

## 学位論文題名

四本の水素結合に基づく相補的塩基対を  
含む新規核酸に関する研究-イミダゾピリドピリミジンヌクレオシドの合成, および  
オリゴヌクレオチド中における諸性質について-

## 学位論文内容の要旨

DNAは遺伝情報の担い手としてその保存、伝達を行っている。DNAの二本鎖構造は主に、1) 二組の相補的な塩基対(A:T, G:C)による水素結合の形成、2) この塩基対の積み重なりによるスタッキング効果、および3) 糖部、リン酸部、塩基部による親水性、疎水性の相互作用により二重らせん構造を形成し、その熱的安定性を維持している。また、これらの相互作用は核酸-蛋白質間などでの分子認識にも関与しており、様々な生体機能の調節に深くかかわっている。

著者は天然核酸の構造や機能を参考にして、非天然型の新規核酸を創製することを計画した。特に水素結合と二本鎖の熱的安定性との相関〔天然DNAでは、A:T(二本の水素結合)、G:C(三本の水素結合)の二組の塩基対により二本鎖が形成され、GCリッチな配列ほど安定な二本鎖を形成する〕に着目し、天然には存在しない四本の水素結合による相補的な塩基対を形成するヌクレオシドを合成すれば、この塩基対を組み込んだDNAでは熱的に非常に安定な二本鎖が形成されるのではないかと考えた。そしてこのような機能を有する新規塩基対による非天然型核酸の合成を計画し、四種の新規三環性化合物、イミダゾ[5',4':4,5]ピリド[2,3-d]ピリミジンヌクレオシド( $N^N$ ,  $O^O$ ,  $N^O$ ,  $O^N$ )をデザインした。 $N^N$ 体と $O^O$ 体、 $N^O$ 体と $O^N$ 体はそれぞれ四本の水素結合による塩基対形成が可能であり、DNA二本鎖内ではこの四本の水素結合形成による二本鎖の安定化が期待できる。さらにこれらの化合物では塩基部にイミダゾール環-ピリジン環-ピリミジン環からなる三環骨格を有しているため、天然型の核酸塩基と比べ芳香環の広がりによる強いスタッキング効果が予想され、この効果により二本鎖のさらなる安定化が期待される。このような機能を有する核酸誘導体の合成は今までに報告例がなく、そのためDNA二本鎖内における様々な性質の解析を行うことは非常に意義深いことであると考えられる。

目的化合物のうち、 $N^N$ 体はAICA 2'-デオキシリボシドより誘導した4-シアノ-5-ヨードイミダゾールヌクレオシドと4-アミノ-2-クロルピリミジンの有機スズ化合物との間でのパラジウム触媒を用いたクロスカップリング反応を利用して合成した。他の化合物も同様にイミダゾールヌクレオシドのヨード体と2,4置換ピリミジンの有機スズ化合物を用いて合成した。まず、NMR測定、およびNOE実験により合成した化合物の立体構造解析を行った。そして、四種の化合物はいずれも糖部バックリング様式がC2'-endo構造であり、グリコシル結合回りの配向がanti配座をとっていることを明らかにした。この構造は天然のDNA二本鎖内におけるデオキシヌクレオシドの構造に類似しており、三環性化合物を用いて合成した非天然型核酸も天然

型に類似した構造により二本鎖を形成可能であることが示唆された。

つぎに糖部保護体を用いて温度可変NMR測定を行い、予想した塩基対が形成可能であるか検討した。その結果、 $N^O$ 体、 $O^N$ 体はそれぞれ単独で四本の水素結合によるアンチパラレル型の二量体を形成していることがわかった。 $N^O$ 体と $O^N$ 体の1対1混合溶液ではこの二量体のシグナルに加え予想した $N^O$ 体と $O^N$ 体の間での塩基対形成を示すシグナルが観察された。 $N^N$ 体と $O^O$ 体についても塩基対が実際に形成されることを確認した。

