

1 序

RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) は、短い二本鎖 RNA によってその配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。この遺伝子発現抑制システムを遺伝子疾患の治療に役立てることへの期待が非常に高まっている。この様な治療法の確立には適切な遺伝子導入技術が必須である。

遺伝子導入システムとして用いられているベクターには二種類ある。現在多くの遺伝子治療はウイルスベクターによって行われているが、1) コストがかかる、2) 免疫原性がある、3) 安全性に問題がある、などの理由により安全性の高い非ウイルスベクターの使用は以前から切望されている。しかしながら、非ウイルスベクターは一般的に言って用いる DNA 当りの遺伝子発現効率はウイルスベクターよりも劣っている為に、より効率の高い遺伝子導入技術の開発が検討され、様々な導入法が考案されてきた。

非ウイルスベクターにおいて遺伝子の発現効率を落としている原因は以下のものが挙げられる。1) 細胞に認識され細胞膜を通過する効率が低い。2) エンドサイトーシスで導入される場合、エンドソームからのリリース効率が低い。3) 細胞内での安定性が低い。4) 核膜の通過効率が低い。ウイルスベクターの場合はウイルス本来に備わっている機能としてこれらの条件はクリアされるのであるが、非ウイルスベクターの開発にあたってはこれらの問題に対して意識的に取り組まなければならない。

これらの問題に対し、私は以下の手法を用いて解決することを試みた。細胞膜を通過し(上記1)、エンドソームからの効率的なリリースを促進する(上記2)ためにはペプチドを用いることにした。この研究に関しては、効率的な遺伝子導入能を有するペプチドを構築することを目的として、大腸菌においてペプチドライブラリーを合成したことを特徴とする。また、細胞内での安定性を高め(上記3)、核膜通過の効率を上げるため(上記4)には DNA の末端を修飾し、核移行シグナルを付加し酵素による分解を防ぎながら核への移行を促進しようと考えた。ここでは、新規核酸アナログを合成し、DNA と様々な生理活性分子とを共有結合させる系を確立したことを特徴とする。

1-1 新規核酸アナログを用いた DNA の 3' 末端特異的修飾法の開発とその応用

DNA の化学修飾は非ウイルスベクターにおいて遺伝子発現効率が低い原因となっている問題のいくつかを解決できる可能性がある。実際、アンチセンスの研究においては、DNA にペプチド、コレステロール、脂質などを共有結合させて、細胞への取り込みや、核への取り込み効率を向上させたという研究例が報告されている。しかしながら、DNA の修飾はアンチセンス分子などの短いものに関しては DNA 合成機で可能であるが、長い DNA に関しては複雑で難しい。これまでも、diazocoupling

や photocoupling による DNA の修飾反応が報告されているが、これらの反応では非特異的に DNA の複数の個所に反応してしまうため、DNA の転写が妨げられている可能性が高い。

この問題を解決するために、私は DNA を酵素によって 3' 末端特異的に修飾することを試みた。細胞においては DNA が 3' 末端から主に分解されることが知られており、3' 末端を修飾することにより、DNA の加水分解を防ぐこともできると考えられる。概要図を図 1 に示す。

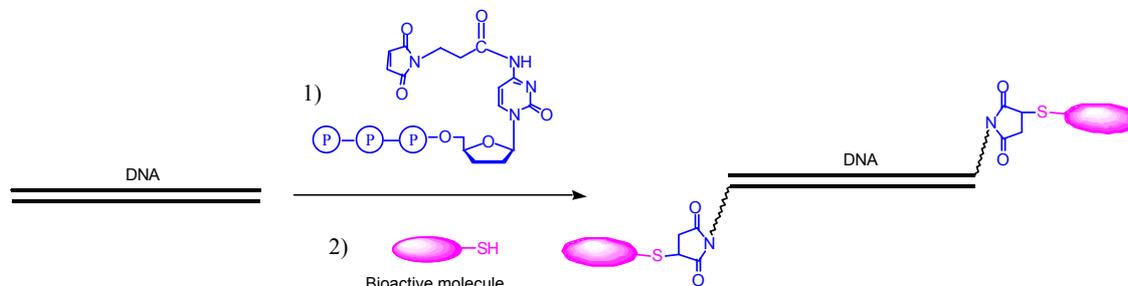


図 1 3' 末端特異的 DNA 修飾

図 1 に示す様に、マレイミドを含む新規核酸アナログを合成し、酵素 (TdT; Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) で DNA の 3' 末端に取り込むことを計画した。この核酸アナログはマレイミドを有するので、チオール基を持つ様々な分子と共有結合できる。新規核酸アナログはデオキシシチジンを出発原料とし 9 ステップで合成した。

