

研究終了報告書

「眠れる遺伝子機能を呼び起こす革新的光操作技術の開発」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：山吉 麻子

1. 研究のねらい

遺伝子発現の調節過程で最も重要な役割を果たすものの1つが「DNAのメチル化修飾」である。DNA中のシトシン塩基(C)がメチル化を受けることによって5-メチルシトシン(5mC)となると、その部分の遺伝子発現が抑制される。つまり、「5mCは遺伝子発現のOFFスイッチ」になっている。受精卵ならびにES細胞などの幹細胞では、このDNAのメチル化の度合いは低下することが明らかとなっており、個々の細胞に特異的なDNAメチル化状態を獲得することで細胞の分化は進行する。この原理に則って考えると、分化して機能を持った体細胞(神経細胞、皮膚細胞、筋肉細胞など)のDNAのメチル化状態を変化させることで、細胞の分化状態を制御し、万能性を持つ細胞を作製することが可能であると推測される。しかしながら、人工核酸のみを用いて体細胞での脱DNAメチル化を人為的かつ配列特異的に制御する手法はいまだかつて存在しない。

これまでに研究代表者(山吉)は、光応答性分子であるPsoralen(ソラレン)誘導体を含む人工核酸「Methyl-Tracker」の開発に成功し、シトシンのメチル化の有無によって、標的遺伝子に対するMethyl-Trackerの架橋効率が大きく異なることを見出した。本研究は、Methyl-Trackerの5mCへの選択性と、細胞の持つDNA修復機構を組み合わせることで、これまで誰も成し得なかったDNAの配列特異的な「脱メチル化」の実現に挑むものである。Methyl-Trackerは標的DNAに対して3重鎖を形成して結合する性質を持つ。このため、以下の様な特徴がある：

- Psoralenを標的DNA中の5mCに配列特異的に挿入することが可能である。
- 光照射によってPsoralenと5mCとを架橋させることで、人為的に配列特異的な「DNAの損傷」を作製することが可能である。
- 作製した「人為的DNA損傷」を、細胞中のDNA修復酵素群に修復させ、その部分に「メチル化されていないシトシン塩基」の挿入を誘導することで、5mCの脱メチル化が誘起されると期待される。

本研究課題では、このMethyl-Trackerの配列特異性を向上させるために化学構造の最適化を行い、続いて、最適化されたMethyl-TrackerによるDNAの脱メチル化能を*in vitro*あるいは*in vivo*で検証する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、「眠れる遺伝子」を標的とした光操作技術を新たに提案することを目指す。すなわち、メチル化修飾によって遺伝子発現が抑制された状態にあるDNAに対して配列特異的に反応する光応答性核酸素子(Methyl-Tracker)を用い、DNAを配列特異的に「脱メチル化」する手法を世界にさきがけて開発することを目的とする。

この目的の達成のため、以下4項目に沿って研究を遂行した。まず Methyl-Tracker の配列特異性を高めるための化学構造の最適化を進めてその光架橋特性評価を行い(研究テーマ A & B)、最適化された Methyl-Tracker を駆使して *in vitro* ならびに細胞内での DNA 脱メチル化能の評価へ展開した(研究テーマ C & D)。

研究テーマ A:「新規 Methyl-Tracker の合成」

研究テーマ B:「Methyl-Tracker の光架橋特性の検証」

研究テーマ C:「Methyl-Tracker による DNA 脱メチル化能評価」

研究テーマ D:「体内埋込型光照射デバイスを用いた *in vivo* での検証実験」

上記項目 A & Bにおいて、5mCを始めとした修飾シトシン塩基を含む DNA に体して光架橋能を有する新規 Methyl-Tracker の合成に成功した。また、上記項目 C & Dにより、少なくとも培養細胞系においては、Methyl-Tracker と光照射のみでは DNA の脱メチル化は困難であることが示唆された。この原因として、メチル化を受けている DNA はヘテロクロマチン構造を形成しやすく、そのため Methyl-Tracker が標的 DNA へアクセス出来ない可能性が考えられた。このため、①ヌクレオソームのジャンクション DNA 領域を標的とした Methyl-Tracker の分子設計、②ヘテロクロマチン構造緩和のためのヒストン脱アセチル化阻害剤の併用、について検討したところ、配列特異的な DNA の脱メチル化が認められた。現在、実験動物を用いた実験系を構築し、*in vivo* での有効背評価実験を同時平行で検討中である。

