ポリアミン修飾オリゴヌクレオチドの合成とアンチセンス、アンチジーン分子としての性質

上野 義仁
松田 彰*

Synthesis of Oligonucleotides Modified with Polyamines and Their Properties as Antisense and Antisense Molecules

Yoshihito Ueno and Akira Matsuda*

Recent studies concerning properties of oligonucleotides containing nucleoside analogs modified with polyamines have been comprehensively reviewed in relation to the antisense and antisense strategies. Synthesis of the oligonucleotides containing 5-(*N*-aminoalkyl)carbamoyl-2'-deoxyuridines by the post-elongation modification method using 5-trifluoroethoxycarbonyl-2'-deoxyuridine as a convertible nucleoside is described. Thermal stabilities of the oligonucleotides incorporating the nucleoside analogs with a wide variety of the aminoalkyl groups at the 5- and 4- positions of pyrimidine bases, the 2-position of a purine base, the 1', 2', 4'- and 5'-positions of sugar moieties, and the 6'-position of a carbocyclic nucleoside have been compared. The resistant properties of these oligonucleotides to hydrolysis by endo- and exo-nucleases are also discussed. In addition, this review deals with abilities of the modified oligonucleotides to elicit RNase H activity.

Key words: oligonucleotide, polyamine, hybridization, nuclease-resistant property, antisense strategy, antisense strategy

はじめに

アンチセンス(AS)法は、病因となるウイルスあるいは遺伝子の塩基配列が既知の時、AS分子を論理的に設計できることから、様々なウイルスおよびがんをはじめとする遺伝子疾患に対する新しい治療法として期待されている^{1,2)}。しかし、AS法を実際に細胞内で成立させるためには、合成したASオリゴヌクレオチドが細胞内外に存在するヌクレアーゼに対して抵抗性であること、標的となるmRNAと安定な二本鎖核酸を形成し、RNA鎖がRNase Hの基質になること、さらにASオリゴヌクレオチドが細胞膜透過性であること等が必要となる^{1,2)}。現在、AS法に用いられているオリゴヌクレオチドは主にリン酸部位を修飾した誘導体であり³⁾、特にホスホロチオエート(PS)型オリゴヌクレオチドはヌクレアーゼに対して抵抗性を示し、かつRNAとの二本鎖がRNase Hの基質となることから多くの研究に用いられてきた。しかし、PS型オリゴヌクレオチドは導入したP-S結合の性質からタンパクに対する非選択的な結合が毒性発現の原因になることも指摘されており^{4,5)}、現在ではできる

だけチオリン酸結合を減らした新しいASオリゴヌクレオチドの合成研究が活発に行われている。一方筆者らは、天然のリン酸ジエステル結合を持ち、かつヌクレアーゼに対して抵抗性を示すASオリゴヌクレオチドの合成を目指し、リン酸ジエステル結合部分の修飾ではなく、塩基部ならびに糖部にポリアミンを結合させたヌクレオシドアナログを含むオリゴヌクレオチドを合成し、その性質について検討してきた。本稿では、これまでに報告されているポリアミン修飾オリゴヌクレオチドのAS分子ならびにアンチジーン分子としての性質について、筆者らの実験結果を併せて系統的に紹介する。

1. ポリアミン類の性質

ポリアミン類は生物中に広く見出され^{6,7)}、真核生物の細胞ではスベルミジンおよびスベルミン(図1)はmM単位の濃度(核内では5 mM程度)で存在していると見

Fig. 1 Structures of polyamines and α -putrescylthymidine.

* 北海道大学大学院薬学研究科

* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

積られている⁸⁾。また、これらのポリアミン類は細胞周期においてその濃度が変化することが知られており、細胞増殖過程の制御で何らかの役割を果たしていると考えられている⁹⁾。スペルミジンは3個の、スペルミンは4個の正電荷をそれぞれ有し、二本鎖DNAに対しては $10^3-10^6 \text{ dm}^3/\text{mol}$ という強い結合能を持ち¹⁰⁾、 Mg^{2+} 非存在下で二本鎖DNAとスペルミンのX線結晶構造解析像も得られている¹¹⁾。一方、スペルミン、スペルミジンの生合成前駆体としてプトレッシンが知られている^{6,7)}。*Pseudomonas bacteriophage* $\phi\text{W-14}$ のDNA中のチミジンの約半分が、このプトレッシンで修飾された α -プトレッシニルチミジン(T^p)に置換されていることが知られている¹²⁾。 $\phi\text{W-14}$ のDNAはそのGC含量より予想される融解温度(90.3°C)よりも高い融解温度(99.3°C)を示すこと¹³⁾、デオキシリボヌクレアーゼ(DNase)Iやホスホジエステラーゼなどの加水分解酵素に抵抗性を示すことが明らかとなっている¹⁴⁾。一方、竹田らは、化学合成した T^p を含む12-merオリゴヌクレオチドの物理化学的性質について詳細に検討したところ、意外にもDNAとの二本鎖を熱的に不安定化することを見出した¹⁵⁾。筆者らはこの熱的不安定性の原因は、1)側鎖中5位近傍のアモニウムカチオンの存在と、2)リン酸アニオンと静電的な相互作用をするための側鎖末端のアモニウムカチオンが、不適切な距離関係にあるからであると考えた。そこで、これらの問題を解決するために、以下に述べる新規ポスト-エロンゲーション-モディフィケーション(PEM)法を開発した。

