

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06464

研究課題名（和文）修飾核酸塩基および修飾アミノ酸との結合形成反応を基にした生理機能解析法の構築

研究課題名（英文）Development of novel methods for the analysis of physiological functions of modified nucleic acids and amino acids based on covalent bond formation

研究代表者

平野 智也（Hirano, Tomoya）

大阪医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20396980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体内のタンパク質を構成するアミノ酸、DNA、RNAを構成するアデニンなどの核酸塩基はメチル化などの化学修飾反応を受けます。こうした化学修飾は重要な生理機能を制御し、その異常は疾患の要因になります。そのため、化学修飾の詳細を明らかにすることは基礎研究、医療のいずれにおいても重要となります。本研究では、化学修飾、特にアデニンのメチル化とリシン残基のモノメチル化のそれぞれを簡便かつ安価に検出する手法を開発しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のアミノ酸、核酸塩基に対する化学修飾を選択的に検出する手法は基礎研究の発展を通じた学術的な意義だけでなく、新たな治療法の構築などによる社会的な意義も極めて大きいです。本研究では有機化学反応を利用するという独自の戦略に基づき、安価かつ簡便な検出法の開発に成功しました。開発した方法は医療、創薬などで有用となる重要な研究成果です。

研究成果の概要（英文）：In living organisms, amino acids and nucleobases could be chemically modified such as methylation, and those chemical modifications could not only regulate physiological functions, but also be incriminated as the cause of several diseases. So those selective and sensitive detection methods are extremely useful. In this research, novel methods for methylation of adenine nucleotide and monomethylation of lysine residue, respectively, based on chemical reactions have been developed.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：エピジェネティクス エピトランスクリプトーム 蛍光 生体内有機化学反応

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸塩基を基に構築される DNA、RNA、アミノ酸からなるタンパク質は様々な化学的な修飾反応を受ける。例えば、DNA 上の特定のシトシンはメチル化などの修飾が起こる (図 1)。DNA と複合体を形成するヒストンタンパク質のリシン残基は、アセチル化、メチル化などの修飾反応が起こり、転写を制御する機構の一つとなっている。これらは、遺伝子の変異を伴わない発現制御機構であるエピジェネティクスの分子的な基盤にもなっている。さらに RNA の核酸塩基に対するメチル化は、タンパク質への翻訳の制御や、tRNA などの非翻訳性 RNA の機能にも関与しており、これらの解析を行うエピトランスクリプトームと呼ばれる研究分野が近年注目を集めている。こうした分野の生物学研究、修飾反応を制御する酵素を標的とした創薬、疾患診断のマーカーとして用いる医療などにおいて、修飾された核酸、アミノ酸の検出法は必須となる。

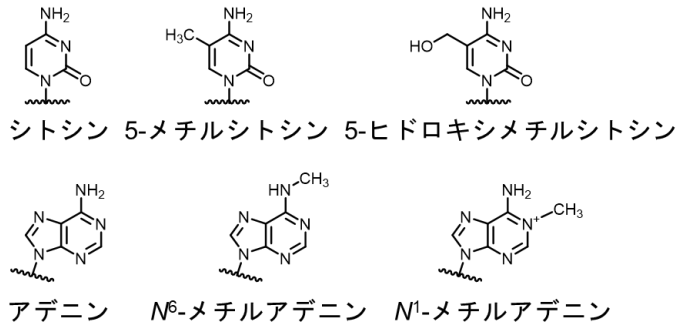


図 1 修飾核酸塩基の例

2. 研究の目的

修飾された核酸、アミノ酸の検出では、質量分析、各々に選択的な抗体などを基にした検出法が開発され、利用されてきたが、問題点も指摘されている。例えば抗体を用いる手法には、抗体の質による測定結果の変動や、高価であること、煩雑な操作が必要であるなどの問題がある。また、修飾核酸塩基、修飾アミノ酸は、修飾反応を担う“writer”となる酵素と、脱修飾反応を担う“eraser”となる酵素活性のバランスによって変動しやすいことに加え、生理的な条件下での不安定な修飾核酸塩基もある。そのため、操作が簡便かつ安価であることに加え、生きた細胞、組織、個体での修飾核酸塩基、アミノ酸のリアルタイムな解析を可能とする手法が強く求められている。そこで、本研究ではこうした手法の構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究ではまず、修飾核酸塩基、修飾アミノ酸と選択的に結合を形成する有機化学反応を見出す。見出した反応を利用して、修飾核酸塩基、修飾アミノ酸を簡便に検出する実験系の構築を行う。例えば、結合反応を起こす分子団を蛍光物質の適切な部位に導入することによって、反応前後で蛍光特性が変化することにより、修飾核酸塩基、修飾アミノ酸をリアルタイムに検出可能な蛍光センサーなどの開発を行う。