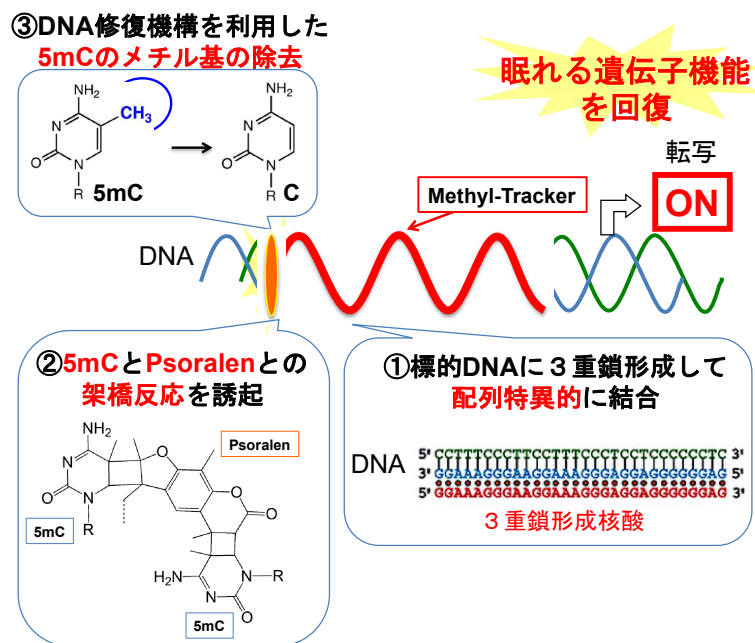


図1 本研究で目指す「眠れる遺伝子」を標的とした新たな光操作技術

Methyl-Tracker を用いた新光操作技術によって、DNA を配列特異的に「脱メチル化」する手法の開発を目指す。

(2) 詳細

研究テーマ A:「新規 Methyl-Tracker の合成」

これまでに研究代表者(山吉)が主に用いてきた Methyl-Tracker は、核酸の 5'末端に比較的長くフレキシブルなリンカー構造を介して Psoralen 誘導体を導入していたため、標的遺伝子の前後塩基とも架橋してしまう課題があった。そこで、DNA 中の 5mC に対する架橋選択性を向上させるため、グアノシン糖部 2'位にソラレンを導入したヌクレオシド(Gps)を含む新規光架橋性核酸(Gps-Oligo)の開発を行った。

研究テーマ B:「Methyl-Tracker の光架橋特性の検証」

シトシン塩基(C)および 5mC を含む相補鎖 DNA ならびに RNA に対する Gps-Oligo の架橋効率を評価したところ、mC を含む DNA に対し選択的に架橋することが確認された。また、mC の脱メチル化過程で生じるヒドロキシメチルシトシン(hmC)、ホルミルシトシン(fC)、カルボキシシトシン(caC)を含む相補鎖 DNA との架橋効率を評価したところ、fC に対しても架橋することが見出された。fC に対して架橋能を示す光応答性分子に関する報告例は未だなく、極めて興味深い結果であるといえる。

研究テーマ C:「Methyl-Tracker による DNA 脱メチル化能評価」

Methyl-Tracker によって細胞内で 5mC の脱メチル化が誘導されるか否かを細胞内で検証した。Human dopamine transporter (hDAT) 遺伝子のプロモーター領域を標的とした Methyl-Tracker を合成し、培養細胞に導入後、脱メチル化効率は標的組織を抽出しゲノム DNA を抽出した後、Bisulfite-Sequence によって評価したところ、SAHA などのヒストン脱アセチル化阻害剤を併用することによって配列特異的なゲノム DNA の脱メチル化が認められた。

研究テーマ D:「体内埋込型光照射デバイスを用いた *in vivo* での検証実験」

本領域 1 期生の徳田崇研究者らの開発した *in vivo* 光照射デバイスを用い、Methyl-Tracker の標的遺伝子に対する光架橋効率を評価したところ、有意に両者の架橋体の生成が認められたため、現在、マウス腹腔への埋入条件を検討中である。

