

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350086

研究課題名（和文） ゲノム標的化学を指向した機能性分子の創製

研究課題名（英文） Development of the Functional Molecules for Genome Targeting Chemistry

研究代表者

永次 史 (NAGATSUGI FUMI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90208025

研究成果の概要（和文）：

ヒトゲノム情報の解析が終了し、ゲノムの大部分は蛋白に翻訳されずに機能すると考えられてきており、従来、「生命の設計図」であり情報の担い手であると考えられていたDNAやRNAに様々な機能があることが次々と明らかになってきている。本申請研究では、ゲノムの分子レベルからナノレベルの構造変化を厳密に識別できる高機能性分子を開発し、生命科学研究の新たな方法論に展開することを目指した。その結果、標的RNAの機能を制御できる人工分子の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

After the human genome project, it is revealed that most of genome has functions without translation to protein. Especially, RNA has a variety of the functions to control the gene expression, for example, rebozyme, riboswich, siRNA and miRNA, so on. In this study, we have developed the novel molecules to recognize strictly the target RNA for regulation of these functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸・蛋白質・糖化学、クロスリンク反応

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム情報の解析が終了し、ヒトゲノムサイズが31億塩基対であるにもかかわらず、蛋白質へと翻訳される遺伝子の数はわずか2万個から3万個であることがわかってきた。つまりゲノムの大部分は蛋白質に翻訳されずに機能すると考えられてきており、従来、「生命の設計図」であり情報の担い手であると考えられていたDNAやRNAに様々な機能があることが次々と明らかになってきている。特に注目されているのはRNAの機能である。RNAは従来遺伝情報の仲介役であると考えられてきた。しかし、近年の研究により、蛋白質に翻訳されない、いわゆる non coding RNA (ncRNA)が遺伝子発現の制御において非常に重要な働きをもつことが明らかになってきている。特に20塩基程度の長さを持つ内在性低分子RNAであるmiRNAは、癌の発症や脂質代謝、ウィルスの複製などにかかわることが明らかにされ、種々の疾患の標的分子として注目を集めている[1]。また2本鎖DNAは片方の鎖のみがmRNAに転写されると考えられていたが、センス遺伝子(蛋白質に翻訳される側)をコードする逆のDNA鎖からもRNAが転写され、内在性アンチセンスRNAとして遺伝子発現制御に働くことが次々とわかってきている[2]。さらに2本鎖DNAはその高次構造が遺伝子発現の制御に重要な働きを持つことも明らかになってきている。[3]このようにDNAやRNAは従来考えられてきたような蛋白質に翻訳されるテンプレートとしての働きだけではなく、遺伝子発現を調節する重要な担い手であることから、生命科学研究における新たな標的として期待される。

2. 研究の目的

本申請研究では、ゲノムの分子レベルからナノレベルの構造変化を厳密に識別できる高機能性分子を開発し、生命科学研究の新たな方法論に展開することを目指した。具体的には、ゲノム標的化学の新たな標的に作用する革新的な遺伝子制御法への展開を目指し、機能性RNAを効率的に阻害する遺伝子応答型アルキル化機能性核酸の開発を目指した。

3. 研究の方法

ゲノムの機能を阻害する方法論としては標的遺伝子に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを用いる方法が古くから知られている。しかし天然型の核酸では細胞内における安定性また細胞内への透過性が低いことから、これを解決する手段として多数の人工核酸が開発されており、標的遺伝子に対する阻害の効率化が報告されている。本申請者は遺伝子応答型アルキル化機能性核酸を創製し1塩基の違いをも識別し標的遺伝子中のシトシンに反応することで、細胞内における蛋白質発現を効率的に阻害することに成功した。本研究では我々が開発した遺伝子応答型アルキル化機能性核酸をより広範なゲノム標的の化学に展開するために下記の3つの課題について検討した。

