

Title	シチジン誘導体を含むオリゴヌクレオチドの二重鎖DNA認識能に関する研究
Author(s)	中田, 昌明
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34387">https://hdl.handle.net/11094/34387</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 中田 昌明 )

論文題名 シチジン誘導体を含むオリゴヌクレオチドの二重鎖DNA認識能に関する研究

## 論文内容の要旨

核酸は多様な分子認識能、高次構造形成能、触媒機能などをもった生体機能性分子であり、遺伝子治療をはじめとした様々なテクノロジーへの応用が期待されている。中でも三重鎖核酸の形成を利用した遺伝子発現制御法は、病因タンパクの生成を転写レベルで阻害することが可能とされ、これまでにない新たな治療法として注目されてきた。しかし、現時点で三重鎖核酸は実用化の目処すら立っていない。その最も大きな原因は標的DNAの配列制限である。

一般に三重鎖核酸は三重鎖形成オリゴ核酸 (Triplex-forming oligonucleotide、以下TFO) が二重鎖DNAにハイブリダイズすることで形成される。その結合様式はTFOのTと二重鎖DNAのAT塩基対、あるいはTFOのプロトン化したC (C<sup>+</sup>) と二重鎖DNAのGC塩基対がHoogsteen水素結合を形成することで成り立っている。しかし標的DNA中にCG塩基対やTA塩基対といったピリミジン・プリン塩基対が含まれた場合、三重鎖の安定性が著しく低下する。これはピリミジン・プリン塩基対を選択的に認識できる天然の核酸が存在しないためであり、三重鎖核酸の致命的な問題となっていた。そこで申請者は標的配列に依存しない三重鎖核酸の形成を目指してピリミジン・プリン塩基対の一つであるCG塩基対に着目し、これを選択的かつ強固に認識する人工核酸を開発すべく研究を行った。

CやTといった天然のピリミジン塩基は僅かながらCG塩基対を認識することが知られており、これらを基本骨格とした人工核酸がこれまでいくつか開発されてきた。その結果、CG塩基対を選択的に認識することには成功したが、その結合親和性は未だ不十分であり、T・ATやC<sup>+</sup>・GC三重鎖からなるフルマッチ三重鎖の安定性には遠く及ばなかった。これをふまえて申請者はCやTを基本骨格とした誘導体、*N,N*-ジ置換シチジンおよび*N,N*-ジ置換3-デアザシチジンを設計した。そしてこれら誘導体を含むTFOを効率良く合成すべく、伸長後修飾 (post-elongation modification、以下PEM) 法を用いて種々のTFOを合成することを試みた。PEM法はオリゴ核酸上で化学反応を行うことで様々な修飾オリゴ核酸を合成する手法であり、通常DNA合成過程に適さない官能基を有する誘導体も余分な保護基を用いることなく簡便に合成することができる。また今回の場合はTFOの設計から評価までに要する時間を大幅に短縮することができ、論理的かつ緻密な分子の探索が可能になると考えられた。そこで、申請者は各誘導体のPEM法確立を目指した。

*N,N*-ジ置換シチジンのPEM法による合成には既知化合物である2'-デオキシ-4-トリアゾリルウリジンまたはチミジンを利用することとし、DNA合成後、これらを導入した前駆体TFOに種々の二級アミンを反応させることで目的の*N,N*-ジ置換シチジンを含むTFOを合成することに成功した。つづいて*N,N*-ジ置換3-デアザシチジンのPEM法による合成を達成するために、前駆体ユニットの候補化合物として3-デアザ-4-トリスプロフェニルホルルウリジン誘導体 (4-TPS-daU) および4-フルオロ-2-ピリドン誘導体 (4-FP) を設計した。そしてまず、4-TPS-daUのアミダイト体を論文既知の化合物から4工程、総収率66%にて合成した。次に、4-FPのアミダイト体を既知化合物から5工程、総収率21%にて合成した。それから、合成したこれらアミダイト体をDNA合成機によってTFOへと導入し、二級アミンで処理することでPEM法の適応性について精査した。その結果、ピロリジンを用いた場合、4-TPS-daUを含むTFOは室温で、6時間後に30%収率にて目的のTFOが得られるのに対し、4-FPを含むTFOは55 °Cで16時間後に31%収率にて目的のTFO反応が得られた。以上より比較的穏和な条件で反応が進行する4-TPS-daUを本研究の前駆体ユニットに定め、これを用いて種々の*N,N*-ジ置換3-デアザシチジンを含むTFOを合成することに成功した。

