

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590102
 研究課題名（和文） 核酸医薬としての高活性 RNA 切断人工酵素の開発
 研究課題名（英文） Development of highly active artificial ribonucleases
 as nucleic acid drugs
 研究代表者
 井上 英夫 (INOUE HIDEO)
 大阪市立大学・大学院工学研究科・教授
 80088856

研究成果の概要：種々の型のターピリジン結合ヌクレオシド誘導体の合成を行ない、これらを用いてターピリジン・Cu(II)錯体残基を鎖中央に2個含む2'-O-メチル RNA オリゴマーの基本形4種を構築した。これらの人工 RNase は相補的配列を含む短鎖 RNA や長鎖 RNA を位置特異的に、また短鎖 RNA については高効率に切断することが分かった。また天然酵素のように触媒回転能を有していた。加えて、ほとんどの酵素の活性は、以前に筆者が開発した同型の酵素よりも高いものであった。一方、RNA 変異体基質を用いた切断反応の解析により、人工酵素の構造・活性相関について重要な知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	450,000	3,850,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：人工 RNA 分解酵素、アンチセンス核酸医薬、塩基配列特異的切断、オリゴヌクレオチド誘導体、金属錯体触媒、分子設計

1. 研究開始当初の背景

核酸である DNA は遺伝情報の保持、複製に関わっており、RNA はその遺伝情報の伝達・発現に関与している。核酸を分解する化合物は病因遺伝子の発現やウイルス遺伝子の発現を抑制することが可能であり、たとえばブレオマイシン・Fe(II)錯体は制がん剤として

用いられている。また、特定の mRNA を分解（切断）する方法としては、mRNA の標的塩基配列に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を用いるアンチセンス法およびアンチセンス鎖を含む二本鎖 RNA オリゴマー類を用いる RNAi 法が開発されている。前者の方法では形成するアンチセンス鎖-mRNA

ハイブリッドに対して細胞内 RNase H が働き、RNA が部位特異的に切断される。後者では、細胞内 Argonaute タンパク質によってハイブリッドが形成され、Slicer によって mRNA が切断される。このようにこれらの方法は、細胞内の酵素活性を利用するものである。

一方、RNA を塩基配列特異的に認識してリン酸ジエステル結合を切断する機能をもつオリゴヌクレオチド誘導体の研究も盛んである。しかし、現在までに実用化に適した活性を示すものは見つかっていない。天然酵素に匹敵するような活性を有し、かつ配列特異性をもつ人工 RNA 分解酵素が開発されれば、医薬への応用や RNA の構造と機能の研究に役立つものと期待される。なお、タンパク質酵素では配列特異的 RNase は発見されていない。

筆者はこれまでに上記の人工酵素の開発研究を進め、2'-O-メチルオリゴヌクレオチドの鎖中央に RNA 切断に関与する二つのターピリジン・Cu(II) 錯体を結合させると、錯体が協同的に働き、この活性部位に相対する RNA 部位が高効率かつ位置特異的に切断すること、またこの人工酵素は過剰の RNA 基質を切断する触媒回転能を有することを明らかにしている。これらの活性や位置特異性は既知の切断剤と比べて最も高かった。

2. 研究の目的

筆者が以前に開発した RNA 切断人工酵素は 2'-O-メチルオリゴヌクレオチドの鎖中央にある二つのヌクレオシド残基の糖部にターピリジン基が結合したものである。本研究ではこの型の人工酵素を核酸医薬として発展させるために、実用化に適する活性を有するオリゴヌクレオチド系 RNA 切断酵素の開発を目的としている。活性の向上には酵素・基質複合体において、活性部位の構造、すなわちターピリジン基の空間配置および塩基対の有無などの検討が必要である。そのために最初に種々の型の新規ターピリジン結合ヌクレオシドユニット類の合成を行ない、次にこれらを組み込んだオリゴヌクレオチド誘導体を構築して RNA の切断反応を行ない、活性を評価することを計画した。

