

ゲノム標的化学の新しい展開

九州大学大学院薬学研究院

佐々木 茂貴

1. 新しい時代における有機合成化学の役割：ゲノム標的化学の提案¹

ヒトの全遺伝子配列の解読は、周辺技術の発展とともに生命科学に大きな変化を与えており、莫大な DNA 配列情報に蓄えられている細胞内たんぱく質機能を迅速に解明するためのバイオテクノロジーに大きな関心が集まっている。中でも人工の合成化学物質を用いて DNA および RNA などの遺伝情報分子を直接標的とする手法は、バイオテクノロジーとしてだけではなく、将来の医薬品への発展性をもっており、大きな期待が寄せられている。我々は、一塩基の違いを識別し、遺伝子発現阻害ならびに修復機能をもつ分子の開発を目的に、新しい化学概念としての**ゲノム標的化学**を提案している。本研究では、巨大分子である遺伝子を反応場とする、高選択的かつ高効率の化学反応性分子の実現を目標にしている。我々はゲノムを標的とするための基盤として、(1)DNA/RNA 複合体、(2)3本鎖 DNA 複合体、(3)DNA マイナーグループ結合分子、の3種類の配列認識手法を検討しているが、ここでは、ゲノム標的化学の2つの中心課題である特異的認識と効率的反応を中心に我々の基本概念と結果について紹介する。

2. 遺伝子に対する化学反応²

N-メチルニトロソウレアは DNA アルキル化能があり、発がん性を示すものとして十分注意して利用すべき試薬となっている。また、活性酸素は生命活動で必然的に発生し、その遺伝子酸化作用は、がん化の原因として疑われている。一酸化窒素 (N=O) は細胞内情報伝達をつかさどる最小の分子であるが、DNA と反応し脱アミノ化反応を引き起こし、変異を誘起する可能性があると考えられている。このように遺伝子にランダムに起こる化学反応は、有害な作用をもたらす。一方、制癌剤の中には DNA アルキル化能を持つものが多く、この場合は分子の DNA 配列特異的反応性が制癌作用につながっていると考えられている。遺伝子のわずか1塩基の変異でも、蛋白質機能を変化させ、結果的に生体機能に重大な影響を及ぼすため、遺伝子に対する化学反応を人工的に精密に制御できれば、さまざまな遺伝子発現制御法として発展可能と考えられる。このような将来展望に立ち、我々はゲノム標的化学において、遺伝子に対する精密に制御された反応性分子の開発を目標とすることにした。

3. 分子設計の基本戦略³

分子設計の基本戦略では、特異的反応性分子を導入したオリゴヌクレオチドを利用している。オリゴヌクレオチドで配列を認識し、反応性分子によりより標的塩基で識別することで正確な認識を実現できると期待した。反応により共有結合を形成させることにより、1塩基レベルの識別能をもつ発現阻害の実現が期待される。また、このような

共有結合形成部分は変異を誘起するため、遺伝子機能改変技術への発展も期待した(図1)。塩基構造を変化させる反応性分子は、将来、化学的遺伝子修復法に発展可能であるため、きわめて重要な分子機能である。本研究ではこの基本戦略に利用可能な新しい反応性分子の設計を最初の目標とした。

