

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                            |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            | 塩基部を窒素含有芳香環で修飾した新規三重鎖形成核酸の開発                                                                                                                                               |
| Title(English)    |                                                                                                                                                                            |
| 著者(和文)            | 伊藤優                                                                                                                                                                        |
| Author(English)   | Yu Ito                                                                                                                                                                     |
| 出典(和文)            | 学位:博士(理学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第10080号,<br>授与年月日:2016年3月26日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,一瀬 宏,林 宣宏,大窪 章寛,関根 光雄                                                |
| Citation(English) | Degree;<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第10080号,<br>Conferred date:2016/3/26,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文)          | 博士論文                                                                                                                                                                       |
| Category(English) | Doctoral Thesis                                                                                                                                                            |
| 種別(和文)            | 要約                                                                                                                                                                         |
| Type(English)     | Outline                                                                                                                                                                    |

# 塩基部を窒素含有芳香環で修飾した

## 新規三重鎖形成核酸の開発

伊藤 優 指導教員 清尾 康志 准教授

三重鎖形成核酸(Triplex Forming Oligonucleotide: TFO)は、DNA 二重鎖の major groove 側に沿って結合することで配列特異的に三重鎖構造を形成するオリゴヌクレオチドである。その性質から TFO には、アンチジーン法やナノテクノロジーへの応用が期待されている。しかし、TFO には応用を妨げる 2 つの問題がある。1 つは、天然型核酸塩基のみを含む三重鎖構造の熱安定性は、ワトソン-クリック型 DNA 二重鎖のそれに比べ低い安定性の問題である(Figure 1-a)。2 つめは、TFO が結合できる配列が主鎖にグアニン (Gua) やアデニン (Ade) が連続する配列に限られる配列制限の問題である(Figure 1-b)。これは、Figure 1-c に示すように主鎖を Ade あるいは Gua とした場合のみ、チミン (Thy) あるいはシトシン (Cyt) と安定な Hoogsteen 塩基対を形成できるからである。

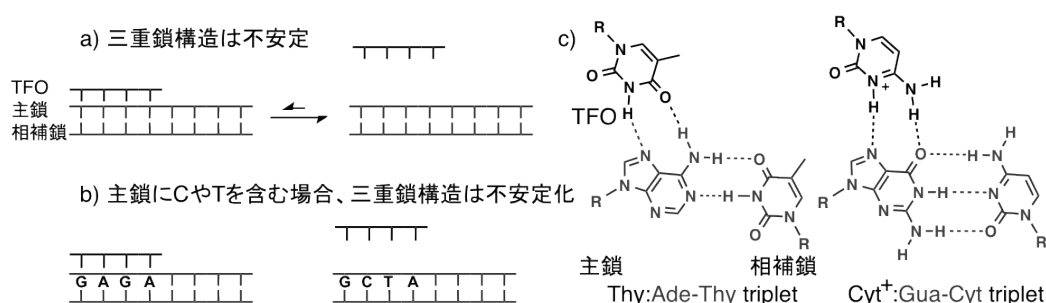
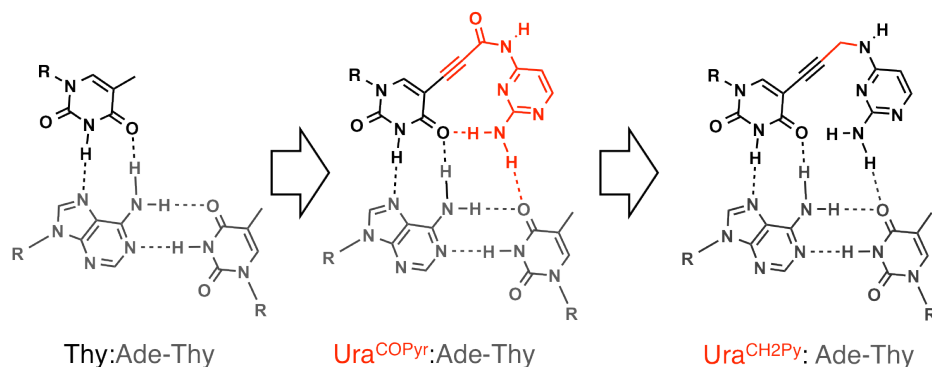


Figure 1. 天然型核酸で構成された核酸三重鎖の問題点

これらの問題を克服し、TFO を用いた応用技術を実現するための研究が積極的に行なわれている。そこで、著者はこれらの問題を人工核酸塩基の設計と合成により解決するための研究に着手した。

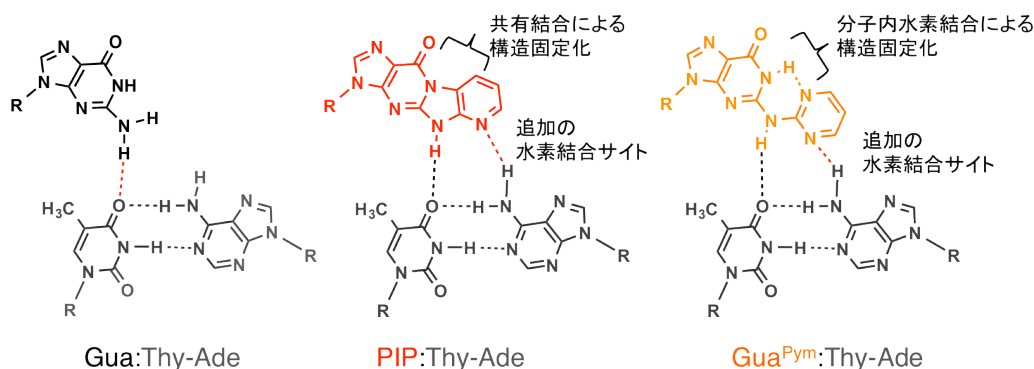
第一章では、三重鎖構造の安定性の問題を克服するために人工核酸塩基の開発をおこなった。天然型核酸塩基のみを含む三重鎖構造が不安定な原因の 1 つに、Thy:Ade-Thy triplet が、Cyt<sup>+</sup>:Gua-Cyt triplet よりも不安定なことが挙げられる<sup>1</sup>。この問題は、Ade-Thy 塩基対と安定な triplet 構造を形成する人工核酸塩基の開発により解決できると考えた。そこで、N-(4-アミノピリミジン-2-イル)-3-(ウラシル-5 イル)プロピオールアミド(Ura<sup>COPYr</sup>)を設計した。Ura<sup>COPYr</sup> の合成は達成したが、形成したアシル部

