

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659045

研究課題名(和文) microRNA 創薬を指向した細胞膜透過性パイ電子充填型人工核酸の創製

研究課題名(英文) Development of artificial aromatic nucleic acid with cell membrane permeability

研究代表者

上野 義仁 (UENO, Yoshihito)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20250467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜透過能を有するアンチセンス核酸の創製を目的とし、ベンゼン環を内部に有する人工オリゴ核酸の合成を行った。(S)-マンデル酸を出発原料とし、エステル化、ヨード化、還元、シリル化を行った後に、ボロン酸誘導体へと導いた。このものと、アデニン及びシトシンを銅イオン存在下でカップリングすることにより、目的とするアデニン及びシトシンアナログの合成に成功した。アナログを中央に3個含むオリゴマーを合成し、その性質を検証したところ、アナログを含むオリゴマーは二重鎖を熱的に不安定化するものの高い塩基識別能を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is development of artificial aromatic nucleic acid with cell membrane permeability which involves a benzene ring instead of a ribose ring. (S)-mandelic acid was used as a starting material. After esterification, iodization, reduction, and silylation, it was converted to a boronic acid derivative. Coupling reaction of it with an adenine or cytosine in the presence of copper (II) produced adenine and cytosine analogs in good yields. It was found that the analogs reduced thermal stabilities of DNA/DNA and DNA/RNA duplexes, but the analogs possessed high base discrimination abilities.

研究分野：創薬化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：アンチセンス核酸 細胞膜透過性 ヌクレアーゼ耐性 RNA親和性 DNA二重鎖 RNA二重鎖 熱力的安定性 熱力学的安定性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子の発現は DNA より転写された mRNA がリボソーム上でタンパク質へと翻訳されることによって行われる。この時、遺伝子情報に何らかの不具合があるとタンパク合成や調節に異常が起こり、疾病の原因となる。アンチセンス法では、このような疾病の原因となる遺伝子に対応する mRNA (センス) に対し、相補的な配列をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与し、アンチセンス分子と mRNA との間で Watson-Crick 型水素結合により二本鎖を形成させることで、遺伝子発現を抑制するものである。アンチセンス法は遺伝子を標的としているため、疾患の病因となる遺伝子の塩基配列が既知であれば、アンチセンス分子を論理的に設計・合成できることから、これまで治療が困難とされてきた様な疾患に対する新しい治療法になるものと期待されている。しかし、アンチセンス法を実際に生体内で達成させるためには様々な問題を克服する必要があり、アンチセンス分子が以下の条件を満たす必要があると考えられている。アンチセンス分子が細胞膜を透過できること (細胞膜透過性)。アンチセンス分子が細胞内外に存在するヌクレアーゼにより加水分解を受けず安定に存在すること (ヌクレアーゼ耐性)。mRNA と熱的に安定な二重鎖を形成すること (RNA に対する親和性)。mRNA と形成した二本鎖が RNase H の基質となり、RNA 鎖のみが加水分解されること (RNase H 活性誘導) などの諸条件を満足させることが必要である。これまでのアンチセンス核酸の開発研究から、多くの化学修飾した機能性人工核酸が合成されてきた。しかし、これらの人工核酸は標的となる RNA との親和性は向上させるものの、核酸医薬開発で重要となる DDS (Drug Delivery System; 薬剤を細胞膜を通過させ目的とする部位に到達させるシステム) の問題は解決していない。

(2) これまでに筆者は、DNA の構成単位であるヌクレオシドの糖部を、糖とは全く異なるベンゼン環で置き換えた塩基-ベンゼンから成るヌクレオシド類縁体を基本単位としたベンゼン-リン酸骨格から成る核酸類縁体の合成を行ってきた。このベンゼン-リン酸骨格から成る核酸類縁体は、塩基とベンゼン環の間に二面角をもつことから、ベンゼン-リン酸骨格に沿って塩基をそれぞれ水平に配列させることが可能となる。実際に、合成したベンゼン-リン酸骨格から成る核酸類縁体が、天然の DNA よりも熱的、熱力学的に安定な二重鎖を形成することを見出してきた。この安定化の要因はベンゼン環どうしのスタッキング相互作用によるものと推定されている。また、ベンゼン-リン酸骨格から成る核酸類縁体は天然の DNA よりも脂溶性が高く細胞膜透過性に優れており、実際に、ベンゼン-リン酸骨格から成る核酸類縁体を組み込んだモレキュラー-ビーコンを用いる

