

^<5m>CG塩基対を認識し3本鎖DNAを形成可能にする人工核酸の開発とメチル化DNAを標的とした新たな人工的遺伝子発現制御法への展開

納富，亮大朗

<https://hdl.handle.net/2324/7182414>

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：

権利関係：Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



5mCG 塩基対を認識し 3 本鎖 DNA を形成可能にする人工核酸の開発と メチル化 DNA を標的とした新たな人工的遺伝子発現制御法への展開

先端的核酸創成化学分野 3PS21009M 納富 亮大朗

【目的】

3 本鎖 DNA は、2 本鎖 DNA の主構に対してもう一本の DNA 鎖 (TFO) が配列特異的に結合することで形成される高次構造である。この 3 本鎖構造は、TFO の核酸塩基が 2 本鎖 DNA の塩基対に対して水素結合を介して認識を行い、3 重塩基対を形成することで安定化する。しかし、3 本鎖 DNA の形成領域は 2 本鎖 DNA 中の GC、AT 塩基対から構成される領域に限定され、これらの塩基が入れ替わった CG、TA 塩基対は天然の核酸塩基では認識することができない。同様に、CG 塩基対がメチル化修飾された 5mCG 塩基対も天然核酸では認識することができない。これらの塩基対は障害部位と呼ばれ、3 本鎖 DNA の形成領域を制限している。当研究室ではこれらの制限を克服するため、様々な人工核酸の開発を行ってきた¹⁻⁴⁾。中でも 5mCG 塩基対は生体内の代表的な修飾核酸であり、全ゲノム中に約 1% 存在し遺伝子発現をエピジェネティックに調節する重要な役割を果たしている。そのため、本研究では 3 本鎖形成領域の拡張を目指し、5mCG 塩基対を認識可能な人工核酸の開発に取り組んでいる (Fig. 1)。

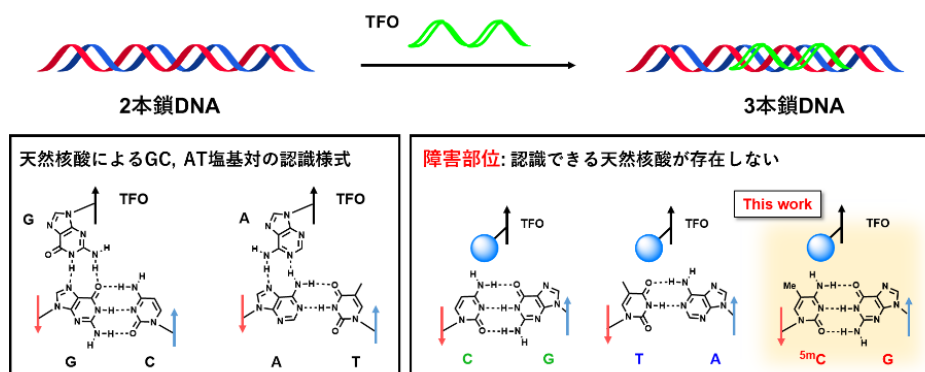


Fig. 1 5mCG 塩基対を含む配列への 3 本鎖 DNA 形成

【方法】

5mCG 塩基対を認識可能な人工核酸の分子設計として、当研究室で開発された CG 塩基対を認識可能な MeAP-ΨdC の構造を基に MeAP-d(Y-H) を開発した。この人工核酸は MeAP-ΨdC で考えられた 5mCG 塩基対のメチル基との立体障害を回避するように設計した。その結果、MeAP-d(Y-H) は 5mCG 塩基対を認識したが、その親和性は低く配列依存性を示した⁵⁾。そこで、5mCG 塩基対への親和性を向上させるために、核酸塩基の基本骨格としてピリミジン環よりも大きな芳香族環であるアミノプリン環を用いた dAN (アミノネブラリン) 誘導体を開発した。中でも、グアニン塩基への水素結合ユニットとしてアミノ基を採用した Amino-dAN は一部の配列で 5mCG 塩基対に高い親和性を示した⁶⁾。しかしこの認識も配列依存性があったため、さらなる改良としてプリン環と水素結合ユニット間のリンカーを短くするために dN (ネブラリン) 誘導体を採用し、Guanidino-dN を設計した (Fig. 2)。水素結合ユニットにグアニジノ