4. 研究成果

本研究で得られた成果の概要を以下に記す。

(1) M¹-メチルアデニンを検出する蛍光センサーの開発

核酸塩基に対する修飾反応としてはシトシンに対するメチル化が最も古くから研究されているが、DNA、RNA 上のアデニンに対してもメチル化が起こり、様々な生理機能に関与していることが示唆されている (図 1)。例えば、RNA 上の N⁶位のメチル化は、体内時計に関わることなどが報告されている。一方、N¹位に対するメチル化に関しては不明な点が多く、タンパク質-RNA 間の相互作用による転写制御や、tRNA の安定化などの非翻訳性 RNA を介した生理機能が示唆されているのみである。こうした要因の一つは、信頼がおける選択的な検出法が開発されていないことである。例えば、M¹-メチルアデニンに対する抗体は、N⁶-メチルアデニンとの選択性が不十分であるという指摘がある。さらに、化学的な安定性の低さが、細胞を溶解させた後の質量分析などの解析で問題となる。そこで本研究ではまず、こうした問題を解決した新たな手法を開発するために、生理的条件下で M¹-メチルアデニンと選択的に結合を形成する有機化学反応の探索を行った。

M¹-メチルアデニンは、N¹位のメチル化により C2 位の求電子性が向上している。そのため、アルカリ性水溶液中では、水酸化物イオンが C2 位を攻撃し、N⁶-メチルアデノシンが生成するディムロス反応が起こることが報告されている (図 2a)。この反応は従来、M¹-メチルアデノシンの不安定性の要因となる「問題」とされてきたが本反応を逆に利用することにより、選択的な結合反応が開発できると考えられた。そこで様々な求核性の反応団で検討した結果、脂肪族の一級アミノ基を有する化合物が、図 2b に示す反応を起こすことを見いだした。続いて、本反応を蛍光センサーへと応用するために、蛍光物質であるクマリンの様々な置換位置にアミノメチレン基を導入した化合物群を合成し、M¹-メチルアデニンとの反応前後での蛍光特性の変化を解析した (図 2c)。その結果、反応後に蛍光強度が大きく増大する、もしくは減少する蛍光センサーを得ることに成功した。得られたセンサーは、特定の塩基配列を認識するヌクレオチド鎖に導入

