

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670056

研究課題名(和文)人工ジヌクレオチドユニットによるCpGアイランド結合分子の創製

研究課題名(英文)Development of CpG island binding molecule based on artificial dinucleotide

研究代表者

谷口 陽祐(Taniguchi, Yosuke)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：00452714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子発現のエピジェネティック制御機構に関与するCpGアイランドに対して結合可能な新規人工分子の創製を目的とした。天然型3本鎖DNA形成のG/GC塩基対構造に着目して、グアノシンの2位に芳香環を有する人工核酸を分子設計した。化学合成に成功し、オリゴヌクレオチドに導入後、2本鎖DNAに対する相互作用を調べた結果、芳香環としてベンゼン環を含む人工核酸でGC塩基対を認識できる事を見いだした。天然型のグアノシンと錯体形成定数を比べることにより、安定かつ選択的に認識できる事を明らかにした。しかも、1つであればオリゴヌクレオチドのどの位置に組み込んでも認識能を有する事を見いだす事に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to create novel artificial molecules capable of binding to CpG islands deeply involved in the epigenetic regulation mechanism of gene expression. Focusing on the G/GC base triplet structure of natural type triplex DNA formation, an artificial nucleic acid analogue having an aromatic ring at the 2-position of guanosine was designed as a recognition molecule. We have succeeded in chemical synthesis of the target compound. After incorporation of them into oligonucleotide using an automated DNA synthesizer, we evaluated the interaction with duplex DNA and synthesized oligonucleotides. We found that the artificial nucleic acid containing benzene ring could recognize the GC base pair with high stability and selectivity by comparing the association constant of the natural type guanosine. Moreover, we succeeded in finding that it has recognition ability if only one is contained regardless of where it is incorporated in the oligonucleotide.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸医薬 核酸化学 分子認識 人工核酸

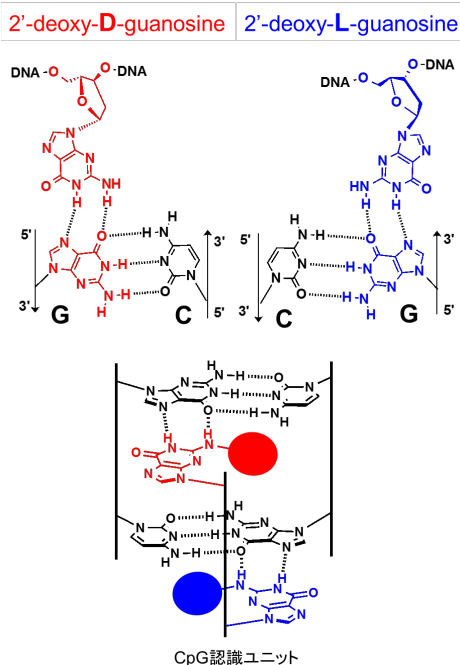
1. 研究開始当初の背景

2本鎖 DNA に直接作用する人工分子は、遺伝子の検出のみならず、遺伝子の異常に起因する様々な疾患の根本的な治療法への展開が期待される。本研究では、CpG アイランドを標的とした新しい創薬リードとしての分子の開発を目的として、シトシンのメチル化、脱メチル化を介して遺伝子発現に関与している2本鎖 DNA 中の CpG アイランドのメジャーグループ側から直接結合可能な人工ジヌクレオチドの創製を目指し、人工的な遺伝子発現制御法の開発へ展開する事とした。CpG 配列 (シトシン-グアニンのジヌクレオチド) が高度に集積した CpG アイランドは、転写の起点となるプロモーターに多く観測され、シトシン 5' メチル化によって遺伝子の発現調節に関わっている事が報告されている。この機構は、細胞の発生・分化・老化、リプログラミングなど多彩な生物学的現象に関与するエピジェネティック制御機構の一つとして重要性が認識されており、機能解明に向けた多くの研究がなされている。しかしながら、CpG 領域認識分子の創製に関する報告例はほとんど無く (ジンクフィンガータンパク質による認識例のみ)、さらに人工核酸分子による認識及び遺伝子発現の制御法への展開は申請者が調べる限りでは報告例が無い。そのため、遺伝子発現に関与している CpG 領域の配列特異的な認識が可能な人工核酸の開発ができれば、エピジェネティック異常が関与している疾患に対する次世代医薬「核酸医薬」(アンチジーン核酸)として新たな治療法、診断法の開発に繋がる事が期待される。