合成した核酸アナログを用いて、DNA の 3' 末端を核移行シグナル (NLS) で修飾することを試みた。非ウイルスベクターによる遺伝子導入では多くの場合、DNA は細胞内にとどまり、分裂によって核内に取り込まれると考えられている。しなしながら、非分裂細胞においてはこの過程が非常に起こりにくく、能動的に核膜を通過するようなシステムを構築する必要がある。これらの効果を見るために、RNAi 効果を有する short hairpin RNA (shRNA) をコードする DNA (350-mer) を TdT を用いて核酸アナログを付加し、その後、C 末端にシステインを持つ SV40 の核移行シグナル (NLS = PKKKRKVEDPYC) を加え、共有結合させた。結果を図 2 に示す。

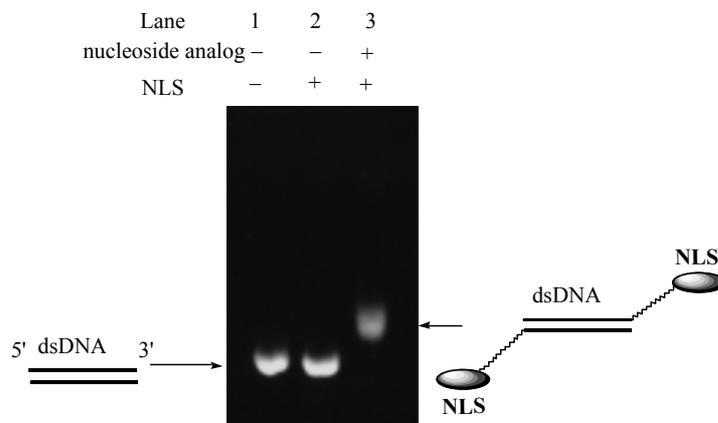


図 2 DNA の 3' 末端特異的修飾

図 2 に示す様に、ほぼ 100% の DNA が 3' 末端において NLS と共有結合していることがわかった。す

なわち、今回合成した新規核酸アナログは非常に効率よく TdT により DNA の 3' 末端に取り込まれていることがわかった。また、マレイミドとチオールの反応は穏やかな条件（中性水溶液中、室温）で定量的に反応が進むため、このような非常に良い収率が得られた。この手法ではミリグラム単位の DNA の修飾が実験室スケールで可能であり、また収率が非常に良いため、精製及びスケールアップが簡便に行われる。

この様にして合成した shRNA をコードする DNA-NLS 複合体をターゲットとなるルシフェラーゼ遺伝子と共に細胞内に導入し、3' 末端に共有結合し NLS の効果を見た。結果を図 3 に示す。

