―Review―

外部刺激応答型人工核酸スイッチの設計と合成

兒玉哲也

Design, Syntheses and Properties of Nucleic Acid Switch in Response to External Stimuli

Tetsuya KODAMA
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1–6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871, Japan

(Received July 26, 2010)

The control of molecular properties using external stimuli is an attractive research area that offers the potential for regulation of various biological phenomena. This review summarizes the concept, design, syntheses and properties of nucleic acid switches in response to external stimuli, namely, ''external-stimuli-responsive bridged nucleic acids monomer''. From ^{1}H-NMR experiments, every external-stimuli-responsive bridged nucleic acid monomer was found to have an N-conformation, while an S-conformation was predominantly observed after exposure to a proper stimulus. Each bridged nucleic acid monomer was effectively introduced into oligodeoxynucleotides using an automated DNA synthesizer. Moreover, oligonucleotides modified with these bridged nucleic acid monomer were changed in their hybridization property and tolerance to enzymatic digestion in response to each stimulus. These results clearly showed that external-stimuli-responsive bridged nucleic acids monomers should work as a nucleic acid switch, and have the potential for regulation of various biological phenomena.

Key words――bridged nucleic acid; nucleoside; oligonucleotide; molecular switch

1. はじめに

外部刺激に応答して物性が変化する化合物は生体システムのスイッチとして機能する可能性がある．その分子スイッチはすなわちわれわれの望む場所やタイミングで，かつ特定の生体機能のみのON/OFF調節ができる技術となり得ることから，活発に研究が進められている．[1-3] 新しい医薬品送達技術として，また，生体機能スイッチとして，外部刺激応答性化合物の期待は高まっている．中でも核酸の機能を外部刺激により調節することのできる核酸系素材の開発は，核酸が関連するあらゆる生命現象を自在に制御できる技術の開発へと大きく発展すると考えられ，注目されている．これまでに，光，[4-6] 温度変化，[7] 酸化還元条件変化[8]など[9]外部刺激として性質を変化させる修飾核酸や人工核酸が報告されている（Fig. 1）．

一方で，RNA干渉の発見[10]とヒトゲノム計画の実践，[11] それに核酸の化学合成技術の向上が相まって，核酸関連研究の進展は近年特に目覚ましく，ついには次世代医薬品としての「核酸医薬」が注目されるようになった．しかし，天然の核酸をそのまま生体に適用することは非常に難しく，その理由は様々であるが，例えば核酸分解酵素による速やかな分解や標的遺伝子（mRNAなど）との親和性不足，送達技術開発の遅れなどがあるため，それらの問題点を克服できる核酸の化学修飾法の開発が現在の重要な研究課題となっている．

筆者の在籍する研究室では，核酸糖部に架橋構造を導入することでその立体配座を固定化した架橋型人工核酸（bridged nucleic acid, BNA）を種々開発し，核酸の素材としての問題点を克服してきた．[12] 一般に天然の一本鎖核酸の糖部立体配座は自由度が高く，主に2′-エキソ-3′-エンド構造（N型）と2′-エンド-3′-エキソ構造（S型）と呼ばれる2つの立体配座間の平衡状態にあるが［Fig. 2(a)］，二重鎖

大阪大学大学院薬学研究科（〒565–0871 大阪府吹田市山田丘1–6）
e-mail: kodama@phs.osaka-u.ac.jp
本総説は，平成21年度日本薬学会近畿支部奨励賞（化学系薬学）の受賞を記念して記述したものである．

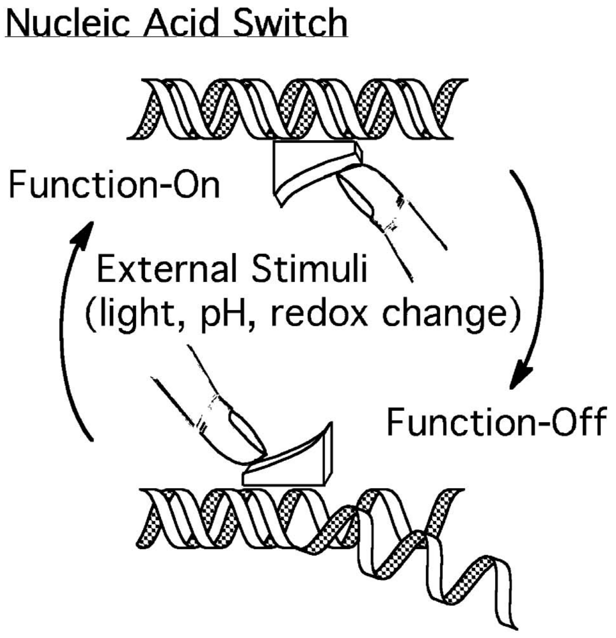


Fig. 1. Concept of Nucleic Acid Switch in Response to External Stimulus

を形成するとその糖部立体配座の揺らぎが抑制される．BNA 類は糖部構造に揺らぎを持たないことで二重鎖形成時のエントロピー損失が軽減されるため，標的核酸への強固な親和性を示し，また恐らくはその架橋構造が核酸分解酵素との接近を妨げることで天然の核酸類にはみられない高い核酸分解酵素耐性をもたらす［Figs. 2(b) and 3(left)］．筆者は，この核酸素材として有用な BNA の性質自身をわれわれの望むタイミングで ON/OFF することができれば，例えば，期待する場所でのみ機能性核酸の機能を発現させることが可能となるため，標的への選択的送達を必要としない核酸医薬品の開発や遺伝子発現のタイミングを制御可能な遺伝子スイッチへの応用が期待できると考えた（Fig. 3）．

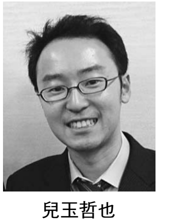
本稿では，この基本概念を達成するために必要な外部刺激応答性ヌクレオシド類の設計と合成，そしてその核酸スイッチとしての基本的な機能性について紹介する．

2. 人工核酸スイッチへの萌芽：スイッチ官能基の導入に適した場所の考察

筆者らはこれまでに，核酸の高機能化を目指して様々な糖部修飾ヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドの合成法を確立し，[13–23] また生体内微量核酸損傷の有機化学的試験管内再現研究とその検出法の開発など[24–26]に携わることで外部刺激による核酸の構造変化の重要性を検討してきた．その過程で見い出してきた人工核酸をスイッチ化する上での重要な知見となったいくつかの人工核酸の性質について，この節では紹介したい．

