



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

糖部開環型人工核酸の合成と遺伝子発現抑制法への
応用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小縣, 綾 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56217

糖部開環型人工核酸の合成と
遺伝子発現抑制法への応用

2016 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻

(岐阜大学)

小縣 綾

糖部開環型人工核酸の合成と
遺伝子発現抑制法への応用

小縣 綾

略語表

本論文に用いた略語および略記号は、以下に示す通りである。

rA = adenosine

dA = deoxyadenosine

rC = cytidine

dC = deoxycytidine

CPG = controlled pore glass

EDCl · HCl = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide HCl

DMAP = 4-dimethylaminopyridine

DMF = *N,N*-dimethylformamide

DMTr = 4,4'-dimethoxytrityl

EDTA = ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

rG = guanosine

dG = deoxyguanosine

MALDI-TOFMS = matrix assisted laser desorption ionization - time of flight

MEM = minimum essential medium

NIS = *N*-iodosuccinimide

NMR = nuclear magnetic resonance

dT = thymidine

TBAF = tetrabutylammonium fluoride

TBDMS = *tert*-butyldimethylsilyl

TBDPS = *tert*-butyldiphenylsilyl

THF = tetrahydrofuran

Tris = tris (hydroxymethyl) aminomethane

TMS = tetramethylsilane

rU = uridine

目次

第1章 序論

第1節 核酸医薬品	1
1-1-1. RNA 干渉	
1-1-2. アンチセンス法	
第2節 核酸への化学修飾	7
1-2-1. リン酸部への修飾	
1-2-2. 糖部への修飾	
1-2-3. 塩基部への修飾	
1-2-4. 研究目的	

第2章 糖部開環型人工核酸の合成

第1節 糖部開環型核酸（チミジンアナログ）の合成	11
2-1-1. 糖部合成	
2-1-2. 塩基部合成	
2-1-3. チミジンアナログの合成	
第2節 糖部開環型核酸（シチジンアナログ）の合成	14
2-2-1. 塩基部合成	
2-2-2. シチジンアナログの合成	

第3章 RNAi への応用検討

第1節 siRNA/miRNA の設計	16
3-1-1. オフターゲット効果の回避	
3-1-2. 今回検討する siRNA/miRNA	
第2節 アナログ T^a を導入したオリゴヌクレチドの合成と物理化学的性質	18
3-2-1. アナログ T^a を導入した RNA 二重鎖の熱的安定性の検証	
3-2-2. アナログ T^a を導入した RNA のエキソヌクレアーゼ耐性の検証	
3-2-3. アナログ T^a を導入した RNA のエンドヌクレアーゼ耐性の検証	
第3節 アナログ T^a を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証	23
3-3-1. アナログ T^a を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証 I	
3-3-2. アナログ T^a を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証 II	
3-3-3. アナログ T^a を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証 III	

第4節	アナログ T^a を導入した miRNA の遺伝子発現抑制能の検証	31
3-4-1.	アナログ T^a を導入した miR-199a-3p の遺伝子発現抑制能の検証	
3-4-2.	アナログ T^a を導入した miR-199a-5p の遺伝子発現抑制能の検証	
第4章 アンチセンス法への応用検討		
第1節	アンチセンス核酸	36
4-1-1.	アンチセンス核酸への化学修飾	
4-1-2.	今回検討するアンチセンス核酸	
第2節	アナログを導入したオリゴヌクレオチドの合成と物理化学的性質	38
4-2-1.	アナログを導入したオリゴヌクレオチドの合成	
4-2-2.	アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の熱的安定性の検証	
4-2-3.	アナログを導入したオリゴヌクレオチドの塩基特異性の検証	
4-2-4.	アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の熱力学的安定性の検証	
4-2-5.	アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の高次構造の検証	
第3節	ヌクレアーゼ耐性の検証	49
4-3-1.	アナログ T^a を導入したオリゴヌクレオチドの合成	
4-3-2.	エキソヌクレアーゼ耐性の検証	
第4節	アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の RNase H 活性化能の検証	51
4-4-1.	アナログを導入したオリゴヌクレオチドの合成	
4-4-2.	RNase H による RNA 分解能の検証 I	
4-4-3.	RNase H による RNA 分解能の検証 II	
総括		58
実験項		61
引用文献		73
謝辞		78

第 1 章 序論

第 1 節 核酸医薬

近年、siRNA やアンチセンス核酸をはじめとする核酸医薬品は 1) 低分子医薬品や抗体医薬品では標的とできなかつた RNA や DNA などを創薬ターゲットにできる点、2) 基質特異性が高いため副作用が少ない点、3) 製品の規格化が抗体医薬などと比較して容易である点などの理由から、次世代医薬品として注目を集めており、これまでに様々な研究が進められている (Table 1) ¹⁾。

一般名 (商品名)	分類	上市時期	標的	適応症	投与方法
Fomivirsen (Vitravene)	アンチセンス	1998 (米) 1999 (EU)	サイトメガロウイルス (CMV) 遺伝子 IE2 mRNA	CMV 性網膜炎 (AIDS 患者)	硝子体内局所
Pegaptanib (Macugen)	アプタマー	2004 (米) 2006 (EU)	Vascular endothelial growth factor (VEGF) 165 タンパク質	加齢性黄斑変性症	硝子体内局所
Mipomersen (Kynamro)	アンチセンス	2013 (米)	ApoB 100 mRNA	ホモ接合型家族性高 コレステロール血症	皮下

Table 1. 上市された核酸医薬品 (~2013 年)

この中で注目すべきは、それまでの核酸医薬品が局所投与であるのに対し、2013 年に Kynamro が全身投与の核酸医薬品としてはじめて上市されたことである。この Kynamro は DDS 分子なしでの皮下投与が可能であり、肝臓に発現する ApoB mRNA の遺伝子発現を抑制することで効果を示すアンチセンス核酸です。これは 20 塩基からなる DNA であり、ホスホロジエステル結合に代わりホスホロチオエート結合を用いることで血中滞留性が向上し皮下投与を可能にしている ²⁾。

この他に、2016 年 9 月にはデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬として eteplirsen³⁾、12 月には脊髄性筋萎縮症 (SMA) 治療薬として SPINRAZA (ヌシネルセン) が FDA (Food and Drug Administration、米国食品医薬当局) に承認された ⁴⁾。これらは上市された世界初のスプライシング制御型のアンチセンス核酸であり、詳細は 1-1-2. アンチセンス法に記載した。

しかし、核酸医薬品開発には解決すべき問題点がまだ数多く存在し、大別して以下の 3 点が挙げられている ⁵⁾。

1. 天然型の核酸の生体内安定性の乏しさ

核酸を医薬品に応用するには、生体内においても安定に存在し、標的特異的に効果を示すことが必須条件である。しかし、天然型の核酸は生体内において普遍的に存在するヌクレアーゼにより容易に分解されるため非常に不安定である。

2. デリバリーが困難である

核酸はリン酸ジエステル結合に由来する負電荷ゆえに細胞膜透過性が低い。また、水溶性は極めて高く、毛細血管から漏出し、糸球体ろ過を経て速やかに尿中に排泄される。

3. インターフェロン応答による副作用

生体内に備えついた生存に必須の機構であるが、核酸医薬品開発にとって重篤な副作用の原因ともなりうる。

これらの問題を克服する手段のひとつとして、核酸への化学修飾体の導入が盛んに研究されている。化学修飾体については第 2 節に記載した。

1-1-1. RNA 干渉

近年、アンチセンス法や RNA アプタマーに続く新たな核酸医薬手法として RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) 法が期待されている。1998 年の Fire と Mello らによる線虫による実験で RNA 干渉⁶⁾ は大きな注目を集めた。これまでの研究から、この RNA 干渉は線虫をはじめ、ショウジョウバエ、哺乳類、植物でも保存されていることが知られている。そして、2001 年には Elbashir らが化学合成した 21-22 塩基の siRNA が哺乳類細胞においてインターフェロン応用を誘起せず配列特異的な遺伝子発現抑制を示すことを報告した⁷⁾。

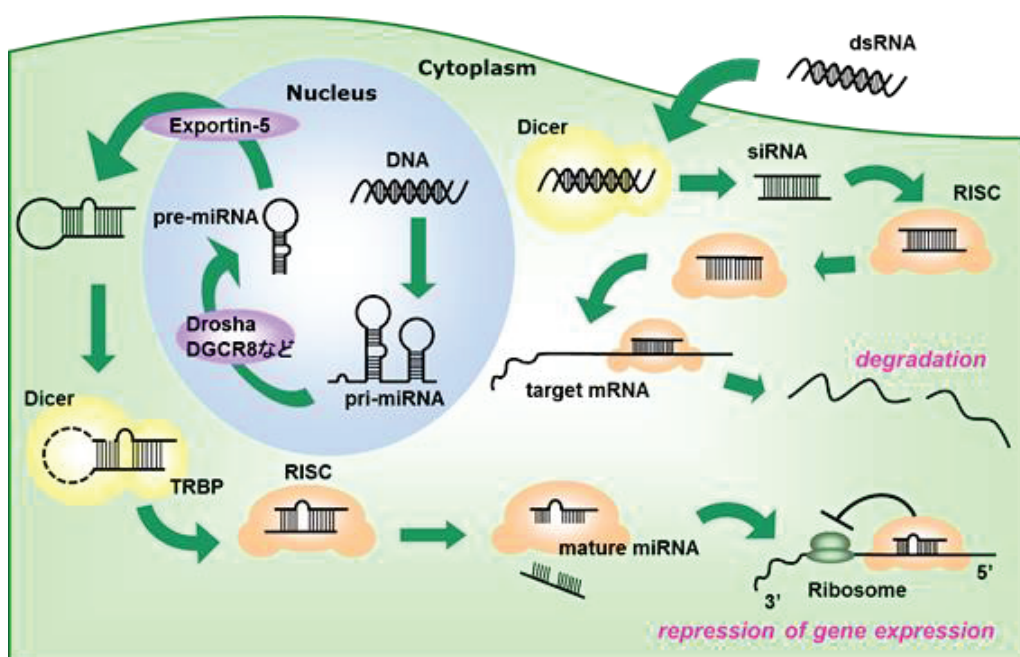


Figure 1. RNA 干渉

RNA 干渉の作用機構は以下の通りである (Figure 1)。RNA 干渉は長鎖二重鎖 RNA が引き金となって引き起こされ、ヒトをはじめとする哺乳動物において、細胞内に導入された長鎖二重鎖 RNA は Dicer (RNaseIII タンパク質ファミリー) により 25-21 塩基程度の siRNA (small interfering RNA) に切断される。そして、siRNA は ATP 非依存的な巻き戻しを受けてパッセンジャー鎖が取り除かれ一重鎖となり、Argonaute タンパク質 (Ago) などと共に RISC (RNA-induced silencing complex) を形成する。その後、RISC はガイド鎖に相補的な配列を含む標的 mRNA を認識し、Ago2 の Slicer 活性によりガイド鎖中央部分で切断されることにより遺伝子発現抑制を引き起こすことが知られている⁸⁾⁹⁾。

この RNA 干渉を引き起こす siRNA は 3'末端が 2 塩基突出した構造を持つ鎖長 21-23mer の二重鎖 RNA であり、DNA/RNA 自動核酸合成機により容易に合成可能である。そのため、核酸医薬の問題点を解決するための化学修飾の導入も容易であり、様々な化学修飾 siRNA の開発が進められている。2015 年 12 月時点で、上市している siRNA 医薬はないものの、日本国内でも肝硬変治療薬の ND-L02-s0201 (日東電工/札幌医科大/北海道大)、乳がんを標的とした TMD-812 (国立がん研究センター/3DM) とクローン病の合併症として生じる腸管狭窄症を対象とした STNM01 (新潟大/ステリック再生医科学研究所) の 3 件の臨床試験が進められている¹⁰⁾。

また、siRNA によって引き起こされる RNA 干渉に対して、内在性低分子である miRNA (micro RNA) によっても RNA 干渉は引き起こされる (Figure 1)。miRNA はまず DNA から長い一次転写産物 (pri-miRNA) として転写され、そのうちヘアピン状の高次構造をとっている部分が切り出され (pre-miRNA)、これが Dicer によるプロセシングを受けて miRNA となる。そして、siRNA と類似の経路を辿り mRNA と結合し切断、あるいは mRNA の 3'-UTR に結合して翻訳を阻害する。

miRNA は大多数の機能が未だ解明されていないが、生物の発生や形態形成、細胞増殖や癌化など、非常に重要な生物学的機能を緻密に制御していることが知られている。特に近年、癌と miRNA の関連性が指摘されている^{11) 12)}。そのため、癌細胞に特異的に発現する miRNA を利用した診断や創薬ターゲットとして miRNA の研究も進められている。

1-1-2. アンチセンス法

1998年、世界発の核酸医薬品として HIV 患者のサイトメガロウイルスを感染による網膜炎を治療するアンチセンス医薬 Vitragen が FDA により承認された。そして、2012年には家族性高コレステロール血症を治療する全身投与可能なアンチセンス医薬 Kynamro が承認され、核酸医薬開発の中でもアンチセンス医薬は臨床研究が最も進んでいる手法である。アンチセンス法とは、DNA→RNA→タンパク質のセントラルドグマの流れをアンチセンス核酸 (ASO) により遮断する遺伝子発現制御法である (Figure 2)。このアンチセンス核酸は一重鎖のオリゴヌクレオチドであり、標的 mRNA と配列依存的に二重鎖を形成し、標的 RNA の機能を制御する¹³⁾¹⁴⁾。これは作用機序により、gapmer 型とスプライシング制御型に大別される¹⁵⁾。

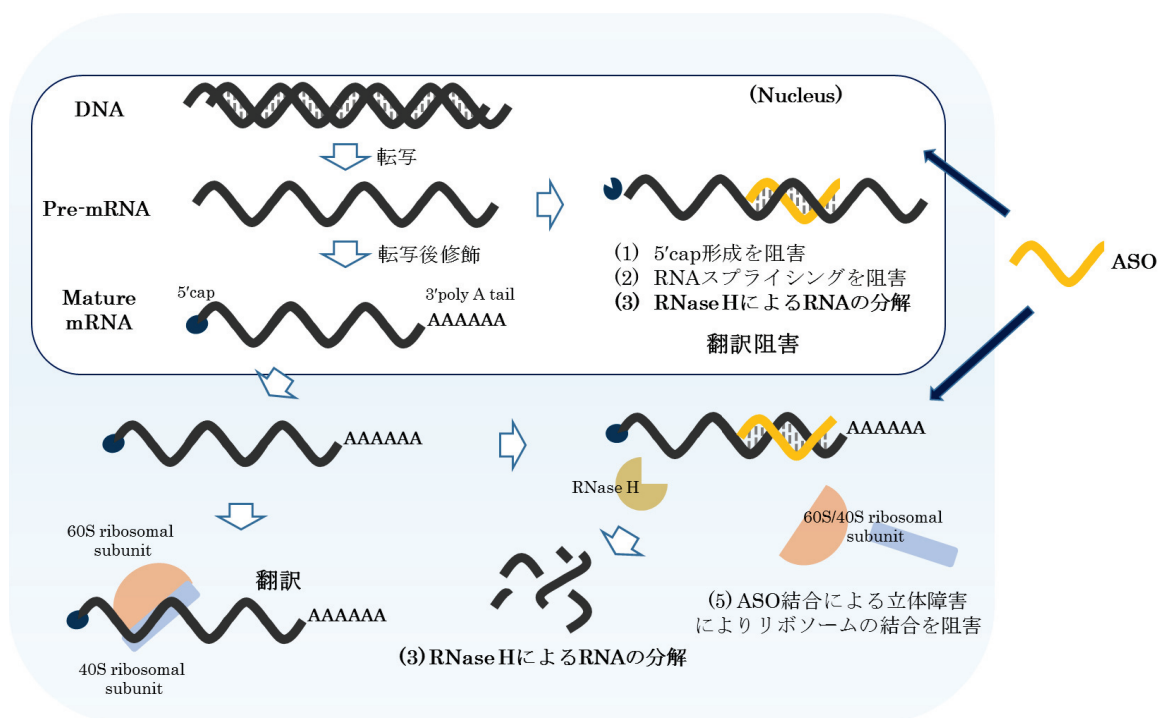


Figure 2. アンチセンス法

Gapmer 型アンチセンス核酸は、両末端の wing region に RNA との結合能力が高い化学修飾体を導入し、中央の gap region に DNA 鎖を用いた核酸である。そして、主に核内に存在する DNA/RNA 二重鎖を認識して RNA 鎖のみを切断するヌクレアーゼである RNase H が ASO/RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖のみを切断することでその遺伝子発現を抑制する。上述した Kynamro が gapmer 型アンチセンス核酸の代表例であり、RNA との結合能力を高めるために wing region に 2'-MOE RNA を導入し、gap region に DNA 鎖を用いることで効率的に遺伝子発現を抑制している¹⁶⁾。

次に、スプライシング制御型はスプライシングを変化させ、mRNA の配列を修正することで有効性を発揮する。この手法は、RNA 鎖を分解する必要がなく、強固に標的 RNA と結合することで作用するため、RNA との結合親和性が極めて高く、RNase H の基質にならない化学修飾体が使用される。現在、スプライシング制御型アンチセンス核酸ではデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療薬の開発段階が進んでいる。これはエキソンスキッピングの機序によって作用しており、化学修飾体は RNase H の基質にならないモルフォリノオリゴヌクレオチド (PMO) や 2'-MOE RNA (Figure 3) が使われている^{17) 18)}。そして、2016年9月、PMO を導入したスプライシング制御型アンチセンス核酸である eteplirsen が FDA に承認されたのをはじめ、12 月には SMA 治療薬の SPINRAZA (ヌシネルセン) が承認された。

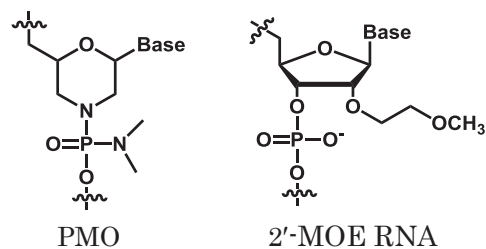


Figure 3. 化学修飾体

第2節 核酸への化学修飾

化学修飾体の開発

核酸医薬の問題点を克服するため、様々な化学修飾体が考案されている。例えば、siRNA やアンチセンス核酸に化学修飾体を導入することで、ヌクレアーゼ耐性が大幅に向上し、体内での安定性は大きく改善した。また、標的 RNA との親和性や細胞内への取り込み効率も天然型と比較して改善した。これらの効果によって、siRNA やアンチセンス核酸はより低濃度で有効性を得ることが可能となり、細胞毒性の問題も低減しつつある。そのため、核酸医薬品にとって化学修飾体の導入は極めて有用であると考えられる。核酸の化学修飾は、リン酸部、糖部、塩基部に分類できる (Figure 4)^{19) 20)}。

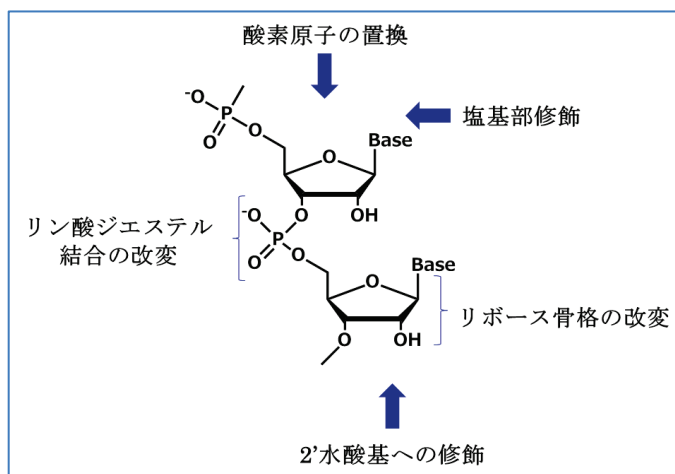


Figure 4. 核酸への化学修飾

1-2-1. リン酸部への修飾

リン酸ジエステル結合部位への代表的な修飾法 (Figure 5) は、ホスホジエステル結合の非結合性酸素原子を硫黄原子に置き換えたホスホロチオエート (PS) 修飾である。核酸と核酸をつなぐリン酸ジエステル結合部位の修飾であることから、ヌクレアーゼ耐性の獲得に大きく寄与し、疎水性が増すことから細胞内への取り込みも改善した。しかし、天然型と比較して非特異的なタンパク結合が増加し、細胞毒性が誘導されるということが報告されており、核酸医薬の実用化に多数の PS 修飾の導入は難しい^{21) 22)}。その他の修飾法に、非結合性酸素を等電子のボラン (-BH₃) に置き換えたボラノリン酸修飾がある。siRNA に BH₃ 修飾を導入すると、配列によっては PS 修飾よりも高い遺伝子発現抑制能を示すことも

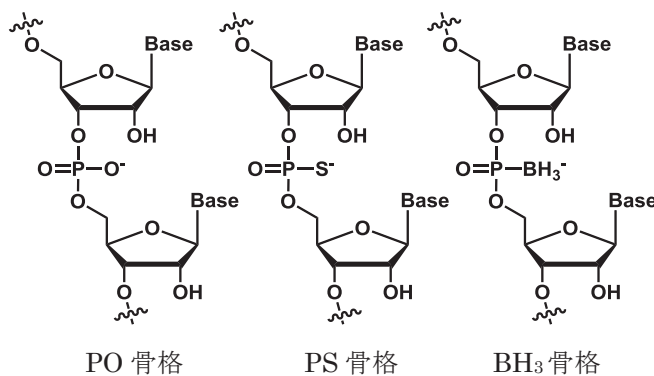


Figure 5. リン酸部修飾体

あり、また、パッセンジャー鎖よりもガイド鎖への導入の方が遺伝子発現抑制能の向上につながるという、他の化学修飾とは対照的な特徴を有している²³⁾。

1-2-2. 糖部への修飾

siRNA が RNAi 誘導活性を有するためや、アンチセンス核酸が RNase H 切断活性を惹起するためには、二重鎖が A 型らせん構造を保持していることが重要である^{24) 25)}。しかし、2'水酸基はこれら活性に必須ではないことから、2'位への化学修飾の導入が多く報告されている (Figure 6)。その中でも 2'-O-methyl (2'-OMe) RNA は、相補鎖との結合親和力およびヌクレアーゼ耐性を向上させるため²⁶⁾、有効な核酸修飾法として汎用されている。しかし、高い遺伝子抑制能を維持するためには、2'-OMe RNA の導入数や導入部位に制限があると報告されている²⁷⁾。また、メトキシエチル (2'-O-MOE) 基やアリール (2'-O-allyl) 基の導入もヌクレアーゼ耐性の向上や高い遺伝子発現抑制能を付与する²⁸⁾。この 2'-O-MOE 修飾は 2'-O-Me 修飾よりも高いヌクレアーゼ耐性を持つ²⁹⁾。

他にも、2'位へのフッ素原子の導入も有効な修飾法である。2'位に電子吸引性の置換基を導入するとヌクレオチドの糖部立体配座が C2'-endo 型 (N 型) に移行することから、この修飾を導入した RNA は二重鎖形成に有利である。また、2'-F RNA の siRNA への導入はヌクレアーゼ耐性の向上に加えて、高い遺伝子発現抑制能を示した。さらに、この修飾法はガイド鎖、パッセンジャー鎖共に全て修飾してもその遺伝子発現抑制能が保持されたと報告されている^{30) 31)}。次に、リボース環の酸素原子を硫黄原子に置換した 4'S-RNA は、相補 RNA と安定な A 型らせん構造の二重鎖を形成し、高いヌクレアーゼ耐性を有していることが報告されている。パッセンジャー鎖への 4'S-RNA の導入は遺伝子抑制活性に影響を与えないが、ガイド鎖へ導入すると、4'S-RNA の導入部位や数によって遺伝子抑制活性の低下が引き起こされる^{32) 33) 34)}。

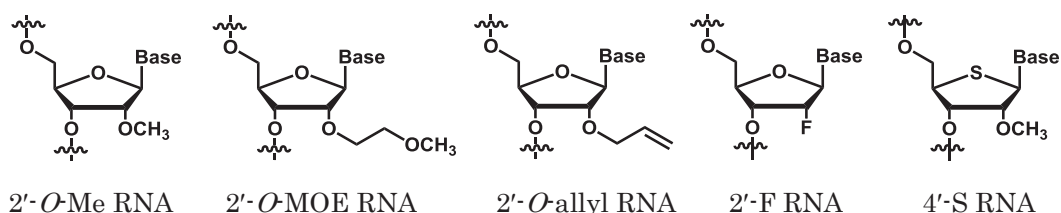


Figure 6. 糖部修飾体

一方で、糖部の立体配座を固定した架橋型核酸、LNA (locked nucleic acid)³⁵⁾ (Figure 7) は立体配座の固定化により、二重鎖の熱的安定性を大幅に向上させることが報告されている。LNA は高い二重鎖安定性とヌクレアーゼ耐性を有することから、様々

な siRNA やアンチセンス核酸への導入が行われている。そんな架橋型に対して、PNA (polyamide nucleic acid)³⁶⁾ や GNA (glycerol nucleic acid)³⁷⁾ のような開環型核酸 (Figure 7) が開発された。PNA はリン酸ジエステル結合を持たず、電荷がない構造であるため中性で二重鎖形成に電子反発がないことから、DNA と高い熱的安定性を示す。その反面、電荷がないため水溶性が低下し、長鎖となると水に溶けない欠点がある。

また、GNA は天然型以上の熱的安定性を持つ GNA 二重鎖を形成することができ、RNA とは二重鎖を形成するが DNA とは二重鎖を形成しない³⁸⁾。一般的に、開環型核酸は構造の自由度が高いため、二重鎖形成がエントロピー的に不利になりやすい傾向がある³⁹⁾。しかし、GNA は一重鎖でも高次構造をとっているため、二重鎖形成時のエントロピー損失が小さく、GNA 二重鎖形成はエントロピー的に有利である。それに加えて、DNA 塩基間の距離と GNA 塩基間の距離はほぼ同じであるため、GNA は DNA とほぼ同等の水素結合能を有していると考えられる点が GNA 二重鎖の熱的安定性に寄与していると報告されている^{40) 41)}。

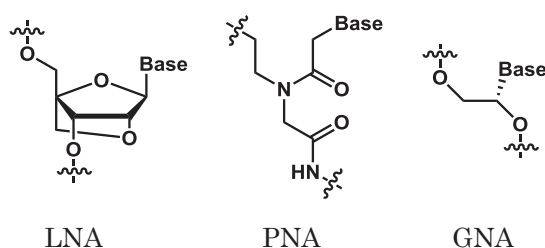


Figure 7. 糖部改変型修体

1-2-3. 塩基部への修飾

塩基部は相補鎖との結合に特に重要であることから、相補鎖形成が前提である RNA 標的の核酸医薬品において使われる例は少ない。成功例として有名な修飾法 (Figure 8) は、2-チオウリジンやシチジンと塩基対を形成するシュードウリジンである⁴²⁾。2-チオウリジン及びシュードウリジンはリボース環の立体配置を 3'-endo 型に固定化させるため二重鎖の熱力学的安定性を向上させることが報告されており、この特徴を利用し、siRNA に導入することで遺伝子抑制活性やターゲット特異性を向上させることに成功した。

