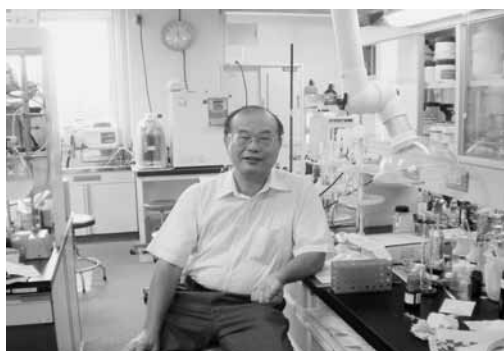




核酸分子をデザインする

関根・清尾 研究室～分子生命科学専攻



関根 光雄 教授

ヒトの DNA の解読と解析は完了し、多くの疾患が DNA 上にある遺伝子の変異によって引き起こされることがわかりつつある。疾患の原因となる遺伝子の変異の有無を調べ、治すには、DNA と似た構造の分子を用いればよいと考えられた。しかし、DNA と全く同じ構造の分子では、うまくいかない。関根・清尾研究室では、遺伝子診断や治療のできる分子を、化学的な視点からデザインし、合成する研究を行っている。ヒトの体がもつ精巧な高分子、DNA を下敷きに、それを越える分子づくりについて、お話を伺った。



生命情報を司る分子、核酸

関根・清尾研究室では、核酸という分子を有機化学的手法で合成する研究を行っている。具体的には、遺伝子に関わるさまざまな問題を解決できるよう、核酸分子に、人工的に設計した構造を組み込むことを試みている。

生物の体で起こる反応では、タンパク質が重要な役割を果たしている。タンパク質はアミノ酸が多数結合したものであり、このアミノ酸の配列を決定するのが遺伝子である。タンパク質を組み立てる際、DNA の中に書かれている遺伝子はいったんコピーされ、RNA に書き込まれる。RNA と DNA は構造がよく似ており、これらをあわせて核酸とよぶ。

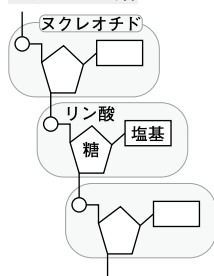
核酸は、ヌクレオチドを構成単位とする高分子である。リン酸・糖・塩基からなるヌクレオチドは、図 1 に示した構造をもっている。一つのヌクレオチドの糖と、隣り合ったヌクレオチドのリン酸との結合を繰り返すことにより、ヌクレオチドの多量体の鎖である核酸がえられる。

DNA、RNA の塩基はそれぞれ 4 種類ある。DNA の塩基はアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) の 4 種類であり、RNA

の塩基はアデニン、グアニン、シトシン、ウラシル (U) の 4 種類である。

ヌクレオチドは塩基が水素結合することによって対をつくる。塩基対は、生体内では A と T、A と U、あるいは G と C のみがつくられ、その他の対は存在しない。A と T、A と U の場合は 2 か所、G と C の場合は 3 か所の水素結合によって、対を成している。DNA は、この塩基どうしの結合によって、二本のヌクレオチド鎖からなる二重らせん構造をしている。RNA は、通常生体内では、一本のヌクレオチド鎖として存在している。

ヌクレオチド鎖



塩基対

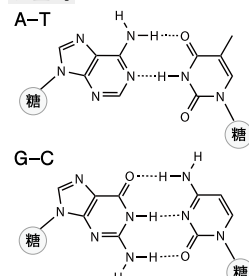


図 1 ヌクレオチドと塩基対

では、DNA 上の遺伝子から、体を構成するタンパク質がつくられるまでの過程を説明しよう。まず、DNA の二重らせんのタンパク質合成に使う部分がほどこける。次に、ほどこけた DNA 鎖の片方を鋳型として、決まった塩基対をつくりながら、ヌクレオチドが結合して短い鎖となる。この鎖はメッセンジャー RNA (mRNA) とよばれる。この mRNA の塩基の並びが、三つずつで個々のアミノ酸に対応している。続いて、対応するアミノ酸を引き連れたトランスファー RNA (tRNA) が mRNA に次々と結合する。そして tRNA に引き連れられて並んだアミノ酸がつなげられ、タンパク質ができあがる。

