

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	2'-O-アルキルカルバモイルエチル核酸の効率的合成法ならびに標的RNA結合能とヌクレアーゼ耐性の研究
Title(English)	
著者(和文)	岸村智太
Author(English)	Tomohiro Kishimura
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11894号, 授与年月日:2021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,大窪 章寛,秦 猛志
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11894号, Conferred date:2021/3/26, 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)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	岸村 智太		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	清尾 康志 准教授	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

### 要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

核酸医薬品の開発をより簡便に行なうために、核酸の生体内動態の調節と標的選択性を独立に調節できるような修飾の開発が求められている。私は、この目的を達成するための修飾として 2'-O-カルバモイルエチル型修飾に着目した。既知の 2'-O-カルバモイルエチル型修飾の合成経路においては、鍵となるアミド結合形成反応が合成経路の中盤にあるため、複数種類の修飾を導入することが困難である。また、アミド結合形成反応に必要なアミンの必要量も多く、副反応の進行などの問題点もある。そこで私は、2'-O-ベンジルオキシカルボニルエチル基を持つヌクレオシドを中間体として用いる新規合成経路を考案した。この中間体は副反応の起こらない条件でカルボン酸体へと変換でき、縮合剤を用いてアミド結合形成反応を行なうことで用いるアミンの必要量を大幅に削減することに成功した。さらに、アミド結合形成反応からオリゴヌクレオチド合成に必要なアミダイトユニットへの変換もわずか 1 工程で行なえるため、従来と比較して迅速にカルバモイルエチル型修飾を導入することが可能になった。

確立した手法を用いて、種々の直鎖アルキル基を導入した 2'-O-カルバモイルエチル核酸を合成し、化学的性質と熱力学的性質を評価した。まず、相補鎖 RNA に対する二重鎖融解温度測定を行なうことで二重鎖構造の安定性について評価を行なった。驚くべきことに、炭素数 8 のオクチルカルバモイルエチル型修飾を用いた場合において、二重鎖融解温度の低下は修飾 1 箇所あたり 0.8 °C に留まった。過去の知見では、炭素数 9 のノニル基を導入した場合、修飾 1 箇所あたり 3 °C 程度二重鎖融解温度が低下することが報告されており、本研究で評価したアルキルカルバモイルエチル核酸はいずれも二重鎖構造の安定性を高度に保持するということが明らかとなった。また、二重鎖を形成する際のエンタルピー変化およびエントロピー変化について測定を行なったところ、エンタルピー変化の影響をエントロピー変化の影響が打ち消すエンタルピーエントロピー補償が起きていることが確認された。このことは、疎水性のアルキル基の表面での疎水の水和の影響や、二重鎖を形成する際に鎖中に取り込まれる水分子の数の変化などが起きていることが考えられる。いずれにせよ、アルキルカルバモイル核酸は核酸二重鎖の熱力学的安定性に影響を与えていないことが明らかとなった。さらに、HPLC を用いたオリゴヌクレオチドの脂溶性の評価を行なったところ、ヌクレオチド単位で算出した脂溶性と HPLC の保持時間との間に高い相関があることがわかった。このことより、アルキルカルバモイルエチル核酸は核酸の生体内動態の調節に重要な核酸の脂溶性をコントロールできる可能性が示唆された。続いて、核酸の生体内動態の評価するため、3'エキソヌクレアーゼであるスネークベノムホスホジエステラーゼを用いて核酸分解酵素耐性の測定を行なった。アルキルカルバモイルエチル核酸の分解酵素耐性は、アルキル基の鎖長に応じて上昇し、オクチルカルバモイルエチル修飾はメチルカルバモイル修飾の 2 倍程度の酵素耐性を示した。過去の知見により、メチルカルバモイルエチル修飾は核酸医薬品に頻用される 2'-O-MOE 修飾の 3 倍程度の酵素耐性を持つことが知られているため、本研究で開発したアルキルカルバモイルエチル核酸はいずれも実用に耐えうる優れた酵素耐性を持っていると考えられる。

最後に、二重鎖構造の安定性について構造学的見地から評価を行なうために、CD スペクトルの測定および AMBER16 を用いた分子動力学計算を行なった。まず、CD スペクトルの測定結果から、相補鎖 RNA との二重鎖は一般的な RNA 二重鎖構造に多く見られる A 型らせん構造を維持していることが明らかになった。続いて、分子動力学計算を用いて局所的な立体構造の変化について考察を行なった結果、塩基対パラメーターや塩基対間パラメーターなどの二重鎖構造の安定性評価に用いられる各種パラメーターのいずれにおいても変化は観測されなかった。また、シミュレーション後の構造から、アルキルカルバモイルエチル基は二重鎖構造の副溝に位置し、アルキル基が二重鎖構造の外側に突き出すような形で存在していることが示唆された。このような位置に修飾が存在しているために、かさ高いアルキル基を導入した際にも二重鎖構造の安定性が保持されたと結論づけた。

本研究では、2'-O-カルバモイルエチル型修飾を持つ核酸の効率的な合成法を確立した。また、アルキルカルバモイルエチル核酸は核酸二重鎖の安定性に対して影響を与えない一方で、脂溶性や酵素耐性などの化学的性質を劇的に変化させることが出来ることを明らかにした。本研究の成果は、核酸医薬品開発における生体内動態と標的選択性を独立して調節できないという常識を打ち破るものであり、今後のさらなる応用研究が期待される。

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 : 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) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	( 理学 )
学生氏名 : Student's Name	岸村 智太		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	清尾 康志 准教授	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words )

In order to facilitate the development of therapeutic nucleic acid, it is necessary to produce the modification that is able to change in vivo kinetics and target selectivity separately. For this purpose, I developed efficient synthetic pathway of oligonucleotides containing 2'-O-alkylcarbamoylethyl modification. I established such a synthetic pathway with using 2'-O-benzyloxycarbonylethyl nucleosides. It was able to convert into its carboxylic acid form easily under the neutral condition through hydrogenation, and then condensation with the appropriate amine gave the desired nucleoside.

First, I evaluated the duplex stability for complementary RNA with melting temperature ( $T_m$ ) analysis. Interestingly, 2'-O-octylcarbamoylethyl modification decreased the  $T_m$  only 0.6 °C per modification, while 2'-O-nonyl modification decreased the  $T_m$  about 3 °C per modification. Furthermore, I found that there are high relationship between the calculated hydrophobicity of nucleotides and HPLC retention time. It is suggested that I could be controlling the hydrophobicity of oligonucleotides with changing the kind and the number of modifications. In addition, it was revealed that as the length of alkyl chain of 2'-O-alkylcarbamoylethyl modification increased, the nuclease stability for 3'-exonuclease (SVPDE-1) increased.

And then, based on a structural approach, to study the reason that 2'-O-alkylcarbamoylethyl-modified oligonucleotides didn't decrease the duplex stability, I performed molecular dynamics simulation with AMBER 16. As a result, It is suggested that 2'-O-methylcarbamoylethyl and octylcarbamoylethyl modification did not effect any structural parameters of nucleotides. According to simulation, the carbamoylethyl linker was located into the minor groove of duplex, and the alkyl chain was projecting outside, so it is suggested the bulkiness of modification did not effect on duplex stability.

In this research, I established an efficient synthetic pathway of oligonucleotides having various carbamoylethyl modification at 2' position. I also revealed that these modifications did not effect on duplex stability, while they could be changing chemical properties of oligonucleotides. I'm sure that this result is applicable to develop of therapeutic nucleic acid.

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).