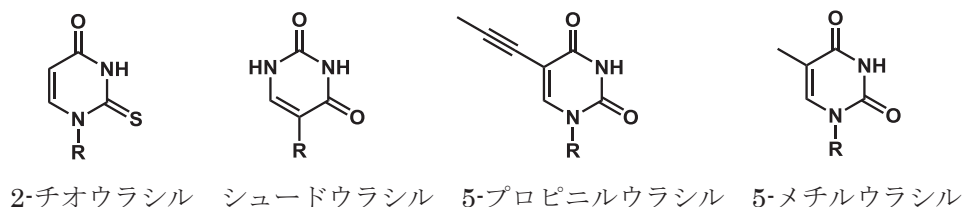


Figure 8. 塩基部修飾体

また、近年、C5 位にプロピニル及びメチル基をもつウラシルを siRNA へ導入する修飾法が報告された^{43) 44)}。5-メチルウラシルが導入された siRNA は天然型と同等の遺伝子発現抑制能を示したが、5-プロピニルウラシルが導入された siRNA の遺伝子抑制能

は天然型よりも低下した。この原因として、Ago タンパク質とプロピニル基の間での立体反発が考えられる。しかし、プロピニル基が導入された siRNA は疎水性相互作用によるエントロピー的有利に加えて、 π - π 結合が塩基間のスタッキングを増強することによるエンタルピー的有利が大きく働き二重鎖形成を有利にしていることが報告されている。

1-2-4. 研究目的

今回、RNA と選択的に二重鎖を形成する GNA (1-2-2. 参照) に、塩基間のスタッキング相互作用の増強を狙ってエチニル基を介して塩基を結合させた糖部開環型人工核酸を設計した。自由度が高く二重鎖形成がエントロピー的に不利な糖部開環型アナログのなかでも、エントロピー的に有利に二重鎖を形成する GNA に剛直な性質を持つエチニル基を導入することで、GNA 以上に RNA と熱的に安定な二重鎖を形成する糖部開環型人工核酸の創製を期待した (Figure 9)。

本研究では、設計した糖部開環型人工核酸の合成とそれらを導入したオリゴヌクレオチドの物理化学的性質の検証、siRNA やアンチセンス核酸といった遺伝子発現抑制ツールへの応用について検討した。

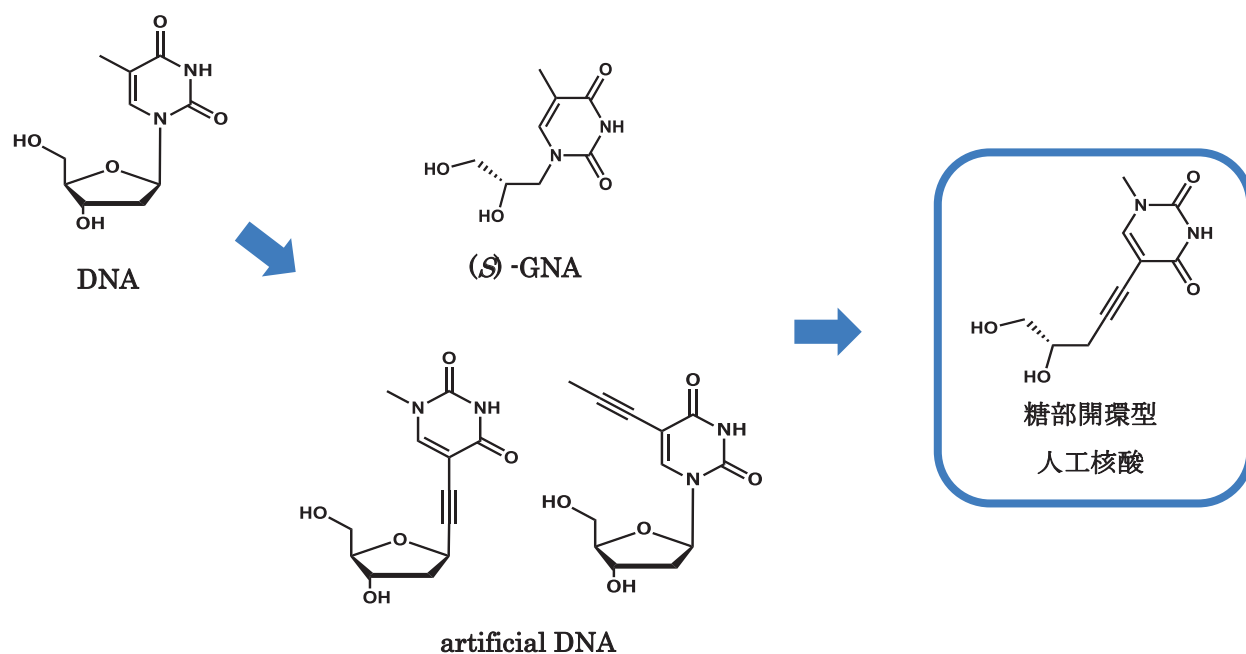


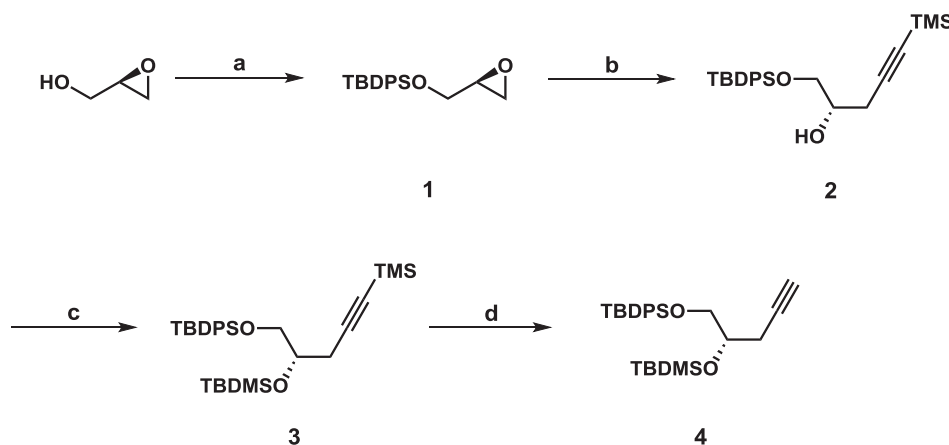
Figure 9. 今回設計した糖部開環型人工核酸

第2章 糖部開環型人工核酸の合成

第1節 糖部開環型核酸 (チミジンアナログ) の合成

2-1-1. 糖部合成

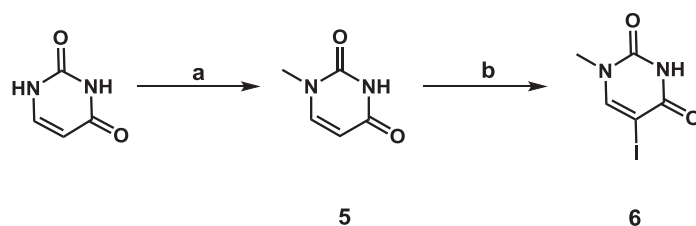
Meggers らによる GNA の合成³⁷⁾ と同様に (*R*)-(-)-glycidol を出発原料とし、氷浴下、水酸基を TBDPSCI と反応させることにより、第一級水酸基を TBDPS 基で保護した化合物 **1** を収率 69% で得た。続いて、ルイス酸存在下、アセチリドイオンの求核付加によるエポキシの開環反応によって化合物 **2** を収率 93% で得た。化合物 **2** の第二級水酸基を TBDMS 基により保護した化合物 **3** を収率 85% で得た後、TMS 基を NaOCH₃ で処理することで、塩基部とのカップリングに用いるアルキン誘導体である化合物 **4** を収率 99% で合成した。



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) TBDPSCI, imidazole, DMF, 12 h, 0 °C, 69%; (b) trimethylsilylacetylene, *n*-butyllithium, BF₃·O(C₂H₅)₂, THF, 12 h, -78 °C, 93%; (c) TBDMSCl, imidazole, DMF, 12 h, r.t., 85%; (d) 1 M NaOCH₃ in MeOH, MeOH,

2-1-2. 塩基部合成

ウラシルを出発原料として、ヘキサメチルジシロキサン (HMDS) 中、クロロトリメチルシラン (TMSCl) によりシリル化した後、CH₃I と反応させることで1位の N をメチル化した化合物 **5** を収率 68% で合成した⁴⁵⁾。続いて、化合物 **5** を酢酸中、NIS によりヨード化した化合物 **6** を収率 67% で得た。

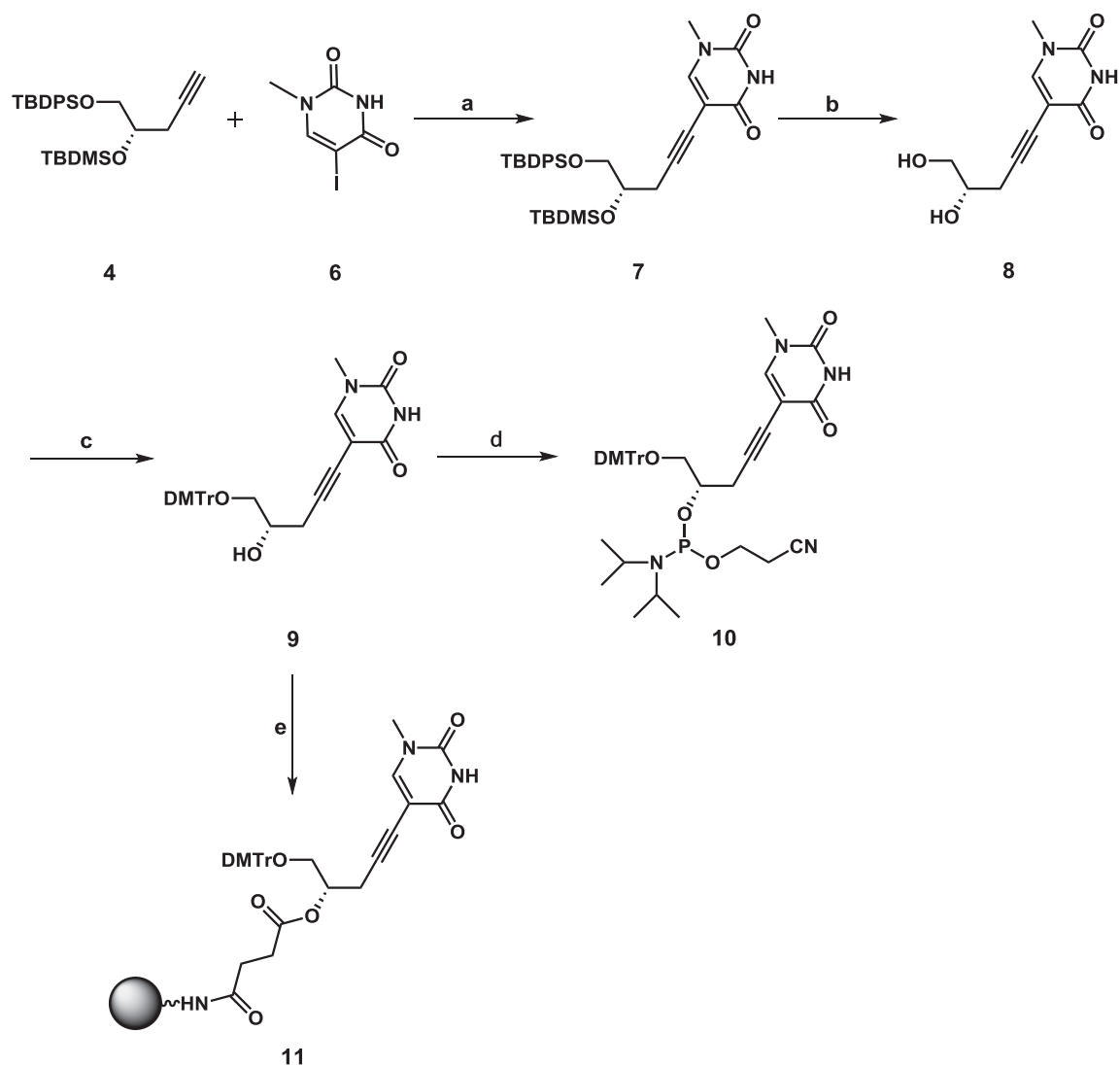


Scheme 2. Reagents and conditions: (a) 1. TMSCl, HMDS, 130 °C, 2 h, 2. CH₃I, 60 °C, 12 h, 68%; (b) NIS, CH₃COOH, 100 °C, 5 h, 67%.

2-1-3. チミジンアナログの合成

アルキン誘導体 (化合物 **4**) と塩基部ヨード体 (化合物 **6**) をパラジウム触媒存在下、園頭カップリング反応により連結させることで化合物 **7** を収率 58% で合成した⁴⁶⁾。続いて、TBAF によって化合物 **7** の各シリル基を除去することで、化合物 **8** を収率 86% で得た。その後、化合物 **8** の第一級水酸基を DMTr 基で保護した化合物 **9** を収率 92% で合成した。

DNA/RNA 自動核酸合成機を用いて、固相ホスホロアミダイト法によりアナログを含むオリゴヌクレオチドを合成するため、アミダイトユニットの合成を行った。化合物 **9** を THF 中、アミダイト試薬と塩基を加え亜リン酸化することで、ホスホロアミダイト体 (化合物 **10**) を収率 88% で合成した。一方、化合物 **9** を THF 中、DMAP を触媒として無水コハク酸と反応させることによりスクシニル体とした後に、CPG 樹脂を加えて縮合させることでアナログの固相担体である化合物 **11** を得た (樹脂活性; 39 μmol/g)。

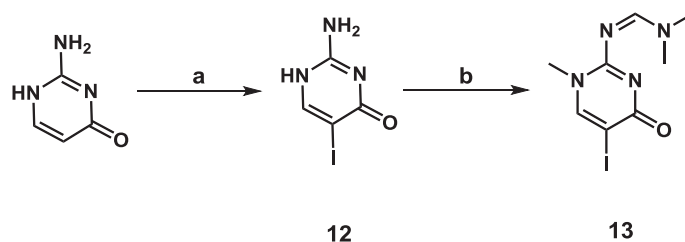


Scheme 3. Reagents and conditions: (a) CuI, Pd(PPh₃)₄, Et₃N, DMF, 40 °C, 12 h, 58%; (b) TBAF, THF, r.t., 24 h, 86%; (c) DMTrCl, pyridine, r.t., 4 h, 92%; (d) chloro(2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)phosphine, *i*-Pr₂NEt, THF, r.t., 1 h, 88%; (e) 1. succinic anhydride, DMAP, pyridine, r.t., 72 h, 2. CPG resin, EDCI·HCl, DMF, r.t., 72 h, 39 μmol/g loading amount.

第 2 節 糖部開環型核酸 (シチジンアナログ) の合成

2-2-1. 塩基部合成

イソシトシンを出発原料として、1 M NaOH 中、ヨウ素と反応させることによりヨード体である化合物 **12** を収率 96% で合成した⁴⁷⁾。続いて、化合物 **12** を *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal (DMF-DMA) で処理することで、アミノ基をジメチルアミノメチレン基で保護した化合物 **13** を収率 66% で合成した。

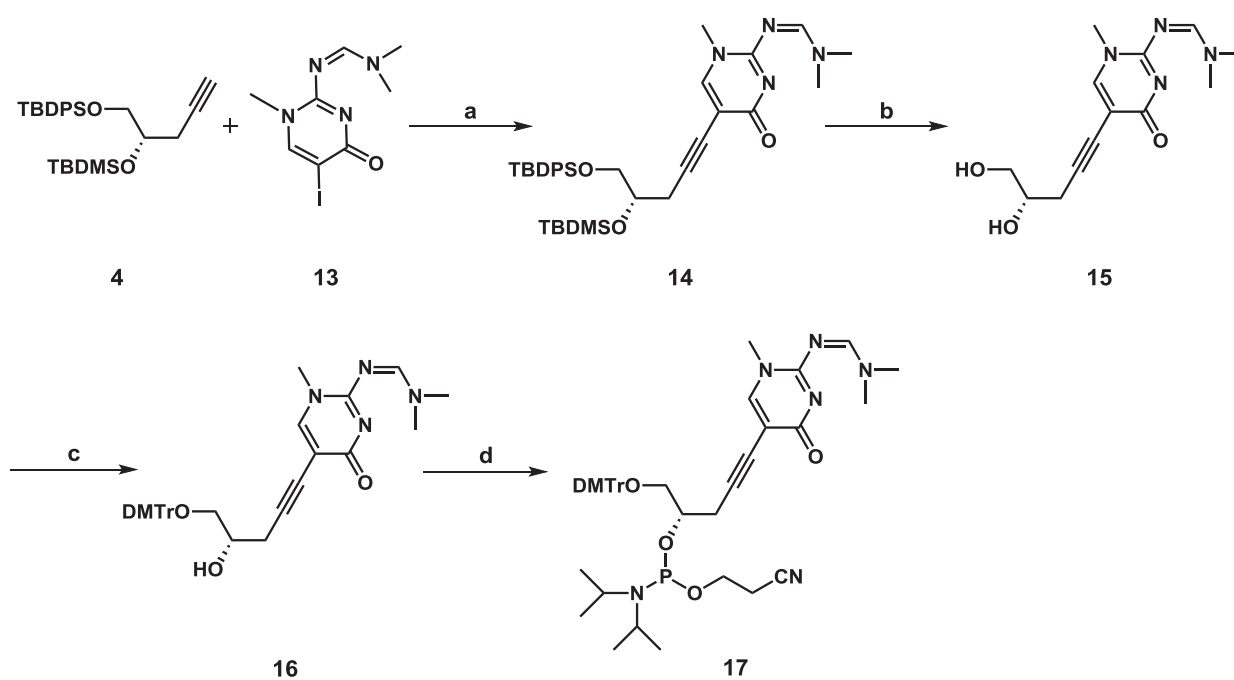


Scheme 4. Reagents and conditions: (a) I₂, 1 M NaOH, 100 °C, 2 h, 96%; (b) DMF-DMA, DMF, 40 °C, 5 h, 66%.

2-2-2. シチジンアナログの合成

アルキン誘導体 (化合物 **4**) と塩基部ヨード体 (化合物 **13**) をパラジウム触媒存在下、園頭カップリング反応により連結させることで化合物 **14** を収率 67% で合成した⁴⁶⁾。続いて、TBAF によって化合物 **14** の各シリル基を除去することで化合物 **15** を収率 45% で得た。その後、化合物 **15** の第一級水酸基を DMTr 基で保護した化合物 **16** を収率 69% で合成した。

DNA/RNA 自動核酸合成機を用いて、固相ホスホロアミダイト法によりアナログを含むオリゴヌクレオチドを合成するためアミダイトユニットの合成を行った。化合物 **16** を THF 中、アミダイト試薬と塩基を加えて亜リン酸化することで、ホスホロアミダイト体 (化合物 **17**) を収率 89% で合成した。



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) CuI, Pd(PPh₃)₄, Et₃N, DMF, 40 °C, 12 h, 67%; (b) TBAF, acetic acid, THF, r.t., 24 h, 45%; (c) DMTrCl, pyridine, r.t., 4 h, 69%; (d) chloro(2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)phosphine, *i*-Pr₂NEt, THF, r.t., 1 h, 89%.

第3章 RNA干渉法への応用

第1節 siRNA/miRNA の設計

3-1-1. オフターゲット効果の回避

siRNA の核酸医薬品化に向けて解決すべき課題のひとつに、オフターゲット (off-target) 効果の回避がある。オフターゲット効果とは、細胞内に導入した siRNA が標的 mRNA 以外の mRNA の遺伝子発現を抑制する現象のことで、生体内で起きた場合、重篤な副作用につながるおそれがある。このオフターゲット効果は、標的 mRNA に相補的な siRNA の 19 塩基のうち 11 塩基が同じであれば、その遺伝子発現に影響を及ぼしうするため、他の遺伝子と相同性を示さない領域を標的として選ぶことが重要である⁴⁸⁾。現在、全ヒトゲノムの解読が終了しており、コンピュータ解析によるオフターゲット効果を抑制する配列の予測が可能となっている。

一方、siRNA 二重鎖のうち本来、RISC に取り込まれるべきガイド鎖ではなく逆鎖のパッセンジャー鎖が RISC に取り込まれることによって引き起こされるオフターゲット効果がある。これを回避するためには、RISC のガイド鎖選択性の向上を目指した siRNA の設計が必要となる。RISC による鎖の選択性は、短鎖二重鎖 RNA の熱力学的非対称性に左右されることが報告されている (Figure 10)^{49) 50)}。ショウジョウバエ

における RNA 干渉機構には、二重鎖 RNA の熱力学的非対称性を感知する機能を持つ Dicer-2/R2D2 ヘテロダイマーが存在し、より熱力学的に不安定な鎖の 5'末端付近に Dicer-2 が結合する。そして、他の因子が加わり RLC (RISC loading complex) を形成し、Dicer-2 が次第に Ago2 に置換され、siRNA 二重鎖の一重鎖への巻き戻しが起こる。そして、RISC を形成し、RISC に取り込まれ

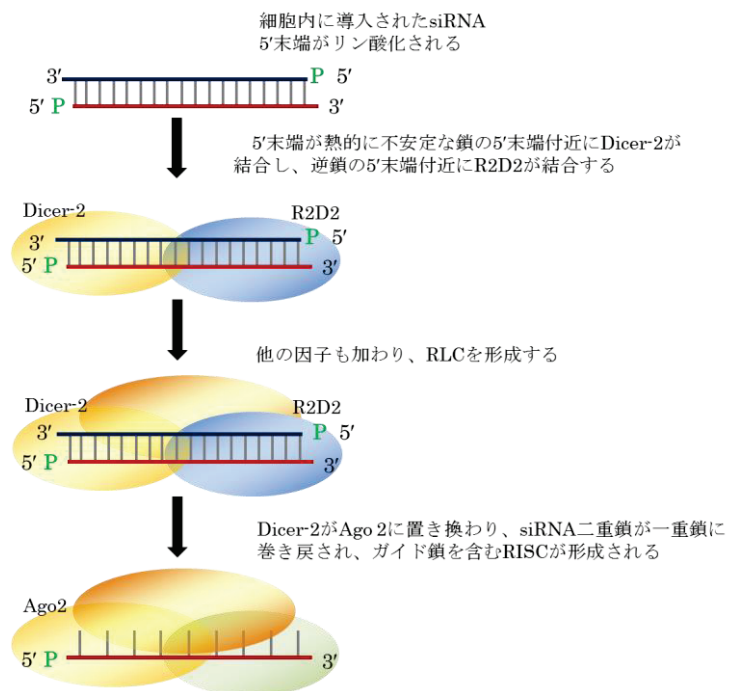


Figure 10. ガイド鎖選択機構 (ショウジョウバエ)

た鎖（ガイド鎖）と相補的な配列を含む標的 mRNA の発現を抑制するとされている⁵¹⁾。そのため、siRNA 二重鎖の熱力学的安定性は、RISC のガイド鎖選択性にとって重要な要素となる。

3-1-2. 今回検討する siRNA/miRNA

今回、パッセンジャー鎖によるオフターゲット効果を回避し、天然型以上の遺伝子発現抑制能を示す siRNA 及び miRNA の創製を目的とした。合成したアナログ **T^a** は RNA 二重鎖中に導入することで、RNA 二重鎖の熱的安定性が変化し RISC のガイド鎖選択性に影響を与えることが予想された。そのため、本研究では RNA 二重鎖中の U や C を **T^a** に置換した siRNA 及び miRNA (Figure 11) を合成し、その二重鎖 RNA の熱的安定性や遺伝子発現抑制能を検証した。**T^a** の RNA 二重鎖への導入が RISC のガイド鎖選択性を向上させ、高い遺伝子発現抑制能につながることを期待した。

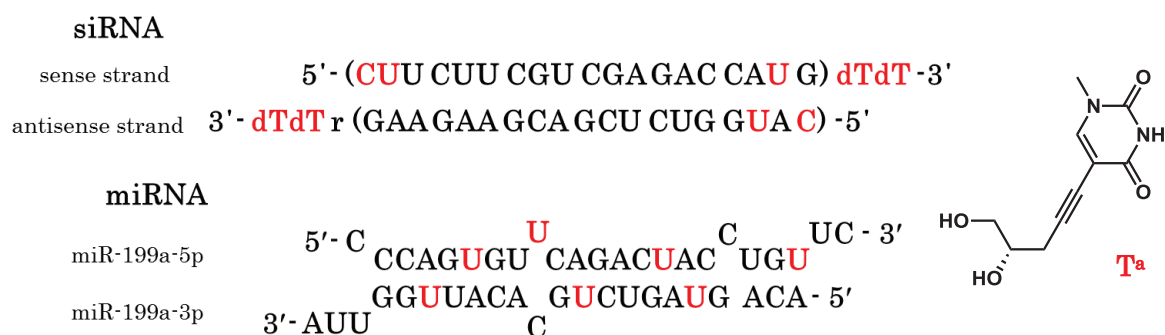


Figure 11. 今回検討する siRNA/miRNA のデザイン

第2節 アナログ **T^a** を導入したオリゴヌクレオチドの合成と物理化学的性質

3-2-1. アナログ **T^a** を導入した RNA 二重鎖の熱的安定性の検証

アナログ **T^a** (Figure 12) を siRNA の修飾体として利用する場合に、**T^a** を導入した RNA 二重鎖が安定な二重鎖を形成する必要がある。また、siRNA 二重鎖の熱的、熱力学的安定性が RISC の鎖の選択性に影響を与えることも報告されている。そこで、鎖の中央に **T^a** を導入した RNA (ON 3) と相補鎖 RNA (ON 2) との二重鎖並びにミスマッチ塩基 (rU, rC, rG) を導入した RNA (ON 4-6) との二重鎖について、50%融解温度 (T_m 値) を測定した。その結果より、今回合成した **T^a** を導入した RNA 二重鎖の熱的安定性と **T^a** の塩基特異性の有無について検討した (Table 2, Figure 12)。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence ^a
Duplex 1	ON 1	5'-r (AGA GAU ACA UUG ACC UUC) -3'
	ON 2	3'-r (UCU CUA UGU AAC UGG AAG) -5'
Duplex 2	ON 3	5'-r (AGA GAU ACA T^a UG ACC UUC) -3'
	ON 2	3'-r (UCU CUA UGU AAC UGG AAG) -5'
Duplex 3	ON 3	5'-r (AGA GAU ACA T^a UG ACC UUC) -3'
	ON 4	3'-r (UCU CUA UGU <u>U</u> AC UGG AAG) -5'
Duplex 4	ON 3	5'-r (AGA GAU ACA T^a UG ACC UUC) -3'
	ON 5	3'-r (UCU CUA UGU <u>C</u> AC UGG AAG) -5'
Duplex 5	ON 3	5'-r (AGA GAU ACA T^a UG ACC UUC) -3'
	ON 6	3'-r (UCU CUA UGU <u>G</u> AC UGG AAG) -5'

^aUnderlined letters indicate mismatched bases.

