

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04633

研究課題名(和文) 化学反応性人工核酸を用いたRNAの特異的化学修飾と人工的編集の研究

研究課題名(英文) Chemically reactive oligonucleotides for site-specific modification of RNA and artificial RNA editing

研究代表者

佐々木 茂貴 (Sasaki, Shigeki)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10170672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNAとハイブリッド錯体を形成することにより官能基を転移させ、部位特異的および塩基特異的に化学修飾する人工核酸を展開し、RNAレベルで遺伝子制御を行う斬新なバイオツールへの展開を目指した。その結果、RNAリボース水酸基の化学修飾法を新たに確立し、光アシル化のためインドリン誘導体を合成した。さらに、これらの人工核酸によるmRNAの部位特異的な化学修飾の翻訳に与える効果を調べるため、短鎖ペプチドをコードするmRNAを用いて非細胞系翻訳システムによるペプチド合成系を確立した。本研究の成果は、さらにRNAを標的とする遺伝子発現制御法開発の基盤となる重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at the development of the oligodeoxynucleotides to selectively modify RNA with a high base- and sequence selectivity, and their application to regulate gene the translation.As a result, a selective acylation of the 2'-hydroxy group of the RNA molecules has been achieved by the reactive oligonucleotide incorporating a new nucleobase analog as a catalyst of the acyl transfer.In addition, new nucleoside analogs have been contracted with the indolin skeleton, which were incorporated into the oligonucleotides for the selective acylation of the amino group of RNA bases by the activation of photo-irradiation.n order to evaluate the effect of the modification of RNA base, non-cell translation system has been established based on the use of synthesized mRNA, in which produced peptides are easily analyzed by gel-analysis as well as MS measurement. In conclusion, this study has successfully established oligonucleotide basis for the artificial regulation of gene expression.

研究分野：核酸化学

キーワード：遺伝子発現制御 RNA DNA 人工核酸 オリゴヌクレオチド 部位特異的RNA修飾

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報は mRNA からタンパク質に翻訳されて機能が発現するが、ヒト全ゲノムの 97% 以上を占める非コード領域から転写される ncRNA が、タンパク質の発現と機能を精密に制御していることが明らかにされ、大きな反響を呼んでいる(図 1)。発生や分化および恒常性維持においても ncRNA は中心的な役割を担っている。また、その異常は癌などの疾患と密接に関連することから、革新的な創薬・治療法開発のフロンティアとして期待されている[3]。このような背景から、様々な機能の RNA を標的とする斬新な機能性分子(バイオツール)の開発が強く望まれている。

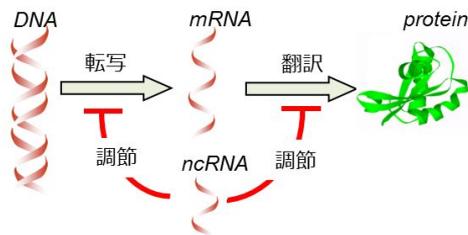


図1. ncRNAを組み入れた遺伝子発現のセントラルドグマ

2. 研究の目的

DNA のシトシン 5 位メチル化や、100 種類以上の修飾 RNA 塩基など、核酸の構造と機能は種々の化学修飾によって精密に制御されている。これまで、化学合成された修飾 RNA を用いて詳細な構造機能相関が明らかにされてきた。我々は、生体内で RNA を選択的に化学修飾できれば、RNA 研究の斬新な分子ツールになり、さらには RNA レベルでの遺伝子制御剤となり得るものと期待し、機能性人工核酸の研究を展開している。オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)は標的 RNA に対する特異的配列が理論的に設計でき、容易に合成できる。そこで、我々は、ODN に反応性官能基を搭載し、RNA とハイブリッド複合体を形成することによって、官能基が RNA の標的塩基に転移する反応を立案した(図 2)[3]。具体的には、ケトビニル基を導入

