

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20550147

研究課題名（和文）ncRNAを標的とした機能性アンチセンス核酸の研究

研究課題名（英文）Study on functional antisense nucleic acids for ncRNA

研究代表者

尾崎 広明 (OZAKI HIROAKI)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90211820

研究成果の概要（和文）：microRNA の活性を制御するアンチセンス分子の創成を目指して、機能性オリゴヌクレオチドの創成を行った。DNA 鎖中へのアラビノヌクレオシドの導入、もしくは5'末端にフェナンスロリン-ポリアミン誘導体を結合し、そのアンチセンス活性を検討したが、活性に向上に至らなかった。一方、siRNA の3'オーバーハング領域に5位置換ピリミジンヌクレオチドを導入することは、活性の向上に有効であることを明らかにした。さらに、この修飾 siRNA は microRNA の活性制御にも使用可能であった。

研究成果の概要（英文）：Functional oligonucleotides were prepared for new antisense molecule to regulate microRNA. Incorporation of arabinonucleosides or phenanthroline-polyamine derivatives in DNA did not contribute to enhancement of antisense activity. siRNA bearing modified nucleoside was more active in silencing the gene expression. These siRNA could regulate the microRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：核酸化学

科研費の分科・細目：化学・生体関連化学

キーワード：核酸、アンチセンス、siRNA

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、非タンパク質コード RNA (non-coding RNA, ncRNA) の機能が解明されつつあった。その状況は、今でも変わっていない。例えば、分化誘導や一部のがんの発現には microRNA が関わっていることがわかってきており、その機能に関する研究が活発に行われている。これまでの研究で、多くの microRNA が発見されているものの、その機能が解明されているものはまだ少ない。その機能解明には、microRNA を制御する技術が必要

である。これらの機能を制御する分子としては、アンチセンス核酸や siRNA の利用が考えられる（図1参照）。siRNA は、細胞質でのみ利用できる技術であり、核内で働く ncRNA の機能解明には利用できない。一方、アンチセンス核酸は、核の内外を問わず機能する。また、これまでの研究により、mRNA を標的としたアンチセンス核酸が、サイトメガウイルスによる網膜炎の治療薬として承認され実用化されている。これは、microRNA に対するアンチセンス核酸の実用化も可能であることを示

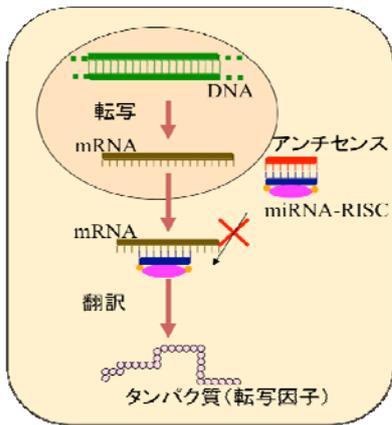


図1 microRNA(miRNA)は、RISC とコンプレックスを形成し、mRNA の切断する。そのmicroRNA 発現細胞にアンチセンス核酸を作用させるとその機能が止まる。

唆している。

一方、我々は、アンチセンス核酸の機能向上のために、機能性基を持つアンチセンス核酸の開発を行っていた。その中でも、DNA 中のチミンの C5 位にポリアミンを持ち、糖部をデオキシリボースに換えてアラビノースとした修飾 DNA (図2) がアンチセンス核酸として優れた機能を有していることを見いだした。この修飾 DNA を合成するための原料となるヌクレオシドは、我々が独自に開発した合成法により、効率よく合成することができる。

