まで向上させた大規模 RNA ライブラリを作製し、これらライブラリを用いて同一標的に対して SELEX を行い、RNA アプタマーを濃縮した。これにより、ライブラリの多様性の向上が、濃縮される RNA アプタマーにどのような影響を与えるかを考察した。

1) Zhao, J.; Li, Y.; Terasaka, N.; Aikawa, H.; Suga, H., Diversity Scale of Library Matters: Impact of mRNA Library Diversity Scales on the Discovery of Macrocyclic Peptides Targeting a Protein by the RaPID System. *ACS Cent. Sci.*, **2025**, 11(3), 431-440



DNA ナノ構造体を用いた集光性アンテナ複合体の再構築

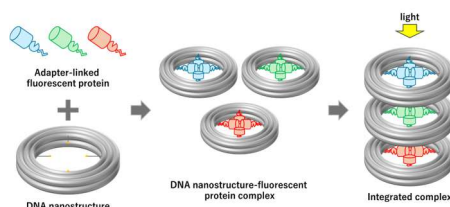
(京大エネ研) ○近藤 隆之介・小松原 風汰・Lin Peng・Rajendran Arivazhagan・中田 栄司

Reconstruction of Light-Collecting Antenna Complexes Using DNA Nanostructures (*Institute of Advanced Energy, Kyoto University*)○Ryunosuke Kondo, Futa Komatsubara, Peng Lin, Arivazhagan Rajendran, Eiji Nakata

Phycobilisomes (PBS) are one of the light-harvesting antenna pigment proteins found in cyanobacteria and so on, performing light capture in the initial stages of photosynthesis. If the complexes capable of light energy transfer could be artificially constructed, it would enable verification of the energy transfer process and the potential development of highly efficient energy conversion systems surpassing biological ones. We have focused on DNA nanostructures as scaffolds to construct complex assembly, and modular adapters have been developed to locate the proteins of interest at precisely defined locations on DNA nanostructure. Here, the toroidal DNA nanostructures with fluorescent proteins positioned on their inner surfaces were designed, and the stacked complex via DNA hybridization was constructed. And the function of the constructed complex will be discussed.

Keywords : DNA nanostructure; Fluorescent proteins; Light-harvesting antennae

フィコビリソーム(PBS)はシアノバクテリアや紅藻、灰色藻に見られる集光性アンテナ色素タンパク質で、光合成の初期段階での光捕集を担っている¹⁾。PBSのような光エネルギー伝達を達成できる複合体を人工的に構築できれば、エネルギー伝達過程の検証や、生体を超える高効率なエネルギー変換システムの構築が期待できる。当研究室では、DNA オリガミ法²⁾で構築されるDNA ナノ構造体を足場として、DNA ナノ構造体上の狙った位置にタンパク質を配置可能なモジュール型アダプター³⁾を開発してきた。本研究では、蛍光タンパク質を内側に配置可能なトロイド状のDNA ナノ構造体を設計し、これらをDNA ナノ構造体の自己組織化⁴⁾により積み重なった複合体を作製して、複合体形成に伴う蛍光タンパク質間での光エネルギー移動を評価することを目指した。DNA ナノ構造体の骨格となる一本鎖DNA(1536 nt)を高純度に作製し、これを用いてトロイド状DNA ナノ構造体を調製し、原子間力顕微鏡で設計通りに構築できていることを確認した。さらに、モジュール型アダプターを融合した蛍光タンパク質を、DNA ナノ構造体上に配置することに成功した。その自己組織化についても評価をおこなっているので報告する。



- 1) B. R. Green, *Biomolecules*, **2019**, 9, 748. 2) P. W. K. Rothmund, *Nature*, **2006**, 440, 297.
3) T. A. Ngo, et al., *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 12428. 4) X. Wang, et al., *JACS.*, **2022**, 144, 4403.

核酸の細胞内取り込みを促進する多価脂質修飾法の探索

(東大院工) ○杉浦 天斗・猿渡 峻正・岡本 晃充

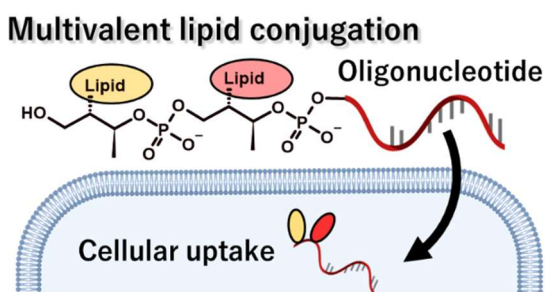
Exploration of multivalent lipid conjugation for enhancing cellular uptake of nucleic acids
(Graduate school of Engineering, The University of Tokyo) ○Tento Sugiura, Ryosei Sawatari, Akimitsu Okamoto

