

医療応用を目指した核酸の機能的再インストール

名古屋大学大学院工学研究科 浅沼 浩之

1. 緒言

DNA は遺伝情報の担い手であり、タンパク質のアミノ酸配列は 4 種類の塩基配列としてコードされている。またタンパク質をコードしていない non-coding RNA も遺伝子発現の制御に深く関与していることが明らかとなり、DNA のみならず RNA は創薬ターゲットとしても大いに注目されつつある。一方 DNA や RNA は、その高度な超分子性からプログラム可能なナノマテリアルとしても極めて魅力的な生体高分子であり、DNA コンピューティング、ナノアーキテクチャー、あるいは分子マシンなど、近年核酸は遺伝子としての枠を超越した分野にまで進出している。しかし 4 種類の天然のヌクレオチドのみではどのように配列を工夫しても実現可能な機能は限られる。そのため核酸に新たな機能を付与すべく、有機化学的手法を駆使して様々な機能性核酸が合成されてきた。

機能性核酸の典型例は、Fig.1 に示すようにリボースの 2' 位、ピリミジン塩基の 5 位あるいはプリン塩基の 8 位に化学修飾を施したものである。これらの部位は塩基対形成に直接影響を与えない上、修飾に伴う二重鎖の構造的な変化も最小限で済むことから一般的に行われてきた。しかしこのような従来の天然のヌクレオチド単位の化学修飾は、

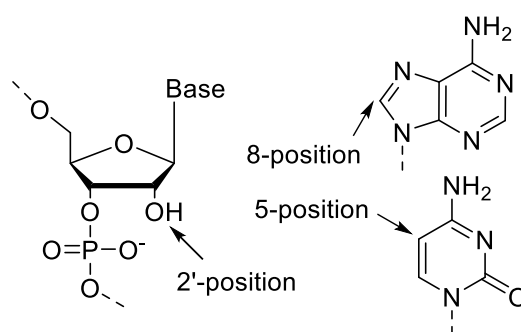


Fig.1. Conventional modification sites on natural nucleotide.

1) 二重鎖を必ずしも安定化しないため、核酸の局所的な“マイナーチェンジ”に留まっている

2) すべての配列に対応させるためには A,G,C,T の 4 つのヌクレオチドに対応する修飾モノマーを合成する必要がある

3) 天然のヌクレオチドの化学修飾は多段階の合成が必要

といった問題を抱えていた。核酸が従来の枠を超えて新たな機能を獲得するためには、いわば“核酸の機能的再インストール”とでも言うべきパラダイムシフト、すなわち DNA や RNA の大胆なフルモデルチェンジを可能にする全く新たな方法論が求められていた。

我々は、非環状ジオールの D-threoninol (2-amino-1,3-butanediol) を足場に用いた核酸アナログモノマーを設計し (Fig.2a 参照)、これを天然の DNA や RNA と “共重合” するという、新たな DNA や RNA の機能化法を開発した。さらに我々は、後述する様に threoninol 誘導体に核酸塩基を導入した人工核酸 (XNA) がペプチド核酸を凌駕するほどの安定なホモ二重鎖を形成することを見出し、また主鎖のメチル基の位置を制御すれば DNA や RNA と安定な二重鎖を形成することも明らかにした。これら一連の核酸アナログと XNA は合成の簡便さと高機能を兼ね備えていることから実用性も高く、天然の DNA や RNA をターゲットとした診断薬や核酸医薬から DNA ナノテクノロジーなど広範囲での応用展開が期待できる。本講演では、我々の開発した機能性人工核酸の設計・合成と応用について紹介する。

