3 本鎖 DNA 認識コード拡張の ための人工ヌクレオシドの開発

谷口 陽祐
佐々木茂貴*

*Development of Novel Artificial Nucleosides for Expansion of
Triplex-Recognition Codes*

Yosuke Taniguchi and Shigeki Sasaki*

Triplex-forming oligonucleotides (TFOs) are potential DNA-targeting molecules, and would become powerful tools for genomic research. However, the problem that the stable triplexes form only with homopurine: homopyrimidine sequences has not been generally solved in spite of extensive studies. In this study we have developed new base analogs (WNA) constructed of three parts, a benzene ring, a heterocyclic ring, and a bicyclic skeleton to hold these two parts. Among a number of WNA analogs, we have determined two useful WNA analogs, WNA- β T and WNA- β C, for selective stabilization of triplexes at a TA and a CG interrupting site with higher stability than the natural-type triplexes, respectively. The results of this study will provide useful information for the design of new WNA analogs to overcome inherent problems for further expansion of triplex recognition codes.

Key words: triplex DNA, non-natural nucleoside analog, interrupting site, antigene, gene targeting

はじめに

2003 年 4 月にヒトゲノムの全遺伝子配列の解読終了が公表され、本格的にポストゲノムシーケンス時代に突入した^{1,2)}。ゲノム配列情報を基本にして、生物の進化や生体機能の解明などの学術的研究、さらには画期的な新薬開発への利用など、様々な研究の展開が期待されている。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、その情報は一旦 mRNA に転写され、最終的にはたんぱく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、触媒活性を持つ核酸や、遺伝子発現を調節する核酸など、たんぱく質に翻訳されることなく機能を発現する分子が、多く見出され、ゲノムは情報だけでなく様々な機能を担っていることが明らかにされてきている。このようなゲノムの多機能性を考えると、ゲノムの特定領域に特異的に結合する分子は様々な生物機能を発現できる可能性が期待される。これまでも DNA に結合する多くの天然物あるいは人工化合物が治療薬として用いられている。一方では、非選択的な DNA アルキル化剤は反対に極めて重大な障害を遺伝子に与え、発がん性や変異原性などを示すこと

が知られている。つまり、DNA に作用する分子を有用な生物活性物質とするためには、高い配列特異性を持つことが必須の条件となる。最近、機能性有機分子に DNA 配列選択性を持たせる試みが活発に検討され、ゲノムケミストリー(あるいはゲノム標的の化学)と総称される分野を形成している³⁾。我々も、新しい診断薬および治療薬への発展を目指して、遺伝子を直接標的とするゲノム標的分子(特異的認識分子および特異的反応性分子)の開発に取り組んでいる⁴⁾。特に我々の研究室では、1塩基の違いを認識できるようなゲノム標的分子の開発を目指し、遺伝子を反応場とする新しい認識分子、反応性分子の開発を目標としている。

生体内では DNA 配列特異的なたんぱく質が存在しており、遺伝子発現調節を行っている。このようなたんぱく質の特異性は長い進化の過程で獲得されたと考えられ、これらのたんぱく質の情報から任意の配列に特異性を示す人工化合物を開発するのは容易ではない⁵⁾。有機合成化学的方法としては、DNA マイナーグループ(副溝)結合分子が検討され、認識機能は年々高まってきている⁶⁾。本稿では DNA 配列を認識するためのもう 1 つの有力な手段である 3 本鎖 DNA⁷⁾について扱う。3 本鎖 DNA は 2 本鎖 DNA に配列特異的にさらにもう 1 本の DNA 鎖が結合して生成されるもので、認識が正確であることと、比較的長い DNA 配列の認識が可能であることなど、有用な利点がある。そのため、遺伝子に直接作

* 九州大学大学院薬学研究院

()

* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University ()

用する「アンチジーン法」として遺伝子発現の阻害、活性化、さらには遺伝子の変異・修復のためのバイオテクノロジーに利用されている⁸⁾。ゲノムの中には3本鎖DNA形成が可能な遺伝子発現に重要な部位と考えられる配列が約1%含まれることから⁹⁾、新しい医薬品としての展開も期待されている。しかし、3本鎖形成で標的にできる配列には制限があり、その制限を克服するための努力が続けられている。我々も以前からこの課題に挑戦しており、最近、新しい認識分子の開発により3本鎖DNA形成コードの一部拡張化に成功した^{10,11)}。以前、我々は本誌に3本鎖DNAについて解説したが¹²⁾、本稿では、その後の本分野の発展と我々が開発した新しい3本鎖形成人工ヌクレオシドの分子設計、合成および機能評価について報告する。

1. 3本鎖DNA

3本鎖DNAは、2本鎖DNAのメジャーグループ(主溝)にもう一本のDNAが配列特異的に結合したDNA複合体である(図1)。3本鎖DNAの存在は1957年にFelsenfeldとRichらによって初めて発見され¹³⁾、1987年のDervanやHeleneらによる先駆的な研究によりいっそう注目を集めるようになった¹⁴⁾。しかし、後述するように3本鎖DNAは特定の配列でしか形成できず利用範囲が限られるため、最初期待されたようには広く利用されていない。

Fig. 1 Structures of triplex DNA. A TFO binds with the duplex within the major groove.