2. 塩基部5位にアミノ側鎖を持つヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの合成とその性質

新規PEM法は、まず、1)前駆体ヌクレオシド(convertible nucleoside; CN)に必要な位置に必要な個数だけ予めDNA合成機で導入しておき、2)例えば、鎖長の異なるアルキルジアミンを導入する場合、樹脂を必要な数に分割し、各々を鎖長の異なるアルキルジアミンと反応させ、CNに対してアルキルジアミンの導入、塩基部およびリン酸部保護基の除去、さらに樹脂からの切り出しを一挙に行い、目的とする鎖長の異なるアルキルジアミンを含むオリゴヌクレオチドを得る方法である(スキーム1)¹⁶⁾。CNとして5-トリフルオロエトキシカルボニル-2'-デオキシウリジン(8)を設計した¹⁷⁾。5-トリフルオロエトキシカルボニル-2'-デオキシウリジン誘導体7は5-ヨード-2'-デオキシウリジン誘導体6を出発原料とし、 $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 存在下Pd触媒を用いた一酸化炭素挿入反応により容易に合成できる^{17,18)}。続いて、7をアミダイト体9へと導いた後に、DNA自動合成機によって8を含むオリゴヌクレオチドを合成した。得られたCPG(controlled pore glass)樹脂を各種アルキルジアミンで処理することで、ジアミノエタンを導入した1およびジアミノヘキサンを導入した2を含むオリゴヌクレオチドを合成した(図2)^{19,20)}。一方、トリス(2-アミノエチル)アミンおよびトリス(3-アミノプロピル)アミンを導入した3および4を含むオリゴヌクレオチドは、3および4のアミダイト体を用いることにより合成した^{21,22)}。ヌクレオシド1-4を含むオリゴヌクレオチドの特性として、導入したアミノ側鎖のカルボニル基の影

Scheme 1 A synthetic route of a convertible nucleoside and an outline of post-elongation modification methods.

Fig. 2 Structures of 5-(*N*-aminoalkyl)carbamoyl-2'-deoxyuridines and 5-(*N*-aminoalkyl)carbamoyl-2'-deoxycytidine.

響により3位のイミノプロトンの酸性度が上昇し、二本鎖核酸中でワトソン・クリック型の水素結合に有利に働くこと、導入したアミノ側鎖の末端アミノ基が生理的条件下でプロトン化されることによって生じるアンモニウムカチオンがアニオン集合体であるDNA、およびRNAとの二本鎖の熱的安定性を高めること、また導入したアミノ側鎖の影響により、アナログ近傍のリン酸ジエステル結合がヌクレアーゼによる加水分解に対して抵抗性を示すことを期待した。

合成した修飾オリゴヌクレオチドと相補鎖DNAとの二本鎖の安定性を、熱変性法により50%融解温度(T_m)を測定することで比較したところ、アナログを導入することで二本鎖は熱的に安定化されることがわかった^{20, 21)}。その安定化の度合いは17-mer中にアナログを3個組み込んだ場合に、10 mM NaCl, pH 7.0の条件下、1で+2.0 °C/修飾体、2で+2.3 °C/修飾体、3で+2.1 °C/修飾体、および4で+3.9 °C/修飾体となり、トリス(3-アミノプロピル)アミンを導入した4が最も安定化効果が高かった。RNAを相補鎖として用いた場合には、100 mM NaCl, pH 7.0の条件下、1で+0.67 °C/修飾体、2で+1.0 °C/修飾体、3で+1.1 °C/修飾体、および4で+2.3 °C/修飾体となり、同様にトリス(3-アミノプロピル)アミンを導入した4が最も安定化効果が高いことがわかった。また、シチジン誘導体5を導入した場合には、DNAとの二本鎖を10 mM NaCl条件下+5.0 °C/修飾体で、RNAとの二本鎖を100 mM NaCl条件下+3.0 °C/修飾体で熱的に安定化することが明らかとなった²³⁾。続いて、導入したアミノ側鎖の末端アミノ基が二本鎖の熱的安定性に与える影響について調べるために、DNAとの二本鎖の T_m 測定を1 M NaCl条件下において行い、10 mM NaCl条件下における T_m 値と比較した。その結果、コントロールと比較してアナログを導入したオリゴヌクレオチドでは修飾体導入数の増加に伴って T_m 値の上昇度が減少した^{20, 21)}。このことから、ピリミジン塩基部5位に導入したアミノ側鎖の末端アミノ基

は、二本鎖核酸中で二本鎖のリン酸バックボーンと静電的な相互作用をしていることが強く示唆された。

一方、Hashimotoらは、ピリミジン塩基部5位修飾体として5-アミノヘキシル-2'-デオキシウリジン(10)および5-アミノヘキシル-2'-デオキシチジン(11)を含むオリゴヌクレオチドを合成し(図3)、その性質について検討している²⁴⁾。その結果、11を含むオリゴヌクレオチドは相補鎖DNAとの二本鎖を熱的、熱力学的に不安定化(50 mM NaCl中、-0.1 ~ -0.4 °C/修飾体)することを明らかにしている。

次に、ヌクレオシド2を含むオリゴヌクレオチドの二本鎖核酸安定化のメカニズムについて考察した。筆者らが合成したヌクレオシド2と、Hashimotoらが合成したヌクレオシド10の二本鎖核酸安定化能の差は何に起因するのであろうか。その要因の1つに、先にも述べたウラシル塩基部N3位のプロトンの酸性度の差が考えられる。ヌクレオシド10と比較して2では、導入したアミノ側鎖のカルボニル基の影響により3位のイミノプロトンの酸性度が上昇し、塩基対形成能が上昇したと推測される。実際に、滴定法により測定したアミノエチルカルバモイル誘導体1の pK_a は8.1で、チミジンの pK_a (9.9)と比較して1.8小さい値であった¹⁹⁾。また、ヌクレオシド2と10の構造を比較すると、2では5位カルバモイル基のアミドプロトンがウラシル塩基部4位のカルボニル酸素と、分子内水素結合を形成してアミノ側鎖の方向性がある程度規制されることが推測されるのに対して(スキーム1に5-カルバモイル体の結晶構造を示した)¹⁹⁾、ヌクレオシド10ではウラシル5位にアミノアルキル側鎖が直接結合していることから、そのような水素結合は存在せず、側鎖の方向性の規制は2に比べて弱いと考えられる。Dandeらは、メチル化剤である*N*-メチ

Fig. 3 Structures of pyrimidine nucleosides analogs possessing aminoalkyl-linkers at 5-positions.

