

遺伝子発現の化学的制御を目指した機能性認識分子の創製

佐々木茂貴

Creation of Functional Recognition Molecules for Chemical Modification of Gene Expression

Shigeki SASAKI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University,
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received August 30, 2002)

Artificial molecules that exhibit specific recognition of duplex DNA have attracted great interest because of their potential application in the manipulation of gene expression. Specific chemical reactions to the target base within the predetermined site would secure selective inhibition at either translation or transcription reactions. A more interesting application would be to alter the reacted base structure to induce a point mutation. In our study, we have focused our efforts on: 1) development of new cross-linking molecules with high efficiency as well as high selectivity; 2) establishment of a new molecular basis for the formation of nonnatural triplexes; and 3) synthetic approaches to the new minor groove binders. This paper summarizes our recent results using two new functional molecules: 2-amino-6-vinylpurine derivatives as new cross-linking agents; and W-shaped nucleic acid analogues as new recognition molecules for the formation of nonnatural-type triplexes.

Key words—antisense; antigene; site-directed reaction; cross-linking; 2-amino-6-vinylpurine; triple helix

1. はじめに

21世紀の幕開けと同時に達成されたヒトの全遺伝子配列の解明は、生命科学に大きなインパクトを与えている。中でも病気に関連する遺伝子とそれに対する治療薬の発見には社会的に大きな期待が持たれている。DNAアレイなどの大規模分析技術、たんぱく質の構造解析、さらにコンビナトリアル化学・ハイスループットスクリーニング技術など新しい基盤技術の融合による新しい創薬の希望が高まっている。

現在は、“ポストシーケンス時代”と呼ばれているが、この時代に先行して1990年代初頭には既に多くの病気と遺伝子異常の関係が明らかになっていた。特に、癌は突然変異を含む多遺伝子異常を含むこと、それゆえに生じる無数の多様性に関する知見が蓄積されていた。複数の遺伝子異常を含む病気

に対する理想的治療法としては、多様性に対応できる「個人対応治療」の確立が必要と考えられた。そこで、我々は病気の多様性の原因となっている1個の塩基変異に臨機応変に対応できる新しい手法の確立を目指すことにした。

人工のオリゴヌクレオチドを用いる遺伝子発現制御法は、原理的には配列情報から容易に阻害剤を設計できるため、新しい治療薬としての発展が期待されている。mRNAを標的とするアンチセンス法はすでに多くの誘導体が医薬品として臨床試験中である。¹⁾ また2本鎖DNAへの配列特異的結合を基本とするアンチジーン法も遺伝子発現の根本に作用する手法として発展が期待されている²⁾ (Fig. 1)。デコイ,^{3,4)} siRNA⁵⁾などはより効率的な阻害活性が実現できるものとして最近特に関心を集めている。

我々が本稿のタイトルとした研究は、ゲノム関連のバイオテクノロジーの急速な発展の中で、将来の治療法への展開に対して化学者が成しえる貢献とは何かということを常に念頭に置いて行ってきたものである。我々のグループではいくつかのアプローチの共通目標として、生体内で1塩基変異のような極

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

e-mail: sasaki@phar.kyushu-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

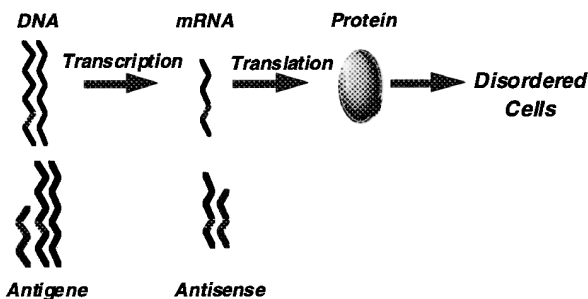


Fig. 1. Genetic Processes of Diseases and New Therapeutic Approaches

小の違いを正確に認識し選択的な反応を実現するための機能性認識分子の創造を目指している。本稿では、我々の研究課題の中で、(1)配列及び塩基特異的な反応剤の開発、及び(2)非天然型3本鎖DNAの配列特異的形成に関する研究成果を紹介する。

2. DNA 及び RNA に対する選択的化学反应剤の開発

我々の1つのアプローチではオリゴヌクレオチドに反応性官能基を導入し、配列特異的かつ塩基特異的にDNAあるいはRNAに化学反応を起こすことを検討している。抗腫瘍活性天然物などにはDNAとの反応を主な作用機構としているものがあるが、配列特異性は高くなく、副作用の原因ともなっている。そこで、DNA配列を認識できるオリゴヌクレオチドに反応基を導入することは、配列特異的な反応を実現するための極めて有効な戦略である。反応により標的位置と共有結合を形成させることができれば、阻害の特異性と効率の大幅な改善が期待できる。また、最近このような共有結合形成部分が変異を誘起することが報告されており、⁶⁻¹²⁾ 阻害法としてだけでなく遺伝子機能改変技術に発展できる可能性が考えられている (Fig. 2)。

2-1. 従来の問題点 これまで共有結合形成(クロスリンク)分子として、アジリジン、^{13,14)} ハロアセチル基¹⁵⁾などの反応性分子が種々検討されている。¹⁶⁾ しかし実用化されているのはチミンに対する光架橋分子であるソラーレンだけであり、その他の塩基選択性及び効率を満足するクロスリンク剤はほとんど報告例がない。これまでの反応剤の問題点を整理すると、(1)認識部分と反応部分が別々であるため、高い特異性を実現できなかった、(2)高いクロスリンク効率を得るために、反応性の高い官能基を

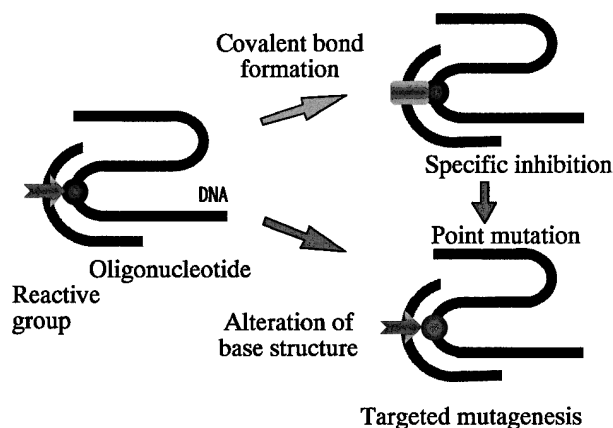


Fig. 2. Application of Reactive Oligonucleotides

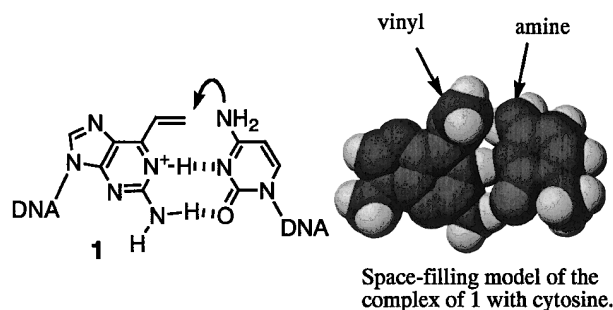


Fig. 3. Design of 2-Amino-6-Vinylpurine for Selective Alkylation with Cytidine

用いるため、水中で不安定となり使用条件が限られたものとなった、(3)用いる官能基が高反応性であったため、オリゴヌクレオチドに自由に導入することが困難であった、などがあげられる。以下に述べるように、我々の分子設計は、これらの問題点を解決できるように工夫したものである。¹⁶⁾

