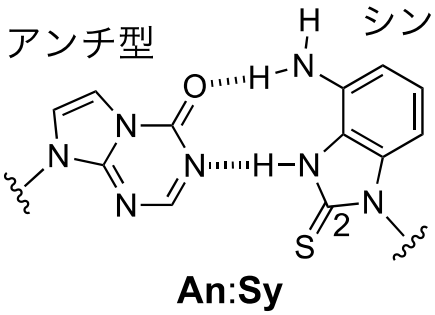
126　核酸創薬研究に資する新規非天然塩基対の開発	森廣　邦彦

【目的】天然のA：T及びG：C核酸塩基対は選択的かつ強固に形成されることから、遺伝情報の保存と伝達に大きな役割を果たしている。もしこれらに加えて第3の塩基対をDNA中に導入することができれば、合成生物学や核酸医薬品の素材としても非常に有用である。しかし、既存の非天然塩基対には化学的安定性や酵素認識能、安全性に問題点が存在し、実用化へのハードルは未だ高いのが現状である。本研究では核酸塩基のアンチ-シン配向性に着目した新規非天然塩基対 **An**：**Sy** の開発研究を行った（図）。

【方法】 **An** および **Sy** を塩基部にもつアミダイトブロックを化学合成し、DNA合成機によるオリゴヌクレオチドへの導入を計画した。また、**An**：**Sy** 塩基対の安定性については、二重鎖DNAの融解温度（T_m値）測定によって評価することとした。また、得られた結果を基に量子化学計算を実施し、化合物設計へフィードバックすることで構造の最適化を行うこととした。

【結果】当初予定していた合成スキームから若干の変更はあったものの、計画通り **An** および **Sy** アミダイトの合成を完了し、DNA自動合成機を用いてオリゴヌクレオチド中に導入することに成功した。続いて、融解温度（T_m値）測定により **An**：**Sy** 塩基対の安定性を評価した結果、**An**：**Sy** 塩基対は一定の安定性を示すものの、天然のA：T塩基対と比較すると熱的に不安定であることが明らかとなった。また、その選択性にも一部不十分な点が見られた。これらの原因を考察するべく量子化学計算を実施したところ、**Sy** 塩基の異性化の関与が示唆された。現在、これらの欠点を解決できる誘導体の合成を行なっている。

本研究で設計した非天然塩基対 **An**：**Sy** の構造と期待される特性



・高い化学的安定性
・安定かつ選択的な塩基対形成
・配列制限のない酵素的伸長
・低い細胞毒性

126. 核酸創薬研究に資する新規非天然塩基対の開発

森廣　邦彦

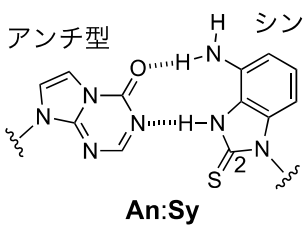
東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻

Key words：非天然塩基対，人工核酸，核酸医薬，合成生物学，アンチ-シン配向性

緒　言

天然のA：T及びG：C核酸塩基対は選択的かつ強固に形成されることから、遺伝情報の保存と伝達に大きな役割を果たしている。もしこれらに加えて第3の塩基対をDNA中に導入することができれば、遺伝暗号の拡張により人工アミノ酸を持った生物を作り出すことも可能になる。実際これまでにいくつかの非天然塩基対が開発され、中でもBennerらによる**P**：**Z**、Romesbergらによる**NaM**：**5SICS**そして平尾らによる**Ds**：**Px**塩基対はPCRによる酵素的な増幅が可能であることから特に実用性が高いとされている［1］。また、これらの非天然塩基対は近年注目されている核酸医薬品の素材としても非常に有用である。一例として、平尾らは**Ds**を加えた5種類の核酸塩基からなるDNAアプタマーを作製し、それらが天然塩基のみからなるものと比較してはるかに高い標的結合力を有することを報告している［2］。このような人工アプタマーをはじめ、非天然塩基対を搭載した核酸分子は今後の核酸創薬研究で大きな役割を担っていくことが予想される。しかし、既存の非天然塩基対にはいくつかの欠点が存在し、実用化へのハードルは未だ高いのが現状である。例えば、**Z**の3位NHのp*K*aは5位ニトロ基の電子求引効果によって7.8に低下しており、中性条件下においても脱プロトン化による塩基対形成能の低下が起こり得る［3］。また、**NaM**：**5SICS**と**Ds**：**Px**はポリメラーゼによる連続的な伸長が不可能であり、酵素的に増幅できる配列に制限が存在する。さらに、**NaM**：**5SICS**塩基対については光細胞毒性［4］についても指摘がなされている。以上の背景から、創薬研究に資するためのより高い実用性と汎用性を有する非天然核酸塩基対の開発が強く求められている。

