

令和元年6月14日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05840

研究課題名(和文) 修飾U1snRNAを用いた新規核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of modified U1 snRNA derivatives as new nucleic acid drugs

研究代表者

大窪 章寛 (Ohkubo, Akihiro)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：60376960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、U snRNAを4つにわけたRNAオリゴマーをRNA Ligaseを用いて酵素連結反応をおこなったところ、U snRNAの高次構造の影響によりその連結効率が非常に低く、目的のU snRNAを得る事ができなかった。この高次構造による影響を少なくするために、splint DNAとDNA Ligaseを用いて酵素連結反応を行ったところ、効率良く目的のU snRNAの合成に成功した。

また、m3Gキャップ構造やスプライスサイト認識部位に化学修飾を加えたU1 snRNAおよびU11snRNAアナログも、このDNA Ligaseを用いることで効率良く合成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異によるエキソンの欠落を化学合成したRNAによって阻止する「スプライシングコレクション」は、これまで治療が困難とされてきたスプライシング異常に起因する遺伝子疾患の治療に多に貢献できると期待される。また、従来の核酸医薬とは全く違った作用機序をもつため、当該分野における貢献度も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we carried out synthesis of a U snRNA by the ligation reactions using four RNA oligomers and RNA ligase. However, the ligation efficiency was very low due to the steric hindrance of the RNA structure. In order to overcome the steric hindrance, we used DNA ligase in the presence of a splint DNA. As a result, we successfully synthesize a U snRNA in an efficient yield.

Moreover, we also synthesized modified U1 and U11 snRNA analogs containing a m3G cap structure under the ligation conditions using DNA ligase in the presence of a splint DNA. At the present, the splicing activities of the U RNAs are evaluated cystic fibrosis model cells.

研究分野：生物有機化学

キーワード：U snRNA スプライシング 核酸合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エキソンとイントロンのつなぎめの配列(スプライスサイト)は、U1 snRNP と U6 snRNP によって認識されるが、このスプライスサイトに変異が入ってしまうとこれら UsnRNP が結合できなくなり、スプライシング異常が起こるため疾患につながる。例えば、U1 snRNP が結合する 5'-スプライスサイトへの変異による疾患としては、一部の筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症、嚢胞性線維症、血友病などが挙げられる。U1snRNA は 5'側のわずか 8 塩基のみで pre-mRNA を認識しており、多少の多様性をもっているが、この位置に変異がおき U1 snRNA との結合が弱くなってしまうと、その位置でのスプライシングが起きなくなってしまう。現在までに、遺伝子工学的な手法を用いてスプライスサイトの変異に合わせた変異 snRNA を細胞内で作らせると、スプライシング異常が解消され、正常な mRNA が生成される事が報告されている。この知見は人工 U1 snRNA が新たな作用機序をもつ核酸医薬候補であることを示唆している。

Pre-mRNA に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてスプライシングを阻害し、特定のエキソンを人為的に欠落させるエキソンスキッピングは筋ジストロフィーの新しい治療法として注目されており、日本でも、臨床試験がおこなわれている。

しかし、このエキソンスキッピングは多少短くなくても機能するジストロフィン特有の性質を利用したものであり、ほとんどのエキソンの欠落を伴う遺伝子疾患では効果が期待できない。それに対し、本研究課題のように遺伝子変異によるエキソンの欠落を化学合成した RNA によって阻止する「スプライシングコレクション」は、適応できる疾患も多いと期待される非常に独創的な技術であり、未だ報告例はない。しかし、U1snRNA の化学合成は非常に難しく、これまでに化学合成の報告例はなかった。その理由は、この RNA が 164 塩基と鎖長が長いことと、5'-末端に非常に複雑なトリメチルグアノシンキャップ(m_3G)構造(図 3a)を有するためである。 m_3G 構造は、スプライシングに關与する UsnRNA に共通した構造であり核内局在化に非常に重要な役割をもつが、塩基性条件下非常に不安定であるため通常の RNA 合成法では合成できない。

