

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655152

研究課題名(和文)mRNAの位置選択的塩基変換法の開発

研究課題名(英文)Development of site-specific conversion method of nucleobase in mRNA

研究代表者

張 功幸(Hari, Yoshiyuki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50347423

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、メッセンジャーRNA中の望みのシトシン塩基をウラシル塩基に変換する技術の開発を目指した。その実現のためにスルフィン酸を連結したオリゴ核酸を独自に設計し、その化学合成を達成した。その後、合成したスルフィン酸を連結したオリゴ核酸を用いて2'-O-メチルRNA中のシトシンを標的とした変換反応を種々検討したが、本研究期間内に目的の技術を確立することができなかった。しかし、本研究を通じて、スルフィン酸はシトシン塩基と反応してウラシル塩基へと変換する能力を持つことをはじめ、将来的に本技術開発に役立つ幾つかの有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文): In this study, we aimed at the development of the method for conversion of cytosine nucleobase into uracil one in messenger RNA. In order to implement the method, sulfinic acid-conjugated oligonucleotides were designed as a new class of modified oligonucleotides, and their syntheses were achieved. Although the conversion reaction of cytosine nucleobase within 2'-O-methyl-RNA using the synthesized oligonucleotides under various conditions was investigated during this research period, we could not succeed in the development of the conversion method. However, this research provided useful information for the development of the method in future.

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：核酸化学

1. 研究開始当初の背景

一本鎖DNAやRNAの特定部位の核酸塩基に化学修飾を施す手法の開発は多く試みられているが、その修飾生成物は天然の核酸塩基とは異なる構造となる。もし、この化学反応により一本鎖RNA中のある天然核酸塩基から別の天然の核酸塩基へと変換させることができれば、将来的にはアミノ酸変異タンパク質の合成や、遺伝子変異疾患治療への応用など極めて有用な技術になり得ることが期待できる。

そのような中、私は、早津らが見出したシトシン塩基からウラシルへと変換(C→U変異)する手法に着目した [Hayatsu, H. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 724; *Biochemistry* **1970**, *9*, 2858 等]。本手法は、弱酸性条件下での亜硫酸水素ナトリウム処理、続く塩基処理により実現され、現在バイサルファイト法としてDNAメチル化解析に頻用されている。このC→U変換能を持つユニットをオリゴ核酸に連結すれば、標的一本鎖核酸の特定部位の塩基変換(C→U変換反応)を実現できるのではないかと考えた。連結するC→U変換ユニットとして、構造上、亜硫酸水素ナトリウム自体を利用することは出来ないため、代わりに亜硫酸エステルあるいはスルフィン酸を利用することを考えた。

2. 研究の目的

mRNA中の特定の核酸塩基を別の天然核酸塩基に変換できる技術は、様々な核酸テクノロジーに応用可能な魅力的なものになり得る。従って本研究では、一本鎖RNAの望みの位置のシトシン塩基をウラシル塩基へと変換(C→U変換)する手法およびそれを実現する亜硫酸あるいはスルフィン酸を連結した人工オリゴ核酸の開発を目指すこととした。最終的には、開発した機能性人工オリゴ核酸を用いて細胞中のmRNA中の特定のシトシン塩基をウラシルに変換することを計画した。

3. 研究の方法

(1) 二重鎖核酸中のシトシン塩基に対するC→U変換反応の検討

低分子の亜硫酸モノエステルならびにスルフィン酸誘導体を利用したC→U変換反応を検討し、後にオリゴ核酸との連結ユニットとして利用するスルフィン酸アナログの探索を行った。

(2) スルフィン酸を連結したオリゴ核酸の合成

目的の機能性オリゴ核酸の合成には、オリゴ核酸合成後にスルフィン酸ユニットをコンジュゲート化する手法をとることでその効率化を図った。なお、コンジュゲート化には、click chemistryとして汎用されている銅触媒を用いたアジドとアルキンの[3+2]環化付加反応(CuAAC反応)を利用した。

(3) スルフィン酸を連結したオリゴ核酸を利用した一本鎖核酸中のC→U変換反応

将来的にmRNAを標的とすることを考慮し、RNAの安定化アナログである2'-O-メチル修飾RNAを用いて検討を行った。また、その評価は逆相HPLCにより行った。

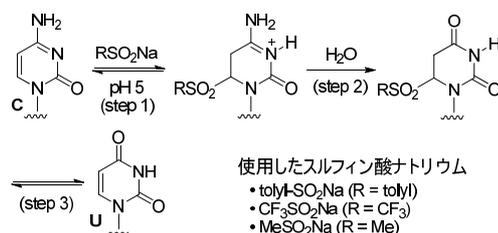
(4) 細胞中のmRNAを標的とした位置選択的C→U変換反応

研究開始当初、上述のin vitroでのC→U変換反応を達成後、培養細胞を用いた評価を計画していた。しかし、本研究期間内にin vitroでのC→U変換反応を達成できなかったため、本計画は実行できなかった。