本研究で我々は、①高い化学的安定性 ②安定かつ選択的な塩基対形成 ③配列制限のない酵素的伸長 ④高い安全性の全てを兼ね備え、真に核酸創薬研究に資することができる新規非天然塩基対**An**：**Sy**の開発を行う（図1）。**An**は通常のプリン塩基と同様のアンチ型のコンホメーションをとる一方、**Sy**は2位硫黄原子の立体的な嵩高さからシン型を優先すると考えられる［5］。本塩基対は、①**An**と**Sy**が共に生理的条件下においてプロトン化や脱プロトン化を受けないため、化学的に安定であると考えられる。また、②水素供与基/受容基のパターンから天然のA、T、G及びCとは高い直交性を持ちつつ、2本の水素結合によって安定な塩基対を形成するように設計した。③については、疎水性相互作用や形状フィッティングによって安定化する**NaM**：**5SICS**と**Ds**：**Px**の酵素的連続的伸長が不可能である一方、水素結合により塩基対が安定化する**P**：**Z**はそれが可能であることが分かっている［6］。**An**：**Sy**は水素結合によって安定化するように設計していることから、酵素的な連続伸長が可能であり、増幅できる配列に制限はないと考えている。④の安全性について予想できる部分は多くないが、**NaM**：**5SICS**と比較すると**An**：**Sy**は天然の核酸塩基対と化学構造が類似しており、毒性の低下が期待できる。以上のように、**An**：**Sy**は弱点のない完璧な非天然核酸塩基対となり得る。



・高い化学的安定性
・安定かつ選択的な塩基対形成
・配列制限のない酵素的伸長
・低い細胞毒性

図1. 非天然塩基対**An**：**Sy**の構造と期待される特性

方法および結果

1. An と Sy を導入したオリゴヌクレオチドの合成

まず、**An** を塩基部にもつアミダイトブロックを化学合成した（図 2）。具体的には、文献既知化合物 **1** [7] と Hoffer's sugar とのグリコシル化反応により **An** ヌクレオシド誘導体 **2** をα：β=1：1 の異性体混合物として得た。続いて塩基性条件下 Tol 基を除去した後、1 級水酸基を DMTr 化、2 級水酸基をホスホロアミダイト化し、望みの **An** アミダイトブロックを合成した。

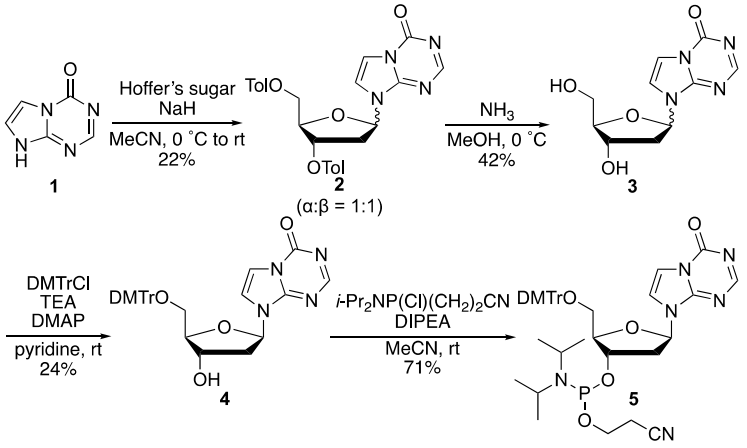


図 2. **An** アミダイトブロックの合成経路

同様に、**Sy** アミダイトブロックの合成を実施した（図 3）。文献既知化合物 **6** [8] のチオール基を選択的にシリル基で保護した後、Hoffer's sugar とのグリコシル化反応により **Sy** ヌクレオシド誘導体 **8** を望みのβ体選択的に得た。Tol 基を加水分解により除去した後、塩基部アミノ基を選択的に DMA 基で保護した。最後に 1 級水酸基の DMTr 化、2 級水酸基のホスホロアミダイト化を行い、望みの **Sy** アミダイトブロックを合成に成功した。

