三本鎖 DNA 形成による遺伝子発現の化学的制御(アンチジーン法)のための分子設計

佐々木 茂 貴*

Molecular Design for the Antigene Method, Chemical Regulation of Genetic Expression Based on the Triplex Formation

Shigeki SASAKI*

The triplex formation between the duplex and a single strand DNA has been shown to inhibit transcription at the specific DNA site, and expected as a new biological tool and a new therapeutic method in the so-called antigene strategy. However, native oligonucleotides can form triplexes only within the major groove of the homopurine-homopyrimidine stretch of DNA, and the triplex is destabilized either at a TA or a CG interrupting site. Despite a number of methods have been attempted to expand the limitation of triplex formation, this problem has not been generally solved. This review describes (1) molecular design to stabilize triplex at a TA or a CG interrupting site, including new recognition molecules which have been recently shown by the reviewer and coworkers to be specific toward each base pair. And (2) some method to enhance stability of triplexes with use of DNA binding molecules such as intercalators, cross-linking agents, and groove binders are also discussed.

Key words: Triple helix (Triplex), DNA Binder, Cross-link, Non-natural base.

1. はじめに

近年の生化学手法の発展により、癌など多くの病気が遺伝子の異常を伴っていることが明らかになってきている。人の遺伝子を分析することによって、癌の有無だけでなくその種類、悪性度などを明らかにする遺伝子診断は一般的な診断手法として広がりつつあるが、むしろ、現時点では診断の結果に対応できる治療法が確立していないことから、診断結果の告知が社会的な問題になっている。さて、癌の発生を遺伝子異常の観点から捉えようと、正常細胞では恒常性維持に不可欠な遺伝子に、様々な化学物質(食物、嗜好品、環境物質など)によりごく僅かな変異(点変異など)が誘発され、さらに別の遺伝子の変異が次々に蓄積されて、悪性の癌細胞になる、という「複数

遺伝子の変異による多段階発癌」の機構が、現在一般的に受け入れられている¹⁾。このような癌化の原因となる可能性のある遺伝子は多様であるばかりでなく、変異箇所にも多くの可能性があるため、その組み合わせの結果発生する癌は非常に多くの多様性を含んでいる。このように本来的に多様な異常遺伝子に基づく病気の克服には、それぞれの遺伝子を特異的に阻害できる方法、さらに、新たに明らかにされる異常遺伝子にも迅速に対応できる方法が理想的と考えられる。このような治療法になり得る有力候補として、二本鎖 DNA の遺伝情報そのものを標的にする「アンチジーン法」が期待されている(図1)²⁾。すでに、多くの遺伝子の転写阻害が実現されているが^{3,4)}、アンチジーン法で標的にできるのは限られた DNA 配列だけであるため、標的をすべての配列に拡張するための努力が続けられている。我々もこの課題に挑戦しており、最近、標的配列を拡張する可能性のある新しい認識分子を開発することができた。本稿では、アンチジーン法の展開のための分子設計を中心に、この分野の発展の可能性などを交えて解説する。

* 九州大学薬学部製薬化学科 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University ()

Fig.1 A genetic disorder as a cause of diseases. In the antigene strategy, transcription is inhibited by triplex fomation.

Fig.2 Schematic structures of duplex and triplex DNA. The third DNA strand binds with the duplex within the major groove.

2. 三本鎖 DNA

アンチジーン法の基本となる化学は、二本鎖 DNA とさらにもう 1 本の DNA からなる三本鎖 DNA の形成である(図 2)。三本鎖 DNA は、Watson-Crick の二本鎖 DNA モデルの発表から少し遅れて、すでに 1957 年には発表されていたが、Dervan や Helene などの合成オリゴ核酸を用いた先駆的な研究をきっかけにここ 10 年急速に重要性が認識されてきた。三本鎖の構造、生体内での存在や意義について最近多くの研究が報告されているので詳細は最近の総説および成書を参照されたい^{1~5)}。本稿では、(1)三本鎖形成の配列制限の拡張、および(2)三本鎖錯体の安定性の向上、の 2 つの問題の解決に向けた研究について紹介する。

3. 三本鎖形成の分子認識機構と天然核酸の認識限界

典型的な三本鎖は片方の鎖がグアノシン(G)とアデノシン(A)(ホモプリン鎖)からなり、もう一方の鎖がシチジン(C)とチミジン(T)(ホモピリミジン鎖)で構成される二本鎖 DNA に対して、ホモピリミジン鎖の 3 本目の DNA がメジャーグループにおいて結合することによって形成される(図 3)。

なお、本稿で三本鎖を記述するときには、ホモピリミ

Fig.3 Limitations for the target duplex sequences for triplex formation. I: The third homopyrimidine strand binds to the homopurine-homopyrimidine duplex. II: Pyrimidine bases within the homopurine strand become unfavorable mismatch sites for triplex formation.

