

RNA部位特異的な修飾能をもつ人工核酸の創製と核酸構造および機能制御への応用

菊田, 健司

<https://hdl.handle.net/2324/2236162>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)



氏 名 : 菊田 健司

論文題名 : RNA 部位特異的な修飾能をもつ人工核酸の創製と
核酸構造および機能制御への応用

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】DNA や RNA などの核酸塩基の化学修飾は遺伝子の発現を精密に制御している。修飾部位が核酸塩基の認識に直接的に干渉するため、核酸塩基の化学修飾法はその構造・機能解析に加え遺伝子発現を制御する画期的な医薬品やバイオツールに展開できる。本研究の目的は RNA の核酸塩基を部位特異的に化学修飾可能な人工核酸の創製である。その特色は人工核酸を含むオリゴ核酸と相補的な RNA の二本鎖形成によって反応点と標的塩基を選択的に近接させる点である。従来の遺伝子発現の促進や抑制に加え mRNA の化学修飾によってコドン情報を編集することを狙う。

【方法と結果】1. 反応系中で T-vinyl へ活性化されるスルフィド誘導体の開発

当研究室では 4-ビニルチミジン (T-vinyl) が開発され、相補的なウラシルあるいはその隣接するアデニンと化学架橋 (クロスリンク) を形成することが見出された¹⁾。しかし T-vinyl は不安定であり細胞応用は困難であった。そこで安定性と反応性を満たすために T-vinyl を基に誘起反応性をもつスルフィド誘導体を設計した (Fig. 1)。T-vinyl のビニル基をチオールで保護し、スルフィド保護基による安定性の向上とチオールの β 脱離反応による活性化を狙った。種々のスルフィド誘導体を含むオリゴ核酸を合成し mRNA に対する反応を検討した結果、チオピリミジン誘導体 (S-Pym) が T-vinyl に比べ高収率に反応した。S-Pym 保護基によって T-vinyl の失活が抑制されたためだと考えられる。

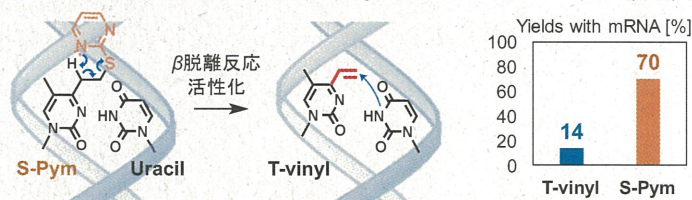


Figure 1. S-Pym 体の活性化と mRNA に対する反応収率

2. 鎖内クロスリンクによる i-motif の安定化²⁾

i-motif はシトシン豊富な配列で形成される四本鎖構造であり、その細胞内形成が 2018 年に初めて確認された³⁾。しかし i-motif は中性緩衝液中で不安定であり、その結合分子の探索や開発は困難である。そこで鎖内クロスリンクの形成によって i-motif 構造を安定化させることを検証した (Fig. 2)。まず分子モデル計算を基に i-motif 形成配列の 5' 末端にスルフィド誘導体を導入し、酸性条件での i-motif 形成と同時にインターループ領域のアデニンもしくはチミジンに対する鎖内反応を検討した。その結果、アデニンと反応したクロスリンク i-motif の合成に成功した。次に i-motif 形成能を評価した結果、架橋型では天然型に比べ、より中性条件で i-motif の形成が示された。熱力学的解析を行い、鎖内クロスリンクによる i-motif 安定化の要因はエントロピー変化の減少であることを明らかにした。i-motif を中性条件で安定化できたことは生理的条件で結合する分子の開発に繋がると考えている。

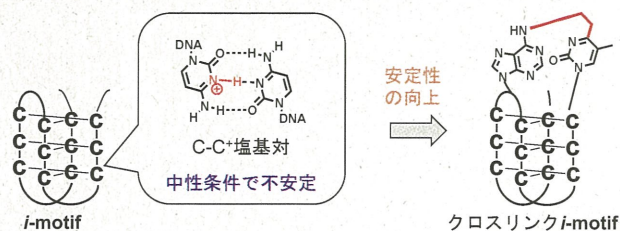


Figure 2. 鎖内架橋の形成による i-motif の安定化

3. 人工的な mRNA 修飾による遺伝子発現制御法への展開

mRNA の化学修飾が翻訳に及ぼす影響を非細胞系で評価した。まずクロスリンク修飾では発光タンパク質であるルシフェラーゼの発現を抑制し、短鎖タンパク質を産生させることを達成した (Fig. 3A)。mRNA に人工的な翻訳終始点を導入させた点が意義深い。一方、人工 mRNA のコドン中の第 2 塩基、第 3 塩基となるシトシンの官能基転移修飾が翻訳に及ぼす影響を調べた結果、完全長のペプチドが産生された (Fig. 3B)。この結果から官能基転移修飾反応を核酸認識に影響しない RNA ラベル化法に応用できる可能性が示された。今後、第 1 塩基のシトシン修飾による効果を調べる。

