

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18日(水) 9:00 ~ 11:40 | 会場 H935 (9号館 [3階] 935)

[H935-2am] 口頭A講演

座長：榎田 啓、寺 正行

◆ 日本語

9:00 ~ 9:10

[H935-2am-01] 熱安定な分子スイッチによるDNA高次構造の光制御

○鶴田 爽太¹、今任 景一¹、奥田 大登¹、兼田 直輝¹、村山 恵司²、大山 陽介¹ (1. 広島大学、2. 名古屋大学)

◆ 英語

9:10 ~ 9:20

[H935-2am-02] 光分解性保護基を用いる塩基部無保護オリゴヌクレオチド合成法の開発

○玄 眞嬉¹、高橋 裕平¹、佐藤 一樹¹、和田 猛¹ (1. 東京理科大学大学院)

◆ 日本語

9:20 ~ 9:30

[H935-2am-03] 低酸素細胞膜に選択集積する人工DNAを活用した薬剤送達

○櫻野 優輔¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院)

◆ 日本語

9:30 ~ 9:40

[H935-2am-04] SNA-DNA二重鎖における特異構造の解析

○北村 蒼衣¹、稲垣 和真¹、日比野 希美¹、浅沼 浩之¹、榎田 啓¹ (1. 名古屋大学)

◆ 日本語

9:40 ~ 9:50

[H935-2am-05] Ru錯体とスチルベンによる三重項エネルギー移動を利用したDNA二重鎖の光制御

○寺田 啓人¹、浅沼 浩之¹、榎田 啓¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

◆ 日本語

9:50 ~ 10:00

[H935-2am-06] 等温核酸増幅による検出を指向したウイルス膜破壊法の開発

○高見 佳代¹、奥田 真由、佐藤 智典、松原 輝彦¹ (1. 慶應義塾大学)

◆ 英語

10:00 ~ 10:10

[H935-2am-07] ボラノホスフェートを前駆体とするオリゴデオキシヌクレオチド伸長後官能基化反応の開発

○大根 翔悟¹、渡辺 丞¹、佐藤 一樹¹、和田 猛¹ (1. 東京理科大学)

10:10 ~ 10:20

休憩

◆ 日本語

10:20 ~ 10:30

[H935-2am-08] 標的分子応答型非酵素増幅反応を用いたマルチターゲット高感度検出法の確立

○高 廷瑞¹、菅原 正人¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

◆ 日本語

10:30 ~ 10:40

[H935-2am-09] 光化学的内在化を目指したニトロビフェニル-核酸コンジュゲートの合成と評価

○椎葉 蓮¹、吉田 七唯¹、金森 功吏¹、湯浅 英哉¹ (1. 東京科学大学)

◆ 日本語

10:40 ~ 10:50

[H935-2am-10] 光架橋基とアルキンを有するG4プローブの開発とG4部位標識

○井町 悠太郎¹、 Mohammad Jafar Sheikhi¹、野原 玲奈¹、棚谷 優磨¹、長澤 和夫¹、寺 正行¹ (1. 東農工大院工)

◆ 日本語

10:50 ~ 11:00

[H935-2am-11] 2'-*O*-フェノキシスルホニルプロピル修飾核酸の合成と評価○大石 健智¹、瀧川 駿太郎¹、友利 貴人¹、村上 英太郎¹、清尾 康志¹ (1. 東京科学大学)

◆ 日本語

11:00 ~ 11:10

[H935-2am-12] ポリアミンによって形成される液滴内の酵素反応の解析

○田立 ののか¹、文屋 諒太郎¹、千田 隆誠¹、田代 竜²、河合 信之輔¹、大吉 崇文^{1,3,4} (1. 静岡大学大学院総合科学技術研究科、2. 鈴鹿医療科学大学薬学部、3. 静岡大学創造科学技術大学院、4. 静岡大学グリーン科学技術研究所)

◆ 日本語

11:10 ~ 11:20

[H935-2am-13] Staple核酸のTandem rG4構造体誘導が示す強力な遺伝子発現制御

○谷口 凜々花¹、大野 琳加²、横山 莉瑚²、勝田 陽介^{1,3}、萩原 正規²、佐藤 慎一^{1,3}、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 弘前大学大学院理工学部、3. 株式会社StapleBio)

◆ 日本語

11:20 ~ 11:30

[H935-2am-14] 一本鎖DNA選択的な化学修飾の探索法開発

○前田 純佳¹、村上 英太郎¹、清尾 康志¹ (1. 東京科学大学)

◆ 日本語

11:30 ~ 11:40

[H935-2am-15] リン原子の立体化学を制御したリン原子修飾核酸のイオンモビリティ分析

○白石 ともみ¹、加塩 詩子²、渡邊 正人²、佐藤 一樹¹、和田 猛¹ (1. 東京理科大学、2. バイオインダストリー協会)

熱安定な分子スイッチによる DNA 高次構造の光制御

(広島大工¹・広島大院先進理工²・名大院工³) ○鶴田 爽太¹・今任 景一²・奥田 大登¹・兼田 直輝²・村山 恵司³・大山 陽介²

Photocontrol of higher-order structures of DNA using thermally bistable molecular photoswitches (¹*School of Engineering, Hiroshima University*, ²*Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University*, ³*Graduate School of Engineering, Nagoya University*) ○ Sota Tsuruda,¹ Keiichi Imato,² Hiroto Okuda,¹ Naoki Kaneda,² Keiji Murayama,³ Yousuke Ooyama²

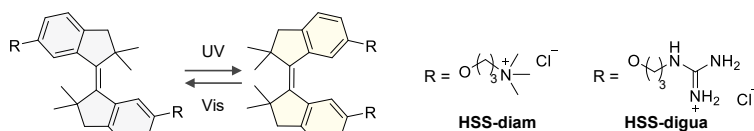
DNA is a precisely designable nanomaterial that forms higher-order structures, including double helix, based on its primary sequence and exhibits structure-derived functions. In recent years, reversible control of these higher-order structures using photoresponsive molecular switches has attracted significant attention. However, most previous studies have relied on thermally unstable azobenzene (AB) photoswitches, limiting precise structural control.

In this study, we investigated the photocontrol of DNA higher-order structures using a new thermally stable photoswitch, sterically hindered stiff stilbene (HSS), which also undergoes large structural changes comparable to those of AB. An HSS derivative bearing ammonium salts at both ends (**HSS-diam**) changed the melting temperature (T_m) of DNA (GTTACGTAAC) upon photoisomerization in HEPES buffer solution, whereas an HSS derivative bearing guanidinium salts at both ends (**HSS-digua**) drastically induced drastic changes in solubility between dissolution and aggregation upon photoisomerization.

