

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2005～2008
課題番号：17209001
研究課題名(和文) 化学反応性ゲノム標的分子の展開とインテリジェント・ナノ医薬としての基礎検討
研究課題名(英文) Development of Genome-Targeting Molecules with Ability of Chemical Reactivity and Application to Intelligent Nano-Medicine
研究代表者 佐々木 茂貴 (SASAKI SHIGEKI) 九州大学・大学院薬学研究院・教授 研究者番号：10170672

研究成果の概要：本研究では、インテリジェント機能性分子をナノ医薬に発展させるための基礎検討を行い、(1)ハイブリッド内において、中性条件下ではシトシン特異的でありアルカリ条件下でグアニン特異的な官能基転移反応、(2)新規ヌクレオシドアナログの合成に成功し、非天然型3本鎖DNAの形成、(3) DNA中の酸化損傷塩基、8-oxodGの検出プローブの開発、(4) クロスリンク反応によるアンチセンス阻害の効率向上、を達成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	12,400,000	3,720,000	16,120,000
2006年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
総計	39,400,000	11,820,000	51,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学子

キーワード：ゲノム標的分子、機能性核酸、反応性分子、インテリジェント核酸、ナノ医薬

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムシーケンス時代に突入した現在では個々の遺伝情報に基づく新しい医薬品ならびに治療法の開拓が急務となっている。人工核酸を用いてDNAやRNAなどの遺伝情報分子を直接標的にするバイオテクノロジー(ゲノム標的分子)はナノサイズの高機能分子として、ナノ医薬への展開が精力的に検討されている。我々はこれまで継続的にゲノム標的分子について有機化学的な検討を行い、ハイブリッド形成にシンクロナイズしたアルキル化反応、配列特異的なニトロシル転移反応、3本鎖DNA標的を拡張する認識分子など従来にないインテリジェント機

能性分子の創製に成功した。さらにナノ輸送システムを利用することによってアルキル化反応性オリゴ核酸を細胞内で機能させることにも成功した。

## 2. 研究の目的

ゲノム標的化学に関するこれまでの成果を踏まえ、本研究では、インテリジェント機能性分子をナノ医薬に発展させるための基礎検討を目的として、次の項目を検討した。  
(1) 生体内でゲノムを標的とする新規反応の開発と機能評価  
(2) ゲノム標的化のための有用な認識分子の設計とアンチジーンとしての評価

- (3) ナノ医薬のための高機能集積型分子の設計  
 (4) ナノ医薬としての新しい生物活性の検証。

### 3. 研究の方法

- (1) 生体内でゲノムを標的とする新規反応の開発と機能評価

**効果的なクロスリンク分子の開発** すでに我々はハイブリッド形成を活性化刺激とする特異的なクロスリンク反応性分子を用いて生細胞中で有効なアンチセンス阻害活性を達成した。本研究では、より効率的なクロスリンク分子の開発を検討した。

**新規官能基転移反応の開発** ハイブリッド形成によって生起する更なる反応としてシトシン特異的なニトロシル転移反応を開発し、反応点にピンポイントで変異を誘起することに成功した。本研究ではこの人工核酸をナノ医薬化して細胞への展開を図ると平行し、新しい官能基転移反応の開発を検討した。

**RNA 検出プローブとしての人工核酸の開発** 更なる新規反応性分子としてハイブリッド形成により自己分解する人工核酸を設計した。この反応の進行によってハイブリッドが解離するため、標的 mRNA のリサイクルによる、反応の触媒化を期待した。

- (2) ゲノム標的化のための有用な認識分子の設計とアンチジーンとしての評価

**新しい非天然型ヌクレオシドの開発** 3本鎖 DNA 形成によって認識できる遺伝子配列を拡張するため、我々はピシクロ糖構造を持つ人工核酸 (WNA) を開発し、世界に先駆けて4種の認識コードを完成させることに成功した。本研究では、これらを利用したアンチジーンによる遺伝子阻害を検討した。さらに認識の一般性を高めるため、ベンゼン環を種々の芳香族に置換した構造を合成し、3本鎖形成能を検討した。

