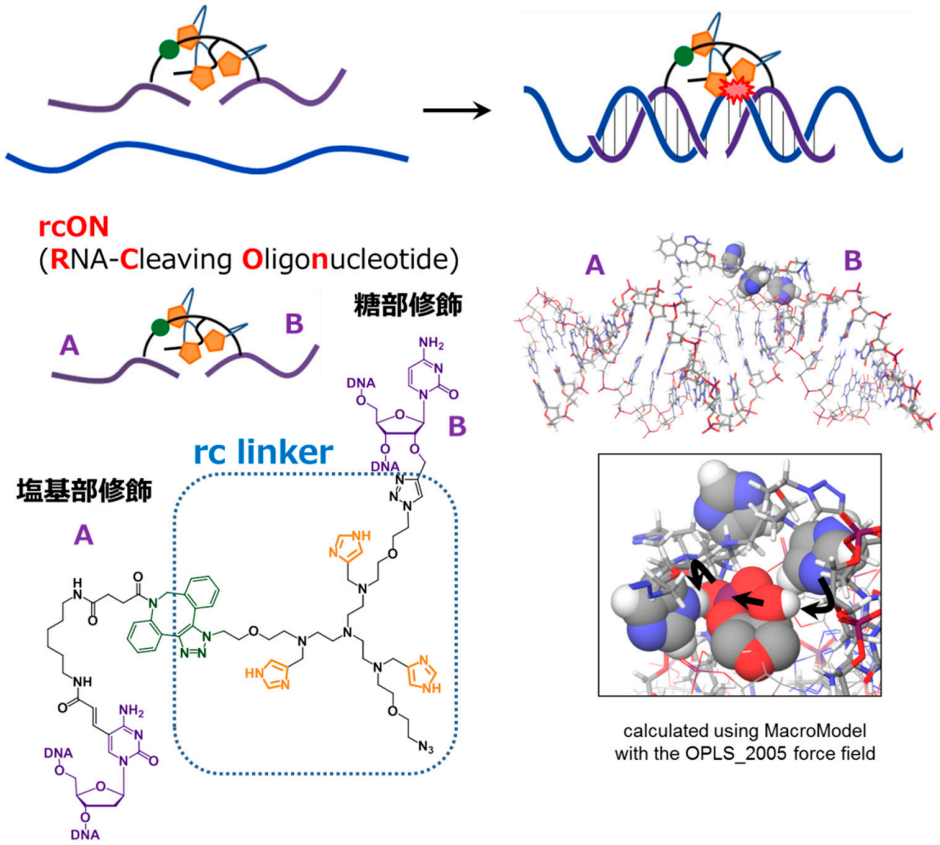
100　触媒的RNA切断能を持つ人工核酸の創製	鬼塚　和光

【目的】RNA は遺伝情報の伝達や制御を担う重要な生体高分子であり、その配列選択的な切断を誘起する人工核酸の開発は核酸医薬分野にとって非常に重要である。本研究では、RNase A の切断メカニズムを参考に、標的 RNA を化学的に切断可能な人工核酸 rcON を新たに設計した。rcON の基本骨格は我々が開発した擬ロタキサン形成核酸研究により得られた核酸構造を基にした。本研究では生理的条件下、酵素非依存的かつ触媒的に mRNA を切断する新規人工核酸の開発を目的とし、従来とは異なる骨格を持つ機能性核酸の設計・合成・RNA 切断能評価を行った。

【方法】三分岐リンカーのそれぞれの鎖にイミダゾールおよびアジド基を有する rc リンカーを合成、クリックケミストリーを利用することでオリゴヌクレオチドにコンジュゲートし設計した rcON を合成した。RNA 切断反応は、pH7 の緩衝液中で行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析した。

