

博士論文

構造情報を活用した siRNA 活性増強法の構築

(Development of a method for enhancing the siRNA activity by utilizing structural information)

篠原 史一

目次

目次	1
I. 研究背景および目的	4
I.1 核酸医薬品とは	4
I.2 核酸医薬品開発の状況	5
I.3 核酸医薬品の課題	8
I.4 核酸の化学修飾技術の進歩	9
I.5 siRNA 医薬品の機能メカニズム	11
I.6 構造情報を活用した創薬	15
I.7 本研究の目的	18
I.8 本研究の戦略	19
II. 結果	21
II.1 緒言	21
II.2 ガイド鎖 5'末端 1 塩基置換は siRNA 活性に影響を及ぼす	23
II.3 動物モデルにおいても 5'末端 1 塩基置換は siRNA 活性に影響を及ぼす	25
II.4 無作為な 5'末端塩基改変では siRNA 活性は増強しない	27
II.5 ヒト AGO2 タンパク質の MIDドメイン構造は低分子誘導体展開に適する	30
II.6 市販化合物を対象にした <i>in silico</i> SCR による 8-Br AMP の取得	36
II.7 8-Br AMP は AGO2 MIDドメイン結合が増強する(Biacore 実験)	38
II.8 8-Br AMP は Y529 と新たな疎水性相互作用を形成する(X 線結晶構造解析)	40
II.9 AMP 6 位展開によるアナログ候補としての 6-mCEPh-purine デザイン	42
II.10 6-mCEPh-purine も AGO2 MIDドメイン結合親和性が増強する(Biacore)	43
II.11 6-mCEPh-purine も AGO2 MIDドメインに結合する(X 線結晶構造解析)	45
II.12 アデニン 6 位、8 位アナログは共に AGO2 MID 結合親和性が向上する(NMR)	47
II.13 6-mCEPh-purine siRNA は RISC 形成効率増加傾向を示す(Native agarose gel)	51
II.14 ガイド鎖 5' 6-mCEPh-purine 置換 siRNA は複数 siRNA 配列で強活性を示す	56
II.15 ガイド鎖 5' 6-mCEPh-purine 置換 siRNA は siRNA の AGO2 集積を促進する	60
II.16 5'末端 6-mCEPh-purine siRNA は内在遺伝子に対しても siRNA 活性増強を示す	62
II.17 5'末端修飾 siRNA はマウスモデルにおいても活性増強を示す	63
III. 考察	67
III.1 緒言	67
III.2 AMP 6 位、8 位誘導体戦略の妥当性について	68
III.3 塩基アナログによる MIDドメイン結合親和性増強機構について	69
III.4 5'末端置換 siRNA の活性増強効果について	71
III.5 本研究戦略「構造情報に基づく siRNA 活性増強策」について	72
III.6 今後の展開について	74
IV. 材料及び方法	76
IV.1 培地、血清、培養用添加物	76

IV.2	AGO2 MIDドメイン調製.....	76
IV.3	qPCR用プローブ、プライマー.....	77
IV.4	AMP/UMP結合部位周辺のマッピングと、化合物デザインへの応用.....	77
IV.5	AGO2 MIDドメイン/ヌクレオチドモノマーX線結晶構造解析.....	78
IV.6	NMR結合実験.....	79
IV.7	Biacoreを用いたヌクレオチドのAGO2 MIDドメイン結合評価.....	81
IV.8	Luciferase標的siRNAのRNAi活性評価.....	82
IV.9	マウス初代肝細胞に対するsiRNAノックダウン評価.....	84
IV.10	細胞からのRNA抽出およびcDNA合成.....	85
IV.11	定量PCR(qPCR).....	85
IV.12	Native agarose gel解析.....	85
IV.13	RISC中siRNAガイド鎖分子数の定量.....	86
IV.13.1	タンパク定量.....	86
IV.13.2	anti-human AGO2 beadsの調製.....	87
IV.13.3	AGO2タンパク溶解溶液の調製.....	87
IV.13.4	逆転写反応および定量PCR.....	88
IV.14	マウス動物モデル実験用デリバリー製剤LNP調製.....	88
IV.15	マウス動物モデル実験.....	89
IV.16	肝臓組織からのtotal RNAの抽出、qPCR.....	89
IV.17	マウス血漿中コレステロール定量.....	90
IV.18	統計解析.....	90
IV.19	ホスホロアミダイト合成.....	90
IV.20	6-mCEPh-purine合成.....	92
IV.21	核酸オリゴ合成.....	96
V.	謝辞.....	99
VI.	参考文献.....	100

I. 研究背景および目的

I. 研究背景および目的

I.1 核酸医薬品とは

「核酸医薬品」とは、デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)の構成成分であるヌクレオチドおよびその誘導体を基本骨格に、十〜数十塩基連結したオリゴ核酸で構成され、化学合成により製造される医薬品である。遺伝子である DNA はメッセンジャーRNA(mRNA)に転写され、mRNA はタンパク質に翻訳されるが、核酸医薬は、この生命の基本的機構であるセントラルドグマのいずれかに対して、遺伝子発現を介さずに直接的に作用する。核酸医薬の薬効本体であるオリゴヌクレオチドは、生体に備わる機構をうまく活用しながら多彩な機能を発現することができるため、作用機序や構造の異なる多様な核酸医薬品が開発されている。また、創薬の場においては創薬シーズの枯渇が大きな問題となってきたが、核酸医薬品は従来の低分子医薬品ならびに抗体医薬品では標的にできなかったタンパク質、mRNA、miRNA なども創薬ターゲットにできることから、低分子医薬品、抗体医薬品に続く第 3 の医薬品として注目を集めている。

核酸医薬品は構造やターゲット、機能メカニズムの違いによって複数の種類に分類される。mRNA に結合してタンパク質の合成(翻訳)を阻害する他、mRNA 前駆体に結合して正常なタンパク質の発現を増加させることも可能な「アンチセンス医薬品」、mRNA を切断して遺伝子の発現を阻害する「siRNA (small interfering RNA)医薬品」、抗体医薬品と同様に標的タンパク質に結合してその機能を阻害する「アプタマー医薬品」などが存在するが、近年、特に開発が進んでいる核酸医薬品としてはアンチセンス医薬品と siRNA 医薬品が挙げられる(図 1)。

アンチセンス医薬品は一本鎖の DNA/RNA から成り、mRNA、pre-mRNA、miRNA などのあらゆる RNA に相補的に結合する性質を持ち、mRNA の分解や、スプライシング制御、miRNA の阻害等、様々な作用機構で機能発揮する。RNA 分解型アンチセンスは核内に存在する RNase H と協調して機能するため、主に核内で RNA 分解すると考えられている。スプライシング制御型アンチセンスならびに miRNA 阻害型アンチセンスは、RNA と RNA 結合分子の結合を立体的に阻害することで機能する。一般的にアンチセンス医薬品では修飾核酸が用いられることが多く、DDS 不要な場合も多い。

siRNA 医薬品は二本鎖 RNA から成り、細胞内で RISC (RNA-induced silencing complex) 複合体を構成する Argonaute 2 (AGO2) と協調して、相補的な配列を持つ標的 mRNA の認識と切断を行う。一般的に DDS が必要とされるが、近年は DDS 不要の修飾型 siRNA 医薬品も開発されている。

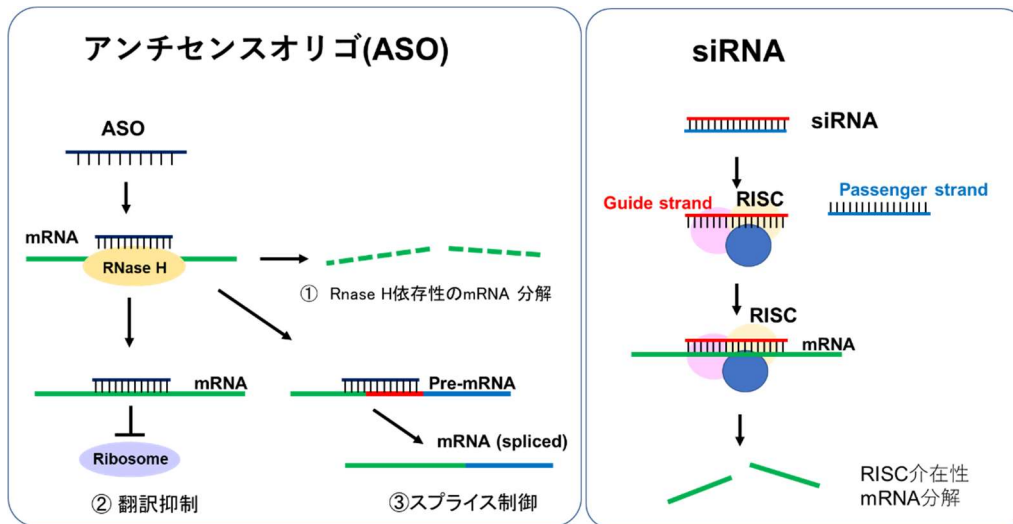


図 1 Mechanisms of oligonucleotides

1.2 核酸医薬品開発の状況

これまでに国内外で上市されてきた核酸医薬品はアンチセンス 8 品目、アプタマー 1 品目、siRNA 3 品目の 12 品目が挙げられる(表 1)。

商品名	薬名	種類	標的	開発者	承認国(年)	適応	投与ルート
Vitravene	Fomivirsen	アンチセンス	CMV RNA	ISIS/Novartis	US 1998 EU 1999	CMV 性網膜炎	硝子体内
Macugen	Pegaptanib	アプタマー	VEGF	Gilead Sciences	US 2004 EU 2006 JP 2008	滲出型 加齢黄斑変性	硝子体内
Kynamro	Mipomersen	アンチセンス	ApoB100mRNA	ISIS/Genzyme	US 2013	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys 51	Eteplirsen	アンチセンス	Dystrophin pre-mRNA	Sarepta	US 2016	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza	Nusinersen	アンチセンス	SMN 2 pre-mRNA	IONIS/Biogen	US 2016	脊髄性筋萎縮症	髄腔内
Tegsedi	Inotersen	アンチセンス	TTR mRNA	IONIS/Akcea	EU 2018	遺伝性ATTRアミロイド シス	皮下
Patisiran	Onpatro	siRNA	TTR mRNA	alnylam	US 2018 EU 2018 JP 2019	遺伝性ATTRアミロイド シス	静脈内
Waylivra	Volanesorsen	アンチセンス	ApoCIII mRNA	IONIS/Akcea	EU 2019	家族性カイロミクロン血症	皮下
Givlaari	Givosiran	siRNA	ALAS1 mRNA	alnylam	US 2019	急性肝性ポルフィリン症	皮下
Vyondys 53	Golodirsen	アンチセンス	Dystrophin exon 53	Sarepta	US 2019	デュシェンヌ型筋ジストロ フィー	静脈内
viltolarsen	Viltepso	アンチセンス	Dystrophin exon 53	日本新薬	JP 2020	デュシェンヌ型筋ジストロ フィー	静脈内
OXLUMO	Lumasiran	siRNA	Hydroxyacid oxidase 1 mRNA	alnylam	EU2020	原発性高シュウ酸尿症	皮下

表 1 国内外で上市された核酸医薬品一覧(2020年11月時点)

核酸医薬品の開発は、1990年代後半からアンチセンス医薬品を中心に試みられており、1998年に初めて Fomivirsen というサイトメガロウイルス (CMV) 性網膜炎を適応としたアンチセンス医薬品が硝子体内投与製剤として米国において認可された。近年では、ISIS/Genzyme が開発した家族性高コレステロール血症の発症に関連するアポタンパク質 B (Apo B) の mRNA に対するアンチセンス医薬品である Mipomersen が、静脈内投与製剤として 2013 年に米国で認可されている。また最近では mRNA 前駆体を標的として、エキソスキッピングが原因で起こるデュセンヌ型筋ジストロフィー (DMD) を適応とするエキソスキップ薬としてのアンチセンス医薬品も Nusinersen、Golodirsen、Viltepso の 3 品目が上市されている。

一方の siRNA 医薬品は 2000 年以降に siRNA が注目されて以来、医薬品としての開発が盛んに行われているが、上市まで至ったケースはまだ 3 品目に限られる。Alnylam が開発した Onpattro は初めての siRNA 医薬品であり、トランスサイレチン型アミロイドーシス (ATTR) を適応としている。ATTR は、トランスサイレチン遺伝子変異によって不溶性アミロイドタンパク質が産生され、全身に蓄積することにより神経や臓器の機能不全を起こす疾患である。Onpattro はリポソームという脂質二重層の中に核酸を封入した製剤で、標的組織である肝臓へ効果的な siRNA デリバリーが可能となった静脈内投与製剤である。2 品目の Givlaari は aminolevulinic acid synthase-1 (ALAS-1) を標的とする siRNA で、適応症は代謝性の希少疾患である急性肝性ポルフィリン症 (AHP) であるが、まずは AHP の中でも非常に稀な急性間欠性ポルフィリン症 (AIP) を適応としている。AIP においてはポルフィリン合成酵素 (PBGD) の欠損の結果、毒性が高いヘム合成中間体ポルフィリンが一連の酵素反応上流に蓄積する。ポルフィリン分子の蓄積は、重度の疼痛、麻痺、呼吸不全、てんかん発作や精神状態の変化などポルフィリア発作という急性発作を引き起こす重篤な疾患である。Givlaari は Alnylam が独自に開発した siRNA デリバリー技術である GalNac-siRNA 技術を用いた皮下注射製剤である (図 2)。3 品目の Oxlumio はグリコール酸オキシダーゼを標的とした siRNA で、適応症は原発性高シュウ酸尿症 1 型 (PH1) である。PH1 は、肝臓内で、肝ペルオキシソームに局在するアラニングリオキシル酸アミノ転移酵素 (AGT) の遺伝的な欠損が原因で代謝産物のシュウ酸が増加し、腎臓でシュウ酸カルシウム結晶が生成して、腎結石、腎障害などの腎不全を引き起こす疾患である。Oxlumo によって肝臓でのシュウ酸生成を低下させることで PH1 の症状が軽減される。Oxlumo も GalNac-siRNA 技術をデリバリー技術に用いた皮下注射製剤である。

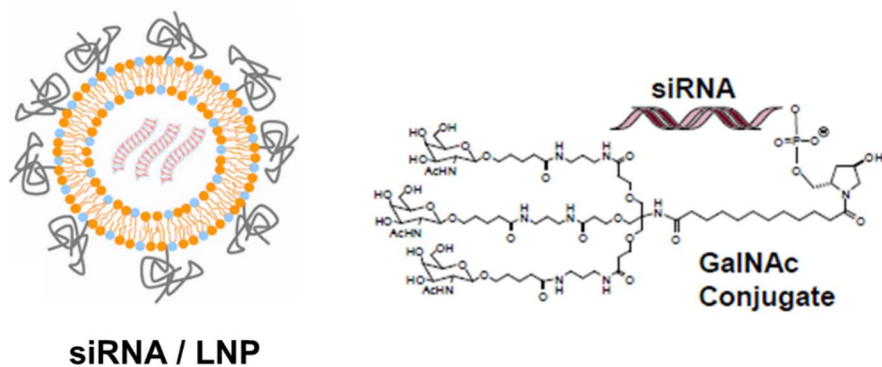


図2 2つのタイプの全身投与型 siRNA 医薬品

上述の通りに siRNA 医薬品として上市に至っているケースがまだ3つと少ない理由は、siRNA の機能メカニズムの課題というよりは、siRNA が二本鎖 RNA として生体内で分解されやすいこと、適切なデリバリー技術の欠如のために標的とする組織へ siRNA を効果的にデリバリーすることが難しいことにあると考えられている。核酸医薬品のドラッグデリバリーシステム開発においては、標的とする組織や細胞が多様なことから、特に肝臓以外の組織に対しては単一の技術開発による課題解決は難しく、標的とする組織や細胞に即して適切なドラッグデリバリーシステムの技術開発を必要とする課題が残っている。また、後述する通りに、siRNA 機能メカニズムは複雑であるために、siRNA の安定性向上ならびに活性向上を意図する化学修飾は単にヌクレアーゼ耐性を意識するのみならず、RNAi メカニズムの作用機序を阻害しない RISC 親和性も考慮すべきことが siRNA 医薬開発の難しさの一つと考えられる。

1.3 核酸医薬の課題

DNA や RNA を構成成分とする核酸医薬品は体内に存在するヌクレアーゼによって分解されやすい。比較的共通なオリゴ合成法により製造できるというメリットの一方、分子量が大きく、多くのアイソマーができるために均一性が低い点は製造コスト面にデメリットを有する。核酸特有の副作用として、自然免疫系受容体刺激による免疫賦活、相補配列依存的なオフターゲット効果なども指摘されている。また、核酸医薬は負の電荷を帯びた高分子化合物となるため、細胞膜透過性が無く、全身投与された場合には肝臓、脾臓、もしくは腎臓に集積しやすい性質を有する。一方で、肝臓、脾臓、腎臓以外の標的組織への siRNA デリバリーには新たな技術開発が必要とされるが、その技術開発ハードルは高いため、一般的には以下のアプローチによる技術開発も組み合わせながら課題解決に向けた検討がなされている。

- ① 核酸安定化：核酸構造の安定性向上により体内半減期延長、細胞内送達後の効果延長が期待できる。主に核酸の人工修飾化によって課題解決が検討された成果として、今日ではアンチセンス医薬品、siRNA 医薬品ともに十分なヌクレアーゼ耐性が付与され、核酸医薬基盤への核酸安定化に関するニーズはほぼ満たされつつあるとも言える。
- ② 核酸機能改良：1 分子あたりの比活性を向上させることができれば、同じ細胞内送達量でもより有効な治療効果が期待できる。もしくは、同じ治療効果を発揮するために必要とされる細胞内送達分子数が軽減される。効果発揮に必要とされる細胞内送達分子数の減少は、siRNA デリバリーが難しいとされる組織へのデリバリー技術開発のハードルを下げることにもつながる。更に比活性向上により投与量が削減されれば、薬剤あたりの核酸合成コストの軽減、核酸に起因する免疫刺激性の軽減、オフターゲット効果の軽減も期待される。核酸医薬改良は主として核酸の人工修飾化によって検討されるが、技術開発に際しては核酸医薬基盤の機能メカニズムに即した検討が必須であることから、核酸医薬基盤改良と機能メカニズム検証は併行して行うことが重要となる。
- ③ デリバリー技術開発：標的組織へのデリバリー開発は、核酸の人工修飾化や、抗体や低分子リガンドなど機能性素子のコンジュゲート、あるいは脂質製剤等のドラッグデリバリーシステム(DDS)の技術開発によって課題解決に取り組まれている。今日では肝臓へのデリバリー技術開発はほぼそのニーズが満たされつつあるが、肝臓以外の組織に対しての有効なデリバリー技術開発は引き続きの課題として残る。

1.4 核酸の化学修飾技術の進歩

核酸医薬の課題解決や基盤改良は、一般的に核酸化学修飾を施す検討から始められる。核酸医薬品に用いるオリゴヌクレオチド修飾法については、これまでの約 40 年におよぶ核酸化学の歴史に基づく蓄積があるが、核酸化学修飾の種類によって得られる効果は異なる上、同じ化学修飾でも核酸医薬基盤との組み合わせによって効果が異なる場合もある。核酸医薬基盤に化学修飾を施すケースでは、ヌクレアーゼ耐性獲得による生体内での安定性向上、標的分子との結合親和性向上、機能改善による活性向上が意図され、現在開発中にある核酸医薬品も、そのほぼ全てで化学修飾が施されており、その化学修飾の種類は核酸構造中のリン酸部修飾、糖部修飾、塩基部修飾に分類される。

リン酸部の修飾としては、リン酸ジエステル基の O(酸素原子)を S(硫黄原子)に置換するホスホロチオエート修飾(PS 修飾)が多用されており、アンチセンス医薬品の多くで PS 修飾が施されている。この S 化は、ヌクレアーゼ消化を受けるリン酸ジエステル結合部に対する修飾であるためにヌクレアーゼ耐性向上を獲得するのみならず、脂溶性向上による体内分布向上、細胞内導入効率向上にも貢献する。その他のリン酸部修飾としては、siRNA の機能発揮に重要なガイド鎖 5'末端リン酸部の修飾による性能向上も報告されている。通常このガイド鎖 5'末端リン酸部は細胞内 Clp1 (cleavage and polyadenylation factor I subunit 1)キナーゼによって付加される(Weitzer and Martinez 2007)、もしくは化学合成時に人工的にリン酸基導入されるが、細胞内に導入された後にデホスホリラーゼによって脱リン酸化を受けると siRNA の RISC 複合体形成効率が低下し、siRNA 活性も減弱する。そこで代謝的に安定なリン酸類似体 5'-(E)-ビニルホスホネート(5'-VP)を導入することによって siRNA ガイド鎖 5'末端のリン酸基が提示され続ける結果、細胞株および動物モデルにおいて siRNA 活性を維持する、もしくは siRNA 配列に依っては siRNA 活性を増強させる効果が確認されている(Elkayam et al. 2017; Prakash et al. 2016; Lima et al. 2012)。

糖部の修飾としては、2'位の修飾と架橋型修飾が挙げられる。核酸医薬基盤の 2'糖水酸基部位に 2'-F、2'-O-Methyl(2'-O-Me)、2'-O-Methoxyethyl(2'-MOE) を導入することで、核酸構造安定化(Chiu and Rana 2003; Czauderna et al. 2003)、TLR 免疫刺激性軽減効果(Robbins et al. 2007; Hamm et al. 2010)が得られることも知られており、実際に siRNA 医薬品 ONPATTORO の二本鎖 siRNA は、11 の 2'-OMe 修飾が導入されることで治療効果と免疫刺激作用軽減効果の向上が確認されている(Adams et al. 2018)。

核酸塩基部位は、オリゴ核酸相補鎖塩基と水素結合を形成することにより相補対認識と結合に機能する。一般的な核酸医薬基盤改良展開において塩基構造に化学修飾を施す例は少ないものの限られた報告例はあり、例えばシトシンの5位をメチル化した5-methyl cytosine (5-Me C)は、オリゴ核酸中へ導入されることで核酸のA型およびB型らせん構造におけるスタッキングを増強し、二本鎖の熱安定性を向上させる(Nardo et al. 2015)。一方で過剰な塩基修飾導入によって相補塩基対形成が損なわれることから、核酸相補鎖形成が機能発揮の前提となる核酸医薬(アンチセンス, siRNA のガイド鎖等)においては塩基部が修飾されるケースは極まれである。

以上の通り、長い歴史を通じた様々な核酸修飾技術の蓄積により、核酸医薬品の生体内不安定性に対してはほぼ課題解決されつつある状況にあり、最近ではそのようにほぼ十分レベルに担保された安定性の上に、更に薬剤としての有効性ならびに安全性をどれだけ向上させることができるのかが、検討課題の中心になりつつあると言える。ただし核酸修飾を過剰に導入しすぎることによって核酸医薬基盤が元来有した活性を喪失させてしまう例も多数報告されており(Chiu and Rana 2003; Braasch et al. 2003)、核酸医薬品への核酸修飾基導入においては、核酸医薬基盤の機能メカニズムを十分に理解した上で有効性や安全性への影響を慎重に検討することが重要であると言える。

1.5 siRNA 医薬品の機能メカニズム

siRNA は RNA-induced silencing complex(RISC)とよばれる RNA-タンパク質複合体を形成し、相補的な配列領域をもつ mRNA と二本鎖を形成し、標的 mRNA を切断することで遺伝子発現を抑制する。RISC の主要構成タンパク質である AGO2 タンパク質は N ドメイン, PAZ ドメイン, MID ドメイン, PIWI ドメインと呼ばれる 4 つのドメインと、L1 リンカーと L2 リンカーと呼ばれる 2 つのリンカーで構成される(Song et al. 2004; Ma et al. 2005; Wang et al. 2008)(図 3)。

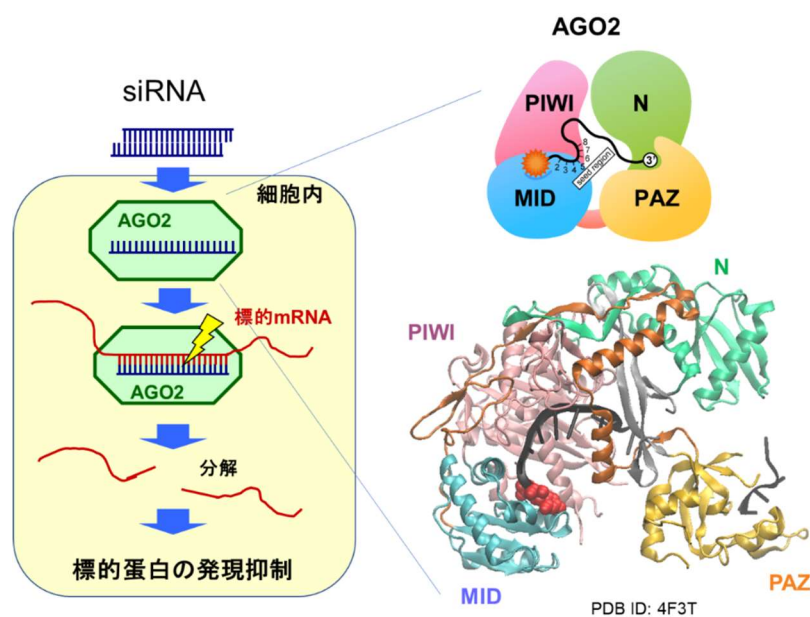


図 3 Structure of human AGO2

siRNA ガイド鎖の 5'末端は MID ドメインと PIWI ドメインの境界で認識、固定化され、3'末端は PAZ ドメインで固定化されている。固定化されたガイド鎖が標的 mRNA と完全相補に結合した際、AGO2 の“スライサー”とよばれるエンドヌクレアーゼ活性によって mRNA 鎖の切断が起こる(Schirle and MacRae 2012; Nakanishi et al. 2012)。

これまでの生化学的な解析により、AGO タンパク質による siRNA 認識におけるガイド鎖 5'末端構造の機能的重要性が明らかにされている。AGO タンパク質の MID ドメインと PIWI ドメインで構成される 5'末端結合ポケットはガイド鎖 5'末端モノリン酸の認識との結合に寄与するが、リン酸結合様式は原核生物と真核生物で異なり、原核生物では Mg^{2+} 介在のリン酸基結合が行われる一方、真核生物ではリジン

残基がリン酸との結合に寄与することが確認されている(Parker et al. 2005; Ma et al. 2005; Wang et al. 2008)。5'末端リン酸と同様に、5'末端塩基の機能的な重要性も報告されており、ショウジョウバエ、植物の miRNA には 5'末端塩基がウラシル(U)やアデニン(A)である miRNA の存在比率が高いが(Czech et al. 2009; Ma et al. 2005)、ヒト AGO2 タンパク質も 5'末端塩基がウラシルまたはアデニンの miRNA との複合体存在量が高いことが報告されている(Frank et al. 2010)。さらに let-7 miRNA の 5'末端塩基ウラシルを他の塩基で置換すると、ヒト AGO2 との結合は維持されるが、標的切断活性が低下するなどの機能減弱も報告されている(Felice et al. 2009)。

AGO2 とガイド鎖 RNA の結合分子機構を理解する上で重要となる構造生物学的解析結果も複数報告されている。ヒト AGO2 MID ドメインの結晶構造解析の結果、リン酸化されたガイド鎖 5'末端が MID ドメイン中の Y529、K533、N545、K566 の側鎖で形成されたカチオン性ポケットに取り込まれて安定化されること、MID ドメイン中のヌクレオチド特異性ループと呼ばれる固定ループでウラシルまたはアデニンを認識し、シトシンやグアニンとは立体障害することが示されている。NMR 滴定実験の結果からも AMP は 0.26 mM、UMP は 0.12 mM の乖離定数の一方で、CMP は 3.6 mM、GMP は 3.3 mM の値となり、UMP/AMP と CMP/GMP の間では約 30 倍 AGO2 結合親和性に差があることが明らかにされている(Frank et al. 2010) (図 4)。

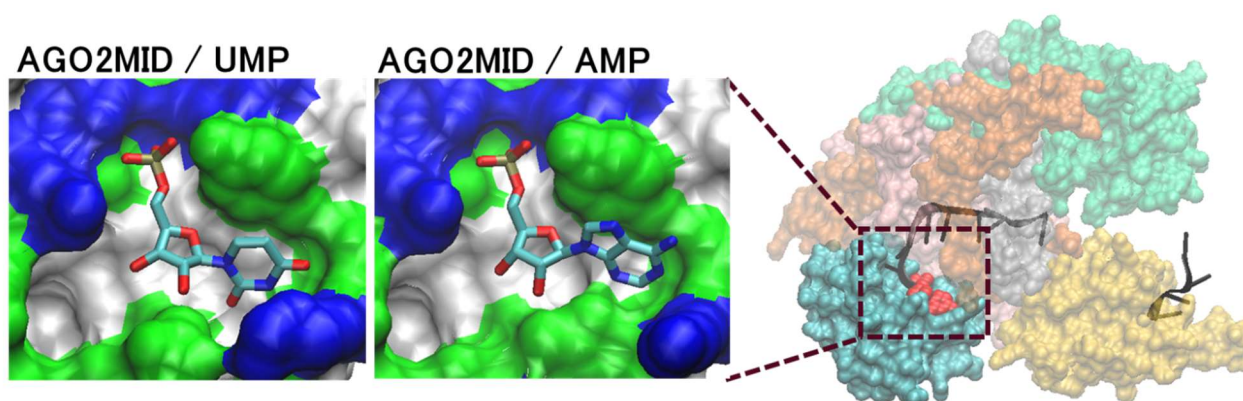


図 4 Crystal structures of hAGO2 MID ドメイン

更にヒト AGO2 全長と miRNA ガイド鎖複合体の X 線結晶構造解析からは、Helix-7 中 Ile365 の存在がガイド鎖 a6 と a7 の間に大きな折れ曲がりを生じさせ、R710 がガイド鎖 a9 塩基と、R635 がガイド鎖 a10 塩基とのスタッキングにより、a9 と a10 の間にも大きな折れ曲がりを形成させること、Proline knuckle(Pro67)により a14 塩基 がフリップアウトして Arg276 にスタッキングしていること、ガイド鎖は a17 と a18 の間で鋭くターンしていることなど、siRNA と AGO2 の相互作用を構造生物学的に理解する上での重要な知見が明らかとなっている(Elkayam et al. 2012; Schirle and MacRae 2012)。

上述のガイド鎖 5'末端の核酸塩基構造が siRNA と AGO2 の相互作用および標的切断活性に影響を与え得ることは、siRNA の構造活性相関から見出された siRNA デザインルールとしても示されている。程等の研究グループではホタルルシフェラーゼ mRNA に対して無作為にデザインした siRNA の活性評価結果から、標的 mRNA 発現抑制効果が高い siRNA はその特徴として、(i) ガイド鎖の 5'末端塩基がアデニン(A)またはウラシル(U) であること、(ii) パッセンジャー鎖の 5'末端塩基がグアニン(G)またはシトシン(C) であること、(iii) ガイド鎖 5'末端側の 7 塩基中の 4 塩基以上は A または U であること、(iv) 長い GC ストレッチが無いこと、を共通点に持つことを見出した(Ui-Tei et al. 2004) (図 5)。他のグループからも同様の siRNA デザインガイドラインが提唱されており、各ガイドラインは細部において相違点はあるものの、ガイド鎖の 5'末端塩基は A または U であることが好ましく、ガイド鎖の 5'末端からある程度の長さ (3~7 塩基) に A または U が多いことを重視する点で一致している。さらに、パッセンジャー鎖の 5'末端塩基は、G または C であるほうが好ましいとする点も共通である(Reynolds et al. 2004; Amarzguioui and Prydz 2004; Naito et al. 2004)。これらの報告は上述のヒト AGO2 中の miRNA 含有量は 5'末端塩基が A または U である miRNA が、5'末端塩基が G または C の miRNA よりも多いとの 5'末端バイアスとも一致する。

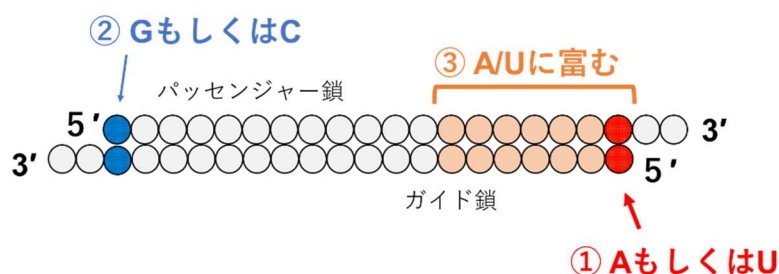


図 5 高活性 siRNA の特徴

上述の通りにガイド鎖 5'末端塩基構造は AGO2 と siRNA の相互作用および siRNA 活性に影響を与えるが、結晶構造解析結果から、この 5'末端塩基構造は、標的 mRNA との塩基対形成には寄与せず、AGO2 MID ドメインと PIWI ドメインの境界領域に存在するガイド鎖 5'末端結合ポケットへの結合に寄与することが示されている(Frank et al. 2010)。以上の一連の知見より、ガイド鎖 5'末端塩基 U/A バイアスに基づく細胞内 miRNA の 5'末端塩基毎の存在量の違い、同じくガイド鎖 5'末端塩基 U/A バイアスに基づく siRNA 活性の違いはともに AGO2 MID ドメインの構造と塩基嗜好性に起因することが示唆される。