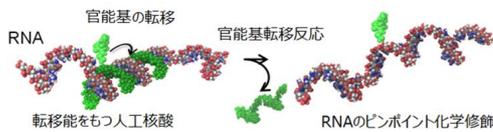


図 2. これまで確立した官能基転移反応による RNA 化学修飾法の概念図

した 6-チオグアノシン体を設計し、アミノ基によるマイケル付加反応、その後の逆マイケル反応によるチオグアノシン体の脱離を経て官能基をアミノ基に転移させる。これまで、ジケトン型転移基を用いて、中性でシトシン-4-アミノ基、塩基性でグアニン-2-アミノ基を配列特異的に化学修飾することに成功し、分子設計の有効性を実証した。さらに金属カチオンによる誘起反応性転移基(ピリジンケト

ビニル基)は、高い反応性と塩基特異性を持ち、なお且つ、高い安定性が得られているため、細胞内での利用が期待される(図 3)[4]。本研究では、これまで確立した官能基転移核酸による RNA の特異的修飾技術を革新的なバイオツールとしての展開するため、標的塩基の拡張、アシル化反応の開発、修飾 RNA の翻訳への効果、について検討する。

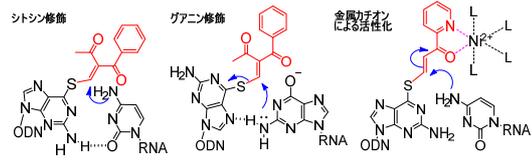


図3.これまで決定した転移基による塩基修飾

[1] Maass, P.G., Luft, F. C. Bähring, *J. Mol. Med.* **92**, 337 (2014).

[2] Sasaki, S., Onizuka, K., Taniguchi, Y., *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5698–5706 (2011).

[3] Gibb, E. et al, *Mol. Cancer*, **10**, 38. (2011).

[4] Jitsuzaki, D. et al, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8808. (2014).

3. 研究の方法

(1) 標的塩基の拡張 官能基転移核酸の概念を拡張し、金属イオンにより活性化されるピジジンケト型転移基を用いて、転移反応の標的塩基をアデニンおよびグアニンに拡張する(図 4)。さらに、新規の転移反応として、リボース-2'-水酸基への転移反応を検討し、特異的アシル化反応を開発する(図 5)。

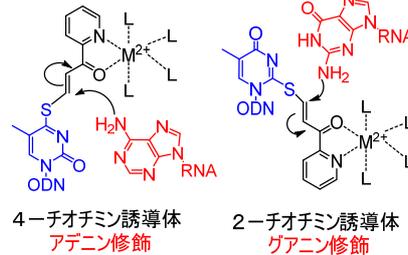


図 4. 標的塩基の拡張

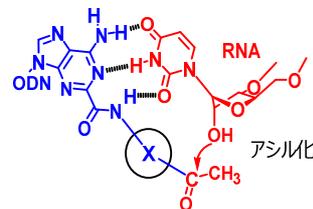


図5. 2' 水酸基の選択的アシル化反応

(2) N-アシル化反応の開発 4-N-アシル化シトシンを水中でルイス酸処理すると効率的に脱アミノ化が進行することを見出した。そこで、シトシンの-N-アシル化能を持つ、光誘起アシル転移反応を開発する(図 6)。

(3) 修飾 RNA の転写および翻訳反応への効果 官能基転移反応のバイオツールとしての機能を確立するため、まず試験管内実験で、多様な分子修飾 RNA の逆転写、翻訳反応への効果を調べる(図 7)。

