

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02761

研究課題名(和文) 三重鎖形成ポリペプチド核酸プローブによる次世代RNA解析技術の創成

研究課題名(英文) Development of triplex-forming peptide nucleic acid probes for advanced RNA analysis

研究代表者

西澤 精一 (NISHIZAWA, Seiichi)

東北大学・理学研究科・教授

研究者番号：40281969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームRNAのA-site及びA型インフルエンザウイルス(IAV) RNAのプロモーター領域は、阻害剤開発の重要なターゲットとなっている。本研究では、ペプチド核酸による三重鎖核酸形成に着目することで、世界最強クラスの結合力を有する蛍光プローブを開発、阻害剤スクリーニング(FID法)における蛍光インジケータとしての活用を提案した(Chem. Commun. 2020; Anal. Chem. 2022; Org. Biomol. Chem. 2023)。さらに、IAV RNA検出に適用できるのみならず、IAV RNAの転写・複製を阻害できることを示した(特願2020-129884)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した「三重鎖形成ペプチド核酸蛍光プローブ」は、既存プローブの性能を遥かに凌ぐ結合機能と検出機能を発現しており、阻害剤開発の要となる技術基盤(スクリーニング法)の発展のみならず、RNAを標的とする核酸医薬設計への貢献、さらにはRNA検出に基づくウイルス感染診断技術の創製など、RNA biology研究における強力な分子ツールになると期待できる。なお、本研究の一部は、英国王立化学会速報誌(Chem. Commun.)のFront Coverおよび米国化学会誌(Anal. Chem.)のSuppl. Cover Artとしてハイライトされた。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new class of triplex-forming peptide nucleic acid-based fluorogenic probes for sensing of the panhandle structure of the influenza A virus (IAV) RNA promoter region (Anal. Chem. 2022; Org. Biomol. Chem. 2023). Here, a small molecule (DPQ) capable of selectively binding to the internal loop structure was conjugated with triplex-forming forced intercalation of thiazole orange (tFIT) probe with natural PNA nucleobases. The resulting conjugate, tFIT-DPQ, showed a significant light-up response (83-fold) upon strong binding ( $K_d = 107$  nM), and facilitated the sensitive and selective detection of IAV RNA. tFIT-DPQ also worked as a sensitive indicator for screening of test compounds targeting IAV RNA promoter region in FID assay. Furthermore, we also developed a tFIT probe conjugated with a naphthyridine derivative that showed high selectivity and strong binding for the bacterial rRNA A-site ( $K_d = 190$  nM) for use in FID assay (Chem. Commun. 2020).

研究分野：分析化学

キーワード：ペプチド核酸 三重鎖核酸形成 リボソームRNA A-site A型インフルエンザウイルスRNA FIDアッセイ  
検出

## 1. 研究開始当初の背景

Chain や Florey らによるペニシリンの再発見以来、さまざまな抗生物質が発見・開発され、かつては不治の病とされた結核など、種々の感染症治療における抗菌薬として用いられている。バクテリアリボソーム RNA(rRNA) の A-site (3つのアデニンから成るインターナルループ部位を含む二重鎖構造) は抗菌薬の主要なターゲットの一つであり、アミノグリコシド系抗菌薬が A-site のインターナルループ部位に結合することで、タンパク質合成が阻害される(*Nature* **2000**, 407, 340)。しかし、アミノグリコシド系抗菌薬を含むほとんどの抗菌薬に対して耐性菌が出現しており、さらには複数の抗菌薬に対して耐性を示す多剤耐性細菌も出現している。こうした新規抗菌薬の開発と薬剤耐性(Antimicrobial resistance, AMR)の出現は、“いたちごっこ”に例えられる。岡島らが報告した解説(*化学と生物* **2019**, 57, 416)には、抗菌薬開発をめぐる現状がよくまとめられている。すなわち、「1990年代以降、低い収益性と創薬ターゲット・新規骨格の不足のため新規抗菌薬の開発が停滞」し、「2017年にはWHOが新規抗菌薬の開発において緊急性が高い耐性菌12種のリストを初めて公表し新規抗菌薬の開発の必要性を提言」、さらに英国オニール委員会の報告によると、「このまま何も対策を取らないとすると、2050年には全世界でAMRに起因する死者数が1,000万人へと爆発的に増加することが警告されている」とある。事実、本研究課題を実施した3年間(2020年4月~2023年3月)新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の脅威を身をもって経験した今、次世代型抗菌薬を実現することは喫緊の課題であり、新規創薬ターゲットの探索に加えて、RNA結合リガンド(非アミノグリコシド系の新規骨格)の開発を加速させる必要がある。しかし、現時点において、「RNAに対して明確な結合選択性と十分な結合力を発現させる分子設計指針は確立していない」と言って過言ではなく、RNA結合に適したリード骨格の探索(スクリーニング)が急速に進められている。

