



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

氏 名 (本国籍)	小縣 綾 (岐阜県)		
学位の種類	博士 (農学)		
学位記番号	農博甲第669号		
学位授与年月日	平成29年3月13日		
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	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		
審査委員会	主査	岐阜大学 准教授	柳 瀬 笑 子
	副査	岐阜大学 教授	上 野 義 仁
	副査	静岡大学 教授	河 合 真 吾

論 文 の 内 容 の 要 旨

核酸医薬、特にアンチセンス医薬や small interfering RNA (siRNA) は、創薬開発の簡便さと標的選択性の高さから次世代の医薬品として期待・注目されている。アンチセンス核酸は 17~20 塩基から成る一本鎖核酸であり、標的 mRNA と二重鎖核酸を形成し、標的 mRNA が RNase H により切断されることでタンパク質の発現を抑制する。siRNA は、2 塩基のオーバーハング塩基を持つ約 19 塩基対から成る短鎖二本鎖 RNA であり、Ago タンパク質を主因子とする複数のタンパク質と RNA induced silencing complex (RISC) を形成し、相補 mRNA が RISC に取り込まれた後、Ago タンパク質の持つスライサー活性により mRNA が切断されることでタンパク質の発現が抑制される。この様に、アンチセンス核酸及び siRNA は触媒量で作用することから高い活性が期待されるが、核酸医薬に応用するためには様々な問題点を解決する必要がある。最も大きな問題点として、天然の DNA 及び RNA は生体内で容易に分解されてしまうことから、アンチセンス核酸及び siRNA の実用化にはヌクレアーゼ耐性を増す必要がある。これまでヌクレアーゼ耐性の増強、標的 mRNA との親和性の向上を目的として、種々の人工核酸が合成されている。特に、Meggers らは、糖部開環型核酸として GNA (glycerol nucleic acid; 図 1) を報告した。GNA は、相補鎖 RNA と熱的に安定な二重鎖を形成するが、DNA とは二重鎖を形成しない RNA 選択性を持つことが報告されている。また、チミジン塩基部 5 位にプロピニル基を導入したヌクレオシドアナログを含む DNA は、疎水性相互作用の増強により相補鎖との二重鎖が熱的に安定化されるとの報告がされてる。このような背景を基に、本研究では、グリコール骨格にエチニル基を介して塩基を結合させた新規糖部開環型ヌクレオシドアナログ T^a 及び C^a を設計・合成し、それらを含む siRNA 及びアンチセンス核酸の性質について検証した。

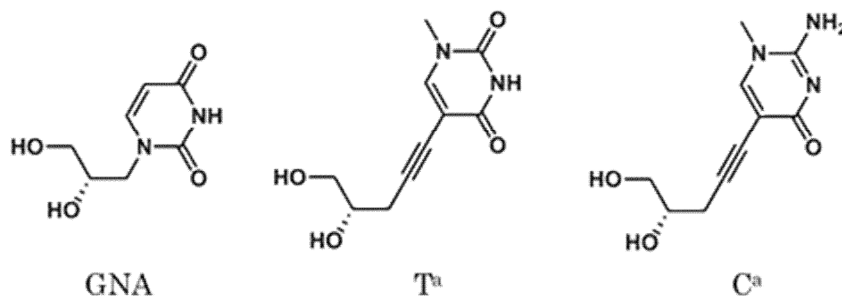


図 1. 糖部開環型ヌクレオシドの構造

(*R*)-glycidol を出発原料とし、水酸基のシリル基による保護、エポキシへのアセチリドイオンの求核付加反応によりプロピニル誘導体を合成した。その後、ウラシルから誘導した *N*-メチル-5-ヨードウラシルとプロピニル誘導体との園頭クロスカップリング反応によりチミジンアナログ **T^a** の保護体を合成した。一方、イソシトシンより誘導した *N*-メチル-5-ヨードイソシトシンとプロピニル誘導体を縮合することによりシチジンアナログ **C^a** の保護体を合成した。常法に従いアナログ **T^a** 及び **C^a** をアミダイト体へと変換した後、核酸自動核酸合成機によりアナログを含むオリゴヌクレオチド (ON) を合成した。アナログ **T^a** 及び **C^a** を含む ON と RNA との二重鎖の安定性を 50%融解温度 (T_m) を測定することにより検証した。また、アナログの塩基対形成能を詳細に解析するため、van't Hoff プロットから熱力学的パラメータを算出した。その結果、**T^a** 及び **C^a** を導入した ON はいずれも天然の DNA と比較して相補 RNA との二重鎖を熱的に不安定化させることが明らかとなった。また、熱力学的パラメータの比較から不安定化の要因は主にエンタルピー項に起因するものであるが、一方、アナログの導入は二重鎖形成においてエントロピー的には有利に働いていることも判明した。

