



Title	外部刺激応答性人工核酸塩基の開発
Author(s)	森, 翔平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72327
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (森 翔 平)	
論文題名	外部刺激応答性人工核酸塩基の開発
論文内容の要旨	
<p>外部刺激応答性を持つ分子は新しい薬物送達システムの開発や生命機能の解明、分子コンピューターの制御など様々な分野においての応用が期待されている。中でも、性質を外部刺激によって制御出来る核酸素材は、遺伝子レベルでの生命現象を自在に制御可能な技術や、相補的水素結合を通じた複雑な高次構造の形成・乖離が任意に可能なナノマシン、特定の臓器・細胞特異的に薬効を発現する核酸医薬品の開発などの発展に大きく寄与すると考えられ、大きな注目を集めている。核酸の構造は糖部、リン酸ジエステル部および塩基部に大別できるが、核酸塩基部は水素結合能や近傍塩基とのスタッキング相互作用に関与することから、同位置に外部刺激応答能を付与することでオリゴ核酸分子全体の高次構造を制御可能であると考えた。本研究では外部刺激による核酸高次構造の制御を志向し、二種類の塩基部修飾人工核酸を開発した。</p> <p>まず、光刺激によって二重鎖安定化能を制御可能な人工核酸の開発を行った。これまでに報告されている光刺激応答性人工核酸塩基は水素結合形成部位を光分解性官能基で保護する、もしくは立体障害の大きさを光照射により変化させることにより高次構造形成の制御を達成している。新たなコンセプトに基づいた光刺激応答性人工核酸の開発が同種人工核酸の応用可能性を拡充出来ると考え、塩基部5位からアルキンリンカーを介してアゾベンゼン誘導体を有する2'-デオキシウリジンアナログを設計、合成した。トランス型のアゾベンゼンは核酸二重鎖中でメジャーグループから突き出し、水やカチオン種のネットワーク形成を阻害し、二重鎖の安定性を低下させる。一方で、シス型のアゾベンゼンは折り畳まれ、メジャーグループ内に収納され、その阻害を解消することを期待した。合成した人工核酸を導入したオリゴ核酸鎖に365 nmの紫外線を照射したところ、アゾベンゼン骨格がトランス型からシス型へと迅速に異性化することが確認された。更に続けて450 nmの可視光を照射することでシス型からトランス型へと異性化し、紫外線/可視光の照射で繰り返し、減衰することなくアゾベンゼン部の異性化が可能であった。続いて標的RNA鎖との二重鎖の融解温度を測定した結果、紫外線照射の前後で人工核酸による二重鎖安定化能が変化し、当初の設計通り、アゾベンゼン部がトランス型の時のみ二重鎖を不安定化させることが明らかになった。また、アゾベンゼン部に電子的、立体的に異なる置換基を導入することで異性化能や熱安定性といった物性を任意に調節可能であった。開発した光応答性人工核酸を導入したオリゴ核酸は光照射によって幾何学的性質を大きく変化させるため、アプタマー核酸への応用が期待される。</p> <p>次に、過酸化水素に特異的に反応し、水素結合能を回復するケージド核酸分子の開発を行った。これまでに様々な外部刺激応答性核酸が開発されてきたが、病変細胞や特定組織のみで薬効を発現する核酸医薬の実現には至っていない。そのような核酸医薬の実現には病変部位特異的に過剰発現するマーカーに対し高い反応性と選択性を併せ持ち、反応の前後で核酸の構造及び性質を大きく変化させることのできる外部刺激応答性核酸の開発が肝要である。</p> <p>内因性の酸化ストレスにより様々ながん細胞において過酸化水素濃度が上昇することが知られ、過酸化水素濃度はがん細胞と正常細胞を識別するマーカーといえる。つまり、過酸化水素選択的に反応する官能基を核酸塩基部に付与し、核酸分子の水素結合能を制御することでがん細胞選択的な核酸医薬の創製へ応用可能であると考えた。そこで、ホウ素-炭素結合の酸化的開裂を利用することとした。種々の天然核酸塩基の水素結合形成部位を4-(ボロン酸ピナコールエステル)フェニルメチル基および4-(ボロン酸ピナコールエステル)フェニルメチルオキシカルボニル基で保護した人工核酸を設計、合成した。合成した人工核酸に対し過酸化水素を作用させたところ、迅速に天然の核酸へと変換されることが分かった。とりわけ優れた応答性を示したチミジンアナログについてはその他の活性化素種に対する応答性も確認し、天然の核酸への変換が過酸化水素との反応時に特異的に起こることも明らかになった。更に、過酸化水素応答性を持つチミジンアナログをオリゴ核酸中に導入し、標的RNA鎖との融解温度を測定した結果、人工核酸が二重鎖を大幅に不安定化させること、過酸化水素添加後には二重鎖安定化能が回復することがそれぞれ明らかになった。最後に、同様の化学修飾をアンチセンス核酸のギャップ部へと導入し、培養細胞系において特定の細胞内mRNAを</p>	

標的としたノックダウン活性を確認した。過酸化水素を添加しない条件ではコントロール群と比べ、約8割のmRNAの発現を確認した一方で、過酸化水素添加時は標的mRNAの発現が約2割へと抑制され、過酸化水素添加の有無によりアンチセンス活性が制御可能であることを示した。開発した過酸化水素応答性人工核酸は生体内において正常細胞とがん細胞を精細に識別し、病変部位特異的に薬効を示す核酸医薬品への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森 翔 平)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 小比賀 聡
	副 査	教授 赤井 周司
	副 査	教授 高木 達也

論文審査の結果の要旨

外部刺激応答性を有する核酸分子は、任意のタイミング、任意の部位で活性を示す次世代の核酸医薬品や、相補的水素結合を通じた複雑な高次構造の形成・乖離が可能なナノマシンなどの新たな技術に欠かせない素材である。申請者は、核酸の構造の中でも相補鎖の分子認識に関わる核酸塩基部分に着目し、外部刺激応答能の付与によりオリゴ核酸分子全体の高次構造制御を目指し、二種の塩基部修飾人工核酸を開発した。その結果、以下に示す優れた成果を得た。

- 1) 光刺激により二重鎖の安定性を制御可能な人工核酸として、塩基部5位に各種アゾベンゼン誘導体を導入した2'-デオキシウリジンアナログを設計・合成した。
- 2) これらを導入したオリゴヌクレオチドは、異なる波長の光照射によりシストランス異性を繰り返すことが可能であり、光応答性核酸として機能することを明らかにした。また、相補鎖RNAとの二重鎖はトランス体よりもシス体をとる際により安定化されることを見出した。
- 3) ボロン酸エステル基をピリミジン塩基4位及びプリン塩基6位にもつヌクレオシド類縁体を合成し、これらが過酸化水素と反応し対応する天然のヌクレオシドに効率よく変換されることを明らかにした。特に、チミジン類縁体に関してはその他の活性酸素種との反応性も確認し、過酸化水素特異的な応答性を示すことを見出した。
- 4) このヌクレオシド類縁体をギャップマー型アンチセンスオリゴヌクレオチドに導入することで、培養細胞系における過酸化水素依存的な標的mRNAのノックダウン活性制御を達成した。

以上、本論文は、綿密な分子設計のもと薬効の精密制御を可能にする核酸医薬品の開発につながる有益な方法論を提示しており、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。