

氏名（本籍）	柴田 綾（愛知県）
学位の種類	博士（工学）
学位授与番号	甲第 315 号
学位授与日付	平成 19 年 3 月 25 日
専攻	物質工学専攻
学位論文題目	新規架橋型核酸の開発とその遺伝子抑制法への応用 (Synthesis of novel double-stranded oligonucleotides and their application for gene suppression)
学位論文審査委員	(主査) 教授 北出 幸夫 (副査) 教授 西川 一八 教授 野原 大輔 助教授 上野 義仁

論文内容の要旨

近年、遺伝子発現抑制法としてアンチセンス法とアンチジーン法が注目されている。アンチセンス法は mRNA に相補となる合成オリゴヌクレオチドを結合させ、二本鎖核酸を形成させることによりタンパクへの翻訳の過程を阻害するものである。一方、アンチジーン法は二本鎖 DNA を標的とし第三鎖を結合させることで三本鎖核酸を形成させ、転写や複製の過程を阻害するものである。

二本鎖核酸と一本鎖核酸が会合する三本鎖核酸形成は、本来、エントロピー的には不利な反応であるが、新しく形成される第二鎖および第三鎖間の塩基間の Hoogsteen 水素結合および隣接する塩基間のスタッキング相互作用（疎水性相互作用とロンドン分散力の和）によりエンタルピー的に有利であるため、ある塩濃度および基質濃度下では室温においても自発的に進行する。三本鎖核酸形成を熱力学的に有利に進行させる 1 つの方法として、核酸をリンカーで架橋して構造をあらかじめ組織化する方法がある。オリゴヌクレオチドを架橋し、オリゴヌクレオチドを三本鎖核酸形成に有利な型にプレオーガナイズ (pre-organize) することにより、三本鎖核酸形成におけるエントロピーロスを減少させ、その結果、三本鎖核酸をより熱力学的に安定化させることが可能となる。

これまでにヒト、ショウジョウバエなどさまざまな生物種より三本鎖核酸構造を認識し特異的に結合するタンパク質 (TBP; triplex-binding protein) が見出されている。これら TBP の役割は完全には明らかにされていないが、三本鎖核酸構造を認識し、結合することでその機能を発現していると推定されている。したがって、TBP が三本鎖核酸に結合し、その構造を熱的に安定化するのであれば、細胞内に存在するこれら TBP の性質に合った分子を開発することは、三本鎖核酸形成を利用した遺伝子発現抑制法を行う上で非常に有効であると考えられる。

申請者らの研究室では、ペンタエリスリトールを利用した機能性核酸の合成を行っている。ペンタエリスリトールは四つの等価な水酸基を持つ化合物で、四つの水酸基にオリゴ

ヌクレオチドを結合させることにより、オリゴヌクレオチドを高機能化することが可能となる。また、リンカーを介してオリゴヌクレオチドを結合させることにより、オリゴヌクレオチド間の距離を制御することも可能となる。そこで本研究では、三本鎖核酸形成を利用した新しい遺伝子発現抑制分子として、二本のオリゴヌクレオチドを上述したペンタエリスリトールを用いて架橋した二本鎖アンチセンス核酸を合成し、その性質について詳細に検討した。

(1) パラレル架橋型核酸の合成とその性質

パラレル型三本鎖核酸形成を利用した新規アンチセンス核酸の創製を目的とし、パラレルにオリゴヌクレオチドをペンタエリスリトールで架橋した分子を合成し、その三本鎖核酸形成能を検討した (Fig.1)。その結果、第二、第三鎖を架橋すること、および第三鎖に 2'-O-メチルリボヌクレオシド から成る修飾 RNA (2'-O-Me RNA) を導入することで三本鎖核酸の熱的安定性が大幅に向上することを見出した。

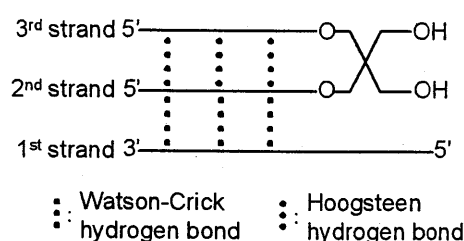


Fig. 1. Triplex formation by the 3'-3'-linked oligonucleotide.

2'-デオキシイノシンおよび 2'-デオキシキサントシンは天然の 4 種の塩基のすべてと塩基対を形成することが可能であることからユニバーサル塩基と呼ばれている。パラレル架橋型核酸の標的配列の拡大を目指し、2'-デオキシイノシンおよび 2'-デオキシキサントシンを第二鎖に相当する鎖に導入したオリゴヌクレオチドを合成し、プリン塩基を含む第一鎖との三本鎖核酸形成能について検討した。その結果、2'-デオキシキサントシンを含むオリゴヌクレオチドを用いた場合に、キサンチン塩基の相補となる位置に 4 種の天然型塩基のいずれが存在する場合でも安定な三本鎖核酸が形成されることを見出した。

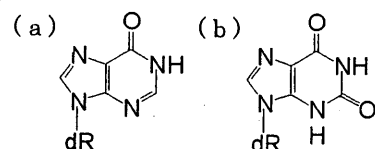


Fig. 2. Structure of (a) 2'-deoxyinosine and (b) 2'-deoxyxanthosine.

