

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790119

研究課題名（和文）ホスフィン酸型ジヌクレオチド誘導体を含む siRNA 分子の創製

研究課題名（英文）Synthesis of siRNA molecules containing phosphinate type dinucleotide derivatives

研究代表者

疋島貞雄 (HIKISHIMA SADAŌ)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70398816

研究成果の概要（和文）：生体内で安定な siRNA 分子の創製を目的として、3'-突出末端をホスフィン酸型ジヌクレオチド誘導体で置換した新規修飾型 siRNA 分子を設計し、それらの合成を検討した。二つ合成法についてそれぞれ検討したが、いずれの場合においても目的とするホスフィン酸型ジヌクレオチドユニット（ジヌクレオチド誘導体）を効率的に合成することができなかった。

研究成果の概要（英文）：For the production of stable siRNA molecules in vivo, We have designed novel modified siRNA molecules that contain phosphinate type dinucleotide derivatives at 3'-end. Though we examined various synthetic routes of phosphinate type dinucleotide derivatives, we could not find effective synthetic route.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬, siRNA

1. 研究開始当初の背景

近年の様々な研究により、RNA 分子は細胞内において、転写制御や転写後遺伝子制御など多様な機能を担っていることが明らかとされつつあり、分子細胞生物学やバイオテクノロジーをはじめとして遺伝子疾患や遺伝子治療への短鎖 RNA 分子の応用が検討されている。これら RNA 分子の機能のうち、RNA 干渉 (RNAi) は現在最も研究されている転写後遺伝子抑制効果であり、その発見以降、遺伝子抑制ツールとして様々な生物種に利用さ

れてきた。その RNAi 効果の発現機構は未だ不明な点が多々あるものの、現在、哺乳類細胞への RNAi の適用には、3'-末端に 2 塩基の突出をもつ 21 ヌクレオチド程度の短鎖二本鎖 RNA (siRNA) 分子を用いた場合、効果的に遺伝子発現を抑制できることが明らかとなっている。しかしながら、siRNA 分子を細胞や生体試料に利用する際、天然型 siRNA 分子が生物学的に不安定であることから、なんらかの化学修飾により安定化する必要がある。この観点から、これまでに様々な修飾型

siRNA 分子の創製研究が行われてきたが、天然型 siRNA 分子と同等な RNAi 効果を維持し、且つ生物学的安定性をもった修飾分子の報告例は少ない。

2. 研究の目的

本研究は、天然型 siRNA 分子の 3'-突出末端構造に着目し、RNAi 効果を維持した生物学的に安定な新規修飾型 siRNA 分子の創製を目的としており、それを RNAi 効果の発現機構の詳細を明らかとするための分子プローブに活用すると共に、遺伝子抑制ツールとして利用可能な汎用性の高い修飾型 siRNA を見いだすことを最終目的としている。

新規修飾型 siRNA 分子の設計にあたり、RNAi 効果の発現過程において siRNA 分子との結合に深く関与しているタンパク質群のうち、PAZ ドメインに着目した (Fig. 1)。

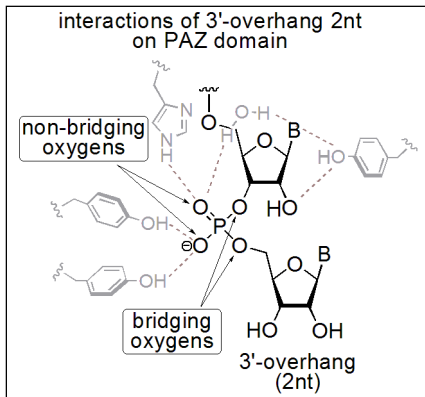


Fig. 2

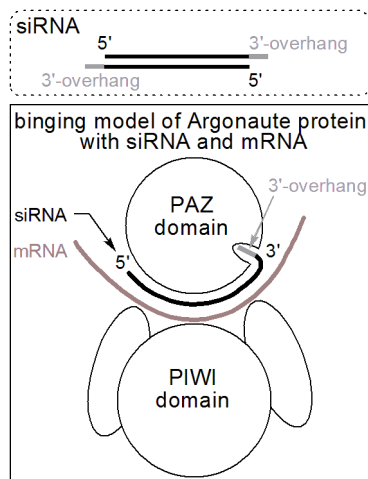


Fig. 1

この PAZ ドメインと siRNA 様短鎖 RNA 分子とから成る複合体の構造情報は明らかとされている (Fig. 2)。

これらの情報に基づき、siRNA 分子の 3'-突出末端のジヌクレオチドを連結しているリン酸ジエステル結合を非加水分解性の等価体であるホスフィン酸型あるいはジフルオロメチレンホスフィン酸型に化学修飾することで、siRNA 分子に生物学的な安定性を付与できるものと考えた (Fig. 3)。