The clinical application of nucleic acid therapeutics is significantly limited by poor delivery efficiency. To address this problem, covalent conjugation of lipids to nucleic acids has been investigated to enhance cellular uptake. The hydrophobicity and structure of the lipid moiety critically influence nucleic acid behavior¹. Conventional approaches have predominantly relied on monovalent conjugation due to synthetic constraints, which often result in limited delivery efficacy. In this study, we explored a multivalent lipid conjugation strategy by attaching multiple lipids to the nucleic acid terminus to fine-tune hydrophobicity and compared how lipid structure and hydrophobicity affect cellular uptake. We synthesized multiple lipid phosphoramidites containing an artificial nucleic acid backbone and introduced them into the terminus of oligonucleotide with varying numbers and types of lipids. The hydrophobicity of the obtained oligonucleotides was evaluated by measuring the critical micelle concentration (CMC) using dynamic light scattering (DLS) and by reverse-phase HPLC. Furthermore, we assessed the cellular uptake efficiency of fluorescently labeled oligonucleotides to determine the impact of the hydrophobicity and structure of the lipid modifications on nucleic acid delivery efficiency.

Keywords : Nucleic acid, Drug delivery system, Lipid, Cellular uptake

核酸医薬は送達効率の低さが課題となり、その臨床応用が大きく制限されている。そこで核酸に脂質を共有結合することで、細胞内取り込み効率を向上させる手法が研究されてきた。一般に修飾脂質の疎水性及び構造が核酸の挙動に大きな影響を与えることが知られている¹。共有結合型脂質修飾は化学合成上の制約から単一の脂質を導入した一価修飾が多く用いられてきたが、送達能に限界があった。本研究では、複数の脂質を核酸の末端に修飾する「多価修飾」によって核酸の疎水性を調整し、疎水性及び構造が核酸の細胞内取り込みに与える影響を比較した。脂質部位として人工核酸骨格を有する複数の脂質ホスホロアミダイト体を合成し、DNA 自動合成機を用いて脂質の導入数及び種類の異なる多価脂質修飾オリゴヌクレオチドを合成した。得られたオリゴヌクレオチドについて、動的光散乱法(DLS)による臨界ミセル濃度の測定と逆相 HPLC によって核酸の疎水性を評価した。さらに、蛍光色素標識した修飾核酸の細胞内取り込み効率を評価することで、脂質修飾の疎水性と構造が核酸送達能に与える影響を評価した。

1. *Nucleic Acids Research*, **2019**, 47, 3, 1070–1081



RNAi 医薬を志向したマンノース-6-リン酸-siRNA コンジュゲートの設計と合成

(岐阜大学大学院連合科農学研究¹・岐阜大学応用生物科学部²・岐阜大学大学院自然科学技術研究科³・One Medicine 創薬シーズ開発・育成研究教育拠点⁴・微生物化学研究所⁵) ○佐藤 仁昂¹・坂本 修一⁵・上野 義仁^{1,2,3,4}

Design and Development of Mannose 6-Phosphate-Conjugated siRNAs for Targeted RNAi Therapeutics (¹*The United Graduate School of Agriculture Science (UGSAS), Gifu University.* ²*Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University,* ³*Graduate School of Natural Sciences and Technology, Gifu University,* ⁴*Center for One Medicine Innovative Translational Research (COMIT), Tokai National Higher Education and Research System,* ⁵*Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN)*) ○Hitotaka Sato,¹ Shuichi Sakamoto,⁵ Yoshihito Ueno^{1,2,3,4}

Mannose-6-phosphate (M6P) is known to interact specifically with the cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-M6PR), which is highly expressed on the cell surface of various cancers, including prostate and breast cancers. Consequently, utilizing M6P as a targeting ligand enables the development of efficient drug delivery systems (DDS). While sugar-ligand conjugation is expected to enhance target specificity and minimize off-target effects, the application of M6P to nucleic acid therapeutics remains largely unexplored. Furthermore, reports on the synthesis of multivalent M6P ligands and their phosphoramidite derivatives are still limited. In this study, we designed and synthesized a novel M6P-ligand phosphoramidite and established a straightforward synthetic strategy for multivalent M6P-siRNA conjugates using an automated oligonucleotide synthesizer. Biological evaluations revealed that these conjugates exhibit significant ligand-dependent gene knockdown activity in CI-M6PR-expressing K562 cells without the need for transfection reagents.

Keywords : *Nucleic acid therapeutics; siRNA; Drug delivery system; Sugar-ligand conjugate; Mannose-6-phosphate*

マンノース-6-リン酸 (M6P) は、前立腺がんや乳がんなどの細胞膜表面に高発現するカチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体 (CI-M6PR) と特異的に相互作用することが知られている。このため、M6P を標的化リガンドとして用いることで、効率的なドラッグデリバリーシステム (DDS) の構築が可能となる。特に、糖リガンドの修飾は標的特異性の向上やオフターゲット効果の抑制に寄与するが、M6P を核酸医薬に応用した例は極めて少ない。また、多価構造を有する M6P リガンドや、そのアミダイト体の合成報告も未だ限定的である。

