

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21091

研究課題名(和文)mRNAの化学合成を可能にするRNAライゲーション反応の開発

研究課題名(英文)Development of Chemical Ligation Reaction of RNA for Chemical Synthesis of mRNA

研究代表者

木村 康明(Kimura, Yasuaki)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：80769977

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究ではmRNAなどに代表される長鎖オリゴ核酸の合成を可能にする核酸のケミカルライゲーション(化学的連結)反応の開発を行った。核酸医薬に用いるオリゴ核酸合成には高い分子均一性や非天然構造に対する許容性が求められるため化学合成が最適であるが、現状の固相合成法では合成可能な長さに限がある。そのため固相合成したオリゴ核酸のフラグメント同士を化学反応で連結する手法が必要である。本研究では天然核酸に類似した連結構造を持つライゲーション体を与える核酸のケミカルライゲーション法の開発を行った。

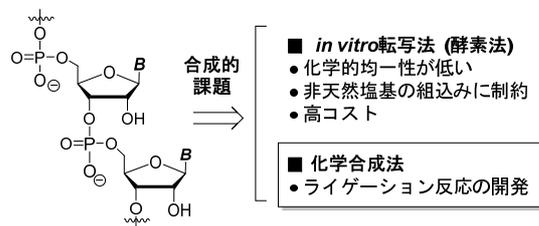
研究成果の概要(英文):We developed chemical ligation reaction for oligonucleotides (ONs) that enables the synthesis of long ONs such as mRNA etc. In the ON synthesis for ON medicines, chemical synthesis is optimal because high molecular homogeneity and tolerance for unnatural structure are required, but the current solid phase synthesis has an upper limit on the length of the products. Therefore, it is necessary to couple the fragments obtained by the solid phase synthesis by chemical reaction. We developed new chemical ligation reactions for ONs, which afford ligated strands having a linkage structure similar to that of natural ONs.

研究分野：核酸化学

キーワード：RNA DNA ケミカルライゲーション 核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

近年 mRNA などに代表される長鎖オリゴ核酸の化学合成法の開発が求められている。特に核酸医薬などの目的に用いられるオリゴ核酸に求められる高い化学的均一性を満たし、更に安定性や機能の向上のために非天然核酸を自在に組み込める合成手法へのニーズは大きい。長鎖 RNA の合成法としては RNA polymerase を用いた *in vitro* 転写法が存在するが、上記の要請を満たしていない。すなわちこの方法では、酵素の転写忠実性が不完全であるために合成物の化学的均一性に問題があり、更に非天然型ヌクレオチドの組み込みに大きな制約がある。これらの問題点を解決する手法として、長鎖 RNA の化学的合成法の開発が求められている (図 1)。



長鎖RNA RNA医薬品やプローブ分子として重要

図 1 長鎖 RNA 合成における課題

RNA の化学合成では、ホスホロアミダイト法を用いた固相合成が一般的であるが、現状において 80 塩基程度の鎖長伸長が限界である。固相合成で作られた RNA フラグメント同士をライゲーションする反応が可能となれば、化学合成による長鎖 RNA 合成への道が開ける。

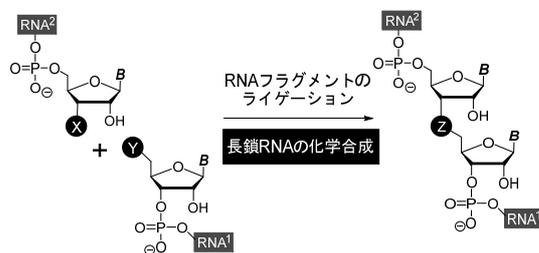


図 2 研究の目的:

RNA フラグメントのライゲーション反応の開発

このような需要が存在するものの、RNA フラグメントのライゲーション法の開発は進んでいない。数少ない前例の一つに、末端にアルキンとアジドを持つオリゴ核酸同士をクリック反応で連結する手法が存在する。しかし反応で形成されるトリアゾール骨格が、天然のリン酸エステルと大きく異なるため、酵素による翻訳に問題が生じる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、翻訳可能な構造を与える RNA のライゲーション法の開発を目指した。翻訳可能性を担保するために、ケミカルライゲーションで生じる連結構造が、天然のホスホジエステル構造に近いケミカルライゲーション反応の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

上記のような制約を踏まえて、次のようなケミカルライゲーション反応を設計した。5'末端あるいは 3'末端にホスホロチオエート基を持つオリゴ核酸を求電子剤で処理しホスホロチオエステル基を形成させる。これに対し 3'あるいは 5'末端にアミノ基やチオール基を持つオリゴ核酸を求核攻撃させ、ホスホロアミデート結合やホスホロチオレート結合で連結したオリゴ核酸を与える。ここで生じる連結構造は天然のホスホジエステル結合の酸素原子 1 つを窒素原子あるいは硫黄原子に置き換えたもので、構造は極めて類似しており生成物の生理活性が担保される。

## 4. 研究成果

### (1) アミノ基末端を利用した連結反応

アミノ基末端を有する基質の場合、以前の検討からホスホロチオエート基の活性化剤として DNFB (2,4-ジニトロフルオロベンゼン) が最適な求電子剤であることを見出していた (図 3)。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

### 1. Hiroshi Abe, Yasuaki Kimura

“Chemical Ligation Reactions of Oligonucleotides for Biological and Medicinal Applications”  
*Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2018**, *66*, 117. 査読有

### 2. Hideto Maruyama, Ryota Oikawa, Mayu Hayakawa, Shono Takamori, Yasuaki Kimura, Naoko Abe, Genichiro Tsuji, Akira Matsuda, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe

“Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester”  
*Nucleic Acids Research*, **2017**, *45*, 7042. 査読有

[学会発表](計14件)

1. 木村康明, 丸山豪斗, 笈川涼太, 早川真由, 吉永静也, 辻巖一郎, 阿部奈保子, 木村康明, 周東智, 松田彰, 南川典昭, 阿部洋 ”高分子核酸医薬の低分子化戦略:細胞内ビルドアップ法の開発” 日本薬学会第138年会, 金沢, 石川県立音楽堂, 2018年03月25日~2017年03月28日

2. Yasuaki Kimura, Hideto Maruyama, Ryota Oikawa, Mayu Hayakawa, Naoko Abe, Genichiro Tsuji, Akira Matsuda, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe “Chemical ligation reaction for oligonucleotides based on electrophilic phosphorothioester” 255th ACS National Meeting, New Orleans, 2018年03月18日~2017年03月22日

3. Yasuaki Kimura, Hideto Maruyama, Ryota Oikawa, Genichiro Tsuji, Shizuya Yoshinaga, Naoko Abe, Satoshi Shuto, Akira Matsuda, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe “RNA Interference by

Intracellular Buildup of siRNA” The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 東京理科大学葛飾キャンパス, 岐阜大学, 2017年11月14日~2017年11月16日

4. 笈川涼太, 早川真由, 丸山豪斗, 阿部奈保子, 友池史明, 木村康明, 周東智, 松田彰, 南川典昭, 阿部洋 “機能性核酸合成を志向した化学的核酸連結反応” 第48回中化連秋季大会, 岐阜大学, 2017年11月11日~2017年11月12日

5. 吉永静也, 阿部奈保子, 木村康明, 友池史明, 阿部洋 “環境応答性環状オリゴ核酸による遺伝子発現制御” 第48回中化連秋季大会, 岐阜大学, 2017年11月11日~2017年11月12日

6. 木村康明, 丸山豪斗, 笈川涼太, 早川真由, 吉永静也, 辻巖一郎, 阿部奈保子, 木村康明, 周東智, 松田彰, 南川典昭, 阿部洋 高分子核酸医薬の低分子戦略:細胞内ビルドアップ法の開発 第35回メディシナルケミストリーシンポジウム, 名古屋大学, 2017年10月25日~2017年10月27日

7. 木村康明, 丸山豪斗, 笈川涼太, 早川真由, 吉永静也, 辻巖一郎, 阿部奈保子, 木村康明, 周東智, 松田彰, 南川典昭, 阿部洋 ”高分子核酸医薬の低分子戦略:細胞内ビルドアップ法の開発” 第11回バイオ関連化学シンポジウム, 東京大学弥生キャンパス, 2017年09月07日~2017年09月09日

8. 笈川涼太, 早川真由, 丸山豪斗, 阿部奈保子, 木村康明, 周東智, 松田彰, 南川典昭, 阿部洋 “機能性核酸合成を志向した化学的核酸連結反応” 日本核酸医薬学会第3回年会, 札幌コンベンションセンター, 2017年07月12日~2017年07月14日

9. 木村康明, 丸山豪斗, 笈川涼太, 早川真由, 吉永静也, 辻巖一郎, 阿部奈保子, 周東智, 松田彰, 南川典昭, 阿部洋 “高分子核酸医薬の低分子戦略:細胞内ビルドアップ法の開発” 日本核酸医薬学会第3回年会, 札幌コンベンションセンター, 2017年07月12日~2017年07月14日

10. 木村康明, 丸山豪斗, 笈川涼太, 早川真由, 吉永静也, 辻巖一郎, 阿部奈保子, 木村康明, 周東智, 松田彰, 南川典昭, 阿部洋 “高分子核酸医薬の低分子戦略:細胞内ビルドアップ法の開発” 日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会, 北海道大学, 2017年06月07日~2017年06月09日

11. 木村康明, 丸山豪斗, 笈川涼太, 早川真由, 阿部奈保子, 松田彰, 周東智, 伊藤嘉浩, 阿部洋 ”求電子的ホスホロチオエステルによる核酸の化学的連結反応” 日本化学会第97春季年会, 2017年03月16日~2017年03月19日, 慶応大学日吉キャンパス

12. Ryota Oikawa, Hideto Maruyama, Mayu Hayakawa, Naoko Abe, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe “Development of novel chemical ligation reaction for RNA strands” The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 熊本大学, 2016年09月27日~2016年09月29日

13. 木村康明, 丸山豪斗, 笈川涼太, 早川真由, 阿部奈保子, 松田彰, 周東智, 伊藤嘉浩, 阿部洋 ”Chemical ligation of oligonucleotides using electrophilic phosphorothioester” 第10回バイオ関連化学シンポジウム 金沢石川県立音楽堂, 2016年09月07日~2016年09月09日

14. Yasuaki Kimura, Ryota Oikawa, Hideto Maruyama, Mayu Hayakawa, Naoko Abe, Hiroshi Abe “Chemical Ligation Reaction for RNA Strand” RNA 2016, 京都国際会議場, 2016年6月28日-2016年7月2日

〔図書〕(計2件)

1. 木村康明, 阿部洋  
機能性核酸合成を指向した化学的核酸連結反応

「中分子医薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術」  
シーエムシー出版, p. 171-180 (2018)

2. 阿部洋, 木村康明

「RNA 干渉医薬の実現に向けた新手法の開発」

Biophilia, Vol. 6, No. 1, p.9-15 (2017)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://biochemistry.chem.nagoya-u.ac.jp/publications/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 康明 (Yasuaki Kimura)

名古屋大学大学院・理学研究科物質理学専攻(化学系)・助教

研究者番号: 80769977