

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05716

研究課題名(和文) アンチセンス核酸の脱PS化を志向したRNase H活性を持つ修飾核酸の開発

研究課題名(英文) Development of modified nucleic acid possessing RNase H activity for antisense oligonucleotides without phosphorothioate (PS) modification

研究代表者

張 功幸 (Hari, Yoshiyuki)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：50347423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アンチセンス核酸には通常ホスホロチオエート(PS)修飾が施される。特に、RNase H依存型アンチセンス核酸のギャップ部分はRNase Hによる認識部位となるため天然ヌクレオシドが用いられており、PS修飾は必要不可欠となっている。本研究では、アンチセンス核酸のギャップ部分の脱PS化を目指し、RNase Hによる認識を維持した修飾核酸の開発を行った。4'位にカルボン酸等価体やメチルチオ基をもつ修飾核酸ならびに1',4'-架橋型核酸を導入したオリゴ核酸を合成し、RNase H活性などを調べた。結果、部分的な脱PS化につながり得る修飾核酸を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチセンス核酸医薬品に利用されるホスホロチオエート(PS)修飾は毒性や品質管理の面での問題を抱えている。そのような中、本研究の成果はアンチセンス核酸のPS修飾の数を減らすことにつながり、これら課題の緩和が期待できる。また、本成果は、全くPS修飾する必要のないアンチセンス核酸の開発を将来実現するために有用な知見をもたらすと考えられる。以上のことから、本研究成果は、今後のアンチセンス核酸をはじめとするオリゴ核酸医薬品開発の発展に貢献することが期待できる。

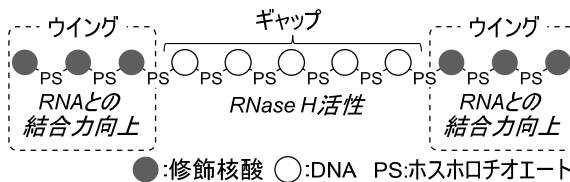
研究成果の概要(英文)：Phosphorothioate (PS) modifications are generally used for antisense oligonucleotides (ASOs). In particular, the gap region of RNase H-dependent ASOs consists of natural nucleosides to need to be recognized by RNase H; thus, PS modifications are necessary for the gap region. In this study, development of a nucleic acid analog that works as a substrate of RNase H was tried aiming to remove PS modification from the gap region in ASOs. Oligonucleotides containing nucleic acid analogs possessing carboxylic acid equivalents at the 4' position, 4'-methylthio group, and bridge structure between 1' and 4' positions were synthesized and their RNase H activity was examined. Some analogs that can lead to partial removal of PS modifications could be found.

研究分野：核酸有機化学

キーワード：アンチセンス核酸 修飾オリゴ核酸

1. 研究開始当初の背景

アンチセンス核酸 (ASO) は RNase H 依存型 (mRNA 分解により翻訳を抑制する) と RNase H 非依存型 (mRNA を分解せず、強固に結合してエクソンスキップ等を狙う) に大別でき、いずれのタイプの ASO にもホスホロチオエート (PS) 修飾が利用されている。しかし、PS 修飾は毒性や品質管理の面での問題を抱えている。中でも RNase H 依存型 ASO は中央部に RNase H の認識部位となる未修飾 DNA 領域 (ギャップ部分) を持つため、PS 修飾による核酸分解酵素耐性の付与が必須となっている (図1)。それゆえ、RNase H 依存型 ASO のギャップ部分に利用するための RNase H 活性を持つ修飾核酸の開発がこれまで検討されてきたが、十分な機能を持つ修飾核酸の開発には至っておらず、現状 PS 修飾を施した DNA (未修飾体) が利用されている。



●:修飾核酸 ○:DNA PS:ホスホロチオエート

2. 研究の目的

RNase H 活性と核酸分解酵素耐性能を兼ね備えた修飾核酸を開発できれば、RNase H 依存型 ASO のギャップ部分の脱 PS 化につながると考えられる。それゆえ、本研究では、それを実現できる修飾核酸の開発を目指す。

3. 研究の方法

研究目的を実現し得る修飾核酸として、4'-置換核酸 (4'位にカルボン酸等価体を持つ核酸と 4'-アルキルチオ核酸) と 1',4'-架橋型核酸を設計した。本研究では、それらのチミジンアナログを合成する (図2)。次に、それらを導入したオリゴ核酸を合成後、オリゴ核酸の標的一本鎖 RNA との結合親和性、RNase H 活性、核酸分解酵素に対する抵抗性を調べる。それらを通して、RNase H 活性と核酸分解酵素耐性能を兼ね備えた修飾核酸の開発を達成する。