2′-*O*,5′-*N* bridged nucleic acid（2′,5′-BNA^{ON}）(**2**)[21] と 2′-deoxy-*trans*-3′,4′-BNA（**3**）[22]は，B 型 DNA 中に広く観察される“S 型”に糖部立体配座を固定化した人工核酸である（Fig. 4）．2′,5′-BNA^{ON}（**2**）はヌクレオシド糖部 2′,5′位間を酸素原子 1 つで架橋した構造をしており，その S 型糖部立体配座や 5′隣接ヌクレオチドとの配向性（ねじれ角 γ）は B 型 DNA 二重鎖に平均的なものである．そのため 2′,5′-BNA^{ON}（**2**）を含むオリゴヌクレオチドには相補鎖 DNA との高い親和性が期待されるが，実際には相補鎖核酸との二重鎖安定性は大きく低下した（Table 1）．導入した架橋構造がオリゴヌクレオチド中での核酸塩基を不適切な配向に固定してしまったことがその原因の 1 つと考えられる．[21] 一方で，2′-deoxy-*trans*-3′,4′-BNA（**3**）は 3′,4′位間に配置された架橋構造を有し，オリゴヌクレオチド中ではその架橋構造が二重鎖らせんの外側を向くために核酸塩基との不利な相互作用がない．S 型人工核酸としては最適な構造を持つとも考えられるこの 2′-deoxy-*trans*-3′,4′-BNA（**3**）は，予想通り天然の B 型二重鎖らせん構造とほぼ同じ構造を取り，これまでに世界中で合成されてきた純粋な S 型人工核酸の中でも最も DNA との高い結合親和性を示す人工核酸の 1 つであったが，その熱的安定性は天然の DNA とほぼ同じ値であった．[22] 他の研究グループが明らかにしてきた研究成果[27–31]を合わせて考えると，“S 型”人工核酸の化学修飾にはどうやら 3′位と 4′位が適当らしい．

“N 型”人工核酸の設計においては，2′位と 4′位間での架橋形成が極めて有効に作用する．[32–44] ただし，その特性は架橋の長さによるところが大きいか



兒玉哲也

大阪大学大学院薬学研究科助教，博士（薬学）．宮城県出身．2004 年北海道大学大学院薬学研究科博士後期課程修了．その後，ジョンズホプキンス大学において日本学術振興会海外特別研究員，大阪大学薬学研究科助手を経て，2007 年より現職．専門：核酸化学，生物有機化学．

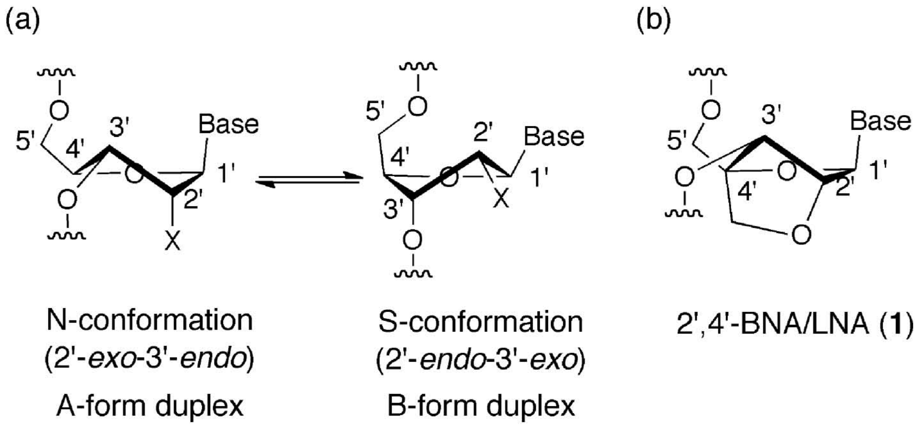


Fig. 2. Sugar Puckering of Nucleosides (a) and an Example of Conformationally Pre-locked Nucleic Acid Analogue (b)

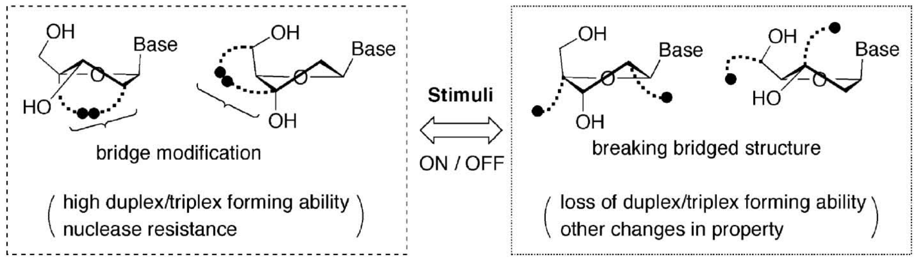


Fig. 3. Conformational Sugar-fixing by Bridge Modifications (left) and the Concept of Molecular Switch in This Study

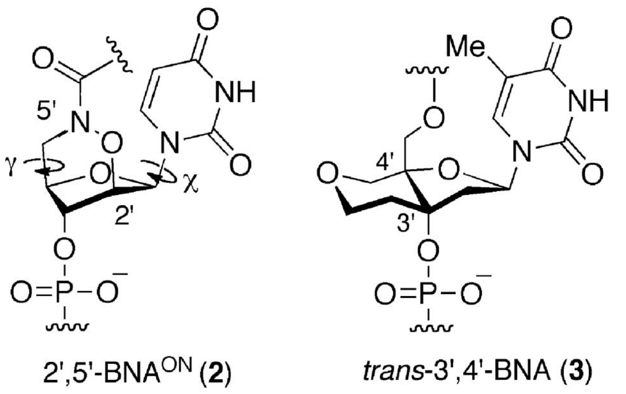


Fig. 4. Examples of BNA Bearing an S-Conformation of Sugar Puckering

もしれない．例えば，架橋のサイズが大きく違わない 2′-*O*,4′-*C*-methylenoxymethylene bridged nucleic acid（2′,4′-BNA^{COC}）(**4**)[20,43]とウレア型 2′,4′-BNA (**5**)[44]は，架橋の構成元素や水素結合様式が全く異なるものの，その RNA 選択的な結合力と核酸分解酵素に対する酵素耐性は類似している（Fig. 5 and Table 2）.

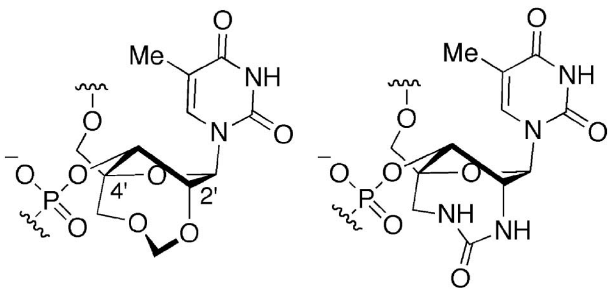
3. 人工核酸スイッチの設計

架橋型人工核酸 BNA 類にみられる高い相補鎖核酸親和性は，分子認識（標的核酸との結合）時のエントロピー損失を軽減する糖部立体配座の固定化，すなわち架橋の導入に由来する．このことは，

Table 1. T_m Values (℃) of Oligonucleotides Modified with S-Type BNA toward Complementary DNA and RNA[a)]

Oligonucleotides	Target: 3′-CGCAAAAAACGA-5′ DNA	Target: 3′-CGCAAAAAACGA-5′ RNA
5′-d(GCGTTTTTTGCT)-3′	51	46
5′-d(GCGTTXTTTGCT)-3′ (X=2′,4′-BNA^{ON})	17	18
5′-d(GCGTTXTTTGCT)-3′ (X=*trans*-3′,4′-BNA)	49	44

a) Conditions: 100 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate (pH 7.2), 4 μM each strand oligonucleotide.