1. D-threoninol を足場を使用した核酸アナログによる機能性核酸の設計¹⁾

D-threoninol は D-アミノ酸の一種である D-threonine のメチルエステルを還元して得られるジオールで、2 位のアミノ基を通じて任意の機能性分子 (R) が導入できる (Fig.2a)。ジオール部位を適切に保護することで容易にモノマー化でき、DNA 合成機で DNA (RNA) 鎖中の任意の位置に任意の数を導入することが可能となる。すなわち、従来の化学修飾のように AGCT に対応する 4 種類のモノマーを合成する必要はない。いわば高分子化学の “共重合” に対応し、天然のヌクレオチドモノマーと核酸アナログモノマーの固相担体上での共重合と見なせる²⁾。また原料の threonine は安価な上、モノマー化も極めて容易なので、従来法と比べてコスト的にも優れている。この核酸アナログと天然のヌクレオチドと

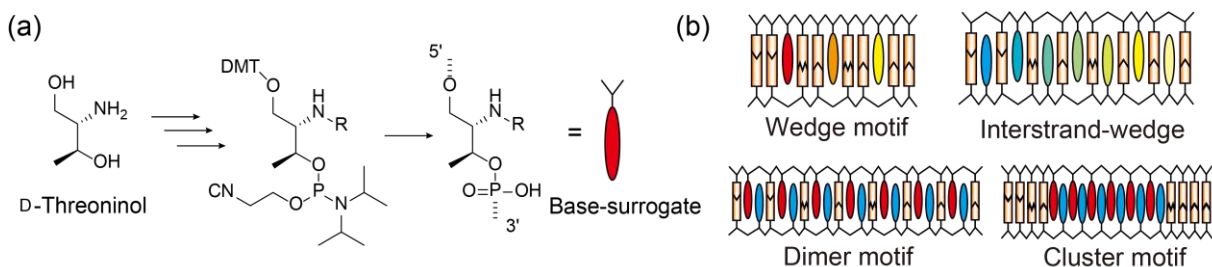


Fig. 2. Design of (a) a base-surrogate with D-threoninol as a scaffold, and (b) four stable functional motifs.

の “共重合” により、我々は Fig.2b に示すような 4 つの安定な機能性モチーフを設計した。興味深いことに、多数の核酸アナログを導入しても天然のヌクレオチド部位の配列認識能は維持されており、機能性分子が平面分子ならば隣接する塩基対とのスタッキングにより二重鎖は大

きく安定化した。目的に応じて機能性分子とモチーフを選択すれば、天然核酸では不可能な様々な機能を容易に実現できる。

2. 光応答性 DNA による二重鎖形成と解離の光制御³⁾

DNA の最大の特徴は、対応する相補鎖と自発的に二重鎖を形成するという超分子性にある。したがって DNA に光応答性を付与すれば、DNA が関与するほぼ全ての反応を光制御できる。そこでアゾベンゼンを核酸アナログ化して DNA 配列中に導入し、二重鎖形成と解離の可逆的な光制御を実現した(Fig.3a)⁴⁻⁶⁾。平面構造の *trans*-型ではいずれのモチーフでも大きく二重鎖を安定化するのに対し、360 nm の UV 光を照射して