Keywords : Molecular Switch; Photoisomerization; DNA; Melting Temperature; Higher-Order Structure

DNA は一次構造の塩基配列に基づき二重らせんを含む高次構造を形成し、構造由来の機能を示す精密に設計可能なナノ材料である。近年、この高次構造を光応答性の分子スイッチにより可逆的に制御する研究が注目を集めている。しかし、熱不安定なアゾベンゼン (AB) が主に用いられ、精密に光制御できなかった。そこで本研究では、熱安定で AB 同様に大きな構造変化を示す新たな光応答性分子スイッチのヒンダードスティッフスチルベン (HSS)¹⁾を用いて、DNA の高次構造の光制御を検討した。

両末端にアンモニウム塩 (**HSS-diam**) およびグアニジニウム塩 (**HSS-digua**) を修飾した HSS を合成して、DNA (GTTACGTAAC) の HEPES 緩衝液に添加し、DNA 二本鎖の 50%が解離する融解温度 (T_m) の光異性化による変化を測定した。**HSS-diam** を添加した場合、光異性化により T_m が変化した一方、**HSS-digua** を添加した場合、光異性化により溶解性が大きく変わり (溶解↔凝集)、DNA 高次構造の光制御を達成した。



1) K. Imato, Y. Ooyama et al., *J. Org. Chem.* **2022**, 87, 15762; *JACS Au* **2023**, 3, 2458; *Chem. Sci.* **2024**, 15, 20545.

Development of a Photolabile Protecting Group on a Phosphite Moiety for the Synthesis of Oligonucleotides

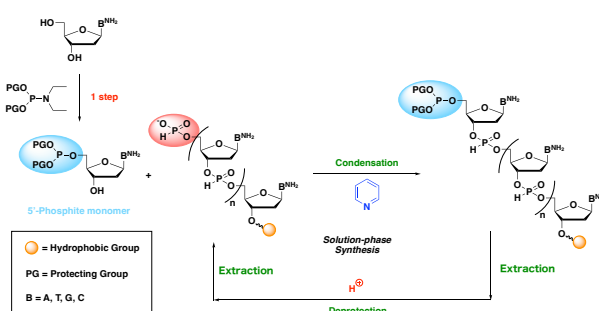
(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science)

○Jinhee Hyun, Yuhei Takahashi, Kazuki Sato, Takeshi Wada

Keywords: Oligonucleotide synthesis; 5'-Phosphite method; Photolabile protecting group; *o*-Nitrobenzyl derivatives

We have developed a 5'-phosphite method, a new approach for oligonucleotide synthesis, which enables the synthesis of 5'-phosphite monomer units and chain elongation without using protecting groups on nucleobases (Scheme 1). In this method, a 5'-phosphite monomer is synthesized by a chemo- and regio-selective phosphitylation reaction of a 5'-hydroxy group of an unprotected nucleoside by using a phosphitylating reagent with large steric hindrance. Then, 3'-hydroxy group of the monomer and 5'-*H*-phosphonate monoester are condensed to form an internucleotidic *H*-phosphonate diester. By removal of protecting groups, the 5'-phosphite is converted into an *H*-phosphonate monoester and condensed with another monomer's 3'-hydroxy group. Unmodified and P-modified oligonucleotides can be obtained by appropriate transformation of the internucleotidic linkages.

Scheme 1 5'-Phosphite method



We have used a phosphite protecting group which is removed under acidic conditions so far, but the oligomer tended to form emulsion during the extraction step and the synthetic intermediate was partially hydrolyzed. To solve these problems and simplify the synthesis, we investigated three nitrobenzyl-based protecting groups that can be removed by UV irradiation at wavelengths that do not damage nucleobases (Figure 1). The details will be discussed in the presentation.

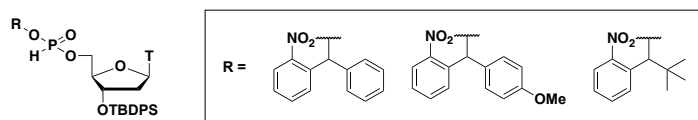


Figure 1 Structure of *H*-phosphonatediester derivatives having a photolabile protecting group

- 1) Kato, Y.; Oka, N.; Wada, T.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2501-2505.
- 2) Matsuda, H.; Yoshida, E.; Shinoda, T.; Sato, K.; Hara, R. I.; Wada, T. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 38094-38107.

低酸素細胞膜に選択集積する人工 DNA を活用した薬剤送達

(青山学院大院理工) ○櫻野 優輔・西原 達哉・田邊 一仁

Drug delivery by oligodeoxynucleotides that accumulated in hypoxic cell membrane (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)○Yusuke Sakurano, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

The methodologies for selective treatments to hypoxic cells in solid tumor tissues have been required. In this study, we prepared DNA materials that accumulated on hypoxic cell membrane. We have developed DNA aggregate, which is combined uridine derivative ($d^{alkyl}U$) that accumulates on cell membrane and thymidine derivative ($d^{NB}T$) bearing hypoxia-responsive moiety. DNA aggregate with consecutive artificial nucleobases accomplished accumulation on the hypoxic cell membrane. Introducing an aptamer of anticancer drug to DNA aggregate showed selective cytotoxicity to hypoxic cells.

Keywords : Oligodeoxynucleotides; Aptamer; Cell membrane; Hypoxic cells; Drug delivery

低酸素細胞はがん悪性化に関与することから、有効な治療法が求められる。本研究では低酸素細胞の細胞膜に選択的に集積する DNA 材料を開発した。具体的には、細胞膜集積性アルキル基含有ウリジン誘導体 ($d^{alkyl}U$) および低酸素応答性ニトロベンジル基含有チミジン誘導体 ($d^{NB}T$) を導入した DNA オリゴマー Ux-ODN、Nx-ODN を合成し、DNA 鎖の細胞内運搬に利用可能な DNA 会合体を作製した (Figure 1)。

蛍光標識した DNA 会合体 U3N2(U3-ODN と N2-ODN から成る会合体)と U2N2(U2-ODN と N2-ODN から成る会合体)を酸素濃度 0.3%および 21%の条件下で A549 細胞に投与したところ、酸素濃度 0.3%の低酸素細胞において U3N2 は細胞膜に、U2N2 は細胞内にて強い蛍光が見られた。この結果から U3N2 により低酸素細胞膜上に人工 DNA が集積したことが示された。低酸素細胞膜への集積は以下の機構によると考えられる。まず、細胞内に取り込まれた U3N2 は低酸素環境下で活性をもつ還元酵素により、N2-ODN 中の $d^{NB}T$ のニトロ基還元反応を受ける。この還元反応を起点にニトロベンジル基が脱離し、疎水性部位を失った U3N2 が崩壊する。その後、U3-ODN 中の $d^{alkyl}U$ のアルキル鎖が脂質膜に挿入され、U3-ODN が固定化された脂質膜が細胞膜に移行し、細胞膜に U3-ODN が集積する。

この結果を受け、抗がん剤メトトレキサート (MTX) のアプタマーを U3N2 に導入し、細胞膜上のアプタマーによる薬剤捕捉を細胞生存率により評価した。MTX のみ投与した場合には、低酸素細胞の生存率は有酸素細胞の生存率から 24.3%低下したが、アプタマーの導入後に MTX を投与した場合には 57.2%減少した。すなわち、細胞膜上のアプタマーにより低酸素細胞周辺で薬剤が捕捉され、選択的な細胞毒性を発揮したことが示唆された。

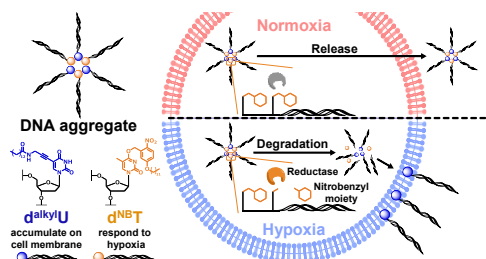


Figure 1. Accumulation of Ux-ODNs on hypoxic cell membrane.