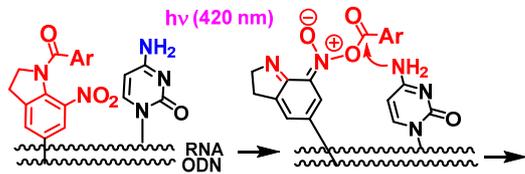


図6. 光誘起アシル転位反応の設計

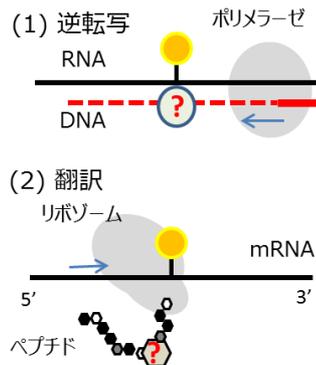


図7. 非細胞翻訳系によるmRNA化学修飾の効果検証

4. 研究成果

(1) 標的塩基の拡張 天然 TA 塩基対類似の錯体形成を経たアデニン選択的修飾反応を期待して 4-チオチミン基本骨格に化学的安定性と金属カチオンによる活性化能を期待し、ピリジンケトン型転移基を導入した(図4)。これらプローブを用い、標的部位にアデニンを持つ相補鎖 RNA に対する転移反応性を評価したところ、中性条件、金属カチオン共存下において、特に、二価銅カチオンが共存するとき反応は非常に速く 5 分以内に終結した。金属カチオン非添加の場合も反応は進行したが、EDTA を添加すると全く反応が進行しなかったことから、緩衝液中に存在する極微量な金属カチオンですら反応加速効果が得られることが示唆された(図8)。一方、他の塩基に対してはほとんど反応性を示さず、高いアデニン選択性を示した。

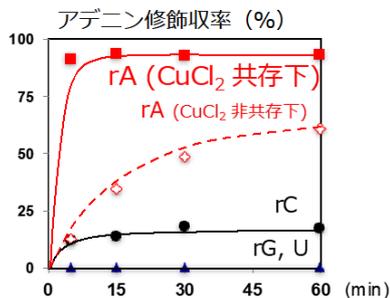


図8. 4-チオチミン官能基転移核酸によるアデニン修飾反応

リボース-2'-水酸基の部位特異的アシル化反応を実現するためアシル化触媒基をプリン2位にカルボキサミド基として導入した。無水酢酸は触媒基と反応し活性化されると同時に、水酸基に近接すると期待した(図5)。ピリジン触媒基の場合、最も反応性が高く、アシル化は人工塩基と対となるヌクレオシ

ドの3'側で起こっていた。一方、ヒスタミンを触媒基に導入した場合は、人工塩基と対となるヌクレオシドの水酸基がアセチル化されていることが分かった。

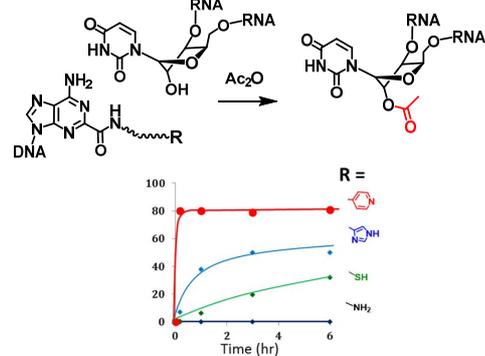


図9. 部位特異的リボース2'-水酸基アシル化反応

(2) N-アシル化反応の開発 N-アシル化反応の開発 (図10)

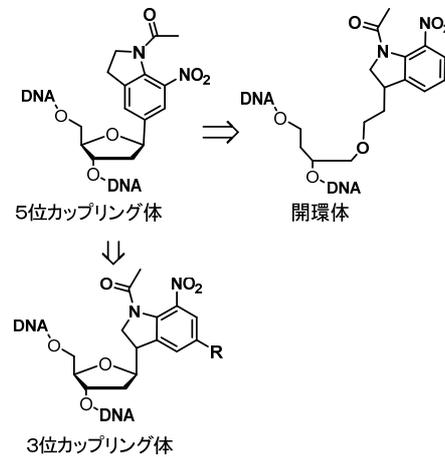
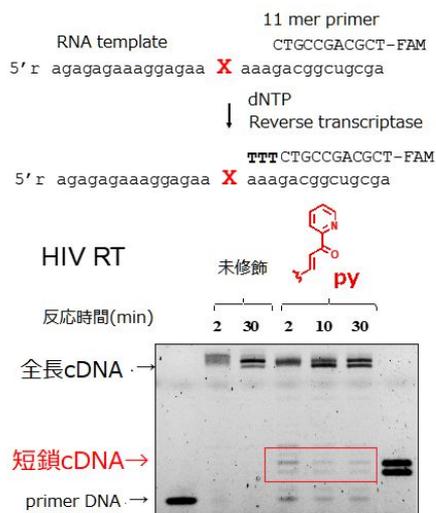