現在、リード骨格の一次スクリーニングにおいて、NMR法が汎用されているが、少量サンプルで低コスト、網羅的かつハイスループットなスクリーニングが可能となるのは蛍光法である(*Methods* **2019**, 167, 3)。特に、RNA結合能を有する蛍光インジケータを用いて、標的RNAに対する競合的な結合反応を利用する手法(Fluorescence indicator displacement (FID) assay)では、RNAの蛍光ラベル化が不要であるため、1アッセイあたりのコストを大幅に削減できる利点がある。しかし、蛍光法(FIDアッセイ)が主体と成り得ていない根本的な理由は、標的RNAと候補化合物との相互作用を正確に評価できる蛍光インジケータが欠如していることにある。つまり、RNA結合小分子の開発が困難であるように、標的RNAに対する高親和力と結合選択性をもつ蛍光インジケータを開発することは容易ではない。加えて、RNA結合能が見出されている非アミノグリコシド系の小分子(リード骨格)は、青色~緑色蛍光性を持つものが多く(*J. Biol. Chem.* **2021**, 296, 100191)、今後、新たに見出される候補化合物はヘテロ環が複数縮合した蛍光性化合物である可能性が高い。したがって、蛍光法の利点を最大限に活かしたスクリーニングを可能とするためには、解離定数  $K_d$  値としてナノモルレベルの結合力と結合選択性、さらには明瞭な蛍光応答と赤色蛍光検出( $\lambda_{em} > 600 \text{ nm}$ )機能を兼ね備えた蛍光インジケータを開発する必要があり、これを開発することができれば、抗菌薬開発の要となる技術基盤(スクリーニング法)を格段に発展させることが期待できる。さらには、ウイルスRNA検出リガンドとしてウイルス感染診断への適用、加えて、次世代抗菌剤・抗ウイルス剤開発における分子設計指針そのものにも有用な知見を与えることが期待できる。

## 2. 研究の目的

以上の社会的・学術的背景に基づき、本研究では、バクテリア rRNA の A-site を標的とする RNA 結合リガンド(蛍光インジケータ: 三重鎖形成ペプチド核酸プローブ)を開発する。具体的には、インターナルループ結合分子を連結したペプチド核酸を基本骨格とするもので、「ループ部位結合」とフーグスティン塩基対形成を介した「塩基配列選択的な三重鎖核酸形成」を利用することで、既往の RNA 結合リガンドでは達成し得ない、結合力と結合選択性を実現する。さらに、新規創薬の標的として注目される A 型インフルエンザウイルス RNA のプロモーター領域(2つのアデニンと1つのウラシルから構成されるインターナルループ部位を含む二重鎖構造)を研究対象として、これに特異的に結合しうる蛍光インジケータ(三重鎖形成ペプチド核酸プローブ)を開発する。

## 3. 研究の方法

三重鎖形成ペプチド核酸プローブの設計と合成: 本研究で研究対象とする RNA は、いずれもインターナルループ部位を有した二重鎖構造をとっている(Fig. 1 and 3)。これに着目し、(1)ループ部位にある程度選択的に結合できる小分子を開発し、(2)ループ部位に隣接する二重鎖部分に、三重鎖形成を介して塩基配列選択的に結合するペプチド核酸を小分子と連結、さらに(3)蛍光色素チアゾールオレンジ(TO)を擬似塩基として組み込むこと(Nishizawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 9397)で、各 RNA 二重鎖に対する特異的な結合選択性を有する蛍光プローブを開発した。

より具体的には、rRNA A-site インターナルループ結合分子として、独自に開発したナフチリジン誘導体 (ATMND-C<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 13862) を活用した。また、A 型インフルエンザウイルス RNA プロモーター領域に対しては、Varani らが開発した結合分子 (DPQ; *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 368) を活用した。

#### 4. 研究成果

(1) バクテリア rRNA A-site を標的とする三重鎖形成ペプチド核酸プローブ (*Chem. Commun.* **2020**; *分析化学* **2021**; *分析化学* **2022**)

