

二国間交流事業 共同研究報告書

令和5年4月28日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
甲南大学・先端生命工学研究所
[職・氏名]
所長、教授・杉本直己
[課題番号]
JPJSBP 120215004

1. 事業名 相手国: スロベニア (振興会対応機関: MESS) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 核酸の非標準構造の安定性予測法の開発

(英文) Development of stability prediction method of non-canonical structures of nucleic acids

3. 共同研究実施期間 2021年4月1日 ～ 2023年3月31日 (2年)

4. 相手国側代表者 (所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Slovenian National NMR Centre ・ Professor ・ Janez Plavec

5. 委託費総額 (返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,800,000 円
内訳	1年度目執行経費	1,900,000 円
	2年度目執行経費	1,900,000 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数 (代表者を含む)

日本側参加者等	5 名
相手国側参加者等	3 名

* 参加者リスト (様式 B1(1)) に表示される合計数を転記してください (途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	0	0	0 (0)
2年度目	2	0	3 (0)
3年度目			()

* 派遣・受入実績 (様式 B1(3)) に表示される合計数を転記してください。

派遣: 委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績 (延べ人数)。

受入: 相手国側参加者等の来日実績 (延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

近年、核酸(DNA や RNA)は細胞内で標準的な二重らせん以外の構造(非標準構造)を形成し、遺伝子発現制御を司ることが明らかになってきた。また、非標準構造の形成によって癌や筋萎縮性側索硬化症(ALS)等の神経疾患が引き起こされることなども示唆されている。そのため、非標準構造の安定性を変化させて疾患を治療する医薬品開発が注目されている。しかし、非標準構造は配列や分子環境によってその立体構造が変化するため、標準構造と比べ核酸の配列情報を基に非標準構造の安定性を予測することが困難であるのが課題であった。課題解決のためには、非標準構造の配列に依存した安定性と構造の関係性を定量的に結びつけることが不可欠である。そこで核酸の配列情報から非標準構造(非二重らせん核酸)の安定性を精密に予測する手法を確立するために、核酸の物理化学的解析に実績のある本国グループ(甲南大学先端生命工学研究所、所長 杉本直己教授)と核酸の立体構造解析で世界有数の技術を有するスロベニアの研究グループ(代表者スロベニア国立 NMR センター、センター長 Janez Plavec 教授)との共同研究を立案した。本研究交流事業では、本共同研究を実施するために両国の研究グループの研究交流を通じ、疾患の原因となる様々な非標準構造の安定性を予測できる技術の開発を行うとともに、核酸化学分野で今後の活躍が期待される若い世代の研究者を養成することを目的とした。

2021 年度は新型コロナウイルス感染症による渡航規制が厳しく、両国双方のグループによる直接訪問による研究交流が叶わなかった。両研究グループの共同研究は過去 2 回(H27-H28 および H30-R1 年度)における二国間交流事業に採択されており、それ以前からも研究交流があった。そのため、研究結果に関する意見交換を e-mail やオンライン会議を綿密に行う連携体制が既に整っていたことから、申請時に計画した代案のとおり、オンラインでの研究交流を頻繁に行うことで共同研究を実施した。研究試料に関しては本国の研究グループが合成、調製などの検討を行い、スロベニアの研究グループはそれらの条件を参考に核酸構造の解析をスムーズに行うことができた。2022 年 2 月には国際講演会として「FIBER 若い世代の特別講演会」をオンライン開催した。本講演会では、スロベニア側の二人の若手研究者を講演者として招待し、FIBER の若手研究者をはじめとする国内の参加者が積極的に議論を深めた。

2022 年度は徐々に新型コロナウイルス感染症による規制が緩和され、双方のグループの直接訪問による研究交流を実現することができた。2022 年 7 月にはスロベニア側の若手研究者が来日し、共同研究に関する研究打ち合わせを行った。さらに、同時期に国際講演会「FIBER International Summit for Nucleic Acids 2022 (FISNA2022)」を開催し、両国双方の若手研究者が最新の研究成果について講演を行い、両国以外の研究者も交えて討論する機会を設けた。2022 年 10 月および 2023 年 1 月には本国のメンバーがスロベニアに渡航し、共同研究の打ち合わせを行うと共に、現地で開催された国際シンポジウムで招待講演者として研究成果を発表した。また、2023 年 2 月にはスロベニア側の研究者が再度来日し、共同研究の総括と、今後の展開について打ち合わせを行った。合わせて、国際講演会として「FIBER 未来大学」並びに「FIBER 若い世代の特別講演会」を開催し、国内外のシニアから若手研究者が参加する国際講演会を開催し、両国の若手研究者を養成する好機となった。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

