

Title	硫黄のレドックス特性および求核性を利用した新規機能性人工核酸に関する生物有機化学的研究
Author(s)	馬場, 武
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59413">https://hdl.handle.net/11094/59413</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

【12】

氏 名	ぼ ぼ たけし 馬 場 武
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学 位 記 番 号	第 2 5 1 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 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	硫黄のレドックス特性および求核性を利用した新規機能性人工核酸に関する生物有機化学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小比賀 聡 (副査) 教 授 小林 資正 教 授 宇野 公之 教 授 藤岡 弘道

#### 論 文 内 容 の 要 旨

硫黄は自然界に存在する主要な元素の一つであり、金属親和性や高い求核性、レドックス応答性などの特徴的な性質を有している。これらの性質は核酸の金電極基板への固定や機能性分子との連結、ジスルフィドクロスリンクを用いた核酸の高次構造の解析研究などに応用され、これまでに様々な含

硫黄人工核酸が開発されてきた。一方で、申請者の所属する研究室では核酸糖部2',4'位に架橋構造を有する架橋型人工核酸 (BNA) アナログを開発し、それらが核酸の糖部コンホメーションをN型に固定することで、相補鎖RNAに対して高い結合親和性を有することを明らかにしてきた。申請者は「硫黄の性質」と「架橋型人工核酸の性質」を組み合わせれば、より高機能な人工核酸の創製が可能になると考え、新規人工核酸の開発に着手した。

まず、酸化還元環境をセンシング可能なレドックス核酸プローブの創製を目指して、酸化還元により結合の形成と開裂を繰り返し行えるジスルフィド結合を糖部架橋構造に有する新規人工核酸 (ジスルフィド型人工核酸) を開発した。このジスルフィド型人工核酸は、酸化条件では架橋を形成するため高い相補鎖結合親和性を有するのに対し、還元条件では架橋構造が開裂するため相補鎖結合親和性が低下すると予想される。まず、ジスルフィド架橋構造を有するヌクレオシドを合成し、種々の酸化還元条件における特性を評価した。その結果、ヌクレオシドの架橋の形成と開裂が酸化還元環境依存的に起こること、また酸化環境と還元環境でその糖部コンホメーションが異なることを明らかにした。続いて、ヌクレオシドをオリゴヌクレオチド中に導入した。合成したオリゴヌクレオチドの相補鎖核酸に対する二重鎖形成を酸化および還元条件下でそれぞれ評価したところ、当初の期待通りジスルフィド型人工核酸を含むオリゴヌクレオチドが、酸化還元条件に応じて異なる結合親和性を有することが明らかとなった。さらに、ジスルフィド型人工核酸のレドックスプローブとしての応用を目指し、ジスルフィド型人工核酸を含むオリゴヌクレオチドに消光基を、相補鎖オリゴヌクレオチドに蛍光基を導入した二重鎖オリゴヌクレオチドを設計した。このプローブの蛍光は二重鎖の形成と解離の状態を表すため、酸化還元環境を蛍光強度から観察できると考えた。酸化条件と還元条件における蛍光強度を測定したところ、その強度は酸化還元条件に応じて大きく変化し、ジスルフィド型人工核酸が酸化還元環境をセンシングするプローブになりうることを明らかにした。ジスルフィド型人工核酸は、分子内ジスルフィド結合を利用して核酸分子の性質を変化させた世界初の人工核酸であり、レドックスプローブとしての応用のほか生体酸化還元環境に応じて異なる性質を示す核酸分子 (アンチセンス分子やリボザイム、アプタマー) などへ応用が期待できる。

