

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04705

研究課題名(和文) 遺伝子ネットワークを制御する分子の開発と細胞への応用

研究課題名(英文) Development of molecules that control gene networks and their application to cells

研究代表者

杉山 弘 (SUGIYAMA, Hiroshi)

京都大学・高等研究院・研究員

研究者番号：50183843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレオソームのネットワークを介した遺伝子発現機構を分子レベルで解明することができれば、生体機能分子研究への応用が期待できる。研究開発代表者は、ヌクレオソームを中心とした遺伝子発現の動態の可視化をDNAオリガミ-AFM測定技術によって実現した。さらに遺伝子発現ネットワークを制御するための機能分子として環状ポリアミド分子やクロラムブシルポリアミド分子を開発し、培養ヒトがん細胞やハンチントン発症マウスへの解析評価を行った。本研究遂行により得られた成果によって、ナノスケールでの分子配列化と一分子解析を活かした生命現象の解明に成功し、機能分子創成に関する技術基盤を確立したと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現はヌクレオソーム中のヒストンや核酸塩基の化学修飾によって制御され、ヌクレオソーム間の距離や配向によってクロマチンの高次構造が形成される。分子レベルの解像度のクロマチン構造の動態や反応機構の詳細は解明されておらず、研究代表者らが分子科学の立場からナノスケールでの遺伝子発現機構の解明と機能分子による制御技術の開拓を行ったことに、学術的な意義があると考えます。本研究で得られた遺伝子発現制御技術に関する知見は、大学研究機関や企業へ広がっており、核酸領域研究に関連する新概念の創出や将来的な医薬品分野への発展の可能性が見込まれている。

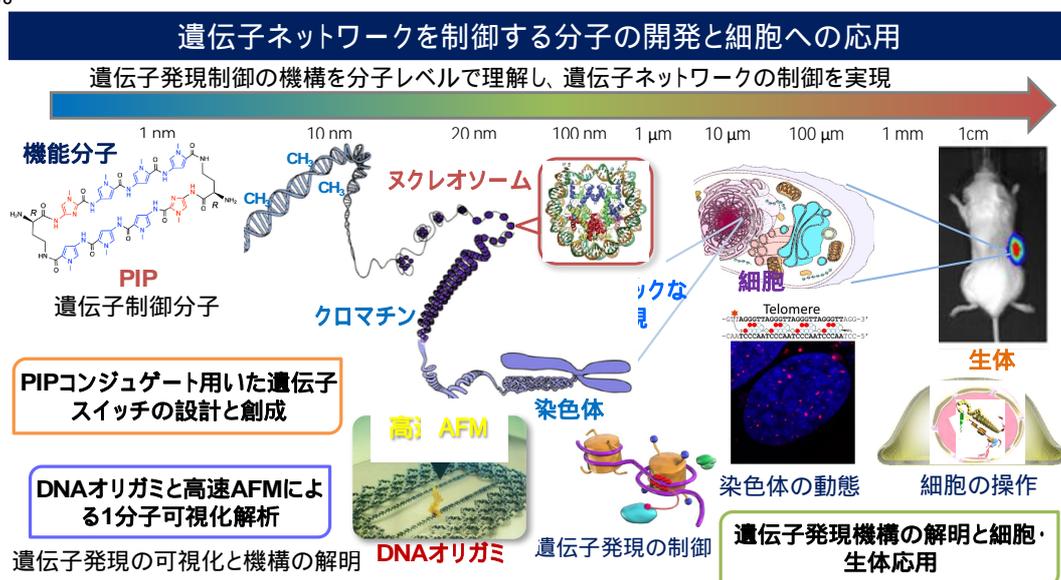
研究成果の概要(英文)：If we can elucidate the gene expression mechanism mediated by the nucleosome network at the molecular level, we can expect its application to biofunctional molecular research. The research and development representative succeeded in visualizing the dynamics of gene expression centered on nucleosomes using DNA origami-AFM measurement technology. Furthermore, we developed cyclic polyamide molecules and chlorambucil polyamide molecules as functional molecules to control gene expression networks, and analyzed and evaluated them in cultured human cancer cells and mice with Huntington's disease. We believe that the results obtained through this research have enabled us to successfully elucidate biological phenomena using nanoscale molecular arrangement and single molecule analysis, and have established a technological foundation for the creation of functional molecules.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 生物有機化学