本研究では、アミダイト化した M6P リガンドを新たに設計・合成し、核酸自動合成機を用いることで、多価 M6P-siRNA コンジュゲートの簡便な合成法を確立した。機能評価の結果、本コンジュゲートは CI-M6PR を発現する K562 細胞に対し、トランスフェクション試薬を介さずにリガンド依存的な遺伝子ノックダウン能を示すことを明らかにした。

生理条件下におけるアセトアルデヒド由来 DNA 変異誘発の 1 分子蛍光計測

(科学大生命理工¹) ○磯谷友孝¹・近藤洋平¹・川井清彦¹

Single-molecule fluorescence measurements of DNA mutations induced by acetaldehyde under physiological conditions (¹*Department of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo*) ○Tomotaka Isoya,¹ Yohei Kondo,¹ Kiyohiko Kawai¹

Acetaldehyde, a metabolite of ethanol, has gained significant attention as a carcinogenic factor associated with alcohol consumption. It is known to react with guanine (G) to form *N*²-ethylidene-G (ethG), which can induce DNA mutations through mispairing¹⁾. Detecting ethG is important for elucidating the molecular mechanisms of acetaldehyde-induced mutagenesis. However, ethG is produced in trace amounts and has a very short lifetime under physiological conditions. Previous studies have mainly relied on the detection of surrogate markers formed by chemical reduction of ethG into stable *N*²-ethyl-G^{2,3)}. Therefore, direct detection of ethG has remained challenging.

In this presentation, we report an investigation into the detection of acetaldehyde-derived DNA mutations using single-molecule measurements of changes in DNA binding and dissociation patterns of fluorescently labeled DNA. We aim to identify ethG by finding ethG-containing DNA strands from a vast population of DNA through massive single-molecule analysis.

Keywords : *Fluorescent Molecules; Single-Molecule Measurements; DNA Damage; Nucleic Acid*

エタノール代謝物であるアセトアルデヒドは飲酒に起因する発がん要因の 1 つとして注目されている。アセトアルデヒドはグアニン(G)と反応して *N*²-ethylidene-G (ethG)を生成することが知られており、誤った塩基対形成を介して DNA 変異を誘発する可能性がある¹⁾。ethGを検出することはアセトアルデヒドが引き起こす DNA 変異誘発の分子メカニズムを理解するうえで有用である。しかしながら、生理条件下において ethG の生成量は極めて低く短時間しか存在しない。これまでの研究では還元剤によって ethG を安定な *N*²-ethyl-G へと変換した代替指標の検出が主であり、ethG の直接検出は困難であった^{2,3)}。

本発表では、蛍光修飾 DNA の結合解離パターン変化の 1 分子計測を用いたアセトアルデヒド由来 DNA 変異誘発の検出に向けた検討について報告する。網羅的な 1 分子測定により、膨大な数の DNA の中から ethG を有する DNA 鎖を見つけ出すことで、ethG の同定を目指す。

1) H. Seitz, F. Stickel, *Nat. Rev. Cancer*. **2007**, 7, 599–612.

2) T. Matsuda *et al.*, *Carcinogenesis*. **2007**, 28, 2363–2366.

3) Y. Komoto, T. Ohshiro, M. Taniguchi, *Chem. Commun.* **2020**, 56, 14299–14302.

塩基部修飾型 4'-チオヌクレオチドを導入した化学修飾 mRNA の開発

(徳島大薬¹・徳島大院薬²) ○黒田 知優¹・柏原 優太²・月本 準²・田良島 典子²・南川 典昭²

Preparation of 4'-thiomodified mRNAs using base-modified 4'-thioNTP analogs (¹*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University*, ²*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University*) ○Chihiro Kuroda,¹ Yuta Kashiwabara,² Jun Tsukimoto,² Noriko Saito-Tarashima,² Noriaki Minakawa²

In the development of mRNA-based therapeutics, immunogenicity and poor biochemical stability of mRNA are drawbacks for clinical application. To develop modified mRNAs that overcomes these limitations, in this study, we have synthesized base-modified 4'-thiomodified nucleoside 5'-triphosphates, m6-4'SATP (**1**), m5-4'SCTP (**2**), 4'SΨTP (**3**), and m1-4'SΨTP (**4**), and prepared 4'-thiomodified mRNAs containing them. *N*-Glycosylated nucleosides, m6-4'SA and m5-4'SC, were synthesized via the Pummerer-type reaction between 4-thiofuranose derivatives and the corresponding nucleobases. *C*-Glycosylated nucleosides, 4'SΨ and m1-4'SΨ, were synthesized via Stille coupling between 4-thiofuranoid glycal derivatives and 5-iododimethoxypyrimidine, followed by hydroboration.¹ Then, we performed phosphorylation to obtain the corresponding 5'-triphosphates **1–4**, and then evaluated their recognition by RNA polymerases and their translatability into protein. In this presentation, we will report these details.

