

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410182

研究課題名(和文) ヒトアルゴノート2タンパクの機能構造に基づくsiRNAの最適化学構造の探索

研究課題名(英文) Exploration of optimized chemical structure of siRNA based on the functional structure of human argonaute 2 protein

研究代表者

藤井 政幸 (FUJII, Masayuki)

近畿大学・工学部・教授

研究者番号：60199297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によりヒトアルゴノート2タンパクの機能構造に基づくsiRNAの化学修飾によりAgo2によるアンチセンス鎖選択の効率を改善することが可能となること、シグナルペプチドとのコンジュゲートにより細胞内局在化の制御が可能となること、両親媒性ペプチドとの複合体により細胞膜透過性の改善及び細胞内での安定性の向上が可能となることを示すことができた。今後、さらに多様な化学修飾、コンジュゲート、複合体の組み合わせにより、細胞内の標的分子と親和性良く特異的に結合して、副作用なく目指した作用だけを發揮する様な核酸医薬分子の設計に近づくことができると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we could demonstrate that chemical modification of siRNA increased the probability of the selection of antisense strand by Ago2, that conjugation of siRNA with signal peptides made it possible to control the intracellular localization of siRNA, and that non-covalent complexation of siRNA with the designed amphiphilic peptide improved cellular uptake and biological stability of siRNA. By a combination of further chemical modification, conjugation and complexation with a variety of functional molecules, we believe we can design an optimized structure of siRNA therapeutics which can effectively penetrate into cells and bind to the target molecule with a good affinity and specificity, without any side effects.

研究分野：化学

キーワード：核酸化学 遺伝子サイレンシング 化学修飾siRNA アルゴノート2

## 1. 研究開始当初の背景

siRNA や miRNA およびアンチセンス DNA/RNA などの小分子核酸により特定の遺伝子の発現を制御する遺伝子サイレンシング法は医学、分子生物学における研究ツールとして定着し、さらには、新しい医薬としての期待が高まっている。特に siRNA は化学合成により高活性で高品質なものが取得できるため医薬として最も有力な候補と目されている。しかしながら、(1) 細胞内へのデリバリー、(2) 細胞内での安定性、(3) off-target 効果の低減などの課題克服に向けて化学修飾による構造の最適化に関する研究は未だに不十分である。その第 1 の原因は siRNA の関与する RNA 干渉機構の中心的な役割を担うヒトアルゴノート 2 タンパク (hAgo2) の作用機構の解明が不十分であったために、合理的な siRNA の化学構造の最適化が困難なためである。2012 年、hAgo2 の X 線構造解析および作用機構に関する重要な論文が発表され、siRNA の化学構造の最適化に重要な示唆がなされた。(MacRae J. et al, Science 2012, Tomari Y. et al, Nat Struct Mol Biol. 2012) また、当研究室ではペプチドとの機能融合による siRNA の無毒性細胞内デリバリーとサイレンシング効率の向上を達成してきた。すなわち、アルギニンとロイシンの繰り返し配列を持つ両親媒性ペプチド RL<sub>n</sub> は siRNA に対して  $\beta$ -シート構造をとりながら強く結合して、その複合体は毒性なく効率よく細胞膜を透過し、かつ、siRNA をヌクレアーゼ分解から保護すること (Fujii et al., Journal of Peptide Science, 2012)、さらには siRNA のパッセンジャー鎖の 5'-末端に核外輸送シグナル(NES)ペプチドを結合した NES-siRNA コンジュゲートは 95%以上の効率で慢性骨髄性白血病原因遺伝子 bcr/abl を選択的に抑制することを見出している。(Fujii et al., Progress in Drug Delivery Systems, 2011) 本研究では hAgo の機能構造に基づいた siRNA の化学構造の最適化とペプチドとの機能融合による最強の siRNA 分子の構築とデリバリー法の確立により siRNA 医薬の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