一方、オリゴヌクレオチドと機能性分子を連結した際、その分子の示す性質は核酸への導入部位によって異なることが知られている。申請者はジスルフィド型人工核酸のオリゴヌクレオチドへの導入を試みた際に、ジスルフィド架橋構造を有するヌクレオシドが光転位反応により、糖部架橋の6'位にチオール基を有するヌクレオシドに変換されることを見出した。架橋型人工核酸の糖部架橋に導入された分子が核酸の機能に与える影響についてはほとんど知られていないことから、チオール基を用いて様々な機能性分子を効率よく導入することができれば、糖部架橋6'位における機能性分子が与える影響を明らかにできると考え、架橋部位にチオール基を有する人工核酸の研究に着手した。まず、光反応の条件最適化を行い、続いて人工核酸のヌクレオシドをオリゴヌクレオチドに導入できる構造に誘導した。そして、人工核酸をオリゴヌクレオチドへ組み込み、二重鎖核酸の安定性や核酸の細胞内への取り込みに影響を与える種々の機能性分子を導入した。相補鎖核酸に対する結合親和性を評価したところ、相補鎖DNAに対しては機能性分子の導入効果が顕著にあらわれたのに対し、相補鎖RNAに対してはその性質はほとんど変わらず、嵩高い分子を導入してもその安定性はほとんど変化しなかった。これらの結果から、6'位における機能性分子の導入は相補鎖DNAに対しては二重鎖核酸と相互作用する機能性分子の導入に適しており、相補鎖RNAに対しては二重鎖核酸とは無関係な新たな機能、例えば核酸の体内動態を改善するデリバリー担体の導入などに適していると考えられる。

機能性分子の導入は核酸の性質を增强するための優れた手法である。核酸のリン酸ジエステル結合部の酸素原子の一つを硫黄原子に置き換えたホスホロチオアートは、その高い核酸分解酵素耐性が注目され、現在核酸医薬の素材として広く用いられている。申請者は、ホスホロチオアートの硫黄原子が機能性分子を導入するための素材としても利用できる点に着目し、相補鎖核酸に対して高い結合親和性を有するBNAと核酸の機能性分子修飾部位としてのホスホロチオアートの性質を組み合わせることで、より結合親和性の優れた人工核酸の開発が可能になると考えた。導入する分子にはオリゴヌクレオチド間のリン酸アニオンの反発を弱めることで結合親和性を向上させることが期待されるアミノ

アルキル基を用い、相補鎖DNAやRNA、二重鎖DNAに対する結合親和性を評価した。その結果、ホスホロチオアートの立体に応じてその性質は変化し、一方の立体異性体において相補鎖DNAと二重鎖DNAの結合親和性を向上させることに成功した。また、アミノアルキル修飾により核酸分解酵素耐性をさらに向上させることにも成功している。本手法はアンチジーン法等のDNAを標的とした手法への応用が期待できるほか、BNAのみならず他の修飾核酸と組み合わせることで、簡便に結合親和性を向上させる手法になると考えられる。

以上のように申請者は硫黄の特性を架橋型人工核酸の機能化に応用することで、人工核酸にレドックスセンシング能や機能性分子結合能などを付加し、それらが優れた機能性を有することを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

機能性人工核酸の開発は、各種のポストゲノムテクノロジーへの応用が可能であることから、現在世界中で活発に検討されている。申請者は、特に硫黄原子の持つ興味深い特性を利用することで、新たな機能性人工核酸の開発を進めた。

まず、酸化還元環境をセンシングすることを目指し、核酸の糖部をジスルフィド結合で架橋した新規な人工核酸の設計・合成を行なった。このジスルフィド型人工核酸は、周囲の酸化還元環境に応じてその化学構造が可逆的に変化し、標的となる相補鎖核酸との結合親和性などを大きく変えることが可能である。酸化還元環境の変化に応じて機能性を調節できることから、核酸医薬のみならず各種の研究用ツールとして期待がもたれる。

一方、申請者は核酸分子と各種の機能性分子とのコンジュゲート体合成にも取り組み、硫黄原子を介した新たな合成法の確立に成功した。さらに、得られたコンジュゲート体の機能解析を進め、標的核酸がRNAの場合とDNAの場合で、コンジュゲート体の機能性が大きく変わるという興味深い知見を得た。

加えて、核酸のリン酸ジエステル結合部分に導入した硫黄原子上の反応についても精査を行ない、各種のアミノアルキル基を導入することに成功した。得られた人工核酸は、核酸分解酵素への耐性向上や、相補鎖DNAとの結合親和性向上に寄与することを見いだしている。

以上、申請者は硫黄の特性を人工核酸の機能化に利用し、多くの優れた機能性人工核酸の創製に成功した。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として十分価値あるものと認める。