

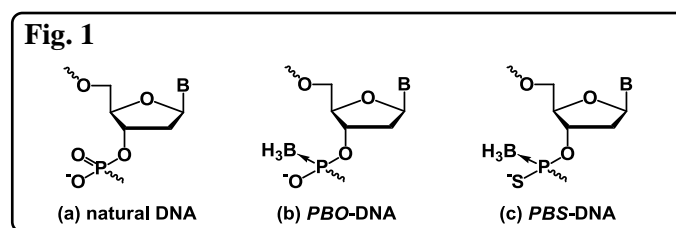
論文の内容の要旨

論文題目 *H*-ボラノホスホネート法による ボラン修飾型アンチセンス核酸の合成

氏名 植原 渉

【緒言】

遺伝子発現制御法の一つであるアンチセンス法は、化学修飾を施したオリゴヌクレオチドを特定の mRNA に塩基配列特異的に結合させ、タンパク質への翻訳過程を阻害する手法である。近年、アンチセンス分子としてリン原子がボランに配位結合した DNA 誘導體 (ボラン修飾型 DNA) が注目を集めている。最も一般的なボラン修飾型 DNA として、ボラノホスフェート DNA (*PBO*-DNA, Fig.1-(b)) が挙げられる。これは、天然型 DNA (Fig.1-(a)) よりも高いヌクレアーゼ耐性と細胞膜透過性を有するだけでなく、細胞毒性が低いことから医薬候補分子として注目されている¹。また、ボラノホスホロチオエート DNA (*PBS*-DNA, Fig.1-(c)) は、*PBO*-DNA よりもさらに高いヌクレアーゼ耐性と脂溶性を有していることから、新規アンチセンス分子として期待されている²。しかし、長鎖のボラン修飾型 DNA オリゴヌクレオチドの合成法は未だ確立されていない。そこで本研究では、*H*-ボラノホスホネート法に着目し、固相合成によるボラン修飾型 DNA オリゴヌクレオチドの効率的な合成法の開発を目指した。また、合成したオリゴヌクレオチドの物理化学的性質や生物学的性質を明らかにし、アンチセンス医薬への応用を目指した。



H-ボラノホスホネート法の概略図を以下の **Scheme. 1** に示す。まず、*H*-ボラノホスホネートモノマーユニット **1** と 5'位に遊離の水酸基を有するヌクレオシド **2** を縮合させ、鍵中間体として *H*-ボラノホスホネート DNA 二量体 **3** を得る。次に、**3** の P-H 結合の水素原子を塩基で引き抜き、リン原子上にアニオンを生じさせ、種々の求電子剤を反応させることで、様々なボラン修飾型 DNA **4** の合成が可能となる³。

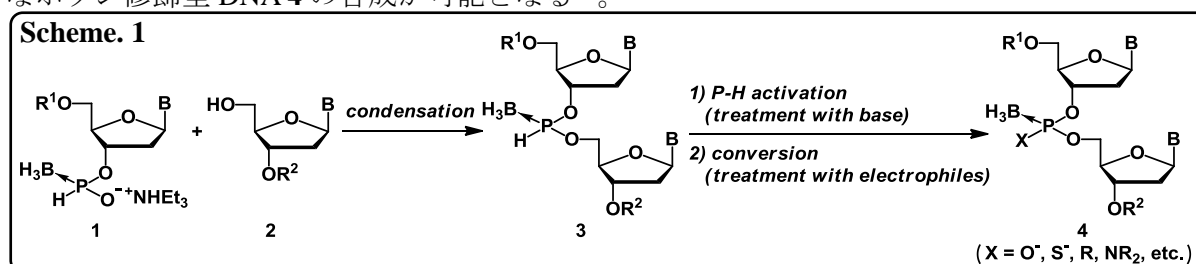


Table. 1

Entry	oligonucleotide ^[a]	Isolated yield [%]
1	T _{(PBO)11} 8	28
2	T _{(PBS)11} 9	31
3	T _{(PBN)11} 10	10
4	G _{PBO} C _{PBO} A _{PBO} T _{PBO} T _{PBO} G _{PBO} G _{PBO} T _{PBO} A _{PBO} T _{PBO} T _{PBO} C 11	44
5	G _{PBS} C _{PBS} A _{PBS} T _{PBS} T _{PBS} G _{PBS} G _{PBS} T _{PBS} A _{PBS} T _{PBS} T _{PBS} C 12	16
6	G _{PBO} C _{PBO} A _{PBO} T ^L _{PBO} T ^L _{PBO} G _{PBO} G _{PBO} T ^L _{PBO} A _{PBO} T ^L _{PBO} T ^L _{PBO} C 13	7

[a] Subscript 'PBO', 'PBS', 'PBN' and 'T^L' = boranophosphate diester, boranophosphorothioate diester, *N*-(2-morpholinoethyl) boranophosphoramidate diester and LNA thymidine, respectively; Base sequence of ODN **11-13** (Entry **4-6**) is against apoB protein mRNA.