2-2. 分子軌道計算に基づく分子設計 我々の戦略では、次の3項目に留意し問題点の解決を計画した。すなわち、(1)近接効果による高い反応性の実現、(2)反応部位と認識部位を同一分子に組み込むこと、さらに(3)生体内の安定性を確保するために、安定前駆体からの高い反応性基の2本鎖内での自動活性化機構の設計である。最初に、特定の位置のシチジンに対して反応する分子として2-amino-6-vinylpurine (1)を設計した。1はプロトン化した状態で、Fig. 3に示すようにシチジンと天然のG-C類似の錯体を形成し、アミノ基とビニル基反応点同士が接近することで反応が選択的にかつ効率よく進行すると予想した。この分子設計は半経験的分子軌道計算

MOPAC (PM3) に基づいて支持された, 2-amino-6-vinylpurine とシチジンとの錯体内反応を用いて予測した結果, 遷移状態の活性化エネルギーは約 23 kcal/mol であり, 室温で十分に進行することが示唆された (Fig. 4).^{17,18)} さらに基底状態, 遷移状態及び生成物の構造が天然の G-C pair と類似の構造をとっており, 2-amino-6-vinylpurine はシチジンとの反応に preorganize された構造であることが示された. また, 反応性部位であるビニル基に種々の置換基を導入することにより反応の活性化エネルギーを調節できる可能性も示唆された.¹⁸⁾ 我々は核酸塩基の反応性に関してはまったく経験的知識がないままに本研究を開始したが, MOPAC による反応性予測の手法とそれによって示された 2-amino-6-vinylpurine (**1**) の反応性調節の可能性は研究の遂行に大きな助けとなった.

2-3. 標的部位でのみ高い反応性を発現するためのシンクロナイゼーション活性化概念の提案 2-amino-6-vinylpurine は有機溶媒中のモデル反応で

はアミンやチオールなどの求核剤に高い反応性を示すことが分かった.¹⁷⁾ しかし, このことは生体内での利用を念頭に置いた場合, 生体内に存在する多くの求核剤と非選択的に反応する危険性を示すものであった. そこで, 反応性ビニル基を標的部位に到達するまで安定な構造として保護しておき, 反応部位に到達した時のみ活性化するための新しい方策を立案した.¹⁹⁾ すなわち, ビニル基の安定前駆体としてフェニルスルフィドあるいはフェニルスルフォキシド体を用いれば, 2本鎖形成後活性化を受け反応性の高いビニル基を再生し, 効率のよいクロスリンク剤として機能すると考えた (Fig. 5). 以下これらの合成及びその反応性の評価について述べる.

2-4. 2-Amino-6-Vinylpurine 誘導体 (1**) の合成** **1** は未知化合物であったため, 合成法を種々検討したところ, 非常に効率的で簡便な方法を開発することができた (Scheme 1).^{17,18)} すなわち, 保護デオキシグアノシン誘導体のトシル体, 0 価のパラジウム触媒及びリチウムクロライド存在下ビニルトリ

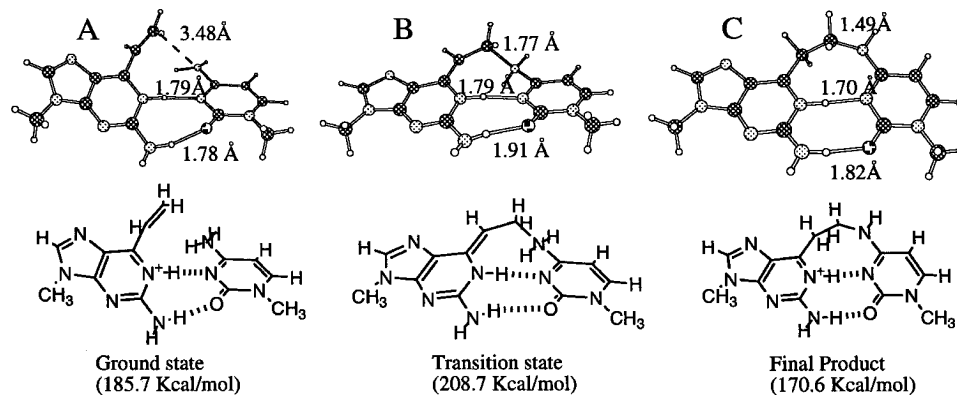


Fig. 4. Calculated Structure and Heat of Formation (MOPAC6, PM3) of the Ground State (A), the Transition State (B) and the Final Product (C) of Cross-Linking with **1**

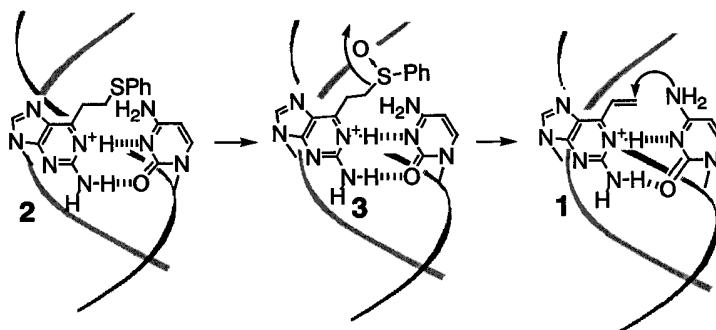
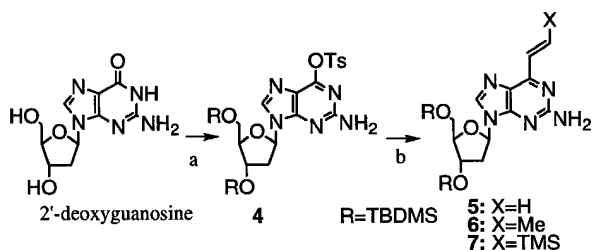


Fig. 5. Synchronous Activation of the Precursors within Duplex



Scheme 1. Synthesis of 2-Amino-6-Vinylpurine Nucleoside Derivatives

a) (i) TBDMSCl, (ii) TsCl, b) $n\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{CH}=\text{CH}-\text{X})$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$.

ブチルすずを用いたクロスカップリング反応により効率的に **1** を得ることができた。我々とほぼ同時にクロル体²⁰⁾を基質とした方法が報告されたが、我々の方法はトシル体を基質として用いるものであり、基質の合成も簡便であり合成収率も高くプリン骨格6位への炭素官能基導入反応として一般的で有用な反応である。さらにこの反応により置換基を有するビニル誘導体 (**6**, **7**) を合成した。

2-4. 2-Amino-6-Vinylpurine 誘導体 (1) の有機溶媒中でのモデルクロスリンク反応 糖部分を保護した4種の塩基 (A, G, T, C) とビニル体 (**5**) を用いて有機溶媒中での反応性の評価を行った。その結果ビニル体はクロホルム中酸触媒下シチジン、グアノシンと反応し、Fig. 6 に示す付加体を与えることが分かった。^{17,18)}

2-5. 2-Amino-6-Vinylpurine 誘導体 (1) を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成 2-amino-6-vinylpurine 誘導体 (**1**) を DNA 合成機により DNA に組み込むため、まずビニル基をスルフィド基で保護した後、定法によりホスホロアミダイト前駆体へと変換した。これを DNA 自動合成装置に導入し、スルフィド体を含むオリゴマー DNA (**9**) を合成した (Scheme 2)。単離精製したスルフィド体 DNA を MMPP (magnesium monoperoxyphthalate) により酸化しスルフォキシド体に変換し、引き続き溶液をアルカリ性にするすることで、非常に効率よくビニル体を得ることができた。それぞれのオリゴマー DNA は HPLC でほぼ単一のピークを示す化合物として得ることができ、構造は MALDI TOF-MASS 及び NMR により決定した。¹⁹⁾

