



Title	一置換型または二置換型グアニジノ基を有する架橋型人工核酸の合成と機能評価
Author(s)	堀江, 直宏
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82178
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

論文内容の要旨

氏 名 (堀 江 直 宏)	
論文題名	一置換型または二置換型グアニジノ基を有する架橋型人工核酸の合成と機能評価
論文内容の要旨 モダリティの多様化が進む中、核酸医薬が難治性疾患の新たな治療法として近年多くの実績を挙げ始め、2021年1月現在では世界で13品目の核酸医薬が実際に承認されている。疾患関連タンパク質の遺伝情報を含んだメッセンジャーRNA (mRNA) を標的とするアンチセンス核酸は核酸医薬の中で最も盛んに開発されており、上記13品目のうち8品目がこれに該当する。アンチセンス核酸の効果を上げる研究の歴史の中で、核酸の化学修飾は非常に重要な位置を占めており、(1) 標的RNAに対する高い二重鎖形成能や (2) 核酸分解酵素に対する耐性能を高める化学修飾が今なお数多く開発されている。当研究室およびWengelらのグループにより開発された糖部架橋型人工核酸2',4'-BNA/LNA (2'-O,4'-C-Methylene-bridged nucleic acid/Locked nucleic acid) は糖部骨格の揺らぎを固定することで二重鎖形成時のエントロピー損失を抑え、標的RNAに対する二重鎖形成能を大きく向上させることが見出されている。一方で2',4'-BNA/LNA導入オリゴ核酸は酵素分解耐性に改善の余地を残していることから、架橋部にさらなる化学修飾を施した2',4'-BNA/LNA誘導体が数多く開発されてきた。例えば、架橋部をアミド結合により構築したAmNA (Amido-bridged nucleic acid) はアミド部分の窒素原子上にアルキル修飾を施すことで、オリゴ核酸の酵素分解耐性や体内動態を改善させることができる人工核酸として報告されている。このように、架橋部への化学修飾はわずかな違いでもアンチセンス核酸の特性を大きく変化させることが知られている。 近年当研究室が開発したGuNA (Guanidine-bridged nucleic acid) は糖部に架橋構造とグアニジノ基を有する人工核酸であり、このグアニジノ基の正電荷により相補鎖RNAおよびDNAに対する非常に高い二重鎖形成能と酵素分解耐性を獲得している。また、GuNAのグアニジノ基をさらなる化学修飾の足場として考えると、先述の通り架橋部への化学修飾のわずかな違いがオリゴ核酸の特性を大きく変化させることから、グアニジノ基上の化学修飾によりGuNA以上の特性を示す誘導体の創出が可能であると期待される。そこで著者は本研究にてグアニジノ基上に嵩高い置換基を導入した各種GuNA誘導体を設計・合成し、これを導入したオリゴ核酸の特性を評価することで、この置換基がオリゴ核酸の特性に与える影響を詳細に解析した。 まず著者は、グアニジノ基上にメチル基 (Me)、エチル基 (Et)、イソプロピル基 (iPr)、<i>tert</i>-ブチル基 (tBu) をそれぞれ導入した一置換型GuNA誘導体 (GuNA[R]) を設計した。一般的に架橋部の嵩高さは、酵素分解耐性を向上させる一方で、二重鎖の形成を妨げることがいくつかの2',4'-BNA/LNA誘導体で報告されている。そこで著者は設計したGuNA[R]も同様にオリゴ核酸の酵素分解耐性や二重鎖形成能に影響を及ぼすと考え、これらの特性評価を行なった。まずGuNA[R]導入オリゴ核酸を合成後、相補鎖RNAに対する二重鎖形成能を融解温度 (T_m) の測定により評価した。その結果、置換基の嵩高さが増すに従いオリゴ核酸の二重鎖形成能も向上することが判明した (GuNA[Me] < GuNA[Et] < GuNA[iPr] < GuNA[tBu])。このように置換基の嵩高さが核酸二重鎖を安定化させる効果はこれまでの2',4'-BNA/LNA誘導体とは異なる結果であり、GuNA特有の性質であると言える。続いてGuNA[R]導入オリゴ核酸の酵素分解耐性を評価したところ、嵩高い置換基を有するGuNA[tBu]が最も優れた酵素分解耐性を示すことが分かった。以上の結果より、GuNAグアニジノ基上の置換基の嵩高さはオリゴ核酸の二重鎖形成能と酵素分解耐性に良い影響を及ぼすことが明らかとなった。 続いて著者は、複数の置換基を導入したGuNA誘導体の設計を見越して、3種類の二置換型GuNA誘導体 (GuNA[R,R]) の合成に着手した。これまでのGuNA誘導体では、グアニジノ基上の保護基がオリゴ核酸合成の煩雑化を招いており、保護基の再検討が求められていた。そこで著者はこのGuNA[R,R]導入オリゴ核酸の合成に際して、グアニジノ基無保護合成法を考案し、合成の簡便化を図った。実際に合成を行なったところ、設計した3種のGuNA[R,R]のうち2つのモノマー合成を達成し (GuNA[Me, Me], GuNA[Me, tBu])、種々検討の結果、GuNA[R,R]導入オリゴ核酸のグアニジノ基無保護合成法を確立するに至った。GuNA[R,R]の合成では核酸塩基としてチミン以外にもアデニンと5-メチルシトシンの合成も行い、それぞれオリゴ核酸の導入に成功した。得られたオリゴ核酸の相補鎖RNAおよびDNAへの二重鎖形成能を評価したところ、GuNA[R]と同様、置換基の嵩高さが増すに従い安定な二重鎖が形成されることが確認された (GuNA[Me, Me] <	

