機能性アンチセンス DNA の化学合成

村 上 章*・牧 野 圭 祐*

Chemical Syntheses of Functionalized Antisense DNA.

Akira MURAKAMI* and Keisuke MAKINO*

In this short review, recent developments in the syntheses of antisense DNAs are described. The antisense DNA/RNA method is one of the ways to regulate gene expression specifically and uses sequence specific DNAs and their analogs, namely antisense DNAs. They have been designed and synthesized in order to meet requirements, for use in living systems, such as selectivity, nuclease resistance, cell membrane permeability, and duplex stability. The design is mainly focused on the modification of phosphate backbones, the modification of sugar moieties, and the introduction of functional molecules into antisense DNAs. The ability of these antisense DNAs to regulate gene expression are also discussed as well as biological studies.

1. 緒 言

遺伝子の発現の制御に遺伝子自身も関与している場合があるという事実が最近明らかにされた¹⁾。遺伝子の発現に際して、その遺伝子配列と相補的な遺伝子断片がその領域と二重鎖を形成し、その結果遺伝子の発現が抑えられるという機構である。この機構を人為的に再現させることができれば、従来困難であった生体系での遺伝子発現機構の解明や遺伝子発現の制御が可能になる。またこの考え方によればウイルス病に対して遺伝子に直接作用する形で効果を発揮する治療薬の開発(ドラッグデザイン)も可能となる²⁾。一方、こうした遺伝子発現制御の方法は1970年初めから提唱され、合成核酸アナログを用いて試みられてきており³⁻⁵⁾、アンチセンス DNA・RNA 法(ハイブリダイゼーション・アレスト法, トランスレーション・アレスト法などとも呼ぶことがある。本稿ではアンチセンス法と略す)と呼ばれている。生体での現象の化学的な先取りという形で発展してきている点で興味深い。同法による遺伝子制御の対象は、現在 AIDS ウイルス(HIV)⁶⁾やインフルエンザウイルス⁷⁾等の

ウイルス病, c-myc, c-fos 等発ガン遺伝子群⁸⁾, Trypanosoma 等原核生物⁹⁾におよび、近年では新しい農薬開発にも応用されようとしている¹⁰⁾。本報ではアンチセンス法に用いられるオリゴヌクレオチド及びその誘導体の最近の化学合成法に重点を置き、次いで、それらの性質および二, 三の遺伝子発現制御の試みについて報告する。

2. アンチセンス DNA・RNA 法の原理とアンチセンス分子構築の基本条件

アンチセンス法の基本的原理を図1に示す。遺伝子の発現の各過程において一重鎖になる遺伝子(DNA, RNA)の特定領域を、その塩基配列に選択的(相補的)な分子種で被覆すれば(図1の斜線部分)当該遺伝子はその発現を抑制されることになる。(先に明らかにされたのはこうした段階での生体内在性遺伝子(RNA)の関与である。)アンチセンス法は制御分子種として DNA, RNA やオリゴヌクレオチド(誘導体を含む)などを用いて人為的に遺伝子発現を制御しようとするものである。対象遺伝子を選択的に修飾あるいは切断することで遺伝子発現制御を行う試みもこの範疇に入る。

アンチセンス分子が最終的には生体内で機能しなければならないことから、その設計、構築については以下の点を考慮する必要がある。

(1) 塩基配列

アンチセンス分子の塩基配列は対象遺伝子の特定領域(例えば翻訳開始コドンやスプライシング部位等, セ

* 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科 ()

* Kyoto Institute of Technology, Faculty of Textile Science, Department of Polymer Science and Engineering, ()

Fig.1 Principle of antisense DNA · RNA method.
 ▨ : Antisense molecule

ンス領域)に完全に相補的かつそれらの配列がその種独特であるような領域が遺伝子配列の情報から決定される。近年の遺伝子情報バンクの充実は遺伝子のコンピューターによる相同性試験や2次構造検索などを容易にし、最も特異性の高いと考えられる塩基配列(アンチセンス配列)の選択がある程度の確度をもってなされるようになってきている。

(2) 構造

アンチセンス法が適用される系は最終的には生体系(*in vivo*系)であるため、アンチセンス分子の設計に種々の満たすべき基本的条件が存在する。それらを次に挙げる。

(a) DNA あるいは RNA との結合安定性および選択性

アンチセンス分子が機能するためには対象遺伝子とアンチセンス分子とが生理的条件下(例えば 37°C, pH 7.2 イオン強度 0.15 等)で安定に二重鎖を形成する必要がある。

(b) *in vivo* 系での安定性(抗ヌクレアーゼ特性)

組織、細胞に作用させる際、アンチセンス分子は体液や細胞培養液に含まれる種々の加水分解酵素群(ヌクレアーゼ、ホスファターゼなど)に対して少なくとも作用を発現するまである程度安定である必要がある。

(c) 細胞膜透過性

アンチセンス分子は細胞膜を透過し、細胞内に入らなければならない。

(d) 細胞毒性

細胞毒性が低いあるいは全くないこと。

(e) 代謝性

細胞に取り込まれた後代謝され生体外に排出あるいは生体に吸収されること。

(f) 切断活性

生理的条件下で DNA あるいは RNA を切断できる活性を有すること。

(g) 合成法

合成が簡便であり製造コストが安価であること。などである。

現在までに上述の基本条件を満たすべく多くの試みが発表されてきている。それらのあるものは同時に複数の条件を満たそうとしている。以下にそれらを挙げる。

3. アンチセンス分子の化学合成

3.1. 天然型オリゴヌクレオチド アンチセンス分子として最初に用いられたのは中性のトリエステル結合を有するオリゴヌクレオチド誘導体(3量体、後述)⁴⁾と天然型のオリゴデオキシリボヌクレオチド(13量体、ODN)である⁵⁾。現在までにアンチセンス分子として最も多く用いられているものは後者である。図2にODNの基本構造および構成成分の構造を示す。ODNの化学合成法は反応中間体のリン酸エステルの状態から主に3種類に分類される(スキーム1)¹¹⁻¹³⁾。本稿で紹介するアンチセンス分子の合成法はこれらいずれかに基づいている。

