

新規がん抑制遺伝子型 microRNA の探索と
創薬への展開

2017 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)

中本 航介

新規がん抑制遺伝子型 microRNA の探索と
創薬への展開

中本 航介

目 次

略語表

第 1 章 序論

1-1	RNA 干渉	1
1-2	miRNA と癌化	2
1-3	miRNA による標的 mRNA の認識	3
1-4	コンピュータを用いた標的 mRNA の予測	4
1-5	標的 mRNA を予測する為の実験的な手法	5
1-6	光反応性残基	8
1-7	トリフルオロメチルジアジリン	8

第 2 章 光反応性残基を導入した新規 RNA プロブの合成とその RNA 捕獲能

2-1	光反応性ヌクレオシドアナログ及びそのアミダイト体の合成	11
2-2	ヌクレオシドアナログ 1 および 2 を導入した RNA プロブの合成	17
2-3	アナログ 1 および 2 を含む二本鎖の熱的安定性	18
2-4	RNA プロブの RNA 捕獲能	22
2-5	アナログ 2 を導入した miRNA プロブによる遺伝子発現抑制能の検証	25

第 3 章 光反応性 miRNA プロブによる標的 mRNA の捕獲

3-1	miRNA プロブの設計	27
3-2	miRNA プロブの配列	28
3-3	アナログ 2 を導入した miR-145 プロブによる標的遺伝子の抑制能検証	30
3-4	アナログ 2 を導入した miR-145 プロブによる標的 mRNA の捕獲	33

第4章 光反応性残基及びエチニル基を導入した新規 RNA プローブの合成とその RNA 捕獲能

4-1 ベンゼン環にジアジリニル基及びエチニル基を有するアルコール誘導体の合成	36
4-2 ヌクレオシドアナログ 25 及びそのアミダイト体の合成	37
4-3 アナログ 25 を導入した RNA プローブの合成	38
4-4 RNA プローブの RNA 捕獲能	38
4-5 アナログ 25 を導入した miRNA プローブによる遺伝子発現抑制能の検証	39

第5章 cRGD コンジュゲートの合成とその遺伝子発現抑制能

5-1 miRNA 医薬品の開発	42
5-2 核酸医薬品のデリバリー	43
5-3 本研究の目的	45
5-4 cRGD-siRNA コンジュゲートの設計	46
5-5 アミノ修飾アミダイト及び固相単体の合成	47
5-6 スペーサーアミダイトの合成	47
5-7 アミノ修飾 RNA の合成	48
5-8 RNA54 の合成	49
5-9 RNA55 の合成	51
5-10 RNA56 の合成	53
5-11 cRGD-siRNA コンジュゲートの細胞膜透過性	55
5-12 cRGD-siRNA コンジュゲートの遺伝子発現抑制能	57
5-13 ポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートの合成と遺伝子発現抑制能	59
5-14 ヌクレアーゼ耐性 miRNA の合成と機能評価	62

第6章 結語及び今後の展望

6-1 総括	66
6-2 今後の展望	68

第7章 実験の詳細

7-1	使用機器及び使用試薬	69
7-2	ヌクレオシドアナログの合成	72
7-3	オリゴヌクレオチドの合成と精製	85
7-4	熱変性法による 50 %融解温度 (T_m) の測定	86
7-5	Dual luciferase reporter assay	87
7-6	RNA 捕獲能の評価	88
7-7	ウェスタンブロッティングによる遺伝子抑制能の評価	88
7-8	miRNA プローブによる標的 mRNA の捕獲	89
7-9	cRGD コンジュゲートオリゴヌクレオチドの合成	89
7-10	細胞膜透過性の検証	90
7-11	遺伝子発現抑制能試験	90
7-12	抗腫瘍活性評価	90
7-13	ヌクレアーゼ耐性試験	91
参考文献		92
謝辞		99

略語表

本研究全般に用いた略語および略記号は以下に示す通りである。

Ago	Argonaute
APS	ammonium peroxodisulfate
CPG	controlled pore glass
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DMTr	4,4-dimethoxy trityl
ds	double strand
EDTA	ethylenediamine- <i>N, N, N', N'</i> -tetraacetic acid
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MASS	MASS spectroscopy
MeCN	Acetonitrile
MEM	minimum essential medium
mRNA	messenger ribonucleic acid
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butyllithium
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optical density
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
ss	single strand
TBAF	tributylammoniumfluoride
TBDMSCl	<i>tert</i> -buthyldimethylsilyl chloride
TBE	tris-boric acid-EDTA
TEAA	triethylamine-acetic acid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylenediamine
THF	tetrahydrofuran

TLC	thin-layer chromatography
T_m	melting temperature
TMSOTf	Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TsCl	<i>p</i> -toluensulfonyl chloride
UV	ultraviolet

第1章 序論

1-1 RNA 干渉

RNA 干渉 (RNAi; RNA interference) とは、細胞内へ導入された二本鎖 RNA が起点となって、配列特異的に標的 mRNA が分解される現象である。この現象が最初に報告されたのは、1998 年であり、Fire と Mello らは線虫を用いた研究からこの現象を見出した¹。その後、昆虫、菌類、哺乳類細胞、分裂酵母、プラナリアなどでも同様の現象が観察され、RNA 干渉が広く知られるようになった。この RNA 干渉の発見により、RNA は、DNA から遺伝情報をタンパク質に翻訳するまでの介在物としての機能だけではなく、RNA 独自の様々な機能を持つことが解明されはじめた。

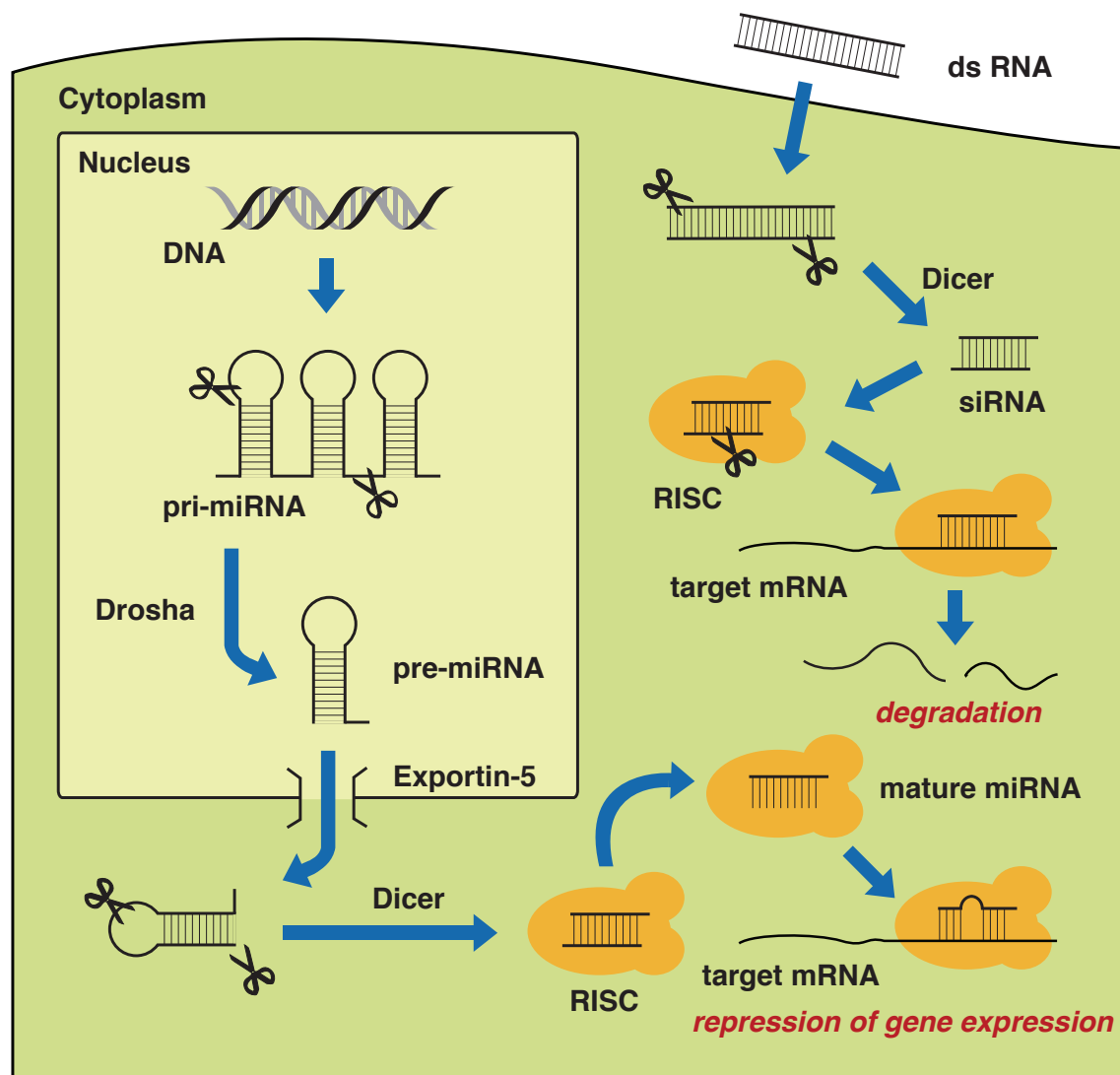


Figure 1. RNA 干渉機構

RNA 干渉は、生体内に導入された二本鎖 RNA (dsRNA) が引き金となり引き起こされる (Figure 1)。細胞内に導入された dsRNA は、RNase III ファミリーに属する Dicer によって 2 塩基のオーバーハング部位を持つ 21~25 塩基対程度の低分子 RNA (siRNA; small interfering RNA) へと切断される。続いて、二本鎖 siRNA は Argonaute2 タンパク質に取り込まれて、他の因子とともに RNA-induced silencing complex (RISC) を形成する。その後、二本鎖 siRNA は、一方の鎖が Argonaute2 のエンドヌクレアーゼ活性による切断を受けて、一本鎖化し成熟型 RISC となる。この際、Argonaute2 に残る鎖はガイド鎖、分解される鎖はパッセンジャー鎖と呼ばれている。RISC はガイド鎖と相補的な配列を含む標的 mRNA を認識し、ガイド鎖の中央部分で標的 mRNA を切断することで遺伝子発現を抑制する²。

一方、microRNA (miRNA) は 20~24 塩基程度の内因性二本鎖 RNA で、翻訳レベルでタンパク質の発現調節を行う細胞内調節因子である。miRNA 最初の報告は、1993 年、Lee らによってなされた³。彼らは線虫の突然変異体を用いた実験から、胚発生 の時間制御に miRNA である *lin-4* が関与していることを明らかにした。近年では哺乳動物、特にヒトにおいても多くの miRNA が見つかり、現在までに約 1900 種類が確認されている。miRNA 遺伝子は初めに RNA ポリメラーゼによって、primary miRNA (pri-miRNA) と呼ばれるヘアピン状の RNA へ転写される。続いて核内で、Drosha と呼ばれる RNase III ドメイン酵素によって切断されて、ステムループ構造を有する precursor miRNA (pre-miRNA) を生成する。pre-miRNA は Exportin-5 によって細胞質に輸送された後、Dicer によって切断されて成熟型 miRNA となる。この二本鎖 miRNA はその後、Argonaute を含む一連のタンパク質とともに RISC を形成し、二本鎖から一本鎖への解離あるいは切断を受けて一本鎖となり、RISC に残った鎖をガイド鎖として標的 mRNA を配列特異的に認識することでタンパク質への翻訳を抑制する⁴。miRNA は一部にミスマッチ塩基対を含みながら mRNA に結合することから、一つの miRNA が複数の標的 mRNA 結合し、翻訳を抑制している。このため、各 miRNA に対する標的 mRNA の解析は困難であり、多くは未同定のままである。

1-2 miRNA と癌化

近年、多くの疾病において、miRNA の発現異常がその原因であることが明らかになっている⁵。特にその発現の増加及び発現の低下が細胞の癌化の直接的な原因となり得る miRNA は、oncomiR 呼ばれ非常に良く研究されている⁶。実際に、いくつかの miRNA は正常細胞を癌細胞に誘導することや (oncomiR)、癌細胞にアポトーシスを誘導することが知られており (Table 1)、oncomiR の阻害剤 (antagomir) や miRNA 自体が新たな抗がん剤として注目を集めている。また、これら癌関連 miRNA の発現量を観察することで、新規バイオマーカー

としての利用も期待できる。

Table 1. 癌化に関与する miRNA

miRNA	腫瘍形態	機能	Reference
miR-122	肝臓癌	C 型肝炎ウイルスの複製を促進	7
miR-10b	肺癌	癌細胞の転移を促進	8
miR-221	肝細胞癌	血管形成を促進	9
miR-380-5p	神経芽細胞腫	腫瘍抑制因子 p53 の発現を抑制	10
miR-296	神経膠腫	血管形成を促進	11
let-7	多くの癌細胞	KRAS,MYC,HMG2 等の癌遺伝子を抑制	12
miR-34	多くの癌細胞	アポトーシスを誘導	13
miR-143/145	大腸癌細胞	MYC の発現を抑制	14
miR-26a	肝細胞癌	サイクリン D2、E2 の発現を抑制	15

以上のように、miRNA は様々な生物学的プロセスに関与しており、標的 mRNA の同定は細胞内調節因子としての miRNA の働きを理解するだけでなく、miRNA を利用した新しい抗がん剤やバイオマーカーの開発といった医療分野への展開も期待できる。したがって、miRNA の標的 mRNA の同定は、近年重要な研究課題の一つとなっている。

1-3 miRNA による標的 mRNA の認識

前述したように、Argonaute と複合体を形成した miRNA は、巻き戻しを受けて一本鎖に解離することにより成熟型 miRNA となる。Argonaute に残ったガイド鎖のうち 5'末端から 2-7 番目の塩基はシード領域と呼ばれ、この領域と標的 mRNA の 3'UTR 間で、ワトソンクリック塩基対がよく保存されている¹⁶。このことから、miRNA による標的 mRNA の認識には、シード領域と標的 mRNA の相補性が重要であると考えられていた。実際に X 線結晶構造解析からも、Argonaute の結合によってシード領域が標的 mRNA との二重螺旋構造を"pre-organize"している

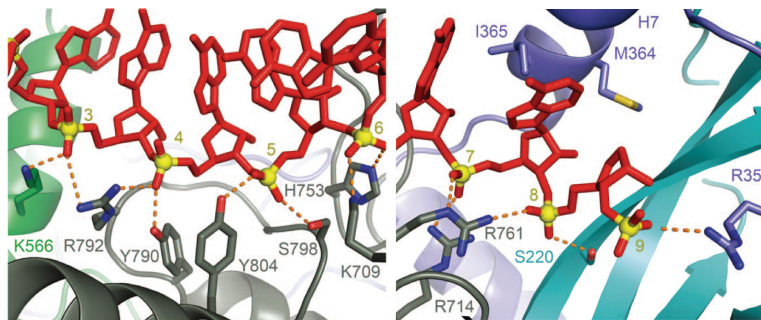


Figure 2. ヒト Argonaute2 とガイド鎖 RNA の結晶構造

ことが示され、シード領域における標的 mRNA の優先的な塩基対形成はエントロピー的に有利であるためだと証明された(Figure 2)¹⁷。また、一般的に miRNA の標的 mRNA 発現抑制能は、ガイド鎖 5'末端の相補塩基 (t1) がアデノシンの際に向上する傾向にある。多くの哺乳類において、t1 位にはアデノシンがよく保存されていることが知られており¹⁸、X 線結晶構造解析によりヒトの Argonaute2 において t1 を認識している MID ドメインには、アデニン部位と特異的に相互作用する結合ポケットが存在していることが明らかになった (Figure 3)¹⁹。

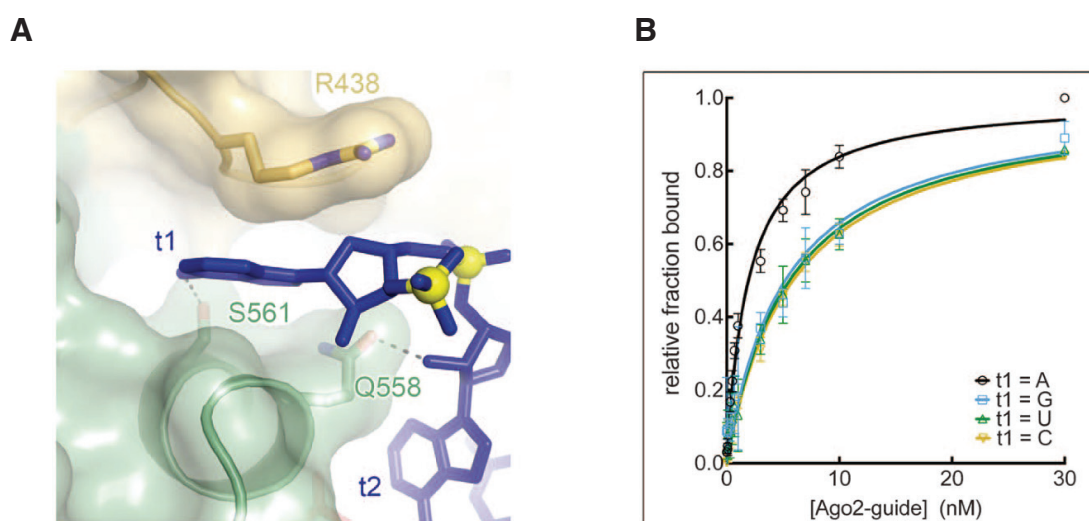


Figure 3. (A) MID ドメインに存在するアデニン結合ポケット (B) t1 に異なる塩基を導入した標的鎖と Argonaute2 の結合スコア

1-4 コンピュータを用いた標的 mRNA の予測

これまで述べたような miRNA と標的 mRNA 間の結合様式を基にして、標的 mRNA の予測アルゴリズムが数多く開発されている (Table 2)。TargetScan、PicTar、EMBL、EMMO はシード領域の相補性を優先的に考慮したプログラムであり、予測される標的 mRNA はよく似ている。しかし、全て同様の結果になる訳ではなく、それぞれ補足的な選択基準がアルゴリズムに組み込まれている。例えば TargetScan は、シード領域の相補性に加え、t1 位がアデノシンであるような mRNA を上位候補に挙げるが、この位置に塩基対を形成する mRNA を上位候補に挙げるアルゴリズムも存在する。従って、ガイド鎖の 5'末端がウラシルの場合には、4 アルゴリズムで同様の結果が得られるが、ウラシル以外の場合では結果が異なってくる。他にも異なる選択基準が各プログラムに組み込まれているが、プロテオソーム解析と比較を行った際に、最も良い成績を収めたのは TargetScan であった²⁰。

Table 2. 標的 mRNA を予測するためのコンピュータプログラム

プログラ ム	対象種 ^a	標的遺伝子の選出基準	URL	Reference
TargetScan	m,w,f	シード領域の相補性、 結合領域の数、標的 1 の配列	http://www.targetscan.org	21
EMBL	f	シード領域の相補性、 結合領域の数、標的と の二本鎖の熱的安定性	http://russell.embl-heidelberg.de	22
PicTar	m,f,w	シード領域の相補性、 結合領域の数、標的と の二本鎖の熱的安定性	http://pictar.mdc-berlin.de	23
EIMMo	m,f,w	ある程度のシード領域 の相補性、結合領域の 数	http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo2	24
Miranda	m,f,w,+	ある程度のシード領域 の相補性、シード領域 の数	http://www.microrna.org	25
MirBase Targets	m,f,w,+	ある程度のシード領域 の相補性、シード領域 の数、二本鎖全体の相 補性	http://microrna.sanger.ac.uk	26
PITA Top	m,f,w	ある程度のシード領域 の相補性、結合領域の 数、標的との二本鎖の 熱的安定性	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/ mir07/mir07_data.html	27
RNA22	m,f,w	ある程度のシード領域 の相補性、結合領域の 数、二本鎖全体の相補 性及び熱的安定性	http://cbcsrv.watson.ibm.com/ rna22.html	28

^am = mammalian/vertebrate, f = fly, w = worm, + = additional clades

1-5 標的 mRNA を予測するための実験的な手法

コンピュータプログラムを用いた標的 mRNA の予測は、miRNA の機能解析において非常に強力である。しかし、予測される標的 mRNA は一般的な miRNA の結合様式に依存したものが多く、例外的な結合様式を持つ標的 mRNA の予測は困難である。また、実際には標的ではない mRNA が標的として予測される偽陽性もしばしば問題となっている。Jiang らは標的 mRNA 予測プログラムである miRanda を用いて CyclinD1 を標的とする miRNA を探索し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを利用した実験により、本プログラムの信頼性を検証した²⁹。その結果、miRanda によって予測された 45 種類の候補 miRNA のうち、実際に CyclinD1 の 3'UTR に結合して発現を抑制したものは 7 種類 (16%) だけであった。このように、コンピュータプログラムによる標的 mRNA の予測は網羅性や正確性に欠くため、より確実な実験的手法の開発が求められている。

1-5-1 トランスクリプトーム解析による標的 mRNA の同定

miRNA を細胞へ導入すると、一部の標的 mRNA において発現量の低下が確認される³⁰。従って miRNA を過剰発現した後の全 mRNA 量 (トランスクリプトーム) を解析することで標的 mRNA を同定できると考えられる。Lim らはこの発想に基づき、miRNA を Hela 細胞へ導入して 12 時間後の全 mRNA 量をマイクロアレイで解析した。その結果、miRNA の過剰発現により約 1000 種類の mRNA において発現量の低下が確認された。また、発現量の低下した mRNA の多くがその 3'UTR に、導入した miRNA のシード領域と相補な配列を持っており、miRNA の直接的な標的であることが示唆された³¹。マイクロアレイ解析によって広範囲に渡る標的 mRNA が推定されたことから、その後、他のグループによっても同様の実験が数多く行われている³²⁻³⁴。miRNA の相補配列を細胞内へ過剰発現した場合、miRNA の機能が阻害され標的 mRNA の発現量は増加すると考えられる。従って miRNA の機能阻害をした場合も同様に、マイクロアレイ解析による標的 mRNA の推定が可能である³⁵。さらに、miRNA の過剰発現と機能阻害の両方を行うと、発現が増加する mRNA と低下する mRNA の 2 パターンの解析結果が得られるが、どちらのパターンにも共通する mRNA は、標的 mRNA としての可能性が極めて高くなることが Nicolas らの研究によって示された³⁶。以上のように、トランスクリプトーム解析を用いることで網羅的な標的 mRNA の同定が可能となる。しかし、予測できる標的 mRNA が、miRNA の導入によって発現量が変化するもの、すなわち miRNA によって分解されるものに限定されることや、間接的な発現量の変化

によって生じる偽陽性などが問題点として挙げられる。

1-5-2 HITS-CLIP

HITS-CLIP は UV cross-linking immunoprecipitation (CLIP) 法と high-throughput sequencing (HITS) を組み合わせた、迅速で網羅的な標的 mRNA の解析法である³⁷。光クロスリンク能を持つ 4-チオウリジンを細胞へ添加して UV を照射すると、4-チオウリジンを取り込んだ RNA が RISC 複合体において、Argonaute と光架橋される。抗 Argonaute 抗体で RNA-Argonaute 複合体を精製した後、RNA 部分を ³²P で標識、SDS-PAGE で精製することで mRNA-Argonaute 複合体を選択的に得ることができる。それらを用いてハイスループットシーケンシングを行うことにより、Argonaute に含まれている (miRNA に標的とされている) mRNA を網羅的に分析することが可能となる (Figure 4)。しかし、本手法から miRNA が結合する mRNA を直接同定することはできず、バイオインフォマティクスの手法と組み合わせる必要がある。

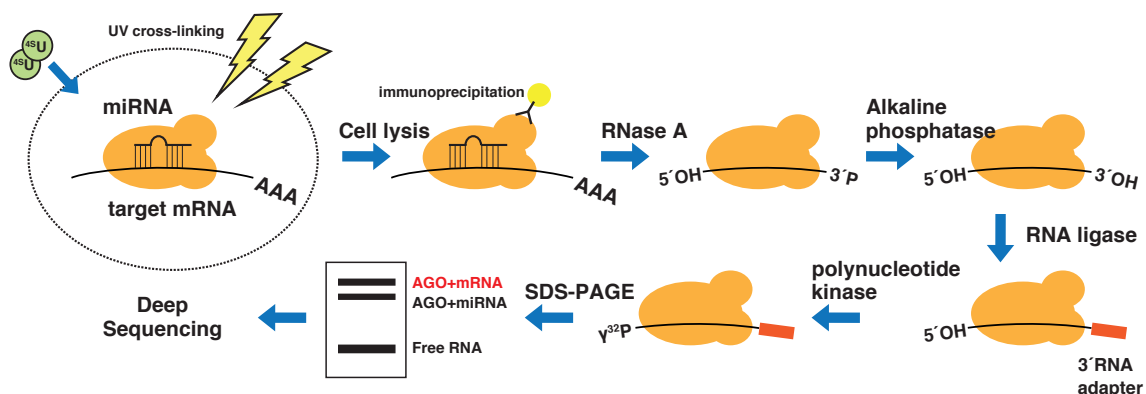


Figure 4. Argonaute HITS-CLIP 法³⁸

1-5-3 miR-CLIP

microRNA crosslinking and immunoprecipitation (miR-CLIP) は、光反応性分子であるソラレンとビオチンで化学修飾した miRNA による標的 mRNA の同定法である³⁹。ソラレンはウラシルと選択的に光架橋するため、修飾 miRNA は RISC を形成後、UV 照射によって標的 mRNA と直接共有結合を形成する。抗 Argonaute 抗体で RISC を精製した後、ストレプトアビジンとビオチンの相互作用を利用して miRNA と標的 mRNA の複合体を単離し、ハイスループットシーケンシングを行うことにより、miRNA が直接結合する標的 mRNA を網羅的

に解析することが可能である (Figure 5)。Jochen らはこの手法を用いて miR-106a および miR-17-5p の標的 mRNA を探索し、コンピュータプログラムからは予測されない「例外的な」結合パターンを持つ標的 mRNA の同定に成功している³⁹。

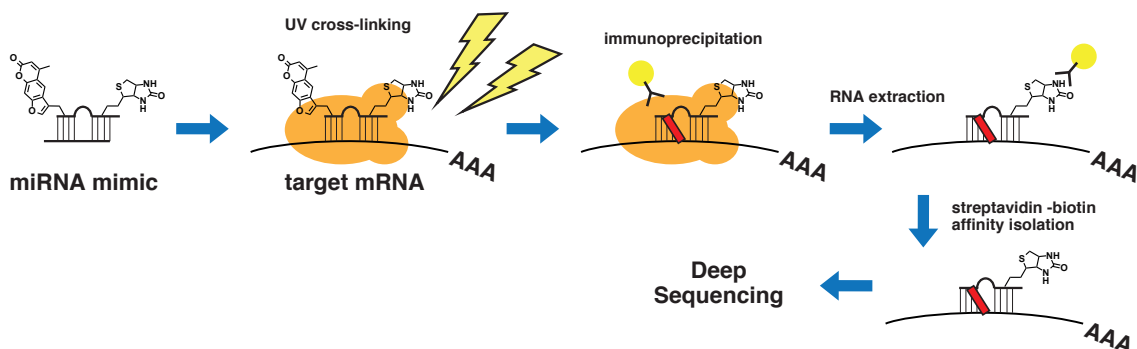


Figure 5. miR-CLIP

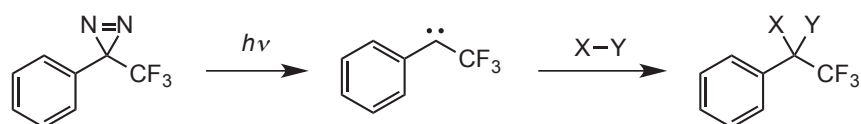
1-6 光反応性分子

代表的な標的 mRNA の解析法である HITS-CLIP や miR-CLIP は、どちらも共通して光反応性分子を利用している。光反応性分子とは、光エネルギーで容易に分解する化学官能基を持つ分子であり、紫外領域の光照射により最寄りの分子と共有結合を形成することが可能である。特定のリガンドにあらかじめ光反応性残基を導入し、適切なタイミングで光照射することで未知のレセプターに共有結合を形成することができる。また、光照射による細胞毒性は少なく、生理活性を保ったまま共有結合の形成が可能であるため、生体高分子の解析に適している。miR-CLIP は、miRNA に導入されたソラレン分子によって標的 mRNA のみを選択的に捕獲できる強力な手法ではあるものの、導入したソラレンのウラシル選択的な反応性のため捕獲できる標的 mRNA には制限があり、網羅的な解析法とは言えない。未知の標的 mRNA を網羅的に捕獲・解析するためには、相補塩基に依存しない反応性を持つ新しいプローブの開発が必要である。

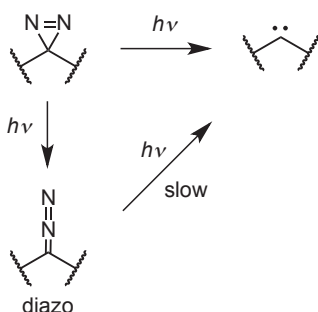
1-7 トリフルオロメチルジアジリン

光反応性残基であるトリフルオロメチルジアジリンは、365 nm 付近の長波長側の UV 照射によりカルベンを生じる (Scheme 1)⁴⁰。カルベンは非常に反応性が高く、C-H、O-H、N-H、C-C 結合を含む多くの官能基と反応することが可能である。3 位のフェニル基とトリフルオロメチル基は合成条件におけるジアジリン環の熱的安定性を高めると同時に、ウルフ転移

とそれに続く求電子置換反応によって生じるジアゾ異性体の生成を抑制している (Scheme 2)。ジアゾ異性体は UV 照射によってカルベンを生成できるが、反応速度が遅いため、他の求核剤と反応して非特異的な標識を引き起こす可能性がある。そこで、置換基としてトリフルオロメチル基を用いることでジアゾ体の加水分解を抑制している。



Scheme 1. ジアジリンの反応メカニズム



Scheme 2. UV照射によるジアゾ異性体の生成

生体高分子の標識化にジアジリンを用いる利点として、細胞毒性の低い長波長のUV照射によって活性化されること、UV照射によって生じるカルベンの反応性が極めて高いことが挙げられる。UV照射によって生じたカルベンは、フリーの状態では水と速やかに反応してクエンチされるため、標的を誤標識する可能性は極めて低い。近年、ジアジリン残基を用いた生体高分子の解析が盛んに行われおり^{41,42}、当研究でもガイド鎖の3'末端にジアジリン残基を導入したsiRNAプローブを合成し、RISCの構成因子であるArgonaute2の捕獲に成功している (Figure 6)⁴³。

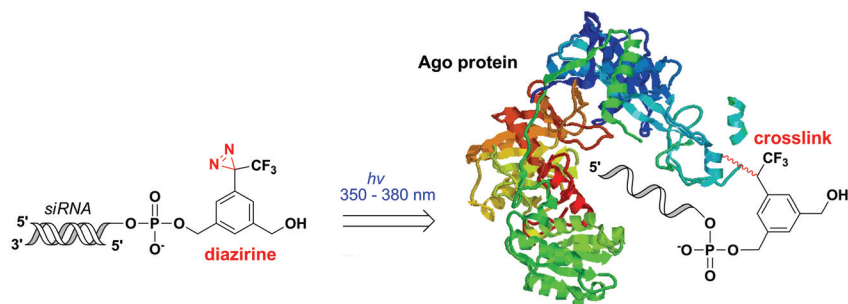


Figure 6. 光反応性siRNAプローブによるArgonaute2の捕獲

2章 光反応性残基を導入した新規RNAプローブの合成とそのRNA捕獲能

前述した様に、光反応性残基トリフルオロメチルジアジリンは長波長のUV照射によってカルベンを生じ、近傍の様々な化合物と共有結合を形成することが可能である。従って、ジアジリン残基を導入したmiRNAプローブを細胞へ導入し、UVを照射することで、標的mRNAを網羅的に標識できると考えた (Figure 7)。

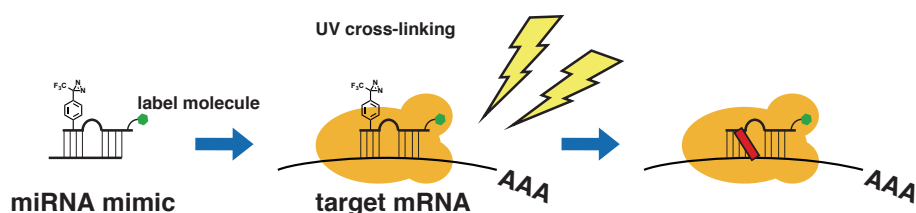


Figure 7. miRNAプローブによる標的mRNAの標識化

ジアジリン残基を導入したmiRNAプローブを合成するため、新たにヌクレオシドアナログ**1**および**2**を設計した (Figure 8)。**1**および**2**は、天然のRNAと同様の糖-リン酸骨格を有することから、これらを導入したmiRNAプローブは天然のmiRNAと同等の生理活性を示すことが期待できる。また、UV照射によって生じるカルベンは極めて反応性が高いため、相補配列に依存せず、標的mRNAを網羅的に捕獲できると考えられる。本研究では、**1**および**2**を導入したRNAプローブを合成し、そのRNA捕獲能を検証した。

