

外部刺激応答性機能核酸の創製

ターゲット核酸との錯体形成と解離を、極僅かな温度や pH 変化により可逆的に制御可能な、ペプチドリボ核酸 (PRNA) と名付けた次世代の人工核酸を設計・合成した。PRNA は DNA と塩基配列特異的に非常に安定な錯体を形成すると共に、錯体形成・解離は可逆的に制御可能であり、ガン細胞で特異的に機能するアンチセンス RNA 医薬などへの展開が期待される。

Key Words: 人工核酸・外部刺激応答性・認識制御・遺伝子治療・配向制御

大阪大学大学院工学研究科分子化学専攻¹・PRESTO「合成と制御」JST²・エントロピー制御プロ ICORP JST³

和田健彦^{1,2}・井上佳久^{1,3}

E-Mail : hiko@chem.eng.osaka-u.ac.jp

はじめに

2003 年 4 月 14 日ヒトゲノム配列決定計画の完了が宣言され¹⁾、タンパク質工学、核酸化学、糖鎖工学を中心とした生命化学は、ファンクショナルゲノム、プロテオーム、グライコームそしてバイオインフォマティクスなどと総称されるゲノムシークエンスデータに基づく新しい研究としてより一層注目され、最も精力的に研究される分野の一つとなっている。すでに暫定ゲノム解析の結果により、疾患遺伝子、ガン遺伝子などの疾病遺伝子のみならず、数々の機能性遺伝子・遺伝子配列が明らかにされている。しかし、バイオインフォマティクスにおいて、機能分子としてタンパク質 (プロテオーム) や糖質 (グライコーム) を主な対象としており、遺伝子・核酸はその単なる設計図としてしか意識されていないように思われる。すなわち、核酸は動的な機能分子としてではなく、静的な情報蓄積分子として考えられる傾向にある。しかし、核酸には酵素機能を有するリボザイムや miRNA、RNAi、siRNA そしてアプタマーをはじめとする多彩で、動的な機能を有する分子も多数知られるようになってきた。ところが核酸を現実的な機能分子・機能材料として応用展開するためには、RNA や DNA の糖-リン酸ジエステル骨格が有する、酵素耐性が低く化学的にも不安定で、水以外の溶媒に対する溶解性が低く有機溶媒の添加などにより容易に変性を受けてしまうなどの問題が大きな障害となり、アンチセンス分子や医用材料を含めても実用的な材料開発には至っていない²⁾。

これらの問題を解決し、サブナノからナノレベルの分子サイズを有する核酸を、より安定な機能分子として医学・薬学、そして分子生物学・バイオテクノロジーなどに活用するため、核酸の持つ骨格構造をエステル・アミド、そして炭素-炭素結合などのより安定な骨格構造に変換した誘導体である、核酸モデル化合物の開発が必要となる。このようなバイオロジー関連分野への適応を意識した生体機能モデル化合物の開発は、広くバイオナノテクノロジーと呼ばれることも多い。特に核酸モデルは、DNA 自動合成機などで合成された天然核酸と同じ骨格を有する「合成核酸」と区別するため、「人工核酸」と総称されることもある。一方、アンチセンス分子、アンチジーン、デコイ RNA などとして現在広く用いら

れているリン酸ジエステル部の酸素をイオウ、窒素などで置換した phosphorothioate や phosphoramidate などは、人工核酸と区別するため「修飾核酸」と呼ばれることが多い。

人工核酸とは・・・

人工核酸は DNA の二重らせん構造発見から約 15 年後、1960 年代のおわりに Jones と Walker ら、Kaye らがそれぞれヌクレオシドを用いたポリヌクレオチドモデルを報告したことにはじまり、その後竹本、Overberger, Pitha らのグループが核酸塩基を導入したビニルポリマー や、ポリアミノ酸を中心に種々の構造を有する誘導体が開発され、徐放性や制御放出を目指した高分子医薬としての応用が検討されたものの、主に機能性高分子として工業材料への応用展開を中心に研究が展開され²⁾、生化学、バイオテクノロジー関連分野への人工核酸の応用展開研究は、積極的に検討されているとは言い難い状況であった。

人工核酸を用いた生命化学、医学、薬学などバイオテクノロジーにおける一つの大きなターゲットは、遺伝子治療薬剤、特にアンチセンス RNA、アンチジーン療法への適用である。昨年ヒト全ゲノム配列決定が完了し、その解析が進むことにより非常に多くの重要な情報が得られることが期待されている。すでに暫定ゲノムの解析結果により³⁾、多くの疾患・疾病遺伝子、ガン遺伝子などの病因遺伝子の配列が明らかとされ、疾病・疾患の発病と対象遺伝子の一塩基多型 (SNPs) を中心とした遺伝子配列多型との相関が、現在精力的に研究されている。病因遺伝子群の SNPs と発病との相関が明らかになれば、遺伝子診断や薬剤感受性に対する予測・判別が可能となり、オーダーメイド医療・予防治療の実現が期待される。さらにこれらの遺伝情報に基づき、次世代の治療法として注目されている積極的な遺伝情報発現制御に基づく遺伝子治療法の実現も期待される。特に外部から加えた核酸誘導体に代表される塩基配列特異的核酸結合分子により、疾病・疾患特有タンパク質合成やガン細胞などの増幅に不可欠なタンパク質合成を mRNA の段階で抑制することにより治療する、アンチセンス RNA 法、より根本的に核内の二重らせん DNA に結合し転写段階を阻害することにより治療しようとするアンチジーン法が検討されている。アンチジーン核酸法は、大きくアンチセンス法に含まれることも多い。

