

Journal of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry

日本核酸化学会誌

創刊号

Vol. 1, 2017

巻頭言

日本核酸化学会 (JSNAC) に夢を託す

会長 杉本直己

研究論文

講演賞受賞者 (2011/2015) の最新研究

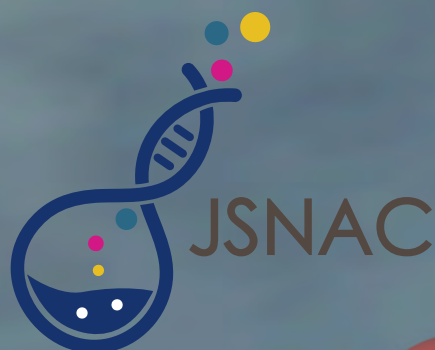
川井清彦、葛谷明紀、三好太輔／寺 正行、山田 研

エッセイ

浅沼浩之、井原敏博、岡本晃充、齊藤博英、南川典昭、和田 猛、和田健彦

付録

日本核酸化学会会則、細則、各賞規程 等



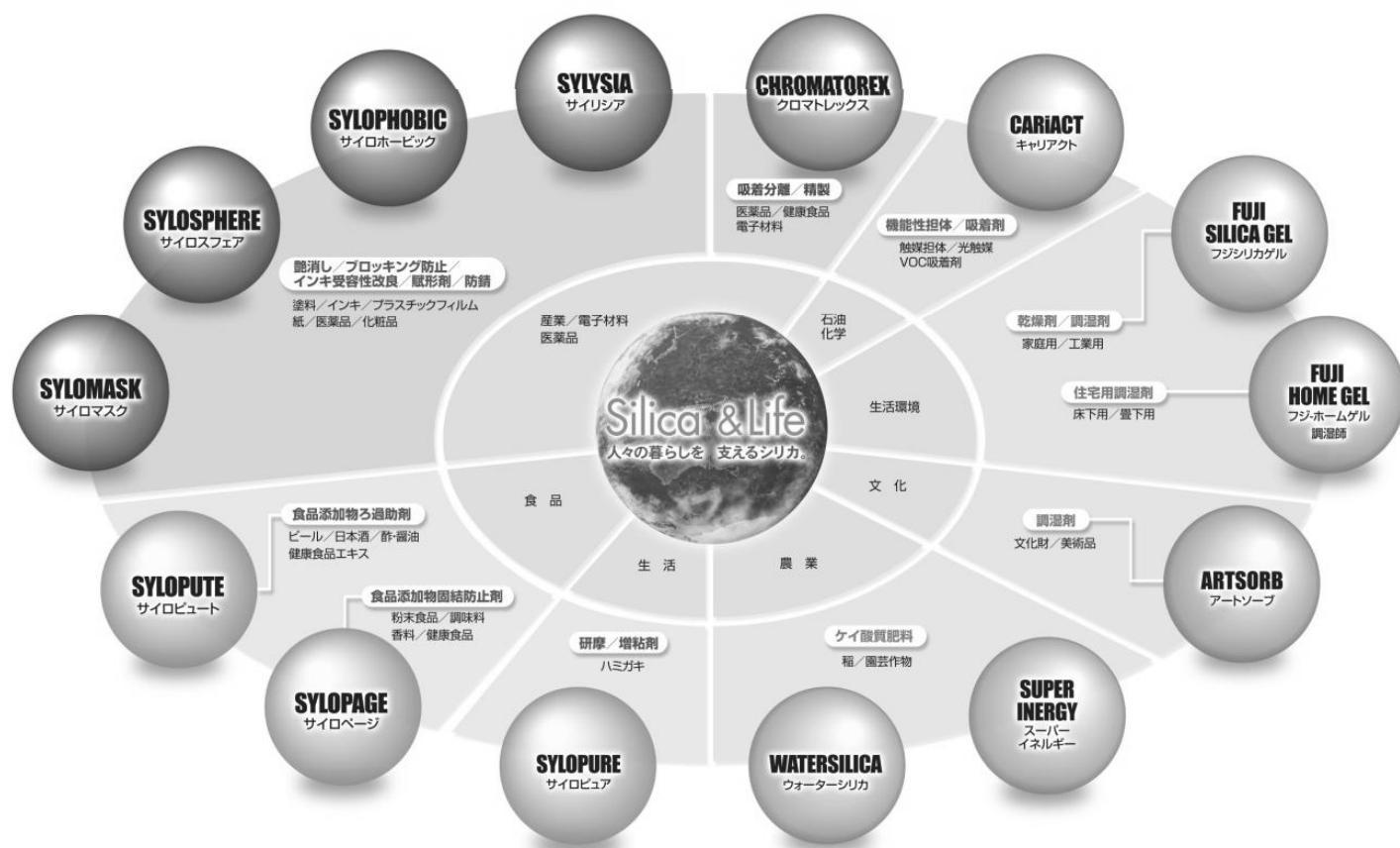
産業、医療、衣食住、文化・・・。

あらゆる分野に適合するシリカ製品を供給してまいります。

シリカ（ SiO_2 ）は地殻の約 60%を占めるケイ素の酸化物です。私たちはシリカがまだ身近で豊富に存在しながら、資源として評価されていなかった時代からその用途を追及・開発し続けてきました。

シリカのスペシャリストであることを自負し、これからもシリカの持つ可能性を見出し、新たな技術フィールドへの挑戦とグローバル展開を続けてまいります。

ONE CUSTOMER ONE GRADE



Fuji Silysia Chemical Ltd.
富士シリシア化学株式会社

487-0013 愛知県春日井市高蔵寺町 2 丁目 1846
Tel : 0568-51-2511 Fax: 0568-51-8557
E-mail: sales@fuji-silysia.co.jp

巻頭言

日本核酸化学会 (JSNAC) に夢を託す

甲南大 FIBER・FIRST 杉本 直己

いよいよ、日本核酸化学会 (The Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, 略称JSNAC) がスタートした。JSNACは、これまで長い歴史を誇る国際核酸化学シンポジウム (ISNAC) の参加メンバーが中心となって設立されたものである。我が国初の核酸化学分野の学会であるだけでなく、世界各国にも類をみない化学を基盤にした核酸学会である。

遺伝子に科学者の注目が集まり始めたのは、19世紀に遡る。その切欠をつくったのは、グレゴール・ヨハン・メンデルであろう (同時代のチャールズ・ダーウィンも忘れてはならないが)。メンデルは、後に遺伝子と呼ばれる遺伝粒子による遺伝の法則 (メンデルの法則) を発見した。偉大な生物学研究といえよう。化学的な核酸研究もほぼ同時期に、フリードリヒ・ミーシャによってなされた。核中の酸性物質 (ヌクレイン)、つまり核酸の発見である。しかしながら、多くの化学者が参入した切欠は、何と言っても1953年のワトソンとクリックのDNA二重らせん構造の発見であろう。それ以後、偉大な核酸化学研究が相次いでいる。ゲノム研究がはじまった1980年代後半以降のノーベル化学賞に輝いた核酸関連の研究だけでも、核酸の塩基配列の決定 (1980年ノーベル化学賞)、リボザイムの発見 (1989年)、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の発明 (1993年)、ATP合成に関する研究 (1997年)、転写の研究 (2006年)、リボソームの構造と機能の解明 (2009年)、DNA修復の研究 (2015年) など枚挙にいとまがない。

わが国で国際シンポジウムになっていなかった第1回の核酸化学シンポジウムが開催されたのは、1973年、大阪であつたらしい。核酸化学シンポジウムの歴史に関しては、関根光雄先生の「核酸化学の歴史と将来展望」や佐々木茂貴先生の「学会・研究会・シンポジウムレポート」と題する文章に詳しい (ともに日本化学会編、『核酸化学のニュートレンドーDNA・RNAの新たな可能性を拓く』、2011年に掲載)。それによると、第1回の核酸化学シンポジウムは、池原森男先生が中心となり、大塚栄子、早津彦哉、清水剛夫、畑辻明らの先生方が世話人となって開催されたようである。2016年までに43回を数える核酸化学シンポジウムが開催され、現在では国際シンポジウムとなって、世界中から多くの核酸化学研究者が集う重要なシンポジウムに発展している。本年2017年の第44回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2017) は、日本核酸化学会第1回年会として、東京理科大 和田猛先生を実行委員長に、11月14、15、16日の3日間、東京で開催される。

今2017年。核酸化学がますます熱くなっている。いつ新しい発見があっても不思議ではない。DNAについては、非二重らせん構造のDNAが細胞のがん化や老化に関与していることが科学的に解明されつつある。また、通常のワトソン・クリック塩基対以外にも、フーグスティーン塩基対やスリーウェイ・ジャンクションなどの構造が重要であるということもわかってきた。このような知見のもとに、DNAは遺伝子であるという概念を離れて、DNAをセンサーやデバイスに用いるナノテクノロジーも盛んだ。RNAについては、リボスイッチやmiRNA (マイクロRNA) のメカニズムが化学的に示され、ncRNA (ノンコーディングRNA) の機能の解明も盛んにおこなわれている。クリックの提唱した、DNAに保持された情報がRNAを経てタンパク質の機能と

して発現されるまでの過程である“セントラルドグマ”においても、新しい知見が見いだされつつある。ゲノム編集においても、ゲノム医療においても、核酸化学の需要が高まっている。このような核酸化学の興隆の時期に、JSNACが設立できたことは素晴らしい。

JSNACの役割は、会員の利便性や社会的な存在感を鑑み、3つの大きな“繋ぐ”を基にするのが肝要であろう。

(1) 世界を繋ぐ。

研究テーマは個人の発想に基づくのは当然であるが、素晴らしい成果を得るには優れた共同研究は欠かせない。JSNACは、学会会員の研究を世界に発信し、国際共同研究に繋ぐ支援を行わないといけない。そのためには国際シンポジウムやミニシンポジウム、レクチャーツアーなどの交流活動を盛んに行う必要がある。また、大学・研究機関の格差が問題となっている、わが国の国内研究を繋ぐ支援も視野に入れるべきであろう。

(2) 分野を繋ぐ。

核酸は、セントラルドグマに基づき、タンパク質などの多くの生命分子の情報を握る重要な分子である。それゆえ、核酸化学は、学問のセントラルドグマとして、核酸だけでなく多種多様な生命分子の研究分野に大きな影響を及ぼし、偉大な貢献をなす可能性がある。核酸をナノマテリアルやDNAコンピューターなどの観点から研究することで、材料学やシステム工学などへの展開も考えられよう。JSNACは、会員の研究成果を他の分野の研究者に広め、その反響をフィードバックすることが求められる。

(3) 時代を繋ぐ。

進る情熱によって奔走された創生期の先生方や、その熱き想いを引き継いだ我々の世代の先生方によって、JSNACは設立された。その概念と技を繋ぐことも重要である。シニアには経験の蓄積があり、若者には改革の勇気がある。“The Future of the Past”の視点から、若手の会の開催だけでなく、シニアと若手を繋ぐことができれば、JSNACは光り輝けるものになるだろう。

JSNACに期待される重要な使命の一つは、社会と時代の要請に応じた、最先端研究の成果の還元と次世代を担う優れた人材の育成である。上記の3つの繋ぐができれば、JSNACは、①社会的希求度や注目度が高く、②基盤的にも産業的にも重要性が見込まれ、かつ③将来にわたって学術的存在感が見込まれる学会に育つであろう。

学問の潮流は変わりやすい。一方で、脈々と受け継がれる基本はさらに後世に伝えておかenないといけない。俳人松尾芭蕉が『奥の細道』の旅で会得した概念と言われている、「不易流行(ふえきりゅうこう)」。「不易を知らざれば基立ちがたく、流行を知らざれば風新たならず」。つまり、世の中が変化し状況が変わっても絶対に変わらない学問と、社会や状況の変化に従ってどんどん変わっていく学問の共存。これこそがJSNACの今後において重要な指針になると思われる。

私の大好きな寮歌の一つに、北海道大学の学生寮であった恵迪寮(けいてきりょう)の寮歌『都ぞ弥生(みやこぞやよい)』(作詞者は、夢に燃える当時の学生、横山芳介氏)がある。JSNACの発展に欠かすことができない会員の皆様にその一節を改変紹介してエールを送ることとしたい。

「貴(たふ)とき野心の訓(をし)へ培ひ
栄え行く 我等が“日本核酸化学会”を誇らずや」

Contents

日本核酸化学会誌 Vol. 1

目次

- 巻頭言 日本核酸化学会 (JSNAC) に夢を託す／杉本直己 **1**
- 研究論文 蛍光 **blinking** 制御による核酸構造分析
ー核酸を 1 分子レベルで調べるー／川井清彦 **3**
- 単分子検出デバイスとしてのナノメカニカル DNA オリガミデバイス
ーそのアロステリック制御から剛性調節までー／葛谷明紀 **8**
- 細胞環境化学模倣実験系における DNA の構造とその熱力学的安定性
／三好大輔 **13**
- Turn-on 型蛍光グアニン四重鎖プローブの創成
ー天然有機化合物をリードとしてー／寺 正行 **20**
- 核酸糖部構造と HIV-逆転写酵素の薬剤耐性活性との相関について
ーケミカルバイオロジーツールとしての化学修飾核酸の利用ー／山田 研 **25**
- エッセイ 出 AGCT 記／浅沼浩之 **32**
- 超分子化学と核酸／井原敏博
- 日本核酸化学会の設立は意味のあることなのでしょうか？／岡本晃充
- RNA に魅せられて／齊藤博英
- 核酸化学研究者の登竜門／南川典昭
- 核酸化学シンポジウムと私／和田 猛
- 核酸化学のさらなる発展に向けて／和田健彦
- 付録 日本核酸化学会設立趣意 **44**
- 日本核酸化学会会則
- 日本核酸化学会細則
- 日本核酸化学会 学会賞等規定
- 平成 29 年度役員

神戸天然物化学の受託サービス

<http://www.kncweb.co.jp/>

私たちは化学のプロです

有機合成化学分野、バイオケミストリー分野、天然物化学分野に於いて
研究ステージ、試作ステージ、生産ステージにおける幅広い範囲で
お客様のご支援を仕事として活動しています

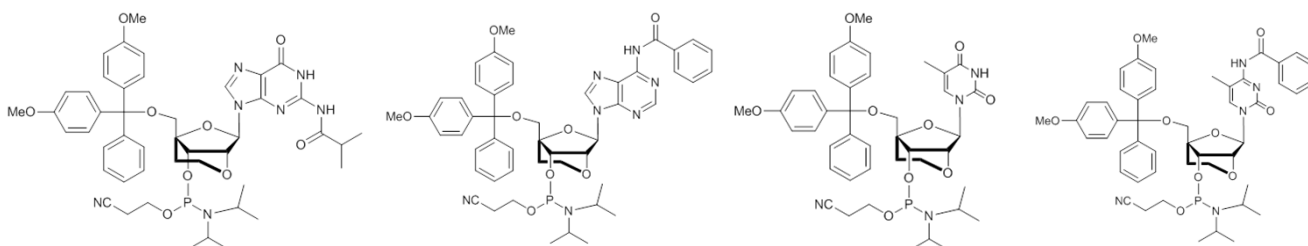
■受託製造(核酸関係)

・cGMP対応でのオリゴ核酸製造

「**核酸モノマー**」の製造及び**オリゴ核酸医薬品**の開発研究・試験
製造から**治験薬・医薬品原薬**製造まで」

■試薬販売

ENA[®] (2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids) アミダイトの販売
(ENA[®]は第一三共の商標登録)



■有機合成による受託研究および製造

Name Reactionから最新の反応まで、少量のサンプル合成から工場
でのトンオーダーの生産まで有機合成反応を駆使して、お客様の様々
なご要望にお応えします



 神戸天然物化学株式会社

<http://www.kncweb.co.jp/>

本社営業部 651-2241 兵庫県神戸市西区室谷 1-1-1 TEL:078-224-5106 FAX:078-990-3215

東京営業所 101-0035 東京都千代田区神田紺屋町6 大矢ビル5F TEL:03-3251-1861 FAX:03-3251-1862

相対する指標



死細胞

生細胞

細胞傷害性については、測定原理の異なる複数の指標を用いることで実験の裏付けを行うことができます。細胞の状態を確認する手法の一つであるLDHアッセイは1960年、Nachlasらにより遊離LDH（乳酸脱水素酵素）を指標とした細胞傷害性試験が行われて以降、今なお世界中で論文数は増え続けています。

小社で開発したLDHアッセイキットとCell Counting Kit-8は、死細胞及び生細胞それぞれを測定します。そして、2つの測定を同じ細胞を用いて実験することができ、時間短縮とサンプル間の誤差を抑えた評価法として、使用することができます。

細胞毒性測定キット

Cytotoxicity LDH Assay Kit - WST

細胞増殖・毒性測定キット

Cell Counting Kit - 8

試薬を通して最新研究をサポート

DOJINDO

超高速光クロスリンカー

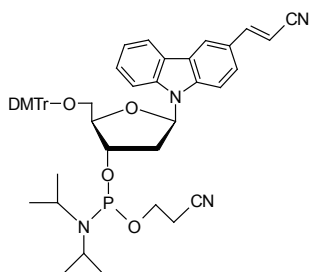
世界最高速のスピードで簡単・確実に核酸を捕捉する

CNV シリーズ

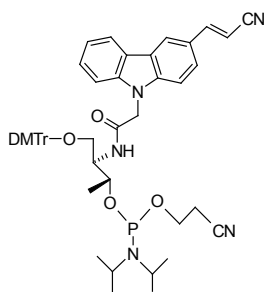
(3-シアノビニルカルバソール修飾スクレオシド)

北陸先端科学技術大学院大学 藤本教授開発

CNV-K
デオキシリボースリンカー



CNV-D
トレオニノールリンカー



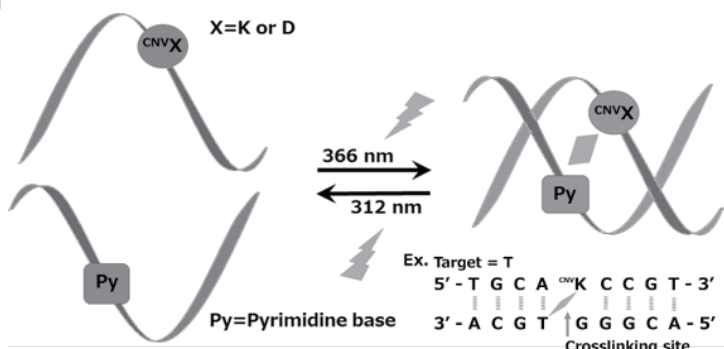
[ピリジン塩基と可逆的に架橋]

UV 照射により 結合 (366 nm) ⇌ 解離 (312 nm)

Point① 反応率は照射強度 / 時間によりコントロール可能

Point② 細胞毒性や核酸損傷の可能性が低い波長を使用

<CNV シリーズ修飾オリゴ核酸の光架橋>



【CNV シリーズに関するお問い合わせはこちら】

日華化学株式会社 界面科学研究所 先端技術研究部
福井市文京 4 丁目 23-1

URL : www.nicca.co.jp (お問い合わせフォームより)

TEL : 0776-25-8587 (ダイヤルイン)

カーシートの
難燃加工などにも
NICCA

プロ仕様の
ヘアケア製品にも
NICCA

衣類の
抗菌消臭加工にも
NICCA

チケット類の
感熱紙にも
NICCA

界面科学で
暮らしを支える
NICCA!

ハンドソープや
手指消毒製品にも
NICCA

クリーニング用の
洗剤にも
NICCA

スポーツウェアの
超撥水加工にも
NICCA

新聞紙等の
脱墨加工にも
NICCA

これからも、ずっと、輝く未来。

Activate Your Life

 日華化学株式会社

Barnstead 超純水製造システム

水道水直結型超純水製造装置が 520,000円 から！！



水道水直結型超純水製造装置
Smart2Pureシリーズ



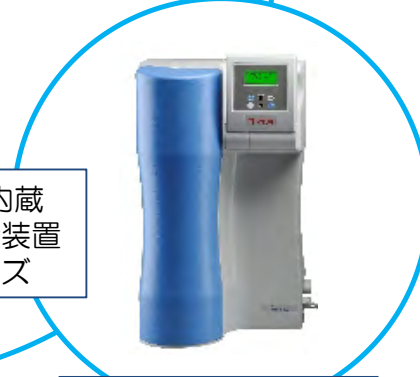
簡易型純水製造装置
MicroPureシリーズ



超純水製造装置
GenPureXCADシリーズ



容量可変100Lタンク内蔵
水道水直結型超純水製造装置
LabTowerEDIシリーズ



純水製造装置
PacificT II シリーズ

Barnstead超純水装置は、低価格・低コストでありながら充実した機能を搭載し、ご用途に合わせ豊富な機器バリエーションからお選びいただけます。

日本総代理店
ニッコー・ハンセン株式会社
ハンセン営業部
Nikko Hansen & Co., Ltd.

〒530-0043 大阪府大阪市北区天満4-15-5
TEL : 06-4801-7751 (代表)
FAX : 06-6358-5580
<http://www.nikko-hansen.jp>

JASCO Corporation

New Circular Dichroism Spectrometers Based on JASCO's latest technology

With the optimized optics and the latest technology of digital signal processing, J-1000 series are born as the evolution to the new stage. As the UV/VIS model with wavelength range of 180nm-600nm, J-1100 is suitable for the research of bio molecules such as proteins and nucleic acids. The J-1500 with the wavelength range of 163nm-1600nm, will answer all the demands for not only proteins, nucleic acids, but also the chiral molecules, super molecules and metal complexes. The J-1700 high end CD spectrometer can measure CD spectra entire VUV to NIR region.(163-2500nm)

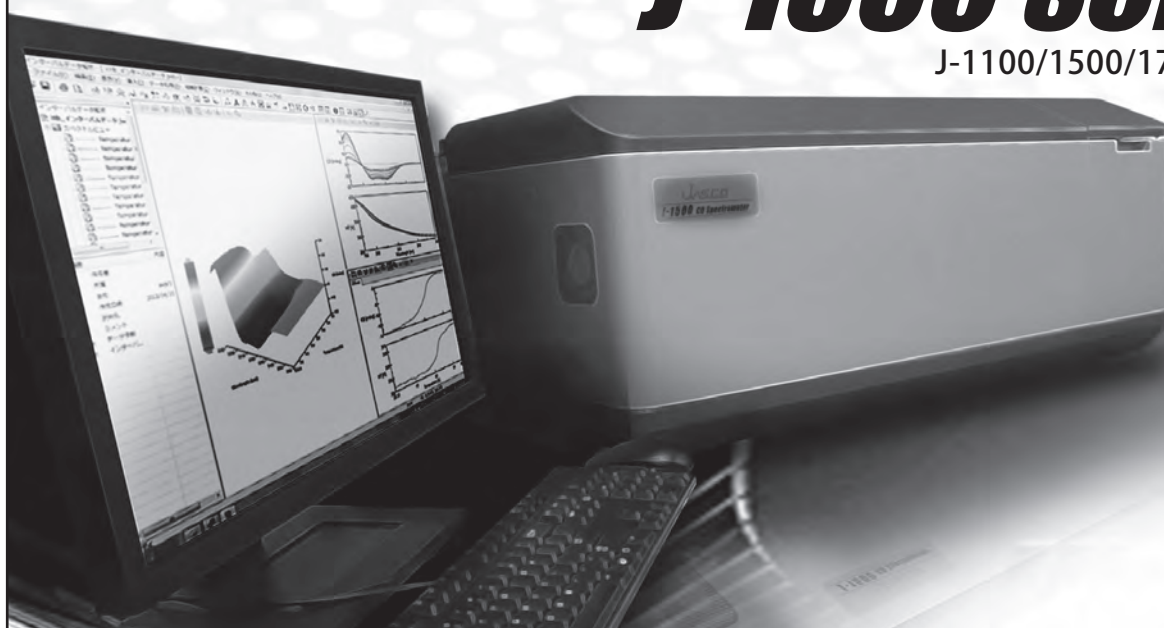
Features

- Measurement with high S/N available in vacuum UV region
- Multi-Probe system supports versatile measurement modes, such as CD, LD, Abs, FDCD, fluorescence spectra, fluorescence anisotropy, ORD etc.
- High efficient purging system needs less N₂ gas consumption.
- The latest wide dynamic Lock-in amplifier enables accurate CD measurement in high absorbance.

Circular Dichroism Spectrometer

J-1000 series

J-1100/1500/1700



日本分光の最新情報はここから <http://www.jasco.co.jp>

光と技術で未来を見つめる

日本分光

日本分光株式会社

〒192-8537 東京都八王子市石川町 2967-5
TEL 042(646)4111 (代)
FAX 042(646)4120

北海道S-C 011(741)5285	神奈川S-C 045(989)1711
北日本S-C 022(748)1040	名古屋S-C 052(452)2671
筑波S-C 029(857)5721	大阪S-C 06(6312)9173
東京S-C 03(3294)0341	広島S-C 082(238)4011
西東京S-C 042(646)7001	九州S-C 092(588)1931

JASCO

JASCOは日本分光株式会社の登録商標です。
本広告に記載されている装置の外観および各仕様は、
改善のため予告なく変更することがあります。



蛍光 blinking 制御による 核酸構造分析

～核酸を1分子レベルで調べる～

大阪大学産業科学研究所

川井清彦

(kiyohiko@sanken.osaka-u.ac.jp)



Abstract: In addition to canonical right-handed B-form double helix, DNA can adopt various higher-ordered structures such as, a hairpin, an A-form duplex, a left handed Z-form duplex, a triplex and a quadruplex. The thermodynamic stability of these higher-ordered DNA structures are shown to be strongly dependent on DNA sequences, and thus the relation between higher-ordered DNA structures and their functions has attracted wide attention. Since higher-ordered DNA structures are considered to appear rarely and transiently, the development of single-molecule level probing methods to investigate when and how they appear is highly desired. So far, we have focused on the fluctuating emissions between bright “ON” and dark “OFF” states of fluorescent molecules, so-called “blinking”. We developed a method termed Kinetic Analysis based on the Control of the fluorescence Blinking (KACB). This article reviews the discrimination of a hairpin, a duplex, and a triplex DNA structures by KACB.