3. 研究の方法

本研究で用いる RNA 切断人工酵素の構造の模式図と頻用する RNA 24 mer 基質の代表的配列を図 1 に示す。

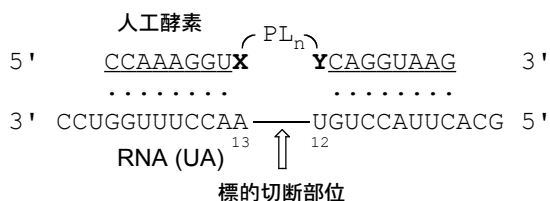


図 1

X と Y はターピリジン結合ヌクレオシド残基であり、N は 2'-O-メチルヌクレオシド残基である。PL はリンカーを示す。

人工酵素に組み込んだヌクレオシド誘導体(X, Y)は新規に合成した Uat、It、T^t、B^t である (図 2)。人工酵素の構築は、これら 4 種の化合物から導いたオリゴヌクレオチド合成用ユニットおよび市販の 2'-O-メチルヌクレオシドユニットと PL リンカーユニットを用いて核酸自動合成機を使用して行なった。なお、Ut-tU^t 型 RNA 切断酵素 (X=Ut, Y=tU^t, PL=1 unit) は以前に合成したものをを用いた [S. Sakamoto et al., *Nucleic Acids Res.* **31**, 1416-1425 (2003)]。

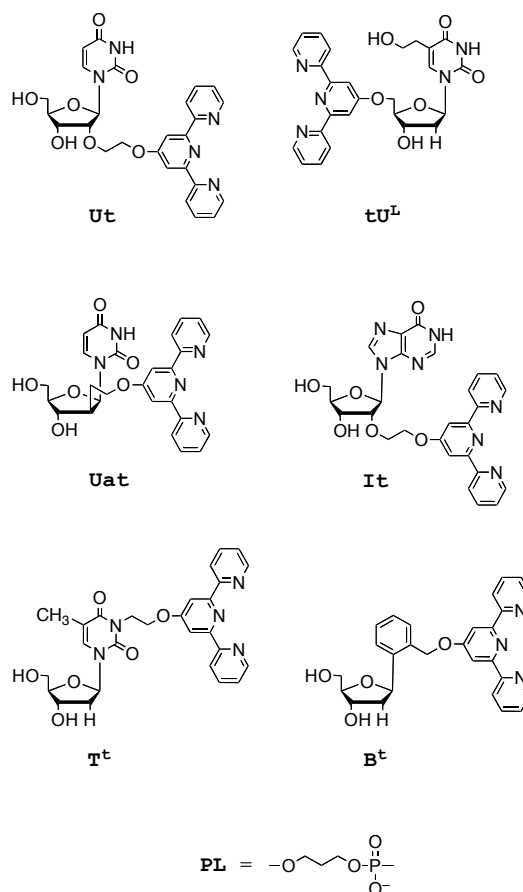


図 2

RNA 切断反応は、基質に 5'-末端 ³²P 標識 RNA 24 mer を主として用い、酵素過剰条件下あるいは基質過剰条件下で、pH 7.5 の緩衝液中、37° C に保温することにより行なった Cu(II) イオンは酵素に対して 2 等量を使用した。切断生成物の解析はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって行なった。

4. 研究成果

(1) Uat-tU^L型 RNA 切断酵素(I)

以前の Ut-tU^L型 RNA 切断酵素の活性向上を目的として、Ut 残基のターピリジン基の空間配置を検討するために Ut 残基を Uat 残基に置き換えた酵素 I を構築した。

酵素 I と RNA (UA) の反応は酵素過剰条件および基質過剰条件下で行ない、5 時間後の切断率を Ut-tU^L型酵素と比較した (図 3)。酵素 10 倍量の過剰条件下での擬一次反応速度定数 (k_{obs}) は、酵素 I では 2.80 h^{-1} 、以前の酵素では 0.83 h^{-1} であり、酵素 I の活性は 3.4 倍高いことを示した。また酵素 I は RNA 基質 10 倍量の条件でも以前の酵素と比べて高い活性を示すことが明らかとなった。一方、切断の位置特異性については変化がなく、切断箇所は U-A 間の一カ所のみであった。なお、酵素と RNA の複合体 (ハイブリッド) において、tU^L 残基に相対する RNA 塩基には塩基対を形成しない塩基 (U) を選んでいる。この理由は塩基対形成が可能な A 塩基置換 RNA の場合では酵素活性が低下するためである。塩基対の有無に関しては次の (2) 項も参照されたい。

