



Title	各種非天然型核酸塩基を有する 2' , 4' -BNA類縁体の合成と三重鎖形成オリゴヌクレオチドとしての応用
Author(s)	猪原, 裕康
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47233
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	いの 猪 原 ひろ 裕 やす 康
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 0 9 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 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	各種非天然型核酸塩基を有する 2',4'-BNA 類縁体の合成と三重鎖形成オリゴヌクレオチドとしての応用
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 宇 野 公 之

論 文 内 容 の 要 旨

遺伝子を直接分子標的とする手法の一つにアンチジーン法がある。アンチジーン法とは、オリゴヌクレオチドを外部から導入することで、病因となる遺伝子の二重鎖 DNA と配列特異的に三重鎖を形成させ、転写過程を阻害する手法である。アンチジーン法における三重鎖は、Watson-Crick 型水素結合した標的二重鎖 DNA に対して TFO (Triplex-forming oligonucleotide) が Hoogsteen 型水素結合をすることで形成され、その水素結合様式はチミンと A・T 塩基対、またはプロトン化したシトシンと G・C 塩基対からなる。しかし三重鎖形成には大きな問題がある。それは C・G 塩基対の C、あるいは T・A 塩基対の T を特異的に認識して結合する天然核酸塩基が存在しないことであり、標的配列中にそのようなピリミジン・プリン塩基対が一区所でも存在すると、三重鎖核酸の安定性が著しく低下してしまう。ピリミジン・プリン塩基対の認識達成に直結すると期待されるものに、非天然型核酸塩基を用いてピリミジン・プリン塩基対を認識する方法が挙げられる。しかし、C・G 塩基対や T・A 塩基対は水素結合を形成できる部位が少なく、非天然型核酸塩基による水素結合形成のみでは十分な安定性を得ることは難しい。

一方当研究室では、糖部のコンホメーションを N 型に固定化したヌクレオシド類縁体 2',4'-BNA を合成し (Fig. 1)、それをオリゴヌクレオチドに組み込むことで、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大きく向上させることに成功している。そこで著者は、非天然型核酸塩基部の水素結合形成による配列選択性の向上と、2',4'-BNA による三重鎖の安定化とを組み合わせることで、ピリミジン・プリン塩基対認識達成できると考え、本研究に着手した。そしてその成果として、T・A 塩基対に対して 2-hydroxybenzene、3-hydroxybenzene、indole、2-aminoquinoline、2-aminopyridine、N-benzoyl-N-methylthiazole、benzoylaminopyrazole を、C・G 塩基対に対しては pyridine、pyridine-N-oxide を非天然型核酸塩基として有する 2',4'-BNA モノマー (2hB^B、3hB^B、In^B、Q^B、aPy^B、Tz^B、1Pr^B、2Pr^B、Py^B、oxPy^B) の合成に成功した (Fig. 2)。

続いてそれら 2',4'-BNA モノマーを、DNA 合成機によりオリゴヌクレオチドへ導入することに成功した。そして、合成したオリゴヌクレオチドの、二重鎖 DNA との三重鎖形成能の評

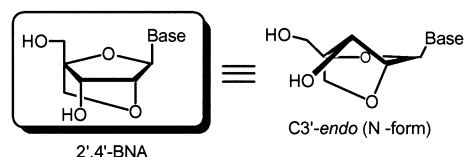


Fig. 1. Typical conformation of sugar pucker and structure of 2',4'-BNA.

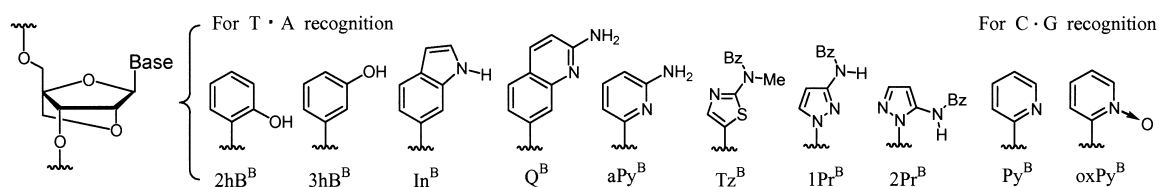


Fig. 2. Structures of the 2',4'-BNAs bearing unnatural nucleobase.

価を融解温度 (T_m) 測定により行なった。その結果から、2hB^B や 3hB^B のような水酸基をプロトンドナーとする塩基は塩基対選択性に乏しく、Py^B のようにピリジン環の2位の位置で糖部と結合させたものは、C・G塩基対と強く結合することができるということなど塩基設計のための様々な知見が得られた。そして評価した塩基のなかでは、C・G塩基対に対してはPy^B が、T・A塩基対に対してはIn^B と Tz^B が結合力及び、塩基対選択性の両方の観点からみて、特に優れた特性を示していた。

T・A塩基対のT、C・G塩基対のCそれぞれに対して満足いく結合能をもつ核酸塩基を見出せたので、次にそれらを用いて、ピリミジン・プリン塩基対を含んだ配列をもつ二重鎖との三重鎖形成を試みた。標的配列の制限を克服するため、C・G塩基対にはPy^B を、T・A塩基対にはIn^B あるいはTz^B を用い、さらに結合親和性を高めるため2',4'-BNA修飾を一ヶ所おきに施すことにした。ターゲットとする配列にはインターロイキン-2レセプター α 鎖(IL-2R α)上のプロモーター領域に存在するNF κ B-SRF結合配列及びCREB/ATF結合配列を選択し、 T_m 測定により形成された三重鎖核酸の安定性を調べた。その結果として、NF κ B-SRF結合配列とCREB/ATF結合配列いずれに対しても、In^B、Tz^B、Py^Bを含むTFOは高い T_m 値を示し、安定な三重鎖を形成していることが分かった。一方、比較検討のためにC・G塩基対に対してはチミジンを、T・A塩基対に対してはグアニンを用いたTFOも併せて評価したところ、NF κ B-SRF結合配列とCREB/ATF結合配列いずれに対しても、三重鎖の形成は見られなかった。

以上、TFO中にIn^B、Tz^B、Py^Bを用いることで、これまで問題となっていた標的配列の制限を一気に緩和させることに成功した。このように、T・A塩基対とC・G塩基対の両方を配列中に含んだ二重鎖DNAと、安定な三重鎖を形成した例は無く、アンチジーン法の実用化に向け大きく前進したと言える。

論文審査の結果の要旨

アンチジーン法は遺伝子DNAの二重らせん構造に配列特異的にオリゴヌクレオチドを結合させ安定な三重鎖を形成させて標的遺伝子の発現を制御するゲノムテクノロジーで、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。しかし、その実用化には①三重鎖の安定性が乏しい、②標的DNAの塩基配列に制約がある(TA塩基対のTおよびCG塩基対のCを認識し結合する核酸ユニットがない)の克服が必須であるが、天然や既存の人工オリゴヌクレオチドでは解決できていない。

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2',4'-BNAが三重鎖の安定性を飛躍的に向上できると言う知見を基に、残る課題「標的DNA塩基配列の制約」を解決するため、2',4'-BNA骨格に各種の人工核酸塩基を組み合わせた新規な人工核酸を種々合成するとともにそれらについて三重鎖形成能の機能評価を行った。その結果、これまで困難であったCG塩基対のCおよびTA塩基対のTをそれぞれ認識して強く結合する人工核酸の開発に成功した。

本研究内容は、アンチジーン法の実用化にとって大変重要な成果であり、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。