

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810083

研究課題名(和文) 完全加水分解耐性をもつトリアゾール連結型RNAを活用した高効率siRNAの開発

研究課題名(英文) Chimeric RNA Oligonucleotides with Triazole and Phosphate Linkages: Synthesis and RNA Interference

研究代表者

藤野 智子 (Fujino, Tomoko)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70463768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：短鎖の二本鎖RNA (siRNA) にを用いたRNA干渉法は、次世代医薬の要の技術として注目されている。その実用化においては、siRNA自身の不安定性や非特異的抑制効果などが問題となっており、これらの化学修飾による克服が重要な課題となっている。本研究では、トリアゾール連結RNAとRNAとのキメラ型多量体を開発し、高効率・簡便合成可能な人工siRNA分子を開発した。量的供給可能な液相合成法とホスホアミダイト固相合成法を組み合わせた手法を確立することで、非天然型連結部の導入位置の異なるsiRNAライブラリを構築し、そのRNA干渉能の網羅的な構造活性相関研究からトリアゾール連結部の許容度を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chimeric RNA oligonucleotides with an artificial triazole linker were synthesized using solution-phase click chemistry and solid-phase automated synthesis. Scalable synthesis methods for joining units for the chimeric structure have been developed, and after click-coupling of the joining units with triazole linkers, a series of chimeric oligonucleotides was prepared by utilizing a well-established phosphoramidite method for the elongation. The series of chimeric 21-mer oligonucleotides that possessed the triazole linker at different strands and positions allowed for a screening study of the RNA interference to clarify the preference of the triazole modifications in small-interfering RNA molecules.

研究分野：生物有機化学

キーワード：siRNA キメラ型多量体 トリアゾール

1. 研究開始当初の背景

短鎖の二本鎖 RNA (siRNA) により標的遺伝子を切断する RNA 干渉法は、次世代医薬の要の技術として注目されている。RNA 干渉法の実用化においては、siRNA 自身の不安定性や非特異的な翻訳抑制効果などが問題となっており、これらを化学修飾により克服することが重要な課題となっている。siRNA の化学修飾では、RNA 分子の加水分解標的部であるリン酸部を排除した設計を施すことが高い化学的安定性を獲得するうえで鍵となるが、これらにおいては酵素活性を阻害しない精巧な分子設計に加え、単量体の簡便な合成法や、多量体合成のための高効率な伸長反応を実現しなければならず、有機合成化学の力量が問われるところとなっていた。

我々は最近、核酸のリン酸部のみをトリアゾール環に置き換えることで完全加水分解耐性をもつ「トリアゾール連結型核酸、^{TL}核酸 (^{TL}DNA・^{TL}RNA, 図 1a)」を開発している。^{TL}核酸は核酸伸長反応に銅触媒アジアルキル付加環化 (CuAAC) 反応を活用することで、1 伸長あたり 85% の高い効率で長鎖多量体を合成することができる。さらに ^{TL}核酸は天然核酸と類似の構造をもつため、天然酵素によって「基質」として認識され、天然核酸の代替物として働くことができる。例えば ^{TL}DNA が逆転写酵素の「開始鎖基質」となることをこれまでに実証してきている。本研究では、^{TL}核酸の特質である「完全加水分解耐性・高効率合成法・酵素基質性」を siRNA の化学修飾法に活用することで、RNA 干渉の抱える問題を解決するための機能性 siRNA 分子を実現することができるとの着想に至った。

