

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860007

研究課題名(和文) RNAを標的とした擬ロタキサン形成による新規翻訳制御法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method to control translation by pseudorotaxane formation targeting on RNA

研究代表者

鬼塚 和光 (Onizuka, Kazumitsu)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：00707961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAは遺伝情報の伝達や制御を担う生体内分子であり、遺伝子発現制御において中核となる役割を果たしている。そのRNAを軸に擬ロタキサン構造を形成させ、極めて安定な複合体を形成させることができれば、効率的にリボソームの進行を止めることができると考え、新しい人工核酸、擬ロタキサン形成オリゴDNAの開発に着手した。本研究により開発した擬ロタキサン形成オリゴDNAは、生理的条件下、標的RNAとの二本鎖形成を引き金に化学反応が進行し、5分の反応で85%と高効率、高収率で擬ロタキサン構造体の形成に成功した。

研究成果の概要(英文)：It is expected that forming rotaxane-like architecture on target mRNA will lead to the regulation of gene expression. In this study, we tried to form pseudorotaxane architecture on the target RNA using a pair of pseudorotaxane-forming oligo DNAs (prfODNs) under physiological conditions. The pseudorotaxane formation reaction proceeded in 85% for 5 min, that is, we have developed the high-performance prfODN with high efficiency and yield.

研究分野：生物有機化学

キーワード：核酸化学 人工核酸 ロタキサン

1. 研究開始当初の背景

RNA は遺伝情報の伝達や制御を担う非常に重要な生体内分子であり、遺伝子発現制御において中核となる役割を果たしている。これらの RNA に対しオリゴヌクレオチド(ON)を用いて二本鎖を形成させ蛋白質発現を制御するアンチセンス法は、長年創薬に向けた研究が行われ、国内外を含め多数の修飾 ON が臨床試験まで進んでいる。これらのアンチセンス効果を効率化する一つのアプローチとしてクロスリンク核酸がある (Fig. 1)。クロスリンク核酸を導入した ON は標的 mRNA に対して共有結合を形成し、リボソムの進行をとめることで効率的に蛋白質発現を阻害できる。しかしクロスリンク核酸を用いた方法論では、共有結合を形成する標的が比較的反応性の低い核酸構成官能基であるため、高い反応性を持つクロスリンク核酸を用いる、あるいは高い反応性が外部刺激により活性化される分子を用いる必要があり、細胞内への適用には制限があった。

このような背景の下、本研究では従来のアプローチとはまったく異なる、標的 RNA と強く結合する新しいアプローチを考案した。今回、我々は二つの分子が、「直接共有結合でつながってはいないが外れもしない」というロタキサンの性質に着目した。ロタキサンは、輪の中にひも状の分子が貫通し、その両端にストッパーがつくことで、ひもが輪から抜けられない構造である (Fig. 2)。標的 RNA を軸に、擬ロタキサン構造 (RNA にストッパーがないため) を形成させることで、RNA と直接つながっていないが外れもしない、つまり RNA に巻き付く極めて安定な複合体を形成し、効率的にリボソムの進行を止めることができると考え本研究に着手した (Fig. 1)。

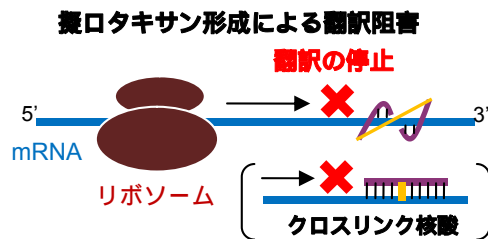


Fig.1 翻訳阻害の概念図

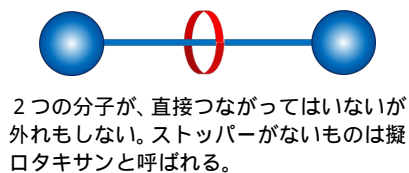


Fig.2 ロタキサン の 模式 図

2. 研究の目的

効率的な翻訳阻害を実現するためには高性能な擬ロタキサン形成核酸を開発する必要があります。本申請課題では、擬ロタキサン形成能を持つ人工核酸の開発、および新規

翻訳阻害法の確立の二つを研究期間内の目的とした。

3. 研究の方法

標的 RNA を軸に擬ロタキサン構造を形成する人工核酸として、一对の擬ロタキサン形成オリゴ DNA ( pseudorotaxane-forming oligo DNA, prfODN ) prfODN1、prfODN2 を設計した。それぞれの prfODN が標的 RNA に対して二本鎖を形成することで、まずホスホロチオエート基とクロロアセトアミド基との  $S_N2$  反応が進行、prfODN1 と prfODN2 が連結された後、DBCO (環歪みをもつアルキン) とアジド基が近接することで、銅触媒なしのクリックケミストリーが加速されヘリックス間で架橋が結ばれることを期待した (Fig. 3)。これら二つの反応が RNA 上で進行することで擬ロタキサン構造を形成し、RNA に対し非常に安定な複合体を形成できると期待した。