2. 3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

2本鎖DNAはWatson-Crick塩基対と呼ばれるグアノシン(G)とシチジン(C)塩基対およびアデノシン(A)とチミジン(T)塩基対から構成される。これらの特異的な塩基対形成を可能にしている相補的水素結合はWatson-Crick水素結合と呼ばれている。典型的な2本鎖DNA構造(B型DNA)では、Watson-Crick塩基対は副溝(マイナーグループ)と主溝(メジャーグループ)にさらに水素結合可能な官能基を持っている。GおよびAの

プリン塩基は主溝において、それぞれ3N-プロトン化シチジン(C⁺と略記)およびチミジン(T)が2個の水素結合を形成することができる。このような水素結合様式は発見者にちなんでHoogsteen水素結合¹⁵⁾と呼ばれる。2本鎖DNAの片方の鎖がグアノシンとアデノシン(プリン塩基)で構成され、もう一方の鎖がシチジンとチミジン(ピリミジン塩基)で構成されるホモプリン・ホモピリミジン領域では、プリン鎖に対して、C⁺とTからなるもう1本の鎖(3本鎖形成核酸、TFOと略記)が2本ずつのHoogsteen水素結合を形成することができるため安定な3本鎖DNAが形成される。3本鎖DNAの安定化には3本目の鎖(TFO)にピリミジン塩基が規則正しく並ぶことによるスタッキング効果も重要な安定化要因と考えられている。ピリミジン塩基からなるTFOは糖-リン酸ジエステル結合の結合方向が同じ方向に並ぶためパラレル型3本鎖と呼ばれる。(図2, IとII)。また、プリン塩基のみで形成されるTFOは、Gに対してはGが、Aに対してはAがそれぞれ2箇所の逆Hoogsteen型水素結合を形成することができるため、安定な三重塩基対を形成する(図2, IIIとIV)。この場合、3本鎖DNAは糖-リン酸ジエステル結合の結合方向が逆方向に並ぶアンチパラレル型と呼ばれる3本鎖を形成するが多い。アンチパラレル型3本鎖はプリン塩基の強いスタッキング効果によりパラレル型よりも一般的に安定性が大きい。図3Aにはアンチパラレル型3本鎖を模式的に表してある。3本鎖の認識は(逆)Hoogsteen水素結合によるため、2本鎖DNA中のホモプリン鎖中にピリミジン塩基が1箇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箇所しかないため、安定な3本鎖の形成が阻害されてしまう。図3Bの模式図に示してあるように、このような部位は3本鎖形成のための障害部位となる。一般的な配列ではホモプリン-ホモピリミジンという特殊な配列は少なく、プリン塩基とピリミジン塩基が混在しているため、安定な3本鎖は形成できない。このような認識配列の制限が3本鎖DNAの利用への重大な問題点となっている。

3. これまでに開発された障害部位認識のための人工ヌクレオシドの例

上述したようにホモプリン・ホモピリミジン2本鎖中に含まれる塩基対が入れ代わったピリミジン・プリン塩基対は3本鎖形成において障害部位になる。この障害部位を選択的に認識し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創薬として展開するためには、解決すべき重要な課題である。

Fig. 2 Canonical structures of base triplets to stabilize parallel triplex (I, II) and antiparallel triplex (III, IV).

Fig. 3 Schematic structures of natural triplex DNA (A) and an CG-interrupting site (B).

パラレル型3本鎖形成における初期の人工核酸の開発は、ピリミジン塩基とプリン塩基との両方に対して水素結合を形成させるものであった。Dervanらにより開発された人工ヌクレオシド(図4, A)¹⁶⁾およびMillerらが開発した化合物(図4, B)¹⁷⁾は、3本鎖形成障害部位の認識は可能であったが、一般的に適応可能な塩基対選択性を持つことはできなかった。

アンチパラレル型3本鎖形成についても、Dervanらによる2'-deoxybularine(図4, E)¹⁸⁾、Raoらによる2'-

deoxyformycin A(図4, F)¹⁹⁾、Leumannらによる2-アミノプリンを α 配置で連結した化合物(図4, G)²⁰⁾、またDurlandらによる4種のアゾール系化合物(図4, H)²¹⁾などが開発されている。これらの化合物も同様に3本鎖の形成は可能であったが、他の塩基対に対しても同等の安定性を有するなど、完全な選択性を得ることはできなかった。

以前、我々もパラレル型3本鎖形成を目指し、Hoogsteen型水素結合をもつ認識分子を設計した(図5, I)。この分

Fig. 4 Structures of nucleosides analogues for recognizing of mismatch site of parallel triplet (A-D) and antiparallel triplet (E-H). dR represents 2'-deoxyribose unit.