(2) アンチパラレル架橋型核酸の合成とその性質

アンチパラレル型三本鎖核酸形成を利用した新規アンチセンス核酸の創製を目的とし、アンチパラレルにオリゴヌクレオチドをペンタエリスリトールで架橋した分子を合成し、その三本鎖核酸形成能を検討した。さらに、合成した架橋型三本鎖核酸と三本鎖核酸結合タンパク質 (TBP) の相互作用について解析した。その結果、第二、第三鎖を架橋することで三本鎖核酸の安定性が大幅に上昇すること、第二、第三鎖を架橋することで TBP との親和性が向上することを見出した。また、5-アミノメチル-2'-デオキシウリジン (5-AM dU, Fig.3a) を第三鎖に導入した、アンチパラレル架橋型オリゴヌクレオチドを合成し、その性質について検討した。その結果、5-AM dU を導入することで三本鎖核酸の安定性が向上すること、 Mg_2^{+} 非存在下においても三本鎖核酸が形成されることを見出した。

さらに、混合配列を標的とした二本鎖アンチセンス核酸として、第三鎖に相当する鎖に

糖部開環型アナログ (Fig.3b,c) を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、その三本鎖核酸形成能について検討した。その結果、^{bu}T を用いることで A・T” inverted “塩基対を含む配列を標的としてアンチパラレル型三本鎖核酸を形成させることが可能であることを見出した。

(3) 架橋型核酸の遺伝子発現抑制効果

得られた知見を基に、架橋型アンチセンス核酸の遺伝子発現抑制効果を Dual Luciferase Assay により検討した。psiCHECK ベクター内の蛍ルシフェラーゼを標的配列とし、24 時間後に発現したタンパクの発光強度を測定した。その結果、架橋型アンチセンス核酸は一本鎖核酸に比べより低濃度で遺伝子の発現を抑制することを明らかとなった。

三本鎖核酸形成を利用した新しい遺伝子発現抑制分子として、ペンタエリスリトールを用いて架橋した分子を合成し、その性質について詳細に検討した。そして、三本鎖核酸形成における安定性と標的配列の制限に関する問題の解決に成功した。また、実際に細胞を用いた結果より、開発した二本鎖アンチセンス核酸は新しい遺伝子発現抑制分子の有望な候補になるものと考えられる。

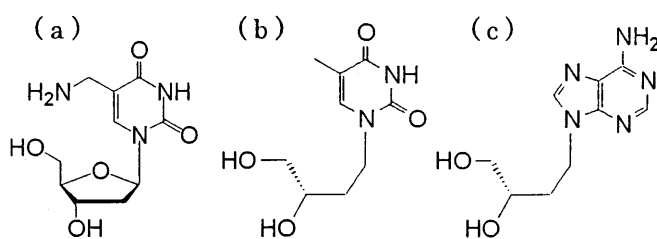


Fig. 3. Structure of (a) 5-AM dU, (b) ^{bu}T and (c) ^{bu}A.

論文審査結果の要旨

近年、遺伝子発現抑制法としてアンチセンス法とアンチジーン法が注目されている。アンチセンス法は mRNA に相補となる合成オリゴヌクレオチドを結合させ、二本鎖核酸を形成させることによりタンパクへの翻訳の過程を阻害するものである。一方、アンチジーン法は二本鎖 DNA を標的とし第三鎖を結合させることで三本鎖核酸を形成させ、転写や複製の過程を阻害するものである。

二本鎖核酸と一本鎖核酸が会合する三本鎖核酸形成は、本来、エントロピー的には不利な反応であるが、新しく形成される第二鎖および第三鎖間の塩基間の Hoogsteen 水素結合および隣接する塩基間のスタッキング相互作用（疎水性相互作用とロンドン分散力の和）によりエンタルピー的に有利であるため、ある塩濃度および基質濃度下では室温においても自発的に進行する。三本鎖核酸形成を熱力学的に有利に進行させる 1 つの方法として、核酸をリンカーで架橋して構造をあらかじめ組織化する方法がある。オリゴヌクレオチドを架橋し、オリゴヌクレオチドを三本鎖核酸形成に有利な型にプレオーガナイズすることにより、三本鎖核酸形成におけるエントロピーロスを減少させ、その結果、三本鎖核酸をより熱力学的に安定化させることが可能となる。