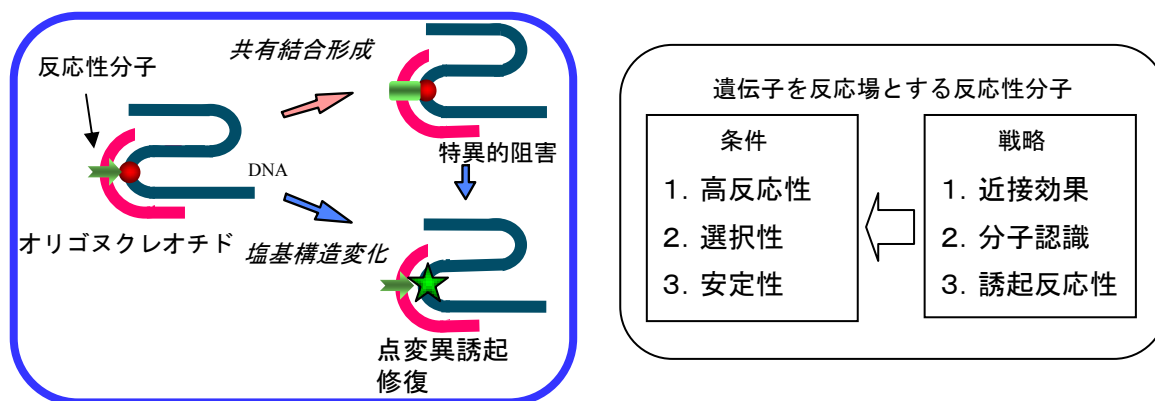


図1. 反応性分子を用いる化学的遺伝子マニピュレーション技術の基本概念図。

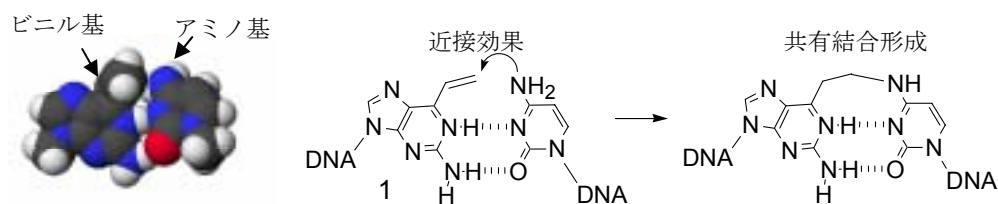


図2. シトシン認識能を持ち、近接効果によって高い反応性を期待し設計された2-amino-6-vinylpurine 誘導体

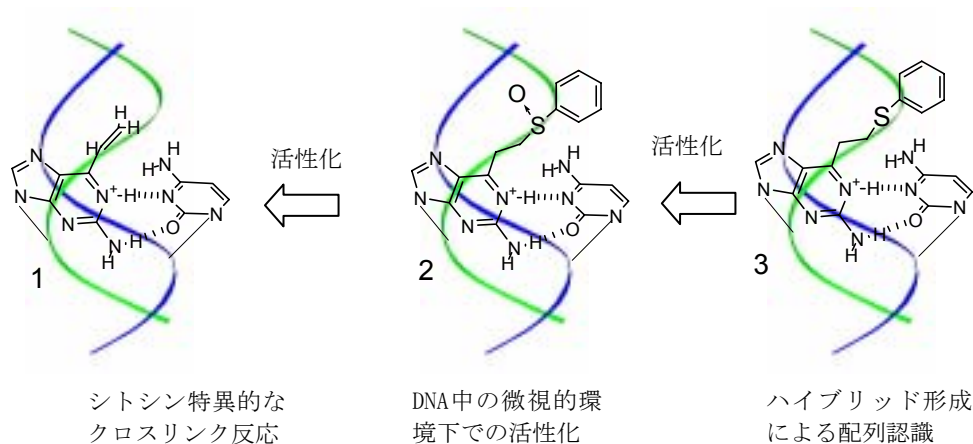


図3. 2-Amino-6-Vinylpurine (1) の分子設計、および安定前駆体(2 and 3)を用いるハイブリッドダイゼーションをトリガーとする2本鎖内活性化分子のデザイン。

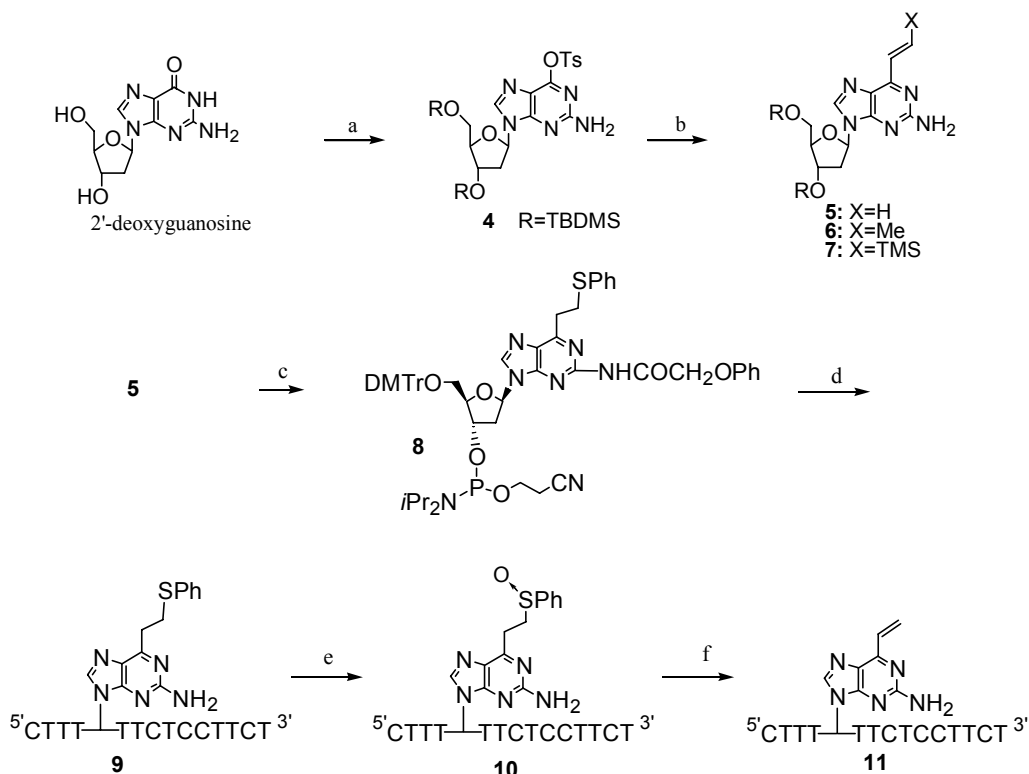
さらに、遺伝子を反応場とする反応性分子は、アミンやチオールなどの種々の求核剤の存在する水中で、高い反応性と選択性を実現するという厳しい条件を満たさなくてはならない。我々の戦略では、高い反応性を近接効果で獲得させ、選択性は反応性分子自

身に分子認識能を持たせることで克服できると考えた (図2)。さらに、安定な構造として保護された反応性分子が標的の近傍でのみ活性化される誘起反応性を設計することによって安定性を持たせることを考えた (図3)。

4. 反応性核酸の合成

2-Amino-6-vinylpurine (1)は未知化合物であったため、合成法を種々検討したところ、非常に効率的で簡便な独自の方法を開発することができた。すなわち、保護デオキシグアノシン誘導体のトシル体に、0価のパラジウム触媒及びリチウムクロライド存在下ビニルトリブチル鉛を用いたクロスカップリング反応により効率的に1を得ることができた (Scheme 1)⁴。

スキーム1. 2-Amino-6-vinylpurineと反応性オリゴヌクレオチドの合成



a) (i) TBDMSCl, (ii) TsCl, b) $n\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{CH}=\text{CH}-\text{X})$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, c) 1) PhSH, CH_2Cl_2 r.t., 1 h, 74 %, 2) $\text{PhOCH}_2\text{COCl}$, benzotriazole, 78 %, 3) $n\text{Bu}_4\text{NF}$, 76 %, 4) DMTrCl, pyridine, 75 %, 5) $i\text{Pr}_2\text{EtN}$, CH_2Cl_2 , $i\text{Pr}_2\text{N}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, 64%, d) 1) synthesis with an automated DNA synthesizer, 2) 0.1 N NaOH, 3) neutralized with CH_3COOH , 70%-80%, 3) 10 % CH_3COOH , e) 2 equivalent MMPP (magesium monopерphthalate), pH 10, 30 min, quantitative, d) 10 equivalent MMPP, pH 10, 1 d, quantitative, f) 470 mM NaOH, 30 min, quantitative.

さらにビニル基をスルフィド体として保護し、DNA 合成前駆体(8)に誘導した後、DNA 自動合成装置でオリゴヌクレオチドに導入した。オリゴヌクレオチド中の官能基変換も容易に行うことができ、水溶性過酸によるスルフォキシドへの酸化、引き続くアルカリ処理によりビニル体を収率よく合成することができた。

5. シトシン選択的および位置選択的クロスリンク反応⁵

これらの反応性オリゴヌクレオチドを用いて、相補鎖とのアルキル化反応 (クロスリ

リンク)を検討したところ、化学的に安定なフェニルスルフォキシド体が速やかな反応性を示した。さらに新しいクロスリンク剤は塩基特異性ならびに位置特異性も高いことが確認された。