2. 研究の目的

2本鎖 DNA 中の CpG 配列が繰り返し存在する領域 (CpG アイランド) は転写の起点とな

新規人工核酸の設計概念



るプロモーターに多く観測され、シトシン 5' メチル化によって転写が抑制され、発生や分化誘導などのエピジェネティックな遺伝子制御の重要な役割を果たしている。また、過剰なメチル化は癌化と関連しており、配列特異的に CpG アイランドを標的化できる分子は、新しい創薬リードとしての展開が期待される。しかし、これまでに、CpG アイランドに特異的に結合する分子は開発されておらず、新規分子の開発が望まれている。本研究課題では、新規な CpG アイランド認識分子の開発を目的とした。本目的を達成するために、CpG アイランドではグアニン塩基が交互に配置されている点に着目し、糖部分が D-体、L-体のヌクレオチドを交互に連結したジヌクレオチドユニット分子を設計し、グアニンと連続的にフーグスティーン塩基対形成により結合する特異的分子の開発を目指す事にした。

3. 研究の方法

本研究では、最終的な目標として2本鎖 DNA 中の CpG アイランドに直接結合可能な人工ジヌクレオチドユニットの創製を目指す。具体的には、交互に配置されたグアニンに対して D-dG と L-dG を交互に連結した、GC-CG 塩基対を認識可能なジヌクレオチドユニットの合成、CpG アイランドへの結合親和性の確認と人工核酸の構造の最適化、を行う研究計画をした。

まず、ジヌクレオチドユニットの基盤となる2位のアミノ基にベンゼン環を結合させた D-dG(NHPh)あるいは L-dG(NHPh)の合成を行い GC 塩基対あるいは CG 塩基対への結合評価を行う。さらに、ジヌクレオチドユニットの認識基本骨格の構築および合成経路の確立を行う。構造の最適化をするために、芳香環部分を種々に変換したユニットの合成を行い、芳香環修飾 D-dG と L-dG の結合順序検討や CpG 配列への結合評価を行い、細胞に導入し惹起される細胞反応を観測するという計画を行った。

具体的な検討項目、

(1) L-dG 誘導体の合成と、オリゴヌクレオチドへの導入

D-dG(NHPh)体の各合成収率は 70%前後で、さらに工程数も短いという結果が得られていることから、同条件を用いて L-リボース dG を出発原料として L-dG(NHPh)体の合成を行い、ベンゼン環を有するユニットの合成を達成し、オリゴヌクレオチドへの導入および精製法の確立を行う。

(2) L-dG(NHPh)体を含むオリゴヌクレオチドの評価

修飾体を1箇所導入したオリゴヌクレオチドを用いて、コントロールとなる L-dG を含むオリゴヌクレオチドとの3本鎖 DNA 形成能の評価をゲルシフトアッセイにより行う。ここで、3本鎖 DNA 形成に対する L-dG の機能評価はこれまでに報告例が無く、L-dG(Ph)体と同

