

Title	細胞レベルでRNA切断活性を示す化学修飾を施した8-17 DNAzymeの開発研究
Author(s)	千葉, 幸介
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/96134">https://doi.org/10.18910/96134</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 千葉 幸介 )

論文題名 細胞レベルでRNA切断活性を示す化学修飾を施した8-17 DNAzymeの開発研究

## 論文内容の要旨

核酸医薬は、これまで治療が困難であった遺伝性疾患や希少疾患に対してアプローチできる、新たな創薬モダリティとして注目を集めている。本研究では、臨床応用されているsiRNAやアンチセンス核酸 (ASO) と同様、標的RNAを切断するデオキシリボザイム (DNAzyme) に注目した。DNAzymeは30塩基長ほどから成るDNA鎖であり、標的RNAと塩基対を組み二重鎖を形成する結合アームと、 $Mg^{2+}$ などの金属イオンを固定化する触媒コアで構成される。DNAzymeは結合アームによって標的RNAと配列特異的に二重鎖を形成し、触媒コアで固定化した金属イオンを用いて、標的RNAの分子内加水分解反応 ( $2' - 3'$  環化反応) を引き起こすことによって標的RNAを切断する。siRNAがRNA誘導サイレンシング複合体を、ASOがリボヌクレアーゼHを用いて標的RNAを切断する機構とは異なり、DNAzymeは生体酵素を用いずにRNA切断できることと、標的RNAの切断部位の塩基選択性が高いという特徴を有しており、医薬応用に向けた基礎研究が盛んに進められている。一方で、siRNAやASOでは修飾核酸を適切に導入することで、標的RNAとの結合力や酵素耐性 (核酸分解酵素や血漿中の安定性) を高め臨床応用されているが、DNAzymeはそのような修飾核酸の導入パターンが十分に確立されていない。そのため、細胞レベルでもRNA切断活性を示すDNAzymeはほとんど見出されていなかった。特に触媒コアの構造は複雑であり、 $5'$  側から $3'$  側までの各位置に修飾核酸を導入するスクリーニング的な研究は行われているが、理論的に修飾核酸を導入する方法は報告されていなかった。

そこで本研究は、修飾核酸の新たな導入方法を構築し、細胞レベルでもRNA切断活性を示す活性と酵素耐性に優れたDNAzymeを取得することを目的に研究を行った。研究対象とするDNAzymeとして、基質 (相補鎖) を切断する直前の活性化状態と考えられるX線結晶構造が唯一報告されたサブタイプである8-17 DNAzymeに注目した。DNAzymeの触媒コアは修飾核酸の導入が難しいことが先行研究から想定されたが、このX線結晶構造中の各ヌクレオチドの構造情報に基づくことで、修飾核酸の種類や導入位置を理論的に選定できると考えた。さらに、標的RNAである相補鎖と二重鎖を形成する結合アームは、ASOに求められる特性と似通っており、当研究室のASOに関する修飾知見を活用し適切に設計できることが期待された。上記修飾戦略によって8-17 DNAzymeを理論的に修飾し、8-17 DNAzymeでは報告のなかった細胞レベルでのRNA切断活性を示すことで、DNAzymeの創薬研究の進展に寄与できると考えた。

第一章第一節では、触媒コアに対してX線結晶構造に基づく修飾アプローチを検証した。8-17 DNAzymeの各ヌクレオチドの立体構造情報に基づき、その特徴 (糖部配座など) に適した修飾核酸を選択して導入できると考えた。リボース環の糖部配座が*North*型を取るヌクレオチドに対し、*North*型糖部配座をとりやすい修飾核酸である $2' - O$ -メチルRNA ( $2' - OMe$ )を用いることで、活性を損なうことなく修飾導入することに成功し、さらにDNAzymeの切断活性を向上させる効果も得た。第二節は、結合アームに対してASO修飾の知見を活用した。結合アームに求められる特性はASOと同様、核酸分解酵素などに対する安定性と、相補鎖である標的RNAとの適切な二重鎖形成能であると想定し、臨床応用まで進むASOにも搭載されている $2' - OMe$ やlocked nucleic acid (LNA)、phosphorothioate (PS) 結合を有力と考えた。8-17 DNAzymeにASOと類似したパターンでこれらを導入したところ、DNAzymeの切断活性を維持できることが明らかとなった。さらに、相補鎖との二重鎖形成能 (結合力) を最適化するため、結合アームの塩基長を短くすることで相補鎖との結合力を低下させていったところ、活性を最大約1.6倍向上させることに成功した。この結果は、DNAzymeが相補鎖を切断した後、その切断断片から乖離し新たに別のRNAと結合して切断する、ターンオーバーが強く関連することが示唆された。さらに第三節では修飾した8-17 DNAzymeの時間依存的、濃度依存的な切断活性を評価したところ、特に結合アームを最適化することにより、相補鎖切断活性の擬一次速度定数が未修飾体のおよそ4倍まで向上することが明らかになった。また、第四節では、8-17 DNAzymeへ修飾核酸を導入することで、核酸分解酵素に対する安定性 (酵素耐性) が向上することを確認した。