塩基配列がアミノ酸配列を決定するため、DNA の塩基配列に異常があった場合、つくられるタンパク質のアミノ酸配列が変わってしまう可能性がある。この場合、正常なタンパク質がつかれなくなり、体の重要な機能の一部が失われてしまうこともありうる。実際に、DNA の塩基配列に起きた異常によって生じる病気の例は、がんを始めとして、多く知られている。



DNA チップを医療現場へ

関根・清尾研究室では、研究テーマの一つとして、遺伝子診断に用いる DNA チップの開発を行っている。DNA チップとは、1～10 cm² のガラス片の上に人工的に合成した核酸を多数配置したものだ。これを用いると、疾患の有無を遺伝子レベルで診断することができる。生体外で、チップの核酸が配置された面に検査したい DNA が含まれる溶液をかけ、その後チップに光を当てるという操作を行って診断する。疾患に関わっている異常な塩基配列をもつ DNA とのみ結合するような人工核酸を埋め込んでおけば、異常がある場合だけ、チップ上に DNA が捕らえられる。チップにかける DNA には光を当てると蛍光を放つ構造を組み込むことができる。この構造を組み込んでおくことにより、チップに光を当てた際に目的の遺伝子が捕らえているか否かがわかる。

DNA チップを用いる遺伝子診断法は、長きにわたりその実現が夢見られてきたが、未だヒトの病気を診断する技術として医療現場には普及していない。DNA チップの検出精度が低いからだ。

近年、ヒトの DNA 塩基配列全体を解読し、解析することが可能となり、また解析にかかる時間は年々短くなってきている。現在では、これまでに解析された DNA 塩基配列に関する情報から、病気を引き起こす遺伝子異常がわかりつつあり、この情報をもとにして、人工核酸を医療に応用することが期待されている。異常の生じた遺伝子に正確に結合するような人工核酸を用いることで、DNA 塩基配列における異常の有無を調べたり、異常部分が mRNA に写し取られるのを制御したりすることができると考えられている。これらの実現のために、適切な構造の核酸を人工的に合成することが求められているのだ。

関根・清尾研究室では、遺伝子異常の検出や、治療への応用を見据えながら、核酸分子を化学合成するという基礎的なアプローチで研究を進めている。先生が取り組んでいる多くのテーマから、本稿では、DNA チップ精度の向上、三本鎖形成能をもつ人工核酸の開発、塩基部無保護法の開発、そして筋ジストロフィー治療への応用の四つについて紹介する。

DNA チップでの検出精度が低い理由のひとつとして、ミスマッチ塩基対の形成が挙げられる。先に、生体内では塩基対は決まったペアでのみつくられると述べた。しかし、4種類の塩基構造の熱力学的な安定性を考えると、A-T、G-C 以外の組み合わせも十分起こりうる。これらはミスマッチ塩基対と呼ばれる。生体内では、ミスマッチ塩基対が誤ってつくられても、それを巧みに修復する機構があるが、生体外で行う DNA チップ上の反応では、その機構が存在しないため、ミスマッチ塩基対がつくられるとそれを修復することができない。DNA チップを用いる遺伝子診断を実現させるためには、生体内におけるミスマッチ塩基対の修復機構に代わる何らかの方法で、生体外でも正しい塩基対を形成するようにしなければならないのである。

ミスマッチを防ぎ、確実に正しい塩基対を形成させるため、関根先生らは DNA チップに埋め込む核酸の塩基の構造を改良した。ミスマッチ塩基対のなかでも、特に形成されやすいのが T-G、

