

siRNA-NESコンジュゲートの合成、デリバリー、遺伝子サイレンシング Synthesis, Delivery and Gene Silencing of siRNA-NES Conjugates

藤井 政幸¹⁾
Masayuki FUJII

Irmina DIALA²⁾

Abstract: Herein we described the synthesis of siRNA-NES (nuclear export signal) peptide conjugates by solid phase fragment coupling (SPFC) and application of them to silencing of bcr/abl chimeric gene in human leukemia cell line K562. Synthesis of siRNA-NES conjugates was achieved by SPFC. As a result, two types of siRNA-NES conjugates **C1** and **C2** were prepared in which 5'-end of sense strand was covalently linked to N-terminus of the NES peptides derived from TFIIIA and HIV-1 rev, respectively. Silencing effects of **C1** and **C2** against bcr/abl mRNA in human leukemia cell line K562 were evaluated by quantitative PCR. The expression of bcr/abl gene was suppressed to 30.2 % at 200nM and 36.3 % at 50 nM by native siRNA. Significant enhancement of silencing efficiency was observed with **C1** and **C2**. siRNA-TFIIIA NES (**C1**) suppressed the expression of bcr/abl gene to 8.3% at 200 nM and 11.6 % at 50nM and siRNA-HIV-1rev NES (**C2**) suppressed to 4.0 % at 200 nM and 6.3 % at 50nM. Previously, we reported that DNA-HIV-1 rev NES peptide conjugate was localized in cytoplasm of Jurkat cell. The large enhancement of the silencing efficiency of siRNA-NES conjugates could be reasonably ascribed to the localization of siRNA-NES conjugates in cytoplasm. It can be also pointed out that modification of 5'-endo of sense strand reduced off-target effect by minimizing the extent of the sense strand incorporation into RISC. (3) Unfortunately, siRNA-NES conjugates could not penetrate the cellular membrane by itself and required a transfection reagent to be taken up into cells, while oligodeoxyribonucleotide-NES conjugates were internalized into cells without any transfection reagents. It can be elucidated the double stranded structure of siRNA retarded the penetration through cellular membrane.

キーワード: siRNA, 核外輸送シグナルペプチド, 固相フラグメント縮合法, 細胞内デリバリー, 遺伝子サイレンシング、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素

Keywords: siRNA, nuclear export signal (NES) peptides, solid phase fragment condensation, cellular delivery, gene silencing, human telomerase elongation reverse transcriptase (hTERT)

1. はじめに

アンチセンスDNA/RNA, dsRNA, siRNA, miRNAなどの小分子核酸による遺伝子発現制御機構を利用して生物学的プロセスを人為的に調節することにより、未知遺伝子の機能解明や疾病の治療に応用する研究が注目を集めている。いずれにおいても、細胞内あるいは生体内で効果的に作用する小分子核酸を開発するために様々な化学修飾や導入剤の検討が行われている。しかしながら、未だにこれら核酸分子を毒性なく、効率よく細胞内に導入する方法は見出されておらず、その生体系への応用、さらには医薬として人体への応用に向けてのもっとも重要な課題であると認識されている。

2. 結果と考察

我々のグループでは、細胞内への取り込み効率の向上、

細胞内でのヌクレアーゼ耐性の向上、標的遺伝子への結合親和性の向上、標的遺伝子のサイレンシング効果の向上など複合的な効果を狙って、様々な機能性ペプチドをコンジュゲート核酸分子の開発を行ってきた。その中で、アンチセンスDNAに核局在化シグナル(NLS)ペプチドをコンジュゲートさせたDNA-NLSコンジュゲートはリボソーム等の遺伝子導入剤を用いることなく細胞内に効率よく取り込まれ、細胞内では細胞核に局在化することを見出した。