ル-N-ニトロソウレアを用いた実験から、ヌクレオシドアナログ10のアミノアルキル側鎖は二本鎖核酸内で、導入したアナログの3'方向に二本鎖のメジャーグループに沿って伸長していることを明らかにしている²⁵⁾。従って、この側鎖の自由度の違いも二本鎖の安定性の違いに影響を与えている一因と考えられる。さらに、10では5位側鎖の長さが7原子であるのに対して、2では8原子、4では9原子であり、側鎖が長くなるにつれて T_m 値が上昇することから、これらはリン酸アニオンと静電的相互作用をする最適の長さになっていないことが考えられる(図4)。

続いて、2の導入が各種ヌクレアーゼとの反応に及ぼす効果について検討した。ヌクレオシド2を4個導入したオリゴヌクレオチド17-merの5'末端を ^{32}P で標識した後、3'-エキソヌクレアーゼである蛇毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)で処理し、その加水分解産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により解析した。その結果、アナログの5'側のリン酸ジエステル結合が加水分解反応に対して強く抵抗し、コントロールの半減期が1時間であるのに対し、2を含むものでは抵抗性が162倍増大することが明らかとなった。また、未修飾オリゴヌクレオチドの子ウシ血清中での半減期は13分であるのに対し、2を含むものでは220倍長い48時間であった(図5)²⁰⁾。一方、エンドヌクレアーゼに対する抵抗性をヌクレアーゼS1を用いて検討したところ、コントロールの半減期が3.5分であるのに対し、17-mer中に2を3, 4, 5, 6, および8個組み込んだオリゴヌクレオチドの半減期は、それぞれ7.5, 12.5, 12, 12, および25分となり、アナログを1残基おきに導入した場合でもエンドヌクレアーゼに対する抵抗性は未修飾オリゴヌクレオチドの7倍程度であった²⁶⁾。このことから、

Fig. 5 20% PAGE of 5'- ^{32}P -labeled oligonucleotides (25 μM) incubated in the medium containing 10% FCS.

2はオリゴヌクレオチドのエンドヌクレアーゼ耐性を大きくは上昇させないことがわかった。

一方、澤井らは5-(アミノアルキルカルバモイルメチル)-2'-デオキシウリジン(12-14)²⁷⁾を、Heystekらは5-アミノプロピニル-2'-デオキシウリジン(15)²⁸⁾(図3)を組み込んだオリゴヌクレオチドを合成し、その二本鎖核酸安定化能について検討している。その結果、15を導入したオリゴヌクレオチドは相補鎖DNAとの二本鎖を熱的に大きく安定化し、その安定化の度合いは50 mM NaCl中で $+3.0 \sim +3.8^\circ\text{C}/\text{修飾体}$ であった。また、5'末端に16を導入したオリゴヌクレオチドは、標的二本鎖DNAとのパラレル型三本鎖核酸を熱的に安定化($+4^\circ\text{C}/\text{修飾体}$, 100 mM NaCl, pH 7.0)する²⁹⁾。

Fig. 4 Structures of pyrimidine nucleosides analogs possessing aminoalkyl-linkers at 5-positions.

3. その他の塩基部位にアミノ側鎖を持つヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの性質

Behrらは6位を保護した2'-デオキ-2-フルオロイノシン誘導体17をCNとして用いたPEM法によって(図6)、2'-デオキシイノシンの塩基部C2位にスベルミンを導入したヌクレオシド18を含むオリゴヌクレオチドを合成している³⁰⁾。導入したスベルミン残基は二本鎖核酸中において二本鎖のマイナーグループに位置すると考えられる。ヌクレオシド18を含むオ

Fig. 6 Structures of nucleoside analogs modified at base moieties.

リボヌクレオチドは未修飾のオリゴヌクレオチドと比較して相補鎖 DNA との二本鎖をより熱的に安定化し、その安定化の度合いは 100 mM NaCl, pH 7.4 の条件下で +3.0 °C/修飾体であった³¹⁾。また、塩基部 2 位にトリシアミンを導入したアナログ 19 を含むオリゴヌクレオチドは、未修飾のオリゴヌクレオチドと比較してヌクレアーゼ P1 (エンドヌクレアーゼ) による加水分解反応に対してより抵抗性を示すことが明らかとなっている³²⁾。

一方、Barawkar らは、2'-デオキシ-5-メチルシチジンの C4 位にスベルミンを結合させた 20 を 1-3 個含むオリゴヌクレオチドが二本鎖 DNA と 100 mM NaCl, pH 7.3 の条件下で安定な二本鎖を形成し、その T_m 値は 25 °C ~ 40 °C であることを報告している³³⁾。一方、20 を含むオリゴヌクレオチドは相補鎖 DNA との二本鎖を熱的に不安定化 (-4.5 ~ -5.0 °C/修飾体, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, pH 7.0) した³⁴⁾。