1. はじめに

DNAは、ワトソン・クリックにより解明された右巻きのB型と2本鎖構造だけでなく、溝の深さが異なるA型構造、逆巻きの左巻きのZ型構造、そして、3本鎖、4本鎖、ヘアピン構造など、様々な高次構造(非標準構造)を形成することが知られる。これら高次構造の熱力学的安定性は、DNA配列に大きく依存することがわかっている。したがって、DNA高次構造も配列情報を反映して形成されと考えられ、遺伝子発現におけるDNA高次構造の役割に関して注目が集まっている¹。これまでの研究により、プロモーター領域に4重鎖を形成しやすい配列(潜在的4重鎖形成配列)が数多く見出されており、4重鎖形成が転写活性と密接にかかわっていることが示唆され、人為的な遺伝子発現制御のターゲットとして注目されている²。また、トリプレットリピート病と呼ばれるハンチントン病などの疾患において、複製中にヘアピン構造が形成されることが原因の1つとして指摘されている³。いずれの場合においても、DNA高次構造は転写あるいは複製時に過渡的にダイナミックに形成されと考えられている。

DNAの高次構造転移のダイナミクスは、多量に調製可能な短鎖DNAオリゴヌクレオチドを用いて調べられてきた。複数の分子が存在するアンサンブルの実験では、速度を計測するためには反応を同期させる必要があり、混合をトリガーとするstopped-flowや、短パルス光照射により引き起こされる光化学反応や温度ジャンプなどを利用した過渡分光法が用いられてきた。しかしながら、DNA高次構造転移はタンパク質との相互作用、すなわち、転写、複製等に伴い始めて誘起される現象であり、従来法では、測定に十分な量のタンパク質-DNA複合体を調製できない、あるいは、構造転移を同期させることが難しく、DNA高次構造転

移のダイナミクスは未解明な点が多く残されている。

一方、近年の分光技術の発展に伴い、核酸やタンパク質などの貴重な生体試料のダイナミクス観測にあたり、1分子蛍光観測法が有効な手段となってきた。1分子蛍光観測では同期の必要がなく、蛍光強度の時間変化を追跡して速度を求めることができる。特に、2分子の蛍光分子間の距離の変化を調べることができる1分子FRET法は、生体分子の様々なダイナミクスを我々に提供してきた⁴。1分子FRETは非常に有効な手法であるが、FRET観測のためには大きな構造変化を伴う必要があり(FRET効率が半分となる蛍光分子間の距離は50 Å程度)、長鎖DNA中に生じる部分的なわずかな構造変化を読み出すことは難しい。筆者らは長年、DNA高次構造の検出やダイナミクスに関して研究を行ってきた⁵。近年、極微量のDNA試料を用いたDNA高次構造転移観測法の確立を視野に入れ、蛍光分子を1分子レベルで見たときに現れる物理化学現象である蛍光の点滅=blinkingに注目し、blinkingを制御・活用することに基づいた1分子レベル分析・診断法の開発を進めている(Kinetic Analysis based on the Control of the fluorescence Blinking: **KACB**法)⁶。本総説では、KACB法により、1本鎖、2本鎖、3本鎖、ヘアピン構造の読みわけを行った結果について概説する。

2. blinkingとは？

筆者らは、分子を1つ1つ見た時にはじめて気付くような分子の光り方、輝き方に注目すれば、1分子を区別してはつきりと見つけられるだろうと考えた。そこで、1分子レベル特有の現象、blinkingに注目した。蛍光分子が「光を吸収して一励起され一発光する」サイクルが繰り返されている時が“ON状態”、分子が化学反応等により、一時的に発光できない時が“OFF状態”となる。1つの分子に注目し、ON、OFF状態の繰り返しにより蛍光が点滅しているように観測される現象がblinkingである(図1)。蛍光分子を1分子検出可能になった当初は、確かに1分子を見ている証拠として言及されていた1分子観測特有の現象であり、blinking観測により何かを調べることができれば、1分子からの情報読み出しにつながることを意味する。blinking現象は、当初は1分子蛍光観測を妨げる現象として敬遠されていたが、超解像顕微鏡の原理として用いられるなど、最近ではblinking現象を分析へと応用する試みがなされている。blinkingは様々な理由で起こるが、筆者らはblinkingが起こる化学反応を操り、blinkingパターンが蛍光分子の置かれた環境に応じて変化するように制御することにより、blinkingパターンの変化から蛍光分子周辺情報を読み出す手法開

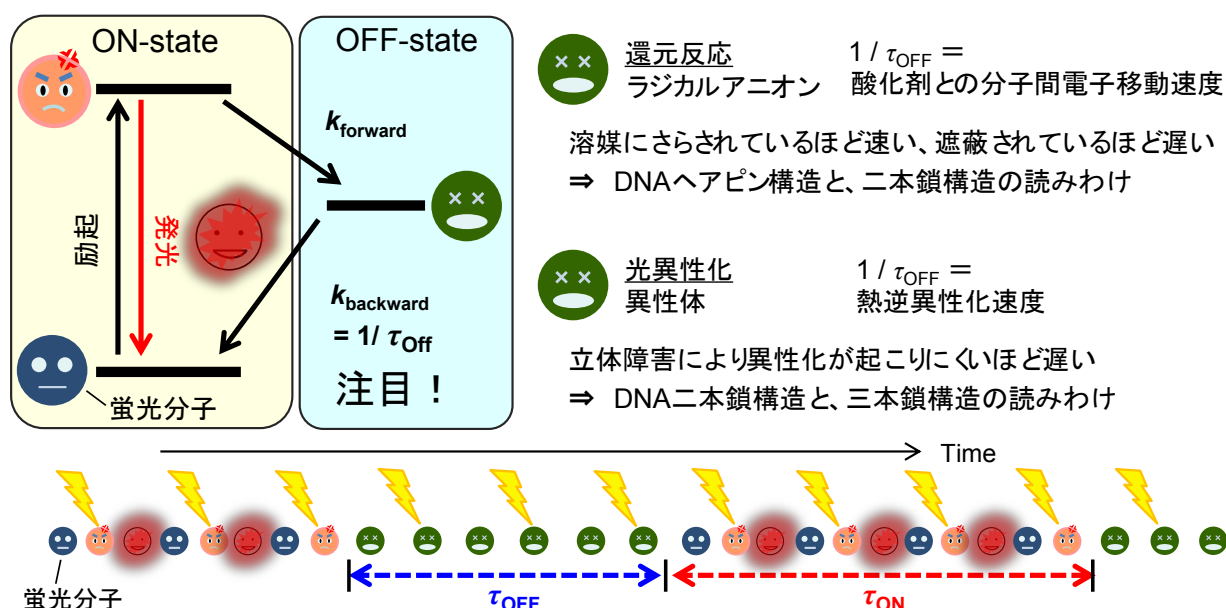


図1 蛍光の blinking が起こる仕組みと、blinking 観測の鍵となる計測される速度定数。

発に取り組んできた。Blinkingは、蛍光相関分光(FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy)を用いて、1 μs 程度の時間分解能で測定することができ、筆者らは特に照射光強度や励起効率に依存しないOFF状態の持続時間(= τ_{OFF})の測定による分析に着目している。

3. KACB法による三本鎖構造の検出: blinkingを制御する上で重要となるのはOFF状態の性質である。光励起により生じる異性体がOFF状態となる蛍光分子Cy3のblinkingに注目し、スタッキングなどにより熱逆異性化速度(= $1/\tau_{\text{OFF}}$)が遅くなるほど、 τ_{OFF} が長くなることを利用した核酸構造分析を検討した。核酸構造にCy3の構造を重ね合わせると、Cy3の分子の大きさがDNA三本鎖構造の断面の大きさと同程度であることがわかった(図2)。これにより、立体障害により三本鎖構造特異的にCy3の異性化反応が遅くなるのではと考えた。狙ったように、二本鎖構造と比較して三本鎖構造では τ_{OFF} が約8倍長くなり、Cy3のblinkingを観測することにより、二本鎖構造、三本鎖構造を読み分けられることを提唱した。ここで、アデニンの8位にアミノ基を導入してHoogsteen水素結合の数を増やすと^{5a}、 τ_{OFF} が三本鎖構造特異的に顕著に増加した。一方、Watson-Crick水素結合を増やすアデニンの2位のアミノ基は τ_{OFF} に大きな影響を及ぼさなかった。熱力学的には測定温度においてほぼ三本鎖状態にあることから、三本鎖構造の有無だけでなく、その剛直性・ゆらぎに関してCy3の蛍光のblinkingにより調べられることが示唆された^{6d}。

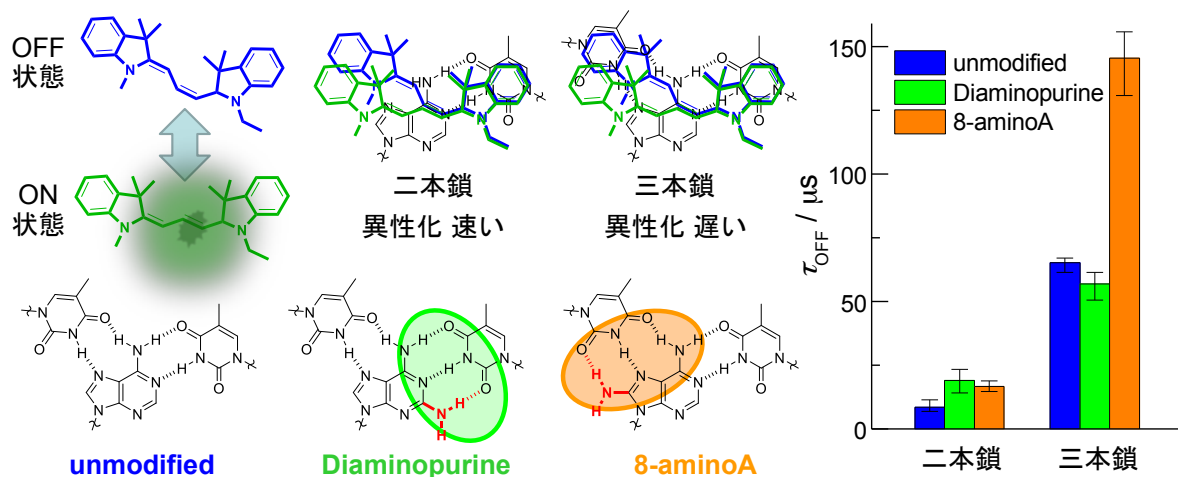


図2 光異性・熱逆異性化由来の blinking の制御・活用に基づく KACB 法

4. KACB法による、ヘアピンループ、二本鎖構造の読みわけ

分子間反応の速度は、分子の濃度と分子と分子の衝突しやすさに依存する。著者らは、核酸に結合した蛍光分子と溶液中の分子との間の反応速度が、蛍光分子が溶媒にさらされているほど速くなり、逆に核酸構造により溶媒から遮蔽されているほど遅くなることを利用したDNA高次構造の読みわけを検討した(図3)。蛍光分子R6Gをヘアピンループ部位に結合し、ヘアピン状態では蛍光分子は溶媒へと突き出すが、ターゲット相補鎖存在下では二本鎖が形成され、二本鎖中にインターカレートすることにより溶媒から遮蔽されるよう分子設計したモレキュラービーコンタイププローブを構築した。溶液中に還元剤としてリン酸化アスコルビン酸(VcP)を添加し、蛍光分子R6Gの励起状態とVcPの反応により生じるR6Gのラジカルアニオン状態をOFF状態とする酸化・還元blinkingについて検討した。まず、脱気せずに溶存酸素分子を酸化剤とするblinkingを観測したところ、ラジカルアニオン状態の寿命に対応する τ_{OFF} 値は、蛍光分子がループ部位に位置するときに短く、逆に二本鎖中に存在するときに長くなり、蛍光分子の置かれた周辺環境を酸化・還

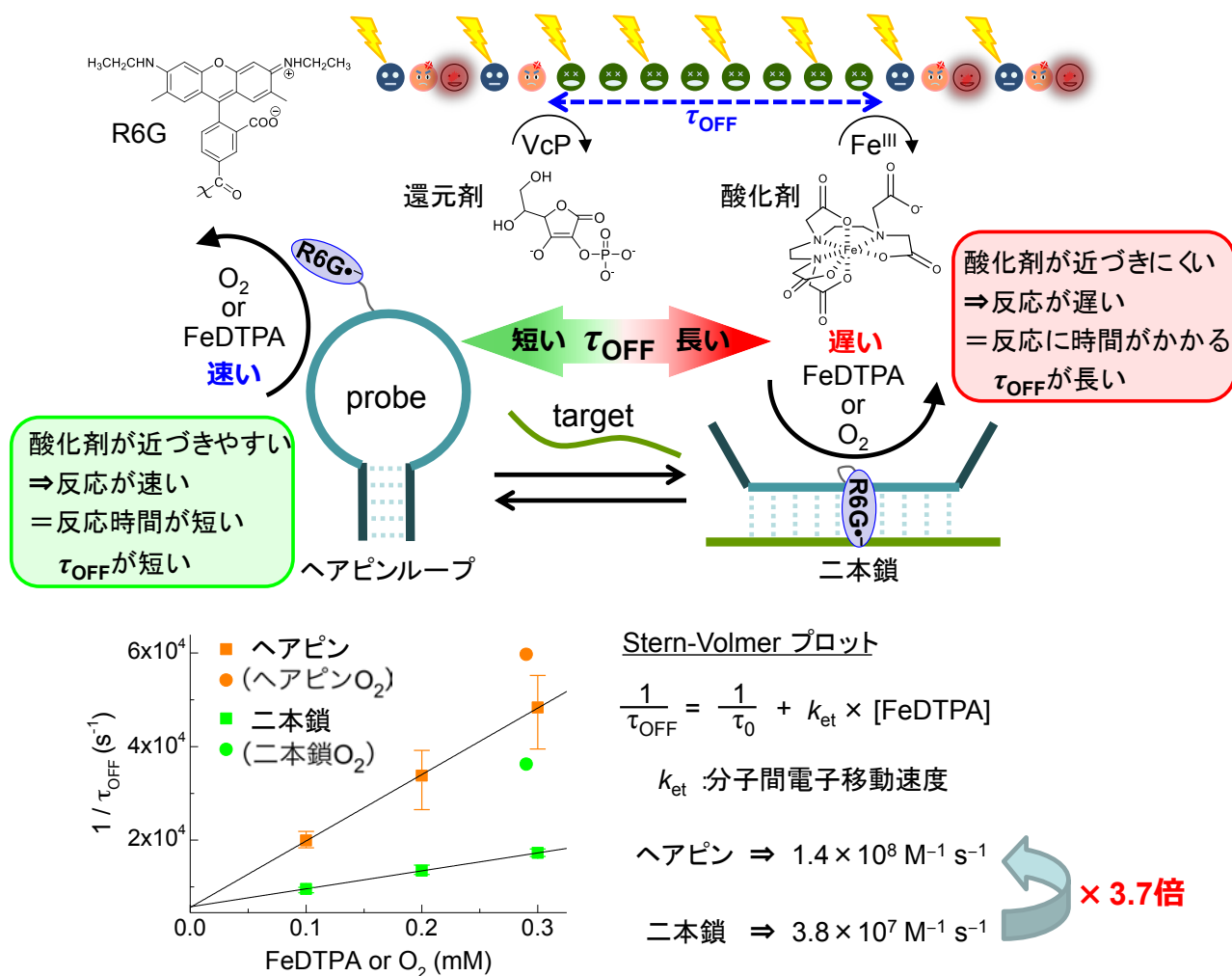


図3 酸化・還元 blinking の制御・活用に基づく KACB

元blinkingにより読み出せることが示された。しかしながら、 τ_{OFF} の変化は1.6倍と小さかった。筆者らは、DNAには大小二つのグループがあるため、小さな酸素分子は比較的容易に二本鎖中の蛍光分子にアクセスできるのではと考えた。そこで、次にかさ高い酸化剤であるFeDTPAを用いた酸化・還元blinkingの制御を検討した。狙ったように、 τ_{OFF} 値は、DNAの構造変化に伴いより大きく変化し、ヘアピンと二本鎖の構造の違いをより明確に区別できるようになった。FeDTPAの濃度を変え測定し、Stern-Volmer plotから分子間電子移動速度を決定したところ、R6Gがヘアピンループ部位に位置する時と、二本鎖中に埋没する場合で反応速度が3.7倍変化することが示された。このように、酸化剤の大きさによって得られる情報が異なることから、Connolly法においてprobe球の大きさを変えながら溶媒接触表面積を調べるのと同じように、調べたいDNA高次構造に応じて適切な大きさの酸化剤を選択することにより、よりはっきりと構造転移を観測可能になることが示唆された^{6c}。

5. おわりに

本稿では、4 nMの蛍光分子濃度のサンプルを用いてアンサンブル系で測定した結果を紹介したが、blinking測定の魅力はやはり1分子分析である。1つの核酸に注目しそのblinking挙動の時間変化を追跡することにより、構造転移のダイナミクスを調べることが可能になる。現在、種々のblinkingの制御に基づく

核酸高次構造転移の1分子分析に取り組んでいる。本稿で紹介した研究成果は、東京工業大学生命理工学院の丸山厚教授との共同研究によって得られたものである。深く感謝の意を表す。本研究を遂行するにあたり、JSTさきがけ(「分子技術と新機能創出」加藤隆史研究総括)、文科省・JSPS科研費(24350084, 15K12755, 16H01429 “Resonance Bio”)の助成を受けた。ここに記して感謝する。

References

- 1 a) Y. Xu, H. Sugiyama, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 1354 (2006); b) S.-i. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.*, **114**, 2733 (2014).
- 2 a) A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11593 (2002).
b) Y. Katsuda, S.-i. Sato, L. Asano, Y. Morimura, T. Furuta, H. Sugiyama, M. Hagihara, M. Uesugi, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 9037-9040 (2016).
- 3 K. Nakatani, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **82**, 1055 (2009).
- 4 S. Weiss, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 724 (2000).
- 5 a) K. Kawai, I. Saito, H. Sugiyama, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5221 (1998); b) K. Kawai, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1391 (1999); c) K. Kawai, K. Miyamoto, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 912 (2003); d) T. Kimura, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *Chem. Commun.*, 1438 (2004); e) T. Kimura, K. Kawai, T. Majima, *Chem. Commun.*, 268 (2004); f) K. Kawai, H. Yoshida, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13232 (2005); g) T. Kimura, K. Kawai, T. Majima, *Org. Lett.*, **7**, 5829 (2005); h) K. Kawai, M. Hayashi, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9406 (2012).
- 6 a) K. Kawai, E. Matsutani, A. Maruyama, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 15568 (2011); b) K. Kawai, T. Majima, A. Maruyama, *ChemBioChem*, **14**, 1430 (2013); c) K. Kawai, T. Koshimo, A. Maruyama, T. Majima, *Chem. Commun.*, **50**, 10478 (2014); d) K. Kawai, A. Maruyama, *Chem. Commun.*, **51**, 4861 (2015); e) K. Kawai, K. Higashiguchi, A. Maruyama, T. Majima, *ChemPhysChem*, **16**, 3590 (2015).

(2017 年 5 月 31 日受領)

(2017 年 8 月 9 日受理)



単分子検出デバイスとしての ナノメカニカル DNA オリガミデバイス

～そのアロステリック制御から
剛性調節まで～

関西大学化学生命工学部

葛谷明紀

(kuzuya@kansai-u.ac.jp)



Abstract: We have recently developed nanomechanical DNA origami devices, DNA Pliers and DNA Forceps, which can pinch exactly one target molecule, and transform between X-shaped open and parallel closed form. Detectable targets of such DNA origami pinching devices vary from proton, metal ions, small molecules such as ATP, to gigantic proteins such as antibodies, since there is almost no limitation in the choice of ligand(s) introduced to the devices. Although single-molecule pinching of targets with strong binding affinities were successful, targets only weakly bind to the ligands were often incapable of triggering transformation by single binding event. Cooperative and multiple binding of such targets is one of the good solutions, although it makes the binding profile more complex. To improve target pinching efficiency and form discrimination under AFM, allosteric control of the pinching devices as well as construction of more rigid DNA origami devices was examined.

はじめに

近年、原子間力顕微鏡をはじめとする単分子イメージング技術が急速に発展し、「検出したい分子を直接観る」生体分子検出法の実現に必要な環境が整ってきた。しかしながら、多くの生理活性物質は未だ検出限界以下の大きさしかもたず、また、相当の大きさをもつタンパク質であっても、その外見のみから多種多様のタンパク質を区別することはおよそ不可能である。そこで、検出したい分子のみに選択的にしるしを付与する技術が重要となる。我々はこれまで、長鎖の一本鎖環状DNAを多数の短いDNA鎖を用いて一筆書き状に折り畳み、任意の平面構造を形成させるDNAオリガミ法^{1,2}を活用して、さまざまな分子デバイスを作成してきた³。その中で、ターゲットとの相互作用により大きな構造変化をするナノメカニカルデバイスを活用し、ターゲットの存在を1分子ずつ分子レベルで数え上げられる新たな生体分子検出法を開発することに成功したので報告する⁴⁻⁹。

デバイスの設計

本研究ではまず、長さ約170 nmの2本のレバー部から構成されるペンチ型 (DNA Pliers)、および鉗子型 (DNA Forceps) のナノメカニカルDNAオリガミデバイスをデザインした。構造体中の2本のレバーは、オリガミ形成の足場となるM13mp18ファージゲノムの主鎖に存在する、2本のリン酸ジエステル結合のみで連結されている。この連結部分は、天然にも相同組換えの際等に見られる、DNA二重らせんが四分岐した Holliday Junction構造に相当する。過去の立体構造解析等の結果から、このデバイスはDNAオリガミの作

成条件である Mg^{2+} 存在下では、X字型に交叉した構造(cross体)を優先して形成すると予想される。一方で、2本のレバー部間に何らかの相互作用が生じた場合には、2本のレバーが平行になって閉じたParallel体、もしくは逆向きになって閉じたAntiparallel体の形成が予想される(図1)。

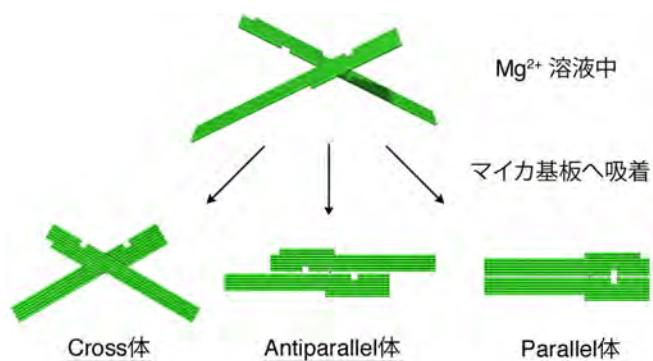


図1 DNA Pliersのデザインと各種形態

さらに第2世代のナノメカニカルDNAオリガミデバイスとして、より剛直なDNA Chopstickもデザインした(図2)。DNA PliersもForcepsも、いずれも「DNA二重らせんをいかだ状に平面に並べて結合する」という、古典的なDNAオリガミ構造体の設計手法に基づいて作成している。DNA Chopsticksではこれに変えて、「DNA二重らせんをチューブ状に配置して結合する」という、立体DNAナノ構造体の設計手法を採用した。構成するDNAのらせん乗り換え地点を適宜調整して、6本の二重らせんを内角 120° の関係で結合していくことにより、正六角形の各頂点に二重らせんが配置された管状構造を構築できる(これを6 helix bundle (6HB)という)。このような管状パーツを2本用意し、上述のDNA PliersのようにHolliday Junctionで連結することにより、一粒のターゲットを2本の棒でつまむ DNA Chopsticksが形成される。

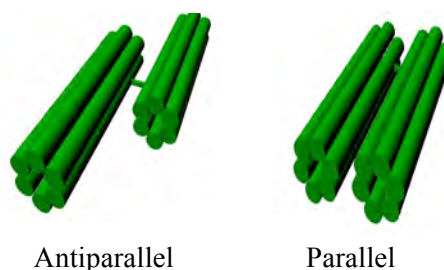


図2 DNA Chopsticksのデザイン

実験方法

足場となる7,249塩基の1本鎖環状DNAウイルスM13mp18のゲノムDNA(4 nM)と、その構造を固定するためのstaple strands(およそ200本, 各20 nM)を1xTAE/ Mg^{2+} (12.5 mM) 緩衝液中で混合した。これを 90°C から 25°C まで徐冷($-1^\circ\text{C}/\text{min}$)することで、長さ約170 nmの2本のレバー部からなる各種のナノメカニカルDNAオリガミデバイスを自己組織化により形成させた。構造の確認は、マイカ基板上での液中AFM観察およびアガロースゲル電気泳動で行った。

結果と考察

図3にDNA PliersおよびDNA Forcepsの等量混合液のAFM画像を示す。目論見通り、およそ長さ170 nmの2本の棒状パーツからなる構造体が多数観察され、DNA PliersとDNA Forcepsの形状の違いもはっきり区別できる。

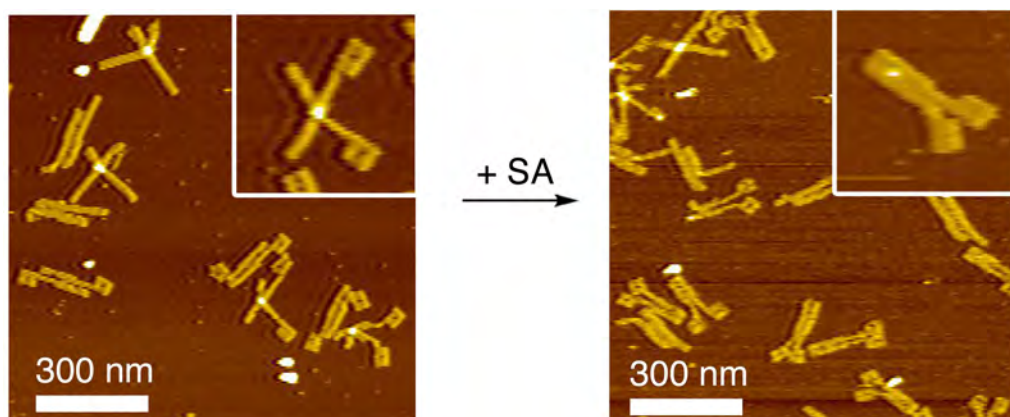


図3 フルオレセイン修飾DNA Pliersとビオチン修飾DNA ForcepsのAFM像。SAの添加で、DNA Forcepsのみが閉じる(右)。

このようなオリガミデバイスを用いてターゲット分子を検出する手法として、まずターゲット分子をペンチで挟むように1分子だけ捕獲する動作機構(pinching機構)を考案した。ターゲット分子と強く結合するリガンドを、デバイスのレバー部の先端にそれぞれ1分子ずつ導入しておき、これらを同時に1分子のターゲット分子と結合させる。これによりレバー間に新たな架橋構造が生まれ、通常交叉した状態にあるレバー部が平行な閉じた状態へと変型する。このデバイス全体の構造変化をAFMで観察することにより、ターゲットが溶液内に存在することを検知する。レバー部をそれぞれビオチンで修飾すれば、系中に加えたストレプトアビジン(SA)を1分子だけ結合し、明瞭に観察できる構造体の内およそ7割が閉じたparallel体に構造変化する。レバーをフルオレセインで修飾すれば、同様に抗フルオレセイン抗体がペンチ内に厳密に1分子だけ捕獲され、構造変化したデバイスが捕獲された抗体分子とともにはっきりとイメージングできる。それぞれ見た目の違うDNA PliersとDNA Forcepsを、異なるリガンド(上記の例で言えばビオチンとフルオレセイン)で修飾しわけておけば、どちらのデバイスが構造変化したかを手がかりに、溶液中に存在するタンパク質の種類を見分けることができる。通常AFMでタンパク質を観察しただけでは、ただの球状の物体が見えるだけであるので、DNAオリガミデバイスを使用してはじめてできる芸当である。

