

1 はじめに

試行錯誤を主な手段とした生物学研究の時代は、終わりつつあるのではなからうか。それは、生命体の根源である遺伝子の解析がすさまじい勢いで進んでいるからである¹²⁾。例えば、30億塩基対と言われるヒト遺伝子の全塩基配列が2005年までに決定できる見込みとなっている³⁾。このような状況から、今後の生物学・医学の研究は遺伝子の情報をどれだけ上手く活用できるかにかかっている。

さて、ここで紹介するアンチセンス核酸は、遺伝子の働きを阻害する物質として、生物学や医学の分野でその有用性が注目されている⁴⁻¹¹⁾。すなわち、後でも述べるように、ある特定遺伝子に対し、その遺伝情報を基にアンチセンス核酸を設計し、人工的に合成する。そしてそれを生体内に入れ、その遺伝子の作用のみを抑えるのである。それ故、ある遺伝子の機能を調べたり、病気の原因となる特定蛋白質の生産を阻害するのに利用できる。言うまでもなく、前者では生化学や分子生物学の研究に利用され、後者では医薬開発へとつながっていく。特にアンチセンス核酸医薬は遺伝子治療薬などとともに、21世紀の新しいタイプの医薬として期待されている。

このレポートでは、アンチセンス核酸の分子設計について述べる。現時点では、「このように設計すれば特定遺伝子の働きだけを阻害する効果が確実に期待できる」と明言することはできない。しかし、設計の際に考慮すべき因子については、アンチセンス核酸研究者の間で合意が形成されつつある。そこで、筆者らの最近の研究成果を織り込んでアンチセンス核酸分子設計の概要を説明したい。分子設計についての理解を容易にするために、まずアンチセンス核酸を用いる方法の原理などを簡単に紹介する。

2 アンチセンス核酸法について

生物体の遺伝情報の源は、2重鎖が螺旋構造をとっているDNAに蓄えられている。そしてその情報は、1本鎖のメッセンジャーRNA (mRNA) を経て最終的には酵素などの蛋白質となって現われる。この中間段階で出現するmRNAの一部の領域に対して強く結合する、相補的な塩基配列を持つ核酸をアンチセンス核酸という。そして、このアンチセンス核酸を用いてmRNAの働きを抑えるのがアンチセンス核酸法である(図1) すなわち、DNAのような2重鎖構造を部分的に作り、mRNAに蓋をしてその機能を阻害するのである。アンチセン

ス核酸の分子設計とは、あるmRNAと効果的に2重鎖を形成できるような核酸分子の塩基配列を決めることと言える。

このアンチセンス核酸法の特徴は次のようにまとめることができる。

負の遺伝子制御法である。

任意の遺伝子に対して適用可能である。

特異性が高い。例えばヒトに対するアンチセンス核酸として17量体以上のオリゴ核酸を用いれば、特定遺伝子の発現の

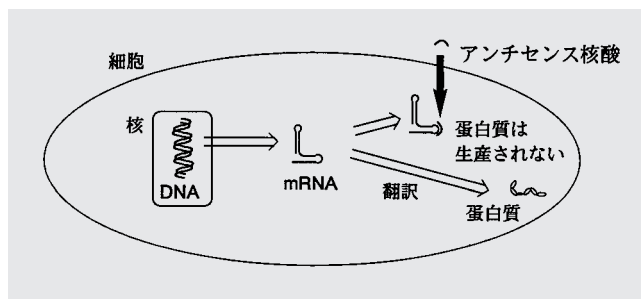


図1 アンチセンス核酸の作用機構

みを抑制することが統計的には可能である。(核酸を構成する塩基は4種であるので、17塩基からなるオリゴ核酸では $4^{17}=1.7 \times 10^{10}$ 種の異なった分子種が含まれる。これは、ヒト遺伝子の全塩基数(30億の2倍、すなわち $2 \times 3 \times 10^9$)を超える。)

mRNAの塩基配列をもとに論理的アプローチが可能である。すなわち、標的遺伝子の塩基配列が既知ならば、原理的にはアンチセンス核酸の論理的な設計ができる。

医薬開発の方法としてこれらの特徴を眺めたとき、は従来の医薬が主に試行錯誤で開発されてきたのとは対照的である。アンチセンス核酸法の最大の利点がこの点にあると筆者は考える。すなわち、アンチセンス核酸分子の論理的な設計法が確立されれば医薬開発の方法やスピードにも影響するであろう。また生化学や分子生物学における本方法の利用は、遺伝子解析の成果と共にさらに広がることが予想される。

