

研究課題別評価書

1. 研究課題名

パイ電子充填型人工核酸の創製と活用

2. 氏名

上野 義仁

3. 研究のねらい

パイ電子に富むベンゼン環の特性を活用した高機能化した RNA 検出分子および RNA 発現抑制分子の開発を目的とした。具体的には、ベンゼン-リン酸骨格から成る核酸アナログが、天然の核酸とは二重鎖構造を形成しないがアナログ同士では安定なハイブリッドを形成することに着目した、高機能化した RNA 検出用のモレキュラービーコン(MB)の開発を目的とした。このものを基盤上に固定化することで RNA 診断あるいは DNA 診断に応用可能なチップを作成することが可能となる。

また、ベンゼン-リン酸骨格から成る核酸アナログとタンパク質との疎水性相互作用に着目した、ベンゼン-リン酸骨格をダングリングエンドに導入した新規 siRNA (small interfering RNA) の開発を目指した。ベンゼン-リン酸骨格をダングリングエンド部位に導入することにより、これまでのダングリングエンド部位における制約を回避した、将来的に、核酸医薬への応用も可能な高機能化した siRNA の創製が可能となる。

4. 研究成果

筆者は、本研究を開始するに当たり、DNA の構成単位であるヌクレオシドの糖部を、糖とは全く異なるベンゼン環で置換した核酸塩基-ベンゼンから成るヌクレオシドアナログを基本単位としたベンゼン-リン酸骨格から成る核酸アナログの開発に成功していた(図1)。本ヌクレオシドアナログは、ベンゼン環と塩基部位が直接結合していることから両者の間に二面角を持つ。オリゴマー中においても、ベンゼン-リン酸骨格に対して各塩基が角度を持って配向し、相補鎖中の各塩基と効果的に水素結合していると推察される。実際に、ベンゼン-リン酸骨格から成る本核酸アナログは、天然の核酸とは二重鎖を形成しないが、アナログ同士で熱的、熱力学的に安定なハイブリッドを形成することが明らかとなっている。

一方、モレキュラービーコン(MB)はステム&ループ構造から成るヘアピン型核酸で、この状態では蛍光剤から発せられた蛍光は消光剤によって消光されている。しかし、ループ部位に相補な核酸が存在すると二重鎖を形成しステム部位が解離するため、消光剤が蛍光剤から離れ蛍光が観察される。

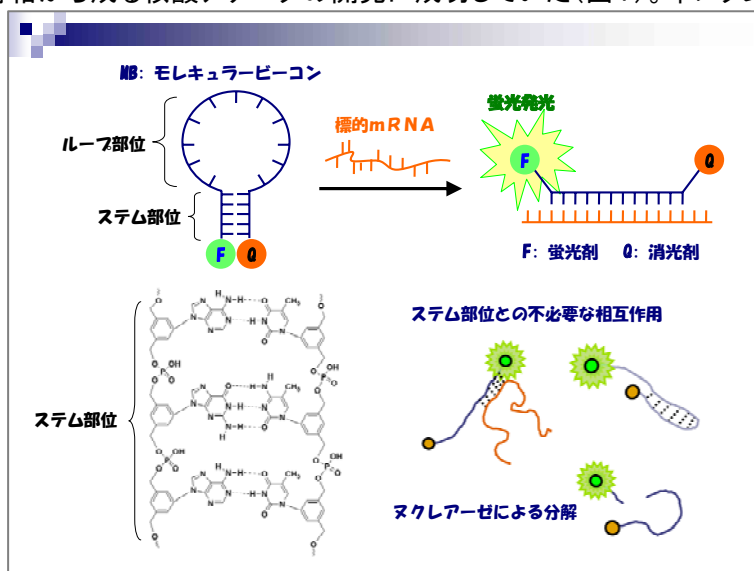


図1 ベンゼン-リン酸骨格から成る核酸アナログの構造とステム部位にアナログを導入したモレキュラービーコン (MB) による標的 mRNA の検出。

一方、モレキュラービーコン(MB)はステム&ループ構造から成るヘアピン型核酸で、この状態では蛍光剤から発せられた蛍光は消光剤によって消光されている。しかし、ループ部位に相補な核酸が存在すると二重鎖を形成しステム部位が解離するため、消光剤が蛍光剤から離れ蛍光が観察される。