1970 年代後半にオリゴヌクレオチドや修飾オリゴヌクレオチドを用いたアンチセンス法の検討により、その有用性が一部実証されたが、酵素分解などによりアンチセンス分子として使用されたオリゴヌクレオチド類が迅速に分解されてしまうため、再現性に乏しく、安定した機能発現は報告されていない。これらアンチセンス法は核酸レベルでのタンパク質合成抑制を目的としているため、遺伝子の複製・転写・翻訳のどの過程を阻害することも可能で、ゲノムシーケンスに基づく医学分野への応用はもちろん、分子生物学や遺伝子工学など様々な分野から注目されている。アンチセンス分子としてオリゴヌクレオチドを用いた際の根本的な問題を解決するため、1) 高い核酸塩基配列認識能、2) ターゲット DNA・RNA とのコンプレックスの高い安定性、3) 化学的、特に酵素的な (細胞内) 安定性、4) RNA とのコンプレックスが RNaseH の基質となる、5) 高い細胞膜透過性、6) タンパク質など存在下における核酸との選択的相互作用性、などの特性を有するアンチセンス分子の創製を目指し、天然核酸の塩基部、糖部、リン酸ジエステル部を化学修飾した膨大な種類に上る「修飾核酸」が合成化学的な見地から精力的に検討され、膨大な数に上る化合物群が報告されている。しかし、人工核酸を用いた実用的な研究例はまだまだ少なかった³⁾。

ペプチド核酸 (PNA) ならびにその誘導體

1991年に Nielsen らにより *N*-2-アミノエチルグリシンを主鎖骨格とするペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid; PNA) が報告され (図 1)⁴⁾、状況は一変した。PNA は相補的な一本鎖 DNA/RNA と、Watson-Crick 型塩基対形成に基づく安定な二重らせん錯体を形成する。PNA が DNA と形成する錯体の融解温度 (T_m) は、対応する DNA・DNA 錯体のそれに比較して一塩基対あたり 1~5°C も高く、非常に安定な錯体を形成することが報告されている。さらに PNA・DNA 錯体は、1ヶ所のミスマッチ塩基の存在により T_m が 8~20°C も低下し、優れた塩基配列認識性を示すことも明らかとなった。この一塩基のミスマッチによっても錯

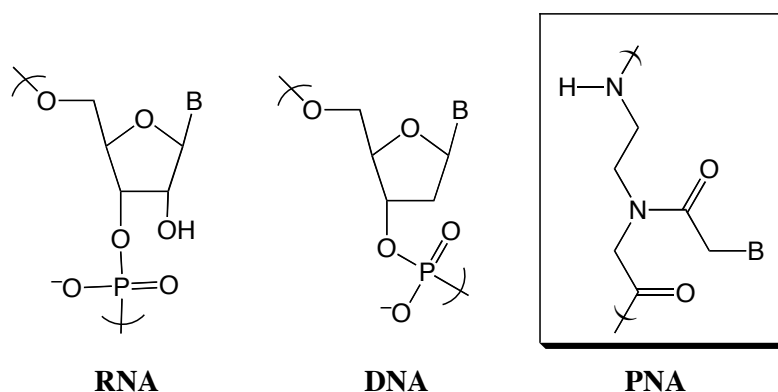


Figure 1 DNA, PNA, and PNA. (天然核酸と人工核酸の構造の一例)

体安定性が大きく低下するのは、PNA の主鎖骨格がポリアミド骨格であり比較的剛直で、局所的な主鎖コンホメーション変化がミスマッチ塩基により誘起され、その結果ミスマッチ塩基近傍の塩基対も解離することに基づくと考えられている。

また、二重らせんを形成している DNA・DNA 錯体に PNA を添加すると、その塩基配列に応じて多彩な三重鎖錯体が形成されることが報告された⁵⁾。例えば DNA (ホモプリン配列)・DNA (ホモピリミジン) 錯体に、チミン塩基がリッチなホモピリミジン配列を有する一本鎖 PNA を添加すると、ホモピリミジン DNA 鎖が PNA の添加により解離し、添加した PNA が相補的な DNA 鎖と Watson-Crick 型塩基対 (・で表す、図 3) 形成により鎖交換反応の起こった strand invasion 型とよばれる PNA・DNA 錯体を形成すると共に、もう一本の PNA 鎖が Hoogsteen 型水素結合により PNA・DNA 二重らせん錯体と相互作用し、PNA・DNA*PNA 型三重鎖錯体が形成される。

PNA の代表的な優れた特性は、1) アミド骨格を有するためヌクレアーゼに対してはもちろん、プロテアーゼなどに対しても耐性を示し、高い酵素耐性ならびに化学的安定性、2) PNA・DNA、PNA・RNA 錯体共に天然核酸錯体に比較して非常に高い安定性、3) ミスマッチ塩基導入により大きく低下する錯体安定性、すなわち高い塩基配列選択性、である。

このように優れた特性・機能を示す PNA であるが、ポリアミド主鎖に複素環である核酸塩基をグラフトしたオリゴマーであると考えれば当然ではあるが、水に対する溶解性が比較的 low、現実に用いられるのは 18 量体程度までで、自己会合性も強く疎水性に基づくタンパク質や酵素類との非特異的吸着も無視できず、疎水性に起因すると考えられている膜透過性の欠如など深刻な問題も併せ持つ。またターゲット DNA/RNA との錯体形成においても、PNA の *N* 末端、*C* 末端と DNA/RNA 鎖の 5'末端、3'末端の方向