【結果】合成した rcON は、低収率ながら標的 RNA を選択的に切断可能であることが明らかになった。しかし、反応が低収率で止まることおよび切断点が期待した位置と異なったことから、正確な切断活性種（活性複合体）およびメカニズムは現在までのところ明らかにできていない。今後これらを明らかにし、高効率、高収率かつ触媒的に切断可能な人工核酸の創製を目指す。

RNA 切断反応の概念図と設計した人工核酸 rcON の構造



100. 触媒的 RNA 切断能を持つ人工核酸の創製

鬼塚　和光

東北大学 多元物質科学研究所 生命機能分子合成化学研究分野

Key words：RNA，切断，ロタキサン，核酸，イミダゾール

緒　言

核酸医薬は、難治性疾患に対する次世代の医薬品として注目されており、国内外で医薬品実現に向けた研究が競って行われている。特に、RNase H の作用を利用したアンチセンス核酸、Ago タンパク質と RISC 複合体を形成し作用する siRNA は、配列選択的に標的 mRNA に結合し、触媒的に標的を切断するため、狙ったタンパク質の発現を効率的に抑制することが可能である。しかし、アンチセンス核酸や siRNA はいずれも酵素の基質になる必要があるため生体内安定性付与等を目的とした化学修飾には制限がある。一方、化学的な mRNA 切断能を持つ人工核酸は 1990 年代から人工酵素開発研究の一環として盛んに研究されるようになった。例えば、RNase A の切断活性中心を模倣し、イミダゾール（Im）基をオリゴ核酸の末端にコンジュゲートした人工核酸は、配列特異的に RNA 鎖を切断することが報告されている。このような単純な Im 基修飾でも切断反応は進行するが、酵素反応と比べ速度は遅く触媒的な反応ではないため実用レベルには程遠いのが現状であった。本研究では生理的条件下、酵素非依存的かつ触媒的に mRNA を切断する新規人工核酸の開発を目的とし、従来とは異なる位置にイミダゾール基を持つ機能性核酸の設計・合成・RNA 切断能評価を行ったので報告する。

方法、結果および考察

生体内 RNA は様々な遺伝子疾患の創薬ターゲットとなっており、特に RNA の配列選択的な切断はその機能を強く阻害することができるため、核酸医薬品開発にとって重要な戦略の一つになっている。その中で、核酸医薬品開発の主流であるアンチセンス核酸や siRNA は RNase H や Ago2 タンパク質と複合体を形成し、標的 RNA の切断を行う。特に mRNA の切断は翻訳過程の阻害につながるため、狙ったタンパク質の生成を抑えることが可能になる（図 1）。RNA の切断技術としてこれらは非常に強力な方法であるが、アンチセンス核酸、siRNA は酵素の基質になる必要があるため、化学修飾には制限があった。

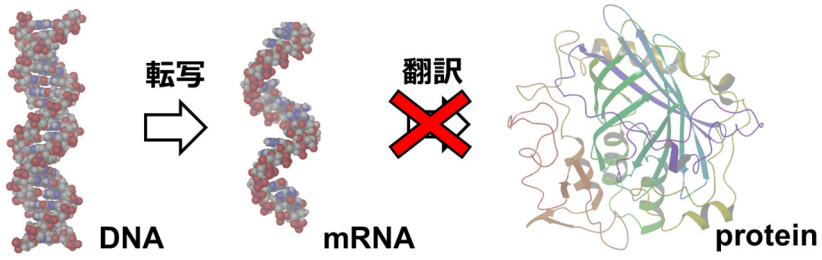


図 1. mRNA の切断による翻訳過程の阻害

これらの背景のもと、RNA 切断酵素の一つである RNase A の切断メカニズムを模倣し RNA を切断する研究も行われている。RNase A は RNA2'-OH 基の脱プロトン化、続く 5'-OH 基のプロトン化によって RNA を切断する（図 2）。このプロトンの授受には酵素活性部位中の二つのイミダゾール基が関与している。したがって、イミダゾール誘導体をオリゴ核酸に化学修飾しそれらを適切に RNA へ接近させることができればいくつか例があるように RNA を切断する

ことが可能になる。このような方法は酵素反応に比べ切断速度が極めて遅いという欠点がある［1，2］。しかし、オリゴ核酸部分を自由に化学修飾可能であるため、適切にイミダゾール基を RNA へ接近できれば更なる発展が見込める。

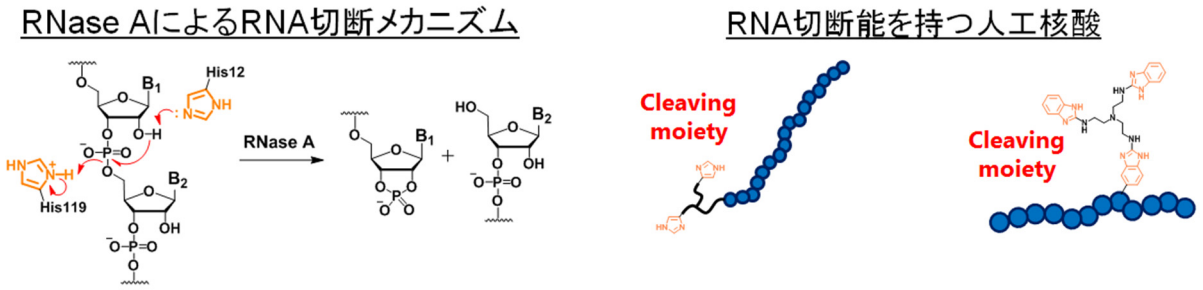


図 2. RNase A による RNA 切断メカニズムと RNA 切断能を持つ人工核酸の例

一方で私たちは標的 RNA 配列に対して自発的に図 3 のような貫通構造、いわゆる擬ロタキサン構造体を形成することのできる人工核酸を開発している［3，4］。この構造と反応収率の系統的な相関研究を行う中で、効率的に反応が進行した構造は、らせん間で結ばれたリンカーが標的鎖のリン酸バックボーンの丁度上側に位置することがモデル計算から示唆された。この構造情報を基に、リンカー部位にイミダゾール基を導入すれば、標的 RNA の切断点にうまく接近し効率的に RNA を切断できるのではないかと考えた。図 4 に具体的な分子設計を示す。3 つのイミダゾール基をもつ 3 分岐リンカー（rc リンカー）で 2 本のオリゴ核酸を連結した RNA 切断人工核酸（rcON）を設計した。擬ロタキサン構造の安定性情報から A 鎖は塩基部、B 鎖は糖部で連結することでこの rcON は歪みを最小限に相補鎖と二本鎖を形成することが期待できる。また 3 級アミンを 4 カ所もつカチオン性リンカーを用いることで、静電相互作用によりリンカーが相補鎖リン酸基へ接近し、それにより効率的な切断が進行することを期待した。