SNA–DNA 二重鎖における特異構造の解析

(名大院工¹) ○北村 蒼衣¹・稲垣 和真¹・日比野 希美¹・浅沼 浩之¹・樫田 啓¹

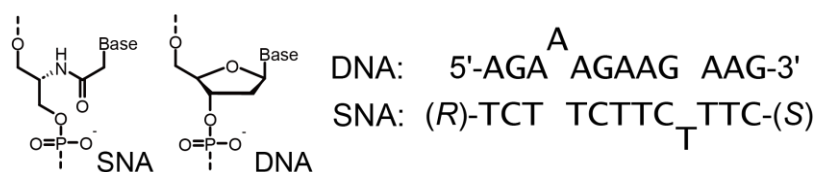
Analysis of a unique structure in an SNA–DNA duplex (¹*Graduate School of Engineering, Nagoya University*) ○ Aoi Kitamura,¹ Kazuma Inagaki,¹ Nozomi Hibino,¹ Hiroyuki Asanuma,¹ Hiromu Kashida,¹

Serinol nucleic acid (SNA), an acyclic artificial nucleic acid developed in our laboratory, exhibits stable duplex formation and high enzymatic resistance compared to natural nucleic acids. However, conventional sequencing methods rely on enzyme-mediated extension, making SNA sequence analysis challenging. To address this, we have developed a novel sequencing method for SNA. Using this technique to analyze a specific SNA sequence, we discovered that mismatched DNA specifically forms a double helix with it. In this study, we investigated the binding mechanism of this SNA/DNA duplex. Melting temperatures indicated this SNA/DNA duplex has comparable stability to that of a fully-matched duplex despite containing 4-base mismatches. Detailed analyses revealed that this sequence forms a duplex containing two bulges. In this presentation, we will report on effects of the number of base pairs between two bulges on duplex stabilities.

Keywords : *Serinol nucleic acid; Bulges; Sequencing*

当研究室で開発された非環状型人工核酸であるセリノール核酸 (SNA) は、天然核酸と比べて安定な二重鎖形成能や高い酵素耐性を有している。しかしながら、従来の配列解析法は酵素による伸長反応を利用しており、SNA の配列解析は不可能であった。それに対し、本研究室では SNA の新たな配列解析法を開発した。この手法を利用してある SNA の配列解析を行ったところ、完全相補的ではない DNA が特異的に二重鎖形成することがわかった。このことは、SNA においては完全相補的な二重鎖以上に安定な核酸認識モチーフが存在していることを示唆している。

そこで、本研究ではこの SNA の DNA 認識機構について詳細に解析した。まず、融解温度測定を行ったところ、この SNA/DNA 二重鎖は 4 塩基のミスマッチを含むにもかかわらず、完全相補的な二重鎖と同程度の安定性をもつことがわかった。一方、DNA/DNA 二重鎖では同様の安定化は見られなかったことから、SNA/DNA 二重鎖特有の現象であることがわかった。詳細な解析を行った結果、この配列が 2 つの 1 塩基バルジ構造を形成している示唆された (Scheme 1)。本発表では、2 つのバルジ構造間の塩基対数が及ぼす影響やミスマッチの影響について詳細に解析したので報告する。



Scheme 1. Sequences of DNA/SNA duplex investigated in this study. Chemical structures of SNA and DNA are shown.

Ru 錯体とスチルベンによる三重項エネルギー移動を利用した DNA 二重鎖の光制御

(名大院工¹) ○寺田 啓人¹・浅沼 浩之¹・檜田 啓¹

Photocontrol of DNA duplex using triplet energy transfer from ruthenium complex to stilbene
(¹Graduate School of Engineering, Nagoya University) ○Hiroto Terada,¹ Hiroyuki Asanuma,¹
Hiromu Kashida¹

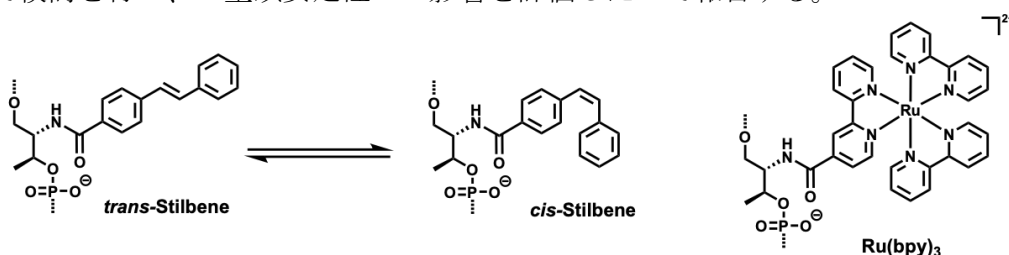
Photocontrol of DNA enables modulation of duplex stability without contamination, and it has been used for several applications such as gene-expression regulation. Our laboratory has reported DNA photocontrol based on azobenzene photoisomerization and photocycloaddition of stilbene derivatives. However, conventional systems often require cytotoxic UV light, which limits biological applications. In addition, they do not allow independent control of multiple photoswitches. Recently, we developed a site-specific DNA photocrosslinking method using visible light by exploiting triplet-triplet energy transfer (TTET) from ruthenium complex to stilbene. With visible-light activation and high site selectivity, this platform should expand DNA photocontrol strategies. In this study, we investigated DNA photocontrol using photoisomerization of stilbene mediated by ruthenium complex and evaluated its effect on duplex stability.