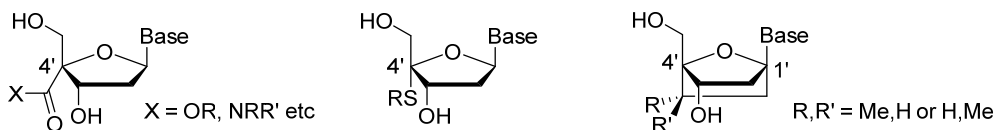


図2. 設計した修飾核酸のモノマー構造

4. 研究成果

4-1. 4'-置換チミジンを含むオリゴ核酸

4'位にカルボン酸等価体を持つチミジンアナログについては、私たちの報告¹⁾に従いチミジンから 4'- α -COOMe 体 (4'-メトキシカルボニル体) へと誘導し、DNA/RNA 自動合成機を用いてそれを含むオリゴ核酸を合成した。RNase H 活性評価のためのオリゴ核酸は、ウイング部分が 2'-メトキシ修飾、ギャップ部分が天然核酸と 4'-メトキシカルボニル体からなるものを用いた。その後、4'-メトキシカルボニル部は、オリゴ核酸合成後修飾法を用いた変換反応を行った。具体的には、様々な種類の塩基処理により、それぞれ対応するカルボン酸等価体へと変換した (図3)。

4'-アルキルチオチミジンについては、チミジンから 4'- α -SMe-チミジンのホスホロアミダイト体 (オリゴ核酸合成のためのビルディングブロック) を合成した。その後、4'位にカルボン酸等価体を持つチミジンアナログと同様、DNA/RNA 自動合成機を用いてそれを含むオリゴ核酸を合成した (図3)。

RNase H 活性評価に用いたオリゴ核酸配列 (下線は 2'-OMe 修飾)

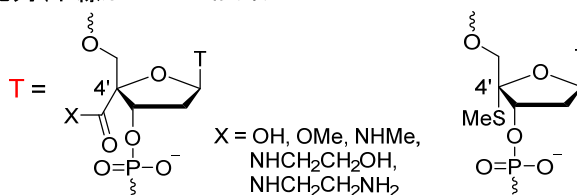
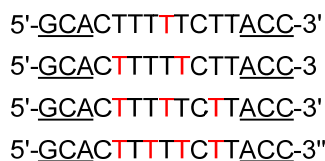


図3. 合成したオリゴ核酸の代表例

4-2. 1',4'-架橋型チミジンを含むオリゴ核酸

1',4'-架橋型チミジンの合成を図4に示す。市販の 2,2'-O-アンヒドロ-5-メチルウリジン **1** から7工程にて化合物 **2** へと導いた。続いて、フォトドックス触媒を用いた 1,5-水素移動による 4'-炭素ラジカル発生を行うべく、5'位水酸基をオキシムイミデート化した。得られた化合物を最近

私たちが報告したフォトドックス条件²⁾に付したところ、目的の1',4'-架橋体 **3** (S-メチル体) を立体選択的に得ることができた。TBS 基を除去した後、常法に従い、オリゴ核酸合成のビルディングブロック **4** へと誘導した。DNA/RNA 自動合成機により **4** を用いて、1',4'-架橋型チミジンを含むオリゴ核酸を合成した。

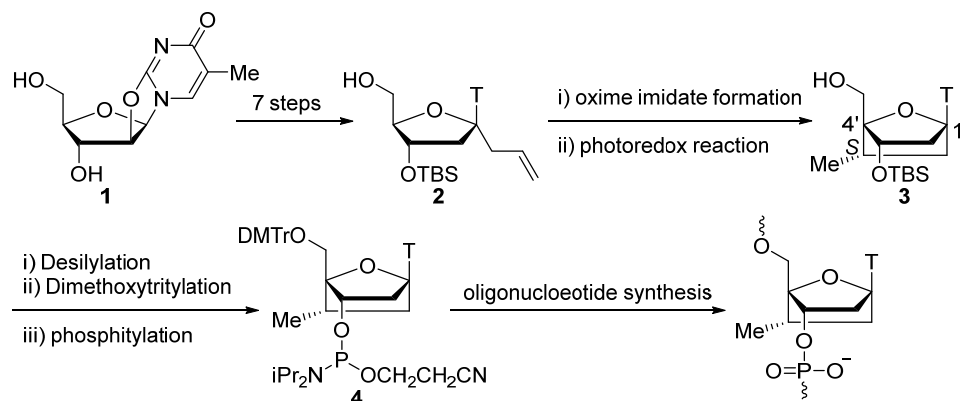


図4. 1',4'-架橋型核酸の合成

4-3. 修飾オリゴ核酸の機能評価

合成した各種修飾体を含むオリゴ核酸と一本鎖 RNA との結合親和性を融解温度測定により評価した。図3に示す4'-置換体はいずれの場合も、中性条件下、形成した二重鎖核酸の熱安定性に殆ど影響を与えないことが分かった。一方、1',4'-架橋型チミジンは1修飾あたり2-4°Cの安定化が確認された。これらの結果から今回の修飾核酸を使用しても標的 RNA と安定な結合親和性を維持できることが示された。