一般にODNは対象遺伝子と安定な二重鎖を形成しアンチセンス分子としての機能も高いが、リン酸ジエステル結合(I)は細胞培養液あるいは血液等に含まれるヌク

レアーゼにより容易に加水分解されるという欠点を持つ。従い、この欠点を補い、より機能的なアンチセンス能力を有する種々の分子が開発された。新しい型のアンチセンス分子は基本的にODNの修飾体である。

3.2. 耐ヌクレアーゼ活性を持つ修飾リン酸結合を有するアンチセンス分子 アンチセンス分子による遺伝子制御で最も重要な点として、アンチセンス分子の安定性が注目され、それらを増加すべく多くの試みが行われた。ここでは種々のリン酸結合様式の改良について述べる。

3.2.1. トリエルテル結合(II) 生理的条件下でアンチセンス分子を電気的に中性にすればDNAやRNAとの

Fig. 2 Structures of nucleic acids and their components.

Scheme 1 DNA synthesis.

相互作用時において静電的斥力が働かず、安定なハイブリッドを形成するとの考えからトリエステル結合型アンチセンス分子が開発され、*t*RNA のコドン領域の選択的被覆による *t*RNA のアミノアシル化反応の抑制に用いられた⁴⁾。リン酸トリエステル型オリゴヌクレオチド(6, 3量体まで)はリン酸ジエステル合成法により塩基部分および2'-水酸基を保護したオリゴマーを合成し、それをDMF/2, 6-ルチジン/トシルクロリド中エタノールによりアルキル化して得ている(収率: 27%)。化学合成して得たODNをFmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニ

ルクロリド)により塩基部分、3'および5'水酸基部分を保護した後、トシルクロリドのDMF/メタノール/2,6-ルチジン溶液で処理することでトリエステル型アンチセンス分子を得る方法も報告されている¹⁴⁾。すべてのリン酸ジエステルがトリエステルに置き替わったものの回収率は18量体で37%であった。この方法は精製したODNを得てからでも修飾できる点に利点がある。H-ホスホネート法(スキーム1(3))を応用してもトリエステル結合は得られる¹⁵⁾。H-ホスホネート結合の酸化をN-メチルイミダゾール/トリエチルアミン(TEA)/CCl₄/アルコール系で行うことでリン酸トリエステル結合(II)が得られると報告されているが、この方法は反応が系中の水分に影響され易い点に問題がある。またオリゴヌクレオチドの特定部位にトリエステル結合を導入する方法^{16,17)}、トリエステル結合とジエステル結合とを交互に持つアンチセンス分子¹⁸⁾も報告されている。

このアンチセンス分子はリン原子に関して立体異性を示し(以後 *p*-キラルと略称する)、各結合にそれぞれ *S* 型と *R* 型の絶対配置が存在する。従って、*n* 量体のオリゴマーには 2^{*n*-1} 個の異性体が存在することになり、³¹P-NMR スペクトルではその結果幅広いピークを与える¹⁴⁾。

3.2.2. メチルホスホネート結合 トリエステル結合型アンチセンス分子(3.2.1.)は細胞に取り込まれた後比較的簡単に加水分解されるため、より安定な結合としてメチルホスホネート結合(III)が考案された¹⁹⁾。この結合も中性であるため高い細胞膜透過性やヌクレアーゼ耐性が期待された。オリゴヌクレオシドメチルホスホネート(OMP)はメチルホスホン酸ジクロリド(7)で活性化した8あるいはそのテトラゾリド(9)を3と反応させることで得られたが、収率は50%-60%であった²⁰⁾。次いで比較的安定であるイミダゾリド(10)をテトラゾールで活

性化する方法がとられ、90%程度の収率が得られた²¹⁾。さらに3価リンのアミダイト誘導体(11)を用いた場合各段反応収率98%以上が達成されている²²⁾。11は4同様自動合成機に適用することができ、各段合成収率は97%以上と報告されている²³⁾。このメチルホスホネート結合も *p*-キラルであり、後述するようにODNとのハイブリッドの安定性が問題となっている。現在までのところ立体選択的の合成あるいは分離には成功していないが、*p*-キラルなモノマー(12)から出発した場合、その

12

立体異性を保持しつつ、立体的にコントロールされた(例えば *R* 型のみ)オリゴマーを得る方法が最近開発された²⁴⁾。

メチルホスホネートオリゴマーの精製において注意しなければならないのは、メチルホスホネート結合がリン酸ジエステル結合に比べアルカリ条件で不安定であり、容易にOMPが切断される点である。従って、塩基の脱保護には濃アンモニア水よりもTEA/エタノールが用いられる²¹⁾。

3.2.3. ホスホロチオエート結合 ホスホロチオエート結合(IV)は本稿で紹介するリン酸結合の中で最も天然

(IV)

(V)