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

することにより部位特異的な修飾反応を検出する手法になりえる。

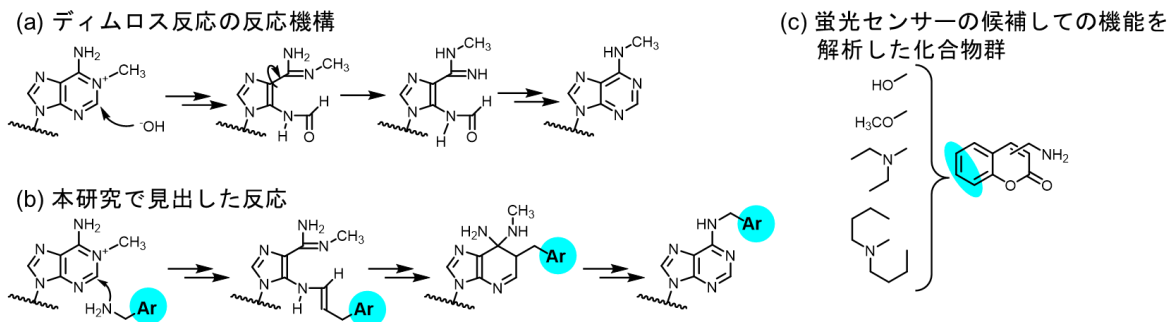


図2 N¹-メチルアデニンを検出する蛍光センサーの開発

(2) ヒストンメチル化酵素 Set7/9 の活性を蛍光変化により検出する実験系の構築

エピジェネティクス機構の一つであるヒストンタンパク質の、特定のリシン残基側鎖アミノ基へのメチル化は遺伝子の転写の制御を通じて、様々な生理機能、疾患に関与する。例えば、ヒストンメチル化酵素の一つである Set7/9 はヒストンタンパク質 H3 の 4 番目のリシン残基 (H3K4) をモノメチル化し、特定の遺伝子の転写を活性化している。さらに、Set7/9 はヒストン以外のタンパク質もメチル化し、多様な生理作用に関与することが示唆されている。我々はこれまで、乳がんに対する治療薬の開発を目的に、Set7/9 阻害剤の開発を行ってきたが¹⁻³、その開発においてより簡便かつ高感度な検出系が必要であることが明らかとなっていた。そこで本研究では、有機化学反応を利用して簡便かつ高感度に Set7/9 活性を蛍光変化によって検出する実験系の構築を行った。これまでの研究において我々は、モノメチル化リシンに対してある程度の選択性で芳香族求核置換反応 (S_NAr 反応) が起こり、結合を形成する分子団 **1** を見出していた⁴。この反応を蛍光による検出法へと展開するために、**1** にリンカーを介して蛍光物質を導入した分子を新たに合成した。合成した蛍光分子と、ビオチン化した H3 のペプチドおよびアビジンコートをした磁気ビーズとを用いることによって、Set7/9 活性を磁気ビーズに付着した蛍光物質由来の蛍光強度の増大によって検出する実験系の構築に成功した。

