

Title	N-Homo-DNA オリゴマーおよび長鎖 RNA の合成と機能に関する研究
Author(s)	石山, 幸一
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49180">https://hdl.handle.net/11094/49180</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">〈a href="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">〈/a〉</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	いしやまこういち 石山幸一
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第21659号
学位授与年月日	平成20年2月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	<b><i>N</i>-Homo-DNA オリゴマーおよび長鎖 RNA の合成と機能に関する研究</b>
論文審査委員	(主査) 教授 今西 武  (副査) 教授 北 泰行 教授 田中 徹明 教授 小林 資正

### 論文内容の要旨

天然 DNA/RNA の化学修飾は、その合成、物性、機能および応用面で非常に興味もたれ、これまでに数多くの化学修飾体の研究開発がなされ、その修飾部位としては核酸塩基部、糖部位、リン酸部位などが挙げられる。しかしながら、グリコシル結合部位にメチレンを挿入した *N*-homo-DNA/RNA が、DNA/RNA オリゴマーとしての諸性質、特にグリコシル結合部位の構造変化、自由度増加が DNA/RNA オリゴマーの構造および活性にどのように影響を及ぼすか大変興味深いにもかかわらず、核酸のグリコシル結合部に対する修飾はこれまで殆どなされておらず、わずかにモノマーのヌクレオシドレベルの研究がなされていたにすぎなかった。

一方、2006年の Fire, Mello のノーベル生理・医学賞受賞に代表される、RNAi (RNA 干渉) の発見に基づく RNA の医薬応用に、最近、期待が非常に高まってきている。現在既に、数多くの RNA 医薬候補品が臨床入りしており、RNA の化学合成法の研究は以前にも増して注目されてきている。また、様々な新しい生理活性 RNA (例えば、shRNA, pre-miRNA) は一本鎖 RNA であり、最低 50 mer 以上の鎖長 RNA が必要である。そのような長鎖 RNA の化学合成を行う場合、従来の方法では合成が非常に困難であったため、長鎖 RNA 合成に適した、従来法を凌駕する新しい合成法の開発が重要なポイントであった。このような背景下、著者は *N*-homo-DNA オリゴマーおよび長鎖 RNA の合成と機能に関する研究に着手し、以下の成果を得た。

まず、*N*-homo-DNA オリゴマーに関する研究については下記のとおりである。

研究開始当時、*N*-homo-RNA モノマーの合成が既に報告されていたが、*N*-homo-DNA モノマーの合成例は皆無であった。そのため、1-アミノ-D-アリトール誘導体の効率的な合成法を見出し、これを共通中間体に使い、閉環反応による核酸塩基部位の構築を行うことにより *N*-homo-DNA モノマーの合成ルートの確立を行った (塩基部位がアデニンおよびチミン)。モデル化合物として、塩基部位がアデニンである *N*-homo-DNA 二量体および *N*-homo-RNA 二量体の合成を液相法にて行い、UV、CD、NMR、T<sub>m</sub> (二重鎖融解温度) 測定を行った。特に NOESY-NMR、CD 測定より *N*-homo-DNA 二量体は塩基部位が左巻きにスタッキングしている可能性があることを明らかにした。

次に、*N*-homo-DNA モノマーを出発原料にオリゴマー合成用のアミダイトを合成すると共に、*N*-homo-DNA モノマーを固定化した固相反応用樹脂 (CPG) を合成し、これらを用いて種々の *N*-homo-DNA オリゴマーを固相合成により得た。その物性評価として CD、T<sub>m</sub>、AFM (原子間力顕微鏡) の測定を行なった。その結果、*N*-homo-DNA オリゴマーが一本鎖でも二重鎖状態でも生理的条件下 (PBS 中) で左巻き構造を取り得ることが CD より、また 50 mer の *N*-homo-DNA 二重鎖の AFM 測定により *N*-homo-DNA オリゴマーが左巻き構造を有することが明らかとなった。

さらに、*N*homo-DNA オリゴマーは天然 DNA に対しては右巻きの二重鎖構造をとり、左巻き構造の *N*homo-DNA に対しては左巻きの二重鎖構造をとるユニークな特性をもつ核酸であることを明らかにした。これまでに報告された左巻き構造を有する核酸と異なり、*N*homo-DNA オリゴマーは、グリコシル結合部分がフレキシブルになった構造をしているにもかかわらず、また、生理的条件下においても左巻き構造を有する、これまでの報告例にはない新しいタイプの核酸誘導体であることを明らかにした。