Keywords : mRNA; 4'-thiomodified nucleotide

mRNA 医薬の開発では、mRNA の免疫原性ならびに生体内での安定性が課題となる。本研究では、mRNA に免疫原性回避能および核酸酵素分解耐性を付与する人工核酸技術の創出を目的とし、m6-4'SATP (**1**)、m5-4'SCTP (**2**)、4'SΨTP (**3**) ならびに m1-4'SΨTP (**4**) の化学合成とそれらを含む 4'-チオ修飾 mRNA の創製に取り組んだ。*N*-ヌクレオシド類である m6-4'SA および m5-4'SC については、4-thiofuranose 誘導体と対応する核酸塩基との Pummerer 様反応を基盤として合成した。一方、*C*-ヌクレオシド類である 4'SΨ および m1-4'SΨ は、原口らの報告¹を参考に、4-thiofuranoid glycal 誘導体と 5-iododimethoxypyrimidine のスティールカップリングとそれに続くヒドロホウ素化反応を基盤として合成した。得られたヌクレオシドを対応する 5'-三リン酸体 **1–4** へと変換した後、これらを基質として各種 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応および翻訳反応についても検討した。本発表では、それらの詳細について報告する。

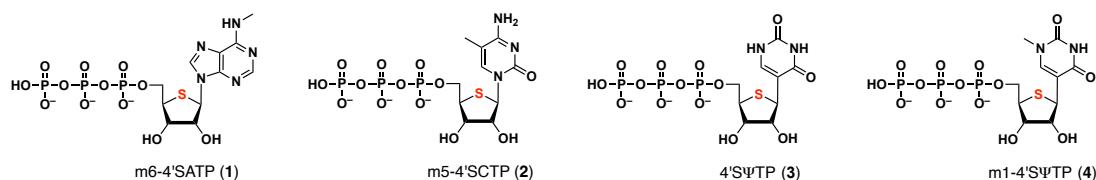


Figure 1. 4'-チオヌクレオチド 5'-三リン酸体 **1–4** の構造

1) K. Haraguchi et. al., *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 21, 8658

金仲介塩基対を含む核酸の X 線構造解析

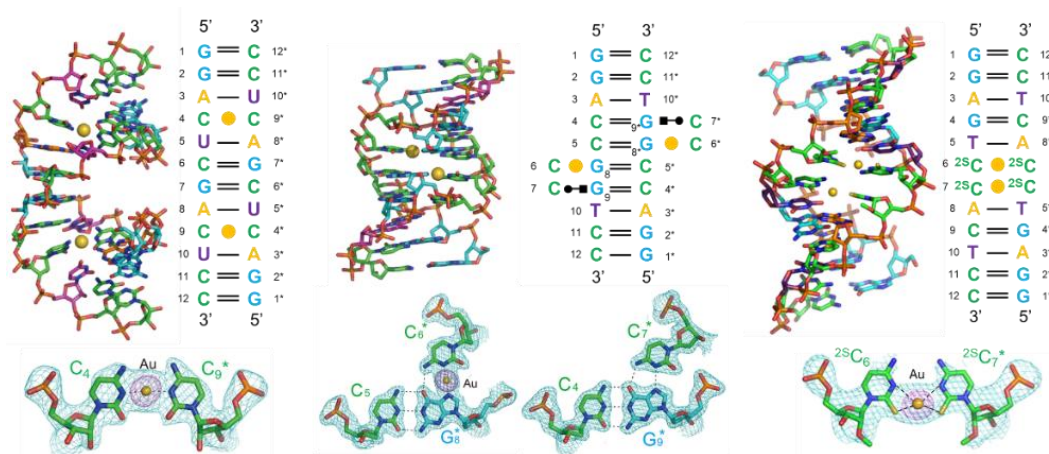
(上智大¹・神奈川大²) ○小杉 海¹・菅原 彩乃¹・岩瀬 襟伽¹・藤原 章司²・金澤 宏樹¹・小野 晶²・近藤 次郎¹

X-ray analysis of modified nucleic acids containing gold-mediated base pairs (¹Graduate School of Science and Technology, Sophia University, ²Department of Material and Life Chemistry Faculty of Engineering, Kanagawa University) ○Kai Kosugi¹, Ayano Sugawara¹, Erika Iwase¹, Shoji Fujiwara², Hiroki Kanazawa¹, Akira Ono², Jiro Kondo¹

DNA and RNA are fundamental biopolymers that play central roles in gene expression by forming double helices with complementary base pairs to transmit genetic information. Recently, metal-mediated base pairs have garnered attention due to their potential applications in nanomaterials. To expand the repertoire of metal ions that can be incorporated into nucleic acids, we focused on modifying natural bases by replacing the carbonyl group with a thiocarbonyl group. Our X-ray analysis revealed that gold ions exhibit distinct binding modes depending on the mismatch type¹. In the C-C mismatch, the gold ion makes a linear coordination geometry with the N3 atoms of both cytosines. In contrast, in the 2sC-2sC mismatch, the gold ion adopts a nearly square-planar coordination geometry, binding to both the S2 and N3 atoms of the two 2sC residues.

