



Title	ウレタン・ウレア骨格で糖部をN型に固定した架橋型人工核酸の合成と機能性に関する研究
Author(s)	西田, 勝
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49656">https://hdl.handle.net/11094/49656</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">大阪大学の博士論文について</a>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

人工核酸オリゴマーを用いた核酸医薬品が注目を集めている。2009年現在、二種の人工核酸オリゴマーが核酸医薬品として承認されており、また多くの人工核酸オリゴマーが幅広く臨床研究されている。これら核酸医薬品候補に使用されている代表的な人工核酸としてS-オリゴがある。S-オリゴは分解酵素に対して非常に高い抵抗性を示し、また優れた膜透過性を有する一方で、標的となるRNAへの結合親和性に乏しく、またタンパク質との非特異的な相互作用による副作用が問題として挙げられる。当研究室では、これらの問題を解決するために1997年に世界で最初に架橋型人工核酸BNA（Bridged Nucleic Acid）を開発した。このBNAはRNAの2'位の酸素原子と4'位の炭素原子をメチレン架橋し、糖部立体配座をN型に固定化した人工核酸であり、二重鎖形成時に核酸構造の自由度が失われることで生じるエントロピーの損失を減らすことで強固なRNA結合親和性を獲得した。申請者は、現存するBNA類にはない新たな架橋様式として、ウレタン型架橋構造を選択し、この架橋構造を有するBNAの合成を目指した。一つは2'位、4'位間をウレタン架橋することで糖部立体配座をN型に固定化した2', 4'-BNAであり、もう一つは3'位、4'位間を架橋し、糖部立体配座をS型に固定した3', 4'-BNAである。このS型の3', 4'-BNAは2', 5'-リン酸ジエステル結合を持つ2', 5'-核酸であり、天然のオリゴヌクレオチドへの導入数を増やすことでRNAに対する高い結合親和性が期待できる。当研究室ですでに合成に成功している二種類の2', 5'-核酸の3', 4'-BNAや3'-amino-3', 4'-BNAと性質を比較することで、架橋構造の拡大や親水性の向上に伴う二重鎖、および三重鎖形成時の影響に関する知見を得ることが出来る。さらに、本研究では架橋部にウレア骨格を有するBNAを併せて合成し、その性質を評価することでこれまでのBNAにはない極性架橋構造が人工核酸の性質に与える影響を精査した。

ウレタン架橋型2', 4'-BNA及びウレタン架橋型3', 4'-BNAについては、共通の出発原料を用い2', 4'-BNAを合成後、架橋部の転位反応を利用して3', 4'-BNAを導いた。この3', 4'-BNAはオリゴヌクレオチドへと導入し、その二重鎖形成能を評価した。その結果、3', 4'-BNAを1ヶ所導入したオリゴヌクレオチドは、比較として合成した2', 5'-DNAを含むオリゴヌクレオチドと同等の結合親和性を示した。これはウレタン架橋構造による糖部立体配座の固定化が、結合親和性にあまり影響を及ぼさないことを示した結果であるといえる。さらに3', 4'-BNAを導入したオリゴヌクレオチドは、アンモニアのような求核種と反応させることで、4'-修飾オリゴヌクレオチドへと誘導することが可能であったことから、ウレタン架橋部を機能的分子の導入部位として応用できると考えられる。

