

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19052

研究課題名(和文)化学の力で創造する新しい細胞システム

研究課題名(英文)Novel cell system developed by chemistry

研究代表者

南川 典昭(MINAKAWA, Noriaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：40209820

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):本研究課題では、4'-チオ核酸からなるsynthetic central dogmaを内包する新しい人工細胞システムの創出を目的とし、研究を行った。  
その結果、rSG DNA(配列中のグアノシン残基を4'-チオグアノシンに置換)を鋳型として用い、4'-チオシチジン 5'-三リン酸(rSCTP)存在下で反応を行うことで、ワンポットにて連続する4'-チオDNA 4'-チオRNA タンパク質への転写・翻訳の進行を確認できた。さらにこの一連の反応が、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)との薄膜水和法により調整した人工細胞中で起こることも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「DNAに保存された遺伝情報はRNAへと転写され、タンパク質へと翻訳される」というセントラルドグマの概念は、全ての細胞の生命活動の根幹を成す。では、DNAやRNAは、セントラルドグマに基づく遺伝情報の保存と伝搬を担う唯一の物質なのであろうか。もし違うとすれば、DNAやRNAの代替となる物質を化学の力で創造出来ないだろうか。  
本研究課題では、その解を求めることに挑戦し、4'-チオ核酸がその代替物質となることを証明した。この研究成果は、合成生物学の研究分野の広がり大きな影響を与えられらる。

研究成果の概要(英文): In this research project, we aimed to create a new artificial cell system containing a synthetic central dogma composed of 4'-thionucleic acid.  
As a result, we were able to confirm the progress of transcription and translation from 4'-thio DNA to protein via 4'-thioRNA in a one-pot, when rSG DNA (with 4'-thioguanosine substituted for the guanosine residue in the sequence) as a template and 4'-thiocytidine 5'-triphosphate (rSCTP) were used. Furthermore, we confirmed that this series of reactions occurred in artificial cells prepared by the thin film hydration method with 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC).

研究分野：合成生物学

キーワード：核酸化学 合成生物学 4'-チオ核酸 人工細胞

## 1. 研究開始当初の背景

「DNA に保存された遺伝情報は RNA へと転写され、タンパク質へと翻訳される」というセントラルドグマの概念は、全ての細胞の生命活動の根幹を成す。では、DNA や RNA は、セントラルドグマに基づく遺伝情報の保存と伝搬を担う唯一の物質なのであろうか。もし違うとすれば、DNA や RNA の代替となる物質を化学の力で創造出来ないだろうか。

この素朴な疑問に対する解のひとつとして、核酸化学を専門とする研究代表者はこれまでに、大腸菌の発現系において 4'-チオ DNA → 4'-チオ RNA → タンパク質の synthetic central dogma を確立した (Saito-Tarashima *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 17255) (図 1)。

この研究の主役である 4'-チオ核酸 (4'-チオ DNA および 4'-チオ RNA) は、研究代表者がアンチセンスや siRNA 分子などの核酸医薬品創製をめざして開発した化学修飾核酸である。構造的にはフラノース環内の酸素原子を同族元素の硫黄原子に置換するという極めてシンプルな化学修飾様式を持つ。それ故、核酸医薬品開発に求められる高い二本鎖形成能や核酸分解酵素に対する抵抗性に加えて、天然型核酸との高い生物学的等価性を示すことを明らかとしてきた。

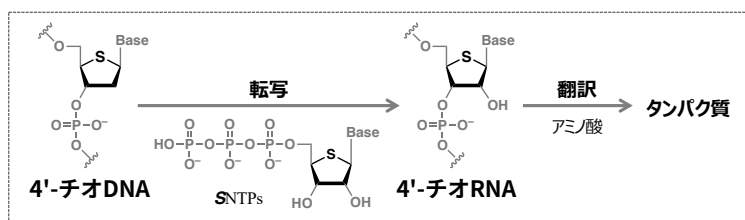


図 1 4'-チオ核酸 (4'-チオ DNA と 4'-チオ RNA) からなる synthetic central dogma

## 2. 研究の目的

本研究課題では、この唯一無二の性質をもつ 4'-チオ核酸 (4'-チオ DNA と 4'-チオ RNA) からなる synthetic central dogma を内包する新しい人工細胞システムの創出を目的とする。

