The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	舟型ピラノース核酸類の合成と構造及び物性解析
Author(s)	森, 和土
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52263
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　森　和土　　）	
論文題名	舟型ピラノース核酸類の合成と構造及び物性解析

論文内容の要旨

現在、次世代の医薬品として核酸医薬が大いに注目を浴びている。核酸医薬開発の主流の一つは遺伝子発現抑制法を利用した医薬品の開発であり、そのため今まで難治性の病であった遺伝子疾患等も治療可能となると期待されている。この遺伝子発現抑制法の代表的なものにアンチセンス法がある。現在、このアンチセンス法を用いた医薬候補品が、多数臨床試験に上がっている。臨床試験中の多くの核酸医薬候補において、人工核酸の使用によって種々の機能性が付与されており、人工核酸研究は核酸医薬の成功に欠かせないものとなっている。とりわけ、アンチセンス核酸の標的mRNAとの結合力は配列設計の柔軟性を変化させる重要なパラメーターであり、標的に対する結合親和性を向上させる目的で様々な人工核酸が創り出されてきた。これまでの人工核酸研究においては主に糖部構造と相補鎖結合親和性との関連性に着目した研究が為されてきており、リン酸ジエステル結合部と核酸塩基部の相対配置が相補鎖結合親和性にどういった影響を及ぼすのかに関しては詳細な検証は為されてこなかった。申請者は、リン酸ジエステル結合部と核酸塩基部との相対配置が相補鎖結合親和性にどういった影響を及ぼすのかを明らかにすることがアンチセンス核酸の相補鎖結合親和性に影響を及ぼす構造特性の解明に繋がり、RNA結合親和性の獲得においてブレークスルーを起こす為の鍵になると考えた。具体的には、リン酸ジエステル結合部と核酸塩基の相対配置を様々に固定した人工核酸を種々合成し、それらの相補鎖結合親和性を解析することで、二重らせん中のどの位置に核酸塩基を配置すれば天然核酸とより安定な二重鎖を形成するのかを精査した。

まず、これまでに当研究室で開発した人工核酸のうち、結合親和性が優れているものに関してどのような構造的特徴があるのかを精査した。その結果、リン酸ジエステル結合部を基準として考えた場合に、核酸塩基の傾きが大きいほどRNA結合親和性も大きい傾向にあるということが明らかになった。そこで、核酸塩基の傾きをより大きくすることで、相補鎖結合親和性に影響があるのかを調べることとし、そのために舟型ピラノース核酸 (BsNA) を設計、合成した。BsNAは糖部にピラノース環を有し、その2’位と5’位の間に架橋を施すことで既存の人工核酸類と比較して、より塩基が傾いた構造に固定される。合成したBsNAの相補鎖結合親和性を融解温度 (T_m) 測定実験により評価した所、BsNAを導入したオリゴヌクレオチドは一本鎖DNA、一本鎖RNAのどちらに対しても安定な二重鎖を形成せず、天然のオリゴヌクレオチドよりもT_m値は大きく低下した。この原因を追究するべく、BsNAヌクレオシドのX線結晶構造解析を行い、解析により得られた構造を他の人工核酸類あるいはRNAの構造と比較した。その結果、リン酸ジエステル結合部を基準とした核酸塩基の回転角がRNAや他の人工核酸と比較してBsNAの場合には大きく異なっており、これが結合親和性の低下の要因であることが考えられた。

そこで、BsNAの核酸塩基の回転角をRNA等の持つ回転角へと近づけるように調整した場合に、相補鎖結合親和性がどうなるのか調査することとした。まず、4’位にメチル基を導入することにより、チミン6位水素原子との立体反発が生じ、それによって核酸塩基が回転することを期待したBsNA類縁体を設計、合成したが、合成したヌクレオシドのX線結晶構造解析の結果、核酸塩基の回転角はBsNAから変化がなく、また、相補鎖結合親和性もBsNAとほぼ同様の結果となり、BsNA類のグリコシル結合は非常に回転しにくくなっていることが考えられた。

この結果を受けて、申請者は核酸塩基そのものを回転させるのではなく、糖部を回転させることで相対的な核酸塩基の配向を変化させることを考えた。水酸基の位置を様々に変えることで糖部本体が回転し、それに伴ってリン酸ジエステル結合部に対する相対的な核酸塩基の配向を変えた種々のBsNA類縁体を設計、合成した。合成した種々の類縁体の相補鎖結合親和性をT_m値測定実験により評価した所、これらの類縁体を導入したオリゴヌクレオチドは総じてBsNAを導入した場合から比べて大きくT_m値が改善した。これらの類縁体のヌクレオシドのX線結晶構造解析の結果、グリコシル結合周りの二面角χはBsNAのヌクレオシドと比較してほとんど変わっていなかったことから、当初の設計通り、水酸基の位置をずらしたことで、糖部本体が回転し、それに伴ってリン酸ジエステル結合部に対する相対的な

