

博士論文

核酸高次構造を標的とした
選択的アルキル化分子の開発

佐藤 憲大

平成 27 年

目次

第 1 章 序論

第 2 章 塩基欠損部位におけるアルキル化反応

第 3 章 4 本鎖 DNA を標的としたアルキル化反応

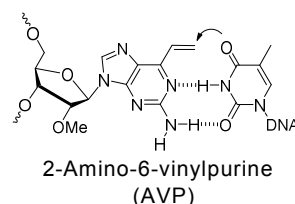
第 4 章 miRNA の高次構造を標的としたアルキル化反応

第 5 章 総括

第1章 序論

近年、DNA や RNA は遺伝子情報を保持するだけでなく、様々な高次構造を形成し、これらの構造が遺伝子発現の制御や遺伝病などの疾患に関わっていることが明らかにされている。これらの核酸の高次構造を選択的に化学修飾する手法は、遺伝子発現の新たな人工的制御法としての展開が期待される。しかし、現在までに、核酸の高次構造を選択的にアルキル化する手法は報告例が少なく、新たな手法の開発が望まれる。一方、核酸の高次構造内の標的塩基に対し水素結合を介して結合する分子はいくつか報告されており、高次構造内には水中でも水素結合を形成できる特殊な疎水空間があると考えられる。

当研究室では、標的塩基と水素結合を形成し、反応点が近接することで架橋反応する塩基として 2-Amino-6-vinylpurine (AVP)を開発している。AVP を持つオリゴヌクレオチドは相補的な位置のチミンと選択的に反応することを報告している。本研究ではこれらの結果に基づき、核酸高次構造の疎水空間において水素結合形成

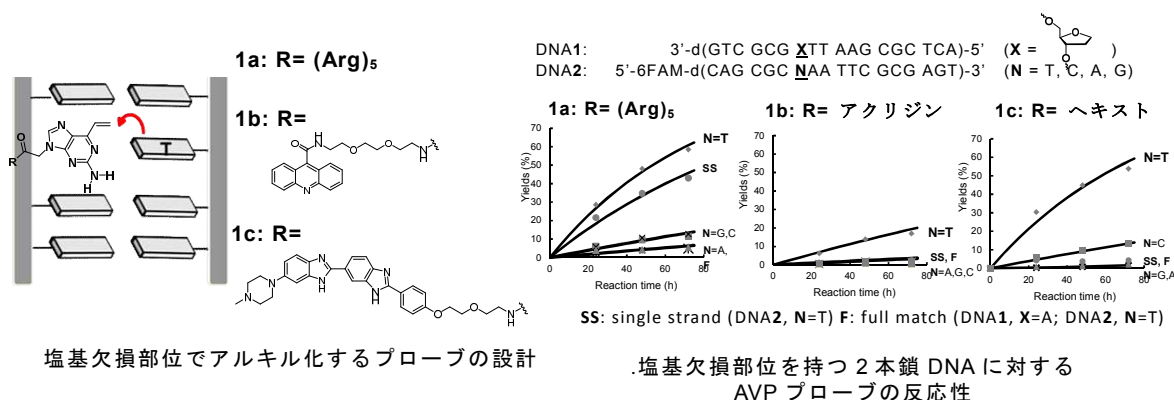


による反応活性化が有効に機能すると考え、新たに AVP プローブを設計し、疎水空間における標的塩基に対するアルキル化反応の開発を目指した。第2章ではまずこの設計概念の妥当性を示すために、疎水空間を持つ高次構造として塩基欠損部位を持つ2本鎖DNAに対するプローブを設計し、その反応性を解析した。第3章ではこの設計概念に基づいた4本鎖DNAに対するプローブを合成、反応性を解析した。第4章では高次構造をもつRNAを標的としたプローブを設計・合成し、その反応性を評価した。

第2章 塩基欠損部位におけるアルキル化反応

本章では、疎水空間を持つ高次構造のモデルとして、塩基欠損部位を持つ2本鎖DNAを設定し、疎水空間におけるアルキル化反応の設計概念を検証した。今回設計したプローブは、核酸に対する親和性を向上する部位(**R**)、および標的塩基との水素結合形成により活性化される反応性塩基部位の AVP を持つ。核酸に対して親和性を持つ部位(**R**)で標的核酸にプローブを接近させ、核酸の疎水空間で AVP が標的塩基と水素結合を形成して選択的にアルキル化することを期待した。核酸に対して親和性を持つ部位(**R**)としてカチオン性が高いペンタ-アルギニン[(Arg)₅]、インターカレーターのアクリジン、2本鎖DNAの副溝に結合するヘキスト 33258を導入した AVP プローブ(**1a**, **1b**, **1c**)を設計・合成した。