Table 2. 鎖中央に **T^a** を導入した RNA 二重鎖の配列

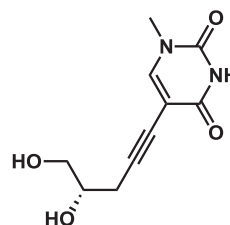


Figure 12. 糖部開環型ヌクレオシドアナログ **T^a**

測定条件

測定温度範囲; 20-100 °C

測定波長; 260 nm

サンプル濃度; 3.0 μ M

buffer; 10 mM Na Phosphate and 100 mM NaCl (pH 7.0)

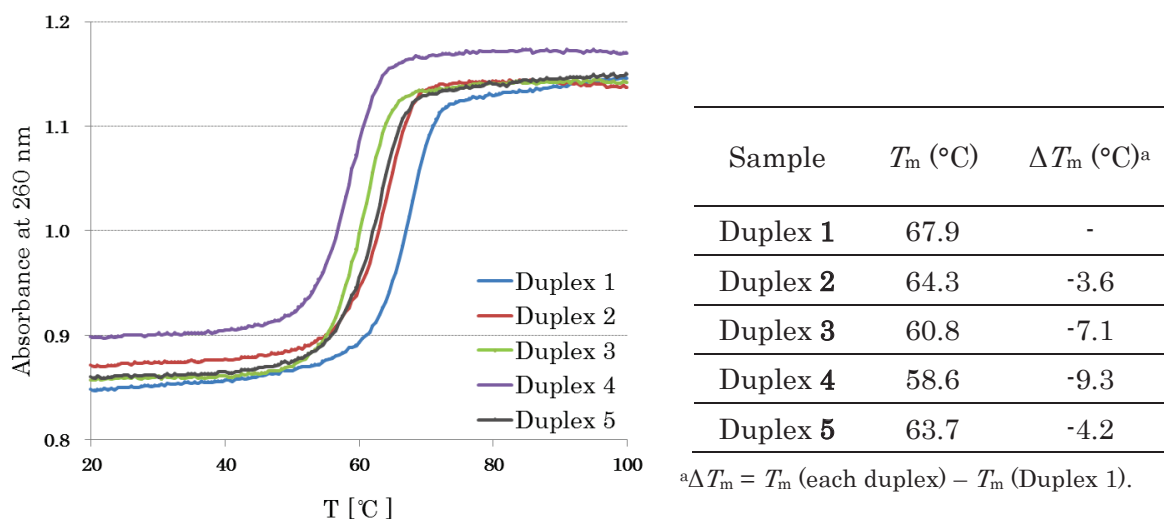


Figure 13. 鎖中央に **T^a**を導入した RNA 二重鎖の 50%融解温度測定結果

Figure 13 より、Duplex 1-5 の各二重鎖はシグモイド曲線を描く熱的に安定な二重鎖を形成していることが示唆された。また、Duplex 2-5 の各二重鎖の 50%融解温度は天然型である Duplex 1 ($T_m = 67.9$ °C) と比較して、3.6~9.3 °C 低下することが示された。この結果から、今回合成した **T^a** を鎖の中央に導入した RNA 二重鎖は天然型に劣るものの熱的に安定な二重鎖を形成することが示唆された。

しかし、**T^a** と対になる塩基がアデニン (Duplex 2, $T_m = 64.3$ °C, $\Delta T_m = -3.6$ °C) の場合、グアニン (Duplex 5, $T_m = 63.7$ °C, $\Delta T_m = -4.2$ °C) やウラシル (Duplex 3, $T_m = 60.8$ °C, $\Delta T_m = -7.1$ °C)、シトシン (Duplex 4, $T_m = 58.6$ °C, $\Delta T_m = -9.3$ °C) の場合と比較して 50%融解温度の減少幅が小さい。このことから、天然型である U:rA 塩基対に劣るものの、**T^a** もアデニンと塩基対を形成していることが明らかとなった。

3-2-2. アナログ **T^a** を導入した RNA のエキソヌクレアーゼ耐性の検証

RNA はヒト血清中において、主に 3'末端から加水分解する酵素である 3'-エキソヌクレアーゼによって分解される。そこで、3'-エキソヌクレアーゼである蛇毒ホスホジエステラーゼ (Snake venom phosphodiesterase, SVPD) を用いて、**T^a** を導入した一重鎖 RNA のエキソヌクレアーゼに対する抵抗性を検証した。SVPD は 3'-OH 末端から 3' → 5' の方向に段階的にホスホジエステル結合を切断し、5'-モノヌクレオチドを産出する酵素である。

5'末端を蛍光標識化した 21 塩基からなる ON 7 とそれに 3'末端のオーバーハング部位に **T^a** を導入した ON 8 を合成し (Table 3)、一重鎖状態において SVPD で処理し、各時間で反応を停止後、電気泳動によってその RNA 分解物を解析した (Figure 14)。

Sample	Sequence ^a
ON 7	F -5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
ON 8	F -5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) T^aT^a -3'

^aF; Fluorescein.

Table 3. エキソヌクレアーゼ耐性検証用オリゴヌクレオチドの配列

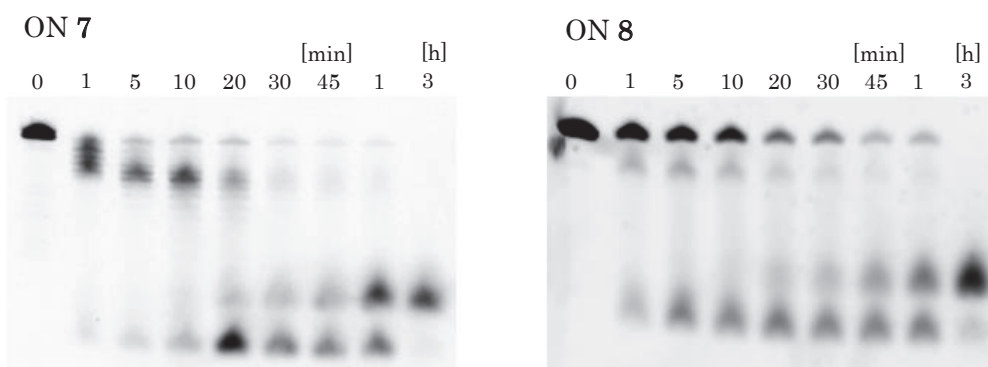
反応条件

反応温度; 37 °C

サンプル濃度; 3.0 μM

buffer; 250 mM Tris-HCl and 50 mM MgCl₂ (pH 8.0)

SVPD; 0.5 unit



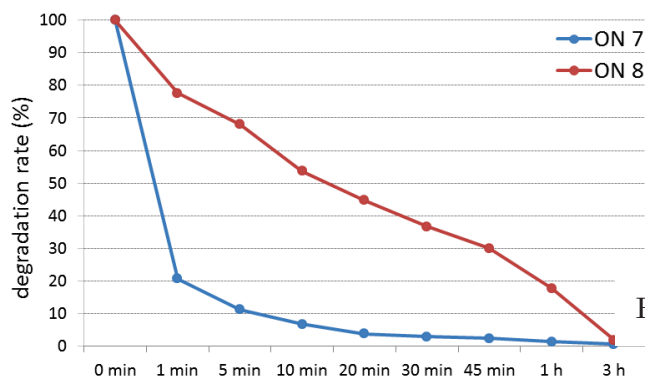


Figure 14. SVPD による RNA 分解能の検証

Figure 14 から、天然型である ON 7 が 1 分後には 80% が分解されていたのに対し、3'末端のオーバーハング部位に T^a を導入した ON 8 は 1 分後でも 20% 前後しか分解されていないことが明らかとなった。また、ON 7 の半減期が 38 秒であるのに対し、ON 8 は 845 秒であり、このことからエキソヌクレアーゼ抵抗性は 22.4 倍増強したと考えられる。従って、3'末端のオーバーハング部位への T^a の導入は 3'-エキソヌクレアーゼ耐性の向上に有用であることが示された。

3-2-3. アナログ T^a を導入した RNA のエンドヌクレアーゼ耐性の検証

RNA 二重鎖状態でのエンドヌクレアーゼ耐性を、遺伝子発現抑制能の検証で用いる HeLa 細胞培養条件下で検討した。本研究に使用する HeLa 細胞は、D-MEM、10% BS (ウシ血清、Bovine serum) で培養しているため、まず、この条件下で二重鎖を処理したが二重鎖はほとんど分解されなかった。そこで、BS 濃度を 30% に上げて、5'末端を蛍光標識化した天然型である Duplex 6 と 3'末端のオーバーハング部位に T^a を導入した Duplex 7 (Table 4) を D-MEM、30% BS で処理し、各時間で反応停止後、電気泳動によって RNA 分解産物を解析した (Figure 15)。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence
Duplex 6	ON 7	F -5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
Duplex 7	ON 8	F -5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) T^aT^a -3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'

Table 4. エンドヌクレアーゼ耐性検証用 RNA 二重鎖の配列

反応条件

反応温度; 37 °C

サンプル濃度; 4.0 μ M

buffer; 細胞培養液 (D-MEM 高グルコース)

ウシ血清 (Bovine serum, BS) 終濃度 30%

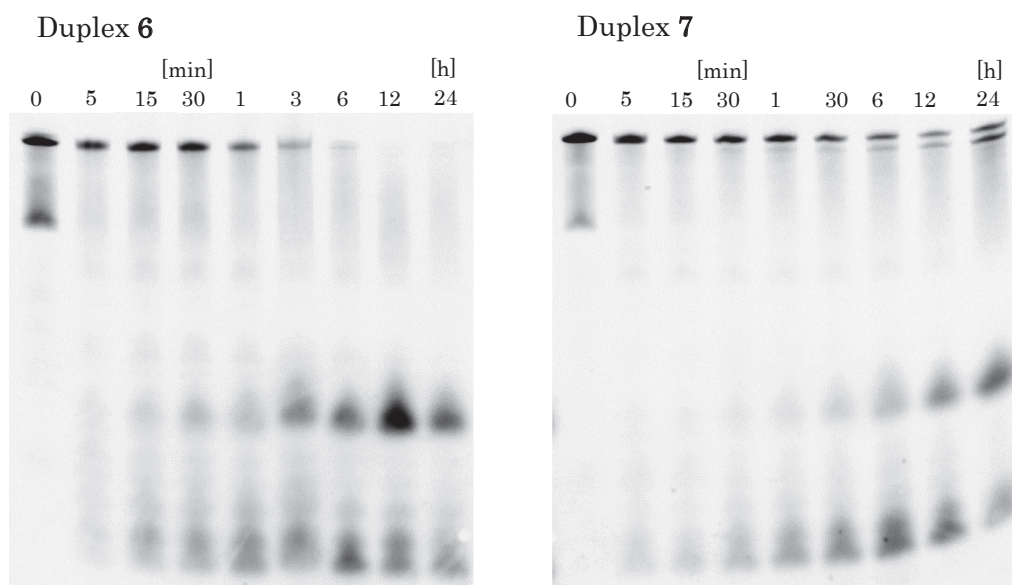


Figure 15. BS30%による RNA 分解能の検証

Figure 15 の結果より、天然型である Duplex 6 が 6 時間後にほぼ完全に二重鎖が分解されているのに対し、3'末端のオーバーハング部位に **T^a** を導入した Duplex 7 では 24 時間後でも 10%が完全長で二重鎖が残存していることが明らかとなった。このことから、細胞培養条件下で **T^a** を導入した RNA 二重鎖はヌクレアーゼに対して安定に存在していることが示唆された。

第3節 アナログ **T^a** を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証

3-3-1. アナログ **T^a** を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証

今回合成したアナログ **T^a** を様々な部位に導入した RNA を、固相ホスホロアミダイト法に従って DNA/RNA 自動核酸合成機を用いて合成した。そして、相補的な配列を持つ RNA と二重鎖を形成させ、様々な部位に **T^a** を導入した siRNA **2-7** を調製した (Table 5)。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence
siRNA 1	ON 10	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 2	ON 11	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) T^aT^a -3'
	ON 12	3'- T^aT^a (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 3	ON 13	5'-r (T^a UUU CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 4	ON 14	5'-r (C T^a U CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 5	ON 15	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CA T^a G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 6	ON 10	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
	ON 16	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG G T^a A C) -5'
siRNA 7	ON 10	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
	ON 17	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA T^a) -5'

Table 5. **T^a** を導入した siRNA の配列

siRNA (Table 5) をヒト子宮癌由来細胞である HeLa 細胞を用いて、Dual-luciferase reporter assay によって遺伝子発現抑制能を検証した (Figure 16)。詳細な実験方法は実験項に記載した。

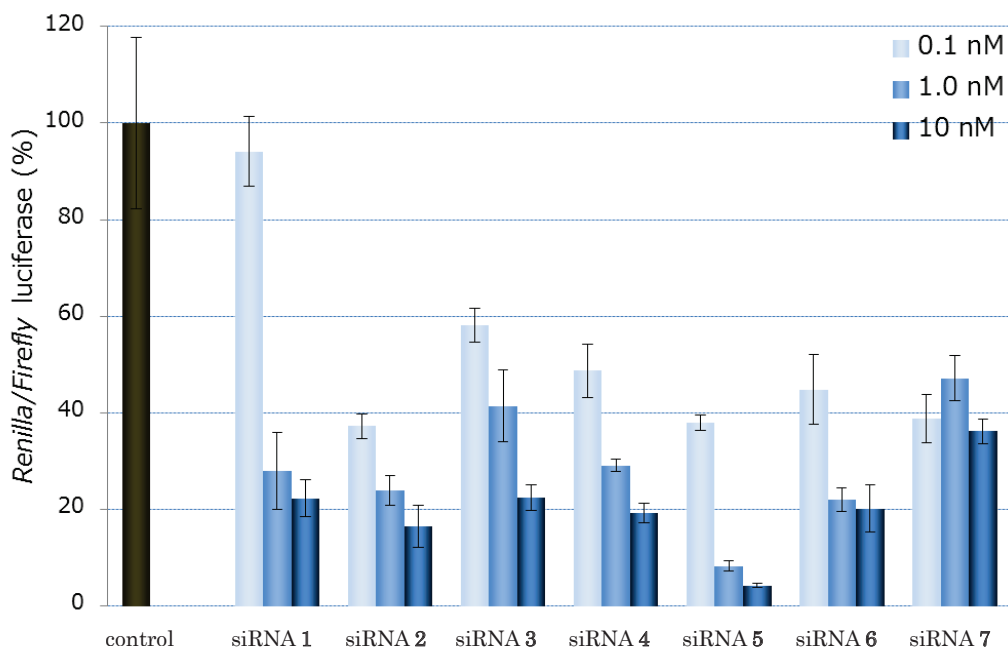


Figure 16. siRNA (Table 5) の遺伝子発現抑制能の検証

Figure 16 の結果より、3'末端オーバーハング部位へ **T^a** を導入した siRNA 2 は天然型である siRNA 1 と比較して遺伝子発現抑制能が向上した。この原因として、3'末端オーバーハング部位に **T^a** を導入したことで siRNA 2 のヌクレアーゼ耐性が向上したためと考えられる (3-2-3、3-2-4 参照)。

また、センス鎖 5'末端付近に **T^a** を導入した siRNA 3 と siRNA 4 は天然型である siRNA 1 と比較して、特に低濃度において遺伝子発現抑制能が低下した。これは、**T^a** を導入したことでセンス鎖 5'末端付近が熱的に不安定化し、センス鎖もガイド鎖として取り込まれやすくなるなど、RISC の鎖の選択性が低下したためと考えられる。特に siRNA 3 は 5'末端に **T^a** を導入したことで、センス鎖 5'末端のリン酸化が阻害され、これにより 5'末端がリン酸化されたアンチセンス鎖の RISC への鎖の取り込みが促進されることが期待された。しかし、siRNA 3 は天然型を下回る遺伝子発現抑制能を示したことから、**T^a** の導入による二重鎖の熱的不安定化は鎖の 5'末端のリン酸化よりも鎖の選択性に大きな影響を与えることが示唆された。

次に、センス鎖 3'末端付近に **T^a** を導入した siRNA 5 は siRNA 1 と比較して、遺伝子発現抑制能が著しく向上した。siRNA 5 の遺伝子発現抑制能の向上はセンス鎖 3'末端付近に **T^a** を導入したことで、アンチセンス鎖の 5'末端付近を熱的に不安定化し、アンチセンス鎖の RISC への取り込みが促進されたためと考えられる。

最後に、アンチセンス鎖 5'末端付近に **T^a** を導入した siRNA 6 と siRNA 7 は siRNA 1 と比較して、その遺伝子発現抑制能が低下した。この結果から、アンチセンス鎖の 5'

末端付近に **T^a** を導入して二重鎖を熱的に不安定化するよりも、siRNA **5** のようにセンス鎖 3'末端付近に **T^a** を導入して間接的にアンチセンス鎖の 5'末端を熱的に不安定化して、RISC への鎖の取り込みを促進した方が有用であることが示唆された。この理由として、RISC に取り込まれるアンチセンス鎖の seed 領域への化学修飾体の導入を回避しつつ、アンチセンス鎖 5'末端の熱的不安定化を引き起こせる点が考えられる。

3-3-2. アナログ **T^a** を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証 II

アナログ **T^a** を導入した siRNA による遺伝子発現抑制能に対する効果の一般性を検討するため、3-3-1. で用いた配列とは異なる配列の siRNA を合成した (Table 6)。この siRNA の配列は、アンチセンス鎖 5'末端側に GC 塩基対を多く含み、センス鎖 5'末端側に AU 塩基対を多く含むため、センス鎖が RISC に取り込まれやすい性質を持つ。そのため、この siRNA はあまり遺伝子発現抑制能を示さないという特徴を示す。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence
siRNA 8	ON 18	5'-r (UAA GAU GUU CAU CGA GUC C) dTdT-3'
	ON 19	3'-dTdT (AUU CUA CAA GUA GCU CAG G) -5'
siRNA 9	ON 20	5'-r (T^a AA GAU GUU CAU CGA GUC C) dTdT-3'
	ON 19	3'-dTdT (AUU CUA CAA GUA GCU CAG G) -5'
siRNA 10	ON 21	5'-r (UAA GAU GUU CAU CGA G T^a C C) dTdT-3'
	ON 19	3'-dTdT (AUU CUA CAA GUA GCU CAG G) -5'
siRNA 11	ON 22	5'-r (T^a AA GAU GUU CAU CGA G T^a C C) dTdT-3'
	ON 19	3'-dTdT (AUU CUA CAA GUA GCU CAG G) -5'

Table 6. **T^a** を導入した siRNA の配列 II

siRNA (Table 6) をヒト子宮癌由来細胞である HeLa 細胞を用いて、Dual-Luciferase reporter assay によって遺伝子発現抑制能を検証した (Figure 17)。

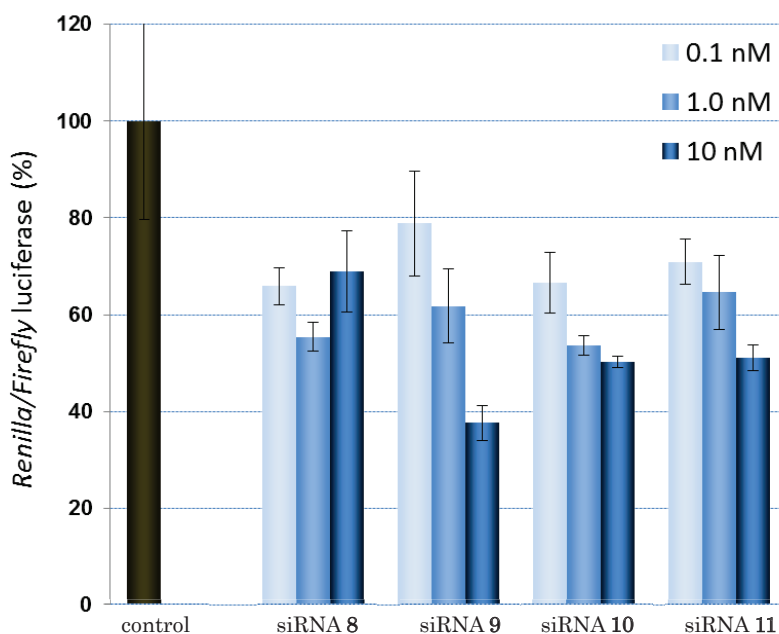


Figure 17. siRNA (Table 6) の遺伝子発現抑制能の検証

Figure 17 の結果より、天然型である siRNA 8 でも 40%前後しか遺伝子発現を抑制せず、また濃度依存的な遺伝子発現抑制能が観察されなかった。この結果から、本配列の siRNA は当初の予想通り鎖の選択性が低く、遺伝子発現抑制が低いことが示唆された。

一方で、**T^a**を導入した siRNA 9-11 は濃度依存的な遺伝子発現抑制能を示した。siRNA 9 はセンス鎖 5'末端への **T^a**の導入により、センス鎖 5'末端のリン酸化を阻害され、アンチセンス鎖 5'末端が優先的にリン酸化されることで、アンチセンス鎖の RISC への取り込みが促進されたため、遺伝子発現抑制能が向上したと考えられる。また、siRNA 10 はセンス鎖 3'末端付近に **T^a**を導入したことで、アンチセンス鎖 5'末端付近を熱的に不安定化し、アンチセンス鎖の RISC への取り込みが促進されたため遺伝子発現抑制能が向上したと考えられる。しかし、これらの siRNA を組み合わせた siRNA 11 は siRNA 9、siRNA 10 と比較して遺伝子発現抑制能が低下した。これは、siRNA に **T^a**を 2 個導入したことにより、RNA 二重鎖の熱的な不安定化が進行しすぎたためではないかと考えられる。

以上の結果から、センス鎖 3'末端付近やセンス鎖 5'末端への **T^a**の導入は、遺伝子発現抑制能を向上させるために有用な修飾方法であることが示唆された。また、**T^a**の導入は RNA 二重鎖を熱的に不安定化させるため、数多く導入することには不向きであり、1 個程度の導入が最適と考えられる。

3-3-3. アナログ **T^a** を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能の検証III

3-3-1. で述べたとおり、siRNA 5 は高い遺伝子発現抑制能を示した。このセンス鎖 3' 末端から 4 番目の位置へのアナログ **T^a** の導入の有用性を、各ミスマッチ塩基を導入した siRNA 12-14 を用いて二重鎖の熱的安定性と遺伝子発現抑制能を比較することで検証した。

まず、siRNA 5 の **T^a** 導入部位と同じ部位に、**T^a** のように鎖の熱的不安定化を引き起こすと考え、各ミスマッチ塩基を導入した siRNA を合成した (Table 7)。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence ^a
siRNA 1	ON 10	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAU G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 5	ON 15	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CA T^a G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 12	ON 23	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CA <u>A</u> G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 13	ON 24	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAG <u>G</u>) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'
siRNA 14	ON 25	5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CA <u>C</u> G) dTdT-3'
	ON 9	3'-dTdT (GAA GAA GCA GCU CUG GUA C) -5'

^aUnderlined letters indicate mismatched bases.

Table 7. ミスマッチ塩基を導入した siRNA 二重鎖の配列

センス鎖 3' 末端から 4 番目の位置へ **T^a** や各ミスマッチ塩基を導入した siRNA 二重鎖の熱的安定性を比較するため、50%融解温度 (T_m 値) を測定した (Figure 18)。

測定条件

測定温度範囲; 20-100 °C

測定波長; 260 nm

サンプル濃度; 3.0 μM

buffer; 10 mM Na Phosphate and 100 mM NaCl (pH 7.0)

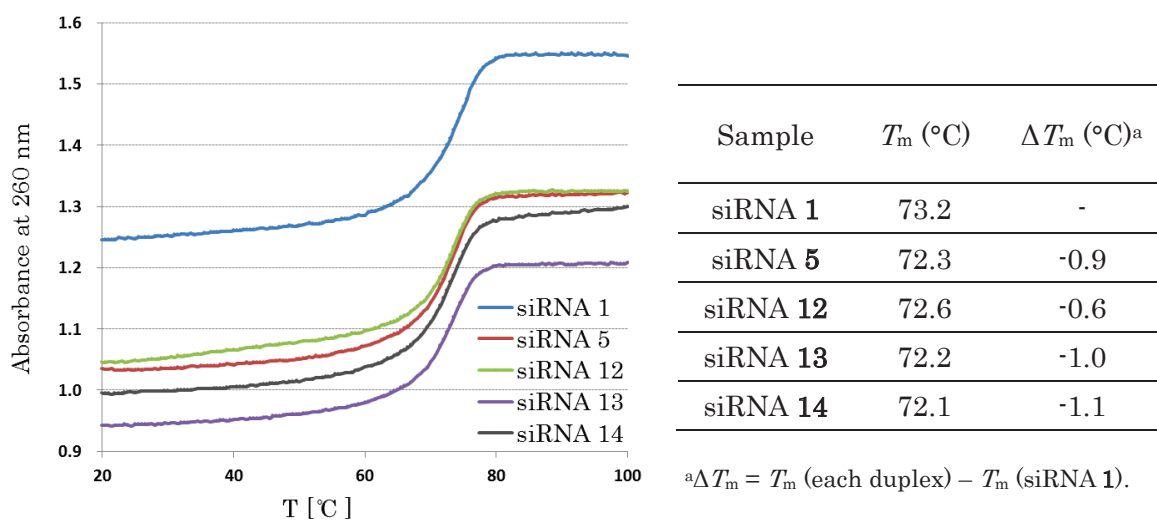


Figure 18. siRNA 1, 5, 12-14 の 50%融解温度測定結果

Figure 18 より、siRNA 5、12-14 は天然型である siRNA 1 と比較して、ほぼ同程度 T_m 値が低下することが示された。この結果から、センス鎖 3'末端から 4 番目の位置への **T^a** の導入はミスマッチ塩基と同程度の熱的不安定化を引き起こすことが示唆された。

次に、siRNA (Table 7) をヒト子宮癌由来細胞である HeLa 細胞を用いて、Dual-Luciferase reporter assay によって遺伝子発現抑制能を検証した (Figure 19)。

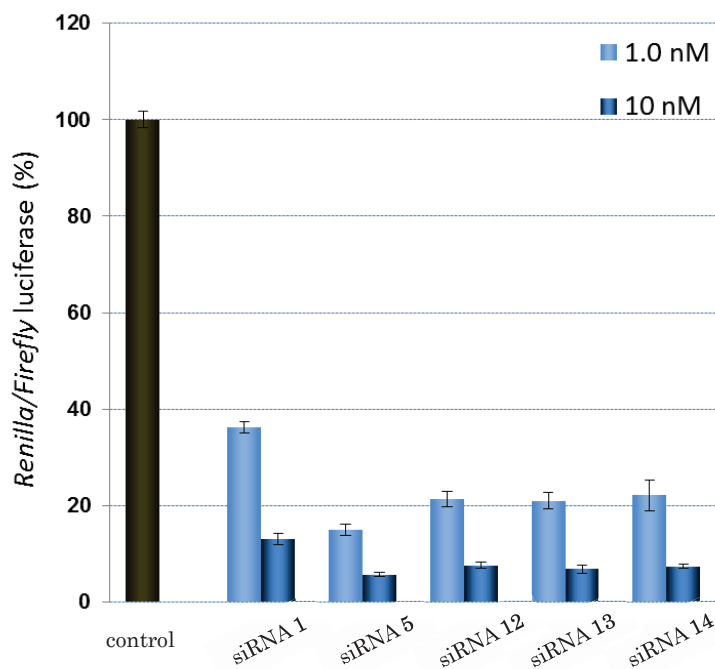


Figure 19. siRNA (Table 7) の遺伝子発現抑制能の検証

Figure 19 より、siRNA 5、12-14 はいずれも天然型である siRNA 1 以上の遺伝子発現抑制能を示すことが明らかとなった。この結果から、センス鎖 3'末端から 4 番目の位置への **T^a** やミスマッチ塩基のような RNA 二重鎖を熱的に不安定化させるアナログの導入は、遺伝子発現抑制能の向上に有用であることが示唆された。

また、ミスマッチ塩基を導入した siRNA 12-14 に対して **T^a** を導入した siRNA 5 は僅かではあるが、高い遺伝子発現抑制能を示した。これは、**T^a** の導入によりヌクレアーゼ耐性が向上したためであると考えられるため、5'末端を蛍光標識化しセンス鎖 3'末端から 4 番目の位置への **T^a** を導入した RNA を合成し、一重鎖状態において SVPD に対する抵抗性を検証した。SVPD で処理した RNA を各時間で反応停止後、RNA 分解産物を電気泳動によって解析した (Table 8, Figure 20)。

Sample	Sequence ^a
ON 7	F -5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAUU G) dTdT-3'
ON 26	F -5'-r (CUU CUU CGU CGA GAC CAT ^a U G) dTdT-3'

^aF; Fluorescein.