核酸が三重鎖構造をとりうることは、1950 年代から知られており、特に DNA 二重鎖を標的とするアンチジーン法への活用が注目されてきた。しかし、三重鎖形成があまり安定ではないこと、反応が極めて遅いこと、標的となる塩基配列が連続したプリン塩基 (A, G) に限定されること、さらに、酸性条件 (シトシンのプロトン化が必要であるため:  $pK_a = 4.5$ ) が必要であることから、定量的かつ迅速な検出を要する核酸二重鎖検出プローブの検出原理として注目されることはほとんどなかった。ところが 2010 年に、人工核酸の一種であるペプチド核酸 (PNA: peptide nucleic acid) が、天然核酸 (DNA, RNA) と比べて、より安定な三重鎖を形成することが Rozners らにより明らかにされた (*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8676)。彼らの研究成果でさらに注目すべきことは、天然の核酸とは異なり、PNA が DNA 二重鎖よりも RNA 二重鎖とより安定な三重鎖を形成することである。その理由は未だに明らかにされていないものの、「RNA 二重鎖構造」を標的とする新しい RNA 結合リガンドを創製するうえで、特筆すべき結合特性と言える。しかし、PNA の持つ優れた三重鎖核酸形成機能を上手く活用するためには、明瞭な蛍光シグナル機能を付与するとともに、三重鎖核酸形成のボトルネックである「塩基配列の制限」と「酸性条件」を克服する必要がある。

実際、三重鎖核酸形成のボトルネックを克服する人工核酸塩基の開発研究が急速に進められている。すなわち、「pH 中性条件下で機能するシトシン類縁体」や「ピリミジン塩基と水素結合できる人工核酸塩基」であり、三重鎖形成 PNA の化学が大きく進展しつつある。例えば、バクテリア rRNA の A-site を標的とする三重鎖形成 PNA プローブとして、Rozners らによる報告があり (*Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11125)、ここでは U に対する人工核酸塩基として 3-oxo-2,3-dihydropyridazine (E) が活用されている。また、Chen らが A 型インフルエンザウイルス (IAV) RNA のプロモーター領域を標的とする三重鎖形成 PNA の開発に成功している (*Anal. Chem.* **2019**, *91*, 533)。ここでは、G に対するシトシン類縁体として thio-pseudoisocytosine (L)、C-G 塩基対に対する人工核酸塩基として guanidine-modified 5-methylcytosine (Q)、さらに蛍光性ウラシル誘導体として 5-benzothiophene uracil (<sup>b</sup>U) が活用されており、IAV RNA 検出に適用できることを報告している。

一方、本研究では、rRNA A-site を標的として「中性条件下でも機能しうる三重鎖形成 PNA プローブ」を開発するにあたり、「インターナルループ部位に結合できる小分子を連結すること」に着目した。具体的に、rRNA A-site (Fig. 1) には 3 つの A から成るインターナルループ構造が含まれていることに着目したもので、小分子として研究代表者らの研究グループが開発した rRNA A-site インターナルループ結合分子 (ATMND-C<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 13862) を活用した。6-mer PNA 部位には、全て天然の C のみを用い、U に対するユニバーサル塩基として蛍光色素チアゾールオレンジ (TO) を活用した。本研究ではこの三重鎖形成 PNA を新たに SPOC (small molecule-PNA oligomer conjugate) プローブと名付けて、その機能を評価した。その結果、中性条件下においても SPOC プローブが三重鎖を形成して rRNA A-site に結合し、優れた結合力・選択性・蛍光応答機能を見出した。

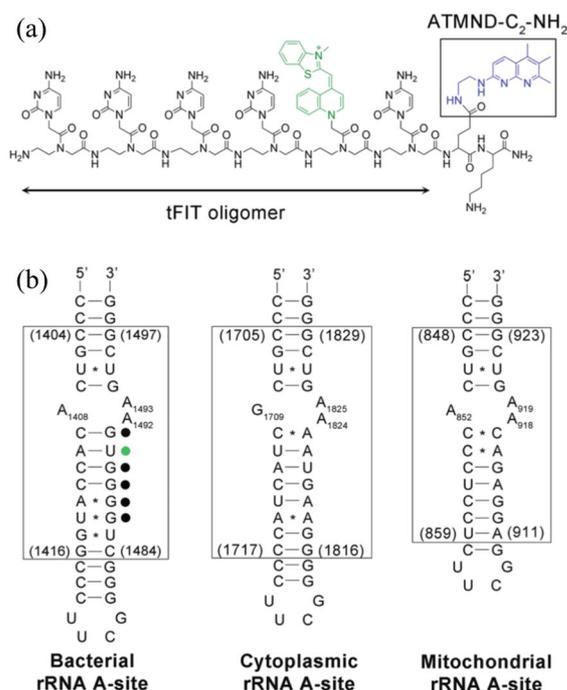


Fig. 1 (a) Chemical structure of the SPOC (small molecule-PNA oligomer conjugate) probe and (b) sequences of the model rRNAs used in this work.

