

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689006

研究課題名(和文) 3本鎖DNA形成可能な人工核酸を基盤とした遺伝子標的アンチジーン核酸医薬創製研究

研究課題名(英文) Development of antigene strategy by triplex forming oligonucleotides having artificial nucleoside analogues

研究代表者

谷口 陽祐 (TANIGUCHI, YOSUKE)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00452714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、次世代の医薬品として注目を集めている、核酸医薬の開発を目的として、これまで殆ど研究がなされていない3本鎖DNA形成による遺伝子発現制御法に関する検討を行った。天然の核酸では安定な3本鎖DNAを形成する事ができない領域に対して安定な3本鎖DNAを形成可能な人工核酸を創成し、その3本鎖形成能の評価を行った。本研究課題で開発した人工核酸は安定な3本鎖DNAを形成可能で、なおかつ細胞内の特定の遺伝子発現を効果的に抑えうる事に成功した。本成果は、人工核酸による3本鎖DNA形成を利用した画期的な遺伝子発現制御技術であり、次世代の核酸医薬開発に向けた基盤となる成果である。

研究成果の概要(英文)：The triplex DNA formation against duplex DNA offers a potential basis for genome targeting technology and/or medicine with sequence specificity. In triplex DNA, the sequence-specificity is established via the formation of specific base triplets between a triplex forming oligonucleotide and a duplex DNA, however, there is no natural nucleoside which can recognize inverted sites. The application of the triplex formation is consequently limited to the homopurine-homopyrimidine region of a duplex DNA. We showed the design and synthesis of artificial nucleoside analogues for selective recognition of CG base pair to expand triplex-forming sequence. The 2'-deoxycytidine derivatives were shown to possess high selectivity and affinity toward CG base pair without being effected by neighboring bases. Furthermore, TFO bearing them was demonstrated to effectively inhibit gene expression in living cells.

研究分野：生物有機合成化学

キーワード：核酸医薬 アンチジーン核酸 人工核酸 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読により、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。このような研究の中でタンパク質をコードしないncRNAの重要な機能の発見はライフサイエンスの革命的な変化を生み出している。小さなRNA(miRNA)は複数の遺伝子発現を制御していることから癌や糖尿病など多因子疾患の創薬標的あるいはリードとして臨床応用に向けた研究が活発化している。一方、RNAの制御・調節機能の複雑さが明らかになるにつれ、RNA産生そのものの制御など謎が深まっている。2本鎖DNAを標的にするアプローチはRNAを中心とする創薬に比べて展開速度は遅いものの、病気に関与している異常遺伝子に直接作用するため次世代の核酸医薬(アンチセンス核酸)として注目すべき手法である。

アンチセンス核酸は、遺伝子の異常が関与する様々な病気の根本的な原因となる2本鎖DNAに高い配列特異性と安定性で3本鎖DNA(1)を形成し転写過程を阻害する方法である。さらに、人工的に形成させた3本鎖DNA領域では特定の遺伝子発現(転写)を人工的にコントロール、内在性機構を利用した突然変異の誘起や修復など遺伝子編集に利用できる可能性も示されている。これらの詳細な機構は未解明であるものの3本鎖DNA形成の有用性は明らかである。しかしながら、3本鎖DNAを形成できる2本鎖DNA塩基配列に制限があり一般的な利用の妨げになっている。この制限を克服するための非天然型核酸の開発研究も行われ、糖部を修飾したBNAや塩基部分を修飾した核酸誘導体により一部制限を克服した例が報告されている。

2. 研究の目的

疾病の原因となる異常遺伝子を標的にした創薬として核酸医薬の開発研究が行われ、多様な機能をもつRNAを標的とする創薬が注目を集め、臨床応用に向け活発な研究が展開されている。一方、RNA調節機構は複雑に相互関連していることから、RNA制御の根幹となるDNAを標的とした創薬の重要性が再認識されると考えられる。これまでに、2本鎖DNA標的に配列特異的に3本鎖DNAを形成する独自の人工核酸を創製してきた。本研究では、3本鎖DNA技術を創薬として展開するための基盤として、化学的検討により、より効果的な人工核酸の開発を検討し、さらに、3本鎖形成による遺伝子発現制御法を確立し、新たな核酸医薬の基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究課題では、3本鎖DNA形成を基盤とした新たな核酸医薬の創製を目指し、人工核酸搭載アンチセンス核酸をより低濃度での機能させるため、アンチセンス核酸の生体内安定性を高めるエンハンサー分子、生体内因子を特異的に誘導するパイロット分子修飾

