

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02845

研究課題名（和文）核酸高次構造上で活性化する新規反応素子の開発と高選択的阻害剤への展開

研究課題名（英文）Development of novel reactive units that activate on higher-order structures of nucleic acids and their application to highly selective inhibitors

研究代表者

鬼塚 和光 (Onizuka, Kazumitsu)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：00707961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では標的核酸と選択的に反応する反応素子の創製を目指し、標的誘起反応性を有する新しい核酸修飾素子の開発に取り組んだ。その結果、標的誘起反応性のための優れた脱離基を発見、G4重鎖（G4）構造選択的な反応剤を開発、化学修飾RNA探索法の開発に成功した。特にではパラレルG4構造選択的な反応剤も開発することに成功、では反応するRNAを簡便かつ大規模にランク化（1824種の配列の反応性ランク化）することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した反応素子は、核酸との反応点が従来の反応素子とは異なり二本鎖構造の内部に存在する。さらに、標的誘起反応性をキーワードに分子の反応性を巧みに制御することで、目的の核酸構造で活性化し修飾できる選択性の高い分子を開発することに成功した。活性化のシグナルは標的核酸に結合すること、という非常にシンプルかつ新規性の高いものであり、学術的意義は高い。共有結合性薬剤や核酸の構造解析試薬への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, we aimed to create a reactive unit that selectively reacts with the target nucleic acid, and worked on the development of a novel nucleic acid modification unit with target-induced reactivity. As a result, we succeeded in discovering an excellent leaving group for target-induced reactivity, developing a G-quadruplex (G4) structure-selective reactant, and developing a chemically modified RNA search system. In particular, in , we succeeded in developing a parallel G4 structure-selective reactant, and in , we succeeded in ranking the reacting RNA easily and on a large scale (1824 types of sequences).

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸修飾 アルキル化 誘起反応性 G4 RNA 大規模解析

### 1. 研究開始当初の背景

生体夾雑系における生体高分子の標的選択的な化学修飾は、生命現象の制御や解明にとって非常に重要である。例えば、核酸に対する化学修飾では、ナイトロジェンマスタード薬や白金製剤のような抗がん剤としての利用が有名であり、生化学的ツールとしてもよく用いられている(図1)。現在でも核酸修飾のための様々な反応素子が研究・開発されている一方で、チオール(グルタチオンなど)やアミン(スペルミンなど)のような生体夾雑物との望まない反応(不活性化)や標的以外の核酸への反応の回避は非常に難しい課題となっている。

DNA や RNA は二本鎖構造だけでなく、様々な高次構造を形成することが知られている。近年の研究から配列情報だけでなく、これらの高次構造も遺伝子発現制御において重要であることが明らかになってきた。私はこれまでに核酸が形成する高次構造の中でも、生体内の遺伝子発現制御に重要な意味を持ち、創薬ターゲットになり得る G-四重鎖(G4)構造および T-T/U-U ミスマッチ構造に注目し、その選択的な化学修飾の開発を行ってきた。前者はテロメアやがん関連遺伝子に形成されると考えられており、その高選択的な化学修飾は抗がん剤開発や G4 構造の機能解明研究ツールとして重要であると考えられている。後者は、トリプレットリピート病の一つである筋強直性ジストロフィー1型(DM1)の原因となる CAG/CTG リPEAT DNA、CUG リPEAT RNA 上に形成されると考えられており、高選択的な化学修飾は転写や複製阻害、酵素結合阻害を引き起こすことが可能なため、未だ治療法が確立していないこの難病の治療薬開発に役立つことが期待できる。

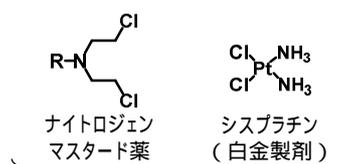
また、RNA は多種多様な高次構造を形成し、様々な生命現象を制御している。例えば、miRNA は癌を中心に数多くの病気で発現異常が報告されてきており、miRNA または miRNA 前駆体を標的とした創薬が注目されている。

### 2. 研究の目的

上記のような背景の下、反応素子に標的誘起反応性を付与することで反応素子の不活性化や標的以外への反応を回避できると考えた。つまり、標的に結合したときのみ反応性が ON になり、標的以外では反応が起こらない(OFF)、スマート反応素子の創製によりこれまでの問題点の克服を狙う(図2)。本研究課題では、核酸高次構造上で活性化する新規反応素子の開発と各標的に対する強力な阻害剤開発を目指し、4つの目標、(1)標的誘起反応性のための最適脱離基の探索、(2)標的構造選択性の付与(G4、ミスマッチ)(3)化学修飾 RNA 探索法の開発、(4)細胞での機能評価および機能探索を設定した。

