

遺伝情報の自在な機能発現制御を目指して - 外部因子による核酸認識制御機能を有する 核酸モデル (PRNA) の設計・合成・機能 -

大阪大学大学院工学研究科 分子化学専攻 和田 健彦

E-Mail : hiko@chem.eng.osaka-u.ac.jp

2001年2月にヒトの遺伝子配列のドラフトシーケンスが報告され、いよいよ個人のDNA配列から薬の効き易さ・副作用の強弱などを予想し、その予想に基づいた医療、いわゆるオーダーメイド医療が夢物語ではない状況となってきた。このヒトゲノム計画に代表されるように人間の遺伝的疾患の原因遺伝子の解明やガンを始め様々な疾病の原因遺伝子あるいは関連遺伝子の探索、またウイルス性疾患の発現機構解明のための遺伝子解析などが精力的に行われ、現在多くの病気の遺伝子的原因が明らかにされてきている。それに伴って、遺伝性疾患やウイルス病、ガンなどに対する新しい治療法として遺伝子治療法が大きな期待を集めている。遺伝性疾患とは遺伝子の異常に関連する病気の総称で、ダウン症などの染色体異常、血友病や色盲などの単一遺伝子障害、そして成人病やガンなどの多因子障害が知られている。現在遺伝子治療のターゲットとしては単一遺伝子障害が最も有望視されている。

実際、正式な手続きを経た最初の遺伝子治療は1990年アメリカ国立衛生研究所 (NIH) でアデニンデアミナーゼ (ADA) 欠損症の患者に対して行われた。この治療法は患者のリンパ球 (T細胞) を取り出し細胞外で培養し増殖させ、患者に欠損して

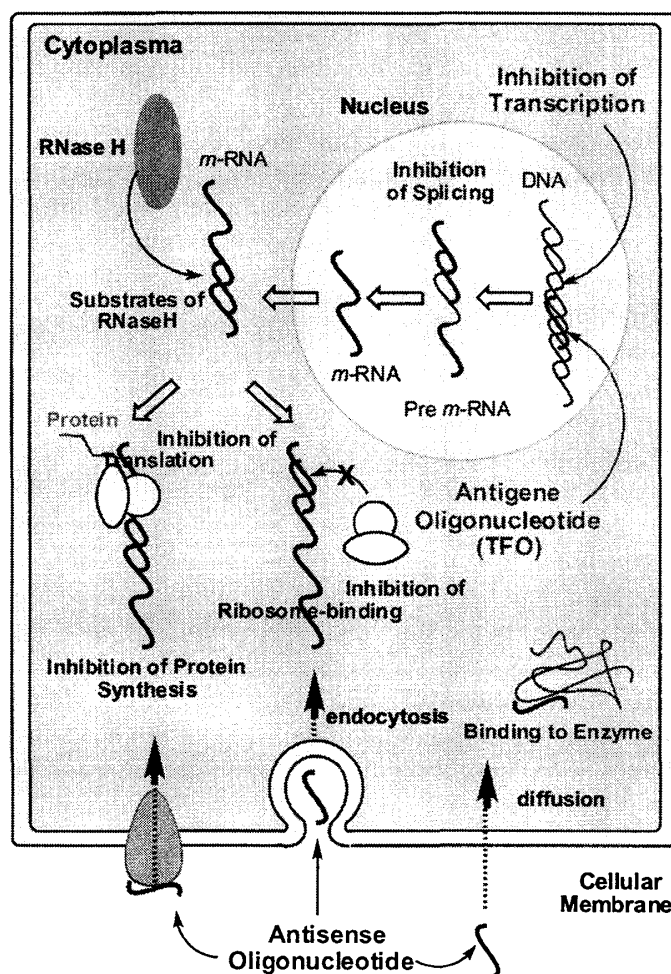


Fig. 1 Typical Antisense RNA and Antisense Strategy.

