

Title	含窒素糖を有する新規人工核酸 Amino-BNA 類の合成と特性
Author(s)	中川, 治
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44811
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

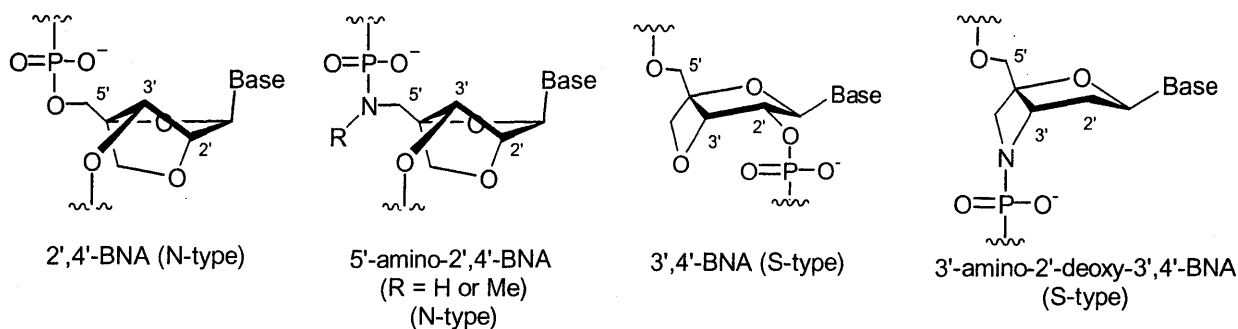
Osaka University

氏名	なか がわ おさむ 川 治
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 18640 号
学位授与年月日	平成 16 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	含窒素糖を有する新規人工核酸 Amino-BNA 類の合成と特性
論文審査委員	(主査) 教授 今西 武 (副査) 教授 北 泰行 教授 小林 資正 教授 村上 啓寿

論文内容の要旨

近年、ヒトゲノム配列の解読が終了し、これらの遺伝情報を生かした様々なポストゲノム技術の開発が飛躍的に発展しており、その代表的なものとして、アンチセンス・アンチジーン法、遺伝子診断法、デコイ核酸法などが知られているが、人工的に合成した核酸類縁体がこれら技術の中心的役割を担っており世界規模でこれら技術に適した新たな人工核酸の研究開発が活発に展開されている。遺伝子診断法の中で特に、一塩基多型 (SNP) を迅速にそして正確に解析できれば、各個人に対して適切な医療を施すオーダーメイド治療の実現が可能となる。SNP 解析技術には、正確な配列認識能力や特異的に切断するといった特殊な性質を有する人工核酸が必要とされる。しかし、未だに実用的な SNP 診断を可能とする人工核酸の開発には至っていない。一方、デコイ核酸法は、アンチセンス法について実用化が期待されている手法であり、臨床応用に向けた研究が進められている。このデコイ核酸法は、転写因子が結合する二重鎖 DNA 領域と同配列の短い二重鎖 DNA を細胞へ導入することで、その“おとり”の二重鎖 DNA に転写因子が結合し、遺伝子発現を阻害するものである。デコイ核酸法に用いる人工核酸には、転写因子と効率よく結合する DNA 二重らせん構造 (B 型らせん構造) 及び生体内酵素に対する安定性が要求される。しかし、これまで、これらの性質を満足させるデコイ分子は開発されていない。

以上の背景下に著者は、SNP 解析及びデコイ核酸法の有用機能材料となり得ると期待できる 2 種の新しい含窒素糖を有する人工核酸 5'-amino-2',4'-BNA 類及び 3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA の開発に着手した。これら新規人工核酸の分子設計は、当研究室で開発している糖部架橋橋造型 BNA 類とホスホロアミダート型ヌクレオシド間結合との組み合わせにより行った。2',4'-BNA は糖部コンホメーションが厳密に N 型に固定化された人工核酸で、2',4'-BNA を