(Figure 1b-d) さらに、anti-hTR sDNA-NLSコンジュゲートはヒト急性リンパ性白血病細胞中でヒトテロメラーゼを95%以上抑制することを証明した。また、アンチセンスDNAに核外輸送シグナル (NES) ペプチドをコンジュゲートさせたDNA-NESコンジュゲートはやはり遺伝子導入剤を用いることなく細胞内に取り込まれ、細胞内では細胞質(核外)に局在化することを見出した。(Figure 1e-g)さらに、

1) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科 教授 mfujii@fuk.kindai.ac.jp

2) 近畿大学大学院産業技術研究科物質工学専攻博士後期課程

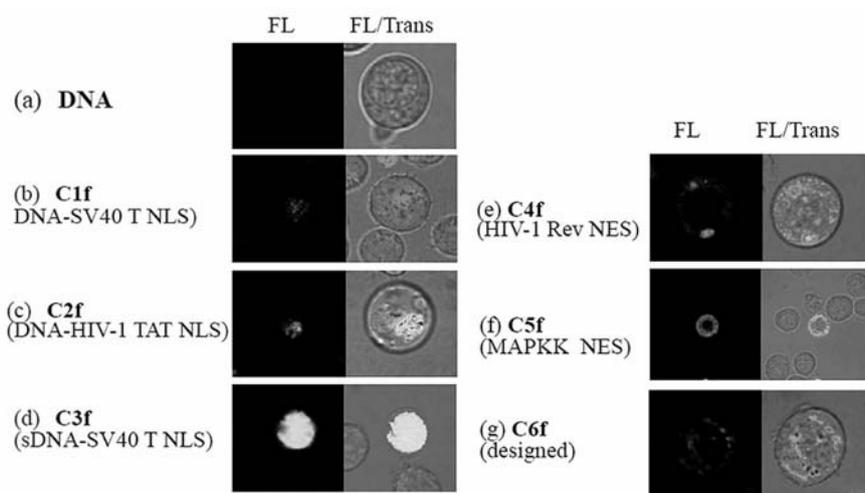
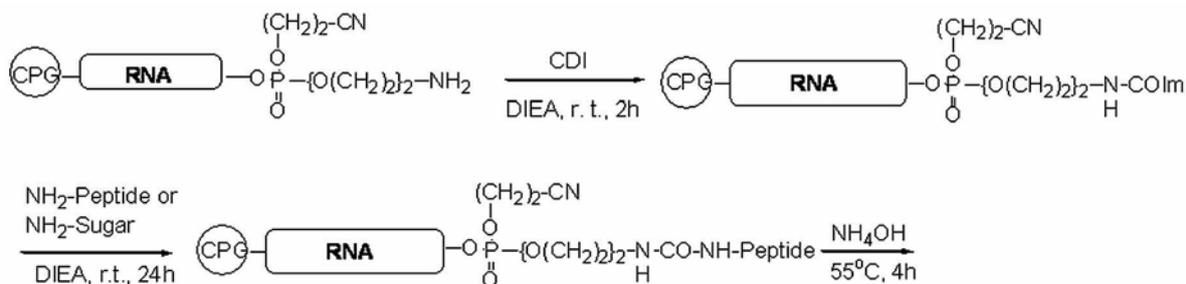
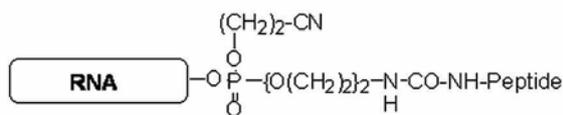


Figure 1. Nuclear (b-d) and Cytoplasmic (e-g) Localization of DNA-Signal Peptide Conjugates



Protective groups in peptide fragments:
 -NHtfa (Lys), -SAc (Cys)
 free: -OH (Ser, Thr), -COOH(Asp, Glu), -CONH₂
 (Asn, Gln), -guanidiny I(Arg), -imidazolyl (His)