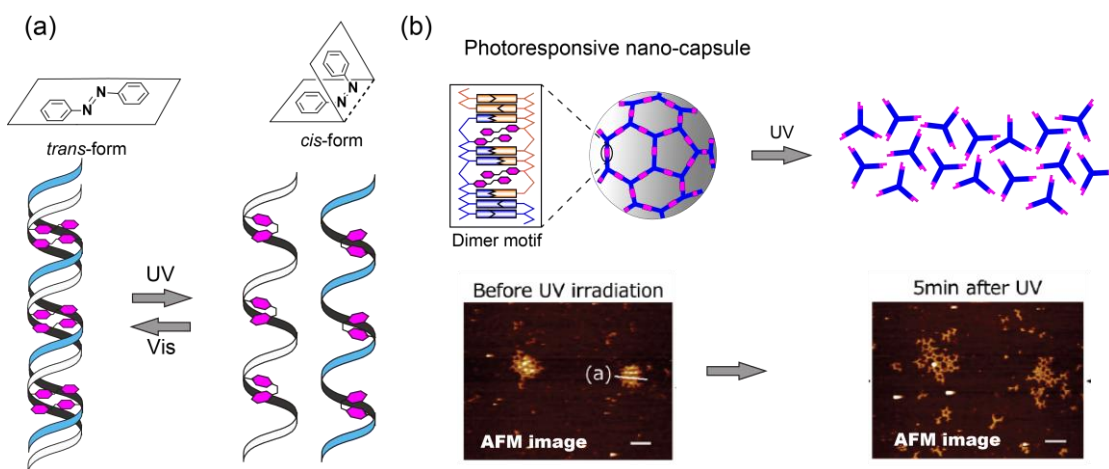


Fig.3. (a) Photoregulation of hybridization by azobenzene-tethered DNA, and (b) photo-induced collapse of DNA nano-capsule for drug release.

非平面構造の *cis*-体に異性化させると二重鎖が大きく不安定化して解離する。我々は、3D-DNA ナノ構造体の接合部分に光応答性 DNA を使用することで、光照射で崩壊する光駆動型 DNA ナノカプセルの調製に成功した (Fig.2b)⁷⁾。このナノカプセルに抗がん剤である doxorubicin (Dox)を内包させ、光照射により Dox を放出させることでガン細胞の死滅を誘導することもできた⁸⁾。このように DNA ナノ構造体に光応答性を付与することで、薬物の controlled release が実現できる。

我々の光応答性 DNA を使用すれば、上記以外に DNAzyme による RNA 切断の光スイッチング⁹⁾、光応答性プロモーターによる転写反応の光制御¹⁰⁾、光駆動型 DNA ナノマシン^{11, 12)}など、核酸が関わる様々な反応の光制御が実現できる。さらにタンパク質に光応答性 DNA を実装することで、ATP 駆動型タンパク質の運動を光制御することも実現している¹³⁾。このように我々の光応答性 DNA は、極めて幅広い応用展開が可能

である。

3. 高感度蛍光プローブによる細胞内 RNA の検出¹⁾

DNA や RNA を配列特異的に検出する高感度蛍光プローブは、テーラード医療実現のためのツールや細胞内 RNA のイメージングに利用できる。我々は、これまでに蛍光色素と消光色素の核酸アナログを設計・合成することで、様々な高感度プローブを設計した。その中の一つが、ステム・ループ構造を必要としないリニアプローブである¹⁴⁾。リニアプローブには、一本鎖 DNA 内に核酸アナログ化した蛍光色素が天然のヌクレオチド 2-3 残基ごとに多数導入されており (Fig.4)、標的核酸非存在下では蛍光色素同士が弱く相互作用するため自己消光により発光しない。一方標的核酸と二重鎖形成すると蛍光色素が塩基対間にインターカレートするため、自己消光が解消して蛍光色素の数に対応した発光を示す。すなわち導入する蛍光色素が多い程消光するのに対し、ターゲットが存在すると導入した蛍光色素の数だけ強く発光する。従来核