(1) MID ドメインの機能構造に基づく 5'-末端修飾による最適 siRNA 化学構造の探索

hAgo2 の MID ドメインはその Lys, Arg 残基により siRNA のガイド鎖 5'-末端のリン酸を認識し、この時点でガイド鎖とパッセンジャー鎖との区別が行われている。(MacRae J. et al, Science 2012) したがって、ガイド鎖 5'-末端をリン酸基 (-電荷) で、パッセンジャー鎖 5'-末端を +電荷または中性グループで修飾することにより、両鎖の区別が最適化され、off-target 効果を解消することができると予想される。ガイド鎖とパッセンジャー鎖の様々な 5'-末端修

飾体を合成し、そのサイレンシング効果を詳細に評価しながら、最適な siRNA 化学構造を探索する。

(2) PAZ ドメインの機能構造に基づく 3'-末端修飾による最適 siRNA 化学構造の探索

hAgo2 の PAZ ドメインは siRNA ガイド鎖 3'-末端を認識し、siRNA の 2 本鎖を解く際、N ドメインがそのくさびの役割をしていることが示唆された。(Tomari Y. et al, Nat Struct Mol Biol. 2012)

すなわち、siRNA のガイド鎖 3'-末端側の解けやすさがその活性に大きく影響することが予想される。当グループがデザインした塩基修飾ヌクレオシド (X) は 2 重鎖核酸のダングリグエンドをスタッキングにより安定化するとともに 2 重鎖中では対面塩基をフリップアウトさせることを見出している。したがって、X を siRNA のガイド鎖 3'-末端オーバーハング部位に組み入れることにより siRNA 二重鎖は解けにくくなり、活性が低下し、反対にガイド鎖 3'-末端近傍の 2 重鎖部分に組み入れることにより siRNA 二重鎖は解けやすくなり、活性が向上すると期待できる。その他の 3'-末端側化学修飾の効果を評価し、最適な siRNA 化学構造を探索すると同時に、hAgo2 の作用機構を検証する。

(3) MID ドメインの機能構造に基づく hAgo-RNA コンジュゲートによる人工 RNAi 装置の創製

hAgo2 の MID ドメインの Lys906 と siRNA のガイド鎖 5'-末端を共有結合でつないだ hAgo-RNA コンジュゲートを合成し、そのサイレンシング効果を詳細に評価しながら、最適な siRNA 化学構造を探索する。siRNA は細胞内でのヌクレアーゼ分解により短寿命であるが、hAgo2 と複合体を形成した後は安定で、ターンオーバーも大きいとされている。hAgo-RNA コンジュゲートはより安定で大きなターンオーバーが期待でき、off-target 効果も完全に解消されるため、優れた人工 RNAi 装置が創製できる。

(4) 両親媒性ペプチド RL<sub>n</sub> による siRNA の無毒性細胞導入法の開発

申請者は両親媒性ペプチド RL<sub>n</sub> による siRNA の細胞導入効率を向上させ、in vivo での応用に供するため、RL<sub>n</sub> と長鎖脂肪酸、PEG、細胞認識糖鎖、ガン細胞特異的リガンドなど各種機能性化合物とのコンジュゲートを合成し、その生化学特性およびサイレンシング効率を評価する。最終的には (1) - (4) の成果をもとに最強の siRNA 分子の構築とデリバリー法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) MID ドメインの機能構造に基づく 5'-末端修飾による最適 siRNA 化学構造の探索

### ①ガイド鎖 5'-末端の修飾

ガイド鎖 5'-末端は MID ドメインのリジン、アルギニン残基に結合するので、-電荷を持つグループが有利である。ガイド鎖 5'-末端を  $-OPO_3^{2-}$ 、 $-COO^-$ 、 $-SO_3^-$  などで修飾した siRNA を化学合成し、従来から行っている hTERT および bcr/abl 遺伝子サイレンシング活性をリアルタイム定量 PCR により評価しながら、リンカーの長さなど最適 siRNA 化学構造を探索する。もしも、これらの修飾により活性の向上が認められない場合にはガイド鎖 5'-末端は未修飾な水酸基とする。