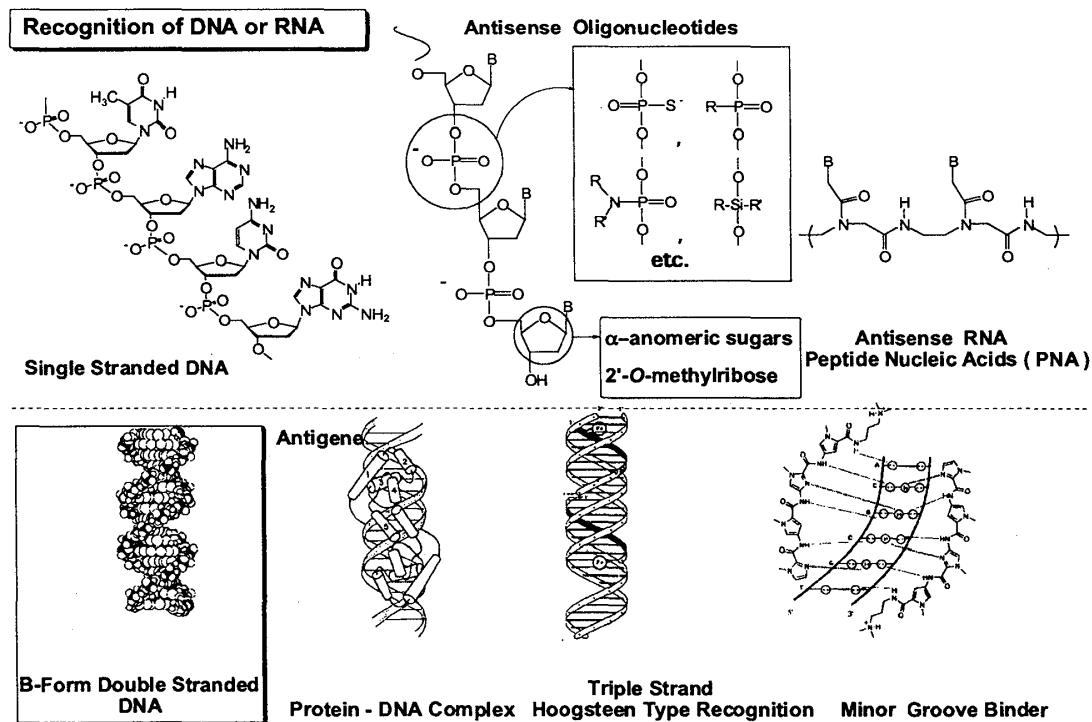


Fig. 2 Typical Antisense RNA and Antigenic molecules.

いるADA遺伝子を組み込んだベクターを感染させることによりADA遺伝子をリンパ球遺伝子に導入する。このT細胞は、患者に点滴により戻され患者の体内でもADAを合成することが出来、一定の成果を納めた。しかしこの療法にもいくつか欠陥があり、そのひとつはリンパ球に寿命があり、ある一定期間後に繰り返しADA遺伝子導入リンパ球の点滴を必要とする点である。このように患者の遺伝子に欠陥あるいは欠損した遺伝子配列を人為的に導入する遺伝子導入法は、遺伝子導入を体内で行う体内法と、ADA欠損症と同様に体外で行う体外法に二分され医学・生化学者により精力的に研究されている。

遺伝子治療にはこのような遺伝子導入法他に、疾病の原因細胞に特有のタンパク質合成やガン細胞などの増幅に不可欠なタンパク質合成を、mRNAの段階で外部から核酸誘導体を加えることにより抑制するアンチセンスRNA法や、より根本的に標的タンパク質のコード領域遺伝子すなわち二重らせんDNAに塩基特異的に結合する核酸誘導体を加えることにより、転写段階を阻害しようとするアンチジーン核酸法が検討されている。アンチジーン核酸法は大きくアンチセンス法に含まれることも多い。アンチセンス法は、1970年代後半にオリゴヌクレオチドや修飾オリゴヌクレオチドを用いた検討によりその有用性が証明され、さらにエイズウイルスに対する興味深い結果も報告されたことから今日では医学分野への応用はもちろん、分子生物学の有効なツールとして広く検討されるようになってきている。これらアンチセンス法は核酸レベルでのタンパク質合成抑制を目的としているため、遺伝子の複製・転写・翻訳のどの過程を阻害することも可能で(図1)、核酸に非常に高い特異性、特に塩基配列特異性と高い親和性を持って結合する化合物の開発が

必要となる。この点から化学者がアンチセンス法に貢献するためのテーマが数多く見受けられる。

アンチセンス分子に求められる性質は数多くあるが、①高い核酸塩基配列認識能 ②コンプレックスの高い安定性 ③化学的、特に酵素的な安定性 ④高い細胞膜透過性 ⑤核酸との特異的な相互作用性 などが重要である。当初用いられた天然型のオリゴヌクレオチドの場合①、②は比較的満足できるものの、生体内のヌクレアーゼなどにより即座に酵素分解されてしまい目的の成果が得られない。一方、今日アンチセンスRNA分子として最も広く用いられている化合物は、通常ホスホジエステル結合を有するオリゴヌクレオチドのリン酸基部の酸素原子を硫黄原子で置換したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (S-オリゴ) で、S-オリゴはヌクレアーゼに対して比較的強い抵抗性を示し③の条件は満足するものの、酸素原子を硫黄原子で置換したためリン酸基部に立体異性体が生じ、この異性体間で標的核酸に対する親和性が異なる。例えばn量体のS-オリゴを自動合成機で合成した場合、生成するS-オリゴは 2^{n-1} 個の異性体混合物となり、標的遺伝子への結合安定性は低下する。また、硫黄原子の疎水性のためS-オリゴの水に対する溶解性は通常オリゴヌクレオチドに比較して低下し、疎水性タンパク質などの疎水相互作用も強くなるなどの問題点も報告されている。しかし、現在の多くの研究はこのホスホロチオエート型オリゴマーを用いて行われており、アンチセンス配列を有するオリゴマーのみにアンチセンス効果が観測される報告も多く、その有効性は一般的にも認められている。しかし、このS-オリゴがアンチセンスRNA分子として最適の化合物とは言い難く、他の多くの化合物が設計・合成され、アンチセンス機能について検討されている。