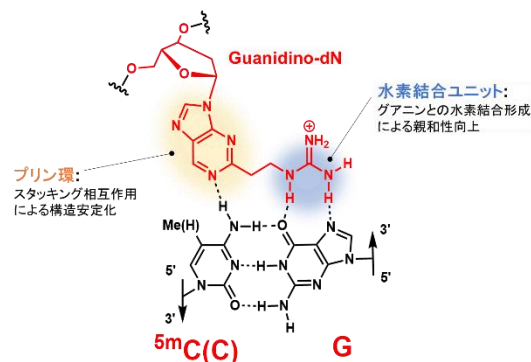


Fig. 2 5mCG 塩基対の認識を目指した Guanidino-dN の分子設計

基を有する Guanidino-dN は配列依存性無く ^{5m}CG、CG 塩基対の高い親和性での認識を達成した。Guanidino-dN を含む TFO の合成については次のように行った (Scheme 1)。出発原料である 2'-デオキシグアノシンの糖部位水酸基を Ac 保護し、6 位のカルボニル基を塩化ホスホリルにてクロル化した。6 位を接触還元によって水素化し、糖部位水酸基の保護を TBS 基へ変換した後、2 位のアミノ基を亜硝酸 *tert*-ブチルとジヨードメタンを用いてヨウ素化した。マロン酸ジエチルとのカップリング反応および脱炭酸は、触媒や試薬の当量数について条件検討を行い、高い収率での合成に成功した (Table 1)。次に、エチルエステルを還元し、Appel 反応によってアルコールをブロモ化した後、求核置換反応によってアジド基を導入、続く接触還元によってアジド基をアミノ基へと変換した。アミノ基を Fmoc 基にて保護し、糖部位水酸基の脱 TBS 化、5'位水酸基を DMTr 化、3'位水酸基をホスホロアミダイト化することで人工核酸のアミダイト体へ誘導した。を合成した。このアミダイト体を DNA 自動合成装置でオリゴヌクレオチドに組み込み、人工核酸を含む TFO を得た。最後に、TFO 上の核酸塩基を脱保護した後、オリゴヌクレオチド中の人工核酸のアミノ基をグアニジノ修飾することで Guanidino-dN を含む TFO を合成した。

