

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560452

研究課題名(和文) Safety-catch型ケージド核酸の開発とマイクロRNAの発現制御

研究課題名(英文) Design and synthesis of safety-catch caged nucleic acids

研究代表者

古田 寿昭(FURUTA, Toshiaki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90231571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：標的細胞内だけで生理機能を発現するような新規ケージド化合物を開発し、マイクロRNAの発現制御への応用を目指して研究を行った。外部から導入した特異的な酵素存在下で光作動性を獲得するケージドヌクレオチド類を複数開発した。刺激で発現が上昇する内在性酵素存在下で光活性化可能なケージド化合物を設計・合成した。塩基配列選択的にRNAを修飾し、さらに、光分解性保護基で修飾されたRNAを精製する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to develop new caged RNA molecules which can be photochemically activated with cell type specificity. One barrier to using conventional caged compounds in in vivo applications is the lack of cell type specificity or targetability because the compounds are not genetically encoded. To overcome the problems, we designed and synthesized new caged nucleotides which can be photo-activated in the presence of specific enzymes upon 405 nm irradiation. Other types of caging groups having a peptide substrate were synthesized. The group become photoactive after the reaction with endogenously expressed enzymes such as caspase 3. To facilitate the synthesis of appropriately modified caged RNAs, we developed new nucleotide selective caging agents having sequence selectivity. The caging agents have used to prepare caged DNAs and RNAs with sequence selective manner and the resulting caged RNAs can be purified by affinity separation.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ケージド化合物 光化学 RNA

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質をコードしない RNA (ncRNA) が次々に同定されている。このうち、マイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる 20 塩基程度の RNA 断片が様々な生物種で同定され、mRNA の機能発現を調節していることが明らかになってきた。ヒトゲノム中にも 1,800 種類以上の miRNA がコードされていることが明らかになっている。miRNA の発現異常が様々な疾患に深く関係していることが指摘され、新しい創薬ターゲットとしての可能性も注目されている。一過的な濃度上昇と分解によって、ダイナミックにその細胞内局在が調節されていると考えられるので、その機能解明と利用のためには、厳密に miRNA の機能発現と機能阻害を実現する実験手法が必須である。しかし、現行の遺伝子工学的な手法だけでは、miRNA の発現を高い時空間分解能で制御することはできない。ケージド化合物とは、光分解性保護基を導入した生理活性分子のことで、光照射によってその活性を高い時空間分解能で制御できる。国内外の複数のグループから、優れた性質を持つケージド化合物が報告されてきた (ACS Chem Biol. 2009, 4, 409 や Chemical Reviews 2013, 113, 119 に総説)。我々も、1 光子および 2 光子励起の感受性が他のどれよりも高い (6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl (Bhc) ケージド化合物を開発し (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 1193, Trends Anal. Chem. 2004, 23, 501, J Synth. Org. Chem. Jpn., 2012, 1164 など)、モデル生物個体内で mRNA の機能発現を光制御することに成功している (Nature Genet. 2001, 28, 317, Dev. Biol. 2005, 287, 456 など)。しかし、生きた細胞内で miRNA の機能を光制御した例は報告されていない。以上の背景を踏まえて、ケージド化合物を用いた遺伝子の機能制御法の課題を解決することで、標的細胞内の miRNA の機能を高い時空間分解能で制御可能な、Safety-catch 型ケージド miRNA の開発を着想した

## 2. 研究の目的

標的細胞内だけで生理機能を発現するような新規ケージド化合物を開発し、マイクロ RNA (miRNA) の発現制御への応用の可能性を明らかにする。まず、標的細胞内の環境下で特異的に光活性化できるような近赤外光応答性の新規光分解性保護基を、合理的な分子設計で設計・合成し、細胞内のマイクロ RNA 濃度を直接制御できるような機能性核酸のケージド化合物合成に応用する。続いて、標的細胞を認識して集中する能動型の DDS と組み合わせることで、標的部位に集中するだけではなく、標的細胞の特殊な細胞内環境と近赤外光照射の 2 つが揃って初めて生理活性を示すような、safety-catch 機能を持つマルチターゲティング型の機能性核酸分子の

開発に応用し、標的細胞内のマイクロ RNA 濃度を精密に制御する技術に展開する。

(1) 標的細胞選択的に光感受性を獲得するケージド核酸誘導体の合成法を確立する。  
(2) 遺伝子工学的に目印を付けたモデル標的細胞内でのみ光活性化可能な Safety-catch 型ケージドマイクロ RNA の合成に応用する。  
(3) モデル標的細胞に集中すると期待されるマイクロカプセルにケージドマイクロ RNA を内包する。各機能の相乗効果により、標的細胞選択的に、しかも高い時空間分解能で細胞内マイクロ RNA 濃度を制御できることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