そこで AGO2 MID ドメインのガイド鎖 5'末端結合ポケットに対する塩基構造の最適化は、siRNA の AGO2 結合親和性の向上と RISC 複合体形成効率の向上をもたらし、その結果として siRNA 活性も向上させる siRNA 基盤改良戦略となりうるのではないかと考えた。例えば鬼塚らのグループは構造誘導計算スクリーニングを実行し、計算的に AGO2 との結合親和性向上が期待できる、ガイド鎖 5'末端置換目的のトリアゾリルヌクレオチドアナログを取得した。興味深いことに、siRNA ガイド鎖 5'端のトリアゾリル修飾は、標的 mRNA として部分的に相補的な mRNA に対するオフターゲット効果を著しく減少させたが、完全相補的な標的に対するオンターゲットサイレンシング増強効果は 2 倍に留まることを報告している(Onizuka et al. 2013)。一方、該当の論文報告中においてはアデニンを母格とするアナログは機能せず、むしろ活性が下がることが報告されている。また、これまでに AGO2 MID ドメインに対する結合親和性向上効果を実証した上で、ガイド鎖 5'末端に配置し siRNA 活性が増強することを示す、人工修飾塩基の探索に関する報告例は無い。

1.6 構造情報を活用した創薬

構造生物学とは、X線結晶構造解析、NMR、電子顕微鏡などの分析手法により、生体内における重要な反応を司るタンパク質分子の三次元構造を原子レベルで決定し、その立体構造と機能を分子レベルで解析することによって、生体内反応の分子機構を解明することである。さらに、近年の計算機技術の著しい発展により、タンパク質や核酸、糖質などの生体高分子のさまざまな物性や反応性を分子シミュレーションにより静的および動的に構造解明し、体系化することも可能になりつつある。

近年、医薬品の研究開発現場では、新規なリード化合物を見つける手段として、ハイスループットスクリーニング (high-throughput screening: HTS) とともに、構造生物学を礎にしたタンパク質構造に基づく分子設計 (structure-based drug design: SBDD) が広く利用されるようになってきている (図 6)。一つの探索プロジェクトにおいて、実験を主体とする HTS と計算を主体とする SBDD の両方を相補的に組み合わせることで、無数に存在する化合物から標的タンパク質と結合する薬の候補化合物を抽出する、もしくは実際の実験で検討すべき候補化合物の数を大幅に絞り込むなど、医薬品開発の成功率向上やコストの削減に SBDD が大きく貢献している。

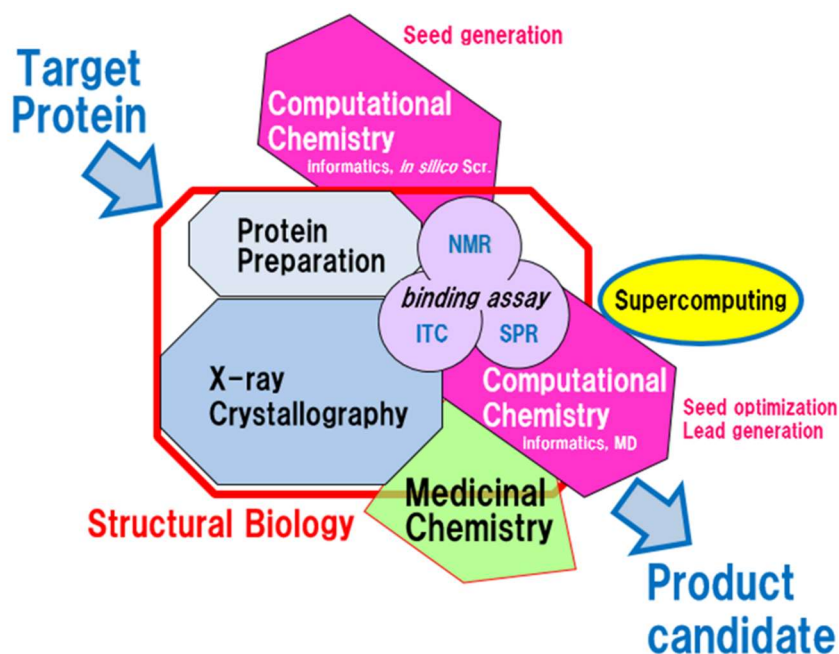


図 6 構造情報に基づく低分子化合物探索の全体像

実際に SBDD が創薬に重要な役割を果たした例として、インフルエンザ治療薬として使われるノイラミニダーゼ阻害剤のリレンザやタミフルが挙げられる。インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼは活性中心構造がウイルスの型によらずに保存されているために創薬標的として適しており、リレンザやタミフルはともにノイラミニダーゼの基質結合ポケットに結合することで酵素活性を阻害する。これら薬剤はインフルエンザ A 型ウイルスのうち、主にグループ 2 のノイラミニダーゼ (N2 や N9 など) に対する結合と阻害で効果発揮する。一方でパンデミックを起こす可能性が危惧されている高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) ウイルス表面にあるノイラミニダーゼはグループ 1 (N1 や N8 など) に属し、グループ 2 のノイラミニダーゼよりも構造柔軟性が高いこと、阻害剤の結合によりオープンフォームからクローズドフォームへの構造変化が起きること、グループ 1 基質結合部位のオープンフォームではクローズドフォームには見られないくぼみがあることなど、ノイラミニダーゼグループ 1 に対する新たな阻害剤探索の必要性が明らかにされた (Russell et al. 2006)。更にこのくぼみ部位を標的とすれば高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) のグループ 1 ノイラミニダーゼに対する創薬が可能となることも示唆されたことから、即座にヴァーチャルスクリーニングによって新たな骨格の阻害剤が複数提案された (Cheng et al. 2008)。現在ではグループ 1 ノイラミニダーゼに対する創薬研究は精力的に行われ、さらにはタミフルやリレンザ耐性となり得る変異型ノイラミニダーゼに対する構造解析と新たな薬剤開発の動きも活発となっている。

上記の例が示すように、現在、構造情報に基づく創薬 (SBDD) は構造や分子機構の理解に留まらず、ヴァーチャルスクリーニングも加えたかたちで結合分子のデザインとリード化合物の選定がなされることが一般的である。タンパク質 X 線結晶構造解析、NMR 結合実験、化合物の設計と合成など、一連の創薬ステップにおいてはそれぞれに高度な専門性が要求されるが、今日ではこれらを担当する研究者らに部署間の連携も緊密になってきており、必ずしも各分野のすべてに専門性が無くとも、高い専門性を持つ研究員に参加を要請したプロジェクトチームを設定して連携することで、SBDD の専門家で無い研究員が SBDD のツールを用いて分子設計し、さらにその仮説を検証することが可能になってきている。

ヴァーチャルスクリーニングに必要とされる具体的なものには、① SBDD 展開が可能な精度の高い創薬標的の立体構造情報、② 配座解析された低分子化合物の構造データベース、③ SBDD が行える計算環境とそれを扱うことが可能な専門性の高い研究者が挙げられる。① の精度の高い立体構造情報に関しては、ヒト AGO2 MID ドメインタンパク質の構造は AMP (PDB ID: 3LUD) もしくは UMP (PDB ID: 3LUJ) との複合体構造として精度の高い情報がプロテインデータバンクに登録されており、参照可能な状態にある。② についてもウェブからダウンロード可能な化合物データベース (ZINC など) や、市販データベー

ス等の入手により活用可能な状況にある。③に関しても創薬基盤として利用される解析環境とスキルを持つ研究者との共同研究によってヴァーチャルスクリーニングの実施は可能と考えられたため、次項に述べる目的と戦略に基づき本研究の計画と立案を行った。

1.7 本研究の目的

核酸医薬品とは DNA や RNA などの核酸を医薬応用するものであり、低分子や抗体に次ぐ新たな医薬基盤として期待されている。核酸医薬が注目される背景としては低分子や抗体で狙える標的が枯渇しつつあることも一因にある。例えば低分子化合物が最も得意とするのは受容体や酵素であり、抗体が最も得意とするのは膜表面タンパク質や血中内タンパク質とされるが、核酸医薬品はタンパク質をコードする mRNA が標的であるため、理論上は標的の制限が無い。実際に核酸医薬品は低分子や抗体が苦手な標的とする転写因子やアダプタータンパク質なども核酸医薬では標的となっている他、既に治療薬が存在する疾患に対しても機能メカニズムの違いを生かす形で新たな標的を設定することによる最善の治療薬提供が試みられている。核酸医薬品の開発状況は近年、増加の一途をたどっており、これまで有効な治療法が無かった希少疾病の治療薬が提供されることも期待されているが、デリバリー技術開発や核酸医薬基盤改良など、まだまだ解決すべき課題も多い。

核酸医薬基盤の一つである siRNA 医薬品は細胞内で配列相補性を持つ mRNA を切断し標的の発現を抑制することで効果発揮するが、siRNA は細胞内で単独で機能せず、細胞内蛋白質 Argonaute 2 (AGO2)と複合体を形成し、AGO2 の機能を介することで標的 mRNA の捕捉と切断を行う。細胞内における siRNA と AGO2 の複合体形成効率は siRNA の形状や末端塩基構造等により左右されるが、特に複合体形成の初期段階とされる、siRNA ガイド鎖 5'末端塩基と AGO2 タンパク質塩基結合ポケットの相互作用に注目することで siRNA 活性増強策の構築につながるのではないかと考えた。すなわち、AGO2 塩基結合ポケットに高親和性の人工塩基を創成することで RISC 複合体形成効率向上とその結果として siRNA 活性の向上につながる、siRNA 活性増強策の一つとなり得るのではないかと考えた。siRNA 活性増強策を構築できれば、治療効果の増進、投与量軽減による副作用減少やコスト節減、更には細胞内に送達すべき核酸分子数が低減されることで現状は限られた分子数しか届けられていない標的組織においても siRNA 医薬品による薬効発揮が可能となる。更にデリバリー技術に求める細胞内送達数必要量を下げること、デリバリー技術開発の負担軽減にもつながるなど、siRNA 医薬品開発に対して貢献が可能となる。また本コンセプトはガイド鎖 5'末端の 1 塩基を修飾するシンプルな方法であるため、多数の製薬企業が医薬応用を検討中の各 siRNA 基盤とも技術融合可能と考えられることから、核酸医薬基盤 siRNA に対して広く応用可能となることも期待できる。

1.8 本研究の戦略

AGO2 MIDドメインのガイド鎖 5'末端結合ポケットによる塩基嗜好性に基づき、siRNA ガイド鎖 5'末端塩基構造が、AGO2 との複合体形成効率や siRNA 活性に影響を与えることが示唆されていることから、AGO2 MIDドメインが嗜好する天然塩基 AMP、UMP 以上に AGO2 塩基結合ポケットに高親和性の人工塩基を創成することで siRNA 活性増強に繋がらないか、検討することとした。

本技術を遂行する上で、「AGO2 塩基結合ポケットに結合親和性を示す核酸塩基誘導体をどのように取得するか?」、「塩基アナログの AGO2 MIDドメインに対する結合親和性をどのように評価するか?」、そして「どのような評価系で siRNA ガイド鎖 5'末端置換が与える siRNA 活性への影響を確認するか?」が初期の検討課題であったため、まずこれらの検討を可能とする初期探索系として、細胞株ならびに動物レベルでの siRNA 活性評価系と、ピアコア結合実験系によるアナログ評価系を構築しながら本研究コンセプトの妥当性を検証することとした。

続いて低分子創薬を支える基盤である「SBDD: Structure Based Drug Design (タンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計)」と「タンパク質低分子結合評価系(X線、NMR、ITC、ピアコア等)」に関わる各分野の専門家との議論を通じ、共同研究体制を設定することで独自かつ新規な塩基アナログの取得に挑戦することとした(図7)。



図7 本研究の基本戦略全体像

II. 結果

II. 結果

II.1 緒言

本研究は第一章に述べた研究背景と研究基本戦略に則り、以下に示す 3 部構成で研究を展開した。

- ① 実験系の構築と初期コンセプト検証
- ② AGO2 MIDドメインに高親和性に結合する素子探索(共同研究)
- ③ 5'末端置換 siRNA の機能評価(一部、共同実験含む)

まず、第一のステップである「①実験系の構築ならびにコンセプト検証」に際して、第一章で述べた通りに高活性を与える siRNA デザインルールに「ガイド鎖の 5'末端は A もしくは U が推奨される」ことを受け、ガイド鎖 5'末端 1 塩基置換が siRNA 活性に与える影響を検証した。具体的には、複数の siRNA 配列をデザインし、5'末端 1 塩基を天然塩基間で置換した siRNA 配列を活性評価することで、ガイド鎖 5'末端 1 塩基置換効果を検証した。上記の初期検証を通じて本研究のコンセプトである siRNA ガイド鎖 5'末端の一塩基置換による活性向上策の妥当性を確認するとともに、次のステップとして② 5'末端結合素子探索に向けた研究戦略を立案した。

次の「② AGO2 MIDドメインに高親和性に結合する素子探索」に向けては、第一章の背景紹介で述べた通りに、SBDD を活用した結合素子のデザインと評価が有効と思われたことから、SBDD を構成する重要パートである、計算科学、X 線、NMR、化学合成の各パートに専門性を有する研究者へ本研究コンセプトの共有ならびに協力を要請し、共同研究プロジェクトを発足した。具体的にはいずれも協和キリン株式会社に所属する、齋藤純一氏(SBDD 統括)、小葦泰治氏(計算科学)、宮城光氏、高橋雄一氏、鈴木道彦氏(X 線結晶構造解析)、高山裕生氏(NMR)、山本潤一郎氏、西川知之氏(核酸合成)へ研究背景説明を行い、協力を仰いだ。自身は各パートにおける研究戦略の共同立案、探索の結果得られた結合素子候補の AGO2MID 結合評価や siRNA 活性評価、各パートで得られた解析結果に基づく考察、研究プロジェクトリーダーとして共同研究全体指揮を担当することで、SBDD を軸とした AGO2 MIDドメイン高親和性結合性素子探索を牽引した(図 8)。

最後の③5'末端置換 siRNA の機能評価においては、②で得られた AGO2 MIDドメイン結合性素子を搭載した siRNA を用い、細胞株ライセートによる生化学実験、細胞株ならびにマウス動物モデルによる siRNA ノックダウン試験によってガイド鎖 5'末端置換効果の検証と、有用性評価を行った。細胞株を用いた RISC 取り込みへの影響を検討する目的の Native agarose gel 実験、AGO2 免疫沈降による RISC 取り込み定量実験は自身で実施するとともに、細胞株およびマウス動物モデルにおける siRNA ノックダウン試験に関する研究計画の立案を行った。データ取得に際しては協和キリン株式会社の春元俊正氏、牧野麻奈氏に協力いただいた。

以上①から③のステップによって得られた結果を以下に記す。

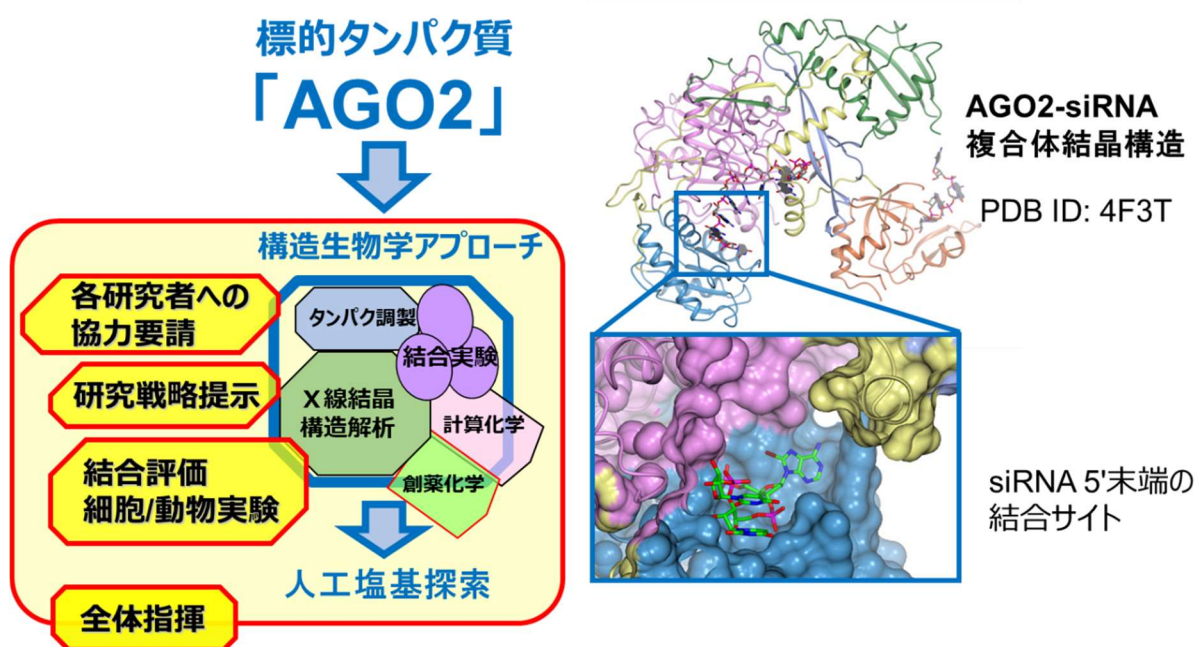


図 8 構造情報に基づく人工塩基の探索

II.2 ガイド鎖 5'末端 1 塩基置換は siRNA 活性に影響を及ぼす

高活性 siRNA のデザインルールとして、(1) ガイド鎖の 5'末端が A または U、(2) パッセンジャー鎖の 5'末端が G または C、(3) ガイド鎖の 5'末端側 7 塩基中の 4 塩基以上は A または U であることが提唱されているが、このうち、「(1) ガイド鎖 5'末端が A または U であること」の重要性を再確認しつつ、5'末端一塩基置換が siRNA 活性に与える影響を検証する目的で、Luciferase mRNA を標的とし、ガイド鎖 5'末端を天然塩基間で置換した siRNA を 5 配列デザインした。各 siRNA 配列のガイド鎖 5'末端塩基をそれぞれ A、G、C、U に置換するのに伴い、パッセンジャー鎖の相補塩基もガイド鎖 5'末端置換塩基の相補塩基に置換した siRNA 配列 (5 配列それぞれのガイド鎖 5'末端を天然塩基 4 種類に置換した計 20 配列) を合成し、Luciferase 発現 HeLa 細胞にリポフェクション試薬 RNAiMAX で 100 pM siRNA 導入 24 時間後の Luciferase 発光レベルを観察することで siRNA 活性評価を行った。

siRNA 活性評価の結果、5 本全ての配列で 5'末端に A もしくは U を持つ siRNA は、5'末端が G もしくは C である siRNA よりも高い発現抑制活性を示した(図 9)。今回得られた siRNA 活性の 5'末端塩基バイアスは、上記 siRNA デザインルール「ガイド鎖 5'末端が A もしくは U をもつ配列の方が 5'末端 C もしくは G よりも高活性を出し易い」と一致する上、5'末端 1 塩基のみの置換によっても siRNA 活性に影響を及ぼすことが確認された。その際に、5'末端 A と U の間における活性差は顕著でなく、5'末端 G と C の間においても同様に活性差は見られなかったことから、特に A/U と G/C の間での活性差が顕著であることが確認された。

上記の結果より、siRNA ガイド鎖 5'末端塩基の AGO2 MID ドメイン親和性は siRNA の活性に強く影響を及ぼすことが確認されたが、今回は外来遺伝子 Luciferase を対象とする細胞株を用いた実験であったため、動物モデルにおいて内在遺伝子を標的としても同様の結果が得られるか、引き続き動物モデルにおける初期検証を実施することとした。

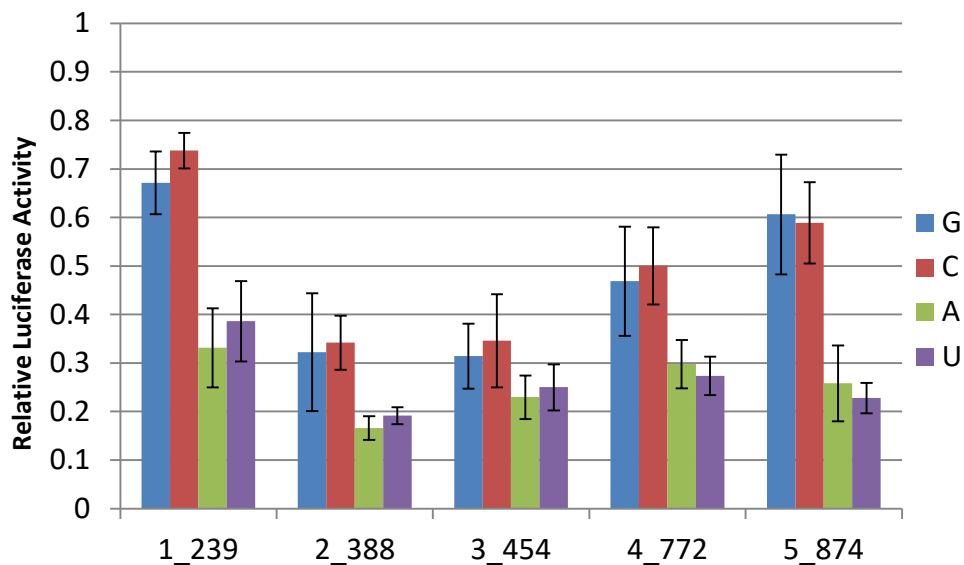


図 9 Luciferase 標的 siRNA に対するガイド鎖 5'末端 1 塩基置換効果

縦軸は siRNA 未導入群(陰性対照群)における発光量を 1 としたとき、ルシフェラーゼ標的 siRNA 100 pM 処理群の発光を、相対的な割合として平均値±SD として示した (n = 7)。

5 本全ての配列で 5'末端に A もしくは U を持つ siRNA は、末端が G もしくは C である siRNA よりも高い発現抑制活性を示し、siRNA ガイド鎖 5'末端塩基の AGO2 MID ドメイン親和性は siRNA の活性に強く影響を及ぼすことが確認された。一方、5'末端 A と U の間における活性差は顕著でなく、5'末端 G と C の間においても同様に活性差は見られなかったことから、特に A/U と G/C の間での活性差が顕著であることが確認された。

II.3 動物モデルにおいても 5'末端 1 塩基置換は siRNA 活性に影響を及ぼす

上項 II.2 において細胞株における Luciferase 標的 siRNA ガイド鎖 5'末端 1 塩基置換効果が確認されたことを受け、マウス動物モデルにおいても同様に siRNA ガイド鎖 5'末端 1 塩基置換効果が観察されるか、内在遺伝子を標的に初期検証を実施した。

コレステロール生合成に関わる遺伝子であるアポリポタンパク質 B (Apolipoprotein B: ApoB) を標的とする siRNA 配列のガイド鎖 5'末端塩基がプリン塩基骨格の A および G であり、パッセンジャー鎖側相補塩基はガイド鎖 5'末端 1 塩基置換に伴う相補塩基に置換した siRNA を合成した。脂質ナノ粒子 (LNP) に封入した 5'A ApoB 標的 siRNA 製剤および 5'G ApoB 標的 siRNA 製剤を Balb/cA マウスに静脈内投与し、動物モデルにおける両 siRNA の活性を比較した。製剤投与後 2 日目及び 7 日目に各個体の肝臓から total RNA 調製、cDNA 合成、qPCR を行い、標的である ApoB mRNA の肝臓発現レベルを解析することで、各 siRNA の活性を比較した。得られた ApoB mRNA の Ct 値を HPRT1 遺伝子の Ct 値で補正し、生理食塩水投与群の ApoB mRNA 発現量を 1 としたとき、各製剤投与群の ApoB mRNA 発現量を相対的な割合として算出した。得られた各群の ApoB mRNA 発現割合を平均±標準偏差で表した結果を図 10 に示す。0.1 mg siRNA/kg 投与によって、Day 2、Day 7 とともに 5'A ApoB 標的 siRNA は、5'G ApoB 標的 siRNA 以上にマウス肝臓における ApoB mRNA 発現抑制を示した(図 10)。この 5'末端バイアスは、siRNA においてガイド鎖 5'末端が A もしくは U をもつ配列の方が、5'末端 G もしくは C の siRNA よりも高活性を発揮し易いとのデザインルールと一致する上、マウス動物モデルにおいても 5'末端の 1 塩基構造のみの置換によって siRNA 活性が影響を受けることが確認された。

そこで本研究のコンセプトとした「siRNA 5'末端に搭載可能なヒト AGO2 高親和性非天然塩基の創出による siRNA 活性向上策」の研究を継続することとし、次頁の 5'末端非天然塩基置換の初期検討を実施することとした。

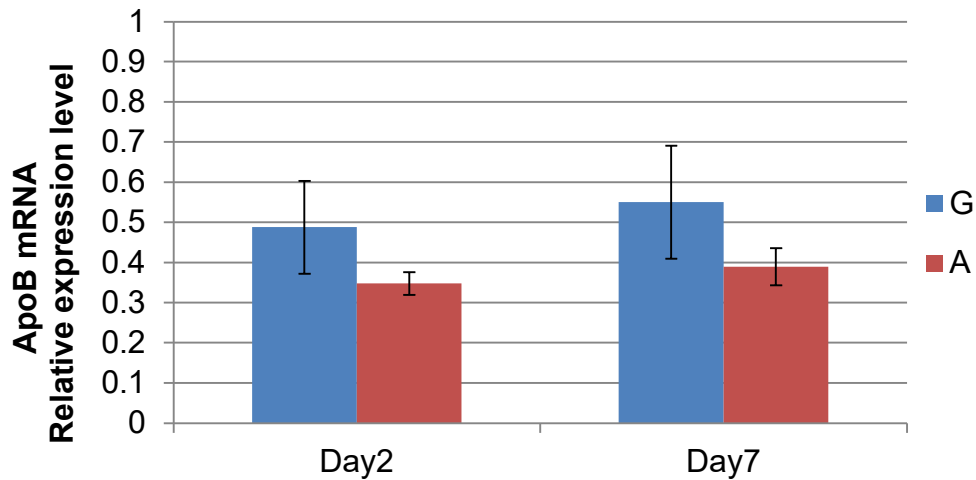


図 10 マウス動物モデルにおける肝臓中 ApoB mRNA 発現解析結果

0.1 mg siRNA/kg 投与後 Day 2 および Day 7 におけるガイド鎖 5'末端 A および G の ApoB mRNA 標的 siRNA 活性を示す。非投与群における肝臓中の ApoB mRNA 発現量を1とした時の各 siRNA 投与群の相対的発現割合として平均値±SD として示した。(n = 3)

Day 2、Day 7 ともに 5'A ApoB 標的 siRNA は、5'G ApoB 標的 siRNA 以上にマウス肝臓における ApoB mRNA 発現抑制を示したことから、マウス動物モデルにおいても 5'末端の 1 塩基構造のみの置換によって siRNA 活性が影響を受けることが確認された。

II.4 無作為な 5'末端塩基改変では siRNA 活性は増強しない

siRNA ガイド鎖 5'末端の人工塩基置換によって siRNA 活性が増強することを期待し、5'末端のリン酸、糖、塩基で構成されるヌクレオチドモノマーであり、siRNA ガイド鎖 5'末端への配置が可能な人工塩基核酸を 6 種選定した(図 11)。ただし、この人工塩基 6 種選定に際しては AGO2 MID ドメイン構造に対する構造的適合性は考慮に入れず、市販品として入手可能であり、siRNA オリゴ合成にも供することが可能であることのみを選定指標とした。

上項 II.3 で用いたガイド鎖 5'A ApoB 標的 siRNA を母配列に、ガイド鎖 5'末端 1 塩基を 6 種人工塩基に置換した siRNA を委託合成後、それぞれの siRNA 活性はヒト肝細胞株 HepG2 を用いた ApoB mRNA 発現解析系によって評価した。市販のリポフェクション試薬である RNAiMAX 試薬を用いて HepG2 細胞へ siRNA を導入した 24 時間後に total RNA を抽出し、逆転写反応後に ApoB mRNA 及び HPRT1 mRNA 発現量を定量 PCR(qPCR)にて解析した。得られた ApoB mRNA の Ct 値を HPRT1 の Ct 値で補正し、無処群の ApoB mRNA 発現量を 1 としたときの相対的な割合として siRNA 処置サンプルの ApoB mRNA 発現量を算出した。その結果は図 12 に示す。解析の結果、ガイド鎖 5'末端を各種人工塩基に置換した ApoB siRNA は 5'末端にアデニンを有する ApoB A siRNA と比較して同等以下の活性を示し、今回選択した人工塩基によるガイド鎖 5'末端置換は許容されないと判断した。

以上より、無作為なガイド鎖 5'末端の人工核酸塩基置換は許容されず、siRNA の機能は維持されるどころか、むしろ活性喪失につながることを確認した。siRNA ガイド鎖 5'末端は RISC 複合体形成過程、特に初期相互作用過程に重要な機能を有することが明らかになっていることから、やはり AGO2 MID ドメイン構造情報に基づき、ガイド鎖 5'末端置換用人工塩基を戦略的に探索することが重要であると考察した。そこで AGO2 MID ドメイン構造情報を活用した SBDD に基づく人工塩基探索に挑戦すべく、SBDD の重要パートを構成する構造情報解析、構造生物学研究、合成研究に専門性を持つ研究員との共同研究プロジェクト体制を立ち上げ、各専門家との議論と協力を仰ぎながら引き続き、AGO2 MID ドメイン高親和性結合素子の探索を継続することとした。

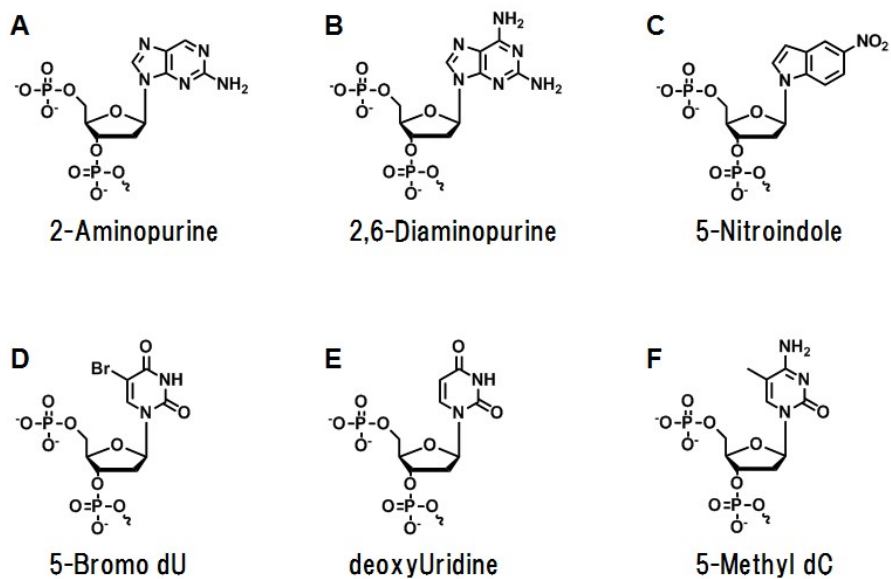


図 11 オリゴ合成向けに市販入手可能であった 5'末端改変用塩基

siRNA ガイド鎖 5'末端の人工塩基置換によって siRNA 活性が増強することを期待し、委託合成可能であり、siRNA ガイド鎖 5'末端に置換可能な人工塩基修飾核酸を 6 種選定した。ただし上記の人工塩基 6 種選定に際しては AGO2 MID ドメイン構造に対する構造的適合性は考慮に入れず、市販品として入手可能であり、siRNA オリゴ合成にも供することが可能であることのみを選定指標とした。

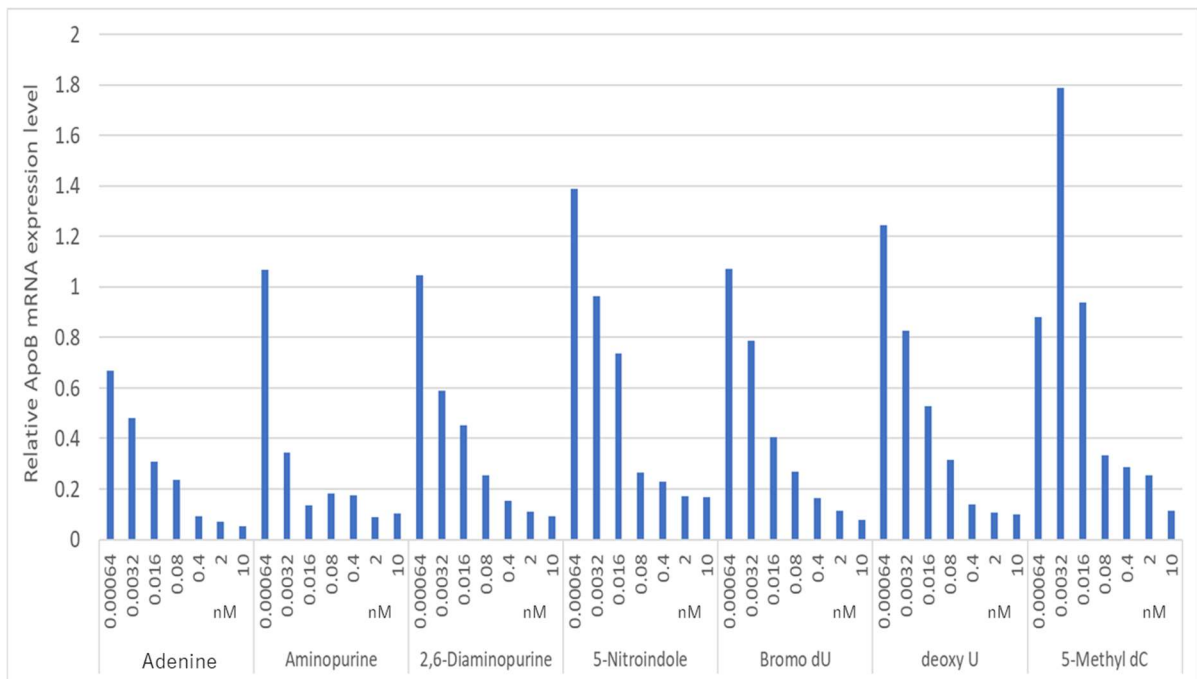


図 12 ガイド鎖 5'末端を各種人工塩基に置換した ApoB siRNA 活性評価 (HepG2)

