The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	新規人工核酸2’,4’-BNA/LNA-7-deazapurine及びBlNA-U類の開発研究 : 二重鎖形成能に及ぼす二面角χの影響
Author(s)	原, 孝志
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61698
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　（　　原 孝志　　）	
論文題名	新規人工核酸2’,4’-BNA/LNA-7-deazapurine及びBlNA-U類の開発研究 -二重鎖形成能に及ぼす二面角χの影響-

論文内容の要旨

近年、核酸医薬が低分子や抗体に続く第3世代の医薬品として期待されている。また、核酸は配列特異的な認識能を有するためナノ素材としても注目されており、医療応用以外にも多様な研究開発が行われている。このような技術革新に伴い、核酸の構造に改変を加えた人工核酸が、天然の核酸には不十分な性質を付与できる点で注目を集め、欠かせない存在になっている。核酸は大きく分けて核酸塩基部、糖部、リン酸ジエステル結合部の三種類の部位で構成されており、いずれの部位も化学修飾 (機能付与) の対象となりうる。特に核酸塩基部と糖部修飾は核酸の機能を大幅に向上できると考えられており、研究報告例も多い。例えば、塩基部の修飾では水素結合パターンを変化させることや、芳香環のスタッキングを変化させること、分子認識を変化させることが比較的容易に行えると考えられている。一方、糖部修飾に関しては標的核酸との結合力を向上させる目的で様々な人工核酸が創り出されている。糖部フラノース環のねじれ角の固定によって二重鎖安定性を向上させた代表例が、2’,4’-bridged nucleic acid (2’,4’-BNA) / locked nucleic acid (LNA) である。2’,4’-BNA/LNAはRNAに対する優れた二重鎖形成能を有しており、現在、2’,4’-BNA/LNAをはじめとした糖部修飾型人工核酸はアンチセンス法やエキソンスキッピング法、アンチmiRNA法などに応用されている。このように、塩基部、糖部修飾を個々に修飾した研究戦略は着実に成功を収めつつある。しかしながら、これらを共に修飾した人工核酸の研究例は少なく、どのような結果が得られるのかは未知数である。また、RNAではなくDNAを強固に認識できる人工核酸も遺伝子解析技術や遺伝子治療法の開発を行う上で優れた素材になる可能性を持っているものの、糖部修飾型人工核酸では期待されるDNA結合親和性を獲得できていない。そこで、本研究ではこれらの課題を解き明かすことにした。

初めに、塩基部と糖部を同時修飾することで現れる相加あるいは相乗的な効果を検証することを目的に、人工核酸の開発を行った。具体的には7-デアザグアニン、8-アザ-7-デアザグアニンと呼ばれる修飾型塩基を持つ2’,4’-BNA/LNAヌクレオシド2種類 (LNA-^{7c}G, LNA-^{8n7c}G) を合成し、オリゴヌクレオチドへと導入した。これらの分子は糖部修飾による相補鎖結合親和性の向上に加え、塩基部修飾の効果により、グアニンが連続する配列で問題となる高次構造を抑制する効果が期待された。実際に合成したオリゴヌクレオチドの相補鎖核酸に対する結合安定性を融解温度 (T_m値) 測定により評価し、塩基部と糖部の二重鎖形成時における協奏的な作用を検証した。その結果、LNA-^{7c}Gは天然の塩基を持つLNA-Gと同程度の高い結合親和性を維持していた一方、塩基部8位窒素原子の有無のみが異なるLNA-^{8n7c}Gは、予想に反し2’,4’-BNA/LNA修飾から期待される結合能の向上は認められず、LNA-Gと比べて大きく結合親和性を低下させていた。結合能が低下した原因を調べるために熱力学的パラメータ測定および非経験的分子軌道計算を行った結果、LNA-^{8n7c}Gの最安定構造における核酸塩基と糖の二面角χが、LNA-GやLNA-^{7c}Gの二面角χとかけ離れており、二重鎖形成時にエンタルピー的に不利になっていることが示唆された。さらに、7-デアザアデニン塩基を有する2’,4’-BNA/LNA類 (LNA-^{7c}A, LNA-^{8n7c}A) についても同様の傾向が見られることをその合成と評価を通して確認した。すなわち、塩基と糖の双方を修飾した人工核酸において、グリコシド結合周りの二面角χが二重鎖形成に大きく影響することを見出した。続いて、高い結合親和性を持つLNA-^{7c}Gが、7-デアザグアニン塩基に由来する高次構造の抑制効果を有しているか否かを検証したところ、極めて効果的に高次構造を抑制できることが明らかになった。