4. 糖部 1' 位にアミノ側鎖を持つヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの合成とその性質

筆者らが本研究に着手した当時、オリゴヌクレオチドアナログとしては、リン酸部位や、duplex のメジャー

グループ側が修飾されたものが多く、duplex のマイナーグループ側の修飾についての報告はほとんどなされていなかった。しかし、多くの抗腫瘍性抗生物質や核酸の切断活性を持つ化合物がマイナーグループに作用することから、マイナーグループに官能基を導入することに興味を持たれた。ヌクレオシド糖部 1' 位は二本鎖核酸中のマイナーグループのほぼ中央に位置し、そこに側鎖を導入することによって生じる立体障害は小さいことが予想された。そこで、糖部 1' α 位にアミノ側鎖を導入したヌクレオシド 21 を含むオリゴヌクレオチドを合成し (スキーム 2)、その性質について検討した^{35, 36)}。糖部 1' α 位にアミノ側鎖を持つヌクレオシド 21 は、3'-デオキシサイコフラノシルウラルシルの 1' 位水酸基に側鎖を伸長することにより合成した。すなわち、Holy の報告³⁷⁾に従って合成した 22 のアンヒドロ結合を加水分解し、生じた水酸基をラジカル還元により除去して 3'-デオキシ体とした後に、24 の一級水酸基にアミノブチル側鎖を導入した。

合成した修飾オリゴヌクレオチドと poly rA との二本鎖の T_m を熱変性法により測定したところ、コントロールと比較してアナログを導入することで T_m 値が若干低下することがわかった³⁶⁾。しかし、50 mM NaCl 条件下、16-mer 中に 21 を 3 個導入した場合において -1.0 °C/修飾体程度の低下であり、その不安定化の度合いは小さいものであった。一方、d(A)₁₆ を相補鎖として用いた場合には、未修飾の二本鎖と比較してアナログを導入することで T_m 値が大きく低下し、その低下の度合いは 50 mM NaCl 条件下、16-mer 中に 21 を 3 個含む場合において -8.6 °C/修飾体であった。また、21 を含むオリゴヌクレオチドの各種ヌクレアーゼに対する抵抗性について検討したところ、SVPD に対してはアナログの 3' 側のリン酸ジエステル結合が抵抗性を示し、ヌクレアーゼ P1 に対してはアナログの両側 (特に 3' 側) の

リン酸ジエステル結合が抵抗性を示した。

5. 糖部 2' 位にアミノ側鎖を持つヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの性質

Griffey らは、糖部 2' 位にアミノ側鎖を持つヌクレオシドアナログを含むオリゴヌクレオチドとして、糖部 2' 位水酸基にアミノプロピル基を結合させたヌクレオシド 28 を含むオリゴヌクレオチドを合成している (図 7)³⁸⁾。ヌクレオシド 28 からなるオリゴヌクレオチドは

Fig. 7 Structures of nucleoside analogs possessing aminoalkyl-linkers at 2'-OH positions.

RNA との二本鎖を熱的に安定化し、その安定化の度合いは $+0.39 \sim +0.43$ °C/修飾体であった。一方、同配列中に 2'-O-プロピルヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドの二本鎖安定化効果は $+0.99 \sim +1.10$ °C/修飾体であり、このことからヌクレオシド 28 の側鎖の末端アミノ基は二本鎖の熱的安定化に寄与していないことが示唆された。オリゴヌクレオチド 3' 領域に 2 残基の 28 を導入したオリゴヌクレオチドの SVPD に対する抵抗性は、天然のオリゴヌクレオチドの 600 倍に、また 3 残基導入したオリゴヌクレオチドでは 1440 倍に増大した。また、3' 領域に 9 残基の 28 を導入した PS 型 AS オリゴヌクレオチドは、28 を含まない PS 型 AS オリゴヌクレオチドと比較して C-raf kinase の mRNA およびタンパク発現を 5-10 倍より効果的に抑制することが示された³⁸⁾。

一方、Cuenoud らは、2'-O-アミノエチルヌクレオシド (29) を含むオリゴヌクレオチドを合成し、その三本鎖核酸形成能について検討している³⁹⁾。ヌクレオシド 29 を含むオリゴヌクレオチドは DNA 二本鎖と熱的に安定な平行型三本鎖核酸を形成し、その安定化の度合いは天然のオリゴヌクレオチドと比較して $+3.5$ °C/修飾体であった。また、その安定化の要因は、29 のアミノエチル側鎖の末端アンモニウムカチオンが三本鎖核酸中において第二鎖のオリゴプリンヌクレオチド鎖のリン酸バックボーンと静電的に相互作用して、リン酸バックボーンの負電荷を中和していることによることが分子動力学計算および NMR 測定より示唆された⁴⁰⁾。さらに、5' 末端に psoralen を結合させた 29 を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、哺乳動物細胞において hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) 遺伝子の発現を効果的に抑制した⁴¹⁾。また、より脂溶性を

増加させる目的で、糖部 2' 水酸基にジメチルアミノオキシエチル基を導入したヌクレオシド 30 を含むオリゴヌクレオチドも合成されている⁴²⁾。

6. 糖部 4' α 位にアミノ側鎖を持つヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの合成とその性質