Keywords : Triplet energy transfer; DNA; Stilbene; Ru complex

DNA の光制御は、反応系を汚染することなく二重鎖安定性を制御できることから注目されており、遺伝子発現制御など様々な用途に利用されている。当研究室でも、これまでにアゾベンゼンの光異性化やスチルベン誘導体の光環化付加等の光化学反応を利用した DNA の光制御法を報告してきた^{1,2}。

しかしながら、従来の手法では細胞毒性をもつ紫外光を利用するため生体への応用が困難であり、また複数種類の光スイッチをそれぞれ独立に制御することは不可能であった。それに対し、当研究室では、Ru 錯体からスチルベンへの三重項-三重項エネルギー移動 (TTET) を利用することで部位特異的 DNA 光架橋法の開発に成功した³。本手法は可視光による励起が可能であり、高い位置選択性を持つため新たな DNA 光制御法への応用が期待できる。

本研究では、Ru 錯体によるスチルベンの光異性化を利用した DNA の光制御について検討を行い、二重鎖安定性への影響を評価したので報告する。



Scheme 1. Chemical structures of stilbene and Ru(bpy)₃ monomers.

- 1) Y. Kamiya, H. Asanuma, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1663
- 2) T. Doi, H. Kashida, H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 4430-4437
- 3) H. Kashida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, 63, e202319516

等温核酸増幅法による検出を指向したウイルス膜破壊法の開発

(慶應大理工¹) 高見 佳代¹・奥田 真由¹・佐藤 智典¹・松原 輝彦¹

Development of a virus membrane disruption method suitable for virus detection via isothermal nucleic acid amplification (¹*Faculty of Science and Engineering, Keio University*)

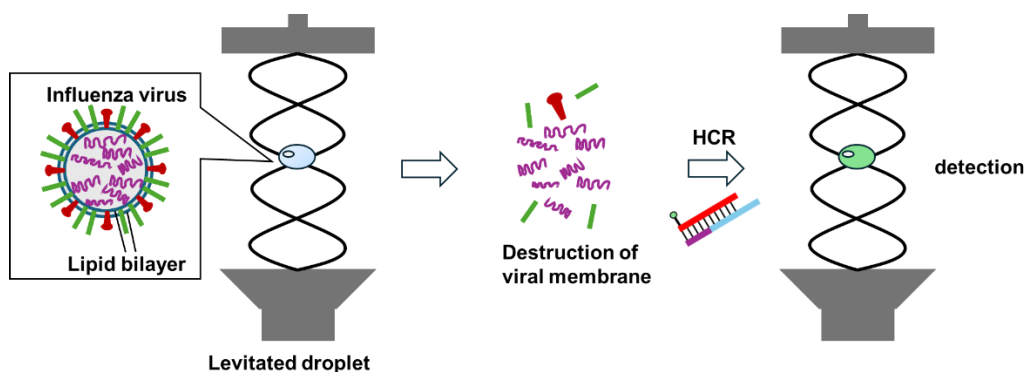
○Kayo Takami¹, Mayu Okuda¹, Toshinori Sato¹, Teruhiko Matsubara¹

The purpose of this study is to develop a simple and rapid virus detection technique using an isothermal nucleic acid amplification method. In this study, we treated virus-containing droplets using acoustic levitation, which allows non-contact handling of viral solutions, and then perform nucleic acid amplification via hybridization chain reaction (HCR) and fluorescent detection. First, we investigated the condition for disrupting the viral lipid bilayer, and it was found that ethanol and sodium hypochlorite destroy the lipid bilayer. Second, the synthetic viral gene was amplified via HCR in the presence of ethanol.

Keywords : *hybridization chain reaction; acoustic levitation; virus; isothermal nucleic acid amplification; fluorescence detection*

インフルエンザサーベイランスなどで用いられている PCR 法は温度変化が必要なため、専用の試薬や装置を要し手軽に行うことができない。等温核酸増幅法の一つである hybridization chain reaction (HCR) 法は室温で進行するため、PCR 法と比較して操作が簡便である。そこで本研究では、非接触で物質を扱うことができる音響浮揚装置によってウイルスを含む液滴を捕捉し、ウイルス膜の破壊と HCR 法による核酸増幅を行って、浮揚液滴中でウイルス検出を完結させることを計画した。

まず、ウイルス膜破壊法の検討を行った。エタノールなどを含む溶液とインフルエンザウイルスを混合して粒子径測定を行ったところ、粒子径の増大が見られ、ウイルス膜の内容物が凝集したことが示唆された。次に、HCR 法によるオリゴ DNA の連結反応を行った。反応産物の長さや標的 DNA 濃度との間に相関関係が見られ、エタノール暴露した溶液で HCR が進行することが示された。



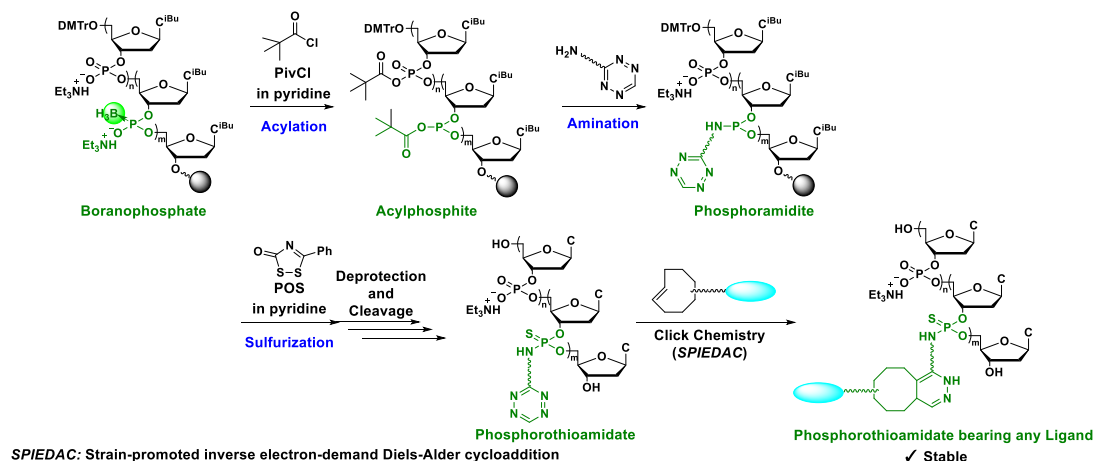
Development of a Post-Synthetic Modification Reaction for Oligodeoxynucleotides using a Boranophosphate as a Precursor

(Department of Medicinal and Life Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science) ○Shogo Ohne, Tasuku Watanabe, Kazuki Sato, Takeshi Wada

Keywords: Oligonucleotide therapeutics; *P*-Modified nucleic acid derivatives; Click chemistry; Boranophosphate

Recently, delivery technologies for oligonucleotide therapeutics have been a major issue. To address this issue, introduction of a ligand to oligodeoxynucleotides (ODNs) has been vigorously investigated. However, the introduction site of a ligand is limited to the ends of ODNs due to the complexity of synthesis. We previously established a method for conversion of DNA, which is a *P*-modified DNA bearing a $P \rightarrow B$ bond, a boranophosphate, into the key intermediate, an acylphosphite. This intermediate is a useful precursor for the synthesis of various *P*-modified derivatives.¹ This study aims to introduce a chemical handle that enables efficient internal ligand modification of ODNs by utilising a boranophosphate as a synthetic precursor. A boranophosphate is introduced at an arbitrary position beforehand, and an amine bearing a click chemistry scaffold is used in the reaction. Then the boranophosphate is converted to phosphorothioamidate bearing a click chemistry scaffold via an acylphosphite. It allows a subsequent click reaction to readily introduce various modifications.