2',4'-BNA^{COC} (**4**)　　urea-type 2',4'-BNA (**5**)

Fig. 5. Examples of BNA Bearing an N-Conformation of Sugar Puckering

Table 2. Effects of 2′,4′-BNA Analogue, 2′,4′-BNA^{COC} and Urea-type 2′,4′-BNA, on the Thermal Stability of Oligonucleotides toward Complementary DNA and RNA[a)]

Oligonucleotides	ΔT_m[b)]	
	DNA complement	RNA complement
2′,4′-BNA^{COC}	−2 to −1℃/mod.	+1 to +3℃/mod.
Urea-type 2′,4′-BNA	−4 to −1℃/mod.	+1 to +2℃/mod.

a) Conditions: 100 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate (pH 7.2), 4 μM each strand oligonucleotide. b) ΔT_m: T_m (T_m value of BNA oligonucleotide) − T_m^{DNA} (T_m value of natural DNA oligonucleotide) per modification.

BNA 類の架橋形成と開裂を制御することができれば，それに伴って性質が変化する人工核酸が創製できることを意味している（Fig. 3）．前節で考察したように，2′,4′-位間の架橋による糖部立体配座のN型への固定化は核酸素材としての性質を向上させる効果が非常に大きく，また化学構造の制限も少ない．言い換えると，架橋開裂に伴う大きな性質変化が期待できる上に，大胆な官能基化が可能と言える．筆者らはこの事実を基に，N 型の糖部立体配座を持つ人工核酸を基盤とした外部刺激に応答して架橋構造が変化する 2 種類の人工核酸を設計した（Fig. 6）．1 つは，光，酸，還元剤等により架橋構造が開裂する外部刺激感受性 BNA であり，官能基化したベンジリデンを架橋構造とすることで非可逆的な性質の変化を誘起できる［Fig. 6(a)］．[45)] もう 1 つは，架橋部にジスルフィド構造を導入した BNA であり，酸化還元環境の変化に応じて架橋構造が開裂したり形成したりを繰り返す［Fig. 6(b)］．[46,47)] 以降これら 2 種類の外部刺激応答型人工核酸について，紹介していくこととする．

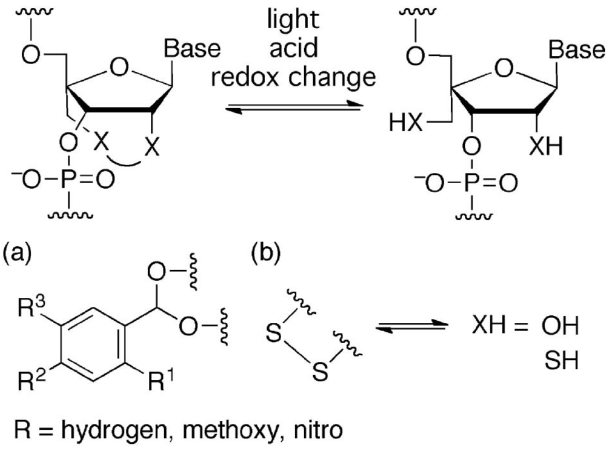
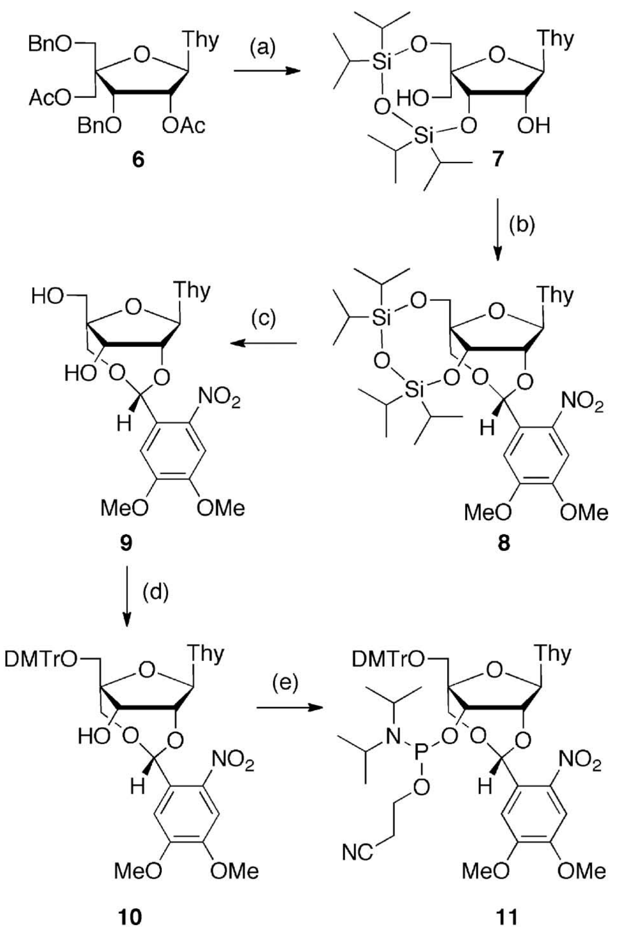


Fig. 6. External-stimuli-responsive Nucleoside Analogues

4. ベンジリデン型 BNA ヌクレオシドの合成[45)]

ベンジリデンアセタールは，フェニル基上の置換基によって多様な性質を示す．例えば，電子供与性置換基はその（加水）分解を促進し，電子求引性置換基はその逆である．また，オルトニトロ置換体は紫外線照射により分解し，アルコールとベンゾイルエステルを生じる．こうした化学的特徴を適切に利用することで，光，酸，還元環境などが刺激となるスイッチを開発できると考えられる．

各種ベンジリデン型 BNA の合成は，その基本骨格を継承した 2′,4′-BNA^{COC} (**4**)[20,43)] の合成を参考に，D-グルコースから誘導可能な化合物 **6**[48)] を出発原料として行った（Scheme 1）．Scheme 1 には，ベンジリデンアセタール型 BNA の合成経路を示している．まず，ベンジリデン型架橋の切断が危惧される酸や接触水素化を合成経路中に利用できない制限があることから，ベンジル基に代わる 3′位と 5′位の保護基を検討した．例えば *tert*-ブチルジフェニルシリル基を保護基とすると，架橋形成反応（アセタール化）において，室温では反応が進行せず，また加熱条件下ではシリル基の転位が優先することから複雑な混合物を与えた．検討の結果，3′位と 5′位を同時に保護できる 1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル（TIPDS）基がベンジリデンアセタール架橋の形成には好適であり，室温で塩化亜鉛の存在下に中程度の収率で目的の BNA 骨格を持つ化合物 **8** の合成に成功した．TIPDS 保護したヌクレオシドの糖部立体配座は架橋化後の N 型立体配座に近いことが知られており，[49)] 架橋形成に



Scheme 1.