塩基部と糖部の両修飾から得られる効果を検証することで、それぞれの効果を維持できること、また予期せぬ結果が生まれることを示した。次に著者は「塩基の二面角と結合力の関係」を積極的に考慮した分子を設計すれば、従来法では達成できなかった、DNA結合親和性を向上させる人工核酸を開発できると考えた。そこで、「共有結合による塩基の固定化」という手法を導入した次世代人工核酸base-locked nucleic acid (BlNA-U1, BlNA-U2) の創成および、相補鎖結合親和性に与える影響の調査を行った。まず初めに分子設計の妥当性を非経験的分子軌道計算によって評価し、合成に着手した。BlNA-U1の合成検討を行った結果、ヌクレオシドの1’位にヒドロキシメチル基を導入する新たな合成手法を見出した。またBlNA-U1については、合成途上における架橋部位の不可逆的な開裂のため、その合成を達成できなかったが、BlNA-U2に関してはヌクレオシド合成およびオリゴヌクレオチドへの導入に成功した。BlNA-U2の熱力

学的安定性を評価したところ、相補鎖DNA、RNAに対する結合親和性を天然核酸よりも向上させることが明らかとなり、共有結合による二面角χの固定化が相補鎖結合親和性の向上に有効な手法であることを見出した。さらにミスマッチ認識能を評価した結果、天然の核酸と同等以上のアデニン選択性を有していることも明らかになり、塩基対形成を基盤とした技術の応用化に際し、有用な分子である可能性が示された。これまでにも数例、共有結合による塩基固定型人工核酸が報告されていたものの、いずれの人工核酸も高親和性の獲得には至っていなかった。今回初めて「共有結合による塩基の固定化」というコンセプトに基づき相補鎖親和性を向上させることに成功した。BlNA-U1、BlNA-U2には分子の安定性の面で一部課題を残すものの、今後は安定性が向上した分子が設計されること、また他の修飾との組み合わせを行うことでさらに有用な人工核酸が開発されることに期待したい。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　原　孝志　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	小比賀 聡
	副 査　教授	小林 資正
	副 査　教授	藤岡 弘道

論文審査の結果の要旨

人工核酸の創成研究において、標的に対する結合親和性の向上は非常に重要な要素である。これまで核酸糖部の修飾が相補鎖に対する親和性の向上に有効であると考えられてきたが、期待された成果が得られない例も見つかっている。原　孝志君は、「塩基部と糖部を同時に修飾した人工核酸の開発」および「塩基固定型人工核酸の開発」を行い、核酸塩基と糖部の二面角χが二重鎖形成能に及ぼす影響を検証した。その結果、以下に示す非常に優れた成果を得た。

1）核酸塩基部、糖部を共に修飾したデュアル修飾体の一つである2’,4’-BNA/LNA-7-デアザプリンアナログ4種類の設計・合成を行い、オリゴヌクレオチドに導入して熱力学的安定性を評価したところ、LNA-^{7c}G、LNA-^{7c}Aが高い安定性を示した一方で、LNA-^{8n7c}G、LNA-^{8n7c}Aが相補鎖結合親和性を低下させることを見出した。

2）LNA-^{7c}Gをグアニン塩基が豊富に含まれるオリゴヌクレオチドに導入したところ、効果的に高次構造を抑制できることを見出した。

3）4種の2’,4’-BNA/LNA-7-デアザプリンアナログに対して熱力学的パラメータの算出及び量子化学計算を行った結果から、二面角χが二重鎖形成能に影響を及ぼすことを明らかにした。

4）核酸塩基部と糖部を共有結合によって固定化した人工核酸BlNA-U類を二種類設計し、それらの合成を実施した。その過程で1’位に簡便にヒドロキシメチル基を導入する新たな手法を見出し、BlNA-U2の合成に成功した。

5）BlNA-U2を導入したオリゴヌクレオチドの熱力学的安定性を評価したところ、相補鎖DNA、RNAに対する結合親和性を向上させることが明らかとなり、二面角χの固定化が相補鎖結合親和性の向上に有効であることを見出した。

以上の研究成果は、人工核酸の設計の新たな基準の一つとなるものであり、今後の人工核酸の創出に大きく寄与するものと考えられる。よって、本研究内容は、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。