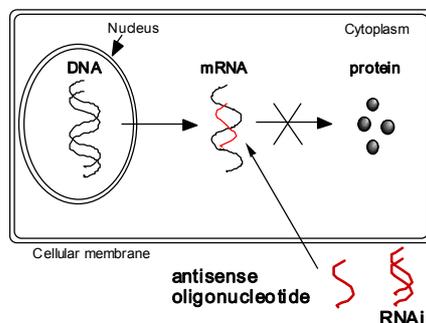


フラーノース環構造を固定化したアミド結句型 RNA の固相合成と遺伝子制御法への展開 (人工 RNA の開発と遺伝子発現制御)

講師 岩瀬 礼子

細胞内の mRNA の機能の特異的に阻害するオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の機能解析研究に有用であり、遺伝子関連疾患の治療や診断への応用も期待される (Scheme 1)。RNA は、生体内に存在する核酸分解酵素で容易に分解される性質を持つ。このため、人工 RNA を遺伝子の機能調節物質や構造探索プローブとして用いようとする場合、RNA を化学修飾して分解耐性を持たせることが必要となる。本研究では、RNA のリン酸ジエステル結合をアミド結合に変換して分解耐性型とし、アンチセンス核酸、RNAi や RNA 構造探索プローブとして応用可能な新規な機能性人工 RNA の創出を行うことを目的とした。アミド結句型 RNA (Figure 1, 1) は、2'-水酸基の存在と 3'-水酸基のメチレン基への置換により、糖骨格が C3'-endo 型に固定されることから、RNA 相補鎖と安定な A 型二重鎖構造を形成するものと予想される。また、バックボーン構造に電荷を持たないため、細胞膜の負電荷との電氣的斥力がなく、細胞膜透過性を示すことが期待される。さらに、アミド結句型 RNA 上の 2'-水酸基に蛍光剤ピレンが導入されれば、RNA 相補鎖と結合して A 型様の二重鎖構造をとることにより、ピレンに由来する蛍光強度の増加が生じると期待され、RNA の 1 本鎖部位の検索や遺伝子の塩基配列の変異を検出する新規ピレン修飾蛍光核酸プローブとしての可能性が考えられる。アミド結句型 RNA は、高い化学的安定性が見込まれるため、配列依存的な遺伝子発現制御物質を目指して、その合成法の開発が複数の研究グループにより行われている。しかし、これまでに報告されている鎖長伸長反応は、活性エステル法で数日間の反応時間を必要としており、この方法をオリゴヌクレオチド合成として有用な固相合成法へ適用するのは困難である。本研究は、固相法で迅速かつ簡便にアミド結句型 RNA、天然型 RNA とアミド結句型 RNA とのキメラオリゴヌクレオチド、そして蛍光修飾アミド結句型 RNA など合成する方法を開発し、mRNA の機能制御が可能な機能性人工 RNA としてのアミド結句型 RNA の性質を分光学的手法並びに細胞生物学的手法により検討した。

Scheme 1



1. アミド結句型 RNA 誘導体の固相合成とその二重鎖形成能の検討

アミド結句型 RNA の固相合成に用いる単量体のビルディングブロック (2a, 2b) をウリジンから合成した。次に、ホスホニウム系脱水縮合剤 (PyBOP (3), PyAOP (4)) を用い、アミド結句型 RNA (3-6 量体) の固相合成を検討した (Scheme 2)。1M の PyAOP と 1.5M の N-メチルモルホリンを用いて縮合反応を行うと、縮合収率は 74-92% となり、PyBOP を用いた場合よりも平均で約 5% 程度

収率が向上した。次に各アミド結合型 RNA の末端に天然型 RNA を延長して、10 量体のキメラオリゴヌクレオチドを合成した。これら修飾 RNA と RNA 相補鎖の二重鎖構造を CD スペクトルで検討した結果、A 型二重鎖構造をとることが示唆された。また、UV 融解温度測定から、3-4 量体のアミド結合型 RNA を含む修飾 RNA は天然型 RNA と同等の二重鎖形成能をもつことが分かった。そして、二重鎖形成能が顕著に低下した **amide-6** について、CD スペクトルを詳細に検討した結果、アミド結合型 RNA は、C3'-endo 型に固定化された糖環構造と、バックボーン構造の剛直性の 2 つの立体的な束縛があることが示唆された。以上の結果より、3 量体及び 4 量体のアミド結合型 RNA を用いて、核酸分解酵素耐性と RNA 結合親和性を持つ機能性修飾 RNA フラグメントとしてキメラ型アンチセンス核酸などへの応用を検討する予定である。

2. アミド結合型 RNA 誘導体の細胞膜透過性に関する検討

フルオレセインで標識したアミド結合型ウリジン 6 量体を HeLa 細胞培養系に 2 μ M 添加して 6 時間培養後、蛍光顕微鏡観察を行った結果、主に細胞質に蛍光発光が観察された。これより、アミド結合型 RNA は、細胞膜を透過して細胞質内に分布する性質を持つことが示唆された。今後、アミド結合型 RNA の細胞内分布の詳細やバックボーン構造が無電荷であることの細胞内取り込みに及ぼす影響について検討していく予定である。

3. 糖部を C3'-endo 型に固定化した 2'-O-ピレン修飾アミド結合型 RNA の合成とその性質

2'-ピレン修飾ウリジン (Upy) を含むオリゴヌクレオチドは RNA と結合して蛍光増感するため、RNA 検出プローブとなる。しかし、その蛍光増感の程度は Upy 近傍の塩基配列により大きく影響される。そこで、Upy の糖骨格を C3'-endo 型固定化してピレンの立体配座を規制することにより、蛍光増感の塩基配列依存性を解消する方法について検討することにした。3'-水酸基をカルボキシメチル基に変換した Upy 誘導体をウリジンから 10 工程で合成した結果、その糖骨格は、C3'-endo 型に固定化されていることを NMR 分析により確認した。これを用いて、アミド結合型ピレン修飾ジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを合成した。今後、その蛍光プローブとしての性質について検討していく予定である。