- (3) ナノ医薬のための高機能集積型分子の設計

**DNA への自己集積分子の開発** 天然物

chromomycin をリードとする新しい DNA 結合分子は  $Mg^{2+}$  を介して 2 量体となって DNA 副溝に結合する。そこで、本研究では DNA 結合性ユニットを結合した分子を合成し、DNA 上に自己集合する分子の開発を検討した。

- (4) ナノ医薬としての新しい生物活性の検証

本研究では、細胞を用いた評価によってナノ医薬としての基礎検討を行うため、細胞実験系を立ち上げ、種々の人工核酸の生体機能の評価を行った。

### 4. 研究成果

- (1) 生体内でゲノムを標的とする新規反応の開発と機能評価

**生体内で効果的なクロスリンク分子の開発**

【分子設計】2-アミノ-6-ビニルプリンスルフィド保護体 (Figure 1) は、細胞内において天然型よりも高いアンチセンス効果を持つことが示されている。しかしながら、これらの ODN は試験管内反応で標的に RNA を用いた場合、ほとんど反応性を示さないことが明らかになった。そこで本研究では、RNA に対して高いクロスリンク反応性を示し、かつシトシンへの塩基選択性を保持する 2-アミノ-6-ビニルプリン誘導体の開発を検討した。

RNA に対する反応性が低い原因として、近接効果がうまく得られていないことが予測された。そこでビニルプリンに炭素鎖のスペーサーを導入し、反応点の自由度を上げることで効果的な近接効果が得られることを期待した (Figure 1)。スペーサーは長さの異なる三種類 (炭素数 1, 2, 4) を選択し、それぞれの効果を比較した。

【クロスリンク反応性評価】合成した ODN と、

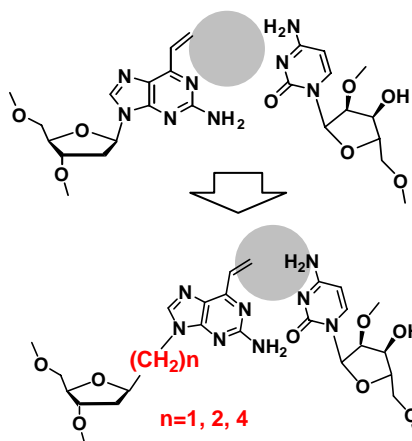


Figure 1 スペーサーを導入した新クロスリンク分子

5 末端を FAM で標識した相補的な DNA および RNA とのクロスリンク反応を行った。その結果メチレンスペーサー体 ( $n = 1$ ) およびブチレンスペーサー体 ( $n = 4$ ) の反応性・選択性は共に低かったが、エチレンスペーサー体 ( $n = 2$ ) は RNA 中のシトシン選択的に高い反応性を示した (Figure 2)。

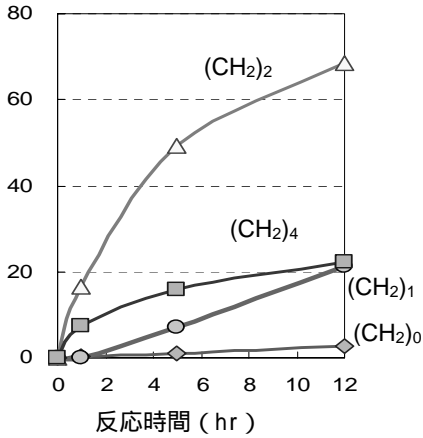


Figure 2. RNA シトシンに対する反応性

【アンチセンス効果の評価】ルシフェラーゼの mRNA を標的とした反応性 ODN の PEG コンjugate 体を細胞抽出液中でインキュベートし、発現したルシフェラーゼにルシフェリンを加えて発光量を測定することでアンチセンス効果の評価を行った (Figure 3)。