子は、CG 塩基対を認識する認識部位と糖鎖部位をアルキルリンカーにより連結し、構造に柔軟性を持たせることで2本鎖DNAの多様な高次構造に対応できるものと期待したものである。オリゴマー検討に先立ち分子認識能を、ボルフィリン固定化モデル塩基対を用いてDMSO- d_6 中でNOESYスペクトル測定を行い、設計通り選択的にCG塩基対を認識できることが明らかにした^{22, 23)}。しかし、引き続き、図5に示したIおよびIIの類似体を含むオリゴマーを合成し、3本鎖DNA形成能

Fig. 5 Unsuccessful results by our group: Aminobenzimidazole-CG base triplet (I) and guanigine-CG base triplet (II).

を調べたところ、十分な選択性や安定性が得られなかった。これらの分子設計では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考慮していなかったことが原因と考えられ、分子設計の大きな方針転換の必要性を示す結果となった。

我々の人工ヌクレオシドアナログを含めて、パラレル型3本鎖DNAを形成するために開発された分子が効果的な安定化に成功していない原因として、これらが3本目のDNA鎖から遠いDNA鎖のプリン塩基の認識を目的に設計されたため、3本目の鎖の糖鎖から標的サイトまでのスパーサー構造が必要であったことが一因と考えられる。

最近、Leumann および今西グループから相次いで障害部位認識のための人工ヌクレオシドが発表された。Leumann らは糖部分に直接5-メチルピリジン-2-オンを結合させ、3本目の鎖から近い位置にあるCG塩基対のシトシンと1箇所の水素結合を形成させ、さらに安定化因子として糖の2'位にアミノエチル基を導入することで、2本鎖DNAのリン酸ジエステル鎖との電気的相互作用により3本鎖DNAを安定化している(図4, C)²⁴⁾。

一方、今西らは糖部分の2'位酸素原子と4'位炭素原子をメチレン架橋した糖構造に塩基として、2-ピリドンを用いてCG塩基対のシトシンと1箇所の水素結合を形成させることで、3本鎖DNAを安定化している(図4, D)²⁵⁾。糖のコンフォメーションが3本鎖形成に都合のよい形に固定化されていることにより、3本鎖形成においてエントロピー的に有利に作用していると説明されている。この2-ピリドン有する2', 4'-架橋型ヌクレオシドは、人工核酸の前後の塩基配列が異なる配列でもCG塩基対に高親和性並びに高選択性を有することが示されており、CG塩基対認識の一般性が明らかにされている^{25b)}。さらに生理的条件を模倣した系で、CG塩基対が複数存在する2本鎖DNAに対しても非常に高い安定性を示しており、実用化に向けたさらなる試みが期待される。しかしながら、これまでのところ一点水素結合分子によるTA塩基対の選択的認識は報告されていない。3本鎖DNA形成配列の拡張の目的のために、このような分子設計が有効であるかどうかは今後の検討が待たれる。

4. 新しい人工ヌクレオシド WNA(W-shaped nucleoside analogue)の分子設計

我々は分子設計の方針転換を行うために3本鎖DNA構造を見直し、アンチパラレル型3本鎖とパラレル型3本鎖との際立った構造上の違いに着目した。すなわち、3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(図 6, A), 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 6, B)²⁶⁾。この正三角形構造では、標的となる遠い側の DNA 鎖の塩基の認識でも長いスペーサーは必要でないことが予想された。Leumann らは α -グリコシド結合を持つヌクレオシド誘導体を合成し、この着想を検証しているが、目的の 3 本鎖形成能は達成していない。単に α -ヌクレオシド誘導体を用いるだけでは、水素結合形成の点からも不十分であるものと考えられる(図 6, C)²⁰⁾。比較のために図 6, D には我々が設計した人工ヌクレオシド分子を示してあるが、塩基が標的のアデニンに接近していること、天然型塩基の代わりにベンゼン環が空間を占めていることを図示してある。新しい人工ヌクレオシドの分子設計の考え方を図 7 にまとめた。まず、認識塩基グアニンはエチレンスペーサーで糖部分に連結し(図 7, A), スペーサーコンフォーメーションを固定化するために 5 員環を構築し、ビシクロ構造にした(図 7, B)。最後に、天然ヌクレオシドで塩基が占めている β 位空間にはベンゼン環を導入し、隣接塩基とのスタッキング相互作用による DNA 鎖の安定化を期待した(図 7, C)。このように、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徴となっている。ベンゼン環と塩基部分がコンフォーメーションの固定化されたビシクロ骨格に結合されている構造が W-字型になっていることから(図 7, C), 新しい人工ヌクレオシドを WNA: W-shaped nucleoside analogue と命名した。後述するように、この設計概念を確認するために、最初グアニンを認識塩基とする WNA-7 β G を合成した(大文字は塩基の省略名, 数字は塩基の結合位置, ギリシャ文字は *N*-グリコシド結合の立体化学を表

Fig. 6 Schematic illustration of difference in backbone geometry of parallel and antiparallel triplex. Circles represent the position of C 1'. (A) T-TA triplet, (B) A-AT triplet, (C) an anticipated triplet of C 1' α A-TA, (D) an anticipated triplet of WNA-7 β G-TA.

