

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08024

研究課題名(和文) 圧倒的な結合親和性を有する糖部架橋型人工核酸の創製と核酸医薬への応用

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of 2',4'-bridged nucleic acid with a phenoxazine base

研究代表者

中川 治 (Nakagawa, Osamu)

大阪大学・薬学研究科・招へい教員

研究者番号：90380691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬の劇的な活性向上を目指し、相補鎖核酸に対する圧倒的な結合親和性を有する人工核酸として、糖部架橋型核酸2',4'-BNA/LNAに三環性シトシン誘導体(フェノキサジン塩基)を導入したBNAP(2',4'-Bridged Nucleic Acid with Phenoxazine)シリーズを開発した。一方で新たに開発した9-アザフェノキサジン人工塩基核酸(9-TAP)は、オリゴ核酸中で様々な金属イオンと安定な金属錯体型塩基対を形成することを見出した。9-TAPはDNAナノテクノロジー等にこれまでにない動的変化を誘起させる新たな革新的分子としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We designed and synthesized a novel artificial 2',4'-methylene bridged nucleic acid with a phenoxazine nucleobase (named BNAP). Oligonucleotide containing BNAP showed higher binding affinities toward complementary DNA and RNA. Thus, BNAP is a promising candidate for oligonucleotide therapeutics, especially for those requiring high duplex-forming ability. On the other hand, we developed a novel artificial nucleic acid containing a 9-azaphenoxazine nucleobase (9-TAP), which behaves as a cytosine (C) analog as well as a thymine (T) analog. Oligonucleotides containing 9-TAP could form stable duplexes via metal-mediated base pairs with C and T, via AgI and HgII, respectively. Duplexes bearing the mismatched base pair 9-TAP-C were effectively stabilized in the presence of CuII. Thus, 9-TAP is expected to have applications in DNA nanotechnology via the formation of various nanostructures triggered by different metal ions.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸化学 核酸医薬 人工核酸 糖部架橋型核酸

1. 研究開始当初の背景

人工核酸は様々な分野で幅広く活用されており、特に核酸医薬においてその利用が不可欠となっている。核酸医薬の主要戦略の一つであるアンチセンス法は、遺伝子発現抑制効果を向上・持続させるために、相補鎖核酸(mRNA) に対する強固な二重鎖形成能や生体内安定性(ヌクレアーゼ耐性能) 等が要求される。これまでに本代表者らはこれら特性の獲得を目指し、糖部架橋型人工核酸(Bridged Nucleic Acid, BNA) シリーズを開発してきた。¹⁾

一方で、核酸塩基が特定の金属イオンと金属錯体型塩基対を形成し、二重鎖親和性を向上させることが近年報告されている。²⁾ 代表的なものにチミン(T)-Hg^{II}-T、シトシン(C)-Ag^I-C、アデニン(A)-Ag^I-C があり、様々な DNA テクノロジーに対して新しい機能性の付与が期待できる。しかし、天然型核酸塩基のみでは拡張性に制約もあることから、各テクノロジーに適した多機能型的人工塩基核酸の開発が期待される。

2. 研究の目的

(1) 核酸医薬の薬効の劇的な向上を目指し、相補鎖核酸に対する圧倒的な結合親和性を有する人工核酸分子の創製を目的とする。これまでない圧倒的な結合親和性を獲得できれば、薬効の大幅な向上が期待され、その結果、投与量の大幅な抑制、オリゴ核酸中における人工核酸の修飾数の大幅な削減につながり、医薬としての安全性向上も期待できる。本コンセプトに基づき、本代表者らのグループで開発してきた糖部架橋型人工核酸 2',4'-BNA/LNA¹⁾ に三環性シトシン塩基(フェノキサジン人工塩基)³⁾ を導入した新たな人工核酸 BNAP (2',4'-Bridged Nucleic Acid with Phenoxazine base) シリーズを設計した(図 1)。本研究にて、BNAP 類を組込んだオリゴ核酸を合成し、相補鎖核酸への二重鎖形成能等の基礎的物性評価を実施することで、核酸医薬への実用性を検証する。