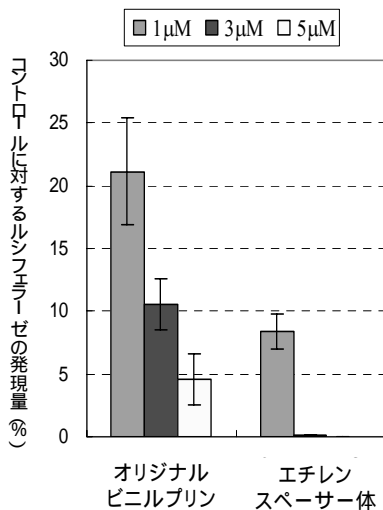


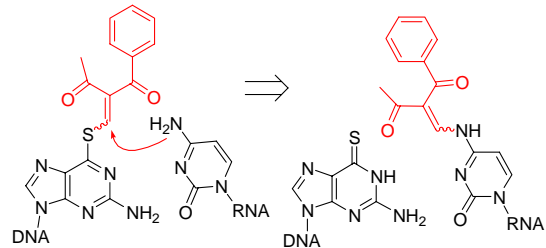
Figure 3. PEG コンjugate 体のアンチセンス評価

その結果、エチレンスペーサー体を含む ODN はスペーサーのないオリジナルビニルリンより高いアンチセンス効果を示した。本成果により、従来型よりも有効性の期待できる機能性分子が開発された。

### 新規官能基転移反応の開発

タンパク質をコードしない non-coding RNA による RNA レベルでの遺伝子発現調節メカニズムが注目を集めている。RNA をターゲットとした新たなテクノロジーの中で、RNA の部位特異的修飾技術は、RNA の構造機能研究の基礎科学的ツール、遺伝子診断技術や医薬品への応用が期待されている。本研究では、

RNA の配列を認識し、化学反応により官能基転移を起こす RNA 標的官能基転移分子の開発を目指した。すでに、配列・塩基特異的にシトシンアミノ基へ NO を転移させ、脱アミノ化を誘起することにより、塩基構造の改変に成功している。本研究では、転移後安定に存在できる官能基の転移反応を検討し、RNA を部位特異的に修飾できる新しい技術の開発を目指した (Figure 4)。



X = NO, vinyl derivative (previous study)  
X = photo-activated vinyl derivative (this study)

Figure 4. 官能基転移反応

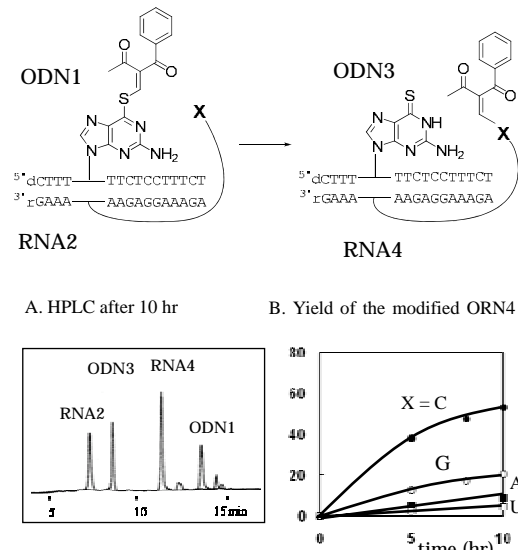


Figure 4. シトシン選択的官能基転移反応

合成した官能基転移性核酸に、シトシンを標的部位に含む相補的 RNA2 を加えることで官能基転移反応を行った。標的塩基 C に対して選択的に転移生成物である RNA4 が新たに生成した (Figure 4)。転移反応により修飾されたシトシンを含む RNA をテンプレートに用いて逆転写反応を行うと、修飾された C で反応が特異的に停止し 14mer の DNA が生成した。この結果により、本分子が逆転写反応を部位特異的に阻害できることが示された。

### RNA/DNA 検出プローブとしての人工核酸の開発

当初の計画では自己分解型人工核酸の開発を目指したが、多くの困難のため、この計画は断念した。その検討の過程で塩基欠損 DNA 箇所 (AP サイト) を認識する低分子の候補を見出すことができた。

