

論文の内容の要旨

論文題目 基質の活性化を利用した新規な RNA 切断法の開発

氏名 葛谷 明紀

1. 序論

RNA は生体内で多様な機能を担う高分子であり、RNA を塩基配列特異的に切断する操作は重要である。しかしながら、DNA における制限酵素のように RNA の配列を認識して切断する酵素は、現状では天然から単離されていない。また、遺伝子による疾病の治療薬として mRNA を標的として無効化させるアンチセンス試薬の効果を高めるために、RNA の目的配列を選択的に切断する機能を付与したアンチセンスオリゴマーの開発が行われてきた。

近年、RNA を配列選択的に切断するリボザイムの研究、改良が進み、その医療への応用が試みられるようになった。生体内で発現させることができる点でリボザイムは治療薬として有望であるが、遺伝子工学の道具として使う場合には、様々な機能化が容易に実現できる人工的に構築した RNA 切断系が重要な役割を果たすと考える。

これまでに報告されている RNA 配列選択的切断は、そのほとんどが「RNA 切断活性をもつ触媒分子を DNA に結合し、目的部位の近傍に固定する」という方法論に基づいている。しかしながらこの方法では、(1) 触媒分子の固定化に際し、煩雑な有機合成を必要とする (2)適切な設計を行わないと触媒分子が本来持っている活性を大きく損なってしまう、といった問題が不可避であった。

そこで本研究では、これらの問題点を解決し生命科学における有用な道具を開発することを目的とし、従来の方法とは異なる「RNA を位置特異的に活性化することで、切断分子を固定することなく RNA を望みの位置で切断する」という全く新しい RNA 配列選択的切断法を採用した。

私はこの活性化の手段として、DNA 鎖内に導入したアクリジン分子が RNA を位置特異的、かつ効率よく活性化することを見出し、フリーのランタニドイオンを用いて迅速に RNA を切断することに成功した。さらにこの新規な配列選択的 RNA 切断法の最適化を行うと共に、各種の分光学的測定などからアクリジンによる RNA の選択的活性化、及びその切断の機構を検討した。

2. 結果と考察

2.1 新規に開発した RNA 配列選択的切断法

(I) 末端にアクリジンを導入した DNA による RNA 活性化

使用した核酸の配列の代表

例を Fig.1 に示す。基質としてはランダムな配列を有する 36 mer の合成 RNA を使用した。5'末端を RI ラベルし、19番目の残基 U (U-19) をターゲットとする。次に、(1) 基質の 5'側 18 塩基と相補的な DNA_{L1} (2) 基質の 3'側 17 塩基と相補的な DNA_{R1} (3) DNA_{L1} の 5'末端にアクリジンを導入

した DNA_{L1}-Acr (4) DNA_{R1} の 3'末端にアクリジンを導入した Acr-DNA_{R1} の 4本の DNA を合成した。

DNA_{L1}、DNA_{R1} 及び基質 RNA の 3者で二本鎖を形成することで、ターゲットとした U-19 の正面に 1塩基のギャップ構造を形成させる。また、DNA_{L1}-Acr あるいは Acr-DNA_{R1} を DNA_{L1}、DNA_{R1} のかわりに使用することで、ギャップ内にアクリジンを配置する (Fig. 2)。まず、これら 4本の DNA と RNA を組合せてできる 3者複合体を用いて、Lu(III)による RNA 選択的切断を検討した。

Fig.3 に生理条件 (37°C、pH8) 下、2時間の切断反応の PAGE 解析結果の一例を示す。Lane 1 に見られるように、一本鎖の RNA に対して Lu(III)イオンのみを作用させた場合、RNA はランダムかつ均等に切断される。Lu(III)イオン自体には配列依存性はない。一方、RNA をあらかじめ DNA_{L1} 及び DNA_{R1} と二本鎖を形成させておくと、Lu(III)は U-19 の 3'側のリン酸ジエステル結合を選択的に切断した (lane 2)。

これに対し、DNA_{L1}-Acr/DNA_{R1} あるいは DNA_{L1}/Acr-DNA_{R1} の組合せを使用すると、新たに U-19 の 5'側のリン酸ジエステル結合で非常に強い切断が生じた (lane 3, 4)。特に注目すべきは、この切断によって生じたバンドが、lane 1 における一本鎖 RNA の切断によって生じたバンドよりも著しく濃い点である。これはアクリジンが RNA を大幅に活性化したことを意味する。それに対して、DNA_{L1}-Acr/Acr-DNA_{R1} の組合せで 2残基のアクリジンをギャップに配置すると、切断活性は大幅に低下した (lane 5)。