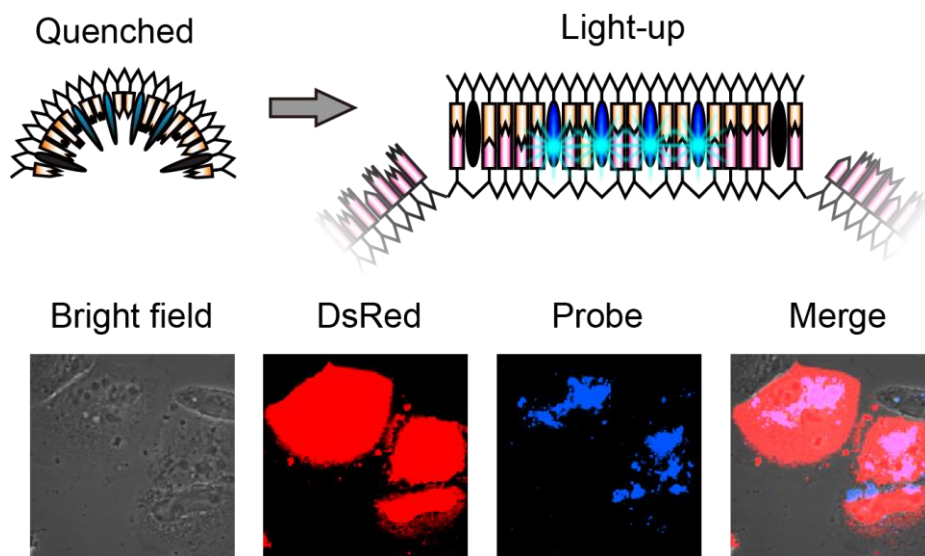


Fig.4. Design of linear probe for the detection of RNA in living cell.

酸の配列特異的認識に使用されてきたモレキュラービーコン(MB)と異なり、導入した色素の数に対応した強い蛍光シグナルを出す。またステム構造を持たないことから MB よりも応答が速い。さらに非天然の核酸アナログを多数含むため、極めて高い酵素耐性も併せ持つ。このリニアプローブを用いることで、生細胞中で分解されることなく mRNA を配列特異的に蛍光検出することに成功した (Fig.4)¹⁵⁾。

4. 非環状型人工核酸 ; D-,L-aTNA, SNA¹⁾

Threoninol に機能性分子ではなく核酸塩基を導入すれば、骨格改変型人工核酸 (XNA) が合成できる。これまで非環状骨格を有する様々な人工核酸が設計されてきたが、そのほとんどは柔軟な骨格に由来するエントロピーロスのため二重鎖を形成することは出来なかった。しかし興味深いことに、D-threoninol を骨格に持つ acyclic D-Threoninol Nucleic Acid (D-aTNA:Fig.5 上)は、同じ配列の DNA よりもはるかに安定なホモ D-aTNA 二重鎖を形成した^{16,17)}。主鎖のメチル基を除去してさらに柔軟性が増した Serinol Nucleic Acid(SNA:Fig.5 中)は、D-aTNA よりは劣るものの、やはり DNA よりも遥かに安定なホモ二重鎖を形成した^{17,18)}。一方 SNA は D-aTNA と異なり、天然の DNA や RNA と安定な二重鎖を形成した¹⁸⁾。メチル基の位置の異なる新たな人工核酸 L-aTNA (Fig.5 下)は、DNA および RNA に対して SNA よりもさらに高い親和性を示した¹⁹⁾。SNA と L-aTNA は、天然の DNA/RNA を認識可能な世界初のアニオン性非環状型人工核酸である。

