遺伝子を標的とする細胞内 DDS としてのオリゴヌクレオチド

特集 ナノテクノロジーと DDS

佐々木 茂貴*

Oligonucleotides as a tool for intracellular DDS

Oligonucleotides attaching a reactive molecule may cause irreversible change to the target sequence at the reactive site. Inhibition of transcription, site-directed mutagenesis (or site-directed manipulation of genes) at the specific site has been proposed as a new tool of biotechnology with the use of a triplex-forming oligonucleotide. Thus, the oligonucleotides are regarded as a tool for intracellular DDS of useful reactive molecules. This review deals with development of a new alkylating group with high selectivity toward cytosine as well as new non-natural base analogs for the formation of stable non-natural triplexes.

Shigeki Sasaki*

key words : cross-link, alkylation, triplex, non-natural base analog, targeted mutagenesis

ゲノム配列解析技術の進展により、ヒトをはじめ多くの生物の全ゲノム配列が解読されてきている。病気に関係する遺伝子の解明は、ゲノム解読と平行して 1980 年代後半から盛んに行われており、その結果、病気の発生には複数の遺伝子異常が関与していること、それぞれに含まれる異常は点変異のような小さな異常であり、さらに小さな遺伝子異常が組み合わせたり、きわめて多様な病気の個性を生み出す原因になっていることなどが明らかになってきた。現在の医療技術では、このような遺伝子異常の多様性に対応できないが、未来技術予想では毛細血管や細胞まで入り込めるナノスケールのロボット(ナノマシン)が病気の原因となっている遺伝子異常を見つけ出し、治療するようになると考えられている。筆者らの研究室では、10 年ほど前から“異常遺伝子を見つけ出し、異常部分に特異的に作用する分子ロボット”を夢見て、特異的な化学的反応性を示すオリゴヌクレオチドの研究を行っている。未来医療での活躍が考えられている異常遺伝子を治療するナノマシンには“原子 1 個 1 個をつまんで動かせる”機能が設定されている。“原子を動かす作業”とは、まさに“化学反応”を意味していることや、オリゴヌ

図 1 ナノ材料としての核酸の大きさ
20-30 塩基長オリゴヌクレオチドは 6~9 nm になる。

クレオチドがナノスケールの構造体であることなどから(図 1)、筆者らの研究は、最終的にはナノマシンを創造することと捉えられる。オリゴヌクレオチド中の化学反応性分子は、ナノマシンの“原子を動かす手”に相当する。オリゴヌクレオチドは、一般的には DDS によって目的の臓器に運搬されるべき物質であるが、筆者らの研究では、オリゴヌクレオチ

* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 九州大学大学院薬学研究院

図2 塩基配列認識の主な手法
A: DNA/RNA 2本鎖形成¹⁾, B: 3本鎖DNA形成²⁾, C: マイナーグループ結合³⁾

ドは化学反応性分子を目的の場所、つまり特定の遺伝子配列に正確に運搬する細胞内DDSの役割を担っている。本稿ではこのような観点から、遺伝子を治療するナノマシンに向けた筆者らの研究を紹介したい。

核酸(オリゴヌクレオチド)のさまざまな作用様式

遺伝情報は、DNAからmRNAへの転写を経て蛋白質に翻訳され、機能を発現する。オリゴヌクレオチドは、この遺伝子発現機構のさまざまなステップに介入して機能を発揮する。オリゴヌクレオチドによる配列認識は、Watson-Crick塩基対形成に基づくDNA/RNA複合体形成(図2A)¹⁾ならびにWatson-Crick塩基対にさらにもう1個の塩基が水素結合して形成される(逆)Hoogsteen塩基対による3本鎖DNA形成(図2B)²⁾によって、特異的に行うことが可能である。オリゴヌクレオチド以外の分子による2本鎖DNAの塩基配列の認識は、ペプチド、インターカレーターやマイナーグループ結合分子(図2C)³⁾などで可能であるが、配列認識分子の設計がまだ一般化されていない。オリゴヌクレオチドを用いる方法は、基本的には標的遺伝子配列が決まれば論理的に認識分子の設計が可能のため、変異の質と部位が多様な原因遺伝子のそれぞれに臨機応変

