



Title	7員環架橋構造を有する新規人工核酸類縁体の合成とその物性に関する研究
Author(s)	尾崎, 朋久
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45675">https://hdl.handle.net/11094/45675</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

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	尾崎朋久
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第18965号
学位授与年月日	平成16年6月30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	7員環架橋構造を有する新規人工核酸類縁体の合成とその物性に関する研究
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

現在までに、塩基部及び糖部が修飾された様々な機能を有する合成ヌクレオシドが数多く見出されており、これらの研究からヌクレオシドを化学修飾することはヌクレオシド医薬品開発の有効な手法であることが示された。一方で分子生物学の目覚しい発展とともに、疾病に関与している遺伝子が明らかになると、遺伝子を標的にした医薬品の開発に興味が向けられるようになった。その一つにオリゴヌクレオチドを利用したアンチセンス法やアンチジーン法等の遺伝子治療法がある。これらオリゴヌクレオチドにも化学修飾が施されるようになり、化学修飾核酸はモノマーとしての利用のみならずオリゴマーに組み込まれて利用されるようになった。様々なヌクレオシドの化学修飾法があるなか、通常N型とS型との平衡状態で存在しているヌクレオシド糖部立体配座を、あらかじめ適切な形に固定化することは生理活性発現等、種々の用途へ適用できる可能性があり、非常に有効な核酸修飾法である。一般的に一本鎖オリゴヌクレオチドが二重鎖を形成する際にはエントロピーは不利に働く。そこであらかじめ糖部立体配座を望ましい形に固定することで二重鎖を形成する際のエントロピーの損失を軽減することができ、相補鎖との二重鎖形成能が向上するものと理解できる。この考え方はヌクレオシドと酵素との結合や、受容体に対するヌクレオシドの活性発現に寄与するコンホマーの探索にも展開可能であり、糖部立体配座をあらかじめ固定化する化学修飾法の意義は大きい。

当研究室においてもこれまでに糖部立体配座の固定化に着目して種々の架橋型人工核酸の開発研究を進めており、RNAあるいはDNAに対する高い二重鎖結合能など優れた物性を獲得した人工核酸の開発に成功している。代表的な架橋型人工核酸に糖部立体配座をN型に固定化した2'-O,4'-Cmethyleneribonucleoside(2',4'-BNA: Bridged Nucleic Acid)があり(Figure 1)、優れた二重鎖結合能等を有することを明らかにしている。また、フランオース環の3'位、4'位間でトランス架橋を施すことで糖部立体配座をS型に固定化したtrans-3',4'-BNAの合成にも最近成功している(Figure 1)。この両化合物の構造を詳しく見ると架橋部分の環サイズの影響によるためか糖部のN性あるいはS性が極端に強調された構造となっている。すなわち、

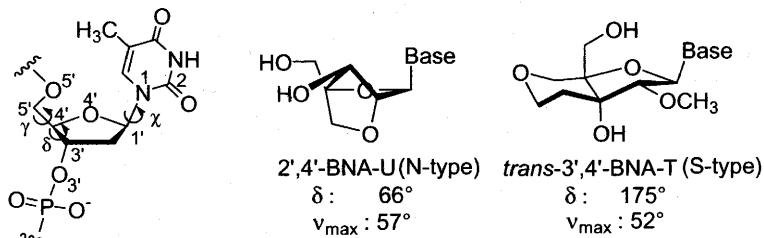


Figure 1. Structures of 2',4'-BNA-U and trans-3',4'-BNA-T.

天然の A 型及び B 型二重鎖核酸で観測される値 (Table 1) と比較して、5 員環で架橋した  $2',4'$ -BNA ではより小さいねじれ角  $\delta$  値 ( $66^\circ$ ) とより大きな最大ねじれ角  $\nu_{\max}$  ( $57^\circ$ ) を有しており、また 6 員環で架橋した *trans*  $3',4'$ -BNA ではより大きな  $\delta$  値 ( $175^\circ$ ) と  $\nu_{\max}$  ( $52^\circ$ ) を示している。

Table 1. Structural parameters of oligonucleotide duplex.<sup>6)</sup>

duplex conformation	A-form	B-form
sugar puckering	N-type	S-type
$\gamma$ (C3'-C4'-C5'-O5')	45°	36°
$\delta$ (O3'-C3'-C4'-C5')	83°	157°
$\chi$ (O4'-C1'-N1-C2)	-158°	-117°
$\nu$ max	38°	36°

そこで、分子モデリングにより種々検討したところ、それぞれの架橋構造を7員環にすることで糖部立体配座の固定化とともに、ねじれ角 $\delta$ 、及び最大ねじれ角 $\nu_{max}$ が天然の二重鎖核酸で観測される配座をもつ新規な架橋型人工核酸が開発できることがわかった。著者は合成の簡便性と化合物の親水性を考慮して二つの架橋型核酸、2'-deoxy-*trans*-3',4'-BNAと2',4'-BNA<sup>COC</sup>を設計した (Figure 2)。これらは、それぞれ天然の二重鎖核酸中で見られるS型及びN型立体配座を有することからモノマーとしての物性に興味が持たれるばかりか、オリゴヌクレオチドへ導入することができればDNAやRNAを標的としたDNAチップやアンチセンス法への展開が大いに期待できる。

