

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19040

研究課題名（和文）化学合成短鎖核酸の凝集による細胞核内ゲノム高次構造改変の探索

研究課題名（英文）Exploration of the modification of genomic higher-order structures in the cell nucleus by aggregation of chemically synthesized short nucleic acids

研究代表者

岡本 晃充（Okamoto, Akimitsu）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：60314233

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、連続ハイブリダイゼーションによって集合体を形成する配列を持つ1対の化学合成ヘアピン型核酸を作成した。試験管内実験でこの核酸対がmiRNAを起点にして集合体を形成することを確認した。核酸対を細胞導入剤とともにHeLa細胞に加えると細胞質でmiRNAを起点にして集合体を形成した。核酸の蛍光標識のFRETの蛍光顕微鏡観察によって観察を行った結果、細胞質内で相分離を引き起こして液滴状顆粒を形成していた。さらに、FACSで解析すると、標的のmiR-21を過剰発現した細胞でFRET由来の強い蛍光が現れたのに対し、miR-21の発現量が小さい細胞ではFRET由来の蛍光が弱かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果として、ヘアピン型人工核酸が細胞質内で相分離を引き起こすことやその原因が自然免疫関連タンパク質cGASの結合によること、さらにはその複合体形成が細胞死へ至らしめることが明らかになり、新たな部類の核酸医薬品のタネを見つけることができた。将来的には、化学合成ヘアピン型核酸対についてさらに検討を加えることによって他のタンパク質をトラップして効率的にノックダウンできる相分離系を作成したい。

研究成果の概要（英文）：We have created a pair of chemically synthesized hairpin nucleic acids with sequences that form assemblies by sequential hybridization. In vitro experiments confirmed that these nucleic acid pairs form aggregates starting from miRNAs. When the nucleic acid pairs were added to HeLa cells together with a cell transfection agent, the nucleic acid pairs formed aggregates in the cytoplasm starting from miRNAs. Observation by fluorescence microscopy of FRET of the fluorescent labeling of the nucleic acids showed that they caused phase separation in the cytoplasm and formed droplet-like granules. Furthermore, FACS analysis revealed that strong FRET-derived fluorescence appeared in cells overexpressing the target miR-21, whereas FRET-derived fluorescence was weak in cells with low miR-21 expression.

研究分野：生物有機化学

キーワード：核酸 化学合成 集合体 ハイブリダイゼーション マイクロRNA 相分離

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学合成短鎖核酸は細胞に入り込んで蓄積して集合体を作る場合がある。その集合体が一定の濃度で結合タンパク質を呼び寄せることができれば、相分離を引き起こして液滴状顆粒を形成すると考えられる。核酸結合性タンパク質のトラップによる「核酸不溶化」による強制的な液滴状顆粒の形成は、核膜内膜領域の「流動性」「粘度」「屈折率」を局所的に大きく変える可能性があるが、顆粒形成条件を含めて未知である。タンパク質の結合を伴う短鎖核酸の凝集が細胞の物理的な機能を変える可能性が期待されており、ここで核酸の新たな物理化学的な役割を定義づけるべきである。

2. 研究の目的

これまで外来短鎖核酸を用いた核酸医薬研究では内在性核酸やタンパク質に対する結合によるそれらのノックダウンが短鎖核酸に期待されている。しかし、我々の研究では、短鎖核酸に対して異なる見方、つまり、短鎖核酸を細胞内の物理的性質を制御する物質と捉えることにした。最近の細胞内相分離の研究では、細胞内で分子集合体を形成すれば相分離液滴を容易に形成されるとの指摘がある。しかし、細胞内核酸と相互作用することなしに短鎖核酸それ自身がもしくはタンパク質との結合を介して細胞内環境で自己集合して毒性を発揮する可能性、それらが液滴形成することによって細胞機能を変えてしまう可能性についてこれまで検討されてこなかった。本研究では、これらの課題の解決を目指して種々の合成実験・反応実験・細胞実験を進める。

3. 研究の方法

ハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR) を可能にするヘアピン型核酸対を合成する。HCR 生成物は内在性タンパク質が結合できる二重鎖配列を与える。熱力学的な二本鎖安定性を考慮すると、20-40 塩基長が望ましい。核内に存在する分解酵素を HCR のトリガーとする直鎖上の核酸を用いる場合には 20 塩基長、miRNA など内在短鎖核酸を HCR のトリガーとするヘアピン型の核酸を用いる場合には 30~40 塩基長 (ステム部分 7~10 塩基長×2、突出末端部 8~10 塩基長、ループ部分 4~10 塩基長) の核酸を設計する。自己重合しないように、少なくとも 2 種類の異なる配列を用意して HCR を作成する。ここでは、miR-21 を標的にしてヘアピン型核酸対を設計する。ゲル電気泳動によってヘアピン型核酸対が集合体を形成することを確認するとともに、miR-21 過剰発現細胞へ導入して細胞内で顆粒を形成することを観察する。

4. 研究成果

4-1. ヘアピン核酸対 (oHPs) の設計・合成・集合体形成評価

我々は、miR-21 への結合をきっかけに集合体を形成する一対のヘアピン型核酸 oHPs を DNA/RNA 自動合成機を用いて合成した。miRNA 選択的な集合体形成には、突出末端 toehold 領域の長さの制御が重要であり、toehold 領域の長さを種々変えた oHPs を作成して、miRNA 選択性を検討した (図 1)。その結果、toehold 塩基長が 7~8 塩基であるとき、miR-21 存在下で効率的に集合体を形成するとともに、非存在下では集合体形成が強く抑制されることが確認された。したがって、以降は toehold 塩基長を 7~8 塩基で検討することとした。

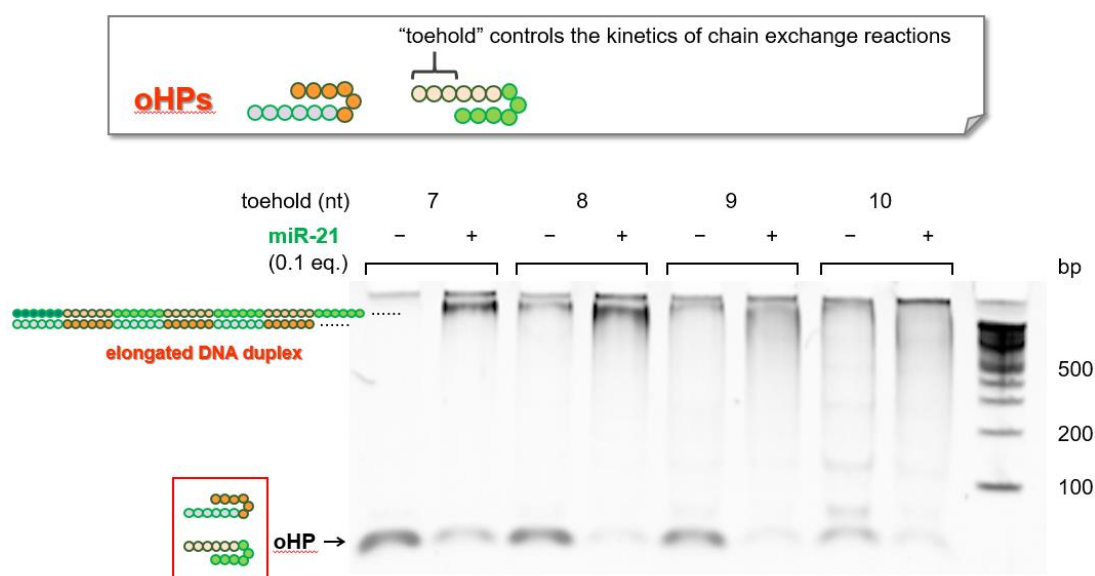


図 1

4-2. 集合体への cGAS の結合

oHPs が集合してできる長鎖二重鎖核酸に対して、細胞質内では cGAS が結合することが期待される。一般的な長鎖二重鎖核酸とは異なり、集合体では一定間隔でニックや修飾が入った構造であるため、cGAS の結合性をゲル電気泳動を用いて確認した (図 2)。その結果、miR-21 をきっかけにして oHPs が集合体を形成することによって cGAS が集合体に結合することを確認した。一方で、単独の oHPs には cGAS は結合しなかった。

