

2-チオウリジンを利用したアンチセンス核酸の化学合成と性質

清尾 康志^{1*}・岡本 到²・関根 光雄²

化学的に合成したDNAやRNAを用いる核酸医薬にはアンチセンス法、アンチジーン法、RNAi、デコイ法、ゲノム修復法など多くの手法がある。中でもアンチセンス法はすでにいくつかの疾患に対して臨床応用され、実用性の高い手法として期待されている。¹⁾

これまでに、アンチセンス核酸の効果を高めるために、多くのデザイン分子の合成が行われてきた。その目的は、(1) 標的 mRNA とのハイブリダイゼーション強化、(2) 生体内の核酸分解酵素に対する安定性の向上、(3) 脂溶性向上による薬物動態の改善などである。

アンチセンス核酸の効果増強を指向したこれらの分子デザインに対し、目的の mRNA のみを標的とするためのハイブリダイゼーションの選択性向上の試みはあまり行われていない。生体内には、標的とする mRNA と部分的に共通する配列をもった多種類の mRNA が存在するため、アンチセンス核酸のハイブリダイゼーションの強さと同時に選択性を向上させることが、アンチセンス核酸の毒性や副作用を軽減するために重要であると考えられる。

このような考えに基づき、筆者らは、核酸塩基部を修飾した人工核酸のハイブリダイゼーションの選択性に着目し、新規な人工核酸のデザインと合成、および物理化学的性質の解明を進めてきた。本稿では特に、tRNA の修飾ヌクレオシドのひとつである2-チオウリジン類がアデニンを究めて精度よく認識する能力を利用した新規アンチセンス核酸候補の合成とRNA-RNA 二重鎖ハイブリダイゼーションに関する研究について紹介し、それらのアンチセンス核酸の新素材としての可能性について述べたい。

2-チオウリジンを含む RNA の性質

2-チオウリジン(s^2U)は種々の tRNA 中に存在する修飾ヌクレオシドで、ウリジンのウラシル塩基 2 位のカルボニル基がチオカルボニル基に置き換わった化合物である。また、tRNA 中のアンチコドン部位には 2-チオウラシル環 5 位がさらに修飾された、5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン($mnms^2U$)や5-メチル-2-チオウリジン(m^5s^2U)などの構造類縁体も存在している(図1A)。

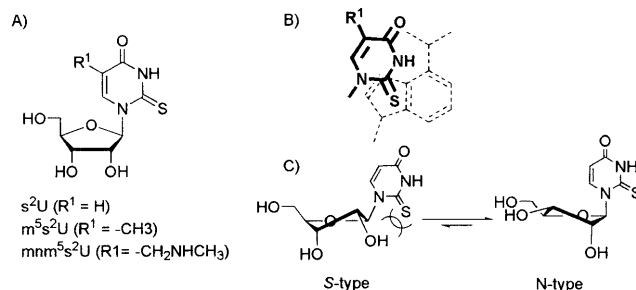


図1. tRNA に存在する2-チオウリジン誘導体とその特徴

これらの s^2U 誘導体は tRNA の立体構造の安定化やコドン-アンチコドン相互作用の安定化などに寄与することが知られている。また s^2U を含む合成 RNA のハイブリダイゼーションの研究から、二重鎖 RNA を安定化する効果もあることが報告されている。これらの効果は、2-チオウリジンのリボース環コンホメーションが 2-チオカルボニル基と 2'-水酸基との立体反発をさせて N 型に固定化されていて、これが RNA の高次構造形成に有利に働くためと考えられている(図1C)^{2,3)} また 2-チオカルボニル基の硫黄原子が、高い分極率を持っているため、RNA 二重鎖中で上下の塩基間の大きな分散力でスタッキングが安定化されることも大事な要因である(図1B)。

2-チオウリジンの塩基識別能

生体内の RNA には 4 種類の塩基 (A, U, G, C) が存在し、A-U, G-C のワトソンクリック塩基対を形成する。しかし、ワトソンクリック塩基対以外のミスマッチ塩基対も比較的安定であり、アンチセンス核酸が標的 mRNA に結合する際の選択性が低下する一因ともなっている。