RNA: 5'-GCAGAGUUCAAAAGCCCUUTT-3'
NES Peptides:
C1: NH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO-LVLDKLTl-OH (TFIIIA NES), 26.8%
C2: AcNH-LPPLRLTL-KG-OH (HIV-1 REV NES), 31.2%

Scheme 1. Synthesis of RNA-NES Conjugates by SPFC

anti-bcr/abl DNA-NESはヒト慢性骨髄性白血病細胞K562中に発現するbcr/abl 遺伝子を85%以上抑制することを証明した。

本研究では、これらの結果を踏まえてsiRNA-NESコンジュゲートを合成し、そのRNA干渉機構を利用した遺伝子サイレンシング効果の向上を期待してbcr/abl遺伝子の発現抑制効果の評価した。

siRNA-NESコンジュゲートはScheme 1に示す通り、独自に開発した固相フラグメントカップリング法により合成し

た。

5'-末端をアミノ基で修飾したセンス鎖RNAに固相担体上でカルボニルジイミダゾール (CDI) をリンカーとしてTFIIIAおよびHIV-1 REVの核外輸送シグナル(NES)ペプチドをコンジュゲートした。反応後、アンモニア処理により切り出し、脱保護を行い、逆相HPLC(ODS)により精製し、逆相HPLCおよびMALDI-TOF MSにより純度の決定と同定を行った。(Figure 2-5)

まず、センス鎖およびアンチセンス鎖の5'-末端をアミ

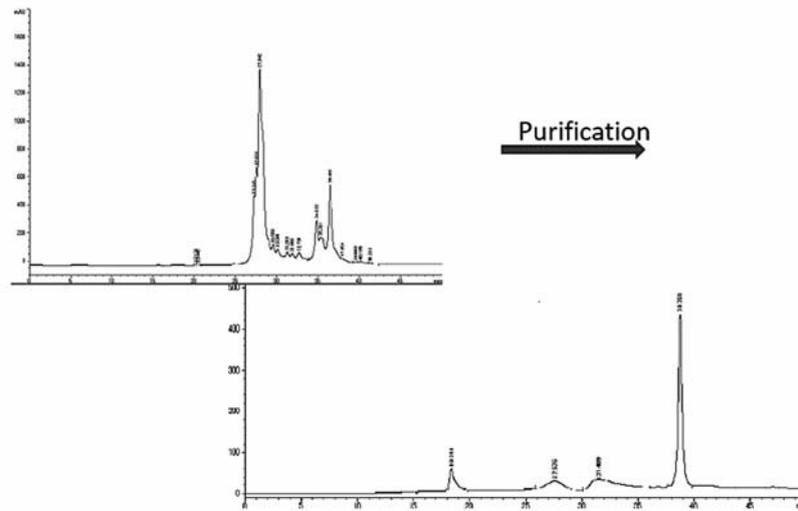


Figure 2. HPLC Profile;
 C1: 3'-TTCUUCCCGAAAACUUGAGAC-OPO₃⁻
 (CH₂)₂O(CH₂)₂NHCONH-GABA-TFIIIA NES-5'

