Journal of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry

日本核酸化学会誌

Vol. 2, 2018

巻頭言 国際核酸化学シンポジウムISNACへの期待
佐々木茂貴

研究論文 テトラエチレングリコールで修飾されたグアニン四重鎖の安定性の分子動力学計算による解析
大山達也、建石寿枝、田中成典、杉本直己

総合論文 講演賞受賞者（2012、2016）の最新研究
遠藤玉樹／金森功吏／山元淳平／正木慶昭

研究室紹介 長崎の中心で核酸化学を叫ぶ
山吉麻子

学会報告 第44回国際核酸化学シンポジウム（ISNAC 2017）／日本核酸化学会第1回年会 開催報告
和田猛

付録 日本核酸化学会会則、細則、各賞規程 等

JSNAC

巻頭言

国際核酸化学シンポジウム ISNAC への期待

九州大学大学院薬学研究院　佐々木茂貴

核酸化学シンポジウムはわが国の核酸化学研究の進展に長年貢献してきましたが、2017年には杉本直己初代会長の強いリーダーシップのもと、装いを新たに日本核酸化学会が誕生しました。順調なスタートにお祝い申し上げます。すでに ISNAC （International Symposium on Nucleic Acid Chemistry）は、世界の核酸化学者の間でも評価されており、学会の発足を機に海外からの参加者の増加を期待したいと思います。福岡で開催した ISNAC2005 は、国内学会としての会費をアナウンスした後に諸事情により国際学会に変更となったもので、海外からの参加者を全体の１０％以上にするために、わずか 10 万円の援助で著名な海外の研究者を招へいするなど、今思えば随分と無茶なことをしたものです。

核酸化学の起点は生体内のヌクレオシド、ヌクレオシド、DNA、RNA の構造と機能です。医薬品としてのヌクレオシドアナログの研究は、以前から現在まで続く大きな流れです。2018 年 8 月に FDA 認可された siRNA 薬は RNA 干渉という生命現象を基盤としています。これらの実用化には化学は鍵となる役割を果たしました。現在、爆発的に増えているエピゲノムの研究は、1940 年代の 5-メチルシトシンの発見に端を発しています。当初から発生分化への関与が考えられていましたが、1990 年代からは確実な証拠とともに今では定説となっています。この分野の発展でも化学は重要な役割を担っており 1970 年に早津彦哉先生（当時岡山大学教授）の発見されたシトシンのバイサルファイト処理によるウラシルへの変換は、シークエンシングによる 5-メチルシトシン決定法に組み入れられています。一方、合成 DNA によって明らかにされた 3 本鎖や 4 本鎖構造は、生体内での存在や機能を想起させることになり、化学から生命科学への重要なフィードバックの流れを作り出しています。DNA 折り紙の化学研究が核内での DNA 構造になにか関係しているかどうか、個人的に関心のあるところです。

生体内の核酸の機能については、短期間に数多くのドグマの転換がありました。RNA 触媒機能、リボスイッチ、miRNA などノンコーディング RNA の制御機構、ノンコーディング RNA からのペプチド翻訳など、これらは教科書を書き変えるほどの大発見でした。最近では、mRNA のコード領域に多数発見されている塩基やリボースのメチル化などの化学修飾が RNA エピゲノムとして新しいドグマの転換点なると考えられます。このような生命科学の大転換は化学者の創造意欲を掻き立て、新しい潮流を生みだすきっかけになってきました。

核酸化学の社会的に重要な役割は、有用な技術を生み出し貢献することです。DNA 配列解読手法の進歩が更に画期的な発見につながったように、技術の進歩は基礎研究の進化と切り離せません。生命の精緻な制御システムを考えますと、今後も定説を覆すような大発見があるものと思われます。ISNAC は、そのような発見に核酸化学者が触発され、斬新な次世代の技術の誕生を促し、イノベーションが発信されるような場になれるものと期待しています。しかし、学問はそれぞれ専門の言葉で成立していて、お互いの壁を超えることはとてもむずかしい作業です。化学の言葉が共通語の ISNAC は、異分野の研究者には敷居が高いかもしれません。そこで、会員の皆様には、異分野の研究者にこちらから積極的に働き掛け、ISNAC に招待し、発見の興奮と展望を共有し、学会に新しい刺激を絶え間なく注入することによって、核酸化学をさらなるステージへと飛躍させることを期待いたします。

日本核酸化学会誌 Vol. 2

Contents

目　次

巻頭言　国際核酸化学シンポジウム ISNAC への期待／佐々木茂貴 1

研究論文　テトラエチレングリコールで修飾されたグアニン四重鎖の安定性 分子動力学計算による解析／大山達也、建石寿枝、田中成典、杉本直己 3

総合論文　RNA 四重鎖構造による翻訳変調／遠藤玉樹 11

DNA 三重鎖構造を利用したヌクレオチドおよびヌクレオシドの turn-on 型蛍光プローブの開発／金森功吏 16

(6-4)光回復酵素による DNA 認識および修復機構／山元淳平 21

化学修飾 RNA と二重鎖構造の安定性／正木慶昭 26

研究室紹介　長崎の中心で核酸化学を叫ぶ／山吉麻子 31

学会報告　第 44 回国際核酸化学シンポジウム（ISNAC 2017）／日本核酸化学会第 1 回年会 開催報告／和田猛 35

付録　日本核酸化学会設立趣意 39

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

2018 年度委員

研 究 論 文

テトラエチレングリコールで修飾されたグアニン四重鎖の安定性の分子動力学計算による解析

Investigation for Stabilities of Tetraethylene Glycol-Modified G-quadruplexes by Molecular Dynamics

甲南大学先端生命工学研究所（FIBER)[1]、神戸大学大学院システム情報学研究科[2]、
甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科（FIRST)[3]

大山達也[1]、建石寿枝[1]、田中成典[2]、杉本直己[1,3]

[1]*Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University,*
[2]*Graduate School of System Informatics, Kobe University,*
[3]*Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), Konan University*

Tatsuya Ohyama[1], Hisae Tateishi[1], Shigenori Tanaka[2], Naoki Sugimoto[1,3]

(sugimoto@konan-u.ac.jp)

Abstract: G-quadruplex formation in DNA templates regulates gene expressions such as transcription and replication. Methods to stabilize the G-quadruplex are promising for anticancer and antiviral approaches. We previously developed deoxythymidines modified with tetraethylene glycol (TEG) to stabilize the G-quadruplex structures. It was shown that the modified G-quadruplexes were stable relative to unmodified G-quadruplexes. Here, we investigated important interactions to determine the modified G-quadruplex stability by the molecular dynamics (MD) simulations and electronic state calculations using fragment molecular orbital (FMO) method. Based on the interactions, the MD simulations and calculations suggested that TEG interacts with bases in the loop via CH–π and lone pair–π interactions, although it was assumed previously that oligoethylene glycols do not interact directly with DNAs. These results are useful for designing the G-quadruplex stabilizing molecules to regulate gene expressions.

１．はじめに

核酸の標準的な構造は二重鎖であるが、核酸は三重鎖や四重鎖などの非標準構造も形成する。非標準構造核酸の代表的な構造である四重鎖 (グアニン四重鎖; G-quadruplex) は、転写や翻訳、逆転写、テロメア伸長反応などの生体反応を高い効率で制御する[1–3]。例えば、転写反応において、鋳型 DNA 配列上に形成されるグアニン四重鎖は、Arrest、Slippage、Pause などの転写変異を引き起こす。これらの転写変異にはグアニン四重鎖の安定性が大きく関与している。このグアニン四重鎖は、4 つのグアニンがフーグスティーン塩基対を介して結合した G-quartet 部位とループ部位で構成されている。G-quartet 間の空孔に存在するカチオンはグアニン四重鎖構造を維持する上で非常に重要であり、特に親和性が高い

K^+ 共存下におけるグアニン四重鎖構造は非常に安定である。そのため、通常の細胞に比べて K^+ 濃度が低いがん細胞中では、グアニン四重鎖の安定性が低下する[4]。一方、G-quartet の広い π 平面と、π 平面を持つ化合物 (リガンド) は高い親和性で結合する[5]。リガンドとの結合は、グアニン四重鎖を安定化し、転写や翻訳、逆転写、テロメア伸長反応などを強く阻害する[6]。これまでにベルベリン[7]や *N*-methyl mesoporphyrin IX[8]、テロメスタチン[9]、環状ナフタレンジイミド誘導体[10,11]などが四重鎖結合性リガンドとして開発されている。また、生体反応を制御するグアニン四重鎖の機能は後天性免疫不全症候群 (Acquired immune deficiency syndrome; AIDS)、B 型及び C 型肝炎、エボラ出血熱、重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome; SARS) などに関与するウイルスでも確認されており、グアニン四重鎖の制御はこれらの疾病の治療にも応用できると期待されている[12,13]。しかしながら、リガンドによってグアニン四重鎖を安定化する手法は、標的配列のグアニン四重鎖を選択的に安定化することが難しく、また標的部位までの運搬法 (ドラッグデリバリーシステム; DDS) の開発が必要であるなど、実用には多くの課題が残っている。

我々は細胞内の生体分子で込み合った環境 (分子クラウディング環境) を試験管内で再現し、細胞内環境が核酸の構造や安定性に及ぼす影響を解析してきた[14–18]。その結果、オリゴエチレングリコールやポリエチレングリコール (Polyethylene glycol; PEG) による分子クラウディング環境において、グアニン四重鎖構造が安定化することを見出した。さらに、オリゴエチレングリコールや PEG は生体適合性が高く、ヌクレアーゼ耐性を向上させることが実験とシミュレーションの結果から明らかになった[19,20]。また、PEG が結合したリボソームは DDS において用いられていることから、PEG を用いてグアニン四重鎖を安定化させる手法は、リガンドを用いてグアニン四重鎖を安定化させるよりも有効な手法であるとも考えられる[21]。これらのことから、我々はクラウディング分子として広く活用されているテトラエチレングリコール (Tetraethylene glycol; TEG) で化学修飾したチミン塩基を導入したオリゴヌクレオチド (TEG 修飾オリゴヌクレオチド) を開発した[22,23]。このオリゴヌクレオチドは、四重鎖誘起配列 (図 1 の G-quadruplex forming sesquence) とガイド配列 (図 1 の Guide sequence) から成る。四重鎖誘起配列は標的鎖のグアニンの連続配列 (図 1 の G-tract) とグアニン四重鎖を形成する。ガイド配列は、標的鎖選択性を向上させるために必要な配列で、グアニンの連続配列の近傍の配列と二重鎖を形成する。この TEG 修飾オリゴヌクレオチドは、*in vitro* の環境下で、AIDS の原因となるヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus; HIV) 由来の RNA と安定なグアニン四重鎖を選択的に形成し (図 1)、この安定なグアニン四重鎖が HIV の逆転写反

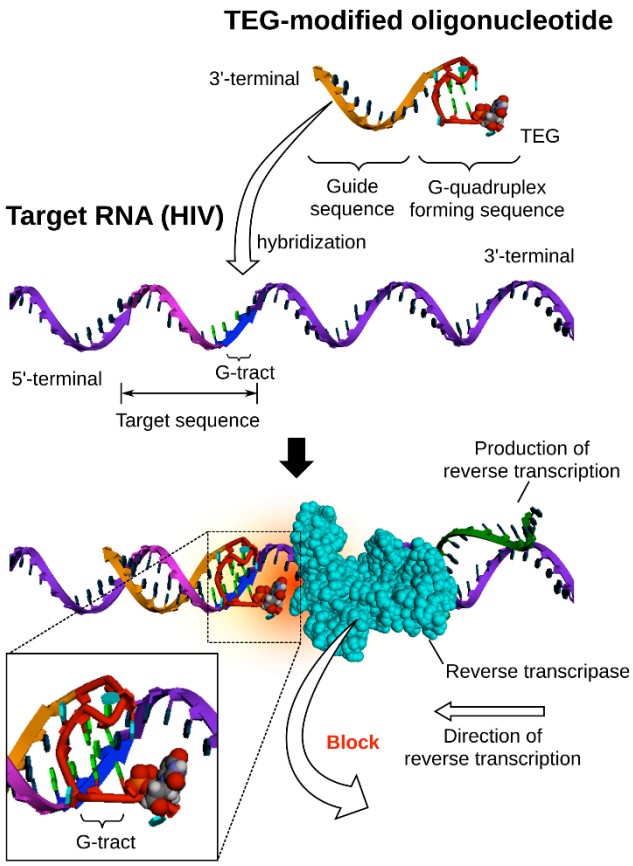


図 1. TEG 修飾オリゴヌクレオチドを用いた HIV の逆転写反応の阻害。

応を高い効率で抑制することがわかった[22]。しかしながら、TEG 修飾オリゴヌクレオチドが、グアニン四重鎖をどのように安定化するのか詳細な機構は明らかにはされていなかった。この安定化メカニズムを明らかにすることで、グアニン四重鎖を安定化させる TEG 以外の代替化合物の模索や我々が用いた手法以外のグアニン四重鎖安定化手法の提案につながると考えられる。本論文では、我々が開発した TEG 修飾オリゴヌクレオチドの DNA グアニン四重鎖 (図 1) をモデル化し、分子動力学シミュレーションと電子状態計算によってこのグアニン四重鎖の安定化メカニズムについて解析した成果を報告する。

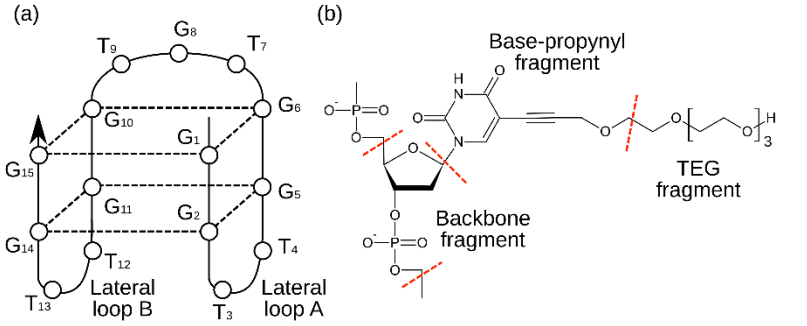


図 2. (a) 本研究のシミュレーションで用いたアンチパラレル型 DNA グアニン四重鎖と (b) チミン塩基のメチル基をプロピニル基と TEG で化学修飾した T_{TEG} の構造。

２．実験方法

グアニン四重鎖の詳細な構造を調べる X 線や NMR を用いた実験的構造解析、及びシミュレーションを用いた計算的構造解析や動的挙動解析はグアニン四重鎖の安定性や反応性を説明する上で不可欠である。しかしながら、TEG は柔軟性に富み、NMR や X 線による観測が困難であることから、我々は分子動力学 (MD) シミュレーションで構造を解析することにした。我々が開発した TEG 修飾オリゴヌクレオチドの四重鎖誘起配列 (5’-TTGGTGTGGTTGG-3’) はトロンビンアプタマー配列のグアニン四重鎖と類似した構造を形成する[22,24]。そこで、Protein Data Bank (PDB) のトロンビンアプタマー配列 (5’-GGTTGGTGTGGTTGG-3’) の NMR 構造 (PDB ID: 1C35; 図 2a)[25] を参考にし、MD シミュレーションの初期構造とした。系の電荷を中和するため、この構造の 14 個のリン酸基の周辺に K^+ を 14 個配置した。この構造を TEG で化学修飾していないグアニン四重鎖構造 Gq とした。TEG で化学修飾したグアニン四重鎖 (Gq-T_{TEG}) は、Gq の 4 番目のチミン塩基 (図 2a の T_4) のメチル基と TEG をプロピニル基で結合させ (図 2b)、作製した。これらの構造からシミュレーションで扱う系の壁面までの距離が 20 Å になるように系のサイズを設定し、その後、系に水分子を追加した。力場は核酸に Amber99bsc0[26] を、水分子に TIP3P を、T_{TEG} には Gaussian09[27] の HF/6-31G (d) レベルで計算して得られた T_{TEG} の Restrained electrostatic potential (RESP)[28] 電荷を用いた GAFF[29] を適用した。これらの系に対し、分子動力学計算パッケージプログラム AMBER Ver.14[30] を用いて溶液、そして系全体の順に構造最適化をそれぞれ 1500 ステップずつ行った。MD シミュレーションは 1 atm の定圧環境下で、100 ps で 298 K まで温度を上げ、35 ns のサンプリングをした。時間の刻み幅は SHAKE アルゴリズム[31] で水素原子の結合を束縛した上で、2 fs とした。

T_{TEG} と各ヌクレオチド間の相互作用は、核酸とその周囲 5 Å の水分子を切り出した構造に対し、フラグメント分子軌道 (Fragment molecular orbital; FMO) 法[32–34] を用いた電子状態計算を MIZUHO/ABINIT-MP Ver. 3.0 で行った。核酸はヌクレオチドをリン酸-デオキシリボースの骨格フラグメントと塩基フラグメントに、T_{TEG} は backbone fragment、base-propynyl fragment、TEG fragment にそれぞれ分け、分子間力も評価できる MP2/6-31G (d) レベルで計算した (図 2b)。

