



Title	創薬応用を志向した8-17 DNAzymeの触媒コアの化学修飾と切断するRNAの配列選択性に関する研究
Author(s)	中嶋, 覚子
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105567
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (中 嶋 覚 子)

論文題名 創薬応用を志向した8-17 DNAzymeの触媒コアの化学修飾と切断するRNAの配列選択性に関する研究

論文内容の要旨

アンチセンス核酸 (antisense oligonucleotide, ASO) やsiRNA (small interfering RNA) に代表される核酸医薬は、化学合成されたオリゴヌクレオチドから成る医薬品である。mRNAの切断やスプライシング制御など遺伝子レベルで生体を制御できる特性を有することから、難治性疾患に対する革新的なモダリティとして急速に実用化が進んでいる。同様にヌクレオチドから成る機能性分子として“DNAzyme”が知られている。DNAzymeは約30塩基の一本鎖DNAであり、中央部の触媒コアとその両側に位置する結合アームという2種類のドメインで構成される。結合アームが標的RNAと相補的に二重鎖を形成し、触媒コア内に Mg^{2+} などの金属イオンが配位することでRNAを切断する。この核酸でありながら自ら化学反応を触媒するという性質は、ASOやsiRNAによる生体内酵素を介したRNA切断機構とは大きく異なり、標的遺伝子の発現を直接的に制御するツールとしての応用が期待されている。しかしながらDNAzymeは複雑な高次構造を有するため、活性を損なわずにヌクレアーゼ耐性を高める化学修飾を導入することが困難であるといった課題があり、依然として実用化には至っていない。このような背景から本研究では、高活性なDNAzymeを創出する合理的な配列設計を提案することを目的として、代表的なDNAzymeである8-17 DNAzymeの活性を向上させる方策を2つのアプローチで検討した。

1つ目のアプローチは、DNAzymeの触媒コアにおける化学修飾の導入である。近年、化学修飾の導入による細胞内でのRNA切断活性が確認されており、当研究室では複数の化学修飾を組み合わせることで8-17 DNAzymeがRNAノックダウンを誘導することを報告している。しかし、この時の修飾パターンでは、結合アームには複数の修飾が導入されている一方で、触媒コアへの導入は1箇所のみに留まっている。そこで、ヌクレアーゼ耐性能または触媒性能の向上を期待して、触媒コアにおけるさらなる化学修飾の導入を試みた。まず、ヌクレアーゼ耐性能の向上にはASOやsiRNAで一般的に使用されるホスホロチオエート (phosphorothioate, PS) 結合が適切と考え、触媒コアの複数箇所にもPS結合を導入し切断活性を評価した。その結果、ほとんどの修飾パターンで活性が大幅に低下したが、PS結合を導入しながらも未修飾体の約60%の切断活性を維持したパターンで、血清中においてもより安定であり、ヌクレアーゼ耐性能の改善が確認された。続いて、触媒コアの高次構造の安定化が触媒性能の向上に寄与するとの考察が報告されていることを踏まえ、コア内のステムループ構造に着目した検討を行った。ステム部位は3箇所のG・C (グアニン・シトシン) 塩基対から成り、それぞれ3本の水素結合を形成している。このシトシン塩基を、4本の水素結合を形成してグアニン塩基と高い親和性を示すシトシン誘導体、G-clampに置換することで触媒コアの構造安定化を狙った。切断活性を評価したところ、3箇所のG・C塩基対のうち1箇所を置換した修飾パターンで活性が同程度わずかに上昇したが、他の2箇所では大幅に低下し、さらに複数箇所の置換では活性が完全に消失した。これはステム部位における塩基間の相互作用が強固になったことで触媒コアの立体配置にずれが生じ、活性に最適な高次構造を維持できなくなったことが原因であると推察された。触媒性能の大幅な向上は達成できなかったが、G-clampの導入はヌクレアーゼ耐性能を改善することも報告されており、他の修飾核酸との組み合わせを検討する余地がある修飾パターンであると考えた。

2つ目のアプローチでは、切断する基質RNAの性質に焦点を当てた。DNAzymeは、RNA切断部位の2塩基配列選択性が高いことが報告されており、8-17 DNAzymeは配列GG (5'→3') に対して最大活性を示す。一方、同様に広く研究されている10-23 DNAzymeに関する最近の報告では、2塩基の両側を挟む塩基を含む4塩基配列が切断効率に影響したことが示された。これに着想を得て、基質RNAに対する4塩基配列選択性を体系的に評価し、8-17 DNAzymeが優先的に切断する配列の同定を試みた。同定にあたっては、X線結晶構造が報告されている配列をモデルとして採用し切断部位の4塩基配列を網羅的に変化させた変異配列を設計し、切断活性を確認した。その結果、8-17 DNAzymeは4塩基レベルで明確な配列選択性を示すことが明らかになった。切断部位をGGとしたときの5'側隣接塩基がUである場合に高い切断活性を、また3'側隣接塩基がCである場合に低い切断活性を示し、全体としては4塩基配列UGGG、UGGUおよびUGGAが優先的に切断される配列として同定された。また、体系的な評価においてUGGGは最も効率的に切