現在報告されているアンチセンス分子としては図2に示すような、①リン酸基部を修飾した誘導体 ②リボース糖部のグリコシル結合あるいは水酸基を修飾した誘導体 ③塩基部を修飾した誘導体 ④糖-リン酸骨格以外の骨格構造を有する核酸モデル分子 などが研究されている。①についてはS-オリゴ以外にホスホロチオエート型、ホスホロアミデート型やメチルホスホネート型、さらにメチルホスホノチオエート型オリゴマーなどが研究されている。②としては通常ヌクレオシドが有する β -グリコシル結合とは逆の α -アノマーも合成され興味深い知見が得られている。また、糖3'-5'リン酸ジエステル結合をリボヌクレオシドを用いて2'-5'結合に変化させた誘導体は、インターフェロン処理細胞から得られる2'-5'ポリアデニル酸 (2', 5'-A) との関連からも興味深く、通常オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成能が異なることも見出されている。また糖-リン酸ジエステル結合以外を基本骨格とする④のタイプの核酸モデルも多数報告されているが、特にペプチド核酸とよばれるペプチド骨格を有する化合物が注目されている。ペプチド核酸 (PNA) は、核酸塩基を導入したアミノエチルグリシンをモノマーと

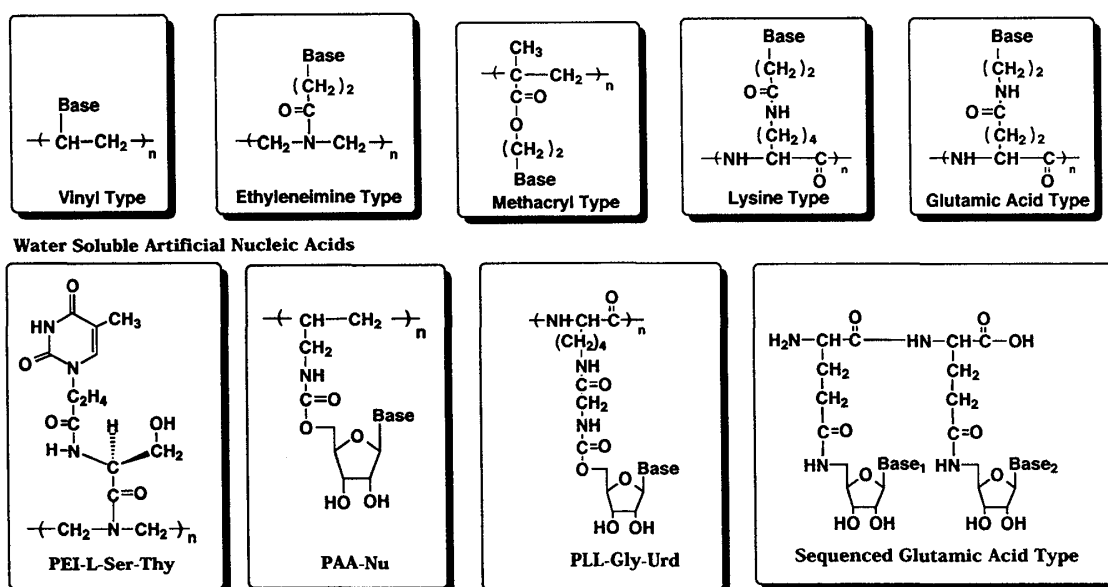


Fig. 3 Typical nucleic acid models.

し、アミド結合により縮合した核酸モデルで、相補的な塩基を有するDNA・RNAに対して天然核酸よりも非常に高い T_m を示し、さらにミスマッチとよばれる非相補的な塩基が一塩基導入されるだけで T_m は大きく低下し、非常に優れた塩基特異性を有する。さらに、ホモプリン・ホモピリミジン系二重らせんDNAに相補的なホモピリミジンPNAを加えると安定な3重らせんを形成するが、興味深いことにDNA二重らせんにPNAが割り込み安定な二重らせんを形成し、剥がされたDNAが3本目の鎖としてDNA-PNA二重鎖に巻き付いていることが明らかとされ、PNAのもつ高い可能性が注目されている。しかし、PNAは細胞内タンパクとの非特異的吸着、比較的水溶性に乏しいなどの問題を抱えており、分子構造に改良の余地を有すると考えられる。

このようにアンチセンス分子に関する研究は、化学者が分子生物学的な知識を学び、これまで化学の分野で広く展開されている分子認識化学の知見を基に精力的に研究を行っており、まさに新しいバイオテクノロジーの一分野といえる。

私はこのような化学者の立場からのアンチセンス分子開発、さらにそれらを通じて現在化学の分野で精力的に研究されている分子認識化学・構造-認識関連化学での新領域を、生化学の素材を用いて切り開こうと考えている。具体的には核酸の特異的認識を、核酸塩基等を認識部位とする図3に一例を示すような種々のモデル分子の設計・合成を行い、DNA・RNAとの相互作用について検討することにより、構造-分子認識関連の点から検討している。