のDNAの結合と構造的に類似し、電荷も存在する。この結合は酵素を用いても形成される。DNAポリメラーゼIはα-チオ化ATPなどを基質として認識し、ホスホロチオエート結合を有する高分子量(約10⁶)のDNA誘導体を与える²⁵⁾。化学的には保護ヌクレオシドホルキノメトキシホスファイト(13)と3'-保護ヌクレオシドをテトラゾール存在下で反応させ15を得た後、原子状硫黄(S₈)のピリジン懸濁液中で処理してホスホロチオエート結合(16)を得ている。2量体の合成収率は50%-60%であった²⁷⁾。また、ホスホロアミダイト法によるDNA固相合成の際、各段階で行われるヨウ素/水/THFによる酸化にかわりにS₈の2,6-ルチジン懸濁液あるいはS₈の二硫化炭素(CS₂)溶液を用いることでホスホロチオ

11

エート結合型オリゴヌクレオチド誘導体(17)が得られる^{27,28)}。14 量体, 28 量体がそれぞれ 50%, 38% の収率で得られている。この方法は DNA 自動合成機を用いて行うことができるが, 反応カラムや流路の洗浄に充分配慮する必要があると指摘されている²⁸⁾。

他方, H-ホスホネート法による DNA 合成の過程でホスホロチオエート結合を導入する試みもなされ, H-ホスホネート結合(V)に S_8 の CS_2 /TEA 溶液で反応させて 17 が得られている^{13,29)}。同様の反応は 2'-水酸基を保護した RNA オリゴマー(18, 20 量体)の合成に適用された

が, 88 μmol のヌクレオシドを担持したサポートから出発した合成で 9.1 μmol の最終アンチセンス分子が得られている^{6e)}。ホスホロチオエート結合はある程度求核反応性があり, 反応性を利用して蛍光剤等を導入している場合もある³¹⁾。後述するようにこの種のアンチセンス分子は AIDS ウイルス (HIV) の活性制御に大きな効果を示

しているが, その際アンチセンス機構以外の機構で効果が発現されている可能性が示唆されている。様々な機構が考えられるが, ホスホロチオエート結合の反応性の高さも関係しているものと考えられる。リン酸結合のすべてがホスホロチオエート結合であるアンチセンス分子の場合水に対する溶解度が小さく, 精製の過程で問題となるが, アンチセンス分子として生体系に用いるには差し支えないと思われる。

3.2.4. ホスホロジチオエート結合 ホスホロチオエート結合は *p*-キラルであり, また S 型の結合はヌクレアーゼ P1 で加水分解されるためホスホロジチオエート結合(VI)が考案された。ビスアミダイト法による DNA 合成

法を一部変換することでホスホロジチオエート結合が形成される。ビスアミダイト(19)を 2,4-ジクロロベンジルメルカプタンでチオアミダイト(20)に変換し, テトラゾールを活性化剤として固相で 3 と反応させ, 続いて S_8 のピリジン/ CS_2 /ジオキサン溶液で酸化処理して(21)ホスホロジチオエートオリゴマー(22)が得られている³²⁾。 S_8 による酸化反応は $I_2/H_2O/THF$ 系での酸化より遅く 400 秒程要し, 最終段階の脱ジクロロベンジルはチオフエノール/TEA/ジオキサン系で 20 時間要する。この結合は立体異性を示さず, 対象遺伝子と ODN と同

様の安定な二重鎖を形成するものと期待される。

3.2.5. ホスホロアミデート結合 ホスホロアミデート結合(VII)はリン原子にアルキルアミノ基が直接結合しており、生理的条件下ではほとんど電荷がなく細胞膜透過性、ヌクレアーゼ耐性が期待される。最も容易な合成法はH-ホスホネート法を経由するものである。H-ホスホネート結合(23)は四塩化炭素中1, 2級アミンによる酸化処理ではほぼ定量的にホスホロアミデート結合に変換される(24)^{13,33,34}。この際ジアミンを用いればODNのリン酸結合位置にアミノ基遊離型スペーサーとしてアルキルアミノ基が導入され、ODNの標識や、DNAプローブ

の合成にも用いることができる。ビスジエチルアミノホスホクロリダイトにより得られる19を固相合成反応に適用し、得られる中間体25を*t*BuOOH/トルエンで

酸化する方法でもほぼ定量的にホスホロアミデート結合が得られる³⁵⁻³⁷。この方法はDNA自動合成機にも応用でき、アンチセンス分子の大量合成に役立つものと思われる。リン原子に関する立体異性はこの結合にも存在し、その絶対配置が2次元NMRにより決定されている³⁸。

通常絶対配置はX線回折により決定されるが³⁹⁾, 2次元NMR法は結晶化の手間がかからず有効な方法になるものであろう。しかし, 今少しのデータの蓄積が必要である。

3.3. 耐ヌクレアーゼ活性を持つ α -アノマー型アンチセンス分子 リン酸結合に関する修飾の他に, リボースの修飾によるアンチセンス分子の合成も行われている。天然のDNAのN-グリコシド結合は β -アノマー型(27)であるが α -アノマー型のアンチセンス分子が合成された。 α -アノマー型ヌクレオシド(28)⁴⁰⁾を出発原料と

して用いて, β -アノマー型ヌクレオシドの場合と同様に保護ならびにリン酸化を行い, 縮合反応は液相トリエステル法によるブロック合成法で, 6量体が得られている(収率65%)⁴¹⁾。他方, ホスホロアミダイト法による固相合成も行われ, 収率は15量体で27%であった⁴²⁾。 α -アノマー型ODNの合成は β -アノマー型ODNの場合とはほぼ同様に行うことができる。