本研究交流では本国の研究グループが、対象となる核酸の非標準構造を設計し、配列及び環境依存的な安定性の定量的な解析を行った。塩濃度やポリエチレングリコール 200 の添加など異なる擬似細胞内環境下で、

癌や老化に関わるヒテロメア由来の DNA グアニン四重らせんの物理化学的特性を定量的に解析した。また、細胞内の機能を調べるために、DNA ポリメラーゼによるグアニン四重らせんを形成する配列の複製反応も解析した。それにより、ヒテロメア配列由来のグアニン四重らせんの安定性を決定する化学的要因である“配列・環境パラメータ”を得た。さらに、スロベニア側である Plavec 教授の研究グループは、上述のヒテロメア由来グアニン DNA 四重らせんの立体構造を NMR によって解析し、溶液環境に応じて変化するヒテロメア由来のグアニン四重らせんの配列および環境依存的に立体構造を定義する“構造パラメータ”を得ることができた。これらのパラメータをデータベース化し、ヒテロメア由来のグアニン四重らせんのループ領域に相互作用する化合物としてナフタレンジイミド誘導体を得た。実際に、ナフタレンジイミド誘導体によってヒテロメア由来のグアニン DNA 四重らせんの構造と機能が制御されることを明らかにした。さらに得られた結果をフィードバックすることでデータベースを改良し、四重らせん DNA をより強く安定化し、複製反応を効果的に抑制する新規化合物を開発することができた (*J. Am. Chem. Soc.*, 143, 16458 (2021))。また、四重らせん構造以外の核酸非標準構造についても、核酸構造の低分子化合物との結合相互作用解析にも取り組んだ。その一つとして、本国のグループがヒト細胞に存在する RNA から抗菌活性を有するベルベリンに結合する配列を特定し、スロベニア側がその複合体の立体構造を決定することで、ベルベリンが RNA の非標準構造に直接相互作用することを見出した (*Nucleic Acids Res.*, 49, 8449 (2021))。本研究では、グアニン四重らせんとは別の四重らせんである i-motif 型 DNA に対しても検討を行った。本国のグループが i-motif 型 DNA の“配列・環境パラメータ”を、スロベニア側が“構造パラメータ”を求めることで、i-motif 型 DNA のらせんのねじれが溶液環境に影響を受け、構造安定性が変化する挙動を予測できるデータベースの構築に成功した。このデータベースと分子動力学計算を基に、Bcl2 などの癌遺伝子の発現に関与する i-motif 型 DNA に結合する小分子化合物を取得し、実際に癌細胞の Bcl2 遺伝子の発現抑制が観察された。成果は現在論文投稿準備中である。これらの成果をあげることができたのも、双方の研究者が定期的に行う e-mail やオンラインミーティングとともに、お互いの研究機関を訪問し、直接意見交換を行うことで効率的に研究を進めたことに依るところが大きい。また、双方のグループが、お互いの訪問に合わせて若手研究者向けの講演会を企画することで、若手研究者の活発な議論と交流が促された。したがって、本事業をきっかけとして若い世代が海外との共同研究を自ら積極的に展開できたことは大きな成果である。

その他にも共同研究で得られた知見を活かし、グアニン四重らせんの配列に依存して変化する水和量の解析 (*Anal. Chem.*, 94, 7400 (2022)) や、DNA メチル化修飾が及ぼすグアニン四重らせんの安定性と立体構造に対する効果の解析 (*Chem. Commun.*, 58, 12459 (2022)) 等の成果をあげることができた。これらは本事業に参画する若手研究者が筆頭著者として執筆した特筆すべき成果である。現在、以上の成果を踏まえ、ゲノム編集などの核酸を用いた医工学技術の効率を予測できるシステムの構築をスロベニアのグループと共同で進めている。すでに、細胞内環境下での DNA および RNA から形成される二重鎖の安定性予測の開発 (*Nucleic Acids Res.*, 47, 3284-3294 (2019)、*Nucleic Acids Res.*, 51, (2023) *in press.*) に成功しており、目標とする予測システムの開発を達成しつつある。今後も両国で連携し、様々な細胞内環境下での核酸の構造と機能を予測できるデータベースを構築し、特定の遺伝子上の核酸をターゲットとする医工学技術を合理的に設計するためのシステム開発に関わる研究を進める予定である。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