る。これにより、標的 DNA および RNA を検出することが可能となる。MB を RNA 検出に利用する際の問題点として、MB 自身が細胞内に存在するヌクレアーゼにより分解され、RNA 非存在下においても蛍光を発しバックグラウンドが上昇してしまうこと、また、ステム部位とループ部位あるいは標的以外の RNA との不必要な相互作用により蛍光強度が変化してしまうこと等が挙げられる。

本研究では、これらの問題点を解決すべく、ベンゼン-リン酸骨格から成る核酸アナログをステム部位に導入したMBを設計・合成し、その性質について検証した(図1)。ベンゼン-リン酸骨格から成る核酸アナログは、天然の核酸とは二重鎖を形成しないがアナログ同士では安定なハイブリッドを形成することから、本アナログをステム部位に導入することで上述した問題点を解決できると考えた。その結果、アナログをステム部位に導入することにより、ヌクレアーゼに対する抵抗性が向上すること、また、ステム部位の不必要な相互作用により蛍光強度が変化すると言った問題点を改善できることが明らかとなった。

続いて、ベンゼン環に各種芳香環を結合させたビアリール型ユニットをリン酸ジエステル結合で連結させた蛍光性色素集積体の合成並びにビアリール型ユニットをステム部位に導入したMBの合成と、そのRNA検出能について検討した(図2)。各ビアリール型ユニットは、ベンゼン環と芳香環との間に二面角を持つことから、これらをリン酸ジエステル結合で連結することにより各種芳香環をベンゼン-リン酸骨格に沿って水平に集積することが可能となる。

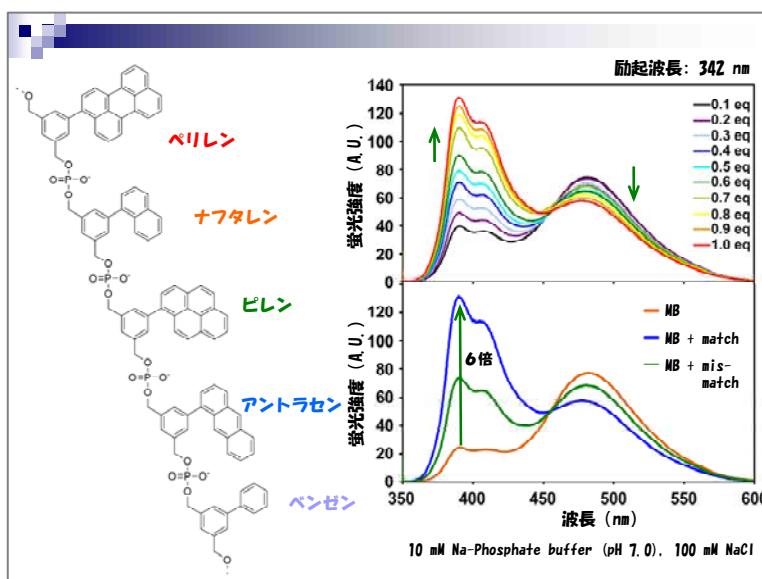


図2 ビアリール型ユニットをリン酸ジエステル結合で連結した蛍光色素集積体の構造とステム部位にビアリール型ユニットを導入したモレキュラービーコン(MB)による標的 mRNA の検出。

合成した蛍光性色素集積体の蛍光特性を検証した。その結果、ビアリール型ユニットの種類、数、配列を変えることにより、単一の励起波長で 380~650nm 間の様々な波長の蛍光を生じさせることが可能であることが分った。また、ビアリール型ユニットを導入した DNA 二重鎖の性質を検証した。その結果、ビアリール型ユニットを導入することにより二重鎖の熱的、熱力学的安定性が向上すること、また、その安定化は芳香環の疎水性相互作用によるものであることが明らかとなった。ピレンを導入したビアリール型ユニットを DNA の中央に集積させることにより、エキシマー発光が観察され、その強度はユニットの数に伴い増大した。