α -アノマー型アンチセンス分子はヌクレアーゼ耐性を示し, β -アノマー型ODNと平行型二重鎖を形成するという特徴が明らかになっている⁴³⁾。

3.4. アンチセンス分子の高機能化 前節で紹介した種々の結合様式を持つアンチセンス分子を他の機能を持つ分子(結合安定化能, 細胞膜透過性能)との複合化によるアンチセンス分子の高機能化が行われている。

3.4.1. インターカレーターを有するアンチセンス分子 DNAあるいはRNAの二重鎖に色素などのインターカレーターが結合すると, その二重鎖は安定化することに注目し⁴⁴⁾, チミジル酸2量体にホスホロアミダイト結合を介してインターカレーター(フェナントロジン誘導体)を導入した誘導体(29)が合成された⁴⁵⁾。天然型の2量体は通常の条件ではボリ(A)とほとんど相互作用しないが

29は強く相互作用した(融解温度(T_m): 45°C)。予想どおりインターカレーターによるハイブリッド安定化が観測されている。さらに, オリゴヌクレオチドの3'-リン酸基に ω -ヒドロキシルアルキルアミノアクリジン誘導体を縮合剤(メジチレンスルホニルテトラゾリド)により導入したもの(30)⁴⁶⁾が合成された。30のスペーサーの

メチレン鎖長はインターカレーターの機能に大きな影響を与え, 二重鎖は $n=5, 6$ の時最も安定した⁴⁷⁾。ホスホロアミダイト結合の酸化過程にヨウ素/ジアミン系を利用し, アルキルアミンをスペーサーとしてリン酸基に導入し(導入効率: 56%), 次いで, アクリジン誘導体(6-クロロ-9-(*p*-クロロフェノキシ)-2-メトキシアクリジン)と反応させたアンチセンス分子も合成されている⁴⁸⁾。また, リボヌクレオシドの2'-水酸基を利用してインターカレーターを導入する方法も開発されている⁴⁹⁾。この場合ウリジンの2', 3'-水酸基をジブチルチンオキシドで活性化した後(31), プロモメチルアントラキノンにCsF存在下で作用させ32を得ている。2'-置換体と3'-置換

体との生成比はほぼ1:1であり, それらはシリカゲルカラムで容易に分離される。2'-置換体はホスホロビスアミダイト型に変換されオリゴヌクレオチドの中間位置に導入されている。また, インターカレーターは塩基部分にも導入されている⁵⁰⁾。

インターカレーターの導入はいずれの場合も二重鎖の安定性を高めた。細胞膜透過性に関して報告は少ないがインターカレーター分子の性質に大きく依存すると思わ

れる。インターカレーターの導入位置は末端リン酸基、中間リン酸結合部位、塩基部分等が選ばれているが、アンチセンス分子としての機能の点では大差がないようである。

3.4.2. 共有結合で対象 DNA/RNA と結合する官能基を持つアンチセンス分子 二重鎖の形成が水素結合によるものであり、一本鎖状態との間で平衡が存在するため、遺伝子の対象部分の被覆が場合によっては外れることも有り得る。従ってアンチセンス分子を何等かの方法で対象遺伝子と共有結合させれば、不可逆的に遺伝子の発現を制御することが可能である。紫外線照射 (365 nm) でピリジン塩基とシクロブタン環を形成して反応するソラレン誘導体 (4,5',8-トリメチルソラレン, TMP, 33) をアミノアルキル化し、ホスホロアミデート結合により 5'-リン酸化 OMP の 5'-末端に導入したアンチセンス分子が開発された (34)⁵¹⁾。これら導入反応は 90% 以上の

高率で進行するもので応用範囲が広い方法である⁵²⁾。ソラレン修飾 OMP は選択的に対象遺伝子の特定部位に結合し、また OMP のアンチセンス分子としての能力を増大した。しかしながら、実際の治療への利用に関しては光の照射可能な部位にしか用いられないという欠点があり、当面は皮膚疾患等への利用に限定されよう。一方、活性なアルキル化剤、例えば 35 や 36 をオリゴヌクレオチドの 3'あるいは 5'-位に導入したもの⁵³⁾、塩基部分にアルキル化剤を導入したもの^{54,55)}等が合成されている。これらアルキル化試薬の反応性は高く、高い選択性で対象遺伝子の塩基部分をアルキル化した。

チドの 3'あるいは 5'-位に導入したもの⁵³⁾、塩基部分にアルキル化剤を導入したもの^{54,55)}等が合成されている。これらアルキル化試薬の反応性は高く、高い選択性で対象遺伝子の塩基部分をアルキル化した。

3.4.3. 細胞膜に親和性の高い分子を導入したアンチセンス分子 細胞膜に親和性の高い分子をオリゴヌクレオチドに導入することでアンチセンス分子の細胞膜透過性

を高める試みがなされている。細胞膜を電荷の観点から眺めた場合と疎水性の観点から眺めた場合とで用いる分子の構造が異なる。前者の例として生理的条件下で正に帯電しているポリ-L-リジン (PLL) が選ばれた⁵⁶⁾。3'-末端にリボヌクレオチドを持つオリゴヌクレオチドを過ヨード酸酸化の後 NaCNBH₃ 存在下 PLL と反応させ 37

が得られている。この場合、PLL の分子量がアンチセンス効果に大きく影響し、分子量 14000 の PLL が最良の結果を与えている。後者の例としてコレステロールが選ばれている⁵⁷⁾。この場合はホスホロアミダイト結合にスパーサーを介してコレステロールがオリゴヌクレオチドに導入されている⁵⁷⁾。いずれの分子もアンチセンス分子として高機能を獲得しているが、具体的な膜透過性については言及されていない。