2-6. 2本鎖 DNA 形成をトリガーとするシンクロナイゼーション活性化によるクロスリンク反応 反応性オリゴマーとして、スルフィド体 (**9**)、スル

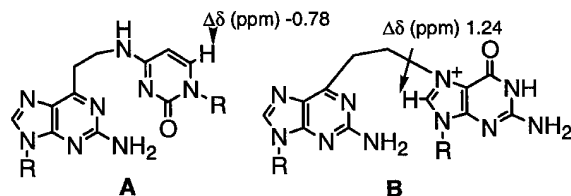
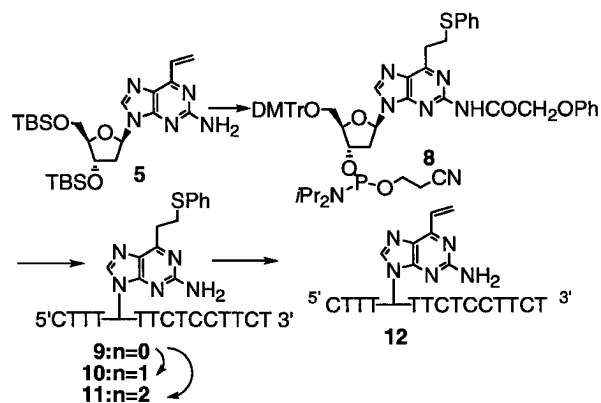


Fig. 6. Structure of the Adduct Formed between 2-Amino-6-Vinylpurine and Cytidine (A) and Guanosine (B)

Selected chemical shift changes that indicate the above structure are indicated.



Scheme 2. Synthesis of Oligonucleotides Incorporating 6-Substituted 2-Aminopurine Nucleoside

フォキシド体 (**10**)、スルフォン体 (**11**) 及びビニル体 (**12**) を含むオリゴマーを用い、その相補的な位置にシチジンを含む標的 DNA との反応性を比較した。クロスリンク付加体は、5'末端を³²P 標識した標的 DNA トレーサーが、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、低移動度のバンドに変化することで検出した。その結果、Fig. 7A に示すように、いずれのオリゴマーでも付加体由来のバンドが観測された。Figure 7B には電気泳動図から求めた付加体の収率の時間経過をまとめてあるが、4つの反応性オリゴマーのうちスルフォキシド体が最も効率よく反応していることが分かった。興味深いことに非常に安定なスルフィド体も反応収率時間経過とともに付加体の生成量が増加していることが分かった。ビニル体以外の反応基はモノマーでは全く反応性を示さず安定であるため、この結果はこれらの官能基が2本鎖 DNA 形成を引き金として活性化され、高い反応性が誘起されていることが明らかに示されている。この結果により標的近傍でのみ高い反応性をえるための「シンクロナイゼーション活性化」

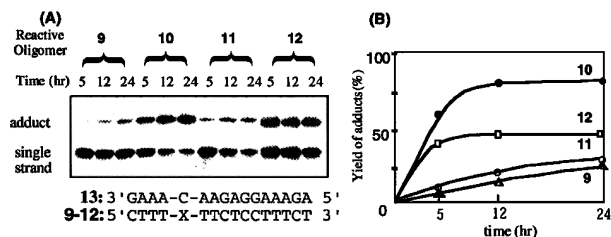


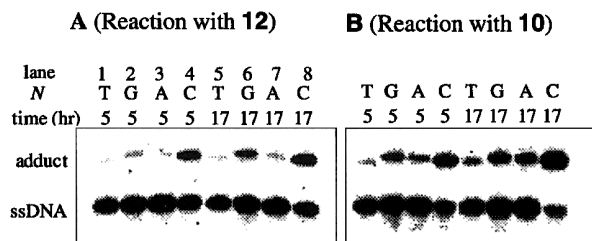
Fig. 7. Comparison of the Cross-Linking Reactivity

The reaction was done using 7 μ M ODNs (9, 10, 11, or 12), 3 μ M target oligomer including 13 labeled with 32 P at 5' end as a tracer in 0.1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 5.0, 33 $^{\circ}$ C.

概念の有効性が確認された。

ビニル体及びスルフォキサイドを含むオリゴマー DNA を用いて塩基選択性を調べたところ、シチジンに対して非常に選択的であることが分かった (Fig. 8)。さらに位置選択性を調べるために、シチジンの位置を 1 塩基ずつらした標的配列に対するクロスリンク反応を検討したところ、1 塩基ずれた標的にはほとんど反応せず、これらの分子が位置選択性も極めて高い分子であることが明らかになった (Fig. 9)。以上のようにスルフォキサイド体、ビニル体は酸性条件下、標的シチジンに対して高効率で高選択的な反応性を有することが分かった。

2-7. シンクロナイゼーション活性化を受ける安定なクロスリンク剤の検索²¹⁾ Figure 7B の結果から安定なスルフィド体も 2 本鎖内で活性化を受けていることが分かったので、さらにより 2 本鎖内で活性化されやすい安定なスルフィド構造の検索を行った。この活性化には芳香環上の置換基が影響を与えるとの予想をもとに、種々の置換基を含むフェニルスルフィド体を合成した。これらのスルフィド体を含むオリゴマーを前述と同様の方法でクロスリンク反応を行い、そのクロスリンク収率を比較した (Table 1)。その結果、電子吸引基を導入すると反応収率が低下し、電子供与基の導入により反応収率が向上することが分かった。また検討した誘導体のうち、2 位カルボキシル置換体が非常に高い収率で付加体を与えることが分かった。この反応性分子を含むオリゴヌクレオチドは 1 本鎖では非常に安定であり、相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを加えることでのみ活性化され効率的に反応が進行することから、従来には全く例のない機能であると言える。



13 (N=T, G, A, C) 3' GAAA-N-AAGAGGAAAGA 5'
10, 12 5' CTTT-X-TTCTCCTTTCT 3'

Fig. 8. Comparison of the Base Selectivity

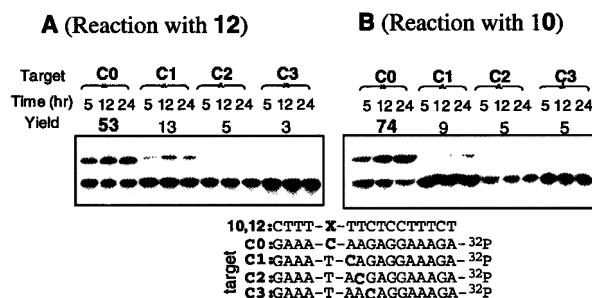


Fig. 9. Comparison of the Site-Selectivity

Table 1. Relationship between the Substituent on the Aromatic Ring and the Cross-Linking Yield

X	*yield (%)	Category
4-NO ₂	9	electron withdrawing
4-Br	14	
4-H	25	electron donating
4-OH	30	
4-NH ₂	44	
2,4-Me ₂	28	
3,4-(MeO) ₂	37	
2,4,6-Me ₃	42	
3-SO ₃ ⁻	45	
2-COOH	60	

*3 μ M Target and 7 μ M reactive oligomer were used, and yield was determined by gel electrophoresis at 24 hr.