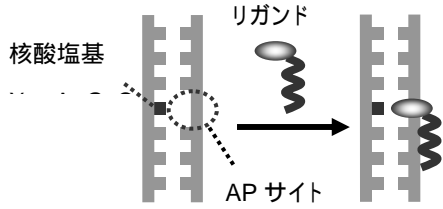


Figure 4. 塩基欠損箇所 (AP) 認識リガンド

AP サイトに結合する低分子リガンドとして、DNA と非特異的に相互作用するカチオン部、AP サイトにはまり込み、対をなす位置に存在する核酸塩基と相補的な塩基対を形成して特異的に認識するアデニン、グアニン、シトシン、チミンの4種類の核酸塩基の結合体を設計・合成した。核酸塩基としてアデニンを有するリガンドを用いて融解温度 ( $T_m$ ) 測定を行った結果、AP サイトと対をなす位置に存在する核酸塩基がチミンの時に選択的な  $T_m$  値の上昇 ( $\cdot T_m = 7.7^\circ\text{C}$ ) が観察され、低分子リガンドが AP サイトに選択的に結合している可能性が示された。

(2)ゲノム標的化のための有用な認識分子の設計とアンチジーンとしての評価

### 新しい非天然型ヌクレオシドの開発

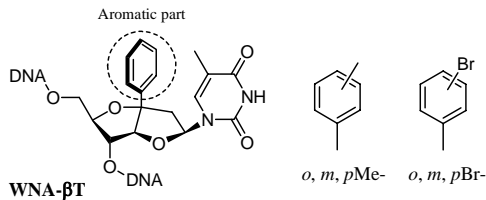


Figure 5. 新 WNA 誘導体の構造式

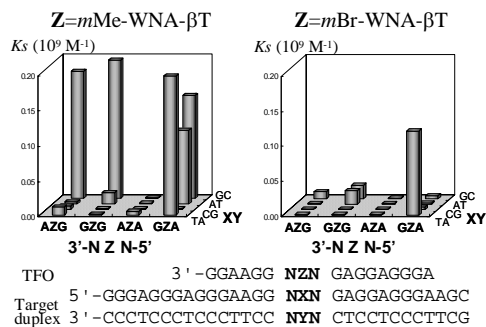


Figure 6. 3本鎖形成能の評価

本研究では、WNA 誘導体 n3 本鎖の安定性に関与していると考えている芳香環に置換貴を導入した  $\alpha\text{Br-}$ ,  $m\text{Br-}$ ,  $p\text{Br}$  WNA- $\cdot\text{T}$  および  $m\text{Me-}$ ,  $p\text{Me}$  WNA- $\cdot\text{T}$  を合成し (Figure 5)、3 本鎖安定化効果を評価した。その結果、 $m\text{Me-WNA-}\cdot\text{T}$  は 3 本鎖形成障害部位である TA 塩基対に対して選択性は示さなかったが、隣接塩基に G をもつ配列 (3 AZG5, 3 GZG5, 3 GZA5) では天然型 3 本鎖 (dG/GC) よりも安定な 3 本鎖を形成した (Figure 6)。さらに興味深いことに、 $m\text{Me-WNA-}\cdot\text{T}$  は DNA 鎖挿入効果があることが見出され新しいゲノム標的分子の可能性が見出された。

### DNA への自己集積分子の開発

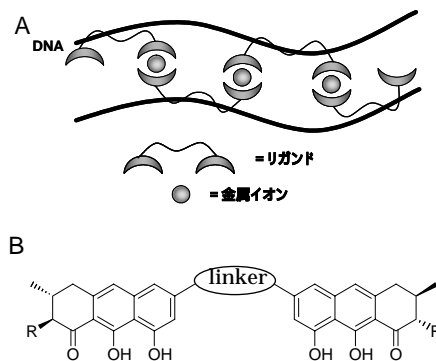


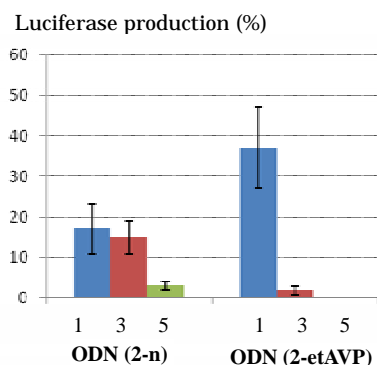
Figure 7. アンスラセノン骨格を2個もつスリガンドの一般式 (B) と金属イオンを介した DNA への集積期待図