ただ一つの架橋構造を利用してオリガミデバイスを閉じる「pinching機構」は、非常に強い相互作用を示すSAなどのターゲットには適しているが、それ以外の中程度以下の相互作用しか示さないターゲットでは、オリガミデバイスの十分な構造変化を誘起できないことが予想される。DNAオリガミ技術を利用してある程度の大きさがあるDNAナノ構造体をつくる利点の一つは、複数のDNAを構造体上にのせ、協調して動作させることができることにある。そこでタンパク質以外のターゲットに対しては、オリガミデバイスのレバー部上に4組のDNA鎖をジッパーの歯のように導入し、これらを協同的に作用させる「zipping機構」を検討した。その結果、12 merのヒテロメア配列一本鎖DNAが二量化する性質を利用して、溶液中の Na^+ や K^+ の存在をオリガミデバイスの構造変化として分子レベルで検出することに成功した。同様に、溶液中の Ag^+ の存在も、C-Cミスマッチの安定化を利用することで検出できる。さらには、弱酸性環境下のみで形成されるDNA四重鎖であるi-motifを利用することで、溶液のpH変化を検知することも可能である⁵。

複数の相互作用を協同的に作用させてオリガミデバイスを選択的に閉じる「zipping機構」とは逆に、ターゲットと検出用DNA鎖との相互作用により、あらかじめ閉じておいたデバイスを選択的に開くことでターゲットの存在を検知する「unzipping機構」についても検討した。あらかじめ閉じるために使っていたDNA二重鎖

における鎖交換反応や、DNAアプタマーにおける構造変化を利用することで、microRNAやATPなどを分子レベルで検出する系の構築にも成功した。

「zipping機構」のように代替手段を講じるのではなく、結合の比較的弱いターゲットでも1分子捕獲を実現するための別の方策としては、アロステリック酵素の機構を模倣したDNAデバイスの二段階構造制御が挙げられる⁶。1番目のターゲット分子(エフェクター)の結合により酵素全体の構造が変化し、2番目のターゲット、すなわち本来の基質の結合が促進される機構を(正の)アロステリック効果という。これを模倣した系として、DNA Pliersのレバー部に導入したジッパーによってあらかじめDNA Pliersをparallel型に閉じておき(すなわちこれがエフェクターの結合とそれに伴う構造変化に相当する)、1分子捕獲したいターゲットに対するリガンドどうしをあらかじめ互いに近接させておくことが考えられる。実際に、ジッパー部に Na^+ 検出に使用したヒトのテロメア配列を使ってあらかじめDNA Pliersを閉じておくと、開いた形態では非常に捕獲収率の低かったmiRNAや、金ナノ粒子が効率良く捕獲でき、系から Na^+ を除いてジッパーを解除しても、DNA Pliersは閉じた形状を保つことが明らかとなった。特に、金ナノ粒子を単粒子捕獲した系では、1つの金ナノ粒子に2分子の異なるDNAが反対側から結合した、通常では非常に得がたい特殊な複合体ができていることになり、金ナノ粒子のさらなる複合化への応用なども期待される。

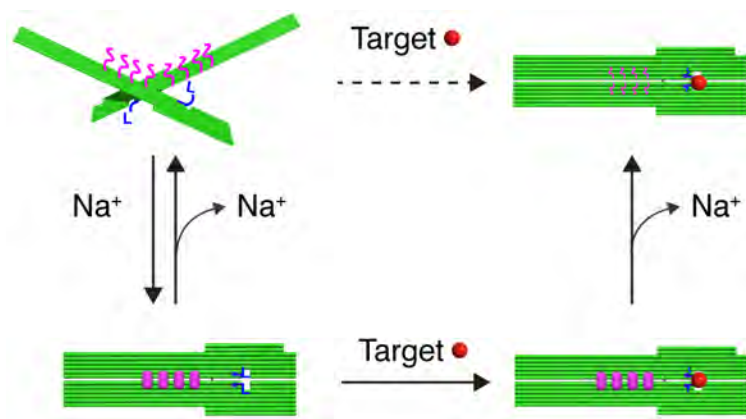


図4 DNA Pliersのアロステリック制御

AFMイメージングにおける各形態観察⁷を容易にすることを目的としてデザインした剛直なデバイス、DNA Chopsticksに関しては、マイカ基板に吸着した構造体のほぼ全てが予想通り、通常のDNAの2倍の高さを持つX字に交叉した形状で観察された。観察された構造体の9割以上は、ほぼ曲がりの無い完全な形状を保持しており、3~4割が何らかの折れ、曲がりを伴っていた従来のDNA Pliersと比較して、AFM観察における管状構造の有用性が示された。さらにビオチン修飾によるSA分子の捕獲能を調べたところ、こちらは予想に反して、4割弱のデバイスしか閉じた形状への構造変化を示していなかった。ビオチン化DNA Pliersとの等量混合液を作成し、これにSAを加えて同条件でくらべた場合でも、構造変化率はDNA Pliersが有意に高かった。このことから、DNAオリガミデバイス上でターゲット分子の協同的な結合を起こさせたい場合には、より柔軟な「古典的」DNAオリガミデザインの方が適していることが示唆された。

おわりに

以上のように、可動変形する各種のナノメカニカルDNAオリガミデバイスを活用することで、理論的に最小の質量数をもつプロトンをはじめとして、数十の金属イオン、分子量数百の小分子、さらには分子量数万のタンパクまでの幅広いターゲットを検出できることが確認された。これらのナノデバイスの構造変化は、AFMのみならず、一般的な研究室の設備でも実施できるゲル電気泳動によっても、明瞭に判別することが

できる。たとえば最近では、リン酸ジエステルではなくペプチド結合の主鎖を持った核酸アナログであるPNAが、DNA二重鎖に潜り込んでこれを引きはがす様子(Strand Invasion)など、生体関連分子に時としてみられる特異な結合形態を、DNA Pliersをゲル電気泳動することで容易に解析できることがわかってきた⁸。蛍光ラベル化なども自在に行え⁹、全反射蛍光(TIRF)顕微鏡と蛍光修飾DNAを組み合わせた超解像蛍光観察法の一つであるDNA-PAINT法¹⁰と組み合わせれば、デバイス1分子の構造変化をリアルタイム検出することも不可能ではないだろう。

従来の設計では、DNA Pliersの構造変化はcross体と二種類の閉じた形態(2本のレバーが同じ向きを向いたparallel型および逆向きになったantiparallel型)のうちの一方との間でしか行うことができなかったが、レバー同士を結合するDNA鎖の配列を工夫することにより、上述の三つの形態間で自由に行き来させる系の構築にも成功している¹¹。Parallel型とantiparallel型の間の変型では、レバー末端の移動距離は200 nmにもおよぶ。ポリスチレンビーズやリボソームなどを操作する技術等の開発に役立つかもしれない。

これまでの核酸化学分野の精力的な研究の成果として、今日では「DNAに結合することのできる化合物にはほぼ制限がない」と言っても過言ではない環境が整っている。我々が開発したナノメカニカルデバイスも、これらを活用して様々な研究分野への応用が期待される。

謝辞

本研究は主に、東京大学先端科学技術研究センター小宮山眞研究室および、関西大学化学生命工学部化学・物質工学科機能性高分子研究室にて、科研費基盤研究(B)(24350088)、新学術領域研究「分子ロボティクス」(24104004)、「ソフト界面」(23106706)、JSTさきがけ「分子技術と新機能創出」領域(JPMJPR12K4)、および野口遵研究助成金(野口研究所)の支援に基づいて行われた。ご指導、ご助言をくださった小宮山眞先生(現MANA-NIMS)、大矢裕一先生、加藤隆史先生ほか、同僚、学生各位に感謝いたします。

References

1. P.W.K. Rothmund, *Nature*, **440**, 297 (2006).
2. A. Kuzuya, M. Komiyama, *Nanoscale*, **2**, 310 (2010).
3. A. Kuzuya, Y. Ohya, *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1742 (2014).
4. A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama, *Nature Commun.*, **2**, 449 (2011).
5. A. Kuzuya, R. Watanabe, Y. Yamanaka, T. Tamaki, M. Kaino, Y. Ohya, *Sensors*, **14**, 19329 (2014).
6. A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, Y. Yamanaka, Y. Ohya, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **53**, 8276 (2017).
7. Y. Han, A. Hara, A. Kuzuya, R. Watanabe, Y. Ohya, A. Konagaya, *New Gen. Comput.*, **33**, 253–270 (2015).
8. T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda, Y. Sakai, Y. Yamanaka, A. Kuzuya, Y. Ohya, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **48**, 11361 (2012).
9. H.-K. Walter, J. Bauer, J. Steinmeyer, A. Kuzuya, C. M. Niemeyer, H.-A. Wagenknecht, *Nano Lett.*, **17**, 2467 (2017).
10. R. Jungmann, M. S. Avendaño, J. B. Woehrstein, M. Dai, W. M. Shih, P. Yin, *Nat. Methods*, **11**, 313 (2014).
11. A. Kuzuya, R. Watanabe, M. Hashizume, M. Kaino, S. Minamida, K. Kameda, Y. Ohya, *Methods*, **67**, 250 (2014).

(2017年6月1日受領)

(2017年8月7日受理)



細胞環境化学模倣実験系における DNA の構造とその熱力学的安定性

甲南大学 フロンティアサイエンス学部 生命化学科
三好 大輔、造住有輝、上田侑美
(miyoshi@center.konan-u.ac.jp)



Abstract: DNA structure and its thermodynamics largely depend on not only nucleotide sequence but also molecular environment around the DNA strand because hydration and counter ion condensation, critical factors affecting DNA structure and its thermodynamics, are dependent of molecular environment. In this study, we discussed how molecular environment in a living cell, where biomolecules are crowded, is different from that in a test tube. We further used one of the typical osmolytes, trehalose, to induce molecular crowding conditions and evaluate thermodynamic parameters of a DNA duplex under the conditions. It was shown that trehalose and a synthetic polymers show a different effect on thermodynamics of the DNA duplex. These results suggest that trehalose affects the DNA stability *via* a hydration change and other factors such as a direct binding to the DNA duplex or an excluded volume. It is possible to propose an importance of development of a cell-mimicking experimental system with naturally-occurring biomolecules to induce a molecular crowding condition for investigation of biomolecular properties in cells.

背景

DNAの構造形成に重要な相互作用様式

DNAの標準構造はB型の二重らせん構造である。DNA鎖はWatson-Crick塩基型の水素結合と塩基対間のスタッキング相互作用によって熱力学的に安定な二重らせん構造を形成する(図1)。この二つの相互作用様式に注目した最近接塩基対モデルなどを用いることで、DNAの二次構造と、その熱力学的安定性が予測できる¹。しかしDNAの構造形成においては、水素結合とスタッキング相互作用と同様に、水和や対イオン濃縮も重要な役割を果たす²。水和は、水分子との結合

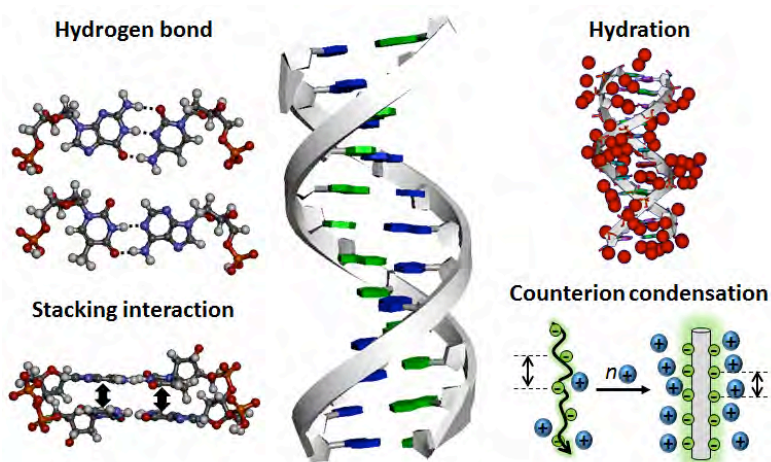


図1 B型二重らせん構造(中央)とその熱力学的安定性を決定する相互作用因子。左は環境非依存、右は環境依存的因子である。

であり、対イオン濃縮は陽イオンとの結合である³。これらの因子は、周辺の分子環境の変化により安定化エネルギーを変える。そのため、水素結合とスタッキング相互作用は分子環境非依存的であるのに対し、水和と対イオン濃縮は分子環境依存的となる。DNAの構造や機能を解明するためには、DNAが存在する分子環境を考慮に入れる必要がある。そこで次に、細胞内部の分子環境の詳細を述べる。

細胞内部の分子環境

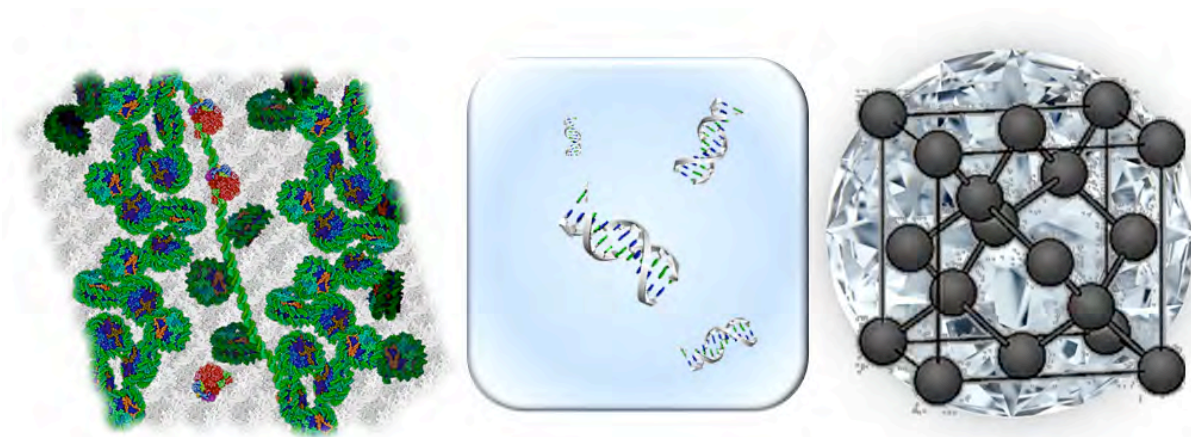


図 2 細胞核内(左)、希薄溶液の試験管内(中央)、ダイヤモンドの結晶(右)における分子環境の模式図。左図ではヘテロクロマチン・ユークロマチンの状態と DNA 鎖に結合するタンパク質(赤)を示している。

「ヒトの体の70%は水でできている」というコマーシャルを見た際に、ほとんどが水なのだと感じた記憶がある。しかしこれは、残りの30%は生体分子である、ということである。1 Lのビーカーに300 gのタンパク質を入れてみると、そのボリュームに圧倒され、本当に水に溶けるのだろうかと思ってしまうほどである。このような例を挙げるまでもなく、細胞内部は生体分子に満たされている。細胞を構成する分子は、核酸やタンパク質などの生体高分子と、浸透圧調節分子や代謝産物などの低分子である。これらの生体分子の細胞内濃度は400 g/Lにも達し、細胞の体積の約40%を占有する(図2)^{4,5}。ダイヤモンドの充填率が34%であることと比較すると、細胞内で如何に分子が込み合った状態で存在しているかを容易に想像できる。実際に細胞内部は、固体に近い環境を作り出していることも報告されつつある⁶。このように、分子が高濃度に存在して込み合った環境を「分子クラウディング」とよぶ^{3,4}。また、細胞内の生体分子濃度は、細胞周期や細胞の状態によって変化する。例えば、細胞に高濃度に存在する浸透圧調節分子(図3)は、外部からのストレスに応答するために産生されている^{7,8}。さらに、生育環境が異なると、浸透圧調節分子の濃度や存在比率も大きく変化する^{7,8}。存在する生体分子も多種多様である。大腸菌ゲノムには、約4,000のORFが存在し、同程度の種類のタンパク質が生合成されていると考えられている。一つの大腸菌には、約 3×10^6 個のタンパク質が含まれている⁹。このように細胞には、多様性が極めて

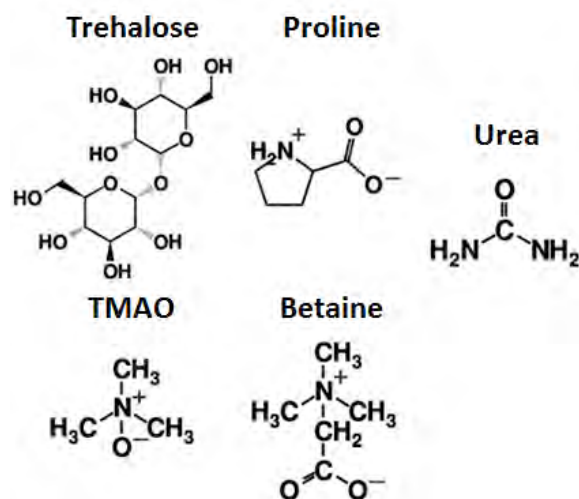


図 3 細胞内に見られる浸透圧調節因子の化学構造

高い生体分子が高濃度に存在しており、その濃度や種類はダイナミックに変化する。

生命の誕生以来、生体分子は、多種多様な生体分子によって生み出される分子クラウディング環境においてその機能を最適化するように進化を遂げてきた。実験的にも、タンパク質に変異導入が生じた際に、そのタンパク質が活性構造を保持するか否かは、溶液中に存在する浸透圧調節分子の種類によって大きく変化することが示されている¹⁰。このことは、分子環境が進化の過程に関与することを示唆するものであると考えられている⁸。一方で、これまでの核酸の構造や機能などの諸物性に関する検討は、研究対象とする分子の濃度を極力低く(通常は10 nM程度から1 mM程度)設定した希薄溶液中(図2)で行われることがほとんどであった。前述のように、DNAの構造とその熱安定性には、周辺の分子環境に依存した水和や対イオン濃縮も重要な役割を果たす。試験管内の希薄溶液環境で得られてきた膨大な結果は、細胞に存在するDNAの物性を反映していない可能性がある。このことから、分子クラウディング環境下でのDNAの構造やその熱力学的安定性を定量的に検討する必要がある。そこで本研究では、細胞内部に高濃度で存在する浸透圧調節分子を用いて分子クラウディング環境を構築し、その環境下におけるDNA二重らせん構造の熱力学的安定性を検討した。

実験

実験試料の調製

本研究で用いたDNA鎖は、北海道システムサイエンス(北海道)もしくはシグマアルドリッチ(東京)からHPLC精製グレードのものを購入し、それ以上の精製を行うことなく使用した。その他の緩衝溶液調製用試薬などは和光純薬(大阪)等から購入した。

DNA鎖の濃度調整は、最近接塩基対モデルから算出されたモル吸光係数と、90°Cで測定した波長260nmにおける吸光度から算出した¹¹。超純水に溶解したDNAは、使用するまで冷凍保存した。

UV融解曲線の測定によるDNA構造の熱力学的安定性の検討

DNAのUV融解曲線を測定することで、DNAが形成する構造の熱力学的安定性を検討した。二重らせん構造は波長260 nmで融解曲線を測定した。得られたUV融解曲線は、理論式に対して非線形二乗法を用いてカーブフィットを行い熱力学的諸量を算出した¹¹。DNAは、測定前に90 °Cで3分間インキュベーションし、測定温度まで、0.5 °C/minでアニーリングを行った。その後、測定温度において、1時間以上インキュベーションを行った。

結果及び考察

分子クラウディング環境におけるDNAの構造安定性

まず DNA の二重らせん構造の熱安定性に及ぼす分子クラウディング効果を検討するために、緩衝溶液(100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0))に平均分子量が200のポリエチレングリコール(PEG200)を0 wt%から40 wt%まで添加し、DNA鎖[d(AGTTCAAGGCGCCTTAAC)]の形成する二重らせん構造の融解挙動を測定した。融解挙動の測定には、温度変化に伴う波長 260 nm における吸光度変化を用いた(図 4A)。その結果、PEG200 非存在下の希薄溶液環境での融解温度が66.4°Cと算出された。PEG200 の添加に伴い融解温度は低下し、40wt%のPEG200 存在下では55.6°Cに低下した。この際の自由エネルギー変化(ΔG_{37}°)は-17.3 kcal/mol から-14.1 kcal/mol へと変化し(図 4B)、PEG200 による分子クラウディングはDNA二重らせん構造を熱力学的に不安定化することが示された。この結果は、これまでに報告されている他の塩基配列をもつ DNA二重らせん構造に及ぼす分子クラウディング効果と一致している^{12,13}。一方、

これまでに著者らの研究結果から、DNA の三重らせん構造、四重らせん構造、枝分かれ構造等の DNA の非標準構造は、PEG200 による分子クラウディングによって安定化することも示されている¹⁴⁻¹⁸。これらのことから、分子クラウディング環境にある細胞内部では、DNA の標準構造である二重らせん構造が不安定化し、非標準構造が安定化することが考えられる。実際に、グアニンに富んだ DNA 鎖とその相補鎖であるシトシンに富んだ DNA 鎖の二重らせん構造が、分子クラウディング環境ではかい離して、各々が四重らせん構造(G-quadruplex と i-motif)を形成することも報告されており¹⁹、本研究結果と合致する。また、グアニンに富んだ DNA 鎖の形成する G-quadruplex 構造は、塩の種類や分子クラウディング度合いによって構造を劇的に変化させることが物理化学的解析や NMR 測定で明らかにされている²⁰⁻²²。このように、PEG200 による分子クラウディング環境は、DNA の標準構造を不安定化し、非標準構造を安定化することで、DNA の構造多様性を誘起することが確認された。

細胞模倣環境実験系の構築

上に述べたような検討結果から、細胞での核酸の構造やその熱力学的安定性は、試験管の希薄溶液

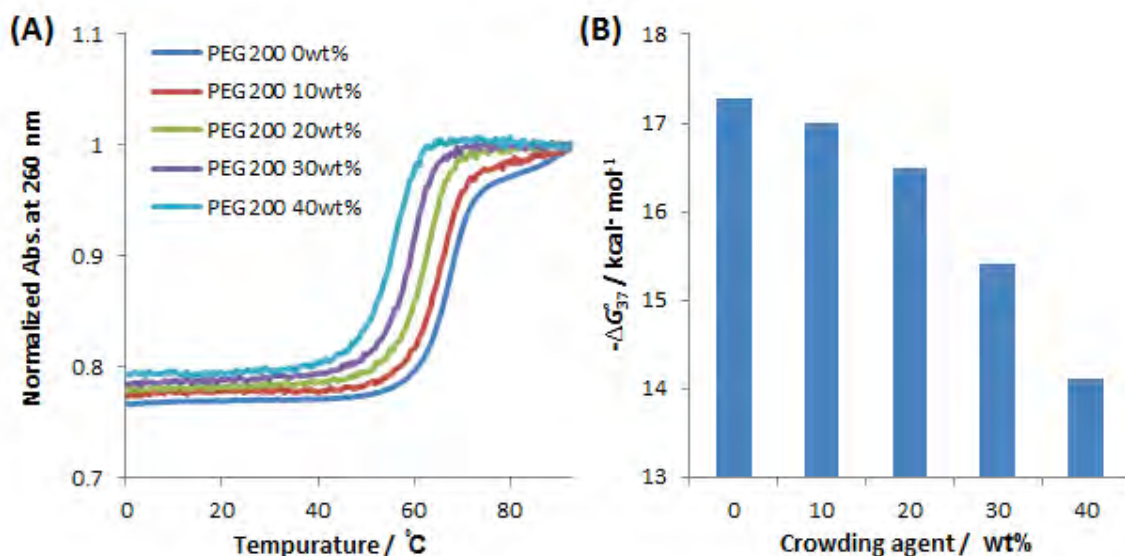


図 4 (A) 0 ~ 40 wt% PEG200 存在下における 10 μ M DNA 二重らせんの規格化した UV 融解曲線。測定は 100 mM NaCl and 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0) 緩衝溶液中で行った。(B) 0 ~ 40 wt% PEG200 存在下における自由エネルギー変化($-\Delta G^\circ_{37}$) の値。大きな値は熱力学的に安定であることを示している。

環境下でのそれらと大きく異なることが示されつつある。核酸をはじめとする生体分子の物性が、試験管内と細胞内で大きく異なることは、細胞を志向した機能性分子(例えばリガンド、プローブ、阻害剤、医薬品等)の分子設計においても大きな問題となる。著者らも、リガンドの DNA 四重らせん構造に対する結合能が分子クラウディングで低下し、テロメアを伸長するテロメラーゼの酵素活性阻害能も低下することを報告している²³。これらのことから、細胞内部の分子環境を試験管内で化学的に再現した実験系が構築できれば、生体分子の物性解析に有用であるだけでなく、細胞内で活性を保持できる機能性分子の設計開発にも有用であると考えられる。しかし、これまで分子クラウディング効果を検討するために用いられてきた PEG などの合成高分子は細胞内部に存在せず、細胞内の環境を精密に模倣しているとは言い難い。

そこで、細胞内分子環境をより精密に化学模倣することが必要である。その端緒として本研究では、細胞に高濃度に存在する浸透圧調節分子を用いた分子クラウディング環境を構築し、DNAの構造安定性に及ぼす効果を検討した。浸透圧調節分子としてトレハロース(図3)を用いた。トレハロースは代表的な浸透圧調節分子であり、タンパク質の構造を安定化することが知られている²⁴。図5Aは、緩衝溶液にトレハロースを0 wt%から40 wt%まで添加した際の、d(AGTTCAAGGCGCCTTAAGT)の形成する二重らせん構造のUV融解曲線である。40 wt%トレハロース存在下での ΔG_{37}° は-15.6 kcal/molであった。この結果から、PEG200に比べて、トレハロースの添加によるDNA二重らせん構造の不安定化度合いは小さいことが分かった。興味深いことに、 ΔG_{37}° の変化はトレハロース濃度に対して直線的ではないことが示された(図5B)。これまでに、PEG200の添加によるDNA二重らせん構造の直線的な不安定化から、DNA二重らせん構造の熱力学的安定性が低下する要因が、分子クラウディング剤がDNAの水和環境に影響を及ぼすことにあることが報告されている^{12,15}。一方、本研究で見られた低濃度のトレハロースによる二重らせん構造の安定化は、トレハロースが二重らせん構造安定性に及ぼす効果に、水和環境への効果以外の因子があることを示唆している。

