

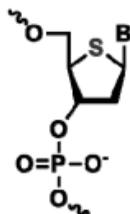
29F-am10

4'-thioDNA 修飾型 shRNA 発現 cassette の創製

○丸山 豪斗¹, 紙谷 浩之², 南川 典昭³, 松田 彰¹ (¹北大院薬, ²愛媛大院理工, ³徳島大院ヘルスバイオサイエンス)

【目的】 RNA 干渉 (RNAi) を利用した既存の遺伝子発現抑制法には、免疫応答の活性化による毒性発現や RNAi 効果の持続性などの問題点がある。当研究室ではこれまでに、ベクターの構造最小化による毒性発現の低下とヌクレアーゼ抵抗性 4'-thioDNA (Figure 1) 修飾による持続性の向上を期待した 4'-thioDNA 修飾型 shRNA 発現 cassette を修飾型のトリリン酸体を用いた PCR により創製している (Inoue *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 15424)。しかし、このものはピリミジンヌクレオチドのみが 4'-thioDNA により修飾されており、プリンヌクレオチドは天然型の DNA で構成されていた。そこでさらなる活性と持続性向上のため、プリンヌクレオチドも 4'-thioDNA により修飾した shRNA 発現 cassette の創製を計画した。

【方法と結果】まず、shRNA 発現 cassette においては細胞内で修飾型の DNA から RNA が転写されることが必須であるため、プリンヌクレオチドが 4'-thioDNA 修飾された場合に転写反応が進行するかどうかを検討することにした。4'-thioDNA 修飾型ルシフェラーゼ発現ベクターを調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、プリンヌクレオチドが 4'-thioDNA 修飾された場合にも転写反応が進行することを明らかとした。さらにトリリン酸体を合成し、PCR により目的の shRNA 発現 cassette を調製しようとしたが、PCR による増幅反応が進行しなかった。そこで、現在は化学合成した短鎖 4'-thioDNA を酵素的にライゲーションし、目的の shRNA 発現 cassette の創製を行っている。本発表では、shRNA 発現 cassette の創製とその活性についても報告する予定である。



B = A, G, C, T
4'-thioDNA

Figure 1