### 1. 研究開発当初の背景

研究代表者らは、DNA 構造体の構築法である「DNA オリガミ法」と AFM 技術を組み合わせることで、任意のナノスケール構造体の空間を設計し、分子の集積化や 1 分子レベルの動的な観察を可能にする測定技術を開発してきた「CREST 研究「プロセスインテグレーションに向けた高機能ナノ構造体の創出」(H20-26)」。また、独立して基盤研究(S)「分子科学的アプローチによる遺伝子発現の制御と機構の解明」(H24-27)および「人工遺伝子スイッチを用いた遺伝子発現の制御と機構の解明」(H28-R2)において、化学的なアプローチによる遺伝子の発現制御を研究してきた。特に、塩基配列特異的に DNA へ結合する ピロールイミダゾールポリアミド (PIP) に注目し、PIP と各種薬剤を共有結合で連結させた複合体 PIP コンジュゲートの研究開発を進めてきた。PIP コンジュゲートは、ゲノムを標的として細胞内の遺伝子ネットワークを制御するツールとして大きな可能性を有する化合物であり、高い汎用性を持つ制御分子として期待されていた。



### 2. 研究の目的

本研究提案は、ヌクレオソームを中心とした遺伝子発現の機構を 1 分子レベルの可視化技術を通じて解明することを目的とする。そのために、まずヌクレオソーム多量体を DNA ナノ構造に配列化することで、その空間配置や相互作用から生まれる遺伝子発現の動態の可視化と機構の解明を行い、遺伝子ネットワークを制御するための新たな分子の開発と細胞への応用を進める。研究代表者らは、1) DNA やヒストンの修飾がヌクレオソーム多量体の構造にどのような影響を与えるのか、2) 最終的にこれらのヌクレオソーム高次構造の変化がどのように遺伝子発現のパターンを変化させるのか、について 1 分子レベルでその動態を可視化し解析評価する。

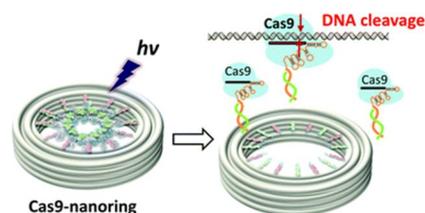
### 3. 研究の方法

本研究は、(1)高速 AFM による 1 分子解析技術を遺伝子ネットワークに関連する複合的なヌクレオソーム構造の動態解析と遺伝子発現制御機構の解明、(2)様々な遺伝子配列やヌクレオソーム配列に対する遺伝子発現の制御技術の開発に向けた細胞生物学的機能解析評価、(3)ヌクレオソーム構造を制御する PIP コンジュゲートの合成と化学特性評価、以上の 3 つの研究目標を立てて本研究を進めた。

#### 4. 研究成果

##### (1) DNA ナノ構造体の遺伝子ネットワークを模倣した配列化研究と1分子解析

DNAナノ構造体上に光照射によって構造変化が誘起される機能性分子を配列化プログラムに基づいて配置し、そのナノ構造体の光ダイナミックな変化を基にタンパク質などの1分子の動的な解析、距離と空間を制御した状態での相互作用の解析測定技術の開発を進めた。例えば、構造内にCas9タンパク質を封入したnano-ring状のDNAオリガミを作成し、その活性発現を光で制御する方法論を報告した (Abe, K. et al. *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 5594-5596)。



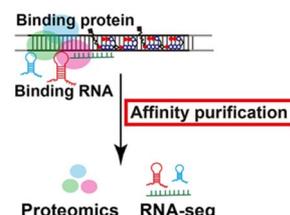
また、光照射で長さを制御するアゾベンゼンを含むDNAナノ構造体を用いて、細胞外マトリックスを開発し、光照射による応答性を実証した [ Sethi, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, 20342-20349. Sethi, S. et al. *Nanoscale*, **2023**, 15, 2904-2910. ]。これらの技術開発によって、細胞の動態を光応答性分子を付与したDNAナノ構造体によって制御できる可能性を示した。

異なる研究アプローチとして、Nanopore測定を用いるRNA配列内の変異型塩基の解析技術への応用を試行した結果、変異型塩基の存在に対して特異的に発生する応答を確認することに成功した (Ramasamy, S. et al. *Genomics*, **2022**, 114, 110372)。

異なる研究アプローチとして、Nanopore測定を用いるRNA配列内の変異型塩基の解析技術への応用を試行した結果、変異型塩基の存在に対して特異的に発生する応答を確認することに成功した (Ramasamy, S. et al. *Genomics*, **2022**, 114, 110372)。

