



Title	糖部S型立体配座を有する新規架橋型人工核酸類の合成とその機能性に関する研究
Author(s)	関口, 光明
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45680
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	関 口 光 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 19423 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 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	糖部 S 型立体配座を有する新規架橋型人工核酸類の合成とその機能性に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 今 西 武 (副査) 教 授 田 中 徹 明 教 授 北 泰 行 教 授 小 林 資 正

論 文 内 容 の 要 旨

近年、様々なゲノムテクノロジーによる特定遺伝子の発現制御法の開発が注目を集めている。なかでもアンチセンス法およびデコイ核酸法は臨床応用に向けた研究が進められており、次世代の遺伝子治療法として期待されている。これら技術の実用化には高機能性人工核酸の開発が不可欠であり、現在、核酸の立体配座特性に着目した機能性人工核酸の開発研究が活発に展開されている。核酸の糖部は一本鎖オリゴヌクレオチド中では N 型および S 型立体配座の平衡状態にあるが、二重らせん構造を形成すると 2 つの配座間の揺らぎは束縛され、RNA/RNA 二重鎖にみられる A 型二重らせん中では N 型配座に、DNA/DNA 二重鎖にみられる B 型二重らせん中では S 型配座に固定された状態になる。この知見から、糖部を予め S 型配座に制御した人工核酸は転写因子の結合に適した B 型らせんを形成するため、デコイオリゴの機能性向上が期待できる。また、核酸分解酵素 RNase H は DNA/RNA 二重鎖を認識し RNA 鎖を分解するためアンチセンス効果の向上に寄与することが知られており、DNA と同じ糖部 S 型構造を有する人工核酸を開発することは大変意義深い。しかし、これまで報告されている糖部 S 型人工核酸類は糖部立体配座の制御には成功しているものの、相補鎖核酸との安定な二重鎖形成には結びついておらず、高機能性を有する S 型人工核酸の開発には至っていないのが現状である。

以上の背景下に、著者は核酸の糖部をこれまでにない新たな架橋構造によって S 型配座に制御した 2 種の新規架橋型人工核酸 *trans*-3',4'-BNA 類及び 5'-amino-3',5'-BNA の開発研究に着手した。B 型二重らせん構造において核酸の糖部 3' 位及び 4' 位はらせん構造の外側に位置することから、この部位での架橋構築によってこれまで問題となっていた二重鎖形成時の立体障害を回避できると考えた。分子モデリング実験から糖部 3' 位、4' 位間でのトランス縮環型 6 員環構造により糖部を S 型配座に固定できることが示され、テトラヒドロピラン構造を有する 2 つの *trans*-3',4'-BNA 誘導体 (*ribo* 及び *arabino*) を設計した。その合成は D-グルコースを出発原料に行った。すなわち、3 位及び 4 位の立体選択的な増炭反応により炭素官能基を導入後、チミン塩基の導入に続く閉環反応を経て *trans*-3',4'-BNA 骨格を構築した。その後、2' 位水酸基のメチル化を行い *trans*-3',4'-BNA (*ribo*) の合成に成功した。また、*trans*-3',4'-BNA (*arabino*) は 2' 位水酸基の酸化に続く立体選択的な還元反応を経てその合成に成功した。¹H NMR 測定及び X 線結晶構造解析から *trans*-3',4'-BNA の糖部が S 型配座の C3'-*exo* 構造であることを確認した。次に、オリゴヌクレオチドへの導入を検討したところ *trans*-3',4'-BNA (*ribo*) については導入に至らなかったが、

trans-3',4'-BNA (*arabino*) を含むオリゴヌクレオチドの合成に成功した。続いて、相補鎖核酸との二重鎖形成能を評価した結果、*trans*-3',4'-BNA (*arabino*) オリゴヌクレオチドは期待した相補鎖核酸との安定な二重鎖形成ができないことが明らかになったが、天然 DNA 以上の塩基配列認識能を有していることを見いだした。

