

論文内容の要旨

論文題目：「核酸切断触媒の開発とその細胞導入に向けての検討」

氏名：石窪 章

第1章：本研究の目的と背景

核酸の一つである RNA は、塩基（アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルのいずれか）が付加された糖（リボース）とリン酸がホスホジエステル結合によって繰り返し結合された生体の遺伝を司る高分子電解質である。発現される DNA の一部が RNA として写し取られ、塩基配列に沿ったアミノ酸配列のタンパク質が組み上げられるという一連の流れの中で、DNA は遺伝情報のマスターという重要な役割を担っている一方で、RNA は遺伝子の伝達、アミノ酸の運搬、リボソームの構成要素、RNA 自身の切断・結合などを触媒する酵素（リボザイム）、更には近年注目を集めている遺伝子発現抑制役（RNA 干渉、RNAi）といった多様な役割を担っている。この RNA を、位置選択的に加水分解できる人工リボヌクレアーゼによって RNA を目的通り操作した後に細胞内に導入すること、あるいはその人工リボヌクレアーゼを細胞導入して mRNA の選択的な破壊を行なうことによって遺伝子発現を自在に制御することができれば、遺伝子治療、遺伝子工学の発展に大いに役立つものと考えられる。本研究ではこれを実現するための大きなポイントとなる人工リボヌクレアーゼの構築、およびその人工リボヌクレアーゼそのもの、あるいは遺伝子操作後の RNA の細胞導入に着目して研究を行なった。

生体内には RNA を加水分解することができるリボヌクレアーゼと呼ばれる天然酵素が存在するものの、位置選択的に加水分解する酵素はこれまでに見出されていない。そのため、位置特異的に RNA を加水分解できる人工酵素の開発に向け、これまでに多くの研究がなされてきている。選択性の高さ、汎用性の高さが最も期待できる手法の一つに、RNA を加水分解できる活性中心部分に標的 RNA の相補鎖を繋げる方法がある。このようなデザインの人工酵素を達成するには、高い RNA 加水分解能を有した活性中心部分の構築が強く求められる。天然のリボヌクレアーゼには、その活性中心に Mg^{2+} や Ca^{2+} のような 2 価金属イオンを有するものが多く、これらの金属イオンが生体条件という温和な条件での触媒作用を可能にしている。そこで本研究では、生体に学び単核・多核金属錯体をデザイン・合成・機能評価し、効果的に RNA を加水分解できる活性中心を見出すことを目的の一つとした。

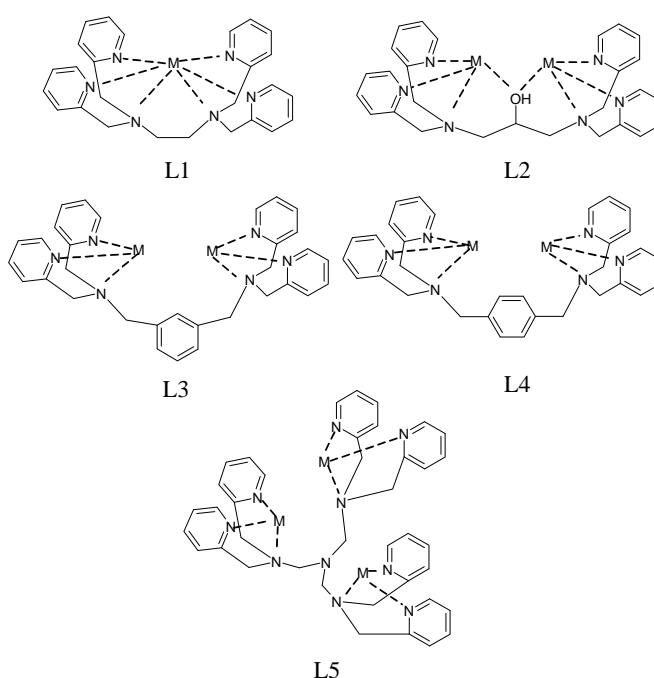
遺伝子発現の抑制などの遺伝情報を操作する場合、作成した人工酵素や核酸などを細胞内に戻さなくてはならない。この技術は核酸を細胞内に取り込ませるトランスフェクションという技術であり、これまでに幾つかの手法が開発されてきた。その中で、導入率の高さと安全性から正電荷を持ったリボソームと核酸を混合して得た複合体をベクターとするリポフェクション法や、ポリエチレンイミンなどのようなポリカチオンと核酸の複合体をベクターとするポリフェクション法などの、核酸と反対電荷を持った両親媒性物質を複合

