

実施課題名：分子クラウド環境下における核酸の構造及び μ s-msダイナミクス解析を可能にするNMR法の開発

【背景】

哺乳類のX染色体不活化(XCI)による遺伝子量補償を担うlncRNA XistのAリピート領域は機能発現に重要である(Fig. 1)。細胞内は生体高分子が高濃度に存在する分子込み合い環境であり、核酸のダイナミクスは希薄溶液下と本質的に異なる。従来法は夾雑物に由来するシグナルや希薄溶液環境を前提とした解析理論の限界によりこの環境下での解析が困難であった。本課題ではSELOPE法と緩和分散(RD)・CEST法を組み合わせ、Xist AリピートRNAの μ s-msダイナミクス解析法を開発する。

【実施内容】

申請者はこれまでに、DNAの三重鎖構造をはじめとする非標準構造を形成する核酸分子の構造・ダイナミクスをin-cell NMR法や緩和分散法で解析した実績(Sakamoto *et al.*, *ChemComm* 2021; *FEBS J.* 2026)を有し、本課題ではこの技術基盤をRNA分子へと展開した。まずXist AリピートRNAのNMRシグナル帰属を進めるべく、理化学研究所の超高磁場NMR装置を計3回利用(900 MHz $\times$ 1回・600 MHz $\times$ 2回、延べ約236時間)し、帰属に必要な一通りのスペクトル(1D ^1H 、NOESY、 ^{15}N HSQC、 ^{13}C HSQC、TOCSY、COSY)の取得に成功した。これにより塩基対の形成および特定の二次構造の存在を示す証拠を得た。一方、1D ^1H のイミノプロトン領域および ^1H - ^1H TOCSYのピリミジン塩基H5-H6領域において一部のシグナルの広幅化が観察され(Fig. 2)、本RNAが複数のコンフォメーションを採りやすい多型性を示す可能性が示唆された。現在、帰属作業を継続中であり、緩和分散(RD)・CEST法によるダイナミクス解析に向けた測定条件の最適化も並行して進めている。

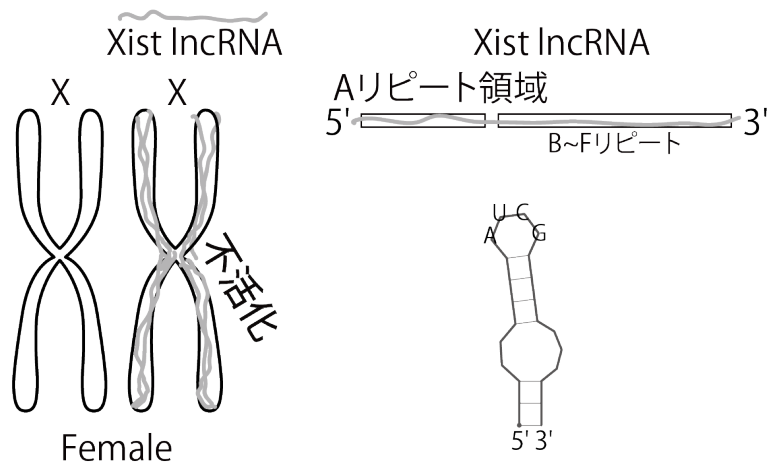
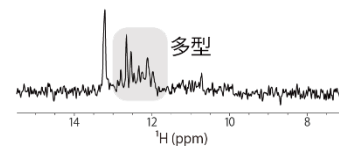
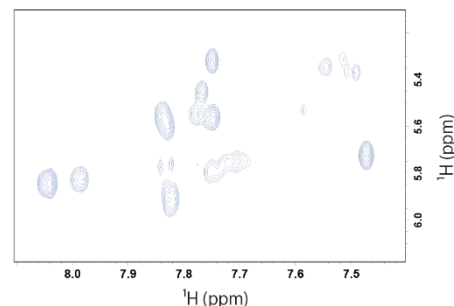


Fig. 1 (左)Xist lncRNAはX染色体に局在し、関連タンパク質群をリクルートすることでX染色体を不活化し、遺伝子量補償を担う。(右)本研究で使用したXist AリピートRNA断片の模式図。



複雑なシグナルパターンを示すイミノプロトン領域：多型の存在が示唆される。



一部シグナルの広幅化から、本RNAは単一の立体構造を採っていない、あるいは構造の一部が特定のコンフォメーションを形成していない可能性が考えられる。

Fig. 2 Xist AリピートRNAの1D ^1H NMRスペクトル(上)および ^1H - ^1H TOCSYスペクトル(下)

