

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14028

研究課題名(和文) D体核酸を鋳型にL体核酸を創製する非酵素的転写反応の開発

研究課題名(英文) Development of Non-Enzymatic Method to Translate D-Nucleic Acid to L-Nucleic Acid

研究代表者

谷口 透 (Taniguchi, Tohru)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：00587123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：鏡像の生命創製の第一歩として、また生分解性の低い核酸医薬の開発に資する研究として、本研究では酵素フリーの条件下でD体核酸をL体核酸に転写する反応の開発に向けた研究を行った。L体核酸のモノマーを有機合成によって入手する過程で、核酸塩基と糖の効率的なグリコシル化反応の開発、ならびに五員環糖の立体配置・立体配座のVCD(赤外円二色性)による簡便な構造決定法の開発に成功した。L体核酸モノマーを導入したオリゴヌクレオチドを固相合成によって入手し、D体オリゴヌクレオチドとの二本鎖の形成を確認したところ、L体メチルシチジンをを用いた配列において、D体-D体二本鎖と同程度の安定性が見られた。

研究成果の概要(英文)：Aiming both at creation of mirror-image life and at development of nucleic acid drugs resistant to nucleases, this work studied toward creation of non-enzymatic reaction to translate D-nucleic acid to L-nucleic acid. During the synthesis of L-nucleotide monomers, we succeeded in developing an efficient glycosidation reaction to connect a sugar and a nucleobase. We also established a new method to elucidate the configuration and conformation of furanoside and nucleoside by using vibrational circular dichroism. L-Nucleotides obtained in this study were submitted to solid-state synthesis, which yielded several oligonucleotides containing L-nucleotides. Oligonucleotides containing L-methylcytidines showed high stability when forming a duplex with D-oligonucleotides.

研究分野：生体関連化学

キーワード：鏡像体 核酸 構造解析

1. 研究開始当初の背景

生命を構成する分子は、核酸はD体、アミノ酸はL体というように単一のキラリティーで構成されている。科学者の究極の研究目標の一つとして、生命のホモキラリティーの起源の解明、ならびに鏡像の分子群の合成、そして最終的には鏡像の生命の創製が挙げられる。しかし、この中でも鏡像の生命についてはその困難さのために全く研究が進んでいない。鏡像体生命の創製は、ホモキラリティーの起源解明にも重要な知見を与えたと考えられる。

遺伝情報やリボザイム活性を持つRNAが生命の起源であるとするRNAワールド説に立脚すると、そのような配列情報を持つL体の核酸(天然体はD体核酸)を構築することができれば、自己複製可能な原始的な鏡像体人工生命となり得ると考えられる。従って、いかに効率的に特定配列を有するL体核酸を構築するかが鍵となる。そこで、既存のD体核酸をL体核酸に転写するのが効率的と考えられる。生命は元来、非酵素的に発生したはずであり、核酸を鋳型に娘鎖を伸長する非酵素的な反応が古くから研究されてきた。近年では、活性化されたリン酸結合を有する人工塩基を用いてD体核酸を非酵素的に複製させる方法論が、Szostakらによって開発が進んでいる。本方法によって生成する娘鎖は天然型核酸と同じ構造、あるいは非天然型核酸(XNA; xeno-nucleic acid)として得ることもできる。一方、類似の方法論を用いてD体核酸を鋳型とするL体核酸の伸長に成功した例は報告されてこなかった。

2. 研究の目的

L体核酸は核酸医薬品や生化学ツールとして期待されていることに加えて、生命起源解明の鍵として研究が盛んに行われている。RNAワールド説においては、原始地球における核酸のキラリティー選択がいかにして行われたか、という問いは生命起源研究にとって非常に重要な問題である。

