

学位論文題名

四本の水素結合を有する新規塩基対モチーフの設計

—1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドの合成と
イミダゾピリドピリミジンとの塩基対形成—

学位論文内容の要旨

【序論】

DNA 中の核酸塩基部は Watson-Crick 塩基対により厳密にその遺伝情報の保存・伝達を行っている他、塩基間の水素結合やそれらの重なりによるスタッキング効果、形の相補性によって DNA の熱的安定性や高次構造を維持している。近年、この塩基部に化学修飾を施すことによって機能性人工核酸の創製をめざした報告が数多くなされ、アンチセンス分子としての利用や遺伝暗号の拡張を目的とした人工塩基対の開発などが精力的に行われている。著者らの研究室でも人工塩基対の開発を目的として、これまでにプリン環の環拡張型ヌクレオシド誘導体である四本の水素結合能を有した四種の三環性のイミダゾピリドピリミジンヌクレオシド (Im-N^0 、 Im-O^N 、 Im-N^N 、 Im-O^0) の設計、合成を行っている。これらの内、 Im-O^N と Im-N^0 はヌクレオシドレベルで四本の水素結合による塩基対 ($\text{Im-O}^N\text{:Im-N}^0$) の形成が確認できたが、DNA オリゴマーに導入した場合、DNA 二本鎖の熱的安定性は導入様式に依存することが明らかとなった。これは、三環性同士から成る塩基対では、四本の水素結合形成やスタッキング効果による安定化効果とともに、プリン-プリン型塩基対に類似した塩基対を形成するためその導入により DNA 二本鎖構造に歪みを生じさせるという負の安定化効果も合わせ持つためであると考えた。

そこで著者は、導入様式に依存せず DNA 二本鎖構造を安定化できる第 2 世代塩基対 ($\text{Im-O}^N\text{:Na-N}^0$ 、 $\text{Im-N}^0\text{:NaO}^N$) の開発を目的としてピリミジン環の環拡張型ヌクレオシド誘導体である二種の二環性 1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシド (Na-O^N 、 Na-N^0) を設計した。これら両化合物は三環性ヌクレオシドと四本の水素結合により塩基対を形成でき、Watson-Crick 型プリン-ピリミジン塩基対に類似した塩基対を形成できるものと考えた。さらにこの塩基対は芳香環の広がりによるスタッキング効果も期待できる。本研究では、1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドの合成と DNA オリゴマー中での塩基対形成能、さらにこれら塩基対により熱的に安定化された DNA 二本鎖のデコイ分子としての応用について検討した。

【結果と考察】

ナフチリジン C-ヌクレオシドの合成

目的とする化合物は C-ヌクレオシドであり、塩基部と糖部をそれぞれ合成した後、Heck 反応を利用して縮合することにした。まず、2,6-ジアミノピリジンを出発原料としてナフチリジン体へと誘導した後、1 当量の NIS で処理し、アミノ基を保護することで Na-N^0 の塩基部に対応した 6-ヨード体を得た。また、ナフチリジン体を過剰量の NIS で処理し、アミノ基を保護して 3,6-ジヨード体とした後、パラジウム触媒存在下、水素化トリブチルスズによる位置選択的な還元により Na-O^N の塩基部に対応する 3-ヨード体を得ることができた。

6-ヨード体とグリカル体とを Heck 反応により縮合させ、得られたシリルエノール体の 3' 位シリル基の除去、カルボニル基の立体選択的な還元、塩基部の脱保護を経て目的とする Na-N^0 を得ることができた。また、3-ヨード体を用い同様に反応を行うことで、 Na-O^N を合成した。得られた両化合物は DNA オリゴマーに導入するため、塩基部

のアミノ基の保護、糖部 5'位水酸基の DMT 化を経て、それぞれのアミダイトユニットへと誘導した。

第2世代塩基対を含む DNA 二本鎖の熱的安定性

まず第2世代塩基対の塩基対形成能を評価するため、1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシド (Na-N^0 , Na-O^N) を三環性ヌクレオシド (Im-N^0 , Im-O^N) の相補的な位置に導入しその DNA 二本鎖の 50%融解温度 (T_m 値) を求めた。その結果、三環性同士から成る塩基対 ($\text{Im-O}^N:\text{Im-N}^0$) の場合とは異なり、第2世代塩基対 ($\text{Im-O}^N:\text{Na-N}^0$, $\text{Im-N}^0:\text{Na-O}^N$) を一塩基対導入した場合、DNA 二本鎖は天然型のものよりも熱的に安定化された。さらに連続または不連続で三塩基対導入した場合でもこれら塩基対は極めて高い安定化効果を示し、第2世代塩基対はその導入様式に関わらず DNA 二本鎖を熱的に安定化することが明らかとなった。