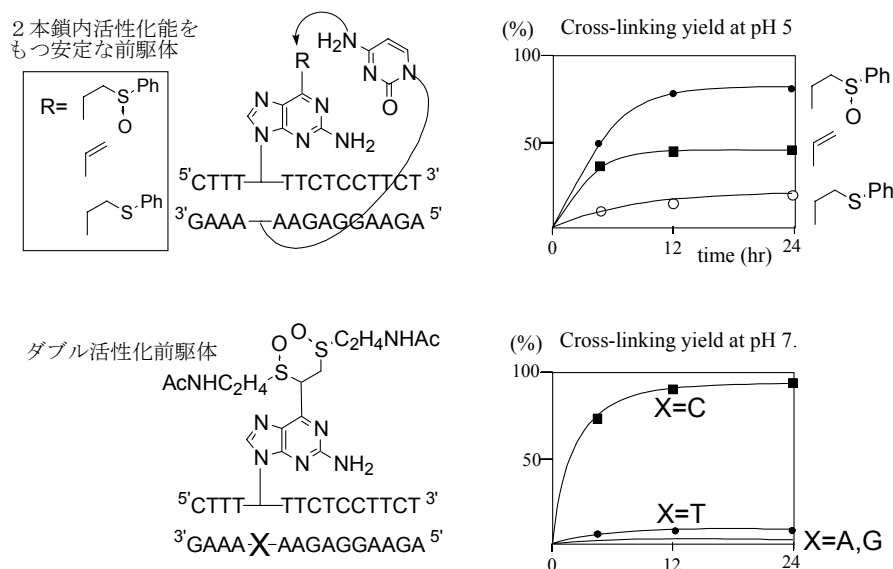


図4. 効率的・シトシン選択的な誘起反応性クロスリンク反応。

これらの実験結果から、(1) 近接効果による反応加速、(2) 分子認識による塩基特異性、(3) 2本鎖形成をトリガーとする誘起反応性、を目指した当初の設計概念を確立した。ダブル活性化構造前駆体を利用した反応では極めて速い反応と高いシトシン選択性が達成できることが示されている (図4)。

これまで、この概念を利用し次のような新機能を実現してきた。

- (1) ダブル活性化機構によるさらに高反応性のクロスリンク反応⁶
- (2) アンチセンス効果の増強⁷
- (3) 3本鎖DNA形成を利用した、特異的クロスリンク反応^{8,9}
- (4) 3本鎖DNAクロスリンク反応による遺伝子への特異的変異導入¹⁰

[誘起反応性に関する考察]我々は、フェニルスルフィドあるいはフェニルスルフォキシド前駆体が2本鎖DNA内で脱離し、反応性ビニル基を発生すると設計した(図3)。最近、*ab initio*計算によりフェニルスルフォキシド体は脱離反応よりも直接の求核置換反応が起こりやすいことが示されており¹¹、実際の誘起反応性機構の詳細は今後検討の必要がある。

6. 分子設計概念の拡張：遺伝子への特異的官能基転移反応

詳細な反応メカニズムにはまだ検討の余地があるものの、近接効果、分子認識および誘起反応性を基本とする設計概念は、ゲノム標的反応性分子の開発には非常に有効であることが示された。そこで、この概念を拡張し、特異的に官能基を転移する新しい反応性分子を設計した(図5)。このような官能基転移反応を遺伝子に対して配列特異的

および塩基特異的に起こすことができれば、ピンポイントに特定遺伝子を標識化する技術の開発や、遺伝子の転写あるいは翻訳コードを自由に変える技術などへの展開が可能になると期待される。

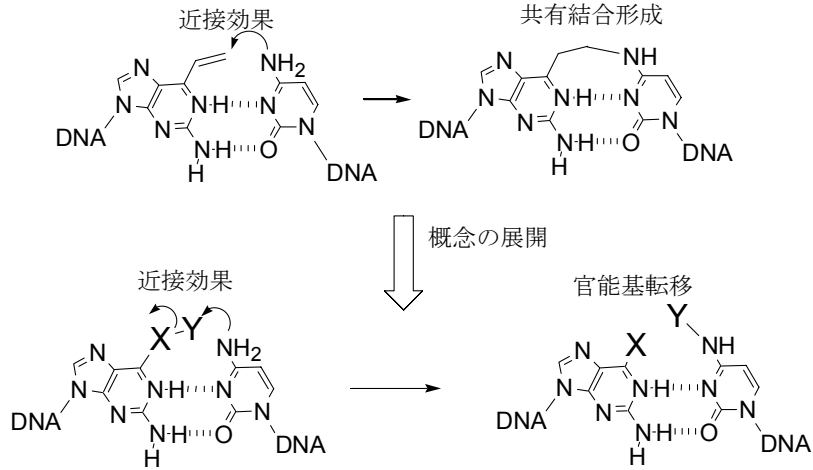


図5. 近接効果によって官能基転移を起こす新しい反応性分子の設計。

官能基転移反応の一例として、最近我々はニトロシル基を配列および塩基特異的に転移させる分子の開発に成功した (図6)¹²。図5の一般式における X=S、Y=NO に相当する S-ニトロシルチオグアノシンをオリゴヌクレオチドに導入した反応性オリゴヌクレオチドを合成し、相補鎖との反応を行ったところ、標的部位にシトシンおよび5-メチルシトシンをもつ相補鎖とのみ速やかな S から N への NO 転移反応が起こった (図6)。標的部位に他の塩基をもつ相補鎖あるいはシトシンを標的部位と異なる位置に持つ相補鎖にはほとんど反応性を示さず、極めて高い反応特異性が示された。また、転移したニトロシル基 (NO) を検出したところ、ほぼ定量的に相補鎖に転移していることが確認された。

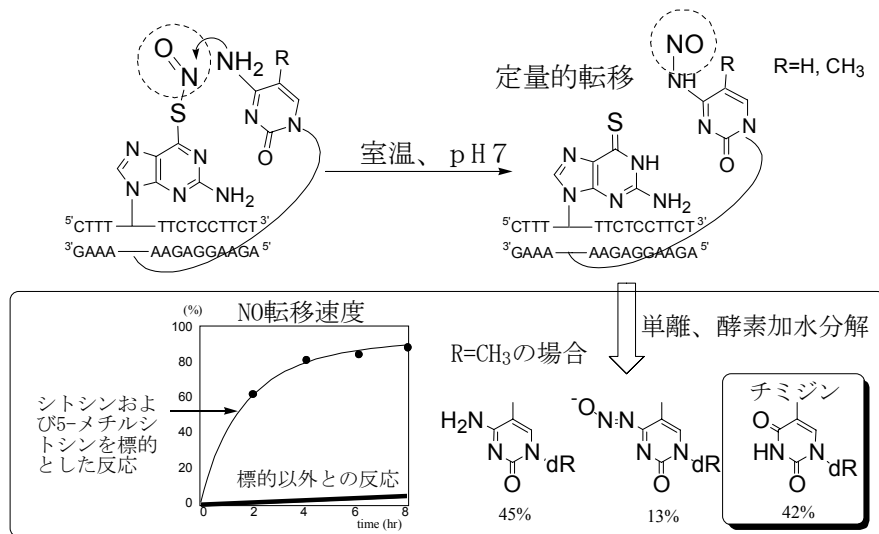


図6. 配列および塩基特異的なニトロシル転移反応および特異的な塩基構造の改変。

一酸化窒素 (NO) およびニトロシル化合物はシトシンのアミノ基と反応し、*N*-ニトロシル体の生成後、脱アミノ化が起こることがわかっている¹³。そこで、*S*→*N* NO 転移反応後、単離精製した相補鎖を酵素加水分解し、ヌクレオシド成分を分析したところ、脱アミノ体が得られることを確認した。特に、標的が5-メチルシトシンの場合、脱アミノ体つまりチミン体が42%の収率で生成することがわかった(図6)。これらの結果から、新しい官能基転移反応により、ニトロシル基が配列特異的にシトシンアミノ基に転移し、さらに選択的脱アミノ化を実現したことが確認された。

[配列および塩基特異的ニトロシル基転移反応の意義]この新しいニトロシル基転移反応は、これまでまったく報告されていない方法であり、基礎的ツールとしても応用面でも極めて重要な意義を持っていると考えられる。基礎的なツールとしては、これまで選択的な合成が不可能であったニトロシル化ヌクレオシドが容易に得られることになり、その点変異について極めて詳細な検討が可能になる。さらに、このニトロシル転移による5-メチルシトシンからチミジンへの化学的塩基変換は、細胞内でも実現可能と考えられるため、DDSなどの関連技術とあわせて化学的遺伝子マニピュレーション技術(図1)としての展開し、最終的には、化学的遺伝子治療法に発展させたいと考えている。