これまでにヒト、ショウジョウバエなどさまざまな生物種より三本鎖核酸構造を認識し特異的に結合するタンパク質 (TBP; triplex-binding protein) が見出されている。これら TBP の役割は完全には明らかにされていないが、三本鎖核酸構造を認識し、結合することでその機能を発現していると推定されている。したがって、TBP が三本鎖核酸に結合し、その構造を熱的に安定化するのであ

れば、細胞内に存在するこれら TBP の性質に合った分子を開発することは、三本鎖核酸形成を利用した遺伝子発現抑制法を行う上で非常に有効であると考えられている。

そこで本研究では、三本鎖核酸形成を利用した新しい遺伝子発現抑制分子として、二本のオリゴヌクレオチドをペンタエリスリトールにて架橋した二本鎖アンチセンス核酸を合成し、その性質について詳細に検討している。

(1) パラレル型三本鎖核酸形成を利用した新規アンチセンス核酸の創製を目的とし、パラレルにオリゴヌクレオチドをペンタエリスリトールで架橋した分子を合成し、その三本鎖核酸形成能を検討している。その結果、第二、第三鎖を架橋すること、および第三鎖に 2'-O-メチルリボヌクレオチド から成る修飾 RNA を導入することで三本鎖核酸の熱的安定性が大幅に向上することを見出している。2'-デオキシイノシンおよび 2'-デオキシキサンチンは天然の 4 種の塩基のすべてと塩基対を形成することが可能であることからユニバーサル塩基と呼ばれている。パラレル架橋型核酸の標的配列の拡大を目指し、2'-デオキシイノシンおよび 2'-デオキシキサンチンを第二鎖に相当する鎖に導入したオリゴヌクレオチドを合成し、プリン塩基を含む第一鎖との三本鎖核酸形成能について検討している。その結果、2'-デオキシキサンチンを含むオリゴヌクレオチドを用いた場合に、キサンチン塩基の相補となる位置に 4 種の天然型塩基のいずれが存在する場合でも安定な三本鎖核酸が形成されることを見出している。

(2) アンチパラレル型三本鎖核酸形成を利用した新規アンチセンス核酸の創製を目的とし、アンチパラレルにオリゴヌクレオチドをペンタエリスリトールで架橋した分子を合成し、その三本鎖核酸形成能を検討している。更に、合成した架橋型三本鎖核酸と三本鎖核酸結合タンパク質 (TBP) の相互作用について解析している。その結果、第二、第三鎖を架橋することで三本鎖核酸の安定性が大幅に上昇すること、第二、第三鎖を架橋することで TBP との親和性が向上することを見出している。また、5-アミノメチル-2'-デオキシウリジン (5-AMdU) を第三鎖に導入した、アンチパラレル架橋型オリゴヌクレオチドを合成し、その性質について検討している。その結果、5-AMdU を導入することで三本鎖核酸の安定性が向上すること、 Mg_2^{+} 非存在下においても三本鎖核酸が形成されることを見出している。

(3) 混合配列を標的とした二本鎖アンチセンス核酸として、第三鎖に相当する鎖に糖部開環型アナログを導入したオリゴヌクレオチドを合成し、その三本鎖核酸形成能について検討している。その結果、修飾チミジンを用いることで A-T inverted “塩基対を含む配列を標的としてアンチパラレル型三本鎖核酸を形成させることが可能であることを見出している。

(4) 得られた知見を基に、架橋型アンチセンス核酸の遺伝子発現抑制効果を Dual Luciferase Assay により検討している。psiCHECK ベクター内の蛍ルシフェラーゼを標的配列とし、24 時間後に発現したタンパクの発光強度を測定している。その結果、架橋型アンチセンス核酸は一本鎖核酸に比べより低濃度で遺伝子の発現を抑制することを明らかにしている。

以上詳しく述べたように、三本鎖核酸形成を利用した新しい遺伝子発現抑制分子として、ペンタエリスリトールで架橋した分子を開発し、三本鎖核酸形成における安定性と標的配列の制限に関する問題の解決にも成功している。また、実際に細胞を用いた実験により、開発した二本鎖アンチセンス核酸が新しい遺伝子発現抑制分子として有望であることなどを示しており、この論文の有用性は極めて高い。従って、審査の結果、この論文を学位論文に値するものと判定した。

最終試験結果の要旨

この論文の主要部分は、審査付き論文として公表済みの3編の論文である。この論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

公聴会において、学位論文の内容を中心として、またこれに関する事項、即ち新規架橋型アンチセンス核酸の合成法とその機能の解析並びにアンチセンス分子として遺伝子発現抑制法への応用、更には今後の展開や本研究の将来性などに関して諮問を行った。論文申請者から、十分な内容のある回答が得られたので、最終試験にも合格したと判定した。