３．結果

Gq 内の T_{TEG} がどのような構造を形成するかを解析するため、T_{TEG} の慣性半径の分布をまず解析した。解析に必要な平衡状態の構造の決定には、構造の類似性を定量的に示す平均二乗偏差 (root mean square deviation; RMSD) を採用した。この RMSD をサンプリングの開始時の構造とそれぞれの時間の構造の DNA 骨格の重原子について計測した結果、11～35 ns (24000 構造) の RMSD 値が 2.9 ± 0.2 Å と構造の差異が小さかったため、これらの構造を解析に用いた (図 3 の赤い領域)。T_{TEG} の慣性半径を解析すると 5.5～6.0 Å をピークに分布しており、この範囲にある構造はシミュレーションで計算した時間のうち 23.3% を占めている (表 1)。この慣性半径における代表構造 (図 4 の (4)) を見ると、図 2a の lateral loop A の T_4 に位置する T_{TEG} の TEG 部位が lateral loop B の T_{12}、T_{13} に向けて伸びた構造をとっていることがわかる。この構造は慣性半径が 5.5 Å 以上の構造に多く見られ (図 4 の (4)～(8))、シミュレーションで得られた 24000 スナップショットのうち 78.5% を占めることがわかった。このことから、T_{TEG} はグアニン四重鎖の lateral loop 間をつなぐような構造を取りやすい傾向にあることが明らかになった。

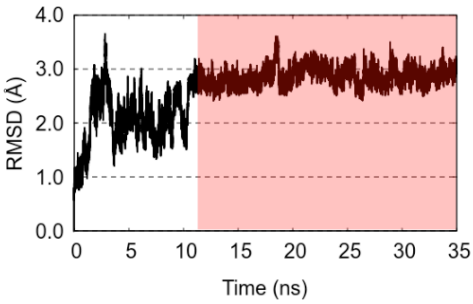


図 3. DNA 骨格内の重原子の平均二乗偏差 (root mean square deviation; RMSD) の経時変化。赤い領域は Gq-T_{TEG} が平衡状態にあるとみなし、本研究で用いた構造群を示している。

表 1. T_{TEG} の慣性半径の分布 [a]

Radius of gyration (Å)	The number of snapshots	Structure index[b]
4.0 – 4.5	990 (4.1%)	(1)
4.5 – 5.0	1,598 (6.7%)	(2)
5.0 – 5.5	2,560 (10.7%)	(3)
5.5 – 6.0	5,531 (23.0%)	(4)
6.0 – 6.5	5,104 (21.3%)	(5)
6.5 – 7.0	3,131 (13.0%)	(6)
7.0 – 7.5	4,886 (20.4%)	(7)
7.5 – 8.0	200 (0.8%)	(8)

[a] 1 スナップショットは 1 ps ごとの構造を示す。
[b] 図 4 の代表構造と対応する番号。

そこで、この lateral loop B に伸びる構造がどのように維持され、Gq の構造にどのような影響を与えているのかを解析するため、FMO 法を用いた電子状態計算を行った。FMO 法では、分子を任意のフラグメントに切り分けて電子状態を解析できることから、特定部位間の相互作用や電子状態の解析ができる。我々は、T_{TEG} を図 2b に示すように、backbone、base-propynyl、TEG の 3 つの fragment に分

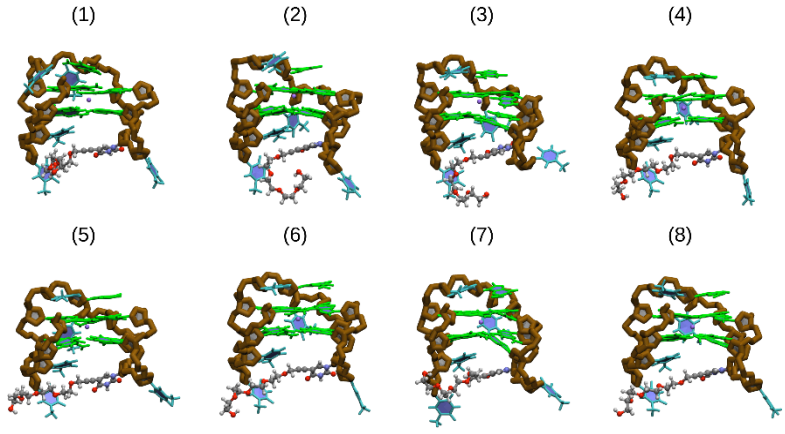


図 4. (1)～(8) 表 1 のそれぞれの分布の代表構造。茶色、緑、水色の stick 表示はそれぞれ骨格、グアニン塩基、チミン塩基を示している。T_{TEG} は ball & stick で表示しており、灰色、赤、青、白はそれぞれ炭素、酸素、窒素、水素原子を示している。

けて解析した。さらに、相互作用エネルギーの種類を特定するため、相互作用エネルギーを静電相互作用や水素結合などを示す静電エネルギー (Electrostatic energy; ES)、立体障害などの斥力相互作用を示す交換反発エネルギー (Exchange repulsion energy; EX)、電子の移動で生じる相互作用を示す電荷移動エネルギー (Charge transfer energy; CT)、ファンデルワールス力などの分子間力を示す分散力エネルギー (Dispersion energy; DI) に分けた。その結果、backbone fragment 間の相互作用ではリン酸の静電相互作用が強く、特異的な相互作用が観測できなかった。一方で、各ヌクレオチドの塩基と T_{TEG} の base-propynyl fragment (図 5a) 及び TEG fragment (図 5b) 間の相互作用エネルギーの解析では、T_{TEG} と T_{12} 及び T_{13} に特異的な相互作用が観測された。まず、base-propynyl fragment では、T_{13} との間に分散力エネルギー (DI, −7.0 kcal mol^{-1}; 図 5a の T_{13} の水色) 及び電荷移動エネルギー (CT, −3.1 kcal mol^{-1}; 図 5a の T_{13} の青色) が作用し、引き合っている。この相互作用に対し、静電相互作用エネルギー (ES, 3.4 kcal mol^{-1}; 図 5a の T_{13} の赤色) と交換反発エネルギー (EX, 7.0 kcal mol^{-1}; 図 5a の T_{13} のオレンジ色) が反発エネルギーとして T_{13} との間で作用しているため、T_{13} との相互作用はこれらの引力と斥力の総和である 0.3 kcal mol^{-1} となり、ほぼ相殺されている。一方で、TEG fragment と T_{12} との相互作用の ES (−14.6 kcal mol^{-1})、EX (5.5 kcal mol^{-1})、CT (−0.6 kcal mol^{-1})、DI (−9.1 kcal mol^{-1}) の総和は −18.8 kcal mol^{-1} で、非常に強い引力の相互作用が働いている。そのエネルギーの多くは静電エネルギー (図 5b の T_{12} の赤色) と分散力エネルギー (図 5b の T_{12} の水色) によって占められている。

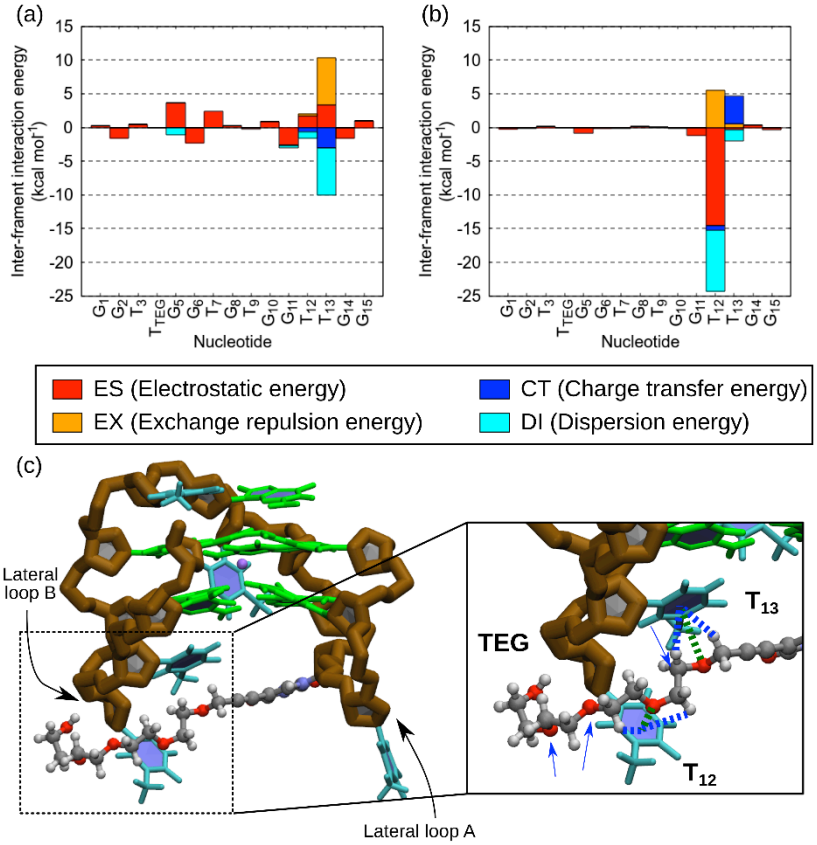


図 5. 各ヌクレオチドに対する T_{TEG} の (a) base-propynyl fragment 及び (b) TEG fragment の相互作用エネルギー。(c) Gq-T_{TEG} の全体構造とループ部位と相互作用する T_{TEG} の構造。緑色と青色の破線はそれぞれ孤立電子対–π 相互作用、CH–π 相互作用を示している。

4．考察

4－1．TEGによるグアニン四重鎖安定化機構

本研究における T_{TEG} の構造とグアニン四重鎖構造の相互作用解析の結果から、T_{TEG} が静電エネルギー及び分散力エネルギーによって、lateral loop A から B にかけて伸びた構造を形成していることが明らかになった。そこで、T_{TEG} と相互作用している T_{12} 及び T_{13} の周囲の構造を調べると、TEG fragment に含まれる酸素原子 (図 5c の青矢印で示した赤色の球) がこれらの塩基の付近に位置している。このことから、これらの酸素原子がチミン塩基内の分極した部位 (ケトン基やアミン基) と双極子–双極子相互作用 (静電エネルギー ES; 図 5b の T_{12} の赤色) で引き合っていることがわかった。また、TEG fragment

の酸素原子や CH の水素原子が T_{12} の π 平面の付近にあることから、分散力エネルギー (図 5b の T_{12} の水色) は酸素原子との孤立電子対–π 相互作用 (図 5c の緑破線) 及び TEG の CH の水素原子との CH-π 相互作用 (図 5c の青破線) に起因すると考えられる。これらの π 電子が関与する相互作用エネルギーは、一般的に −2.5 ～ −1.5 kcal mol^{-1} と言われており、水素結合の −7 ～ −1 kcal mol^{-1} に比べると多くの場合、かなり小さい [35]。しかしながら、図 5b の水色で示す分散力は −9.1 kcal mol^{-1} であった。その理由として、TEG の複数の酸素原子や CH の水素原子により、孤立電子対–π 相互作用や CH-π 相互作用が複数箇所で形成されたと推察される。従来、グアニン四重鎖構造の安定化には、G-quartet 中央のカチオンとグアニンの酸素原子との静電相互作用、グアニン間の水素結合、G-quartet 間のスタッキング相互作用が重要であると考えられてきた [36]。我々はこれまでほとんど考慮されてこなかった孤立電子対–π 相互作用や CH-π 相互作用を電子状態計算によって評価し、その結果、これらの複数の相互作用が水素結合のエネルギーに近い大きさの相互作用を生み出すことを示した。これらの孤立電子対–π 相互作用及び CH-π 相互作用がチミン塩基に化学修飾された TEG とグアニン四重鎖間で多く形成されることによって、lateral loop の A と B は長時間繋ぎ止められ、最終的にグアニン四重鎖構造を安定化したと考えられる。

我々は今回のシミュレーションにおいて、PEG の中でも比較的合成が容易な TEG をチミン塩基に化学修飾した。図 4 の結果は慣性半径が 5.5 Å 未満の TEG は lateral loop 間を繋ぎ止めず、安定化に寄与しない結果を示している。このことからグアニン四重鎖をより安定化させるためには、TEG fragment とグアニン四重鎖間の CH-π や孤立電子対–π 相互作用を多く形成させ、PEG がグアニン四重鎖から離れないように設計する必要がある。そのためには、PEG の鎖長を長くするか、T_{12} 及び T_{13} の塩基の π 平面と PEG が数多くの相互作用を形成できるように、例えば T_{12} 及び T_{13} の位置で分岐するような PEG 等を用いるのが有効であると考えられる。我々はこの PEG の長さとグアニン四重鎖の安定性について、オクタエチレングリコールまではグアニン四重鎖の安定性が増加することを既に実験により確認している [23]。分岐させた PEG 等の場合も、孤立電子対–π 相互作用や CH-π 相互作用を形成できる酸素原子や CH の数が増え、かつ分岐させることにより図 2a に示す G_{11} や G_{14} などの lateral loop B 周辺の塩基とも相互作用することができるので、分岐させた PEG でもグアニン四重鎖を安定化できると考えられる。

４－２．CH–π相互作用の活用

我々の結果は、細胞内環境における共溶質間、共溶質-核酸間の相互作用の一部も明らかにした。これまでの研究で、溶液中の PEG が G-quartet に結合し、安定化させることが報告されている [24]。この構造は PEG の CH が G-quartet のグアニン塩基の π 平面に対し垂直に位置していることから、我々の PEG と T_{12} 及び T_{13} の構造 (図 5c) と一致する。また、細胞内は核酸やタンパク質以外にも、グルコースやオスモライト、ペプチドのような低分子が込み合った環境になっている。これらの分子にも孤立電子対-π 相互作用を形成する酸素原子や CH-π 相互作用を形成できる炭化水素部位が多く存在する。したがって、本研究結果の T_{TEG} と T_{12} 及び T_{13} 間に形成された孤立電子対-π 相互作用や CH-π 相互作用はこれらの分子でも多く形成されると考えられる。これらの相互作用は最終的に核酸やタンパク質の安定性への寄与だけでなく、これらの相互作用によって水分子のようなネットワークを低分子同士が形成し、系内の分子の挙動にも影響する可能性もある。

また、このような CH-π 相互作用による安定化メカニズムは、四重鎖結合リガンドの開発にも有用な知見である。四重鎖結合性リガンドはほとんどがグアニン四重鎖の G-quartet を選択的に認識するため、広い π 平面を持つように設計されている。PEG は構造が柔軟で、グアニン四重鎖のループ部位の塩基とでも CH-π 相互作用は形成できることから、既存のグアニン四重鎖リガンドに PEG 修飾を施すことで、既存リガンドのグアニン四重鎖親和性をさらに向上できると期待される。

５．結論

我々は、アンチパラレル型 DNA グアニン四重鎖のループ部位に TEG とプロピニル基で化学修飾したデオキシチミンヌクレオチド T_{TEG} を導入した TEG 修飾オリゴヌクレオチドを開発した。本研究では、この修飾した DNA グアニン四重鎖の安定化メカニズムを解明するため、MD シミュレーションと電子状態計算で T_{TEG} の構造と、T_{TEG} と DNA グアニン四重鎖間の相互作用を解析した。その結果、導入された T_{TEG} は TEG 部位が折り畳まれた構造よりも、lateral loop A と B をつなぐように直線的な構造をとることが示された。T_{TEG} と lateral loop B の相互作用の解析には FMO 法による電子状態計算を用い、相互作用エネルギーを静電エネルギー、交換反発エネルギー、電荷移動エネルギー、分散力エネルギーの 4 種類に分けて定量的に解析した。その結果、T_{TEG} は主に lateral loop B の塩基 T_{12} 及び T_{13} と双極子–双極子、CH–π や孤立電子対–π 相互作用で結合していることが見出された。特に CH–π 相互作用や孤立電子対–π 相互作用は、単体では弱い相互作用ではあるが、TEG には相互作用可能な部位が多く、これらが複合的に相互作用することにより、水素結合と同程度かそれ以上の相互作用をすることがわかった。これらの相互作用は、TEG を伸ばした PEG や分岐させた PEG によってさらに大きくなり、グアニン四重鎖を大きく安定化させる可能性がある。また、我々の結果は、細胞内のような込み合った環境下にある他の核酸やタンパク質、代謝産物などの間でも、CH–π 相互作用や孤立電子対–π 相互作用が構造の安定化や反応に関与していることを示唆し、リガンドの設計においてもこのような相互作用活用が有効であることも示された。

６．謝辞

本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業、文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究「分子夾雑化学」(JSPS 科研費 JP17H06351)、甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金、岡崎一雄先端科学研究奨励助成金、伊藤忠兵衛基金文化厚生事業助成金等により実施されたことを記し、謝意を表します。

７．参考文献

1. H. Tateishi-Karimata, N. Isono, N. Sugimoto, *PLoS ONE*, **9**, e90580 **(**2014**)**.
2. M. Hagihara, L. Yamauchi, A. Seo, K. Yoneda, M. Senda, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 11171–11178 **(**2010**)**.
3. T. Endoh, Y. Kawasaki, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 5522–5526 **(**2013**)**.
4. H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 642–651 **(**2018**)**.
5. C. Marchetti, A. Minarini, V. Tumiatti, F. Moraca, L. Parrotta, S. Alcaro, R. Rigo, C. Sissi, M. Gunaratnam, S. A. Ohnmacht, S. Neidle, A. Milelli, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 3819–3830 **(**2015**)**.
6. A. De Cian, G. Cristofari, P. Reichenbach, E. De Lemos, E. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, K. Shin-ya, L. Lacroix, J. Lingner, J.-L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 17347–17352 **(**2007**)**.
7. A. Arora, C. Balasubramanian, N. Kumar, S. Agrawal, R. P. Ojha, S. Maiti, *FEBS J.*, **275**, 3971–3983 **(**2008**)**.
8. J. M. Nicoludis, S. P. Barrett, J. L. Mergny, L. A. Yatsunyk, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5432–5447 **(**2012**)**.
9. T. Miyazaki, Y. Pan, K. Joshi, D. Purohit, B. Hu, H. Demir, S. Mazumder, S. Okabe, T. Yamori, M. Viapiano, K. Shin-ya, H. Seimiya, I. Nakano, *Clin. Cancer Res.*, **18**, 1268–1280 **(**2012**)**.