ガイド鎖 5'末端 A および各人工塩基に置換した ApoB mRNA 標的 siRNA 活性を示す。無処理群における ApoB mRNA 発現量を 1 とした時の各 siRNA 処理群の相対的発現割合として ApoB mRNA 発現量を示した。(n = 1)

ガイド鎖 5'末端を各種人工塩基に置換した ApoB siRNA は 5'末端にアデニンを有する siRNA と比較して同等以下の活性を示したことから、AGO2 MIDドメイン構造に対する構造的適合性を考慮しない無作為なガイド鎖 5'末端の人工核酸塩基置換は許容されず、siRNA 活性は喪失することを確認した。

II.5 ヒト AGO2 タンパク質の MID ドメイン構造は低分子誘導体展開に適する

標的タンパク質と結合リガンドとの複合体構造情報が既知の場合、計算化学的アプローチにより、リガンド結合ポケットの解析、新規の相互作用ポイントの同定が可能となる。さらにはその解析結果に基づき、ヴァーチャルスクリーニングによって市販化合物中から既知リガンド以上の結合能を持つリガンド候補を選定し、リード創製、周辺 SAR の取得、合成デザインに結びつけることが可能となる場合もある。そこでヒト AGO2 MID ドメインと AMP、UMP の複合体の X 線結晶構造情報を用いて(Frank et al. 2010)、天然核酸塩基以上に結合能のある非天然を見出せないか、構造計算専門家との議論と解析を行った。協議の結果、図 13 に示すスキームを設定し、以下①から③を意図したヒト AGO2 MID ドメイン内核酸塩基結合ポケットの分析が行われた。

- ① 更なる親和性向上に向けた、AMP/UMP と AGO2MID ドメインの既知構造情報からの新規の相互作用ポイント候補部位の抽出
- ② 市販化合物中から天然核酸以上の結合能が期待できる非天然核酸アナログの選定
- ③ AGO2 MID ドメインとの化学的・形状相補性を高め、活性向上が期待できる核酸改変案を含む合成展開方針の提案とデザイン

ヒト AGO2 MID ドメインの AMP/UMP 結合部位周辺の 14 Å 以内にあるアミノ酸残基に対し、独自に *in silico* ポケット解析が行われた結果、推定リガンド結合ポケットが同定された。その結果、AMP/UMP 結合部位周辺で、天然塩基側鎖の合成展開が可能な空間と表面電荷、疎水性環境等の新規相互作用獲得可能性が見出された。これらの空間と新規相互作用可能性部位に対して核酸塩基の構造を最適化すれば AGO2 MID ドメインと新規の相互作用を獲得し、siRNA ガイド鎖 5'末端と AGO2 間の結合力増強ならびに RISC 形成効率向上により、結果として siRNA 活性向上につながることを期待された。MID ドメインと AMP/UMP 両複合体の X 線結晶構造に水素原子を付加し、構造最適化を実施後、複合体中から、AMP/UMP、水分子を取り出し、リガンド結合ポケット内のマッピングが実施された。その結果、AMP/UMP 結合部位における、水素結合受容体(赤)、供与体(青)、疎水性原子(ライム)の理想配置が得られ、それぞれ赤、青、緑の等値面のメッシュとして表記された図 14 と、相互作用部位解析結果として図 15 が得られた。マッピングの結果から、ヒト AGO2 MID ドメインのループとの相互作用において、UMP の Uracil の 3 位、4 位部分はほぼ最適で、更なる誘導体展開の余地が少ないのに対し、AMP の

Adenine では、1 位部分は最適で、UMPの方がAMPよりもAGO2 MIDドメインへの親和性が高いとの Frank ら既報(Frank et al. 2010)を反映する結果が得られた。興味深いことに、AGO2 側からは、Adenine の 6 位アミノ基部分は、疎水性原子の配置が好まれることが示唆され、AGO2 親和性向上に向けた今後の誘導体展開での活用が期待できた。

化合物デザインへの活用に向け、ポケット解析とマッピング結果を統合した結果、Uracil の 5 位には水素結合供与体、6 位には van der Waals 相互作用もしくは Tyr529 との π - π スタッキングを狙える置換基の導入、または誘導体展開が望ましいことが示唆された。また Adenine に関しては、五員環部分ですでに Tyr529 と π - π スタッキングを形成していることから、8 位には van der Waals 相互作用が獲得できる置換基、6 位には疎水性置換基の導入が望ましいことが示唆された(図 16)。

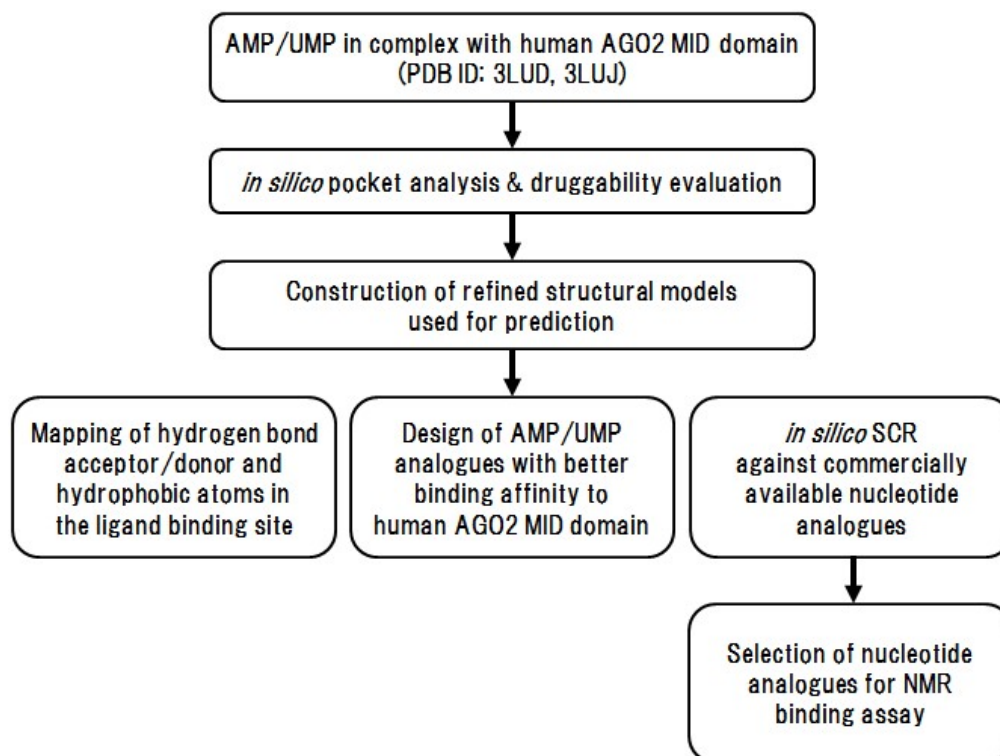


図 13 flow diagram of the computational methods used in this study

以下のスキームに則り、次の①から③を意図したヒト AGO2 MID ドメイン内核酸塩基結合ポケットの分析が行われた。

- ① 更なる親和性向上に向けた、AMP/UMP と AGO2 MID ドメインの既知構造情報からの新規の相互作用ポイント候補部位の抽出
- ② 市販化合物中から天然核酸以上の結合能が期待できる非天然核酸アナログの選定
- ③ AGO2 MID ドメインとの化学的・形状相補性を高め、活性向上が期待できる核酸改変案を含む合成展開方針の提案とデザイン

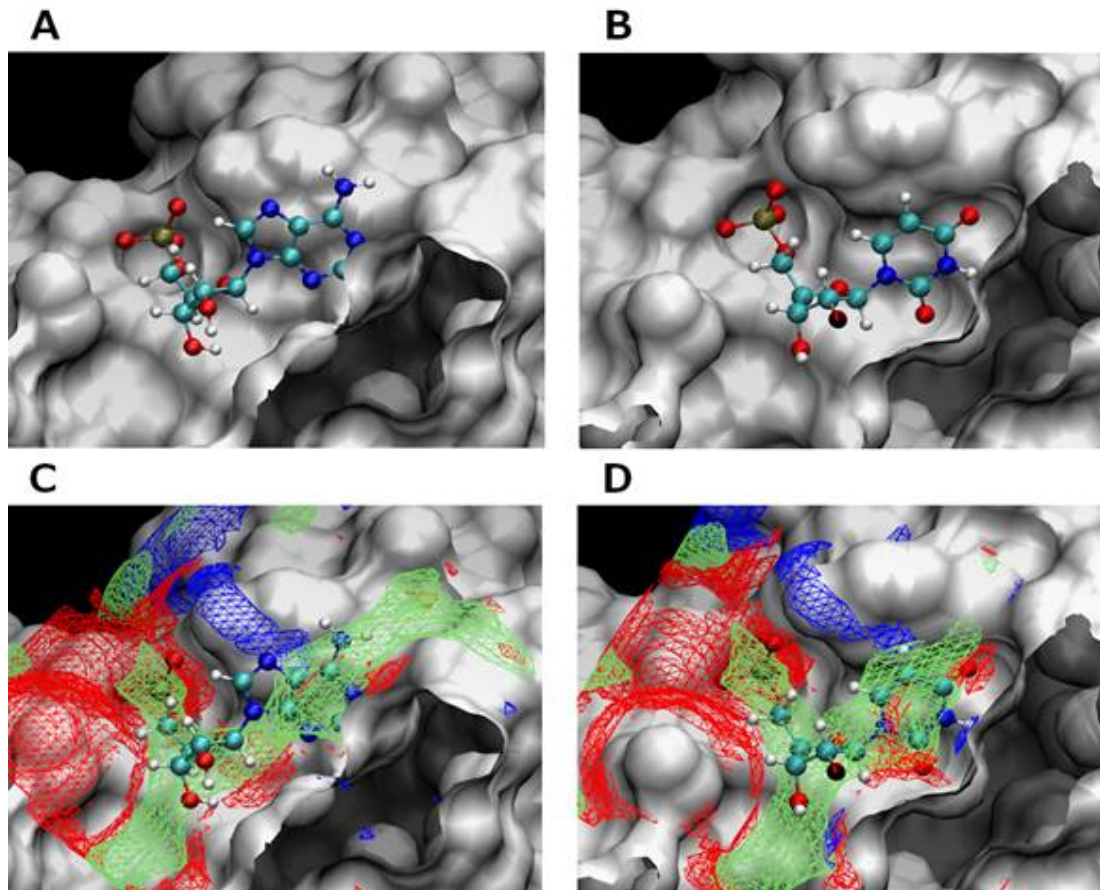


図 14 水素結合アクセプター(赤メッシュ)、水素結合ドナー(青メッシュ)、および疎水性部分(緑メッシュ)の高確率等値面 (A)AMP 結合様式モデル、(B)UMP 結合様式モデル、(C)ワイヤーフレーム付きの AMP 結合様式モデル、(D)ワイヤーフレーム付きの UMP 結合様式モデル。AMP と UMP は球とバーで表現し(水素:白、炭素:水、窒素:青、酸素:赤、リン:黄色)、AGO2 タンパク質分子表面は白で表示した。

マッピングの結果から、ヒト AGO2 MIDドメインのループとの相互作用において、UMP の Uracil の 3 位、4 位部分はほぼ最適であること、AMP の Adenine の 1 位部分は最適であるが、6 位アミノ基部分は、疎水性原子の配置が好まれることが示唆され、AGO2 親和性向上に向けた今後の誘導体展開の方向性が示された。

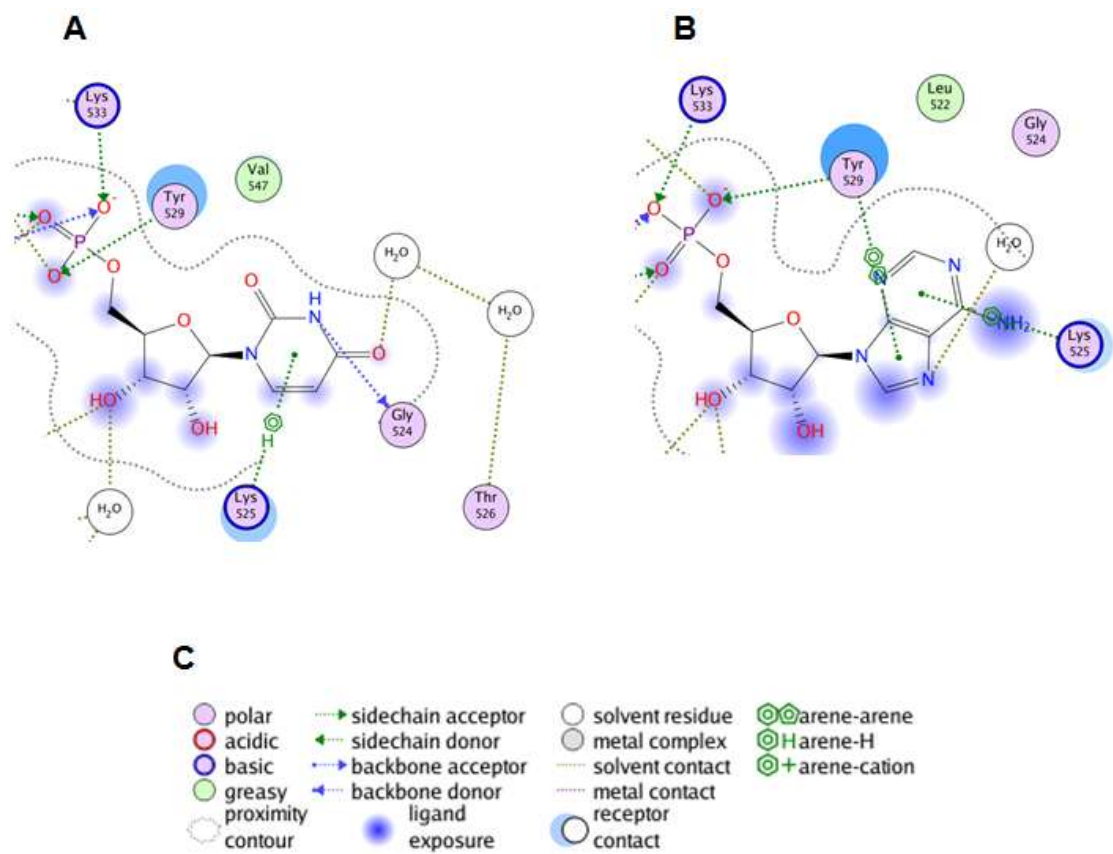


図 15 hAGO2/UMP、hAGO2/AMP 複合体モデル解析に基づく相互作用点分析結果

(A) 構造モデル解析に基づく UMP と hAGO2 MID ドメイン間の相互作用分析(2D 表現)。ウラシルは、Gly524 バックボーンであるカルボニルと水素結合を形成し、UMP と Tyr529 の間に π - π スタッキングは観察されない。(B) 構造モデル解析に基づく AMP と hAGO2 MID ドメイン間の相互作用分析(2D 表現)。は、hAGO2 の AMP と Tyr529 の間で π - π スタッキングが観察される。(C) 2D ダイアグラムの詳細説明。

マッピングの結果から UMP の Uracil の 3 位、4 位部分はほぼ最適であること、AMP の Adenine の 1 位部分は最適であるが、6 位アミノ基部分は、疎水性原子の配置が好まれることが示唆され、AGO2 親和性向上に向けた今後の誘導体展開の方向性が得られた。

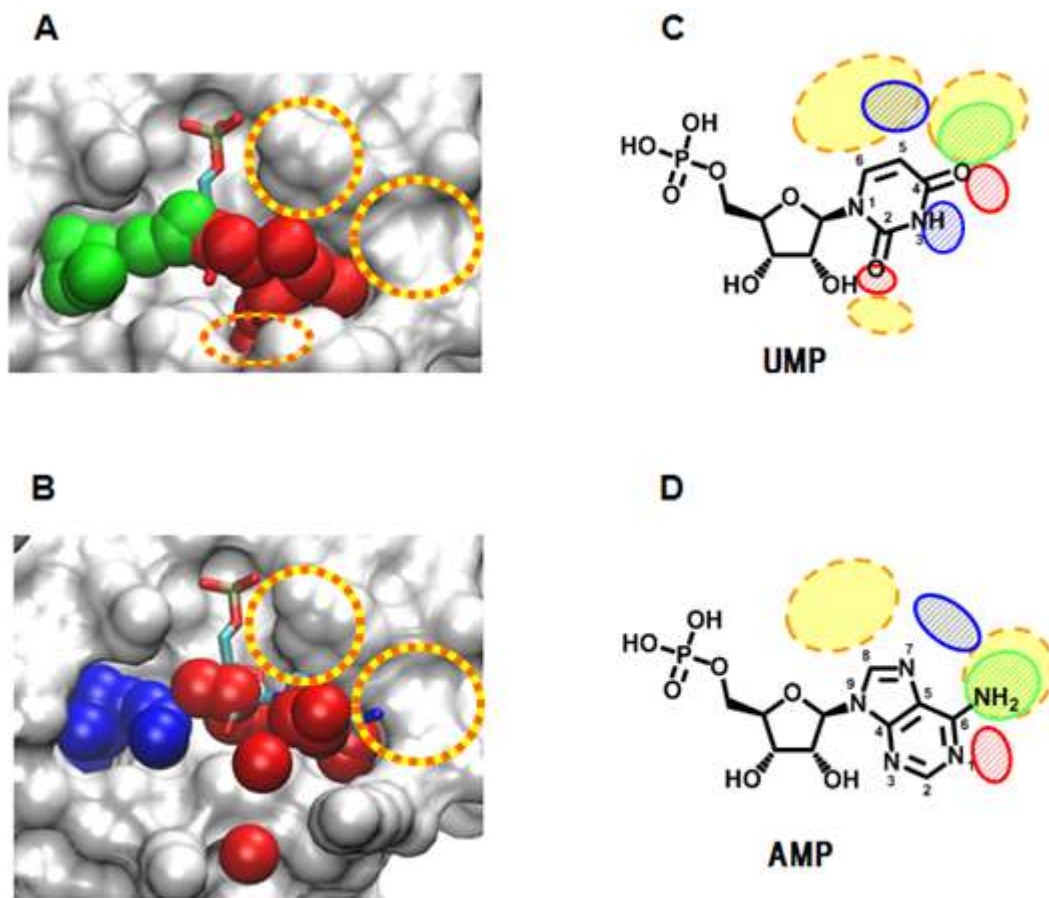


図 16 誘導展開への参照を意図した hAGO2 との新規相互作用候補点の抽出と化学的特徴

(A, B) hAGO2 MIDドメインへの結合親和性増強を狙い構造拡張可能な領域が黄色の円で示されている。(C, D) マッピング分析から得られた新規相互作用が期待できる空間領域と (C) UMP、(D) AMP のオーバーレイ。水素結合形成候補部位(赤:受容体、青:供与体)、疎水性環境(緑)、新規相互作用が期待できる空間領域(黄色)で示す。

Uracil の 5 位には水素結合供与体、6 位には van der Waals 相互作用もしくは Tyr529 との π - π スタッキングを狙える置換基の導入、または誘導体展開が望ましいことが示唆された。また Adenine に関しては、五員環部分ですでに Tyr529 と π - π スタッキングを形成していることから、8 位には van der Waals 相互作用が獲得できる置換基、6 位には疎水性置換基の導入が望ましいことが示唆された。

II.6 市販化合物を対象にした *in silico* SCR による 8-Br AMP の取得

上記 II.5 の解析結果に基づき、5'末端置換による siRNA 活性増強を意図した AGO2 MID ドメイン高親和性結合素子探索の議論と取り組みを継続した。MID ドメインの分析結果に合致する新規塩基アナログの取得に際し、まずは市販化合物中からコンセプト検証用塩基アナログを取得できないか、市販化合物ライブラリを対象に *in silico* での計算と探索を行うこととした。市販試薬データベース(Available Chemicals Directory (Dassault Systèmes BIOVIA (San Diego)))約 510 万種から、II.5 項において抽出された AGO2 MID ドメイン新規相互作用候補点との相互作用が期待でき、かつ 5'リン酸基を有するヌクレオチド誘導体として 8-Br AMP(図 17)が選択された。この 8-Br AMP 構造を用い、ヒト AGO2 MID ドメインとの予想複合体構造と、相互作用解析を *in silico* で計算した結果は、図 18 の 3D、2D から成る相互作用分析マップとして示す。計算による相互作用分析の結果、8-Br AMP のリン酸基と hAGO2 MID ドメイン中の Lys533 は静電相互作用し、Gln545 とは水素結合を形成すること、8-Br AMP のアデニン 1 位 N と Thr526 とは水素結合を形成し、8-Br AMP リボースの 2'OH と Gln548 とで水素結合が増強される可能性が示唆された。更に 8-Br AMP 8 位 Br 基と Tyr529 は van der Waals 相互作用が増強されることも示唆された。以上の計算結果からは、8-Br AMP では、上記の相互作用により、hAGO2 MID ドメインに対して AMP と同等以上の結合親和性が獲得できる可能性が示唆された。そこで上記に得られた結果に基づき、本研究においてまずは 8-Br AMP の評価を通じて AMP 8 位側鎖変換の有用性と AGO2 MID ドメイン高親和性人工核酸取得研究のコンセプト検証を行うことにした。

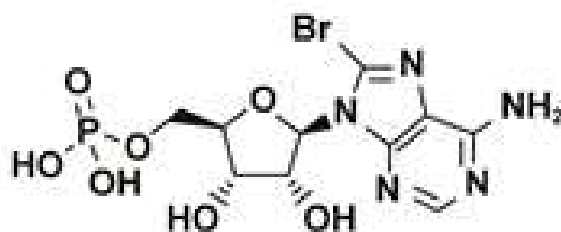


図 17 8-Br AMP の構造

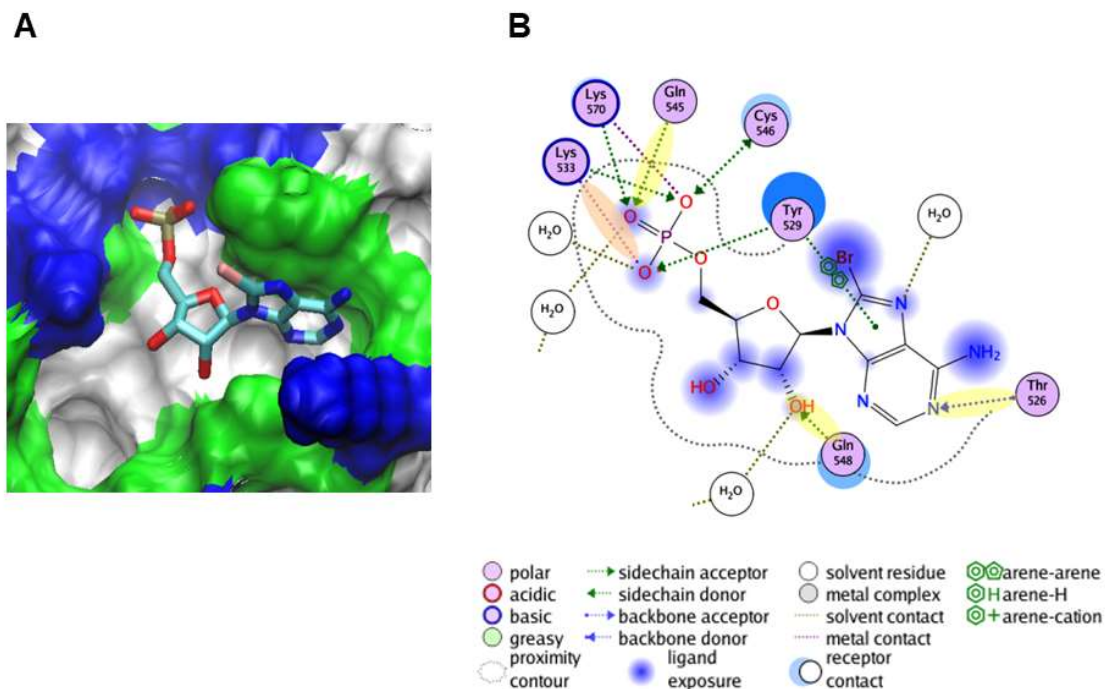


図 18 ヒト AGO2 MID ドメインへの 8-Br AMP の予測される結合モードと相互作用分析

(A) ヒト AGO2 MID ドメインへの 8-Br AMP の予測 3D 結合モード。(B) 8-Br AMP とヒト AGO2 MID ドメイン間の主要な相互作用の 2D 表現。黄色で網掛けされた 3 つの水素結合とオレンジで網掛けされた 1 つの静電相互作用が 8-Br AMP においては強化される計算結果が得られた。

8-Br AMP のリン酸基と hAGO2 MID ドメイン中の Lys533 は静電相互作用を、Gln545 とは水素結合を形成し、8-Br AMP のアデニン 1 位 N と Thr526 とは水素結合を形成し、8-Br AMP リボースの 2'OH と Gln548 とで水素結合が増強される可能性が示唆された。更に 8-Br AMP 8 位 Br 基と Tyr529 は van der Waals 相互作用が増強されることも示され、8-Br AMP では、AMP と同等以上の結合親和性が獲得できる可能性が示唆された。そこでまずは 8-Br AMP の評価を通じて AMP 8 位側鎖変換の有用性と AGO2 MID ドメイン高親和性人工核酸取得研究のコンセプト検証を行うこととした。

II.7 8-Br AMP は AGO2 MIDドメイン結合が増強する(Biacore 実験)

前項 II.6 において 8-Br AMP が AGO2 MIDドメインに結合することが *in silico* 計算解析の結果として示唆されたことを受け、8-Br AMP の結合親和性評価を目的に Biacore による AGO2 MIDドメインと核酸ヌクレオチドモノマーの結合実験評価系を構築した。ガイド鎖の 5'末端にリン酸基を持つ siRNA は、パッセンジャー鎖側の 5'末端に修飾したビオチンによって、ストレプトアビジン固定化 Biacore チップ基盤(Sensor Chip SA)に固定した。AGO2 MIDドメインタンパク質を流路に流す系を基本に、更に同系に阻害剤として各ヌクレオチドモノマーを共添加した際の MIDドメインと基盤固定化 siRNA オリゴの結合阻害の度合いを評価した。ヌクレオチドモノマーによる MIDドメインタンパク質と基盤に固定した siRNA の結合阻害強度を指標に、MIDドメインタンパク質に対する各ヌクレオチドモノマーの親和性が評価可能となる条件を検討した(図 19)。解析では、Biacore T200 Evaluation Software を用い、solvent correctionを実施した。その後、固定化したセルのグラフからブランク固定をしたグラフを差し引いたグラフの binding level を使用し、残存結合率(%)を $([\text{Sample}] - [\text{BLANK}]) / ([\text{CONTROL}] - [\text{BLANK}]) \times 100$ で算出し、阻害率(%)を $100 - (\text{残存結合率})$ で算出した。この実験条件により、ヌクレオチドモノマーの AGO2 MIDドメイン結合親和性に応じて siRNA と AGO2 MIDドメインとの結合が阻害されること、その阻害の程度を指標に各ヌクレオチドモノマーの AGO2 MIDドメインとの親和性も判断することが可能となった。

AGO2 MIDドメインと pC 末端オリゴとの結合阻害レベルは AMP ヌクレオチドモノマーで 4、20、100 μM 添加時でそれぞれ 10.5%、11.5%、21%であるのに対し、8-Br AMP ヌクレオチドモノマー4、20、100 μM 添加時では 7.5%、22.9%、49.0%の結合阻害を確認した(図 20)。以上より、8-Br AMP は MIDドメインと相互作用し、MIDドメインに結合可能であること、特に高濃度で AMP 以上の結合阻害を観察したことから、AMP 以上に MIDドメインに結合可能であることが示唆された。前項 II.6 の *in silico* 計算解析においても 8-Br AMP が AGO2 MIDドメインに高親和性に結合する可能性、8位 Br と Tyr529 との van der Waals 相互作用による結合親和性増強も示唆されていたことから実際の 8-Br AMP/AGO2 MIDドメイン複合体結晶構造解析を行うことにより、Biacore 実験結果から得られた 8-Br AMP の強阻害、ならびに *in silico* 分析結果の検証も可能か、検討することとした。

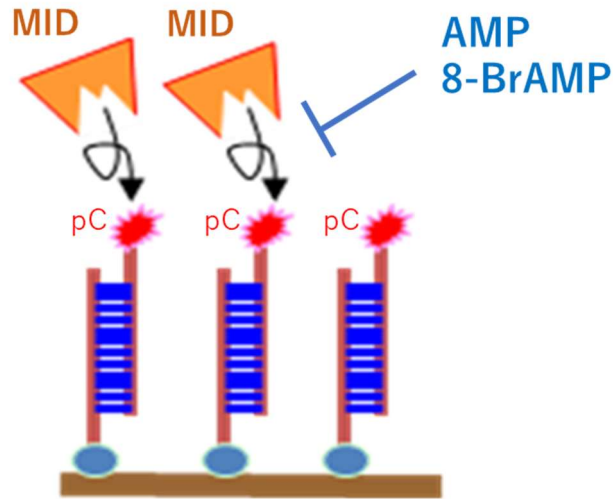


図 19 AGO2 MIDドメイン/5'末端 pC オリゴを用いた Biacore 結合阻害系模式図

siRNA ガイド鎖 5'末端に 5'末端リン酸基を持ち、パッセンジャー鎖 5'末端側にビオチン標識した siRNA を、パッセンジャー鎖 5'末端側でストレプトアビジン固定化 Biacore チップ基盤 (Sensor Chip SA) に固定した。AGO2 MID ドメインタンパク質を流路に流す系を基本に、更に同系に阻害剤として各ヌクレオチドモノマーを共添加した際の MID ドメインと基盤固定化 siRNA オリゴの結合阻害の度合いを評価した。

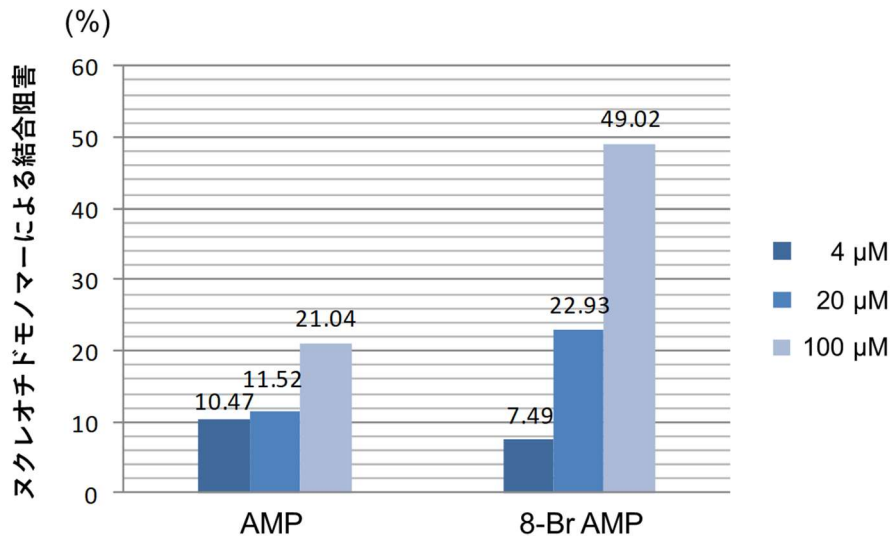


図 20 Biacore によるヌクレオチド単体の AGO2 MIDドメイン結合親和性評価結果

AMP、8-Br AMP を 4 μM、20 μM、100 μM で共添加した際の MID ドメインタンパク質と基盤固定化済み siRNA との結合阻害強度を示す。

AGO2 MIDドメインと pC 末端オリゴとの結合阻害レベルは AMP ヌクレオチドモノマーで 4 μM、20 μM、100 μM 添加時でそれぞれ 10.5%、11.5%、21%であるのに対し、8-Br AMP ヌクレオチドモノマーでは 7.5%、22.9%、49.0%の結合阻害を示したことより、8-Br AMP は MIDドメインに結合可能であり、AMP 以上に MIDドメインに結合親和性を持つことが示唆された。

II.8 8-Br AMP は Y529 と新たな疎水性相互作用を形成する(X線結晶構造解析)

前項 2.5 および 2.6 から市販品として入手した 8-Br AMP が AMP 以上に MID ドメインに結合する可能性が *in silico* 計算解析ならびに Biacore による結合阻害実験で示唆されたことを受け、結晶構造解析に専門性を持つ研究員へ本研究のコンセプト、ならびに AGO2 MID ドメイン構造に関する知見、これまで取得されたデータに基づく協議を行い、8-Br AMP の MID ドメイン結合様式を X 線結晶構造解析で同定する実験を実施した。

AGO2 MID ドメインへの 8-Br AMP の正確な結合モードを決定する目的で、以前に複数のグループから報告された結晶構造解析方法に基づき、8-Br AMP と AGO2 MID ドメインの複合体結晶構造解析が実施された(Frank et al. 2010; Schirle et al. 2014)。得られた X 線開設データは AMP と AGO2 MID ドメイン複合体のデータベース登録情報(PDB ID: 3LUD)を初期モデルとして解析された。この構造データを基に電子密度を計算し、アデニン環 8 位に Br 基に相当する高い余剰の電子密度が確認された。そこで、8-Br AMP を AMP と置き換えてモデルに追加し、電子密度に当てはめたところ、8-Br AMP の配座が妥当であることも確認された。すなわち AMP ならびに 8-Br AMP の両構造を比較した際、両方の錯体のリン原子とリボース原子の位置は、2 つの構造間で同様に配置されていることが確認できた。また、AMP ならびに 8-Br AMP のアデニン塩基部位は、AGO2 MID ドメインによる 5'-リン酸認識および核酸塩基結合ポケットを構成する Y529 に対してスタックしつつ、更に 8-Br AMP では 8 位の Br 基により Y529 と新たな疎水性相互作用が追加されていることが示唆された。得られた X 線結晶構造解析データは PDB ID 7D7U としてデータベース登録された(図 21)。

