

Title	外部刺激応答性核酸の開発と人工核酸スイッチへの展開
Author(s)	森廣, 邦彦
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60073">https://hdl.handle.net/11094/60073</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

【22】

氏名	もり ひろ くに ひこ 森 廣 邦 彦
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 25974 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	外部刺激応答性核酸の開発と人工核酸スイッチへの展開
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 宇野 公之

## 論文内容の要旨

DNAやRNAは生体内で遺伝情報の保存と伝達において重要な役割を果たしているのみならず、生体内で積極的に遺伝子の発現を調節していることが明らかにされつつある。これら天然の核酸スイッチとも言うべき遺伝子発現制御システムは周囲の化学的環境や遺伝子発現レベルの変化によってそのオン/オフが巧みに制御されている。もし化学修飾した人工核酸を利用してより高機能なスイッチを開発することができれば、これまでは不可能だった生体機能の制御が可能になると期待できる。本研究で申請者はこれまでにない高機能性人工核酸スイッチの創製を目指し、異なる3つの戦略に基づいた外部刺激応答性核酸の開発研究を行うこととした。

まず光刺激によって認識塩基が時空間的に変化する、認識塩基可変型核酸の開発を行った。核酸塩基間で形成される水素結合に着目すると、通常の二重鎖中で見られるワトソン-クリック塩基対は水素供与基と水素受容基が適切な位置関係で組み合わせることで形成されている。申請者はこの水素供与/受容様式を光刺激によって切り替えることができれば認識塩基の変化を誘起できると考え、光分解性6-ニトロペラトリル

(NV) 基で修飾した8-メルカプトアデニン、8-メルカプトヒポキサンチン及び2-メルカプトベンズイミダゾール誘導体を塩基部にもつ人工核酸を設計、合成した。合成した3種の人工核酸を導入したオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) に365 nmの光を照射したところ、NV基が効率よく除去され、光刺激によって核酸塩基部の水素供与/受容様式が変化することが分かった。続いて標的DNAとの二重鎖の融解温度を測定した結果、ベンズイミダゾール誘導体の認識塩基が光照射によってグアニンからアデニンへ変化することが明らかとなった。この光刺激による認識塩基の変化は異なる配列においても発揮され、ベンズイミダゾール誘導体が認識塩基可変型核酸として優れた機能性を有していることが示された。そこでこの認識塩基可変型核酸を用いて、異なる配列のRNAを標的とした鎖交換反応を検討した。標的としてBcl-2ファミリータンパク質の1種であるBadとBcl-xLのmRNAフラグメント配列を選択し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって鎖交換を評価した。その結果、ベンズイミダゾール誘導体を導入したODNは光照射前はBad mRNAと、光照射後はBcl-xL mRNAとそれぞれ特異的に二重鎖を形成し、光刺激をきっかけとした鎖交換反応が効率よく進行することが明らかとなった。

次に様々な外部刺激に応答して核酸糖部架橋が開裂して性質が変化するベンジリデンアセタール架橋型人工核酸の開発を行った。当研究室ではこれまでに糖部に架橋構造を施すことでその立体配座を固定した架橋型人工核酸 (BNA) を種々開発してきた。BNA類は糖部構造に揺らぎを持たないため二重鎖形成時のエンロピー損失が軽減され、標的核酸に対する強固な結合親和性を示す。またその架橋構造が核酸分解酵素の接近を妨げることで天然核酸には見られない高い核酸分解酵素耐性を発揮する。これらの優れた性質は糖部架橋構造に由来するため、何らかの外部刺激によってその開裂を引き起こすことで性質が大きく変化すると考えられる。申請者は様々な外部刺激に応答して架橋が開裂するBNAアナログとして、種々官能基化したベンジリデンアセタール架橋構造をもつ人工核酸の設計と合成を行った。ベンジリデンアセタール架橋型人工核酸はODN中でそれぞれ酸や還元剤、光などの異なる外部刺激に特異的に応答して架橋が開裂し、また架橋の開裂に伴い二重鎖形成能や酵素耐性が大きく変化することが明らかとなった。この特性を利用することで様々な外部環境の変化に応答した遺伝子発現の調節が可能になると期待できる。