に対応できる基盤技術としての発展が期待されている。

図3に、オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現制御の主な方法をまとめた。オリゴヌクレオチドは細胞内ではさまざまな機構で遺伝子発現を制御可能であるが、リン酸エステル結合が生体内での分解を受けやすく、また表面にリン酸アニオンを含む大きな分子であるため細胞膜を通過しにくいことなどから、生体内での利用率がきわめて低い。オリゴヌクレオチドを用いる方法のすべてに関わるこの問題点克服のために、種々の化学的修飾やDDSの研究が検討されている(図3①)。アンチジーン法は、ピリミジン塩基あるいはプリン塩基だけからなるオリゴヌクレオチドを用いて、2本鎖DNAのプリン塩基の連続する部分に配列特異的に3本鎖DNA(図2B)²⁾を形成させることによって、転写因子の作用を阻害する方法である。この手法は、遺伝情報の根本に作用することから効率的な阻害効果が期待されており、ヒト全ゲノム配列から3本鎖DNA形成に可能な配列が検索されている(図3②)⁴⁾。転写因子が結合する配列を持つ2本鎖DNAは、転写因子の“おとり(デコイ)”として働き、転写を阻害する。デコイは、遺伝子治療法として最近実用化された(図3③)⁵⁾。アンチセンス法は、RNAを標的にしたいいくつかの機構で蛋白質合成を阻害する。医薬品としての

図3 オリゴヌクレオチドが遺伝子発現系に作用する主作用

実用化研究が最も進んでおり、FDA 認可薬をはじめ臨床試験中のものも多い(図3④)⁶⁾。リボザイムは、標的とするRNAを配列特異的に切断する方法である(図3⑤)。2本鎖RNAを用いるRNAi法は、生体内機構による配列特異的mRNA切断を誘発し、阻害活性を発現する方法で、標的配列に対する依存性が小さく、信頼性の高い方法として急速に広がってきている(図3⑥)⁷⁾。蛋白質に親和性を持つオリゴヌクレオチドは、選択を繰り返す方法により効果的に検索することが可能で、特異的な酵素阻害剤として利用される(図3⑦)。

遺伝子に対する化学反応—ランダムな反応と特異的な反応

さて、化学反応はナノマシンに搭載する“手”に相当する役割を果たせるが、オリゴヌクレオチドが遺伝子配列を認識できるのに対して、反応性化学物質はそのままでは配列を認識できず、ランダムに遺伝子と反応する。たとえば、発癌性物質の多くはDNAと化学結合を形成し、突然変異を引き起こすことが知られているが、結合する塩基や位置、突然変異は発癌性物質によって異なり、遺伝子上のラン

ダムな位置に起こる。このような突然変異が癌関連遺伝子の“ホットスポット”に起こり、修復されなかった場合には、発癌の危険な要因となる。ベンツピレン、*N*-ニトロソウレア、マスタードガスなど多くのDNA反応性の発癌物質が突然変異性を示す⁸⁾。一方、癌治療に用いられる制癌剤もDNA反応性を示すものが多い⁹⁾。制癌剤として用いられるマイナーグループ結合分子は、厳密ではないものの短い配列を認識することが可能であり、比較的特異的な反応を行う。マイトマイシンは、DNA 2本鎖のマイナーグループに非共有結合的に結合することによって反応性が誘起され、CG-GC配列のGをクロスリンクする。このように、ランダムな反応性を持つ分子をオリゴヌクレオチドに組み込めば、反応を配列特異的に行うことが可能であり、さらに組み込む反応性分子の機能をより高度化し、塩基への反応を正確にコントロールすることができれば、まさに原子を動かすように特定の塩基構造を自由に変化させる高機能のナノマシンの創製に繋がるのではないかとというのが、筆者らの基本的なアイデアである。

