



Title	高機能性人工核酸2'、4'-BNA類の合成と三重鎖形成オリゴヌクレオチドへの応用
Author(s)	張, 功幸
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43360">https://hdl.handle.net/11094/43360</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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

氏名	張 功 幸
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 16964 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	高機能性人工核酸2',4'-BNA 類の合成と三重鎖形成オリゴヌクレオチドへの応用
論文審査委員	(主査) 教授 今西 武  (副査) 教授 小林 祐次 教授 北 泰行 教授 小林 資正

### 論文内容の要旨

2001年 Nature 誌、Science 誌に相次いで、人の DNA の全塩基配列の解読に成功したという報告がなされ、ヒトゲノムプロジェクトが終焉を迎えた。そして、ポストゲノムシーケンス時代へと突入した。その結果、遺伝子治療薬の開発研究が一層本格化してくるものと考えられる。これまで、遺伝子治療薬の創製に向け、一本鎖である mRNA や遺伝子本体である二重鎖 DNA を標的とした研究が行われている。その代表として、病因となる mRNA の塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチドを用いることでその翻訳を阻害するアンチセンス法と標的二重鎖 DNA に対して三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) を配列特異的に三重鎖形成させることで転写過程を阻害して該当遺伝子発現を抑制するアンチジーン法がある。アンチジーン法はアンチセンス法に比べて遺伝子本体である二重鎖 DNA を標的としているため化学量論的に非常に効率が高く、TFO の設計次第で標的遺伝子の転写を促進させることも可能であるなど大変魅力的手法である。しかし、TFO と二重鎖 DNA 間での三重鎖形成には二つの重大な問題がある。それは中性条件下における三重鎖の低安定性と標的二重鎖 DNA 配列が限られていることである。これらの問題を克服すべく数多くの修飾 TFO に関する研究が報告されているが未だこれと言った解決策は見い出されていない。

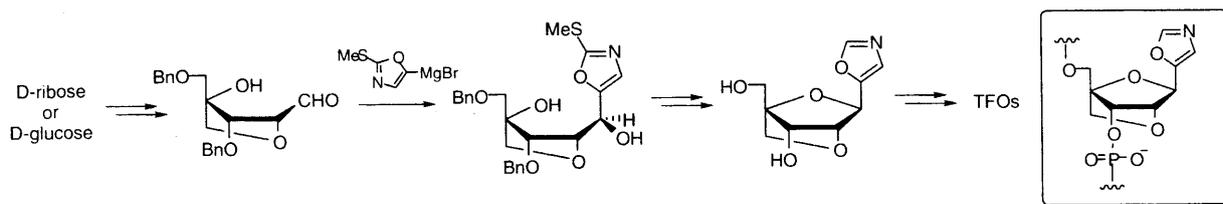
一方、当研究室では実用的なアンチセンス核酸の創製を目指し、これまで糖部コンホメーションを束縛した種々の BNA (bridged nucleic acid) 類の合成とその機能に関する研究を行っている。中でも、天然リボヌクレオシドの 2' 位酸素原子と 4' 位炭素原子をメチレン架橋した 2',4'-BNA は糖部コンホメーションを厳密に N 型 (C3'-endo) に固定化した最初のヌクレオシド類縁体の実例であり、この 2',4'-BNA モノマーを含むオリゴヌクレオチド類は一本鎖 RNA に対して配列特異的に強固に結合することなど、アンチセンス法の適応に十分な資質を有していることを明らかにしている。

これまで糖部修飾を施したヌクレオシド類縁体の TFO への応用研究において、ヌクレオシド糖部コンホメーションが N 型である方が S 型に比べて三重鎖を安定化する傾向が見い出されている。従って、その糖部コンホメーションが完全に N 型固定されている 2',4'-BNA を含む TFO は標的二重鎖 DNA と安定な三重鎖を形成することが期待される。さらに、2',4'-BNA と適当な構造を持つ非天然型核酸塩基と組み合わせることでピリミジン・プリン塩基対の認識が可能になると考えられる。

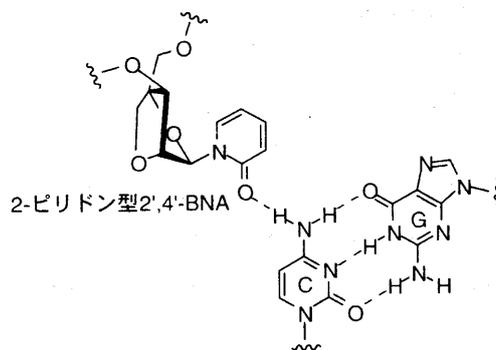
そこで、著者は三重鎖形成における問題を解決するため天然型あるいは非天然型核酸塩基を有する 2',4'-BNA の