ジン・ホモプリン-ホモピリミジンのように左から、3 本目の鎖・それと結合しているホモプリン鎖-左と相補的なホモピリミジンの順番で記す。図 4 は、3 本目の鎖とそれと結合している 2 本目の鎖が同じリン酸結合の方向を持っている平行型(parallel)三本鎖と呼ばれるものであり、G に対してプロトン化した C(C⁺)が 2 個の Hoogsteen 水素結合を形成し、A に対しては T が 2 個の Hoogsteen 水素結合を形成することによって三本鎖を

Fig.4 Canonical structures of base triplets to stabilize parallel triplex DNAs.

安定化する(図4Ⅰ,Ⅱ)。一方、二本鎖の塩基対が逆の配向のときには、CとTはメジャーグループ側には1個の水素結合部分しか持たず、Cに対してTが、Tに対してはGが水素結合を形成できると考えられているが、三本鎖の安定化能は小さい(図4Ⅲ,Ⅳ)。従ってこれらの配列は三本鎖形成にとってはミスマッチ部分になる。このようにある配列では三本鎖が形成されないという配列上の制限がアンチジーン法の本質的な問題点となっている。ホモプリン鎖が別の鎖で連続している場合には鎖を替えて三本鎖を形成させたり⁶⁾、ミスマッチを不安定化しない手法などが検討されているが⁷⁾、一般的な配列の二本鎖に対する三本鎖形成には成功していない。

3本目と2本目の鎖のリン酸結合が逆方向のものは逆平行型(antiparallel)トリプレックスと呼ばれ、G・GCおよびA・AT三重塩基対が三本鎖の安定化に寄与する⁸⁾。また、GC塩基対を認識するためにはプロトン化したCが必要であるため(図4Ⅰ)、この三重塩基対を含む三本鎖形成は、酸性で行わなくてはならず、生理的条件下での利用が制限されていた。この問題は、中性でもプロトン化されるメチルシチジン⁹⁾やプロトン化の必要のない核酸誘導体(5-methyl-6-oxocytidine¹⁰⁾、6-*N*-methyl-8-oxoadenosine¹¹⁾の開発によって現在はほぼ解決されている。

4. ミスマッチ配列での安定化を目指した非天然核酸塩基

上述したようにホモプリン-ホモピリミジン二本鎖中に含まれるピリミジン-プリン塩基対は三本鎖形成においてはミスマッチ部分になる(図3)。このミスマッチ部分に選択的に結合する非天然塩基の開発はアンチジーン法をより一般的な配列のDNAを標的とする方法に発展させるためには、是非解決すべき重要な課題である。

三本鎖の分野で先駆的な研究を続けている Dervan らは、標的配列の拡張のための非天然核酸塩基の設計にも最初に着手した。彼らはCG塩基対と2個の水素結合を形成するようにD3を設計した(図5)¹²⁾。D3とDNA切断ユニット(EDTA-Fe(II))を組み込んだ15塩基の三本鎖形成オリゴヌクレオチド(triplex-forming oligonucleotide, TFO)を合成し、30塩基対を含む二本鎖DNAと三本鎖を形成させ、DNA切断能を調べた。表1の配列のX, Y, Zの部分を変化させて、三重塩基対の選択性を見ている。この切断実験の結果、D3は設計とは異なり、CG塩基対だけでなく、TA塩基対も認識することが示され、D3は水素結合ではなく、van der Waals相互作用でCGとTA塩基対を認識していると予想された

Table 1 Relative cleavage of the target DNA by the TFO incorporating EDTA-Fe complex**.

DNA Components		Relative Cleavage (%)
X	Y, Z	
T	C, G	50
T	G, C	40
T	T, A	5
T	A, T	95
C	C, G	10
C	G, C	100
C	T, A	45
C	A, T	5
D3	C, G	65
D3	G, C	25
D3	T, A	75
D3	A, T	50

EDTA-Fe complex is introduced to the TFO marked with*. **Data were transformed from the bar graph in the literature 12a), in which the data were reproducible within 10% errors. Cleaving conditions: pH 7.4, 35 °C, 40% ethanol, spermine(1 mM), Tris acetate(25 mM), NaCl(50 mM), calf thymus DNA(100 μM(bp)).

