



Title	オリゴ (2'-O-メチルリボヌクレオチド) 誘導体の合成とその選択的RNA切断との応用及び抗ウイルス活性
Author(s)	柴原, 進
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36898
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【11】

氏名・(本籍)	柴原進
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 8919 号
学位授与の日付	平成元年12月18日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	オリゴ(2'- <u>O</u> -メチルリボヌクレオチド)誘導体の合成とその 選択的RNA切断への応用及び抗ウイルス活性
論文審査委員	(主査) 教授 北川 勲
	(副査) 教授 岩田 宙造 教授 冨田 研一 教授 京極 好正

論文内容の要旨

2'-O-メチルリボヌクレオチドは、天然RNA中に見いだされる微量成分である。この人工的に合成された重合体は、RNA分解酵素に対して抵抗性を示す、等のRNAとは異なった性質を有する。又、その相補的な塩基配列のRNAと熱的に安定な二本鎖を形成し、しかもその両鎖ともRNaseH(RNA-DNA二本鎖のRNAを分解する酵素)により切断されないことが明らかにされている。更に、2'水酸基の保護基が必要なRNAオリゴマー合成とは異なり、DNAと同様な化学合成ルートが可能と考えられる。この様な観点から、2'-O-メチルRNAオリゴマー及びその誘導体の迅速かつ簡便な合成法を確立し、以下に述べる様に、それらを用いた長鎖RNAの位置特異的切断への応用と、抗ウイルス性発現と構造の関連性について検討した。

RNAを位置選択的に切断する満足な方法はこれまで知られてなかった。しかし最近井上らは、直鎖状短鎖RNA(9-mer)と、その相補的塩基配列の2'-O-メチルRNAオリゴマーと3-5鎖長のDNAオリゴマーより構成されるキメラオリゴマーを用い、これらの二本鎖にRNaseHを作用させることにより高選択的に短鎖RNAが切断できることを報告している。即ち、この方法でDNA部分はRNaseHの認識部位として、2'-O-メチルリボオリゴマー部分は二本鎖の安定化の為にそれぞれ寄与している。ところで、一般にはRNAは自己分子内の相補的領域により安定な二次構造を形成している為、特にそのステム領域(二本鎖領域)で高選択的切断が可能かどうか重要な問題である。そこで著者は、二次構造を有する90鎖長のRNA(Q β フェージ複製酵素の鋳型となるWS-s(+))RNAを題材に、キメラオリゴマー/RNaseHを用いてその高選択的切断について検討した。

まず標的領域として、安定なステム領域を選び、その片側に相補的な3本のキメラオリゴマー(10-

12mer 中 3-5 鎖長の DNA 部分) と、両側 (即ちステムの二本鎖共) に相補的な 3 本のキメラオリゴマー (15-mer 中 3-5 鎖長の DNA 部分) を、それぞれ中間体として三価の垂リン酸アミダイトを経由するアミダイト法による固相合成法で合成した。更に、これらとは別にループ領域 (一本鎖領域) に相補的なキメラオリゴマー (9mer 中 5 鎖長の DNA 部分) も同様に合成した。次に、各オリゴマーと 9mer RNA とを混合し、加熱冷却後 RNaseH を作用させ、切断物を解析した。その結果、ループ領域に相補的なキメラオリゴマーは、最も効率よく位置選択的な切断物を与えた。一方、ステム領域に相補的なものでは、ステムの両鎖に相補的なオリゴマーを用いた場合は、位置選択的な切断物が認められたが、これに対し、片側鎖のみに相補的なキメラオリゴマーを用いた場合は、切断反応はほとんど進行しなかった。切断物を与えた場合の位置選択性については、キメラオリゴマー中の DNA 部分の鎖長が重要で、4 鎖長の場合は最も選択性が高く一ヶ所の切断物を与えたのに対し、DNA 部分が 3 及び 5 鎖長のオリゴマーでは隣接する二ヶ所の切断物を与えた。切断位置はいずれの場合も向かい合う DNA 部分の 3' 側より 4 残基目 (及びその隣) の位置であった。以上のことから、オリゴマーの相補的領域をステムの両鎖に及ぶようにし、DNA 部分を 4 鎖長に設定しておくことにより、キメラオリゴマー/RNaseH 法より、長鎖 RNA をそのステム領域に於いても位置選択的に一ヶ所で切断可能であることを明らかにできた。ここで得られた知見は、更に長鎖の高分子 RNA の位置特異的切断に応用が可能と考えられる。