3.4.4. DNA あるいは RNA を切断するアンチセンス分子 DNA あるいは RNA を単に被覆するのではなく、不可逆的に切断することで発現制御が可能である。まずエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-Fe 錯体が活性酸素を生成し DNA を切断することが着目され⁵⁸⁾、EDTA を有するアンチセンス分子が開発された⁵⁹⁾。デオキシウリジンの 5 位にスパーサーアームを導入し、EDTA 無水物と反応させることで 38 を得、それをホスホロアミダイト法

によりオリゴヌクレオチド (19 量体) の中央に導入している。また、EDTA 無水物を 5'-アミノアルキルリン酸オリゴヌクレオチドと反応させた 39 も合成され⁶⁰⁾、同

様の修飾は OMP にも施された⁶¹⁾。一方、フェナンスロリン-Cu 錯体も同様の DNA 切断活性を持つことから、フェナンスロリンがオリゴヌクレオチドにホスホロアミデート結合を介して導入された (40)⁶²⁾。

以上の分子はいずれも DNA を切断したが、切断部位の塩基配列特異性は大きくなかった。この理由は EDTA はアンチセンス分子により対象遺伝子の特定部位に運ばれるが、そこで生成した活性酸素がある程度の濃度分布を持って拡散した結果と考えられる。

3.5. その他 以上の他、カルバメート結合を持つ 41 や 42 などが最近開発されてきている^{63,64)}。こうした新規の結合様式を持つアンチセンス分子はたぶん今後も発表されると思われるが、その効果まで予測して分子設計し合成することができるかが重要である。

4. アンチセンス分子の性質

前節までに報告した種々のアンチセンス分子についてそれらの *in vivo* 系, *in vitro* 系における挙動をまとめる。

4.1. 細胞膜透過性 図3に示したのは OMP の細胞透過特性である。1.5 時間まで直線的に取り込まれ、 $100\ \mu\text{M}$ の初期添加濃度条件下で細胞中の濃度は $117\ \mu\text{M}$ に達した⁶⁵⁾。この値は OMP が細胞に濃縮されたことを示している。34 も高い透過性を示し TMP の存在は影響を与えていない。一方、ODN は透過性が低いと考えられてきたが、4 時間の培養で細胞内部のオリゴヌクレオチド濃度は $1.5\ \mu\text{M}$ になり (初期添加濃度 $20\ \mu\text{M}$)、ウイルス RNA 濃度の 1 万倍におよぶという試算がある⁶⁶⁾。もっともこの場合細胞培養液系には血清は含まれていないことに留意すべきであろう。PLL やコレステロール

Fig. 3 Transport of dGpGp[³H]T (○, $100\ \mu\text{M}$) and d(Tp)₃[³H]T (●, $100\ \mu\text{M}$) into transformed Syrian hamster fibroblasts at 37°C⁶⁵⁾.

を有するアンチセンス分子に関して透過性実験は行われていないが、それらの有効作用濃度が非修飾アンチセンス分子に比べ数 10 分の 1 (nM のオーダー) にまで減少したことは細胞への透過性が増したためと考えられる。

4.2. 耐ヌクレアーゼ活性 種々のアンチセンス分子が開発されその安定性が試験された。図4に 5'-リン酸基を ³²P でラベルした ODN (12 量体) および OMP (12 量体) を通常の細胞培養に用いられる 10% 血清で 1 分から 2 時間処理し、それらの変化をポリアクリルアミドゲル電気泳動で検討した結果を示した。OMP は 2 時間後もほぼ分解されないまま残ったのに対し、ODN はさきめて容易に分解され短鎖分解物を与えた (半減期約 5 分)⁶⁷⁾。ODN を卵母細胞にマイクロインジェクションにより導入した場合も半減期は 10 分間であった⁶⁸⁾。α-アノマー型アンチセンス分子を *Xenopus* oocyte にマイクロインジェクションした場合、8 時間で 40% の 16 量体が分解されたに過ぎなかった。ホスホロアミデート結合

Fig. 4 Stability of OMP (12 mer) and ODN (12 mer) in 10% serum. (15% PAGE) Incubation time: a, 5 min, b, 15 min, c, 30 min, d, 60 min, e, 120 min, f, 1 min, g, 2 min, h, 5 min, i, 15 min, j, 30 min, k, 60 min, l, 120 min⁶⁷⁾.

Table 2 Effects of OMP on globin synthesis in rabbit reticulocyte lysate and cells^{69,70,72)}.

No.	Oligomer	binding site	concn. (μ M)	% Inhibition			
				lysate		cell	
				α	β	α	β
1	d-TpGCACCAT	α 37-44	100	35	28		
2	d-CpATTCTGT	β 54-61	200	73	70	42	29
		β 49-56	200	21	17	0	0
			200* ¹	30	36		
3	d-CpATTCTGTCTGT	β 45-56	100	49	50		
			200			21	17
4	d-TpGATGTTGG	α 62-70	100	38	11	59	59
5	d-ACAGACAT	none	100	19	8		
6	d-TTTTTT	Poly(A)tail	300	0	0		
7	d-TMP-TGTTGGTCTTGT* ²	α 56-67	5	43	8		
8	d-TMP-ACAGCATTTGCA* ²	β 206-217	5	13	67		
9	d-TMP-CAGACATTTTGA* ²	none	5	0	0		

*² Preannealed before translation. *¹ Irradiated at 365 nm at 4°C for 16 min.

