

核酸合成用試薬

2' & 3' -O-Methyl RNA

2'-O-アルキル/アンチセンス核酸合成のためにアミダイトと固相合成用支持担体

DNA には遺伝情報が組込まれており、複製・転写・翻訳を経てタンパク質が合成されます。オリゴヌクレオチドを用いた診断薬や医薬品開発のためには、DNA からたんぱく質合成への遺伝情報伝達のメカニズムを知る必要があります。

遺伝情報伝達

DNA の遺伝情報は転写されてメッセンジャーRNA (mRNA) に伝達されます。このプロセスでは、DNA の二本鎖の一本のストランドが鋳型となり、RNA ポリメラーゼによってエクソンとイントロンを含む mRNA 前駆体が合成されます。mRNA 前駆体はスプライシングによってイントロンの部分が除かれ、その両端の修飾も行なわれます。その結果得られる mRNA にはタンパク質合成の情報が含まれています。mRNA は、核から細胞質に輸送され、DNA からの遺伝情報に従って、翻訳のプロセスでタンパク質が合成されます^{1,2}。

全ての生物においてタンパク質は重要な成分であり、酵素、ホルモン、抗体など体の機能を担う多くの種類が細胞中に存在します。しかし、そのタンパク質が必要以上に存在すれば病気の原因にもなります。

従来は、標的たんぱく質に対する低分子化合物の医薬品開発が主流でした。低分子医薬品は、病気の原因となるタンパク質の形にフィットするようにデザインされ、そのタンパク質との相互作用によって機能を調節するように設計されています。しかし、意図しない別のタンパク質と作用してしまうこともあり、予期しない副作用が発生することが欠点とされてきました。

一方、mRNA やゲノム DNA のオリゴヌクレオチドを標的としたアプローチは、低分子医薬品に代わる中分子医薬品として現在注目されています。mRNA を標的としたアプローチでは、翻訳を阻害すること（アンチセンスを用いた戦略）³ や、DNA を標的としたアプローチで転写を抑制することで、異常なタンパク質合成を阻止する戦略です（遺伝子を標的とした戦略）⁴。これらは、従来の低分子医薬品のターゲットよりも早い段階（転写や翻訳の段階）でのアプローチです。翻訳の過程で mRNA からタンパク質が合成されますが、タンパク質が大量に発現されてしまうと、全てを阻害することは難しくなります。そのため、タンパク質合成がなされる前の遺伝子発現の段階での抑制は、高い効果が期待できます。

遺伝子抑制（ジーンサイレンシング）は、標的配列に対して相補的な塩基配列のオリゴヌクレオチドプローブを合成し、それを細胞中に導入してターゲット配列（mRNA や dsDNA）と結合させ遺伝情報の流れを遮断するといった原理的にはシンプルな方法です。しかし、これには難しい課題がいくつもあります。オリゴヌクレオチドとの結合力と選択性、適切な細胞への取り込み、核酸の分解、毒性などの課題とともに、アンチセンスなどのオリゴヌクレオチド医薬品の大量生産のコストが現実的であるかどうか必須条件になってきます。

また、標的分子においてオリゴヌクレオチドが結合する部位を同定する必要性がありましたが、ヒトゲノムプロジェクト⁵以降、疾病に関連する遺伝子が特定され配列が同定されてきましたし、分子生物学の発展によって、関連する合成法や化合物の開発も進められてきました。核酸医薬品には、アンチセンス、siRNA、デコイ、アプタマーなどがあります。たとえば、ウイルスのタンパク質の産生は、タンパク質合

成を担う mRNA の一部の配列に相補的なオリゴヌクレオチド（アンチセンス）によって阻害することができます。その他の HIV のようなウイルスの制御機構は、相補的配列（アンチセンス）やデコイ（センス鎖）のオリゴヌクレオチドを利用してターゲティングが行われてきました。創薬を目的としたオリゴヌクレオチドには、標的に対する高い選択性や、ワトソン・クリック塩基対に基づく設計の容易さなどの利点があります。結合定数が高ければ、低濃度のオリゴヌクレオチドで有効性を示すことができます。

