

学位論文題名

4'-thioRNA の機能性核酸分子としての性質解析と
RNA 干渉法への展開

学位論文内容の要旨

【序論】

オリゴヌクレオチドによる創薬は遺伝子の特定の配列を標的とし、その発現を抑制可能なため様々な疾病に対してデザインが容易であるという特徴があり、近年盛んに研究がなされている。しかしオリゴヌクレオチドは、1) 核酸分解酵素により容易に分解されること、2) 細胞膜透過性が低いこと、3) 生体内で標的分子と安定な複合体の形成を要求されることなど、医薬分子へと展開する上で克服すべき問題点がある。これらの問題点を解決するために様々な化学修飾オリゴヌクレオチドが合成され、アンチセンス法などへの応用研究がなされている。また近年、RNAi の発見や SELEX 法により様々な機能性 RNA 分子の獲得が可能となったため化学修飾 RNA アナログの創製研究が特に活発に行われ始めている。

本研究で筆者が着目した 4'-thioRNA は、リボヌクレオシド糖部の環内酸素原子を硫黄原子へと置換した 4'-チオリボヌクレオシドを構成単位とする化学修飾 RNA の一つである。既に Leidier らが 4'-thioRNA の合成と若干の性質について報告しているが、各モノマーユニットの合成の困難さから、その後、機能性核酸分子としての応用・展開研究はなされていない。

ところで最近、当研究室の Naka らは Pummerer 反応を用いた 4'-チオリボヌクレオシドの効率的合成を達成している。この方法により、4'-thioRNA を容易に供給することが可能となった。そこで本研究では 4'-thioRNA を医薬核酸分子として応用することを視野に入れ、その性質をより詳細に解析した。さらに遺伝子発現制御法への応用研究として 4'-チオリボヌクレオシドを用いた化学修飾 siRNA 分子の創製研究を行った。

【結果と考察】

1. 4'-thioRNA の合成と機能性核酸分子としての性質解析

Naka らの合成法より得られる 4 種の 4'-チオリボヌクレオシド誘導体の 2'位を TBS 基で保護したのち 4'-thioRNA 合成のためのアミダイト体へと変換した。得られたアミダイト体を用いて、まず 15mer の 4'-thioRNA

(5'-AGUCCGAAUUCACGU-3' とその相補鎖、3'-UCAGGCUUAAGUGCA-5') を合成した。最初にこれらを含む二本鎖の熱的および熱力学的安定性を示差走査型カロリーメーターを用いて解析した。その結果、天然型 RNA 二本鎖の T_m 値は 53.9 °C であったが、4'-thioRNA:RNA 二本鎖では 66.9 °C であった。さらに 4'-thioRNA:4'-thioRNA 二本鎖の T_m 値は 91.0 °C となり、他の二本鎖の値を大きく上回った。すなわち、各二本鎖の熱的安定性の序列は 4'-thioRNA:4'-thioRNA >> 4'-thioRNA:RNA > RNA:RNA となり、4'-thioRNA:4'-thioRNA 二本鎖が熱的に非常に安定であることが明らかとなった。また各二本鎖の熱力学的安定性 ΔG° (37 °C) 値は熱的安定性の序列に一致し、その安定化効果はエンタルピー一項の寄与が大きいことが示された。

続いて各二本鎖の構造について CD スペクトルを用いて解析した。天然型 RNA 二本鎖は典型的な A 型構造のスペクトルを示し、4'-thioRNA:RNA 二本鎖もほぼ同様のスペクトルを示した。一方 4'-thioRNA:4'-

thioRNA 二本鎖では正のコットン効果が減少、負のコットン効果が消失したが同様の波形を示したため、構造上、若干違いがあるものの天然型 RNA 二本鎖と類似していることが示唆された。

修飾核酸を機能性分子として利用するためには、そのものがヌクレアーゼ抵抗性を有することが要求される。そこで 50% ヒト血清中での天然型 RNA および 4'-thioRNA 一本鎖の安定性を比較した。その結果、天然型 RNA は 10 秒でそのほとんどが分解されたのに対して 4'-thioRNA の半減期は 107 分となり、ヒト血清中 4'-thioRNA が天然型 RNA よりも 600 倍以上も安定であることが明らかとなった。

2. NF- κ B に対する RNA アプタマーの 4'-チオリボヌクレオシドによる post-modification

4'-thioRNA の性質解析より、この修飾核酸が全体構造に大きな変化を伴わずに熱的に安定な高次構造をとり、かつヌクレアーゼに対して高い抵抗性を示すことが明らかになった。そこで機能性核酸分子としての応用研究の一環として、SELEX 法によって獲得された 31mer の NF- κ B に対する RNA アプタマーの様々な部位へ 4'-チオリボヌクレオシドで post-modification を行った。その結果、NF- κ B との結合部位への修飾は親和性を消失させたが、結合部位以外への修飾では天然型アプタマーと同等の親和性を示した。さらにその修飾アプタマーは熱的に安定化され、ヌクレアーゼに対しても抵抗性を示し、4'-チオリボヌクレオシドによる post-modification が有用であることが明らかとなった。