法の確立、3本鎖DNA形成配列拡張し適用範囲を拡大するため、配列依存性を克服した3本鎖DNA形成可能な新規人工核酸の創製を行う計画をした。具体的には、invitroで細胞増殖阻害活性が確認された人工核酸搭載アンチセンス核酸の細胞増殖阻害活性を高めるため、ポリエチレングリコール、ペプチド、コレステロールなどで修飾し、細胞への反応を検証する。さらに、A549細胞以外の細胞にも作用させ、遺伝子発現制御法の一般性を確立する。同時に、独自のプラットフォーム核酸分子を用いて、効率的に3本鎖DNA形成人工核酸を合成し3本鎖形成配列の拡張をし、細胞増殖に関わる遺伝子を標的として人工核酸搭載アンチセンス核酸による細胞増殖阻害効果の向上を行う計画をした。

4. 研究成果

アンチセンス核酸の分解耐性の獲得に向けてプロピルアミノリンカーを導入したアンチセンス核酸の合成を行い、各種DNA分解酵素と作用させる事で、未修飾体よりも安定に存在する事を確認できた。本成果の一環として、アンチセンス核酸の末端にアリキンを有する新規核酸誘導体を導入し、別途合成したアジド基を有するピレン、ナフタレン、ベンゼン、アルキル、ポリアミンやポリエーテル基の導入に固相担体上でのクリック反応を用いて成功した。末端に導入したアンチセンス核酸は3本鎖DNAの安定性の向上には至らなかったが、酵素耐性は有すると期待される。一方、アンチセンス核酸の内部に導入すると、ピレン基を導入したアンチセンス核酸で3本鎖DNAの安定化に成功した。この核酸を細胞に導入する事で細胞増殖阻害活性があり、有望な化学修飾(エンハンサー分子)である事を明らかにした(図1)。

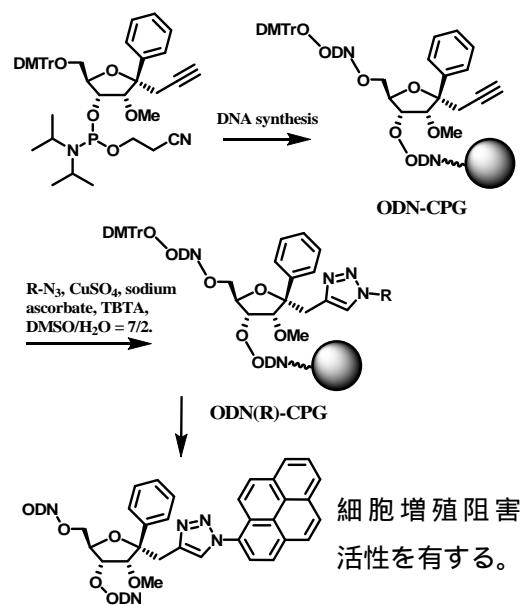


図1 固相担体上での人工核酸合成

3本鎖 DNA 形成配列拡張し適用範囲を拡大するため、配列依存性を克服した3本鎖 DNA 形成可能な新規人工核酸の分子設計を天然型の弱い相互作用である T/CG-3 重鎖構造を参考に行った。N-グアニジノエチル-2'-デオキシイソチジン骨格を見だし一部の配列で安定性は低いものの全ての配列で CG 塩基対を認識する事に成功した(図2)。また、グアノシン認識ユニットを連結しているリンカー部分を固定化する事により、より安定にしかも全ての配列で CG 塩基対の認識が可能な、イソチジン誘導体の開発に成功し、機能の向上を達成した(図3)。