1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドのスタッキング効果

今回合成した Na-N^0 , Na-O^N は天然型のピリミジン塩基と比較して芳香環が拡張していることから、核酸塩基のスタッキング効果による DNA 二本鎖の安定化も期待される。そこで、ダングリングエンドに両塩基を導入した自己相補的なオリゴヌクレオチドの T_m 値を測定し、スタッキング能を評価した。その結果、両ナフチリジン塩基は天然型のプリン、ピリミジン塩基よりも高い T_m 値を示し、芳香環の拡張による高いスタッキング能を有していることが明らかとなった。以上の結果から、今回考案した第2世代塩基対は、その導入様式によらず四本の水素結合と強いスタッキング効果により DNA 二本鎖構造を著しく熱的に安定化することが明らかとなった。

1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドと天然型塩基との塩基対形成能

ナフチリジン塩基は天然型塩基とも塩基対を形成することが可能であるため、その塩基対形成能をナフチリジン塩基の相補的な位置に天然型塩基を導入した DNA 二本鎖を用いて T_m 値により評価した。その結果、A、G、C、T を相補塩基としたいいずれの場合もその T_m 値は天然型塩基対よりも低く、ナフチリジン塩基は相補的な三環性塩基とのみ熱的に極めて安定な塩基対を形成することが明らかとなった。

第2世代塩基対のデコイ分子への応用

第2世代塩基対は DNA 二本鎖構造を熱的に安定化することから、これら塩基対をデコイ分子に導入することにより、熱的に安定なデコイ分子を創製できるものと考えた。現在、このデコイ分子を利用した遺伝子治療が注目されているが、短鎖 DNA 二本鎖を用いることから、その熱的安定性を高めることが求められている。

本研究では NF- κ B タンパクを標的としたデコイ分子に第2世代塩基対を導入し、熱的に安定なデコイ分子の創製をめざした。そこで、配列の中央に NF- κ B 結合配列を有し、その両末端に第2世代塩基対 ($\text{Im-O}^N:\text{Na-N}^0$) を一塩基対ずつ導入したデコイ分子 (2- κ B)、二塩基対ずつ導入したデコイ分子 (4- κ B) を合成し、その熱的安定性や NF- κ B タンパクとの結合親和性について検討した。また、結合配列中に $\text{Im-O}^N:\text{Na-N}^0$ 塩基対を導入したデコイ分子 (3- κ B) を合成し、NF- κ B タンパクとの結合に及ぼす影響についても検討した。まず合成したデコイ分子の熱的安定性を T_m 値により評価したところ、第2世代塩基対の導入数の増加に伴い熱的安定性は向上し、両末端に二塩基対ずつ導入したデコイ分子 (2- κ B) では、DNA 二本鎖は天然型よりも熱的に極めて安定になることがわかった。次にデコイ分子の NF- κ B タンパクとの結合親和性を、評価したところ、合成した修飾デコイ分子 (2- κ B, 4- κ B) は天然型と同程度かそれ以上の結合親和性を示し、第2世代塩基対を両末端に導入した DNA 二本鎖は、有用なデコイ分子に成り得ることが示唆された。一方、結合配列中に第2世代塩基対を導入したデコイ分子 (3- κ B) は全く競合阻害せず、NF- κ B タンパクに認識されないことがわかった。

【結語】

- 1) 四本の水素結合能を有した新規 1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドを設計、合成した。
- 2) ナフチリジン塩基は相補的な三環性塩基とのみ特異的に塩基対を形成し、その塩基対は導入様式によらず DNA 二本鎖を熱的に安定化した。
- 3) 第2世代塩基対を導入した修飾デコイ分子は、熱的に安定化され、かつ転写因子と高い結合親和性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 南 川 典 昭
副 査 教 授 松 田 彰
副 査 助 教 授 紙 谷 浩 之
副 査 助 教 授 森 岡 弘 志

学 位 論 文 題 名

四本の水素結合を有する新規塩基対モチーフの設計

—1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドの合成と
イミダゾピリドピリミジンとの塩基対形成—

DNA 中の核酸塩基部は Watson-Crick 塩基対により厳密にその遺伝情報の保存・伝達を行っている他、塩基間の水素結合やそれらの重なりによるスタッキング効果、形の相補性によって DNA の熱的安定性や高次構造を維持している。近年、この塩基部に化学修飾を施すことによって機能性人工核酸の創製をめざした研究が数多く報告され、人工塩基対の開発などが精力的に行われている。我々の研究室でも人工塩基対の開発を目的として、これまでにプリン環の環拡張型ヌクレオシド誘導体である四本の水素結合能を有した四種の三環性のイミダゾピリドピリミジンヌクレオシド (Im-N^0 , Im-O^N , Im-N^N , Im-O^0) の設計、合成を行ってきた。これらの中で、相補的な Im-O^N と Im-N^0 はヌクレオシドレベルで四本の水素結合による塩基対 ($\text{Im-O}^N:\text{Im-N}^0$) の形成が確認できたが、DNA オリゴマーに導入した場合、DNA 二本鎖の熱的安定性は導入様式に依存することが明らかとなった。これは、三環性塩基対を DNA 二本鎖に導入した場合、形成される塩基対はプリン-プリン型塩基対に類似するため、四本の水素結合やスタッキング効果による安定化効果と同時に形の相補性が崩れるという負の安定化効果も働いたためであると考えられた。