さらに、これまで報告されている核酸モデルのほとんどは、ターゲット鎖とのコンプレックス形成による遺伝情報の発現抑制を目的とする。単純な抑制的制御ではなく、コンプレックス形成能自身の制御、すなわち認識能の自在な制御が可能になれば、抑制効果のみならず核酸の機能発現の積極的なコ

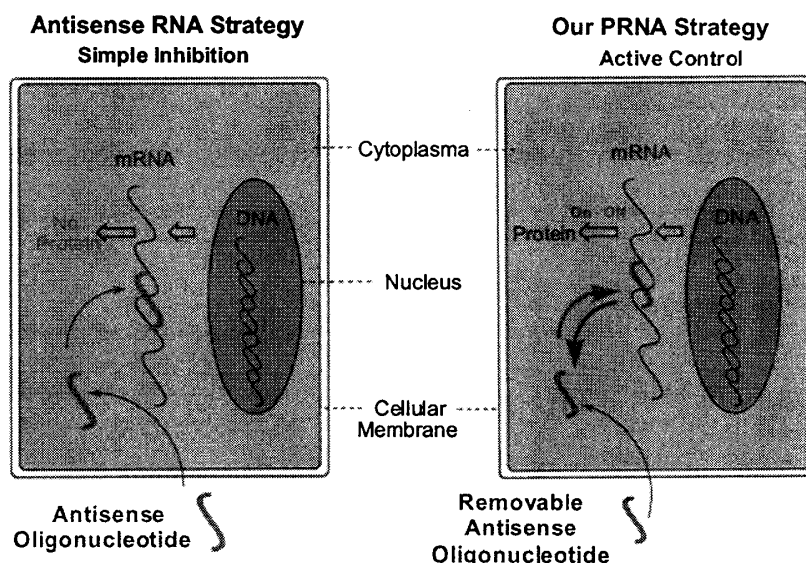


Fig. 4 Schematic drawing of antisense RNA strategy and PRNA strategy.

ントロールが可能になると考えられ、核酸認識分子の応用範囲がさらに広がることが期待される（図4）。

核酸の水素結合に基づく塩基対形成・認識過程においては塩基部の配向が重要であり、塩基配向は糖部のコンホメーションにより影響を受けることが知られている。すなわち、フラノース糖を有する核酸認識分子において、外部因子により糖部コンホメーション変化を誘起し、塩基部の配向制御が可能になれば、認識制御が期待できる。

これらの観点から、我々は外部因子による認識部位のコンホメーションならびに塩基部の配向の変化を検討し（図5）、RNAを認識部位として有する新規ペプチドリボ核酸（PRNA）の開発を行った。まず、外部因子による塩基部の配向制

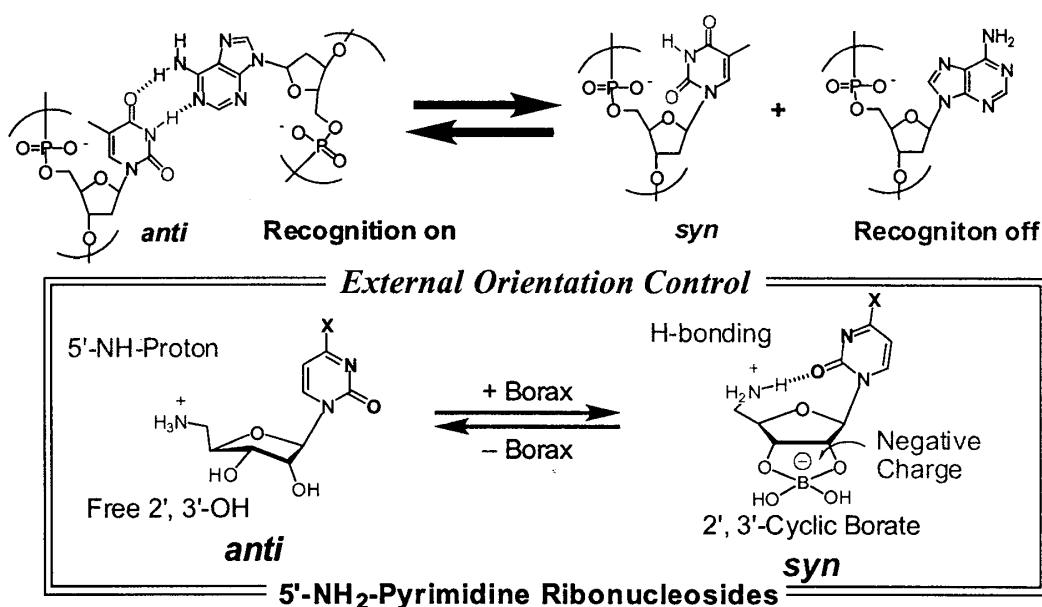


Fig. 5 Strategy for active control of nucleobase orientation by borates.