高性能な擬ロタキサン形成核酸を完成させるため、以下三点に着目し系統的に形成効率を調査した。

反応性基を伸長しているヌクレオチド間の塩基数

リンカーを挿入する部位

アジド基を修飾している PEG リンカーの長さ

また副反応を防ぐために、ホスホロチオエート基はジスルフィドダイマー-prfODN1' とすることで保護し、系中のグルタチオンにより活性化することを計画した (Fig. 3)。合成した種々の prfODN は組み合わせを変え、擬ロタキサン形成反応を 37 °C、pH7.2 の条件下行い、ゲルシフトアッセイにて系統的に解析した。

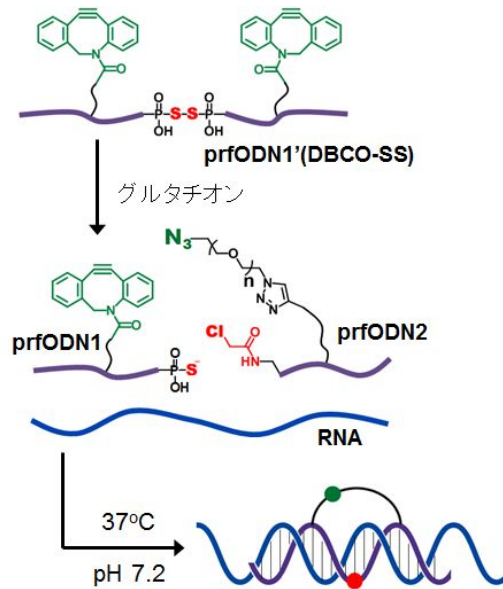


Fig.3 擬ロタキサン形成反応

4. 研究成果

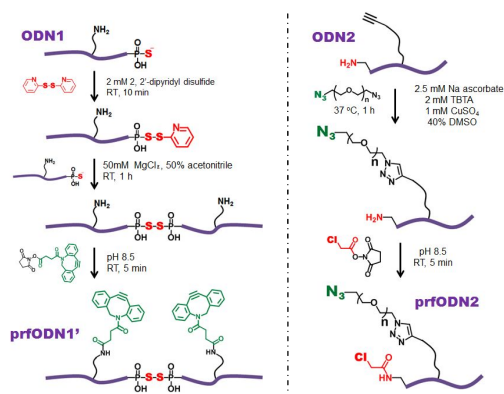
prfODN1'、prfODN2 の合成

prfODN1': DNA 自動合成装置で合成した

ODN1 を 2,2'-ジピリジルジスルフィドで活性化することでホモダイマーとし、続いて DBCO の活性エステルを用いて合成した。(Scheme 1)

prfODN2: DNA 自動合成装置で合成した ODN2 をクリック反応でアジド PEG リンカーをコンジュゲートし、続いてクロロ酢酸 N-スクシンイミジルで処理することで合成した。

それぞれの prfODN は HPLC で精製し、MALDI-TOF/MS で分子量を測定することで構造を確認した。



Scheme 1 prfODN の合成

#### 擬口タキサン形成反応

28mer の標的 RNA 存在下、prfODN1, 2 を用いて pH 7.2、37°C の条件で反応を行い、変性ポリアクリルアミドゲルにて分析を行った。その結果、変性ゲル上で通常の二本鎖より安定な擬口タキサン由来と考えられるバンドが観測された。64 の組み合わせの系統的な検討の結果、prfODN1 のリンカーを主溝側から、prfODN2 のリンカーを副溝側から伸ばすことで、5 分の反応で最大 85% と高効率、高収率な反応を見出した。さらに本反応は環状の一本鎖 DNA (7249 塩基) に対しても進行し、カテナン (二つの環が鎖のようにつながった構造体) を形成できることも確認した。この結果から、想定した貫通構造の形成が強く示唆された。