続いて、ビアリール型ユニットの本特性を MB に応用した。即ち、ピレン型ビアリール型ユニットをステム部位に導入することで、モノマーおよびエキシマー発光により一塩基多型を検出可能なエンドフリーの MB を創製出来ると考えた(図2)。薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子を標的とした。その結果、ピレン型ビアリール型ユニットを MB のステム部位に導入することで、モノマーおよびエキシマー発光により CYP2C9 中の一塩基多型を検出することが可能であることが分った。本MBはエンドフリーのため、末端の水酸基を介してMBをさらに修飾することが可能であり、今後、様々な応用が可能になる。

RNA 特異的な核酸アナログを開発する過程で図3に示す糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを合成した。本アナログは、400nm を中心に強い蛍光を持ち、メタノール中での蛍光量子収率は0.83であった。また、その蛍光強度は溶媒の極性に依存し、極性溶媒中では強く

非極性溶媒中では低下した。本アナログを用いた一塩基多型の検出について検討した。即ち、本アナログをバルジ型に鎖の中央に導入した DNA プローブを設計・合成した。アナログに隣接する塩基が相補塩基と塩基対を形成する場合には、自由度の高い糖部開環型の三環性アナログは二重鎖外にフリップアウトし、水中に露出するため蛍光を発する。一方、隣接する塩基が、標的塩基とミスマッチの場合には、よりインターカレートし易い三環性アナログが二重鎖内に入り込み疎水性条件下に置かれるため蛍光が消光する。これにより一塩基多型を検出可能と考えた。薬剤耐性に関与する MDR1 の遺伝子を標的とした。標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。

このことから本三環性アナログを用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能であることが明らかとなった。また同時に、隣接塩基と標的塩基が T(U):G ペアの場合においても蛍光強度が増大した。これは、T(U)、G 塩基間における wobble 型の塩基対形成に起因するものである。これに関しては、今後解決法を検討して行く予定である。

siRNA (small interfering RNA) は、疾患に関与する遺伝子の塩基配列が明らかであれば、siRNA を論理的に設計・合成できることから、核酸医薬としての期待が高い。X線結晶構造解析の結果より、siRNA の 3' -末端ダングリングエンド二塩基は、Ago タンパク質中の Pazドメインに存在する疎水性ポケットに入り込み認識されていることが明らかになっている。

siRNA のヌクレアーゼ耐性の向上および RNAi 誘導活性の増強を目的とし、ダングリングエンド部に各種ビアリール型ユニットを導入した siRNA を設計・合成し、そのタンパク質発現抑制活性について検証した。その

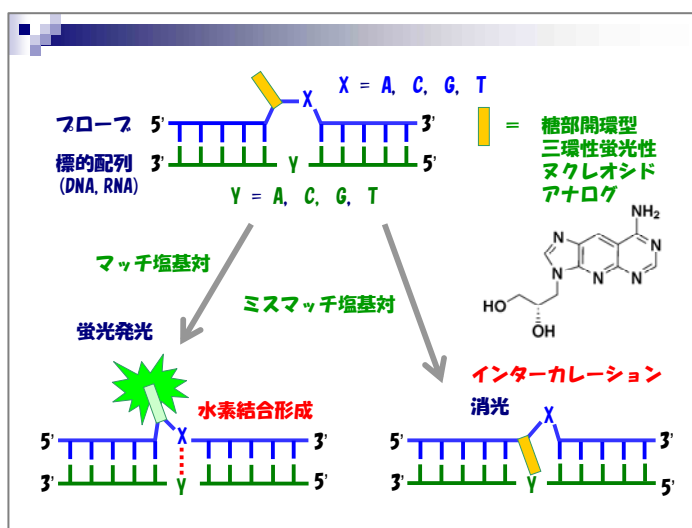


図3 糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを導入した蛍光性核酸プローブによる一塩基多型の検出。