SPOC プローブの結合力は、酸性条件下 (pH 5.5) に比べて低下するものの、中性条件下においても解離定数  $K_d = 190 \pm 72$  nM (pH 7.0, 25°C) に達する (Fig. 2)。その結合力は、Rozners らが開発した 9-mer PNA (Lys-NH-CCCCCTTC-CONH<sub>2</sub>) と同等で ( $K_d = 190$  nM, pH 6.25, 25°C)、rRNA A-site を標的とする非アミノグリコシド系化合物として最強と言ってよい。また、結合選択性も優れており、バクテリア rRNA A-site に対して明確な結合選択性を発現する ( $K_d$  /nM: cytoplasmic rRNA A-site,  $1400 \pm 550$ , mitochondrial rRNA A-site,  $1500 \pm 160$ )。さらに、off-on 型の明瞭な蛍光応答を示し ( $\lambda_{em} = 537$  nm,  $I/I_0 = 68$ -fold) FID 法における蛍光インジケータとして活用できる。

本研究のアプローチは、三重鎖形成 PNA のボトルネックを克服する新しい方法論を提案・実証したもので、「ピリミジン塩基に対して TO をユニバーサル塩基として活用すること (Nishizawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9397)」は、塩基配列の限定を克服するのみならず、明瞭な off-on 型の蛍光シグナル応答を得るうえでも極めて有用である。また、「小分子リガンドと連結すること」は、研究代表者らが世界に先駆けて提案したもので、バクテリア rRNA A-site のみでなく、後述する A 型インフルエンザウイルス RNA のプロモーター領域にも適用可能であることから、汎用性のある有用な方法論になりえる。現在、インターナルループ結合分子の構造最適化、上述した「人工核酸塩基」の相補的な活用、及び独自に開発した深赤色蛍光色素 BIQ (*Anal. Chem.* **2019**, *91*, 14254) を活用することで、さらなる高機能化を進めている。

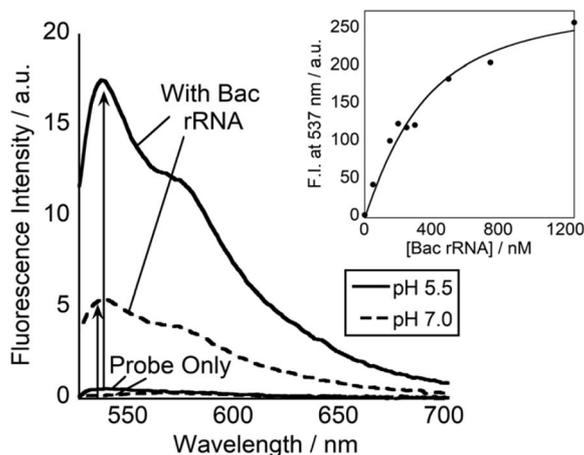


Fig. 2 Fluorescence spectra of the SPOC probe with bacterial rRNA A-site at pH 5.5 and pH 7.0. [Probe] = [rRNA] = 50 nM. Inset: Fluorescence response of the SPOC probe (250 nM) with bacterial rRNA at 25°C (pH 7.0). Excitation wavelength: 515 nm, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) or acetate buffer (pH 5.5) containing 100 mM NaCl and 1.0 mM EDTA. Incubation: 30 min.

[*Chem. Commun.* **2020**, *56*, 14976-14979] -Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

(2) A 型インフルエンザウイルス (IAV) RNA プロモーター領域を標的とする三重鎖形成ペプチド核酸プローブ (*Anal. Chem.* **2022**; *Org. Biomol. Chem.* **2023**; 特願 2020-129884)

先に述べたように、A 型インフルエンザウイルス RNA プロモーター領域を標的とする三重鎖形成 PNA として、Chen らによる報告がある (*Anal. Chem.* **2019**, *91*, 533)。IR-1X と名付けられたこの蛍光プローブは、中性条件下で標的 RNA と三重鎖を形成し ( $K_d = 0.7$   $\mu$ M,  $\lambda_{em} = 466$  nm,  $I/I_0 = 4$ -fold) IAV RNA 検出に適用できることを報告している (検出下限: 3600 ng/mL)。