##### (2) ヒトテロメア配列に特異的に結合する機能性PIPの開発

テロメア配列は染色体末端に存在しており、その長さが細胞寿命にも関連するため高い関心を集めている。国立遺伝学研究所の前島教授らとの共同研究として、ヒトテロメア配列に結合する蛍光性PIPを用いて、テロメア結合性タンパク質やRNAの結合性をRNA-seq解析によって評価した結果をまとめ、論文として報告した (Ide, S. et al. *Epigenetics & Chromatin* **2021**, 14, 46)。これらの解析結果は、細胞内のクロマチン構造の機能や組織化の機構解明に向けて役立つと考える。

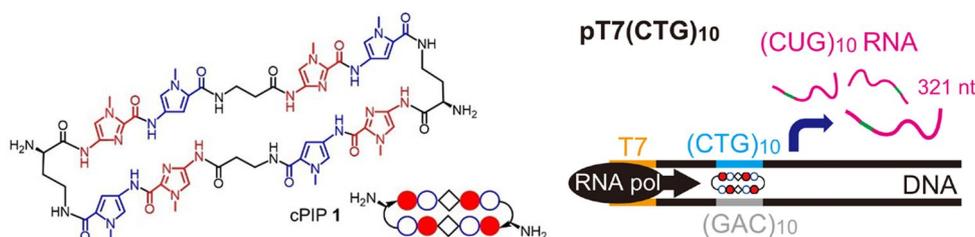


##### (3) 疾患性トリプレットリピート配列に特異的に結合する環状 PIP の開発

先天性のトリプレットリピート病の重篤度と比例して、リピート配列の異常伸長が確認されている。研究代表者らの開発した環状 PIP を用いれば、異常伸長したリピート配列に対する高い結合性によって異常遺伝子の発現抑制が可能であると考えた。まず CAG/CTG リピート配列を標的とする環状 PIP(cPIP 1)を設計、合成し、化学的に結

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

合特性を解析評価した結果、CAG/CTG 配列に対する強い DNA 結合性を有していることを確認した (Hirose, Y. et al. *ChemBioChem* **2022**, 23, e202100533)。塩田らとの共同研究として、cPIP 1 の異常伸長した CAG/CTG 配列を持つ疾患細胞に与える影響を解析評価した結果、特異的な転写阻害を確認した。加えて、疾患発症マウスを用いた動物実験において症状の緩和が観察されたことから、研究成果をまとめ論文として報告した (Ikenoshita, S. et al. *J. Clin. Invest.* **2023**, 133, e164792)。今後、様々な疾患要因となっている他のトリプレットリピートに対する薬剤の開発にも本アプローチは応用可能であると考えられる。



また、GAA/TTC リピート配列を標的とする PIP コンジュゲートの研究開発として様々なカチオンを持った鎖状誘導体を合成し、それらの構造活性比較によって構造内の極性が遺伝子発現へ与える影響を解析評価し、結果をまとめ報告した [ Hatanaka, J. et al. *ChemBioChem* **2022**, 23, e202200124. Hatanaka, J. et al. *Bioorg Med Chem.* **2023** 81, 117208. ]。これらの解析結果は、先天性疾患細胞内のクロマチン構造の機能制御を目指す上で役立つと期待する。

### (4) Runx 結合配列を標的とする DNA 損傷性 PIP の開発

Runx 遺伝子は白血病などのがんの発症や増殖に関連性がある転写因子であり、研究代表者らは、Runx 結合配列を標的とする DNA 損傷型 PIP の開発を進めてきた。本研究期間内で千葉がんセンター 上久保らとの共同研究として、マウスに移植した各種ヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を解析評価し、得られた結果を論文として報告した (Masuda, T. et al. *Cancer Science* **2022**, 113, 529-539 他)。また、p53 変異配列をもつヒト髄芽腫細胞に対する増殖抑制効果も確認しており (Matsui, Y. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* **2022**, 620, 150-157)、薬剤候補化合物として機能性 PIP の細胞応用を進めたと考えられる。

### (5) 国際共同研究の推進

本研究期間内に研究代表者らの有する DNA ナノ構造体構築技術や 1 分子解析技術を介して、以下の国際共同研究が進んだ。(a) 華東工科大学 Xuhong Qian 教授らとの共同研究では、ポリペプチド修飾によって自己集合させた DNA ナノスフィア構造体の