DNA cleaving unit (EDTA-Fe)

Fig.5 The structure of the DNA cleaving unit (EDTA-Fe) and the speculative structures of the base triplets with D3.

(図5)。しかし、別の実験ではD3の認識は隣接する塩基対に依存していることが示され、さらに、NMRによる構造解析によって、D3は隣接塩基対間にインターカレートすることが明らかになった¹³⁾。

Miller らも CG 塩基対の両方と水素結合を形成できるような認識部位をシチジン基本骨格に設計している(図6)¹⁴⁾。彼らはホモ T・ホモ A-ホモ T 三本鎖中にある1箇所の三重塩基対の組み合わせを変えて、UV 融解

Table 2 Melting temperature (T_m) of the triplexes.

DNA Components		T_m (°C)	Buffer	Lit
X	Y, Z			
M1	C, G	19	A	14a
M1	G, C	8	A	14a
M1	T, A	<0	A	14a
M1	A, T	<0	A	14a
M2	C, G	25-38	A	14b
M2	G, C	20	A	14b
M2	T, A	23	A	14b
M2	A, T	32	A	14b
M5	C, G	<0	B	14d
M5	G, C	18	B	14d
M5	T, A	22	B	14d
M5	A, T	<0	B	14d
T	A, T	22	B	14d
G	T, A	15	B	14d

TFO: 5'-³²PCTTCTTTTTT-X-TTTT-3'
target 5'- GAA GAAAAA-Y-AAAA-3'
duplex 3'- CTT CTTTTT-Z-TTTT-5'
1 μ M DNA in buffer containing 0.1 M NaCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM MOPS; A(or Tris; B) at pH 7.0.

Fig.6 The cytidine analogs by Miller's group (M1-M5 are tentatively named in this review) and W3 by Fujii's group.

曲線を測定し、非天然塩基の安定化効果を比較した(表2)。M1はCGおよびGCを、M5はGCおよびTAを認識して三本鎖を安定化しているが、M2,3はどの塩基対とも相互作用し、M4はどの塩基対も認識していない。藤井らは、同様にピリミジン修飾アルキンを伸長した核酸誘導体W3が、表2に記載の三本鎖形成反応の検討においてCG塩基対部分での安定化効果が大きいことを報告している¹⁵⁾。

Durland らは簡単なazole誘導体をオリゴマーに組み込み、逆平行型三本鎖形成における効果を評価している。かれらのアッセイは³²P標識核酸を用いて、ゲル電気泳動により三本鎖を検出するもので、用いたTFOの濃度と生成した三本鎖の濃度から三本鎖形成定数を算出した(表3)¹⁶⁾。天然型のG・GC三重塩基対による安定化により得られた形成定数 $40 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ を基準にするといずれの人工塩基も安定化効果および選択性ともに小さい。Zimmerman らは強固な認識構造の塩基を設計して

Table 3 Stabilization effects on the antiparallel GC-rich duplex.

DNA Components		Apparent association constants ($\times 10^8, \text{M}^{-1}$)
X	Y, Z	
e	C, G	1
e	G, C	0.3
e	T, A	0.8
e	A, T	-
G	G, C	40
G	T, A	4
T	C, G	10
T	T, A	20
T	A, T	2

Fig.7 The model base triplet with the CG pair by Zimmerman's group.

いる¹⁷⁾。彼らは有機溶媒中での錯体形成を調べ、 CDCl_3 中で長鎖アルキル基を持つシトシンおよびグアニンを用いたときに期待する錯体構造を支持するNOEを観測している(図7)。しかし、その他の塩基対との親和性や、オリゴマーでの認識については報告されていない。

5. ミスマッチ塩基対(CGおよびTA)部分を安定化する新しい非天然認識分子の設計

これまで三本鎖の安定化に及ぼす塩基のスタッキング効果やコンフォメーションの固定化を重要視し、天然核酸塩基の誘導体が主に検討されてきた。我々は、Hoogsteen 水素結合形成部分のみを持つような認識分子を検討することを目的に図8に示す分子(BIG)を設計した。認識部位と糖鎖部分を連結するリンカーとして単純なアルキル鎖を用いることにしたのは、配列の違いに基づくヘリックスの多様な高次構造に対応するためには柔軟な構造の方が相応しいのではないかと考えたためである。まず、幾つかの候補構造とCG塩基対との三重塩基対構造を分子軌道計算(MOPAC(PM3))で予測し、3個のHoogsteen 水素結合が最もよく形成される構造を選び、次に糖部分が天然型の平行三本鎖の糖部分と重なるようにスペーサーの長さを決定した。オリゴマーでの検討に先立ち有機溶媒中での分子認識能を、久留らのポルフィ

Fig. 8 Speculative structure of the BIG(B1)-CG base triplet.