3. 4'-thioRNA を用いた RNA 干渉による遺伝子発現抑制

RNA 干渉は二本鎖 RNA を細胞内へと導入することで相同な配列をもつ遺伝子発現を抑制する現象である。この現象は遺伝子発現抑制の新技术となり得ることから 21 残基の短鎖二本鎖 RNA、すなわち siRNA を用いた核酸医薬分子の開発研究が活発に行われている。その中で化学修飾によって siRNA の安定化を図る試みが精力的に行われている。筆者は上述した 4'-thioRNA の性質を利用すれば大きな構造変化伴わずに細胞内で安定な二本鎖構造を保持し、かつ高いヌクレアーゼ耐性を有した siRNA を創製可能であると考え、4'-thioRNA を新規な化学修飾 siRNA として利用することを計画した。

まず、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした種々の修飾 siRNA を用い、修飾数および修飾部位が RNAi 効果に及ぼす影響を検討した。修飾体の導入位置は siRNA 分子中（センス鎖およびアンチセンス鎖）の、1) ウリジン残基、シチジン残基および全残基の修飾、2) 5'-末端および 3'-末端 6 残基、中央部 7 残基の修飾、3) 5'-末端および 3'-末端の修飾数を 6 から 4、2 残基と減少、の 3 通りの様式で行った。その結果、修飾 siRNA では修飾数および修飾位置に応じて RNAi 効果に大きな違いが観察された。センス鎖の修飾ではほとんどの配列が高い RNAi 効果を示したが、アンチセンス鎖の修飾ではその導入位置が大きく RNAi 効果に影響を及ぼした。特にアンチセンス鎖の中央部への修飾は RNAi 効果を大きく低下させた。また末端部の修飾はアンチセンス鎖の 5' 側の方がより RNAi 効果に影響することも明らかとなった。以上のように修飾様式を種々検討した結果、センス鎖の両末端を 4 残基ずつの 8 残基、アンチセンス鎖の 3' 末端を 4 残基修飾した siRNA が修飾数が多くかつ高い RNAi 効果を示した。

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした実験結果から得られた修飾様式は他の遺伝子を標的とした場合も有効であった。すなわちウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を標的とした遺伝子発現抑制実験を行ったところ、天然型 siRNA の RNAi 効果はわずか 41.7% であったが、上述した修飾様式の siRNA は 91.0% と高い RNAi 効果を示した。以上の結果から著者は標的 mRNA の配列に依存せず、高い RNAi 効果を示す修飾 siRNA を見出した。

【結語】

- 1) 4'-thioRNA の合成と機能性核酸分子としての利用を志向した性質解析を行った。
- 2) NF- κ B に対する RNA アプタマーへの post-modification を行い、NF- κ B に対する親和性を損なうことなく、高い熱的安定性とヌクレアーゼ抵抗性をもつ修飾アプタマーを創製した。
- 3) siRNA への化学修飾と RNAi 効果の相関を詳細に検討し、標的 mRNA の配列に依存せず、高い RNAi 効果を示す修飾 siRNA を見出した。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 南 川 典 昭
副 査 教 授 松 田 彰
副 査 教 授 原 島 秀 吉
副 査 助 教 授 紙 谷 浩 之

学 位 論 文 題 名

4'-thioRNA の機能性核酸分子としての性質解析と RNA 干渉法への展開

オリゴヌクレオチドによる創薬は遺伝子の特定の配列を標的とし、その発現を抑制可能なため様々な疾病に対してデザインが容易であるという特徴があり、近年盛んに研究がなされている。しかしオリゴヌクレオチドは、1) 核酸分解酵素により容易に分解されること、2) 細胞膜透過性が低いこと、3) 生体内で標的分子と安定な複合体の形成を要求されることなど、医薬分子へと展開する上で克服すべき問題点がある。これらの問題点を解決するために様々な化学修飾オリゴヌクレオチドが合成され、アンチセンス法などへの応用研究がなされている。また近年、RNAi の発見や SELEX 法により様々な機能性 RNA 分子の獲得が可能となったため化学修飾 RNA アナログの創製研究が特に活発に行われ始めている。

このような研究背景のもと、星加周一は 4'-チオリボヌクレオシドからなる RNA、すなわち 4'-thioRNA を医薬核酸分子として応用することを視野に入れ、その性質をより詳細に解析した。さらに遺伝子発現制御法への応用研究として 4'-チオリボヌクレオシドを用いた化学修飾 siRNA 分子の創製研究を行った。