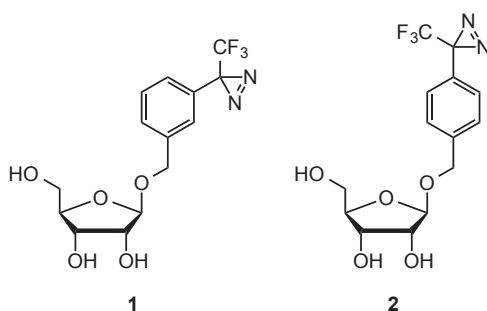
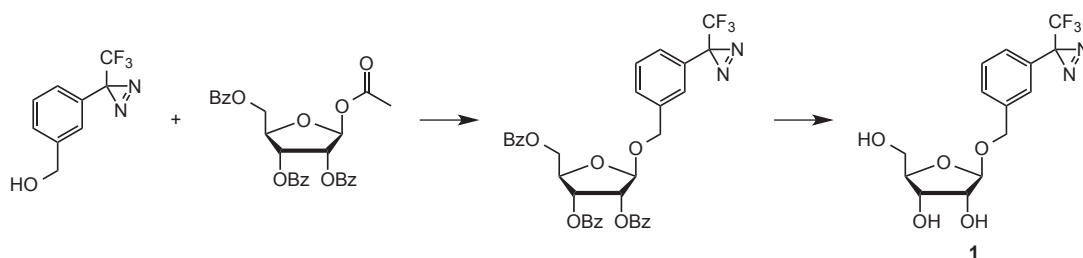


Figure 8. ジアジリン残基を有するヌクレオシドアナログ

2-1 光反応性ヌクレオシドアナログ及びそのアミダイト体の合成

ヌクレオシドアナログ**1**および**2**は、トリフルオロメチルジアジリンのアルコール誘導体と β -D-リボフラノースをグリコシル化することで得られると考えた (Scheme 3)。なお、トリフルオロメチルジアジリンのアルコール誘導体は、既知の報告に従って合成することとした⁴¹。



Scheme 3. 光反応性ヌクレオシドアナログの合成戦略

このグリコシル化反応では、2'-位水酸基にアシル系保護基を有する β -D-リボフラノースを出発原料として選択することで、導入したアシル基の隣接基効果により、 β -位選択的にアルキル基を導入することが可能である (Figure 9)。

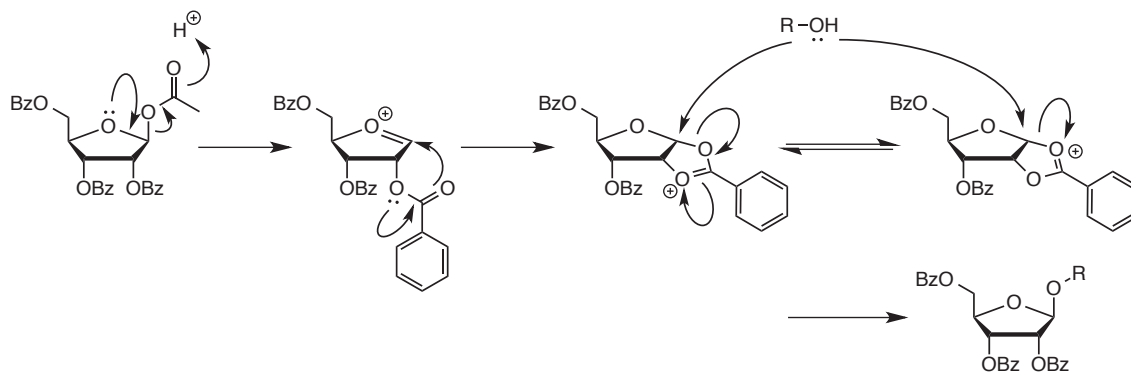
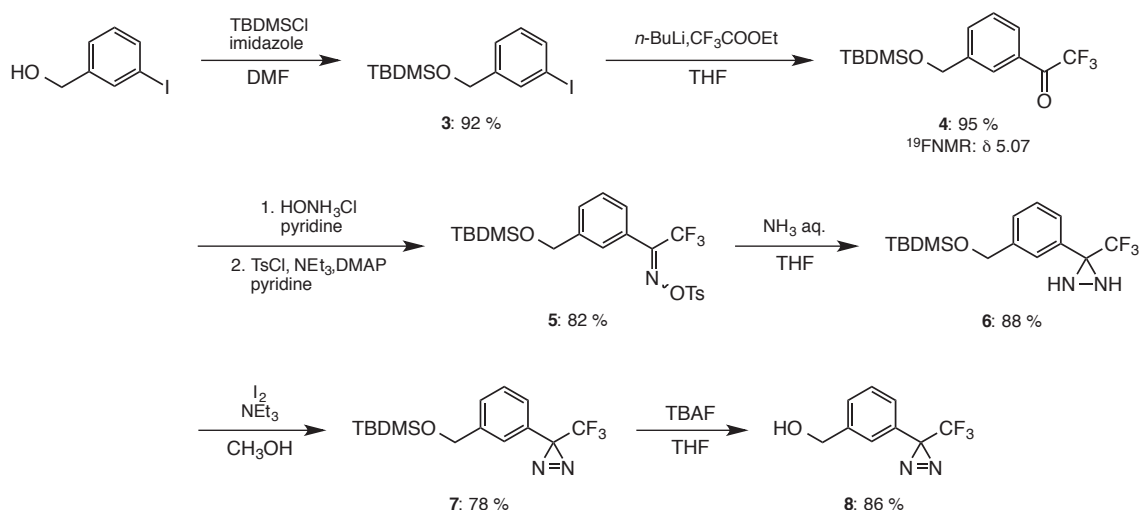


Figure 9. アシル系保護基の隣接基効果

2-1-1 ベンゼン環メタ位にジアジリニル基を有するアルコール誘導体の合成

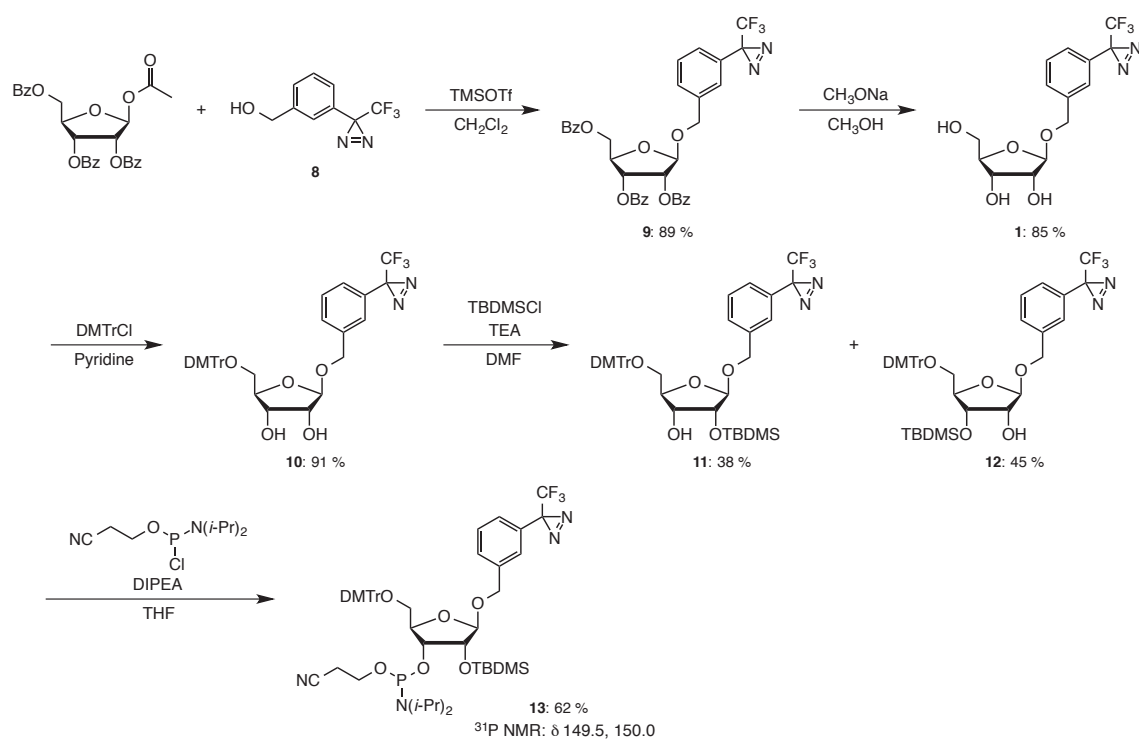
m-Iodobenzyl alcoholを出発原料として、TBDMSClを反応させることにより、水酸基をTBDMs基で保護した化合物**3**を収率92%で得た。続いて、化合物**3**をTHFに溶解し-78 °Cにて*n*-BuLi処理することによりベンゼン環のメタ位をリチオ化した後、トリフルオロ酢酸エチルを添加することで化合物**4**を収率95%で得た。化合物**4**にヒドロキシアミン塩酸塩を作用させ、オキシム体とした後に、水酸基をトシル化し化合物**5**を収率82%で得た。続いて、トシル体**5**を封管中で2日間アンモニア水と反応させて化合物**6**を収率88%で合成した。得られたジアジリジン誘導体**6**をI₂で酸化して化合物**7**を収率78%で得た。最後にTBDMs基をTBAFで処理することで除去し、目的のアルコール誘導体**8**を収率86%で合成した (Scheme 4)。



Scheme 4. メタ位にジアジリニル基を有するアルコール体の合成

2-1-2 ヌクレオシドアナログ**1**及びそのアミダイト体の合成

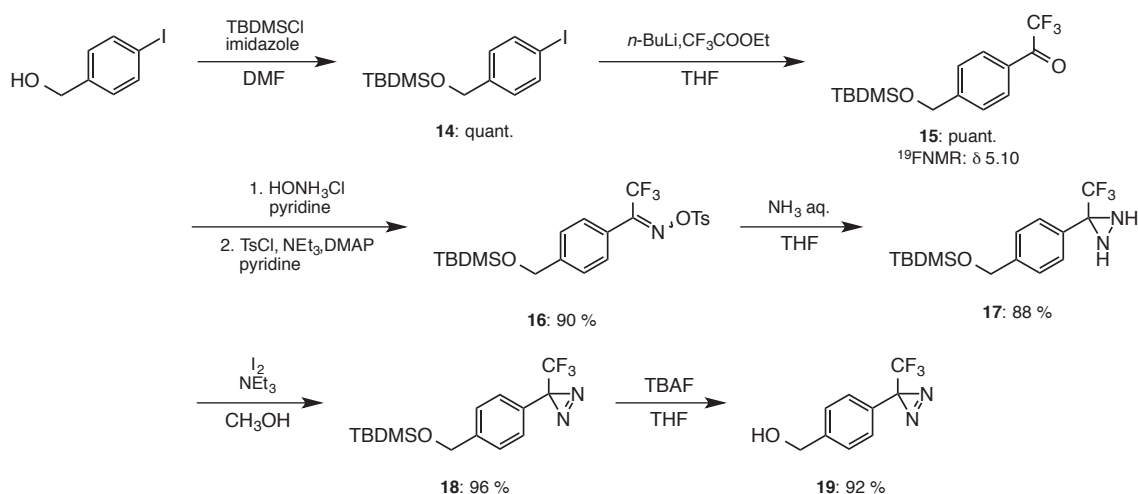
続いて、化合物**8**と1-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranoseのグリコシル化反応を行った。化合物**8**と1-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranoseをCH₂Cl₂中、TMSOTf存在下で反応させたところ目的とする化合物**9**を収率89%で得ることができた。一般に、ヌクレオシドのアノマー位の立体配置は、糖部の1'-位及び2'-位のHの間のカップリング定数 (*J*値) を基に決定することができる。即ち、1'-位の立体配置が β -位の時に、1'-Hと2'-H間での二面角が約90°を成すことから、二面角 Φ とKarplus式の関係により、*J*値は小さく、シングレットとして観察されると推測される。実際、化合物**9**の¹H NMR解析をおこなったところ、5.31ppm付近に、1'-位のHに帰属されるシングレットのピークが観察された。よって、生成物を β -体と決定した。続いて化合物**9**に、触媒量のCH₃ONaを作用させ脱ベンゾイル化することで、ヌクレオシドアナログ**1**を収率85%で合成した。更に、化合物**1**にDMTrClを1当量反応させ、5'-位の1級水酸基を選択的にDMTr基により保護し、化合物**10**を収率91%で得た。合成したDMTr体**10**をTBDMSClにて処理し、得られた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製することで2つの化合物を単離した。それぞれを¹H NMR及び¹H-¹H COSYを用いて解析をおこなったところ、一方では、水酸基のピークが2.5ppmにダブレットとして観察され、3'-位に位置するHとのカップリングが観測された。このことから、水酸基は3'-位に位置し、TBDMS基は2'-位に位置していることが確認できた。また、もう一方では、水酸基のピークが2.8ppmにダブレットとして観察され、2'-位に位置するHとのカップリングが観測された。このことから、水酸基は2'-位に位置し、TBDMS基は3'-位に位置していることが確認できた。よって、これらの観測データより、2'-TBDMS体である化合物**11**及び3'-TBDMS体である化合物**12**を収率38%、45%にてそれぞれ得られたことが分かった。最後に、2'-TBDMS体**11**を常法により亜リン酸化し、ヌクレオシドアナログ**1**のアミダイト体である化合物**13**を収率62 %で合成した (Scheme 5)。



Scheme 5. ヌクレオシドアナログ1及びそのアミダイト体の合成

2-1-3 ベンゼン環パラ位にジアジリニル基を有するアルコール誘導体の合成

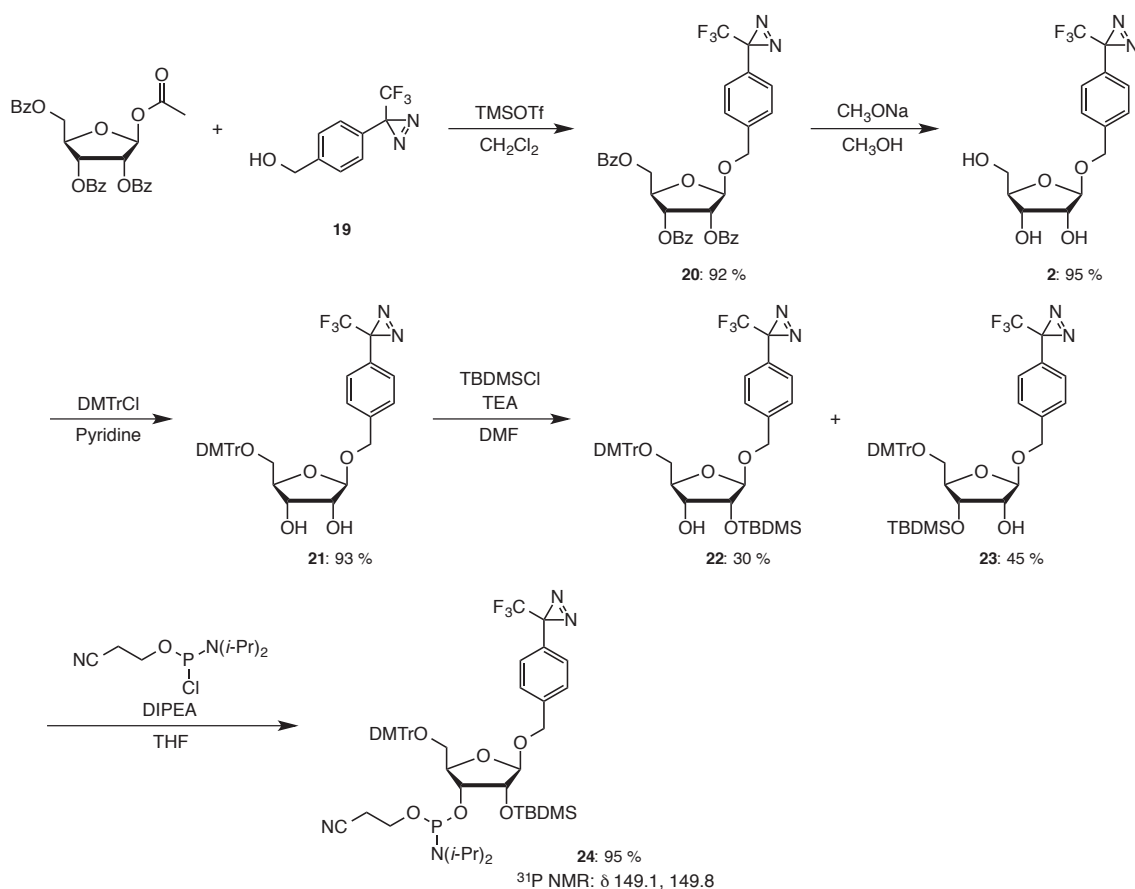
化合物**8**の合成と同様の手法によりパラ誘導体**19**を合成した。*p*-Iodobenzyl alcoholを出発原料として、TBDMSClと反応させることにより、水酸基をTBDMS基で保護し化合物**14**を定量的に得た。続いて化合物**14**をTHF中、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で*n*-BuLi処理することによりベンゼン環パラ位をリチオ化した後、トリフルオロ酢酸エチルを添加することで化合物**15**を定量的に得た。化合物**15**にヒドロキシアミン塩酸塩を作用させ、オキシム体とした後に、水酸基をトシル化し化合物**16**を収率90%で得た。続いて、トシル体**16**を封管中で2日間アンモニア水と反応させて化合物**17**を収率88%で合成し、得られたジアジリジン誘導体を I_2 で酸化して化合物**18**を収率96%で得た。最後にTBDMS基をTBAFで処理することで除去し、目的のアルコール誘導体**19**を収率92%で合成した (Scheme 6)。



Scheme 6. パラ位にジアジリニル基を有するアルコール誘導体の合成

2-1-4 ヌクレオシドアナログ2及びそのアミダイト体の合成

化合物**13**の合成と同様の手法により、アナログ**2**のアミダイト体を合成した。化合物**19**と1-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranoseを先と同様の条件下でグリコシル化し、化合物**20**を収率92%で合成した。¹H NMRによる解析をおこなったところ、5.31ppm付近に、1'-位のHに帰属されるシングレットのピークが観察されたため、生成物を β -体と決定した。更に、化合物**20**に触媒量のCH₃ONaを用いて脱ベンゾイル化することで、ヌクレオシドアナログ**2**を収率95%で合成した。続いて化合物**2**にDMTrClを1当量反応させ、5'-位の1級水酸基を選択的にDMTr基により保護し、化合物**21**を収率93%で得た。化合物**21**をTBDMSClにて処理し、得られた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。単離した2つの化合物をそれぞれ¹H NMR及び¹H-¹H COSYを用いて解析し、2'-TBDMS体である化合物**22**及び3'-TBDMS体である化合物**23**をそれぞれ収率30%及び45%にて得られたことが分かった。最後に、2'-TBDMS体**22**を常法により重リン酸化し、ヌクレオシドアナログ**2**のアミダイト体である化合物**13**を収率95%で合成した(Scheme 7)。



Scheme 7. ヌクレオシドアナログ2及びそのアミダイト体の合成

2-2 ヌクレオシドアナログ1および2を導入したRNAの合成

2-2-1 固相ホスホアミダイト法

核酸は一般的に、固相ホスホアミダイト法に従って化学合成される (Figure 10)。先ず、酸処理で樹脂上に固定化されたヌクレオチドのDMTr基を脱保護し (工程①)、続いてアミダイト体をテトラゾール等の酸触媒により活性化して、樹脂上に固定化されたヌクレオシドの5'-水酸基とのカップリング反応を行う (工程②)。未反応の5'-水酸基をアセチル基で保護した後 (工程③)、亜リン酸エステルを I_2 で酸化することで1サイクルが終了する (工程④)。このサイクルを繰り返すことでDNA/RNAを化学的に合成することが可能である。

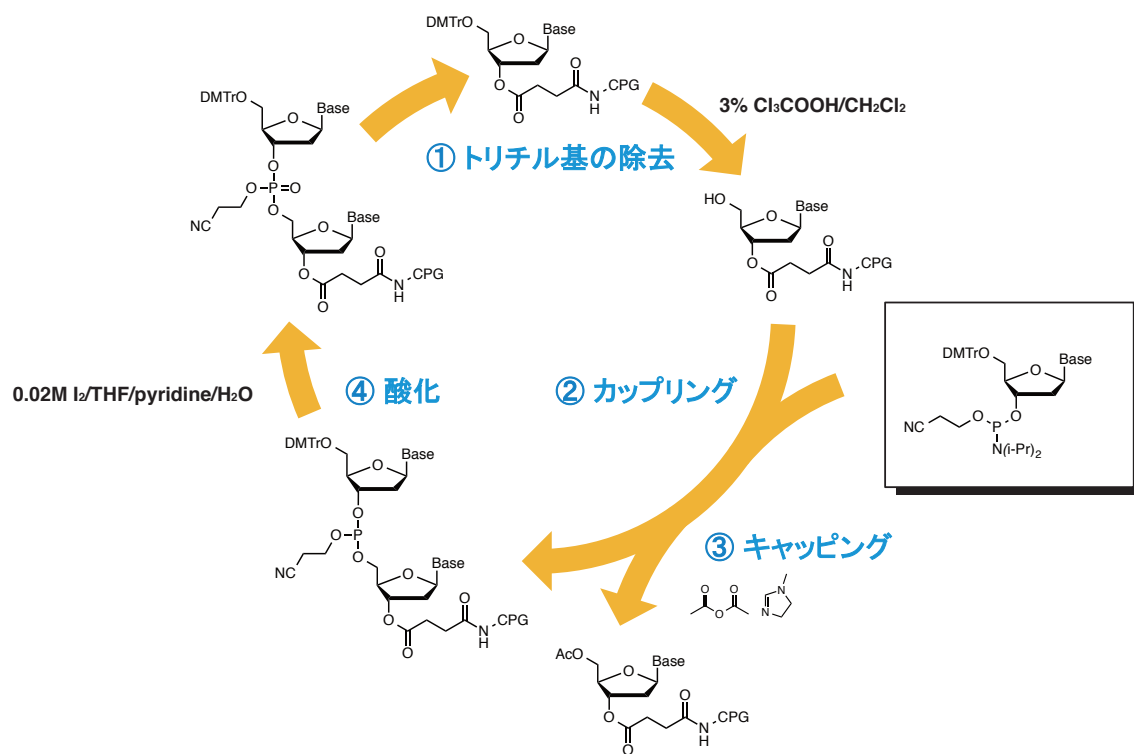


Figure 10. 固相ホスホアミダイト法

2-2-2 アナログ1および2を導入したRNAプローブの合成

合成したヌクレオシドアナログ**1**および**2**の各アミダイト体を用いて、核酸自動合成機にてオリゴヌクレオチドを合成した (Table 3)。配列は天然のmiRNAである*let-7*を模しており、5'末端の8-10番目にアナログ**1**および**2**を導入した (RNA2-9)。*let-7*は代表的な癌抑制遺伝子型miRNAの1種であり、肺癌細胞において顕著な生育阻害効果を示すことが報告されている⁴⁴。また、RNA捕獲能検証のため、5'-末端をFITCで標識した標的鎖も同様に合成した。配列は、天然型の*let-7*と相補な配列からなるもの (RNA10) とミスマッチ塩基対を1つ含むもの (RNA11) を合成した。合成した各オリゴヌクレオチドの構造は、MALDI-TOF/MSにより確認した。

Table 3. 各オリゴヌクレオチドの配列

RNA	Sequence ^a	calculated	observed
RNA 1	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU-3'	6791.9	6790.3
RNA 2	5'-UGA GGU A 1 U AGG UUG UAU AGU-3'	6856.9	6854.6
RNA 3	5'-UGA GGU AG 1 AGG UUG UAU AGU-3'	6895.9	6897.7
RNA 4	5'-UGA GGU AGU 1 GG UUG UAU AGU-3'	6872.9	6875.9
RNA 5	5'-UGA GGU AGU A 1 G UUG UAU AGU-3'	6856.9	6854.1
RNA 6	5'-UGA GGU A 2 U AGG UUG UAU AGU-3'	6856.9	6855.9
RNA 7	5'-UGA GGU AG 2 AGG UUG UAU AGU-3'	6895.9	6895.0
RNA 8	5'-UGA GGU AGU 2 GG UUG UAU AGU-3'	6872.9	6871.9
RNA 9	5'-UGA GGU AGU A 2 G UUG UAU AGU-3'	6856.9	6855.6
RNA 10	3'-ACU CCA UCA UCC AAC AUA UCA- F -5'	7078.1	7078.0
RNA11	3'-ACU CCA UGA UCC AAC AUA UCA- F -5'	7118.1	7118.0

^a**F** = FITC

2-3 アナログ1および2を含む二本鎖RNAの熱的安定性

内部にヌクレオシドアナログ**1**および**2**を導入したRNAプローブ (RNA2-9) と、標的RNA (RNA10,11) を組み合わせ、二本鎖の50%融解温度 (T_m) を100mMのNaClを含むリン酸バッファー (pH=7.0) 中で測定した。天然のヌクレオシドからなるRNA1と標的RNA (RNA10,11) 二本鎖の T_m 値と比較することで、アナログの導入による二本鎖RNAの熱的安定性への影響を評価した。

2-3-1 アナログ1を導入した二本鎖RNAの熱的安定性

アナログ1を導入したRNAプローブ (RNA2-5) と標的RNA (RNA10,11) を組み合わせて二本鎖を形成させ、50 %融解温度 (T_m)を測定した (Figure 11,12)。

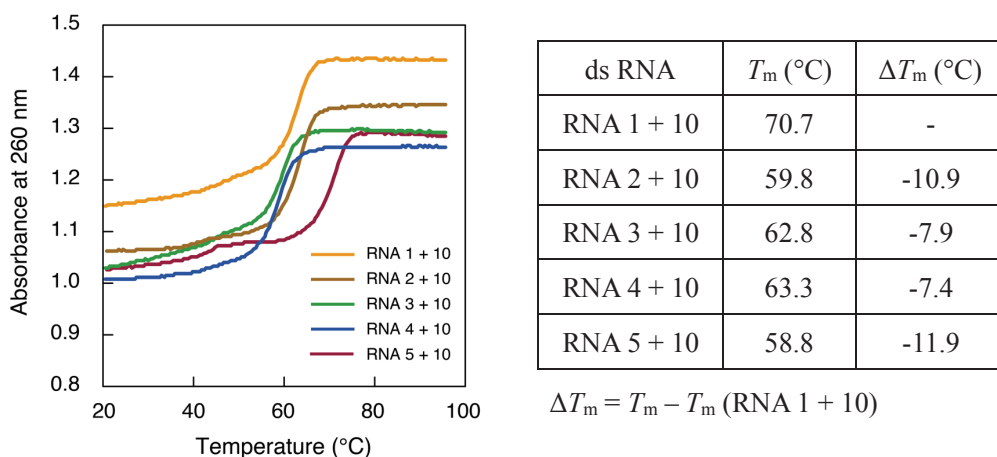


Figure 11. アナログ1を導入したRNAプローブとRNA10による二本鎖の熱的安定性

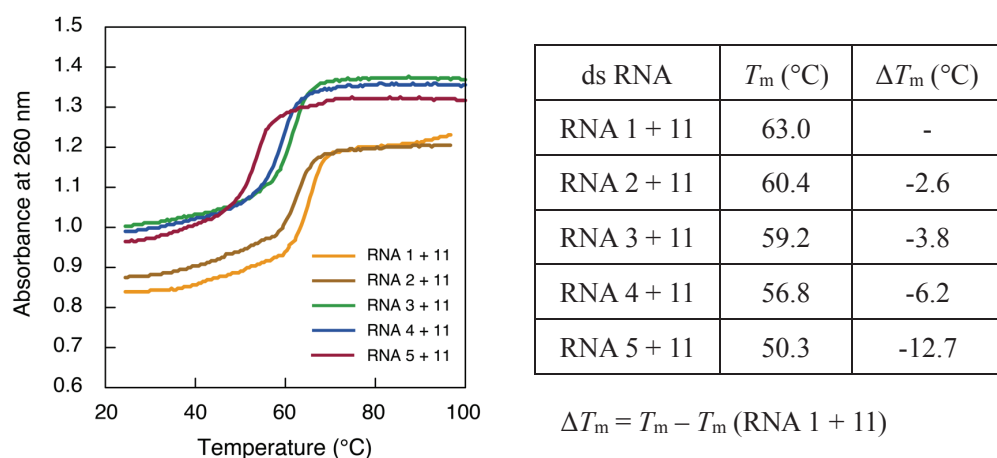


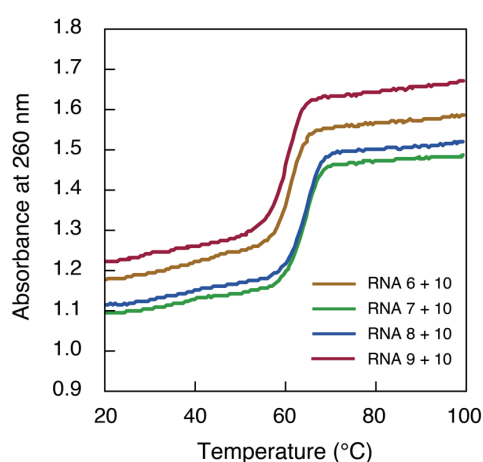
Figure 12. アナログ1を導入したRNAプローブとRNA11による二本鎖の熱的安定性

アナログ1を導入したRNAプローブでは、天然型のRNA1の場合と比較して二本鎖における熱的安定性が減少していることが確認された。また、1の導入による二本鎖の不安定化は、1の相補塩基がC、Gの場合 (RNA2 + 10, RNA 2 + 11) と比較して、相補塩基がA、Uの場合 (RNA 3 + 10, RNA 4 + 10) では小さかった。天然型のC-G塩基対は水素結合を3本形成するのに対して、A-U塩基対では2本しか形成しない。従って、C-G塩基対への1の導入は水素結合

を3本切断するため二本鎖をより不安定化する結果となった。また、**1**の導入による T_m 値の低下は天然型のミスマッチ配列 (RNA 1 + 11) と同程度だったことから、**1**の導入はmiRNAのミスマッチ領域 (シード領域外) であればmiRNAの活性に影響を与えないと考えられる。

2-3-2 アナログ2を導入した二本鎖RNAの熱的安定性

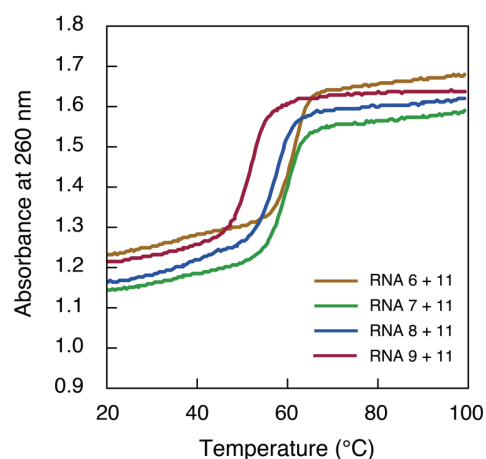
同様に、アナログ2を導入したRNAプローブ (RNA6-9) と標的RNA (RNA10,11) を組み合わせさせて二本鎖を形成させ、50 %融解温度 (T_m) を測定した (Figure 13,14)。



ds RNA	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
RNA 1 + 10	70.7	-
RNA 6 + 10	61.0	-9.7
RNA 7 + 10	64.1	-6.6
RNA 8 + 10	64.4	-6.3
RNA 9 + 10	60.1	-10.6

$$\Delta T_m = T_m - T_m (\text{RNA 1 + 10})$$

Figure 13. アナログ2を導入したRNAプローブとRNA10による二本鎖の熱的安定性



ds RNA	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
RNA 1 + 11	63.0	-
RNA 6 + 10	61.3	-1.7
RNA 7 + 10	59.6	-3.4
RNA 8 + 10	57.6	-5.4
RNA 9 + 10	52.0	-11.0

$$\Delta T_m = T_m - T_m (\text{RNA 1 + 11})$$

Figure14. アナログ2を導入したRNAプローブとRNA11による二本鎖の熱的安定性

アナログ**2**を導入したRNAプローブでも、天然型のRNA1の場合と比較して二本鎖における熱的安定性が減少していることが確認された。また、**2**の導入による二本鎖の不安定化は、**2**の相補塩基がC、Gの場合 (RNA2 + 10, RNA 2 + 11) と比較して、相補塩基がA、Uの場合 (RNA 3 + 10, RNA 4 + 10) では小さかった。これは、先ほどと同様にC-G塩基対への**2**の導入によってA-U塩基対よりも多くの水素結合が切断されたためである。また、**2**の導入による T_m 値の低下は、天然型のミスマッチ配列 (RNA 1 + 11) と同程度だったことから、**2**の導入もまた、miRNAのミスマッチ領域 (シード領域外) であればmiRNAの活性に影響はないものと考えられる。

2-4 RNAプローブのRNA捕獲能

アナログを導入した RNA プローブと相補鎖 RNA が熱的に安定な二本鎖を形成することが確認された。続いて、ヌクレオシドアナログを導入した RNA プローブの RNA 捕獲能を検証した。RNA プローブと相補鎖 RNA を 1:1 の割合で混合し、アニーリング処理により二本鎖形成させた後に、UV (365 nm 30 分、302 nm 10 分) を氷浴上で照射した。7 M ウレア溶液を加えて反応を停止させ、得られた混合液を 20% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (20% PAGE) にて分析した。