国際研究プロジェクト『Genome Project-Write』(Boeke *et al.*, *Science* **2016**, *353*, 126) の設立を皮切りに、ゲノム DNA あるいは細胞を人工的に合成することで生命の成り立ちを理解し、社会に革新的なイノベーションをもたらそうとする研究の推進が求められている。しかし、これらの研究は、“天然と同じ”構造を持った DNA あるいは細胞を人工的に合成する技術の革新を主目的とする。これに対し本研究は、化学の力で創出した天然型を凌駕する DNA や RNA 誘導体 (4'-チオ DNA および 4'-チオ RNA) を内包した人工細胞を利用して、新しい細胞システムの創出を目指すものであり、従来には無い学術研究である。

## 3. 研究の方法

### (1) Synthetic central dogma 内包人工細胞の最適化

① GFP をコードする 4'-チオ DNA、② 転写産物となる 4'-チオ RNA の構成要素となる 4'-チオオリボヌクレオシド三リン酸体 (SNTP)、③ RNA ポリメラーゼなどの転写因子、さらに④ リボソームなどの翻訳因子、の一式を脂質膜(脂質小胞)中に内包することで人工細胞を作成する。この時、細胞外での遺伝子発現を抑制する方法等について、最適化研究を実施する。

### (2) Synthetic central dogma の哺乳動物遺伝子発現系への適用拡大検討

研究代表者らはこれまで、大腸菌の遺伝子発現系において synthetic central dogma システムを作動させることに成功している。しかし、synthetic central dogma システムおよびこれを内包する人工細胞の創薬応用を見据えると哺乳動物遺伝子発現系への適応拡大が必須となる。哺乳動物遺伝子発現系における遺伝子発現を実現するため、配列最適化研究を実施する。

## 4. 研究成果

### (1) Synthetic central dogma 内包人工細胞の最適化

#### ① 4'-チオ DNA → 4'-チオ RNA → タンパク質の連続的遺伝子発現反応

研究代表者らが目標とした 4'-チオ核酸からなる synthetic central dogma を内包する人工細胞システムを構築するためには、4'-チオ DNA → 4'-チオ RNA → タンパク質の連続的な遺伝子発現反応を実現する必要がある。そこでまず、T7 RNA ポリメラーゼなどの転写因子ならびにリボソームやアミノ酸などの翻訳因子を含む *E. coli* 由来の無細胞タンパク質合成系において、rSG DNA (配列中のグアノシン残基を 4'-チオグアノシンに置換) を鋳型として用い、RNA への転写に必要なオリボヌクレオチド 5'-三リン酸 (rNTP) のうちシチジン 5'-三リン酸 (rCTP) を 4'-チオシチジン 5'-三リン酸 (rSCTP) に置換して反応を行うことで、ワンポットにて連続する 4'-チオ DNA → 4'-チオ RNA → タンパク質への転写・翻訳の進行を確認した。

反応条件と得られた結果を図 2 に示した。まず、ポジティブコントロールである天然 DNA を

鋳型として天然型 rCTP を加える条件 1 においては、GFP の発現に由来する強い蛍光が確認できた。この天然型の遺伝子発現系 (条件 1) において翻訳された GFP をウエスタンブロット法により検出し、得られたバンド強度を 100% として以降の反応条件における GFP 発現量を相対値で示した。

天然型 DNA の代わりに dSG DNA を鋳型として用い、天然型 rCTP を加えることで天然型 RNA への転写を介した翻訳反応 (dSG DNA → RNA → GFP) が進行する条件 3 においては、80% の効率で GFP の発現が確認出来た。また、天然型 DNA を鋳型とし、天然型 rCTP の代わりに rSCTP を加えることで DNA → rSC RNA → GFP の流れで遺伝情報が伝達される条件 5 においても、79% の効率で GFP を与えた。これらの結果は、4'-チオ核酸は遺伝子発現系において、天然型 DNA/RNA の機能を代替する人工遺伝子ポリマーとして機能し、両者は互いに混じり合う関係にあることを意味する。

さらに、本研究の主目的である dSG DNA を鋳型とし、反応系へ rSCTP を加える synthetic central dogma (dSG DNA → rSC RNA → GFP) が進行する条件 6 においても GFP 蛍光を観察することが出来た。また、得られた GFP に対してトリプシン消化を行い、得られたペプチドフラグメントの LC-MS/MS 解析を行なった結果、フラグメントイオンが検出された範囲においてアミノ酸変異は生じていないことが確認された (フラグメントイオンの検出レベルも天然に相違なかった)。条件 6 において、ウエスタンブロット法により検出された GFP のバンド強度は 26% であり、その遺伝子発現効率は天然型よりも劣るものではあったが、以上の実験において、4'-チオ DNA → 4'-チオ RNA → タンパク質の情報伝達がワンポットで進行し、遺伝情報が正しく保存・伝達されることを実証できた。

