

**【目的】** 本研究において、我々は RNA ウイルス感染症、特に新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の治療薬開発のための新しい方法論確立を目的とする。具体的には、我々がこれまで独自に開発してきた 4'-チオ核酸 (核酸の糖部フラノース環酸素原子を硫黄原子に置換した核酸の総称) の技術を基盤とし、膜透過性環状ジヌクレオチド (c-di-4'-チオ AMP<sub>B</sub>: 図左) 開発による中分子戦略とヌクレアーゼ抵抗性 small-interfering RNA (siRNA) 開発による高分子戦略 (図右) を実践し、これらにより SARS-CoV-2 との闘いに勝利するための礎を築く。

**【方法】** 中分子戦略の目的化合物である c-di-4'-チオ AMP<sub>B</sub> の合成にあたっては、過去に参考となる前例が極めて少なかった。そこでまずモデル化合物として二つのウリジンモノマー 1 と 2 を用いて c-di-UMP<sub>B</sub> を合成することで、立案した合成経路の妥当性を検証することにした。化合物 1 と 2 を *N*-PhIMT を活性化剤として用いてダイマーとした後、ボラノホスフェート (PB) 型ダイマーとするためボラン・ジメチルスルフィド錯体と処理した。続いて、得られたダイマー体の 5'位水酸基の保護基を除去し、ジアミダイト試薬を用いたアミダイト化を行った後、連続して *N*-PhIMT を活性化剤とした環化とボラン・ジメチルスルフィド錯体との処理を行い、c-di-UMP<sub>B</sub> を合成した。一方、高分子戦略であるヌクレアーゼ抵抗性 siRNA 開発については、まず天然型の siRNA を用いて標的配列の最適化を検討した。当初予定した leader 配列の他、ウイルスが独自にコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) などを標的とした siRNA を計 11 種類調製し、SARS-CoV-2 感染細胞 (Vero E6 細胞) を用いたプラークアッセイを行うことで最適な配列を見出した。続いて、最適な siRNA のパッセンジャー鎖とガイド鎖の各位置を 4'-チオ体で修飾し、それらの RNAi 効果と修飾様式の相関解析を行った。

**【結果】** モデル化合物である c-di-UMP<sub>B</sub> を合成するために、まず二つのウリジンモノマー 1 と 2 の縮合とボラン・ジメチルスルフィド錯体による酸化を行い、ボラノホスフェート (PB) 型ダイマーを達成した。続いて、ダイマー体の 5'位水酸基の保護基を除去した後、*N*-PhIMT 存在下でのアミダイト化、環化と酸化を連続的にを行い c-di-UMP<sub>B</sub> 保護体の合成を達成した。最後に保護基を除去し、c-di-UMP<sub>B</sub> の生成をマスマスペクトルにより確認した。高分子戦略であるヌクレアーゼ抵抗性 siRNA 開発については、*in vitro* でのプラークアッセイの結果、検討した 11 種類の配列の中で RdRp を標的とした siRNA に顕著な抗ウイルス活性が観察された。そこでこの配列のパッセンジャー鎖とガイド鎖に、G を除く 4'-チオ体を 1 残基ずつ導入した 4'-チオ siRNA を合成し、その抗 SARS-CoV-2 を先と同様のプラークアッセイにより評価した。また、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に標的配列を組み込んだレポータープラスミドを調製し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより修飾体導入位置が RNAi 活性に与える影響を調べた。その結果、活性に若干のばらつきはあるものの、パッセンジャー鎖とガイド鎖のいずれの修飾も天然 siRNA に匹敵する RNAi 効果を示すことが明らかとなった。

#### 本研究戦略の概要