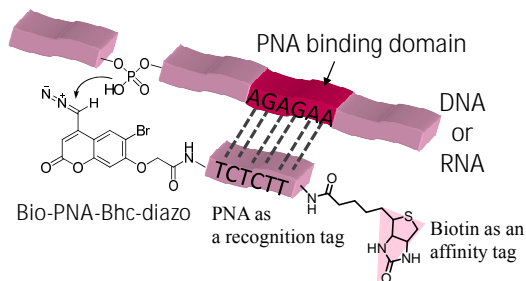
(1) 標的細胞選択的に光感受性を獲得するケージド核酸誘導体の合成法の確立：光感受性をロックする「鍵」付ケージド化合物として Gal-Bio-Bhc 基を設計し、 $\square$ -Gal が存在する環境下でのみ、405 nm 光照射によって活性化されるケージド miRNA 誘導体の高純度合成に利用する。(2) 標的細胞内でのみ光活性化可能な Safety-catch 型ケージドマイクロ RNA 合成への応用：合成した Gal-Bio-Bhc miR218 の安定性と光化学的性質を明らかにする。モデル標的細胞として  $\square$ -Gal を発現する哺乳動物培養細胞を用いて、光照射と  $\square$ -Gal 応答性の相乗効果によって選択性が向上することを明らかにする。標的細胞選択的に光活性化するための「鍵」のレパートリーを増やして、多様な細胞環境下で選択的に光活性化できるケージド miRNA の合成法に展開する。(3) 分子標的 DDS との組み合わせの検討：Gal-Bio-Bhc miRNA の RGD ペプチド修飾リボソームに内包し、複合化による選択性向上を定量する。

## 4. 研究成果

平成 26 年度

標的細胞内だけで生理機能を発現するような新規ケージド化合物を開発し、マイクロ RNA (miRNA) の発現制御への応用の可能性を明らかにすることを目的に研究を行った。ケージド miRNA に未修飾の miRNA が混在すると、光照射無しでも機能発現してしまうことから、二つの方法でこの問題の解決を図った。モデル分子として短鎖の一本鎖 DNA を用いて、ビオチンを導入したケージンググループ前駆体 (Bio-Bhc-diazo) によってケージングできること、導入したビオチンを利用して、生成した Bio-Bhc ケージド DNA を未修飾 DNA から分離精製できること、紫外光照射で Bio-Bhc 基が脱保護されることを確認した。また、塩基配列を認識するペプチド核酸 (PNA) を導入したケージング試薬 (PNA-Bhc-diazo) を用いると、近接効果によりケージング反応の効率が向上することも明らかにした。さらに、両者の特徴を併せ持つ新規ケージング試薬、Bio-PNA-Bhc-Diazo

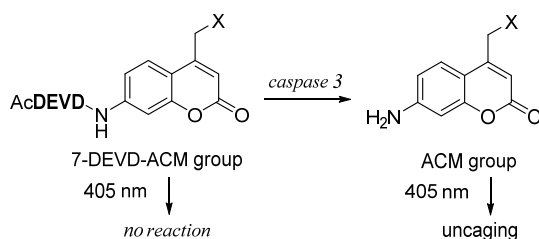
を設計・合成した。Bio-PNA-Bhc-Diazo を用いると、塩基配列選択的に DNA をケージングできること、ケージド DNA を分離精製できることを確認した。また、ケージング反応の効率も PNA 部位を持たないケージング試薬より向上することを明らかにした。



平成 27 年度

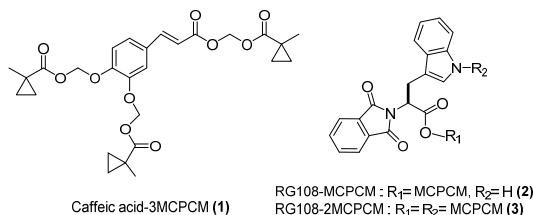
(1) 細胞内環境を認識して光活性化されるケージド化合物の設計と合成

新しい DDS の要素技術開発を目指して、光で鍵が外れて活性化されるケージド化合物に、標的細胞選択性を付与するような第 2 の「鍵」を付けて、「光照射」と「特異な細胞内環境」の 2 つの条件が揃ったときにのみ薬剤が放出されるような、Safety-Catch 型ケージド化合物を設計・合成した。平成 27 年度は、標的細胞選択的に光活性化するための「鍵」のレパートリーを増やして、多様な細胞環境下で選択的に光活性化できるケージド RNA の合成法に展開することを目指した。標的細胞を見分ける「鍵」としてプロテアーゼを選び、カスパーゼ 3 の発現が上昇している細胞だけで光感受性を獲得することが期待される新規ケージド化合物 7-DEVD-ACM-OAc (化合物 1) を設計・合成することに成功した。7-DEVD-ACM-OAc がカスパーゼ 3 存在下ではテトラペプチド DEVD 部位が脱保護されて、ACM-OAc (化合物 2) を定量的に生成することを確認した。化合物 1 および 2 の光化学的および物理学的性質を検証したところ、化合物 1 に pH 7 の緩衝溶液中で 405 nm 光を照射しても光反応しないのに対し、化合物 2 は 405 nm 光照射でアンケージングされることを確認した。以上の結果より、新たに開発した 7-DEVD-ACM ケージド化合物は、カスパーゼ 3 の発現が上昇した細胞内で、かつ、405 nm 光を照射した時のみ生理活性分子を放出する、Safety-catch 型のケージド化合物のレパートリーの一つといえる。第 2 の「鍵」であるペプチド部位のアミノ酸配列を変えることで、様々なプロテアーゼを標的にすることが可能なこと、修飾可能な可能基を持つ生理活性分子であれば、Safety-catch 型ケージド化合物に適用できることが特徴である。