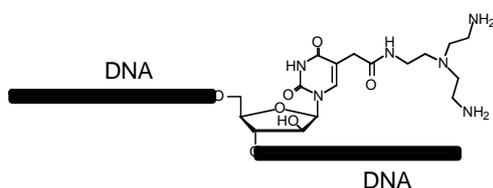


図2 アラビノフラノシル C5 位置換ウラシルを含む DNA

2. 研究の目的

本研究においては、アンチセンス核酸の機能のさらなる向上を目指し、その (1) siRNA への拡張と (2) 核酸切断活性を持つ機能性基の結合を行う。

(1) siRNA は、細胞質中での RNA に作用し、機能制御を行えることから、mRNA や microRNA の発現制御に利用できる。本研究では、siRNA に修飾ヌクレオシドを導入することにより、その RNAi 活性の向上を図った。

(2) 核酸切断活性を持つ DNA はこれまでも報告されているが、酸化的切断を行うものが多い。酸化的切断を行うためには、金属イオンと還元剤が必要であるため、生体への応用に問題がある。また、リン酸ジエステル結合を加水分解的に切断する機能性基も見いだされているが、有機分子だけからなるものは少ない。一方、我々は、これまでにフェナンス

ロリンーポリアミン複合体が、銅イオンと還元剤の存在下、酸化的に DNA を切断し、還元剤の非存在下では、加水分解的に DNA を切断することを見いだした。このフェナンスロリンーポリアミン複合体をアンチセンス核酸に結合することにより、生体内で標的 RNA を切断し、その機能を阻害できる。核酸の切断は、金属イオンや還元剤がある場合には、酸化的切断により迅速に起こるが、それらが存在しない場合でも加水分解的に標的核酸を分解する。

本研究で得られた機能性アンチセンス核酸は、標的核酸の認識能、酵素耐性、細胞膜透過性、標的核酸分解能力を併せもつ分子であり、塩基配列を選べば、mRNA との結合により、特定のタンパク質の合成阻害を効率良く行える。また、microRNA の阻害を行えば、細胞の分化誘導に関わる機能制御が可能になる。

3. 研究の方法

(1) 合成

修飾ヌクレオシドとして用いる 5 位置換ピリミジンヌクレオシドは、すでに我々が報告した方法に従い合成し、図3に示す誘導体とした。

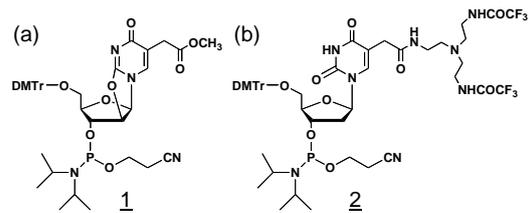


図3 5 位置換ピリミジンヌクレオシド-ホスホロアミダイト誘導体。(a)アラビノヌクレオシド導入用、(b)デオキシヌクレオシド導入用。

図3(a)に示す 5-メトキシカルボニルメチルアンヒドロウリジン誘導体は、DNA 合成機で DNA 中の任意の位置に組み込んだ後、トリス(2-アミノエチル)アミン (TAEA) で処理することで、アラビノヌクレオシド誘導体とした(図4)。