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF25-01-086		
利用課題名	分子クラウディング環境下における核酸の構造及び μ s-ms ダイナミクス解析を可能にする NMR 法の開発		
所属機関	東京薬科大学		
所属部署	薬学部		
役職・氏名	役職	助教	氏名 阪本知樹
利用実施時期、及び期間	2025 年 8 月 1 日～2026 年 3 月 31 日 総利用日数：約 10 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更		

1. 本課題の概要・目的

細胞内環境は約 15-40%もの高濃度の生体高分子やその他代謝物等の分子が存在する分子込み合い環境である。このような環境下における核酸分子の構造やダイナミクスは希薄溶液下とは本質的に異なることが指摘されている。これを NMR を用いて研究する上で、従来の手法では、夾雑物に由来するバックグラウンド信号や粘度の増大による感度の低下、希薄溶液環境を前提としたデータ解析の理論の限界により、分子込み合い環境における核酸分子の構造やダイナミクス、特にダイナミクスの解析には多くの困難がある。

本課題では、部位特異的な同位体標識法や選択励起法、J 結合定数の違いを利用してシグナルを単純化する手法（SElective Optimized Proton Experiment：SELOPE 法など）を、緩和分散（Relaxation Dispersion：RD）法および化学交換飽和移動（Chemical Exchange Saturation Transfer：CEST）法と組み合わせることで、 μ s-ms スケールの核酸ダイナミクスを分子込み合い条件下で高感度かつ定量的に測定可能な手法の開発を目的とする。解析対象として哺乳類雌の X 染色体不活化（X chromosome inactivation：XCI）による遺伝子量補償を担う lncRNA である Xist の A リピート領域に由来する RNA 断片（利用報告書_概要スライド Fig. 1 参照）を用い、XCI 機構における構造とダイナミクスの役割を明らかにするとともに、開発した解析理論とパルスシーケンスをオープンソースとして公開し、in-cell NMR や RNA 創薬研究への展開を見据えた技術基盤の構築を目指す。

2. 成果の概要

実施内容

申請者はこれまでに、DNA の三重鎖構造をはじめとする、二重鎖以外の核酸の非標準構造とそのダイナミクスを in-cell NMR 法や緩和分散法で解析した実績（Sakamoto *et al.*, *ChemComm* 2021; Sakamoto *et al.*, *FEBS J.* 2026）を有する。本課題では、この技術基盤を RNA 分子にも展開し、Xist A リピート RNA の細胞内環境、また再現された分子込み合い環境下での μ s-ms ダイナミクス解析法の開発を目指した。

ダイナミクス解析法の開発、in-cell NMR 測定および分子込み合い環境での測定に向けた準備段階として、まず Xist A リピート RNA の NMR シグナルの帰属を進めるべく、理化学研究所の超高磁場 NMR 装置を計 3 回利用し、帰属に必要な一通りのスペクトル（1D ^1H 、 ^1H - ^1H NOESY、 ^1H - ^{15}N HSQC、 ^1H - ^{13}C HSQC、 ^1H - ^1H TOCSY、 ^1H - ^1H COSY）の取得に成功した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

今回の利用期間において、Xist A リピート RNA 断片の塩基対形成を 1D ^1H NMR により確認し、特定の二次構造の形成を示す証拠を得た（利用報告書_概要スライド Fig. 2 参照）。1D ^1H NMR のイミノプロトン領域、および ^1H - ^1H TOCSY スペクトルのピリミジン塩基の H5-H6 の相関ピークが観測される領域において一部のシグナルの広幅化が観察されたことから、本 RNA が複数のコンフォメーションを採りやすい多型性を示す可能性が示唆された（利用報告書_概要スライド Fig. 2 参照）。これにより帰属作業がやや難航しているが、現在帰属を継続中であり、ダイナミクス解析に向けた測定条件の最適化も並行して進めている。

成果発表

【学会発表（計 9 件）】

高橋直史、武田光広、阪本知樹、青山洋史、三島正規 “光操作ツールの開発を志向した光センサータンパク質の解析” 超異分野学会 2025、2025 年 9 月 6 日

武田光広、石塚美葵、高橋直史、阪本知樹、青山洋史、宮ノ入洋平、甲斐荘正恒、三島正規，“重水素同位体シフトを利用した水との交換が速い脱プロトン化リシンの同定” 第 64 回 NMR 討論会 2025 年 11 月 26-28 日

Tomoki Sakamoto, Yudai Yamaoki, Takashi Nagata, Masato Katahira “DNA 三重鎖の塩基対開閉ダイナミクスに対する分子込み合い効果の研究” 第 15 回エネルギー理工学研究所国際シンポジウム, 2026 年 12 月 11