含むオリゴヌクレオチドは非常に優れた二重鎖及び三重鎖形成能を有することが明らかになっている。一方、ヌクレオシドの 5' 位酸素原子を窒素原子に置換した P3'→N5' ホスホロアミダート結合型オリゴヌクレオチド (P3'→N5' オリゴ) は、緩やかな酸性条件下において P3'→N5' ホスホロアミダート結合を部位特異的に分解を受けることが知られている。遺伝子診断にはこれら 2 つの特性は重要な要因であり、本ハイブリッド型人工核酸として 5'-amino-2',4'-BNA を設計するに至った。また、3',4'-BNA は糖部が S 型で強く束縛されていることがわかっているが、これまでの 3',4'-BNA は 2',5' ヌクレオシド間結合にてオリゴヌクレオチドに導入せざるを得ない構造であった。今回著者は、デコイ核酸アナログとして有用性が高いと思われる 3',5' ヌクレオシド間結合できる S 型人工核酸として 3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA を新たに設計した。このものは S 型に束縛された N3'→P5' ホスホロアミダート結合型オリゴヌクレオチドの形成が可能でこれまでに類がなく、ユニークな特性が期待できる。まず著者は、2',4'-BNA 及びその合成中間体から効率よく 5'-amino-2',4'-BNA 類の合成を達成し、5'-amino-2',4'-BNA ユニットをオリゴヌクレオチドに導入することに成功した。5'-Amino-2',4'-BNA を含むオリゴヌクレオチドは、緩やかな酸性条件下において特異的に分解させることが可能であり、さらに、5'-NMe 体は当初の期待通り 5'-NH 体よりも酸特異的分解能が高いことがわかった。次に、SNP 解析において必要とされる二重鎖形成能を評価したところ、5'-amino-2',4'-BNA オリゴヌクレオチド類は、優れた二重鎖形成能及び配列選択性を獲得させることに成功した。また、細胞抽出液及び細胞内において直接 SNP 解析を行うことを想定し、5'-amino-2',4'-BNA オリゴヌクレオチド類の酵素耐性能を評価した。その結果、5'-amino-2',4'-BNA 類を含むオリゴヌクレオチドは優れた酵素耐性能を示した。さらに、5'-NMe 体は、臨床応用されており酵素耐性能が高いとされている S-オリゴを上回る結果を示した。将来、SNP 解析においてゲノム DNA を直接診断することが想定される。そこで、5'-amino-2',4'-BNA オリゴヌクレオチド類の二重鎖 DNA に対する三重鎖形成能を評価したところ、十分な三重鎖形成能及び配列選択性を有していた。以上、5'-amino-2',4'-BNA オリゴヌクレオチド類は、P3'→N5' オリゴの問題点であった二重鎖形成能低下を克服し、SNP 解析において必要とされる、緩やかな酸性条件下での特異的分解能を獲得することに成功した。さらに、5'-amino-2',4'-BNA オリゴヌクレオチド類は、優れた三重鎖形成能を有することを明らかとし、SNP 検出への応用以外にも、アンチジーン候補分子としての可能性を見出した。

一方、デコイ核酸法への応用を目指して設計した 3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA は、デコイ核酸分子として必要とされる酵素耐性能を、N3'→P5' ホスホロアミダート結合により獲得している。さらに、転写因子の結合に必要とされる B 型二重らせん構造を得るために、糖部コンホメーションをアゼチジン環により S 型に束縛させる設計とした。著者は D-グルコースから効率よく 3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA モノマーの合成を達成し、3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA ユニットをオリゴヌクレオチドに導入することに成功した。3'-Amino-2'-deoxy-3',4'-BNA オリゴヌクレオチドは、天然 DNA と同様な CD スペクトルパターン及び二重鎖形成能を示し、デコイ核酸分子として適切な DNA 型構造をとっていることを確認した。次に、デコイ核酸法において必要とされる酵素耐性能を評価したところ、3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA は、優れた酵素耐性能を有することを明らかとした。また、3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA オリゴヌクレオチドは、天然 DNA と同様な三重鎖形成能を示した。以上、3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA は、優れた酵素耐性能及び天然 DNA と同様な典型的 B 型らせん構造を獲得し、そして、天然 DNA に匹敵する二重鎖形成能を有することから、デコイ核酸分子として理想的な分子であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ポストゲノム時代に期待される新たな技術として SNP 解析技術やデコイ核酸法が挙げられる。これら技術を成熟させ真の実用化へと導くには、現存する問題点を解決した新規な機能性人工核酸の開発が必須である。

そこで、申請者は、これら技術に適した含窒素等を有する 2 種の人工核酸モノマー類を設計し、その合成に成功した。さらに、これら人工核酸モノマーをオリゴヌクレオチドへ導入し、得られたオリゴヌクレオチド類の酸分解活性や二重鎖形成能等を詳細に評価することで、これら新規人工核酸類が SNP 解析技術やデコイ核酸法に有用であることを見いだした。

以上の成果は、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。