### 3. 研究の方法

スマート反応素子の基本骨格には、ビニルキノザリノン(VQ)を選定した。このVQを高反応性活性種と想定して、この反応部位を様々な求核剤(Nu)で保護をした化合物を種々合成し、高次構造に対する化学修飾能を調査する。研究開始時には、チオフェニル(SPh)基を用いたときに、DNA中のチミジン(T)と効率的に反応できることを見出していた(図3)。この反応は標的核酸反応場が酸塩基触媒として働き E1cB 反応が促進されるため(標的誘起反応) VQ が生成し反応していると考えている。(1)最適脱離基の検討および(3)化学修飾 RNA 探索法の開発では幅広い高次構造に対するスクリーニングのため、結合ユニットとしてインターカレーターであるアクリジンを用いた。(2)と(4)では様々な核酸結合分子に VQ を修飾し、検討を行った。



抗がん剤として利用  
(二本鎖 DNA 中の G、A と反応し複製を阻害する)

#### 本研究

#### 核酸高次構造専用の反応素子開発

図1 既存の核酸修飾素子

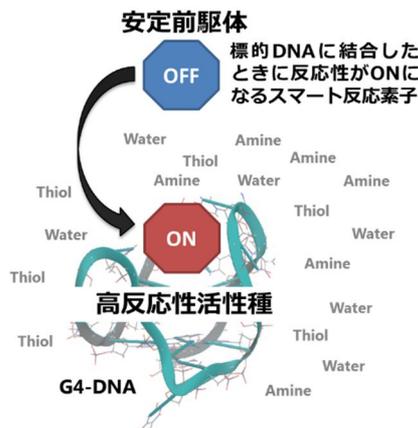


図2 スマート反応素子の概念図

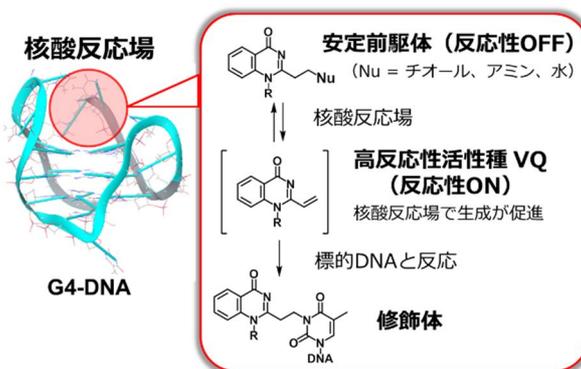


図3 標的誘起反応性を持つ反応素子

#### 4. 研究成果

(1) 標的誘起反応性のための最適脱離基を探索するため、VQ 安定前駆体の脱離基を種々検討した。pKa の異なる 8 種類のチオールや 6 種類のアミン、メタノールや水の付加物に関して、G4 構造に対する反応を検討した。その結果、すべての付加物に関してアルキル化反応の進行を観測することができた。チオール付加物に関して、反応性は pKa 依存적であり、pKa が低下するにしたがって、反応性は増加した。pKa が 9.5 以上のチオール付加物の反応は、G4 構造に結合することで脱離反応が促進される結合誘起反応であることも明らかになった。アミン付加物では期待以上の高効率な反応が観測された。アミン付加物は VQ と平衡状態で存在するため、標的がないときには安定であった(図 4)。一方で、標的を加えると速やかに反応し高収率で DNA や RNA の付加物を生成することが分かった。このアミン脱離基による反応は、アミンのプロトン化が重要であった。メタノール付加物は不安定であり、保存中次第に水付加物へと変化した。水付加物の反応効率は高くなかったものの反応自体は進行した。通常反応剤は水が付加すると失活するがこの分子は反応性を保っており、興味深い性質である。

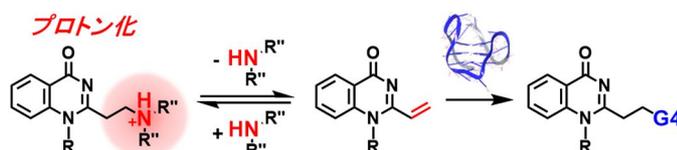


図 4 アミン付加体の反応機構

(2) 標的構造選択性を付与するため、初期検討・反応スクリーニングに用いていたアクリジンの代わりに G4 や T-T/U-U ミスマッチ構造に対して選択的に結合するユニットをコンジュゲートした。G4 に対して高い結合性を持つテロメスタチン誘導体、ベルベリンや T-T/U-U ミスマッチ構造をクロスリンクするための二反応性基修飾ピクサントロンなどを合成し、そのアルキル化能、クロスリンク能を調査した。テロメスタチン誘導体-VQ は東京農工大学の長澤教授に中間体をいただき合成した。その結果、テロメスタチン誘導体-VQ はパラレル G4 構造選択的な反応(図 5) ベルベリンはどの G4 構造とも反応することを見出した。リガンドを変えることで、期待以上に選択性をコントロールすることに成功した。特に、パラレル G4 構造選択的な反応は RNA の機能制御、機能探索に極めて重要な技術である。二反応性基修飾ピクサントロンは、収率は高くないものの、クロスリンクした生成物を確認することに成功した。

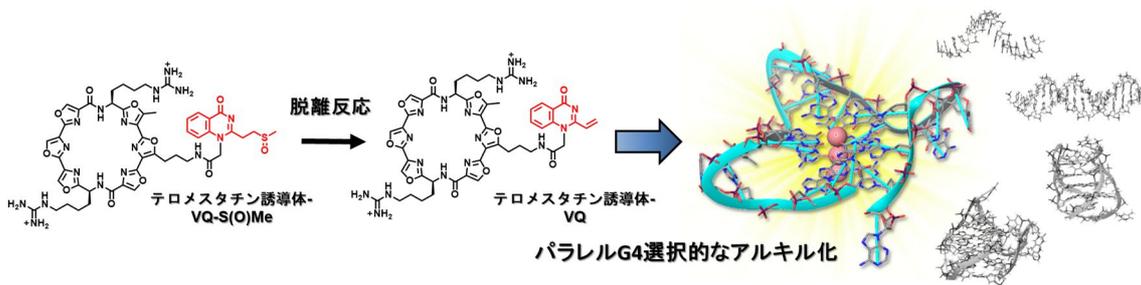


図 5 テロメスタチン誘導体-VQ のパラレル G4 選択的なアルキル化

(3) 化学修飾 RNA 探索法の開発では、バーコードマイクロアレイ法を応用した。本法は齊藤博英教授(京大・iPS 細胞研究所)により開発された RNA-タンパク質相互作用大規模解析技術(FOREST、RNP マイクロアレイ法)を改良したものである。反応性分子としてはプルダウンのためにアジド基を修飾したアクリジン-VQ-S(O)Me-N<sub>3</sub> を合成した(図 6)。次に、マイクロアレイ法に付すことでアルキル化効率のランク化を試みた。得られた結果を実際に検証したところ、1824 種類のモチーフ構造を精度よく反応性のランク化できていることが分かった(相関係数: 0.96)。また、ランク上位の配列の中で疾患に関与する pre-miRNA が含まれていたため、その RNA に対する反応点の検証を行い反応の詳細を明らかにした。本手法はアルキル化だけでなく、結合分子のランク化にも成功した。今後、様々な結合分子の選択性を調査することでこれまで見逃されていた反応や結合を見出していきたいと考えている。

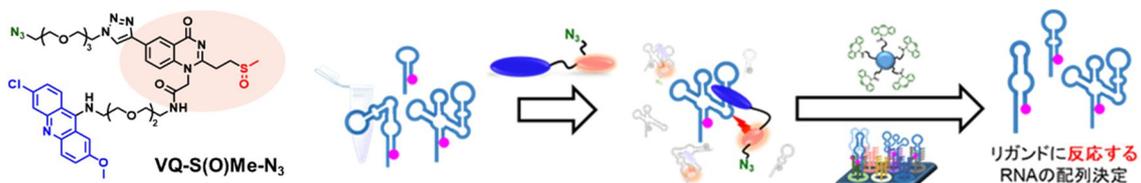


図 6 反応性 RNA のランク化

(4) 細胞での機能評価および機能探索では、ベルベリン-VQ、ピクサントロン-VQ を用いて

細胞株パネル（さまざまな臓器がん由来の細胞株計 39 種）に対する細胞増殖阻害活性を調査した（分子プロファイリング支援活動を利用）。その結果、反応性化合物の中で顕著な阻害活性を持つものは見られなかった。結合分子、反応性分子どちらも改善が必要であると考えている。

< 引用文献 >

K. Onizuka, M. E. Hazemi, N. Sato, G. Tsuji, S. Ishikawa, M. Ozawa, K. Tanno, K. Yamada, F. Nagatsugi, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 6578-6589.

K. Onizuka, A. Usami, Y. Yamaoki, T. Kobayashi, M. E. Hazemi, T. Chikuni, N. Sato, K. Sasaki, M. Katahira, F. Nagatsugi, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1059-1068.