そこで、我々はこれまでに培ってきた世界最高峰の RNA 合成技術、「迅速かつ高効率なポリリン酸化」(Org. Lett., 2012)と「中性条件下切り出し可能なシリルリンカー」(J. Am. Soc Chem, 2004)を駆使し、最近、 m_3G 構造を有する RNA オリゴマーの効率合成に成功している。現在では、世界に先駆けて U1 snRNA の化学合成を初めておこなうことが出来ている。(Org. Lett., 2013) 本研究課題では、提案者のもっている RNA 合成技術および核酸化学分野の知識をフル活用し、高度に化学修飾した U1 snRNA を合成した後、スプライシングコレクションに用いていく計画で研究を行った。

2. 研究の目的

研究課題では、化学合成した核内低分子 RNA (U1 snRNA) を用いて、「遺伝子突然変異によるスプライシング異常を正確に修正するスプライシングコレクション技術」の開発をおこなう。

遺伝子疾患のうちの 15%程度がスプライシング異常によるものであり、またそのほとんどがスプライスサイト配列(イントロンとエキソンの境界配列)におこった塩基配列の変異によって引き起こされる。通常、スプライスサイト配列は、相補塩基配列を有する UsnRNA (主に U1 および U6) によって認識され、それらを含むスプライソソームによってイントロンが切り出される。このスプライスサイトに変異がおき UsnRNA に認識されにくくなると、目的の位置でのスプライシングが起こらなくなり一部のエキソンがイントロンとして扱われてしまう。そこで、本研究課題では変異したスプライスサイトに相補的な配列をもつ人工 UsnRNA (今回は U1 snRNA) を化学合成し細胞導入をおこなうことで、スプライシングを正常にもどすことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、「1. 修飾 U1 snRNA の化学合成」および「2. 修飾 U1 snRNA を用いたスプライシング効率の評価」、「3. 修飾 U1 snRNA を用いた遺伝子発現抑制評価」を行った。

(1) 修飾 U1 snRNA の化学合成

修飾 U1 snRNA の化学合成では、「a. U1 snRNA の高効率化学合成法の確立」、「b. 核酸分解酵素に対する耐性向上、および標的 mRNA との結合能向上を指向した化学修飾基の導入」、「c. 効率の良いドラッグデリバリーを目指した化学修飾基の導入」を行った。

a. U1 snRNA の高効率化学合成法の確立

U1 snRNA は 5' 側のわずかに 8 塩基を使ってイントロンとエキソンにまたがるスプライスサイトを認識する。そこで、U1 RNA のこの部分に修飾を加え疾病原因遺伝子の塩基配列変異に対応させるほか、さらなるスプライスサイト認識や核酸分解酵素に対する耐性の向上をおこなっていく。そのためには、人工 U1 snRNA の高効率な化学合成法を確立する必要がある。

これまでに我々は「ホスホロアミダイト化合物を利用した高効率ポリリン酸化反応」を独自に開発 (Org. Lett., 2012) し、m₃G キャップ構造を有するオリゴヌクレオチドの迅速かつ高効率な合成法を報告してきた。(Org. Lett., 2013) 現在では、m₃G キャップ構造を有する U1 snRNA の 5' 側の短い RNA 分子と 3' 側の長い RNA 分子を別途合成し、T4 DNA Ligase を用いて連結することで、世界で初めて U1 snRNA の化学合成に成功している。しかし、3' 側の長い RNA 分子は T7 RNA ポリメラーゼを用いた酵素合成で合成しているため、後述する様々な化学修飾基を U1 snRNA に導入することが困難である。そこで、本研究では U1 snRNA を 4 つに分割し、それぞれを有機化学合成した後に、それらすべての RNA オリゴマーを T4 RNA Ligase 2 で鋳型 DNA を用いることなく一気に酵素連結し、高効率な U1 snRNA 合成を目指した。