- (1) RNA型アルキル化機能性核酸
- (2) ペプチド核酸型アルキル化機能性核酸
- (3) 第2世代遺伝子応答型アルキル化機能性核酸

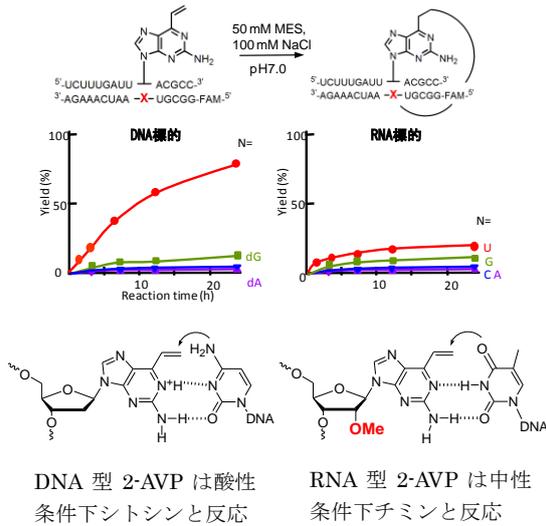
以下、それぞれについてその研究成果を述べる。

4. 研究成果

(1) RNA型アルキル化機能性核酸

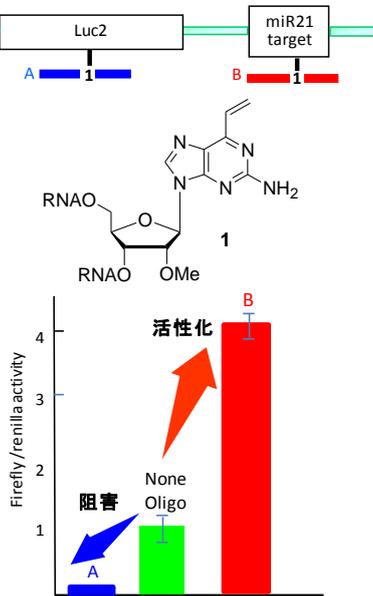
従来の機能性核酸である2-amino-6-vinylpurine (2-AVP) はデオキシリボ型でありRNAに対する反応性が低いことがわかっている。そこでこの項目ではRNA型の遺伝子応答型アルキル化機能性核酸を合成し、RNAに対する反応性の向上を目指した。細胞内に適用するために2'-OMeRNA型のアルキル化機能性核酸を合成した。この分子を組み込んだ2'-OMeRNAオリゴを合成し、その反応性を評価したところ、非常に興味深いことに、DNAのチミンに対して中性条件下において反応することがわかった。デオキシ型2-AVPでは酸性条件下においてのみシトシンに対して反応しており、糖部構造を変えることで塩基選択性が劇的に変化したことは非常に興味深い。

図1 2'-OMe RNA 型 2-AVP のクロスリンク反応性



RNA 標的に関しては酸性条件下ではウラシルに反応したものの中性条件下での反応性はそれほど高くはなかった。そこで、前後の塩基配列を検討したところ、3' GXC5' (X:2-AVP) の配列では中性条件下でも RNA 中のウリジンに対して効率的に反応することがわかった。

図2 2'-OMe 型 2-AVP 核酸を用いた機能評価



さらにルシフェラーゼを発現する翻訳領域及び miRNA-21 (miR21) の標的となる UTR を持つ mRNA を調製し、1 を含む 2'-OMeRNA オリゴ RNA を反応させた後、miR21 を発現している細胞内に投与した。その結果、翻訳領域に架橋を形成させた mRNA (A) では非常に効率

よくルシフェラーゼの発現が阻害された。さらに UTR に架橋を形成させた mRNA (B) では、miR21 の UTR への結合が阻害され、タンパク質発現が活性化されることがわかった。このように 2'-OMe RNA 型 2-AVP を組み込んだオリゴ 2'-OMe RNA は RNA の標的の場所を選ぶことで、蛋白質発現の阻害及び活性化を自在に調節できることがわかった。