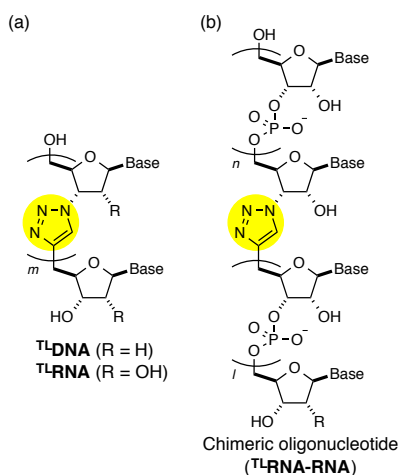


図 1. ^{TL}DNA, ^{TL}RNA, キメラ型多量体の構造

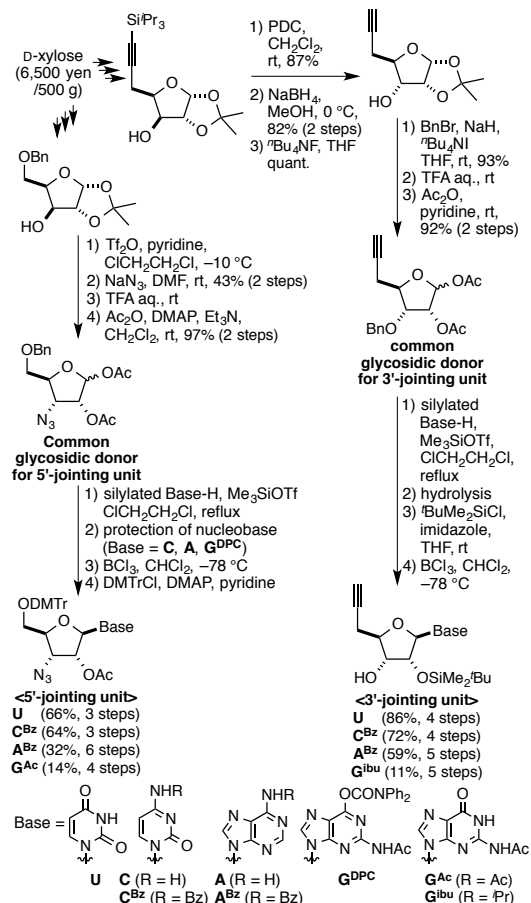
2. 研究の目的

本研究では、天然 RNA 類似の構造と完全加水分解耐性を併せ持つ ^{TL}RNA を siRNA の分子構造に適用することで、高効率・高機能 siRNA 分子の開発を目的とした。siRNA 分子

の開発において鍵となる連結部への改変構造に対する許容度への知見は、合成上の制約により未だ知見の少なく、本研究を遂行することで、siRNA 分子の設計指針を確立することを目指した。生体内で機能性を獲得するためには、^{TL}RNA の中性骨格に由来する溶解性の低さを克服しながら検討を行う必要があり、今回、天然型 RNA と ^{TL}RNA とのキメラ型多量体合成法 (図 1b) を開発し、siRNA ライブラリを構築することで、その網羅的な構造活性研究を行い、未だ知見の少ない siRNA 中での非天然型連結部の導入効果について明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

^{TL}RNA と天然型 RNA との連結用単量体を合成し、^{TL}RNA と RNA のキメラ型多量体を開発した。^{TL}RNA 部の合成においては量的供給が可能な液相合成法を利用し、RNA の伸長においては天然型核酸合成に汎用されるホスホアミダイト固相合成法法を組み合わせることで、簡便・迅速なキメラ型多量体合成法を確立した。この手法をもとに、多様な位置に ^{TL}RNA 部を有するキメラ型多量体ライブラリを構築した。これらを siRNA 分子として用いた RNA 干渉実験における構造活性相関研究を行うことで、^{TL}RNA 部の導入効果を明らかにし、高効率な siRNA 分子を開発するための分子設計指針確立に資する知見を得た。

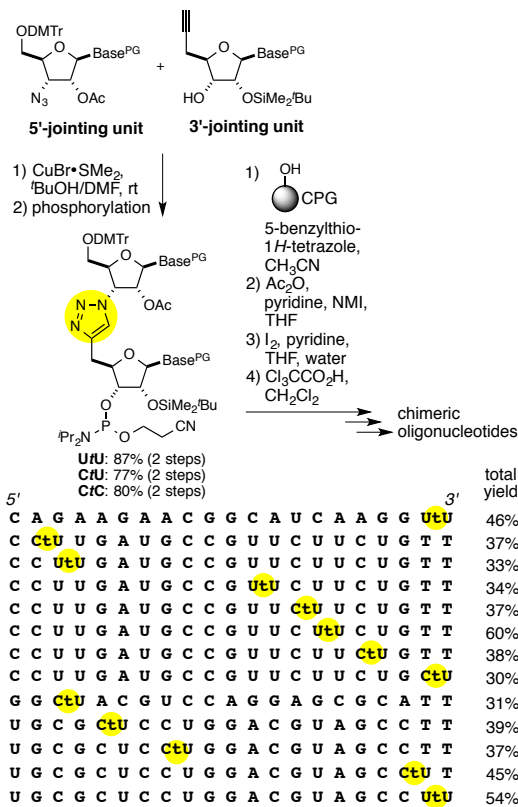


スキーム 1. 5'および3'連結用単量体の合成法

4. 研究成果

(1) ¹¹B-RNA と RNA 間の連結用単量体の開発

¹¹B-RNA 部をホスホアミダイト法のビルディングブロックとして利用するためには、天然型ビルディングブロックと同様、5'末端にジメトキシトリチル保護されたヒドロキシ基をもつ 5'-連結用単量体と、3'位にホスホアミダイト基への誘導が可能なヒドロキシ基を有する 3'-連結用単量体が必要となる。今回、両者を 4 種の核酸塩基を用いて合成した。安価な D-キシロース (6500 円/500 g, wako pure chemical) からそれぞれ 4 種の核酸塩基に共通となる糖供与体のワンバッチ 100 g スケールでの合成法を開発した (スキーム 1)。これらに対し、4 種の核酸塩基をそれぞれ活性化して導入し、各種保護基の導入・脱保護を行うことで、合計 8 種の単量体をいずれも高収率・高選択的に得ることができた。