核酸医薬品への応用

アンチセンスは、標的 mRNA の配列に相補的な DNA あるいは RNA を用いて遺伝子を抑制してタンパク質合成の発現を制御します。治療薬としてのアンチセンスの可能性を初めて報告したのは、ザメクニック (Zamecnik) とステファンソン (Stephenson) らで、オリゴヌクレオチドが遺伝子配列にハイブリダイズして、タンパク質合成の発現を阻害できることを発見しました⁶。それ以降、アンチセンスの特異的なメカニズムにより、診断としても治療薬としても開発が進められてきました。アンチセンスの医薬品の第一号となったのは Fomivirsen (Vitravene)⁷ で、1998 年に主にエイズ患者が発症して失明につながるサイトメガロウイルス (CMV) 性の網膜炎治療薬として、アメリカの FDA (米国食品医薬品局) によって承認されました。引き続き、2013 年には、Mipomersen (Kynamro) が、ホモ型家族性高コレステロール血症の治療薬としてアメリカで、2016 年には Eteplisen (Exondys51) がデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬としてアメリカで承認されました。Nusinersen (Spinraza) は、脊髄性筋萎縮症治療薬として、2016~2017 年にアメリカ、ヨーロッパ、日本で、Inotersen (Tegsedi) が遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス治療薬として 2018 年にアメリカとヨーロッパで、Volanesorsen (Waylivra) が、家族性高カイロミクロン血症治療薬として 2019 年にヨーロッパで認可されました (2019 年 6 月時点)。さらに多くのアンチセンスオリゴヌクレオチドが開発段階にあります^{3c}。

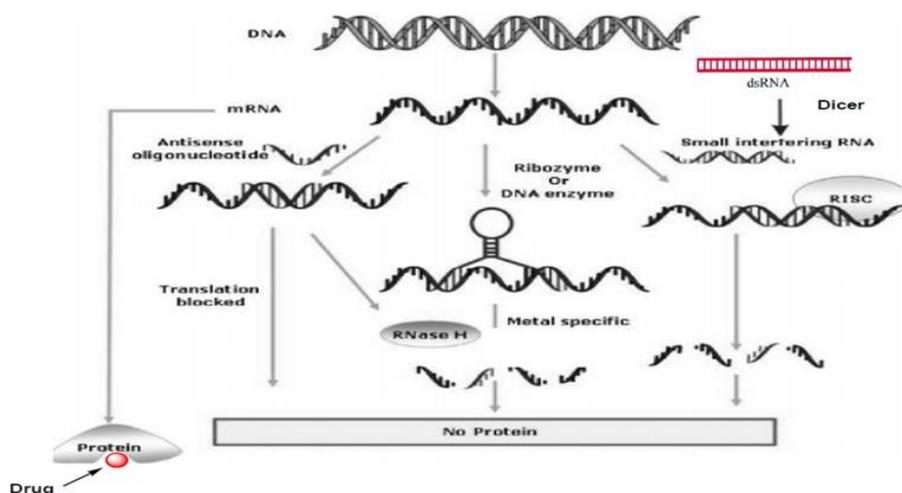


図 1 : アンチセンスの薬物療法のアプローチ^{7b}

図 1 は、mRNA に対する 3 種類のアプローチを示しています^{3b}。

最初のアプローチ (図 1 の左側) では、通常 13–15 ヌクレオチドの一本鎖のプロープを遺伝子制御に使用します。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、スプライシングなどの mRNA 前駆体のプロセッシングを阻害する方法で、mRNA の機能を阻害することが知られています⁸。アンチセンスには複数のメカニズムが報告されています。ひとつは、RNase H を介したもので、これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと mRNA のヘテロ二本鎖の mRNA を分解し、アンチセンスオリゴヌクレオチドはそのまま残るといふものです^{3b,c}。作用機序は触媒的で、mRNA が分解されると、アンチセンスオリゴヌクレオチドは二本鎖から離れて次の標的 mRNA 分子を結合するために利用されます。これによって、一本のア

