

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03372

研究課題名(和文) RNA分解酵素・アンチセンスの細胞内分子複合体化と長鎖RNA機能制御への応用

研究課題名(英文) Complex formation between RNA cleaving-enzyme and antisense and its application to regulation of long non-coding RNAs.

研究代表者

小松 康雄 (Yasuo, Komatsu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究部門長

研究者番号：30271670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNAを切断するRNase Hとアンチセンス(ASO)を近接させることで、少量の投与量でも機能する新規な2本鎖結合型ASOの開発を試みた。まずクロスリンクして安定化させた2本鎖(CLD)を接続したASOの細胞内動態を解析した。その結果、CLDはRNase Hの結合部位に用いることは適さなかったものの、細胞内でも長期間安定で、ASOの細胞内分布を制御できる能力を有することを見出した。続いてCLDの安定性を向上させるためにシクロプロパン環を有するpCLDを新たに合成した。このpCLDを有するASOは細胞内において安定で、高いmiRNA阻害活性を有することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASOなどの核酸医薬が近年相次いで上市され、今後もこの傾向が続くと考えられる。本研究では、独自の核酸2本鎖安定化技術を利用してCLDを接続したASO開発し、CLDが細胞内におけるASOの安定化と細胞内分布の制御に有効であることを確認した。また、シクロプロパン構造を導入した新たな2本鎖構造を開発し、長期間細胞内で安定であることを確認した。これらの成果は低濃度のASO条件下でも持続的に細胞内で作用し得る新たな核酸医薬の提供につながり、今後、siRNAとASOの欠点を補間する技術に成り得ると考える

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a novel type of antisense oligonucleotide (ASO) that has a RNaseH-binding domain proximal to the single stranded antisense region and act catalytically work in cells. First, we analyzed the intracellular dynamics of an ASO having a cross-linked double strand (CLD) and found that the CLD is stable within cells for an extended period and has potential to control the intracellular distribution of the ASO. Subsequently, to improve the stability of the CLD within cells, we synthesized a new type of pCLD that has rigid cyclopropane rings at the cross-linked sites. It was confirmed that the pCLD-connected ASOs could show high nuclease resistance and inhibit miRNA function.

研究分野：核酸化学

キーワード：アンチセンス RNA オリゴヌクレオチド クロスリンク miRNA

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬としてアンチセンスオリゴ (ASO) と siRNA が 2013 年より合わせて 6 件相次いで医薬として上市され、今後もこの傾向が続くと考えられている。それらは主に mRNA を標的にしたもののだが、一方でヒトの遺伝子数を超える数の長鎖のノンコーディング RNA (lncRNA) が相次いで発見され、そのうち約 2,000 種類の lncRNA は何らかの疾病に関与すると推定されている。そのため、今後はこうした lncRNA も疾病の標的となる可能性は高く、核酸医薬の重要性はさらに増すと考えられる。lncRNA は種類に応じて、核と細胞質のいずれか一方、またはその両方に存在するタイプに分けられる。

RNA の機能制御には高い RNA 切断活性を有する siRNA を用いることができるが siRNA はその生成機構のために核内に移行することが困難で核内 RNA の切断には適さない。ASO は、化学合成される標的 RNA と相補的な 1 本鎖であり、中央部に 5~10 mer の DNA とその両側に RNA に高い結合親和性を有する修飾核酸を配置したギャップマー型が一般的に利用されている。ASO が RNA と結合すると RNA/DNA ハイブリッド (以下 RD) が 2 本鎖中央部に形成され、この RD 構造を細胞内の RNA 分解酵素 (RNase H) が認識して RNA を加水分解する。ASO は細胞内に取り込まれた後、エンドソームから細胞質に放出され核内にも拡散し、RNase H も核内外に存在するため核および細胞質に存在する RNA の切断に ASO は適している。しかしながら RNase H は 1 本鎖の ASO に結合しないため RNA の切断後には複合体から離れ、また ASO の核内への移行やエンドソームからの脱出は障壁が高く一部しか進行しない。そのため、ASO の効果は添加濃度の影響を受け易く十分な量の ASO を細胞内に送達する必要がある。ASO の投与量の増加は誤った標的に結合するリスクの増加に加え、化学修飾と共に合成コストの上昇をもたらす。そこで、核内外に到達できる細胞内で安定な ASO 技術を確立し、さらに ASO と酵素との複合体化を維持できる性能を付与することが可能になれば、低濃度でも酵素的に標的 RNA を切断し、化学修飾を抑えた新しい ASO 開発につながると考えた。

