

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	2-N-ヘテロアリールグアニンおよび α -ヌクレオシドが高次構造形成に与える影響およびトリアゾリルリン酸構造を有する人工核酸の合成
Title(English)	Effects of 2-N-heteroarylguanine and α -deoxynucleoside residues on DNA higher-order structures, and synthesis of oligodeoxynucleotides having triazolylphosphonate backbone
著者(和文)	印出健志
Author(English)	Takeshi Inde
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10736号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,大窪 章寛,林 宣宏,相澤 康則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10736号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	分子生命科学	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（ 理学 ）
学生氏名： Student's Name	印出 健志		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	清尾 康志	
			指導教員（副）： Academic Supervisor (sub)		

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

DNA は生体内で二重鎖、三重鎖、四重鎖などの高次構造を形成することで生体内での機能を発現する。そのため、損傷塩基や修飾核酸の化学合成法、およびそれらの高次構造安定性に対する影響に関する研究は、DNA の損傷が DNA 自体の機能にもたらす変化を知るだけでなく、核酸医薬に対する適切な化学修飾構造を知る上で非常に重要である。本博士論文は 3 章から成り、第 1 章および第 2 章では塩基部における芳香族複素環修飾の影響を、第 3 章ではリン酸部における芳香族複素環修飾体の合成法について、それぞれ研究を行った。

第 1 章では 2-*N*-ヘテロアリアルグアニン (G^{H^A}) を有するオリゴデオキシヌクレオチド(オリゴヌクレオチド)の高次構造形成について研究を行った。2 位のアミノ基に変異原生物質が付加したグアニン塩基は損傷塩基の 1 つであり、その一部は生体内に長く留まることが知られている。そのため、これらの損傷グアニンの性質は、損傷塩基が転写や複製などの生体機能に与える影響を考える上で重要である。そこで著者は、損傷グアニン塩基のモデル化合物としてアミノ基にビリジン、ピリミジン、ピラジン環などを有する G^{H^A} を用い、その高次構造形成への影響を二重鎖、パラレル型三重鎖、グアニン四重鎖について測定した。

はじめに、ヘテロアリアル環の位置によって生じる 2 つのコンホメーション、closed-type および open-type コンホメーションの安定性を DFT 計算により算出した。その結果、 G^{H^A} -C 塩基対形成に必要な open-type コンホメーションの安定性は修飾構造によって大きく異なることが示唆された。つづいて、Buchwald-Hartwig 反応を用いて G^{H^A} のヌクレオシド誘導体を合成し、続いてホスホロアミダイトユニットおよび G^{H^A} を含むオリゴヌクレオチドを合成した。得られたオリゴヌクレオチドを用いて二重鎖の安定性を熱融解温度 (T_m) 測定により求めた結果、open-type が安定である G^{H^A} を含むオリゴヌクレオチドはより安定な二重鎖を形成することが判明した。つぎに、パラレル型三重鎖の安定性を T_m 測定により求めた結果、 G^{H^A} を三重鎖形成核酸 (TF0) に含む DNA 三重鎖は未修飾のものと比較して不安定化することが分かった。最後に、 G^{H^A} を含むグアニン四重鎖形成配列による高次構造形成を T_m 測定により評価した結果、open-type が安定である G^{H^A} を含む四重鎖形成配列はより安定な高次構造を形成することが分かった。

以上の結果から、 G^{H^A} を含む DNA 二重鎖およびグアニン四重鎖の安定性は、 G^{H^A} の open-type コンホメーションの安定性を計算することで予測可能であることが示唆された。また二重鎖を不安定化する損傷グアニン塩基はグアニン四重鎖も不安定化する可能性が示された。

第 2 章では、 α -デオキシヌクレオシドを含むアンチパラレル型三重鎖形成核酸の性質について研究を行った。三重鎖形成核酸 (TF0) はゲノム二重鎖 DNA に結合して三重鎖を形成する。この TF0 は遺伝子発現抑制や相同組み替えなどへの応用が期待されているが、その標的配列は G および A から成るホモプリン配列に限られている。これまでに天然型塩基を有する α -デオキシヌクレオシドをアンチパラレル型 TF0 に用いることで標的配列の拡大が試みられてきたが、その三重鎖安定性や標的選択性についての検討は不十分だった。そこで著者は、 α -デオキシアデノシン、 α -デオキシグアノシン、 α -デオキシシチジン、 α -デオキシチミジンを含むアンチパラレル型 TF0 をそれぞれ合成し、ゲル電気泳動を用いて三重鎖形成能と配列選択性を網羅的に評価した。その結果、これまでに報告例のない三塩基対を含む三重鎖が形成可能であることを見出した。また、比較的安定であった三重鎖について分子動力学計算を行い、 α -デオキシヌクレオシドを含む三塩基対の結合様式を考察した。その結果、TF0 のリン酸バックボーンの歪みなどが三重鎖安定性に寄与していることが示唆された。

第 3 章では、リン酸部にトリアゾールを導入した人工核酸の合成を行った。これまでにリン酸部の非架橋性酸素原子をトリアゾールに置換したトリアゾリルホスホネートを有するオリゴヌクレオチドが細胞取り込み能を有することが報告されており、トリアゾリルホスホネート構造は薬理動態の優れた核酸医薬の開発に向けて非常に興味深い。そこで著者はトリアゾリルホスホネート核酸の性質をより深く追求するため、その誘導体としてリン酸部の架橋性酸素原子をトリアゾールに置換した誘導体の合成を行った。はじめにトリアゾリルホスホネートを含む二量体ホスホロアミダイトユニットの合成を試みた。修飾部位の保護基としてシアノエチル基を用いた場合安定性が不十分であったが、1-ナフチルメチル基を用いることで、ホスホロアミダイトユニットの合成および単離精製することに成功した。今回、7 種類の配列を有する二量体の合成に成功した。また得られたホスホロアミダイトユニットを用いて、目的の修飾を 5 カ所含む 2 2 量体オリゴヌクレオチドを合成し、1-ナフチルメチル基が通常の脱保護条件下で脱保護可能であることを見出した。これらの結果から、トリアゾリルホスホネートを配列中の様々な箇所を含む修飾オリゴヌクレオチドの合成が可能になり、また核酸医薬への応用を目指した様々な研究が可能になった。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： 分子生命科学 専攻
Department of
学生氏名： 印出 健志
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (理学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)： 清尾 康志
Academic Supervisor(main)
指導教員(副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Biological functions of DNAs are based on their higher-order structures, such as duplex, triplex and quadruplex. Therefore, it is crucial to study on the higher-order structure stabilities of damaged/modified oligodeoxynucleotides in order to understand properties of damaged/modified DNAs. In this thesis, I studied the synthetic method and higher-order structure stabilities of three kinds of chemically damaged/modified oligodeoxynucleotides.

Firstly, I studied the effect of guanine 2-*N*-adduct on DNA higher order structure by using four different 2-*N*-heteroaryl guanines (G^{HA} s) as model compounds. Stabilities of two possible conformations of G^{HA} s were calculated by density functional theory. Then, the higher order structure stabilities of duplex, parallel-oriented triplex and G-quadruplex containing G^{HA} s were evaluated by measuring their melting temperatures (T_m s). T_m experiments showed that stabilities of duplex and quadruplex were related to the relative stability of the G^{HA} 's conformation called open-type conformation, which suggests that stabilities of duplex and quadruplex containing a guanine 2-*N*-adduct could be anticipated by calculating the relative stability of open-type conformation.

Secondly, I studied the possibility of α -deoxynucleosides to expand the target sequence of triplex-forming oligonucleotides (TFOs) which can bind to DNA duplex to form antiparallel-oriented DNA triplex. TFOs containing single modification of α -deoxyadenosine, α -deoxyguanosine, α -deoxycytidine or α -thymidine were synthesized, and their target sequence specificity was measured by gel shift assays. The comprehensive measurement showed that α -nucleosides could also target other base pairs than previously reported. Further structural study using molecular dynamics suggested that the nucleobase triplet containing alpha-nucleoside could be stable in antiparallel-oriented DNA triplex.

Thirdly, I developed the synthetic method of chemically modified oligodeoxynucleotides containing triazolyolphosphonate backbone, which have a possibility to penetrate cell membrane, therefore could be used for nucleic acid drug. I have successfully synthesized the phosphoramidite dimer units and oligodeoxynucleotides by using 1-naphthylmethyl group as protective group. The method developed here enables to elucidate the properties of modified oligodeoxynucleotides such as duplex stability, nuclease resistance and cell membrane permeability toward clinical applications.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).