反応性オリゴヌクレオチド

反応性分子を組み込んだオリゴヌクレオチドを用いて実現可能な機能を図4にまとめた。オリゴヌクレオチドに組み込んだ反応性分子と標的DNA(RNA)との間に共有結合を形成させることによって、特異的な阻害効果を高めることが可能である(図4②、③)。2本鎖DNAに形成させた共有結合部分に、選択的に点変異を誘起することが可能である(図4④)。さらに、標的塩基構造を変化させる反応(図4⑤)を開発できれば、特異的な変異を化学的に誘起することが可能になり、遺伝子修復法としての発展が可能と考えられる(図4⑥)。このような共有結合形成や、直接的に塩基構造を変化させるような化学反応などを高度にコントロールする技術の展開は、特異的な変異を誘起する新しいバイオテクノロジーの開拓に繋がると期待されている。

上記のように、選択的な反応性分子は、オリゴヌクレオチド機能の高度化に非常に有用な道具となるものと考えられる。しかし、これまでの反応性分子は、*in vitro*の限定された条件でしか使用できず、しかも選択性および反応効率の低いものしか知られていない。ソラーレン分子は、オリゴヌクレオチドに組み込まれて*in vitro*細胞実験などでよく用いられるほとんど唯一の反応性分子である。この分子の特徴は、細胞培養実験条件下でも安定であり、光照射でのみ活性化され、選択的にチミンと共有結合(光付加体、クロスリンク)を形成することである。ソラーレン分子は*in vitro*実験では有用であるものの、光照射はDNA中の光反応を非特異的に誘起してしまう可能性があることや、*in vivo*での利用に制限があることなどの欠点も持っている。そこで筆者らは、オリゴヌクレオチドに組み込み可能で、より広く利用可能な選択的かつ効率的な反応性分子を開発することにした¹⁰⁾。

2本鎖DNA形成をトリガーとするシンクロナイゼーション活性化によるクロスリンク反応

従来のアルキル化剤は、核酸塩基のなかで求核反応性が高いグアニンとアデニンを標的としており、

図4 反応性分子を組み込んだオリゴヌクレオチドの機能

図5 シトシンアミノ基と効率的な反応を期待した2-アミノ-6-ビニルプリン誘導体のデザイン

低い選択性しか得られていない。また、ソラーレンはチミンを標的としており、シトシンに対する効率的な反応剤は知られていなかった。そこで筆者らは、シトシンアミノ基と特異的な反応性を期待して、2-アミノ-6-ビニルプリン誘導体を設計した(図5)¹¹⁾。反応の予測を半経験的分子軌道計算を用いて行ったところ、2-アミノ-6-ビニルプリンの1-Nプロトン化体とシトシンとの錯体内で、反応点のビニル基とアミノ基の有効な近接効果が示唆された。さらにビニル基への電子供与性基あるいは電子吸引性基の置換により、反応性が調節できる可能性も示された。筆者らの分子の特徴は、(シトシン)認識部位と反応部位が同一分子内に組み込まれている点であり、オリゴヌクレオチドを用いて配列特異性を実現するだけでなく、反応性分子で塩基特異性を達成することを期待した。有機溶媒中のモデル実験などにより、設計どおりにシトシンと高い反応性があることがわかったが、同時にアミンやチオールなどとも高い反応性を示した。そこで、生体内でのさまざまな求核剤との非選択的な反応を避けるため、高い反応性を

図 6 2本鎖DNA内でのシンクロナイゼーション活性化概念

標的の配列およびシトシンの近傍でのみ発生させるための新しい概念を考案した。つまり、ビニル体の安定前駆体としてスルフィドあるいはスルフォキシド誘導体を利用し、これらが2本鎖DNA中のマイクロな化学環境における活性化による反応性を獲得することを期待した(図6)。活性化は、核酸のハイブリダイゼーションに同調，“シンクロナイゼーション”して起こるもので、これまでにないきわめてユニークな機構である。このシンクロナイゼーション活性化機構により、安定性と高い反応性を兼備する新しいクロスリンク分子を開発することができた¹²⁾。新しいクロスリンク分子は、高いシトシン選択性に加えて、高い配列選択性を示した。現在、筆者らの研究室で最も効率的なクロスリンク分子は、スルフォキシビニル基を含む2-aminopurine誘導体である¹³⁾。図7に、中性条件下での反応の例を示したが、1時間後に約50%の高い収率でクロスリンク反応が起こっており(図7A)、シトシンに対して高い選択性を示した(図7B)。