Previously, this conversion reaction was only achieved in the liquid-phase synthesis.² Therefore, we aim to adapt it to the solid-phase synthesis using propylamine as a model compound. The details will be discussed in the presentation.



1) K. Sato, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 11092-11095. 2) Y. Takahashi, *J. Org. Chem.* **2023**, *88*, 15, 10617–10631.

標的分子応答型非酵素増幅反応を用いたマルチターゲット高感度検出法の確立

(青山学院大理工) ○高 廷瑞・菅原 正人・西原 達哉・田邊 一仁

Establishment of a Highly Sensitive Multiplex Detection Method Based on Target-Responsive Non-Enzymatic Amplification (*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*) ○Jungsur Koh, Masato Sugawara, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Highly-sensitive multiplex detection of disease-related biomolecules is in demand, however, fluorescence spectral overlap limits simultaneous analysis. We previously developed a strategy using DNA probes with reactive tags on the phosphate backbone. In this study, we applied Catalytic Hairpin Assembly (CHA) to this system to achieve higher sensitivity. By systematic investigation on the position of reactive groups on the DNA strand, we found that their modifications at the toehold and stem regions effectively suppressed unintended background reactions. On the other hand, it is striking that, the CHA reaction proceeded specifically in the presence of the target. We further confirmed that the resulting duplex DNA products could be efficiently accumulated onto beads. These results indicate that the present approach offers a promising solution for controlling signal amplification and overcoming the limitations of current multiplex detection methods.

Keywords : *DNA Fluorescent Probe, Non-Enzymatic Amplification Reaction*

生体試料中に含まれる疾患関連生体分子の濃度は大きく変動することが知られており、その高感度かつ多成分同時検出が求められている。蛍光分子プローブを活用した既存検出法は有用な手法であるが、蛍光スペクトルの重なりにより、同時解析可能な標的分子数は約 4～6 種に制限されるという課題があった。

当研究室ではこれまで DNA の配列選択的な二重鎖形成能を活用した多成分同時解析手法の構築を進めてきた¹⁾。具体的には、蛍光標識 DNA のリン酸部位に標的分子応答型の反応点を導入したプローブを用い、標的分子の同時検出に成功している。本研究では、さらなる高感度化を目指し、非酵素的増幅反応である Catalytic Hairpin Assembly (CHA) 反応に着目した (Figure 1)。標的分子依存的に CHA 反応が進行するよう制御するため、DNA プローブのリン酸部位への反応点導入位置を系統的に検討した結果、トーホールド、およびステム部位への導入により、初期状態での CHA 反応を抑制可能であることを見出した。一方で、標的分子存在下では、CHA 反応が進行し、生成した二重鎖 DNA が高効率にビーズへ集積されることを確認した。

1) T. Nishihara, M. Sugawara, R. Mio, Y. Motohashi, K. Tanabe, *Chem. Biomed. Imaging*, **2026**, in press, DOI: 10.1021/cbmi.5c00226.

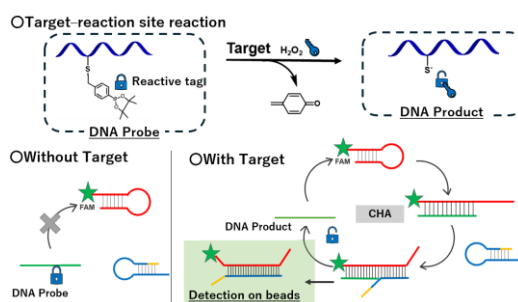


Figure 1. Schematic illustration of target detection using non-enzymatic amplification

・光化学的内在化を目指したニトロビフェニル-核酸コンジュゲートの合成と評価

(東京科学大¹⁾ ○椎葉 蓮¹・吉田 七唯¹・金森 功吏¹・湯浅 英哉¹

Synthesis and Evaluation of Nitrobiphenyl-Nucleic Acid Conjugates Aimed at Photochemical Internalization (¹*School of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo*) ○Ren shiiba,¹ Nanai Yoshida,¹ Takashi Kanamori,¹ Hideya Yuasa¹

In recent years, nucleic acid therapeutics have been developed for the treatment of numerous diseases. However, one major challenge with nucleic acid therapeutics is their low escape efficiency from endosomes. Photochemical internalization (PCI)¹⁾ has been investigated as one solution to this problem^{2,3)}. PCI is a technology that introduces a photosensitizer along with the target delivery molecule into cells via endocytosis. Upon light irradiation, reactive oxygen species generated from the photosensitizer are used to rupture the endosomal membrane, releasing the delivery molecule into the cytosol¹⁾.

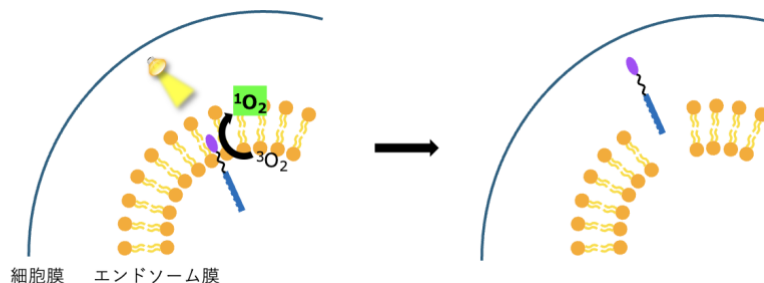
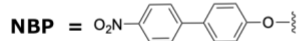
In this study, we aimed to actively localize the photosensitizer to the lipid membrane to achieve efficient membrane disruption via PCI. Therefore, we synthesized a conjugate by introducing nitrobiphenyl (NBP), a small, highly efficient photosensitizer⁵⁾ developed in our laboratory and expected to localize to the membrane⁴⁾, at the terminal end of an oligonucleotide. Concurrently, we investigated the influence of the linker structure connecting the nucleic acid and NBP on membrane disruption capacity. To evaluate membrane disruption, we prepared liposomes encapsulating a fluorescent dye and assessed the membrane disruption capacity of the photosensitizer-oligonucleotide conjugate based on the percentage of released fluorescent dye. We will report the details of these findings in our presentation.