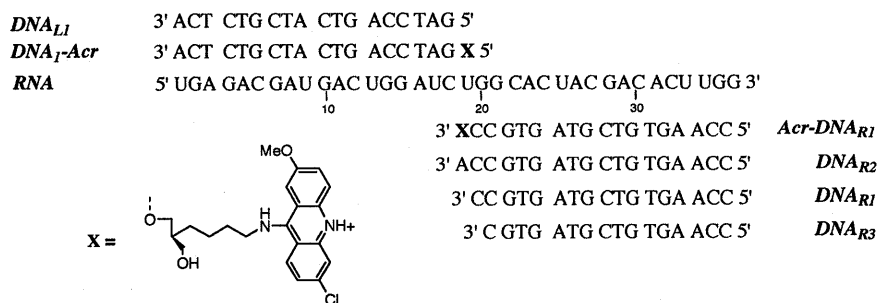


Fig.1 Structures of the substrate RNA and the DNA oligomers.

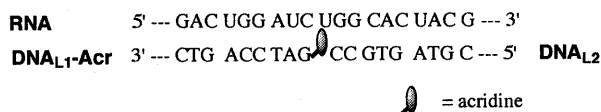


Fig.2 Schematic representation of the system.

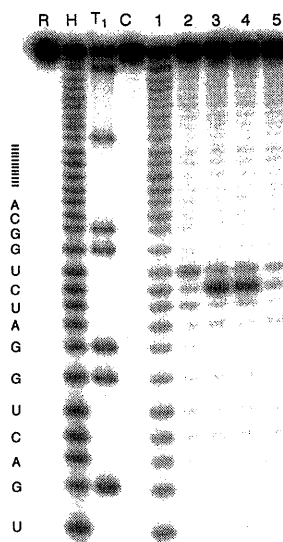


Fig.3 RNA scission by various combinations of DNAs, which are presented in Fig.1, and Lu(III). Lane 1, Lu(III); lane 2, DNA_{L1}/DNA_{R1}/Lu(III); lane 3, DNA_{L1}-Acr/DNA_{R1}/Lu(III); lane 4, DNA_{L1}/Acr-DNA_{R1}/Lu(III); lane 5, DNA_{L1}-Acr/Acr-DNA_{R1}/Lu(III). R, RNA only; H, alkaline hydrolysis; T1, RNase T1 digestion; C, control;. At pH 8.0 and 37 °C for 2 h; [RNA]₀ = 1, [DNA]₀ = 10 and [LuCl₃]₀ = 100 μM; [NaCl]₀ = 200 mM.

(II) アクリジンを鎖の内部に導入した修飾 DNA による RNA 活性化

アクリジン周辺の構造をより正確に制御して切断活性をさらに向上することを目指して、前記2本の DNA をアクリジン残基で結合したアクリジン修飾 DNA を新たに合成、その機能を評価した。配列を Fig.4 に示す。鎖の内部にアクリジンを導入した DNA_{F1}-Acr でも、2本の DNA を組み合わせた時と同様に RNA は目的位置のみで非常に効率よく切断された。その切断活性は2本の DNA を組み合わせた場合と比較して、およそ 20%高かった。一方、アクリジンをもたないスペーサーのみを導入した DNA_{F1}-S や、RNA にバルジを形成する DNA_{F1} を使用した場合には強い切断は起きなかった。

RNA 5' UGA GAC GAU GAC UGG AUC UGG CAC UAC GAC ACU UGG 3'
 DNA_{F1} 3' ACT CTG CTA CTG ACC TAG -- CC GTG ATG CTG TGA ACC 5'
 DNA_{F1}-X 3' ACT CTG CTA CTG ACC TAG XCC GTG ATG CTG TGA ACC 5'
 DNA_{F2}-X 3' ACT CTG CTA CTG ACC TAX ACC GTG ATG CTG TGA ACC 5'
 DNA_{F3}-X 3' ACT CTG CTA CTG ACC TAG AXC GTG ATG CTG TGA ACC 5'

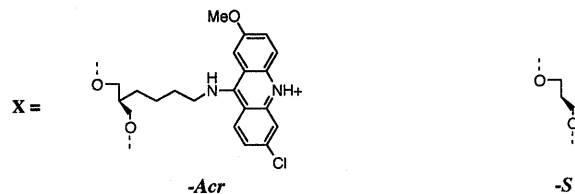


Fig.4 Structures of the substrate RNA and the DNA oligomers.