位は不安定であり、容易に分解することが分かった。そこで、より安定性を向上させた 5-[3-(2-アミノピリミジン-4-イル)アミノプロピン-1-イル]-ウラシル(Ura<sup>CH<sub>2</sub>Pyr</sup>)を設計し、そのホスホロアミダイト誘導体とそれを含む TFO の合成を達成した。この TFO の三重鎖形成能を三重鎖融解温度( $T_m$ )にて評価した結果、Ura<sup>CH<sub>2</sub>Pyr</sup> は著しく三重鎖構造を安定化することを明らかにした。



**Figure 2.** 第一章で設計した Ade-Thy 塩基対を認識する人工核酸塩基

第二章では、配列制限の問題に取り組んだ。TFO の結合できる配列が Gua や Ade が連続する場合に限られる原因は、Cyt-Gua 塩基対あるいは Thy-Ade 塩基対を選択的に認識する天然型核酸塩基がないためである。Cyt-Gua 塩基対と安定な塩基対を形成する人工塩基として、Seidman らや著者らのグループは、4-グアニドエチル-シトシンを報告している。そこで、この章では Thy-Ade 塩基対を含む二重鎖 DNA と結合できる人工核酸塩基の開発を検討した。設計にあたり著者は、選択性が低く、三重鎖構造は不安定なものの Gua が Thy-Ade 塩基対に対して結合することに注目した<sup>2</sup>。不安定な原因は、Thy には水素結合サイトが 4 位のカルボニル基一カ所しかないことが原因であると考えた。そこで、Thy と相補的な位置にある Ade にも注目し、Thy-Ade 塩基対を認識する人工核酸塩基の設計をおこなった。1 つ目は、ピリド[2',3':4,5]イミダゾ[1,2-a]プリン-10-オン (PIP) である。2 つ目は、2-N-ピリミジニル-グアニン (Gua<sup>Pym</sup>) である (Figure 3)。



**Figure 3.** 第二章で設計した Thy-Ade 塩基対を認識し結合する人工核酸塩基

PIP は Gua の 2-*N*-アミノ基とピリジン 2 位、*N*<sup>1</sup>-イミノ基とピリジン 3 位とのアリール化反応により合成する。前者に関してはアリール化条件を見いだした。しかし、後者に関しては、アリール化条件を見いだせなかった。そこで、PIP の合成を断念し、PIP の合成で見いだした 2-*N*-アミノ基とピリジン 2 位のアリール化反応を用いて、Gua<sup>Pym</sup> の合成をおこない、そのホスホロアミダイト誘導体とそれを含む TFO の合成を達成した。この TFO の三重鎖形成能を三重鎖融解温度(*T*<sub>m</sub>)にて評価した結果、Gua<sup>Pym</sup> は母格である Gua よりも僅かではあるが、Thy-Ade 塩基対を安定化することが分かった。

#### 「参考論文」

1. Keppler, M. D.; Fox, K. R. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4644
2. Yoon, K.; Hobbs, C. A.; Koch, J.; Sardaro, M.; Kutny, R.; Weis, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3840.

#### 「論文発表」

1. Ito, Y.; Masaki, Y.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. "Synthesis of 5-[3-(2-aminopyrimidin-4-yl)aminopropyn-1-yl]uracil derivative that recognizes Ade-Thy base pair in double-stranded DNA" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 194.
2. Ohkubo, A.; Yamada, K.; Ito, Y.; Yoshimura, K.; Miyauchi, K.; Kanamori, T.; Masaki, Y.; Seio, K.; Yuasa, H.; Sekine, M. "Synthesis and triplex-forming properties of oligonucleotides capable of recognizing corresponding DNA duplexes containing four base pairs." *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 5675.

#### 「学会発表」

1. 伊藤優、大窪章寛、山田健司、吉村貴一、金森功吏、正木慶昭、清尾康志、関根光雄、「T-A, C-G 塩基対を含む配列で認識可能な新規人工三重鎖形成核酸の合成」、第 23 回アンチセンスシンポジウム、徳島、2013 年 11 月、口頭およびポスター
2. 伊藤優、山田健司、正木慶昭、金森功吏、清尾康志、関根光雄、「5-[3-(2-アミノピリミジン-4-イル)アミノプロピン-1-イル]-2'-デオキシウリジン誘導体の合成と性質」、第 95 春季年会、船橋、2015 年 3 月、ポスター
3. Ito, Y.; Kanamori T.; Masaki Y.; Ohkubo A.; Seio K.; Sekine, M. "Synthesis of deoxyuridine derivatives modified with 2,4-diaminopyrimidine moiety for the development of high affinity triplex forming oligonucleotides" Himeji, October 2015, Oral