三本鎖形成による DNA 認識のための人工塩基の開発

近年、高次構造を有する RNA や DNA が触媒活性や調節機能を担う例が多く見いだされている。これらは細胞の置かれた時空間に依存して遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしており、ゲノム情報の多面性が明らかになっている。したがって情報の最上流に位置する DNA に特異的に結合する分子は、バイオツールとしてさらには医薬リードとしての発展性がある。本稿では、二本鎖 DNA 配列認識を目指した三本鎖 DNA 形成分子の開発に向けた筆者らの研究成果について紹介する。

佐々木茂貴

1. はじめに

生化学のセントラルドグマでは、情報を担う分子は、遺伝子 (DNA) であり、その情報はいったんメッセンジャー RNA に転写され、最終的にはタンパク質に翻訳されて機能が発現するとされている。しかし近年では、触媒活性をもつ核酸や、遺伝子発現を調節する核酸などタンパク質に翻訳されることなく機能を発現する分子が多く見いだされ、ゲノムは情報だけでなくさまざまな機能を担っていることが明らかにされてきている¹⁾。また、遺伝子発現系において DNA の三本鎖²⁾や四本鎖³⁾あるいは枝分かれ構造⁴⁾などの高次構造が重要な要因として関与しているなど、ゲノム情報の多面性が明らかになっている。したがって、ゲノムの特定領域に特異的に結合する分子はさまざまな生物機能を発現でき、バイオツールとしてさらには医薬リードとしての発展可能性が期待されている。本稿では、精密な配列認識を目指した三本鎖 DNA 形成のための人工ヌクレオシドアナログ開発について、これまでの研究例を紹介する。

2. 三本鎖 DNA²⁾

三本鎖 DNA は、二本鎖 DNA のメジャーグループ (主溝) にもう 1 本の DNA (三本鎖形成オリゴヌクレオチド, Triple helix Forming Oligonucleotides: TFO) が配列特異的に結合して形成される。このとき、安定な三本鎖 DNA は、二本鎖 DNA の片方の鎖がプリン塩基 (グアノシンとアデノシン) だけで構成され、相補鎖がピリミジン塩基 (シチジンとチミジン) で構成されるホモプリン・ホモ

(A) 3本目のDNA (黒) が2本の主溝の溝で錯体形成 (B) ピリミジン塩基はプリン鎖とアンチパラレル配向 (C) プリン塩基はプリン鎖とアンチパラレル配向

図1 三本鎖 DNA の模式図 (A) とパラレル型 (B) およびアンチパラレル型 (C) の概念図
矢印は DNA 鎖の 5'末端から 3'末端の方向を示している。

ピリミジン領域でのみ形成されるという制限がある。二本鎖 DNA のプリン鎖と三本目 DNA との配向性の違いによって、パラレル型とアンチパラレル型があるが、三本目 DNA がピリミジンで構成されるときにはパラレル型が、三本目 DNA にグアニンが多く含まれる配列ではアンチパラレル型三本鎖 DNA が形成しやすい (図1)。遺伝子プロモーター領域には安定な三本鎖 DNA が形成されるホモプリン・ホモピリミジン領域が高い頻度で含まれており、三本鎖 DNA 形成による転写阻害の標的になりえると考えられている。RNA は転写後種々の構造変換を受けて機能を発現するため、転写そのものを制御できる三本鎖 DNA は診断や治療の新しい手段として高い潜在能力をもっている。このような三本鎖 DNA の有用性を十分活用するために、いくつかの解決すべき問題が指摘されている。物理化学的性質としては、(1) 生理的条件下での複合体の不安定性、(2) 認識できる二本鎖 DNA 配列の制限、さらには生体への適用に関しては、(3) 酵素による速やかな加水分解、(4) 低い細胞膜透過性、(5) 二本鎖 DNA のヌクレオゾーム (DNA タンパク質複合体) による保護効果、などである。一般的解説は他に譲り、ここでは三本鎖形成の認識配列の拡張の課題解決に向けた試みを紹介する。

Shigeki SASAKI 九州大学大学院薬学研究
院 (812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1) ・
教授. 1982年 東京大学大学院薬学研究科製
薬化学専攻博士課程修了. 専門は生物有機化
学, 合成化学, 核酸化学.

図2 三本鎖 DNA を形成するアンチパラレル型三重塩基対.
I: グアニン: G: C, II: アデニン: A: T.