10. Y. Esaki, M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato, S. Takenaka, *Chem. Commun.*, **50**, 5967–9 **(**2014**)**.
11. M. Micco, G. W. Collie, A. G. Dale, S. A. Ohnmacht, I. Pazitna, M. Gunaratnam, A. P. Reszka, S. Neidle, *J. Med. Chem.*, **56**, 2959–2974 **(**2013**)**.
12. R. Perrone, E. Butovskaya, S. Lago, A. Garzino-Demo, C. Pannecouque, G. Palù, S. N. Richter, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **47**, 311–316 **(**2016**)**.
13. E. Ruggiero, S. N. Richter, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3270–3283 **(**2018**)**.
14. D. Miyoshi, S. Matsumura, S. Nakano, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 165–169 **(**2004**)**.
15. D. Miyoshi, K. Nakamura, H. Tateishi-Karimata, T. Ohmichi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3522–3531 **(**2009**)**.
16. H. Tateishi-Karimata, S. Nakano, N. Sugimoto, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **53**, 7.19.1-7.19.17 **(**2013**)**.
17. S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.*, **114**, 2733–2758 **(**2014**)**.
18. S. Nakano, N. Sugimoto, *Mol BioSyst*, **13**, 32–41 **(**2017**)**.
19. R. Buscaglia, M. C. Miller, W. L. Dean, R. D. Gray, A. N. Lane, J. O. Trent, J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7934–7946 **(**2013**)**.
20. S. Katayose, K. Kataoka, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 160–163 **(**1998**)**.
21. U. Lächelt, E. Wagner, *Chem. Rev.*, **115**, 11043–11078 **(**2015**)**.
22. H. Tateishi-Karimata, T. Muraoka, K. Kinbara, N. Sugimoto, *ChemBioChem*, **17**, 1399–1402 **(**2016**)**.
23. H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, T. Muraoka, P. Podbevsek, A. M. Wawro, S. Tanaka, S. Nakano, K. Kinbara, J. Plavec, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 7021–7030 **(**2017**)**.
24. V. Limongelli, S. De Tito, L. Cerofolini, M. Fragai, B. Pagano, R. Trotta, S. Cosconati, L. Marinelli, E. Novellino, I. Bertini, A. Randazzo, C. Luchinat, M. Parrinello, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **125**, 2325–2329 **(**2013**)**.
25. V. M. Marathias, P. H. Bolton, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1969–1977 **(**2000**)**.
26. A. Pérez, I. Marchán, D. Svozil, J. Sponer, T. E. Cheatham, C. A. Laughton, M. Orozco, *Biophys. J.*, **92**, 3817–3829 **(**2007**)**.
27. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian09 Revision D.01, (2013).
28. B. H. Besler, K. M. Merz, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.*, **11**, 431–439 **(**1990**)**.
29. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1157–1174 **(**2004**)**.
30. D. A. Case, J. T. Berryman, R. M. Betz, D. S. Cerutti, I. T.E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, P. A. Kollman, The Amber biomolecular simulation programs, (2015).
31. J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, *J. Comput. Phys.*, **23**, 327–341 **(**1977**)**.
32. S. Tanaka, Y. Mochizuki, Y. Komeiji, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 10310–10344 **(**2014**)**.
33. K. Fukuzawa, C. Watanabe, I. Kurisaki, N. Taguchi, Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Tanaka, Y. Komeiji, *Comput. Theor. Chem.*, **1034**, 7–16 **(**2014**)**.
34. K. Fukuzawa, I. Kurisaki, C. Watanabe, Y. Okiyama, Y. Mochizuki, S. Tanaka, Y. Komeiji, *Comput. Theor. Chem.*, **1054**, 29–37 **(**2015**)**.
35. M. Nishio, Y. Umezawa, J. Fantini, M. S. Weiss, P. Chakrabarti, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 12648 **(**2014**)**.
36. A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray, J. O. Trent, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5482–5515 **(**2008**)**.

2018 年 8 月 7 日受領
2018 年 9 月 26 日採択

総　合　論　文

私の研究

RNA 四重鎖構造による翻訳変調

Modulation of translation through RNA G-quadruplex

甲南大学　先端生命工学研究所
遠藤玉樹
Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), Konan University
Tamaki Endoh
(t-endoh@konan-u.ac.jp)

Abstract: Nucleic acids (DNA and RNA) are not the molecules that only store genetic information in their nucleotide sequences. DNA and RNA form various types of non-canonical tertiary structures and are involved in the modulation of gene expressions. The stabilities of the non-canonical nucleic acid structures largely depend on solution conditions such as pH and ionic strength. We hypothesize that the non-canonical nucleic acid structures function as a new dimensional genetic code that modulate gene expressions depending on the intracellular chemical conditions. G-quadruplex (G4) is one of the non-canonical nucleic acid structures. G4 structures are drastically stabilized under cell-like molecular crowding conditions. Here, we demonstrate that the RNA G4 in open reading frame of mRNA suppresses the ribosome progression during translation elongation and affects various biological reactions such as ribosomal frameshift and co-translational protein folding.

1. 緒言

「遺伝子」とはある種の概念的な言葉であり、物質としてのその正体は「DNA」である。生命は、DNAの塩基配列に保存された遺伝情報を読み取り、主たる機能分子であるタンパク質を産出する。この過程は、遺伝子発現、あるいはセントラルドグマと呼ばれる。セントラルドグマを扱う生命科学系の教科書では、その導入部において、シンプルなイラストで遺伝子の発現過程が描かれていることが多い。DNAは二重鎖、転写されるRNAは一本鎖、翻訳されるタンパク質は高次構造を形成している（図1A）。このことは、DNAやRNAといった核酸は一次配列（塩基配列）が重要であり、タンパク質は高次構造が重要であることを示しているように感じられる。つまり、核酸は情報を担う分子であり、タンパク質は機能を担う分子として描かれているとも言える。しかしながら核酸は、一次配列として遺伝情報を提供するだけではなく、タンパク質などと協働して遺伝子の発現過程を調節するという機能も有している。

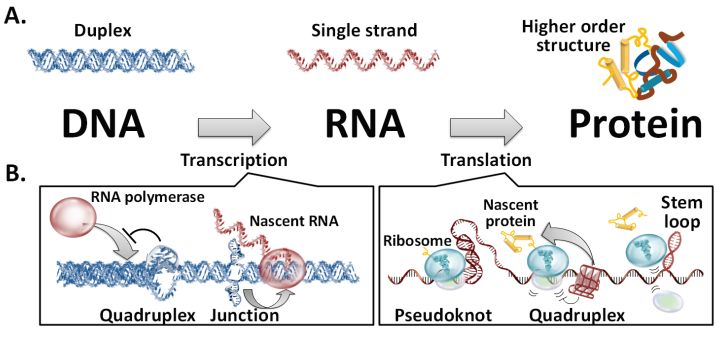


図 1　（A）一般的なセントラルドグマの模式図と（B）非標準核酸構造に影響される遺伝子の発現過程

筆者が所属する甲南大学先端生命工学研究所（FIBER）では、2003年の設立当初から、核酸が形成する構造の物理化学的な緒性質を定量的に解析する研究を進めてきた。特に、細胞内の環境を特徴付ける分子クラウディング環境に着目し、その環境を生体外で化学的に模倣する実験系を構築することで、核酸構造の熱安定性、形成速度、他の生体分子との相互作用などを詳細に解析している[1]。その成果の一例として、分子クラウディング環境中では、標準的な二重鎖構造が不安定化する一方で、三重鎖、四重鎖などを含む非標準的な高次構造（非標準核酸構造）が安定化される傾向にあることを示してきた[2]。また、多くの非標準核酸構造は、pHやカチオン濃度などに応答してその構造や熱安定性を大きく変化させることも示されている。このような成果に基づきFIBERでは、「分子クラウディング環境で安定化される傾向にある非標準核酸構造は、細胞内の時間や空間などに依存した化学環境の変化にも応答しつつ、転写反応や翻訳反応などの遺伝子の発現過程を一時的かつ可逆的に調節する機能を有しているのではないか？」と想定している（図1B）。筆者は2009年にFIBERに加わり、以降、生体外の模倣実験系で得られる非標準核酸構造の分子挙動と、細胞内における非標準核酸構造による遺伝子発現系への影響を相関させて議論する研究を進めてきた。その中でも本稿では、メッセンジャーRNA（mRNA）に形成されるRNA四重鎖構造による、翻訳伸長反応への影響を解析してきた研究成果を紹介する。

2. RNA四重鎖構造

グアニン四重鎖（G4）構造は、非標準核酸構造の中でも非常に特徴的である。四畳半の部屋に敷かれた畳のように配置された4つのグアニン塩基が、隣り合うグアニン同士でHoogsteen型の塩基対を形成したG-カルテットを基本とし、G-カルテットがスタッキング相互作用で積み重なることでG4構造が形成される（図2）。四畳半の中心に位置する半畳分のスペースには金属イオンが配位し、G4構造が安定化される。一般的には、DNAもしくはRNAの塩基配列中に、3塩基以上の連続したグアニンの配列が4カ所存在し、それらを比較的短い塩基配列（7塩基以下）が繋いでいる場合に安定なG4構造が形成される。翻訳反応の鋳型となるmRNAの場合、安定なG4構造を形成し得る配列は、5′非翻訳領域（untranslated region: UTR）に有意に多く存在していることが示されている[3]。また、癌などの疾患に関連する遺伝子から転写されるmRNAにおいて、5′ UTR に形成されるG4構造が、遺伝子の発現調節に関与していることが示唆されている[4]。一方で、mRNAの翻訳領域（open reading frame: ORF）については、G4構造を形成し得る配列が少なく、翻訳伸長反応に対してどのような影響をもたらすのかに関する知見はほとんどなかった。

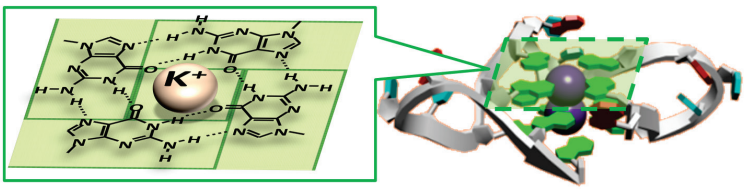


図 2　RNA が形成する平行型グアニン四重鎖の基本構造

3. RNA G4構造による翻訳変調

翻訳伸長を行うためには、リボソームはmRNAを一本鎖状態に解きつつ内部へと取り込む必要がある。そのため、ORF中に安定なG4構造が存在していた場合、翻訳伸長反応の速度低下や一時的な停滞（翻訳変調）が起こり、その結果として細胞内での遺伝子発現に影響を与えると考えられる。

3.1 翻訳伸長反応の停滞とタンパク質発現量の低下

ORF中に形成されるG4構造による翻訳伸長反応への影響を解析するために、筆者らは、「Synchronized Translation」という新たな解析手法を構築した[5]。この手法では、一段階目の反応で、翻訳反応を開始したリボソームを特定のコドンの位置で停止させて同調させる。そして、二段階目の反応で伸長反応を再開させ、伸長反応に伴う翻訳産物の長さの変化を継時的に解析する。筆者らは、大腸菌のゲノム配列を検索し、5つの遺伝子においてG4構造を形成する配列がORF中に存在することを見出した。これらの配列を有する

mRNAを調製し、「Synchronized Translation」による翻訳伸長反応を解析した結果、G4構造の手前で伸長反応が停滞することが明らかとなった（図3A）[6]。*in vitro*での明確な結果が示されたため、細胞内でも同じような影響があるのかどうかを確かめた。レポーター遺伝子を構築してタンパク質の発現量への影響をヒト由来の細胞株を用いて評価した。その結果、G4構造を形成する配列を有するmRNAからのタンパク質の発現量は、同じアミノ酸配列をコードしつつG4構造を形成しない配列を有するmRNAからの発現量よりも低くなることが示された[7]。つまり、細胞内でもG4構造によって翻訳伸長反応が停滞し、タンパク質の発現量が低下したと考えられる。

3.2 翻訳変調を利用した人為的なフレームシフトの制御

ウイルスなどのmRNAでは、翻訳伸長反応の途中でコドンの読み枠（フレーム）がずれ、1本のmRNAからC末端側のアミノ酸配列が異なる2種類のタンパク質が翻訳されることがある。フレームシフトと呼ばれるこの現象は、滑り配列と呼ばれるmRNA上の特徴的な配列と、その下流に形成されるステムループやシュードノットなどのmRNA構造によって引き起こされる。下流のmRNA構造は、翻訳伸長反応を一時的に停滞させ、滑り配列上で形成されているmRNA-tRNA間の塩基対のずれを誘起する[8]。天然のmRNAでの報告はないものの、筆者らは、G4構造による翻訳伸長反応の停滞が、フレームシフトを誘起するのではないかと予測した。人工的なmRNA配列を設計して検証を行った結果、滑り配列とG4構造形成配列を6塩基のスペーサーを隔てて配置することで、フレームシフトが起こることをヒト細胞内で明らかにした[9]。さらに、G4構造と相互作用してその構造安定性を増大させる化合物（ベルベリン）を利用し、フレームシフトの効率を低分子の化合物で制御できることも示した（図3B）。本研究成果は、基礎研究から明らかになった翻訳伸長反応を停滞させるというG4構造の特性を活用し、その熱安定性を変化させる化合物との併用により、人為的に遺伝子の発現過程（フレームシフト）を制御することに成功した好例である。

3.3 翻訳変調に依存したタンパク質構造の変化

細胞内で翻訳されるタンパク質は、リボソームから出てくるのと同時にN末端側から順に構造が形成される。伸長反応の途中で翻訳変調が起こると、タンパク質の構造や会合体の形成過程に影響を与え、結果的に翻訳されるタンパク質の機能に変化が生じる可能性が考えられる[10]。このことから、mRNA上に形成されるG4構造が、細胞内の化学環境に応答してタンパク質の構造を調節する「Protein Folding Code」として機能しているのではないかと想定した。そこで、ORF中で特徴的な位置にG4構造形成配列を有する遺伝

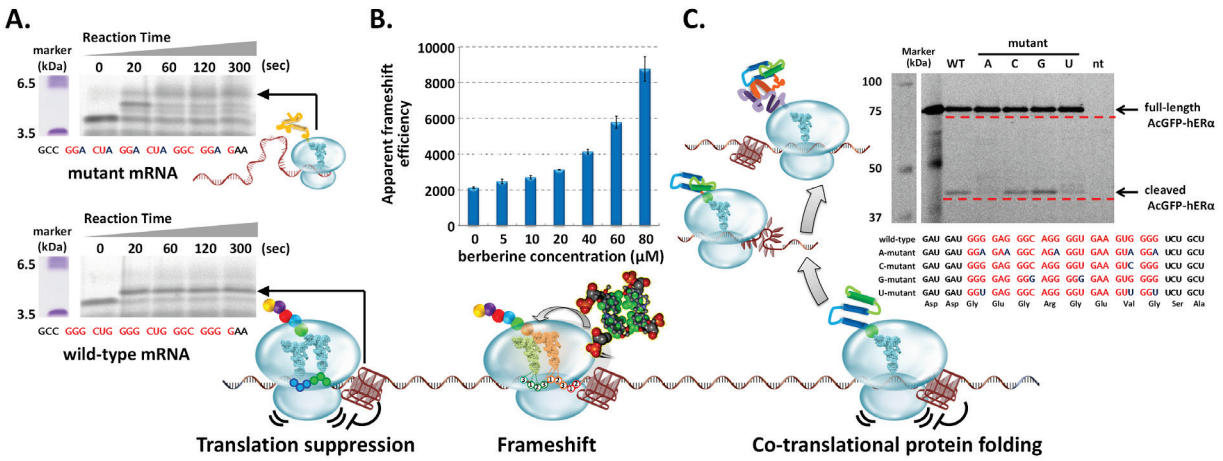


図 3　ORF 中に形成された RNA G4 構造による翻訳変調と遺伝子の発現過程への影響
（A）RNA G4 構造は、翻訳伸長反応の一時的な停滞を引き起こす。（B）一時的な翻訳伸長反応の停滞は、上流に配置された滑り配列と共にフレームシフトを誘起する。（C）hERα の mRNA では、G4 構造の熱安定性に依存した翻訳伸長反応の停滞が、hERα の構造形成過程（co-translational protein folding）と細胞内での分解挙動に影響を与える。

