

17. 人工 U1snRNA を用いた新規遺伝子治療の開発

大窪 章寛

Key words: 核酸医薬, スプライシング制御, U1 snRNA

東京工業大学
大学院生命理工学研究科
分子生命科学専攻
バイオ構造化学講座

緒言

スプライシングとは、ゲノム DNA から転写された mRNA 前駆体 (pre-mRNA) から不必要な配列 (イントロン) を抜き取り、必要な配列 (エキソン) だけの mRNA を生成する生体反応である。このスプライシングを触媒するのがスプライソームと呼ばれる RNA-タンパク質複合体で、5つの核内低分子リボヌクレオタンパク質 (U1, 2, 4, 5, & 6 snRNP) で構成されている。エキソンとイントロンのつなぎめの配列 (スプライスサイト) は、U1 snRNP と U6 snRNP によって認識されるが、このスプライスサイトに変異が入ってしまうとこれら U snRNP が結合できなくなり、スプライシング異常が起こるため疾患につながる¹⁾。例えば、U1 snRNP が結合する 5'-スプライスサイトへの変異による疾患としては、一部の筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症、嚢胞性線維症、血友病などが挙げられる。U1 snRNP は、4つのステムループ構造を有する U1 snRNA を中心に、U1-70K, U1-A, U1-C, Sm タンパク複合体で構成されており、U1 snRNA の 5'側のわずか 8 塩基のみで pre-mRNA を認識していることが分かっている。スプライスサイトの配列は、多少の多様性をもっているが、この位置に変異がおき U1 snRNA との結合が弱くなってしまうと、その位置でのスプライシングが起きなくなってしまう。現在までに、遺伝子工学的な手法を用いてスプライスサイトの変異に合わせた変異 snRNA を細胞内で作らせると、スプライシング異常が解消され、正常な mRNA が生成される事が報告されている。この知見は人工 U1 snRNA が新たな作用機序をもつ核酸医薬候補であることを示唆している。

また、最近では U1snRNP に含まれる U1-70K が pre-mRNA のポリ A 付加を阻害することが見いだされ、この生体反応を利用した遺伝子発現制御 (U1i) が注目されつつある。すなわち、遺伝子工学的な手法を用いて認識配列を 3'末端のエキソンに相補的な配列に改変した変異 U1 snRNA を細胞内で作らせることで、ポリ A 付加阻害を経由する標的 mRNA の選択的な分解が可能であることが報告されている。この知見からも、人工 U1 snRNA が次世代の核酸医薬候補として有用であることが示唆される。

しかし、これまでに U1 snRNA の化学合成は全く報告されていない。その理由は、この RNA が 164 塩基と鎖長が長いことと、5'末端に非常に複雑なトリメチルグアノシン (m^3G) キャップ構造を有するためである。 m^3G キャップ構造は、スプライシングに関与する U snRNA に共通した構造であり核内局在化に非常に重要な役割をもつが、塩基性条件下非常に不安定であるため通常の RNA 合成法では合成できない。

そこで、我々はこれまでに培ってきた世界最高峰の RNA 合成技術、「迅速かつ高効率なポリリン酸化」²⁾と「中性条件下切り出し可能なシリルリンカー」³⁾を駆使し、世界に先駆けて U1 snRNA の化学合成を初めて行った。

方法

U1 snRNA は 5'側のわずか 8 塩基を使ってイントロンとエキソンにまたがるスプライスサイトを認識する (図 1)。そこで、U1 snRNA のこの部分に修飾を加え疾病原因遺伝子の塩基配列変異に対応させるほか、さらなるスプライスサイト認識や核酸分解酵素に対する耐性の向上を行っていく。そのためには、人工 U1 snRNA の高効率な化学合成法を確立する必要がある。しかし、U1 snRNA は 164 量体と鎖長が長いだけでなく、5'末端に一般的な核酸合成法では導入することのできない m^3G キャップ構造をもつため、効率よく合成することができない。