以上の結果は、計算による 8-Br AMP の予測結合様式の考察と同様の結果であることから *in silico* 計算結果の妥当性を示すとともに、Biacore 実験による 8-Br AMP の AGO2 MID ドメイン/5'末端結合の強阻害も裏付ける結果となった。以上より独自かつ新規なヒト AGO2 MID ドメイン高親和性結合非天然核酸 8-Br AMP を見出すに至ったと判断した。

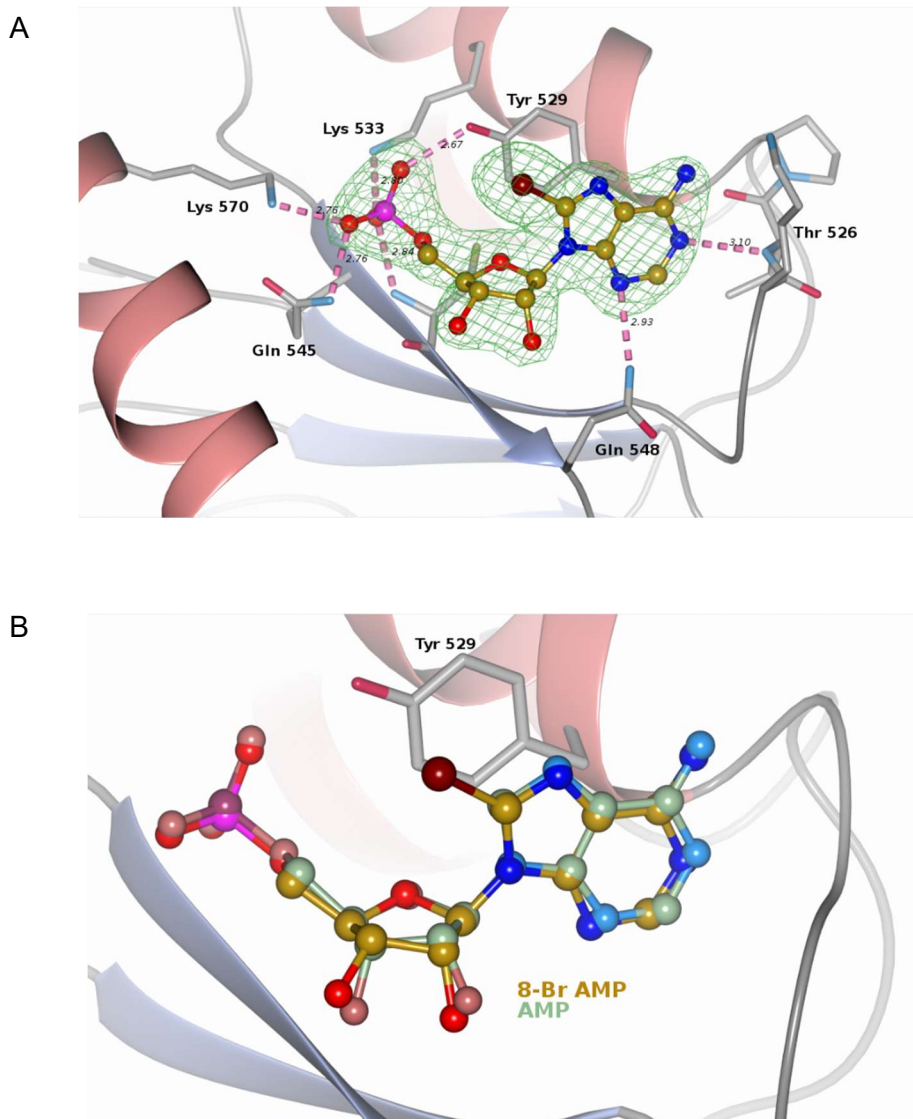


図 21 8-Br AMP と AGO2 MIDドメインの X 線結晶構造解析結果 (A)8-Br AMP 電子密度と、AGO2 MIDドメインとの相互作用 (B) 8-Br AMP と AMP それぞれの AGO2 MIDドメインとの複合体構造のオーバーレイ。

AMP ならびに 8-Br AMP の両構造を比較した際、両方の錯体のリン原子とリボース原子の位置は、2つの構造間で同様に配置されていることが確認された。また、AMP ならびに 8-Br AMP のアデニン塩基部位は、AGO2 MIDドメインによる 5'-リン酸認識および核酸塩基結合ポケットを構成する Y529 に対してスタックしつつ、更に 8-Br AMP では 8 位の Br 基により Y529 と新たな疎水性相互作用が追加されていることが示唆された。

II.9 AMP 6 位展開によるアナログ候補としての 6-mCEPh-purine デザイン

前項 II.8 において AMP 8 位誘導体 8-Br AMP を AGO2 MID ドメイン高親和性人工核酸として取得したため、AMP の 6 位で展開する人工塩基を取得することを目的に探索を継続した。II.5 項においては Adenine の 6 位アミノ基周辺環境は疎水性環境であり、疎水性原子の配置により AGO2 MID ドメイン結合親和性向上も期待できるとの分析結果が得られていたことから、これら AMP 6 位周辺環境分析に基づき、誘導体展開の可能性を協議継続した。*In silico* 解析の結果からは AMP 6 位周辺は疎水性環境であり、AMP 6 位を疎水性側鎖に置換することで MID ドメインに対する結合親和性が増強することが期待されていた。この AMP 6 位には本来 N6 アミノ基が位置しているが、この N6 アミノ基は AGO2 MID ドメインのヌクレオチド特異性ループとは明確な相互作用を示さないことから AGO2 MID ドメインへの結合における寄与が小さい側鎖であることは既報からも示唆されていた(Frank et al. 2010)。そこで、この N6 アミノ基を疎水性側鎖であるフェニル基に置換することを決定した。さらに AMP 6 位周辺の *in silico* 分析結果からは、疎水性環境の延長上には Lys525 が位置しており、この Lys525 と静電的相互作用を形成することができれば新たな相互作用獲得と MID ドメイン結合親和性増強の可能性も示唆されたことから、AMP 6 位に新たに導入を判断したフェニル基の先には、さらに酸性官能基であるカルボキシル基も備えた 6-(3-(2-carboxyethyl)phenyl)purine (6-mCEPh-purine) (図 22) がデザインされた。6-mCEPh-purine の合成手順の詳細については、材料と方法に記述する。

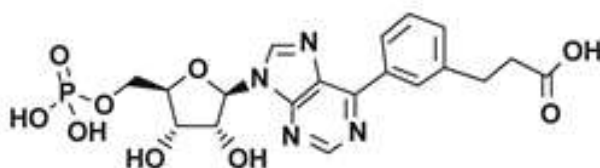


図 22 6-(3-(2-carboxyethyl)phenyl)purine (6-mCEPh-purine) 構造

II.10 6-mCEPh-purine も AGO2 MID ドメイン結合親和性が増強する (Biacore)

II.7 項において Biacore 実験系により 8-Br AMP の AGO2 MID ドメイン結合能を評価実施したのと同様に、6-mCEPh-purine の AGO2 MID ドメイン結合親和性を評価する目的で 6-mCEPh-purine モノマーを Biacore 結合実験にて評価した。II.7 項と同様、Biacore 基板の上に 5'末端リン酸基を有するシントシンを固定化させ、AGO2 MID ドメインを流路に流す系を基本として、同系に阻害剤として各ヌクレオチド添加し、その阻害の強さを評価することで MID ドメインに対する結合親和性を評価した。解析では、Biacore T200 Evaluation Software を用い、solvent correction を実施した。その後、固定化したセルのグラフからブランク固定をしたグラフを差し引いたグラフの binding level を使用し、残存結合率(%)を $([\text{Sample}]-[\text{BLANK}])/([\text{CONTROL}]-[\text{BLANK}]) \times 100$ で算出し、阻害率(%)を $100-(\text{残存結合率})$ で算出した(図 23)。天然塩基 AMP と同様に 6-mCEPh-purine は AGO2 MID ドメインとチップに固定したオリゴ核酸との結合を阻害したことより、6-mCEPh-purine も AGO2 MID ドメインに結合可能であることが示唆された。0.8 μM と 4 μM の低濃度添加域においては AMP の阻害強度が高い一方、20 μM と 100 μM の高濃度添加域においては 6-mCEPh-purine がより強い阻害を見せた。特に 6-mCEPh-purine 100 μM 添加時に観察した約 8 割の阻害率は、8-Br AMP 100 μM 添加時の阻害率であった約 5 割と比較しても優位であったことから、6-mCEPh-purine は AGO2 MID ドメインに AMP と同様に結合するのみならず、AMP ならびに 8-Br AMP と比較して同等以上に AGO2 MID ドメイン結合親和性を有する可能性が示唆された。

II.6 項の *in silico* 構造解析結果に基づき、6-mCEPh-purine は AMP 6 位周辺の疎水性環境との相互作用ならびに疎水性環境延長上の Lys525 との静電的相互作用による新たな相互作用獲得の可能性を期待してデザインされた AMP アナログである。そこで実際の 6-mCEPh-purine/AGO2 MID ドメイン複合体結晶構造解析を行うことにより、Biacore 実験結果から得られた 6-mCEPh-purine の強阻害、ならびに *in silico* 分析結果に基づく 6-mCEPh-purine デザインの妥当性検証が可能か、検討することとした。

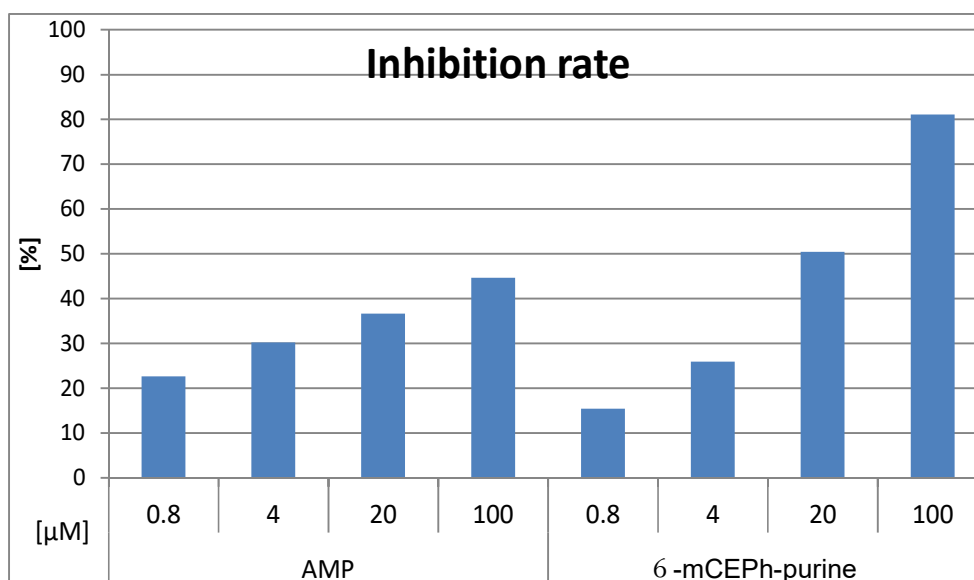
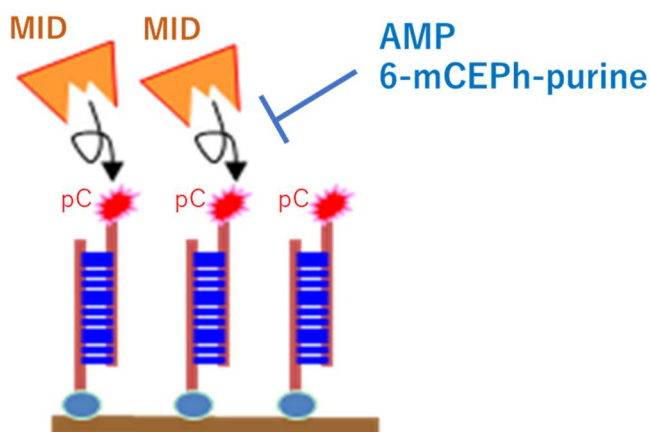


図 23 Biacore によるヌクレオチド単体の AGO2 MID ドメイン結合親和性評価結果

AMP ならびに 6-mCEPh-purine を 0.8 μM、4 μM、20 μM、100 μM で共添加した際の MID ドメインタンパク質と基盤固定化済み siRNA との結合阻害強度を示す。

天然塩基 AMP と同様に 6-mCEPh-purine も AGO2 MID ドメインに結合可能であることが示唆された。0.8 μM と 4 μM の低濃度添加域においては AMP の阻害強度が高い一方、20 μM と 100 μM の高濃度添加域においては 6-mCEPh-purine がより強い阻害を見せたことから、6-mCEPh-purine は AGO2 MID ドメインに AMP と同様に結合するのみならず、AMP と同等以上の AGO2 MID ドメイン結合親和性を有することが示唆された。

II.11 6-mCEPh-purine も AGO2 MID ドメインに結合する(X 線結晶構造解析)

II.8 項で実施の AGO2 MID ドメイン/8-Br AMP 複合体結晶構造解析と同様の方法で AGO2 MID ドメインと 6-mCEPh-purine の複合体結晶構造解析を実施した。構造解析の結果、AGO2 MID ドメインの 5'ヌクレオチド結合ポケットに 6-mCEPh-purine の明瞭な電子密度が確認され、構造精密化も踏まえた結果、AGO2 MID ドメイン/6-mCEPh-purine 複合体構造が 1.7 Å 分解能で決定された。結晶学的 R 因子は、Rwork/Rfree = 19.4%/22.9%であり、1.7 Å 分解能のデータとして妥当な値に収束していること、Ramachandran Plot により立体化学的に妥当な構造であることも確認され、未解釈の余剰電子密度がないことをもって構造解析が完了したと判断された。得られた結晶構造データは PDB ID: 7C6B としてプロテインデータバンクに登録された (図 24)。

6-mCEPh-purine のプリン塩基部分、及びリボース部分、5'リン酸基の相互作用は AGO2 MID ドメインと AMP 複体の相互作用と同様の結合様式であることを確認した。一方、プリン 6 位の 3-(2-carboxyethyl)phenyl 基の先端のカルボキシル基は、デザイン時には Lys525 とのイオン性相互作用を獲得することを期待していたが、実際の結晶構造解析結果からは Lys525 と強固な相互作用は形成しておらず、水分子を介して Thr526 主鎖カルボニルと相互作用していることが明らかとなった。この相互作用に関係している水分子はタンパク質分子の表面に位置しており、ポケット内部に束縛された水分子ではないため、これらの水分子を介した相互作用はそれほど強くないと考えられた。

今回の AGO2 MID ドメインと 6-mCEPh-purine の X 線結晶構造解析結果からは、6-mCEPh-purine が AMP とほぼ同様の結合様式で AGO2 MID ドメインに結合することが明らかになったものの、結合親和性の向上を示唆させる特定の新規相互作用部位を見出すことはできなかった。前項 II.10 のピアコア評価結果からは 6-mCEPh-purine が AGO2 MID ドメインに対して結合親和性が増強していることが示唆されていたことも受け、より詳細に結合親和性を評価可能な実験系として Frank ら(Frank et al. 2010)が AGO2 MID ドメインに対して天然塩基間の結合親和性の違いを評価した NMR 評価が必要と考えた。NMR に専門性を持つ研究員に Frank らの報告ならびに NMR 実験の趣旨を共有した上で、6-mCEPh-purine と 8-Br AMP の NMR 結合親和性評価を実施した。

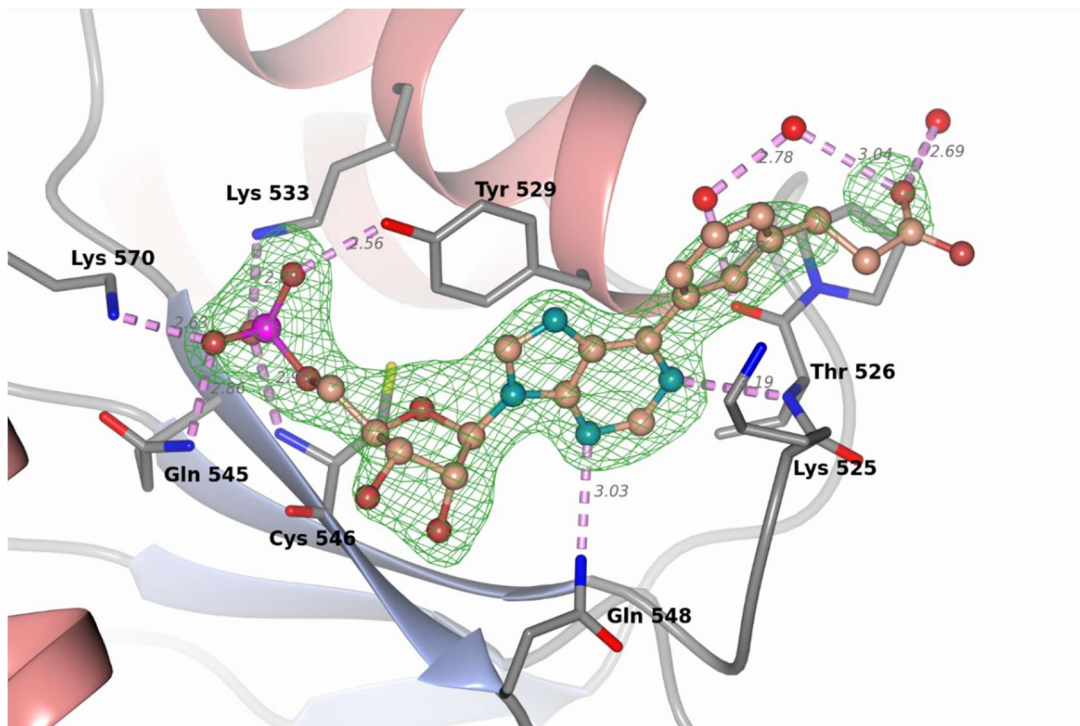


図 24 6-mCEPh-purine と AGO2 MID ドメインの X 線結晶構造解析結果

6-mCEPh-purine のプリン塩基部分、及びリボース部分、5'リン酸基の相互作用は AGO2 MID ドメインと AMP 複合体の相互作用と同様の結合様式であることが確認された。一方でプリン 6 位の 3-(2-carboxyethyl)phenyl 基の先端のカルボキシル基は Lys525 との強固な相互作用は形成せず、水分子を介して Thr526 主鎖カルボニルと相互作用していた。この水分子を介した相互作用だけでは 6-mCEPh-purine の結合親和性向上を説明できず、X 線結晶構造解析の結果のみでは明確な新規相互作用部位を見出すことはできなかった。

II.12 アデニン 6 位、8 位アナログは共に AGO2 MID 結合親和性が向上する(NMR)

前項 II.8 で得られた 8-Br AMP、II.9 で得られた 6-mCEPh-purine の結合親和性を評価するにあたり、Frank ら(Frank et al. 2010)の報告に基づく NMR 評価を実施した。II.7 項にて構築した Biacore 実験系はタンパク質と化合物間の結合の有無を評価する手法として多用される手法であるが、タンパク質のどの領域と結合するかまで判定することは難しい。II.8 項ならびに II.11 項で実施の X 線結晶構造解析では詳細な結合様式を決定できる一方、化合物の結合の強さや化合物が結合しないことを結論付けることは難しい。それらの点で NMR 評価系では、結合の有無に加え、帰属情報を利用することでどのアミノ酸残基と相互作用しているかも検出することが可能となる。そこで AGO2 MID ドメインのアミノ酸帰属情報も用いたヌクレオチドモノマー結合評価を目的として、AGO2 MID ドメインの NMR 信号の帰属と、当該ドメインを用いた結合実験系の構築、および AMP ならびに AMP 由来塩基アナログである 8-Br AMP、6-mCEPh-purine を用いた結合実験が行われた。

{¹³C,¹⁵N}ラベル化 AGO2 MID ドメインの主鎖 C^α, C^β, C', N_H, H_N の信号に対して、HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB, HNCO, HN(CA)CO, HSQC に関する測定法(John Cavanagh 2007)を用いた帰属が行われた結果、AGO2 MID ドメインの主鎖アミド NH における 97% の信号が帰属された(図 25)。主鎖にアミド水素を持たない Pro 残基は NMR では観測できないため、Pro 残基間に挟まれた塩基特異的認識ループ(specific loop)である Pro523-Pro527 も未帰属とされた。また、Leu540-Met542, Val547-Lys550 の NMR 信号も未帰属とされた。しかし、この大きさのタンパク質(16.4 kDa)での帰属率としては十分であり、5'末端結合部位周辺のアミノ酸に由来する信号が帰属できたことから、結合親和性評価系として用いるには十分であると判断された。

引き続き AMP 由来の核酸アナログである 8-Br AMP ならびに 6-mCEPh-purine の AGO2 MID ドメインに対する結合親和性を評価する目的で、AMP、8-Br AMP、6-mCEPh-purine を用いた NMR 結合実験系による検証が行われた。核酸、および核酸誘導体を滴定することにより、{¹⁵N} AGO2 MID ドメインを観測する ¹H-¹⁵N 相関スペクトル(HSQC スペクトル)において信号が変化するアミノ酸残基が見られた。化学シフトの変化量を CSP として表し、CSP の大きい領域を立体構造上でみると、ガイド鎖 5'末端が結合するポケット周辺で、大きな CSP を示した(図 26)。このことから 5'末端が結合するポケットに化合物が結合すれば、化学シフトの変化として同定できる評価系として成り立つことが確認された。

次に、それぞれの化合物を滴定することで変化するNMR信号から解離定数が決定された(図27)。その結果、AMP, 8-Br AMP, 6-mCEPh-purine に対する K_d はそれぞれ 380 ± 9 , 100 ± 4 , $42 \pm 4 \mu\text{M}$ であった(文献値 $K_d^{\text{AMP}} = 260 \mu\text{M}$ (Frank et al. 2010))。本結果により、8-Br AMP は AMP に比べて約4倍の結合親和性向上が、6-mCEPh-purine は AMP より約9倍ほど結合親和性が向上していることが示唆された。

以上、AMPを母格に8位側鎖改変体として8-Br AMPを取得し、6位側鎖改変体として6-mCEPh-purineが取得されたが、*in silico*解析、Biacore、X線、NMRによる一連の評価がなされた結果、6位改変体の6-mCEPh-purineの方が、8位改変体である8-Br AMPよりも結合親和性が強いことが示されたため、引き続きsiRNAガイド鎖5'末端に搭載することによる影響を6-mCEPh-purineを用いて検証することとした。

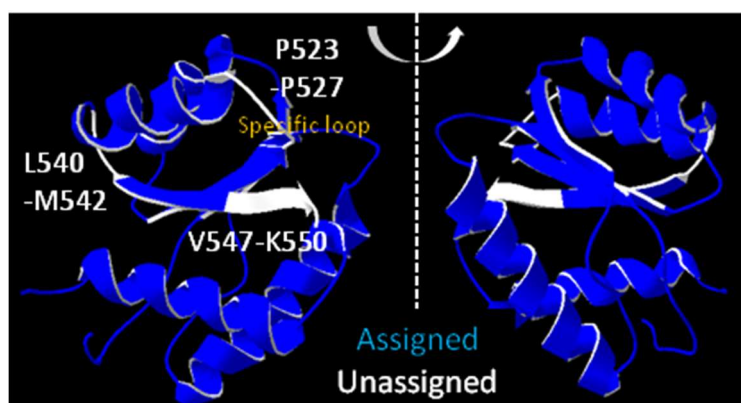


図25 AGO2 MIDドメイン信号割り当ての概要

アミドNH信号帰属がAGO2 MIDドメイン(PDB:3luc)の結晶構造に対してマッピングされた結果、約97%のアミドシグナルが帰属された(青)。帰属されていない信号は白で表示した。この大きさのタンパク質(16.4 kDa)での帰属率としては十分であり、5'末端結合部位周辺のアミノ酸に由来する信号が帰属できたことから、結合親和性評価系として用いるには十分であると判断された。

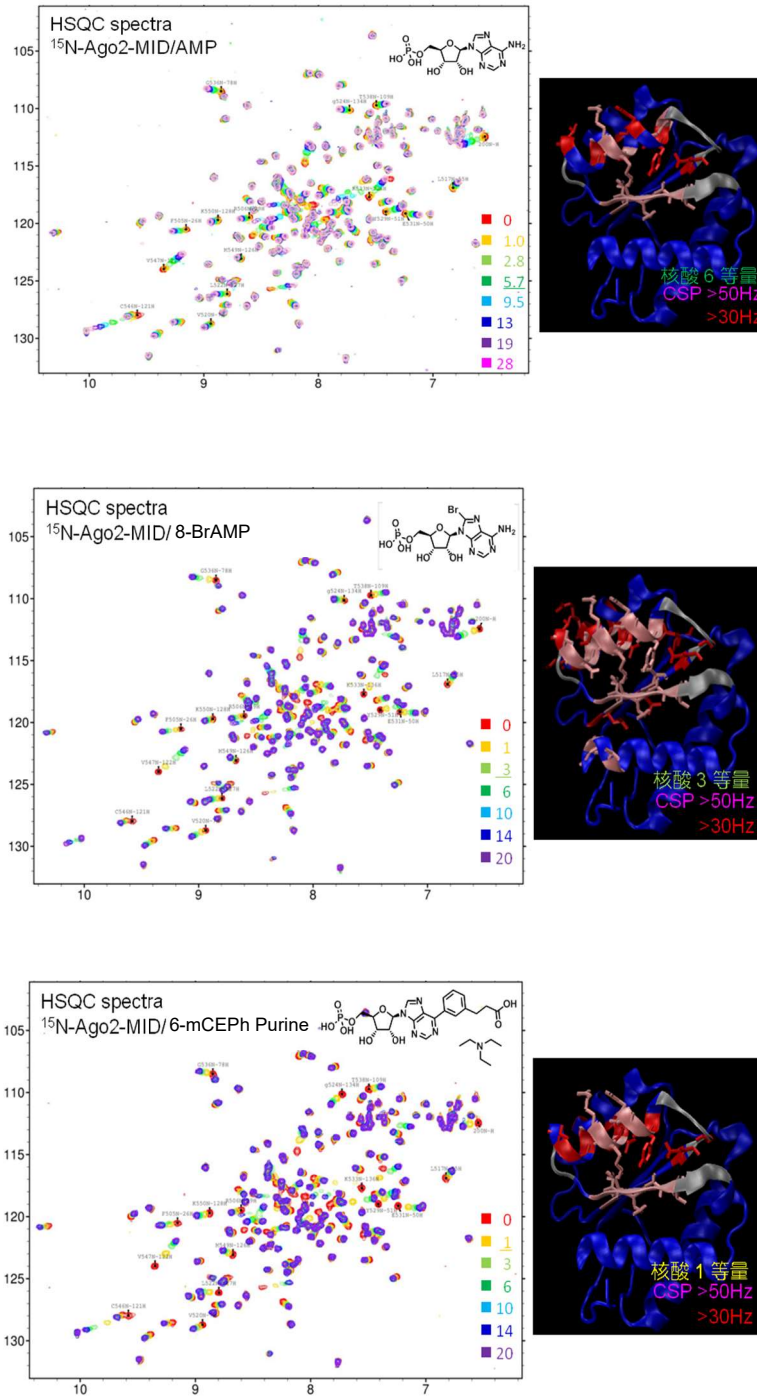


図 26 $\{^{15}\text{N}\}$ AGO2 MID の ^1H - ^{15}N correlation (HSQC) spectra AGO2 MID と AMP(上)、AGO2 MID と 8-Br AMP(中央)、AGO2 MID と 6-mCEPh-purine(下)の間の相互作用により発生した CSP がプロットされている。ガイド鎖 5'末端が結合するポケット周辺で、大きな CSP を示したことから、5'末端が結合分子の結合評価系として成り立つことが確認された。

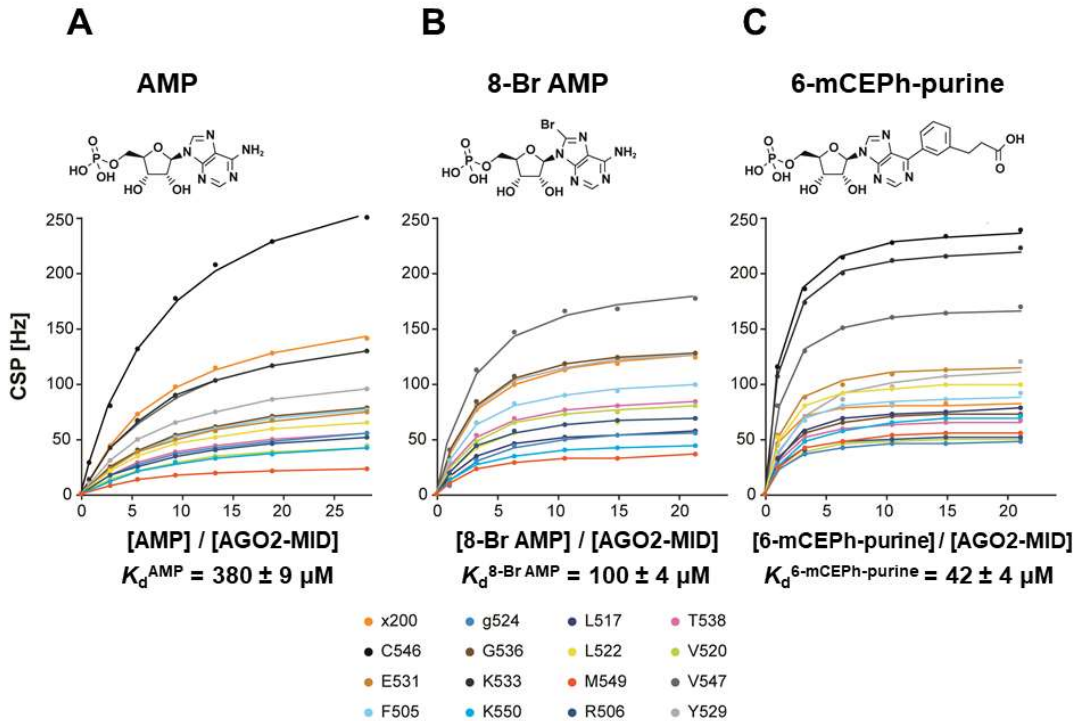


図 27 解離定数を決定するための同時フィッティング (A)AMP、(B)8-Br AMP、および(C)6-mCEPh-purine のヌクレオチド滴定時の化学シフト結果がプロットされている。K_d の決定には、(1)各滴定で他の信号から分離されて追跡可能、(2)CSP > 20 Hz (図中に掲載)、の要件を満たす信号が選択された、図中の 16 シグナルが使用された。×200 は帰属されていないシグナルを、単一の文字は MID ドメイン構成アミノ酸を表す。

AMP, 8-Br AMP, 6-mCEPh-purine に対する K_d はそれぞれ 380 ± 9, 100 ± 4, 42 ± 4 μM であったことより、8-Br AMP は AMP に比べて約 4 倍の結合親和性向上が、6-mCEPh-purine は AMP に比べて約 9 倍の結合親和性向上が示唆された。

II.13 6-mCEPh-purine siRNA は RISC 形成効率増加傾向を示す(Native agarose gel)

前項 II.12 にて 6-mCEPh-purine の AGO2 MIDドメイン結合親和性が AMP に比較して 9 倍増強していることが観察されたことを受け、ガイド鎖 5'末端の 6-mCEPh-purine 置換は RISC 形成向上に寄与するか、RISC 複合体形成効率検証を目的に、当研究室の依田真由子博士、岩崎信太郎博士、Pieter Bas Kwak 博士らの報告に従い、Native agarose gel による RISC 複合体形成効率解析を実施することとした。(Yoda et al. 2010; Iwasaki et al. 2010; Kwak and Tomari 2012)。

siRNA はガイド鎖の 5'末端塩基を A もしくは 6-mCEPh-purine に置換した配列を用い、ガイド鎖 5'末端のリンを ^{32}P RI 標識した。一方、パッセンジャー鎖 5'末端リンは合成的に RI 無標識のリンを付加した。本試験において RISC 形成過程をステップワイズに追う目的から、ターゲットの RNA は RISC 複合体形成過程における切断を回避することを期待した 2'-OMe 完全修飾オリゴを用いた。既報に従い、HeLa 細胞および HEK293 細胞に対して一過的に AGO2 を過剰発現するコンストラクトを導入し、導入 24 時間後の細胞を用いて細胞ライセートを調製した。実験は 25 °C にて、上記 ^{32}P ラベルした siRNA を細胞ライセート中でインキュベーションした。インキュベーション開始より 5 分、15 分、30 分、45 分、60 分でサンプルを回収し、各時点で AGO2 に取り込まれた ^{32}P ガイド鎖を Native agarose gel によって検討した。電気泳動は 1.4% Native agarose gel、300 V、2 時間の条件で行った。電気泳動の結果、HeLa 細胞株ライセート、HEK 細胞株ライセートで同様の泳動パターンが検出され、Guide 5'A と Guide 5' 6-mCEPh-purine (5' 6-mCP) の比較においては 5' 6-mCEPh-purine 側で下方向へのバンドシフト(**)が早い傾向が観察された(図 28)。一方で各バンド(*/**)が RISC 形成過程のどの複合体に対応するか判断がつかないため、再現性確認ならびに target mRNA との複合体に相当するバンドを明確にするため、ターゲット RNA 配列(37 mer)有無の条件で再実験を行った。HeLa 細胞株ライセートを用い、上記と同様の条件で Guide 5'A と Guide 5' 6-mCEPh-purine の比較かつ、ターゲット RNA 配列の共添加有無による影響を観察したが、図 28 と同様に 5' 6-mCEPh-purine 側で下方向へのバンドシフト(**)が濃い傾向が観察されるも、ターゲット RNA 配列有無によるバンドの有無は観察されず明確に target RNA(37 mer)との複合体に由来するバンドを見いだすことはできなかった(図 29)。

