

ゲノム修復型遺伝子治療を指向した、機能性DNAドラッグのデザインと創製

●清尾康志

東京工業大学フロンティア創造共同研究センターティア創造共同研究センター

＜研究の目的と進め方＞

本研究では特異な塩基識別能を有する人工核酸の開発とその医学・生物学分野への応用を目的とし、塩基部がアシル化されたオリゴヌクレオチドの合成法の開発、二重鎖形成能、および塩基対形成能の評価を行った。また、分子軌道計算を用いた、人工核酸塩基の塩基対およびスタッキング能の計算化学的手法も用いて、より合理的な分子デザインを行った。

開発すべき人工核酸の性質としては、ターゲットとなる塩基をより高い精度で認識する高精度塩基認識能、およびそれとは逆にミスマッチ塩基を認識するミスマッチ認識能をもった人工核酸塩基の開発を目指した。高精度な塩基認識は、より正確にターゲット核酸を検出するために遺伝子検出用プローブとして、PCRやDNAチップへの応用が可能である。また、ミスマッチ塩基認識能をもった人工核酸塩基については、生体内のミスマッチ修復系タンパク質により強固に結合する可能性を考慮し、ミスマッチ修復系によるゲノム修復を利用した新しいDNAドラッグの開発を目指した。

常に低いため、実用化にはいたっていない。

＜研究開始時の研究計画＞

1. N-カルバモイルおよびN-アルコキシカルボニルシトシンを含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成法の開発とハイブリダイゼーション能の解析
2. N-アシルシチジンヌクレオシドの誘導体合成
3. 人工核酸の遺伝子修復タンパクMutSとの相互作用解析

＜研究期間の成果＞

1. 合成ターゲットとしてまず、下記のN-カルバモイルシトシンおよびN-アルコキシカルボニルシトシンを含むホスホロアミダイトユニットの合成検討を行った(図1)

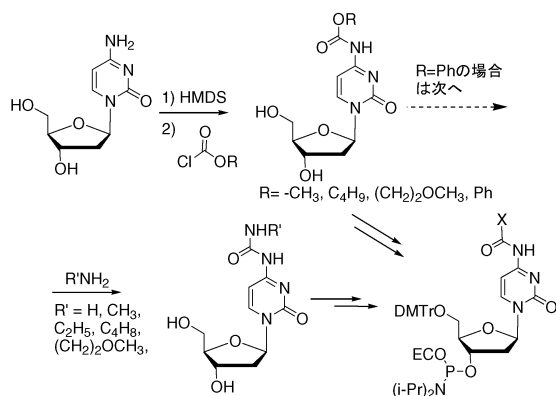


図1

いずれの化合物もデオキシシチジンから短工程でかつ収率よく合成することができた。得られたホスホロアミダイトを用いて合成することができた。これらのホスホ

ロアミダイトを用いてオリゴヌクレオチドを合成し、そのハイブリダイゼーション能を評価した。

まずオリゴヌクレオチド中のアルコキシカルボニルシチジン(ROC(O)dC)とグアニンとの塩基対は天然のG-C塩基対に匹敵する強度を有していることが分かった。また興味深いことに、RocdCはアデニンとも非常に安定な塩基対を形成することが分かった。(表1)

T_m value (°C) of 5'-d(TTTTTCCT*TTTTCCT)/d(AAAAAAXAAAAA)

	X=G	X=A
天然型 C	41.2	30.2
R=-CH ₃	42.9	36.0
R=-C ₂ H ₅	39.8	35.1
R=-(CH ₂) ₂ OCH ₃	39.7	34.3

表1

また、同様にオリゴヌクレオチド中のカルバモイルシチジン(R'NHC(O)dC)とグアニンとの塩基対について調べたところ、こちらもグアニンとは天然型シトシンとほぼ同等の塩基対を形成し、かつアデニンと著しく安定なミスマッチ塩基対を形成することがわかった。(表2)

T_m value (°C) of 5'-d(TTTCTCC*TTCTCT)/d(AAAGAGXAAGAGA)