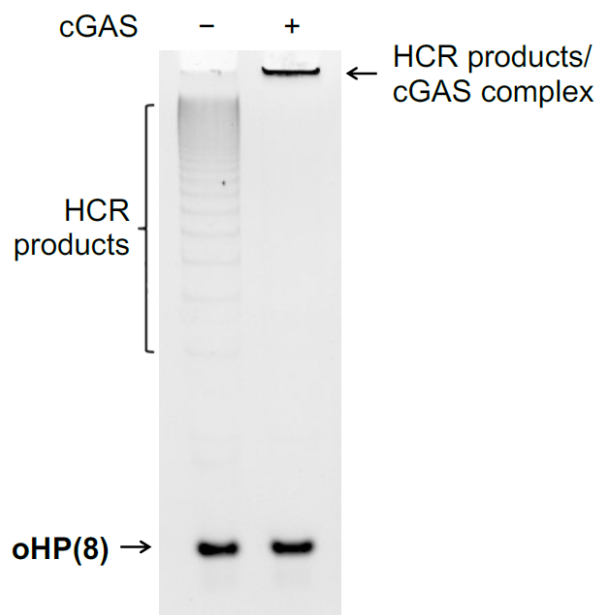


図 2

4-3. 細胞内での集合体形成と相分離

蛍光修飾した oHPs を用意した。oHPs が集合体形成すると、蛍光色素間で FRET を生じるように設計されている。この oHPs を細胞導入剤を用いて細胞に取り込ませた。その結果、miR-21 を過剰発現する HeLa 細胞の細胞質に FRET 由来の斑点が蛍光顕微鏡で観察された (図 3)。これは、核酸集合体に cGAS が結合することによって電荷が中和されてできた相分離液滴だと考えられる。一方、miR-21 の発現が小さい HEK293T 細胞に同様の実験を行うと、FRET 由来の蛍光を示す相分離液滴の増加は観察されず、集合体形成は進んでいないことが確認された。oHPs を導入した HeLa 細胞を FACS で解析すると、スクランブル配列のヘアピン核酸を導入した場合と比べて、明らかに蛍光発光した細胞が増加しており、miR-21 選択的な集合体形成が進んでいることが示された (図 4)。さらに、miR-21 の発現が小さい HEK293T 細胞に比べて miR-21 が過剰に発現している HeLa 細胞や、MM231 細胞、A549 細胞で FRET 由来の強い蛍光が現れた。