している)。WNA-7 β G は、TA 塩基対と形状の相補性があり、3 本鎖形成においてベンゼン環は近接の塩基とスタッキング相互作用が期待された(図 8)。その結果、WNA-7 β G を含むオリゴヌクレオチドが安定性は低いものの、後述するように予想どおりに TA 塩基対に対し選択的に 3 本鎖 DNA を形成することがわかった¹¹⁾。この結果により WNA 誘導体の設計が有効であることが示されたため、引き続き WNA の認識部分である塩基と芳香環部分を種々変えた WNA 誘導体を合成し、3 本鎖形成

Fig. 7 Design of a bicyclic structure having a base and a benzene ring.

WNA-7βG/TA base triplet structure simulated in modeling of the triplex shows possible hydrogen bonds and shape complementarity.

TFO is highlighted, and stacking interaction is suggested.

Fig. 8 Expected structure of triplet with a WNA-7βG/TA interrupting site.

Fig. 9 The structures of the WNA (W-shaped nucleoside analogue). The number, or represent the position of the nucleobase for glycosidic bond and its stereochemistry, respectively.

能を調べることにした(図9)。

5. WNA 誘導体の合成

鍵中間体であるビスクロ骨格の合成はD-riboseを出発原料として行った。2位と3位の水酸基をアセトナイド保護し、5位の水酸基を選択的にTBDPS基にて保護した後、アノマー位を酸化しリボノラクトン体(12)とした²⁷⁾。引き続き、ベンゼン環を導入し化合物13とし、さらにアノマー位をアリル化(14)した。立体異性体は単離せずに、ビニル基を酸化開裂によりアルデヒド体に誘

導し、アセトナイドの脱保護と同時に環化反応を行った。目的の立体異性体のみが環化体を与えたため、これを単離した後、水酸基をアセチル化し、目的の中間体15を得た(スキーム1)。芳香環を持たないWNA誘導体の合成は、D-riboseを出発原料として水酸基を保護(16)した後、小林らの方法により過塩素酸トリチルをルイス酸触媒としてα-選択的アリル化反応(17)を行った²⁸⁾。同様に、酸化し環化反応を行うことにより目的の中間体18を得た(スキーム2)。

N-グリコシル化による塩基の導入は、ルイス酸と保

Scheme 1 (a) i) Acetone, H^+ , ii) TBDPSCI, TEA, DMAP, CH_2Cl_2 , iii) PCC, CH_2Cl_2 , (b) PhLi, THF, (c) allyltrimethylsilane, $ZnBr_2$, CH_3NO_2 , ($\alpha:\beta = 7:6$), (d) i) OsO_4 , $NaIO_4$, pyridine, ii) 5% H_2SO_4 , THF, iii) Ac_2O , pyridine.

Scheme 2 (a) Allyltrimethylsilane, $TrClO_4$, DME, (b) i) OsO_4 , $NaIO_4$, pyridine, ii) 2 M HCl, THF, iii) Ac_2O , pyridine.

Scheme 3 (a) Et_3SiH , TMSOTf, CH_2Cl_2 , (b) BSA, TMSOTf, CH_3CN , (c) HMDS, TMSOTf, CH_3CN , (d) BSA, $SnCl_4$, CH_3CN .

Scheme 4

Scheme 5 (a) 2-Thienyllithium, THF, or 1 (or 2)-bromonaphthalene, *n*-BuLi, THF, (b) allyltrimethylsilane, ZnBr₂, CH₃NO₂, (c) i) OsO₄, NaIO₄, pyridine, ii) 5% H₂SO₄, THF, iii) Ac₂O, pyridine, (b) thymine, HMDS, TMSCL, SnCl₄, CH₃CN.

護した塩基を用いることにより行い、すべての異性体を単離することで目的の WNA 誘導体 19(1)–26(1)を得た(スキーム 3, 4)²⁹⁾。グアニンの 7 あるいは 9 位の位置異性体はグアニンの 8 位の ¹H NMR および ¹³C NMR スペクトルの化学シフト値を比べることにより行った^{30,31)}。また、立体異性体はすべての異性体を単離して ¹H COSY によりプロトンの帰属を行い、¹H NOESY スペクトル測定により糖部分のアノマー位と 4' 位のプロトンに NOE が観測される化合物を β-配置、アノマー位と 2' 位のプロトンと NOE が観測される化合物を α-配置と決定した(図 10)。NOESY スペクトルではチミン 6-H はアノマープロトンとの強い相関に加えてビシクロ環上の隣接するプロトンとの相関が観測されたことから、このグリコシド結合が比較的自由に回転しているものと考えられる。

ベンゼン環の代わりにチオフェンおよびナフタレン環

Fig. 10 Selected chemical shifts of ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) of WNA (19(2), 20(2)), and NOE correlations identifying stereochemistry of WNA analogues.