	X=G	X=A
天然型 C	52.1	32.5
R=H	50.2	38.1
R=-CH ₃	50.2	39.0
R=-C ₂ H ₅	49.1	38.9
R=-C ₄ H ₉	47.8	38.1
R=-(CH ₂) ₂ OCH ₃	48.5	37.2

表2

これらの結果からアルコキシカルボニルおよびカルバモイル基でシトシン塩基を修飾すると、アデニンとのミスマッチ塩基対を安定化させる効果を有することが明らかとなった。

そこで、このミスマッチ塩基対の構造を明らかにするために、アルコキシカルボニル修飾のひとつである、メトキシカルボニル体を用いて、塩基対構造の解析を有機溶媒中のヌクレオシドレベルでの1H-NMRスペクトルにより行った。その結果、アルコキシカルボニルシトシンは天然型のシトシンとアデニンとが中性条件の水溶液中でとっている構造であるreverse-wobble型塩基対を形成していることが示唆された(図2)

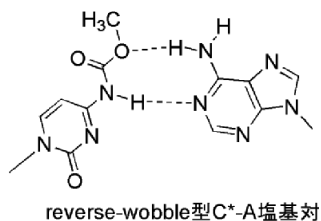


図2

また、オリゴヌクレオチド中でも同様のreverse-wobble型塩基対を形成していることを確かめるために、メトキシカルボニルシトジンとアデニンとのミスマッチを含む二本鎖DNAのT_mを、pHを変えて測定した。一般に天然型のC-AミスマッチはpHが低いほうから高いほうに上昇するにつれてアデニンをプロトン化された安定なwobble型塩基対から不安定なreverse-wobble型塩基対へと変化する。これに従い、二重鎖のT_mが低下することが知られている。

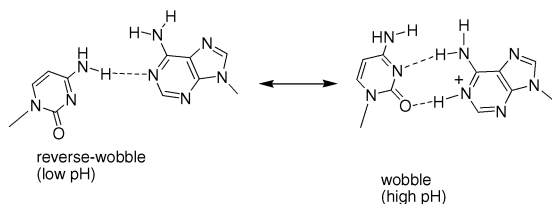


図3

一方、メトキシカルボニルシトジンを導入した上記のd(TTTTTTC*TTTTT)/d(AAAAAAAAAA)のT_mはpH5.5から7.0の範囲でほとんど一定であった。この結果からもメトキシカルボニルシトジンなどのアルコキシカルボニルシトジンwobble型の塩基対を形成せずオリゴヌクレオチド中でも、reverse-wobble型塩基対を形成するユニークな人工核酸塩基であることが示唆された。

そこでこの、ミスマッチ塩基対形成能をさらに高めるために、カルバモイル型化合物の構造をさらに修飾し、カルボニル基の配向を固定化した、二環性核酸塩基、ジヒドロピリミドピリミジン塩基 (hpp) をデザインし合成を検討した。

その構造と合成法を図4に示した。

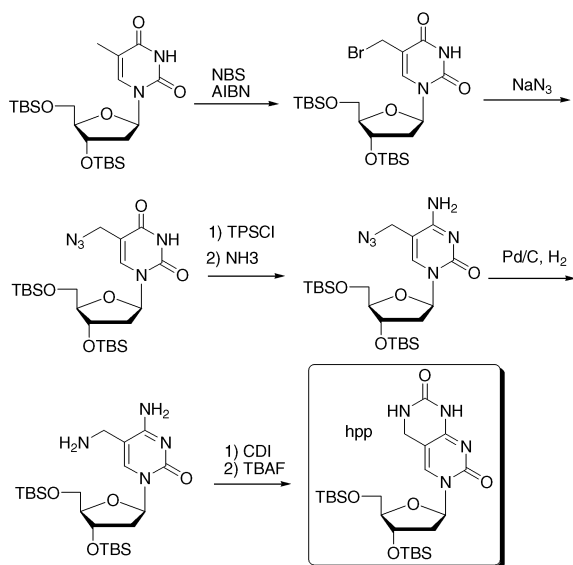


図4

合成したhppをホスホロアミダイトに誘導し、オリゴヌクレオチドに導入し、そのT_mを測定した(表3)。

T_m value (°C) of 5'-d(CGCAATC*TAACGC)/d(GCGTTAXATTGCG)

