

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23790146

研究課題名(和文) RNA機能の制御を目指したRNA精密修飾法の開発

研究課題名(英文) Development of methodology for site-specific RNA modification using the Reactive Oligonucleotides

## 研究代表者

井本 修平 (IMOTO SHUHEI)

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：20447189

研究成果の概要(和文): RNAは転写後に構造修飾を受けることで本来の機能が発現する。RNAを人工的に修飾することが可能になれば、mRNAまたはmiRNAをはじめとしたncRNAの機能制御や解明ができると考えられる。そこで本研究では、①標的塩基への架橋反応、②光照射による架橋構造の一部脱離、という2段階反応にて標的RNAの反応点を厳密に制御した修飾化を行うための人工核酸の設計・開発を目指すこととした。本研究期間中には最初の段階である架橋反応が非常に短時間で完了する新しい人工核酸である6-ビニルプリンの開発に成功した。

研究成果の概要(英文): RNA function is controlled by post-transcriptional modification. Therefore, there is increasing demand for methods of the site-specific modifications of RNA because of potential applications as biological tools and therapeutic methods. In this research, we are developing site-specific RNA modification tool using cross-linking forming oligonucleotide. We have found that the 6-vinylpurine newly designed in the current study serves well as a new nucleobase for increasing cross-link reactivity to target cytosine.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：核酸化学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：RNA修飾、架橋反応

## 1. 研究開始当初の背景

RNAはその鋳型であるゲノムDNAから転写された後、さまざまな構造修飾を受けて成熟し、本来の機能を発揮する。これまでに報告されているRNA修飾は100を超え、メチル化からアミノ酸が付加した構造まで多彩なものとなっている。RNAの修飾は、遺伝情報の修飾と解読、立体構造の安定化など生命現象で重要な役割を果たしている。RNAを人工的に修飾することができれば、RNA

が担う生体機能の制御が可能になると考えられる。しかし、生体内で反応点を精密に制御してRNA標的塩基を修飾する報告は現在までほとんど報告がない。

## 2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究課題では、RNAを標的としたピンポイント化学修飾反応を開発し、生体内におけるRNA機能の制

御を目指すこととした。そのために、①標的塩基への架橋反応、②照射による架橋構造の一部脱離、という2段階反応にて標的RNA修飾を行う人工核酸の設計および合成を行った。

### 3. 研究の方法

RNAを標的とした2段階でのピンポイント化学修飾を行うためには、まず、標的核酸塩基への架橋反応を達成する必要がある。この目標を達成するための反応性人工核酸としては、申請者らが取り組んできた2-アミノ-6-ビニルプリン(AVP, **1**)による標的シトシン塩基との架橋反応を利用することとした。架橋構造の一部脱離を起こすために、糖部4'位にニトロベンジルオキシ基を導入することとした。架橋反応後に照射を行うことでグリコシル結合の切断が起こり、人工核酸塩基部位が脱離し、目的が達成できると考えた。

### 4. 研究成果

#### ①架橋反応の効率化を目指した人工核酸塩基6-ビニルプリンの開発

本研究の目標である、RNA構成塩基への特異的修飾反応を達成するためには、反応の第一段階である架橋反応が効率的に進行する必要がある。架橋反応性を有する人工核酸塩基として、申請者らは2-アミノ-6-ビニルプリン(AVP, **1**)の開発を進めてきた。しかし、AVPによるRNAへの架橋収率反応は前後配列などの影響を受け、必ずしも高くない場合があることが予備的な検討から分かってきた。そこで、まずは架橋反応収率の向上を目指し、反応性核酸であるAVPの構造最適化を行うこととした。

具体的には、AVPにおいて共役付加が起こるビニル基末端の反応性が、2位アミノ基の電子供与効果によって低下している可能性を考え、2位アミノ基を持たない6-ビニルプリン(VP, **2**)を設計した。

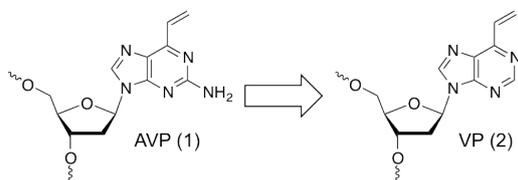


Figure.1 新しい架橋反応性人工核酸塩基6-vinylpurineの設計

VPをDNAに組み込むために必要となるアミダイトユニットは2'-deoxyadenosineを出発原料とし7工程を経て合成した。このアミダイトユニットをDNA自動合成装置に適用し、収率よくVPを含むオリゴヌクレオチド

ドを合成することに成功した。

まずはVPを組み込んだオリゴヌクレオチドと標的DNAとの架橋反応をポリアクリルアミドゲル電気泳動にて評価した。その結果、酸性の緩衝液条件下(MES buffer, pH=5.0)において標的DNAのシトシン塩基と2時間で84%程度(Figure2, Lane4)と従来型の架橋性核酸であるAVPよりも遙かに早い速度で架橋反応が進行することが明らかとなった(Figure2, Lane6)。また、この架橋反応はAVPと同様に高いシトシン塩基選択性を維持していることも確認された。

5'-AGTAGCCTXTCGTGTG-3'  
3'-TCATCGGAYAGCACCAC-FAM-5'