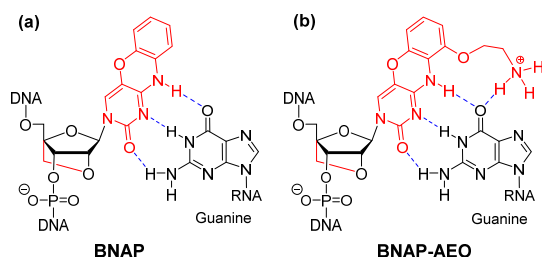


図 1. BNAP と BNAP-AEO の構造

(2) 種々の金属イオンで特異的な金属錯体型塩基対が形成できれば、DNA ナノテクノロジー等への応用が格段に高まるものと期待

される。そこで、フェノキサジン塩基核酸の優れた特性に着目し、フェノキサジンの 9 位に窒素原子を導入した新たな人工塩基核酸 9-TAP (1,3,9-TriAza-2-Oxo-Phenoxazine) を設計した(図 2)。本分子の容易な互変異性化は、多様な金属錯体型塩基対の形成が可能になるものと考えられる。9-TAP の開発は、将来的に DNA ナノテクノロジー分野への動的変化能付与など新たな機能化が期待される。

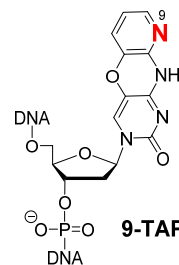


図 2. 9-TAP 人工核酸の構造

3. 研究の方法

(1) BNAP シリーズの開発:

圧倒的な結合親和性を有する人工核酸として糖部架橋型核酸 2',4'-BNA/LNA¹⁾ とフェノキサジン人工塩基³⁾ を融合した BNAP を設計した(図 1,a)。フェノキサジン塩基は三環性のシトシン誘導体としてグアニンと 3 本の水素結合で認識し、更に隣接塩基との π - π スタッキング相互作用により安定化する。

また、グアニンと 4 本目の水素結合形成を狙った分子として、BNAP の 9 位にアミノエトキシ(AEO) 基を導入した BNAP-AEO を設計した(図 2,b)。

これら BNAP 類のヌクレオシド体を合成し、オリゴ核酸へと導入した。そして、BNAP 類を組込んだオリゴ核酸を相補鎖との二重鎖形成能を融解温度(T_m) 測定により評価した。また、BNAP 類がどのように二重鎖形成能を獲得しているかを熱力学的パラメータ、分子モデリング、円二色性(CD) スペクトル測定により詳細に評価した。そして、3'-エキソヌクレアーゼ耐性を評価することで核酸医薬への有用性を検証した。

(2) 9-TAP 核酸による金属錯体型塩基対:

フェノキサジン人工塩基の 9 位に窒素原子を導入した 9-TAP を設計した(図 2)。9 位は Watson-Crick 面に位置していることから、互変異性化を誘起し、本来シトシン誘導体であるにも関わらず、チミン誘導体としての機能も期待される。それ故に、9-TAP は種々の金属イオンに対して多様な金属錯体型塩基対を形成できるのではないかと考えた。

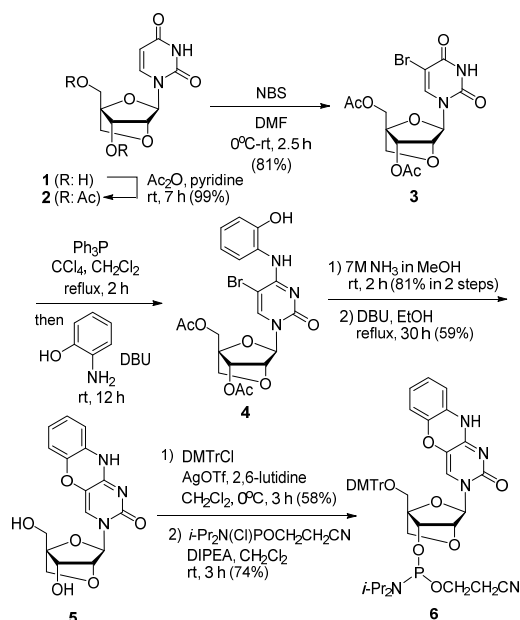
そこで、9-TAP ヌクレオシドを合成し、オリゴ核酸中へ組み込み、種々金属イオン存在下で、対面塩基に各種塩基が存在するオリゴ核酸に対して、二重鎖形成能を評価することで、9-TAP の金属錯体型塩基対能を検証した。また、これらの金属錯体型塩基対が与える二重鎖構造への影響を CD スペクトルや蛍光スペクトル測定等により評価した。