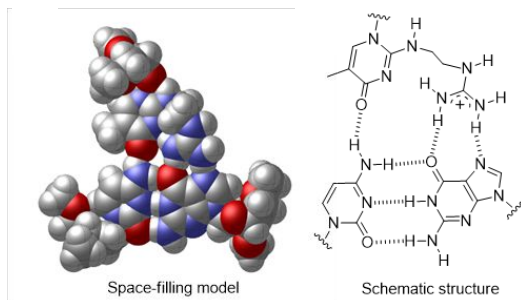


図2 CG塩基対を認識可能な人工核酸

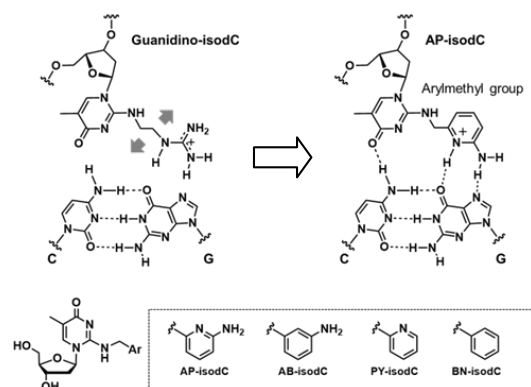


図3 CG塩基対を認識可能な人工核酸

配列依存性の克服可能な基本概念を確立したため、3本鎖 DNA の安定性の向上に期待した誘導体開発に着手した。より柔軟性を制御する為に、リンカー部分を短くしようと試みたが、化合物の N-グリコシド結合が分解したため合成を断念した。そこで、N-グリコシド結合部分の窒素原子を炭素原子に置き換えた C-ヌクレオシド誘導体を設計した(図4)。合成したる擬シチジン誘導体を用いて3本鎖 DNA 形成能を調べた結果、天然型の3重塩基対である T/AT-3 重鎖よりも安定な3本鎖 DNA を形成する事を世界で初めて見いだした。分子モデリングによる認識構造の予測を行った結果、予想通りに認識には人工核酸のプロトネーションが必要であり、さらに多点型水素結合が形成可能である事が示された。そこで、3'末端をアミノプロピルリンカーで修飾し擬シチジン誘導体を組み込んだア

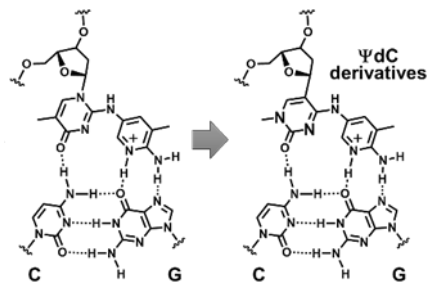


図4 新規人工核酸

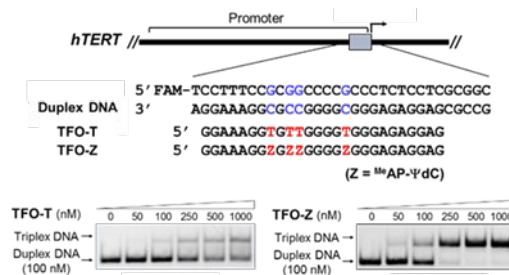


図5 3本鎖形成能の評価

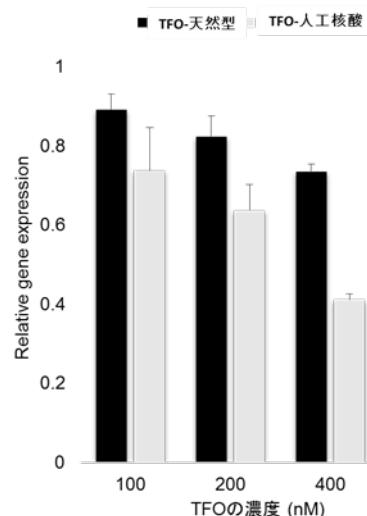


図6 mRNA 遺伝子発現制御

ンチジン核酸 (TFO: Triplex Forming Oligonucleotide) を合成した。このアンチジン核酸は、細胞のがん化に関与していると考えられている、hTERT 遺伝子のプロモータ領域を標的としている。3本鎖形成能の評価を行った結果、人工核酸を含むアンチジン核酸の方がより安定な3本鎖 DNA を形成する事を見いだした(図5)。さらに、培養細胞に導入し内因性の hTERT mRNA を定量したところ、人工核酸を含むアンチジン核酸の方がより発現量を抑えている事を見いだした。以上の結果は、人工核酸搭載アンチジン核酸による効果的な遺伝子発現制御であり、次世代の核酸医薬の一つになる可能性を示している。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Taniguchi Y., Kikukawa Y and Sasaki S. Discrimination Between 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine and 2'-Deoxyguanosine in DNA by the Single Nucleotide Primer Extension Reaction with Adap Triphosphate, *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有, Vol. 54, No.17, 2015, pp. 5147-5151. doi:10.102/anie.201412086.

Taniguchi Y., Tomizaki A, Matsueda N, Okamura H, Sasaki S, Enhancement of TFO Triplex Formation by Conjugation with Pyrene via Click Chemistry, *Chem. Pharm. Bull.* 査読有, Vol. 63, No. 11, 2015, pp. 920-926.

<http://doi.org/10.1248/cpb.c15-00570>  
Okamura H., Taniguchi Y. and Sasaki S. An Isocytidine Derivative with a 2-Amino-6-methylpyridine Unit for Selective Recognition of the CG Interrupting Site in an Antiparallel Triplex DNA, *ChemBioChem.* 査読有, Vol. 15, No. 16, 2014, pp. 2374-2378. doi: 10.1002/cbic.201402328

Jitsuzaki D., Onizuka K., Nishimoto A., Oshiro I., Taniguchi Y. and Sasaki S. Remarkable acceleration of the DNA/RNA inter-strand functionality-transfer reaction to modify a cytosine residue: the proximity effect via complexation with a metalcation, *Nucleic Acids Res.*, 査読有, Vol. 42, No. 13, 2014, 8808-8815. doi: 10.1093/nar/gku538

Taniguchi Y., Okamura H., Fujino N., Sasaki S. Synthesis of 1'-phenyl-2-OMe ribose analogues connecting the thyminebase at the 1' position through a flexible linker for the formation of a stable anti-parallele triplex DNA, *Tetrahedron*, 査読有, Vol. 69, No.2, 2013, pp. 600-606. DOI: 10.1016/j.tet.2012.11.016

Okamura H, Taniguchi Y and Sasaki S. N-(Guanidinoethyl)-2'-deoxy-5-methylisocytidine exhibits a selective recognition of a CG interrupting site for the formation of anti-parallel triplexes, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, Vol. 11, 2013, pp. 3918-3924. DOI: 10.1039/C30B40472B

### 〔学会発表〕(計 2 5 件)

岡村秀紀、谷口陽祐、佐々木茂貴、3 本鎖 DNA 中の CG 塩基対を選択的に認識する擬シチジン誘導体の合成と機能評価、第 13 回次世代を担う有機化学シンポジウム、2015

谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、非天然型 3 本鎖 DNA を可能にする人工核酸の合成とアンチジーン法への応用、日本核酸医薬学会第 1 回年会、2015

Hidenori Okamura, Yosuke Taniguchi, Shigeki Sasaki, Synthesis of novel pseudocytidine derivatives for the selective recognition of CG base pairs in triple-helix DNA, *PACIFICHEM2015*, 2015

岡村秀紀、谷口陽祐、佐々木茂貴、CG 生涯部位を選択的に認識する擬シチジン誘導体の合成と 3 本鎖形成能の評価、日本薬学会第 135 回年会、2015

Hidenori Okamura, Yosuke Taniguchi, Shigeki Sasaki, Selective CG base pair recognition by pyrimidine nucleoside analogues in all four flanking pairs within antiparallel triple helix DNA, *XXI Round Table on NNA*, 2014

岡村秀紀、谷口陽祐、佐々木茂貴、CG 塩基対を選択的に認識可能な擬シチジン誘導体の合成と 3 本鎖形成能評価、アンチセンスシンポジウム・遺伝子デリバリーシンポジウム 2014、2014

Yosuke Taniguchi, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Development of triplex-forming oligonucleotide having artificial nucleoside analogues to inhibit the gene expression as an antigene strategy, *DPhG jahrestagung2014/Annual meeting*, 2014

岡村秀紀、谷口陽祐、佐々木茂貴、CG 塩基対を選択的に認識可能な N-グアニジノエチルイソシチジンの合成を 3 本鎖 DNA 形成能の評価、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013

Hidenori Okamura, Yosuke Taniguchi, Shigeki Sasaki, N-(Guanidinoethyl)2'-deoxy-5-methylisocytidine exhibits selective recognition of the CG inversion site for the formation of anti-parallel triplex DNA, *ACMS2013*, 2013

冨崎瑛、谷口陽祐、佐々木茂貴、3 本鎖 DNA の安定化を目指した 1',1'-二置換ヌクレオシドの回春、第 25 回若手研究者のためのセミナー、2013

Yosuke Taniguchi, Akira Tomizaki, Hidenori Okamura, Syohie Misumi, Tomoko Takaki, Naoto Ishibashi, Shigeki Sasaki, Synthesis and evaluation of anti-parallel triplex formation of 1'-phenyl-2'-thymine nucleoside analogues for the application to the antigene strategy, *AIMECS2013*, 2013

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)  
取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

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・准教授

研究者番号：00452714