Conditions: a) (i) H_2, $Pd(OH)_2$-C, AcOEt; (ii) $TIPDSCl_2$, imidazole, DMF, 72% over 2 steps; (iii) 40% $MeNH_2$ aq., THF, 0℃, 85%; b) 6-nitroveratraldehyde, $ZnCl_2$, HFIP, 54%; (c) TBAF, THF, 89%; (d) DMTrCl, pyridine, 89%; (e) $(iPr_2N)_2PO(CH_2)_2CN$, 4,5-dicyanoimidazole, MeCN, 55%. Ac＝acetyl, Bn＝benzyl, DMTr＝4,4′-dimethoxytrityl, HFIP＝1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, Thy＝thymin-1-yl, TBAF＝tetra-*n*-butylammonium fluoride, TIPDS＝1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxane-l,3-diyl.

有利に働いたものと考えられる．ベンジリデン-，2-ニトロベンジリデン-，6-ニトロベラトリリデン-，及び 4-ニトロベンジリデン架橋がほぼ同等の反応条件で形成できる．得られた各種ベンジリデン架橋ヌクレオシドの TIPDS 保護体はフッ素処理により脱保護し，目的のベンジリデン型 BNA ヌクレオシド **9** の合成を達成した．なお，興味深いことに，アセタール中心炭素の立体配置はすべて（*R*）-配置であった．

5. ジスルフィド結合型 BNA ヌクレオシドの合成[46,47]

ジスルフィド結合は生理活性物質の高次構造を規定する重要な働きをしており，外部の酸化還元環境の変化に応じてその結合を開裂したり形成したりすることでその活性発現を調節している．数は少ないが核酸類にも硫黄原子が使われている例は知られており，ある種のバクテリアではゲノム DNA のリン酸主鎖の一部酸素が硫黄で修飾されていたり（ホスホロチオアート化），[50] tRNA 中では塩基部のカルボニル基がチオカルボニル基化されていたりするが，[51] その高次構造を維持するためにジスルフィド結合を利用している核酸は自然界からは発見されていない（Fig. 7）．さらに，リンカー分子との結合部位として応用している例を除くと，ヌクレオシドの構成成分としてジスルフィド結合を導入した例はこれまでに知られておらず，ジスルフィド結合型 BNA が最初の例である．

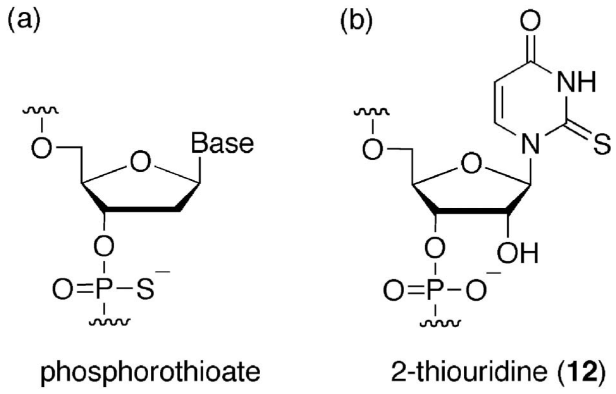
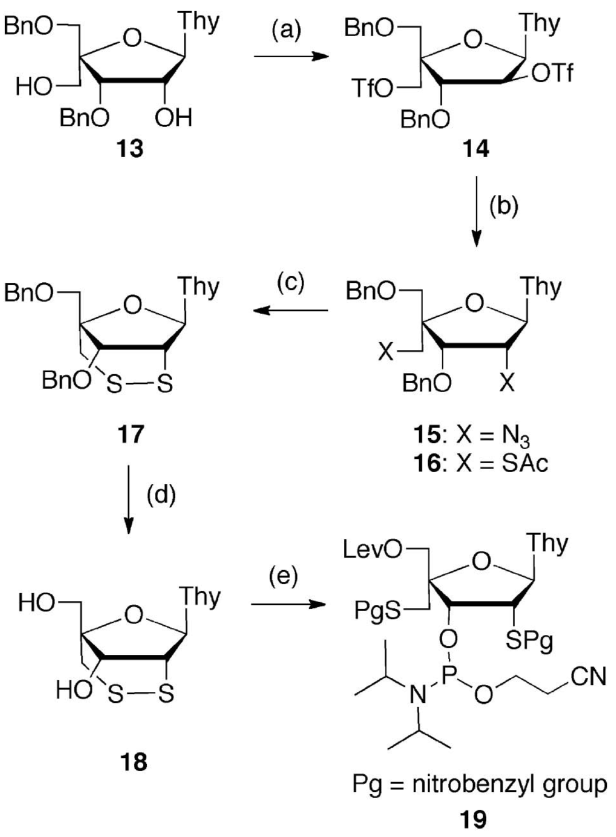


Fig. 7. Examples of Sulfur-modified Nucleic Acid in Nature

筆者らは最近，相補鎖 RNA に対する選択的な結合力と核酸分解酵素に対する高い抵抗性を示す新しい人工核酸ウレア型 2′,4′-BNA（**5**）を開発し，その合成過程で，ビス（トリフラート）体 **14** が穏和な条件下にジアジド体 **15** へと変換可能であることを見い出している（Scheme 2）．[44] ジスルフィド結合型 BNA ヌクレオシドもまた硫黄官能基を 2 ヵ所に導入する必要があることから，その合成はウレア型 2′,4′-BNA の合成経路を参考に検討した (Scheme 2)．[46,47] その結果，化合物 **13** から 3 工程カラム精製なしで誘導したビストリフラート体 **14** に対し室温下 DMF 中でチオ酢酸カリウムを作用させることで，ビス（アセチルチオ）体 **16** が良好な収率で得られることが分かった．得られたビス（アセチルチオ）体 **16** は，アンモニア処理によるジスルフィド体 **17** への誘導と，三塩化ホウ素による脱ベンジル化により目的のジスルフィド結合型 BNA ヌクレオシド **18** の合成に成功した．

6. 人工ヌクレオシド類の外部刺激応答性[45–47]

合成した人工ヌクレオシド類を分子スイッチとして機能させるには，外部刺激に応答して生じる化学構造変化を理解しておく必要がある．本節では，ベンジリデン型 BNA ヌクレオシドのうち光応答性を示すニトロベラトリリデン体（Scheme 3）とジスルフィド型 BNA ヌクレオシド（Scheme 4）についての外部刺激応答性の化学的評価について概説する．

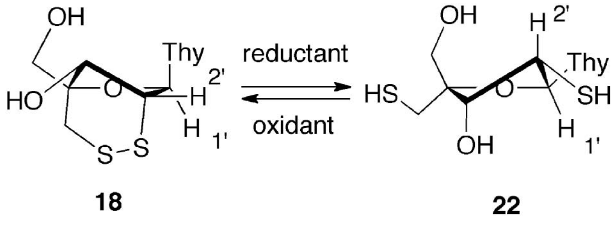


Scheme 2.