2-8. シンクロナイゼーション活性化機構の考察
我々はスルフォキサイド体、2 位カルボキシル置換フェニルスルフィド体がいずれも活性化を受け、ビニル体を經由してクロスリンク反応が起こっていると考えている。このことは、これらのクロスリンク生成物を酵素加水分解し得られた付加体を構造決定したところ、3 種類の化合物から同一の付加体が得られた実験事実によっても支持されている。2 位カル

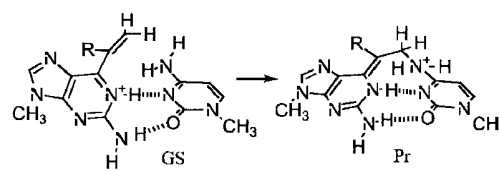
ボキシル置換フェニルスルフィド体が2本鎖内で活性化される機構は、Fig. 10に示すような2本鎖DNA内での錯体構造において、カルボキシル基によるイオウ原子のプロトネーションと塩基としてのシトシアミノ基のpush-pullの触媒的役割によってビニル体が再生されることによって反応が進行したと考えている。1本鎖の時にはスルフィド部位が自由に回転できるためこのような活性化が起こらず安定であると考えている。

2-9. 中性条件化での効率的クロスリンク反応の実現²²⁾ フェニルスルフィド及びフェニルスルフォキシド誘導体は安定であり、なおかつ効率的・選択的クロスリンク反応を実現した。しかしこれらは酸性条件でのみ反応性を示すという欠点があった。そこで、中性条件でも反応する分子としてビニル基に電子吸引基であるスルフォキシド基を導入した**14**を新しい反応基として設計した。電子吸引性のスルフォキシド基を導入したビニル体とシチジンとの反応の活性化エネルギーをMOPAC (PM3)により評価したところ、無置換のものに比べ活性化エネルギーの大幅な低下が予測された。クロスリンク反応のpH依存性から予測された本反応に関わるプロトネーションは約pKa 6であることから、中性条件下プロトン化の比率が低下しても、速やかな反応の進行が期待された (Table 2)。

合成はScheme 3に示すようにまずジスルフィド体を合成しオリゴマーDNAに組み込み、アルカリ処理、引き続き酸化することでビニルスルフォキシド体を含むオリゴマーの合成を行った。これらのオリゴマーを用い中性条件において前述と同様の方法で反応性を評価した。ダブル活性化前駆体から得られる活性本体であるスルフォキシビニル体の反応性

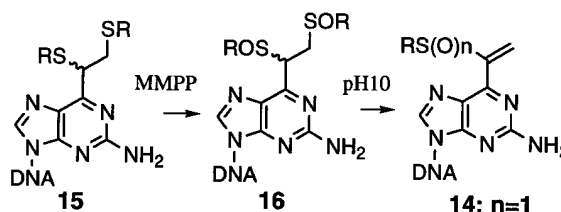
をFig. 11Aに示している。この結果から明らかのように、中性条件下でもビニルスルフォキシド体(**14**)は非常に効率よく反応が進行していることが分かる。酸性条件下反応性の高かったスルフォキシド体(**10**)は中性条件下ではほとんど反応しない。またビニルスルフォキシド体(**14**)はシチジンに対する選択性も非常に高いことが分かった (Fig. 11B)。現在、効率的にビニルスルフォキシド体を発生できるダブル活性化前駆体を検索しており、中性条件下で安定性と高い反応性を兼ね備えたクロス

Table 2. Estimated Heat of Formation (kcal/mol)*



R	GS	TS	ΔG^\ddagger	Pr
H	185.7	208.7	23.0	205.4
SOMe	159.2	177.7	18.5	174.5
SMe	186.3	210.4	24.1	189.3
SO ₂ Me	123.0	141.70	18.7	140.1

*MOPAC96(PM3). GS:ground state, TS: transition state, Pr: product. Structures of ground state and product of the complex are schematically shown.



Scheme 3. *In situ* Activation to Sulfonylvinyl Derivative (**14**)

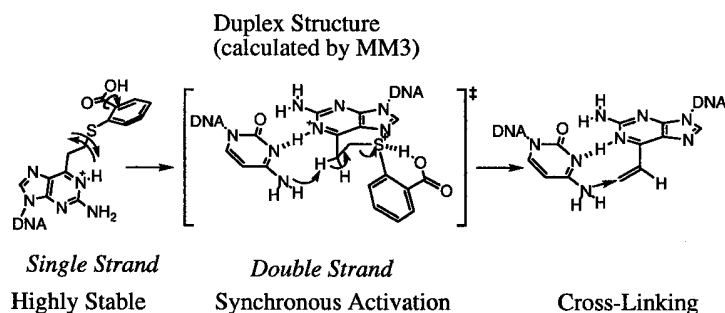


Fig. 10. Plausible Mechanism of the Synchronous Activation

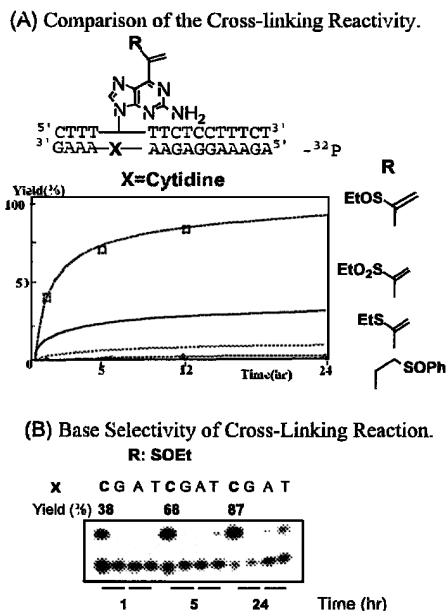


Fig. 11. Cross-Linking Reaction under the Neutral Condition
Electrophoresis: 19% denaturing polyacrylamide gel, Cross-Linking: 10 μ M Reactive ODN, 1 μ M target oligomer, Buffer: 100 mM NaCl, 50 mM MES, pH 7.0, 37°C.

リンク分子を開発し、生体への応用研究への展開を検討中である。

2-10. 3本鎖形成クロスリンク反応への展開^{23,24)}
前項までに1本鎖DNAを標的として精密にコントロールした効率的な反応を起こす分子を開発できたので、次に2本鎖DNAを標的として反応する分子の開発に着手した。2本鎖DNAでは、塩基の求核反応点はDNA主溝の底に位置しており、反応そのものが2本鎖内での反応よりも困難である。そこで我々は3本鎖内反応の設計に当たり、塩基対の動的な運動に着目した。つまり、塩基対が一時的に解離して外に出ている塩基を反応標的とすることにし、2-amino-6-vinylpurine 塩基部分を糖からアルキルスペーサーで連結することにした。分子モデリングでの考察によりスペーサー長が炭素4個の場合には外に出てきているシトシンとの反応に相応しいものと設計した。後述するように、スペーサー長が炭素2個の場合には外にでてきたアデニンと反応することが分かった。すなわち、2-amino-6-vinylpurine 基本構造をスペーサーで連結し、反応標的は3本鎖から遠くのピリミジン鎖にあるシチジンあるいはアデニンに選択的に反応できる分子として **23**, **24** の分子を設計した (Fig. 12)。