SczepanskiとJoyceは、“自身の鏡像体となるRNA断片を合成するリボザイム”を創ることに成功した。この研究は、生命起源におけるキラリティー問題について、逆のキラリティーを持つ核酸同士が相互作用していた可能性がある、という新たな視点を提供した。Sczepanskiの研究では「リボザイム」と「鋳型とヌクレオチド」が逆のキラリティーを持つ系を構築した。そこで我々は、「鋳型」と「ヌクレオチド」が逆のキラリティーを有する系を着想し、D体核酸を鋳型にL体核酸が転写される系の構築に向けて研究を実施した。

また、L体核酸は生体内分解性が低いことから、L体核酸によるアプタマー(Spiegelmerなど)の開発が進んでいる。本研究で得られるL体核酸はD体核酸と二本鎖を形成すると期待されるため、L体アンチセンス薬のシ-

ズ開発への可能性も考慮し、D体核酸-L体核酸二本鎖の安定性と構造解析も行う。

3. 研究の方法

特殊修飾を有するL体核酸モノマーはほとんど市販されていないため、有機合成によって調達する。合成によって得られたL体モノマーを固相合成によりL体含有オリゴヌクレオチドへと伸長する。このようにして得たL体含有オリゴヌクレオチドとD体のみから成る天然型オリゴヌクレオチドによる二本鎖の安定性を、T_m測定によって明らかにするとともに、温度可変CD測定によって安定性と構造情報を得る。

以上の研究によって、D体オリゴヌクレオチドと安定に二本鎖を形成するL体含有オリゴヌクレオチドの配列を同定する。このような配列について、活性化されたリン酸基を有するL体ヌクレオチドを用いた、D体核酸配列の転写反応を試みる。

4. 研究成果

L体ヌクレオチドモノマーの合成にあたり、天然型(非修飾型L体ヌクレオチド)および非天然型(アミン置換型などの修飾型L体ヌクレオチド)をデザインした。自然界に存在するD体ヌクレオチドの合成と異なり、L体ヌクレオチドの合成においては、L-リボースやL-アラビノースのような単糖を出発原料として合成を行う必要がある。そこで、適宜誘導化を経た後に核酸塩基とグリコシル化し、各種のL体ヌクレオチドモノマーを得る計画を立てた。研究初期の段階で確立した、アミン置換型の修飾型L体ヌクレオチドの中間体入手するための合成経路を図1に示す。その他の各種合成検討の結果、新たな保護基を用いた効率的グリコシル化の開発などにも成功した(未発表)。

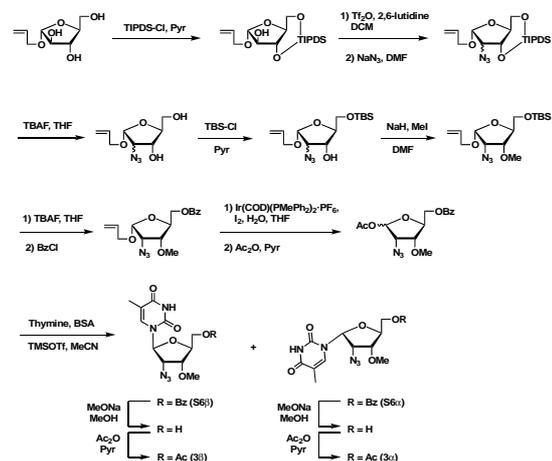


図1. アミン置換型L体ヌクレオチドの合成中間体の入手スキーム。置換基Rを活性型リン酸基に変換すると所望のヌクレオチドとなる。なお、固相合成に用いるL体ヌクレオチドの合成には別のスキームを用いる。

一方、グリコシル化によって得られた糖のアノマー位は もしくは のどちらかの立体配置を取りうる。また、五員環糖（フラノシド）の 2' 位や 3' 位の水酸基をアミンに変換する際にも、立体配置が反転または保持が起こる。五員環糖の化学において、これらの立体配置を簡便に帰属する方法論は欠如しており、本研究の進展の妨げとなった。

そこで、代表者が開発・応用してきた赤外円二色性（VCD）を利用して五員環糖の立体配置ならびに立体配座を溶液中で簡便に解析する手法の開発にも着手した。そこで、L 体ヌクレオシドのみならず、その合成中間体についても VCD で構造解析することとした。また、核酸医薬において重要な AZT（抗 HIV 薬）や 2'-フッ素化ヌクレオシド FANA についても、立体配置既知のモデル研究対象として VCD 構造解析を行った（図 2）。その結果、予想通りこれらの分子の立体配置・立体配座を簡便に決定できることが判明した（図 3）。VCD による構造決定は糖やヌクレオシド以外の五員環含有分子にも有効であり、Latanoprost などの医薬品の合成中間体モデルの研究にも用いられた（Chem. Eur. J. 印刷中。doi: 10.1002/chem.201800829）。

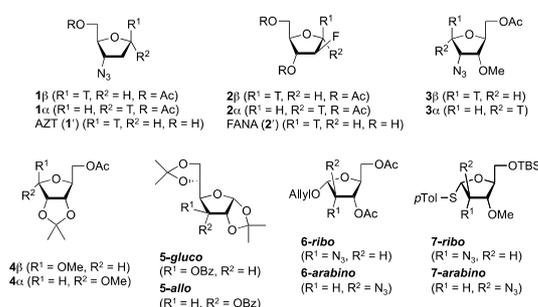


図 2. VCD 構造解析に用いた、五員環糖ならびにヌクレオシドの例

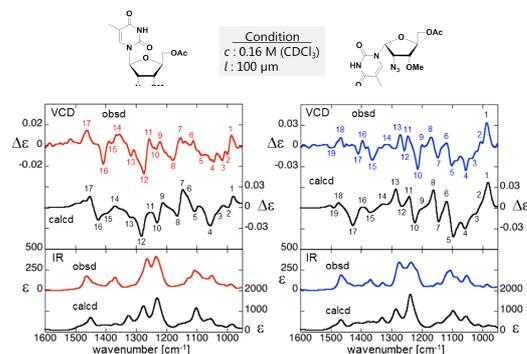


図 3. VCD を用いると、五員環糖の立体配置や立体配座を簡便に決定することができる。左の構造 () について理論計算した VCD スペクトルは、赤線の VCD スペクトルとよく一致する。すなわち、赤線のような VCD を示すサンプルが β 体であると結論できる。同様に、青線の VCD スペクトルを示すサンプルはアルファ体であると帰属できる。

効率的グリコシル化法の開発と、VCD による構造解析法の開発によって L 体ヌクレオチドモノマーを各種調製した。次に、得られた L 体ヌクレオチドをモノマーとして、固相合成によって L 体含有（全て L 体または D-L のキメラ配列）オリゴヌクレオチドを作成した。過去の研究より、L 体オリゴヌクレオチドは通常、D 体オリゴヌクレオチドと二本鎖を形成しないことが知られている。右巻きをとる D 体 DNA に対して二本鎖を形成されるためには、何らかの構造修飾を有する L 体 DNA をデザインし、両者の巻き方向を揃える必要がある。本研究では、主鎖構造（糖構造）の修飾、ならびに特殊塩基の利用の両者のアプローチをそれぞれ検討した。

二本鎖の形成においては、特殊塩基を有する L 体オリゴヌクレオチドを用いた場合に特に良好な結果を与えた。すなわち、メチルシチジン（エピゲノムでも重要な、生体内に存在する塩基）などを導入することで、より逆巻き螺旋を形成しやすくなった。これにより、本来左巻きである L 体オリゴヌクレオチドを右巻きに偏らせることに成功した。このような、L 体メチルシチジン含有配列は、D 体オリゴヌクレオチドと二本鎖を形成した。安定性の評価において、L 体メチルシチジンを、D 体メチルシチジンならびに L 体シチジンに置換した配列とも比較した結果、L 体メチルシチジンを含有する配列は D 体メチルシチジンに置換された配列と同程度の T_m を有することが明らかとなった。L 体含有配列の巨視的な構造については CD 解析によって左巻き B 型のようならせんであるという知見を得たものの、詳細な構造については分子動力学計算などを行う必要があり、今後の課題である。また、得られた L 体含有配列は生体内分解性が高いことが期待され、アンチセンスによる遺伝子発現の制御などへの利用が期待される。

活性化リン酸エステルを有する L-チミジンを用いて、D 体オリゴヌクレオチドを鋳型とする伸長反応を試みた。D 体オリゴヌクレオチドは全長を用いた。もう一方の鎖は全長より 3' 末端側が数残基短い配列を用い、5' 末端には蛍光基を付与する。これにより、反応後に蛍光検出の LC-MS 分析によって伸長の有無を確認できる。これまでの少ない試行回数では伸長は確認されていないものの、各種反応条件の設定や MS 検出条件の設定などの検討が必要になる。

本研究では自然界に存在しない L 体を利用する必要性のため、有機合成法・構造解析法から確立する必要があった。五員環に対する有効な構造解析法を本研究で示せたことは、構造決定の共同研究の依頼や、本 VCD 構造解析方法論の解説論文執筆依頼など、反響が大きかった。L 体核酸は核酸医薬などでも今後さらなる発展が望まれる研究分野と期待される。L 体核酸研究のさらなる発展のために

も、有機化学者のみならず誰でも簡単にL体核酸を入手できるような状況が必要であろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

- 1 谷口透、中野貴恵、門出健次「Stereochemistry (and Conformation) of Nucleosides and Their Synthetic Precursors by Vibrational Circular Dichroism.」Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry 査読有、2018、pp. 7.29.1-7.29.9.
- 2 谷口透、門出健次「円二色性(CD)・赤外円二色性(VCD)による立体構造解析～実践例と注意点」有機合成化学協会誌 査読有、Vol. 75、2017、pp. 522-529.
- 3 谷口透「Analysis of Molecular Configuration and Conformation by (Electronic and) Vibrational Circular Dichroism: Theoretical Calculation and Exciton Chirality Method.」Bull. Chem. Soc. Jpn. 査読有、Vol. 90、2017、1005-1016.
- 4 谷口透、中野貴恵、馬場亮祐、門出健次「Analysis of Configuration and Conformation of Furanose Ring in Carbohydrate and Nucleoside by Vibrational Circular Dichroism」Org. Lett. 査読有、Vol. 19、2017、pp. 404-407.
- 5 谷口透「鏡の国の核酸医薬? D-microRNAを標的とするL-RNAアプタマー」化学、査読無、Vol. 71、2016、pp. 59-60.

[学会発表](計 5件)

- 1 谷口透「Determining Molecular Configuration and Conformation by Vibrational Circular Dichroism: from Small Molecules to Macromolecules」第98回日本化学会春季年会 天然物及び生物有機化学に関する中西シンポジウム 2018、2018年3月20日、日本大学(千葉県船橋市)
- 2 谷口透「円二色性(CD)と赤外円二色性(VCD)によるキラル分子の構造解明～基礎と実践例～」静岡県立大学薬学研究院 講演会、2018年3月13日、静岡県立大学(静岡県静岡市)
- 3 谷口透「キラル分光法で合成分子・生理活性分子の立体配置と溶液中立体配座を観る」高知大学 超分子化学特別セミナー、2017年11月17日、高知大学(高知県高知市)
- 4 村林はるか、谷口透、門出健次「Examination of the Effects of L-5-methylcytidine on the Structure and Stability of D-L Hybrid Double Helix」第

- 44 回国際核酸化学シンポジウム、2017年11月15日、東京理科大学(東京都葛飾区)
- 5 谷口透「実践的VCD構造解析のすすめ」VCD & ROA ユーザーズミーティング、2017年7月13日、ホテルベストランド(茨城県つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口透 (TANIGUCHI, Tohru)
北海道大学・先端生命科学研究院・助教
研究者番号: 00587123