2. 研究の目的

我々は、これまでに、DNA、RNA および 2'-O-methyl RNA のホモ 2 本鎖間を部位選択的にクロスリンクして安定化した 2 本鎖 (CLD) を開発し、CLD が核酸分解酵素に対する高い耐性を有し、細胞内でも安定に存在できることを確認してきた。本研究では、CLD を利用して、細胞内で安定かつ細胞内分布の制御可能な新たな ASO 技術と、ASO と RNA 分解酵素 (RNase H) が複合体化し標的 RNA を切断するための基盤技術の開発を目指した。

(1) ASO の細胞内分布の制御技術

RNase H も核内外に存在するため核および細胞質に存在する RNA の切断に ASO は利用できるが、ASO の効果は添加濃度の影響を受け易く十分な量の ASO を細胞内の標的 RNA が存在する位置に送達させる必要がある。CLD は細胞内で安定に存在することが可能であるが、CLD を接続した ASO が細胞内でどのような分布をするのかは明らかではなかった。そこで CLD を接続した ASO の細胞内動態を調べ、その構造活性相関を明らかにし、ASO の細胞内分布の制御に CLD が利用できるかどうかを調べた。

(2) 2 本鎖安定化技術の開発

RNase H は、RNA/DNA ハイブリッド (RD) 結合ドメインと触媒ドメインから構成されており、本来、DNA の複製時に生じる RD に対し結合ドメインで結合し、結合部位近傍の RD の RNA 鎖のみを触媒ドメインが切断する。この自然界の複合体化にならない RNase H の RD 結合ドメインに結合する核酸構造体を介して ASO を細胞内で酵素に結合させることを着想し、安定な RD 構造の合成を試みた。通常の 2 本鎖は生体内では解離し、加えて 2 本鎖を安定化させる修飾核酸の導入は酵素との結合を阻害する。そこで、酵素との結合に干渉しないよう RNA/DNA ハイブリッドのヘリックス内部で 2 本鎖を CL させて安定化させる方法を選択した。また、従来の CLD は、2 本鎖上の脱塩基した開環型デオキシリボースの 2 つのアルデヒド基を連結する。開環型デオキシリボースは自由度が高いため、CL 部位である脱塩基部位をシクロプロパン環に変えた新たな CL 構造の開発も目指した。

3. 研究の方法

クロスリンクさせた2本鎖 (CLD) を異なる位置に有する1本鎖 ASO を合成し、細胞内の安定性ならびにその細胞内動態を解析した。

(1) CLD2本鎖を有する ASO の細胞内分布の評価

- ① CLD2 本鎖の末端それぞれに蛍光標識を導入し、Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 観察による2本鎖構造の評価系を構築した。
- ② CLD を有する ASO の末端を蛍光標識して細胞内に導入し、細胞内における ASO の分布を蛍光顕微鏡で調べ、分子構造と細胞内局在との相関性を評価した。

(2) RNase H 活性の評価と新規な CLD 構造の開発

- ① RNA/DNA ハイブリッド2本鎖(RD)の中央部をクロスリンカー (aoNao) で結合して CLD を作製し、RD-CLD を有する ASO のアンチセンス活性および細胞内安定性を調べた。
- ② CLD の細胞内での安定性を向上させるためにシクロプロパン環を有する pCLD を新たに合成した。ここでは、立体構造を強力に固定した CL 部位としてアルデヒド基を有するシクロプロパン誘導体をデザインした。オリゴ合成中はアルデヒド基を保護しなければならないため、ジオール基を有するシクロプロパン誘導体 (cPro) を合成してオリゴに導入し、オリゴ精製後にジオール基を過ヨウ素酸化してアルデヒド基をオリゴ上に作製した。

