

平成21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007-2008 年度
 課題番号：19390030
 研究課題名 (和文) ゲノム創薬・遺伝子診断の基盤素材としての人工核酸複合体の開発
 研究課題名 (英文) Development of artificial nucleic acid conjugates as base materials for genome-based drug discovery and DNA-based diagnostics
 研究代表者
 今西 武 (IMANISHI TAKESHI)
 大阪大学・名誉教授
 研究者番号：40028866

研究成果の概要：

ライフサイエンス領域での基盤材料となる人工核酸として、これまでにない新しい架橋構造を持つ架橋型人工核酸 (BNA) を種々設計し、その合成法を確立した。また、新しい蛍光分子や DNA アルキル化分子を創製するとともに更なる誘導体化を実施し、核酸との複合体化を可能とした。さらに、核酸イメージング技術や送達法等への応用が期待できる核酸の別機能性分子との効率的複合体化法の開発に成功した。複合体化 BNA の遺伝子発現抑制活性を評価し、血清中での高い安定性や、培養細胞内での高い遺伝子発現抑制能を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

理論的分子設計に基づく効率的な創薬手法の確立は21世紀のライフサイエンスの重要課題である。現在、病原性タンパク質を分子標的とした医薬品開発が専らであるが、構造と機能とが複雑かつ多様すぎ、詳細な解明が不十分である。このことが理論的な医薬分子設計を困難にしている。一方、タンパク質の生成前駆体のゲノム (遺伝子 DNA, mRNA) は、構造・機能とも至って単純であり、4文字配列の違いのみによって多種多様

なタンパク質へと結びついている。従って、ゲノム機能を自在に制御・検査する技術の熟成が理論的かつ普遍的な医薬分子の開発に直結することを意味している。すなわち、アンチセンス法 (AS法)、アンチジーン法 (AG法)、RNA 干渉法 (RNAi法) をはじめとする種々のゲノムテクノロジーにより標的遺伝子の発現を自在に制御したり観察したりする一般手法の確立が、包括的な創薬手段の創出に繋がると期待されている。ゲノムテクノロジーは、ゲノム配列情報を正確に認識し

て強く結合する特性を備えた核酸類縁体（人工核酸）が基盤材料となつて有効に機能する。

「優れた人工核酸」はこれらゲノムテクノロジーに共通した素材となることから、人工核酸分子は国内外で注目を集め、これまでに様々な核酸類縁体の化学合成と機能性評価が展開されてきたが、満足度が十分な人工核酸の開発には至っていなかった。

こうしたなかで本研究課題代表者らは、「糖部立体配座固定型の新規な高機能性人工核酸（Bridged Nucleic Acid: BNA）」の合成とその応用研究」を展開してきた。その結果、これまでに架橋型人工核酸モノマー（BNA モノマー）を数々開発することに成功し、これら BNA モノマーで化学修飾したオリゴヌクレオチド類（以下、BNA）には、ゲノムテクノロジーの基盤材料になりうる優れた基本特性が備わっていることを明らかにし、それらの成果は世界で高く評価されている。

2. 研究の目的

これまでの個々の研究成果および経験を最大限に活用し、有機的な融合を図り、研究をより一層発展させるため、「人工核酸 BNA に種々の別機能人工分子を結合させた超機能性融合分子（BNA 複合体）を新たに開発することで、BNA 本来の機能性の更なる強化や新しい機能性の発掘に結びつけ、各種ゲノムテクノロジーへの有効活用を可能にし、核酸医薬のみならず遺伝子診断や遺伝子機能解析など幅広いライフサイエンス領域での実用化基盤を確立する」ことを目的とした。

3. 研究の方法

新規 BNA 型人工核酸や複合体化用別機能分子の分子設計・化学合成を行い、それらの複合体を創製する手法の確立を目指す。別機能分子としては、膜透過性向上を目指した化合物、ホタルルシフェリンをリード化合物とした蛍光性化合物、DNA 切断活性化化合物などとする。さらに、それら複合体の機能性を非細胞系および培養細胞系で評価する。