ピンをコードする mRNA (α 型および β 型の混合溶液), タンパク質合成系としてはウサギ網状血球破砕液を採用し, OMP によるグロビン産生の制御を検討した。図 5 に α , β 型のウサギグロビンの塩基配列 (センス領域, 部分) および OMP の塩基配列 (アンチセンス配列) を示した。表 2 に結果の一部を示す。OMP はそれらの配列に依存した形でグロビン産生を制御した。阻害効率はアンチセンス分子の鎖長, 作用濃度, mRNA の対象領域等によって影響を受けることが明らかになった。特にこの遺伝子の場合タンパク質合成の開始コドン領域 (配列 1, 2) とその上流 (5'側, 配列 3) を被覆対象とした場合, α , β 両グロビン産生を阻害し, タンパク質コード領域を被覆対象とした場合 (配列 4) 選択的阻害がみられた。この実験に用いられたアンチセンス分子が対象 mRNA と相補的に相互作用をすることは逆転写酵素による cDNA の生成とその遺伝子配列から確認されており⁷¹⁾, 表 2 の結果はアンチセンス分子がまさに遺伝子の対象部分と相互作用した結果生じたものと見なすことができ, アンチセンス効果が確認されたといえる。また配列 2 は加熱処理 (2 次構造をアンチセンス分子存在下で一時的に破壊すること) により効果を示し, このことから, 配列 2 の対象とする mRNA の領域が 2 次構造に組み込まれていることが示唆された。

これらの結果は高機能化により顕著になった。光架橋性基 (TMP) を導入した 34 は, 紫外線照射 (365 nm) により RNA-OMP アダクツを生成するが, 表 2 に示したように 5 μ M の濃度で明瞭な選択的タンパク質合成阻害,

すなわち選択的遺伝子制御が行われている⁷²⁾。

5.2. AIDS ウイルス制御 アンチセンス法の実用化を目指した注目される試みとしては AIDS ウイルス (HIV) の制御に関する研究が挙げられる。用いられているアンチセンス分子は ODN, ホスホロチオエート結合型分子, メチルホスホネート型分子等である。最も効果が高いのはホスホロチオエート結合型アンチセンス分子である。HIV 感染細胞の生存率を指標にした制御試験では, 1 μ M 程度で HIV の活性を 90% 以上抑制している。この試みで興味ある点はアンチセンス分子の塩基配列が効果の発現にそれほど寄与していない場合があるという結果である。おそらくアンチセンス機構に加え, 他の機能も作用していることを示しているが, 詳細は解明されていない。

6. 終わりに

アンチセンス DNA・RNA 法による遺伝子発現制御の研究は近年加速されてきている。現在までに報告された結果は当初意図したものとは異なるものもあるが興味ある結果も出ている。これは対象遺伝子あるいはそれを持つ生物系の個別的事情によるものであろう。それでも遺伝子の塩基配列情報に基づいて分子設計ができ, 新しいタイプの治療薬開発につながる魅力ある方法であることには違ひなく, 今後多くの生体系で試みられ, 確実な成果を生み出すものと確信している。

(平成元年 11 月 30 日受理)

