遺伝子発現の化学的制御を目指した方法論の開発

東北大学　多元物質科学研究所　生命機能分子合成化学分野
永次　史

1. はじめに

核酸医薬は20-30塩基長の人工的に化学合成された核酸分子(オリゴヌクレオチド)であり、特定の遺伝子発現をできる可能性をもつことから、次世代のバイオ医薬品として注目を集めている。現在、アンチセンス医薬やsiRNAを用いた、癌や糖尿病などに対する臨床試験の検討、さらに蛋白に結合するアプタマー医薬の認可により、核酸医薬に対する期待はますます高まっている。従来の核酸医薬は、標的RNAに対して水素結合及び疎水性相互作用などの弱い結合により結合するため、形成される複合体は不安定であり、効率的な遺伝子発現制御を行う際に問題となると考えられる。近年、ヒトゲノムのうち蛋白質に翻訳されるのはわずか2%であり、ゲノムのほとんどは蛋白質に翻訳されない非翻訳領域であることがわかってきた。さらに、この領域を含むほぼゲノム全体がRNAへと転写されることが発表され、細胞内には膨大な種類の転写産物（その多くが蛋白質に翻訳されないnon coding RNA(ncRNA)）が存在することから、その機能に注目が集まってきている。最近の研究により、ncRNAは転写レベルから蛋白質の機能レベルまで、すべての遺伝子発現系に関与し、複雑な制御ネットワークを形成していることが次々と解明されてきている。中でも、20塩基程度の長さを持つ内在性低分子RNAであるmiRNAはmRNAに作用し蛋白質合成を制御し、発生、分化、恒常性維持において重要な役割を持つことがわかってきており、核酸医薬の標的として、注目を集めている。miRNAの阻害には標的に対して、強固に結合できる核酸医薬が有効であることが報告されており、様々な人工核酸が検討されている。本研究では、将来を見据えた新しい次世代型核酸医薬開発に向けた新しい方法論の構築を目指し、架橋反応性を持つ核酸医薬による細胞内における遺伝子発現制御について検討を行う。

図１　遺伝子発現の流れ

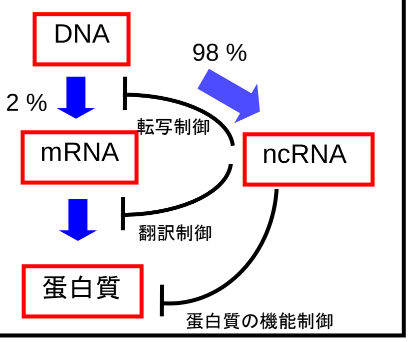
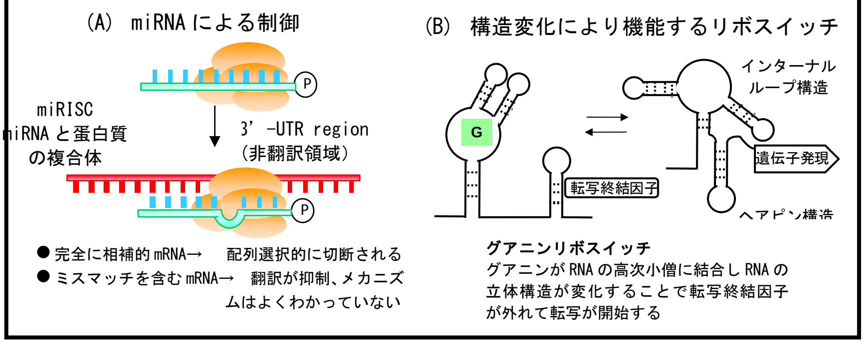
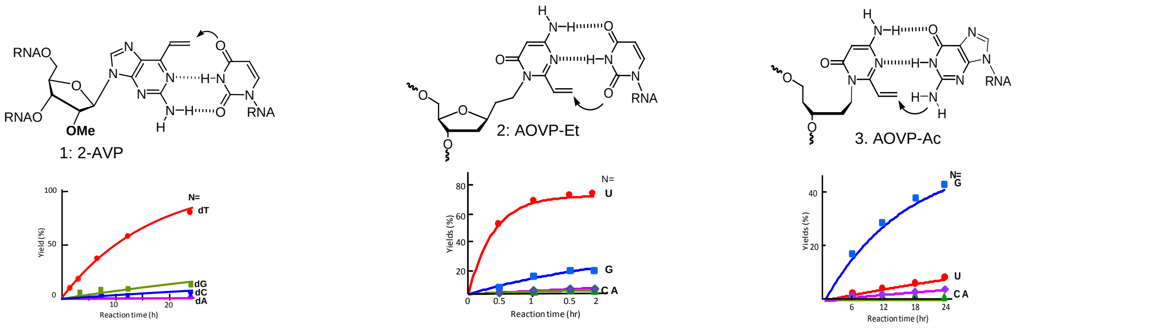


図２　ncRNA による遺伝子発現制御機構



既に私は、効率的な遺伝子発現制御法として、標的遺伝子に対して共有結合を形成する架橋反応性塩基を導入した核酸医薬を用いる方法を提案し研究を行ってきた。その結果、標的遺伝子に対して複合体を形成することで活性化され、標的塩基に対して、非常に選択的にかつ効率的に反応する自己活性型架橋反応性分子の開発に成功した（図３）。本申請研究では、これらの分子を用いた、細胞内における効率的な遺伝子発現制御を行う新しい核酸医薬創製の概念構築、さらには高い架橋反応性を持つ新規分子の開発について研究を行った。

図３　図３　自己活性化架橋核酸の反応性発現制御



2.　方 法

①架橋反応性オリゴを用いた遺伝子発現制御に関する検討：

試験管内において、発光蛋白質であるルシフェラーゼをコードした領域およびmiRNAの標的サイトを含むmRNAを調整した。さらに、細胞内における分解に対して安定であると考えられる2'-OMe RNAオリゴに1を組み込んだそれぞれの標的に対して相補的である反応性オリゴを合成した。まず、調整したmRNAとこれらの反応性オリゴを試験管内において架橋反応させ、その架橋したmRNAを用いて、蛋白質発現阻害ついて検討した。さらにこれらの架橋2本鎖複合体を細胞内に導入し、蛋白質発現阻害及びmiRNAの機能阻害について検討した。

図４架橋反応性オリゴを用いた遺伝子発現制御

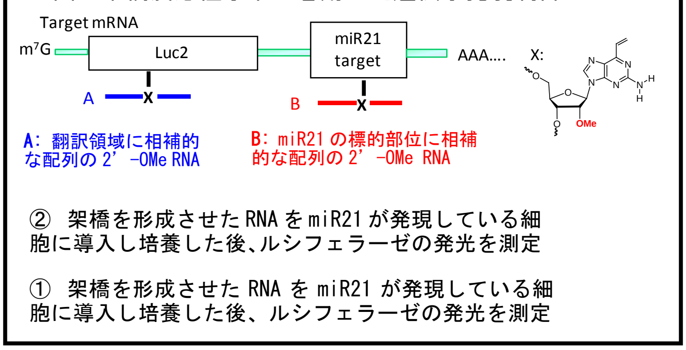
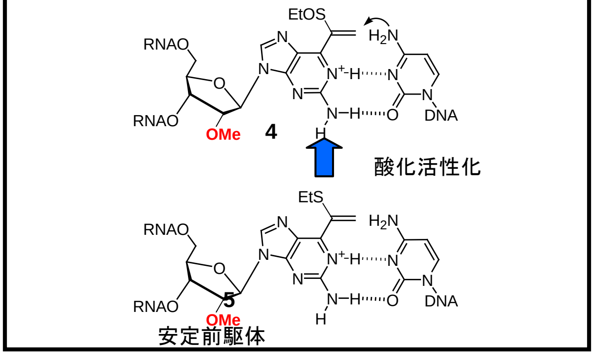


図５　高い架橋反応性を持つ新規分子の設計



②高い架橋反応性を持つ新規分子の開発：①を検討した結果、細胞内における遺伝子発現制御を行うには、より高い架橋反応性を持つことが必要であることがわかってきた。そこで、新たに1の構造を基により反応性の高い架橋分子として、4を設計した。この分子はビニル基に吸引基を導入することで、高い反応性を期待し設計した分子である。本分子はマクロモデルを用いた計算により、標的シトシンに対して、複合体を形成し、高い反応性を示すことが予測された。さらにその前駆体であるスルフィド体（5）は安定であり、細胞内での酸化活性化により高い反応性が誘起されると期待される。

3. 結果　研究成果

①架橋反応性オリゴを用いた遺伝子発現制御に関する検討結果

まず試験管内において、架橋したmRNA及び細胞抽出液を用いて蛋白質発現について検討したところ、効率よく阻害されることがわかった。この阻害効果は架橋反応性を用いた2'-OMe RNAオリゴでは得られておらず、効率的な阻害が架橋反応による結果であることが示唆された(図5)。さらに架橋したmRNAからできた蛋白質を解析したところ、架橋した部位近傍で翻訳が止まり、短い蛋白質ができていることが示唆された。

次に架橋した位置が異なるmRNAをそれぞれ細胞内に導入し、その蛋白質発現について検討した。その結果、ルシフェラーゼをコードする部位に架橋したmRNAでは、ルシフェラーゼの発現が阻害されること、さらにmiRNAが結合する領域に対して架橋したmRNAでは、ルシフェラーゼの発現が活性化されることが示された。このように架橋反応する部位により蛋白質発現が制御できることは大変興味深い結果であると考えている。

図５架橋反応性オリゴを用いた試験管内における蛋白質発現制御

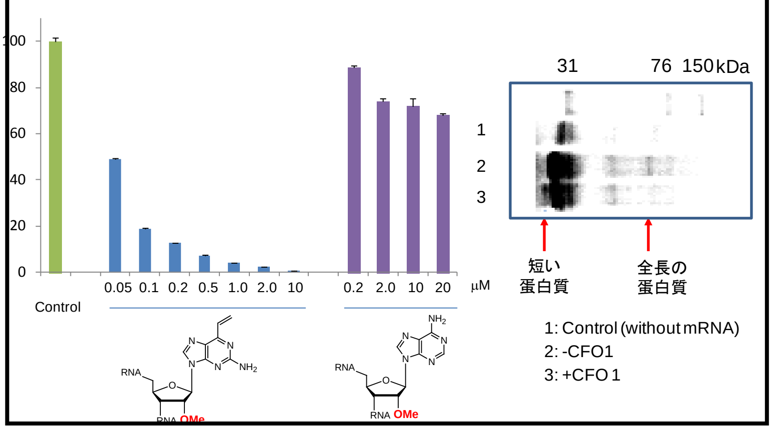
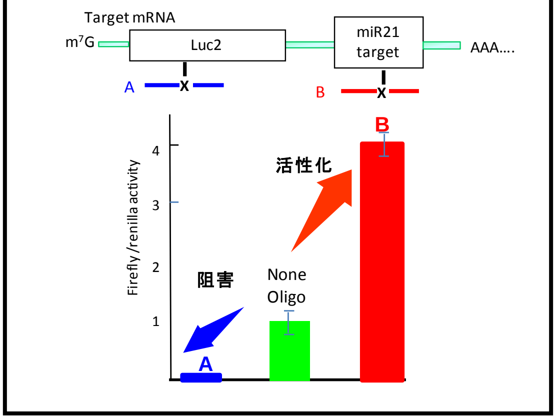


図６　細胞内に導入した架橋した mRNA からの蛋白質発現

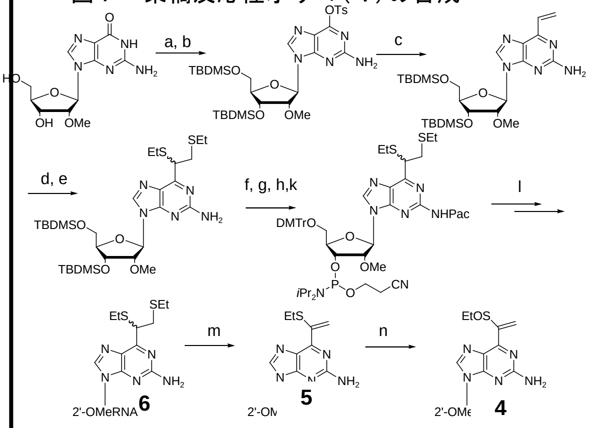


②高い架橋反応性を持つ新規分子の合成と反応性評価：

まず反応性をスルフィドにより保護した６を合成し、自動合成装置により６を組み込んだ2'-OMe RNAオリゴを合成した。さらにアルカリ処理により、安定前駆体である5を合成し、酸化することで、反応性を持つ４の合成に成功した。得られたオリゴを用いて、架橋反応性を検討したところ、従来の架橋反応剤は時間オーダーであった反応時間が分オーダーと大幅に改善されることがわかった。さらに反応の選択性も非常に高く、相補的な位置のシトシンに対

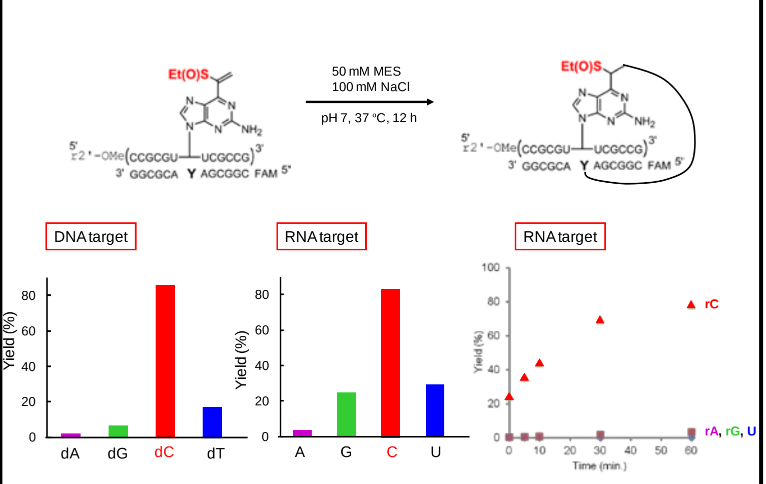
して、３０分で約80%の収率で架橋反応が進行することがわかった。さらに5を組み込んだ2’-OMe RNAオリゴは安定であり、まったく反応しないことがわかった。

図７　架橋反応性オリゴ（４）の合成



Keys; (a) TBSCl, imidazole ; (b) TsCl, TEA, DMAP, CH_2Cl_2; (c) $(C_2H_3BO)_3$, Pd(0), LiBr, dioxane-H_2O; (d)Br_2,H_2O; DBU; (e) EtSH (f) PacCl, Py; (g) TBAF; (h) DMTrCl, pyridine; (k) N,N-diisopropyl chloro phosphoramidite, DIPEA, DCM; (l) DNA automated synthesizer; (m)NaOH; (n) MMPP

図７　架橋反応性オリゴ（４）の反応性



4. 考察　まとめ

以上のように私は架橋反応性オリゴヌクレオチドが、細胞内における効率的な遺伝子発現制御に展開できる可能性を示した。また予備的な検討であるが、細胞内に直接導入した架橋反応性オリゴヌクレオチドを用いて、miRNAを阻害し、蛋白質発現が活性化するという可能性を示す結果も得ており、今後さらに検討する予定である。

さらに効率的な遺伝子発現制御を行うためにはより反応性の高い架橋反応剤が必要であると考え、新たな架橋反応剤を設計、合成した。その結果、シトシンに対して極めて効率的に反応する架橋反応剤の開発に成功した。さらにこの反応性分子は安定な前駆体より酸化活性化により誘導できる。癌細胞では活性酸素の量が上昇していることから、今回開発した架橋反応剤は癌細胞内でのみ酸化活性化され、標的遺伝子を選択的に制御できるものと期待され、癌細胞選択的な治療法としての展開が期待される。

今回、頂いた研究費により、以上のような結果を得ることができ、今後さらに細胞内に展開可能な架橋反応性を持つ核酸医薬の実現に向けて、検討したいと考えている。

5. 発表論文(2011～2012)

1) Kusano,S., Sakuraba, T., Hagihara, S., Nagatsugi, F. Synthesis of 6-amino-2-vinyl purine derivatives for cross-linking and evaluation of the reactivity, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **22**, 6957–6961 (2012)

2) Imoto, S., Chikuni,T., Kansui, H,　Kunieda, T. Nagatsugi, F. Fast DNA Interstrand Cross-linking Reaction by 6-Vinylpurine, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.*, **31**, 752–762 (2012)

3) Hagihara, S., Kusano, S., Lin, W.C., Chao, X.G., Hori, T., Imoto, S., Nagatsugi, F., Production of truncated protein by the crosslink formation of mRNA with 2’-OMe oligoribonucleotide containing 2-amino-6-vinylpurine, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., 22, 3870-3872 (2012)

4) Nagatsugi, F., and Imoto, S. Induced cross-linking reactions to target genes using modified oligonucleotides, *Organic & Biomolecular Chemistry 9*, 2579-2585(2011).