

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19350079
研究課題名（和文） ハイブリダイゼーション活性化反応の細胞内遺伝子機能性制御法への展開
研究課題名（英文） Application of the Activated Reaction by Hybridization to Target Genes for the Regulation of Gene Expression in Cells
研究代表者：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

研究成果の概要：

本研究では遺伝子を標的とした選択的な化学反応により、細胞内における遺伝子機能を制御する方法、すなわち遺伝子を標的とするIn Cell Chemistryを提案し、その実現にむけた新しい分子の設計・合成、さらには細胞内における機能評価を行い、高機能を有する新規人工遺伝子制御分子の開発を目的とした。その方法論として我々が独自に開発したハイブリダイゼーション活性化反応を細胞内の遺伝子制御方法として展開することを目指し検討を行った。その結果、非常に有効な方法論を開発できた

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸・蛋白質・糖化学、クロスリンク反応

1. 研究開始当初の背景

「生命の設計図」に例えられる遺伝子には、たったひとつの細胞から生命をスタートさせ生命活動を維持していくために必要な情報がすべて記録されている。細胞はこの遺伝子の情報をもとに、そこで必要とするたんぱく質を作り、生命活動を維持している。これらの遺伝子に異常、すなわち変異がおこると、遺伝子によって保たれていた細胞の秩序が壊され、様々な病気へとつながることがわかってきている。ヒトゲノム解析の終了に伴ない、我々は膨大な遺伝子情報を手にすることはできたが、細胞内におけるそれらの機能は未解明な部分が多く残されている。さらに近年、たんぱく質をコードしないncRNAが蛋白質の合成量とタイミングの調節に中心的役割を果たしていることが解明されてきており、従来考えられていたDNA→RNA→蛋白質というセントラルドグマが大きく変わりつつある。しかし細胞内のような複雑な環境において遺伝子機能を選択的に制御するのは非常に困難であり、化学的技術革新が必要であると考えられる。本申請研究では遺伝子を標的とした選択的な化学反応により、細胞内における遺伝子機能を制御する方法、すなわち遺伝子を標的とするIn Cell Chemistryを提案した。

2. 研究の目的

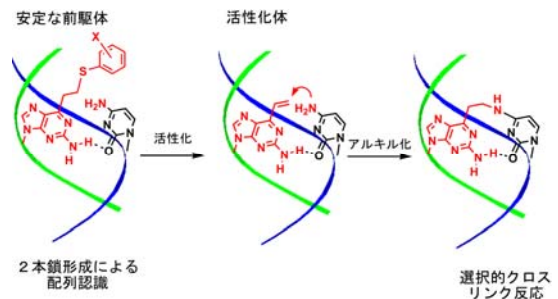
本研究では細胞内における有効な化学的遺伝子機能制御方法の開発を目指し、遺伝子を標的とするIn Cell Chemistryへと展開できる人工遺伝子標的分子の開発を目指す。遺伝子に対する化学反応は、アルキル化剤などの低分子が遺伝子に反応し変異を誘導することが古くから研究されており、癌などの病気の原因になることが知られている。一方で遺伝子に対するアルキル化反応は、抗ガン剤のメカニズムとしても知られており、実際にシスプラチンなどが臨床応用されているが、標的遺伝子に対する選択性がないことが問題とされている。これらの化学反応を高い選択性で狙った遺伝子、また狙った場所に誘起できれば、標的となる遺伝子の発現のみを制御することで異常な遺伝子を持つ癌細胞の増殖のみを阻害できると期待される。

3. 研究の方法

私は細胞内における遺伝子発現を化学的に制御する手法の開発を目指して、その基本的技術の構築について研究を進めてきた。その結

果、標的遺伝子に対し複合体形成により選択的な化学反応を誘起する人工機能性核酸を含むオリゴDNAを用いて、**Hybridization Promoted Reaction**の実現に成功した(図1)。

図1 ハイブリダイゼーションにより活性化される人工機能性核酸の反応



本研究ではこれらの**Hybridization Promoted Reaction**をさらに**拡張し**、細胞内における有効な化学的遺伝子機能制御方法の開発を目的に、遺伝子を標的としたIn Cell Chemistryという新しい領域への展開を目指し、下記3項目について検討した。