Fig. 9 Melting curves in the presence of DNA oligomers including BIG(B1), B2 or B3 (I-III). Experimental conditions are described in Table 4.

リン固定化モデル塩基対を用いてDMSO- d_6 中でのNOESYスペクトル測定により調べたところ、BIG誘導体(2'-oxy-BIGの保護体)はCG塩基対モデルとは錯体の形成が観測されたものの、TA塩基対モデルとは全く相互作用せず、期待通りにCG塩基対に選択的な認識能を持つことが確かめられた¹⁸⁾。

次に、BIGの β -phosphoroamidite誘導体を合成し、DNA自動合成装置によりホモT配列中に1個のBIG(B1)を含むオリゴマーを合成した¹⁹⁾。このオリゴマーを用いてホモA-ホモT配列中に1個のミスマッチ塩基対を含む二本鎖DNAとの三本鎖形成能を、UV融解曲線を測定することによって評価した(図9, 表4)。その結果、BIGは設計どおりにCGミスマッチ部分で三本鎖を

Table 4 Melting temperature(T_m) of triplexes in the presence of TFO containing B1, B2 and B3.

DNA Components		T_m (°C)
X	Y, Z	
BIG(B1)	C, G	22
BIG(B1)	G, C	<0
BIG(B1)	T, A	17
BIG(B1)	A, T	<5
B2	C, G	<0
B2	G, C	<0
B2	T, A	22
B2	A, T	<0
B3	C, G	22
B3	G, C	<0
B3	T, A	<0
B3	A, T	<0
T	T, A	<0
G	T, A	13
T	A, T	21

TFO: 5'-TTTTT-X-TTTTTTTTT
target: 5'-AAAAA-Y-AAAAAAAAA
duplex: 3'-TTTTT-Z-TTTTTTTTT

0.2 μM DNA in buffer containing 0.1 M NaCl, 20 mM MgCl_2 , and 50 mM Tris at pH 7.0.

Fig.10 Speculative binding structures of B1-TA, B2-TA and B3-CG. Chelation structure mediated by a metal cation is expected for the B3-CG triplet.

安定化できることが確認できた ($T_m = 22^\circ\text{C}$)。その安定化効果は天然の T·AT 塩基対と同等であったが ($T_m = 21^\circ\text{C}$)、TA ミスマッチ部分でも弱いながら安定化を行うことがわかった (図 9 I, 表 4, $T_m = 17^\circ\text{C}$)。TA 塩基対部分ではチミジンのメチル基が立体障害となるため、BIG スペースのカルボニル基が立体反発によりコンフォメーションが変化し、さらにアミノベンズイミダゾール部分のコンフォメーションも変化し TA も認識したものと考えられる (図 10)。

一方、BIG (B1) 認識部位を単純化した構造のアミド (図 10, B2) およびカルボン酸体 (図 10, B3) をオリゴマーに組み込んで三本鎖の融解温度を求めたところ、非常に興味深いことに、アミド体は TA ミスマッチ部分のみを認識し、三本鎖を安定化できることがわかった (図 9 II)。この安定化効果 ($T_m = 22^\circ\text{C}$) は、天然三重塩基対 T·AT ($T_m = 21^\circ\text{C}$) によるものとほとんど同程度であり、ミスマッチ TA 塩基対を認識するとされている G·TA 塩基対 ($T_m = 13^\circ\text{C}$) よりも大きい。この非天然型三本鎖の CD スペクトルを測定したところ、天然型三本鎖と類似の CD スペクトルが観測された。驚くべきことに、カルボン酸体を 1 個組み込んだホモ T オリゴマーは、ほぼ完全なミスマッチ CG 塩基対認識を示し、三本鎖を安定化することがわかった (図 9 III, $T_m = 22^\circ\text{C}$)。

三重塩基対による三本鎖の安定化効果は、塩基対の前後の配列や評価法、あるいは水溶液中のイオンの種類や濃度に大きく影響されることが知られており、また、非天然型塩基が複数組み込まれたオリゴヌクレオチドでは、安定化が十分に得られない可能性も考えられる。これらに関しては現在さらに詳細に検討中である。