性に対する選択性が甘いことも報告され、アンチセンス分子として用いる場合に大きな問題点として指摘されている。また、先に述べたがミスマッチ塩基の存在により PNA・DNA 錯体の安定性は大きく低下し T_m は 8~20°C も低下するが、それでも DNA・DNA 錯体の T_m より高く、ミスマッチを有する PNA・DNA 錯体が、フルマッチ DNA・DNA 錯体より優先して生成してしまうという問題も抱えている。また、現実的なアンチセンス RNA 分子としての適応を考えると、PNA・RNA 錯体が RNaseH の基質となり錯体中の mRNA のみが RNaseH により選択的に切断されることにより、触媒量のアンチセンス分子により効果的な抑制効果を発現することが求められるが、PNA・RNA 錯体は RNaseH の基質とはならないため触媒的には機能できず、mRNA と最低化学量論量の PNA の投与が必要なことが既に報告されている。このような PNA の有する水溶性、核酸認識方向性の問題解決、低い細胞膜透過性の向上、高すぎる安定性の低減、RNA との錯体が RNaseH の基質となることなどを実現するため、図 1 に示した種々の修飾 PNA が報告されている⁶⁾。

PNA のモノマーは一時市販もされ、固相合成や自動合成機を用いて比較的簡便にオリゴマー合成が可能で、さらに依頼合成でも目的オリゴマーを入手することも可能にもなり、細胞膜透過性や各位構成シグナルペプチドとのハイブリット合成などの盛んに研究されている。このため、化学者だけではなく、生化学、バイオテクノロジーそして分子生物学を専門とする研究者でも、カスタム合成の DNA/RNA と同様に PNA を用いた研究に取り組める環境となり、PNA を用いた遺伝情報発現制御に関する多数の報告もなされている。

刺激応答性人工核酸の創製

このように PNA は数々の特性を有し、欠点を克服する PNA 誘導体の研究も精力的に行われている。ところが、従来報告されている PNA も含めたほとんどすべての核酸モデル・人工核酸は、ターゲット DNA・RNA といかに強く結合するか、 T_m の高い錯体を形成するかを目標として設計・合成に力が注がれてきた。しかし、単純な一方向の錯体形成だけではなく、ターゲット DNA・RNA との錯体形成・解離の可逆的制御、すなわち認識・錯体形成能の外部因子・外部刺激による自在で、可逆的制御を実現する人工核酸が開発されれば、アンチセンス治療においても抑制的制御のみならず、遺伝情報の発現・抑制の自在により積極的な制御が可能となり、アンチセンス分子の適用範囲の飛躍的拡大が期待される。また、核酸の

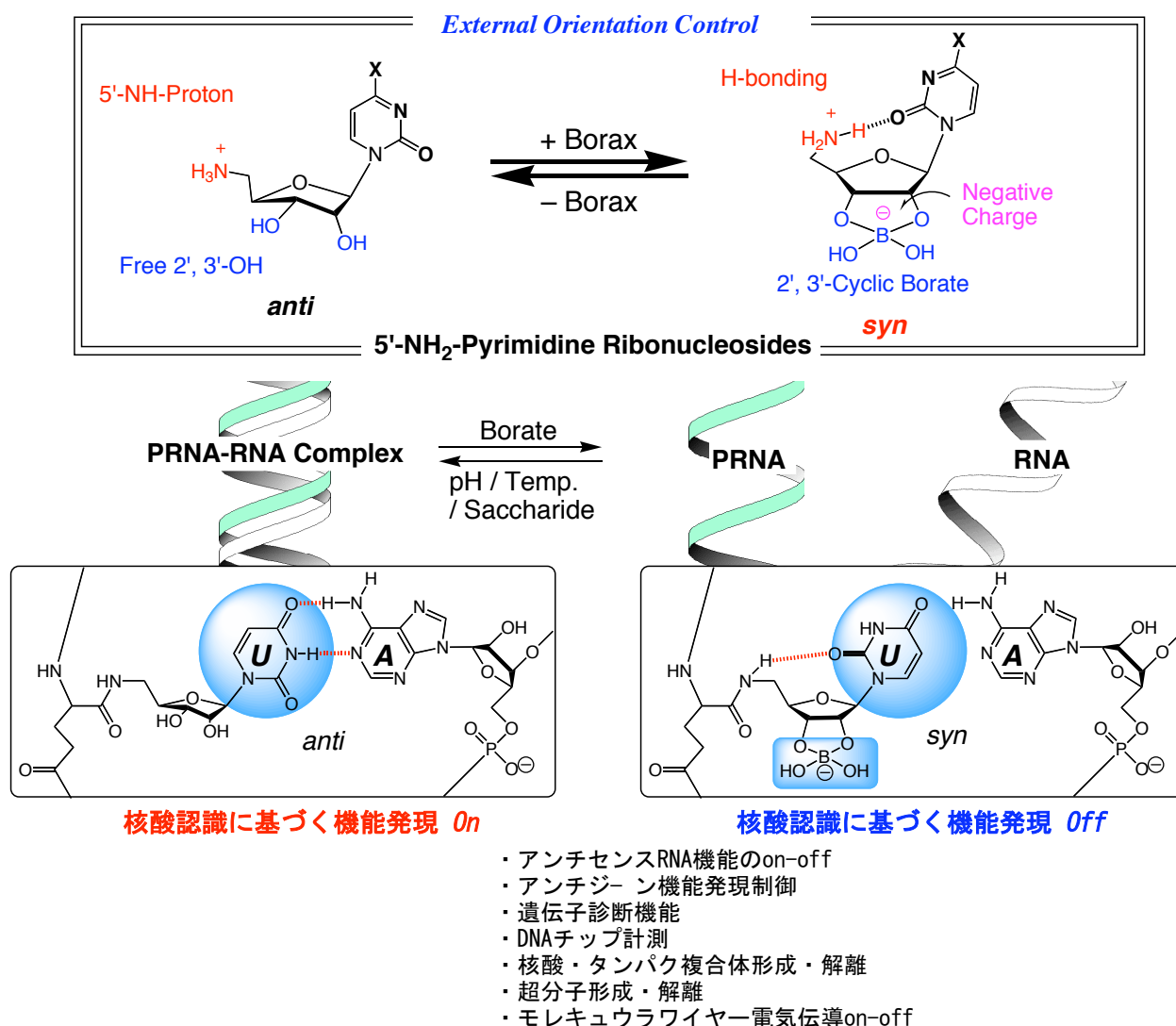


Figure 2 The schematic drawing of reversible control of recognition and complexation behavior of PRNA by borax.

