

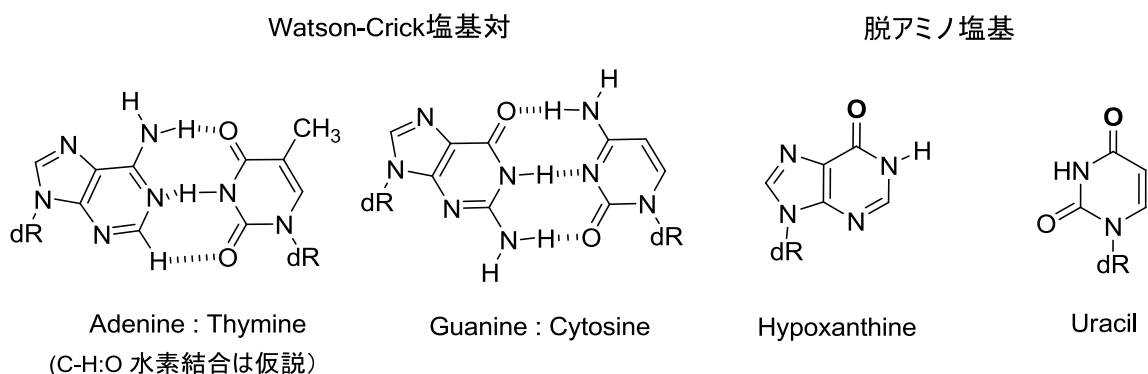
核酸の小さな構造変化に着目したゲノム標的化学の展開

九州大学大学院薬学研究院 佐々木 茂貴

1. はじめに

核酸の小さな化学変化 脳の働きは電子で制御されているので量子理論で理解できる、とノーベル化学賞者の福井謙一先生は考えておられた、というお話を門下生の方からお聞きした。陽子そのものである水素イオンという最も小さな化学種が生命のエネルギー生産に関係することを考えると、生命も量子理論で理解される日がくるかもしれない。このようなことを考えていた25年前に、癌や脳疾患のポジトロンエミッション画像診断薬の研究に携わることになり、改めて病気と遺伝子の関係を勉強し直し、遺伝子のごく小さな化学変化が、病気の発症に決定的な影響を持つことを学び、大きな衝撃を受けた。折しも、遺伝子解析技術が急速に進化し、病気に関係する遺伝子の発見が爆発的に増えていたころである。

DNAはコンピューターのハードディスクに相当する情報保存装置であり、遺伝子は、意味のある一つの情報単位で、アプリケーションソフトに相当する。DNAの塩基（アデニン、グアニン、チミン、シトシン）の並び方で情報が保存されている。1本のDNAに対して、もう1本のDNAがアデニンとチミン、グアニンとシトシンが水素結合と分子の形が補完するように錯体（ワトソン-クリック塩基対）を形成し、2本鎖を形成することによって安定化されて細胞核に収まっている。アプリケーションソフトやデータに生じた不具合を修正するソフトがあるように、細胞にもDNAの不具合を自動的に修復する高度な仕組みが備わっている。

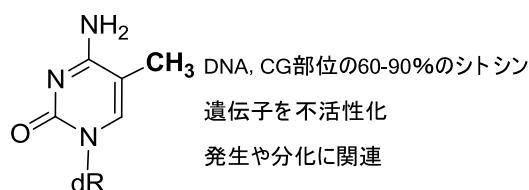


脱アミノ化 アデニン6位アミノ基やシトシン4位アミノ基は水分子の求核反応によって脱アミノ化を受け、ヒポキサンチンとウラシルに変化する。ヒポキサンチンはシトシンと塩基対を作り、ウラシルはアデニンと塩基対を作るので、この脱水反応は遺伝情報にとっては重大な意味を持つ。このような脱水反応が、重要な遺伝子

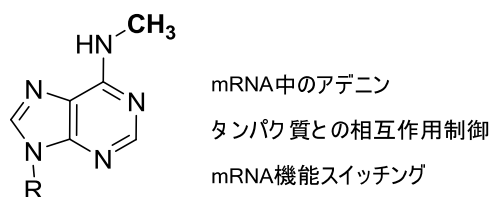
に起こり、修正がうまく働かなかった場合、最悪の場合には病気の原因となることがある。興味深いことに、細胞にはRNAの特定部位でこのような脱水反応を起こす酵素があり、もとの遺伝情報を書き換えて別の用途に利用する、ワープロの編集機能と同じような巧妙な仕組みがあり、遺伝子「編集」と呼ばれている。