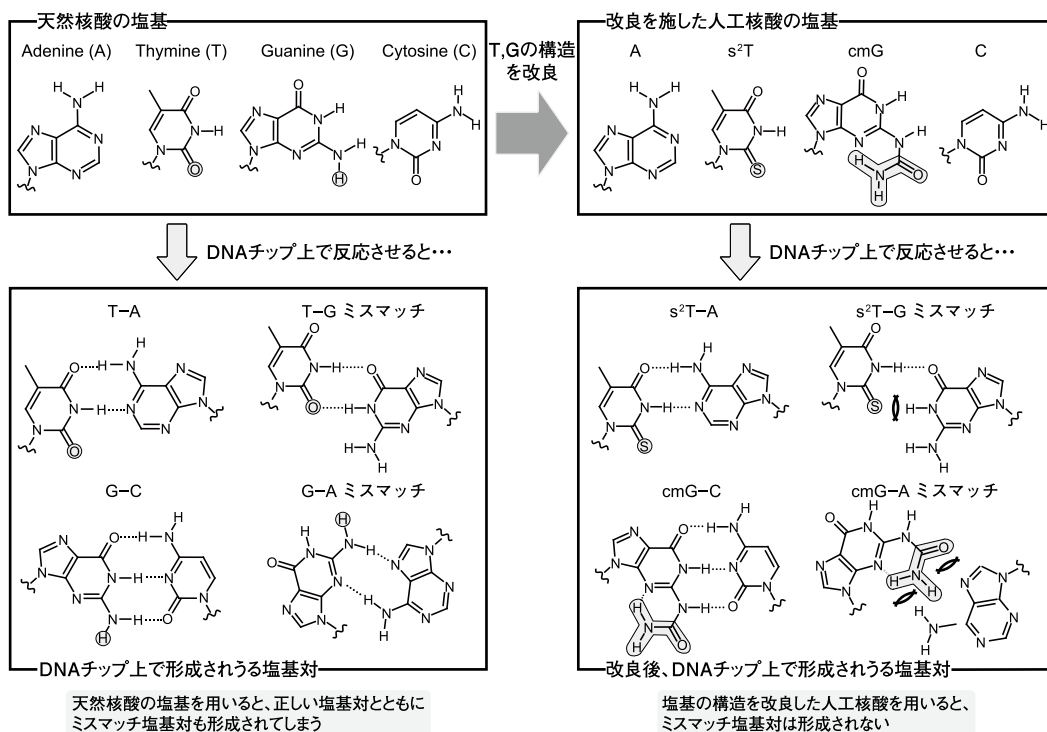


図2 ミスマッチ塩基対形成とその制御

G-Aの塩基対である。これらのミスマッチ塩基対の形成を防ぐ塩基部の構造(図2)について、先生らの研究を紹介しよう。

T-G ミスマッチ塩基対では、図2に示す通りT-A塩基対の場合と異なるところに水素結合が生じていた。T-A塩基対における水素結合と、T-G塩基対における水素結合の強さはほぼ等しいため、ミスマッチ塩基対の形成が起こりやすい。水素結合は原子間の静電的な相互作用によって生じるため、ミスマッチを防ぐには、誤って形成された水素結合の静電気を弱める方法が考えられる。関根・清尾研究室では、T-G ミスマッチ塩基対において、水素結合の生じていたT塩基の酸素原子を硫黄原子に置き換え、s²Tに変えた。すると、T塩基の酸素原子とG塩基の水素原子が引き合うことにより生じていた水素結合を弱めることができた。これは、原子半径の大きい硫黄原子の負電荷が原子表面上で分散するためである。また、硫黄原子の立体障害の影響も大きい。改良を施した後のs²T-G塩基対では、T-G ミスマッチ塩基対に存在した水素結合が二本から一本に減

るため、この塩基対が劇的に減少する。一方で、この置換を行っても、s²T-A塩基対間の水素結合の強さには影響がない。

G-A ミスマッチ塩基対の代表的な構造では、G塩基の六員環の窒素原子と、A塩基の六員環についているアミノ基、G塩基の六員環についているアミノ基と、A塩基の五員環の窒素原子との間の二ヶ所に水素結合が生じていた。そこで、先生らは、G塩基の六員環についているアミノ基に、カルバモイル基とよばれる構造(-CONH₂)を付け加え、cmGに変えた。すると、cmGの六員環の窒素原子と、カルバモイル基の水素原子が引き合って、分子内水素結合を形成し、A塩基との水素結合形成を妨げるため、ミスマッチを防ぐことができた。また、cmG-C塩基対間の水素結合の強さは十分保たれることがわかっている。

以上に紹介したもの以外にも、関根・清尾研究室はミスマッチを防ぐ構造を創出してきており、研究室ではこれらを第一世代の人工核酸と呼んでいる。第一世代の成果を土台に、現在では第二世代の人工核酸を開発中である。