アンチセンスオリゴヌクレオチドが複数の標的の mRNA を分解することができます。RNase H はユビキタスに発現するエンドヌクレアーゼで、DNA と RNA のヘテロ二本鎖を認識します⁹。DNA/RNA ヘテロ二本鎖は、A 型と B 型の間コンフォメーションを有し、RNase H による認識とヘテロ二本鎖の RNA 鎖の切断に繋がります。一方、RNase H 非依存のアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合には、その立体障害による翻訳阻害が生じます⁸。アンチセンスによって翻訳を停止させることができる一般的な条件は、アンチセンスが標的の mRNA に高い親和性で相互作用することであり、これにより転写産物からタンパク質に翻訳されることが阻害されます。

2 番目は、mRNA が、リボザイム^{10b}あるいは DNA 酵素によって切断されるアプローチです^{10b}。これらの酵素として機能するオリゴヌクレオチドには、基質を認識するドメインと触媒のドメインがあります。基質を認識するドメインでは、標的の mRNA とワトソン・クリック塩基対を介して結合し、触媒中心では標的 mRNA のホスホジエステル結合が部位特異的に切断されて遺伝子発現を抑制します¹⁰(図 1 の真中)。このように、高い親和力で認識する部分と触媒機能ドメインを備えたリボザイムと DNA 酵素は、触媒活性を高めることで、さらなる効果が期待できます。

3 番目は、siRNA による遺伝子抑制を誘導するアプローチです¹¹。線虫(*c.elegans*)の RNAi の機能が発表されてから、ターゲット遺伝子の発現を抑制するためのツールとして広く活用されることになり、アンドリュー・ファイアーとクレイグ・メローは 2006 年に RNAi の発見の功績によってノーベル医学賞を受賞しました。RNAi の経路は、Dicer と呼ばれる内在性のリボヌクレアーゼによって開始され、長い二本鎖 RNA が、Dicer によって siRNA と呼ばれる 21–23 ヌクレオチドの長さの 3' 末端突出型の二本鎖 RNA (siRNA) に切断されます。RISC (RNA-induced silencing complex) 複合体に取り込まれた siRNA は解かれて、一方の鎖が mRNA 転写物の特定部位に選択的に結合し、この複合体のエンドヌクレアーゼが標的の mRNA を切断します(図 1 の右側)。その後、siRNA は遺伝子サイレンシングの一般的な方法となり、産学官での研究開発が活発に行われるようになりました¹³。siRNA の治療薬の第一号として、パチシラン(オンパットロ)が、hATTR アミロイドーシスの治療薬として、2018 年にアメリカとヨーロッパで、2019 年には日本で承認されました。