をもつ WNA (27(1)–29(1))の合成も同様に、リボノラクトン体(12)への付加反応を行い、同様の経路で行った(スキーム 5)。

6. 3 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

WNA 誘導体をオリゴヌクレオチドに導入するため、5'-O-DMTr(dimethoxytrityl)-3'-O-β-phosphoramidite 体に変換(19(3)–29(3))し、DNA 自動合成装置により 3 本目の鎖(TFO: triplex forming oligonucleotide)に組み込んだ(スキーム 6)。デオキシオリゴヌクレオチド(ODN)の固相合成後、固相担体からの切り出しおよび脱保護を同時に行い、目的の ODN を HPLC にて精製した。それぞれの ODN の構造決定は、MALDI-TOFMS にて分子量を測定することによって行った。3 本鎖形成能の評価は、WNA を組み込んだ ODN(3 本鎖形成オリ

ゴヌクレオチド、TFO)と標的となる 2 本鎖 DNA を加え錯体を形成させた混合物を、未変性電気泳動ゲルで分離することによって行った。混合物を未変性電気泳動ゲルで展開すると、錯体を形成していない TFO のバンドは移動度が大きく、電気泳動図では下のバンドとして観測される。一方 3 本鎖 DNA は分子量が大きくなっているため移動が遅く電気泳動図では上のバンドとして観測される(それぞれ図 11 に矢印で示した)。この実験は nM オーダーの低濃度の物質を用いて行うため、検出のために 5' 末端を ³²P 標識した TFO をトレーサーとして用いた³²⁾。ゲルの下の方に観測される 1 本鎖 TFO のバンドと、上の方に観測される 3 本鎖 DNA のバンドの放射能を定量化することによって、1 本鎖と 3 本鎖の濃度比を求めることができ、 $K_s = [3 \text{ 本鎖 DNA}] / ([遊$

離 TFO] × [遊離 2 本鎖 DNA]) の式から、3 本鎖 DNA 安定度定数 (K_s , M^{-1}) を算出した。3 本鎖形成の測定に用いた配列は図 11 に示してあり、TFO の Z の部分に人工塩基を組み込み、2 本鎖 DNA の XY 部分を CG, TA, GC, AT と変えた標的との間の 3 本鎖形成を評価した。図 11 の電気泳動図の上に、添加した標的 2 本鎖 DNA 濃度を示してあり、濃度が高くなるに従い、3 本鎖 DNA を示すバンドが大きくなっていることがわかる。後述するように、多くの検討の結果、非常に興味深いことに WNA- β T は天然ヌクレオシドでは認識できない TA 塩基対部分を、特異的かつ高い親和性をもって認識することを見出した。すなわち、図 11A の電気泳動図中の四角で囲んだ部分で明らかに示されるように、WNA- β T は TA 妨害部位を含む 2 本鎖 DNA に対してはほぼ 1:1 の低い標的 2 本鎖 DNA 濃度でほぼ 100% の 3 本鎖 DNA が生成していることが確認された。同様の未変性電気泳動による測定によって各種 WNA の 3 本鎖 DNA 形成定数を求めた結果を表 1 にまとめた。表 1 の Z で示したカラムは TFO に含まれる塩基 Z を表しており、X, Y の下には標的となる塩基対を示してある。例えば、Z=dG (天然型グアノシン) の 3 本鎖安定性はそれぞれの塩基対の下に示してあり、dG は GC 塩基対に選択的に $K_s > 1.0 \times 10^9 M^{-1}$ の安定な 3 本鎖を形成することを示している。ここで得られた結果をまとめると、(1) 認識塩基がプリン塩基の場合では α 位の方が安定性は高く、さらに (2) プリン塩基よりも小さいピリミジン塩基が安定な 3 本鎖を形成し、(3) ピリミジン塩基は β

Scheme 6 (a) i) nBu_4NF , THF, ii) aqueous NaOH, MeOH, (b) aqueous NaOH, MeOH, (c) DMTrCl, pyridine, (d) $iPr_2NP(Cl)OCH_2CH_2CN$, iPr_2NEt , CH_2Cl_2 .

位で結合した WNA 誘導体の方が安定性は高かった。特に、認識塩基のチミンが β 配置で結合した WNA- β T が TA 塩基対に対して非常に安定で選択的に親和性を示すことがわかった。これらの系統的な検討の結果、もう 1 つの障害部位である CG 塩基対は、シトシンを β 配置で結合した WNA- β C が選択的に認識できることがわかった。図 11B には WNA- β C を用いた電気泳動図が示してあり、四角で囲んだ WNA- β C-CG 塩基対の組み合わせでは、低い標的 2 本鎖濃度でも 3 本鎖 DNA 生成を示すバンドの生成が明らかである。WNA という同一の基本骨格で 2 つの障害部位である TA および CG 塩基対を選択的に認識できる人工ヌクレオシドを開発できたことは、極めて意義深いことであり、天然ヌクレオシドを含めて G/GC, A/AT, WNA- β T/TA さらに WNA- β C/CG の 4 種類の全ての塩基対の認識コードがそろったことになる。引き続き、WNA- β T を用いて TA 障害部位が 2

