

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02859

研究課題名(和文) 機能性核酸と小分子化合物を利用した細胞機能解析の技術基盤の創生

研究課題名(英文) Understanding Cellular Function with Short RNAs and Small Molecules

研究代表者

佐藤 慎一 (SATO, SHINICHI)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：70534478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な細胞機能の理解を深めるためには、タンパク質や核酸などの機能性生体高分子の時空間的な機能発現を系統立てて研究することが重要である。しかし、細胞自身が生産する生体分子を天然のまま解析可能な方法は少なく技術的に難しかった。本研究では、採択者自身が開発した「機能性RNAと小分子化合物」を研究ツールとして利用し、哺乳動物細胞内でRNA機能を操り、タンパク質の機能発現機構を解析できる革新的方法の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では生細胞内でRNA機能を操る新たな研究手法を創出し、未知の生命現象を解き明かす研究ツールとして利用することを目指した。研究期間内で大きな成果を得ることに成功し、国際的評価が最も高い核酸化学専門誌であるNucleic Acids Research誌(IF=19.160)への2報の報告を含む、4報への国際誌に研究成果を報告した。

Selected Publications

1. Nucleic Acids Research, 50(14), 8143-8153, 2022, 2. Nucleic Acids Research, 49(22), e132-e132, 2021

研究成果の概要(英文)：To understand complex cellular functions, it is important to systematically investigate the spatio-temporal functional expression of bioorganic molecules such as proteins and nucleic acids. However, there are few methods that allow analysis of endogenous bioorganic molecules in living cells, making it technically difficult. In this research, we established an innovative method to regulate RNA functions in mammalian cells and to analyze gene expression by using "a functional RNA and a small molecule" as a research tool.

研究分野：生体関連化学

キーワード：機能性RNA 小分子化合物 ケミカルバイオロジー イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の恒常性は、核酸・タンパク質・脂質・糖鎖・代謝産物などの生体分子が互いに連携・機能することで維持されている。複雑な細胞機能の理解を深めるためには、タンパク質や核酸などの機能性生体高分子の時空間的な機能発現を系統立てて研究することが重要だ。小分子化合物を利用したケミカルバイオロジーは、タンパク質の生理機能を制御することで、生命現象の解明に新たな切り口を提供してきた。しかし、複雑に絡み合う生命現象の謎を明らかにするには、DNA や RNA などの核酸を含む、生体機能分子の機能を高度に制御・解析する高いツール機能が必要となる。採択者は、哺乳動物細胞内で RNA 機能を操り、これまでの研究ツールで明らかにされていない困難な生命現象の謎に切り込む。採択者が生細胞内で利用する研究ツールとして選んだのは「RNA」と「小分子化合物」。RNA は生体分子で毒性も少なく、直接細胞に発現させることができるのでストレスが低い自然な状態での細胞観察が可能である。また、RNA 自体に高い機能を付加できることに魅力がある。小分子化合物は古くから安定に供給できる細胞生物学ツールとしての利用されており、方法を一般化する上で大きなメリットとなる。誰もが簡単に利用できる研究ツールは、生物学研究を爆発的に加速させる革新的な技術となり得る。

2. 研究の目的

(1) 内在性タンパク質の生細胞内動態解析法の創出

本研究では、採択者が独自に開発した「機能性 RNA と小分子化合物」を基に、生細胞において内在性タンパク質の動態や増減を時空間的に観察・制御できるツールを開発し、それらを利用した細胞機能解析基盤技術の創成を目指す。誰もが簡単に利用できる内在性の生体分子の生細胞内観察手法があれば、生物学研究を爆発的に加速させる革新的な技術となり得る。標的 RNA と正しく相補鎖形成した時のみ RNA を標識できる本イメージング法は、核酸プローブ特有のミスアニーリングによる偽陽性シグナルはほとんど観察されることはない(引用文献)。この RNA イメージング法の考えを土台にして、内在性タンパク質イメージング法を考案すれば、協同的に標的タンパク質を高選択的に蛍光標識できる方法が確立できる。これまでのタンパク質イメージング法とは一線を画する方法であり、抗体様のタンパク質認識能を持つ RNA ツールを生細胞内で操った画期的な方法になる。