RNA-RNA 二重鎖中で、ミスマッチ塩基対の安定性は G-U > G-G > G-A の順である。⁴⁾

筆者らは RNA-RNA 二重鎖中で最も安定な G-U ミスマッチ塩基対に着目し、G との対合を防ぎ A と選択的に結合する人工ウリジンヌクレオシドの開発を計画した。

G-U ミスマッチは wobble 型と呼ばれる、2本の水素結合で安定化された塩基対を形成することがわかっている。そこで、A-U ワトソンクリック塩基対と G-U

*著者紹介(代表) ¹東京工業大学フロンティア創造共同研究センター(助教授) 〒226-8503 横浜市緑区長津田町4259

TEL. 045-924-5136 FAX. 045-924-5144 E-mail: kseio@bio.titech.ac.jp

²東京工業大学大学院生命理工学研究科

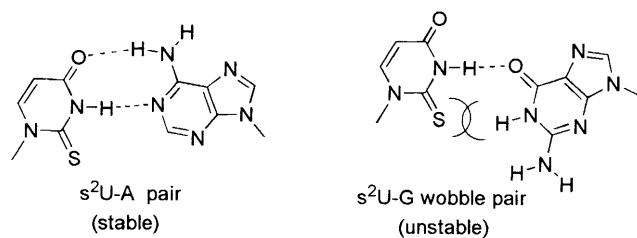


図2. 2-チオウリジンのアデニン選択的認識機構

wobble 塩基対の構造を見比べたところ、ウラシル環2位のカルボニル基を、水素結合能の低いチオカルボニル基に変換した2-チオウリジン誘導体をウリジンの代わりに用いれば、Aとの塩基対形成は阻害せず、Gとのwobble 塩基対のみを選択的に阻害することが可能であると考えた(図2)。

実際、筆者らが行った実験では、RNA: (CGUU_s²UUUGC) 中の $s^2\text{U}$ は、GよりもAを、 T_m にして14.7°Cも強く認識することが分った(未修飾のウリジンでは3.9°Cの差しかない).⁵⁾

アンチセンス核酸を指向した $s^2\text{U}$ 誘導体の合成

以上述べてきたように $s^2\text{U}$ やその誘導体を含んだRNAは、RNA-RNA二重鎖安定化能やアデニン選択的分子認識能を有し、アンチセンス効果の増強や標的mRNAに対する選択性向上などの好ましい効果が期待される。そこで $s^2\text{U}$ のこの性質をアンチセンス核酸に応用するために、生体内の核酸分解酵素に対する耐性が必要なアンチセンスRNAに広く用いられている2'-O-アルキル型の修飾を施した $s^2\text{U}$ 誘導体をRNAに導入し、その性質を調べることにした。従来、 $s^2\text{U}$ は有毒なスズ化合物を用いて、リボース誘導体と2-チオウラシルとを結合させて合成するため、アンチセンス核酸などの医薬目的には適していない。また $s^2\text{U}$ の2'水酸基選択的に種々のアルキル化を行うことは2位のチオカルボニル基が求核性をもつため容易ではなく、新規合成法の開発が望まれる。

今回、新たに2'-O-アルキル-2-チオウリジン誘導体の簡便な合成法を開発することにした。⁶⁾その合成スキームを図3に示す。アルキル基としてはメチル、アリル、2-ヒドロキシエチル、2-メトキシエチルなどアンチセンス核酸として好ましい性質が期待できるものを選んだ。

3', 5'水酸基を環状シリルエーテルで保護したウリジン(1)の4位の酸素原子を2, 6-ジメチルフェニル基(DMP)で保護し(2)、続いて水酸基を適当な方法によりアルキル化した(3a-3c)。引き続きローソン試薬を用いて2位のカルボニル基のみを選択的にチオン化し(4a-4c)、その後に

