The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	クリックケミストリーによるオリゴ核酸上での非天然型塩基の構築とその物性評価
Author(s)	中原, 基
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54711
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【16】

氏　　名	中原　基（なかはら　もとい）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学　位　記　番　号	第　２５９６８　号
学位授与年月日	平成 25 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	**クリックケミストリーによるオリゴ核酸上での非天然型塩基の構築とその物性評価**
論文審査委員	（主査） 教　授　小比賀　聡 （副査） 教　授　藤岡　弘道　　教　授　小林　資正　　教　授　高木　達也

論　文　内　容　の　要　旨

化学修飾を施した核酸（人工核酸）を有するオリゴヌクレオチドは、二重鎖DNAやmRNAに配列特異的に結合できる分子であり、この分子は高度な生命現象の解明や有効性・安全性に優れた医薬品の開発、遺伝子診断用プローブ等への応用が期待される。人工核酸の中でも塩基部位の修飾は、核酸塩基識別能や核酸の高次構造の安定性に大きく関与していることから、塩基部位を化学修飾した人工核酸の開発は非常に重要である。実際に、三重鎖核酸を用いたテクノロジーの開発や、リボザイムの機能解明研究、新たな遺伝情報システムの開発等、それぞれの目的に応じた非天然型塩基を有する人工核酸は、世界中で数多く設計・合成され、その物性評価が行われてきた。

これら人工核酸を開発する主なアプローチは、塩基の分子モデリング等による設計に始まる。続いて、塩基部合成、核酸糖部とのカップリング、アミダイトブロックへの誘導、DNA合成を経て、人工核酸塩基の物性評価を行う。また、通常はさらに機能性の高い分子の開発を目指し、得られたデータを次の分子設計へと応用し、このサイクルを繰り返し行う。そのため、本アプローチでは、化合物合成に長時間を要し、この一連のサイクルがスムーズに行えず、結果として十分な構造最適化をすることが困難である。つまり、非天然型塩基のより迅速な開発法の確立は、望みの機能を有する人工核酸を開発する上で非常に価値があると考えられる。

以上の背景をもとに、著者は、別の開発アプローチとして伸張後修飾法（オリゴ核酸上での化学修飾法）を活用することを考えた。すなわち、塩基部前駆体をもつオリゴ核酸を合成後、伸長後修飾によって誘導体化することで種々の核酸塩基アナログを合成することを考えた。このアプローチでは、誘導体合成の大幅な効率化が可能であるため「得られた人工核酸の物性評価→新たな人工核酸のデザイン→合成」のサイクルに要する時間が大幅に短縮化できる。さらに、DNA合成後に化学変換を行うため、例えば、オリゴ核酸合成時に利用される様々な反応条件に適応困難な不安定な構造の化合物等

も導入することが可能になると考えられる。これにより、より論理的で緻密な分子の探索をスムーズに行うことが可能になると考えた。一方で、新規アプローチの開発において、伸長後修飾反応に近年Sharplessらによって報告されたクリックケミストリーを活用したHuisgen反応を利用することとした。この手法は、溶媒に水を用いることが可能であり、かつ化学選択性が高いことからオリゴ核酸のような生体高分子を基質とする反応に適していると考えた。

まずはじめに、著者は、クリックケミストリーを用いた人工塩基構築法の確立を目指した。エチニル基を有するヌクレオチドのアミダイトブロックを合成し、オリゴ核酸へと導入した。続いて、得られたオリゴ核酸とベンジルアジドを用いたHuisgen反応をモデルに反応条件を検討した。結果、非常に短時間で反応が完結する条件を見いだした。次いで、最適化した条件下、種々のアジド試薬（1級, 2級, 3級, 芳香族アジド）を用いることで本法の基質一般性を確認した。その結果、ほとんどの基質において収率よく反応が進行することがわかった。また、嵩高い3級アジドを用いた場合においても、反応時間の延長により高収率で目的物が得られることを見いだした。さらに本手法の有用性を確認するために、物性評価の一例として、得られた非天然型塩基の塩基認識能を一本鎖DNAとの融解温度測定（T_m測定）により評価した。その中で、1-フェニルチオメチル-1*H*-1,2,3-トリアゾールがユニバーサル塩基としての性質を持つ分子であることを見いだした。以上の結果より、各種のアジド試薬から多様なトリアゾール型塩基をオリゴ核酸上で簡便に合成する手法の確立に成功した。本手法により、従来よりも人工核酸の合成に要する時間と労力の大幅な短縮が可能になったと考えられる。