### ②パッセンジャー鎖 5'-末端の修飾

Off-target 効果を回避するためにはパッセンジャー鎖 5'-末端は MID ドメインのリジン、アルギニン残基と反発する +電荷を持つグループからリン酸化できない中性グループで修飾されるほうが有利と考えられる。パッセンジャー鎖 5'-末端をアミノ基、トリメチルアンモニウム基、グアニジル基、メチル基、メチルカルバモイル基等で修飾した siRNA を化学合成し、従来から行っている hTERT および bcr/abl 遺伝子サイレンシング活性をリアルタイム定量 PCR により評価しながら最適 siRNA 化学構造を探索する。

### ③ガイド鎖およびパッセンジャー鎖 5'-末端の修飾

1-1、および 1-2 の結果を踏まえて siRNA の 5'-末端の化学構造を最適化する。これにより、off-target 効果を抑制した特異性の高い siRNA が構築できる。

## (2) PAZ ドメインの機能構造に基づく 3'-末端修飾による最適 siRNA 化学構造の探索

### ①ガイド鎖 3'-末端の修飾

X を siRNA のガイド鎖 3'-末端オーバーハング部位に組み入れることにより siRNA 二重鎖は解けにくくなり、活性が低下すると予想できる。hAgo 中の N ドメインがそのくさびの役割をしているという機構が検証できる。化学合成した siRNA を用いて、従来から行っている hTERT および bcr/abl 遺伝子サイレンシング活性をリアルタイム定量 PCR により評価しながら最適 siRNA 化学構造を探索する。

### ②ガイド鎖 3'-末端近傍の修飾

X、ミスマッチマッチ塩基、脱塩基ヌクレオチド等をガイド鎖 3'-末端近傍に組み入れた siRNA の二重鎖は解けやすくなり、かつ、3'-エクソヌクレアーゼによる分解耐性が向上し、活性が向上すると期待できる。化学合成した siRNA を用いて、従来から行っている hTERT および bcr/abl 遺伝子サイレンシング活性をリアルタイム定量 PCR により評価しながら、最適 siRNA 化学構造を探索する。

### ③ガイド鎖 3'-末端及び近傍の修飾

2-1、2-2 の結果を踏まえてガイド鎖 3'-末端の解けやすさおよびヌクレアーゼ耐性とサイレンシング効果の相関を検証しながら、siRNA の 3'-末端の化学構造を最適化する。

### (3) hAgo-RNA コンジュゲートによる人工 RNAi 装置の創製

hAgo2 の MID ドメインの Lys906 は siRNA のガイド鎖 5'-末端リン酸基に近接している。ガイド鎖 5'-末端をアミノ基と反応するカルボニル基などの官能基で修飾した siRNA を hAgo に取り込ませると、溶液中で自発的に共有結合を形成すると考えられる。Lys906 のアミノ基をガイド鎖 5'-末端と共有結合でつないだ hAgo-RNA コンジュゲートを合成し、その hTERT および bcr/abl 遺伝子に対するサイレンシング効果を詳細に評価しながら、最適 siRNA 化学構造を探索する。siRNA は細胞内でのヌクレアーゼ分解により短寿命であるが、hAgo-RNA コンジュゲートは細胞内でより安定で大きなターンオーバーが期待でき、off-target 効果も完全に解消されるため、優れた人工 RNAi 装置が創製できる。

### (4) 両親媒性ペプチド RL<sub>n</sub> による siRNA の無毒性細胞導入法の開発

両親媒性ペプチド RL<sub>n</sub>-siRNA 複合体は細胞膜をよく透過し、ヌクレアーゼによる分解に対して耐性で、細胞毒性も全くない。その膜透過性を向上させるために長鎖脂肪酸、PEG、細胞認識糖鎖、ガン細胞特異的リガンド、シグナルペプチドなどとのコンジュゲートを化学合成し、その細胞膜透過性、細胞毒性およびサイレンシング効率を評価する。従来から行っている hTERT および bcr/abl 遺伝子に対するサイレンシング活性をリアルタイム定量 PCR により評価しながら、最適 siRNA 化学構造を探索する。