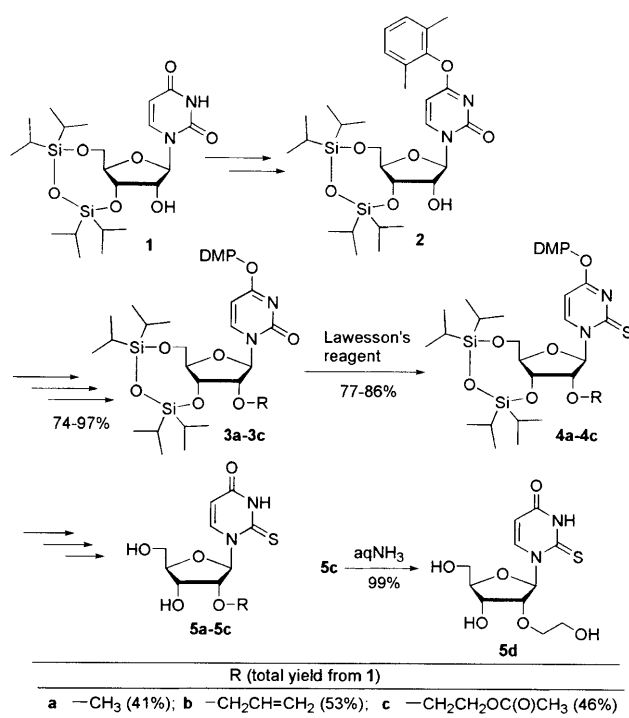


図3. 2-チオウリジン誘導体の合成

脱保護することで、2'-水酸基をアルキル基で修飾した2-チオウリジン誘導体(5a-5c)を収率よく合成することができる。5cはさらに濃アンモニア水で処理し、2-ヒドロキシエチル体(5d)へと誘導した。また2'水酸基を2-メトキシエチル化した5eは文献公知の2'-O-(2-メトキシエチル)ウリジン6から図4のルートで合成した。

この方法によれば、硫黄原子の導入に先立ち2'-水酸基の修飾を行うため、硫黄原子の求核性に起因する副反応を回避することができる。また、スズ化合物を使ったグリコシド化反応も回避することができ、トータル収率も良好なアンチセンスRNAの原料として有用な反応と

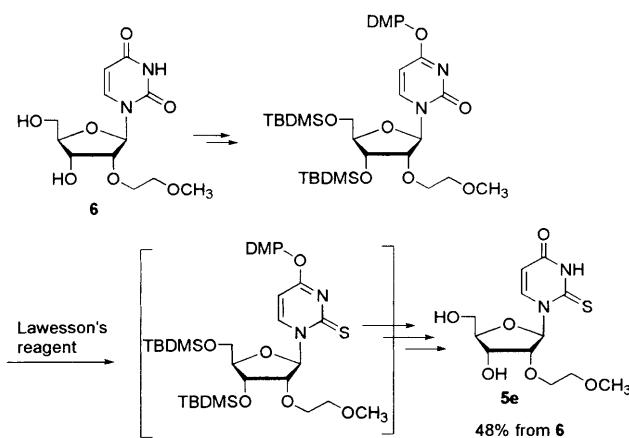


図4. 2'-メトキシエチル誘導体の合成

なった。

合成した 5a-5c, 5e はさらに RNA 合成用のホスホロアミダイトユニットに容易に誘導することができた。

s²U 誘導体 (5a-5d) のコンホメーションと二重鎖安定化能

合成した s²U 誘導体 (5a, 5b, 5d, 5e) についてそのリボース環コンホメーションを ¹H-NMR の $J_{1'-2'}$, $J_{3'-4'}$ を測定することにより解析した。その結果、2' 位を修飾した s²U 誘導体は、2' 位を未修飾の s²U と同様に N 型のコンホメーションを優勢にとることがわかった。特に 2' 水酸基に 2-ヒドロキシエチル基を有する 5d で N 型の存在比が最も高いことが分った (表 1)。このコンホメーション特性から、5a, 5b, 5d, 5e は s²U と同様に RNA 二重鎖を安定化する能力を有していることが示唆された。

そこで、実際にこれらの s²U 誘導体を含む RNA9 量体 (CGUUU*UGC: U*が 5a, 5b, 5d, 5e を表す) を合成し、相補鎖 RNA とのハイブリダイゼーション能を UV 融解曲線から得られる T_m 値で評価した。

