

非修飾 DNA による miRNA 阻害剤 LidNA

米田 善紀、伊田 寛之、斎藤 智、立花 亮、田辺 利住

大阪市立大学大学院工学研究科 化学生物系専攻

〒558-8585 大阪市住吉区杉本3丁目3-138号

E-mail: tatibana@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp (立花)

Home Page: <http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bme/index.html>

miRNA は、複数のタンパク質の翻訳抑制を行うことで細胞の状態を制御している。miRNA の中にはガン細胞中で過剰に発現し、その発生や悪性化に深く関わっているものがあり oncomiR と呼ばれている。これら oncomiR を阻害することで、ガン細胞の増殖が抑制されることが知られている。既存の miRNA 阻害剤は、LNA や 2'-O-Me-RNA などの化学修飾オリゴヌクレオチドであり、非修飾 DNA からなるものは阻害効果がないことが知られていた。我々は、非修飾 DNA を用いた miRNA 阻害剤を世界で初めて開発し、LidNA と名付けた。LidNA は miRNA 結合ドメイン(MBD)とその両端に安定な二本鎖構造を持つことで miRNA 阻害活性を有する。この特徴を持つ様々な構造の LidNA を新たに設計し、阻害活性の向上を目指した。

1. 背景

miRNA は細胞内で発現する non-coding RNA の一種であり、特定の mRNA に結合し、タンパク質の発現を調節し、分化や病気などに関連する様々な機能を担っている。中でも、ある種の miRNA が高発現することでがん化が引き起こされることが知られている。がんを促進する miRNA は oncomiR と呼ばれ、この oncomiR の機能を阻害するとがん細胞に増殖抑制や細胞死が誘導される[1]。miRNA 阻害剤は次世代の核酸医薬として研究されている。miRNA 阻害剤は本来の基質である mRNA と競合し、より高い親和性で標的となる miRNA と相補的に結合するオリゴヌクレオチドである。そのため既存の miRNA 阻害剤は、高い結合力と安定性をもつ 2'-O-methyl-RNA や locked nucleic acid (LNA) といった化学修飾オリゴヌクレオチドで構成されている[2,3]。RNA/RNA の結合に比べて、RNA/DNA の結合は弱いことが知られており、DNA は miRNA 阻害剤として不適である。実際に、DNA は miRNA 活性を全く阻害しないことが報告されているし、私たちもそれを確認している[4]。

図1のように、非修飾 DNA を構造化することによって、miRNA 結合ドメイン(MBD)は自由に運動できなくなり、miRNA との親和性が向上する。その結果、世界で初めて非修飾 DNA による miRNA 阻害剤を開発できた。これを miRNA の機能にフタ(Lid)をする DNA という意味で LidNA と名付けた[5]。

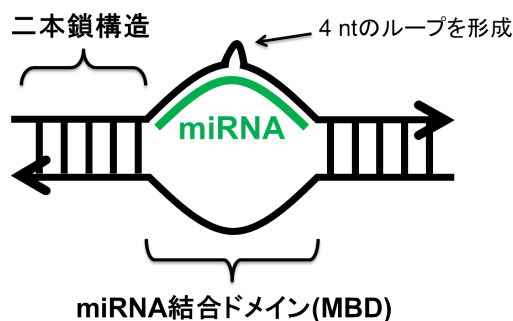


図 1. LidNA の基本構造の模式図

2. 解析データおよび方法

(1) Biacore を用いた miRNA との結合力の測定

miRNA と相補的な配列の両側に DNA 二本鎖結合による構造をもつ LidNA 型のプローブとそのような構造をもたない一本鎖型のプローブをセンサーチップ上に固定し、miRNA をインジェクトし、Biacore3000 を用いて解析を行った。

(2) Reporter gene assay を用いた miRNA 阻害活性の評価

細胞を 96 穴プレートに播種し、その翌日に導入効率評価のための GFP 発現ベクターと標的 miRNA の target 配列を組み込んだ DSRed 発現ベクター、各 LidNA を細胞に co-transfection した。さらに 2 日後、蛍光測定を行

い、DsRed と GFP の比をとることで LidNA の活性を評価した。

3. 結果と考察

(1) miRNA との結合力の測定

驚くべきことに、LidNA 型プローブは一本鎖型の約 2,000 倍の親和性を示し、その KD 値は LidNA の効果のある濃度より低いことがわかった。一本鎖型の KD 値は miRNA 阻害活性を測定した濃度よりはるかに高く、LidNA が miRNA 阻害活性を有し、一本鎖 DNA が阻害活性を有さないことはこの結果からも支持されるものであった。LNA や 2'-O-Me RNA からなる一本鎖型プローブよりも KD 値が低く、miRNA との高い結合力もつことがわかった(表 1)。

表1. 各種プローブの K_D 値

probe-type	K_D value
LidNA-type	0.54 nM
ssDNA-type	1.0 μ M
LNA	4.9 M
2'-O-MeRNA	35 nM

(2) miRNA 阻害活性の評価

様々な構造の LidNA を作製し、それらの miRNA 阻害活性を測定したところ、一本鎖 DNA は全く阻害活性を示さないのに対し、miRNA 結合ドメイン(MBD)のどちらかの端に二本鎖構造があれば活性を持ち、両端に二本鎖構造があれば、さらに高い活性をもつということを見いだした(図 2 の構造 8 および 11)。さらに、両側の構造は二本鎖に限らず、テロメアなどにみられる DNA の立体構造である G カルテット構造でもその活性を高めること、LidNA の MBD を変えることによって、他の miRNA に対しても特異的な活性を示した。LidNA は、LNA や 2'-O-Me RNA からなる miRNA 阻害剤よりも高い活性をもつことがわかった(図 3)。

miR-21 を標的とした LidNA は乳ガン細胞株 MCF7 の増殖を抑制した。

4. 今後の展望

我々の開発した、miRNA 阻害剤 LidNA は非修飾の DNA によって構成されているにも関わらず、安定な二本鎖構造によって miRNA との高い結合力と阻害活性をもつことがわかった。また、その miRNA 結合ドメイン(MBD) を変えることで、他の miRNA に対しても特異的な活性を示すことができた。

今後は、LidNA の構造を最適化し活性を向上させ、研究用ツールおよび核酸医薬としての利用を目指す。

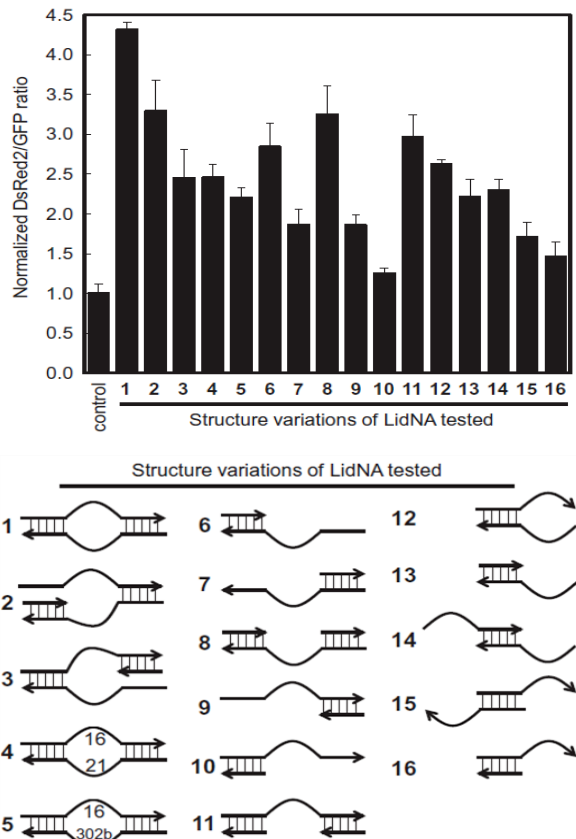


図 2. それぞれの構造の LidNA の miRNA 阻害活性

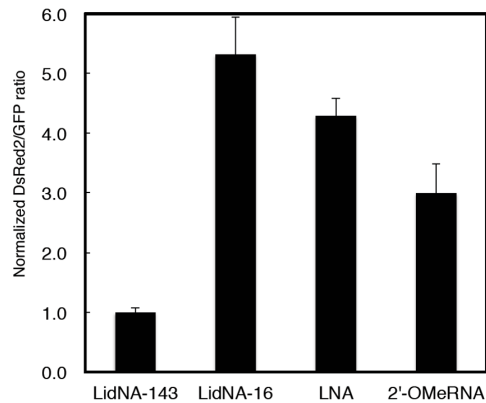


図 3. 従来型の阻害剤と比較した LidNA の miRNA 阻害活性

参考文献

- [1] P.P. Medina, *et al.*: Nature, **467**, 86-90 (2010)
- [2] J. Elmén, *et al.*: Nature, **452**, 896-899 (2008)
- [3] J. Kurreck, *et al.*: Nature, **438**, 685-689 (2005)
- [4] G. Meister, *et al.*: RNA, **10**, 544-550 (2004)
- [5] A.Tachibana, *et al.*: FEBS Letters., **586**, 1529-1532 (2012)