3. 三本鎖 DNA を安定化する 三重塩基対と天然核酸の認識の制限

シチジンとチミジンからなる TFO がホモプリン-ホモピリミジン二本鎖と形成するパラレル型三本鎖 DNA では、ピリミジン塩基とプリン塩基の間の特異的 Hoogsteen 水素結合が安定化に寄与している。TFO の規則正しく並んだ塩基のスタッキング効果は三本鎖 DNA 安定化のための重要な要因と考えられている。グアノシンとアデニンを含む TFO によって形成されるアンチパラレル型三本鎖 DNA はグアニンとアデニンによる逆 Hoogsteen 水素結合によって安定化されている。(図2) 一方、パラレル型およびアンチパラレル型を問わず、二本鎖 DNA 中のホモプリン鎖中にピリミジン塩基が1カ所でも存在する場合、ピリミジン塩基の主溝側には水素結合部位が1カ所しかないため、安定な三本鎖の形成が阻害され、三本鎖形成のための障害部位となる。このような認識配列の制限が三本鎖 DNA の利用への重大な問題点となり、これまで多くの研究者がこの問題点の解決を目指してヌクレオシドアナログの開発に取り組んできた。

4. 三本鎖 DNA 形成のための 人工ヌクレオシド開発の現状

これまで設計された人工ヌクレオシドアナログはすでに総説にまとめられているが⁵⁾、最近の例を含めて図3に代表的な化合物をまとめた。最近の興味深い試みとして、Leumann らは5-メチルピリジン-2-オンを用い CG 塩基対のシトシンと1カ所の水素結合による認識を行い、さらに静電相互作用による安定化因子として2'-O-アミノエトキシ基を導入する分子設計を試みている⁶⁾ (図3, A)。今西らもピリドンを経験部位にもつ誘導体を開発しているが、この場合、糖部をビスクロ構造としてコンホメーション固定化による安定化を期待している⁷⁾ (図3, B)。

最近、Fox らはこれまで開発されてきた種々のヌクレオシドアナログおよび構造修飾を組合せることで、三本鎖形成領域を拡張する試みを報告している⁸⁾ (図3, C, D)。彼らの方法は2'-アミノエトキシ基が三本鎖 DNA を安定化するという事を利用し、それぞれ単独では小さなヌクレオ

図3 一般的配列での三本鎖 DNA 形成のために設計された人工ヌクレオシドアナログ.

シドアナログの安定化効果を補うことを目指している。この戦略では、認識する配列に応じて適切な組合せを選択する必要があるものの、一般的配列で三本鎖形成が可能になったと報告されている。アミノエトキシ基を含む TFO は細胞内での三本鎖 DNA 形成にも有効であるため⁹⁾、三本鎖 DNA 形成における解決策の一つとして興味深い。このように、従来の広範な試みにもかかわらず、一般的な配列での三本鎖 DNA 形成についてはいまだ解決すべき課題が多い。

5. ビシクロ型人工ヌクレオシド WNA (W-shaped nucleoside analogue) の開発

筆者らは上記の例と異なり、グアニン豊富な三本鎖形成オリゴヌクレオチドを用いたアンチパラレル型三本鎖 DNA を安定化するヌクレオシドアナログの分子設計を検討している。アンチパラレル型三本鎖 DNA でも、プリン鎖中のピリミジン塩基は三本鎖 DNA 形成にとっての障害部位として作用するため、特異的なヌクレオシドアナログの開発が必要となっている。しかし、グアニン豊富オリゴヌクレオチドは高塩濃度下で自己会合しやすいという性質が障害となり、アンチパラレル型三本鎖 DNA のためのヌクレオシドアナログの研究は限定されたものとどまっている。三本のリン酸ジエステル鎖の相対的な位置関係は、パラレル型はプリン鎖側に大きく偏った二等辺三角形の頂点に位置するのに対して、アンチパラレル型ではそれらはほぼ正三角形上に位置する(図4)。この正三角形構造を基本にすると、糖部分にビスクロ構造として新たに加えた五員環に塩基を導入し、遠いプリンと水素結合形成が可能になると期待された。天然ヌクレオシドで塩基が占めている空間にベンゼン環を導入することで、隣接塩基とのスタッキング相互作用の連続性が維持されると考え、ビスクロ骨格をもつヌクレオシドアナログ(WNA)を設計した¹⁵⁾(図4)。このように、筆者らが設計した新しいヌクレオシドは、天然ヌクレオシドでは塩基が単独で担っているスタッキング相互作用と水素結合相互作用を、それぞれベンゼン