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

細胞応用に向けた 1 分子解析技術を活かした解析評価を進めた(Wang, B. et al. *Soft Matter*, **2021**, *17*, 1184-1186)。 (b)ケント大学 Hanbin Mao らとの共同研究によって、DNA オリガミ技術を活かした G-quadruplex 構造体の解析研究を行い、論文として報告した(Pandey, S. et al. *J. Phys. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 8692–8698)。 (c)華東理工大学 Xuhong Qian らとの共同研究によって、DNA 修飾したハイドロゲルによって集合させた DNA ナノ構造体の STEM 細胞内応用に向けた解析評価の結果を報告した(Yao, S. et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 20739–20748)。 (d)PSL 大学 C. R-Gendron らとの共同研究によって、DNA origami 技術を基盤とした DNA ナノ構造体の熱的な自己会合様式のコンポーネントに関する研究を進め、論文として報告した (C. R-Gendron et al. *Nat Nanotechnol.* **2023**, *18*, 1311-1318)。

また、研究代表者らの有する機能性ポリアミド研究を介して、以下の国際共同研究が進んだ。(e)浙江工業大学 Wen Zhang 教授らとの共同研究として、PD-L1 転写開始領域の配列を標的とする PIP を開発し、PD-L1 遺伝子の特異的な遺伝子発現抑制を確認した(Wang, M. et al. *J. Med. Chem.*, **2021**, *64*, 6021-6036)。 (f)Wisconsin 大学 Kyubong Jo らとの PIP に関連する共同研究の進展によって、単分子 DNA 内の遺伝情報の PIP の DNA 塩基配列特異的な結合特性を活かした可視的な解析法の開拓に成功した(Jin, Y. et al. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 16927–16935)。

最終年度には、1) 遺伝子ネットワークを制御するための機能分子開発や 2) DNA オリガミ技術を基盤とする DNA ナノ構造の構築技術、3) 核酸を基盤とする小分子を用いる特異的な転写抑制技術への応用研究をまとめ、3 報の review として報告した。本研究期間内に得られた研究成果によって、分子レベルでの遺伝子発現に関する機構解明や、遺伝子ネットワークを制御する機能分子開発研究が大きく進展したと考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hidaka Takuya, Hashiya Kaori, Bando Toshikazu, Pandian Ganesh N., Sugiyama Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Targeted elimination of mutated mitochondrial DNA by a multi-functional conjugate capable of sequence-specific adenine alkylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 690 ~ 695.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.08.003	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 Malinee Madhu, Pandian Ganesh Namasivayam, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Targeted epigenetic induction of mitochondrial biogenesis enhances antitumor immunity in mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 463 ~ 475.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.08.001	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 Jonchhe Sagun, Pandey Shankar, Beneze Christian, Emura Tomoko, Sugiyama Hiroshi, Endo Masayuki, Mao Hanbin	4. 巻 50
2. 論文標題 Dissection of nanoconfinement and proximity effects on the binding events in DNA origami nanocavity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 697 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab1298	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 該当する
1. 著者名 Hirose Yuki, Ohno Tomo, Asamitsu Sefan, Hashiya Kaori, Bando Toshikazu, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Strong and Specific Recognition of CAG/CTG Repeat DNA (5' dwGCWGCW 3') by a Cyclic Pyrrole Imidazole Polyamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202100533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100533	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 Hidaka Takuya, Wee Wen Ann, Yum Ji Hye, Sugiyama Hiroshi, Park Soyoung	4. 巻 32
2. 論文標題 Photo-Controllable Phase Transition of Arylazopyrazole-Conjugated Oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 2129 ~ 2133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00302	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 Sethi Soumya, Hidaka Kumi, Sugiyama Hiroshi, Endo Masayuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Non invasive Regulation of Cellular Morphology Using a Photoswitchable Mechanical DNA Polymer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 20342 ~ 20349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202105425	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 Takusagawa Mari, Kobayashi Yusuke, Fukao Yoichiro, Hidaka Kumi, Endo Masayuki, Sugiyama Hiroshi, Hamaji Takashi, Kato Yoshinobu, Miyakawa Isamu, Misumi Osami, Shikanai Toshiharu, Nishimura Yoshiki	4. 巻 118
2. 論文標題 HBD1 protein with a tandem repeat of two HMG-box domains is a DNA clip to organize chloroplast nucleoids in Chlamydomonas reinhardtii	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2021053118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2021053118	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 Maeda Rina, Bando Toshikazu, Sugiyama Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Application of DNA Alkylating Pyrrole Imidazole Polyamides for Cancer Treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1538 ~ 1545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000752	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0件

〔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	板東 俊和  (Toshikazu Bando)  (20345284)	京都大学・理学研究科・准教授   (14301)	
研究分担者	ナマシヴァヤム パンディアン  (Namasivayam Pandian)  (20625446)	京都大学・高等研究院・講師   (14301)	

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