

論文の内容の要旨

論文題目 アクリジン・DNA コンジュゲートの構造最適
化による効率的な位置選択的 RNA 切断

氏 名 施 云 (し う ん)

[緒論]

ポストゲノムの時代を迎えた今日、遺伝子治療や遺伝子工学の分野において、RNA を位置選択的に切断するのは非常に有力な手段である。

本研究では、RNA を狙った位置で効率的に切断するために、種々の人工酵素を開発されてきた。従来の人工酵素では、触媒を DNA 認識部位に固定化する方法が主として用いられた。しかし、この手法には、触媒分子を DNA に導入するための有機合成の煩雑さや、DNA への導入の際に切断分子の活性が低下してしまうなどの難点があった。従来法のこれらの欠点を克服し、切断触媒の活性を最大限に利用するために、本研究室では“基質の活性化を利用した位置選択的な RNA 切断法”を開発した。アクリジン修飾 DNA が、相補的な RNA と二重鎖を形成すると、アクリジン分子はその正面の RNA 塩基の 5'側のリン酸ジエステル結合を活性化する。従って、RNA 切断触媒（例えば lanthanide イオン）を系中に加えると、アクリジンにより活性化された RNA 部位のみが切断された。この方法は反応触媒を認識 DNA と共有結合で結合する必要が全くなく、従ってそれによる触媒活性の低下もなしに、高効率的に RNA を切断できる。しかし、それでも、生理条件 (pH 8) で RNA を 50% 分解するには、15 時間もかかる。将来の応用を考慮すると、さらなる切断活性の向上が必要である。

本論文は、“基質の活性化を利用した位置選択的な RNA 切断”の切断効率を向上することを研究目的とする。RNA 切断の効率を向上させるために、主にアクリジンを DNA に導入する際に用いられるアクリジンモノマーの構造を検討した。アクリジンモノマーの構造と RNA 活性化能の関係を系統的に調べ、アクリジンモノマーの構造を最適化した。さらに、アクリジンの近傍に配位子を導入し、アクリジンで活性化された部位の近傍に金属イオンを固定化することよりその局所濃度を増やし、RNA 切断効率を向上した。

[結論と考察]

1. アクリジンモノマーのリンカー構造の最適化

D-または L-threoninol を出発原料として、アクリジンのキラルモノマーを設計した。それを用いて、キラルなアクリジン DNA コンジュゲートを構築した (Figure 1)。モノマーの構造 (リンカーの根元の立体配置とリンカーの側鎖の長さ) とアクリジンの RNA 活性化能の関係性を系統的に検討した。アクリジンの機能性を十分に発揮させ RNA を効率的に切断するために、アクリジン分子を DNA に導入する際に用いられたリンカーの構造を最適化した。

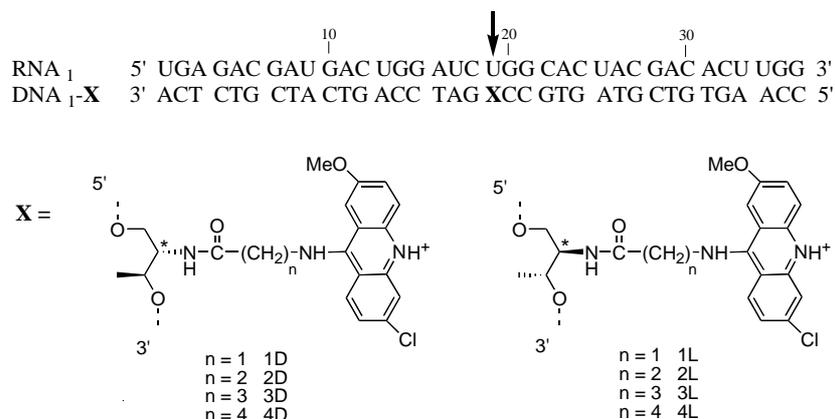


Figure 1. アクリジン DNA コンジュゲートの構造

アクリジンモノマーのリンカーの構造はアクリジンのRNA活性化能に顕著な影響を与える。まず、リンカーの根元の立体配置がアクリジンのRNA活性化能に影響する。ただし、効果は、リンカーの側鎖の長さに顕著に依存した。側鎖が短いと、リンカーの根元の立体配置はアクリジンのRNA活性化能への影響が小さい。一方、側鎖が長くなると、立体配置によるアクリジンのRNA活性化に与える影響が増加する。DNA₁-3LはDNA₁-3Dの約3倍の活性を示す。次に、L-threoninol由来のアクリジン修飾DNAのRNA活性化能が側鎖の長さに強く依存するのに対して、D-threoninol由来のアクリジン修飾DNAのRNA活性化能が側鎖の長さにそれほど依存しない。

アクリジンモノマーのリンカー構造の最適化の結果、L-threoninolを骨格とし側鎖のメチレン基の数がn=3のリンカーでアクリジンをDNAに導入すると(DNA₁-3L)最も高いRNA活性化能を示す。

