核酸医薬と円二色性

北九州市立大学 国際環境工学部 櫻井 和朗

Charactering therapeutic oligonucleotides with circular dichroism

Kazuo Sakurai, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Kitakyushu

Abstract

Therapeutic oligonucleotides become an important modality as a current drug candidate. Their characterization can be done in a great extent by use of circular dichroism (CD) measurements. This short review presents how CD has been used in that purpose, referring from some recent works of therapeutic siRNAs in other labs and of our polynucleotide/polysaccharide complexes.

1. はじめに:核酸医薬の登場

医薬品の世界売上高トップ20が毎年発表される。 このランキング表を眺めていると2010年ごろを境に して大きな変化が起きている。有機合成から生まれる 低分子医薬は、最初の合成医薬品であるアスピリン以 来百年近く薬の主役を務めてきた。しかし、2010年 ごろから抗体医薬品に代表される生物医薬への転換が 進んでいる。全体の売り上げではまだ低分子医薬が 50%以上を占めているが、研究開発の方向は確実に 生物医薬へとパラダイムシフトしている10。時代の流 れは指数関数的に早くなる。生物医薬が主役に登場し てからわずか10年、すでに新しい流れが生まれてい る。核酸医薬である。2018年にRNA干渉を利用した 医薬品が核酸医薬として初めて承認をされた²⁾。核酸 医薬とはDNAやRNAあるいはその化学修飾体を医薬 品有効成分(API; Active Pharmaceutical Ingredient)と して含み、主として有機合成的に作られた比較的短い オリゴ核酸で構成されている。アンチセンスやsiRNA がその代表例である。核酸医薬はタンパク質を標的と する従来の医薬品とは異なり、その上流のDNAある いはRNAのレベルで生体を制御できる点が大きな特 色である。今までの医薬品では治療できなかった遺伝 性疾患や難治性疾患を治療しうる新しい創薬の手法 (モダリティ: modality) として期待され、2030年には 世界で2兆円の市場を形成すると予測されている3-50。

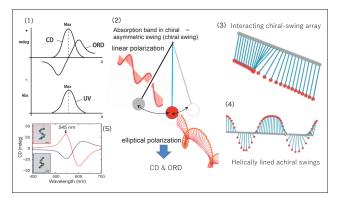
核酸医薬の標的となる分子は多くの場合細胞内に存在する。従って標的まで核酸医薬を運搬する必要がある。このためには効率的な薬物運搬体(DDS: Drug delivery system)が必要となる。すなわち、核酸医薬の開発は核酸分子の設計と目指す疾病や標的の臓器に適したDDSの開発が両輪となって進む。DDSを無効成分の賦形剤(excipient)とみるか核酸医薬が封入されたDDS粒子全体をAPIとして扱うかで要求される試験項目は異なってくる。しかし、設計した核酸医薬がどのような高次構造を取っていて、それが生理活性とどのように相関しているかはいずれにせよ重要であり、レギュラトリーサイエンス上では重要品質特性(CQA: critical quality attributes)となる。核酸の高次構造の微妙な変化を手軽に且つ正確に調べる方法の一

つが円二色性(CD: circular dichroism)の測定である。 本稿では、最近の核酸化学の研究や我々の核酸医薬の DDSの研究からCDがどのように核酸の高次構造の研 究に利用されているかを紹介する。

2. 誘起円二色性の簡単な原理

CDの原理を根本から理解しようとして文献を調べると、量子力学の複雑な数式で記述された遷移状態と波動の相互作用のような世界に入り、筆者にとって意味不明となる。計算化学的にCDスペクトルを予測することは原理的に可能であるようだが、核酸医薬のような原子数の多い系ではまだ計算速度が追い付いておらず簡単にできそうにない。実験者にとって分かりやすい解説は日本分光のWEB⁶に動画付きの優れた説明があるので参考にされたい。また、成書としては文献の7と8を著者は利用している $^{7.8}$ 。ここでは、ごく簡単にかつ直観的かつ独断的にCDの原理、特に重要な誘起CDを解説してみる。

光は進行方向に垂直に振動する電場を持っている。 電場の振動がある方向に固定されているとき光は直線 偏光している。直線偏光は強度が同じ右周りと左周り の光が合成された結果である。光が分子を通過すると き、電場の影響をうけて電子が振動するため、正負電 荷の重心が周期的にずれる。このため振動する電気双 極子モーメントが生まれる。この振動数が分子の官能 基の吸収波長と一致すると分子はその光を吸収する。 分子が不斉構造(キラル chiral) を持っていて鏡像と重 ね合わすことができない場合、電気双極子モーメント の振動もキラルとなる。したがって、右周りと左周り の光で異なった環境(屈折率、吸光度)を進むことに なる。このため左右偏光の強度と位相が異なってくる 楕円偏光となる。CDではこれを測定する。具体的に は左偏光から右偏光の吸光度を引いた値として円二色 性吸光度が定義される。円二色性吸光度は光の楕円率 に換算することができ、実際の測定ではこの楕円率 (角度)を測定する。1個のキラル構造の中に1個の UV吸収に対応する遷移状態があるときは、図1(1)の