図10. 光誘起アセチル化反応剤の開発

N-アセチル-7-ニトロインドリン誘導体は光照射(365 nm)による活性化によってアシル基がニトロ基酸素原子に転位し活性化され、アミンによる求核攻撃によってアミドが生成する。そこで、合成容易さを考慮し5位カップリング体を合成し、オリゴヌクレオチドに組み込み光アシル化反応を行った。ニトロインドリン体はニトロソインドール体に変化し、光活性化が起こっていることが示唆されたが、目的のアシル化は観測されなかった。そこで、反応部位を柔軟にした開環体およびプリン塩基と類似配座を期待した3位カップリング体を新たに合成し、オリゴヌクレオチドに組み込み光アシル化反応を検討した。開環体では光架橋体が生成したが、3位カップリング体ではアシル転位が認められた。

(3) 修飾RNAの転写および翻訳反応への効果 官能基転移核酸によるアデニン塩基部位特異的修飾を施した RNA に対して HIV、MLV を起源とする逆転写酵素で cDNA 伸長反応を行った。修飾位置で一部伸長反応が停止し短鎖 cDNA が生じるが、反応時間を長くすると全長の cDNA が産生していること

から、ピリジンモノケト型転移基は逆転写反応を阻害せず、一時的に遅延させていると考えられる(図11)。



つ 図11. 修飾RNAの逆転写反応に対する効果 tagを有する短いペプチドをコードする131塩基からなる合成 mRNA を用いて、非細胞翻訳系で翻訳を行った。修飾により短いペプチドや、アミノ酸組成が変化したペプチドが産生された場合、タグを利用することにより容易に解析できると期待した。官能基転移反応によりタグ間のシトシンをピリジニルケト基で修飾した RNA を大腸菌由来無細胞再構築系の細胞抽出液に加え、37 で2時間翻訳反応を行った。その結果、本翻訳反応では T7-tag 部は翻訳されるものの Flag-tag 部分は翻訳されず、短いペプチドが産生されていることが示唆された。

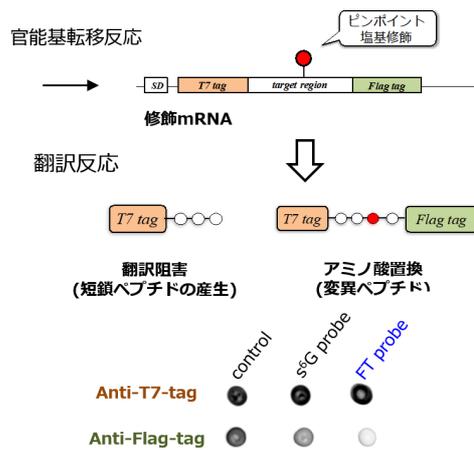


図12. 非細胞翻訳系における化学修飾mRNAの効果

結論として、本研究では mRNA の特定の部位を標的に効果的に化学修飾する手法を検討し、シチジンおよびアデニン塩基部位の特異的修飾法、リボース水酸基の特異的アシル化法、および光活性化アシル化法の開発に成功した。mRNA の部位特異的な化学修飾は翻訳への効果が期待されるものであり、本研究では非細胞系による評価法を確立した。

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 11 件)