### (5) siRNA-NES コンジュゲートによる細胞内デリバリー制御

申請者らは siRNA のパッセンジャー鎖の 5'-末端に核外輸送シグナル(NES)ペプチドを結合した siRNA-NES コンジュゲートは 95%以上の効率で慢性骨髄性白血病原因遺伝子 bcr/abl を選択的に抑制することを見出している。(Fuji et al., Progress in Drug Delivery Systems, 2011) (4) の RL<sub>n</sub> コンジュゲートと siRNA-NES コンジュゲートとの複合体による siRNA 細胞導入法とサイレンシング効率の最適化を図る。化学合成した RL<sub>n</sub> コンジュゲートと siRNA-NES コンジュゲートとの複合体を用いて細胞膜透過性、細胞毒性および hTERT および bcr/abl 遺伝子に対するサイレンシング活性を共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメトリー、リアルタイム定量 PCR 等により評価しながら、最適 siRNA

化学構造を探索する。

#### (6) 最強の siRNA 分子の構築とデリバリー法の確立

(1) - (5) の結果を総合的に踏まえて、siRNA の化学修飾、NES ペプチドとのコンジュゲート、両親媒性ペプチド RL<sub>n</sub> 及びその誘導体との複合体形成などにより最強の siRNA 分子を構築する。

#### 研究が当初計画通りに進まない時の対応

研究に必要な化学合成、生化学評価、細胞系評価実験のノウハウはすでに確立し、設備も整っている。計画 (1) - (2) からは良くも悪くも何らかの結果が得られるのでその中から良いところ取りをして最適化学修飾を探索したい。計画 (3) には困難が予想されるが、対策として部位特異的変異導入により Cys を組み入れた変異 hAgo2 を作成して、マレインイミド修飾 RNA とのコンジュゲートを合成する。計画 (4)

(5) においてはすでにある程度の成果が得られており、最悪、今回の研究において進展がないにしても、これまでの成果を活用して研究の目的を達成することは可能である。

#### 4. 研究成果

<引用文献>

- ① MacRae J. et al, Science 2012.
- ② Tomari Y. et al, Nat Struct Mol Biol. 2012.
- ③ Fujii et al., Journal of Peptide Science, 2012.
- ④ Fujii et al., Progress in Drug Delivery Systems, 2011.
- ⑤ Fujii and Sugimoto et al., J. Am.Chem.Soc. 2003.
- ⑥ Fujii and Sugimoto et al.,Biochemistry, 2009.

#### 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 14 件)

- ① 藤井政幸、核酸医薬の分子デザイン；化学修飾、コンジュゲート、複合体  
日本薬学会医化学部会 MedChem News、**2016**、26(1), 22-28. 査読有
- ② 藤井政幸、核酸医薬における生物学的分子基盤と核酸分子設計、  
日本核酸医薬学会会報、**2015**、Vol.19, No.1, 7. 査読無
- ③ Yasuhiro Shinkai, Yu Ohno, Hirohumi Fujii, Kanami Akaike, Ayumi Takashina,

Jumpei Ariyoshi, Asako Yamayoshi, Akira Murakami and Masayuki Fujii

Rational Design of siRNA by Chemical Modification and Conjugation, *Proceeding of the 11th Oligonucleotide Therapeutic Society Annual Meeting*, **2015**, 138. 査読有

