

遺伝子変異性疾患の新規治療法開発への挑戦

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部
生物有機化学研究室
南川 典昭

1. 序論

通常、DNA から転写された mRNA 前駆体は、U1snRNA をはじめとする核内低分子 RNA (snRNA) との相互作用によって正確にスプライシングを受け、成熟 mRNA へと変換される。しかし、mRNA 前駆体上の 5' スプライス部位に変異が存在する場合 (Figure 1 では CAGGUA から CAGGCA への一塩基変異)、異常 mRNA 前駆体と U1snRNA が相互作用できず、その結果エクソンスキッピングなどのスプライシング異常が引き起こされる。これらが原因で発病する代表的な疾患として筋ジストロフィーをはじめとする遺伝子変異性の疾患が挙げられる。これらの治療法としてこれまでに、siRNA によって異常 mRNA を分解する方法や、正常に機能するたんぱく質を補充する方法などが提案されているが、いずれも決定的な治療法とはなっていない。

ところで最近、Gunderson らは、mRNA 前駆体の 5' スプライス部位を認識する U1 snRNA を、LNA 修飾型アダプター核酸を用いて mRNA の poly(A) signal 付近の配列に会合させることで、遺伝子のサイレンシングが起こることを報告した¹。この実験から、適切なアダプター分子を用いることで、U1snRNA を mRNA 前駆体の任意の部位へリクルート出来ることが示唆された。

そこで我々は、mRNA 前駆体と U1snRNA とを会合させる為のアダプター分子を設計し、スプライシング異常のエディット能を持った核酸分子として機能させることを考えた。このアダプター分子は一塩基多型による異常 mRNA 前駆体上に U1snRNA をリクルートすることで、スプライシングを正常化する (Figure 1)。

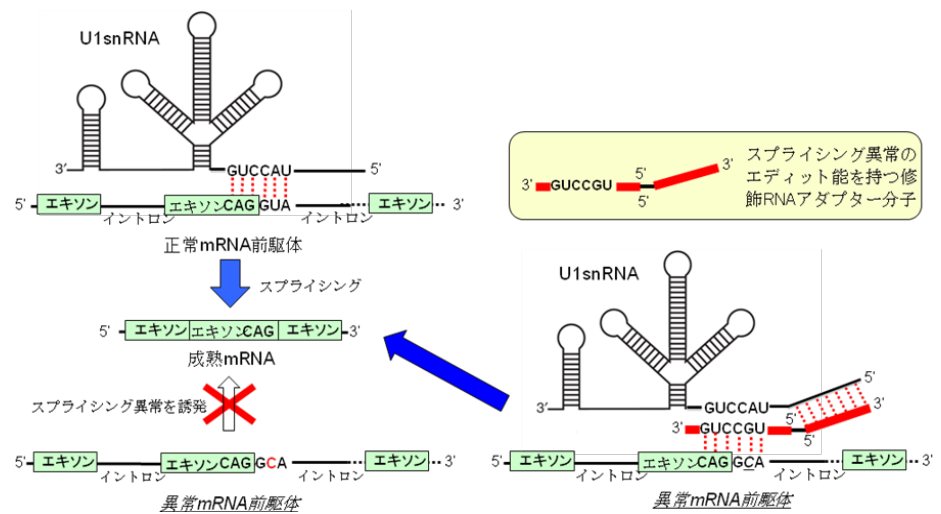


Figure 1. 本研究の概念図

2. 方法

我々はこれまでに、生体内でも使用可能な安定性とハイブリダイゼーション能を持つ化学修飾核酸の創製研究を行ってきた。既に4'-チオ核酸と第二世代型化学修飾核酸である2'-OMeRNAや2'-FRNAとのハイブリッド型修飾核酸 (2'-OMe-4'-チオRNA, 2'-F-4'-チオRNA) の創製に成功している²。本研究では、より強いハイブリダイゼーション能を発揮させるために新たに2'-OMOE-4'-チオRNAを合成した。また、これら修飾核酸を用い合成した核酸分子のU1snRNAリクルート能の有無をU1i活性により評価するために、評価用ベクターを調整し、ルシフェラーゼの発光測定により評価することにした。