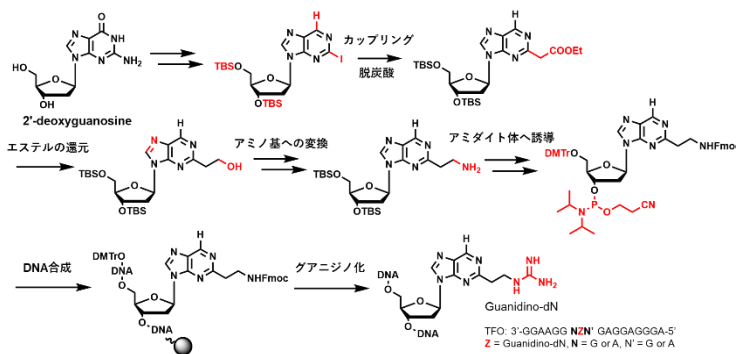


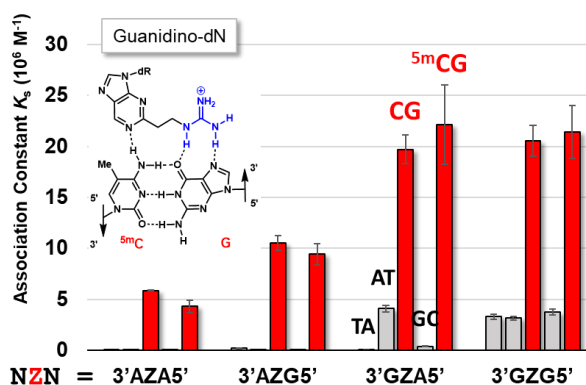
Table 1 マロン酸ジエチルとのカップリング反応の条件検討

entry	catalyst	ligand	solvent	base (equiv.)	yield (%)
1	CuI	2-picolinic acid	DMF	3.0	n.d.
2	Pd(OAc) ₂	Xantphos	diethyl malonate	3.0	16
3	Pd(OAc) ₂	Xantphos	diethyl malonate	2.0	49
4	Pd(OAc) ₂	Xantphos	diethyl malonate	1.5	87

【結果・考察】

3 本鎖形成能評価は、人工核酸を含む TFO とその標的塩基対を含む 2 本鎖 DNA を用いたゲル電気泳動によって行い、親和性の指標となる安定度定数 (K_s 値) を算出した。Guanidino-dN を含む TFO は人工核酸の前後の核酸塩基が異なる 4 種類の配列において、CG または ^{5m}CG 塩基対を含む 2 本鎖 DNA に対して安定な 3 本鎖 DNA を形成した (Fig. 3)。この TFO の親和性は他の塩基対を含む 2 本鎖 DNA に対しては低く、高い塩基対選択性が確認された。

Guanidino-dN の ^{5m}CG、CG 塩基対への高い親和性は、高い pKa を有するグアニジノ基が中性条件下でグアニン塩基への優れた水素結合ユニットになったためであると考えられる。これによって様々な配列で ^{5m}CG 塩基対を認識可能な人工核酸である Guanidino-dN の開発を達成した⁷⁾。



5mCG あるいは CG 塩基対を含む 2 本鎖 DNA に対しても 3 本鎖 DNA を形成可能になったため、続いてこの人工核酸を含む TFO を用いて 5mCG がエピジェネティックに調節している遺伝子発現を人工的に制御可能かの検証を行うことにした。

まず、Guanidino-dN を含む TFO が 5mCG を含む 2 本鎖 DNA へのタンパク質結合の阻害ができるのかの確認を行った。 5mC を特異的に酸化する酵素で、脱メチル化反応に関与する TET を用いて、3 本鎖 DNA 形成による影響の調査を行った。2 本鎖 DNA に対して TET を作用させた場合は 5mC の量が減少するのに対し、3 本鎖 DNA を形成させた後に TET を作用させても 5mC の量の減少は確認できなかった。このことは、TFO による 3 本鎖 DNA 形成によって標的配列へのタンパク質相互作用を阻害できることを示す結果である。

次に、細胞内のゲノム DNA を標的とした遺伝子発現制御を行った。標的遺伝子には代表的な癌抑制遺伝子の 1 つであり、癌細胞のアポトーシスや細胞周期に関連している *RASSF1A* 遺伝子にすることにした。この遺伝子のプロモーター領域の CG 塩基対を含む配列を、TFO の標的配列として設定した。一方で、*RASSF1A* の遺伝子プロモーター領域の CpG 部位は一部の癌細胞において高度にメチル化されて 5mCG 塩基対になっており、エピジェネティックな遺伝子発現抑制状態になっている。そこでまずは、