2-4-1 アナログ 1 を導入した RNA プローブの RNA 捕獲能

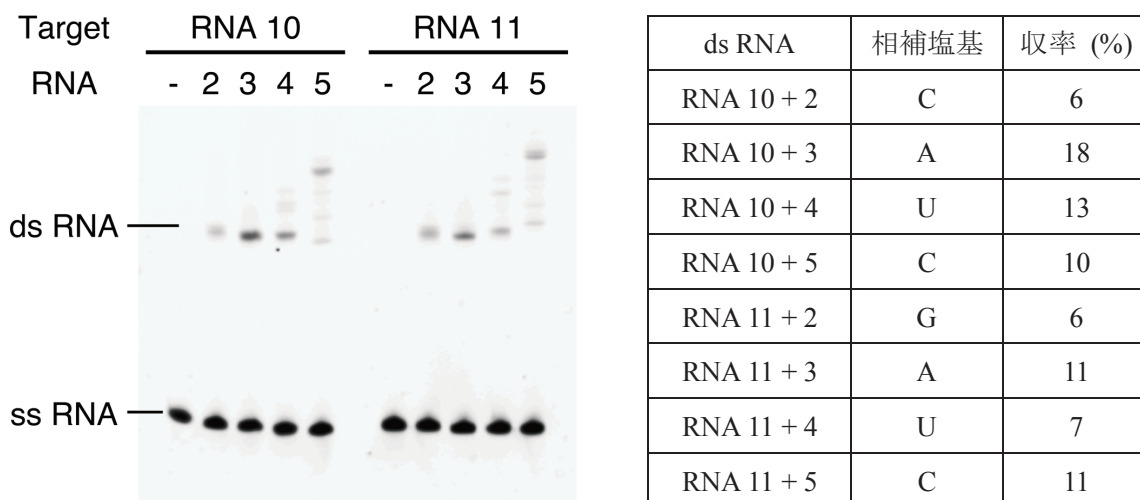


Figure 15. アナログ 1 を導入した RNA プローブの RNA 捕獲能

その結果、全ての組み合わせで高分子量領域に新たなバンドが観察された。一部を精製して ESI-TOF/MS にて分析したところ、RNA プローブと相補鎖 RNA のクロスリンク付加体であることが確認された (Figure 17)。また、ミスマッチを含む組み合わせでは、そうでないものと比較してクロスリンク収率は低下する傾向にあった。これは、付近の水素結合の消失によって 1 の固定化が不十分となり、相補領域に近接できなくなったためだと考えられる。また、全ての組み合わせでクロスリンク反応が進行したことから、1 を導入した RNA プローブによる相補鎖 RNA の捕獲は、1 の相補塩基の種類に依存しないことが明らかになった。

2-4-2 アナログ 2 を導入した RNA プローブの RNA 捕獲能

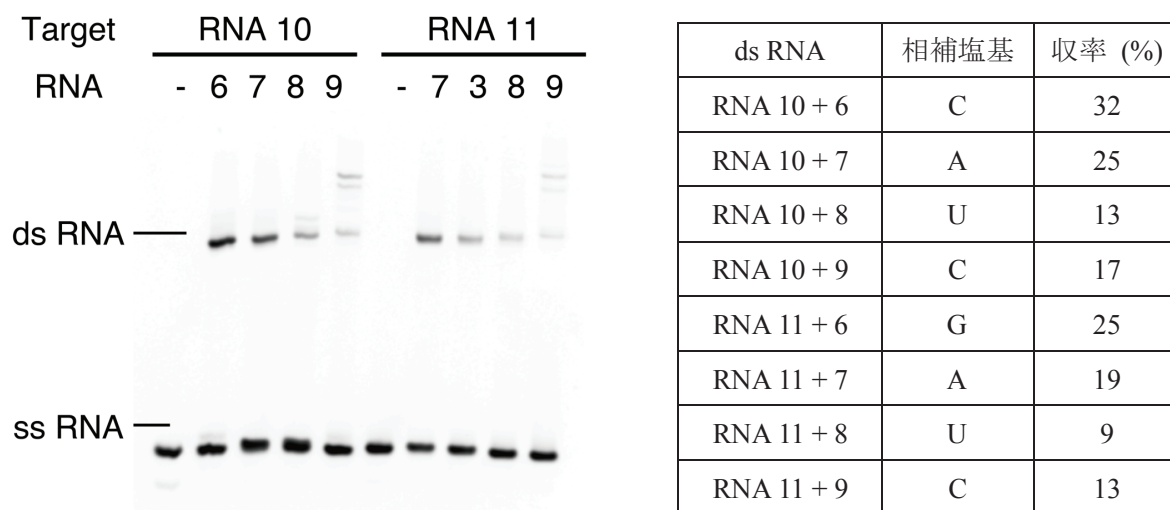


Figure 16. アナログ 2 を導入した RNA プローブの RNA 捕獲能

1 を導入した場合と同様に、全ての組み合わせで高分子量領域に新たなバンドが確認された。一部を精製して ESI-TOF/MS にて分析したところ、RNA プローブと相補鎖 RNA のクロスリンク付加体であることが確認された (Figure 18)。ミスマッチを含む組み合わせで収率が低下する傾向も、1 の場合と同様であった。しかしながら、全体的な収率は 1 を導入した RNA プローブと比較して大きく向上した。これは、反応部位がメタ位からパラ位に置換したことによって、相補領域により接近したためだと考えられる。また、全ての組み合わせで反応が進行したことから、2 を導入した RNA プローブによる相補鎖 RNA の捕獲も相補塩基の種類に依存しないことが明らかとなった。

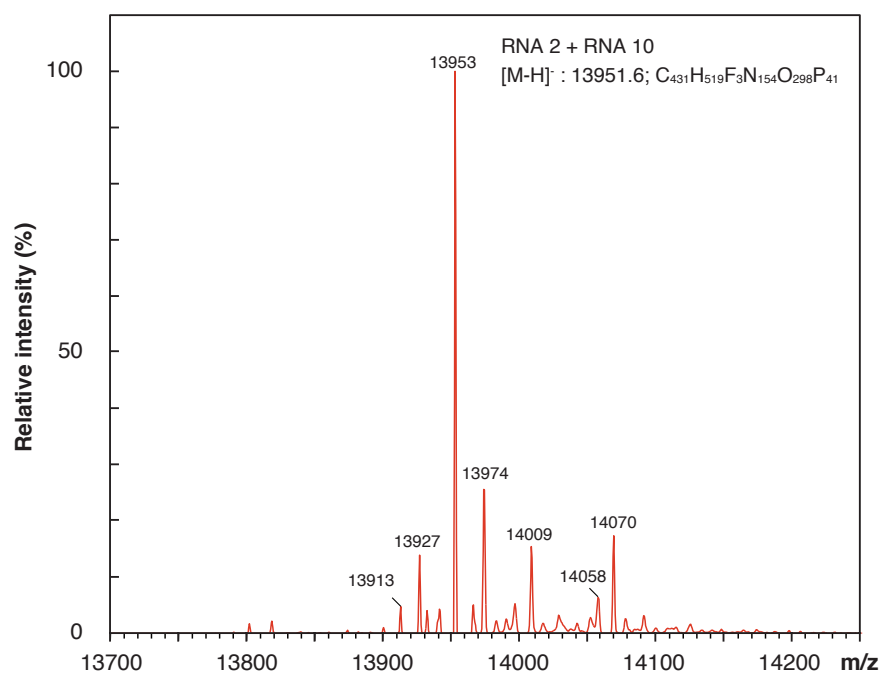


Figure 17. RNA 2 + RNA 10 のクロスリンク体のマスペクトル

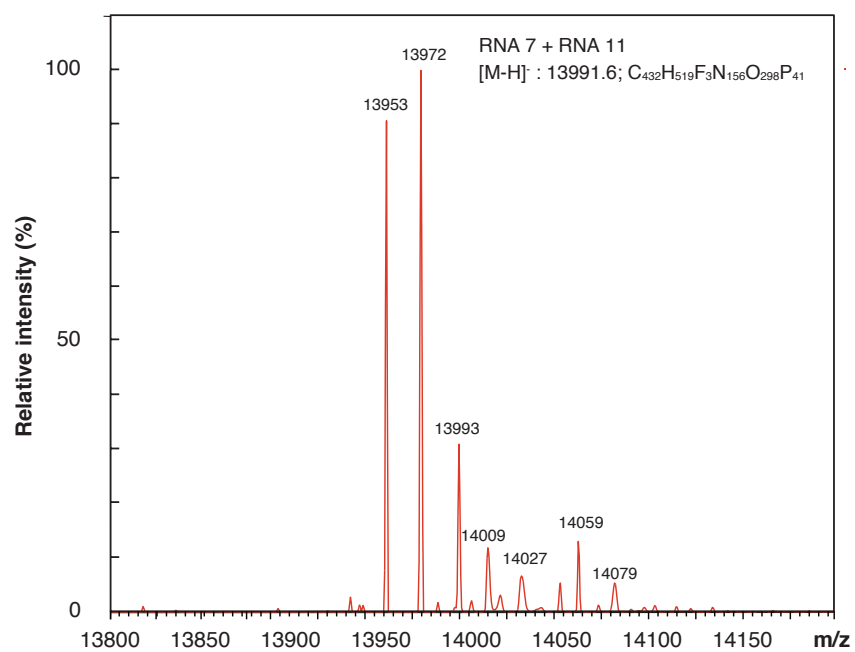


Figure 18. RNA 7 + RNA 11 のクロスリンク体のマスペクトル

2-5 アナログ 2 を導入した miRNA プローブによる標的遺伝子発現抑制能の検証

2 を導入した RNA プローブが効率よく相補鎖 RNA を捕獲可能であることが明らかとなった。そこで 2 を導入した miRNA プローブを新たに合成し、その遺伝子発現抑制能を評価することで 2 の導入が miRNA 活性に与える影響を評価した。

2-5-1 miRNA プローブの合成

2 を導入した miR-199a-5p (RNA12, 14, 16) および miR-199a-3p (13, 15, 17) をそれぞれ固相ホスホアミダイト法に従い、核酸自動合成機で合成した (Table 4) 。また、5p と 3p を組み合わせてアニーリング処理し、miR-199a 二本鎖を調整した (Table 5) (Figure 19) 。

Table 4. miR-199a-5p/3p の配列

RNA	Sequence	calculated	observed
RNA 12	5'-CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC-3'	7220.3	7219.3
RNA 13	5'-ACA GUA GUC UGC ACA UUG GUU A-3'	7003.2	7000.6
RNA 14	5'-CCC AGU G2U CAG ACU ACC UGU UC-3'	7321.2	7324.5
RNA 15	5'-ACA GUA G2C UGC ACA UUG GUU A-3'	7104.2	7106.2
RNA 16	5'-CCC AGU GU2 CAG ACU ACC UGU UC-3'	7321.2	7322.2
RNA 17	5'-ACA GUA GU2 UGC ACA UUG GUU A-3'	7105.1	7104.8

Table 5. miRNA 二本鎖の組み合わせ

miRNA	miR-199a-5p	miR-199a-3p
miRNA 1	RNA 12	RNA 13
miRNA 2	RNA 14	RNA 13
miRNA 3	RNA 16	RNA 13
miRNA 4	RNA 12	RNA 15
miRNA 5	RNA 12	RNA 17

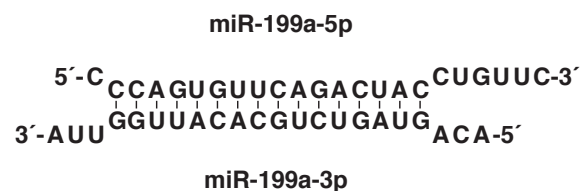


Figure 19. miR-199a の二次構造

2-5-2 アナログ 2 を導入した miRNA プローブの遺伝子発現抑制能

miR-199a は 5p 配列と 3p 配列の二本鎖からなる miRNA であり、どちらの鎖も細胞内で標的 mRNA に結合し、その翻訳を抑制する。2 を導入した 5p および 3p からなる miR-199a を用いてそれぞれの標的に対する遺伝子発現抑制能を測定し、2 の miRNA 活性への影響を評価した。評価法には Dual-luciferase reporter assay を用い、発光タンパク質である *Renilla luciferase* の下流に 5p または 3p の結合配列を挿入したベクターを調整し、miR-199a と同時に細胞へ導入した。24 時間後の *Renilla* と Firefly luciferase 由来の発光量を測定し、miRNA による *Renilla luciferase* の発現抑制効果を評価した。miRNA を導入していない場合の発光量をコントロールとして 100 %とした (Figure 20)。

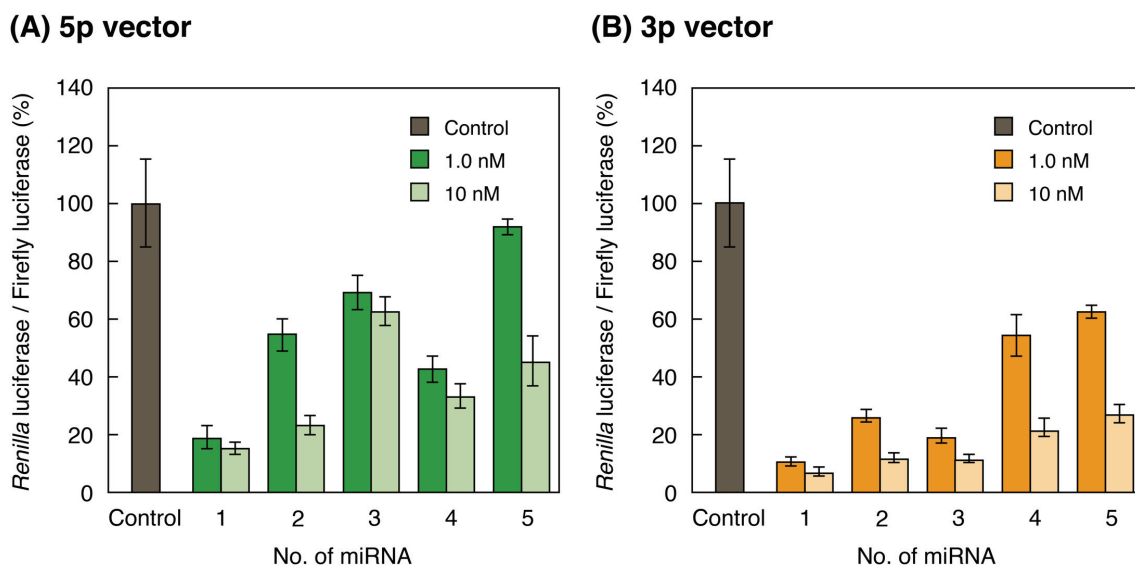


Figure 20. (A) 5p 標的配列を挿入した *Renilla luciferase* の発現抑制効果 (B) 3p 標的配列を挿入した *Renilla luciferase* の発現抑制効果

その結果、2 を導入した miR-199a (miRNA2-5) は、天然型の miR-199a (miRNA1) には劣るものの、*Renilla luciferase* の発現を抑制していることが確認された。これは、2 を導入した miRNA プローブが細胞内で RISC を介して標的 mRNA に結合していることを示しており、2 を導入した miRNA プローブを用いることで、UV 照射による標的 mRNA の捕獲が期待できる。

3 章 光反応性 miRNA プローブによる標的 mRNA の捕獲

これまでに、miRNA の標的 mRNA の網羅的な解析法の開発を目指して、新規光反応性ヌクレオシドアナログ **1** および **2** を合成した。**1** および **2** を導入した RNA プローブは相補塩基の種類に関わらず標的 RNA と光架橋すること、更に **2** を導入した miRNA プローブは細胞内で RISC を介し、標的 mRNA に結合することが確認された。そこで、実際に **2** および標識分子を導入した miRNA プローブを合成し、細胞内で標的 mRNA の捕獲を試みた。

3-1 miRNA プローブの設計

今回、**2** を導入する miRNA として miR-145 を選択した (Figure 21) 。miR-145 は癌細胞において *FSCN1* mRNA 標的とし、その発現を抑制することが報告されている⁴⁵。また、標識分子にはビオチンを選択した。ビオチンは卵白中に存在するタンパク質であるアビジンと非常に強い相互作用を示す小分子であり、miRNA の 3'末端への修飾例も既に報告されている⁴⁶。市販の CPG 樹脂を用いて、各 miRNA の 3'-末端にリンカーを介してビオチンを導入した (Figure 22) 。**2** を導入する位置として、標的 mRNA に結合するガイド鎖 5'末端の 1-23 番目が考えられた。そこで、**2** をガイド鎖の 1-23 番目に 1 つずつ導入した 23 種類の miRNA プローブを合成し、標的遺伝子である *FSCN1* の発現抑制効果をウェスタンブロッティングで評価することで、**2** の適切な導入位置を検討した。



Figure 21. miR-145 二本鎖の構造

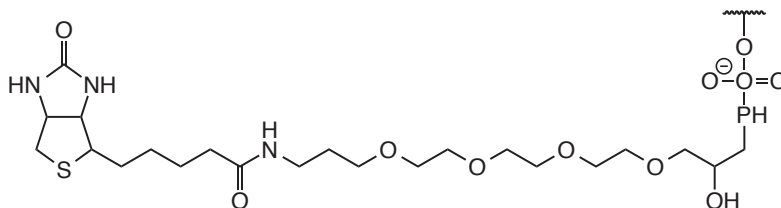


Figure 22. 3'-Biotin TEG

3-2 miRNA プローブの配列

各 miR-145 プローブを固相ホスホロアミダイト法に従い合成した。合成した RNA の配列を Table6 および 7 に示した。各 RNA の構造は MALDI-TOF/MS より確認した。

Table6. 合成した miR-145 ガイド鎖

RNA	Sequence	calculated	observed
RNA 18	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GAA UCC CU-3'	7220.30	7220.30
RNA 19	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7789.91	7789.75
RNA 20	5'- 2 UC CAG UUU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7854.94	7855.91
RNA 21	5'- G2 C CAG UUU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7893.98	7892.14
RNA 22	5'-GU 2 CAG UUU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7894.97	7894.33
RNA 23	5'-GUC 2 AG UUU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7894.97	7894.82
RNA 24	5'-GUC C A G UUU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7870.94	7870.13
RNA 25	5'-GUC CA 2 UUU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7854.94	7854.48
RNA 26	5'-GUC CAG 2 UU UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7893.98	7893.19
RNA 27	5'-GUC CAG U 2 U UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7893.98	7895.33
RNA 28	5'-GUC CAG UU 2 UCC CAG GAA UCC CU- B -3'	7893.98	7893.70
RNA 29	5'-GUC CAG UUU 2 CC CAG GAA UCC CU- B -3'	7893.98	7895.31
RNA 30	5'-GUC CAG UUU U 2 C CAG GAA UCC CU- B -3'	7894.97	7893.84
RNA 31	5'-GUC CAG UUU UC 2 CAG GAA UCC CU- B -3'	7894.97	7895.40
RNA 32	5'-GUC CAG UUU UCC 2 AG GAA UCC CU- B -3'	7894.97	7894.11
RNA 33	5'-GUC CAG UUU UCC C 2 G GAA UCC CU- B -3'	7870.94	7871.07
RNA 34	5'-GUC CAG UUU UCC CA 2 GAA UCC CU- B -3'	7854.94	7854.60
RNA 35	5'-GUC CAG UUU UCC CAG 2 AA UCC CU- B -3'	7854.94	7856.63
RNA 36	5'-GUC CAG UUU UCC CAG G 2 A UCC CU- B -3'	7870.94	7876.67
RNA 37	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GA 2 UCC CU- B -3'	7870.94	7871.08
RNA 38	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GAA 2 CC CU- B -3'	7893.98	7894.25
RNA 39	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GAA U 2 C CU- B -3'	7894.97	7896.05
RNA 40	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GAA UC 2 CU- B -3'	7894.97	7895.08
RNA 41	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GAA UCC 2 U- B -3'	7894.97	7894.37
RNA 42	5'-GUC CAG UUU UCC CAG GAA UCC C 2 - B -3'	7893.98	7894.16

Table7. 合成した miR-145 パッセンジャー鎖

RNA	Sequence	calculated	observed
RNA 43	5'-GGA UUC CUG GAA AUU CUG UUC U-3'	6989.15	6979.82

合成した miR145 のパッセンジャー鎖 (RNA42) と各ガイド鎖 (RNA18-42) を組み合わせて 25 種類の二本鎖 miR-145 を調整した。

Table 8. 調整した miR-145 プローブ

miRNA ^a	ガイド鎖	パッセンジャー鎖
miR-145	RNA 18	RNA 43
miR-145-B	RNA 19	RNA 43
miR-145-G1	RNA 20	RNA 43
miR-145-G2	RNA 21	RNA 43
miR-145-G3	RNA 22	RNA 43
miR-145-G4	RNA 23	RNA 43
miR-145-G5	RNA 24	RNA 43
miR-145-G6	RNA 25	RNA 43
miR-145-G7	RNA 26	RNA 43
miR-145-G8	RNA 27	RNA 43
miR-145-G9	RNA 28	RNA 43
miR-145-G10	RNA 29	RNA 43
miR-145-G11	RNA 30	RNA 43
miR-145-G12	RNA 31	RNA 43
miR-145-G13	RNA 32	RNA 43
miR-145-G14	RNA 33	RNA 43
miR-145-G15	RNA 34	RNA 43
miR-145-G16	RNA 35	RNA 43
miR-145-G17	RNA 36	RNA 43
miR-145-G18	RNA 37	RNA 43
miR-145-G19	RNA 38	RNA 43
miR-145-G20	RNA 39	RNA 43
miR-145-G21	RNA 40	RNA 43

miR-145-G22	RNA 41	RNA 43
miR-145-G23	RNA 42	RNA 43

^a3'-末端にビオチンを導入した miR-145 を miR-145-B と、ビオチン及びアナログを導入した miR-145 はアナログの導入位置 (N) を miR-145-GN と示している。

3-3-1 アナログ 2 を導入した miRNA プローブによる遺伝子発現抑制能

調整した 25 種類の miR-145 による標的遺伝子 *FSCN1* の発現抑制能をウェスタンブロッティングにて評価した (Figure 23)。大腸癌細胞 DLD-1 を 6well で 24 時間培養後、各 miR-145 プローブを最終濃度 40 nM でトランスフェクションした。更に 48 時間培養後、総タンパク質を抽出し、*FSCN1* の発現量を比較することで、各 miR-145 プローブの遺伝子抑制能を評価した。

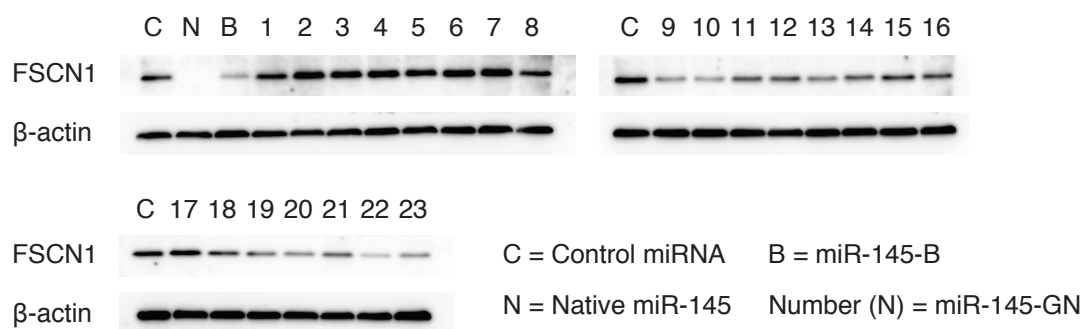


Figure 23. miR-145 プローブの遺伝子発現抑制評価

天然型の miR-145 と比較してビオチンを導入した miR-145-B では、遺伝子発現抑制能が低下することが確認された。この結果は、Wilson らによって報告された 3'-末端へのビオチン修飾が miRNA の RISC 形成を妨げるという知見と一致する⁴⁷。また、2 を 5'-末端の 1-8 番目の位置に導入した場合では、遺伝子発現抑制がほとんど確認されなかった。miRNA は細胞へ導入後、5'-末端の水酸基がリン酸化酵素によってリン酸化を受ける。X 線結晶構造解析より、5'-末端のリン酸基は Argonaute の MID ドメインと強く相互作用しており、RISC の形成に必要であることが報告されている⁴⁸。従って、1 番目への 2 の導入は 5'-末端の水酸基へのリン酸化を阻害し、RISC 形成を妨げることが示唆された。また、シード領域を含む 2-8 番目は、miRNA において標的塩基対を形成しやすい領域である。実際、データー

ベースから予想される *FSCN1* mRNA と miR-145 の二次構造からも、この領域への水素結合が確認された (Table 9)。**2** は塩基対の形成能力を持たないため、この領域への導入は、miR-145 の標的への結合を妨げることが示唆された。15-17 番目への **2** の導入も miR-145 の遺伝子発現抑制能を大きく低下させているが、これも同様に標的との水素結合を妨げているためだと考えられる。しかしながら、その他の領域に **2** を導入した場合では、miR-145-B と同程度の遺伝子発現抑制が確認でき、**2** の導入による影響は少ないと考えられた。

Table 9. *FSCN1* mRNA と miR-145 の推定結合様式

Position of <i>FSCN1</i> 3'UTR	Predicted consequential pairing
Position of 116-123 <i>FSCN1</i> 3'UTR hsa-miR-145	5' -CCCCCUUGCCUUUCA- AACUGGAA- 3' UCCCUAAGGACCCUUUUGACCUG
Position of 377-384 <i>FSCN1</i> 3'UTR hsa-miR-145	5' -CUGGGCGUGUAGUGUAAACUGGAA- 3' UCCCUAAGGACCCUUUUGACCUG
Position of 729-735 <i>FSCN1</i> 3'UTR hsa-miR-145	5' -UUUCACCCUAGCCUGACUGGAA- 3' UCCCUAAGGACCCUUUUGACCUG
Position of 1140-1247 <i>FSCN1</i> 3'UTR hsa-miR-145	5' -AUGAUAGUAGCUUCAAACUGGAA- 3' UCCCUAAGGACCCUUUUGACCUG

TargetScanHuman (<http://www.targetscan.org>)

3-3-2 miR-145-G9 による標的遺伝子抑制能

これまでに述べてきた実験より、アナログ **2** を導入する位置として、シード領域に隣接する 9 番目の塩基が最も適切と考えられた。そこで、この位置にアナログ **2** を導入した miR-145-G9 を用いて luciferase assay を行い、同様に標的遺伝子の抑制能を評価した。評価法には Dual-luciferase reporter assay を用い、発光タンパク質である Firefly luciferase の下流に *FSCN1* mRNA の 3'UTR を挿入したベクターを調整し、miR-145-G9 と同時に細胞へ導入した。24 時間後の Firefly と *Renilla* luciferase に由来する発光量を測定し、miRNA による Firefly luciferase の発現抑制効果を評価した。ランダム配列の miRNA をした場合の発光量をコントロールとして 100 %とした (Figure 24)。

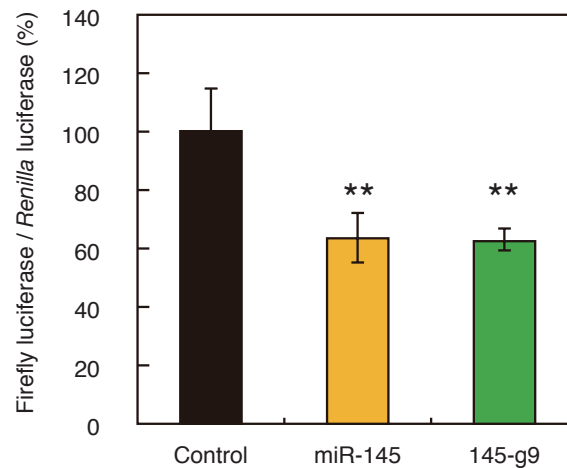


Figure 24. miR-145-G9 による標的遺伝子抑制能

アナログ **2** およびビオチンを導入した miR-145-G9 でも、天然型と同様に firefly luciferase の遺伝子発現抑制が確認されたことから、miR-145-G9 は細胞内で RISC を介し、標的 mRNA に直接結合することでその発現を抑制していることが示された。

3-4 アナログ 2 を導入した miR-145 プローブによる標的遺伝子の捕獲

アナログ 2 およびビオチンを導入した miR-145-G9 が細胞内で RISC を形成し、*FSCN1* に結合することでその発現を抑制していることが確認できたので、実際に本プローブを用いて、*FSCN1* mRNA の捕獲を試みた。大腸癌細胞 DLD-1 を 6 well で 24 時間培養後、miR-145-G9 を最終濃度 40 nM でトランスフェクションした。更に 24 時間後、UV (365 nm 20 分、302 nm 10 秒) を照射し総 RNA を抽出した。miR-145-G9 によってビオチン標識された標的 mRNA を、ストレプトアビジンでコーティングしたマグネットビーズで精製し、再び総 RNA として抽出した。マグネットビーズによる精製前後の総 RNA 中に含まれる *FSCN1* mRNA 量をリアルタイム PCR により定量し、miR-145-G9 による標的遺伝子の捕獲能を検証した (Figure 25)。

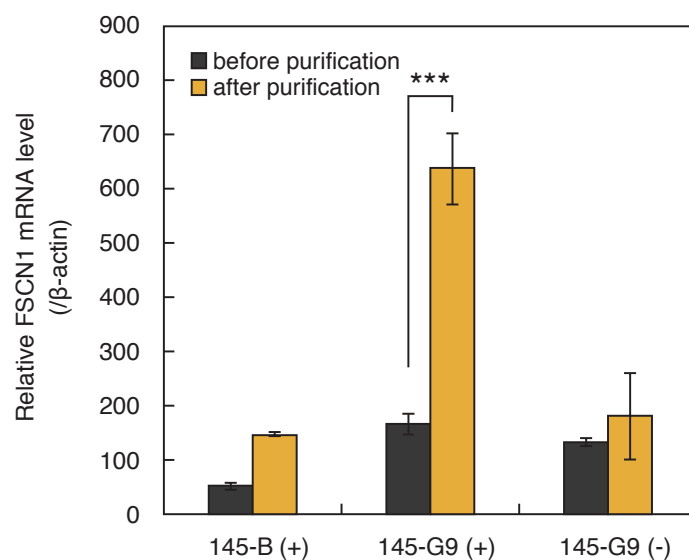


Figure 25. ビーズ精製前後の *FSCN1* mRNA 量

コントロールとして、アナログ 2 を導入していない系 (miR-145-B(+))と UV を照射していない系 (145-G9 (-)) も併せて行った。その結果、アナログ 2 を導入し、UV を照射した 145-G9 (+) でのみ、ビーズの精製後に *FSCN1* mRNA レベルが大きく上昇した。この結果から、アナログ 2 及びビオチンを導入した miR-145-G9 は、UV 照射により標的遺伝子である *FSCN1* mRNA に光架橋を形成したことが確認された。

また、その他の標的遺伝子として、miR-145 は *c-MYC* mRNA に結合し、その発現を抑制することが知られているが⁴⁹、DLD-1 細胞において miR-145 による *c-MYC* の発現抑制は確認できなかった (Figure 26) 。したがって、DLD-1 細胞では miR-145 は *c-MYC* を標的としない可能性が示唆された。

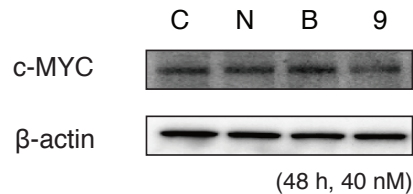


Figure 26. miR-145 プローブによる *c-MYC* の発現抑制能

そこで DLD-1 細胞よりも *c-MYC* の発現量が多い COLO-201、SW480 細胞で miR-145 による *c-MYC* の発現抑制を確認した (Figure 27) 。

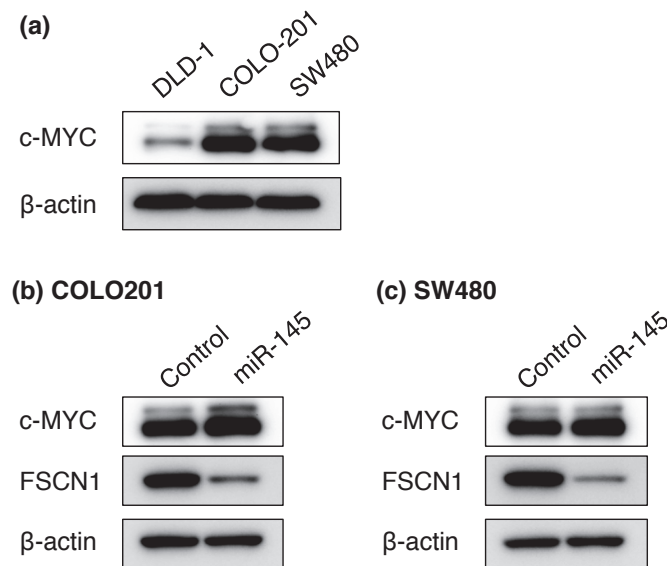


Figure 27. (a) DLD-1, COLO-201, SW480 細胞における *c-MYC* の発現量 (b) COLO-201 細胞中での miR-145 による *c-MYC* の発現抑制評価 (c) SW480 細胞中での miR-145 による *c-MYC* の発現抑制評価

DLD-1 細胞での実験結果と同様に、*FSCN1* の発現量は低下しているが *c-MYC* の発現量に変化は見られなかった。従って、先行文献の結果とは異なるが、少なくとも今回我々が化

学合成した miR-145 は *c-MYC* を標的としていないことが明らかとなった。

そこで、同様にマグネットビーズ精製前後の総 RNA 中に含まれる *c-MYC* mRNA 量をリアルタイム PCR にて定量した (Figure 28)。その結果、マグネットビーズによる精製前後で *c-MYC* mRNA 量に変化はなく、miR-145-G9 に光架橋は形成されていないことが示された。従って、本 miRNA プローブは標的 mRNA のみを選択的に標識していることが確認された。

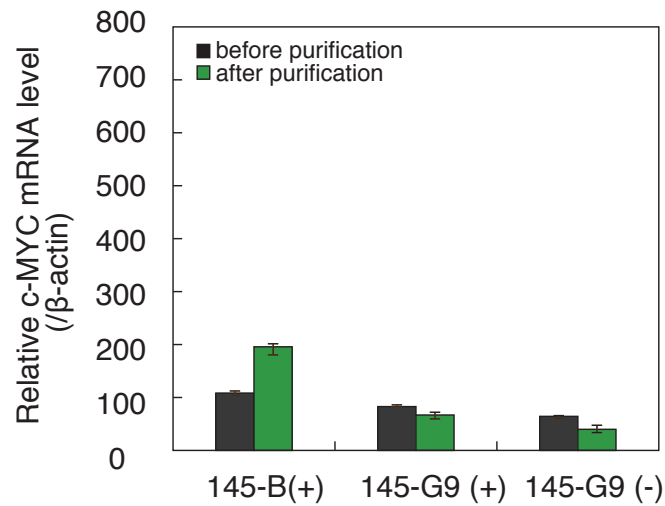


Figure 28. ビーズ精製前後の *c-MYC* mRNA 量

4章 光反応性残基及びエチニル基を導入した新規RNAプローブの合成とそのRNA捕獲能

以上述べて来た様に、新規光反応性ヌクレオシドアナログ**2**及びビオチンを導入したmiRNAプローブを合成し、その標的mRNAを標識化することに成功した。しかしながら、3'-末端へのビオチン導入はmiRNAのRISCの形成を妨げ、標的mRNAへの結合を低下させることが確認された。そこで、より高活性なmiRNAプローブの合成を目指し、新たにヌクレオシドアナログ**25**を設計した (Figure 29)。

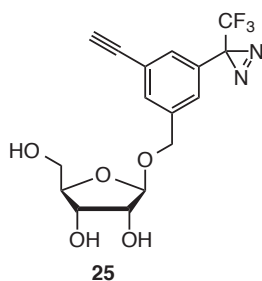


Figure 29. ヌクレオシドアナログ**25**の構造

アナログ**25**は従来型のアナログ**2**に加えて、新たにエチニル基をベンゼン部位に付加した構造を有している。導入したエチニル基は、環化付加反応によりアジドと選択的に反応させることが可能であり、このことから、光クロスリンク反応による標的mRNAの捕獲後に、プローブにビオチン分子を導入することが可能となる。従って、アナログ**25**を用いることでRISCの形成を阻害することなく、標的mRNAの標識及び捕獲が可能になると考えた (Figure 30)。本項では、アナログ**25**を導入したRNAプローブを合成し、そのRNA捕獲能を検証するとともに、標的mRNAの発現抑制能を評価した。

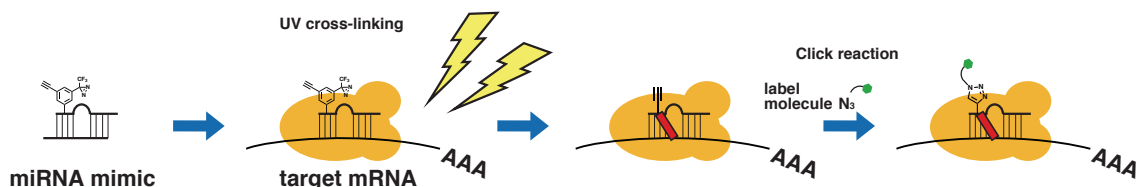
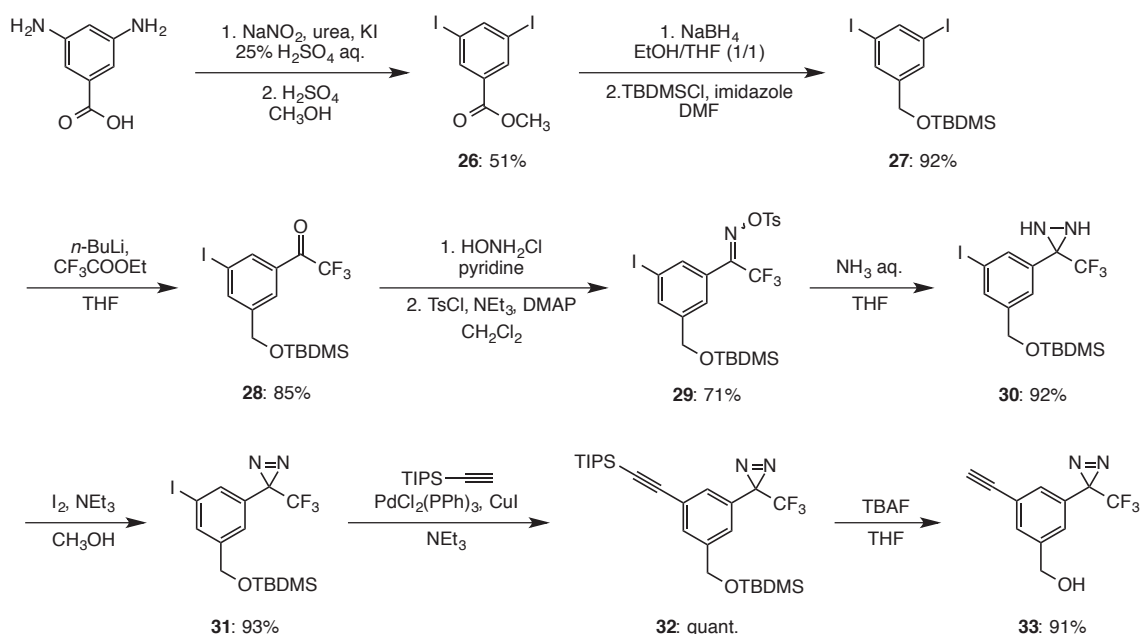


Figure 30. 新規光反応性miRNAプローブによる標的mRNAの捕獲と標識

4-1 ベンゼン環にジアジリニル基及びエチニル基を有するアルコール誘導体の合成

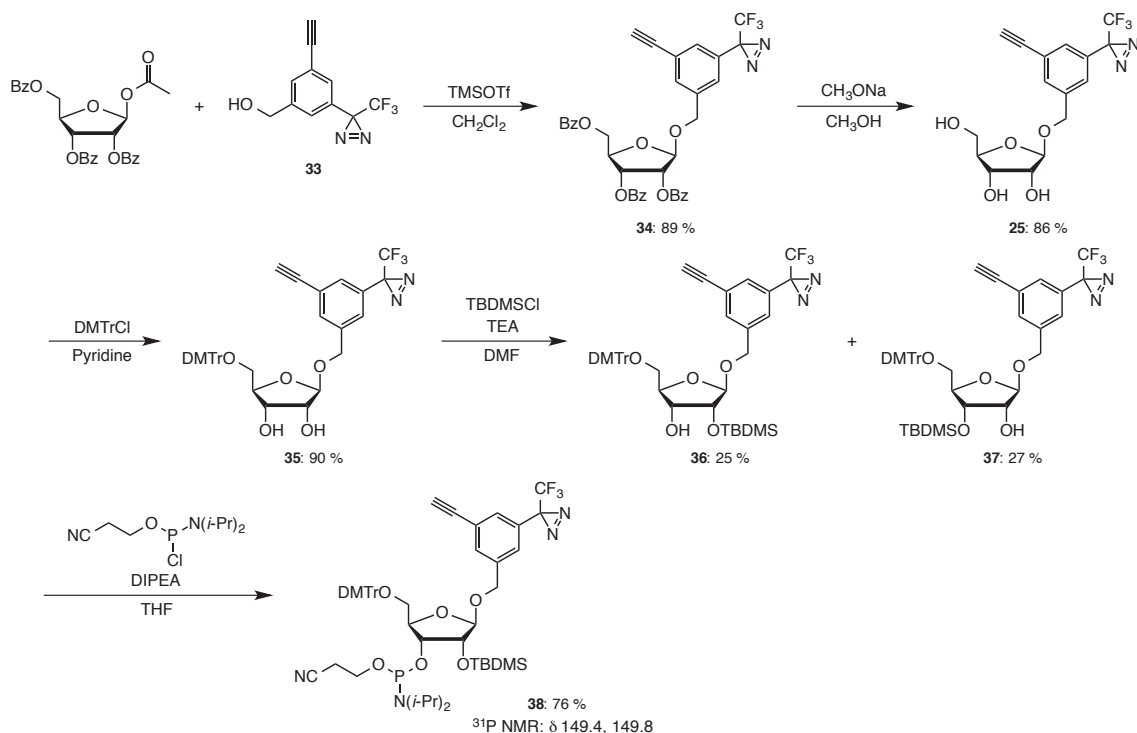
アナログ**25**は、化合物**1**および**2**と同様にアルコール誘導体と β -D-リボフラノースをグリコシル化することで得られると考えた。また、アルコール誘導体は、報告されている手順を参考に合成した (Scheme 8)⁵⁰。3,5-diaminobenzoic acidを出発原料としてアミノ基をsandmeyer反応でヨウ素体に変換した後、生成物をCH₃OHに溶解し、酸性条件でメチルエステルへと変換することで化合物**26**を収率51%で得た。更に、NaBH₄を用いてエステルをアルコールへと変換し、得られたアルコール体をTBDMSClと反応させ、水酸基をTBDMS基で保護化合物**27**を収率92%で得た。続いて化合物**27**をTHFに溶解し、-78 °C条件下、1等量の*n*-BuLiで処理することにより一方のヨウ素をリチオ化した後、トリフルオロ酢酸エチルを添加することで化合物**28**を収率85%で得た。化合物**28**にヒドロキシアミン塩酸塩を作用させ、オキシム体とした後に、水酸基をトシル化し化合物**29**を収率71%で得た。続いて、トシル体**29**を2日間アンモニア水と反応させて化合物**30**を収率92%で合成した。得られたジアジリジン誘導体**30**をI₂で酸化して化合物**31**を収率93%で得た。化合物**31**とTIPS-アセチレンを菌頭カップリングで連結し、化合物**32**を定量的に合成し、各シリル基を2等量のTBAF処理で脱保護することで目的のアルコール誘導体**33**を収率91%で合成した。



Scheme 8.ジアジリニル基及びエチニル基を有するアルコール誘導体の合成

4-2 ヌクレオシドアナログ25及びそのアミダイト体の合成

化合物**12**の合成と同様の手法により、アナログ**25**のアミダイト体を合成した。化合物**33**と1-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranoseを先と同様の条件下でグリコシル化し、化合物**34**を収率89%で合成した。¹H NMRによる解析をおこなったところ、5.31ppm付近に、1'-位のHに帰属されるシングレットのピークが観察されたため、生成物を β -体と決定した。更に、化合物**34**に触媒量のCH₃ONaを用いて脱ベンゾイル化することで、ヌクレオシドアナログ**25**を収率86%で合成した。続いて化合物**2**にDMTrClを1当量反応させ、5'-位の1級水酸基を選択的にDMTr基により保護した化合物**35**を収率90%で得た。化合物**35**をTBDMSClにて処理した後、得られた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、単離した2つの化合物をそれぞれ¹H NMR及び¹H-¹H COSYを用いて解析を行ったところ、2'-TBDMS体である化合物**36**及び3'-TBDMS体である化合物**37**をそれぞれ収率25%、27%にて得られたことが分かった。最後に、2'-TBDMS体**36**を常法により亜リン酸化し、ヌクレオシドアナログ**25**のアミダイト体である化合物**38**を収率76%で合成した(Scheme 9)。



Scheme 9. ヌクレオシドアナログ25及びそのアミダイト体の合成

4-3 アナログ25を導入したRNAプローブの合成

合成したヌクレオシドアナログ**25**のアミダイト体を用いて、核酸自動合成機にてオリゴヌクレオチドを合成した (Table 10)。配列は天然のmiRNAである*let-7*を模しており、5'-末端の8番目にアナログ**25**を導入した (RNA 44)。また、RNA捕獲能検証のため、5'-末端をFITCで標識した標的鎖も同様に合成した。配列は*let-7*の相補鎖であり、アナログの相補部分を変えた4種類のRNAを合成した (RNA 45-48)。合成した各オリゴヌクレオチドの構造は、MALDI-TOF/MSにより確認した。

Table 10. 各オリゴヌクレオチドの配列

RNA	aSequence	calculated	observed
RNA 44	5'-UGA GGU AXU AGG UUG-3'	4963.99	4962.79
RNA 45	5'- F -CAACCU AAU ACC UCA-3'	5178.79	5178.80
RNA 46	5'- F -CAACCU AGU ACC UCA-3'	5194.28	5193.99
RNA 47	5'- F -CAACCU ACU ACC UCA-3'	5154.25	5154.83
RNA 48	5'- F -CAACCU AUU ACC UCA-3'	5155.24	5154.96

^a**X** = アナログ**25** **F** = FITC

4-4 RNAプローブのRNA捕獲能

アナログ**25**を導入したRNAプローブによるRNA捕獲能を検証した。RNAプローブと相補鎖RNAを1:1の割合で混合し、アニーリング処理により二本鎖を形成させた後に、UV (365 nm 30分、302 nm 10分) を氷浴上で照射した。7Mウレア溶液を加えて反応を停止させ、得られた混合液を20% 変性PAGEにて分析した (Figure 31)。

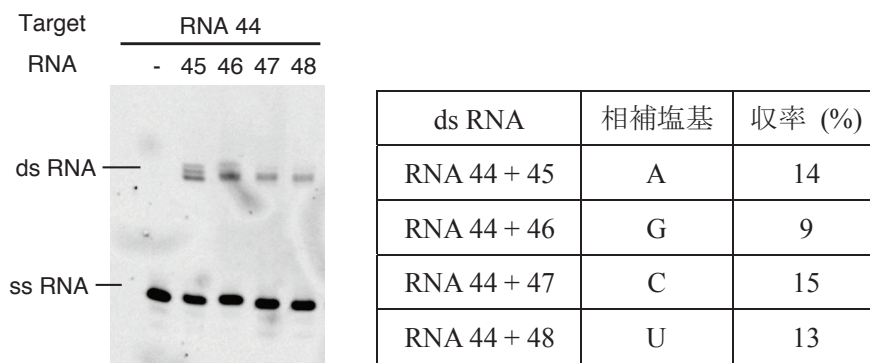


Figure 31. 25を導入したRNAプローブのRNA捕獲能

その結果、全ての組み合わせで高分子量領域に新たなバンドが観察され、RNAプローブと相補鎖RNAのクロスリンク反応の進行を確認した。また、全ての組み合わせでクロスリンク反応が進行したことから、アナログ**25**を導入したRNAプローブによる相補鎖RNAの捕獲は、相補塩基の種類に依存しないことが確認された。

4-5 アナログ**25**を導入したmiRNAプローブによる遺伝子発現抑制能の検証

25を導入したRNAプローブが相補塩基の種類に関わらず相補鎖RNAを捕獲可能であることが確認されたため、**25**を導入したmiR-145プローブを合成し、標的遺伝子である*FSCN1*の発現抑制効果をウェスタンブロッティングで評価した。また、**25**の導入位置はこれまでの実験に倣い5'-末端から9番目の塩基とし、miR-145-G9の*FSCN1*発現抑制能と比較した。

4-5-1 miRNAプローブの合成

ガイド鎖の9番目に**25**を導入したmiR-145プローブを固相ホスホロアミダイト法に従い合成した。RNAの構造はMALDI-TOF/MSより確認した。

Table 11. 合成したmiR-145ガイド鎖

RNA	Sequence ^a	calculated	observed
RNA 49	5'-GUC CAG UUX ^a UCC CAG GAA UCC CU-3'	7350.41	7349.52

^aX = アナログ**25**

ガイド鎖の9番目にアナログ**25**を導入したRNA43とパッセンジャー鎖を組み合わせ、二本鎖miRNAであるmiR-145-X9を調整した。

Table 12. 調整したmiR-145プローブ

miRNA	ガイド鎖	パッセンジャー鎖
miR-145-X9	RNA 49	RNA 43

4-5-2 アナログ25を導入したmiRNAプローブによる遺伝子発現抑制能

調整したmiR-145-X9による標的遺伝子*FSCN1*の抑制能をウェスタンブロッティングにて評価した (Figure 32)。大腸癌細胞DLD-1を6wellで24時間培養後、miR-145プローブを最終濃度20-40 nMでトランスフェクションした。更に48時間培養後、総タンパク質を抽出し、*FSCN1*の発現量を比較することでmiR-145プローブの遺伝子発現抑制能を評価した。また、比較対象として天然型のmiR-145、3'-末端にビオチンを導入したmiR-145-B、ビオチン及び9番目にアナログ25を導入したmiR-145-G9も合わせて実験し、遺伝子発現抑制能を比較した。

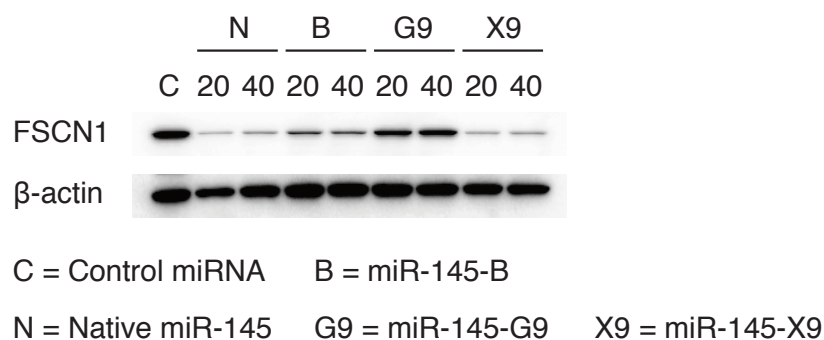


Figure 32. miR-145-プローブによるFSCN1の発現抑制能

これまでの実験同様、天然型のmiR-145と比較してビオチンを導入したmiR-145-BやmiR-145-G9では、遺伝子発現抑制能が低下することが確認された。しかしながら、9番目に25のみを導入したmiR-145-X9は、天然型のmiR-145と同等の遺伝子発現抑制能を示すことが明らかになった。従って、25を導入したmiRNAプローブを用いることで、より効率的な標的mRNAの標識化が期待できる。

5 章 cRGD コンジュゲートの合成とその遺伝子発現抑制能

5-1 miRNA 医薬品の開発

序論で述べた様に、miRNA は様々な疾病に関与しており、特にがん細胞で発現が低下している miRNA は低分子医薬品になる新たな抗がん剤として期待されている。例えば、肝細胞癌において発現量が低下している miR-26a は、がん細胞にアポトーシスを誘導し、その増殖を抑えることが知られている⁵¹⁻⁵²。miR-34a も同様に肝細胞癌の生育阻害を示し、動物モデルでも腫瘍の減少を引き起こすと共に、生存率を大幅に上昇させることが報告されている⁵³。しかしながら、現在臨床研究まで進んでいる miRNA 医薬品は、上述した miR-34a を含む二品目だけであり、その他核酸医薬品と比較して、その開発が大きく遅れている状況にある。内因性の miRNA を医薬品へと応用する為には、以下に挙げる課題を解決する必要がある。

1) 医薬品候補となる miRNA の探索

外因性の siRNA やアンチセンス DNA とは異なり、内因性の miRNA を用いる場合は、医薬品候補となる miRNA を選抜しなければならない。その為には、対象の疾病、例えばがん細胞中で発現量が低下している miRNA を対象に、それらの標的 mRNA を同定し、がん細胞内での働きを明らかにする必要がある。しかしながら、miRNA と標的 mRNA の結合パターンはミスマッチ塩基対を含むことから非常に多様であり、その解析には多くの時間と費用を必要とする。

2) ドラッグデリバリーシステムの開発

核酸医薬品の開発に共通する課題として、核酸のリン酸ジエステル由来の負電荷により、細胞膜透過性が低い問題点があり、これを解決するドラッグデリバリーシステムの開発が必要である。

上述した 2 課題のうち 1) については、これまでの研究で光反応性 miRNA プローブによる標的 mRNA の解析法を開発しており、本手法を用いることで miRNA の機能解析を迅速に行うことが可能となった。そこで本章では、miRNA の医薬品への応用を想定し、新たなドラッグデリバリーシステムの開発を目的とした。

5-2 核酸医薬品のデリバリー

核酸医薬品のデリバリー方法は大きく分けて、1) 脂質ナノ粒子 (Lipid Nano Particle: LNP) をキャリアとする LNP 法と、2) 細胞膜上の受容体に認識されるリガンド分子を核酸に結合させるリガンドコンジュゲート法が存在する (Figure 33)⁵⁴。

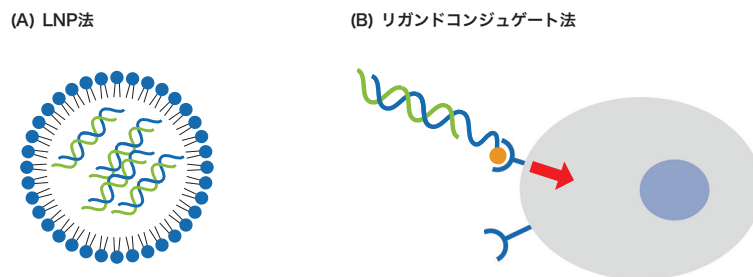


Figure 33. (A) LNP 法と (B) リガンドコンジュゲート法の構造

5-2-1 LNP 法

LNP 法は現在最も広く用いられている核酸のデリバリー方法である⁵⁵⁻⁵⁸。LNP 法では負電荷の核酸がカチオン性の脂質とナノ粒子を形成し、エンドサイトーシスにより効率良く細胞内へ導入される。単純な LNP は培養細胞系では効果的であるものの、*in vivo* で用いるには適さない。カチオン性脂質は血中のタンパク質と強く相互作用し、その結果、細網内皮系のファゴサイトーシスによって速やかに血中から排出されてしまう為である。従って、*in vivo* で用いられる LNP は一般的に、血中のタンパク質との相互作用を避ける為に中性の PEG 分子でコーティングされている。また、一般的な LNP は粒子系が 100-200 nm と比較的サイズの大きな複合体である為、*in vivo* でデリバリー可能な組織は血管透過性の高い肝臓、脾臓及び一部の腫瘍に制限される。加えて、製剤化する際に包摂する siRNA の量、粒子の均一化などが課題となっている。

5-2-2 リガンドコンジュゲート法

近年、新たなドラッグデリバリーシステムとして、核酸へのリガンドコンジュゲート法が注目を集めている⁵⁹⁻⁶²。リガンドコンジュゲート法は LNP 法とは異なり、非常に分子サイズが小さくタンパク質への非特異的な吸着を起こしにくい為、ファゴサイトーシスによる排出を避けられる他、LNP 法と比較して毒性が極めて低いと考えられている。また、分

子サイズが小さいので血管透過性にも優れており、多様な組織へのデリバリーが可能であると予想される。さらに、リガンドとオリゴヌクレオチドから成るシンプルな構造であるため、構造解析が容易であり、製剤の均一化に優れている。一方で、LNP 法と比較すると核酸の細胞内への導入効率が低いという問題点も存在する。また、LNP 法と異なり、核酸が剥き出しで存在する為、ヌクレアーゼによる分解を受けやすい。

5-2-3 miRNA 医薬品の腫瘍へのデリバリー方法

アンチセンス DNA や、siRNA ではリガンドコンジュゲート法が盛んに研究、報告されているが、miRNA では未だ、リガンドコンジュゲート法によるデリバリーの報告例はない。これは、標的特異性の高いアンチセンス DNA や siRNA と比較して、複数の標的 mRNA を制御する miRNA は投与量が多くなる傾向にあり、導入効率の低いリガンドコンジュゲート法との相性が悪い為である。一方で、送達組織を選ばないリガンドコンジュゲート法は腫瘍へのデリバリーに有効である為、より導入効率の高い miRNA-リガンドコンジュゲートシステムの開発が求められている。

5-2-4 Cyclic RGD ペプチド

cyclic RGD (cRGD) は RGD 配列を含む 5 残基の環状ペプチドであり (Figure 34)、細胞表面の受容体である $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに選択的に結合することが知られている⁶³。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは血管新生中の内皮細胞や、多くのがん細胞で高発現している為、cRGD はがん治療におけるデリバリー分子として広く用いられている⁶⁴。アンチセンス DNA や siRNA への cRGD 修飾例も既に報告されており⁶⁵⁻⁶⁶、cRGD を複数搭載した siRNA は、LNP フリーで遺伝子発現抑制能を示すことも明らかになっている⁶⁷。

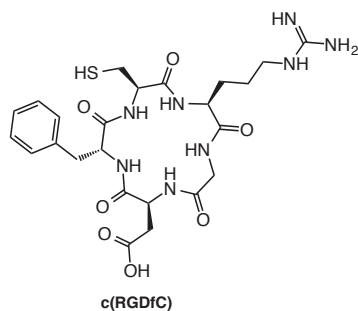


Figure 34. cRGD の構造

また、cRGD は単量体よりも二量体、三量体がより受容体に対する親和性が高いことが多くの研究で明らかになっているが、これは cRGD の局所濃度の上昇と多価効果によるものと考えられている⁶⁹。多価効果とは、複数のリガンドが同時に複数の受容体に結合することで結合力が飛躍的に上昇する現象であり、多価効果を発現させる為にはリガンド間のリンカー長が一定以上の長さである必要がある。

5-3 本研究の目的

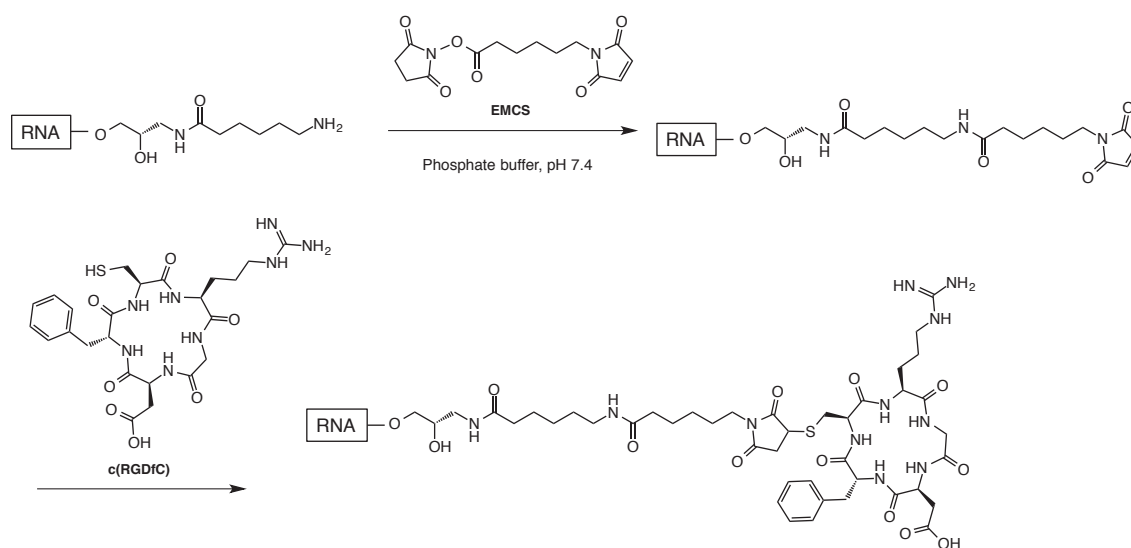
以上の様な背景から、本研究では miRNA に適用可能な、細胞内導入効率の高い cRGD コンジュゲートの開発を目的とした。搭載する cRGD は多価効果による結合力の上昇を狙い、スペーサー長を変えて構造活性相関を行うことを計画した。これにより導入効率の高い cRGD コンジュゲートの構造を探索する。今回、cRGD をコンジュゲートする配列には miRNA ではなく siRNA を採用した。siRNA は人為的に設計した外因性の二本鎖 RNA であり、miRNA よりも低容量で遺伝子発現抑制効果を示す為、cRGD コンジュゲートの構造活性相関を行う上で最適であると考えた。

また、リガンドコンジュゲート法では核酸分子がヌクレアーゼによる分解を受けやすい為、化学修飾を行うことで、ヌクレアーゼ耐性 miRNA 配列を探索する。

最終的には、活性相関により最適化された cRGD 構造とヌクレアーゼ耐性 miRNA を用いて cRGD-miRNA コンジュゲートの合成を行い、miRNA 医薬品への応用を目指す。

5-4 cRGD-siRNA コンジュゲートの設計

cRGD の siRNA への導入には *post-synthetic modification* 法を採用した。即ち、反応性の高いアミノ基で修飾した RNA を核酸自動合成機で合成した後、*N*-ε-maleimidocaproyl-oxysuccinimide ester (EMCS) との縮合反応で RNA にマレイミド基を導入する。続けて、cRGD のチオール基のマレイミド基へのマイケル付加反応により、RNA に cRGD を導入することを計画した (Scheme 10)。



Scheme 10. cRGD ペプチドの RNA への導入

また、RNA にアミノ基を導入する為に、新たにアミノ修飾アミダイトを設計した (Figure 35A)。加えて、cRGD のリンカー長を調節するためのスペーサーアミダイトも同時に設計した (Figure 35B)。アミノ修飾アミダイトとスペーサーアミダイトを組み合わせることで、複数の cRGD を搭載し、リンカー長を調節した cRGD コンジュゲートの合成が可能になると考えた。

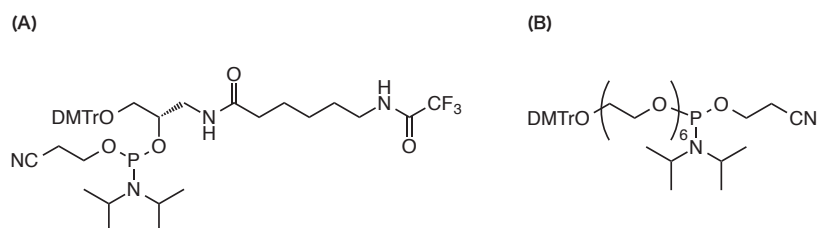
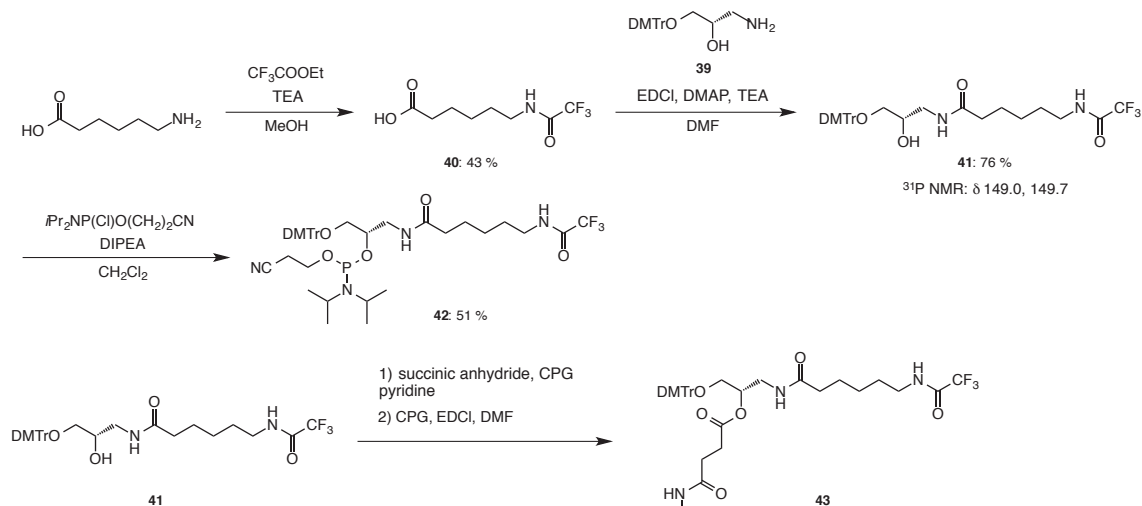


Figure 35. (A) アミノ修飾アミダイトの構造 (B) スペーサーアミダイトの構造

5-5 アミノ修飾アミダイト及び固相担体の合成

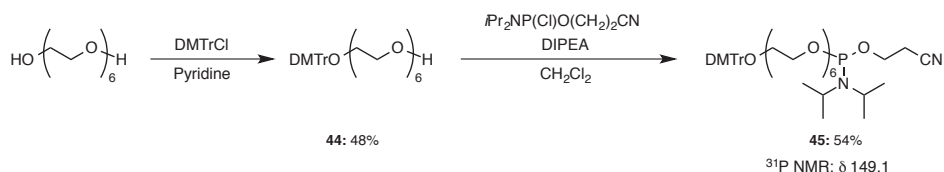
6-aminoheptanoic acid を出発原料とし、アミノ基をトリフルオロ酢酸エチルで処理することにより、トリフルオロアセチル基で保護した。化合物 **40** を収率 43% で得た。続けて、化合物 **40** を (*S*)-3-amino-1-*O*-(4,4'-dimethoxy)trytilyl-2-propandiol (**39**)⁶⁹ との縮合反応に供し、化合物 **41** を収率 76% で得た。最後に化合物 **41** を情報に従い亜リン酸化することで目的のアミダイト体 **42** を収率 42% で合成した。また、化合物 **41** を無水コハク酸と反応させてスクシニル体とした後、アミノ基を有する CPG (controlled pore glass) 樹脂と脱水縮合することにより、固相担体 **43** を導入率 35.8 $\mu\text{mol/g}$ で得た (Scheme 11)。



Scheme 11. アミノ修飾アミダイト及び固相担体の合成

5-6 スペーサーアミダイトの合成

hexaethylene glycol を出発原料とし、0.5 等量の DMTrCl を反応させて、1 方の水酸基のみを DMTr 基で保護した化合物 **44** を収率 48% で得た。更に、もう一方の水酸基を常法に従い亜リン酸化することで、目的のアミダイト体 **45** を収率 54% で得た (Scheme 12)。



Scheme 12. スペーサーアミダイトの合成

5-7 アミノ修飾 RNA の合成

アミノ修飾アミダイト、固相担体及びスペーサーアミダイトを用いて、核酸自動合成機にてアミノ修飾 RNA を合成した。配列はゲノム修復に関与する *RecQL1* mRNA を標的とした siRNA であり、既に 2'-*O*-methyl 修飾によりヌクレアーゼ耐性を獲得している (Figure 36)。アミノ基及びスペーサーは標的とは結合しないパッセンジャー鎖の 3'末端に導入した。また、標的 mRNA に結合するガイド鎖 RNA 57,58 も核酸自動合成機を用いて合成した。合成した各 RNA の構造は、MALDI-TOF/MS により確認した (Table13)。

Table 13. cRGD-RNA コンジュゲートの配列

RNA	Sequence	calculated	observed
RNA 50	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT-3'	6693.19	6693.04
RNA 51	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT XXX -3'	7491.88	7490.30
RNA 52	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT sXXX -3'	7836.18	7835.73
RNA 53	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT sXsXsX -3'	8524.78	8522.44
RNA 57	5'-AAG CUG AAG UGG uCu GAA cTT-3'	6785.18	6784.57
RNA 58	5'-F-AAG CUG AAG UGG uCu GAA cTT-3'	7313.64	7314.83

u, c = 2'-OMe RNA, F = Fluorescein, s = hexaethylene glycol, X = amine

続けて、アミノ基を導入した RNA 51-53 に cRGD を導入し、3 種の cRGD-RNA コンジュゲートを新たに合成した。cRGD を導入した RNA54-56 の構造は、MALDI-TOF/MS により確認した (Table 14)。

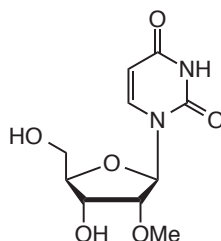
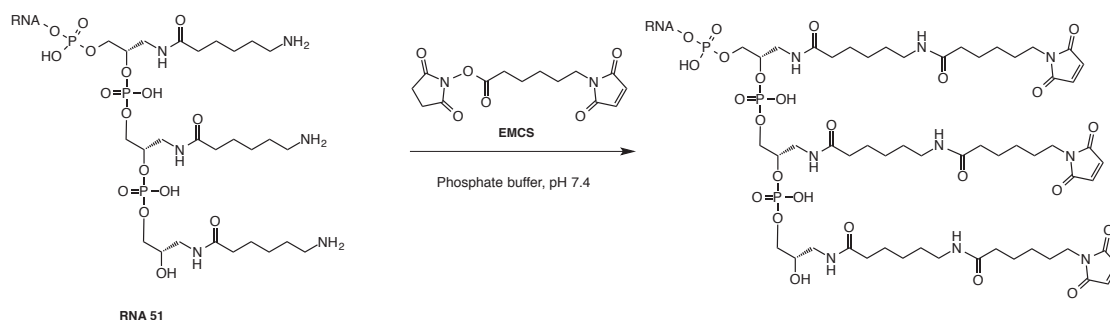


Figure 36. 2'-OMe RNA の構造

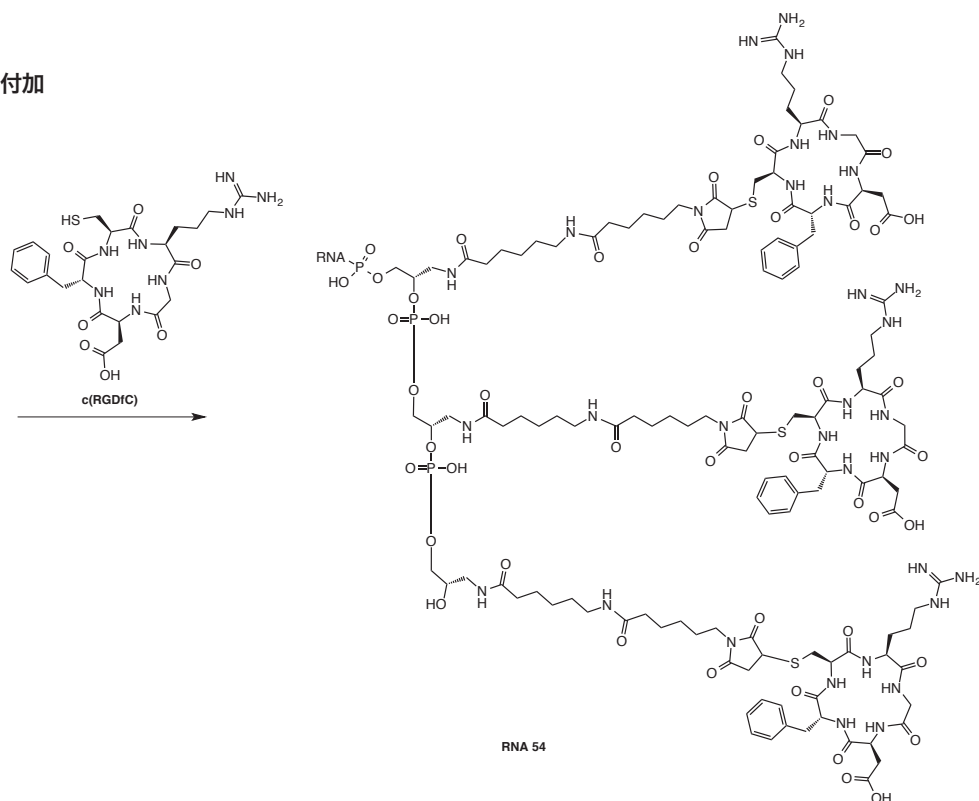
5-8 RNA 54 の合成

合成したアミノ修飾 RNA 51 を pH 7.4 のリン酸緩衝液中に溶解し、アミノ基と *N*-ε-maleimidocaproyl-oxysuccinimide ester (EMCS) による縮合反応で RNA にマレイミド基を導入した。マレイミド付加体を HPLC で精製した後、cRGD のチオール基とマレイミドのマイケル付加反応により、RNA 54 を得た (Scheme13) (Figure 37)。

(1) マレイミドの付加

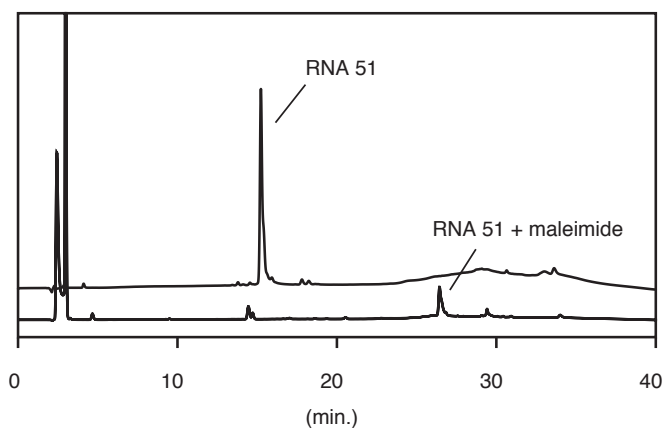


(2) cRGDの付加



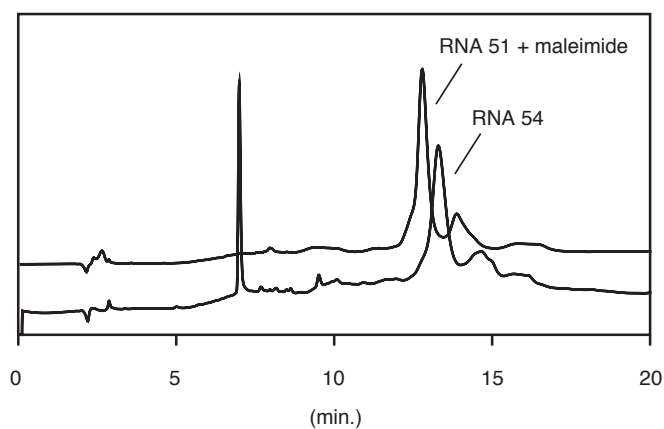
Scheme 13. RNA 54 の合成

(A) マレイミドの付加



検出: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相: (A) 5%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)
(B) 50%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)、グラジエント: B conc. 0% (0 min) → 35% (20 min) → 100% (30-35 min) → 0% (35-40 min)

(B) cRGD の付加

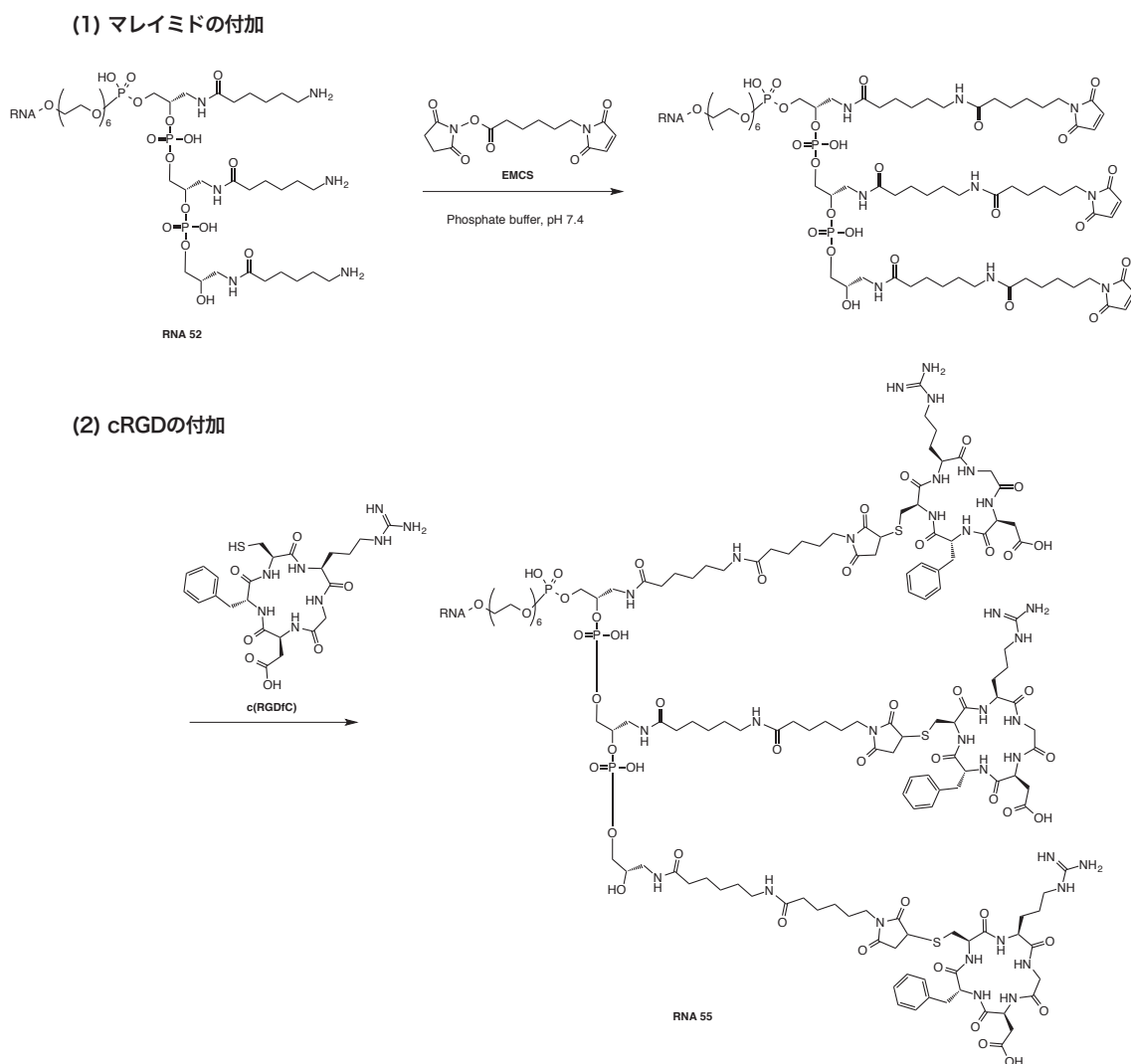


検出: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相: (A) 5%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)
(B) 50%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)、グラジエント: B conc. 0% (0 min) → 35% (2.5 min) → 60% (22.5 min) → 100% (25-35 min) → 0% (40-45 min)

Figure. 37 RNA 54 の反応追跡

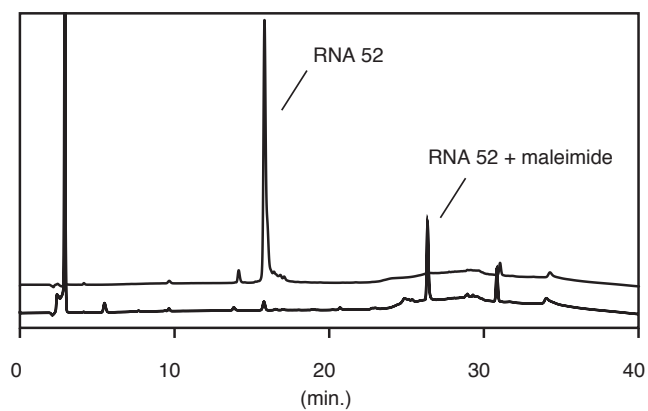
5-9 RNA55 の合成

合成したアミノ修飾 RNA 52 を pH7.4 のリン酸緩衝液中に溶解し、アミノ基と *N*-ε-maleimidocaproyl-oxysuccinimide ester (EMCS) による縮合反応で RNA にマレイミド基を導入した。マレイミド付加体を HPLC で精製した後、cRGD のチオール基とマレイミドのマイケル付加反応により、RNA 55 を得た (Scheme 14) (Figure 38)。



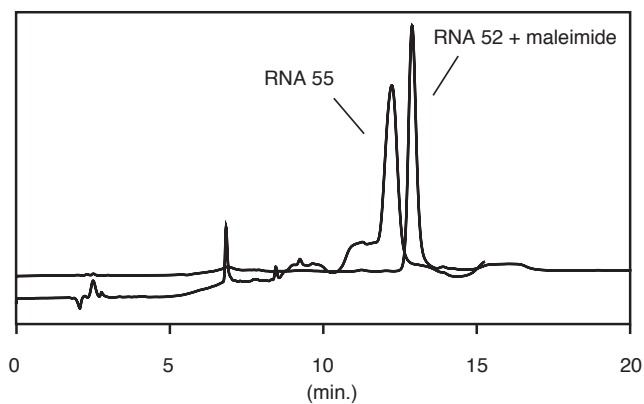
Scheme 14. RNA 55 の合成

(A) マレイミドの付加



検出: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相: (A) 5%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)
(B) 50%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)、グラジエント: B conc. 0% (0 min) → 35% (20 min) → 100% (30-35 min) → 0% (35-40 min)

(B) cRGD の付加



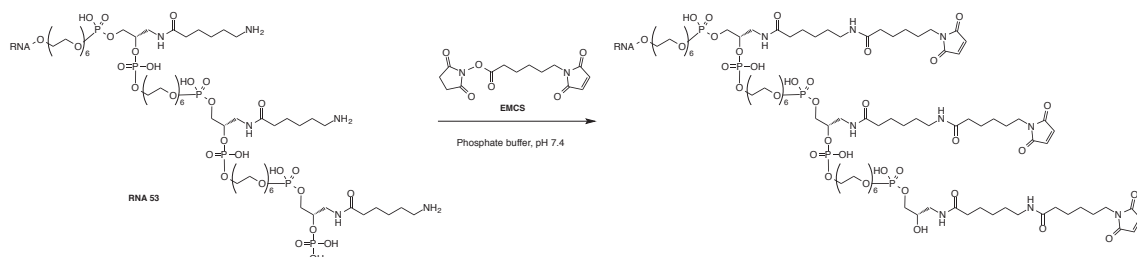
検出: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相: (A) 5%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)
(B) 50%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)、グラジエント: B conc. 0% (0 min) → 35% (2.5 min) → 60% (22.5 min) → 100% (25-35 min) → 0% (40-45 min)

Figure 38. RNA 55 の反応追跡

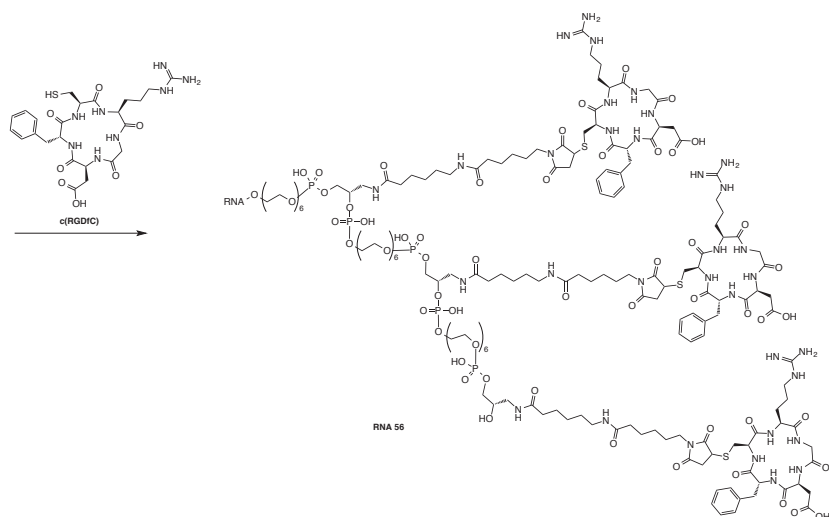
5-10 RNA56 の合成

合成したアミノ修飾 RNA 53 を pH7.4 のリン酸緩衝液中に溶解し、アミノ基と *N*-ε-maleimidocaproyl-oxysuccinimide ester (EMCS) による縮合反応で RNA にマレイミド基を導入した。マレイミド付加体を HPLC で精製した後、cRGD のチオール基とマレイミドのマイケル付加反応により、RNA 56 を得た (Scheme 15) (Figure 39)。

(1) マレイミドの付加

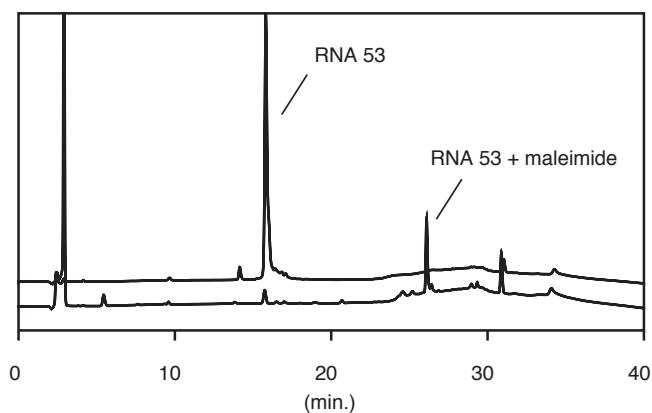


(2) cRGDの付加



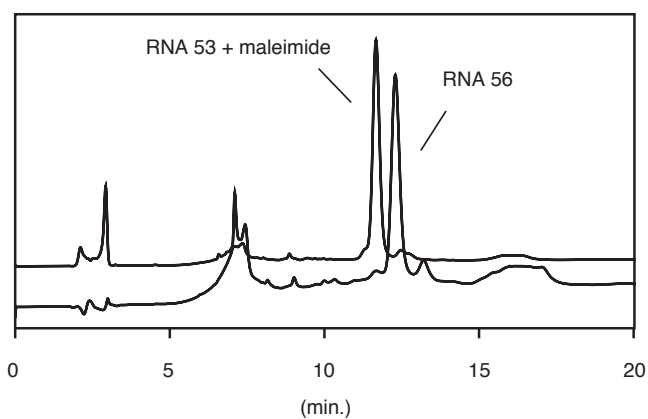
Scheme 15. RNA 56 の合成

(1) マレイミドの付加



検出: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相: (A) 5%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)
(B) 50%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)、グラジエント: B conc. 0% (0 min) → 35% (20 min) → 100% (30-35 min) → 0% (35-40 min)

(2) cRGD の付加



検出: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相: (A) 5%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)
(B) 50%アセトニトリル、0.1 M TEAA (pH=7.0)、グラジエント: B conc. 0% (0 min) → 35% (2.5 min) → 60% (22.5 min) → 100% (25-35 min) → 0% (40-45 min)

Figure 39. RNA 56 の反応追跡

5-11 cRGD-siRNA コンジュゲートの細胞膜透過性検証

合成した各 cRGD-RNA コンジュゲートを基に蛍光標識 siRNA を調整し、細胞への取り込みを蛍光顕微鏡で観察することで、PEG スペーサーが細胞膜透過性に与える影響を評価した。

5-11-1 蛍光標識 cRGD-siRNA コンジュゲートの調整

蛍光標識した RNA 58 と cRGD を導入した相補鎖 RNA 54-56 を組み合わせてアニーリング処理をし、4 種の蛍光標識 siRNA 1-4 を調整した (Table 14)。

Table 14. 蛍光標識 cRGD-siRNA コンジュゲートの配列

siRNA	RNA	Sequece	calculated	observed
siRNA 1	RNA 58	3'-TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA F-5'	-	-
	RNA 50	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT-3'	-	-
siRNA 2	RNA 58	3'-TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA F-5'	-	-
	RNA 54	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT XXX-3'	9867.43	9869.47
siRNA 3	RNA 58	3'-TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA F-5'	-	-
	RNA 55	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT sXXX-3'	10151.73	10150.28
siRNA 4	RNA 58	3'-TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA F-5'	-	-
	RNA 56	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT sXsXsX-3'	10840.33	10842.11

u, c = 2'-OMe RNA, F = Fluorescein, s = hexaethylene glycol, X = cRGD

5-11-2 cRGD-siRNA コンジュゲートの細胞膜透過性試験

蛍光標識した siRNA1-4 をヒトメラノーマ細胞 A2058 へ添加し、その蛍光を観察することで細胞膜透過性を評価した。A2058 を 24 時間培養し、培地を血清フリーの培地に変更した後、siRNA を終濃度 250 nM で添加した。37 °C 条件下、CO₂ インキュベーターで 18 時間培養した後、核染色試薬として Hoechst-33342 を加えて更に 10 分間インキュベートした。培地を取り除き 1×PBS で洗浄した後、蛍光顕微鏡で細胞を観察した (Figure 40)。

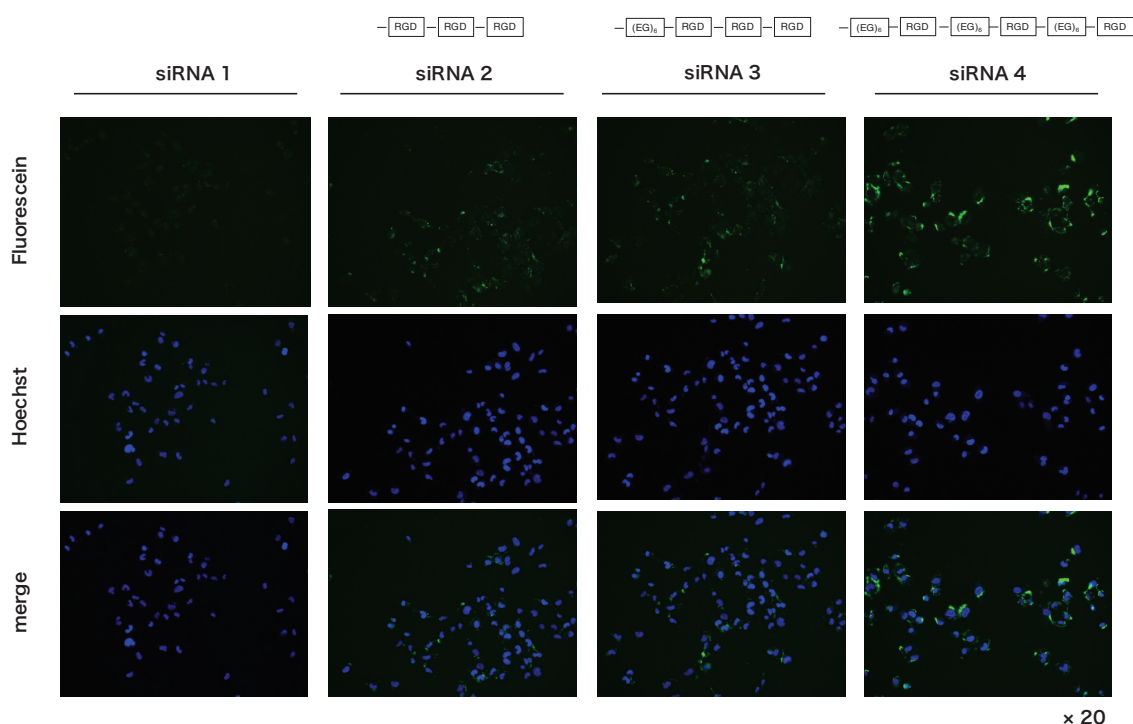


Figure 40. cRGD-siRNA コンジュゲートの取り込み試験

cRGDを導入していないsiRNA 1では蛍光がほとんど観察されなかったのに対して、cRGDを導入した siRNA 2-4 では全てフルオレセイン由来の蛍光が観察された。また、siRNA 2 と siRNA 3 ではほとんど蛍光強度に差がなかった一方で、3 分子の cRGD 間に PEG スペーサーを導入した siRNA 4 で最も強い蛍光が観察された。これは、当初の期待通りスペーサーを導入した 3 分子の cRGD が多価効果によって、結合力が大幅に上昇した為と考えられる。そこで以降の実験は、siRNA 4 のパッセンジャー鎖である RNA 56 を用いて実験を行うこととした。

5-12 cRGD-siRNA コンジュゲートの遺伝子発現抑制評価

細胞内取り込み試験で最も導入効率の良かった RNA 56 を用いて siRNA を調整し、cRGD-siRNA コンジュゲートの遺伝子発現抑制能をリアルタイム PCR 法で評価した。ネガティブコントロールとして、cRGD を導入していない siRNA 5 も同時に調整した (Table 15)。

Table 15. cRGD-siRNA コンジュゲートの配列

siRNA	RNA	Sequece
siRNA 5	RNA 57	3'-TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA-5'
	RNA 50	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT-3'
siRNA 6	RNA 57	3'-TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA-5'
	RNA 56	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT sXsXsX-3'

u, c = 2'-OMe RNA, s = hexaethylene glycol, X = cRGD

5-12-1 cRGD-siRNA コンジュゲートの遺伝子発現抑制能

cRGD の導入が siRNA の活性に与える影響を評価するために、市販の核酸導入試薬であるリポフェクタミン RNAiMAX を用いて siRNA 5 及び 6 の遺伝子発現抑制能を評価した。ヒトメラノーマ細胞 A2058 を 96well で 24 時間培養後、各 siRNA と RNAiMAX の複合体を最終濃度 20 nM でトランスフェクションした。更に 24 時間培養後、総 RNA を抽出して、標的である *RecQL1* mRNA をリアルタイム PCR 法により定量することで、siRNA の遺伝子発現抑制能を評価した (Figure 41A)。

また、cRGD コンジュゲートによる遺伝子デリバリー効果を検証する為、核酸導入試薬を用いずに遺伝子発現抑制能の評価を行った。同様に A2058 を 96well で 24 時間培養し、培地を血清フリーの培地に変更した後、各 siRNA を最終濃度 250 nM で添加した。更に 72 時間培養後、総 RNA を抽出して、標的である *RecQL1* mRNA をリアルタイム PCR 法により定量することで、siRNA のキャリアフリーでの遺伝子発現抑制能を評価した (Figure 41B)

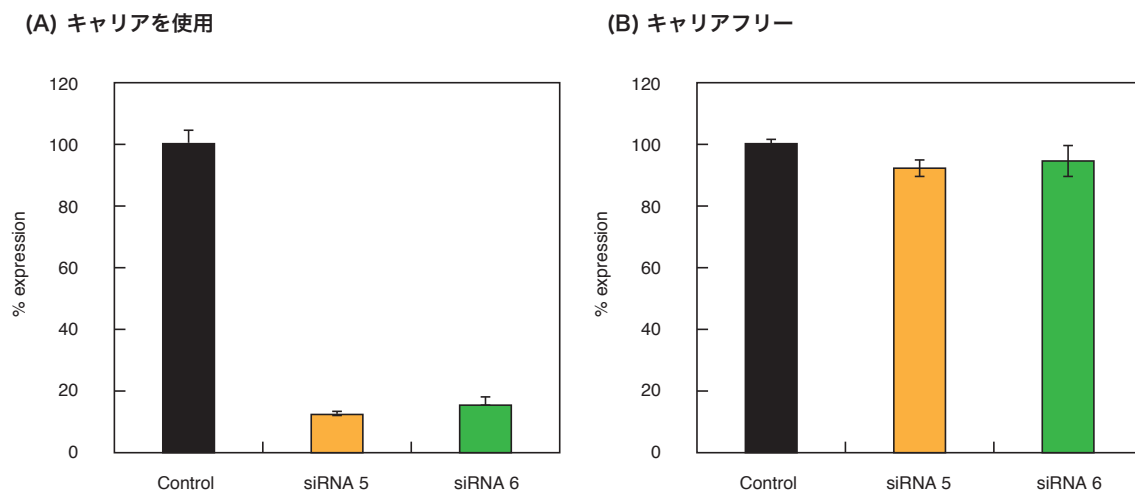


Figure 41. (A) キャリアを使用した遺伝子発現抑制能試験, (B) キャリアフリーでの遺伝子発現抑制能試験

(A) cRGD をパッセンジャー鎖の 3' 末端に導入した siRNA 6 はリポフェクタミン存在下で、未修飾の siRNA 5 と同様な遺伝子発現抑制効果を示した。この結果より、siRNA パッセンジャー鎖の 3' 末端への cRGD 分子の導入は RISC の形成及び標的 mRNA の認識に影響を与えないことが確認された。

(B) 一方で、リポフェクタミンフリーの実験では、siRNA 5、6 共に 250 nM の高濃度条件でも遺伝子発現抑制を示さなかった。蛍光顕微鏡の実験では、cRGD の導入により蛍光強度の増加が観察されていたことから、今回設計・合成した cRGD-siRNA コンジュゲートはエンドサイトーシスで細胞内に導入された後、エンドソームから脱出出来ずにリソソーム中で分解されている可能性が示唆された。

5-13 ポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートの合成と遺伝子抑制能評価

前述した様に、今回合成した cRGD-siRNA コンジュゲートは、キャリアフリーで遺伝子発現抑制を示さなかった。この原因として

- 1) 採用した siRNA の活性が低い (IC_{50} が高い)
- 2) cRGD-siRNA コンジュゲートのエンドソーム脱出が行われていない

以上の2点が考えられた。

1) に関して、コンジュゲート型 siRNA は一般的にキャリアを用いたデリバリーと比較して導入効率が非常に低いことが知られている。原因として、siRNA の負電荷に由来する細胞膜との反発が挙げられる。また、キャリア法では大量の siRNA がカチオン性脂質に包まれて細胞内へデリバリーされているのに対し、コンジュゲート型 siRNA は1分子ごとにデリバリーされており、この点も導入効率が悪い理由の一つである。その為、現在、臨床研究に用いられているコンジュゲート型 siRNA は、キャリアフリーで用いた場合の導入効率の低下を見越し、キャリアを使用した際に IC_{50} が数 pM となるような配列が選抜されている。今回我々が用いた *RecQL1* siRNA は IC_{50} が nM 超であり、キャリアフリーで遺伝子発現抑制効果を示す為には不適切だったと推測された。しかしながら、本研究の最終目標はコンジュゲート型 miRNA の開発であり、前述したように miRNA は siRNA よりも標的特異性が低いため、薬効を示すためには更に高用量を必要とする。従って、siRNA 配列の改善は本研究の達成における根本的な解決とはならない。

2) に関して、近年、コンジュゲート型 siRNA は数多く報告されているが、エンドサイトーシス経路及びエンドソーム脱出経路の詳細は未だ明らかになっていない。今回の実験結果から、cRGD-siRNA コンジュゲートも同様であり、ほとんどはエンドソームから脱出出来ずにリソソーム中で分解されていると示唆された。

そこで、cRGD-siRNA コンジュゲートのデリバリー効率の改善を目的として、新たにポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートを考案した (Figure 42)。

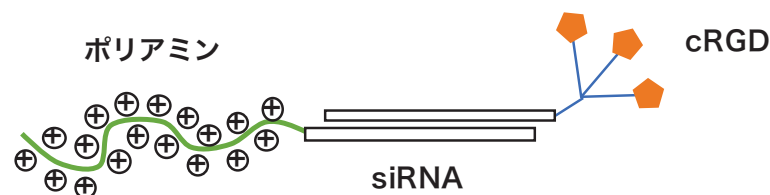


Figure 42. ポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートの構造

cRGD-siRNA コンジュゲートにポリアミン修飾を施すことで、ポリアミンの正電荷によって siRNA の負電荷を中和し、細胞膜との反発を解消することが期待できると考えた。また、エンドソーム中でポリアミンがプロトンスポンジ効果によりエンドソームの崩壊を促すことで、cRGD-siRNA コンジュゲートが効率よく細胞質へ移行できると考えた。

5-13-1 ポリアミン修飾 siRNA コンジュゲートの設計

ポリアミンを siRNA に導入する手法として、Kotera らによって報告されているスペルミンアミダイトを採用した (Figure 43A)⁷⁰。スペルミンアミダイトは、核酸自動合成機を用いることで RNA に導入可能であり、TFA 保護基の脱保護も容易に行うことができる。また、スペルミンの導入数を調節することでアミノ基とリン酸基の比 (N/P 比) も容易に調節することが可能である (Figure 43B)。本研究では、siRNA の電荷を中和する為、N/P 比が 1.05 となるスペルミン 15 分子の修飾を計画した。

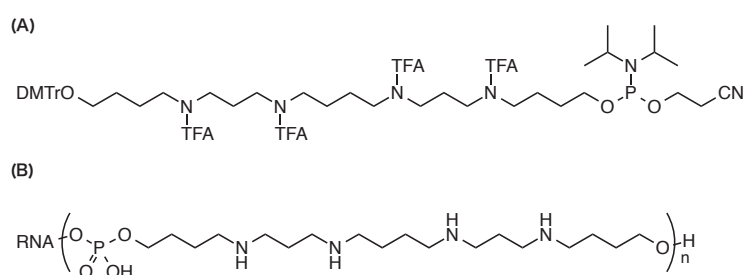


Figure 43. (A) スペルミンアミダイトの構造 (B) スペルミン修飾 RNA の構造

5-13-2 ポリアミン修飾 siRNA の合成

報告されている方法に従い合成したスペルミンアミダイトを用いて、核酸自動合成機に

より、ポリアミン修飾 RNA を合成した (Table 16) 。また、ポリアミン修飾は siRNA の活性に影響がないとされるパッセンジャー鎖の 3'末端側に導入した。ポリアミン修飾 RNA は天然のガイド鎖 RNA 57、もしくはガイド鎖に cRGD を導入した RNA60 と組み合わせ、アニーリング処理により各 siRNA を調整した。

Table 16. スペルミン修飾 cRGD-RNA コンジュゲートの配列

siRNA	RNA	Sequece	calculated	observed
siRNA 7	RNA 57	3'-TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA-5'	-	-
	RNA 59	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT (Y) ₁₅ -3'	13125.19	6773.70 [M-2H] ²⁻
siRNA 8	RNA 60	3'- XsXsXs TTc AAG uCu GGU GAA GUC GAA-5'	10840.33	10840.97
	RNA 59	5'-Guu cAG ACC ACu ucA Gcu uTT (Y) ₁₅ -3'	-	-

u, c = 2'-OMe RNA, Y = spermine, s = hexaethylene glycol, X = cRGD

5-13-3 ポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートの遺伝子抑制能評価

A2058 を 96well で 24 時間培養し、培地を血清フリーの培地に変更した後、各 siRNA 最終濃度 125-250 nM で添加した。24 時間後に血清を 2%となる様に添加した。更に 72 時間培養後、総 RNA を抽出して、標的である *RecQL1* mRNA をリアルタイム PCR 法により定量することで、siRNA のキャリアフリーでの遺伝子発現抑制能を評価した (Figure 44) 。

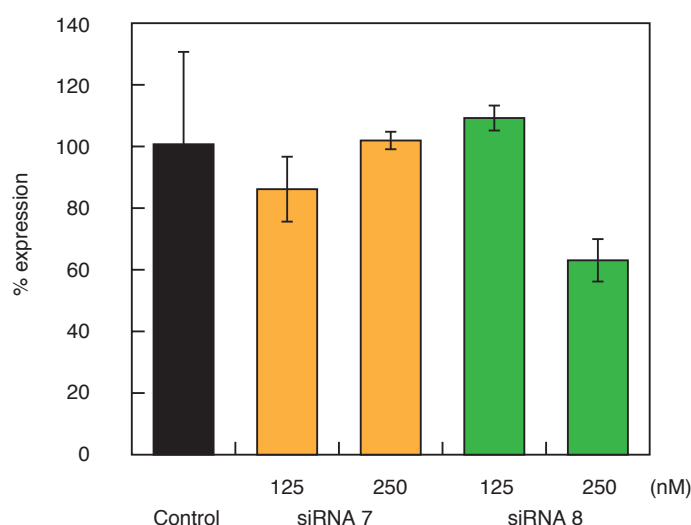


Figure 44. ポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートの遺伝子発現抑制

その結果、スペルミンを 15 分子導入した siRNA 7 では 250 nM でも遺伝子発現抑制能は確認できなかった。一方で、スペルミンに加えて cRGD も搭載した siRNA 8 は、濃度 250 nM で標的 mRNA の遺伝子発現を約 40%抑制していることが明らかとなった。スペルミンと cRGD それぞれ単独の修飾では、siRNA は遺伝子発現抑制を示さなかったのに対して、スペルミン修飾型 cRGD-siRNA コンジュゲートは 250 nM である程度の遺伝子発現抑制を示した。この結果は、当初期待していた通り、siRNA の負電荷中和による細胞膜透過性の向上と、ポリアミンのプロトンスポンジ効果によるエンドソーム脱出能の向上が原因と考えられる。

5-14 ヌクレアーゼ耐性 miRNA の合成と機能評価

続けて、cRGD-コンジュゲートに適用可能なヌクレアーゼ耐性 miRNA を設計した。配列は、cRGD がデリバリー可能なヒトメラノーマ細胞において高腫瘍活性を示す miRNA-205 を選択した。また、化学修飾法は 2'-O-methyl (2'-OMe) RNA と 2'-deoxy, 2'-Fluoro (2'-F) RNA を採用した (Figure 45)。2'-OMe 及び 2'-F 修飾した siRNA は、遺伝子発現抑制能を保持したままヌクレアーゼ耐性を獲得することが報告されており⁷¹⁻⁷³、siRNA と同様の経路で働く miRNA にも適用可能な化学修飾法であると考えられる。

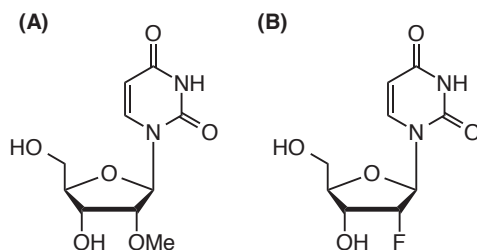


Figure 45. (a) 2'-OMe RNA の構造 (B) 2'-F RNA の構造

5-14-1 miRNA の合成

核酸自動合成機により、化学修飾を施した miRNA-205 を合成した (Table 17)。配列は天然の miRNA-205 である 205-1 を参考にしており、一般的にヌクレアーゼにより分解されやすいと知られているピリミジン塩基を中心に化学修飾した。標的 mRNA に結合しないパッセンジャー鎖は化学修飾による影響をほとんど受けない為、ピリミジン塩基を全て 2'-OMe 修飾した RNA 63 を用いた。また、両 3'-末端の 2 塩基はほとんど活性には影響を与えない為、ヌクレアーゼ耐性なチミジンに変更した。標的 mRNA に結合するガイド鎖 RNA は、2'-

位の化学修飾が活性に影響を与えることが知られており、これはガイド鎖 RNA と Argonaute タンパク質の共結晶構造からも確認されている。特にシード領域である 5'-末端から 1-8 番目は、Argonaute と強く相互作用している為、適用可能な化学修飾様式は限定される。今回は siRNA で広く採用されている 2'-F と 2'-OMe 修飾を交互に並べた RNA 64-67 の様な配列を設計し、抗腫瘍活性を比較した。

Table 17. 化学修飾 miRNA-205 の合成

miRNA	RNA	Sequece	calculated	observed
miRNA 1	RNA 61	5'-UCC UUC AUU CCA CCG GAG UCU U-3'	6852.05	6849.92
	RNA 62	3'-UUG AAG UGA GGU GGC CUC AG-5'	6462.88	6461.67
miRNA 2	RNA 61	5'-UCC UUC AUU CCA CCG GAG UCU U-3'	-	-
	RNA 63	3'-TTG AAG uGA GGu GGc cuc AG-5'	6667.12	6665.70
miRNA 3	RNA 64	5'-uCc UuC aUu Cca cCG GAG UcT T-3'	6988.28	6988.90
	RNA 63	3'-TTG AAG uGA GGu GGc cuc AG-5'	-	-
miRNA 4	RNA 65	5'-uCc UUC AUU CCA CCG GAG UcT T-3'	6896.16	6896.20
	RNA 63	3'-TTG AAG uGA GGu GGc cuc AG-5'	-	-
miRNA 5	RNA 66	5'- uCc UuC aUu CcA cCg GaG uCT T -3'	7002.30	7002.96
	RNA 63	3'-TTG AAG uGA GGu GGc cuc AG-5'	-	-
miRNA 6	RNA 67	5'- uCc UuC aUu CcA cCG GAG uCT T -3'	6974.26	6975.97
	RNA 63	3'-TTG AAG uGA GGu GGc cuc AG-5'	-	-

a, g, c, u = 2'-OMe RNA, C, U = 2'-F RNA, F = Fluorescein, s = hexaethylene glycol, X = cRGD

5-14-2 化学修飾 miRNA-205 の抗腫瘍活性評価

化学修飾が miRNA-205 の抗腫瘍活性に与える影響を評価した。ヒトメラノーマ細胞 A2058 を 6well で 24 時間培養後、miRNA とリポフェクタミン RNAiMAX の複合体を最終濃度 20 nM でトランスフェクションした。更に 72 時間培養後、細胞をトリプシン処理して回収し、トリパンブルー染色した生細胞数をカウントすることで、miRNA の抗腫瘍活性を評価した (Figure 46)。

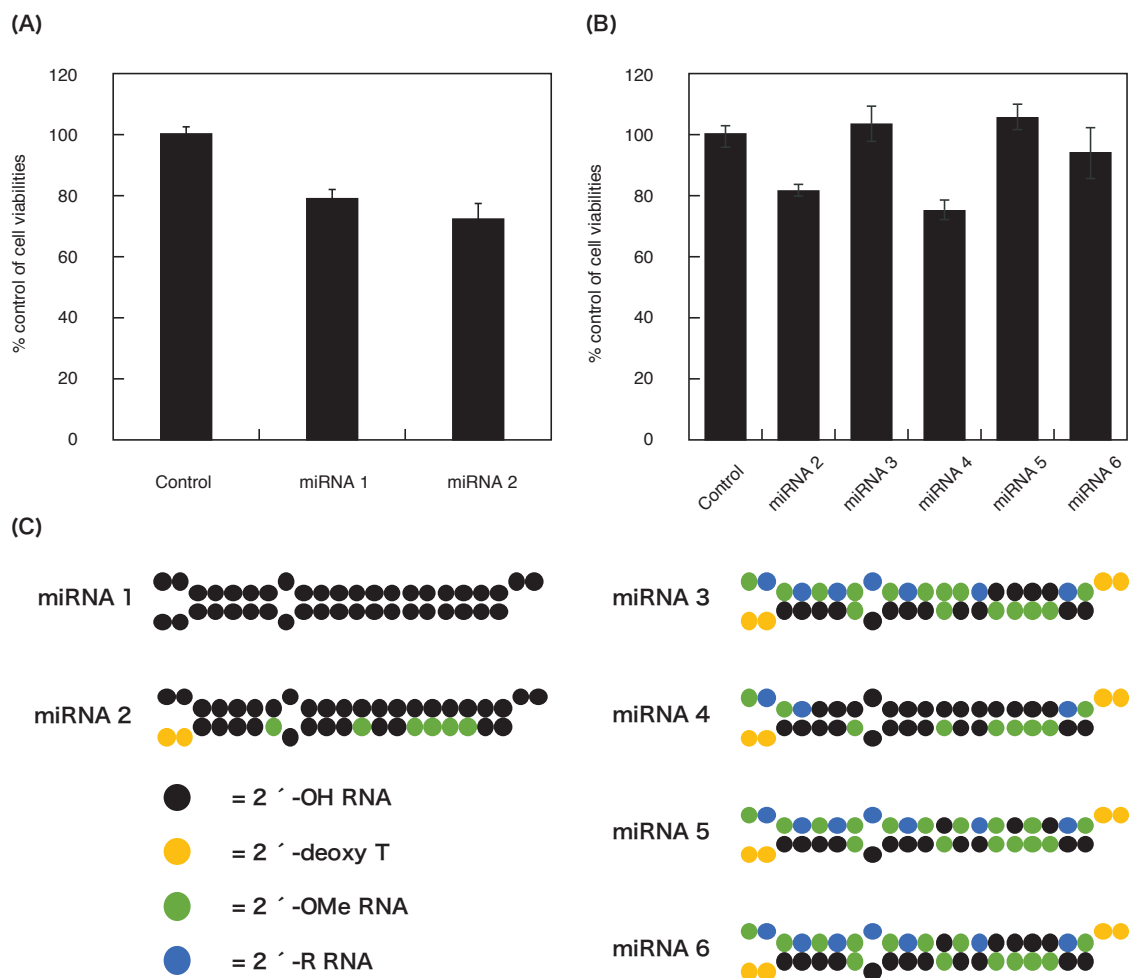


Figure 46. (A) パッセンジャー鎖への化学修飾の影響評価 (B) ガイド鎖への化学修飾の影響評価 (C) 各 miRNA-205 の構造

(A) まず、パッセンジャー鎖への化学修飾への影響を miRNA 1 と miRNA 2 の抗腫瘍活性を比較することで評価した。その結果、パッセンジャー鎖のピリミジン塩基を 2'-OMe 修飾した miRNA 2 の抗腫瘍活性は、未修飾の miRNA 1 と比較してわずかに高く、化学修飾の影響はほとんどないことが確認された。

(B) 続けて、ガイド鎖への化学修飾の影響を miRNA 2-5 の抗腫瘍活性を比較することで評価した。その結果、miRNA 4 はガイド鎖未修飾の miRNA 2 と比較してわずかに高い抗腫瘍活性を示したが、miRNA 3, 5, 6 は抗腫瘍活性を示さなかった。この結果から、ガイド鎖 5'-末端の 4 塩基と 3'-末端側の 4 塩基への化学修飾は活性に影響を示さないことが確認された。しかしながら、更に内部を化学修飾した miRNA 3, 5, 6 は抗腫瘍活性を示さなかった。これ

は化学修飾により、Argonaute タンパク質との相互作用が阻害されたことによると考えられる。siRNA はスライサー活性を有する Argonaute 2 タンパク質と複合体を形成した時のみ、RNA 干渉により標的 mRNA を切断するが、miRNA は Argonaute 1-4 の全てと複合体を形成して機能することが報告されている⁷⁴。従って、siRNA で採用されている化学修飾法は miRNA と Argonaute 2 の複合体形成には影響しないが、Argonaute 1, 3, 4 のいずれかとの複合体形成には不利であり、その結果 miRNA 3, 5, 6 は抗腫瘍活性を示さなかった可能性が示唆された。

5-14-3 化学修飾 miRNA-205 のヌクレアーゼ耐性評価

合成した miRNA-205 の内、化学修飾した miRNA 2, 3, 4 の血清中でのヌクレアーゼ耐性を評価した。各 miRNA を PBS バッファーに溶解した後、ウシ胎児血清を終濃度 10% となる様に添加し、37 °C 条件下にてインキュベートした。1, 3, 6, 12 時間後に反応液を分取し、15% Native PAGE で miRNA を分離した。残存している二本鎖 miRNA を核酸染色試薬である SYBR GREEN I で染色し、蛍光イメージャーで画像化した (Figure 47)。

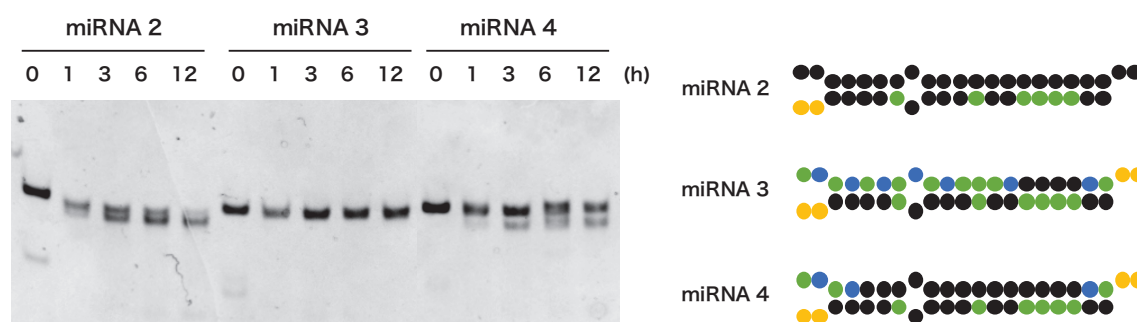


Figure 47. 化学修飾 miRNA ヌクレアーゼ耐性試験

パッセンジャー鎖のみ化学修飾した miRNA 2 は 12 時間後には、完全鎖長のバンドは消失し、ほとんど血清中のヌクレアーゼによって分解されてしまうことが明らかとなった。一方でガイド鎖も化学修飾した miRNA 3 と 4 は、12 時間後も完全鎖長のバンドが確認され、強力なヌクレアーゼ耐性を有することが明らかとなった。

以上の結果から、高い抗腫瘍活性とヌクレアーゼ耐性を有する miRNA 4 は cRGD コンジュゲートに適用可能な miRNA として期待できる。

6 章 総括及び今後の展望

6-1 総括

本研究は miRNA の機能解析と医薬品への応用研究を目指し、1) 新規光反応性 miRNA プローブによる miRNA の機能解析法の開発と 2) cRGD-コンジュゲートの設計及び機能評価を行った。

2 章では、miRNA の未知標的 mRNA を網羅的に捕獲する為、光照射により活性化されるトリフルオロメチルジアジリンを塩基部に置換した新規ヌクレオシドアナログ **1** 及び **2** を設計・合成した。アナログ **1** 及び **2** を導入した RNA プローブは相補鎖 RNA と二本鎖形成後、365 nm の UV を照射することで、アナログの相補塩基の種類に関わらず、二本鎖間にクロスリンクを形成できることが明らかとなった。塩基の種類に依存しない二本鎖 RNA 間のクロスリンク反応は世界で初めての報告であり、アナログ **2** は、近年盛んに研究されている small RNA が関与する様々な生命現象の解明にも有用なツールになると期待される。

3 章ではガイド鎖の 5'-末端から 9 番目の位置にアナログ **2** を、3'-末端にビオチン分子を導入した miRNA-145 のプローブである miR-145-G9 を用いて、miRNA-145 の標的 mRNA として報告されている *FSCN1*, *c-MYC* のラベル化を培養細胞で試みた。miR-145-G9 を細胞に導入後、UV 照射により標的 mRNA へ光架橋を形成し、ビオチン-アビジン相互作用を利用してビオチン標識化された標的 mRNA を精製した。精製 RNA 中の標的 mRNA を定量した結果、標的 mRNA である *FSCN1* mRNA 量が大幅に増加しており、miR-145-G9 により *FSCN1* mRNA に光架橋が形成していることが確認された。一方で、miRNA-145 の標的として報告されている *c-MYC* については、mRNA 量に変化が見られなかった。合成した miRNA-145 を導入後の *c-MYC* の発現量をウェスタンブロッティングにより確認した結果、*c-MYC* の発現量に変化は見られなかった。従って、今回我々が合成した miRNA-145 は、*c-MYC* を標的としていないことが明らかとなった。この結果は、mRNA の定量結果と相関があり、miR-145-G9 は細胞内で標的 mRNA のみを選択的に標識化していることも確認された。本研究成果は、miRNA の標的 mRNA を網羅的に捕獲可能な初めての報告であり、次世代シーケンサー技術と組み合わせることで、miRNA 医薬品の開発研究を大幅に加速する有用なツールになると期待される。

4 章では、光反応性 miRNA プローブの効率的な RISC 形成を目指し、アナログ **2** にエチニル基を導入したヌクレオシドアナログ **25** を設計・合成した。合成したアナログ **25** はアナログ **1**、**2** と同様に二本鎖 RNA 内で効率的に光架橋を形成できることが確認された。また、3'末端にビオチン分子を導入した miR-145-G9 が天然型の miRNA-145 と比較して、遺伝子発現抑制能が低下したのに対して、ビオチン分子を導入していない miR-145-X9 は、天然型の miRNA-145 と同程度の遺伝子発現抑制能を示した。以上の様に、ビオチン分子を必要としないアナログ **25** を導入した miRNA プローブは、RISC 形成能が低下しない為、アナログ **2** を導入した RNA プローブよりも効率良く標的 mRNA を標識化できると期待される。

5 章では miRNA に適用可能な cRGD コンジュゲートの開発を目的とし、cRGD-siRNA コンジュゲートの設計及び合成、更に miRNA への化学修飾を検討した。cRGD は多価効果により受容体への親和性を飛躍的に向上させることが知られているが、オリゴヌクレオチド コンジュゲート体で構造の最適化は行われていない。本研究では固相合成で簡便に構造活性相関を行う為、cRGD 間にスペーサー分子として PEG を導入した cRGD-siRNA コンジュゲートの設計及び合成を行った。蛍光標識した cRGD-siRNA コンジュゲートを細胞に添加し、蛍光顕微鏡で観察した結果、3 分子の cRGD 間に PEG スペーサーを導入した場合、蛍光強度の大幅な増加が確認された。この結果は、当初の設計通り cRGD の多価効果が発現した結果だと考えられる (Figure 48)。

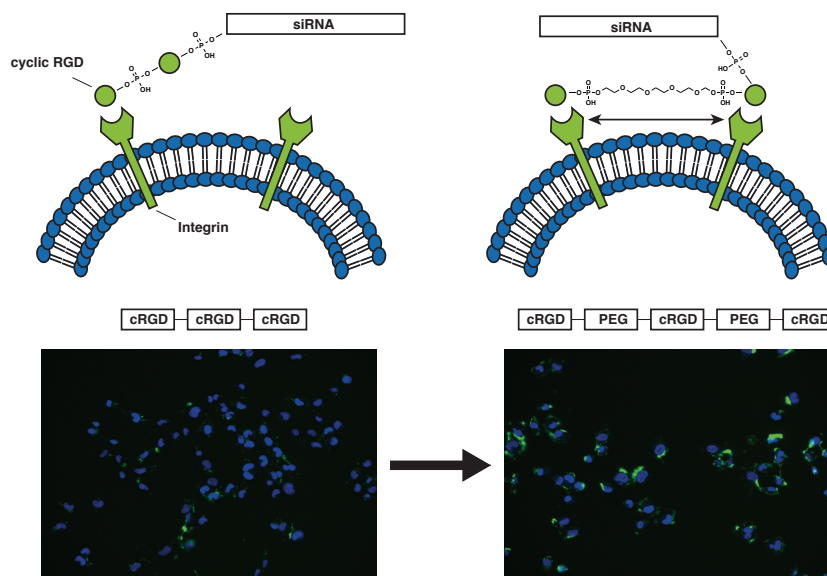


Figure 48. 多価効果による cRGD-siRNA コンジュゲートの細胞導入効率上昇

しかしながら、設計した cRGD 構造を搭載した siRNA コンジュゲートは、単独では遺伝子発現抑制を示さなかった。この為、今回合成した cRGD-siRNA コンジュゲートは、受容体に結合し、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれているものの、ほとんどがエンドソーム脱出できずにリソソームで分解されている可能性が示唆された。そこで、新たにポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートの設計を行った。報告されているスぺルミンアミダイトを 15 分子導入することで、N/P 比が 1.05 となりリン酸由来の負電荷を中和した cRGD-siRNA コンジュゲートの合成に成功した。合成したポリアミン修飾 cRGD-siRNA は、250 nM で 40% 程度の遺伝子発現抑制効果を示し、ポリアミン修飾がコンジュゲート siRNA のデリバリー効率を高めることが明らかとなった。

続けて、リガンドコンジュゲート法に適用可能な miRNA の化学修飾を検討した。ヒトメラノーマ細胞において抗腫瘍活性を示す miRNA-205 に、2'-OMe 及び 2'-F 修飾を施した種々の miRNA を合成し、各 miRNA の抗腫瘍活性を評価した。その結果、miRNA 4 が抗腫瘍活性を維持したままヌクレアーゼ耐性であることが明らかとなった (Figure 49)。



Figure 49. miRNA 4 の構造

6-2 今後の展望

2 章と 3 章の研究で、光反応性 miRNA プローブによる標的 mRNA の UV 照射によるラベル化に成功している。今後は本プローブを用いて、がん細胞で発現量が変化している miRNA の機能解析を網羅的に行い、医薬品候補となる miRNA の探索を行う。また 4 章で開発したエチニル修飾型に関しても同様に UV 照射による標的 mRNA のラベル化を検討し、アナログの有用性を検証する。

4 章の研究では、ポリアミン修飾 cRGD-siRNA コンジュゲートが効率よくメラノーマ細胞にデリバリーされることを見出した。本修飾を施した miRNA-205 にも同様に行い、世界初のコンジュゲート型 miRNA の開発を行う。

最終的には光反応性 miRNA プローブを用いて探索した新規がん抑制遺伝子型 miRNA に、ポリアミン及び cRGD 修飾を施し、新規 miRNA 医薬品の開発を目指す。

第7章 実験の詳細

7-1 使用機器及び使用試薬

1. 測定機器

DNA/RNA synthesizer	NTS-H6 DNA/RNA synthesizer
MALDI/TOF-MS	SHIMADZU AXIMA-CFR plus
NMRスペクトル	JEOL ECX-400P, ECA-500, ECA-600
T_m 測定機	SHIMADZU UV2450
ルミノ・イメージアナライザー	FUJIFILM LAS4000
吸光度計	SHIMADZU UV2450
発光計測用プレートリーダー	ATTO Luminescenser JNR II
リアルタイムPCR装置	Thermal Cycler Dice® Real Time System II
HPLC	SHIMADZU LCsolution DGU-20A3 LC-20AT CTO-10AS VP SPD-20A CBM-20A
蛍光顕微鏡	KEYENCE BZ9000

2. 各種クロマトグラフィー担体

TLC	Merck TLC plates silica gel 60 F254
中性シリカゲル	Silica Gel 60N (spherical,neutral) 63-210 μm
Sep-Pak C18	Waters Corporation

3. 使用試薬

〈有機合成試薬及び溶媒〉

【Aldrich】 1 M TBAF in THF, 3-Iodobenzy alcohol

【関東化学】	THF, <i>n</i> -BuLi in THF
【東京化成】	TBDMSCl, Ethyl trifluoroacetate, DMAP, TMSOTf
【ナカライテスク】	DMF, EtOH, imidazole, NaHCO ₃ , TEA, H ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄
【和光純薬】	DMTrCl, Pyridine, CH ₂ Cl ₂ , Methanol, <i>m</i> -Iodobenzyl alcohol, TsCl, 1- <i>O</i> -Acethyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -benzoyl- β -D-ribofuranose, HONH ₂ •HCl, 2-Cyanoethyl Diisopropylchlorophosphoramidite, DIPEA, I ₂ ,

〈NMR用重溶媒〉

【Aldrich Chemical Company】	CDCl ₃
【Cambridge Isotope Laboratories, Inc.】	DMSO-d ₆

〈オリゴヌクレオチドの合成及び精製〉

【Aldrich】	TEA・3HF
【GLEN RESEARCH】	Oxidizing solution, Cap Mix A, Cap Mix B, Deblocking mix, Activator
【MILLIPORE】	Millex®-LG、Millex®-HV
【PALL】	Acrodisc® Syringe Filter 0.2 μ m HT Tuffryn® Membrane
【TERUMO】	10 mL シリンジ
【関東化学】	
【ナカライテスク】	Uream Acrylamide (monomer), TEMED, Sodium dihydrogen phosphate, Disodium phosphate, EtOH, TEA
【和光純薬】	MeCN (核酸合成用), Bromophenol blue, N,N'-Methylenbisacrylamide, EDTA・4Na, APS, Formamide, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Boric acid, Ammonium solution (28%)

〈生物系実験〉

【promega】	psiCHECK™-2 vector、TransFast™ Transfection Reagent、Dual-Glo™ Luciferase Assay System
-----------	--

【Wako】	D-MEM (high glucose), RPMI-1640
【Invitrogen】	Trypsin-EDTA, Lipofectamine RNAiMAX, RNaseOUT, Superscript VILO, OPTI-MEM
【TOYOBO】	THUNDERBIRD ® qPCR Mix, SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR

7-2 ヌクレオシドアナログの合成

3-iodo-1-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]benzene (3)

アルゴン雰囲気下、室温にて3-Iodobenzyl alcohol (1.00 g, 4.27 mmol) をDMF (10 mL) に溶解させた。続いてimidazole (0.639 g, 9.39 mmol)、TBDMSCl (0.708 g, 4.70 mmol) を加え反応を開始した。原料の消失を確認後、生成物を酢酸エチルとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 1) にて精製した。化合物 **3** (1.38 g, 3.96 mmol, 92%) を無色透明なオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.11 (s, 6H), 0.95 (s, 9H), 4.68 (s, 2H), 7.06 (t, 1H, *J* = 7.6), 7.28 (d, 1H, *J* = 7.8), 7.57 (d, 1H, *J* = 7.8), 7.67 (s, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ -5.3, 18.4, 25.9, 64.1, 94.2, 126.0, 135.0, 135.9, 143.9. Anal. Calcd for C₁₃H₂₁IOSi·1/10H₂O: C, 44.60; H, 6.10. Found: C, 44.42; H, 5.94.

1-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]-3-trifluoroacetylbenzene (4)

アルゴン雰囲気下にて、化合物 **3** (1.44 g, 4.13 mmol) をTHF (30 mL) に溶解し-78 °Cに冷却した。続いて、*n*-BuLi (5.3 mL, 8.67 mmol) を少量ずつ滴下し反応を開始した。15分攪拌後、少量ずつCF₃COOEt (1.0 mL, 8.67 mmol) を滴下した。1時間攪拌後、NaHCO₃ (15 mL) を加え反応を停止させた。生成物をヘキサンとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸で乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 30 : 1) にて精製した。化合物 **4** (1.25 g, 3.93 mmol, 95%) を黄色のオイル状で得た。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 0.12 (s, 6H), 0.96 (s, 9H), 4.81 (s, 2H), 7.52 (t, 1H, *J* = 7.8), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.2), 7.96 (d, 1H, *J* = 7.8), 8.05 (s, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ -5.4, 18.3, 25.8, 64.0, 116.7 (q, ¹J_{C-F} = 292.0), 127.4, 128.6, 129.0, 129.9, 133.0, 142.9, 180.6 (q, ²J_{C-F} = 34.7); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 5.1. Anal. Calcd for C₁₅H₂₁F₃O₂Si·3/20H₂O: C, 56.11; H, 6.69. Found: C, 55.90; H, 6.39.

3-[3-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]phenyl]-3-trifluoromethyldiaziridine (6)

アルゴン雰囲気下にて、化合物 **4** (1.07 g, 3.36 mmol), HONH₃Cl (0.35 g, 5.04 mmol) をEtOH (10 mL) とpyridine (10 mL) に溶解させ、オイルバス (60 °C) にて反応を開始した。一晩反応後、生成物をクロロホルムとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム、

飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸で乾燥させた。溶媒を減圧留去し、得た残渣を適量のCH₂Cl₂に溶解させ、NEt₃ (1.72 mL, 12.43 mmol) とTsCl (1.28 g, 6.72 mmol) を加え、触媒にDMAP (0.04 g, 0.34 mmol) を添加し室温下にて反応を開始させた。一晚反応後、揮発性のものを減圧留去し、得た残渣をクロロホルムとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 15 : 1) にて精製した。オキシム **5** (1.34 g, 4.02 mmol, 82 %) を黄色のオイル状で得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.10 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 2.46-2.49 (m, 3H), 4.72-4.76 (m, 2H), 7.35-7.91 (m, 8H).

アルゴン雰囲気下にて、封管を-78 °Cに冷却した後、化合物 **5** (1.13 g, 2.32 mmol) に7N NH₃ in MeOH (17.0 mL, 116 mmol) を加え溶解させ、密封し、常温にて2日間攪拌した。-78 °Cに冷却した後、開封し、再び常温に戻し、過剰なNH₃ gasを揮発させた。生成物を酢酸エチルとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 20 : 1) にて精製した。化合物 **6** (0.38 g, 1.14 mmol, 49%) を黄色のオイル状で得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.10 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 2.22 (d, 1H, *J* = 8.7), 2.79 (d, 1H, *J* = 8.7), 4.77 (s, 2H), 7.36-7.42 (m, 2H), 7.49 (d, 1H, *J* = 6.4), 7.59 (s, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ -5.3, 18.4, 25.9, 58.1 (q, ²*J*_{C-F} = 36.1), 64.4, 123.5 (q, ¹*J*_{C-F} = 277.6), 125.6, 126.6, 127.7, 128.6, 131.6, 142.3; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 0.9. Anal. Calcd for C₁₅H₂₃F₃N₂OSi: C, 54.19; H, 6.97; N, 8.43. Found: C, 54.06; H, 6.80; N, 8.41.

