様式２

論　文　の　要　約

報告番号	甲 第　　号 乙	氏　名	和田　知也
学位論文題目	siRNA-Ago2間の相互作用様式解明に向けた標的捕捉型ケミカルプローブの開発研究		

論文の要約

RNA 干渉効果を誘起する small interfering RNA (siRNA) 医薬品は、配列を適切にデザインすることであらゆる疾患を治療することができる。しかし、siRNA 医薬品の開発に必須となる化学修飾の導入様式が体系化されておらず、開発研究の中で数多くのトライアンドエラーが繰り返されている。この問題を解決するためには、siRNA-タンパク質間相互作用の解析が必須である。本研究では、RNA 干渉効果の発現に際して中心的な役割を果たすタンパク質である Argonaute2 (Ago2) に着目し、siRNA-Ago2 間の相互作用を簡便かつ動的に解析可能な新規ケミカルプローブを開発することを目的とした。この目的を達成するために著者は、メジャーグルーブ及びマイナーグルーブに面するアデニン環の 7 位及び 2 位に光反応性基であるジアジリン基を有する 7-[3-(3*H*-diazirinyl)butyl]-7-deazaadenosine (7dia-deA) 及び 2-[3-(3*H*-diazirinyl)butyl]adenosine (2dia-A) (図 1) を設計した。このケミカルプローブを導入した siRNA を用いることで、siRNA のどの部位がタンパク質のどのアミノ酸残基と相互作用しているのかを解析可能であると考えた。

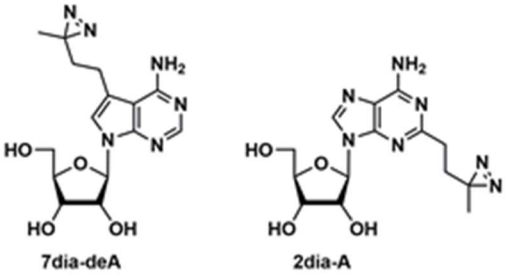

図 1 7dia-deA, 2dia-A の構造

設計した 7dia-deA と 2dia-A の合成は、対応するヨードアデノシン誘導体への 3-buten-2-ol のカップリングとそれを足掛かりとしたジアジリン環構築を基本戦略として、それぞれ 17 工程、13 工程で達成した。続いてそれぞれの光反応性の評価を行った。その結果、両化合物とも 360 nm の UV 照射によって反応性の高いカルベンを生成することを確認した。そこで著者は合成した各ケミカルプローブをホスホロアミダイト誘導体へと誘導し、DNA/RNA 自動合成装置を用いて siRNA の各部位へと導入した。また、ケミカルプローブを導入した siRNA に対しても光反応性の評価を行い、これらが光反応性を有することを確認した。

合成した各 siRNA の熱的安定性の評価行ったところ、センス鎖の中心付近にマイナーグルーブ側のケミカルプローブを導入した siRNA において僅かな熱的安定性の低下が観察されたものの、他の siRNA の熱的安定性は天然型 siRNA とほとんど同程度だった。このことから、ケミカルプローブの導入は siRNA の熱的安定性にほとんど影響を与えないことが示唆された。また、CD スペクトル解析の結果から、ケミカルプローブ導入 siRNA は天然型 siRNA と同じ A 型らせん構造をとっており、ケミカルプローブの導入による siRNA の構造変化もほとんど起きていないことが示唆された。

合成した各 siRNA の RNA 干渉効果を評価したところ、いずれの場合においても RNA 干渉効果を維持していることが明らかとなった。このことから、ケミカルプローブを導入した siRNA は天然型 siRNA と同様に Ago2 へと組み込まれたことが示唆された。

以上の結果から、ケミカルプローブ導入 siRNA を Ago2 と相互作用させた後に UV 照射を行うことで、siRNA-Ago2 質間で共有結合を形成可能であると期待される。