4. 研究成果

(1-1) BNAP オリゴ核酸の合成:

BNAP ヌクレオシドの合成は、2',4'-BNA/LNA のウリジン体 (**1**)⁴⁾ を出発原料とし、7工程にて合成した(スキーム 1)。1の5',3'位水酸基をアセチル基にて保護した後、N-ブロモスクシンイミド (NBS) を用いてウラシルの5位をブロモ化し**3**を得た。続いて、アッペル反応にて4位をクロロ化した後、1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) 存在下にて2-アミノフェノールを作用させることで**4**を得た。続いて、5',3'位のアセチル基を脱保護した後、DBU を作用させることで閉環し、フェノキサジン環を構築し、BNAP ヌクレオシド**5**を得た。続いて常法に従い、5'位水酸基の4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)化、3'位水酸基のアミダイト化を行い、DNA 導入前駆体となるアミダイト体 (**6**)の合成を達成した。

DNA 自動固相合成装置を用い、オリゴヌクレオチドへの導入を試みたところ、縮合時間を僅かに延長するのみで効率よく合成を達成した。合成した BNAP オリゴ核酸は、AMA (メチルアミン/アンモニア水) 条件(60°C, 10 分) で固相からの切出しと脱保護を行った。質量分析 (MALDI-TOF-MS) により目的のオリゴ核酸の構造を決定した。



スキーム 1. BNAP の合成

(1-2) BNAP オリゴ核酸の二重鎖形成能:

BNAP オリゴヌクレオチドの相補鎖核酸に対する二重鎖形成能を融解温度 (T_m , 二重鎖が半分解離する温度) 測定により評価した。その結果、BNAP は、相当する天然シチジン体と比較して、1 修飾で T_m 値が 8°C、プロトタイプの 2',4'-BNA/LNA-5-methylcytosine

(^mC) と比較して 1°C 上昇し、優れた二重鎖形成能を有することが分かった。

そこで、BNAP の塩基認識能を評価したところ、マッチのグアニンに対して高い親和性を示し、ミスマッチのアデニン、チミン、シトシンでは T_m 値が大きく低下し、十分な塩基識別能を有することが明らかとなった。フェノキサジン人工塩基は 5',3'側の隣接塩基と π - π スタッキング相互作用により安定性を向上させる。そこで、BNAP の隣接塩基が二重鎖形成能に対する影響を評価した。その結果、5'位側にピリミジン塩基 (C, T) を有するときに二重鎖形成能が大きく向上することが明らかとなった。

そこで、BNAP はどのように優れた親和性を獲得しているのかを、熱力学的パラメータ測定により算出した。その結果、DNA/DNA 二重鎖中においては、フェノキサジン塩基が大きく影響し、DNA/RNA 二重鎖中においては、2',4'-BNA/LNA 糖部骨格が安定性に大きく寄与していることが分かった。

また CD スペクトル測定より、DNA/DNA, DNA/RNA 二重鎖に BNAP を導入してもその二重鎖構造に大きな構造変化を誘起せず安定化していることも確認した。

更に、核酸医薬への応用を想定し、BNAP オリゴヌクレオチドの 3'-エキソヌクレアーゼ (蛇毒ホスホジエステラーゼ) 耐性能を評価した。配列は 5'-TTTTTTTTTXX-3' (X: BNAP) を用い評価したところ、BNAP は天然 dC、2',4'-BNA/LNA-^mC 体と比較して有意に耐性が向上することが明らかとなった。一般にヌクレアーゼ耐性はリン酸部修飾の方がその効果が大いだが、塩基部修飾でも優れた結果が得られたことは興味深い。