スキーム 2. キメラ型多量体の合成法

(2) キメラ型多量体ライブラリの構築

5'-連結用単量体と 3'-連結用単量体を組み合わせたジヌクレオチド 3 種を CuAAC 反応、つづくホスホアミダイト化により合成し、これをビルディングブロックとした RNA 伸長を行った (スキーム 2)。RNA 伸長においては、天然核酸合成用の核酸自動合成機によるホスホアミダイト合成法をそのまま適用することができ、高効率に 21 量体を得ることができた。この手法を用いて、トリアゾール

連結ジヌクレオチドの導入位置の異なる 13 種のキメラ型 21 量体を迅速・簡便に合成することができた。

(3) キメラ型 ¹¹B-RNA-RNA の遺伝子干渉能の評価

合成したキメラ型 21 量体ライブラリを siRNA 分子として用いた遺伝子干渉能の評価を行った。キメラ型多量体は siRNA のパッセンジャー鎖とガイド鎖のいずれかに用い、もう一方は天然型 RNA とした二重鎖を形成した。この siRNA 二重鎖と EYFP プラスミド、コントロールとして tagRFP プラスミドを共に HeLa 細胞に導入し、48 時間後に EYFP mRNA の発現量が抑制されているかどうかを qRT-PCR を用いて定量的に明らかにした。その結果、パッセンジャー鎖にトリアゾール部を導入した場合は天然型 siRNA と同様の抑制効果が得られたのに対し、ガイド鎖に導入した場合は、その導入位置により抑制効果が異なることがわかった (図 2a)。オーバーハング領域である 3'末端付近では天然型と同等の抑制効果を示したのに対し、5'末端側 (上流部) では顕著な効果を示さなかった。5'末端から 1-8 番目に位置する上流部はシード領域と呼ばれ、結晶構造解析からも、シード領域内の全てのリン酸部がアルゴノートタンパクと水素結合形成をしていることからタンパクによる認識が厳密であることが示唆されていた。一方で、トリアゾール部がシード領域の隣の 8-9 番目に位置する場合、興味深いことに一定の抑制効果を示すことが明らかとなった。これらの抑制効果はその翻訳後のタンパク発現量からも確認できた (図

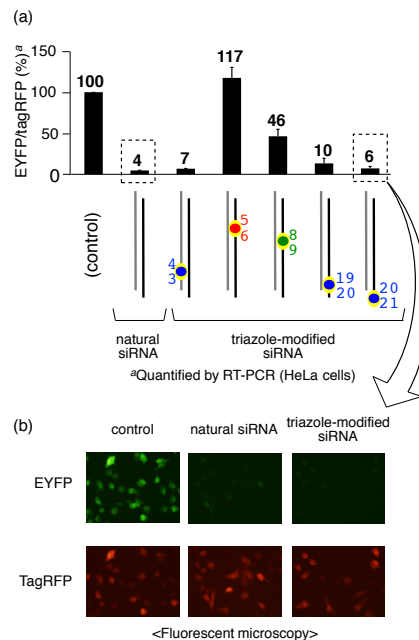


図 2. キメラ型多量体の遺伝子干渉能の評価。(a) RT-PCR による mRNA 発現レベルの評価。(b) EYFP タンパクの発現レベルを示す蛍光顕微鏡写真。

2b). 以上のことから, siRNA 中の非天然型のトリアゾール連結部のアルゴノートからの許容度は, その導入位置に依存し, パッセンジャー鎖とガイド鎖の一部において良好な遺伝子抑制効果を示すことを明らかにした. これまでガイド鎖に許容されるリン酸部改変型人工核酸はごく限られていたが, 今回簡便な人工 RNA 合成法を確立したことで, 導入位置による網羅的な構造活性相関研究解析が可能となり, 効率的な siRNA 分子を見出すことができた. これらの成果は機能性 siRNA 分子を開発する上で新しい設計指針を示すものであるとともに, siRNA 分子に限らず, 多様な機能性生体分子に活用可能であることから, 生化学分野における様々な応用研究へと展開できるものと期待している.

