The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	SELEXでのアプタマー取得を志向した固相樹脂担持型ジアセチルスペルミジンおよびハイプシン誘導体の分子設計と合成
Author(s)	太田, 礼伊也
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72313
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　（　　太田　礼伊也　　）	
論文題名	SELEXでのアプタマー取得を志向した固相樹脂担持型ジアセチルスペルミジン およびハイプシン誘導体の分子設計と合成

論文内容の要旨

ポリアミンはプトレシン、スペルミジン、スペルミンに代表されるように、第一級アミノ基を二つ以上もつ脂肪族炭化水素の総称である。人間、植物、そして細胞など、ほとんどすべての生物に含まれている。ポリアミンは核酸に作用することで、転写や翻訳といったタンパク質合成に影響を及ぼし、生命活動を制御していると考えられている。過剰のポリアミンは細胞外に排出され、最終的に尿中に排出される。尿中には主にアセチル化されたアセチルポリアミンが観測されるが、その量はがん患者で増大することが知られている。特に、ジアセチルスペルミジンおよびジアセチルスペルミンは、偽陽性や偽陰性がみられないため、腫瘍マーカーへの応用が期待されている。現在、抗ジアセチルスペルミン抗体を用いた、検出系の開発が進んでおり、癌マーカーとして臨床応用されている。しかしながら、ジアセチルスペルミジンについては、抗ジアセチルスペルミジン抗体が取得されているものの、未だ検出系の確立には至っていない。

近年、アプタマーと呼ばれる核酸分子に注目が集められている。アプタマーは、化学抗体とも呼ばれるように、標的分子の三次元立体構造を高度に認識し、特異的に結合することが知られている。アプタマーは、試験管内人工進化法（SELEX）を用いて取得することが可能である。SELEXは、配列が異なる任意の核酸ライブラリーの中から、目的の結合活性を示す核酸分子を選び出すランダムスクリーニング法である。アプタマーには、大量合成や低分子化などの化学修飾が容易である点など、抗体にはない特徴がある。そのため、抗体に次ぐ新たな検出系のツールとして、期待されている。SELEXでアプタマーを取得するためには、固相樹脂に標的分子（生物活性物質）を担持した固相担持型誘導体の調製が必要である。標的分子が持つ官能基を足掛かりに、固相樹脂に担持する方法は、誘導体調製が簡便だが、望むアプタマーが得られない場合があった。

著者は、スペルミジンの代謝産物であるジアセチルスペルミジンおよびハイプシンの生体内機能に興味を持ち、研究に着手した。ジアセチルスペルミジンは腫瘍マーカーへの応用が期待されている。しかしながら、その検出系の確立には至っておらず、開発が待たれていた。抗ジアセチルスペルミジン抗体は取得されているものの、応用には依然課題を残しており、抗体に代わる新たな検出系の確立が待たれていた。また、ハイプシンはスペルミジンから二段階の酵素反応によって生成する特殊アミノ酸である。1971年に発見されて以降、機能解明に向けた研究が展開されてきた。しかしながら、生命に必須であること以外の詳細な機能については、未だ明らかになっておらず、その解明が待たれていた。ジアセチルスペルミジンおよびハイプシンのそれぞれに、特異的に結合するアプタマーを取得することができれば、アプタマーを用いた検出系の確立や、機能解析研究への展開が可能である。各種ポリアミンを標的分子に、特異的に結合するアプタマーが取得された例は、小黒らのスペルミン結合アプタマーの1例に限られる。特に、標的分子の官能基部分を足掛かりに、固相樹脂に担持した誘導体をSELEXで用いた場合、偽陽性のアプタマーが得られることが多く、偽陽性を排除するためにいくつもの誘導体を作製する必要があった。