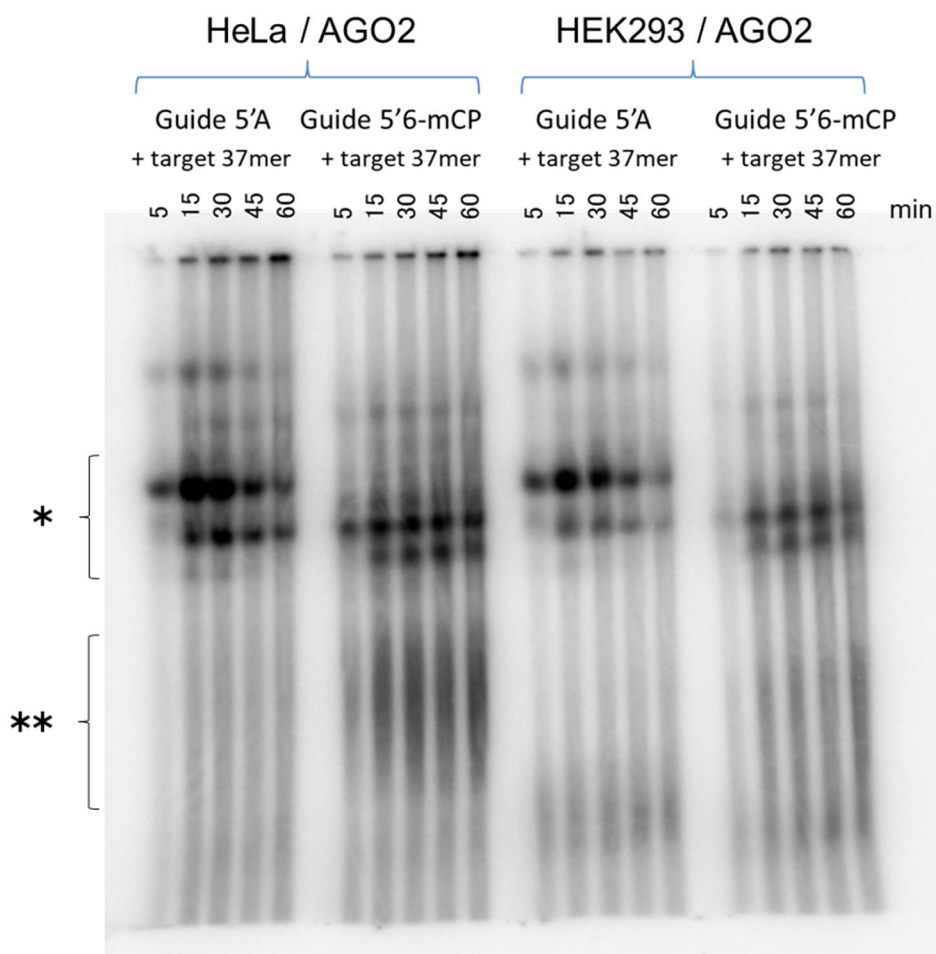
そこで更に、無標識のコールド siRNA を用いた競合条件下で各 siRNA の AGO2 複合体形成効率への影響を解析することとした。HEK 細胞株ライセートを用い、上記と同様の条件で、Guide 5'A と Guide 5' 6-mCEPh-purine、Guide 5'G の比較においてコールド siRNA 配列の共添加による RISC 形成への影響を検討した。25 °C、15 分インキュベーション条件においてガイド鎖を ^{32}P ラベルした 5'A、5' 6-mCEPh-purine、5'G の 3 種 siRNA に対し、コールド siRNA として RI 無標識の Luciferase siRNA を RISC 形成競合目的で共添加した。競合条件としてコールド siRNA は ^{32}P ラベル siRNA に対して 10 倍量(100 nM)、30 倍量(300 nM)、60 倍量(600 nM)の 3 濃度で過剰に添加を行った。電気泳動は 1.4% Native agarose gel、300V×2h の条件で行った。競合実験の結果、5'G siRNA では全体的

にバンドのシグナルが低く、複合体形成を検出しづらい一方で、5'A siRNA に比較して 5' 6-mCEPh-purine 側では全体のバンド強度が強い上、特に下側のバンド(**)が濃く、過剰量のコールド siRNA 共添加による阻害の影響を受けにくい傾向が観察された(図 30)。

一方、これまで当研究室においてヒトの RISC アセンブリ経路を分析する際には Let-7 由来の siRNA 配列のみが用いられているため(Yoda et al. 2010; Iwasaki et al. 2010; Kwak and Tomari 2012)、本研究で用いた ApoB 標的 siRNA に対してはアガロースネイティブゲル上の各バンドの RISC 複合体帰属が十分でない。そのため、明確にどのバンドが RISC 形成過程のどのステップに対応するかを同定するには至らなかった。変性ゲルとは異なり、アガロースネイティブゲル上のバンドの移動性は用いる siRNA 配列に依存して大きく変わり得るため、より詳細な解析として各バンドの抽出および Ago タンパク質と一本鎖/二本鎖 siRNA の存在確認など引き続きの生化学的精査が必要と考えられ、本実験のみでは明確に 5'末端を 6-mCEPh-purine に置換した効果を示すには至らなかった。

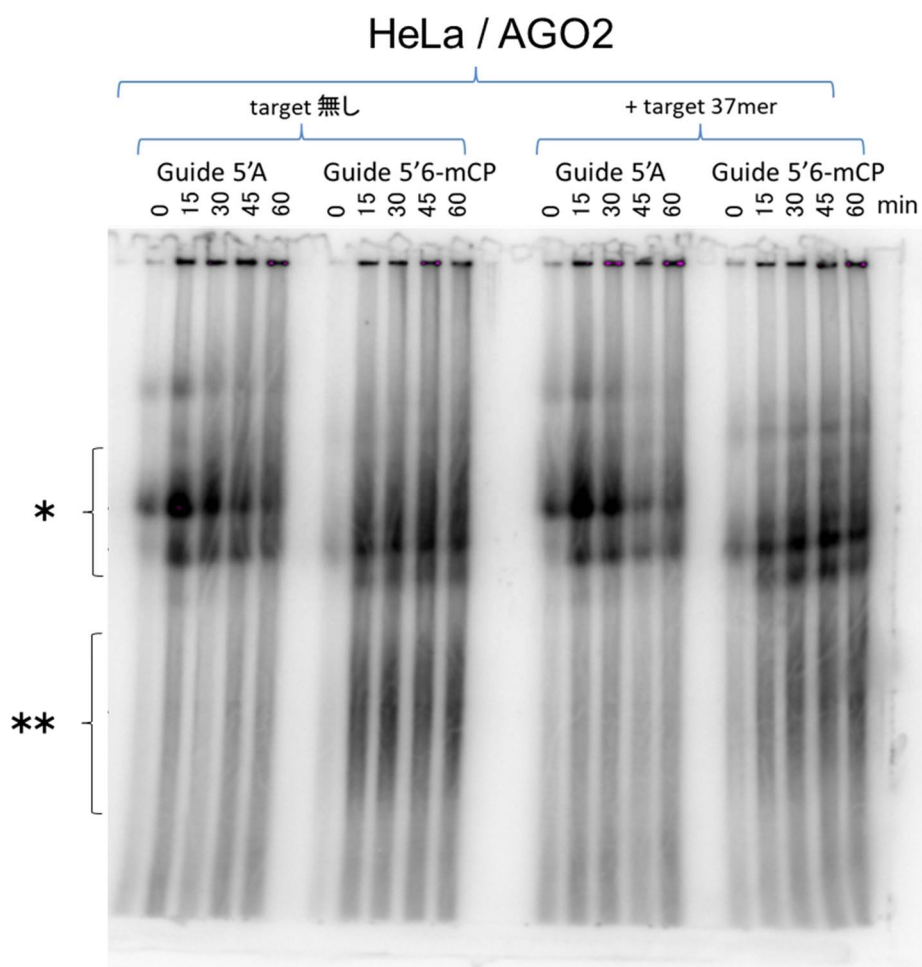
その後、共同研究者の Brechin Vincent 博士により Native agarose gel による RISC 複合体形成解析が継続され、一連のデータ取得によって 5'末端を 6-mCEPh-purine に置換することにより RISC 複合体形成効率が向上すること、その機能メカニズムとしては①RISC 形成時に AGO2 ローディングされるガイド鎖選択に寄与しながら RISC 形成量を増加する、②pre RISC 形成後にパッセンジャー鎖が排出されて mature RISC 形成する際、RISC 複合体安定化することで mature RISC 形成量を増加させる、少なくとも2つのメカニズムで当初の期待通りに mature RISC の複合体形成量向上に寄与することが報告された。(Brechin et al. 2021)

自身の実験としては、引き続き複数の siRNA 配列に対して 5'末端を 6-mCEPh-purine に置換した siRNA を合成し、標的 mRNA に対する発現抑制活性を検討することで機能評価を継続することとした。



ApoB 標的 siRNA Guide 5'A	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	³² P-AGUGUGAUGACACUUGAUUUA
ApoB 標的 siRNA Guide 5' 6-mCEPh-P	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	³² P-(6-mCEPh-P)GUGUGAUGACACUUGAUUUA

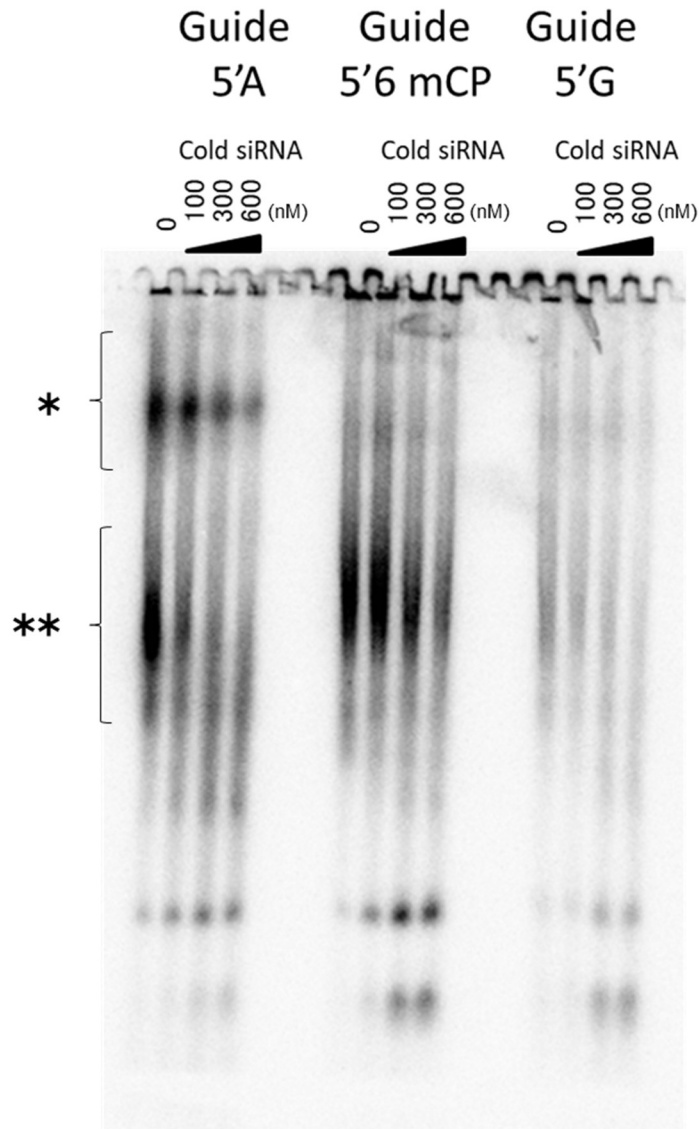
図 28 HeLa ならびに HEK293 細胞ライセートを用いた RISC 複合体解析 (Native agarose gel)
 ApoB 標的 siRNA のガイド鎖 5'末端を A もしくは 6-mCEPh-Purine に置換した siRNA で比較検討を行った結果、HeLa 細胞株ライセート、HEK 細胞株ライセート共に、Guide 5'A と Guide 5' 6-mCEPh-purine の比較においては 5' 6-mCEPh-purine 側で下方向へのバンドシフト(**)が顕著な傾向が観察された。一方で各バンド(*/**)が RISC 形成過程のどの複合体に対応するか判断がつかないため、再現性確認ならびに target mRNA との複合体に相当するバンドを帰属する目的でターゲット RNA 配列(37mer)有無の条件で再実験を行うこととした(図 29)。



ApoB 標的 siRNA Guide 5'A	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	³² P-AGUGUGAUGACACUUGAUUUA
ApoB 標的 siRNA Guide 5' 6-mCEPh-P	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	³² P-(6-mCEPh-P)GUGUGAUGACACUUGAUUUA

図 29 ターゲット配列 (37mer) 有無における RISC 複合体形成効率解析 (Native agarose gel)

ApoB 標的 siRNA のガイド鎖 5'末端を A もしくは 6-mCEPh-Purine に置換した siRNA でターゲット配列 (37mer) の有無における RISC 複合体形成効率の比較検討を行ったが、図 28 と同様に 5' 6-mCEPh-purine 側で下方方向へのバンドシフト(**)が濃い傾向が観察されるも、ターゲット RNA 配列有無によるバンドの有無は観察されず、target RNA(37mer)との複合体に由来するバンドを見だし、各バンドの RISC 複合体形成過程を帰属するには至らなかった。



ApoB 標的 siRNA Guide 5'A	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	³² P-AGUGUGAUGACACUUGAUUUA
ApoB 標的 siRNA Guide 5' 6-mCEPh-P	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	³² P-(6-mCEPh-P)GUGUGAUGACACUUGAUUUA
ApoB 標的 siRNA Guide 5'G	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACCGA
	Guide	³² P-GGUGUGAUGACACUUGAUUUA

図 30 無標識のコールド siRNA を用いた競合条件下における RISC 複合体形成効率解析

無標識のコールド siRNA を共添加する競合条件下で ApoB 標的 siRNA のガイド鎖 5'末端を A, 6-mCEPh-Purine, G に置換した各 siRNA の AGO2 複合体形成効率を検討した。5'G siRNA では全体的にバンドのシグナルが低く、複合体形成を検出しづらい一方で、5'A siRNA に比較して 5' 6-mCEPh-purine 側では全体のバンド強度が強い上、特に下側のバンド(**)が濃く、過剰量のコールド siRNA 共添加による阻害の影響を受けにくい傾向が観察された。一方で、各バンドの RISC 複合体形成過程との帰属が明確でないために RISC 複合体形成効率の向上を明確に示すには至らなかった。

II.14 ガイド鎖 5' 6-mCEPh-purine 置換 siRNA は複数 siRNA 配列で強活性を示す

前項 II.13 の Native agarose gel 解析では 6-mCEPh-purine による RISC 複合体形成効率向上効果を明確に示すことができなかつたため、複数の siRNA 配列に対してガイド鎖 5'末端を 6-mCEPh-purine に 1 塩基置換した siRNA を合成し、各 siRNA 活性を観察することで機能評価することとした。

Luciferase を標的とする siRNA のガイド鎖 5'末端塩基を 6-mCEPh-purine に構造変換した Luc-6-mCEPh-purine を合成し、RNAiMAX で HeLa/Luc2 CP 細胞に導入 24 時間後の発光レベルを測定することで siRNA 活性の評価を行った。比較対象コントロールにはガイド鎖 5'末端に天然塩基アデニンを有する Luc-A を用いた。陰性対照群の発現量を 1 としたときの相対的な割合を平均±標準偏差で表した結果を図 31 に示す。ガイド鎖 5'末端に 6-mCEPh-purine を導入した Luciferase 標的 siRNA は 5'末端に A を有する siRNA と比較して高活性を示した。

ガイド鎖 5'末端置換効果の再現性を確認する目的で、他の Luciferase 標的 siRNA 2 配列 (Luc1, Luc9) を追加し、同様のガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine 置換を行った。Luc1 siRNA 配列の評価結果を図 32 に、Luc9 siRNA 配列の評価結果を図 33 に示す通り、いずれの siRNA 配列においても 6-mCEPh-purine による活性増強効果が再現された。

以上より、siRNA ガイド鎖の 5'末端 6-mCEPh-purine 置換は十分に許容されるのみならず、天然塩基を 5'末端に持つ siRNA よりも siRNA 活性が増強されることが確認された。

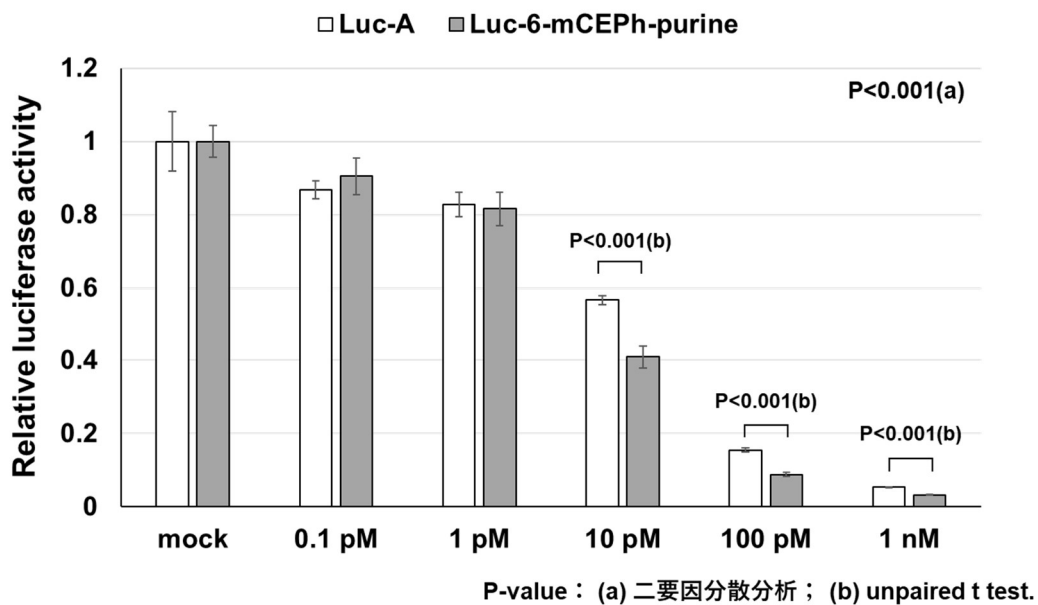


図 31 Luciferase 標的 siRNA に対するガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine 置換効果

ガイド鎖 5'末端に A もしくは 6-mCEPh-purine を持つルシフェラーゼ標的 siRNA 活性比較。

縦軸は siRNA 未導入群(陰性対照群)における発光量を 1 としたとき、ルシフェラーゼ標的 siRNA 処理群の発光を、相対的な割合として平均値±SD として示した (n = 5)。P-value (a) Two-way ANOVA, (b): unpaired t test.

ガイド鎖 5'末端に 6-mCEPh-purine を導入した Luciferase 標的 siRNA は 5'末端に A を有する siRNA と比較して高活性を示し、siRNA ガイド鎖の 5'末端 6-mCEPh-purine 置換は十分に許容されるのみならず、siRNA 活性が増強することを確認した。

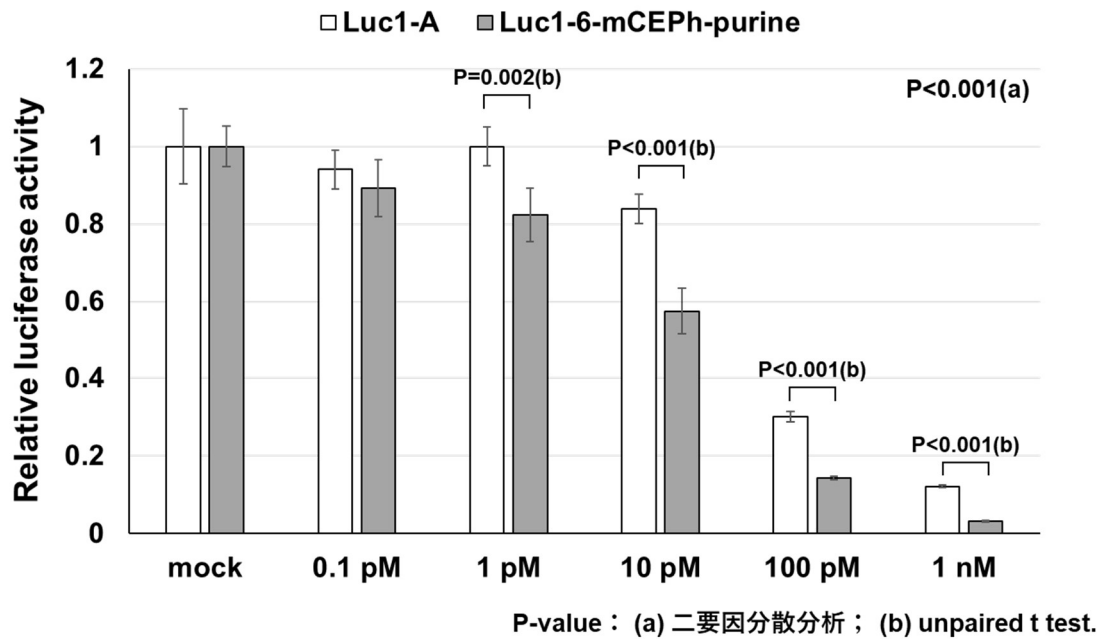


図 32 Luciferase 標的 siRNA (Luc1) に対するガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine 置換効果

ガイド鎖 5'末端に A もしくは 6-mCEPh-purine を持つルシフェラーゼ標的 siRNA 活性比較。

縦軸は siRNA 未導入群 (陰性対照群) における発光量を 1 としたとき、ルシフェラーゼ標的 siRNA 処理群の発光を、相対的な割合として平均値±SD として示した (n = 5)。P-value (a) Two-way ANOVA, (b): unpaired t test.

Luc1 siRNA 配列においても 6-mCEPh-purine 修飾による siRNA 活性増強効果が再現した。

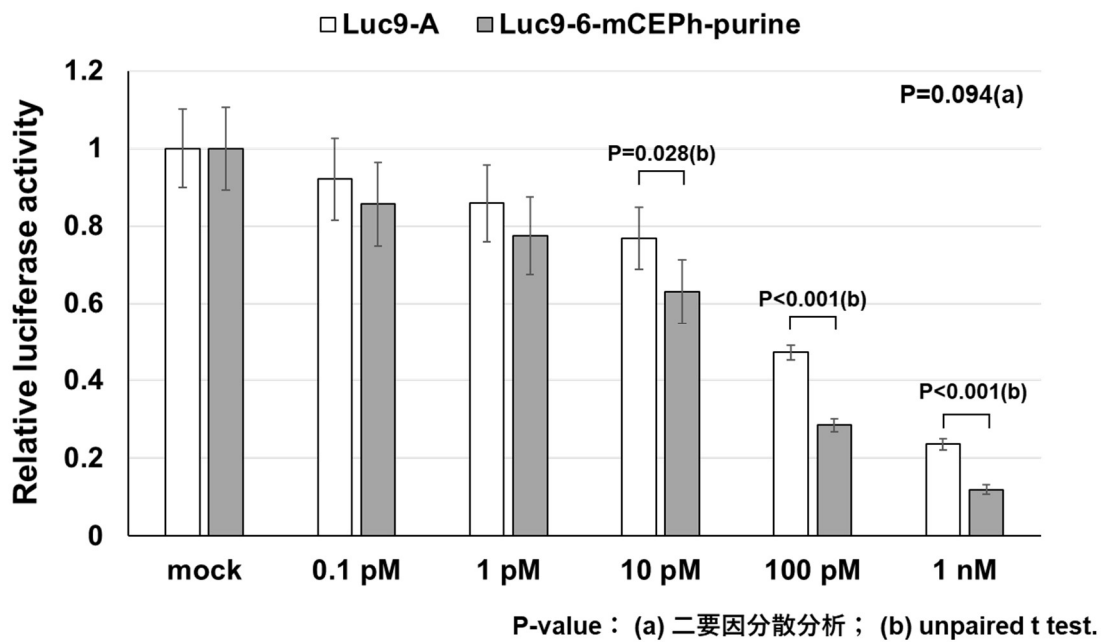


図 33 Luciferase 標的 siRNA (Luc9) に対するガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine 置換効果
 ガイド鎖 5'末端に A もしくは 6-mCEPh-purine を持つルシフェラーゼ標的 siRNA 活性比較。

縦軸は siRNA 未導入群(陰性対照群)における発光量を 1 としたとき、ルシフェラーゼ標的 siRNA 処理群の発光を、相対的な割合として平均値±SD として示した (n = 5)。P-value (a) Two-way ANOVA, (b): unpaired t test.

Luc9 siRNA 配列においても 6-mCEPh-purine 修飾による siRNA 活性増強効果が再現した。

II.15 ガイド鎖 5' 6-mCEPh-purine 置換 siRNA は siRNA の AGO2 集積を促進する

前項 II.14 においてガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine 置換 siRNA が 5'末端 A よりも高活性を示したが、ガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine を有する Luc-mCEPh-purine siRNA のガイド鎖が期待した通りに細胞内で RISC 複合体形成を促進し、細胞内 AGO2 タンパク質への取り込み量が増加しているかを、AGO2 免疫沈降後の定量 PCR による解析系で確認することとした。

まず細胞数の検量線から各 well に含まれている細胞数(cells/mL)を算出し、RISC 定量アッセイに用いた細胞溶液 100 μ L に含まれている細胞数を算出した。qPCR で得られた Luc ガイド鎖の Ct 値は、検量線を用いることで分子数に換算し、各 well に含まれる AGO2 結合ガイド鎖の量が算出された。最終的に上記 AGO2 結合ガイド鎖分子数を各 well の細胞数で割ることで、1 細胞あたりの平均 AGO2 結合ガイド鎖分子数として算出された。その結果を図 34A に示す。解析の結果、5' 6-mCEPh-purine siRNA ガイド鎖は、5'A siRNA ガイド鎖よりも 5 pM 条件下では 1.9 倍、50 pM 条件下では 2.4 倍高い分子数で AGO2 中に存在していることが確認された。さらに 50 pM 条件下において、5'A siRNA および 5' 6-mCEPh-purinesiRNA ガイド鎖の RISC 取り込み量を導入後、1、2、および 3 日後に経時的に観察した結果、各時点において 5' 6-mCEPh-purinesiRNA は 5'A siRNA よりも優位に取り込み量が増加していることが確認された(図 34B)。

上記の結果は、siRNA 活性向上と RISC 取り込み量向上の相関関係を示しており、5' 6-mCEPh-purine 修飾 siRNA が AGO2 によって効率的に認識され、細胞培養株中において長期間残存することが示唆された。

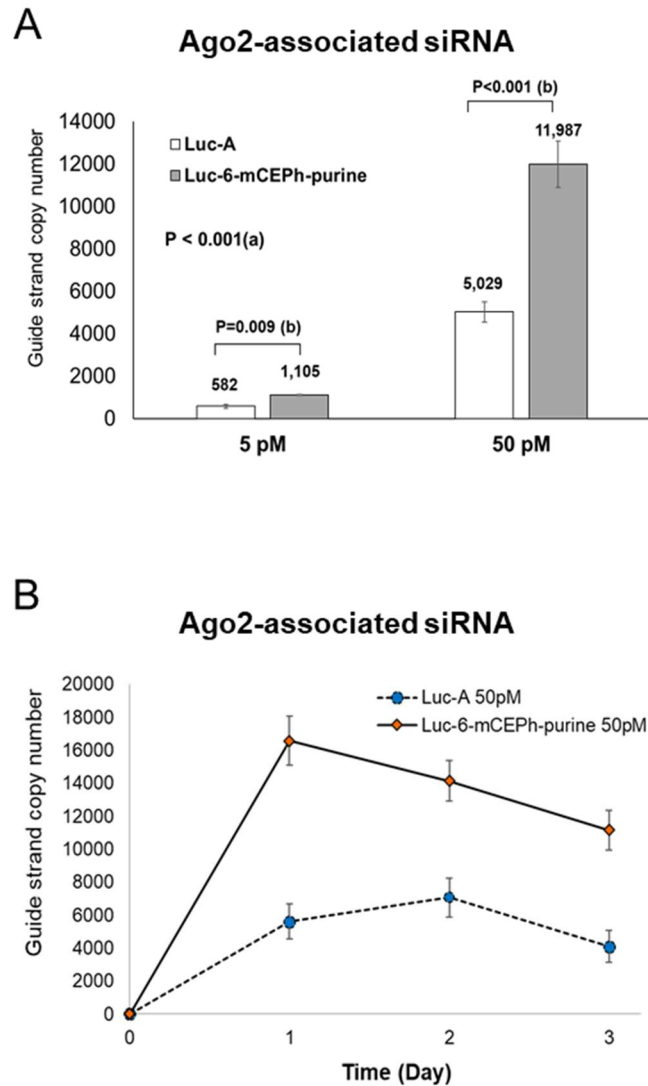


図 34 ガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine 修飾は AGO2 の siRNA 取り込み量を増加させる

(A) 一細胞あたりの AGO2 中に存在する 5'A siRNA および 5' 6-mCEPh-purinesiRNA のガイド鎖分子数。ガイド鎖 5'末端にはそれぞれ A または 6-mCEPh-purine を持つ siRNA を 5 pM ならびに 50 pM で導入後、AGO2 免疫沈降と qRT-PCR によって分子数を決定した。データは平均± SD で示す, n = 5 , P-value (a): two-way ANOVA; (b): unpaired t-test. 5' 6-mCEPh-purine siRNA ガイド鎖は、5'A siRNA ガイド鎖よりも 5 pM 条件下では 1.9 倍、50 pM 条件下では 2.4 倍高い分子数で AGO2 中に存在していることを確認した。

(B) 一細胞あたりの AGO2 中に存在する 5' A siRNA および 5' 6-mCEPh-purinesiRNA のガイド鎖分子数に関する経時的変化観察。ガイド鎖 5'末端にはそれぞれ A または 6-mCEPh-purine を持つ siRNA を 50pM で導入後、AGO2 免疫沈降と qRT-PCR によって分子数を決定した。データは平均± SD で示す, n = 5, 50 pM 条件下において、5'A siRNA および 5' 6-mCEPh-purinesiRNA ガイド鎖の RISC 取り込み量を導入後、1、2、および 3 日後に経時的に観察した結果、各時点において 5' 6-mCEPh-purinesiRNA は 5'A siRNA よりも優位に取り込み量が増加していることを確認した。

II.16 5'末端 6-mCEPh-purine siRNA は内在遺伝子に対しても siRNA 活性増強を示す

siRNA ガイド鎖の 5'末端を 6-mCEPh-purine に置換した 6-mCEPh-purine siRNA が内在性遺伝子に対しても発現抑制効果を示すかを確認する目的で、コレステロール合成に関わる遺伝子アポリポタンパク質 B (ApoB) を標的とする siRNA を合成し、マウス初代肝細胞における活性を評価した。コントロールには 5'末端に天然塩基アデニンを有する ApoB-A を設定した。RNAiMAX 試薬でマウス初代肝細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、導入 24 時間後に total RNA の抽出、逆転写反応を行い、定量 PCR にてマウス ApoB 及び HPRT1 の発現量を測定した。得られた ApoB 遺伝子の Ct 値を HPRT1 の Ct 値で補正し、陰性対照群の ApoB 発現量を 1 としたときの相対的な割合として算出した。その mRNA 量の相対的な割合を平均±標準偏差で表した結果を図 35 に示す。解析の結果、6-mCEPh-purine を 5'末端配置した ApoB siRNA は 5'末端にアデニンを有する ApoB-A と比較して高活性を示したことから 5'末端置換 siRNA の活性増強は内在性遺伝子に対しても効果があることが確認された。

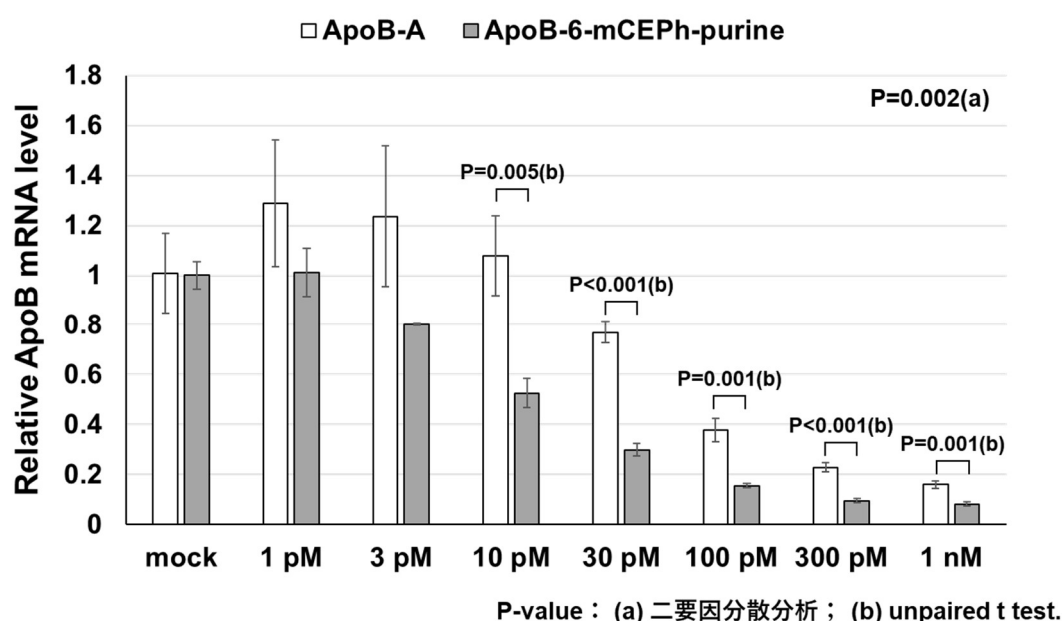


図 35 5' 6-mCEPh-purine ApoB 標的 siRNA による ApoB mRNA 発現抑制(マウス初代肝細胞)