3本鎖形成クロスリンク反応への展開

—1塩基レベルの選択的阻害、遺伝子の選択的改変法への展開を目指して—

筆者らは、前述のクロスリンク分子を3本鎖DNA内(次項参照)で機能できるように展開した。新しい分子設計の特徴は、標的となる2本鎖DNAの塩基対のダイナミックな動きに着目した点である。つまり、2-アミノ-6-ビニルプリン骨格を適当な長さのスペーサーを用いて3本鎖のバックボーンに連結することにより、フリップアウトしている塩基

A: 中性条件下での反応性比較

B: 塩基選択性の比較

図 7 中性条件下での効率的なクロスリンク反応と高いシトシン選択性

との選択的な反応を設計した(図8)。その結果、プチルスパーサーで連結した分子は、特異的に3本目のDNA鎖とは遠い側のピリミジン鎖中のシトシンと反応し(図8A, C)¹⁴⁾、エチルスパーサーで連結した化合物は、特異的にピリミジン鎖中のアデニンと反応することを明らかにした(図8B, D)¹⁵⁾。これらは、3本鎖DNA形成クロスリンク反応としては従来にない高選択的なものであり、さらにアンチジーン法への発展のための検討を続継中である。DNA中のクロスリンク部位は、遺伝子改変への展開(図4④)が期待された。実際、修復酵素欠損細胞を用いたモデル実験では、プチルスパーサー化合物は配列特異的および位置特異的に点変異を誘起することが明らかになった(図9)¹⁶⁾。興味深いことに、図9のアデニンへのクロスリンク反応では、検出された点変異のすべてが反応点であるアデノシンからグアノシンへの変異であった。このクロスリンク部分の修復および点変異誘起能の効率や一般性については今後の検討課題であるが、点変異に対する化学的コントロールの可能性が示されている。また、ここでは詳細は述べることができないが、最近筆者らは、生体内機

図 8 3本鎖DNA形成クロスリンク反応
PU: ホモプリン鎖, PY: ホモピリミジン鎖, TFO: 3本鎖形成オリゴヌクレオチド

図 9 列配特異的 A → G への選択的変異導入
X: プチルスペーサー塩基アナログ(図 8 A)

構の関与なしに塩基構造を変化させる可能性のある反応(図 4 ⑤)を見出すことに成功した。このように筆者らの研究は、オリゴヌクレオチドをナノ材料として用いて、特異的に遺伝子の塩基変換を行う新しいバイオテクノロジーの必須要素となる化学反応性分子の開発に少しずつ接近してきている。

2本鎖DNA配列認識のための人工認識分子の開発

2本鎖DNA配列の認識は、遺伝子を標的とするアプローチでは最も重要な基本である。これらの認識は、生体内では制限酵素や転写因子などの蛋白質で行われているが、きわめて特異性が高いものの、臨機応変に目的とする配列の認識に利用するのは困難である。一方、配列選択性の得られる人工的な方法には、2本鎖DNAのメジャーグループにさらに

もう1本のオリゴヌクレオチドを結合させる3本鎖DNA形成法(図 2 B)と、2本鎖DNAのマイナーグループにおける低分子によるもの(図 2 C)がある。

3本鎖DNAには、平行型と逆平行型の2種類のジオメトリーがある。平行型では、3本目のDNA鎖はピリミジン塩基で構成され、結合している2本鎖のプリン鎖とはリン酸結合が同じ方向である。逆平行型では、3本目のDNA鎖はGの多いプリン塩基で構成され、結合する2本鎖のプリン鎖とはリン酸結合が逆方向となっている。どちらのジオメトリーでも3本目のDNAの塩基が2本鎖のプリン塩基と相補的なHoogsteen水素結合(逆平行型では逆Hoogsteen水素結合)することが安定化の重要な要因となっている。一方、2本鎖DNAのプリン鎖中の1個のプリン塩基がピリミジン塩基になっている場合(CGあるいはTA部分)、天然塩基では(逆)Hoogsteen水素結合を形成できず、3本鎖の安定性が小さく、このような塩基対部分は3本鎖形成を妨げる部分となる(図 10)。このように、3本鎖DNAはホモピリミジン鎖-ホモプリン鎖で構成される2本鎖DNA部分に対してのみ形成されるという本質的な制限があり、一般的な配列の2本鎖を標的にできない。3本鎖DNA形成を一般的な遺伝子配列認識法として利用するためには、この障害の克服が最大の課題となっている¹⁷⁾。これまで、このようなCGあるいはTA部分を安定化するために種々のアプローチが検討されてきたが、平行型3本鎖DNAのCG塩基部分を安定化できる人工塩基が開発されたのはきわめて最近のことである¹⁸⁾。しかしながら、TA塩基部分での安定化を含め、いまだこの問題は