エンドヌクレアーゼの一種である DNase I の基質特異性や切断機構についてはよく調べられており、Lahm らは DNase I-DNA 二本鎖複合体の X 線結晶構造解析を行っている⁴³⁾。それによれば、DNase I は二本鎖のメジャーグループとはほとんど相互作用せずマイナーグループ側から二本鎖に接近し、DNA を切断することが明らかとなっている。そこで次に筆者らは、糖部 4' α 位にアミノ側鎖を導入したヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの合成を計画した。糖部 4' 位は 1' 位と同様に二本鎖核酸中において duplex のマイナーグループに位置すること、また糖部 1' 位と比較してよりリン酸部位に近いことから、この位置にアミノ側鎖を導入したヌクレオシドを組み込んだオリゴヌクレオチドは、よりエンドヌクレアーゼに対して抵抗性を示すのではないかと考えた。すなわち、導入したアミノ側鎖が加水分解酵素の活性中心に存在するアスパラギン酸、グルタミン酸、リジンなどの酸性および塩基性アミノ酸と相互作用あるいは静電的反発により酵素と不正常的な位置で結合し、その結果、合成したオリゴヌクレオチドがエンドヌクレアーゼ抵抗性になるのではないかと推測した。適切なアミノ側鎖の長さを見極めるために、長さの異なるリンカーを導入したチミジン誘導体 31-34 を含むオリゴヌクレオチドを合成した (図 8)⁴⁴⁻⁴⁶⁾。アミノメチル基を持

Fig. 8 Structures of pyrimidine-nucleoside analogs possessing aminoalkyl-linkers at 4'-positions.

つ 31 は Wang らの報告⁴⁷⁾に従い、アミノエチル 32、アミノエチルカルバモイルオキシエチル基を持つアナログ 34 は、筆者らの研究室で開発したビニルシリル基をラジカルアクセプターとする分子内ラジカル環化反応を利用して合成した (スキーム 3)⁴⁸⁾。すなわち、Giese らの報告⁴⁹⁾に従い合成した 4'-β-セレン誘導体 36 の 3'-水酸基にジメチルビニルシリル基を導入して 37 を得、このものを基質としてラジカル環化-環拡大反応を行い、続

Scheme 3 A synthetic route of nucleoside analogs possessing aminoalkyl-linkers at the 4'-positions.

いて、玉尾酸化によって開環することで2-ヒドロキシエチル体 39 を合成した。このものをアミダイト体 49 へ導いた。また、アミノプロピル基を持つものについてはアリルシリル基のラジカル環化反応を利用して合成した。

アナログを導入することで相補鎖 DNA との二本鎖は熱的に安定化されることがわかった^{44, 45)}。その安定化の度合いは 18-mer 中にアナログを 5 個組み込んだ場合に 10 mM NaCl, pH 7.0 の条件下、31 で +0.9 °C/修飾体、32 で +1.14 °C/修飾体、33 で +0.82 °C/修飾体、および 34 で +0.48 °C/修飾体となり、アミノエチル基を導入した 32 が最も安定化効果が高かった。一方、RNA を相補鎖として用いた場合には、未修飾オリゴヌクレオチドに比べ、いずれの場合においても若干 T_m 値が低下した。しかし、アナログ 32 を 5 個含む場合において -0.54 °C/修飾体程度の低下であり、十分アンチセンス法に適用可能であることがわかった。また、これらのヌクレオシドアナログの三本鎖核酸熱的安定性に及ぼす効果について検討したところ、31 および 34 を含むオリゴヌクレオチドは二本鎖 DNA との平行型三本鎖核酸を熱的に不安定化させるのに対して、32 および 33 およびシチジン誘導体 35 は三本鎖核酸を熱的に安定化させることがわかった⁵⁰⁾。

続いて、アナログを含むオリゴヌクレオチドの各種ヌクレアーゼに対する抵抗性について検討した⁴⁵⁾。その結果、SVPD に対するコントロールの半減期は 2 分であるのに対して、31, 32, 33 および 34 を含むオリゴヌクレオチドの半減期は、それぞれ 2.9, 14.4, 17.8 および 5.2 時間となり、32 および 33 を含むオリゴヌクレオチドの安定性は、未修飾オリゴヌクレオチドの 430 倍および 530 倍に増大することがわかった。一方、エンドヌクレアーゼに対する抵抗性を DNase I を用いて検討したところ、コントロール、および 31, 32, 33 および 34 を含むオリ

ゴヌクレオチドの半減期はそれぞれ 20 分、27, 29, 28 および 13 時間となり、32 を含むオリゴヌクレオチドの安定性は未修飾オリゴヌクレオチドの 87 倍に増大した。また、32 のアミノエチル側鎖の末端アミノ基をアセチル基で保護した場合に抵抗性が大きく減弱したことから、アミノ側鎖の末端アミノ基がエンドヌクレアーゼ抵抗性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、導入したヌクレオシドアナログの RNase H 活性に及ぼす効果について比較検討したところ、18-mer 中にアナログを 5 個導入したものでは若干 RNA 鎖が切断されにくくなっているものの、いずれのアナログを含む場合においても十分 RNase H の基質となることがわかった。

7. その他の糖部位にアミノ側鎖を持つヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの性質

Altmann らは、6'- α -アミノプトキシ炭素環チミジン 51 を含むオリゴヌクレオチドが相補鎖 RNA との二本鎖を熱的に不安定化 (-1.1 ~ -1.9 °C/修飾体, 100 mM NaCl) することを報告している (図 9)⁵¹⁾。一方、炭素環チミジンからなるオリゴヌクレオチドアナログは、poly (dA) との二本鎖を熱的に安定化すると報告がなされている^{52, 53)}。そこで筆者らは、6'- α 位に適切な長さのアミノ側鎖を導入したヌクレオシドアナログを含むオリゴヌクレオチドを合成することができれば、相補鎖 RNA との二本鎖を熱的に安定化できるのではないかと考え、6'- α 位にアミノエチル 52, アミノブチル 53 およびアミノヘキシルカルバモイルオキシ基を持つ炭素環チミジン 54 を含むオリゴヌクレオチドを合成し、その性質について検討した⁵⁴⁾。アナログを含む二本鎖の T_m を熱変性法により測定したところ、アミノエチル側鎖を導入した 52 が DNA との二本鎖を熱的に安定化 (+0.75 ~ +2.0 °C/修飾体, 10 mM NaCl) するものの、その他のアナログ

Fig. 9 Structures of nucleoside analogs possessing polyamines at the sugar moieties.