子を検索し、ヒトエストロゲンレセプターα（hERα）のmRNAに着目した。hERαのmRNAでは、G4構造形成配列が、DNA結合ドメインとリガンド結合ドメインをつなぐヒンジ（蝶番）領域をコードしている。筆者らは、同じアミノ酸配列をコードしつつも、異なる熱安定性のG4構造を形成する変異配列を作製し、これらの変異配列を持つhERαのmRNAをヒト細胞内で発現させた。その結果、G4構造を形成するmRNAから発現させたhERαでは、完全長の翻訳産物の他に、完全長よりも小さな分子量を有するhERαが存在していることが確認された（図3C）[11]。この小さな分子量のhERαを解析したところ、hERαが特定の位置で切断された産物であることが分かった。さらに、mRNAが形成するG4構造が安定であればあるほど、切断された産物の量が多くなることも明らかになった。この研究成果より、G4構造の熱安定性に依存した翻訳伸長反応の停滞が、翻訳反応途中のhERαの構造形成過程と、その後の細胞内でのhERαの分解挙動にまで影響を及ぼすことが示された。

3.4 G4構造のダイナミクスが影響する翻訳変調

翻訳反応途中にタンパク質がN末端側から構造を形成していくのと同様に、転写反応途中のmRNAも5′側から順に構造を形成していく。一般的にRNA G4構造は、ヘアピン構造などのその他のRNA二次構造と比較して形成速度が遅い。そのため、G4構造を形成するグアニンに富んだ配列の周囲にシトシンに富んだ配列が存在していた場合、転写反応と共にG–C塩基対を有する二次構造が優先的に形成され、転写反応後に安定なG4構造への構造遷移が起こると予想される。筆者らは、転写反応途中のG4構造の形成をリアルタイムに検出できる実験手法を構築し、予想通りに転写反応後に二次構造からG4構造への構造遷移が起こることを明らかにした[12]。このようなG4構造の形成に関するダイナミックな特性は、転写反応後にどのようなタイミングで翻訳反応が起こるのかに依存して、mRNAの翻訳効率が異なってくる可能性を示している（図4A）。また、G4構造の解離に関する分子挙動も翻訳効率に影響を及ぼす。筆者らは、ORF中のG4構造の位置を1塩基ずつずらしたmRNAを構築し、タンパク質の発現量への影響を解析した。その結果、同じG4構造であっても翻訳効率に与える影響が異なり、3塩基ごとの周期性でその効率が変化することを明らかにした（図4B）[13]。この周期性は、翻訳伸長を行うリボソームの機械的な動きと関連付けられる。リボソームは、アミノ酸を1つ伸長するごとにトランスロケーションを起こしてmRNA上を3′側に3塩基分移動する。G4構造によって翻訳伸長反応の停滞が起こった際、リボソームがG4構造を解いて伸長反応を継続する効率が、リボソームと下流のG4構造の位置関係に依存すると考えられる。最も効率が抑えられた位置関係では、1回のトランスロケーションでG4構造を解離させる必要がある（One-step unfolding）のに対し、それ以外の位置関係では、2回のトランスロケーションを起こしつつG4構造を解離させることができる（Two-step unfolding）と予測された（図4C）。

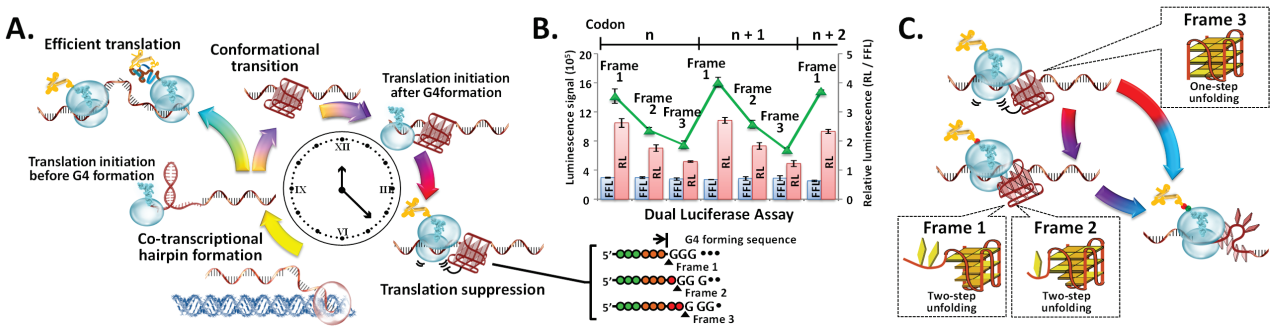


図 4　G4 構造の形成と解離過程が影響する翻訳効率
（A）転写反応直後の二次構造が形成されている状態で翻訳が開始された場合は効率良く翻訳伸長反応が進むのに対し、G4 構造が形成されてから翻訳が開始された場合は翻訳伸長反応の停滞が起こる。（B、C）ORF 中に存在する G4 構造の位置によって G4 構造の解離過程（一段階解離か、二段階解離か）が異なり、翻訳効率が周期的に変動する。

4. まとめ

mRNAのORF中に形成されるG4構造は、その熱安定性に応じて翻訳変調を引き起こし、遺伝子の発現過程を調節していると考えられる[7,9]。また、熱安定性だけではなく、構造の形成や解離に関するダイナミックな分子挙動が翻訳変調にも大きく影響する[12-14]。筆者が所属するFIBERでは、ごく最近、G4構造の形態（トポロジー）変化や、細胞内のイオン濃度変化に伴うG4構造の熱安定性変化が、翻訳と並ぶセントラルドグマの主要な反応である、複製反応や転写反応の効率に影響を及ぼすことも見出しつつある[15]。このように、G4構造に代表される非標準核酸構造は、塩基配列（一次情報）に基づいた遺伝情報の枠組みを超え、細胞内の化学環境、あるいは生体反応が進む場や反応速度などに応答する、高次情報（環境）依存型の遺伝子発現の調節暗号として機能していると考えられる。

5. 謝辞

本研究は、科学研究費補助金、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業、甲南学園平生太郎科学研究基金等の助成により遂行されました。研究をまとめる上でのご指導、ご助言をいただきましたFIBER所長，杉本直己教授にこの場を借りて感謝申し上げます。また、実験を担当していただいたFIBERの学生、研究開発スタッフの皆様に御礼申し上げます。

References

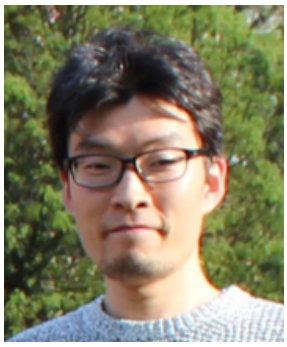
1. S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.*, **114**, 2733 (2014).
2. M. Trajkovski, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, T. Ohyama, S. Tanaka, J. Plavec, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 4301 (2018); 三好大輔, 造住有輝, 上田侑美, *日本核酸化学会誌*, **1**, 13 (2017).
3. J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res*, **33**, 2908 (2005).
4. A. Bugaut, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4727 (2012).
5. T. Endoh, Y. Kawasaki, N. Sugimoto, *Anal. Chem.*, **84**, 857 (2012).
6. T. Endoh, Y. Kawasaki, N. Sugimoto, *Methods*, **64**, 73 (2013).
7. T. Endoh, Y. Kawasaki, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 5522 (2013).
8. D. P. Giedroc, P. V. Cornish, *Virus Res.*, **139**, 193 (2009).
9. T. Endoh, N. Sugimoto, *Anal. Chem.*, **85**, 11435 (2013).
10. E. Natan, T. Endoh, L. Haim-Vilmovsky, T. Flock, G. Chalancon, J. T. S. Hopper, B. Kintses, P. Horvath, L. Daruka, G. Fekete, C. Pal, B. Papp, E. Oszi, Z. Magyar, J. A. Marsh, A. H. Elcock, M. M. Babu, C. V. Robinson, N. Sugimoto, S. A. Teichmann, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 279 (2018).
11. T. Endoh, Y. Kawasaki, N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 6222 (2013).
12. T. Endoh, A. B. Rode, S. Takahashi, Y. Kataoka, M. Kuwahara, N. Sugimoto, *Anal. Chem.*, **88**, 1984 (2016).
13. T. Endoh, N. Sugimoto, *Sci. Rep.*, **6**, 22719 (2016).
14. T. Endoh, N. Sugimoto, *Chem Rec.*, **17**, 817 (2017).
15. S. Takahashi, J. A. Brazier, N. Sugimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, 9605 (2017); H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 642 (2018).

2018 年 9 月25 日受領
2018年 10月12 日採択

総 合 論 文

私の研究

DNA 三重鎖構造を利用したヌクレオチドおよびヌクレオシドの turn-on 型蛍光プローブの開発



Development of fluorescent turn-on probes for nucleotides and nucleosides using DNA triple-helix structure

東京工業大学 生命理工学院
金森功吏

Tokyo Institute of Technology, School of Life Science and Technology
Takashi Kanamori
(tkanamori@bio.titech.ac.jp)

Abstract: So far, fluorescent nucleic acids probes composed of single stranded oligonucleotides with fluorescent dyes have been developed. Most of these fluorescent probes respond upon the duplex formations. From the structural point of view, beside the duplex formation, we focused on the DNA triple helix formation for the precise control of fluorescent signal. As fluorescent dyes, we utilized fluorescent molecular rotors, which show fluorescent turn-on response when they are irradiated under the condition in which their intramolecular motions are restricted. Here we describe fluorescent turn-on probes for the DNA or RNA oligonucleotides and nucleoside.

1. はじめに

蛍光分子は、周辺環境や分子内運動の変化によってその蛍光特性を大きく変化させる。核酸化学における蛍光プローブ開発では、標的核酸との二重鎖形成にともなう環境変化を感知する蛍光核酸プローブが多数研究されてきた[1-4]。一方で核酸は二重らせんの他にも三重らせんや四重らせんという複雑な高次構造体を形成できる。そこで筆者らは、三重らせんの構造体を利用すれば、蛍光分子の環境変化を二重らせん以上に精密に制御できるのではないかと考えた。このような環境変化に応答する蛍光分子として、分子内運動の抑制に応じて蛍光応答を示す”蛍光性分子ローター(fluorescent molecular rotors[5,6])”に注目した。本稿では、これらをDNA三重らせんに導入した我々の蛍光核酸開発について紹介する。

２．三重鎖形成に応答する蛍光核酸プローブの分子設計と合成

蛍光性分子ローター[5,6]は、自由に分子内運動できる環境下では光励起されても分子内回転運動等により無輻射失活して無(弱)蛍光となる。一方、高粘度環境下など分子内運動が拘束された環境下で光励起された場合は、蛍光として励起エネルギーを放出する性質をもつ。このような性質を示す蛍光分子の例として、チアゾールオレンジ、GFPの蛍光分子ベンジリデンイミダゾリノン骨格などが挙げられる。Seitzらは、チアゾールオレンジを核酸塩基の代わりに導入したペプチド核酸プローブを合成し、標的核酸との二重鎖形成に伴うチアゾールオレンジの分子内運動抑制により蛍光応答を示すプローブの開発に成功している[2,7]。Torらは、5位にフラン環を導入した蛍光性デオキシウリジンを報告している。このものは、高粘度溶媒であるグリセロール中で蛍光増大を示す蛍光性分子ローターであることを報告している[6]。

上述の例のように、これまでの一本鎖DNA/RNAを標的とした蛍光性核酸プローブは、プローブと標的核酸との二重鎖形成に基づくものが主流であった。一方我々は先行研究において、脱塩基部位を含む三重鎖形成核酸(TFO)と、5位に芳香族性置換基を導入したデオキシシチジン(C^{Ar})を含むDNA二重鎖の芳香族置換基が、TFOの脱塩基部位に収まる形で三重鎖形成可能であることを見出していた[8]。そこでC^{Ar}の代わりに蛍光性分子ローターを導入すれば、三重鎖形成に伴って蛍光応答を示すのではないかと考えた。

本研究では蛍光性分子ローターの基本骨格として、比較的強い蛍光を示す5-(ベンゾフラン-2-イル)デオキシウリジン(**U^{BF}**)を選択した[9](Fig. 1)。一方で、**U^{BF}**自体が蛍光を示すため、**U^{BF}**のベンゾフラン環の3位にメチル基を導入し(5-(3-メチルベンゾフラン-2-イル)デオキシウリジン(**U^{MBF}**))、二つの芳香環の二面角にメチル基の立体障害によってねじれを与え、無輻射失活により消光させることを考えた(Fig. 1)。ウラシル環とベンゾフラン環のねじれは、三重鎖形成に伴う上下塩基とのスタッキングにより共平面に拘束され、蛍光が回復すると考えた。まず、量子化学計算を行って、メチル基が与える回転障壁エネルギーを調べた(Fig. 2)。その結果、共平面から約33度ねじれた配座が最安定となり、共平面への変化に伴っておよそ1～1.5 kcal/molのエネルギー障壁があることが分かった[10]。このことから、三重らせん形成によって十分制御できると考えた。

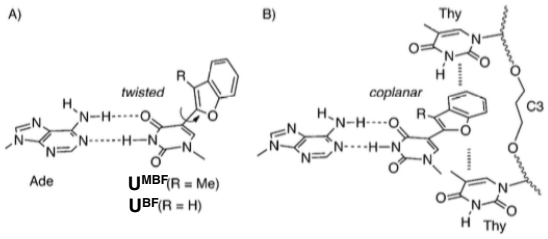


Figure 1. The structure of U^{MBF} in A) duplex and B) triplex DNA.

つづいて**U^{MBF}**の合成を行った。3-メチルベンゾフランおよびデオキシウリジンを原料として、Scheme 1に示すように鈴木宮浦カップリングを行い、目的の**U^{MBF}** (**2**)を得た。つづいて、このヌクレオシドの蛍光特性を調べた。その結果、**U^{BF}**の水中での蛍光量子収率は0.19であるのに対して[9]、**U^{MBF}**では0.003と大きく減弱し[10]、ねじれにより消光されることが分かった。そこで、このヌクレオシドのホスホロアミダイトユニット(**4**)を合成してオリゴヌクレオチドに導入し、三重鎖形成に伴う蛍光応答を調べた。

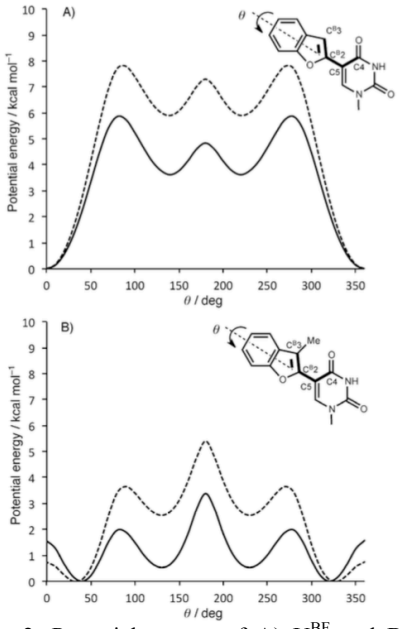
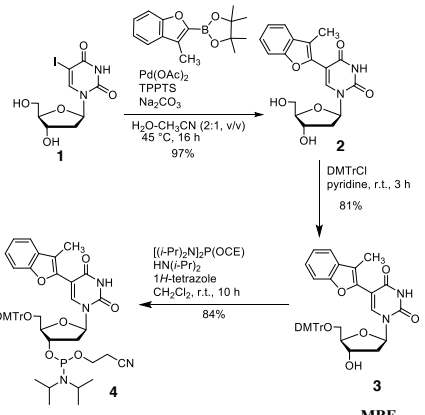


Figure 2. Potential energy of A) U^{BF} and B) U^{MBF}. Dash line is derived from gas phase calculations and solid line is derived from calculation with correction of solvent (water) effect.