次に、今回確立した新規開発アプローチを三重鎖形成核酸のための非天然型塩基開発へと展開した。三重鎖形成核酸は、標的二重鎖DNAに結合して三重らせん構造を形成することが知られているが、CG、TA塩基対をそれぞれ選択的に認識する核酸塩基が存在しない。そこで、本アプローチを用いて種々の非天然型塩基を合成し、CG塩基対選択的な非天然型塩基の探索を行った。その結果、フェニルトリアゾールを塩基部位に持つ人工核酸の中で、ベンゼン環パラ位置換基がCG塩基対選択性に重要であることを見いだし、中でもウレイド基を有する非天然型塩基が中程度の親和性と高い塩基対選択性を有することを明らかとした。

続いて、TA塩基対認識のための塩基部位スクリーニング研究に着手した。はじめに、TA塩基対認識に向けた末端アルキンとスペーサー部位を有する糖部構造を分子モデリング等で設計し、全6種類の糖部構造を有するアミダイト体を合成した。次いでそれぞれのアミダイト体をオリゴ核酸へと導入し、今回確立したアプローチを用いて非天然型塩基の構築を行った。反応はどれも首尾よく進行し、結果として約100種類もの非天然型塩基を有するオリゴ核酸を得ることに成功した。最後に、得られたオリゴ核酸の三重鎖形成能をT_m測定により評価した。それぞれの非天然型塩基のT_m値を比較することにより、TA塩基対のアデニンと非天然型塩基が相互作用している可能性が高い構造を見いだした。このことから、三重鎖核酸中の核酸塩基同士の空間的な配置が推測できると考えられる。また、糖部構造中のスペーサー部位を構成する原子の種類によって、三重らせん構造の安定性が変化することも明らかとした。今回得られた知見は、今後のTA塩基対認識の開発に十分役立つものと考えられる。

以上、著者は伸張後修飾法に基づくオリゴ核酸上での非天然型塩基構築法の開発に成功した。また、本手法を三重鎖形成核酸における非天然型塩基の開発へと展開した。これにより、伸長後修飾法を活用した非天然型塩基の構築法が、目的の非天然型塩基を開発する上で、候補化合物の探索や部分構造のスクリーニング研究に非常に有用であることを示した。

論文審査の結果の要旨

核酸分子の塩基部を化学修飾する方法は多岐に及ぶが、いずれも多工程を要するため各種の機能性核酸創製に向けて、効率的な新たな手法の開発が望まれている。申請者は、三重鎖核酸を用いたテクノロジーの開発やリボザイムの機能解明研究、新たな遺伝情報システムの開発等に展開可能な新たな核酸塩基修飾法の開発研究を実施し、伸張後修飾法と呼ばれるオリゴヌクレオチド上での化学反応を検討することで、以下の成果を得た。

- クリックケミストリーを用いた人工塩基構築法の確立を目的に、エチニル基を有するヌクレオチドのアミダイトブロックを合成し、オリゴ核酸へと導入した。得られたオリゴ核酸とベンジルアジドを用いたHuisgen反応をモデルに反応条件を精査し、非常に短時間で反応が完結する条件を見いだした。
- 上記の検討にて得られた条件を用い、エチニル基を有するオリゴヌクレオチドと種々のアジド試薬との反応を検討することで、本法の基質一般性を確認した。
- 本手法を三重鎖形成オリゴヌクレオチドの開発へ利用し、CG塩基対選択的な非天然型塩基の探索を行なった結果、フェニルトリアゾールの誘導体が良好な結果を示すことを見いだした。
- さらに、TA塩基対選択的な非天然型塩基の探索を進め、TA塩基対のアデニンと非天然型塩基が相互作用している可能性が高い構造を見いだすことに成功した。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものであると判断した。