(2) RNA G-quadruplex の網羅的探索とビッグデータ基盤構築

採択者自身が発見した RGB-1 は、生細胞内において RNA G-quadruplex を持つ mRNA からのタンパク質翻訳を抑制する(引用文献)。この化合物をツールとして利用すれば、生細胞内でタンパク質翻訳に影響している RNA G-quadruplex を網羅的に探索できる。本研究では、プロテオミクス解析とマイクロアレイ解析を重ねて行うことで、タンパク質翻訳に影響を与える RNA G-quadruplex 構造を網羅的に解析してビッグデータ基盤の構築を目指す。

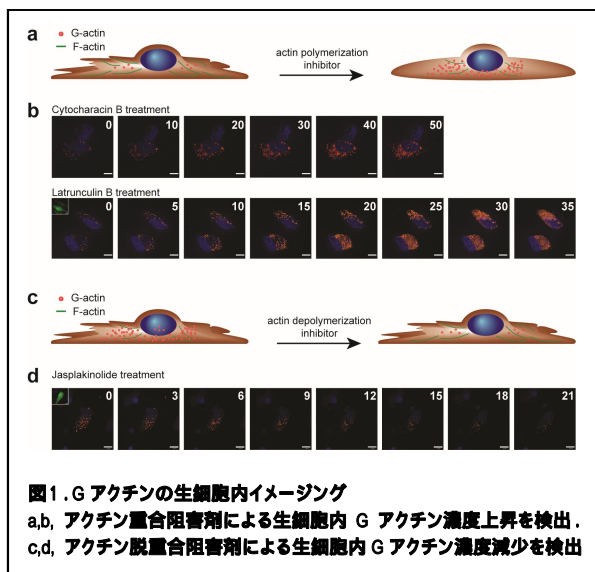
3. 研究の方法

(1) 本研究提案では、生細胞の内在性タンパク質を蛍光標識できる革新的方法を確立する。20塩基からなるランダム配列を両アーム部位に配置したライブラリーを作製し、in vitro selection でタンパク質標的アプタマーを選出する。研究コンセプトの妥当性を示すため、アクチンタンパク質を標的として結合する RNA アプタマーを濃縮・選択する。また、得られた RNA アプタマーを細胞に発現し、アクチンタンパク質の生細胞内イメージングを行う。

(2) 採択者自身が発見した RGB-1 は、生細胞内において RNA G-quadruplex を持つ mRNA からのタンパク質翻訳を抑制する。この化合物をツールとして利用して、生細胞内でタンパク質翻訳に影響している RNA G-quadruplex を網羅的に探索する。プロテオミクス解析とマイクロアレイ解析を重ねて行うことで、タンパク質翻訳に影響を与える RNA G-quadruplex 構造を網羅的に解析してビッグデータ基盤の構築を目指す。

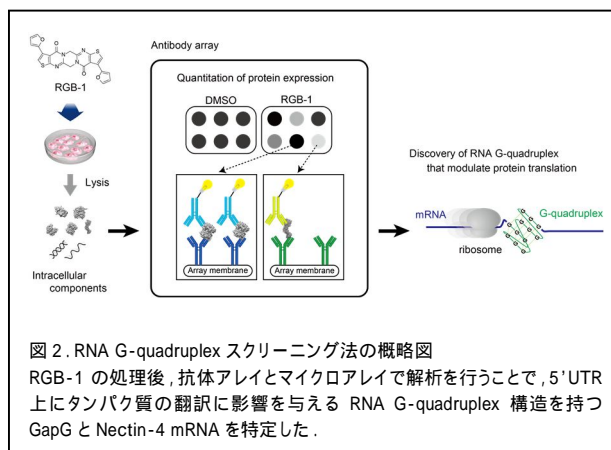
4. 研究成果

(1) 二機能性 RNA アプタマーと蛍光プローブを利用した内在性タンパク質の新規標識法を確立し、国際的科学論文への公表した(Nucleic Acids Res., 2021, IF=19.160)。本研究は、蛍光プローブ結合性 RNA アプタマーをベースにした RNA ライ