K. Onizuka, E. Ganbold, Y. Ma, S. Sasaki, M. E. Hazemi, Y. Chen, N. Sato, M. Ozawa, K. Nagasawa, F. Nagatsugi, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2891-2894.

K. R. Komatsu, T. Taya, S. Matsumoto, E. Miyashita, S. Kashida, Hirohide Saito, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6275.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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<br>Abdelhady Ahmed Mostafa, Onizuka Kazumitsu, Ishida Kei, Yajima Sayaka, Mano Eriko, Nagatsugi Fumi | 4. 巻<br>87                |
| 2. 論文標題<br>Rapid Alkene-Alkene Photo-Cross-Linking on the Base-Flipping-Out Field in Duplex DNA             | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Organic Chemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>2267 ~ 2276 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.joc.1c01498   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nagatsugi Fumi, Onizuka Kazumitsu          | 4. 巻<br>49              |
| 2. 論文標題<br>Functional G-Quadruplex Binding Molecules | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Chemistry Letters                          | 6. 最初と最後の頁<br>771 ~ 780 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1246/cl.200214        | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Onizuka Kazumitsu, Ganbold Erchissaran, Ma Yue, Sasaki Shogo, Hazemi Madoka E., Chen Yutong, Sato Norihiro, Ozawa Mamiko, Nagasawa Kazuo, Nagatsugi Fumi | 4. 巻<br>19                |
| 2. 論文標題<br>Selective alkylation of parallel G-quadruplex structure   | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Organic & Biomolecular Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>2891 ~ 2894 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/D00B02365E   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Onizuka Kazumitsu, Hazemi Madoka E, Sato Norihiro, Tsuji Gen-ichiro, Ishikawa Shunya, Ozawa Mamiko, Tanno Kousuke, Yamada Ken, Nagatsugi Fumi | 4. 巻<br>47                |
| 2. 論文標題<br>Reactive OFF-ON type alkylating agents for higher-ordered structures of nucleic acids  | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Nucleic Acids Research  | 6. 最初と最後の頁<br>6578 ~ 6589 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/nar/gkz512  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>長澤瞭佑、鬼塚和光、小松リチャード馨、宮下映見、小澤眞美子、齊藤博英、永次史        |
| 2. 発表標題<br>RNA-蛍光指示薬間相互作用大規模解析情報を用いた疾患関連pre-miRNA結合分子の探索 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第142年会                                   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>長澤瞭佑、鬼塚和光、小松リチャード馨、宮下映見、小澤眞美子、齊藤博英、永次史 |
| 2. 発表標題<br>RNA標的低分子創薬を目指したRNA - 蛍光指示薬間相互作用大規模解析   |
| 3. 学会等名<br>第11回CSJ化学フェスタ2021                      |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>長澤瞭佑、鬼塚和光、小松リチャード馨、宮下映見、小澤眞美子、齊藤博英、永次史 |
| 2. 発表標題<br>RNA - 蛍光指示薬間相互作用大規模解析を利用したRNA結合性低分子の探索 |
| 3. 学会等名<br>令和3年度化学系学協会東北大会                        |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yutong Chen, Kazumitsu Onizuka, Madoka E. Hazemi, Fumi Nagatsugi   |
| 2. 発表標題<br>Reactivity modulation of reactive OFF-ON type alkylating reagents for higher-ordered structures of nucleic acids |
| 3. 学会等名<br>ISNAC2021 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yutong Chen, Kazumitsu Onizuka, Madoka E. Hazemi, Fumi Nagatsugi                          |
| 2. 発表標題<br>Novel reactivity modulable alkylating agents for higher-order structures of nucleic acids |
| 3. 学会等名<br>有機合成化学夏季国際セミナー（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鬼塚和光、小松リチャード馨、長澤瞭佑、Yutong Chen、宮下映見、石川竣也、小嶋かんな、村瀬裕貴、小澤眞美子、齊藤博英、永次史 |
| 2. 発表標題<br>RNA結合性・アルキル化反応性の大規模解析技術開発  |
| 3. 学会等名<br>第15回 バイオ関連化学シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鬼塚和光、小松リチャード馨、齊藤博英、永次史          |
| 2. 発表標題<br>RNA-小分子間化学シグナル大規模解析技術の展開        |
| 3. 学会等名<br>「化学コミュニケーションのフロンティア」第8回公開シンポジウム |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鬼塚和光、小松リチャード馨、石川竣也、Yutong Chen、小嶋かんな、村瀬裕貴、長澤瞭佑、小澤眞美子、宮下映見、齊藤博英、永次史 |
| 2. 発表標題<br>RNAアルキル化反応の大規模解析技術開発   |