様に非常に興味深い結果が得られると期待される。

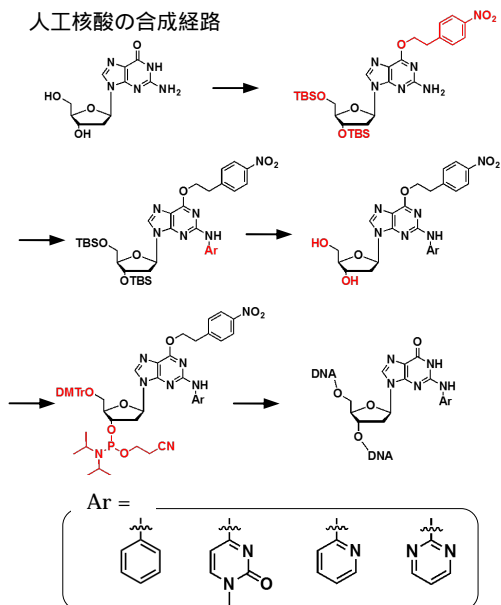
### (3) ジヌクレオチドユニットの合成と機能評価

確立した合成経路により大量合成した D-dG(NHPh) と L-dG(NHPh) のアミダイト体を用いて、ジヌクレオチドユニットやこのユニットを複数含むオリゴヌクレオチドの合成を行う。2本鎖 DNA への結合機能評価を、ゲルシフトアッセイによる評価や、分子間相互作用が測定可能な等温滴定型カロリメーター (ITC) やピアコアを用いて詳細に行う。

### 4. 研究成果

芳香環部分にベンゼン環を有する D-dG(NHPh) のアミダイトユニットを6ステップという短行程での合成に成功し、オリゴヌクレオチドへの導入にも成功した。詳細には、D-リボース構造を有する 2' デオキシグアノシン (dG) の水酸基を TBS 基 (t-ブチルジメチルシリル基) にて保護、6 位のカルボニル基を NPE 基 (p-ニトロエタノール基) にて保護を行った。2 位のアミノ基に対してクロロベンゼンと Buchwald-Hartwig クロスカップリング反応により縮合し、芳香環を導入した化合物の合成に成功した。その後、水酸基の TBS 基の脱保護、糖部の 5' 位の水酸基を DMTr 基 (ジメトキシトリチル基) にて保護、3' 位の水酸基をアミダイト化する事で DNA 合成前駆体とした。DNA 自動合成装置を用いて、オリゴヌクレオチドに組み込んで、アセトニトリル中で DBU (ジアザビシクロウンデセン) で処理することにより、人工核酸の 6 位の保護基である NPE を除去して、アンモニア水により核酸塩基の保護基の脱保護と同時に固相担体からの切り出しを行った。HPLC にて精製を行い、5%酢酸水で処理することで、5' 位の DMTr 基の脱保護を行い、目的のオリゴヌクレオチドを得た。構造は

人工核酸の合成経路



人工核酸を含むオリゴヌクレオチドの 3 本鎖 DNA 形成錯体形成定数

ODN 5' -AGGGAGGAGG**Z**GGGAAGG  
 Duplex DNA 3' -**FLK**-CGAAGGGAGGAGG**X**GGGAAGGGAG  
 5' -FAM-GCTTCCTCCTCCTCC**Y**CCCTTCCTCCT

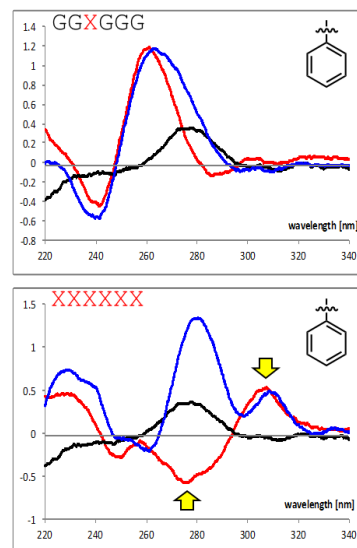
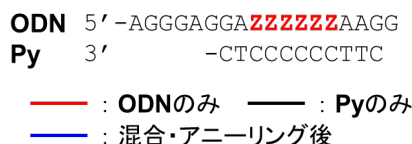
XY =	GC	CG	AT	TA
dG	11.6	n.d.	7.5	0.7
PhdG	<b>19.2</b>	n.d.	0.8	n.d.
MPdG	5.5	1.4	1.4	1.4
PydG	9.4	3.4	5.6	6.3
PymdG	3.9	n.d.	2.1	3.1

$$K_s (10^6 M^{-1}) = \frac{[\text{Triplex}]}{[\text{ODN}][\text{Duplex}]}$$

MALDI-TOF MS 測定により行った。L-リボース構造を有する 2' デオキシグアノシン (dG) も同様に合成を行った。さらに、同経路にて、芳香環部分にピリジンやピリミジン系を有するユニットの合成に成功した。