核酸塩基の配向が調整された結果、結合親和性が大きく向上したと考えられる。すなわち、これらの結果は核酸塩基の位置を固定した場合において、核酸塩基の回転角が相補鎖結合親和性に影響を及ぼす重要な構造特性であることを示唆している。一方、これらのBsNA類縁体におけるリン酸ジエステル結合部と核酸塩基の傾きに着目すると、傾きが大き過ぎる場合には、ややT_m値が低下することがわかり、二重鎖を形成する上で最適な核酸塩基の傾きが存在することが予想された。

本研究で合成した種々のBsNA類において優れた相補鎖結合親和性を有していたものの構造的特徴として、リン酸ジエステル結合部と核酸塩基の相対配置がRNAに近いということが上げられる。すなわち、リン酸ジエステル結合部を基準とした核酸塩基の相対位置をRNAに近い形で固定することが天然核酸との安定な二重鎖の形成に繋がることが明らかになった。

一方、糖部構造に着目すると、相補鎖と安定な二重鎖を形成したBsNA類は天然のDNAやRNAのものとは全く異なる構造である。このことから、優れた相補鎖結合親和性を有する人工核酸の設計指針として、糖部がフラノース環と全く異なる構造であっても、リン酸ジエステル結合部を基準とした核酸塩基の相対配置が適切であれば、安定な二重鎖を形成する可能性が高い。本研究の成果を受けて、今後、斬新な構造を有する人工核酸が創出されることを期待したい。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　森　和土　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	小比賀　聡
	副 査　教 授	赤井　周司
	副 査　教 授	大久保　忠恭

論文審査の結果の要旨

人工核酸の標的mRNAに対する結合力は、アンチセンス医薬の性質を大きく左右する重要なパラメーターであり、これを向上させる人工核酸の創成研究は、アンチセンス医薬開発の成功の鍵となる。本研究は、二重らせん中のどの位置に核酸塩基を配置すれば、天然核酸とより安定な二重鎖を形成するのかを精査し、リン酸ジエステル結合部と核酸塩基部との相対配置が相補鎖結合親和性にいかなる影響を与えるかを探求することを目的としたものであり、以下の興味深い成果につながった。

１）核酸塩基の傾きに着目して舟型ピラノース核酸（BsNA）を設計・合成し、オリゴヌクレオチドへと導入したところ、BsNAは相補鎖結合親和性や三重鎖形成能を低下させることがわかり、BsNAヌクレオシドのX線結晶構造から、リン酸ジエステル結合部を基準とした核酸塩基の回転角が結合親和性低下の原因である可能性を見出した。

２）核酸塩基の回転角が調整されたBsNA類縁体では、初代BsNAと比較して相補鎖結合親和性ならびに三重鎖形成能が大きく向上することを明らかにし、リン酸ジエステル結合部を基準とした核酸塩基の相対位置を固定した場合において、核酸塩基の回転角が二重鎖、三重鎖形成に重要であることを見出した。

３）リン酸ジエステル結合部を基準とした核酸塩基の傾きが大き過ぎる類縁体の場合、相補鎖結合親和性の低下が見られたことから、二重鎖を形成する上で最適な核酸塩基の傾きが存在する可能性を示した。

４）本研究で合成した種々のBsNA類の相補鎖結合親和性及び三重鎖形成能の比較から、リン酸ジエステル結合部を基準とした核酸塩基の相対位置をRNAに近い形で固定することが天然核酸との安定な二重鎖、三重鎖の形成に繋がることを明らかにした。

５）優れた相補鎖結合親和性や三重鎖形成能を有する人工核酸の設計指針として、糖部がフラノース環と全く異なる構造であっても、リン酸ジエステル結合部と核酸塩基の相対配置が適切であれば、安定な二重鎖、三重鎖を形成する可能性が高いことを示した。

以上の研究成果は、今後の人工核酸設計に大きく影響を与えるものであり、斬新な構造を有する人工核酸の創出に寄与することが期待される。よって、本研究内容は博士（薬科学）の学位論文として相応しいものであると判断した。