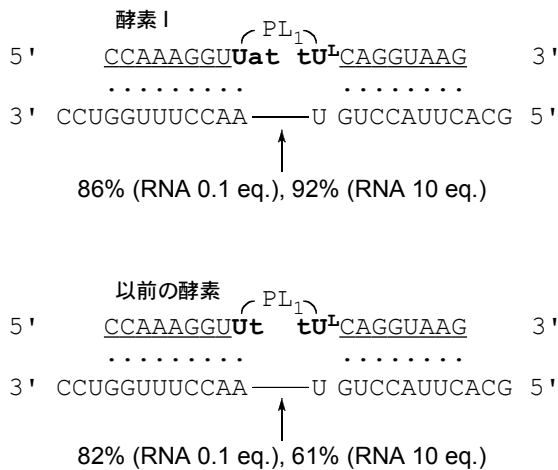


図 3

RNA 切断人工酵素の応用を目的とした場合には、この酵素が高次構造をもつ長鎖 RNA 基質にも適用できるかが問題となる。そこで長鎖 RNA として緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の転写産物 RNA (783 mer) を調製した。標的部位は RNA の二次構造予測プログラムから導出したループ 1 (598-617) およびループ 2 (274-293) とした。これらのループ部位を切断するために酵素 I の鎖長を 20 mer に変え、各ループに相補的な塩基配列に変えた酵素 G1 および酵素 G2 を合成した。

酵素 G1 (予想切断位置: U607-A608) あるいは酵素 G2 (予想切断位置: U283-A284) と長鎖 RNA との反応は各々を等量使い、pH 7.5、37° C の条件下で行なった。反応 10 時間後

のゲル電気泳動では、未反応基質の他、それぞれ二つの RNA 切断断片の生成が認められた。なお、RNA 断片マーカーとの比較により、G1 反応では期待する 607 base と 176 base の断片、G2 反応では 500 base と 283 base の断片が生じていることが強く示唆された。切断部位の同定には至っていないが、酵素による長鎖 RNA の部位特異的切断が起こっていることが明らかとなった。長鎖 RNA に対する酵素の反応性は低く、今後は酵素のデザイン、反応条件の検討などが必要であろう。

(2) It-tU^L型 RNA 切断酵素(II)

この研究では上記の X-Y 型 RNA 切断酵素の構造活性相関、すなわち酵素-RNA 複合体における活性部位での塩基対の有無や塩基対の構造が酵素活性に及ぼす影響を調べることを目的とした。研究に用いた酵素は、Ut-tU^L型酵素と新たに構築したターピリジン結合イノシン誘導体を含む It-tU^L型酵素である。イノシン残基は C 塩基と塩基対を形成できるほか、U 塩基や A 塩基と wobble 塩基対を形成することが分かっており、活性に関する塩基対の構造について検討することができる。

13 番目の塩基 (X) が異なる RNA 基質と 10 倍量の酵素を用いて 5 時間反応を行なった結果を図 4 に示す。以前の酵素および酵素 II は酵素の 5' 側触媒基 (Ut、It) が基質と通常の塩基対を形成する場合に活性が最も高いことが明らかとなった。また酵素 II では It:A および It:U の wobble 塩基対が形成されるが、このような塩基対構造は酵素活性を低下させることが示された。これらの結果は、It 残基が任意の標的配列を切断するユニバーサル触媒基としては期待できないことを示している。