ガイド鎖 5'末端に A もしくは 6-mCEPh-purine を含む ApoB ターゲティング siRNA の活性比較。データは平均値±SD で示す。n = 5; (a): two-way ANOVA; (b): unpaired t-test

6-mCEPh-purine を 5'末端配置した ApoB siRNA は 5'末端にアデニンを有する ApoB-A と比較して高活性を示したことから 5'末端置換 siRNA の活性増強は内在性遺伝子に対しても効果があることが確認された。

II.17 5'末端修飾 siRNA はマウスモデルにおいても活性増強を示す

初期コンセプト検証の一環として、II.3 項でガイド鎖 5'末端を天然塩基 A と G で置換した際に、マウス動物モデルにおいてもガイド鎖 5'末端の活性差が観察可能なことを ApoB 標的 siRNA にて確認済みであった。前項 II.16 においてマウス細胞株にて活性増強が確認された ApoB 標的 6-mCEPh-purine siRNA が、マウス動物モデルにおいても同様に 5'末端置換効果を示すか、検証することとした。

脂質ナノ粒子(LNP)に封入した 5' 6-mCEPh-purine ApoB 標的 siRNA 製剤と、比較対象としての 5'A ApoB 標的 siRNA 製剤を Balb/cA マウスに静脈内投与し、各 siRNA 製剤による標的 mRNA 発現抑制活性が評価された。具体的には、尾静脈投与 2 日後もしくは 7 日後に各個体の肝臓を採取し、total RNA 調製、cDNA 合成、定量 PCR 解析を行うことで標的である ApoB 遺伝子の mRNA 発現レベルを解析した。得られた ApoB mRNA の Ct 値は補正目的で HPRT1 遺伝子の Ct 値で補正し、生理食塩水投与陰性対照群の ApoB mRNA 発現量を 1 としたときの相対的な割合として算出後、平均±標準偏差で表した。投与 2 日後の 0.1 mg siRNA/kg 群では、5'A ApoB 標的 siRNA は、ApoB 発現抑制が 50%に留まった一方、5' 6-mCEPh-purine ApoB 標的 siRNA は肝臓 ApoB mRNA レベルを約 80%減少させた(図 36 A)。さらに Day 7 においても 5' 6-mCEPh-purine ApoB 標的 siRNA の活性は保持され、特に 0.1 mg siRNA/kg ならびに 0.3 mg siRNA/kg 投与群で比較対象の 5'A siRNA よりも優位な発現抑制効果を観察した(図 36 B)。

また、アポリポrotein B-100 遺伝子は LDL と結合して血中を循環しているため、ApoB 遺伝子を KD することで血中内のコレステロール量は減少する。そこで肝臓における mRNA 発現抑制の結果が、血中コレステロール量の減少に反映されるか確認することとした。血中コレステロール量は LabAssay™ Cholesterol キットを用いて定量された。検量線の作製および定量値の算出はプレートリーダーARVO-X3 に内蔵されたデータ解析ソフトウェア WorkOut2.5 にて行われた。各個体で得られたコレステロール濃度の平均値±標準偏差を図 37 に示す。解析の結果、肝臓での mRNA KD と同様に 5' 6-mCEPh-purine siRNA によって血中コレステロールレベルがより低下しており、タンパクレベルでも発現抑制されていることが確認された。以上の結果は 5'末端置換 siRNA の活性増強効果は内在遺伝子に対して、マウス動物モデルにおいても再現することが示された。

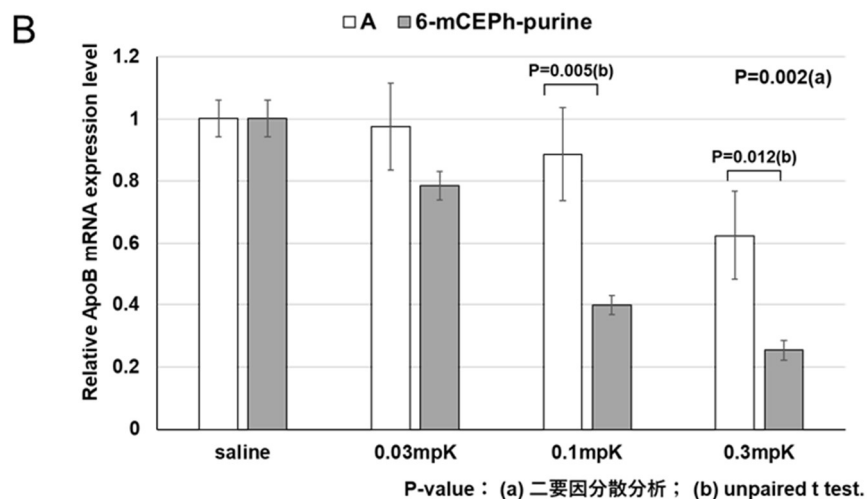
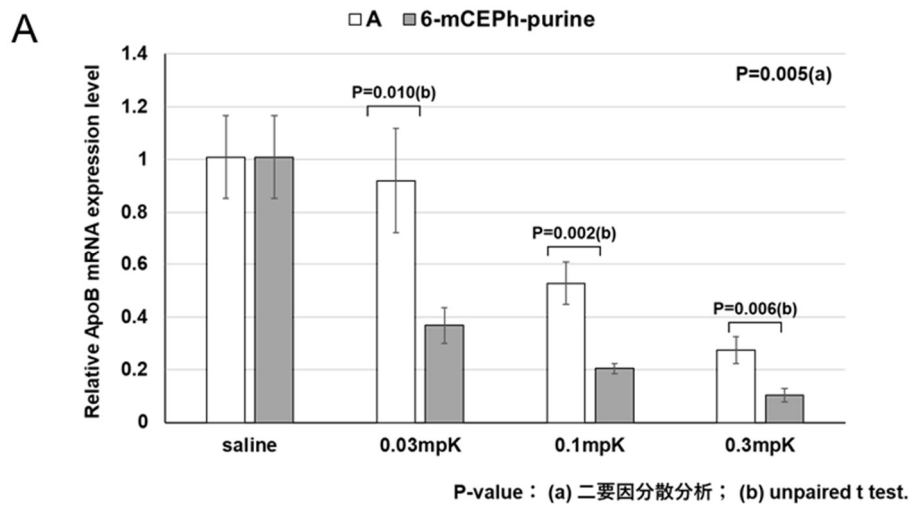


図 36 マウス肝臓における ApoB 標的 siRNA による ApoB mRNA 発現抑制活性

製剤投与後、(A) 2 日目および (B) 7 日目のマウス肝臓における ApoB mRNA の相対レベルを示す。siRNA はガイド鎖 5' 末端アデニン、6-mCEPh-purine を配置した siRNA で活性比較した。データは平均±SD として表す。n = 3; (a): two-way ANOVA, (b): unpaired t-test

投与 2 日後の 0.1 mg siRNA/kg 群では、5'A ApoB 標的 siRNA は、ApoB 発現抑制が 50% に留まった一方、5' 6-mCEPh-purine ApoB 標的 siRNA は肝臓 ApoB mRNA レベルを約 80% 減少させた(図 36 A)。さらに Day 7 においても 5' 6-mCEPh-purine ApoB 標的 siRNA の活性は保持され、特に 0.1 mg siRNA/kg ならびに 0.3 mg siRNA/kg 投与群で比較対象の 5'A siRNA よりも優位な発現抑制効果を観察した(図 36 B)。

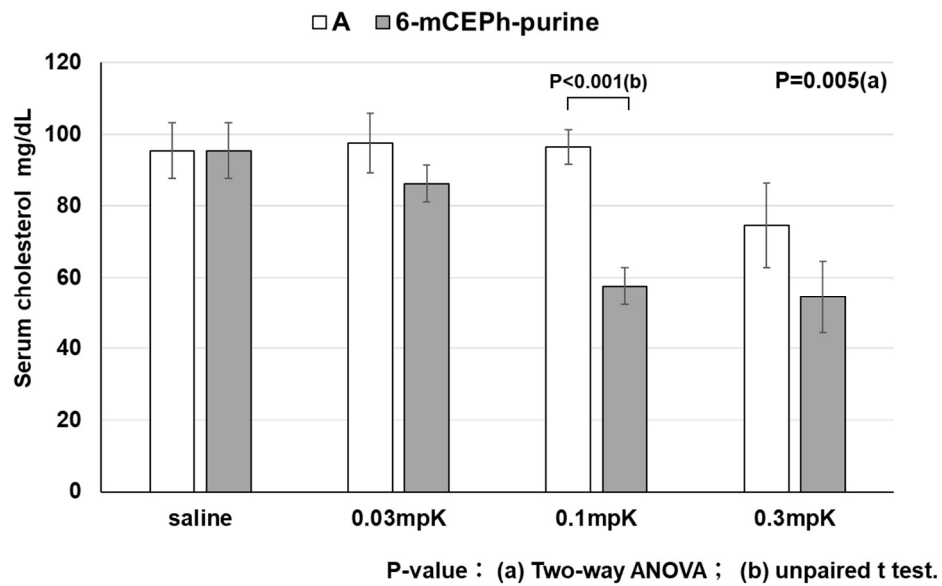


図 37 マウス血清中の総コレステロール発現抑制活性

製剤投与後、7日目のマウス血清中の総コレステロールの変化。データは平均±SDとして表わす。n = 3, (a): two-way ANOVA, (b): unpaired t-test

肝臓での mRNA KD 傾向と同様に 5' 6-mCEPh-purine siRNA 投与によって血中コレステロールレベルがより低下しており、タンパクレベルでも発現抑制されていることが確認された。

Ⅲ. 考察

III. 考察

III.1 緒言

核酸医薬品はヌクレアーゼで分解されやすい、外来性核酸に応答する自然免疫系を活性化して免疫刺激性を持つ、標的組織に対するデリバリーが難しいなどの課題があるが、核酸医薬基盤の化学修飾適用によってこれらの課題解決が試みられており、現在開発されているほとんどの医薬品には何らかの化学修飾が施されている。さらに核酸医薬品の機能メカニズムに即した構造最適化検討も実施されており、化学修飾によって標的配列との結合力が向上する化学修飾や、体内動態ならびに細胞内取り込み効率を改善する化学修飾も開発されている(Khvorova and Watts 2017)。化学修飾によって得られる効果は安定性向上、毒性軽減、活性向上など、化学修飾の種類や核酸医薬基盤との組み合わせによって異なるが、核酸医薬基盤の活性向上技術は治療効果増強、投与量軽減による副作用軽減やコスト節減、限られた分子数しか届けられていない標的組織における薬効発揮など、核酸医薬基盤が抱える課題全般に効果が期待できる。

本研究においては核酸医薬基盤の一つである siRNA に注目し、siRNA の細胞内機能メカニズムに即した構造最適化による活性増強策の構築を試みた。本研究の結果、新規の AMP 由来修飾塩基を取得するとともに、その修飾塩基を siRNA ガイド鎖 5'末端に搭載することで siRNA 活性が向上することを示した。これまでも siRNA デザインにおけるガイド鎖 5'末端塩基選択の重要性や、ガイド鎖 5'末端構造が RISC 複合体形成時に重要な機能を担うことが明らかにされているが、その説明の一つとして AGO2 MID ドメイン塩基結合ポケットの塩基構造嗜好性、すなわち AGO2 MID ドメインが siRNA の 5'末端塩基 A もしくは U を好み、C もしくは G は好まないことにも起因すると考えられていた。しかしながら天然塩基構造 A/U を AGO2 MID ドメインに対してさらに構造最適化することで、天然塩基 A/U 以上に MID ドメイン結合親和性を高めることができるのか、そもそもそのような人工塩基を創生することはできるのか、MID ドメインに対する結合親和性を高めた人工塩基を siRNA ガイド鎖 5'末端に配置することで、siRNA 活性を更に向上させることができるのか知られていなかった。例えば、塩基構造によらない 5'末端リン酸改変体として 5'-E-VP 修飾による AGO2 MID ドメインとの親和性増強と siRNA 活性の増強効果 (Elkayam et al. 2017) は報告がある。また、非塩基構造である 1-ER triazole I (1,2,3-Triazol-4-yl bases formed from the CuAAC reaction of azides and 1-ethynylribose) 構造の siRNA ガイド鎖 5'末端配置により miRNA オンターゲット活性が 2 倍増強することは報告されていたが (Suter et al. 2016)、同グル

ープからは複数のアデニン由来塩基アナログである 7-ethynyl-8-aza-7-deazaadenosine (7-EAA)、7-EAA-triazole、N-ethylpiperidine triazole derived from 2-propargylaminopurine (2-AP-triazole)を検討も、siRNA ガイド鎖 5'末端に配置することで活性はむしろ減弱されること(Onizuka et al. 2013)、さらにアデニン塩基構造をサイズ拡張した size-expanded RNA (xRNA) nucleobases もガイド鎖 5'末端搭載が許容されず活性喪失することが報告されているが、十分に検討されているとは言えない(Hernández et al. 2012)。そこで本研究ではこれまで知られる 5'末端塩基誘導体構造以上に MID ドメインに対して構造最適化された塩基アナログを創生することで独自の siRNA 活性増強策を見出すとともに、その活性増強策によって siRNA 医薬の有用性向上、更には未だ治療薬が無い疾患に対する核酸医薬品開発に貢献できることを期待して研究に取り組むこととした。研究遂行においては、筆者が所属する製薬企業の低分子創薬基盤を生かす形の、構造情報を活用した核酸誘導体展開戦略の立案と、SBDD の各パートに専門性を持つ研究員との共同研究を設定することで、*in silico* スクリーニング、NMR 結合アッセイ、X線結晶構造解析と細胞株ならびにマウス動物モデルにおける機能評価を行うこととした。

III.2 AMP 6 位、8 位誘導体戦略の妥当性について

II.5 項の MID ポケット分析の結果から、天然塩基 Adenine は五員環部分ですでに Tyr529 と π - π スタッキングを形成していること、8 位には van der Waals 相互作用が獲得できる置換基、6 位には疎水性置換基の導入が望ましいことが示唆されたことで、本研究ではアデニンの 6 位と 8 位の位置に構造最適化の可能性が示唆された。今回のアデニン 6 位と 8 位の誘導体展開が好ましく、他の部位の誘導体展開余地が薄いとの分析結果は、上述の 7-ethynyl-8-aza-7-deazaadenosine (7-EAA)、7-EAA-triazole、N-ethylpiperidine triazole derived from 2-propargylaminopurine (2-AP-triazole)において siRNA 活性が減弱した理由を、これらはアデニンの 7 位もしくは 2 位を展開したアナログであるが MID ドメインとの複合体形成時に誘導体側鎖が構造的に許容されず、AGO2 との結合ならびに RISC 形成を阻害した結果として活性が減弱した、と説明できるのではないかと考えられた。

II.6 項以降の *In silico* SCR 手法を用いた市販化合物からのリード化合物候補選定と構造生物学に基づく結合様式評価の結果、アデニン 8 位誘導体として 8-Br AMP が、共同研究によってアデニン 6 位誘導体の 6-mCEPh-purine が取得された。それぞれ NMR によって AGO2 MID ドメインに対する結合親和性が評価された結果、8-Br AMP は AMP と比較して 4 倍、6-mCEPh-purine 修飾は AGO2 MID ドメインに対して約 9 倍高い結合親和性を示すことが確認された。この時に AMP で得られた Kd 値は

380±9 μM であり、以前に Frank らが報告した解離定数(約 280 μM)ともほぼ一致していることから (Frank et al. 2010)、本研究で実施の NMR 実験系とそこから得られる評価結果は妥当と判断された。また、これまでに報告のあるガイド鎖 5'末端塩基置換用の人工核酸は *In silico* 計算に基づく結合親和性予測による探索と評価が中心であったが、本研究では *in silico* 計算予測に留まらず、ピアコア、NMR、X 線など一連の結合実験系で評価することによって、初めて具体的な結合解離定数を示しながら、MID ドメインに対して結合親和性が增強された 5'末端塩基置換用アナログを取得したと考察した。

III.3 塩基アナログによる MID ドメイン結合親和性増強機構について

8-Br AMP ならびに 6-mCEPh-purine を対象とした X 線結晶構造解析の結果より、AGO2 MID ドメインとの複合体構造が明らかにされたが、いずれのアナログも AGO2 MID ドメイン/AMP 複合体中の AMP とほぼ同一の配置を取り、プリン塩基部分、リボース部分、5'リン酸基の間の相互作用が AGO2 MID ドメイン/AMP 複合体と重なることが確認されたことにより、本研究で AMP を母格に、その元来の MID ドメイン結合様式を活かしながら、更に新規な相互作用点を追加することによって結合親和性増強を狙う本研究の戦略の妥当性も示すと考えられた。実際に 8-Br AMP では *in silico* 計算分析の通り、8 位の Br 基が AGO2 MID ドメインの Y529 に対して ππ 結合を形成しながら新たな疎水性相互作用を獲得することで結合親和性が增強することは X 線結晶構造解析や NMR 結合実験も通じて実証された。一方の 6-mCEPh-purine はプリン 6 位に位置する 3-(2-カルボキシエチル)フェニル基のカルボキシル基が、AGO2 Lys525 とイオン相互作用を獲得することで新規相互作用を獲得するとの期待に基づいて当初デザインされたが、X 線結晶構造解析からはカルボキシル基と Lys525 に明確な相互作用は見出されず、Thr526 と水分子を介して相互作用を形成することが示唆された。NMR 実験で得られた AMP 比で約 9 倍の結合親和性増強をこの Thr526 との相互作用のみで説明することは難しく、6-mCEPh-purine は MID ドメインのポケット全体に対して構造最適された結果として、約 9 倍の結合親和性増強を獲得していると考察された。ただし AGO2 の siRNA 5'末端結合ポケット構造は MID のみならず PIWI ドメインの関与も報告されていることから(Elkayam et al. 2012; Schirle and MacRae 2012)、8 位展開の 8-Br AMP ならびに 6 位展開の 6-mCEPh-purine における PIWI ドメインとの相互作用の可能性も考慮する必要性もある。8 位に関しては、8-Br AMP が MID ドメインに適合し、MID ドメインの Y529 に対して新規相互作用を獲得したことが示されたため、PIWI ドメインは影響しないと考えられた。6 位に関しては、PIWI ドメインとの相互作用可能性を否定できず、特に PIWI ドメインの R812(5'末端から 8.9 Å)、R814

(5'末端から 11.0 Å)、および Y815(5'末端から 4.9 Å)はアデニン 6 位環境に近い位置で存在するため、これらの側鎖と 6-mCEPh-purine が相互作用することで、6-mCEPh-purine 修飾 siRNA の RISC 取り込み増加と、siRNA 活性増強につながる可能性はある。しかしながら、上述の通りに 6-mCEPh-purine の構造デザインは MID のみを使用した構造情報に基づく計算でデザインされたこと、II.11 項の X 線結晶構造解析の結果は計算結果と照らし合わせても 6-mCEPh-purine/AGO2 MID ドメイン複合体としての合理的な結果を与えること、NMR 結合実験の結果から、6-mCEPh-purine と MID の結合親和性が大幅に増加したことから、6-mCEPh-purine は主として MID ドメインとの相互作用増強によって AGO2 への親和性増強と、siRNA 活性増強効果を獲得していると考察した。このアデニン 6 位修飾の一般性と、負に帯電した酸性側鎖の重要性を確認するため、6-mCEPh-purine と同様に 6 位に酸性側鎖である、4-ホスホオキシブチルチオ基の酸性側鎖(4-phosphonoxybutylthio group acidic side chain)を持つ、6-(Phosphonoxy-Butyl-Sulfide)Purine (6-PBuS-purine) 図 38 をデザインし、評価した結果を RNA 誌 (Shinohara et al. 2021)に報告した。5' 6-mCEPh-プリンおよび 6-PBuS-プリン siRNA の活性は互いに類似しており、5'A siRNA の活性よりも 4 倍から 6 倍の siRNA 活性増強と、発現抑制効果の持続をもたらしたことより、アデニン 6 位修飾による活性増強の再現性が確認されるとともに、6 位修飾に際しては特に負に帯電した酸性側鎖の存在が重要であると考察された。

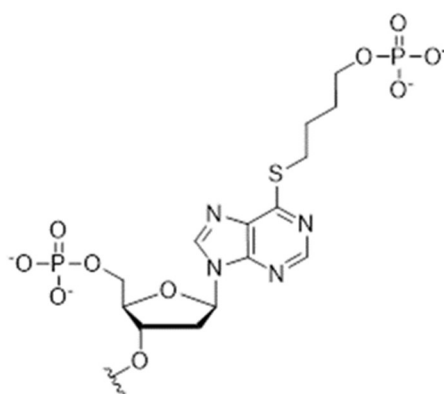


図 38 6-PBuS-purine (6-(Phosphonoxy-Butyl-Sulfide)Purine) の構造

III.4 5'末端置換 siRNA の活性増強効果について

アデニン 6 位置換体である 6-mCEPh-purine 修飾 siRNA は、比較対象である 5'末端アデニンの siRNA よりも数倍高い siRNA 活性を示し、6-mCEPh-purine 修飾により、AGO2-RISC の集合量が増加することも裏付けられた(II.15)。マウス動物モデル実験においても 6-mCEPh-purine 修飾 siRNA の活性増強と、7 日目においても発現抑制効果が比較対象以上に持続する結果が得られた。また、共同研究者である Brechin Vincent 博士による Native agarose gel 実験を通じた生化学的解析の結果、6-mCEPh-プリンは、少なくとも以下の 2 つの異なる方法で mature RISC の形成を向上させることが明らかにされた(Brechin et al. 2021)。(1) 6-mCEPh-プリン修飾は、siRNA 二重鎖のうちいずれの片鎖が AGO2 にローディングされるかを規定し、5'末端に 6-mCEPh-プリン修飾されたガイド鎖のローディングを強化する、さらに重要なステップとして、(2) RISC 形成過程において 6-mCEPh-プリン修飾は siRNA 二重鎖ローディングによる pre RISC 形成量には明らかな影響を及ぼさない一方、pre RISC 形成後のパッセージ切断と排出後の mature RISC の安定性を高めることで RISC 形成量を向上させることが示された。上記の通りに 5'末端置換による RISC 形成効率向上メカニズムが明らかにされたことで、当初の期待通りに siRNA ガイド鎖の 5'末端を AGO2MID に高親和性の人工塩基に置換することで RISC 複合体形成効率の向上を狙う本研究コンセプトが生化学的アプローチによっても実証されたと考える。

細胞内 AGO2 タンパク質は miRNA や siRNA などの小分子 RNA と複合体を形成することによって安定化することが知られており(Yoda et al. 2010)、マウスモデルにおける効果持続も 6-mCEPh-purine 修飾 siRNA による AGO2 集積量増加が一因であると考えられた。治療効果の持続は薬効の持続のみならず、投与間隔の延長にもつながるため投与のための通院負担を軽減する患者メリット、薬剤費コスト軽減のメリットにもつながると期待される。

本研究において得られたガイド鎖 5'末端置換による siRNA 活性増強は細胞株ならびにマウス動物モデルで天然塩基 Adenine に比し、6-mCEPh-purin は約 3 倍の活性増強を示したが、既報によれば塩基構造 Adenine を非プリン構造 1-ER triazole に置換した例では細胞株で約 2 倍の活性増強であり(Onizuka et al. 2013)、ガイド鎖 5'末端リン酸を代謝安定な 5'-(E)-vinylphosphonate (5'-E-VP) に置換した例ではマウス動物モデルでガイド鎖 5'リン酸基無し水酸基体(5'-OH)に比較して 5'-E-VP は約 5 倍の活性向上を示している(Elkayam et al. 2017)。得られる活性増強の度合いは比較対象として用いるガイド鎖 5'末端構造や配列にも依存するが、ガイド鎖 5'末端置換効果はリン酸基改変、塩基改変のアプローチ共に数倍から 5 倍の活性増強となっており、これらの技術レベルはほぼ同等と考えられる。核酸医

薬が抱える課題解決としての「限られた細胞内送達数での薬効発揮(=デリバリー困難な標的組織での薬効発揮)」、「安全性向上」、「コスト削減」に十分な効力を発揮するためには、更なる活性増強も期待される。

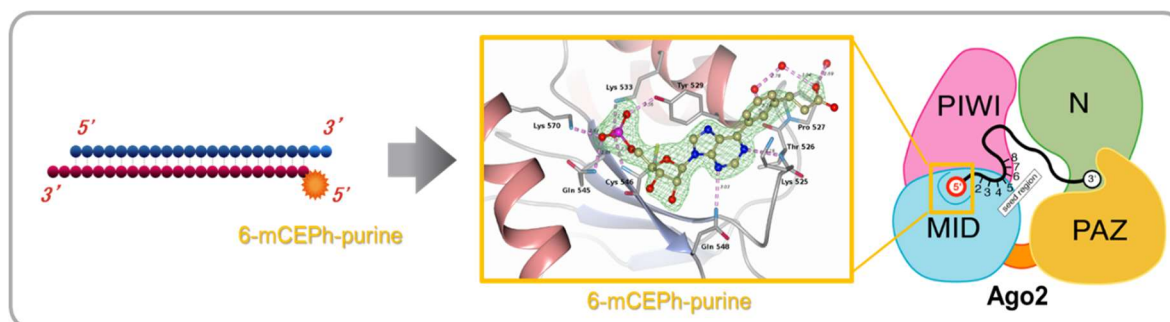


図 39 本研究結果概要図

III.5 本研究戦略「構造情報に基づく siRNA 活性増強策」について

近年、生命活動における RNA の重要性が広く認知され、構造情報に基づき RNA の機能発現メカニズムを解明する「RNA の構造生物学」が、構造生物学のみならず、医学、薬学、工学の多岐な分野で極めて重要な課題として取り組まれている。しかしながら、RNA の構造生物学は、その方法論確立の段階で解決すべき問題も多い上、RNA のある状況における一次的な立体構造や挙動を結晶構造や NMR によって決定しただけでは RNA 機能全体を説明することは難しく、RNA とタンパク質の一連の相互作用をとらえることが可能な NMR 解析法や X 線結晶構造解析法の確立を行う必要がある。さらに近年急速に進歩する分子起動計算法や分子動態学シミュレーションを取り入れることで更に体系立った RNA 構造生物学への展開も期待できるが、RNA とタンパク質の高分子間の相互作用解析は膨大な計算量に及ぶため、NMR や X 線結晶構造解析と計算の両輪を相補的に展開しながら RNA 構造生物学研究を推進することが重要と考えられる。

本研究においては、近年報告が相次いだ AGO2 結晶構造解析に基づく RNA サイレncing の構造生物学的理解に立脚した siRNA 機能向上戦略を立案した。特に RISC 複合体形成効率と細胞内蓄積量決定に大きく寄与すると考えられる、AGO2 による siRNA 取り込みステップ、その中でも「siRNA ガイド鎖 5'末端と AGO2 MID ドメインの相互作用」に注目した。言い換えれば注目点を「siRNA ガイド鎖 5'末

端と AGO2 MID ドメインの相互作用」に限局することで、扱う対象となる構造関連情報、計算量の限定につながり、siRNA と AGO2 全長タンパク全体を扱った相互作用解析では情報量が膨大すぎて実施困難な SBDD に基づく *in silico* 計算解析量と、核酸塩基単量体ベースでの塩基誘導体検討が可能となったのみならず、NMR や X 線結晶構造解析も含めた効果的な研究展開が可能となった。実際に今回の研究では既知構造情報をベースに活用することで、天然塩基ならびに塩基修飾体の化合物毎の化合物受容体構造が計算ならびに構造解析を効率的に展開し、更には極少数の化合物合成で受容体構造の把握、新規相互作用候補点の抽出ならびに新規化合物デザインが論理的かつ効率的に行えたと考えている。

更に既にガイド鎖 5'末端塩基は相補塩基との塩基対形成には寄与せず、AGO2 MID ドメインの結合に機能し、MIDドメインとの構造的合致性が重要であることが明らかであったこと、AGO2 MIDドメインと天然塩基との複合体結晶構造が 2010 年に明らかとされていたこと(Frank et al. 2010)、その後も複数の構造生物学関連報告が続き、RNA サイレンシングの構造生物学的理解が進展し続けことも本研究のコンセプトとした「SBDD をベースとした MID ドメイン高親和性な塩基創生」に集中して検討することを後押しした。

III.6 今後の展開について

今後、siRNA 活性をさらに向上するためのアプローチとして、MIDドメイン結合親和性を更に増強する5'末端塩基誘導体展開の継続が挙げられる。今後取り得るアプローチとしてアデニン6位修飾と8位修飾の組み合わせが戦略の一つ考えられる他、他の骨格を母格とした展開も選択肢となり得る。本研究においては市販アナログから早々に8-Br AMPが取得されたことも受けてアデニン骨格展開を優先したが、AGO2 MIDドメインに対しては天然塩基UMPの解離定数が 0.12 ± 0.01 mM、一方AMPの解離定数は 0.26 ± 0.01 mMと、UMPの方がMIDドメインに対する結合親和性が高いことも報告されていることから(Frank et al. 2010)、UMPを母格に今回と同様の構造最適化を行うことは可能性を残すのみならず、大きな期待を残す。

更にAGO2は5'ヌクレオチド結合ポケットだけでなく、他の多くのドメインを介してsiRNAの5'末端リン酸、siRNA全長の各リボース、各リン酸ジエステルとの相互作用を形成してガイド鎖と結合しているため(Elkayam et al. 2012; Schirle and MacRae 2012; Nakanishi et al. 2012)、今後は5'末端塩基改変のみならず5'-リン酸誘導体や、siRNA分子全体のリボース改変、リン酸ジエステル改変と組み合わせることでAGO2とsiRNAの更なる相互作用向上とsiRNAが機能向上することが期待できる。一方で、今回のような構造情報に基づく核酸構造最適化をSBDDで展開するためには、これまでに得られているsiRNAとAGO2タンパク質全長のX線結晶構造解析情報では不十分であると考えられる。SBDDに基づく化合物探索を成功に導くカギは「立体構造情報をいかに過不足なく抽出するか」にあるが、RISC複合体成熟過程においては、RNAの取り込み、パッセンジャー鎖の放出、機能複合体の形成、標的RNAのサイレンシング、そして、ターンオーバーの過程と、一連のRISC複合体構造変化が明らかになっている。これら一連の構造変化を予測し、計算のみでシミュレーションすることは未だ困難なため、上記各ステップにおける構造生物学的理解の更なる進展を見守りながら、できるだけ多くの高精度構造情報を集めた上でのSBDD戦略再立案が必要になると考えられる。今後、RISC複合体に対する構造生物学が更に進捗し、一連のRISC複合体形成の成熟とターンオーバーに関するsiRNAとAGO2との動的な相互作用が、より精密かつ多角的視点で明らかになっていくことを期待したい。

最後に、本研究を実施中の2018年に初のsiRNA医薬品であるpatisiranがトランスサイレチン型アミロイドーシスの治療薬として、続く2019年にもgivosiranが急性間欠性ポルフィリン症治療薬として、ともにアルナイラムから販売され、これまで十分な治療薬の無かった遺伝性疾患や希少疾患に対する革新的治療薬として患者の方に提供されている。引き続き私もsiRNA医薬品研究を通じて、未だ有効な治

療薬が無い疾患に対応可能な革新的治療薬を提供し、人々の健康と福祉に貢献することを目標としつつ、siRNAの実用性向上に向けた研究開発を推進していきたい。

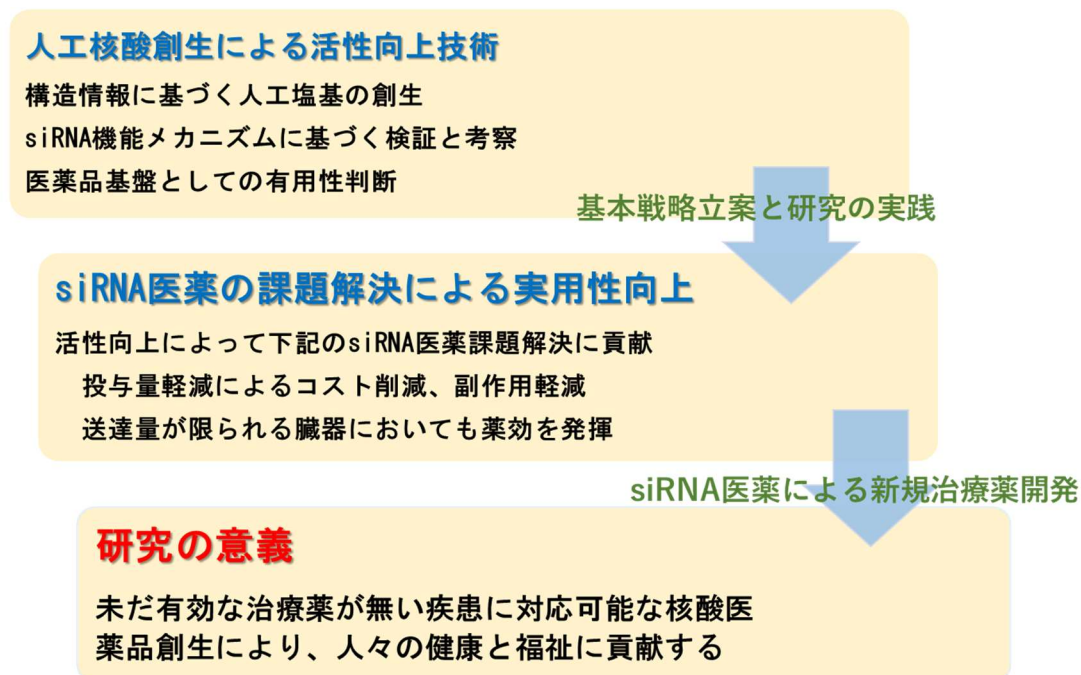


図 40 本研究の意義

IV. 材料及び方法

IV.1 培地、血清、培養用添加物

- Fetal Bovine Serum; Life technologies, Cat. No. 10099-141
- RPMI 1640 Medium (ATCC Modification); Gibco, Cat. No. A10491-01
- 50mg/ml Hygromycin B Solution; 和光純薬工業, Cat. No. 080-07683
- Zell Shield; Minerva Biolabs, Cat. No. 13-0050
- MEM; ナカライテスク, Cat. No. 21442-25
- Penicillin-Streptomycin Mixed Solution; ナカライテスク, Cat. No. 09367-34
- MEM Non-Essential Amino Acids(NEAA); Life technologies, Cat. No. 11140-050
- 100 mM Sodium Pyruvate; Life technologies, Cat. No.11360-070
- William's Medium E (1x, no phenol red); Life technologies, Cat. No. A1217601
- Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum-containing); Life technologies, Cat. No. CM3000