Table 1 Equilibrium association constants (K_s , $10^9 M^{-1}$) of the triplexes at 20 mM $MgCl_2$ concentrations.^a

Z	X,Y			
	T,A	A,T	C,G	G,C
dG	0.16	0.08	0.09	> 1.0
dA	0.069	> 1.0	0.057	0.40
WNA-7 β G	0.02	0.01	<0.001	<0.001
WNA-9 β G	<0.001	0.01	<0.001	<0.001
WNA-7 α G	<0.001	0.008	0.023	0.021
WNA-9 α G	0.10	0.013	0.017	0.017
WNA- β A	0.26	0.015	0.063	0.029
WNA- α A	0.007	0.009	0.067	0.036
WNA- β T	> 1.0	0.042	0.091	0.045
WNA- α T	0.009	<0.001	<0.001	<0.001
WNA- β^m C	0.42	0.018	0.03	0.029
WNA- α^m C	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
WNA- β C	0.057	0.032	0.152	0.055
WNA- α C	0.014	<0.001	0.017	0.023

^aTriplex formation and gel-shift assay were performed as described for Figure 11 except for the use of the buffer containing 20 mM $MgCl_2$, and the bands corresponding to the unbound TFO and the triplex were quantified. The equilibrium association constant was calculated by the equation; $K_s = [\text{triplex}] / ([\text{TFO}] \times [\text{duplex}])$. Concentrations of each component represented as [triplex], [TFO] and [duplex] were estimated from the relative ratio of the bands.

Fig. 11 Gel-shift assay for determination of triplex formation. Triplex formation was done for 12 hours at 22 °C in a buffer containing 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine and 10% sucrose at pH 7.5. Electrophoresis was done at 10 °C with 15% non-denatured polyacrylamide gel. 10 nM TFO containing the ³²P-labeled one as the tracer was used.

Fig. 12 Triplex formation with the TFO incorporating two continuous WNA-βT analogs. The conditions for the triplex formation and gel-shift assay are the same as described for Figure 11 except for the use of the buffer containing 20 mM MgCl₂. Concentrations of the duplex in lanes 1 to 6: 10, 20, 40, 60, 80 and 100 (nM).

個連続する配列での3本鎖形成を調べたところ、安定性は減少するものの選択的に3本鎖DNAを形成できることがわかった(図12)。このようなWNAヌクレオシドの高い3本鎖DNA安定化能は今後の展開にとって非常に有用な性質であると考えられる。

7. WNAヌクレオシドの3本鎖DNA安定化の要因

WNAヌクレオシドの3本鎖DNA安定化の要因を明らかにするため、種々のWNAによる構造の影響を調べた(表2)。まず、低Mg²⁺濃度条件下で天然型3本鎖と

WNA-βTおよび-βCを含む3本鎖の安定性を比較したところ、障害部位であるTAあるいはCG塩基対を含んでいるにもかかわらず、WNAヌクレオシドは天然型3本鎖よりも安定な3本鎖を形成することが明らかになった。次に、認識塩基を持たずベンゼン環のみをもつWNA-Hは、CG、GC塩基対と安定な3本鎖形成を示したことからチミンが塩基対選択性を決定していることがわかった。さらに、チミンを持っているがベンゼン環がないH-WNA-βTがすべての塩基配列に対して3本鎖を形成しなかったことから、ベンゼン環が安定化の重要な要因であることが示された。

引き続き、安定化に寄与していると考えられる芳香環の影響を調べるため、ベンゼン環のかわりにナフタレンおよびチオフェンを持ったWNA誘導体を合成し評価を行った(表3)。これらのWNA化合物はどの配列の標的2本鎖とも3本鎖を形成できないという結果が得られた。これらの効果を立体および電子的な要因から考察することによって今後の分子設計の指針が得られるものと期待される。

8. WNA誘導体による認識様式

当初の設計では、認識部位としての塩基は遠い側のプリン塩基と水素結合をすることを考えた(図8)。しかし、WNA-βTおよびWNA-βCの認識を含め多くの実験結果は、このようなプリン塩基との水素結合では説明しにくい。現在のところ図13に示すように、塩基対の接合部での水素結合を想定している。このような錯体構造を分子軌道計算(PM3)で最適化した構造を、電子ポテンシャル図とともに示してあるが、塩基対の接合部で2箇所の水素結合が形成可能であることが示されている。認識様式の詳細を明らかにするために現在NMR測定などを計画している。

おわりに

我々はアンチパラレル型3本鎖形成に着目して、3本鎖形成障害部位であるTA塩基対を選択的に認識するWNA-βTを、またCG塩基対を選択的に認識するWNA-βCの開発に成功し、天然ヌクレオシドとあわせて3本鎖DNAを形成させるための4種の認識コードを確立した。WNA誘導体はスタッキングを担うベンゼン環と認識を行う塩基の2つのユニットをビシクロ骨格に結合させた特徴的な構造を有する化合物である。WNAヌクレオシドは、生理的条件に近い低濃度のマグネシウ

Table 2 Equilibrium association constants (K_s , 10^9 M^{-1}) of the triplexes at 5 mM MgCl_2 concentrations.^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	0.003	0.009	0.042

^aTriplex formation and gel-shift assay were performed as described in the footnote of Figure 11, and the bands corresponding to the unbound TFO and the triplex were quantified. The equilibrium association constant was calculated by the equation; $K_s = [\text{triplex}] / ([\text{TFO}] \times [\text{duplex}])$. Concentrations of each component represented as [triplex], [TFO] and [duplex] were estimated from the relative ratio of the bands.