Keywords : X-Ray analysis; Gold mediated base pair; nucleic acid

DNA と RNA は、相補的な塩基対からなる二重らせんを形成し、遺伝情報を伝達することで遺伝子発現に中心的な役割を果たす基本的な生体高分子である。近年、金属媒介塩基対はナノ材料への応用可能性から注目を集めている。本研究では、核酸中に取り込める金属種の多様性拡大を目指し、2-チオシトシン (2sC) のようにカルボニル基をチオカルボニル基へ置換した天然塩基修飾に着目した。X 線構造解析の結果、金イオンはミスマッチの種類に応じて特徴的に異なる結合様式を示すことが明らかとなった¹。C-C ミスマッチでは、金イオンは 2 つのシトシンの N3 原子に対して線形の配位幾何をとった。一方、2sC-2sC ミスマッチでは、金イオンはほぼ平面四配位構造を示し、2 つの 2sC 残基の S2 および N3 原子に配位していた。



1) K Kosugi, et al, *Chem Bio Chem*. **2025**, e202500565.

カチオン性タグ修飾オリゴ DNA による生体反応の MS Imaging

(青山学院大理工¹) ○小野 優佳¹・西原 達哉¹・田邊 一仁¹

Mass Spectrometry Imaging of Biological Reactions Using Cationic Tag-Modified Oligodeoxynucleotides(¹*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*)

○Yuka Ono,¹ Tatsuya Nishihara,¹ Kazuhito Tanabe¹

MS Imaging is a multi-component analysis technique capable of simultaneously achieving substance identification based on molecular weight and visualization of spatial distribution. We attempted to design a molecular system capable of clearly visualizing and imaging the bioreactions and behavior of oligodeoxynucleotides using mass spectrometry (MS). We selected MALDI-TOF MS as the mass spectrometer, and searched for functional groups that exhibited strong signals in its positive mode. Then, we introduced the strongest functional group onto DNA strands to track various reactions occurring on the DNA. Evaluation of MS signals for various compounds revealed that cationic and aromatic compounds exhibited particularly strong signals. Consequently, we found triphenylphosphonium (TPP) group as the strongest signal emitter. We prepared TPP-modified DNA strand (TPP-ODN) and found that TPP-ODN showed approximately 40-fold higher MS signal than native ODN without any modification.

Keywords : *Mass Spectrometry Imaging (MS Imaging / MSI); Cationic Tag; Reactive Probe ; Multiplex Analysis*

MS および MS Imaging(MSI)は、分子量に基づく物質同定と空間分布の可視化を同時に実現できる多成分解析手法である。本研究では、短鎖 DNA の反応や挙動を MSI にて明瞭に可視化・画像化が可能なシステムの構築を目指した。MS として MALDI-TOF MS を選択し、そのポジティブモードにて強いシグナルを示す官能基を探索し、DNA 鎖上に導入した上で、DNA 上で進行する各種反応を MS にて追跡した。

まず、アニリン系化合物のアミノ基にアルキル基を導入した 1、2、3、4 をそれぞれ調製して MALDI-TOF MS を測定した。その結果、4 級アミノ基をもつ 4 が最も強い信号を示した。すなわち、カチオン性化合物が MS 測定に良いことが示された。続いて、カチオン性を備えた化合物で、芳香族性をもつ化合物の MS 測定を行った。その結果、トリフェニルホスホニウム (TPP) 基 5 が、強い MS 信号を発したことから、芳香族性も重要であることが示された。

以上の実験事実を踏まえて、TPP 基を DNA に導入したところ、得られた DNA は、未修飾 DNA と比べて約 40 倍の信号強度を示した。この結果は、低ノイズかつ高感度な MS 計測、MSI 計測が TPP 基によって実現し得ることを示している。

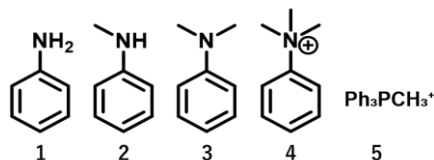


Figure 1 Chemical structures of tag molecules for MS measurements

塩基部修飾ヌクレオシドを含む siRNA の miRNA 様オフターゲット抑制

(¹徳島大院薬, ²徳島大薬) ○井上武刀¹、戎井綾乃²、野木悠平¹、八幡真²、月本準¹、田良島典子¹、南川典昭¹

Suppression of miRNA-like off-target effects of siRNA utilizing base-modified nucleosides. (¹Graduate School of Pharmaceutical Science, Tokushima University, ²Faculty of Pharmaceutical Science, Tokushima University) ○Taketo Inoue¹, Ayano Ebisui², Yuhei Nogi¹, Makoto Yahata², Jun Tsukimoto¹, Noriko Saito-Tarashima¹, Noriaki Minakawa¹

Small interfering RNA (siRNA) is a promising therapeutic modality that enables sequence-specific suppression of gene expression. However, partial base pairing between the seed region of siRNA, 2–8 nucleotide from the 5' end of guide strand, and undesired mRNAs lead to miRNA-like off-target gene silencing. This off-target effect represents a major limitation in the development of siRNA-based therapeutics (**Figure 1**). To address this limitation, we explored the introduction of base-modified nucleoside into the seed region of siRNAs and evaluated their on-target RNAi activity as well as their ability to suppress the off-target effects.

