

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790013
 研究課題名（和文）生体内分子機能の融合活用を目指した 2 本鎖 DNA 標的人工核酸の開発研究
 研究課題名（英文）Development of the nucleoside analogs to harmonize with in vivo molecular function
 研究代表者
 谷口 陽祐（TANIGUCHI YOSUKE）
 九州大学・大学院薬学研究院・助教
 研究者番号：00452714

研究成果の概要（和文）：本研究では、生命の設計図といわれている遺伝子情報に直接作用する人工核酸の設計と合成を行い、その人工核酸を用いて遺伝子情報伝達を人工的に制御する手法の基盤技術の確立を目指した。天然の核酸では相互作用が不可能な 2 本鎖 DNA に対して、特異的に相互作用が可能な人工核酸の開発に成功した。さらに、遺伝子情報を保有している 2 本鎖 DNA を標的とし、この人工核酸を導入した分子を創製し遺伝子情報の伝達阻害をする事にも成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed and synthesized the nucleoside analogs which interact with duplex DNA. Moreover, we aimed to establish the basic technology of the regulation of the gene expression using these nucleoside analogs. We have found that oligonucleotide containing the nucleoside analogs formed the stable triplex DNA as a result of interaction between the nucleoside analogs and duplex DNA. And this oligonucleotide inhibited the gene expression in the cultured cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物有機合成化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：3 本鎖 DNA、W 字型人工核酸、アンチジーン、ミスマッチサイト、

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの全遺伝子配列が公表され、ゲノム情報を利用した病気の診断や治療など、様々な研究が盛んに行われている。2 本鎖 DNA を標的としたアンチジーン核酸、1 本鎖 RNA

を標的としたアンチセンス核酸や RNA 干渉は病気の原因となる遺伝子を直接的に標的とする方法として注目されている。また、遺伝子の異常そのものを人工的に修復する手法の開発にも大きな期待がかけられている。2

本鎖 DNA にもう一本の DNA 鎖 (TF0: Triplex forming oligonucleotide) が配列特異的に結合して形成される 3 本鎖 DNA に着目した。生体内では遺伝子のプロモーター領域に 3 本鎖 DNA が形成できる配列が存在し、遺伝子発現の調節には 3 本鎖 DNA が関与していると考えられている。また、人工的に形成させた 3 本鎖 DNA 領域では、突然変異が誘起されたりあるいは修復されたりするなど遺伝子編集に利用できる可能性が示されている。さらに、3 本鎖 DNA 形成が病気の原因の一つである遺伝子転座にも関与していることも示唆されている。これらは詳細な機構は未解明であるものの内在性因子の介在は明らかである。また、近年、RNA 干渉による効率的な遺伝子サイレンシングの機構が明らかにされ、これまでの核酸医薬とは異なり細胞の内在性機構が有効に活用されていることが明らかになった。遺伝子発現制御機構に関わるこのような発見の経緯から、機能性人工核酸を利用しつつ、さらにそれによって誘起される生体内機能を活用し、従来の人工核酸を凌駕する革新的な機能を獲得するための新しい研究の着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、2 本鎖 DNA を標的とし人工核酸 (WNA: W-shaped Nucleoside Analogs) を組み込んだ 3 本鎖形成オリゴヌクレオチド (TF0) を用いることによって安定な 3 本鎖 DNA を形成させ、さらに生体内に内在するたんぱく質本来の機能を利用し、人工分子と生体内分子の機能を融合活用する革新的な遺伝子発現制御法の確立を目指す事にした。人工分子を用いて遺伝子発現の阻害、活性化や遺伝子の変異・修復に関わる生体内の機能をコントロールする事ができれば、これらの機能を人工的に調節できる化学と生物学を融合した手法の創製が可能となると期待される。

3. 研究の方法

本研究は 2 本鎖 DNA を標的とする機能性核酸を用いて生体内機能を利用したアプローチとして、3 本鎖 DNA 形成の機能あるいは 2 本鎖 DNA に潜り込む機能を利用し、遺伝子発現の阻害、活性化や修復・編集などの生体内反応を惹起する人工分子の検索を行うことである。しかし、安定な 3 本鎖 DNA の形成は 2 本鎖 DNA 配列のホモプリン領域にしか形成できないという本質的な制限がある。すなわち、プリン塩基とピリミジン塩基が入れ替わった部分は 3 本鎖形成障害部位 (ミスマッチサイト) と呼ばれ、安定な 3 本鎖 DNA を形成できる天然の塩基は存在しない。既に申請者は 3 本鎖形成障害部位が含まれる 2 本鎖 DNA 配列でも安定な 3 本鎖 DNA 形成が可能なピシク

ロ型人工核酸 (WNA) の開発に世界に先駆けて成功している。しかし、これまで開発してきた WNA 誘導体の認識能には配列依存性があるという重大な改善点があるため、認識塩基部分 (水素結合サイト)、芳香環部分 (スタッキング部分) の最適化を行い、3 本鎖形成能の評価、構造解析、さらに得られた結果をもとにした計算化学的手法による分子設計を繰り返し、3 本鎖形成障害部位の認識の一般性を有する人工核酸の開発を行う。さらに、ピシクロ骨格を有さない新規誘導体の設計・合成を行い、認識の一般化を目指す。本研究で新たに取り組む課題では、人工分子を搭載したオリゴヌクレオチドが 2 本鎖 DNA に作用することによって誘起される生体内反応を検索する目的で、がん遺伝子に着目しアポトーシス誘導に関わる因子の検索を開始する。この目的を達成するために、まず転写阻害実験としてがん細胞で過剰発現している *c-myc* 遺伝子を含む 2 本鎖 DNA を標的とし、WNA-βT 搭載オリゴヌクレオチドをアンチジーン核酸として用いる。*c-myc* 遺伝子は多機能生遺伝子で細胞分裂、細胞育種、アポトーシス等の機能に関連している。この遺伝子のプロモーター領域の一部に 3 本鎖障害部位を 3ヶ所含むがプリン塩基が連続した配列がある。その配列を標的として 3 本鎖形成能評価や実際に細胞を用いて細胞増殖能の検討や mRNA の量の測定さらにはアポトーシスに関与する因子等の解明を行う。現在までに WNA-βT を組み込んだオリゴヌクレオチドが安定な 3 本鎖 DNA を形成可能であるという結果を見いだしている。さらに Raji 細胞で効果的にアポトーシスを誘導している可能性を示している結果も得ており、研究期間内に 3 本鎖形成に関連するアポトーシス因子を解明するための準備は整っている。また、新たに見いだした新規 WNA 誘導体を含むオリゴヌクレオチドが標的 2 本鎖 DNA 内に潜り込むという機能も利用してアポトーシス誘導因子の解明を効率的に行う。

4. 研究成果

人工核酸 (WNA) の問題点を克服するためにこれまで得られた結果を基に新たに分子設計を行った。この化合物は WNA 誘導体の芳香環部分に 2 本鎖 DNA のリン酸部位と相互作用するように、アミノ基を導入した誘導体 (図 1 左)

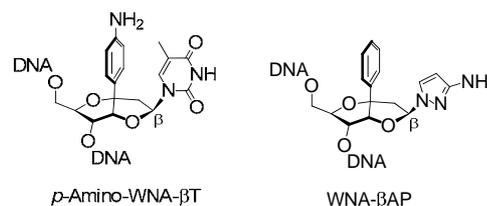


図 1 . ピシクロ型人工核酸誘導体

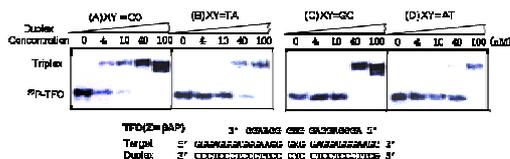


図2. ゲルシフトアッセイによる3本鎖形成能の評価。3本鎖形成オリゴヌクレオチドに WNA-βAP を含む。

であり、有機化学的手法を用いて合成し、3本鎖形成オリゴヌクレオチド(TF0)に導入した。このTF0の塩基選択性は低いという結果が得られたが、ほとんど全ての配列で同じような性質を示したことから、認識塩基による認識能よりも芳香環に結合させたアミノ基の相互作用の方が強く出たものと考えられる。さらに、塩基部分を5員環構造にして、小さくした誘導体(図1右)を設計し合成した。このWNA誘導体を含むTF0を用いることにより、CG塩基対を選択的に認識するという結果を得た(図2)。WNAの芳香環や認識塩基を種々に変換した誘導体だけではなく、ピシクロ骨格に着目した分子設計を行い、糖部分の1位と2位に置換基を有する二置換WNA誘導体を合成した。この誘導体を含むTF0は、安定性は低いもののミスマッチサイトの認識に成功した。また、糖骨格をシクロヘキサン環構造にすることで、3本鎖DNA形成が低下することも見いだした。さらに、ガン遺伝子であるbcl-2遺伝子に対するWNA誘導体搭載3本鎖形成オリゴヌクレオチドの設計し合成を行った。3本鎖形成能の評価の結果、このオリゴヌクレオチドは天然型の3本鎖DNAよりもより安定な3本鎖DNAを形成することを見いだした。また、survivin遺伝子を標的としたオリゴヌクレオチド(TF0)を用いてガン細胞を用いて機能を評価したところ、天然型のTF0よりも強く細胞死を誘導することを見いだした。

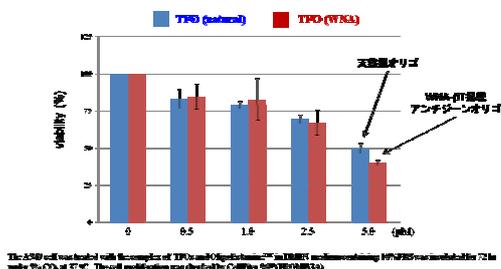


図1. ピシクロ型人工核酸誘導体搭載オリゴヌクレオチドによる遺伝子発現阻害

研究期間に得られた結果は国内外でも例が無く非常にインパクトが高く、世界に先駆けて公表した結果である。今後、本研究で得ら

れた基盤技術を用いて、社会に貢献できる成果として発展していくことができると期待される。

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3件)

Yosuke Taniguchi, Yuko Uchida, Tomoko Takaki, Eriko Aoki and Shigeki Sasaki, Recognition of the CG interrupting site by W-shaped nucleoside analogs (WNA) having the pyrazole ring in an anti-parallel triplex DNA, *Bioorg Med. Chem.*, 査読有、2009 17, 6803-6810.

Yuko Uchida, Yosuke Taniguchi, Eriko Aoki, Mieko Togo and Shigeki Sasaki, Formation of a stable triplex incorporating a CG interrupting site by a new WNA derivative containing 3-aminopyrazole as a nucleobase, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 査読無、2008, 52, 137-138.

Yosuke Taniguchi, Mieko Togo, Eriko Aoki, Yuko Uchida and Shigeki Sasaki, Synthesis of *p*-amino-WNA derivatives to enhance the stability of the anti-parallel triplex, *Tetrahedron*, 査読有、2008, 64, 7164-7170.

[学会発表](計10件)

高木智子、谷口陽祐、石橋直人、佐々木茂貴、3本鎖DNA形成を志向した新規二置換ヌクレオシドアナログの開発、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山

谷口陽祐、内田裕子、高木智子、Tamer Nasr、青木絵里子、佐々木茂貴、口頭発表、非天然型3本鎖DNA形成を可能にするW字型ピシクロ核酸誘導体の合成と機能評価、第35回反応と合成の進歩シンポジウム、2009年11月17日、金沢

Yosuke Taniguchi, Yuko Uchida, Tomoko Takaki, Tamer Mohamed Nasr, Hefni, Shigeki Sasaki, DESIGN OF NEW NUCLEOSIDE ANALOGS FOR THE FORMATION OF STABLE TRIPLEX DNA AND ITS APPLICATION TO ANTIGENE INHIBITION, Joint Symposium of 5th Annual Meeting of Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium in Fukuoka, Japan, 2009.11.4., Fukuoka.

Tomoko Takaki, Yosuke Taniguchi, Naoto Ishibashi and Shigeki Sasaki, Development of novel disubstituted nucleoside analogs for the formation of

triplex DNA, Asian Federation for
Pharmaceutical Sciences 2009, 2009年10
月17日、Fukuoka

内田祐子、谷口陽祐、青木絵里子、東郷美
枝子、佐々木茂貴、小さな認識塩基をもつ
W字型人工核酸の合成と3本鎖形成能の評
価、日本薬学会第129年会、2009年3月27
日、京都

Yuko Uchida, Yosuke Taniguchi, Eriko
Aoki, Mieko Togo and Shigeki Sasaki,
Formation of a stable triplex
incorporating a CG interrupting site by
a new WNA derivative containing
3-aminopyrazole as a nucleobase, Joint
Symposium of the 18th International
Roundtable on Nucleosides, Nucleotides,
and Nucleic Acids and the 35th
International Symposium on Nucleic Acids
Chemistry, 2008.9.8., Kyoto.

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 陽祐 (TANIGUCHI YOSUKE)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：00452714