Table 8. エキソヌクレアーゼ耐性検証用オリゴヌクレオチドの配列

反応条件

反応温度; 37 °C

サンプル濃度; 3.0 μM

buffer; 250 mM Tris-HCl and 50 mM MgCl₂ (pH 8.0)

SVPD; 0.5 unit

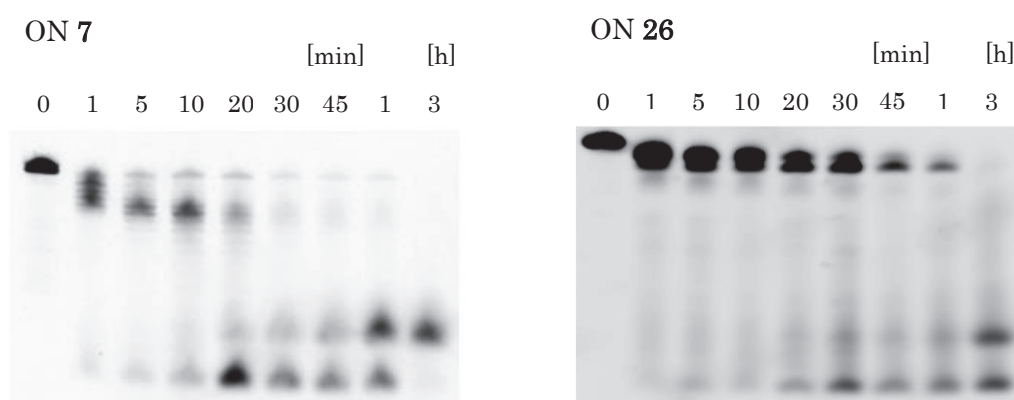


Figure 20. SVPD による RNA 分解能の検証

Figure 20 より、3'末端から4番目の位置へ **T^a** を導入した ON 26 は、天然型である ON 7 と比較して、SVPD に対する抵抗性が大幅に向上した。ON 26 は反応開始1時間後にもごく僅かではあるが完全鎖長の RNA が残存しており、3'末端へ **T^a** を導入した ON 8 (3-2-3.参照) とほぼ同程度のヌクレアーゼ抵抗性を持つことが示唆され、3'末端から4番目の位置へ **T^a** の導入は SVPD に対する抵抗性の向上に有用であることが明らかとなった。

以上の結果より、センス鎖 3'末端から4番目の位置への **T^a** の導入は、ミスマッチ塩基導入と同程度の二重鎖の熱的不安定化を引き起こし、いずれも天然型以上の遺伝子発現抑制能を示すことが明らかとなった。また、**T^a** を導入した siRNA はヌクレアーゼ耐性が向上するため、ミスマッチ塩基を導入した siRNA よりも僅かではあるが高い遺伝子発現抑制能を示した。

第4節 アナログ **T^a** を導入した miRNA の遺伝子発現抑制能の検証

3-4-1. アナログ **T^a** を導入した miR-199a-3p の合成と遺伝子発現抑制能の検証

アナログ **T^a** 導入による二重鎖の熱的不安定化による鎖の選択性の向上が、遺伝子発現抑制能の向上に影響を与えたという点を検証するため、両鎖に標的配列を持つ miRNA を用いて検証を行った。

両鎖に標的 mRNA を持つ miRNA として、C型肝炎ウイルス (HCV) や B型肝炎ウイルス (HBV) が感染した癌細胞において発現異常していることが報告されている miR-199a-5p/3p (Figure 21) を用いた⁵²⁾。

まず、RISC の鎖の選択性の向上に起因する miR-199a-5p 鎖の遺伝子発現抑制能の向上を目的として、miR-199a-3p 鎖の様々な部位にアナログ **T^a** を導入した miRNA 2-4 を合成した。配列は Table 9 に示した。

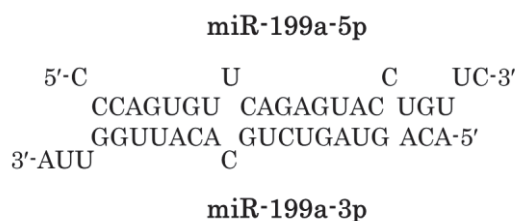
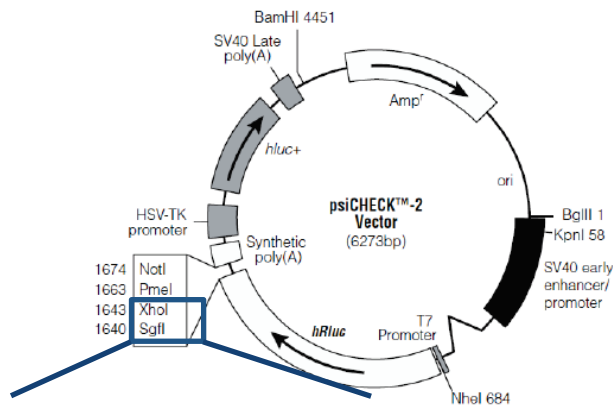


Figure 21. miR-199a-5p/3p

Sample	Abbreviation of ON	Sequence
miRNA 1	ON 27	5'-r (CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC) -3'
	ON 28	3'-r (AUU GGU UAC ACG UCU GAU GAC A) -5'
miRNA 2	ON 27	5'-r (CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC) -3'
	ON 29	3'-r (AUU GG T^a UAC ACG UCU GAU GAC A) -5'
miRNA 3	ON 27	5'-r (CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC) -3'
	ON 30	3'-r (AUU GGU UAC ACG T^a CU GAU GAC A) -5'
miRNA 4	ON 27	5'-r (CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC) -3'
	ON 31	3'-r (AUU GGU UAC ACG UCU GAT T^a GAC A) -5'

Table 9. **T^a** を導入した miR-199a-5p/3p の配列

miRNA (Table 9) をヒト子宮癌由来細胞である HeLa 細胞を用いて、Dual-Luciferase reporter assay によって遺伝子発現抑制能を検証した (Figure 23)。siRNA と同様に評価するため、psiCHECK™-2 vector 内の *Renilla* luciferase 配列の下流部位にそれぞれの標的配列を挿入した psi199a-5p/3p vector を使用した (Figure 22)⁵³⁾。詳細な実験方法は実験項に記載した。



psi-5p reporter: 5'-GAA CAG GTA GTC TGA ACA CTG GG -3'
 psi-3p reporter: 5'-TAA CCA ATG TGC AGA CTA CTG T -3'

Figure 22. psi199a5p/3p vector の構造

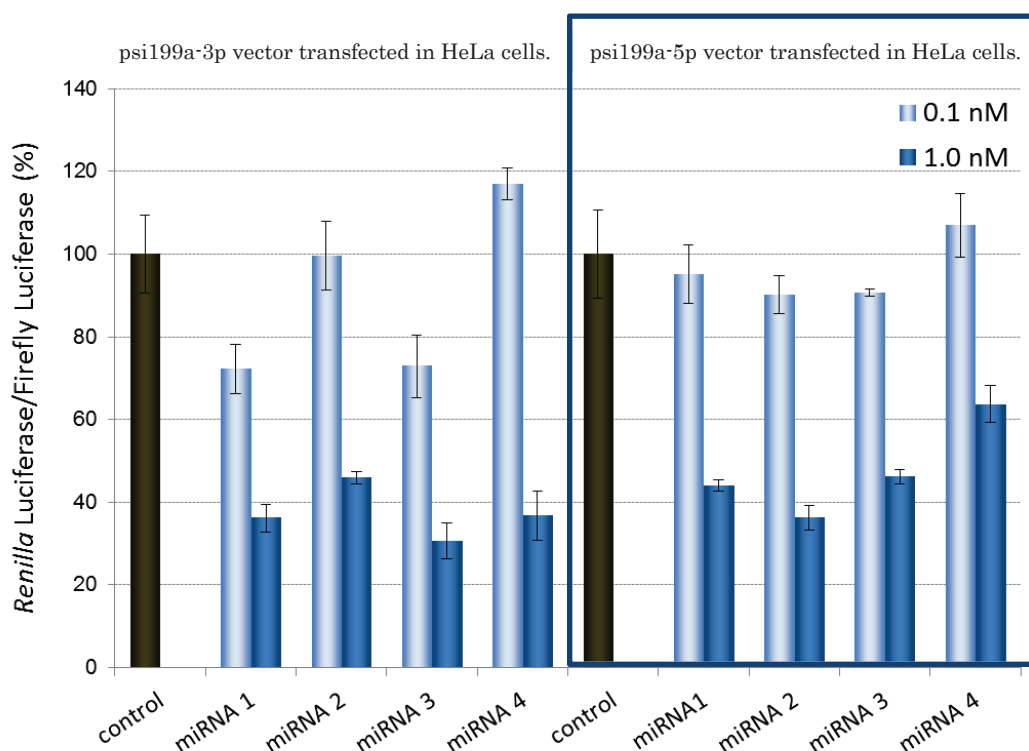


Figure 23. miRNA (Table 9) の遺伝子発現抑制能の検証

Figure 23 の結果より、天然型である miRNA 1 は miR-199a-5p 鎖と比較して miR-199a-3p 鎖がわずかに高い遺伝子発現抑制能を示し、RISC に取り込まれやすいことが示唆される結果を得た。また、miRNA 2-4 は miR-199a-3p 鎖に **T^a** を導入したため miR-199a-5p 鎖がより RISC に取り込まれ、高い遺伝子発現抑制能を示すことを期待した。しかし、miR-199a-3p/5p の両鎖共に天然型と同程度の遺伝子発現抑制しか示さなかったことから、**T^a** の導入による鎖の選択性への影響を観察することができなかった。この原因として、miR-199a-5p/3p がバルジアウト部位やミスマッチ塩基対など二重鎖を熱的に不安定化する構造を持ち合わせている点が挙げられる。

3-4-2. アナログ **T^a** を導入した miR-199a-5p の合成と遺伝子発現抑制能の検証

次に、RISC の鎖の選択性の向上に起因する miR-199a-3p 鎖の遺伝子発現抑制能の向上を目的として、miR-199a-5p 鎖の様々な部位にアナログ **T^a** を導入した miRNA 5-8 を合成した。配列は Table 10 に示した。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence
miRNA 1	ON 27	5'-r (CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC) -3'
	ON 28	3'-r (AUU GGU UAC ACG UCU GAU GAC A) -5'
miRNA 5	ON 32	5'-r (CCC AG T^a GUU CAG ACU ACC UGU UC) -3'
	ON 28	3'-r (AUU GGU UAC ACG UCU GAU GAC A) -5'
miRNA 6	ON 33	5'-r (CCC AGU GU T^a CAG ACU ACC UGU UC) -3'
	ON 28	3'-r (AUU GGU UAC ACG UCU GAU GAC A) -5'
miRNA 7	ON 34	5'-r (CCC AGU GUU CAG AC T^a ACC UGU UC) -3'
	ON 28	3'-r (AUU GGU UAC ACG UCU GAU GAC A) -5'
miRNA 8	ON 35	5'-r (CCC AGU GUU CAG ACU ACC UG T^a UC) -3'
	ON 28	3'-r (AUU GGU UAC ACG UCU GAU GAC A) -5'

Table 10. **T^a** を導入した miR-199a-5p/3p の配列

miRNA (Table 10) をヒト子宮癌由来細胞である HeLa 細胞を用いて、Dual-Luciferase reporter assay によって遺伝子発現抑制能を検証した (Figure 24)。詳細な実験方法は実験項に記載した。

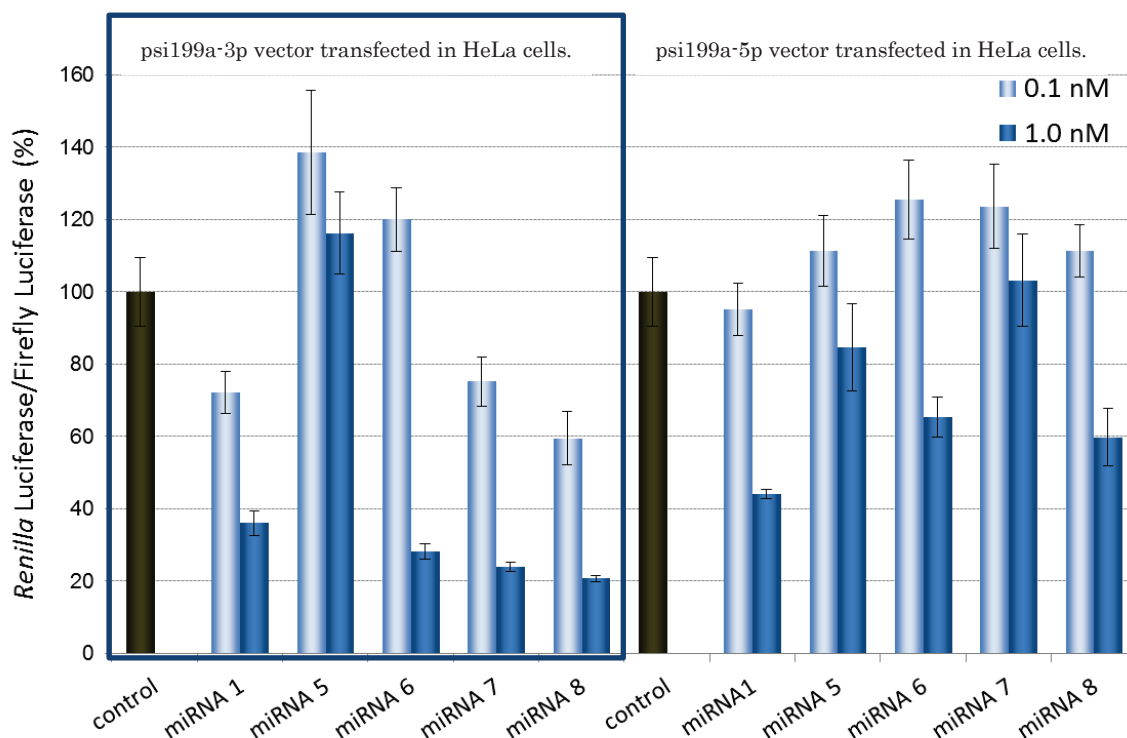


Figure 24. **T^a**を導入した miRNA の遺伝子発現抑制能の検証

miRNA 5-8 は miR-199a-5p 鎖に **T^a**を導入したため、miR-199a-3p 鎖がより RISC に取り込まれ高い遺伝子発現抑制能を示すことを期待した。Figure 24 より、miRNA 5-8 は miRNA 2-4 の結果 (Figure 23) と異なり、鎖の選択性の向上を示唆する結果を得た。

まず、miR-199a-5p 鎖の 5'末端側に **T^a**を導入した miRNA 5 は、miR-199a-5p 鎖の 5'末端を熱的に不安定化することで RISC に取り込まれやすいよう設計した。その狙い通り、miR-199a-3p 鎖はほとんど RISC に取り込まれず、遺伝子発現抑制を示さなかった。しかし、ガイド鎖となる miR-199a-5p 鎖の seed 領域に **T^a**を導入したため、miR-199a-5p 鎖もあまり遺伝子発現抑制能を示さなかった。

また、miR-199a-5p 鎖の中央部位に **T^a**を導入した miRNA 6 は天然型である miRNA 1 と比較して、鎖の選択性の向上による遺伝子発現抑制能の向上を僅かに示した。miRNA の中央部位のミスマッチは RISC への鎖の取り込みを促進させるという知見⁵⁴⁾がある。そのため、miR-199a-5p 鎖の中央部位への **T^a**の導入は **T^a**が塩基特異性を持つこともあり、ミスマッチ塩基と認識され、僅かではあるが miRNA 1 を上回る遺伝子発現抑制能を示したと考えられる。

一方で、miR-199a-5p 鎖の 3'末端側に **T^a**を導入した miRNA 7-8 は miR-199a-3p 鎖で天然型以上の遺伝子発現抑制能を示し、miR-199a-5p 鎖はほとんど遺伝子発現抑制能を示さなかった。特に、miRNA 7 で両鎖による遺伝子発現抑制能の差が大きいこと

から、パッセンジャー鎖となる鎖の 3'末端から 9 塩基目が最も鎖の選択性の向上に効果がある **T^a** 導入部位であると示唆された。以上の結果より、miRNA においても前項で述べた siRNA と同じくパッセンジャー鎖の 3'末端側に **T^a** を導入することで逆鎖であるガイド鎖の 5'末端を熱的に不安定化し、RISC への鎖の取り込みを促進することが明らかとなった。

第4章 アンチセンス法への応用検討

第1節 アンチセンス核酸

4-1-1. アンチセンス核酸への化学修飾

アンチセンス核酸は細胞内で標的 mRNA と結合し、RNase H による mRNA の分解を引き起こすことで遺伝子発現を抑制する。しかし、DNA を基本骨格とするアンチセンス核酸は細胞内の DNase によって短時間で分解されるため、核酸医薬に応用する際には、化学修飾体の導入によるヌクレアーゼ耐性の増強が必要となる。そこで、最初に報告された化学修飾がホスホロチオエート (PS) 骨格を有するオリゴヌクレオチドである (Figure 25)^{18) 19)}。PS 骨格を導入したアンチセンス核酸はヌクレアーゼに対して耐性があり、また、mRNA と二重鎖を形成し、RNase H 活性を惹起して標的 mRNA を分解することが知られている。しかし、アンチセンス核酸中に導入する PS 結合の数を増やす程に mRNA との親和性が低下する、即ち二重鎖の熱的安定性が低下するという問題点がある。また、PS 骨格の導入は Toll-like receptor と相互作用することで免疫応答を引き起こす、もしくはタンパクと直接結合するため重篤な副作用を引き起こす可能性が指摘されている。

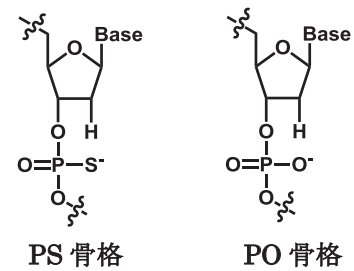


Figure 25. リン酸部修飾体

これらの問題点を解決するため、開発された化学修飾体が標的 mRNA との親和性向上を指向した糖部 2'位への修飾体、2'-O-methyl (2'-OMe) RNA や 2'-O-methoxyethyl (2'-MOE) RNA (Figure 26)^{22) 23)} である。これらを導入したアンチセンス核酸は RNA と熱的に安定な二重鎖を形成し、高いヌクレアーゼ耐性を示す一方で、RNA との二重鎖が RNase H の基質にならないことが報告されている。そのため、これら化学修飾体を利用した gapmer 型アンチセンス核酸 (Figure 27) が設計された。

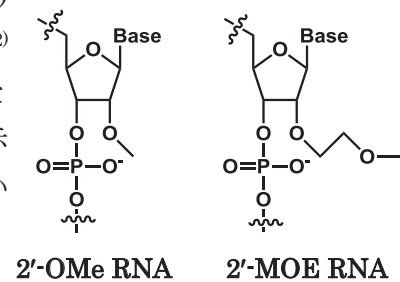


Figure 26. 糖部 2'位修飾体

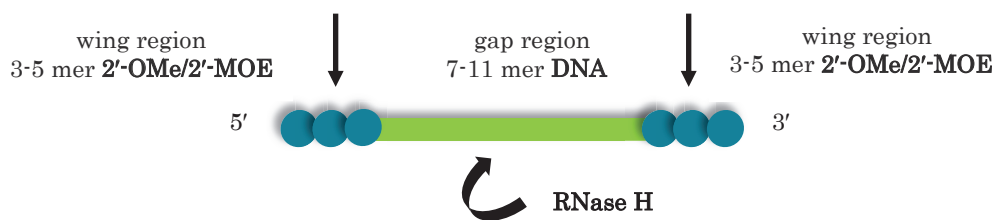


Figure 27. gapmer 型アンチセンス核酸のデザイン

この gapmer 型アンチセンス核酸は、化学修飾体を導入した両末端の wing region と DNA から成る中央部の gap region で構成されている。Gapmer 型アンチセンス核酸は、この化学修飾体を導入した wing region による高いヌクレアーゼ耐性と高い RNA との親和性に加え、DNA から成る gap region が存在することで、RNase H により DNA/RNA 二重鎖が認識され RNA 鎖の分解されることで、遺伝子発現を抑制する。2013 年に Isis 社より、2'-MOE RNA を wing region に導入した gapmer 型アンチセンス核酸が Kynamro という全身投与可能な核酸医薬品として上市されている点からも、この構造は有用であると考えられる。

そして、更なる RNA との親和性の向上を期待して開発された化学修飾体が peptide nucleic acid (PNA)³⁶⁾、locked nucleic acid (LNA)³⁵⁾ や phosphoramidate morpholino oligomer (PMO)⁵⁵⁾ などの糖部修飾体である (Figure 28)。これらの修飾体を導入したアンチセンス核酸と相補 RNA の二重鎖は RNase H の基質にはならなかったが、RNA との親和性、熱的安定性を向上させた。

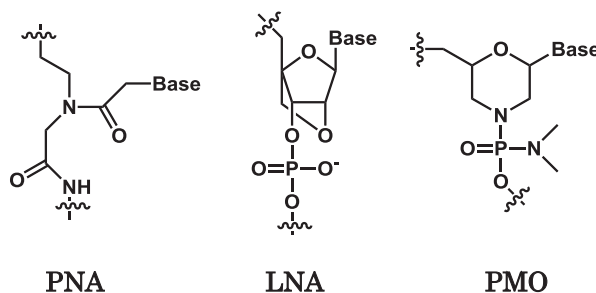


Figure 28. 糖部修飾体

4-1-2. 今回検討するアンチセンス核酸

4-1-1.より、RNA との親和性の向上やヌクレアーゼ耐性の増強を狙った gapmer 型アンチセンス核酸の wing region に糖部開環型ヌクレオシドアナログ (Figure 29) を導入した (Figure 30)。

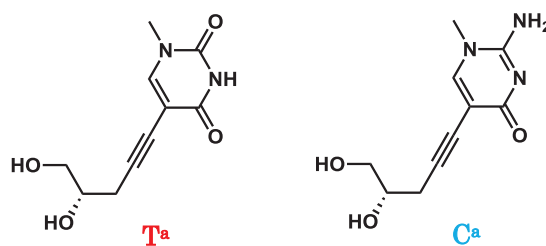


Figure 29. 糖部開環型ヌクレオシドアナログ

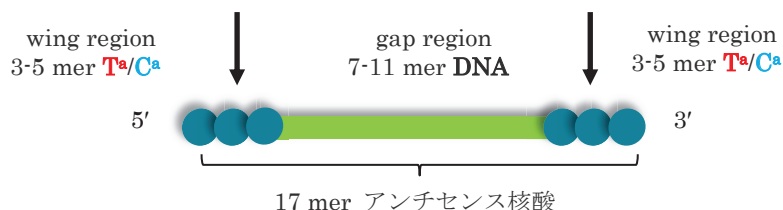


Figure 30. 今回検討するアンチセンス核酸のデザイン

第2節 アナログを導入したオリゴヌクレオチドの合成と物理化学的性質

4-2-1. アナログを導入したオリゴヌクレオチドの合成

両末端にアナログ (Figure 31) を導入した 17 塩基の ON と相補鎖 RNA を固相ホスホアミダイト法に従って、DNA/RNA 自動核酸合成機によって合成した。以下に合成したオリゴヌクレオチドの配列を示した (Table 11)。

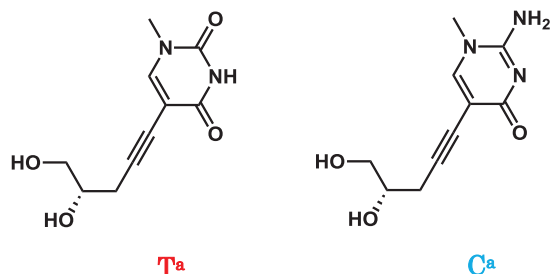


Figure 31. 糖部開環型ヌクレオシドアナログ

Sample	Abbreviation of ON	Sequence
Duplex 8	ON 36	5'-d (TTT CACTACTCCTA TTT) -3'
	ON 37	3'-r (AAA GUGAUGAGGAU AAA) -5'
Duplex 9	ON 38	5'-d (T ^a T ^a T ^a CACTACTCCTA T ^a T ^a T ^a) -3'
	ON 37	3'-r (AAA GUGAUGAGGAU AAA) -5'
Duplex 10	ON 39	5'-d (TTTTT CTACTCC TTTTT) -3'
	ON 40	3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'
Duplex 11	ON 41	5'-d (T ^a T ^a T ^a T ^a T ^a CTACTCC T ^a T ^a T ^a T ^a T ^a) -3'
	ON 40	3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'
Duplex 12	ON 42	5'-d (TCT CACTACTCCTA TCT) -3'
	ON 43	3'-r (AGA GUGAUGAGGAU AGA) -5'
Duplex 13	ON 44	5'-d (T ^a C ^a T ^a CACTACTCCTA T ^a C ^a T ^a) -3'
	ON 43	3'-r (AGA GUGAUGAGGAU AGA) -5'
Duplex 14	ON 45	5'-d (TTT CACCGACGGCG TTT) -3'
	ON 46	3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'
Duplex 15	ON 47	5'-d (T ^a T ^a T ^a CACCGACGGCG T ^a T ^a T ^a) -3'
	ON 46	3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'
Duplex 16	ON 48	5'-d (TTTTT CCGACGG TTTTT) -3'
	ON 49	3'-r (AAAAA GGCUGCC AAAAA) -5'
Duplex 17	ON 50	5'-d (T ^a T ^a T ^a T ^a T ^a CCGACGG T ^a T ^a T ^a T ^a T ^a) -3'
	ON 49	3'-r (AAAAA GGCUGCC AAAAA) -5'
Duplex 18	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'
	ON 52	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'
Duplex 19	ON 53	5'-d (T ^a C ^a T ^a CACCGACGGCG T ^a C ^a T ^a) -3'
	ON 52	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'

Table 11. T^a、C^aを導入したオリゴヌクレオチド配列

4-2-2. アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の熱的安定性の検証

合成した ON と相補鎖 RNA の二重鎖の熱的安定性を、50%融解温度、 T_m 値を測定することで比較検討した (Table 12、13)。

測定条件

測定温度範囲; 20-100 °C

測定波長; 260 nm

サンプル濃度; 3.0 μ M

buffer; 10 mM Na Phosphate and 100 mM NaCl (pH 7.0)

Sample	T_m (°C)	ΔT_m (°C) ^a
Duplex 8	56.5	-
Duplex 9	52.0	-4.5
Duplex 10	56.3	-
Duplex 11	47.1	-9.2
Duplex 12	60.4	-
Duplex 13	53.1	-7.2

^a $\Delta T_m = T_m$ (DNA/RNA duplex) – T_m (corresponding ON/RNA duplex).