長い繰り返し配列に集積する分子の開発にあたり、金属錯体形成により二量化して DNA 結合性を示す低分子化合物に着目した。このような DNA 結合性金属錯体形成分子をリンカーで結合したビスリガンドは、一つの金属錯体形成が次の錯体形成を誘起することにより協奏的に DNA 上での自己集積を促進できるものと期待される (Figure 7)。すでに ChromomycinA<sub>3</sub> をリード化合物とする DNA 結合性リガンドをリンカーで結合したビスリガンドを用いて長い繰り返し配列の DNA 上への自己集積の実現を目指した。その結果、ESI-MS 測定によって  $\text{Mg}^{2+}$  を介して連続的に集積している構造が示唆されたが、DNA 上への集積は確認できなかった。現在、水溶解性を高めた分子による更なる検討を継続中である。

### (3) 生体利用のためのナノ医薬分子の設計

新たに開発したエチルスペーサーを含むクロスリンク分子 (Figure 1) の生体利用のために、PEG 化 ODN 体を合成してアンチセンス阻害効果を調べた。その結果、従来のスペー

Spacer構造のないクロスリンク核酸よりも効果的な阻害効果が得られることが分かった。



**Figure 8.** Spacerを持たないクロスリンク核酸(ODN(2-n)とエチルSpacerを持つ新クロスリンク核酸(ODN(2-etAVP)のPEGコンジュゲータ体のアンチセンス阻害効果の比較

#### (5)結論

当初計画を順調に達成し、ゲノム標的分子の新しい局面を開くことができた。今後は成果を統合・融合し、ナノ医薬としての展開を目指す予定である。

#### 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 68 件)

##### 国際誌

- 1) Onizuka K, Taniguchi Y., Sasaki S., Site-specific covalent modification of nucleic acids guided by functionality-transfer oligodeoxynucleotides, *Bioconjugate Chem.* **20**, 799-803 (2009).
- 2) Ali M. M., Imoto S., Li Y., Sasaki S., Nagatsugi F., Incorporation of inducible nucleotide analog into DNA by DNA polymerases, *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2859-2863 (2009).
- 3) Nasr T., Li Z., Nakagawa O., Taniguchi Y., Ono S., Sasaki S., Selective Fluorescence Quenching of the 8-OxoG-clamp by 8-Oxodeoxyguanosine in ODN, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 727-730 (2009).
- 4) Imoto S., Hirohama T., Nagatsugi F., DNA Templated Click Chemistry for Creation of Novel DNA Binding Molecules, *Bioorg. Chem. Lett.*, **18**, 5660-5663 (2008).
- 5) Nagatsugi F., Nakahara R., Inoue K., Sasaki S., Synthesis and Evaluation of the Luciferase-Oligodeoxynucleotide

for the Sequence-Selective Detection of Nucleic Acids, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **341**, 562-567 (2008).

- 6) Taniguchi Y., Togo M., Aoki E., Uchida Y., Sasaki S., Synthesis of p-amino-WNA derivatives to enhance the stability of the anti-parallel triplex, *Tetrahedron*, **64**, 7164-7170 (2008).
- 7) Haruta Y., Onizuka K., Watanabe K., Kono K., Nohara A., Kubota K., Imoto S., Sasaki S., Stereoselective synthesis of (t)-2-deoxyolivin based on cycloaddition reaction between the homophthalic anhydride and the chiral cyclohexenone derivative, *Tetrahedron*, **64**, 7211-7218 (2008).

續輝久(共同研究者)

- 8) Kamiya H, Uchiyama M, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Harashima, Effects of target sequence and sense versus antisense strands on gene correction with single-stranded DNA fragment., *J. Biochem.*, **144**, 431-436, 2008.
- 9) Tsuchiya H, Uchiyama M, Hara K, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Inoue H, Harashima H, Kamiya H., Improved gene correction efficiency with a tailed duplex DNA fragment., *Biochemistry*, **47**, 8754-8759, 2008.
- 10) Sanada M, Hidaka M, Takagi Y, Takano TY, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M., Modes of actions of two types of anti-neoplastic drugs, dacarbazine and ACNU, to induce apoptosis., *Carcinogenesis*, **28**, 2657-2663, 2007.

