

# ポスト・ゲノム時代に向けた新しい遺伝子治療薬の開発研究

— アンチセンス・アンチジーン法の実用化に向けて —



研究ノート

今 西 武\*, 小比賀 聡\*\*

Studies on New Gene Therapy Directing Post-genome Period  
— Toward Establishment of Practical Antisense and Antigen Method —

Key Words : nucleic acid analogue, antisense, antigen, gene therapy, post-genome

## 1. はじめに

DNAやRNA等の核酸は塩基間での水素結合を介した相互作用によって、相補的な配列を持ったDNAやRNA鎖と安定な二重鎖を、また場合によっては、準安定な三重鎖構造を形成する。この特性を利用することにより、遺伝子産物としてのタンパク質の発現を特異的に制御することが可能となる。遺伝子DNAからmRNAが転写され、さらにそれが翻訳されてタンパク質となる一連の過程の中で、mRNAからタンパク質への翻訳過程を「短い核酸断片とmRNAとの二重鎖形成」によって制御するのがアンチセンス法、DNAからmRNAへの転写過程を「短い核酸断片とDNAとの三重鎖形成」によって制御するのがアンチジーン法である(図1)。

これらの原理が実用的なレベルに到達できれば、病因となる遺伝子の発現のみを制御することが可能

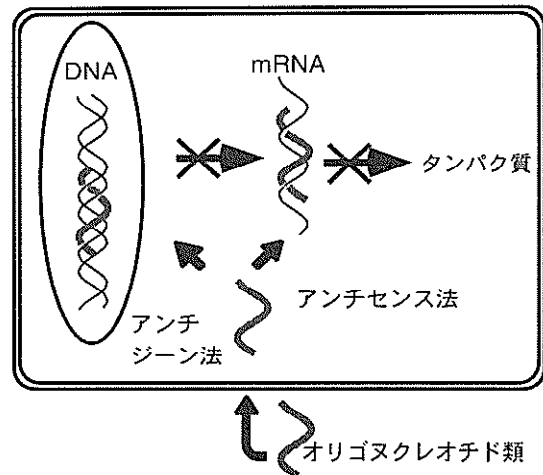
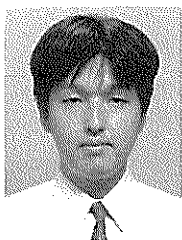


図1 アンチセンス・アンチジーン法の概念図

となり、様々な難治性疾患を短い核酸類縁体の断片(オリゴヌクレオチド類)の配列を変えることにより自在に且つ副作用を伴わずに治療することが可能となる。そのため、優れた機能性材料としての合成オリゴヌクレオチド類の開発研究が世界中で活発に展開されてきたが<sup>1)</sup>、未だに切り札となるものが見い出されていないのが現状である。我々は、標的となるmRNAや二重鎖DNAに対する配列特異性並びに結合親和性を高めるために、天然核酸の糖部の立体的「ゆらぎ」をある方向に固定化することとし、その具体的方法を初めて開発するとともに<sup>2-7)</sup>、この新しい合成核酸ユニットを組み入れたオリゴヌクレオチド類縁体が、期待通り極めて優れたアンチセンス・アンチジーン特性を有していることを見い出している<sup>2, 8-11)</sup>。本稿ではその研究の成果を簡潔に紹介する。



\* Takeshi IMANISHI  
1944年11月29日生  
1972年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了  
現在、大阪大学大学院・薬学研究科、研究科長、教授、薬学博士、生物有機化学  
TEL 06-6879-8200  
FAX 06-6879-8204  
E-Mail imanishi@phs.osaka-u.ac.jp



\*\* Satoshi OBIKA  
1967年7月31日生  
1992年大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程修了  
現在、大阪大学大学院・薬学研究科、助手、薬学博士、生物有機化学  
TEL 06-6879-8202  
FAX 06-6879-8204  
E-Mail obika@phs.osaka-u.ac.jp