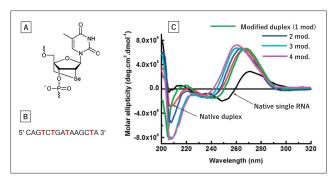
A schematic illustration how the induced circular dichroism (ICD) is created when polarized light goes through chiral environment. (1) relationship among CD, ORD (optical rotatory dispersion), and UV absorbance (from JACSO web) and an exmple of ICD from helically arraied Aunanopaticles [ref 9]. (2) After linearly polarized light goes through chiral absorption band, the light obtaines elliptical polarization to produce CD and ORD. The chiral absorption band may be mimiced by a pendulum swinging asymmetirically. ICD can be produced (3) when the asymmetirc (chiral) swings are arraited under interacting with each other, or (4) even when achiral swings are arried in a chiral manner such as a helix. (5) When goldnanoparticles are positioned in a chiral arrangement (in this case right or left -handed helixes), they become CD active.

ように極めて単純なスペクトルが現れる。

キラル状態にある電気双極子モーメントの振動は左 右で振れ方が異なる振り子で表すとする (図1(2))。 このような振り子が、一定の間隔で規則正しく連結し た暖簾のようなものを考える(3)。この時、振り子の 間には相互作用があると考える。実際には電気双極子 モーメント間の相互作用であるが、このモデルでは赤 い球が磁石でお互いに斥力が働いている考えても良 い。振り子は個々に振動しながら全体としても極めて 複雑な動きをすると考えられる。この複雑な動きがす べて左右偏光の環境の差異に反映されるから、測定さ れるCDのスペクトルは極めて複雑となる。その結果、 振り子間のわずかな相互作用の違いがスペクトルの違 いに現れる。さらに、個々の振り子がキラルでなくて も振り子の並び方にキラルがあれば((4)では右巻き のらせん)、全体としてやはり円二色性を示す。この 場合も構造の僅かな違いがスペクトルに反映される。 このようなUV吸収をもつ官能基がキラル環境で規則 的に並んだ構造に起因する CD を誘起円二色性と言う。 アキラルな吸収がキラルに配列して起きる誘起CDで 有名なのは表面プラズモン共鳴が起きる程度の小さな 金の粒子をラセンに配置したときのCDであろう⁹。

3. 円二色性スペクトルを用いた核酸医薬の分析

した。ここで、塩基配列はまったく同じである。化学 修飾をしていない相補鎖のRNAと2重鎖を形成した後 にCDを比較した(図2C)。未修飾の1本鎖は個々の 塩基に由来する CD が 240-290 nm に観測される。塩 基自体にはキラルは無いが、キラルな分子であるリ ボースに結合しているのでCDが観測される。リン酸 の結合がラセンを組むことで観測される 200 nmのバ ンドは1本鎖には観測されない。このことから、全体 としてはランダムコイルのような不規則な形態で存在 していると考えられる。2重鎖を形成すると2重らせ んに由来する顕著な誘起CDが観測された。特に短波 長でA型DNAに特徴的な負のバンドが化学修飾を増や すと大きくなることから、修飾でラセン構造が安定で 強固になっていると推定される。260 nm あたりの正の バンドが短い波長に移動していくことが分かる。この あたりの吸収は芳香環に由来することから、塩基間の 距離がわずかに短くなっていると想像される。これは リン酸周りの構造が安定化することと一致している。



☑2 CD spectral changes when an siRNA (its sequence is shown in B) under goes chemical modification in T as presented in A.

核酸医薬の実用化にはDDSが必要である。DDSとしてはカチオン性の脂質が用いられることがある。負の電荷をもつ核酸はカチオン性の脂質と強く結合する。この性質を利用したナノ粒子の作成である。カチオン性の化合物の問題点は核酸の高次構造を崩壊させ、生理活性が低下させる可能性がある。Bremmellらはカチオン性のデンドリマーとポリエチレンイミン(PEI)をsiRNAに添加したときのCDの変化を比較した(図3A)。デンドリマーを添加した場合は260 nm

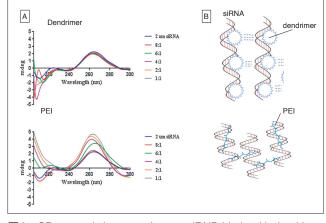
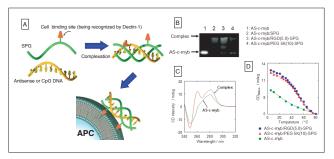


図3 CD spectral changes when an siRND binds with dendrimer and polyethyleneimine.

