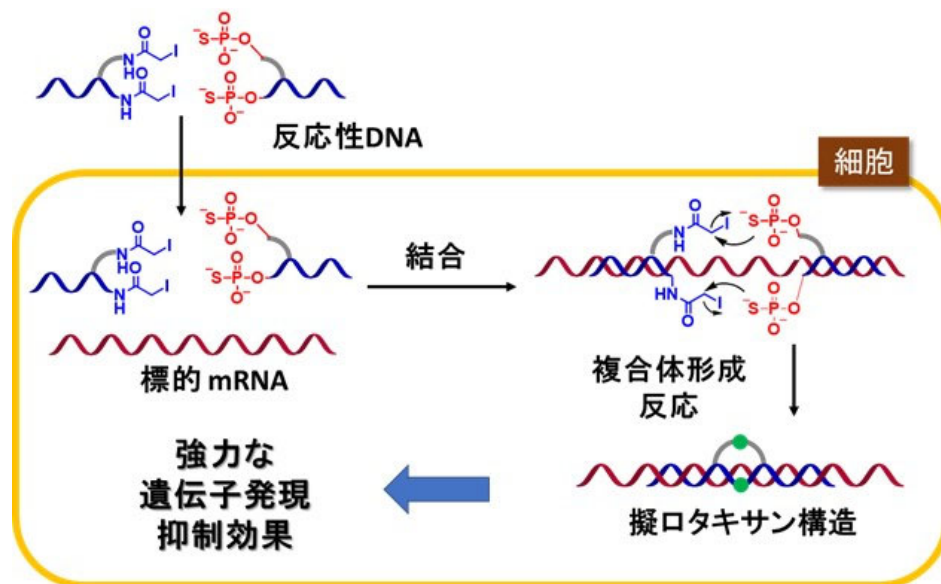




新たな遺伝子サイレンシング技術の開発に成功！

～トポロジカルな mRNA 捕捉による遺伝子治療に向けた革新的一步～

【本研究のポイント】

- ・ アンチセンス法^{注1)}には、低い効果やターゲット特異性の問題などの制約がある。
- ・ 本複数の反応性官能基を持ち、枝分かれしたオリゴデオキシヌクレオチド(DNA)を使用した、トポロジカルな(高次複合体形成を介した)mRNA^{注2)}捕捉法を開発した。
- ・ この手法では、反応性 DNA を用いてターゲット mRNA により安定な複合体を形成し、通常型アンチセンス核酸よりも高い遺伝子サイレンシング^{注3)}効果を示した。
- ・ 新規の遺伝子サイレンシング法として有望な手法となることが見込まれる。

【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院理学研究科の阿部 洋 教授、木村 康明 准教授、阿部 奈保子 特任准教授、Lyu Fangjie (ルー ファンジ) 博士後期課程学生、富田 貴志 博士前期課程学生(研究当時)らの研究グループは、オリゴ核酸の連結反応に基づく新たな遺伝子サイレンシング法を開発しました。

本研究では、遺伝子発現制御技術の革新を目指し、新しい手法として「トポロジー捕捉法」を提案しました。この技術は、新規に開発した分岐型 DNA が標的とする mRNA と複合体を形成することで、遺伝子発現を抑制します。

従来のアンチセンス法では、DNA が mRNA に単純に結合するだけでしたが、「トポロジー捕捉法」では DNA 同士が反応してより安定な複合体を形成します。このため、より高い遺伝子サイレンシング効果が期待できます。特に、2 分岐 DNA によって形成される複合体は、従来の直鎖アンチセンス核酸よりも優れた活性を示しました。

この成果は、遺伝子治療の分野において大きな可能性を秘めています。難治性の疾患や遺伝子異常に対する新たな治療法の開発につながる可能性があり、医学や生命科学の分野において革新的な成果を生み出すことが期待されます。

本研究成果は、2023 年 9 月 4 日付 Royal Society of Chemistry 発行の雑誌「Chemical Communications」のウェブ上で先行公開されました。

【研究背景と内容】

近年、遺伝子治療はさまざまな疾患の治療法として注目を集めていますが、その効果的な実現にはいくつかの課題が存在していました。特に、ターゲットの遺伝子を選択的に抑制するアンチセンス法においては、効果の低さやターゲット特異性の問題が障壁となっていました。こうした課題を克服するため、研究者たちは新たなアプローチを模索していました。