5d を含む RNA は、そのアセチル体 5c から誘導したホスホロアミダイトを用いて RNA 合成を行い、合成終了後、濃アンモニア水によりアセチル基を除去して合成した。その T_m 値の測定結果を表 2 に示す。いずれの s²U 誘導体も、ウリジンにくらべ 3.4–6.9°C の明らかな安定化効果を示した。しかし、最も T_m 上昇が高かったのは、最も N 型コンホメーションの割合の多い 5d ではなく s²U であった。つまり、2'-位の修飾を有する s²U 誘導体

表 1. 結合定数 (Hz) と %N

	U	Um	s ² U	5a	5b	5d	5e
$J_{1'-2'}$	4.6	4.0	2.5	3.1	3.4	2.4	2.9
$J_{3'-4'}$	5.2	5.9	6.0	7.0	6.7	7.6	7.3
$J_{1'-2'}+J_{3'-4'}$	9.8	9.9	8.5	10.1	10.1	10.0	10.2
%N	53	60	70	70	67	76	72

$$\%N = \{J_{1'-2'}/(J_{1'-2'}+J_{2'-3'})\} \times 100(\%)^{7)}$$

表 2. 2-チオウリジン誘導体を含む RNA-RNA 二本鎖 (CGUUU*UUGC/GCAAAAACG) の融解温度

	U	s ² U	5a	5b	5d	5e
$T_m(^{\circ}\text{C})$	36.7	43.6	42.2	40.1	40.6	41.4
ΔT_m	—	+6.9	+5.5	+3.4	+3.9	+4.7

では RNA 二重鎖の安定化は、リボース環 N 型コンホメーションの安定性とは相関がなく、逆に修飾基の立体障害などが RNA 二重鎖を不安定化している可能性が示唆された。

しかし、アンチセンス核酸として考えた場合特筆すべきは、ヌクレアーゼ耐性が向上するとされる 2'-O-アリル修飾や 2'-O-(2-メトキシエチル) 修飾を施した 5b や 5e が明らかな RNA 二重鎖安定化を示すことである。これらを総合的に考えると、今回合成した s²U 誘導体はアンチセンス RNA の新素材として十分な期待がもてる。

我々が開発した 2-チオウリジン誘導体の新規合成法とそれらをふくむ RNA の二重鎖形成能について紹介した。2-チオウリジンの最大の特徴であるアデニン選択的な塩基識別能については、2'-O-メチル-2-チオウリジン (5a) を含む RNA と相補的な RNA を用いて検討し、5a は G よりも A を、 T_m にして 15.7°C も強く認識することが分った。⁵⁾ 最初に述べたように、この値はウリジンでは 3.9°C、2-チオウリジンでは 14.7°C であるから、2' 水酸基をアルキル基で修飾することにより、2-チオウリジンの塩基識別能がさらに向上する可能性も期待される。

今後、これらの塩基識別能とともにヌクレアーゼ耐性やアンチセンス効果も検討し 2-チオウリジン誘導体を用いたアンチセンス RNA について検討する予定である。

また、冒頭で述べたウラシル環 5 位に修飾基を有する 2-チオウリジン誘導体や、さらに視野を広げて天然の RNA 中に存在する数多くの修飾ヌクレオシド⁸⁾ についても、その RNA-RNA 二重鎖安定化能や塩基識別能などはあまり調べられていない。これら性質未知の修飾ヌクレオシドを含む人工 RNA についても、簡便な合成法が開発されれば、アンチセンス核酸に代表される核酸医薬の新素材として、その性質に興味を持たれる。

文 献

- 1) Chieng, P. K.: *Pharmacol. Ther.*, **99**, 55 (2003).
- 2) Sierzputowska-Gracz, H. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7171 (1987).
- 3) Yokoyama, S. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2611 (1979).
- 4) Kierzek, R. *et al.*: *Biochemistry*, **38**, 14214 (1999).
- 5) Shohda, K. -I. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1795 (2000).
- 6) Okamoto, I. *et al.*: *J. Org. Chem.*, in press.
- 7) Davies, D. B. *et al.*: *Biochemistry*, **13**, 4417 (1974).
- 8) Limbach, P. A. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2183 (1994).