3' 末端に修飾ヌクレオシドを有する RNA を合成するために、修飾ヌクレオシドを固相担体 (CPG) に結合した(図5)。

フェナンスロリンーポリアミン複合体 (phen)₂TAEA は、図6に示すように合成した。

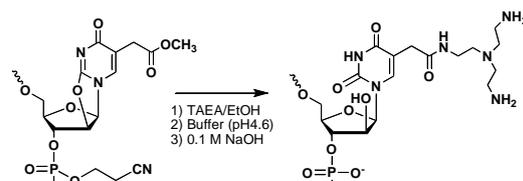


図4 アラビノヌクレオシドへの変換

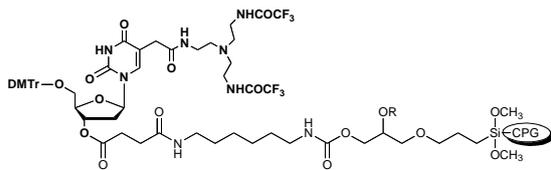


図5 修飾ヌクレオチド結合 CPG 固相担体

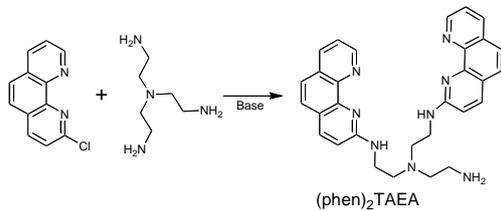


図6 (phen)₂TAEA の合成

DNA と RNA は、市販のヌクレオシドホスホロアミダイトならびに、本研究で合成した修飾ヌクレオシドホスホロアミダイトを用いて、ABI 392 DNA/RNA synthesizer で合成した。フェナンスロリン-ポリアミン修飾 DNA は、5' 末端にスクシンイミド基を持つ DNA を合成後、(phen)₂TAEA と反応させることで得た。

(2) DNA 融解温度の測定

二重鎖融解温度は、温度制御機能の付属した紫外可視分光光度計（島津 UV-2550 with TMSPC）で測定した。

(3) 遺伝子発現制御活性の測定

HNF4a を高レベルで発現する HepG2 細胞を使用し、アンチセンス核酸もしくは siRNA をトランスフェクション試薬と共に加えて 42 時間培養した。全 RNA を抽出後、逆転写で得た cDNA を HNF4a に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR で mRNA 量を測定した。HNF4a の発現量は、所定の試薬で培養した細胞から全たんぱく質を尿素抽出し、ゲル電気泳動で分離した。HNF4a の発現量は、メンブランに転写後、HNF4a 抗体を用いて測定した。

(4) DNA 切断活性の測定

フェナンスロリン-ポリアミン誘導体の DNA 切断活性は、プラスミド pBR322 と所定の条件で反応後、反応生成物をアガロースゲル電気泳動で分析した。

4. 研究成果

(1) 各種化合物の合成

5 位置換アラビノフラノシルピリミジンヌクレオシドを含むオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) は、化合物 **1** を用い、**図4** に示す方法でポリアミンを導入することで効率よく合成できた。ODN (ODN1,

5' -TTGXCCACCACGCACXGCC-3' ; ODN2, 5' -AXGTCCATGXCGACGAGGG-3' , X=modified nucleoside) の配列は、HNF4a の mRNA の相補鎖の一部である。

3' 末端部位を修飾したオリゴボクヌレオチド (ORN) は、化合物 **2** と **図5** に示す修飾ヌクレオチド結合 CPG 固相担体を用いることにより合成した。これを用いて調製した siRNA を **図7** に示す。

siRNA1

5' -ggcagugcgugguggacaaTT-3' (ORN1)

3' -TTccgucacgcaccaccuguu-5' (ORN2)

siRNA2

5' -ggcagugcgugguggacaaTX-3' (ORN3)

3' -XTccgucacgcaccaccuguu-5' (ORN4)

siRNA3

5' -ggcagugcgugguggacaaXX-3' (ORN5)

3' -XXccgucacgcaccaccuguu-5' (ORN6)

図7 siRNA の塩基配列。小文字は RNA 残基、大文字は DNA 残基、X は修飾残基を示す。

(phen)₂TAEA は、**図6** に示す反応により収率 32% で得た。また、(phen)₂TAEA は、5' 末端にスクシンイミド基を持つ DNA と反応させることにより ODN3 (5' -(phen)₂TAEA-ATGTCCATGXCGACGAGGG-3') を得た。

(2) アンチセンス核酸 ODN1 と ODN2 の性質とアンチセンス活性

ODN1 と ODN2 はいずれも修飾ヌクレオシドを 2 個含有している。相補鎖 DNA との二重鎖形成能を融解温度で調べた。その結果、天然型の DNA に比べて若干 (0.2 - 2.0°C) の融解温度の低下が見られたが、十分な二重鎖形成能を有することがわかった。