3 mRNAのどこを狙うか

アンチセンス核酸法は、塩基配列が既知ならば論理的アプローチが原理的には可能であると上で述べた。これは、遺伝子であるmRNAの任意の部位をアタックすればよいということではない。その理由は生体内においてmRNAは、1本鎖が単純に伸びた状態で存在しているのではないからである。すなわち、mRNAは部分的に2重鎖などの自己構造を形成し(図2)さらには蛋白質とも相互作用しうる。従って、アンチセンス核酸の標的として、mRNAの中から適当な部位を選び出す必

要がある。標的としては、mRNAが生体内で1本鎖状態になっているところが適当と考えられている¹²⁾¹³⁾。

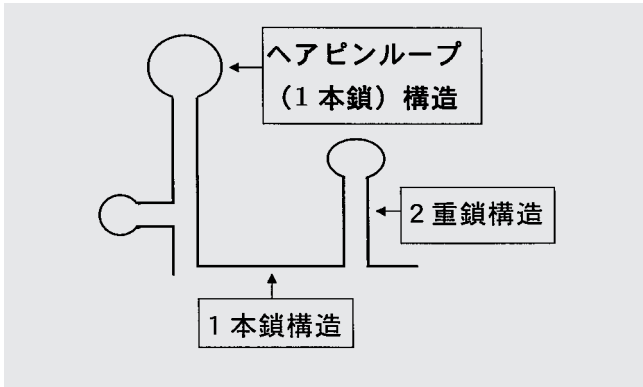


図2 mRNAの構造模式図

3.1 経験則

さて問題は、1本鎖状態をとっている部分をどのようにして見つけるかである。アンチセンス核酸標的部位の選択方法について、これまでにいくつかの提案がなされてきている。簡便さからよく利用されるのは、蛋白質の生合成が開始される部分(翻訳開始部位)を選ぶという「経験則」である¹⁴⁾¹⁵⁾。いくつかの例では、確かにこのようなところを選んで成功している。しかし、逆にそのような箇所をターゲットにしたからといって、それほど高い確率で効果が期待できるのではないようだ。また、他の部位や領域をターゲットとする提案もあるが、的中する確率はあまり変わらないように思う。

3.2 mRNA 2次構造予測の利用

第2の方法は、mRNAの2次構造を計算で予測し、それに基づいて選ぶ方法である⁹⁾。先の方法より論理的であるが、必ずしも決定的な予測ができるわけではない。その原因の第1は、現状ではmRNAの2次構造予測自体が厳密に正確なものではないからであろう。これは2次構造を計算予測するのに必要な基礎データがまだ十分には集積されていないのが大きな理由である。第2として、たとえそれが正確であったとしても、細胞中でのmRNAの実際の姿をどれほど反映できているかの問題がある。従って、アンチセンス核酸の標的部位選出に2次構造予測を用いる際にはその適用の仕方や限界を十分にわきまえた上で用いることが肝要である。

3.3 ランダムスクリーニング法

第3の方法として最近開発された、実験による効率的な探索方法を紹介しよう。この方法については米・欧の研究室からも報告されているが¹⁶⁾¹⁹⁾、ここではつくば研究所で松田らが行った結果を基に紹介する²⁰⁾²²⁾。

アンチセンス核酸の標的部位を予測することは、先にも述べたように、1本鎖状態をとっているmRNAの部分を探し出すことである。その箇所では、アンチセンス核酸との2重鎖形成

が他の箇所(mRNA内で2重鎖を形成している部位など)よりも速度論的かつ熱力学的に容易に起こるはずである。そこで、特定のアンチセンス核酸を用いるかわりに、各塩基の位置に4種すべての塩基を持つオリゴ核酸の混合物であるランダムオリゴ(オリゴ核酸が20量体からなる場合、 4^{20} 種類の分子種を含む)を用いて行った。なお、この方法はランダムオリゴを用いることから、ランダムスクリーニングと呼んでいる。