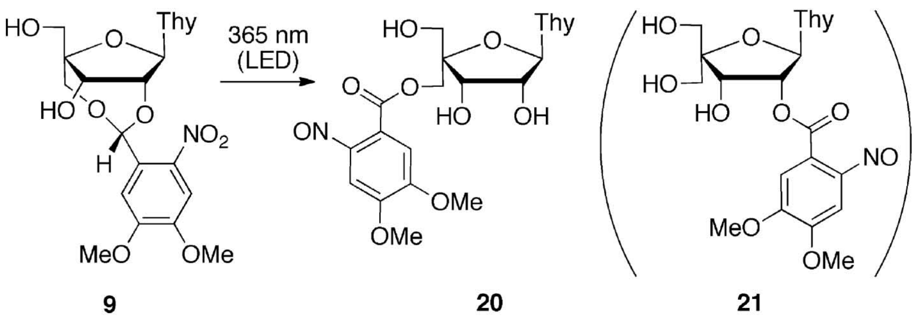
Conditions: a) (i) TfCl, DMAP, Et_3N, CH_2Cl_2, −78°C, (ii) 1 M NaOH aq. 1,4-dioxane, (iii) Tf_2O, DMAP, pyridine, CH_2Cl_2, 0°C; b) NaN_3, DMF, quant. (for **15**), KSAc, DMF, 40% from **13** (for **16**); c) 28% NH_3 aq., MeOH, quant.; d) BCl_3, CH_2Cl_2, −60°C, 71%; e) (i) TBDPSCl, DMAP, DMF, 100°C, 70%, (ii) Bu_3P, H_2O, DMF, then 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide, 54%, (iii) TBAF, THF, 0°C, 86%, (iv) levulinic acid, DCC, pyridine, 1,4-dioxane, (v) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$, diisopropylammonium tetrazolide, acetonitrile, 5% over 2 steps. Ac=acetyl, Bn=benzyl, Lev=levulinyl, Thy=thymin-1-yl, TBAF=tetra-*n*-butylammonium fluoride, TIPDS=1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxane-l,3-diyl, Tf=trifluoromethanesulfonyl.

ニトロベラトリリデンヌクレオシド **9** の光応答性 BNA としての評価は，その含水メタノール溶液に 365 nm の LED 光を照射し，HPLC にて反応を追跡することで行った［Figs. 8(a)–(c)］．その結果，わずか“2 秒”の光照射でニトロベラトリリデンヌクレオシド **9** が消失し，ベンゾイル体 **20** へと変化することが確認された［Fig. 8(c)］．ベンゾイル体 **20** の構造は NMR 解析により決定している（Scheme 3）．この反応ではベンゾイル体 **20** 及び **21** の 2 種を生じる可能性があるが，ベンゾイル体 **20** が選択的に生成した．この結果は，酸性な水酸基として知られている 2′-水酸基[52] の脱離が優先したためと考えることができる．

ジスルフィド型 BNA ヌクレオシドについては，還元剤や酸化剤を外部刺激として構造変化することを確認した．N 型に固定されているジスルフィド型 BNA ヌクレオシド **18** の糖部 1′水素は一重線としてその信号が NMR スペクトルに観察されるが［Fig. 9(a)］，ジチオトレイトールの共存下にはその信号がほぼ消失し，新しく二重線として観察され



Scheme 4. Redox-reaction of Disulfide Type BNA Nucleoside



Scheme 3. Photo-reaction of Light Responsive BNA Nucleoside

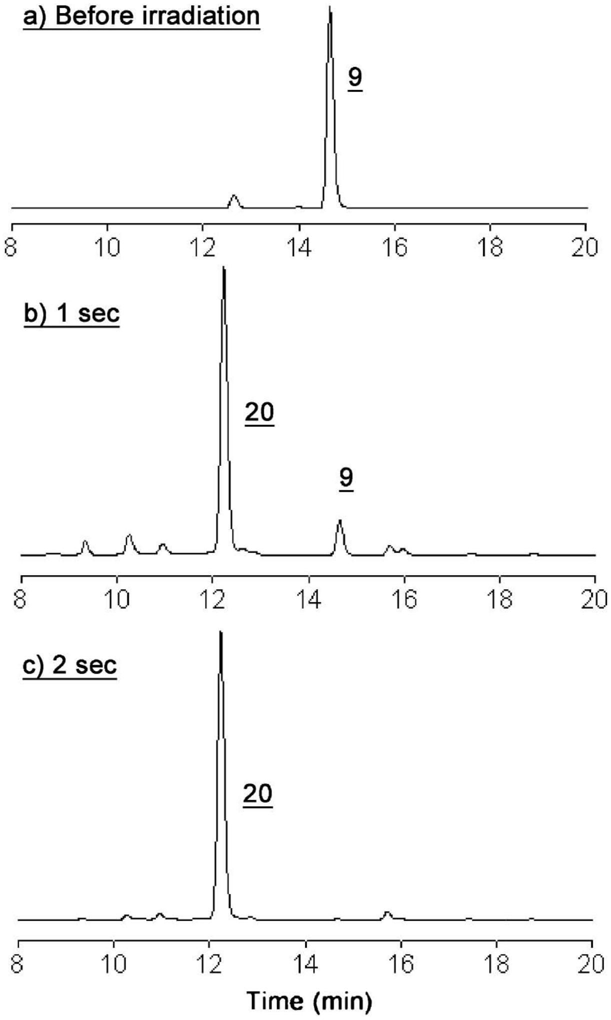


Fig. 8. HPLC Analyses of Light Responsivity

(a) Benzylidene acetal type BNA nucleoside **9** before irradiation, (b) at 1 s irradiation, and (c) at 2 s irradiation.

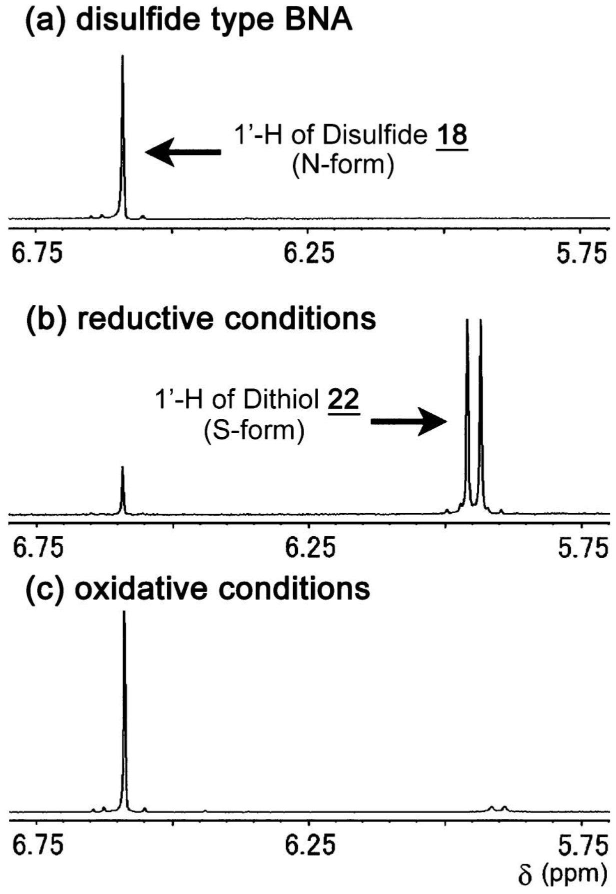


Fig. 9. H-1′ Signals of Redox-responsive BNA Nucleoside on NMR

(a) Disulfide type BNA **18** in absence of redox agents, (b) under reductive conditions, and (c) under oxidative conditions.

