The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アゾベンゼンリンカーを持つヘアピン型ペプチド核酸のDNAに対する三重鎖形成能
Author(s)	澤田, 慎二郎
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59447
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、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

【36】

氏　　名	澤　田　慎二郎（さわだ しんじろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学　位　記　番　号	第　２５１９８　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 理学研究科化学専攻
学　位　論　文　名	**アゾベンゼンリンカーを持つヘアピン型ペプチド核酸の DNA に対する三重鎖形成能**
論文審査委員	（主査） 教　授　加藤　修雄 （副査） 教　授　中谷　和彦　　教　授　高尾　敏文

論文内容の要旨

ヒトの全遺伝子配列が解明されて以降、疾患関連遺伝子の診断や遺伝子発現制御法の開発が精力的に進められている。特に、ヒトの遺伝子発現を制御には、標的ゲノム配列に対する高選択的かつ高効率的に結合する人工核酸の開発が求められている。

ペプチド核酸(PNA) は、DNA や RNA のリン酸ジエステル結合を 2-aminoethylglycine からなるペプチド結合に置換した核酸アナログである(Figure 1)。PNA は電荷を持たない為、DNA や RNA に対して静電反発がなく結合できる。その為、PNA は標的配列を含む二重鎖 DNA 内に潜り込んで、新たに PNA/DNA 会合体を形成することができる。また、標的 DNA に対して Watson-Crick 塩基対と Hoogsteen 塩基対を形成する２つの PNA 鎖をリンカー分子で架橋したヘアピン型 PNA(bis-PNA) は、標的配列と PNA/DNA/PNA の安定な三重鎖を形成する。しかしながら、bis-PNA がポリピリミジン配列からなる場合にはポリプリン配列に対する配列選択性が低下する。さらに bis-PNA のリンカー分子に 2-(2-(2-aminoethoxy) ethoxy)acetic acid (AEEA)を用いた場合、その構造がフレキシブルであるため複数の PNA/DNA 会合体を形成する。

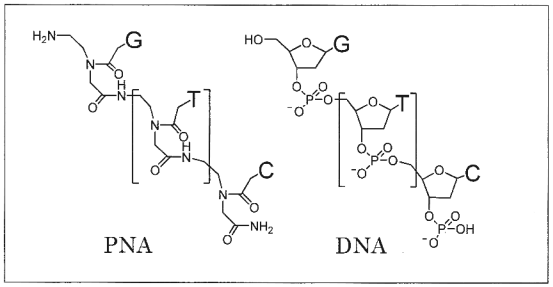

Figure 1. PNA と DNA の化学構造

本研究では bis-PNA のポリピリミジン塩基数を最適化し、非選択的な PNA/DNA 会合体の形成を抑制する検討を行い生理条件下で高選択的に三重鎖を形成する bis-PNA 構造を明らかにすることを目指した。また、リンカーに核酸塩基と π スタッキングするアゾベンゼンを導入した bis-PNA-AZO を合成し、PNA/DNA/PNA の安定性を向上させるとともに、AEEA を用いた場合に確認された複数の会合体形成を制御することを目指した。さらに、bis-PNA-AZO のアゾ骨格を異性化させて、

PNA/DNA/PNA 三重鎖の形成効率の光制御することを目指した。

PNA に導入するアゾベンゼンには生体損傷性の低い可視光に応答し、水溶液中でも *cis* 体として安定に存在する特性を求めた。種々検討の結果、アゾ骨格のパラ位に硫黄原子を含むチオアゾベンゼンが可視光応答性に優れ、水溶液中でも *cis* 体として安定性に存在することを見出した。そこで、チオアゾベンゼンにアミノ基、カルボキシル基を修飾した新規アミノ酸型チオアゾベンゼンを合成し、ペプチド核酸へ導入した場合の DNA に対する会合特性を評価した。その結果、bis-PNA-AZO は短鎖の ssDNA や dsDNA と効率的に会合体を形成することがわかった。しかし、この会合体成分は DNA:PNA=1:2 であることを質量解析から明らかにした。これは、bis-PNA-AZO のリンカー長が三重鎖を形成するには短く、また PNA の結合力が高すぎたため、二分子目の bis-PNA が PNA/DNA 二重鎖に対して非選択的な様式で会合した結果と考えられた。そこで bis-PNA-AZO のリンカー長を最適化すること、ポリピリミジン塩基数を減らすことで効率的かつ選択的に所望の PNA/DNA/PNA 三重鎖を得るための検討を行った。