原著論文

1. Kawara K., Tsuji G., Taniguchi Y., Sasaki S. Synchronized Chiral Induction Between [5] Helicene-Spermine Ligand and B-Z DNA transition, *Chemistry - A European Journal* **23**(8), 1763-1769 (2017).
2. Okamura H., Taniguchi Y., Sasaki S., Aminopyridinyl-pseudodeoxycytidine derivatives selectively stabilize antiparallel triplex DNA with multiple CG inversion sites. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**(40), 12445-12449 (2016).
3. Fuchi Y., Fukuda T., Sasaki S., Synthetic Receptor Molecules for Selective Fluorescent Detection of 8-oxo-dGTP in Aqueous Media, *Org. Biomol. Chem.* **14**, 7949-7955 (2016).
4. Koda H., Brazier J., Onishi I., Sasaki S., Strong Positive Cooperativity in Binding to the A3T3 Repeat by Hoechst 33258 Derivatives Attaching the Quinoline Units at the end of a Branched Linker, *Bioorg. Med. Chem.* **23**(15), 4583-4590 (2015).
5. Kikuta K. Haishun P. Brazier J. Taniguchi Y. Onizuka K. Nagatsugi F. Sasaki S. Stabilization of the i-motif structure by the intrastrand cross-link formation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**(16), 3307-3310 (2015).
6. Oshiro I. Jitsuzaki D. Onizuka K. Nishimoto A. Taniguchi Y. and Sasaki S. Site-specific modification of the 6-amino group of adenosine in RNA by an inter-strand functionality-transfer reaction using an S-functionalized-4-thiothymidine, *ChemBioChem*, **16**(8), 1199-1204 (2015).
7. Fuchi Y., Obayashi H. and Sasaki S. Development of New 1,3-Diazaphenoxazine Derivatives (ThioG-Grasp) to Covalently Capture 8-Thioguanosine, *Molecules*, **20**(1), 1078-1087 (2015).

総説・解説

8. 佐々木茂貴, 核酸医薬品の新しい潮流, *MedChemNews 日本薬学会医薬化学部会*, 2016年1月.
9. 佐々木茂貴, ファインケミカルシリーズ 核酸医薬の創製と応用展開 監修: 和田猛 第6章 インテリジェント人工核酸 クロスリンク核酸・官能基転移核酸、シーエムシー出版、2016年2月.
10. 佐々木茂貴, ヒトゲノム情報を活用する創薬、*学士会会報* 2016年07月
11. 佐々木茂貴, CSJ Current Review 医療・診断・創薬の化学 医療分野に挑む革新的な化学技術 第10章

イオ医薬品（抗体医薬・核酸医薬）の
最前線、日本化学会、2017年9月。

〔学会発表〕(計 40 件)