３．三重らせん形成に伴う蛍光応答の評価

Fig. 3に示す配列を用い、三重鎖形成に伴う蛍光応答を調べた。ここではTFOを第三鎖と呼び、第三鎖と相互作用する鎖を第二鎖、第二鎖とワトソン・クリック塩基対を形成する鎖を第一鎖と称する。第一鎖を**target DNA**または**target RNA**とし、第二鎖および第三鎖をそれぞれ**probe 1**および**probe 2**として用いた。その結果、**probe 1**および**probe 2**の混合溶液では弱蛍光であるのに対し、標的となる**target DNA**または**target RNA**存在下では、それぞれ32倍または22倍の蛍光強度の増大が見られ、三重鎖形成に伴う蛍光検出に成功した(Fig. 3)[10]。つぎに、この蛍光応答がベンゾフラン環とウラシル環のねじれ角変化によるものか調べるため、$\mathbf{U}^{\mathbf{MBF}}$を組み込んだ三重鎖DNAのNMR解析を行った。その結果、Fig. 4に示すようにベンゾフラン環とウラシル環が共平面になっていることが分かった[10]。NMR解析の結果と$\mathbf{U}^{\mathbf{MBF}}$の蛍光特性を合わせて考えると、この蛍光強度の上昇は共平面化および疎水性環境に収容されたことが要因と考えられる。



Scheme 1. Synthetic scheme of $\mathbf{U}^{\mathbf{MBF}}$ (**2**) and its phosphoramidite unit **4**.

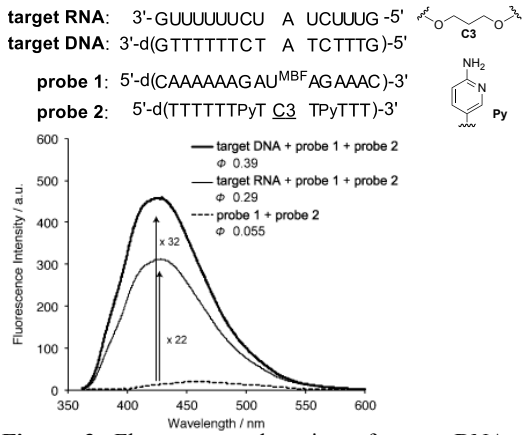


Figure 3. Fluorescence detection of target DNA or RNA using **probe 1** and **probe 2**. Py and C3 represent 2-aminopyridine C-nucleoside and trimethylene linker, respectively.

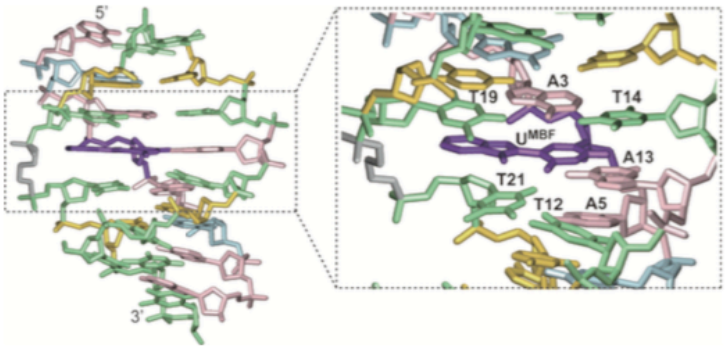


Figure 4. NMR-derived averaged structure of the DNA triplex incorporating $\mathbf{U}^{\mathbf{MBF}}$.

４．Turn-on型蛍光ヌクレオシドセンサーへの応用

前項では、三重らせんの第一鎖を標的核酸(DNAまたはRNA)とした蛍光検出について紹介した。一方、脱塩基部位を含む二重らせんには、リボフラビンが結合し蛍光検出できることが知られている[11]。また、脱塩基部位を有する三重鎖DNAをもちい、生体内でシグナル伝達に関与するアデノシンや酸化損傷塩基である8-オキソグアニンなどの標的ヌクレオシドが結合すると、蛍光が減弱する蛍光センサーが報告されている[12,13]。そこで、我々の三重鎖形成に伴って蛍光応答する三重らせんを、turn-on型蛍光ヌクレオシドセンサーへ応用することを試みた。そこでFig. 5に示すように、第二鎖に導入した$\mathbf{U}^{\mathbf{MBF}}$の隣接位に脱塩基部位を導入し、アデノシン結合サイトを形

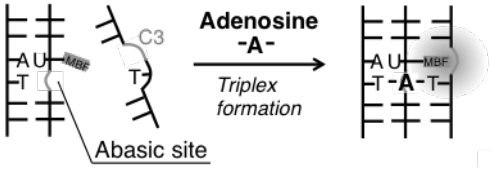


Figure 5. Design of adenosine sensor using triplex DNA.

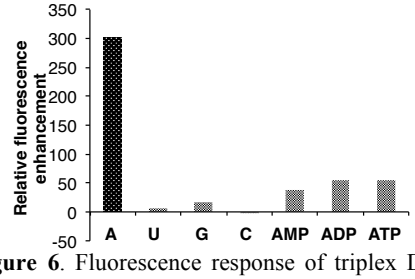
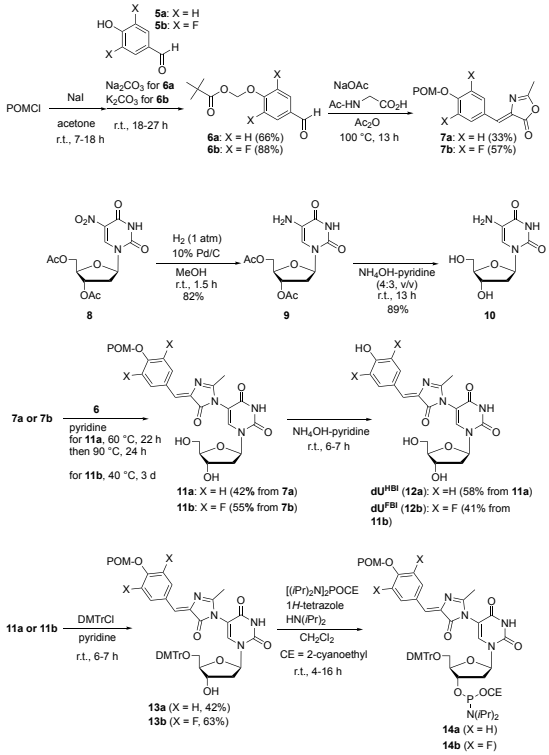


Figure 6. Fluorescence response of triplex DNA based sensor.

成した。この三重鎖に対して、種々のヌクレオシドを添加したところ、アデノシン選択的に蛍光応答する、turn-on型蛍光ヌクレオシドセンサーとなることが分かった(Fig. 6)。

５．GFP色素アナログを用いたTurn-on型蛍光センサーへの応用

前項までは蛍光性分子ローターとして蛍光核酸$\mathbf{U^{MBF}}$を用いた。この蛍光核酸は基底状態でねじれるよう設計されており、共平面構造に拘束された状態で励起されると強い蛍光を示す。一方、基底状態で平面構造でも、励起状態においてねじれを伴う分子内運動によって無(弱)蛍光になる蛍光性分子ローターが多数知られている。このような性質を示す色素の例として、GFP色素アナログ、4-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン骨格がある。そこでGFPをミミックし、三重らせん構造の中心にGFP色素アナログを導入することを思い立った。Scheme 2に示すようにウラシル環の5位にベンジリデンイミダゾリノン骨格を導入した$\mathbf{U^{HBI}}$、$\mathbf{U^{FBI}}$を合成し、これらを三重鎖DNAに導入して蛍光特性を調べた。



Scheme 2. Synthetic scheme of $\mathbf{U^{HBI}}$ and $\mathbf{U^{FBI}}$ and their phosphoramidite units.

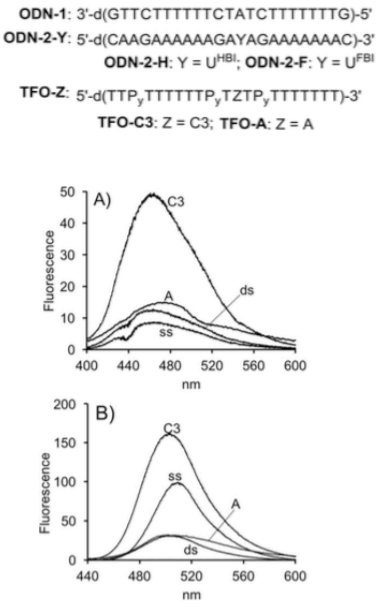


Figure 7. Fluorescence responses of A) **ODN-2-H** and B) **ODN-2-F** in their single-strand states (**ss**), as duplexes with **ODN-1** (**ds**), as triplexes **ODN-1**/**ODN-2-Y**/**TFO-C3** (**C3**), and as triplexes **ODN-1**/**ODN-2-Y**/ **TFO-A (A)**.

その結果、さらなる蛍光応答の改善が必要ではあるが、$\mathbf{U^{HBI}}$、$\mathbf{U^{FBI}}$のいずれの場合においても、三重らせんを形成するのにともなってGFP色素由来の蛍光が増大することが分かった(Fig. 7)[14]。また、異なる蛍光波長をもつGFP色素アナログを用いることで、異なる2色の蛍光核酸プローブの開発に成功した。

６．おわりに

本稿では、蛍光性分子ローターを用い、DNA三重らせん形成を基盤とした蛍光プローブ開発について紹介した。一本鎖核酸を用いた蛍光核酸プローブと比較して、必要となる核酸分子が増えるなどの課題はあるが、構造の多様さの利点を活かせば、一本鎖DNAやRNAのほか、アデノシンなどのヌクレオシドの検出にも適用できる。また、GFP色素アナログのように異なる蛍光性分子ローターを導入すれば、異なる蛍光

波長での検出への展開も可能となることがわかった。

近年では、蛍光性分子ローターを用いた蛍光核酸プローブは二重鎖RNAを標的とするもの[15]や、細胞内RNAイメージングへと発展している[2]。また、GFP色素誘導体に結合するRNAアプタマーを用いた細胞内RNAイメージングへの研究が進んでいる[16]。今後もこれらの蛍光核酸プローブの進展に期待したい。

７．謝辞

本研究は、東京工業大学生命理工学院、関根光雄名誉教授、清尾康志准教授のご指導のもと行われました。これらの成果は、学生諸氏のたゆまぬ努力の賜物であります。$\mathbf{U}^{\mathbf{MBF}}$を導入した三重らせん構造解析に関して、武蔵野大学、武藤裕教授のグループにNMR解析を行って頂きました。また、本研究を遂行するにあたり、文科省JSPS科研費(25810094)の助成を頂きました。この場をお借りして関係各位に深謝申し上げます。

References

1 A. Okamoto, Y. Saito, I. Saito, *J. Photochem. Photobiol.*, **6**, 108 (2005).

2 F. Hovelmann, O. Seitz, *Acc. Chem. Res.*, **49**, 714 (2016).

3 R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.*, **110**, 2579 (2010).

4 H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 7044-7047.

5 M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 1669 (2007).

6 R. W. Sinkeldam, A. J. Wheat, H. Boyaci, Y. Tor, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 567 (2011).

7 O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2203 (1999).

8 a) M. Mizuta, J. Banba, T. Kanamori, R. Tawarada, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 9622 (2008); b) T. Kanamori, Y. Masaki, M. Mizuta, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine and K. Seio, *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 1007 (2012).

9 A. A. Tanpure, S. G. Srivatsan, *ChemBioChem*, **13**, 2392 (2012).

10 T. Kanamori, H. Ohzeki, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Takahashi, K. Tsuda, T. Ito, M. Shirouzu, K. Kuwasako, Y. Muto, M. Sekine, K. Seio, *ChemBioChem*, **16**, 167 (2015).

11 N. B. Sankaran, S. Nishizawa, T. Seino, K. Yoshimoto, N. Teramae, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1563 (2006).

12 M. Patel, A. Dutta, H. Huang, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 3035 (2011).

13 Q. Zhang, Y. Wang, X. Meng, R. Dhar, H. Huang, *Anal. Chem.*, **85**, 201 (2013).

14T. Kanamori, A. Takamura, N. Tago, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio, *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 1190 (2017).

15 T. Sato, Y. Sato, S. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 9397 (2016).

16 J. S. Paige, K. Y. Wu, S. R. Jaffrey, *Science*, 2011, **333**, 642 (2011).

2018 年 10 月 12 日受領
2018 年 11 月 5 日採択

総　合　論　文

私の研究

(6-4)光回復酵素によるDNA認識および修復機構

DNA recognition and repair by the (6–4) photolyase

大阪大学大学院基礎工学研究科
山元　淳平
Graduate School of Engineering Science, Osaka University
Junpei Yamamoto
(yamamoto@chem.es.osaka-u.ac.jp)

Abstract: The reaction mechanism of the (6–4) photolyase, a flavoenzyme responsible for light-dependent DNA repair of the pyrimidine(6–4)pyrimidone photoproduct using blue light in sunlight, has so far remained ambiguous for 20 years after its discovery. In this study, a transient absorption system that sensitively detects the DNA repair reaction of the (6–4) photolyase was constructed. The setup using a special substrate containing both dihydrothymine and the (6–4) photoproduct unraveled a long-standing question, and we found that repair of the (6–4) photoproduct by the (6–4) photolyase requires two photons. The first photon leads to formation of the enzyme-intermediate complex with a lifetime of 100 s at 10°C, and the second photon exciting the intermediate complex yields the repaired product. This mechanism implies that, nature uses more photons when the reaction is more complicated, in the same way as the water splitting in the photosynthesis.

1. はじめに

生命の設計図であるDNAは内因性および外因性の様々な環境要因により絶えず化学反応を受け、従来の化学構造が変化した損傷DNAが形成される。これらの損傷DNAは、正確なDNA複製過程を阻害し、突然変異やがん化の原因となるため、生体はこの損傷DNAを除去し、正しい化学構造へと修復することでゲノム恒常性を維持する機能を有する。このようなDNA修復は大腸菌からヒトを含む高等生物まで幅広く保存されており、DNA修復の分子機構研究についてDr. Tomas Lindahl、Dr. Paul Modrich、およびDr. Aziz Sancarの三名が2015年にノーベル化学賞を受賞している。

DNA修復機構の中でも、光回復と呼ばれる現象は紫外線によって形成される損傷DNAを青色光依存的に修復する機構であり、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を酸化還元補酵素として有するフラビンタンパク質の一つである光回復酵素が単一で機能し、紫外線損傷DNAを認識・修復する[1]。紫外線損傷DNAには大別して2種類あり(図1)、隣接ピリミジン塩基のC5–C6二重結合同士の[2+2]光環化反応により形成されるシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)、および5'側塩基のC5–C6二重結合と3'側塩基のC4–O4間での反応で形成されるピリミジン(6–4)ピリミドン光産物((6–4)光産物、(6–4)PP)のそれぞれに特異的な光回復酵素が存在する。CPD光回復酵素は1978年にSancarらによって遺伝子組換えタンパク質が得られ[2]、(6–

4)光回復酵素は1993年に藤堂らによって発見され遺伝子組換えタンパク質が得られている[3]。いずれの場合でも、2電子還元状態のFADH⁻から損傷への光依存的電子移動が鍵反応であり、これにより損傷DNAの塩基間架橋結合が解裂し、元のDNA構造へと戻る[4,5]。

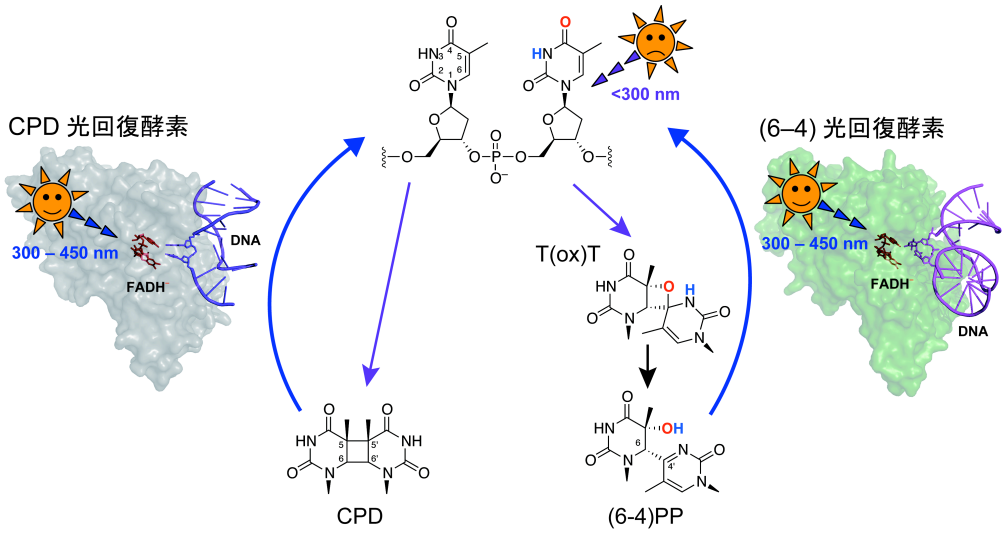


図1　紫外線損傷DNAの形成と光回復酵素によるDNA修復

２．(6-4)光回復酵素の修復反応機構研究

(6–4)光回復酵素は1993年に発見されて20余年が経過した現在でも、いまだに修復反応機構の決定に至っていない。CPD光回復酵素によるCPD修復とは異なり、(6–4)光回復酵素による(6–4)光産物修復は単純な共有結合の解裂では達成されず官能基の再配置が必要であるため(図1)、より複雑な反応が含まれることが発見初期から予想されていた。(6–4)光回復酵素のDNA–タンパク質共結晶構造が2008年に解かれ[6]、その構造を元にして計算科学研究による修復経路の同定が試みられてきたが[1]、様々な修復経路が提唱されるにとどまり、画一的な修復経路の同定には至っていない。これら計算科学研究では、一例[7]を除いてその多くはCPD光回復酵素の場合と同様に1光子反応で修復が進行することを前提としていた。しかし、(6–4)光回復酵素によるDNA修復反応に必要な光子数を決定した例はなく、これを実験的に決定することが急務であると考えた。