メチル化 メチル化は有機反応としては最も基本的な反応である。生体内では、DNAやRNAのメチル化は極めて重要な機能を担っている。受精卵が分割・分化し成体に成長する過程で、必要でなくなった遺伝子は不活性化される。DNAのCGのシトシンが特異的に5位メチル化されると、この遺伝子はもう機能しなくなり、メチル化は分化の印になる。癌を抑制する遺伝子のシトシン5位がメチル化されると、癌化のブレーキが利かなくなり、がん発生の原因になる¹。またシトシン5位メチル化はヒトのニューロン成長に関係し、長期記憶の形成にかかわっていると考えられている²。ニューロン細胞DNAのメチル化と生殖細胞DNAのメチル化は関連しないので、残念ながら記憶は子供には伝わらない。

RNAの塩基は様々な化学修飾を受けているが、メッセンジャー(m)RNAの塩基は化学変化を受けないと考えられてきた。しかし、最近になって、mRNAのアデニン6位アミノ基がメチル化され、機能が制御されることが明らかになってきている³。シトシン5位メチル化やアデニン6位アミノ基のメチル化は、遺伝子配列によらない遺伝子制御という意味でエピジェネティックとして近年注目されている。



5-Methylcytosine



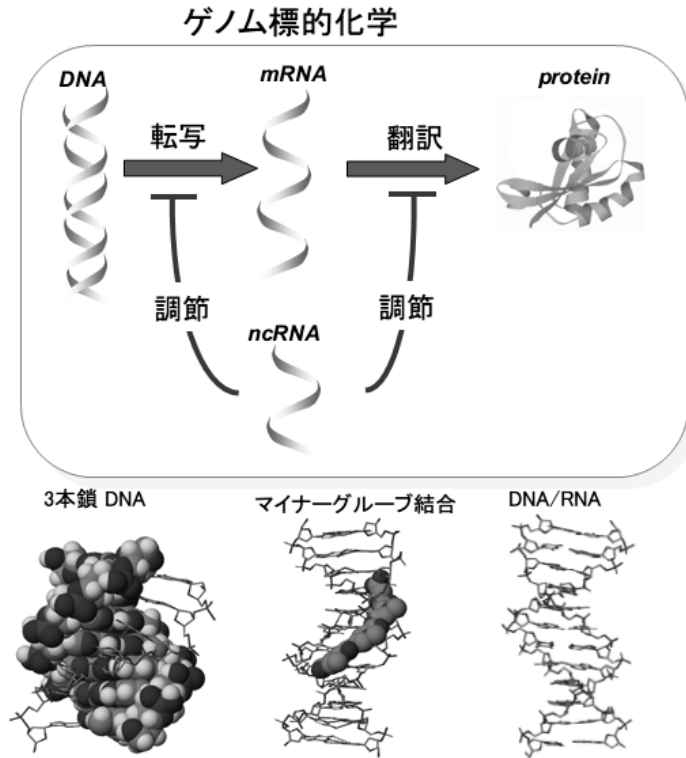
N⁶-Methyladenine

このように、核酸の小さな化学修飾は、遺伝子にプログラムされていないにも関わらず、遺伝子機能をコントロールし、複雑な生命機能の極めて重要な制御装置としての役割を果たしている。核酸の小さな化学修飾の機能に対する驚きが私たちの研究発想の原点となり、病気の原因となる核酸のごくわずかな変化を認識し、治療することができる人工分子の開発に乗り出すことになった。