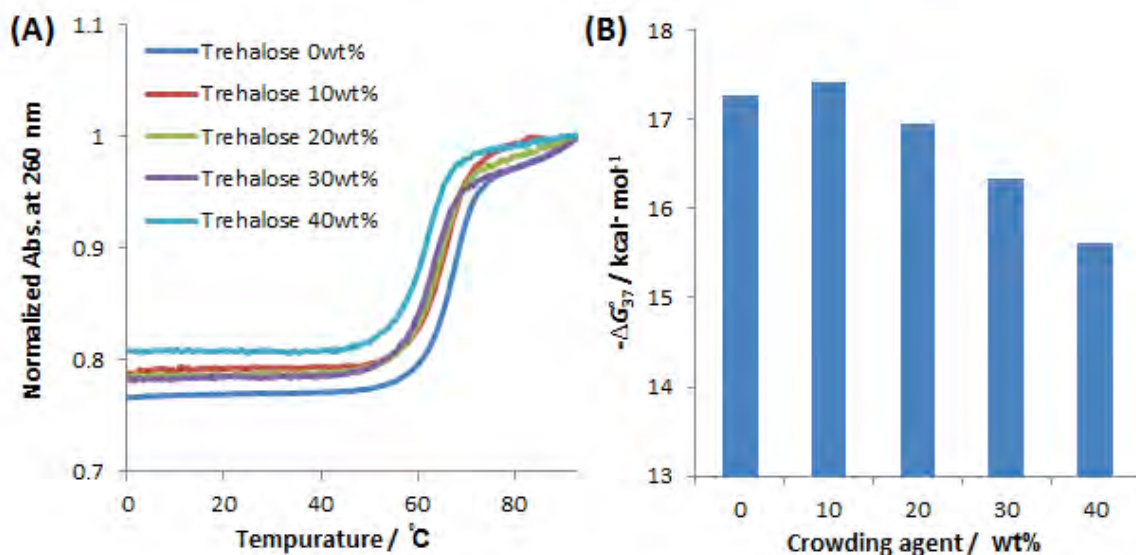


図5 (A) 0 ~ 40 wt% トレハロース存在下における 10 μ M DNA 二重らせんの規格化した UV 融解曲線。測定は 100 mM NaCl and 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0) 緩衝溶液で行った。(B) 0 ~ 40 wt% PEG200 存在下における自由エネルギー変化($-\Delta G_{37}^{\circ}$) の値。大きな値は熱力学的に安定であることを示している。

最近の研究例では、DNAの二重らせん構造と四重らせん構造の熱力学的安定性に対するトリメチルアミン-N-オキシド(TMAO)の効果が検討されている²⁵。この報告では、低濃度のTMAOが二重らせん構造を安定化し、高濃度では不安定化させることが示されている。また安定化機構として、TMAOが二重らせん構造のグループに直接結合することが提唱されている。本研究で明らかとなったトレハロースの安定化は、トレハロースのヒドロキシ基が、二重らせん構造に存在する官能基と相互作用したものである可能性が考えられる。一方、様々な単糖類、二糖類、三糖類による分子クラウディングがタンパク質の構造安定性に与える効果を検討した研究では、糖類による分子クラウディング効果を排除体積効果によって説明できることが明らかにされている²⁴。このことから、排除体積によって二重らせん構造も安定化する可能性もある。さらに、DNAとRNAが形成する四重らせん構造の熱力学的安定性を比較した最新の研究結果からも、水和以外

の効果を加味する必要性が指摘されている²⁴。本研究で観察されトレハロースの低濃度領域における不安定化機構と高濃度における不安定化機構の解明には、分子クラウディング剤の官能基や分子量を系統的に変化させることや、様々な塩基配列をもつ二重らせん構造に及ぼすトレハロースの効果を検討する必要がある。

以上のように本研究では、細胞内部と試験管内希薄溶液の分子環境を比較し、核酸の構造とその安定性、さらには物性解析において周辺環境を考慮する必要があることを論じた。さらに、細胞内分子環境を化学模倣するために、天然に存在する浸透圧調節分子であるトレハロースを用いて分子クラウディング環境を構築した。この分子環境でDNA二重らせん構造の熱力学的安定性を算出したところ、合成高分子であるPEGによる効果とは異なる効果をトレハロースが示すことが明らかとなった。この分子機構の解明には今後のさらなる検討が必要であるが、分子クラウディング剤の違いによって、DNA二重らせん構造安定性への効果が異なることが示された。このことから、実際に生体分子が存在する細胞内部での生体分子の物性を定量的に理解するためには、細胞内部の分子環境をより精密に模倣した実験系の構築が必要であることも示された。

謝辞

本研究はJSPS科研費15H03840、16K14042の助成を受けたものです。

References

1. M. Zuker, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406 (2003).
2. G. S. Manning, *Biophys J.*, **90**, 3208 (2006).
3. D. E. Draper, *Biopolymers*, **99**, 1105 (2013).
4. R. J. Ellis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 114 (2001).
5. R. J. Ellis, A. P. Minton, *Nature*, **425**, 27 (2003).
6. B. R. Parry, I. V. Surovtsev, M. T. Cabeen, C. S. O'Hern, E. R. Dufresne, C. Jacobs-Wagner, *Cell*, **156**, 183 (2014).
7. P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.*, **208**, 2819 (2005).
8. P. H. Yancey, J. F. Siebenaller, *J. Exp. Biol.*, **218**, 1880 (2015).
9. R. Milo, R. Phillips, *CELL BIOLOGY by the numbers*, Garland Science (2016).
10. A. Bandyopadhyay, K. Saxena, N. Kasturia, V. Dalal, N. Bhatt, A. Rajkumar, S. Maity, S. Sengupta, K. Chakraborty, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 238 (2012).
11. H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, *Methods*, **67**, 151 (2014).
12. S. Nakano, H. Karimata, T. Ohmichi, J. Kawakami, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14330 (2004).
13. H. Q. Yu, D. H. Zhang, X. B. Gu, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47**, 9034 (2008).
14. D. Miyoshi, H. Karimata, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7957 (2006).
15. D. Miyoshi, K. Nakamura, H. Tateishi-Karimata, T. Ohmichi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3522 (2009).
16. S. Muhuri, K. Mimura, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9268 (2009).
17. H. Yu, X. Gu, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20060 (2012).
18. S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.*, **114**, 2733 (2014).
19. D. Miyoshi, S. Matsumura, S. Nakano, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 165 (2004).
20. D. Miyoshi, A. Nakao, N. Sugimoto, *Biochemistry*, **41**, 15017 (2002).

21. D. H. Zhang, T. Fujimoto, S. Saxena, H. Q. Yu, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Biochemistry*, **49**, 4554 (2010).
22. B. Heddi, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9825 (2011).
23. H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 2605 (2014).
24. I. Beg, A. P. Minton, I. Hassan, A. Islam, F. Ahmad, *Biochemistry*, **54**, 3594 (2015).
25. Y. Ueda, Y. Zouzumi, A. Maruyama, S. Nakano, N. Sugimoto, D. Miyoshi, *Sci. Technol. Adv Mater.*, **17**, 753 (2016).
26. J. Zhou, S. Amrane, F. Rosu, G. F. Salgado, Y. Bian, H. Tateishi-Karimata, E. Largy, D. N. Korkut, A. Bourdoncle, D. Miyoshi, J. Zhang, H. Ju, W. Wang, N. Sugimoto, V. Gabelica, J.-L. Mergny, *J. Am. Chem. Soc.*, *in press* (2017). doi: 10.1021/jacs.7b00648.

(2017 年 5 月 29 日受領)

(2017 年 6 月 29 日受理)



Turn-on 型蛍光グアニン四重鎖 プローブの創製

～天然有機化合物をリードとして～

公益財団法人 サントリー生命科学財団
寺 正行

(tera@sunbor.or.jp)



Abstract: G-quadruplexes are a higher order nucleic acid structure formed in guanine rich sequences, which are thought to be involved in the control of telomeric length, transcription, and translation. Telomestatin is a natural product known to stabilize G-quadruplexes, however it has several disadvantages as a biological tool in terms of solubility, availability, and accessibility for functional modification. Herein, development of telomestatin analog (6OTD) as a G-quadruplex ligand and elucidation of the telomeric G-quadruplex-6OTD complex by NMR are described. The NMR analysis of the complex suggested that 6OTD's conformation was altered by G-quadruplex binding, which guided the design of berberine (BBR)-dimer as a fluorogenic G-quadruplex ligand. The BBR-dimer containing a *cis*-alkene linker between two chromophores showed reduced fluorescence due to self-quenching. Docking simulations indicated that G-quadruplex induced conformational changes of the BBR-dimer resulted in green fluorescent emission with low nM binding affinity.

1. はじめに

グアニン(G)は種々の金属イオン存在下で環状Hoogsteen型水素結合を介してグアニン四量体(G-quartet)を形成し、これが2-4ユニットで π - π 相互作用することでグアニン四重鎖(G-quadruplex: 以下G4)を形成する。G4を形成する配列は真核生物の染色体末端にあるテロメア領域、c-mycを始めとする種々の遺伝子プロモーター領域、mRNAの非翻訳領域などで見られる¹。G4の生物学的機能解析、創薬標的としての可能性は、G4を安定化あるいは検出する低分子化合物“G4リガンド”により大きく拓かれた²。核酸高次構造はタンパク質と比べ構成単位の種類が少ないため、その構造多様性が限られる。したがって、G4リガンドの開発においては細胞内に多く存在する二重鎖および一本鎖DNA, RNAとの選択的な相互作用を可能とする分子設計が必須となる。本稿ではまず、G4を安定化する放線菌二次代謝産物テロメスタチンの母核骨格を用いた誘導体類の創製、これとG4との複合体解析を述べる。さらに、ここから得られた知見を基盤とし、植物二次代謝産物ベルベリンを用いたturn-on型蛍光G4リガンドの開発について述べる。

2. テロメスタチン母核骨格を用いたG4リガンド

テロメスタチン(TMS)は放線菌二次代謝産物より単離された、G4を強力に安定化する天然有機化合物である³。TMSはその分子サイズがG-quartet平面と近似しており、 π - π スタッキングによりG4を安定化すると考えられているが⁴、直接的な証明はなされていない。生体分子に対するリガンド開発ではそれらの相互作用状態の可視化が極めて重要な情報となる。しかしながら、TMSは平面性が高く極性官能基が無いため

溶解性が低く、また天然からの供給量が限られているために、相互作用解析が困難であった。そこで、G4との複合体解析を可能とするTMSアナログ、6OTD (6-oxazoles telomestatin derivative)骨格を設計^{5,6}、合成し、核磁気共鳴分光法(NMR)によるTMSアナログとテロメアG4の複合体構造解析研究に着手した。6OTD の 一 つ L2H2-6M(2)OTD (1)は、2つのアミノブチル基を側鎖に導入することで、水溶性の向上とG4の主鎖であるホスホジエステル結合と

の静電相互作用を期待した。¹H-NMRシグナルの帰属を容易にするために、6OTD骨格のオキサゾール5位の2箇所にもメチル基を導入し、分子構造を非対称化した(図1A)⁷。

6OTDの中心骨格はG-quartetの4つのグアニン塩基の全てとスタッキングすることがG-quartetのイミノプロトンから6OTDのアミドプロトンおよびメチルオキサゾールへNOESYが観測されたことにより明らかとなった(図1B)。側鎖アミノ基はG4主鎖のリン酸ジエステル基と静電相互作用することが分子シミュレーションおよびアセチル化体2との比較結果から示唆された。さらに量子力学計算の結果から、6OTDは単独ではループ型コンフォメーションを取るが、G4と結合する時にはG-quartetとの π - π 相互作用面を最大化するためにより平面的なコンフォメーションへと変化することがわかった(図1C)⁸。

従来のG4リガンドの開発では、G-quartetとリガンドとのオーバーラップ面の最大化に重きが置かれており、平面性の高い分子設計戦略が採られていた。しかし、今回示したように溶液状態でのG4はG-quartetが必ずしも完全に平面にならず、G4リガンドもまたG4によってコンフォメーションを調節されるため、G4リガンド設計戦略において高い平面性が必ずしも必要では無いことがわかった。このようにG4との結合によってリガンドのコンフォメーションが変化するのであれば、これを分光学的変化、特に蛍光変化へと変換すれば、turn-on型の蛍光G4リガンドを開発できるはずである。しかしながら6OTD自身は蛍光特性を示さず、大環状分子であるためコンフォメーション変化は自ずと限定的になる。そこで、テロメスタチンよりも柔軟性があり、蛍光特性を持つような化合物を用いてturn-on型の蛍光G4リガンドの開発へと着手することにした。

3. Turn-on型G4リガンド、ベルベリン二量体の分子設計

2013年にGratteriらは、植物二次代謝物であるベルベリンが二分子でテロメアG-quartetに π - π スタッキングすることをX線構造解析により報告した(図2A)⁹。ベルベリン(BBR)はその骨格自身が蛍光分子でありG4と結合することが知られていたが、本結合状態を模倣してBBR二分子を連結したBBR-dimerは、より強い結合力が期待出来る。さらにそのリンカーを工夫すればG4との結合の前後でコンフォメーション変化を誘起させ、fluorogenic G4リガンドの開発ができると考えた。G4とBBRの共結晶解析によると、二分子のBBR 2位は互いに5Å離れており、これはリンカーの結合角にもよるが2-3炭素結合長におよそ一致する。また、リンカ

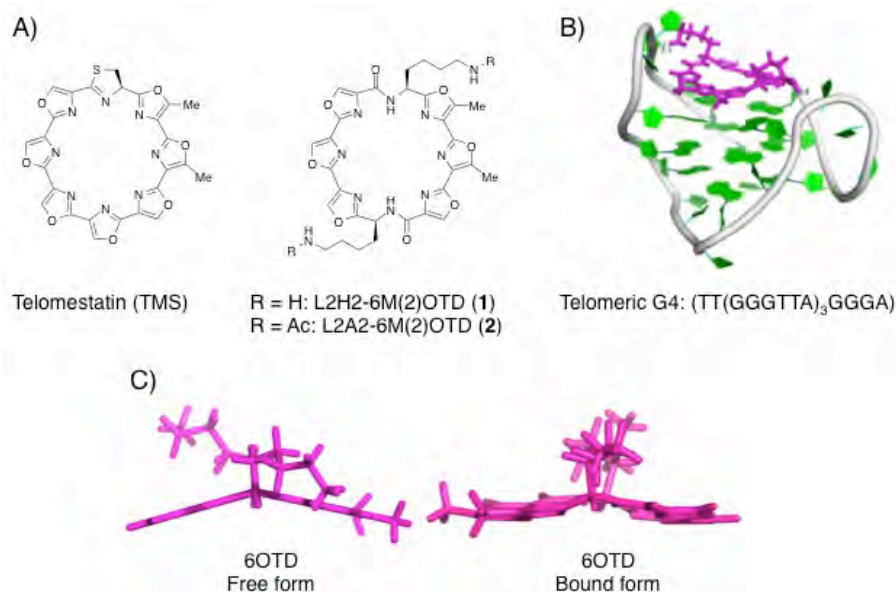


図1 A) TMS および設計した 6OTD 化合物類の構造式. B) 1 とテロメア G4 オリゴヌクレオチドとの NMR 構造解析図. 1 のオキサゾール部位は G-quartet と π - π 相互作用し、アミノ基は G4 主鎖と水素結合を形成している. C) 量子力学計算より求めた遊離時および G4 への結合時の 6OTD コンフォメーション.

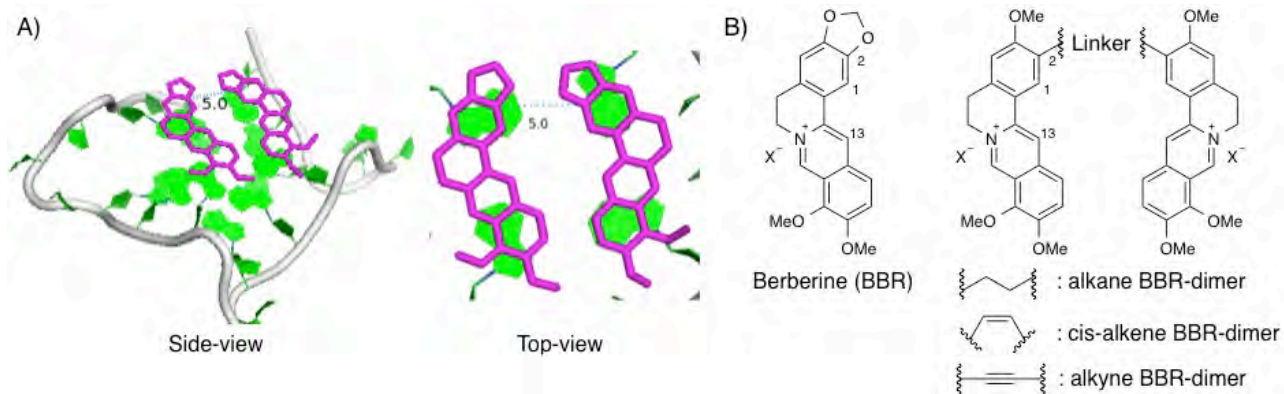


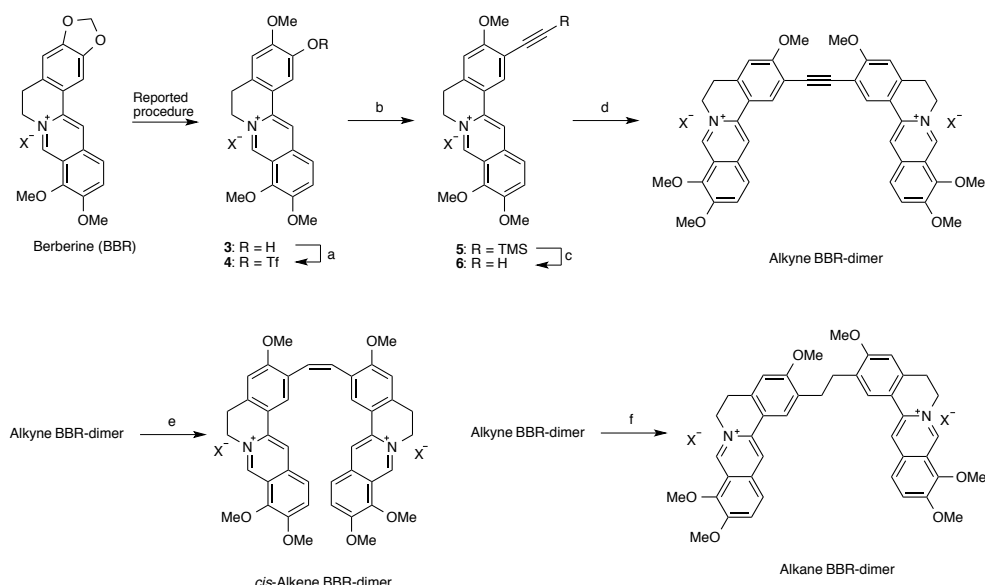
図2 A) BBR およびテロメア G4 との共結晶解析像. B) BBR およびデザインした BBR-dimer 類の構造式

一にある程度の剛直性を持たせることで、G4への結合の前後でコンフォメーションを制御できると考えた。そこで、*cis*-alkeneをリンカーとしてBBRの2位で連結した*cis*-alkene BBR-dimerを設計した。リンカーの影響を調べるために、alkane BBR-dimer、alkyne BBR-dimerも合わせて合成した(図2B、スキーム1)。

文献既知の方法でBBRのメチレンジオキシ環を硫酸酸性条件で加水分解し、生じたカテコールの3位を選択的にメチル化し、フェノール**3**を得た¹⁰。ついで**3**にトリフルオロメタンスルホン酸無水物を作用させることでカップリング前駆体**4**を得た。**4**に対して菌頭反応によりトリメチルシリルアセチレンを導入した後、トリメチルシリル基を除去し、単量体**6**を得た。**4**と**6**で菌頭カップリングすることでalkyne BBR-dimerを合成した。これに対してパラジウム触媒による水素化反応を経てalkane BBR-dimerを、リンドラー触媒による部分還元により*cis*-alkene BBR-dimerをそれぞれ合成した。

まず、得られたBBR-dimer類の¹H-NMRを測定したところ、*cis*-alkene BBR -dimerでのみBBR 1, 13位プロトンに、環電流効果によると思われる高磁場シフトが観測された。これは二つのBBR骨格が*cis*-alkeneで連結されたことで互いにオーバーラップしていることを示唆している(図3A)。さらに単量体に相当する**6**に対する相対蛍光量子収率を測定したところ、二つのBBR母骨格がオーバーラップしえないalkyne BBR-dimerでは**6**に対して10%の蛍光量子収率を示したのに対し、*cis*-alkene BBR-dimerは1.4%の蛍光量子収率しか示さないこ

とがわかった。これらの結果から、*cis*-alkene BBR-dimerではBBR骨格自体が互いにオーバーラップすることで自己消光が起きていることが示唆された。そこで *cis*-alkene BBR-dimerに対してテロメアG4オリゴヌクレオチドを滴定したところ、顕著な蛍光増強が見られた。一方、同じ濃度範囲では二本鎖DNAに対しての結合



スキーム 1 BBR-dimer 類の合成. a) Tf₂O, NaHCO₃, pyridine 44 %; b) TMS-acetylene, CuI, PdCl₂(dppf), Et₃N, 43 %; c) KF, 83 %; d) **4**, Pd(OAc)₂, PPh₃, K₃PO₄, 34 %; e) Lindlar catalyst, H₂, 61 %; f) Pd/C, H₂, 68 %.

は認められなかった(図3C)。これらの蛍光滴定の結果から *cis*-alkene BBR-dimer のテロメア G4 に対する結合定数 ($K_d = 2.6$ nM) は、リード分子である BBR ($K_d = 350$ nM) に比べて100倍以上小さく、強い結合を示すことがわかった。この結果をドッキングモデルシミュレーションで検証した。テロメア G4 の G-quartet 部位に *cis*-alkene BBR-dimer を配置し計算したところ、*cis*-alkene BBR-dimer の BBR 平面が open-form を取ることが示唆

された(図3B)。すなわち、*cis*-alkene BBR-dimer は、消光状態である closed-form から、G4 への結合に伴い open-form へと構造変化することで蛍光を発することが NMR、蛍光滴定およびドッキングシミュレーションの結果から確認できた。最後に、G4 を形成するオリゴヌクレオチドとヘアピン配列および二本鎖配列に対して BBR-dimer を混合し電気泳動したところ、G4 オリゴヌクレオチドを選択的に緑色蛍光バンドとして検出することに成功した(図4)¹¹。現在、*cis*-alkene BBR-dimer と G4 との真の相互作用状態を明らかにすべく、構造解析研究を遂行中である。

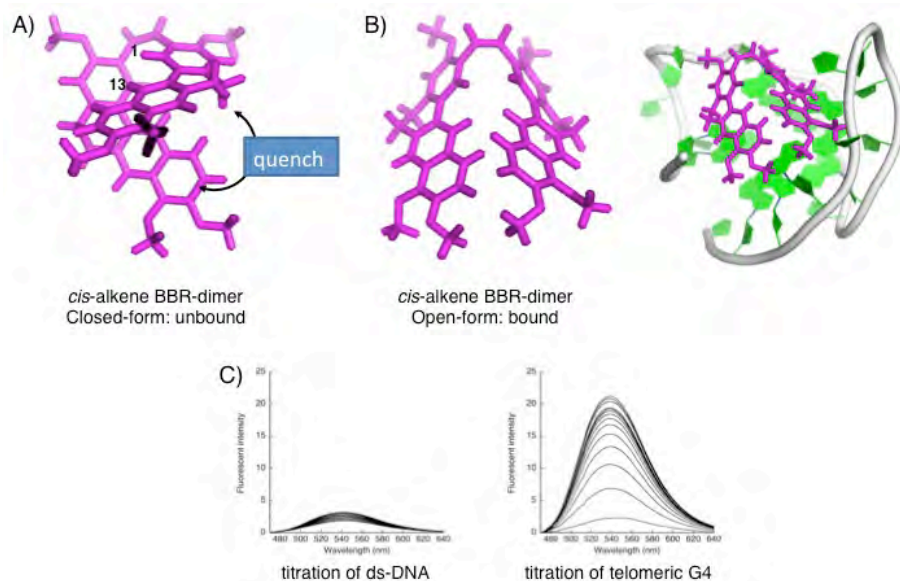


図3 A) *cis*-alkene BBR-dimer のコンフォメーション. B) *cis*-alkene BBR-dimer およびテロメア G4 とのドッキングシミュレーションの結果. C) *cis*-alkene BBR-dimer に対して二本鎖およびテロメア G4 の蛍光滴定.

4. まとめ

天然有機化合物テロメスタチンのアナログとして 60TD 骨格を開発し、これとテロメア G4 との複合体解析を NMR により行った。これにより、G4 リガンドが G4 との結合に伴い自身のコンフォメーションを変化させることを見出した。この知見に加え、天然有機化合物ベルベリンと G4 との結合状態を模倣することで、大きな蛍光発色団を別途導入することなく、自身のコンフォメーション変化をトリガーとして蛍光の on/off 制御が可能な fluorogenic G4 リガンド *cis*-alkene BBR-dimer の開発に成功した。

5. 謝辞

日本核酸化学会誌の創刊号に寄稿させていただく栄誉を賜り、心より感謝申し上げます。テロメスタチンに関する研究は東京農工大学大学院工学府、長澤研究室において、博士論文研究として遂行いたしました。

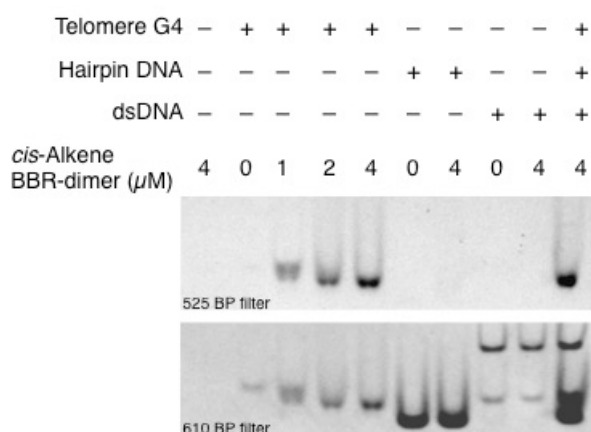


図4 *cis*-Alkene BBR-dimer によるテロメア G4 の可視化. 1 μM の Telomere G4 (TTAGGG)₄, hairpin DNA, dsDNA に対して *cis*-alkene BBR-dimer を種々の濃度で混合し、12.5% 非変性アクリルアミドゲルにて泳動後、エチジウムブロマイドでゲルを染色した。ゲルは 525BP フィルター(緑色蛍光)、610BP フィルター(赤色蛍光)でそれぞれ撮影した。

た。指導教官であります長澤和夫教授に厚くお礼申し上げます。またテロメスタチンとG4の複合体解析は共同研究者であるAhn Tuan Phan准教授(Nanyang Technological University)の主導のもと行われました。ベルベリン二量体の研究はサントリー生命科学財団で行い、清宮啓之部長(癌研究会化学療法センター)、広川貴次ユニットリーダー(産業技術総合研究所)、菅原孝太郎研究員(サントリー生命科学財団)のご協力のもと実施いたしました。日本学術振興会特別研究員奨励費、科研費若手研究B(26750366)より研究費のサポートを受けました。ここに深謝いたします。

References

1. D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8627 (2015).
2. E. Largy, A. Granzhan, F. Hamon, D. Verga, M. P. Teulade-Fichou, *Top. Curr. Chem.* **330**, 111 (2013).
3. K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1262 (2001).
4. M. Y. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-ya, K. Wierzba, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2098 (2002).
5. M. Tera, Y. Sohtome, H. Ishizuka, T. Doi, M. Takagi, K. Shin-ya, K. Nagasawa, *Heterocycles*, **69**, 505 (2006).
6. M. Tera, H. Ishizuka, M. Takagi, M. Suganuma, K. Shin-ya, K. Nagasawa, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 5557 (2008).
7. S. Majima, M. Tera, K. Iida, K. Shin-ya, K. Nagasawa, *Heterocycles*, **82**, 1345 (2011).
8. W. J. Chung, B. Heddi, M. Tera, K. Iida, K. Nagasawa, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 13495 (2013).
9. C. Bazzicalupi, M. Ferraroni, A. R. Bilia, F. Scheggi, P. Gratter, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 632 (2013).
10. M. P. Cava, T. A. Reed, *J. Org. Chem.*, **32**, 1640 (1967).
11. M. Tera, T. Hirokawa, S. Okabe, K. Sugahara, H. Seimiya, K. Shimamoto, *Chem. Eur. J.*, **21**, 14519 (2015).