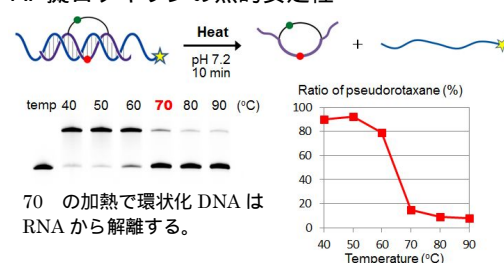
#### 擬口タキサン構造の熱的安定性

この擬口タキサンの熱的安定性を確認するため、様々な温度で 10 分間加熱後、0 °C へ急冷し変性ゲル電気泳動で擬口タキサンの存在率を調査した。その結果、70 °C の加熱で環状化 DNA は RNA から解離することが明らかになった (Fig. 4A)。この二本鎖の  $T_m$  値 (二本鎖の半分が解離する温度) を測定したところ 66 °C であったことから、この擬口タキサン構造は二本鎖構造の熱的安定性を大きく上げる効果はなかった。しかし、室温条件下、変性ゲル上 (非熱的に二本鎖構造を解離する条件) でこの擬口タキサン構造は安定だったことから、これまでの二本鎖構造にはない特殊な安定性を与えることに成功した

といえる。

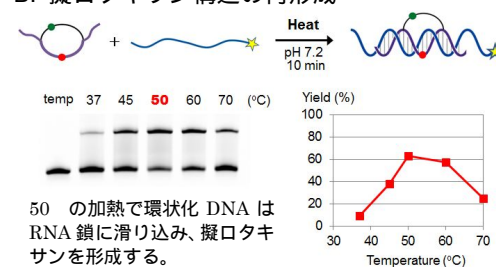
さらに興味深い現象として、この環状化 DNA は 50 °C で加熱することで標的 RNA 鎖に滑り込み擬口タキサンを再形成できることを発見した (Fig. 4B)。つまりこの環状化 DNA は、低温では二本鎖を形成しないが、適度な加熱で二本鎖を形成するという興味深い性質を示した。

#### A: 擬口タキサンの熱的安定性



70 °C の加熱で環状化 DNA は RNA から解離する。

#### B: 擬口タキサン構造の再形成



50 °C の加熱で環状化 DNA は RNA 鎖に滑り込み、擬口タキサンを形成する。

Fig.4 擬口タキサンの熱的安定性と再形成

#### 細胞抽出液を用いた翻訳阻害実験

最適化した prfODN の翻訳阻害効果を調査した。まず、ホタルルシフェラーゼの配列を持つ mRNA に対し合成した prfODN を用いて擬口タキサンを形成させた。続いてその mRNA および細胞抽出液を用いて、試験管内で翻訳反応を行い、ルシフェラーゼ発光を調査した。しかしながら、試した prfODN に翻訳阻害効果は観測されなかった。その原因として、複合体の安定性が翻訳阻害のために十分ではなかったことが考えられる。そこでリンカー部位を PEG リンカーからカチオン性のリンカーに変更することで、貫通構造の安定性をさらに高めることにした。本研究期間中にはカチオン性のリンカーをもつ反応性 ODN の合成まで終了した。今後、同様のアプローチにより翻訳阻害効果を調査していく予定である。

#### 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 6 件)

1. Sato, N., Tsuji, G., Sasaki, Y., Usami, A., Moki, T., Onizuka, K., Yamada, K., Nagatsugi, F, A new strategy for site-specific alkylation of DNA using

oligonucleotides containing an abasic site and alkylating probes, *Chem. Commun*, **51**, 14885-14888 (2015). 査読有 (DOI: 10.1039/c5cc03915k)

2. Kikuta, K., Piao, H., Brazier, J., Taniguchi, Y., Onizuka, K., Nagatsugi, F., Sasaki, S., Stabilization of the i-motif structure by the intra-strand cross-link formation., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**, 3307-3310 (2015). 査読有 (DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.05.064)

3. Oshiro, I., Jitsuzaki, D., Onizuka, K., Nishimoto, A., Taniguchi, Y., Sasaki, S., Site-specific modification of the 6-amino group of adenosine in RNA by an interstrand functionality-transfer reaction with an S-functionalized 4-thiothymidine, *ChemBioChem*, **16**, 1199-1204 (2015). 査読有 (DOI: 10.1002/cbic.201500084)

4. Seo, S., Onizuka, K., Nishioka, C., Takahashi, E., Tsuneda, S., Abe, H., Ito, Y., Phosphorylated 5-ethynyl-2'-deoxyuridine for advanced DNA labeling, *Org. Biomol. Chem.* **13**, 4589-4595 (2015). 査読有 (DOI: 10.1039/c5ob00199d)