3. 今後の展開

これまでの検討によって、少なくとも培養細胞系で脱メチル化能を担保できる Methyl-Tracker の開発が可能となったため、今後は実験動物を中心に実験系を展開し、本法の *in vivo* での有効性評価を推進する。研究テーマ D に示すように、既に *in vivo* で使用可能な体内埋入型光照射デバイスを用いた実験系の構築に着手しており、2021 年度中にはその結果の見通しが立つと予測している。また、発がんに関わる遺伝子や発生・分化に関わる遺伝子のプロモーター領域を標的とした Methyl-Tracker の設計ならびに合成も並行して行っており、ゲノム DNA が脱メチル化された後の細胞内イベントの検証も行う予定である。

4. 自己評価

申請当初は本法を用いて光操作によりゲノム DNA の配列特異的な脱メチル化を実現し、細胞分化制御法などへ発展させることを目指していたが、研究開始 1 年目に自身の異動があり、研究機関の前半部分は研究体制の構築に予想以上の時間がかかってしまった。このため、現

時点において、ゲノム DNA の脱メチル化は実現可能であることを示唆するデータは見出せたものの、これに伴う細胞内転写調節機構の光操作にまで至れていないことが悔やまれる。しかしながら、本研究課題を進めるにあたり、領域内外で様々な共同研究を進めることができ、これによって実用化に必須な製薬企業との共同研究体制の構築や、他の大型研究費を獲得に繋がった萌芽的学術知見を見出すことができた。これらの研究体制を礎にして、当初からの悲願であった、細胞内転写調節機構を *in vivo* において光操作することを、必ず実現したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:4件

1. Asako Yamayoshi*, Shota Oyama, Yusuke Kishimoto, Ryo Konishi, Tsuyoshi Yamamoto, Akio Kobori, Hiroshi Harada, Eishi Asihara, Hiroshi Sugiyama and Akira Murakami. Development of Antibody-Oligonucleotide Complexes for targeting Exosomal microRNA. *Pharmaceutics*, 2020, 12, 545-557.

極微量で高度な機能を発揮し、生体制御系に大きな役割を果たしているエクソソーム内包型 microRNA (exosomal miRNA) を標的とした機能性分子『ExomiR-Tracker』を考案し、核酸医薬の新しい薬物送達システムの開発に成功した。ExomiR-Tracker は、『エクソソーム受容細胞指向性』と『miRNA 制御能』を併せ持つ、世界初の分子である。

2. Asako Yamayoshi*, Maiko Higuchi, Yui Sakai, Akio Kobori, Tsuyoshi Yamamoto, Takayuki Shibata and Akira Murakami. Selective cross-linking behavior of oligodeoxyribonucleotides containing 2'-O-[N-(4,5,8-trimethylpsoralen-4'-ylmethylcarbamoyl)]adenosine to mutant H-ras DNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2020, 39, 119-130.

遺伝子の点変異が起因する難治性疾患が多数報告されているが、これらの治療薬開発において点変異遺伝子のみを分子標的とする薬品の分子モデリングは非常に困難である。本論文では、DNA に対する架橋選択性をより向上させるべく新たな光応答性核酸 (Ps-amd-Oligo) を開発し、悪性腫瘍において高頻度で検出される点変異 *H-ras* 遺伝子を標的として架橋効率ならびに DNA への架橋選択性を検証した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- [著書] 中分子医薬開発に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成・高機能化技術: siRNA、miRNA-mimic、anti-miR 核酸の設計指針、山吉麻子、シーエムシー出版、2018年2月28日
- [著書] 医薬品開発における中分子領域(核酸医薬・ペプチド医薬品)での開発戦略: 核酸医薬品の各作用機序と関連研究事例 miRNA 標的、山吉麻子、株式会社情報機構、2019年10月15日

- [著書] 核酸化学ハンドブック:miRNA (microRNA)、山本剛史・山吉麻子、講談社サイエンスフィック、2020年12月24日
- [Web掲載] 内閣府/総合科学技術のイノベーション会議と河合塾との企画により、河合塾の『みらいぶっく』に、さきがけ研究内容が掲載 (<https://www.miraibook-research.net/wakate/s2168/>)、2020年8月17日
- [プレスリリース(長崎大学)] エクソソーム含有 miRNA を標的とした抗体結合型核酸を開発 ～エクソソームと一緒に標的細胞内に取り込まれる核酸医薬の開発に期待～ (<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/science/science206.html>)、山吉麻子、2020年6月17日
(本研究成果が、令和2年度科研費・学術変革領域(A)「マテリアル・シンバイオシスのための生命物理化学」(領域代表:山吉麻子)の採択に繋がった)