

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14792

研究課題名（和文）光触媒を用いたmRNAピンポイント光修飾法の開発と鎖間光架橋反応の解析

研究課題名（英文）Development of pinpoint RNA photo-modification method for mRNA modification and analysis of interstrand crosslinking reaction by photo-catalytic reaction

研究代表者

山野 雄平（Yamano, Yuuhei）

東北大学・多元物質科学研究所・特任研究員（日本学術振興会特別研究員PD）

研究者番号：50938107

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、1. mRNAのピンポイント修飾に応用可能な新規核酸光修飾反応の開発と、2. 光触媒反応下における架橋型の核酸損傷の機構解明を目指した。

1. 末端に光触媒を導入したプローブDNA配列を設計した。修飾剤存在下、標的配列と二重鎖形成させたプローブDNAに光を照射すると、光触媒近傍の修飾剤が光活性化され、意図した光修飾反応が起きることを確認した。
2. 一重項酸素を生成する光触媒存在下、オリゴDNA配列に光を照射することで、既知のグアニン塩基の酸化に加え、未知の機構に基づく脱塩基（APサイトの生成）が起きることを確認した。架橋損傷はこのAPサイトと相補鎖の相補塩基の反応に基づくと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 今回開発した核酸修飾法は、光を照射するだけで標的の配列を修飾できる方法である。従って、選択性と効率に課題は残るものの、長鎖核酸の機能化や蛍光色素によるラベル化といった多岐にわたる応用可能性を秘めていると考えられる。
2. 本研究では、光架橋型の損傷の発見をきっかけとして、光触媒反応に基づく非酵素的なAPサイト生成を見出した。さらに、その配列・構造依存性や機構についても詳細に検証した。同様の現象に関する詳細な報告はこれまでにない。従って、本研究で得られた知見は未知の損傷修復機構や生命現象の発見・解明にも大いに役立つことが期待され、生物学的にも極めて重要で意義深い試みであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to 1. develop novel photo-modification reaction for nucleic acid, and 2. analyze cross-linking-type nucleic acid lesion under photocatalytic reactions.

1. DNA probes tethered with photocatalysts, Cat-ODNs, are newly designed. Cat-ODN that formed a duplex with the target sequence was exposed to light in the presence of a urazole-type modifier. Intended photochemical modification of nucleic acids was achieved based on the reaction between guanine residues in target sequence and urazole-type modifiers activated by a photocatalyst in Cat-ODN.
2. Confirmed that AP sites were generated in DNA oligomer by irradiating with light in the presence of a photocatalyst. This reaction was mainly mediated by singlet oxygen generated by the photocatalyst. Also suggested that the generated AP sites formed additional cross-linking type lesion with the nucleobases of the complementary strand.

研究分野：核酸化学

キーワード：光修飾 光触媒 光ラベル化 核酸 光酸化 酸化損傷 APサイト 架橋反応

1. 研究開始当初の背景

本研究では、光誘起電子移動を用いた新しいアプローチで **(1) mRNA のピンポイント光修飾に応用可能な新しい核酸修飾法の手法の開発**を目指した。

一方、(1)に関連する予備実験を行う中で、核酸二重鎖が光触媒存在下で鎖間架橋反応を起こすという興味深い現象を発見した(後述)。同様の現象はこれまでに報告例がなく、新しいタイプの核酸損傷であると考えられた。そこで本研究では、この **(2)光触媒反応下における鎖間架橋型の核酸損傷の機構解明**を2つ目の目標に据え、研究を開始した。