文 献

- 1a) T. Mizuno, M. Chou, M. Inouye, *Proc. Jpn. Acad.*, **59**, 335 (1983)
b) T. Mizuno, M. Chou, M. Inouye, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1966 (1984)
c) M. Inouye, *Gene*, **72**, 25 (1988)
2) D.S. Loose-Mitchell, *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 45-47 (1988)
3a) P.S. Miller, K.N. Fang, N.S. Kondo, P.O.P. Ts'o, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 6657 (1971)
b) P.S. Miller, J.C. Barrett, P.O.P. Ts'o, *Biochemistry*, **13**, 4887 (1974)
c) J.C. Barrett, P.S. Miller, P.O.P. Ts'o, *ibid.*, **13**, 4897 (1974)
4a) P.S. Miller, L.T. Braiterman, P.O.P. *ibid.*, **16**, 1988 (1977)
b) K. Jayaraman, K. McParland, P.S. Miller, P.O.P. Ts'o, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1537 (1981)
5a) P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson, *ibid.*, **75**, 280 (1978)
b) M.L. Stephenson, P.C. Zamecnik, *ibid.*, **75**, 285 (1978)
6a) M. Matsukura, K. Shinozuka, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J.S. Cohen, S. Broder, *ibid.*, **84**, 7706 (1987)
b) M. Matsukura, G. Zon, K. Shinozuka, C.A. Stein, H. Mitsuya, J.S. Cohen, S. Broder, *Gene*, **72**, 343 (1988)
c) P.S. Sarin, S. Agrawal, M.P. Civeira, J. Goodchild, T. Ikeuchi, P.C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7448 (1988)
d) S. Agrawal, J. Goodchild, M.P. Civeira, A.H. Thornton, P.S. Sarin, P.C. Zamecnik, *ibid.*, **85**, 7079 (1988)
e) S. Shibahara, S. Mukai, H. Morisawa, H. Nakashima, S. Kobayashi, N. Yamamoto, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 239 (1989)
7) A. Zerial, N.T. Thuong, C. Helene, *ibid.*, **15**, 9909 (1987)
8a) R. Heikkila, G. Schwab, E. Wickstrom, S.L. Loke, D.H. Pluznik, R. Watt, L.M. Neckers, *Nature*, **328**, 445 (1987)
b) E.L. Wickstrom, T.A. Bacon, A. Gonzalez, D.L. Freeman, G.H. Lyman, E. Wickstrom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1028 (1988)
9) P. Verspiieren, A.W.C.A. Cornelissen, N.T. Thuong, C. Helene, J.J. Toulme, *Gene*, **61**, 307 (1987)
10) A.R. van der Krol, J.N.M. Mol, A.R. Stuitje, *ibid.*, **72**, 45 (1988)
11) B.S. Sproat, M.J. Gait, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M.J. Gait, IRL Press, pp.83-115 (1984)
12a) T. Atkinson, M. Smith, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M.J. Gait, IRL Press, pp.35-81 (1984)
b) M.H. Caruthers, *Science*, **230**, 281 (1985)
13a) A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, M. Hata, *J. Org. Chem.*, **49**, 2139 (1984)
b) B.C. Froehler, M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 469 (1986)
c) P.J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, C. Henrichson, *ibid.*, **27**, 4051 (1986)
14) H. M. Moody, M.H.P. van Genderen, L.H. Koole, H.J.M. Kocken, E.M. Meijer, H.M. Buck, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4769 (1989)
15) B.C. Froehler, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5575 (1986)
16) P.S. Miller, S. Chandrasegaran, D.L. Dow, S.M. Pulford, L.S. Kan, *Biochemistry*, **21**, 5468 (1982)
17) K.A. Gallo, K.-L. Shao, L.R. Phillips, J.B. Regan, M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, W.J. Stec, G. Zon, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 7405 (1986)
18) M. Durand, J.C. Maurizot, U. Asseline, C. Barbier, N.T. Thuong, C. Helene, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 1823 (1989)
19) P.S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman, P.O.P. Ts'o, *Biochemistry*, **18**, 5134 (1979)
20a) P.S. Miller, C.H. Agris, A. Murakami, P.M. Reddy, S.A. Spitz, P.O.P. Ts'o, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6225 (1983)
b) P.S. Miller, C.H. Agris, M. Blandin, A. Murakami, P.M. Reddy, S.A. Spitz, P.O.P. Ts'o, *ibid.*, **11**, 5189 (1983)
21) P.S. Miller, M.P. Reddy, A. Murakami, K.R. Blake, C.H. Agris, S.-B. Lin, *Biochemistry*, **25**, 5092 (1986)
22a) A. Jager, J. Engels, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 1437 (1982)
b) M.A. Dorman, S.A. Noble, L.J. McBride, M.H. Caruthers, *Tetrahedron*, **40**, 95 (1984)
23) Product Bulletin, *Applied Biosystems*, June (1987)
24a) Z.J. Lesnikowski, M. Jaworska, W.J. Stec, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 11675 (1988)
b) M. Jaworska, Z.J. Lesnikowski, W.J. Stec, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, No.21, 99-100 (1989)
25) F. Eckstein, T.M. Jovin, *Biochemistry*, **22**, 4546 (1983)
26) B.A. Connolly, B.V.L. Potter, F. Eckstein, A. Pingoud, L. Grotjahn, *ibid.*, **23**, 3443 (1983)
27) W.J. Stec, G. Zon, W. Egan, B. Stec, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6977 (1984)
28) C.A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J.S. Cohen, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3209 (1988)
29) M. Fujii, K. Ozaki, A. Kume, M. Sekine, M.