一方、IAV RNA プロモーター領域のインターナルループ部位 (2 つのアデニンと 1 つのウラシルから構成: Fig. 3) に結合できる小分子 DPQ (Fig. 3 参照) が、4,279 化合物を対象としたスクリーニング (NMR 法) により見出され、弱いながらも抗ウイルス活性を示すことが報告されている (*Chem. Commun.* **2014**, *50*, 368-370;  $K_d = 50.5$   $\mu$ M,  $IC_{50} = 435$   $\mu$ M)。

研究代表者らは、インターナルループ結合分子として、この DPQ を活用することに着目した (Fig. 3)。8-mer PNA 部位には、全て天然の C 及び T のみを用い、U に対するユニバーサル塩基として蛍光色素チアゾールオレンジ (TO) を活用した。本研究ではこの三重鎖形成 PNA を tFIT (triplex-forming forced intercalation of thiazole orange)-DPQ プローブと名付けて、その機能を評価した。その結果、tFIT-DPQ プローブが IR-1X を上回る優れた結合力・蛍光応答機能を発現することを見出した。

中性条件下において、tFIT-DPQ プローブは三重鎖形成を介して標的 RNA に結合し、その結合力は  $K_d = 107 \pm 9.4$  nM (pH 7.0, 25°C) に達する。また、off-on 型の明瞭な蛍光応答を示し ( $\lambda_{em} = 534$  nm,  $I/I_0 = 83$ -fold) FID 法における蛍光インジケータとして活用できる。さらに、IAV RNA 検出に適用できるのみならず (検出下限: 60 ng/mL) IAV RNA の転写・複製を阻害できる (特願 2020-129884)。

tFIT-DPQ プローブが、中性条件化においても効果的に三重鎖を形成し得るのは、DPQ のインターナルループ部位への結合が、一種の“アンカー”のような役割を果たしていると考えられている。すなわち、DPQ の結合は中性条件下でも進行するため、これにより三重鎖核酸形成 (C のプロトン化) が誘起・促進される。研究代表者らの検討では、9-mer PNA (cytosine content: 66%) が中性条件下 (pH 7.0) でも RNA 二重鎖と三重鎖を形成しうることを報告しており ( $T_m = 48.5$  °C,  $[Na^+] = 100$  mM: *Biopolymers* **2021**, e23474)。三重鎖核酸形成において、シトシンの見かけの  $pK_a$  が大きく中性側にシフトし得ることを示している。実際、tFIT-DPQ プローブの三重鎖核酸形成の速度論的解析により、インターナルループ部位への結合が三重鎖形成に先行していることを見出しており、上記考察を支持する結果を得ている (*Org. Biomol. Chem.* **2023**, *21*, 3402)。SPOC プローブも同様の会合過程で三重鎖核酸を形成している可能性が高く、現在、速度論的解析を

進めている。

一方、ユニバーサル塩基として組み込んだ TO も三重鎖核酸形成を促進する役割を果たしている可能性がある。また、本研究で標的とする RNA 二重鎖塩基配列には、非 Watson-Crick 塩基対が複数含まれていることも構造上の特徴で (Fig. 1 and 3) 三重鎖形成に及ぼす効果を検討する必要がある。

いずれにしても、tFIT-DPQ プロブ及び SPOC プロブでは、ループ結合分子単独、あるいは三重鎖形成 PNA 部位のみでは達成しえない高親和力が発現しており、両者が極めて協働的に機能していることが示唆される。繰り返し述べるように、「pH 中性条件下で機能するシトシン類縁体」を活用しなくても中性条件化における三重鎖形成を実現した意義は大きく、三重鎖核酸形成 PNA を開発していくうえで、極めて有用な方法論になると期待できる。