(2017 年 5 月 30 日受領)

(2017 年 6 月 22 日受理)



核酸糖部構造と HIV-逆転写酵素の 薬剤耐性活性との相関について

～ケミカルバイオロジーツールとしての
化学修飾核酸の利用

東北大学 多元物質科学研究所

山田 研

(ken.yamada.e7@tohoku.ac.jp)



Abstract: An emergence of a drug resistance in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) variants is one of major obstacles to successful anti retrovirus therapy. This drug resistance lies in the ability of HIV-1 reverse transcriptase (RT) to excise incorporated nucleos(t)ide RT inhibitors during viral reverse transcription and replication. To design nucleosides which are refractory to this excision, a series of DNA primers containing nucleotides with various sugar pucker at the 3'-terminus were chemically synthesized to assess the correlation between sugar puckering of nucleotides to be excised and RT's excision rate. Remarkably, a subtle change in sugar structure can dictate the translocation state of HIV-1 RT and thus can control the extent of phosphorolytic excision of the primer 3'-terminal nucleotide. Nucleotide sugar conformation is therefore an important parameter in defining the susceptibility of RT-catalyzed excision.

1. はじめに

全世界におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染者数は2015年末の時点で、約3,670万人におよぶと報告されている¹。かつて不治の病とされたHIV感染により発症するエイズは、核酸系抗レトロウイルス薬であるAZT (Zidovudine)の発見を皮切りに、制御可能な病との認識になり、これまでHIV 治療薬としてAZTを初め、HIV逆転写酵素(HIV-RT)を標的とした様々なヌクレオシ(チ)ド系逆転写酵素阻害剤(NRTI)が開発されてきた(図1)¹⁻³。NRTIに共通する主な特徴として、3'-水酸基をもたないことが挙げられ、これらヌクレオシド類は三リン酸体に変換された後、HIV-RTの基質となることでプライマー鎖に取り込まれ、ウイルス由来RNA(またはDNA)鎖伸長を停止し阻害効果を発揮する。現在は、複数の薬剤を組み合わせる「多剤併用療法(HAART)」により、HIV感染者の発症率やエイズ患者の死亡率は大きく低減されたが、薬剤耐性ウイルスの出現の点において、未だに解決されていない大きな課題となっている。本研究で著者らは、上記耐性機構について新たな知見を得る試みを行ったので、本稿にて紹介させて頂く。

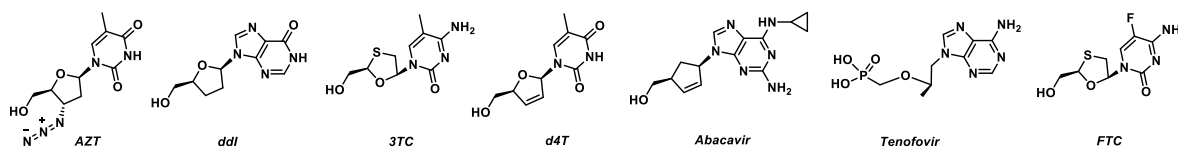


図 1 近年の抗レトロウイルス療法において、汎用されている代表的な核酸系逆転写酵素阻害剤

2. HIV逆転写酵素阻害剤研究における課題、および本研究の目的

HIVの薬剤耐性獲得の主な機構としてHIV-RTは、逆転写反応および複製反応で取り込まれたプライマー鎖3'-末端のNRTIを除去(Nucleotide Excision)する特性を有していることが挙げられる。そのため、このRTの薬剤耐性を獲得する機構が、NRTIの開発における難点のひとつとなっている(図2-A)⁴。

RTによるプライマー鎖伸長の際に、Nucleotide binding site(N-site)に結合する2'-デオキシヌクレオシド-5'-三リン酸の糖部コンフォメーションはC2'-endo(South、S型)からC3'-endo(North、N型)に構造変化を起こすこと⁵、またRTのポリメラーゼ活性領域に存在するDNAオリゴヌクレオチドは、糖部コンフォメーションがS型からN型に構造変化していることが、X線結晶構造解析により明らかにされている(図2-B)⁶。これらの知見から、RTはポリメラーゼ反応を進行する際に、プライマー鎖また鋳型鎖のヌクレオチドに特定の糖コンフォメーションを形成させて反応を進行していることが示唆される。そこで著者らのグループは、「RTのヌクレオチド除去反応においても、反応に好ましい糖コンフォメーションが存在するに違いない」との発想に至った。この除去反応の機構について多く報告はされているが、除去される核酸糖部コンフォメーションと関連させた研究例はきわめて少ないため⁷、本研究では、ヌクレオチド除去反応に対して耐性のある分子を設計する新たな指針を提唱することを目指し、プライマー3'末端の糖コンフォメーションとヌクレオチド除去反応効率との関連性について研究を進めることとした。

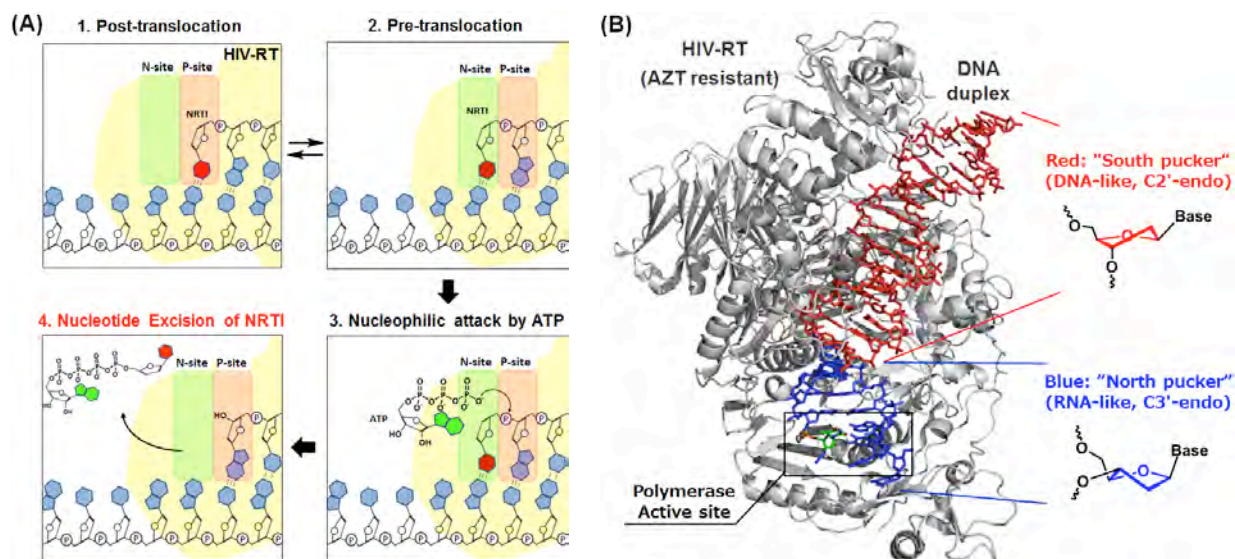


図2 (A) HIV-RTの平衡(Pre/Post)、およびATPを利用したHIV-RTによるヌクレオチド除去反応、(B) HIV-RT (AZTr)とAZTを有するDNA二重鎖との複合体のX線結晶構造(PDB: 3KLH)

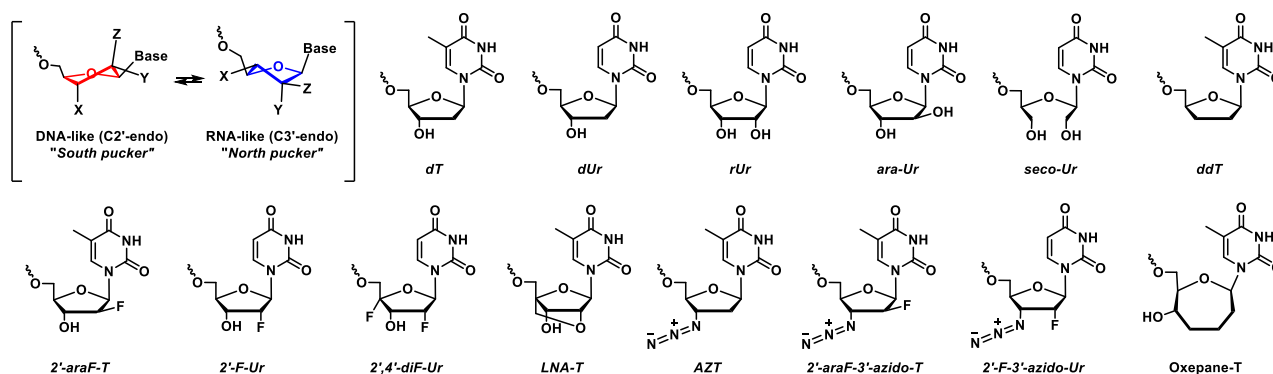
3. 実験結果と考察

修飾DNAプライマーの化学合成

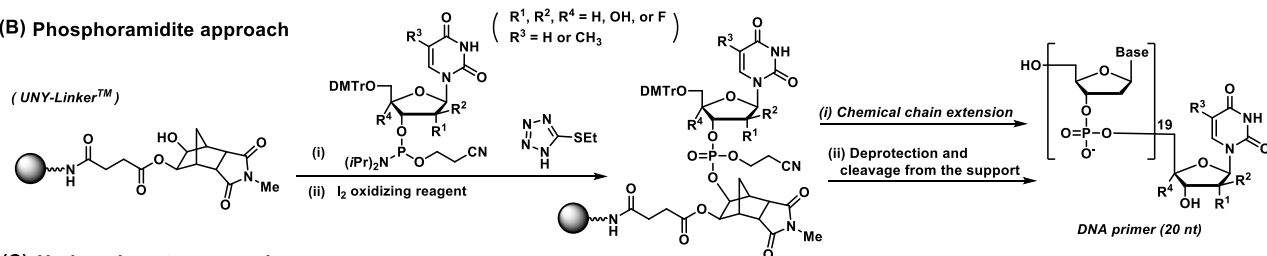
実際に生体内では、阻害剤となるヌクレオシド5'-三リン酸のRTによる (i) 取込み、(ii) リン酸ジエステル結合の形成、(iii) 核酸二重鎖上でのRTの平衡移動 (iv) RTによる除去反応、が起きているが、これら一連の反応は多段階であり、きわめて複雑である。核酸化学合成法の大きな利点である、酵素非依存的に様々なヌクレオチドをDNA/RNA鎖に導入可能であることを利用し、既に取り込まれた“後”の状態のDNAプライマーを化学合成することで、上記一連の反応を“分割”し、(iv)の除去反応のみに焦点を当ててHIV-RT挙動の詳細な解析が可能となると考えた。そこでプライマー3'末端に、S型、またはN型コンフォメーションに偏らせた修飾ヌクレオシドを化学的に組込んだDNAプライマーを種々化学合成した(図3-A)⁸。

方法は既に確立されているホスホロアミダイト法にて(図3-B)⁹、またアジド基を有する核酸の導入においては、アジド基とホスホロアミダイトとの副反応を避けるため、H-ホスホネート法によるカップリングを用いた(図3-C)。^{10,11}

(A) Sugar puckerings and the library of DNA primers



(B) Phosphoramidite approach



(C) H-phosphonate approach

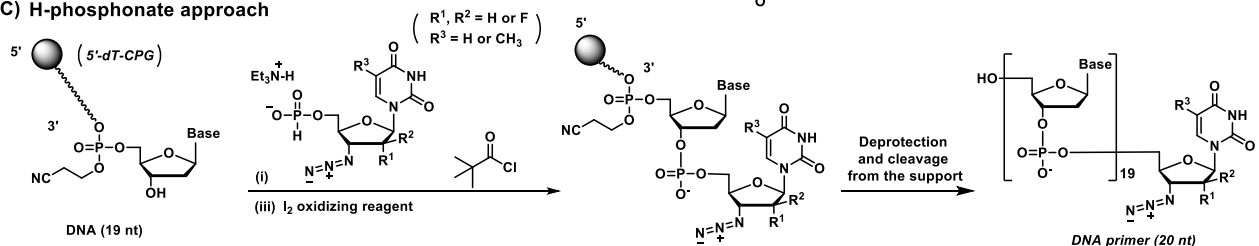


図 3 (A) 3'-末端に S 型または N 型の糖コンフォメーションをとる種々ヌクレオチドを有する DNA プライマー、(B) ホスホロアミダイト法による 3'末端への修飾核酸の導入、(C) H-ホスホネート法による 3'末端へのアジド修飾核酸の導入

核酸糖コンフォメーションとHIV-RTによるヌクレオチド除去反応効率の相関関係

化学合成した各DNAプライマーを用いて、上記の糖コンフォメーションとHIV-RTのヌクレオチド除去反応効率との関連性を検証した。図4に結果の一部を掲載しているが、左4つのS型糖構造を示すヌクレオチドは除去反応が進行し、プライマーの鎖長が短くなった産物がゲルで確認された。一方の右4つのN型糖構造を示すヌクレオチドでは、短くなった産物は確認されず、きわめて安定にプライマー鎖上に残存してい

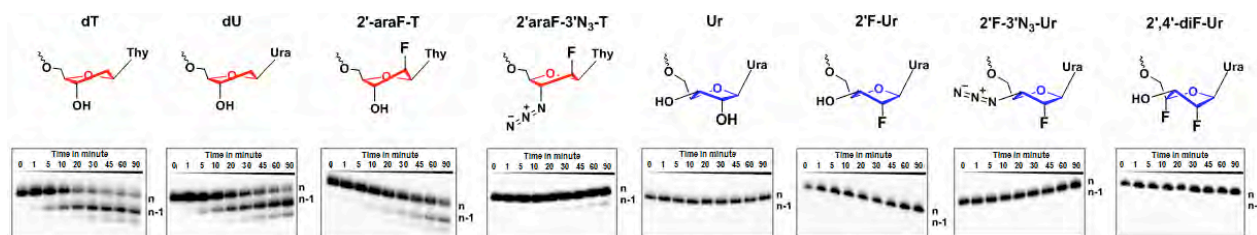


図 4 S 型(左 4 例)および N 型(右 4 例)糖部構造を示すヌクレオチドの、*wild-type* HIV-RT による除去反応。n: 完全長プライマー、n-1: 3'-末端ヌクレオチドが除去されて 1 塩基短くなった切断産物。

ることが分かった(図4)。表1には、全プライマーの結果をまとめて載せたが、N型のヌクレオチドは、S型のヌクレオチドと比べ除去されにくい傾向にあることを見出した⁸。また、除去反応活性がより高い変異株であるAZT-resistant(AZTr)-RTを用いて同様の評価を行ったところ、S型ヌクレオチドは*wild-type* RTと比べて、より速やかに除去反応が進行したが、依然としてN型ヌクレオチドは高い除去反応耐性を示すという傾向に変わりがないことが分かった(表1)。

表 1. Correlation between Sugar conformation, and Excision/Translocation by/of *wild type*(WT)-RT and AZTr-RT

Nucleoside at the 3'-terminus of primers ^a	Nothern P ^b	Southern P ^b	% North ^c	Excision by WT-RT ^d	Translocation %Pre (WT-RT) ^e	Excision by AZTr-RT ^d	Translocation %Pre (WT-RT) ^e
LNA-T ¹²	17	n.a.	100	-	41	-	43
2'-4'-diF-Ur ¹³	18	n.a.	100	-	27	-	30
2'-F-Ur ¹⁴	21	159	87	-	26	-	25
2'-F-3'-N3-Ur ¹⁵	17	155	85	-	32	-	30
ddT ¹⁶	11	154	75	+	66	++	58
Ur ¹⁴	18	162	58	-	19	-	21
AZT ¹⁷	22	160	50	++	80	+++	75
ara-Ur ¹⁸	22	151	46	-	37	+	38
2'-araF-AZT ^{16,19,20}	11	120	40	+	76	++	75
dUr ¹⁴	18	162	39	+++	66	++++	71
dT ²¹	n.a.	n.a.	37	+++	73	++++	66
2'-araF-T ²²	-6	126	31	+	70	+++	72
seco-Ur ^{23,25}	n.a.	n.a.	n.a.	-	24	-	26
oxepane-T ^{24,25}	n.a.	n.a.	n.a.	-	28	-	30

^aNucleoside sugar conformational preferences were obtained from indicated references. ^bNothern (Southern) P is indicative of the pseudorotational angle of the nucleoside in the most stable form of the North (South) conformation. ^c%N = 100 - %S; for ribonucleosides, 2'-(α)-fluoro-2'-deoxyribonucleosides, and ddT: %S²² = $10 \times J_{1,2}$; for 2'-deoxyribonucleosides, 2'-(β)-fluoro-2'-deoxyribonucleosides, and ara-Ur: %S = $100 [J_{1,2}(\text{cis}) + J_{1,2}(\text{trans}) - 7.1]/9$. ^dLegend: - no excision, + slow excision, ++ moderate excision, +++ fast excision, ++++ very fast excision. ^eFor South conformers and AZT: % Pre = Pre/[Pre + Post] $\times$ 100. For North conformers, seco-Ur, and oxepane-T: %Pre = Pre/[ex-Pre + Pre + Post] $\times$ 100.

核酸糖コンフォメーションとHIV-RTの位置平衡状態との相関関係（なぜN型は除去されにくいのか？）

プライマー鎖3'-末端ヌクレオチドは HIV-RT のP-site/N-site間での位置的平衡状態にあるが、ヌクレオチド除去反応が進行する際に、3'-末端ヌクレオチドが N-siteに位置することが知られている(Pre-translocation、図2-A)²⁶。そこで、本研究で明らかになった糖コンフォメーションとヌクレオチド除去反応との相関関係の裏に、このRTの位置平衡状態が関与しているとの更なる仮説をたてるに至った。そこで、HIV-RT と複合体を形成しているDNAの位置特異的鎖切断反応を用いた“Radical-Footprinting法”²⁷を用いて、各DNAプライマー鎖上でのHIV-RTの位置平衡の定量を行い、仮説の検証を行った。本手法では、RT上に存在している特定のシステインアミノ酸残基のチオール基にラジカルを生成させて、その近傍に位置するDNA鎖を切断するが、RTの二重鎖上での位置が1塩基ずれることで、この切断箇所も1塩基ずれる(図5-A)。そこで、その切断産物比をポリアクリルアミドゲル上で定量することで、図2-A、図5-Aに示したPost/Pre状態の比を定量することが可能となる。定量結果から、除去反応が進行したS型ヌクレオチド類である dT、AZT、2'-ara-F修飾ヌクレオチド誘導体は、*wild-type* RT、AZTr-RTいずれの場合においても、除去反応活性部位であるN-siteに位置する傾向にあることが分かった(図5-B、C、表1)⁸。この結果から、「S型ヌクレオチドはN-siteに位置する傾向にあったことから、除去反応が速やかに進行した」と示唆された。一方、N型糖部構造を有する2'-F-ヌクレオチド類は、S型ヌクレオチド類と全く異なる位置平衡を示し、除去反応活

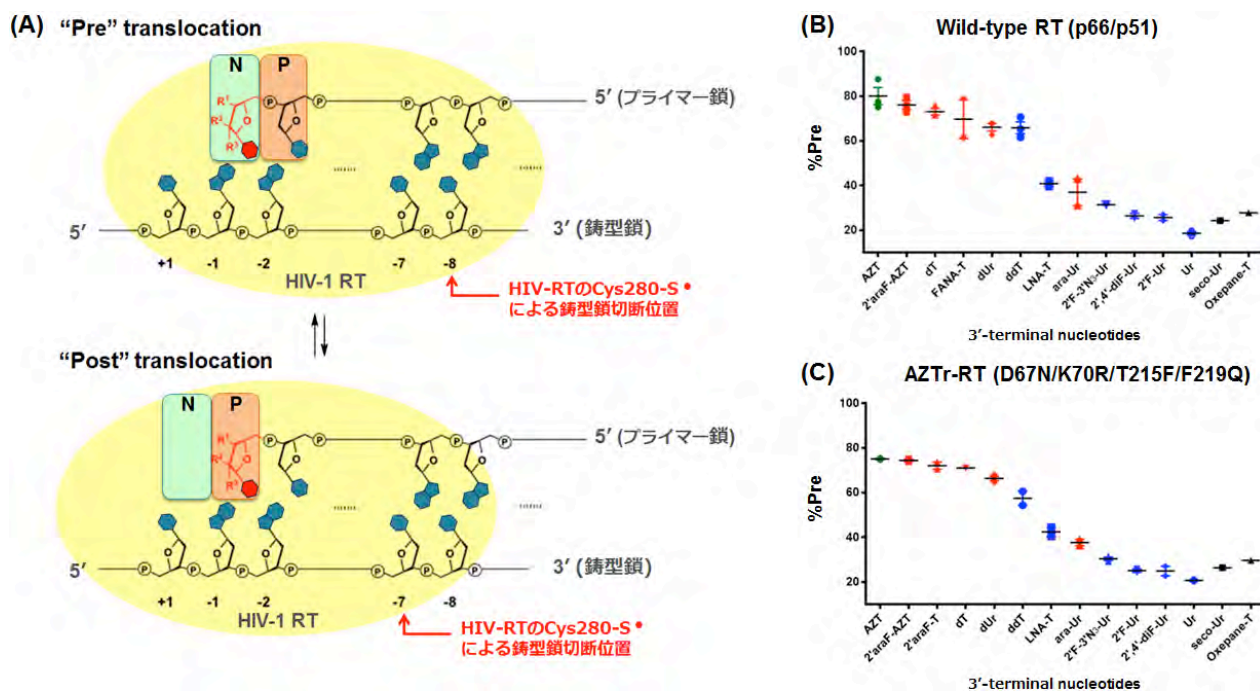


図 5 (A) Radical-footprinting の概念図、(B、C) 各プライマーでの *wild-type* RT または AZTr-RT の位置平衡

性部位であるN-siteではなく P-siteに位置する傾向にあることが明らかになった(図5-B、C、表1)⁸。このことから「N型ヌクレオシドの高い除去反応耐性は、このN-siteに位置しない平衡状態に起因する」ことが示唆された。

以上の結果より、N型ヌクレオシドはHIV-RTのRNaseH活性部位であるN-siteではなく、P-siteに位置する傾向にあり、それによりヌクレオチド除去反応に対して高い抵抗性を示す傾向にある、という新たな知見を得ることができた。

4. 実験手法

DNAプライマー合成

試薬として購入できないホスホロアミダイト体、およびH-ホスホネート体は種々ヌクレオシド原料より数ステップを経て合成し、NMR、HRMS等で化合物の同定を行った。オリゴヌクレオチド固相合成におけるカップリング反応は主にDNA自動合成装置にて行い、H-ホスホネート体のカップリングはマニュアルカップリングで行った²⁸。得られた各プライマーの精製は逆相HPLC、または陰イオン交換HPLCにて行い、同定はESI-MSにて実測値と計算値の一致を確認することで行った⁸。

ヌクレオチド除去反応効率の評価

反応産物の定量評価を行うため、各プライマーは³²Pで放射性標識を行った。ヌクレオチド除去反応は塩化カリウム(50 mM)、塩化マグネシウム(6 mM)、ATP(3 mM)の存在下、トリス-塩酸バッファー(50 mM, pH 8)中、ラベル化されていない鋳型鎖DNA(60 nM)、³²P-標識プライマー鎖(20 nM)、750 nM *wild-type* HIV1-RT(またはAZTr-RT)をインキュベートすることで行った。切断効率は、³²P標識された各切断産物と残存している完全長プライマーをポリアクリルアミドゲル上で定量することで評価を行った^{8,29,30}。

HIV-RTの位置平衡の評価

³²P標識は、ラジカルによる鎖切断を受ける鋳型鎖側に行った。塩化ナトリウム(10 mM)、DTT(165 μM)を含むカコジル酸バッファー(60 mM, pH 7)に溶解させた5 nM DNA二重鎖/RT複合体に対してラジカル

種であるペルオキシ亜硝酸を作用させることにより、鋳型鎖を切断し、酵素の位置 (PreまたはPost) 依存的に生成する切断産物の量比をゲル上で定量した^{8,31-35}。

5. おわりに

核酸化学合成技術を用いることで、様々な化学修飾を施した、様々な糖部コンフォメーションを有するヌクレオシドを導入したDNAプライマーを合成し、HIV逆転写酵素の薬剤耐性機構であるヌクレオチド除去反応との相関関係に関する研究を紹介させて頂いた。本研究を通して、N型ヌクレオシド類はHIV-RTの薬剤耐性機構に対して高い抵抗性を示す知見を得ることができた。NRTI開発において、逆転写酵素への取込み効率もきわめて重要な因子であるが、それに加え、薬剤耐性機構に耐性を示す分子デザインも考慮に入れることで、より高活性なNRTIの開発が可能になるものと考えている。近年では大類洋先生、満屋裕明先生、児玉栄一先生らが共同開発を進めておられる次世代抗HIV薬のEFdA³⁶を始め、Crisper-cas9のゲノム編集技術を用いたHIV治療法の開発³⁷など活発に研究が現在も進められている。本研究が抗ウイルス薬開発において、高い薬剤耐性能を有する核酸誘導体の開発指針の一助となれば幸甚である。

謝辞

本研究は著者が博士研究員としてMcGill大学化学科Masad J. Damha教授の研究室所属時に行った研究であり、Matthias Götte教授、Michael A. Parniak教授との共同研究のもとで進めました。研究室の皆さま共に多大なるお力添えを頂きました事、厚く御礼申し上げます。またAZT-ヌクレオシドを譲渡いただきましたKelvin K. Ogilvie博士に感謝申し上げます。最後になりましたが、本研究を遂行する上で基盤となった核酸化学のいろはを、厚くご指導頂きました恩師・関根光雄教授に、こころより感謝申し上げます。

References

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Fact Sheet 2016. Geneva, Switzerland: UNAIDS (2016). Available at: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
2. H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7096 (1985).
3. (a) S. M. Hammer, D. A. Katzenstein, M. D. Hughes, H. Gundacker, R. T. Schooley, R. H. Haubrich, W. K. Henry, M. M. Lederman, J. P. Phair, M. Niu, M. S. Hirsch, T. C. Merigan, *N. Engl. J. Med.*, **335**, 1081 (1996); (b) D. Asboe, C. Aitken, M. Boffito, C. Booth, P. Cane, A. Fakoya, A. M. Geretti, P. Kelleher, N. Mackie, D. Muir, G. Murphy, C. Orkin, F. Post, G. Rooney, C. Sabin, L. Sherr, E. Smit, W. Tong, A. Ustianowski, M. Valappil, J. Walsh, M. Williams, D. Yirell, *HIV Med.*, **13**, 1 (2012).
4. L. Menéndez-Arias, *Antiviral Res.*, **98**, 93 (2013).
5. H. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science*, **282**, 1669 (1998).
6. S. G. Sarafianos, A. D. Clark Jr, K. Das, S. Tuske, J. J. Birktoft, P. Ilankumaran, A. R. Ramesha, J. M. Sayer, D. M. Jerina, P. L. Boyer, S. H. Hughes, E. Arnold, *EMBO J.*, **21**, 6614 (2002).
7. L. Mu, S. G. Sarafianos, M. C. Nicklaus, P. Russ, M. A. Siddiqui, H. Ford Jr., H. Mitsuya, R. Le, E. Kodama, C. Meier, T. Knispel, L. Anderson, J. J. Barchi Jr., V. E. Marquez, *Biochemistry*, **39**, 11205 (2000).
8. K. Yamada, A. S. Wahba, J. Bernatchez, T. Ilina, S. Martinez-Montero, M. Habibian, G. F. Deleavey, M. Götte, M. A. Parniak, M. J. Damha, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2024 (2015).
9. S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1859 (1981).
10. B.C. Froehler, M. D. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 469 (1986).