Keywords : siRNA, base-modified nucleosides, off-target effects

siRNA は標的 mRNA と相補鎖を形成することで遺伝子発現を特異的に抑制できる創薬モダリティである。しかし、siRNA ガイド鎖のシード領域と呼ばれる 5'末端から 2–8 塩基の領域が、望まない mRNA と部分的な相補鎖を形成し、その遺伝子発現を抑制する miRNA 様のオフターゲット作用が問題視されている (**Figure 1**)。そこで本研究では、塩基部修飾を含むヌクレオシドを siRNA に導入し、そのオンターゲット活性及びオフターゲット作用抑制効果を評価した。

まず、2 種類の塩基部修飾ヌクレオシドのホスホロアミダイト誘導体を合成し、このものを siRNA シード領域に 1 塩基ずつ導入したオリゴヌクレオチドを合成した。合成した siRNA を培養細胞にて活性評価を行った結果、オンターゲット活性を損なうことなく、顕著なオフターゲット作用の抑制が認められた。本発表では、これらの詳細について報告する。

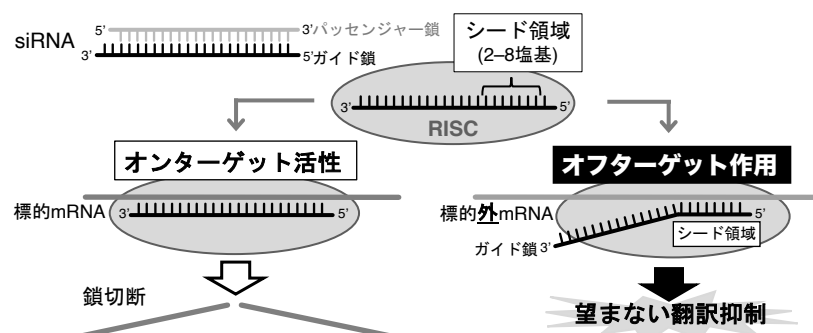


Figure 1 siRNA のオンターゲット活性とオフターゲット作用

NMR 滴定実験に基づく ミスマッチ結合分子中間体の平衡論的解析

(横浜国立大学¹・阪大 蛋白研²・阪大 産研³) ○蒔苗 秀隆¹・櫻林 修平^{1,3}・宮ノ入 洋平²・堂野 主税³・中谷 和彦³・児嶋 長次郎¹

Analysis of Equilibrium Constants for a Binding Intermediate of a Mismatch-Binding Molecule Based on NMR Titration Experiments (¹*Yokohama National University*, ²*Institute for Protein Research, The University of Osaka*, ³*SANKEN, The University of Osaka*) ○Hidetaka Makinae,¹ Shuhei Sakurabayashi,^{1,3} Yohei Miyanoiri,² Chikara Dohno,³ Kazuhiko Nakatani,³ Chojiro Kojima¹

When small molecules interact with nucleic acids, the binding process often proceeds via multiple intermediate states. Equilibrium analysis of transient intermediate is valuable for understanding molecular recognition mechanisms. While solution NMR is one of the few techniques capable of visualizing such intermediates at atomic resolution, it is difficult to determine equilibrium constants from changes in the observed peak intensity profiles in the case of slow exchange.

In this study, equilibrium analysis of complexes formed between dsDNA containing the d(CGG/CGG) motif and the naphthyridine dimer (ND) was carried out. A previous study has shown that this system forms a thermodynamically stable 1:2 complex as well as a transiently populated 1:1 complex.¹⁾ Analysis of the peak intensity of these complexes obtained from NMR titration experiments revealed that the relative K_d ratio between the 1:1 and 1:2 complexes, as well as the lower bounds of each K_d , can be identified. Furthermore, using ¹³C-labeled ND and data acquired under low-concentration conditions (0.5 μ M), the absolute values of the dissociation constants for each binding step were determined.

Keywords : NMR; Mismatch-binding molecule; DNA; Titration Experiment; Equilibrium Theory

低分子が核酸に結合する際、初期結合から最終複合体形成に至るまで複数段階を経由することが多い。過渡的に生じる複合体の平衡論的解析は分子認識機構の理解に有用であり、溶液 NMR はこのような中間体を原子分解能で可視化し得る数少ない手法である。しかし、NMR のタイムスケールにおいて遅い交換の系では、測定濃度が K_d を上回ることが多く、観測されるピーク強度の変化から平衡定数を決定することは困難である。

本研究では、d(CGG/CGG)モチーフを含む dsDNA とナフチリジンダイマー (ND) の複合体の平衡論的解析を行った。先行研究により、熱的に安定な 1:2 複合体と過渡的に生じる 1:1 複合体が形成されることが明らかとなっている¹⁾ (Fig. 1)。NMR 滴定実験より得られたこれらの複合体のピーク強度のプロファイルを基に、1:1 複合体と 1:2 複合体の K_d の相対比および下限を同定できることが分かった。さらに、¹³C 安定同位体標識した ND を用いた 0.5 μ M の低濃度条件での測定データから各解離定数の絶対値を決定することに成功した。



Fig. 1 Two-step binding equilibrium model between dsDNA and ND.