2. ゲノム標的化学

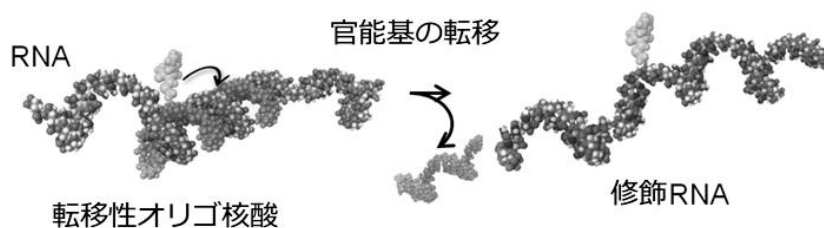
DNAの情報はRNAに転写され、タンパク質に翻訳され機能する。現在では、このセントラルドグマに、タンパク質にならずに機能する非コードRNAが加わり、より精密な制御が行われていることが明らかになっている。私たちはこのようなゲノム情報を構成する核酸を認識する化学を「ゲノム標的化学」と命名し、新しい診断および治療法への展開を最終的な目的に種々の機能性分子を開発している。2本

鎖 DNA を認識する手段として、3 本鎖 DNA とマイナーグループ結合分子を用い、RNA 認識には DNA を用いている。本講演では、ピンポイントの高い選択性で標的 RNA を化学修飾する反応と、塩基構造の小さな構造変化を認識する分子について解説する。



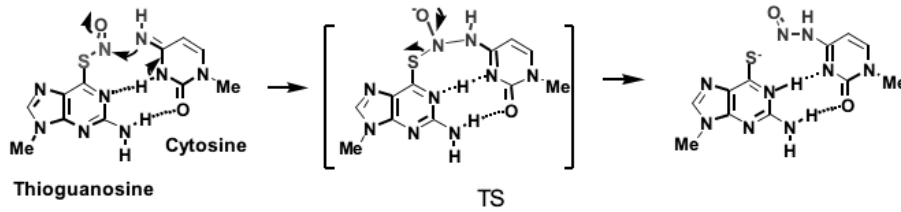
3. ピンポイント選択的 RNA 修飾反応の開発—化学的 RNA 編集反応に向けて—

RNA の特定の位置に特定の化学反応を行うことができれば、RNA レベルで遺伝情報を変えられる可能性がある。この目的のため、私たちは、標的 RNA とオリゴ核酸で 2 本鎖を形成し、塩基選択性、安定性と高い反応性を兼ね備えた官能基転移反応を開発した。



- 1) 配列選択性
- 2) 塩基選択性
- 3) 安定性と高反応性

シトシン 4-アミノ基へのニトロシル基の転移

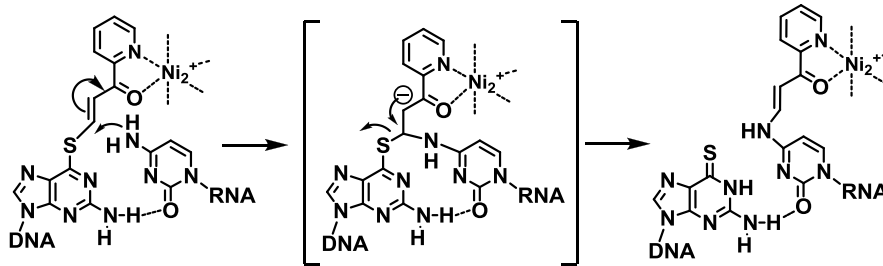


N-ニトロソ体の弱酸性条件での脱アミノ化 シトシンからウラシルの生成 (編集)

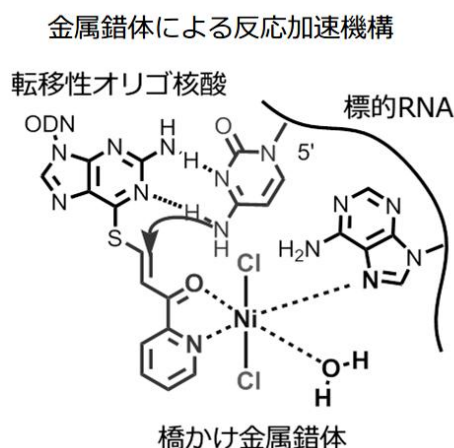
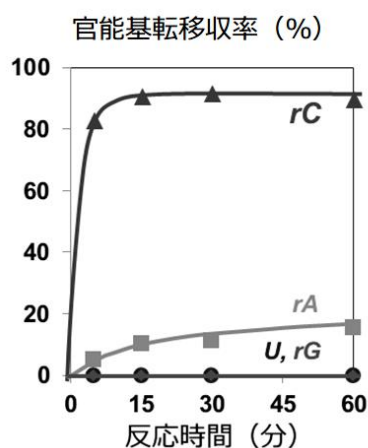


最初の分子設計では、6-チオグアノシンを含むオリゴ核酸を用いて、6-イオウ原子をニトロシル化し、標的鎖のシトシン4位アミノ基にニトロシル基を転移させようとした。幸運にも、不安定な *S*-NO 結合がオリゴ核酸中では安定化され、標的鎖との2本鎖内で選択的にシトシンに転移することが分かった。さらに弱酸性で脱アミノ化も進行し、5-メチルシトシンからチミンが高収率で生成した⁴。しかし、この分子では細胞内で編集反応を確認することができなかった。そこで、より安定な転移官能基の検索を行い⁵⁻⁹、数多くの検討の末、現時点でもっとも優れた反応として、下記の官能基転移反応を開発した^{10,11}。

金属配位能をもつピリジニルビニルケトン基による転移反応



ピリジニルビニルケトン体を転移基として用いることにより、2価遷移金属との錯体形成による活性化を期待した。この転移反応は、等量の NiCl_2 存在下反応が加速され、10分以内に反応が収束し、非常に高いシトシン選択性を示した。最初の設計では、ピリジニルケトン部分は Ni^{2+} と錯体を形成することにより反応性が高まると期待した。しかし、非常に興味深いことに、水中での安定性は変化せず、 Ni^{2+} との錯体形成によって求電子剤としての活性化は受けていないことが分かった。詳細な検討の結果、 Ni^{2+} は標的 RNA のプリン塩基と橋かけ構造の錯体を形成し、反応点を接近させ、活性化エントロピーを低下させることによって反応を加速していることが分かった。この活性化機構により高い安定性と誘起反応性が達成されている。



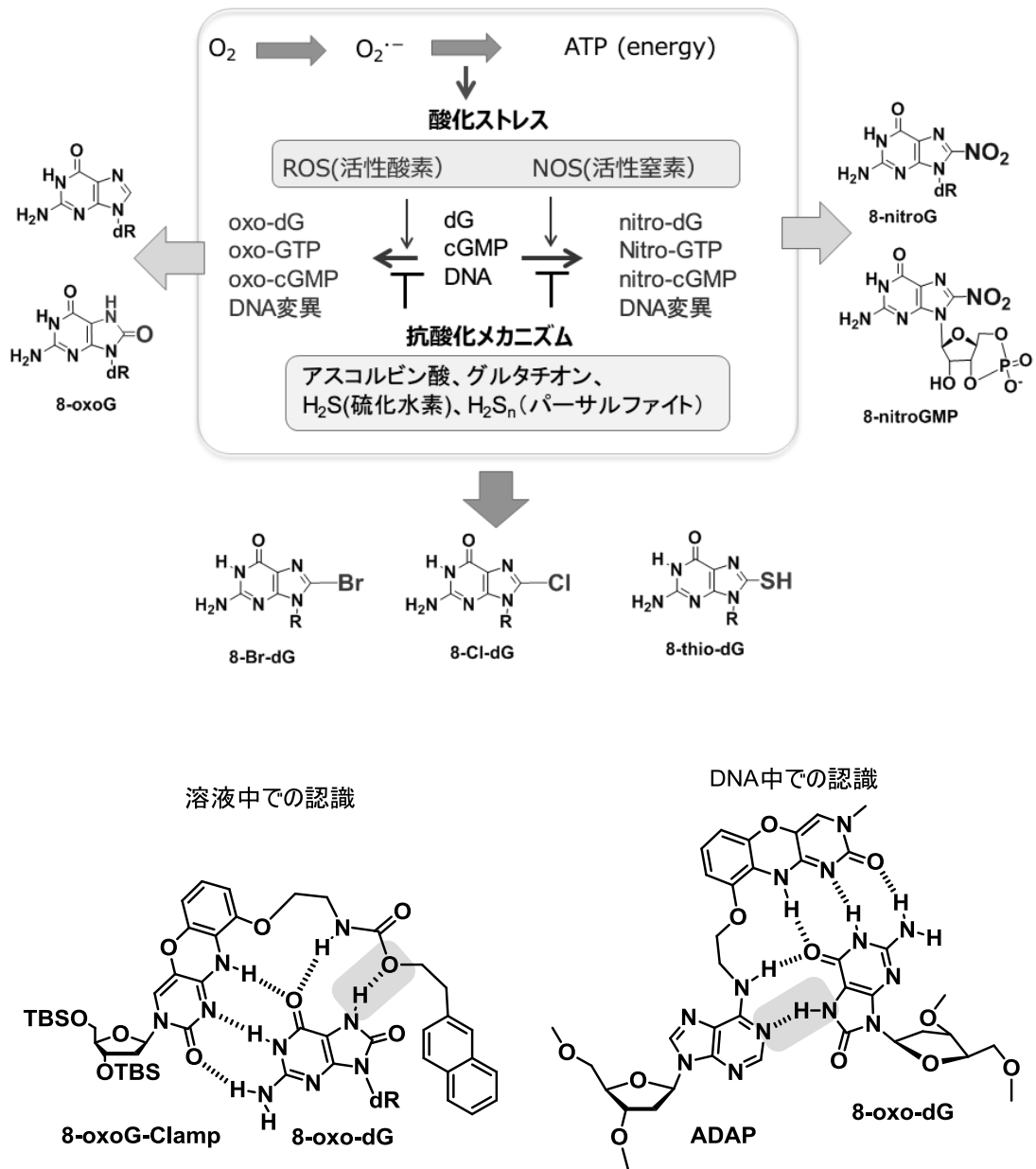
さらに、4-チオチミジンプラットフォームにつかうことによって、アデニン6位アミノ基を特異的に化学修飾することにも成功した¹¹。この転移反応によって、mRNAのような巨大分子の特定の位置に望む官能基を導入する原理を確立することができた。現在、mRNAに対する化学修飾の実現、機能に及ぼす効果について検討している。さらに、脱アミノ化を誘起する転移基についても検討中である。最初のNO転移反応からおおよそ10年の歳月を費やし、さまざまな予期しない現象に遭遇しながらピリジニルビニルケトン転移基に到達した。講演では学生諸氏の苦勞とブレークスルーに繋がった発見についても紹介したい。