(2) 細胞種選択的に細胞の生理機能を制御する分子の設計と合成

細胞種選択的に機能を発揮できる DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) 阻害剤の開発を目指し、豚肝臓エステラーゼ (PLE) によって特異的に切断される官能基である MCPCM (methylcyclopropanecarboxymethyl) 基で修飾した DNMT 阻害剤の合成、および、インビトロメチル化アッセイによる DNMT 阻害効果喪失の確認を行った。DNMT 阻害剤を 2 種類取り上げ、Caffeic acid-3MCPCM (1)、RG108-MCPCM (2) および RG108-2MCPCM (3) の合成を行った。Caffeic acid-3MCPCM と RG108-MCPCM については PLE との反応により、MCPCM 基が脱保護されて元の化合物に戻ることが確認できた。インビトロで DNA メチル化をアッセイする実験系を構築し、化合物 2 および 3 の効果を検証した。その結果、MCPCM 基による修飾では DNMT 阻害効果喪失に十分な高さが不足していることと、RG108 のカルボキシ基をマスクしても DNMT 阻害効果は変わらないことを確認した。さらに、アミノ基に導入した MCPCM 基は PLE によって完全には脱保護されないこと、カルボキシ基に導入したものの水中での安定性が高くないことも明らかにした。以上の結果から目的達成に必要な分子設計の手掛かりを得ることができたと考えている。

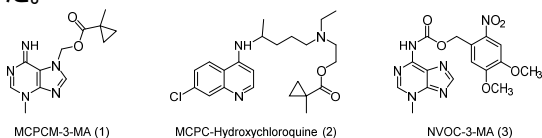


オートファジーは、リソソームに輸送された細胞質成分の細胞内自己分解プロセスである。オートファジーは癌などのヒト疾患に関連していると考えられているため、その阻害剤を用いて任意の時空間で阻害活性を制御できれば、ヒト疾患におけるオートファジー調節機構解明に役立つ。そこで、細胞種選択的にオートファジーを阻害するために、オートファジーの阻害剤の阻害活性を一時的にマスクし、特定酵素存在下、又は光照射によって阻害活性を得る誘導体を設計・合成することを目的に研究を進めた

豚肝臓エステラーゼ (PLE) によって特異的に切断される methylcyclopropane carboxyl (MCPC) 誘導体で修飾した MCPCM-3-MA (1) と、MCPC-Hydroxychloro-quine (2) を

合成した。さらに、光照射でオートファジー阻害効果を発揮すると期待される NVOC-3-MA (3) を合成した。

化合物 1 および化合物 2 は PLE により MCPC 基が切断され、3-MA とヒドロキシクロロキンがそれぞれ生成されることを確認した。化合物 3 に pH 7 の緩衝溶液中で 350 nm 光を照射すると光分解されることも明らかにした。以上の結果より、細胞種選択的に働く期待される化合物 1、2 および光で制御可能な化合物 3 の開発に成功したと結論づけた。



## 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 6 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 1 件 )

K. Sakamoto, A. Suzuki, T. Furuta, Development of DNA methyltransferase inhibitors having cell type specificity, 日本化学会 第 96 春季年会 (2016) , 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス ( 京都府・京田辺市 )

S. Takeda, A. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of autophagy inhibitors having cell type specificity, 日本化学会 第 96 春季年会 (2016) , 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス ( 京都府・京田辺市 )

W. Hashiba, T. Furuta, New caging agent having a PNA tag for sequence selective nucleotide caging, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), December 19, 2015, Honolulu, Hawaii (USA)

T. Furuta, Chemical tools to control cellular chemistry, the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 23, 2015, 神戸国際会議場 ( 兵庫県・神戸市 ) ( シンポジウム招待講演 )

[ 図書 ] ( 計 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 件 )

取得状況 ( 計 件 )

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/sci/biomol/tfuruta-lab/index.html>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古田 寿昭 ( FURUTA, Toshiaki )

東邦大学・理学部・教授

研究者番号 : 90231571

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし