

## 8. インテリジェント人工核酸を用いた革新的 RNA 創薬研究

佐々木 茂貴

九州大学 大学院薬学研究院 創薬科学部門

Key words : RNA, DNA, 核酸, オリゴヌクレオチド, 官能基転移反応

### 緒言

遺伝子情報は DNA から mRNA に転写され、さらにタンパク質に翻訳されて機能する。近年、この遺伝情報の流れが、様々な機構によって精密に制御されていることが明らかにされ、生化学の概念が大きく変革している。最も大きな発見の一つは、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA (ncRNA) の発見であり、現在でも新しい ncRNA の発見が続いている。ncRNA の発見は、遺伝子に作用する核酸医薬の分野にも大きな革新をもたらしている。ゲノム解析法の進歩によって DNA や RNA の塩基修飾の分析も進み、DNA や RNA に対するメチル化のような小さな化学修飾がエピゲノム修飾として遺伝子機能の重要なコントロール機構であることも分かってきた。また、病気の発症においても、核酸塩基に対する化学反応は重要な影響を持ち、塩基配列にわずかに一塩基の違いが発生しても機能に大きな影響を与える。そこで、我々の研究室では、一塩基を正確に区別するための機能性人工核酸の開発を目指している<sup>1)</sup>。相補的な塩基対形成は塩基配列認識の基本であるが、1 塩基の違いを区別する十分な選択性を実現することは容易ではない。我々の手法では、塩基対形成に加えて、化学反応によって標的を厳密に識別するため、高い配列選択性と塩基選択性を兼ね備えた RNA 修飾法の実現が期待された。本研究によって標的塩基選択的な官能基転移人工核酸を開発したので報告する。

### 方法、結果および考察

生体内では、塩基のアルキル化は遺伝子制御の鍵反応となっており、DNA シトシンの 5'-メチル化は代表的なエピジェネティック修飾である。最近では、RNA アデニンの 6-アミノ-メチル化あるいは RNA リボースの 2'-O-メチル化など、RNA に対するエピジェネティック修飾が注目されている。アルキル化抗がん剤は DNA をアルキル化するが、RNA に対する反応も含まれていると考えられている。このように DNA や RNA 塩基の選択的な化学修飾を配列特異的にコントロールできれば、遺伝子発現を一塩基レベルで制御できる技術に展開可能と考えられた。この目的のために我々は標的 RNA との錯体内で官能基を転移させる機能性人工核酸の開発に取り組んだ。図 1 に官能基転移人工核酸の概念図を示した。人工核酸は標的 RNA と相補的な配列を持ち、安定な 2 本鎖を形成する。この錯体内において、官能基と標的塩基が接近することによって特異的な反応が誘起され、配列および塩基特異的に官能基が転移する。その結果、RNA は部位特異的および塩基特異的な化学修飾を受けることになる。

この概念を最初に実現した例は、S-ニトロシル-6-チオグアノシン (1) を含む人工核酸による標的シトシンへのニトロシル基転移反応である。ニトロシル基はシトシンおよび 5-メチルシトシン 4-アミノ基に選択的に転移し、N-ニトロシル体 (2) が生成した。5-メチルシトシンの場合、N-ニトロシル体は脱アミノ化してチミンを生成することが確認された (図 2)<sup>2)</sup>。この反応は配列選択的に 5-メチルシトシンをチミンに変換したことから、人工的な編集反応と呼ぶことができる。

S-ニトロシル-6-チオグアノシンを含む人工核酸は安定性に問題があったため、安定な分子の転移反応を検討した。ジケトビニル転移基が導入されたチオグアノシン (3) はシトシンアミノ基とマイケル反応を起こし、引き続き  $\beta$ -脱離によりチオグアノシンからシトシンに転移する (4)。この反応は、グアニン-2-アミノ基のアルキル化、遷移金属イオンによる活性化、RNA 分子への種々の官能基の導入、O6 メチルグアニンの検出法などに展開された (図 3)<sup>3-6)</sup>。

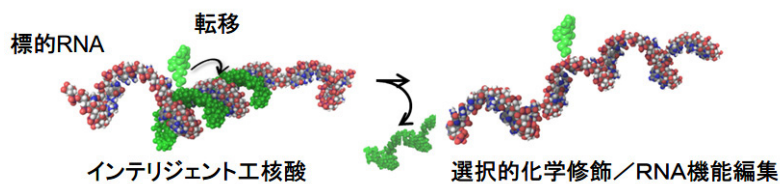


図1. 官能基転移人工核酸による RNA の特異的的化学修飾反応の概念図

人工核酸は標的 RNA と相補的な配列を持ち安定な 2 本鎖を形成する。この錯体内において、官能基と標的塩基が接近することによって特異的な反応が誘起され、配列および塩基特異的に官能基が転移する。

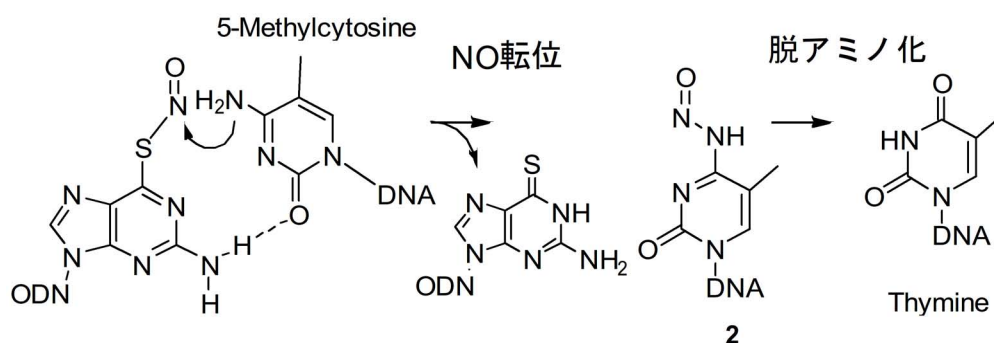


図2. *S*-ニトロシル-6-チオグアノシン **1** を含む人工核酸による標的シトシンへのニトロシル基転移反応

ニトロシル基はシトシン 4-アミノ基に選択的に転移し、*N*-ニトロシル体 **2** が生成する。5-メチルシトシンが基質の場合、*N*-ニトロシル体は脱アミノ化してチミンを生成する。

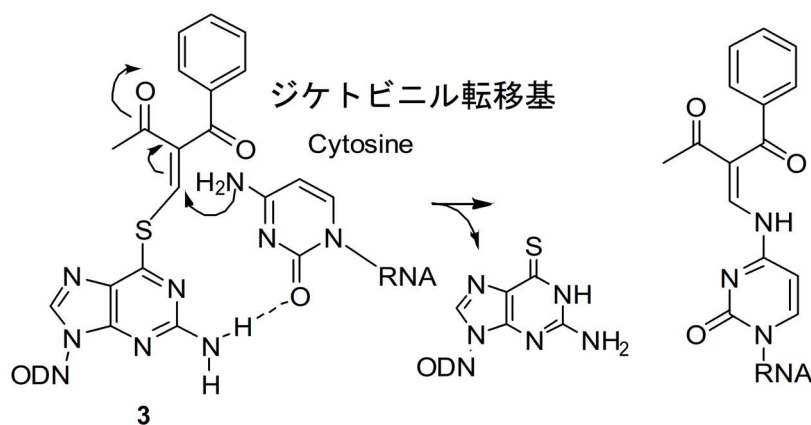


図3. ジケトビニル型転移基によるシトシン 4-アミノ基の修飾

ジケトビニル型転移基にシトシンアミノ基がマイケル反応を起こし、引き続き  $\beta$ -脱離によりチオグアノシンからシトシンに転移する。

ジケトビニル転移基は様々な用途に利用可能であるが、細胞内での利用には、転移基の安定性に問題が残されていた。そこで、転移基の安定性を高め、転移反応性が金属イオンとの錯体形成によって活性化される新しいピリジニルケトビニル転移基を設計した (5)<sup>7)</sup>。ピリジニルケト基は2価リガンドとして遷移金属イオンと錯体形成することによってマイケル反応性が高まることを期待した (図4)。

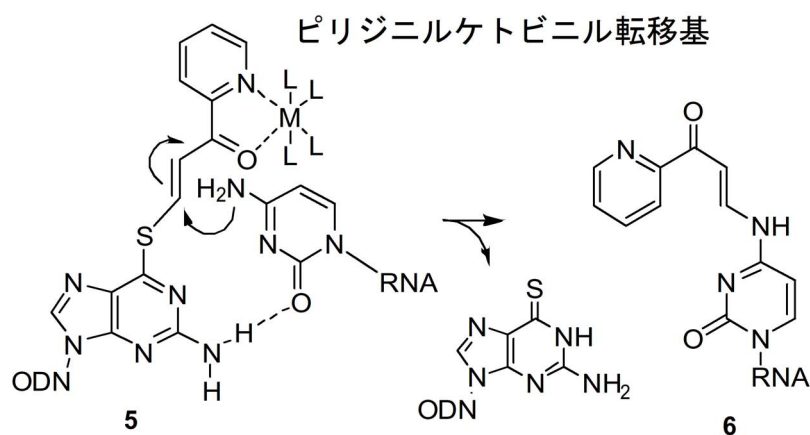


図4. 金属イオンとの錯体形成により活性化されるピリジニルケトビニル転移基の設計  
ピリジニルケト基は2価金属イオンと錯体形成することによって活性化されることが期待された。

興味深いことに、ピリジニルケト基は図4に示した *E*-ビニル体のみが高い反応性を示し、対応する *Z*-体は全く反応しないことが分かった。図5にピリジニルケト転移基を含む人工核酸と標的 RNA との転移反応の結果をまとめた。転移反応は  $\text{NiCl}_2$  の添加により大きく加速され、ほぼ10分以内に反応が終了した。反応は EDTA で完全に阻害されるので、反応の進行に  $\text{NiCl}_2$  が必須であることが示されている。10分後の反応収率を比較するとシトシンは約90%収率であるのに対して、その他の塩基はほとんど反応しておらず、シトシンへの高い反応性が示された。

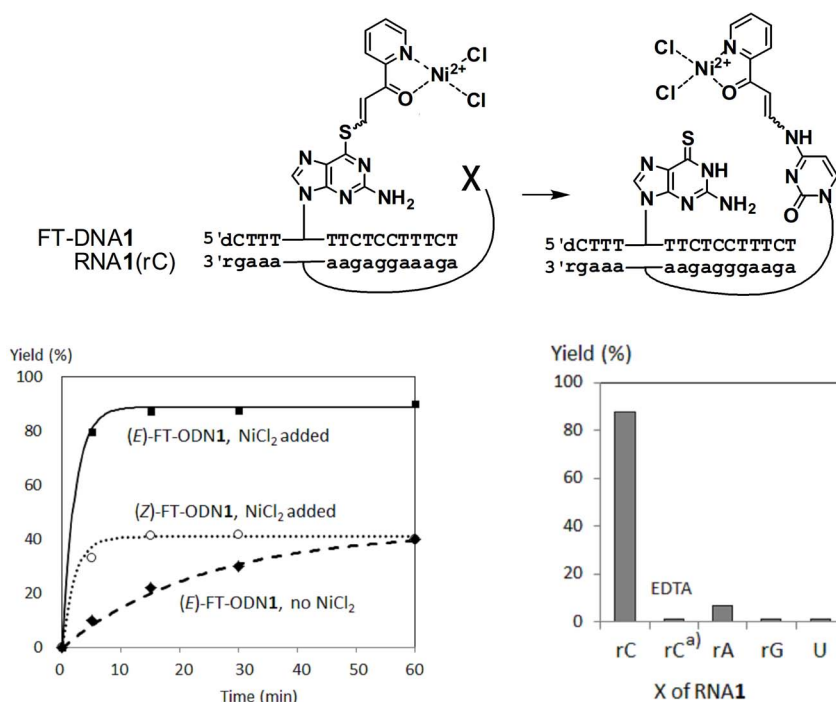


図5. ピリジニルケト転移基による転移反応の時間経過と塩基選択性

反応は pH7, 37 °C で行われた。NiCl<sub>2</sub> は RNA1 と同濃度添加。転移反応収率は HPLC で算出し、塩基の反応収率は 10 分反応後の値を棒グラフで表している。

ピリジニルケト転移基は NiCl<sub>2</sub> により高い反応性が誘起されたが、RNA 基質が存在しないときの水中での安定性はほとんど影響を受けないことがわかった。このことは、NiCl<sub>2</sub> はピリジニルケト転移基の化学的反応性を高めている訳ではないことを示している。そこで、RNA 基質のシトシン反応点で前後配列を変えたすべての 16 種類の組み合わせについて反応を行ったところ、隣接塩基にグアニンとアデニンを含む場合に効果的な転移が起こることが分かった。とくにシトシンの 5' 側のグアニンを 7-デアザグアニンに変更したところ反応は全く進行しなかった。これらのことから、反応の進行は金属イオンがグアニンおよびアデニンの 7 位窒素原子と錯体形成することが必須であることが示された。速度論的な分析を踏まえて、NiCl<sub>2</sub> による転移反応の活性化はピリジニルケト部とプリン塩基の 7 位窒素を橋かけするように錯体形成し、人工核酸と標的 RNA を強制的に接近させることによって、シトシン 4-アミノ基のマイケル付加反応を促進したものと考えている (図 6)。この反応機構によってピリジニルケトビニル転移基は緩衝液中では NiCl<sub>2</sub> による活性化を受けず、安定性は変化しないものの、標的 RNA との錯体内でのみ活性化を受ける現象もよく説明できる。安定な反応基が錯体内で特異的に活性化される興味深い新しい活性化機構が明らかになった。

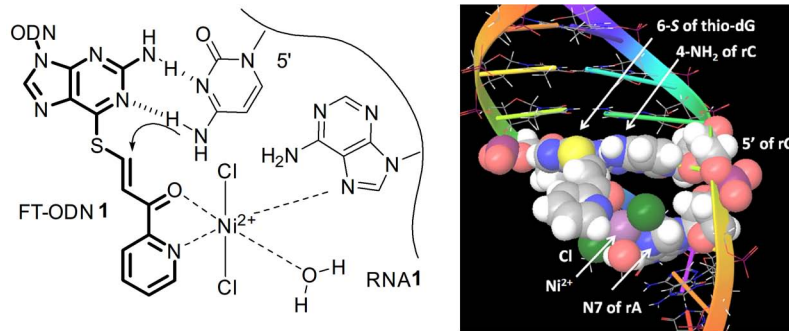


図6. NiCl<sub>2</sub>による転移反応活性化機構

NiCl<sub>2</sub>はピリジニルケト部とプリン塩基の7位窒素を橋かけするように錯体形成し、人工核酸と標的RNAを強制的に接近させることによって、シトシン4-アミノ基のマイケル付加反応を促進する。