る信号が生成した［Fig. 9(b)］．さらにそこに過酸化水素を加えると，速やかに二重線が消失してもとの一重線を生じた［Fig. 9(c)］．これまでの人工核酸合成研究から，糖部立体配座がN型の時はNMRで観察される糖部1′水素と2′水素間の結合定数がほぼ0 Hzに，S型の時は9 Hz前後となることが経験的に知られている．詳細な解析の結果，本実験で新しく生じた二重線はやはり糖部1′水素の信号であったことから，ビシナル2′水素との大きな結合定数から糖部立体配座がS型となっていることが強く示唆された．加えて，ジチオトレイトールの存在下に生じる化合物に関してはエレクトロスプレーイオン化質量分析法によって*m*/*z* 321が観察され，これがジスルフィド型BNAヌクレオシドの*m*/*z* 319に比べて2だけ多いことから，ジスルフィド結合が開裂していることが示された．これらの結果は，糖部立体配座がN型に固定されているジスルフィド型BNAヌクレオシドが，還元剤であるジチオトレイトールの共存下にはジスルフィド結合が開裂してS型配座となり，そこに酸化剤である過酸化水素が添加されると再びジスルフィド結合が形成されてN型構造となったことを端的に示している（Scheme 4）．なお，この酸化還元応答は，副生成物をほとんど生じることなく，少なくとも4回の繰り返しに成功している．

これらのように，筆者らが設計，合成した外部刺激応答性人工ヌクレオシド類は，いずれも分子スイッチとして機能するに十分な応答性を有していることが明らかとなった．

7. 外部刺激応答型人工ヌクレオシドのオリゴヌクレオチドへの導入

外部刺激応答型人工ヌクレオシド類を含むオリゴ

ヌクレオチド類は，DNA 自動合成機を用いたホスホロアミダイト固相合成法により合成した．オリゴヌクレオチド導入に用いたアミダイトユニットは，ベンジリデン型 BNA 類には 5′-*O*-ジメトキシトリチル体 **11**[45] を，ジスルフィド型 BNA には 5′-*O*-レブリニル体 **19**[46] を適用した（Schemes 1 and 2）．固相合成後は，アンモニア水処理によりオリゴヌクレオチドの固相担体からの切り出しと核酸塩基部とリン酸部保護基の除去を行い，HPLC により精製した．得られたオリゴヌクレオチド類 **23**–**26** の純度及び構造確認は，HPLC と MALDI-TOF-MS を用いて行った．合成したオリゴヌクレオチド類の配列は Fig. 10 に示した．

8. 外部刺激応答型人工ヌクレオシドのオリゴヌクレオチド中でのスイッチ機能性

一般に，一本鎖核酸が二重鎖を形成するとある一定の秩序を持って核酸塩基がスタッキングするため，その UV 吸収強度は二本の一本鎖核酸の UV 吸収強度の和よりも小さくなる（淡色効果）．したがって逆に，二重鎖核酸溶液を徐々に加熱しながら UV 吸収強度を観察すると，二重鎖核酸が一本鎖核酸に解離するのに伴って UV 吸収強度が上昇する．それは通常シグモイド的である．このシグモイド曲線の中点は二重鎖核酸の 50％融解温度（T_m）と呼ばれ，二重鎖核酸の熱的安定性の指標として広く利用される．T_m 値が大きいほど安定な二重鎖を形成していると考えることができる．筆者らはこの T_m 値に加え，オリゴヌクレオチドの生物学的安定性の指標の 1 つとなる核酸分解酵素に対する安定性を評価することで，導入した人工ヌクレオシドのスイッチ機能性について検討した．

まず，ベンジリデン型 BNA オリゴヌクレオチドのスイッチ機能性を，ニトロベラトリリデン体を例に議論したい［Figs. 10(a), 11 and Table 3］．はじめに，ニトロベラトリリデン体［Fig. 10(a), **X**^{I}］がオリゴヌクレオチド中においても光応答することを，HPLC 及び MALDI-TOF-MS によって確認した．その際，オリゴヌクレオチド中では光照射により生じるエステル基［Fig. 10(a), **X**^{II}］がグルタチオンやアミンなどの求核種により速やかに除去され，ジオール体［Fig. 10(a), **X**^{III}］へと変換されることを明らかとした．このことは，光応答性 BNA がオリゴヌクレオチドの性質を二段階変化させることを期待させる．実際のところ，オリゴヌクレオチド配列の中央 1 ヵ所にニトロベラトリリデン型 BNA を導入したオリゴヌクレオチド **23** は，UV 照射によりわずかにその相補鎖 RNA との安定性を低下させ，さらにグルタチオン等の求核種による脱ベ