1) *J. Am. Chem. Soc.* **2025**, 147, 17, 14254–14269

DNA i-motif の液-液相分離能決定因子の探索

(甲南大 FIRST¹) ○鈴木涼介¹・川内敬子¹・三好大輔¹

Determinants of DNA i-motif Liquid-liquid phase separation (¹Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University) ○Ryosuke Suzuki¹, Keiko Kawauchi¹, Daisuke Miyoshi¹

Cytosine-rich sequences can form a four-stranded structure known as the i-motif¹). It is known that i-motif-forming sequences are localized in the promoter regions of cancer-related genes. Furthermore, i-motifs have also been demonstrated to form in cells. In recent years, i-motifs have been reported to induce liquid-liquid phase separation (LLPS) together with specific proteins/peptides in vitro³). LLPS is involved in various biological processes, including gene expression and signal transduction. Previously, we reported that i-motifs can be stable and induce LLPS even at neutral pH under molecularly crowded environments⁴). However, structural factors that govern the LLPS ability of i-motifs remain limited. In this study, we focused on the loop and flanking regions of i-motifs and investigated their effects on LLPS ability (Fig. 1). It was found that the LLPS capability increased with larger numbers of nucleotides in the loop and flanking regions, indicating various cytosine-rich DNAs undergo LLPS in living cells.

Keywords: *i-motif, Liquid-liquid phase separation*

シトシンに富んだ核酸鎖は、i-motif と呼ばれる四重らせん構造を形成する¹⁾。i-motif 形成配列は、がん関連遺伝子のプロモーター領域に局在することが知られている。また i-motif は、細胞内においても形成されることも明らかにされている²⁾。近年、試験管内において、i-motif は特定のタンパク質やペプチドと共に液-液相分離(LLPS)を誘起することが報告されている³⁾。LLPS は、遺伝子発現やシグナル伝達など種々の生物学的プロセスに関与している。これまでに当研究室では、分子クラウディング環境下では、中性溶液中でも i-motif が形成され、LLPS が誘起されることを報告した⁴⁾。しかし、i-motif の LLPS 能を規定している構造因子はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、i-motif を構成するループ領域及びフランキンング領域に着目し、それらが LLPS 能に及ぼす影響を系統的に検討した (Fig. 1)。その結果、ループ領域及びフランキンング領域の塩基数の増加に伴い、LLPS 能が上昇することが明らかとなった。

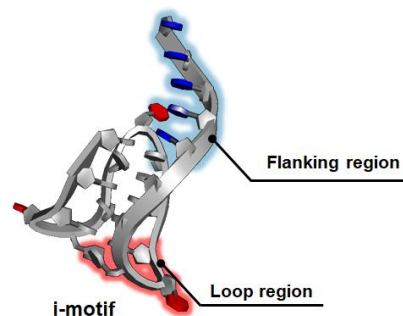


Fig.1 Loop and flanking regions of i-motif

- 1) C. H. Kang, *et al.*, *Nature*, **1993**, 363, 561-565.
- 2) M Zeratti, *et al.*, *Nature chemistry.*, **2018**, 10, 631-637.
- 3) M. Mimura, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 9849-9857.
- 4) R. Suzuki, *et al.*, *polymer journal.*, **2025**, 57, 931-940.

New Data Science in Nucleic Acids Chemistry (23): Nearest-neighbour parameters for stability prediction of 2'-MOE RNA duplex in cancer cells

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

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

Keywords: 2'-MOE RNA; Heteroduplex stability; NN parameters; ASO design; Cellular environments

Among various modified nucleic acids, 2'-O-methoxyethyl (2'-MOE; Fig 1A) is the most important clinically established 2'-O modification used in antisense oligonucleotides and RNAi relevant to cancer applications, because it enhances duplex stability and nuclease resistance. Thermodynamic studies of 2'-MOE RNA/RNA heteroduplexes have been performed mainly in non-crowding buffers, whereas intracellular environments are highly crowded. Molecular crowding alters water activity and dielectric constant, and polyethylene glycol with an average molecular weight of 200 (PEG200) provides a reproducible intracellular-like model.¹ Under molecular crowding, nearest-neighbor (NN) parameters are available only for unmodified RNA,² limiting prediction of 2'-MOE RNA/RNA heteroduplex stability in cancer cells.