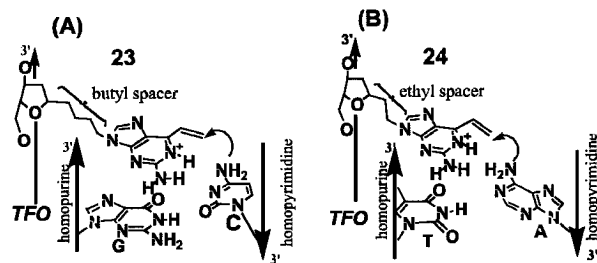
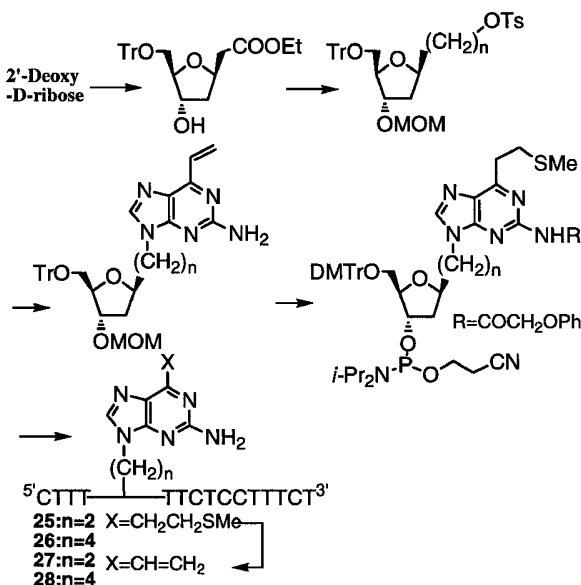


Fig. 12. Design of **23** and **24** to Achieve Selective Reaction to the Flipping Bases within the Triplex



Scheme 4. Synthesis of the Spacer-Linked Cross-Linking Agents

それぞれの反応分子を含む合成は Scheme 4 に示す方法で行った。2'-デオキシリボースをトリチル基で保護したのち、我々が独自に見出した β 選択的な Wittig-Honor-Emmons 反応²⁵⁾ によりエステル体を合成し、炭素鎖伸張及び2-アミノクロロプリンとのカップリング、さらにビニル化、保護、脱保護さらに定法によりアミダイト体を合成し、DNA自動合成装置によりDNAオリゴマーに組み込んだ。引き続き、酸化、脱離反応によりビニル体を含むオリゴマーの合成を行った。クロスリンク反応は、ホモプリン-ホモピリミジン配列を含む2本鎖に対してピリミジン鎖からなる3本目のDNAとの間にparallel 3本鎖(3-1参照)を形成させて行った。2本鎖を構成するDNA鎖として別々に³²Pで標識した標的オリゴマーをトレーサーに用いること

によって反応した鎖が区別できるようにした。その結果、Fig. 13A に示しているように、ブチル Spacer をもつビニル体 (28) では、8 種類の塩基の組み合わせのうちピリミジン鎖に含まれるシチジンに対してのみ選択的に反応していることが分かった。一方、エチル Spacer をもつビニル体 (27) では、ピリミジン鎖に含まれるアデニンに対してのみ付加体得られており、選択性が大きく変化していることが明らかとなった (Fig. 13B)。本反応は通常 3 本鎖形成が不安定化される T-A サイトに対して進行しており mismatches サイトにおいて 3 本鎖の安定化も可能になると期待される。このようにアルキル鎖の長さをかえるだけで塩基に対する選択性が劇的に変化することは、基本構造であるこの構造がフリッピングしているシチジンあるいはアデニンに対して厳密な錯体構造を形成したときのみ反応することを示唆するものであり、さらに構造最適化により反応性の向上を実現できると考えられる。現在、ダブル活性化構造を用いて、中性条件下でのクロスリンク反応について検討中である。

2-11. 2 本鎖及び 3 本鎖形成クロスリンク反応の展望 以上我々は 2 本鎖及び 3 本鎖形成を経由して選択的かつ効率的に反応する分子の開発に成功した。2 本鎖クロスリンク分子はアンチセンス法の中で、効率的な阻害剤としての利用を検討中である。また 3 本鎖形成クロスリンク反応は、モデル実験系ながら反応点に特異的に点変異を誘起することを見出した。²⁶⁾ 特異的で高効率のクロスリンク反応は

DNA 及び RNA オリゴマーを基本とする様々な技術への応用の可能性があり現在検討を続けている。このように、Fig. 2 で示した我々の当初の目的のための基本的な機能分子を創造することができた。

生体内では反応場に種々の反応活性種が存在するため、化学反応を選択的にかつ効率的に行うことは一般的には困難である。したがって、本研究の成果は生体のように多種多様の反応剤が存在する場における化学反応の制御という点で、有機化学の新しい方向を拓くものになると考えている。本研究の鍵となった分子設計の考え方は、選択性及び効率性の実現するための近接効果の活用及び安定性を兼備させるためのシンクロナイゼーション活性化の概念である。現在この概念を発展させて、生体内で特定の塩基構造を変化させることのできる機能分子の開発に取り組んでいる。

3. 2 本鎖 DNA 配列認識のための人工認識分子の開発

本来的に多様な異常遺伝子に基づく病気の克服には、それぞれの遺伝子の特異的に阻害できる方法、さらに新たに明らかにされる異常遺伝子にも迅速に対応できる方法が理想的と考えられる。このような治療法になり得る有力候補として、2 本鎖 DNA 配列そのものを標的にする「アンチジーン法」の展開が期待されている (Fig. 1)。現在、アンチジーン法のために (1)副溝結合分子を用いる方法、(2)3 本鎖 DNA 形成を基本とする方法の 2 種類が試みられている。これらの手法はそれぞれ問題点を抱えており、我々はこれらの解決のために検討を続けている。最近 3 本鎖 DNA 形成反応において有用な認識分子を開発することができたので以下の項ではこの成果について紹介する。

3-1. 3 本鎖 DNA 形成の問題点と従来の取り組み 3 本鎖 DNA は、2 本鎖 DNA の主溝において 3 本目の DNA あるいは RNA 鎖が結合して形成される。この結合力は Watson-Crick 塩基対に対して 3 番目の塩基が結合する水素結合力とスタッキング相互作用からもたらされると考えられている。既に多くの実験によって配列特異的な転写阻害や活性化が可能なが示され、新しい遺伝子発現制御法としての発展が望まれている。3 本鎖 DNA は片方の鎖がグアノシン (G) とアデノシン (A) (ホモプリン鎖) からなり、もう 1 方の鎖がシチジン (C)

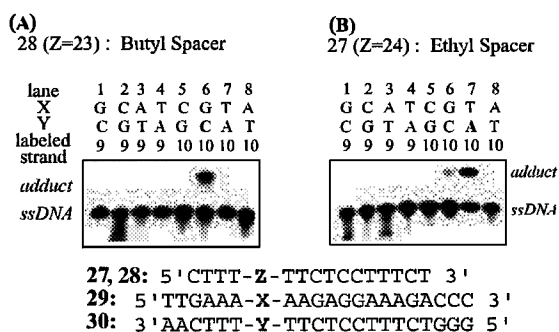


Fig. 13. Cross-Linking Selectivity with the TFO 27 and 28
 A with 28 (Z=23), B with 27 (Z=24). The reaction was done using 10 μ M of TFO, 1 μ M of target duplex 29-30 in a buffer including 10 mM cacodylate, 0.25 mM spermine, 100 mM NaCl, pH 4.5 \pm 0.3 at 30°C. The reaction mixture contained either 5'-³²P-labeled 29 or 30 as a tracer. The reaction was stopped by the addition of formamide after 20 hrs, and analyzed by gel electrophoresis with 15% denaturing polyacrylamide gel.