化させて細胞に導入する非ウイルス的な方法が有望である。核酸と正電荷を持ったリポソームあるいは高分子の複合体形成、細胞膜への吸着、エンドサイトーシスによる取り込みという流れの中で、複合体の状態は非常に重要な要素であり、核酸とカチオンの相互作用の解明、そして新たな状態の複合体の開発が求められている。本研究では、効果的な細胞導入に向けて、核酸を固体表面にブラシ状に固定してベクターと相互作用させるという新たな複合体調製法を検討することで課題に取り組んだ。

第2章. RNA加水分解活性を有するランタニド金属錯体の構築

これまでにランタニド金属イオンは非常に高い核酸加水分解反応活性を有していることが報告されている。このランタニド金属イオンを人工制限酵素の活性部位として活用するためには、金属イオンを認識部位に上手く接続できるように制御する必要がある。溶液中で金属錯体を形成させることは、その制御方法の有力な手段の一つである。

本研究では、ランタニド金属イオンを核酸加水分解の活性種として活用することを目的に、種々の配位子を用いて中性水溶液中での錯形成挙動およびその核酸加水分解活性を検討した。配位子は、ランタニド金属イオンの正電荷を損なわない中性であるものが好ましいと考えられ、これまでにランタニド金属イオンと錯形成が確認されているシクロデキストリンや窒素原子で配位する配位子を検討した。その結果、ピリジン環の窒素が、強くランタニド金属イオンに配位することがわかり、ピリジン窒素を配位部位として活用した配位子(L1)を用いることによって、水溶液中で安定で、かつRNA加水分解活性を保持した錯体を見出すことができた(1)。さらに、2個のランタニド金属イオンを保持できる配位子(L2)を利用して、ランタニド金属イオンの複核錯体を形成させ、加水分解活性を調べた結果、La³⁺イオンの場合、RNAの加水分解活性が約70倍も向上することを見出した(2, 3)。本章では、ランタニド金属イオンの中性水溶液中での錯形成挙動を調べるとともに、RNAの加水分解について反応速度論的な考察を加えながら検討を行った結果を示す。



第3章. 亜鉛多核錯体の合成とRNA加水分解反応の触媒効果

天然酵素には、温和な条件で反応を効率的に触媒するために複数の金属イオンを活性中

心に必要としているものが数多く知られている。 Zn^{2+} イオン、 Cu^{2+} イオン、 Mg^{2+} イオン等、そのもの自身では反応を促進できないものでも、活性中心に効果的に配置されることによって触媒効果を発揮する。 Zn^{2+} イオンは、そのもの自身では種々の反応にイナートであるものの、アルカリフォスファターゼ、フォスホリパーゼや P1 ヌクレアーゼなどの天然酵素の活性中心として触媒反応の中心的役割を果たしていることが知られている。

Zn^{2+} イオンは生体必須微量金属元素であり、金属イオンを上手く配置することによって RNA 加水分解能を有する多核錯体を構築できれば、金属イオン単独では反応を触媒せず、錯体化したときにのみ活性を示すようなシステムが可能となり、より反応選択性が高い *in vivo* でも慣用可能な人工酵素が期待できる。

本章では、 Zn^{2+} イオンを用いた種々の 2 核、3 核錯体を作成し、その核酸加水分解反応の活性について調べた。その結果、3 種類の亜鉛 2 核錯体(L1、L3、L4)および 1 種類の亜鉛 3 核錯体(L5)を中性水溶液中で安定に形成させることに成功し、また、これらが亜鉛イオン単独に比べて非常に優れた RNA 加水分解活性を有していることを見出した (4-7)。溶液中での錯体の構造、RNA の反応と塩基選択性、反応速度論的考察を行うことによって、それぞれの錯体の核酸加水分解機構について詳細に検討を行った。