5. Onizuka, K., Nagatsugi, F., Ito, Y., Abe, H., Automatic Pseudorotaxane Formation Targeting on Nucleic Acids Using a Pair of Reactive Oligodeoxynucleotides, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 7201-7204 (2014). 査読有 (DOI: 10.1021/ja5018283)

6. Jitsuzaki, D., Onizuka, K., Nishimoto, A., Oshiro, I., Taniguchi Y., Sasaki, S., Remarkable acceleration of a DNA/RNA inter-strand functionality transfer reaction to modify a cytosine residue: the proximity effect via complexation with a metal cation *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8808-8815(2014). 査読有 (DOI: 10.1093/nar/gku538)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 鬼塚 和光, 宮下 卓也, 雨宮 拓哉, 永次 史, 核酸を標的とした擬口タキサン形成オリゴ核酸の構造最適化、日本薬学会 第 136 年会、2016.03.26-29、パシフィコ横浜(横浜)

2. 宮下 卓也, 鬼塚 和光, 永次 史, 核酸標的擬口タキサン形成オリゴ DNA の構造最適化、日本化学会 第 96 春季年会、2016.3.24-3.27、同志社大学 京田辺キャンパス(京都)

3. Hazemi Madoka Eurika, Kazumitsu Onizuka, Ken Yamada, Fumi Nagatsugi, Synthesis of natural-like cross-linked duplex RNA for biochemical studies、日本化学会 第 96 春季年会、2016.3.24-3.27、同志社大学 京田辺キャンパス(京都)

4. Kazumitsu Onizuka, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe, Fumi Nagatsugi, Development of pseudorotaxane formation methods targeting on nucleic acids,

*Pacificchem* 2015, 2015.12.14-12.20, Hawaii (USA)

5. 宮下 卓也, 鬼塚 和光, 永次 史, 核酸を標的とした擬口タキサン形成オリゴ DNA の構造最適化、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015.9.10-2015.9.12、熊本大学(熊本)

6. 鬼塚 和光, Hazemi Madoka Eurika, 永次 史, 生化学ツールのための架橋形成した天然疑似二本鎖 RNA の合成、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015.9.10-2015.9.12、熊本大学(熊本)

7. Kazumitsu Onizuka, Takuya Miyashita, Fumi Nagatsugi, Pseudorotaxane formation via slipping process targeting on nucleic acids, *The 42th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*, 2015.9.23-9.25, Himeji (Japan)

8. 鬼塚 和光, 宮下 卓也, Hazemi Madoka Eurika, 永次 史, RNA インターロック構造体および架橋形成した天然疑似二本鎖 RNA の化学的形成法、第 17 回日本 RNA 学会年会、2015.7.15-7.17、ホテルライフオー ト札幌(札幌)

9. 雨宮 拓哉, 鬼塚 和光, 永次 史, RNA を標的にしたインターロック構造形成法の開発、日本化学会 第 95 春季年会、2015.3.26-3.29、日本大学船橋キャンパス(千葉)

10. 鬼塚和光, 伊藤嘉浩, 阿部 洋, 永次 史, 化学反応性オリゴ DNA による擬口タキサン形成反応、第 40 回反応と合成の進歩シンポジウム、2014.11.10-11.11、東北大学(仙台)

11. Kazumitsu Onizuka, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe, Fumi Nagatsugi, Automatic Pseudorotaxane Formation Targeting on Nucleic Acids, *The 41th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*, 2014.11.5-11.7, Kitakyushu (Japan)

12. Kazumitsu Onizuka, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe, Fumi Nagatsugi, Development of pseudorotaxane formation method targeting on nucleic acids, *3rd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS)*, 2014.10.2-10.3, Bern (Switzerland)

13. 鬼塚和光, 伊藤嘉浩, 阿部 洋, 永次 史, 一対の化学反応性オリゴ DNA による RNA 標的擬口タキサン形成法、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, 2014.9.8-9.9、東京医科歯科大学(東京)

14. 鬼塚和光, 伊藤嘉浩, 阿部 洋, 永次 史, 反応性オリゴ DNA を用いた擬口タキサン形成法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第 9 回年会、2014.6.11-6.13 大阪大学豊中キャンパス(大阪)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/lab0/nagats>

ugi/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鬼塚 和光 (ONIZUKA, KAZUMITSU)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：00707961