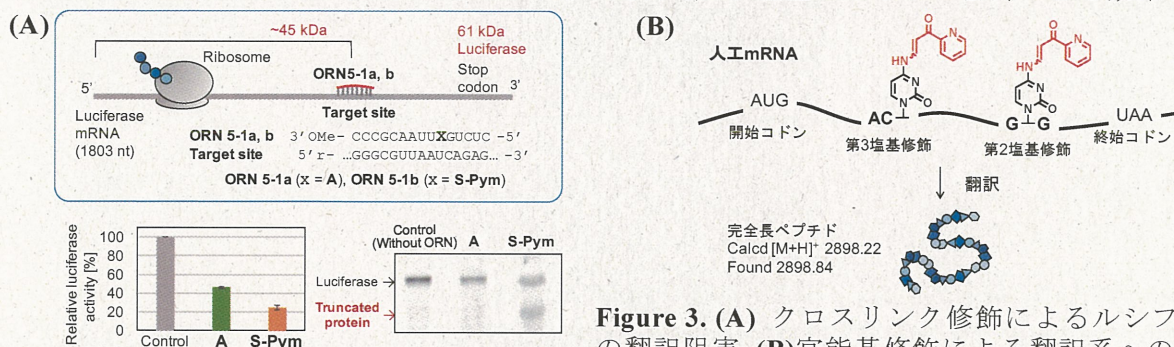


Figure 3. (A) クロスリンク修飾によるルシフェラーゼの翻訳阻害 (B)官能基修飾による翻訳系への影響検討

4. 光誘起反応性をもつアシル転移核酸の開発

シトシン部位特異的なアシル化法の確立を目指し、光誘起反応性をもつアシル転移核酸の開発を検討した。*N*⁴-アシルシトシンの脱アミノ化によってウラシルが生成するため⁴⁾、シトシンのアシル化法は塩基編集技術になり得る。そこで *N*-アシル-7-ニトロインドリンによるアミンの光アシル化反応に着目し⁵⁾、*N*-アセチル-7-ニトロインドリンを塩基部位にもつ人工核酸による RNA 中のシトシンアミノ基部位特異的な光アセチル化反応を設計した (Fig. 4)。まずインドリン 5 位と糖部 1'位を結合させたヌクレオシド誘導体 (5 位カップリング体) をオリゴ核酸に組み込み、RNA に対する光反応を検討した。その結果、アセチル化 RNA は得られなかったが活性中間体の形成が示唆された。そこで近接効果の向上を目指し 3 位カップリング体と非環状体を設計した (Fig. 5)。3 位カップリング体のグアニン類似な配向性、非環状体の柔軟な配向性によって活性中間体のアセチル基をシトシンアミノ基に接近させることを狙った。これら誘導体をそれぞれ含むオリゴ核酸を合成し、RNA に対する光反応を検討した。その結果、3 位カップリング体を用いてアセチル化 RNA が生成したことが示唆された。ただしアセチル化 RNA は HPLC 精製が困難であり、未反応 RNA との混合物として質量分析で検出された。現在、アセチル化 RNA の構造決定に取り組んでいる。

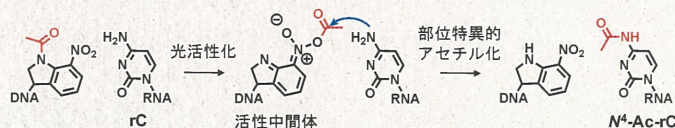


Figure 4. シトシン部位特異的な光アセチル化反応の設計

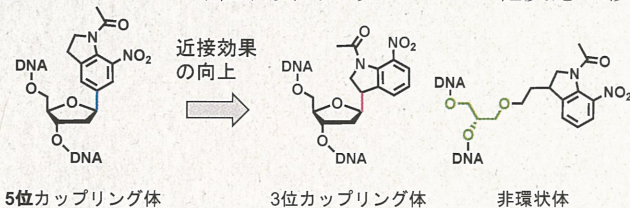


Figure 5. 光アセチル化を目指したインドリン誘導体

【結論】 まずクロスリンク修飾が核酸構造の安定化と mRNA の翻訳阻害に有用なことを立証した。加えて人工 mRNA から産生されるペプチドを質量分析可能な評価系を構築し、mRNA コドン中の第 2、3 塩基のシトシンの官能基転移修飾が翻訳に影響しないことを見出した。また、光誘起反応性アセチル転移核酸を創製し、アセチル化 RNA の生成を示唆する結果を得た。

【参考文献】 1) Nishimoto, N., et al. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6774-6781. 2) Kikuta, K., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3307-3310. 3) Zeraati, M., et al. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 631-637. 4) Nowak, I.; Robins M. J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4903-4905. 5) Helgen, C.; Bochet, C.G. *Synlett*, **2001**, *12*, 1968-1970.