1. 4'-thioRNA の合成と機能性核酸分子としての性質解析

まず 15mer の 4'-thioRNA (5'-AGUCCGAAUUCACGU-3' とその相補鎖、3'-UCAGGCUUAAGUGCA-5') を合成し、これらを含む二本鎖の熱的および熱力学的安定性を示差走査型カロリメーターを用いて解析した。その結果、各二本鎖の熱的安定性の序列は 4'-thioRNA:4'-thioRNA >> 4'-thioRNA:RNA > RNA:RNA となり、4'-thioRNA:4'-thioRNA 二本鎖が熱的に非常に安定であることが明らかにした。さらに CD スペクトルを用いた構造解析から、4'-thioRNA を含む二本鎖核酸は天然型 RNA 二本鎖と類似していることを明らかにした。

修飾核酸を機能性分子として利用するためには、そのものがヌクレアーゼ

抵抗性を有することが要求される。そこで 50%ヒト血清中での天然型 RNA および 4'-thioRNA 一本鎖の安定性を比較した。その結果、天然型 RNA は 10 秒でそのほとんどが分解されたのに対して 4'-thioRNA の半減期は 107 分となり、ヒト血清中 4'-thioRNA が天然型 RNA よりも 600 倍以上も安定であることを明らかにした。

2. NF- κ B に対する RNA アプタマーの 4'-チオリボヌクレオシドによる post-modification

4'-thioRNA を機能性核酸分子として応用する研究の一環として、SELEX 法によって獲得された 31mer の NF- κ B に対する RNA アプタマーの様々な部位へ 4'-チオリボヌクレオシドで post-modification を行った。その結果、NF- κ B との結合部位への修飾は親和性を消失させたが、結合部位以外への修飾では天然型アプタマーと同等の親和性を示した。さらにその修飾アプタマーは熱的に安定化され、ヌクレアーゼに対しても抵抗性を示し、4'-チオリボヌクレオシドによる post-modification が有用であることを明らかにした。

3. 4'-thioRNA を用いた RNA 干渉による遺伝子発現抑制

RNA 干渉は二本鎖 RNA を細胞内へと導入することで相同な配列をもつ遺伝子発現を抑制する現象である。この現象は遺伝子発現抑制の新技术となり得ることから 21 残基の短鎖二本鎖 RNA、すなわち siRNA を用いた核酸医薬分子の開発研究が活発に行われている。その中で化学修飾によって siRNA の安定化を図る試みが精力的に行われている。星加周一は上述した 4'-thioRNA の性質を利用すれば細胞内で安定な二本鎖構造を保持し、かつ高いヌクレアーゼ耐性を有した siRNA を創製可能であると考え、4'-thioRNA を新規な化学修飾 siRNA として利用することを計画した。

まず、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした種々の修飾 siRNA を用い、修飾数および修飾部位が RNAi 効果に及ぼす影響を検討した。修飾体の導入位置は siRNA 分子中（センス鎖およびアンチセンス鎖）の、1) ウリジン残基、シチジン残基および全残基の修飾、2) 5'-末端および 3'-末端 6 残基、中央部 7 残基の修飾、3) 5'-末端および 3'-末端の修飾数を 6 から 4、2 残基と減少、の 3 通りの様式で行った。その結果、修飾 siRNA では修飾数および修飾位置に応じて RNAi 効果に大きな違いが観察された。センス鎖の修飾ではほとんどの配列が高い RNAi 効果を示したが、アンチセンス鎖の修飾ではその導入位置が大きく RNAi 効果に影響を及ぼした。特にアンチセンス鎖の中央部への修飾は RNAi 効果を大きく低下させた。また末端部の修飾はアンチセンス鎖の 5' 側の方がより RNAi 効果に影響することも明らかにした。修飾様式を種々検討した結果、センス鎖の両末端を 4 残基ずつの 8 残基、アンチセンス鎖の 3' 末端を 4 残基修飾した siRNA が修飾数が多くかつ高い RNAi 効果を示した。

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした実験結果から得られた修飾様式は他の遺伝子を標的とした場合も有効であった。すなわちウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を標的とした遺伝子発現抑制実験を行ったところ、天然型 siRNA の RNAi 効果はわずか 41.7%であったが、上述した修飾様式の siRNA は 91.0%と高い RNAi 効果を示した。

以上の研究成果は、機能性 RNA 分子の諸性質の詳細な解析と遺伝子発現抑制法の有効な手法を明らかにしたものであり、核酸医薬品の創製研究に大いに寄与するものである。特に、詳細な化学修飾と RNAi 効果の相関研究から標的 mRNA の配列に依存せず、高い RNAi 効果を示す修飾 siRNA を見出したことは大いに評価できる。従って薬学博士の学位を授与するに十分値するものと判断した。