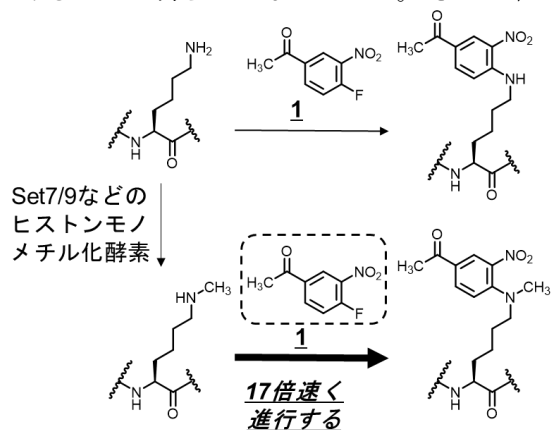


図3 モノメチル化リシンと結合を形成する反応

<引用文献>

1. Yasushi Takemoto, Akihiro Ito, Hideaki Niwa, Mutsumi Okamura, Takashi Fujiwara, Tomoya Hirano, Noriko Handa, Takashi Umehara, Takeshi Sonoda, Kenji Ogawa, Mohammad Tariq, Norikazu Nishino, Shingo Dan, Hiroyuki Kagechika, Takao Yamori, Shigeyuki Yokoyama, Minoru Yoshida, "Identification of cyproheptadine as an inhibitor of SET domain containing lysine methyltransferase 7/9 (Set7/9) that regulates estrogen-dependent transcription." *J. Med. Chem.* **59**, 3650-3660 (2016).
2. Takashi Fujiwara, Kasumi Ohira, Ko Urushibara, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Misae Kanai, Aya Tanatani, Hiroyuki Kagechika, Tomoya Hirano, "Steric structure-activity relationship of cyproheptadine derivatives as inhibitors of histone methyltransferase SET7/9." *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4318-4323 (2016).
3. Tomoya Hirano, Takashi Fujiwara, Hideaki Niwa, Michitake Hirano, Kasumi Ohira, Yusuke Okazaki, Shin Sato, Takashi Umehara, Yuki Maemoto, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, and Hiroyuki Kagechika, "Development of novel inhibitors for histone methyltransferase SET7/9 based on cyproheptadine." *ChemMedChem*, **13**, 1530-1540 (2018).
4. Shuichi Mori, Tomoya Hirano, Asuka Takaguchi, Takashi Fujiwara, Yusuke Okazaki, and Hiroyuki Kagechika, "Selective reagent for detection of N^ε-monomethylation of peptide lysine residue via S_NAr reaction." *Eur. J. Org. Chem.* 3606-3611 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kikuchi Takashi, Anami Daichi, Morikawa Shota, Nakagawa Yuki, Yamada Takeshi, Li Wei, Hirano Tomoya	4. 巻 206
2. 論文標題 Secoergostane- and ergostane-type steroids from <i>Pleurotus cornucopiae</i> var. <i>citrinopileatus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 113552 ~ 113552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2022.113552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 平野智也、横尾英知、影近弘之	4. 巻 80
2. 論文標題 蛍光性天然物を基にした新規蛍光物質の創製	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 有機合成化学協会誌	6. 最初と最後の頁 922 ~ 929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Daiki, Shiraishi Takuya, Kagechika Hiroyuki, Hirano Tomoya	4. 巻 86
2. 論文標題 6-Arylcoumarin as a Scaffold of Photofunctional Molecules with OFF-ON-OFF Type Regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 2264 ~ 2270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c02419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takayanagi Saki, Watanabe Kengo, Maruyama Takeshi, Ogawa Motoyuki, Morishita Kazuhiro, Soga Mayumi, Hatta Tomohisa, Natsume Tooru, Hirano Tomoya, Kagechika Hiroyuki, Hattori Kazuki, Naguro Isao, Ichijo Hidenori	4. 巻 11
2. 論文標題 ASKA technology-based pull-down method reveals a suppressive effect of ASK1 on the inflammatory NOD-RIPK2 pathway in brown adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01123-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Takeshi, Yoshida Kanoko, Kikuchi Takashi, Hirano Tomoya	4. 巻 20
2. 論文標題 Isolation and Structure Elucidation of New Cytotoxic Macrolides Halosmysins B and C from the Fungus Halosphaeriaceae sp. Associated with a Marine Alga	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 226 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md20040226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計20件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安田大輔、磯野真理子、加藤大輝、影近弘之、平野智也
2. 発表標題 過酸化水素存在下で生理活性物質を放出するケージド化合物の創成
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北川星来、岡優希、安田大輔、上川 拓也、影近弘之、平野智也
2. 発表標題 N1-メチルアデノシンを検出する蛍光センサーの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北川星来、岡優希、安田大輔、上川 拓也、影近弘之、平野智也
2. 発表標題 有機化学反応に基づくN1-メチルアデノシンの蛍光検出法の開発
3. 学会等名 第44回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田大輔、中嶋祐介、笹井美花、東田岳都、峰晴満帆、加藤大輝、影近 弘之、平野智也
2. 発表標題 クマリン骨格を有するpH応答型ケージド化合物の合成と光分解特性
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂野翼、星野匡彦、柴崎紀子、安原徳子、平野智也、影近弘之、大崎愛弓
2. 発表標題 Tetradium ruticarpumおよびQuassia amara由来の蛍光を有するアルカロイドの探索
3. 学会等名 第66回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田大輔、片岸大紀、大江知之、平野智也
2. 発表標題 ナフタレン-2-アセトアミド誘導体の細胞内Nrf2活性化効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡優希、北川星来、竹信慶乃、高絢一果、安田大輔、上川拓也、影近弘之、大江知之、平野智也
2. 発表標題 N1-メチルアデノシンを検出する蛍光センサーの構造最適化に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湊沙璃、菊地崇、大月興春、山田剛司、平野智也、李巍
2. 発表標題 タモギタケ子実体の開裂型ステロイドに関する成分研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野智也、磯野真理子、佐々木真衣、加藤大輝、影近弘之
2. 発表標題 活性酸素存在下で機能するCaged化合物の開発
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野智也、加藤大輝、影近弘之
2. 発表標題 活性酸素種によって機能する光分解性保護基の開発
3. 学会等名 第47回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 園畑みずき、神長楓、岸玲奈、安原徳子、柴崎典子、平野智也、影近弘之、大崎愛弓
2. 発表標題 柑橘類“不知火”果皮に含まれる蛍光成分と蛍光特性について
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹井美花、中嶋祐介、安田大輔、加藤大輝、影近弘之、平野智也
2. 発表標題 OFF-ON-OFF変化型pH応答性光分解性保護基の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大間知佳斗、阪本健太郎、高野乃真子、安田大輔、影近弘之、平野智也
2. 発表標題 亜鉛イオン応答型光分解性保護基の開発研究
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大崎愛弓、園畑みずき、安原徳子、柴崎紀子、平野智也、影近弘之
2. 発表標題 柑橘系果皮に含まれるPMFの蛍光特性と細胞への応用
3. 学会等名 第67回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田大輔、大間知佳斗、阪本健太郎、高野乃真子、影近弘之、平野智也
2. 発表標題 亜鉛イオン応答型光分解性保護基の開発
3. 学会等名 第49回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大崎愛弓、園畑みずき、安原徳子、柴崎紀子、平野智也、影近弘之
2. 発表標題 柑橘果皮由来の蛍光成分の蛍光特性と生細胞への応用
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安田大輔、井上大輔、杉本真優、海東和麻、大江知之、平野智也
2. 発表標題 側鎖にアセトアミド構造を有するナフタレン誘導体の細胞内Nrf2活性化効果
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平野智也、安田大輔、大間知佳斗、阪本健太郎、田中諒太、高野乃真子、影近弘之
2. 発表標題 亜鉛イオン応答型光分解性保護基の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安田大輔、井上大輔、海東和麻、多胡めぐみ、大江知之、平野智也
2. 発表標題 タンパク質間相互作用阻害型Nrf2モジュレーターの開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第18回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平野智也、安田大輔、影近弘之
2. 発表標題 生体分子応答型光分解性保護基の開発
3. 学会等名 第46回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

医薬分子化学研究室・大阪医科大学 https://www.ompu.ac.jp/class/pharm/pmb.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------