

学 位 論 文 の 要 旨

Synthesis and characterization of artificial nucleases and modified siRNAs for gene expression control

(遺伝子発現制御のための人工ヌクレアーゼと修飾 siRNA の合成と特性評価)

氏 名 Tomokazu Masuda 印
(増田知和)

In this doctor thesis, the synthesis and characterization of artificial nuclease, which is used for the study of genomes, and modified siRNAs for gene expression control are described.

In chapter 1, I describe the background and purpose of this study. There are the regions that remain to be clarified in the human genome, and it is considered that some of the regions include important genetic functions related with gene expression control. In order to elucidate these genetic functions, a gene knockout mice and a gene knockdown approach have been used. To develop efficient functional analysis methods of genes, artificial restriction enzymes for producing a knockout mice and modified siRNAs as gene knockdown tools, have been investigated.

In chapter 2, the cleavage of plasmid DNA by 1,10-phenanthroline-polyamine conjugates for the development of a small DNA cleaving molecule is discussed. I synthesized the conjugate **1** containing two phenanthrolines groups and the conjugate **2** containing three phenanthrolines groups as 1,10-phenanthroline conjugates with tris(2-aminoethyl)amine. Both conjugates cleaved plasmid DNA in the absence of a reducing agent and any metal ions under physiological conditions. Further, the copper complexes of conjugates **1** and **2** also cleaved plasmid DNA in the absence of a reducing agent under physiological conditions. In the absence of the metal ions, the conjugate **2** showed higher DNA cleavage activity and higher DNA binding ability compared to **1**. This suggests that the high binding ability of conjugate **2** resulted from the higher cleavage activity. Also, the cleavage rate is competitive with the previously reported molecule. It was found that the DNA cleavage by the conjugate **2** proceeds mainly in a hydrolytic manner from the effects of pH and activated oxygen scavengers on the DNA cleavage reaction.

In chapter 3, chemical and enzymatic synthesis of RNA containing the various modified nucleosides at the 3'-end are discussed. Chemical synthesis of the modified RNAs was performed with the solid phase phosphoramidite method to obtain them in high purity and to use them in chapter 4. To investigate the effect of modified groups on the RNAi activity, siRNAs bearing

various modified groups are required. Therefore, I propose the enzymatic method, in which the modified nucleotides were ligated with unmodified RNA by T4 RNA ligase. The modified DNA dimers as the modified nucleotides were easily synthesized by either solid- or liquid-phase synthetic method. The modified DNA dimers bearing one anionic or neutral group on the 3'-terminal nucleoside were ligated to RNA as efficient as a natural DNA dimer. On the other hand, the modified DNA dimers bearing one or two polycationic groups were ligated with less efficiency, especially for that bearing two polycationic groups. This suggests that the decrease in the ligation efficiency is caused by the high-density polyamine.

In chapter 4, the RNAi activity of the modified siRNA containing the C-5 polyamine-substituted pyrimidine nucleoside in the 3'-overhang regions is discussed. It was found that only one modification at the 3'-end provides high exonuclease-resistant to RNA. The RNAi experiments *in vitro* show that only one terminal modification in the 3'-overhang regions is effective enough to increase RNAi activity. This could be due to the increased nuclease resistance caused by the modification. On the other hand, modifications of two nucleosides in the 3'-overhang region resulted in slightly less RNAi activity than single modification. Two modifications in the 3'-overhang region might affect the RISC formation for its steric hindrances.

In chapter 5, I summarize the results of this study.

The small DNA cleaving molecule, 1,10-phenanthroline-polyamine conjugate, studied in this thesis is more useful as artificial nuclease than the conventional natural enzyme. The modified siRNA studied in this thesis is also useful due to its high RNAi activity. Additionally, I propose a novel synthetic route to modified RNA bearing modified groups at the 3'-end.