ゲル電気泳動によって Guanidino-dN を含む TFO が標的配列に 3 本鎖 DNA を形成することを確認した後、TFO を細胞内へトランスフェクションし RT-PCR によって 24 時間後の *RASSF1A* の mRNA の定量を行った。数種類の癌細胞株において評価を行ったところ、*RASSF1A* プロモーター領域の高メチル化によってその発現が抑制されていることが報告されている MCF-7 細胞では *RASSF1A* の転写量が増加した (Fig. 4)。一方で、プロモーターがメチル化を受けていない HeLa 細胞では *RASSF1A* の転写量は減少した。高メチル化プロモーターを有する細胞での遺伝子転写活性化は、 5mC に結合して転写を抑制する機能をもつメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質である MBD タンパク質の結合を 3 本鎖 DNA 形成によって阻害することで、MBD タンパク質のエピジェネティックな転写抑制を妨げたことが原因だと考えている。特にメチル化により抑制されている標的遺伝子の転写を活性化する手法はこれまでに例がないため、TFO を用いた遺伝子転写活性化についてさらなる検証を行った。

TFO が想定した標的配列に作用しているかの確認のために、タンパク質と相互作用してその機能を調整するデコイ核酸を用いて同様の評価を行った。その結果、標的配列と同様に 5mC を含むデコイ核酸をトランスフェクションした MCF-7 細胞では *RASSF1A* の転写が活性化したが、 5mC の代わりに標的配列に C を含むデコイ核酸では転写の活性化は見られなかった。さらに、TFO とデコイ核酸を共トランスフェクションした場合には、TFO による大幅な転写活性化は 5mC を含むデコイ核酸によって抑制された。これらの結果から、TFO は細胞内で標的 2 本鎖 DNA 配列に作用可能であり、標的配列に対する MBD タンパク質の結合を阻害することで遺伝子転写を活性化していることが示唆された。

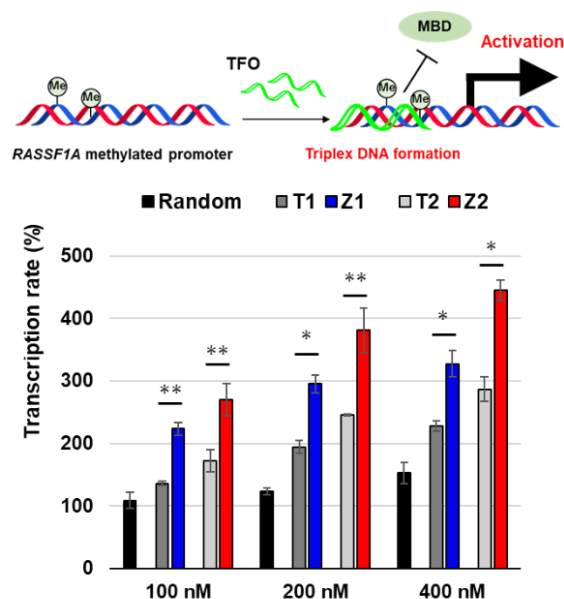


Fig. 4 メチル化プロモーターを標的とした TFO による転写活性化

さらに、この TFO による *RASSF1A* の転写活性化がセントラルドグマの下流に及ぼす影響を調査するため、ウェスタンブロッティングにて *RASSF1A* タンパク質を定量した (Fig. 5)。その結果、Guanidino-dN を含む TFO をトランスフェクションした細胞では *RASSF1A* タンパク質の発現量が増加していた。そこで、*RASSF1A* は癌抑制遺伝子であるため、TFO による遺伝子発現活性化が癌細胞の増殖に与える影響を調査した。その結果、Guanidino-dN を含む TFO はメチル化 *RASSF1A* プロモーターを有する MCF-7 細胞に対して増殖抑制効果を示したが (Fig. 6a)、非メチル化プロモーターを有する HeLa 細胞では有意な増殖抑制は見られなかった (Fig. 6b)。この増殖抑制効果が確認された MCF-7 細胞内の遺伝子発現変動を RNA-Seq によって解析したところ、*RASSF1A* 以外にも細胞周期やアポトーシスに関連する様々な遺伝子レベルに発現変動が見られた (Fig. 7)。