(外部因子により可逆的に相補的核酸と錯体形成・解離制御可能な人工核酸に期待される機能)

分子認識に基づく様々な機能材料への適用においても、材料機能の外部刺激・外部因子による *on-off* スイッチング制御が実現でき、人工核酸の材料展開も大幅に加速されることが期待される (図2)。

このコンセプトを実現するためには、外部からの刺激や外部因子による核酸認識の可逆的制御、ターゲットとの錯体形成と解離制御が必要となる。最近、小宮山・浅沼によってリン酸ジエステル部位に、

アゾベンゼン誘導体を導入した修飾 DNA を用いて、紫外光・可視光照射による塩基配列特異的な二重鎖および三重鎖錯体形成・解離制御ならびに、光によるポリメラーゼや RNaseH 活性を制御する興味深い論文が報告²⁷⁾されたが、これ以外には外部因子・外部刺激による可逆的な核酸認識機能を有する核酸モデルに関する報告、ならびにその方法論に関する報告さえほとんど見あたらない。

このような背景を踏まえ、我々は次世代のアンチセンス分子としてターゲット核酸と安定な錯体を形成するとともに、細胞内環境などの外部因子・外部刺激による可逆的な錯体形成・解離制御可能な人工核酸開発に取り組んでいる。先にも述べたが可逆的な塩基部認識制御に関しては、これまでその方法論さえ提案されていなかった。我々は、核酸の認識過程において塩基部の配向が重要であり、効果的な塩基認識にはピリミジン塩基では 2 位カルボニル基が、プリン塩基の場合はピリミジン部が糖部の反対側に存在する *anti* 配向を優先する必要があるとあり、逆の *syn* 配向は塩基認識にとって不利であること、*anti-syn* 塩基部配向は、糖部コンホメーションにより影響を受けることに注目した。すなわち、糖部 2',3'-水酸基を有する核酸認識分子において、外部因子により糖部コンホメーション変化を誘起できれば、塩基部の配向制御が可能となり、その結果として認識制御が期待できる (図 2)。この観点から、外部因子による塩基部配向制御、核酸認識制御に取り組んだ。そして RNA を核酸認識部位として導入したペプチドリボ核酸 (peptide ribonucleic acid; PRNA) と名付けた新しいカテゴリーの人工核酸を設計・合成した^{28,29)}。先にも述べたように RNA は、DNA に比較して mRNA、tRNA、rRNA などに代表されるように様々な高次構造と多彩で高度な機能を発現することが知られ、その機能応用に注目が集まっている。しかし、RNA は 2'-水酸基に基づく骨格構造不安定性を示し、容易に加水分解を受け失活してしまうなどの本質的で深刻な問題も抱えている。このため、RNA を構成単位とする人工核酸は興味を持たれているが、これまで RNA を有する核酸モデル化合物はほとんど報告されていない。この点からも PRNA はユニークな人工核酸で、高度な機能を発現し、様々な応用研究が期待される。

外部刺激によるヌクレオシド誘導体の塩基部配向制御

一般にピリミジンヌクレオシドの塩基部は溶液中で、塩基部 2-位カルボニル基と糖部アキシャル位水素間の立体反発に基づき塩基認識に有利な *anti* 配向を優先する。リボヌクレオシド糖部 2',3'-水酸基に架橋構造を有する 2',3'-cUMP (uridine 2',3'-cyclic monophosphate) や 2',3'-IPU (2',3'-*O*-isopropylidene uridine) などの誘導体では、塩基部 2 位カルボニル基と、糖部の立体障害が低減した結果 *syn/anti* 比が増加していることが報告されている。しかし、このようなヌクレオシド誘導体の場合、共有結合により *syn* 配向が優先されるため、外部因子により *anti-syn* 配向の可逆的な変化を誘起することは不可能である。

我々はこの bicyclic 構造を有するフラノース構造が *syn/anti* 比を増加させることに注目し、外部因子により可逆的な bicyclic 構造形成・解離を制御出来れば、*syn/anti* の配向制御も可能になると考えた。そして外部因子による *syn* 配向の誘起を達成するため 1) 塩基部 2 位カルボニル酸素とフラノース部 5' 位水素間の水素結合形成、2) フラノース部 2',3'-*cis*-ジオールとホウ酸類との bicyclic-架橋構造形成の協同効果の利用を考案した (図 2)。ホウ酸類は *cis*-1,2-ジオールと水中で可逆的にエステルを形成することが知られている。リボヌクレオシドにおいても 2',3' 位に *cis*-ジオールを有し、ホウ酸エステル形成による糖部コンホメーション変化に伴う塩基部の配向変化が期待される。さらにリボヌ

クレオシドの 5' 位水酸基をアミノ基に変換した 5'-アミノ-5'-デオキシリボヌクレオシドを認識部位として用いる事により、効率よい糖部_核酸塩基間水素結合形成も期待される。この観点から 5' 位水酸基をアミノ基に変換した 5'-アミノ-5'-デオキシウリジン (5'-NH₂-Urd) を合成し、塩基部配向を ¹H-NMR NOE スペクトルならびに円二色(CD)スペクトルにより検討した (図 3)。