断されたが、1塩基のみが異なるGGGGでは切断効率が大幅に低下しており、この顕著な差異が生じるメカニズムを理解するために分子動力学シミュレーションとフラグメント分子軌道法による計算解析を行った。その結果、DNAzymeと基質RNAの結合において形成される水素結合の構造的挙動が配列によって異なり、切断部位がUGGGである場合にDNAzymeが切断しやすい最適な立体配置を維持していることが示唆された。次に、この結果を考慮したDNAzymeの配列設計が内因性mRNAに対して応用可能か検証するため、マウス血液凝固XI因子 (*mFXI*) mRNAの切断部位の4塩基配列を網羅的に変化させ切断活性を確認したところ、配列選択性はモデル配列と同様の傾向を示した。さらに*mFXI* mRNAに対して、効率的に切断されるUGGGあるいは1塩基ずらしたGGGAをそれぞれ切断部位とした場合の活性を評価した結果、UGGGではGGGAの約1.5倍の切断活性を示し、4塩基配列選択性を考慮した切断部位の選定がDNAzymeの配列設計に有用であることを実証した。

以上のように本研究では、高活性なDNAzymeを創出する合理的な配列設計を提案することを目的として、酵素であるDNAzyme側の要因と基質であるRNA側の要因の双方に着目し、8-17 DNAzymeの触媒コアにおける化学修飾パターンと基質RNAの4塩基配列選択性に関する新たな知見を得た。今後、これらの知見がDNAzymeの合理的な設計戦略の確立に貢献し、創薬応用を前進させる一助となることを期待する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中 嶋 覚 子)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	小比賀 聡
	副 査	教授	荒井 雅吉
	副 査	准教授	辻野 博文

論文審査の結果の要旨

核酸医薬は、遺伝子レベルで生体を制御できる特性を有し、難治性疾患に対する革新的な創薬モダリティとして、近年急速に実用化が進んでいる。特に、mRNAを切断して分解誘導するアンチセンス核酸やsiRNAについては、すでに多くの承認薬が誕生している。同様に、mRNAを切断することのできる機能性核酸として、DNA酵素（DNAzyme）が近年注目を集めている。DNAzymeは、配列中央に位置する触媒コアと、その両端に配置された結合アームから構成される。結合アームは標的RNAと配列特異的に二重鎖形成する一方で、触媒コアはマグネシウムイオンなどの金属イオンを配位し、標的RNAのリン酸ジエステル結合を活性化することで、当該結合を加水分解し切断反応を進行させる。DNAzymeを医薬品へと展開するためには、体内での安定性、特にヌクレアーゼ耐性を付与する人工核酸の導入が不可欠である。しかしながら、DNAzymeの触媒コアは複雑な高次構造を形成するため、これまで人工核酸の導入が困難であった。さらに、DNAzymeが高効率に切断可能なRNA配列についても、これまで十分な体系的評価が行われていなかった。このような背景のもと、申請者は、有力なDNAzymeの一つである8-17 DNAzymeに着目し、触媒コアへの化学修飾の導入検討と、当該DNAzymeが切断しやすいRNA配列の同定に向けた評価を実施し、以下に示す成果を得た。

1) DNAzymeの触媒コアに対するホスホロチオアート（PS）修飾の導入を検討し、適切な位置でのPS修飾が活性を大幅に低下させることなく、ヌクレアーゼ耐性能を向上させることを見出した。さらに、ヌクレアーゼに対して高い安定性を示すG-clamp構造についても触媒コアへの導入を検討し、当該触媒コアのステム領域への導入が可能であることを明らかにした。

2) 切断部位に着目し、DNAzyme及び基質RNAの配列を網羅的に評価することで、切断反応が高効率に進行する基質RNA側のモチーフ配列（UGGG, UGGU, UGGA）を同定した。さらに、分子動力学計算及びフラグメント分子軌道計算を用いた計算化学的解析により、切断が進行しやすい配列と進行しにくい配列との間に存在する構造的特徴の違いを明らかにした。

以上の通り、申請者は8-17 DNAzymeの触媒コアに対する適切な化学修飾を見出すことに成功し、さらに、当該DNAzymeが効率的に切断できる基質RNA側のモチーフ配列を明らかにした。これらの成果は、今後の創薬応用に向けたDNAzyme研究の発展に大いに貢献するものであり、本論文は、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。