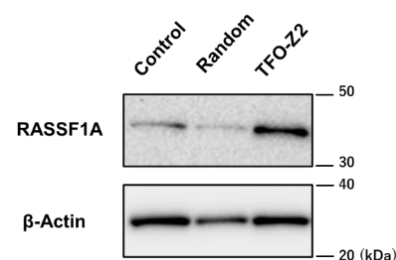


Fig. 5 TFO による *RASSF1A* タンパク発現の増加

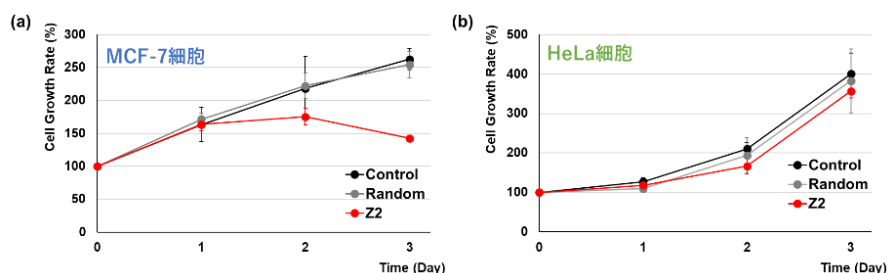


Fig. 6 TFO による細胞増殖への影響

遺伝子機能	遺伝子	
アポトーシス促進	BAX, BNIP3, CASP3, CASP7, FAS, HRK, TNF, TNFRSF10B	増加
アポトーシス抑制	BCL2, BCL2L1, CASP10,	減少
腫瘍形成	AKT1, BIRC5, ESR1, MYD88, UHRF1	減少
細胞周期の停止	BTG1, CHEK1, CCNA1, CDKN1A, CDKN2A, CDKN2B, GADD45A, GADD45G, RC3H1, TGFB2	増加
細胞周期の促進	CDC7, CDK2, CCND1, CCNE2, E2F1, E2F2, ESPL1, MCM, PRKDC	減少

Fig. 7 Guanidino-dN を含む TFO による細胞増殖に関連する遺伝子発現の変動

本研究の TFO による細胞増殖抑制効果は、*RASSF1A* 遺伝

子の活性化に伴ってこれらの幅広い遺伝子発現が変動し引き起こされたものだと考えられる。現在、この TFO による *RASSF1A* 遺伝子の活性化を別の高メチル化細胞においても評価を行っている。また、プロモーターのメチル化によって癌細胞内で発現が抑制されている *RASSF1A* 遺伝子以外の癌抑制遺伝子に対しても本手法が適用できるかを調査しているところである。

本研究で開発した Guanidino-dN ならびにこれを用いたメチル化 DNA に対する 3 本鎖 DNA 形成技術は、これまでに報告例がない新しく非常に独創性の高い成果である。DNA のメチル化に関連する疾患は癌をはじめとして非常に幅広く、セントラルドグマの最上流に位置する DNA に直接アクセスできる本手法によって新たな創薬技術に展開していくことを期待する。

【引用文献】

1) Okamura H., Taniguchi Y., Sasaki S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 40, 12445-12449.; 2) Wang L., Taniguchi Y., Okamura H., Sasaki S., *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, 25, 14, 3853-3860.; 3) Wang L., Taniguchi Y., Okamura H., Sasaki S., *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46, 17, 8679-8688.; 4) Taniguchi Y., Magata Y., Osuki T., Notomi R., Wang L., Okamiura H., Sasaki S., *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, 18, 15, 2845-2851.; 5) Notomi R., Wang L., Osuki T., Okamura H., Sasaki S., Taniguchi Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **2020**, 8, 23, 115782.; 6) Notomi R., Wang L., Sasaki S., Taniguchi Y., *RSC Adv.*, **2021**, 11, 21390-21396.; 7) Notomi, R., Sasaki, S., Taniguchi, Y., *Nucleic Acids Res.*, **2022**, 50, 21, 12071-12081.