(1) mRNA は、塩基配列を設計するだけで様々なタンパク質を産生できる汎用性の高さと設計の容易さから、創薬モダリティや生体機能材料として近年注目されている。しかし mRNA は、生体内では即座に分解される、異常な免疫反応を引き起こす、といった様々な問題点も有している。このことから、mRNA を医薬・材料として積極的に応用するためには、mRNA 配列に機能性分子をピンポイントで修飾し、これらの問題点を克服すること、さらに高機能化することが今後重要となる。これまでに、RNA を修飾する様々な方法が開発されてきたが、天然の mRNA をピンポイントで高効率に化学修飾する手法の開発は未だ難しい課題になっている。今回、研究代表者は、mRNA のピンポイント修飾に適応することを目指し、光触媒反応に基づく新しい核酸修飾法を提案・検証した。これまで、光触媒反応を用いた修飾法としては、活性酸素種生成を利用することで RNA 配列中のグアニンを光酸化し、この酸化体と求核性を持つ機能性分子(修飾剤)を反応させる方法が知られている(図1)(Y. Li, R. C. Spitale, *et. al.*, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2709–2714.; P. Wang, P. Zou, *et. al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 1110–1119.; E. Cadoni, A. Madder, *et. al.*, *Chem. Commun.*, **2021**, *57*, 1010-1013.)。しかし、標的とするグアニン近傍にのみ活性酸素種を生成させることは難しく、これら方法では複数のグアニンの非特異的な酸化や修飾を抑制できないことも示されている。このことから、光触媒反応による mRNA の機能化を実現するためには、更なるブレイクスルーが必要とされている。

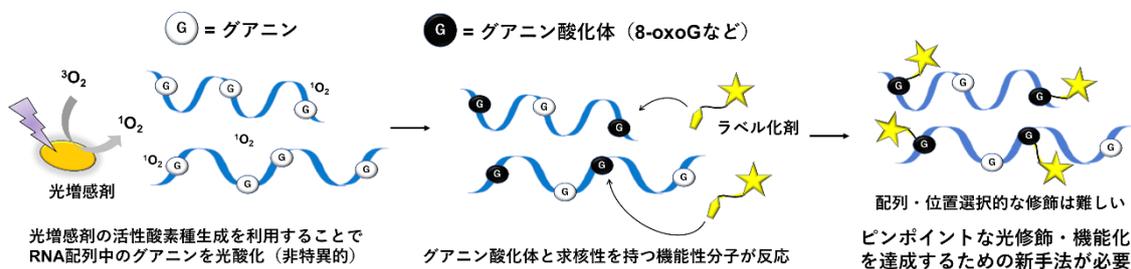


図1 一般的な RNA の光修飾法

(2) 遺伝情報のキャリアである核酸は、好気性代謝の過程で生じる活性酸素種やラジカル種、太陽光中の紫外線などの刺激により様々な酸化損傷を受けることが知られている。また、これらの損傷は細胞死やがん化、老化の原因となることが指摘されている。このような背景から、これまでに知られていない新しいタイプの核酸損傷を発見し、その機構を解明することは、核酸損傷と疾患に関する理解をさらに深めることができるため、新たな創薬につながる必要不可欠な研究課題である。また、新たに発見した核酸損傷が、どのような条件下で、どのような塩基配列・高次構造中で生じるのか、といった損傷の一般性を追求することは、これまでに発見されていない損傷修復機構をはじめ、未知の生命現象の発見・解明にもつながることから、生物学的にも極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では (1) mRNA のピンポイント光修飾に応用可能な新しい核酸修飾法の手法の開発、および、(2) 光触媒反応下での鎖間架橋型の核酸損傷の機構解明を目標として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 初めに、光触媒を配列末端に導入した2つのオリゴDNA、Cat-ODN1, 2を設計した(図2b)。これらのCat-ODNは真ん中に一本鎖領域を持つよう標的配列(Target-ODN)と二重鎖を形成できる。修飾剤存在下でこの二重鎖に光を照射すると、近傍の修飾剤から光触媒に電子が移動し、活性種される。活性化された修飾剤が一本鎖領域のグアニンと反応することで配列選択的な修飾を達成できると期待した。各Cat-ODNは、光触媒のNHSエステル体