著者は、低分子の生物活性物質を標的とするアプタマーの取得における問題を解決すべく、以下のような方策を立てた。すなわち、SELEXで用いる固相担持型誘導体の作製において、標的分子のメチレン主鎖に、官能基化された側鎖を導入して、そこから樹脂に担持する戦略である。これにより、生物活性物質の官能基部分を用いることなく、固相樹脂に担持することができる。標的分子に側鎖を導入することで、本来の三次元立体構造が変化することも考えられるが、計算化学による配座探索を用いることで、側鎖の最適な導入位置を予測することで解決できると考えた。本研究では、ジアセチルスペルミジンおよびハイプシンのそれぞれに、特異的に結合するアプタマーの取得を目指して、SELEXで用いる固相樹脂担持型誘導体の分子設計と化学合成に取り組んだ。なお、官能基間をメチレン鎖でつないだ生物活性物質はヒスタミン、セロトニン、アドレナリンなど多数知られていることから、本法はポリアミンに限らず、他の生物活性物質のアプタマーを取得する上でも有用であると考えられる。また、本研究の過程で、精度よくアプタマーを取得できるような、固相樹脂上での結合形成反応についても検討した。

まず第一章では、腫瘍マーカーとしての応用が期待されているジアセチルスペルミジンに、特異的に結合するアプタマーの取得を目指して、固相樹脂担持型ジアセチルスペルミジンの分子設計と化学合成に取り組んだ。ジアセチルスペルミジンの三次元立体構造と類似した立体構造を有するジアセチルスペルミジン誘導体を作製するために、著者はジアセチルスペルミジンのメチレン主鎖における、側鎖の導入位置について検討した。その結果、C6位に側鎖を導入した誘導体の場合、ジアセチルスペルミジンの立体配座と類似したおおよそ直線状の配座をとることが示唆された。そこで、著者はC6位に側鎖を導入した固相樹脂担持型ジアセチルスペルミジンの合成に着手した。これまでに側鎖を有するジアセチルスペルミジンの合成はなく、その系統的な合成法の確立は、新たな生物活性化合物群の供給の観点からも重要である。本研究では、側鎖に官能基を持つジアセチルスペルミジン誘導体を固相樹脂に担持することで、目的の樹脂担持型ジアセチルスペルミジンを得ることにした。側鎖に官能基を持つジアセチルスペルミジン誘導体は、2つのユニットに分けて合成することにし、Ns基を用いたアミン合成法を用いる、主骨格構築を計画した。末端オレフィンのメタセシス反応により側鎖をあらかじめ伸長したユニットを用いることで、スペルミジン骨格を構築する合成経路を立案し、側鎖に官能基を持つジアセチルスペルミジン誘導体を合成した。最後に、得られたジアセチルスペルミジン誘導体を固相樹脂に担持することで、目的の樹脂担持型ジアセチルスペルミジンの合成を達成した。

また、第二章では生命に必須であるものの、その機能・役割は未解明であるハイプシンについても同様に、固相樹脂担持型誘導体の設計・合成に取り組んだ。ハイプシンの三次元立体構造と類似した立体構造を有するハイプシン誘導体を作製するために、著者はハイプシンのメチレン主鎖における、側鎖の導入位置について検討した。その結果、C4位に側鎖を導入した誘導体の場合、ハイプシンの立体配座と類似した折れ曲がりの配座をとることが示唆された。そこで、著者はC4位に側鎖を導入した固相樹脂担持型ハイプシンの合成に着手した。本研究では、側鎖に官能基を持つハイプシン誘導体を固相樹脂に担持することで、目的の樹脂担持型ハイプシンを得ることにした。従来報告されているハイプシンの既知合成法を応用し、固相樹脂担持型ハイプシンの合成を試みたが、その合成には至らなかった。著者はC4位に側鎖をあらかじめ導入したL-リジンを鍵物質として用いる合成経路を立案し、側鎖に官能基を持つハイプシン誘導体を合成した。最後に、得られたハイプシン誘導体を固相樹脂に担持することで、目的の樹脂担持型ハイプシンの合成を達成した。

