

CG障害部位を選択的に認識する人工核酸の創製と3本鎖形成能の評価

岡村, 秀紀

<https://hdl.handle.net/2324/1654812>

出版情報：九州大学，2015，博士（創薬科学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



CG 障害部位を選択的に認識する人工核酸の創製と 3 本鎖形成能の評価

生物有機合成化学分野 3PS13001R 岡村 秀紀

【序論】ヒトゲノム計画で得られた遺伝情報をもとに遺伝子の発現機構が続々と解明され、それにもとない新たな遺伝子標的技術の開発が活発に研究されている。このような状況下、当研究室では遺伝情報中の 1 塩基の違いを認識できるツールとして 3 本鎖 DNA に着目し、ゲノム標的分子への展開を目指している。3 本鎖 DNA は、2 本鎖 DNA の主溝にもう 1 本の DNA 鎖である 3 本鎖 DNA 形成オリゴヌクレオチド (TFO) が配列特異的に結合することで形成される錯体であり、遺伝子発現を制御する核酸医薬への展開が期待される (Fig. 1)¹⁾。3 本鎖 DNA は、TFO の G が GC 塩基対の G と、また A ならびに T が AT 塩基対の A とそれぞれ 2 ヶ所の水素結合を形成することで配列特異的な形成を示す (Fig. 2a)。しかし、塩基が入れ替わった CG 塩基対ならびに TA 塩基対に対して、選択的な水素結合を形成できる核酸塩基は存在せず (Fig. 2b)、配列特異的な 3 本鎖形成はホモプリン-ホモピリミジン領域に制限される。この障害部位の認識が、3 本鎖 DNA をゲノム標的分子として展開する際の重要な課題となっている。そこで本研究では、3 本鎖形成配列の拡張を目的として、障害部位の一つである CG 塩基対を選択的に認識し、安定な 3 本鎖 DNA を形成可能な人工核酸の開発を目指すこととした。

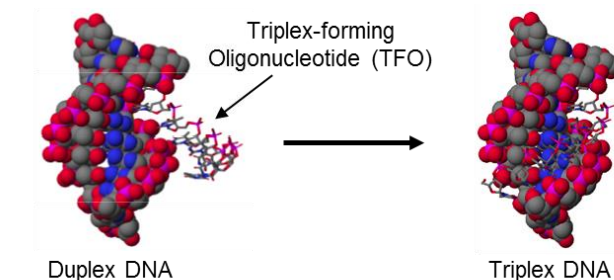


Figure 1 Formation of triplex DNA

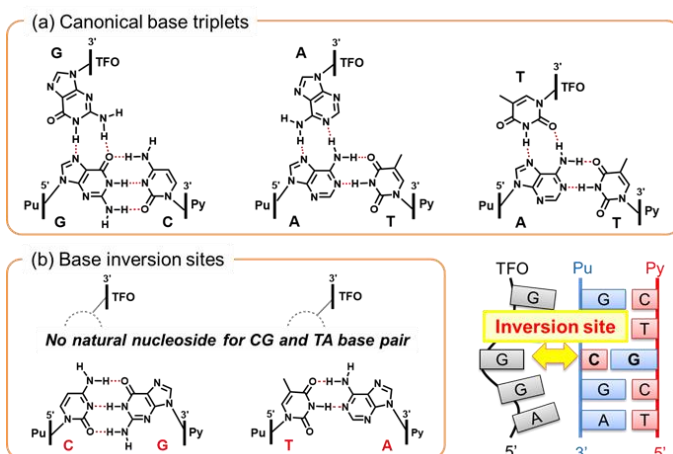


Figure 2 (a) Canonical base triplets and (b) base inversion sites

【実験と結果】

① **N²-修飾 isodC 誘導体の開発** : CG 障害部位を認識可能な人工核酸を設計するにあたり、チミジンが AT 塩基対に加えて CG 塩基対とも弱い相互作用を示すことに着目した (Fig. 3a)²⁾。この T/CG 相互作用を基本として、N²-修飾イソシチジン (isodC) 誘導体を設計した (Fig. 3b)。isodC はチミジンと同様に 4 位カルボニル基を有するが、Watson-Crick 面における水素結合のドナー・アクセ