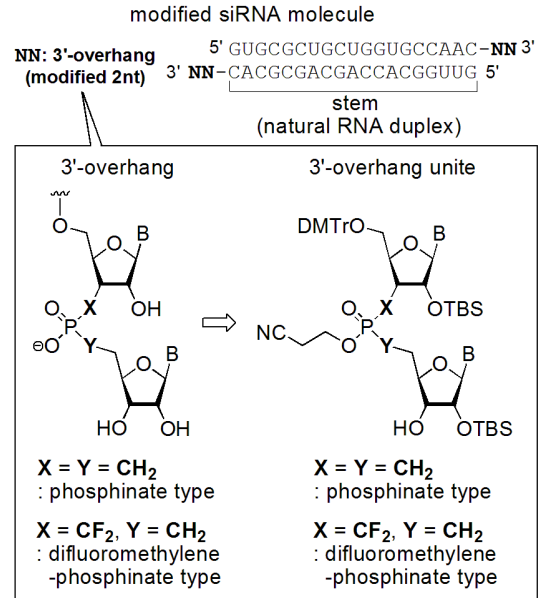


Fig. 3

そこで、これらのホスフィン酸型ジヌクレオチドユニットの合成法の確立および siRNA 分子に組み込んだ場合の有用性について検討することとした。

3. 研究の方法

3'-突出末端ユニットの核酸塩基部は、これまでの知見からウラシルを導入することとした。まず、これらジヌクレオチド誘導体の効率的な合成法を確立した後、DNA/RNA 固相合成法を適用し新規 siRNA 分子を合成する (Fig. 4)。その後、新規 siRNA 分子の物理化学的性質 (二本鎖 RNA 分子の熱的安定性やその二本鎖構造) や酵素 (3'-エキソヌクレアーゼ) 耐性を明らかとし、RNAi 効果について検討することとした。標的とするホスフィン酸型ジヌクレオチドユニット (ジヌクレオチド誘導体) の効率的な合成法を確立するためには、多官能基性のヌクレオシドを基質とした炭素-リン結合形成反応が鍵になると考えられる。そこで申請者は、官能基選択性が高いラジカル反応に着目し、この反応をジヌクレオチド誘導体の合成に適用し、汎用性のある合成法を確立することを検討した。