次に、アナログ **T^a** を siRNA へ導入し、その遺伝子抑制能を検証した。**T^a** を導入した siRNA は天然型よりもわずかに熱的安定性が低下するものの **T^a** は塩基識別能を有していることが明らかとなった。アナログのヌクレアーゼ耐性に及ぼす影響を確認したところ、RNA の 3' 末端へアナログ **T^a** を導入することで RNA の 3' -エキソヌクレアーゼに対する耐性が大幅に向上することも明らかとなった。更に、ルシフェラーゼ・アッセイにより遺伝子発現抑制能を検証したところ、導入部位により異なる遺伝子発現抑制能を示した。特に、**T^a** を両鎖の 3' 末端オーバーハング部位に導入した siRNA とセンス鎖 3' 末端付近に導入した siRNA で遺伝子発現抑制能が向上することが判明した。これは、**T^a** を導入することによりヌクレアーゼ耐性が向上したことに加え、二重鎖の熱力学的安定性の変化から RISC へのガイド鎖の取り込みの選択性が向上したことによるものと考えられる。

最後に、DNA の両末端部位にアナログ **T^a** 及び **C^a** を導入したギャップマー型アンチセンス核酸 (AON) を合成し、その性質を検討した。アナログ **T^a** 及び **C^a** を導入した AON/RNA 二重鎖では天然型と比較して二重鎖の熱的安定性が低下した。一方で、CD 測定から AON/RNA 二重鎖は天然型と同様に A 型らせん構造をしていることが示唆された。アナログを含む AON/RNA 二重鎖の RNase H 活性化能を測定したところ、**T^a** を導入した AON/RNA 二重鎖では RNase H による RNA 分解速度が天然型二重鎖よりも速くなることが判明した。これは、AON/RNA 二重鎖の熱的安定性が天然型と比較し

て低いため、RNase H による RNA 分解後の RNA の AON からの解離が速まることで RNase H のターンオーバー速度が向上したためと考えている。

以上、本研究では、新規糖部開環型ヌクレオシドアナログ T^a 及び C^a を設計・合成し、それらを含む siRNA 及びアンチセンス核酸の性質について検証した。その結果、アナログの導入は、siRNA の遺伝子抑制能を増強させること、また、アンチセンス核酸の RNase H 活性化能を向上させること、更に、ヌクレアーゼ耐性を増強させることから、本アナログは核酸医薬に利用する上で有用であることが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

核酸医薬、特にアンチセンス医薬や small interfering RNA (siRNA) は、創薬開発の簡便さと標的選択性の高さから次世代の医薬品として期待・注目されている。しかし、天然の DNA 及び RNA を核酸医薬に応用するためには様々な問題点を解決する必要がある。最も大きな問題点として、天然の DNA 及び RNA は生体内で容易に分解されてしまうことから、アンチセンス核酸及び siRNA の実用化にはヌクレアーゼ耐性を増す必要がある。これまでヌクレアーゼ耐性の増強、標的 mRNA との親和性の向上を目的として、種々の人工核酸が合成されている。特に、Meggers らは、糖部開環型核酸として GNA (glycerol nucleic acid) を報告した。GNA は、相補鎖 RNA と熱的安定な二重鎖を形成するが、DNA とは二重鎖を形成しない RNA 選択性を持つことが報告されている。また、チミジン塩基部 5 位にプロピニル基を導入したヌクレオシドアナログを含む DNA は、疎水性相互作用の増強により相補鎖との二重鎖が熱的に安定化されると報告されている。このような背景を基に、本研究では、グリコール骨格にエチニル基を介して塩基を結合させた新規糖部開環型ヌクレオシドアナログとして、チミジンアナログ T^a 及びシチジンアナログ C^a を設計・合成し、それらを含む siRNA 及びアンチセンス核酸の性質について検証した。