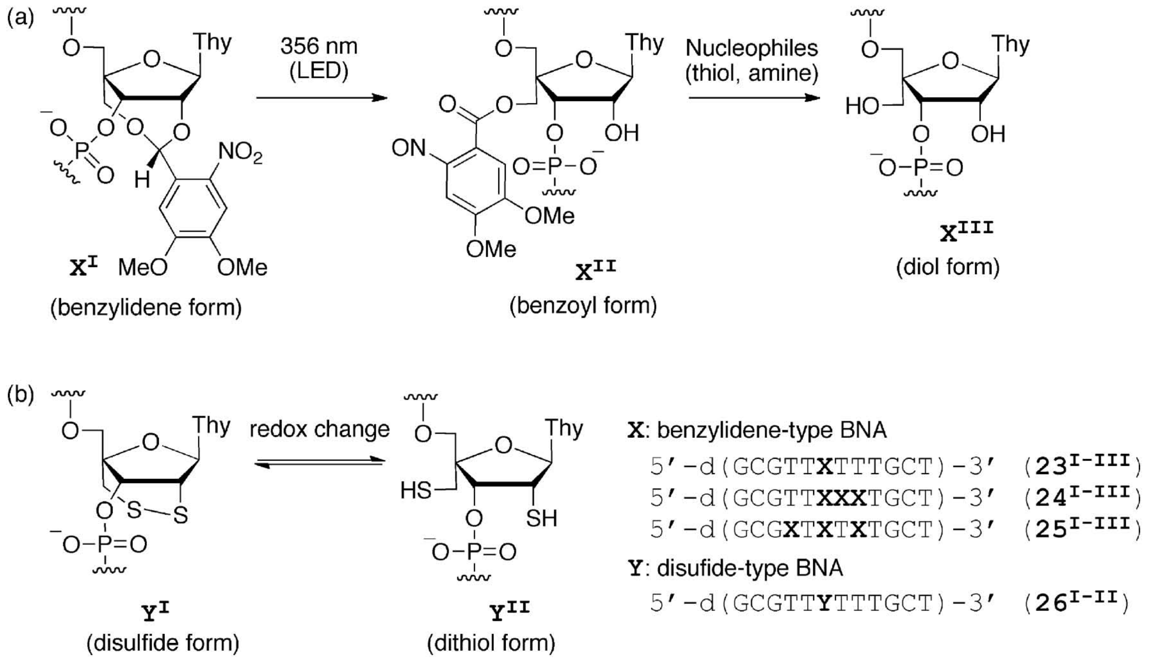


Fig. 10. Sequences and Changes in Structure of External-stimuli-responsive BNAs

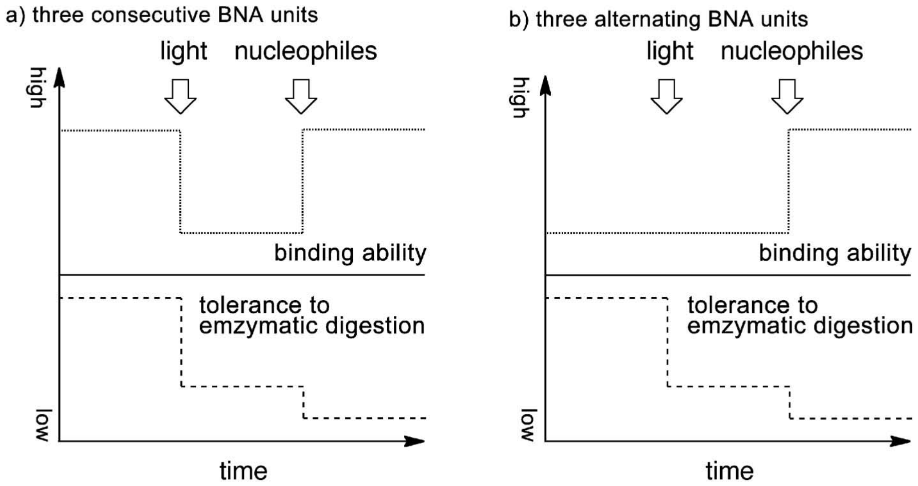


Fig. 11. Changes in Properties of Oligonucleotides Modified with (a) Three Consecutive Light-responsive BNA Units and (b) Three Alternating Light-responsive BNA Units

Table 3. T_m Values (℃) of Oligonucleotides Modified with Light-responsive BNA toward Complementary RNA[a)]

Oligonucleotides	UV (−)	UV (+)	UV (+), Nucleophiles
	acetal form	benzoly form	diol form
23	40	38	44
24	33	N.D.[b)]	36
25	N.D.[b)]	N.D.[b)]	38

a) Conditions: 100 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate (pH 7.2), 4 μM each strand oligonucleotide. b) Not detectable.

ンゾイル化が進行するとその安定性は一転して向上した．オリゴヌクレオチドを 3 ヵ所修飾した場合にはその機能は大きく増強され，例えば，連続してニトロベラトリリデン型 BNA 修飾したオリゴヌクレオチド **24** は，形成していた二重鎖核酸が光照射をきっかけに二重鎖を形成しなくなり，T_m 値は算出できなくなった［Fig. 11(a)］．また，1 ヵ所置きに 3 ヵ所修飾したオリゴヌクレオチド **25** は光照射に関係なくオリゴヌクレオチドの熱的安定性は低下し，二重鎖を形成しなかった［Fig. 11(b)］．一方，これら 3 ヵ所修飾したオリゴヌクレオチドはいずれも，求核種による脱ベンゾイル化が進行すると安定な二重鎖を形成した（Fig. 11）．ベンジリデン型 BNA ヌクレオシドの核酸分解酵素に対する影響は，核酸を 3′側から分解する蛇毒ホスホジエステラーゼによる分解速度を比較した．その結果，未修飾 DNA が 5 分以内に 100％分解する条件下，ベンジリデン型 BNA **X**$^{\mathbf{I}}$ 修飾したオリゴヌクレオチドは 1 時間以上に渡って 90％以上が分解せずに保持され，強力な酵素耐性を示すことが分かった．一方，光刺激に暴露され **X**$^{\mathbf{II}}$ となると 5 分でその 80％が分解される性質へと変化し，さらにアシル基が除去されて **X**$^{\mathbf{III}}$ となると同時間内にその 90％以上が分解される性質へとさらに変化した（Fig. 11）．以上の結果は図としてまとめると分かり易い．BNA 修飾の仕方によってその機能性を変えることができることが分かる（Fig. 11）．

ジスルフィド型 BNA ヌクレオシド **Y**$^{\mathbf{I}}$ をオリゴヌクレオチド配列の中央 1 ヵ所に導入したオリゴヌクレオチド **26** は相補鎖 RNA と安定な二重鎖を形成した［Fig. 10(b)］．その熱的安定性に与える影響はウレア型 2′,4′-BNA と類似している.[44)] 一方で，このオリゴヌクレオチド二重鎖の熱的安定性を還元剤であるトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩の存在下に測定すると，ミスマッチ塩基対（水素結合を形成していない塩基対）を含む場合に匹敵する 10℃ 以上の T_m 値の低下が観察された（Table 4 and Fig. 12）．

以上のように，外部刺激応答型人工ヌクレオシド類がオリゴヌクレオチドの性質を変化させるスイッチとして機能することを理解できる．筆者らはまた，相補鎖 DNA や二重鎖 DNA との二重鎖形成能や三重鎖形成能についても併せて評価することで，標的によってそれぞれ異なるスイッチパターンが得られることを明らかにしている．

Table 4. An Effect of Disulfide-type BNA on the Thermal Stability of Oligonucleotide[a]

	ΔT_m[b]
Normal conditions	+1℃
Reductive conditions[c]	−12℃

[a] Conditions: 100 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate (pH 7.2), 4 μM each strand oligonucleotide; 5′-d(GCGTT**Y**TTTGCT)-3′/3′-r(AGCAAAAAACGC)-5′ (**Y**=disulfide-type 2′,4′-BNA). [b] ΔT_m: T_m (T_m value of BNA oligonucleotide) − T_m^{DNA} (T_m value of natural DNA oligonucleotide). [c] Containing 8 mM of Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride as a reductant.

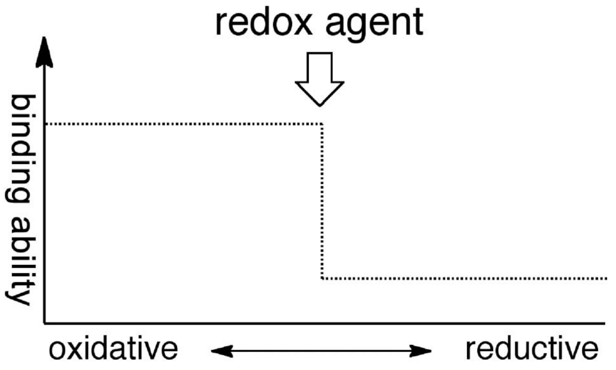


Fig. 12. Changes in Property of Oligonucleotides Modified with a Disulfide-type BNA Unit

9. おわりに

筆者らは，光，酸，酸化還元環境の変化に応じてその物性を変化させる人工ヌクレオシド類を設計し，その合成に成功した．また，オリゴヌクレオチドに導入したこれらのヌクレオシドユニットが，外部刺激に応答してその二重鎖形成能を変化させる人工核酸スイッチとして機能することを強く示唆する結果を示した．こうしたスイッチ技術によって，副作用低減や組織選択的な遺伝子検出，炎症部位特異的な遺伝子発現抑制法などの広範なゲノムテクノロジーやケミカルバイオロジーが飛躍的に進歩することを期待している．