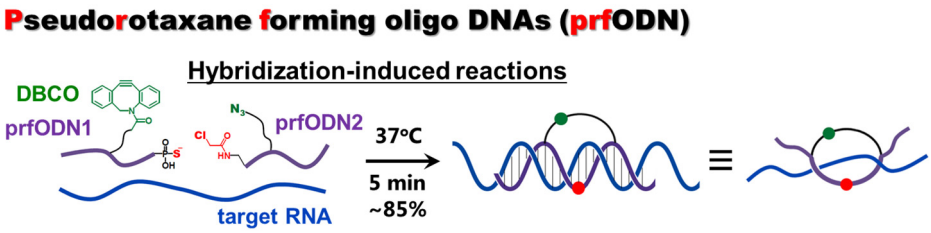


図 3. 擬ロタキサン形成核酸の概念図

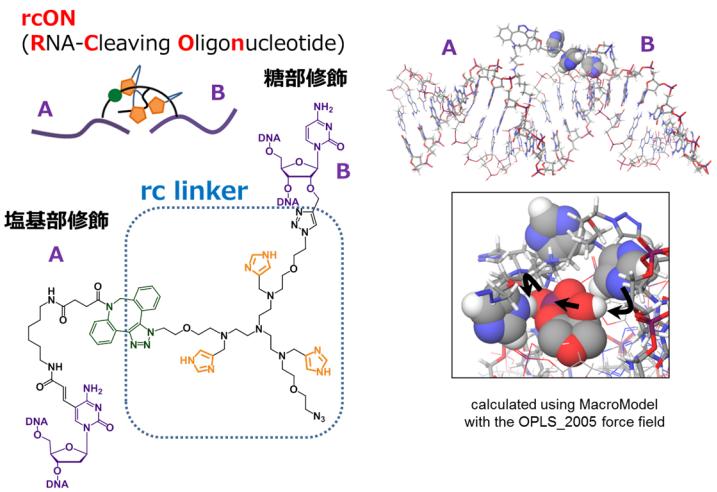


図 4. RNA 切断能を持つ人工核酸の分子設計

rc リンカーの合成を図 5 に示す。Tris(2-aminoethyl)amine を出発原料に、福山アミン合成によってイミダゾールユニットを導入、続いて、アジドリンカーを修飾、最後に TFA によるトリチル基の脱保護にて、設計した rc リンカー6 を合成した。続いて rcON の合成を図 6 に示す。この rcON は DBCO が修飾された DNA(rcON-A)と rc linker が修飾

された DNA(rcON-B)からなる。それぞれの DNA 鎖をテンプレート DNA と二本鎖形成させることで、DBCO とアジド基を接近させ、A 鎖と B 鎖をクリック反応にて連結させることを計画した。rcON-A は内部の X の位置にアミンが修飾された修飾オリゴ核酸 rcON-A0 を DNA 自動合成装置によって合成し、DBCO 基を持つ活性エステルと反応させることで得られた。rcON-B は内部の Y の位置にアルキンが修飾された修飾オリゴ核酸（rcON-B0）を合成し、rc linker のアジド基とクリック反応させることで得られた。次に、rcON-A と B を用いて rcON の合成を行った。16 mer の DNA テンプレート存在下、A 鎖と B 鎖を 1:1 で混合したところ、HPLC 上で 2 つの大きなピークが検出された。これらのピークを分取し、MALDI-TOF-MS で分子量を測定したところ、目的の rcON と一致する値が両方で観測された。したがって、これらは DBCO 上で生じる *cis-trans* 異性体であると考えて、両方の rcON に関して RNA 切断を行うことにした。

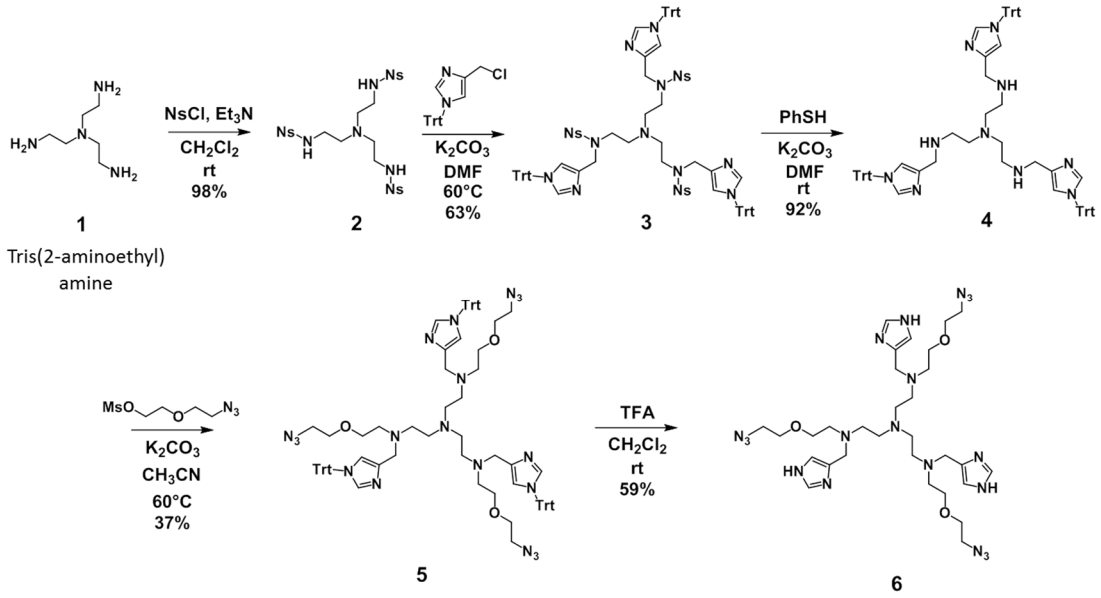


図 5. rc リンカーの合成

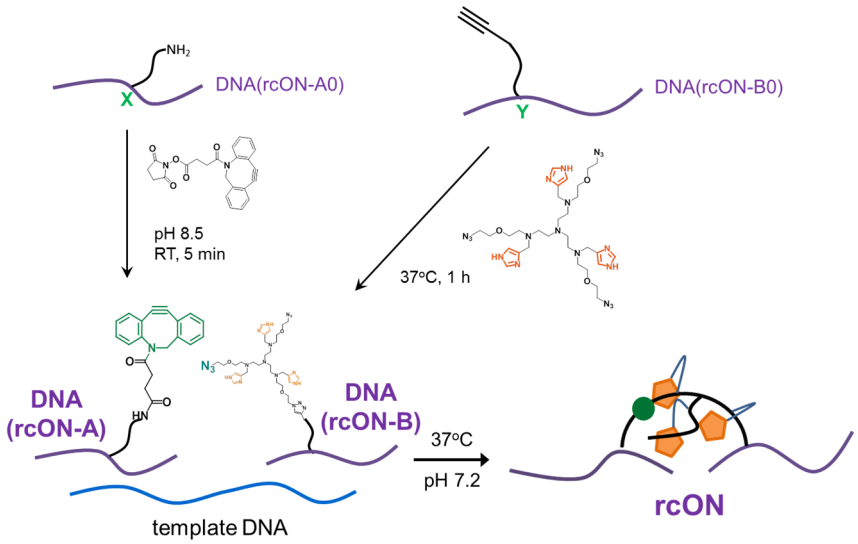


図 6. rcON の合成

クリック反応時に得られた異性体は、保持時間が短い方を 1、長い方を 2 とし、それぞれの rcON を RNA に対して 2 等量加えて反応させ、5 時間、24 時間における切断反応の進行をゲルシフトアッセイにて調査したところ、片方の異性体、rcON（1）でのみ 6%の切断が観測された（図 7）。続いて、RNA のバルジ構造が切断に有利であるという情報を基に、アデニンによってバルジ構造が形成される RNA2 から 5 に対して先ほどと同じ条件で切断反応を行った。5 時間、24 時間の切断反応をゲルシフトアッセイにて調査したところ、先ほどと同様に rcON（1）でのみ切断反応が観測

され、収率も先ほどと大きくは変わらなかった（図 8）。また、これらの検討の中で、どの配列においても 5 時間から 24 時間で切断反応の収率はほとんど上昇しなかった。そこで、より短い時間で反応を追跡したところ、30 分から 5 時間における切断反応の収率もほとんど変わらなかった。したがって、この rcON（1）は 30 分以内で反応はほぼ完了していると考えられる。

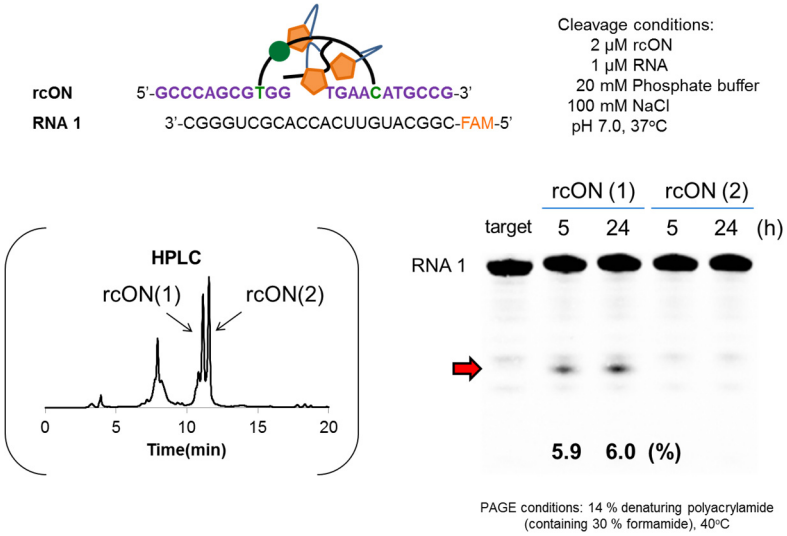


図 7. rcON による RNA 切断反応

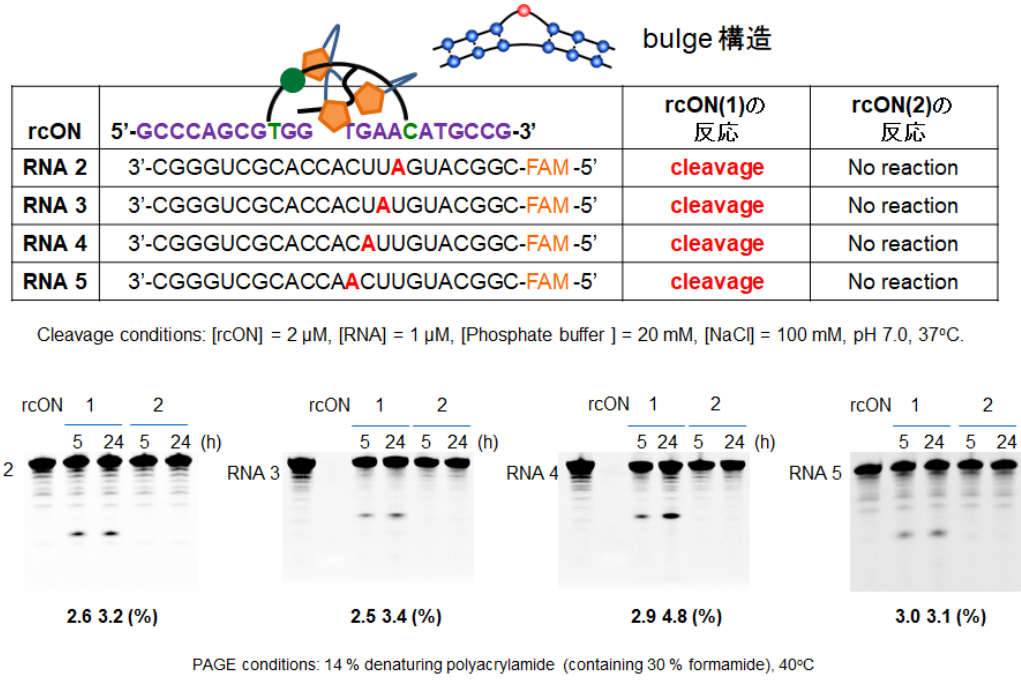


図 8. バルジ構造を持つ RNA に対する RNA 切断反応

一方で時間経過によって反応がほとんど進行していないことから rcON（1）に含まれる微量の化合物が活性種として働いている可能性を考えた。RNA マーカーを用いてゲルシフトアッセイにて切断位置を確認したところ、標的 RNA の中心付近の A-C 間で切断されていることが分かった（図 7）。モデル計算から導かれたイミダゾールが近接する位置と実際に切断が起きた位置が少しずれていることから、やはり設計した rcON ではなく、rcON に含まれる微量の化合物が活性種として働いているのではないかという考えに至った。今回得られた結果は、低収率ながら 30 分以内に反応が完了していたため、真の活性種の切断能力は非常に高いことが考えられる。今後、真の活性種、切断メカニズムを明らかにし、高効率、高収率かつ触媒的に切断可能な人工核酸の創製を目指す。