2.1 DNA修復反応検出系

セットアップ　筆者らは、光依存的DNA修復に伴う(6–4)光産物の消失と修復産物の形成を、励起光の光子条件を整えた上で追跡することを計画した。報告されているFADH⁻から損傷DNAへの電子移動の時定数(225 ps)よりも短い半値全幅を持つ100 psシングルターンオーバーレーザーフラッシュを励起光源とすることで、酵素を仮想的に1光子ずつ励起し、それに伴う(6–4)光産物由来の325 nm吸収の減少、および形成される修復産物由来の265 nm吸収の増大をリアルタイムで検出する過渡吸収測定のセットアップを構築した(図2)。

基質　光修復反応に伴う紫外部の吸収増大を感度良く検出するために、(6–4)光産物以外の核酸塩基をジヒドロチミン(DHT)へと変換した基質を合成した(図2)。DHTを使用する基質デザインはCPD光回復酵素によるCPD修復研究の際に考案されており[8]、当初は報告されている配列(d(HHHHT(CPD)THHHT))中のCPDを(6–4)光産物へと変換した基質を用いたが、CPD光回復酵素の先行研究とは異なり、この配列の

基質では通常核酸塩基を有する基質よりも修復効率が低いことがわかった。そこで、配列中に1つ含まれる通常核酸塩基の位置を種々検討したところ、損傷部位の3'側に通常塩基を含む配列でのみ（図2）、通常基質と同程度の反応量子収率を示したため、この配列のオリゴヌクレオチドを実験に用いた。なお、筆者らのその後の研究により、修復活性を持つ(6–4)光回復酵素のDNA-タンパク質複合体の形成には、損傷部位の3'側に存在する隣接核酸塩基とタンパク質活性中心近傍に存在する保存されたアルギニン側鎖との間で形成される静電相互作用およびCH–π相互作用が必要であることが明らかにされている[9]。

酵素　アフリカツメガエル由来(6–4)光回復酵素を遺伝子組換えタンパク質として得た。遺伝子組換え体は酸化型のFADを有しており、修復活性を持つ2電子還元型$FADH^-$を有するタンパク質を得るためには、嫌気的条件下かつ還元剤存在下でサンプルを調製する必要がある。そこで、酸素濃度が数ppmに維持されたグローブボックス内でサンプルを調製することで、$FADH^-$を有するタンパク質を安定に取り扱った。

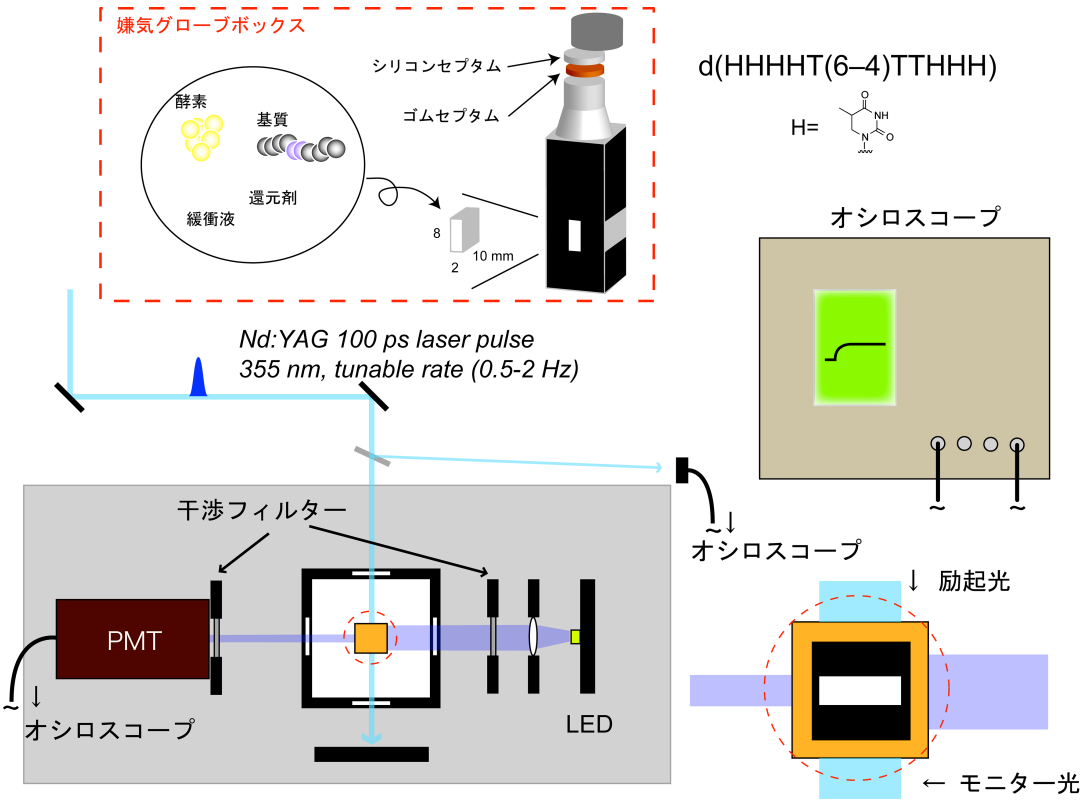


図2　実験のセットアップ

2.2 結果

265 nmおよび325 nmのモニター光で検出した光励起に伴う吸収変化を図3(a)に示す。1パルスによる励起で得られたシグナルと連続的に8回分励起を繰り返し積算したシグナルを比較すると、325 nmにおいては積算の前後でシグナル減少強度に大きな差はなく、どちらも0.3 mOD程度減少が観測されたことから、1パルスで(6–4)光産物が消失していることがわかる。一方、265 nmにおいては大きな違いが観測され、8回積算したシグナルでは265 nm吸収の大きな増大（0.7 mOD）が観測されたのに対し、1パルスではそのような増加は観測されなかった。このことから、(6–4)光回復酵素による修復は1光子では達成できず、中間体Xを経由する逐次的2光子反応であることが示唆された（図3(b)）。さらなる実験により、その中間体は10°Cにおいて約100秒の時定数で暗状態へと失活することが明らかとなった。つまり、1光子目の光反応では寿命100秒の準安定中間体が形成され、中間体-酵素複合体において2光子目の光反応が起こることで修復が完了する新たなスキームを提唱した[10]。

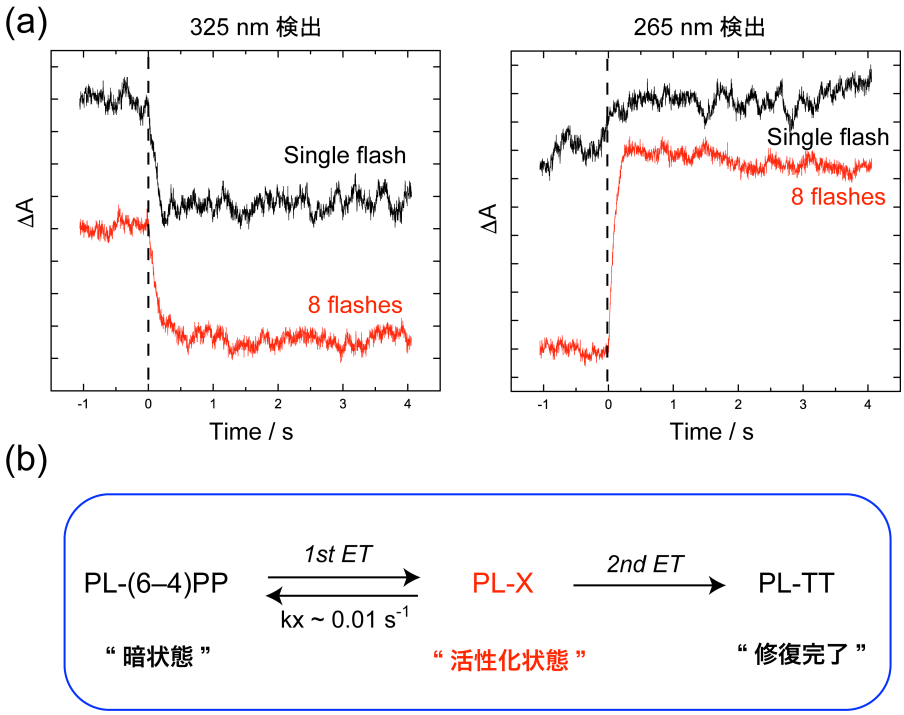


図3 (a) シングルターンオーバーレーザー励起による修復反応検出、(b) 逐次的2光子DNA修復反応

３．考察

本研究から、(6–4)光回復酵素によるDNA修復は、理論計算研究で一例[7]のみ報告されている逐次的2光子反応機構を採用していることが明らかとなった。暗状態への失活を考慮に入れ、得られたデータを解析したところ、1光子目による反応量子収率は約7%、2光子目による反応量子収率は約83%であることがわかった。つまり、中間体Xから修復産物への光反応はCPD光回復酵素による修復と同様に高効率に起こることから、中間体Xの構造は (6–4)光産物形成時の中間体であるオキセタン4員環を含む構造（図1）が有力であると考えている。しかし、現在までに中間体Xの化学構造に関する決定的な証拠を得るに至っていない。上記の実験の結果、中間体は紫外部および可視領域に電子遷移吸収帯を持っていないため、中間体の構造を捉えるためには、振動分光、もしくはX線自由電子レーザーを用いた時分割X線結晶構造解析が必要である。計算科学による反応経路解析は主としてQM/MM計算で行われているが、計算に際して合理的なQM/MM境界を設定する必要があるため、多くの計算科学研究において本研究で実験的に観測された2光子反応が再現されなかった可能性がある。近年、酵素活性中心に存在するアミノ酸側鎖の配座が異なるDNA-(6–4)光回復酵素共結晶構造が解かれたため[11]、本構造を元に最適なQM領域を設定したQM/MM計算科学研究を行うことで、中間体の化学構造を推定することが可能になるかもしれない。

本提唱スキームが自然界で達成されるためには、太陽光の下で生成した中間体が暗状態に減衰するよりも速くFADH⁻が励起されなくてはならない。太陽光スペクトルとFADH⁻の吸収スペクトルのオーバーラップから見積もられるFADH⁻の励起速度は0.4 s^{-1}であり、実験で用いた連続光源による光子数よりも大きな値となったことから、逐次的2光子DNA修復は地球上で起こりうる反応であるといえる。

CPDの修復はC-C単結合の解裂により修復が完了する一方で、(6–4)光産物の場合はより複雑な、つまり、高エネルギーが必要な化学反応が起こる必要があり、それをより多くの光子を用いて達成する。つまり、光合成における水分解反応のように、複雑な光反応には多光子必要であるという一般論が、ゲノム恒常性の維持において重要な役割を果たすDNA修復においても成り立つことが示された。

４．謝辞

本研究はJSPS組織的な若手研究者等海外派遣プログラムの支援の下、フランスで実施した研究成果である。日本帰国後はJSPS科研費 (25870400)およびAgence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV8-0001)の助成の下、研究を展開させることができた。ここに記して深く感謝の意を表す。

References

1. J. Yamamoto, P. Plaza, K. Brettel, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 51 (2017).
2. A. Sancar, C. S. Rupert, *Gene*, **4**, 295 (1978).
3. T. Todo, H. Takemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Sato, T. Nomura, *Nature*, **361**, 371 (1993)
4. Y.-T. Kao, C. Saxena, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16128 (2005).
5. J. Li, Z. Liu, C. Tan, X. Guo, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Nature*, **466**, 887 (2010).
6. M. J. Maul, T. R. M. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 10076 (2008).
7. K. Sadeghian, M. Bocola, T. Merz, M. Schütz, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 16285 (2010).
8. V. Thiagarajan, S. Villette, A. Espagne, A. P. M. Eker, K. Brettel, M. Byrdin, *Biochemistry*, **49**, 297 (2010).
9. Y. Terai, R. Sato, T. Yumiba, R. Harada, K. Shimizu, T. Toga, T. Ishikawa-Fujiwara, T. Todo, S. Iwai, Y. Shigeta, J. Yamamoto, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 6761 (2018).
10. J. Yamamoto, R. Martin, S. Iwai, P. Plaza, K. Brettel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 7432 (2013).
11. S. Franz, E. Ignatz, S. Wenzel, H. Zielosko, E. P. Gusti Ngurah Putu, M. Maestre-Reyna, M.-D. Tsai, J. Yamamoto, M. Mittag, L.-O. Essen, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 8010 (2018).

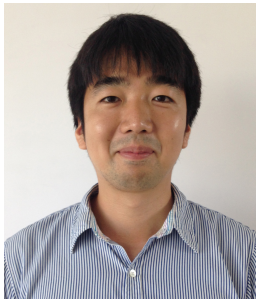
2018 年 9 月 27 日受領
2018 年 10 月 15 日採択

総 合 論 文

私の研究

化学修飾 RNA と二重鎖構造の安定性

Chemically modified RNA and their duplex stability



東京工業大学 生命理工学院
正木 慶昭
Department of Life Science and Technology,
Tokyo Institute of Technology
Yoshiaki Masaki
(ymasaki@bio.titech.ac.jp)

Abstract: Introduction of chemical modifications into RNA duplex could change their thermal duplex stability. Despite their importance, it has been difficult to predict their influence on duplex stability. In this paper, our recent efforts on the development of methods for prediction of duplex stability of 2′-*O*-modified RNAs using molecular dynamic simulations will be reviewed.

1. はじめに

なぜ、化学修飾、特に核酸の2′水酸基への修飾は、RNA二重鎖構造の安定性を変化させるのだろうか。ここで述べる安定性は、化学的・生物学的安定性ではなく、複合体の形成に関わる熱安定性である。興味深いことに、2′修飾は多様な効果を介して二重鎖構造の安定性を変化させている。例えば糖部立体配座の前組織化(preorganization)効果は、よく用いられる説明である[1]。2′-*O*-メチル修飾の導入により、糖部立体配座は核酸塩基とメチル基との立体反発が小さいC3′-*endo*型に制限される[2]。C3′-*endo*型の立体配座は、A型RNA二重鎖に適した構造のため、二重鎖形成に伴うエントロピーロスが軽減する。同様に2′位への電子求引基を導入すると、O4′とのゴーシュ効果によりC3′-*endo*型の立体配座が優先する[3]。C4′とO2′をメチレンで架橋し、糖部立体配座をC3′-*endo*型に固定化したBNAもしくはLNAと呼ばれる修飾核酸は、大幅に二重鎖の安定性を向上することが知られている[4-6]。糖部立体配座に加え、マイナーグルーブの水和に対する影響も二重鎖の安定性変化の説明に用いられる[7]。非架橋型の化学修飾では、修飾基はマイナーグルーブへ突き出た構造をとり、核酸塩基と相互作用している水和水へ影響をあたえる。疎水性修飾基を導入すると、水和水を不安定化すると考えられるが、メチル修飾の場合ではクラスレート様の水和水となり、滞留時間がむしろ長くなることが知られている[8]。メトキシエチル修飾の場合、メトキシ基の酸素原子により、リン酸部および核酸塩基との水和水を介した水素結合ネットワークが強化され、二重鎖構造を安定化するといった説明がなされている[9]。静電相互作用も重要な要素である。例えばカチオン性の修飾基は、リン酸骨格間の静電反発を軽減でき、二重鎖構造の安定化をもたらす。例えばグアニジウムエチル修飾は、二重鎖を安定化する。しかしその一方で、連続で修飾した場合は、むしろ不安定化することが知られている[10]。このような不安定化は、カチオン性官能基と糖部を結ぶリンカーの長いジメチルアミノエトキシエチル修飾などでは見られない[11]。ではアニオン性の修飾はどうだろうか。不安定化する場合[12]も、安定化する場合[13]も知られている。他にも修飾基のサイズ[14]や、修飾基間の相互作用[15]など、非常に多様な効果が互いに影響しながら二重鎖の安定性を決定づけている。

このような効果を予測することはできるのだろうか。実験により二重鎖構造の安定性を調べる方法として、二重鎖融解温度測定がある。二重鎖融解温度(T_m値)とは、二重鎖状態と一本鎖に解離した状態が1対1の平衡状態になる温度である。T_m値が高ければ高いほど、安定な二重鎖構造を形成することが示唆され、二重鎖構造の安定性の指標としてよく用いられる[16]。しかしT_m値は、使用する塩基配列、核酸濃度、塩濃度等、様々な要素に影響されて変化するため、異なる研究者の報告を比較することはむずかしく、ましてや新規修飾の効果を予測することは困難であった。そこで著者らは、計算化学を用いて化学修飾の効果を予測する手法の開発し、二重鎖構造の安定性に対する理解を深めるべく研究に着手した[17]。