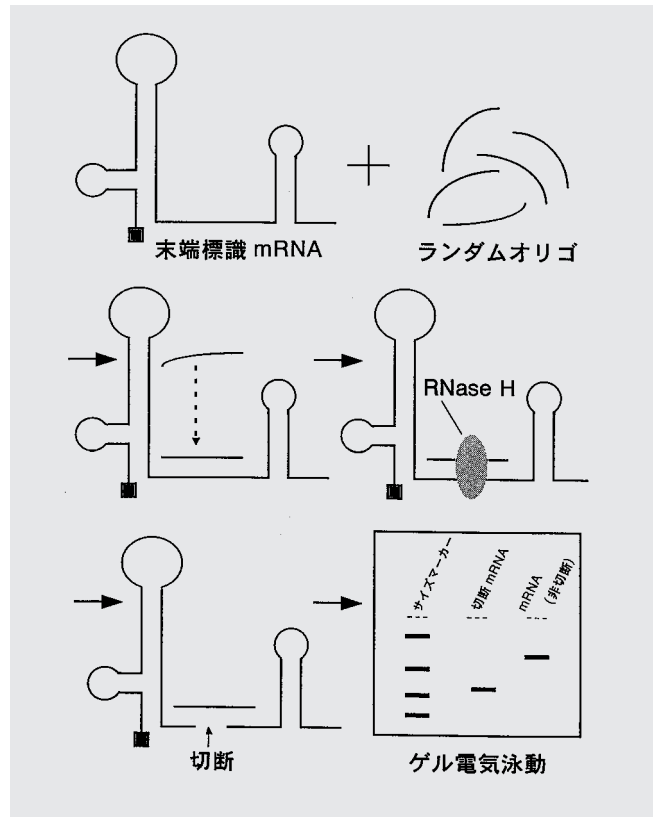


図3 ランダムスクリーニング法の原理

方法の概略を図3に示す。まず、目的のmRNAを単離し、その一端を放射性同位元素で標識する。これを上述のランダムオリゴおよびRNaseH存在下、生理的条件下で保つ。ここでRNaseHはRNAを切断する酵素で、DNAとの2重鎖を形成している箇所でのみ作用する。したがって、mRNAはランダムオリゴが結合した箇所でのみ切断される。反応時間を変えて実験を行い、その生成物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、それをオートラジオグラフィーで分析する。最初に切断される部位は、mRNA自身が本来的に最も切れやすいところと考えられるので、ここをアンチセンス核酸の標的部位として選ぶ。

松田らは、血管内皮細胞増殖因子(VEGF、別名を血管透過性因子(VPF))のmRNAを用いて上述の実験を行った。その結果、翻訳終止の部分より約40塩基上流で最も切断されやすいことがわかった(図4の印、#507付近)。これは、mRNAの2次さらには高次の構造を反映した結果と考えられる。なお、無細胞転写翻訳系におけるアンチセンス核酸効果の結果と比較すると、ランダムスクリーニングで示された箇

所は、アンチセンス核酸効果の最も顕著な領域であることがわかった²²⁾。すなわち、このような方法で、効率的にアンチセンス核酸の標的部位を予測できることが示唆されたわけである。同様な結果が、欧米の研究者らによっても報告されており、この方法の有用性が確立しつつあると言えよう。