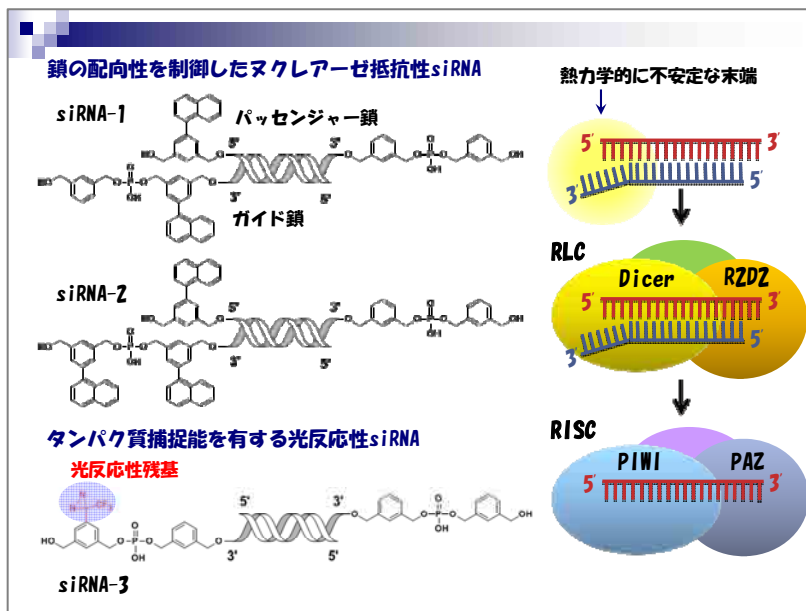


図4 ビアリール型ユニットを導入することにより鎖の配向性を制御したヌクレアーゼ抵抗性 siRNA 並びに光反応性残基を導入したタンパク質捕捉能を有する siRNA の構造。

結果、ベンゼンおよびナフタレン型ビアリールを導入した siRNA の活性はチミジンを導入したものと同様かそれ以上であったのに対し、フェナントレン、ピレン型ビアリールを導入した siRNA では活性が大幅に減弱した。このことから Paz ドメインの疎水性ポケットにはナフタレン型ビアリール程度までの大きさが許容されることが明らかとなった。

これらの結果を基に、センス鎖の 5' -末端ならびにアンチセンス鎖の 3' -末端にナフタレン型ビアリールを導入した siRNA を設計・合成した(図4)。両鎖にこれらのユニットを導入することにより、導入した末端部位の二重鎖の熱力学的安定性が上昇しアンチセンス鎖の選択性が向上すること、さらにセンス鎖の 5' -末端にビアリール型ユニットを導入することでセンス鎖の 5' -末端リン酸化が抑制され、センス鎖によるオフターゲット効果が抑制されると考えた。センス鎖の 5' -末端領域に U:A 塩基対が多く存在する配列を用いて活性を検証した。その結果、未修飾の siRNA では活性が全く見られないのに対し、修飾 siRNA では 30nM においてタンパク質の発現を効果的に抑制した。本修飾 siRNA は、0.1nM の濃度で in vitro において C 型肝炎ウイルス(HCV)の複製を効果的に抑制した。また、3' -末端ダンダリングエンドのベンゼン-リン酸骨格部位に光反応性残基を導入した siRNA を設計・合成し(図4)、その機能について検証した。その結果、本修飾 siRNA は、RNA 干渉に関与するタンパク質を解析する上で有用なプローブであることを明らかにした。

5. 自己評価

二分子の芳香族化合物を直接結合させることにより生じる二面角を利用した新しいヌクレオシドユニットとして、ベンゼン環に直接核酸塩基及び各種芳香族化合物を結合させたビアリール型のヌクレオシドアナログを設計・合成し、このものをモレキュラービーコン及び siRNA に導入することにより、設計したビアリール型ユニットの有用性、即ち、本ユニットを導入することによりそれぞれの分子を高機能化することが可能であることを示すことに成功した。また、糖部開環型の新規三環性ヌクレオシドアナログを含む蛍光性核酸プローブ、及び光反応性残基を導入したクロスリンク能を有する siRNA を設計・合成し、in vitro の系において、それぞれの分子の有用性を示すことに成功した。

一方で、当初計画していた合成したモレキュラービーコン、核酸プローブのマイクロアレイへの応用、及び siRNA の in vivo への応用研究は不十分なものであった。これらに関しては、今後引き続きチャレンジして行きたいと考えている。また、研究期間中の研究成果の論文文化に関するアクティビティーが必ずしも十分なものではなかった。得られた成果は今後出来るだけ早く論文文化して行きたい。