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 2 件)

(1) Fujino, T.; Kogashi, K.; Okada, K.; Mattarella, M.; Suzuki, T.; Yasumoto, K.; Sogawa, K.; Isobe, H. Chimeric RNA Oligonucleotides with Triazole and Phosphate Linkages: Synthesis and RNA Interference, *Chem.-Asian J.* **2015**, *10*, 2683-2688 (doi: 10.1002/asia.201500765)

(2) Fujino, T. Cyclic Dinucleotide and Its Analogues: Synthesis and Function, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2015**, *73*, 278-279 (doi: 10.5059/yukigoseikyokaishi.73.278)

[学会発表] (計 12 件)

うち招待講演 1 件, 国際学会 3 件

(1) 坂本ちか, 阿部博弥, 伊野浩介, 藤野智子, 磯部寛之, 珠玖仁, 末永 智一, 電気化学クリック反応を用いた TLDNA の合成公益社団法人電気化学会第 83 回大会, 2016.3.29-31, 大阪大学 (大阪府吹田市)

(2) 鈴木建, 藤野智子, 岡田滉大, 磯部寛之, 非天然トリアゾール連結部を用いたタンパク質 翻訳用 mRNA の開発研究日本化学会第 96 春季年会, 2016.3.24-27, 同志社大学 (京都府京田辺市)

(3) 古樫加奈子, 藤野智子, 岡田滉大, Martin Mattarella, 鈴木建, 安元研一, 十川和博, 磯部寛之, トリアゾール連結部を導入した RNA キメラによる RNA 干渉, 日本化学会第 96 春季年会, 2016.3.24-27, 同志社大学 (京都府京田辺市)

(4) 藤野智子, トリアゾール連結核酸: 合成と機能, 「天然物ケミカルバイオロジー: 分子標的と活性制御」地区ミニシンポジウム, 2016.3.8, 東京農工大学 (東京都小金井市),

[招待講演]

(5) Tomoko Fujino, Naomi Yamazaki, Kenichi Yasumoto, Kenta Endo, Kodai Okada, Nobuyuki Tsunaka, Ai Hasome, Kazuhiro Sogawa, Hiroyuki Isobe, Triazole-linked analogs of DNA and RNA (¹¹DNA and ¹¹RNA): Synthesis and functions, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015.12.15-20, ホノルル (アメリカ, ハワイ州)

(6) 古樫加奈子, 藤野智子, 岡田滉大, 鈴木建, 安元研一, 十川和博, 磯部寛之, リン酸・トリアゾール連結 RNA キメラ: 合成と RNA 干渉, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015, 2015.10.13-15, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

(7) 鈴木建, 岡田滉大, 藤野智子, 磯部寛之, トリアゾール連結 RNA を活用した翻訳用 mRNA の合成, 第 50 回天然物化学談話会, 2015.7.1-3, グリーンピア岩沼モンタナリゾート (宮城県岩沼市)

(8) 古樫加奈子, 藤野智子, 岡田滉大, Martin Mattarella, 鈴木建, 安元研一, 十川和博, 磯部寛之, トリアゾール連結 RNA と天然 RNA のキメラ型多量体の合成, 第 50 回天然物化学談話会, 2015.7.1-3, グリーンピア岩沼モンタナリゾート (宮城県岩沼市)

(9) 古樫加奈子, 藤野智子, 山崎直美, 磯部寛之, トリアゾール連結 RNA と天然 RNA のキメラ型多量体の合成, 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会, 2015.6.10-12, 東北大学 (宮城県仙台市)

(10) 藤野智子, 山崎直美, 安元研一, 羽染愛, 十川和博, 磯部寛之, トリアゾール連結型核酸の合成と機能, 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会, 2015.6.10-12, 東北大学 (宮城県仙台市)

(11) 古樫加奈子, 藤野智子, Martin Mattarella・山崎直美・磯部寛之, トリアゾール連結 RNA と天然 RNA のキメラ型多量体合成法の開発, 第 25 回基礎有機化学討論会, 2014.9.7-9, 東北大学 (宮城県仙台市)

(12) 鈴木建・藤野智子・磯部寛之, クリック化学を利用したオリゴチオフェン自在配列法の開発, 2014.9.7-9, 第 25 回基礎有機化学討論会, 2014.9.7-9, 東北大学 (宮城県仙台市)

[図書] (計 1 件)

クリック伸長による人工オリゴヌクレオチドの合成, 藤野智子, 磯部寛之, クリックケミストリー -基礎から実用まで-, シーエムシー出版, 2014 年 8 月 1 日

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2件）

（1）名称：アジド基を有するリボクレオシド類縁体及びその製造方法、並びに該類縁体から形成されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体

発明者：磯部寛之，藤野智子，古樫加奈子

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2015/055405

出願年月日：2015年2月25日

国内外の別：国外

（2）名称：トリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むオリゴリボヌクレオチド類縁体を用いるポリペプチドの製造方法

発明者：磯部寛之，藤野智子，岡田滉大，鈴木建

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-011356

出願年月日：2015年1月23日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.orgchem2.chem.tohoku.ac.jp/Main/Top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤野 智子 (FUJINO, TOMOKO)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：70463768

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし