

Journal of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry

日本核酸化学会誌

Vol. 4, 2020

巻頭言 コロナ時代の核酸化学研究者

杉山 弘

研究論文 Cyclic Naphthalene Diimide Derivatives for Recognizing G-quadruplex Structure - The evolution story of cNDI -

Tingting Zou

3本鎖DNA中のCG塩基対を認識する人工ヌクレオチドの創製

岡村秀紀

核酸の高次構造・特殊配列に結合する低分子化合物

- 基盤分子の開発/評価法の構築 -

村瀬裕貴

トリアゾール核酸の合成と機能 - 非分解性連結部をもつ糖保存型核酸 -

藤野智子

環状RNAによる細胞内ビルドアップ型RNA干渉法

- 細胞内化学反応に基づく核酸医薬分子の高機能化 -

木村康明

学会報告 第46回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC 2019)
/日本核酸化学会第3回年会 開催報告

池袋一典



Contents

目次

- 巻頭言 コロナ時代の核酸化学研究者／杉山 弘 **1**
- 研究論文 **Cyclic Naphthalene Diimide Derivatives for Recognizing G-quadruplex Structure –The evolution story of cNDI–**／Tingting Zou **3**
- 3本鎖 DNA 中の CG 塩基対を認識する人工ヌクレオシドの創製
／岡村秀紀 **9**
- 核酸の高次構造・特殊配列に結合する低分子化合物
－基盤分子の開発/評価法の構築－／村瀬裕貴 **15**
- トリアゾール核酸の合成と機能
－非分解性連結部をもつ糖保存型核酸－／藤野智子 **22**
- 環状 RNA による細胞内ビルドアップ型 RNA 干渉法
－細胞内化学反応に基づく核酸医薬分子の高機能化－／木村康明 **28**
- 学会報告 第46回国際核酸科学シンポジウム (ISNAC2019) /
日本核酸化学会第3回年会 開催報告 / 池袋一典 **34**

巻頭言

コロナ時代の核酸化学研究者

京都大学大学院理学研究科 杉山 弘

一寸先は闇。昨年、今ごろ誰がこのコロナ禍を想像しただろうか。武漢に端を発したパンデミックとも言える新型コロナウイルスは、日本でダイヤモンドプリンセス号の隔離問題を経て、あっという間に蔓延し、世界を感染の渦に飲み込んでしまったようである。古より疫病退散を目的として伝えられた京都の伝統的な祇園祭も、観光客への感染拡大防止のため、山鉦は立てられず、山鉦巡行は中止となってしまった。もはや、日本では大勢の人を集めることに対して、忌諱に近い感情が高まっており、昨年までの日常の風景が戻るのはいつか、目処が立たない日々を過ごしている。

さて、筆者の在籍している京都大学でも教育や研究のスタイルは新年度から様変わりしている。5月の連休明けから筆者も Zoom によるオンライン講義を学生に向けて開いており、研究室でのミーティングや研究会も全て Zoom で実施する状況となっている。実際にやってみると、オンラインでの講義ではどうしても一方的になってしまう問題は確かにあるものの、色々と良い点もあった。例えば、パソコンのディスプレイ上では講義資料もはっきり見せることができ、その場でもネット検索ができる点。その上、配布物がデータのやり取りとなるため、紙資源の節約となる点など、などである。また、昨年まで全く積極的にオンラインを進めていく様子になかった保守的な大学の教育状況も変わり、ここへ来て一気に IT 化に伴う教育改革が進んだと言える。加えて、テレワークの推進や有給休暇の取得などの大学内の働き方改革さえも、いわば新型コロナ禍の副産物として結果的に進んでいる。最近、新型コロナ禍の中で研究者としてどのように生きていくべきか、色々と考えることがある。筆者は、今の新型コロナ禍の中で、高校生棋士の藤井聡太さんの言葉が心に響いている。彼は7月16日に五番勝負で棋聖位を奪取したことは記憶に新しいが、実はこの4月中旬から約1カ月半、将棋の公式戦がなかったという。記事によれば、公式戦がなかった間、「じっくりと自分の将棋と向き合えた。序盤の定跡を自分なりに整理していた」と述べている。さすが棋聖、臨機応変、泥中の蓮華とはこういうことを言うのだろうか。かのニュートンが万有引力や微積分を発見、成立させたのも、世界にペストが蔓延していた状況の中であつたことと重なってくる。

筆者の研究室でも4月中旬から1ヶ月ほど大学に研究室の学生が入れない状況になったことから、予想外のまとまった時間が取れることになった。ニュートンに肖って、この機会にこれまでの40年あまりの核酸研究をふりかえることができた。筆者の大学院の学生時代は、主に核酸の光損傷に強い関心を持っていた。研究を始めたのは、DNA とヒストンタンパク質との光クロスリンク反応の研究であった。それ以降、特に DNA の高次構造と反応性について、興味の向くまま、若い情熱を持って核酸関連の研究を続けてきたと言える。DNA 塩基の中でグアニンは最も酸化されやすく、昨今様々な酸化剤の格好のターゲットとなっているが、GG や GGG と並んだグアニンの連続配列では一段と酸化されやすくなることを、実験結果と分子軌道計算によって見出すことができた。当時博士課程の喜納克仁さん(現在徳島文理大准教授)と HPLC を駆使して、不安定なグアニンの酸化生成物を探索した結果、グアニンと塩基対をつくることのできるイミダ

ゾロンを同定することができた。ミトコンドリアでは ATP 産生の際、かなりの活性酸素種が発生するためミトコンドリアゲノムは酸化ストレスにさらされ変異しやすいはずと考えた。ミトコンドリアの独自のタンパク質合成系のグリシンコдонは進化的に酸化損傷を受けやすいGGGを避けて、3文字目はG以外を使っているのではないかと仮説を立てたが、残念ながらそのような偏りを見出すことはできなかった。

2000年代に入り、左巻きの Z 型 DNA やグアニン4重鎖(G4)構造などの非 B 型 DNA 高次構造の中のグアニンの化学反応性に関心をもって取り組んでいった。例えば、Z 型 DNA ではグアニンが4塩基連続した π スタックの状態をとっているため、外部環境にある溶媒にさらされ、活性酸素種などと反応しやすくなっていることや、染色体末端のテロメアにも存在する G4構造もグアニンの酸化損傷を受けやすい構造であることを研究してきた。特に、テロメアではゲノム本体の情報を守るために、あえて酸化的損傷を受けるためのスカベンジャーとなっていることも提案されており、そこに G4 構造の存在が繋がっているのではないかと見立てている。

京都大学の山中教授によって iPS 細胞が発見され、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスによって生命の本質に対する理解はさらに加速度がついたと言える。エピジェネティクスによる遺伝子発現制御のメカニズムが分子レベルで解明されてきた。現在、ヒトゲノムにはテロメア以外にも少なくとも 10,000 カ所ほどの G4構造が存在することが G4-seq で示され、最近では酸化的損傷に対応する修復系機構が作動することによって遺伝子発現が誘起されることなどが提案されている。また、ミトコンドリアゲノムの重鎖には軽鎖と比べ格段に数多くの G4構造をとりうる配列が偏って存在していることは興味深い。さらに、テロメアの伸長に関わるテロメラーゼもミトコンドリアに存在しており、ミトコンドリアの品質管理に寄与していることが示された。全く予想されていなかったミトコンドリアとテロメアの間で、G4構造による酸化的なストレスのアンテナをたてて、あたかも細胞の運命を相互に連携して階層的に決めていように見える。実験的な証拠はほとんどないが、核酸が作り出す様々な局所構造の変化によって生じるグアニンの特異的な反応性は、生体系内でも積極的に利用している可能性が高いと感じている。暇に任せて調べてゆくと、核酸の高次構造が生体系に大きなインパクトを与えているとの確信が深まり、40年近く過ぎていった時代の潮流の中で自らの研究に対する尽きぬ思いを想起することができたのだ。

最後に、確かに今回の新型コロナ禍によって、常在する感染リスクが日常生活の形態すら様変わりさせてしまい、国内、国際問わず主だった学会は軒並み延期や中止となる大きな影響を受けている。振り返ると、日本核酸化学会は杉本直己会長の見事なリーダーシップによる船出から早3年経ち、これまで座礁することなく無事に航海を続けられたのは僥倖だった。ポストコロナの苦難の時代、2期目の会長として就任予定の和田猛先生には、今後の学会活動を含めて臨機応変な対応と変革に臨む気概が求められることだろう。もちろん我々研究者一人一人に対しても、自分の化学と向き合う奇貨と捉えて、自らの研究を進める覚悟が問われているのだろう。



Cyclic Naphthalene Diimide Derivatives for Recognizing G-quadruplex Structure

~The evolution story of cNDI~



Kyushu Institute of Technology

Tingting Zou

(zoutt@che.kyutech.ac.jp)

Abstract: Based on the π - π stacking of Naphthalene diimide for G-quartet, our group has designed cyclic naphthalene diimides (cNDIs) with significant enhanced specificity for G-quadruplex. Here we summarized the recent progress of cNDI series. cNDI was conjugated to ferrocene moiety, to obtain cFNDs as new G4 binder with electrochemical property, and cNDI dimers were constructed for specifically recognizing dimeric G-quadruplex structure. We also identified that cNDI derivatives could keep comparable G-quadruplex binding performance under PEG mimicked molecular crowding condition, and might be potentially promising for further *in vivo* application.

1. Introduction

As a non-canonical DNA structure, G-quadruplex structure, which is commonly formed in guanine rich sequence, has been considered with important biological function, such as regulating gene expression and impacting the activity of telomerase¹. Multiple G-quadruplex units formed as G4 cluster also were supposed that may possess distinct biological roles other than single G-quadruplex². Over the past two decades, a variety of chemical molecules, also termed as G4 ligands, which can recognize and stabilize G-quadruplex structure, are adopted to further involve into regulating G-quadruplex's biological function³. Especially the activity for stabilizing telomere G-quadruplex and inhibiting

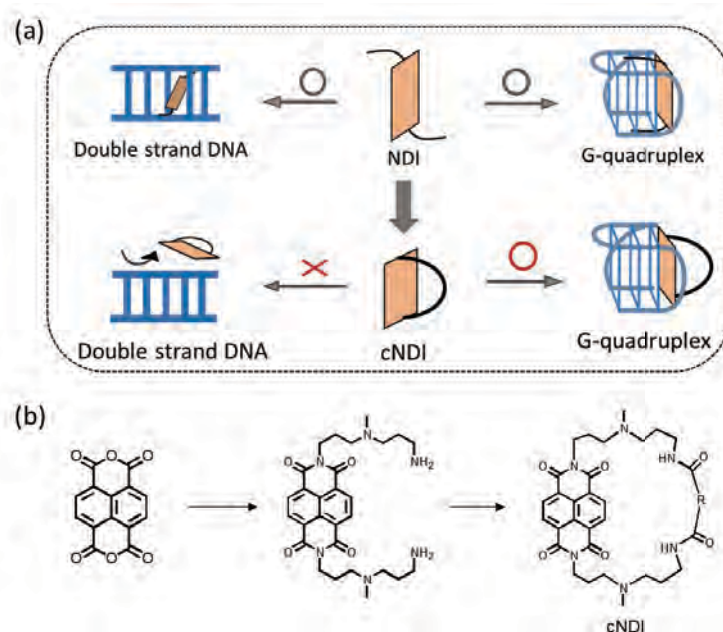


Figure 1. (a) The concept of cyclic naphthalene diimide (cNDI) with enhanced selectivity for recognizing G-quadruplex; (b) The construction of cNDI derivatives.

telomerase activity bring them high potentiality as new anti-cancer candidates⁴.

As one well-known group of G4 ligand, naphthalene diimide (NDI) can recognize G-quadruplex structure through π - π stacking with G-quartet, several NDI derivatives have been reported that could regulate gene expression and induce cancer cell apoptosis⁵. However, since NDIs also work as an efficient DNA intercalating agent, which would impair its specificity for targeting G-quadruplex. Based on the different binding model of NDI for dsDNA and G-quadruplex, our group designed cyclic naphthalene diimide (cNDI)⁶ to interrupt its intercalation with dsDNA due to the steric hindrance, therefore induce an enhanced affinity of cNDI for G-quadruplex (Figure 1). As the evolution of cNDI series, we constructed new cNDI derivatives, cNDI carrying ferrocene moiety, and cNDI dimers, and also verified the binding property of cNDIs towards recognizing G-quadruplex under *in vitro* molecular crowding condition. These research progress can enrich the study of NDI group as G4 binder.

2. cNDI derivatives as G4 binder with electrochemical property

Ferrocenylnaphthalene diimides (FNDs), have been developed for electrochemical detection of telomerase, based on the recognition of NDI with G-quadruplex⁷. To improve FND's selectivity, and with the inspiration from cNDIs, we constructed three cyclic ferrocenylnaphthalene diimides (cFNDs) with different linker length between ferrocene moiety and cNDI (Figure 2a). Interestingly, the Circular Dichroism (CD) spectra of cFND-2 clearly showed new cotton effects around 320-380 nm and 240 nm, which could be considered as a direct evidence to prove the intramolecular stacking between ferrocene and NDI (Figure 2b).

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) was adopted to investigate the binding property of cFNDs with G-quadruplex. For parallel *c-myc* G-quadruplex, cFND 2-4 all showed similar binding affinity around 10^6 M⁻¹

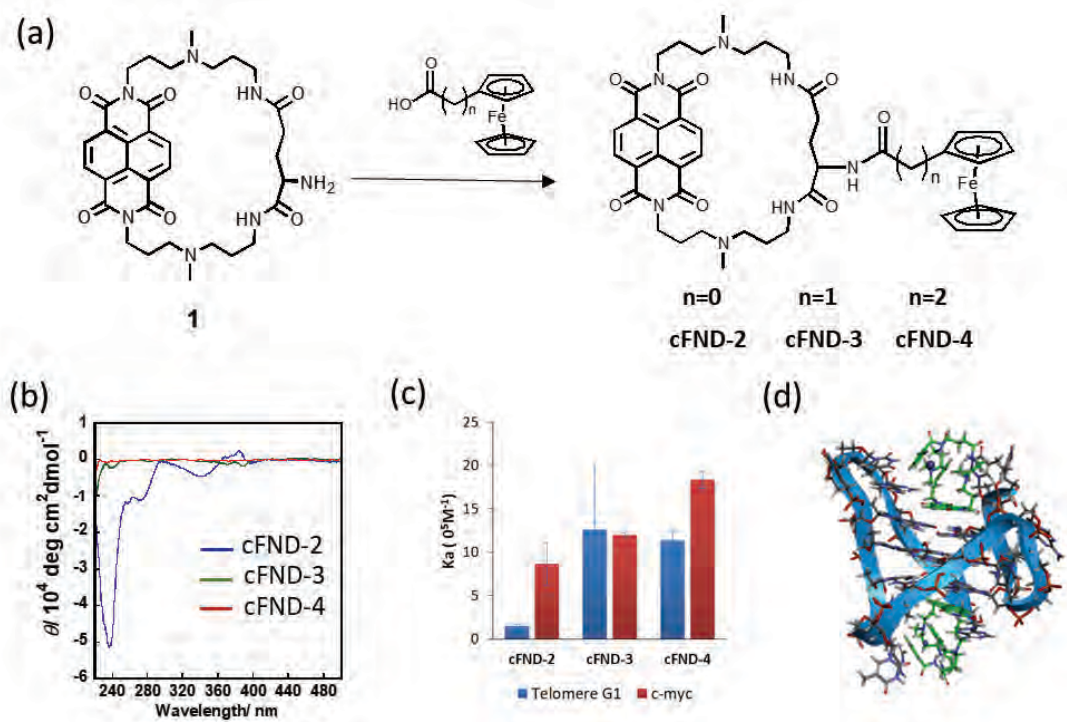


Figure 2. (a) Chemical structures of cyclic ferrocenylnaphthalene diimides (cFNDs); (b) CD spectra of cFNDs; (c) The binding affinity of cFNDs for telomere G1 and *c-myc* G-quadruplex determined by ITC measurement; (d) Molecular modelling of cFND-2 with hybrid telomere G-quadruplex. PDB: 2gku.

order (cFND-2 was slightly weaker). However, for hybrid Telomere G-quadruplex, although cFND-3 and 4 still displayed binding ability within 10^6 M^{-1} order, whereas cFND-2 was only in 10^5 M^{-1} order (Figure 2c). Regarding the structure, Telomere G1 hybrid G-quadruplex contains a big loop part, which may interfere its G-quartet interacting with rigid cFND-2, while, cFND-3 and 4 might be flexible to make some shift during the interaction benefiting from longer linker lengths. According to the simulation modeling of cFNDs with G-quadruplex, ferrocene of cFND-2 was more un-adjustable, and might cause some conformational strain during binding (Figure 2d).

With adopting 6-Mercaptohexanol, single strand DNA (non-G4 formation) or G4 DNA immobilized gold electrodes, cFND 2-4 was confirmed that could be concentrated to tetraplex DNA on the electrode, and displayed redox activity. Comparing to non-cyclic FNDs, cFND 2-4 showed 2-2.7 folds higher selectivity for G-quadruplex than for single strand DNA according to CC and SWV measurement, which suggested an improved potentiality of cFNDs for G-quadruplex targeting-based electrochemical detection⁸. As new cNDI derivatives, cFNDs showed comparable binding performance as cNDIs plus redox active property, the availability of cFNDs for telomerase electrochemical detection is under investigation.

3. cNDI derivatives as G4 binder for multiple G-quadruplex structure specific targeting

The above mentioned cNDIs and cFNDs can work as promising G4 binders for mono G-quadruplex unit, however, as the increasing evidence about G-quadruplex cluster existence in human genome, G4 ligands which can selectively target multiple G4 repeats would be useful for exploring G4 cluster's biological roles². Besides, telomere overhang preferring beads-on-a-string-like multiple G-quadruplex formation also encourage the development of G4 cluster targeting-available G4 ligands⁹. Previously, some ligand dimers and tetramer have been reported, such as dimeric berberine¹⁰ and L2H2-6OTD tetramer¹¹, which supported that G4 ligand

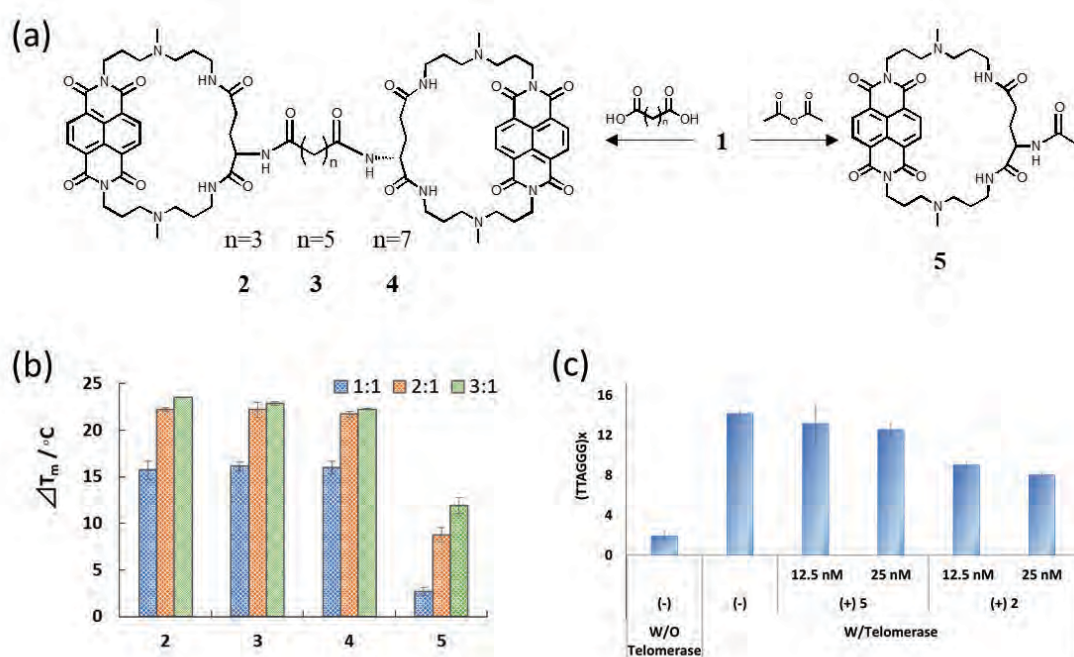


Figure 3. (a) Chemical structures of alkyl-chain tethered cyclic naphthalene diimides dimers; (b) The melting temperature enhancement of dimeric G-quadruplex with adding cNDI monomer or cNDI dimers; (c) The performance of cNDI monomer and cNDI dimer 2 for inhibiting telomerase activity.

multimer might be a good model for stabilizing G-quadruplex repeats.

Therefore, here we adopted cNDI (1) to construct a group of cNDI dimers with different linker lengths of alkyl chain, cNDI-ac (5) was adopted as monomer control (Figure 3a). Regarding the stabilization performance for dimeric telomeric G-quadruplex (G2T1), 5 showed much weaker ability to stabilize G2T1 structure in 1:1 ratio with increasing the T_m only by $2.7 \pm 0.6^\circ\text{C}$; upon continuing to add 5 to G2T1 in 2:1 ratio, T_m was increased by $8.8 \pm 1.1^\circ\text{C}$. In comparison, when adding cNDI-dimers to G2T1 in 1:1 ratio, T_m of G2T1 was increased by $15.7\text{--}16.1^\circ\text{C}$, which is even higher than adding 5 in 2:1 ratio (Figure 3b). The result suggested the enhanced ability of cNDI-dimers for stabilizing dimeric G-quadruplex. However, cNDI dimers exhibited lower binding affinity towards recognizing dimeric G-quadruplex than 5. One possible reason was that, the higher ΔS of 2–4 with dimeric intramolecular G-quadruplex (resulted in a higher ΔG) may partly reflect inherent differences in hydration for DNA structure and/or binding-induced release of counterions. Then, a PCR-free electrochemical telomerase assay was adopted to evaluate the ability of 2-5 for inhibiting telomerase activity. In consistent with the result of T_m measurement, cNDI dimers showed stronger ability to inhibit the elongation of telomeric DNA in lower concentration (Figure 3c)¹².

To improve the water solubility and flexibility of developed cNDI dimer, peptide also was introduced as linker to connect cNDI monomer to construct new cNDI dimers. Interestingly, peptide tethered cNDI dimers showed significantly enhanced binding affinity for *c-myc* G-quadruplex (up to 10^7 M^{-1}), and also stronger ability to stabilize G-quadruplex structure. Using the peptide linker, cNDI trimers and tetramers are under construction for creating new group of cNDI multimers with potentially interesting binding performance.

4. The binding performance of cNDI derivatives as G4 binder under molecular crowding condition

It's considerable that highly crowded cellular milieu might impair the binding of some molecules for G-quadruplex¹³, however, few studies has been reported about G-quadruplex recognition under molecular crowding condition. Although we developed many cNDI derivatives including the above cFNDs and cNDI dimers, whether cNDIs could keep comparable binding ability in molecular crowding condition is still an ambiguous question yet.

To clarify the above question, except previously reported cyclic naphthalene diimide with cyclohexane substituent (cNDI-ch), we constructed another two new cNDI derivatives, cNDI-mBen and cNDI-c3 (Figure 4a). Parallel *c-myc* G-quadruplex and hybrid telomere G-quadruplex were adopted for evaluation. Under K^+ -free polyethylene glycol (PEG) mimicked molecular crowding condition, a mixture of hybrid and parallel telomere G-quadruplex was observed. With increasing the amounts of cNDIs, the cotton effect around 290 nm increased gradually, especially with adding cNDI-mBen in 10 equivalents to telomere G-quadruplex, the CD spectra transferred to quite hybrid-like (Figure 4b). This supposed that cNDIs prefer to induce telomere to form a hybrid G-quadruplex under cation-free molecular crowding condition.

Then the binding parameters of cNDIs for G-quadruplex were measured by ITC and UV-Vis-based Scatchard plot analysis. When comparing to dilute condition, the ITC fitting curve's saturation rates of cNDIs with G-quadruplex under molecular crowding condition were slightly slower, which indicated a decreasing binding ability. However, the decreasing of K_a for G-quadruplex were generally less than 3 folds, and still could keep around 10^6 M^{-1} order. Consistent results were acquired from both ITC and UV-Vis, and supported that cNDIs recognizing G-quadruplex were not significantly interrupted under crowding condition (Figure 4c).

However, although cNDI-ch and cNDI-c3 showed various affinities for telomere G-quadruplex and *c-myc* under dilute condition, in molecular crowding condition, similar affinities for both *c-myc* and telomere were obtained. This might be attributed to that, telomere transformed from hybrid to parallel under molecular crowding condition, then the structure derived binding difference might be diminished¹⁴. This result pointed out one important concern to G4 ligands designed for specific G-quadruplex structure recognition, whether they are still able to discriminate the different structure under molecular crowding condition or *in vivo* complex condition or not, is requiring more evaluation.

5. Summary and future perspective

In this study, we developed new group of cNDI derivatives, cFNDs for G-quadruplex-targeting-based electrochemical detection and cNDI dimers for dimeric G-quadruplex recognition, and also identified that cNDIs keep comparable ability towards binding to G-quadruplex under PEG mimicked molecular crowding condition. Although we supposed that the big loop of hybrid telomere G-quadruplex may interfere its G-quartet interacting with some cNDI derivatives, such interruption possibly could be weakened under molecular crowding condition due to G-quadruplex transformation.

Although G4 cluster is attracting increasing attention, there are still some obstacles encountering for the study of multiple G-quadruplex targeting-capable ligands. First, quite few structure information about dimeric G-quadruplex or higher order G-quadruplex has been released based on NMR or crystallization, which limit the binding model clarification of G4 ligands for multiple G4 repeats recognition; second, although many

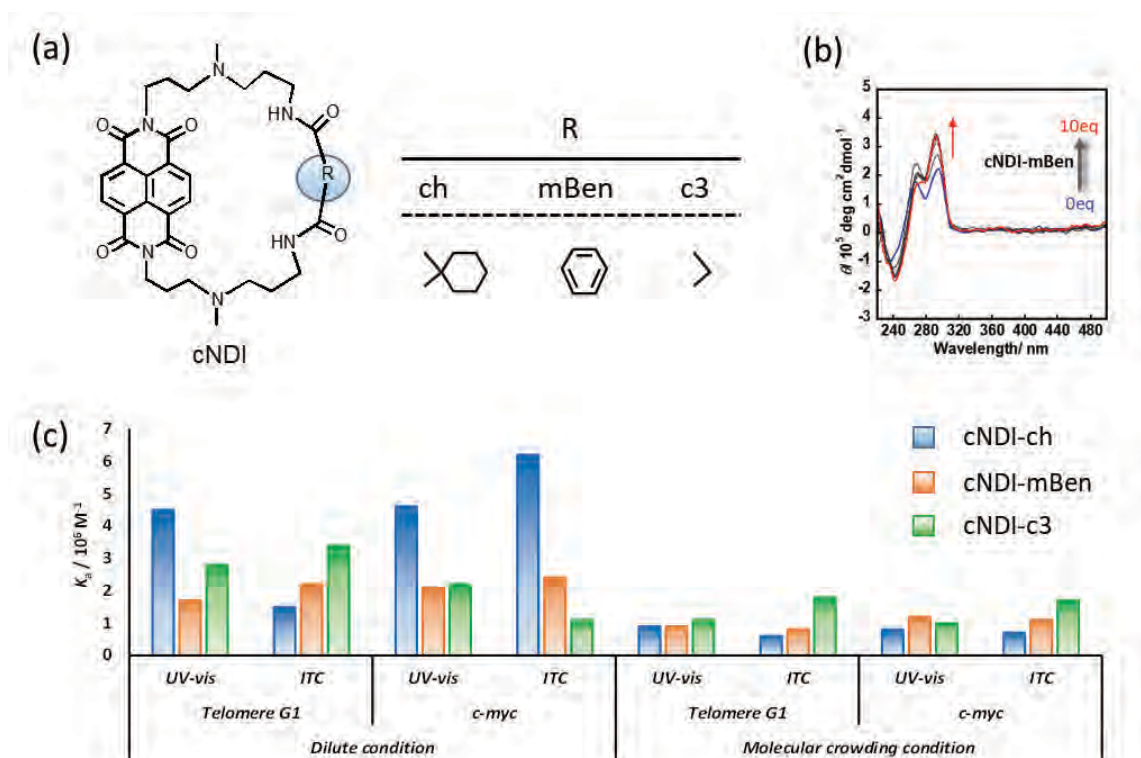


Figure 4. (a) Chemical structures of cNDI derivatives with varied cyclic substituents; (b) CD spectra of telomere G1 with adding cNDI-mBen from 0 to 10 equivalents, under molecular crowding condition without K^+ (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 40%(v/v) PEG 200); (c) The binding affinity of cNDI derivatives for G-quadruplex under dilute condition and molecular crowding condition, with determination by UV-Vis and ITC.

techniques have been employed for investigating the binding property of G4 ligand with G-quadruplex, when towards elucidating the interaction process of G4 ligands for multiple G-quadruplex targeting, some techniques may give ambiguous result or even not able to work for calculation. For these reasons, establishing a standard and applicable evaluation system for multiple G-quadruplex targeting ligands is in demand.

6. Acknowledgement

Thanks for offering the opportunity to introduce my research in Journal of the Japanese Society of Nucleic Acid Chemistry. This work could not be conducted without the hot discussion with Professor Shigeori Takenaka, Associate Professor Shinobu Sato, and hard work of many students (Ryusuke Takeuchi, Shuma Kaneyoshi, Rui Yasukawa *et al.*). I'm also very grateful to many co-researchers (group of Professor Toshihiro Ihara and Assistant Professor Yusuke Kitamura for ESI-MS determination, group of Professor Yasuhiko Yamamoto for NMR analysis, Assistant professor Satoshi Fujii for modelling simulation, and Associate Professor Kazuhisa Fujimoto for peptide synthesis, *et al.*). Finally I greatly appreciate to the support of Grant-in Aid for Early-Career Scientists (19K15700).

References

1. R. Hansel-Hertsch, D. Beraldi, S. V. Lensing, G. Marsico, K. Zyner, A. Parry, M. Di Antonio, J. Pike, H. Kimura, M. Narita, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Genet.*, **48**, 12670 (2016).
2. W. Yoshida, H. Saikyo, K. Nakabayashi, H. Yoshioka, D. H. Bay, K. Iida, T. Kawai, K. Hata, K. Ikebukuro, K. Nagasawa, I. Karube, *Sci. Rep.*, **8**, 3116 (2018).
3. S. Asamitsu, T. Bando, H. Sugiyama, H., *Chem. Eur. J.*, **25**, 417 (2019).
4. J. H. Tan, L. Q. Gu, J. Y. Wu, *Mini Rev. Med. Chem.*, **8**, 1163 (2008).
5. D. Muoio, F. Berardinelli, S. Leone, E. Coluzzi, A. di Masi, F. Doria, M. Freccero, A. Sgura, M. Folini, A. Antoccia, *FEBS J.*, **285**, 3769 (2018).
6. Y. Esaki, M. M. Islam, S. Fujii, S. Sato, S. Takenaka, *Chem. Commun.*, **50**, 5967 (2014).
7. M. Hayakawa, S. Sato, I. Diala, M. Kodama, K. Tomoeda-Mori, K. Haraguchi, K. Tominaga, S. Takenaka, *Electroanalysis*, **28**, 503 (2016).
8. S. Kaneyoshi, T. Zou, S. Ozaki, R. Takeuchi, A. Udou, T. Nakahara, K. Fujimoto, S. Fujii, S. Sato, S. Takenaka, *Chem. Eur. J.*, **26**, 139 (2020).
9. H. Yu, X. Gu, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20060 (2012).
10. C. Q. Zhou, J. W. Yang, C. Dong, Y. M. Wang, B. Sun, J. X. Chen, Y. S. Xu, W. H. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 191(2016).
11. J. Abraham Punnoose, Y. Ma, Y. Li, M. Sakuma, S. Mandal, K. Nagasawa, H. Mao, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 7476 (2017).
12. R. Takeuchi, T. Zou, D. Wakahara, Y. Nakano, S. Sato, S. Takenaka, *Chem. Eur. J.*, **25**, 8691 (2019).
13. H. Yaku, T. Murashima, H. Tateishi-Karimata, S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Methods*, **64**, 19 (2013).
14. T. Zou, S. Sato, R. Yasukawa, R. Takeuchi, S. Ozaki, S. Fujii, S. Takenaka, *Molecules*, **25**, 668 (2020).

(2020年7月27日受領)

(2020年9月30日受理)



3本鎖 DNA 中の CG 塩基対を 認識する人工ヌクレオシドの創製

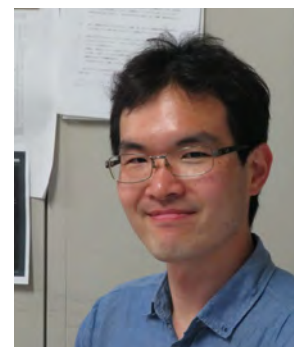
Development of artificial nucleosides for
CG base pair recognition in the triplex DNA

東北大学多元物質科学研究所
岡村 秀紀

*Institute of Multidisciplinary Research for Advanced
Materials, Tohoku University*

Hidenori Okamura

(hidenori.okamura.b8@tohoku.ac.jp)



Abstract: The sequence-specific triplex DNA formation is a potential basis for gene-targeted therapy and biotechnology. Its formation, however, is limited to homopurine-homopyrimidine regions of duplex DNA. In this paper, we review our recent efforts to overcome such limitations by developing isocytidine and pseudocytidine derivatives for the selective recognition of CG base pairs in antiparallel triplex DNA.

1. はじめに

ヒトゲノム計画で得られた遺伝情報をもとに遺伝子発現機構が徐々に解明され、それに伴い新たな遺伝子標的技術の開発が活発に研究されている。このような状況下、筆者らは遺伝情報中の 1 塩基の違いを認識できる方法論として 3 本鎖 DNA 形成に着目し、ゲノム標的技術への展開を目指している。3 本鎖 DNA は、2 本鎖 DNA に対して 3 本鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) が配列特異的に結合することで形成される核酸高次構造であり、核酸医薬の観点からはゲノムを標的とするアンチセンス法への応用が期待される (図 1a)¹。筆者らが注目するアンチパラレル型 3 本鎖 DNA は、中性条件下、TFO の G が GC 塩基対の G と、A もしくは T が AT 塩基対の A とそれぞれ 2 ヶ所の逆 Hoogsteen 型水素結合を形成することにより配列特異的な形成を示す (図 1b)。しかし、3 本鎖 DNA 形成は、ホモプリン-ホモピリミジンで構成さ

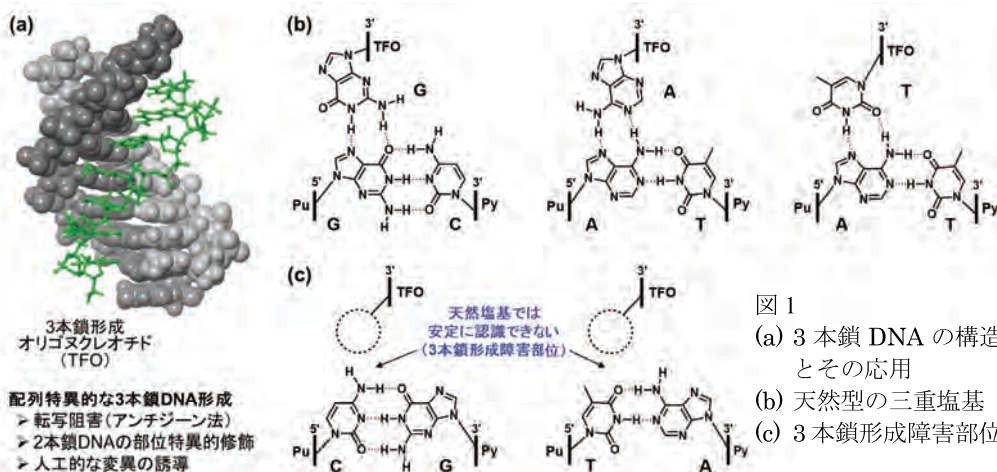


図 1
(a) 3 本鎖 DNA の構造
とその応用
(b) 天然型の三重塩基
(c) 3 本鎖形成障害部位

れる2本鎖領域に本質的に制限される。これは、CG塩基対のCならびにTA塩基対のTの主構側には水素結合できる官能基が1カ所しか存在せず、天然塩基では安定な三重塩基を形成できないためである(図1c)。このような3本鎖形成配列の制限を克服するため、筆者らの研究グループによるW-shaped nucleoside analogues (WNA)をはじめ、3本鎖形成障害部位であるCGおよびTA塩基対を認識する人工核酸の開発が活発に研究されてきた^{2,3}。しかし、既存の分子は認識能が隣接塩基の種類に左右される配列依存性を示すほか、連続導入が困難であり、実用には課題を残している。そこで筆者らは、3本鎖形成配列の拡張を目的として、CG塩基対を認識可能な汎用性の高い人工ヌクレオシドの創製に着手した。

2. CG塩基対を選択的に認識するイソシチジン誘導体の設計と機能評価

新たなCG塩基対認識ヌクレオシドの設計にあたり、天然型の三重塩基を基本様式とすることを重視した。天然塩基の構造と認識様式を模倣することにより、3本鎖DNAの全体構造を大きく崩すことがなく、配列依存性を低減できると考えたためである。チミンがAT塩基対に対して安定な三重塩基を形成することに加えて、4位カルボニル基における水素結合を介してCG塩基対とも相互作用することが報告されている(図2a)⁴。このT-CG三重塩基を基本様式として、選択的なCG塩基対認識を指向したイソシチジン(isodC)誘導体を設計した。isodCはTと同様に4位カルボニル基を有することから、CG塩基対のCの4位アミノ基に対して水素結合を形成できる(図2b)。その一方、Watson-Crick面における水素結合のドナー・アクセプター配置はTと異なるためAT塩基対のAとは水素結合せず、CG塩基対に対する選択性を向上できると考えた。さらに、GのHoogsteen面に対する水素結合ユニットを、isodCの2位アミノ基にリンカーを介して導入することで、多点水素結合によるCG塩基対選択的な認識を実現できると期待した(図2c)。

設計概念の有効性を確認するために、種々の水素結合性置換基を導入したisodC誘導体を組み込んだTFOを合成し、標的塩基対に対する認識能を検証することにした。isodC誘導体を組み込んだTFOの合成経路をスキーム1に示す。チミンを原料として合成した環状チミンにエチレンジアミンを反応させたのち、末端アミノ基をFmoc基で保護した。得られたジオール体を定法に従ってDNA合成前駆体とし、ホスホロアミダイト固相合成法を用いてオリゴヌクレオチドに組み込んだ。リンカー末端にグアニジノ基とウレイド基を有する

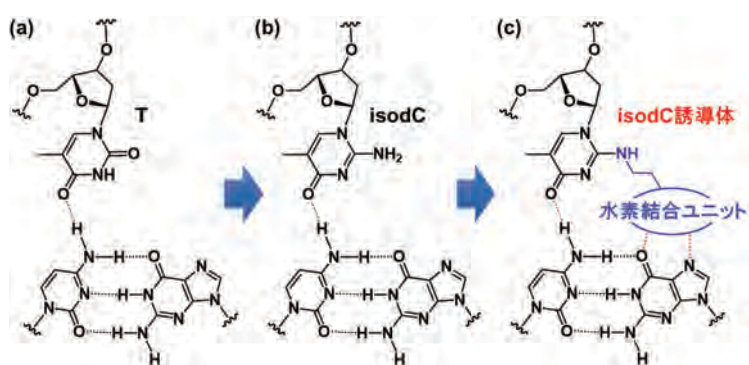
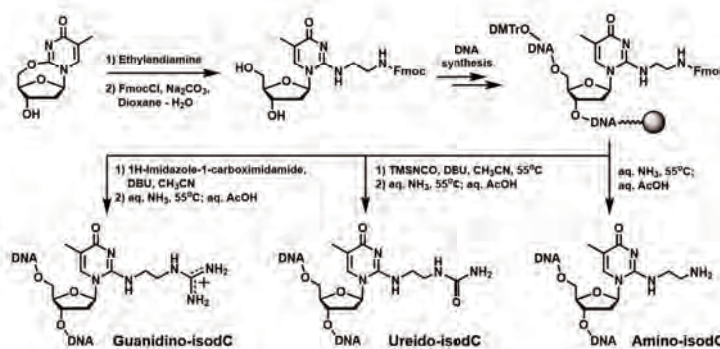


図2 T-CG 三重塩基をもとにしたイソシチジン(isodC)誘導体の設計



スキーム1 isodC誘導体を組み込んだTFOの合成経路

	標的塩基対 (XY)			
	GC	CG	AT	TA
T	2.30	7.99	29.24	0.98
isodC	10.95	8.40	n.d.	0.56
Guanidino-isodC	0.28	5.16	n.d.	n.d.
Ureido-isodC	n.d.	5.03	n.d.	n.d.
Amino-isodC	0.04	0.23	n.d.	0.11

Conditions: 20 mM Tris-HCl buffer, 20 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine, 10% sucrose, pH 7.4, 30°C. $K_b (10^4 M^{-1}) = ([\text{Triplex}] / ([\text{TFO}][\text{Duplex}]))$, n.d., not determined.

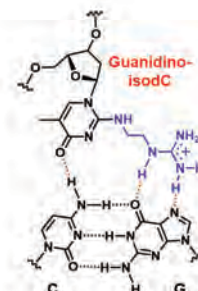


図3 (a) isodC誘導体を組み込んだTFOの結合定数と(b)予想認識構造

誘導体は、DBUの存在下、固相担体上のDNAに対して各種アミン修飾試薬を反応させることにより合成した。isodC誘導体の塩基対認識能は、各誘導体をZに組み込んだTFOと標的塩基対(XY)が異なる2本鎖DNAの3本鎖形成をゲルシフトアッセイにて比較することにより評価した。標的塩基対を変えた4種類の2本鎖DNAに対する各TFOの結合定数を図3aに示す。チミジンはAT塩基対に対して高い親和性を示すと同時に、CG塩基対に対しても中程度の親和性を示すことがわかる。一方、水素結合ユニットを持たないisodCは、GC塩基対とCG塩基対の両方に対してT-CG三重塩基と同程度の親和性を示した。これらに対して、isodCの2位アミノ基にエチレンリンカーを介してグアニジノ基とウレイド基を導入したGuanidino-isodCは、T-CG三重塩基と比べて安定性は低いものの、CG塩基対選択的な3本鎖形成を示した。アミノ基をリンカー末端に有するAmino-isodCではCG塩基対に対する親和性が減少することから、グアニジノ基とウレイド基とGの間の多点水素結合が親和性に寄与していることが示唆された(図3b)。以上のように、isodC誘導体がCG塩基対認識における有用な基本骨格であることを見出した⁵。そこで、Guanidino-isodCをもとにした構造最適化を行い、CG塩基対に対する親和性の向上を図ることとした。

3. リンカー部位の柔軟性に着目したイソシチジン誘導体の構造改良

Guanidino-isodCはCG塩基対選択的ではあるが、T-CG三重塩基よりも親和性が低い。この理由として、リンカーの柔軟性が高く三重塩基形成に伴うエントロピー損失が大きいこと、および水素結合ユニットが適切な位置に配置されていないことが予想された。そこで、グアニジノエチル基を2-アミノピリジンメチル基で置換したAP-isodCを設計した(図4)。2-アミノピリジンは、中性付近でプロトン化されることによってGのHoogsteen面と水素結合すると考えられる。リンカー部の柔軟性も制限されるため、CG塩基対に対する親和性を向上できると期待した。さらに、2-アミノピリジン以外の芳香族アミンを導入した類縁体を用いて置換基効果を調べることで、isodC誘導体の認識様式に関して知見を得ることができると考えた。

AP-isodCとその類縁体は、先程と同様、環状チミジンを原料としてベンジルアミン誘導体を反応させることにより合成し、ホスホアミダイト固相合成法によりTFOに組み込んだ。各isodC誘導体を組み込んだTFOの3本鎖形成能は、上述の通りゲルシフトアッセイにより行った(図5)。その結果、AP-isodCはCG塩基対選択的な認識を示すと同時に、T-CG三重塩基を超える結合定数を示すことを見出した。一方で、2-アミノピリジン構造をGに対する水素結合点を減らしたアニリン、ピリジン、ベンゼンに置換した誘導体ではCG塩基対に対する親和性が大幅に減少した。また、AP-isodCのCG塩基対に対する認識能はpH依存性を示し、酸性条件下において親和性の向上が確認された。NMR滴定により算出したAP-isodCの2-アミノピリジン環の pK_a が6.5であることも踏まえると、AP-isodCは予想通り、プロトン化した状態でグアニン塩基と相互作用することが示唆された。以上のように、2-アミノピリジンメチル基を有するAP-isodCが、T-CG三重塩基を超える親和性でCG塩基

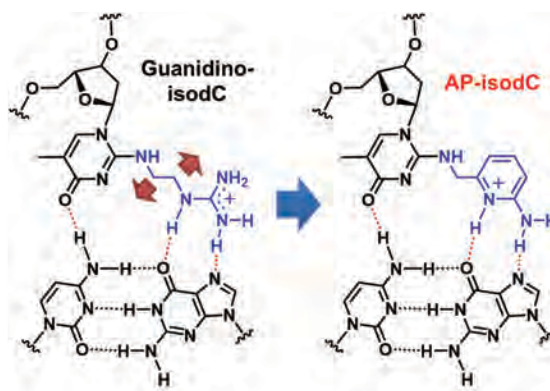


図4 リンカー部の柔軟性を制限したAP-isodCの設計

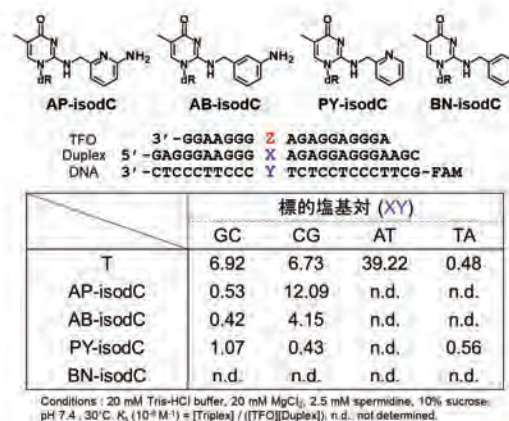


図5 各isodC誘導体を組み込んだTFOの結合定数

対を認識できることを見出した⁶。しかし、その親和性は T-AT 三重塩基には及ばず、3 本鎖形成を応用した遺伝子標的技術へと展開するためにはさらなる改良が必要と考えられた。

4. シュードシチジン誘導体の設計と機能評価

isodC 誘導体の機能評価より、2-アミノピリジン構造が CG 塩基対認識に有用であること、また、リンカー部位の柔軟性を制限することが親和性の向上につながる事が考えられた。これらを踏まえて、アミノピリジン環をイソシチジン骨格に直結させたイソシチジン誘導体を設計した(図 6)。本設計により、塩基部全体の平面性が向上し、隣接塩基との効果的なスタッキング相互作用も期待できると考えられた。しかし、合成を試みたところ、環状チミジンに対する芳香族アミンの置換反応がほとんど進行しないことから、目的とする isodC 誘導体の獲得が困難であることが判明した。そこで、芳香族アミンの導入とヌクレオシドの化学的安定性を同時に解決するために、シュードシチジン(ΨdC)を基本骨格にもつ ΨdC 誘導体を新たに設計した。

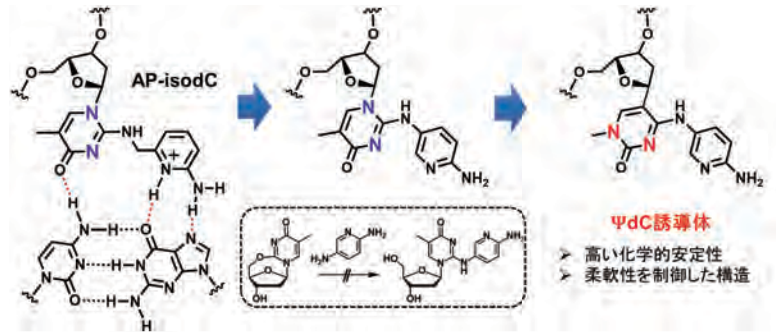
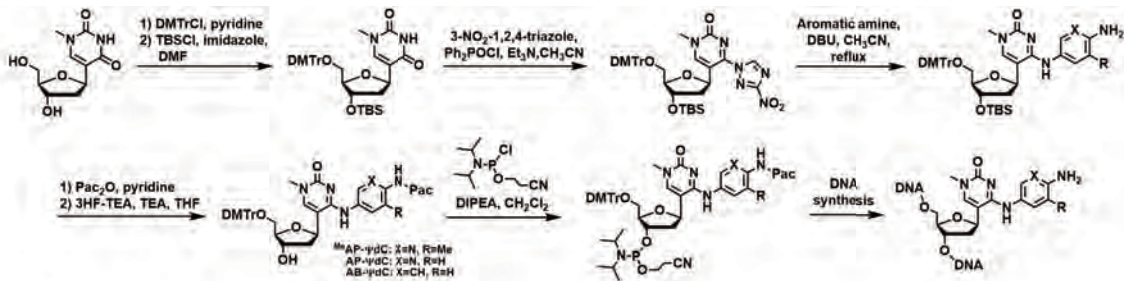


図 6 シュードシチジン(ΨdC)を基本骨格にもつ ΨdC 誘導体の設計

ΨdC は、isodC の C-ヌクレオシドアナログであり、高い化学的安定性を有する。また、ピリミジン環に対する芳香族求核置換反応により芳香族アミンを導入できることから、目的の分子構造を構築できると考えた。

ΨdC を組み込んだ TFO の合成経路をスキーム 2 に示す。まず、Benner らの報告⁷に従って合成したシュードチミジンを 4,4'-ジメキソトリチル保護、TBS 保護したのち、ニトロトリアゾリル化した。続いて、種々の



スキーム 2 ΨdC 誘導体を組み込んだ TFO の合成経路

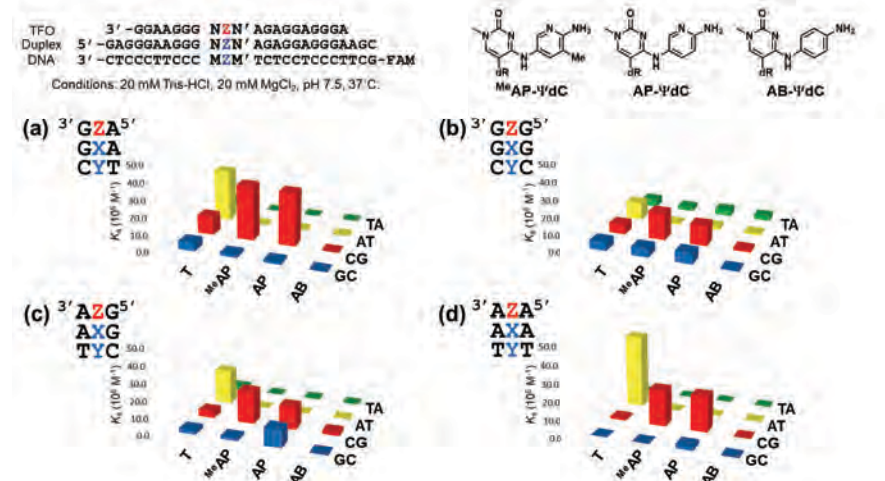


図 7 隣接塩基が異なる配列における ΨdC 誘導体を組み込んだ TFO の 3 本鎖形成能

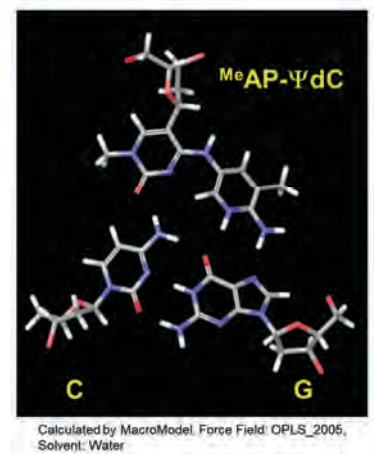


図 8 MeAP-ΨdC の予想認識構造

芳香族アミンを反応させることにより Ψ dC 骨格を構築した。各 Ψ dC 誘導体は、定法に従って DNA 合成前駆体としたのち、DNA 自動合成装置を用いた固相合成法により TFO に組み込んだ。

Ψ dC 誘導体を組み込んだ TFO について、標的塩基対 (XY) が異なる 2 本鎖 DNA に対する 3 本鎖 DNA 形成を評価した結果を図 7 にまとめる。各 Ψ dC 誘導体について、隣接塩基を変えた 4 種類の配列における塩基対認識能を評価した。Z の 3' 側が G、5' 側が A の ${}^3\text{GZA}^5$ 配列における塩基対認識能 (図 7a) を比較すると、アミノピリジンユニットを有する $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ もしくは $\text{AP-}\Psi\text{dC}$ を組み込んだ TFO が、T-AT 三重塩基と同等の親和性で CG 塩基対を認識できることがわかる。一方、アミノベンゼンユニットをもつ $\text{AB-}\Psi\text{dC}$ はいずれの塩基対に対しても親和性を示さなかった。 Ψ dC のカルボニル基とプロトン化したアミノピリジン環が、CG 塩基対の C と G のそれぞれと水素結合形成することで、高い親和性を示したと考えられる。さらに、隣接塩基が異なる配列を用いた評価より、 $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ の CG 塩基対認識能は、塩基配列の影響を受けないことを見出した (図 7b-d)。塩基配列非依存的な障害部位認識は従来困難であったが、天然型の三重塩基をもとに設計した本分子で初めて達成できたものである。以上のように、任意の配列で CG 塩基対を選択的かつ安定に認識できる汎用性の高い $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ の開発に成功した (図 8)⁸。そこで、転写を阻害するアンチジーン法への展開を見据えて、これまで標的困難であったゲノム配列に対する転写阻害実験を試みることにした。

5. hTERT 遺伝子のプロモーター配列を標的としたアンチジーン効果の検証

遺伝子プロモーター領域に対する 3 本鎖形成は、転写因子の結合やポリメラーゼ伸長反応を阻害するため、遺伝子発現を抑制できる。しかし、3 本鎖形成配列の制限のため、標的可能なゲノム配列はこれまで限られていた。そこで、 $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ を用いて、CG 障害部位を複数含む hTERT 遺伝子のプロモーター配列に対する転写阻害を検証した。まず、標的配列に対する TFO を設計し、3 本鎖形成能を評価した (図 9a)。この標的配列は、複数の CG 障害部位をもつため、対応する位置にチミジンを組み込んだ TFO-TN では安定な 3 本鎖を形成できない。一方、 $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ を組み込んだ TFO-ZN は、標的配列に対して安定な 3 本鎖形成を示した。複数かつ連続する CG 障害部位をもつ配列に対する 3 本鎖形成はこれまでに報告例がなく、 $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ の汎用性の高さを示す重要な結果と考えられる。続いて、TFO-TN と TFO-ZN をそれぞれ Hela 細胞にトランスフェクションし、遺伝子発現阻害効果をリアルタイム RT-PCR によって比較した (図 9b)。その結果、 $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ を組み込んだ TFO-ZN は、T を組み込んだ TFO-TN と比べて hTERT の mRNA 発現量を有意に減少させることを明らかにした。

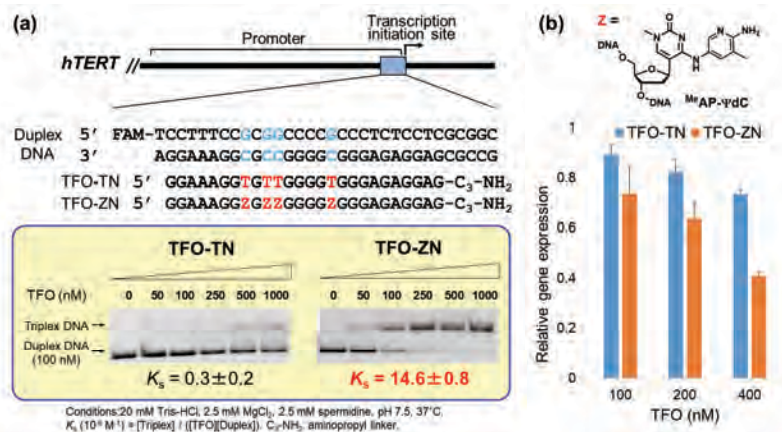


図 9 (a) hTERT 配列に対する 3 本鎖形成と (b) 転写阻害活性の評価

6. おわりに

本研究では、CG 塩基対を選択的に認識できる isodC 誘導体および Ψ dC 誘導体の開発を行い、任意の隣接塩基の存在下における選択的かつ安定な CG 塩基対認識に成功した。 $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ 誘導体を用いることにより、従来標的困難であった塩基配列に対するアンチジーン効果も確認され、3 本鎖形成配列を拡張

できたものと考えている。現在、^{Mc}AP-ΨdC 誘導体をもとにしたさらなる構造最適化⁹や TA 塩基対認識ヌクレオシドの開発¹⁰も進んでいる。核酸化学を基盤とする 3 本鎖 DNA 形成技術の進展が、アンチジーン医薬をはじめとする新たなゲノム標的手法につながることを強く期待する。

7. 謝辞

本研究は、筆者が九州大学薬学府博士課程在籍中に、JSPS 特別研究員奨励費の助成により遂行されました。ご指導ご鞭撻を賜りました九州大学薬学研究院 佐々木茂貴教授(現:長崎国際大学薬学研究科、研究科長)、谷口陽祐准教授にこの場をお借りして心より感謝申し上げます。

References

1. A. Mukherjee, K. M. Vasquez, *Biochimie*, **93**, 1197 (2011).
2. N. A. Kolganova, A. K. Shcholkina, A. V. Chudinov, A. S. Zasedatelev, V. L. Florentiev, E. N. Timofeev, *Nucleic Acids Res*, **40**, 8175 (2012); Y. Hari, M. Akabane, S. Obika, *Chem. Commun.*, **49**, 7421 (2013); A. Ohkubo, K. Yamada, Y. Ito, K. Yoshimura, K. Miyauchi, T. Kanamori, Y. Masaki, K. Seio, H. Yuasa, M. Sekine, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5675 (2015).
3. S. Sasaki, Y. Taniguchi, R. Takahashi, Y. Senko, K. Kodama, F. Nagatsugi, M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 516 (2004); Y. Taniguchi, A. Nakamura, Y. Senko, F. Nagatsugi, S. Sasaki, *J. Org. Chem.*, **71**, 2115 (2006); Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 8336 (2012); Y. Taniguchi, H. Okamura, N. Fujino, S. Sasaki, *Tetrahedron*, **69**, 600 (2013).
4. K. Dittrich, J. Tinder, M. Hogan, X. Gao, *Biochemistry*, **33**, 4111 (1994).
5. H. Okamura, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 3918 (2013).
6. H. Okamura, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *ChemBioChem*, **15**, 2374 (2014).
7. H. J. Kim, N. A. Leal, S. A. Benner, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 3728 (2009).
8. H. Okamura, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 12445 (2016).
9. L. Wang, Y. Taniguchi, H. Okamura, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3853 (2017); L. Wang, Y. Taniguchi, H. Okamura, S. Sasaki, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 8679-8688 (2018).
10. Y. Taniguchi, Y. Magata, T. Osuki, R. Notomi, L. Wang, H. Okamura, S. Sasaki, *Org. Biomol. Chem.*, **18**, 2845 (2020).

(2020年7月21日受領)

(2020年9月3日受理)



核酸の高次構造・特殊配列に 結合する低分子化合物

～基盤分子の開発/評価法の構築～

Small molecular ligands binding to the higher-order
structure or repeat sequence of nucleic acid



長崎国際大学 薬学部薬学科

村瀬 裕貴

Graduate School of Pharmaceutical Sciences,

Nagasaki International University

Hiroataka Murase

(murase@niu.ac.jp)

Abstract: The nucleic acid has the various higher-order structures or particular sequences, which can play important roles in the gene expression. Recently, the binding ligands for these nucleic acids attract a great attention as a gene control methodology. In this manuscript, we report two topics on the development of the small molecular ligands for RNA higher-order structure and the evaluation of the multiple-binding to DNA repeat sequences.

1. はじめに

核酸の多様な高次構造や特殊配列は遺伝子の発現・制御における重要因子であり、遺伝子発現のON/OFFを緻密にコントロールしている。したがってこれらの核酸構造に結合する分子は、人工的に遺伝子発現を制御する方法論として期待される。本稿では、核酸に結合する低分子をテーマに、「新規RNA高次構造結合分子の開発」と「DNA繰り返し配列への全サイト結合能の評価」についての研究成果を紹介する。

2. RNA高次構造に結合する低分子化合物の開発

RNAは、DNAの遺伝情報の仲介を担うばかりでなく、mRNAなどの長鎖RNAの構造変化や、microRNAなどの短鎖RNAが介在する機構によって遺伝子発現を制御している。近年、このRNA分子による制御機構に対して、アンチセンス法またはRNA干渉法が広く用いられているが、核酸オリゴマーの生体内安定性や細胞膜透過性などが問題となっている。これらの問題の解決が世界的に研究されている一方で、別の方法論としてRNAの高次構造を標的とした低分子的手法が注目を集めている。RNAはヘアピン、内部ループ、G4重鎖構造などの様々な高次構造を形成し遺伝子発現制御に深く関与するため¹、これらの構造に結合する低分子リガンドは翻訳機構に影響を与えることが可能と考えられる。しかしながら、RNAの構造的多様性により、配列選択的なRNA結合分子を新規開発するのは難易度が高い。例えば、RNA結合分子として知られるアミノグリコシド類は、複合体形成時の相互作用が複雑であり、構造修飾による選択性改善の障害となっている。一方、構造解析や論理的な分子設計の試みとして、AP-siteや塩基ミスマッチ、バルジ構造などの疎水環境下にあるRNA塩基と選択的に水素結合を形成する分子が報告されている²。これらの例

のように有用なRNA結合分子はいくつか創出されてはきたが、DNA結合分子の数と比較してその数はまだまだ少ないのが現状であり、RNA結合分子の新規開発が望まれている。

そこで本研究では、報告例を参考に標的RNA塩基と水素結合を形成可能な新規RNA結合分子の設計・合成を行った。基本構造としては1,3-diazaphenoxazine環 (G-clamp)³を採用した。G-clampを低分子的に利用した報告例として、8-oxo-guanineの認識分子が報告されている⁴。本研究ではG-clamp構造がRNAの高次構造中のグアニン塩基と多点水素結合を形成することを期待し、**G-clamp-monomer**と**G-clamp-dimer**の2種類の分子を合成した(Fig.1)。

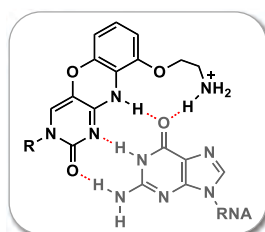


Fig. 1
Guanine recognition
by G-clamp

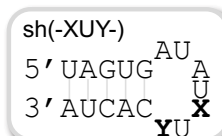
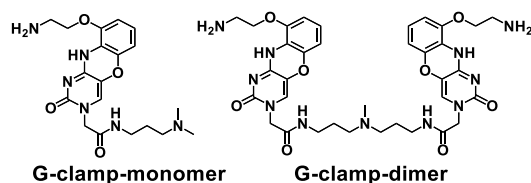


Fig. 2
RNA sequences. The stem parts
are represented by underlines.

Name	Sequence
sh(-GUG-)	5' - <u>UAGUG</u> AUA <u>UGUG</u> CACUA-3'
sh(-CUA-)	5' - <u>UAGUG</u> AUAUCU <u>ACAC</u> UA-3'
sh(-CUG-)	5' - <u>UAGUG</u> AUAUCU <u>G</u> CACUA-3'
sh(-GUA-)	5' - <u>UAGUG</u> AUA <u>UG</u> UACACUA-3'
ssRNA-5mer	5' -AGUGA-3'

RNA結合評価のために、ループ内にグアニン塩基をもつモデルショートヘアピン配列sh(-XUY-)を設計した (Fig.2)。この配列群を用いて、まずは蛍光測定によりRNA結合評価を行った。**G-clamp-monomer**は水系緩衝液中にて360 nmの照射により450 nm付近に中程度の蛍光発光を示す。そこに標的RNAを添加するとRNA濃度依存的にG-clamp由来の蛍光がわずかに減少していった (Fig. 3A)。この消光現象は

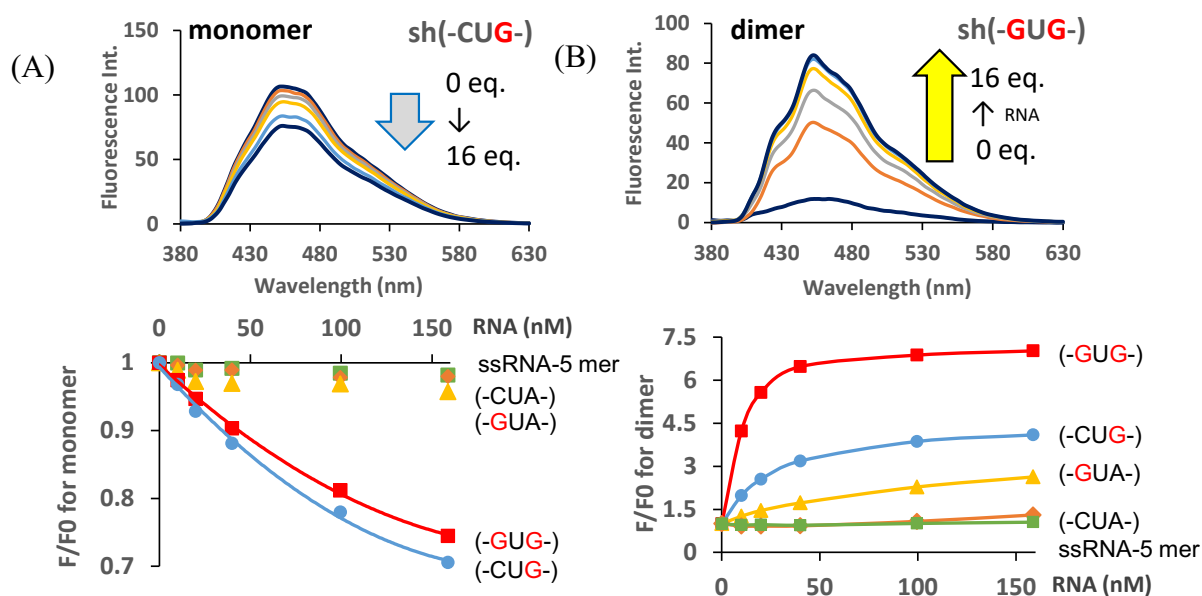


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of 10 nM G-clamp ligands (A) monomer, (B) dimer excited by 360 nm light in the presence of 0 to 160 nM sh(-XUY-) in the buffer containing 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) and 100 mM NaCl at 20 °C. Relative fluorescence intensity (F/F₀) at 450 nm (A lower) monomer, (B lower) dimer (F: in presence of RNA, F₀: in the absence of RNA).

グアニン塩基との結合に伴うPeT消光によるものであると推察される⁵。この変化をプロットし解離定数 (K_d) を算出したところ、sh(-CUG-)で155 nM, sh(-GUG-)で202 nMという強い結合親和性を有することがわかった。また、sh(-GUA-)ではほとんど消光はみられておらずグアニン塩基の位置選択性が確認された。一方で、ヘアピン内部にグアニンをもたないsh(-CUA-)や一本鎖RNA (5 mer, 5'-AGUGA-3') では蛍光変化はみられず、リガンドの高い配列選択性と構造選択性が確認された。

G-clamp-monomerの蛍光特性とは異なり、**G-clamp-dimer**では、興味深いことに、水系緩衝液中ではすでに消光状態となっており、標的RNAの添加により**G-clamp**由来の蛍光が増大することがわかった (Fig. 3B)。この蛍光増大は最大で7倍ほどであり、蛍光滴定のプロットの結果、ループ内にグアニン塩基を2つもつsh(-GUG-)に対して、 $K_d = 9$ nMという非常に強力な値が得られた。一方、sh(-CUG-)とsh(-GUA-)では、それぞれ $K_d = 27, 103$ nMを示し、sh(-CUA-)と一本鎖RNAではやはり蛍光変化はみられなかった。この蛍光増大のメカニズムについて現在のところ以下のように考察している。水中での**G-clamp**ユニットは、分子内スタッキング相互作用により互いに近接しており、分子内消光を起していると考えられる。ここに、標的RNAが添加されるとグアニン塩基と**G-clamp**の水素結合形成により分子内スタッキングが解消され、蛍光が回復する。結合に伴うグアニンからのPeT消光も一部予想されるが、蛍光増大が優位であり結果として蛍光が増大すると考えられる。Fig. 4は分子動力学計算により導かれた水中での安定構造の一つであるが、分子内のフェノキサジン環間の距離は3.65 Åであり、これはスタッキング相互作用の形成に適する距離である。

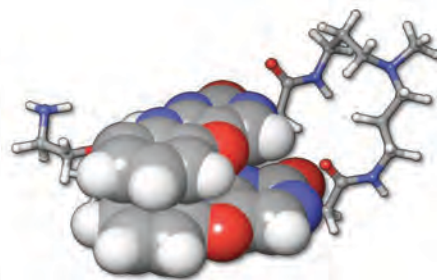


Fig. 4 One of the stable structures of G-clamp-dimer in water.

最後に、UVスペクトル測定によって**G-clamp-dimer**のRNA結合を調べた。**G-clamp-dimer**に対して標的RNAを添加したところ、**G-clamp**由来の吸収帯にて濃度依存的な淡色効果とレッドシフト、加えて2ヶ所の等吸収点がみられたことから、**G-clamp-dimer**とRNAとの錯体形成が確認された (Fig. 5A)。またCDスペクトル測定では、興味深いことに、**G-clamp-dimer**のRNA結合によって、RNAのステムループ構造が大きく変化していることが確認された (Fig. 5B)。この結果から、**G-clamp-dimer**は、RNA構造変化を誘起させるリガンドとして、人為的な遺伝子制御技術への展開も期待される。

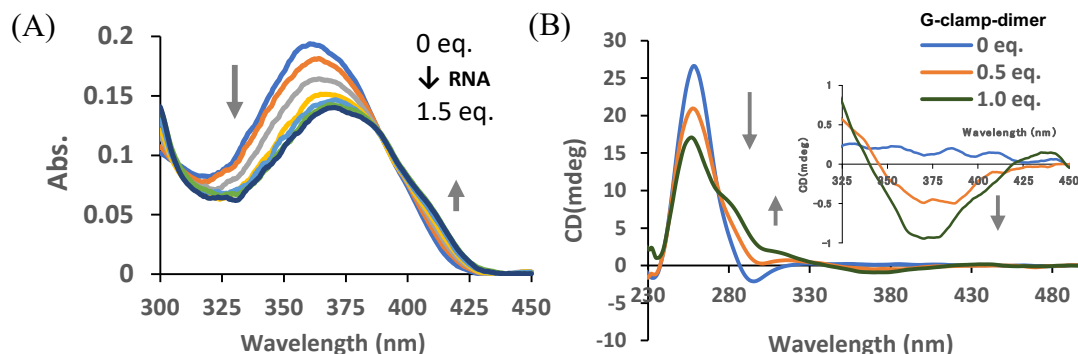


Fig. 5 (A) UV-Vis spectrum of 10 μ M G-clamp-dimer in the presence of 0 to 15 μ M sh(-GUG-), (B) CD spectrum of 10 μ M sh(-GUG-) in the presence of 0, 5 or 10 μ M G-clamp-dimer. The above titrations were performed in the buffer containing 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) and 500 mM NaCl at 25 $^{\circ}$ C.

3. DNA繰り返し配列への全サイト結合性についての研究

遺伝子中に含まれる繰り返し配列は、遺伝子発現を制御する重要な因子である。この領域に繰り返し数の異常な増加が生じると、転写によって生じるRNAの異常構造や翻訳で産生される異常ポリペプチドなどが原因となり疾患を引き起こす⁶。これらの病気の多くは難治療性の遺伝性疾患であり、今もなお治療法が確立していない。したがって、核酸の繰り返し配列は創薬標的として設定され、低分子リガンドの開発が盛んに行われている^{2b,7}。しかしながら、繰り返し配列中の複数サイトに対する結合を解析する際、一般的な結合解析法(分光学的方法、DNAフットプリンティング法、表面プラズモン共鳴法、等温滴定型カロリメトリー法など)では、その複数の結合が別々の鎖上でランダムに起きているのか、あるいは同一鎖上の全結合サイトに協同的に結合しているのかを知るのは非常に困難である。例えば、DNAフットプリンティング法にて、リガンド結合により複数箇所でもフットプリントが観測されても、それらの複数箇所にリガンドが全て同時に結合していることを必ずしも意味しない。そこで、本研究では、モデル結合リガンドとして、天然物 Chromomycin A₃ (CRA₃) を用いて、DNA配列中の複数の結合部位へのリガンドの全サイト結合を解析する方法論について検討した。CRA₃はGC選択的なマイナーグループ結合分子であり、Mg²⁺を介した二量体型錯体がGC-richなDNA配列に結合する (Fig.7)⁸。

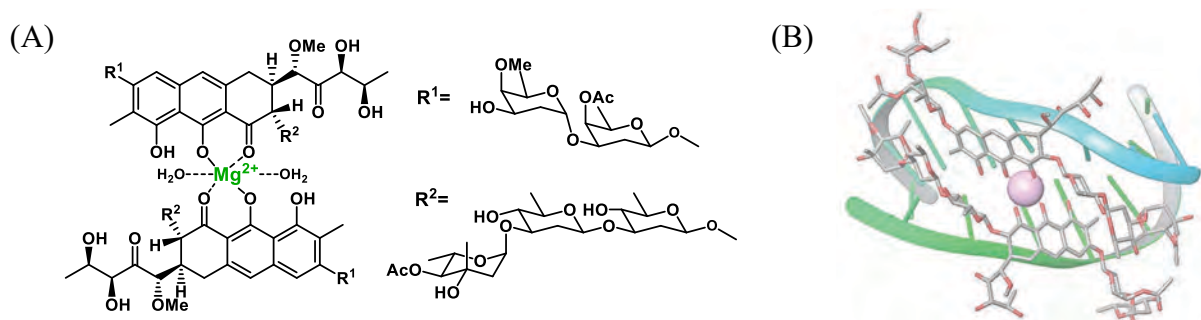


Fig. 7 (A) Chromomycin A₃ (CRA₃). (B) The crystal structure of the Mg²⁺-(CRA₃)₂-d(TTGGCCAA)₂ complex (PDB ID: 1VAQ⁸). CRA₃ in a stick model, DNA in a ribbon model, and Mg²⁺ in a space-filling model.

我々は複数の連続するDNA結合部位に対するリガンドの全サイト結合能を簡便に評価する手法として、制限酵素阻害アッセイ法を考案した (Fig.8)。制限酵素は特定の塩基配列を認識し特異的に切断するエンドヌクレアーゼであり、酵素切断部位にリガンドが結合していると酵素切断が阻害される。本実験ではd(CGCG)₂配列を平滑切断する制限酵素*Acc II*と、d(CGCG)₂部位を複数もつ基質DNAを用いて、CRA₃による切断阻害を調べた。リガンド共存下、制限酵素処理により生じるDNA切断バンドを解析することで次のことがわかる。(a) リガンドが独立的な様式でd(CGCG)₂部位にランダムに結合している場合では、酵素はリガンド結合部にて部分的な切断阻害を受ける。一方で、リガンドが結合していないd(CGCG)₂部位は酵素で切断されるため複数のDNA断片が生じる。(b) リガンドが全d(CGCG)₂部位に結合している状態では、全d(CGCG)₂部位で切断阻害を受けるため、全長DNAが残存する。すなわち、DNA鎖が制限酵素で完全に加水分解される条件では、同一鎖上の全てのd(CGCG)₂部位に同時にリガンドが結合しているときにのみ、加水分解されない全長DNAバンドが生じる。したがって、この全長DNAバンドの残存率をPAGEにて定量分析することで、リガンドの全サイト結合性を評価することにした。

本実験では、基質DNAとして、d(CGCG)₂サイト数をm、サイト間d(A/T)塩基をnとしたGC(m-n)、及びリガンドとしてCRA₃を用いて、*Acc II*阻害アッセイを行った (Fig. 9A)。GC(1)とGC(5-5)の結果、いずれもCRA₃の濃度増加に伴い全長DNAのバンド強度の増加がみられた (Fig. 9B)。次にCRA₃の濃度を10 μMに固定

し、CRA₃の結合が飽和しない条件下での結合性の比較を行った (Fig. 9C)。その結果、d(CGCG)₂数が1から5と増加するにつれ全長DNA残存率が顕著に減少していく様子が確認された。この結果は、d(CGCG)₂サイトの当量増加によってCRA₃の結合していないサイトが生じ、そこを酵素が切断したためである。一方で、非常に興味深いことに、d(CGCG)₂の数が同じ (m=5) であるにもかかわらず、サイト間のd(A/T)数nが減少するにつれ、全長DNA残存率が上昇することがわかった。この結果は、結合サイト間のd(A/T)塩基数が少ない標的DNAに対して、CRA₃が協同的に全サイト結合することを示唆している。過去に報告されたDNA-(CRA₃)₂Mg²⁺複合体のX線結晶構造では、CRA₃構造中の三糖鎖はDNAマイナーグループに沿うように配置されており、4塩基のGC結合サイトのさらに外側のA/T塩基対にも張り出していることがわかる (Fig. 7B)⁸。このことから、d(CGCG)₂サイト間隔の短い配列では、おそらく隣接するCRA₃分子間での糖-糖相互作用に

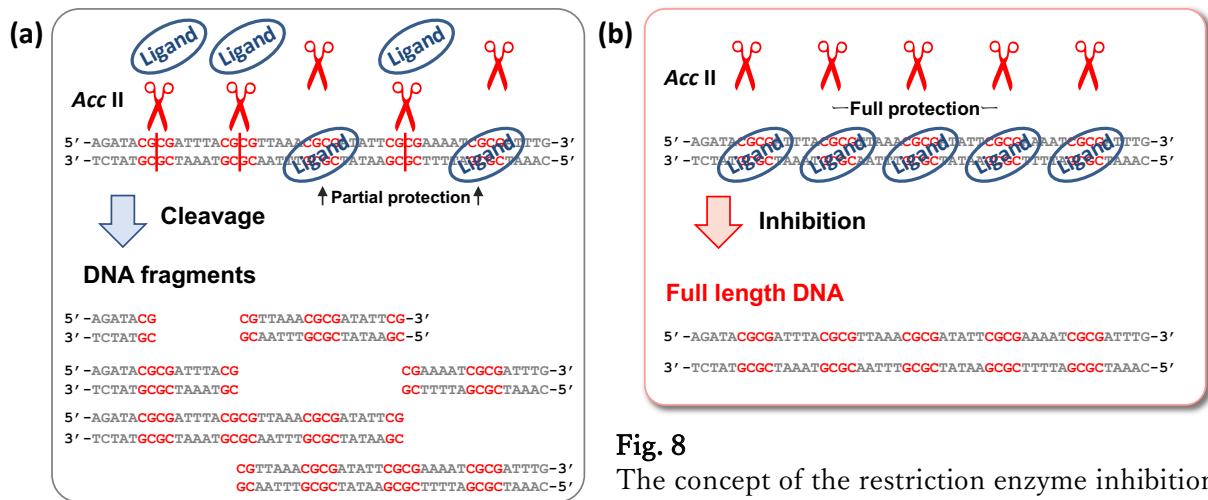


Fig. 8 The concept of the restriction enzyme inhibition

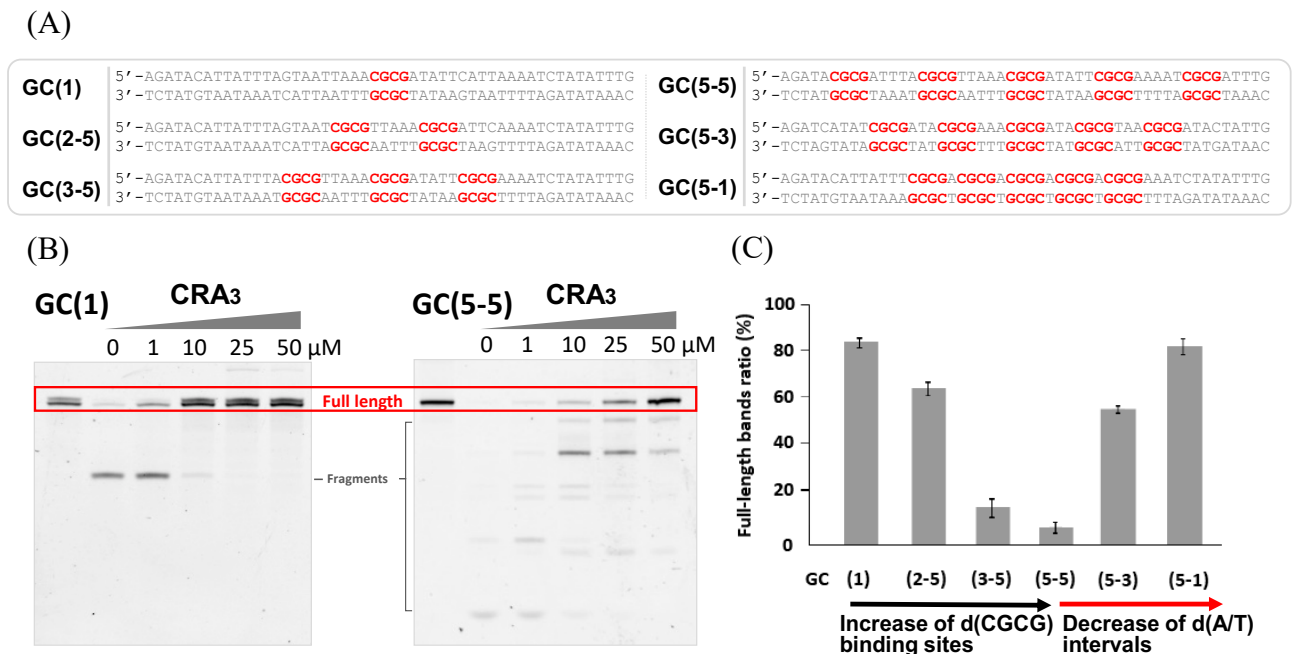


Fig. 9 (A) Model repeat DNA sequences, GC(m-n). (B) The gel results of *Acc* II inhibition assay for GC(1) and GC(5-5). (C) The comparison of full-length band ratio at 10 μM CRA₃. Duplex (50 nM) was treated with *Acc* II (0.25 U) for 120 min at 15 °C in the buffer containing 20 mM Tris-HCl and 20 mM MgCl₂ at pH 8.0 in the presence of CRA₃ (0, 1, 10, 25 or 50 μM). The reactions were analyzed by denaturing polyacrylamide gel and SYBR® Gold.

よって正の協同効果が働き、全サイト結合性を示したものと考えられる。また、これらの配列選択的な酵素阻害は*Acc II*に対する直接的な酵素阻害を否定するものである。

CGGリピート配列は、FMR1遺伝子の5'非翻訳領域内に存在し、そのリピート異常は脆弱X症候群 (FXS) や脆弱X随伴振戦/失調症候群 (FXTAS) を引き起こすことが知られている。今回、制限酵素阻害アッセイ法を適用し、CGGリピート配列へのCRA₃の結合性を評価した。CGGリピートとその相補鎖であるCCGリピートとの二本鎖にはd(5'-GCGGC/CGCCG-5')の繰り返しが発生する。そこで、この配列 [d(5'-GC↓GGC/CGC↑CG-5')] を矢印の位置で切断する*Fnu4HI*を用いて制限酵素阻害アッセイを検討した。CGGリピートの16回繰り返し配列[CGG(16)]には14か所の*Fnu4HI*切断サイトが生じる (Fig.10)。アッセイの結果、10 μM以下のCRA₃共存下では、CGG(16)は完全に消化されており、*Fnu4HI*阻害効果はみられなかった。一方で、25 μM以上の濃度条件では、全長DNAの残存が顕著にみられ、加えて部分的な阻害を受けた切断バンドがほとんどみられないことから、CRA₃のCGGリピート配列に対する強い全サイト結合性が示唆された。これはCRA₃の結合サイトであるd(5'-GGCG/CCGC-5')が、CGG(16)中に短い間隔で繰り返し含まれるため、GC(5-1)と同様に、隣接リガンド間で正の相互作用が働いたものと考えられる。CRA₃の結合サイトをもたず、酵素切断部位を一つもつCGG(1)での対照実験では、高濃度CRA₃存在下でも切断阻害はほとんどみられておらず、CRA₃の結合は確認されなかった。以上の結果から、CGGリピート配列に対するCRA₃の結合様式について、複数連続する結合サイトに協同的に全サイト結合するという非常に興味深い知見を得ることができた。

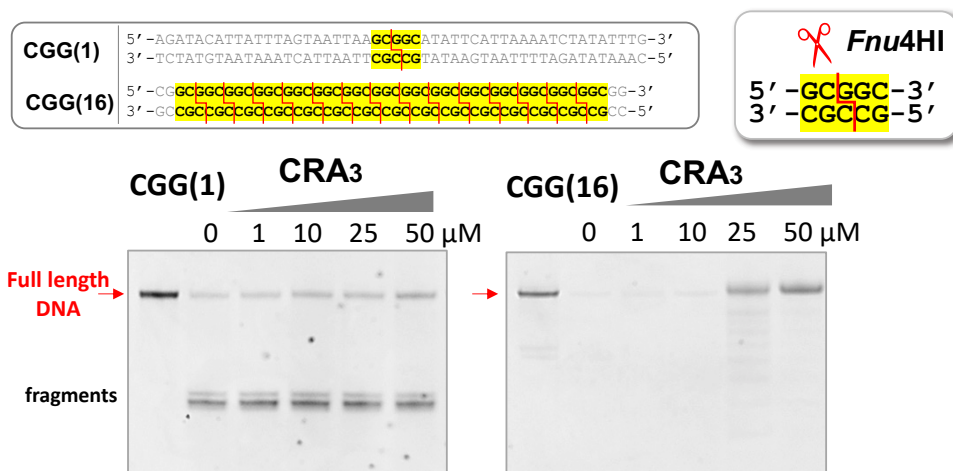


Fig. 10 *Fnu4HI* inhibition assay. The duplex (50 nM) was treated with *Fnu4HI* (5 U) for 60 min at 37 °C in the buffer containing 20 mM Tris-acetate and 20 mM Mg acetate at pH 8.0 in the presence of CRA₃ (0, 1, 10, 25 or 50 μM). The reactions were analyzed by denaturing polyacrylamide gel and SYBR® Gold.

4. おわりに

本稿では、RNA高次構造に結合する低分子G-clamp誘導体の開発について紹介した⁹。現在は、特定のRNA構造に対して選択性を発揮するような修飾や、他分子とのコンジュゲーションによる機能付加を検討している。またDNAリピート配列への結合分子探索の一環として、DNAリピート配列へのCRA₃の全サイト結合能の評価について紹介した¹⁰。この知見を参考にして、現在はリガンド間相互作用として疎水性相互作用や金属錯体形成などを利用し、リピート配列に集積する合成リガンドの開発を検討している¹¹。

5. 謝辞

本研究は、JSPS科研費 (18K14330, 16K15099) の助成を受けたものです。また遂行にあたり、東北大学多元物質科学研究所 永次史教授、鬼塚和光准教授、九州大学大学院薬学研究院 (現 長崎国際大学薬学部薬学科) 佐々木茂貴教授のご指導、ご助言を賜りました。この場をお借りして感謝申し上げます。

References

1. L. R. Ganser, M. L. Kelly, D. Herschlag, H. M. Al-Hashimi, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **20**, 474 (2019).
2. (a) Y. Sato, T. Ichihashi, S. Nishizawa and N. Teramae, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 6369 (2012). (b) J. F. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 16068, (2009). (c) K. Nakatani, S. Horie, Y. Goto, A. Kobori, S. Hagihara, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 5384 (2006), (d) J. Zhang, F. Takei, K. Nakatani, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4813 (2007).
3. W. M. Flanagan, J. J. Wolf, P. Olson, D. Grant, K. Y. Lin, R. W. Wagner and M. D. Matteucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 3513 (1999).
4. (a) O. Nakagawa, S. Ono, Z. Li, A. Tsujimoto, S. Sasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4500 (2007), (b) Y. Fuchi, T. Fukuda, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 3254 (2018).
5. Y. Koga, Y. Fuchi, O. Nakagawa, S. Sasaki, *Tetrahedron*, **67**, 6746 (2011).
6. J. Gatchel, H. Zoghbi, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 743 (2005).
7. K. Nakatani, S. Hagihara, Y. Goto, A. Kobori, M. Hagihara, G. Hayashi, M. Kyo, M. Nomura, M. Mishima, C. Kojima, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 39 (2005), (b) R. Burnett, C. Melander, J. W. Puckett, L. S. Son, R. D. Wells, P. B. Dervan, and J. M. Gottesfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 11497 (2006), (c) A. Pushechnikov, M. M. Lee, J. L. Childs-Disney, K. Sobczak, J. M. French, C. A. Thornton, and M. D. Disney, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9767 (2009).
8. M. -H. Hou, H. Robinson, Y. -G. Gao, A. H.-J. Wang, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2214 (2004).
9. H. Murase, F. Nagatsugi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **29**, 1320 (2019).
10. H. Murase, T. Noguchi, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **28**, 1832 (2018).
11. (a) H. Koda, J. Brazier, I. Onishi, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 4583 (2015). (b) H. Murase, G. Wakisaka, T. Noguchi, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.*, **28**, 115730 (2020).

(2020年7月28日受領)

(2020年9月2日受理)



トリアゾール核酸の合成と機能

～非分解性連結部をもつ糖保存型核酸～

東京大学 物性研究所
藤野 智子

*The Institute for Solid State Physics,
The University of Tokyo*

Tomoko FUJINO
(fujino@issp.u-tokyo.ac.jp)



Abstract: As a new series of non-natural DNA and RNA, we have developed triazole-linked analogs, ^{TL}DNA and ^{TL}RNA. Backed up by the robust synthesis utilizing efficient elongation method with click chemistry, we achieved the synthesis of long oligonucleotides applicable to the biological application. The sugar-mimicking unique structures with the non-degradable linkers endowed their original functionalities, including excellent activities as substrates for natural enzymes.

DNA や RNA などの核酸は、その核酸塩基の配列に基づいた精巧な分子認識能力をもつことから、生命科学・医学・ナノ材料科学などで不可欠な分子ツールとなっている。特に、核酸を認識する天然酵素反応との組み合わせによる遺伝子調節・解析技術は、その簡便性・汎用性の高さから、今後の展開に期待が高まっている。しかし、その核酸の構造は、本来の生体内での遺伝情報伝達のために分解されやすい構造をとっており、その化学的安定性の低さが機能展開の足枷となっている。そこで、核酸を構成する三要素(リン酸・糖・核酸塩基)のなかで、分解標的となるリン酸部を非分解性連結部に改変しつつ、天然酵素の認識部となる糖構造を維持した「非リン酸・糖保存型核酸」が注目されているが、その伸長における反応性の乏しさから短鎖での実現例しかない。このため比較的合成の容易なペプチド核酸(PNA)などの「糖排除・非リン酸型核酸」が代用されているが、その天然構造とかけ離れた構造ゆえに天然酵素の基質となりえず、ツールとしての用途が限られている。本研究では、高効率な結合生成反応である銅触媒アジド・アルキン付加環化(CuAAC)反応を核酸伸長反応に活用することで、非分解性のトリアゾール連結部をもつ「非リン酸・糖保存型核酸:^{TL}DNA/^{TL}RNA (図1)¹⁾」を開発した。安価な出発原料からの単量体合成法や高効率伸長法の開発などを経て、現存の糖保存型オリゴマーでの世界最長鎖の合成を達成した。さらに、これらの天然核酸への高い二重

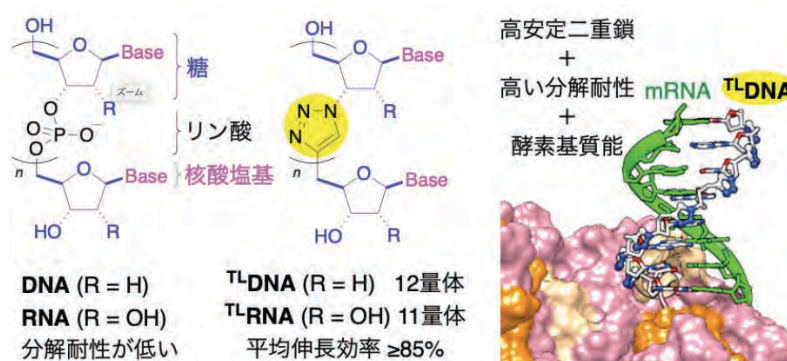


図1. ^{TL}DNA/^{TL}RNA の構造と特質.

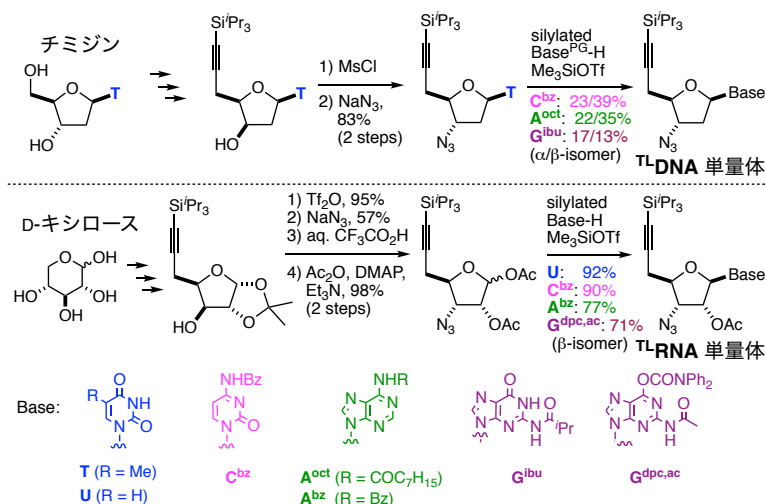
鎖形成能を見出し、その生命化学・材料科学における機能性ツールとしての展開まで行っている。

1. TLDNA/TLRNA 合成法の開発

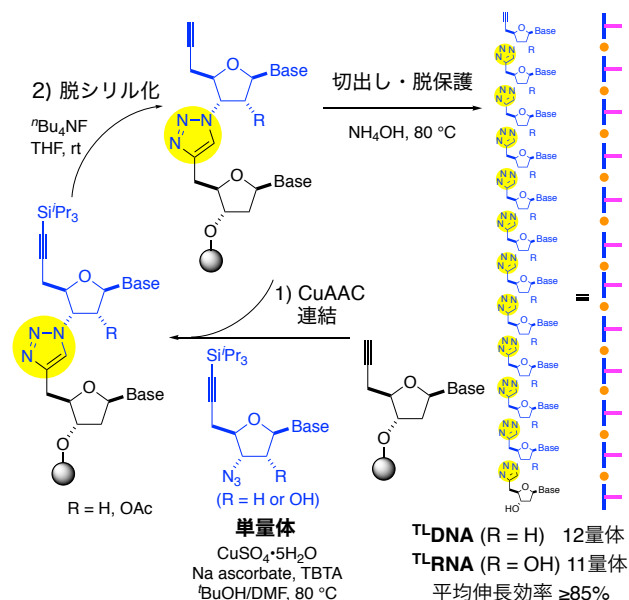
単量体糖部の分子設計においては、伸長後のオリゴマーが天然型核酸との二重鎖形成を促進するために、天然型と同様の 6 結合周期性を踏襲した。安価な出発原料を出発原料として、簡便・高効率な合成経路をチミン/ウラシル、シトシン、アデニン、グアニンの 4 種の核酸塩基でそれぞれ実現している(スキーム 1)²⁻⁵。TLRNA 用単量体の合成においては、2'位アセトキシ基の導入を足がかりとして、天然型と同様のβ異性体を高選択的に得る手法を確立した。いずれにおいても、グラムスケールでの量的供給法の確立まで行っている。

多段階の合成工程を要するオリゴマーの伸長法には、反応後の精製工程を省略することで簡便合成を可能とする固相合成法を活用した。ポリスチレン上に担持させた単量体を出発点とし、固相上で CuAAC 連結と脱シリル化からなる 2 工程を繰り返すことで、12 量体までの長鎖のオリゴマーを合成した(スキーム 2)^{2,4,6}。反応条件の精査により一伸長あたりの平均効率が 85%以上の高効率・高選択的・簡便な長鎖オリゴマー合成法を確立できた。

全ての連結部をトリアゾール連結部としたオリゴマーに加えて、水易溶性のトリアゾール環をメチル化したトリアゾリウム連結部を持つ TLDNA+⁷ や、トリアゾール・リン酸混合連結



スキーム 1. TLDNA/TLRNA 単量体合成法。



スキーム 2. TLDNA/TLRNA の CuAAC 伸長法。

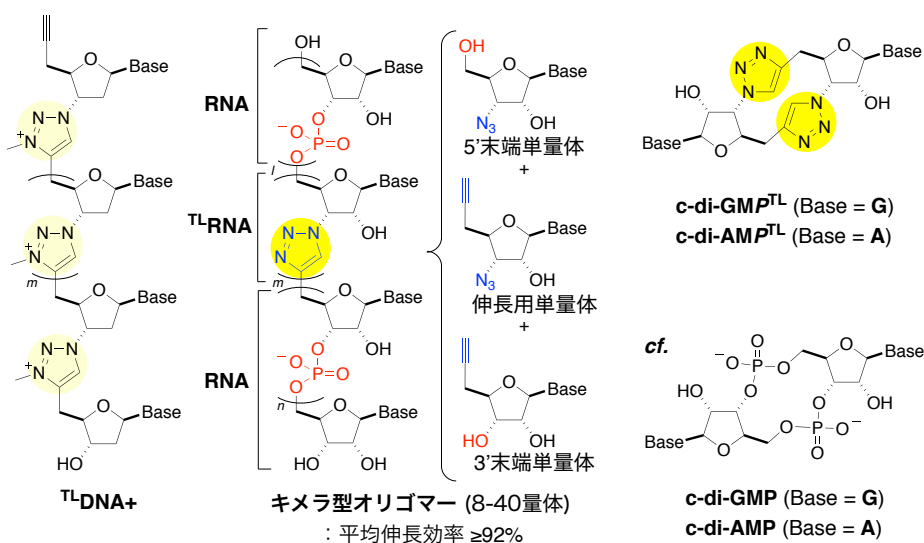


図 2. トリアゾール連結核酸の構造多様化。

型のキメラ型オリゴマー⁸⁻¹⁰も開発している. ここでは, ^{Tl}DNA 構造と天然 RNA 構造を接続するための 5'末端/3'末端連結用単量体を新たに 4 種の核酸塩基で合成した(図 2). 伸長用単量体を含む計 12 種の単量体を自在に組み合わせることで, あらゆる配列・混合連結構造を設計可能とし, 40 量体まで合成を一伸長あたり 92%以上の効率で達成している. こうした線形構造のオリゴマーに加え, 環状構造をもつ c-di-XMP^{Tl}(X = G, A)の開発も行っている. 天然型 c-di-XMP が 12 員環構造に由来した構造柔軟性を示すのに対し, 剛直なシクロファン構造に由来して配座を一義的に固定できることを見出している¹¹.

2. ^{Tl}DNA/^{Tl}RNA の二重鎖形成と材料科学への展開

糖部保存型オリゴマーのなかで, 二重鎖形成を実現した例は未だに数例しかなく, 二重鎖形成にかかる詳細な熱力学的・構造的知見に欠けていた. 我々は, 合成したトリアゾール連結型オリゴマーが, 天然型核酸と極めて安定な二重らせんを形成することを見出した(図 3a)². DNA 同士の二重鎖は,

20.0 °C で解離するのに対し, ^{Tl}DNA と天然型 DNA との二重鎖は 61.1 °C まで解離せず, 極めて高い熱的安定性を示した. この高い安定性は, ^{Tl}DNA の電気的中性の骨格による負電荷の天然核酸への静電反発の軽減と, 連結部の剛直性によるエントロピー的寄与の両者によって得られたものと考えられる. RNA 型の ^{Tl}RNA でも天然 RNA および天然 DNA と二重鎖を形成することを見出している¹². これらの二重鎖は, 非天然型連結部を持ちながらも天然型二重鎖と酷似した構造を示すことがわかった. これは, 糖骨格を保存した分子設計に基づいており, これにより次項で述べる天然酵素の酵素基質能としての特質を獲得可能としている. さらに, ^{Tl}DNA 同士の二重らせん ^{Tl}DNA・^{Tl}DNA も構築した(図 3b). ^{Tl}DNA 3 量体を用い, 水銀イオンを二重鎖の架橋部位とすることで, 選択的に二重らせんを組み上げることができた. 3 量体という天然 DNA では, 二重鎖形成は検出できないほどの長さであったが, ^{Tl}DNA 骨格の活用により二重鎖を形成させることができた. この二重鎖は薄膜で $1.3 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ の移動度を示し, n 型有機半導体として比較的高い電子輸送能を示した¹³.

3. ^{Tl}DNA/^{Tl}RNA の生命化学への展開

^{Tl}DNA/^{Tl}RNA の構造の最大の特徴は, ペプチド核酸(PNA)などの既存の糖部をもたない人工核酸とは異なって, 天然核酸と同じ糖構造を保存している点にあり, その天然核酸との二重鎖構造は, 天然型に極めて類似していた. このため, 核酸二重鎖を認識する天然酵素によって ^{Tl}DNA/^{Tl}RNA が「核酸基質」として分子認識され, 酵素反応を開始・促進する機能性をもつことを見出した. これは, 糖部を排除した既存の人工核酸が酵素反応阻害性を示すのとは全く逆の機能性であり, 糖保存構造により初めて実現可能となったものである. ^{Tl}DNA/^{Tl}RNA 固有の, 酵素基質能と非分解性とを併せ持つ構造的な特質を活用し, 天然核酸や従前の人工核酸にはない新しい遺伝子技術へと展開した.

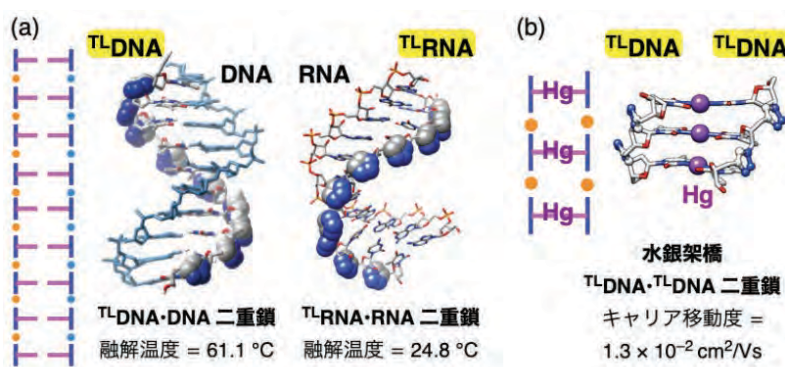


図 3. (a) ^{Tl}DNA・DNA, ^{Tl}RNA・RNA 二重鎖.
(b) ^{Tl}DNA・^{Tl}DNA 水銀架橋自己二重鎖.

[逆転写酵素の開始鎖基質化] RNA を鋳型として DNA を合成する逆転写反応は, PCR 検査などの遺伝子解析のために, 細胞内の鋳型 RNA (mRNA) の遺伝情報を安定な DNA (cDNA) として取り出す工程に汎用されている. しかし, その反応時に同時に生成するノイズ DNA の存在による cDNA 質の低下が問題となっていた. ^{11}Li DNA を逆転写反応の開始鎖として用いることで, このノイズを選択的に代謝できることを見出した. ^{11}Li DNA は天然核酸への高い錯形成能をもつことから, 開始鎖として高い基質能を示し, DNA 開始鎖の 1.5 倍量の cDNA を産生した (図 4)¹⁴. ここでは, 5'末端側に ^{11}Li DNA 構造を含む cDNA と, DNA 構造を含むものノイズ DNA の混合物として得られたが, ノイズ DNA のみを 5'エキソヌクレアーゼにより分解することができた. ^{11}Li DNA 由来の cDNA は 5'側に位置するトリアゾール連結部が保護基となって分解をうけず, ノイズ DNA

のみが分解されることで, cDNA を高純度化できた. さらに, このトリアゾール連結部構造は, 複製酵素の鋳型基質としても機能することを見出した. 次世代シーケンシング解析のための DNA 鋳型の調整において, 一本鎖 DNA の 3'末端のアジド化と, アルキン修飾開始とを CuAAC 連結させる化学的手法を用いたアダプティング技術を開発してきている

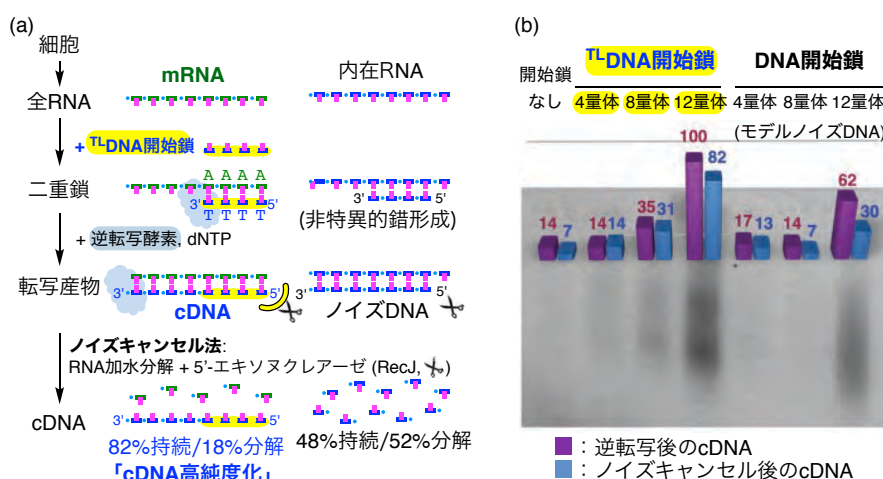


図 4. (a) ^{11}Li DNA 開始鎖を用いた高純度 cDNA 合成法. (b) ノイズキャンセル前後の逆転写産物.

10.

[遺伝子干渉用アルゴノートの二本鎖 siRNA 基質化] アルゴノートタンパクは, mRNA の位置選択的に切断する遺伝子干渉法に汎用されている. この干渉法では, タンパクを mRNA の切断箇所に誘導するガイド鎖・センス鎖として 21 量体程度の二本鎖 RNA (siRNA) が用いられるが, siRNA 自身の分解耐性の低さによるオフターゲット効果の誘発・低持続性などの問題があり, 連結部への化学修飾への期待が高まっている. 我々は, 非分解性のトリアゾール連結部を任意の位置に導入した人工 siRNA ライブラリを開発し, siRNA 連結部への化学修飾の位置特異的な許容性を系統的に定量評価した (図 5)⁸. 特に, タンパクによる厳密な分子認識様式が結晶構造解析から予想されていたガイド鎖中での許容性を実験的に明白にし, 切断点近傍のシード領域付近 (8-9 位) においても, トリアゾール連結部が一定に許容されることを見出した. これらにより, 人工 siRNA 開発のための化学修飾指針を明確にすることができた.

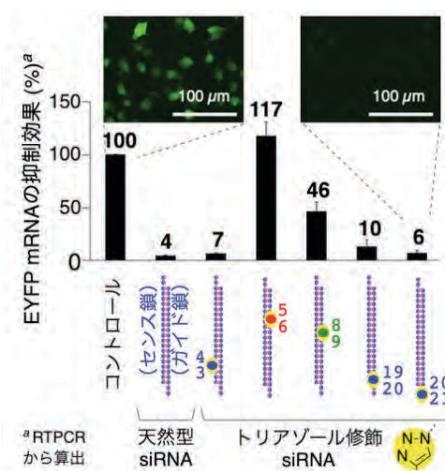


図 5. 修飾 siRNA の遺伝子干渉制御.

【翻訳用リボソームの鋳型 mRNA 基質化】 生体内における最も複雑・高度といえる翻訳系においても、 ^{15}N RNA 構造は許容されうることを見出し、初めての非リン酸型コドン部をもつ人工 mRNA を実現した。翻訳系は、巨大リボザイムである 70S リボソームや多種多様な酵素類が混在する複雑なシステムであり、このなかで、mRNA はタンパク・ペプチドのアミノ酸配列を各酵素類に指示する鋳型として機能する。 ^{15}N RNA 構造からなるコドン部をもつ人工 mRNA は、この複雑な翻訳システムにおいても認識され、その塩基配列として記述したアミノ酸配列からなるペプチドの生成を指示することができた(図 6)⁹。その生成量は天然型 mRNA を 1.8 倍も凌駕した一方で、アミノ酸への選択性は低下した。このことは非天然コドンを用いることで位置特異的に多様なアミノ酸を許容可能となることを意味しており、位置特異的に点変異を導入したペプチドライブラリの簡便構築法を実現可能とした。

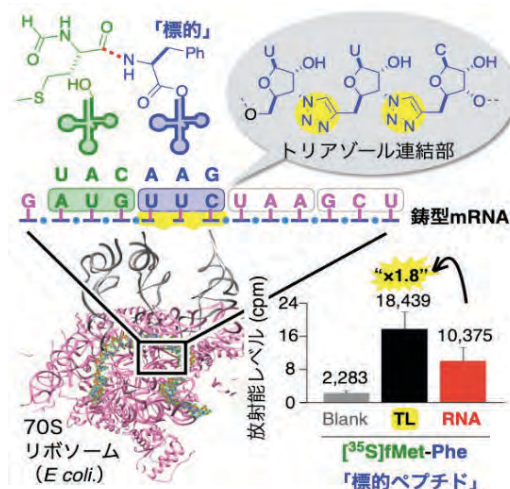


図 6. ^{15}N RNA の mRNA 鋳型基質化。

以上、CuAAC 反応を活用した新しい非リン酸・糖保存型人工核酸オリゴマーを開発した。こうしたオリゴマーは、高安定な天然核酸代替物として期待されながらも合成の制約が常に立ちはだかっていたが、本研究にてその長鎖オリゴマー合成を実現し、その機能展開を可能とした。特に、糖保存骨格による天然型類似の二重鎖構造を体現したことで、天然酵素を活性化できる「酵素基質能」を獲得し、これによりこれまでにない遺伝子解析・制御技術を開発してきている。こうした境界領域研究においては、有機化学的観点からの機能性理解・内在の問題点の明確化に基づいた分子設計へのフィードバックが鍵となっており、今後もこうした研究戦略により、多彩な機能性分子・材料を実現していきたいと考えている。

謝辞 本研究を遂行するうえで、15年間の長期にわたり親身にご指導くださった東京大学 大学院理学系研究科 磯部寛之教授に、この場を借りて心より感謝申し上げます。また、挑戦的な合成課題に昼夜問わずに果敢に挑み、常に刺激を与え続けてくれた磯部研究室の学生・博士研究員の皆様、ならびに共著者として文献に記載された多くの共同研究者に厚くお礼申し上げます。これらの研究の一部は科学研究費補助金、資生堂女性研究者サイエンスグラント等の支援により遂行されたものです。

References

1. H. Isobe, T. Fujino, *Chem. Rec.*, **14**, 41 (2014) (invited account: Mukaiyama aldol memorial issue).
2. H. Isobe, T. Fujino, N. Yamazaki, M. Guillot-Nieckowski, E. Nakamura, *Org. Lett.*, **10**, 3729 (2008).
3. T. Fujino, N. Tsunaka, M. Guillot-Nieckowski, W. Nakanishi, T. Iwamoto, E. Nakamura, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2036 (2010).
4. T. Fujino, N. Yamazaki, A. Hasome, K. Endo, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.*, **53**, 868 (2012).
5. T. Fujino, K. Endo, N. Yamazaki, H. Isobe, *Chem. Lett.*, **41**, 403 (2012).
6. T. Fujino, N. Yamazaki, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.*, **50**, 4101 (2009).
7. T. Fujino, Y. Miyauchi, N. Tsunaka, K. Okada, H. Isobe, *Heterocycles*, **87**, 1023 (2013).
8. T. Fujino, K. Kogashi, K. Okada, M. Mattarella, T. Suzuki, K. Yasumoto, K. Sogawa, H. Isobe, *Chem.-Asian J.*, **10**, 2683 (2015).

9. T. Fujino, T. Suzuki, K. Okada, K. Kogashi, K. Yasumoto, K. Sogawa, H. Isobe, *J. Org. Chem.*, **81**, 8967 (2016).
10. F. Miura, T. Fujino, K. Kogashi, Y. Shibata, M. Miura, H. Isobe, T. Ito, *Nucleic Acids Res.*, **46**, e95 (2018).
11. T. Fujino, K. Okada, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.*, **55**, 2659 (2014).
12. T. Fujino, T. Suzuki, T. Ooi, K. Ikemoto, H. Isobe, *Chem.—Asian J.*, **14**, 3380 (2019).
13. H. Isobe, N. Yamazaki, A. Asano, T. Fujino, W. Nakanishi, S. Seki, *Chem. Lett.*, **40**, 318 (2011).
14. T. Fujino, K. Yasumoto, N. Yamazaki, A. Hasome, K. Sogawa, H. Isobe, *Chem.—Asian J.*, **6**, 2956 (2011).

(2020年8月23日受領)

(2020年9月27日受理)



環状 RNA による細胞内ビルドアップ型 RNA 干渉法

～細胞内化学反応に基づく核酸医薬分子 の高機能化～



名古屋大学大学院理学研究科
木村 康明

Graduate School of Science, Nagoya University

Yasuaki Kimura

(y-kimura@chem.nagoya-u.ac.jp)

Abstract: RNA interference (RNAi), which is mediated by 20–23 base pairs of double-stranded RNA (siRNA), is widely used for target-specific gene suppression and in therapeutic applications. However, standard siRNAs cause undesired immune responses and exhibit instability and off-target effects *in vivo*. Various RNA molecular designs have been reported to solve these problems based on chemical modification of nucleotides and the nanostructure design of RNA oligomers. In this study, we developed an intracellular build-up reaction for siRNA assembly, in which circular precursor RNAs form siRNA in cells. Here, two circular single-stranded RNAs with an environmental responsive linker (nitrobenzyl-type or disulfide linker) were converted into the corresponding linear RNAs in the cell, and this process was triggered by light irradiation or by a GSH-mediated reductive reaction. Subsequently, they formed double-stranded RNA, namely active siRNA, thereby exhibiting an RNAi effect. The circular RNAs showed comparable RNAi activity to that of normal siRNA, indicating that these precursor RNAs can be converted into active siRNA in cells in response to an external stimulus (photoirradiation) or the intracellular environment (GSH). When administrated to the cells without lipofection, the circular RNAs showed higher RNAi activity than normal siRNAs, suggesting that the circular RNAs had higher cellular uptake than normal siRNAs. These results demonstrated the effectiveness of the circular structure format siRNA precursors.

1. はじめに

RNA干渉(RNAi)は、siRNAと呼ばれる20～23塩基対の二本鎖天然RNAによる、標的特異的な遺伝子の発現抑制法であり¹、近年では疾病治療法としても応用されている^{2,3}。しかし、通常のsiRNAは、生体内で望ましくない免疫応答を惹起し、不安定性とオフターゲット効果を示す。これらの問題を解決するために核酸モノマーの化学修飾や、RNAのナノ構造設計に基づいた様々なRNAの分子設計が提案されてきた⁴。一方我々は、新たなRNAiの手法としてsiRNAの細胞内ビルドアップ反応を初めて報告した。このアプローチでは、断片化した短鎖RNAを用いて細胞内で活性型siRNAの構築する(図1A(i))。すなわち細胞内

GSHによって誘起されるケミカルライゲーション反応によって、断片化したRNAから活性siRNAが生じる。この「分子サイズの小さな前駆体から細胞内で活性型siRNAを構築する」というビルドアップ型アプローチは、RNAiの医薬応用においてsiRNAの分子特性を改善するための有効な手法である。実際に断片化されたRNAを前駆体として用いることで、免疫応答の大幅な低減化が可能となった¹⁰。

この研究で実証されたビルドアップ法の有効性を踏まえ、環状前駆体RNAが細胞内でsiRNAを形成する系を新たに設計した(図1A(ii))¹¹。すなわち互いに相互作用しない2つの環状一本鎖RNAが、細胞内で光照射またはGSHにより直鎖型RNAに変換され、活性型siRNAを形成しRNAi効果を示すものと期待した。ここで用いる環状siRNA前駆体は、鋳型鎖非依存的な酵素反応または化学反応によって容易に調製可能である(図1B)。

この手法を開発するにあたり、まず環状RNAが直鎖RNAと比較して免疫応答を低減化できるかを調べた。T98G細胞に25塩基長の二本鎖RNA、或いは同じ配列の2本の環状RNAを導入し、免疫応答の指標であるIFN-β mRNAの発現量を定量RT-PCRで解析した(図2)。その結果、環状RNAによるIFN-β mRNAの発現量は、直鎖状RNAによるものよりも50%以上少ないことが明らかとなった。この結果から、環状構造により免疫応答受容体の活性化を回避できることが示唆された。以上の予備的検討に基づき、新しいビルドアップ法の前駆体として環状構造を選択することにした。

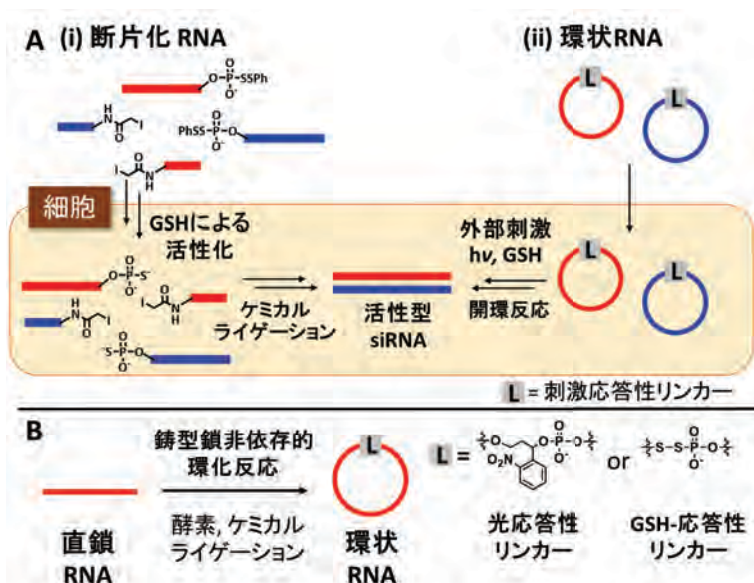


図1 細胞内ビルドアップ法のコンセプト (A) ビルドアップ法のメカニズム (B) 環状RNAと合成法とリンカーの構造

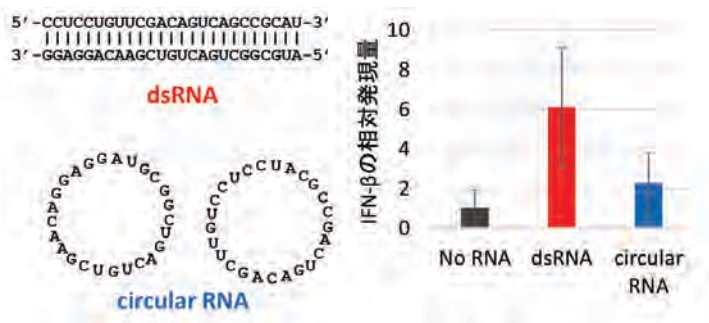


図2 直鎖状RNAと環状RNAによる免疫応答

2. 光応答性環状RNAを用いたRNA干渉法

環状RNAによるビルドアップ反応では、ビルドアップ反応前に2つの環状RNAが二本鎖を形成せず、反応が進行した後に直鎖RNAが二本鎖RNAを形成するように分子設計することが重要である。環状RNAの分子サイズが大きくなると、環状の状態でも二本鎖の形成が起こると考えられる。そのため光応答性切断リンカーとしてo-ニトロベンジルアルコールを組み込んだ21, 23, 27塩基長の環状RNAを設計した(図3)。RNA配列はホタルルシフェラーゼを標的としたsiRNAに基づき設計した。対応する市販のホスホロアミダイト試薬を用いて、21 mer (21LS, 21LA), 23 mer (23LS, 23LA), 27 mer (27LS, 27LA)の3セットのsiRNA前駆体を合成した。5'末端にリン酸基を有する直鎖状RNAを、T4 RNAリガーゼで処理し、標的の環状RNA

(nCS, nCA; n = 21, 23, 27)を調製した。多量体形成を抑制するために、RNA濃度は1 μ Mの低濃度に設定した。生成物の環状RNAはdPAGEにより9.1%-15%の収率で単離された。

RNAi活性を評価する前に、環状RNAの分子特性の評価を行った。最初に、環状RNAの二本鎖形成能を非変性PAGEによって解析した。直鎖状または環状RNAを対応する相補的

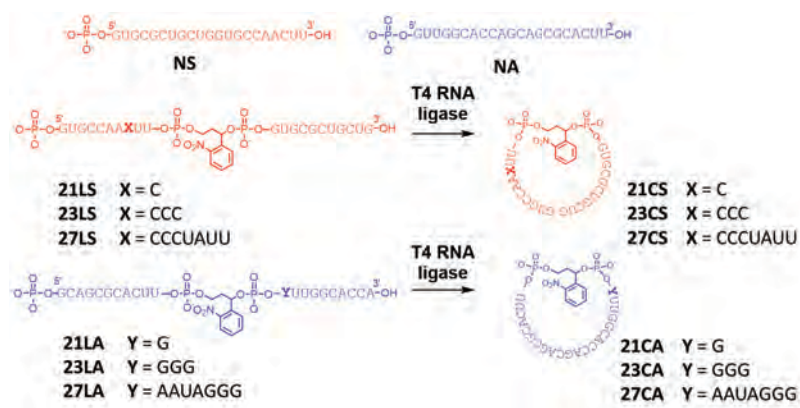


図4 光応答性環状RNAの構造と合成法

RNA鎖と混合し、混合物を分析したところ(図4A)、直鎖状RNAペアでは各RNAフラグメントのバンドからの著しいバンドシフトを持つ単一のバンド(二本鎖に対応)が観測された。一方環状RNAペアでは2つのRNAフラグメントに対応する2つのバンドが観測された。

これは、21 merの環状RNAが相補配列を持つ環状RNAと二本鎖を形成できないことを示唆している。同様の傾向は、23 merおよび27 merの環状RNAでも観察された。次に、環状RNAの光照射に対する反応性を*in vitro*で評価した。RNA溶液に365 nmのUV光を一定時間(5~15分)照射した後、サンプルをdPAGEで分析した(図4B)。その結果、照射時間が長くなるにつれて、環状RNAのバンドは徐々に消失し、直鎖状RNA

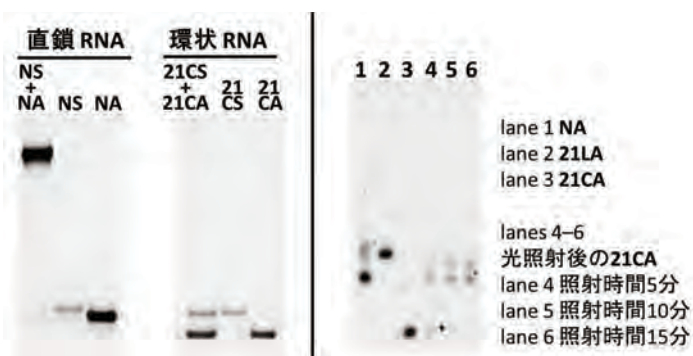


図3 光応答性環状RNAの性質 (A) 二本鎖形成能の評価 (B) 光照射による直鎖化反応

のバンドが新たに生じた。UV照射後に新しく形成された2つのバンドは、5'-リン酸末端にニトロソベンゼン構造を有する直鎖状RNAと、それを有さない直鎖状RNAと推定される。この結果は、環状RNAがUV照射により効率的に直鎖状RNAに変換されることを示唆している。

これらのsiRNA前駆体の基本的な分子特性を確認した後、HeLa細胞におけるdual luciferase assayによりRNAi活性を評価した。RNAサンプルをリポフェクションにより細胞に投与し、相対的なルシフェラーゼ活性を評価した(図5A)。RNA投与の4時間後にUV照射を行い、ルシフェラーゼ活性を光照射の20時間後に評価した。通常のsiRNA(NS + NA)の場合、遺伝子発現抑制効果はUV照射に関係なく90%以上であった。スクランブルRNA(scrRNA)の場合、UV照射の有無にかかわらず、遺伝子発現抑制効果は観察されなかった。21 merのsiRNA前駆体(21CS + 21CA)では、遺伝子発現抑制効果はUV照射に大きく依存していた。すなわちUV照射下で通常のsiRNAに匹敵する遺伝子発現抑制効果が観察されたのに対し、UV非照射下では、遺伝子発現抑制効果はほとんど観測されなかった。一方、光照射による活性のoff/on応答能は、環サイズが大きくなるほど顕著では無くなった。27 merの環状siRNA前駆体(27CS + 27CA)の場合、UV非照射下でも54%のRNAi効果が観察された。これは、サイズの大きな環状RNAがエンドヌクレアーゼの影響を受けやすく、光照射非依存的に直鎖状RNA型に変換されやすいためと推測される。また環状のアンチセンス鎖(21CA)のみを投与した場合、遺伝子発現抑制効果は観察されず、先の遺伝子発現抑制効果がアンチセンス型メカニズムによるものである可能性は否定された。さらに、この方法は内在性

遺伝子であるApoB¹²に適用可能であり、光照射依存的な遺伝子発現抑制効果が観察された。

続いて、リポフェクションを使用せずに細胞への投与を行い、dual luciferase assayにより環状RNAの細胞内取り込みを評価した。ここでは、HeLa細胞を高張液

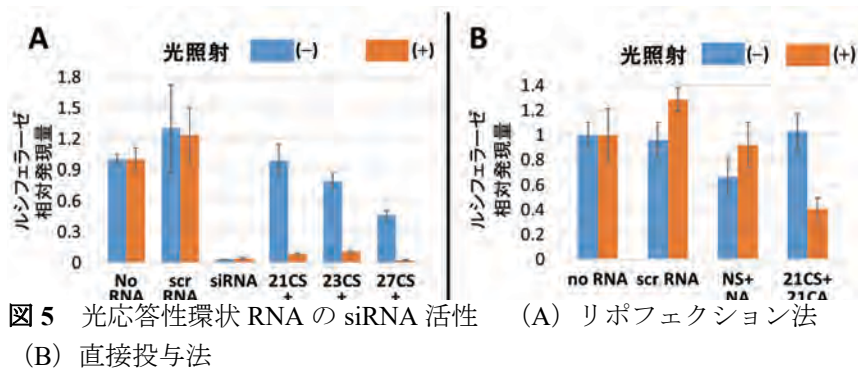


図5 光応答性環状RNAのsiRNA活性 (A) リポフェクション法 (B) 直接投与法

のRNAサンプルで処理した後、培地に水を加えた(図5B)^{13, 14}。通常のsiRNAは、UV照射に関係なく9%~34%の遺伝子発現抑制効果を示したのに対し、siRNA前駆体はUV照射下でのみ、より強い遺伝子発現抑制効果(60%)を示した。このRNAi活性の差は、通常のsiRNAと比較して、環状siRNA前駆体がより高い細胞取り込み効率を持つことに起因するものと推測される。

3. GSH応答性環状RNAを用いたRNA干渉法

細胞内因子による刺激でビルドアップ反応が進行する場合、治療応用においてより実用的と考えられる。そこで細胞内に豊富に存在するGSHによって切断されると考えられるホスホリルジチオ結合を、刺激応答性リンカーとして選択した(図6A)。RNA配列は上記のものと同じで、3'末端にアルキルチオール基、5'末端にホスホロチオエート基を持つ直鎖状RNAを核酸自動合成機(PS-LS, PS-LA)で合成した。脱保護およびCPGからの切断後、ジスルフィド型として保護された3'末端を持つRNAが得られた。このRNAをジチオスレイトール(DTT)で処理してジスルフィド結合を切断し、次に2,2'-ジチオジピリジンで処理して環化を行った。標的の環状RNA(PS-CS, PS-CA)は、dPAGEとそれに続くゲル抽出を経て約7%の単離収率で得られた。

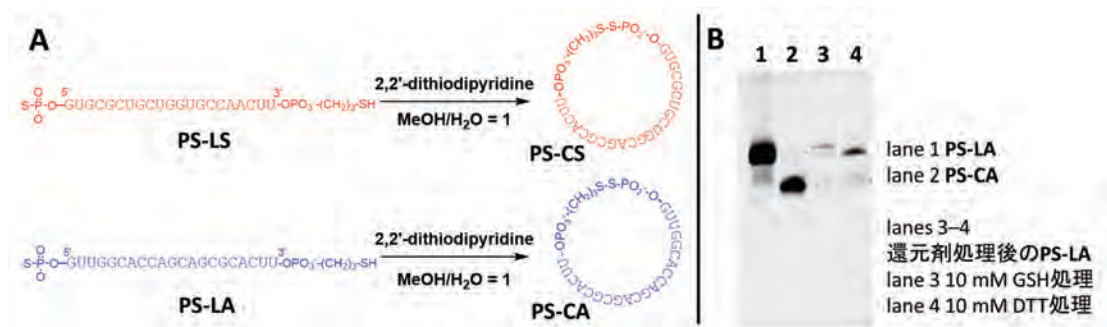


図6 GSH 応答性環状RNA (A) 構造と合成法 (B) 還元剤処理による直鎖化反応

このようにして得られたジスルフィド型環状RNAを10 mM DTTまたはGSHで30分間処理し、反応混合物をdPAGEで分析した(図6B)。これらのチオール系還元剤による処理により、環状RNAは対応する直鎖状RNAに速やかに変換された。細胞内GSH濃度は通常1~10 mMであるため、この結果はジスルフィドベースの環状RNAが細胞内で効率的に開環反応を起こし直鎖型に変換されることを示唆している。

続いてdual luciferase assayによりsiRNA活性を評価した。リポフェクション法で細胞に投与した場合、通常のsiRNAとほぼ同等の遺伝子発現抑制効果が観察された(図7A)。リポフェクションに依らないdual luciferase assayも行った(図7B)ところ、環状siRNA前駆体(50%)は、通常のsiRNA(43%)より優れた遺伝子発現抑制効果を示した。どちらの場合も、RNAi効果は外部刺激とは無関係であり、この手法が治療用

途に適しているといえる。更に内在性のApoBを標的とした場合でも、通常のsiRNAと、ジスルフィド型環状RNAの間で同等の遺伝子発現抑制効果が観察された。また、光切断リンカー及びジスルフィドリンカーを有する環状RNAは、通常のsiRNAと比較して免疫原性が低いことも確認された¹¹。

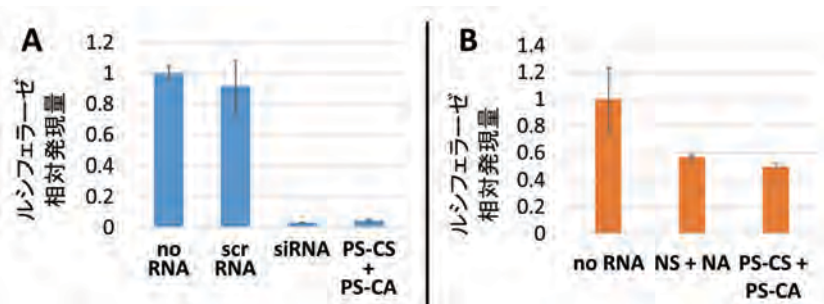


図7 還元環境応答型環状RNAのsiRNA活性 (A) リポフェクション法 (B) 直接投与法

4. まとめ

本研究では、光切断リンカーあるいはジスルフィドリンカーを有する環状siRNA前駆体を使用する新しいビルドアップ型RNA干渉法を開発した。これらの前駆体は、*in vitro*でUV照射または高濃度のGSH, DTT処理により、対応する直鎖状RNAに効率的に変換された。HeLa細胞系のdual luciferase assayでは、環状siRNAは通常のsiRNAと同等のRNAi活性を示し、これらの環状RNAが外部刺激(光照射)または細胞内環境(GSH)に応答して、細胞内で活性siRNAに変換されることが示唆された。リポフェクション非依存的に細胞に投与すると、環状RNAは通常のsiRNAよりも高いRNAi活性を示し、環状RNAはより高い細胞内取り込み効率を有することも示唆された。この手法は、内在性のApoB遺伝子にも適用可能であり、手法の一般的な有効性も確認された。現在*in vivo*応用に適した分子特性と機能を付与することを目指し、環状RNAの分子設計の改良検討を続けている。

5. 謝辞

本研究は科学研究費補助金の助成により遂行されました。研究についてご指導・ご助言頂きました名古屋大学大学院理学研究科 阿部洋 教授、および実験を担当して頂いた研究室の皆様へ感謝申し上げます。

References

1. R. C. Wilson, J. A. Doudna, *Ann. Rev. Biophys.*, **42**, 217 (2013).
2. B. L. Davidson, P. B. McCray Jr, *Nat. Rev. Genetics*, **12**, 329 (2011).
3. A. de Fougerolles, H.-P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **6**, 443 (2007).
4. S. H. Ku, S. D. Jo, Y. K. Lee, K. Kim, S. H. Kim, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **104**, 16 (2016).
5. T. Li, M. Wu, Y. Y. Zhu, J. Chen, L. Chen, *Nucleic Acid Therapeutics*, **24**, 302 (2014).
6. H. Peacock, A. Kannan, P. A. Beal, C. J. Burrows, *J. Org. Chem.*, **76**, 7295 (2011).
7. G. F. Deleavey, M. J. Damha, *Chem. Biol.*, **19**, 937 (2012).
8. L. Zhang, D. Liang, Y. Wang, D. Li, J. Zhang, L. Wu, M. Feng, F. Yi, L. Xu, L. Lei, Q. Du, X. Tang, *Chem. Sci.*, **9**, 44 (2018).
9. N. Abe, H. Abe, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15108 (2007).
10. H. Maruyama, Y. Nakashima, S. Shuto, A. Matsuda, Y. Ito, H. Abe, *Chem. Commun.*, **50**, 1284 (2014).

11. Y. Kimura, Z. Shu, M. Ito, N. Abe, K. Nakamoto, F. Tomoike, S. Shuto, Y. Ito, H. Abe, *Chem. Commun.*, **56**, 466 (2020).
12. C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1149 (2007).
13. C. Y. Okada, M. Rechsteiner, *Cell*, **29**, 33 (1982).
14. M. Aoki, T. Ishii, M. Kanaoka, T. Kimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **341**, 326 (2006).

(2020年7月31日受領)

(2020年9月4日受理)

学会報告

第 46 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2019)

日本核酸化学会第 3 回年会 開催報告

東京農工大学大学院工学研究院 池袋 一典

The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 (第46回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2019)) / The 3rd Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (日本核酸化学会第3回年会)は、2019年10月29日～10月31日の日程で、東京都の小金井市市民交流センターで開催されました(年会頭:池袋一典 東京農工大学大学院工学研究院 教授)。

本シンポジウムは、核酸化学を主題とする国際会議としては世界最大であり、長年の間、日本の核酸化学研究を世界レベルにするのに大きく貢献してまいりました。ゲノミクスやエピゲノミクス研究の急速な進展に伴い、核酸化学は、その重要性が極めて高くなっております。更に昨今の世界の脅威となっているCOVID-19に対しても、核酸化学は有効な対策を提供できます。基礎研究から応用研究に至る幅広い分野で、学問領域の枠を超え、第一線の研究者が一堂に会して成果を発表・討論する場である本シンポジウムで、新機能を持つ核酸関連分子の化学合成、核酸関連バイオテクノロジー、核酸構造に関する物理化学的研究、機能性核酸、生物機能・医薬応用に関する研究等の様々な分野で、最新の成果が発表されました。海外・国内から、招待講演6件及び3件の受賞講演、合計 165 件の口頭発表とポスター発表を実施し、11カ国から総勢 312名の方々にご参加いただき、盛会のうちに終えることができました。演者並びに参加者をはじめ、展示(10 件)、広告(7 件)、中谷医工計測技術振興財団、テルモ生命科学振興財団、井上科学振興財団様からのご寄付等の支援を賜りましたおかげです。心から感謝申し上げます。

シンポジウム 2 日目午後には、日本核酸化学会 (JSNAC) 第 3 回総会が行われました。第3回日本核酸化学賞(池原賞, Ikehara Award, The Award of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry 2019)は、齋藤烈先生、今西武先生、小宮山真先生の 3 名に授与されました。



左から、杉本直己会長、今西武先生、小宮山真先生、齋藤烈先生



Prof. Burrows



Dr. Gabelica



Prof. Yang



Prof. Gu

海外からは以下の4名の著名な先生をお招きし、ご講演いただきました。

Prof. Cynthia J. Burrows (University of Utah)

“Oxidative damage in G-quadruplexes is epigenetic”

Dr. Valérie Gabelica (Université de Bordeaux, CNRS, INSERM)

“Advanced mass spectrometry approaches to decipher nucleic acid folding and binding”

Prof. Man Bock Gu (Korea University)

“Graphene-oxide assisted SELEX (GO-SELEX) for pair of aptamers and its application on sandwich-type biosensors”

Prof. Danzhou Yang (Purdue University)

“G-quadruplexes in human telomeres and oncogene promoters as anticancer drug targets”

若手優秀講演賞（大塚賞）(Ohtsuka Award, ISNAC Outstanding Oral Presentation Award for Young Scientist 2019) は、大会実行委員による厳正なる審査に基づき、以下の3名が受賞されました。

Dr. Keiji Murayama (Nagoya University) “Photo-control of reversible duplex formation between SNA and RNA by [2+2] photocycloaddition of 8-pyrenylvinyl adenine”

Dr. P.K. Hashim (The University of Tokyo) “siRNA Embedded GroEL Protein Nanotube as ‘Artificial Viruses’ for gene therapy”

Dr. Saptarshi Ghosh (Konan University, Japan) “Prediction method for DNA duplex stability in molecular crowding conditions”

優秀ポスター賞 (ISNAC Outstanding Poster Award 2019) は以下の4名が受賞されました。

Mr. Akihiro Eguchi (The University of Tokyo)

Ms. Kinuko Ueno (Tokyo University of Agriculture and Technology)

Mr. Hiroyuki Chaya (The University of Tokyo)

Mr. Shogo Sasaki (Tokyo University of Agriculture and Technology)

2日目終了後に吉祥寺第一ホテルにおいて交流会が開催され、180名を超える皆さまにご参加いただき、東京農工大学の 大野弘幸学長、招待講演者、第一線で活躍する研究者や若手研究者、大学院生が有意義な交流の時間を過ごすことができました。各賞授賞者や招待講演者のスピーチ等を交え、和やかで、稔りある交流会となりました。

日本核酸化学会誌, Vol. 4 (2020)

2020年10月10日 発行

発行人 日本核酸化学会

編集委員 杉山 弘、中谷和彦、井川善也、和田 猛、井原敏博

事務局 和田健彦（東北大学多元科学研究所）

E-mail: hiko@tohoku.ac.jp

Tel: 022-217-5608

問合せ 井原敏博（熊本大学大学院先端科学研究部）

E-mail: toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp

Tel & Fax: 096-342-3873

*本誌掲載記事の無断複製・転載を禁じます。