1. 北崎健太郎、高崎隼颯、谷口陽祐、佐々木茂貴、RNA 糖部 2'位 OH 基を配列特異的に修飾する人工核酸の開発、日本薬学会第 138 回年会、2018.03.26.
2. 真方祐哉、谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、3 本鎖 DNA 中の TA 塩基対の認識を目指した C-ヌクレオシドの合成と 3 本鎖形成能評価、日本薬学会第 138 回年会、2018.03.26.
3. 菊田健司、Jan BARTA、谷口陽祐、佐々木茂貴 光誘起能をもつ RNA アシル化反応の検討、日本薬学会第 138 回年会、2018.03.26.
4. Yasufumi Fuchi, Takashi Fukuda, Shigeki Sasaki, Specific Sensor Molecules for 8-oxo-dGTP in Aqueous Media using Cyclen-Metal Complexes、IRCCS-JST CREST Joint Symposium, Fukuoka, 2018.01.26.
5. 北崎健太郎、高崎隼颯、谷口陽祐、佐々木茂貴、糖部 2' 位 OH 基を配列特異的に修飾する人工核酸の開発、第 34 回日本薬学会九州支部大会、熊本、2017.11.26.
6. Yasufumi Fuchi, Takashi Fukuda, Shigeki Sasaki, Specific Detection of 8-oxo-dGTP in Aqueous Media using Cyclen-Metal Complexes、The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, 2017.11.14-16.
7. Kenji Kikuta, Jan Barta, Yosuke Taniguchi, Shigeki Sasaki、An Attempt to Photo-induced RNA Acetylation by Oligonucleotides Containing 1-Acetyl-7-nitroindolines, The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, 2017.11.14-16.
8. 谷口陽祐、岡村秀紀、王磊、佐々木茂貴、CG 塩基対を選択的に認識する擬シチジン誘導体の合成と 3 本鎖 DNA 形成能の機能評価、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、富山、2017.11.07.
9. 淵靖史、福田高志、佐々木茂貴、サイクレンー金属錯体による水中での 8-oxo-dGTP 特異的検出分子の開発、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、富山、2017.11.07.
10. 菊田健司、朴海順、John Brazier、鬼塚和光、永次史、谷口陽祐、佐々木茂貴、誘起反応性アルキル架橋剤を用いた mRNA のアンチセンス阻害と i-motif の安定化、日本核酸医薬学会第 3 回年会、札幌、2017.07.12.
11. 北崎健太郎、高崎隼颯、谷口陽祐、佐々木茂貴、RNA 糖部 2'位の OH 基を位置特異的に修飾する人工核酸の開発、第 54 回化学関連支部合同九州大会、北九州 2017.07.01.
12. 淵靖史、福田高志、佐々木茂貴、蛍光性金属錯体分子を用いた水中における 8-oxo-dGTP の特異的検出、日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会、札幌、2017.06.07-09.
13. 淵靖史、福田高志、佐々木茂貴、水中で 8-oxo-dGTP を特異的に検出する系抗生金属錯体分子の開発」第 2 7 回万有福岡シンポジウム、福岡、2017.06.03.
14. 佐々木茂貴、薬学会賞受賞講演：ゲノム標的化学の展開による機能性分子の創成 日本薬学会第 137 回年会、仙台 2017.03.26.
15. 大城郁也、松本卓也、實崎大地、谷口陽祐、佐々木茂貴、RNA 部位特異的修飾能を持つ官能基転移核酸の開発と遺伝情報制御法への応用、日本薬学会第 137 回年会、仙台 2017.03.25-26.
16. 松本卓也、大城 郁也、實崎 大地、谷口陽祐、佐々木茂貴、長鎖 mRNA に対する部位特異的修飾を利用した翻訳制御の評価、日本薬学会第 137 回年会、仙台 2017.03.25-26.
17. 菊田健司、谷口陽祐、佐々木茂貴、クロスリンクを RNA 部位特異的に形成する人工核酸の開発と翻訳制御の検討、日本薬学会第 137 回年会、仙台 2017.03.25-26.
18. 高崎隼颯、羽田野友里恵、谷口陽祐、佐々木茂貴、RNA の 2' 位水酸基を配列特異的に修飾する人工核酸の開発、第 3 3 回日本薬学会九州支部大会、2016.12.03.
19. 福田 高志、淵靖史、佐々木茂貴、長寿命蛍光による 8-oxo-dGTP 検出を目指したランタノイド錯体の開発、第 3 3 回日本薬学会九州支部大会、2016.12.03.
20. 谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、アンチパラレル型 3 本鎖 DNA 形成可能な擬シチジン誘導体の開発と遺伝子発現制御法への展開、日本核酸医薬学会第 2 回年会、2016.11.15.
21. 菊田健司、谷口陽祐、佐々木茂貴、クロスリンク核酸による mRNA の化学修飾と翻訳への影響、第 42 回反応と合成の進歩シンポジウム、2016.11.07.
22. 佐々木茂貴、ゲノム標的化学による創薬研究、薬学シンポジウム 2016 有機化学の先進的ビジョン、2016.10.17.
23. 佐々木茂貴、核酸医薬の現状と話題、医学工学フォーラム、2016.10.03.
24. 福田 高志、淵靖史、佐々木茂貴、8-oxo-dGTP を特異的に認識する蛍光性ランタノイド分子の開発、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016.07.02.
25. 高崎隼颯、羽田野友里恵、谷口陽祐、