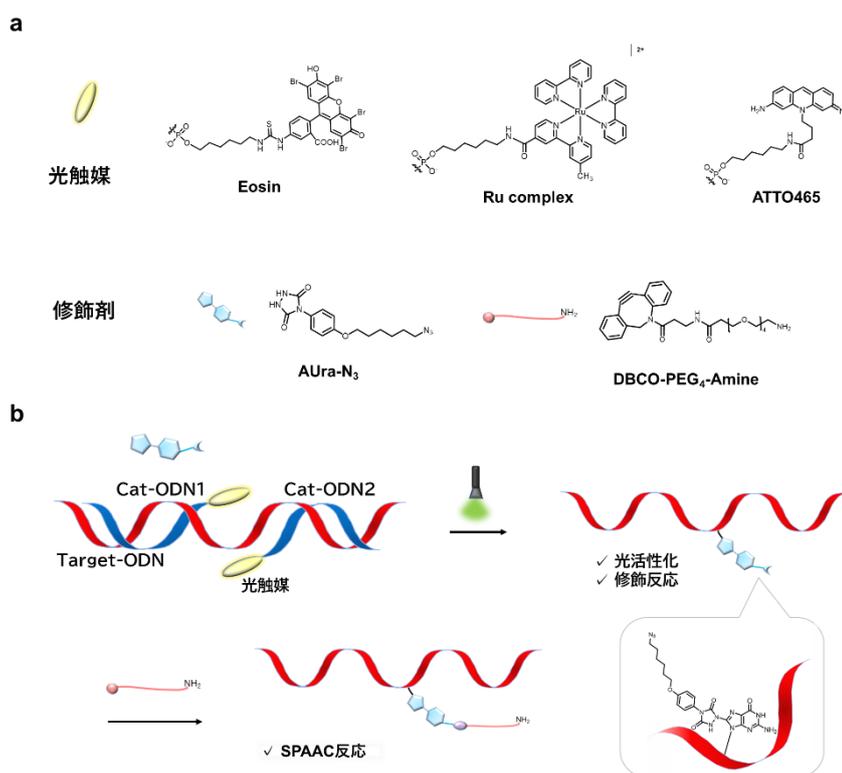


図 2 a: Cat-ODN に導入した光触媒、および修飾剤の化学構造
b: 光触媒反応を利用した核酸の光修飾法の概要

あるいはイソチオシアネート体とアミノ基末端を持つオリゴヌクレオチド配列を反応させることで合成した。その後、HPLCにて精製しMALDI TOF-MSにて目的とする光触媒導入配列(Cat-ODN)が問題なく合成できていることを確認した。一方、修飾剤としては電子移動を介したタンパク質の光ラベル化に用いられるウラゾール系化合物のAUra-N₃(図2a)など、数種類の化合物を検討した。修飾剤にはアジド基が導入されているため、クリック反応(SPAAC反応)を介して様々な機能性分子を導入(二段階修飾)することも可能であり、核酸の機能化にも応用できると考えた。標的配列あるいは非標的配列とCat-ODNを混合し、修飾剤存在下で導入した光触媒の吸収波長(505 nmあるいは455 nm)の光を0-30分間照射した。照射後のサンプルに対して二段階目のモデル修飾剤としてDBCO-PEG₄-Amineを加え、37°Cで3時間インキュベーションすることでSPAAC反応を行った。反応後のサンプルを変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(変性PAGE)やMALDI-TOF-MSなどを用いて解析し、機能評価を行った。