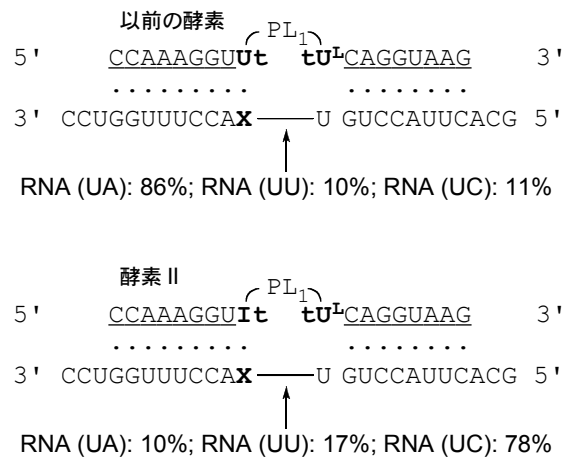


図 4

(3) T^t-T^t型 RNA 切断酵素 (III)

前述したターピリジン結合ヌクレオシド類 (Ut, tU^t, Uat, It) は合成に多くの行程を要し、酵素の構築においても2種類のターピリジン結合ユニットを必要とする。ここでは容易に合成できるT^tを2残基含む酵素IIIの構築を行ない、その活性を評価した。前述の酵素類では酵素-RNA複合体において活性部位での酵素5'側の通常型塩基対の形成が高い活性の発現に必要であった。この場合、5'側のリンカー結合ターピリジン錯体基の運動の自由度が制限され、活性発現にとって好ましい空間配置をとっている推測される。一方、T^t残基は塩基対形成能を有しないが、アンチ型のチミジンに結合したターピリジン錯体基はRNA鎖に近接するものと予想された。またT^t-T^t配列において、T塩基間およびターピリジン基間でスタッキング相互作用(さらにはターピリジン基とRNA塩基間でのスタッキング相互作用)が存在した場合、両錯体基の運動の自由度も制限されると考えられた。

酵素IIIとRNA(UA)の5時間の反応の結果を図5に示す。この酵素はPL非導入酵素であり、PL₁導入Tt-Tt型酵素よりも活性が高かった。

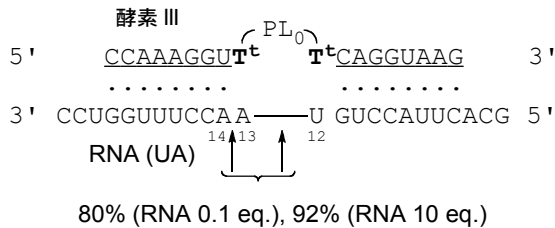


図 5

図中の切断率は二カ所 (U12-A13, A13-A14) の切断率の和である。酵素過剰の条件では10時間後でほとんどの基質は切断された。経時的にはA13-A14切断生成物は徐々に減少し、それにともないU12-A13切断生成物が増加することが分かった。擬一次反応速度定数(k_{obs})は、0.47 h⁻¹を示した。また酵素IIIはRNA基質10倍量の条件でも以前の酵素と比べて高い活性を示すことが明らかとなった。なお、この条件ではA-A切断断片からU-A切断断片の生成は確認できなかった。

(4) B^t-B^t型 RNA 切断酵素 (IV)

B^t-B^t型酵素の形はT^t-T^t型酵素と似ている。そのデザイン上の優位点としては、塩基部にベンゼン環を用いており、T^t塩基部と比べてB^t擬似塩基部はより強いスタッキング作用が期待できる。またTt残基と異なり、ターピリジン基の結合位置がグリコシド結合に対して隣(ベンゼン環オルト位)にあり、切断