## 2. 核酸の糖部立体配座の固定化

核酸はその化学構造上「ゆらぎ」部分を多く持ち、一本鎖状態ではかなりの自由度を有しているが、二重鎖構造においてその自由度は大きく制御される。そのため、一本鎖核酸が二重鎖を形成する場合、あるいは一本鎖核酸と二重鎖核酸が三重鎖を形成する際にはエントロピー的に大きく不利となる。また、DNA-DNA二重鎖において糖部の立体配座は概ねS型となるが、RNA-RNA二重鎖ではこれとは逆にN型で存在している(図2)。さらに、二重鎖DNAに対してオリゴヌクレオチド類が三重鎖を形成する際には、その糖部立体配座がN型であること

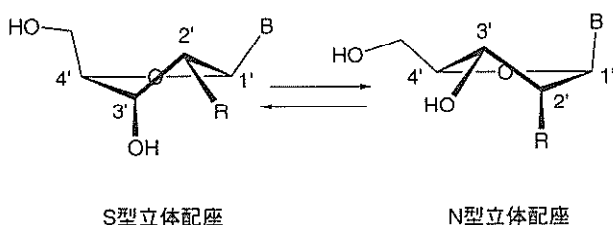


図2 核酸の糖部立体配座

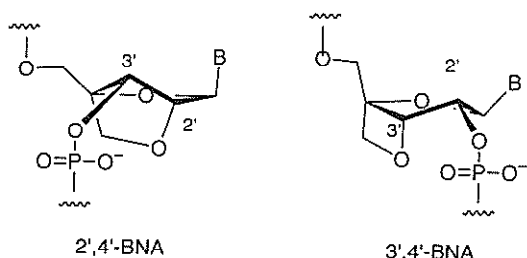


図3 BNAの構造

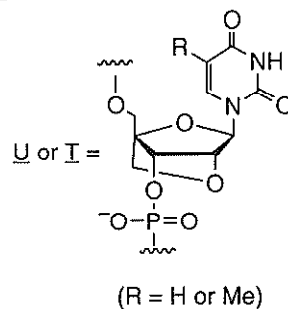
が望ましいとも言われている。従って、アンチセンス・アンチジーン法に供するオリゴヌクレオチド類縁体の分子設計においては、予め糖部の立体配座をN型に固定化しておけば熱力学的観点から有利であることが容易に理解できる。そこで我々は、RNAの2'位水酸基と4'位炭素原子間をメチレン鎖にて架橋した新しい核酸類縁体2'-O, 4'-C-Methylene Bridged Nucleic Acid(2', 4'-BNA)を設計し、その合成に成功した<sup>2,4,5,7)</sup>(図3)。これとは別に、糖部立体配座がS型で、且つ一般の核酸とは異なる2', 5'-リン酸ジエステル結合を持つ3', 4'-BNA(図3)についても非常に興味深い知見を見出しているが<sup>2,3,6,9)</sup>、ここではその詳細は割愛し、2', 4'-BNAのアンチセンス・アンチジーン特性について述べたい。

## 3. 2', 4'-BNAの二重鎖形成能

一般に、核酸塩基のスタッキングによりUV吸収強度は減少する(淡色効果)ため、二重鎖DNA(或いはRNA)溶液の温度を緩やかに上昇させると、UV吸収強度がある特定の温度で急激に上昇する。これは秩序的な二重らせん構造が崩れるためである。この際の転移の中間点が融解温度( $T_m$ )と呼ばれており、二重鎖核酸の安定性の指標として幅広く用いられている<sup>40)</sup>。そこで、得られた人工オリゴヌクレオチド類の相補鎖DNA並びにRNAに対する二重鎖形成能について、融解温度( $T_m$ )を指標に検討を加えた。その結果、2', 4'-BNA型修飾を施したオリゴヌクレオチド類(以後、2', 4'-BNAオリゴヌクレオチド)は、相補鎖核酸に対して極めて高い結合親和性を示した<sup>8)</sup>(表1)。特に相補鎖RNAに対する $T_m$ 値の上昇はこ

表1 2', 4'-BNAオリゴヌクレオチドと相補鎖RNAあるいはDNAとの $T_m$ 値(°C)

オリゴヌクレオチド	標的配列	
	相補鎖RNA	相補鎖DNA
5'-d(GCGTTTTTTGCT)-3'	45	47
5'-d(GCG <u>U</u> TTTTGCT)-3'	49 (+4)	50 (+3)
5'-d(GCGTT <u>U</u> TTTGCT)-3'	49 (+4)	49 (+2)
5'-d(GCGTTTT <u>U</u> TTGCT)-3'	50 (+5)	49 (+2)
5'-d(GCGTTTTT <u>U</u> GCT)-3'	51 (+6)	52 (+5)
5'-d(GCG <u>U</u> TTTTGCT)-3'	53 (+4)	51 (+2)
5'-d(GCGTT <u>U</u> TTTGCT)-3'	53 (+4)	50 (+1.5)
5'-d(GCGTTTT <u>U</u> UGCT)-3'	55 (+5)	54 (+3.5)
5'-d(GCG <u>U</u> UUUUUGCT)-3'	71 (+4.3)	58 (+1.8)
5'-d(GCGTTTTTTGCT)-3'	80 (+5.9)	67 (+3.3)



れまでに知られている核酸類縁体には類を見ないほど優れたものであった。相補鎖RNAに対してこのように極めて高い結合親和性を示したのは、2', 4'-BNAの糖部立体配座がRNAと同じN型に厳密に固定化されており、二重鎖形成時にエントロピー的に非常に有利に働いたものと考えられた。そこでこのことを検証するために、二重鎖形成時の熱力学的パラメータを測定したところ、予想通り2', 4'-BNAオリゴヌクレオチドは、相補鎖RNAとの二重鎖形成時にエントロピー的に有利となっていることが確認された<sup>8)</sup>。

#### 4. 2', 4'-BNAの三重鎖形成能

ホモピリミジン配列を有するオリゴヌクレオチド類は、図4に示したHoogsteen型水素結合によりDNA二重鎖中のホモプリン領域に配列特異的に結合し三重鎖を形成することが知られている<sup>12)</sup>。しかし、Hoogsteen型水素結合ではグアニン・シトシン塩基対に結合する三本鎖目のシトシン塩基の3位

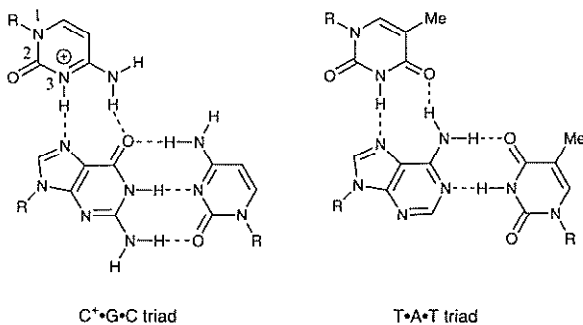


図4 Hoogsteen型水素結合

窒素原子がプロトン化される必要があるため、生理的条件下で安定な三重鎖を形成させることは困難であるとされている。シチジンの5位をメチル化した5-メチルシチジン(mC)を用いることによりこの問題はある程度解消されるが、アンチジーン法の実用化を考えた場合、この安定化の寄与はまだ不十分であると言わざるを得ない。そこで、2', 4'-BNAオリゴヌクレオチド類の三重鎖形成能について、 $T_m$ 測定により評価を行った<sup>2)</sup>(表2)。その結果、天然のオリゴヌクレオチドは弱酸性条件(pH6.6)並びに中性条件(pH7.2)のいずれにおいても標的DNAと結合することはできないが、シチジンを5-メチルシチジンに置換したオリゴヌクレオチドは、pH6.6において三重鎖を形成し得ることが確認できた。一方、2', 4'-BNAオリゴヌクレオチド類では三重鎖形成能の大幅な向上が認められた。とりわけ、シトシン塩基の5位メチル化を併用した2', 4'-BNAオリゴヌクレオチド類では、pH7.2においても顕著な三重鎖形成能を示した。さらに、DNase I フットプリント法やゲルシフト法により、この2', 4'-BNAオリゴヌクレオチド類の三重鎖形成能は配列特異的であり、且つその親和性は天然のオリゴヌクレオチド類と比べ少なくとも300倍以上優れていることが明らかとなった<sup>2)</sup>。