ブラリーから、蛍光プローブと アクチンタンパク質を同時に結合する能力を持つ二機能性 RNA アプタマーを In vitro selection により得ることから始めた。得られた RNA アプタマーは、細胞内のアクチンタンパク質検出に置いて、単量体アクチンである G アクチンを選択的に標識するものであった。G アクチンの生細胞内イメージングでは、アクチン重合・脱重合阻害剤により、G アクチンの細胞内濃度変化を可視化できた (図 1)。

(2) 採択者自身が開発した RNA G-quadruplex 結合化合物である RGB-1 を利用して、ハイスループットスクリーニング法の確立を行った (図 2)。RGB-1 で処理された細胞の中では、mRNA 上に存在する G-quadruplex が安定化され、タンパク質の翻訳が抑制されると考えられる。すなわち、RGB-1 の処理の有無でタンパク質の発現量が異なる遺伝子は、mRNA に G-quadruplex を持つと予想できる。mRNA の発現量に影響が無く、タンパク質の翻訳に影響があった遺伝子を抗体アレイとマイクロアレイで解析し、G-quadruplex を持つ mRNA を特定した。84 種のがん関連



遺伝子群を解析した結果、CapG と Nectin-4 の mRNA の 5' UTR 上にタンパク質の翻訳に影響を与える RNA G-quadruplex 構造が存在することを発見した。更なる機能解析により、CapG に存在する G-quadruplex 構造は、構造多型を持ち、カリウムイオン濃度により G-quadruplex 構造を組み替えることで、タンパク質翻訳を制御しているという RNA G-quadruplex 構造の新たな生理機能を明らかにした。その成果は国際的科学論文への公表した (Nucleic Acids Res., 2022, IF=19.160)。