11. T. Wada, A. Mochizuki, S. Higashiya, H. Tsuruoka, S. Kawahara, M. Ishikawa, M. Sekine, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 9215 (2001).
12. K. Morita, M. Takagi, C. Hasegawa, M. Kaneko, S. Tsutsumi, J. Sone, T. Ishikawa, T. Imanishi, M. Koizumi, *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 2211 (2003).
13. S. Martínez-Montero, G. F. Deleavey, A. Kulkarni, N. Martín-Pintado, P. Lindovska, M. Thomson, C. González, M. Götte, M. J. Damha, *J. Org. Chem.* **79**, 5627 (2014).
14. W. Guschlbauer, K. Jankowski, *Nucleic Acids Res.* **8**, 1421 (1980).
15. The minimization of the South and North conformations to calculate the corresponding P values for 2'-araF-3'-azido-Ur were carried out with the program Gaussian 09 at the HF/6-31+G(d,p) level.
16. B. Jagannadh, D. V. Reddy, A. C. Kunwar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 386 (1991).
17. J. Plavec, L. H. Koole, A. Sandström, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, **47**, 7363 (1991).
18. J. B. Houseknecht, C. Altona, C. M. Hadad, T. L. Lowary, *J. Org. Chem.*, **67**, 4647 (2002).
19. K. A. Watanabe, K. Harada, J. Zeidler, J. Matulic-Adamic, K. Takahashi, W. Y. Ren, L. C. Cheng, J. J. Fox, T. C. Chou, Q. Y. Zhu, B. Polsky, J. W. M. Gold, D. Armstrong, *J. Med. Chem.*, **33**, 2145 (1990).
20. R. Z. Sterzycki, I. Ghazzouli, V. Brankovan, J. C. Martin, M. M. Mansuri, *J. Med. Chem.*, **33**, 2150 (1990).
21. C. Thibaudeau, J. Plavec, J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.*, **61**, 266 (1996).
22. J. K. Watts, K. Sadalapure, N. Choubdar, B. M. Pinto, M. J. Damha, *J. Org. Chem.*, **71**, 921 (2006).
23. M. M. Mangos, K. L. Min, E. Viazovkina, A. Galarneau, M. I. Elzagheid, M. A. Parniak, M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 654 (2003).
24. D. Sabatino, M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8259 (2007).
25. M. J. Damha, P. A. Giannaris, S. V. Zabarylo, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3813 (1990).
26. P. L. Boyer, S. G. Sarafianos, E. Arnold, S. H. Hughes, *J. Virol.*, **75**, 4832 (2001).
27. B. Marchand, M. Götte, *J. Biol. Chem.*, **278**, 35362 (2003).
28. T. Wada, Y. Sato, F. Honda, S. Kawahara, M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12710 (1997).
29. N. Sluis-Cremer, D. Arion, U. Parikh, D. Koontz, R. F. Schinazi, J. W. Mellors, M. A. Parniak, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29047 (2005).
30. S. F. Le Grice, F. Grüninger-Leitch, *Eur. J. Biochem.*, **187**, 307 (1990).
31. M. Götte, R. Marquet, C. Isel, V. E. Anderson, G. Keith, H. J. Gross, C. Ehresmann, B. Ehresmann, H. Heumann, *FEBS Lett.*, **390**, 226 (1996).
32. M. Götte, G. Maier, H. J. Gross, H. Heumann, *J. Biol. Chem.*, **273**, 10139 (1998).
33. B. Marchand, M. Götte, *J. Biol. Chem.*, **278**, 35362 (2003).
34. B. Marchand, E. P. Tchesnokov, M. Götte, *J. Biol. Chem.*, **282**, 3337 (2007).
35. D. Jochmans, J. Deval, B. Kesteleyn, M. H. Van, E. Bettens, I. De Baere, P. Dehertogh, T. Ivens, G. M. Van, S. B. Van, M. Ehteshami, P. Wigerinck, M. Götte, K. Hertogs, *J. Virol.*, **80**, 12283 (2006).
36. H. Ohru, *J. Antivir. Antiretrovir.*, **6**, 32 (2014).
37. W. Hu, R. Kaminski, F. Yang, Y. Zhang, L. Cosentino, F. Li, B. Luo, D. Alvarez-Carbonell, Y. Garcia-Mesa, J. Karn, X. Mo, K. Khalili, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 11461 (2014).

(2017 年 5 月 31 日受領)

(2017 年 8 月 9 日受理)



出 AGCT 記

名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻

浅沼浩之

日本核酸化学会誌の創刊号でエッセイを執筆させていただくのは大変な名誉であるが、同時に私を準備委員にご指名頂いたことに、大きな戸惑いも覚えている。実は私は生物が大嫌いで、中学・高校時代はゴルジ体だとか小胞体という学術用語を聞くだけで虫唾が走った。だから核酸に関しても、その立体構造から生物学的機能に至るまで全く興味が無かった。ではなぜ私が核酸を研究対象として選んだのか？その最も大きな理由は言うまでも無く、某社を退職した私を雇っていただいた小宮山真先生が核酸を扱っていたからだ。もう一つの小さな理由は、私が小宮山研でDNA二重鎖の模型を初めて見た時、塩基対が縦方向に積みあがったH会合体に見えたのだ。

少し時間を遡るが、私が某社を就職先に選んだのは、子供のころから光に興味があり、できれば光化学に携わる仕事に就きたかったからである。研究室配属の際にも光化学関連の研究室を選んだつもりだったが、私が入室した年には光化学関連のテーマが無かった。そこで高分子錯体による一酸化窒素の除去という、社会に役立ちそうな卒論テーマを選んだ。私の入った研究室は自由に溢れたパラダイスであり、アタラクシアを享受するためそのまま大学院に進学した。修士で就職するつもりだったが、友達が博士課程に進学したのにつられて私も進学し、パラダイスを楽しんだ。しかし就職を真剣に考える時期が来たとき、やはり光に関わりたと思った。希望がかなって某社に入社し、分光増感の世界的権威である谷忠昭博士のご指導のもと、ハロゲン化銀の分光増感に必須のシアニン色素J会合体に関する研究を開始した。J会合体とは色素が斜めに積みあがった会合体であり、吸収スペクトルが先鋭化を伴いながら長波長シフトするという特徴を持つ。初めてJ会合体を観察した時、その美しさに感動した・・・シアニン色素の水溶液はマゼンタ色なのだが、ハロゲン化銀乳剤に添加すると瞬時にその表面に吸着されて鮮やかなライトブルーに変色したのだ。その色変化と色彩の鮮やかさに心を奪われ、私は色素会合の制御と吸収スペクトル変化の理論に没頭した。これぞ私が求めていた光化学だった。

二重鎖がH会合体に見えた私にとって、核酸塩基は実につまらない分子に思えた。可視領域に吸収が無いため、せっかくH会合しても淡色効果という地味な変化しか示さないからだ。しかしもし可視領域に吸収を持つ色素を核酸塩基の代わりに導入して精密に積層させることが出来たら、J会合体とは真逆の変化—先鋭化を伴いながら短波長シフト—が観察できるはずである。そう思った私は、色素を核酸塩基の代わりに多数入れることを密かに考えていた。しかし一部の方はご存知のように、私が最初に行った研究は、アゾベンゼン導入DNAによる二重鎖の形成と解離の光制御である。なぜ色素会合体の研究を最初に行わなかったのか、その理由は二つある。第一に、DNAで色素会合体を調製しても核酸化学者は全く興味を示さないだろうと予想したからだ。事実H会合体を最初に報告した時、核酸化学者の反応はとても冷たかった。二番目は、当時35歳を過ぎていた私は切羽詰まっており、何かインパクトのある研究をしないと生き残れないと焦っていた。そこで、もしアゾベンゼンを核酸塩基の代わりに導入して二重鎖の形成と解離が光制御できたら、核酸化学者も大いに注目してくれると思った。またアゾベンゼンを使うことにも意味があった。アゾ

ベンゼンは簡単な官能基で修飾するだけで可視領域に吸収を持つ色素になり得る。したがってアゾベンゼンを核酸塩基の代わりに導入する合成法を確立すれば、容易にH会合体が調製できると考えた。

当初は私も、核酸化学の神と崇めているEric Kool博士の論文を参考にしてリボースへのアゾベンゼンの導入を試みた。しかし合成経験が無かったため失敗に終わり、紆余曲折あって合成の容易な非環状ジオールのD-トレオニノールを、リボースの代わりに使うことにした。そしてここから核酸への冒涇が始まった。当時の目標は色素のH会合体を調製することだったので、もともとリボースを使う必然性はなかった。しかし実際に使ってみると、悪魔の誘惑のごとき甘美なジオールで、合成は簡単で、アミド結合でどんな分子でも核酸アナログ化できる。まずはアゾベンゼンをモノマー化してDNAに導入したところ、なんと二重鎖の安定性が光制御でき、期待通り核酸化学者が注目してくれた。これで遅咲きの私もなんとか生き残れたので、早速アゾベンゼンのパラ位にジメチルアミノ基をつけて $\lambda_{\max}$ を可視領域にシフトさせ(クエンチャーのメチルレッド)、DNAの真ん中にメチルレッドを連続的に導入した。こうして当初目論んでいたメチルレッドH会合体を作った。驚いたことに会合数を増やすほど二重鎖は安定化した。スペクトル変化も予想通り、会合数を増やすことで先鋭化を伴いながら見事に短波長シフトし、当初の目的を達成できた。それならトレオニノールに、色素の代わりに逆に“つまらない分子”の核酸塩基を入れてみたらどうなるか？どう考えてもエントロピーロスの大きな非環状骨格で安定な塩基対を形成するとは思えない。と思いつつ、ちょっと期待しながら作ってみた。そうしたら驚いたことに、PNAよりも安定な二重鎖を形成してしまった。相補的水素結合で対を作っており、配列特異性もあるようで、ミスマッチを入れると T_m が下がる。こんなアバウトな主鎖でも安定性でDNAを凌駕する悪魔のような二重鎖ができてしまった。ではなぜ神は核酸を、リボースを遺伝暗号の骨格に選んだのだろうか？そんなことを疑問に思いながら、ここまで来たなら、徹底的に核酸を冒涇し、核酸の呪縛から自分を解放しようと思った。つまりDNAを糊がわりに両末端に導入することなく、核酸塩基も使わず、水素結合も無く、リボースも使わない、そんな二重鎖をつくってやろうと思った。色々試行錯誤したら、オリゴピレンとオリゴアントラキノンで安定な二重鎖が形成できた。しかも核酸のG-C対より遥かに安定な対を形成した。完全人工二重鎖の実現である。こうなると、トレオニノールを使えばどんな核酸アナログでも設計次第で安定な二重鎖を形成してくれそうだ。核酸塩基にもリボースにもこだわる必要が全くなり、完全に核酸から解放された。でも、これを果たして日本核酸化学会は受け入れてくれるだろうか？？？神の創り給うた核酸の痕跡として残っているのは、リン酸ジエステルだけだ。核酸の敬虔な使徒から見れば私は異端者であり、黒魔術で冒涇しているだけに見えるかもしれない。禁断のトレオニノールを使い核酸を解放しようとした私は、異端者として追放されてしまうのだろうか？

嗚呼、トレオニノールはやはり禁断の主鎖だった！これを酷使し続けた私に、容赦のない激痛が走った！ピシッという破滅の音と共に右足の足首と親指の間の屈筋と伸筋肉が切れ・・・ではなく、度重なる核酸の破壊で血液中に濃縮された尿酸が針状結晶となり右足の関節に析出し、そこを白血球成分がさらに攻撃して血管壁に致命的なダメージを与えたのだ。激痛は否応なしに、夏を目前にした私に、ある種の重大な覚悟を迫る。核酸を破壊し続けることに快樂を覚えていた私に、神罰が下ったのか？

しかし神よ、その信者が集うであろう日本核酸化学会よ、核酸を冒涇し続ける私を許し給え。そして異端の私を暖かく受け入れよ。核酸を冒涇し放浪した先に、核酸の真の意味が見えてくるはずだ。なぜ神はリボースを祝福したのか？なぜAGCTだったのか？核酸を破壊し続ける冒涇者だからこそ、いずれは核酸の愛が理解できるのだ。その一端を明らかにできた時、私は核酸に真の喜びを見出し、再び神に帰依し、そして約束の地に戻れるのだ。



超分子化学と核酸

熊本大学大学院先端科学研究部

井原 敏博

日本核酸化学会 (JSNAC) の創立、誠にありがとうございます。日本の核酸化学研究の歴史は長く、卓越した多くの先達が生み出した研究成果の質・量を考慮すると、本会の発足はむしろ遅すぎると感じておられる方も多いと思います。この歴史的イベントに、当事者のひとりとして立ち会うことができたことをたいへん嬉しく感じております。JSNACの活動をとおりて日本の核酸化学研究がさらに発展し、世界における日本のプレゼンスを確立することができればたいへん素晴らしいことです。さて、JSNAC創立に併せて創刊されたこの日本核酸化学会誌は、その名のとおり 本学会の機関誌 (論文誌) として位置づけられます。同じ情報媒体としての学会のWebサイトとの住み分けなど十分考慮する必要がありますが、編集方針など いまは手探り段階で、十分に練られているとは言い難い状況です。Webサイトが比較的即時的な (リアルタイムの) 会員同士、あるいは学会から会員への情報提供・交換の場とすれば、日本核酸化学会誌は論文誌としての役割も担うことから、時間的により長いスパンで有効な情報、すなわち記録としての価値を意識した会員からの情報発信のための媒体となればと考えています。会員の皆さんからのご意見を反映させながら、徐々に最適解に近づけていければと考えています。

私は学部4年次、故 高木 誠先生の主宰する分析化学の研究室に配属され、クラウンエーテルの研究で3人の研究者にノーベル賞が与えられた まさに超分子化学隆興の年に研究者としてのキャリアをスタートさせました。当時、周辺の研究室では様々な包接化合物や分子集合体が競うように作られ、それらを積み上げた超分子を用いた人工光合成、酵素モデル、分子認識... などの研究が華やかで たいへん魅力を感じたものです。そうした環境の中で、研究材料 (分析対象) としてDNAを与えられたとき、私はそれを生命が選択した究極の超分子と感じました。誤解を恐れずに言うと、当時の多くの超分子は“自然に集まった”ものを指して、“制御した”、あるいは“設計した”と称しているような印象もありました。しかし、DNAを足場として利用すると数Åの精度で“意図して”分子を配置できるわけです。すなわち DNAは超分子化学とは、とても親和性の高い分子ということができます。DNAの美しい構造的特徴は、超分子化学において *preorganization*、*complementarity*、*cooperativity* などの概念 (キーワード?) として帰納的に昇華し、幾多の研究をインスパイアしました。また 逆に、超分子化学において抽象化されたこれらの概念が演繹的にフィードバックされ、ゲノムケミストリーの発展に多大な影響を与えたことはいまさら言うまでもありません。

DNAやRNAは、それ単独でもすでに超分子としての要素をもちますが、その *complementarity* に基づいて様々な高次構造をとり、さらに高次の超分子を形成します。リボソームはいうに及ばず、テロメラーゼ、RNAi、CRISPR/Cas9の動作メカニズムにはタンパク質を含んだ核酸同士の特異的な複合体形成が必須です。また、生体中では、G4 DNA、TERRA、i-motif、H-DNA、cruciformなど、いわゆるnon-Bタイプの様々な非標準型構造も知られるようになり、それぞれの構造が何らかの特定のバイオロジカルな意味をもつと考えられています。CRISPR/Cas9やRNAiは実際に存在していた生命現象を工学的に利用した好例ですが、純粋な人工系では、例えば 様々なタイプのモレキュラービーコン、スプリットプローブのように構造の変化によりシグナルを発する工夫を施されたDNA超分子システム、M-DNAや光反応性基を導入したDNAなど

によりその標的分子との結合を金属イオンや光などの刺激で制御することができる分子システム...などDNA複合体(超分子)の工学的利用については枚挙にいとまがありません。自律的に進行する鎖交換反応に基づくDNAサーキットなどはシグナル増幅に非常に有用ですが、(静的な)構造を超えて(時間軸に沿った)構造の変化をプログラムできるという意味でも超分子系とよぶことができるかもしれません。また、DNA折り紙、DNAゲルなどは、complementarityに基づいたボトムアップの設計により工学的に作られた究極の超分子構造ですが、最近、RNAのトリプレットリピート配列が、世代を経て長くなると相転移的に細胞中でゲルを形成すること、そしてそれが関連する病態の進展と関係している可能性が報告されました。DNA(RNA)折り紙のような超分子構造も、近い将来、細胞中に発見されるかも知れません。

生命の進化は、(私の理解では)その時々々の環境の変化に応答した、単純なビジョンなき平衡移動に過ぎず、つまり、DNAの構造はあくまで進化の早い段階での揺らぎの中でたまたま決定された先に位置したローカルミニマムであり、必ずしもその機能を担うための最適解ではないはずです。DNAワールドに住む一員として、今後、進化の過程を経て、BNAやaTNAなどのより優れたXNAへの遺伝的乗っ取りが起こらないことを祈りますが、生物学的しがらみのない超分子化学は、天然系と人工系とを組み合わせ、用途(計測、制御、治療...)に合わせて系を柔軟に最適化するための有力な手段・指針になると考えています。最近では、例えば 多くのnon-coding RNAが関連タンパク質や特定の遺伝子などとの複合体(超構造)形成をとおして、遺伝子発現のコントロールに決定的に関わっていることがわかってきて、核酸化学がさらに活性化されています。人工核酸とsiRNAやアプタマー技術の融合により実用レベルが進歩し、このところ核酸医薬界も活況を呈しているように見えます。こうした流れの中で核酸を化学する学会 JSNACの創立は誠に時宜を得たものと感じています。JSNACが、会員同士の交流をとおして互いが刺激され、日本初の画期的な研究成果を連発できるような学会になれば準備委員の一人としてこれ以上の喜びはありません。



日本核酸化学会の設立は 意味のあることなのでしょうか？

東京大学 先端科学技術研究センター
岡本 晃充

国内に学会や研究会と名のつく集会在乱立する中で、またひとつ新しい学会が誕生しようとしています。筆者は、すでにいくつも学会に所属していて満腹なので、わずかな手持ちのお金のことを考えながら、この学会に入るならあの学会を辞めようかと考えたりしています。ざっくりとした研究分野に対して設立された学会があったり、一方で歴史や世代を理由に同じような分野に名前を変えた似たような学会ができたり…。です。筆者はいつも「新」学会に対して好ましい感情を持っていません。今度の日本核酸化学会の設立は本当に我々にとって意味のあることなのでしょうか？

今度の新学会は、議論の対象にする物質「核酸」を学会名に掲げています。言うまでもなく、核酸は、生命を定義づける情報の維持と次世代への伝達を司る有機分子であり、化学もしくは生物の研究者が通じ合える共通語として機能しています。一方で、この文章を平成29年(2017年)の初夏に書いていますが、少なくとも現時点では、核酸はまだ謎にうち満ちており、大変夢のある分子です。

▷ 核酸は、セントラルドグマを構成する複製、転写、翻訳において中心的な役割をしますが、特定の発現イベントを時空間的に制御する核酸が次々と見つかり、今でもとどまることを知りません。核酸の修飾に目を転じれば、DNA、mRNA、tRNAに多くの新ヌクレオチドが発見されており、配列認識や構造制御だけでなく、遺伝子発現に決定的な影響を与えています。

▷ 構造に目を転じれば、核酸は、タンパク質や糖、膜に比べて遙かに美しい立体構造を持つ一方で、構成単位に着目するとアミノ酸や単糖、脂質に比べて遙かに複雑なヌクレオチドを使っています。神はそのためになぜ美しくも複雑な核酸を選んだのでしょうか？必然なのか偶然なのか、まだ誰も知りません。

▷ どんな阻害剤よりも、どんな抗体よりも、核酸は良く効く薬になるに違いありません。なぜなら、細胞の特定の核酸に結合して機能を止めたり、加えた核酸自身が細胞に新たな機能を加えたりすることが可能なのですから。

▷ 核酸の分子機能は無限です。それらを私たちの手で創り出すことができます。核酸は、或る時にはタンパク質のように働くことができます。相補的な核酸配列を認識するだけでなく、時にはアプタマーとして分子を認識し、時にはリボザイムとして触媒作用を発揮します。

▷ 核酸からは、本来の右巻二重らせん構造を遙かに超える構造を作り出すことができます。核酸は有機化合物ですので、見たこともない構造のヌクレオチドを化学的に組み込んだ非天然核酸、超核酸が誕生するでしょう。また、核酸のピースを組み上げることにより、二本鎖、三本鎖、四本鎖、平面、箱形…ミクロなプラモデルのようになってきました。

核酸化学は、合成化学者がバイオの世界に入門するのにぴったりのフィールドです。新型ヌクレオチドの合成、核酸分子における反応の解析、はたまた核酸を反応場にした新反応開拓…。分子生物学者から

すれば、細胞機能発現の最も根源になる分子のサイエンスだと捉えられ、新薬を開発するのに必要な重要情報の宝庫です。物理化学者からすると、ミクロスコピックでは堅牢な二重らせん構造によって原子と原子の位置的関係の揺らぎが小さく、一方でマクロスコピックでは柔軟な紐状構造体という一見相反する構造的特徴を持つ核酸は、化学的もしくは生物学的環境での物理定数を求めるのに有用なプラットフォームを与えてくれます。したがって、核酸化学は、さまざまなフィールドの科学者が集うことができるサイエンスであり、同時に異種の研究フィールドへ展開していくことができる起点になります。つまり、合成化学者が核酸化学を経由して遺伝学や材料科学へ進んでいくこともできるし、物理化学者が核酸化学を通して薬学へ手を出すことができます。「核酸化学会」なるものがあれば、おそらくそれは知のジャンクションとして機能し、異分野の科学者が「核酸化学」をキーワードに集うことができる絶好の場所になるでしょう。こんな場所がこれまでになかったのが不思議で仕方ありません。発展的知的好奇心をもてあましている科学者にとって、「核酸化学会」はもしかすると日本化学会や分子生物学会よりも遙かに良質で核心的な交流の場になるでしょう。化学や生物学をエンジョイする場を与えつつ、自身の研究を大きく展開できるきっかけを与える場を求めて異分野の研究者が次々と参加できる語らいのサロンになればいいのでは。

はじめに述べました。新学会は、議論の対象にする物質を学会名に明示しています。境界があいまいな学問分野を冠した学会とは違い、議論の焦点が明確であり学問のトレンドにも左右されないので、新学会が漂流したりすることはおそらくないでしょう。核酸に接する世界中の研究者が集い、新しい知見を得たら次の段階へ卒業していく、そんな学会であれば是非設立すべきです。マンネリ研究を忌避し、好奇心にあふれ進取の気質とフロンティア魂を最上の誇りにする研究者の集まりの場を提供する日本核酸化学会の設立は、世界のサイエンスの発展にとって画期的な出来事になるはずです。

追記: 筆者が後日この文章を読み返したときの反省材料とするために、平成29年現在に筆者の研究室で行っている核酸化学関連研究を備忘録として下に示します。これらの研究は数年後には次の段階へ歩みを進めているでしょうか、それとも…。

エピジェネティック修飾核酸の捕捉と解析・可視化、細胞内RNAの時空間イメージング、核酸の細胞導入法、細胞内へ導入された核酸の挙動解析、外来物質による細胞内RNAの損傷、ヌクレオソームの全合成、前生物学的環境での核酸合成など。



RNA に魅せられて

京都大学 iPS 細胞研究所

齊藤 博英

「生命はこの宇宙でどのように誕生し、これからどのような運命をたどっていくのか？」生命の誕生と進化の謎は、今世紀の科学がとりくむ最も大きな課題の一つだろう。この鍵を握る分子として、DNA や RNA となる核酸が過去から現在、未来に至るまで重要な役割を果たすことは疑いの余地がない。研究には時々流行り廃りがあるが、そのような時代の潮流に惑わされることのない、核酸に関わる様々な基礎研究をさらに深く、広く推し進めるために日本核酸化学会 (JSNAC) が設立されたことは誠に喜ばしく、その設立に際し新参者ながら寄稿させていただける幸運に巡りあえたこと、関係者の皆様に心から感謝申し上げる次第である。私は核酸、特に機能性 RNA 分子の設計原理に着目して研究を進めているが、なぜ RNA が魅力的なのか、自身の経験から感じることを述べさせていただきたい。