一方、ウレタン架橋型2', 4'-BNAについては架橋部の転位反応速度が予想した以上に速く、その制御が困難であることからオリゴヌクレオチドへの導入には至らなかった。そこで親水性の高さを損なうことなく、転位反応の制御が可能と考えられる結合様式として、化学的により強固なウレア架橋構造を選択した。目的とするウレア架橋型2', 4'-BNAは、分子設計の段階で推測した通りに転位反応を起こすことなく、安定に単離することが出来た。このウレア架橋型2', 4'-BNAは効率よくオリゴヌクレオチドへ導入でき、1ヶ所、2ヶ所、3ヶ所、6ヶ所導入したオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成することに成功した。これらオリゴヌクレオチドの結合親和性の測定を行った所、ウレア架橋型2', 4'-BNAのオリゴヌクレオチドへの導入数を増やすに従い、一本鎖RNAに対しては徐々に高い結合親和性を示し、一本鎖DNAに対してはウレア架橋型2', 4'-BNAの導入数に限らず天然の二重鎖DNAよりも低い結合親和性を示した。すなわち、ウレア架橋型2', 4'-BNAの導入数の増加に伴い、相補鎖RNAに対する選択性が高くなることが明らかとなった。このウレア架橋型2', 4'-BNAを含むオリゴヌクレオチドと相補鎖RNAからなる二重鎖核酸のCDスペクトル測定を行ったところ、ウレア架橋型2', 4'-BNAの導入数の異なる全てのオリゴヌクレオチドにおいて、それらの二重らせん構造はA型のRNA二重らせん構造に近いことを示した。一方、相補鎖DNAとウレア架橋型2', 4'-BNAを含むオリゴヌクレオチドからなる二重らせん構造は、ウレア架橋型2', 4'-BNAの導入数の増加に伴い、B型のDNA二重らせん構造と比較して大きくずれ、A型のRNA二重らせん構造に近づいていくことが分かった。すなわち、ウレア架橋型2', 4'-BNAは、RNA二重鎖中のRNAとほぼ同等の構造をとっていることが明らかとなった。最後に、ウレア架橋型2', 4'-BNAを含むオリゴヌクレオチドの核酸分解酵素に対する酵素耐性能を評価した。その結果、ウレア架橋型2', 4'-BNAを含むオリゴヌクレオチドの酵素耐性能は、天然のオリゴヌクレオチドや2', 4'-BNAを含むオリゴヌクレオチドを遥かに上回り、S-オリゴとほぼ同等であることが明らかとなった。以上、ウレア架橋型2', 4'-BNAは一本鎖RNAに対する高い選択性と酵素耐性能の獲得に成功したことから、優れたアンチセンス候補分子であるといえる。

氏名	にしだまさる 西田 勝
博士の専攻分野の名称	博 士（薬 学）
学 位 記 番 号	第 2 2 8 8 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 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	ウレタン・ウレア骨格で糖部をN型に固定した架橋型人工核酸の合成と機能性に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小比賀 聡  (副査) 教 授 小林 資正 教 授 田中 徹明 教 授 藤岡 弘道

今回申請者は、二種類の新たなBNAの設計と合成、そしてこれらBNAを含むオリゴヌクレオチドの機能性の評価を行い、これらBNAが有用な機能性分子、アンチセンス候補分子として機能する可能性を見出した。

## 論文審査の結果の要旨

ポストゲノム時代を迎えた現在、合成低分子を素材にした創薬研究に加えて、人工核酸オリゴマーを素材とした核酸医薬の開発研究が注目を集めている。特に、核酸の糖部立体配座を架橋構造により適切に固定化した人工核酸は、その優れた機能性発現から、これからの核酸医薬の有力な候補であると考えられている。西田勝君は、新たな架橋型人工核酸の開発を目指し研究を行い、以下の成果を得た。

- (1) ウレタン及びウレア構造で糖部に架橋を施した新規な人工核酸モノマーの合成を達成し、その糖部立体配座が適切に固定されていることを明らかにした。
- (2) これら人工核酸モノマーをオリゴヌクレオチドへ導入するとともに、相補鎖DNAやRNAとの結合親和性を詳細に解析し、i) 人工核酸モノマー導入によってRNA選択性が高まること、ii) 糖部をN型に固定した人工核酸モノマーを導入した場合は結合親和性が大幅に上昇することを見いだした。
- (3) 人工核酸の生体内での安定性評価という観点から、人工核酸を含むオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼに対する耐性を精査し、これら人工核酸モノマーの導入によって、オリゴヌクレオチドの生体内での安定性が大幅に向上するということを明らかにした。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと判断する。