trans-3',4'-BNA オリゴヌクレオチドが二重鎖を不安定化させる要因として、*trans*-3',4'-BNA のねじれ角 δ が不適切な角度をとることが考えられた。そこで、第二の S 型人工核酸として糖部 3' 位、4' 位間においてシス縮環型ピロリジン環構造を有する 5'-amino-3',5'-BNA を設計した。本化合物は分子モデリング実験からねじれ角 γ 及び δ が二重鎖形成に適した角度に制御されていることが示された。さらに、5' 位酸素原子を窒素原子に置換しているため、オリゴヌクレオチドへ導入するとホスホロアミダート型リン酸結合となり分解酵素耐性能の向上が期待される。5'-Amino-3',5'-BNA の合成はチミジンを出発原料に、3' 位での立体選択的増炭反応及び窒素官能基の導入後、閉環反応によるビシクロ骨格構築により達成した。¹H NMR 測定及び X 線結晶構造解析から、5'-amino-3',5'-BNA の糖部は C1'-*exo*O4'-*endo* 構造のやや特異な S 型配座であること、並びにねじれ角 γ 及び δ が二重鎖形成に適した角度に制御されていることを確認した。続いて、5'-amino-3',5'-BNA のオリゴヌクレオチドへの導入に成功するとともに、期待通り相補鎖核酸（特に相補鎖 RNA）との安定な二重鎖形成能および優れた塩基配列認識能を有することを明らかにした。また、熱力学的解析から結合親和性の向上が糖部立体配座を固定化したことによるエントロピー項の影響であることを明らかにした。さらに、CD スペクトル測定から 5'-amino-3',5'-BNA の糖部立体配座は DNA/RNA 二重鎖中の DNA の立体配座と類似していることが示された。以上の結果から、著者は 5'-amino-3',5'-BNA がアンチセンスオリゴの素材として有望な物性を有していると考え、アンチセンス法への応用に向け更なる検討を行った。その結果、5'-amino-3',5'-BNA オリゴヌクレオチドの 5' 側および 3' 側リン酸結合が共に、天然核酸と比べて高い分解酵素耐性能を有することを見いだした。さらに、5'-amino-3',5'-BNA オリゴヌクレオチドの RNaseH 誘導活性を評価したところ、期待通り 5'-amino-3',5'-BNA が RNase H に認識され、相補鎖 RNA の分解を誘導することを見いだした。

以上、著者は新規 S 型人工核酸の開発研究を行った結果、5'-amino-3', 5'-BNA オリゴヌクレオチドが相補鎖核酸との結合親和性を向上させ、さらに高い分解酵素耐性能ならびに RNaseH 誘導活性を有していることを見だし、5'-amino-3',5'-BNA がアンチセンス法をはじめとする様々なゲノムテクノロジーへ応用可能な優れた基盤材料であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

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することによる人工核酸の高機能化研究」の一環として、新規な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) 糖部 3' 位と 4' 位を 6 員環でトランス型に架橋した新規人工核酸 *trans*-3',4'-BNA モノマーの開発に成功し、その X 線結晶構造解析などから糖部が C3'-*exo* 型の S 型配座であることを明らかにし、このモノマーをオリゴヌクレオチドに組み込むことに成功している。
- 2) 別途、糖部 3' 位と 4' 位を 5 員環でシス型に架橋した新規人工核酸 5'-amino-3',4'-BNA モノマーの開発にも成功し、その X 線結晶構造解析などから当該人工核酸の糖部が C1'-*exo*O4'-*endo* 型の S 型配座であることを明らかにした。
- 3) 5'-Amino-3',4'-BNA モノマーをオリゴヌクレオチドに導入した各種の 5'-amino-3',4'-BNA 修飾オリゴの合成に成功し、相補構造の DNA や RNA 鎖と安定な二重鎖を形成する特性を有していることを明らかにした。また、CD スペクトル解析から、5'-amino-3',4'-BNA は DNA/RNA 二重鎖中の DNA と類似した糖部立体配座を有していることも明らかにした。
- 4) 5'-Amino-3',4'-BNA 修飾オリゴは優れたヌクレアーゼ耐性ととともに RNaseH 認識能を有していることを見だし、この新規人工核酸がアンチセンス法の機能素材として有用が高いことを示す結果を得ている。

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。