その他 58 件

[学会発表](計 180 件)

招待講演(国内 19 件)

- 1) 佐々木茂貴、選択的化学反应による遺伝子改変へのアプローチ、第4回バイオ医工学シンポジウム、理化学研究所(和光市) 2009.3.16.
- 2) 佐々木茂貴、遺伝子発現の制御を目指した三重鎖形成人工塩基の新展開、第24回日本DDS学会学術集会、六本木ヒルズ(東京都)、2008.06.26-27.
- 3) 佐々木茂貴、永次史、井本修平、谷口陽祐、鬼塚和光、遺伝子特異的人工核酸のデリバリーシステムを用いた細胞内反応への展開 - 化学反应による遺伝子修飾および修復を目指して、第57回高分子討論会、大阪市立大学(大阪市)、2008.09.24-26.

- 4) 佐々木茂貴、中川治、小野沙弥香、李志春、辻本朗、古賀洋平、酸化損傷塩基 8 - オキソグアノシン特異的蛍光プローブの開発、第 47 回電子スピンスイェンス学会年会、九州大学医学部百年講堂、2008.10.01-03.
  - 5) 佐々木茂貴、アンチセンスの機能拡張を目指したインテリジェント人工核酸、第 18 回アンチセンスシンポジウム、岐阜大学薬学部記念会館(岐阜県)、2008.11.17-18
- その他 14 件

招待講演 (国際学会 13 件)

- 1) K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, Design of 5-vinylated 6-thioguanosine as a specific modifier of cytidine, 14th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Cesky Krumlov, Czech, 2008.06.08-06.13.
- 2) S. Sasaki, Design of Specific Reaction to DNA and RNA for Regulation of Gene Expression-New Functionality Transfer Reaction for Site-selective Modification of RNA. The 3rd International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia under Asian Core Program, Lis Ying Hotel (China), 2008.10.19-23.
- 3) S. Sasaki, New Functionality Transfer Reaction for Site-Selective Modification of RNA and DNA, 8th France-Japan DDS Symposium, Cannes, France, 2008.10.05-08.

その他 10 件

一般講演

口頭発表

国内 40 件

国際 9 件

ポスター発表

国内 42 件

国外 24 件

續輝久 (共同研究) 計 33 件

[その他]

受賞等

- 1) 阿部由希子、平成 21 年度笹川科学研究助成 2009 年 3 月
- 2) 内田裕子、第 25 回日本薬学会九州支部大会優秀発表賞受賞 2008 年 12 月 6 日

- 3) 鬼塚和光、第 18 回アンチセンスシンポジウムポスター優秀賞、2008 年 11 月 17 日
- 4) 野原昭広、第 25 回有機合成化学セミナーポスター優秀賞 2008 年 9 月 10 日
- 5) Tamer Mohamed Nasr Hefmi, The Technical Program Committee of the First Egypt Japan International Symposium of Science and Technology 2008 優秀発表賞 (EJISST2008 Award) 2008 年 6 月 10 日
- 6) 東郷美枝子、第 17 回アンチセンスシンポジウム優秀発表賞受賞 2007 年 12 月 4 日
- 7) 青木絵里子、第 34 回核酸化学シンポジウム、東京、ポスター優秀賞受賞 (Nucleic Acid Research 賞) 2007 年 11 月 22 日
- 8) 青木絵里子、第 23 回日本薬学会九州支部大会優秀発表賞を受賞 2006 年 12 月 9 日
- 9) 中山静香、第 33 回核酸化学シンポジウムポスター賞 (SAFC-Prologo 賞) 受賞 2006 年 11 月 22 日
- 10) 河野杏子、第 16 回福岡シンポジウム (萬有シンポ) ポスター賞受賞、2006 年 5 月 27 日

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 茂貴 (SASAKI SHIGEKI)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10170672

(2) 研究分担者

中川 治 (NAKAGAWA OSAMU)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：90380691

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

續 輝久 (TSUZUKI TERUHISA)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40155429

永次 史 (NAGATSUGI FUMI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90208025