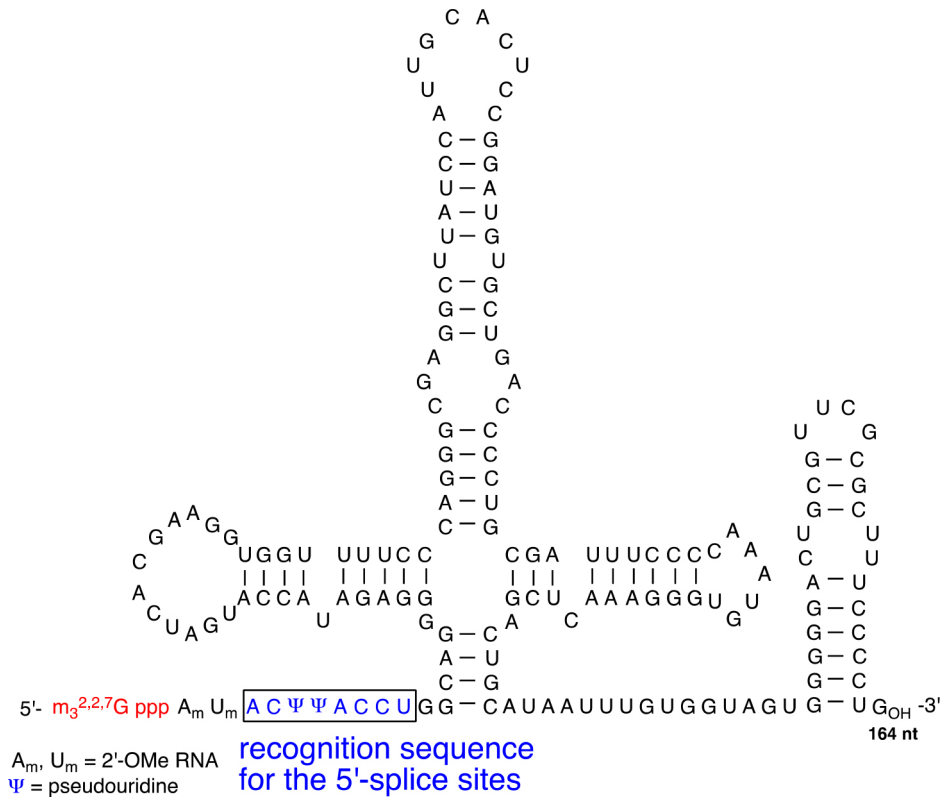


図1. U1 snRNA の構造.

これまでに我々は「ホスホロアミダイト化合物を利用した高効率ポリリン酸化反応」を独自に開発し、m³G キャップ構造を有するオリゴヌクレオチドの迅速かつ高効率な合成法を報告してきた (図2).

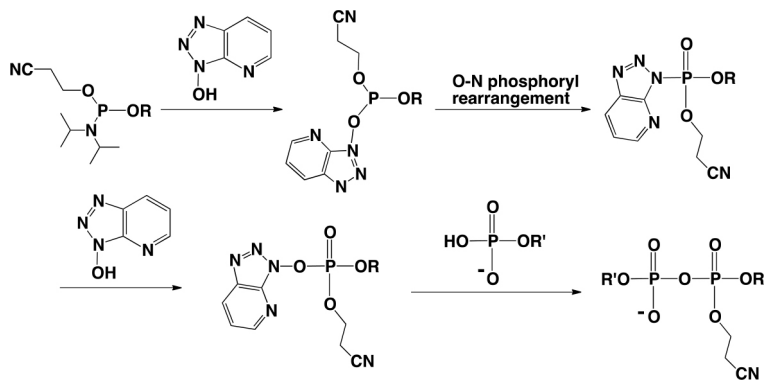


図2. ホスホロアミダイト化合物を利用した高効率ポリリン酸化反応.

そこで、本研究課題において m³G キャップ構造を有する U1 snRNA の5'側の短い RNA 分子 (10 塩基程度, 図3) と 3'側の長い RNA 分子 (150 塩基程度) を別途合成し、T4 DNA Ligase を用いて連結することで、世界で初めて U1 snRNA の化学合成に成功した (図4).

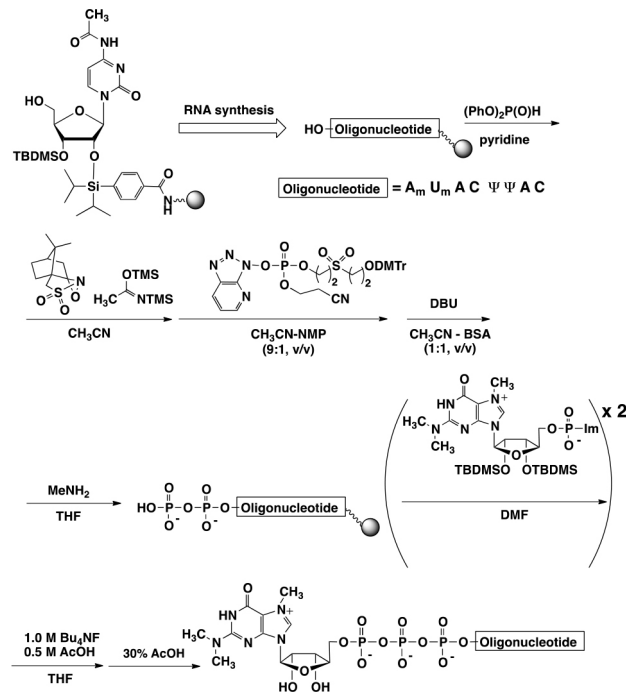


図 3. m^3G キャップ構造を有する RNA オリゴマーの化学合成.

