

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	塩基部に光分解性保護基を有するデオキシシュードウリジン三リン酸の化学合成および化学修飾核酸の酵素合成法の開発
Title(English)	
著者(和文)	竹下玲央
Author(English)	Leo Takeshita
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11395号, 授与年月日:2020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,一瀬 宏,林 宣宏,大窪 章寛
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11395号, Conferred date:2020/3/26, 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

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	竹下 玲央		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)

化学修飾核酸は、天然の核酸(DNA, RNA)と比較して高い分解耐性を有することや、天然の核酸が持たない化学的性質を付与できることから、核酸医薬や分子生物学などへの応用がおこなわれている。化学修飾核酸は天然の核酸とは異なる構造であるため、ホスホアミダイト法を用いた化学合成法によって作成される。核酸の合成法には他にもポリメラーゼを用いる酵素合成法があるが、こちらは化学合成法と比較して長鎖核酸の合成に適していることや、PCR による増幅や SELEX によるアプタマーの開発にも適応可能であり、更に化学合成法と比較して高価な核酸自動合成機を必要としないためバイオ系の研究室でも簡便に作成可能といった利点があるが、一方でポリメラーゼの基質特異性が高く、化学修飾されたヌクレオシド三リン酸は酵素合成法に適していないものが多い。そのため酵素合成可能な化学修飾核酸は構造や機能の多様性に乏しく、応用研究の選択肢が限られるといった問題がある。そこで本博士論文では酵素合成可能な化学修飾核酸の多様性の拡充を目的とした。

第 1 章では、光照射によって除去される光分解性保護基(PPG)を有する DNA であるケージド DNA を酵素合成するために、その単量体としてケージドデオキシシユードウリジン三リン酸(dPPGΨTP)を開発した。dPPGΨTP は天然の TTP のミミックとして DNA ポリメラーゼの基質となり、テンプレート DNA のアデノシンの逆側に選択的に導入され、ケージド DNA の酵素合成に適用可能であることを明らかにした。また PPG としては NB 基と NPOM 基といった 2 種類を導入したが、NPOM 基を導入したものの方が NB 基を導入したものと比較して DNA ポリメラーゼによる取り込み速度が 200 倍も優れることを明らかにし、二重鎖融解温度測定の結果から二重鎖の局所的な安定性が取り込み速度に影響することを明らかにした。さらに dPPGΨTP を用いて酵素合成したケージド DNA を用いた応用として、転写反応の光制御と三重鎖の安定性の光制御をおこなった。転写反応においては、T7 プロモーターに PPG を有するケージド DNA を酵素合成し、T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応をおこなったところ、光照射により転写量が約 2 倍増加することを明らかにした。また三重鎖の安定性の光制御は、過去に報告された酵素合成可能なケージド DNA を用いておこなうことができない機能であるが、今回開発した dPPGΨTP により酵素合成したケージド DNA を用いたところ、DNA 三重鎖の安定性を光照射により向上させることに成功した。

第 2 章では、RNA アプタマー開発に用いる SELEX 法で用いることが可能な RNA ポリメラーゼの基質となる 2' 修飾ヌクレオシド三リン酸の多様性拡充のために、2'-O-アルキルカルバモイルウリジン三リン酸(U_{Rcm}TP)を開発した。また U_{Rcm}TP は過去に開発された 2' 修飾ヌクレオシド三リン酸と比較して高い疎水性を有することや、塩基性バッファー中でアルキルカルバモイル基の転位や脱離が起こることを明らかにし、その反応速度を算出した。さらに UTP の代わりに U_{Rcm}TP を用いて RNA ポリメラーゼによる転写反応をおこない、得られた生成物の構造について考察した。

以上を要するに本論文では、過去に報告例の少なく多様性の乏しさが問題となっていた酵素合成可能な化学修飾核酸の多様性を拡充するために、酵素合成の基質である化学修飾ヌクレオシド三リン酸として新たに dPPGΨTP および U_{Rcm}TP の合成と性質について研究した結果について報告した。

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).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of, Graduate major in 生命理工学 コース
学生氏名： 竹下 玲央
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)

Chemically modified oligonucleotides have higher degradation resistance than natural oligonucleotide and extra chemical properties. Therefore, chemically modified oligonucleotides are used in various fields such as nucleic acid drugs and molecular biology. Many chemically modified oligonucleotides are prepared by chemical synthesis. On the other hand, some chemically modified oligonucleotides are prepared by enzymatic synthesis, which is applied for long chain oligonucleotide synthesis, PCR method and SELEX method. However, there are little information about chemically modified nucleoside triphosphates because polymerases can recognize few chemical modifications such as 2'-fluoro group and 5-ethynyl group. In this study, I aimed to develop new modified nucleoside triphosphates as a substrates for polymerases.

In chapter 1, I synthesized N1-photo-caged deoxypseudouridine triphosphates as a substrate for DNA polymerases, and applied to enzymatic synthesis of photo-caged DNA. I determined the steady state kinetic parameters of a single nucleotide insertion and melting temperature of DNA duplex containing the photocleavable protecting groups. These results suggested that insertion activity and duplex stability are similar correlation. Moreover, I demonstrated the photo-activation of transcription reaction and DNA triplex stability using enzymatically synthesis of photo-caged DNA.

In chapter 2, I synthesized 2'-O-alkylcarbamoyl uridine triphosphate as a substrate for RNA polymerase, which had up to 5 heavy atoms. RP-HPLC analysis revealed that 2'-O-alkylcarbamoyl uridine triphosphate had higher hydrophobicity than 2'-fluoro UTP and 2'-methoxy UTP which was reported as the substrate for RNA polymerase. Furthermore, I confirmed the migration and the elimination of alkylcarbamoyl groups during incubation in a buffer (pH 8.0). I also tested the transcription reaction using 2'-O-alkylcarbamoyl uridine triphosphate instead of UTP, and the structure of the full-length RNA product was analyzed.

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).