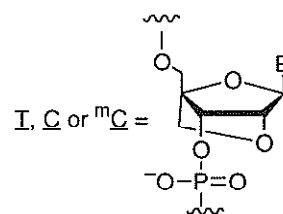
#### 5. おわりに

核酸の糖部立体配座を望ましい形に予め固定化しておくという新しいコンセプトに基づき設計・合成された2', 4'-BNAは、我々の期待をはるかに上回る

表2 2', 4'-BNAオリゴヌクレオチドと標的DNAとの $T_m$ 値(°C)

標的DNA: \_\_\_\_\_  
 5' -d (GAACAAACAGAGAGAGGGAAAATCCCCCTA) -3'  
 3' -d (CTTGTTTGTCTCTCTCCCTTTTAGGGGGAT) -5'

オリゴヌクレオチド	pH	
	6.6	7.2
5'-d(TCTCTCTCCCTTTT)-3'	- (64)	- (64)
5'-d(T <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTTT)-3'	28 (63)	- (63)
5'-d(ICTCTCICCCITTT)-3'	39 (64)	23 (63)
5'-d(I <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTTT)-3'	53 (64)	36 (65)
5'-d(ICICICICCCITTT)-3'	41 (64)	- (64)
5'-d(I <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTTT)-3'	54 (64)	37 (64)
5'-d(TCTCTCTCCCTTTT)-3'	41 (64)	- (63)
5'-d(T <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> CT <sup>m</sup> C <sup>m</sup> CTTTT)-3'	55 (64)	33 (64)
5'-d(ICICICICCCITTT)-3'	48 (63)	28 (63)



優れたアンチセンス・アンチジーン特性を示した。本稿では十分にふれることができなかったが、アンチセンス・アンチジーン法の実用化に向けては、オリゴヌクレオチド類縁体が生体内でいかに安定に存在できるかという点も極めて重要である。我々は2', 4'-BNAが天然のDNAに比べて生体内での安定性にも優れていることを既に見い出している<sup>2)</sup>。現在、がんやC型肝炎をはじめとする様々な疾病の原因遺伝子を標的とし、新しい遺伝子治療薬の開発に向けた研究を展開している。

#### 参 考 文 献

- 1) Uhlmann, E. ; Peyman, A. *Chem. Rev.* 1990, *90*, 543-584 ; Beaucage, S. L. ; Iyer, R. P. *Tetrahedron* 1993, *49*, 6123-6194 ; Fox, K. R. *Curr. Med. Chem.* 2000, *7*, 17-37.
- 2) Imanishi, T. ; Obika, S. *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* 1999, *57*, 969-980
- 3) Obika, S. ; Morio, K. ; Nanbu, D. ; Imanishi, T. *Chem. Commun.* 1997, 1643-1644.
- 4) Obika, S. ; Nanbu, D. ; Hari, Y. ; Morio, K. ; In, Y. ; Ishida, T. ; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* 1997, *38*, 8735-8738.
- 5) Obika, S. ; Andoh, J. ; Sugimoto, T. ; Miyashita, K. ; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* 1999, *40*, 6465-6468.
- 6) Obika, S. ; Morio, K. ; Hari, Y. ; Imanishi, T. *Chem. Commun.* 1999, 2423-2424.
- 7) Obika, S. ; Hari, Y. ; Morio, K. ; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* 2000, *41*, 215-219.
- 8) Obika, S. ; Nanbu, D. ; Hari, Y. ; Andoh, J. ; Morio, K. ; Doi, T. ; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* 1998, *39*, 5401-5404.
- 9) Obika, S. ; Morio, K. ; Hari, Y. ; Imanishi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, *9*, 515-518.
- 10) Obika, S. ; Hari, Y. ; Morio, K. ; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* 2000, *41*, 221-224.
- 11) Obika, S. ; Hari, Y. ; Sugimoto, T. ; Sekiguchi, M. ; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* 2000, *41*, 8923-8927.
- 12) Moser, H. E. ; Dervan P. B. *Science* 1987, *238*, 645-650 ; Le Doan, T. ; Perrouault, L. ; Praseuth, D. ; Habhoub, N. ; Decout, J. L. ; Thuong, N. T. ; Lhomme, J. ; Hélène, C. *Nucleic Acids Res.* 1987, *15*, 7749-7760.