Dervan らは三本鎖中のミスマッチ CG および TA 塩基対に対しては、塩基のない (abasic site) 構造が、不安定化が少ないことを報告している⁶⁾。我々の認識構造は芳香族構造を含んでいないため、不安定化の作用が少なく、水素結合などの相互作用による安定化の効果の方が大きく出たものと考えられる。現在のところ、認識機構

は明確ではないが、新しい柔軟な構造モチーフは従来の核酸誘導体とは大きく異なっており、三本鎖安定化因子の解明に有用な知見を提供でき、さらにより有効な非天然塩基の開発の基礎になるものと期待される。

6. 三本鎖安定化のための DNA 結合分子

一般的三本鎖は二本鎖よりも不安定であり、三本鎖利用の発展のためには配列の拡張に加えてさらなる安定化が必要と考えられている。興味深い方法の 1 つは、抗腫瘍活性天然物など DNA 結合能を持つ低分子を利用するものであり、TFO とこれらを組み合わせることによって三本鎖の安定化が試みられている²⁰⁾。

二本鎖 DNA に結合するインターカレーター²¹⁾の多くは三本鎖も安定化する (図 11)。有名なインターカレーターである ethidium bromide は $\text{C}^+ \cdot \text{GC}$ を含む三本鎖にはほとんど結合せず、poly(dT)·poly(dA)·poly(dT) の生成を促進する。恐らくプロトン化したシチジンとカチオン部分との静電的反発のためと考えられる²²⁾。Benzopyridoindole 類も同様に ATA 配列に選択的だが、特に B[e]PI は二本鎖よりも三本鎖に強い結合を示した²³⁾。B[e]PI や acridine はさらに二本鎖-三本鎖

Fig.11 Representative intercalators for binding with triplex DNAs.

接合部に強く結合するという興味深い性質を持っていることから、TFO への導入が検討された。Helene らの検討した配列ではインターカレーターを含まない TFO に比べて T_m の上昇と制限酵素の阻害活性の向上が実現された²⁴⁾。アクリジンは三本鎖の途中で組み込まれた場合、選択性なく安定化してしまう²⁵⁾。B[h]PQ を 5' 末端側に組み込んだ TFO は、 T_m 値がミスマッチ 1 個当たり約 17°C ずつ減少することから、三本鎖形成の選択性を維持しながら安定性が向上できることが示された²⁶⁾。

McLaughlin らは DNA マイナークループに結合することが知られている Hoechst 33258²⁷⁾ を TFO に組み込み三本鎖の安定化を試みた(図 12)²⁸⁾。天然核酸($X=C$)を用いたときには、TFO のみに比べて pH 7 で約 18°C、メチルシチジン($X=m^5C$)を用いたときには pH 7 で約 6°C の T_m の上昇がみられ、三本鎖が安定化されていることが示された。Hoechst 33258 マイナークループ結合分子であり、単独では三本鎖を不安定化することが報告されているが、共有結合で連結したため三本鎖形成との競合がなくなったものと説明される。

Dervan らは pyrrole-imidazole polyamide 系分子が、自己逆平行型で会合してマイナークループに結合し、塩基対を認識することを明らかにしている²⁸⁾。彼らはこの構造を TFO に組み込み、マイナーおよびメジャーグループ両方の認識の協調効果について調べた²⁹⁾。DNase I を用いた定量的なフットプリンティング滴定によるアフィニティー測定では、連結していないそれぞれのユニットに比べて 150 倍の親和性の向上が見られた。図 13 のマイナークループ結合分子は 5'-TGACA サイトを認識するものであるが、ここに別の配列を認識する pyrrole-imidazole polyamide ユニットを結合すると親和性は 300 倍の減少がみられ polyamide による認識が親和性の向上に重要な役割を果たしていることが示された。

我々は抗腫瘍活性天然物の研究の中で、配列特異性を

Fig. 12 The structures of the TFO connected with the minor groove binder, Hoechst 33258, and the target duplex.

示す新しい DNA 結合分子ジアミノビス THF 化合物を見いだした(図 14)³⁰⁾。この分子はアセトゲニン類(bullatacin)³¹⁾をリードとして設計したもので、水溶性の向上を目的に水酸基をアミノ基に変換したものである。

Fig. 13 The structures of the TFO with the polyamide minor groove binder and the target duplex.