謝辞　本研究は，大阪大学大学院薬学研究科生物有機化学分野において行われたものであり，終始，ご指導ご鞭撻を賜りました大阪大学・今西　武名誉教授，並びに薬学研究科・小比賀　聡教授に心より御礼申し上げます．また，本研究を推進するにあたり協力頂いた馬場　武君，森廣邦彦君を始めとする大阪大学大学院薬学研究科生物有機化学分野の諸氏に深く感謝致します．

REFERENCES

1) Mayer G., Heckel A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4900–4921 (2006).
2) Feringa B. L., *J. Org. Chem.*, **72**, 6635–6652 (2007).
3) Klajn R., Stoddart J. F., Grzybowski B. A., *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 2203–2237 (2010).
4) Deiters A., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 678–686 (2009).
5) Asanuma H., Ito T., Yoshida T., Liang X., Komiyama M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2393–2395 (1999).
6) Ogasawara S., Maeda M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 8839–8842 (2008).
7) Tashiro R., Sugiyama H., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2094–2097 (2005).
8) Hatano A., Makita S., Kirihara M., *Tetrahedron*, **61**, 1723–1730 (2005).
9) Wada T., Minamimoto N., Inaki Y., Inoue Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6900–6910 (2000).
10) Fire A., Xu S. Q., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Nature*, **391**, 806–811 (1998).
11) Human Genome Project Information, 〈http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml〉, U.S. Department of Energy Office of Science, cited 25 October, 2010.
12) Rahman S. M. A., Imanishi T., Obika S., *Chem. Lett.*, **38**, 512–517 (2009).
13) Kodama T., Shuto S., Nomura M., Matsuda., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 3643–3646 (2000).
14) Kodama T., Shuto S., Nomura M., Matsuda. A., *Chem. Eur. J.*, **7**, 2332–2340 (2001).
15) Kodama T., Shuto S., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **67**, 7706–7715 (2002).
16) Yamamoto Y., Shuto S., Tamura Y., Kodama T., Hoshika H., Ichikawa S., Ueno Y., Ohtsuka E., Komatsu Y. Matsuda A., *Biochemistry*, **43**, 8690–8699 (2004).
17) Kodama T., Shuto S. Matsuda A., *Tetrahedron Lett.*, **47**, 4429–4432 (2006).
18) Kodama T., Matsuda A., Shuto S., *Tetrahedron*, **62**, 10011–10017 (2006).
19) Miyoshi T., Kodama T., Obika S., Imanishi T., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 305–306 (2008).

20) Mitsuoka Y., Kodama T., Ohnishi R., Hari Y., Imanishi T. Obika S., *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1225–1238 (2009).
21) Kodama T., Matsuo C., Ori H., Miyoshi T., Obika S., Miyashita K., Imanishi T., *Tetrahedron*, **65**, 2116–2123 (2009).
22) Kodama T., Sugaya K., Baba T., Imanishi T. Obika S., *Heterocycles*, **79**, 873–882 (2009).
23) Kodama T., Sugaya K., Harada Y., Mitsuoka Y., Imanishi T., Obika S., *Heterocycles*, **77**, 1209–1217 (2009).
24) Bales B. B., Kodama T., Weledji Y. N., Pitie M., Meunier B., Greenberg M. M., *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5371–5379 (2005).
25) Kodama T., Greenberg M. M., *J. Org. Chem.*, **70**, 9916–9924 (2005).
26) Dhar S., Kodama T., Greenberg M. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8702–8703 (2007).
27) Bolli M., Litten J. C., Schütz R., Leumann C. J., *Chem. Biol.*, **3**, 197–206 (1996).
28) Renneberg D., Leumann C. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5993–6002 (2002).
29) Altmann K. H., Imwinkelried R., Kesselring R., Rihs G., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 7625–7628 (1994).
30) Nielsen P., Pfundheller H. M., Olsen C. E., Wengel J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3423–3433 (1997).
31) Ravn J., Thorup N., Nielsen P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1855–1861 (2001).
32) Obika S., Nanbu D., Hari Y., Andoh J., Morio K., Doi T., Imanishi T., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5401–5404 (1998).
33) Koshkin A. A., Singh S. K., Nielsen P., Rajwanshi V. K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C. E., Wengel J., *Tetrahedron*, **54**, 3607–3630 (1998).
34) Kurnar R., Singh S. K., Koshkin A. A., Rajwanshi V. K., Meldgaard M., Wengel J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2219–2222 (1998).
35) Singh S. K., Kumar R., Wengel J., *J. Org. Chem.*, **63**, 10035–10039 (1998).
36) Xu J., Liu Y., Dupouy C., Chattopadhyaya J., *J. Org. Chem.*, **74**, 6534–6554 (2009).
37) Morita K., Hasegawa C., Kaneko M., Tsutsumi S., Sone J., Ishikawa T., Imanishi T., Koizumi T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 73–76 (2002).
38) Varghese O. P., Barman J., Pathmasiri W., Plashkevych O., Honcharenko D., Chattopadhyaya J., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15173–15187 (2006).
39) Albaek N., Petersen M., Nielsen P., *J. Org. Chem.*, **71**, 7731–7740 (2006).
40) Wang G., Gunic E., Girardet J.-L., Stoisavljevic V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 73–76 (2002).
41) Rahman S. M. A., Seki S., Obika S., Yoshikawa H., Miyashita K., Imanishi T., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4886–4896 (2008).
42) Morita K., Takagi M., Hasegawa C., Kaneko M., Tsutsumi S., Sone J., Ishikawa T., Imanishi T., Koizumi M., *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 2211–2226 (2003).
43) Hari Y., Obika S., Ohnishi R., Eguchi K., Osaki T., Ohishi H. Imanishi T., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 1029–1038 (2006).
44) Nishida M., Baba T., Kodama T., Yahara A., Imanishi T., Obika S., *Chem. Commun.*, **46**, 5283–5285 (2010).
45) Morihiro K., Kodama T., Nishida M. Imanishi T. Obika S., *ChemBioChem*, **10**, 1784–1788 (2009).
46) Baba T., Kodama T., Imanishi T., Obika S., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **53**, 107–108 (2009).
47) Baba T., Kodama T., Mori K., Imanishi T., Obika S., *Chem. Commun.*, **46**, 8058–8060 (2010).
48) Singh S. K., Nielsen P., Koshkin A. A., Wengel J., *Chem. Commun.*, 455–456 (1998).
49) Buff R., Stoeckli-Evans H., Hunzieker J., *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **54**, 1860–1862 (1998).
50) Wang L., Chen S., Xu T., Taghizadeh K., Wishnok J. S., Zhou X., You D., Deng Z., Dedon P. C., *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 709–710 (2007).
51) Agris P. F., *Nucleic Acids Res.*, **32**, 223–238 (2004).
52) Velikyan I., Acharya S., Trifonova A., Földesi A., Chattopadhyaya J., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2893–2894 (2001).