図 10
逆平行型 3 本鎖
DNA の模式図

図 11 非天然型 3 本鎖形成のための新しい認識分子(WNA)の設計と認識期待図

完全には解決されていない。

3 本鎖形成を妨げる部位となっているこれらの TA および CG 塩基対部分を、特異的に認識できる人工の塩基アナログを開発することができれば、天然塩基のみを用いる場合に比べて、はるかに多くの遺伝子配列を 3 本鎖形成(アンチジーン法)の標的とすることが可能となる。筆者らは 3 本鎖 DNA 形成のコード拡張を目指し、人工認識分子の開発に取り組んでいる。最近、逆平行型 3 本鎖において、TA 塩基対部分を特異的に安定化する分子を見出すことができた(図 10, 塩基アナログ①および②)。新たに設計した分子 WNA (W-shape nucleic acid) は、図 11 に示してあるように、ビシクロ構造の上にベンゼン環と塩基構造の両方を持っており、ベンゼン環にはスタッキング相互作用の連続性を、塩基構造には水素結合相互作用を期待した。WNA 骨格の特徴は、ビシクロ構造のコンフォメーションの強固さ

と、導入する塩基およびベンゼン環を変化させることにより、多様な認識分子を構築できる点にある。WNA のこの特徴を生かして種々の認識分子を合成し、TA 塩基対および CG 塩基対をそれぞれ選択的に認識し、安定な非天然型 3 本鎖を形成できる WNA を見出すことができた¹⁹⁾。さらに、多くの誘導体の配列選択性を精査することにより、一般的な配列での 3 本鎖形成のための有用な認識分子の開発を目指している。この研究により、遺伝子配列を正確に認識しながら目的とする部位に反応性分子を運搬できる、核酸ナノ材料が開発できるものと期待している。

おわりに

遺伝子配列解析技術は今後ますます進歩し、高速化、大規模化が進み、近い将来には個人の全ゲノム

配列の解析が実用的な速度で行われるようになると予想される。それに伴い、病気の治療は個人特有の原因遺伝子を標的に行われるようになるのが望ましいと考えられる。現在は、個人による薬効の違いをSNPsから解析し、最良の治療法を確立することがはじまっているが、癌化の原因となるような点変異を標的とする治療法は確立していない。筆者らの研究方針である“異常遺伝子を見つけ出し、異常部分に特異的に作用する分子ロボット”は、現時点ではSF的な印象が強いが、実験室レベルながら、化学実験により配列特異的に塩基構造の変化ができることを示しつつある。

プラスミドやオリゴヌクレオチドを目的の臓器に効果的に運搬するDDSは発展を続けており、近い将来有効な方法が確立されることが期待される。筆者らの反応性分子を組み込んだオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド部分が反応性分子を標的配列に運搬するための細胞内DDSとしての役割を担っている。このような研究の有用性を高めるためにも、オリゴヌクレオチド自体の効率的なDDSの確立が望まれる。2本鎖DNA配列を正確に認識するための新しい人工の核酸アナログと、特異的に塩基構造を変化させる反応性核酸の開発を通して、筆者らの研究を“遺伝子に働くナノマシン”の実現に向けて、さらに進化させたいと考えている。