4. 8位酸化グアノシン体の特異的認識

グアニンは核酸塩基のなかで最も酸化を受けやすく、細胞内で発生する種々の酸化活性種によって8位酸化体が生成する。一般的に酸化ストレスと呼ばれる活性酸素によって8-オキシグアノシン体が生成し、活性窒素種によって8-ニトログアノシン体が生じる。ハロゲンイオンの酸化活性化により生じる8位ハロゲン化グアノシン体や細胞内硫化水素により8-チオグアノシン体も発生している。通常は、これらの酸化反応と生体内の抗酸化作用のバランスが保たれ、生体の恒常性が維持されているが、生体が異常となり恒常性が破たんすると、これらの8位酸化グアノシン体の生成比が変化する。例えば、抗酸化機能の低下によって8-オキシグアノシンの発生量が増え、DNA中に蓄積される量や尿に排出される濃度が上昇する。

8-オキシグアノシンは、もっとも高頻度に生成する酸化損傷塩基で、DNAやRNAに発生すると遺伝子変異や異常たんぱく質を産生し、疾患の原因となる^{12,13}。同様に8-ニトログアノシンも遺伝子毒性物質として知られていたが、近年、新しい細胞内常用伝達物質としての機能が注目されている¹⁴。私たちは、診断や創薬リードへの展開を期待し、8位酸化グアノシン体をそれぞれ特異的に認識する分子の開発を検討している。ここでは、8-オキシグアノシンと8-ニトログアノシンそれぞれに対する特異的分子について紹介する。