第二章では、第一章で得た修飾8-17DNAzymeを用いて細胞内におけるRNA切断活性を得ることを目指した。第一節で、細胞内に存在する金属イオン ( $Mg^{2+}$ や $Zn^{2+}$ ) を用いたときの8-17 DNAzymeのRNA切断活性を評価した上で、第二節では細胞内に内在する標的RNAとしてmetastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (*MALAT-1*) およびscavenger

receptor B1 (*SRB1*) を選定し、これらに対する8-17 DNAzyme配列を設計、それぞれについて切断活性があることを確認した。そして第三節では、修飾8-17 DNAzymeを用いて細胞に内在する上記2種類のRNAを切断できるか検証を行った。その結果、DNAzymeの切断活性を消失させたネガティブコントロールと比較し、修飾8-17 DNAzymeは有意に標的RNAを切断することが逆転写定量PCRにより明らかになった。最後に第四節では、この細胞内でのRNA切断効果はRNase H1を介したアンチセンス効果によるものではなく、DNAzymeのRNA切断活性によるものであることを示した。

本研究では、細胞レベルでRNA切断活性を示すような8-17 DNAzymeの取得を目的に、新たな修飾方法の検討を行った。8-17 DNAzymeのX線結晶構造に注目することで、活性を損なうことなく、触媒コアにさまざまな修飾核酸を理論的に導入できることが明らかになった。これまでに構造的な特徴を持つ数多くの修飾核酸が報告されており、本アプローチは拡張性も高いと期待される。また、ASOでの知見をもとに結合アームを修飾・設計することで、酵素耐性、さらに切断活性の向上に至った。上記修飾を導入した8-17 DNAzymeは、2種類の内在RNAを細胞内で切断することに成功し、本研究は8-17 DNAzymeを用いて細胞内の切断活性を明確に示す初めての報告となった。これらの研究成果は、DNAzymeの新たな修飾アプローチを提案するものであり、また理論的に化学修飾を導入したDNAzymeの創薬応用可能性を示唆するものになったと考えている。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 千葉 幸介 )			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	荒井 雅吉
	副 査	教授	有澤 光弘
	副 査	教授	水口 裕之

## 論文審査の結果の要旨

DNAzymeは、特定の化学反応を引き起こす触媒機能を持ったDNA鎖である。中でも、相補鎖RNAと配列特異的に結合して当該RNAの切断反応を引き起こすDNAzymeは、アンチセンス核酸やsiRNAと同様に医薬応用化が期待される。申請者である千葉幸介氏は、RNA切断活性を持つ8-17 DNAzymeに着目し、複雑な高次構造を持つ触媒コア、及び、標的RNAと配列特異的に結合する結合アームに対して適切な化学修飾を施すことで、細胞内でRNA切断活性を示す8-17 DNAzymeが取得できるものと考え、精力的に研究に取り組み、以下に示す成果を得た。

- 1) 文献で報告されている8-17 DNAzymeのX線結晶構造を基に、活性発現に重要となる触媒コアの化学修飾に取り組み、活性を減弱させることなく導入できる化学修飾の種類及び位置を見出した。結合アームの化学修飾においては、反応を加速させるべく、RNAとの結合力を化学修飾やアームの長さによって調節する戦略を取り、活性向上につながるデザインを見出した。
- 2) 上記知見に基づいて化学修飾を施した8-17 DNAzymeは、ウシ胎児血清 (FBS) を含む培地中あるいはヌクレアーゼを含む緩衝液中で高い安定性を示すことが明らかになった。
- 3) 8-17 DNAzymeによって細胞内の内在性RNAを切断分解できるかについて検証すべく、*Malat-1*や*Srb1*を標的RNAに設定し、結合アームの配列を変え、上記知見に基づいた化学修飾を行うことで所望の活性を持つ化学修飾型DNAzymeの取得に成功した。得られた化学修飾型DNAzymeは、細胞内で標的RNA (*Malat-1*や*Srb1*) の発現量を有意に低下させることが明らかになった。細胞内で活性を示すDNAzymeの例は限られており、現状ではアンチセンス核酸と比較して活性は低いものの、当該研究分野に重要な知見を与えた。

以上の研究成果は、DNAzymeの創薬応用に向けた可能性を切り拓く成果であると言える。よって、本研究内容は博士(薬科学)の学位論文として相応しいものであると認める。