効率的な核酸合成法

DNA 化学合成法では、30 年ほど前は、ヌクレオチドの数をねずみ算式に増やしていく方法がとられていた。二つの核酸の単量体どうしをつなげて二量体をつくり、二量体どうしをつなげて四量体をつくる、という方法だ。しかし、多量体の合成は長時間を要することが難点だった。この問題が多く研究者により解決されて、現在の DNA 化学合成では、ヌクレオチドを一つずつつなげていくという方法がとられているが、この方法にも問題点が残っている。ヌクレオチドをつなげる一連の合成サイクルが繰り返されるなかで、保護をしなければ塩基部で副反応が起こるということである。ヌクレオチドの塩基部には反応性の高いアミノ基が含まれているため、本来目的とするリン酸を介して連結した部分だけでなく、塩基部において分岐した DNA が生成してしまうのだ。これを防ぐ目的で、従来、DNA の化学合成は塩基部に保護基を導入した上で行われてきた。しかし近年では、塩基部に保護基を導入しなくても副反応を抑えられる塩基部無保護法の開発が盛んに行われている。

塩基部無保護法は、保護基の導入や脱保護の必要がないため、これらの反応工程に必要な試薬や操作を省くことができる。また、アンモニアを用いる脱保護操作を行わなくてよいと、塩基性条件下で不安定な機能性官能基を人工核酸に導入することもできる。この利点から、これまで複数の塩基部無保護法が研究されてきた。関根・清尾研究室は、活性ホスファイト法と呼ばれるもっとも実用的な塩基部無保護法を開発した。この活性ホスファイト法について説明しよう。

DNA を合成する際には、新たな一つのヌクレオチドを、合成途中のヌクレオチド鎖末端に縮合させる。その際に、これまではテトラゾールという試薬が用いられてきた(図3)。しかし、テトラゾールでは1回の縮合の収率が低く、実用的とは言えなかった。DNA が塩基部において分岐したり、ヌクレオチド数個分が縮合しなかったために、予定した長さにならなかった DNA が多量に生成してしまったのである。仮に、ヌクレオチド百個をつなげたヌクレオチド 100 量体をつ

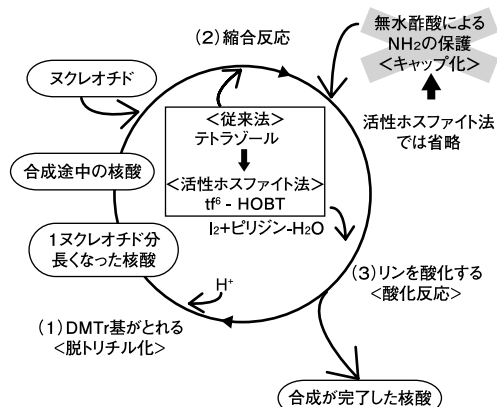


図3 活性ホスファイト法

くるとすると、縮合反応は 99 回繰り返される。一回の縮合における収率が 99 % と一見高い割合であっても、反応の繰り返しによって、目的の 100 量体は、大変低い割合でしか得られなくなる。複雑にエラーが重なることで、塩基部が幾度も分岐し、またそもそもヌクレオチドの足りない核酸分子が多く合成されてしまうからだ。

関根・清尾研究室で開発された活性ホスファイト法では、縮合反応に用いる試薬を、テトラゾールから 6-トリフルオロメチル-1-ヒドロキシベンズotリアゾール($\text{tf}^6\text{-HOBT}$)に変えた。すると、一回の縮合における収率が 99.7 % 以上に向上し、縮合反応を繰り返した後に目的の DNA が得られる割合は非常に高まった。実際には、100 量体もの多量体の場合、ヌクレオチド鎖の分岐が起きなくても、ヌクレオチドの塩基の構造が壊れてしまうという新たな問題が起きる。しかし、30 量体前後のヌクレオチド鎖については、分岐がなく塩基の構造も壊れていないものをほぼ完璧に合成することができるようになった。

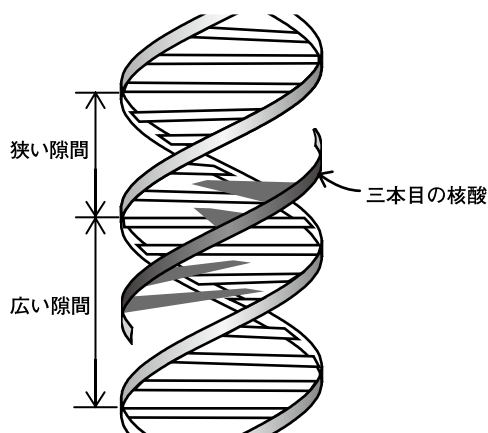
生体内では、酵素という触媒タンパク質により、塩基部を保護しなくても正確な DNA のみがつくられる。その点で、関根・清尾研究室の活性ホスファイト法は酵素に近づいた画期的な合成法と言えるだろう。現在は、人工生命の創出など、応用研究の効率化のために 100 量体以上の超多量体を使いたい、との呼び声も高い。関根・清尾研究室では、核酸合成法のさらなる向上を目指している。