とチミジン (T) (ホモピリミジン鎖) で構成される 2 本鎖 DNA に対してのみ形成されるという本質的な制限があり, この障害の克服が最大の課題となっている.²⁾

3 本鎖 DNA には 2 種類のジオメトリーがある. (1) 平行型 (parallel) 3 本鎖と呼ばれるものでは, 3 本目の DNA 鎖はピリミジン塩基で構成され, 結合している 2 本鎖のプリン鎖とはリン酸結合が同じ方向である. (2) 逆平行型 (antiparallel) 3 本鎖と呼ばれるものでは, 3 本目の DNA 鎖は G の多いプリン塩基で構成され, 結合する 2 本鎖のプリン鎖とはリン酸結合が逆方向となっている. どちらのジオメトリーでも 3 本目の DNA の塩基が 2 本鎖のプリン塩基と相補的な Hoogsteen 水素結合 (逆平行型では逆 Hoogsteen 水素結合) することが安定化の重要な要因となっている (Fig. 14). 一方, 2 本鎖のプリン塩基がピリミジン塩基になっている場合, 天然塩基では (逆) Hoogsteen 水素結合を形成できず, 3 本鎖の安定性が小さい. したがってプリン鎖中のピリミジン塩基部分は 3 本鎖形成を妨げる部分 (interrupting site) となる. これまで, interrupting site を安定化するために種々のアプローチが検討されてきたが, 平行型 3 本鎖 DNA の CG 塩基部分を安定化できる人工塩基が開発されたのは極めて最近のことである.²⁷⁻²⁹⁾ しかしながら, TA 塩基部分での安定化を含め, いまだこの問題は完全には解決されていない.

3-2. 分子力場計算による分子設計 我々は以前平行型 3 本鎖 DNA 構造に基づき, CG 塩基対と

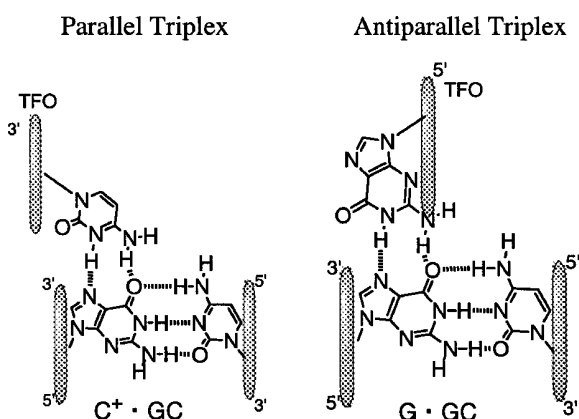


Fig. 14. Schematic Drawing of the Parallel and Antiparallel Triplexes

水素結合を形成できる認識分子を設計した (Fig. 15). この分子は有機溶媒中では目的の錯体を形成できたが, 3 本鎖 DNA 中の安定化を達成することができなかった.^{30,31)} この研究を踏まえて, 分子設計の基本方針を変更することにした. 最も大きな点は目標とする 3 本鎖構造を平行型 3 本鎖から逆平行型に変更した点である. Figure 14 に模式的に示してあるように 3 本目の DNA は, 平行型 3 本鎖では比較的にプリン鎖に近く, 逆平行型では主溝の中央付近に位置している. 平行型 3 本鎖内で反対側の DNA 鎖のプリン塩基を認識するためには芳香族化合物を利用した拡張塩基構造かあるいは長いスペーサーの導入が必要となっていた. 最近報告された平行型 3 本鎖で CG 塩基対を認識する人工塩基は, 遠い側のプリン塩基ではなく, 手前のピリミジン塩基と 1 個の水素結合を形成するように設計されている (Fig. 16A).²⁷⁻²⁹⁾ 一方, 逆平行型 3 本鎖の場合には, 3 本目 DNA が主溝の中央付近に位置するため, 立体化学を天然と逆配置にすることで遠い側のプリン塩基と水素結合の形成が可能と予想される (Fig. 16B).

我々は逆平行型 3 本鎖の構造を基本に, 天然塩基とは逆の α 立体化学で塩基部分を導入することとした. さらに水素結合を遠い側のプリン塩基と形成させるために短いスペーサーで塩基部分と糖部分を連結することにした (Fig. 17A).³²⁻³⁴⁾ スペーサー部分のコンフォメーションの自由度を制限するために 5 員環構造を構築し (Fig. 17B), さらにベンゼン環を天然塩基と同じ立体化学の部分に導入し 3 本鎖のスタッキング相互作用の連続性を維持することを期待した (Fig. 17C). 分子動力学計算ではベンゼン環が 3 本鎖 DNA の塩基に挟まれスタッキング相互作用に寄与し得ることが示唆された (Fig.

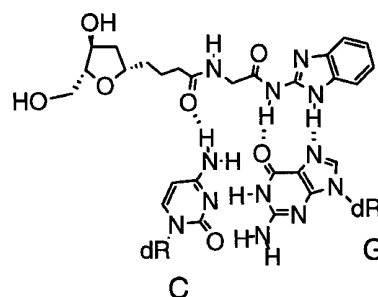


Fig. 15. Speculative Structure of the BIG-CG Base Triplet

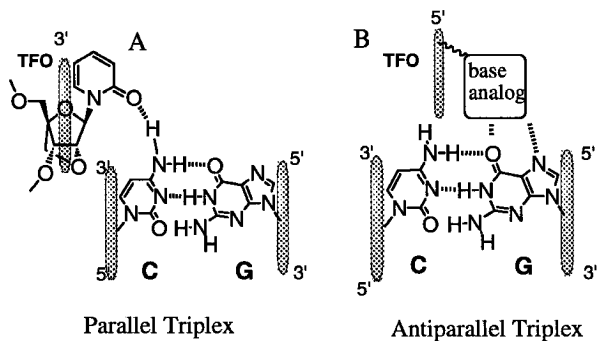


Fig. 16. Comparison of Hydrogen Bondings in the Hypothetical Structure of Parallel and Antiparallel Triplex

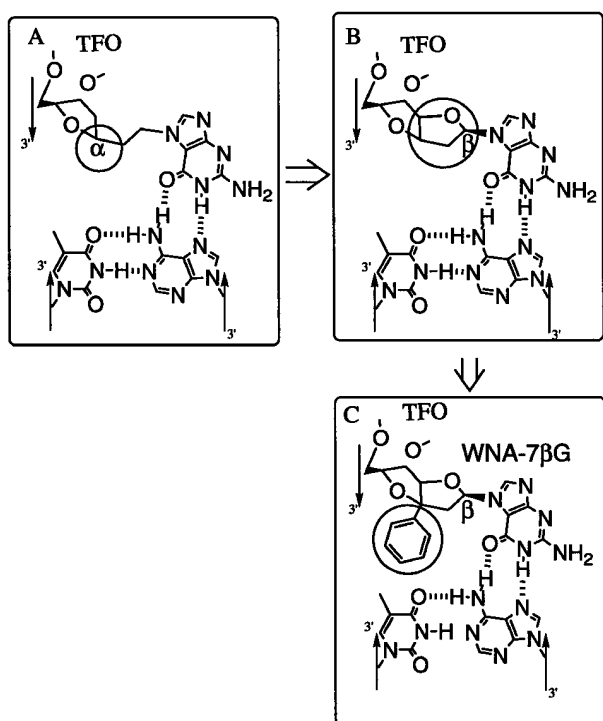


Fig. 17. Design of the New Base Analog (WNA-7βG) and the Plausible Base Triplet Structure with a TA Base Pair

A: Base connected with a short spacer. B: Five membered ring to fix the spacer conformation. C: Addition of benzen ring to maintain stacking interaction.

18). この新規人工塩基をその形から WNA (w-shape nucleic acid) と命名したが, Fig. 17 に示してある WNA-7βG は, グアニン 7 位と β- グリコシド結合で連結していることを表している. この塩基の構造上の特徴はピシクロ骨格を基本に塩基及びその立体化学, ベンゼン環部分を変化させることによって容易に構造多様性が得られることであり, 構造の最適化にも適している.

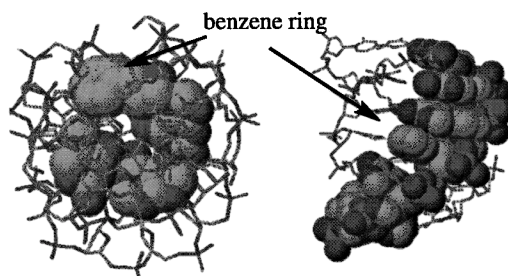
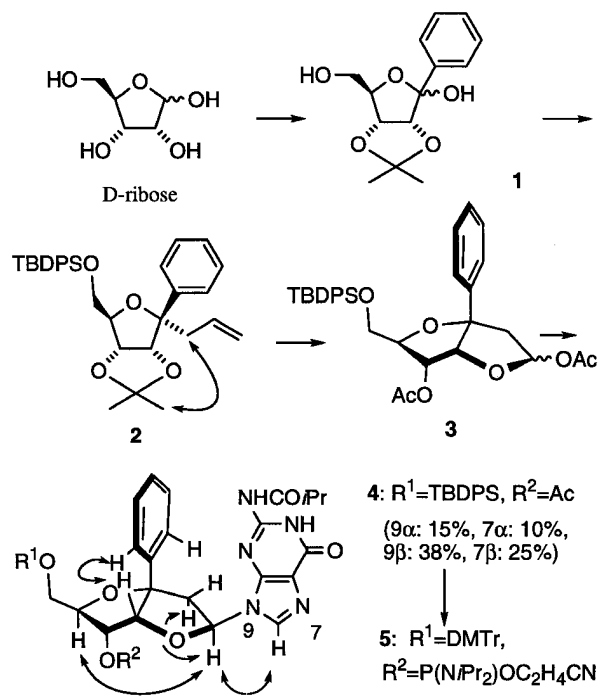


Fig. 18. MM Simulation of Antiparallel Triplex Containing WNA-7βG

It is shown that the benzene ring may play a role for stacking interaction.



Scheme 5. Synthesis of the WNA Derivatives

3-3. 人工認識分子の合成と DNA への導入

設計分子の合成は D-ribose から始め, ベンゼン環及びスパーサー部分の導入, 5 員環の構築を経て酸触媒により塩基部分を結合した. 最終生成物は可能なすべての異性体の混合物として得られたためすべて単離し, 2 次元 NMR スペクトルによって構造を決定した (Scheme 5). 引き続き DNA 合成用のホスホロアミダイト前駆体に誘導し, グアニンを多く含むホモプリン鎖の 3 本鎖形成オリゴヌクレオチドに導入した. 新規のピシクロ型塩基合成経路を活用し, これまで種々の誘導体を合成しホモプリン DNA に導入することができた.

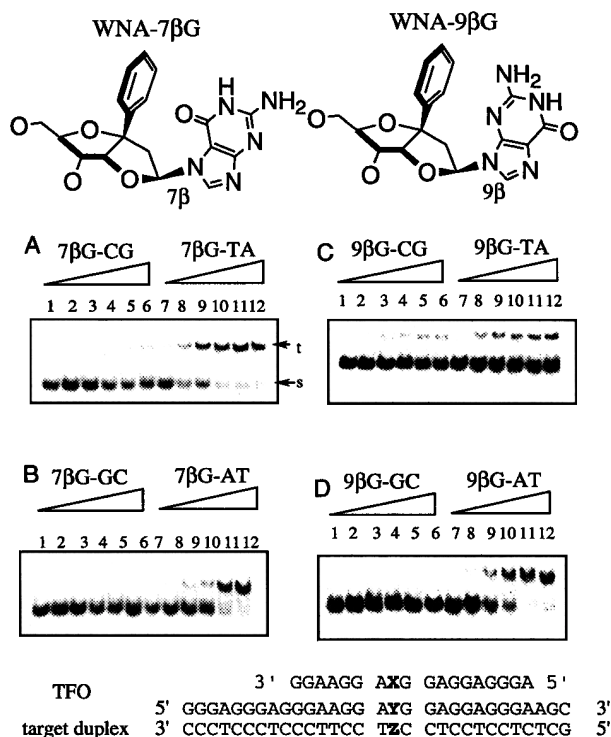


Fig. 19. Gel Shift Assay for Determination of Triplex Formation

Triplex formation was done for 12 hrs at 22°C in the buffer containing 20 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine and 10% sucrose at pH 7.5. Electrophoresis was done at 10°C with 15% non-denatured polyacrylamide gel. A-D: 10 nM TFO containing the ³²P-labeled one as the tracer was used. The concentration of duplex was increased from lane 1 to 12 (nM); 10, 20, 40, 60, 80, 100, 10, 20, 40, 60, 80, 100. The combination of X-Y-Z is shown such as 7βG-CG.

3-4. 3本鎖形成反応 3本鎖形成反応は30塩基対のホモプリン-ホモピリミジン2本鎖を標的として、人工塩基を組み込んだホモプリン鎖 (TFO) を用いて行った。3本鎖形成により³²P-標識TFOトレーサーが未変性ゲル上での移動度の遅いバンドを与えるので、このバンドを定量し3本鎖の安定性を評価した。Figure 19にはWNA-7βG及びWNA-9βGの結果をまとめてあるが、WNA-9βGがAT部分に対して3本鎖を形成するのにに対してWNA-7βGは選択的にTA部分を安定化しているのが明らかに示されている。Figure 20には立体化学の異性体を用いた結果をまとめてあるが、非常に興味深いことにWNA-9αGはTA塩基対に対してより高い親和性を示し、WNA-7αGは選択性は顕著ではないもののCG塩基対に対して高い親和性を示した。

現在、塩基部分にグアニン以外の塩基を導入した化合物及びベンゼン環部分を変化させたものなど種

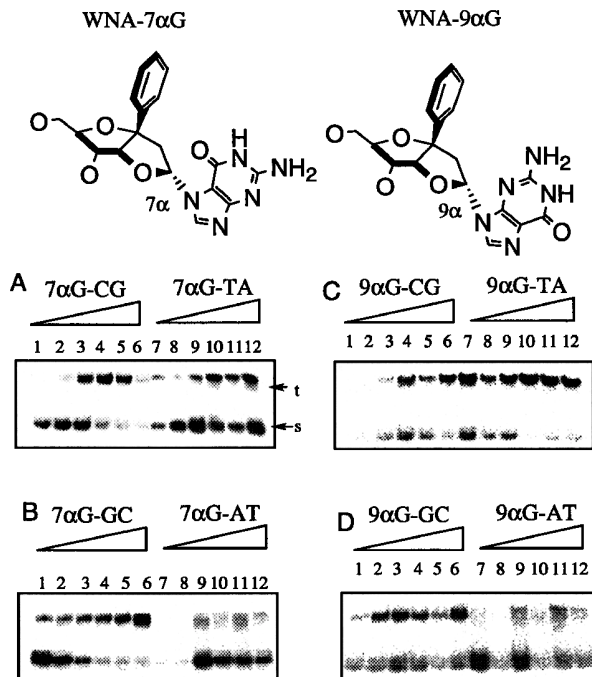


Fig. 20. Gel Shift Assay for Determination of Triplex Formation with WNA-7αG or WNA-9αG

See notes of Fig. 19.

々の誘導体を合成し、その中にWNA-7βGあるいはWNA-9αGよりも高い親和性及び選択性でTA-interrupting siteを安定化できる分子を見出すことに成功している。³⁴⁾このようにWNA分子は、構造の最適化により一層の認識機能の改善が可能と考えており、この分子を新しい出発点として一般的な配列での3本鎖形成の実現に向けた努力を継続している。

4. おわりに

ゲノムサイエンスは現在急速に発展しているが、このような新しい知識が創薬や治療法などに具体的に結びつくには、これまでと同様に地道な努力の継続が必要であることには変わりがない。アンチセンス、アンチジーンあるいは最近特に注目されているsiRNAなどオリゴ核酸を利用する手法は、原理的には遺伝子配列を直接標的にできるため、予防、診断及び治療などにおける幅広い発展が期待されている。我々の研究室では遺伝子を標的にする手法の特徴を活かすため、点変異認識を確実にする特異的の化学反応に着目してきた。また天然塩基では認識できない遺伝子配列の標的化に挑戦し、解決の糸口を見つけることができた。

オリゴ核酸はポストゲノムシーケンス時代の創薬（ゲノム創薬）の有力候補であるものの、大きな発展のためには生体内での利用効率が極めて低いという本質的な欠点がある。最近、このような課題克服を目指して精力的な研究が行われており、オリゴ核酸の医薬品としての利用研究は一気に加速するようなブレイクスルーがもたらされることが期待される。我々は、オリゴ核酸に化学的高度機能を付与し、生体内の遺伝子発現機構に対して作用し、阻害、活性化、改変あるいは修復などを実現しようとしており、オリゴ核酸の将来像の中で重要な役割を果たし得るものと考えている。

本稿では記述できなかったが、遺伝子配列の人工分子による認識はDNA副溝結合分子によっても可能である。DNA副溝結合分子はオリゴヌクレオチドよりも低分子量、低極性化合物であり、ヌクレオゾームDNAへの接近が容易であるなどの利点を有しているため、遺伝子を標的とするための有力な候補の1つである。我々はこのようなDNA副溝結合分子の利点を活かした新しいアンチジーン法の開拓研究も継続している。

謝辞 本研究は九州大学大学院薬学研究科及び薬学研究院（放射性薬品化学講座、組織変更後病態分子認識化学分野）において、ここ10年間に達成されたもので、終始暖かく見守って頂きました前田稔教授に深く感謝いたします。また、研究室の原田平輝志助手（現放医研）、山本文彦助手のご協力に深く感謝致します。

第2項の研究は、永次史博士をリーダーとして、歴代の大学院学生諸氏（上村、河崎、臼井、徳田、Monsur Md Ali、松山（故）、曾我、末永）の努力の結果であり、ここで改めて深く感謝します。第3項の研究では、現在の大学院学生（山内、高橋、谷口、児玉、川后）だけではなく、困難なテーマに共に挑戦した初期の学生諸氏（中島、松浦、屋敷）にも深く感謝しています。また、本研究は研究室に在籍したすべての学生諸氏との相互作用の成果と考えており、合わせて感謝いたします。

この研究は文部（科学）省科学研究費、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業などの助成を受けて行ったものでありその資金援助に深く感謝します。

私は、平成14年度から新設の研究室（九州大学大学院薬学研究院生物有機合成化学分野）に場所を変え、本稿で述べた研究のさらなる発展に向け努力を継続しながら、生命にアプローチする合成化学的研究を遂行し、新しい時代の創薬への貢献を目指しています。今後ともより一層のご支援を賜りますよう、心より願ひ申し上げます。

REFERENCES

- 1) Hogrefe R. I., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, **9**, 351 (1999).
- 2) Soyfer V. N., Potaman V. N., "Triple-Helical Nucleic Acids," Springer-Berlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1996.
- 3) Bielinska A., Shivdasani R. A., Zhang L. Q., Nabel G. J., *Science*, **250**, (4983) 997 (1990).
- 4) Morishita R., Gibbons G. H., Horiuchi M., Ellison K. E., Nakama M., Zhang L., Kaneda Y., Ogihara T., Dzau V. J., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 5855 (1995).
- 5) A recent review: Fjose A., Ellingsen S., Wargelius A., Seo H. C., *Biotechnology Annual Review*, **7**, 31 (2001).
- 6) Chan P. P., Lin M., Faruqi A. F., Powell J., Seidman M. M., Glazer P. M., *J. Biol. Chem.*, **274**, 11541 (1999).
- 7) Vasquez K. M., Narayanan L., Glazer P. M., *Science*, **290**, 530 (2000).
- 8) Thuong N. T., Hélène C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 666 (1993).
- 9) Wang Z., Rana T. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 6688 (1997).
- 10) Praseuth D., Guieysse A. L., Hélène C., *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure & Expression*, **1489**, 181 (1999).
- 11) Faria M., Wood C. D., Perrouault L., Nelson J. S., Winter A., White M. R. H., Hélène C., Giovannangeli C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 3862 (2000).
- 12) Majumdar A., Khorlin A., Dyatkina N., Lin F. L. M., Powell J., Liu J., Fei Z. Z., Khripine Y., Watanabe K. A., George J., Glazer P. M., Seidman M. M., *Nature Genetics*, **20**, 212 (1998).
- 13) A recent article, Reed M. W., Wald W., Meyer R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9729 (1998).
- 14) Belousov E. S., Afonina I. A., Podyminogin

- M. A., Gamper H. B., Reed M. W., Wydro R. M., Meyer R. B., *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3440 (1997).
- 15) An example: Cowart M., Benkovic S. J., *Biochemistry*, **30**, 788–796 (1991).
- 16) A review: Sasaki S., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 43 (2001).
- 17) Nagatsugi F., Uemura K., Nakashima S., Maeda M., Sasaki S., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 421 (1995).
- 18) Nagatsugi F., Uemura K., Nakashima S., Maeda M., Sasaki S., *Tetrahedron*, **53**, 3035 (1997).
- 19) Nagatsugi F., Kawasaki T., Usui D., Maeda M., Sasaki S., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6753 (1999).
- 20) Gundersen L. L., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3155 (1994).
- 21) Kawasaki T., Nagatsugi F., Maeda M., Sasaki S., *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, **44**, 129 (2000) and unpublished data.
- 22) Nagatsugi F., Tokuda N., Maeda M., Sasaki S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2577 (2001).
- 23) Nagatsugi F., Usui D., Kawasaki T., Maeda M., Sasaki S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 343 (2001).
- 24) Nagatsugi F., Matsuyama Y., Maeda M., Sasaki S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 487 (2002).
- 25) Matsuura N., Yashiki Y., Nakashima S., Maeda M., Sasaki S., *Heterocycles*, **51**, 975 (1999).
- 26) Nagatsugi F., Sasaki S., Miller P. S., Seidman M. M., submitted.
- 27) Prevot-Halter I., Leumann C. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2657 (1999).
- 28) Obika S., Hari Y., Sugimoto T., Sekiguchi M., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 8923–8927 (2000).
- 29) Obika S., Hari Y., Sekiguchi M., Imanishi T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2079 (2001).
- 30) Nakashima S., Nagatsugi F., Tanaka Y., Hisatome M., Maeda M., Sasaki S., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 9521 (1995).
- 31) Nakashima S., Matsuura N., Nagatsugi F., Maeda M., Sasaki S., *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, **35**, 105 (1996).
- 32) Sasaki S., Yamauchi H., Nagatsugi F., Takahashi R., Taniguchi Y., Maeda M., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 6915 (2001).
- 33) Sasaki S., Yamauchi H., Takahashi R., Taniguchi Y., Minoru M., *Nucleic Acids Res.*, **44**, 23 (2001).
- 34) unpublished data.