合成したプローブの反応性は、塩基欠損部位を持つ2本鎖DNAに対して各種 AVP プローブを添加し 37°Cで静置後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動することで解析した。その結果、いずれのプローブも塩基欠損部位の相補鎖側にあるチミン塩基を選択的にアルキル化すること、塩基欠損部位の無い2本鎖DNAとは反応しないことが明らかとなった。さらに **1b**, **1c** は1本鎖DNAとほとんど反応しなかった。また、今回合成したプローブの中で、ヘキストを導入した AVP プローブ (**1c**)は2本鎖DNAに対する選択性および反応効率が最も高いことがわかった。そこで、**1c** が付加したDNAを鋳型としたDNAポリメラーゼによる伸長反応を行ったところ、塩基欠損部位の相補鎖側でDNA伸長が停止した。この結果は、アルキル化反応が塩基欠損部位の相補鎖側のチミンに対し選択的に進行していることを示唆している。以上の結果は、疎水空間においてアルキル化反応するプローブの設計概念がうまく機能したことを示すと考えている。



第 3 章 4 本鎖 DNA を標的としたアルキル化反応

4 本鎖 DNA は 4 つのグアニンがフーグスティーン型水素結合を介して G-カルテット構造を形成し、スタッキング相互作用することで形成される構造である。この構造は染色体末端に見られる 1 本鎖テロメア領域で形成されることが明らかになっている。4 本鎖構造を安定化する分子は、がん細胞で活性化しているテロメラーゼによるテロメア伸長を阻害することから、抗がん剤としての可能性を持つと考えられている。前章で確立したアルキル化分子の設計概念に基づき、本章では 4 本鎖 DNA 選択的なアルキル化分子の開発を目指した。今回、4 本鎖 DNA にスタッキング相互作用で結合する分子を AVP に導入した分子を設計・合成し、ヒトテロメア配列の 4 本鎖 DNA に対するアルキル化反応を解析した。

その結果、今回合成したプローブは 4 本鎖に対して選択的に反応し、1 本鎖および 2 本鎖 DNA に対する反応性は低いことを明らかにした。また、ヒトテロメア配列の 4 本鎖 DNA は、その形成条件によって異なる構造をとることがわかっている。今回合成したプローブの反応率は、4 本鎖 DNA の構造によって異なることも明らかとなった。今後、これらの 4 本鎖 DNA 構造とアルキル化率の相関を詳細に解析する必要がある。また、アルキル化した 4 本鎖 DNA の CD スペクトルを確認したところ、未修飾の 4 本鎖 DNA とほぼ同じスペクトルを示した。この結果はアルキル化した 4 本鎖構造が未修飾の 4 本鎖 DNA と類似の構造であることを示唆している。さらに、アルキル化体は未修飾の 4 本鎖 DNA に比べ融解温度が上昇しており、アルキル化によって 4 本鎖構造が安定化されることも示唆された。

第 4 章 miRNA の高次構造を標的としたアルキル化反応

近年、miRNA の発現量が亢進あるいは減少することで生じる遺伝子疾患が知られている。miRNA は前駆体の pre-miRNA および pri-miRNA から生じ、前駆体ではインターナルループやヘアピンループといった高次構造が見られる。これらの高次構造に結合する化合物は、miRNA の生成を抑制することが知られており、遺伝子疾患の治療法への展開が期待される。本章では、前章までの分子設計概念に基づき、miRNA 前駆体の高次構造を標的としたアルキル化分子の開発を検討した。miRNA 前駆体に結合する分子を導入した AVP 誘導体を合成し、高次構造を持つ核酸に対するアルキル化反応を解析した。しかし、現在までに明確なアルキル化反応は確認できていない。RNA を標的とする場合には、分子設計の見直しを含めた検討が必要であると考えている。

第 5 章 総括

本博士論文では、反応性核酸塩基である AVP に核酸親和性分子を導入したアルキル化プローブを用いて、DNA の高次構造を選択的にアルキル化する方法を提示できたと考えている。本研究で得られた結果より、核酸親和性部位を変えることで他の核酸高次構造を標的としたアルキル化にも展開できるものと期待している。