リン酸緩衝液中での 5'-NH₂-Urd のピリミジン塩基部 6 位水素の照射により、塩基部 5 位・糖部 1' 位水素に加えて糖部 2', 3' そして 5' 位水素にも核オーバーハウザー効果 (NOE) に基づくピークが観測され、塩基部カルボニル部位が糖部の反対を向く *anti* 配向を優先することが示唆された。一方、糖部 2', 3'-*cis*-ジオールが、架橋構造を有する環状ホウ酸エステルを形成するホウ酸存在下では、同じく塩基部 6 位水素照射により塩基部 5 位水素・糖部 1' 位水素にのみ NOE ピークが観測され、他の糖部水素との NOE ピークは全て消失した。以上の事実は、ホウ酸の添加により核酸塩基部が *anti* から *syn* 配向優先に変化したことを明確に示唆している。すなわち、5'-アミノピリミジンリボヌクレオシドはホウ酸類を外部因子として *anti-syn* 塩基部配向制御可能な分子であることが明らかとなった。

さらに 5'-NH₂-Urd の CD スペクトルをホウ酸緩衝液中で測定すると $[\theta]_{\max}$ 値は *anti* 配向を示す 9800

から、*syn* 配向に基づく 1600 にまで減少した (図 3)。すなわち、CD スペクトルからもホウ酸類による 2', 3' 間の架橋構造形成、ならびに分子内水素結合形成の協同効果により、ホウ酸を外部因子とする効果的な *syn* 配向の誘起が実現出来ることが明らかになった。また、同じくピリミジン塩基を有し 5'-水酸基をアミノ基に変換した 5'-アミノ-5'-デオキシシチジンにおいても、同様にホウ酸類を外部因子として塩基部配向を *anti*→*syn* へと配向制御可能であることが示された。一方、3' 位水酸基が存在しない 5'-アミノチミジンや、2 位カルボニル基が存在しない 5'-アミノリボアデノシンや 5'-アミノイノシンでは、ホウ酸添加に伴う塩基部配向は全く観測されず、非常に構造特異性の高い配向制御法であることが明らかとなった。表 1 に様々なヌクレオシド誘導体に対してホウ酸類添加による、可逆的塩基部配向制御について検討した結果を示した。

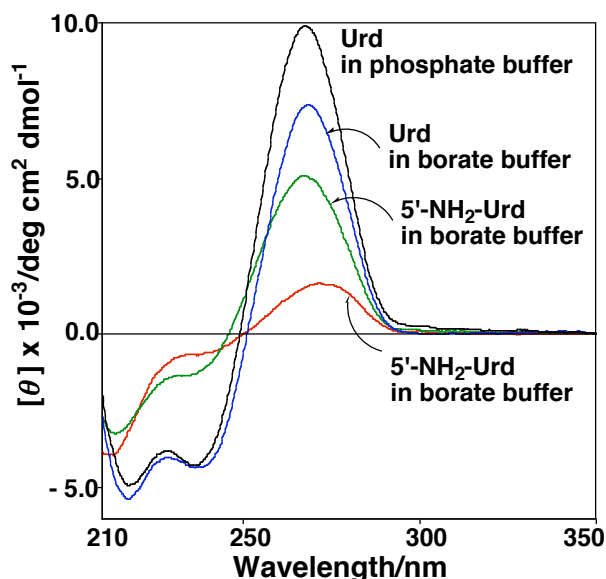
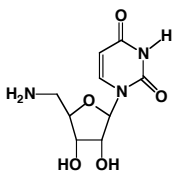
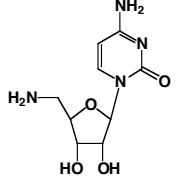
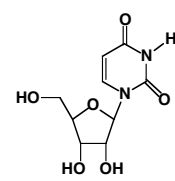
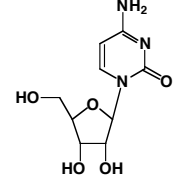
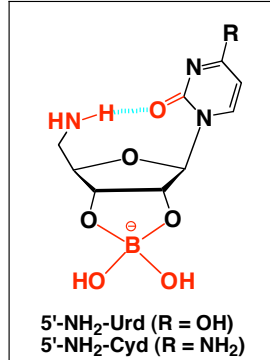
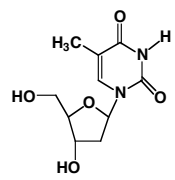
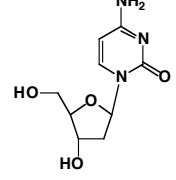
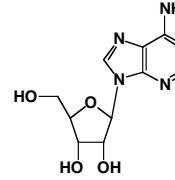
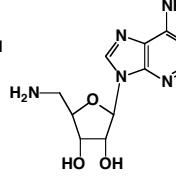
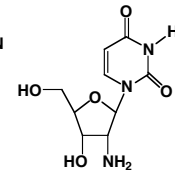


Fig. 3 CD spectra of Urd and 5'-NH₂-Urd in phosphate and borate buffer.

(円二色スペクトルを用いた塩基部配向の観察。Anti 配向優先するウリジンでは大きな CD ピークを、*syn* 配向を優先 5'-NH₂-Urd では小さな CD ピークを示す。)

Table 1 *Anti-syn* orientation of nucleosides and nucleoside derivatives (ホウ酸による anti→syn 配向制御可能なヌクレオシド誘導体)

					 <p>5'-NH₂-Urd (R = OH) 5'-NH₂-Cyd (R = NH₂)</p>
$[\theta]_{\text{ext}}$					
phosphate buffer (a)	5100	8400	9700	14200	
borate buffer (b)	1600	4900	7400	12200	
b/a (%)	31	58	75	86	

					
$[\theta]_{\text{ext}}$					
phosphate buffer (a)	3400	700	-2100	-2100	7700
borate buffer (b)	3200	7100	-2500	-2200	7200