次に、リン酸部誘導体化に有利な H-phosphonate 法による 2'-O-メチルリボオリゴマー・チオリン酸誘導体の合成法を確立し、これら化合物の *in vitro* での抗 HIV (ヒト免疫不全ウイルス) 作用について検討した。

まず、HIV 遺伝子上で重要な機能を担っていると考えられる領域を標的に選び、これらの塩基配列に相補的な 2'-O-メチルリボオリゴマー (天然リン酸ジエステル型、20-21 鎖長) を、上述のアミダイト法により数種合成した。又、同化合物のチオリン酸誘導体として、同領域に相補的な 10-25 鎖長のオリゴマー数種と、HIV 遺伝子に相補性の無いホモオリゴマーである、オリゴ (2'-O-メチルアデニレート) 及びイノシネートを H-ホスホネート法により合成した。即ち、保護したモノマーの 3'-H-ホスホネート体を合成し、これと活性化剤としてアシルクロリドを用いて、固相担体上で自動合成機を用いて順次縮合反応を繰り返した後イオウ酸化を行った。次いで脱保護・精製し、チオリン酸誘導体を単離した。その際の平均縮合収率は 97% と高収率であった。次に、HIV 感染により顕著な細胞障害を起こす MT-4 細胞を用い、これらオリゴマーによる細胞障害抑制効果を調べた。その結果、天然リン酸ジエステル型の 2'-O-メチルリボオリゴマーはすべて無効であったのに対し、チオリン酸誘導体はすべて効果を示した。又その効果は鎖長依存的で、25mer は 1 μ M の濃度に於いても強い活性を示した。次に、効果の無かった天然リン酸ジエステル型の 2'-O-メチルリボオリゴマー (20 鎖長) 中の 5', 3' 両端合計 7 個のリン酸をチオリン酸に置換したオリゴマーを、H-ホスホネート法で、鎖長延長過程でイオウ酸化、ヨウ素酸化、イオウ酸化の順に行うことにより合成した。この化合物の効果は、同鎖長の完全チオリン酸体よりやや弱いものの、10 鎖長の完全チオリン酸体よりも強かった。従って、これらの化合物の抗 HIV 作用発現にはチオリン酸残基数は必須では無く、鎖長が重要である

ことが明らかとなった。又、両端のチオリン酸残基は作用発現に重要で、おそらくエンド型のヌクレアーゼによる分解を防いでいる可能性が考えられた。一方、H I V 遺伝子に相補性の無いホモオリゴマー(チオリン酸誘導体)では、イノシネートは1 μ M, アデニレートは7.5Mの濃度に於いてそれぞれ抗H I V作用を示した。このことから、ウイルス遺伝子を標的とした作用メカニズム以外の作用点の存在(詳細については、明らかではないが)が考えられた。

この様に、2'-O-メチルRNAオリゴマー誘導体の迅速かつ簡便な合成法を確立し、それらの抗ウイルス活性発現と構造の関連性について上記知見を得た。

論文の審査結果の要旨

RNAを特定の位置で任意に切断する方法は、未だ限られた例しか知られていない。本論文では、天然RNAの微量成分で、その人工合成オリゴマーがRNAとは異なった種々の性質を有する2'-O-メチルリボヌクレオチドに着目し、1) 2'-O-メチルRNAオリゴマーの固相合成法を確立し、2) それを含むキメラオリゴマーを用いて長鎖RNAの高選択的切断が可能であることを示している。さらに3) H-ホスホネート法による固相合成で2'-O-メチルRNAオリゴマー・チオリン酸誘導体を合成し、4) それらがin vitroで抗H I V作用を有することを示し、抗ウイルス性発現と構造の関連性について重要な知見を得ている。

以上の成果は、薬学博士の学位論文として、充分価値のあるものと認められる。