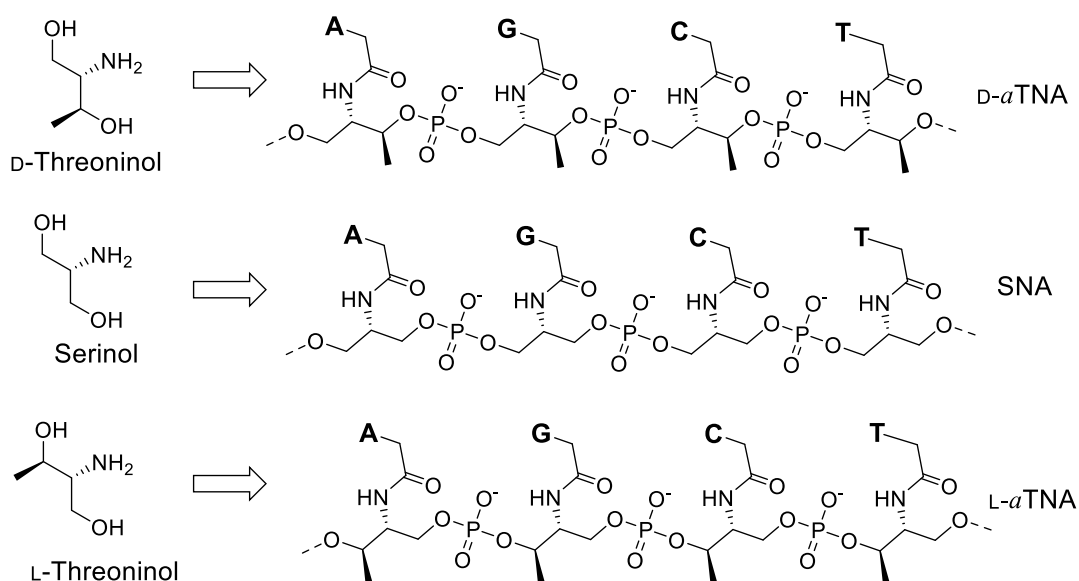


Fig. 5. Three acyclic artificial oligonucleotides designed from acyclic scaffolds.

SNA と L-aTNA は、天然のヌクレオチドと骨格構造が全く異なる。そのためリボース修飾型の人工核酸と異なり、細胞内や血清中に含まれるヌクレアーゼで分解されることは無い。また細胞毒性も無いので、生体応用が可能である。例えば SNA のみで合成された MB が細胞中のヌクレアーゼで分解されることなく mRNA を蛍光イメージング可能なことや²⁰⁾、RNA の両末端に SNA を導入した short interference RNA (siRNA)

が酵素耐性と高活性化を併せ持つことも明らかにした²¹⁾。さらに最近、SNAがmiRNAを標的としたアンチセンス核酸(AMO)としても有効であることが判明した²²⁾。このようにSNA(およびL-aTNA)は、近年新たなバイオ医薬品として注目されている核酸医薬への応用も期待できる。

6. まとめと今後の展望

我々が開発した非環状骨格は構造が単純なため、合成は極めて容易である。一方XNAで紹介したように、我々の非環状骨格は、HをCH₃に変えるというほんの僅かな変化に対してさえ、大きな影響を受ける。有機合成化学の神髄は大胆かつ繊細な設計を自在に行えることであり、D-aTNA→SNA→L-aTNAへの進歩は、ごく簡単な化学修飾でさえも人工核酸の設計に大きな力を発揮できたことを端的に示している。また単純な構造であるが故に、さらに緻密かつ高度な修飾も可能である。例えばCH₃の導入位置や数を系統的に変化させれば、安定なホモ二重鎖やDNA・RNAとのヘテロ二重鎖形成を設計するための合理的な指針を得ることができる。またL-aTNAの主鎖のCH₃をCH₂-NH₂やCH₂-OHへ置換すれば、主鎖への正電荷や水素結合サイトの導入も可能になり、更なる高機能化も期待できる。今後は主鎖骨格の改変に加え、天然のリボースへの導入が困難な高機能化修飾塩基と組み合わせることで、従来の人工核酸を遥かに凌駕する非環状型人工核酸の設計と、その核酸医薬等の医療応用を目指す予定である。

H. Asanuma *et al.*, 1) *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 1055. 2) *Polymer J.*, **2017**, *49*, 279. 3) *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 1663. 4) *Nat. Protoc.*, **2007**, *2*, 203. 5) *Small* **2009**, *5*, 1761. 6) *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 9001. 7) *Nano Lett.*, **2010**, *10*, 35. 8) *ChemMedChem*, **2017**, *12*, 2016. 9) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167. 10) *ACS Synth. Biol.*, **2015**, *4*, 365. 11) *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 702. 12) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1165. 13) *Nat. Commun.*, **2017**, *accepted*. 14) *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 3165. 15) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 4315. 16) *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14702. 17) *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 14151. 18) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1285. 19) *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500. 20) *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 1298. 21) *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 2549. 22) *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 1917.