さらに、DNA オリゴマーの 3',5'-末端領域を *N*homo-DNA で置換した修飾体は核酸分解酵素である RNase に対して抵抗性を示した。また、RNase H 活性化能を保持してアンチセンス活性発現するには天然型 DNA とのギャップマー構造化が必要であることが示唆され、この作用を利用することにより mRNA の特異的切断を伴う遺伝子発現調節が可能と考えられる。

次いで長鎖 RNA の化学合成法の研究においては、最も重要な点の一つとして RNA の 2'-水酸基の保護基の問題があった。そこで、著者は従来の保護基とは異なり、立体障害を極力抑え、保護基に不斉中心を有しない独自の保護基、2-cyanoethoxymethyl (CEM) 基を見出し、これまでにない高縮合収率による実用的な RNA の新規合成法 (CEM 法) を確立した。RNA 固相合成に必要なモノマーである 2'-CEM アミダイトの合成ルートを確認し、U の 40 mer について、RNA 固相合成の基本的条件を検討した。次に、A、G、C、U 全ての塩基を含む実配列、20 mer から 55 mer の鎖長 RNA オリゴマー合成を検討し、特に、脱保護条件の検討により副反応を抑制する脱保護条件を見出し、RNA の新規合成法 (CEM 法) を確立した。新規合成法は従来法に比べ、DNA 合成並の効率および精製の容易さで RNA 合成を可能とし、大量合成、医薬品開発を目的とした高品質 RNA 合成に可能であり、さらに、これまで合成が困難であった 50 mer 以上の長鎖 RNA も容易に合成できる効率の良い RNA 合成法であることを明らかにした。

さらに、この有用性の検証および機能性 RNA 合成する目的で、これまでの化学合成では成し得なかった 100 mer を超える長鎖 RNA 合成 (110 mer) に挑んだ。縮合工程時の活性化剤検討およびキャッピング工程の新たな条件を見出すことにより長鎖 RNA の固相反応条件の最適化を行い、化学合成としては世界最長クラスの 110 mer RNA 合成を新規合成法 (CEM 法) により達成した。また、その構造を MALDI-TOF Mass と酵素分解を組み合わせることで確認することに成功した。さらに、化学合成した pre-miRNA を直接、細胞内に導入することにより、最終的に miRNA として機能していることを遺伝子発現抑制効果より確認した。

長鎖合成 RNA による本成果は、今後、RNA 研究分野において、新しい研究ツールとして応用性が高いことを示している。

## 論文審査の結果の要旨

天然核酸分子の核酸塩基部、糖部、リン酸ジエステル部を化学修飾した人工核酸は、ゲノム創薬・遺伝子診断・遺伝子機能解析などの機能的素材としての有用性が期待できるため、これまでに国の内外で、開発研究が活発に展開されている。核酸塩基のグリコシル結合部位にメチレンを挿入した *N*homo-DNA/RNA については、オリゴマーとしての構造上や機能上の特性に興味をもたれる人工核酸であるにも関わらず、殆どその研究例がなかった。

申請者は、*N*homo-DNA モノマー体の合成法を確立するとともに、そのダイマーおよびオリゴマーの合成にも成功し、その物性を種々の手法で検討し、新しい知見の数々を得ている。中でも、*N*homo-DNA オリゴマーは、天然 DNA とはらせん構造が逆向き傾向 (天然核酸は右巻きらせんであるが、*N*homo-DNA は左巻き) が強いという大変珍しく興味深い知見を見出した。

一方、RNA オリゴマーは、RNA 干渉法をはじめ医薬品の開発や生体 RNA の機能の解明などのツールとしてその合成の重要度が高まってきている。しかし、DNA とは違って長鎖の RNA 合成は既知の方法では困難であった。申請者は RNA オリゴマーの合成を困難にしている RNA モノマーでの 2'-水酸基の嵩高い保護基を立体障害の小さな 2-cyanoethoxymethyl (CEM) 基に変換とする方法を確立し、これにより長鎖 RNA の効率的な合成が可能であることを実証した。

これらの本研究内容は、核酸化学分野におい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。