各細胞株を培養する際には、特に記載が無い限り、以下の組成の液体培地を用いた。

(A) HeLa

RPMI 1640 Medium (ATCC Modification) 500mL に Fetal Bovine Serum 50 mL および Zell shield 5mL、50mg/ml Hygromycin B Solution を 3mL 加えた。

(B) HepG2

MEM 500 mL に Fetal Bovine Serum 50 mL および Penicillin-Streptomycin Mixed Solution 5 mL、MEM NEAA 5 mL、100 mM Sodium Pyruvate 5mL を加えた。

(C) 市販マウス初代肝細胞

William's Medium E (1x, no phenol red) 500 mL に Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serumcontaining) 1 バイアルを加えた。

IV.2 AGO2 MIDドメイン調製

Human AGO2 MID ドメイン発現ベクターは、AGO2 の Gln432-Leu578 部分を pE-SUMOpro-3 vector (Life Sensors)に挿入し、クローニングすることにより構築した。DNA 塩基配列の確認には、ABI

PRISM 3100 ジェネティックアナライザ(Applied Biosystems)を用いて、添付のマニュアルに従って dye-terminator 法で行った。構築したベクターを大腸菌 BL21(DE3)に形質転換し、LB 培地 2L にて培養を行った。Ni Sepharose 6 Fast Flow で精製した後、PD-10 カラム (GE Healthcare) でバッファー交換することで His-SUMO タグ付与の AGO2 MID ドメインを精製した。その後、SUMO タグは SUMO プロテアーゼ 2 を用いて 20 °C で切断したのち、Ni Sepharose 6 Fast Flow を介してフロースルーを回収後、SDS-PAGE にて切断を確認した。得られたサンプルは PD-10 カラムでバッファー交換、Millex-HV(Millipore) によりろ過後、AKTA_{FPLC} システム(GE Healthcare)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製を行った。カラムは Mono-Q (GE-Healthcare)を用い、25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM TCEP, 10 % glycerol 中で塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出した。さらに、HiLoad 26/60 Superdex(GE Healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにて精製を行うことで AGO2 MID ドメインを調製した。この時のバッファーは 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 3 mM DTT で行った。

IV.3 qPCR 用プローブ、プライマー

- ・ヒト GAPDH 検出用:Hs02786624_g1, VIC-MGB_PL; ; Life technologies, Cat. No. 4448484
- ・マウス ApoB 検出用:Mm01545156_m1, FAM-MGB; Life technologies, Cat. No. 4331182
- ・マウス HPRT1 検出用: VIC 標識 Taqman プローブ MmHPRT1_P616 及び MmHPRT1_F576, MmHPRT1_R664
- ・VIC 標識 Taqman プローブ; Taqman MGB probe(VIC); applied biosystems, Cat. No. 4316034
- ・マウス GAPDH 検出用:Mm99999915_g1, FAM-MGB; Life technologies, Cat. No. 4331182

IV.4 AMP/UMP 結合部位周辺のマッピングと、化合物デザインへの応用

X 線結晶構造解析により決定された、既知のヒト AGO2 MID ドメインと AMP/UMP との複合体構造の構造座標 (PDB ID: 3LUD、3LUJ)を、Protein Data Bank (PDB)より取得し、下記に示す各種解析の基構造とした。PDB より取得した構造座標には、水素原子が含まれないため、化合物デザインで新規の水素結合形成を狙う場合、水素原子情報が必要とされた。そこで、ヒト AGO2 MID ドメインと AMP/UMP との複合体構造 (PDB ID: 3LUD、3LUJ)を基に、計算化学ソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc.) の Protonate3D を用い、298K、pH7.2、イオン

強度 150 mM の条件下で、水素原子の付加が行われた。さらに、MMFF94x カ場パラメータ(Halgren 1996)) を用い、拘束条件無しで、ヒト AGO2 MID ドメイン/AMP・UMP 複合体構造の最適化が行われた。次に、水素原子付加後、MMFF94x カ場パラメータを基に部分電荷を割り当て、核酸のリン酸・deoxyribose の重原子を固定した状態で、ヒト AGO2 MID ドメイン、核酸塩基、周辺水分子の構造最適化が行われた。リガンド(AMP/UMP)から 4.5 Å 以内の範囲で box を作製後、0.4 Å ごとにグリッドが作製され、その後、複合体構造中からリガンドと水分子を取り除いたアポ体構造で、グリッドの各頂点に、水素結合受容体、供与体、疎水性原子の原子半径、部分原子電荷を反映した擬似原子を配置し、ヒト AGO2 MID ドメインとの相互作用エネルギーが算出された。一連の計算結果は、ビジュアライズソフトウェアの VMD (米イリノイ大)に読み込み視覚化された。ヒト AGO2 MID ドメインのアポ体構造から見た AMP/UMP 結合部位周辺の水素結合受容体、供与体、疎水性原子が好まれる配置をマッピングすることで、特徴付けが行われた。

AGO2 との相互作用エネルギーを評価するために、疎水性または水素結合アクセプター/ドナー原子などの各仮想原子がグリッドポイントに配置された。さらに、AGO2 および AMP/UMP 構造は固定されたまま、AMP/UMP にコンビナトリアルビルダーモジュールを使用して置換基を導入のフラグメント計算が実行された。

IV.5 AGO2 MID ドメイン/ヌクレオチドモノマー X 線結晶構造解析

RNA を含まない AGO2 MID ドメインは、既報の論文(Frank et al. 2010)に記載の方法に基づき IV.2 で示す方法により発現および精製された。タンパク質溶液と沈殿剤溶液を 1:2(v/v) の比で混合して結晶化溶液とし、リザーバー溶液として沈殿剤溶液を用いて、20 °C の室内でシッティングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。また、結晶化の際には、マイクロシーディングを行った。文献での結晶化条件を基にして、AGO2_MID のアポ体結晶化実験を行い、X 線回折実験に供するアポ体結晶を作製した。結晶化プレートの観察は、RockImager (Formulatrix, Waltham, MA, USA) 、または、実体顕微鏡を用いて行われた。X 線回折実験に供した結晶は、抗凍結剤溶液 [10w/v% Glycerol 0.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Imidazole pH 8.0, 2.4 mol/L K₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH7.3, 20 mmol/L 8-Br AMP (6-mCEPh-purine)] に浸漬した後、少量の抗凍結剤溶液と共にループで掬って直ちに液体窒素中に浸漬し、瞬間的に冷却させた。100K の超低温窒素気流下で X 線回折実験を行った。

X線照射による結晶の放射線損傷を低減するため、100Kの極低温窒素気流下でX線回折実験を行う低温結晶解析の手法が用いられ、X線回折実験は、高エネルギー加速研究機構 Photon Factory beamline NW12A (8-Br AMP)、Photon Factory-Advanced Ring beamline BL17A (6-mCEPh-purine) において実施された。得られた X 線回折像に対して、プログラム HKL2000(HKL Research, Inc., Charlottesville, VA), Mosflm(Leslie 2006), KAMO, XDS, CCP4 Software Suite 内の POINTLESS、AIMLESSを用いて回折点の指数付け、結晶空間群の決定、回折強度積分計算、強度データスケールリング、及びマーキングが行われた。構造解析はプログラム Phaser を用いた分子置換法によって初期位相が決定された。得られた初期構造をもとに、プログラム REFMAC5 を用いた逆空間構造精密化(剛体近似精密化、束縛付き精密化、TLS モデルによる非等方性温度因子の精密化など)と、構造修正用グラフィックスソフト Coot 上での実空間におけるマニュアル構造修正(電子密度図を確認しながらタンパク質構造修正、リガンドモデル構築、水分子や溶媒分子の電子密度へのアサインなど)を、Rwork、Rfree などの結晶学的 R 因子や、Ramachandran Plot などの立体化学的な指標が妥当な値に収束するまで繰り返された。また、構造の作図は CCP4mg で行われた(Vagin and Teplyakov 1997)。

IV.6 NMR 結合実験

全ての測定は AVANCE600 (Bruker, Billerica, MA, USA) を用いて、20 °C で行われた。AGO2 MID ドメインのタンパク質フラグメントは、既報に基づく手法で調製され(Frank et al. 2010)、25 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、および 2 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンにて pH 6.70 で溶解された。8-Br AMP ならびに 6-mCEPh-purine モノヌクレオチドは結晶構造解析のために DMSO-*d*₆ (Merck, #10351) で 100 mM 濃度に調製したものをを用いた。重溶媒である重水(D₂O)、重ジメチルスルホキシド(DMSO-*d*₆)は MERCK 社から購入したものを使用し、カタログ番号がそれぞれ 113366、10351 のものを使用した。

全ての測定は AVANCE600 (Bruker BioSpin, Germany) を用いて、20°C で測定を行った。

(1) AGO2-MID の NMR 信号帰属は、500 μmol/L に調製した {¹³C, ¹⁵N} ラベル化 AGO2-MID (Lot10) を 5 mm φ の NMR 試料管(Norell, #509-UP-7) に 500 μL 移し、タンパク質の主鎖 NMR 信号帰属のために必要な三次元測定を実施した。(2) 結合実験は、47 μmol/L の{¹⁵N} ラベル化 AGO2-MID (Lot9) を用いて実施した。タンパク質試料の ¹H-¹⁵N 相関スペクトルを測定し、化合物を滴定することにより、

NMR 信号変化を観察した。(1), (2) で得られた NMR スペクトルは Topspin 3.1 (Bruker BioSpin, Germany) により処理し、SPARKY3 により解析を行った。帰属には MARS4 を用いた。

結合実験: $\{^{15}\text{N}\}$ AGO2-MID の ^1H - ^{15}N 相関スペクトルから、化合物の有無により変化する信号を

$$\text{CSP (chemical shift perturbation)} = \text{SQRT}(\{\Delta\nu_{\text{H}}\}^2 + \{\Delta\nu_{\text{N}}\}^2)$$

とし、その変化量から結合部位の同定を行った。ここで $\Delta\nu_{\text{H}}$, $\Delta\nu_{\text{N}}$ はそれぞれ、化合物の有無により変化した水素核 (^1H) と窒素核 (^{15}N) の周波数差 [Hz] を表す。

解離定数 (K_d): タンパク質と化合物の結合の割合は、化学シフトの変化で観測でき、

$$f(x) = \delta_{\text{obs}} - \delta_0$$

(δ_{obs} , δ_0 はそれぞれ、ある化合物濃度における化学シフトと化合物のないときの化学シフトを表す) として表すことができる。これは、

$$f(x) = \delta_{\text{sat}} / [\text{MID}]_{\text{tot}} * \{ (K_d + [\text{MID}]_{\text{tot}} + [\text{MID}]_{\text{tot}} * X) / 2 - \text{SQRT}[(K_d + [\text{MID}]_{\text{tot}} + ([\text{MID}]_{\text{tot}} * X)^2 - 4 * [\text{MID}]_{\text{tot}}^2 * X] / 2 \}$$

として置き換えることができる。ここで、 δ_{sat} , $[\text{MID}]_{\text{tot}}$, X はそれぞれ、CSP の最大値、AGO2-MID の濃度、化合物と AGO2-MID の濃度比 ($[\text{化合物}] / [\text{AGO2-MID}]$) を表し、 X を横軸に、化学シフト変化値を縦軸に取り、 δ_{sat} , K_d を変数としてエクセルのソルバーにより、

$$\chi^2 = \sum \{ f(x) - \delta_{\text{obs}} \}^2$$

が最少となるように、非線形フィッティングを行った。また、AMP, 8-Br AMP, 6-mCEPh purine においては、(1) CSP > 20 [Hz] を持ち、(2) NMR 信号が分離している、2つの条件を満たした 16 個の NMR 信号 (Phe505, Arg506, Leu517, Val520, Leu522, Gly524, Tyr529, Glu531, Lys533, Gly536, Thr538, Cys546, Val547, Met549, Lys550, 未帰属信号 1 つ) を用いて (6-mCEPh purine は信号の重なりのある Lys533, Cys546 を除く 14 個の信号を用いて) 同時フィッティングを行った。同時フィッティングは、それぞれのフィッティングにおいて同一の K_d と、それぞれの δ_{sat} (n) を変数として、 $\sum \chi(n)^2$ が最少となるよう、フィッティングを行った。エラーはジャックナイフ法により決定した。

IV.7 Biacore を用いたヌクレオチドの AGO2 MID ドメイン結合評価

Biacore 試験用試薬

- ・HBS-EP+ 10X; GE, Cat. No. BR-1006-69
- ・Dithiothreitol; ナカライテスク, Cat. No. 14128-04
- ・Series S Sensor Chip SA; GE, Cat. No. BR100531
- ・Dimethyl Sulfoxide; Sigma-Aldrich, Cat. No. D2650-100ML
- ・Adenosine 5'-monophosphate monohydrate; Sigma-Aldrich, Cat. No. A2252-5G
- ・5M NaCl; Ambion, Cat. No. AM9759
- ・2-propanol; ナカライテスク, Cat. No. 29113-95

ヌクレオチドモノマーの AGO2 MID ドメインとの結合親和性を、基盤表面に固定した核酸との競合を測定することで評価した。測定は Biacore T200(GE 社)が用いられた。Series S Sensor Chip SA にビオチン化核酸ガイド鎖 pC 末端オリゴ(パッセンジャー鎖 5'末端 Biotin 標識)の固定化を行った。流速(Flow rate)は 10 μ L/min で一定、HBS-EP+で 100 nM に希釈したオリゴ溶液を以下のプログラムで Fc2 に固定化した。同時に Fc1 はブランクの固定化操作を行った。

1. 1M NaCl/50 mM NaOH, 60 秒(INJECT コマンド), 3 回
2. ランニングバッファー, 60 秒(WASH コマンド)
3. ランニングバッファー, 60 秒(INJECT コマンド)
4. Aim for Immobilized Level を 200 RU に設定し固定化(LIGAND INJECT コマンド)
5. 1M NaCl/50 mM NaOH/50% イソプロピルアルコール, 120 秒(WASH コマンド)

HBS-EP+ 10x を純水で 10 倍希釈し、終濃度 2 mM となるように Dithiothreitol (DTT)を加え、フィルターろ過することで HBS-EP+, 2 mM DTT 水溶液とした。この溶液に終濃度 5%となるように Dimethyl Sulfoxide (DMSO)を加え、ランニングバッファーとした。

ヌクレオチドモノマーは 200 μ M, 40 μ M, 8 μ M, 1.6 μ M/(10% DMSO, HBS-EP+, 2 mM DTT)となるように希釈し、HBS-EP+, 2 mM DTT 溶液で希釈した 5 μ g/mL AGO2 MID ドメインと等量混合することで、HBS-EP+, 2 mM DTT, 5%DMSO 溶液でモノマーをそれぞれ 100 μ M, 20 μ M, 4 μ M, 0.8 μ M 含む 2.5 μ g/mL AGO2 MID ドメイン溶液を調製した。

ビオチン化核酸を固定化したチップを用いてヌクレオチド(モノマー)による競合実験を行った。流速は全て 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で行い、1 サイクルは結合 60 sec、解離 15 sec、再生 1M NaCl, 5 sec で行った。

機器安定化のため、初めの 10 サイクルはランニングバッファーのみ添加し、その後はサンプル毎にランニングバッファー[BLANK]、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGO2 MIDドメイン溶液[CONTROL]、siRNA をそれぞれ 0.8 μM , 4 μM , 20 μM , 100 μM 含む 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGO2 MIDドメイン溶液の順に測定した。

IV.8 Luciferase 標的 siRNA の RNAi 活性評価

HeLa 細胞(CCL-2; American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA)に pGL4.50 [luc2 / CMV / Hygro](Promega, Madison, WI)ベクターをトランスフェクトし、ハイグロマイシン含有 RPMI 培地(A10491 Gibco; Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム)で培養した。ルシフェラーゼ発現 HeLa 細胞を、10%ウシ胎児血清を添加した RPMI 培地に懸濁し、96 ウェル培養皿に 7.5×10^3 細胞/ウェルで播種した。siRNA を各最終濃度の 12 倍濃度となるように OPTI-MEM で希釈し、OPTI-MEM 100 μL あたり 2.4 μL の Lipofectamine RNAiMAX を含むように希釈した溶液と等量混合させることで siRNA-Lipofectamine RNAiMAX 複合体を形成させた。その後、添付のプロトコルに従い室温で 15 min 静置後、各ウェルに複合体溶液を 10 μL 添加することで siRNA を HeLa 細胞へ導入した。この際、陰性対照群として Opti-MEM に対し Lipofectamine RNAiMAX 希釈溶液を等量混合させた溶液も調製し、細胞に添加した。

37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 条件下で 24 時間培養後、各 well に対して市販ルシフェラーゼ定量試薬である Steady-Glo Luciferase Assay System を各ウェルに 40 μL 添加し、1 分間のインキュベーション後、ARVO-X3 (PerkinElmer)にて各ウェルの 1 秒あたり発光量(cps)を測定した。

実験に供する siRNA は下記配列を用いた。また各 siRNA はシグマアルドリッチ、北海道システムサイエンスに委託合成し、アニーリングしたものを試験に供した。

siRNA	Guide 鎖 5'末端	strand	sequence 5'-3' (全て RNA)
Luc1_239	A	Passenger	UGCAGCGAGAAUAGCUUGUAG
		Guide	ACAAGCUAUUCUCGCUGCACA
	C	Passenger	UGCAGCGAGAAUAGCUUGGAG
		Guide	CCAAGCUAUUCUCGCUGCACA
	G	Passenger	UGCAGCGAGAAUAGCUUGCAG
		Guide	GCAAGCUAUUCUCGCUGCACA
U	Passenger	UGCAGCGAGAAUAGCUUGAAG	
	Guide	UCAAGCUAUUCUCGCUGCACA	
LUC2_388	A	Passenger	GAAAGGGCUGCAAAAGAUUCU
		Guide	AAUCUUUUGCAGCCCUUUCUU
	C	Passenger	GAAAGGGCUGCAAAAGAUGCU
		Guide	CAUCUUUUGCAGCCCUUUCUU
	G	Passenger	GAAAGGGCUGCAAAAGAUCCU
		Guide	GAUCUUUUGCAGCCCUUUCUU
U	Passenger	GAAAGGGCUGCAAAAGAUACU	
	Guide	UAUCUUUUGCAGCCCUUUCUU	
LUC3_454	A	Passenger	GGAUAGCAAGACCGACUAUCA
		Guide	AUAGUCGGUCUUGCUAUCCA
	C	Passenger	GGAUAGCAAGACCGACUAGCA
		Guide	CUAGUCGGUCUUGCUAUCCA
	G	Passenger	GGAUAGCAAGACCGACUACCA
		Guide	GUAGUCGGUCUUGCUAUCCA
U	Passenger	GGAUAGCAAGACCGACUAACA	
	Guide	UUAGUCGGUCUUGCUAUCCA	
LUC4_772	A	Passenger	CGGCUUUCGGGUCGUGCUUUAU
		Guide	AAGCACGACCCGAAAGCCGCA
	C	Passenger	CGGCUUUCGGGUCGUGCUGAU
		Guide	CAGCACGACCCGAAAGCCGCA
	G	Passenger	CGGCUUUCGGGUCGUGCUCU
		Guide	GAGCACGACCCGAAAGCCGCA
U	Passenger	CGGCUUUCGGGUCGUGCUAAU	
	Guide	UAGCACGACCCGAAAGCCGCA	
LUC5_874	A	Passenger	UAGCUUCUUCGCUAAGAGUAC
		Guide	ACUCUUAGCGAAGAAGCUAAA
	C	Passenger	UAGCUUCUUCGCUAAGAGGAC
		Guide	CCUCUUAGCGAAGAAGCUAAA
	G	Passenger	UAGCUUCUUCGCUAAGAGCAC
		Guide	GCUCUUAGCGAAGAAGCUAAA
U	Passenger	UAGCUUCUUCGCUAAGAGAAC	
	Guide	UCUCUUAGCGAAGAAGCUAAA	

siRNA	ガイド鎖 5'末端	strand	sequence 5'-3'
Luc	A	Passenger	GGAUAGCAAGACCGACUAUCA
		Guide	p-AUAGUCGGUCUUGCUAUCCA
	6-mCEPh-purine	Passenger	GGAUAGCAAGACCGACUAUCA
		Guide	p-6-mCEPh-purineUAGUCGGUCUUGCUAUCCA
Luc1	A	Passenger	UGCAGCGAGAAUAGCUUGUAG
		Guide	pACAAGCUAUUCUCGCUGCACA
	6-mCEPh-purine	Passenger	UGCAGCGAGAAUAGCUUGUAG
		Guide	P-6-mCEPh-purineCAAGCUAUUCUCGCUGCACA
Luc9	A	Passenger	GACGAGGUGCCUAAAGGAUUG
		Guide	pAUCCUUUAGGCACCUCGUCCA
	6-mCEPh-purine	Passenger	GACGAGGUGCCUAAAGGAUUG
		Guide	p-6-mCEPh-purineUCCUUUAGGCACCUCGUCCA
ApoB	A	Passenger	AAUCAAGUGUCAUCACACUGA
		Guide	p-AGUGUGAUGACACUUGAUUUA
	6-mCEPh-purine	Passenger	AAUCAAGUGUCAUCACACUGA
		Guide	p-6-mCEPh-purineGUGUGAUGACACUUGAUUUA

IV.9 マウス初代肝細胞に対する siRNA ノックダウン評価

初代肝細胞(MSCP10;マウス[CD-1]凍結保存肝細胞、Pateable Male; Thermo Fisher Scientific)を、初代肝細胞用培地培地に懸濁しました。懸濁した細胞を 50 g にて 3 分間遠心し、上清を注意深く除去した後、初代肝細胞用培地にて 150,000 cells/mL になるように希釈後 50 μ L ずつ Collagen I コート 96 well 平底プレート(BD, Cat. No. 356407) に播種した。メーカーの指示に従って Lipofectamine RNAiMAX を使用して解析対象 siRNA を初代肝細胞にトランスフェクトし、37 °C、5% CO₂ 条件で 24 時間培養した。SuperPrep Cell Lysis&RT Kit for qPCR(SCQ-101; Toyobo、Osaka、Japan)を使用して、トータル RNA を抽出し、cDNA に変換した。ApoB mRNA レベルは、ApoB TaqMan プローブ (Mm01545156_m1; Thermo Fisher Scientific)と HPRT TaqMan プローブ MmHPRT1_P6-mCEPh-purine (5'-TGGTTAAGGTTGCAAGCTTGCTGGTG-3'; Thermo Fisher Scientific)、MmHPRT1_F576(5'-GCTTCTGTCCTGTCCTGTCCTGTCCTGTCCTGCTCTGCTCTGCA、セントルイス、ミズーリ州)、および MmHPRT1_R664 (5'-CAACAAAGTCTGGCCTGTATC-3'; Sigma-Aldrich) (QuantStudio™ 12K Flex リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems、カリフォルニア州

フォスターシティー))を用いて解析を行った。HPRT mRNA レベルで補正を行いながら解析対象の ApoB mRNA 発現レベルを定量した。

IV.10 細胞からの RNA 抽出および cDNA 合成

培養後の細胞から培地を除き、4 °C に冷やした PBS を 100 μ L 加えることで細胞を洗浄、上清を除いた。その後、RNA を含む細胞溶解液の調製には SuperPrep Cell Lysis キット(toyobo)を用い、同キット付属の RT Kit for qPCR を用いてキットに添付された説明書に従って逆転写反応を行うことで cDNA を合成した。

IV.11 定量 PCR(qPCR)

調製された cDNA に対し以下の通り qPCR 反応を行うことで Taqman probe 法により目的遺伝子及び対照遺伝子の mRNA 量を測定した。

鋳型 cDNA 4 μ L、標的 mRNA に対するプローブならびにプライマー、2xTaqMan Gene Expression Master Mix 10 μ L を混合し、滅菌水にて全量 20 μ L に調製した反応溶液をポリプロピレン製 384 well PCR プレート(Life technologies)に加え、50 °C 2 分、95 °C 10 分で加熱後、95 °C 1 秒、60 °C 1 分の加熱処理を 50 サイクル実施し、各ウェルの蛍光強度を継続的に測定した。機器は Quantstudio12K Flex(Applied biosystems)を使用した。

IV.12 Native agarose gel 解析

HeLa 細胞または HEK 細胞ライセートは 40x 反応ミックス(ATP、ATP 再生システムおよび RNase 阻害剤を含む)、および溶解バッファー(30 mM HEPES (pH 7.4)、100 mM KOAc および 2 mM Mg(OAc)₂)を用いて Dounce ホモジナイゼーションにて調製した(Haley and Zamore 2004; Yoda et al. 2010)。

in vitro RISC アセンブリアッセイは、ライセート 5 μ l、40x 反応ミックス 3 μ l、small RNA 1 μ l、ターゲット RNA 1 μ l(合計 10 μ l)にて反応させた。1.4%(w/v)アガロース(ローレンジウルトラアガロース、Bio-Rad Laboratories)を含む、厚さ 1.5~2 mm のネイティブゲルを、厚さ 0.5 mm の下部スペーサー(16 cm \times 16

cm)を備えたガラスプレート間に垂直に設置した。10 nM の ^{32}P 放射性標識二本鎖 siRNA と 10 nM の非標識 2'-OMe 修飾ターゲット RNA、100~600 nM の非標識 siRNA を RISC アセンブリアッセイ条件に応じて 25 °C にてインキュベーション後、サンプルを氷冷した 0.5X Tris-borate-EDTA バッファー中、300 V で 1.5 時間、垂直のネイティブアガロースゲル電気泳動で分離した。複合体は PhosphorImager (BAS-1500 または FLA-7000 画像アナライザー、Fujifilm) によって検出した(Kawamata et al. 2009)。Target RNA には次の配列を用いた。

Target RNA: 5'-

mAmGmCmUmAmGmCmUmAmAmUmCmAmAmGmUmGmUmCmAmUmCmAmCmAmCmUmGmAmAmGmCmUmAmGmCmU-3'

siRNA は以下の配列を実験に用いた。

ApoB 標的 siRNA Guide 5'A	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	^{32}P -AGUGUGAUGACACUUGAUUUA
ApoB 標的 siRNA Guide 5' 6-mCEPh-P	Passenger	pAAUCAAGUGUCAUCACACUGA
	Guide	^{32}P -AGUGUGAUGACACUUGAUUUA

IV.13 RISC 中 siRNA ガイド鎖分子数の定量

ルシフェラーゼ発現 HeLa 細胞を、10%ウシ胎児血清を補充した RPMI 培地に懸濁し、96 ウェル培養皿に 1 ウェルあたり 1×10^4 細胞で播種した。細胞に Lipofectamine RNAiMAX を 10 μL /ウェルで使用して siRNA をトランスフェクトした後、37 °C、5% CO₂ 条件で 24 時間培養した。24 時間培養後、100 μL のリシスバッファー M (034-21143; Wako Chemicals) と 1%プロテアーゼ阻害剤カクテル (P8340; Sigma-Aldrich) で溶解した。溶解した培養液の一部は Micro BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質定量を行った。残りの溶解液を新しいチューブに移し、その後、siRNA ガイド鎖レベルをステムループ逆転写と TaqMan qPCR で定量した。

IV.13.1 タンパク定量

調製した各細胞溶解液 5 μL に Lysis buffer M を 45 μL 加えることで 10 倍希釈溶液を調製した。測定には Micro BCA Protein Assay Kit を用い、添付のプロトコルに従って Micro BCA Working Reagent(WR)を調製し、本溶液 50 μL と上記 10 倍希釈溶液を混合させ、プレートシールの後 37 °C、2 時間反応を行った。検量線サンプルとして、HeLa 細胞 1×10^6 cells を Lysis buffer M で溶解した溶液を

調製し、Lysis buffer M を用いて 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, 0.001x10⁶ cells/mL 溶液を作製後、上記と同様の手順で n=4 の条件にて反応を行った。反応終了後、ARVO-X3 (PerkinElmer)にて 560 nm における各ウェルの 1 秒あたり吸光度を測定した。

IV.13.2 anti-human AGO2 beads の調製

Dynabeads M-270 Epoxy を Dimethyl formamide 2 mL に溶解させ、その内の 200 μ L を 1.5 mL チューブに分注し DynaMag-2 を用いて PBS で 2 回洗浄を行った。その後、2 M Ammonium sulfate in DPBS 200 μ L, Anti human AGO2, monoclonal antibody (4G8) 200 μ L を加え、37 °C にて 1 晩回転しながら反応を行った。反応完了後は上清除去、0.5% BSA/DPBS にて 4 回洗浄操作の後に、600 μ L の 0.5% BSA/DPBS に懸濁させることで anti-human AGO2 beads を調製した。

細胞溶解液と混合の前には、Lysis buffer M にて 2 回洗浄を行った後に Lysis buffer M に置換して使用した。

IV.13.3 AGO2 タンパク溶解溶液の調製

96 well プレートの各 well に 5 μ L の上記 anti-human AGO2 beads を添加し、100 μ L の細胞溶解液を添加し、well に蓋及びプレートシールを貼った後に、冷室にて 2 時間ボルテックス操作を行うことで、細胞溶液中の AGO2 タンパクを anti-human AGO2 beads に捕捉させた。

反応後は DynaMag-96 Side を用いて Lysis buffer M 200 μ L にて 3 回洗浄操作を実施し、TaqMan Gene Expression Cells-to-CT Kit に含まれる Lysis Solution 20 μ L を加えて 10 min ボルテックスを行うことで AGO2 タンパクを溶解させた。反応終了後は同 Cells-to-CT Kit の Stop solution を 2 μ L 加えることで反応を停止した。検量線用サンプルとしては、Luc AS を 0.33 nM から 0.3 倍ずつ濃度 6 点で希釈した溶液 3 μ L と Lysis Solution 17 μ L, Stop Solution 2 μ L を加えることで調製した(top 濃度で 1 fmol の核酸が含まれる)。

なお、5'末塩基を含むプライマーで qPCR を行うと、5'末端の塩基の違いにより T_m 値が変わり PCR の感度が異なることが考えられるため、qPCR 時のプライマーは 5'末端から 2 塩基目以降にアニーリングする設計とした。

IV.13.4 逆転写反応および定量 PCR

qPCR に使用されるプライマーと TaqMan プローブは、それぞれ Sigma-Aldrich と Thermo Fisher Scientific によって合成された。抽出された RNA と標準 RNA は、TaqMan MicroRNA RT キット (4366597;サーモフィッシャーサイエンティフィック)を使用して、製造元の指示に従い、次のプライマーを使用して cDNA に変換された:

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATGGAT-3'

qPCR は、TaqMan Gene Expression Master Mix(Thermo Fisher Scientific、4369542)を使用して、次のプライマーを用いて行われた:

Forward プライマー; 5'-TAGTCGGTCTTGCTATC-3'

Reverse プライマー; 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

TaqMan プローブ; 5'-CTGGATACGACATGGA-3'

Luc ガイド鎖の検出に際しては、テンプレート溶液 4 μ L、2 μ M Luc_Taqman プローブ 2 μ L、15 μ M の Forward プライマー 2 μ L、7 μ M Reverse primer 2 μ M、2x TaqMan Gene Expression Master Mix 10 μ L を混合した反応溶液をポリプロピレン製 384 well PCR プレート(Life technologies)に加え、50 $^{\circ}$ C 2 分、95 $^{\circ}$ C 10 分で加熱後、95 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分の加熱処理を 50 サイクル実施し、各ウェルの蛍光強度を継続的に測定した。機器は Quantstudio12K Flex(Applied biosystems)を使用した。

IV.14 マウス動物モデル実験用デリバリー製剤 LNP 調製

カチオン性脂質 SST-02((3-hydroxypropyl)dilinoleylamine)(Kuboyama et al. 2019)は社内合成された。PEG2000-DMPE [N-(carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; sodium salt], DSPC (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)、およびコレステロールは、NOF(東京、日本)から購入した。既報に基づき各 ApoB siRNA は、カチオン性脂質:PEG2000-DMPE: DSPC:コレステロールの脂質組成が 47.8:5.1:13.9:33.2 モルパーセントとなる LNP へ封入された(Yamauchi et al. 2006; Yagi et al. 2009)。

IV.15 マウス動物モデル実験

すべての動物試験は、協和キリン株式会社の施設内動物管理および委員会承認の下、協和発酵キリン株式会社における動物実験適正実施基準に従って実施された。(協和キリン株式会社は AAALAC International (The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International/国際実験動物ケア評価認証協会)による完全認証施設である。)

クレアジャパン株式会社(東京、日本)から入手した5週齢の Balb / cA 雄マウスを用いてマウス動物試験を実施した。温度と湿度が制御された部屋で、マウスを一定の 12 時間の明/12 時間の暗のサイクルで維持し、自由に餌と水を与えられた。マウスをアデニン、6-mCEPh-purine、6-PBuS-purine (n = 3 /グループ)の3つのグループに分け、尾静脈注射によって 0.03、0.1、または 0.3 mg / kg の LNP 封入済み siRNA を静脈内投与し、各観察時点で安楽死させた。尾静脈投与後 2 日目または 7 日目に血液および肝臓サンプルを採取した。