	X=G	X=A
天然型 C	57.1	40.6
hpp	58.2	50.8

表3

グアニンとの塩基対についてはシトシンとhppとでは1.1°Cか差がなかったが、Aとのミスマッチについては、hppの方が10.2°C安定であった。これからhppが予想通りアデニンとのミスマッチを著しく安定化するの効果を有していることがあきらかとなった。

そこでhppにより安定化されたC-Aミスマッチ塩基対とミスマッチ修復系タンパク質であるMutSタンパク(好熱菌由来)との相互作用を調べることにした。

これまでに報告されたMutSタンパクとG-Tミスマッチを含む二本鎖DNAとの構造生物学的な研究では、G-Tミスマッチが通常のWobble塩基対ではなくreverse-wobble型塩基対に似た特異な構造をとっていることがわかってきた。したがって、reverse-wobble型で安定な塩基対を形成するhpp-AミスマッチもMutSタンパクに強く認識されると考えた。

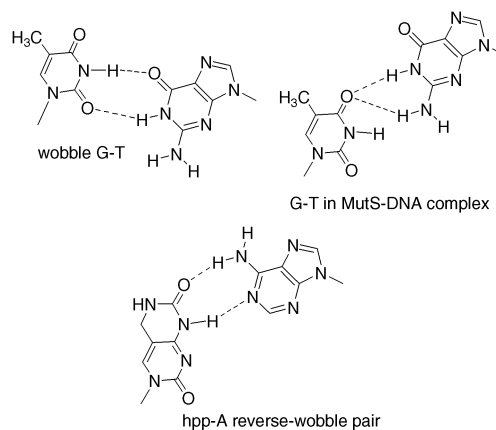


図5

実際にhppを含む下記二本鎖DNA

GCATACGGAAGTTAAC*GTGCGGATCATCTCTAGCC
CGTATGCCTTCAATTA CACGCCTAGTAGAGATCGG

とMutSと混合し、ゲルシフトアッセイにてその結合を解析した。その結果、予想に反して、MutSとhpp-A塩基対の相互作用はmutSとC-Aミスマッチとの相互作用と同等がやや弱い程度であることがわかった。

この研究の後になって、MutSとC-Aミスマッチを含む二本鎖DNAとのX線結晶解析構造が報告され、この複合体中でC-Aミスマッチはこれまで二本鎖中で知られていた構造とは全く異なり、アデニンがsyn型配向をとった特異な構造をとっていることが分かった。これから、hpp-AミスマッチがmutSに認識されにくかったのは、hppによりreverse-wobble型塩基対が安定化されたため、かえってアデニンがsyn配向にコンホメーション変化されにくかったからだと予想される。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究を通して、起案者は特異な化学構造を有するアルコキシカルボニルシトジンおよびカルバモイルシトジンの合成法を確立し、その性質を詳細に調べた。これまで核酸のアミノ基は塩基対を形成する際の水素結合サイトとして必要不可欠であるため、この部位に化学修飾を

ほどこすことはワトソンクリック型塩基対の安定性を損なうと考えられていた。しかし、本研究から明らかになったように、核酸塩基アミノ基へのアシル型修飾は、ワトソンクリック型塩基対の安定性をそこなわないことに加えて新たな塩基対形成能（本研究においてはミスマッチ塩基対安定化能）などを付与することができ、人工塩基の塩基対形成能をモジュレートする簡便で有効な方法であることが始めてあきらかになった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本起案研究で開発したhppは予想に反して、ミスマッチ修復酵素MutSとの相互作用を安定化することはできなかった。本研究を開始した当時はMutSとC-Aミスマッチを含む二本鎖DNAとのX線結晶解析構造の報告がなく、構造に基づいたデザインができなかったことが理由である。今後はこれらの構造情報に基づき、より合理的な分子デザインが必要である。