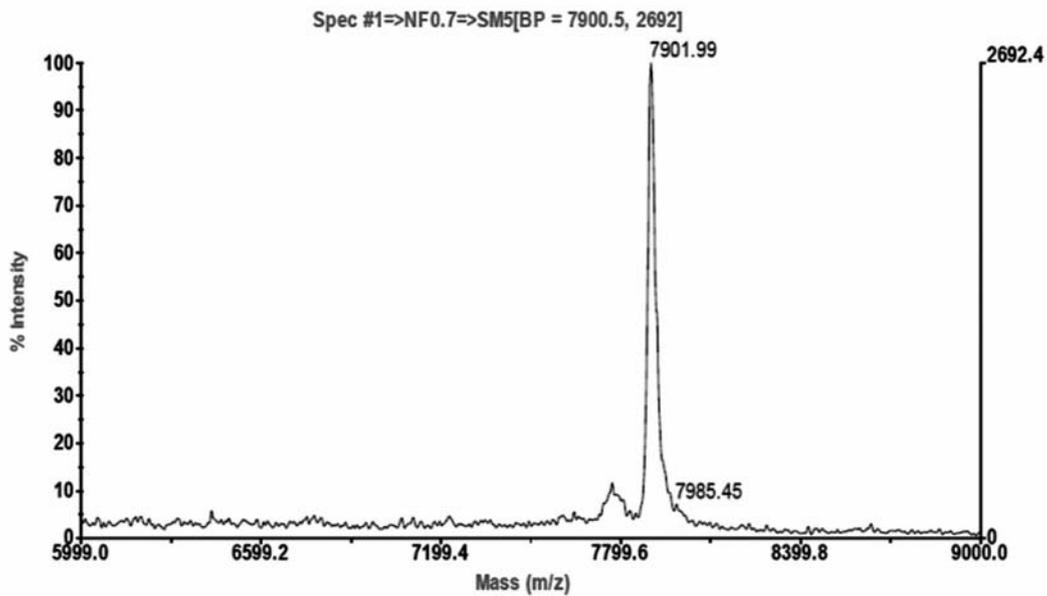


Figure 3. MALDI TOF MS;
 C1: 3'-TTCUUCCCGAAAACUUGAGAC-OPO₃⁻(CH₂)₂O(CH₂)₂NHCONH-GABA-TFIIIA NES-5'
 Theoretical Mw: 7902.44

ノ基で修飾したsiRNAを用いて、慢性骨髄性白血病細胞 K562に発現するbcr/abl キメラ遺伝子のサイレンシング効果をリアルタイムPCR法により評価した結果をFigure 6に示す。

その結果、センス鎖5'-末端のみをアミノ基で修飾したsiRNAでは天然型siRNAとほぼ同等の効果を示したが、ア

ンチセンス鎖5'-末端およびセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の5'-末端をアミノ基で修飾したsiRNAでは天然型siRNAに比べて明らかに効果が低減した。したがって、siRNAにペプチドをコンジュゲートする位置はセンス鎖5'-末端が最も適していると判断した。

次に、合成した2種類のsiRNA-NESペプチドコンジュ

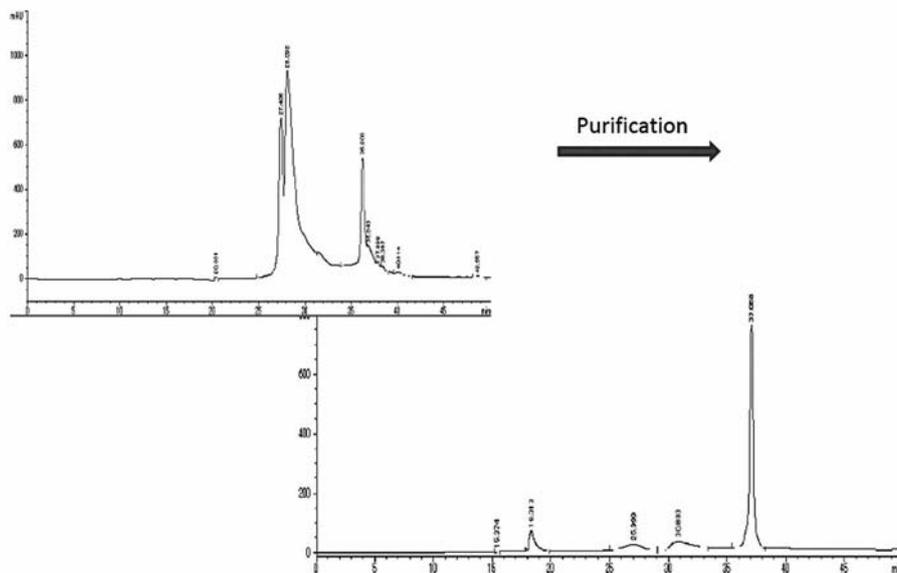


Figure 4. HPLC Profile;
C2: 3'-TTCUUCCCGAAAACUUGAGAC-OPO₃⁻(CH₂)₂O(CH₂)₂NHCONH-HIV1-REV NES-5'