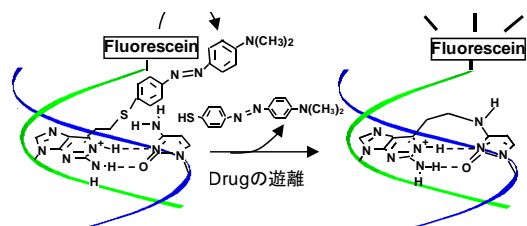
1. **Hybridization Promoted Reaction** の Drug-Releasing Systemへの展開
2. **Hybridization Promoted Reaction**のアンチジーン法への展開
3. **Hybridization Promoted Reaction**を起こす第2世代人工機能性核酸の開発

4. 研究成果

(1) Hybridization Promoted Reaction の Drug-Releasing Systemへの展開

本項目では標的遺伝子に対して2本鎖を形成することで、機能性核酸が活性化され、スルフィド基が脱離することに注目し、薬物をスルフィド基で結合させることで、標的遺伝子がある時にのみ薬物を放出するシステムが構築できると考えた。まずこのシステムが細胞内で機能することを確認するために、FRETを用いたシステムを構築した。(図2)

図2 機能性人工核酸を用いた Drug Releasing Systemの可視化システム



このシステムを細胞内に適用したところ、標的遺伝子がある時にのみ蛍光が増大にて検出するシステムの構築に成功した。

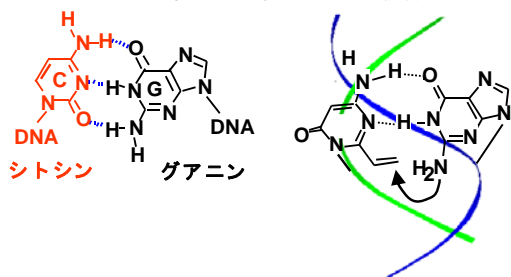
(2) Hybridization Promoted Reactionのアンチジーン法への展開

本項目では、より効率的な遺伝子発現制御方法として、Hybridization Promoted Reactionのアンチジーン法への展開を目指し、2本鎖DNAに対してインベーション能を持つペプチド核酸(PNA)に我々が開発した人工機能性核酸を組み込むことを計画した。その結果、ビニル体を含むPNAの合成に成功し、これらを用いてまず1本鎖DNA及びRNAに対して、アルキル化反応を検討した結果、効率はそれほどよくないものの、末端にビニル体を組み込んだ時に、シトシン選択的に反応が進行することがわかった。

(3) Hybridization Promoted Reactionを起こす第2世代人工機能性核酸の開発

本項目では標的とする塩基の拡張を目指し、第2世代人工機能性核酸として、グアニンに対して反応する新規人工機能性核酸を設計しその合成を検討した。

図3 第2世代機能性人工核酸



反応性塩基の合成には成功したが、糖とのカップリング反応は進行しなかったため、スペーサーを有する、誘導体の合成を行なった。その結果、エチレンスペーサーを有するシトシン誘導体の合成及びその誘導体を組み込んだオリゴヌクレオチドの合成に成功した。さらに合成した反応性オリゴヌクレオチドが設計とは異なり、チミジンに対して非常に効率的に反応することを明らかにした。

図4 チミジン選択的第2世代機能性人工核酸

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 8 件)

- ① Imoto S., Hirohama T., Nagatsugi F., DNA Templated Click Chemistry for Creation of Novel DNA Binding Molecules, *Bioorg. Chem. Lett.*, **18**, 5660-5663 (2008). (査読有)
- ② Nagatsugi F., Nakahara R., Inoue K., Sasaki S., Synthesis and Evaluation of the

Luciferase-Oligodeoxynucleotide for the Sequences-Selective Detection of Nucleic Acids, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **341**, 562-567 (2008). (査読有)

- ③ Imoto S., Shimotazawa A., Goto M., Hirohama T., Nagatsugi F., Synthesis of the Peptide Nucleic Acid (PNA) Incorporating 2-Amino-6-vinylpurine Derivative and Evaluation of the Reactivity, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 391-392 (2008). (査読無)
- ④ Kurose Y., Taniguchi Y., Nagatsugi F., Sasaki S., Synthesis of the new nucleoside analogue connecting 2-amino-6-vinylpurine to the 2'-deoxyribose skeleton via the methylene linker, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 391-392 (2008). (査読無)
- ⑤ Imoto S., Hirohama, T., Nagatsugi F., New Methodology to Search for DNA Binding Ligands Based on Duplex DNA-Templated Click Chemistry, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 381-382 (2008). (査読無)
- ⑥ Nagatsugi F.; Ogata, Y; Imoto, S.; Sasaki, S., Efficient Synthesis of 6-Substituted Purine Derivatives Using Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reactions with 2'-Deoxyguanosine O⁶-Tosylate, *Heterocycles*, **73**, 493-501 (2007) (査読有)
- ⑦ Imoto, S.; Ali, M. M.; Li, Y.; Sasaki, S.; Nagatsugi, F., Enzymatic Incorporation of 2-amino-6-Vinylpurine Derivative, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 357-358 (2007) (査読無)
- ⑧ Nagatsugi F.; Nakayama, S.; Sasaki, S., Development of the Novel Drug Releasing System Triggered by Hybridization with Target Sequence, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **26**, 799-803 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 38 件)