| 3. 学会等名<br>日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kazumitsu Onizuka   |
| 2. 発表標題<br>Chemical reactions for nucleic acids research   |
| 3. 学会等名<br>Current Topics in Emergent Materials and Devices-Cooperated with Advanced Research Network in Materials and Devices in Japan<br>5-Star Alliance, CEFMS-NYCU (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鬼塚和光   |
| 2. 発表標題<br>有機化学的視点からユニークな核酸化学ツールの創製を目指して                  |
| 3. 学会等名<br>第3回ABC-Info講演会 「生体適合化学の進歩」インタラクティブフォーラム (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鬼塚和光、小松リチャード馨、石川竣也、Yutong Chen、小嶋かんな、村瀬裕貴、長澤瞭佑、小澤眞美子、宮下映見、齊藤博英、永次史 |
| 2. 発表標題<br>RNAを標的としたアルキル化反応の大規模解析技術開発   |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第101春季年会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>長澤瞭佑、鬼塚和光、小松リチャード馨、宮下映見、小澤眞美子、齊藤博英、永次史      |
| 2. 発表標題<br>RNA結合分子のハイスループット探索に向けたRNA - 蛍光指示薬間相互作用大規模解析 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第101春季年会                               |
| 4. 発表年<br>2021年  |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yutong Chen, Kazumitsu Onizuka, Madoka E. Hazemi, Fumi Nagatsugi         |
| 2. 発表標題<br>Reactivity modulation of reactive OFF-ON type G4-DNA alkylating reagents |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第101春季年会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ahmed Mostafa Abdelhady, Kazumitsu Onizuka, Sayaka Yajima, Kei Ishida, Eriko Mano, Fumi Nagatsugi |
| 2. 発表標題<br>Alkene-alkene photo-cross-linking reaction on the flipping-out field in duplex DNA                |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第101春季年会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐々木まどか、鬼塚和光、矢島さやか、Ahmed Mostafa Abdelhady、石田圭、永次史 |
| 2. 発表標題<br>標的核酸塩基のフリップアウトを誘起する人工核酸の開発とその機能化                  |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第101春季年会                                     |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鬼塚和光、小松リチャード馨、小嶋かなな、村瀬裕貴、石川竣也、小澤眞美子、長澤瞭佑、宮下映見、齊藤博英、永次史 |
| 2. 発表標題<br>RNA 標的創薬を志向したRNA-小分子間相互作用大規模解析技術の開発                    |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第141年会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鬼塚 和光, Madoka E. Hazemi, 石川 竣也, 永次 史 |
| 2. 発表標題<br>反応性OFF-ON型核酸高次構造選択的アルキル化剤の開発         |
| 3. 学会等名<br>第115回有機合成化学シンポジウム                    |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鬼塚 和光, Madoka E. Hazemi, 石川 竣也, 永次 史 |
| 2. 発表標題<br>核酸高次構造選択的アルキル化のための反応性OFF-ON型反応素子の開発  |
| 3. 学会等名<br>日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会                |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>K. Onizuka, M.E. Hazemi, N. Sato, G. Tsuji, S. Ishikawa, F. Nagatsugi                     |
| 2. 発表標題<br>Development of the alkylation reactions to the higher-ordered structures of nucleic acids |
| 3. 学会等名<br>CISNAC 2019 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>K. Onizuka, K. Ishida, S. Yajima, E. Mano, F. Nagatsugi                       |
| 2. 発表標題<br>Base-flip-inducing oligo DNA and photo-crosslinking on the flipping-out field |
| 3. 学会等名<br>ISNAC 2019 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                 |                                       |               |
|---------------------------------|---------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>RNAの高次構造解析方法        | 発明者<br>小松リチャード馨、<br>宮下映見、鬼塚和<br>光、永次史 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2021-054713 | 出願年<br>2021年                          | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

|   |
|---|
| パラレル型グアニン四重鎖の選択的なアルキル化<br><a href="http://five-star.tagen.tohoku.ac.jp/uploads/pdf/20210216_104704_1613440024.pdf">http://five-star.tagen.tohoku.ac.jp/uploads/pdf/20210216_104704_1613440024.pdf</a><br>DNAの特殊構造選択的な化学修飾に成功 反応性OFF-ON型核酸アルキル化剤を開発<br><a href="http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/news_press/20190620/">http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/news_press/20190620/</a> |
|---|

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|