文 献

- 1) Salazar M, Fedoroff OY, Miller JM, Ribeiro NS, Reid BR: The DNA strand in DNA-RNA hybrid duplexes is neither B-form nor A-form in solution. *Biochemistry* 32: 4207-4215, 1993, (Data taken from the literature).
- 2) Structure was generated and optimized by MM3.
- 3) Coll M, Frederick CA, Wang AH, Rich A: *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8385, 1987, (Data taken from the literature).
- 4) Hoyne PR et al.: *J Mol Biol* 302: 797-809, 2000.
- 5) 森下竜一: *ファルマシア* 37: 511, 2001.
- 6) Hogrefe RI: *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 351-357, 1999.
- 7) 多比良和誠・編: *遺伝子機能破壊実験法*. 羊土社, 2001.
- 8) 黒木登志夫: *発癌と癌細胞*. 東京大学出版会, 1999, p 1-19.

- 9) Foye WO ed.: *Cancer Chemotherapeutic Agents*. American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- 10) Sasaki S: Active oligonucleotides incorporating alkylating agent as potential sequence- and base selective modifier of gene expression. *Eur J Phar Sci* 13: 43-51, 2001.
- 11) a) Nagatsugi F, Uemura K, Nakashima S, Maeda M, Sasaki S: 6-vinylated guanosine as a novel cross-linking agent and its versatile synthesis from the 6-O-tosylate by Pd(0)-catalyzed cross-coupling. *Tetrahedron Lett* 36: 421, 1995.
b) Nagatsugi F, Uemura K, Nakashima S, Maeda M, Sasaki S: 2-aminopurine derivatives with C6-substituted olefin as novel cross-linking agents and the synthesis of the corresponding β -phosphoramidite precursors. *Tetrahedron* 53: 3035, 1997.
- 12) Nagatsugi F, Kawasaki T, Usui D, Maeda M, Sasaki S: Highly efficient and selective cross-linking to cytidine based on the new strategy for auto-activation within duplex. *J Am Chem Soc* 121: 6753, 1999.
- 13) Nagatsugi F, Tokuda N, Maeda M, Sasaki S: A new reactive nucleoside analog for highly reactive and selective cross-linking reaction to cytidine under neutral conditions. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 2577, 2001.
- 14) Nagatsugi F, Usui D, Kawasaki T, Maeda M, Sasaki S: Selective reaction to a flipping cytidine of the duplex DNA mediated by triple helix formation. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 343, 2001.
- 15) Nagatsugi F, Matsuyama Y, Kawasaki T, Maeda M, Sasaki S: Selective cross-linking to the adenine of the TA interrupting site within homopurine-homopyrimidine duplex. *Bioorg & Med Chem Lett* 12: 487, 2002.
- 16) Nagatsugi F, Sasaki S, Miller PS, Seidman MM: Site-specific mutagenesis by triple-helix forming oligonucleotides containing a reactive nucleoside analogue in mammalian cells, (submitted).
- 17) Soyfer VN, Potaman VN: *Triple-helical nucleic acids*. Springer-Berlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1996.
- 18) a) Prevot-Halter I, Leumann CJ: Selective recognition of a C-G base-pair in the parallel DNA triple-helical binding motif. *Bioorg & Med Chem Lett* 9: 2657, 1999.
b) Obika S, Hari Y, Sekiguchi M, Imanishi T: A2',4'-bridged nucleic acid containing 2-pyridone as a nucleobase: Efficient recognition of a C center dot G interruption by tripler formation with a pyrimidine motif. *Angew Chem Int Ed* 40: 2079, 2001.
- 19) a) Sasaki S, Yamauchi H, Nagatsugi F, Takahashi R, Taniguchi Y et al.: W-shape nucleic acid(WNA) for selective formation of non-natural anti-parallel triplex including a TA interrupting site. *Tetrahedron Lett* 42: 6915, 2001.
b) Sasaki S, Yamauchi H, Takahashi R, Taniguchi Y, Minoru M: New base analogs for the formation of non-natural triplexes. *Nucleic Acids Res Suppl* 44: 23, 2001.
c) Taniguchi Y, Takahashi R, Kodama K, Senko Y, Minoru M et al.: Selective formation of non-natural type triplexes containing TA interrupting sites with the TFO incorporating W-shape nucleic acid(WNA) analogs. *Nucleic Acids Res Suppl*, (in press).