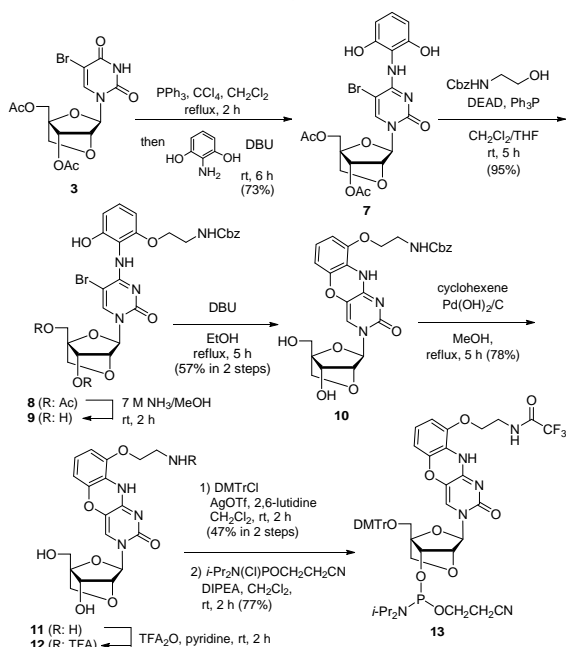
(1-3) BNAP-AEO オリゴ核酸の合成:

BNAP を組込んだオリゴ核酸は相補鎖核酸に対する優れた二重鎖形成能を有することを見出した。フェノキサジン人工塩基と糖部架橋型核酸の組み合わせは二重鎖形成能向上に効果的であることが示された。そこで、BNAP の更なる向上を目指し、フェノキサジン塩基の 9 位にアミノエトキシ (AEO) 基を導入した新たな BNAP シリーズとして、“BNAP-AEO”を設計し、その開発に着手した。

BNAP-AEO の合成は BNAP の合成法に基づき、BNAP の合成中間体である **3** から合成した(スキーム 2)。アッペル反応により4位をクロロ化した後、DBU 存在下、2-アミノレゾルシノールを作用させることで **7** を得た。その後、アミノ基を Cbz 基で保護したアミノエタノールを光延反応により導入し **8** を得た。続いて、5',3'位のアセチル基を脱保護し、DBU 存在下でフェノキサジン環を構築し **10** を得た。その後、アミノエトキシ末端の Cbz 基を、接触還元条件下で脱保護し、BNAP-AEO ヌクレオチド体 **11** を得た。その後、DNA 導入のためにアミノ基をトリフル

オロアセチル基で保護した後、5'位水酸基をDMTr化、3'位水酸基のアミダイト化を経てDNA導入前駆体となるアミダイト体**13**の合成を達成した。

続いてBNAP-AEOを、DNA自動固相合成装置を用いてオリゴ核酸への導入を試みたところ、BNAPと同条件にて効率良く成功した。固相からの切出し・脱保護は、種々検討した結果、炭酸カリウムメタノール水溶液下で効率よく達成した。



スキーム 2. BNAP-AEO の合成

(1-4) BNAP-AEO オリゴ核酸の物性評価：

BNAP-AEO を組込んだオリゴ核酸 (12-mer) の相補鎖核酸 (DNA or RNA) に対する二重鎖形成能を T_m 測定により評価した。その結果、BNAP-AEO オリゴ核酸は相当する天然シチジンと比較して T_m 値が 18°C 上昇した。上述の BNAP よりも T_m 値が更に 10°C 向上しており、劇的な二重鎖安定化効果を示した。そこで、結合定数 (K_s) を算出したところ、BNAP-AEO は天然シチジンと比較して約 1 万倍高い親和性を有することが明らかとなった。これまでに優れた親和性を有することで知られている 2',4'-BNA/LNA-^mC よりも約 150 倍、BNAP の約 50 倍、更に糖部天然型の 9-AEO-phenoxazine (G-clamp)³⁾ と比較しても約 10 倍高い圧倒的な親和性であることが明らかとなった。