2. 最適化したリンカーと種々のアクリジンとの組み合わせによる位置選択的RNA切断

構造最適化したキラルリンカーを用いて、酸性度がより高いアクリジンや、嵩高い置換基を持つアクリジン分子を繋ぎ、新たなアクリジンモノマーを構築した。これらのア

クリジンモノマーを DNA に導入し、アクリジン修飾 DNA を合成した。RNA への切断実験を行って、アクリジン修飾 DNA の RNA 活性化能を評価した。

酸性度が高い 9-amino-2-methoxy-6-nitroacridine を持つアクリジン修飾 DNA は、酸性度が低い 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine を持つアクリジン修飾 DNA と比べて、RNA 活性化能が約 4 倍高い。また、2 位に嵩高いイソプロポキシ置換基を持つアクリジン修飾 DNA はメトキシ置換基を持つ DNA より RNA 活性化能が 1.5 倍高い。

さらに、酸性度が高いアクリジンの系でも、両異性体間の RNA 活性化能の差は酸性度が低いアクリジンの系と同じ程度である。

結論として、Figure 2 に示すアクリジンモノマー残基を持つアクリジン修飾 DNA の RNA 活性化能がもっとも高いことが明らかになった。その結果、RNA 切断の半減期は 15 時間から 3.5 時間に短縮された。

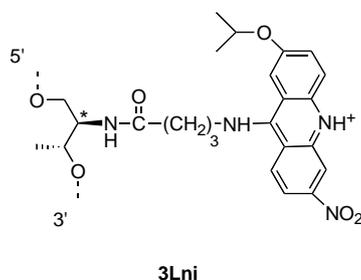


Figure 2. 最適化したアクリジンモノマー残基の構造

3. リンカーの根元の立体配置が RNA 活性化能に及ぼす効果の分子論的考察

UVスペクトル、蛍光スペクトル、分子モデリング、CDスペクトルおよび¹H NMRなどの分光学的な手法を利用し、二重鎖中の2つの異性体DNA中のアクリジンの環境を比較した。その結果、リンカーの根元の立体配置によりアクリジンのRNA活性化能が異なるのは次のような原因によるものと結論した。リンカー根元の立体配置のみが異なる2つのアクリジンDNA異性体は、相補的なRNAと二重鎖を形成すると、両者のアクリジンはほぼ同じ位置に配置されるが、方向が異なる。また、両者のアクリジンのインターカレーションよりその周辺の核酸のコンフォメーションの変化の度合いが異なる。L-アクリジン修飾DNAの場合、アクリジンのインターカレーションにより、ターゲットRNAの2'-OとPとの距離を短くさせ、リン酸ジエステル結合を加水分解に有利な五配位中間体を形成しやすいコンフォメーション変化を行い、従って、RNA活性化能が高いと推定した。

4. Lu(III)錯体の固定化による RNA 切断効率のさらなる向上

位置特異的な RNA 切断の効率を向上させるために、アクリジンの近傍にさらに配位子を導入した。本研究は主に配位子モノマーの構造に着目した。

配位子モノマーの構造は、RNA 切断効率に顕著な影響を与えた。特にイミノ二酢酸配位子は、DNA の近傍に配置されると、RNA 切断効率が大幅に向上した。また、配位子分子は D-threoninol 由来のリンカーで DNA に導入するのは、L-threoninol 由来のリンカーで DNA に導入することより RNA 切断への加速効果が高い。

結論として、Figure 3 に示すような配位子モノマー残基を持つ配位子修飾 DNA の RNA 切断への加速効果が最も高い。

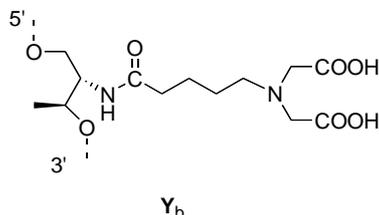


Figure 3. 最適化した配位子モノマーの構造

[結論]

本研究をまとめると、次のことが分かった。

1. アクリジンモノマーの構造を最適化することより、位置特異的な RNA 切断の半減期を従来の 15 時間から 3.5 時間に短縮した。
2. アクリジンで活性化された部位の近傍に配位子を導入することにより、位置特異的な RNA 切断効率はさらに向上した。

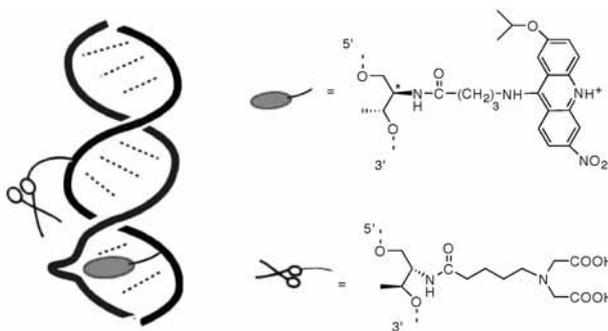


Figure 4. 効率的な位置特異的 RNA 切断