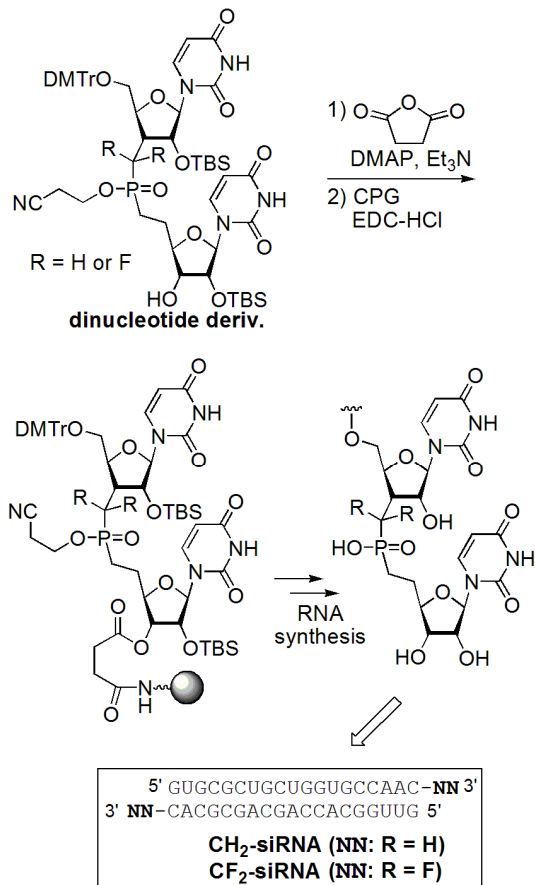
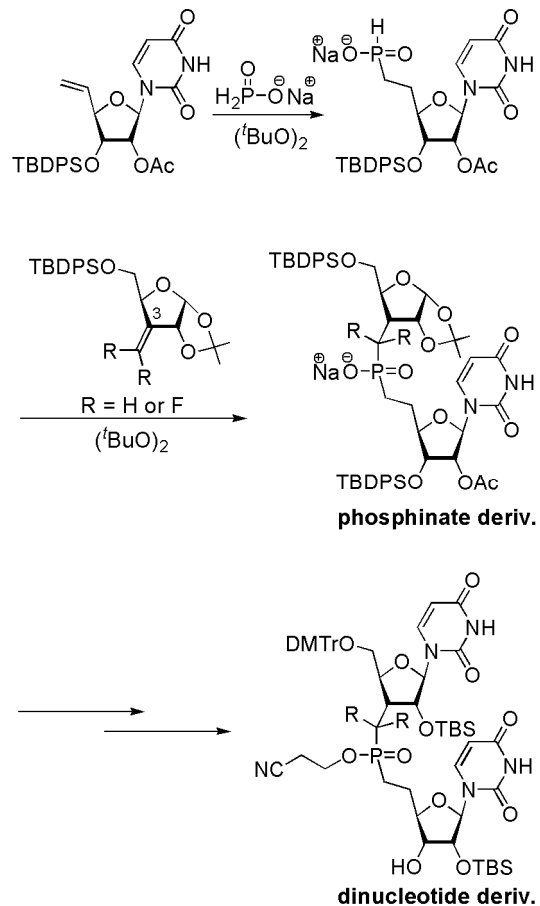


Fig. 4

4. 研究成果

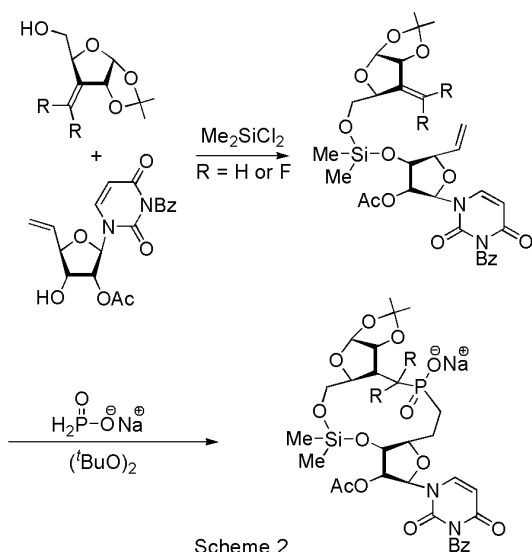
ホスフィン酸型ジヌクレオチドユニット（ジヌクレオチド誘導体）の合成にあたり、二つ合成法を考案し、それらについて検討した。すなわち、その一つとして、5' 位にアルケニル基を有するウリジン誘導体と次亜リン酸ナトリウムとの分子間ラジカル反応を鍵反応とする段階的な合成法（ウリジンより誘導した5'-アルケン体を次亜リン酸ナトリウムで処理しH-ホスホネート体とした後、3-メチレンフラノシド誘導体と処理することで、ホスフィン酸誘導体を合成した後、ウラシル塩基を導入し、種々保護基の変換を行い、目的とするジヌクレオチド誘導体へと誘導する合成法）について検討した (Scheme 1)。

その結果、目的とするジヌクレオチド誘導体の生成はわずかに確認できたものの、効率良く合成することができなかった。これは、用いた保護基や反応条件が不適切であったためであると考えられ、今後この点に関して更に検討する必要がある。



Scheme 1

また、もう一つの合成法として、シリルケタール基を利用した分子内ラジカル環化反応を鍵反応とする合成法についても検討した。すなわち、まず5'位にアルケニル基を有するウリジン誘導体と3'位にエキソメチレン基を有するリボース誘導体との連結反応について検討したところ、望みとするシリルケタール体の生成は確認できなかった (Scheme 2)。



Scheme 2

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 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

疋島 貞雄 (HIKISHIMA SADAŌ)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70398816

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：