Keywords: Photosensitizer, Photochemical Internalization, PCI, Antisense

近年、核酸医薬は多くの疾患の治療に向けて開発が進んでいる。しかし、核酸医薬の大きな課題の一つとしてエンドソームからの脱出効率が低いことが挙げられる。この解決策の一つとして光化学的内在化(PCI)¹⁾が検討されている^{2,3)}。PCIは、送達したい分子と共に光増感剤をエンドサイトーシスにより細胞に導入し、光照射によって光増感剤から生成する活性酸素を利用してエンドソーム膜を破壊し、送達分子を細胞内に放出させる技術である¹⁾。

本研究では、PCIでの効率的な膜破壊を目的に光増感剤を脂質膜へ積極的に局在させることを考えた。そこで、膜への局在が期待される骨格⁴⁾として当研究室で開発した小型高効率光増感剤ニトロビフェニル(NBP)⁵⁾を、オリゴ核酸の末端に導入したコンジュゲートを合成した。合わせて、核酸とニトロビフェニルをつなぐリンカーの構造が膜破壊能に与える影響を検討した。膜破壊能評価のため、蛍光剤を内包したリポソームを作成し、溶出した蛍光剤の割合から光増感剤-オリゴ核酸コンジュゲートの膜破壊能を評価した。発表では以上の詳細について報告する。

光増感剤-ASOコンジュゲート



- 1) A. Hogset, *et al. Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2004**, 56, 95-115.
- 2) Y. Matsushita-Ishiodori, T. Ohtsuki, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1039-1047.
- 3) A. Yuan, *et al. Chem. Commun.* **2015**, 51, 6678-6680.
- 4) A. Rashid, *et al. Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2017**, 1859, 712-721.
- 5) Y. Tsuga, *et al. Chem. Asian J.* **2019**, 14, 2067-2071.

光架橋基とアルキンを有する G4 プローブの開発と G4 部位標識

(東農工大院工¹) ○井町悠太朗¹・Mohammad Jafar Sheikhi¹・野原玲奈¹・棚谷優磨¹・長澤和夫¹・寺正行¹

Development of G-Quadruplex Probes Bearing Photoreactive and Alkyne Moieties for G4 Labelling

(¹Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

○Yutaro Imachi¹, Mohammad Jafar Sheikhi¹, Rena Nohara¹, Yuma Tanaya¹, Kazuo Nagasawa¹, Masayuki Tera¹

G-quadruplexes (G4s) are secondary structures formed within guanine-rich nucleic acid sequences and are thought to regulate cellular functions through epigenetic mechanisms. However, methods to map G4-forming regions in living cells are still limited, limiting functional analysis. Here, we synthesized G4 probes in which a G4-binding ligand is functionalized with a photoreactive benzophenone and an alkyne tag. We demonstrate that these G4 probes undergo efficient photo-crosslinking upon UV irradiation and subsequent functionalization via click reactions.

Keywords: Guanine-quadruplex, 6OTD, click chemistry, photo-crosslink

【目的】グアニン四重鎖 (G4) は、グアニン豊富な核酸で形成される二次構造である。G4 はエピジェネティックな制御を介し、細胞機能の調節に関与する¹⁾。G4 は SARS-CoV-2 や HIV などのウイルス RNA 上にも確認されており、G4 の変異やリガンド結合による安定化によって、ウイルスの増殖や転写を阻害することが示されている^{2,3)}。したがって、核酸上に存在する G4 の場所を特定することは、その生物学的な機能を解明する上で重要な課題の一つである。本研究では、G4 の部位標識を指向し、G4 に結合するリガンド (6OTD) に対し、光架橋基であるベンゾフェノンおよびアルキンタグを修飾した G4 プローブを合成した。

【結果】6OTD に対し、UV 照射により架橋を形成するベンゾフェノンおよびアルキンを導入した G4 プローブ **6OTD-Bp-AI** を合成した (Figure 1a)。G4 配列または非 G4 配列の RNA をモデルとして使い、**6OTD-Bp-AI** を添加して UV 照射を行い、続いてアジド標識蛍光色素とのクリック反応後に電気泳動解析を行った (Figure 1b)。その結果、**6OTD-Bp-AI** 存在下で UV 照射を行った場合にのみ蛍光バンドが検出され、G4 に対する特異的な UV クロスリンクが進行したことが示された。

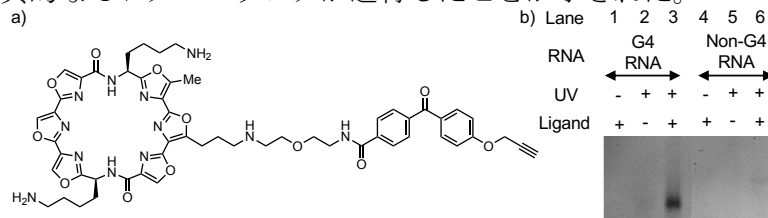


Figure 1. a) Structure of **6OTD-Bp-AI**. b) Denaturing PAGE analysis of G4 and non-G4 RNA following UV-induced photo-crosslinking and click labeling with azide-dye.

【参考文献】 1) J. Spiegel, S. Adhikari, S. Balasubramanian, *Trends Chem.*, **2020**, 2, 2, 123-136; 2) S. Sasaki, K. Watashi, M. Tera* *et al*, *ACS Infect. Dis.*, **2025**, 11, 8, 2131-2144; 3) D. Park, J. Ahn* *et al*, *Nat. Commun.*, **2024**, 15, 7353.

2'-O-フェノキシスルホニルプロピル修飾核酸の合成と性質

(東京科学大学 生命理工¹) ○大石 健智¹・瀧川 駿太朗¹・友利 貴人¹・村上 英太郎¹・清尾 康志¹

Synthesis and properties of 2'-O-Phenoxysulfonylpropyl-modified nucleic acid. (¹Dept. Life Sci. Tech., Science Tokyo) ○Taketo Oishi¹, Shuntaro Takigawa¹, Takahito Tomori¹, Eitaro Murakami¹, Kohji Seio¹

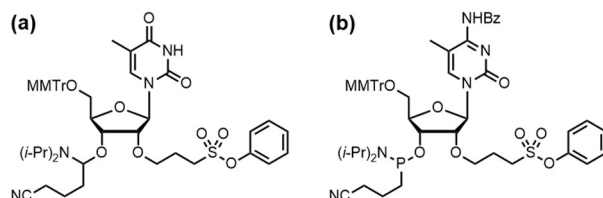
Antisense oligonucleotides (ASOs), a class of nucleic acid therapeutics, are used to target RNA. Incorporating modified nucleic acids into ASOs improves nuclease resistance and duplex stability, allowing ASOs to suppress mRNA translation and modulate pre-mRNA splicing. Among approaches to modify the 2'-hydroxy group of nucleic acids, methoxyethyl modification (2'-MOE) has shown clinical success.

To further improve properties, we focused on a phenoxysulfonylpropyl modification at the 2'-hydroxy position. In this study, a 5-methyluridine derivative (a) and a 5-methylcytidine derivative (b) were synthesized. These derivatives were designed to enhance nuclease resistance due to the steric bulk of the aromatic ring and to improve duplex stability through π - π interactions. The synthesized 5-methyluridine derivative was incorporated into oligonucleotides, and ASO properties were evaluated by duplex melting temperature measurements, nuclease resistance assays, and MD simulations.