2.2 新規 RNA 配列選択的切断法に必要な諸因子

(I) アクリジン

前節(I)でも述べたように、DNA にアクリジンを導入しない場合は、RNA の活性化はほとんど見られない。すなわち、アクリジンの導入は、RNA の活性化ならびにそれに基づく配列選択的切断に必須である。

DNA_{L1} に導入するアクリジンの構造をいくつか変えることで、RNA 活性化におけるアクリジン上の置換基の効果を検討した (Table 1)。リンカーの根元はアミノ基とした場合の活性が高く、また -Cl と -OMe の2つの置換基も RNA 活性化に寄与している。これら2つの置換基はインターカレート時のアクリジンの向きを固定する役割を果たしていると推定される。

X =	none			
Tm (°C)	63.1	66.0	68.9	69.1
activity	1	1.8	5.2	14.5

Table 1. Structures of various acridine residues, Tm values of RNA/DNA duplexes, and relative activities.

(II) ギャップ構造

DNA_{L1}-Acr あるいは DNA_{R1} を単独で使用した場合、Lu(III)は RNA の残り半分の一本鎖領域をランダムに切断し、アクリジンによる顕著な活性化は観測されなかった。アクリジンによる RNA 活性化にはギャップ構造が必須である。また、RNA の全ての塩基が塩基対を形成している場合 (DNA_{L1}-Acr/DNA_{R2}) 切断はほとんど起こらなかった。ギャップの長さを2塩基にした場合は (DNA_{L1}-Acr/DNA_{R3}) 選択的切断と活性化は見られるものの、1塩基のギャップ (DNA_{L1}-Acr/DNA_{R1}) と比較するとその効果は小さかった。1塩基ギャップが最適である。

(III) 金属イオン触媒

RNA を切断する触媒として、Lu(III)イオン以外の金属イオンについても検討した。その結果、ランタニドイオンはいずれも有効であり、さらに Zn(II)イオン、Mg(II)イオンなど RNA 切断活性を有する金属イオンならば、アクリジンによって活性化された RNA を選択的に切断することができるということがわかった。

アクリジンによって活性化された RNA の選択的切断がリン酸ジエステルの加水分解で進行することは、

2'-OMe-RNA に置換した基質の切断、並びに蛍光ラベルした基質断片の MALDI-TOF MS 解析で確認した。

2.3 切断活性および配列依存性

DNA_{LI}-Acr/DNA_{RI}/Lu(III)による RNA 選択的切断をより長時間追跡すると、切断は終始位置選択的に進行し、転化率は 13 時間で約 50%、48 時間で 90%を超えた。今回開発した RNA 配列選択的切断法は、現在までに報告されている人工系の中で最も活性が高いものの一つである。

Lu(III)の濃度を 0~1 mM まで変化させると、およそ 10 μ M から選択的切断が観測され、ほぼ単調に活性は上昇した。

アクリジンによる RNA 活性化の配列依存性を以下の 2つの方法によって確認した。まず、19 番目の残基を U 以外の 3 種 (A, C, G) に変えた基質をそれぞれ合成し、2.1 節と同様の切断実験を行った。ターゲットが 4 種の塩基いずれの場合もアクリジンによる活性化が観測され、ターゲットが A である場合が最も活性が高く、ついで U、G、C の順となった。

またアクリジンの導入位置を変えることで、ターゲットの両側の塩基も含めた配列依存性を見るとともに、アクリジンが正しく自分の正面を活性化していることを確認した (Fig. 5)。

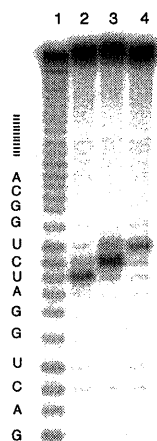


Fig.5 RNA scission by combinations of various acridine-modified DNA and Lu(III). Lane 1, Lu(III); lane 2, DNA_{F2}-Acr/Lu(III); lane 3, DNA_{F1}-Acr/Lu(III); lane 4, DNA_{F3}-Acr/Lu(III).

