

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350094

研究課題名（和文） 核酸の高度な高次構造制御を基盤としたオリゴヌクレオチド型人工転写因子の創製

研究課題名（英文） Development of oligonucleotide-based artificial transcription factor based on the higher-order structure of nucleic acids.

研究代表者

小比賀 聡 (OBIKA SATOSHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80243252

研究成果の概要（和文）：構造変化のスイッチ機能を持つ人工核酸、核酸複合体化に有用な人工核酸、そして二種の架橋型人工核酸グアニン類縁体を創出した。また、中性付近でシトシン四重鎖を形成し得るオリゴ人工核酸を合成した。さらに、蛍光観察による非侵襲的遺伝子発現制御評価系を構築し、本来発現する遺伝子とは異なる遺伝子の発現を人工核酸で誘起できることを示した。これら成果は、我々が日々創製を重ねている人工核酸が、現在の遺伝子発現抑制法から脱却した真の制御法に有用であることを示唆する大きな前進である。

研究成果の概要（英文）：An artificial nucleic acid bearing a switching function controlling structural properties, a useful nucleic acid unit for conjugation chemistry, and a couple of bridged nucleic acid guanine analogs were synthesized. Non-natural oligonucleotides that can form cytosine quadruplex structure at physiological conditions were synthesized as well. Moreover, invasive technique for evaluating gene expression change was established, and it was shown that artificial oligonucleotide could induce a change in gene expression pattern. These results indicate that our developing artificial nucleic acids are effective to gene expression regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸、人工核酸、三重鎖、4重鎖、分子認識、転写制御

1. 研究開始当初の背景

4つのグアニン塩基が水素結合を介して平面にならぶ‘G-tetrad’、そしてそれが層を成すことで形成する四重鎖核酸（グアニン四重鎖、G-quadruplex）、これらの発見は40

年以上も昔にさかのぼる。四重鎖核酸という極めて興味深い構造は国内外を問わずに注目され、その特性を明らかにするべく精力的に研究がなされてきた。特に、細胞の寿命に関連するテロメア配列（ヒトではTTAGGGの

繰返し)がグアニン四重鎖を形成することが明らかにされたところから研究対象は急激に広がり、研究開始時には、c-kit などのがん遺伝子の転写活性化因子の活性調節にグアニン四重鎖が機能している可能性が示されるまでになった。一方、グアニン四重鎖を安定化する小分子も多く見いだされている。テロメスタチンに代表されるこうした小分子はテロメア配列に強固に結合し、がん細胞で発現が亢進していることの多いテロメラーゼの機能を阻害することから、細胞のがん化を抑制する分子として着目されている。

一方申請者らは、糖部フラノース環を RNA-RNA 二重鎖と同じ N 型コンホメーションに固定化した従来には類をみない全く新しいヌクレオシド類縁体 (Bridged Nucleic Acid monomer: BNA monomer) を設計・合成し、本類縁体を組込んだオリゴヌクレオチド (BNA) が、これまでにない強い親和性で相補鎖 RNA に対して結合し、高いヌクレアーゼ耐性を有していることを見出している。さらに、この BNA が標的三重鎖 DNA に対し、配列選択的に結合し極めて安定な三重鎖核酸を形成することを明らかにした。また、BNA の高い三重鎖形成能を利用し、転写因子の一種である NF- κ B の結合サイトを標的とすることで、DNA と NF- κ B との相互作用を効果的に阻害するという極めて興味深い結果を得ることも成功している。さらに申請者らは、「CG あるいは TA 塩基対に対して選択的かつ強力に結合する核酸塩基が天然に存在しない」三重鎖形成核酸の最大の問題を克服する核酸類縁体の開発を進め、従来世界中の多くの研究者がその実現に向け研究を行ないつつも達し得なかった CG 塩基対の認識にも成功した。これは我々が開発してきた BNA に、綿密な分子モデリングにより設計した非天然型核酸塩基を導入することで実現したもので、申請者らが独自性の高い研究を継続して行なってきた結果であると言える。さらに、転写因子-DNA 複合体の詳細な分子動力学計算を行い転写因子が二重鎖 DNA を認識する機構について重要な知見を得ている。また BNA 類縁体の開発研究を進める中で、従来の BNA よりも遥かに三重鎖形成能が向上し、生体内での安定性に優れた分子 2', 4'-BNANC の開発にも成功してきた。