さらに、第三章では、生物活性物質を固相樹脂に結合する新しい方法が、一般に必要であることを鑑み、生物活性物質をエーテル結合で固相樹脂に結合する新しい手法の確立を目指して研究に着手した。エーテル結合の形成には、当研究室で開発されたピリジニウム型塩中間体を経由するエーテル合成法を応用することにした。著者は本反応の詳細を理解するべく、ピリジニウム型塩中間体を経由するエーテル合成法における反応活性種（シリルトリフラートとピリジン種の酸塩基複合体）の構造解析研究を実施した。また、アセタール由来ピリジニウム型塩中間体を経由する反応を固相樹脂上でのエーテル結合形成反応に応用すべく検討した。目的とする結合形成法の確立には至らなかったものの、固相樹脂上でのエーテル結合法における知見を得ることができた。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　太田　礼伊也　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	赤井　周司
	副 査　教 授	井上　豪
	副 査　准教授	有澤　光弘

論文審査の結果の要旨

ポリアミンは第一級アミノ基を二つ以上もつ脂肪族炭化水素の総称であり、ほとんどすべての生物に含まれている。ポリアミンは核酸に作用することで転写や翻訳に影響を及ぼし、生命活動を制御していると考えられている。過剰のポリアミンは細胞外に排出され、最終的に尿中に排出されるため、腫瘍マーカーへの応用が期待されている。しかし、ポリアミン類の抗体はいくつか取得されているものの、未だ検出系の確立に至った例は少ない。近年、アプタマーと呼ばれる核酸分子に注目が集められており、抗体に次ぐ新たな検出系のツールとして期待されている。SELEXでアプタマーを取得するためには、固相樹脂に標的分子を担持した固相担持型誘導体の調製が必要である。標的分子が持つ官能基を足掛かりに固相担持する方法は、誘導体調製が簡便である一方で、目的のアプタマーが得られない場合があった。このような背景下、申請者はSELEXで用いる固相担持型誘導体の調製において、標的分子のメチレン主鎖に官能基化された側鎖を導入し、そこから固相樹脂に担持する戦略を立案した。本学位論文では、スペルミジンの代謝産物であるジアセチルスペルミジンおよびハイプシンを特異的に認識するアプタマーの取得を目指して研究に着手し、以下の成果を得た。

第一章では、腫瘍マーカーへの応用が期待されているジアセチルスペルミジンに特異的に結合するアプタマーの取得を目指して、固相樹脂担持型ジアセチルスペルミジンの分子設計と化学合成に着手した。計算化学による配座探索の結果、C6位に側鎖を導入した誘導体がジアセチルスペルミジンの立体配座と類似した配座をとることが明らかになった。申請者は末端オレフィンのメタセシス反応により側鎖をあらかじめ伸長したユニットを鍵物質として用いることで、側鎖に官能基を持つジアセチルスペルミジン誘導体の合成に成功した。また、得られたジアセチルスペルミジン誘導体を固相樹脂に担持することで、目的の固相樹脂担持型ジアセチルスペルミジンの合成を達成した。

第二章では、生命に必須であるものの機能や役割は未解明であるハイプシンに特異的に結合するアプタマーの取得を目指して、固相樹脂担持型ハイプシンの分子設計と化学合成に着手した。ジアセチルスペルミジンと同様に、計算化学による配座探索を実施し、最適な側鎖の導入位置を予測した。その結果、C4位に側鎖を導入した誘導体がハイプシンの立体配座と類似した配座をとることが明らかになった。申請者はC4位に側鎖をあらかじめ導入したL-リジンを鍵物質として用いる合成経路を確立し、側鎖に官能基を持つハイプシン誘導体の合成に成功した。また、得られたハイプシン誘導体を固相樹脂に担持することで、固相樹脂担持型ハイプシンの合成を達成した。

第三章では、生物活性物質をエーテル結合で固相樹脂に結合する新しい手法の確立を目指して研究に着手した。一般に、生物活性物質を固相樹脂に結合する新しい方法の開発が求められており、ピリジニウム型塩中間体を経由するエーテル合成法を固相合成に応用すべく検討した。申請者はピリジニウム型塩中間体を経由するエーテル合成法の詳細を明らかにすべく、NMR、X線結晶構造解析、計算化学を用いて反応活性種の構造解析を実施することで、シリルトリフラートとピリジン種の酸塩基複合体が形成されている可能性を示した。また、ピリジニウム型塩中間体を経由する反応を固相樹脂上で検討することで、固相樹脂上での反応性に関する知見を得ることができた。

以上の成果は、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。