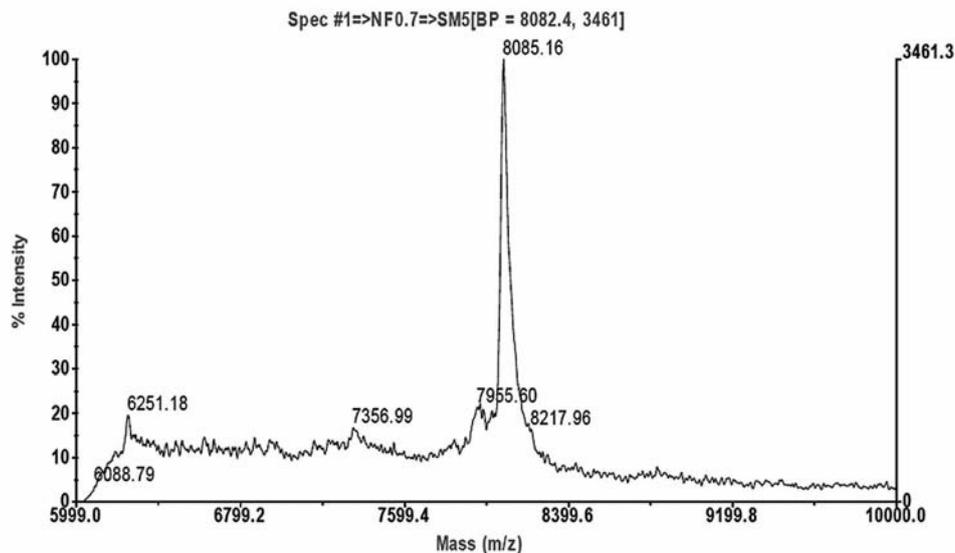


Figure 5. MALDI TOF MS;
C2: 3'-TTCUUCCCGAAAACUUGAGAC-OPO₃⁻(CH₂)₂O(CH₂)₂NHCONH-HIV1-REV NES-5'
Theoretical Mw: 8084.66

ゲートC1およびC2を用いて、慢性骨髄性白血病細胞K562に発現するbcr/abl キメラ遺伝子のサイレンシング効果をリアルタイムPCR法により評価した。標的配列は下に示す通り、bcr/abl キメラ遺伝子のb3a2転写産物のジャンクション部位の21nt (361-381) である。

bcr/abl mRNA(355-390)の標的配列

5'-ggauuuagcagagucaaaagcccuucagcgcca-3'

siRNA (anti bcr/abl mRNA361-381)

sense: NES-5'-GCAGAGUUCAAAAGCCCUUTT-3'

antisense: 3'-TTCGUCUCAAGUUUCGGGAA-5'

NES Peptides:

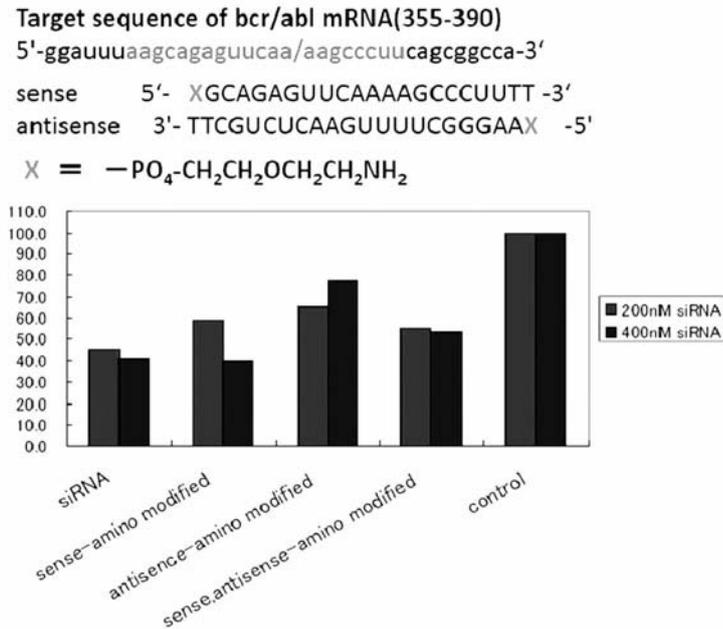


Figure 6. Silencing of bcr-abl in K562 by 5'-modified siRNA
 siRNA mediated the reduction of bcr-abl mRNA expression in K562 cells. Normalized bcr-abl/GAPDH mRNA levels were measured 24 hours after transfection.

C1: $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-LVLDKLTl-OH}$ (TFIIIA NES)

C2: Ac-LPPLRLTL-KG-OH (HIV-1 REV NES)

C1およびC2の評価の結果をそれぞれFigure 7およびFigure 8に示す。Figure 7に示す通り、天然型siRNAを用いた場合にはbcr/abl 遺伝子の発現は200nMにおいては30.2 % 50nMにおいては36.3 % にそれぞれ抑制された。一方、siRNA-NESコンジュゲートC1およびC2を用いた場合には著しいサイレンシング効果の向上が見られ、siRNA-TFIIIA NESコンジュゲート (C1) では200nMにおいて8.3%、50nMにおいて11.6 %にまで抑制され、siRNA-HIV-1REV NES コンジュゲート(C2) では200nMにおいて4.0 %、50nMにおいて6.3 %までそれぞれ抑制された。これらのサイレンシング効果の向上は先のアミノ基で修飾したsiRNAの結果と併せて考えると、NESで修飾したことによる効果であることは明らかである。以前、我々のグループは DNA-HIV-1 REV NES ペプチドコンジュゲートがヒト急性リンパ性白血病細胞Jurkatの細胞質に局在化することを証明しており³⁾、siRNA-NESコンジュゲートによりサイレンシング効果が著しく向上したのはsiRNA-NESコンジュゲートが細胞質に局在化し、RNA干渉機構により標的とするmRNAをより効率的に分解したためと推測できる。また、C1およびC2はいずれもセンス鎖5'-末端を修飾しており、センス鎖がRISCに取り込まれることを阻害して、off-target効果を低減した結

果とも考えることができる。⁴⁾ DNA-NESコンジュゲートは導入剤なく細胞内に取り込まれたが、残念ながら、siRNA-NESコンジュゲートは単独では細胞膜を透過できず、何らかの導入試薬を必要とした。siRNAの2重鎖構造が細胞膜透過を阻害していると考えられる。

さらに、siRNAとある種の新規ペプチド (Pfect) とのコンプレックスを形成させることにより、市販導入剤と同等以上に効率よく細胞内に導入できることを見出しており、siRNA-NESとPfectとのコンプレックスを用いるとbcr/abl遺伝子を95%以上サイレンシングできることも証明した。この新規ペプチドPfectは全く細胞毒性がなく、また、PfectとsiRNAのコンプレックスはヌクレアーゼによる分解に対して非常に耐性が強く、10%FBS中での評価では、siRNAのみの場合には半減期が約2時間であり、siRNA-Lipofectamine 2000コンプレックスの半減期もほぼ変わらないのに対して、その半減期は48時間以上に伸びることも証明している。当グループでは、さらに高い効率でsiRNAを細胞内に導入できるペプチドを開発中で、様々な機能性化合物とのハイブリッドによりさらに効果の高いペプチドが見出されている。これらの研究結果は改めて別の機会に公表したいと考えている。