4. 研究成果

(1) ASO の細胞内分布

まず初めに、2本鎖の隣り合う末端に Donor および Acceptor となる蛍光分子を修飾し、CLD と通常の2本鎖で安定性を調べた。ASO、CLD は全て 2'-O-methylRNA で合成した。実験の結果、通常の2本鎖では温度を上げると FRET による蛍光が消失したが、CLD では蛍光が維持され、CLD が高い安定性を有することを確認した。細胞内の安定性も調べたところ、24 時間以上 FRET に伴う蛍光が観察されたことから、CLD は細胞内においても2本鎖構造を安定に保持していることを確認した。

次に、細胞質に局在するノンコーディング RNA (microRNA-21) を標的とした ASO の 5' または 3' の末端に 12mer の CLD を連結し、蛍光色素で標識した (図1)。細胞内に導入後、ライブイメージングを利用して各種 ASO の核と細胞質の局在の比率を解析した。ASO の 5' 末端に1本鎖構造 (5'SS-ASO) または通常の2本鎖構造 (5'DS-ASO) を接続した場合には、核に分布する比率が高かったが、5'末端に CLD を有する ASO では、細胞質に留まる比率が高くなった (図1, 2, 5'CL-ASO)。また、ASO の 3' 末端に CLD を接続しても 5'末端が未修飾の場合には核への局在率が高くなったが (図1, 2, 3'CL-ASO)、興味深いことに 5'末端を化学修飾した 3'CL-c₃ASO では 5'CL-ASO と同様に細胞質に分布するようになった。これらの結果は、5'末端が未修飾の ASO では、速やかに細胞質内で分解を受けて低分子化されて核に移行するが、5'末端に化学修飾や CLD が接続されている場合には、そうした分解から保護されることが寄与しているためと推察された。加えて、CLD が接続された場合には、核酸分解酵素が

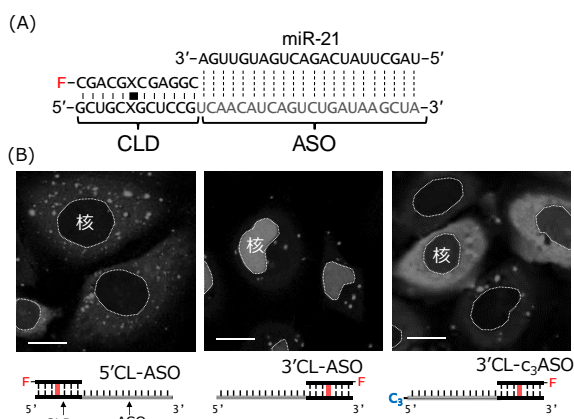


図1 (A)5'CL-ASO の配列、(B) 2本鎖構造を接続した ASO の細胞内分布、F: Alexa-546

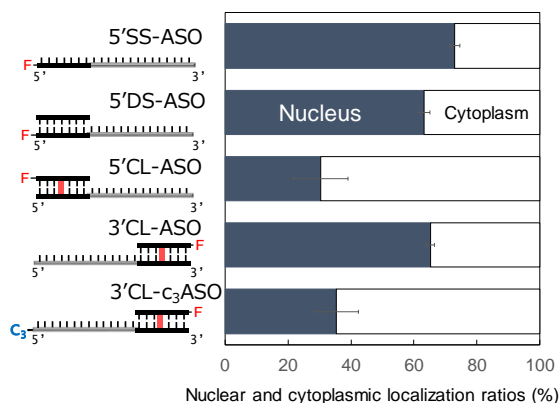


図2 ASO の核/細胞質分布 F: Alexa-546

らの保護効果に加えて、CLD によって ASO 全体がかさ高い構造に変化させられることで ASO の核内移行が抑制され、細胞質内に局在する率が高くなったと考察したり。従って、これらの結果は、CLD はアンチセンス核酸の細胞質局在を促進し、細胞質に局在する RNA の活性を効果的に抑える構造として有効であることを示唆していると考えた。