は DNA との二本鎖を熱的に不安定化 ($-0.2 \sim -1.8$ °C/修飾体, 10 mM NaCl) することがわかった。また, 相補鎖が RNA の場合には, いずれの側鎖を導入したものについてもすべて二本鎖は熱的に不安定化 ($-1.9 \sim -3.7$ °C/修飾体, 100 mM NaCl) した。

一方, Tung らは, 5'末端に 55 を組み込んだオリゴヌクレオチドが, 二本鎖 DNA と 100 mM NaCl, pH 6.5 の条件下で熱的に安定なパラレル型三本鎖 ($T_m = 42$ °C) を形成することを報告している⁵⁵⁾。同条件下で未修飾のオリゴヌクレオチドは三本鎖核酸を形成しなかった。また, Sund らは, 5'末端に 57 あるいは 3'末端に 56 を含むオリゴヌクレオチドは, 相補鎖 DNA との二本鎖を熱的に安定化することを報告している⁵⁶⁾。その安定化の度合いは 100 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , pH 7.0 の条件下でそれぞれ $+2.5$ °C/修飾体および $+0.5$ °C/修飾体であった。一方, 56 を中央に含むオリゴヌクレオチドは相補鎖 DNA との二本鎖を熱的に不安定化 (-28.5 °C/修飾体) した。同様に, 5'末端に 57 あるいは 3'末端に 56 を含むオリゴヌクレオチドは, 二本鎖 DNA とのパラレル型三本鎖を熱的に安定化 ($+1.3 \sim +3.3$ °C/修飾体; 100 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , pH 7.0) するのにに対し, 56 を中央に含むオリゴヌクレオチドは同条件下において三本鎖核酸を形成しなかった⁵⁶⁾。

8. 5-(N-アミノヘキシル)カルバモイル-2'-O-メチルウリジンを含むオリゴヌクレオチドの合成とその性質

筆者らは, 5-(N-アミノヘキシル)カルバモイル-2'-デオキシウリジン (2) を含むオリゴヌクレオチドが高い RNA 親和性, および 3'-エキソヌクレアーゼ抵抗性, さらに RNase H 活性誘導能を持つことから, 新しいアンチセンス分子の候補として有望であることを見出した⁴⁵⁾。しかし, 2 を含むオリゴヌクレオチドのエンドヌ

クレアーゼに対する抵抗性は十分ではなかった。一方, 2'-O-メチルヌクレオシド 59 (図 10) からなるオリゴヌ

Fig. 10 Structures of 2'-O-methyluridine analogs.

クレオチドは相補鎖 RNA と高い親和性を持つこと, また未修飾のオリゴヌクレオチドと比較してエンドヌクレアーゼによる加水分解反応に対して抵抗性を示すことが明らかとなっている⁵⁷⁾。そこで筆者らは, エンドおよびエキソの両ヌクレアーゼに対して抵抗性を示すオリゴヌクレオチドの創製を目指し, 2 に 2'-O-メチル基を導入した 5-(N-アミノヘキシル)カルバモイル-2'-O-メチルウリジン (58) を含むオリゴヌクレオチドを合成し, その性質について検討した⁵⁸⁾。2'-O-メチル基の導入により RNase H 活性誘導能の低下が懸念されたが, 井上, 大塚らの報告⁵⁹⁾に基づき, 修飾ヌクレオシド間に天然型ヌクレオシドを挿入した gapmer 構造を持つオリゴヌクレオチドを構築することで, この問題を回避できると考えた。ヌクレオシド 58 は先と同様に, 5'-ヨード-2'-O-メチルウリジンを原料として合成した⁵⁸⁾。

アナログを含むオリゴヌクレオチドと相補鎖 RNA との二本鎖の T_m を熱変性法により測定したところ, 2 および 58 を導入したオリゴヌクレオチドでは修飾体の導入数の増加に伴い, 二本鎖がより熱的に安定化された。その安定化の度合いは 2 で $+1.0 \sim +3.0$ °C/修飾体であり, 58 では $+0.4 \sim +3.9$ °C/修飾体であった。また, 同数の 58 および 2 を導入した時の二本鎖の T_m 値の差は $+0.2 \sim +2.6$ °C であり, 2 と比較して 58 はより RNA との二本鎖を熱的に安定化することがわかった。続いて, アナログ 58 の導入がヌクレアーゼとの反応に及ぼす効果について検討したところ, SVPD に対する未修飾オリゴヌクレオチドの半減期は 5 分であるのに対し, 58 を 5 個含むものでは 20 時間となり 58 を導入することで抵抗性が 240 倍に増大した。また, その値は 2 を含むオリゴヌクレオチドの 1.8 倍であった。一方, DNase I に対してはアナログの両側のリン酸ジエステル結合が予想通り抵抗性を示し, コントロールおよび 2 を含むオリゴヌクレオチドの半減期が, それぞれ 7.3 分および 12 分であるのに対し, 58 を含むオリゴヌクレオチドでは 174 分となり, 58 を導入することで抵抗性が未修飾オリゴヌクレオチドの 24 倍に増大した。また, 58 のアミノ側鎖の末端アミノ基をアセチル基で保護したヌクレオシド