Table 12. 50%融解温度 (Duplex 8-13)

Sample	T_m (°C)	ΔT_m (°C) ^a
Duplex 14	66.1	-
Duplex 15	63.8	-2.3
Duplex 16	57.6	-
Duplex 17	44.2	-13.4
Duplex 18	69.3	-
Duplex 19	61.9	-7.4

^a $\Delta T_m = T_m$ (DNA/RNA duplex) – T_m (corresponding ON/RNA duplex).

Table 13. 50%融解温度 (Duplex 14-19)

Table 12、13 より、天然型である Duplex 8 ($T_m = 56.5$ °C) や Duplex 14 ($T_m = 66.1$ °C) と比較して、**T^a**を導入した ON/RNA 二重鎖である Duplex 9 ($T_m = 52.0$ °C, $\Delta T_m = -4.5$ °C) や Duplex 15 ($T_m = 63.8$ °C, $\Delta T_m = -2.3$ °C) は熱的安定性が低下した。加えて、**C^a**を導入した ON/RNA 二重鎖である Duplex 13 ($T_m = 53.1$ °C, $\Delta T_m = -7.2$ °C) や Duplex 19 ($T_m = 61.9$ °C, $\Delta T_m = -7.4$ °C) の熱的安定性もまた対応する天然型と比較

して低下した。**C^a**はシチジンを模しており、チミジンを模している**T^a**よりも二重鎖の熱的安定性の向上に寄与すると推測していた。しかし、**C^a**を導入した Duplex 13 ($\Delta T_m = -7.2\text{ }^\circ\text{C}$) や Duplex 19 ($\Delta T_m = -7.4\text{ }^\circ\text{C}$) の対応する天然型と比較した際の ΔT_m は、**T^a**を導入した Duplex 9 ($\Delta T_m = -4.5\text{ }^\circ\text{C}$) や Duplex 15 ($\Delta T_m = -2.3\text{ }^\circ\text{C}$) と比較して大きかった。この結果から、**C^a**は ON/RNA 二重鎖内で相補塩基と 3 本の水素結合による Watson-Crick 型の塩基対を形成していないことが考えられる。これに関して、Schlegel らも GNA/RNA 二重鎖 (A:T 10 mer) 中に G:C 塩基対を増やしていくと二重鎖の熱的安定性が不安定化することを報告している²⁶⁾。そのため、今回合成した**T^a**と**C^a**の塩基特異性について検証することとした。

4-2-3. アナログを導入したオリゴヌクレオチドの塩基特異性の検証

アナログ**T^a**、**C^a**を導入した ON/RNA 二重鎖中における塩基特異性を検証するため、ミスマッチ塩基対を含む ON/RNA 二重鎖の 50%融解温度、 T_m 値を測定した。測定結果は下記に示した (Table 14)。

測定条件

測定温度範囲; 20-100 °C

測定波長; 260 nm

サンプル濃度; 3.0 μM

buffer; 10 mM Na Phosphate (pH 7.0) and 100 mM NaCl

Sample	Abbreviation of ON	Sequence ^a	T_m (°C)	ΔT_m (°C) ^b
Duplex 14	ON 45	5'-d (TTT CACCGACGGCG TTT) -3'	66.1	-
	ON 46	3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'		
Duplex 14m	ON 45	5'-d (TTT CACCGACGGCG TTT) -3'	65.0	-1.1
	ON 52	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'		
Duplex 15	ON 47	5'-d (<u>T^aT^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aT^aT^a</u>) -3'	63.8	-
	ON 46	3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'		
Duplex 15m	ON 47	5'-d (<u>T^aT^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aT^aT^a</u>) -3'	61.8	-2.0
	ON 52	3'-r (<u>AGA</u> GUGGCUGCCGC <u>AGA</u>) -5'		
Duplex 10	ON 39	5'-d (TTTTT CTACTCC TTTTT) -3'	56.3	-
	ON 40	3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'		
Duplex 10m	ON 39	5'-d (TTTTT CTACTCC TTTTT) -3'	51.1	-5.2
	ON 54	3'-r (AAGAA GAUGAGG AAGAA) -5'		
Duplex 11	ON 41	5'-d (<u>T^aT^aT^aT^aT^a</u> CTACTCC <u>T^aT^aT^aT^aT^a</u>) -3'	47.1	-
	ON 40	3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'		
Duplex 11m	ON 41	5'-d (<u>T^aT^aT^aT^aT^a</u> CTACTCC <u>T^aT^aT^aT^aT^a</u>) -3'	44.7	-2.4
	ON 54	3'-r (AAGAA GAUGAGG AAGAA) -5'		
Duplex 18	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'	69.3	-
	ON 52	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'		
Duplex 18m	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'	63.2	-6.1
	ON 46	3'-r (<u>AAA</u> GUGGCUGCCGC <u>AAA</u>) -5'		
Duplex 19	ON 53	5'-d (<u>T^aC^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aC^aT^a</u>) -3'	61.9	-
	ON 52	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'		
Duplex 19m	ON 53	5'-d (<u>T^aC^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aC^aT^a</u>) -3'	63.0	+1.1
	ON 46	3'-r (<u>AAA</u> GUGGCUGCCGC <u>AAA</u>) -5'		

^aUnderlined letters indicate mismatched bases.

^b $\Delta T_m = T_m$ (DNA/RNA duplex) – T_m (corresponding ON/RNA duplex).

Table 14. ミスマッチ塩基対を含む ON/RNA 二重鎖の 50%融解温度

Table 14 より、Duplex 15m ($T_m = 61.8$ °C) は Duplex 15 ($T_m = 63.8$ °C) よりも T_m 値が低下しており、かつ、Duplex 11m ($T_m = 44.7$ °C) も Duplex 11 ($T_m = 47.1$ °C) より T_m 値が低下していることから、**T^a** と RNA は天然型よりも塩基特異性は小さいものの A と塩基対を形成していることが示唆された。

一方で、Duplex 19m ($T_m = 63.0$ °C) は Duplex 19 ($T_m = 61.9$ °C) よりも T_m 値が上昇したことから、**C^a** は天然型のように G と Watson-Crick 塩基対を形成していないことが示唆された。また、**C^a** を導入した ON/RNA 二重鎖中における塩基特異性を更に検証するため、他のミスマッチ塩基対を含む ON 55-56 合成し、ON 53 と二重鎖を形成させ、50%融解温度、 T_m 値を測定した (Table 15)。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence ^a	T_m (°C)	ΔT_m (°C) ^b
Duplex 19	ON 53	5'-d (<u>T^aC^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aC^aT^a</u>) -3'	61.9	-
	ON 52	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5		
Duplex 19m	ON 53	5'-d (<u>T^aC^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aC^aT^a</u>) -3'	63.0	+1.1
	ON 46	3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5		
Duplex 20m	ON 53	5'-d (<u>T^aC^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aC^aT^a</u>) -3'	62.1	+0.2
	ON 55	3'-r (<u>ACA</u> GUGGCUGCCGC <u>ACA</u>) -5		
Duplex 21m	ON 53	5'-d (<u>T^aC^aT^a</u> CACCGACGGCG <u>T^aC^aT^a</u>) -3'	62.6	+0.7
	ON 46	3'-r (<u>AUA</u> GUGGCUGCCGC <u>AUA</u>) -5		

^aUnderlined letters indicate mismatched bases.

^b $\Delta T_m = T_m$ (DNA/RNA duplex) – T_m (corresponding ON/RNA duplex).

Table 15. **C^a** の塩基特異性の検証 (50%融解温度)

Table 15 の結果より、ミスマッチ塩基対を含む Duplex **19m-21m** はいずれも天然型である Duplex **19** と比較して T_m 値が上昇したことから、**C^a** は塩基特異性を示さないことが示唆された。そのため、**C^a** と相補塩基間の水素結合の有無を確認する必要があり、ON/RNA 二重鎖の熱力学的パラメータを算出することでより詳細な検討を行うことにした。

4-2-4. アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の熱力学的安定性の検証

ON/RNA 二重鎖の熱力学的安定性を検証するため、3、6、9、12、15、18、21 μM の 7 水準の濃度で 50%融解温度、 T_m 値を測定した。そして、式 (2) に基づき縦軸 $\ln(C_T/4)$ 、横軸 $1/T_m$ で van't Hoff plot (Figure 32) を行い、その傾きと切片からエンタルピー項 (H°)とエントロピー項 (S°)を算出した。式 (1) から ΔG° を求め以下にまとめた (Table 16)。

測定条件

測定温度範囲; 20-100 $^\circ\text{C}$

測定波長; 260 nm

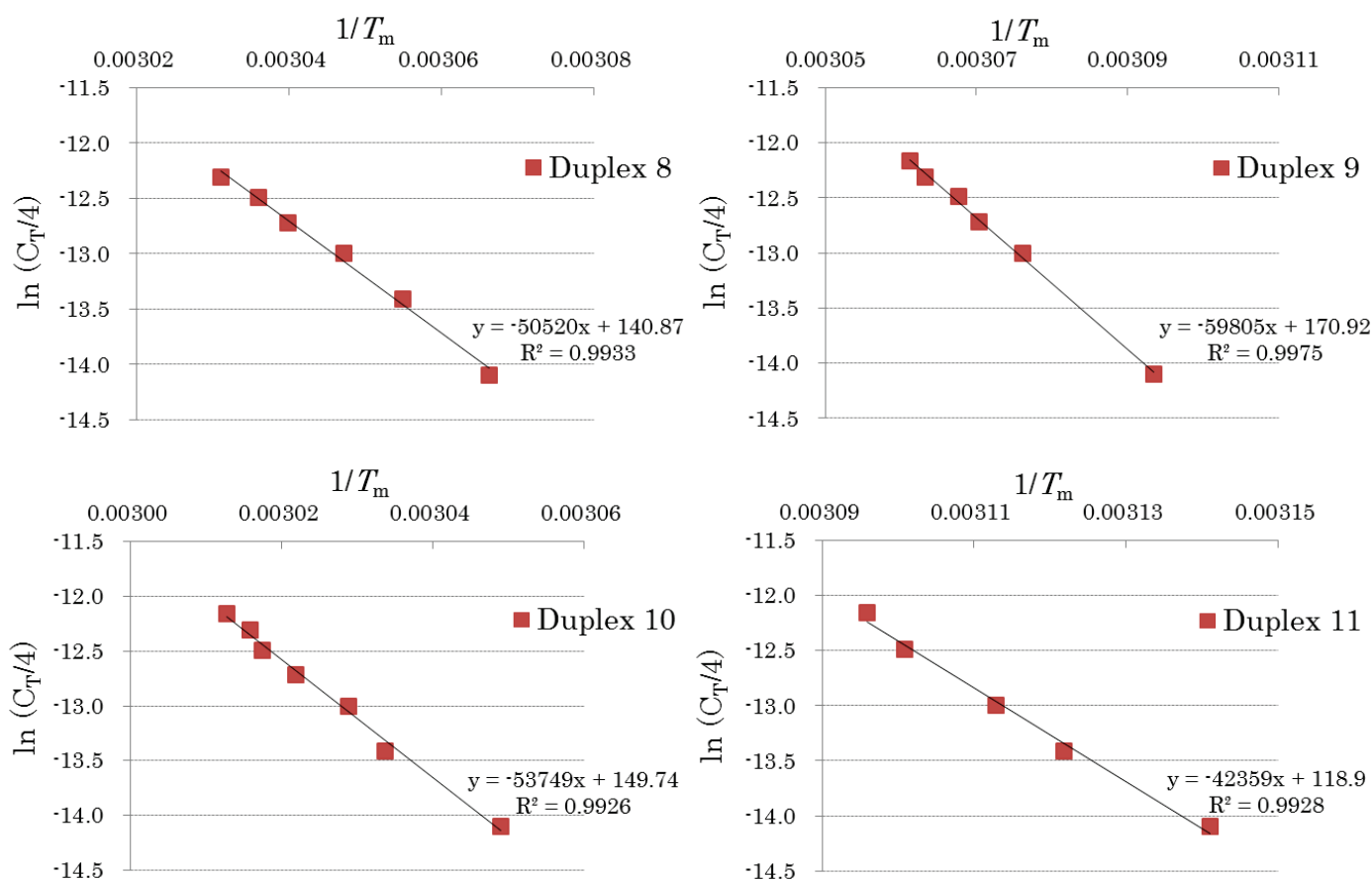
サンプル濃度; 3.0, 6.0, 9.0, 12, 15, 18, 21 μM

buffer; 10 mM Na Phosphate (pH 7.0) and 100 mM NaCl

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \dots (1)$$

$$\ln(C_T/4) = -\Delta H^\circ / (RT) + \Delta S^\circ / R \dots (2)$$

C_T ; オリゴヌクレオチドの総濃度



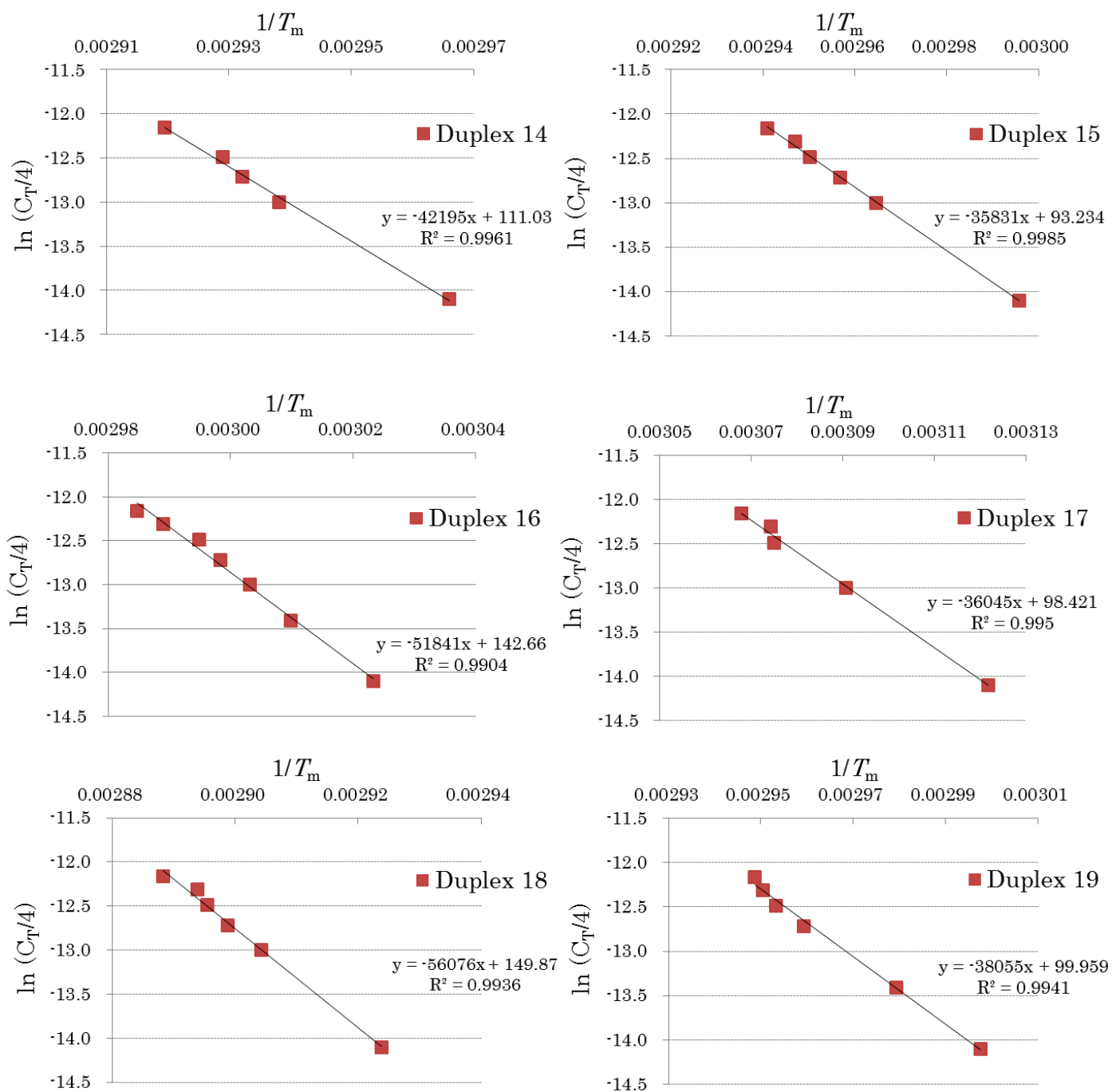


Figure 32. van't Hoff plot (Duplex 8-11, 14-19)

Sample	Sequence	ΔG_{310}° [kcal/mol]	ΔH° [kcal/mol]	ΔS° [cal/K·mol]
Duplex 8	5'-d (TTT CACTACTCCTA TTT) -3' 3'-r (AAA GUGAUGAGGAU AAA) -5'	-13.6	-100.3	-279.8
Duplex 9	5'-d (T^aT^aT^a CACTACTCCTA T^aT^aT^a) -3' 3'-r (AAA GUGAUGAGGAU AAA) -5'	-13.5	-118.8	-339.5
Duplex 10	5'-d (TTTTT CTACTCC TTTTT) -3' 3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'	-14.5	-106.8	-297.4
Duplex 11	5'-d (T^aT^aT^aT^aT^a CTACTCC T^aT^aT^aT^aT^a) -3' 3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'	-10.9	-73.3	-236.2
Duplex 14	5'-d (TTT CACCGACGGCG TTT) -3' 3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'	-15.4	-83.8	-220.5
Duplex 15	5'-d (T^aT^aT^a CACCGACGGCG T^aT^aT^a) -3' 3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'	-13.7	-71.2	-185.2
Duplex 16	5'-d (TTTTT CCGACGG TTTTT) -3' 3'-r (AAAAA GGCUGCC AAAAA) -5'	-15.1	-103.0	-283.3
Duplex 17	5'-d (T^aT^aT^aT^aT^a CCGACGG T^aT^aT^aT^aT^a) -3' 3'-r (AAAAA GGCUGCC AAAAA) -5'	-11.0	-71.6	-195.5
Duplex 18	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3' 3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'	-19.1	-111.4	-297.7
Duplex 19	5'-d (T^aC^aT^a CACCGACGGCG T^aC^aT^a) -3' 3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'	-14.0	-75.6	-198.5

Table 16. ON/RNA 二重鎖の熱力学的パラメータ

Table 16 より、**T^a**を導入した ON/RNA 二重鎖形成は天然型と比較して、 ΔG_{310}° の絶対値が減少していることから熱力学的に不利になることが示唆された。全体の傾向として、アナログを導入した Duplex は対応する天然型よりもエンタルピー項の絶対値が減少していることから、二重鎖形成能の低下はエンタルピー的不利に起因していることが示唆された。また、アナログの導入を増やす程、エンタルピー項が増加することから、アナログへのエチニル基の導入が相補 RNA との水素結合を阻害していると考えられる。

一方で、アナログの導入を増やす程、エントロピー項の絶対値は減少し、二重鎖形成はエントロピー的には有利になることが示唆された。これは、アナログへのエチニル基の導入による π - π スタッキングによる疎水性相互作用の増加に起因するのではないかと考えられる。

また、**C^a**を導入した ON/RNA 二重鎖である Duplex 19 と **T^a**のみを導入した Duplex 15 を比較すると、gap region の配列が同じであるにも関わらず各熱力学的パラメータ

にほとんど差がなかった。これに対し、Duplex 18 ($\Delta H^\circ = -111.4$ kcal/mol) と Duplex 14 ($\Delta H^\circ = -83.8$ kcal/mol) はエンタルピー項の絶対値の差が 27.6 kcal/mol であるのをはじめ、各熱力学的パラメータに差が生じた。また、このエンタルピー項の差である 27.6 kcal/mol の 1/2 である 13.8 kcal/mol がこれは、A:T 塩基対と G:C 塩基対の水素結合力の差であると考えられる。しかし、アナログを導入した Duplex 19 ($\Delta H^\circ = -75.6$ kcal/mol) と Duplex 15 ($\Delta H^\circ = -71.2$ kcal/mol) はエンタルピー項の絶対値の差が 4.4 kcal/mol であり、A: **T^a** 塩基対と G: **C^a** 塩基対の水素結合力の差は 2.2 kcal/mol であると考えられる。そのため、A: **T^a** 塩基対と G: **C^a** 塩基対は水素結合数が同じなのではないかと考えられる (Figure 33)。以上から、**C^a** は Watson-Crick 塩基対とは異なる塩基対形成をしていることが示唆された。

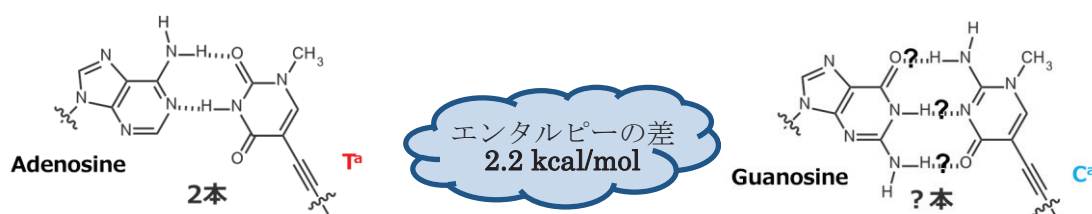


Figure 33. A: **T^a** 塩基対と G: **C^a** 塩基対

4-2-5. アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の高次構造

RNase H によって ON/RNA 二重鎖が認識、RNA 鎖の分解を引き起こすためには、ON/RNA 二重鎖が RNase H の基質になりやすいとされる A 型らせん構造をとる必要がある⁴⁴⁾。そのため、今回合成した **T^a** を導入した ON/RNA 二重鎖の高次構造を CD スペクトルにより検証した (Figure 34)。

測定条件

測定温度; 室温 (25 °C)

測定波長; 260 nm

サンプル濃度; 6.0 μM

buffer; 100 mM Na Phosphate (pH 7.0), 100 mM NaCl and 10 mM MgCl₂

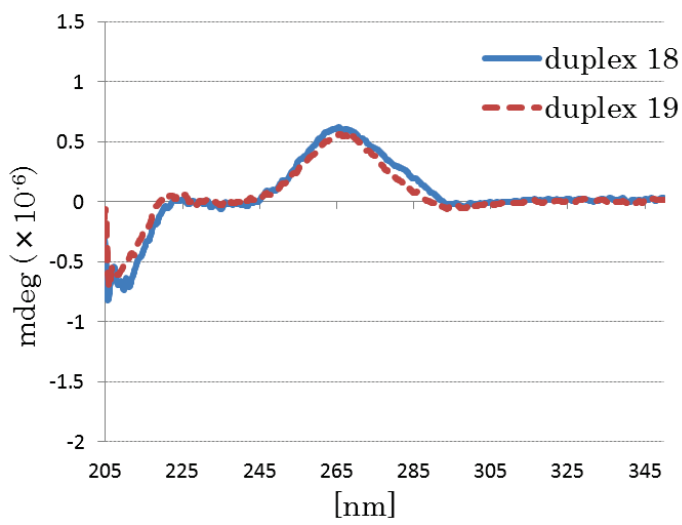
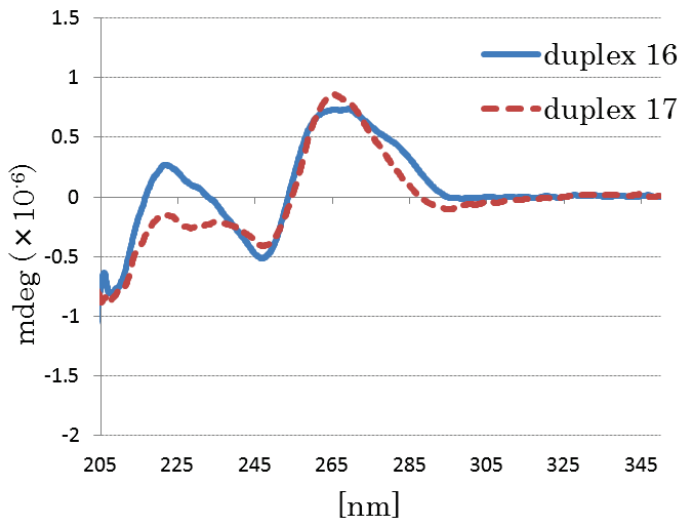
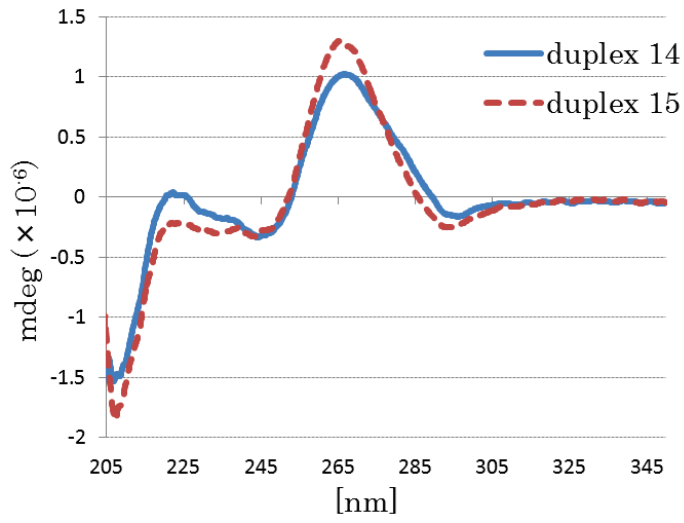