(2) CLD の安定化技術の開発

RD の中央部をクロスリンカー (aoNao, 図 4A) で結合して CLD を作製し、RNase H による切断を受けるかどうかを調べた。その結果、この RD の CLD 構造は RNA 側が切断されることを確認した。RNA は CL 構造があっても切断される可能性が高いことから、クロスリンク部位である脱塩基部位をシクロプロパン環 (cPro) に変え、新たな CLD を構築できるかどうかを調べた。cPro はオリゴ合成中の保護としてジオール基を有することから、相補的な 2 本鎖 DNA をハイブリ後、過ヨウ素酸酸化させてアルデヒド基を生成させ、これまでと同じく aoNao によるクロスリンク反応を調べた(図 4B)。

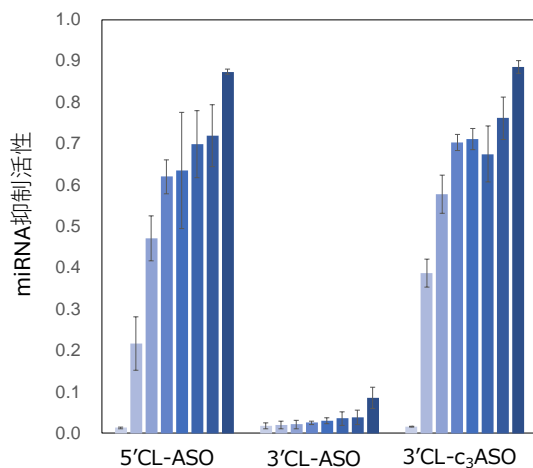


図 3 2 本鎖構造を接続した ASO の miRNA 抑制活性

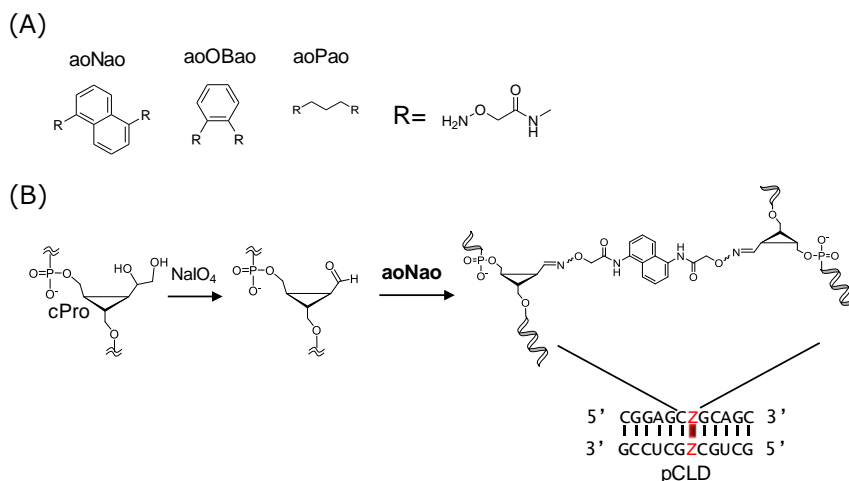


図 4 シクロプロパン構造を利用した CLD の安定化
(A)クロスリンカーの構造、(B)pCLD の作製

その結果、cPro-cPro 間のクロスリンク反応が進行することを確認した。aoNao は 2 つのアミノキシ基の中央にナフタレンがあるが、プロピル基またはベンゼン環のクロスリンカー (aoPao, aoOBao, 図 4A) による クロスリンク反応を行い、これまでの AP site と同様に反応が進行することを確認した。ただしクロスリンク効率は最も高い aoNao を用いた場合でも 60%であった。1 本鎖の 5'末端に cPro の CLD (pCLD, 図 4B) を接続したアンチセンスを合成し、相補的な核酸とハイブリさせ融解温度を測定した。その結果、これまでの CLD と同様に隣接するハイブリダイゼーションを安定化する効果があることを確認した。また、pCLD を miR-21 のアンチセンスの一方の末端または両末端に接続した ASO を合成して核酸分解酵素で処理したところ、pCLD を有する ASO は核酸分解酵素に対する高い耐性を有することを確認した。さらに、pCLD 修飾した ASO を細胞内に導入してその活性を評価した結果、高いアンチセンス活性を有し、その活性は 96 時間以上もの間、維持されることも確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukushima Ruriko, Suzuki Tetsuya, Komatsu Yasuo, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 825
2. 論文標題 Biased distribution of action-at-a-distance mutations by 8-oxo-7,8-dihydroguanine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 111794 ~ 111794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrfmmm.2022.111794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Yu, Komatsu Yasuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Promotion of cytoplasmic localization of oligonucleotides by connecting cross-linked duplexes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 24471 ~ 24477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2RA04375K	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abdelhady Ahmed Mostafa, Hirano Yu, Onizuka Kazumitsu, Okamura Hidenori, Komatsu Yasuo, Nagatsugi Fumi	4. 巻 48
2. 論文標題 Synthesis of crosslinked 2'-OMe RNA duplexes and their application for effective inhibition of miRNA function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 128257 ~ 128257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.128257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Akiyoshi, Wang Daole, Komatsu Yasuo	4. 巻 27