約 20 年前に東京大学工学部に進学した私は、工学部化学生命工学科の渡邊公綱先生の研究室に配属され、RNA 分子と出会った。正直なところ渡邊先生の分子生物学の授業は私にはチンプンカンプンで、多くのことは理解できなかったのだが、その中で「RNA ワールド」という言葉を知った。「生命は自己複製能と触媒機能を併せもつ RNA から始まった」とする RNA ワールド仮説は私の興味を強く惹き、RNA の研究で生命の起源を理解したい、と強く感じた。といっても私は成績の良い学生ではなく、かといって実験を朝から頑張る忍耐強さも持ち合わせていなかった(新装開店のパチンコ店に朝から並ぶ忍耐強さはあったが)。しかしながら渡邊先生はいつもガハハと声をあげて笑う大らかさで、できの悪い私を暖かく見守ってくれていた。渡邊先生は昨年度亡くなられた。渡邊先生の大らかな性格と研究の自由を尊重する精神を引き継ぎ、研究室から多くの人材が輩出され、日本の RNA 研究を進める原動力の一角を担っていると感じる。

「生命の起源を探究する研究をどのようにできるだろうか？」思いあぐねていた修士課程の時に、アメリカの Jack Szostak 博士や David Bartel 博士らの RNA 酵素の試験管内進化実験に関する論文を読んで、感動した。これに触発され、博士課程へ進学する際に RNA 試験管内進化法 (In vitro selection / SELEX) を学びたいと思い、当時ニューヨーク州立大学におられた、菅裕明先生(現東京大学教授)に思いきってメールを書いた。菅さんとの面識はなく、「ポニーテールで少し怖そう」という印象をもっていたが、菅さんから「アメリカに来てもいいよ」という返事をもらえたときはとても嬉しく、自分の未来に新しい世界が開けていく気がした。アメリカでのアパートが見つかるまで菅さんの自宅に一週間程泊めていただけることになったが、一つの問題が生じた。私は当時ヘビースモーカーだったが、渡米前に菅さんから電話で「齊藤君はタバコすわないよね？」と聞かれた時に(菅さんがタバコ嫌いということは人づてに聞いていた)思わず「はいもちろんです！」と答えてしまったのである。実は心配で成田空港でタバコのカートンを何箱か買いだめしていたのだが、そのまま渡米してはいけない気がして、結局、飛行機に乗る直前にそのカートンを全部捨てた。それが今までの自分との決別宣言である気がした。タバコのカートンをゴミ箱に投げ捨てたシーンはスローモ

ーションのように今も目にやきついている（最初から買うなよという声も聞こえてきそうではあるが）。菅さんは私に RNA のケミストリーをトレーニングしてくださり、念願の人工 RNA 酵素を進化させる研究をはじめた。当時私は遺伝暗号の起源に RNA 酵素が関与した可能性に興味があった。そこで、tRNA にアミノ酸を転移する反応を触媒する最も原始的な酵素の一つである、アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) の働きを模倣する RNA 酵素の進化実験を進めた。RNA 酵素が実験進化により出現した時は、感動した。ランダムな配列から進化した RNA は、非常に巧妙にアミノ酸と tRNA を認識し、アミノ酸転移反応を触媒できるということがわかった。これは関係者から今でもミラクルと言われることがあるが、ランダムな 70 塩基を持つライブラリーから始めて、たった1種類の RNA 酵素(後のフレキシザイム)の進化に成功し、しかもこの pre-24 は天然 ARS のように、tRNA の末端リボースの 3'-OH を精密に認識し、フェニルアラニン誘導体を付加することができた。その際に私は、RNA は精密な化学反応を触媒、制御する能力を秘めていることを確信した。この研究はパチンコの例で話すと確変を引いたようなものであり、その後 RNA 酵素の生化学解析、構造解析を進め、博士学位研究に足る一連の仕事を菅研で達成できたことが研究者としてやっていく自信につながった。今もって偉大な師匠である菅さんには感謝の気持ちで一杯である。

その後私は、京都大学生命科学研究科の井上丹先生の研究室で学び、RNA 分子デザインの研究を始め、2011 年より京都大学 iPS 細胞研究所で研究室をもたせていただき、今に至っている。RNA の可能性はとどまることを知らず、ノンコーディング RNA, small RNA, RNP 複合体など天然の RNA から学べることに限界はない。このような生命システムに内包された RNA の魅力を最大限に引き出せるように、化学の力を活用しながら、ユニークで面白い RNA 研究を展開したいと思っている。JSNAC でも最新の研究成果を発表できるよう、研究室メンバーと苦労と興奮を共有しながら、泥臭くともゆっくりと着実に進んでいきたい。



核酸化学研究者の登竜門

徳島大学 大学院医歯薬学研究部

南川 典昭

今年で第44回を迎える核酸化学シンポジウムですが、いよいよ日本核酸化学会として新たなスタートを切ろうとしています。学会組織化の準備委員の一人として非常に喜ばしく感じています。これを契機に日本の核酸化学の益々の発展を祈念するとともに、自身もその一端を担えるように研鑽を積んでいきたいと考えています。

さて、私が核酸化学シンポジウムに初めて参加したのは1988年9月に札幌で開催された第15回核酸化学シンポジウム(第2回国際核酸化学シンポジウムだったと記憶しています)でした。ちょうど北海道大学大学院修士課程を中退して教務職員になった年であり、シンポジウム運営のスタッフとして関わるとともに、ポスター発表を行いました。発表演題は、“Synthesis of imidazoazepine nucleosides via the palladium-catalyzed cross coupling reaction”で、Akira Matsuda, Noriaki Minakawa and Tohru Uedaでの発表でした。それまでも何度か学会発表の経験はありましたが、核酸化学シンポジウムというのはやはり特別な学会という意識があり、ポスター発表といえどもちょっとした緊張感を感じていたように思います。その気持ちを知ってか知らずか、発表開始とともにN大のH先生とT工大のS先生がお二人揃って私のポスターの前にいらして、「この反応条件はなんだ?」、「この反応は本当にうまくいくのか?」など、研究に対して矢継ぎ早に質問をされ、それに対して必死で応戦していたように記憶しています。今でも強く印象に残っているのは、そのうちヒートアップしたお二人が、私をそっちのけで白熱した議論を始めたことでした。餌の魚を目の前に、それを取り合う二羽の鳥。もちろん当時は、そんな失礼なことをイメージする余裕もなく、この二人はいったい何者だ?と唾然としていました。今思うと、「H大のM先生の弟子のようだし、少しかわいがってやるか!」くらいのお気持ちだったと思いますが、非常に懐かしく感じるとともに、このような「かわいがり(良い意味での)」に感謝しています。

核酸化学シンポジウムは、核酸化学研究者にとっては登竜門であったと私は考えています。そこで発表し、多くの先生と議論する中で、自分が徐々に認められていったような気がします。核酸化学会となってもこのスタンスは変わらずに、若い研究者の登竜門であってほしいと願っています。また今の自分は、かつての先生がたのように、「かわいがり」の役目を担っていきたいと考えています。若い先生や学生は、その「かわいがり」に臆することなく自身をアピールしていただきたいと思います。

右の写真はシンポジウムの際に羊ヶ丘展望台のクラーク像の前で撮影したものです(向かって左が約30年前の著者。他4名は、T工大のS先生もしくはC工大のT先生のお部屋の学生だったように思います)。核酸化学の研究領域はどんどん多岐に渡っており、無限の可能性があると感じています。初心にかえり、「少年よ大志を抱け」の精神で、我が国の核酸化学の発展に邁進したいと考えています。





核酸化学シンポジウムと私

東京理科大学薬学部

和田 猛

日本核酸化学会の設立にあたり、我が国における核酸化学、より広くは核酸科学関連分野の研究がますます活性化されることを心から期待しています。

私が核酸化学の分野に足を踏み入れたのは、1985年に東京工業大学の畑辻明先生の研究室に卒業研究生として配属された時です。その年の11月には、大阪大学で開催された第13回核酸化学シンポジウムに初めて参加させていただき、その雰囲気と高度な発表内容に圧倒されたのを今でも覚えています。以来、核酸の化学合成一筋に今日まで研究を続けて来られたのはとても幸せなことだと思っています。私が研究を始めた当時は、DNAの化学合成法の開発研究が盛んに行われていた時期で、オリゴヌクレオチドの合成法としては、リン酸トリエステル法とホスホロアミダイト法がまだ拮抗している状況でした。国内の複数のメーカーは、リン酸トリエステル法の自動合成機を生産・販売しており、その後、米国のABI社からホスホロアミダイト法の自動合成機が販売され、グローバルスタンダードになったのは記憶に新しいところです。修士課程在学中の私は、当時、世界最速の縮合反応を実現すべく日夜実験に励んでおりました。博士課程進学後は、ホスホロアミダイト法とは全く異なるホスホン酸誘導体をモノマーとする新しい核酸合成法の開発を行いました。当時の私の研究上の遠い目標は、「保護基を使わない核酸合成」と「リン原子修飾核酸の立体選択的合成」でした。博士課程修了後、関根光雄先生に助手として雇ってもらい、自由に研究に没頭させていただきました。助手時代に「保護基を使わない核酸合成法の開発」を完成させ、その限界や可能性について認識し、現在もなお、ライフワークとして保護基を使わない究極の核酸合成法の開発を続けています。1999年に東京大学に異動してからは西郷和彦教授のもとで、「リン原子修飾核酸の立体選択的合成」に着手し、その後、核酸創薬企業(Chiralgen社およびWAVE Life Sciences社)の設立に至りました。ごく最近、WAVE社で開発中の核酸医薬が臨床研究に入るまでに発展したことは誠に幸運なことであり、これまでご指導いただいた先生、先輩方、共同研究者および学生の皆様に心から感謝する次第です。

核酸化学シンポジウムの歴史はまさに私の研究の軌跡であり、そこで研究成果を発表することを目標に日々精進してきました。今後、核酸化学シンポジウムが日本核酸化学会へと発展・進化し、核酸科学に関わる幅広い学術分野の第一線で活躍する専門家と、この分野の発展を担う若い世代の研究者が集い、産学官の枠を越えて、最新の研究成果・学術情報を日本から世界へ発信できる場となることを期待しています。



核酸化学のさらなる発展に向けて

東北大学多元物質科学研究所

和田 健彦

日本核酸化学会が2017年9月1日に設立されましたこと、心よりお祝い申し上げます。設立に携われた一人として、紆余曲折を経たものの学会を発足できたことに大いなる喜びを感じると共に、今後の学会発展に向け、さらなる努力を重ねるべく身の引き締まる思いで御座います。会員の皆様、そして核酸化学関連分野の研究に携わる皆様、また核酸化学関連分野にご興味をお持ちの皆様の、日本核酸化学会へのご理解とご参画、そしてご協力をお願い申し上げます。

さて、私が核酸に興味を抱いたのは恩師である竹本喜一先生の“積み木の化学”と題する、機能性高分子の講義でした。「DNAは、たった4種類の核酸塩基だけで遺伝情報をコントロールしてるんやわ、凄いと思わへん？ 4種類を順番にぎょうさん繋いで、積み木みたいに色んな形に組み上げて、高分子にするから出来んねん。DNAに一個酸素が付いたRNAはもっと面白いんや」って、独特の少し高い声で優しく講義下さいました。この講義が切っ掛けで竹本研に入り、核酸塩基を側鎖に導入したビニルポリマー合成研究を始めました。最初に気付いたのは核酸塩基、特にGやCがほとんど溶けないって事実でした。DNAは水に良く溶けるって既存概念が崩され、それ以降、既存概念・先入観にとらわれず、一つ一つ真摯に考えて取組む...って姿勢が身に付いたと感じています。

後にこの核酸塩基の難水溶性が、水中においても水素結合に基づく相補的塩基対を形成するため、主に疎水的相互作用に駆動された微視的相分離構造形成の鍵になっている事を実感する事にも繋がっており、心に残っています。核酸塩基導入ビニルポリマーを手始めに、鋳型重合、チミンの光反応性を活用したフォトレジスト開発や核酸塩基固定化シリカゲルを用いたアフィニティーHPLCシステム開発、そしてPoly(I)-Poly(C)に触発された生体賦活化材料開発など、人工核酸と名付けた核酸ポリマーの機能材料への展開を中心に、合成と機能・特性解析研究に没頭しました（当時多くの研究者は核酸誘導体を修飾核酸と呼称しているなか、異端であった我々は最初に「人工核酸」との名称を提唱したと自負しています。）

このように非・糖-リン酸骨格核酸を中心に研究を進める中で、水中での安定な水素結合・相補的塩基対形成の難しさに直面し、分子認識や物理化学的研究にも取り組みました。そして水中においても局所的に溶媒極性の低い疎水場の構築、微視的相分離構造形成の重要性に気付き、これに伴う水和・脱水和の影響に興味を抱き、エントロピー項の重要性、そしてエントロピー活用系の提案に繋がりました。

このタイミングで光化学の研究室に移動し、人工核酸の研究で気付いたエントロピー関連外部因子による不斉光反応系の制御、エントロピー制御化学の適用研究に取り組みました。そして温度、圧力、さらに溶媒和（非極性溶媒に極性溶媒を添加する系など）などエントロピー関連因子に基づく、生成物キラリティー反転さえ実現する事が出来ました。さらにこの知見を基に、エントロピー項を低減させた系を構築出来れば、常温・高温においても低温に相当する環境構築が可能と発案し、二

重らせんDNAをはじめ生体関連化合物をキラル反応場とする超分子不斉光反応系を提案し、実証実験に成功しました。特に世界で初めて、人工坑体を不斉反応場とする超分子不斉光反応系の構築にも成功し、現在その適用可能基質範囲の拡大と、一般的な方法論としての確立に取り組んでいます。

研究室を担当することとなり、人工核酸の生命機能制御物質としての展開研究に取り組み、現在超分子不斉光反応系の構築と共に、細胞内環境応答性を有する核酸医薬の創製研究を推進しています。

このように自らの研究の流れを俯瞰的に考えると、核酸化学研究の影響を色濃く受けている事に気付きます。核酸誘導体合成研究で有機合成研究者としての、相互作用研究・超分子への展開研究から物理化学的研究の、そして核酸医薬の*in vitro*、*in vivo*展開研究から分子生物学の、各々スキルを身に付けてこれたと感じています。そして、自らの研究を振り返って“核酸化学”の範疇がいかに広いかを再認識しています。またPCR法、siRNA法など現代バイオテクノロジーの根幹をなす基盤技術、そしてここ2~3年臨床応用への期待が急速に高まっている次世代分子標的薬として注目されている核酸医薬研究も、オリゴDNA合成と特性解析研究、DNA配列決定ならびにその機能に関する研究、そしてオリゴRNA合成やその構造ならびに機能に関する研究など、核酸化学における基盤的研究の進展がなければ為し得なかった事は明白でしょう。即ち時代に応じ、さまざま機能応用・展開研究が進展しますが、いつの時代でも基盤研究の重要性は揺るぐものではなく、その意味からも日本核酸化学会の設立は極めて重要であると信じています。2017年9月1日に設立された日本核酸化学会が、合成化学、物理化学、分析化学、分子生物学をはじめ、研究分野にとらわれることなく、分子レベルでの真理と学理の追求を目指した知的好奇心を大切に、杉本会長がよく仰っている「脇が甘く、懐が広い」学会に育っていつてくれることを心から願っています。

蛇足ですが、私が研究者として歩み始め、初めての学会発表はM1春の高分子年次大会でした。年次大会は質疑応答時間が長く、当時筑波大学におられたK助教授、東工大におられたS助教授やO助教授から、この研究のどこが面白いと思っている？これまでの研究と、どう違うんだ？などと厳しい質問攻めにあい、サイエンス、そして学会の厳しさを身をもって体験しました。その後、研究が発展し鑄型重合による人工核酸とDNAとの相互作用などの成果を、大阪・吹田メイシアターで開催された核酸化学シンポジウムで発表させて頂きました。核酸シンポジウムは、高分子学会とは雰囲気異なるものの、ここでも私はポスター発表で北大M先生、東工大H先生、S先生、名大H先生そして岡山大H先生、京工繊大M先生をはじめ多くの先生から厳しい質問攻めに遭いました。なんとか凌いだものの、学会は怖い...発表で質疑応答に耐えるためには、十分信頼性の高いデータを得ると共に、論理的に説明できるよう熟考しなければ...との肝に銘じました。このように“怖い”先生方ですが、発表後には面白い発表だったよ、次の発表を期待しているよ、頑張ってください！って感じで、優しく声を掛けて頂き、さらに若手の会や懇親会に出るようになってからは、相変わらず厳しい質問と共に、研究が進展してるね...などと研究を見守り、時に応じて温かい声を掛けて頂けるようになりました。このような「お声掛け」でモチベーションが高まり、ますます核酸研究に打ち込んでいった事を記憶しています。

このように、若手研究者が最先端のデータだけでなく、その研究の意義付け、研究哲学さえも強く意識して発表する場であり、かつコミュニティに参加し、認められる事でさらに研究のモチベーションを向上できる...日本核酸化学会がそのように有能な若手人財育成の場となる事も心より願っております。応用研究が重要であることは言を俟ちませんが、それにも増して重要なのは核酸研究を深め、発展させる知的好奇心旺盛で、モチベーションの高い次世代人財養成だと信じます。日本核酸化学会の発展を心から願うと共に、みなさまのご支援とご協力を御願い申し上げます。

付録

日本核酸化学会設立趣意書	44
日本核酸化学会会則	45
日本核酸化学会細則	46
日本核酸化学会 各賞規定	47
2017 年度委員会	48
評議員名簿	48

日本核酸化学会設立趣意書

日本核酸化学会発起人一同

1953年にWatsonとCrickが遺伝子という漠然とした概念を、二重らせんDNAという具体的な化学構造として提示してから、生命現象を精緻な化学反応として捉える分子生物学の爆発的な進歩が始まった。DNA配列の人為的な改変は遺伝子操作を可能とし、バイオテクノロジーという生命現象の工学的な応用を実現した。その礎となったのは、先述のWatsonとCrickによる二重らせん構造の発見、そして1957年のToddのヌクレオシド・ヌクレオチド類の化学修飾、そして1968年のKhoranaへのノーベル賞授与に代表されるリン酸ジエステル法、アミダイト法によるDNAの化学合成法の開発と固相合成への展開に基づく自動合成機の開発と普及である事は言を俟たない。

1978年アンチセンス法の実践、1980年代のリボザイムの発見、1990年SELEXおよびアプタマー概念の提出、2000年前後のRNA干渉やマイクロRNAの発見、さらに2003年のヒトゲノムの全塩基配列の解明などを通じて、分子生物学において生命を司る化学物質としての核酸の地位を確固たるものにした。さらに超分子的観点から、精緻な相補的塩基対形成を駆動力とし自発的に二重鎖を形成する核酸の魅惑は、生物学者のみならず多くの化学者の研究対象となり、その超分子性のメカニズム解明、新たな核酸のデザイン、さらには医療、バイオマテリアルなどへの応用を目指すナノ・バイオマテリアル研究へと発展し、核酸化学という新たな分野の確立に至った。

1973年秋に、日本の核酸化学者が一堂に会し研究成果を活発に議論する場として第一回核酸化学シンポジウムが大阪大学蛋白質研究所で開催された。これ以降毎年多くの優れた研究成果がこのシンポジウムより発信され、日本の核酸化学研究の発展に大きく貢献してきた。年々拡大しつつある核酸化学シンポジウムは、2005年(平成17年)に国内だけでなく日本の優れた核酸化学研究を世界に発信することを目的に、第一線で活躍している海外の研究者も招いた国際シンポジウムへと発展した。我が国の核酸化学は、黎明期からその発展に大きく貢献しており、数多くの素晴らしい研究成果を挙げ、世界的に極めて高く評価されてきた。これら先駆的研究を礎とし、日本において多くの優れた核酸化学者が輩出された。

世界の核酸化学者が一堂に会する国際会議である International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRN3)は、我が国の核酸化学シンポジウムを模して始まったものでもあり、我が国の核酸化学のアカデミアは質、量ともに充実し、模範的な組織としても注目され、この国際会議を京都で開催するなど世界の核酸化学の中心的な役割を担ってきている。核酸化学シンポジウムも約40年の間に多彩な分野の多くの研究者を取り込み、従来の生物学的な枠を遥かに超越した存在になりつつある。すなわち核酸化学は、生命の真理を希求し、学理とその応用を考学する中心に位置しており、これらを俯瞰しつつ包括的に議論できる新たな組織の設立が強く求められている。

このような背景に基づき、我々は日本核酸化学会の設立を提案するに至った。今後核酸化学は、異分野をさらに取り込みつつ大きく発展を遂げるだろう。日本から世界に向けて優れた研究業績を常に発信し、拡大しつつある核酸化学を更に大きく発展させることが日本核酸化学会の目的であり、責務であると信じる。このような趣旨にご賛同いただき、多くの研究者が日本核酸化学会に入会されることを期待したい。

日本核酸化学会会則

(2017 年 10 月 23 日の評議員会、11 月 14 日の総会で承認の後に施行予定)

第1条	本会は、日本核酸化学会(The Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, 略称 JSNAC)という。	1. 学会長は本会を代表し、会務を統括する。 2. 年会長は実行委員長として国際シンポジウム(ISNAC)を開催する。 3. 幹事は学会長による会務の遂行を補佐する。 4. 会計監事は会計を監査する。 5. 顧問は会の運営に助言を行う。 6. 学会長は、幹事より構成される運営委員会を組織し、実際の学会運営を行う。運営委員会には、学会長の要請により年会長、会計監事、顧問も参加することが出来る。 7. 評議員は評議員会を構成し、本会に関する諸事項を審議する。
第2条	本会は、生命の真理を希求し、学理とその応用を考 学する中心に位置している核酸化学研究を俯瞰しつ つ包括的に議論できる組織として設立する。広い意 味での核酸(ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、核酸類 縁体、およびこれらを含む複合体)を扱い、これらを用 いた基礎化学、複合化学、材料化学、超分子化学、ゲ ノム科学、生物科学、農芸化学、薬学、基礎医学、ナノ マイクロ科学などの基礎研究、およびこれらに立脚した 医療、センサー、バイオマテリアル、合成生物学などへ の応用を目指す研究を議論する場として組織され、本 会の活動を通して日本の核酸化学研究を広く世界に発 信することを目的とする。	
第3条	本会は、前条の目的を達成するために必要な事業を行 う。 1. 本会の年会として、これまで開催されてきた国際シン ポジウム(International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 略称 ISNAC)に準じ、原則として英語を公 用語に用いた国際シンポジウムを年 1 回開催する。 2. 日本の核酸化学の発展に貢献してきた研究者を顕彰す るとともに、将来の核酸化学を担う若手を育成する活動 を行う。 3. 会誌等の発行や学術情報の共有化など、前条の目的を 達成するための情報発信を行う。	第7条 学会長、幹事、会計監事の任期は2年とし、評議員の中 から選出する。ただし再任は可とする。年会長の任期は 1年とし、評議員の中から選出する。学会長、幹事、会 計監事は、別途定める細則に基づき選出する。
		第8条 本会は必要に応じて各界の著名な研究者若干名を特 別顧問として招聘し、本会の運営等に助言を求めるもの とする。
		第9条 本会は原則として年 1 回総会を開き、事業計画、決算、 予算、会則の変更などの重要事項、会務を協議し、議 決する。総会は学会長が招集する。また、必要に応じ適 宜運営委員会、評議員会を開く。
第4条	本会の会員は正会員、学生会員、賛助会員、特別賛助 会員とする 1. 正会員は、広い意味での核酸に関する研究に従事、ま たはこれに関心をもつ個人であって、本会の目的に賛 同し、定められた入会届を提出し年会費を納めた者を 言う。 2. 学生会員は、核酸に関する研究に従事、またはこれに 関心を持つ大学および大学院に学生、研究生、あるい は院生として籍を有する個人で、本会の目的に賛同し、 定められた入会届を提出し、学生会員年会費を納めた 者を言う。学生としての籍を失った時をもって、正会員と しての年会費を納め、正会員への移行手続きを行うもの とする。 3. 賛助会員は本会の目的に賛同し、定められた賛助会費 1口以上を納める個人または団体を言う。賛助会員のう ち賛助会費10口以上を納めた個人または団体に、特 別賛助会員の称号を付与するものとする。 4. 個人会員は、氏名および所属を本会に登録する。法人 会員は、代表連絡者の氏名および所属を本会に登録 する。	第10条 会員として入会しようとする個人または団体は、細則に 定められた手続きに従って申込み、運営委員会の承認 を得なければならない。正会員は年会費 5000 円、学生 会員は年会費 1000 円を納めるものとする。賛助会員は 年額1口以上の賛助会費(1口 50,000 円)の会費を納め るものとする。また、特別賛助会員は、年額10口以上の 会費を納めるものとする。なお同じ大学組織に属してい る正会員から直接指導を受けている学生は、その正会 員からの推薦を受け、学会長が承認すれば年会費は 免除される。
		第11条 会員は学会長に届け出て脱会することができる。また、 2 年間会費納入を滞納した会員、ならびに運営委員会 で理由をあげて本会の会員として適当でないと決議さ れた会員は学会長によって脱会させられる。
		第12条 本会の事業遂行のための費用は、会費、補助金、事業 に伴う収入、寄付金、資産から生じる資金、およびその 他の収入により賄う。本会の会計年度は9月1日に始ま り、翌年8月31日に終わる。
		第13条 本会則の施行についての細則は別に定め、その変更は 評議員会の議決を経る。
第5条	会員は本会の行う諸事業に参加し、本会の発行する学 会誌等会員向け情報の配布を受ける事ができる。	第14条 本会則の変更ならびに本会の解散は総会の議決を経 る。
第6条	本会に評議員をおき、うち1名を学会長、1名を年会長、 若干名を幹事、2名を会計監事、若干名を顧問とする。	第15条 本会則は 2017 年 11 月 14 日より施行する。

日本核酸化学会細則

(2017 年 10 月 23 日の評議員会での承認の後、11 月 14 日に施行予定)

第 1 章 会員

第1条 正会員または学生会員として入会を希望する者は、必要事項を届け出ることによって申込みを行う。申込みが受理された場合には、速やかに当該年度の年会費を納めなければならない。

第2条 賛助会員、特別賛助会員として入会を希望する団体は、必要事項を書面にて学会事務局に届け出ることによって申込みを行う。申込みが受理された場合には、速やかに当該年度の年会費を納めなければならない。

第 2 章 役員の選出・任期

第3条 評議員は、正会員の中から評議員の推薦を受けた者が、評議員会の承認を得て就任する。

第4条 日本核酸化学会へのこれまでの貢献が極めて大と認められた評議員は、学会長からの推薦を受け、評議員会での承認を経て、荣誉評議員に選出される。65 歳以上の荣誉評議員は、会費が免除される。