b. 核酸分解酵素に対する耐性向上、および標的 mRNA との結合能向上を指向した化学修飾基の導入

核酸分解酵素に対して高い耐性を示すことは、核酸医薬において必須な条件である。これまでに、我々は独自に開発した 2'-水酸基に N-メチルカルバモイルエチル基 (MCE) を有する MCE-RNA が核酸分解酵素に非常に高い耐性を示すことを見いだしている。また、ピリミジン塩基の 5-位にメチル基を導入しても核酸分解酵素に耐性をもつことが、我々の研究の中でわかっている。これらの知見を基盤とし、U1 snRNA のどこに MCE 基もしくは 5-メチル基を導入すれば、スプライシング制御活性を損なわず生体内での安定性を向上できるかを詳細な構造活性相関を嚢胞性線維症モデル細胞での評価する計画で研究を行った。

c. 効率の良いドラッグデリバリーを目指した化学修飾基の導入

U1 snRNA のドラッグデリバリーも本研究課題の重要なポイントであるが、「一般的なカチオンリポソームなどのトランスフェクション試薬を使ったデリバリー」と「化学修飾のみでトランスフェクション試薬を使わないデリバリー」両方を検討した

(2) 修飾 U1 snRNA を用いたスプライシング効率の評価

合成した修飾 U1 snRNA を用いて、スプライシングコレクションの検討を行う。CFTR イオンチャンネルの exon12 のスプライスサイトが変異した mini gene を導入した HeLa 細胞 (嚢胞性線維症モデル細胞) に対し、変異したスプライスサイトと相補的になるように設計した修飾 U1 snRNA を細胞に、スプライシングの回復を確認することを目指した。様々な修飾 U1 snRNA を用いて構造活性相関をとることで、よりスプライシング効率の高い修飾 U1 snRNA のデザインにつなげていく。

4. 研究成果

本研究課題では変異したスプライスサイトに相補的な配列をもつ人工 U snRNA (今回は U1 snRNA や U11 snRNA) を化学合成し細胞導入をおこなうことで、スプライシングを正常にもどすことを目的としている。U1 snRNA および U11 snRNA は 5' 側のわずかに 8 塩基

を使ってイントロンとエキソンにまたがるスプライスサイトを認識する。これまでに我々は「ホスホロアミダイト化合物を利用した高効率ポリリン酸化反応」を独自に開発し、m3G キャップ構造を有するオリゴヌクレオチドの迅速かつ高効率な合成法を報告してきた。

そこで本研究では、まず、効率の良い長鎖 RNA 構築法の開発検討を行った。U snRNA (U1 snRNA および U11 snRNA) を 4 つにわけた RNA オリゴマーを T4RNA Ligase 2 を用いて酵素連結反応をおこなったところ、U snRNA の高次構造の影響によりその連結効率が非常に低く、目的の U snRNA を得る事ができなかった。この高次構造による影響を少なくするために、splint DNA と T4 DNA Ligase を用いて上記 RNA オリゴマーの酵素連結反応を行ったところ、効率良く目的の U snRNA の合成に成功した。

また、m3G キャップ構造やスプライスサイト認識部位に化学修飾を加えた U1 snRNA および U11 snRNA アナログも、この T4 DNA Ligase を用いた手法により効率よく合成することができた。