(2) 予備検討では、図2のCat-ODNとTarget-ODNの二重鎖に対し、修飾剤非存在下で光を照射するコントロール実験を行った。照射産物を変性PAGEなどで解析した結果、興味深いことに、Cat-ODNとTarget-ODNがわずかに鎖間架橋を起こす(架橋型損傷が引き起こされる)ことが示された。この反応は修飾剤存在下では観察されず、(1)で述べた光修飾反応とは競合することも示唆された。しかしながら、複数の光触媒導入配列(Cat-ODN)を含む系の複雑さゆえに、この系をそのまま用いて損傷反応を詳細に解析することは困難であった。そこでより単純な系でこれらの損傷の解析を行うこととした。まず、系を単純化するために、数種の自己相補DNA配列などをモデル配列として使用し、EosinY、Ruthenium tris(bipyridine) complex(Ru錯体)、あるいはRose Bengal(RB)などの遊離の光触媒存在下で光を照射し、生成物を変性PAGEで解析した。さらに生成物をMALDI-TOF-MSでも詳細に解析し、どのような種類の核酸損傷がメインで生じているのかを評価した。また、活性酸素種のスカベンジャー存在下でも反応を検証することで、損傷発生のメカニズムについても詳細に検討した。

4. 研究成果

(1)初めに 6 種類の Cat-ODN (表 1) を合成し、Target-ODN との二重鎖の融解温度 (T_m) を測定した。その結果、各二重鎖の融解温度はいずれも 60 °C 程度 (57.9-60.2 °C) となり、光触媒の導入が二重鎖形成能に大きな影響を与えないことが確認された。次に、実際に各 Cat-ODN1, 2 ペアを用い、Target-ODN を光修飾できるか調べた。

Eosin-ODN1,2 を用い、光反応、SPAAC

反応を行った後の変性 PAGE の結果を図 3 に示す。光照射時間の経過に伴って、Target-ODN の上部にバンドが現れ、30 分照射後にはこの上部バンドのバンド収率は約 28% となった。一方、SPAAC 反応を行わない場合には、この上部のバンドは観察されなかった (data not shown)。これらの結果から、この上部バンドは AUra-N₃ と DBCO-PEG₄-Amine で二段階修飾された Target-ODN であることが強く示唆された。さらに、光照射後のサンプルを脱塩精製し MALDI-TOF-MS で質量分析した (図 4)。その結果、未修飾の Target-ODN に加え、AUra-N₃ 修飾 Target-ODN に対応する MS がメインピークとして観測された。つまり、AUra-N₃ を修飾剤に用いれば、大きな副反応を伴うことなく核酸を光化学的に修飾できることが確認された。

表 1 Cat-ODN 配列と標的、非標的配列の設計

Name	Sequence
Eosin-ODN1	5'-TTGCGTTCGCG-E-3'
Eosin-ODN2	5'-E-TCAGTCTCGC-3'
Ru-ODN1	5'-TTGCGTTCGCG-Ru-3'
Ru-ODN2	5'-Ru-TCAGTCTCGC-3'
ATTO-ODN1	5'-TTGCGTTCGCG-At-3'
ATTO-ODN2	5'-At-TCAGTCTCGC-3'
Target-ODN	3'-AACGCAAGCGCGGAGTGACGAGCG-5'
Non-Target-ODN	3'-TTTTTTTTTTTTGGTTTTTTTTTTTT-5'