Keywords : Antisense oligonucleotides, Modified nucleic acid, Phenoxysulfonylpropyl-modification

核酸医薬の一種のアンチセンス核酸(ASO)は、RNA を標的とした治療薬として用いられる。ASO への修飾核酸の導入により、核酸分解酵素耐性や二重鎖安定性などを向上させることで、mRNA からタンパク質への翻訳の抑制や、pre-mRNA から mRNA へのスプライシング過程の制御など、薬効を獲得している。核酸の 2'水酸基を修飾するアプローチでは、メトキシエチル基(2'-MOE)の導入が取り組まれており、核酸分解酵素耐性や二重鎖安定性に寄与している。

さらなる機能向上を目指し、2'水酸基にフェノキシスルホニルプロピル構造を持つ修飾核酸に着目した。本研究では、芳香環の嵩高さによる核酸分解酵素耐性と、芳香環の π 電子系の相互作用による二重鎖安定性の向上を期待し、5-メチルウリジン誘導体(a)および 5-メチルシチジン誘導体(b)を合成した。合成した 5-メチルウリジン誘導体をオリゴヌクレオチドに導入し、二重鎖融解温度測定、核酸分解酵素耐性試験、MD シミュレーションにより、その性質を評価した。



ポリアミンによって形成される液滴内の酵素反応の解析

(静大院理¹・鈴鹿医療科学大²・静大院創造³・静大グリーン研⁴) ○田立 ののか¹・文屋 諒太郎¹・千田 隆誠¹・田代 竜²・河合 信之輔¹・大吉 崇文^{1,3,4}

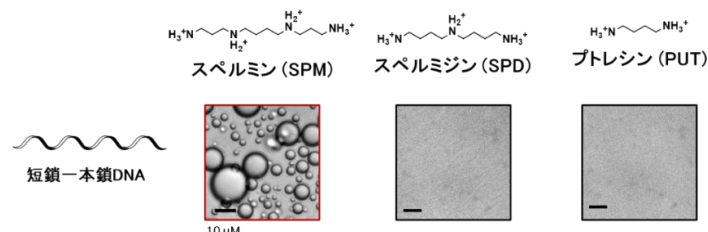
Analysis of enzyme reactions within droplets formed by polyamines (¹Graduate School of Science, Shizuoka University, ²Faculty of Pharmacy, Suzuka University of Medical Science, ³Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, ⁴Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University) ○Nonoka Tadachi,¹ Ryotaro Bunya,¹ Ryusei Senda,¹ Ryu Tashiro,² Shinnosuke Kawai,¹ Takanori Oyoshi^{1,3,4}

Within cells, polyamines interact electrostatically with negatively charged DNA, stabilizing its structure while also participating in the regulation of transcription and translation.¹ On the other hand, their high positive charge is known to induce DNA aggregation, leading to droplet formation.² In general, droplets formed within cells are thought to function as membraneless organelles that regulate enzymatic reactions. However, it remains unclear whether droplets formed by polyamines are involved in such enzymatic processes.

In this study, we compared the droplet-forming ability of polyamines (spermine, spermidine, and putrescine) using short single-stranded DNA. We found that spermine exhibited the highest droplet-forming ability. Furthermore, we formed droplets using spermine and hairpin-loop DNA containing single-stranded regions and examined how DNA polymerase activity was affected by the presence or absence of droplets.

Keywords : Liquid-Liquid Phase Separation (LLPS); Polyamine; DNA Polymerase

細胞内において、ポリアミンはDNAの負電荷と相互作用し、構造を安定化させるとともに、転写や翻訳の調節にも関与している¹⁾。一方で、その高い正電荷により、DNAを凝集させて液滴を形成することが知られている²⁾。一般的に、細胞内に形成される液滴は膜を持たないオルガネラとして機能し、酵素反応を制御していると考えられているが、ポリアミンによって形成された液滴が酵素反応に関与しているかは不明である。本研究では、ポリアミン（スperlミン、スperlミジン、プトレシン）と短鎖一本鎖DNAを用いて、ポリアミンの違いによる液滴形成能を比較した。すると、スperlミンは液滴形成能が最も高いことが分かった。さらに、スperlミンと一本鎖DNAを含むヘアピンループDNAを用いて液滴を形成し、液滴の有無によってDNAポリメラーゼ反応がどのように変化するかを解析した。



- 1) Aumiller, Jr., W. M., Cakmak, F. P., Davis, B. W., and Keating, C. D. *Langmuir*. **2016**, 32, 39, 10042-10053.
- 2) Viereg, J. R., Lueckheide, M., Marciel, A. B., Leon, L., Bologna, A. J., Rivera, J. R., and Tirrell, M. V. *J. Am. Chem.* **2018**, 140, 5, 1632-1638.

Staple 核酸の tandem rG4 構造体誘導が示す強力な遺伝子発現制御

(熊本大学大学院先端科学研究部¹・弘前大学大学院理工学部²・株式会社 StapleBio³)
 ○谷口凜々花¹・大野琳加²・横山莉瑚²・勝田陽介^{1,3}・萩原正規²・佐藤慎一^{1,3}・井原敏博¹

Induction of Tandem rG4 Structures by Staple Oligomers Enables Potent Gene Expression Regulation (¹*Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University*, ³*StapleBio Inc*)○Ririka Taniguchi,¹ Rinka Ohno,² Riko Yokoyama,² Yousuke Katsuda,^{1,3} Masaki Hagihara,² Shin-ichi Sato,^{1,3} Toshihiro Ihara^{1,3}

Our laboratory developed a new technology, which regulate gene expression by modulating mRNA structure using a short oligonucleotide termed a Staple oligomer. The Staple oligomer binds between distinct the G-tracts on target mRNA, bringing these G-tracts into close proximity and thereby inducing the formation of RNA G-quadruplex(rG4) structure. Because rG4s are highly thermostable, they block multiple enzymatic reactions including ribosomal translation and exonuclease-mediated mRNA degradation. Consequently, this technology termed RNA hacking (RNAh) enables precise regulation of gene expression.

In the present study, we report a new idea to enhance the regulatory efficacy of RNAh. When rG4 structures are positioned into close proximity, two rG4s cooperatively assemble into a highly thermodynamically stable tandem rG4 structure, which results in strong gene suppression. Using this unique rG4 property, we designed a Staple oligomer that induces tandem rG4 formations, thereby achieving robust suppression of gene expression.