現在では、これら U snRNA と、CFTR イオンチャンネルの exon12 のスプライスサイトを変異させた mini gene を導入した嚢胞性線維症モデル細胞を用いて、合成した核酸の取り込み効率、およびスプライシング活性評価を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. T. Kanamori, Y. Oda, H. Ohzeki, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio, DNA triplex-based fluorescence turn-on sensors for adenosine using a fluorescent molecular rotor 5-(3-methylbenzofuran-2-yl)deoxyuridine. **Org. Biomol. Chem.** 2019, 17, 2077-2080. (査読有り)
2. T. Inde, S. Nishizawa, Y. Hattori, T. Kanamori, H. Yuasa, K. Seio, M. Sekine, A. Ohkubo*, Synthesis of and triplex formation in oligonucleotides containing 2'-deoxy-6thioxanthosine. **Bioorg. Med. Chem.** 2018, 18, 30902-30907. (査読有り)
3. T. Kaewsomboon, S. Nishizawa, T. Kanamori, H. Yuasa, A. Ohkubo*, pH-Dependent switching of base pairs using artificial nucleobases with carboxyl groups. **J. Org. Chem.** 2018, 83, 1320-1327. (査読有り)
4. Fluorescence enhancement of oligodeoxynucleotides modified with green fluorescent protein chromophore mimics upon triplex formation. T. Kanamori, A. Takamura, N. Tago, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio, **Org. Biomol. Chem.** 2017, 15, 1190-1197. (査読有り)
5. Coating lanthanide nanoparticles with carbohydrate ligands elicits affinity for HeLa and RAW264.7 cells, enhancing their photodamaging effect. T. Kanamori, T. Sawamura, T. Tanaka, I. Sotokawa, R. Mori, K. Inada, A. Ohkubo, S. Ogura, Y. Murayama, E. Otsuji, H. Yuasa, **Bioorg. Med. Chem.** 2017, 25, 743-749. (査読有り)
6. Enzymatic synthesis and reverse transcription of RNAs incorporating 2'-O-carbamoyl uridine triphosphate. Y. Masaki, H. Ito, K. Yamazaki, N. Tago, K. Ohno, N. Ishii, H. Tsunoda, T. Kanamori, A. Ohkubo, M. Sekine, K. Seio. **Chem. Comm.** 2016, 52, 12889-12892. (査読有り)
7. Synthesis of 5-[3-(2-aminopyrimidin-4-yl)aminopropyn-1-yl]uracil derivative that recognizes Ade-Thy base pairs in double-stranded DNA. Y. Ito, Y. Masaki, T. Kanamori, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2016, 26, 194-196. (査読有り)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. S. Nishizawa, T. Ohnishi, L. Watanabe, T. Kanamori, H. Yuasa, A. Ohkubo, Synthesis and properties of triplex-forming oligonucleotides containing modified sugar moieties and nucleobases, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会), 2018 年
2. R. Hashimoto, S. Nishizawa, Y. Miyake, T. Kanamori, H. Yuasa, A. Ohkubo, Synthesis and properties of cyclic oligonucleotides containing acyl groups at the 5'- and 3'- terminal sites, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会), 2018 年
3. T. Kaewsomboon, S. Nishizawa, R. Hashimoto, Y. Miyake, T. Kanamori, H. Yuasa, A.

- Ohkubo, Synthesis and properties of cyclic oligonucleotides containing acyl groups at the 5'- and 3'-terminal sites, The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会), 2017 年
4. T. Aoyama, K. Muto, L. Watanabe, T. Kanamori, H. Yuasa, A. Ohkubo, Synthesis and properties of new modified oligonucleotides containing amino groups at the 5'-positions of ribose moieties, The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会), 2017 年
 5. 細谷輝・金森 功史・湯浅 英哉・大窪 章寛, U1 snRNA 誘導体の合成, 日本薬学会 第 137 回春季年会, 2017 年
 6. 西村 ゆり・Tanasak Kaewsomboon・金森 功史・湯浅 英哉・大窪 章寛, イソフタル酸誘導体を有する新規修飾核酸の合成と性質, 日本薬学会 第 137 回春季年会, 2017 年
 7. 西澤 周平・橋本 律・三宅 優・金森 功史・湯浅 英哉・大窪 章寛, 5' および 3' 末端にアシル基を有する環状オリゴヌクレオチドの合成, 日本化学会 第 97 回春季年会, 2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ohkubo.bio.titech.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。