3-[3-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]phenyl]-3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine (**7**)

アルゴン雰囲気下にて、化合物 **6** (0.42 g, 1.25 mmol) にMeOH (5 mL) を加え溶解させた。続いて、NEt₃ (0.43 mL, 3.13 mmol), I₂ (0.35 g, 1.38 mmol) を加え反応を開始した。一晚攪拌後、生成物を酢酸エチルとH₂Oで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) にて精製した。化合物 **7** (0.60 g, 2.78 mmol, 78%) を黄色のオイル状で得た。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 0.01 (s, 6H), 0.95 (s, 9H), 4.73 (s, 2H), 7.04 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.35 (d, 2H, *J* = 4.6); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ -5.3, 18.3, 25.9, 28.5 (q, ²*J*_{C-F} = 40.5), 64.3, 122.2 (q, ¹*J*_{C-F} = 274.7), 123.9, 124.9, 127.0, 128.7, 129.1, 142.5; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ

11.2. Anal. Calcd for $C_{15}H_{21}F_3N_2OSi \cdot 3/10H_2O$: C, 53.65; H, 6.48; N, 8.34. Found: C 53.52; H, 6.20; N, 8.32.

3-[(3-hydroxymethyl)phenyl]-3-trifluoromethyl-3H-diazirine (8)

アルゴン雰囲気下、遮光状態にて、化合物 **7** (1.07 g, 3.24 mmol) を THF (10 mL) に溶解させた。続いて TBAF (3.6 mL, 3.56 mmol) を加え反応を開始した。30分攪拌後、揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) にて精製した。化合物 **8** (0.60g, 2.78mmol, 86%) を黄色のオイル状で得た。

1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 1.57-1.77 (m, 1H), 4.70-4.72 (m, 2H), 7.18-7.43 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 28.4 (q, $^2J_{C-F}$ = 40.5), 64.6, 122.1 (q, $^1J_{C-F}$ = 274.7), 124.7, 125.7, 128.0, 129.1, 129.4, 141.7; ^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ 11.2. Anal. Calcd for $C_9H_7F_3N_2O \cdot 1/5H_2O$: C, 49.19; H, 3.39; N, 12.75. Found: C 49.21; H, 3.23; N, 12.78.

2,3,5-tri-O-benzoyl-1-O-[3-(3-trifluoromethyl-3H-diazirine-3-yl)]benzyl- β -D-ribofuranose (9)

アルゴン雰囲気下、1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranose (0.32 g, 0.63 mmol) を CH_2Cl_2 (3 mL) に溶解させ、-30 $^{\circ}C$ に冷却した。続いて、TMSOTf (0.14 mL, 0.76 mmol)、 CH_2Cl_2 (2 mL) に溶解させた化合物 **8** (0.17 g, 0.79 mmol) を加え反応を開始した。2時間攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) を加え反応を停止した。生成物をクロロホルムと H_2O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 7 : 1) にて精製した。化合物 **9** (0.37 g, 0.56 mmol, 89%) を無色透明のオイルで得た。

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.52-4.58 (m, 2H), 4.74-4.80 (m, 3H), 5.31 (s, 1H), 5.77 (d, 1H, J = 4.6), 5.92 (t, 1H, J = 5.7), 7.05-8.02 (m, 16H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 14.2, 21.1, 28.3 (q, $^2J_{C-F}$ = 40.5), 60.4, 64.4, 69.0, 72.1, 75.5, 76.8, 79.3, 104.7, 122.0 (q, $^1J_{C-F}$ = 274.7), 125.4, 126.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.8, 128.9, 129.0, 129.1, 129.3, 129.5, 129.7, 129.7, 129.8, 133.1, 133.4, 133.5, 137.9, 165.2, 165.4, 166.2, 171.1; ^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ 11.3. Anal. Calcd for $C_{35}H_{27}F_3N_2O_8$: C, 63.64; H, 4.12; N, 4.24. Found: C, 63.41; H, 3.95; N, 4.24.

1-O-[3-(3-trifluoromethyl-3H-diazirine-3-yl)]benzyl- β -D-ribofuranose (1)

アルゴン雰囲気下、化合物 **9** (0.37 g, 0.56 mmol) を MeOH (5 mL) に溶解させた。続いて 28% CH₃ONa in MeOH を触媒量添加し、反応を開始した。2 時間攪拌後、飽和塩化アンモニウム水溶液を 1 滴加えて反応を停止した。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) にて精製した。化合物 **1** (0.18 g, 0.52 mmol, 95%) を白い結晶で得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.01 (s, 1H), 2.52 (d, 1H, *J* = 6.4), 2.71 (d, 1H, *J* = 3.7), 3.81 (s, 2H), 4.01-4.15 (m, 2H), 4.40-4.41 (m, 1H), 4.54 (d, 1H, *J* = 12.4), 4.75 (d, 1H, *J* = 12.4), 5.04 (s, 1H), 7.12-7.18 (m, 2H), 7.38-7.39 (m, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 28.3 (q, ²*J*_{C-F} = 40.5), 63.1, 67.4, 71.1, 74.6, 84.0, 106.5, 122.1 (q, ¹*J*_{C-F} = 274.7), 125.4, 125.7, 127.8, 129.6, 129.7, 140.0; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 11.3. Anal. Calcd for C₁₄H₁₅F₃N₂O₅: C, 48.28; H, 4.34; N, 8.04. Found: C, 48.17; H, 4.26; N, 8.01.

1-*O*-[3-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl-β-D-ribofuranose (10)

アルゴン雰囲気下、化合物 **1** (0.36 g, 1.03 mmol) を pyridine (4 mL) に溶解させた。続いて DMTrCl (0.42 g, 1.24 mmol) を加え、反応を開始した。3 時間攪拌後、生成物を酢酸エチルと H₂O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) にて精製した。化合物 **10** (0.61 g, 0.94 mmol, 91%) を黄色い結晶で得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.27-2.54 (m, 2H), 3.29-3.35 (m, 2H), 3.77-3.80 (m, 7H), 4.12-4.14 (m, 1H), 4.43 (d, 2H, *J* = 11.9), 4.70 (d, 1H, *J* = 11.9), 5.03 (s, 1H), 6.78-7.46 (m, 17H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 14.2, 21.0, 28.4 (q, ²*J*_{C-F} = 40.5), 55.2, 60.4, 64.8, 68.7, 72.7, 75.3, 82.2, 86.1, 106.3, 113.1, 122.0 (q, ¹*J*_{C-F} = 274.7), 125.5, 125.8, 126.8, 127.8, 128.1, 128.9, 129.0, 129.2, 130.0, 135.9, 138.5, 144.7, 158.4; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 11.3. Anal. Calcd for C₃₅H₃₃F₃N₂O₇: C, 64.61; H, 5.11; N, 4.31. Found: C, 64.47; H, 5.10; N, 4.24.

2-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl-1-*O*-[3-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl-β-D-ribofuranose (11) and

2-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl-1-*O*-[3-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl-β-D-ribofuranose (12)

アルゴン雰囲気下、化合物**10** (1.30 g, 2.00 mmol) をDMF (15 mL) に溶解させた。続いてNEt₃ (0.92 mL, 6.75 mmol), TBDMSCl (0.47 g, 3.15 mmol) を加え反応を開始した。一晩攪拌後、生成物を酢酸エチルとH₂Oで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) にて精製した。化合物**11** (0.46 g, 0.60 mmol 30%) 及び**12** (0.48 g, 0.63 mmol, 32%) を無色透明なオイルで得た。

11: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.10-0.12 (m, 6H), 0.90-0.92 (m, 9H), 2.46 (d, 1H, *J* = 7.4), 3.15-3.36 (m, 2H), 3.76 (s, 6H), 4.11-4.13 (m, 2H), 4.19-4.20 (m, 1H), 4.59-4.78 (m), 4.94 (d, 1H, *J* = 1.8), 6.78-7.47 (m, 17H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ -5.0, -4.7, 25.7, 28.4 (q, ²*J*_{C-F} = 40.5), 55.1, 64.6, 68.8, 72.2, 76.5, 83.8, 85.9, 106.6, 113.0, 122.1 (q, ¹*J*_{C-F} = 274.7), 125.4, 125.8, 126.7, 127.7, 128.2, 128.9, 129.0, 129.2, 130.1, 130.1, 136.1, 136.1, 138.7, 144.9, 158.3; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 11.3. Anal. Calcd for C₄₁H₄₇F₃N₂O₇Si·1/5H₂O: C, 63.63; H, 6.25; N, 3.62. Found: C, 63.38; H, 6.03; N, 3.53.

12: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ -0.13 (s, 3H), 0.00 (s, 3H), 0.81 (s, 9H), 2.75 (d, 1H, *J* = 1.8), 3.08 (dd, 2H, *J* = 5.0 and 10.1), 3.38 (dd, 2H, *J* = 2.8 and 10.1), 3.76-3.80 (m, 6H), 3.97-3.98 (m, 1H), 4.12-3.13 (m, 1H), 4.35-4.38 (m, 1H), 4.51 (d, 1H, *J* = 11.9), 4.78 (d, 1H, *J* = 11.9), 5.09 (s, 1H), 6.76-7.50 (m, 17H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ -4.9, 17.9, 25.6, 28.4 (q, ²*J*_{C-F} = 40.5), 55.2, 63.8, 68.8, 72.3, 75.4, 82.9, 85.9, 106.4, 113.0, 122.1 (q, ¹*J*_{C-F} = 274.7), 125.6, 125.8, 126.7, 127.7, 128.3, 129.2, 129.2, 129.5, 130.0, 136.1, 136.1, 138.7, 144.7, 158.4; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 11.2. Anal. Calcd for C₄₁H₄₇F₃N₂O₇Si: C, 64.38; H, 6.19; N, 3.66. Found: C, 64.16; H, 6.27; N, 3.57.

2-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl-1-*O*-[3-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl-3-*O*-[(2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)]phosphanyl-β-D-ribofuranose (13**)**

アルゴン雰囲気下、化合物**11** (0.50 g, 0.65 mmol) をTHF (3.3 mL) に溶解させた。続いて、DIPEA (0.55 mL, 3.25 mmol), 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (0.29 mL, 1.30 mmol) を加え反応を開始した。1時間攪拌後、生成物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) にて精製した。化合物**13** (0.39 g, 0.40 mmol, 62%) を無色透明なオイルで得た。

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 149.5, 150.0.

4-iodo-1-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]benzene (14)

アルゴン雰囲気下、室温にて4-Iodobenzyl alcohol (2.00 g, 8.58 mmol) をDMF (20 mL) に溶解させた。続いてimidazole (1.29 g, 18.88 mmol), TBDMSCl (1.42 g, 9.44 mmol) を加え反応を開始した。原料の消失を確認後、生成物を酢酸エチルとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 30 : 1) にて精製した。化合物**14** (2.98 g, 8.56 mmol, quant.) を無色透明なオイルとして得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.09 (s, 6H), 0.93 (s, 9H), 4.68 (s, 2H), 7.07 (d, 2H, *J* = 8.2), 7.65 (d, 2H, *J* = 8.2); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ -5.3, 18.4, 25.9, 64.4, 92.0, 128.0, 137.2, 141.2. Anal. Calcd for C₁₃H₂₁IOSi: C, 44.83; H, 6.08. Found: C, 44.68; H, 5.99.

1-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]-4-trifluoroacetylbenzene (15)

アルゴン雰囲気下にて、化合物**14** (2.98 g, 8.56 mmol) をTHF (30 mL) に溶解させ-78 °Cに冷却した。続いて、*n*-BuLi (11.0 mL, 17.98 mmol) を少量ずつ滴下し、15分攪拌後、CF₃COOEt (2.2 mL, 17.98 mmol) を少量ずつ加えて反応を開始した。1時間攪拌後、飽和炭酸ナトリウム水溶液 (15 mL) を加え反応を停止させた。生成物をヘキサンとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸で乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 30 : 1) にて精製した。化合物**15** (2.69 g, 8.46 mmol, 99%) を黄色のオイル状で得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.12 (s, 6H), 0.96 (s, 9H), 4.83 (s, 2H), 7.50 (d, 2H, *J* = 8.2), 8.05 (d, 2H, *J* = 8.2); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ -5.4, 18.4, 25.9, 64.3, 116.7 (q, ²*J*_{C-F} = 292.0), 126.2, 128.6, 130.2, 150.1, 180.2 (q, ¹*J*_{C-F} = 34.7); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ 5.1. Anal. Calcd for C₁₅H₂₁F₃O₂Si: C, 56.58; H, 6.65. Found: C, 56.62; H, 6.55.

3-[4-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]phenyl]-3-trifluoromethyldiaziridine (17)

アルゴン雰囲気下にて、化合物**15** (2.18 g, 6.85 mmol), HONH₃Cl (0.71 g, 10.28 mmol) をEtOH (10 mL) とpyridine (10 mL) に溶解させ、オイルバス (60 °C) にて反応を開始した。一晩反応後、生成物をクロロホルムとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸で乾燥させた。溶媒を減圧留去し、得た残渣を適量のCH₂Cl₂に溶解させ、NEt₃ (3.5 mL, 25.35 mmol) とTsCl (2.61 g, 13.70 mmol)を加え、触媒量のDMAP (0.08 g, 0.69 mmol) を添加し室温下にて反応を開始させた。一晩反応後、揮発性の溶媒を減圧留去し、得られた残渣をクロロホルムとH₂Oで抽出した後、有機層を飽和炭酸

水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 15 : 1）にて精製した。化合物**16** (3.01 g, 6.17 mmol, 90%) を黄色のオイル状で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.11 (s, 6H), 0.95 (s, 9H), 2.47 (d, 3H, $J = 7.3$), 4.77 (d, 2H, $J = 6.88$), 7.36-7.91 (m, 8H).

アルゴン雰囲気下にて、封管を -78°C に冷却した後、化合物**16** (0.80 g, 1.64 mmol) にTHF (8 mL) を加え溶解させ、さらにアンモニア水 (10 mL, 164 mmol 100 eq.) を加えて密封し、常温にて2日間攪拌した。 -78°C に冷却した後、再び常温に戻して過剰な NH_3 gasを揮発させた。生成物を酢酸エチルと H_2O で抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 20 : 1）にて精製した。化合物**17** (0.48 g, 1.44 mmol 88%) を黄色のオイル状で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.11 (s, 6H), 0.95 (s, 9H), 2.20 (d, 1H, $J = 8.7$), 2.78 (d, 1H, $J = 8.2$), 4.76 (s, 2H), 7.36-7.48 (m, 2H), 7.58 (d, $J = 8.3$), 7.59 (s, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ -5.3, 18.4, 25.9, 57.9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 34.7$), 123.6 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 279.0$), 126.2, 128.0, 130.2, 143.8; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ 0.7. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{OSi}$: C, 54.19; H, 6.97; N, 8.43. Found: C, 54.07; H, 6.77; N, 8.21.

3-[4-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]phenyl]-3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine (**18**)

アルゴン雰囲気下にて、化合物**17** (1.48 g, 4.46 mmol) にMeOH (15 mL) を加え溶解させた。続いて、 NEt_3 (1.5 mL, 11.15 mmol)、 I_2 (1.25 g, 4.91 mmol) を加え反応を開始した。一晩攪拌後、生成物を酢酸エチルと H_2O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 50 : 1）にて精製した。化合物**18** (1.41 g, 4.27 mmol, 96%) を黄色のオイル状で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.01 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 4.74 (s, 2H), 7.17 (d, 2H, $J = 8.2$), 7.35 (d, 2H, $J = 8.2$); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ -5.3, 18.4, 28.4 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 40.5$), 64.2, 122.2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 274.7$), 126.2, 126.4, 127.6, 143.3; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ 11.1. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{OSi} \cdot 3/10\text{H}_2\text{O}$: C, 53.94; H, 6.46; N, 8.39. Found: C 53.81; H, 6.24; N, 8.43.

3-[(4-hydroxymethyl)phenyl]-3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine (**19**)

アルゴン雰囲気下、遮光状態にて、化合物**18** (0.78 g, 2.36 mmol) をTHF (10 mL) に溶解させた。続いてTBAF (2.6 mL, 2.56 mmol) を加え反応を開始した。30分攪拌後、揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) にて精製した。化合物**19** (0.47 g, 2.18 mmol, 92%) を黄色のオイル状で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.70-1.73 (m, 1H), 4.73 (d, 2H, $J = 5.6$), 7.20 (d, 2H, $J = 7.8$), 7.40 (d, 2H, $J = 8.2$); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 28.3(q, $^2J_{\text{C-F}} = 40.5$), 64.2, 122.1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 274.7$), 126.7, 127.1, 128.3, 142.5; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ 11.1. Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{F}_3\text{N}_2\text{O} \cdot 3/20\text{H}_2\text{O}$: C, 49.39; H, 3.36; N, 12.80. Found: C 49.26; H, 3.31; N, 12.66.

2,3,5-tri-*O*-benzoyl-1-*O*-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl- β -D-ribofuranose (20**)**

アルゴン雰囲気下、遮光状態にて、1-*O*-Acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranose (0.46 g, 0.91 mmol) を CH_2Cl_2 (5 mL) に溶解させ、 -30°C に冷却した。続いて、TMSOTf (0.14 mL, 0.76 mmol), CH_2Cl_2 (3 mL) に溶解させた化合物**19** (0.18 g, 0.83 mmol) を加え反応を開始した。2時間攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) を加え反応を停止した。生成物をクロロホルムと H_2O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 7 : 1) にて精製した。化合物**20** (0.50 g, 0.76 mmol, 92%) を白い結晶で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.49-4.59 (m, 2H), 4.76-4.81 (m, 3H), 5.31 (s, 1H), 5.77 (d, 1H, $J = 4.6$), 5.93 (t, 1H, $J = 6.0$), 7.11-8.02 (m, 16H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 28.3(q, $^2J_{\text{C-F}} = 40.5$), 64.2, 68.7, 72.0, 75.5, 79.3, 104.6, 122.1(q, $^1J_{\text{C-F}} = 274.7$), 126.5, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.8, 129.1, 129.5, 129.7, 129.7, 129.8, 133.1, 133.4, 133.5, 138.6, 165.2, 165.4, 166.2; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ 11.2. Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$: C, 63.64; H, 4.12; N, 4.24. Found: C, 63.66; H, 4.12; N, 4.15.

1-*O*-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl- β -D-ribofuranose (2**)**

アルゴン雰囲気下、遮光状態にて化合物**20** (1.22 g, 1.85 mmol) をMeOH (5 mL) に溶解させた。続いて28% CH_3ONa in MeOHを一滴加え反応を開始した。2時間攪拌後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止した。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) にて精製した。化合物**2** (0.61 g, 1.75 mmol, 95%)を白い結晶で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.99 (s, 1H), 2.44 (d, 1H, $J = 6.0$), 2.65 (s, 1H), 3.68 (d, 1H, $J = 11.5$), 3.82 (dd, 1H, $J = 3.2$ and 12.0), 4.09-4.12 (m, 2H), 4.41 (d, $J = 5.5$), 4.55 (d, 1H, $J = 12.4$), 4.66 (d, 1H, $J = 12.4$), 5.04 (s, 1H), 7.19 (d, 2H, $J = 7.8$), 7.35 (d, 2H, $J = 8.2$); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 28.2 ($^2J_{\text{C-F}} = 40.5$), 63.9, 68.9, 71.9, 75.2, 83.6, 106.6, 122.0 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 274.7$), 126.6, 128.0, 128.8, 138.7; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ 11.7. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$: C, 48.28; H, 4.34; N, 8.04. Found: C, 48.35; H, 4.33; N, 7.95.

1-*O*-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl- β -D-ribofuranose (21)

アルゴン雰囲気下、遮光状態にて化合物**2** (1.01 g, 2.90 mmol) をpyridine (15 mL) に溶解させた。続いてDMTrCl (1.18 g, 3.48 mmol) を加え、反応を開始した。3時間攪拌後、生成物を酢酸エチルと H_2O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) にて精製した。化合物**21** (1.77 g, 2.72 mmol, 93%) を黄色い結晶で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.24 (d, 1H, $J = 6.0$), 2.52 (d, 1H, $J = 3.2$), 3.27-3.32 (m, 2H), 3.77 (s, 6H), 4.11-4.15 (m, 2H), 4.32-4.36 (m, 1H), 4.42 (d, 1H, $J = 12.4$), 4.70 (d, 1H, $J = 11.9$), 5.03 (s, 1H), 6.77-7.46 (m, 17H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 28.3 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 40.5$), 55.2, 64.7, 68.6, 72.8, 75.4, 82.3, 86.2, 106.4, 113.1, 122.5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 274.7$), 126.5, 126.8, 127.8, 128.1, 128.2, 128.4, 130.0, 135.9, 139.3, 144.7, 158.5; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ 11.3. Anal. Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7 \cdot 1/10\text{H}_2\text{O}$: C, 64.43; H, 5.13; N, 4.29. Found: C, 64.25; H, 5.14; N, 4.32.

2-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl-1-*O*-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl- β -D-ribofuranose (22)

アルゴン雰囲気下、遮光状態にて化合物**21** (2.01 g, 3.09 mmol) をDMF (20 mL) に溶解させた。続いて NEt_3 (1.3 mL, 9.27 mmol), TBDMSCl (0.93 g, 6.18 mmol) を加え反応を開始した。一晩攪拌後、生成物を酢酸エチルと H_2O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) にて精製した。化合物**22** (0.71 g, 0.93 mmol, 30%) 及び**23** (1.07 g, 1.40 mmol, 45%) を透明な泡状で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.09-0.11 (m, 6H), 0.91 (d, 9H, $J = 4.6$), 2.45 (d, 1H, $J = 7.8$), 3.15 (dd, 1H, $J = 5.0$ and 10.1), 3.35 (dd, 1H, $J = 3.2$ and 10.1), 3.76 (d, 6H, $J = 1.4$) 4.10-4.20 (m, 3H),

4.46 (d, 1H, $J = 12.4$), 4.78 (d, 1H, $J = 11.9$), 4.95(d, 1H, $J = 1.4$), 6.76-7.49 (m, 17H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ -5.0, -4.7, 18.1, 25.7, 28.3 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 40.5$), 55.1, 64.6, 68.8, 72.2, 76.5, 83.8, 85.9, 106.7, 113.0, 120.2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 274.7$), 126.5, 126.7, 127.7, 128.1, 128.2, 128.3, 130.1, 136.0, 136.1, 139.4, 144.9; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ 11.1. Anal. Calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}$: C, 64.38; H, 6.19; N, 3.66. Found: C, 64.39; H, 6.22; N, 3.61.

2-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl-1-*O*-[4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl-3-*O*-[(2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)]phosphanyl- β -D-ribofuranose (24**)**

アルゴン雰囲気下、化合物**23** (0.75 g, 0.98mmol) をTHF (4.9 mL) に溶解させた。続いて、DIPEA (0.85 mL, 4.90 mmol), 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (0.43 mL, 1.96mmol) を加え反応を開始した。1時間攪拌後、生成物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) にて精製した。化合物**24** (0.90 g, 0.93 mmol, 95%) を無色透明な泡状で得た。

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 149.1, 149.8

2,3,5-tri-*O*-benzoyl-1-*O*-[3-ethynyl-5-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl- β -D-ribofuranose (34**)**

アルゴン雰囲気下、1-*O*-Acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranose (0.26 g, 0.51 mmol) を CH_2Cl_2 (3 mL) に溶解させ、-30 °Cに冷却した。続いて、TMSOTf (0.14 mL, 0.76 mmol)、 CH_2Cl_2 (2 mL) に溶解させた化合物 **33** (0.17 g, 0.79 mmol) を加え反応を開始した。30分攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) を加え反応を停止した。生成物をクロロホルムと H_2O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) にて精製した。化合物 **34** (0.27 g, 0.41 mmol, 89%) を無色透明のオイルで得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.13 (s, 1H), 4.48-4.53 (m, 2H), 4.71-4.81 (m, 3H), 5.31 (s, 1H), 5.78 (d, 1H, $J = 6.7$), 5.93 (dd, 1H, $J = 6.0$ and 9.0), 7.00 (s, 1H), 7.28-7.35 (m, 4H), 7.40-7.54 (m, 6H), 7.59 (t, 1H, $J = 10$), 7.89 (d, 2H, $J = 10.5$), 7.98-8.03 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 28.1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 40.9$), 64.1, 67.0, 68.5, 72.0, 75.6, 78.9, 79.5, 82.1, 104.8, 121.9 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 275.2$), 123.4, 125.5, 128.3, 128.4, 128.5, 128.9, 129.1, 129.4, 129.4, 129.5, 129.6, 129.7, 129.7, 129.8, 132.1,

133.2, 133.4, 133.5, 138.4, 165.2, 165.2, 166.2; ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ 9.9. Anal. Calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 3/5\text{H}_2\text{O}$: C, 63.90; H, 4.11; N, 3.73. Found: C, 64.07; H, 4.11; N, 3.77.

1-*O*-[3-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl- β -D-ribofuranose (25)

アルゴン雰囲気下、化合物 **34** (2.00 g, 3.03 mmol) を MeOH (10 mL) に溶解させた。続いて 28% CH_3ONa in MeOH を触媒量添加し、反応を開始した。2時間攪拌後、飽和塩化アンモニウム水溶液を1滴加えて反応を停止した。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) にて精製した。化合物**1** (0.91 g, 2.61 mmol, 86%) を白い結晶で得た。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.33-3.38 (m, 1H), 3.52-3.57 (m, 1H), 3.78 (q, 2H, $J = 5.0$), 3.92 (q, 1H, $J = 7.0$), 4.37 (s, 1H), 4.43 (d, 1H, $J = 12.5$), 4.65 (t, 1H, $J = 5.5$), 4.69 (d, 1H, $J = 12.5$), 4.82 (t, 2H, $J = 6.5$), 5.06 (d, 1H, $J = 4.5$), 7.25 (s, 2H), 7.56 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 28.0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 39.7$), 62.9, 66.9, 70.9, 74.6, 82.1, 82.7, 84.0, 106.6, 121.9 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 276.4$), 123.1, 125.9, 128.4, 128.5, 132.5, 140.9; ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ 10.0. Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$: C, 51.62; H, 4.06; N, 7.52. Found: C, 51.58; H, 4.09; N, 7.68.

1-*O*-[3-ethynyl-5-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl- β -D-ribofuranose (35)

アルゴン雰囲気下、化合物**25** (0.80 g, 2.30 mmol) を pyridine (8 mL) に溶解させた。続いて DMTrCl (0.94 g, 2.76 mmol) を加え、反応を開始した。一晩攪拌後、生成物を酢酸エチルと H_2O で抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) にて精製した。化合物 **10** (0.61 g, 0.94 mmol, 91%) を黄色い結晶で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.12 (s, 1H), 3.31 (d, 2H, $J = 6.3$), 3.77 (d, 6H, $J = 2.9$), 4.10-4.15 (m, 2H), 4.33 (q, 1H, $J = 7.5$), 4.41 (d, 1H, $J = 15.5$), 4.67 (d, 1H, $J = 15.5$), 5.02 (s, 1H), 6.79 (dd, 4H, $J = 3.5$ and 11.0), 6.97 (s, 1H), 7.17-7.25 (m, 3H), 7.33 (d, 4H, $J = 11.0$), 7.39 (s, 1H), 7.43-7.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 28.1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 41.0$), 50.8, 55.1, 64.7, 68.0, 72.5, 75.3, 78.8, 82.4, 86.1, 106.4, 113.1, 119.8 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 244.0$), 123.2, 125.5, 126.8, 127.8, 128.1, 129.3, 129.6, 130.0, 132.1, 135.9, 139.1, 144.6, 158.4; ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ 10.1. Anal. Calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 65.00; H, 5.01; N, 4.10. Found: C, 65.01; H, 4.04; N, 4.84.

2-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl-1-*O*-[3-ethynyl-5-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl-β-D-ribofuranose (36)

アルゴン雰囲気下、化合物**35** (1.21 g, 1.86 mmol) をDMF (15 mL) に溶解させた。続いてNEt₃ (0.8 mL, 5.58 mmol), TBDMSCl (0.56 g, 3.72 mmol) を加え反応を開始した。一晩攪拌後、生成物を酢酸エチルとH₂Oで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) にて精製した。化合物**36** (0.36 g, 0.47 mmol 25%) 及び**37** (0.38 g, 0.50 mmol, 27%) を無色透明なオイルで得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.10-0.14 (m, 6H), 0.86-0.93 (m, 9H), 2.46 (d, 1H, *J* = 9.2), 3.12 (s, 1H), 3.14-3.16 (m, 1H), 3.34-3.36 (m, 1H), 3.76 (s, 6H), 4.12-4.15 (m, 2H), 4.21-4.22 (m, 1H), 4.45 (d, 1H, *J* = 15.5), 4.73 (d, 1H, *J* = 15.5), 4.93 (s, 1H), 6.78 (d, 4H, *J* = 10.9), 7.02 (s, 1H), 7.16-7.24 (m, 3H), 7.35 (d, 4H, *J* = 10.5), 7.42 (s, 1H), 7.47 (d, 2H, *J* = 9.8); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ -5.0, -4.7, 18.1, 25.7, 55.1, 64.6, 68.1, 72.2, 78.7, 82.1, 83.9, 86.0, 106.6, 113.0, 123.2, 125.5, 126.7, 127.7, 128.2, 129.3, 129.6, 130.0, 130.1, 132.1, 136.1, 136.1, 139.3, 144.8, 158.4; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ 9.9. Anal. Calcd for C₄₃H₄₇F₃N₂O₇Si·1/5H₂O: C, 64.73; H, 6.05; N, 3.51. Found: C, 64.86; H, 6.02; N, 3.47.

2-*O*-(*tert*-butyldimethyl)silyl-1-*O*-[3-ethynyl-5-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirine-3-yl)]benzyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxy)trityl-3-*O*-[(2-cyanoethoxy)(*N,N*-diisopropylamino)]phosphanyl-β-D-ribofuranose (38)

アルゴン雰囲気下、化合物**36** (0.32 g, 0.42 mmol) をTHF (2.1 mL) に溶解させた。続いて、DIPEA (0.36 mL, 2.10 mmol), 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (0.2 mL, 0.84 mmol) を加え反応を開始した。1時間攪拌後、生成物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1) にて精製した。化合物**13** (0.32 g, 0.32 mmol, 76%) を無色透明なオイルで得た。

³¹P NMR (203 MHz, CDCl₃) δ 149.4, 149.8.

6-(trifluoroacetamido)hexanoic acid (40)

アルゴン雰囲気下、hexanoic acid (1.00 g, 7.62 mmol) をMeOH (2.0 mL) に溶解させた。続いて、NEt₃ (1.6 mL, 11.43 mmol), CF₃COOEt (1.4 mL, 11.43 mmol) を加え反応を開始した。一晩攪拌後、生成物を酢酸エチルで抽出し、有機層を1M HCl aq.、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮することで、化合物**40** (1.67 g, 7.35 mmol, 97%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.36-1.46 (m, 2H), 1.64-1.70 (m, 4H), 2.39 (t, 2H, *J* = 7.3), 3.38 (t, 2H, *J* = 6.9), 3.14-3.16 (m, 1H), 6.36 (s, 1H).

(S)-3-(6-trifluoroacetyl-amino)hexanecamido-1-O-(4,4'-dimethoxy)trityl-2-propanol (41)

アルゴン雰囲気下、化合物**39** (0.50 g, 1.27 mmol) と**40** (0.35 g, 1.52 mmol) をDMF (10 mL) に溶解させた。続いて、DMAP (0.19 g, 1.52 mmol), NEt₃ (0.21 mL, 1.52 mmol), EDCI (0.29 g, 1.52 mmol) を加え反応を開始した。一晩攪拌後、生成物を酢酸エチルで生成し、有機層を蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 30 : 1) にて精製することで化合物**41** (0.44 g, 0.73 mmol, 57%) を得た。

(S)-3-(6-trifluoroacetyl-amino)hexanecamido-1-O-(4,4'-dimethoxy)trityl-2-O-[(2-cyanoethoxy)(N,N-diisopropylamino)]phosphanyl-propane (42)

アルゴン雰囲気下、化合物**41** (0.64 g, 1.06 mmol) をCH₂Cl₂ (6.4 mL) に溶解させた。続いて、DIPEA (0.74 mL, 4.24 mmol), 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (0.5 mL, 2.12 mmol) を加え反応を開始した。一晩攪拌後、生成物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 2) にて精製することで化合物**42** (0.43 g, 0.54 mmol, 51%) を得た。

³¹P NMR (203 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 149.0.