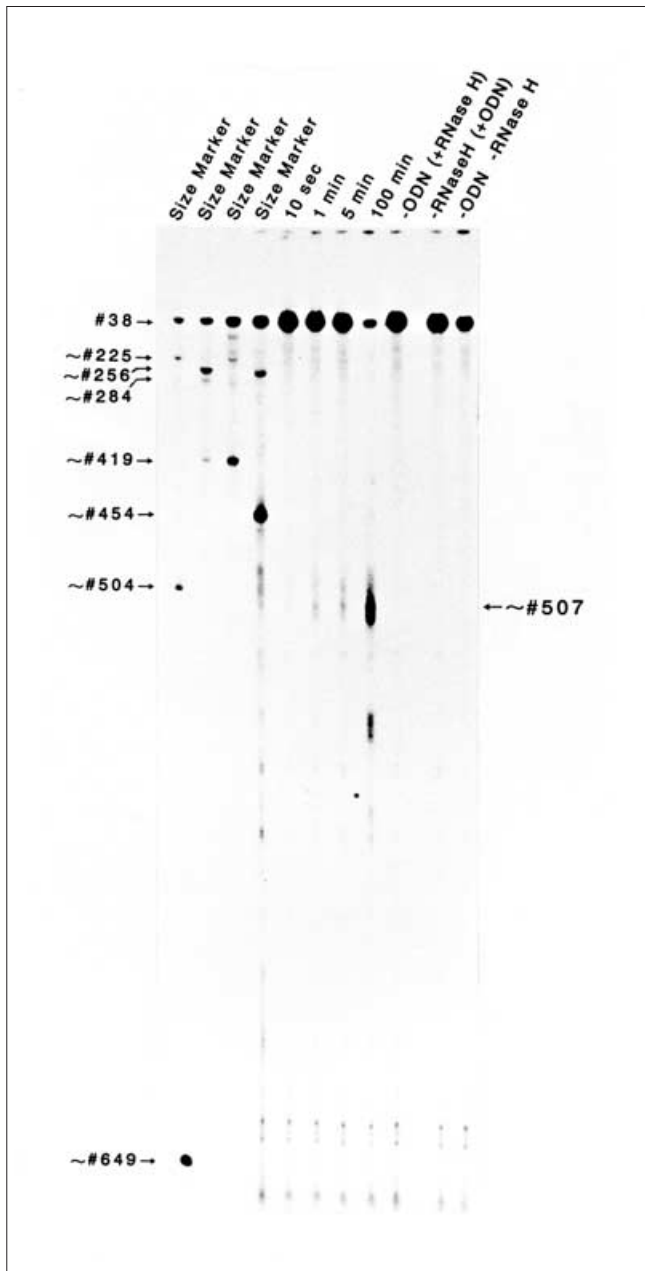


図4 ランダムスクリーニングで得られた断片のゲル電気泳動の結果

3.4 検索と計算による新しい予測法の試み

次に筆者が開発中の検索と計算による予測方法について紹介したい²³⁾。先にmRNAの2次構造を基にする標的部位予測について述べたが、筆者の方法ではいわゆる2次構造予測を行わない。その理由は、目的とするmRNAの中で、1本鎖状態が存在する部分を高い確率で予測できればよいからである。このような考えを基に以下に述べる方法を開発した。

まずmRNAの各塩基について、mRNA中の他の塩基と2重鎖を形成する可能性があるかどうかを調べる。2重鎖形成の可

能性は、形成される2重鎖が長いほど（厳密に言えば、生成の自由エネルギーが大きいほど）、また、2重鎖を形成する部分同士のmRNA内での距離が、可能な範囲で近いほど大きいとする。これをすべての塩基について行う。そしてそれらの中で2重鎖を形成する可能性が低い部分を標的部位候補とし、その中から標的部位を選び出すのである。

この方法を上で述べたVEGFの遺伝子に適用した結果を図5に示す（この図では各塩基が2重鎖を形成する可能性の和を連続する20量体について加算し、その対数をプロットしてある）。この結果より、塩基番号500番目付近は、2重鎖を形成する可能性が際立って低いことがわかる。この領域はランダムスクリーニングで最も切断されやすかった部位であり、またアンチセンス効果で最も顕著な効果が見られた箇所である。

この他の多数の遺伝子に関して、国内のアンチセンス核酸研究者のご協力を得て、この方法の予測能を試している。これまでのところ、複数の研究者から有用であるとの評価をいただいている。

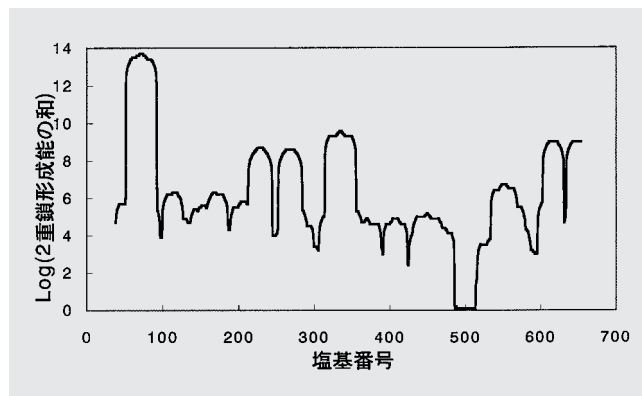


図5 2重鎖形成能を計算予測した結果の例

4 アンチセンス核酸分子設計で考慮すべき因子

アンチセンス核酸の標的として、mRNA上でどのような部分が候補となるかについては3でおわかりいただけたと思う。これ以外についても考慮すべき点があり、それらをまとめること次のようになる。

アンチセンス核酸の標的部位として、mRNAで1本鎖状態をとっている可能性の高い部分を選ぶ（選び方は、3で述べた通り）。

アンチセンス核酸が自己構造をとったり2量体を形成しないように設計する。アンチセンス核酸の核酸分解酵素安定性を高めるために積極的に自己構造をとらせる場合があるが、通常は、mRNAとの結合を容易にするために、アンチセンス核酸自身はその構造をとらないようにする。このような構造をとるかどうかの可能性は、最近塩基対モデルに基づく2次構造計算予測により調べることができる。ホスホロチオエート型のオリゴマーについては実験結果が十分ではないので天然型についての結果をもとに評価する²⁴⁾²⁵⁾。また、この2次構造予測のかわりに、3.4で述べた方法と類似の方法を

用いることもできる。

mRNAの標的部位に強く結合できるような(ハイブリッド形成エネルギーが大きい)アンチセンス核酸を選ぶ。この目的のためにも、最近塩基対モデルに基づいて計算するのが手軽である。ただし、ホスホロチオエート型のオリゴマーを用いた実験値がないので、天然型オリゴデオキシリボヌクレオチドとRNAとが結合するときの値で代用する²⁶⁾。どの程度の値を目安にすればよいかは今のところ明確でないが、相対的に大きな値のものを選ぶほうがよいと予想される。もし20量体のアンチセンス核酸で、mRNAとの結合形成のエネルギーが不足なら、22や25量体と長くするのが一つの解決法である。但し、長くなるに従って、で述べた自己構造の形成が問題となりやすい。

蛋白質等との特異的な相互作用が報告されている配列は避ける。例えば、CG配列を含むものは、免疫系B細胞表面のレセプターに結合し、B細胞を活性化することが明らかにされている²⁷⁾⁻²⁹⁾。また、G₄配列についても、蛋白質との相互作用が報告されている³⁰⁾⁻³¹⁾。従って、アンチセンス核酸中にCGやG₄配列は含まれないようにするのが賢明である。

選んだ配列が他の遺伝子と強固に結合する可能性について調べる。20量体程度のアンチセンス核酸では、他の遺伝子とミスマッチなく完全に結合する確率は少ないであろうが、部分的な結合を形成する可能性はある。どの程度までなら許容かについては一概には言えないが、ミスマッチを含んだ各々の場合について、で述べたエネルギーを計算し、ある程度の判断をすることは出来る。一般に、ミスマッチの数が多くなるに従ってその効果は大きくなる。また、アンチセンス核酸の真中付近でミスマッチが生じる場合は、末端付近の場合に較べてミスマッチの効果が大きい。その効果が大きいときは、目的の遺伝子に対する阻害にくらべ、他遺伝子への阻害効果は小さいと予想できる。

5 最後に

筆者は、3と4で述べたことを考慮して、アンチセンス核酸の設計を行っている。はじめにも述べたように、その方法はまだ確立されたものではなく、改良すべき点が含まれている。しかし、そのようなレベルではあっても無作為にアンチセンス核酸の標的部位を選ぶよりはこのような方法を用いた方が当たる確率は高くなると考えられる。実際に、アンチセンス核酸研究を計画している生化学や分子生物学の研究者から部位予測の依頼がしばしばあり、この方法で実験がうまくいったとの報告もいただいている。

今後は、4で述べた ~ または の条件間の重要性を考慮に入れ、より確度の高い予測法にしていきたい。

参考文献

- 1) パートランド・ジョーダン(美宅成樹訳)、“ヒトゲノム計画とは何か”，講談社(1995)。
- 2) 松原謙一，中村桂子，“ゲノムを読む”，紀伊国屋書店(1996)。
- 3) 大久保公策，*遺伝子医学*，1，53(1997)。
- 4) 村上章，牧野圭祐，*有機合成化学*，48，180(1990)。
- 5) E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.*, 90, 543(1990)。
- 6) C. Hélène, J.-J. Toulme, *Biochim. Biophys. Acta*, 1049, 99(1990)。
- 7) S. T. Crooke, B. Lebleu 編 "Antisense Research and Applications," CRC Press, Boca Raton (1993)。
- 8) 村上章，岩瀬礼子，*化学と生物*，34，454(1996)。
- 9) 杉本直己，内多潔，*医薬ジャーナル*，32，1035(1996)。
- 10) S. T. Crooke, "Therapeutic Application of Oligonucleotides." R. G. Landes Company, Austin (1995)。
- 11) S. Agrawal, *Trends in Biotechnology*, 14, 376(1996)。
- 12) 内多潔，杉本直己，*Antisense*，1，6(1997)。
- 13) 内多潔，*化学と工業*，50，1758(1997)。
- 14) 武内恒成，池上司郎，井ノ口馨，渡辺和忠，*実験医学*，14，573(1996)。
- 15) 金田安史，分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール(実験医学別冊，横田淳，山本雅 編)，p142(1995)。
- 16) S.P.Ho, D.H.O.Britton, B.A.Stone, D.L.Behrens, L.M.Leffet, F.W.Hobbs, J.A.Miller, G.L.Trainor, *Nucleic Acids Res.*, 24,1901(1996)。
- 17) W.F.Lima, V.B-Driver, M. Fox, R. Hanecak, T.W. Bruice, *J. Biol. Chem.*, 272, 626(1997)。
- 18) K.R.Birikh, Y.A.Berlin, H.Soreq, F.Eckstein, *RNA*, 3, 429(1977)。
- 19) B.L.Frank J.Goodchild, *Methods in Molecular Biology*, 74, 37(1997)。
- 20) 松田陽子，内多潔，特開平9-154579(1997)。
- 21) 松田陽子，内多潔，第6回アンチセンスシンポジウム，O1-18，つくば(1996)。
- 22) 松田陽子，神谷欽也，内多潔，第12回生体成分の分析化学シンポジウム，22C18，広島(1997)。
- 23) 内多潔，特許出願中。
- 24) J.SantaLucia, Jr., H.T.Allawi, P.A.Seneviratne, *Biochemistry*, 35, 3555(1996)。
- 25) N.Sugimoto, S. Nakano, M.Yoneyama, K.Honda, *Nucleic Acids Res.*, 24, 4501(1996)。
- 26) N.Sugimoto, S.Nakano, M.Kato, A.Matsumura, H.Nakamura, T.Ohmichi, M.Yoneyama, M.Sasaki, *Biochemistry*, 34, 1211.(1995)。

-
- 27) E.Kuramoto, O.Yano, Y.Kimura, M.Baba, T.Makino,
S.Yamamoto, T.Yamamoto, T.Kataoka,
T.Tokunaga, *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 1128 (1992).
- 28) C.A.Stein, A.M. Krieg, *Antisense Res.,
Dev.*, 4, 67 (1994).
- 29) A.M.Krieg, A.-K.Yi, S.Matson, T.J.
Waldschmidt, G.A.Bishop, R.Teasdale, G.A.
Koretzky, D.M. Klinman, *Nature*, 374, 546 (1995).
- 30) C.A.Stein, *Nature Medicine*, 1, 1119(1995)
- 31) J.R.Wyatt, T.A.Vickers, J.L.Roberson, R.W.
Buckheit,Jr., T.Klimkait, E.DeBaets, P.W.Davis,
B.Rayner, J.L.Imbach, D.J.Ecker, *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA*, 91, 1356 (1994).