次に核酸分解酵素に対する抵抗性を調べた。結果、いずれのアナログにおいても、天然のものより核酸分解酵素に対して分解され難かった。特に、1',4'-架橋型チミジンは高い核酸分解酵素抵抗性を示すことが明らかとなった。

最後に RNase H 活性を評価した。5'末端をフルオレセインで修飾した RNA とギャップ部分に修飾核酸を導入したオリゴ核酸を用いて大腸菌由来の RNase H1 処理を行った。所定の時間が経過した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。その結果、本評価で用いた配列において4'-置換体の置換基の種類により RNase H 活性が異なることが示された。図5にその結果の一部を示す。2塩基おきに修飾核酸を導入した場合、4'-COOMe 体、4'-CONHMe 体、4'-CONHCH₂CH₂OH 体は RNase H 活性が見られたのに対して、4'-COOH 体、4'-CONHCH₂CH₂NH₂ 体、4'-SMe 体は RNase H による標的 RNA の分解は見られなかった。中でも、4'-COOMe 体と4'-CONHMe 体が RNase H 活性が高かったが、いずれの場合においても1塩基おきでの修飾では RNase H 活性を示さなかった。一方、1',4'-架橋型チミジンでは、RNase H 活性は2塩基おきの修飾でも示さないことが分かった。

標的RNA



オリゴ核酸 5'-GCACTTTTTTTACC-3'

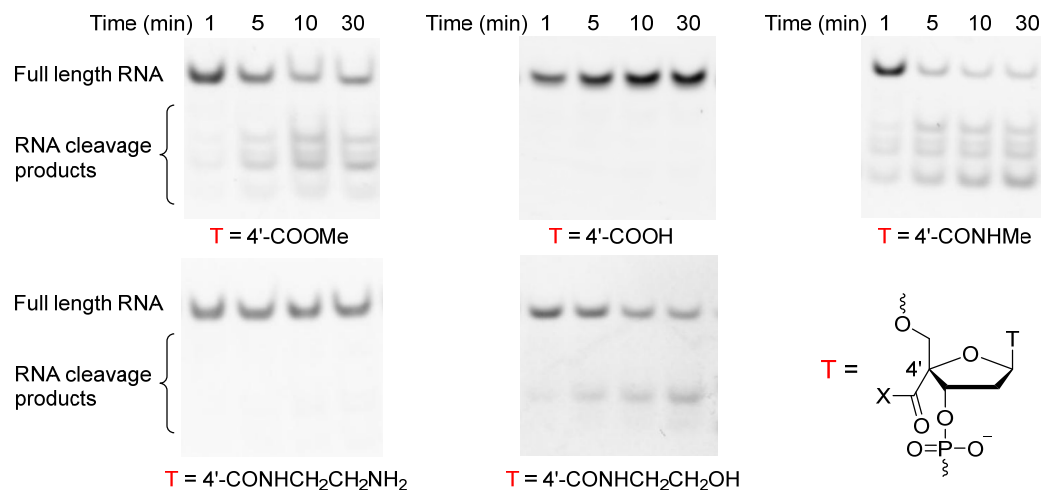


図5. RNase H活性評価の結果(一部)

本研究により見出した修飾核酸を用いることで、RNase H 活性を保持したギャップ部分の部分的な化学修飾が可能であった。その際、RNA との結合親和性を維持しており、さらに核酸分解酵素に対する抵抗性も向上した。本結果は、ギャップ部分の部分的な脱 PS 化を実現できる可能性を示唆するものである。

<引用文献>

- 1) Y. Hari, T. Osawa, S. Obika, Synthesis and duplex-forming ability of oligonucleotides containing 4'-carboxythymidine analogs, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9639-9649.
- 2) Y. Ito, K. Mizuno, S. Sumise, A. Kimura, N. Noguchi, Y. Fuchi, Y. Hari, Generation of 4'-carbon radicals via 1,5-hydrogen atom transfer for the synthesis of bridged nucleosides, *Org. Lett.* **2022**, *24*, 7696-7700.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤優大、伊藤勇太、淵 靖史、張 功幸
2. 発表標題 1',4'-架橋型チミジンを含むオリゴ核酸の合成とその物性評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川楓子、淵 靖史、伊藤勇太、張 功幸
2. 発表標題 4'-置換チミジンを含むオリゴヌクレオチドのRNase H活性とヌクレアーゼ耐性能
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------