Fig. 14 Changes of melting curves of the duplex in the presence of the diamino bis-THF ligand. The concentration of the ligand ranged from 0 to 20 μ M in the solution containing 1 μ M DNA buffered with 100 mM KCl and 5 mM Na_2HPO_4 at pH 4.8~5.0.

GC 豊富な二本鎖 DNA (図 14) と AT 豊富な二本鎖 DNA を用いて調べたところ、GC 豊富な二本鎖 DNA に特異的な安定化効果を持つことが明らかになった。さらに、三本鎖の生成を促進する性質を持つことを見いだした。CD スペクトルの測定によってこの新しいリガンドは GC 豊富な二本鎖 DNA を A 型から B 型へのコンフォメーション変化を誘起することが示された。この新規のリガンドの GC 豊富配列への結合を利用した三本鎖の安定化に興味もたれる。

TFO にクロスリンク能を持つ分子 (図 15) を導入し、三本鎖生成を非可逆的にする試みがある。Matteucci らはアジリジン環を含む塩基誘導体を TFO に導入し、三本鎖の安定化を検討した³²⁾。二本鎖 DNA のアルキル化はグアノシンの N7 で起こるため、pyrrolidine 処理により DNA 鎖が切断されることになり、三本鎖形成は切断効率で検出できる。Matteucci らの系では室温 19 時間後 95% 以上の切断率であり、三本鎖の形成が確認されている。また、プロモ酢酸を含む核酸誘導体を組み込んだ TFO ではより効率的な三本鎖-クロスリンクに基づく DNA 鎖の切断が報告されている³³⁾。

我々は新しいタイプのクロスリンク分子として 2-amino-6-vinylpurine 誘導体を検討している (図 15 II)³⁴⁾。この分子はモデル反応において、シチジン(4-

NH₂)およびグアノシン(N7)と容易にアルキル化を起こすことを明らかにした (図 15 II, A, B)。ビニル基の高い反応性のためこのままの形でオリゴマーに導入することができなかったが、スルフィド保護体としてオリゴマーに組み込んだ後、酸化あるいはアルカリ処理により容易に再生した。この活性化したオリゴマーは一本鎖 DNA とのクロスリンク反応は確認されたため、Matteucci らの例と同様に三本鎖におけるクロスリンク反応への展開が可能になると考えられる。ソラーレン骨格は光照射により二本鎖 DNA 中の 2 個のチミジンと反応することから、TFO に導入した場合には 3 本の鎖間のクロスリンクが可能と考えられる (図 15 III)³⁵⁾。Griegoriev らはこの性質を利用し、生きた細胞を用いて光照射によって転写因子 NF- κ B の発現の効率的な阻害に成功した³⁶⁾。

7. 展 望

三本鎖 DNA の形成はこれまで、標的となる配列がホモプリン-ホモピリミジン部分に限られていたが、我々の研究成果により、標的にできる配列が拡大される可能性が高まった。今後、遺伝子発現阻害、RNA の二本鎖部分確認への展開、生体内の特定配列の二本鎖 DNA の単離や分析、遺伝子工学への利用などにおいてさらに多くの可能性が拓かれるものと期待される³⁷⁾。アンチジーン法は抗腫瘍治療薬および抗ウイルス治療薬などの遺伝子標的治療法としての展開が考えられているが、この方法は遺伝子発現機構の最も根源的である DNA を標的にすること、さらに三本鎖の細胞内での寿命は数時間程度であることなどの点から、連続的に生産される mRNA を標的にするアンチセンス法よりも高い効率が期待される³⁸⁾。また、最初に認識の原理を確立しておけば、薬物-蛋白質相互作用などの特異的な認識を個々に決定する必要がなく、多様な標的に柔軟かつ迅速に対応して特異的な阻害を実現できるようになる点も、将来の発展が期待される理由である。しかし、アンチジーン法は基本的にはオリゴ核酸を用いるため、ヌクレアーゼに対する抵抗性や細胞膜透過性など、アンチセンス法と同様の問題点も抱えている。これらの問題点の解決のため、ペプチド系核酸の利用、糖部分の修飾などを含め²⁾、さらなる検討が必要とされる。

8. おわりに

三本鎖 DNA に関わる我々の研究では、最初の設計とは若干ちがう結果とはなったが、これまでの大きな問題点を解決できる可能性のある新しい認識分子を見いだすことができた。この分子を用いて一般的な配列の二本鎖

Fig. 15 Cross-linking molecules. I: Alkylating molecules used in the TFO, II: Chemical activation of the sulfide to regenerate vinyl group, and the adduct structures with C(A) and G(B). III: Psoralen and its photoadduct with two T molecules.