We measured UV melting curves of representative 2'-MOE RNA/RNA heteroduplexes (MOE-1a) in the absence or presence of 40 wt% PEG200 (Fig. 1B). The measured melting temperatures (T_m) of the MOE-1a were 9.4 °C higher under the crowding condition and 12.3 °C higher under non-crowding conditions than those predicted for the corresponding unmodified RNA duplex (1a) were calculated from published NN parameters for unmodified duplex.² In addition, the presence of PEG200 resulted in a T_m decrease of 12.1 °C compared with non-crowding conditions. Therefore, we established crowding-adapted NN parameter sets for 2'-MOE RNA/RNA heteroduplex formation. This dataset enables quantitative stability prediction under cellular-like crowding and provides a practical thermodynamic guide for MOE-sequence optimization, for example by selecting antisense oligonucleotides and RNAi designs.

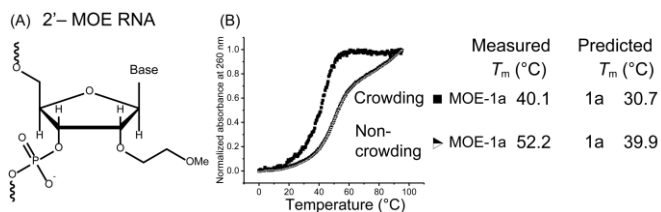


Figure 1. (A) Chemical structure of 2'-MOE RNA. (B) UV melting curves of MOE-1a (5'-A^MA^MG^MC^MG^MU^MA^MG^M-3'/5'-CUACGCUU-3', where superscript M denotes a 2'-MOE modified ribose.) measured in the absence (non-crowding) and presence (crowding) of 40 wt% PEG200. The corresponding unmodified RNA duplex 1a (5'-AAGCGUAG-3'/5'-CUACGCUU-3') was used as a reference for thermodynamic prediction. Measurements were performed at 4 μ M duplex concentration in buffer containing 100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0 at 37°C, 1 mM Na₂EDTA.

1) a) D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, M. Toplishek, T. Ohyama, S. Ghosh, S. Takahashi, M. Trajkovski, J. Plavec and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 23503. b) S. Takahashi, M. Hamada, H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, *RSC Chemical Biology* **2025**, *6*, 1667. 2) S. Ghosh, S. Takahashi, D. Banerjee, T. Ohyama, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 4101.

がん微小環境に応答する AND ゲート型細胞膜集積性人工核酸の開発

(青山学院大理工) ○黒住 結生・山田 梨沙・岡 大陸・西原 達哉・田邊 一仁
Development of AND-Gate-Type Cell Membrane-Associated Artificial Nucleic Acids Responding to the Tumor Microenvironment (*Collage of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*) ○Yui Kurozumi, Risa Yamada, Daichi Oka, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Cancer tissues feature unique microenvironments like acidity and oxidative stress, making environment-responsive materials essential for precise drug delivery. We developed a DNA material exhibiting AND-gate cellular accumulation targeting these factors. Previously, we utilized acid-induced i-motif formation to enhance cell membrane accumulation. To add oxidative stress responsiveness, we introduced ROS-reactive phenylboronic acid tags to the phosphate backbone of the duplex-forming region attached to the i-motif. This modification inhibits accumulation under physiological neutral conditions. However, in the presence of ROS, the tags are cleaved, allowing the duplex formation. Combined with acid-induced i-motif folding, this mechanism ensures that cellular accumulation is recovered only when both acidity and hydrogen peroxide are present. This dual-responsive system offers a promising strategy for specific cancer targeting.

Keywords : *I-motif; Cell Recognition; Reactive Oxygen Species*

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。そのため、微小環境を認識する分子材料は、がんへの薬剤送達やイメージングへ応用する上で有用である。本研究では、がん組織の周辺環境因子に対して、AND ゲート型に細胞集積性が変化する DNA 材料の開発を試みた。

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 材料の細胞への集積性が向上する現象を見出してきた。本研究では、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を試みた (Figure 1)。具体的には、i-motif 配列末端の二重鎖形成部位のリン酸基に活性酸素種との反応性部位を導入した。本設計では、弱酸性環境下で i-motif を形成した後、活性酸素種との反応により反応性タグが脱離することで二重鎖を形成し、細胞集積性が向上する。実際に、過酸化水素に対する反応点であるフェニルボロン酸部位を導入することにより、生理的中性条件下では細胞集積が阻害され、弱酸性かつ、過酸化水素の存在下でのみ集積量が回復することを確かめた。

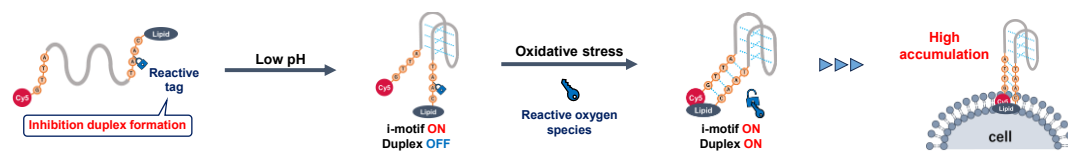


Figure 1. The i-motif labeled reactive tag to accumulate on the cell surface under the condition of low pH and oxidative stress.