外部刺激応答性人工核酸、ペプチドリボ核酸 (PRNA) の設計

以上の結果を踏まえ、5'-アミノリボヌクレオシドを導入した新しいカテゴリーの人工核酸として、ペプチドリボ核酸 (PRNA) を設計・合成した (図 4)。人工核酸においても、ホウ酸類を外部因子とする 5'-アミノピリミジンリボヌクレオシド塩基配向の *anti*↔*syn* 配向制御を実現するために必要な構造条件として、1) ホウ酸と可逆的にホウ酸エステルを形成するために必要な 2',3'-*cis*-ジオール、2) 塩基部 2 位カルボニル基と水素結合形成可能な 5' 位水素結合供与基を有する必要がある。しかし、このような構造的必要条件は、天然 DNA・RNA では当然満足されず、従来報告されている PNA も含めた膨大な種類の核酸モデル化合物・人工核酸でも満足されない。そこで、1) と 2) の条件を満足すると共に、様々な塩基配列を有するモデルが容易に合成可能であり、天然核酸と同程度の核酸塩基の繰り返し距離を有する核酸モデルとして γ -ペプチドリボ核酸 (γ -PRNA) を設計・合成した。また、主鎖として α -helix 構造など高次構造を有することが期待される α -PRNA も設計・合成した⁷⁾。

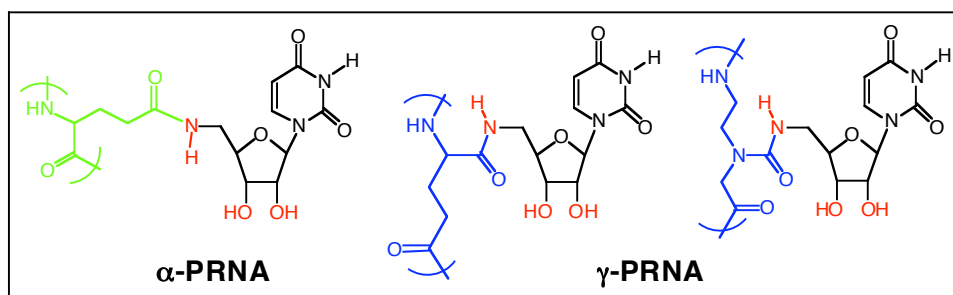


Figure 4 Structures of PRNAs. (外部刺激応答性人工核酸 PRNA の構造)

α -PRNA、 γ -PRNA いずれのモノマーにおいてもリン酸緩衝液中ではピリミジン塩基部は *anti* 配向を

優先するのに対し、ホウ酸添加に伴い *syn* 配向優先に変化することが 5'-アミノヌクレオシドの場合と同様に $^1\text{H-NMR}$ NOE, CD スペクトルを用いた検討により明らかとなった。さらに塩基部配向の可逆的制御について検討した。

我々は、ホウ酸エステルの安定性は酸性条件下で大きく低下し、解離方向に平衡が移動することに着目し、ホウ酸類を配向規制因子、pH を配向制御因子とする 5'-アミノ-ピリミジンヌクレオシドの可逆的な塩基部配向制御について検討した。まず、いくつかの pH におけるホウ酸添加に伴う CD スペクトル変化について検討した。ホウ酸エステルが安定に存在する pH8.8 の弱アルカリ性条件下では少量のホウ酸添加に伴い 270nm 付近の CD 強度は大きく減少し、効率良く塩基部の *anti*→*syn* 配向制御が示されたのに対し、ホウ酸エステルの安定性が低下する pH6.0 の弱酸性条件下では、大量のホウ酸を添加しても CD スペクトルはほとんど変化せず、2',3'-ホウ酸エステル形成を鍵とする *anti*→*syn* の配向制御が誘起されないことが明らかとなった。この結果を踏まえ、ホウ酸存在下、pH を外部因子とした塩基部配向の可逆的制御について検討した(図5)。pH 7.2 のリン酸緩衝溶液に 5.5 mM のホウ酸を添加すると、 $[\theta]_{\text{ext}}$ は減少し塩基部は *anti*→*syn* に配向変化を誘起した。続いて、この系の pH を 6.2 に調整すると、 $[\theta]_{\text{ext}}$ はホウ酸添加前の値まで回復し、塩基部は *syn*→*anti* 配向に変化した。さらにこの系の pH を 8.0 続いて 6.3 と調整することにより、 $[\theta]_{\text{ext}}$ も可逆的に変化し、塩基部配向についてホウ酸存在下 pH を外部因子として可逆的に制御可能であることが明らかとなった。これらの結果より、配向変化を利用した核酸認識の可逆的制御が期待される。

ペプチドリボ核酸 (PRNA) オリゴマーの合成

以上の結果を踏まえ、アンチセンス分子や生体適合性材料などへの適用に不可欠な PRNA オリゴマー合成に取り組んだ。アンチセンス・アンチジーン分子は、ターゲット RNA・DNA と相補的な種々の配列を有することが必要不可欠である。我々は当初、Boc 基を N 末端保護基として用いる液相法により PRNA オリゴマー合成を検討してきた。しかし、本合成法のプリン塩基への拡張を考える場合、Boc 基の脱保護過程における酸性条件下で、ヌクレオシド部より脱プリン化反応の進行も予想される。さらには様々な配列を有する PRNA オリゴマーの、簡便かつ高収率な合成が困難であるといった本質的な問題点もあった。一方、9-(fluorenyl)methyloxycarbonyl (Fmoc)基を N 末端保護基として用いる、ペプチド固相合成法による α -ペプチド合成が数多く検討されている。Fmoc 法は 20-30%ピペリジン(PPD)を用いる温和な弱塩基性条件下で Fmoc 基を脱保護するため、PRNA のプリンヌクレオシド部脱プリン化に基づくアベシクサイト生成の抑制が期待される。さらに、様々な活性を有する縮合剤を検討することにより、PRNA のヌクレオシド部の 2',3'-水酸基を無保護で、十分な伸長反応効率の達成が可能になることが期待される。そこで元来