GuNA[Me, 'Bu])。一方でGuNA[Me, 'Bu]とGuNA['Bu]は同等の二重鎖形性能を示しており、二置換目のメチル基は二重鎖形性能に大きな影響を及ぼさないことが判明した。同時に、GuNA誘導体の塩基識別能を評価した結果、GuNA['Bu]およびGuNA[Me, 'Bu]は無置換のGuNAと比較して優れた塩基識別能を示すことが分かった。この結果はグアニジノ基上の置換基が核酸塩基対近傍に存在し、その立体障害によりミスマッチ塩基対の形成を妨げている可能性を示唆している。続いてGuNA[R, R]導入オリゴ核酸の酵素分解耐性を評価したところ、GuNA[R]よりも優れた安定性を示すことが分かった。以上の結果より、GuNAグアニジノ基上の二置換目の化学修飾は二重鎖形性能には大きく影響しない一方で酵素分解耐性を著しく向上させる効果を持つことを明らかにした。

以上の研究で判明したGuNAグアニジノ基上の置換基による二重鎖安定化効果のメカニズム解明は、今後さらに優れた特性を有するGuNA誘導体の設計には欠かせない知見である。そこで著者は、この二重鎖安定化効果の詳細なメカニズムを解明するため、GuNA誘導体導入オリゴ核酸を用いた熱力学的評価や結晶構造解析を行った。まず、GuNA誘導体導入オリゴ核酸の二重鎖形成時における熱力学的評価を行ったところ、グアニジノ基上の置換基による二重鎖安定化効果がエンタルピー項に寄与することが確認された。続いて、GuNA誘導体を導入した自己相補配列を各種設計・合成し、これを用いた結晶構造解析を試みた。その結果、GuNA[Me, Me]とGuNA[Me, 'Bu]の結晶構造解析に成功し、嵩高い*tert*-ブチル基が立体的に混み合った二重鎖の副溝側に近接する様子が観測された。この*tert*-ブチル基の特徴的な位置取りは比較的疎水性環境下にある副溝との疎水性相互作用に起因すると考えられる。また、GuNA[Me, 'Bu]導入オリゴ核酸の結晶構造では、グアニジノ基の窒素原子とチミン塩基2位のカルボニル酸素原子との間で、特有の水素結合を形成していることも判明した。熱力学的評価の結果でGuNA誘導体の二重鎖安定化効果がエンタルピー項に寄与していたことを踏まえると、この二重鎖安定化効果はGuNA[Me, 'Bu]で特徴的に見られた水素結合が主要因であると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (堀江 直 宏)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	小比賀 聡
	副 査	教授	赤井 周司
	副 査	教授	有澤 光弘

論文審査の結果の要旨

核酸医薬は、難治性疾患の新たな治療法として現在大きな注目を集めている。中でも、アンチセンス核酸は最も研究開発が進んでいる。アンチセンス核酸がその効果を発揮するためには、適切な化学修飾が必要不可欠であり、世界中で核酸の新たな化学修飾が研究されている。申請者が所属する研究室では、核酸の糖部に架橋構造とグアニジノ基を併せ持つ人工核酸GuNA (Guanidine-bridged nucleic acid)を開発してきた。GuNAはその特徴的な化学構造から、標的RNAおよびDNAに対する高い結合親和性や、ヌクレアーゼと呼ばれる核酸分解酵素に対する耐性に優れていることが見出されており、今後の核酸創薬への応用が期待されている。申請者はこのGuNAの更なる機能向上を目指し、GuNAの誘導体の設計・合成を行うとともに、その物性の評価を実施した。その結果、以下に示す優れた成果を得た。

1) GuNAのグアニジノ基窒素原子上に各種の置換基 (Me, Et, ⁱPr, ^tBu) を一つ導入したGuNA[R]を合成し、そのオリゴヌクレオチドへの導入に成功した。

2) GuNA[R]導入オリゴヌクレオチドの物性を評価し、相補的なRNAやDNAと強固に結合すること、核酸分解酵素に対する耐性を有することを明らかにした。特に、嵩高い置換基の導入が相補鎖との二重鎖の安定化に有効であるという興味深い知見を得た。

3) GuNAのグアニジノ基窒素原子上に置換基を二つ持つGuNA[R,R]を合成し、オリゴヌクレオチドへの導入を行なった。この際、GuNA[R,R]のグアニジノ基部分に保護基を導入することなくオリゴヌクレオチド合成が可能であることを見出した。

4) GuNA[R,R]導入オリゴヌクレオチドの物性評価を行い、GuNA[R]導入オリゴヌクレオチドと同様に相補的なRNAやDNAと強固に結合することを見出した。また、核酸分解酵素に対する耐性はGuNA[R]導入オリゴヌクレオチドを大きく上回ることを明らかにした。

以上、本論文では、人工核酸GuNAのグアニジノ基窒素上に置換基を導入することでその特性をさらに向上させることに成功している。また導入した嵩高い置換基が二重鎖の副溝に位置し、安定化に寄与しているという新たな発見にもつながっており、今後の核酸化学の発展に大いに貢献するものである。これらのことから本論文は、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。