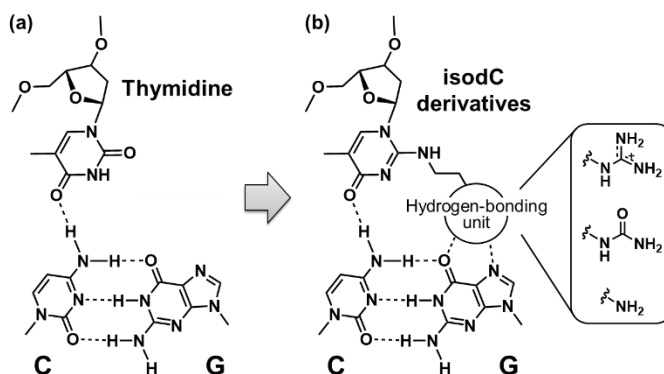
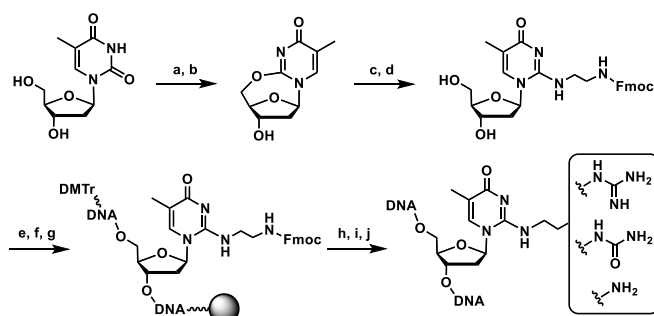


Figure 3 (a) T/CG base triplet and (b) design of isodC derivatives

プター配置が異なるため、アデニン塩基との相互作用を防ぐことができると考えられた。さらに、グアニンに対する付加的な水素結合ユニットを、isodC の 2 位アミノ基にリンカーを介して導入することにより、CG 塩基対に対する選択性と親和性を達成できると期待した。初期検討として、エチレンリンカーを介してグアニジノ基、ウレイド基、アミノ基を水素結合ユニットとして持つ isodC 誘導体を設計し、CG 塩基対に対する親和性を検証した。Scheme 1 に isodC 誘導体を組み込んだ TFO の合成経路を示す。チミジンを原料として合成したシクロチミジンにエチレンジアミンを反応させたのち、アミノ基を Fmoc 保護することでジオール体を得た。次に、定法に従って DNA 合成前駆体とし、DNA 自動合成装置を用いて TFO を固相合成した。固相担体上の TFO に対して、種々の試薬を反応させることで isodC 誘導体のリンカー末端の修飾を行い、目的とする各 TFO を合成した。isodC 誘導体を組み込んだ TFO の 3 本鎖形成能は、蛍光標識した標的 2 本鎖 DNA と TFO をインキュベートしたのち、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離することにより評価した (Table 1)。チミジンを組み込んだ TFO は、報告通り、AT 塩基対に対して高い親和性を示すと同時に CG 塩基対に対しても中程度の親和性を示した。一方、リンカー部位を持たない isodC は、GC 塩基対と CG 塩基対の両方に対して、T/CG 相互作用と同程度の親和性を示した。これらに対して、リンカー末端にグアニジノ基・ウレイド基を導入した Guanidino-isodC は、親和性は低いものの、CG 塩基対選択的な相互作用を示した³⁾。そこで、Guanidino-isodC をプラットフォームとした構造最適化を行い、親和性の向上を図ることにした。



Reagents and conditions: (a) TsCl, Pyridine, 0-4°C (b) DBU, CH₃CN, reflux (c) Ethylenediamine (d) FmocCl, Na₂CO₃, dioxane-H₂O (e) DMTrCl, Pyridine (f) Amidite reagent, DIPEA, CH₂Cl₂, 0°C (g) DNA synthesis (h) 1H-Pyrazole-1-carboxamide·HCl, DBU, CH₃CN (i) TMSNCO, DBU, CH₃CN, 55°C (j) aq. NH₃, 55°C; aq. AcOH