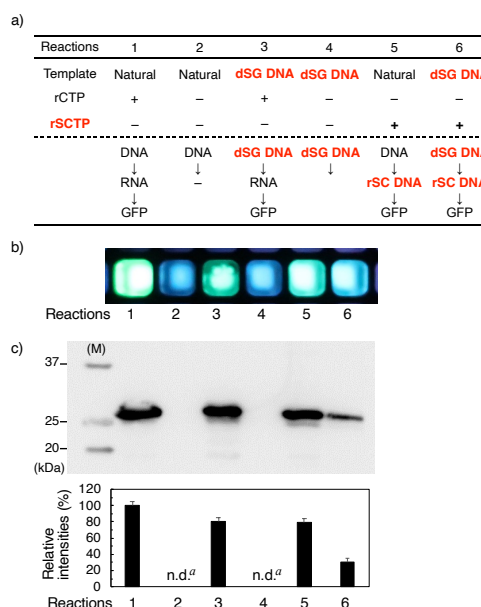


図 2 4'-チオ DNA (dSG DNA) → 4'-チオ RNA (rSC RNA) → タンパク質の連続的遺伝子発現反応

## ② Synthetic central dogma (dSG DNA → rSC RNA → GFP) を内包する人工細胞の作成

検討 (1)–① で作成した 4'-チオ核酸からなる連続的遺伝子発現反応溶液を内包する人工細胞の作成方法を検討した。

鋳型である dSG DNA および rCTP の代わりに rSCTP を含む改変大腸菌無細胞液中で、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) との薄膜水和法 (Kuruma *et al.*, *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 1328–1344) により人工細胞を形成した。細胞外に発現した GFPuv を消光させるため、まず、人工細胞構築の一般的なプロトコールを参考に、薄膜水和溶液中に RNase A を添加した結果、自然界における遺伝子発現 (図 3a) のように、dSG DNA に格納された遺伝情報が rSC RNA に転写され、転写された rSC RNA 上の遺伝情報に基づいて GFPuv が生成される (図 3b) ことが示された。また、その遺伝子発現効率は、天然型 (図 3a) よりも優れることが確認された。図 3c に示すように、rSCTP 非存在下では、ナイルレッド染色により脂質二重層小胞の形成は確認されたものの、rSC RNA 転写の構成要素として rSCTP が欠如しているため、dSG DNA からの GFPuv の発現は確認されなかった。

細胞外における GFPuv 発現の停止を目的として RNase A の代わりに Proteinase K を用いる条件においても検討を実施した結果、先と同様の場合においても同じ結果が示された (data not shown)。しかし、4'-チオ核酸からなる人工細胞と天然型の人工細胞における遺伝子発現効率の間に有意な差は確認されず、いずれの条件においても、4'-チオ核酸からなる人工細胞を効率良く作製できることが確認された。

研究代表者らは、化学合成した短鎖 4'-チオ DNA および 4'-チオ RNA が酵素分解に対して著しく耐性があることを報告した (Inoue *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3476)。本研究により、4'-チオ DNA および 4'-チオ RNA の優れた安定性は、人工細胞中での遺伝子発現に有利に働くことが示された。

## (2) Synthetic central dogma の哺乳動物遺伝子発現系への適用拡大検討

Synthetic central dogma システムおよびこれを内包する人工細胞を哺乳動物遺伝子発現系へと適応拡大するため、HEK293 細胞における遺伝子発現を試みた。しかし、化学修飾様式および配列を種々検討したものの、タンパク質発現効率が著しく低下する結果となった。現在、化学合成法との組み合わせにより、より精密な化学修飾様式最適化研究を実施中である。