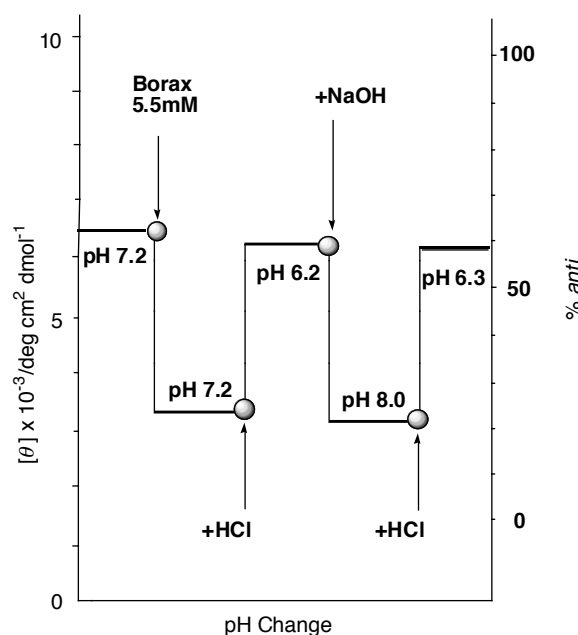


Figure 5. pH dependence of $[\theta]_{\text{ext}}$ of PRNA monomer containing uracil base in the presence of borax.

(pH7.2- 6.2 の変化に伴う塩基部配向の可逆的制御)

α -アミノ酸の伸長反応に用いられてきた Fmoc 固相合成法を用いた PRNA 合成に取り組んだ。その結果、自動・半自動固相合成法への適用が可能となり、種々の配列を有する 24 量体程度のオリゴ PRNA も簡便かつ高収率で合成可能となった。

このようにして合成したオリゴ PRNA の、ホウ酸類を外部因子とする *anti-syn* 配向制御について CD, $^1\text{H-NMR-NOE}$ を用いて検討した。ホモウラシル配列を有する γ -PRNA 8 量体のリン酸緩衝液にホウ砂を添加した系における CD スペクトルは、260nm 付近で 6000 程度の $[\theta]$ を示し *anti* 配向を優先することが示唆されたのに対し、ホウ砂を添加することにより PRNA モノマー や 5'-アミノピリミジンリボヌクレオシドより効率よく、*syn* 配向が誘起されることが明らかとなった。この外部因子による塩基部配向変化は、 $^1\text{H-NMR NOE}$ スペクトルによっても確認され、PRNA は外部因子によって可逆的に塩基部配向制御が可能なのはじめての人工核酸であることが示された。

ペプチドリボ核酸 (PRNA) による DNA 認識・錯体形成挙動ならびに可逆的錯体形成・解離制御

次に最も重要なターゲット DNA・RNA との錯形成挙動、錯体安定性、そして錯形成・解離制御能を検討するために相補的塩基を有するポリヌクレオチドを用いて、ホウ酸類添加に伴う錯形成・解離挙動について検討した。種々の配列を有する PRNA 8 および 12 量体オリゴマーは、Fmoc 固相合成法を用いて得た。PRNA オリゴマーの塩基認識能は融解温度 (T_m) を指標として、相補的塩基ならびにミスマッチ配列を有する DNA を用いて検討した。各コンプレックスの塩基ユニット比は、UV スペクトルの核酸塩基部の吸収に基づく 260nm における吸光度の Job プロットから 1:1 であることが明らかとなり、PRNA は相補鎖 DNA と 1:1 の錯体を形成することが明らかとなった。また、非相補鎖との混合溶液では淡色効果、 T_m ともに観測されなかったことから、PRNA と DNA の錯体は核酸塩基間の特異的水素結合により形成されていることが明らかになった。ウリジンを有する PRNA 8 量体と d(A)₈ のリン酸緩衝液中における T_m 値は、DNA 錯体の T_m と比較すると 8°C 高い値を示し、PRNA は天然核酸と比較してより安定な錯体を形成することが明らかになった。また、ウラシルおよびシトシンを交互に有する PRNA 8 量体の場合、アミノ末端と天然核酸の 3' 末端を同じ側に有する antiparallele 型二重鎖が、逆の parallele 型錯体より安定に存在することが示され、DNA 鎖方向に対する良好な識別能を有することが明らかとなった。PRNA においては先に述べたように、DNA 鎖方向に対する認識性が低いことから、ヌクレオシドの導入とキラルアミド骨格により PRNA は良好な鎖方向認識性を獲得したと考えられる。

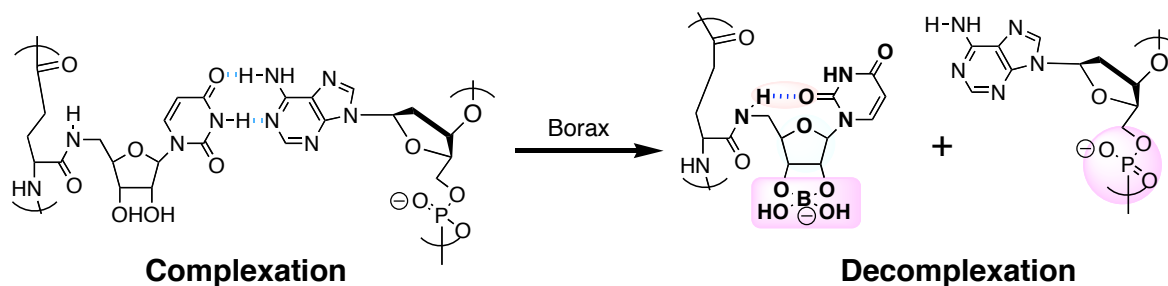


Figure 6 Schematic drawing of complexation and decomplexation process of PRNA – DNA complex by borax.