第5条 学会長は、次の各号に掲げる方法により選任する。

1. 学会長は評議員会を招集し、評議員の中から新会長候補を選出する。
2. 学会長は評議員会で選出し、選出された候補者を、総会での承認を得て就任する。学会長選出は、別途定める学会長選出規定に従い実施する。

第6条 幹事、年会長、会計監事、顧問は、学会長が指名し、評議員会の承認を得て委嘱する。

1. 幹事は、庶務幹事、財務幹事、広報・出版幹事、会員幹事、企画幹事の5つの業務幹事から構成される。その他、学会長が運営のために必要と認める業務の幹事あるいは各種委員会をおくことができる。
2. 庶務幹事は、幹事を統括する幹事長を兼ねる。

第7条 会則第7条に定める役員の任期は年会長を除き、2年後の総会までとする。ただし再任可とする。年会長に関しては担当する ISNAC 終了日までとする。

第 3 章 総会

第8条 総会は主催する国際シンポジウム (International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 略称 ISNAC) に併せて開催する。総会の議案は学会長が作成し、評議員会の議決を経て提出するものとする。また、議案には前年度の事業報告および収支決算、新年度の事業計画および収支予算を含むものとする。

第 4 章 評議員会

第9条 評議員会は、表決権を有する出席者の過半数の賛成により成立する。また、やむを得ない事由のため評議員会に出席出来ない構成員は委任状により表決することがで

きる。

第 5 章 学会誌

第10条 「日本核酸化学会誌」を日本核酸化学会の学会誌とする。広報・出版幹事は、事務局と共同して学会誌の編集にあたる。

第 6 章 各賞

第11条 日本核酸化学会は、会則第 3 条第 2 項に基づき、別途定める賞規定によって、日本核酸化学会賞、若手優秀講演賞、優秀ポスター賞を授与する。

1. 核酸化学シンポジウムを創設された池原森男博士の功績を後世まで称えるため、日本核酸化学会賞を池原賞とする。
2. 日本の核酸化学に多大な貢献をされた大塚榮子博士の功績を後世まで称えるため、若手優秀講演賞を大塚賞とする。

第 7 章 共催・協賛・後援

第12条 他学協会から日本核酸化学会への共催・協賛・後援依頼の採否は、運営委員会で協議し承認を得た後に学会長名で行う。運営委員会で承認された依頼は、評議員会ならびに総会で報告する。日本核酸化学会が主催する事業に関して他学協会へ共催・協賛・後援依頼する場合は、事業の実行委員長の依頼を受けて運営委員会で協議し、承認を得た後に実行委員長名で行う。

第 8 章 主催事業

第13条 日本核酸化学会主催事業とは、ISNAC を除き、会員からの提案を受けて運営委員会での協議を経て承認を得た行事を示す。主催事業は、若手の会や市民講座などの講演会および書籍出版など、日本核酸化学会が主体となって行うものを広く含む。

第 9 章 事務局

第14条 事務局所在地は学会長が定める。

第 10 章 細則改正

第15条 本細則の改正は、評議員会の議決による。

第 11 章 付則

第16条 本細則は、2017 年 11 月 14 日よりこれを施行する。ただし本会発足時は、評議員会において第 1 期の役員の選出を行い、その承認は 2017 年 11 月 14 日から開催される国際シンポジウム (ISNAC) に併せて開催する第 1 回総会で行うものとする。なお、第 1 期の役員の任期のみ、3 年とする。

また第 1 期の学会長のみ、日本核酸化学会準備委員会が評議員の中から学会長候補を推薦し、評議員会の承認を経た後に学会長とする。

日本核酸化学会 各賞規定

(2017 年 10 月 23 日の評議員会での承認の後、11 月 14 日に施行予定)

日本核酸化学会 日本核酸化学会賞（池原賞）規程

- (総 則)
- 第 1 条 日本核酸化学会賞（池原賞）の授賞については、この規程の定めるところによる。
- (対 象)
- 第 2 条 本賞は、本会会員で、顕著な研究業績により核酸化学の深化や新たな研究展開に指導的役割を果たし、独創的かつ優れた業績を挙げたものに授与する。
- (受賞件数)
- 第 3 条 本賞の受賞件数は、原則毎年 2 件以内とするが候補者多数の年は最大 3 件までとする
- (委員会の設置)
- 第 4 条 本賞の受賞候補者を選考するため、学会賞候補者選考委員会（以下「委員会」）を設ける。
委員会の委員は学会長の推薦により本会評議員より若干名を選出するが、核酸化学の各分野に偏りの無いように配慮する。委員長は委員の互選により定める。
- (候補者の推薦)
- 第 5 条 本賞の受賞候補者の推薦は、他薦によるものとする。本会評議員である推薦者は、推薦理由を添えて候補者を推薦するとともに、選考委員会の求めに応じて必要な資料を提出しなければならない。
- (委員会における審議及び選考)
- 第 6 条 委員会は推薦理由をもとに受賞候補者を絞り、推薦者が提出する資料にもとづいて若干名の受賞候補者を選び、選定理由を付して学会長に報告する。なお、受賞候補者が無い場合も、その旨を学会長に報告する。選考にあたっては、原著論文業績の他に啓蒙的役割を果たした著書類及びそれらの国内外の波及効果、加えて本会並びに核酸化学への貢献に留意する。
- 第 7 条 委員が被推薦者となった場合で、選考の最終段階に候補として残った場合には、委員会から外れるものとする。
- (受賞者の決定)
- 第 8 条 学会長は、委員会が選定した候補者について評議員会に諮り承認を得て、これを受賞者として決定し、直ちに本人に通知をする。また、受賞候補者が無い場合には、評議員会の了承を受けて、受賞者が無いことを会員に公表する。
- (受賞者の表彰)
- 第 9 条 授賞式は、受賞者決定後に開催される国際核酸化学シンポジウム（ISNAC）において行う。
受賞者には賞状及び副賞を贈呈する。
- 第 10 条 受賞者は、原則として、その授賞式が行われる ISNAC において記念講演し、その内容を本会の学会誌に総説として投稿する。
- (学会賞の英訳名)
- 第 11 条 本賞の英文名は、“The Award of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (Ikehara Award) (受賞西暦年度)”とする。
- (秘密の保持)
- 第 12 条 委員会の構成員は、申請書、審議、選考の内容等に関し、秘密を保持するものとする。
委員会の構成員名及び受賞者名は、受賞が決定するまでは公表しないものとする。
- (改廃)
- 第 13 条 この規則の改廃は、評議員会の承認を得なければならない。
- 補 則
- この規程は、評議員会の承認を得て施行する。

日本核酸化学会 国際核酸化学シンポジウム (ISNAC) 若手優秀講演賞（大塚賞）及び優秀ポスター賞規程

- (総 則)
- 第 1 条 国際核酸化学シンポジウム（ISNAC）若手優秀講演賞（大塚賞）及び優秀ポスター賞の授賞については、この規程の定めるところによる。
- (対 象)
- 第 2 条 各賞は、国際核酸化学シンポジウム（ISNAC）にて

- 研究成果発表をし、研究内容と研究発表、及び参加者との議論を通して、顕著に優れた評価を受けた日本核酸化学学会会員に授与する。
- (委員会の設置)
- 第 3 条 本賞の受賞候補者を選考するため、国際核酸化学シンポジウム（ISNAC）若手優秀講演賞（大塚賞）及び優秀ポスター賞候補者選考委員会（以下「委員会」）を設ける。
委員会の委員は年会長（ISNAC 実行委員長）の推薦により若干名を選出するが、核酸化学の各分野に偏りの無いように配慮する。また、発表者との利害関係にも配慮する。
- (若手優秀講演賞（大塚賞）の資格)
- 第 4 条 本賞の受賞件数は、毎年 3 件以内とする。
- 第 5 条 日本核酸化学学会会員で、ISNAC 開催年の翌年 3 月 31 日で 35 歳以下の博士の学位を有する研究者を対象とする。
対象者は、発表研究内容に責任を持てる研究者で、かつ発表要旨の筆頭著者でなければならない。過去に受賞した研究者は、対象から除外される。過去に優秀ポスター賞を受賞した研究者が応募した研究については、その内容が当人の過去の受賞研究と明らかに異なると委員会によって判断された場合のみ本賞の審査対象になる。
- 第 6 条 本賞への応募は、ISNAC 演題申込と同時に受け付ける。
- 第 7 条 本賞への応募が多数になり ISNAC 内で応募者全員に発表機会を与えることが困難である場合は、委員会では発表要旨の内容を基に事前審査し、発表候補者を決定する。この発表候補者のみが、本賞審査の対象になる。
- (優秀ポスター賞の資格)
- 第 8 条 本賞の受賞件数は、毎年概ね 5 件とする。
- 第 9 条 日本核酸化学学会会員で、ISNAC 開催時点で博士後期課程在籍の学生及びポスドク研究者を対象とする。
対象者は、発表要旨の筆頭著者でなければならない。過去に受賞した研究者は、対象から除外される。
- 第 10 条 本賞への応募は、ISNAC 演題申込と同時に受け付ける。
- 第 11 条 対象者は、1 研究室（研究グループ）につき 2 名を超えてはならない。
- (委員会における審議及び選考)
- 第 12 条 委員会は各賞対象者の研究内容と研究発表、及び対象者との英語での議論を評価して総合的に審議し、受賞候補者を選考する。選考結果は、選定理由を付して年会長に報告する。なお、受賞候補者が無い場合も、その旨を年会長に報告する。
- (受賞者の決定)
- 第 13 条 年会長は、委員会からの報告に基づいて受賞者を決定する。
- (受賞者の表彰)
- 第 14 条 各賞受賞者の発表及び授賞式は ISNAC 懇親会において行い、受賞者には賞状ならびに副賞を贈呈する。
- 第 15 条 受賞者は、原則として、ISNAC での発表内容を日本核酸化学会の学会誌に総説として投稿する。
- (各賞の英訳名)
- 第 16 条 国際核酸化学シンポジウム（ISNAC）若手優秀講演賞（大塚賞）の英文名は、“ISNAC Outstanding Oral Presentation Award for Young Scientist (Ohtsuka Award) (受賞西暦年度)”とし、国際核酸化学シンポジウム（ISNAC）優秀ポスター賞の英文名は、“ISNAC Outstanding Poster Award (受賞西暦年度)”とする。
- (秘密の保持)
- 第 17 条 委員会の構成員は、審議及び選考の内容等に関し、秘密を保持するものとする。
委員会の構成員名及び受賞者名は、受賞が決定するまでは公表しないものとする。
- (改廃)
- 第 18 条 この規則の改廃は、日本核酸化学会評議員会の承認を得なければならない。
- 補 則
- この規程は、日本核酸化学会評議員会の承認を得て施行する。

2017 年度 日本核酸化学会 委員会

(2017 年 10 月 23 日の評議員会での承認の後、11 月 14 日に発足予定)

運営委員会

- * 会長：杉本直己教授（甲南大学）
 * 幹事長：和田健彦教授（東北大学）－兼務：庶務
 * 財務担当幹事：浅沼浩之教授（名古屋大学）、南川典昭教授（徳島大学）－兼務：会費の徴収
 * 広報・出版担当幹事：井原敏博教授（熊本大学）、和田 猛教授（東京理科大学）－兼務：会報の編集と配信
 * 会員担当幹事：齊藤博英教授（京都大学）、岡本晃充教授（東京大学）－兼務：入脱会の実務

役員・委員会（◎は委員長）

- * 編集委員会：◎杉山 弘教授（京都大学）、中谷和彦教授（大阪大学）、和田 猛教授（東京理科大学）、井原敏博教授（熊本大学）、井川善也教授（富山大学）－業務：会誌「日本核酸化学誌」の企画・編集
 * 賞・顕彰委員会：
 池原賞：◎ 森井 孝教授（京都大学）、岡本晃充教授（東京大学）、上野義仁教授（岐阜大学）
 大塚賞：◎ 岩井成憲教授（大阪大学）、齊藤博英教授（京都大学）
 ポスター賞：◎ 藤井政幸教授（近畿大学）、浅沼浩之教授（名古屋大学）

- * 男女参画委員会：◎ 永次 史教授（東北大学）、南川典昭教授（徳島大学）、阿部 洋教授（名古屋大学）
 * ホームページ委員会：◎ 鳥越秀峰教授（東京理科大学）、和田健彦教授（東北大学）、山東信介教授（東京大学）
 * 国際交流委員会：◎ 竹中繁織教授（九州工業大学）、井原敏博教授（熊本大学）、藤本健造教授（北陸先端大学院大学）
 * 広報委員会：◎ 池袋一典教授（東京農工大学）、和田健彦教授（東北大学）、櫻井和朗教授（北九州市立大学）
 * 産学官連携委員会：◎ 小泉 誠博士（第一三共株式会社）、和田 猛教授（東京理科大学）

- * 支部幹事：
 北海道・東北地区：鬼塚和光先生（東北大学）
 関東地区：林 剛介先生（東京大学）
 中部地区：樫田 啓先生（名古屋大学）
 関西地区：建石寿枝先生（甲南大学）
 中国・四国地区：田良島典子先生（徳島大学）
 九州地区：谷口陽祐先生（九州大学）

- （* 準備委員会：杉本直己委員長、浅沼浩之委員、井原敏博委員、岡本晃充委員、齊藤博英委員、南川典昭委員、和田 猛委員、和田健彦委員）

日本核酸化学会 評議員

栄誉評議員

今西 武 株式会社 BNA・大阪大学
 大塚榮子 (独)産業技術総合研究所・北海道大学
 小宮山 真 NIMS MANA・東京大学
 齋藤 烈 京都大学・日本大学
 関根光雄 東京工業大学・(株) 環境レジリエンス
 田中博道 昭和大学
 早川芳宏 名古屋大学
 早津彦哉 就実大学
 松田 彰 北海道大学

評議員

浅沼浩之 名古屋大学
 阿部 洋 名古屋大学
 井川善也 富山大学
 池袋一典 東京農工大学
 伊豆田俊二 熊本大学
 井上将彦 富山大学
 井原敏博 熊本大学
 岩井成憲 大阪大学
 上野義仁 岐阜大学
 大槻高史 岡山大学
 大矢裕一 関西大学
 岡本晃充 東京大学
 小野 晶 神奈川大学
 小比賀 聡 大阪大学
 片山佳樹 九州大学
 川井清彦 大阪大学
 川上純司 甲南大学
 北出幸夫 愛知工業大学
 栗原正晴 群馬大学
 小泉 誠 第一三共株式会社
 小松康雄 産業総合研究所
 小堀 哲生 京都工芸繊維大学
 齊藤博英 京都大学
 齋藤義雄 日本大学
 櫻井和朗 北九州市立大学
 佐々木茂貴 九州大学
 佐藤智典 慶応義塾大学
 山東信介 東京大学

塩谷光彦 東京大学
 篠塚和夫 群馬大学
 斯波真理子 国立循環器病研究センター
 徐 岩 宮崎大学
 菅 裕明 東京大学
 杉本直己 甲南大学
 杉山 弘 京都大学
 清尾康志 東京工業大学
 竹中繁織 九州工業大学
 田中好幸 徳島文理大学
 張 功幸 徳島文理大学
 豊福秀一 (株)ボナック
 鳥越秀峰 東京理科大学
 中谷和彦 大阪大学
 中村 史 産業技術総合研究所
 長澤和夫 東京農工大学
 永次 史 東北大学
 中野修一 甲南大学
 西澤精一 東北大学
 馬場嘉信 名古屋大学
 平尾一郎 IBN 研究所
 藤井政幸 近畿大学
 藤本健造 北陸先端科学技術大学院大学
 二木史朗 京都大学
 前田瑞夫 理化学研究所
 松倉 誠 崇城大学
 丸山 厚 東京工業大学
 南川典昭 徳島大学
 宮田完二郎 東京大学
 三好大輔 甲南大学
 森井 孝 京都大学
 森下竜一 大阪大学
 山名一成 兵庫県立大学
 山本泰彦 筑波大学
 横田隆徳 東京医科歯科大学
 古田寿昭 東邦大学
 和田 猛 東京理科大学
 和田健彦 東北大学
 遠藤玉樹 甲南大学
 建石寿枝 甲南大学

▼遺伝子増幅用ヌクレオチド

当社独自のリン酸化技術などを用いて、高品質・低価格を実現いたしました。

製品コード	製品名	容量	溶液濃度	価格(税抜)
NT010	dATP	1.0ML	100mM	4,000円
NT020	dCTP	1.0ML	100mM	4,000円
NT030	dGTP	1.0ML	100mM	4,000円
NT040	dTTP	1.0ML	100mM	4,000円
NT050	dNTP Set	★1Set	100mM	3,600円
NT060	dNTP Mix	1.0ML	各2.5mM	3,000円
NT070	dUTP	1.0ML	100mM	4,000円

★1Set 100mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP が各0.25ml)

- ◆純度：> 99%の国内製品
- ◆弊社独自の純化学合成品（一切、酵素等は使用していません）
- ◆バルクでの販売も可能
- ◆送料無料！

核酸化学でジーンテクノロジーに素材を提供



株式会社ジーンアクト

〒830-0042 福岡県久留米市荘島町8-5-101

TEL:0942-36-8117 FAX:0942-36-8113

<http://www.geneact.com> Email:info@geneact.com

DNA / RNA自動合成機 nS-8 II



コンパクト設計 H54cm × W30cm × D41cm
マルチ合成 最大8カラム同時合成
多彩な修飾 アミダイト12ボトル×補助試薬7種セット可能
操作性抜群 アイコン方式でプログラムを容易に作成可能

核酸合成用試薬



ジーンデザインでは英国 Link Technologies 社の
合成用試薬の販売を行っております

【主な製品】

- ・ DNA / RNA 合成用アミダイト体と関連試薬
- ・ 合成用担体
- ・ 修飾核酸用アミダイト体
- ・ PNAモノマー 等

詳細は：<https://www.genedesign.jp/products/synthesizer-link/>

各種カスタムオリゴの受託合成も承ります！高品質にご提供致します！



株式会社ジーンデザイン

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7番地29号

TEL : 072-640-5180 FAX : 072-640-5181

E-mail : info@genedesign.co.jp

有機化合物の受託研究・受託合成で 研究開発を支援します

欲しい化合物があるけど手に入らない ...
アイデアはあるけれど合成は難しそう ...
網羅的に調べたい、スクリーニングの範囲を広げたい ...
大量合成や原料合成は面倒 ...
マンパワーや設備が足りない ...

あきらめる前にナード研究所にご相談ください

低分子化合物 長年にわたる合成実績を活かし、多種多様な化合物の有機合成が可能です

非天然核酸モノマー アミダイト化された修飾ヌクレオチドをご提供いたします

非天然ペプチド 蛍光色素や安定同位体などのラベル化、その他修飾された非天然型のペプチドを合成いたします

スクリーニング用化合物ライブラリ ハイスループットな合成でケミカルライブラリを構築いたします

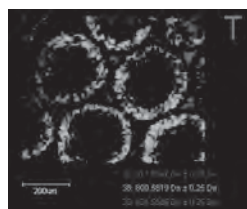
大量合成 スケールアップは子会社のナードケミカルズにて対応します

株式会社ナード研究所 神戸研究所 コーポレート研究部
NARD Institute, Ltd.

〒650-0047 神戸市中央区港島南町5-4-1
TEL: 078-958-7026 FAX: 078-958-8026
E-mail: corporate@nard.co.jp



核酸化学・MS イメージングをリード



Rat testis imaged at 10 μm pixel size with MALDI-TOF



autoflex speed

Mass Spectrometry

Innovation with Integrity

Bruker Daltonics is continually improving its products and reserves the right to change specifications without notice. © BDAL

ブルカー・ダルトニクス株式会社

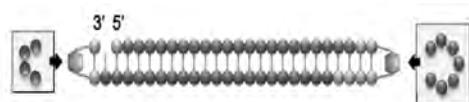
●本社 営業部
〒221-0022 横浜市中区守屋町3-9
TEL: 045-440-0471 FAX: 045-453-1827
●大阪営業所
〒532-0004 大阪市淀川区西宮原1-8-29 ササキ第2ビル2F
TEL: 06-6396-8211 FAX: 06-6396-1118

独自の技術を通じ、核酸医療の発展に貢献します

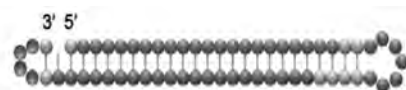
ボナック核酸 (The BONAC Nucleic Acid)

ボナックは、核酸医薬開発に関する創薬技術的なハードルを克服するため、独自に研究を進め、新規核酸分子「ボナック核酸:例、nkRNA[®]、PnkRNA[®]」を見出し、世界初の強固な基盤技術群を確立しました。

従来の siRNA とは異なり、ユニークな分子内構造を有する一本鎖長鎖核酸分子であり、独創的な基本特許として、世界各国へ出願し、既に日米欧で特許登録済みです。



PnkRNA[®]



nkRNA[®]

BONAC CORPORATION

Bridge Of Nucleic Acids Chemistry

株式会社ボナックは、核酸化学を通じ医薬品の創出や
診断薬の開発など、世界の核酸医療の展開に対し、
様々なソリューションを提供する架け橋を目指します。



【事業内容】

核酸プラットフォーム特許ライセンス事業
核酸合成事業
核酸合成技術コンサルティング事業

株式会社 ボナック (URL: <http://www.bonac.com/>)

本社: 福岡県久留米市合川町 1488-4 福岡バイオファクトリー TEL:0942-32-6700 FAX:0942-32-4611

沖縄バイオ研究所: 沖縄県うるま市字州崎 12-75 沖縄健康バイオテクノロジー研究開発センター

東京支店: 東京都千代田区内神田 2 丁目 16-8 第五氏家ビル 502 号



BONAC CORPORATION

北海道システム・サイエンスをパートナーとして 研究・開発を進めてみませんか？

特殊合成

2'-O-メチル、2'-Fluoro、S化などの修飾品の経験が豊富です。DNA/RNA キメラ合成、コレステロール修飾も可能。
蛍光標識やスパーサーなど各種取り揃えており、さまざまな研究用途にお使いいただけます。

大量合成

大量生産可能な専用機を用いて1回の合成で1000mg（30塩基以下のDNAの場合は2000mg）での合成を実現しました。
mg単位からg単位までの合成が可能です。
また、ご指定の分量やバイアルへの分注も可能です。

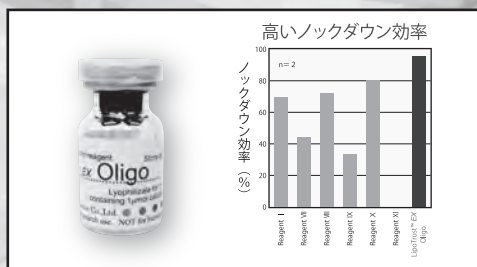
GMP 準拠核酸大量合成

GMP 準拠の製造施設にて合成したgスケールの製品を提供いたします。
エンドトキシン試験、生菌数試験、重金属・残留溶媒測定、水分含有量測定、塩基濃度測定を実施いたします。



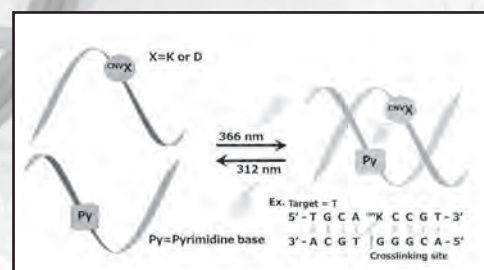
DDS

「Lipo Trust™EX Oligo（特許取得済）」はほ乳類細胞および実験動物への核酸導入試薬で、siRNA, antisense DNA, miRNA 等 short oligonucleotide の導入に最適なリポソームです。
in vivo 用として開発した処方、「血清存在下」でトランスフェクションが可能です。



光架橋性オリゴ

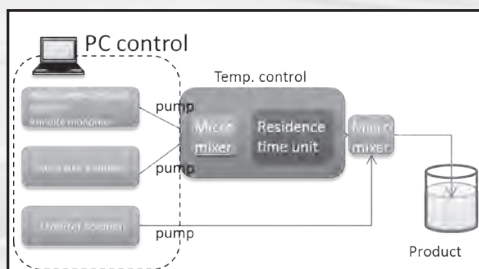
北陸先端科学技術大学院大学 藤本教授が開発した CNV シリーズ (CNV-K および CNV-D) を DNA に組み込むことで、光を用いて自由自在に DNA・RNA を操作することができます。UV 照射 1 秒で相補鎖のチミンと結合し、波長を変えることで簡単に乖離可能となります。



※ 北海道システム・サイエンス株式会社は日華化学株式会社より製造販売委託を受け光架橋性オリゴ CNV シリーズ製品の製造・販売を行っております。

液相核酸合成

製造スケールの連動性問題を解決した液相フロー合成システムを開発し、製造量の柔軟な調整を可能としました。
液相反応は、固相合成と比較して反応中の分析が容易です。
現在、より低コスト・高効率で副反応を抑制した合成条件の構築や、効率の良い分離手法の開発を進めています。
本製造法を通して核酸医薬の発展に貢献いたします。



in vivo 用 核酸合成

HPLC 精製・脱塩済み。純度 95% 以上※¹。
ご希望により核酸カウンターカチオンを Na に置換します※²。
オプションでエンドトキシン測定※² も可能。



※¹ 標準的な配列の DNA・RNA 20mer の場合。
逆相 HPLC による面積百分率 (UV260)

※² 別途追加料金あり。

ご依頼方法・サービスの詳細は下記までお問い合わせください



北海道システム・サイエンス株式会社

〒001-0932 札幌市北区新川西2条1丁目2-1

☎ 0120-613-190

TEL: 011-768-5903 FAX: 011-768-5951

E-mail: dna@hssnet.co.jp URL: http://www.hssnet.co.jp

日本核酸化学会誌, Vol. 1 (2017)

2017 年 11 月 10 日 印刷

2017 年 11 月 14 日 発行

発行人	日本核酸化学会
編集委員	杉山 弘、中谷和彦、和田 猛、井原敏博
事務局	和田健彦（東北大学多元科学研究所） E-mail: hiko@tohoku.ac.jp Tel: 022-217-5608
印刷所	今野印刷株式会社 〒984-0011 仙台市若林区六丁の目西町 2-10 Tel: 022-288-6123 Fax: 022-288-0138
問合せ	井原敏博（熊本大学大学院先端科学研究部） E-mail: toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp Tel & Fax: 096-342-3873

* 本誌掲載記事の無断複製・転載を禁じます。

核酸のLC/MS分析に必要な 全ての包括的なツールを提供

Oligonucleotides



核酸分析用カラム



超小型MS検出器



高感度QToF MS

分析用スタンダード&試薬、解析ソフトウェアも
ラインアップしています。



分析例多数
核酸分析アプリケーション集
および製品詳細はこちら
www.waters.com/oligos

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

製薬 ■ ヘルスサイエンス ■ 食品 ■ 環境 ■ 化学工業

©2017 Waters Corporation. Waters および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

【東京本社】〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
【大阪支社】〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734