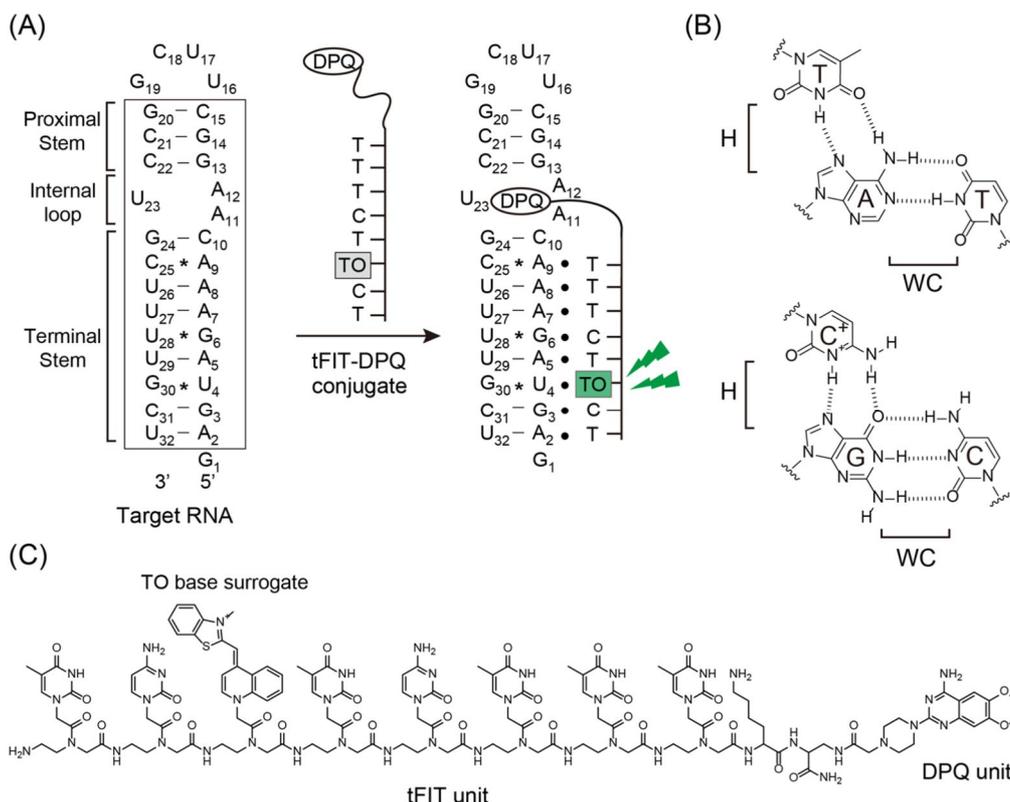


Fig. 3 (A) Sequence of target RNA containing the panhandle structure of IAV RNA promoter region indicated in the box, used in this study. Schematic illustration of fluorescence sensing by tFIT-DPQ conjugates is also shown. (B) Hoogsteen base pairing (H) between PNA pyrimidines and purines in the Watson-Crick (WC) base-paired dsRNA. (C) Chemical structure of tFIT-DPQ (NH<sub>2</sub>-TC(TO)TCTTT-Lys-Dap-DPQ).

Reproduced with permission from *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 7814-7822. Copyright 2022 American Chemical Society.