- ④ Aleksey I. Vladyko, Boris P. Chelobanov, Maxim S. Kupryushkin, Dmitrii V. Pyshnyi, Masayuki Fujii and Dmitry A. Stetsenko, Synthesis, purification and delivery into mammalian cells of phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO) with either DNA or 2'-OMe RNA backbone, *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> International Symposium of Nucleic Acid Chemistry*, **2015**, 244-245. 査読有
- ⑤ Yu Ohno, Kanami Akaike, Yasuhiro Shinkai, Hirohumi Fujii, Ayumi Takashina, Jumpei Ariyoshi, Asako Yamayoshi, Akira Murakami and Masayuki Fujii, Gene Silencing by Chemically Modified siRNAs Bearing Cationic Charge on 5'-End. *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> International Symposium of Nucleic Acid Chemistry*, **2015**, 322-323. 査読有
- ⑥ Yasuhiro Shinkai, Hirohumi Fujii, Yu Ohno, Kanami Akaike, Ayumi Takashina, Jumpei Ariyoshi, Asako Yamayoshi, Akira Murakami and Masayuki Fujii, Gene Silencing by miRNA-like siRNAs Bearing Mismatches and Bulges, *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> International Symposium of Nucleic Acid Chemistry*, **2015**, 324-325. 査読有
- ⑦ Bo Yang, Akiko Jinnouchi, Kazuteru Usui, Tsutomu Katayama, Masayuki Fujii, Hiroshi Suemune, Mariko Aso. Bioconjugation of oligodeoxynucleotides carrying 1,4-dicarbonyl groups via

- reductive amination with lysine residues  
*Bioconjugate Chemistry*, **2015**, 26(8),  
1830-1838. DOI:10.1021/acs.bioconjche  
m.5b00361 査読有
- ⑧ Ayumi Takashina, Hikari Kayano,  
Tomohiro Emi, Kana Murakami, Noriko  
Ogawa, Jumpei Ariyoshi, Asako  
Yamayoshi and Masayuki Fujii.  
CATIONIC CHARGE ON siRNA AND RNAI  
EFFECT, *Proceedings of the XXI Round  
Table on Chemical Biology of Nucleic  
Acids*, **2014**, 143. 査読有
- ⑨ Hikari Kayano, Ayumi Takashina, Madoka  
Naemura, Yojiro Kotake, Yasutaka  
Morita and Masayuki Fujii EFFICIENT  
TRANSFECTION OF siRNA BY DESIGNED  
PEPTIDES. *Proceedings of International  
Symposium of Nucleic Acid Chemistry*,  
**2014**, 374-375. 査読有
- ⑩ Ayumi Takashina, Hikari Kayano,  
Tomohiro Emi, Madaoka Naemura,  
Yojiro Kotake, Jumpei Ariyoshi, Asako  
Yamayoshi, Akira Murakami and  
Masayuki Fujii, Gene Silencing by  
Cationic siRNA, *Proceedings of  
International Symposium of Nucleic Acid  
Chemistry*, **2014**, 328-329. 査読有
- ⑪ Masayuki Fujii and Ayumi Takashina,  
Chemical modification of siRNAs and  
their silencing effects, *Proceedings of the  
9<sup>th</sup> Annual Meeting of the  
Oligonucleotide Therapeutics Society*,  
**2013**, 108. 査読有
- ⑫ Ayumi Takashina and Masayuki Fujii,  
Structure of Human Argonaute2 Protein  
and Chemically Modified siRNA,  
*Proceedings of International Symposium  
of Nucleic Acid Chemistry*, **2013**,  
318-319. 査読有
- ⑬ Ayumi Takashina, Jyunichi Obata,  
Shutaro Fujiaki and Masayuki Fujii,  
Non-Toxic Delivery and Gene  
Silencing by siRNA-Peptide  
Complex. *Biopolymers*, **2013**, 100(3),  
265. DOI: 10.1002/bip.22277 査読有
- ⑭ Nakano, Shu-ichi; Uotani, Yuuki; Sato,  
Yuichi; Oka, Hirohito; Fujii, Masayuki;  
Sugimoto, Naoki, Conformational  
changes of the phenyl and naphthyl  
isocyanate-DNA adducts during DNA  
replication and by minor groove binding  
molecules. *Nucleic Acids Research* **2013**,  
41(18), 8581-8590. DOI:  
10.1093/nar/gkt608. 査読有
- [学会発表] (計32件)
- ① 大野結有、新貝恭広、藤井啓史、柏原  
慎一、苗村円佳、神武洋二郎、山吉麻  
子、村上章、藤井政幸、5' -アミノ T  
を有する siRNA の遺伝子サイレンシン  
グ効果. 日本核酸医薬学会第1回年  
会, 2015年11月30-12月2日、京都テ  
ルサ(京都)
- ② 新貝恭広、藤井啓史、柏原慎一、苗村  
円佳、神武洋二郎、山吉麻子、村上章、  
藤井政幸、ミスマッチまたはバルジ構  
造を有する miRNA 様 siRNA の遺伝子サ  
イレンシング効果. 日本核酸医薬学会  
第1回年会, 2015年11月30-12月2日、  
京都テルサ(京都)
- ③ Yu Ohno, Kanami Akaike, Yasuhiro  
Shinkai, Hirohumi Fujii, Ayumi  
Takashina, Jumpei Ariyoshi, Asako  
Yamayoshi, Akira Murakami and  
Masayuki Fujii, Gene Silencing by  
Chemically Modified siRNAs Bearing  
Cationic Charge on 5' -End. 第42回  
国際核酸化学シンポジウム、2015年9  
月23-25日、イーグルひめじあいめっ  
せホール(姫路)
- ④ Yasuhiro Shinkai, Hirohumi Fujii, Yu  
Ohno, Kanami Akaike, Ayumi Takashina,