マウス血漿中の総コレステロールは、LabAssay™コレステロールキット(Cat#294-65801、和光化学、大阪、日本)を使用して、製造元の指示に従って測定した。

IV.16 肝臓組織からの total RNA の抽出、qPCR

肝臓組織からの total RNA の抽出及び mRNA 量の測定は以下の手順で実施した。

肝臓サンプルの入った 2 mL 丸底 tube に 500 μ L の Trizol reagent および 5 mm のジルコニアビーズを添加し、Tissue lyser II (QIAGEN)にて 1/25fre1, 1.5 min の条件で破碎した。破碎後遠心(10000 rpm, 10 min)し上清を回収、200 μ L のクロロホルムを添加し激しく攪拌後再び遠心(15000 rpm, 15 min)した。得られた上清 200 μ L から自動核酸抽出機 MagNA PURE 96 (Roche)にて、Cellular RNALarge Volume Kit を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA 濃度を微量吸光光度計 Dropsense96 にて測定し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit を用い以下の手順で cDNA の合成を行った。

500 ng の total RNA に オリゴ(dT)₁₈プライマー 1 μ L、5xRT 反応バッファー 4 μ L、10xdNTP 2 μ L、RNase インヒビター 0.5 μ L、Transcriptor Reverse Transcriptase 0.5 μ L に RNase free water を加えて最終的に 20 μ L の溶液を調製し、逆転写反応に供した(25°C 10 分、50°C 60 分、85°C 5 分)。逆転写された cDNA は RNase free water を用いて 5 倍に希釈し、希釈済み cDNA 5 μ L を用いて TaqMan Gene Expression Master Mix を用いてマウス ApoB 遺伝子とマウス HPRT1 遺伝子を測定した。mRNA ノックダウン活性は、各実験において生理食塩水で処理された対照と比較して計算された。

IV.17 マウス血漿中コレステロール定量

マウス血漿中のコレステロール量は LabAssay™ Cholesterol キットを用い以下の手順で測定した。検量線作製のサンプルとしてキット付属のコレステロール標準液を蒸留水で希釈することで 25 mg/dL, 50 mg/dL, 100 mg/dL, 200 mg/dL, 397.4 mg/dL, 592.2 mg/dL の溶液を調製した。本検量線サンプル (各 2 点) 及び測定用のマウス血漿サンプルを各 2 μ L ずつ 96well Plate に添加し、発色試薬を 150 μ L ずつ各 well に加え、プレートシールをした後に 37 °C, 5 min インキュベートすることで反応させた。測定機器には ARVO-X3(パーキンエルマー社)を用い、560 nm の 1 秒間の吸収を測定した。

IV.18 統計解析

特に記載のない限り、データは平均値 \pm SD として表示した。双方向分散分析(ANOVA)を使用して、解析対象ならびに比較対象の両グループ間の各濃度の有意差が検定された。対応のない t 検定(Unpaired t-tests)を使用して、連続変数の 2 つのグループ間の差異が検定された。Unpaired t-test と一元配置分散分析(one-way ANOVA)を使用して、連続変数のグループ内の差異が検定された。ボンフェローニ補正(Bonferroni correction)をグループ間比較時の補正に使用された。P 値<0.05 を有意であると見なした。すべての統計分析は、Windows の SPSS バージョン 22.0(IBM、Armonk、ニューヨーク)を使用して、株式会社サティスタによって実行された。

IV.19 ホスホロアミダイト合成

略語表

Et	ethyl
BOP	(benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIEA	N,N-diisopropylethylamine
DMF	N,N-dimethylformamide
DMTr	4,4'-dimethoxytrityl
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
HOBt	1-hydroxybenzotriazole

Im	imidazole
PBS	phosphate buffered saline
py	pyridine
TBS	tert-butyl dimethylsilyl
TEA	triethylamine
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin-layer chromatography

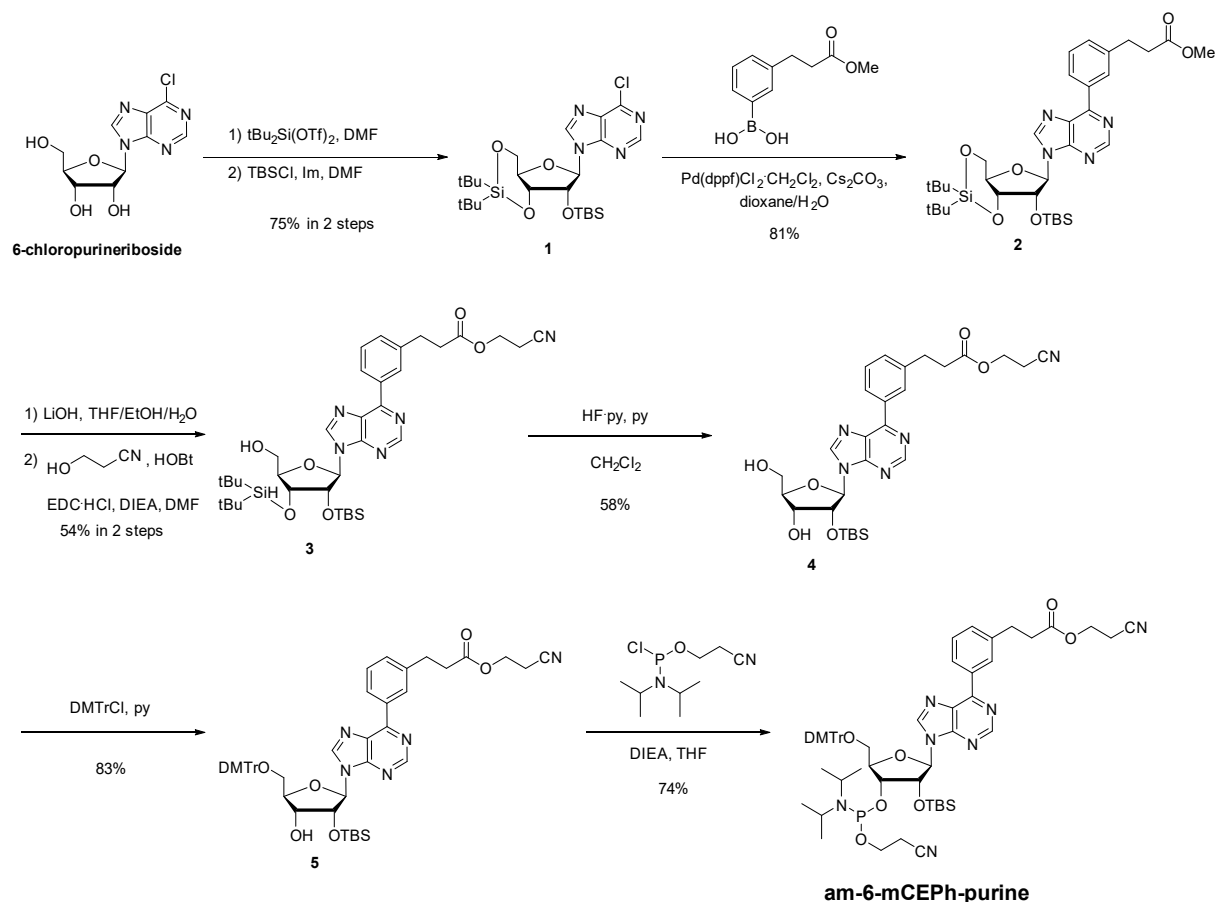
機器・装置

物理化学データは、以下の機器類を用いて測定した。

核磁気共鳴スペクトル(^1H , ^{31}P -NMR)は JEOL ECS-400, ECX-400P を用いて測定し、内部標準としてテトラメチルシランを用いケミカルシフト値は δ 値で示した。質量分析は Waters 社製 Waters 2795、Waters 2487、Waters micromass ZQ を用いて測定した。

IV.20 6-mCEPh-purine 合成

以下に示す合成ルートにより 6-mCEPh-purine アミダイトの合成を行うことでオリゴ合成に供された。



6-chloro-9-((4aR,6R,7R,7aR)-2,2-di-*tert*-butyl-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydro-4H-furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxasilin-6-yl)-9H-purine (化合物 1)

市販の 6-クロロプリンリボシド (5.14 g, 17.9 mmol) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (60 mL) に溶解し、ジ-*tert*-ブチルシリルジトリフラート (6.97 mL, 21.5 mmol) を 0 °C で加え、2 時間半攪拌した。飽和重曹水でクエンチした後、酢酸エチル (100 mL) で 2 回抽出し、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し、粗成績体を得た。

粗成績体を *N,N*-ジメチルホルムアミド (60 mL) に溶解した後、イミダゾール (3.05 g, 44.8 mmol) 及び *tert*-ブチルジメチルシリルクロリド (3.24 g, 21.5 mmol) を加え、60 °C で 1 時間攪拌した。TLC の結果より反応が完結していなかったため、*tert*-ブチルジメチルシリルクロリド (2.70 g, 17.9 mmol) を加え、60 °C で更に 1 時間攪拌した。TLC の結果より反応が完結していなかったため、イミダゾール (1.83 g, 26.9 mmol) 及び *tert*-ブチルジメチルシリルクロリド (2.70 g, 17.9 mmol) を加え、60 °C で更に 1 時間攪拌した。飽和重曹水でクエンチした後、酢酸エチル (150 mL) で 2 回抽出し、飽和食塩水 (200 mL) で洗浄し

た。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し、化合物 1 の粗成績体を得た。得られた粗成績体をカラムクロマトグラフィー (山善ハイフラッシュカラム 3L, 展開溶媒: *n*-ヘプタン/酢酸エチル = 100/0 → 80/20)にて精製することにより、化合物 1 (7.29 g, 13.5 mmol) を淡茶色アモルファス状固体として得た(収率 75%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.74 (1H, s), 8.14 (1H, s), 5.98 (1H, s), 4.62 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 4.51 (1H, dd, *J* = 9.4, 5.3 Hz), 4.43 (1H, dd, *J* = 9.6, 4.6 Hz), 4.26 (1H, td, *J* = 10.1, 5.2 Hz), 4.03 (1H, t, *J* = 9.8 Hz), 1.07 (18H, dd, *J* = 13.5, 6.6 Hz), 0.94 (9H, d, *J* = 2.7 Hz), 0.16 (6H, dd, *J* = 6.4, 3.2 Hz).

ethyl 3-(3-(9-((4*aR*,6*R*,7*R*,7*aR*)-2,2-di-*tert*-butyl-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydro-4*H*-furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxasilin-6-yl)-9*H*-purin-6-yl)phenyl)propanoate (化合物 2)

化合物 1 (900 mg, 1.66 mmol)をジオキサン (15 mL)/水 (1.5 mL)の混合溶媒に溶解した後、3-(2-エトキシカルボニルエチル)フェニルボロン酸 (519 mg, 2.49 mmol)、炭酸セシウム (1.63 g, 4.99 mmol)、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II), ジクロロメタン付加体 (136 mg, 0.166 mmol)を加え、80 °C で 1 時間半攪拌した。TLC の結果より反応が完結していなかったので、3-(2-エトキシカルボニルエチル)フェニルボロン酸 (346 mg, 1.66 mmol)、炭酸セシウム (1.63 g, 4.99 mmol)、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II), ジクロロメタン付加体 (136 mg, 0.166 mmol)を加え、更に 80 °C で 1 時間攪拌した。飽和重曹水でクエンチした後、酢酸エチル (40 mL)で 3 回抽出し、飽和食塩水 (80 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し、化合物 2 の粗成績体を得た。得られた粗成績体をカラムクロマトグラフィー (山善ハイフラッシュカラム L, 展開溶媒: クロロホルム/メタノール = 100/0 → 99/1)にて精製することにより、化合物 2 (905 mg, 1.35 mmol) を茶白色アモルファス状固体として得た(収率 81%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.98 (1H, s), 8.64 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.59 (1H, s), 8.14 (1H, s), 7.49 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.38 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.05 (1H, s), 4.66 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 4.55-4.49 (2H, m), 4.27 (1H, td, *J* = 10.1, 5.0 Hz), 4.06 (1H, t, *J* = 9.8 Hz), 3.68 (3H, s), 3.10 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 2.73 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 1.09 (9H, s), 1.06 (9H, s), 0.96 (9H, s), 0.20 (3H, s), 0.17 (3H, s).

2-cyanoethyl 3-(3-(9-((2R,3R,4R,5R)-3-((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)-4-((di-tert-butyl)silyl)oxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)phenyl)propanoate (化合物 3)

化合物 2 (905 mg, 1.35 mmol)をテトラヒドロフラン (6.0 mL)/エタノール (4.0 mL)/水 (1.5 mL)の混合溶媒に溶解した後、水酸化リチウム一水和物 (114 mg, 2.71 mmol)を加え、室温で 7 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液でクエンチした後、酢酸エチル (60 mL)で 2 回抽出し、飽和食塩水 (80 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し、粗成績体を得た。得られた粗成績体を *N,N*-ジメチルホルムアミド (10 mL)に溶解した後、3-ヒドロキシプロパンニトリル (199 μ L, 2.94 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (423 mg, 2.21 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (338 mg, 2.21 mmol)、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (771 μ L, 4.42 mmol)を加え、室温で終夜攪拌した。飽和重曹水でクエンチした後、酢酸エチル (60 mL)で 2 回抽出し、飽和食塩水 (80 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し、粗成績体を得た。得られた粗成績体をカラムクロマトグラフィー (山善ハイフラッシュカラム L, 展開溶媒:*n*-ヘプタン/酢酸エチル = 70/30 \rightarrow 50/50)にて精製することにより、化合物 3 (563 mg, 0.80 mmol) を白色アモルファス状固体として得た(収率 54%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.00 (1H, s), 8.71 (1H, dt, $J = 7.8, 1.4$ Hz), 8.62 (1H, s), 8.18 (1H, s), 7.52 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.09 (1H, dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz), 5.90 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 5.16 (1H, dd, $J = 7.3, 4.1$ Hz), 4.73 (1H, d, $J = 4.1$ Hz), 4.38 (1H, s), 4.30 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 4.02 (1H, dd, $J = 11.2, 2.1$ Hz), 3.82 (1H, td, $J = 12.4, 1.7$ Hz), 3.12 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 2.80 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), 2.69 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.33 (1H, s), 1.09 (18H, s), 0.77 (9H, s), -0.17 (3H, s), -0.50 (3H, s).

2-cyanoethyl 3-(3-(9-((2R,3R,4R,5R)-3-((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)phenyl)propanoate (化合物 4)

化合物 3 (530 mg, 0.749 mmol)を塩化メチレン (8.0 mL)に溶解した後、ピリジン (1.21 mL, 15.0 mmol)、65wt%フッ化水素ピリジン錯体 (209 μ L, 7.49 mmol)を加え、終夜室温で攪拌した。飽和重曹水でクエンチした後、酢酸エチル (60 mL)で 2 回抽出し、飽和食塩水 (80 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し、粗成績体を得た。

得られた粗成績体をカラムクロマトグラフィー (山善ハイフラッシュカラム M, 展開溶媒: *n*-ヘプタン/酢酸エチル = 50/50 → 30/70)にて精製することにより、化合物 4 (248 mg, 0.437 mmol) を白色アモルファス状固体として得た(収率 58%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.01 (1H, s), 8.71 (1H, dt, *J* = 7.9, 1.5 Hz), 8.64 (1H, s), 8.14 (1H, s), 7.52 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 5.99 (1H, dd, *J* = 12.1, 2.1 Hz), 5.88 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 5.21 (1H, dd, *J* = 7.3, 4.6 Hz), 4.40 (2H, t, *J* = 5.3 Hz), 4.30 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 4.01 (1H, dt, *J* = 12.8, 1.8 Hz), 3.80 (1H, td, *J* = 12.6, 1.2 Hz), 3.12 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 2.81 (3H, dd, *J* = 9.4, 5.7 Hz), 2.69 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 0.80 (9H, s), -0.18 (3H, s), -0.40 (3H, s)

2-cyanoethyl 3-(3-(9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)phenyl)propanoate (化合物 5.)

化合物 4 (248 mg, 0.437 mmol)をピリジン (4.0 mL)に溶解した後、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (222 mg, 0.655 mmol)を加え、室温で4時間攪拌した。飽和重曹水でクエンチした後、酢酸エチル (60 mL)で2回抽出し、飽和食塩水 (80 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧濃縮し、粗成績体を得た。

得られた粗成績体をカラムクロマトグラフィー (山善ハイフラッシュカラム, 展開溶媒: *n*-ヘプタン/酢酸エチル = 20/80 → 80/20)にて精製することにより、化合物 5 (315 mg, 0.362 mmol) を白色アモルファス状固体として得た(収率 83%)。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.92 (1H, s), 8.69 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.60 (1H, s), 8.36 (1H, s), 7.52-7.20 (11H, m), 6.82 (4H, td, *J* = 6.0, 3.7 Hz), 6.16 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 5.05 (1H, t, *J* = 5.3 Hz), 4.38 (1H, q, *J* = 4.3 Hz), 4.31-4.26 (3H, m), 3.78 (6H, s), 3.57 (1H, dd, *J* = 10.5, 3.2 Hz), 3.40 (1H, dd, *J* = 10.8, 3.9 Hz), 3.12 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 2.80 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 2.70 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 2.65 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 0.84 (9H, s), 0.00 (3H, s), -0.13 (3H, s).

2-cyanoethyl 3-(3-(9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-(((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphanyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)phenyl)propanoate (am-616)

化合物 5 (315 mg, 0.362 mmol)をテトラヒドロフラン (4.0 mL)に溶解した後、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (379 μ L, 2.17 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジド (242 μ L, 1.09 mmol)を 0 °C で加え、室温で 1 時間半攪拌した。反応が完結していなかったため、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (379 μ L, 2.17 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジド (242 μ L, 1.09 mmol)を 0 °C で加え、更に室温で 2 時間半攪拌した。飽和重曹水 (1 mL)でクエンチした後、水 (1 mL)を加え、珪藻土カラムにより濾過を行い、酢酸エチルで洗浄した。得られた溶液を減圧濃縮し、粗成績体を得た。得られた粗成績体をカラムクロマトグラフィー (山善ハイフラッシュカラム M, 展開溶媒: 1%トリエチルアミン含有 *n*-ヘプタン/酢酸エチル = 20/80 \rightarrow 40/60)にて精製することにより、化合物 am-616 (285 mg, 0.266 mmol) を白色アモルファス状固体として得た (収率 74%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.91, 8.89 (1H, 2 s), 8.72-8.57 (2H, m), 8.38, 8.34 (1H, 2 s), 7.53-7.45 (3H, m), 7.41-7.33 (5H, m), 7.32-7.19 (3H, m), 6.85-6.79 (4H, m), 6.19-6.09 (1H, m), 5.15-5.09 (1H, m), 4.49-4.35 (2H, m), 4.31-4.24 (2H, m), 4.03-3.84 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.68-3.55 (4H, m), 3.38-3.28 (1H, m), 3.15-3.08 (2H, m), 2.83-2.77 (2H, m), 2.69-2.62 (3H, m), 2.34-2.27 (1H, m), 1.24-1.02 (12H, m), 0.76, 0.75 (9H, 2 s), -0.01, -0.05, -0.20, -0.20 (6H, 4 s).

IV.21 核酸オリゴ合成

略語表

CPG	controlled pore glass
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI-LC/MS	electrospray ionization-liquid chromatography/mass spectrometry
IP-RP-HPLC	ion pair-reverse phase-high performance liquid chromatography
MALDI-TOF/MS	matrix Assisted Laser Desorption Ionization-time of flight/mass spectrometry
SEC	size exclusion chromatography
siRNA	small interfering RNA
TEAA	triethylammonium acetate
TE	tris-EDTA
UPLC	ultra performance liquid chromatography

種々の精製・分析は、以下の試薬及び機器類を用いて測定した。

IP-RP-HPLC 精製及び SEC 分析は島津の Prominence シリーズを用いて行った。精製用カラムは Waters X-Bridge C-18, 5 μm , 4.6 \times 250 mm を用いた。SEC 分析には島津のカラムには TOSOH の TSKgel G2000SWXL, 5 μm , 7.8 \times 300 mm を用いた。UPLC 分析は DIONEX の UltiMate 300 を用いて行い、カラムには Waters の ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm , 2.1 \times 50 mm を用いた。ESI-LC/MS による分子量解析は Agilent Technologies の 1200 Series を用いて行い (検出器は 6120 Quadrupole)、カラムは Waters の ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm , 2.1 \times 50 mm を用いた。MALDI-TOF/MS による分子量解析は bruker の Reflex III または UltrafleXtreme を用いて行った。濃度は Trinean の DropSense 96 を用いて吸光度を測定し、各塩基の ϵ を単純加算した値を用いて算出した。遠心濃縮には TOMY の MV-100 または TITEC の VC-15S とポンプとして ULVAC の DTU-20 を用いた。滅菌水は大塚製薬の日本薬局方 注射用水を用いた。フィルターろ過は ADVANTEC の DISMIC-13CP (0.2 μm)を用いた。加熱用のヒートブロックには EYELA の DRY THERMO BATH MG-2000 を用いた。

オリゴ核酸は装置付随のサイクルを用いて Gene Design の ns-8 または日本テクノサービスの M-8-MX で合成した。活性化剤は Sigma の 0.25 mol/L アクチベーター42 を用いた。ホスホロアミダイトは Sigma または Glen Research のウルトラマイルドホスホロアミダイトを用い、0.1 mol/L アセトニトリル溶液とした。溶媒のアセトニトリルは和光の超脱水グレードを用いた。固相担体は Glen Research の各種塩基の CPG またはユニバーサルサポート CPG (Universal Support III, UnySupport 1000) の 0.2 μmol カラムを用いた。酸化剤は Sigma の 0.02 mol/L ヨウ素のテトラヒドロフラン/ピリジン/水の混合溶液を用いた。脱トリチル溶液は和光の 3%ジクロロ酢酸のジクロロメタン溶液を用いた。5'-リン酸化試薬は Glen Research の化学的リン酸化試薬 II または Sigma のホスフェート-オンホスホロアミダイトを用いた。固相合成後、固相担体は AMA (40%メチルアミン水溶液:濃アンモニア水=1:1、300 $\mu\text{L}/\text{column}$)を用いて、20 分から 1 時間かけて切り出しを行い、室温で 2 時間または 65 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間脱保護を行った。エッペンチューブに溶液を回収し、AMA (300 $\mu\text{L}/\text{column}$)を用いて樹脂の洗浄を行い、合わせて遠心エバポレーターで減圧濃縮した。得られた粗成績体をジメチルスルホキシド (150 $\mu\text{L}/\text{column}$)に溶解し、三フッ化水素・トリエチルアミン塩 (50 $\mu\text{L}/\text{column}$)を加え、65 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間半加熱した。3 mol/L 酢酸ナトリウム (50 μL)を加えた後、n-ブタノール (600 μL)を加え、-20 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間静置した。12500 rpm で 10 分間遠心を行った後、上清を廃棄し、エタノール (500 μL)で 2 回洗浄を行った。残存する溶媒を減圧濃縮に

より除去し、オリゴ核酸の粗精製物であるペレット状白色固体を得た。蒸留水 (200 μ L)に溶解した後、フィルターろ過を行い、再度蒸留水 (100 μ L)で洗いこみを行った。得られた水溶液をイオンペア逆相高速液体クロマトグラフィー (A buffer: 0.1 mol/L TEAA, B buffer: アセトニトリル, 0 \rightarrow 30% in 20 min, 1 mL/min)にて精製を行い、目的のフラクションを回収し、遠心濃縮を行った。精製したオリゴ核酸は適当な濃度の水溶液とした後、ESI-LC/MS または MALDI-TOF/MS により分子量を測定し、目的物であることを確認した。UPLC 分析 (A buffer: 0.1 mol/L TEAA, B buffer: アセトニトリル, 5 \rightarrow 30% in 9 min, 0.8 mL/min)により 90%以上 (260 nm)の純度であること確認し、DropSense により吸光度を測定することで濃度を算出した (修飾塩基の ϵ は A に近似して計算)。同量の市販センス鎖と 100 mmol/L 塩化ナトリウム含有 TE バッファー中、85 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、アニーリングさせることで目的とする siRNA (20 μ mol/L, 50 μ L)を得た。得られた siRNA は SEC 分析 (1 x PBS, isocratic, 30 min, 1 mL/min)または PAGE 分析により、二本鎖を形成していることを確認した。外注品に関しても、委託先にて上記に類する条件で合成を行った。

V. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻 RNA 機能研究分野教授 泊幸秀先生に心から深謝の意を表します。泊先生には本研究を遂行する上で貴重な御指導を賜りましたこと、企業に勤めながら社会人として博士課程に入学することの御了承と核酸医薬技術開発に関わる本研究内容を博士論文にまとめる機会を頂きましたことに改めて感謝申し上げます。さらに海外での学会発表機会の提供、研究者としての在り方に関する御指導など、多岐にわたる御指導、御鞭撻を賜りましたことに改めて感謝の意を表します。

本研究の審査過程において御指導と御助言を賜りました、東京大学大学院新領域創成科学研究科富田耕造教授、東京大学大学院新領域創成科学研究科 伊藤耕一教授、東京大学大学院理学系研究科 程久美子准教授、理化学研究所 岩崎信太郎主任研究員、東京大学大学院工学系研究科 鈴木健夫講師に深謝いたします。貴重な御意見、御指導をありがとうございました。

本研究の第Ⅱ章の SBDD 共同研究において協和キリン株式会社 低分子医薬研究所 齋藤純一博士には SBDD 関連共同研究のとりまとめと論文作成に多大なるご支援を頂いたことに感謝の意を表します。また、本研究遂行に際して御支援いただきました以下の協和キリンの皆様には感謝申し上げます。計算科学実験を御担当いただいた小葦泰治博士、佐藤敦子博士(計算科学)、X 線結晶構造解析を御担当いただいた宮城光氏、高橋雄一氏、鈴木道彦主任研究員、NMR 実験を実施いただいた高山裕生博士、タンパク調製いただいた濱口香織氏、核酸デザインと合成を担当いただいた山本潤一郎氏、西川知之氏、澤田貴史博士、中島雄大氏、幸田康生氏、細胞株ならびにマウス動物モデル実験を協力いただいた春元俊正博士、牧野麻奈氏に深謝いたします。

泊研究室の Vincent Brechin 氏、松浦(鈴木)絵里子博士、依田真由子博士におきましては Native agarose gel の実験方法を丁寧に御指導いただきありがとうございました。また研究室スタッフ岩川 弘宙博士をはじめ、学生の皆様におきましては社会人の私も分け隔てなくディスカッションの輪に加えていただき、多数の貴重なコメントや御教示をありがとうございました。皆様の常に真剣かつ熱意にあふれたディスカッションより多くの感銘と刺激をいただきました。改めまして深謝致します。

最後に、常に私をサポートしてくれた妻の祥子と家族(長男圭吾、次男佑介、長女瑞季)ならびに両親に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

VI. 参考文献

- Adams D, Gonzalez-Duarte A, O’Riordan WD, Yang C-C, Ueda M, Kristen A V., Tournev I, Schmidt HH, Coelho T, Berk JL, et al. 2018. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* **379**: 11–21.
- Amarzguioui M, Prydz H. 2004. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 1050–1058.
- Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White MA, Corey DR. 2003. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* **42**: 7967–7975.
- Brechin V, Shinohara F, Saito J, Seitz H, Tomari Y. 2021. Mechanistic analysis of the enhanced RNAi activity by 6-mCEPh-purine at the 5' end of the siRNA guide strand. *Rna* **27**: 151–162.
- Cheng LS, Amaro RE, Xu D, Li WW, Arzberger PW, McCammon JA. 2008. Ensemble-based virtual screening reveals potential novel antiviral compounds for avian influenza neuraminidase. *J Med Chem* **51**: 3878–3894.
- Chiu Y, Rana TM. 2003. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* **9**: 1034–48.
- Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Pronk GJ, Giese K, Ag A, Warburg O, Jörg Kaufmann. 2003. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **31**: 2705–2716.
- Czech B, Zhou R, Erlich Y, Brennecke J, Binari R, Villalta C, Gordon A, Perrimon N, Hannon GJ. 2009. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol Cell* **36**: 445–456.
- Elkayam E, Joshua-Tor L, Parmar R, Brown CR, Willoughby JL, Theile CS, Manoharan M. 2017. siRNA carrying an (E)-vinylphosphonate moiety at the 5' end of the guide strand augments gene silencing by enhanced binding to human Argonaute-2. *Nucleic Acids Res* **45**: 3528–3536.
- Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, Joshua-Tor L. 2012. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* **150**: 100–110.
- Felice KMM, Salzman DWW, Shubert-Coleman J, Jensen KPP, Furneaux HMM. 2009. The 5' terminal uracil of let-7a is critical for the recruitment of mRNA to Argonaute2. *Biochem J* **422**: 329–341.

- Frank F, Sonenberg N, Nagar B. 2010. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* **465**: 818–822.
- Haley B, Zamore PD. 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 599–606.
- Halgren TAM. 1996. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization and Performance of MMFF94. *J Comp Chem* **17**: 490–519.
- Hamm S, Latz E, Hangel D, Müller T, Yu P, Golenbock D, Sparwasser T, Wagner H, Bauer S. 2010. Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist. *Immunobiology* **215**: 559–569.
- Hernández AR, Peterson LW, Kool ET. 2012. Steric restrictions of RISC in RNA interference identified with size-expanded RNA nucleobases. *ACS Chem Biol* **7**: 1454–1461.
- Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. 2010. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* **39**: 292–299.
- John Cavanagh. 2007. Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice, 2nd ed. *Protein NMR Spectrosc Princ Pract 2nd ed.*
- Kawamata T, Seitz H, Tomari Y. 2009. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 953–960.
- Khvorova A, Watts JK. 2017. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol* **35**: 238–248.
- Kuboyama T, Yagi K, Naoi T, Era T, Yagi N, Nakasato Y, Yabuuchi H, Takahashi S, Shinohara F, Iwai H, et al. 2019. Simplifying the Chemical Structure of Cationic Lipids for siRNA-Lipid Nanoparticles. *ACS Med Chem Lett* **10**: 749–753.
- Kwak PB, Tomari Y. 2012. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 145–151.
- Leslie AGW. 2006. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **62**: 48–57.

- Lima WF, Prakash TP, Murray HM, Kinberger GA, Li W, Chappell AE, Li CS, Murray SF, Gaus H, Seth PP, et al. 2012. Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals. *Cell* **150**: 883–894.
- Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. 2005. Structural basis for 5' -end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* **434**: 666–670.
- Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. 2004. siDirect: Highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res* **32**: 124–129.
- Nakanishi K, Weinberg DE, Bartel DP, Patel DJ. 2012. Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* **486**: 368–74.
- Nardo L, Lamperti M, Salerno D, Cassina V, Missana N, Bondani M, Tempestini A, Mantegazza F. 2015. Effects of non-CpG site methylation on DNA thermal stability: A fluorescence study. *Nucleic Acids Res* **43**: 10722–10733.
- Onizuka K, Zheng Y, Mac S, Ball-Jones AA, Beal PA, Lam W, Ibarra-Soza JM, Tantillo DJ, Ly D, Harrison JG. 2013. Short Interfering RNA Guide Strand Modifiers from Computational Screening. *J Am Chem Soc* **135**: 17069–17077.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. 2005. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* **434**: 663–666.
- Prakash TP, Kinberger GA, Murray HM, Chappell A, Riney S, Graham MJ, Lima WF, Swayze EE, Seth PP. 2016. Synergistic effect of phosphorothioate, 5'-vinylphosphonate and GalNAc modifications for enhancing activity of synthetic siRNA. *Bioorganic Med Chem Lett* **26**: 2817–2820.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**: 326–330.
- Robbins M, Judge A, Liang L, McClintock K, Yaworski E, MacLachlan I. 2007. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol Ther* **15**: 1663–1669.
- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, Hay AJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2006. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* **443**: 45–49.
- Schirle NT, MacRae IJ. 2012. The crystal structure of human Argonaute2. *Science* **336**: 1037–40.

- Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. 2014. Structural basis for microRNA targeting. *Science* **346**: 608–13.
- Shinohara F, Oashi T, Harumoto T, Nishikawa T, Takayama Y, Suzuki M, Yamamoto J, Tomari Y, Saito J-I., et al. 2021. siRNA potency enhancement via chemical modifications of nucleotide bases at the 5'-end of the siRNA guide strand. *Rna* **27**: 163–173.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. 2004. Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science (80-)* **305**: 1434–1437.
- Suter SR, Sheu-Gruttadauria J, Schirle NT, Valenzuela R, Ball-Jones AA, Onizuka K, Macrae IJ, Beal PA. 2016. Structure-Guided Control of siRNA Off-Target Effects. *J Am Chem Soc* **138**: 8667–8669.
- Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. 2004. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* **32**: 936–948.
- Vagin A, Teplyakov A. 1997. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. *J Appl Crystallogr* **30**: 1022–1025.
- Wang Y, Sheng G, Juraneck S, Tuschl T, Patel DJ. 2008. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* **456**: 209–213.
- Weitzer S, Martinez J. 2007. The human RNA kinase hCtp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature* **447**: 222–226.
- Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Jong HK, Nishimura S, Fujii K, Oishi Y, Itaka K, et al. 2009. A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res* **69**: 6531–6538.
- Yamauchi M, Kusano H, Saito E, Iwata T, Nakakura M, Kato Y, Uochi T, Akinaga S, Aoki N. 2006. Improved formulations of antisense oligodeoxynucleotides using wrapped liposomes. *J Control Release* **114**: 268–275.
- Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, Tomari Y. 2010. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 17–24.