を導入したオリゴヌクレオチドを用いた実験より、58を含むオリゴヌクレオチドのDNase Iに対する抵抗性はアミノ側鎖の末端アミノ基の静電的な効果ではなく、主に2'-O-メチル基の立体障害によるものであることが明らかとなった。

また、導入したヌクレオシドアナログのRNase H活性に及ぼす効果について比較検討したところ、58を含むオリゴヌクレオチドではgap部位の2'-デオキシヌクレオシドの数、すなわちアナログ間の天然型ヌクレオシドの数が5個以上の時にRNAが効果的に切断されることがわかった。

9. ま と め

最後に、筆者らが合成したアナログを含むオリゴヌクレオチドの性質を図11(+は二本鎖の熱的安定性あるいはヌクレアーゼ耐性が未修飾のオリゴヌクレオチドと比較して高いことを、-は低いことを示す)にまとめて示した。糖部4'α位にアミノエチル側鎖を導入したヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドは、相補鎖RNAとの二本鎖の熱的安定性を若干低下させるものの、エンドおよびエキソの両ヌクレアーゼに対して高い耐性を示すこと、またRNase H活性を誘導することから現在リン酸ジエステル結合型アンチセンス分子として最も有望であると考えている。

おわりに

以上、本稿はポリアミンで修飾したオリゴヌクレオチドの合成とアンチセンスおよびアンチジーン分子としての性質について、筆者らの研究を中心にまとめたものである。RNAとの親和性の向上、ヌクレアーゼ耐性の向上に関しては当初の目的を達成することができたと考えている。しかし、これらをアンチセンスおよびアンチジーン分子として使用するためには、膜透過およびデリバリー等の問題点を解決しなければならず、さらなる検討が必要である。

本文で紹介した我々の研究成果は、筆者らの研究室の伊藤高範博士をはじめとする團亮人、奈良洋、萩野谷憲康、野村由加利、金崎真紀子、長澤有紀、三川麻衣、熊谷いづみ、狩野奈保子、渥美奈央子、富野圭介の学生諸氏の熱心な実験によるものであり、心から謝意を表します。また、協同研究者として貴重な助言と指導に協力していただいた東京都立大学小野晶助教授にこの場をかりてお礼申し上げます。

(2003年5月13日受理)

文 献

- 1) E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.*, **90**, 544 (1990)
- 2) J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.*, **36**, 1923 (1993)
- 3) A. D. Mesmaeker, K.-H. Altmann, A. Waldner, S. Wendeborn, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 343 (1995)
- 4) M. A. Guvakova, L. A. Yakubov, I. Vlodavsky, J. L. Tonkinson, C. A. Stein, *J. Biol. Chem.*, **270**, 2620 (1995)
- 5) P. Rockwell, W. J. O' Connor, K. King, N. I. Goldstein, L. M. Zhang, C. A. Stein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6523 (1997)
- 6) C. W. Tabor, H. Tabor, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 285 (1976)
- 7) C. W. Tabor, H. Tabor, *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 749 (1984)
- 8) S. Sarhan, N. Seiler, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **370**, 1279 (1989)
- 9) A. E. Pegg, *Cancer Res.*, **48**, 759 (1988)
- 10) M. C. Etter, *Acc. Chem. Res.*, **23**, 120 (1990)
- 11) S. Jain, G. Zon, M. Sundaralingam, *Biochemistry*, **28**, 2360 (1989)
- 12) A. M. B. Kropinski, R. J. Bose, R. A. J. Warren, *Biochemistry*, **12**, 151 (1973)
- 13) B. Gerhard, R. A. J. Warren, *Biochemistry*, **21**, 5458 (1982)
- 14) R. A. J. Warren, *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**, 137 (1980)
- 15) T. Takeda, K. Ikeda, Y. Mizuno, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3558 (1987)
- 16) 小野晶, 松田彰, 蛋白質核酸酵素, **40**, 1391 (1995)
- 17) Y. Nomura, Y. Ueno, A. Matsuda, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2784 (1997)
- 18) Y. Ueno, A. Ogawa, A. Nakagawa, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2817 (1996)
- 19) A. Ono, N. Haginoya, M. Kiyokawa, N. Minakawa, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 361 (1994)
- 20) N. Haginoya, A. Ono, Y. Nomura, Y. Ueno, A. Matsuda, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 271 (1997)
- 21) Y. Ueno, M. Mikawa, A. Matsuda, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 33

	R = -C(=O)NH(CH ₂) ₆ NH ₂	R = -CH ₂ OC(=O)NH(CH ₂) ₄ NH ₂	R = -(CH ₂) ₂ NH ₂	R = -OC(=O)NH(CH ₂) ₂ NH ₂
Thermal Stability				
DNA-DNA	+++	ND	-	+
DNA-RNA	+	+++	---	-
Nuclease Resistance				
3'-exonuclease	+++	+++	+	++++
endonuclease	±	++	+	++++

ND, not determined

Fig. 11 Properties of the oligonucleotides containing the nucleoside analogs possessing the aminoalkyl-linkers.