TFO への応用展開を試みた。まず、融解温度 ( $T_m$ ) 測定さらに熱力学的解析、速度論的解析により天然型核酸塩基を持つ 2',4'-BNA を含む TFO とホモプリン・ホモピリミジン配列からなる二重鎖 DNA との三重鎖形成能を検討した。その結果、2',4'-BNA 修飾を施した TFO は中性条件下、非常に安定かつ配列特異的に標的 DNA を認識することを明らかにした。また、2',4'-BNA による三重鎖の安定化は糖部コンホメーションの N 型固定によりエントロピーの損失を効果的に抑制するためであること、さらに 2',4'-BNA 修飾 TFO は一度形成した三重鎖の解離を大きく抑制することが明らかとなった。これらの結果は天然型核酸塩基を有する 2',4'-BNA が三重鎖形成において問題となる中性条件下での低安定性を克服できることを強く支持するものである。

2',4'-BNA を基本骨格として非天然型核酸塩基部を綿密に設計することでこれまで困難とされてきたピリミジン・プリン塩基対の一つである C・G 塩基対の選択的認識が可能になると考えられる。分子モデリング等から、非天然型核酸塩基としてのオキサゾール (C-ヌクレオシド型核酸塩基) と 2-ピリドン (N-ヌクレオシド型核酸塩基) は C・G 塩基対を選択的に認識可能であるとの知見が得られた。そこで、著者はオキサゾールを有する 2',4'-BNA 型 C-ヌクレオシドの合成を行った。また、オキサゾール以外にも種々の 2',4'-BNA 型 C-ヌクレオシドの合成に成功し、2',4'-BNA 型 C-ヌクレオシド類の効率的な一般合成法の確立に成功した。オキサゾールを核酸塩基とする 2',4'-BNA 型 C-ヌクレオシドを含む TFO の二重鎖 DNA 認識能を  $T_m$  測定により評価したところ、標的配列中に C・G 塩基対を含む二重鎖 DNA と比較的安定な三重鎖を形成することが明らかとなった。



さらに、著者は種々の 2-ピリドン類を有する 2',4'-BNA 及びその TFO 誘導体の合成に成功した。 $T_m$  測定の結果、C・G 塩基対を選択的に認識する非天然型核酸塩基として無置換 2-ピリドンが非常に優れていること及び 2-ピリドン型 2',4'-BNA は C・G 塩基対を選択的かつ強固に認識することを見出した。また、2-ピリドン型 2',4'-BNA の優れた C・G 塩基対認識能は標的配列及び塩条件にも左右されないことを明らかにした。熱力学的解析の結果、2-ピリドン型 2',4'-BNA の 2-ピリドン部が C・G 塩基対を認識し、2',4'-BNA 骨格によって三重鎖の安定性が向上することが明らかとなった。最後に、2-ピリドン型 2',4'-BNA を含む TFO はこれまでなし得なかった複数カ所の C・G 塩基対を含む二重鎖 DNA との三重鎖形成を可能にすることを明らかにした。2-ピリドン型 2',4'-BNA を用いることにより C・G 塩基対を含む二重鎖 DNA を標的とすることができ、これまで問題となっていた標的配列の制限を大きく軽減させることに成功した。



以上、著者は天然型核酸塩基を有する 2',4'-BNA と非天然型核酸塩基として 2-ピリドンを有する 2',4'-BNA が三重鎖形成オリゴヌクレオチドの機能性素子として非常に有用であることを明らかにした。これら機能性素子の開発はアンチジーン法の実用化に向け大いに貢献すると言えるだろう。

#### 論文審査の結果の要旨

アンチセンス・アンチジーン法は、ポストゲノムシーケンス時代の新しい医薬品創製、遺伝子診断、分子生物学研究の優れた道具として大いに期待され、注目されている。

本研究は、DNA 二重鎖を標的としてもう一本のオリゴヌクレオチドにより配列特異的に三重鎖を形成させ、遺伝子発現をコントロールするアンチジーン法の分子開発に関するものである。張君は核酸糖部コンホメーションを N 型

に固定した構想ユニットを用いることで三重鎖が配列特異的に強く形成されることを見出すとともに、このユニットに人工核酸塩基 2-ピリドンを組み合わせることで、これまで不十分であった CG 塩基対を厳密に認識する三重鎖形成用のヌクレオシドを開発した。

以上の成果は、学術的に高く評価でき、博士（薬学）学位論文として十分に価値あるものと認められる。