Scheme 1 Synthesis of TFO incorporating isodC derivatives

Table 1 Association constant of the synthesized TFOs

TFO	3' -GGAAGG A Z G GAGGAGGGA			
	5' -GAGGGAAGG A X G GAGGAGGGAAGC			
Duplex DNA	3' -CTCCCTTCC T Y C CTCCTCCCTTCG-FAM			
	Target base pair(XY)			
	GC	CG	AT	TA
T	2.30	7.99	29.24	0.98
isodC	10.95	8.40	n.d.	0.56
Guanidino-isodC	0.28	5.16	n.d.	n.d.
Ureido-isodC	n.d.	5.03	n.d.	n.d.
Amino-isodC	0.04	0.23	n.d.	0.11

20 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine, 10% sucrose, pH 7.5, 30°C
 $K_s (10^6 \text{ M}^{-1}) = [\text{Triplex}] / ([\text{TFO}][\text{Duplex}])$, n.d.: not determined

② isodC 誘導体の構造最適化：CG 塩基対に対する親和性の向上を目指すにあたり、Guanidino-isodC を基本として、リンカー部位に 2-アミノピリジンメチレン基を導入した isodC 誘導体 (AP-

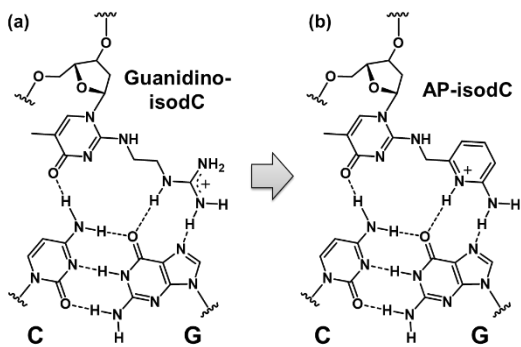
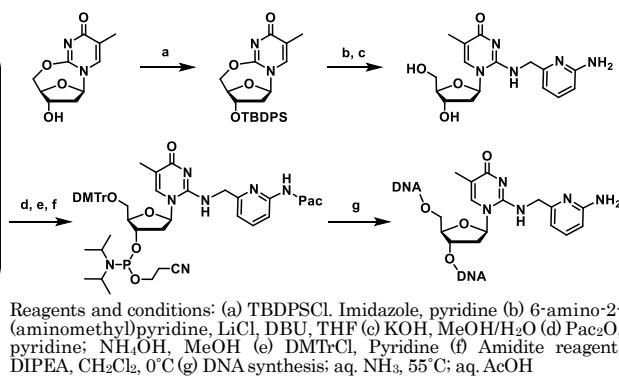


Figure 4 Design of AP-isodC and its derivatives



Reagents and conditions: (a) TBDPSCl, Imidazole, pyridine (b) 6-amino-2-(aminomethyl)pyridine, LiCl, DBU, THF (c) KOH, MeOH/H₂O (d) Pac₂O, pyridine; NH₄OH, MeOH (e) DMTrCl, Pyridine (f) Amidite reagent, DIPEA, CH₂Cl₂, 0°C (g) DNA synthesis; aq. NH₃, 55°C; aq. AcOH

Scheme 2 Synthesis of TFO incorporating AP-isodC

isodC) を設計した (Fig. 4)。グアニジノエチル基を 2-アミノピリジンメチレン基で置換することにより、リンカー周りの自由回転を抑制できると同時に、グアニン塩基との水素結合 (静電相互作用) を介して CG 塩基対を選択的に認識できると期待した。さらに、2-アミノピリジンメチレン基以外のベンジルアミン誘導体をリンカー・水素結合部位に導入し、isodC 誘導体と CG 塩基対との相互作用様式の解明を試みることにした。AP-isodC 並びにその誘導体を組み込んだ TFO の合成は、前述と同様にして行った (Scheme 2)。

AP-isodC を組み込んだ TFO の標的 2 本鎖 DNA に対する錯体形成定数を Table 2 に示す。チミンが AT 塩基対ならびに CG 塩基対と相互作用するのに対し、Guanidino-isodC は、CG 塩基対選択的な弱い相互作用を示していることがわかる。これらに対し、AP-isodC を組み込んだ TFO は、CG 塩基対選択的な 3 本鎖形成を示すと同時に、CG 塩基対に対して T-CG 相互作用よりも高い親和性を示した。また、アミノピリジン環を種々の芳香環に置換した AP-isodC 誘導体の評価したところ、2-アミノピリジン環が選択的な CG 塩基対認識に重要な役割を果たしていることを見出した⁴⁾。