この核酸分子を望みとするアダプター分子として機能させるためには、核酸分子の5'末端同士が結合したhead-to-head型構造とする必要がある。本アダプター分子は、逆アミダイト試薬を用いることによって合成可能と考えられるが、より汎用性のある方法としてHuisgen反応(クリックケミストリー)を用いる手法を開発した。また、スプライシング異常の校正能の評価に用いる、評価用ベクターを調整しルシフェラーゼの発光測定による評価系の確立を行った。

3. 結果

まず最初に、アダプター分子の構成単位であるヌクレオシドユニットの合成を行った。L-arabinoseより合成した4-チオ糖に対し、Pummerer反応により核酸塩基との縮合を行うことで4'-チオヌクレオシドを得た。続いて、これらの2'位へと置換基を導入することで目的とするハイブリッド型修飾核酸を合成するためのアミダイトユニットを得た (Figure 2)。

また、ハイブリッド型修飾核酸のU1snRNAリクルート能をU1i活性により評価する為に、ルシフェラーゼ発現ベクターの3' UTR部位にアダプター分子結合配列を挿入したU1i活性評価用ベクターを調整した。このベクターでは、アダプター分子が挿入配列に結合してU1snRNAをリクルートすることで遺伝子発現抑制を引き起こすことが期待される。そこで、この評価系を用い、ハイブリッド型修飾核酸のU1i活性を評価した結果、Figure 3に示した2'-F-4'-チオRNAを含むアダプター分子において濃度依存的な遺伝子発現抑制効果が確認された。

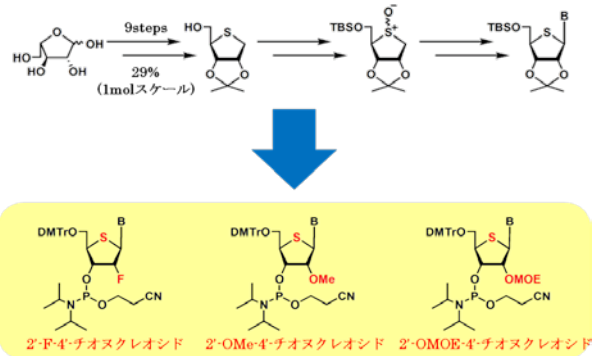


Figure 2. アミダイトユニットの合成

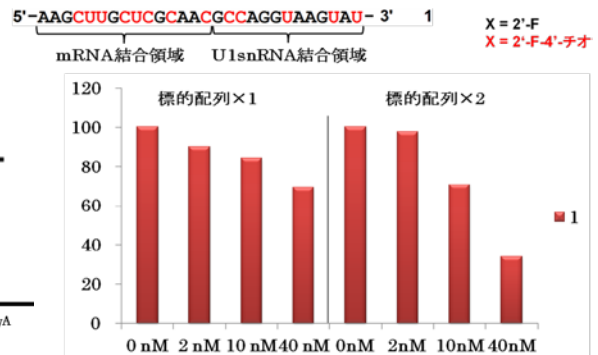
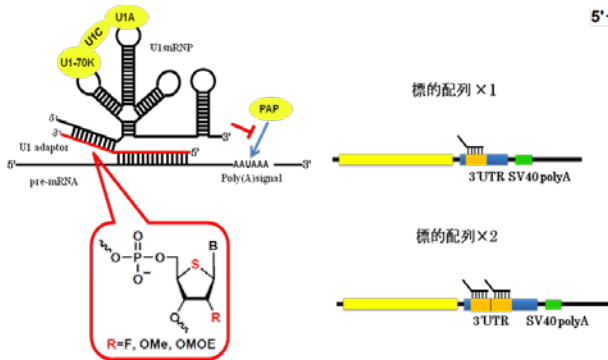


Figure 3. ハイブリッド型修飾核酸のU1i活性

上述した遺伝子発現抑制効果がアンチセンス効果ではなく、U1i機構によるものであることを証明する為に、U1snRNA結合部位のみからなる配列 **4** と mRNA結合部位のみからなる配列 **5** を別途合成し、それぞれ活性を評価した。その結果、遺伝子発現抑制は全く確認されなかった。この結果より、今回合成したアダプター分子はU1i活性により遺伝子発現抑制を引き起こしており、U1snRNAリクルート能を有する分子であるということが明らかとなった。