4. 研究成果

(1) 二重鎖核酸中のシトシン塩基に対するC→U変換反応の検討

スルフィン酸ナトリウムを用いたC→U変換反応は知られていない。そこで、亜硫酸水素ナトリウムと同様の弱酸性条件下、スルフィン酸ナトリウムを用いてシチジンとの反応を検討した。亜硫酸水素ナトリウムと同じ反応条件下その変換効率をNMRを利用して比較したところ、用いた3種のスルフィン酸ナトリウム間での反応性の差は大差ないものの、亜硫酸水素ナトリウムと比べてC→U変換速度が著しく遅かった(亜硫酸水素ナトリウムにおいてシチジンの19%がウラシル付加体、79%がウリジンに変換された条件下、スルフィン酸ナトリウムではシチジンの5-10%がウリジンへと変換されたのみであった)。さらに詳細な反応解析の結果、スルフィン酸ナトリウムの反応は、亜硫酸水素ナトリウムのものと比べて、(i) 初めの付加の進行が非常に遅いこと(step 1)、(ii) 付加体が進行してもスルフィン酸の脱離(Cの再生)が起こり易く、結果的にstep 2の反応も極めて遅いことが判明した(Scheme 1)。その一方で、スルフィン酸ナトリウムの場合、反応系中での生成物はウリジンのみで付加体は全く検出されなかった。このことは、反応性の問題はあるもののスルフィン酸ナトリウムを用いることで、一挙にC→U変換反応を実現できることが示唆された。さらに、亜硫酸モノエステル(ROSO₂)を用いた検討も行った。しかし、亜硫酸モノエステルは安定性に乏しく(分解して二酸化硫黄が生成)、C→U変換反応には全く適用できなかった。



Scheme 1

反応は遅いもののスルフィン酸ナトリウムは C→U 変換反応を進行させることが確認できたので、オリゴ核酸中のシトシン塩基に対する C→U 変換反応を検討することとした。亜硫酸水素ナトリウムのシトシン塩基に対する付加反応は、中性条件下では殆ど進行しない。それは、標的シトシンの 3 位窒素原子がプロトン化される必要があるためと考えられている。従って、Hoogsteen 型水素結合形成を利用することで中性条件下においてもシトシンをプロトン化できると考えた (Figure 1)。標的一本鎖核酸として 2'-O-メチル修飾 RNA (5'-UUCUCUUUUUCUUU-3')、Hoogsteen 型水素結合により標的核酸を認識するオリゴ核酸 [5'-d(AAGAGAAAAGAAA-A)-3' 及び、その配列中の幾つかの dA あるいは dG を 8-amino-dA、8-amino-dG 修飾した複数のオリゴ核酸] を用いて、2'-O-メチル修飾 RNA 中のシトシンを標的とした C→U 変換反応を検討した結果、トルエンスルフィン酸ナトリウムを用いた時、2'-O-メチル修飾 RNA のシトシンに対するスルフィン酸の付加体が一部生成していることが HPLC 分析並びに質量分析により確認できた。この場合、使用したスルフィン酸ナトリウムの濃度は核酸より遥かに高濃度であったため、付加体が得られたものと考えられた。しかし本反応系では、中性条件下におけるスルフィン酸の低安定性のためか、反応効率ならびに反応再現性に関する問題があり、この点については今後より詳細な検討が必要と考えられる。

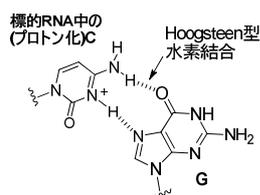


Figure 1

(2) スルフィン酸を連結したオリゴ核酸の合成

上記(1)の結果から、オリゴ核酸にスルフィン酸をコンジュゲートさせることにより近接濃縮効果で、標的一本鎖核酸の特定のシトシンを変換できると考えた。具体的な設計に関しては、二重鎖核酸の安定性に与える影響、標的シトシン塩基との空間的距離等を考慮し、2'位にアルキンを有するオリゴ核酸を考案した。実際に合成したオリゴ核酸の一例を Figure 2 に示す。アルキン修飾核酸の付近のグアニン塩基と塩基対形成するシトシン塩基をターゲットとする設計となっている。

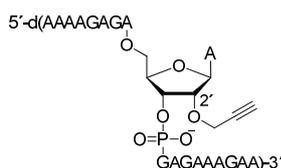
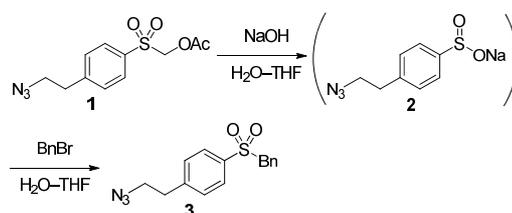