この ODN1 と ODN2 がヒト肝癌細胞株 HepG2 中で、発現する転写因子 HNF4a に対する発現制御活性を有するかをウエスタン・ブロット法で調べた。その結果を **図8** に示す。その結果、ODN2 では若干の発現量の低下が見えらるものの、いずれの ODN でも顕著な抑制が見られなかった。その原因を調べるため、別途、5' 末端に蛍光標識を持つ ODN2 を合成し、細

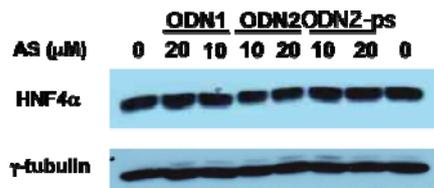


図8 ウエスタン・ブロット・イメージ。©-tubulin は比較として用いた。ODN2-ps は、ホスホロチオエート結合を持つ。

胞への取り込みを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、核内、細胞質内ともに蛍光が観察されなかったことから、ODN2は細胞に取り込まれていないことが明らかとなった。これは、ODN2がヒト細胞に取り込まれ難いことを示唆している。今後、ヒト細胞への取り込み効率の向上を図る必要がある。

(3) (phen)₂TAEAによるDNAの切断

本研究で合成した(phen)₂TAEAのDNA切断能力をプラスミドを用いて調べた。その結果、銅イオンと還元剤としてメルカプトプロピオン酸を含む場合には、高い切断活性を示した。このときのDNA切断は、酸化的に進行していると推察される。一方、還元剤を含まない場合にも、プラスミドの切断が見られた。DNAの切断は、加水分解的に進行すると推測できるが、その切断効率は低いことがわかった。

(phen)₂TAEAをODNに結合し、蛍光標識した相補鎖DNAの切断を試みた。銅イオンと還元剤の存在下では、DNAの非特異的切断が観察された。一方、還元剤非存在下では、DNAの切断は、ほとんど観察されなかった。今回は、比較的長いリンカーを用いたので、特定部位に切断活性基を固定できず、特異的切断を引き起こすことはできなかった。また、相補鎖の一部にRNAを含むキメラDNA/RNAに対して

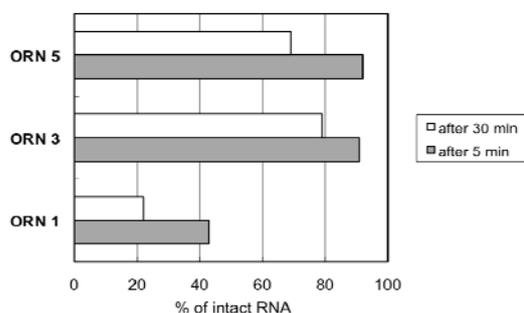


図9 修飾 RNA の酵素耐性

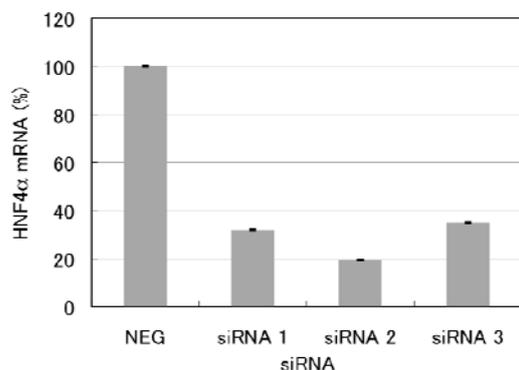


図10 siRNA 処理細胞の HNF4α mRNA 発現量。NEG はナンセンス配列のコントロール siRNA。

も切断しないことがわかった。今後、リンカーの構造を検討する必要がある。

(4) siRNA の 3' 末端修飾とその RNAi 活性

合成した 3' 末端修飾 RNA の核酸分解酵素に対する耐性を、蛇毒ホスホジエステラーゼを用いて調べた。結果を図9に示す。図より末端にチミジンのみを含む ODN1 が 30 分で約 20%しか残っていないのに対し、修飾残基を 1 つ含む ODN3 で約 80%、2 つ含む ODN5 で約 70%が残存していた。これは、3' 末端のオーバーハング領域に我々の修飾残基を入れると、その酵素耐性が大きく向上することを示している。