また塩基識別能について、BNAP-AEO は、BNAP よりも格段にグアニン塩基に対する選択性が向上していることが見出された。

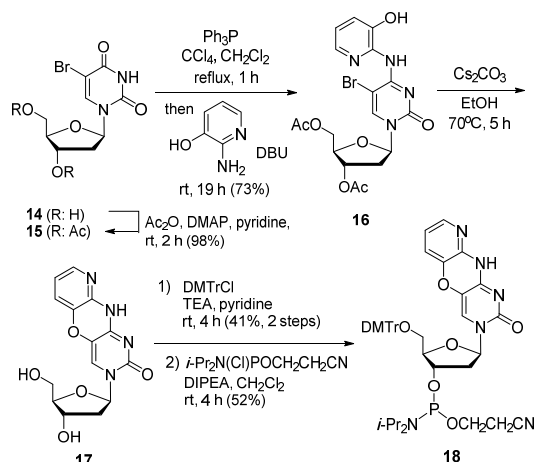
現在、細胞を用いた BNAP-AEO の遺伝子発現抑制効果を検証すべく、BNAP-AEO を

組込んだホスホロチオエート型オリゴ核酸の合成を試みている。

(2-1) 9-TAP 人工塩基核酸の合成：

9-TAP の合成は、2'-デオキシウリジン (**14**) を用いて合成した (スキーム 3)。**14** の 5',3' 位の水酸基をアセチル保護した後、アップル反応にて 4 位を活性化し、2-アミノ-3-ヒドロキシピリジンを DBU 存在下で作用させることで **16** を得た。続いて、炭酸セシウムを作用させることで、5',3'位水酸基のアセチル基の脱保護と閉環反応を一挙に行い、9-TAP ヌクレオシド **17** を得た。その後、5'位水酸基の DMTr 化、3'位水酸基のアミダイト化を経てアミダイト体 **18** を得ることに成功した。

続いて 9-TAP 人工塩基核酸を、DNA 自動固相合成装置を用いてオリゴ核酸へ導入を試みたところ、縮合時間を僅かに延長するのみで天然型核酸と同条件にて効率よく成功した。固相からの切出し・脱保護は、AMA 条件下で首尾良く達成することに成功した。



スキーム 3. 9-TAP 人工塩基核酸の合成

(2-2) 9-TAP 人工塩基核酸の塩基識別能評価：

9-TAP の金属錯体型塩基対を評価する前に、9-TAP オリゴ核酸の相補鎖核酸に対する塩基識別能を T_m 測定により評価した。対面塩基がグアニンの場合、9-TAP は相当する天然型シトシンよりも T_m 値が 2°C 上昇し、優れた二重鎖形成能を有することが分かった。

一方で、対面塩基がアデニンの場合、こちらも有意に親和性が向上することが見出された。これは期待通り、Watson-Crick 面の 9 位に窒素原子を導入したことにより、容易に互変異性を誘起し、本来シトシン誘導体であるにも関わらずチミン誘導体として機能したものと考えられる (図 3)。

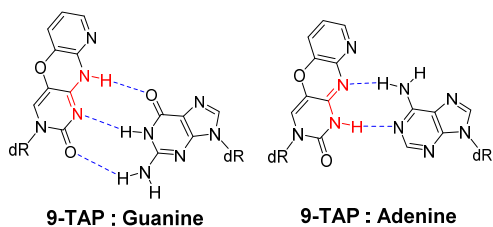


図 3. 9-TAP の互変異性化によるグアニン、アデニンとの水素結合形成能

(2-3) 9-TAP 人工塩基核酸の金属錯体型塩基対評価：

二本鎖中において、9-TAP の対面がグアニン・アデニン塩基の場合、塩基に応じて適切に互変異性化し、両塩基を認識し安定化することが分かった。そこで、9-TAP のシトシン・チミン誘導体としての特性は、種々の金属イオン存在下で、多様な金属錯体型塩基対形成が可能になるものと考えられる。