ことにより高効率で細胞内の RNA を検出することが可能であった。しかし、本アナログはベンゼン環の 3,5 位を連結した構造から成る為、リン酸間の距離が天然の核酸よりも長く、このことから本アナログ同士では熱的、熱力学的に安定な二重鎖を形成するものの、天然の DNA 及び RNA とは安定な二重鎖を形成しない問題点があった。一方、近年、Meggers らは、グリセロールを基本骨格とした核酸類縁体 (GNA) が、天然の DNA 及び RNA と安定な二重鎖を形成することを報告している。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、DNA 及び RNA と安定な二重鎖を形成し、且つ、細胞膜透過能をもつ新規核酸類縁体として、エチレンリンカーにベンゼン環を介して各種塩基を結合させたパイ電子充填型人工核酸、Aromatized Nucleic Acid (ArNA)、の創製及び ArNA を用いた miRNA の機能阻害に関して検証することを目的とする。

(2) これまでに開発された人工核酸は相補鎖、特に、相補 RNA との親和性を向上させる目的で設計されたものであった。本研究で開発する人工核酸 ArNA は、疎水性残基であるベンゼン環を分子の内部に内包させた、これまでに核酸医薬の開発で問題となっていた DDS の機能を分子内部に兼ね備えた革新的な機能性人工核酸である。

## 3. 研究の方法

エチレンリンカーにベンゼンを介して塩基を結合させたヌクレオシドアナログの合成経路を確立する。続いて、アナログのみから成るオリゴマー及びアナログを含む DNA キメラオリゴマーを合成し、その性質を検証する。その後、細胞を用いた実験を行ない得られた結果を化学合成にフィードバックさせる。

## 4. 研究成果

(1) 以下の手順でカップリング反応の基質となるボロン酸誘導体を合成した。(S) -マンデル酸 (1) を出発原料とし、エタノールに溶解後、濃硫酸を少量滴下し、オイルバスを用いて 70 °C に加熱してエステル化を行い、収率 94% で目的とするエステル体 (2) を得た。その後、化合物 (2) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> に溶解し、TfOAc 及び I<sub>2</sub> を添加し反応させることで、目的とするヨード体 (3) を収率 47% で合成した。さらに、ヨード体 (3) をエタノールに溶解し、水素化ホウ素ナトリウムを添加・攪拌することにより還元し、目的とするジオール体 (4) を 98% の収率で得た。その後、化合物 (4) を DMF に溶解させ、イミダゾール存在下、TBDMSCl を添加、室温で攪拌することでシリル化を行い、目的とするシリル保護体 (5) を 98% の収率で合成した。さらに、化合物 (5) を THF に溶解させ -72 °C に冷却した後に、

*n*-BuLi を用いてリチオ化し、続いて、ホウ酸トリメチルを加えて攪拌後、塩酸で処理することで、目的とするフェニルボロン酸誘導体 (6) を収率 74% で合成した。オイル状の化合物 (6) を THF に溶解させ、ピナコールを加えてエステル化することでボロン酸エステル (7) として単離することに成功した。