図4 アンチパラレル三本鎖 DNA の塩基対構造とビスクロ型ヌクレオシドアナログ WNA (W字型ヌクレオシドアナログ) の基本構造

環と塩基部分に別々に分担させているという点がこれまでの人工塩基にない特長である。

6. 三本鎖 DNA 形成の評価: TA および CG 塩基対の安定かつ選択的な認識の達成

ベンゼン環部分および塩基部分を種々変化させた多種類の WNA 誘導体を合成し, TFO に導入, 三本鎖形成能を評価した。その結果, 塩基部分にチミンを含む WNA-βT が三本鎖形成 DNA 障害部位である TA 塩基対を選択的に安定化できることが見いだされた(表 1)。さらに塩基がシトシンである WNA-βC は, CG 塩基対に選択的に三本鎖を形成できることがわかり, 天然型塩基と合わせて三本鎖 DNA の認識コードを 4 種類に拡張することに成功した¹⁶⁾。認識塩基を持たずベンゼン環のみをもつ WNA-H が CG, GC 塩基対と安定な三本鎖 DNA を形成し, チミンをもちベンゼン環がない H-WNA-βT はまったく安定化効果を示さなかったことから, ベンゼン環は重要な安定化要因であり, チミンは選択性を決定していることが示された。他の誘導体の実験結果および分子モデリングでの考察から, 当初の設計とは異なり, 塩基は遠い側のプリン塩基と水素結合しているのではなく, 塩基対接合部で水素結合をしているのではないかと想定している(図 5)。

7. ビスクロ型ヌクレオシドアナログ(WNA)による三本鎖 DNA 形成の配列依存性

WNA-βT および WNA-βC の認識の一般性を確認する目的で隣接塩基の異なる標的に対して三本鎖 DNA 形成能を調べたところ, WNA-βT は標的の 3'側がアデノシンの場合にはまったく三本鎖形成能を示さないなど, WNA の安定化効果には配列依存性があることがわかった¹⁷⁾。安定化の重要因子と考えられるベンゼン環に置換基を導入した

図5 WNA-βC と WNA-βT と塩基対との水素結合予想図

図6 プロモ置換ベンゼン環を有する WNA の三本鎖 DNA の錯体安定度定数 (K_s ; 10^9 M^{-1})

表 1 ビスクロ型ヌクレオシドアナログ(WNA)による三本鎖 DNA の錯体安定定数 (K_s ; 10^9 M^{-1})^{a)}

Z	X, Y			
	T, A	A, T	C, G	G, C
dG	0.004	0.008	0.008	0.086
dA	<0.001	0.074	<0.001	0.047
WNA-βT	0.30	<0.001	0.015	0.082
WNA-βC	<0.001	0.025	0.115	0.047
WNA-H	0.067	0.047	0.18	0.28
H-WNA-βT	0.002	0.0036	0.009	0.042

TFO 3'-GGAAGG A-ZG GAGGAGGGA5'
target 5'-GGGAGGGAGGGAAGG A-X-G GAGGAGGGAAGC
duplex 3'-CCCGCCCTCCCTTCC T-Y-C CTCCTCCCTTCG

a) 反応は 22°C, pH 7.5, 12 時間行い, 生成する三本鎖 DNA をゲルシフトアッセイで定量した。

WNA-βT を種々合成し検討したところ, 従来の WNA では安定化できなかった配列で安定な三本鎖 DNA を形成できるメタプロモ置換体 (5'側がグアノシンの配列, G-X-A), オルトプロモ置換体 (5'側がアデノシンの配列, A-X-A) を見いだした¹⁸⁾(図 6)。これらを組合せることで隣接塩基にかかわらずすべての TA 塩基対の認識が達成できるようになった。現在, 一般的な配列の二本鎖 DNA を認識できる新たな人工ヌクレオシドの開発を継続中である。

8. おわりに

ゲノム (二本鎖 DNA) は生命現象の中心的意義をもつ物質であり, RNA やタンパク質の情報の源であるばかりでなく, シトシンメチル化などの小さな化学構造や, 三本