第 4 章 両親媒性物質と高分子電解質の相互作用を利用した遺伝子の細胞導入法の開発

負電荷を持つ高分子電解質である核酸と正電荷を持つ両親媒性物質の複合体は、DNA のフォールディングや、細胞内に核酸を送達するトランスフェクションのベクターとしての応用が期待されている。複合体形成は、濃度・温度・イオン強度などの調製条件によって大きく影響を受けるため、効果的な複合体を得るために種々の混合条件において検討がなされている。

本研究では、核酸の効率的なトランスフェクション用ベクターとして高密度に核酸をフォールディングした複合体の開発、および複合対形成の制御を目的に、高分子電解質ブラシと反対電荷を持つカチオン活性剤を相互作用させるという新たな切り口で課題に取り組んだ。高分子電解質ブラシとは、高分子の片末端を固体表面に高濃度にグラフトして水中で膨潤させたもので、水中での高分子の慣性半径に比べてグラフト密度が高いため、高分子が引き伸ばされた状態で整列したものである。これを用いることによって、より高密度でコンパクトな核酸の濃縮、また濃縮の制御が可能になると考えられ、新たなベクター用複合体調整法として期待できる。核酸モデルとしてポリスチレンスルフォネートを用いて高分子電解質ブラシを作成し、反対電荷の両親媒性物質（セチルトリメチルアンモニウムブロミド、CTAB）との相互作用を、表面力測定器やエリプソメトリーを用いて直接的・定量的に測定した結果を用いて詳細に調べた (8-11)。その結果、表面上に高密度に高分子を固定させた薄膜状態の高分子ブラシは、両親媒性物質との相互作用によって効率的に凝縮させることが出来ること、さらに高分子電解質の濃縮率はバルク CTAB 濃度、塩濃度によって制御可能であることがわかり、このシステムは、トランスフェクション用ベクター調製

法として有望であることを明らかにした。

参考論文

- (1) M. Yashiro, A. Ishikubo, T. Takarada, and M. Komiyama
Lanthanide complexes with high stability and efficiency for the hydrolysis of a ribonucleotide dimer, *Chem. Lett.*, 1995, 665-666
- (2) M. Yashiro, A. Ishikubo, and M. Komiyama
Dinuclear lanthanum(III) complex for efficient hydrolysis of RNA, *J. Biochem.*, 120, 1067-1069 (1996)
- (3) A. Ishikubo, M. Hattori, M. Yashiro, and M. Komiyama
Dinuclear Lanthanide complexes for rapid RNA hydrolysis, *Kidorui*, 28, 36-37 (1996)
- (4) M. Yashiro, A. Ishikubo, and M. Komiyama
Preparation and Study of dinuclear zinc(II) complex for the efficient hydrolysis of the phosphodiester linkage in a diribonucleotide, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 1793-1794
- (5) A. Ishikubo, M. Yashiro, and M. Komiyama
Dinuclear metal complexes for the efficient RNA hydrolysis, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, 34, 85-86 (1995)
- (6) M. Yashiro, A. Ishikubo, M. Hattori, and M. Komiyama
Trinuclear Zn(II) complex for the efficient and structure dependent RNA hydrolysis, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, 35, 103-104 (1996)
- (7) M. Yashiro, A. Ishikubo, and M. Komiyama
Unique trinuclear Zinc(II) complex for efficient and selective RNA hydrolysis, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1997, 83-84
- (8) Akira Ishikubo, Jimmy Mays and Matthew Tirrell
Interaction between end-tethered polyelectrolyte brushes in the presence of oppositely charged surfactant, *Polymer Preprint*, 2005, 46(2), 27-28.
- (9) Akira Ishikubo, Jimmy Mays and Matthew Tirrell
Interactions between end-tethered poly(styrenesulfonate) brushes in the presence of cationic surfactant, *Macromolecules* 2006, *accepted for publication*.
- (10) Akira Ishikubo, Feng Li, Jimmy Mays and Matthew Tirrell
Tuning Soft, Hydrated Interfaces Composed of Tethered Polymer Layers with Multi-Valent, Ionic Interactions, *Science* in submission
- (11) Akira Ishikubo, Jimmy Mays and Matthew Tirrell
Behaviors of Cationic Surfactants in oppositely charged polyelectrolyte brushes, *Langmuir* 投稿予定