以上のように、オリゴヌクレオチドは将来の治療薬として、また遺伝子発現の操作をするための分子生物学におけるツールとして使われています。

2'-O-メチル修飾のオリゴヌクレオチドは、a) 細胞膜を透過する b) 標的の RNA に結合する c) 標的 RNA を不活化するように設計されています。

2'-O-メチル修飾のオリゴヌクレオチドの生物学的特徴

- 2'-O-メチル修飾のオリゴヌクレオチドは、RNase H による RNA の部位特異的切断のための DNA オリゴマーとのキメラオリゴマーとして使用されます^{14,15}。
- DNA や RNA はヌクレアーゼにより分解されやすい欠点がありますが、2'-O-メチル修飾することで、ヌクレアーゼによる耐性が向上します¹⁶。
- 2'-O-メチル修飾とホスホロチオエイトの両方を使うことで、HIV 誘発性の細胞変性作用、および、MT4 培養細胞中でのウイルス特異的抗原の発現の阻害をもたらします。抗ウイルス活性は、ある種のデオキシヌクレアーゼに対する耐性と関係していると考えられています¹⁷。
- 2'-O-メチル修飾のオリゴヌクレオチドは、相補的な RNA と安定なヘテロ二本鎖を形成します。形成されたハイブリット RNA は、同じ配列の DNA よりも高い Tm 値を持ちます¹⁴。
- 2'-O-メチル修飾のオリゴヌクレオチドは、mRNA 前駆体のスプライシングやスプライソソームの構造解析のためのアンチセンスプローブとしても使われています^{18,19}。

- 2'-O-メチルエーテルは、RNA の微量成分としてみつかっています^{20,21}。
- アンチセンスオリゴヌクレオチドは、myc, bcl-2(リンパ腫に関連)、erb-B2(乳がんに関連)などの哺乳類細胞株におけるいくつかの遺伝子機能を阻害します。

References:

1. Stryer, L. *Biochemistry, 4th Ed.* W. H. Freeman and Company; New York, **1995**.
2. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Ed. Garland science, New York, **2002**.
3. a) Uhlmann, E.; Oeyman, A. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543-584; b) Kurreck, J. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644; c) Abou I-Fadl, T. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2193-2214.
4. Buchini, S.; Leumann, C. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 717-726.
5. a) International Human genome Sequencing Consortium, *Nature* **2001**, *409*, 860-921. b) Venter, J. C. et al. *Science*, **2001**, *291*, 1304-1351.
6. Stephenson, M. L.; Zamecnik, P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 285- 288; b) Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280-284.
7. a) Marwick, C. J. *Am. Med. Assoc.* **1998**, *280*, 867-871. b) Kaur, H.; Babu, B. R.; Maiti, S. *Chem. Rev.* 2007, *107*, 4672-4697.
8. Baker, B. F.; Monia, B. P. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 3-18.
9. Fedorof, O. Y.; Salazer, M.; Reid, B. R. *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 509-523.
10. a) Doherty, E. A.; Doudna, J. A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 457-475; b) Santoro, S. W.; Joyce, G. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262-4266.
11. Dykxhoorn, D. M.; Novina, C. D.; Sharp, P.A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 457-467.
12. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
13. a) Dorsett, Y.; Tuschl, T. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2004**, *3*, 318-329; b) Uprichard, S. L. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5996-6007.
14. Inoune, H.; Hayese, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 6131-6148.
15. Shibahara, S.; Mukai, S.; Nishihara, T.; Inoune, H.; Ohtsuka, E.; Morisawa, H. *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 4403-4415.
16. Dunlap, B. F.; Friderici, K. H.; Rottman, F. *Biochemistry*, **1971**, *10*, 2581-2587.
17. Shibahara, S.; Mukai, S.; Morisawa, H.; Nakashima, H.; Kobayashi, S.; Yamamoto, N. *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*, 239-252.
18. Lamond, A. I.; Sproat, B. S.; Ryder, U.; Hamm, J. *Cell* **1989**, *58*, 383-390.
19. Barbino, S.; Sproat, B. S.; Ryder, U.; Blencowe, B. J.; Lamond, A. I. *Cell*, **1989**, *59*, 531-539.
20. Hall, R. H. *"The Modified Nucleosides in Nucleic Acids"*, Columbia University Press, **1971**, New York, NY.
21. Cotton, M.; Oberhauser, B.; Schaffner, G.; Wagner, E.; Birnstein, M. L. *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19*, 2629-2635.
22. Agarwal, S.; Tang, J. Y., *Antisense Res. and Devel.* **1992**, *4*, 261.
23. Michael, J. G. *XII International Roundtable, Nucleosides, Nucleotides & Their Biological Applications*, **1996**, La Jolla, CA, Sep 15-19, Abstract 0850.