そこで対面塩基に各種天然型塩基 (A, C, T, G) が存在する場合の様々な金属存在下での錯体形成能について、 T_m 測定により評価した。

その結果、9-TAP は水銀イオン存在下で、チミンと特異的に 9-TAP-Hg^{II}-T を形成し、銀イオン存在下でシトシンに対して選択的に 9-TAP-Ag^I-C 錯体を形成し安定化することが分かった。一般に銀イオンは、天然型塩基による錯体形成の選択性が低く、C-Ag^I-C, C-Ag^I-A, C-Ag^I-T など複数の安定な塩基対を形成するが、9-TAP は銀イオンと高選択的にシトシンに対して安定化することが分かった。一方で、銅イオンは天然型塩基では安定な金属錯体型塩基対は形成しないが、9-TAP は銅イオン存在下で、選択的にシトシンに対して安定な 9-TAP:Cu^{II}-C 塩基対を形成することが分かった。このように 9-TAP は、3 種の金属イオンに対して安定な金属錯体型塩基対を形成しつつ、天然型塩基にない特異性を獲得しており、応用性が高いと考えられる。

続いて、9-TAP 同士での金属錯体型塩基対形成能も評価した。その結果、複数の Ag^I イオン、Cu^{II} イオンを介して、それぞれ極めて安定な 9-TAP-Ag^I-9-TAP、9-TAP-Cu^{II}-9-TAP 錯体が形成することが分かった。現在、詳細な錯体形成様式を解明中である。

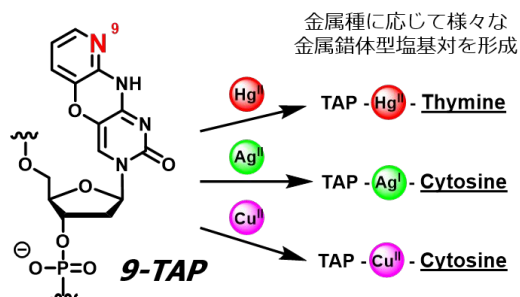


図 4. 9-TAP の金属錯体型塩基対

(3) まとめ：

相補鎖核酸に対する圧倒的な二重鎖形成能を目指し、BNAP シリーズを開発した。中でも BNAP-AEO を組込んだオリゴ核酸は、相当するシチジン体と比較して、約 1 万倍高い親和性を有することを明らかとした。将来的に核酸医薬への応用展開を目指す。

金属錯体型塩基対核酸として 9-TAP を開発した。9-TAP を組込んだオリゴ核酸は、多様な金属に対して特異的な金属錯体型塩基対 (9-TAP-Ag^I-C, 9-TAP-Hg^{II}-T, 9-TAP-Cu^{II}-C, 9-TAP-Ag^I-9-TAP, 9-TAP-Cu^{II}-9-TAP) を形成できることが分かった。魅力的な本特性を有する 9-TAP は、DNA ナノテクノロジーに動的変化を誘起する革新的分子として、今後の展開が期待される。

<引用文献>

- (1) a) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 8735–8738; b) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5401–5404; c) S. Obika, O. Nakagawa, A. Hiroto, Y. Hari, T. Imanishi, *Chem. Commun.*, **2003**, 2202–2203.
- (2) Y. Tanaka, J. Kondo, V. Sychrovsky, J. Sebera, T. Dairaku, H. Saneyoshi, H. Urata, H. Torigoe, A. Ono, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 17343–17360
- (3) K.-Y. Lin, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8531–8532.
- (4) S. Obika, T. Uneda, T. Sugimoto, D. Nanbu, T. Minami, T. Doi, T. Imanishi, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 1001–1011.