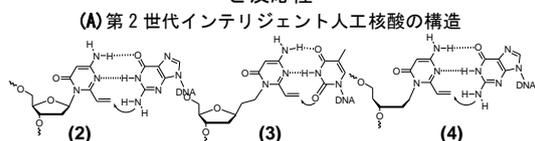
(2) ペプチド核酸型アルキル化機能性核酸
本項目では 2 本鎖 DNA にインバージョンする性質を持つ PNA に 2-AVP を導入することで、2 本鎖 DNA に対するアルキル化反応を誘導する方法論の開発を目指した。まず 2-AVP を導入した PNA を合成し、その反応性を検討した。その結果、DNA オリゴヌクレオチドに組み込んだ場合に比較し反応性は非常に低いことがわかった。その原因として、PNA と標的 DNA との複合体の構造が DNA-DNA との構造とは異なるため、標的塩基に対して、反応点が近接していない可能性が考えられる。

(3) 第 2 世代遺伝子応答型アルキル化機能性核酸

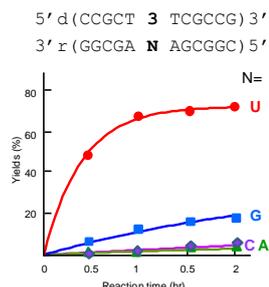
機能性核酸の標的塩基を拡大するために、新規機能性核酸として 4-amino-6-oxo-2-vinyl pyrimidine (VAOP) を設計した。最初に設計した VAOP 誘導体(2) は、種々検討したが合成することはできなかった。そこで、この塩基と糖部をエチルスパーサーで連結した機能性核酸(3) を合成し、その反応性を調べたところ、標的 RNA の相補的位置にあるウラシルと非常に効率的にクロスリンク反応することがわかった。これらの付加体の構造を検討した結果、VAOP はウラシルに対して 2 つの水素結合を形成し、反応点であるビニル基とカルボニル基を接近させることで反応が速やかに進行したことが示された。さらに、VAOP をフレキシブルなリンカーで結合したインテリジェント核酸(4) は RNA 中の相補的な位置のグアニンに対して反応すること、さ

らにこの反応は Zn, Ni の添加により加速されることもわかった。この結果は、これらの金属の添加によりグアニンの2位のアミノ基の反応性が向上し、VAOP に対する反応が加速されたためと考えている。

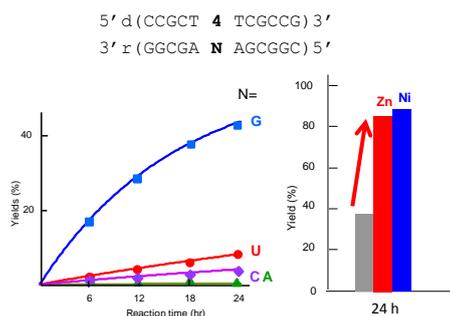
図3 第2世代インテリジェント人工核酸の構造と反応性



(B) 3を組み込んだオリゴ DNA を用いた架橋反応性



(C) 4を組み込んだオリゴ DNA を用いた架橋反応性と金属イオン添加による効果



以上、本研究では 2'-OMe 型 2-AVP を合成しモデル細胞系において遺伝子発現の阻害及び活性化を達成した。さらに、新規機能性核酸としてピリミジン誘導体(3, 4)の開発にも成功した。本研究期間中に試験管内で標的 RNA に対して非常に高い選択性でウラシル及びグアニンに対し架橋を形成する機能性核酸の開発に成功した。本成果は今後革新的な遺伝子制御法への展開に繋がるものと考えている。

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 10 件)