そこで、我々は新たな遺伝子サイレンシング技術「トポロジカルな mRNA キャプチャー法」を開発し、その有用性を示す研究を行いました。この研究は、複数の反応性官能基を持つ枝分かれした DNA 鎖を利用して、標的としたメッセンジャーRNA (mRNA) に対して、擬口タキサン^{注4)}構造と呼ばれる安定な複合体を形成する手法です。

従来のアンチセンス法では、DNA がターゲットの mRNA に対して結合することで、翻訳を抑制したり、RNase H^{注5)}と呼ばれる核酸分解酵素を誘導して mRNA を分解したりすることで、遺伝子の機能発現を抑制します。しかし、これらの方法では DNA と mRNA の複合体の安定性が低く、遺伝子発現抑制効果が限定される場合があり、治療効果の向上には課題が残っていました。

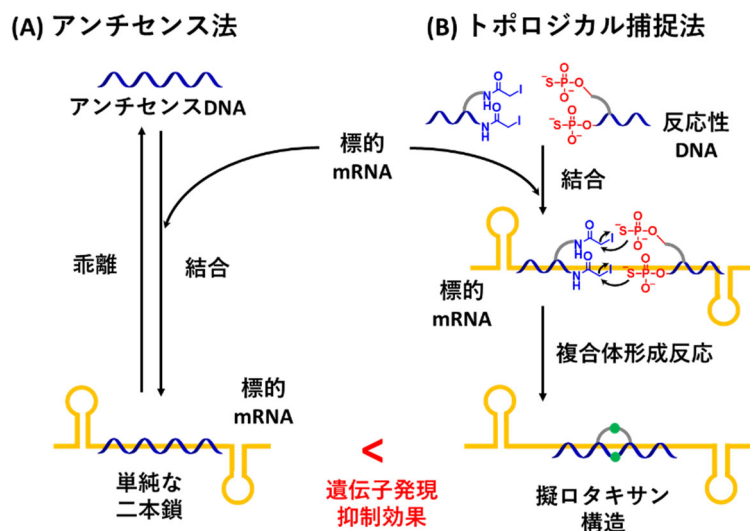


図 1. 従来のアンチセンス法と本研究のトポロジカル捕捉法の比較

本研究では、トポロジカルな mRNA キャプチャーでは、反応性 DNA によって mRNA とより強固な複合体を形成することで、遺伝子サイレンシング効果を高めるアプローチが開発されました。具体的には、反応性 DNA が mRNA に対して分岐した形で結合し、複数の反応性官能基による連結が行われることで、より安定な結合が実現されます。

反応性 DNA の分子設計については、アンチセンス DNA を適切な位置で断片化し、各 DNA 断片の末端に化学的連結反応の反応性官能基を導入しました。さらに、バックボーン DNA から分岐した末端に 2 つ目または 3 つ目の反応性官能基を導入し、標的 mRNA をトポロジ的に強固に固定するための複数回の連結反応を可能にしました。

合成した分岐型 DNA を用いて、標的である GFP^{注6)}の mRNA に対して、試験管内で

擬口タキサン構造の形成を評価したところ、細胞内条件に相当する中性条件、37℃で迅速に DNA の連結反応が進行し、90%近くの高効率で複合体形成が確認されました。

さらに形成された複合体の熱的安定性を評価するために、温度勾配かけた電気泳動を行ったところ、天然型の直鎖 DNA と比較して、擬口タキサン構造に基づく複合体がより熱的に安定であることが示されました。