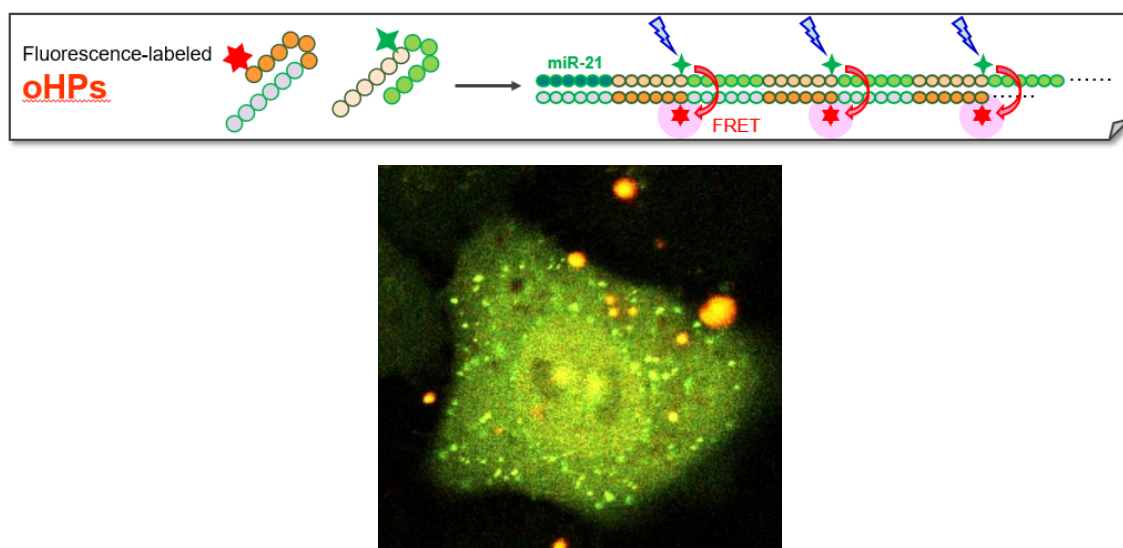


図 3

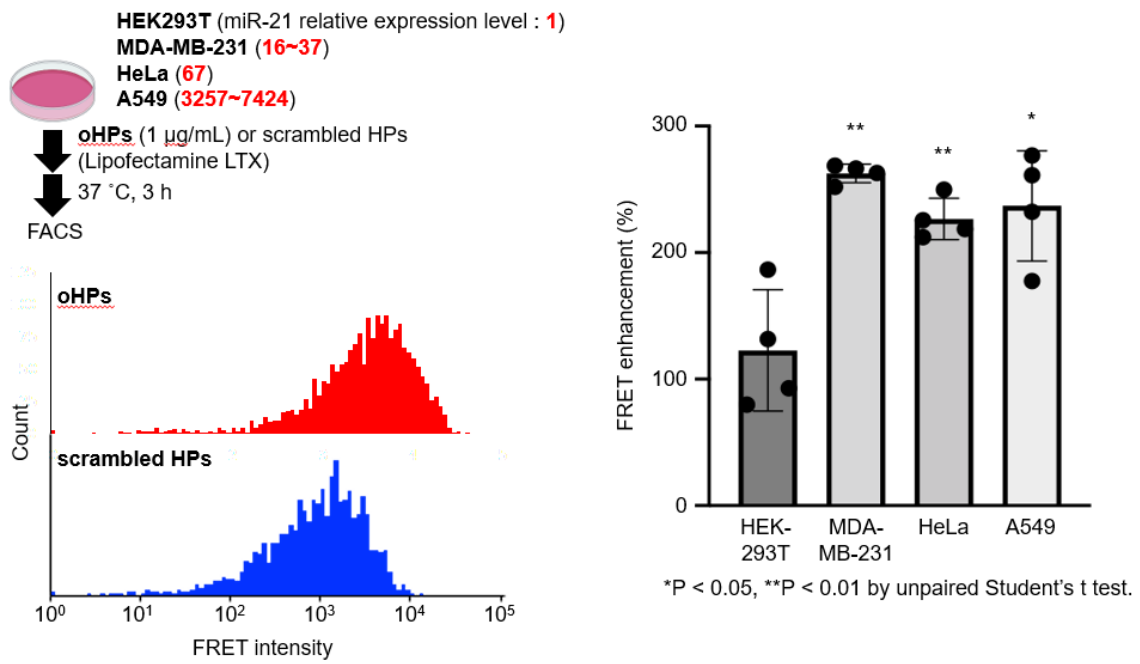


図 4

以上のように、短鎖核酸の機能に対する我々の新たな視点の提示は革新的な核酸医薬を生み出すためのカギになるだろう。これらの知見は、核酸医薬をはじめとする医薬品の設計の発想の転換に大いに寄与するに違いない。我々の新技術と新発見がサイエンスへ貢献するだけでなく、医薬イノベーションへの爆発的な発展に貢献することを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A.	4. 巻 73
2. 論文標題 Silyl-Protected Propargyl Glycine for Multiple Labeling of Peptides by Chemoselective Silyl-Deprotection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 153093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2021.153093	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 Paulson, B.; Shin, Y.; Okamoto, A.; Oh, Y.-M.; Kim, J. K.; Pack, C.-G.	4. 巻 22
2. 論文標題 Poly(A)+ Sensing of Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotide Probe Characterized by Fluorescence Correlation Methods	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 6433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22126433	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 該当する
1. 著者名 Koyama, K.; Hayashi, G.; Ueda, H.; Ota, S.; Nagae, G.; Aburatani, H.; Okamoto, A.	4. 巻 19
2. 論文標題 Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytidine by Selective Oxidation and Reverse Transcription Arrest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Org. Biomol. Chem.	6. 最初と最後の頁 6478-6486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D10B00995H	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 Yamaguchi, S.; Takamori, S.; Yamamoto, K.; Ishiwatari, A.; Minamihata, K.; Yamada, E.; Okamoto, A.; Nagamune, T.	4. 巻 32
2. 論文標題 Sterically Bulky Caging of Transferrin for Photoactivatable Intracellular Delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chem.	6. 最初と最後の頁 1535-1540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.bioconjchem.1c00159	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 Morihiro, K.; Moriyama, Y.; Nemoto, Y.; Osumi, H.; Okamoto, A.	4. 巻 143