御が可能なヌクレオシド誘導体を探
索した結果について述べ、この知見
を基に設計・合成したPRNAの認識
能制御について述べる。

一般にピリミジンヌクレオシドの
塩基部は、溶液中でピリミジン塩基
部カルボニル基が糖部とが立体障害
を避けるため、逆の方向を向いた
*anti*配向を優先する。リボヌクレオ
シド糖部 2',3'-水酸基に架橋構造
を有する誘導体ではこのカルボニル
基と糖部との立体障害が減少し、
*syn/anti*比が増加していることが
報告されている。しかしこのよう
なヌクレオシド誘導体の場合、外
部因子による配向の可逆的な変化
を誘起することは困難である。外
部因子による *syn* 配向の誘起を達
成するため、(i) 塩基部2位カルボ
ニル酸素とフラノース部 5' 位水素
間の水素結合形成、(ii) フラノース
部 2',3'- *cis*- ジオールとホウ酸類
との架橋構造形成の共同効果の利
用に着目した。ホウ酸類は *cis*-
1,2- ジオールと水中で可逆的にエ
ステルを形成することが知られて
いる。リボヌクレオシドにおいて
も2',3'位に *cis*- ジオールを有し、ホ
ウ酸エステル形成による糖部コン
ホメーション変化に伴う塩基部の
配向変化が期待される。

この観点から 5' 位水酸基をアミ
ノ基に変換した 5'-アミノ-5'-デオ
キシリボヌクレオシド (5'-NH₂-
Urd) を合成し、塩基部配向を円二
色(CD) スペクトルならびに NMR
スペクトルにより検討した。5'-

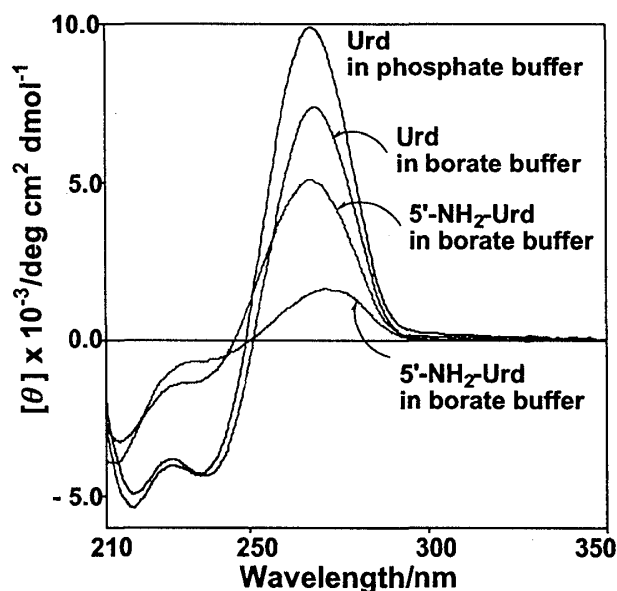


Fig. 6 CD spectra of Urd and 5'-NH₂-Urd in phosphate and borate buffer.

(a) Phosphate buffer

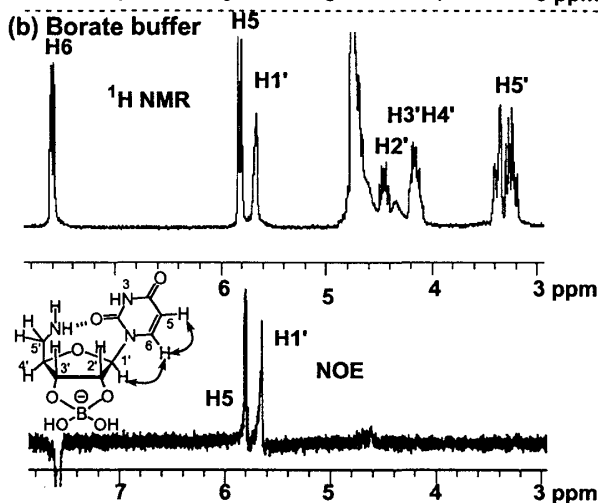
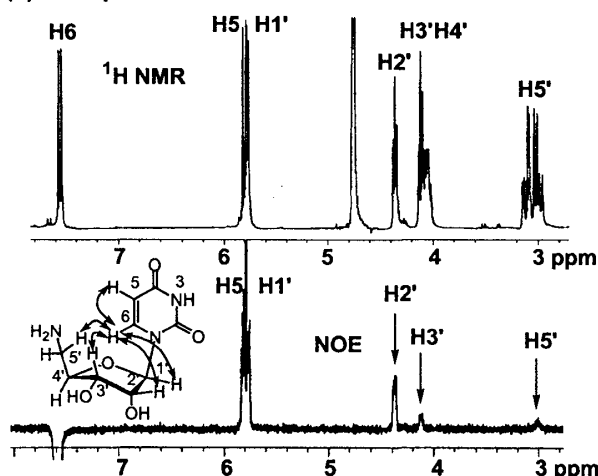


Fig. 7 ¹H NMR and NOE differential spectra of 5'-NH₂-Urd obtained with presaturation at H6 (δ7.6) in (a) phosphate buffer (pH7.2) and (b) borate buffer (pH 7.2).

NH₂-UrdのCDスペクトルをホウ酸緩衝液中で測定すると $[\theta]_{\max}$ 値は*anti*配向を示す9800から、*syn*配向に基づく1600にまで減少した(図6)。

すなわち、ホウ酸類による2',3'間の架橋構造形成、ならびに分子内水素結合形成の共同効果によりホウ酸を外部因子とする*syn*配向の誘起が達成されることが明らかになった。また、ホウ酸による5'-NH₂-Urdの*anti* - *syn* 配向変化はNMR NOE スペクトルからも確認された(図7)。すなわちリン酸緩衝液中でのピリミジン塩基部6位水素の照射により、塩基部5位水素・糖部1'位水素に加えて糖部2'、3'-そして5'-位水素にも核オーバーハウザー効果(NOE)に基づくピークが観測され、塩基部カルボニル部位が糖部の反対を向く*anti*配向が示唆されたのに対し、ホウ酸添加系では同じく塩基部6位水素照射より塩基部5位水素・糖部1'位水素にのみNOEピークが観測され、ホウ酸の添加により核酸塩基部が*anti*から*syn*に配向変化したことが示された。すなわち、5'-NH₂-Urdはホウ酸類を外部因子として塩基部配向制御可能な分子であることが明らかとなった。

また、同じくピリミジン塩基を有し5'-水酸基をアミノ基に変換した5'-アミノ-5'-デオキシシチジンにおいても同様にホウ酸類を外部因子として塩基部配向を*anti*↔*syn*に配向制御可能であることが示された。一方、2'位水酸基が存在しない5'-アミノチミジンや2位カルボニル基が存在しない5'-アミノリボアデノシンや5'-アミノイノシンではホウ酸添加に伴う塩基部配向は全く観測されず、非常に構造特異性の高い配向制御法であることが明らかとなった。図8に様々なヌクレオシド誘導体に対してホウ酸類による可逆的塩基部配向制御について検討した結果を示した。

これらの結果を踏まえ、5'-アミノリボヌクレオシドを導入した新しいカテゴ

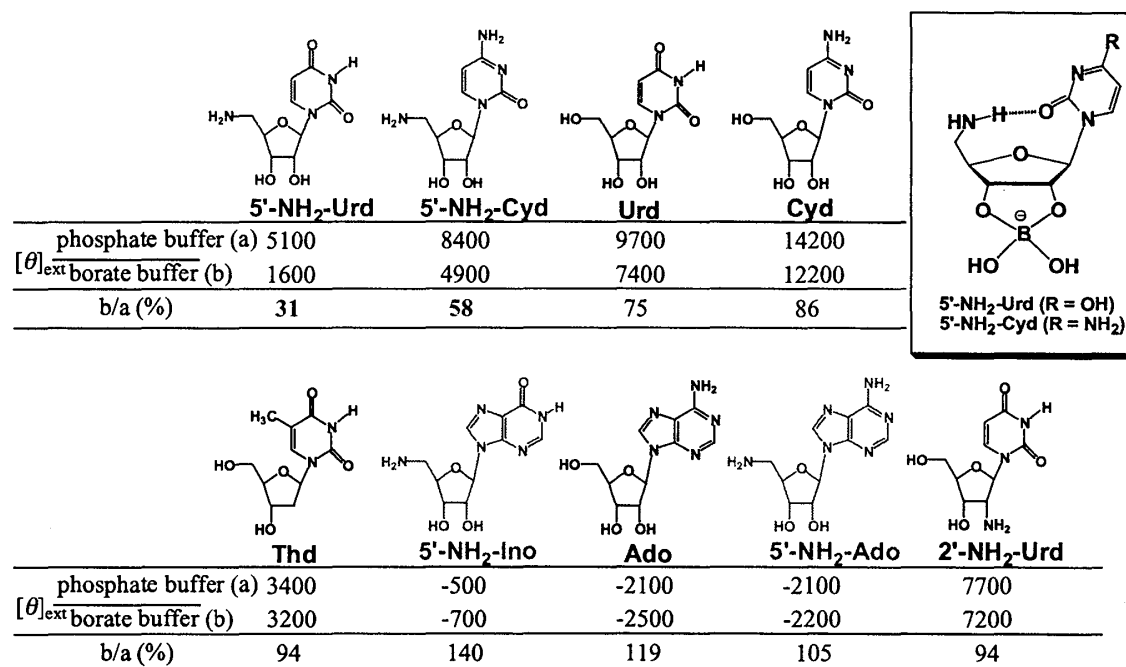


Fig. 8 CD spectral data of nucleoside derivatives.

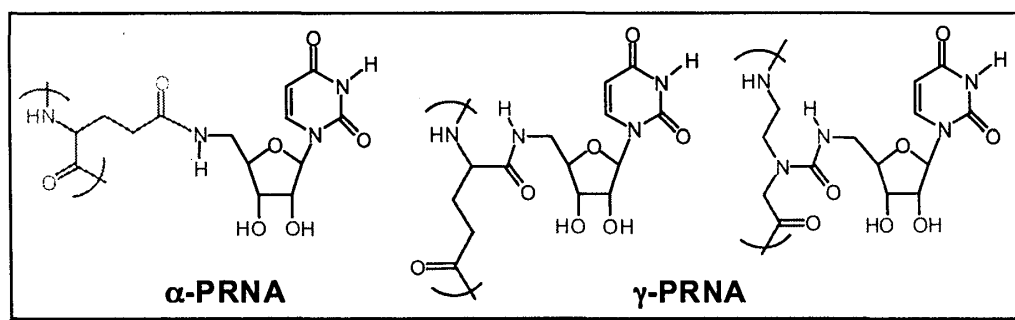


Fig. 9 Structures of PRNA's.

リーの核酸モデルとして、ペプチドリボ核酸(PRNA)を設計・合成した(図8)。ホウ酸類を外部因子とする5'-アミノピリミジンリボヌクレオシド塩基部配向の *anti* $\rightleftharpoons$ *syn* 配向制御を実現するために必要な構造条件として、①ホウ酸と可逆的にホウ酸エステルを形成するために必要な2',3'-*cis*-ジオール、②塩基部2位カルボニル基と水素結合形成可能な5'位水素結合供与基を有する必要がある。しかし、このような構造的必要条件は天然DNA・RNAでは当然満足されず、従来報告されている膨大な種類の核酸モデル化合物でも満足されない。そこで、①と②の条件を満足すると共に、様々な塩基配列を有するモデルが容易に合成可能であり、天然核酸と同程度の核酸塩基の繰り返し距離を有する核酸モデルとして γ -PRNAを設計・合成した。また、主鎖として α -Helix構造を持つことが期待される α -PRNAも合成した。

α -PRNA、 γ -PRNAいずれのモノマーにおいてもリン酸緩衝液中ではピリミジン塩基部は*anti*配向を優先するのに対し、ホウ酸添加に伴い*syn*配向優先に変化することがCD, ^1H -NMR NOE スペクトル検討により明らかとなった。

さらにFmoc保護PRNAモノマーを合成することにより、自動・半自動固相合成法への適用が可能となり、種々の配列を有するオリゴPRNAが簡便かつ高収率で合成可能となった。

ホウ酸類によるオリゴPRNAの*anti*-*syn*配向制御についてもCD, NMR-NOEを用いて検討した。図9に γ -PRNAのリン酸緩衝液にホウ砂を添加した系におけるCDスペクトル変化を示した。リン酸緩衝液中では

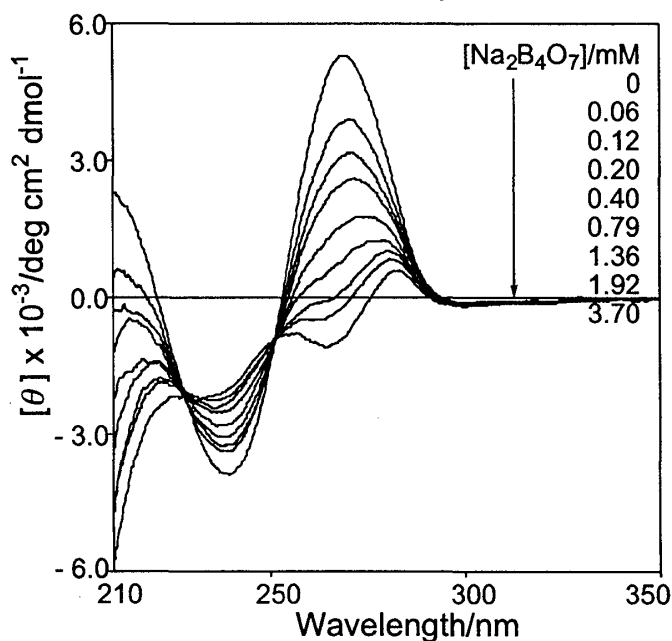


Fig. 10 CD spectra changes of $(\text{isoGln}(5'\text{U}))_8\text{-Lys}\cdot\text{HCl}$ with increasing concentrations of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ in phosphate buffer; [uracil base] = 1.0×10^{-4} M.

Table 1 T_m values of PRNA complexes with complementary DNA

γ -PRNA or Oligodeoxyribonucleotide	Complement	$T_m / ^\circ\text{C}$	
		Additive	
		None	20 mM Borax
NH ₂ -UUUUUUUU-Lys-OH	d(A) ₈	52.8	<0
(T) ₈	d(A) ₈	45.0	56.9
NH ₂ -UCUCUCUC-Lys-OH	d(GpApGpApGpApGpA)	49.2	<0
NH ₂ -UCUCUCUC-Lys-OH	d(ApGpApGpApGpApG)	41.6	<0

Solvent : Phosphate buffer (1/30 M KH₂PO₄ - 1/30 M Na₂HPO₄, pH 7.2)

anti 配向を優先することが示されたのに対し、ホウ砂を添加することにより PRNA モノマーや 5'-アミノピリミジンリボヌクレオシドより効率よく *syn* 配向が誘起されることが明らかとなった。この外部因子による塩基部配向変化は ¹H-NMR NOE スペクトルによっても確認され、PRNA は外部因子によって可逆的に塩基部配向制御が可能なのはじめての核酸モデルであることが示された。

最後に最も重要なターゲット DNA・RNA との錯形成挙動、錯体安定性、そして錯形成・解離制御能を検討するために相補的塩基配列を有するポリヌクレオチドを用いて、ホウ酸類添加に伴う錯形成・解離挙動について検討した。

PRNA オリゴマーは固相合成法を用いて得た。PRNA オリゴマーの塩基認識能を融解温度 (T_m) を指標として、相補的塩基配列を有する DNA を用いて検討した。各コンプレックスの塩基ユニット比は UV スペクトルの淡色効果の Job プロットから 1:1 であることが明らかとなった。また、非相補鎖との混合溶液では淡色効果、 T_m ともに観測されなかったことから、PRNA と DNA の錯体は核酸塩基間の特異的水素結合により形成されていることが明らかになった。ウリジン有する PRNA₈ 量体と d(A)₈ のリン酸緩衝液中における T_m 値は、DNA 錯体の T_m と比較すると 8°C 高い値を示し PRNA は天然核酸と比較してより安定な錯体を形成することがことが明らかになった (表 1)。また、Urd および Cyd を交互に有する PRNA の場合、アミノ末端と天然核酸の 3' 末端を同じ側に有する二重鎖がより安定に存在することが明らかになった。

一方、ホウ酸を添加すると PRNA と DNA の混合系ではどの系においても T_m および淡色効果は観測されなくなり、PRNA の塩基部が *syn* 配向を優先するため DNA との塩基対形成が困難になったためと考えられる。また、ホウ酸エステル形成にともなうホウ素上に生じる負電荷による両鎖の静電的な反発も塩基対解離

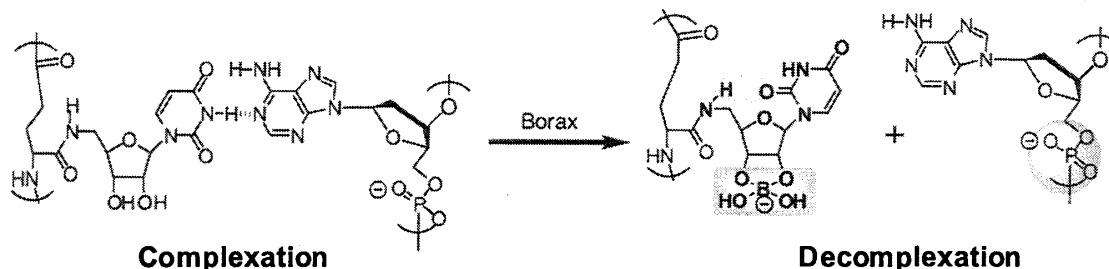


Fig. 11 Schematic drawing of on - off switching of complexation between PRNA and DNA by borax.

の要因として考えられる（図 10）。

以上のようにペプチドリボ核酸（PRNA）という新しいカテゴリーの分子を用いることにより、従来の単なる核酸の認識から一歩進んで、認識の外部因子による制御を行う新たな方法論を提案し、いくつかの具体例でその有効性を実証した。この方法論は一般性を有し、緒言で述べたように次世代の遺伝子治療用アンチセンス分子としてだけでなく、DNA チップなどの遺伝子診断薬や分子生物学への応用也大いに期待され、現在精力的に研究を展開している。

参考文献（抜粋）

1. T. Wada, N. Minamimoto, Y. Inaki, and Y. Inoue, *Chem Lett*, 1025 (1998).
2. T. Wada, N. Minamimoto, Y. Inaki, and Y. Inoue, *Nucleic Acids Res.Symp. Ser*, **39**, 29 (1998).
3. T. Wada, N. Minamimoto, H. Satoh, and Y. Inoue, *Nucleic Acids Res.Symp. Ser*, **42**, 145 (1999).
4. T. Wada, N. Minamimoto, Y. Inaki, and Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6900 (2000).
5. T. Wada, H. Sato, and Y. Inoue, *Nucleic Acids Res.Suppli.*, **45**, 229 (2001).
6. 和田健彦, 生体機能関連化学レター, 16 (3), (2001).
7. 「生命高分子化学入門」, 和田健彦共著, 講談社サイエンティフィック, 1999年4月
8. 「生命化学のニューセントラルドグマ」 和田健彦共著, 分担執筆, 杉本直己編, 化学同人(株), 2002年2月