足島貞雄は以上の研究結果を踏まえ、導入様式に依存せず DNA 二本鎖構造を熱的に安定化できる人工塩基対の開発を目的とし、三環性塩基と相補的なピリミジン環の環拡張型ヌクレオシド誘導体である二種の二環性 1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシド (Na-O^N , Na-N^0) を設計した。これら両化合物は三環性ヌクレオシドと四本の水素結合による相補的な塩基対形成が可能であり、さらにプリン-ピリミジン塩基対に類似した塩基対を形成できるものと考えた。

1) 1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドの合成

チミジンより容易に誘導できるグリカル体を共通の糖部ユニットとした。また塩基部ユニットとして Na-N^0 については 6-ヨード 1,8-ナフチリジン体を、 Na-O^N については 3-ヨード 1,8-ナフチリジン体を、2-アミノ-7-ヒドロキシ-1,8-ナフチリジンを共通の原料として合成した。続いてそれぞれのモノヨード体とグリカル体とを

Heck 反応により縮合させた後、種々変換することで Na-N^0 、 Na-O^N を合成した。

2) 1,8-ナフチリジン C-ヌクレオシドの DNA オリゴマー中での塩基対形成能

i) まず、三環性塩基とナフチリジン塩基とから成る塩基対 (第 2 世代塩基対) の塩基対形成能を評価するため、これらを導入した DNA 二本鎖の 50%融解温度 (T_m 値) を求めた。

その結果、三環性塩基対 ($\text{Im-O}^N:\text{Im-N}^0$) の場合とは異なり、第 2 世代塩基対 ($\text{Im-O}^N:\text{Na-N}^0$ 、 $\text{Im-N}^0:\text{NaO}^N$) を一塩基対導入した場合でも DNA 二本鎖は天然型のものよりも熱的に安定化された。さらに連続または不連続で三塩基対導入した場合にはいずれの場合も相加的な安定化効果がみられ、第 2 世代塩基対はその導入様式に関わらず DNA 二本鎖を熱的に安定化することを明らかにした。

ii) 次に、スタッキング能を評価するためダングリングエンドにナフチリジン塩基を導入した自己相補的なオリゴヌクレオチドの T_m 値を測定した。その結果、両塩基は天然型のプリン、ピリミジン塩基よりも高い T_m 値を示し、芳香環の拡張による高いスタッキング能を有していることを明らかにした。

iii) ナフチリジン塩基は天然型塩基とも安定な塩基対を形成することが予想されたため、その塩基対形成能をナフチリジン塩基の相補的な位置に天然型塩基を導入した DNA 二本鎖を用いて T_m 値により評価した。その結果、A、G、C、T を相補塩基としたいずれの場合もその T_m 値は天然型塩基対よりも低く、ナフチリジン塩基は相補的な三環性塩基とのみ熱的に極めて安定な塩基対を形成することが明らかにした。

以上の結果から第 2 世代塩基対は、1) 四本の水素結合、2) 強いスタッキング効果、3) 形の相補正の 3 つの因子により DNA 二本鎖構造を著しく熱的に安定化することを明らかにした。

3) 第 2 世代塩基対のデコイ分子への応用

熱的に安定な NF- κ B デコイ分子の創製を目的として、配列の中央に NF- κ B 結合配列を有し、その両末端に第 2 世代塩基対 ($\text{Im-O}^N:\text{Na-N}^0$) を導入した新規デコイ分子を合成し、その熱的安定性や NF- κ B タンパクとの結合親和性について調べた。その結果、合成したデコイ分子の熱的安定性は第 2 世代塩基対の導入数の増加に従い向上し、また NF- κ B タンパクとの結合親和性は天然型と同程度かそれ以上の結合親和性を示した。この結果により第 2 世代塩基対を両末端に導入した DNA 二本鎖は、有用なデコイ分子に成り得ることを示唆した。

以上の研究成果は、DNA 二本鎖の熱的安定性に関わる因子の重要性を明らかにしたものであり、人工塩基対の創製研究に大いに寄与するものである。また設計した新規塩基対を利用した修飾デコイ分子の創製を行ったことも大いに評価でき、薬学博士の学位を授与するに十分値するものと判断した。