

学 位 論 文 題 名

5 - (*N*-アミノヘキシル) カルバモイル-2'-*O*-
メチルウリジンを含むオリゴヌクレオチドの合成と
アンチセンス法を指向した諸性質の解析

学位論文内容の要旨

近年、難治性疾患に対する新しい試みとして、遺伝子治療法が注目されている。対象となる先天性疾患やウイルス疾患、末期癌などは、いずれも発症に遺伝子発現が深く関与していることが知られている。中でもアンチセンス法は病因となる遺伝子配列が既知の時、それに対する薬剤を論理的に設計できることから注目を集めている。

1. 新規アンチセンス分子の設計と合成

本研究ではアンチセンス法を指向した新規オリゴヌクレオチドとして、5-(*N*-アミノヘキシル)カルバモイル基および2'-*O*-メチル基を導入したウリジン誘導体 ($^N\text{U}_m$ ユニット)を含むオリゴヌクレオチド ($^N\text{U}_m$ オリゴマー)を合成した。途中得られた合成中間体のNMRカップリング定数よりヌクレオチド糖部の立体配座を調べたところ2'-*O*-メチル基の導入により3'-endo型配座を優先してとっていることが判った。

2. $^N\text{U}_m$ オリゴマー/RNA 二本鎖の熱力学的安定性

次に RNA に対する親和性を二本鎖の 50%融解温度 (T_m 値)の測定より調べた。その結果、 $^N\text{U}_m$ オリゴマーは修飾体残基の導入数が 2-5 個の時に修飾体導入数の増加に伴って二本鎖が安定化する傾向が見られた (約 2 °C/修飾体)。一方、2'-*O*-メチル基を持たない 5-(*N*-アミノヘキシル)カルバモイルウリジン (^NU ユニット)を含む ^NU オリゴマーと RNA との二本鎖の T_m 値測定を行ったところ、同様の傾向を示した。そこで 5 位末端アミノ基が RNA との二本鎖形成に及ぼす効果を調べるため、 $^N\text{U}_m$ オリゴマー/RNA 二本鎖の T_m 値に対する塩濃度の影響を調べた。すると 5 位置換基の導入により、塩濃度の T_m 値に与える影響が減少していることが判った。このことから $^N\text{U}_m$ オリゴマー/RNA 二本鎖の安定性に 5 位末端アミノ基の静電的効果が大きな影響を与えていることが示唆された。また二本鎖の溶液中での高次構造を CD スペクトルから調べた。 $^N\text{U}_m$ オリゴマー/RNA 二本鎖では $^N\text{U}_m$ ユニットの導入数の増加に伴って A 型二本鎖構造に近づく傾向が観察されたが 2'-*O*-メチル基のみを有する U_m オリゴマーで T_m 値との相関を示さなかったことから、2'-*O*-メチル基の導入は RNA との二本鎖構造を A 型に近付ける傾向はあるものの、二本鎖安定化には関与しないことが明かとなった。

3. ヌクレアーゼ抵抗性

アンチセンス分子を静脈投与する際、問題となるのは 3'-エキソヌクレアーゼによる加水分解である。3'-エキソヌクレアーゼとして snake venom phosphodiesterase (SVPD)を用いて $^N\text{U}_m$ オリゴマーのエキソヌクレアーゼ抵抗性を評価したところ、天然型 DNA と比較して 100 倍以上の高い抵抗性を示した。また $^N\text{U}_m$ ユニットの 5 位アミノ基をアセチル化したオリゴマーでも高い抵抗性を維持していたことから、 $^N\text{U}_m$ オリゴマーにおける 3'-エキソヌクレアーゼ抵抗性は主に 5 位置換基の立体障害によるものであることが明かとなった。

細胞内ではエンドヌクレアーゼによる加水分解も憂慮される。そこで DNase I を用いて $^N\text{U}_m$ オリゴマーのエンドヌクレアーゼ抵抗性を調べたところ、 $^N\text{U}_m$ ユニットの導入数が 4 個以上の時に高いエンドヌクレアーゼ抵抗性を示した (16-30 倍)。一方、 ^NU オリゴマーでは殆ど抵抗性を示さず、 U_m オリゴマーで 8 倍程度の抵抗性を示した。よって $^N\text{U}_m$ オリゴマーにおけるエンドヌクレアーゼ抵抗性は 2'-O-メチル基の影響が大きいことが示唆された。