Table 3 Equilibrium association constants (K_s , 10^9 M^{-1}) of the triplexes at 5 mM MgCl_2 concentrations.^a

Z	X,Y			
	T,A	A,T	C,G	G,C
WNA-βT	0.30	<0.001	0.015	0.082
H-WNA-βT	0.002	0.003	0.009	0.042
Thio-WNA-βT	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
1Naph-WNA-βT	0.003	<0.001	<0.001	<0.001
2Naph-WNA-βT	<0.001	<0.001	0.006	<0.001

^aTriplex formation and gel-shift assay were performed as described in the footnote of Table 2.

Fig. 13 Speculated complex structures of thymine to a TA (I) and cytosine to a CG base pair (II). These complex structures were optimized with PM3. Electric potentials were displayed by 3 D mapped isosurface.

ム存在下で、天然型3本鎖よりも安定な3本鎖DNAを、障害部位を含む配列に対して形成できる優れた認識能を実現した。これまでのところ、WNAヌクレオシドを含むTFOが認識できる2本鎖DNA配列にはまだ制限があるため³³⁾、現在、これまで得られた知見をもとに認識の最適化を検討している。これら誘導体の中から一般的な配列の認識が可能になる有用な化合物を見つけ出すことによって、WNA誘導体がアンチジーン法への適

用の第一歩として一般的な塩基配列を認識できる分子になるものと期待を膨らませている。

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、困難な課題とともに挑戦してくれた共同研究者(中島昌二博士、松浦尚子修士、屋敷吉隆修士、山内裕之修士、高橋亮修士、児玉恵一修士、川后祐介修士、中村綾子修士)の努力に深く感謝いたします。また、本研究は基盤研究(C)および(B)、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。

(2004年5月10日受理)