(2) 以下の手順でカップリング反応を行いアデニン誘導体を合成した。フェニルボロン酸誘導体 (6) を、メタノール:水 = (4:1) に溶解させた後、酢酸銅一水和物、シトシン、TMEDA を加え攪拌することにより、カップリング体 (8) を収率 74% で得ることに成功した。続いて、以下の手順でカップリング体 (8) をアミダイト体へと変換した。まず、アミノ基を保護するために、化合物 (8) をピリジンに溶解させ、BzCl を添加し攪拌することにより、Bz 保護体 (9) を 85% の収率で得た。さらに、水酸基の保護基であるシリル基を除去するために、化合物 (9) を THF に溶解させ、TBAF を加え攪拌することにより、目的とするジオール体 (10) を収率 84% で合成した。引き続き、化合物 (10) をピリジンに溶解させ、DMTrCl を加え攪拌することにより一級水酸基を保護し、目的とするトリチル体 (11) を 96% の収率で得た。その後、化合物 (11) を亜リン酸化試薬と塩基を加え室温で攪拌することにより 75% の収率で目的とするアミダイト体 (12) を合成した。

(3) 以下の手順でカップリング反応を行いシトシン誘導体を合成した。フェニルボロン酸誘導体 (6) をメタノール:水 = (4:1) に溶解させ、酢酸銅一水和物、シトシン、TMEDA を加え、室温で攪拌することにより、カップリング体 (13) を 49% の収率で得ることに成功した。続いて、以下の手順でカップリング体 (13) をアミダイト体へと変換した。まず、アミノ基を保護するために、化合物 (13) をピリジンに溶解させ、BzCl を添加、室温で攪拌することにより、目的とするベンゾイル体 (14) を収率 55% で得た。さらに、水酸基の保護基であるシリル基を除去するために、化合物 (14) を THF に溶解させ、TBAF 添加、室温で攪拌することにより、目的とするジオール体 (15) を 82% の収率で得た。引き続き、ジオール体 (15) をピリジンに溶解させ、DMTrCl を加え、室温で攪拌することにより、一級水酸基に選択的にトリチルを導入し、目的とする化合物 (16) を 99% の収率で合成した。その後、オリゴヌクレオチドの合成のため、アミダイト体の合成を行った。化合物 (16) を亜リン酸化試薬と塩基を加え室温で攪拌することにより、目的とするアミダイト体 (17) を収率 90% で得た。

(4) 以下の手順でアデノシンアナログが結合した固相担体を合成した。化合物 (11) に無水コハク酸と触媒量の DMAP を加え室温で攪拌することで、目的とするスクシニル体を得た。その後、得られたスクシニル体を CPG 樹脂に加えて縮合剤と共に室温で攪拌する

ことにて、目的とする化合物 (11) が結合した CPG 樹脂を合成した (導入率 36  $\mu\text{mol/g}$ )。 (5) 合成したシチジンアナログ、アデノシンアナログを天然型の核酸、DNA 及び RNA、の中央に 3 塩基導入したオリゴマーとアデノシンアナログのみから成るホモポリマーを合成し、その性質を検証した。上述した方法で合成したシチジンアナログ C<sup>b</sup>、アデノシンアナログ A<sup>b</sup> のホスホロアミダイト体を用いて、12mer のオリゴマーを固相ホスホロアミダイト法に従って、DNA/RNA 自動核酸合成機で合成した。相補鎖となる天然の DNA 及び RNA の 12 mer も合成した。アンモニア水で処理することにより、樹脂からの切り出しと保護基の除去を行った。得られた混合物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で生成し目的とするオリゴマーを得た。アナログを含むオリゴマーは合成後、HPLC により、その純度を確認した。天然の DNA 及び RNA の中央にアナログ導入したオリゴマーでは単一のピークが観測されたが、アナログのみから成るオリゴマーでは複数のピークが観測された。これは核酸自動合成機による合成において、アナログ同士のカップリング収率の低下より、短鎖のオリゴマーが生成され、混入しているためであると考えられる。この為、以降、天然の DNA 及び RNA の中央にアナログ導入したオリゴマーを用いてその性質を検証した。