具体的には、既開発の BNA を基に各種ヘテロ原子置換型の BNA モノマーを設計し、安価な D-グルコース等を原料とした合成ルートを確認するとともに、それら BNA モノマーユニットで修飾したオリゴヌクレオチドの効率的合成法を開拓する。また、DNA アルキル化天然化合物アジノマイシンをリード化合物とした新たな DNA 切断分子を創製する。さらに、遺伝子導入機能性 dendrimer 分子や、遺伝子検出用蛍光性化合物の効率的 BNA 複合体化を達成するための複合体化法を開発する。

合成する新規 BNA 類の培養細胞系での AS・AG・RNAi 効果は、天然および既存の BNA 類と比較しながら評価検討する。また、

新たに開発する dendrimer によるオリゴヌクレオチド類の細胞内への導入効率を評価する。

4. 研究成果

(1) 人工核酸複合体の基盤材料となる架橋型人工核酸 (BNA) として、トランス架橋構造やカルバマート架橋構造を持つ BNA を新たに 2 種類設計し、チミジンや D-グルコースを出発原料とする合成法を確立した。また、アセタール架橋構造や N-O 架橋構造を有する新規 BNA を選択し、D-グルコースを出発原料とした BNA モノマー及び DNA 自動合成機への適用が可能なアミダイトブロックを合成した。さらに細胞系での BNA 高機能化による影響を詳細に評価するため、すべての核酸塩基に対応するアセタール架橋型 BNA の合成法を確立した。開発した化合物の一部は、その化合物特性に興味をもった国内研究者により利用され、その別機能性の開発が試みられている。

(2) BNA とそれら機能性分子との複合体化を効率的に達成する手法を開発した。この手法により、BNA のみならず各種核酸類縁体の機能性分子複合体を類似プロトコルにより合成することを可能とした。本研究成果は、バイオイメージング技術や遺伝子送達法等へ応用し、現在別プログラムによりすでに利用している。

(3) ホタルルシフェリンをリード化合物として開発したベンゾイミダゾール型蛍光分子を BNA 複合体化するため、その蛍光分子と窒素官能基とを TEG リンカーを介して結合し、蛍光化試薬として開発した。また、(2) で開発した核酸類縁体の機能性分子複合体化法を蛍光化試薬用に最適化し、オリゴヌクレオチドの両末端、中央のいずれの位置においても室温 30 分で 90% 以上の収率で蛍光化できる手法を開発した。なお本蛍光分子からは、核酸の二重鎖形成によりその蛍光強度をおよそ 3 倍増強させる性質を見いだしており、これまでに無い核酸検出法開発への発展が期待できる。

(4) DNA 切断分子アジノマイシンをリード化合物として、その構造を単純化かつ安定化したエポキシピペリジン化合物を種々設計・合成した。それらの DNA 切断活性を非細胞系で評価し、新しい DNA 切断分子候補を見いだした。さらに、新たに創出した DNA アルキル化分子エポキシピペリジン化合物を BNA 複合体化するために窒素官能基化した。アンチジーン法への応用に向け、そのアルキル化能の詳細な評価を進めている。

(5)カチオニックリポソームに変わる核酸類の細胞内導入法の開発に向け、三次元放射状に分岐が広がる新規デンドリマーを設計した。第一世代から第三世代のデンドリマーを異なる2種の縮合方法を用いて合成することで、生体内における安定性の変化を期待できる6種類のデンドリマーを得ることに成功した。さらに、デンドリマーの分子量分布をMALDI-TOF-MSやGPCを用いて見積もると共に、各世代のデンドリマーと核酸との複合体形成能をゲル電気泳動で評価した。現在、*in vivo* レベルでの実験に向け、その精製法等の課題解決に向け取り組んでいる。

(6) 複合体化 siRNA (siBNA) の遺伝子発現抑制活性を指標に、高機能化 BNA の培養細胞中での機能性を評価した。天然 siRNA の RNAi 効果を上回る siBNA を見いだすには至らなかったが、siBNA が siRNA に比べて血清中で安定であることを明らかにした。これは、投与後長期間にわたる RNAi 効果を期待できる結果であり、siRNA の投与回数を減らしても同様の効果を維持できる *in vivo* での有用性を示唆している。また、複合体化位置が重要であることを明らかにし、例えばセンス鎖の9(10)番目を機能化した siBNA はその RNAi 効果が大きく減弱し完全な RISC 複合体の形成を妨げる可能性を示した。

(7) アンチセンス分子としての機能性評価は、bcl-xL を標的とした高機能化 BNA を用い、培養細胞中で遺伝子発現抑制効果を比較することで評価した。本研究の成果の一部は、核酸医薬品の開発に向けた別プロジェクトにおいて、その配列設計の参考とした。

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 12 件)

1. Yasunori Mitsuoka, Tetsuya Kodama, Ryo Ohnishi, Yoshiyuki Hari, Takeshi Imanishi and Satoshi Obika. A Bridged Nucleic Acid, 2',4'-BNA^{COC}: Synthesis of Fully Modified Oligonucleotides Bearing Thymine, 5-Methylcytosine, Adenine and Guanine 2',4'-BNA^{COC} Monomers, and RNA-selective Nucleic Acid Recognition. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, *37*, 1225-1238. 査読有
2. Tetsuya Kodama, Chieko Matsuo, Hidetsugu Ori, Tetsuya Miyoshi, Satoshi Obika, Kazuyuki Miyashita, Takeshi Imanishi. Design, Synthesis, and Evaluation of a Novel Bridged

Nucleic Acid, 2',5'-BNA^{ON}, with S-type Sugar Conformation Fixed by N-O Linkage. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 2116-2123. 査読有

3. Tetsuya Kodama, Kensaku Sugaya, Takeshi Baba, Takeshi Imanishi, Satoshi Obika. Synthesis of a Novel *trans*-3',4'-BNA Monomer Bearing a 4,8-Dioxa-5-azabicyclo-[5.3.0]decane Skeleton. *Heterocycles*, **2009**, *79*, 873-882. 査読有
4. Satoshi Obika, S. M. Abdur Rahman, Bingbing Song, Mayumi Onoda, Makoto Koizumi, Koji Morita, Takeshi Imanishi. Synthesis and properties of 3'-amino-2',4'-BNA, a bridged nucleic acid with a N3'→P5' phosphoramidate linkage. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 9230-9237. 査読有
5. S. M. Abdur. Rahman, Sayori. Seki, Satoshi. Obika, Haruhisa Yoshikawa, Kazuyuki Miyashita, Takeshi Imanishi. Design, synthesis and properties of 2',4'-BNA^{NC}: A bridged nucleic acid analogue. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 4886-4896. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1. 西田 勝、兒玉 哲也、馬場 武、小比賀 聡、今西 武、カルバマート骨格を有する新規架橋型人工核酸の合成とその評価、第34回反応と合成の進歩シンポジウム (京都) 2008年11月4日-5日
2. 佐藤 寛之、津田 直人、生川 径祐、今西 武、小比賀 聡、架橋型人工核酸 BNA 修飾による siRNA の高機能化、第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会 (兵庫) 2008年12月9日-12日
3. 松山 憲司、渡部 徹也、兒玉 哲也、小比賀 聡、宮下 和之、今西 武、2,2'-ビスベンゾイミダゾール骨格を有した新規蛍光分子の開発とオリゴヌクレオチドラベル化に関する研究、第三回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008、(神奈川) 2008年9月18日-20日
4. 河田 裕治、山口 卓男、宮下 和之、小比賀 聡、今西 武、3,4-エポキシピペリジン構造を有する新規 DNA アルキル分子の合成と活性評価、第27回メディスナルケミストリーシンポジウム (大阪) 2008年11月26日-28日
5. 兒玉 哲也、松尾 智恵子、小里 英嗣、小比

賀 聡、宮下 和之、今西 武、Synthesis and properties of a 2'-deoxy analogue of *trans*-3',4'-BNA having an S-type sugar conformation、5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Tokyo) 2007.11.19-22.

6. 山口 卓男、河田 裕治、宮下 和之、今西 武、Studies toward the total synthesis of azinomycin A, a potent antitumor antibiotic、The 21st International Congress for Heterocyclic Chemistry (Sydney) 2007.7.14.-21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 武 (IMANISHI TAKESHI)

大阪大学・名誉教授

研究者番号：4 0 0 2 8 8 6 6

(2) 研究分担者

土井 健史 (DOI TAKEFUMI)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：0 0 2 1 1 4 0 9

兒玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：0 0 4 3 2 4 4 3

(3) 連携研究者

該当なし