Jumpei Ariyoshi, Asako Yamayoshi,  
Akira Murakami and Masayuki Fujii  
Gene Silencing by miRNA-like siRNAs  
Bearing Mismatches and Bulges. 第42  
回国際核酸化学シンポジウム、2015年  
9月23-25日、イーグルひめじあいめっ  
せホール(姫路)

- ⑤ Yasuhiro Shinkai, Yu Ohno, Hirohumi  
Fujii, Kanami Akaike, Ayumi  
Takashina, Jumpei Ariyoshi, Asako  
Yamayoshi, Akira Murakami and  
Masayuki Fujii, Rational Design of  
siRNA by Chemical Modification and  
Conjugation. 11<sup>th</sup> Oligonucleotide  
Therapeutic Society Annual Meeting,  
2015 11 September, Leiden Holland.  
他

〔図書〕(計3件)

- ① 核酸医薬の創製と応用展開(分担執筆)、  
(株)シーエムシー出版、監修 和田 猛、  
2016年2月19日 藤井政幸、第III  
編 DDS 第6章 新規ペプチドによる  
siRNAの無毒性細胞導入 pp.210-217.
- ② 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい  
医薬品・診断薬の開発(分担執筆)、  
(株)技術情報協会、2014年5月30日  
藤井政幸、高科あゆみ、神武洋二郎、  
森田資隆、山田康枝、6章 遺伝子の  
導入・改変技術における適切なプロト  
コールとトラブル回避策 第3節  
siRNAの細胞導入技術 pp.262-267.
- ③ 第4版マクマリー・生物有機化学(共  
訳) J. McMurry, M. Castellion, D.  
Ballantine 著, 菅原二三男監訳, 丸善  
(2013年)  
第3章「生化学エネルギーの発生」  
pp.84-119. 藤井政幸  
第11章「化学メッセンジャー:ホル  
モン、神経伝達物質、薬物」pp.322-351.  
藤井政幸

〔産業財産権〕  
○取得状況(計2件)

①US Patent 9,057,067  
発明の名称: Method for transfecting  
nucleic acid to cell and nucleic acid  
complex

特許権者: 学校法人近畿大学

発明者: 藤井政幸

登録日: 2015年6月16日

国内外の別: 国外

②特許第5738862号

発明の名称: 細胞への核酸導入方法および  
核酸複合体

特許権者: 学校法人近畿大学

発明者: 藤井政幸

登録日: 2015年5月1日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 政幸 (FUJII, Masayuki)

近畿大学・産業理工学部・教授

研究者番号 60199297