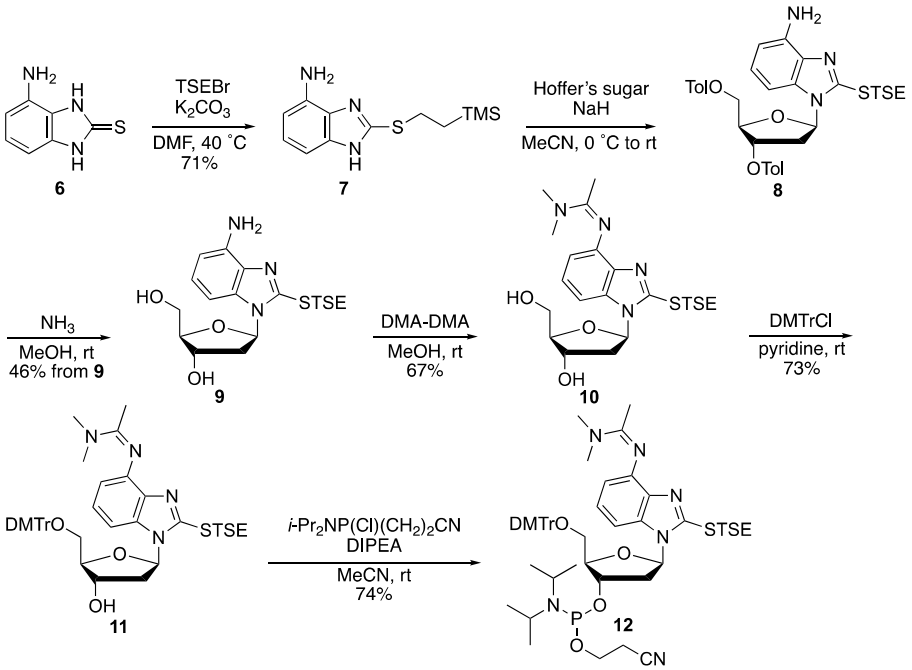


図 3. **Sy** アミダイトブロックの合成経路

続いて合成した **An** および **Sy** アミダイトブロックを DNA 自動合成基によりオリゴヌクレオチド中に導入した。An ヌクレオチドが強塩基性条件に不安定であることが判明したため、合成条件としてウルトラマイルド法を採用した。

2. An : Sy 塩基対形成能の評価

合成したオリゴヌクレオチドが形成する二重鎖の融解温度（T_m 値）測定により、**An : Sy** 塩基対の安定性を評価した。測定結果を表 1 にまとめて示す。**An : Sy** 塩基対は 36℃の T_m 値を示し、天然の A : T 塩基対（T_m = 47℃）よりも不安定であるが、A : C ミスマッチ塩基対 （T_m = 28℃）と比較すると熱的に安定であることが明らかとなった。また選択性に着目すると、**An** は **Sy** を他の天然塩基より 4 から 7℃の T_m 値の差で認識していた。一方で、**Sy** の **An** 認識能が不十分であることも分かった。すなわち、**An : Sy** 塩基対の T_m 値（36℃）は A : **Sy** 塩基対と同値であり、選択的な **An : Sy** 塩基対は困難であった。

表 1. T_m 値測定結果

5′-d(ATGCGA**X**AGCGTA)-3′

3′-d(TACGCT**Y**TCGCAT)-5′

X : **Y**	T_m[b] (℃)	ΔT_m[c] (℃)	**X** : **Y**	T_m[b] (℃)	ΔT_m[c] (℃)
An : **Sy**	36	-			
An : A	29	7	A : **Sy**	36	0
An : G	30	6	G : **Sy**	34	2
An : C	32	4	C : **Sy**	24	12
An : T	31	5	T : **Sy**	33	3
A : T	47	-11	A : C	28	8