続いて、三環性化合物をオリゴヌクレオチド中に導入し、 $N^N$ 体と $O^O$ 体、 $N^O$ 体と $O^N$ 体との塩基対がDNA二本鎖内でも形成可能であるかを調べた。各三環性化合物は塩基部を適切に保護した後アミダイト体へと変換し、DNA自動合成機によりoligo I~IVを合成した。Oligo I, IIは17 merの中心に一残基三環性化合物を導入した配列であり、oligo III, IVは中心に連続三残基の三環性化合物を導入した配列である。この二組の二本鎖について熱変成法により50%融解温度、および自由エネルギー変化を算出し、これらの結果を比較することによりDNA二本鎖内における三環性化合物の水素結合能の評価を行った。

oligo. I, IIを用いた場合には二本鎖の融解温度の差が小さく、ほとんど塩基特異性が観察されなかった。一方、三環性化合物を中心に連続三残基導入したoligo. III, IVの二本鎖では、いずれの化合物にも特徴的な塩基特異性が観察された。このうち最も安定な組み合わせは $N^O$ 体と $O^N$ 体との組み合わせであり、このときの融解温度は天然型で最も安定なG:C塩基対よりも18度高く、 $N^O$ 体と $O^N$ 体の一組の塩基対あたりG:C塩基対と比較して6度以上の安定化効果が得られた。この結果よりDNA鎖内での $N^O$ 体と $O^N$ 体の塩基対による四本の水素結合形成が強く示唆された。 $N^N$ 体と $O^O$ 体の組み合わせでもG:C塩基対より高い融解温度が観察され、今回合成した二組の新規塩基対による二本鎖の安定化効果が示された。その他にも $N^O$ : $N^O$ 塩基対などいくつかの安定な組み合わせが見つかったが、いずれの場合も二本鎖の熱的安定性と塩基対間での水素結合形成能との間に強い相関が観察された。各三環性化合物は天然核酸塩基と組み合わせた場合でも塩基特異性を示し、同様に二本鎖の熱的安定性と水素結合形成能との相関が観察された。

また、オリゴヌクレオチド中の様々な部位に三環性化合物を導入した二本鎖の融解温度の測定により、三環性化合物との塩基対による二本鎖の安定化には、三環性化合物が連続して二本鎖内に導入されていることが必要であることを示した。これは、三環性化合物による塩基対が天然型の塩基対に比べ嵩高く、そのため導入部位前後の塩基対を不安定化しているためであると考えられる。

さらに著者は三環性化合物によるスタッキング相互作用の評価を行ない、二本鎖の安定化が三環性化合物同士、あるいは三環性化合物と天然型塩基との間での四本、または三本の水素結合による安定な塩基対形成と同時に、三環性化合物による強いスタッキング相互作用も大きく寄与していることを明らかにした。またその効果が塩基部の極性により異なることが示唆された。

最後に三環性化合物を導入したDNAテンプレートと $^{32}P$ ラベルしたプライマーを用いてKlenow Fragmentにより鎖伸長反応を行い、三環性化合物がポリメラーゼの認識に及ぼす影響を調べ、先に示した三環性化合物の水素結合能と、ポリメラーゼによる認識との関係の考察を行った。三環性化合物を含むテンプレートは、天然のヌクレオシドのものと比較して低効率ながら鎖伸長が起こることがわかり、 $N^O$ 体と $O^N$ 体では完全鎖長の生成も確認された。dNTP取り込み実験では、各三環性化合物の相補的な部位へ取り込まれるdNTPに特異性が観察された。そしていくつかでは水素結合能とKlenow Fragmentによる認識に相関関係が見い出され、Klenow Fragmentが三環性化合物を認識する際には、その水素結合能を認識し対応するdNTPを取り込んでいることが強く示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 彰  
副 査 教 授 大 塚 栄 子  
副 査 助 教 授 周 東 智  
副 査 助 教 授 井 上 英 夫

学 位 論 文 題 名

## 四本の水素結合に基づく相補的塩基対を含む新規核酸に関する研究

—イミダゾピリドピリミジンヌクレオシドの合成、およびオリゴヌクレオチド中における諸性質について—

著者は、天然核酸の構造や機能を参考にして、非天然型の新規核酸を創製することを計画した。特に水素結合と二本鎖の熱的安定性との相関〔天然DNAでは、A:T（二本の水素結合）、G:C（三本の水素結合）の二組の塩基対により二本鎖が形成され、GCリッチな配列ほど安定な二本鎖を形成する〕に着目し、天然には存在しない四本の水素結合による相補的な塩基対を形成するヌクレオシドを合成すれば、この塩基対を組み込んだDNAでは熱的に非常に安定な二本鎖が形成されるのではないかと考えた。そしてこのような機能を有する新規塩基対による非天然型核酸の合成を計画し、四種の新規三環性化合物、イミダゾ[5',4':4,5]ピリド[2,3-d]ピリミジンヌクレオシド ( $N^N, O^O, N^O, O^N$ ) をデザインした。