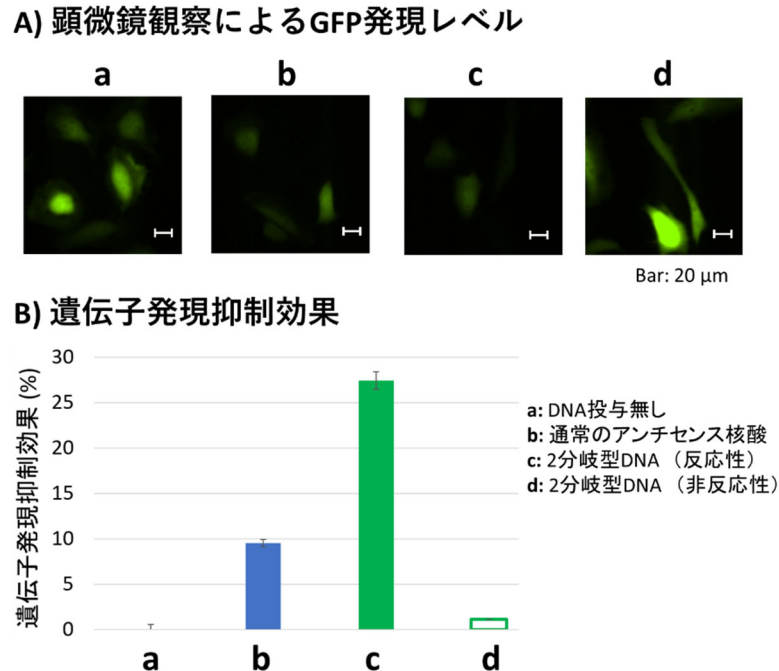


図 2.トポロジカル捕捉法による遺伝子発現抑制効果

これらの高い複合体形成効率および、生じた複合体構造の安定性を踏まえて、細胞系において GFP を標的とした遺伝子発現抑制効果の評価を行いました。蛍光顕微鏡による観察およびフローサイトメトリーを用いた定量解析から、2 分岐の反応性 DNA が天然型アンチセンス DNA と比較して約 2.8 倍のサイレンシング効果を示し、以上の結果から、本手法はアンチセンス法における効果を強力に向上させることができることが明らかとなりました。

【成果の意義】

このトポロジカルな mRNA キャプチャーの開発により、従来の遺伝子サイレンシング技術に比べてより高い効果と安定性を持つことが明らかになりました。今後は、この技術の進化や応用によって、さまざまな遺伝子関連疾患の治療に向けた新しい治療法の実現が期待されています。この成果は、生物医学分野における遺伝子治療研究において重要な一歩となることが期待されます。

本研究は、令和元年度から始まった AMED『先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業』の支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

注 1)アンチセンス法:

標的の mRNA に結合するオリゴデオキシヌクレオチド(DNA)を用いて特定の遺伝子の発現を抑制する技術。

注 2)mRNA(メッセンジャーRNA):

遺伝子から転写された情報を DNA から細胞質へ運ぶ RNA の一種。mRNA は細胞内でタンパク質の合成に必要な情報を運ぶ。

注 3)遺伝子サイレンシング(Gene Silencing):

特定の遺伝子の機能を抑制することを指す技術。遺伝子サイレンシングを行うために、抑制したい遺伝子と相補的な配列を持つ DNA を使用することが一般的。

注 4)ロタキサン:

環状分子と軸状分子から構成される分子複合体で、軸状分子が環状分子の穴を貫通する構造を有する。

注 5)RNase H (Ribonuclease H):

RNA と DNA の二重鎖領域を切断する酵素。アンチセンス法においては、RNase H によって mRNA の分解が促進され、遺伝子のサイレンシングが行われる。

注 6)GFP (Green Fluorescent Protein):

オワンクラゲに由来するタンパク質で、特定の波長の光を当てると緑色の蛍光を発する。この特性に基づき、GFP は生物学研究で頻用されるツール分子であり、遺伝子発現やタンパク質の動きを可視化するマーカーとして広く用いられている。

【論文情報】

雑誌名: Chemical Communications

論文タイトル: Topological capture of mRNA for silencing gene expression

著者: Fangjie Lyu (大学院生) Takashi Tomita (大学院生、当時), Naoko Abe (特任准教授), Haruka Hiraoka (特任助教), Fumitaka Hashiya (助教), Yuko Nakashima (研究員), Shiryu Kajihara (大学院生) Fumiaki Tomoike (助教、当時), Zhaoma Shu (大学院生、当時), Kazumitsu Onizuka, Yasuaki Kimura (准教授), Hiroshi Abe (教授)

DOI: 10.1039/d2cc06189a

URL: <https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2023/CC/D2CC06189A>