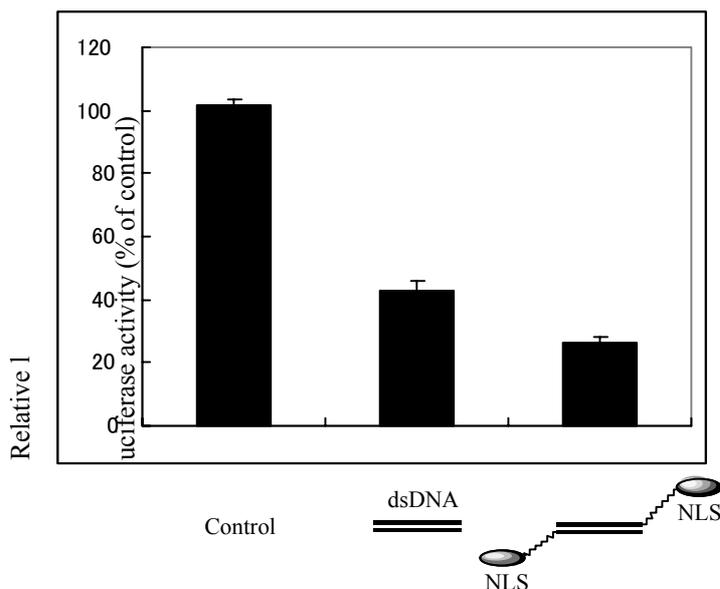


図 3 二本鎖 DNA (dsDNA) 及び DNA-NLS 複合体による RNAi 活性の比較

図 3 に示したように、DNA-NLS 複合体は RNAi の効果を促進していることがわかった。今回の手法では DNA の 3' 末端がマレイミドで修飾されているため、様々な分子と非常に良い収率で共有結合をすることが可能である。今回は SV40 の NLS を結合させたが、この他にも様々な生理活性を有するタンパク質、ペプチド、小分子を結合させることにより、非ウイルス系の遺伝子導入に応用が可能であると考えられる。

1- 2 ペプチドによる遺伝子導入を目指した大腸菌によるペプチドライブラリーの構築

近年、様々な手法で DNA を標的細胞へ導入しようという試みがされている。非ウイルスベクターを用いたものでは liposome や、糖骨格を有するもの、デンドリマーや Naked DNA など様々である。DNA を細胞内に導入するためには、DNA を 100 nm 程度にまで小さくする必要がある。そのため、これらの導入試薬はいずれも正電荷に帯電し、負電荷を帯びている DNA を小さくしている。しかしながら、正電荷が強すぎると、1) DNA との相互作用が強すぎるため細胞内で DNA がリリースされにくい、2) 毒性が強くなる、などの問題があり、DNA を効率よく導入し発現させるためには、電荷の問題はもとより細胞内の環境を考慮した導入試薬の開発が望ましい。

そこで私はペプチドの有する官能基の多さに注目し、ペプチドで遺伝子を導入しようと考えた。古

くは正電荷を帯びた poly-lysine によって遺伝子導入が試みられてきた。近年ではシステイン (C) のチオール基によるジスルフィド結合が細胞内で還元されることを利用した薬物及びDNAのデリバリーや、ヒスチジン (H) が DNA のエンドソームからのリリースを補助しているとの報告もある。そこでこれらのアミノ酸をランダムに組み合わせたペプチドライブラリーを合成して、DNA を効率よく細胞内で発現させるペプチドを見つけ出そうと考えた。

ペプチドは通常ペプチド合成機で合成する。しかしながら、1) 合成できるペプチドの長さに制限がある、2) コストがかかる、3) アミノ酸配列によっては合成収率が低いものがある、などの問題点がある。

一方、遺伝子組換え技術により大腸菌などでタンパク質を合成する場合はこれらの問題点は解決されるが、構造をとっていない短いペプチドなどは大腸菌の中で分解されてしまうため合成が難しい。さらに、通常、大腸菌でタンパク質を合成した場合、精製を簡便にするために tag(his-tag, GST-tag など)をタンパク質の末端に付けなければならない。そこで私は目的のペプチドをインテインとキチン結合ドメイン(CBD)タンパクとの融合タンパクとして発現するシステムを用い、ペプチドの発現・精製を試みた (図4)。この手法の利点は以下の点にある。1) 望みのペプチドはインテインとキチン結合ドメインタンパクとの融合タンパク質として発現されるためにタンパク質全体として構造を有しており、ペプチド自身では構造を有していても大腸菌内で発現される。2) インテインとキチン結合ドメインタンパクは可溶性のタンパク質であり、望みのペプチ