目的化合物のうち、 $N^N$ 体はAICA 2'-デオキシリボシドより誘導した4-シアノ-5-ヨードイミダゾールヌクレオシドと4-アミノ-2-クロルピリミジンの有機スズ化合物との間でのパラジウム触媒を用いるクロスカップリング反応で合成した。他の化合物も同様にイミダゾールヌクレオシドのヨード体と2,4置換ピリミジンの有機スズ化合物を用いて合成した。まず、NMR測定、およびNOE実験により合成した化合物の立体構造解析を行った。四種の化合物はいずれも糖部パッカリング様式がC2'-endo構造であり、グリコシル結合回りの配向がanti配座をとっていることを明らかにした。この構造は天然のDNA二本鎖内におけるデオキシヌクレオシドの構造に類似しており、三環性化合物を用いて合成した非天然型核酸も天然型に類似した構造により二本鎖を形成可能であることが示唆された。

つぎに糖部保護体を用いて温度可変NMR測定を行い、予想した塩基対が形成可能であるか検討した。その結果、 $N^O$ 体、 $O^N$ 体はそれぞれ単独で四本の水素結合によるアンチパラレル型の二量体を形成していることを明らかにした。 $N^O$ 体と $O^N$ 体の1対1混合溶液ではこの二量体のシグナルに加え $N^O$ 体と $O^N$ 体間での塩基対形成を示すシグナルが観察された。 $N^N$ 体と $O^O$ 体についても塩基対が実際に形成されることを確認した。

続いて、三環性化合物をオリゴヌクレオチド中に導入し、 $N^N$ 体と $O^O$ 体、 $N^O$ 体と $O^N$ 体との塩基対がDNA二本鎖内でも形成可能であるかを調べた。各三環性化合物は塩基部を適切に保護した後アミダイト体へと変換し、DNA自動合成機によりoligo I-IVを合成した。Oligo I, IIは17 merの中心に一残基三環性化合物を導入した配列であり、oligo III, IVは中心に連続三残基の三環性化合物を導入した配列である。この二組の二本鎖について熱変成法により50%融解温度、および自由エネルギー変化を算出し、これらの結果を比較することによりDNA二本鎖内における三環性化合物の水素結合能の評価を行った。

Oligo I, IIを用いた場合では二本鎖の融解温度の差が小さく、塩基特異性がほとんど観察されなかったが、oligo III, IVの二本鎖では、いずれの化合物にも特徴的な塩基特異性が観察された。このうち最も安定な組み合わせは $N^O$ 体と $O^N$ 体との組み合わせであり、このときの融解温度は天然型で最も安定なG:C塩基対よりも18度高く、 $N^O$ 体と $O^N$ 体の一組の塩基対あたりG:C塩基対と比較して6度以上の安定化効果が得られた。この結果よりDNA鎖内での $N^O$ 体と $O^N$ 体の塩基対による四本の水素結合形成が強く示唆された。 $N^N$ 体と $O^O$ 体の組み合わせでもG:C塩基対より高い融解温度が観察され、今回合成した二組の新規塩基対による二本鎖の安定化効果が示された。各三環性化合物は天然核酸塩基と組み合わせた場合でも塩基特異性を示し、同様に二本鎖の熱的安定性と水素結合形成能との相関が観察された。

さらに著者は三環性化合物によるスタッキング相互作用の評価を行ない、二本鎖の安定化が三環性化合物同士、あるいは三環性化合物と天然型塩基との間での四本、または三本の水素結合による安定な塩基対形成と同時に、三環性化合物による強いスタッキング相互作用も大きく寄与していることを明らかにした。またその効果が塩基部の極性により異なることが示唆された。

最後に三環性化合物を導入したDNAテンプレートと $^{32}P$ ラベルしたプライマーを用いてKlenow Fragmentにより鎖伸長反応を行い、三環性化合物がポリメラーゼの認識に及ぼす影響を調べ、先に示した三環性化合物の水素結合能と、ポリメラーゼによる認識との関係の考察を行った。三環性化合物を含むテンプレートは、天然のヌクレオシドのものと比較して低効率ながら鎖伸長が起こることがわかり、 $N^O$ 体と $O^N$ 体では完全鎖長の生成も確認された。dNTP取り込み実験では、各三環性化合物の相補的な部位へ取り込まれる

dNTPに特異性が観察された。そしていくつかでは水素結合能とKlenow fragmentによる認識に相関関係が見い出され、Klenow fragmentが三環性化合物を認識する際には、その水素結合能を認識し対応するdNTPを取り込んでいることが強く示唆された。

以上のように本研究は、四本の水素結合に基づく相補的塩基対を用いた新規核酸に関する知見を得たものであり、博士（薬学）の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。