< 引用文献 >

- Sato, S., Watanabe, M., Katsuda, Y., Murata, A., Wang, D. O., Uesugi, M., Live-Cell Imaging of Endogenous mRNAs with a Small Molecule, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54(6), 1855-1858, 2015
- Katsuda, Y., Sato, S., Asano, L., Morimura, Y., Furuta, T., Hagihara, M., Uesugi M., A Small Molecule That Represses Translation of G-Quadruplex-Containing mRNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 138(29), 9037-9040, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toh Kohei, Nishio Kosuke, Nakagawa Reiko, Egoshi Syusuke, Abo Masahiro, Perron Amelie, Sato Shin-ichi, Okumura Naoki, Koizumi Noriko, Dodo Kosuke, Sodeoka Mikiko, Uesugi Motonari	4. 巻 144
2. 論文標題 Chemoproteomic Identification of Blue-Light-Damaged Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 20171 ~ 20176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c07180	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 Katsuda Yousuke, Sato Shin-ichi, Inoue Maimi, Tsugawa Hisashi, Kamura Takuto, Kida Tomoki, Matsumoto Rio, Asamitsu Sefan, Shioda Norifumi, Shirotto Shuhei, Oosawatsu Yoshiki, Yatsuzuka Kenji, Kitamura Yusuke, Hagihara Masaki, Ihara Toshihiro, Uesugi Motonari	4. 巻 50
2. 論文標題 Small molecule-based detection of non-canonical RNA G-quadruplex structures that modulate protein translation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8143 ~ 8153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac580	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 Noda Naotaka, Jung Yejin, Ado Genyir, Mizuhata Yoshiyuki, Higuchi Masakazu, Ogawa Tetsuya, Ishidate Fumiyoshi, Sato Shin-ichi, Kurata Hiroki, Tokitoh Norihiro, Uesugi Motonari	4. 巻 17
2. 論文標題 Glucose as a Protein-Condensing Cellular Solute	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 567 ~ 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.1c00849	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 Jung Yejin, Noda Naotaka, Takaya Junichiro, Abo Masahiro, Toh Kohei, Tajiri Ken, Cui Changyi, Zhou Lu, Sato Shin-ichi, Uesugi Motonari	4. 巻 17
2. 論文標題 Discovery of Non-Cysteine-Targeting Covalent Inhibitors by Activity-Based Proteomic Screening with a Cysteine-Reactive Probe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 340 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.1c00824	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 Ado Genyir, Noda Naotaka, Vu Hue T., Perron Amelie, Mahapatra Amarjyoti D., Arista Karla Pineda, Yoshimura Hideaki, Packwood Daniel M., Ishidate Fumiyoshi, Sato Shin-ichi, Ozawa Takeaki, Uesugi Motonari	4. 巻 13
2. 論文標題 Discovery of a phase-separating small molecule that selectively sequesters tubulin in cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 5760 ~ 5766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1SC07151C	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 Kathleen Beverly Alog Pe, Kenji Yatsuzuka, Hayase Hakariya, Tomoki Kida, Yousuke Katsuda, Masatora Fukuda, Shin-ichi Sato	4. 巻 49
2. 論文標題 RNA-based cooperative protein labeling that permits direct monitoring of the intracellular concentration change of an endogenous protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e132 ~ e132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab839	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 Masaki Hagihara, Shuhei Shiroto, Shunya Igarashi, Shin-ichi Sato	4. 巻 50
2. 論文標題 Guanine-tethered Oligonucleotides Restore Abnormal Protein Synthesis with a SNP Mutation in a 5'-UTR G-quadruplex of Human MSH2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1806 ~ 1809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210391	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 Nishio Takashi, Yoshikawa Yuko, Yoshikawa Kenichi, Sato Shin-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Longer DNA exhibits greater potential for cell-free gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91243-x	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 Hakariya Hayase, Takashima Ippei, Takemoto Misao, Noda Naotaka, Sato Shin-ichi, Uesugi Motonari	4. 巻 57
2. 論文標題 Non-genetic cell-surface modification with a self-assembling molecular glue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC07171D	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 Punzalan Louvy Lynn, Jiang Lulu, Mao Di, Mahapatra Amarjyoti Das, Sato Shinichi, Takemoto Yasushi, Tsujimura Mari, Kusamori Kosuke, Nishikawa Makiya, Zhou Lu, Uesugi Motonari	4. 巻 27
2. 論文標題 Chemoproteomic Profiling of a Pharmacophore-Focused Chemical Library	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 708 ~ 718.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.04.007	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 嘉村 匠人、勝田 陽介、中村 太志、辻田 賢一、北村 裕介、萩原 正規、佐藤 慎一、井原 敏博
2. 発表標題 次世代型核酸医薬を志向したRNA hacking技術による遺伝子発現制御法の開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木田 朋輝、勝田 陽介、嘉村 匠人、北村 裕介、萩原 正規、佐藤 慎一、井原 敏博
2. 発表標題 RNA hacking技術に基づいた人工核酸型Staple核酸によるin vivo遺伝子発現抑制
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤慎一
2. 発表標題 生細胞内でRNA機能を操作して生命現象を理解する
3. 学会等名 久留米高専生物応用化学科セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝田陽介, 嘉村匠人, 木田朋輝, 北村裕介, 佐藤慎一, 萩原正規, 井原敏博
2. 発表標題 RNA高次構造変化に伴う新規核酸医薬技術の開発
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 五木結愛, 勝田陽介, 北村裕介, 萩原正規, 佐藤慎一, 井原敏博
2. 発表標題 新規パーキンソン病治療薬開発に向けたStaple核酸による遺伝子発現制御
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 嘉村匠人, 勝田陽介, 中村太志, 辻田賢一, 北村裕介, 萩原正規, 佐藤慎一, 井原敏博
2. 発表標題 Staple核酸によるmRNA高次構造の形成誘導戦略に基づく遺伝子発現制御法の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木田 朋輝、勝田 陽介、北村 裕介、萩原 正規、佐藤 慎一、井原 敏博
2. 発表標題 次世代型核酸医薬開発を指向した人工核酸型Stapleの遺伝子発現制御
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤慎一
2. 発表標題 生細胞内でRNA機能を操作して生命現象を理解する～核酸の機能的デザイン～
3. 学会等名 岩手大学理工学部セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin-ichi Sato, Hayase Hakariya, Eiji Nakata, Takashi Morii
2. 発表標題 A small-molecule-based technology for live-cell imaging of energy
3. 学会等名 The 12th International Symposium of Advanced Energy Science
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木田朋輝, 勝田陽介, 嘉村匠人, 北村裕介, 萩原正規, 佐藤慎一, 井原敏博
2. 発表標題 核酸医薬への応用を目指した Staple XNAs による標的遺伝子発現抑制
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	萩原 正規 (HAGIHARA MASAKI) (40403000)	弘前大学・理工学研究科・准教授 (11101)	

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
---------	---------