本事業を遂行するにあたり、スロベニアからの研究者が延べ3名来日(新型コロナウイルスの影響で事業1年度は来日なし)し、本国からは延べ2名渡航し(同じく新型コロナウイルスの影響で事業1年度は渡航なし)、共

同実験、成果報告会、研究打ち合わせを行った。本国の研究グループは、核酸構造の機能を熱力学や動力学を用いた定量的なアプローチで解析してきた。本研究では、核酸構造の立体解析に精通したスロベニアの研究グループとの共同研究を遂行することにより、核酸の非標準構造の安定性とその立体構造の特徴を数値化することで、立体構造から導かれる機能を定量的に議論した。それにより、細胞内環境の変化に応じて変化する核酸構造の物性と機能を予測し、化学的に制御するための化合物の設計をすることができた。本成果は、癌や神経変性疾患に関わる非標準核酸構造をターゲットとする技術として今後の医工学分野への貢献が期待できる。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

研究代表者の所属する甲南大学先端生命研究所(FIBER)では、研究成果を分かりやすくまとめた機関誌 NanoBioNow を毎年発刊し、FIBER での活動を広く一般に発信することに努めている。2022 年度の機関誌にはスロベニア側代表の Plavec 教授に寄稿していただき、本事業の成果による社会への貢献について国際的なリーダーとしての立場から説明いただいた。本機関誌は周辺の研究機関や企業、財団などに送付され、また FIBER で開催する講演会や、産学連携を目的とした展示会などにおいても配布された。

企画した公開講演会は研究成果を社会還元する機会としても開催した。2022 年 7 月に開催した FISNA2022 では日本スロベニア両国以外にもアメリカ、イギリス、インド、韓国から 60 名を超える参加者が集まり、最先端の研究成果に対する議論のみならず、多様な文化的な交流の場を提供することができた。本講演会はアカデミックの研究者だけでなく、企業研究者や核酸化学に興味を持つ一般の方まで幅広く参加いただいた。各講演会においてアンケート調査を行った結果、アンケート調査を行ったすべての講演会において 9 割以上の参加者に講演会の内容に関して、非常に面白い・次回も参加したいと回答していただいた。本国の研究グループの研究所が立地する神戸ポートアイランドでは、神戸医療産業都市として医療や生物学の研究交流会が多数開催されているものの、化学系研究や国際交流に焦点を当てた研究交流会はほとんどなかった。そのため、本事業により地域の科学技術および研究者交流の活性化に貢献できたと考えられる。

核酸の非標準構造の形成によって癌などの種々の疾患に関わる遺伝子発現への影響が報告されているが、細胞の環境で変化するこれら核酸構造の物性がどのように発症機構に関連しているかは明らかになっていない。本事業において、細胞内の溶液環境変化が核酸構造の安定性に及ぼす影響を定量的に予測できるデータベースを構築することができた。本事業の知見は、癌や神経変性疾患の診断や治療といった特に社会的希求の高い現代的諸問題の克服と解決への貢献が期待できる。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

若手研究者養成を目指して、若手研究者向けの国際講演会を企画した。その一つとして、本国で優れた研究を行い今後の活躍が期待される学生または博士研究員を招聘し、スロベニア国立 NMR センターの Assistant Professor や博士研究員とともに研究成果を発表する公開講演会“FIBER 若い世代の特別講演会”を開催した(2022 年 2 月及び 2023 年 3 月)。本講演会では、質疑応答の時間を長く設定し、若手研究者の活発な議論を促すよう工夫を設けた。さらに、本国の講演者には「FIBER 若い世代の特別講演証」を授与した。別の企画として、核酸化学分野の国際シンポジウム FIBER International Summit for