人工核酸を一つ含むオリゴヌクレオチドの 3 本鎖形成能の評価を行った結果、ベンゼン環を含む D-dG(NHPh) 体のみで安定で、しかも天然型の dG より高い選択性にて GC 塩基対の認識に成功した。そこで、連続して組み込んだオリゴヌクレオチドや D 体と L 体を交互に組み込んだオリゴヌクレオチドを用いて 3 本鎖 DNA 形成能の評価を行った結果、安定な 3 本鎖 DNA 形成は観測されなかった。そこで、

合成したオリゴヌクレオチドの CD スペクトル



連続して導入したオリゴヌクレオチドに関して CD スペクトルや 2 本鎖融解温度を測定した結果、2 本鎖形成よりも 1 本鎖で何らかの高次構造を形成している可能性を明らかにした。このことは、人工核酸が連続して存在することで、その分子同士の相互作用による予想しなかった高次構造を形成していると考えられた。

そこで、D-dG(NHPh)体を一つ組み込んだ位置の異なるオリゴヌクレオチドを種々合成して、3 本鎖 DNA 形成能の評価を行った。その結果、どのオリゴヌクレオチドを用いても安定かつ選択的な GC 塩基対に対して 3 本鎖 DNA が観測された。一つだけ組み込むことが有用である事が明らかとなった。

本研究では、CpG アイランドに結合可能な人工分子の創製を目指して、グアノシンの 2 位に芳香環を有する人工核酸の創製と機能評価を行った。その結果、ベンゼン環を含む人工核酸で GC 塩基対を安定かつ選択的に認識できる事を新たに発見することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Okamura H., Taniguchi Y. and Sasaki S., Aminopyridinyl-pseudodeoxycytidine derivatives selectively stabilize antiparallel triplex DNA with multiple CG inversion sites, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 128, 2016, pp. 12633-12637. DOI: 10.1002/ange.201606136

Taniguchi Y., Tomizaki A., Matsueda N., Okamura H. and Sasaki S., Enhancement of TFO Triplex Formation by Conjugation with Pyrene via Click Chemistry, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol. 63, 2015, pp. 920-926. DOI: <http://doi.org/10.1248/cpb.c15-00570>

〔学会発表〕(計 5 件)

宮崎芽依、谷口陽祐、松枝望、佐々木茂貴、N-2 フェニル置換グアノシン誘導体による PhdG/GC3 重鎖塩基対特異性の向上、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016 年 12 月 4 日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) Mei Miyazaki, Yosuke Taniguchi, Nozomu Matsueda, Shigeki Sasaki, Synthesis of the N2-substituted 2'-deoxyguanosine derivatives and the binding evaluation for the triplex DNA formation, 第 43 回国際核酸化学シンポジウム、2016 年 9 月 27 日、熊本大学(熊本県・熊本市) Hidenori Okamura, Yosuke Taniguchi, Shigeki Sasaki, Non-natural nucleoside derivatives for selective stabilization of the antiparallel triplex DNA with multiple inversion

sites, The first A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub, 2016 年 9 月 23 日、ホテルレオパレス博多(福岡県・福岡市)

宮崎芽依、谷口陽祐、松枝望、佐々木茂貴、GC 塩基対に対する親和性の向上を目指した N-2 置換グアノシン誘導体の開発、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

宮崎芽依、谷口陽祐、松枝望、佐々木茂貴、GC 塩基対に強く結合可能な人工核酸の開発、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 29 日、九州保健福祉大学(宮崎県・延岡市)

〔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