その結果、bis-PNA の Watson-Crick 鎖に 9 塩基、Hoogsteen 鎖に 5 塩基をもち、リンカー分子としてアゾベンゼンに加え β-alanine(β-Ala) をスペーサーとして導入することで、三重鎖会合体形成効率を高選択的に得られることを見出した。bis-PNA－AZO（β-Ala）のアゾ骨格を光異性化させることによる会合体形成効率の変化は期待したほどではなかったが、アゾベンゼン上に化学修飾を施して幾何異性体間の平面構造に差異がでるように設計すれば会合性形成を制御することが可能になると期待された。

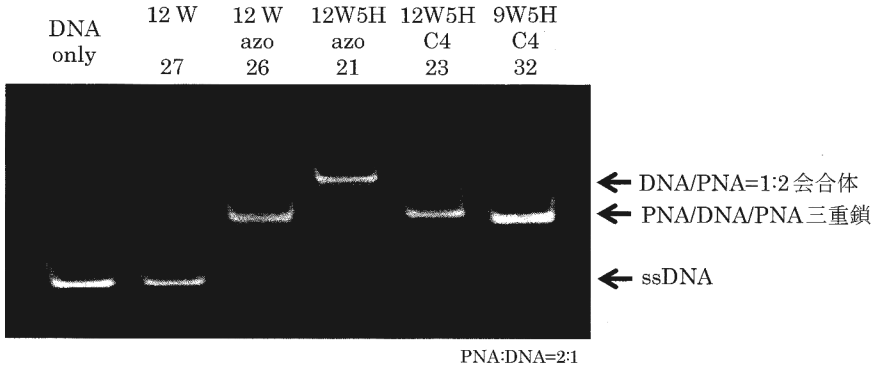

Figure 2. bisPNA のリンカー長および塩基数最適化の結果

論文審査の結果の要旨

本論文は、究極的には生体内での遺伝子制御を見据えたヘアピン型ペプチド核酸（bis-PNA）の分子設計に関する研究成果を纏めたものである。

遺伝子制御を光応答性官能基であるアゾベンゼン骨格の光異性化によって達成することを想定する際、まず考慮すべきは、細胞障害性を持たない波長で異性化が可能であり、かつ生理条件下でも幾何異性体が十分な安定性を有するアゾベンゼンを見出すことである。本論文では、アゾ基パラ位のヘテロ原子が光異性化の波長依存性およびシス型幾何異性体の熱安定性に重要であることに着目し、種々検討した結果、硫黄原子がアゾ基パラ位に置換している場合に目的に適う特性を有することを見出し、ペプチド核酸に組込むことが可能な新規アミノ酸型チオアゾベンゼン誘導体の創出を達成した。同時に、このチオアゾベンゼンをリンカーとする bis-PNA (bis-PNA-AZO) が従来知られる bis-PNA より格段に優れた DNA 会合能を有することも見出している。

次いで、PNA の高すぎる DNA 会合能によって生じる配列非選択的会合の問題を詳細に検討した。まず、既に報告のある PNA/DNA/PNA 三重鎖の結晶構造を基に、最適なリンカー長を予測し検討を行った。その結果、予測通り、配列選択的な会合体形成に最適なリンカー長が存在することを明らかにした。 さらに、bis-PNA の２本の PNA 鎖（一方が Watson-Crick 型、他方が Hoogsteen 型で DNA に会合する）に配置する核酸塩基数についての最適化を行い、Watson-Crick 鎖に 9 塩基、Hoogsteen 鎖に 5 塩基を有する場合に、DNA に対して過剰な bis-PNA-AZO が存在する条件下においても配列選択的に三重鎖を形成することを見出した。なお、この種の会合体構造解析に対して、従来はゲルシフト評価がもっぱら行われて来たが、その解析だけでは DNA/bis-PNA-AZO の化学量論比を議論することは困難である。本論文では、定量的議論を可能とする質量分析を解析手段に用い、最適化された bis-PNA-AZO が標的 DNA に対して 1:1 の組成比の三重鎖型会合体を形成していることを明確にした。この bis-PNA-AZO が標的 DNA の PCR 増幅を顕著に阻害することも明らかにしている。

トランス型アゾベンゼン部位を光異性化して得られるシス型幾何異性体の会合能も評価し、トランス型の会合能とは異なることも明らかにした。この会合能の差異は必ずしも大きくはなかったが、さらなる構造最適化により光異性化による遺伝子制御が原理的には可能であることを示す結果である。

本研究によって得られた研究成果は、従来曖昧であった配列選択的三重鎖形成能を持つペプチド核酸の分子構造要素を明確に示している点において、ペプチド核酸科学に大きく寄与する重要な成果である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。