7. おわりに

ポストゲノム時代と呼ばれる現在における新しい有機化学の方向として、我々はゲノム標的化学を提案している。具体的な分子設計指針として、近接効果、分子認識および誘起反応性を考慮する分子設計概念が極めて有効であることを示し、新規のゲノム標的反応性分子としてクロスリンク剤、ニトロシル基転移分子を開発した。現在これらの生体への展開を検討中であり、有機化学でしか創りえない新しい生物機能が創造できることを夢見ている。

ここでは、紙面の関係で、3本鎖DNA¹⁴およびDNAマイナーグループ結合分子¹⁵による遺伝子認識分子については紹介できなかったが、発表ではこれらの研究成果についても紹介する予定である。

謝辞

本研究は、九州大学大学院薬学研究院に平成15年4月に新設された生物有機合成化学分野のメインテーマとして取り組んでいるものです。新しい研究分野の立ち上げに、ともに取り組んできてくれた学生ならびに博士研究員の皆様に、深く感謝いたします。ゲノム標的反応性分子の開発に当たり、着想から具体化まで中心的な役割を担っている永次史助教授に感謝いたします。

本研究は文部(科学)省科学研究費、科学技術振興機構戦略的基礎研究推進事業、九州経済産業局地域新生コンソーシアム研究開発事業などの助成を受けて行ったものでありその資金援助に深く感謝します。

参考文献

- 1) 佐々木茂貴、永次史、遺伝子発現機構を標的とする核酸医薬品の新しい化学、*ファルマシア*、**2003**, 39, 39.
- 2) E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, “*DNA Repair and Mutagenesis*”, ASM Press, Washington DC, 1995.
- 3) S. Sasaki, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, 13, 43.
- 4) a) F. Nagatsugi, K. Uemura, S. Nakashima, M. Maeda, S. Sasaki, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 421, b) F. Nagatsugi, K. Uemura, S. Nakashima, M. Maeda, S. Sasaki, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 3035.
- 5) F. Nagatsugi, T. Kawasaki, D. Usui, M. Maeda, S. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6753.
- 6) F. Nagatsugi, N. Tokuda, M. Maeda, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2577.
- 7) Unpublished results.
- 8) F. Nagatsugi, D. Usui, T. Kawasaki, M. Maeda, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 343.
- 9) F. Nagatsugi, Y. Matsuyama, M. Maeda, S. Sasaki, *Bioorg & Med. Chem Lett.* **2002**, 12, 487.
- 10) Nagatsugi F., Sasaki S., Miller P. S. and Seidman M. M.F. Nagatsugi, S. Sasaki, P. S. Miller, M. M. Seidman, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31(6), e31.
- 11) 山口大工, 堀 憲次先生 私信。
- 12) a) 特願 2003-117589 「チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体」、佐々木茂貴、b) Md. M. Ali, Md. R. Alam, T. Kawasaki, F. Nagatsugi, S. Sasaki, submitted.
- 13) a) Suzuki, T.; Nakamura, T.; Yamada, M.; Ide, H.; Kanaori, K.; Tajima K.; Morii, T.; Makino, K. *Biochemistry* **1999**, 38, 7151, b) Suzuki, T.; Yamada, M.; Nakamura, T.; Ide, H.; Kanaori, K.; Tajima, K.; Morii, T.; Makino K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 10, 1063.
- 14) a) S. Sasaki, H. Yamauchi, F. Nagatsugi, R. Takahashi, Y. Taniguchi, M. Maeda, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6915, b) Sasaki, S.; Taniguchi, Y.; Takahashi, R.; Senko, Y.; Kodama, K.; Nagatsugi, F.; Minoru M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 516
- 15) a) S. Sasaki, T. Shibata, H. Torigoe, Y. Shibata, M. Maeda, *Nucleoside, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2001**, 20, 551, b) M. Tanada, Y. Shibata, Yoshihiro; M. Maeda, S. Sasaki, *Heterocycles*, **2004**, 63, 29.