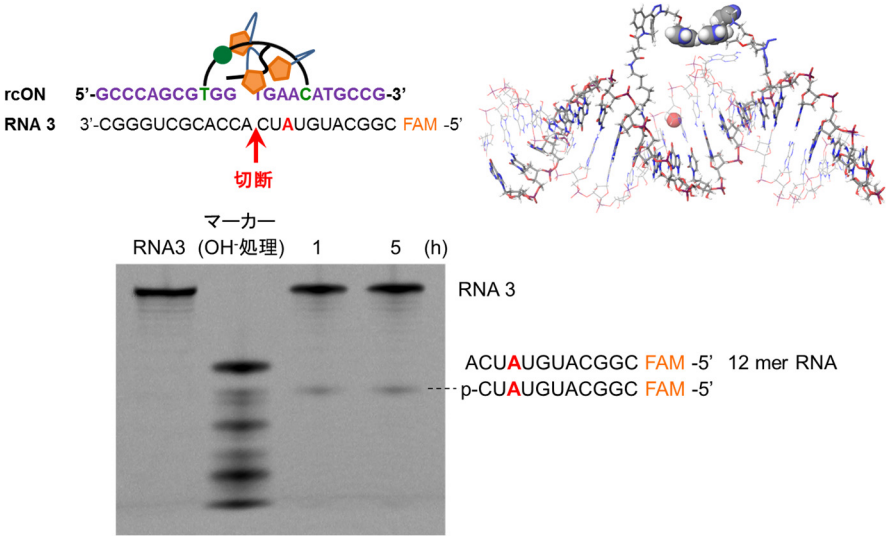


図 9. rcON による RNA 切断の切断位置

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学多元物質科学研究所の永次 史教授および田口晃史である。最後に、ご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

1) Beloglazova NG, Fabani MM, Zenkova MA, Bichenkova EV, Polushin NN, Sil'nikov VV, Douglas KT, Vlassov VV. Sequence-specific artificial ribonucleases. I. Bis-imidazole-containing oligonucleotide conjugates prepared using precursor-based strategy. Nucleic Acids Res. 2004 Jul 23;32(13):3887-97. Print 2004. PMID: 15273275 DOI:10.1093/nar/gkh702.

2) Dogandzhiyski P, Ghidini A, Danneberg F, Strömberg R, Göbel MW. Studies on Tris(2-aminobenzimidazole)-PNA Based Artificial Nucleases: A Comparison of Two Analytical Techniques. Bioconjug Chem. 2015 Dec 16;26(12):2514-9. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00534. Epub 2015 Nov 12. PMID: 26544527 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00534.

3) Onizuka K, Nagatsugi F, Ito Y, Abe H. Automatic pseudorotaxane formation targeting on nucleic acids using a pair of reactive oligodeoxynucleotides. J Am Chem Soc. 2014 May 21;136(20):7201-4. Epub 2014 May 7. PMID: 24807826 DOI: 10.1021/ja5018283.

4) Onizuka K, Chikuni T, Amemiya T, Miyashita T, Onizuka K, Abe H, Nagatsugi F. Pseudorotaxane formation via the slippage process with chemically cyclized oligonucleotides. Nucleic Acids Res. 2017 May 19;45(9):5036-5047. PMID: 28407122 DOI: 10.1093/nar/gkx265.