1. Hagihara, S., Kusano, S., Lin, W.C., Chao, X.G., Hori, T., Imoto, S., Nagatsugi, F., Production of truncated protein by the crosslink formation of mRNA with 2'-OMe oligoribonucleotide containing 2-amino-6-vinylpurine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press 査読有
2. F.Nagatsugi, and S. Imoto Induced cross-linking reactions to target genes using modified oligonucleotides, *Organic & Biomolecular Chemistry* **9**, 2579-2585(2011). 査読有
3. F.Nagatsugi, Development of the Highly Selective Reactions to Target Gene for the Control of the Gene Expression in Cells, *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan*, **69**, 108-117(2011). 査読有
4. 永次 史、チミンとの架橋反応性を有する新規人工核酸の開発、*化学工業*、**62**, 137-142 (2011) 総説、査読無
5. 永次 史、自己活性化インテリジェント人工核酸の創製、*核酸化学のニュートレンド*, DNA・RNAの新たな可能性を拓く, CSJ カレントレビュー (化学同人, 48-55 (2011) 総説 査読有
6. F.Nagatsugi, and S. Sasaki, Synthesis of Reactive Oligonucleotides for Gene Targeting and Their Application to Gene Expression Regulation, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **83**, 744-755 (2010). 査読有
7. 永次 史、佐々木 茂貴、インテリジェント核酸を用いた細胞内遺伝子発現制御、*Antisense (アンチセンス DNA/RNA研究会) vol14, No1*, 19-30 (2010) 査読無
8. S. Imoto, T. Hori, S. Hagihara, Y. Taniguchi, S. Sasaki, F. Nagatsugi, Alteration of cross-linking selectivity with the 2'-OMe analogue of 2-amino-6-vinylpurine and evaluation of antisense effects. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** 6121-6124 (2010) 査読有
9. K. Hattori, T. Hirohama, S. Imoto, S. Kusano, F. Nagatsugi, Formation of highly selective and efficient interstrand cross-linking to thymine without photo-irradiation. *Chem. Commun.* **42** 6463-6465 (2009) 査読有
10. M. M. Ali, S.Imoto, Y. Li, S. Sasaki and F. Nagatsugi, Incorporation of an inducible nucleotide analog into DNA by DNA polymerases, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 2859-2863 (2009), 査読有

[学会発表] (計 51 件)

1. 永次 史、萩原 伸也、草野 修平、井本 修平、架橋反応性核酸を用いた効率的蛋白質発現阻害 (日本薬学会第 132 年会、2012/3/29-3/31、北海道大学、北海道)