文 献

- 1) 野島博, 編集, 「ゲノム創薬の最前線」, 羊土社, 2002
- 2) 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
- 3) 関根光雄, 斎藤烈編「ゲノムケミストリー」講談社サイエンスティフィク, 講談社, 東京, 2003
- 4) (a) 佐々木茂貴, 永次史, ファルマシア, 39, 39 (2003); (b) 佐々木茂貴, 薬学雑誌, 122, 1081 (2002)
- 5) Zn-フィンガー蛋白質の例: (a) M. Nagaoka, Y. Sugiura, *J. Inorg. Biochem.*, 82, 57 (2000); (b) 杉浦幸雄, 永岡真, 有合化, 55, 384 (1997)
- 6) (a) P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 2215 (2001); (b) 飯田博一, 杉山弘, 有合化, 58, 975 (2000), など
- 7) Soyfer, V. N., Potaman, V. N. "Triple-Helical Nucleic Acids" Springer-Verlag: New York, 1996
- 8) 遺伝子の活性化: (a) C. Shen, A. Buck, A. Schmid-Kotsas, C. Matuschek, H.-J. Gross, M. Bachem, S. N. Reske, *Cancer Gene Ther.*, 10, 403 (2003); (b) S. Cogoi, V. Rapozzi, F. Quadrioglio, L. Xodo, *Biochemistry*, 40, 1135 (2001); (c) J. Song, Z. Intody, M. Li, J. H. Wilson, *Gene*, 324, 183 (2004), 配列特異的切断: (d) P. A. Beal, P. B. Dervan, *Science*, 251, 1360 (1991), 細胞内での遺伝子発現阻害: (e) V. Rapozzi, S. Cogoi, P. Spessotto, A. Risso, G. M. Bonora, F. Quadrioglio, L. E. Xodo, *Biochemistry*, 41, 502 (2002); (f) Y. Inoh, D. Kitamoto, N. Hirashima, M. Nakanishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 57 (2001); (g) A. Astriab-Fisher, D. S. Sergueev, M. Fisher, B. R. Shaw, R. L. Juliano, *Biochem. Pharmacol.*, 60, 83 (2002), DNA組み換え: H. J. Datta, P. P. Chan, K. M. Vasquez, R. C. Gupta, P. M. Glazer, *J. Biol. Chem.*, 276, 18018 (2001) など
- 9) Chapter 6 in literature 7, p 220
- 10) (a) S. Sasaki, Y. Taniguchi, R. Takahashi, Y. Senko, K. Kodama, F. Nagatsugi, M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 516 (2004); (b) Y. Taniguchi, Y. Senko, K. Kodama, A. Nakamura, S. Sasaki, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 3, 113 (2003); (c) Y. Taniguchi, R. Takahashi, K. Kodama, Y. Senko, M. Maeda, S. Sasaki, *ibid.*, 2, 35 (2002)
- 11) (a) S. Sasaki, H. Yamauchi, F. Nagatsugi, R. Takahashi, Y. Taniguchi, M. Maeda, *Tetrahedron Lett.*, 42, 6915 (2001); (b) S. Sasaki, H. Yamauchi, R. Takahashi, Y. Taniguchi, M. Maeda, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 1, 23 (2001)
- 12) 佐々木茂貴, 有合化, 55, 590 (1997)
- 13) G. Felsenfeld, D. Davis, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2023 (1957)
- 14) (a) H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science*, 238, 645 (1987); (b) T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhouh, J. Decout, C. Helene, *Nucleic Acids Res.*, 15, 7749 (1987)
- 15) K. Hoogsteen, *Acta Crystallogr.*, 12, 822 (1959)
- 16) L. C. Griffin, L. L. Kiessling, P. A. Beal, P. Gillespie, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 7979 (1992)
- 17) C. Y. Huang, C. D. Cushman, P. S. Miller, *J. Org. Chem.*, 58, 5048 (1993)
- 18) H. U. Stilz, P. B. Dervan, *Biochemistry*, 21, 2177 (1993)
- 19) T. S. Rao, M. E. Hogan, G. R. Revankar, *Nucleotides Nucleosides*, 13, 95 (1994)
- 20) S. P. Parel, C. J. Leumann, *Nucleic Acids Res.*, 29, 2260 (2001)
- 21) R. H. Duland, T. S. Rao, G. R. Revankar, *Nucleic Acids Res.*, 23, 647 (1995)
- 22) S. Sasaki, S. Nakashima, F. Nagatsugi, Y. Tanaka, M. Hisatome, M. Maeda, *Tetrahedron Lett.*, 36, 9521 (1995)
- 23) S. Nakashima, N. Matsuura, F. Nagatsugi, M. Maeda, S. Sasaki, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 35, 105 (1996)
- 24) (a) S. P. Parel, C. J. Leumann, *Tetrahedron Lett.*, 44, 5065 (2003); (b) I. Prevot-Halter, C. J. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 85, 504 (2002); (c) *idem*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 2657 (1999)
- 25) (a) Y. Hari, S. Obika, M. Sekiguchi, T. Imanishi, *Tetrahedron*, 59, 5123 (2003); (b) S. Obika, Y. Hari, T. Sugimoto, M. Sekiguchi, T. Imanishi, *Chem. Eur. J.*, 8, 4796 (2002); (c) S. Obika, Y. Hari, M. Sekiguchi, T. Imanishi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 2079 (2001), 糖部コンフォーメーション固定化の概念について今西らの総論論文を参照: T. Imanishi, S. Obika, *J. Syn. Org. Chem., Jpn.*, 57, 969 (1999)
- 26) J. L. Mergny, J. S. Sun, M. Rougee, T. Montenay-Garestier, F. Barcelo, J. Chomilier, C. Helene, *Biochemistry*, 30, 9791 (1991)
- 27) H. Ogura, H. Takahashi, T. Itoh, *J. Org. Chem.*, 37, 72 (1972)
- 28) T. Mukaiyama, S. Kobayashi, *Carbohydr. Res.*, 171, 81 (1987)
- 29) (a) H. Vorbrüggen, G. Höfle, *Chem. Ber.*, 114, 1256 (1981); (b) H. Vorbrüggen, K. Krolikiewicz, B. Bennua, *ibid.*, 114, 1234 (1981)
- 30) P. Garner, S. Ramakanth, *J. Org. Chem.*, 53, 1294 (1988)
- 31) M. Masköy, M. Bolli, B. Schweizer, C. J. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 76, 481 (1993)
- 32) P. B. Arimondo, F. Barcelo, J. S. Sun, J. C. Maurizot, T. Garestier, C. Helene, *Biochemistry*, 37, 16627 (1998)
- 33) 未発表データ

PROFILE

谷口陽祐 九州大学大学院薬学府創薬科学専攻・博士後期課程2年
〔経歴〕2001年九州大学薬学部薬学科卒業、2003年九州大学大学院薬学府創薬化学専攻博士前期課程修了、同年より同博士後期課程在籍。〔専門〕有機合成化学、生物有機化学、核酸化学。

佐々木茂貴 九州大学大学院薬学府創薬科学専攻・教授 薬学博士
〔経歴〕1982年東京大学大学院薬学研究科製薬化学専攻博士後期課程修了、インディアナ大学化学科博士研究員、東京大学薬学部助手、九州大学薬学部助教授などを経て2002年より現職。日本薬学会学術振興賞。〔専門〕有機合成化学、生物有機化学、核酸化学。〔連絡先〕e-mail: [redacted]