- Hata, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 935 (1986)
- 30) S. Agrawal, J. Goodchild, M.P. Civeira, A.H. Thornton, P.S. Sarin, P. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7079 (1988)
- 31) N.E. Conway, J. Fidanza, W. MacClaulin, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, No.21, 43-44 (1989)
- 32a) J. Nielsen, W.K.-D. Brill, M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 2911 (1988)
- b) W.K.-D. Brill, J. Nielsen, M.H. Caruthers, *ibid.*, **29**, 5517 (1988)
- c) W.K.-D. Brill, J.-Y. Tang, Y.-X. Ma, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2321 (1989)
- d) M.H. Caruthers, W.K.-D. Brill, A. Grandas, Y.-X. Ma, J. Nielsen, J.-Y. Tang, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, No.21, 119-120 (1989)
- 33) L.F. Fieser, M. Fieser, Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Inc., pp.252-253 (1967).
- 34) B. Froehler, P. Ng, M. Matteucci, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4831 (1988)
- 35) Y. Hayakawa, M. Uchiyama, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4191 (1986)
- 36a) K. Yamana, Y. Nishijima, H. Nakano, O. Sangen, H. Ozaki, T. Shimidzu, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, No.21, 31-32 (1989)
- b) K. Yamana, Y. Nishijima, A. Oka, H. Nakano, O. Sangen, H. Ozaki, T. Shimidzu, *Tetrahedron*, in press.
- 37a) T. Shimidzu, H. Ozaki, S. Yamoto, S. Maikuma, K. Honda, K. Yamana, *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, No.19, 38
- b) H. Ozaki, K. Yamana, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 5899 (1989)
- 39) W.B.T. Cruse, S.A. Salisbury, T. Brown, R. Cosstick, F. Eckstein, O. Kennard, *J. Mol. Biol.*, **192**, 891 (1986)
- 40) T. Yamaguchi, M. Saneyoshi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1441 (1984)
- 41a) F. Morvan, B. Rayner, J.-L. Imbach, D.-K. Chang, J.W. Lown, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5019 (1986)
- b) F. Morvan, B. Rayner, J.-L. Imbach, S. Thenet, J.-R. Bertrand, J. Paoletti, C. Malvy, C. Paoletti, *ibid.*, **15**, 3421 (1987)
- 42) F. Morvan, B. Rayner, J.-P. Leonetti, J.-L. Imbach, *ibid.*, **16**, 833 (1988)
- 43) D. Praseuth, M. Chassignol, M. Takasugi, T.L. Doan, N.T. Thuong, C. Helene, *J. Mol. Biol.*, **196**, 939 (1987)
- 44) J.K. Barton, S.J. Lippard, *Biochemistry*, **18**, 2661 (1979)
- 45) R.L. Letsinger, M.E. Schott, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7394 (1981)
- 46) U. Asseline, N.T. Thuong, C. Helene, *Nucleosides & Nucleotides*, **5**, 45 (1986)
- 47) U. Asseline, M. Delarue, G. Lancelot, F. Toulme, N.T. Thuong, T. Montenay-Garestier, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3297 (1984)
- 48) A. Jager, M.J. Levy, S.M. Hecht, *Biochemistry*, **27**, 7237 (1988)
- 49) 山名一成, 西嶋佳孝, 池田正, 中野英彦, 三軒斉, 第4回生体機能関連化学シンポジウム, 講演予稿集, 129-132 (1989)
- 50) J. Telser, K.A. Cruickshank, L.E. Morrison, T.L. Netzel, C.-K. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7226 (1989)
- 51) B.K. Lee, A. Murakami, K.R. Blake, S.-B. Lin, P.S. Miller, *Biochemistry*, **27**, 3197 (1988)
- 52) B.C.F. Chu, G.M. Wahl, L.E. Orgel, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6513 (1983)
- 53) V.V. Vlassov, V.F. Zarytova, I.V. Kutiavin, S.V. Mamaev, M.A. Podymnugin, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4065 (1986)
- 54) T.R. Webb, M.D. Matteucci, *ibid.*, **14**, 7661 (1986)
- 55) R.B. Meyer, Jr., J.C. Tabone, G.D. Hurst, T.M. Smith, H. Gamper, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8517 (1989)
- 56a) M. Lemaitre, B. Baynard, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 648 (1987)
- b) J.P. Leonetti, B. Rayner, M. Lemaitre, C. Gagnor, P.G. Milhaud, J.-L. Imbach, B. Lebleu, *Gene*, **72**, 323 (1988)
- 57) R.L. Letsinger, G. Zhang, D.K. Sun, T. Ikeuchi, P.S. Sarin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6553 (1989)
- 58) R.P. Hertzberg, P.B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 313 (1982)
- 59) G.B. Dreyer, P.B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 968 (1985)
- 60) B.C.F. Chu, L.E. Orgel, *ibid.*, **82**, 963 (1985)
- 61) S.-B. Lin, K.R. Blake, P.S. Miller, P.O.P. Ts'o, *Biochemistry*, **28**, 1054 (1989)
- 62) C.-H.B. Chen, D.S. Sigman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7147 (1986)
- 63) E.P. Stirchak, J.E. Summerton, D.D. Weller, *J. Org. Chem.*, **52**, 4202 (1987)
- 64) E.P. Stirchak, J.E. Summerton, D.D. Weller, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6129 (1989)
- 65) P.S. Miller, K.B. McParland, K. Jayaraman, P.O.P. Ts'o, *Biochemistry*, **20**, 1874 (1981)
- 66) P.C. Zamecnik, J. Goodchild, Y. Taguchi, P.S. Sarin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4143 (1986)
- 67) A. Murakami, P.S. Miller, unpublished data
- 68) C. Cazenave, M. Chevrier, N.T. Thuong, C.

- Helene, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 10507 (1987)
- 69a) K.R. Blake, A. Murakami, P.S. Miller, *Biochemistry*, **24**, 6132 (1985)
- b) P.S. Miller, C.H. Agris, L. Aurelian, K.R. Blake, A. Murakami, M.P. Reddy, S.A. Spitz, P.O.P. Ts'o, *Biochimie*, **67**, 769 (1985)
- c) P.O.P. Ts'o, P.S. Miller, L. Aurelian, A. Murakami, C.H. Agris, K.R. Blake, S.-B. Lin, C.C. Smith, *Annals of New York Acad. Sci.*, **507**, 220 (1987)
- 70) K.R. Blake, A. Murakami, S.A. Spitz, S.A. Glave, M.P. Reddy, P.O.P. Ts'o, P.S. Miller, *Biochemistry*, **24**, 6139 (1985)
- 71) A. Murakami, K.R. Blake, P.S. Miller, *ibid.*, **24**, 4041 (1985)
- 72) J.M. Kean, A. Murakami, K.R. Blake, C.D. Cushman, P.S. Miller, *ibid.*, **27**, 9113 (1988)

次 号 予 定

巻 頭 言

合成, この創造的仕事の発展を……………織 方 郁 映
 総説および総合論文

キラルなルイス酸を用いる不斉反応……………林 雄 二 郎
 奈良 坂 紘 一
 カルボニル-エン反応: 新しい鎖状立体制御法……………三 上 幸 一
 寺 田 真 浩
 清 水 正 毅
 中 井 武 樹
 L-トレイトール誘導体を共通キラル素子として活用する天然物合成……………樹 林 千 尋
 [4]スーパーフェロセノファン([4₅]) (1,2,3,4,5)フェロセノファン)
 および関連化合物の合成と分子構造……………久 留 正 雄
 山 川 浩 司
 有機 14 族元素化合物の光誘起電子移動反応……………中 平 靖 弘
 久 新 莊 一 郎
 大 橋 守

ケミカルス覚え書き

トリクロロエチレン……………佐 藤 和 夫

十 字 路

アンチベリプラナー遷移状態とシンクリナル遷移状態 } ……………三 上 幸 一
 Stephenson テスト
 Wacker 酸化……………樹 林 千 尋
 ラジカル時計……………中 平 靖 弘

REVINDEX, 新しい合成, ほか