固相単体 (43)

アルゴン雰囲気下、化合物**41** (0.10 g, 0.17 mmol) をPyridine (2 mL) に溶解した。続いて、Succinic anhydride (0.10 g, 1.00 mmol), DMAP (61 mg, 0.50 mmol) を加え反応を開始した。一晩室温で静置した後、生成物を酢酸エチルで抽出し、有機層を蒸留水、飽和炭酸

水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。揮発性の溶媒をエバポレータにより減圧濃縮することでスクシニル体**42**を定量的に得た。続けて、アルゴン雰囲気下化合物**42**をDMF (1.7 mL) に溶解し、EDCI (32 mg, 0.17 mmol), CPG (0.26 g, 0.04 mmol) を加えて反応を開始した。室温で96時間静置した後、CPGをフィルターに移し、Pyridineで洗浄した。続いて、アルゴン雰囲気下洗浄したCPGにCapping mix (pyridine 13.5 mL, DMAP 0.183 g, Acetic anhydride 1.5 mL) を加えて反応を開始した。室温で48時間静置した後、CPGをフィルターに移し、Pyridine, EtOH, MeCNで洗浄することで固相単体**43** (25.8 μ mol/g) を得た。

化合物**45**は報告されている方法に従い合成した⁷⁵。

7-3 オリゴヌクレオチドの合成と精製

オリゴヌクレオチドの合成は核酸自動合成機によるホスホロアミダイト法に従い0.2 μ molスケールで行った。天然のホスホロアミダイトは0.1 M、合成したアナログのアミダイト体は0.15 MのMeCN溶液に調整した。CPG樹脂は0.2 μ mol分を固相合成用のカラムに量り取り、核酸自動合成機にセットした。なお、オリゴヌクレオチドの5'-末端はDMTr基を除去した状態で合成を終了し、アルゴンガスを通じてCPG樹脂を乾燥させた。

合成終了後、CPG樹脂をサンプルストックチューブに写し、NH₄OH : Ethanol (3 : 1) 溶液 1.0 mLを加え55 °Cで4時間振とうすることによりCPG樹脂からの切り出し及び脱保護を行った。反応後のろ液をエッペンドルフチューブに移し、減圧下乾固させた。続いて、得られた残渣にDMSO (100 μ L), NEt₃ · 3HF (125 μ L)を加え、65 °Cで90分静置することで、TBDMS基の脱保護を行った。反応終了後、反応液を0.1 M TEAA buffer (10 mL) で希釈し、平衡化したC-18逆相カラム(Sep-Pak C-18) に吸着させた。滅菌処理したmiliQ水でカラムを洗浄することで脱塩処理し、MeCNによりオリゴヌクレオチドを溶出した。続いて、溶出液を減圧濃縮し、得られた残渣をloading buffer (TBE buffer in formamide) 200 μ Lに溶解させ、20 % PAGE (500 V, 20 mA) によりオリゴヌクレオチドを精製した。ゲル中から目的のオリゴヌクレオチドバンドを切り出し、溶出バッファー (0.1 M TEAA buffer, 1 mM EDTA, 10 mL) 中で一晩振とうした。得られたろ液を平衡化したC-18逆相カラム (Sep-Pak C-18) に通し、カラムに吸着させた。カラムを滅菌処理したmiliQ水で洗浄することで脱塩処理し、MeCNによりオリゴヌクレオチドを溶出した。溶出液を減圧濃縮した後、得られた残渣を再度H₂O

1 mLに溶解させた。得られた水溶液の希釈液を作成し、260 nmにおける吸光度を測定することで、各オリゴヌクレオチドの収量を計算した。

7-4 熱変性法による 50 %融解温度 (T_m) の測定

オリゴヌクレオチドの 50 %融解温度 (T_m) 測定におけるそれぞれの鎖の濃度を 3 μ M になるように調整・減圧乾固後、測定用緩衝液 (10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 7.0), 1 mM NaCl) 200 μ L に溶解した。その後、95 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間加熱し、1 時間以上放置し常温に戻すことでアニーリング処理した。アニーリング処理した RNA 溶液 150 μ L を専用セルに入れ、20 $^{\circ}\text{C}$ から 100 $^{\circ}\text{C}$ へと加熱 ($\Delta 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) し、吸光度の変化を測定することで 50 % 融解温度 (T_m) を測定した。

7-5 Dual luciferase reporter assay

HeLa 細胞を 4000 cell/ml になるように調製し、96 well plate の各 well に 100 μ L ずつ入れ 24 時間培養した。調整した miRNA を TE buffer に溶解し、95 $^{\circ}$ C で 3 分間過熱後、1 時間以上放置し常温に戻してアニーリング処理した。づいて、miRNA 各量、培地 (OPTI-MEM) 各量、0.1 μ g/ μ L psi-CHECK 1 μ L、transfast 1.5 μ L を総量 175 μ L になるように混合し、培地を除いた 96 well plate に 35 μ L ずつ加え、更に 1 時間培養した後、通常の培地を 100 μ L ずつ加え、24 時間培養した。24 時間後、培地を除き、冷凍保存した。解凍後、Dual glo substrate 24 μ L を加え 5 分間振盪した。混合液から 23 μ L を発光測定用の 96 well plate に移し、Firefly luciferase の発光量を測定した。その後、Stop and glo substrate 23 μ L を加え 10 分振盪後、*Renilla* luciferase の発光量を測定した。*Renilla* luciferase の発光量を Firefly luciferase の発光量で標準化し、% of control を用いて比較した。なお、各発光量の測定には、Luminescenser JNR II を使用した。

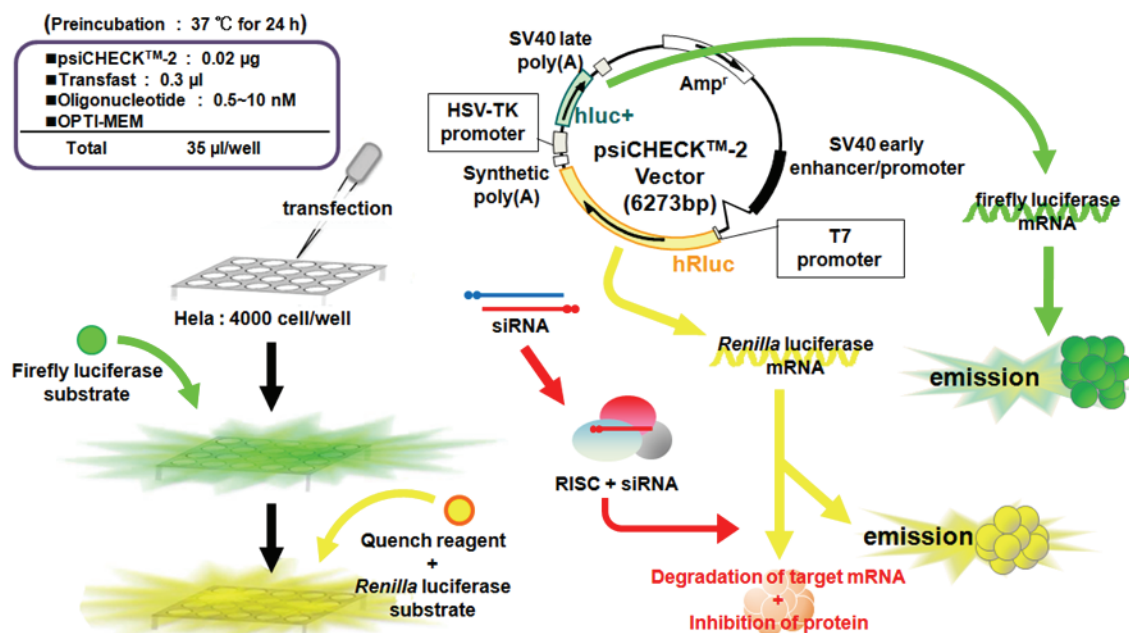


Figure 31. Dual luciferase reporter assay

7-6 RNA 捕獲能の評価

光反応性残基を導入した RNA プローブと標的となる相補鎖を 1 : 1 の割合で混合し、乾固させた。そこに、3 μ M となるように buffer (10 nM Tris-HCl (pH = 7.2), 100 nM NaCl) を加え溶解させた。その後、95 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱後、1 時間以上放置し常温に戻すことで二本鎖を形成させた。続いて、混合液に UV 照射 (365 nm 30 分、302 nm 10 分) することで、光架橋を形成させた。反応液に 7 M ウレア水溶液と loading buffer (10% TBE buffer in formamide) を加えることで未反応の二本鎖 RNA を変性させた。その後、20%PAGE (500 V, 20 mA) にて分析した。高分子量領域に新たに出現したバンドを切り出し、溶出バッファー (0.1 M TEAA buffer, 1 mM EDTA, 10 mL) 中で一晩振とうした。得られたろ液を平衡化した C-18 逆相カラム (Sep-Pak C-18) に通し、カラムに吸着させた。カラムを滅菌処理した miliQ 水で洗浄することで脱塩処理し、MeCN によりオリゴヌクレオチドを溶出した。溶出液を減圧濃縮した後、得られたオリゴヌクレオチドを減圧下乾固させ、MALDI-TOF/MS にて分析した。

7-7 ウェスタンブロッティングによる遺伝子抑制能の評価

DLD-1細胞を5000 cell/mlの濃度で調整し、6 well plateで24時間培養した。合成したmiRNAの各鎖をTE bufferに終濃度20 μ Mで溶解し、95 $^{\circ}$ Cで3分間過熱後、1時間以上放置し常温に戻してアニーリング処理することで、二本鎖miRNAを調整した。調整したmiRNAをOPTI-MEM希釈し、Lipofectamine RNAiMAXを加えて15分間静置した。調整した混合液を終濃度40 nMとなるように細胞へ添加し、更に48時間培養した。続いて、セルスクレーパーでウェル上の細胞をはがし、エッペンドルフチューブに回収し、遠心分離 (2,000 rpm, 5分) した後、上清を除いた。Protein lysis bufferにprotease inhibitor及びalkaline phosphataseを加えた混合液を作成し、細胞へ添加し氷浴上で20分間静置した。続いて、2遠心分離 (12,000 rpm, 20分) を行い、上清を総タンパク質として得た。タンパク質はLowry法にて濃度を測定し、100 μ g/100 μ lとなるようにSDSと滅菌水で調整した。調整したタンパク液は98 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後、氷浴に取り、タンパク質を変性させた。変性させたタンパク質を12.5 %SDS- PAGEで分離し、ウェスタンブロッティング法に従いメンブレン上に転写した。メンブレンをスキムミルクでブロッキングした後、1次抗体希釈液に浸して4 $^{\circ}$ Cで1晩静置した。メンブレンを洗浄した後、2次抗体希釈液に浸して室温で1時間振盪し、2次抗体上のホースラディッシュペルオキシダーゼをLAS 4000で検出することにより、各タンパク質の発現量を評価した。

7-8 miRNAプローブによる標的mRNAの捕獲

DLD-1細胞を300,000 cell/9.0 mLとなるように調整し、6 wellプレートで24時間培養した。また、アニーリング処理したmiRNAプローブをOPTI-MEMで希釈し、Lipofectamine RNAiMAXを加えて15分間静置した。調整した混合液を、miRNAプローブが終濃度40 nMとなるよう細胞へ添加し、更に24時間培養した。培地を除き、PBS bufferを加えた後、氷上でUV (365 nm 15分) を照射した。続いてセルスクレーパーを用いて細胞をはがし、エッペンドルフチューブへ回収した。遠心 (2,000 rpm, 5分) して上清を除いた後、NucleoSpin miRNAを用いてプロトコルに従い、総RNAを抽出した。dynabeads M-280 50 μ Lをwash buffer (500 μ L, 20 mm Tris, 200 mm NaCl, 2.5 mm $MgCl_2$, 0.1 % NP-40, pH 7.5) で2回洗浄し、reaction buffer (100 μ L, 20 mm Tris, 200 mm NaCl, 2.5 mm $MgCl_2$, 0.5 % NP-40, pH 7.5, 20U RNaseOUT) に再度溶解し、抽出したRNAを添加して1時間室温で振盪した。次にdynabeadsをwash buffer 500 μ Lで2回洗浄し、TRIZOL 200 μ L及びRNase free water 50 μ Lを加え、プロトコルに従い総RNAを抽出した。精製前後の総RNAをSuperscript VILOを用いてcDNAへと逆転写し、Thermal Cycler Dice® Real Time System II によりリアルタイムPCRを行い、mRNAを定量した。

7-9 cRGDコンジュゲートオリゴヌクレオチドの合成

RNA54の合成

RNA51 (15 nmol) を10 mMリン酸バッファー (100 mM NaCl, pH 7.4) に溶解した。続けてEMCS (50 mM in DMSO, 1.5 μ mol) を加えて37 °Cで一晩静置した。反応液を0.1 MTEAAバッファーに希釈し、0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過した後、HPLCを用いてマレイミド修飾RNAを分取した。さらに、回収液にcRGDペプチド (50 mM in DMSO, 100 nmol) を直接加え、室温で一晩静置した後、HPLCを用いてcRGDコンジュゲート体であるRNA54 (1.9 nmol, 12%) を得た。

RNA55の合成

RNA52 (20 nmol) を10 mMリン酸バッファー (100 mM NaCl, pH 7.4) に溶解した。続けてEMCS (50 mM in DMSO, 0.75 μ mol) を加えて37 °Cで一晩静置した。反応液を0.1 MTEAAバッファーに希釈し、0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過した後、HPLCを用いてマレイミド修飾RNAを分取した。さらに、回収液にcRGDペプチド (50 mM in DMSO, 50 nmol) を直

接加え、室温で一晩静置した後、HPLCを用いてcRGDコンジュゲート体であるRNA55 (2.8 nmol, 14%) を得た。

RNA56の合成

RNA53 (20 nmol) を10 mMリン酸バッファー (100 mM NaCl, pH 7.4) に溶解した。続けてEMCS (50 mM in DMSO, 4.0 μ mol) を加えて37°Cで一晩静置した。反応液を0.1 MTEAAバッファーに希釈し、0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過した後、HPLCを用いてマレイミド修飾RNAを分取した。さらに、回収液にcRGDペプチド (50 mM in DMSO, 110 nmol) を直接加え、室温で一晩静置した後、HPLCを用いてcRGDコンジュゲート体であるRNA56 (5.0 nmol, 25%) を得た。

7-10 細胞膜透過性の検証

A2058細胞を30,000 cell/mLとなるように調整し、35 mmガラスボトムディッシュで24時間培養した。続いて、培地を除き、TE buffer中でアニーリング処理した蛍光修飾siRNA (250 nM in OPTI-MEM) を加え、更に18時間培養した。Hoecst-33342を用いて核染色をした後、各ウェルを1×PBSで洗浄し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

7-11 リアルタイムPCR法による遺伝子発現抑制能試験

A2058細胞を30,000 cell/mLとなるように調整し、96 wellプレートで24時間培養した。続いて、培地を除き、TE buffer中でアニーリング処理したsiRNA (OPTI-MEM溶液) を加え、24時間培養した。FBSを2%濃度になるよう培地に添加し、更に48時間培養後、Superprep cell Lysis & RT kit for qPCRを用いてcDNAを合成した。合成したcDNA中の*RecQL1* mRNAと β -*actin* mRNAの発現量をThermal Cycler Dice® Real Time System II を用いたリアルタイムPCR法により定量した。

7-12 抗腫瘍活性評価

A2058細胞を40,000 cell/mLとなるように調整し、6 wellプレートで24時間培養した。また、アニーリング処理したmiRNAプローブをOPTI-MEMで希釈し、Lipofectamine RNAiMAXを加えて15分間静置した。調整した混合液を、miRNAプローブが終濃度20 nMとなるよう細胞へ添加し、更に72時間培養した。培地を除きウェルを1×PBSで洗浄した後、トリプシン処理により細胞を回収した。トリパンブルーを用いて染色した生細胞数をカウントすることで、miRNAの抗腫瘍活性を評価した。

7-13 ヌクレアーゼ耐性試験

miRNA を PBS バッファーに溶解した後、ウシ胎児血清 (FBS) を終濃度 10%となる様に添加し、37 °C 条件下にてインキュベートした。1, 3, 6, 12 時間後に反応液を分取し、15% Native PAGE (200 V, 15 mA) で miRNA を分離した。ゲルを染色液 (SYBR GREEN 1 1 μ L, TBE buffer 10 mL) に浸し、30 分間浸透した後、LAS4000 を用いて蛍光標識された RNA を観察することでヌクレアーゼ耐性を評価した。

参考文献

- (1) Fire, A.; Xu, S. Q.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature.*, **1998**, *391*, 806–811.
- (2) Kim, V. N.; Han, J.; Siomi, M. C. Biogenesis of Small RNAs in Animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, *10*, 126–139.
- (3) Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. The *C. Elegans* Heterochronic Gene *Lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*. *Cell.*, **1993**, *75*, 843–854.
- (4) Tang, G. siRNA and miRNA: an Insight Into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences.*, **2005**, *30*, 106–114.
- (5) Li, Y.; Kowdley, K. V. MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics.*, **2012**, *10*, 246–253.
- (6) Jansson, M. D.; Lund, A. H. MicroRNA and Cancer. *Molecular oncology.*, **2012**.
- (7) Krützfeldt, J.; Rajewsky, N.; Braich, R.; Rajeev, K. G.; Tuschl, T.; Manoharan, M.; Stoffel, M. Silencing of microRNAs in Vivo with “Antagomirs.” *Nature.*, **2005**, *438*, 685–689.
- (8) Ma, L.; Teruya-Feldstein, J.; Weinberg, R. A. Tumour Invasion and Metastasis Initiated by microRNA-10b in Breast Cancer. *Nature.*, **2007**, *449*, 682–688.
- (9) Park, J.-K.; Kogure, T.; Nuovo, G. J.; Jiang, J.; He, L.; Kim, J. H.; Phelps, M. A.; Papenfuss, T. L.; Croce, C. M.; Patel, T.; et al. miR-221 Silencing Blocks Hepatocellular Carcinoma and Promotes Survival. *Cancer Research.*, **2011**, *71*, 7608–7616.
- (10) Swarbrick, A.; Woods, S. L.; Shaw, A.; Balakrishnan, A.; Phua, Y.; Nguyen, A.; Chanthery, Y.; Lim, L.; Ashton, L. J.; Judson, R. L.; et al. miR-380-5p Represses P53 to Control Cellular Survival and Is Associated with Poor Outcome in MYCN-Amplified Neuroblastoma. *Nature Medicine.*, **2010**, *16*, 1134–1140.
- (11) Würdinger, T.; Tannous, B. A.; Saydam, O.; Skog, J.; Grau, S.; Soutschek, J.; Weissleder, R.; Breakefield, X. O.; Krichevsky, A. M. miR-296 Regulates Growth Factor Receptor Overexpression in Angiogenic Endothelial Cells. *Cancer Cell.*, **2008**, *14*, 382–393.
- (12) Johnson, S. M.; Grosshans, H.; Shingara, J.; Byrom, M.; Jarvis, R.; Cheng, A.; Labourier, E.; Reinert, K. L.; Brown, D.; Slack, F. J. RAS Is Regulated by the Let-7 MicroRNA Family. *Cell.*, **2005**, *120*, 635–647.

- (13) Hermeking, H. The miR-34 Family in Cancer and Apoptosis. *Cell Death and Differentiation.*, **2009**, *17*, 193–199.
- (14) Pramanik, D.; Campbell, N. R.; Karikari, C.; Chivukula, R.; Kent, O. A.; Mendell, J. T.; Maitra, A. Restitution of Tumor Suppressor microRNAs Using a Systemic Nanovector Inhibits Pancreatic Cancer Growth in Mice. *Molecular Cancer Therapeutics.*, **2011**, *10*, 1470–1480.
- (15) Kota, J.; Chivukula, R. R.; Donnell, K. A. O.; Wentzel, E. A.; Montgomery, C. L.; Hwang, H.-W.; Chang, T.-C.; Vivekanandan, P.; Torbenson, M.; Clark, K. R.; et al. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model. *Cell.*, **2009**, *137*, 1005–1017.
- (16) Lewis, B. P.; Shih, I.; Jones-Rhoades, M. W.; Bartel, D. P. Prediction of Mammalian microRNA Targets. *Cell.*, **2003**, *115*, 787–798.
- (17) Schirle, N. T.; MacRae, I. J. The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science.*, **2012**, *336*, 1037–1040.
- (18) Lewis, B. P.; Burge, C. B.; Bartel, D. P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are MicroRNA Targets. *Cell.*, **2005**, *120*, 15–20.
- (19) Schirle, N. T.; Sheu-Gruttadauria, J.; MacRae, I. J. Structural Basis for microRNA Targeting. *Science.*, **2014**, *346*, 608–613.
- (20) Baek, D.; Villén, J.; Shin, C.; Camargo, F. D.; Gygi, S. P.; Bartel, D. P. The Impact of microRNAs on Protein Output. *Nature.*, **2008**, *455*, 64–71.
- (21) Friedman, R. C.; Farh, K. K. H.; Burge, C. B.; Bartel, D. P. Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of microRNAs. *Genome Research.*, **2008**, *19*, 92–105.
- (22) Ruby, J. G.; Jan, C.; Player, C.; Axtell, M. J.; Lee, W.; Nusbaum, C.; Ge, H.; Bartel, D. P. Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. Elegans*. *Cell.*, **2006**, *127*, 1193–1207.
- (23) Stark, A.; Lin, M. F.; Kheradpour, P.; Pedersen, J. S.; Parts, L.; Carlson, J. W.; Crosby, M. A.; Rasmussen, M. D.; Roy, S.; Deoras, A. N.; et al. Discovery of Functional Elements in 12 *Drosophila* Genomes Using Evolutionary Signatures. *Nature.*, **2007**, *450*, 219–232.
- (24) Lall, S.; Grün, D.; Krek, A.; Chen, K.; Wang, Y.-L.; Dewey, C. N.; Sood, P.; Colombo, T.; Bray, N.; MacMenamin, P.; et al. A Genome-Wide Map of Conserved MicroRNA Targets in *C. Elegans*. *Current Biology.*, **2006**, *16*, 460–471.

- (25) Gaidatzis, D.; van Nimwegen, E.; Hausser, J.; Zavolan, M. Inference of miRNA Targets Using Evolutionary Conservation and Pathway Analysis. *BMC Bioinformatics.*, **2007**, *8*, 69.
- (26) Betel, D.; Wilson, M.; Gabow, A.; Marks, D. S.; Sander, C. The microRNA.org Resource: Targets and Expression. *Nucleic Acids Research.*, **2008**, *36*, D149–D153.
- (27) Griffiths-Jones, S.; Saini, H. K.; van Dongen, S.; Enright, A. J. miRBase: Tools for microRNA Genomics. *Nucleic Acids Research.*, **2008**, *36*, D154–D158.
- (28) Miranda, K. C.; Huynh, T.; Tay, Y.; Ang, Y.-S.; Tam, W.-L.; Thomson, A. M.; Lim, B.; Rigoutsos, I. A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. *Cell.*, **2006**, *126*, 1203–1217.
- (29) Jiang, Q.; Feng, M.-G.; Mo, Y.-Y. Systematic Validation of Predicted microRNAs for Cyclin D1. *BMC Cancer.*, **2009**, *9*, 194.
- (30) Bagga, S.; Bracht, J.; Hunter, S.; Massirer, K.; Holtz, J.; Eachus, R.; Pasquinelli, A. E. Regulation by Let-7 and Lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell.*, **2005**, *122*, 553–563.
- (31) Lim, L. P.; Lau, N. C.; Garrett-Engle, P.; Grimson, A. Microarray Analysis Shows That Some microRNAs Downregulate Large Numbers of Target mRNAs. *Nature.*, **2005**.
- (32) Hutvagner, G.; Simard, M. J.; Mello, C. C.; Zamore, P. D. Sequence-Specific Inhibition of Small RNA Function. *Plos Biol.*, **2004**, *2*, e98.
- (33) Meister, G.; Landthaler, M.; Dorsett, Y.; Tuschl, T. Sequence-Specific Inhibition of microRNA- and siRNA-Induced RNA Silencing. *RNA.*, **2004**, *10*, 544–550.
- (34) Ørom, U. A.; Kauppinen, S.; Lund, A. H. LNA-Modified Oligonucleotides Mediate Specific Inhibition of microRNA Function. *Gene.*, **2006**, *372*, 137–141.
- (35) Frankel, L. B.; Christoffersen, N. R.; Jacobsen, A.; Lindow, M.; Krogh, A.; Lund, A. H. Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA miR-21 in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 1026–1033.
- (36) Nicolas, F. E.; Pais, H.; Schwach, F.; Lindow, M.; Kauppinen, S.; Moulton, V.; Dalmay, T. Experimental Identification of microRNA-140 Targets by Silencing and Overexpressing miR-140. *RNA.*, **2008**, *14*, 2513–2520.
- (37) Chi, S. W.; Zang, J. B.; Mele, A.; Darnell, R. B. Argonaute HITS-CLIP Decodes microRNA–mRNA Interaction Maps. *Nature.*, **2009**.
- (38) Thomson, D. W.; Bracken, C. P.; Goodall, G. J. Experimental Strategies for microRNA Target Identification. *Nucleic Acids Research.*, **2011**, *39*, 6845–6853.

- (39) Imig, J.; Brunschweiler, A.; mmer, A. B. U.; Guennewig, B.; Mittal, N.; Kishore, S.; Tsikrika, P.; Gerber, A. E. P.; Zavolan, M.; Hall, J. miR-CLIP Capture of a miRNA Targetome Uncovers a lincRNA H19&miR-106a Interaction. *Nature Chemical Biology*., **2014**, 1–10.
- (40) Brunner, J.; Senn, H.; Richards, F. M. 3-Trifluoromethyl-3-Phenyldiazirine. a New Carbene Generating Group for Photolabeling Reagents. *J. Biol. Chem.*, **1980**.
- (41) Tomohiro, T.; Yamamoto, A.; Tatsumi, Y.; Hatanaka, Y. [3-(Trifluoromethyl)-3 H -Diazirin-3-YI]Coumarin as a Carbene-Generating Photocross-Linker with Masked Fluorogenic Beacon. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 11551–11553.
- (42) Morimoto, S.; Tomohiro, T.; Maruyama, N.; Hatanaka, Y. Photoaffinity casting of a coumarin flag for rapid Identification of ligand-binding sites within protein. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 1811–1813.
- (43) 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.*, **2010**, 46, 7367–7369.
- (44) Takamizawa, J.; Konishi, H.; Yanagisawa, K.; Tomida, S.; Osada, H.; Endoh, H.; Harano, T.; Yatabe, Y.; Nagino, M.; Nimura, Y.; et al. Reduced Expression of the Let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Research*., **2004**, 64, 3753–3756.
- (45) Kano, M.; Seki, N.; Kikkawa, N.; Fujimura, L.; Hoshino, I.; Akutsu, Y.; Chiyomaru, T.; Enokida, H.; Nakagawa, M.; Matsubara, H. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-Suppressive miRNAs Target FSCN1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Cancer*., **2010**, 127, 2804–2814.
- (46) Ørom, U. A.; Lund, A. H. Isolation of microRNA Targets Using Biotinylated Synthetic microRNAs. *Methods*., **2007**, 43, 162–165.
- (47) Wilson, R. C.; Tambe, A.; Kidwell, M. A.; Noland, C. L.; Schneider, C. P.; Doudna, J. A. Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell*., **2014**, 1–11.
- (48) Elkayam, E.; Kuhn, C.-D.; Tocilj, A.; Haase, A. D.; Greene, E. M.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L. The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell*., **2012**, 150, 100–110.

- (49) Sachdeva, M.; Zhu, S.; Wu, F.; Wu, H.; Walia, V.; Kumar, S.; Elble, R.; Watabe, K.; Mo, Y.-Y. P53 Represses C-Myc Through Induction of the Tumor Suppressor miR-145. *PNAS.*, **2009**, *106*, 3207–3212.
- (50) Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Aoyama, H.; Ohmae, T.; Endo, M.; Suzuki, M. Design of dantrolene-derived probes for radioisotope-free photoaffinity labeling of proteins involved in the physiological Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 1289–1294.
- (51) Ji J.; Shi J.; Budhu A.; Yu Z.; Forgues M.; Roessler S.; Ambs S.; Chen Y.; Meltzer P. S.; Croce C. M.; Qin L.; Man K.; Lo C.; Lee J.; Ng I. O. L.; Fan J.; Tang Z.; Sun H.; Wang X. MicroRNA Expression, Survival, and Response to Interferon in Liver Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **2009**, *361*, 1437– 1447.
- (52) Ichikawa T.; Sato F.; Terasawa K.; Tsuchiya S.; Toi M.; *et al.* Trastuzumab produces therapeutic actions by upregulating miR-26a and miR-30b in breast cancer cells. *PLoS One.*, **2012**, *7*, e31422.
- (53) Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.*, **2010**, *17*, 193-199
- (54) Juliano R. L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research.*, **2016**, *44*, 6518-6548.
- (55) Huang L.; Liu Y. In vivo delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2011**, *13*, 507-530.
- (56) Leung A. K.; Tam Y. Y.; Cullis P. R. Lipid nanoparticles for short interfering RNA delivery. *Adv. Gent.*, **2014**, *88*, 71-110.
- (57) Yin H.; Kansty R. L.; Eltoukhy A. A.; Vegas A. J.; Drkin J. R. Anderson D. G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Gent.*, **2014**, *15*, 541-555.
- (58) Li J.; Wang Y.; Zhu Y.; Oupicky D. Recent advances in delivery of drug-nucleic acids combinations for cancer treatment. *J. Control. Release.*, **172**, 589-600.
- (59) Soutschek J.; Akinc A.; Bramlage B.; Charisse K.; Constien R.; Donoghue M.; Elbashir S.; Geick A.; Hadwiger P.; Harborth J.; *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.*, **432**, 173-178.
- (60) Lee S. H.; Kang Y. Y.; Jang H. E.; Mok H. Current preclinical small interfering RNA (siRNA)-based conjugate systems for RNA therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2015**, *104*, 78-92.

- (61) Nair J. K.; Willoughby J. J.; Chan A.; Charisse K.; Alam M. R.; Wang Q.; Hoekstra M.; Kandasamy P.; Kel'in A. V.; Milstein S.; *et al.* Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 16958-16961.
- (62) Yamamoto T.; Sawamura M.; Wada F.; Harada-Shiba M. Obika S. Serial incorporation of a monovalent GalNAc phosphoramidite unit into hepatocyte-targeting antisense oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 26-32.
- (63) Chen X.; Plasencia C.; Hou Y.; Neamati N. Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 1098–1106.
- (64) Wang F.; Li Y.; Shen Y.; Wang A.; Wang S.; Xie T. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, 14, 13447-13462.
- (65) Alam M. R.; Dixit V.; Kang H.; Li Z.; Chen X.; Trejo J.; Fisher M.; Juliano R. L. Intracellular delivery of an anionic antisense oligonucleotide via receptor-mediated endocytosis. *Nucleic Acids Research*, **2008**, 36, 2764-2776.
- (66) Liu X.; Wang W.; Samarsky D.; Liu L.; Xu Q.; Zhang W.; Zhu G.; Wu P.; Zuo X.; Deng H.; *et al.* Tumor-targeted in vivo gene silencing via systemic delivery of cRGD-conjugated siRNA. *Nucleic Acids Research*, **2014**, 42, 11805-11817.
- (67) Alam M. R.; Ming X.; Fisher M.; Lackey J. M.; Rajeev K. G.; Manoharan M.; Juliano R. L. Multivalent cyclic RGD conjugates for targeted delivery of small interfering RNA. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 1673-1681.
- (68) Liu S. Radiolabeled cyclic RGD peptidies as integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20 2199-2213.
- (69) Azhayev A. V.; Antopolsky M. L.; Amide group assisted 3'-dephosphorylation of oligonucleotides synthesized on universal A-supports. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 4977-4986.
- (70) Voirin E.; Behr J.; Kotera M. Versatile synthesis of oligodeoxylibonucleotide-oligospermine conjugates. *Nat. Protocol.*, **2007**, 2, 1360-1367.
- (71) Brassch D. A.; Jensen S.; Liu Y.; Kaur K.; Arar K.; White M. A.; Corey D. R. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry*. **2003**, 42, 7967-7975.
- (72) Deleavey G. F.; Damha M. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chemistry & Biology*, **2012**, 19, 937-954.

- (73) Schirle N. T.; Kinberger G. A.; Murray H. F.; Lima W. F.; Prakash T. P.; MacRae I. J. Structural analysis of human argonaute-2 bound to a modified siRNA guide. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 8694-8697.
- (74) 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.
- (75) Altevogt D.; Hrenn A.; Ken C.; Clima L.; Bannwarth W.; Merfort I. A new assay format for NF- κ B based on a DNA triple helix and a fluorescence response energy transfer. *Org. Biomol. Chem.*, **209**, 7, 3934-3939.

謝辞

本研究遂行にあたり、学部時代から6年間、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、ご多忙の中、本論文の審査をお引き受けくだ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、細胞実験を行うに際し有益なご助言、ご指導をいただきました岐阜大学連合創薬医療情報研究科 赤尾幸博教授に深く感謝致します。また、実験操作について有益なご助言、ご指導をいただきました同研究室の皆様に深く感謝致します。

本研究を遂行する上で、多くのご助言を頂きました岐阜大学応用生物科学部 産官学連携研究員 前田雄介博士に深く感謝致します。

応用生物科学部 生物有機化学研究室で多くの時間を共有し、多大なご助言・ご協力を頂きました先輩方、他同輩諸氏に深く感謝致します。

最後に、筆者の9年間の長い学生生活を経済的に支援して頂いた両親並びに親族の皆様に心より感謝致します。