

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) | 審査の要旨 |
| Type(English) | Exam Summary |

論文審査の要旨及び審査員

| | | | | | | |
|-------------|-----|------|---------|------|------|-----|
| 報告番号 | 甲第 | 号 | 学位申請者氏名 | 竹下玲央 | | |
| 論文審査 審査員 | | 氏名 | 職名 | | 氏名 | 職名 |
| | 主査 | 清尾康志 | 准教授 | 審査員 | 大窪章寛 | 准教授 |
| | 審査員 | 湯浅英哉 | 教授 | | | |
| | | 一瀬 宏 | 教授 | | | |
| | | 林 宣宏 | 准教授 | | | |

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」と題し、序論、第一章、第二章より構成されている。

序論では、天然型核酸の塩基対形成能や二重鎖、三重鎖、四重鎖などの高次構造形成能が核酸の機能に重要であることを、セントラルドグマ、エビジェネティクス、リボスイッチなどを例に説明した後、核酸のこれら性質を化学修飾により向上させた修飾核酸が、医薬・工学分野で広く用いられていることを述べている。さらに、修飾核酸として光分解性保護基により修飾された核酸（光ケージド核酸）や 2'-修飾核酸が有用であり、これらの合成法として、化学合成法の他に核酸合成酵素を用いた合成法が必要であると述べている。

第一章「塩基部ケージドデオキシシュードウリジン三リン酸の開発とケージド DNA の酵素合成」では、ピリミジン環 5 位に光分解性保護基を有するヌクレオシド三リン酸が DNA 合成酵素の基質となるという最近の知見について述べている。さらに、新たに N1 位に光分解性保護基として 2-ニトロベンジル基または 2-ニトロピペロニルオキシメチル基を導入したデオキシシュードウリジン三リン酸（各々 d^{NB}ΨTP, d^{NPOM}ΨTP）を設計したことを述べている。そして、シュードウリジンを出発物質として用い、水酸基の適切な保護・脱保護と塩基部への光分解性保護基の導入、さらには 5'水酸基の三リン酸化を行うことで d^{NB}ΨTP と d^{NPOM}ΨTP を合成したことを述べている。

次いで、合成した d^{NB}ΨTP と d^{NPOM}ΨTP が核酸酵素の基質となることを、Klenow fragment exo- と鋳型 DNA ならびにプライマーDNA を用いた実験により検証した結果について、d^{NB}ΨTP と d^{NPOM}ΨTP はいずれも鋳型鎖のデオキシアデノシン残基の相補的ヌクレオチドとしてプライマーDNA 中に取り込まれたことを述べている。また、この酵素反応の速度論解析を行い、d^{NPOM}ΨTP の方が d^{NB}ΨTP より優れた基質であることを明らかにしている。さらに、d^{NPOM}ΨTP の他に、dATP, dCTP, dGTP を加えて酵素反応を行い、d^{NPOM}ΨTP が取り込まれた後も DNA 鎖が伸長することを明らかにしている。

次に、酵素的に合成した d^{NPOM}ΨTP を含む DNA の機能を光照射により制御した結果について、T7-RNA ポリメラーゼによって d^{NPOM}ΨTP を含む DNA を転写する反応について検討し、光照射により転写効率が 2.4 倍に向上することを明らかにしている。また、d^{NPOM}ΨTP を含む DNA と三重鎖形成核酸との相互作用についても検討し、光照射により三重鎖の存在量が 3 倍に増加することを明らかにしている。

第二章「2'-O-アルキルカルバモイル UTP の開発」では、最初に、化学修飾を加えた RNA の有用性をアプタマー、リボザイム、mRNA 医薬などを例に述べた後、これらの技術に応用可能な化学修飾 RNA を酵素合成するための基質として、2'-O-アルキルカルバモイルウリジン三リン酸 (U_{Rcm}TP) を設計したことを述べている。さらに、ウリジンを出発原料として、2'水酸基のカルバモイル化と 5'水酸基の三リン化を経て、アルキル基が水素原子、メチル基、エチル基、プロピル基である U_{Rcm}TP を合成したことについて述べている。

次いで、T7-RNA ポリメラーゼ反応の条件下での U_{Rcm}TP の化学的安定性について詳細に調べ、pH8.0 でインキュベートすると U_{Rcm}TP のアルキルカルバモイル基が 2'位から 3'位に転位することや、この転位反応の速度がアルキル基を高くするにつれ低下することを述べている。さらに、4 時間インキュベートした場合アルキルカルバモイル基が脱離した UTP が痕跡量生成することを見出ししている。最後に、これらの知見をもとに、鋳型 DNA, U_{Rcm}TP, ATP, CTP, GTP, T7-RNA ポリメラーゼを用い、鋳型 DNA の転写反応を 5 分間行い、転写反応が完全に進行した RNA が生成したことを述べている。さらに、得られた RNA が U_{Rcm}TP を含む可能性について T7-RNA の結晶構造や酸性条件下での転写反応などの実験結果をもとに考察している。

以上を要するに、本論文は光ケージド核酸や 2'修飾 RNA の酵素合成に有用なヌクレオシド三リン酸について、その合成法の開発と核酸合成酵素の基質としての特性について明らかにしたものであり、理学的に貢献するところが大きい。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。