〈今後の課題〉

本研究ではhppをはじめ種々のアルコキシカルボニル型およびカルバモイル型ヌクレオシドの合成法とオリゴヌクレオチドへの導入法を確立した。カルバモイルシチシン合成の知見をもとに、h p pの他に以下のようなユニークな構造と特性をもつヌクレオシドを合成されている。

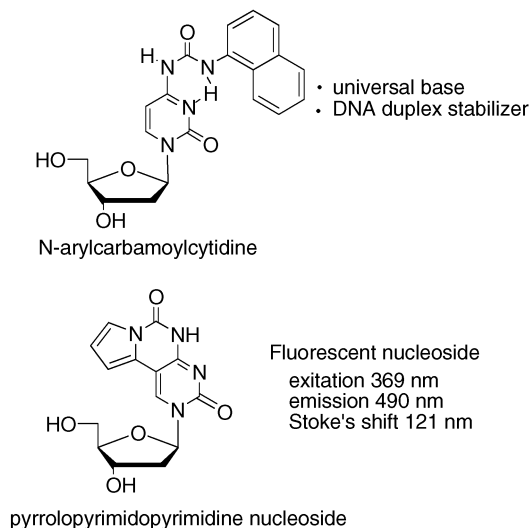


図 6

4-N-アリアルカルバモイルシチジンはインターカレート型ユニバーサル塩基としての性質をもち、A, T, G, C全ての塩基を同等の強さで認識するため、遺伝子のクローニングやハイブリダイゼーションプローブとして有用である。また、この塩基をDNAチップ上のプローブの両末端に導入することでDNAチップ上でのプローブのハイブリダイゼーション効率を向上することが可能である。またpyrrolopyrimidopyrimidine (PPP)は大きなストークスシフトと強い発光をするもつユニークな蛍光ヌクレオシドであり、オリゴヌクレオチドに導入することで、核酸のハイブリダイゼーションプローブや構造プローブとして有用である。

これら、本研究から得られたカルバモイル型シチジンの特性を活用した人工核酸の開発や、シチジン以外の核酸塩基をアシル基で修飾して塩基対形成能のモジュレートで、医学・生物学的に有用な人工核酸や、高精度塩基認識能を有する、高精度人工核酸などによる遺伝子検出法の開発が望まれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0303281324
Miyata, K., Kobori, A., Seio, K., Sekine, M., Hybridization ability and base pair geometry of modified deoxycytidine derivatives having a 4-N carbamoyl group, *Nucleic Acids Research Supplement*, 2, 161-162 (2002).
- 0303281344
Seio, K., Utagawa, E., and Sekine, M., A new protecting group for 5'-hydroxyl function in oligonucleotide synthesis without acid treatment utilizing unique properties of tritylthio group, *Nucleic Acids Research Supplement*, 2, 27-28 (2002).
- 0303281336
Ukawa, H., Seio, K., and Sekine, M., Computational analysis of stacking interactions between 3-nitropyrrole and natural nucleobases, *Nucleic Acids Research Supplement*, 2, 173-174 (2002).
- Seio, K., Kumura, K., Bologna, J.-S., and Sekine, M., Enhanced Stereoselectivity in Internucleotidic Bond Formation by the Effective use of the Potential of the Chiral Ribose Moiety of Thymidine, *J. Org. Chem.* 68, 3849-3859 (2003).
- 0404081441
Seio, K., Sasaki, T., Sekine, M. Fine-tuning of acid susceptibility of 4, 4'-dimethoxytrityl ether derivatives by a methoxy group introduced via a styryl substituent. *Letters Org. Chem.* 1, 159-162 (2004)
- 0404081450
Seio, K., Ukawa H., Shohda, K., Sekine, M. Important factors stabilizing stacking interaction between 3-nitropyrrole and natural nucleobases revealed by ab initio calculations. *Nucleic Acids Res. Supplement* 3, 49-50 (2003)