Nucleic Acids 2023 (FISNA2022)を開催した(2022年7月)。当該シンポジウムでは、国内外の若手研究者だけの講演セッションを用意し、若手研究者が核酸化学分野において著名な国内外の研究者の前で成果を発表し、議論する機会を設けた。これらの講演会においては、事後アンケートによって参加者全員から本講演会に対して非常に面白い・次回も参加したい、と高評価をいただいた。国内外のトップレベルの若手研究者を招聘し、研究成果を講演・討論する企画はFIBER独自の試みであり、アンケート調査では高評価を得たことから、若手研究者の研究支援に対して一定の成果があったと考えられる。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本事業を含むスロベニアの Janez Plavec 教授のグループとのこれまでの二国間交流事業(採択期間 H27-H28、H30-R1、および R3-R4)において、細胞内を想定した様々な分子環境下において、非標準構造を形成する核酸の配列と立体構造の相関性が明らかになってきた(Plavec and Sugimoto et al., *Nucleic Acids Res.*, 58, 2387 (2020)、*J. Am. Chem. Soc.*, 143, 16458 (2021)など)。これらの一連の基礎研究で得られた成果が充実しつつあることから、現在、特定の非標準構造に結合する分子を合目的的に開発し、画期的な医薬品開発を行う応用段階に差し掛かっている。そこで、本事業の今後の展開として、得られた知見を基に細胞内環境に応じて形成する特定の非標準構造を特異的に認識して結合し、疾患細胞内で効果を発揮する医薬品の開発を行う。現在まで開発されてきた非標準構造に結合する化合物は、塩基対に相互作用する平面的な形状を持つものがほとんどであった。そのため、既存のリガンド分子は非標準構造への特異性が乏しい。そこで、コアのらせん部位を安定化しつつ、周辺配列を同時に認識する分子を設計することで、特定の非標準構造に特異的に結合する人工分子を開発できると考えられる。実際に、本事業を含む事前の予備的研究により、非標準構造のコア部位とループ等の周辺部位を同時に認識できる分子が、極めて高い構造安定性の向上をもたらすことが示されている(*J. Am. Chem. Soc.*, 143, 16458 (2021)、*J. Am. Chem. Soc.*, 144, 5956 (2022))。具体的な研究展開として、本国の研究グループが構築してきたデータベースを活用し、分子環境依存的に標的の核酸配列が形成する非標準構造を予測する。そして、標的の構造を特異的に認識する分子を開発する。現在新たな二国間交流事業として独国の研究グループ(代表者ドルトムント工科大学、Guido Clever 教授)と新規の四重らせん構造に結合する分子の開発を進めている。Clever 教授の錯体化学を基にした技術を活用し、核酸をベースとした人工分子で特定の非標準構造に結合する分子を開発することで、配列と環境情報を基に特定の非標準構造の形成を制御する分子を合理的かつ効率的に設計できることを示していく。核酸の非標準構造は癌や神経疾患に関する遺伝子のみならず、新型コロナウイルスをはじめとするウイルス遺伝子にも存在するため、有力な工学的なターゲットである。今後の研究展開で開発する人工分子は、核酸の非標準構造をターゲットとする新型核酸医薬として工学的な研究開発が加速度的に進展することが期待される。

(7)その他(上記(2)~(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

本国代表者である杉本は、本事業で築き上げた二国間研究ネットワークをさらに発展させ、相手国研究グループであるスロベニアのグループを含む5カ国の研究グループで構成される国際共同研究プロジェクトを立案した。本プロジェクトは、日本学術振興会令和4年度「研究拠点形成事業」の「先端拠点形成型」に申請し、「非二重らせん核酸を活用した遺伝子発現の制御法を開発する核酸化学研究拠点」としてプロジェクトが採択された。二国間交流事業での成功を基に、多国間からなる国際プロジェクトへ

と展開できた好例であり、現在事業を実施している。また、本国代表者が指導する博士研究員が「日本核酸化学会第 6 回年会・ISNAC2022 第 49 回国際核酸化学シンポジウム」で「Ohtsuka Award (ISNAC Outstanding Oral Presentation Award for Young Scientist 2022)」を受賞した。受賞対象となった研究は本事業に深く関連する内容で、本事業の根幹でもある物理化学的な解析に基づいた核酸構造の機能解明とその活用に関する研究成果が高く評価された。