E: Eosin, Ru: Ru complex, At: ATTO465

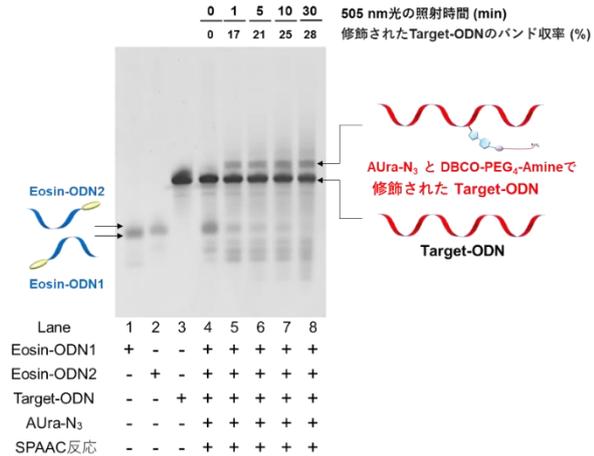


図 3 変性 PAGE による光修飾反応の解析

The reaction was monitored by denaturing polyacrylamide gel (PAGE) containing 20% formamide. Gel was stained with SYBR Gold. Conditions: 5.0 μM Target-ODN, 5.0 μM Eosin-ODN1, 5.0 μM Eosin-ODN2, 500 μM AUra-N₃, 100 mM NaCl, 20 mM phosphate buffer (pH = 8.0), 10% DMSO. Photoirradiation was performed for 0-30 min at 505 nm. The SPAAC reaction was conducted by incubating the irradiated samples with DBCO-PEG₄-Amine (1000 μM) for 3 h at 37 °C.

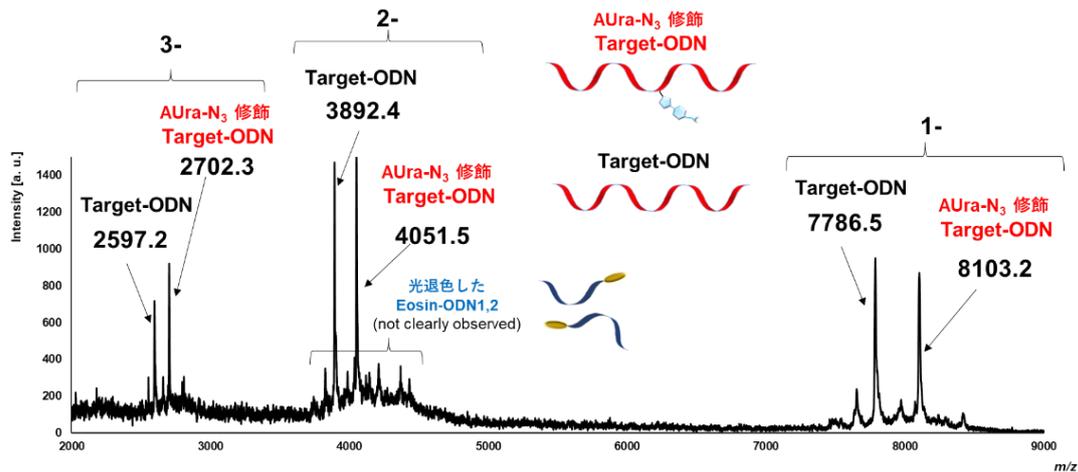


図 4 MALDI-TOF-MS による光修飾反応の解析

Reaction conditions: 5.0 μM Target-ODN, 5.0 μM Eosin-ODN1, 5.0 μM Eosin-ODN2, 500 μM AUra-N₃, 100 mM NaCl, 20 mM phosphate buffer (pH = 8.0), 10% DMSO. Photoirradiation was conducted for 10 min at 505 nm.

次に修飾反応の配列選択性を調べるため、非標的 (Non-Target-ODN) を Target-ODN の代わりに用いて修飾反応を行った。その結果、予想に反し、30 分の光照射後には Non-Target-ODN も約 21% の割合で修飾され、修飾反応の配列選択性は不十分であることが示された。近接効果が働かない非標的配列での意図しない修飾反応は、光触媒自身の一重項酸素生成と核酸塩基の酸化に基づいて起きている可能性が考えられた。そこで、一重項酸素生成の量子収率が Eosin よりも低い、Ru 錯体及び ATTO465 を導入した Ru-ODN1, 2 や ATTO-ODN1, 2 を代わりに用い、

455 nm を照射した後の Target-ODN と Non-Target-ODN の修飾率（変性 PAGE におけるバンド収率）を比較した。結果、Ru-ODN1, 2 を用いた場合には Target-ODN の修飾率も最大で 13% となり効率的な修飾には至らなかった。一方で ATTO-ODN1, 2 を用いた場合には Target-ODN と Non-Target-ODN の修飾率は、25% および 10% となり、わずかながら選択性を見出すことができた。そこで、ATTO-ODN1, 2 と target-ODN に対して、環外アミノ基や様々な複素環を含む化合物を AUra-N₃ の代わりに加え光を照射することで、修飾剤のスクリーニングを行った。結果、多くの化合物では修飾率は AUra-N₃ を下回り、効率的な光修飾反応にはウラゾール構造が必須であることが示された。