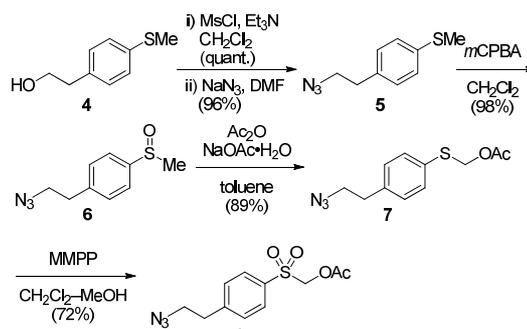
Figure 2

上記(1)の検討により、スルフィン酸の安定性が懸念されたため、コンジュゲート化するスルフィン酸は保護した形で合成し、標的一本鎖核酸との反応前にスルフィン酸ナトリウムへと変換することを考えた。実際には、アセトキシメチルスルホニル基を利用することとした [Vleeschauer, M. D. *et al. Synlett* 1997, 375.]. Scheme 2 にその一例を示すが、アセトキシメチルスルホニル化合物 1 の水酸化ナトリウム処理、続く BnBr 処理によりスルホン化合物 3 が得られたことから、水酸化ナトリウム処理で対応するスルフィン酸ナトリウム 2 が生成していることが示唆された。このことから、アセトキシメチルスルホニル基がスルフィン酸ナトリウムの前駆体として利用可能であることが示された。



Scheme 2

化合物 1 の合成を Scheme 3 に示す。既知化合物 4 [Avery, M. A. *et al. J. Med. Chem.* 2003, 46, 4424.] をアジド基へと変換することで化合物 5 とした後、*m*CPBA 酸化によりスルホキシド 6 を得た。その後、Pummerer 転位続くモノペルオキシフタル酸マグネシウム (MMPP) による酸化により望みの前駆体 1 を合成した。同様の手法により、リンカー長の異なるアナログ 8-10 の合成にも成功した (Figure 3)。



Scheme 3

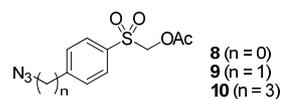
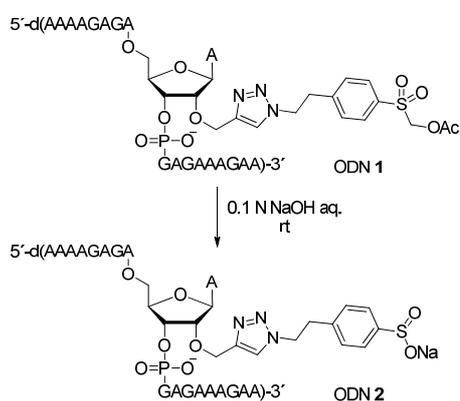


Figure 3

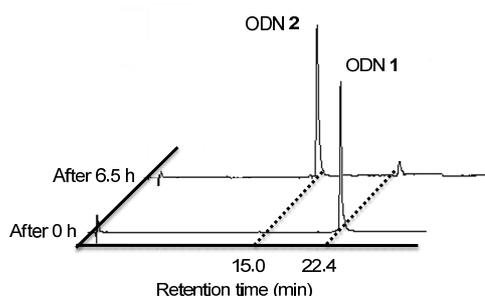
アルキンを有するオリゴ核酸とアジドを有するスルフィン酸前駆体のコンジュゲート反応は、私たちが最適化した条件 [Nakahara, M. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 3316.] を用いて行ったところ、全ての基質に

において首尾よく目的のコンジュゲート体を得ることに成功した。

次に、コンジュゲート体においても水酸化ナトリウム処理にてスルフィン酸へと変換されているかを検討した(Scheme 4 and Figure 4)。結果、ODN 1 の水酸化ナトリウム処理では、きれいに反応が進行することが HPLC 分析により明らかとなった。スルフィン酸体の安定性が乏しいためか、ODN 2 の MALDI-TOF-Mass 測定では目的の分子量ではなく、酸化されたスルホン酸体の分子量が観測されたが、Scheme 3 の結果を考慮すると、ODN 2 は目的のスルフィン酸ナトリウム体であり、MALDI-TOF-Mass 測定のサンプル調製時に酸化されたものと考えられる。また水酸化ナトリウム水溶液の濃度を濃くすると、より短時間でスルフィン酸ナトリウムへと変換できることも確認した。本合成戦略は、スルフィン酸を連結したオリゴ核酸の合成に有用であると考えられる。



Scheme 4



Conditions: eluent A: 0.1 M TEAA buffer, eluent B: A:MeCN = 1:1, gradient of B = 12-24% for 30 min, column temperature = 50°C.

Figure 4

(3) スルフィン酸を連結したオリゴ核酸を利用した一本鎖核酸中の C→U 変換反応

スルフィン酸連結型オリゴ核酸を用いた 2'-O-メチル修飾 RNA 中の C→U 変換反応を検討した。反応温度、塩濃度、基質の濃度、使用する核酸配列、リンカーの長さ等、種々検討したが、いずれの条件においても反応生成物を全く検出することが出来なかった。

現在、本計画を実現するために反応条件、核酸構造に関する検討を引き続き行っている一方、より高活性なスルフィン酸ユニットの開発にも着手している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

廣瀬 望, 張 功幸, 小比賀 聡, スルフィン酸アナログを用いた C→U 変換反応, 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都, 2013 年 10 月 12 日)。

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張 功幸 (HARI YOSHIYUKI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 50347423

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし