

## 学位論文題名

## 4'-チオ DNA の性質解明と機能性人工核酸への展開

## 学位論文内容の要旨

## [序論]

機能性人工核酸とは化学的修飾を施した核酸に様々な機能を付与したものであり、それらを利用した核酸医薬や新解析技術の開発が現在盛んに行なわれている。一般に核酸は核酸分解酵素により速やかに分解されるため機能性人工核酸の設計においては、いかにして分解されにくい修飾体を設計するかが重要となる。しかし、過度の修飾は核酸分子が本来持つ二本鎖形成能や酵素による認識能の低下という負の効果をもたらす。そこで、著者はフラノース環内酸素原子の硫黄原子への置換という、最小限の修飾をほどこした 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドを設計した。これらを含む 4'-チオ DNA の合成はすでになされており、RNA に対する高いハイブリダイゼーション能や核酸分解酵素に対する安定性が示されている。しかし、ヌクレオシドユニットである 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドの合成の困難さから完全修飾の 4'-チオ DNA は合成されておらず、その後の詳細な研究はまったくなされていない。これらの事実を踏まえ、本研究では 4'-チオ DNA の合成、性質解明と機能性人工核酸への展開を目的とした。

## [結果と考察]

## I. 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドの合成と性質

2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドは 4'-チオリボヌクレオシドの 2' 位水酸基のデオキシ化により合成することにした。まず 5-メチル-4'-チオウリジン誘導体をチオカーボネート体へと変換後、加熱条件下ラジカル還元反応を行なった。しかし、この条件下では目的とする 2' 位デオキシ体が 48% の収率でしか得られず、C-S 結合が開裂した副生成物が 35% 生成した。そこで、より温和な条件でデオキシ化するために、まず 2,2'-アンヒドロチミジン誘導体を経由し 2'-ブromo-4'-チオチミジン誘導体を合成した。続いて、室温でラジカルを発生する V-70L を用いラジカル還元反応を行なったところ、2'-デオキシ-4'-チオチミジン誘導体を高収率で得ることに成功した。同様の合成法により他の 3 種の 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドについても合成した。この方法により、各ヌクレオシドユニットをグラムスケールで合成することが可能となった。

## II. 4'-チオ DNA の性質

合成した 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドを用いて DNA 自動合成機により 4'-チオ DNA を化学的手法により合成した。合成した 15 mer の 4'-チオ DNA 二本鎖について熱的安定性の指標である 50% 融解温度 ( $T_m$  値) を調べた。その結果、4'-チオ DNA 二本鎖は天然型 DNA 二本鎖と比較し、 $T_m$  値が上昇し (DNA: 55.7°C, 4'-チオ DNA: 65.2°C)、天然型 RNA 二本鎖と同等の熱的安定性を持つことも明らかとなった (RNA: 66.2°C)。次に核酸分解酵素である DNase I (エンドヌクレアーゼ) に対する天然型 DNA 二本鎖と 4'-チオ DNA 二本鎖の抵抗性を調べた。その結果、DNA 二本鎖の半減期はわずか 3.3 分であった。一方、4'-チオ DNA 二本鎖の半減期は 24 時間以上となり、DNA 二本鎖と比較し 400 倍以上という驚異的な核酸分解酵素に対する抵抗性を持つことが明らかとなった。このような結果が得られたのは 4'-チオ DNA 二本鎖が DNA 二本鎖とその高次構造が大きく異なっているためではないかと考えた。

そこで次に二本鎖核酸の高次構造を調べるため、円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定した。その結果、4'-チオ DNA 二本鎖のスペクトルは B 型構造をとる天然型 DNA 二本鎖のスペクトルとは大きく

異なり、A 型構造をとる RNA 二本鎖のスペクトルと類似していることが明らかとなった。4'-チオ DNA 二本鎖に関し、さらなる構造学的知見を得るために RNA 二本鎖特異的核酸分解酵素である RNase V<sub>1</sub> を用いた競合阻害実験を行なった。実験の結果、RNA 二本鎖は RNase V<sub>1</sub> 存在下速やかに分解された(半減期 :1.8 分)。一方、この結果とは対照的に、阻害剤として 4'-チオ DNA 二本鎖を加えた場合は RNA 二本鎖の半減期が 8.2 分まで延長し、4'-チオ DNA 二本鎖が RNA 二本鎖切断反応の阻害剤となることが示された。このことは 4'-チオ DNA 二本鎖が RNase V<sub>1</sub> に RNA 二本鎖として認識されたことを示している。これらの実験の結果から、4'-チオ DNA 二本鎖は 2'位の水酸基がない DNA 誘導体であるにもかかわらず、A 型構造をとる RNA 二本鎖と類似した高次構造を持つという特異的な性質を持つことを明らかとした。

### III. DNA ポリメラーゼによる 4'-チオ DNA の酵素的合成

4'-チオ DNA 二本鎖は高い熱的安定性とヌクレアーゼに対する抵抗性を持ち、4'-チオ DNA は機能性人工核酸としての資質を有していることを明らかとなった。そこで、著者は機能性人工核酸への展開研究として 4'-チオ DNA アプタマーの獲得を計画した。アプタマーとはある特定の分子に特異的に結合する核酸分子のことであり、SELEX と呼ばれる手法によって獲得される。4'-チオ DNA アプタマーを SELEX により獲得するには 4'-チオ DNA を酵素により増幅する必要がある。そこで著者は 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドトリリン酸体 (dtNTP) を合成し、まず DNA ポリメラーゼによる dtNTP の取り込み反応に関する基礎的研究を行うこととした。合成した dtNTP を用い、DNA からなるテンプレート、プライマー複合体に対し、様々な DNA ポリメラーゼによる 4'-チオ DNA の鎖伸長反応の検討を行なった。その結果、Taq DNA ポリメラーゼなどの A ファミリーに属する DNA ポリメラーゼでは鎖伸長反応がほとんど進行しなかった。一方、Therminator DNA ポリメラーゼや KOD Dash DNA ポリメラーゼなどの B ファミリーに属する DNA ポリメラーゼを用いると効率よく鎖伸長反応が進行することが明らかとなった。

dtNTP を用いた定常状態速度論解析を行なった結果、A ファミリーでは  $K_m$  値の増大が原因となり 4'-チオ DNA の鎖伸長反応が進行しないことが明らかとなった。一方、B ファミリーではそのような傾向は観察されず、効率よく 4'-チオ DNA の鎖伸長反応が進行することが明らかとなった。

次に dtNTP を用いた PCR による 4'-チオ DNA の増幅反応の検討を行った。前述の鎖伸長反応で比較的効率よく反応が進行した KOD Dash DNA ポリメラーゼを用いて PCR を行った。種々反応条件を検討した結果、1 種類または 2 種類の dtNTP を天然型 dNTP と置換した系では PCR が進行し、4'-チオ DNA を含む DNA が得られた。しかし、それ以上 dtNTP を増やすと PCR の効率性は低下した。

これまでの実験結果から 4'-チオ DNA は天然型 DNA をテンプレートとした鎖伸長反応を行なうことは可能であるが、4'-チオ DNA を PCR により直接増幅することは困難であることが明らかとなった。以上の結果を踏まえ、4'-チオ DNA を PCR により直接増幅する必要のないサイクルで 4'-チオ DNA アプタマーの獲得を行なうことにした。種々検討の結果、4'-チオ DNA を SELEX へ適用可能なことを確認し、4'-チオ DNA アプタマー獲得の方法論を確立した。

#### [結語]

- ・ 2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドを効率的に合成することに成功した。
- ・ 4'-チオ DNA を化学的に合成し、高いハイブリダイゼーション能と、ヌクレアーゼに対する抵抗性を持つことを明らかとし、さらに 4'-チオ DNA は RNA に類似した構造を持つことを明らかとした。
- ・ dtNTP の速度論的解析を行ない、それらを用いて DNA ポリメラーゼによる鎖伸長反応を行なうことで 4'-チオ DNA を酵素的に合成することに成功した。
- ・ 4'-チオ DNA アプタマー獲得の方法論を確立した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 彰  
副 査 教 授 周 東 智  
副 査 助 教 授 紙 谷 浩 之  
副 査 助 教 授 南 川 典 昭

## 学位論文題名

### 4'-チオ DNA の性質解明と機能性人工核酸への展開

機能性人工核酸とは核酸に化学的修飾を施し様々な機能を付与したものであり、それらを利用した核酸医薬や新解析技術の開発が盛んに行なわれている。一般にヌクレアーゼにより速やかに分解されるために機能性人工核酸の設計では、いかにして酵素耐性を持たせるかが重要となる。しかし、過度の修飾は核酸分子本来の二本鎖形成能や酵素による認識能を低下させる。そこで、著者はフラノース環内酸素原子を硫黄原子へ置換し、最小限の修飾を施した 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシド (dsN) を設計した。本研究では完全修飾型 4'-チオ DNA の合成、性質解明と機能性人工核酸への応用を目的とした。