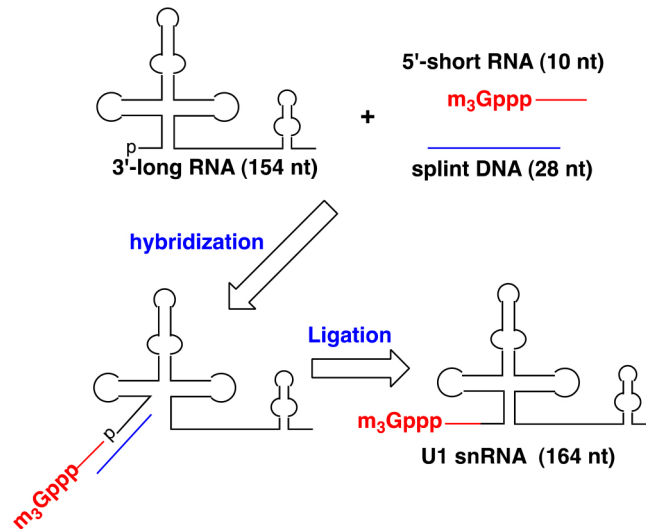


図 4. U1 snRNA の構造.

結果および考察

U1 snRNA は一般的な核酸医薬と違い m^3G キャップ構造 (図 5a) を有しており, 分解酵素による 5'末端からの分解は起こりにくい. しかし, 細胞内にはキャップ構造を認識し分解する酵素 (デキャッピング酵素) も知られているため, 本研究ではデキャッピング酵素に分解されない新たな m^3G キャップ構造アナログの導入も行った. m^3G キャップ構造はスプライシング制御には直接関与しないが U1 snRNA の核内輸送・局在化に寄与しているため, 薬剤デリバリーにおいて必要な箇所である. そのため, m^3G キャップ構造アナログは核輸送タンパク質 (SPN1) には認識されなければ

ならない。そこで本研究では、様々な m³G キャップ構造アナログをもつ U1 snRNA を合成し、SPN1 との結合を評価した。その結果、エチレングリコール架橋アナログ (図 5b) の SPN1 と結合力が未修飾の m³G キャップ構造と同等であることを見いだした。現在では、これら化学合成した U1 snRNA のスプライシング制御活性を詳細に調べている。

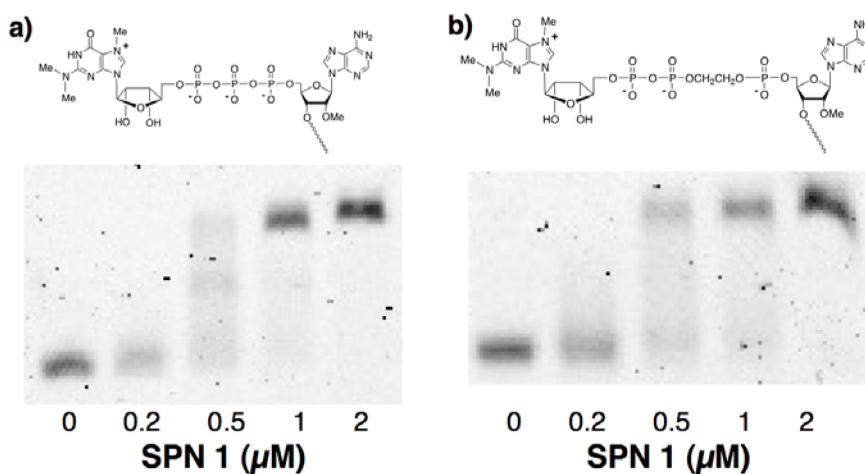


図 5. U1 snRNA およびそのアナログの SPN1 との結合アッセイ。

本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Pomeranz Krummel, D. A., Oubridge, C., Leung, A. K. W., Li, J. & Nagai, K. : Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature*, **458** : 475-481, 2009.
- 2) Ohkubo, A., Tago, N., Yokouchi, A., Nishino, Y., Yamada, K., Tsunoda, H., Seio, K. & Sekine, M. : Synthesis of 5'-terminal capped oligonucleotides using O-N phosphoryl migration of phosphoramidite derivatives. *Org. Lett.*, **14** : 10-13, 2012.
- 3) Ohkubo, A., Sasaki, K., Noma, Y., Tsunoda, H., Seio, K. & Sekine, M. : Efficient solid-phase synthesis of oligodeoxynucleotides having a 5'-terminal 2,2,7-trimethylguanosine pyrophosphate linkage. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 4819-4824, 2009.