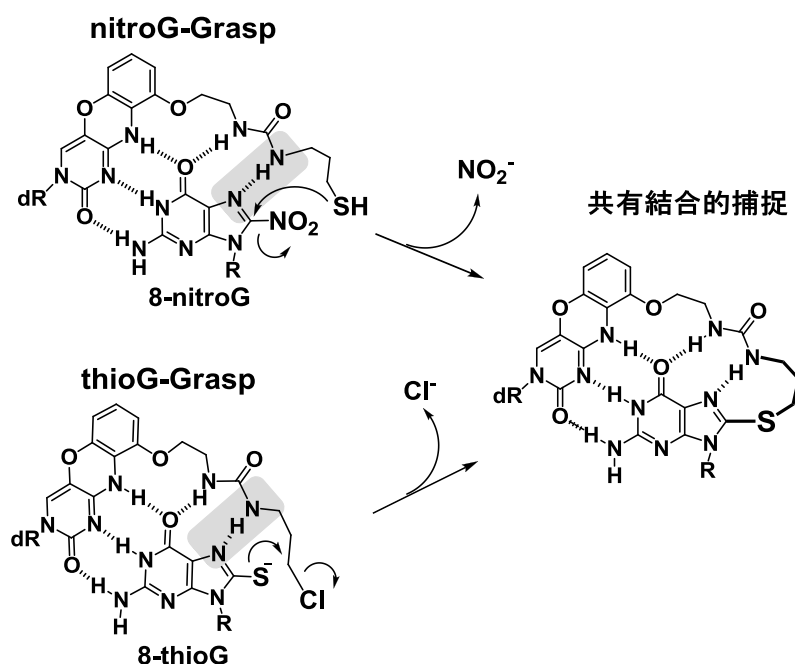
細胞内レドックス恒常性と8位酸化グアノシン誘導体



8-オキソグアノシンの特異的認識分子として、シトシン類似体の1,3-ジアザフェノキサジン骨格を基本に、7位NHと水素結合するカルバメート基を導入し、5個の水素結合で錯体を形成する8-oxoG-clampを開発した¹⁵⁻¹⁸。この分子は1,3-ジアザフェノキサジン骨格に由来する蛍光を発し、錯体の形成によって消光する。この消光現象を定量化することによってnMレベルの8-オキソグアノシンの検出が可能になった。この8-oxoG-clamp分子を固相担体に固定し、8-オキソグアノシンの簡便な検出キットへの展開を検討している。

一方、DNA中の8-オキソグアノシンはアデニンとも塩基対を作る。この塩基対構造に着目して設計されたADAPはアデニン塩基に1,3-ジアザフェノキサジン

を連結しており、DNA 中の 8-オキソグアノシンの特異的認識を期待した。ADAP を組み込んだオリゴ核酸は 2 本鎖 DNA の解離温度を 8-オキソグアノシン特異的に上昇させ、特異的に蛍光応答することが確認された^{19,20}。さらに、ADAP トリリン酸体は DNA ポリメラーゼによる DNA への取り込み反応において 8-オキソグアノシンとグアノシンを完全に区別することが可能で、生体 DNA 中に生じた少量のオキソグアノシンの位置を決定できる方法への展開が期待される²¹。



8-ニトログアノシン誘導体である 3',5'-環状モノリン酸体(8-nitro-cGMP)は NO 代謝に伴って産生し、NO シグナル伝達系で重要な役割を果たしていることが、近年発見された¹⁴。cGMP が NO から発生する活性窒素でニトロ化され、8-nitro-cGMP が生成し、このニトロ基がタンパク質システインのチオール基により求核置換され、タンパク質がグアニル化される。この一連の反応によって、NO シグナルがタンパク質に伝達されることになる。また、細胞内ガス状シグナル分子である硫化水素 (H_2S) やペル(ポリ)スルフィド ($\text{RS}(\text{S})_n\text{H}$) も 8-nitro-cGMP のニトロ基を求核置換し、8-チオグアノシン体を生成し、別の酸化還元系を構成する²²。私たちは、8-ニトロ-および8-チオグアノシン誘導体の特異的に認識し生体内反応と同様の反応を誘起する分子を開発し、診断法や生物活性物質としての展開を検討している。1,3-ジアザフェノキサジン骨格を基本に、チオール反応基を導入した **nitroG-grasp** は 8-ニトログアノシンと効果的に反応し、共有結合的捕捉体を生成した²³。求核剤と脱離基の関係を逆にした **thioG-grasp** 分子は、8-チオグアノシンと選択的、効率的に反応し、共有結合的捕捉に成功した²⁴。