最後にセレン原子の可逆的な酸化還元特性を利用し、酸化還元環境の変化に応答して二重鎖形成能や酵素耐性が変化するセレンメチレン架橋型人工核酸の開発を行った。セレンは酸素や硫黄原子と同じ第16族の原子であり、生体内でもセレノシステインなどの形で存在する必須元素の一種である。近年ではセレンの様々な特徴を生かしたセレン含有ヌクレオチドやオリゴ核酸の開発も報告されるようになってきたが、これまでにセレンの大きな特徴の1つである、酸化還元によるセレンキンドとの可逆的な構造変換を利用した人工核酸の開発例はない。本研究で申請者が設計したセレンメチレン架橋型人工核酸 (SeBNA) は架橋部に低極性のセレン原子を有するBNA誘導体であり、セレンキンド型 (SeOBNA) との可逆的な構造変換が可能であると考えられる。SeBNAとSeOBNAは架橋部の構造や極性が異なるため、二重鎖形成能などの性質が大きく変化すると思われる。まずODN中のSeBNAの酸化還元特性について評価した結果、過酸化水素とジチオトレイトールで処理することによってSeBNAとSeOBNA間の構造変換を誘起できることが明らかとなった。また構造変換の繰り返し耐久性にも優れており、酸化還元応答型スイッチとして有用な素材であることが示された。次に二重鎖形成能を評価した結果、導入残基数を増やすに従ってSeBNAとSeOBNA間の二重鎖形成能の差が大きくなり、特に6残基連続して修飾した場合にSeBNA修飾ODNはSeOBNA修飾ODNを20 °C以上回る融解温度を示した。最後にSeBNAの特性を利用した有用な核酸プローブを開発するべく、周囲の酸化還元環境の変化をセンシングできるモレキュラービーコン型ODNの設計と合成を行った。このプローブは過酸化水素とグルタチオンに応答して高次構造が変化し、それに伴う蛍光強度の変化を追跡することで周囲の酸化還元環境の変化をモニターできることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

核酸分子に化学修飾を施すことにより、多様な機能性を付与することが可能となる。本研究は、独自のアイデアに基づき綿密に設計した人工的な核酸分子を用いて、遺伝子発現を制御するための人工核酸スイッチ創成を目指したものであり、核酸の糖部や塩基部への化学修飾を行なうことで3種の異なる人工核酸を開発するとともに、得られた人工核酸の機能性について評価検討を行った。

その結果、以下の知見を明らかにした。

- 光刺激によって認識塩基が時空間的に変化する認識塩基可変型核酸として、光分解性6-ニトロペラトリル基で修飾した8-メルカプトアデニン、8-メルカプトヒポキサンチン及び2-メルカプトベンズイミダゾール誘導体を塩基部に有する人工核酸を考案し、その合成を達成した。合成した人工核酸は、当初の予想通り、光刺激に応じて水素結合様式を変化させ、異なる2種の遺伝子mRNAを選択的に認識した。
- 様々な外部刺激に応答して核酸糖部架橋が開裂して性質が変化する各種のベンジリデンアセタール架橋型人工核酸を設計・合成し、酸や光、酸化還元条件等の外部刺激に応答して、標的核酸への

結合親和性や核酸分解酵素への耐性を大きく変化させることに成功した。

- 外部の酸化還元条件に応答し、可逆的に構造を変化させる架橋型人工核酸を新たに合成した。この人工核酸は分子中にセレン原子を含んでおり、酸化還元環境に応じて物性を変化させることがわかった。その応用として、この分子を含むモレキュラービーコン型プローブを考案し、外部環境に応じて蛍光強度が大きく変化するという特性、すなわち酸化還元センサーとしての有用性を明らかにした。

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。