このような背景から、人工核酸 BNA を基盤とし、G-quadruplex の安定化をはじめとした核酸の高度な高次構造制御を実現する新たな機能性分子を開発することで、生細胞内の遺伝子発現制御を実現する人工転写因子の創製が可能であると考え、本研究計画を提

案する。

2. 研究の目的

本研究では、人工核酸を用いて核酸の高次構造を高度に制御し、本来発現している遺伝子とは異なる遺伝子の発現を誘起する新しい遺伝子発現調節法の開発法を目指す。例えば核酸高次構造を安定化する小分子と人工核酸の複合体化 (コンジュゲーション) や特定遺伝子のプロモーター領域に強制的に転写因子をリクルートすることで不活性化されている遺伝子を活性化する人工オリゴヌクレオチドを基盤とする人工転写因子を創製する。さらに、これまでに開発してきた遺伝子スイッチの一部分を組み合わせ、遺伝子発現の ON/OFF を外部刺激によって自由に制御する方法に進化させる。

3. 研究の方法

(1) 転写を調節していると考えられている DNA 構造 (例えば、G-quadruplex) の誘導または強力な安定化を基盤とし、これを実現するための遺伝子関連機能性分子と申請者らが開発を続けている二重鎖 DNA を強固に認識する BNA とのバイオコンジュゲートを創出する。バイオコンジュゲートは別途検討を重ねてきた技術 (H19 年度基盤 B) を利用して合成する。人工核酸と複合体化するものとしては、G-quadruplex との構造を安定化することが知られている小分子化合物、G-quadruplex を形成する可能性のある配列 (Putative G-quadruplex sequence, PQS)、そして PQS 領域の二重鎖構造をほどこき得る配列、例えば PQS のシチジンリッチ鎖 (G-quadruplex を形成しない側鎖) への高い二重鎖形成能を有する BNA、さらには転写因子結合ドメイン-BNA コンジュゲートである。

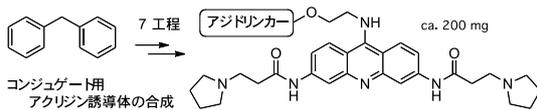
(2) 設計・合成する人工核酸分子を用いることで転写活性化を調節する生体因子を強制的に誘導し、またはその機能を強化する新たな遺伝子発現制御機能を迅速かつ視覚的に評価・判断するための非侵襲的遺伝子発現制御評価系を構築する。GFP (Green Fluorescent Protein) などのレポーター遺伝子のプロモーター領域、またはその上流を人工核酸 BNA 類の結合標的配列とし、(1) で合成する BNA コンジュゲート類による標的遺伝子発現 (タンパク質の発現) を蛍光で検出可能とする評価系を構築する。これまでに培ってきた PCR 法やルシフェラーゼアッセイ法と比較検討することで進める。また、2 種の異なる蛍光色素と 2 種の消光色素を適切な位置に導入することで、人工核酸類が結合し高次構造が形成されると、消光または蛍光色の変化が誘起される系を構築する。これにより、核酸の高次構造変化を簡便・迅速に検出する。

(3) 先行して研究を進めていた光刺激に応じる遺伝子スイッチの高機能化と、上述の核酸コンジュゲートへの外部刺激応答機能の付与を検討する。

4. 研究成果

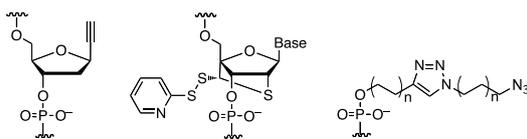
(1) ヒト細胞のガン化に関連する3つの遺伝子を中心に標的遺伝子を選定し、各遺伝子の転写活性化領域にあるグアニン四重鎖を形成する可能性のある配列および三重鎖核酸の形成が可能なポリピリミジン、ポリプリン配列を抽出するとともに、各標的DNAを配列特異的に認識するBNAオリゴヌクレオチドを各2種類ずつ設計した。また、設計したBNAオリゴヌクレオチドのコンジュゲート化用リンカー分子としてオリゴエチレングリコールリンカーを10グラム程度、グアニン四重鎖構造安定化小分子としてアクリジン誘導体を200ミリグラム程度合成する事に成功した。

さらに、各種コンジュゲート合成のための



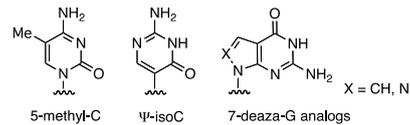
エチル化、チオール化、アジド化 BNA オリゴヌクレオチドの合成にも成功した。これらのオリゴヌクレオチドを用い、別途合成したペプチドやアクリジン分子、DNA アルキル化分子との各種コンジュゲートを効率的に合成することに成功した。

また、シトシン塩基との塩基対は形成する



がグアニン四重鎖を形成しない新たな架橋型人工核酸BNAの核酸塩基認識能を詳細に評価した。その結果、核酸塩基認識能を高度に保持しつつも、その二重鎖形成能が予想に反して低いことが明らかとなった。そこで、精密な分子軌道計算を実施することにより原因と推定された分子内電子反発を低減する新たなBNAグアニン類縁体を設計・合成した。さらに、グアニンとは塩基対を形成せずに、シトシン四重鎖を形成し得るオリゴ人工核酸を合成した。

また、構造制御のスイッチ機能を持つ人工核酸を創出し、それら構造特性を評価した他、c-kit や k-ras、テロメア配列などのがん関



PQS 近傍の核酸高次構造の制御に有効であることが分かった核酸塩基類

連遺伝子をはじめとする各種 mRNA 遺伝子類を標的とした 12mer から 30mer 程度の人工核酸を種々合成した。

これらオリゴ核酸類の構造特性を各種分光法(紫外光吸収/円二色性/蛍光)やHPLC、ゲル電気泳動等により評価した。その結果、5-メチルシトシンやプソイドイソシトシンを塩基とする核酸類が、生理的条件下に特殊な核酸構造を安定化する事を明らかとした。

特にガン関連遺伝子であるテロメア配列が形成する4重鎖構造の安定化効果については、修飾塩基による修飾位置に配列依存性が観察され、連続した修飾と立体障害が最少になる配列設計が重要であることが明らかとなった。5-メチルシトシンは生体内修飾塩基であるため、生体内の高次構造の安定化に関与している可能性がある。一方で7-デアザグアニン誘導体は、グアニン塩基の自己集合性を抑制する事で複雑な高次構造が形成されるのを抑制し、強固な二重鎖核酸を形成する事を明らかとした。これによりこれまで標的とすることができなかった GC 含量の多い配列も含めた全配列を標的とした設計が可能となった。例えばテロメア配列の相補鎖を標的としたオリゴヌクレオチドとして有効に機能し、グアニン4重鎖を誘起できる可能性を示した。以上の様に、様々な核酸高次構造の形成を促進出来る可能性を示した。

(2) 遺伝子発現制御機能を迅速かつ視覚的に評価・判断するための非侵襲的遺伝子発現制御評価系を構築した。本研究では、遺伝子発現の抑制にとどまらずに発現促進をも考慮する必要がある事から、人工核酸分子による処理の前後で標的遺伝子の発現が蛍光波長(色)の変化で観察できる評価系、具体的にはFLAGタグ、蛍光タンパク質DsRed(赤色蛍光)、蛍光タンパク質EGFP(緑色蛍光)、そして標的タンパク質(遺伝子)の各遺伝子配列を導入したプラスミド(ミニ遺伝子)を作成した。このミニ遺伝子を腎臓由来のHEK293細胞に組み込んだところ、ミニ遺伝子由来であるレポータータンパク質の赤色蛍光が観察された。

(1)で合成した人工核酸のうち、5merのBNAを含む各種ホスホロチオアート型15mer DNA(100 nM)を遺伝子発現制御評価用ミニ遺伝子とともにFlp In 293細胞にトランスフェクションして蛍光顕微鏡で観察したところ、これまで観察されていなかった緑色蛍光が24時間後に観察されるようになった。これは我々が合成した人工核酸が本来発現

する遺伝子とは異なる遺伝子の発現を誘起できることを示している。

これら一連の研究成果は、我々が日々新たな創製を重ねている人工核酸を用いることで、抑制によるこれまでの遺伝子発現制御法を脱却し、真の制御法を構築できることを示唆する非常に大きな前進である。

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 8 件)

- ① Yuji Kawada, Tetsuya Kodama, Kazuyuki Miyashita, Takeshi Imanishi, Satoshi Obika. Synthesis and evaluation of novel caged DNA alkylating agents bearing 3,4-epoxypiperidine structure. *Organic & Biomolecular Chemistry*, in press. DOI. 10.1039/c2ob25366f. 査読有
- ② S.M. Abdur Rahman, Takeshi Baba, Tetsuya Kodama, Md. Ariful Islam, Satoshi Obika. Hybridizing ability and nuclease resistance profile of backbone modified cationic phosphorothioate oligonucleotides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, in press. DOI. 10.1016/j.bmc.2012.05.009 査読有
- ③ Kosuke R. Ito, Tetsuya Kodama, Futaba Makimura, Noritsugu Hosoki, Tomohisa Osaki, Ayao Orita, Takeshi Imanishi, Satoshi Obika, Cleavage of oligonucleotides containing a P3' →N5' phosphoramidite linkage mediated by single-stranded oligonucleotide templates. *Molecules*, 16, 2011, 10695-10708. 査読有
- ④ Kazuto Mori, Tetsuya Kodama, Satoshi Obika, Design, synthesis and properties of boat-shaped glucopyranosyl nucleic acid. *Organic Letters*, 13, 2011, 6050-6053. 査読有
- ⑤ K. Morihiro, T. Kodama, S. Obika, Benzylidene acetal-type bridged nucleic acids: changes in properties upon cleavage of the bridge triggered by external stimuli. *Chemistry - A European Journal*, 17, 2011, 7918-7926.

- ⑥ Kazuto Mori, Tetsuya Kodama, Takeshi Baba, Satoshi Obika, Bridged nucleic acid conjugates at 6' -thiol: synthesis, hybridization properties and nuclease resistances. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9, 2011, 5272-5279. 査読有
- ⑦ Takeshi Baba, Tetsuya Kodama Kazuto Mori, Takeshi Imanishi, Satoshi Obika, A novel bridged nucleoside bearing a conformationally switchable sugar moiety in response to redox changes. *Chemical Communications*, 46, 2010, 8058-8060. 査読有
- ⑧ Yoshiyuki Hari, Motoi Nakahara, Juanjuan Pang, Masaaki Akabane, Takeshi Kuboyama, Satoshi Obika. Synthesis and triplex-forming ability of oligonucleotides bearing 1-substituted 1H-1,2,3-triazole nucleobases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 2011, 1162-1166. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 肯特夫, 森廣邦彦, 兒玉哲也, 小比賀 聡、光刺激により糖部架橋構築が誘起される人工核酸の開発、第132回日本薬学会年会、2012年3月31日、北海道大学(札幌)
- ② 森廣邦彦, 兒玉哲也, 小比賀 聡、光刺激により認識塩基が変化するシン配向型非天然核酸塩基の開発、日本化学会第92春季年会、2012年3月25日、慶応大学(横浜)
- ③ Kunihiro Morihiro, Tetsuya Kodama, Satoshi Obika, Synthesis and Evaluation of External Stimuli-responsive Bridged Nucleic Acids. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (2011ISNAC), 2011年11月9-11日、北海道大学(札幌)
- ④ Kosuke. R. Ito, Tetsuya Kodama, Futaba Makimura, Noritsugu Hosoki, Tomohisa Osaki, Ayako Orita, Takeshi Imanishi, Satoshi Obika. Cleavage of Oligonucleotides Containing a P3' →N5' Phosphoramidate Linkage Triggered by Duplex Formation. The

38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (2011ISNAC), 2011年11月9-11日, 北海道大学 (札幌)

- ⑤ Tetsuya Kodama, Kazuto Mori, Takeshi Baba, Satoshi Obika, A new entry of thiol-containing nucleic acid monomer for conjugation chemistry. 6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology. 2011年9月4日-7日, Queens' College Cambridge, UK
- ⑥ Yumi Takegaki, Kunihiro Morihiko, Tetsuya Kodama, Moeka Nakatani and Satoshi Obika, Synthesis and properties of 2',4'-BNA with 8-aza-7-deazaguanine. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010年12月15-20日, Honolulu, Hawaii (USA)
- ⑦ 小比賀 聡、機能性人工核酸の開発 -新たな核酸医薬・診断薬創出に向けて-, 日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、大阪
- ⑧ 小比賀 聡、機能性アンチセンス分子による核酸医薬の開発、第3回創薬とイメージングに関するワークショップ、2009年12月4日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小比賀 聡 (OBIKA SATOSHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：80243252

(2) 研究分担者

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：00432443