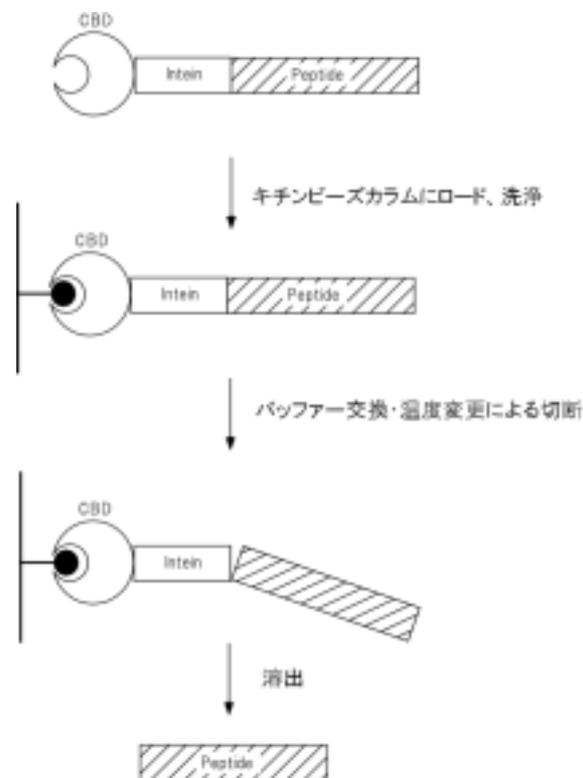


図4 大腸菌によるペプチドの合成

ドがある程度水に溶けにくくても全体として水に溶けやすく精製が容易である。3) 通常、大腸菌で発現させたタンパク質を精製するためにはHis-tagやGST-tagなどの余分なペプチド配列が必要

となるが、この系ではキチン結合ドメインタンパクで精製し、それはインテインの反応後に切り出されるため除かれる。したがって余分なタグを含まないペプチドが得られる。

上記のシステムを用いて、効率的な遺伝子導入機能を有するペプチドを探索するために大腸菌でペプチドライブラリーを構築することにした。構築したペプチドライブラリーは $CR(X)_{27}CC$ である ($X=R, H, L, N, Q, S$)。システインは細胞内の還元環境下でジスルフィド結合が切断され、コンプレックスが崩れ、DNA が放出されやすくなる効果が期待できる。リシン (L)、アルギニン (R) は正電荷により DNA を小さくし、また、細胞表面と相互作用することが期待できる。ヒスチジン (H) は DNA がエンドサイトーシスで取り込まれる際にエンドソームからリリースされるのを促進する働きがあると考えられる。大腸菌でペプチドライブラリーを合成した結果を図 5 に示す。ランダムにコロニーを選びタンパクを発現・精製した。75% (6/8) のコロニーからは望みのペプチドが得られていることがわかる。

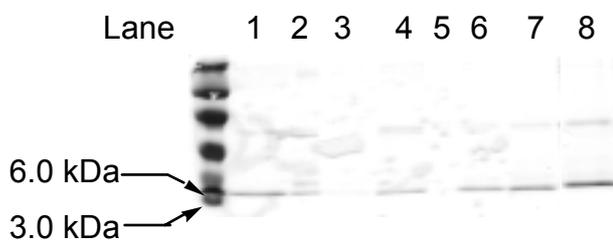


図 5 大腸菌によるペプチドライブラリーの構築

2 非天然ヒスチジンアナログの合成と大腸菌による効率的な取り込み

天然のタンパク質は20種類のアミノ酸から構成されており、それらが巧みな配列と高次構造を構成することでタンパク質は様々な機能を持っている。その中でヒスチジンは酸解離定数が7であり、様々なタンパク質において酸・塩基触媒として働いている。そこで我々はヒスチジンよりも酸として強いヒスチジンアナログを合成し、タンパク質中に導入することにより天然の酵素と活性・至適 pH 等の点で異なった性質を持つ酵素を創出できるのではないかと考えた。今回私は、新規非天然ヒスチジンアナログである **9** を合成することにした。この化合物は天然のヒスチジン (**8**) のイミダゾール環をトリアゾール環にしたものであり構造が非常によく似ているために、タンパク質中に導入してもその構造をほとんど歪めないと考えられる。

非天然アミノ酸のタンパク質への導入法であるが、調製できるタンパク質の量や簡便性、経済性を考え、大腸菌を用いて非天然アミノ酸を導入することを試みた。大腸菌は通常、自身でヒスチジンを合成し、タンパク質中に取り込んでいるが、ヒスチジン欠損株はこの機能を持たない。そこで我々は、今回合成したヒスチジン類似体の構造がヒスチジンに極めてよく似ているため、培地にこれら非天然アミノ酸を加えるだけで導入できないかと考えた。その結果、合成した化合物 **9** については極めて効率良く導入を確認することができた。(図 7)