(和訳)

本学位論文は、機能の解明されていない DNA の研究に利用できる人工ヌクレアーゼと、遺伝子発現制御を効率的に行うための修飾 siRNA の合成とその特性に関する研究についてまとめたものである。

第 1 章では、本研究の背景と目的について述べた。ヒトゲノム中にはまだ機能が解明されていない領域があり、その中には遺伝子発現制御に関わる重要な遺伝子も含まれる。これら遺伝子の機能解明には、特定の遺伝子をノックアウトさせたマウスを用いるか、あるいは、遺伝子をノックダウンさせて、解析を行う。より効率的な遺伝子の機能解析には、ノックアウトマウスの製作に必要な細胞内で利用可能な人工制限酵素の低分子 DNA 切断部位が要求される。また、効率的な遺伝子のノックダウンには、活性の高い修飾 siRNA の開発が望まれる。

第 2 章では、低分子 DNA 切断部位の開発のために、1,10-フェナントロリン-ポリアミン複合体によるプラスミド DNA の切断の検討について述べた。1,10-フェナントロリン-ポリアミン複合体としては、トリス (2-アミノエチル) アミンにフェナントロリン 2 つが結合した複合体 **1** と 3 つ結合した複合体 **2** を合成して用いた。いずれの複合体も生理的条件、多価金属ならびに還元剤非存在下でプラスミド DNA を切断した。また、**1** と **2** のいずれの銅錯体も、生理的条件、還元剤非存在下でプラスミド DNA を切断した。多価金属非存在下では、複合体 **2** は **1** に比べ、高い DNA への結合能と DNA 切断活性を示した。これは複合体 **2** の高い結合能が、高い切断活性をもたらしたことを示唆している。さらに複合体 **2** を用いて、その切断活性に及ぼす活性酸素種スカベンジャーの添加効果と反応溶液の pH 依存性を検討した。その結果、複合体ならびにその銅錯体は、加水分解的に DNA を切断していることが分かった。得られた複合体 **2** の反応速度を見積ったところ、その反応速度から既報の DNA 切断分子に匹敵する高い切断活性を有することが分かった。

第 3 章では、効率的な修飾 RNA の開発を目指して、3'-末端に種々の修飾ヌクレオシドを含む RNA の化学合成法、及び、酵素を用いた合成法についての検討結果を述べた。修飾 RNA の化学合成は、固相ホスホロアミダイト法で行い、高純度で目的物を得ることができた。得られた修飾 RNA は第 4 章で、RNAi 活性の検討に用いた。しかしながら、修飾基の RNAi 活性に及ぼす効果を調べる場合には、多種多様な修飾基を持った RNA が必要となる。そこで、酵素を用いた方法を考案した。この方法では、未修飾の RNA と修飾基を含む短鎖 DNA を T4 RNA リガーゼで結合して、目的とする修飾 RNA を得る。短鎖 DNA として用いる修飾 DNA 2 量体は、固相合成法と液相合成法のいずれでも合成可能であった。T4 RNA リガーゼによる修飾 DNA 2 量体と RNA のライゲーシオンは、中性およびアニオン性の機能性基を 3'-末端ヌクレオシド上に一つ持つ修飾 DNA 2 量体では天然型とほぼ同等の効率だった。一方、ポリカチオン性の機能性基を持つ場合には効率が低下した。これは修飾基であるポリアミンが酵素反応を阻害するために反応速度が低下したと考えられる。また、修飾 DNA 2 量体の全ヌクレオシドに機能性基を持つ場合には、ライゲーシオン効率が著し

く低下することが分かった。

第4章では、3'-オーバーハング領域に C5-ポリアミン修飾ピリジンヌクレオシドを含む修飾 siRNA の RNAi 活性の検討を行った。修飾 RNA のヌクレアーゼに対する耐性を調べた結果、3'-末端への1残基の修飾ヌクレオシドの導入のみで RNA に高いエキソヌクレアーゼ耐性を付与できることがわかった。修飾 siRNA の RNAi 活性を *in vitro* 系で調べた結果、siRNA の 3'-オーバーハング領域への末端1残基修飾が RNAi 活性を著しく向上させることが分かった。これは、ヌクレアーゼ耐性が向上したことで、細胞内での siRNA の残存時間が長くなり、RNAi 活性を高めたと考えられる。一方、3'-オーバーハング領域への末端2残基修飾は、1残基修飾よりも活性が若干低かった。これは、3'-オーバーハング領域の2つの修飾が、その立体障害のために RISC 形成に影響を与えていると推測される。

第5章では、本研究の成果をまとめた。

本論文で、人工ヌクレアーゼとして 1,10-フェナントロリナーポリアミン複合体が有用であること、3'-オーバーハング領域に C5-ポリアミン修飾ピリジンヌクレオシドを含む修飾 siRNA が高い RNAi 活性を示すことを明らかにした。また、種々の修飾 siRNA 調製に有効な RNA の 3'-末端への修飾ヌクレオシドの導入方法を示すことができた。