考　察

Sy の **An** 認識能の低さの原因の 1 つとして、**Sy** のチオケトン-イミノチオール間の互変異性化を考えた。量子化学計算ソフト Spartan を用いてエネルギー計算を実施した結果、六員環構造内の窒素原子が増加するにつれて異性化のエネルギー障壁が大きくなり、チオカルボニル構造が安定化されることが示唆された（図 4）。すなわち、予想通り **Sy** はイミノチオール型に互変異性しやすく、**An** : **Sy** 塩基対形成の選択性低下に寄与していることが示唆された。この計算結果から、現在は **Sy** の六員環部分に窒素原子を導入した誘導体の合成に取り組んでいる。



X	Y	ΔE (kcal/mol)
CH	CH	7.6
CH	N	22.3
N	N	50.2

HF/6-31++G**

図 4. 量子化学計算による異性化エネルギー障壁

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻におきまして岡本晃充教授のご指導のもと、森山悠也修士にご協力を賜りながら進めて参りました。この紙面をお借りいたしまして、心より感謝を申し上げます。

文 献

1) Malyshev DA, Romesberg FE. The expanded genetic alphabet. Angew Chem Int Ed Engl. 2015 Oct 5;54 (41):11930-11944. doi: 10.1002/anie.201502890. Epub 2015 Aug 25.

2) Kimoto M, Yamashige R, Matsunaga K, Yokoyama S, Hirao I. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. Nat Biotechnol. 2013 May;31 (5):453-457. doi: 10.1038/nbt.2556. Epub 2013 Apr 7.

3) Reichenbach LF, Sobri AA, Zaccai NR, Agnew C, Burton N, Eperon LP, Ornellas S, Eperon IC, Brady RL, Burley GA. Structural basis of the mispairing of an artificially expanded genetic information system. Chem. 2016 Dec 8; 1(6), 946-958. doi: 10.1016/j.chempr.2016.11.009.

4) Pollum M, Ashwood B, Jockusch S, Lam M, Crespo-Hernández CE. Unintended consequences of expanding the genetic alphabet. J Am Chem Soc. 2016 Sep 14;138(36):11457-11460. doi: 10.1021/jacs.6b06822. Epub 2016 Sep 2.

5) Miyata K, Tamamushi R, Tsunoda H, Ohkubo A, Seio K, Sekine M. Synthesis and triplex formation of oligonucleotides containing 8-thioxodeoxyadenosine. Org Lett. 2009 Feb 5;11 (3):605-608. doi: 10.1021/ol802622s.

6) Yang Z, Chen F, Alvarado JB, Benner SA. Amplification, mutation, and sequencing of a six-letter synthetic genetic system. J Am Chem Soc. 2011 Sep 28;133(38):15105-15112. doi: 10.1021/ja204910n. Epub 2011 Sep 6.

7) Nair V, Lyons AG, Purdy DF. Novel dideoxynucleoside isosteres. Tetrahedron. 1991 Nov 4; 47 (43), 8949-8968. doi: 10.1016/S0040-4020 (01)86501-7.

8) Carry JC, Clerc F, Minoux H, Schio L, Mauger J, Nair A, Parmantier E, Le Moigne R, Delorme C, Nicolas JP, Krick A, Abécassis PY, Crocq-Stuerga V, Pouzieux S, Delarbre L, Maignan S, Bertrand T, Bjergarde K, Ma N, Lachaud S, Guizani H, Lebel R, Doerflinger G, Monget S, Perron S, Gasse F, Angouillant-Boniface O, Filoche-Rommé B, Murer M, Gontier S, Prévost C, Monteiro ML, Combeau C. SAR156497, an exquisitely selective inhibitor of aurora kinases. J Med Chem. 2015 Jan 8;58 (1):362-375. doi: 10.1021/jm501326k. Epub 2014 Nov 24.