(R)-glycidol を出発原料とし、水酸基のシリル基による保護、エポキシへのアセチリドイオンの求核付加反応によりプロピニル誘導体を合成した。その後、ウラシルから誘導した N¹-メチル-5-ヨードウラシルとプロピニル誘導体との園頭クロスカップリング反応によりチミジンアナログ T^a の保護体を合成した。一方、イソシトシンより誘導した N¹-メチル-5-ヨードイソシトシンとプロピニル誘導体を縮合することによりシチジンアナログ C^a の保護体を合成した。常法に従い、T^a 及び C^a をアミダイト体へと変換した後、核酸自動核酸合成機によりアナログを含むオリゴヌクレオチド (ON) を合成した。アナログを含む二重鎖の安定性を 50%融解温度 (T_m) を測定することにより検証した。その結果、T^a の導入は siRNA の熱的安定性を下させるものの、T^a は塩基識別能を有していることが明らかとなった。また、RNA の 3'-末端へ T^a を導入することで RNA の 3'-エキソヌクレアーゼに対する耐性が大幅に向上することが明らかとなった。更に、T^a を両鎖の 3'-末端オーバーハング部位及びセンス鎖 3'-末端付近に導入することで、siRNA の遺伝子発現抑制能が向上することが判明した。

続いて、DNA の両末端部位に T^a 及び C^a を導入したギャップマー型アンチセンス核酸 (AON) を合成し、その性質を検討した。アナログ T^a 及び C^a の導入は、AON/RNA

二重鎖の熱的安定性を低下させるものの、CD 測定から AON/RNA 二重鎖は天然型と同様に A 型らせん構造をしていることが明らかとなった。アナログを含む AON/RNA 二重鎖の RNase H 活性化能を測定したところ、T^aを導入することで RNase H による RNA 切断速度が天然型二重鎖よりも速くなることが判明した。これは、RNase H による RNA 切断後の RNA の AON からの解離速度が速まることで RNase H のターンオーバー速度が向上したためと考えられた。

以上、本研究では、新規糖部開環型ヌクレオシドアナログ T^a 及び C^a を設計・合成し、それらを含む siRNA 及びアンチセンス核酸の性質について検証した。その結果、アナログの導入は、siRNA の遺伝子抑制能を増強させること、また、アンチセンス核酸の RNase H 活性化能を向上させること、更に、ヌクレアーゼ耐性を増強させることから、本アナログは核酸医薬に利用する上で有用であることが示された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

【学位論文の基礎となる学術論文】

1. Ogata A, Ueno Y. Incorporation of an acyclic alkynyl nucleoside analog into siRNA improves silencing activity and nuclease resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 12, 2015, 2754-2578.
2. Ogata A, Maeda Y, Ueno Y. Synthesis of antisense oligonucleotides containing acyclic alkynyl nucleoside analogs and their biophysical and biological properties. *Bioorg. Med. Chem.*, in press.

【学位論文の既発表学術論文】

- 1) Ogata A, Furukawa C, Sakurai K, Iba H, Kitade Y, Ueno Y. Biaryl modification of the 5'-terminus of one strand of a microRNA duplex induces strand specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 2010, 7299-7302.
- 2) Kuboe S, Yoda M, Ogata A, Kitade Y, Tomari Y, Ueno Y, Diazirine-containing RNA photocrosslinking probes for the study of siRNA-protein interactions. *Chem. Commun.*, **46**, 2010, 7367-7369.
- 3) Yoshikawa K, Ogata A, Matsuda C, Kohara M, Iba H, Kitade Y, Ueno Y. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance, *Bioconjugate Chem.*, **22**, 2010, 42-49.
- 4) Sakurai K, Furukawa C, Haraguchi T, Inada K, Shiogama K, Tagawa T, Fujita S, Ueno Y, Ogata A, Ito M, Tsutsumi Y, Iba H. microRNAs miR-199a-5p and -3p target the Brm subunit of SWI/SNF to generate a double-negative feedback loop in a variety of human cancers, *Cancer Res.*, **71**, 2011, 1680-1689.
- 5) Iwata M, Ogata A, Ito Y, Ueno Y. Synthesis, thermal stability and photochemical properties of DNA containing fluorescent biaryl-type nucleoside surrogates, *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **7**, 2013, 962-971.