### (3) その他

上記(1)(2)の他、三重鎖核酸形成の速度論的・熱力学的解析 (*Biopolymers* **2021**)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の TAR RNA (Trans-activation responsive region RNA) を標的とする蛍光インジケータ (分析化学 **2021**)、RNA (核小体) イメージング蛍光色素 (*RSC Adv.* **2021**; *Analyst* **2023**; *ACS Omega* **2023**; 特許第 7029841 号) 及び DNA 損傷 (チミングリコール) 検出プロブ (*Chem. Commun.* **2023**) を報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>西澤精一, 佐藤貴哉, LEE En Ting Tabitha, 坂本直柔, 千葉年輝, 田邊貴昭, 芳野幸奈, 高橋勇樹, 佐藤雄介  | 4. 巻<br>71                |
| 2. 論文標題<br>シアニン色素擬塩基を有する三重鎖形成ペプチド核酸プロープによるRNA二重鎖構造蛍光検出   | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>分析化学   | 6. 最初と最後の頁<br>133-144     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2116/bunsekikagaku.71.133   | 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>Yusuke Sato, Hiromasa Miura, Takaaki Tanabe, Chioma Uche Okeke, Akiko Kikuchi, Seiichi Nishizawa   | 4. 巻<br>94                |
| 2. 論文標題<br>Fluorescence sensing of the panhandle structure of the influenza A virus RNA promoter by thiazole orange base surrogate-carrying PNA conjugated with small molecule | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Anal. Chem.  | 6. 最初と最後の頁<br>7814-7822   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.analchem.1c05488   | 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>Mengmeng He, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa  | 4. 巻<br>148               |
| 2. 論文標題<br>Classical thiazole orange and its regioisomer as fluorogenic probes for nucleolar RNA imaging in living cells   | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Analyst  | 6. 最初と最後の頁<br>636-642     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/D2AN01804G   | 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>Michiyuki Suzuki, Yusuke Sato, Nao Togashi, Seiichi Nishizawa  | 4. 巻<br>8                 |
| 2. 論文標題<br>Cationic oligopeptides with amino groups as synthetic nuclear localization signal (NoLS) for the rational design of nucleolus-staining probes                       | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>ACS Omega  | 6. 最初と最後の頁<br>9592 - 9596 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acsomega.3c00116   | 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>Chioma Uche Okeke, Hiromasa Miura, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa  | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Kinetic analysis for highly effective triplex formation between small molecule-peptide nucleic acid conjugate probe and Influenza A virus RNA promoter region at neutral pH | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>Org. Biomol. Chem.   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/d3ob00262d   | 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>西澤精一, LEE En Ting Tabitha, 芳野幸奈, 矢島さやか, 六川正文, 佐藤雄介            | 4. 巻<br>70            |
| 2. 論文標題<br>rRNAを標的とする蛍光プローブの分子設計: FID法における蛍光インジケータと生細胞核小体イメージング<br>蛍光色素 | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>分析化学  | 6. 最初と最後の頁<br>703-714 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2116/bunsekikagaku.70.703                | 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>Takaya Sato, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa   | 4. 巻<br>113          |
| 2. 論文標題<br>Spectroscopic, Thermodynamic and Kinetic Analysis of Selective Triplex Formation by Peptide Nucleic Acid with Double-stranded RNA over its DNA Counterpart | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Biopolymers   | 6. 最初と最後の頁<br>e23474 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/bip.23474   | 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>Yusuke Sato, Yugo Igarashi, Michiyuki Suzuki, Kei Higuchi, Seiichi Nishizawa   | 4. 巻<br>11                |
| 2. 論文標題<br>Deep-red fluorogenic cyanine dyes carrying amino group-terminated side chain for the improved RNA detection and nucleolar RNA imaging | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>RSC Adv.   | 6. 最初と最後の頁<br>35436-35439 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/d1ra05872j   | 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>伊東良子, 佐藤雄介, 寺前紀夫, 西澤精一   | 4. 巻<br>70            |
| 2. 論文標題<br>HIV-1 TAR RNAを標的とする蛍光インジケータ：モノメチンシアニン色素チアゾールオレンジの機能評価とFIDアッセイへの適用 | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>分析化学   | 6. 最初と最後の頁<br>149-157 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2116/bunsekikagaku.70.149                     | 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>En Ting Tabitha Lee, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa                                  | 4. 巻<br>56                |
| 2. 論文標題<br>Small Molecule-PNA Oligomer Conjugates for rRNA A-site at neutral pH for FID Assays | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Chemical Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>14976-14979 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/DOCC06084D   | 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>西澤精一, 佐藤雄介                   | 4. 巻<br>11            |
| 2. 論文標題<br>RNA解析・生細胞イメージングのための深赤色蛍光色素  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>ぶんせき                         | 6. 最初と最後の頁<br>450-454 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無            |
| 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>Yusuke Sato, Yoshihide Takaku, Toshiaki Nakano, Ken Akamatsu, Dai Inamura, Seiichi Nishizawa   | 4. 巻<br>59              |
| 2. 論文標題<br>Synthetic DNA binders for fluorescence sensing of thymine glycol-containing DNA duplexes and inhibition of endonuclease activity of endonuclease activity | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Chemical Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>6088-6091 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/d3cc01501g   | 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18件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西澤精一                         |
| 2. 発表標題<br>三重鎖形成ペプチド核酸プローブによるRNA二重鎖構造検出 |