続いて、スプライシング異常の校正能を評価する評価系を構築するために、pRL-TK intronの5' スプライス部位に5残基の変異を導入した配列をpGL3-CのORFに挿入した。実際に、このプラスミドベクターを細胞内へトランスフェクションしたところ、スプライシングが阻害されルシフェラーゼの発光が抑制された。このことから、ルシフェラーゼの発光測定によるスプライシング異常校正能の評価系が確立できた。この系に対し、エディット能を有するアダプター分子を機能させることで、スプライシングが正常化され、ルシフェラーゼ活性が回復することが予想される。

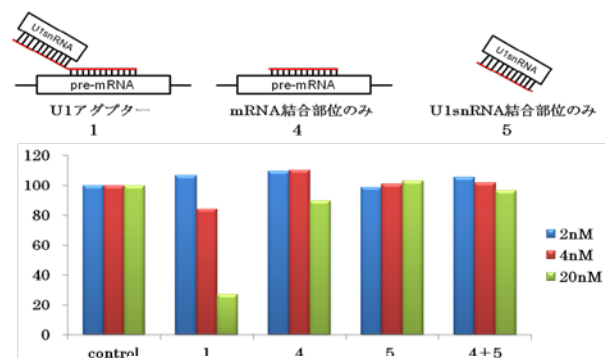


Figure 4. U1i活性の検証

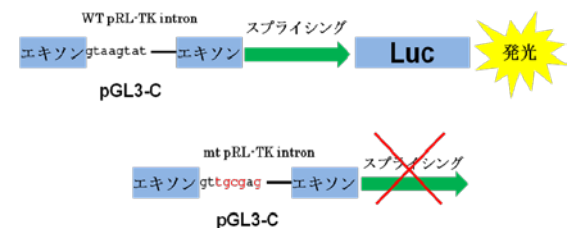


Figure 5. 評価用プラスミドベクターの調製

また合わせて、U1i実験に用いた今回のアダプター分子を実際にスプライシング異常のエディット能を有する核酸分子として機能させるために、head-to-head型オリゴマーの合成を検討した。その結果、末端にアジドとアセチレンを有する2本のoligoをHuisgen反応条件下で反応させた結果、HPLC上で新たなピークが観測された。

今後は、目的とする2'-F-4'-チオRNAを含むアダプター分子の合成へ向け検討を行っていく予定である。

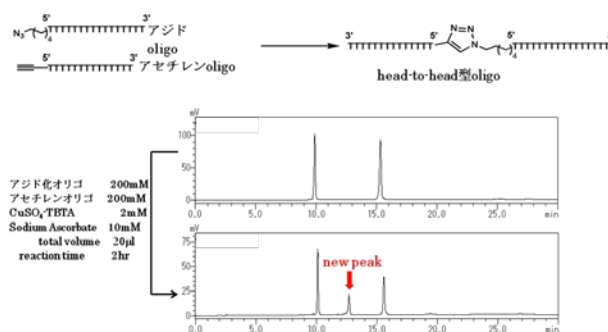


Figure 6. head-to-head型 oligo の合成

4. まとめ

今回我々は、難治性の遺伝子変異疾患治療の新たな方法論確立へ向け、スプライシング異常の校正能を有するアダプター分子の創製を行った。その結果、2'-F-4'-チオRNAを含むアダプター分子がU1snRNAのリクルート能を有すること確認出来た。今後は、head-to-head型アダプター分子を合成し、評価用ベクターを用いたアッセイによりこれら分子のスプライシング異常の校正能を評価する予定である。

5. 参考文献

1. R. Goraczniak, M. A. Behlke, S. I. Gunderson, *Nat. Biotechnol.*, **2009**, *27*, 257-263.
2. (a) M. Takahashi, N. Minakawa, A. Matsuda, *Nucleic Acids Res.*, **2009**, *37*, 1353-1362.
 (b) M. Takahashi, S. Daidouji, M. Shiro, N. Minakawa, A. Matsuda, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 4313-4324