*2'-Deoxy-trans-3',4'-BNA* を合成するために、構造上 DNA に類似させることを考慮してチミジンを出発原料とした。糖部を固定化するための基本構造となる二つのヒドロキシメチル基は 3' 位続いて 4' 位へ導入した。導入した二つのヒドロキシメチル基を足掛かりにメチレンアセタール化反応にて 7 員環架橋構造を構築することができた。最後に保護基を脱保護して目的の *2'-deoxy-trans-3',4'-BNA* を合成することに成功した。本化合物は X 線結晶構造解析より適切に糖部が S 型に固定化されていることに加えて、B 型二重鎖核酸形成時において望ましいねじれ角 ( $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\chi$ 、 $\nu_{\text{max}}$ ) を有する理想的な DNA 構造類縁体であることを明らかにした (Figure 2)。

一方、糖部 N 型核酸である  $2',4'-\text{BNA}^{\text{COC}}$  については、 $2',4'-\text{BNA}$  合成中間体へ核酸塩基（チミン）を導入後、2' 位水酸基と 4' 位ヒドロキシメチル基の水酸基からメチレンアセタール化反応により 7 員環架橋構造を構築して効率良く合成することに成功した。X 線結晶構造解析より A 型二重鎖核酸形成時に観測されるねじれ角に近い値をもつ RNA 構造類縁体であることがわかった (Figure 2)。続いて  $2',4'-\text{BNA}^{\text{COC}}$  を含むオリゴヌクレオチドの物性を評価した。その結果、RNA に対する二重鎖結合能を見てみると、 $2',4'-\text{BNA}$  オリゴヌクレオチドは、 $2',4'-\text{BNACOC}$  オリゴヌクレオチドより相対的に高い二重鎖結合能を示した。 $\delta$  値が  $2',4'-\text{BNA}^{\text{COC}}$  では  $78^\circ$ 、 $2',4'-\text{BNA}$  では  $66^\circ$  と小さくなる、すなわち糖部の N 性が大きくなるにつれて RNA に対する二重鎖結合能が高くなることがわかる。このことから、RNA に対する優れた二重鎖結合能の獲得には糖部立体配座を天然で観測される N 型で固定するより、さらに強調された N 型で固定するほうが良いことが示唆された。本研究により修飾核酸の糖部 N 性と相補鎖 RNA に対する二重鎖結合能との関係を考察することができた。これら

の結果は、今後相補鎖に対する二重鎖結合能の獲得を志向した修飾核酸を開発するうえで貴重な知見である。なお、2',4'-BNACOC オリゴヌクレオチドは現在臨床で使用されている S-オリゴと同等の酵素耐性能を有しており、実用的アンチセンス分子としての展開が期待できる。

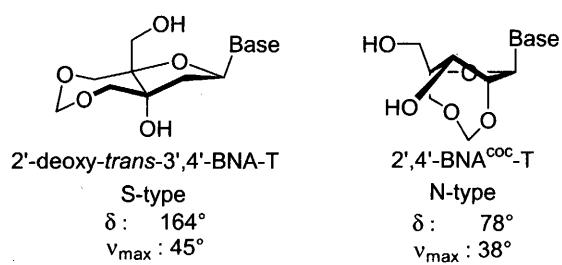


Figure 2. Structures of 2'-deoxy-*trans*-3',4'-BNA and 2',4'-BNA<sup>coC</sup>.

## 論文審査の結果の要旨

アンチセンス法やアンチジーン法などのゲノムテクノロジーは、ゲノム情報に基づく新しい創薬手法や遺伝子診断手法として注目されている。その基盤材料となる人工核酸の開発研究が世界中で活発に展開されている。

申請者は、天然核酸の糖部立体配座を架橋構造化により固定した高機能性人工核酸類の開発研究の一環として、優

れたゲノムテクノロジー基盤材料となりうる新しい架橋構造型人工核酸の開発研究に着手し、以下の成果を得た。

- 1) メチレンアセタール骨格を含む 7 員環架橋構造化で糖部を S 型立体配座に固定した新規人工核酸  $2'$ -deoxy-*trans*- $3',4'$ -BNA モノマーの合成法を開発した。また、本化合物の糖部が B 型らせんの二重鎖核酸における糖部とほぼ同じ立体配座に固定されていることを、X 線結晶構造解析や分子軌道計算により明らかにした。
- 2) メチレンアセタール骨格を含む 7 員環架橋構造化して糖部を N 型配座に固定した新規人工核酸  $2',4'$ -BNA<sup>COC</sup> モノマーの合成法を開発した。当人工核酸の糖部は、X 線結晶構造解析や分子軌道計算から A 型らせんの二重鎖核酸に近似した立体配座に固定されていることが判明した。
- 3)  $2',4'$ -BNA<sup>COC</sup> で部分修飾したオリゴヌクレオチドは相補鎖 RNA に対して安定な二重鎖を形成し、強いヌクレアーゼ耐性も有していることを明らかにし、 $2',4'$ -BNA<sup>COC</sup> が様々なゲノムテクノロジーの基盤材料として有用であることを示す知見を得た。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文として相応しい内容であると判断致します。