また、非標的配列の意図しない修飾を防ぐために、プローブのさらなる改良を目指した。具体的にはヘアピンループ（モレキュラービーコン）型のプローブ DNA を設計・合成した。標的配列非存在下ではプローブ DNA の末端に導入した光触媒ともう一方の末端のグアニンがプローブ内で近接し修飾反応がクエンチ（OFF）、標的配列存在下では標的配列との二重鎖形成に伴い光触媒能が回復する（ON 状態になる）ことを期待した。しかし、実際に修飾反応を行った結果、非標的配列の修飾は大きく抑制されたものの、標的配列の修飾収率も（先の設計と比較して）大きく低下してしまうことがわかり、長鎖核酸の位置選択的な修飾に適応可能なレベルで高効率かつ高選択的な修飾反応を開発するためには、さらなる設計の改良が必要であることがわかった。

以上、選択性や効率には課題はあるものの、本研究では光触媒反応を利用した核酸の新規修飾法を開発することに成功した。

(2) まず、配列末端にグアニン残基を有する 12 mer の自己相補 DNA 配列に対して上記の遊離光触媒存在下で光を 0-5 分間照射し、生成物を変性 PAGE にて解析した。その結果、光触媒に RB を用いた場合、原料配列は 2 分以内の光照射で速やかに消失し、PAGE 上には原料配列よりも移動度の低い二つのバンドが生じることがわかった。これらのバンドは、損傷塩基を含む配列と、損傷に基づき架橋した配列である可能性が考えられた。そこで、RB 存在下、2 分間光を照射した後のサンプルを脱塩・精製し、MALDI-TOF-MS にて詳細に解析した。結果、損傷は主にグアニン塩基で起き、8-オキソグアニン (8-oxoG) やスピロイミノジヒダントイン (Sp)、グアニジノヒダントイン (Gh) といった既知のグアニン酸化体の生成に加え、Abasic サイト (AP サイト) が配列中に生成していることが見出された (図 4)。また、照射後サンプルの MALDI-TOF-

MS のピーク面積を比較・定量することで、配列によっては 30% 以上の割合で少なくとも一つのグアニン残基が AP サイトに変換される可能性があることが示された。AP サイトは相補