に対して三本鎖が安定に形成できるかどうか興味深い。さらに、独自に見いだした DNA 結合分子やクロスリンク分子と組み合わせた安定化も試みる予定である。

我々が三本鎖 DNA の発展性に魅せられてこの分野の研究に入ってからまだ日が浅く、重大な思い違いや重要な論文を見落している可能性があるため、多くのご指摘、ご批判をいただければ幸いである。また、この研究の次のステップでは、従来標的とされなかった配列の遺伝子発現の阻害などを検討する計画であり、生化学者との協同によりアンチジーン法としての可能性を拡張したい。

本稿で紹介した我々の研究を進めるにあたり、有益な議論をいただいている前田 稔教授および協同研究者の永次 史博士に感謝いたします。また、我々の研究の成果は引用文献の中に記した学生諸君の日々の努力の賜であり、心から謝意を表します。また、研究の一部は文部省科学研究費補助金(三本鎖 DNA : 基盤研究(C)) : 佐々木, DNA 結合分子 : 一般研究(C) : 佐々木, クロスリンク分子 : 奨励研究(A) : 永次)を得てより行われたもので、ここで深謝いたします。

(平成 9 年 5 月 1 日受理)

文 献

- 1) (a) 豊島久真男, 黒木登志男, 編集代表, 「がんのバイオサイエンス (全 5 巻)」東大出版会, 1991; (b) 「細胞癌化の分子機構」日本分子生物学会編, 丸善, 1989; (c) 山本 雅, 「がん遺伝子とがん抑制遺伝子」, 南江堂, 1996
- 2) (a) J.A.H. Murray, ed., "Antisense RNA and DNA", A John Wiley & Sons, INC, New York, 1992, pp.11-14; (b) W.O. Foye, ed., "Cancer Chemotherapeutic Agents", American Chemical Society, 1995, pp.548-553
- 3) V.N. Soyfer, V.N. Potaman, "Triple-Helical Nucleic Acids", Springer-Verlag New York, 1996
- 4) C. Giovannangeli, S. Diviacco, V. Labrousse, S. Gryaznov, P. Charneau, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 79 (1997)
- 5) (a) 清水光弘, 神藤平三郎, 松本潮, *ファルマシア*, **30**, 173 (1994); (b) 井上英夫, *蛋白質核酸酵素*, **40**, 1383 (1995)
- 6) D.A. Horne, P.B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2435 (1990)
- 7) D.A. Horne, P.B. Dervan, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4963 (1991)
- 8) Chapter 3 in ref 3)
- 9) J.S. Lee, D.A. Johnson, A.R. Morgan, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3073 (1979)
- 10) G. Xiang, W. Soussou, L.W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11155 (1994)
- 11) S.H. Krawczyk, J.F. Milligan, S. Wadwani, C. Moulds, B. Froehler, M.D. Matteucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3671 (1992)
- 12) (a) L.C. Griffin, L.L. Kiessling, P.A. Beal, P. Gillespie, P.B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7976 (1992); (b) L.L. Kiessling, L.C. Griffin, P.B. Dervan, *Biochemistry*, **31**, 2829 (1992)
- 13) K.M. Koshlap, P. Gillespie, P.B. Dervan, J. Feigon, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7908 (1993)
- 14) (a) C.-Y. Huang, C.D. Cushman, P.S. Miller, *J. Org. Chem.*, **58**, 5048 (1993); (b) C.-Y. Huang, P.S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10456 (1993); (c) C.-Y. Huang, G. Bi, P.S. Miller, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2606 (1996); (d) S. Verma, P.S. Miller, *Bioconjugate Chem.*, **7**, 600 (1996)
- 15) 山本将司, 高瀬修司, 藤井政幸, 第 11 回生体関連化学シンポジウム講演要旨集, pp.166-167, 1996 (福岡)
- 16) R.H. Durland, T.S. Rao, V. Bodepudi, D.M. Seth, K. Jaaraman, G.R. Revankar, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 647 (1995)
- 17) S.C. Zimmerman, P. Schmitt, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10769 (1995)
- 18) S. Sasaki, S. Nakashima, F. Nagatsugi, Y. Tanaka, M. Hisatome, M. Maeda, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 9521 (1995)
- 19) (a) S. Nakashima, N. Matsuura, F. Nagatsugi, M. Maeda, S. Sasaki, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 105 (1996); (b) 松浦尚子ら, 日本薬学会第 117 年会, 講演要旨集 2, p.61; (c) 中島昌治ら, 日本薬学会第 117 年会(町田), 講演要旨集 2, p.62, 論文投稿中
- 20) 最近の総説 : N.T. Thuong, C. Helene, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **32**, 666 (1993)
- 21) 最近の総説 : U. Asseline, N.T. Thuong, C. Helene, *New J. Chem.*, **21**, 5 (1997)
- 22) P.V. Scaria, R.H. Shafer, *J. Biol. Chem.*, **266**, 5417 (1991) and pp.189-192 in ref 3)
- 23) J.L. Mergny, G. Duval-Valentin, C.H. Nguyen, L. Perrouault, B. Faucon, M. Rougee, T. Montenay-Garestier, E. Bisagni, C. Helene, *Science*, **256**, 1681 (1992)
- 24) D.A. Collier, N.T. Thuong, C. Helene, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 1457 (1991)
- 25) B. Zhou, E. Puga, J.-S. Sun, T. Garestier, C. Helene, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10425 (1995)
- 26) G.C. Silver, J.-S. Sun, C.H. Nguyen, A.S. Boutorine, E. Bisagni, C. Helene, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 263 (1997)