Table 2 Association constant of the synthesized TFOs

TFO	3' -GGAAGG AZG GAGGAGGGA			
Duplex DNA	5' -GAGGGAAGG AXG GAGGAGGGAAGC			
	3' -CTCCCTTCC TYC CTCCTCCCTTCG-FAM			
	Target base pair(XY)			
	GC	CG	AT	TA
T	2.30	7.99	29.24	0.98
isodC	10.95	8.40	n.d.	0.56
Guanidino-isodC	0.28	5.16	n.d.	n.d.
AP-isodC	0.54	9.74	n.d.	n.d.

20 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine, 10% sucrose, pH 7.5, 30°C
 $K_s (10^6 \text{ M}^{-1}) = [\text{Triplex}] / ([\text{TFO}][\text{Duplex}])$, n.d.: not determined

③ ΨdC 誘導体の開発: AP-isodC は CG 塩基対選択的な認識を示すことを見出したが、3 本鎖 DNA 形成をアンチジーン法へと展開するためには親和性のさらなる改善が必要と考えられた。そこで、シュードシチジン (ΨdC) を母骨格にもつ ΨdC 誘導体を設計した。各ヌクレオシドを Z に組み込んだ TFO と標的塩基対 (XY) の異なる 2 本鎖 DNA との 3 本鎖 DNA 形成は、ゲルシフトアッセイにより評価した。その結果、アミノピリジンユニットを有するシュードシチジン誘導体を組み込んだ TFO が、T/AT と同等の親和性を持って、任意の配列において CG 塩基対を認識できることを見出した。現在、MeAP を組み込んだ DNA の NMR 測定によって、詳細な認識構造の解明を行っている。

④ 遺伝子プロモーター配列を標的としたアンチジーン効果の検証: 遺伝子プロモーター領域に対する 3 本鎖形成は、転写因子と 2 本鎖 DNA との相互作用を阻害するため、遺伝子発現を抑制する。そこで、CG 障害部位を選択的かつ安定に認識できる ΨdC 誘導体を用いて、これまで標的にできなかった配列に対する遺伝子発現阻害実験を行った。ガン遺伝子である hTERT のプロモーター配列を標的とした TFO を設計し、3 本鎖形成能を評価した。標的配列は、複数の CG 障害部位をもつため、対応箇所にチミジンを組み込んだ TFO-T では安定な 3 本鎖を形成できない。一方、ΨdC 誘導体を組み込んだ TFO-Z は、標的配列に対して安定な 3 本鎖形成を示した。複数かつ連続した CG 障害部位をもつ配列に対する 3 本鎖形成はこれまでに報告がなく、革新的な結果と考えられる。続いて、この TFO-Z を Hela 細胞にトランスフェクションし、遺伝子発現阻害効果をリアルタイム RT-PCR によって観察した。その結果、MeAP を組み込んだ TFO-Z は、チミジンを組み込んだ TFO-T と比べて有意に hTERT の mRNA 発現量を減少させることが明らかとなり、MeAP を組み込んだ TFO によるアンチジーン効果が確認された。

【結論】 本研究では、CG 塩基対を選択的に認識できる Λ^2 -修飾 isodC 誘導体・ Ψ dC 誘導体の開発に成功した。特に、 Ψ dC 誘導体による CG 塩基対認識は隣接塩基の影響を受けず、複数個の CG 障害部位を同時に認識できることから、様々な配列への応用が可能であると考えられる。さらに hTERT 遺伝子の発現阻害も達成しており、核酸医薬としての今後の展開を期待する。

【参考論文】

- 1) A. Mukherjee and K. M. Vasquez, *Biochimie*, **2011**, *93*, 1197-1208.
- 2) K. Dittrich, J. Tinder, M. Hogan and X. Gao, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 4111-4120.
- 3) H. Okamura, Y. Taniguchi and S. Sasaki, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 3918-3924.
- 4) H. Okamura, Y. Taniguchi and S. Sasaki, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 2374-2378.
- 5) Kim, H. J.; Leal, N. A.; Benner, S. A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 3728-3732.