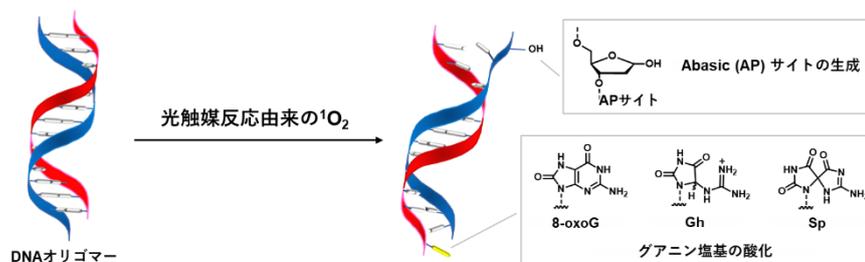


図 5 光触媒反応に基づくグアニン塩基の酸化と AP サイト生成

鎖中の核酸塩基の環外アミノ基と架橋反応を起こすことが知られているため、変性 PAGE で観測された架橋体は AP サイト由来である可能性が高いと考えられる。光酸化反応に基づく非酵素的な AP サイト生成に関してはほぼ報告例がなく、恐らく未知の機構に基づいて生じていることが予想された。そこで、この AP サイト生成反応のメカニズムについても検討した。具体的には、様々な活性酸素種のスキャベンジャーを系中に加えて AP サイトの生成率が変化するかを調べた。結果、一重項酸素のスキャベンジャーであるアジ化ナトリウムを添加した場合にのみ AP サイトの生成が大幅に抑制されることがわかり、AP サイト生成反応には光触媒由来の一重項酸素 (type II 酸化) が関与していることが示唆された。さらに、DNA 配列中のグアニン残基の一部を 8-oxoG に置き換えた場合には、AP サイトの生成率は大幅に低下することもわかり、グアニンは 8-oxoG などの酸化体を経由せずに AP サイトに変換されていることが示唆された。また、グアニン四重鎖構造を形成するモデル DNA 配列でも光触媒反応に基づき同様の効率的な AP サイト生成が起きることも確認され、その効率には配列・構造依存性もあることが示された。

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 0件）

1. 著者名 Onizuka Kazumitsu, Yamano Yuuhei, Abdelhady Ahmed Mostafa, Nagatsugi Fumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Hybridization-specific chemical reactions to create interstrand crosslinking and threaded structures of nucleic acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 4699-4708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob00551d	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 Yamano Yuuhei, Onizuka Kazumitsu, Sasaki Madoka, Sato Shinichi, Nagatsugi Fumi	4. 巻 51
2. 論文標題 Photochemical Labeling of Nucleic Acid by Photocatalyst Tethered DNA Probe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1121-1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220397	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 Murayama Keiji, Yamano Yuuhei, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Functionalization of acyclic xenonucleic acid with modified nucleobases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 743-752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-023-00776-7	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 Kuwahara Kazuki, Yajima Sayaka, Yamano Yuuhei, Nagatsugi Fumi, Onizuka Kazumitsu	4. 巻 34
2. 論文標題 Formation of Direction-Controllable Pseudorotaxane and Catenane Using Chemically Cyclized Oligodeoxynucleotides and Their Noncovalent RNA Labeling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 696-706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.3c00031	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山野雄平、鬼塚和光、佐々木まどか、佐藤伸一、永次史
2. 発表標題 光触媒修飾DNAプローブを利用した核酸の光修飾法の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamano Yuuhei, Onizuka Kazumitsu, Sasaki Madoka, Sato Shinichi, Nagatsugi Fumi
2. 発表標題 Nucleic acids modification by photo-catalytic reaction
3. 学会等名 第49回国際核酸化学シンポジウム 日本核酸化学会第6回年会（ISNAC2022）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamano Yuuhei, Onizuka Kazumitsu, Okan Altan, Sato Shinichi, Nagatsugi Fumi
2. 発表標題 光酸化反応による新たな核酸酸化損傷の解析
3. 学会等名 第1回分子生命反応創発討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山野雄平、鬼塚和光、佐々木まどか、佐藤伸一、永次史
2. 発表標題 光触媒導入DNAプローブを利用した核酸光修飾法の開発
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会（2023）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuuhei Yamano、 Kazumitsu Onizuka、 Altan Okan、 Madoka Sasaki、 Ahmed Mostafa Abdelhady、 Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Abasic site generation in nucleic acids by photo-catalytic reaction
3. 学会等名 第50回国際核酸化学シンポジウム 日本核酸化学会第7回年会 (ISNAC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuuhei Yamano、 Kazumitsu Onizuka、 Altan Okan、 Madoka Sasaki、 Ahmed Mostafa Abdelhady、 Fumi Nagatsugi
2. 発表標題 Analysis of photo-catalytic abasic site generation in DNA
3. 学会等名 Supra FIBER International Summit for Nucleic Acids (S-FISNA) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山野 雄平、 鬼塚 和光、 アルタン オーカン、 佐々木 まどか、 アーメド アブデルハーディ、 永次 史
2. 発表標題 光酸化によるDNA中のAbasic site生成反応の解析
3. 学会等名 日本化学会 第104春季年会 (2024)
4. 発表年 2024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
---------	---------