- (1998)
- 22) Y. Ueno, M. Mikawa, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2863 (1997)
 - 23) Y. Nomura, N. Haginoya, Y. Ueno, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2811 (1996)
 - 24) H. Hashimoto, M. G. Nelson, C. Switzer, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7128 (1993)
 - 25) P. Dande, G. Liang, F.-X. Chen, C. Roberts, M. G. Nelson, H. Hashimoto, C. Switzer, B. Gold, *Biochemistry*, **36**, 6024 (1997)
 - 26) Y. Ueno, I. Kumagai, N. Haginoya, A. Matsuda, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3777 (1997)
 - 27) H. Ozaki, A. Nakamura, M. Arai, M. Endo, H. Sawai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 1981 (1995)
 - 28) L. E. Heystek, H. Zhou, P. Dande, B. Gold, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12165 (1998)
 - 29) H. Nara, A. Ono, A. Matsuda, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 54 (1995)
 - 30) N. Schmid, J.-P. Behr, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1447 (1995)
 - 31) P. Potier, A. Abdennaji, J.-P. Behr, *Chem. Eur. J.*, **6**, 4188 (2000)
 - 32) K. Shinozuka, M. Onodera, H. Ikeda, H. Sawai, *Chem. Lett.*, **2002**, 200
 - 33) D. A. Barawkar, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **205**, 1665 (1994)
 - 34) T. P. Prakash, D. A. Barawkar, V. Kumar, K. N. Ganesh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 1733 (1994)
 - 35) A. Dan, Y. Yoshimura, A. Ono, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 615 (1993)
 - 36) A. Ono, A. Dan, A. Matsuda, *Bioconjugate Chem.*, **4**, 499 (1993)
 - 37) A. Holy, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 289 (1974)
 - 38) R. H. Griffey, B. P. Monia, L. L. Cummins, S. Freier, M. J. Greig, C. J. Guinasso, E. Lesnik, S. M. Manalili, V. Mohan, S. Owens, B. R. Ross, H. Sasmor, E. Wanciewicz, K. Weiler, P. D. Wheeler, P. D. Cook, *J. Med. Chem.*, **39**, 5100 (1996)
 - 39) B. Cuenoud, F. Casset, D. Hüskén, F. Natt, R. M. Wolf, K.-H. Altmann, P. Martin, H. E. Moser, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 1288 (1998)
 - 40) M. J. J. Blommers, F. Natt, W. Jahnke, B. Cuenoud, *Biochemistry*, **37**, 17714 (1998)
 - 41) N. Puri, A. Majumdar, B. Cuenoud, F. Natt, P. Martin, A. Boyd, P. S. Miller, M. M. Seidman, *J. Biol. Chem.*, **276**, 28991 (2001)
 - 42) T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, A. S. Fraser, G. Vasquez, M. Manoharan, *J. Org. Chem.*, **67**, 357 (2002)
 - 43) A. Lahm, D. Suck, *J. Biol. Mol.*, **221**, 645 (1991)
 - 44) Y. Ueno, Y. Nagasawa, I. Sugimoto, N. Kojima, M. Kanazaki, S. Shuto, A. Matsuda, *J. Org. Chem.*, **63**, 1660 (1998)
 - 45) M. Kanazaki, Y. Ueno, S. Shuto, A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2422 (2000)
 - 46) Y. Ueno, K. Tomino, I. Sugimoto, A. Matsuda, *Tetrahedron*, **56**, 7903 (2000)
 - 47) G. Wang, W. F. Seifert, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6515 (1996)
 - 48) S. Shuto, M. Kanazaki, I. Sugimoto, S. Ichikawa, Y. Nagasawa, Y. Ueno, H. Abe, N. Minakawa, M. Sakeda, T. Kodama, M. Nomura, A. Matsuda, "Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy", ed. by C. K. Chu, Elsevier Science B. V., 2002, p 21
 - 49) B. Giese, P. Erdmann, T. Schafer, U. Schwitter, *Synthesis*, **1994**, 1310
 - 50) N. Atsumi, Y. Ueno, M. Kanazaki, S. Shuto, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 2933 (2002)
 - 51) K.-H. Altmann, M.-O. Bévierre, A. D. Mesmaeker, H. E. Moser, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 431 (1995)
 - 52) M. Perbost, M. Lucas, C. Chavis, A. Pompon, H. Baumgartner, B. Rayner, H. Griengl, J.-L. Imbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 742 (1989)
 - 53) J. Sági, A. Szemző, J. Szécsi, L. Ötvös, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2133 (1990)
 - 54) Y. Ueno, N. Karino, A. Matsuda, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 933 (2000)
 - 55) C.-H. Tung, K. J. Breslauer, S. Stein, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5489 (1993)
 - 56) C. Sund, N. Puri, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, **52**, 12275 (1996)
 - 57) H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6131 (1987)
 - 58) T. Ito, Y. Ueno, Y. Komatsu, A. Matsuda, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2514 (2003)
 - 59) H. Inoue, Y. Hayase, S. Iwai, E. Ohtsuka, *FEBS Lett.*, **215**, 327 (1987)

PROFILE

松田 彰 北海道大学大学院薬学研究科・教授
 〔経歴〕 1972 年北海道大学薬学部卒, 1977 年北海道大学大学院薬学研究科博士課程修了, 1978-79 年カリフォルニア大学サンフランシスコ校博士研究員, その後, スローン・ケタリング癌研究所研究員を経て, 1985 年北海道大学薬学部助手, 1986 年同助教授, 1991 年から現職。〔専門〕 核酸化学, 医薬化学

上野義仁 岐阜大学工学部生命工学科・助教授 理学博士
 〔経歴〕 1987 年東京理科大学理学部卒業, 1992 年東京工業大学総合理工学研究科博士課程修了, 同年科学技術庁基礎科学特別研究員, 1993 年北海道大学薬学部助手, 2001 年岐阜大学工学部助教授。〔専門〕 核酸有機化学。〔連絡先〕