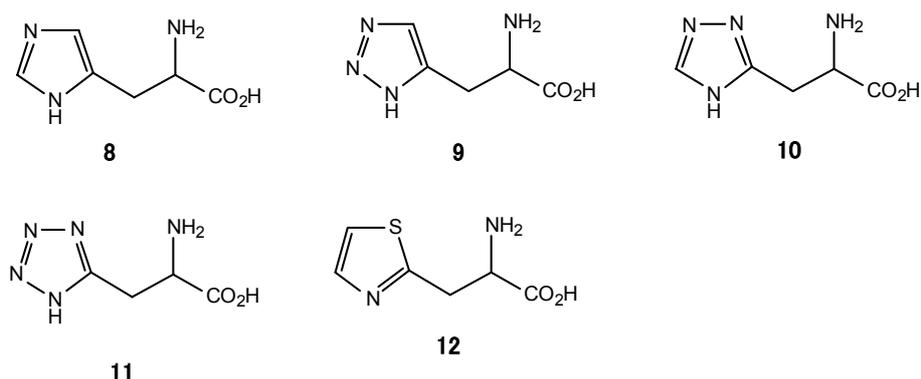


図6 今回の実験に用いたヒスチジン (8) 及びそのアナログ (9-12)



図7 ヒスチジン欠損株大腸菌によるヒスチジン (8) 及びヒスチジンアナログ (9-12) のタンパク質への取り込み。

分子軌道計算の結果より、これらのヒスチジンアナログの取り込みの差は、取り込まれたヒスチジン及びヒスチジンアナログに関しては、最も安定な異性体に以下の ϕ の位置の窒素原子に水素が結合しているために、his-tRNA 合成酵素の Glu 131 との水素結合により効率的に酵素に認識されていることが示唆された。

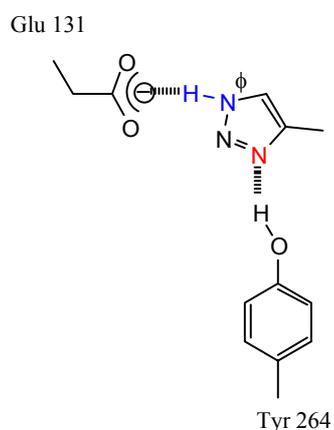


図8 ヒスチジンアナログ (9) his-tRNA 合成酵素の相互作用のモデル

以下の研究は京都大学の修士課程で行った研究で以下の二報の論文にまとめられている。

Direct Strand Cleavage via Furanyladenine Formation in Anaerobic Photoirradiation of 5-Bromouracil-Containing Oligonucleotides. Tetrahedron Lett. 2000, 41. 6455.

Deoxyribonolactone formation in photoirradiation of 5-bromouracil-containing oligonucleotides by direct C1' hydrogen abstraction. Tetrahedron Lett. 2002, 43. 2243.

DNA に引き起こされる様々な損傷反応の一つに酸化的損傷反応がある。なかでも放射線照射などにより生じるウラシルラジカル (1) は、様々な損傷反応を引き起こすことが知られている。しかしこの DNA の損傷反応については生成物の不安定性、反応の複雑性からその機構が未知な部分も多い。そこで私は以下の論文において DNA の糖上の水素引き抜きによる酸化的損傷について新たな反応経路を提示した。

DNA 中に生じたラジカル (1) がどの水素を引き抜くことによって損傷が起こるのかを調べるために C1'の水素を重水素で置き換えた化合物 (2) を合成した。この合成した (2) 及び光照射によりラジカルを生じることが知られているブロモウラシルを DNA 中に組み込み、光照射によりラジカル (1) を発生させ、重水素がどこに移動したのかを ESI-TOF-Mass で調べたところウラシルの 5 位に移動していることがわかった。またこの水素引き抜き反応の同位体効果を測定したところ 1.7 という値が得られた。さらにラジカル (1) が C2'の水素を引き抜いた時、DNA の直接鎖切断が起こり、その切断フラグメントはフラン骨格を有する (3) のようなものであることも解明した。DNA の切断フラグメントとしてこのようなものが観測されたのは世界で初めてである。これらのことから私の研究によって以下に示すような DNA の酸化的損傷機構が提示された。