Figure 34. CD スペクトル (Duplex

Figure 34 の結果より、Duplex14-19 いずれも 260 nm に正の CD バンド、210 nm に負の CD バンドが観察されたことから、A 型らせん構造をしていることが示唆された。よって、今回合成したアナログを導入した ON/RNA 二重鎖は RNase H の基質になりうると考えられる。

第3節 ヌクレアーゼ耐性の検証

4-3-1. アナログ **T^a** を導入したオリゴヌクレオチドの合成

アンチセンス核酸は細胞内のヌクレアーゼに対して、分解されないことが重要である。そのため、5'末端を蛍光標識化した10塩基からなるDNAオリゴマーであるON 57と3'末端に **T^a** を導入したON 58を合成した (Table 17)。

Abbreviation of ON	Sequence
ON 57	F-5'-d (TTTTTTTTTTT) -3'
ON 58	F-5'-d (TTTTTTTTTT T^a) -3'

Table 17. エキソヌクレアーゼ耐性検証用オリゴヌクレオチド配列

4-3-2. エキソヌクレアーゼ耐性の検証

3'-エキソヌクレアーゼの1つであるSVPD (3-2-2. 参照) を用いて、**T^a** を導入したオリゴヌクレオチドのエキソヌクレアーゼに対する抵抗性を検証した。一重鎖状態において、SVPDで処理し、各時間で反応を停止後、電気泳動によってそのDNA分解産物を解析した (Figure 35)。

反応条件

温度; 37 °C

サンプル; 1200 pmol

SVPD; 0.006 unit

buffer; 250 mM Tris-HCl and 50 mM MgCl₂ (150 μL)

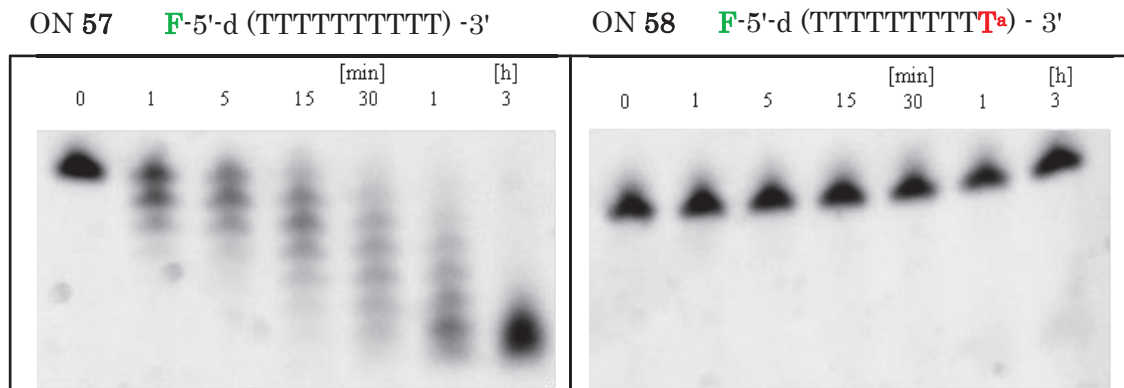


Figure 35. SVPD による RNA 分解能の検証

Figure 35 より、天然型である ON 57 は SVPD 処理 1 分後には分解が始まるのに対し、3'末端に **T^a** を導入した ON 58 は SVPD 処理後 3 時間経っても分解が始まらなかった。この結果より、DNA の 3'末端に **T^a** を導入することでエキソヌクレアーゼ耐性が著しく増強されることが示唆された。

第4節 アナログを導入した ON/RNA 二重鎖の RNase H 活性化能の検証

4-4-1. アナログを導入したオリゴヌクレオチドの合成

RNase H による RNA 分解能を検証するため、5'末端を蛍光標識化した RNA を合成し、**T^a**や **C^a**を導入した ON (Table 11) と以下の ON/RNA 二重鎖を調製した (Table 18)。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence
Duplex 8f	ON 36	5'-d (TTT CACTACTCCTA TTT) -3'
	ON 59	3'-r (AAA GUGAUGAGGAU AAA) -5'-F
Duplex 9f	ON 38	5'-d (T^aT^aT^a CACTACTCCTA T^aT^aT^a) -3'
	ON 59	3'-r (AAA GUGAUGAGGAU AAA) -5'-F
Duplex 10f	ON 39	5'-d (TTTTT CTACTCC TTTTT) -3'
	ON 60	3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'-F
Duplex 11f	ON 41	5'-d (T^aT^aT^aT^aT^a CTACTCC T^aT^aT^aT^aT^a) -3'
	ON 60	3'-r (AAAAA GAUGAGG AAAAA) -5'-F
Duplex 12f	ON 42	5'-d (TCT CACTACTCCTA TCT) -3'
	ON 61	3'-r (AGA GUGAUGAGGAU AGA) -5'-F
Duplex 13f	ON 44	5'-d (T^aC^aT^a CACTACTCCTA T^aC^aT^a) -3'
	ON 61	3'-r (AGA GUGAUGAGGAU AGA) -5'-F
Duplex 14f	ON 45	5'-d (TTT CACCGACGGCG TTT) -3'
	ON 62	3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'-F
Duplex 15f	ON 47	5'-d (T^aT^aT^a CACCGACGGCG T^aT^aT^a) -3'
	ON 62	3'-r (AAA GUGGCUGCCGC AAA) -5'-F
Duplex 16f	ON 48	5'-d (TTTTT CCGACGG TTTTT) -3'
	ON 63	3'-r (AAAAA GGCUGCC AAAAA) -5'-F
Duplex 17f	ON 50	5'-d (T^aT^aT^aT^aT^a CCGACGG T^aT^aT^aT^aT^a) -3'
	ON 63	3'-r (AAAAA GGCUGCC AAAAA) -5'-F
Duplex 18f	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'
	ON 64	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'-F
Duplex 19f	ON 53	5'-d (T^aC^aT^a CACCGACGGCG T^aC^aT^a) -3'
	ON 64	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'-F

Table 18. RNase H 活性化能検証用 ON/RNA 二重鎖の配列

4-4-2. RNase H による RNA 分解能の検証

アナログ **T^a**、**C^a** を導入した gapmer 型アンチセンス核酸の RNase H 活性化能を評価した。RNase H は ON/RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖だけを特異的に切断する酵素であり、今回の評価には *E. coli* 由来のものを用いた。

T^a、**C^a** を導入した ON と相補鎖 RNA (Table 18) を ON:RNA = 1:5 の割合の二重鎖状態において、RNase H 処理後に各時間で反応を停止後、Duplex **8f-19f** における加水分解産物を電気泳動によって解析した (Figure 36)。また初速度については、Table 19 に示した。

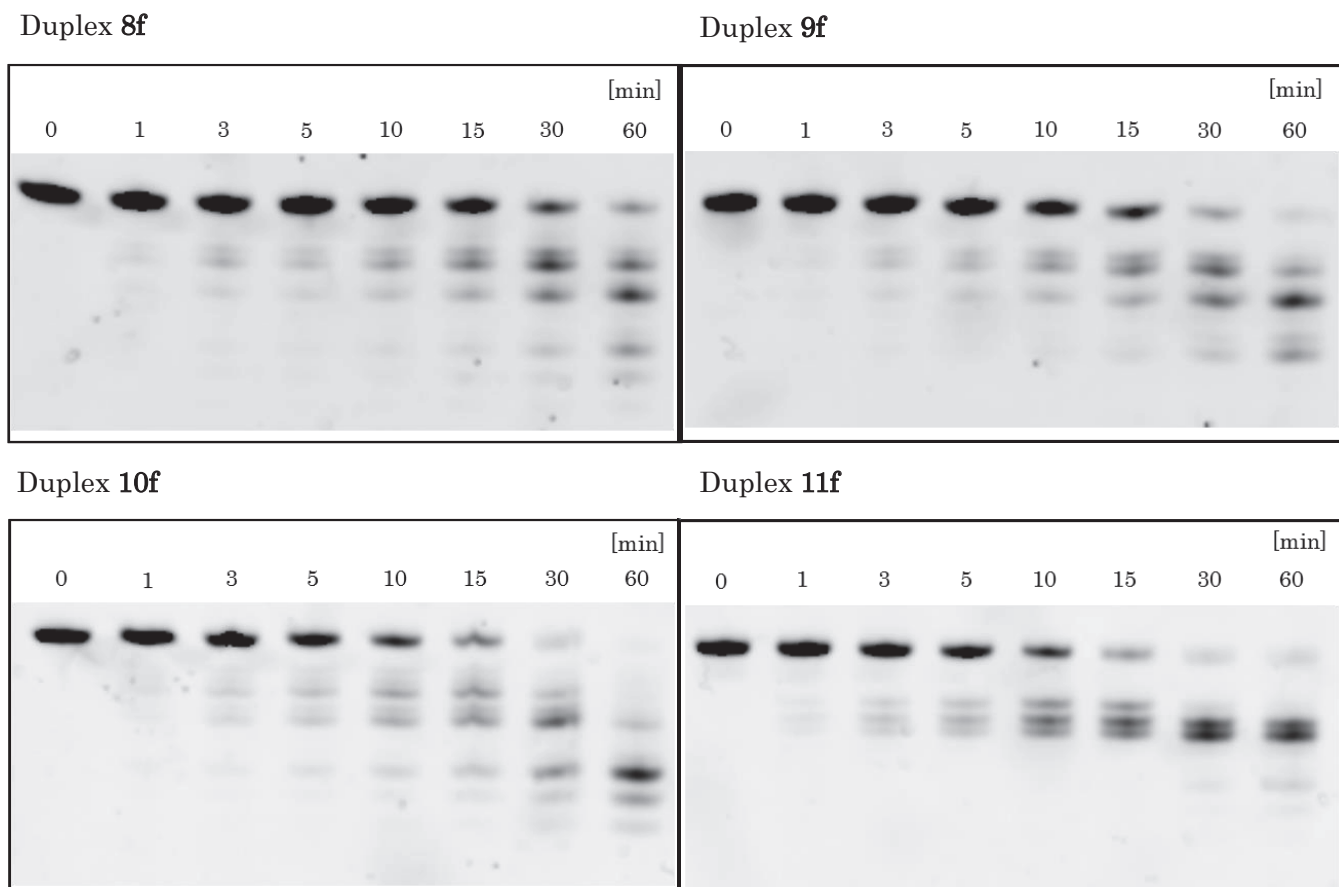
反応条件

温度; 37 °C

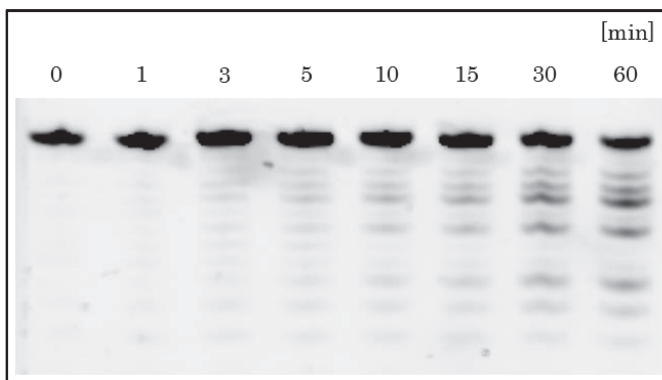
サンプル; ON:RNA = 300:1500 pmol

E. coli RNase H; 3.0 unit

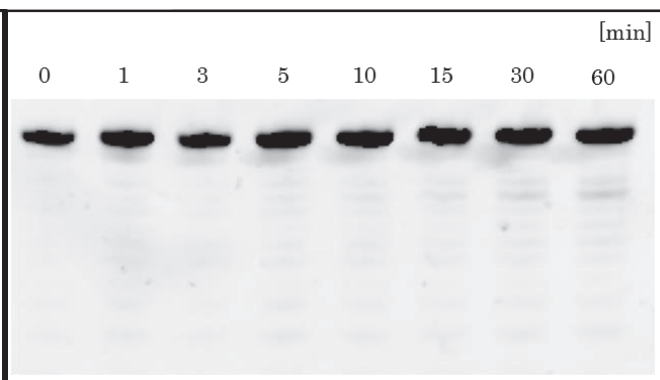
buffer; 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ and
10 mM dithiothreitol (150 μL)



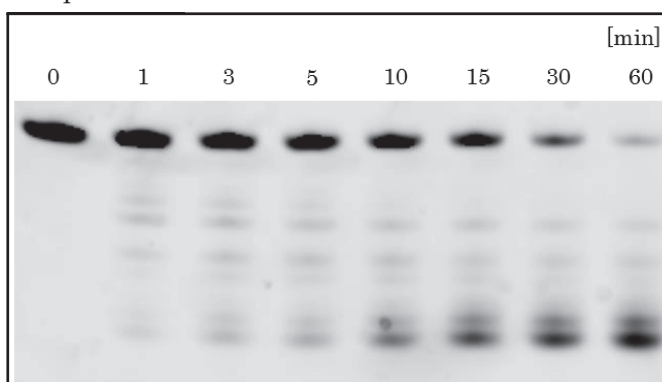
Duplex 12f



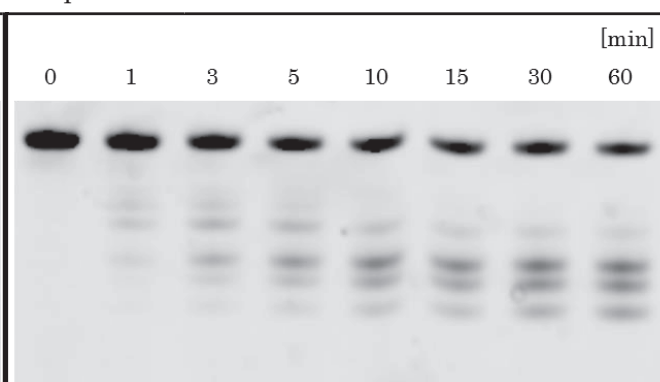
Duplex 13f



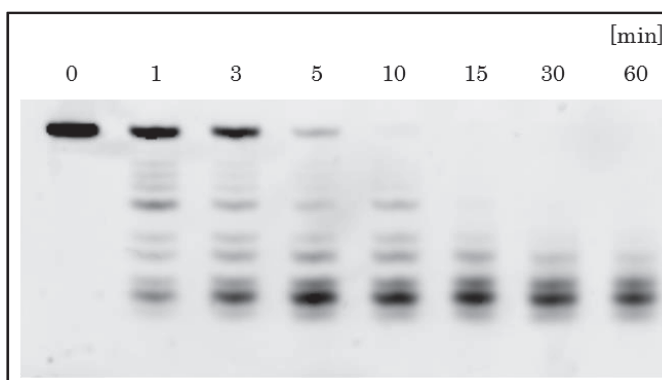
Duplex 14f



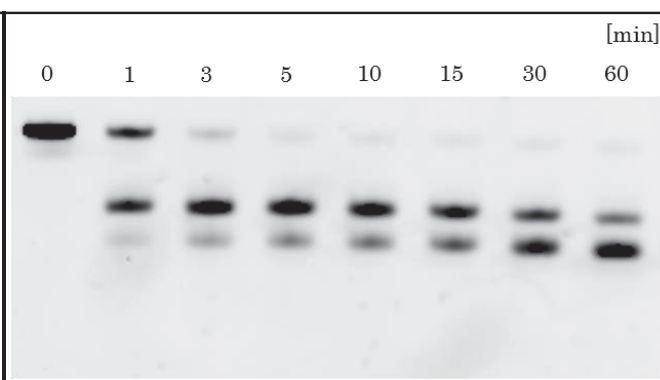
Duplex 15f



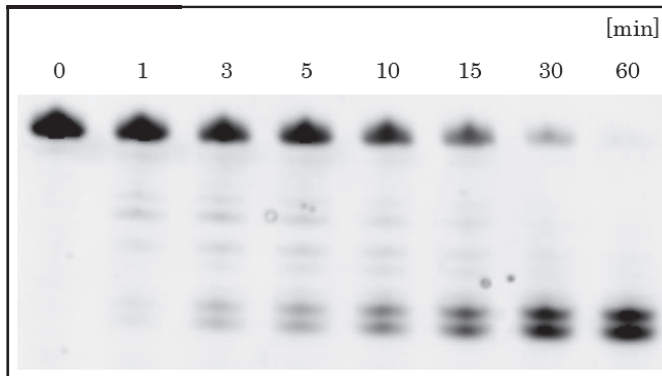
Duplex 16f



Duplex 17f



Duplex 18f



Duplex 19f

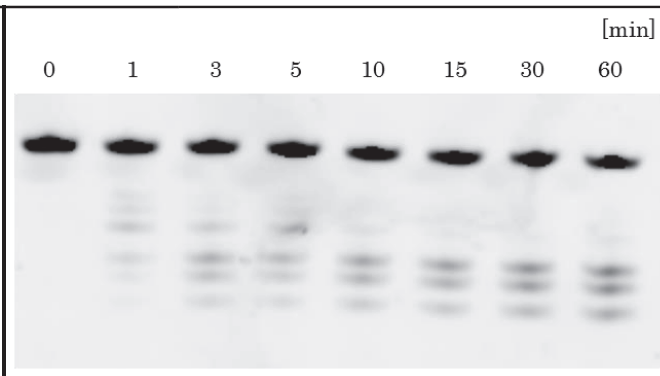


Figure 36. RNase H による RNA 分解能の検証 (Duplex 8f-19f)

Figure 36 より、**T^a**を導入した ON/RNA 二重鎖のいくつかは対応する天然型よりも速く RNA が加水分解された。初速度についても Duplex **9f** (70 pmol/min)、Duplex **11f** (86 pmol/min)、Duplex **17f** (245 pmol/min) であるのに対し、対応する天然型は Duplex **8f** (42 pmol/min)、Duplex **10f** (71 pmol/min)、Duplex **16f** (192 pmol/min) であった (Table 19)。この結果から、gap region の配列によって差はあるものの、アンチセンス核酸 wing region への **T^a** の導入は *E. coli* RNase H による RNA 分解を加速させたことが示唆された。この原因として、**T^a** を導入した ON/RNA 二重鎖は天然型と比較して熱的安定性が低いため (Table 13-14, 17)、RNase H による RNA 分解後の ON の RNA からの解離が天然型よりも速いことが考えられる。

一方で、**C^a** を導入した ON/RNA 二重鎖は対応する天然型と比較してその RNA 分解速度が大幅に低下した。初速度についても Duplex **13f** (2 pmol/min)、Duplex **19f** (31 pmol/min) であるのに対し、天然型は Duplex **12f** (39 pmol/min)、Duplex **18f** (56 pmol/min) であった。加えて、gap region が全く同じ配列であり wing region に **T^a** のみを導入した Duplex **9f** (42 pmol/min) や Duplex **15f** (45 pmol/min) と比較しても、**C^a** を導入した ON/RNA 二重鎖の初速度は小さい。これらの結果は、**C^a** は **T^a** と比較して、相補塩基との塩基対形成が弱いことに起因するのではないかと考えられる。

Sample	initial late [pmol/min]
Duplex 8f	42
Duplex 9f	70
Duplex 10f	71
Duplex 11f	86
Duplex 12f	39
Duplex 13f	2
Duplex 14f	57
Duplex 15f	45
Duplex 16f	192
Duplex 17f	245
Duplex 18f	56
Duplex 19f	31

Table 19. RNase H による RNA 加水分解初速度

4-4-3. 塩基対形成が RNase H による RNA 分解能へ与える影響の検証

wing region の塩基対形成が RNase H 活性化能にどのような影響を与えるのかを検証するため、wing region にミスマッチ塩基を導入した RNA を用いて **T^a**、**C^a** を導入した gapmer 型アンチセンス核酸の RNase H 活性化能を評価した (Table 20、Figure 37)。4-4-2. と同様の評価方法を用いた。

Sample	Abbreviation of ON	Sequence ^a
Duplex 18f	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'
	ON 64	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'-F
Duplex 18mf	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'
	ON 62	3'-r (<u>AAA</u> GUGGCUGCCGC <u>AAA</u>) -5'-F
Duplex 22mf	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'
	ON 65	3'-r (<u>ACA</u> GUGAUGAGGAU <u>ACA</u>) -5'-F
Duplex 23mf	ON 51	5'-d (TCT CACCGACGGCG TCT) -3'
	ON 66	3'-r (<u>AUA</u> GUGAUGAGGAU <u>AUA</u>) -5'-F
Duplex 19f	ON 53	5'-d (T^aC^aT^a CACCGACGGCG T^aC^aT^a) -3'
	ON 64	3'-r (AGA GUGGCUGCCGC AGA) -5'-F
Duplex 19mf	ON 53	5'-d (T^aC^aT^a CACCGACGGCG T^aC^aT^a) -3'
	ON 62	3'-r (<u>AAA</u> GUGGCUGCCGC <u>AAA</u>) -5'-F
Duplex 20mf	ON 53	5'-d (T^aC^aT^a CACCGACGGCG T^aC^aT^a) -3'
	ON 65	3'-r (<u>ACA</u> GUGAUGAGGAU <u>ACA</u>) -5'-F
Duplex 21mf	ON 53	5'-d (T^aC^aT^a CACCGACGGCG T^aC^aT^a) -3'
	ON 66	3'-r (<u>AUA</u> GUGAUGAGGAU <u>AUA</u>) -5'-F

^aUnderlined letters indicate mismatched bases.

Table 20. RNase H 活性化能検証用 ON/RNA 二重鎖の配列

反応条件

温度; 37 °C

サンプル; ON:RNA = 300:1500 pmol

E. coli RNase H; 3.0 unit

buffer; 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ and
10 mM dithiothreitol (150 μL)

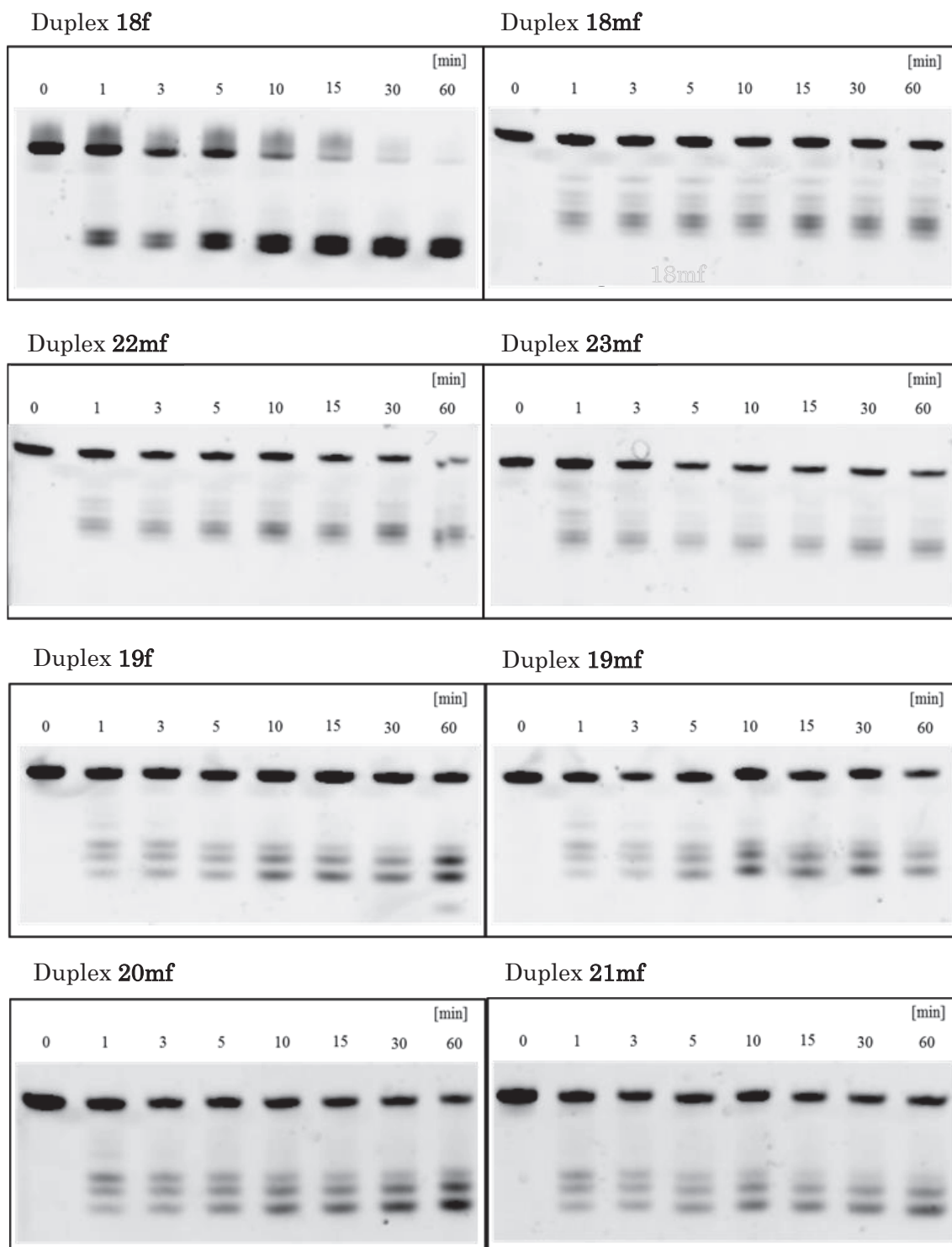


Figure 37. RNase H による RNA 分解能の検証 (Table 20)

Figure 37 より、天然型のマッチ配列である Duplex 18f と比較して、ミスマッチを含む Duplex 18mf、Duplex 22mf、Duplex 23mf は RNA 分解速度が低下した。また、初速度も同程度低下した (Table 21)。Wing region へのミスマッチ塩基対の導入は、RNase H による RNA 切断活性に大きな影響を与えることが示唆された。一方で、Ca を導入した Duplex 19f と比較して、ミスマッチを含む Duplex 19mf、Duplex 20mf、Duplex 21mf は RNA 分解速度に大きな差がなく、初速度も同程度であった (Table 21)。これらの結果から、ミスマッチ塩基や Ca のような天然型と同様の Watson-Crick 塩基対の形成が難しいアナログの導入は、RNase H による RNA 切断活性に大きな影響を与えることが示唆された。

Sample	initial rate [pmol/min]
Duplex 18f	56
Duplex 18mf	32
Duplex 22mf	36
Duplex 23mf	36
Duplex 19f	31
Duplex 19mf	33
Duplex 20mf	39
Duplex 21mf	32

Table 21. RNase H による RNA 加水分解初速度

総括

本研究では、新規糖部開環型人工核酸 **T^a** (チミジン誘導体)、**C^a** (シチジン誘導体) の合成 (Figure 38) とそれらの siRNA やアンチセンス核酸をはじめとする遺伝子発現抑制ツールへの応用について検討した。