2. 論文標題 anti-syn Unnatural Base Pair Enables Alphabet-Expanded DNA Self-Assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 14207-14217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c05393	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 Itaya, R.; Idei, W.; Nakamura, T.; Nishihara, T.; Kurihara, R.; Okamoto, A.; Tanabe, K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Changes of C C Triple Bond Vibration that Disclosed Non-Canonical Cytosine Protonation in i-Motif-Forming Oligodeoxynucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 31595-31604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c04074	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9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小阪 高広、山口 哲志、山平 真也、岡本 晃充
2. 発表標題 光応答性基板を用いた免疫細胞の細胞傷害性のシングルセル解析
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 Phebee Angeline Devadasan Racheal, Takafumi Furuhashi, Iori Murayama, Usano Toyoda, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Enzymatic branched ubiquitin chain formation on K63 homotypic chain with branched points defined by photo-induced stepwise poly-ubiquitin synthesis
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 Xuanyu LIAO、Takafumi Furuhashi、Akimitsu Okamoto、Ikuma Arakaki
2. 発表標題 Evaluation of nucleosome structure alteration and accessibility change caused by platinum-based antineoplastics
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 宇野 大輝、藤田 涼香、古畑 隆史、岡本 晃充
2. 発表標題 低分子リガンド-ユビキチンキメラを用いたタンパク質の間接的ユビキチン化法
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 山本 一穂、山口 哲志、岡本 晃充
2. 発表標題 刺激分解性ピオチン化試薬を用いた細胞内タンパク質送達
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 中津 幸輝、村上 裕、林 剛介、岡本 晃充
2. 発表標題 2-aminobenzamide誘導体によるチアゾリジン開環とone-potペプチド連結法への応用
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 吉田 和生、藤田 涼香、古畑 隆史、岡本 晃充
2. 発表標題 ユビキチンキメラ分子による転写因子のケミカルノックダウン
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 Ryoka Fujita, Takafumi Furuhata, Yuto Matsumura, Tokiha Ozawa, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Indirect ubiquitination for targeted degradation of the transcription factor
3. 学会等名 第48回国際核酸化学シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 哲志・梅田 侑生・山平 真也・岡本 晃充
2. 発表標題 細胞膜のマイクロ流体剥離技術を用いた細胞内1細胞解析
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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