2.4 アクリジンによる RNA 活性化の機構解明

アクリジン修飾 DNA が DNA と B 型二重らせんを形成すると、アクリジンはその正面の塩基をフリップアウトさせながらインターカレートすることが報告されている。しかし、本研究のように RNA と A 型二重らせんを形成した場合に関する研究は行われていない。アクリジン周辺の環境を知るために各種の分光学的測定を行った結果、A 型二重らせん中でもアクリジンは DNA_{LI} と DNA_{RI} の間に挟まって存在していることが明らかとなった。また、アクリジン環への Lu(III)イオンの直接の配位が起きていないことも示された。

以上の結果を総合して、アクリジンによる RNA 活性化の機構は以下のように推定される。アクリジンのインターカレートに伴って、塩基対を形成していない目的部位の塩基が部分的にらせんから押し出される。その結果近傍の局所構造に変化が生じ、2'水酸基とリン原子の距離が減少、2'水酸基による分子内求核攻撃が促進される。

2.5 金属イオンの固定化によるさらなる活性の向上

切断活性をさらに高めるため、アクリジンによって活性化された RNA の近傍に金属イオンを固定化することを検討した。新たに金属イオンと錯形成する配位子を導入した修飾 DNA を合成し、これをアクリジン修飾 DNA と組み合わせて切断実験に使用した。配位子を導入する位置は、目的部位から major groove を越えて 1 ピッチ下流にあたる位置になるように配列を設計した (Fig. 6)。

金属イオンとしてはランタニドイオン、これを固定する配位子としては当研究室で利用実績のあるイミノ二酢酸を採用し、DNA にあらかじめ導入しておいたアミノリンカーを介して液相法で DNA の 3' 末端に導入した。

配位子とアクリジンの導入

位置との距離を 5~8 塩基としたところ、A 型二重らせんにおいて目的位置に最も近い、アクリジンから 6 塩基離れた位置に配位子を導入した場合が最も高い切断活性を示した。配位子を導入しない場合と比較しておよそ 4 倍反応が加速し、基質の半減期を 3 時間にまで短縮することに成功した。配位子の位置を固定してアクリジンの導入位置を変化させると、切断位置もそれにつれて順次移動した。これにより、導入した配位子がアクリジンによって活性化された位置のみを切断していることを確認した。以上のように、アクリジン修飾 DNA による基質の活性化と配位子導入 DNA による金属イオンの固定化を組み合わせることが、RNA の選択的切断に非常に有効であることがわかった。

3. 結論

アクリジン修飾 DNA による RNA 活性化を利用した、全く新しい RNA 配列選択的切断法を開発することに成功した。「基質とアクリジン修飾 DNA の二本鎖を形成し、系中に触媒を加える」という非常に簡便な手法ながら、高い活性と選択性に加えて幅広い金属触媒に対する汎用性も有している。この系で必要な要素は、

(1) アクリジン (2) 1 塩基のギャップ 及び (3) 金属触媒である。DNA 骨格へのさらなる機能化も可能であり、今後の応用が期待される。

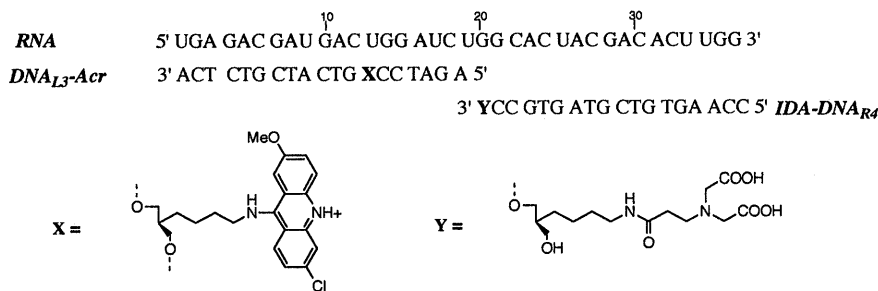


Fig.6 Structures of the substrate RNA and the DNA oligomers to introduce a ligand.