- 佐々木茂貴, RNA の 2' 位水酸基を配列特異的に修飾する人工核酸の開発, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 2016.07.02.
26. 佐々木茂貴, 核酸医薬の臨床実用化に向けて現状から見えること, 第 32 回日本 D D S 学会学術集会, 2016.07.01.
27. 瀧靖史, 佐々木茂貴, 酸化損傷ヌクレオチド 8-oxo-dGTP の特異的検出を目指した亜鉛錯体分子の開発, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会, 2016.06.17.
28. 菊田健司, 谷口陽祐, 佐々木茂貴, 自己活性化をもつピリミジン型クロスリンク核酸の開発, 日本薬学会第 136 回年会, 2016.03.26.
29. 大城郁也, 實崎大地, 松本卓也, 谷口陽祐, 佐々木茂貴, 塩基・部位特異的 RNA 化学修飾能を持つ官能基転移核酸による遺伝情報制御法の開発, 日本薬学会第 136 回年会, 2016.03.26.
30. 瀧靖史, 福田高志, 佐々木茂貴, 細胞中検出を目指した 8-oxoGTP 特異的認識分子の開発, 日本薬学会第 136 回年会, 2016.03.26.
31. 高崎 隼颯, 羽田野 友里恵, 谷口陽祐, 佐々木茂貴, RNA の 2' 位水酸基を修飾する官能基転移核酸の開発, 第 32 回日本薬学会九州支部大会, 2015.11.28.
32. 佐々木茂貴, 高い選択性と反応性を有するインテリジェント人工核酸の開発, 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 2015.11.30.
33. 谷口陽祐, 岡村 秀紀, 佐々木茂貴, 人工核酸導入オリゴヌクレオチドによる遺伝子転写阻害法の開発研究, 第 33 回メディスナルケミストリーシンポジウム, 2015.11.25.
34. 菊田健司, 朴海順, John Brazier, 鬼塚和光, 永次史, 谷口陽祐, 佐々木茂貴, 鎖内クロスリンク形成による i-motif の安定化, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015.09.10.
35. 大林秀都, 瀧靖史, 佐々木茂貴, 水素結合錯体形成を介した効率的な 8 - チオグアノシン捕捉反応分子の開発, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015.06.27.
36. 菊田健司, 朴海順, John Brazier, 鬼塚和光, 永次史, 谷口陽祐, 佐々木茂貴, 鎖内クロスリンク反応を用いた i-motif の安定化, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015.06.27.
37. 瀧靖史, 大林秀都, 佐々木茂貴, 選択的 8 位酸化グアノシン捕捉モデル分子 "Grasp" 誘導体の開発, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 10 回年会, 2015.06.10.
38. 谷口陽祐, 尹貽貞, 和田真由子, 佐々

木茂貴, 遺伝子修復酵素特異的結合を目指した酸化損傷塩基類似体の開発, 日本ケミカルバイオロジー学会 第 10 回年会, 2015.06.10.

39. 岡村 秀紀, 谷口陽祐, 佐々木茂貴, 3 本鎖 DNA 中の CG 塩基対を選択的に認識する擬シチジン誘導体の合成と機能評価, 第 13 回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2015.05.22.
40. 大城郁也, 實崎大地, 西本篤史, 鬼塚和光, 谷口陽祐, 佐々木茂貴, 金属応答性ピリミジン型機能性核酸を用いたアデニン選択的 RNA 修飾法の開発, 第 25 回万有福岡シンポジウム, 2015.05.16.

〔図書〕(計 3 件)

1. 佐々木茂貴, スタンダード薬学シリーズ I I 3 I I 生体分子・医薬品の化学による理解 日本薬学会 2016 年 3 月.
2. 佐々木茂貴, 難病研究 up-to-date - 臨床病態解析と新たな診断・治療法開発をめざして - 第 3 章 難病の治療法(総論) 3. 核酸医薬 遺伝子医学 MOOK 32 号 2017 年 12 月.
3. 佐々木茂貴, 中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術 第 編 核酸 第 2 章 インテリジェント人工核酸—クロスリンク核酸・官能基転移核酸の合成—シーエムシー出版, 2018 年 1 月.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木茂貴(SASAKI, Shigeki)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 10170672

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

谷口陽祐(TANIGUCHI, Yosuke)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 00452714
瀧靖史(FUCHI, Yasufumi)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 40748795

(4) 研究協力者