2. 論文標題 Analysis of GTP addition in the reverse (3' → 5') direction by human tRNA(His) guanylyltransferase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 665 ~ 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.078287.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Sho, Hirano Yu, Komatsu Yasuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Stable duplex-linked antisense targeting miR-148a inhibits breast cancer cell proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90972-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Tetsuya, Katayama Yuri, Komatsu Yasuo, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Similar frequency and signature of untargeted substitutions induced by abasic site analog under reduced human APE1 conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 283 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Ryota, Oono Hiroyuki, Kumazawa Keiko, Ida Tomohide, Hirata Jun, White Ryan D., Min Xiaoshan, Guzman-Perez Angel, Wang Zhulun, Symons Antony, Singh Sanjay K., Mothe Srinivasa Reddy, Belyakov Sergei, Chakrabarti Anjan, Shuto Satoshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Discovery of 6-Oxo-4-phenyl-hexanoic acid derivatives as ROR t inverse agonists showing favorable ADME profile	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 127786 ~ 127786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.127786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小松 康雄
2. 発表標題 生物プロセス研究部門の研究概要
3. 学会等名 産総研北海道センターシンポジウム in札幌
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 悠、小松 康雄
2. 発表標題 安定化した2本鎖構造を有するアンチセンス核酸の細胞内動態
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第8回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小松 康雄
2. 発表標題 生物プロセス研究部門におけるバイオものづくり研究
3. 学会等名 LS-BT講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成廣 隆、菊池 義智、光田 展隆、玉木 秀幸、小松 康雄
2. 発表標題 地域イノベーション創出連携拠点形成に向けたバイオリソース解析プラットフォーム
3. 学会等名 第20回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野 悠、小松 康雄
2. 発表標題 2本鎖構造を利用したアンチセンス核酸の細胞内局在の制御
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 彰良、汪 道楽、小松 康雄
2. 発表標題 Nucleotide recognition mechanism of human tRNAHis guanylyltransferase and its application to RNA 5'-modification
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野 悠、小松 康雄
2. 発表標題 2本鎖構造を有するアンチセンス核酸の細胞内局在
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 彰良、汪 道楽、小松 康雄
2. 発表標題 ヒト由来tRNAHisグアニルトランスフェラーゼによる逆方向(3'-5')の塩基付加反応の解析とRNA5'末端修飾への応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島 直、小松 康雄
2. 発表標題 核酸の効率的な化学修飾を可能にするリンカーの開発
3. 学会等名 理研セミナー「核酸分析の最前線 2」
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小松康雄、平野 悠	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック 第11部第2節 371-374	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	周東 智 (Shuto Satoshi) (70241346)	北海道大学・薬学研究院・教授 (10101)	
研究 分担者	平野 悠 (Hirano Yu) (70415735)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------