Keywords : Nucleic acid; G-quadruplex; RNA hacking; Staple oligomer; gene expression regulation

当研究室では、Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を用いて mRNA の高次構造を制御し遺伝子発現を調節する RNA hacking (RNAh) を開発した¹。Staple 核酸は、mRNA 上の離れた位置に存在するグアニン連続配列 (G-tract) 間に結合し、G-tract 同士を近接させることで RNA G-quadruplex (rG4) 構造の形成を誘導する。誘導された rG4 構造は熱力学的に安定であり、リボソームによる翻訳反応を阻害するので遺伝子発現を効果的に抑制する。

本研究では、RNAh の効果を劇的に向上させるアイデアについて報告する。二つの rG4 構造が近接すると、極めて安定な tandem rG4 構造体を協同的に形成する。この性質を応用し、空間的に離れた rG4 構造を近接させる Staple 核酸により、人為的に tandem rG4 構造体を誘導することに成功した。本手法は、従来の RNAh と比べて、強力な遺伝子発現抑制能を示すことが期待される。

1) Staple oligomers induce stable RNA G-quadruplex structure for protein translation inhibition in therapeutics. Katsuda, Y., Kamura, T., Kida, T. *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, 2025.

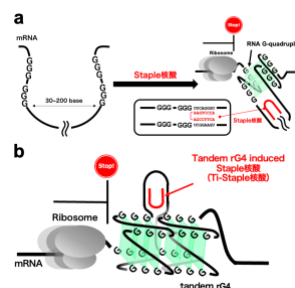


Fig. 1 a. RNAh の作用機序の概念図。b. tandem rG4 誘導型 Staple 核酸 (Ti-Staple 核酸) により mRNA 上に tandem rG4 構造体が形成されることで翻訳反応が強力に抑制される。

一本鎖 DNA 選択的な化学修飾の探索法開発

(東京科学大学生命理工¹) ○前田 純佳¹・村上 英太郎¹・清尾 康志¹

Developent of exploring method for single-stranded DNA selectively chemical modification
(¹*Sch. Life Sci. Tech., Science Tokyo*) ○Sumika Maeda,¹ Eitaro Murakami,¹ Kohji Seio¹

The formation of single-stranded DNA plays a crucial role in transcription and DNA repair. R-loop is a tri-stranded structure composed of single-stranded DNA and double-stranded DNA-RNA. It performs important functions *in vivo*, however its abnormal formation can cause genomic instability. Accurate detection of transiently formed single-stranded DNA, such as R-loop, is expected to identify its biological functions.

This study focuses on the difference in reactivity between single-stranded and double-stranded DNA, and aims to detect single-stranded DNA through chemical modification within cells. Wu *et al.* successfully detected single-stranded DNA by selective reaction to the glyoxal derivative N₃-kethoxal *in situ* (T. Wu *et al.*, *Nat. Methods*, **2020**, *17*, 515-523.). In preparation for the detection by chemical modification, we aimed to develop the exploring method for single-stranded DNA selective reagents. We established an exploring system by creating pseudo-single-stranded structures, and evaluated reactivity to single-stranded DNA in phosphate buffer solution(pH=7.0). We identified a single-stranded DNA-selective reagent by this evaluation system.

Keywords : *Nucleic acids chemistry; Modified base; Organic chemistry; Single-stranded DNA; R-loop*

一本鎖 DNA 形成過程は、転写や DNA 修復等において重要な役割を果たす。一本鎖 DNA 形成構造の一つである R-loop は、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA-RNA からなる三本鎖構造であり、生体内機能を担う一方で異常形成によりゲノム不安定化を引き起こす。R-loop のように一時的に形成される一本鎖 DNA を正確に検出することは、生体内での機能解明につながると期待される。

本研究では一本鎖と二本鎖に対する反応性の違いに着目し、細胞内での化学修飾による一本鎖 DNA 検出を目指す。Wu らは、glyoxal 誘導体である N₃-kethoxal を核内で一本鎖 DNA 選択的に反応させることで、一本鎖 DNA を検出することに成功している(T. Wu *et al.*, *Nat. Methods*, **2020**, *17*, 515-523.)。このように化学修飾を用いて、より高分解能の検出法を確立することを指向し、一本鎖 DNA 選択的な反応剤の探索法開発を目的とした。今回、擬似的な一本鎖構造を作成し、pH=7.0 リン酸緩衝液中での一本鎖 DNA に対する反応性を評価する探索系を構築した。本探索系を用いた結果、一本鎖 DNA 選択的な反応剤を見出した詳細について報告する。

リン原子の立体化学を制御したリン原子修飾核酸のイオンモビリティ分析

(東理大薬¹・JBA²) ○白石ともみ¹・加塩詩子²・渡邊正人²・佐藤一樹¹・和田猛¹

Analysis of stereocontrolled phosphorus-modified oligonucleotides using cyclic ion mobility mass spectrometry (¹*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,* ²*Japan Bioindustry Association*) ○Tomomi Shiraishi,¹ Utako Kashio,² Masato Watanabe,² Kazuki Sato,¹ Takeshi Wada¹

For the development of oligonucleotide therapeutics, phosphorus-modified nucleic acids, such as phosphorothioates, are highly useful oligonucleotides. However, phosphorus modifications generate stereoisomers at the phosphorus center, and their physicochemical and biological properties are known to differ depending on the stereochemistry. Various analytical techniques, including liquid chromatography and electrophoresis, have been explored for separation of stereoisomers. Our group has previously reported the stereocontrolled synthesis of phosphorothioate (PS) and boranophosphate (PB) oligonucleotides in which one of non-bridging oxygen atoms is replaced with a borano group. In this study, we analyzed these stereoisomers using cyclic ion mobility mass spectrometry, revealing differences in mobility between the stereoisomers.

Keywords : *phosphorus-modified oligonucleotide; ion mobility mass spectrometry; phosphorothioate DNA; boranophosphate DNA*

核酸医薬の開発において、化学修飾は不可欠である。代表的なホスホロチオエート (PS) 核酸を含め、リン原子修飾体は多くの場合、リン原子の不斉に基づく立体異性体が生じ、異性体間で性質に違いがあることが知られている。現在までに市販されている核酸医薬品は立体異性体の混合物であるが、核酸医薬品の開発においては、より有用な立体化学を有する配列の核酸の製造およびその品質管理法の確立が望まれている。

PS 核酸の異性体の分離については、液体クロマトグラフィーや電気泳動など種々の分析手法が検討されているが、我々はイオンモビリティ分光法 (IMS) に着目した。IMS は、分析対象と不活性ガスの衝突によって生じるイオンの移動度の違いにより、気相中で立体構造の異なるイオンを分離することが可能である。さらに我々は、リン原子の立体化学を厳密に制御した PS 核酸および、リン原子上にボラノ基を有するボラノホスフェート (PB) 核酸の合成が可能である。

そこで本研究では、立体化学を制御した PS-DNA および PB-DNA について、cyclic IMS を用いたイオンモビリティ質量分析により、移動度の違いを調査した。その結果、立体異性体間で IMS 分離が確認された。この詳細について発表する。