確立したPEM法を用いて今回設計した誘導体を合成し、それぞれの塩基対認識能を評価した。まずは*N,N*-ジ置換シチジンについて、 $T_m$ 測定実験によって各誘導体の塩基対認識能を評価した結果、シチジンの4位にグアニジノピロリジン骨格を有する誘導体GPが天然のCやTに匹敵する選択性とC・CGやT・CG三重鎖を上回る結合親和性を示すことが明らかとなった。ただし、GP・CG三重鎖もフルマッチ三重鎖の安定性には及ばなかった。そこで、この誘導体GPを糖部修飾核酸とすることで親和性の向上を目指した。そして種々検討の結果、架橋型人工核酸2',4'-BNA/LNAとのハイブリッド体GP<sup>B</sup>の合成に成功し、これがCG塩基対に対して天然のCやTを上回る選択性を示し、かつT・AT三重鎖に匹敵する結合能を持つことを見出した。

GP<sup>B</sup>がCG塩基対を選択的かつ強固に認識することが明らかとなったため、この認識能の一般性について精査すること

とした。具体的には、これまで用いてきた配列に関してGP<sup>B</sup>の前後の塩基配列のTをCへと置き換えて $T_m$ 測定実験を行った。その結果、GP<sup>B</sup>のCG塩基対認識能は低下し、配列一般性を保つことは出来なかったが、変化した配列においてもGP<sup>B</sup>がCG塩基対を選択的に認識できることを明らかとした。一方、申請者は同様の研究において、当研究室で開発された2-ピリドン塩基を持つ人工核酸P<sup>B</sup>が配列中3'側の隣接塩基をT→Cとした場合でもCG塩基対認識能がほとんど変化しないことを見出した。これを受けて、申請者はP<sup>B</sup>を基本骨格とした*N,N*-ジ置換3-デアザシチジン誘導体を、PEM法を用いて種々合成し、これの3'側の隣接塩基をCとした配列での塩基対認識能を評価した。その結果、(2*R*)-グアニジノメチルピロリジン構造を有する誘導体daGMP<sup>B</sup>がT・CG三重鎖を上回る結合親和性を示しつつ、GP<sup>B</sup>を越える高い選択性にてCG塩基対を認識できることを見出した。以上より、申請者はGP<sup>B</sup>で認識できなかった配列のCG塩基対を、*N,N*-ジ置換3-デアザシチジン誘導体を用いることで認識できる可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 中 田 昌 明 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 小比賀 聡
	副 査	教 授 赤井 周司
	副 査	教 授 藤岡 弘道
	副 査	教 授 小林 資正
<b>論文審査の結果の要旨</b>		
<p>核酸医薬にはいくつかのストラテジーが知られているが、中でもアンチジーン法は三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TF0) を用いて、標的二重鎖DNAと配列特異的に三重鎖を形成させることで転写を抑制する手法である。しかし、その原理的制約から未だ実用化には至っていない。本研究は、この制約を打破し、どのような配列に対しても三重鎖形成可能なTF0分子の創成を目指したものであり、以下の興味深い知見を見いだした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) これまで三重鎖核酸形成における大きな課題として残されてきた標的配列の制限という問題を解決するためには、新たな人工核酸塩基を数多く合成する必要がある。本研究では、伸長後修飾法と呼ばれる方法を駆使することで、オリゴヌクレオチド上にて核酸塩基の構造変換を実現し、多種多様なN, N-ジ置換シチジン及びN, Nジ置換 3-デアザシチジン誘導体を含有するTF0の効率的合成を達成した。</li> <li>2) より効果的な三重鎖形成を狙い、核酸塩基部分だけでなく核酸糖部の修飾をもあわせて検討するために、各種の糖部修飾核酸を母核とした伸長後修飾を実施した。これにより核酸塩基並びに糖部の同時修飾型人工オリゴヌクレオチドを多種合成することに成功した。</li> <li>3) 上記の1) 及び2) にて合成した各種TF0を用いて標的二重鎖DNAとの結合親和性を評価したところ、グアニジノピロリジン構造を核酸塩基部に含む架橋型人工核酸がホモプリン/ホモピリミジン配列中のCG塩基対を極めて効果的に認識可能であることを見いだした。</li> <li>4) さらに、配列の一般性評価を重ね、N, N-ジ置換デアザシチジンをコア部分に有する架橋型人工核酸がホモプリン/ホモピリミジン配列中のCG塩基対認識において優れた頑健性を示すことを明らかにした。</li> </ol> <p>以上の研究成果は、アンチジーン法やSNP検出等のゲノムテクノロジーの発展に大いに貢献するものであり、博士 (薬学) の学位論文として相応しいものであると判断した。</p>		