三本鎖を形成する人工核酸

人工核酸を用いる遺伝子治療法の一つとして、アンチジーン法というものがある。アンチジーン法とは、DNAの二重鎖を標的として、遺伝子の異常が起きている部分を人工核酸を用いて不活化することで、mRNAに写し取られないようにする方法だ。合成された多数のmRNAの異常部を不活化する方法に比べ、遺伝情報の原本であるDNAを標的としているアンチジーン法は、より効率のよい治療を可能にすると考えられている。しかし、アンチジーン法による治療薬は、異常部分を不活化する際の正確さが不十分であるため、まだ実用に至っていない。関根先生らが研究している第三の人工核酸は、このアンチジーン法の治療を実現させるためのものである。

まず、DNAの二重らせんをどのようにして不活化するのかを説明しよう。DNAの二重らせんは図4に示したように巻いていて、らせんどうしの隙間には狭い部分と広い部分がある。塩基配列の異常部分を認識して結合するように合成した、一本鎖の短い核酸を入れたら、その核酸は、二重らせんの構造を大きく崩さず広く広い隙間におさまって、三本鎖を形成する。DNAの二重らせん構造を認識してとりつき、らせんをほどく物質は、三本鎖の部分にとりつくことができない。遺伝子の異常が生じている部位を三本鎖にしておくこと



スタッキングにより、DNA二重鎖の広い隙間に三本目の核酸がファンデルワールス力により結合する

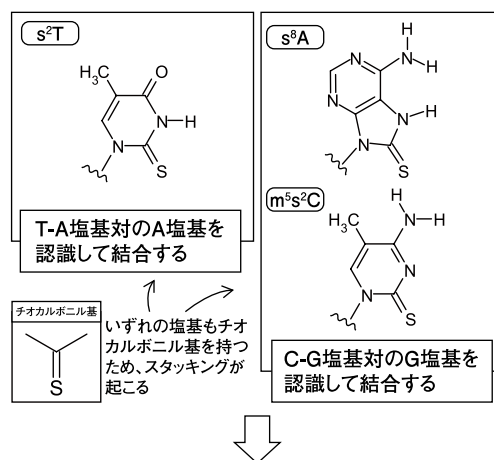
図4 三本目の核酸

により、この部分は不活化される。

三本鎖を形成するには、二重鎖のDNAにしっかりと結合するような三本目の核酸を合成することが必要となる。生体内に存在するものと同じ構造の核酸を用いる場合、生体外の反応では、酸性条件下に限って三本鎖が形成される。しかし、細胞の核内はpH7.2とほぼ中性である上、約37℃に保たれているから、核内に等しい条件下で二重鎖DNAと結合するよう、核酸塩基の構造を改良しなければならない。この改良には多くの研究者が取り組んだが、良い成果が上らず諦める場合が多かった。しかし、その中で先生らは継続して、生体内の環境で三本鎖を形成するスクレオチドの構造を探し、その結果、核内に等しい環境下で、T-A塩基対、C-G塩基対をそれぞれ認識して結合する構造(図5)を発見した。

T-A塩基対を認識して結合する塩基として、 s^2T を使う。C-G塩基対の認識と結合には、 s^8A 、または m^5s^2C を使う。これらの塩基はすべて炭素と硫黄の二重結合であるチオカルボニル基をもっている。この置換基をもっていることによって、スタッキングという現象が起こる。

スタッキングとは、核酸の塩基のような平面分子が、一種のファンデルワールス力によって積み重なろうとする現象だ。DNAの二重らせんは、



体温・中性条件下でも三本鎖が容易に形成される

図5 三本鎖が形成する塩基の構造

リン酸と糖の鎖の部分を外側として、内側に水素結合で対になった塩基が積み重なっている。三本目の核酸塩基は、この積み重なった塩基の間に入り込み、塩基間の強いファンデルワールス力で結合するようになる。このとき、チオカルボニル基をもつヌクレオチドを連続させると、体温・中性条件の下でも三重鎖が安定に形成される。

三重鎖の結合が強化される上に、細胞内に多数存在する mRNA ではなく、二重鎖 DNA のみに結合する、という選択性も保たれる。これには、 s^8A の性質が関わっている。ヌクレオチドはグリコシド結合に関して、塩基と糖の五員環の向きが揃っているものが *syn* 型、 180° 回転したものが *anti* 型とよばれる。 s^8A は、*anti* 型の場合に A-T、または A-U 塩基対をつくるが、*syn* 型では A-T 塩基対しか形成されない。*syn* 型と *anti* 型の

安定性を比較すると、*syn* 型の方が圧倒的に安定である。したがって、生体内の環境下では、 s^8A が天然の A 塩基のように mRNA の U 塩基と塩基対を形成するということは起こりにくい。また、一本鎖の C 塩基、G 塩基と結合することもない。

s^2T 、 s^8A 、 m^5s^2C の三つの塩基の発見により、アンチジーン法による遺伝子治療は実現へ大きく近づいた。現在では、DNA に代わるものとして、より三重鎖をつくりやすい RNA を用いて、アンチジーン核酸を創ろうとしている。関根・清尾研究室には、すでに開発済みの 2'-O シアノエチル RNA というオリジナルの RNA がある。これは、天然の RNA の安定性の低さを克服した RNA であり、これを用いればますます有効なアンチジーン人工核酸ができる、と関根先生は考えている。今後の進展にも期待がかかる。



遺伝子疾患を救う核酸へ

遺伝子変異に起因する病気の一つに、筋ジストロフィーが挙げられる。筋ジストロフィーとは、筋肉の萎縮や脱力を引き起こす疾患で、型により死に至る場合もある。遺伝子変異により、筋細胞を細胞膜の内側から支えるジストロフィンというタンパク質が欠損することが直接の原因である。

核内にある DNA は、タンパク質のアミノ酸配列を直接決定する部分であるエクソンと、そうでない部分であるイントロンからなり、エクソンとイントロンは交互に並んでいる。DNA 上の遺伝子からタンパク質がつくられるとき、まず、mRNA 前駆体がつくられる。これが DNA の塩基配列をそのまま写し取ったものである。そして、mRNA 前駆体からイントロンが取り除かれ、不要な部分が取り除かれた mRNA ができる。この前駆体から mRNA が合成される過程をスプライシングという。

筋ジストロフィー患者の遺伝子の異常は、所々ヌクレオチドが欠けていることにある。本来ジストロフィン遺伝子は 79 個のエクソンからなるが、筋ジストロフィー患者の遺伝子では、スプライシングの際に乱れが生じるため、その半数以上の情報が読み取られない。本稿の初めの節で述べたように、mRNA の塩基配列は、塩基三つごとに一組として、その三つ組の並んだ順番通りに読み取

られていく。ゆえに、例えばエクソンのなかで、ある一つのヌクレオチドが欠けているとき、塩基の三つ組を読み取る枠は、一つずつずれてしまう。塩基の三つ組のなかには、個々のアミノ酸に対応するものの他に、タンパク質合成の終了を指令する配列が存在する。患者の遺伝子におけるヌクレオチドの欠損のしかたでは、本来は 79 番目で現れるタンパク質合成中止の配列が、非常に順番の早いエクソンで現れる。すると、十分な長さのジストロフィンが合成されなくなってしまう。

2009 年 3 月発表の、国立精神・神経センターが米国の機関と行った共同研究で、筋ジストロフィーの症状を示す犬のジストロフィン合成を回復するために、モルフォリノ核酸という人工核酸が有効であることが分かった。モルフォリノ核酸とは、DNA、RNA の糖を人工化合物であるモルホリン環に置き換えたものである。この核酸は、ジストロフィンの欠損により支えを失って緩んだ細胞膜だけを通る大きなので、変異した細胞には入るが、正常な細胞には入り込まない。モルフォリノ核酸を体内に取り込むことによって、筋ジストロフィー患者の症状を改善することができるのである。関根・清尾研究室は、このモルフォリノ核酸を含む核酸医薬品の開発を担っている。では、実際にモルフォリノ核酸がどのようにしてジスト

ロフィン合成を回復させたのかを説明する。

スプライシングの乱れを解消するために、モルフォリノ核酸を用い、エクソン・スキッピングとよばれる方法で治療を行う。エクソン・スキッピングについて、筋ジストロフィー犬の場合を例に説明する(図6)。筋ジストロフィー犬のジストロフィン遺伝子変異は、イントロン6のスプライシング調節領域にありエクソン7の正常なスプライシングを妨げる。これにより、読み枠のずれが起こり、ジストロフィンが合成されなくなる。読み枠のずれを防ぐために、エクソン6の頭とエクソン8の末尾にモルフォリノ核酸を結合させる。するとエクソン6～8のスプライシングが阻害される。この阻害により、読み枠のずれは解消し、

