論　文　内　容　要　旨

（NO．1）

氏　　名	秋澤　拓也	提出年	平成 27 年
学位論文の 題　　目	架橋反応性をもつ非環状人工核酸の合成と機能性評価		

論　文　目　次

1 章：序論
2 章：4-amino-6-oxo-2-vinylpirimidine (AOVP)をもつ PNA の合成と機能性評価
3 章：2-amino-6-vinylpurine (AVP)をもつ PNA の合成と機能性評価
4 章：AVP をもつ pseudo-complementary PNA (pcPNA)の合成と機能性評価
5 章：AVP をもつ Serinol Nucleic Acid (SNA)の合成と機能性評価
6 章：総括

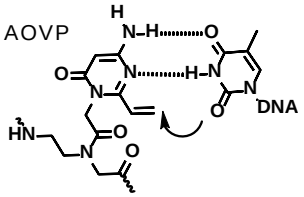
論　文　内　容　要　旨

1 章：序論

数十塩基からなるオリゴヌクレオチド（ON）は、配列選択的に特定の核酸に結合できることから、核酸医薬としての展開が期待されている。しかし、天然型 ON は生体内で酵素に分解されやすい等のいくつかの課題があり、その課題の解決を目指し化学修飾を施した核酸が開発されている。当研究室では効率的な遺伝子発現制御をめざし、標的遺伝子に対して選択的に共有結合を形成する架橋反応性核酸塩基（2-amino-6-vinylpurine (AVP)　及び 4-amino -6-oxo-2-vinylpyrimidine (AOVP)）を修飾した ON を開発している。ON 中の AOVP 及び AVP は、外部刺激（光、熱、酸化等）を必要とせず、標的核酸と二本鎖を形成した後、相補的な位置にあるチミンと反応点同士が接近することで架橋を形成することを明らかにしている。本論文は、効率的な遺伝子発現制御法の開発を目的とし、当研究室で開発した興味深い性質をもつ架橋反応性核酸塩基の標的拡大を目指し行った研究成果をまとめたものである。1 章から 4 章は、当研究室で開発した架橋反応性核酸塩基を導入したペプチド核酸(PNA)を合成し、その反応性について検討した結果を記載した。5 章では、導入する核酸の骨格により架橋反応性が変化する AVP の性質を利用し、これまでとは異なる架橋反応性をもつ人工核酸の開発を目指し行った研究成果を記載した。

2 章：4-amino-6-oxo-2-vinylpirimidine (AOVP)をもつ PNA の合成と機能性評価

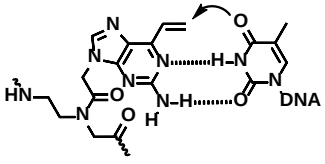
2 章では、4-amino-6-oxo-2-vinylpirimidine (AOVP)を導入した PNA を合成しその反応性を評価した。その結果、AOVP を N 末端にもつ PNA は、標的 DNA 中の相補的な位置にあるチミンと選択的に架橋を形成するものの、同様の配列を持つ標的 RNA 鎖に対する反応性は非常に低いことが明らかになった。一方、AOVP を配列中央に持つ PNA は、いずれの標的核酸に対してほとんど架橋反応性を示さなかった。上記の様に AOVP を持つ PNA はその導入位置により架橋反応性が大きく変化し、配列中央に AOVP を導入した PNA は、標的核酸と二重鎖を形成した際、反応点であるビニル基が標的塩基に対して近接できなかったため、架橋反応効率が低いものと考えられる。次章では、異なる架橋反応性核酸塩基を修飾した PNA を合成し、その架橋反応性を検証した。



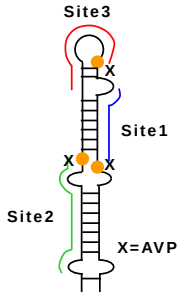
標的 DNA 鎖のチミンと選択的に架橋を形成したが架橋反応性は低い

3 章：2-amino-6-vinylpurine (AVP)をもつ PNA の合成と機能性評価

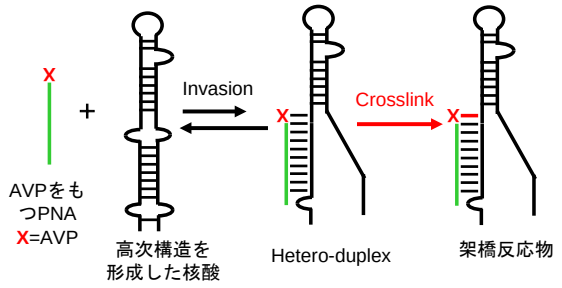
3 章では、まず 2-amino-6-vinylpurine (AVP)を導入した PNA を合成しその反応性を評価した。その結果、AVP を N 末端にもつ PNA は、標的 DNA 鎖中の相補的な位置にあるチミン及び標的 RNA 鎖中の相補的な位置にあるウラシルと選択的に架橋を形成することがわかった。さらに前章で合成した、AOVP をもつ PNA よりも高い架橋反応性を有することがわかった。一方、AOVP と同様に、配列中央に AVP を導入した PNA は標的核酸に対してほとんど反応性を示さなかった。これらの結果は、いずれの架橋反応性核酸も配列中央に導入した場合、PNA-標的核酸の複合体において、標的塩基に対して近接できない構造をとっていることを示唆している。



AVP もつ PNA



標的 pre-miRNA と標的位置

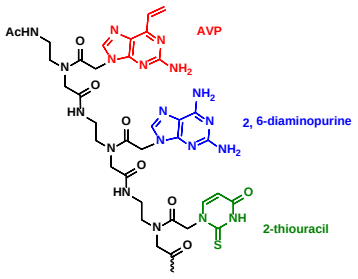


次に、最も高い架橋反応性を示した N 末端に AVP をもつ PNA を用いて、miRNA の生成に関わる Dicer の機能阻害について検討した。Dicer の基質としては、高次構造を形成している pre-miR122 を用いることとし、pre-miR122 の異なる 3 か所を標的とする架橋反応性 PNA をそれぞれ合成した。合成した PNA を用いて架橋反応を検討したところ、ヘアピンループ部位を含む標的 RNA に対して効率的に反応することがわかった。次にこれらの PNA を用いて Dicer 阻害能を検討した。その結果、site2 及び site3 に対して結合する架橋反応性 PNA は、架橋反応性を持たない PNA に比べ

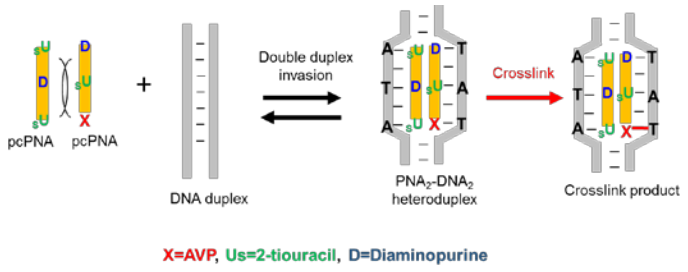
高い Dicer 阻害効率を示した。さらに、各標的部位に対する 2 重鎖形成効率を比較したところ、site2 を標的とする AVP を持つ PNA は、天然型 PNA よりも効率よく二重鎖を形成することが明らかになった。この結果は、架橋形成により二重鎖形成が不可逆的に進行することで、PNA のインベージョン能が向上したからだと考えている。一方、安定な二重鎖を形成した site1 を標的とする AVP を持つ PNA の架橋反応効率及び二重鎖形成効率は低く、これは、PNA のインベージョン能が低すぎることが原因だと考えられる。そこで、次章では、より高いインベージョン能をもつ pseudo-complementary PNA（pcPNA）に AVP を導入することとした。

4 章：AVP をもつ pseudo-complementary PNA (pcPNA)の合成と機能性評価

4 章では、高いインベージョン能及び架橋反応性を持つ PNA として AVP を修飾した pseudo-complementary PNA（pcPNA）を合成した。pcPNA とは、アデニンとチミンの代わりに 2,6-Diaminopurine（D）と 2-thiouracil（sU）をそれぞれ導入した PNA のことであり、Double duplex invasion を誘導することが知られている。本章で合成した AVP をもつ pcPNA は、標的一本鎖 DNA 中のチミンと選択的に架橋を形成することが明らかになった。さらに、この pcPNA は二重鎖 DNA にインベージョンし、架橋を形成することも明らかになった。しかしそのインベージョン収率は、通常の pcPNA よりも低く、更なる検討が必要だと考えられる。