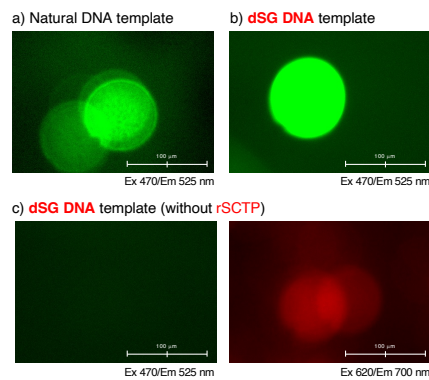


図 3 4'-チオ核酸からなる synthetic central dogma を内包する人工細胞

## 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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito-Tarashima Noriko, Kinoshita Mao, Igata Yosuke, Kashiwabara Yuta, Minakawa Noriaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Replacement of oxygen with sulfur on the furanose ring of cyclic dinucleotides enhances the immunostimulatory effect via STING activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1519 ~ 1524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1MD00114K	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 Rion, Saito-Tarashima Noriko, Wakamatsu Hideaki, Natori Yoshihiro, Minakawa Noriaki, Yoshimura Yuichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Synthesis and Properties of 4 -ThioLNA/BNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4062 ~ 4066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c01306	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 Uemura Kentaro, Nobori Haruaki, Sato Akihiko, Sanaki Takao, Toba Shinsuke, Sasaki Michihito, Murai Akiho, Saito-Tarashima Noriko, Minakawa Noriaki, Orba Yasuko, Kariwa Hiroaki, Hall William W., Sawa Hirofumi, Matsuda Akira, Maenaka Katsumi	4. 巻 24
2. 論文標題 5-Hydroxymethyltubercidin exhibits potent antiviral activity against flaviviruses and coronaviruses, including SARS-CoV-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103120 ~ 103120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103120	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 Tarashima Noriko S., Kumanomido Yusuke, Nakashima Katsuyuki, Tanaka Yoshiyuki, Minakawa Noriaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Synthesis of a Cyclic Dinucleotide Analogue with Ambiguous Bases, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 15004 ~ 15010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c01706	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 Hinotani Naoto, Saito Tarashima Noriko, Minakawa Noriaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Convenient Synthesis of 3 Deazapurine Nucleosides (3 Deazainosine, 3 Deazaadenosine and 3 Deazaguanosine) Using Inosine as a Starting Material	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpz1.297	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 Nakamura Motoki, Uemura Kentaro, Saito-Tarashima Noriko, Sato Akihiko, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Matsuda Akira, Maenaka Katsumi, Minakawa Noriaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Synthesis and Anti-dengue Virus Activity of 5-Ethynylimidazole-4-carboxamide (EICA) Nucleotide Prodrugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 220 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-01038	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 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 近藤明希、木下真緒、田良島典子、南川典昭
2. 発表標題 4-チオフラノースを構成糖にもつ環状ジヌクレオチドアナログの合成と免疫誘導評価
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

1. 発表者名 太田雅士、田良島典子、南川典昭
2. 発表標題 4'-セレンRNAの性質評価およびsiRNAへの導入
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下真緒、田良島典子、近藤明希、南川典昭
2. 発表標題 ヌクレオチド糖部4'位に硫黄原子を有する環状ジヌクレオチドアナログの創製
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyazawa T., Maeda R., Saito-Tarashima N., Yoshimura Y., Minakawa N.
2. 発表標題 Synthesis and Properties of 4'-ThioLNA/BNA
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry / The 5th Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2021). (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kinoshita M., Saito-Tarashima N., Minakawa N
2. 発表標題 Chemical synthesis and evaluation of 4'-thiomodified cyclic dinucleotides.
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry / The 5th Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kinoshita M., Saito-Tarashima N., Minakawa N.
2. 発表標題 Synthesis of 4'-thiomodified cyclic dinucleotide analogs as STING agonists.
3. 学会等名 AFMC International Medicinal Chemistry Symposium 2021 (AIMECS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井あきほ、田良島典子、南川典昭
2. 発表標題 ZTPの合成とRNAポリメラーゼに対する基質認識能の解析
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野木悠平、田良島典子、南川典昭
2. 発表標題 Z塩基を含むDNAオリゴマーの合成と物理化学的性質評価
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内駿弥、田良島典子、茂谷康、小迫英尊、南川典昭
2. 発表標題 膜透過型STINGアゴニストとしてのbis-pivSATE-2'-F-c-di-dAMPの創製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野谷直人、中村元紀、田良島典子、大場靖子、澤洋文、松田彰、前仲勝美、南川典昭
2. 発表標題 5-Ethynylimidazole-4-carboxamide (EICA)ヌクレオチドプロドラッグの合成と抗 Dengue ウイルス活性
3. 学会等名 日本薬学会第142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	小暮 健太郎  (KOGURE Kentaro)  (70262540)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授   (16101)	
研究 分担者	田良島 典子  (TARASHIMA Noriko)  (90755183)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授   (16101)	

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