- ① 永次 史, 新しいバイオ技術開発に向けた機能分子の創製, 未来を切り拓く女性化学者たち「女性科学者が語る研究最前線」, 北九州, 12月17日(2008) (invited)
- ② 永次 史, 遺伝子発現の選択的制御を目指した機能性分子の合成, 第2回 機能性分子ミニシンポジウム, 筑波, 9月11日(2008) (invited)
- ③ S. Imoto, A. Shimotazawa, M. Goto, T. Hirohama, F. Nagatsugi, Synthesis of the Peptide Nucleic Acid (PNA) Incorporating 2-Amino-6-vinylpurine Derivative and Evaluation of the Reactivity, Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, 2008.9.10

- ④ T. Hirohama, S. Imoto, F. Nagatsugi, Development of New DNA Binding Ligand Based on duplex DNA Templated Click Chemistry, Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, 2008.9.10
- ⑤ Y. Kurose., Y. Taniguchi, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Synthesis of the new nucleoside analogue connecting 2-amino-6-vinylpurine to the 2'-deoxyribose skeleton via the methylene linker, Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, 2008.9.10
- ⑥ F. Nagatsugi, Development of the New Strategies by Artificial Molecules for Regulation of Gene Expression, G-COE Summer School, Sendai, Japan, 2008.8.17 invite
- ⑦ 永次 史, 遺伝子発現の選択的制御を目指した機能性分子の合成, 第20回, 生体機能関連化学若手の会, 白石, 8月10日 (2008) (invited)
- ⑧ S. Imoto, M. Goto, T. Hirohama, F. Nagatsugi, Synthesis and Evaluation of the Peptide Nucleic Acids (PNAs) Incorporating Reactive Artificial Molecules, XIV Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Czesky Krumlov, Czech Republic, 2008.6.10
- ⑨ S.Imoto, M. M. Ali, Y. Li, S. Sasaki, F. Nagatsugi, Enzymatic Incorporation of 2-amino-6-Vinylpurine Derivative, 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, Japan, 2007.11.21
- ⑩ F.Nagatsugi, Application of the Inducible Reactive Oligonucleotides for Novel Drug Releasing System Triggered by Hybridization to Target Genes, 4th Japanese-Sino Symposium on Organic Chemistry for Young Scientists, Narita, Japan, 2007 9.26 (invited)
- ⑪ F. Nagatsugi, S. Imoto, Development of the Methodology for Searching New Binding Molecules to highly-Ordered DNA Structure, The 2nd International Workshop on Approaches to Single-cell Analysis, Tokyo, Japan, 2007.9.6
- ⑫ F. Nagatsugi, S. Nakayma, S. Mori, S. Sasaki, Application of the Inducible Reactive Oligonucleotides for Novel Drug Releasing System Triggered by Hybridization, Gordon Conferences, New

Port, USA, 2007.6.28

- ⑬ 永次 史, 細胞内における化学的遺伝子発現制御を目指したアプローチ, 東北大学学際科学国際高等研究センターフォーラム「生命科学における学際研究の最前線」(仙台, 2007年 1月26日) (invited)
- ⑭ 永次 史, 機能性人工核酸を用いた遺伝子発現制御による新しい創薬手法の開発, 第8回創薬ビジョンシンポジウム (京都, 2007年 1月25日) (invited)

他 24 件

[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]

【解説・総説】

① 永次 史, 機能性人工核酸を用いた遺伝子発現制御による新しい創薬手法の開発 Pharma VISION NEWS, No. 9, 24-28 (2007)

② 永次 史, 遺伝子発現の化学的な制御を目指した人工分子の開発, ペプチド研究会レター, No. 66, 4-6 (2007)

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

井本 修平 (IMOTO SHUHEI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：20447189