#### 1. 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドの合成と性質

dsN は 4'-チオリボヌクレオシドの 2' 位水酸基のデオキシ化により合成した。まず 2,2'-アンヒドロチミジン体を経由し 2'-プロモ-4'-チオチミジン体を合成した。続いて、V-70L を用いラジカル還元を行ない、2'-デオキシ-4'-チオチミジン (dsT) 体を高収率で得た。同様の合成法で他の 3 種の dsN も合成した。

#### 2. 4'-チオ DNA の性質

合成した dsN を用いて 4'-チオ DNA (15mer) を化学的に合成した。4'-チオ DNA 二本鎖の熱的安定性を調べたところ、天然型 DNA 二本鎖と比較し、 $T_m$  (50%融解温度) 値が上昇し (DNA: 55.7 °C, 4'-チオ DNA: 65.2 °C)、天然型 RNA 二本鎖とほぼ同等の熱的安定性を示した (RNA: 66.2 °C)。次に核酸分解酵素である DNase I (エンドヌクレアーゼ) に対する抵抗性を調べた。その結果、DNA 二本鎖の半減期は 3.3 分であった。一方、4'-チオ DNA 二本鎖の半減期は 24 時間以上となり、400 倍以上の抵抗性を示した。このような結果が得られたのは両者の高次構造の違いが原因ではないかと考えた。

そこで円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定した。4'-チオ DNA 二本鎖のスペクトルは B 型構造をとる天然型 DNA 二本鎖のスペクトルとは大きく異なり、むしろ A 型構造をとる RNA 二本鎖のスペクトルと類似していた。4'-チオ DNA 二本鎖に関し、さらなる構造的知見を得るために RNA 二本鎖特異的核酸分解酵素である RNase V<sub>1</sub> を用いた競合阻害実験を行なった。実験の結果、RNA 二本鎖は RNase V<sub>1</sub> 存在下速やかに分解された (半減期: 1.8 分) が、4'-チオ DNA 二本鎖を加えた場合は RNA 二本鎖の半減期が 8.2 分まで延長し、4'-チオ DNA 二本鎖が RNA 二本鎖切断反応の阻害剤となることが示された。これらの実験結果から、4'-チオ DNA 二本鎖は 2' 位の水酸基がない DNA 誘導体であるにもかかわらず、A 型構造をとる RNA 二本鎖と類似した高次構造を持つ

ことを明らかとした。

### 3. DNA ポリメラーゼによる 4'-チオ DNA の酵素的合成

4'-チオ DNA 二本鎖は高い熱的安定性とヌクレアーゼに対する抵抗性を示し、機能性人工核酸として応用できる可能性がある。そこで、4'-チオ DNA アプタマーの獲得を計画した。アプタマーとはある特定の分子に特異的に結合できる核酸分子であり、SELEX 法により獲得できる。そのためには 4'-チオ DNA を酵素により増幅する必要がある。最初に 2'-デオキシ-4'-チオリボヌクレオシドトリリン酸体 (dsNTP) を合成し、まず DNA ポリメラーゼ(pol)による dsNTP の取込みに関する基礎的研究を行なった。合成した dsNTP を用い、天然型 DNA からなるテンプレート、プライマー複合体に対し、様々な DNApol による鎖伸長反応を検討した。その結果、Taq DNApol などの A ファミリーに属する DNApol では鎖伸長反応がほとんど進行しなかった。一方、Therminator DNApol や KOD Dash DNApol などの B ファミリーに属する DNApol を用いると効率よく鎖伸長反応が進行した。

次に dsNTP を用いた PCR による 4'-チオ DNA の増幅反応を検討した。前述の鎖伸長反応で比較的効率よく反応が進行した KOD Dash DNApol を用いて PCR を行った。種々反応条件を検討した結果、1 種類または 2 種類の dsNTP を天然型 dNTP と置換した系では PCR が進行し、4'-チオ DNA を含む DNA が得られた。しかし、それ以上 dsNTP の種類を増やすと PCR の効率は低下した。

以上の結果を踏まえ、核酸増幅反応を天然型 DNA で行ない、鎖伸長反応を 4'-チオ DNA で行なう SELEX 法を考案した。条件を種々検討し、SELEX へ適用可能なことを確認し、4'-チオ DNA アプタマー獲得の方法論を確立した。

論文発表に続いて発表内容を中心として関連のある専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識、また核酸の構造や機能など多岐に亘った。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。

提出された学位論文に含まれる研究成果は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、猪上尚徳氏を博士(薬学)の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。