2. 井本修平、永次 史、千国友子、寒水壽朗、國枝武久、6-ビニルプリンによるシトシンへの極めて早い DNA 架橋反応 (日本薬学会第 132 年会、2012/3/29-3/31、北海道大学、北海道)
3. 草野 修平、萩原 伸也、茂木琢磨、永次 史、糖部修飾型架橋反応性ピリミジン誘導体の合成と評価 (日本化学会第 92 春季年会、2012/3/25-3/28、慶應義塾大学、神奈川県)
4. 萩原 伸也、草野 修平、Chao Xio Guang、岩本直生、永次 史、機能性オリゴ核酸の RNA への架橋形成による遺伝子発現制御 (日本化学会第 92 春季年会、2012/3/25-3/28、慶應義塾大学、神奈川県)
5. F. Nagatsugi, Development of Reactive Oligonucleotides with High Selectivity to a Target Base in RNA (Asian Chemical Biology Initiative 2012, 2012/2/24-2/26, Hanoi, Vietnam)
6. F. Nagatsugi, T. Hori, S. Kusano, S. Imoto, S. Hagihara, C.H.Guang, Evaluation of the Antisense Effects Using the Reactive Oligonucleotides with High Selectivity to the Target Base (8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of Medicinal Science", 2011/11/29-12/2, Tokyo, Japan)
7. S. Hagihara, S. Imoto, C. X. Guang, S. Kusano, F. Nagatsugi, 2'-OMe RNA containing 2-amino-6-vinylpurine as a potent gene regulator (The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2011/11/19-11/21, Sapporo, Japan)
8. F. Nagatsugi, Development of the Reactive Oligonucleotides with high selective reactivity to a Target Base (France-Japan workshop Micro- & Nano- Architectures, Materials & Imaging, 2011/10/10-10/12, Bordeaux, France)
9. 永次 史、萩原伸也、草野修平、Chao Xiao Guang、茂木琢真、細胞内における遺伝子発現制御を目指した自己活性化架橋反応性核酸の開発 (第 60 回高分子討論会、2011/9/28-9/30、岡山大学、岡山県)
10. 草野修平、萩原伸也、永次 史、架橋反応性ピリミジン誘導体の合成と評価 (第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011/9/12-9/14、つくば国際会議場「エポカルつくば」、茨城県)
11. S. Hagihara, S. Kusano, C. X. Guang, F. Nagatsugi, Dependency of the Cross-linking Reactivity with 2-Amino-6-vinylpurine on the Neighboring Bases (7th Annual Meeting of the oligonucleotides therapeutic society, 2011/9/8-9/10, Copenhagen, Denmark)
12. F. Nagatsugi, S. Hagihara, S. Kusano, C. X. Guang, Development of Cross-linking Agents with Highly Selective Reactivity to a Target Base (6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, 2011/9/4-9/7, Cambridge, United Kingdom)
13. 草野 修平、萩原 伸也、永次 史、架橋反応性ピリミジン誘導体の合成と評価 (アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011、2011/9/1-9/2、大阪大学、大阪府)
14. 永次 史、遺伝子変異と老化～化学的ピンポイント遺伝子変異誘導方法を目指したアプローチ～ (第 6 回老年医学研究会、2011/7/26、東北大学、宮城県)
15. F. Nagatsugi, Development of Selective Cross-linking Reactions and Evaluation of Antisense Effects (Gordon Conference on Nucleic Acids, 2011/6/5-6/10, University of New England, USA)
16. 萩原伸也、井本修平、堀常晃、鈔暁光、永次 史、架橋性オリゴ核酸による遺伝子発現制御 (第 6 回日本ケミカルバイオロジー年会、2011/5/23-5/25、東京工業大学大岡山キャンパス、東京都)
17. 草野修平、萩原伸也、永次 史、グリコシル化を鍵反応とした架橋反応性を有するピリミジン誘導体の合成 (日本化学会第 91 春季年会、2011/3/25-3/29、神奈川大学、神奈川県)
18. 櫻庭誠也、Chao Xiao Guang、萩原伸也、永次 史、架橋反応性の制御因子解明を目指したビニルプリン誘導体の合成 (日本化学会第 91 春季年会、2011/3/25-3/29、神奈川大学、神奈川県)
19. 高橋佑輔、小林麻衣子、永次 史、2本鎖 DNA に結合するペプチド導入型分子モーターの合成と評価 (日本化学会第 91 春季年会、2011/3/25-3/29、神奈川大学、神奈川県)
20. 永次 史、井本修平、萩原伸也、堀常晃、Cho Xio. Guang、核酸医薬を目指したチミン選択的クロスリンク剤の開発 (日本薬学会第 131 年会 2011/3/29-3/31、静岡大学、静岡県)
21. 萩原伸也、井本修平、堀常晃、X. Chao、永次 史、細胞内遺伝子発現制御に向けた架橋性核酸の開発 (日本化学会第 91 春季年会、2011/3/25-3/29、神奈川大学、神奈川県)
22. F. Nagatsugi, S. Hagihara, S. Kusano, Design of the novel artificial molecules for the control of gene expression (International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics II -Soft Nanomaterials and Soft Robotics -, 2011/2/25-2/26, AIST Tsukuba Central, Tsukuba, Japan)
23. 永次 史、萩原伸也、堀常晃、井本修平、反応性核酸を導入した 2'-OMe オリゴ RNA を用いたアンチセンス効果及び miRNA の阻害 (第 20 回アンチセンスシンポジウム 2010/12/2-12/3 甲南大学ポートアイランドキャンパス、兵庫県)
24. F. Nagatsugi, T. Hori, S. Kusano, S. Imoto, S. Hagihara, Development of the effective cross-linking reaction to target gene (Pacifichem,