(6) シチジンアナログ C<sup>b</sup>、アデノシンアナログ A<sup>b</sup> を含むオリゴマーの熱的安定性の検証するため、相補鎖と二重鎖を形成させ、50% 融解温度  $T_m$  を測定し、比較した。また、シチジンアナログ C<sup>b</sup>、アデノシンアナログ A<sup>b</sup> を含むオリゴマーの熱力学的安定性を検討するため、van't Hoff plot による関係式を用いて熱力学的パラメータを算出した。天然型 DNA-DNA である duplex 1 と比較して、アナログを導入した DNA-DNA 二重鎖 duplex 2 は、 $T_m$  値が減少し、その差  $T_m$  の値は 7.4 ( $^{\circ}\text{C}$ ) となった。これにより、天然の DNA の中央にアナログを導入することで、二重鎖の熱的安定性が減少することが分かった。その他の熱力学的パラメータを比較すると、アナログを導入した duplex 2 は、自由エネルギーの変化 ( $G^{\circ}_{298}$ ) の絶対値が小さくなっていることから、duplex 2 は duplex 1 よりも、熱力学的にも不安定である。しかし、この熱力学的変化はベンゼン環との疎水性相互作用により、エントロピー的に有利に働いていた。一方、天然型 RNA-RNA である duplex 3 と比較して、アナログを導入した RNA-RNA 二重鎖 duplex 4 は、DNA-DNA 二重鎖の場合と同様に、 $T_m$  値が減少し、その差  $T_m$  の値は 17.2 ( $^{\circ}\text{C}$ ) となった。その他の熱力学的パラメータを比較すると、アナログを導入した duplex 4 は、自由エネルギーの変化 ( $G^{\circ}_{298}$ ) の絶対値が小さくなっていることから、duplex 4 は、duplex 3 よりも、熱力学的にも不安定である。しかし、この熱力学的変化は

ベンゼン環との疎水性相互作用により、エントロピー的に有利に働いていた。続いて、オリゴマーの塩基識別能を検証するために、ミスマッチ塩基対を一か所導入した二重鎖の  $T_m$  値を測定した。その結果、天然型二重鎖と同様にアナログを導入したものにおいても大きく、 $T_m$  値が低下し、強い塩基識別能を有することが分かると共に、アナログは二重鎖内で相補塩基と水素結合していることが明らかとなった。前述したように、アンチセンス法においては、DNA-RNA 二重鎖を形成することが必要である。つまり DNA アナログと天然型相補的 RNA との二重鎖の熱的安定性を検証することが重要である。DNA-RNA 鎖においても、アナログを導入したオリゴマーの塩基識別能を検証するために、それぞれのオリゴマーを用いて、その  $T_m$  値を測定した。その結果、DNA-RNA 二重鎖の熱的安定性は、天然型の duplex 9 とアナログを導入した duplex 10 比較して、 $T_m$  値がそれぞれ、 $42.1^{\circ}\text{C}$ 、 $36.5^{\circ}\text{C}$  となり、その差  $T_m$  は  $5.6^{\circ}\text{C}$  となった。天然型の二重鎖に比べて、アナログを導入すると、その  $T_m$  値は減少、つまり、安定性は低下するが、DNA-DNA 二重鎖、RNA-RNA 二重鎖と比較して、天然型とアナログを導入した二重鎖の  $T_m$  の値は小さくなり、アナログを導入したオリゴマーが DNA-RNA 二重鎖を形成するのに適していることが示唆された。またミスマッチ塩基対を含むものでは、duplex 11、duplex 12 の結果より、共に二重鎖を形成していないことが判明した。しかし天然型の二重鎖よりもアナログを含むものでは、UV-融解曲線の形状から、より大きく  $T_m$  値が低下し、より大きな塩基識別能有することが明らかとなった。

#### 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)

Nakamoto, K. and Ueno, Y.<sup>\*</sup>:  
Diazirine-containing RNA  
photo-crosslinking probes for capturing  
microRNA targets. J. Org. Chem. 79:  
2463-2472, 2014. (査読有)

Iwata, M., Ogata, A., Ito, Y. and Ueno, Y.<sup>\*</sup>:  
Synthesis, thermal stability and  
photochemical properties of DNA  
containing fluorescent biary-type  
nucleoside surrogates. J. Chem. Chem. Eng.  
7: 962-971, 2013. (査読有)

{ その他 }

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上野 義仁 (UENO, Yoshihito)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20250467