4. RNase H 活性誘導能

RNase H は DNA/RNA 二本鎖を基質とし RNA のみを切断するエンドヌクレアーゼである。 $^N\text{U}_m$ ユニットは 2'-O-メチル基を有しているが、DNA 鎖側の全てに 2'-O-メチル基を導入すると RNase H は RNA を切断しなくなる。しかしオリゴマー内部に連続した DNA 残基部 (gap) があると RNA は切断されるようになる。そこで ($^N\text{U}_m$ ユニットを含む 2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド)-(DNA)-($^N\text{U}_m$ ユニットを含む 2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド)なるサンドイッチ構造を持つオリゴマー (gapmer) を用いて、内部に何個の DNA 残基を導入すれば RNA が効率的に切断されるか調べた。DNA 導入数 (gap 数) が 3 または 4 個の時は RNA の切断は非常に遅かった。しかしながら gap 数が 5 個以上では効率的に切断反応が進行することが明かとなった。 $^N\text{U}_m$ ユニットを含む gapmer はこのものを含まない gapmer と比べて、RNA の効率的切断により多くの gap 数が必要であった。このことから RNase H の切断反応に対する 5 位置換基の影響が推測された。そこで切断反応の速度論的解析を行ったところ、5 位末端アミノ基は RNase H の基質認識には影響を与えないものの酵素の触媒回転に大きな影響をもたらすことが判った。

5. X 線結晶構造解析

$^N\text{U}_m$ ユニットを含む Dickerson 型 DNA/DNA 二本鎖の X 線結晶構造解析を行った。二本鎖全体の構造は未修飾の二本鎖と大差は見られなかった。しかし 5 位置換基は結晶中で固定化されておらず、非常に柔軟な構造をとっていることが明かとなった。またヌクレオシド糖部立体配座の解析から予想された通り、二本鎖中で $^N\text{U}_m$ ユニットは実際に 3'-endo 型配座をとっていることが確認された。5 位置換基は 5' 端方向には自鎖と、3' 端方向には相補鎖のリン酸基とそれぞれ静電相互作用が可能な 3 Å 程度まで伸長が可能であることが示された。これらの構造的特徴を基に ^NU ユニットを含む DNA/RNA 二本鎖モデルを構築し、その構造を検討した。DNA/RNA モデルでも 5 位アミノ基はリン酸基と静電相互作用可能な距離まで接近が可能であったことから、RNA との二本鎖の熱的安定性に及ぼす 5 位置換基の効果が裏付けられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松田	彰
副査	助教授	周東	智
副査	助教授	神谷	浩之
副査	助教授	森岡	弘志

学位論文題名

5 - (N - アミノヘキシル) カルバモイル - 2' - O - メチルウリジンを含むオリゴヌクレオチドの合成と アンチセンス法を指向した諸性質の解析

近年、難治性疾患に対する新しい試みとして、遺伝子治療法が注目されている。中でもアンチセンス法は病因となる遺伝子配列が既知の時、それに対する薬剤を論理的に設計できることから注目を集めている。伊藤高範は、以下のように、アンチセンス法への応用を念頭に 5-(N-アミノヘキシル)カルバモイル-2'-O-メチルウリジンを含むオリゴヌクレオチドを合成し諸性質の解析した。

1. 新規アンチセンス分子の設計と合成

本研究ではアンチセンス法を指向した新規オリゴヌクレオチドとして、5-(N-アミノヘキシル)カルバモイル基および 2'-O-メチル基を導入したウリジン誘導体 ($^N\text{U}_m$ ユニット)を含むオリゴヌクレオチド ($^N\text{U}_m$ オリゴマー)を合成し、 $^N\text{U}_m$ ユニットが 3'-endo 型配座を優先してとっていることを明らかにした。

2. $^N\text{U}_m$ オリゴマー/RNA 二本鎖の熱力学的安定性

RNA に対する親和性を二本鎖の 50%融解温度 (T_m 値)の測定より調べた。その結果、 $^N\text{U}_m$ オリゴマーは修飾体残基の導入数が 2-5 個の時に修飾体導入数の増加に伴って二本鎖が安定化する傾向が見られた (約 2 °C/修飾体)。一方、2'-O-メチル基を持たない 5-(N-アミノヘキシル)カルバモイルウリジン (^NU ユニット)を含む ^NU オリゴマーと RNA との二本鎖の T_m 値測定を行ったところ、同様の傾向を示した。そこで 5 位末端アミノ基が RNA との二本鎖形成に及ぼす効果を調べるため、 $^N\text{U}_m$ オリゴマー/RNA 二本鎖の T_m 値に対する塩濃度の影響を調べた。すると 5 位置換基の導入により、塩濃度の T_m 値に与える影響が減少していることを示した。また二本鎖の溶液中での高次構造を CD スペクトルから調べた。 $^N\text{U}_m$ オリゴマー/RNA 二本鎖では $^N\text{U}_m$ ユニットの導入数の増加に伴って A

型二本鎖構造に近づく傾向が観察されたが 2'-O-メチル基のみを有する U_m オリゴマーで T_m 値との相関を示さなかったことから、2'-O-メチル基の導入は RNA との二本鎖構造を A 型に近付ける傾向はあるものの、二本鎖安定化には関与しないことを明かにした。

3. ヌクレアーゼ抵抗性

3'-エキソヌクレアーゼとして snake venom phosphodiesterase (SVPD)を用いて $^N U_m$ オリゴマーのエキソヌクレアーゼ抵抗性を評価したところ、天然型 DNA と比較して 100 倍以上の高い抵抗性を示した。また $^N U_m$ ユニットの 5 位アミノ基をアセチル化したオリゴマーでも高い抵抗性を維持していたことから、 $^N U_m$ オリゴマーにおける 3'-エキソヌクレアーゼ抵抗性は主に 5 位置換基の立体障害によるものであることを明かにした。

DNase I を用いて $^N U_m$ オリゴマーのエンドヌクレアーゼ抵抗性を調べたところ、 $^N U_m$ ユニットの導入数が 4 個以上の時に高いエンドヌクレアーゼ抵抗性を示した (16-30 倍)。一方、 $^N U$ オリゴマーでは殆ど抵抗性を示さず、 U_m オリゴマーで 8 倍程度の抵抗性を示すことを確認した。

4. RNase H 活性誘導能

RNase H は DNA/RNA 二本鎖を基質とし RNA のみを切断するエンドヌクレアーゼである。 $(^N U_m$ ユニットを含む 2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド)-(DNA)-($^N U_m$ ユニットを含む 2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド)なるサンドイッチ構造を持つオリゴマー (gapmer)を用いて、内部に何個の DNA 残基を導入すれば RNA が効率的に切断されるか調べた。その結果、gap 数が 5 個以上では効率的に切断反応が進行することが明かとなった。切断反応の速度論的解析を行い、5 位末端アミノ基は RNase H の基質認識には影響を与えないものの酵素の触媒回転に大きな影響をもたらすことを示した。

5. X 線結晶構造解析

$^N U_m$ ユニットを含む Dickerson 型 DNA/DNA 二本鎖の X 線結晶構造解析を行った。二本鎖全体の構造は未修飾の二本鎖と大差は見られなかった。しかし 5 位置換基は結晶中で固定化されておらず、非常に柔軟な構造をとっていることが明かとなった。またヌクレオシド糖部立体配座の解析から予想された通り、二本鎖中で $^N U_m$ ユニットは実際に 3'-endo 型配座をとっていることが確認された。DNA/RNA モデルでも 5 位アミノ基はリン酸基と静電相互作用可能な距離まで接近が可能であったことから、RNA との二本鎖の熱的安定性に及ぼす 5 位置換基の効果が裏付けられた。

以上の結果は、アンチセンス法の基礎研究において極めて重要な知見であり、薬学博士の学位を授与するに値するものと判断した。