| 3. 学会等名<br>第39回無機・分析化学コロキウム（招待講演）       |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Chioma Uche Okeke, Hiromasa Miura, Yuki Sato, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa   |
| 2. 発表標題<br>Design of Thiazole Orange Base Surrogate- carrying PNA conjugate with Small Molecule for Strong Binding towards the Promoter Region of Influenza A Virus (IAV) RNA |
| 3. 学会等名<br>みちのく分析科学シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鈴木理志、佐藤雄介、富樫奈央、西澤精一                     |
| 2. 発表標題<br>カチオン性オリゴペプチドを基盤とした核小体 RNA イメージングプローブの開発 |
| 3. 学会等名<br>みちのく分析科学シンポジウム                          |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>He Mengmeng, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa   |
| 2. 発表標題<br>Synthesis and Evaluation of Thiazole Orange Derivatives for Nucleolar RNA Imaging in Living Cells |
| 3. 学会等名<br>みちのく分析科学シンポジウム  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐藤雄介、三浦弘真、田邊貴昭、西澤精一                                   |
| 2. 発表標題<br>A型インフルエンザRNAプロモーター領域を標的とした三重鎖形成性PNAを基盤とする蛍光プローブの設計と応用 |
| 3. 学会等名<br>バイオ関連化学シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鈴木理志、佐藤雄介、富樫奈央、西澤精一                     |
| 2. 発表標題<br>カチオン性オリゴペプチドを基盤としたリボソームRNAイメージングプローブの開発 |
| 3. 学会等名<br>バイオ関連化学シンポジウム                           |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鈴木理志、佐藤雄介、富樫奈央、西澤精一                       |
| 2. 発表標題<br>カチオン性短鎖ペプチドを基盤とした核小体RNAイメージングプローブの合成と機能評価 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第71年会                              |
| 4. 発表年<br>2022年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西澤精一                             |
| 2. 発表標題<br>生命現象を分子レベルで解明するためのケミカルプローブの創成と応用 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会北海道支部講演会（招待講演）            |
| 4. 発表年<br>2022年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Lee En Ting Tabitha  |
| 2. 発表標題<br>Designing Probes for Fluorescent Indicator Displacement Assays Targeting RNA |
| 3. 学会等名<br>第38回無機・分析化学コロキウム   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>西澤精一                   |
| 2. 発表標題<br>生細胞RNAイメージング・検出プローブの開発 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第70年会（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2021年                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鈴木理志、佐藤雄介、西澤精一                   |
| 2. 発表標題<br>カチオン性ペプチドを基盤としたRNA検出プローブの合成と機能評価 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第70年会                     |
| 4. 発表年<br>2021年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Chioma Uche Okeke, Hiromasa Miura, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa   |
| 2. 発表標題<br>Design of Thiazole Orange Base Surrogate-carrying PNA Conjugated with Small Molecule for Strong Binding toward the Promoter Region of Influenza A Virus (IAV) RNA |
| 3. 学会等名<br>ASIAN CONFERENCE ON ANALYTICAL SCIENCES 2021 (ASIANALYSIS XV) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>En Ting Tabitha Lee, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa                                 |
| 2. 発表標題<br>Small Molecule-PNA Oligomer Conjugates for rRNA A-site at Neutral pH for FID Assays |
| 3. 学会等名<br>ASIAN CONFERENCE ON ANALYTICAL SCIENCES 2021 (ASIANALYSIS XV) (国際学会)                |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Chioma Uche Okeke, Hiromasa Miura, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa   |
| 2. 発表標題<br>Effect of the linker length of Thiazole Orange Base Surrogate in the Peptide Nucleic Acid-DPQ Conjugate on the Binding and Fluorescence Sensing of the Promoter Region of Influenza A Virus RNA |
| 3. 学会等名<br>The 5th Symposium for the Core Research Clusters for Material Science and Spintronics and The 4th Symposium on International Joint Graduated Program in Materials Science (国際学会)                |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Chioma Uche Okeke, Hiromasa Miura, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa  |
| 2. 発表標題<br>Design of Binder with Enhanced Binding Affinity for the Promoter Region of Influenza A Virus (IAV) RNA   |
| 3. 学会等名<br>The 5th Symposium for the Core Research Clusters for Material Science and Spintronics and The 4th Symposium on International Joint Graduated Program in Materials Science (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>En Ting Tabitha Lee, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa                                 |
| 2. 発表標題<br>Small molecule-PNA oligomer conjugates for rRNA A-site at neutral pH for FID assays |
| 3. 学会等名<br>ISNAC2021 第48回国際核酸化学シンポジウム 日本核酸化学会第5回年会 (国際学会)                                      |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kei Higuchi, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa  |
| 2. 発表標題<br>Design of bright yellow fluorogenic probes based on benzo[c,d]indole-containing cyanine dyes for RNA imaging in living cells |
| 3. 学会等名<br>ISNAC2021 第48回国際核酸化学シンポジウム 日本核酸化学会第5回年会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiromasa Miura, Takaaki Tanabe, Yusuke Sato, Seiichi Nishizawa   |
| 2. 発表標題<br>Fluorescence sensing of influenza A virus RNA promoter by thiazole orange base surrogate-carrying PNA conjugated with small molecule |
| 3. 学会等名<br>ISNAC2021 第48回国際核酸化学シンポジウム 日本核酸化学会第5回年会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                   |                             |               |
|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>ウイルスRNAの複製と転写を阻害する複合体 | 発明者<br>佐藤雄介, 西澤精一,<br>田邊貴昭ら | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2020-129884   | 出願年<br>2020年                | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計1件

|                                |  |               |
|--------------------------------|--|---------------|
| 産業財産権の名称<br>RNA検出用蛍光色素及びその使用方法 | 発明者<br>西澤精一, 佐藤雄介,<br>芳野幸奈, 富樫奈央,<br>樋口啓 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、第7029841号    | 取得年<br>2022年                             | 国内・外国の別<br>国内 |

〔その他〕

-

#### 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 |
|---------|---------|