阪本 知樹、山置 佑大、永田 崇、片平 正人 “細胞内分子込み合い環境における三重鎖構造をはじめとする非標準構造を形成する核酸の構造とダイナミクスの in-cell NMR 法による解析” 日本薬学会第 146 年会, 2026 年 3 月 27-29 日

藤崎 紗羽、武田 光広、今野 翔、阪本 知樹、青山 洋史、田口 晃弘、谷口 敦彦、林 良雄、三島 正規 “ペプチド環化酵素 TycC のチオエステラーゼドメインの構造研究” 日本薬学会第 146 年会 2026 年 3 月 27-29 日

阿部 友哉、阪本 知樹、武田 光広、西 美沙紀、大洞 康嗣、三島 正規、青山 洋史 “Fura-2 フラグメントを活用した XO 阻害剤の開発研究” 日本薬学会第 146 年会 2026 年 3 月 27-29 日

小島 和也、武田 光広、阪本 知樹、青山 洋史、三島 正規 “デングウイルス由来プロテアーゼにおける低障壁水素結合観測の試み” 日本薬学会第 146 年会 2026 年 3 月 27-29 日

及川 宏貴、阪本 知樹、野村 夏鈴、武田 光広、青山 洋史、三島 正規 “遺伝子量補償に関わる Spen ファミリータンパク質の構造研究” 日本薬学会第 146 年会 2026 年 3 月 27-29 日

水野 湧太、阪本 知樹、今井 洸、武田 光広、青山 洋史、森田 鉄兵、三島 正規 “転写終結を制御する CspD タンパク質の構造研究” 日本薬学会第 146 年会 2026 年 3 月 27-29 日

【講演（計 2 件）】

阪本知樹 “NMR で捉える核酸分子の構造ダイナミクス” 生物物理学セミナー(エネルギー理工学研究所共催) , 2026 年 3 月 2 日

阪本知樹 “NMR 法で捉える生体高分子の構造ダイナミクス” 第 64 回 NMR 討論会 チュートリアルコース, 2025 年 11 月 25 日

今後の展開

今回得られた Xist A リピート RNA 断片の測定データをもとに帰属を完成させ、緩和分散 (RD) 法および CEST 法による μs - ms スケールの構造ダイナミクスの解析へと進める。複数の超高磁場装置を活用することで、より広いタイムスケールにわたるダイナミクスの網羅的かつ確実な解析が可能となり、Xist RNA の機能的なコンフォメーション変化の解明が期待される。また、分子込み合い環境を再現するクラウディング剤 (PEG 等) を添加した条件での測定プロトコルを確立し、細胞内環境に近い条件下でのダイナミクスの解析の実現を目指す。本課題で開発するパルスシーケンスや解析理論は、Xist RNA に留まらず、他の lncRNA やウイルス RNA など多様な機能性核酸への応用展開を予定している。さらに、Xist RNA とそのパートナータンパク質である SPEN 等との相互作用の解析へと展開させ、XCI 機構の分子論的な理解を深めるとともに、RNA 創薬を志向した研究へと繋げる。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本研究で開発する分子込み合い環境下における核酸分子の構造ダイナミクスの解析技術は、細胞内での機能性核酸の動的挙動を理解するための基盤技術となる。第一に、RNA 創薬への貢献が挙げられる。RNA の機能はその構造とダイナミクスに密接に関わっており、細胞内環境を模倣した条件下での解析は、RNA 分子を創薬標的とするための重要な情報となる。第二に、Xist RNA および XCI 機構の解明を通じて、エピゲノム関連疾患の理解への展開が考えられる。また、本課題で開発するパルスシーケンスおよびデータ解析のための一連のプログラムをオープンソースとして公開することで、国内外の NMR 研究者が広く利用できる情報基盤を構築し、関連する分野の研究の促進に貢献する。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

測定試料を装置にセットした後に遠隔で測定を行う利用形態が整っており、非常に助かりました。超高磁場装置群が良好な状態に保たれており、目的とする測定もスムーズに行え、難航することなく目的のスペクトルを得ることができました。施設スタッフの方々の対応も非常に丁寧で、測定条件の設定において適切なお助言をいただくことができました。今後も引き続き、プラットフォームを有効に活用したいと考えております。ありがとうございました。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

装置の空き状況や冷媒の充填日等が Web 上で確認できると、ものすごくありがたいと感じました。また、遠隔測定の制度は非常に便利で、今後も継続・拡充されることを望みます。どうぞよろしくお願いいたします。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (☐) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

特になし

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 900MHz

利用期間 1: 2025 年 8 月 18 日～8 月 22 日

溶液 600MHz

利用期間 2: 2025 年 9 月 8 日～9 月 10 日

利用期間 3: 2026 年 3 月 12 日～3 月 16 日

9. その他の利用施設

特になし