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 1 件)

- (1) Yuki Kishimoto, Akane Fujii, Osamu Nakagawa, Tetsuya Nagata, Takanori Yokota, Yoshiyuki Hari, Satoshi Obika, Synthesis and thermal stabilities of oligonucleotides containing 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid with a phenoxazine base, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 8145–8152, DOI: 10.1039/c7ob01874f, 査読有。

〔学会発表〕(計 13 件)(発表者)

(国際)

- (1) Akane Fujii, Yuki Kishimoto, Osamu Nakagawa, Satoshi Obika, Formation of various metal-mediated base pairs by a 9-azaphenoxazine nucleobase, *44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2017)* (Tokyo, Japan) (2017 年 11 月).
- (2) Akane Fujii, Yuki Kishimoto, Osamu Nakagawa, Satoshi Obika, Synthesis and Properties of Oligonucleotides Containing 9-Azaphenoxazine, *7th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology*, (Cambridge, UK) (2017 年 9 月).
- (3) Yuki Kishimoto, Akane Fujii, Osamu Nakagawa, Satoshi Obika, 2',4'-Bridged Nucleic Acid with 9-(Aminoethoxy)phenoxazine: Synthesis and Duplex-Forming Abilities, *7th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology* (Cambridge, UK) (2017 年 9 月).
- (4) Yuki Kishimoto, Akane Fujii, Osamu Nakagawa, Satoshi Obika, Synthesis and evaluation of 2',4'-bridged nucleic acid with 9-(aminoethoxy)phenoxazine, *The 10th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists* (Osaka, Japan) (2017 年 5 月).
- (5) Yuki Kishimoto, Osamu Nakagawa, Satoshi Obika, Development of 2',4'-Bridged Nucleic Acid with a Phenoxazine base, *IS3NA, XXII International Roundtable* (Paris, France), (2016 年 7 月).

(国内)

- (1) 中川 治, 岸本悠希, 藤井 茜, 中辻悠輔, 小比賀 聡, フェノキサジン人工塩基核酸類の合成と機能評価, *第 47 回 複素環化学討論会* (高知) (2017 年 10 月).
- (2) 藤井 茜, 岸本悠希・中辻悠輔, 中川 治, 小比賀 聡, 9-アザフェノキサジン人工塩基核酸の金属錯体形成能, *第 67 回 日本薬学会 近畿支部総会・大会* (神戸) (2017 年 10 月).
- (3) 中辻悠輔, 藤井 茜, 岸本悠希・中川 治, 小比賀 聡, N⁴ 位に 2-(2-アミノエトキシ)フェニル基を有するシチジン誘導体の合成と機能評価, *第 67 回 日本薬学会 近畿支部総会・大会* (神戸) (2017 年 10 月).

- (4) 藤井 茜, 岸本悠希, 中川 治, 小比賀 聡, 9-アザフェノキサジン人工塩基核酸の合成と三重鎖形成能評価, *日本核酸医薬学会 第 3 回年会* (札幌) (2017 年 7 月).
- (5) 岸本悠希, 藤井 茜, 中川 治, 小比賀 聡, 9-(アミノエトキシ)フェノキサジン塩基を有する糖部架橋型人工核酸の二重鎖形成能評価, *日本核酸医薬学会 第 3 回年会* (札幌) (2017 年 7 月).
- (6) 岸本悠希, 中川 治, 小比賀 聡, 塩基部に 9-(アミノエトキシ)フェノキサジンを有する糖部架橋型人工核酸 BNAP-AEO の合成と評価, *日本薬学会 第 137 年会* (仙台) (2017 年 3 月).
- (7) 藤井 茜, 岸本悠希, 中川 治, 小比賀 聡, 9-アザフェノキサジン塩基を有する人工核酸の合成と機能評価, *第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会* (大阪) (2016 年 10 月).
- (8) 岸本悠希, 中川 治, 小比賀 聡, フェノキサジン塩基を有する糖部架橋型人工核酸の合成と評価, *日本薬学会 第 136 年会* (横浜) (2016 年 3 月).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中川 治 (NAKAGAWA, Osamu)
大阪大学 大学院薬学研究科・招へい教員
研究者番号 : 90380691