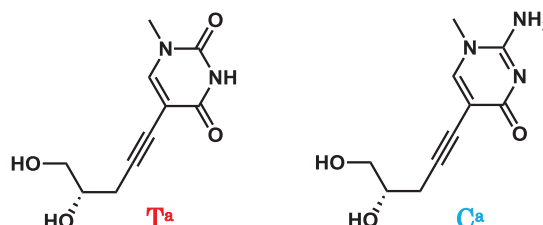


Figure 38. 糖部開環型ヌクレオシドアナログ

今回設計したアナログは GNA にアルキニル基を介して塩基を結合させた構造をしており、ON に導入することで GNA 以上の熱的、熱力学的安定性を持つ二重鎖を形成することを期待した。しかし、鎖の中央に **T^a** を導入した RNA 二重鎖の 50%融解温度は天然型と比較して低下したことから、今回合成したアナログは二重鎖の熱的、熱力学的安定性を低下させることが示唆された。また、**T^a** を 3'末端に導入した一重鎖 ON のヌクレアーゼ耐性を SVPD で評価したところ、天然型以上のヌクレアーゼ抵抗性を示した。そのため、今回合成したアナログはヌクレアーゼ耐性の向上に有用であることが示唆された。

これらの性質を利用して、**T^a** の siRNA/miRNA への応用を検討した。RNA 二重鎖へ **T^a** を導入すると、RNA 二重鎖の熱的安定性を変化させることを利用して、RISC の鎖の選択性を向上させてオフターゲット効果を回避することを目指して siRNA を設計した。まず、siRNA の様々な部位に **T^a** を導入した siRNA の遺伝子発現抑制能を検証した。その結果、3'末端オーバーハング部位に **T^a** を導入した siRNA **2** とセンス鎖 3'末端から 4 番目に **T^a** を導入した siRNA **5** で、天然型以上の遺伝子発現抑制能を示した (3-3-1. Figure 16 参照)。siRNA **2** は 3'末端オーバーハング部位へ **T^a** を導入したことによる高いヌクレアーゼ耐性に起因する遺伝子発現抑制能の向上と考えられる。一方、siRNA **5** はセンス鎖 3'末端付近への **T^a** の導入が、アンチセンス鎖 5'末端付近を熱的に不安定化させ RISC へのアンチセンス鎖の取り込みを促進させたことに起因すると考えられた。

この仮説を裏付けるため、両鎖に標的をもつ miR-199a-5p/3p に **T^a** を導入し、遺伝子発現抑制能を検証した。その結果、miR-199a-3p 鎖の 3'末端から 9 番目に **T^a** を導入した miRNA **7** において、miR-199a-5p 鎖が優先的に RISC に取り込まれ天然型以上の遺伝子発現抑制能を示し、miR-199a-3p 鎖はほとんど遺伝子発現抑制能を示さなかつ

た。以上のことから、**T^a**はオフターゲット効果を回避し遺伝子発現抑制能を向上させるために有用なアナログであることが示され、同じく RNA 二重鎖を熱的に不安定化させるミスマッチ塩基よりもヌクレアーゼ耐性を有する点が利点である (3-3-3. Figure 18-19 参照)。また、その最適な修飾部位は siRNA のセンス鎖 3'末端から 4 番目の位置と同定された。

次に、wing region に **T^a**、**C^a**を導入した gapmer 型アンチセンス核酸への応用を検討した。今回設計した gapmer 型アンチセンス核酸は wing region へのアナログの導入により高いヌクレアーゼ耐性を有し、アンチセンス核酸と RNA の二重鎖は CD スペクトルの結果から、天然型の DNA/RNA 二重鎖と同じく A 型らせん構造をとっていることが示された。

また、この gapmer 型アンチセンス核酸と RNA 二重鎖の熱的安定性を 50%融解温度 (T_m 値)で評価した結果、天然型と比較して 2.3~13.4 °C 低下し、**T^a**、**C^a**共に ON/RNA 二重鎖の熱的安定性を低下させることが示唆された (4-2-2. Table 12-13 参照)。加えて、ミスマッチ塩基を含む RNA との熱的安定性を T_m 値で評価した結果、**T^a**は天然型には劣るものの A と塩基対を形成していることが示された。一方で、**C^a**は塩基特異性を示さなかったため、相補塩基との水素結合の有無についてより詳細な検討をするため、 T_m 値から van't Hoff plot から熱力学的パラメータを算出した。その結果、天然型と比較して ΔG_{310}° の絶対値が減少したことから、アナログの導入は RNA との二重鎖形成が不利になることが明らかとなった。また、全体の傾向として、この二重鎖形成能の低下はエンタルピー的不利に起因している。これはアナログの導入を増やす程、エンタルピー項が増加したことから、アナログへのエチル基の導入が相補 RNA との水素結合を不利にしていることが考えられる。また、アナログの導入はエントロピー的には二重鎖形成に有利であり、この原因としては π - π スタッキングによる疎水性相互作用の増加や GNA が一重鎖でも高次構造を保持しているため二重鎖形成時のエントロピー損失が少ない点などが考えられる。そして、A:**T^a**塩基対と G:**C^a**塩基対がエンタルピー的に同程度であることから、**C^a**は G と水素結合をしているがその様式は Watson-Crick 塩基対とは異なると考えられる (4-2-4. Table 16、Figure 33 参照)。

続いて、アナログを導入した ON と相補 RNA 二重鎖の *E. coli* RNase H 活性化能について検証したところ、**T^a**の ON への導入は RNase H による RNA 分解を加速させることが示唆された。この原因として、**T^a**を導入した ON/RNA 二重鎖は天然型と比較して熱的安定性が低いため、RNase H による RNA 分解後の ON からの RNA 解離が速いことが考えられる (4-4-2. Figure 36)。一方で、**C^a**を導入した ON/RNA 二重鎖は天然型と比較して、その RNA 分解速度が低下した。これは、**C^a**と相補塩基との塩基対形成様式が天然型と異なることに起因するのではないかと考えられ、**C^a**やミスマッチ塩基を wing region に導入しただけで、その RNase H 活性化能に大きな影響を与えること

が示された (4-4-3. Figure 37 参照)。

以上の本研究で得られた知見より、今回合成したアナログ **T^a**、**C^a**を導入した ON は相補 RNA と天然型より熱的安定性は低下するものの安定な二重鎖を形成することが明らかとなった。また、**T^a**を導入した ON は優れたヌクレアーゼ耐性を有し、その高次構造は天然型から大きく解離しないことが示された。加えて、siRNA/miRNA への応用検討ではオフターゲット効果を回避し、遺伝子発現抑制能を向上させる **T^a**の最適な修飾部位の同定に成功した。また、gapmer 型アンチセンス核酸への応用検討では、wing region への **T^a**の導入により天然型を上回る RNaseH 分解初速度を示した ON が存在することが示された。RNase H 活性化能の高い gapmer 型アンチセンス核酸の多くは高い熱的安定性を示すが、今回の結果から、熱的安定性を低下させるアナログを用いても高い RNase H 活性を示す gapmer 型アンチセンス核酸を設計できることが明らかとなった。以上より、今回合成した糖部開環型人工核酸は核酸医薬の研究ツールとして有用であると考えられる。

実験項

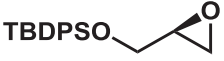
1. Experimental Section

1-1. General remarks

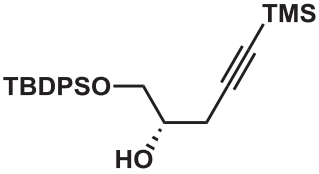
CDCl_3 -*d* (CIL), CD_3OH -*d*₃ (CIL) or DMSO -*d*₆ (CIL) was used as a solvent for obtaining NMR spectra. Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) downfield from a solvent (for ^{13}C NMR and ^1H NMR in CDCl_3 -*d*, CD_3OH -*d*₃ and DMSO -*d*₆) as an internal reference with coupling constants (J) in Hz. The abbreviations s, d, dd, ddd and m signify singlet, doublet, double doublet, double double doublet and multiplet, respectively.

1-2. Synthesis of the acyclic thymidine analog

1-2-1. (*S*)-2-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-oxirane (1).

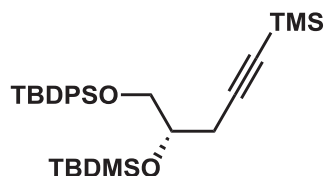
 (*B*)-glycidol (1.5 mL, 22.6 mmol) was dissolved in DMF (50 mL). The reaction solution was added imidazole (3.69 g, 54.2 mmol) and *tert*-butylchlorodiphenylsilane (6.9 mL, 26.5 mmol) and stirred at 0 °C for 12 h. The mixture was partitioned between EtOAc and H₂O. The organic layer was washed with brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO_2 , 5% EtOAc in hexane) to give 1 (4.84 g, 69%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -*d*) δ 7.71-7.68 (m, 4H), 7.46-7.38 (m, 6H), 3.86 (dd, 1H, J = 12 and 2.8), 3.72 (dd, 1H, J = 12 and 4.8), 3.15-3.12 (m, 1H), 2.75 (dd, 1H, J = 5.2 and 4.0), 2.62 (dd, 1H, J = 5.2 and 2.8), 1.07 (s, 9H); ^{13}C NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 135.7, 133.4, 129.9, 127.9, 64.5, 52.4, 44.6, 26.9 (3C), 19.4; $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Si}$, calcd. C 73.03, H 7.74, N 0; found C 72.87, H 7.69, N 0.

1-2-2. (*S*)-1-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-hydroxy-5-trimethylsilyl-4-pentyne (2).

 Compound 1 (3.41 g, 10.9 mmol) was dissolved in THF at -78 °C, added *n*-butyllithium solution in hexane (9.14 mL, 14.2 mmol), trimethylsilylacetylene (2.27 mL, 16.4 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ (2.04 mL, 16.4 mmol). The reaction solution was stirred at -78 °C for 12 h under Ar. The reaction solution was neutralized with aqueous NH_4Cl (saturated, 15 mL) and partitioned between EtOAc

and H₂O. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO₂, 4% EtOAc in hexane) to give **2** (4.15 g, 93%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 7.70-7.67 (m, 4H), 7.43-7.37 (m, 6H), 3.85 (dd, 1H, *J* = 12 and 3.2), 3.71 (dd, 1H, *J* = 12 and 4.8), 3.15-3.13 (m, 1H), 2.75 (dd, 1H, *J* = 5.2 and 4.0), 2.61 (dd, 1H, *J* = 5.2 and 2.8), 1.06 (s, 9H), 0.00 (s, 9H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 135.7, 133.3, 130.0, 127.9, 102.8, 87.3, 70.4, 66.6, 44.6, 27.0 (3C), 19.5, 0.20 (3C); C₂₄H₃₄O₂Si₂, calcd. C 70.19, H 8.34, N 0; found C 70.38, H 8.19, N 0.

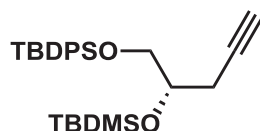
1-2-3. (*S*)-2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-5-trimethylsilyl-4-pentyne (3**).**



Compound **2** (4.15 g, 10.1 mmol) dissolved in DMF (20 mL). The reaction solution was added imidazole (1.65 g, 24.2 mmol) and *tert*-butylchlorodiphenylsilane (1.83 g, 26.5 mmol) and stirred for 12 h. The mixture was

partitioned between EtOAc and H₂O. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO₂, 33% EtOAc in hexane) to give **3** (4.50 g, 85%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 7.56-7.53 (m, 4H), 7.31-7.22 (m, 6H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.51 (dd, 1H, *J* = 10 and 4.8), 3.42 (dd, 1H, *J* = 10 and 6.0), 2.54 (dd, 1H, *J* = 17 and 5.2), 2.25 (dd, 1H, *J* = 17 and 7.2), 0.92 (s, 9H), 0.72 (s, 9H), 0.00 (s, 9H), -0.06 (s, 3H), -0.15 (s, 3H); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 135.7, 133.7, 129.9, 129.8, 127.9, 127.8, 104.8, 85.9, 72.0, 67.3, 46.8, 27.0 (3C), 26.0 (3C), 19.4, 18.2, 0.24 (3C), -4.43 (2C); C₃₀H₄₈O₂Si₃ · 0.2H₂O, calcd. C 68.17, H 9.23, N 0; found C 68.09, H 9.23, N 0.

1-2-4. (*S*)-2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-4-pentyne (4**).**

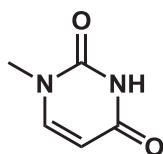


Compound **3** (4.55 g, 8.67 mmol) was dissolved in MeOH (100 mL). Then, the reaction solution was added 1 M NaOCH₃ in MeOH (11.3 mL, 11.3 mmol) and stirred at 40 °C for 20 min.

The reaction solution was neutralized with aqueous NH₄Cl (saturated, 15 mL) and partitioned between EtOAc and H₂O. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated to give **4** (3.88 g, 99%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 7.64-7.61 (m, 4H), 7.36-7.32 (m, 6H), 3.83-3.78 (m, 1H), 3.59 (dd, 1H, *J* = 10 and 4.8), 3.54 (dd, 1H, *J* = 10 and 6.4), 2.55 (ddd, 1H, *J* = 17, 6.4 and 2.8), 2.31

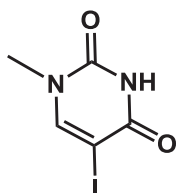
(ddd, 1H, $J = 17, 5.6$ and 2.8), 0.99 (s, 9H), 0.80 (s, 9H), -0.08 (s, 3H), 0.00 (s, 3H); $C_{27}H_{40}O_2Si_2 \cdot H_2O$, calcd. C 68.88, H 8.99, N 0; found C 68.96, H 8.91, N 0.

1-2-5. 1-methyluracil (5).



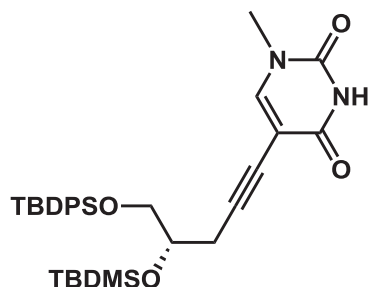
Uracil (2.24 g, 20.0 mmol) was dissolved in hexamethyldisilazane (40 mL, 0.5 M), added trimethylchlorosilane (7.0 ml, 55.3 mmol) and stirred at 130 °C for 2.0 h. The reaction solution was added CH_3I (5.0 mL, 80.0 mmol) at 60 °C for 12 h. The mixture was neutralized with 36% CH_3COOH at 0 °C and filtered with 2-propanol. The residue was recrystallized to give **5** (1.70 g, 68%). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.22 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, $J = 8.1$), 5.52 (d, 1H, $J = 8.1$), 3.23 (s, 3H).

1-2-6. 5-iodo-1-methyluracil (6).



Compound **5** (1.12 g, 8.88 mmol) was dissolved in CH_3COOH (17.8 mL) and stirred at 70 °C for 20 min. The reaction solution was added *N*-iodosuccinimide (2.40 g, 10.7 mmol) and stirred at 100 °C for 5.0 h. Then, the reaction solution was added H_2O at 0 °C and filtered to give **6** (1.50 g, 67%). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.60 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 3.24 (s, 3H).

1-2-7. (*S*)-2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-5-

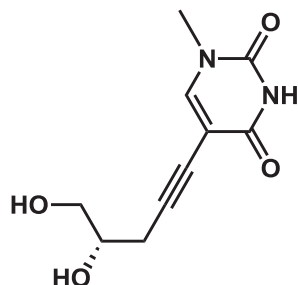


(1-methylpyrimidine-2,4-dion-5-yl)-4-pentyne (7).

A mixture of compound **4** (0.81 g, 3.21 mmol), compound **6** (2.01 g, 4.44 mmol), CuI (0.12 g, 0.63 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (0.37 g, 0.32 mmol) and Et_3N (1.12 mL, 8.06 mmol) in DMF (35 mL) was stirred at 40 °C for 24 h. The mixture was partitioned between $EtOAc$ and aqueous $NaHCO_3$ (saturated). The organic layer was washed with brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO_2 , 1% $MeOH$ in $CHCl_3$) to give **7** (0.38g, 58%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3-d$) δ 8.93 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.69-7.67 (m, 4H), 7.44-7.36 (m, 6H), 3.94-3.92 (m, 1H), 3.67 (dd, 1H, $J = 10$ and 4.6), 3.59 (dd, 1H, $J = 10$ and 6.4), 2.83 (dd, 1H, $J = 17$ and 5.5), 2.58 (dd, 1H, $J = 17$ and 6.4), 1.55 (s, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), -0.01 (s, 3H); ^{13}C NMR (98.5 MHz, $CDCl_3-d$) δ 162.0, 150.1, 147.0, 135.8, 135.6, 132.3, 132.2, 132.0, 132.0, 128.7, 128.7, 128.5, 127.8, 100.8, 92.8, 77.4, 71.9,

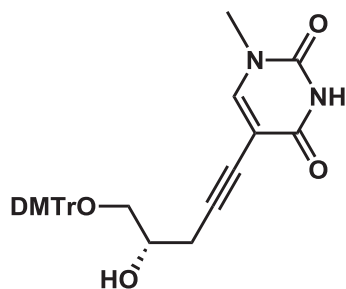
67.3, 36.3, 26.9 (3C), 25.9 (3C), 25.5, 19.3, 18.2, -4.5, -4.6; C₃₂H₄₄N₂O₄Si₂·0.5H₂O, calcd. C 65.60, H 7.74, N 4.78; found C 65.78, H 7.61, N 4.78.

1-2-8. (*S*)-1,2-dihydroxy-5-(1-methylpyrimidine-2,4-dion-5-yl)-4-pentyne (8).



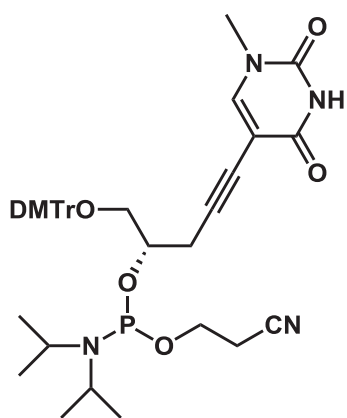
Compound **7** (0.36g, 0.63 mmol) was dissolved in THF (13.3 mL). 1 M tetrabutylammonium fluoride in THF (1.33 mL) was added to the solution, and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture concentrated, and the residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO₂, 1% MeOH in CHCl₃) to give **8** (0.12 g, 86%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OH-*d*₃) δ 7.82 (s, 1H), 3.82-3.76 (m, 1H), 3.62 (dd, 1H, *J* = 11 and 5.0), 3.56 (dd, 1H, *J* = 11 and 6.0), 3.34 (s, 3H), 2.63 (dd, 1H, *J* = 11 and 6.0), 2.54 (dd, 1H, *J* = 11 and 6.4); ¹³C NMR (98.5 MHz, CD₃OH-*d*₃) δ 165.6, 152.1, 150.3, 100.2, 91.7, 73.9, 71.8, 65.9, 36.4, 25.3.

1-2-9. (*S*)-1-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-2-hydroxy-5-(1-methylpyrimidine-2,4-dion-5-yl)-4-pentyne (9).



A mixture of compound **8** (0.19 g, 0.85 mmol) and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (0.30 g, 0.89 mmol) in pyridine (8.5 mL) was stirred at room temperature for 4.0 h. The mixture was partitioned between EtOAc and aqueous NaHCO₃ (saturated). The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO₂, 1-10% MeOH in CHCl₃) to give **9** (0.41 g, 92%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 8.81 (s, 1H), 7.43-7.17 (m, 9H), 6.82-6.80 (m, 4H), 3.98-3.95 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.34 (s, 3H), 3.28-3.22 (m, 2H), 2.73-2.62 (m, 2H); ¹³C NMR (98.5 MHz, CDCl₃-*d*) δ 162.2, 158.6, 150.1, 147.3, 144.9, 136.0, 130.3, 128.2, 128.0, 126.9, 113.2 (4C), 100.1, 91.6, 86.3, 69.5, 66.0, 55.3 (2C), 36.3, 25.3.

1-2-10. (*S*)-2-[(2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)phosphanyloxy]-1-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-5-(1-methylpyrimidine-2,4-dion-5-yl)-4-pentyne (10).

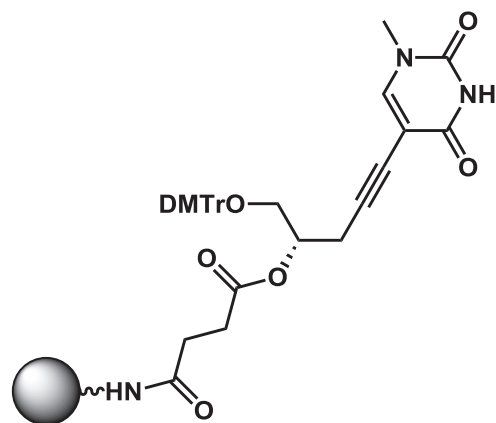


A mixture of compound **9** (0.48 g, 0.91 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (0.80 mL, 4.58 mmol), and choro (2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)phosphane (0.41 mL, 1.84 mmol) in THF (4.6 mL) was stirred at room temperature for 0.75 h. The mixture was partitioned between CHCl₃ and aqueous NaHCO₃ (saturated). The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO₂, 33% EtOAc in hexane) to give **10** (0.58 g, 88%). ³¹P NMR (158.6 MHz, CDCl₃-*d*) δ

149.4, 149.2.

1-2-11. Solid support synthesis (11).

A mixture of compound **9** (90 mg, 0.17 mmol), succinic anhydride (50 mg, 0.51 mmol) and DMAP (0.42 mg, 3.40 μmol) in pyridine (1.7 mL) was stirred at room temperature. After 72 h, the solution was partitioned between CHCl₃ and H₂O, and the organic layer was washed with H₂O and brine. The separated organic layer was

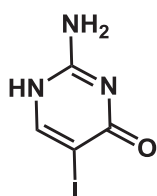


dried (Na₂SO₄) and concentrated to give a succinate. Aminopropyl controlled pore glass (0.38 g, 0.17 mmol) was added to a solution of the succinate and WSC (34.6 mg, 0.18 mmol) in DMF (4.5 mL), and the mixture was kept for 72 h at room temperature. After the resin was washed with pyridine, a capping solution (15 mL, 0.1 M 4-dimethylamoinopyridine in pyridine/Ac₂O = 9:1, v/v) was added and the

whole mixture was kept for 24 h at room temperature. The resin was washed with pyridine, EtOH and MeCN, and dried in vacuo. The amount of loaded compound **11** to solid support was 38.9 μmol/g from calculation of released dimethoxytrityl cation by a solution of 70% HClO₄/EtOH (3:2, v/v).

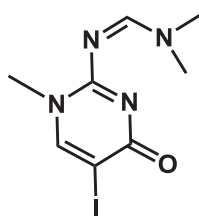
1-3. Synthesis of the acyclic cytidine analog

1-3-1. 2-amino-5-iodo-4-pyrimidinone (**12**).



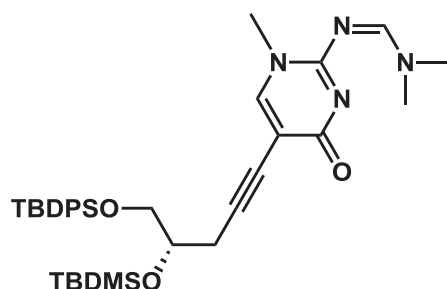
Isocytosine (1.0 g, 9.00 mmol) was dissolved in 1 M NaOH (9.0 mL), added I₂ (2.29 g, 9.00 mmol) and stirred at 100 °C for 2.0 h. The mixture was filtered with dH₂O and MeOH to give **12** (2.04 g, 96%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.21 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 6.66 (s, 2H).

1-3-2. 2-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]amino-5-iodo-*N*-methyl-4-pyrimidinone (**13**).



compound **12** (1.30 g, 5.49 mmol) was dissolved in DMF (5.5 mL), added *N,N*-dimethylformamid dimethylacetal (3.64 mL, 27.4 mmol) and stirred at 40 °C for 5.0 h. The mixture was concentrated, the residue was purified by column chromatography (SiO₂, 10% MeOH in CHCl₃) to give **13** (1.11 g, 66%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 3.09 (s, 3H); ¹³C NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.0, 159.8, 158.5, 158.3, 76.3, 40.9, 35.0, 30.3; HRMS (ESI) *m/z* calcd. for C₈H₁₂IN₄O [M + H]⁺ 307.0056, found 307.0043.

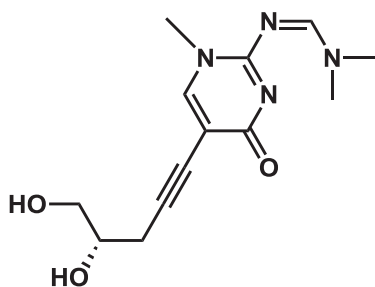
1-3-3. (*S*)-5-[5-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-pentynyl]-2-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]amino-*N*-methyl-4-pyrimidinone (**14**).



A mixture of compound **4** (0.73 g, 1.61 mmol), compound **13** (0.41 g, 1.34 mmol), CuI (27 mg, 0.14 mmol), Pd (PPh₃)₄ (162 mg, 0.14 mmol) and Et₃N (0.98 mL, 7.05 mmol) in DMF (7.0 mL) was stirred at 40 °C for 12 h. The mixture was partitioned between EtOAc and aqueous NaHCO₃ (saturated). The residue was purified by column chromatography (SiO₂, 50% EtOAc in hexane) to give **14** (0.56 g, 67%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 8.56 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.69-7.68 (m, 4H), 7.40-7.34 (m, 6H), 3.98-3.95 (m, 1H), 3.70 (dd, 1H, *J* = 10 and 4.6), 3.62 (dd, 1H, *J* = 10 and 6.0), 3.57 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 2.90 (dd, 1H, *J* = 17 and 5.5), 2.59 (dd, 1H, *J* = 17 and 6.9), 1.05 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.08 (s, 3H), 0.00 (s, 3H); ¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃-*d*) δ 163.4, 158.8, 158.1, 155.5, 135.8, 135.7, 134.0, 133.9, 133.8, 133.7, 129.7 (2C), 128.8, 128.7, 127.8 (2C), 104.9, 92.4, 75.6, 72.3, 67.4, 41.5, 35.4, 29.9, 27.0 (3C),

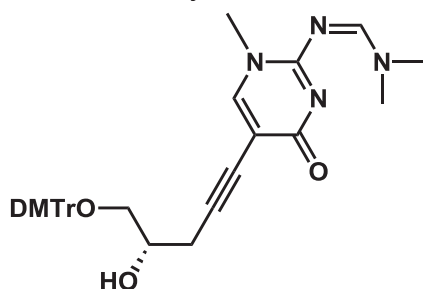
26.0 (4C), 19.4, 18.2, -4.5 (2C); HRMS (ESI) m/z ; calcd. for $C_{35}H_{50}KN_4O_3Si_2$ $[M + K]^+$ 669.3059, found 669.3030.