やや小型のジストロフィンが合成される。やや小型ではあるが、こうしてできたジストロフィンは、実験において筋ジストロフィー犬の症状を回復させた。現在関根・清尾研究室では、ヒトの筋ジストロフィー治療実現に向けて、治療により適した人工核酸を本格的に開発しようと模索している。

ここまでで紹介した核酸合成技術は、関根・清尾研究室のスタッフ(清尾康志准教授、大窪章寛助教、角田浩佑 GCOE 助教)と学生が一丸となり、化学的な裏付けの下に開発したものであり、さまざまな応用研究への始めの一步を確かなものにする技術ばかりである。関根・清尾研究室はこれからも、生命体とそれらの遺伝子に関わる多くの研究に貢献していくに違いない。

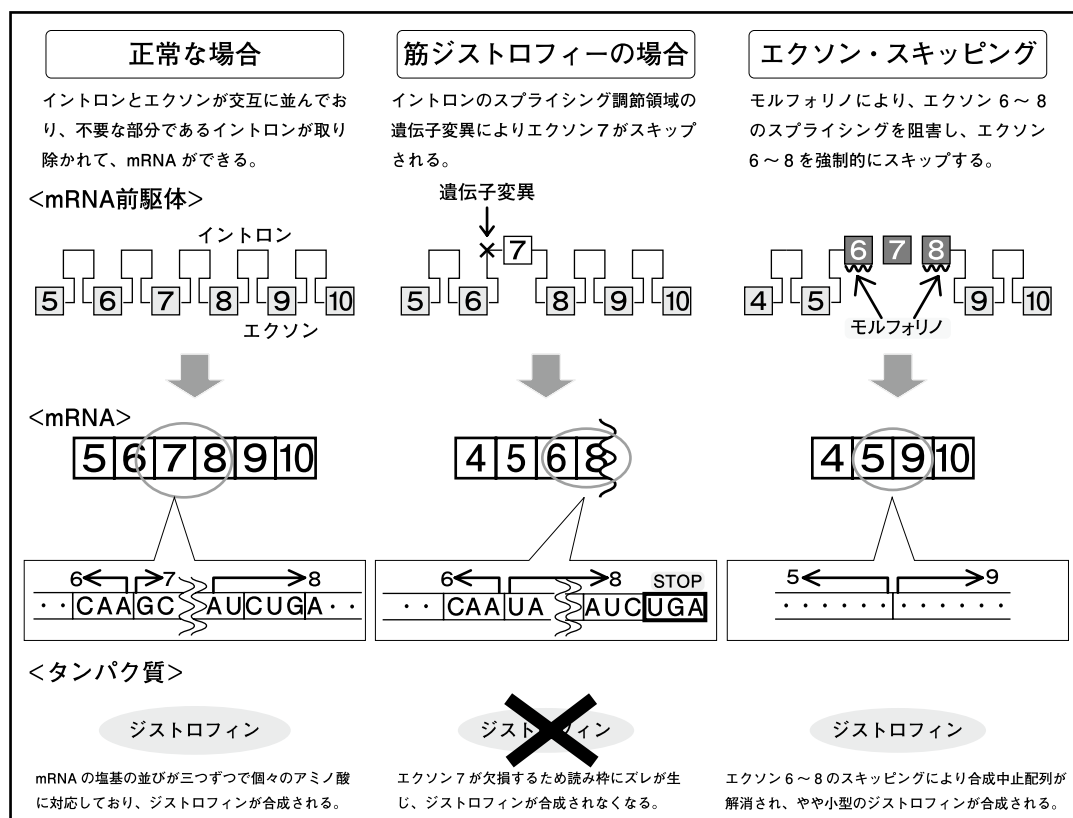


図6 エクソン・スキッピングの説明

本稿の執筆にあたり、関根先生には度重なる取材に加え、多くの助言もいただきました。核酸合成の研究に関するお話は、とても興味深いもので

した。貴重なお時間を割いてご協力下さいました関根先生に、厚く御礼申し上げます。

(中村 佳奈子)