- 2010/12/15-12/22, Hawaii, USA)
25. S. Imoto, T. Hori, C. X. Guang, S. Hagihara, Y. Taniguchi, S. Sasaki, F. Nagatsugi, Cross-linking reactions with the 2'-OME analogue of 2-amino-6-vinylpurine and evaluation of antisense effects (The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2010/11/10-11/12, Hamagin Hall "VIA MARE", Yokohama, Japan)
26. S. Hagihara, W. -C. Lin, S. Imoto, T. Hori, F. Nagatsugi, Crosslink forming oligonucleotide that enhances translation in cells (The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2010/11/10-11/12, Hamagin Hall "VIA MARE", Yokohama, Japan)
27. 永次 史、井本修平、堀常晃、萩原伸也、谷口陽祐、佐々木茂貴、2本鎖形成により活性化されるクロスリンク反応の開発 (第59回高分子討論会、2010/9/15/-9/17、北海道大学高等教育機能開発総合センター、北海道)
28. S. Imoto, T. Hori, K. Hattori, S. Kusano, S. Hagihara, Y. Taniguchi, S. Sasaki, F. Nagatsugi, Development of the cross-linking reactions to thymine with high selectivity (IRT 2010 - XIX International Round Table on *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2010/8/29-9/3, Lyon, France)
29. F. Nagatsugi, Development of the cross-linking reactions activated in duplex formation, (Pohan University, 2010/7/13, Korea)
30. 永次史、次世代型核酸医薬を目指した新規人工核酸の開発 (有機合成化学協会東北支部仙台地区春の講演会、2010/7/3、東北大学、宮城県)
31. F. Nagatsugi, Development of the novel artificial molecules for the control of gene expression (1st Asian Chemical Biology Conference, 2010/6/25-6/27, Seoul National University, Seoul, Korea)
32. 永次 史、堀常晃、井本修平、草野修平、萩原伸也、新規反応性核酸の開発及びmiRNA阻害に向けた検討 (第10回遺伝子デリバリー研究会シンポジウム、2010/6/2-6/3、北海道大学学術交流会館、北海道)
33. 井本修平、服部恵一、草野修平、廣濱智哉、萩原伸也、永次 史、チミンとの架橋反応性を有する新規人工核酸の開発 (第5回日本ケミカルバイオロジー年会、2010/5/23-5/25、慶應義塾大学日吉キャンパス、神奈川県)
34. 草野修平、服部恵一、井本修平、永次 史、チミジンを標的とした新規クロスリンク剤の合成と評価 (日本化学会第90春季年会、2010/03/26-3/29、近畿大学本部キャンパス、大阪府)
35. 永次史、細胞内遺伝子発現制御に向けた新規人工分子の創製 (第31回東北薬学セミナー、2009/12/4、江陽グランドホテル、宮城県)
36. F. Nagatsugi, T. Hirohama, S. Kusano, Hattori, S. Imoto, Development of the novel cross-linking reaction to thymine with high selectivity (The 4th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia, 2009/11/29-12/3, Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand)
37. F. Nagatsugi, Development of the novel artificial molecules for the control of gene expression (ICOK 9, 2009/11/9-11/13, Rihga Royal Hotel, Kyoto, Japan)
38. F. Nagatsugi, K. Hattori, T. Hirohama, S. Kusano, S. Imoto, Development of the novel cross-linking agent with high selectivity to thymine (Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium, 2009/11/3-11/6, Centennial Hall, Kyushu University Hospital Campus Fukuoka, Japan)
39. S. Kusano, K. Hattori, S. Imoto, F. Nagatsugi, Design and synthesis of the novel cross-linking agent (35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2009/9/27-10/1, Takayama, Japan)
40. F. Nagatsugi, T. Hirohama, S. Kusano, K. Hattori, S. Imoto, Development of the novel cross-linking reagents to react to the target genes with high selectivity (2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium, 2009/9/11-9/12, Tokyo, Japan)
41. 永次 史、廣濱智哉、井本修平、2本鎖DNA上におけるクリックケミストリーを応用したDNA結合分子探索手法の開発 (日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、2009/5/18-5/19、神戸市産業進行センター、兵庫県)
- [その他]
<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/nagatsugi/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
永次 史 (NAGATSUGI FUMI)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号：90208025
- (2) 研究分担者
萩原 伸也 (HAGIHARA SHINNYA)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：80373348
- (3) 連携研究者
井本 修平 (IMOTO SYUHEI)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：20447189
(H21：研究分担者)