２．化学修飾の影響を分子動力学計算により見積もる

これまで述べてきたように、2′水酸基に対する化学修飾の導入は、複合的な要因を介して RNA 二重鎖構造の安定性に影響をもたらす。そこで多様な要因をシミュレートできる分子動力学計算をもちい、化学修飾による安定性への影響の指標となるような算出可能なパラメータを見出すことで、新規修飾の効果も予測できるのではないかと考えた。

まず実験値の取得のために、化学修飾を導入した14量体のウリジンおよびアデノシンのオリゴマーを合成した。2′-*O*-メチル修飾をウリジンに導入した U_{OMe} 、2′-*O*-シアノエチル修飾をウリジンに導入した U_{OCE}、2′-*O*-メトキシエチル修飾をウリジンに導入した U_{OMOE}、2′-*O*-メチル修飾をアデノシンに導入した A_{OMe}、2′-*O*-シアノエチル修飾をアデノシンに導入した A_{OCE} のオリゴマーである。これらのオリゴマーと相補となる未修飾のオリゴマー、U_{OH} もしくは A_{OH} が形成する T_m 値を実験値として測定した。基準となる未修飾の RNA 二重鎖 U_{OH} / A_{OH} の T_m 値は 24°C であった。メチル修飾をウリジン側の鎖に導入した U_{OMe} / A_{OH} の T_m 値は 36°C と向上した一方、メチル修飾をアデノシン側の鎖に導入した U_{OH} / A_{OMe} の T_m 値は 24°C と変化がみられなかった。たとえ同じ U / A 二重鎖に同じ種類の 2′-*O*-メチル修飾を導入したとしても、その効果は大きく変わることを意味している。また 2′-*O*-シアノエチル修飾をウリジン側の鎖に導入した U_{OCE} / A_{OH} の T_m 値は43°C、2′-*O*-メトキシエチル修飾をウリジン側の鎖に導入した U_{OMOE} / A_{OH} の T_m 値は40°C であった。ウリジン鎖に導入する化学修飾の構造に応じて、安定化効果も大きく変化する。最も安定化効果が高かったシアノエチル修飾を、アデノシン側の鎖に導入した U_{OH} / A_{OCE} の T_m 値は27°C であり、たとえウリジン鎖で効果が高い修飾であっても、アデノシン鎖の修飾において同様に効果的とは限らないことがわかる。

これらの実験値をもとに、T_m 値と相関のある分子動力学計算で算出可能なパラメータの探索をおこなった。前章でも述べたように、2′水酸基修飾の影響として、糖部立体配座の前組織化効果による説明がよく用いられている。そこでまず、糖部立体配座の自由度が T_m値の指標となりうるか、評価した。核酸の糖部立体配座をあらわす記述方法として、擬回転位相角がよく用いられる。そこで分子動力学計算中の擬回転位相角の変化をヒストグラムにすることで、糖部立体配座の自由度を視覚的に比較した。その結果が図1a, b である。

化学修飾を導入するとウリジン鎖、アデノシン鎖に関わらず、糖部立体配座の変化が抑制されている様子がうかがえる。このヒストグラムの違いを定量的に表すために、調和振動近似下の見かけの力の定数 fを算出した[17, 19-20]。それぞれの擬回転位相角を示す構造の確率密度は、それぞれの構造の安定性を示すエネルギーポテンシャル下での分布で表されると考えられる。エネルギーポテンシャルを調和振動近似した場合、確率密度関数は次式で表される。

$$P(x) = N exp\left(-f\frac{(x-\mu)^2}{2}\cdot\frac{1}{k_B T}\right)$$

ここで、x は興味のある構造パラメータの値、μ はその平均値、k_B はボルツマン定数、T は温度、N は規格化定数となる。正規分布は

$$P(x) = Nexp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)$$

であるため、見かけの力の定数は

$$f = \frac{k_B T}{\sigma^2}$$

となる。この関係式を用いて力の定数を計算すると、未修飾のウリジンの糖部立体配座は 3.5 cal·mol^{-1}·deg^{-2} であるのに対し、メチル修飾、シアノエチル修飾、もしくはメトキシエチル修飾を導入した場合は 8.5、8.6、8.5 cal·mol^{-1}·deg^{-2} となる。同様にアデノシンの未修飾体では 4.4 cal·mol^{-1}·deg^{-2} であるのに対し、メチル修飾およびシアノエチル修飾体ではそれぞれ 7.7, 7.6 cal·mol^{-1}·deg^{-2} であった。予期したように、化学修飾の導入によって糖部立体配座の自由度の制限が観測された。その一方で、化学修飾間の違いを見積もることはできず、二重鎖安定性の予測には不十分であることがわかった。

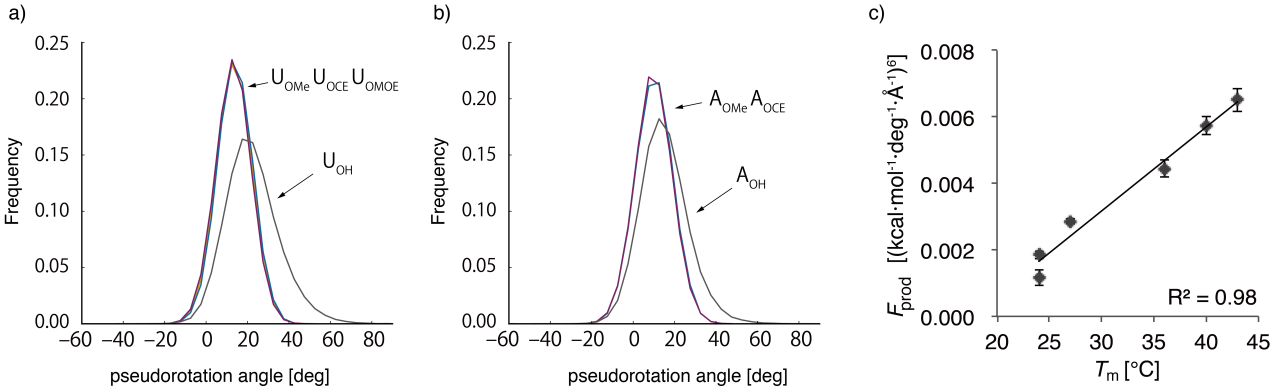


図1 分子動力学計算された構造のゆらぎ。a) ウリジン残基の糖部立体配座のゆらぎ b) アデノシンの糖部立体配座のゆらぎ c) 核酸塩基対のゆらぎを表す力の定数 F_{prod} と実験値(T_m 値)の関係。ref 17(https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp909851j)より転載。

そこで着目したのが核酸塩基部のゆらぎである。直感的なイメージではあるが、二重鎖の融解現象は、加熱に伴い塩基対のゆらぎが徐々に大きくなり、ある温度を超えた段階で、塩基間の相互作用よりも、より自由度の高い一本鎖ランダムコイル状態が有利になる現象と考えた。この場合、核酸塩基部のゆらぎやすさは、T_m 値に密接に関わるパラメータとなることが期待される。核酸の塩基対間パラメータの力の定数の算出は変形能解析(deformability analysis)と呼ばれ、DNA二重鎖の硬さを推定する方法として用いられてきている[19-21]。この方法では、塩基対間パラメータとして並進運動(rise, shift, slide)もしくは回転運動(twist, roll, tilt)の軸を用い、6行6列の分散共分散行列 ***C*** からstiffness行列 ***F*** と呼ばれる力の定数からなる行列を算出する。ここで ***F*** の対角成分がそれぞれの運動軸に対応する力の定数となる。対角成分であるすべての軸の積 F_{prod} は、その構造の硬さの指標となると考え、T_m 値と比較した(図1c)。その結果、実験的に求めた T_m 値と非常に高い相関を有することを見出した。

３．変形能解析をもちいた化学修飾の設計に向けて

化学修飾を設計するにあたり、どのような設計指針をもって、計算する化学修飾の構造を決めたら良いのだろうか。例えば、糖部立体配座の自由度の制御という観点から、電子求引性の修飾基や架橋型核酸、

非固定核酸(UNA, unlocked nucleic acid)[22-23]が開発されてきている。このように設計指針を決めることは、膨大なケミカルスペースから、目的の性質をもつ化学修飾を設計する上で重要な指針となる。前節では、分子動力学計算で算出される塩基対のゆらぎにくさを指標にすることで、T_m値の推定に成功した。このことは、計算機上で二重鎖融解現象に影響する主要な因子を再現できている可能性を示唆している。そこで塩基対のゆらぎに影響をあたえる因子を同定することで、あらたな化学修飾の設計指針を生み出せるのではないかと考えた。

このような考えのもと、ウリジン2′水酸基の化学修飾を系統的に変化させ、それぞれを分子動力学計算により評価した。使用した官能基は、シアノ基(**CN**)、メトキシ基(**M**)、メチルチオ基(**S**)、アセトアミド基(**AA**)、エチニル基(**E**)、メチルカルバモイル基(**MC**)、カルバモイル基(**C**)、ヒドロキシカルバモイル基(**OC**)、メトキシカルバモイル基(**WC**)の9種であり、それぞれの官能基と2′水酸基間のメチレン鎖長を0から3まで変化させた36種（9×4）に加え、2′-*O*-メチル修飾および未修飾の合計38種である。例えばシアノエチル修飾は、官能基がシアノ基、メチレン鎖長が2なので**CN2**と命名した。F_{prod}の計算の結果、シアノエチル修飾(**CN2**)[24]、メトキシエチル修飾(**M2**)[25]、メチルカルバモイルメチル修飾(**MC1**)[26]、およびメチルチオエチル修飾(**S2**)[27]は、メチル修飾よりも安定であることが示唆された。これらの修飾は、本研究とは異なる塩基配列の実験ではあるものの二重鎖の安定化効果を示すことが報告されており、計算値の傾向と一致した。また2′-*O*-カルバモイルエチル修飾(**C2**)[13]、2′-*O*-メチルカルバモイルエチル修飾(**MC2**)[13]は、2′-*O*-メチル修飾(**Me**)と同程度のT_m値を示すことが報告されており、計算結果も同様な傾向が見られた。2′-*O*-カルバモイル修飾(**C0**)[28]や2′-*O*-メチルカルバモイル修飾基(**MC0**)[29]などは二重鎖を不安定化させることが報告されており、計算結果の傾向も一致した。これらの結果は、著者らが開発した方法が多様な修飾基にも適用できることを示唆している。

つづいて、塩基対のゆらぎに影響をあたえる因子の解析を行った。塩基対のゆらぎに影響を与える構造因子として、グリコシル角のゆらぎ、リン酸骨格であるα、β、γ、δ、ε、ζ角のゆらぎとの相関を調べた。それぞれの構造因子と塩基対のゆらぎの相関行列を調べたところ、興味深いことにα角との強い相関(R^2 = 0.92)が見られた。α角はリン酸に直接結合するO3′–P–O5′–C5′の二面角であり、2′水酸基の修飾とは一見あまり関係のない角度に見える。しかし2量体構造としてみると、2′修飾基は3′下流のヌクレオシドのC5′近傍に位置し、適度な大きさの修飾基はα角の揺らぎを直接的に抑制できることがわかる。さらにα角の二面角のみを変動させると、核酸塩基間の距離に密接に関係していることがわかる。このことから、α角のゆらぎの抑制は塩基対間距離を一定に保つのに効果的であり、2′修飾基による安定化効果のメカニズムの一つとして有力であることが示唆された。

４．おわりに

本稿では、化学修飾が二重鎖構造の安定性に対する影響を予測する手法の開発と、その手法を用いた新たなメカニズムの解明について紹介した。現在は、核酸とタンパク質の相互作用に着目し、相互作用の解明と分子設計を通した研究を展開している。本稿の成果は、東京工業大学生命理工学員の関根 光雄 名誉教授、清尾 康志 准教授とともに得たものである。深く感謝の意を表す。また、本研究では科研費(26810086, 17H04886)の助成を受けた。ここに記して感謝する。

References

1. E. T. Kool, *Chem. Rev.*, **97**, 1473 (1997).

2. G. Kawai, Y. Yamamoto, T. Kamimura, T. Masegi, M. Sekine, T. Hata, T. Iimori, T. Watanabe, T. Miyazawa, S. Yokoyama, *Biochemistry*, **31**, 1040 (1992).
3. W. Guschlbauer, K. Jankowski, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1421 (1980).
4. S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8735 (1997).
5. A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron*, **54**, 3607 (1998).
6. H. Kaur, A. Arora, J. Wengel, S. Maiti, *Biochemistry*, **45**, 7347 (2006).
7. M. Egli, S. Portmann, N. Usman, *Biochemistry*, **35**, 8489 (1996).
8. P. Auffinger, E. Westhof, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**, 4648 (2001).
9. M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G. B. Inamati, P. D. Cook, M. Manoharan, M. Egli, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 535 (1999).
10. T. P. Prakash, A. Puschl, E. Lesnik, V. Mohan, V. Tereshko, M. Egli, M. Manoharan, *Org. Lett.*, **6**, 1971 (2004).
11. M. Prhavc, T. P. Prakash, G. Minasov, P. D. Cook, M. Egli, M. Manoharan, *Org. Lett.*, **5**, 2017 (2003).
12. H. Tsuruoka, K. Shohda, T. Wada, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, **65**, 7479 (2000).
13. T. Yamada, Y. Masaki, N. Okaniwa, T. Kanamori, A. Ohkubo, H. Tsunoda, K. Seio, M. Sekine, *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 6457 (2014).
14. E. A. Lesnik, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. J. Ecker, P. D. Cook, S. M. Freier, *Biochemistry*, **32**, 7832 (1993).
15. M. Sekine, Y. Oeda, Y. Iijima, H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 210 (2011).
16. S. M. Freier, K. H. Altmann, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4429 (1997).
17. Y. Masaki, R. Miyasaka, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 2517 (2010).
18. Y. Masaki, M. Sekine, K. Seio, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **68**, 7 27 1 (2017).
19. W. K. Olson, A. A. Gorin, X. J. Lu, L. M. Hock, V. B. Zhurkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 11163 (1998).
20. F. Lankas, J. Sponer, J. Langowski, T. E. Cheatham, 3rd, *Biophys. J.*, **85**, 2872 (2003).
21. A. Noy, F. J. Luque, M. Orozco, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3486 (2008).
22. P. Nielsen, L. H. Dreiøe, J. Wengel, *Biorg. Med. Chem.*, **3**, 19 (1995).
23. A. Pasternak, J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 3591 (2011).
24. H. Saneyoshi, K. Seio, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, **70**, 10453 (2005).
25. P. Martin, *Helv. Chim. Acta*, **78**, 486 (1995).
26. T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, E. A. Lesnik, S. R. Owens, M. Manoharan, *Org. Lett.*, **5**, 403 (2003).
27. T. P. Prakash, M. Manoharan, A. M. Kawasaki, A. S. Fraser, E. A. Lesnik, N. Sioufi, J. M. Leeds, M. Teplova, M. Egli, *Biochemistry*, **41**, 11642 (2002).
28. K. Seio, R. Tawarada, T. Sasami, M. Serizawa, M. Ise, A. Ohkubo, M. Sekine, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 7275 (2009).
29. M. Prhavc, E. A. Lesnik, V. Mohan, M. Manoharan, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 8777 (2001).