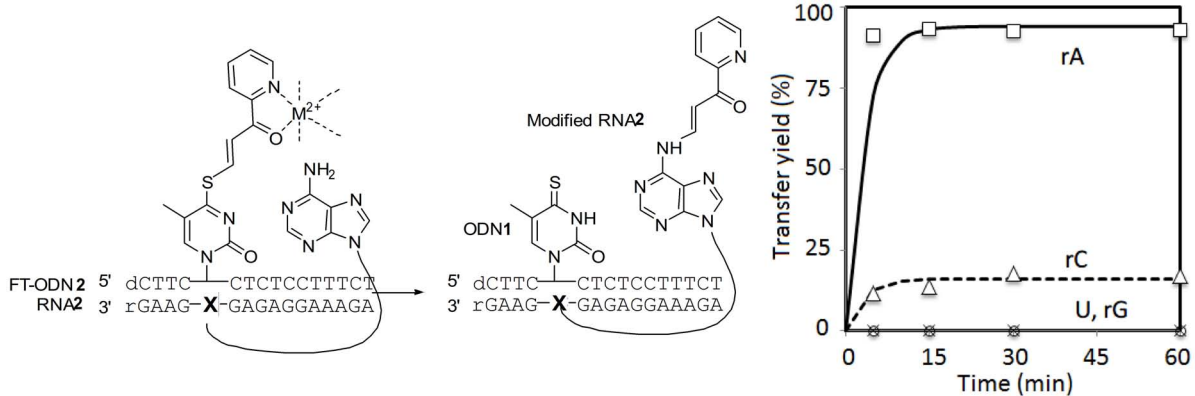


図7. ピリジニルケトビニル導入チオチミン体によるアデニン特異的な修飾反応

反応はpH7、37℃にて行った。ここではCuCl<sub>2</sub>添加による結果をまとめてある。アデニンに対して高い選択性を示しているのが特徴である。

ピリジニルケトビニル転移基は、化学的安定性を損なわずに金属イオンにより特異的に活性化される有用な性質を示したため、さらに標的塩基を拡大するため、4-チオチミンに導入した(ODN2)<sup>8)</sup>。この分子は相補的塩基であるアデニンと接近し、アデニン6アミノ基特異的なアルキル化が期待された(図7)。実際に、転移反応はアデニン選択的に進行し、10分後、90%以上の高い転移効率を得られた。この場合も反応の進行は標的アデニンの前後塩基に依存し、3'側のグアニン、5'側のアデニンの場合の反応効率が高く、ピリミジン塩基では反応を誘起しなかったことから、前述の反応と同様にCuCl<sub>2</sub>はピリジニルケト部とプリン塩基に橋かけ構造の錯体を形成し反応点を接近させているものと考えられる。

## 考 察

本研究で開発したインテリジェント人工核酸は、1塩基の違いを厳密に区別し、官能基転移反応によって配列および塩基特異的にRNAを化学修飾できることが示された。近年、RNAの化学修飾によって遺伝子発現が制御されていることがみだされているので、特異的な修飾能をもつ人工核酸は、斬新なバイオツールとして展開できる可能性を秘めている。現在、特異的に化学修飾したRNAが特異的に遺伝コードの鋳型を変化させる可能性について検討中である。

本研究は九州大学大学院薬学研究院生物有機合成化学分野で行われたものであり、日夜実験に励んでくれた学生諸子の努力の賜物であり、ここに感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Sasaki S, Onizuka K, Taniguchi Y. The oligodeoxynucleotide probes for the site-specific modification of RNA. *Chem Soc Rev.* 2011;40(12):5698–706. DOI:10.1039/c1cs15066a
- 2) Ali M, Alam R, Kawasaki T, Nakayama S, Nagatsugi F, Sasaki S. Sequence- and base-specific delivery of nitric oxide to cytidine and 5-methylcytidine leading to efficient deamination. *J Am Chem Soc.* 2004;126(29):8864–5. DOI:10.1021/ja0498888
- 3) Onizuka K, Taniguchi Y, Sasaki S. Site-specific covalent modification of RNA guided by functionality-transfer oligodeoxynucleotides. *Bioconjug Chem.* 2009;20(4):799–803. DOI:10.1021/bc900009p
- 4) Onizuka K, Taniguchi Y, Sasaki S. A new usage of functionalized oligodeoxynucleotide probe for site-specific modification of a guanine base within RNA. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(5):1760–6. DOI:10.1093/nar/gkp930
- 5) Onizuka K, Shibata A, Taniguchi Y, Sasaki S. Pin-point chemical modification of RNA with diverse molecules through the functionality transfer reaction and the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Chem Commun (Camb).* 2011;47:5004–6. DOI:10.1039/c1cc10582e
- 6) Onizuka K, Nishioka T, Li Z, Jitsuzaki D, Taniguchi Y, Sasaki S. An efficient and simple method for site-selective modification of O6-methyl-2' -deoxyguanosine in DNA. *Chem Commun.* 2012;48(33):3969. DOI:10.1039/c2cc17621a
- 7) Jitsuzaki D, Onizuka K, Nishimoto A, Oshiro I, Taniguchi Y, Sasaki S. Remarkable acceleration of a DNA/RNA inter-strand functionality transfer reaction to modify a cytosine residue: the proximity effect via complexation with a metal cation. *Nucleic Acids Res* 2014 ;42(13):8808–15. DOI:10.1093/nar/gku538
- 8) Oshiro I, Jitsuzaki D, Onizuka K, Nishimoto A, Taniguchi Y, Sasaki S. Site-Specific Modification of the 6-Amino Group of Adenosine in RNA by an Interstrand Functionality-Transfer Reaction With an S-Functionalized 4-Thiothymidine. *ChemBioChem [Internet].* 2015;16(8):1199–204. DOI:10.1002/cbic.201500084