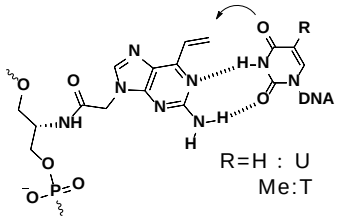


AVP をもつ pcPNA



5 章：AVP をもつ Serinol Nucleic Acid (SNA)の合成と機能性評価

5 章では、新たな非環状人工核酸として、Serinol Nucleic Acid (SNA)に AVP を導入したオリゴヌクレオチドを合成した。SNA は非環状ジオールであるセリノールを持つ人工核酸であり、柔軟な構造を持っている。さらに SNA は合成が容易である点、DNA、RNA に対して安定な二重鎖を形成することから、新規の人工核酸としての応用が期待される。配列末端に AVP をもつ SNA は、PNA と同様に標的 DNA 鎖中のチミン及び標的 RNA 鎖中のウラシルと選択的に架橋を形成することが明らかになった。一方、配列内部に AVP をもつ SNA は標的 DNA 鎖とは反応性を示すものの、標的 RNA 鎖に対する反応性は低いことも明らかになった。今後、AVP をもつ SNA を核酸プローブ等に展開していくには更なる詳細な検討が必要であると考えられる。



AVP をもつ SNA

6 章：総括

本論文では、4 種類の架橋反応性核酸塩基をもつ新規機能性核酸を合成し、それらの架橋反応性を評価した。本編で報告した架橋反応性核酸は、以前から当研究室で報告している架橋反応性核酸塩基をもつ ON にはないユニークな機能及び架橋反応性を示した。これらの結果は、今後の架橋反応性核酸塩基をもつ核酸の設計において新たな視点を齎すと共に、遺伝子発現阻害の新たな方法論としての展開も期待される。

論文審査の結果の要旨

近年、癌や糖尿病等の疾患が遺伝子異常によることが明らかにされており、遺伝子レベルでの治療法が注目されている。特に数十塩基からなるオリゴヌクレオチドは、配列選択的に特定の遺伝子に結合することから、核酸医薬としての展開が期待されている。当研究室では既に効率的な遺伝子発現制御をめざし、標的遺伝子に対して選択的に共有結合を形成する架橋反応性核酸塩基を開発している。本研究では標的核酸拡大をめざし、これらの架橋反応性核酸塩基を導入したペプチド核酸(PNA)の開発を検討した。PNA は高次構造を持つ標的核酸に対して挿入(インベージョン)できる性質を持っており、２本鎖 DNA も標的にできる可能性を持っている。まず第２章では 4-amino-6-oxo-2-vinylpirimidine (AOVP)をもつ PNA の合成さらには反応性評価を行った。その結果、AOVP を N 末端にもつ PNA は、標的 1 本鎖 DNA 鎖中のチミンと選択的に架橋を形成すること、RNA に対する反応性は非常に低いことがわかった。一方、AOVP を配列中央に持つ PNA は DNA、RNA いずれに対してもほとんど反応性を示さないことを明らかにした。3 章では、2-amino-6-vinylpurine (AVP)を導入した PNA を合成しその反応性を評価した。その結果、AVP を N 末端にもつ PNA は、標的 DNA 鎖中チミン及び RNA 鎖中のウラシルと選択的に架橋を形成することがわかった。さらに前章で合成した、AOVP をもつ PNA よりも高い架橋反応性を有することを明らかにした。一方、AOVP と同様に、配列中央に AVP を導入した PNA は標的核酸に対してほとんど反応性を示さなかった。これらの結果は、いずれの架橋反応性核酸も配列中央に導入した場合、PNA-標的核酸の複合体において、標的塩基に対して近接できない構造をとっていることを示唆している。次に最も高い架橋反応性を示した N 末端に AVP をもつ PNA を用いて、miRNA の生成に関わる RNA 切断酵素である Dicer の阻害について検討した。その結果、架橋反応性 PNA は、架橋反応性のない PNA に比べ高い Dicer 阻害効率を示すことを明らかにした。4 章ではより効率的なインベージョン能を持つ PNA として AVP をもつ pcPNA を合成した。この PNA は効率は低いものの二重鎖を形成した DNA にインベージョンし、架橋を形成することも明らかにした。以上のように、本論文では架橋反応性核酸を持つ PNA を合成し高い反応性を持つ PNA の開発に成功した。これらの結果は当該学生が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、秋澤拓也氏提出の博士論文は，博士（理学）の学位論文として合格と認める。