2018年 9 月 28日受領
2018年10 月 12日採択

研究室紹介

長崎の中心で核酸化学を叫ぶ

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科(薬学系) 山吉麻子

本年3月より、長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科(薬学部)において、教育、研究に携わる幸運を頂きました。現在は研究室を立ち上げるという、研究者人生において一大イベントの真っ只中におり、その中で本稿を書かせて頂く機会を頂戴しましたことに、まず心より感謝申し上げます。

まず自己紹介からさせて頂きます。私は京都工芸繊維大学に在籍しておりましたが、その時に村上章先生の研究室に配属され、「核酸」に出会いました。と申しましても、これまでにも生化学の授業等で「核酸」には触れていたので、「核酸化学」に出会ったという言い方が相応しいかもしれません。中学生の頃に近しい人を癌で亡くした際、重篤な副作用を目の当たりにし、「副作用の無い薬を作りたい!」と思ったことが研究者を目指したキッカケでした。癌を治すイコール医者、という単純な発想より医学部を目指していましたが、学力足りず挫折し、敗北感いっぱいで京都工芸繊維大学に入学しました。そんな私に希望の光を与えて下さったのが村上先生でした。核酸の精巧な base-paring ルールを基本に、標的遺伝子に対して特異的に結合する核酸医薬、これこそ自分の目指したい医薬品のカタチではないかと、背筋がゾクゾクとしたのを覚えています。村上先生は、私へ核酸医薬を教えて下さっただけでなく、研究者としての姿勢・生き方・考え方をご教授下さいました。今、自分のラボを持つポジションになり、改めて村上先生の偉大さを痛感しております。

学位取得後、九州大学の2カ所の研究所でポスドクの機会を得ました。1つは生体防御医学研究所(別府)の和氣徳夫教授、加藤聖子講師(現・九州大学 教授)の研究室、もう1つは九州大学先導物質化学研究所(福岡)の丸山厚教授(現・東京工業大学 教授)の研究室です。和氣先生、加藤先生は、生体防御医学研究所において臨床の産婦人科医として勤務されつつ、外来や手術を済ませてから基礎研究も精力的にされておられました。お二人の先生からは、実際に医療現場に携わる者の立場からの創薬の考え方について学ばせて頂きました。そして丸山先生のラボでは、高分子材料で核酸を巧みに操り、様々な研究へ応用していく丸山先生の素晴らしい発想力に大変な感銘を受けました。次々と楽しそうにアイデアを出されていく丸山先生とお話させて頂くことは、今までに使ったことのない頭の部分を刺激されている様で、上手く言葉にできませんが世界観がグッと広がったのを覚えております。そんなこんなで、計4年間弱のポスドク生活を九州で過ごす機会を頂戴しましたが、なにより一番の収穫は、九州を大変気に入ってしまったことかもしれません。食べ物が美味しく、特に魚介類は関西に居る時とは別物でした。また、お酒(焼酎)に目覚めたのもこの頃で、記憶を無くすまで飲む様になったのも、この頃から本格化したものと思われます。

2007年、京都工芸繊維大学の村上章先生の研究室へ戻る機会を頂戴し、助教というポジションにも関わらず、本当に自由に研究をさせて頂きました。自由というのは、同時に厳しいことでもあり、なかなかデータが出ない期間が長く続き、研究費が取れず追い込まれたこともありました。けれど学生らは、こんな不甲斐ない指導者にも関わらず、よく働いてくれました。一緒に徹夜するのも苦にならず、ただただひたすら前

を見て楽しかった時代でもありました。そしてこの時の七転八転の日々が、今の私の研究の基盤となっていることは言うまでもありません。

2015年に京都大学白眉センターへ特定准教授として異動してからは、世界がガラっと変わりました。白眉センターでは、文系から理系まで、幅広い分野の研究者が採用されます。私が採用された第6期白眉研究者もその様な感じで、20名近くいた同期の中で、化学がバックグラウンドだったのは私含め2人くらいではないでしょうか。他は生物学、医学、物理学の研究者がいるのはもちろんのこと、哲学や考古学を研究していたり、宇宙の研究をしていたり、プルーストの研究をしていたりしました。2週間に1度開かれる白眉セミナーでは、白眉研究者の最新の研究成果を拝聴できます。文系の研究など、聴いて理解できるのだろうかと不安に思っておりましたが、これが面白い。結局は、基礎研究というものは、その根底にあるもの（考え方の様なもの）は、同じなのではないかと思いました。そして異分野の研究者同士が、分野が違うからこそ根底から疑問に思ったことをぶつけ合い、議論する。その中で、その最中には何も感じないのですが、後で自分の頭の中でスパークしてアイデアが出てくる様な体験を何度か味わいました。また、白眉研究者は、京都大学内のどこかのラボに受け入れて頂き、研究を遂行することができるのですが、私は理学研究科の杉山弘先生のラボで受け入れて頂きました。杉山先生のことは昔からよく存じ上げておりましたし、大変著名な先生であることは読者の皆様もよくご存知のことと思いますが、同じラボで接してみますと本当に改めて凄い先生だと痛感いたしました。面白いと思ったことを、次々と提案し、実現させていく。毎週土曜日に参加させて頂いたゼミでは、センセーショナルなデータが出たり、著名なジャーナルへアクセプトされたり、かなり位置エネルギーの高い環境で過ごさせて頂き、日々圧倒の思いで過ごさせて頂きました。

図 1　長崎大学薬学部で頂いた研究室の、着任当時の様子。机の上に隙間なく物が置かれている。下図は合成部屋であるが、なぜか細胞培養のためのクリーンベンチがある。

そして今年の3月より、大変幸運にも、九州は長崎大学に研究室を持つ機会を頂戴しました。私が引き継いだ講座は「機能性分子化学」という名称で、この名前は自分にピッタリだと思い、大変気に入っております。私が着任した時には、准教授の先生はおらず、助教の先生が1名おられ、6名の学部学生が在籍して

図２　今年７月頃の研究室の写真。随分と機器を捨てたプチ達成感とともに悦に入っていた。

おりました。助教の柴田先生は大変親切にして下さり、学生らも真面目で良い子ばかりです。これも幸運でした。ただ、柴田先生が5月1日付けで群馬大学へご栄転されることになり、色々なことを柴田先生から引き継ぎながら、4月からは週3コマの学部授業（＋時々・大学院）をこなし、怒濤の毎日でした。今も日々が綱渡り状態で過ごしております。

そしてもう1つ、授業や研究体制以外にも、大きな問題がありました。引き継いだ研究室は、前任の先生の分析機器類（もはや使えないものも多数）が、図1に示す写真の様に、机の上に何も置いてない場所は無いというくらいにミッチリと隙間無く置かれていました。一体、学生らは、どこでサンプル調製をしていたのだろうと、今もこの写真を見て思います。しかも機器が置かれていた机は、実験台ではなく、頑丈な学習机でした（後から判明したのですが、この学習机は前任教授の先生の大変なお気に入りで、わざわざ海外から取り寄せた高価なものの様です）。この頑丈な学習机は、解体しないと外に運べないくらい大きいものでした。なにより、大量に機器が載っているので、それを捨てないとどうにもできない。そして、ただでさえ物に溢れ狭い研究空間なのに、なぜか、実験室に教員室（准教授室、助教室）が2つもありました。もはや使えない共焦点レーザー顕微鏡用に区切られた大きすぎる暗室もありました。実験台の引き出しを開けると、引き出し一杯の大量の温度計や、タイマーや、ガラスシャーレ、ビュレットが出てきました。極めつけは、図1の下段に示す様に、合成部屋に細胞培養用のクリーンベンチがあったことです。合成実験と細胞実験が、同じ部屋で隣接して行われておりました。まず培養室を作らなければ。。。そもそも、部屋のレイアウトから再考しました。6名の学生のうち3名は実習へ行ってしまい、残り3名も当時は就職活動や授業で忙しく、一体どうやって片付けたら良いのか。。。途方にくれていましたが、幸いにも、長崎大学に出入りしている業者様のお心遣いで、少しずつではありますが、随分と不要品を撤去して頂けました。そして長崎大学に部屋の改装工事を申請し、（手続きにかなり長い時間がかかった後に）教員室の撤去と移設、共焦点レーザー顕微鏡用の暗室の撤去をしてもらい、それでようやく7月には図2の様な状態になりました。図1と比べると、格段に広く明るく、スッキリしたと喜んでいた時、JSTさきがけのサイトビジットがありました。私は図1の状態を知っているので、綺麗になった研究室に悦に入っておりましたが、総括の先生や JSTの方々は、研究室を見て、絶句され。。。JSTの方々が当研究室の研究環境についての率直な感想を事務にコメントして下さった結果、ほとんどの費用を事務が負担して産業廃棄物処理業者に依頼して頂けることが叶い、図3の状態にまですることができました。新しく入った実験台（これは自身の研究費で購入）を見て、黒々とした天板をニヤニヤして撫で回し、これまた悦に入っております。やっと実験室らしくなったという状況です。

本学薬学部は10月に3年生が配属されます。当研究室にも定員Max の6名が来てくれ、新たな体制がようやくスタートしました。筆者にとっては長崎大学にいて、自身のテーマを一緒に遂行してくれる1期生で

す。また、何より心強いのは、9月1日付で、当研究室にも准教授の先生が着任されたことです。准教授として着任された山本剛史先生は、大阪大学の中谷和彦先生や、小比賀先生のもとで学生時代を過ごされており、その後に米国NIHで研鑽を積まれていたところを、幸運にも当研究室に来て頂けることになりました。スタッフも増え、いよいよこれからと意気込んでおります。

毎日を無我夢中で日々忙しく動き回り、飛んでくる球をひたすら打ち返す毎日です。しかし、異動して半年が経過し、少しずつ落ち着いてきますと、改めて自分の置かれた状況や厳しさを認識させられております。ですが、自分の人生の中において、研究を続けていける機会を長く与えて頂けたことを、心から幸運に思っております。全力で努力するつもりです。これまでも試行錯誤で、今もなお、試行錯誤で壁にぶつからない日はありませんが、これまで様々な分野で仕事をさせて頂けたことで、多くの先生方に出会い、そこで各々の先生のフィロソフィーに触れることができました。その様な尊敬すべきメンターの先生の背中を見ながら、いつか追いつき追い越そうと夢見ております。

長崎大学薬学部にある私の部屋は学生サークル部屋のある建物の隣に位置しております。ようやく涼しくなり、風を入れるために窓を開けると、学生らが謳ったり、踊ったり、蛇踊り（長崎くんちの名物）の練習をしており（時々うるさいこともあります）、窓辺にあるDNAとRNAの2重らせん模型を眺めながら、この原稿を書いております。長崎大学にて、学生らと日々切磋琢磨しながら、核酸研究を続け、長崎の中心から核酸化学を叫んでいこうと思っております。

図３　実験台が搬入された頃の研究室の様子。黒い天板が美しく輝いている。奥の小部屋は新設した培養室である。

学会報告

第 44 回国際核酸化学シンポジウム（ISNAC 2017）／日本核酸化学会第1回年会　開催報告

東京理科大学薬学部　　和田 猛

The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2017 (第44回国際核酸化学シンポジウム、ISNAC2017) / The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry（日本核酸化学会第1回年会）が、2017年11月14日（火）～11月16日（木）の日程で東京理科大学葛飾キャンパス図書館大ホールにて開催されました（実行委員長：和田猛　東京理科大学教授）。

会場の図書館大ホール

本シンポジウムは、核酸化学を主題とする世界最大のものであり、国際会議となる以前を含めると40年以上の長い歴史を有し、日本の核酸化学研究を世界レベルのものとするのに大きく貢献してきました。特徴としては、各学会で個別に活動している幅広い分野の第一線の研究者が学問領域の枠を横断的に超え、一堂に会して成果を発表・討論する場となっていることがあげられます。本シンポジウムでは、基礎研究から医薬応用研究に至る幅広い主題に関して、新機能を持つ核酸関連分子の化学合成、核酸関連バイオテクノロジー、核酸構造に関する物理化学的研究、機能性核酸の生物機能・医薬応用に関する研究など核酸化学に関する重要な分野における最新の成果が発表されました。総演題数は合計で190題を数え、参加者総数は14ヵ国344名と、多くの方々にご参加頂き盛会のうちに年会を無事終えることができました。これも一重に、演者ならびに参加者をはじめ、本年会に展示（12社）、広告（3社）、寄付（1社）としてご支援頂きました企業の皆様に感謝いたします。

シンポジウムに先立ち、2017年9月1日に発足した日本核酸化学会（JSNAC）の第1回総会が行われました。総会では、日本核酸化学賞（池原賞、Ikehara Award、The Award of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry 2017）の栄えある第1回受賞者として、大塚榮子先生（AIST）が選ばれました。受賞タイトルは、

「Syntheses of nucleic acids for their functional study（核酸合成と機能解明に関する研究）」

です。

池原賞を受賞された大塚先生

シンポジウム冒頭には、核酸化学シンポジウムを創設され、2016年12月に逝去された、池原森男博士の功績について、大塚榮子先生と岩井成憲先生（大阪大学）よりご講演をいただきました。

海外からは10名の著名な先生方をお招きし、招待講演を行っていただきました。

・Dr. Michael Gait (The MRC Laboratory of Molecular Biology, UK)
・Prof. Christine Cardin (University of Reading, UK)
・Dr. Ichiro Hirao (Institute of Bioengineering and Nanotechnology, A*STAR, Singapore)
・Dr. Dmitry Stetsenko (Russian Academy of Sciences, Russia)
・Prof. Tirayut Vilaivan (Chulalongkorn University , Bangkok)
・Dr. Rakesh Naduvile Veedu (Murdoch University, Australia)
・Dr. Chandra Vargeese (Wave Life Sciences, USA)
・Dr. Muthiah Manoharan (Alnylam, USA)
・Dr. François Morvan (Université de Montpellier, France)
・Prof. Kyeong Kyu Kim (Sungkyunkwan University, Korea)

Michael Gate 先生の講演

また、本年より若手優秀講演賞を大塚賞（Ohtsuka Award、ISNAC Outstanding Oral Presentation Award for Young Scientist 2017）とし、厳選な審査の結果、以下の2名に授与されました。

・Dr. Ryosuke Ueki (The University of Tokyo, Japan)
Novel DNA aptamer assemblies that control growth factor signaling and cellular functions
・Dr. Tomoko Fujino (The University of Tokyo, Japan)
Chimeric RNA oligonucleotides: Synthesis and function as mRNA in cell-free translation reactions

大塚賞受賞者

さらに、優秀ポスター賞（ISNAC Outstanding Poster Award 2017）は以下の5名が受賞されました。

・Mr. Takafumi Furuhata (The University of Tokyo, Japan)
Effects of chemical properties of nucleosides on quantum tunneling-based DNA sequencing

・Mr. Bohao Cheng (Nagoya University, Japan)
Light-driven non-toehold DNA strand displacement assisted by chaperone polymer

・Mr. Masaki Hibino (Nagoya University, Japan)
Development of a novel Ru-complex-PNA conjugate for improved DNA invasion

・Ms. Kanako Nose (Fukuoka University, Japan)
Functional evaluation of a guide RNA inducing the editing activity of ADAR for site-directed RNA editing

・Ms. Zhaoma Shu (Nagoya University, Japan)
Nano-structured RNA for RNA interference

優秀ポスター賞受賞者

２日目終了後には浅草ビューホテルにて懇親会が開催され、200名を超える方々にお集まりいただき、有意義な交流の時間を過ごすことができました。各賞の受賞式、和田猛年会長による自作の竹笛（東風笛）の演奏や、招待講演者様へのお土産進呈等の“おもてなし”を交え、和気藹々とした温かい会となりました。

年会長による東風笛演奏

招待講演者へのお土産贈呈

参加者全員による記念撮影

The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018 (ISNAC2018) / The 2nd Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry（日本核酸化学会第 2 回年会）は、杉山弘先生（京都大学）を年会長として 2018 年 11 月 7 日（火）～9 日（木）に京都大学吉田キャンパス百周年時計台記念館にて開催されます。

付録

日本核酸化学会設立趣意書 39
日本核酸化学会会則 40
日本核酸化学会細則 41
日本核酸化学会 各賞規定 42
2018 年度委員会 43
評議員名簿 44

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

2018 年 9 月 1 日施行

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。

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。

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15条　本会則は 2018 年 9 月 1 日より施行する。

日本核酸化学会細則

2018 年 9 月 1 日施行
2018 年 9 月 1 日一部改正

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で申込みを行う。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で申込みを行う。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、栄誉評議員に選出される。65 歳以上の栄誉評議員は、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。また、メール等インターネットを介して評議員会を開催することができる。但し、インターネットを介した評議員会では学会長の選出は行なう事が出来ない。

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、　2018 年 9 月 1 日よりこれを施行する。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

2018 年 9 月 1 日施行

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に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。

2018 年度 日本核酸化学会 委員会

運営委員会

＊会　長：杉本直己（甲南大学）
＊幹事長：和田健彦（東北大学）－兼務：庶務
＊財務担当幹事：浅沼浩之（名古屋大学)、南川典昭（徳島大学）－兼務：会費の徴収
＊広報・出版担当幹事：井原敏博（熊本大学)、和田　猛（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（京都大学)、岡本晃充（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（京都大学)、中谷和彦（大阪大学)、和田　猛（東京理科大学)、井原敏博（熊本大学)、井川善也（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（京都大学)、岡本晃充（東京大学)、上野義仁（岐阜大学）
大塚賞：◎ 岩井成憲（大阪大学)、齊藤博英（京都大学）
ポスター賞：◎ 藤井政幸（近畿大学)、浅沼浩之（名古屋大学）
＊男女参画委員会：◎ 永次　史（東北大学)、南川典昭（徳島大学)、阿部　洋（名古屋大学）
＊ホームページ委員会：◎ 鳥越秀峰（東京理科大学)、和田健彦（東北大学)、山東信介（東京大学）
＊国際交流委員会：◎ 竹中繁織（九州工業大学)、井原敏博（熊本大学)、藤本健造（北陸先端大学院大学）
＊広報委員会：◎ 池袋一典（東京農工大学)、和田健彦（東北大学)、櫻井和朗（北九州市立大学）
＊産学官連携委員会：◎ 小泉　誠（第一三共株式会社)、和田　猛（東京理科大学）

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

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

日本核酸化学会誌, Vol. 2 (2018)
2018年11月7日発行
発行人　日本核酸化学会
編集委員　杉山 弘、中谷和彦、井川善也、井原敏博、和田 猛
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
問合せ　和田 猛（東京理科大学薬学部）
E-mail: twada@rs.tus.ac.jp
Tel & Fax: 04-7121-3671

＊本誌掲載記事の無断複製・転載を禁じます。