1,3-ジアザフェノキサジン骨格を基本プラットフォームとして、付加的認識部位を変えることによって 8-オキソグアノシン体、8-ニトログアノシン体、8-チ

オグアノシン体のそれぞれに特異的な分子を開発することができた。さらに 1,3-ジアザフェノキサジン骨格にリン酸認識部位を導入することによって、水中でもこれらの 8 位酸化グアノシン体の認識が可能であることを確認している。現在、これらの分子を 8 位酸化グアノシン体の選択的検出法への展開するのと並行して、生物活性の評価を検討中である。

5. おわりに

遺伝子異常は病気の共通の原因として捉えられており、異常部分の人工的な修復は、未来医療技術として注目されている。タンパク質や人工遺伝子を活用する技術についてはすでに医療技術への展開が始まっている。私たちは、化学的アプローチの生化学的方法とは異なる機能を実現できる可能性を信じて、生体利用にむけて研究を継続している。

ここに記載した研究は、万有シンポジウムが福岡で開催されるようになった頃に、始めたものである。全くの素人ゆえに先達の教訓を無視することになったが、このことは独創的なアプローチにつながった反面、全く的外れで学生諸氏に戸惑いを与えたことについての反省も多い。万有シンポジウムで、第一人者の講演を聞く中で、研究に対する姿勢や学生諸氏に対する考え方など、多くのことを学ばせて頂いた。忍耐強く、共にチャレンジを続けてくれている学生、スタッフ諸氏に感謝するとともに、万有シンポジウムを支えていただいた財団と講演者の方々に心から謝意を表します。

<参考文献>

1. E. Daura-oller, M. Cabre, M. a Montero, J. L. Paternain, and A. Romeu, *Bioinformation*, 2009, **3**, 340–343.
2. C. a. Miller and J. D. Sweatt, *Neuron*, 2007, **53**, 857–869.
3. N. Liu, Q. Dai, G. Zheng, C. He, M. Parisien, and T. Pan, *Nature*, 2015, **518**, 560–564.
4. M. Ali, R. Alam, T. Kawasaki, S. Nakayama, F. Nagatsugi, and S. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8864–8865.
5. K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Bioconjugate Chem.* 2009, **20**, 799–803.
6. K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Nucleic Acids Res.* 2010, **38**, 1760–1766.
7. K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 1508–1512.
8. K. Onizuka, A. Shibata, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Chem. Commun. (Camb)*., 2011, **47**, 5004–5006.
9. K. Onizuka, T. Nishioka, Z. Li, D. Jitsuzaki, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3969–3971.
10. D. Jitsuzaki, K. Onizuka, A. Nishimoto, I. Oshiro, Y. Taniguchi, and S. Sasaki, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, 8808–8815.
11. I. Oshiro, D. Jitsuzaki, K. Onizuka, A. Nishimoto, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *ChemBioChem*, 2015 in press.
12. N. R. Jena, *J. Biosci.*, 2012, **37**, 503–517.
13. H. E. Poulsen, E. Specht, K. Broedbaek, T. Henriksen, C. Ellervik, T. Mandrup-Poulsen,

- M. Tonnesen, P. E. Nielsen, H. U. Andersen, and A. Weimann, *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, **52**, 1353–61.
14. T. Sawa, H. Arimoto, and T. Akaike, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 1121–9.
 15. O. Nakagawa, S. Ono, Z. Li, A. Tsujimoto, and S. Sasaki, *Angew. Chemie*, 2007, **119**, 4584–4587.
 16. T. Nasr, Z. Li, O. Nakagawa, Y. Taniguchi, S. Ono, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 727–730.
 17. Z. Li, O. Nakagawa, Y. Koga, Y. Taniguchi, and S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 3992–3998.
 18. Y. Koga, Y. Fuchi, O. Nakagawa, and S. Sasaki, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 6746–6752.
 19. Y. Taniguchi, R. Kawaguchi, S. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 7272–7275.
 20. Y. Taniguchi, Y. Koga, K. Fukabori, R. Kawaguchi, and S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 543–6.
 21. Y. Taniguchi, Y. Kikukawa S. Sasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015 in press.
 22. T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto, and T. Akaike, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, **111**, 7606–11.
 23. Y. Fuchi and S. Sasaki, *Org. Lett.*, 2014, **16**, 1760–1763.
 24. Y. Fuchi, H. Obayashi, and S. Sasaki, *Molecules*, 2015, **20**, 1078–1087.