1-3-4. (*S*)-5-(4,5-dihydroxy-1-pentyntl)-2-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]amino-*N*-methyl-4-pyrimidinone (**15**).



Compound **14** (0.52 g, 0.83 mmol) was dissolved in THF (4.2 mL). 1 M tetrabutylammonium fluoride in THF (1.78 mL) and a few drops of acetic acid were added to the solution, and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was concentrated, and the residue was purified by column chromatography (SiO_2 , 20% MeOH in $CHCl_3$) to give **15** (0.10 g, 45%). 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.67 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 4.83 (d, 1H, $J = 4.6$), 4.59 (t, 1H, $J = 5.7$ and 5.2), 3.62-3.59 (m, 1H), 3.44-3.36 (m, 2H), 3.42 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 2.54 (dd, 1H, $J = 17$ and 6.3), 2.41 (dd, 1H, $J = 17$ and 6.3); ^{13}C NMR (100.5 MHz, $DMSO-d_6$) δ 162.2, 158.7, 158.7, 155.5, 102.6, 91.4, 76.0, 70.4, 64.7, 41.0, 35.0, 29.2, 24.6; HRMS (ESI) m/z ; calcd. for $C_{13}H_{18}N_4NaO_3$ $[M + Na]^+$ 301.1277, found 301.1291.

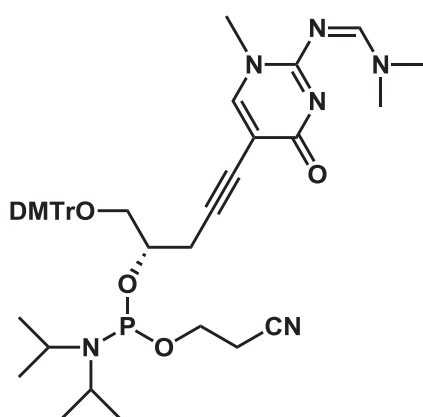
1-3-5. (*S*)-5-[4-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-5-hydroxy-1-pentyntyl]-2-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]amino-*N*-methyl-4-pyrimidinone (**16**).



A mixture of compound **15** (37.6 mg, 0.14 mmol) and 4,4'-dimethoxytrityl chloride (53.0 mg, 0.16 mmol) in pyridine (1.40 mL) was stirred at room temperature for 4.0 h. The mixture was partitioned between EtOAc and aqueous $NaHCO_3$ (saturated). The organic layer was washed with brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO_2 , 2% MeOH in $CHCl_3$) to give **16** (54.2 mg, 69%). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3-d$) δ 8.56 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.45-7.43 (m, 2H), 7.34-7.25 (m, 6H), 7.21-7.17 (m, 1H), 6.83-6.80 (m, 4H), 4.02-3.99 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.55 (s, 3H), 3.28 (dd, 1H, $J = 9.2$ and 5.7), 3.24 (dd, 1H, $J = 9.8$ and 5.2), 3.17 (s, 3H), 3.13 (s, 1H), 2.77 (dd, 1H, $J = 17$ and 5.7), 2.70 (dd, 1H, $J = 17$ and 6.9); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3-d$) δ 163.5, 158.9, 158.5, 158.2, 155.4, 145.0 (3C), 136.2, 130.2 (4C), 128.3 (2C), 127.9 (2C), 126.8, 113.2 (4C), 104.2, 91.1, 86.2, 69.7, 66.1, 55.3 (2C), 41.5, 35.4, 29.8,

25.8; HRMS (ESI) m/z : calcd. for $C_{34}H_{36}N_4NaO_5$ $[M + Na]^+$ 603.2583, found 603.2572.

1-3-6. (*S*)-5-{5-[(2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)phosphanyloxy]-4-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-1-pentynyl}-2-[(*N,N*-dimethylamino)methylene]amino-*N*-methyl-4-pyrimidinone (17).



A mixture of compound **16** (0.10 g, 0.17 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (0.11 mL, 0.63 mmol), and choro (2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino) phosphane (80 μ L, 0.36 mmol) in THF (1.0 mL) was stirred at room temperature for 1.0 h. The mixture was partitioned between $CHCl_3$ and aqueous $NaHCO_3$ (saturated). The organic layer was washed with brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated. The residue was purified by column chromatography (a neutralized SiO_2 , 33% EtOAc in hexane) to give **17** (0.12g, 89%). ^{31}P NMR (158.6 MHz, $CDCl_3-d$) δ 149.57, 149.19.

1-4. Oligonucleotide synthesis

Synthesis of RNA was carried out with a DNA/RNA synthesizer by phosphoramidite method. Deprotection of bases and phosphates was performed in concentrated $NH_4OH:EtOH$ (3:1, v/v) at 55 $^{\circ}C$ for 4.0 h. 2'-TBDMS groups were removed by $Et_3N \cdot 3HF$ (125 μ L) in DMSO (100 μ L) at 65 $^{\circ}C$ for 90 min. The reaction was quenched with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH 7.0) and desalted on Sep-Pak C18 cartridge. Deprotected RNA was purified by 20% PAGE containing 7 M urea to give the purified ON **3** (15), ON **8** (1), ON **11** (11), ON **12** (2), ON **13** (2), ON **14** (4), ON **15** (19), ON **16** (8), ON **17** (3), ON **20** (3), ON **21** (3), ON **22** (2), ON **26** (3), ON **29** (6), ON **30** (28), ON **31** (13), ON **32** (21), ON **33** (12), ON **34** (8) and ON **35** (12). The yields are indicated in parentheses as OD units at 260 nm starting from 0.2 μ mol scale or 1.0 μ mol scale.

On the other hand, synthesis of DNA was carried out with a DNA/RNA synthesizer by phosphoramidite method. Deprotection of bases and phosphates was performed in concentrated $NH_4OH:EtOH$ (3:1, v/v) at 55 $^{\circ}C$ for 12 h. Deprotected ONs were purified by 20% PAGE containing 7 M urea to give the purified ON **38** (2), ON **41** (2), ON **44** (0.1), ON **47** (3), ON **50** (2), ON **53** (5) and ON **56** (7). The yields are indicated in parentheses as OD units at 260 nm starting from 0.2 μ mol scale.

1-5. MALDI-TOF/MS analysis oligonucleotides

The spectra were obtained with a time-of-flight mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337 nm, 3 ns pulsed). A solution of 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) and diammonium hydrogen citrate in H₂O was used as the matrix. Data of synthetic ONs: ON **3** $m/z = 5672.3$ ([M-H]⁻, calcd 5680.5; C₁₇₂H₂₁₂N₆₇O₁₂₁P₁₇); ON **8** $m/z = 7086.5$ ([M-H]⁻, calcd 7084.4; C₂₂₅H₂₆₉N₇₀O₁₅₅P₂₁); ON **11** $m/z = 6539.9$ ([M-H]⁻, calcd 6546.9; C₁₉₈H₂₄₅N₆₉O₁₄₆P₂₀); ON **12** $m/z = 6696.6$ ([M-H]⁻, calcd 6696.1; C₂₀₃H₂₄₈N₈₂O₁₄₀P₂₀); ON **13** $m/z = 6561.6$ ([M-H]⁻, calcd 6563.9; C₁₉₉H₂₄₈N₆₈O₁₄₇P₂₀); ON **14** $m/z = 6564.9$ ([M-H]⁻, calcd 6563.0; C₁₉₉H₂₄₉N₆₉O₁₄₆P₂₀); ON **15** $m/z = 6556.5$ ([M-H]⁻, calcd 6563.0; C₁₉₉H₂₄₉N₆₉O₁₄₆P₂₀); ON **16** $m/z = 6556.5$ ([M-H]⁻, calcd 6712.1; C₂₀₄H₂₅₁N₈₂O₁₄₀P₂₀); ON **17** $m/z = 6711.5$ ([M-H]⁻, calcd 6713.1; C₂₀₄H₂₅₁N₈₁O₁₄₁P₂₀); ON **26** $m/z = 7094.2$ ([M-H]⁻, calcd 7100.5; C₂₂₆H₂₇₃N₇₀O₁₅₅P₂₁); ON **20** $m/z = 6607.5$ ([M-H]⁻, calcd 6607.9; C₂₀₁H₂₄₉N₇₃O₁₄₄P₂₀); ON **21** $m/z = 6603.8$ ([M-H]⁻, calcd 6607.9; C₂₀₁H₂₄₉N₇₃O₁₄₄P₂₀); ON **22** $m/z = 6589.5$ ([M-H]⁻, calcd 6587.9; C₂₀₂H₂₄₉N₇₃O₁₄₂P₂₀); ON **29** $m/z = 6982.1$ ([M-H]⁻, calcd 6979.9; C₂₁₀H₂₅₈N₈₁O₁₅₁P₂₁); ON **30** $m/z = 6982.8$ ([M-H]⁻, calcd 6979.9; C₂₁₀H₂₅₈N₈₁O₁₅₁P₂₁); ON **31** $m/z = 6982.7$ ([M-H]⁻, calcd 6979.9; C₂₁₀H₂₅₈N₈₁O₁₅₁P₂₁); ON **32** $m/z = 7198.9$ ([M-H]⁻, calcd 7197.0; C₂₁₆H₂₇₀N₇₈O₁₆₀P₂₂); ON **33** $m/z = 7198.9$ ([M-H]⁻, calcd 7197.0; C₂₁₆H₂₇₀N₇₈O₁₆₀P₂₂); ON **34** $m/z = 7198.9$ ([M-H]⁻, calcd 7197.0; C₂₁₆H₂₇₀N₇₈O₁₆₀P₂₂); ON **35** $m/z = 7198.9$ ([M-H]⁻, calcd 7197.0; C₂₁₆H₂₇₀N₇₈O₁₆₀P₂₂); ON **38** $m/z = 4953.6$ ([M-H]⁻, calcd 4950.8; C₁₆₅H₂₀₂N₄₈O₁₀₀P₁₆); ON **41** $m/z = 4876.9$ ([M-H]⁻, calcd 4875.7; C₁₆₆H₁₉₇N₄₁O₁₀₁P₁₆); ON **44** $m/z = 4950.7$ ([M-H]⁻, calcd 4948.8; C₁₆₅H₂₀₄N₅₀O₉₈P₁₆); ON **47** $m/z = 4880.3$ ([M-H]⁻, calcd 4873.8; C₁₆₆H₁₉₉N₄₃O₉₉P₁₆); ON **50** $m/z = 5044.7$ ([M-H]⁻, calcd 5041.8; C₁₆₅H₁₉₉N₅₇O₉₈P₁₆); ON **53** $m/z = 4959.5$ ([M-H]⁻, calcd 4965.8; C₁₆₇H₁₆₅N₄₉O₉₉P₁₆); and ON **58** $m/z = 3499.2$ ([M-H]⁻, calcd 3497.6; C₁₂₇H₁₅₃N₂₁O₇₆P₁₀).

1-6. Thermal denaturation study

The solution containing the duplex in a buffer comprising 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) and 100 mM NaCl was heated at 100 °C for 5 min, cooled gradually to an appropriate temperature, and then used for the thermal denaturation study. The thermally induced transition of each mixture was monitored at 260 nm on UV-Vis spectrophotometer fitted with a temperature controller in quartz cuvettes with a path length of 1.0 cm and a 3.0 μM duplex concentration in a buffer of 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) and 100 mM NaCl. The sample temperature was increased by

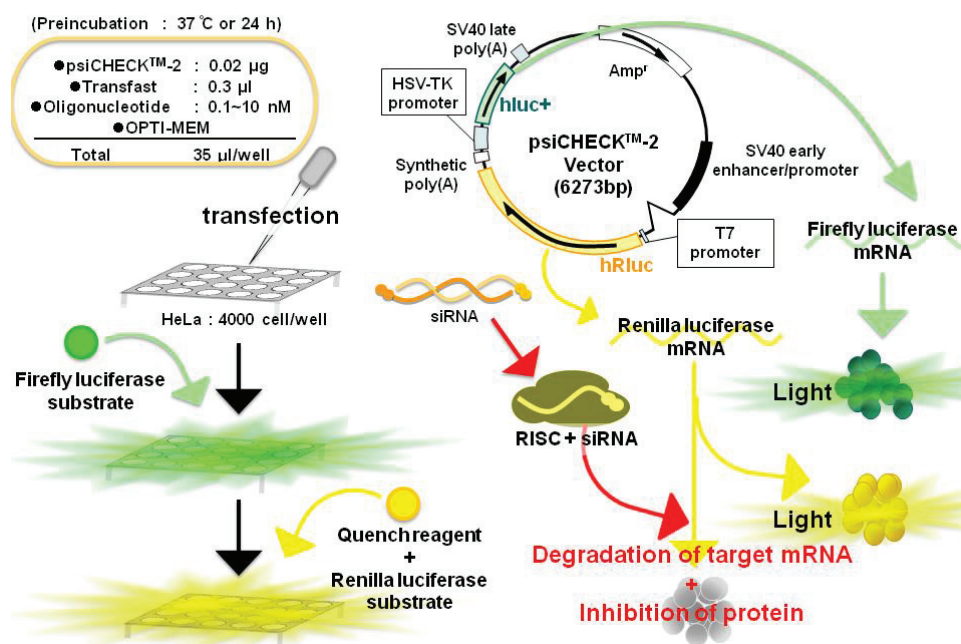
0.5 °C/min. The thermodynamic parameters of the duplexes on duplex formation were determined by calculations based on the slope of a $1/T_m$ vs. $\ln(C_T/4)$ plot, where C_T (3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 μM) is the total concentration of single strands.

1-7. Circular dichroism (CD) spectroscopy

The solution containing the duplex in a buffer comprising 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM NaCl and 10 mM MgCl_2 was heated at 100 °C for 5 min. The reaction mixture (6.0 μM) were cooled gradually to an appropriate temperature, and then used for the measurement of CD spectra by a spectropolarimeter.

1-8. Dual-Luciferase reporter assay

HeLa cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air in Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 10% bovine serum (BS). 24 h before transfection, HeLa cells ($4 \times 10^4/\text{mL}$) were transferred to a 96-well plate (100 $\mu\text{L}/\text{well}$). They were transfected using TransFast (Promega). Cells in each well were transfected with a solution (35 μL) of psiCHECK-2 vector (20 ng), the indicated amounts of siRNA, and TransFast (0.3 μg) in Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Invitrogen), and incubated at 37 °C. Transfection without siRNA was used as a control. After 1.0 h, MEM (100 μL) containing 10% BS was added to each well, and the whole was further incubated at 37 °C. After 24 h, solution in each well was removed and the plate was left unattended at -80 °C. After 24 h, activities of firefly and *Renilla* luciferases in cell were determined with a dual-luciferase assay system (Promega) according to a manufacturer's protocol. The results were confirmed by at least three independent transfection experiments with two cultures each and are expressed as the average from four experiments as mean \pm SD.



1-9. Partial Hydrolysis of ONs with Snake Venom Phosphodiesterase (SVPD)

Each ON (1200 pmol) labeled with fluorescein at the 5'-end was incubated with SVPD (0.006 unit) in a buffer (150 µl) comprised of 250 mM Tris-HCl and 50 mM MgCl₂ at 37 °C. At appropriate periods, aliquots (5.0 µL) of the reaction mixture were separated and added to the loading buffer (15 µL), comprising Tris-borate-EDTA (TBE) buffer and 20% glycerol, on ice. The mixture were analyzed by electrophoresis on 20% polyacrylamide gel containing 7 M urea. The labeled ON in the gel was visualized by use of a Luminescent Image analyzer LAS-4000 (Fujifilm).

1-10. Stability of duplexes in DMEM containing bovine serum

Each duplex (1200 pmol, 50 µL) labeled with fluorescein at 5'-end was incubated in D-MEM (250 µL) containing 36% bovine serum at 37 °C. At appropriate periods, aliquots (5.0 µL) of the reaction mixture were separated and added to the loading buffer (15 µL), comprising Tris-borate-EDTA (TBE) buffer and 20% glycerol, on ice. The mixture were analyzed by electrophoresis on 20% polyacrylamide gel. The labeled duplex in the gel was visualized by use of a Luminescent Image analyzer LAS-4000 (Fujifilm).

1-11. Hydrolysis of RNA with *Escherichia coli* RNase H

The solution containing ON (300 pmol) and RNA (1500 pmol) labeled with fluorescein at the 5'-labeled in a buffer comprised of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ and 10 mM dithiothreitol was heated at 100 °C for 5 min. The reaction mixture were then cooled gradually to an appropriate temperature. Then *E. coli* RNase H (3.0 unit) was added to the solution, and the mixture was incubated at 37 °C. Aliquots (5 µL) were taken at 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 and 60 min, and mixed with a solution comprised of formamide (14 µL) and 0.1M EDTA (1 µL) on ice. Each sample was analyzed by 20% denaturing PAGE at room temperature at 5 mA for 5 h. The gel was visualized by use of a Luminescent Image analyzer LAS-4000 (Fujifilm).

引用文献

1. Inoue T., 核酸医薬品開発の現状. *Drug Delivery Syst.*, 2016, **31**, 1, 10-23.
2. Crooke, S. T.; Geary, R. S., Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2012, **76**, 2, 269-276.
3. Kesselheim, A. S.; Avorn, J., Approving a Problematic Muscular Dystrophy Drug Implications for FDA Policy. *J. Am. Med. Assoc.*, 2016, **316**, 22, 2357-2358. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/206488lbl.pdf
4. Biogen 社によるプレリリース (SPINRAZA、2017年3月参照) https://www.biogen.co.jp/ja_JP/news-insights/japanaffiliatenews/2016-12-26-news.html、http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/209531lbl.pdf
5. 関根光雄、多比良和誠 編 (2005) 「RNAi 法とアンチセンス法」KS 生命科学専門書
6. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**, 806-811.
7. Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T., RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, 2001, **15**, 188-200.
8. Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T., Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell*, 2004, **15**, 2, 185-197.
9. Parker, J. S., How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence*, 2010, **1**, 3.
10. 塩見美喜子、中川真一、浅原弘嗣 編 (2015) 「実験医学 ノンコーディング RNA のテキストブック」羊土社 vol.33 No.20
11. He, L.; Thomson, J. M.; Hemann, M. T.; Hernando-Monge, E.; Mu, D.; Goodson, S.; Powers, S.; Cordon-Cardo, C.; Lowe, S. W.; Hannon, G. J.; Hammond, S. M., A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, **435**, 828-833.
12. Kent, O.A.; Mendell, J.T., A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, 2006, **25**, 6188-6196.
13. Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L., Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 280-284.
14. Stephenson, M. L.; Zamecnik, P. C., Inhibition of Rous sarcoma viral RNA

- translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 285-288.
15. Chan, J. HP.; Lim, S.; Wong, WS. F., Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2006, **33**, 533-540.
 16. Monia, B. P.; Lesnik, E. A.; Gonzalez, C.; Lima, W. F.; McGee, D.; Guinoao, C. J.; Kawasaki, A. M.; Cook, P. D.; Freier, S. M., Evaluation of 2'-Modified Oligonucleotides Containing 2'-Deoxy Gaps as Antisense Inhibitors of Gene Expression. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 19, 14514-14522.
 17. Saito, T.; Nakamura, A.; Aoki, Y.; Yokota, T.; Okada, T.; Osawa, M.; Takeda, S., Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model Was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient. *PLOS one*, 2010, **5**, 8, e12239.
 18. Aartsma-Rus, A.; Kaman, WE.; Bremmer-Bout, M.; Janson, AAM.; den Dunnen, JT.; van Ommen, G-JB.; van Deutekom, JCT., Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene Ther.*, 2004, **11**, 1391-1398.
 19. Bumcrot, D.; Manoharan, M.; Koteliansky, V.; Sah Dinah, W. Y., RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 711-719.
 20. 浅沼浩之、樫田啓、神谷由紀子 (2015)、「生体材料化学 – 基礎と応用–」コロナ社
 21. Stein, C.A.; Subasinghe, C.; Shinozuka, K.; Cohen, J. S., Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 1988, **16**, 3209-3221.
 22. Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie E.; Prydz, H., Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 589-595.
 23. Hall, A. S.; Wan, J.; Shaughnessy, E. E., Shaw, B. R.; Alexander, K. A., RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure–activity relationships. *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 5991-6000.
 24. Chiu, Y. L.; Rana, T. M., RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell*, 2002, **10**, 549-561.
 25. Fedoroff, O. Y.; Salazar, M.; Reid, B. R., Structure of a DNA:RNA Hybrid Duplex: Why RNase H Does Not Cleave Pure RNA. *J. Mol. Biol.*, 1993, **233**, 3, 509-523.
 26. Chiu, Y. L.; Rana, T. M., siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA*, 2003, **9**, 1034-1048.
 27. Czauderna, F.; Fechtner, M.; Dames, S.; Aygun, H.; Klippel, A.; Pronk, G. J.; Giese, K.; Kaufmann, J., Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 2705-2716.

28. Lamond, A. I.; Sproat, B. S., Antisense oligonucleotides made of 2'-O-alkylRNA: their properties and applications in RNA biochemistry. *FEBS Lett.*, 1993, **325**, 1-2, 123-127.
29. Prakash, T. P.; Allerson, C. R.; Dande, P.; Vickers, T. A.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Baker, B. F.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bhat, B., Positional Effect of Chemical Modifications on Short Interference RNA Activity in Mammalian Cells. *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4247-4253.
30. Dowler, T.; Bergeron, D.; Tedeschi, A. L.; Paquet, L.; Ferrari, N.; Damha, M. J., Improvements in siRNA properties mediated by 20-deoxy-20-fluoro-b-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 6, 1669-1675.
31. Blidner, R. A., Hammer, R. P.; Lopez, M. J.; Robinson, S. O.; Monroe, W. T., 2'-Deoxy-2'-Fluoro Substituted Nucleic Acids Induce RNA Interference in Mammalian Cell Culture. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2007, **70**, 113-122.
32. Hoshika, S.; Minakawa, N.; Matsuda, A., Synthesis and characterization of 2'-modified-4'-thioRNA: a comprehensive comparison of nuclease stability. *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 3845-3825.
33. Hoshika, S.; Minakawa, N.; Kamiya, H.; Harashima, H.; Matsuda, A., RNA interference induced by siRNAs modified with 4'-thioribonucleosides in cultured mammalian cells. *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 14, 3115-3118.
34. Hoshika, S.; Minakawa, N.; Shionoya, A.; Imada, K.; Ogawa, N.; Matsuda, A., Study of Modification Pattern-RNAi Activity Relationships by Using siRNAs Modified with 4'-Thioribonucleosides. *ChemBioChem*, 2007, **8**, 2133-2138.
35. Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T., Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methyleneribonucleosides. *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 5401-5404.
36. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O., Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 1991, **254**, 1497-1500.
37. Zhang, L.; Peritz, A.; Meggers, E., A Simple Glycol Nucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 4174-4175.
38. Schlegel, M. K.; Peritz, A. E.; Kittigowittana, K.; Zhang, L.; Meggers, E., Duplex Formation of the Simplified Nucleic Acid GNA. *ChemBioChem*, 2007, **8**, 927-932.
39. Langkjar, N.; Pasternak, A.; Wengel, J., UNA (unlocked nucleic acid): A flexible RNA mimic that allows engineering of nucleic acid duplex stability. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 5420-5425.

40. Schlegel, M. K.; Xiulan, X.; Zhang, L.; Meggers, E., Insight into the High Duplex Stability of the Simplified Nucleic Acid GNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 960-963.
41. Schlegel, M. K.; Essen, L. O.; Meggers, E., Atomic resolution duplex structure of the simplified nucleic acid GNA. *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 1094-1096.
42. Sipa, K.; Sochacka, E.; Kazmierzak-Baranska, J.; Maszewska, M.; Janicka, M.; Nowak, G.; Newrot, B., Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA. *RNA*, 2007, **13**, 8, 1301-1316.
43. Graham, D.; Parkinson, J. A.; Brown, T., DNA duplexes stabilized by modified monomer residues: synthesis and stability. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1998, 1131-1138.
44. Terrazas, M.; Kool, E. T., RNA major groove modifications improve siRNA stability and biological activity. *Nucleic Acids Res.*, 2009, **37**, 2, 346-353.
45. Micklitz, W.; Lippert, B.; Schöllhorn, H.; Thewall, U., An improved synthesis and refined crystal structure of 1-methyluracil. *J. Heterocyclic Chem*, 1989, **26**, 5, 1499-1500.
46. Doi, Y.; Chiba, J.; Morikawa, T.; Inouye, M., Artificial DNA Made Exclusively of Nonnatural C-Nucleosides with Four Types of Nonnatural Bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8762-8768.
47. Beauchamp, L.; *et al.* PCT Int. Appl., 2002008205, 31 Jan 2002.
48. Ui-Tei, K.; Naito, Y.; Takahashi, F.; Haraguchi, T.; Ohki-Hamazaki, H.; Juni, A.; Ueda, R.; Saigo, K., Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acid Res.*, 2004, **32**, 3, 936-948.
49. Schwarz, D. S.; Hutvagner, G.; Tingting, D.; Zuoshang, X.; Aronin, N.; Zamore, P. D., Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 2003, **115**, 199-208.
50. Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D., Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, **115**, 2, 209-216.
51. Robert F. Weaver 著杉山弘、森井孝、井上丹 監訳 (2008) 「生化学・生物科学 ウィーバー分子生物学 第4版」化学同人
52. Murakami, Y.; Hussein, H.; Aly, A.; Tajima, I.; Inoue, K., Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J. Hepatol.*, **2009**, **50**, 453-460.
53. 古川千尋 (2009) 「平成 21 年度修士論文」東京大学
54. Yoda, M.; Kawamata, T.; Paroo, Z.; Ye, X.; Iwasaki, S.; Liu, Q.; Tomari, Y.,

ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, 17, 17-23.

55. Summerton, J.; Weller, D., Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug. Dev.*, 1997, 7, 3, 187-195.

謝辞

本研究遂行にあたり、学部時代からご指導ご鞭撻頂きました岐阜大学応用生物科学部 上野義仁 教授に心より感謝致します。

また、ご多忙のなか、本論文の審査をお引き受け下さった岐阜大学応用生物科学部 柳瀬笑子 准教授、静岡大学農学部 河合真吾 教授に心より感謝致します。

本研究において、細胞実験や **vector** 精製を行うに際し有益なご助言、ご指導を頂きました岐阜大学工学部生命工学科森田研究室、横川研究室の皆様へ深く感謝致します。

そして、岐阜大学大学院連合農学研究科の社会人博士課程在籍について理解を示していただき、3年間にわたり研究機会を設けてくださった国立長寿医療研究センター 鈴木正昭 先生、岐阜大学大学院医学系研究科 古山浩子 助教、愛知工業大学工学部応用化学科 北出幸夫 教授、岐阜大学工学部生命・化学工学科 池田将 准教授に心より感謝致します。

最後に、応用生物科学部 生物有機研究室、工学部 北出研究室、池田研究室で多くの貴重な時間を共有し、多大なご助言・ご協力頂きました先輩方、他同輩諸氏に深く感謝致します。

小縣 綾