付近の塩基の配列に基づくCDには全く変化が見られない。リン酸の配列に関係している低波長では添加にともない負のバンドが大きくなったあとに元に戻っている。一方、PEIを添加した系では塩基のバンドが大きくなり、低波長では負から正に移動している。PEIでは核酸の構造が大きく歪んでいることが分かる。デンドリマーはちょうど核酸の大きな溝に当て嵌まる大きさであるため、イオン結合をした後でも核酸のコンフォメーションを大きく歪めないと結論をしている。適度な大きさのカチオン性デンドリマーがDNAをヒストンタンパクのように規則正しく折りたたむことはよく知られている。

4. 多糖核酸複合体

多糖シゾフィラン(SPG)はキノコのスエヒロタケから抽出される中性の β -1,3-グルカンである。我々はSPGが核酸と複合体を形成することを見出しその基礎研究を20年ほど前から行ってきた $^{11),12)}$ 。中性の多糖が核酸と規則正しい複合体を形成すること自体が驚きである。 β -1,3-グルカンを認識する受容体が抗原提示細胞(APC)に存在することが発見された。この受容体は多糖核酸複合体を認識することができ、それを利用してAPCに様々な核酸医薬を選択的に送達することが可能となる。図4にはその模式図と、c-



☑ 4 CD spectral changes when SPG binds with DNA. (A) a schematic illustration of a complex formation from a β-1,3-glucan SPG and a therapeutic DNA and antigen-presenting cellular specific ingestion of the complex. (B) gel electrophoresis of a complex. (C) the SPG/DNA complexation induce a large CD change. (D) Dissociation of the complex measured by CD.

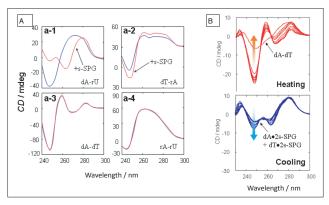


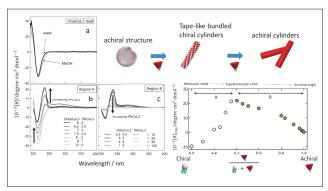
Image: Second of the SPG caused cleavage of double stranded DNA or RNA. (A) comparison of the CD spectral changes among four A and T (or U) combination.

(B) the spectral changes after added SPG to dA-dT duplex, applied heat and cool.

mybと呼ばれる癌の増殖に関係した遺伝子を標的としたアンチセンスと SPGが複合化した時の CD の変化を示す。Dには昇温した時に複合体が解離する様子を示した。中性の多糖と DNA が結合することにより、DNA の形態に由来する CD が大きく変わることが分かる。興味深いことに、SPG は2重ラセンの DNA をも開裂する。図5には4種類の RNA と DNA からなる2 重鎖に SPGを添加した時の CD の変化を比較する 13 。 dA-Uと dT-Aの時に SPG の添加によって CD に変化が起きている。これは室温での変化である。室温では dA-dT の開裂は起きないが、この溶液に SPG を加えて2 重鎖の融解温度まで上げたあとに冷やすと完全な鎖の置き換わりが見られた。

5. その他の例

核酸ではないが、超分子構造に由来する誘起 CD と分子固有の CD が観測された例を紹介する 14 。図 6 の白丸で示した脂質は分子内にキラルを有するため固有の CD を示す。また、この脂質は水中では球状のベシクルを形成する。球状はもちろんその鏡像と重なるからアキラルである。したがって、分子分散するアルコール中と水中では同一の CD を示す(a)。このキラル脂質がつくるベシクルにアキラルな脂質(赤い円錐)を加えていくと、右巻きのシリンダーを作る。従って、このヘリカルシリンダーに由来した CD が観測される(領域 A)。しかし、アキラルな脂質をさらに加えていくとシリンダーがキラルを失いついには CD が消失する(領域 B)。



Improve the CD spectral changes when a vesicle made from chiral lipids is changed to a helical cylinder by adding an achiral lipid.

5. おわりに

円二色性スペクトルが分子や分子が集まって形成する超分子構造の微妙な変化を観測する優れた手段であることが少しでも理解していただけたら幸いである。CDの変化を眺めていると核酸の主鎖のリン酸の部分はランダムだけど、塩基は割とスタッキングしているとか、リン酸部分がZ型の逆向きのラセンを取っているなど、分子の動きが見えてくる。量子化学の第一原理計算で励起状態の電子まで計算して複雑なDNAのCDが理論計算できる世界が近い。しかし、スペクトルを見ながら、分子の動きを想像する(妄想かもしれないが・・)態度は忘れないでいたいと思う。

●文 献

- 1) (医薬産業政策研究所), 戸. 雅. 創薬化学の側面 から見た低分子医薬の将来像―低分子から中分子への広がり―. 2018; Available from: http://www.jpma.or.jp/opir/research/rs_072/article_072.html.
- 2) Hoy, S.M., *Patisiran: First Global Approval*. Drugs, 2018. **78**(15): p. 1625–1631.
- 3) Kikuchi, H., The current situation and the future outlook of the development of nucleic acid/gene medicines from the industrial viewpoint: The relevance to dds. Drug Delivery System, 2019. 34(2): p. 106-115.
- Inoue, T., K. Sasaki, and T. Yoshida, Current status of development of oligonucleotide therapeutics. Drug Delivery System, 2019. 34(2): p. 86–98.
- 5) 株式会社シード・プランニング, 2019年版 世界 の核酸医薬品開発の現状と将来展望. 2019.
- 6) 日本分光, J. Web 基礎セミナー ORD・CDの基礎. Available from: https://www.jasco.co.jp/jpn/ technique/internet-seminar/cdord/cd1.html.
- 7) Fasman, G.D., Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. 2013: Springer Science & Business Media.
- 8) Berova, N., K. Nakanishi, and R.W. Woody, *Circular dichroism: principles and applications*. 2000: John Wiley & Sons.

- 9) Kuzyk, A., et al., *DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response*. Nature, 2012. **483**(7389): p. 311–314.
- 10) Nahar, S., et al., Systematic Evaluation of Biophysical and Functional Characteristics of Selenomethylene-Locked Nucleic Acid-Mediated Inhibition of miR-21. Biochemistry, 2016. 55(50): p. 7023-7032.
- 11) Sakurai, K. and S. Shinkai, Molecular recognition of adenine, cytosine, and uracil in a single-stranded RNA by a natural polysaccharide: Schizophyllan [7]. Journal of the American Chemical Society, 2000. 122(18): p. 4520-4521.
- 12) Mizu, M., et al., A polysaccharide carrier for immunostimulatory CpG DNAs to enhance cytokine secretion. J Am Chem Soc, 2004. **126**(27): p. 8372-3.
- 13) Karinaga, R., et al., Competition between polysaccharide/polynucleotide complexation vs., polynucleotide hybridization; salt concentration dependence of the reaction direction. e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, 2005. 3: p. 38–45.
- 14) Sakamoto, S., et al., Supramolecular Chirality: Vesicle-to-Chiral Helix Transition of the Micelles Consisting of a Sugar-Bearing Calix[4] arene Surfactant. Langmuir, 2016. 32(47): p. 12434-12441.



さくらい かずお 北九州市立大学教授(国際環境 工学部)博士(理学)

筆者紹介 1982年 大阪大学理学 部高分子学科卒業、1984年 大阪 大学大学院理学研究科修士課程 高分子科学専攻課程修了 1996年 3月 博士(理学)取得(大阪大学)、1984年4月 鐘紡㈱入社、

同年8月 鐘紡㈱開発研究所、1990年6月 University of Massachusetts, Department of Polymer Science に留学指導教官: WJ.MacKnight教授、1993年4月 鐘紡㈱開発研究所研究員、1995年6月 同、第4研究グループ長、1997年6月 同、新素材・情報システム事業部O-PET開発部開発グループ長、1999年4月 科学技術振興事業団・分子転写プロジェクトに出向、2000年10月 鐘紡退社、科学技術振興事業団さきがけ研究

員、2001年10月より北九州市立大学国際環境工学部 環境化学プロセス工学科教授(現在に至る)

《所属学会》高分子学会、日本化学会、遺伝子デリバリー研究会、アンチセンス DNA/RNA研究会、日本DDS学会放射光学会、セルロース学会、アメリカ化学会(POLY、PMSE、COLL)、Controlled Release Society 《受賞》1994年5月 高分子学会賞(技術)、1998年11月 発明協会会長奨励賞(「ポリマー2次電池」)、2005年3月 日本化学会 BCSJ 論文賞、2008年9月 高分子学会三菱化学賞、2013年11月 英国王立科学協会 Daiwa Adrian Prizes for Scientific Collaboration、2018年5月 高分子学会賞(科学)、2018年6月 DDS学会永井賞

《その他》高輝度放射光研究施設(SPring-8)外来研究 員、播磨理化学研究所客員研究員、Napa Jenomics 副社 長(2010年から現在)、高分子学会 副会長(2018-2019年度