触媒基がRNA鎖に対してより好ましい空間配置をとることが期待できる。

酵素IVとRNA(UA)の5時間の反応の結果を図6に示す。この酵素はTt-Tt型酵素の場合と同様にPL非導入酵素の方が高活性であった。

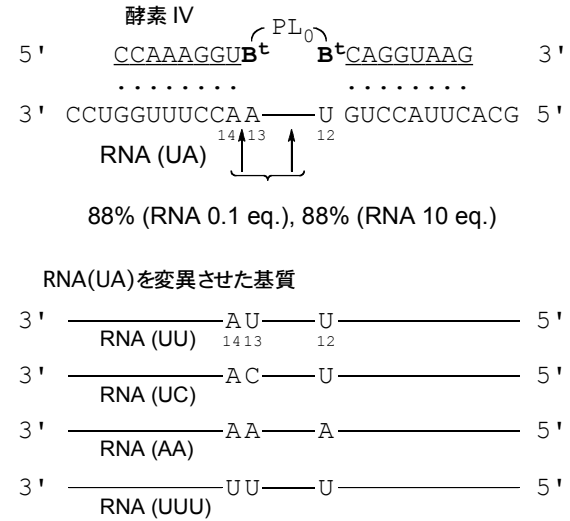


図 6

酵素過剰および基質過剰の条件での切断率は図のようにともに高いものであった。前者の条件では切断点は二カ所であり、Tt-Tt型酵素の場合と同様であった。また後者の条件ではU-A切断断片の生成はほとんど認められなかった。酵素過剰の条件下での擬一次反応速度定数は、酵素Iの約4倍の値を示した。

酵素IVはTt-Tt型酵素と同様に活性部位(B^t-B^t)に相対するRNA塩基と塩基対を形成しない。したがって、この型の酵素では任意の標的配列を切断することが可能と考えられた。これを検討するためにRNA(UA)を変異させた4種の基質(図6)を用いて切断反応を行なった。標準基質RNA(UA)は5'-ピリミジン・プリン-3'の組み合わせであるが、RNA(UU)とRNA(UC)はピリミジン・ピリミジン配列、RNA(AA)はプリン・プリン配列を有する。またこれらの配列はA14を含むが、RNA(UUU)では塩基対を形成できないU14に置換している。

これらのRNA変異体基質に過剰量の酵素IVを作用させると、5時間の反応の切断率は90%以上であり、酵素IVは標的配列にほとんど依存することなく効率よくRNA基質を切断することが分かった。

本研究で従来のものよりも高活性なRNA切断人工酵素を構築することができた。今後はさらに活性の高い、実用化に適した酵素の創製を行なう予定である。また、前述したように高次構造をもつ長鎖RNAの効率的な切断について詳細な検討を行ないたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Daiki Mukoguchi, Satoshi Sakamoto, Hiroshi Takayama, Masaya Kitamura and Hideo Inoue, Structure-activity relationship of an antisense oligonucleotide-two Cu(II) complex conjugate as an artificial ribonuclease, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, No. 52, 377-378 (2008) 査読無し
- ② Hiroshi Takayama, Satoshi Sakamoto, Masaya Kitamura and Hideo Inoue, Development of Site-specific Artificial Ribonucleases, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, No. 51, 203-204 (2007) 査読無し
- ③ Kazuhiro Hara, Masaya Kitamura and Hideo Inoue, Synthesis and ribonuclease activity of oligonucleotides with N^3 -terpyridine•Cu(II)-linked thymine residues, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, No. 50, 71-72 (2006) 査読無し

[学会発表] (計4件)

- ① 向口大喜、阪本聡、高山弘、北村昌也、井上英夫 (発表者)、人工リボヌクレアーゼとしてのアンチセンスオリゴヌクレオチド—二つのCu(II)錯体コンジュゲートの構造-活性相関、第18回 International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids、第35回 International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 合同シンポジウム、平成20年9月11日、京都大学
- ② 高山弘 (発表者)、阪本聡、北村昌也、井上英夫、位置特異的人工リボヌクレアーゼの開発、第5回 International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、平成19年11月21日、東京大学
- ③ 高山弘 (発表者)、阪本聡、北村昌也、井上英夫、アンチセンス化合物としての人工リボヌクレアーゼの開発、第16回アンチセンスシンポジウム、平成18年11月27日、京都国際会議場
- ④ 原和宏、北村昌也、井上英夫 (発表者)、 N^3 位ターピリジン・Cu(II)錯体結合チミジンを含むオリゴヌクレオチドの合成とリボヌクレアーゼ活性、第33回 Symposium on Nucleic Acids Chemistry、平成18年11月21日、大阪大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 英夫 (INOUE HIDEO)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80088856

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし