

医療応用を目指した人工核酸の創成

研究代表者

浅沼浩之 名古屋大学大学院工学研究科 物質制御工学専攻

共同研究者

檜田 啓 名古屋大学大学院工学研究科 物質制御工学専攻

神谷由紀子 名古屋大学 エコトピア科学研究所



1. 研究の背景と達成目標

次世代型先端医療で求められるオーダーメイド医療および核酸医薬の基盤技術の確立を目指し、我々が開発したカートリッジ型人工ヌクレオチドと人工核酸 Serinol Nucleic Acid (SNA)を駆使して、以下の課題に取り組んだ。

- ① 高感度蛍光プローブの設計：標準条件下でシグナル/バックグラウンド(S/B)比=100以上。
- ② ステム構造を必要としないリニアプローブの開発：リニアプローブの特徴を生かした、生細胞内で mRNA をラベル可能なリニアプローブの開発。
- ③ 機能性 small interference RNA (siRNA)の開発：off-target 効果の抑制と酵素耐性の両立。
- ④ 人工ヌクレオチドの効率的な合成法の確立：合成コスト 5000 円/g を目指す。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・超高感度蛍光プローブ(S/B 比 100 以上)の実現
DNA チップへの搭載も可能であり、既存の検出系とも互換性がある。
- ・酵素耐性と超高感度(S/B 比 500 以上)を併せ持つリニアプローブの実現
生細胞内の RNA の蛍光ラベルが可能なので、細胞内の RNA の挙動解析ツールなど分子生物学への大きな貢献が期待できる。
- ・酵素耐性と off-target 効果を抑制した機能性 siRNA の開発
次世代型核酸医薬としての展開が期待できる。
- ・ヌクレオチドの骨格がリボースである理由の解明
自然がなぜリボースを遺伝情報の担い手であるヌクレオチドの骨格として使ったのかという根源的な問いかけに対して、我々の研究は解答の一部を与えている。

3. 研究成果

1. 超高感度蛍光プローブ：我々は、D-threoninol を足場を用いて機能性分子を導入したカートリッジ型人工ヌクレオチド(図1a)を DNA 中の適切な位置に組み込むことで、自在な機能を DNA に付与することに成功している。この技術を超高感度蛍光プローブの設計に応用した。まず In-stem molecular beacon(ISMB)型超高感度プローブは、図1b のように蛍光色素と消光色素の疑似対をステムに複数導入することで設計した。こうすることでステムが閉じた状態では複数の消光色素でほぼ完全に消光でき、ターゲットと二重鎖形成すると導入した蛍光色素2分子が発光するので、超高感度化が実現できた。もう一つは図1c に示したリニアプローブである。多数の蛍光色素を D-threoninol を通じて導入した DNA は、一本鎖状態では色素同士の自己消光でクエンチするが、DNA あるいは RNA と二重鎖形成すると蛍光色素が塩基対間にインターカレートするので自己消光が解消し、導入した

色素の数に応じて蛍光が増大する。その結果極めて高い S/B 比が実現した。またリニアアプローチには多数の非天然ヌクレオチドが導入されているのでヌクレアーゼ耐性が高く、細胞内で分解されにくい。したがってリニアアプローチにより、生細胞中で mRNA の配列特異的な蛍光ラベルが可能になった。

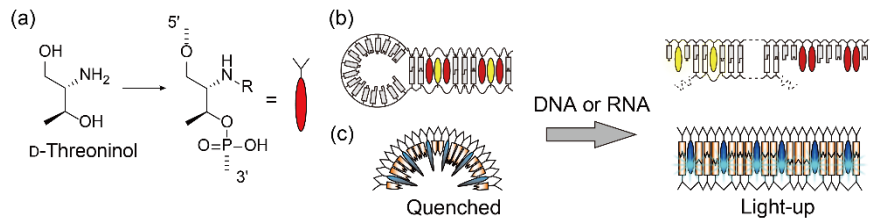


図1 D-Threoninol を足場にしたカートリッジ型人工ヌクレオチド (a) と、これを用いた ISMB (b) とリニアアプローチ (c) の設計

2. 機能性 siRNA: 我々は、DNA や RNA と二重鎖を形成できる新規非環状型人工核酸 Serinol Nucleic Acid (SNA) の開発に成功している。SNA はリボースを骨格とする天然核酸とは構造が大きく異なるため、生体内に存在する核酸分解酵素に対する耐性が非常に高い。そこでこの SNA を siRNA の末端へ導入することで酵素耐性の付与を目指した。興味深いことに、アンチセンス鎖の 5' 端以外の末端を SNA で修飾した siRNA は、酵素耐性のみならず、Off-target 効果が強く抑制され On-target に対する RNAi 活性が天然型の siRNA よりも向上した。このように SNA の導入で、酵素耐性と高活性を両立した機能性 siRNA が設計出来た。

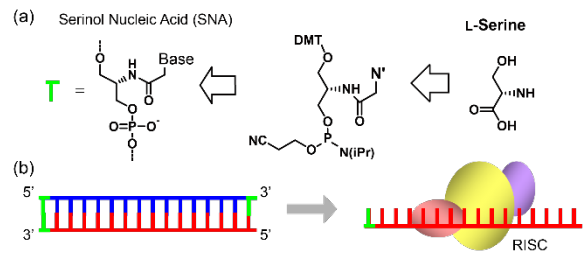


図2 (a) 非環状型人工核酸 Serinol Nucleic Acid(SNA) と、(b)SNA で修飾した siRNA

4. 今後の展開

本研究を通じて、非環状ジオールを使用した疑似ヌクレオチドと非環状骨格を持つ人工核酸 SNA が、機能的に十分高いポテンシャルを持ち、コスト的にも他の人工核酸と比較して有利なことが明らかになった。今後はこの技術を DNA ナノテクノロジー分野に利用して DNA ナノマシンや DNA ナノキャリアに展開するとともに、アンチセンス医薬の可能性も検討する予定である。しかし実用化のためにはこれら人工核酸の大量合成法の確立が不可欠である。従来型のアミダイト法に基づく固相合成では合成可能な量が限られていた。そこで液相法で人工オリゴヌクレオチドの合成方法を確立し、まずはグラムスケールの合成を目指す。

5. 発表実績

- 1) Murayama, K.; Kamiya, Y.; Kashida, H.; Asanuma, H. *ChemBioChem*, **2015**, DOI: 10.1002/cbic.201500167
- 2) Kashida, H.; Osawa, T.; Morimoto, K.; Kamiya, Y.; Asanuma, H. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 1758-1762
- 3) Doi, T.; Kashida, H.; Asanuma, H. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 4430-4437. **Selected as a "Front Cover"**
- 4) Asanuma, H.; Akahane, M.; Niwa, R.; Kashida, H.; Kamiya, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 4315-4319
- 5) Murayama, K.; Kashida, H.; Asanuma, H. *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500-6503. **Selected as a "Back Cover"**
- 6) Kamiya, Y.; Takai, J.; Ito, H.; Murayama, K.; Kashida, H.; Asanuma, H. *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 2549-2555. **Selected as a "Back Cover"**
- 7) Asanuma, H.; Kashida, H.; Kamiya, Y. *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 1055-1069.
- 8) Kamiya, Y.; Ito, A.; Ito, H.; Urushihara, M.; Takai, J.; Fujii, T.; Liang, X.G.; Kashida, H.; Asanuma, H. *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 4016-4021.
- 9) Fujii, T.; Urushihara, M.; Kashida, H.; Ito, H.; Liang, X.G.; Yagi-Utsumi, M.; Kato, K.; Asanuma, H. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 13304-13313. **Selected as a "frontispiece"**
- 10) Asanuma, H.; Akahane, M.; Kondo, N.; Osawa, T.; Kato, T.; Kashida, H. *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 3165-3169. **Selected as an "Inside Back Cover"**