鎖あるいは四本鎖などの立体構造の変化は、これらの変動や調節に関与していると考えられている。したがって、生きた細胞内でこのような小さな構造変化と大きな構造変化を正確に認識しつつ、二本鎖 DNA に結合する分子はバイオツールとして非常に魅力的な素材となるものと考えられる。遺伝子発現系に作用する方法は、アンチセンス、アンチジーンあるいは近年注目されている siRNA (短い二本鎖 RNA による RNA 干渉) を含めて、発見から展開に至る歴史がきわめて類似している。すなわち、最初に爆発的な期待があり、多くの生化学的利用を経て根本的な問題点が明らかになり、最初の熱が冷め再び基礎的研究に立ち戻る、というサイクルである。RNA を標的にするアンチセンスは一時期の冷却期間を過ぎ、機能性 RNA への作用を見据えた新しい時代に入っている。三本鎖 DNA はゲノムそのものに特異的に作用できる人工的な方法として有力な候補の一つであり、過去 10 年以上の基礎的検討を踏まえて、筆者らのグループを含めていくつかの研究グループが従来の困難を克服してきている。今後はさらに分子設計を精密化するのと同時に、ナノスケールの技術との融合により生体内でのゲノムを正確に認識できる手法を確立したいと考えている。

謝 辞 本研究は九州大学大学院薬学研究院にて行われたものであり、永次 史博士(現 東北大学多元研教授)をはじめ共同研究者の学生諸氏の努力に深く感謝いたします。また、本研究は基盤研究、特定領域研究 A (分子シンクロ) などの研究費の援助により行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) ネイチャー特別編集, 「ヒトゲノムの未来〜解き明かされた生命の設計図〜」, 福間書店, 2002
- 2) V. N. Soyfer, V. N. Potaman: "Triple-Helical Nucleic Acids," Springer-Verlag, New York, 1996
- 3) D. Yang, L. H. Hurley: *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 25, 951 (2006)
- 4) K. van Holde, J. Zlatanova: *Bioessays*, 16, 59 (1994)
- 5) 谷口陽祐, 佐々木茂貴: 有機合成化学協会誌, 62, 1026 (2004) および引用文献
- 6) S. P. Parel, C. J. Leumann: *Tetrahedron Lett.*, 44, 5065 (2003)
- 7) Y. Hari, S. Obika, M. Sekiguchi, T. Imanishi: *Tetrahedron*, 59, 5123 (2003)
- 8) D. A. Rusling, V. E. C. Powers, R. T. Ranasinghe, Y. Wang, S. D. Osborne, T. Brown, K. R. Fox: *Nucleic Acids Res.*, 33, 3025 (2005) および引用文献
- 9) N. Puri, A. Majumdar, B. Cuenoud, P. S. Miller, M. M. Seidman: *Biochemistry*, 43, 1343 (2004)
- 10) S. Sasaki, H. Yamauchi, F. Nagatsugi, R. Takahashi, Y. Taniguchi, M. Maeda: *Tetrahedron Lett.*, 42, 6915 (2001)
- 11) S. Sasaki, Y. Taniguchi, R. Takahashi, Y. Senko, K. Kodama, F. Nagatsugi, M. Maeda: *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 516 (2004)
- 12) Y. Taniguchi, A. Nakamura, Y. Senko, K. Kodama, F. Nagatsugi, S. Sasaki: *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 24, 823 (2005)
- 13) Y. Taniguchi, A. Nakamura, F. Nagatsugi, S. Sasaki: *J. Org. Chem.*, 71, 2115 (2006)

Design of Nucleoside Analogs for the Formation of Triplex DNA

Shigeki SASAKI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University
E-mail: sasaki@phar.kyushu-u.ac.jp

Abstract: Recently, important roles of non-canonical higher order structures of DNA and RNA have been identified in regulation of gene expression. Therefore, the molecules that can target specific DNA and RNA sequences will be useful not only as innovative bio-tools but also as potential candidates for new therapeutic agents. Triplex helix DNA formation with the use of synthetic oligonucleotides (triplex-forming oligonucleotides; TFO) provides a unique method for recognition of duplex DNA leading to inhibition of transcription with high sequence specificity in the antigene method. However, as the stable triplex DNA is formed only with the duplex with homopurine—homopyrimidine sequence, development of TFO as the biological tool has been hampered. This limitation arises from the fact that pyrimidine bases provide one hydrogen bonding site to natural bases within the major groove, and pyrimidine—purine base pairs interrupt triplex formation. Much effort has been devoted to overcome to this problem, and some successful approaches were recently reported with the use of newly designed nucleoside analogs. The author's group also succeeded the development of original nucleoside analogs for the recognition of pyrimidine—purine interrupting sites. This mini-review focuses on the development of nucleoside analogs for the formation of stable triplex DNA.

Keywords: Triplex DNA/Triplex-Forming Oligonucleotides/Regulation of Gene Expression/Nucleoside Analog/Antigene/Inhibition of Transcription