- 27) 最近の総説: D.L. Boger, D.S. Johnson, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 1438 (1996)
- 28) J. Robles, S.B. Rajur, L.W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5820 (1996)
- 29) P.B. Dervan, *Science*, **238**, 464 (1986); B.H. Geierstanger, M. Mrksich, P.B. Dervan, D.E. Wemmer, *ibid.*, **266**, 646 (1994), and references cited therein.
- 30) 佐々木茂貴ら, 日本薬学会第 117 年会(町田), 講演要旨集 2, p.62
- 31) 最近の総説: 藤本善徳, 有合化, **52**, 765 (1994) および関連する我々の研究, (a) S. Sasaki, et al., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 5571 (1995); (b) H. Naito, et al., *J. Org. Chem.*, **60**, 4419 (1995); (c) S. Sasaki, et al., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3337 (1994)
- 32) J.-P. Shaw, J.F. Milligan, S.H. Krawczyk, M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7765 (1991)
- 33) *N*-Bromoacetyl をチミジンに導入した分子で同様のアルキル化, DNA 鎖切断を行っている。T.J. Povsic, S.A. Strobel, P.B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9428 (1992)
- 34) (a) F. Nagatsugi, T. Kawasaki, M. Maeda, S. Sasaki, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 105 (1996); (b) F. Nagatsugi, K. Uemura, S. Nakashima, M. Maeda, S. Sasaki, *ibid.*, **34**, 171 (1995); (c) F. Nagatsugi, K. Uemura, S. Nakashima, M. Maeda, S. Sasaki, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 421 (1995); (d) 永次史ら, 日本薬学会第 117 年会(町田), 講演要旨集 2, p.61
- 35) D. Kanne, K. Straub, J.E. Hearst, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6754 (1982)
- 36) M. Grigoriev, D. Praseuth, A.L. Guieysse, P. Robin, N.T. Thuong, C. Helene, A.H. Bellan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3501 (1993)
- 37) p.253-284 in ref 3)
- 38) p.274 in ref 3)
- 39) 最近の報告例: L. Betts, J.A. Josey, J.M. Veal, S.R. Jordan, *Science*, **270**, 1838 (1995)

三菱化学化学研究奨励基金について

三菱油化(現三菱化学)化学研究奨励基金の平成9年度研究助成が下記要領で行われます。

1. 助成の対象: 日本国内の大学及び研究機関等で化学を中心とした基礎から応用にわたる研究に携わる研究者(若手40歳以下・学部生, 大学院生は対象外)。
2. 助成金額: 1件につき最高100万円程度。
3. 応募の方法: 所定の研究助成申請用紙に必要事項を記入して, 下記事務局に直接申し込む。
申込締切: 8月21日(木)必着。

申請用紙は, 返信用封筒(B5判, 切手130円添付)を同封のうえ, 下記あて請求する。

公益信託 三菱油化化学研究奨励基金事務局 〒100 東京都千代田区丸の内1-4-5

三菱信託銀行本店営業部 公益信託推進室(担当: 小崎), TEL 03-3212-1211 (内線4182)