(ホウ酸添加に伴う PRNA—DNA 錯体の形成と解離の可逆的な制御)

つぎに PRNA の開発目的である、錯体形成の外部刺激による形成・解離制御について検討した。約 40%

の大きな単色効果を示し、安定な PRNA・DNA 錯体を形成しているリン酸緩衝液に、少量のホウ酸を添加すると、いずれの PRNA・DNA 錯体形成系でも T_m および淡色効果は観測されなくなり、安定な PRNA・DNA 錯体が迅速に解離したことが示された。つまり DNA・DNA 錯体より安定に形成されていた PRNA・DNA 錯体は少量のホウ酸の添加により、迅速かつ効果的に解離することが示され、PRNA を用いることによりホウ酸を外部因子として核酸との錯体形成・解離制御が達成されることが明らかとなった。このような効果的な錯解離は、PRNA の塩基部がホウ酸添加により *syn* 配向を優先するため DNA との塩基対形成が困難になったことに加え、ホウ酸エステル形成にともなうホウ素上に生じる負電荷による DNA 鎖との静電的な反発の協同効果に基づくと考えている(図6)。

このように PRNA は相補的 DNA と塩基配列特異的に安定なコンプレックスを形成することが明らかとなったので、外部因子による可逆的なコンプレックス形成・解離制御に取り組んだ。具体的には先ほどのヌクレオシド誘導体ならびに PRNA モノマー系においてホウ砂存在下、pH を外部因子とする可逆的な *anti*↔*syn* 配向制御の結果を踏まえ、PRNA・DNA 錯体形成系にホウ砂を添加し、pH を外部因子としたコンプレックス形成・解離挙動を UV スペクトル単色効果ならびに T_m を指標として検討した。先に述べたように、PRNA・DNA 錯体形成系にホウ砂を添加することにより、安定に形成されていた PRNA・DNA 錯体は迅速かつ高効率に解離し、錯体形成のオン→オフ制御が達成された。つぎにホウ酸添加系の pH を 7.2 から 6.2 に調整すると、淡色効果は再び回復し、ホウ砂添加前と同じ T_m が観測され、塩基部の *syn*→*anti* 配向優先変化に伴い、PRNA-DNA 錯体の再形成が確認された。すなわち PRNA はホウ砂存在下、pH を外部因子とし DNA 認識ならびに錯体形成機能の可逆的制御能を有することが明らかとなった。

おわりに

このように PRNA は細胞質内 pH 変化に対応するわずかな pH レンジで、ターゲット DNA・RNA に対する可逆的な認識・錯体形成のオン↔オフ制御機能を有することが示された。最近ガン細胞の細胞質 pH は、シアル酸などの酸性多糖の過剰発現などにより正常細胞の細胞質 pH7.2 より低下し、6.2~6.5 であることが報告された。この報告に基づく、PRNA-ホウ酸結合体は正常細胞内では *syn* 配向を優先し、アンチセンス機能を発現しないのに対し、ガン細胞の酸性細胞質内においてのみ、PRNA-ホウ酸結合体が解離し、アンチセンス機能を発現することが期待できる。このことは高い水溶性や高次構造を持たないなどアンチセンス分子として優れた特性を有する 10~15 量体程度の PRNA を、現在待望されているガン細胞特異的アンチセンス分子、見えないガンに対するアンチセンス分子への展開を可能とする方法論であり、現在細胞レベルでの研究を計画中である。

以上のように Nielsen らにより提案され優れた性質を示すペプチド核酸 (PNA) の新しい展開として、我々はペプチドリボ核酸 (PRNA) という新しいカテゴリーの分子を用いることにより、従来の単なる核酸の認識から一歩進んで外部因子による核酸認識制御を行う新たな方法論を提案し、いくつかの具体例でその有効性を実証した。この方法論は一般性を有し、緒言で述べた次世代の遺伝子治療用アンチセンス分子のみならず、DNA チップなどの遺伝子診断薬や分子生物学への応用も可能であり、今後さらなる発展が期待される。

- 1) Lander, E. S. *et al.*, *Nature* **2001**, *409*, 860-921. (b) Venter, J. C., *et al.*, *SCIENCE* **2001**, *291*, 1304-1351.
- 2) For reviews, see: E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543. (c) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677.
- 3) Nucleic Acid Analogs (Syntheses and Properties), T. Wada, Y. Inaki, and K. Takemoto, *The Polymeric Materials Encyclopedia: Synthesis, Properties and Applications*, J. C. Salamone and M. Lowell Eds., CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, 94-108 (1996).
- 4) (a) J. C. Venter, *et al.*, *Science* **2001**, *291*, 1304; (b) E. S. Lander, *et al.*, *Nature* **2001**, *409*, 860.
- 5) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **1991**, *254*, 1497.
- 6) (a) P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624. (b) 岩瀬礼子、村上章、有合化 **60**, 1179 (2002) (c) 和田健彦、井上佳久、有合化 **63**, No.1 (2005) 印刷中
- 7) a) H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393; b) H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2671; c) H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1977. d) H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11452.
- 8) T. Wada, N. Minamimoto, Y. Inaki, Y. Inoue, *Chem Lett*, **1998**, 1025.
- 9) a) T. Wada, N. Minamimoto, Y. Inaki, Y. Inoue, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **1998**, *39*, 29;. b) T. Wada, N. Minamimoto, H. Sato, Y. Inoue, Y. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **1999**, *42*, 145; c) T. Wada, N. Minamimoto, Y. Inaki, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6900; d) T. Wada, H. Sato, Y. Inoue, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, **2001**, *1*, 45; e) H. Sato, Y. Hashimoto, T. Wada, Y. Inoue, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 7871.