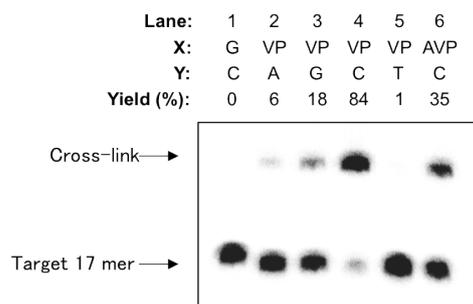


Figure.2 ポリアクリルアミドゲル電気泳動による6-vinylpurineの架橋反応評価

今回開発したVPによるDNAへの架橋反応は極めて早いため、今後アンチジーン法などDNAを標的とする化学ツールとしての展開も期待できる。

#### ②中性条件下での標的RNAへの化学修飾を目指した人工核酸塩基の合成

上記に示した通り、6-ビニルプリンは酸性条件下では2-アミノ-6-ビニルプリンよりも極めて早い架橋反応を達成できたものの、中性条件下ではほとんど架橋反応が進行しなかった。これは、将来的に本研究を細胞レベルにて展開する場合に大きな問題点となる。そこで、中性条件下での架橋反応を達成するため、架橋部位としてハロゲンを有し、照射により塩基構造の一部が脱落する構造であるピリミジン誘導体を新たに設計した。

グアニンの相補的な位置に反応性核酸塩基caged-C1-U(3)を有する人工核酸が標的DNAとハイブリッドを形成すると、caged-C1-Uは架橋形成部位であるハロゲンを有するため、相補的な核酸塩基(N)との間に共有結合による架橋形成が起こると期待できる。続いて、照射を行うとcaged-C1-Uのピリミジン4位酸素のニトロベンジル骨格が脱落するため、標的グアニンへの構造修飾が達成できると期待できる(Figure. 3)。

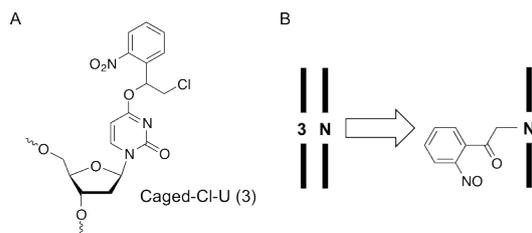


Figure.3 A) Caged-Cl-U の構造 B)修飾を受ける塩基の構造

Caged-U-Cl を組み込んだオリゴヌクレオチドを合成するために必要なアミダイトユニットは 2'-デオキシウリジンを出発原料とし、行程で合成した。

現在、このアミダイトユニットを用いて DNA 固相合成および、切り出し、精製の条件を検討中である。今後、Caged-U-Cl を組み込んだオリゴヌクレオチドを用いて 2 段階反応による標的 RNA の化学修飾が起こるか HPLC、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて詳細に検討予定である。

#### 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 3 件)

(1) Fumi Nagatsugi, Shuhe Imoto  
 “Induced Cross-linking Reactions to Target Genes Using Modified Oligonucleotides”  
*Organic & Biomolecular Chemistry*, **2011**, *9*, 2579-2585. (査読有)  
 DOI: 10.1039/c0ob00819b

(2) Shinya Hagihara, Shuhe Kusano, Wei-Chen Lin, Xiao-guang Chao, Tsuneaki Hori, Shuhe Imoto, Fumi Nagatsugi  
 “Production of truncated protein by a crosslink formation of mRNA with 2'-OMe oligoribonucleotide containing 2-amino-6-vinylpurine”  
*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, *22*, 3870-3872. (査読有)  
 DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.123

(3) Shuhe Imoto, Tomoko Chikuni, Hisao Kansui, Takehisa Kunieda, Fumi Nagatsugi  
 “Fast DNA Interstrand Cross-linking Reaction by 6-Vinylpurine”  
*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2012**, *10*, 752-762. (査読有)  
 DOI: 10.1080/15257770.2012.726756

[学会発表] (計 8 件)

(1) 萩原 伸也、井本 修平、堀 常晃、Chao Xiao-guang、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学会年会  
 東京工業大学大岡山キャンパス、2011 年 5 月 23-25 日

(2) 井本 修平、永次 史、寒水 壽朗、國枝 武久

「新規ピリミジン誘導体を導入したオリゴ核酸の合成と架橋反応評価」  
 第 41 回複素環化合物討論会  
 崇城大学市民ホール、熊本、2011 年 10 月 21-23 日

(3) Shinya Hagihara, Shuhe Imoto, Chao Xiao-guang, Tuneaki Hori, Shuhe Kusano, Fumi Nagatsugi

“2'-OMe RNA containing 2-amino-6-vinylpurine as a potent gene regulator”  
 The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry,  
 北海道大学、札幌、2011 年 11 月 19-21 日

(4) Fumi Nagatsugi, Tuneaki Hori, Shuhe Kusano, Shuhe Imoto, Shinya Hagihara, Chao Xiao-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"  
 京王プラザホテル、東京、2011 年 11 月 29-12 月 2 日

(5) 井本 修平、千國 友子、永次 史、寒水 壽朗、國枝 武久

「グアニン 6 位酸素との架橋反応を目指した人工核酸塩基の開発」  
 第 28 回日本薬学会九州支部大会  
 福岡大学、福岡、2011 年 12 月 10-11 日

(6) 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  
 北海道大学、札幌、2012 年 3 月 28-31 日

(7) 井本 修平、永次 史、千國 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速い DNA 架橋反応」  
 日本薬学会第 132 年会

北海道大学、札幌、2012年3月28-31日

(8) 岩本 直生、草野 修平、萩原 伸也、佐々木 要、河治 久実、児玉 栄一、井本 修平、永次 史

「反応性核酸誘導体を用いたウイルス複製制御を目指した創薬研究」

第12回多元物質科学研究所研究発表会

東北大学、仙台、2012年12月10日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.sojo-u.ac.jp/~simoto/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井本 修平 (IMOTO SHUHEI)

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：20447189

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし