

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790110

研究課題名(和文) 核酸塩基の回転角制御に基づく人工核酸創製法に関する研究

研究課題名(英文) Study on artificial nucleic acids design based on the glycosidic bond angle control

研究代表者

兒玉 哲也 (Kodama, Tetsuya)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授

研究者番号：00432443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：7-デアザプリン類を核酸塩基とする架橋型人工核酸を合成し、また、そのグリコシド結合周りの回転角を見積ることで、架橋型人工核酸が二重鎖を強固に安定化するにはRNA中で観察される塩基の回転角をもつことが重要である事を明らかとした。また、テトラヒドロピラン骨格をもつ3',6'-結合型核酸とシクロヘキセン骨格をもつ架橋型人工核酸などを合成した。さらに、これらを導入したDNAが核酸分解酵素への高い耐性を示すこと、テトラヒドロピラン骨格をもつ3',6'-結合型核酸が天然のDNAと比べて1塩基あたり3°程度の熱的安定化効果を示し、核酸技術に利用可能な新しい核酸分子としての可能性を見いだす事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Several artificial nucleic acids bearing 7-deazapurine-analog were synthesized and those torsion angles about glycosidic bond were estimated. We found that bridged nucleic acids have a similar glycosidic bond angle to RNA to stabilize the double stranded oligonucleotides. Moreover, nucleic acids bearing tetrahydropyran or cyclohexene as a sugar moiety were synthesized. These artificial nucleic acids showed a high resistance to 5'-3' exonuclease, and one of nucleic acids bearing a tetrahydropyran sugar present a high stabilization property of duplex oligonucleotides.

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：核酸 有機化学 核酸医薬 薬学 創薬科学 人工核酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 低分子化合物を基盤としたこれまでの創薬研究に陰りが見られるなか、低分子創薬を補う新たな創薬手法としてバイオ医薬が近年期待されている。その中で核酸医薬は、標的遺伝子の働きを特異的に抑制することで疾病の原因となるタンパク質の発現を抑制するものと、抗体のように標的分子を捕獲するものとして大きく分類できるが、いずれもいくつかの医薬候補品が臨床試験中にあるなど、次世代医薬としての高い期待が寄せられている。申請者はこれまで、有機化学を基盤とした核酸素材の設計と合成、そしてその核酸素材を用いた核酸検出技術や遺伝子発現調節技術の開発に従事し、なかでも、当研究室で開発を続けている構造の揺らぎを抑制した架橋型人工核酸類の高い有用性を示してきた。生物学的安定性に優れ、相補的な RNA との結合親和性が極めて高い 2',4'-BNA/LNA は、分子生物学のツールとして世界中においても広く利用され、海外では核酸医薬品としての臨床試験も進められている。

(2) そうした中で申請者は、特定の核酸塩基 8-アザ-7-デアザグアニンを有する 2',4'-BNA が、BNA 類の最も特徴的な性質である RNA 高選択的な結合親和性とは異なり、DNA への高親和性を有していることを見だし、その DNA 構造制御法への展開に成功した。例外無く RNA 選択的な結合親和性を示してきた 2',4'-BNA 類が特定のわずかな化学修飾でその特徴を大きく変化させたことは興味深く、その理由は現在、8 位窒素原子上の孤立電子対がフラノース環 O4' 位の孤立電子対と反発する事により、核酸塩基の回転角が 2',4'-BNA グアニンの回転角と比べてずれが生じたためと考察している。加えて最近、基本骨格を刷新した架橋型人工核酸 BsNA を合成し、核酸塩基の回転角の制御が安定な二重鎖核酸の形成に重要である可能性を示した。これらの結果は、核酸の糖部構造固定だけではなく、適切な核酸塩基の回転角規定が 2',4'-BNA/LNA 類の RNA 選択的な高い結合親和性を誘起していることを強く示唆している。一方、核酸塩基の回転角を大きく回転(反転)させることで核酸の高次構造を制御する研究は古くから現在でも広く行われているが、上述した微小な回転角の違いが核酸高次構造の安定化に与える影響についてはほとんど研究されていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでその重要性についての議論がなされてこなかった核酸塩基の回転角が核酸高次構造の熱的安定性に与える影響を明確化し、医薬品化が期待されている 2',4'-BNA/LNA に次ぐ新たな人工核酸を創出する。本計画では、(I) 核酸塩基の回転角が異なる人工核酸モノマー(ヌクレオシド)を数種類合成すること、(II) そのヌクレオシド

を導入したオリゴ核酸が形成する二重らせん構造などの高次構造の熱的安定性を系統的に明らかとする事、そして(III) それらオリゴ核酸の構造特性を精査することの3点が最重要である(図3)。従って、これら項目を着実に達成することで医薬品素材に資する人工核酸の創製に繋げる。

3. 研究の方法

本研究では、新たな3つのコンセプトの下に核酸塩基の回転角を大きな角度に制御した人工核酸を創出する。一つは、BsNA の成果を踏まえ、核酸塩基の結合位置の変更と糖部構造を刷新した人工ヌクレオシドを合成し、そのオリゴ核酸が形成する高次構造の熱的安定性を評価する。また、糖部と塩基部との間に共有結合を介することで核酸塩基の回転そのものを制御した人工ヌクレオシドを合成する。さらに、構造解析について精査し、核酸塩基の回転角が核酸高次構造に与える影響を精査する。

4. 研究成果

(1) グリコシド結合周りの二面角(核酸塩基の回転角)の違いが架橋型人工核酸の二重鎖形成能に与える影響を調べるため、7-デアザプリン類ならびに 8-アザ-7-デアザプリン類を核酸塩基とする LNA ヌクレオシドを計4種類合成した(この内、8-アザ-7-デアザグアニン体はすでに合成済み)。また、DNA 合成機を用いた核酸合成に適用するため、それぞれのアミノ基をピバロイルまたは N,N-ジメチルアセトアミド基で保護したホスホロアミダイト体へと誘導した。各アミダイトブロックを用いることで、効率的に12塩基長の DNA 鎖中に7-デアザプリン類を核酸塩基とする架橋型人工核酸の合成に成功した。合成した LNA 類の二重鎖核酸形成能を詳細に調べたところ、アデニン類縁体かグアニン類縁体かの違いに因らず、プリン塩基の8位に窒素原子を持つ 8-アザ-7-デアザプリン LNA の二重鎖形成能は、LNA プリン類よりも大きく低下する事が分かった。一方で、7-デアザプリン類ではこの不安定化効果は観察されなかった。8位に窒素原子をもつプリン塩基を核酸塩基とする LNA の核酸塩基の回転角は、8位に窒素原子をもたないプリン塩基を核酸塩基とする LNA や RNA の核酸塩基の回転角とは大きく異なっており、この違いが二重鎖核酸の安定化能の違いとして表れている事、すなわち架橋型人工核酸が二重鎖を強固に安定化するには RNA 中で観察される塩

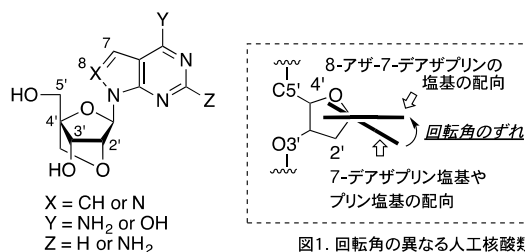


図1. 回転角の異なる人工核酸類

基の回転角をもつことが重要である事を明らかとした。

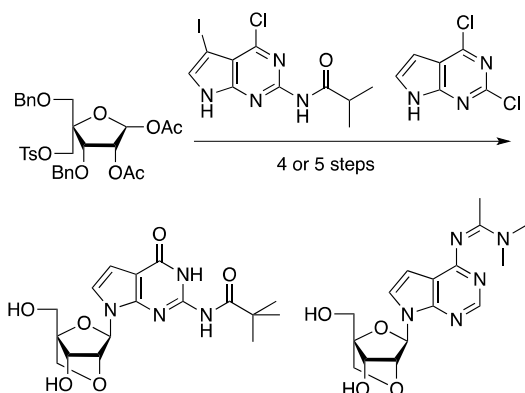


図2. 7-デアザプリン LNA の合成

(2) 核酸の糖部構造をテトラヒドロピラン骨格へと刷新した 3',6'-結合型核酸を合成し、これまでに合成した 4',6'-結合型核酸との性質の違いを様々な角度から比較した。テトラヒドロピラン骨格をもつ人工核酸のなかで、アノマー位に核酸塩基が結合しかつ6位(5位ヒドロキシメチル基)を介してオリゴマー化した人工核酸が天然の核酸類と安定な二重鎖を形成した例は無い。この理由は、二つのリン酸ジエステル結合と核酸塩基との空間的な配置が天然の核酸と異なることで、天然核酸と同じピッチで二重鎖らせん構造を形成できないためと考えられている。しかし、これまでの申請者の研究成果から、二つのリン酸ジエステル結合と核酸塩基との空間的な配置が天然の核酸と同じになるようにテトラヒドロピラン骨格を固定化した BsNA もまた天然の核酸と安定な二重鎖を形成できない事をしめし、この理由が核酸塩基の回転角が天然の人工核酸とは大きく異なるためである事を明らかとした。申請者は、この回転角の違いを修正するために、これまでの4',6'-結合型から 3',6'-結合型へと変更する事でヌクレオシドそのものの配向を回転させることとした。3',6'-結合型の BsNA は、4',6'-結合型 BsNA の合成中間体から、ラジカル反応とヒドロホウ素化-酸化を含む水酸基の立体選択的導入をへて合成した。

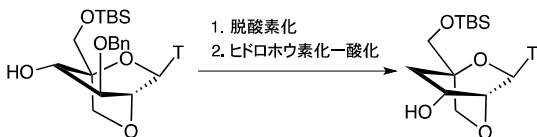


図3. 新たな BsNA の合成鍵反応

オリゴヌクレオチドへと導入後に二重鎖安定化能を BsNA と比較したところ、天然の DNA と比べて1塩基対あたり3程度、BsNA と比較して1塩基対あたり11程度

の安定化効果を示す事を明らかとした。リン酸ジエステル結合間の距離(ピッチ)が天然の核酸類と異なるにもかかわらず二重鎖を安定化させたこの結果は、核酸塩基の回転角が安定な二重鎖核酸を形成する重要な因子である事を明確に示している。

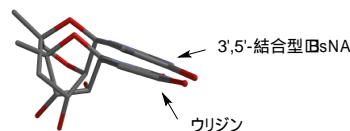


図4. 3',5'-結合型BsNAとRNAとの重ね合わせ図

(3) 核酸塩基の結合位置を変える目的でシクロヘキセン骨格を糖部にもつ人工核酸を設計した。安価なメチルマンノシドを出発原料とし、アルドール反応による2位へのヒドロキシメチル基の導入と、塩化パラジウムを用いた転位反応によってシクロヘキセン骨格の構築を経て、18工程、総収率17%でシクロヘキセン骨格をもつ人工ヌクレオシドの合成を達成した。続いてホスホロアミダイト法に従い、オリゴデオキシヌクレオチドへの導入に成功した。

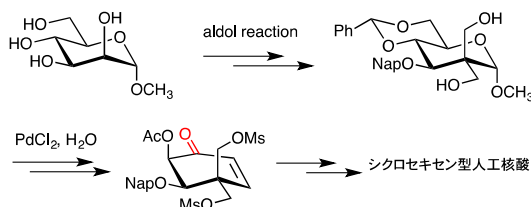


図5. 7-シクロヘキセン型人工核酸の合成

また、シクロヘキセン骨格をもつ人工核酸のエキソヌクレアーゼへの耐性を評価した結果、期待通り DNA や 2',4'-BNA/LNA より遥かに高い酵素耐性能を有することを明らかとした。一方、二重鎖形成能を T_m 値で評価したところ、一塩基修飾ではその効果はほとんど観察されなかったが、連続した修飾により二重鎖を大きく不安定化させることがわかった。類似のシクロヘキセン核酸は多修飾においても天然の核酸と同等の二重鎖形成能を示す事が報告されており、またその構造制限アナログである今回合成した人工核酸 2',4'-BNA/LNA に近い立体構造をもつことから、その二重鎖形成能が低下したことは核酸分子の化学設計上大変興味深い。

(4) さらに、糖部と塩基部との間に共有結合を介することで核酸塩基の回転そのものを制御した人工ヌクレオチド誘導体の合成を検討した。沃化サマリウムを用いたラジカル反応を用いる事で、当初の計画通り、糖部と塩基部との間に共有結合を形成する事に成功した。しかし、予想に反してその核酸塩基部の構造が不安定化されたためか、核酸塩基部の芳香族性が失われ、研究期間内での改

善はできなかった。今後研究費が得られた際に引き続き検討していきたい。

(5) 合成に成功した人工核酸類の高次構造情報を収集するため円二色性を測定し、天然核酸や 2',4'-BNA/LNA やセレノ LNA などの天然と類似の糖部構造を有した人工核酸類とのスペクトルを比較した。その結果、核酸の種類に関わらず、すべての人工核酸でほぼ同じスペクトルを示した。このことは、人工核酸の導入が熱的安定性に影響を与えているかどうかには関わらず、核酸の高次構造はほとんど変化させていない事を示唆している。従って、人工核酸の導入がなぜ熱的安定性を大きく変化させるのかを議論するには、エックス線結晶構造解析などを用いたより詳細な構造解析の必要と考える。

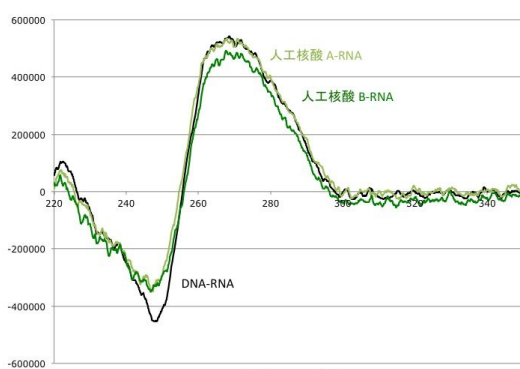


図6. DNA, 人工核酸 A, 人工核酸 B の CD スペクトル

(6) 熱力学的な解析をあわせて実施した。その結果、二重鎖の熱的安定性が向上した人工核酸の多くの場合においてエンタルピー項が有利になっていることが分かった。これは、核酸塩基が適切な配向にあることで、二重鎖形成時に構造変化する必要性がなくなった事やスタッキングを効率的にできるようになった事などが考えられ、本研究のコンセプトが正しい事を強く示唆している。以上のように本研究では、これまでその重要性についての議論がなされてこなかった核酸塩基の回転角が核酸高次構造の熱的安定性に与える影響を精査するため、様々な人工核酸を合成し、その性質を比較検討した。その結果、特に RNA を標的とする際に核酸塩基の回転角がもともと適切な配向に存在している事が安定な二重鎖核酸を形成することに重要である事が明確にした。報告されている核酸高次構造中の核酸塩基の配向はその高次構造によって大きく異なっているため、二重鎖・三重鎖・四重鎖など、それぞれの構造安定化のために適した人工核酸を設計するための指針の一つとして核酸塩基の配向は考慮すべきパラメーターであることを示す事ができた。

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3件)

Kunihiko Morihiko, Tetsuya Kodama, Shohei Mori, Satoshi Obika. Photoinduced changes in hydrogen bonding patterns of 8-thiopurine nucleobase analogues in a DNA strand. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12(15), 2468-2473. DOI: 10.1039/c3ob42427h. 査読有

Kunihiko Morihiko, Tetsuya Kodama, Reiko Waki, and Satoshi Obika. Light-triggered strand exchange reaction using the change in the hydrogen bonding pattern of a nucleobase analogue. *Chem. Sci.* **2014**, 5(2), 744-750. DOI: 10.1039/C3SC51987B

Kunihiko Morihiko, Tetsuya Kodama, Kentefu, Yoshihiro Moai, Rakesh N. Veedu, and Satoshi Obika. Selenomethylene Locked Nucleic Acid Enables Reversible Hybridization in Response to Redox Changes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52(19), 5074-5078. DOI: 10.1002/anie.201300555.

[学会発表](計6件)

兒玉哲也、架橋型人工核酸(BNA)の核酸医薬への応用、名古屋大学 予防早期医療創成センター第4回ワークショップ、2014年1月29日、名古屋大学(愛知)

兒玉哲也、ヌクレオシド・ヌクレオチドならびにオリゴヌクレオチドのメディシナルケミストリー、中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会、2014年12月12日、ウインクあいち(愛知)

森和土、兒玉哲也、小比賀聡、舟形ピラノース核酸類の合成とその標的結合能、第39回反応と合成の進歩シンポジウム、2013年11月6日、九州大学(福岡)

Kazuto Mori, Tetsuya Kodama, Satoshi Obika, Syntheses and properties of nucleic acids having constrained pyranose as the sugar moiety. The 40th international symposium on nucleic acids chemistry. 2013年11月13-15日、神奈川大学(神奈川)

Yoshihiro Moai, Tetsuya Kodama, Kunihiko Morihiko, Hidekazu Hiroaki, Satoshi Obika, Selenomethylene locked nucleic acid (SeLNA) bearing a purine base. The 40th international symposium on nucleic acids chemistry. 2013年11月

13-15 日、神奈川大学（神奈川）

百相義大、廣明秀一、小比賀聡、兒玉哲也、架橋型シクロヘキセニル核酸の合成と評価、第 2 3 回アンチセンスシンポジウム、2013 年 11 月 28-29 日、徳島大学（徳島）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

兒玉 哲也（KODAMA, Tetsuya）

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・准教授

研究者番号：00432443