6. 研究総括の見解

ベンゼン環の特性を活用し、高機能化した人工 RNA 分子の開発を目指した研究を展開した。まず、ヌクレオシドの糖部をベンゼン環で置換したヌクレオシドアナログ(ベンゼン-リン酸骨格からなる)をシュテム部分に持つモレキュラービーコンを作製した。この RNA は、ヌクレアーゼに対する抵抗性が向上し、シュテム部分は核酸と二本鎖を形成しないため、蛍光強度が変化するという問題点を改善することが出来た。また、siRNA の末端の鎖の配向性を制御することによりヌクレアーゼ抵抗性とし、Ago タンパク質に取り込ませた。この修飾 siRNA は 0.1nM の濃度で in vitro において C 型肝炎ウイルスの複製を阻害した。このように、パイ電子に富むベンゼン環を活用した人工 RNA の開発を行い有効に働く可能性を示した功績は高く評価している。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表 *Corresponding author

1. **Yoshihito Ueno***, Koshi Kawada, Tomoharu Naito, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Hye-Sook Kim, Yusuke Wataya, Yukio Kitade, "Synthesis and silencing properties of siRNA possessing lipophilic groups at their 3' -termini", Bioorg. Med. Chem., 16, 7698-7704

(2008).

2. **Yoshihito Ueno***, Miki Hirai, Kayo Yoshikawa, Yoshiaki Kitamura, Yoko Hirata, Kazutoshi Kiuchi, Yukio Kitade, “ Synthesis and properties of siRNA containing 5′ -amino-2′ ,5′ -dideoxy-2′ α -fluororibonucleosides ” , Tetrahedron, 64, 11328-11334 (2008).
3. **Yoshihito Ueno***, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade, “Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs”, Bioorg. Med. Chem., 17, 1974-1981 (2009).
4. **Yoshihito Ueno***, Akihiro Kawamura, Keiji Takasu, Shinji Komatsuzaki, Takumi Kato, Satoru Kuboe, Yoshiaki Kitamura, and Yukio Kitade, “Synthesis and properties of a novel molecular beacon containing a benzene-phosphate backbone at its stem moiety”, Org. Biomol. Chem., 7, 2761-2769 (2009).
5. **Yoshihito Ueno***, Shinji Komatsuzaki, Keiji Takasu, Satoru Kawai, Yoshiaki Kitamura, and Yukio Kitade, “Synthesis and properties of oligonucleotides containing novel fluorescent biaryl units”, Eur. J. Org. Chem., 28, 4763-4769 (2009).

(2) 特許

研究期間累積件数: 2件

発 明 者: 上野義仁、北出幸夫

発明の名称: RNA 選択的ハイブリダイズ試薬及びその利用

出 願 人: 独立行政法人科学技術振興機構

出 願 日: 平成 20 年 3 月 11 日

出願番号: PCT/JP2009/054675

発 明 者: 上野義仁、北出幸夫

発明の名称: オリゴヌクレオチド誘導体、ラベル化剤及びその利用

出 願 人: 独立行政法人科学技術振興機構

出 願 日: 平成 20 年 11 月 14 日

出願番号: PCT/JP2009/068785

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文

1. Tadamiki Tsuruta, Kentaro Oh-hashii, **Yoshihito Ueno**, Yukio Kitade, Kazutoshi Kiuchi, Yoko Hirata*, “RNAi knockdown of caspase-activated DNase inhibits rotenone-induce DNA fragmentation in HeLa cells”, Neurochemistry International, 50, 601-606 (2007).
2. **Yoshihito Ueno***, Takumi Inoue, Mahito Yoshida, Kayo Yoshikawa, Aya Shibata, Yoshiaki Kitamura, Yukio Kitade, “ Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing benzene-phosphate backbones in their 3′ -overhang regions”, Bioorg. Med. Chem. Lett., 18, 5194-5196 (2008).
3. **Yoshihito Ueno***, Kayo Yoshikawa, Yoshiaki Kitamura, Yukio Kitade, “ Effect of incorporation of alkyl linkers into siRNAs on RNA interference”, Bioorg. Med. Chem. Lett., 19, 875-877 (2009).