この ORN1-6 で構成された siRNA1-3 を調製し、その RNAi 活性を調べた。リアルタイム PCR を用いて HNF4a の mRNA を定量した結果を、図10に示す。いずれの siRNA も mRNA レベルが低下しており RNAi 活性があることが示唆される。3 者の中では siRNA2 が最も抑制効果が高い。また、ウエスタンブロット法で HNF4a の発現量を調べた結果、siRNA2 が siRNA1 と siRNA3 に比べてより少ないことがわかった。これらの結果より、siRNA の 3' 末端一残基を 5 位置換ピリミジンヌクレオシドに変えることで、RNAi 活性を向上できることを明らかにできた。その効果は、高い核酸分解酵素に対する耐性によると推測された。

同様に microRNA に対するアンチセンス鎖の 3' オーバーハング領域に 5 位置換ピリミジンヌクレオシドを持つ RNA を合成し microRNA の活性抑制を検討した。アンチセンス鎖のみを添加した場合には、抑制効果は見られなかったが、センス鎖と二重鎖を形成し siRNA とした場合には、抑制効果が見られた。しかしながら、市販の siRNA と同程度であり、その優位性は認められなかった。

(5) まとめ

本研究では、ncRNA である microRNA の活性を制御するアンチセンス分子の創成を目指して、機能性オリゴヌクレオチドの創成を行った。ODN 鎖中へのアラビノヌクレオシドの導入もしくは、5' 末端へのフェナンスロリンポリアミン誘導体の結合を行い、そのアンチセンス活性を検討したが、活性に向上に至らなかった。一方、siRNA の 3' オーバーハング領域に 5 位置換ピリミジンヌクレオシドを導入することは、活性の向上に有効であることを明らかにした。さらに、この修飾 siRNA は microRNA の活性制御にも使用可能であるが、その活性は極めて高いレベルには至っていない。今後、切断活性基の研究と修飾残基の導入位置の検討により、すぐれたアンチセンス活性を目指す予定である。

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1件)

① Mohammad Mehedi Masud, Tomokazu Masuda, Yusuke Inoue, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Sawai, Hiroaki Ozaki, “Synthesis of modified siRNA bearing C-5 polyamine-substituted pyrimidine nucleoside in their 3'-overhang regions and its RNAi activity”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, Vol. 21, No. 2, 2011, pp.715-717.

〔学会発表〕(計4件)

① 増田知和、Mohammad Mehedi Masud、井上裕介、桑原正靖、澤井宏明、尾崎広明、3'オーバーハング領域に修飾ヌクレオシドを導入した siRNA の合成とその RNAi 活性の検討、日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会 2010.11.22、日本原子力研究開発機構(群馬県)。

② Mohammad Mehedi Masud, Tomokazu Masuda, Yusuke Inoue, and Hiroaki Ozaki, Synthesis of modified siRNA and its activity for gene regulation, The 37th International symposium on Nucleic Acid Chemistry 2010, 2010.11.11, Hamagin Hall (Yokohama).

③ 増田知和、Mohammad Mehedi Mohammad Mehedi、尾崎広明、1,10-フェナンスロリン-ポリアミン複合体の開発と核酸の切断活性の検討、日本化学会第4回関東支部大会、2010.8.30、筑波大学(筑波)。

④ 増田知和、尾崎広明、Mohammad Mehedi Mohammad Mehedi、桑原正靖、澤井宏明、5位置換ピリミジンヌクレオシドを含む機能性核酸の合成とアンチセンス法への利用、日本化学会第3回関東支部大会、2009.9.4、早稲田大学(東京)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 広明 (OZAKI HIROAKI)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90211820

(3) 連携研究者

井上 裕介 (INOUE YUSUKE)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90304302