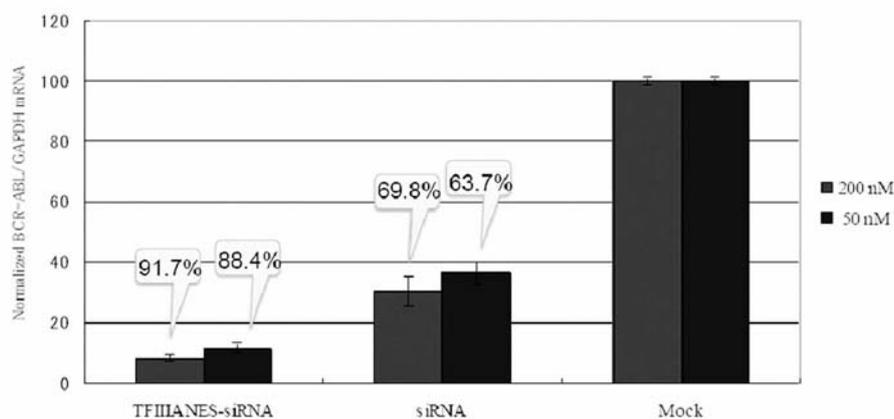


Figure 7. Silencing of bcr-abl by siRNA-TFIIIA NES Conjugate
 siRNA mediated reduction of bcr-abl mRNA expression in K562 cells. Normalized bcr-abl/GAPDH mRNA levels were measured in 24 hours after transfection by Lipofectamine 2000™.

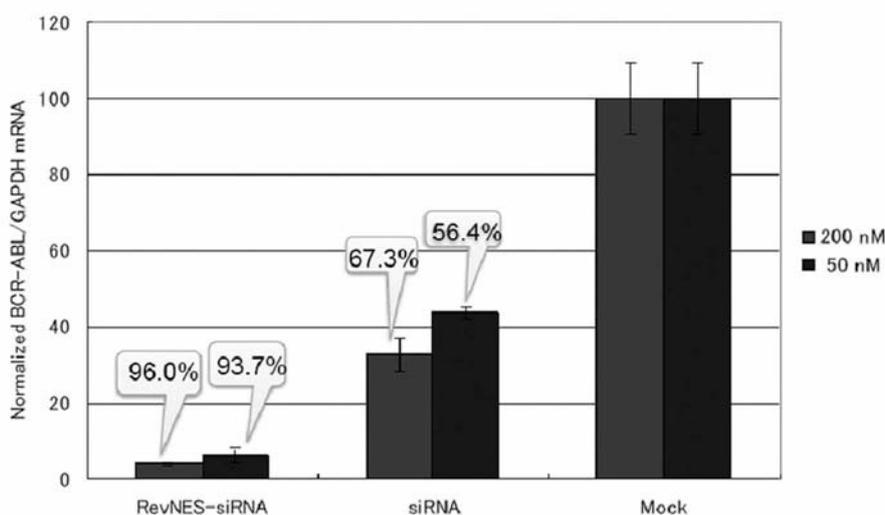


Figure 8. Silencing of bcr-abl by siRNA-HIV1 REV NES Conjugate
 siRNA mediated reduction of bcr-abl mRNA expression in K562 cells. Normalized bcr-abl/GAPDH mRNA levels were measured in 24 hours after transfection by Lipofectamine 2000™.

Reference

- 1) K. Lu, Q-P. Duan, L. Ma and D.-X. Zhao, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 187-202. J. W. Gaynor, B. J. Campbell and R. Cosstick, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 4169-4184.
- 2) T. Kubo, M. Morikawa, H. Ohba, M. Fujii, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 2623-2626.
- 3) T. Kubo, Z. Zhelev, B. Rumiana, H. Ohba, K. Doi and M. Fujii, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 3257-3259.
- 4) Y. Ueno, K. Yoshikawa, Y. Kitamura, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 875-877.