次に、合成したオリゴヌクレオチドを用いて、相補的な DNA 鎖または RNA 鎖との二重鎖融解温度 (T_m) 測定を行った。12 量体のチミジル酸誘導体 **8-10** を用いた場合、明瞭なシグモイド曲線が得られず、 T_m 値を算出することはできなかった (**Table. 2**)。

Table. 2

Entry	oligonucleotide	complementary strand	
		dA ₁₂ T_m [°C]	rA ₁₂ T_m [°C]
0.1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
1	T ₁₂	29.1	25.8
2	T _{(PBO)11} 8	[a]	[a]
3	T _{(PBS)11} 9	[a]	[a]
4	T _{(PBN)11} 10	[a]	[a]
1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
5	T ₁₂	43.1	37.3
6	T _{(PBO)11} 8	[a]	[a]
7	T _{(PBS)11} 9	[a]	[a]
8	T _{(PBN)11} 10	[a]	[a]

[a] Clear T_m values were not observed.

一方、apoB タンパク質をコードする mRNA に相補的な配列を持つ 12 量体 **11-13** を用いた場合⁴、二重鎖の形成を示すシグモイド曲線が得られた。 T_m 値を **Table. 3** に示す。

Table. 3

Entry	oligonucleotide	complementary ODN ^[a]	complementary ORN ^[b]
		T_m [°C] (ΔT_m [°C] ^[c])	T_m [°C] (ΔT_m [°C] ^[c])
0.1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
1	natural ODN	42.7 (-)	42.0 (-)
2	<i>PBO</i> -ODN 11	25.9 (-16.8)	29.9 (-12.1)
3	<i>PBS</i> -ODN 12	15.7 (-27.0)	25.0 (-17.0)
4	^{LNA} <i>PBO</i> -ODN 13	52.1 (+9.4)	63.9 (+21.9)
1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
5	natural ODN	53.2 (-)	52.0 (-)
6	<i>PBO</i> -ODN 11	33.1 (-20.1)	39.0 (-13.0)
7	<i>PBS</i> -ODN 12	20.9 (-32.3)	32.9 (-19.1)
8	^{LNA} <i>PBO</i> -ODN 13	63.6 (+10.4)	77.9 (+25.9)

[a] 3'-CGT AAC CAT AAG-5'. [b] 3'-CGU AAC CAU AAG-5'. [c] Difference from the T_m of natural ODN/ODN(ORN).

全ての核酸塩基を有する 12 量体では、グアニン塩基とシトシン塩基が含まれているため、水素結合数が増加し、また塩基対間の π - π スタッキングの効果によって、二重鎖の高次構造が安定化したと考えられる。*PBO*-ODN **11**、及び *PBS*-ODN **12** を用いた場合、 T_m 値は天然型 DNA よりも 12–18 °C 程度低い。これは、疎水的かつ立体障害の大きいボラノ基によって、二重鎖の水和構造が乱されているためであると考えられる。しかし、興味深いことにボラン修飾型 DNA は相補鎖が RNA の場合、DNA の場合と比較して 5–10 °C 程度 T_m 値が向上した。これは天然型 DNA には見られない性質であり、ボラン修飾型 DNA は mRNA への親和性が高いことが示唆される。また、^{LNA}*PBO*-ODN **13** の T_m 値は天然型 DNA よりも高い値となり、LNA 修飾はボラノ基による二重鎖の不安定化を補う有効な手段であることが明らかとなった。さらに、相補鎖が RNA の場合に T_m 値がより高いことから、アンチセンス分子として有効に働くことが期待される。

【結言】

H-ボラノホスホネート DNA を鍵中間体として、*PBO*-ODN、*PBS*-ODN、*PBN*-ODN 及び ^{LNA}*PBO*-ODN 12 量体を効率的に得ることに成功した。本手法で用いるモノマーユニットは反応性が高く、鎖長伸長が極めて迅速に進行することから、種々のボラン修飾型 DNA オリゴヌクレオチドの効率的な合成手法であると言える。また、 T_m 値測定より、^{LNA}*PBO*-ODN は相補鎖への親和性が非常に高いことが示された。さらに、相補鎖が DNA よりも RNA の場合により高い T_m 値となったことから、新規アンチセンス医薬候補分子として期待できる。

【参考文献】

1) J. S. Summers, B. R. Shaw, *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1147-1155; 2) J. Lin, B. R. Shaw, *Chem. Commun.* **1999**, 1517-1518; 3) R. Higashida, N. Oka, T. Kawanaka, T. Wada, *Chem. Commun.* **2009**, 2466-2468; 4) E. M. Straarup, N. Fisker, M. Hedtjærn, M. W. Lindholm, C. Rosenbohm, V. Aarup, H. F. Hansen, H. Ørum, J. B. R. Hansen, T. Koch, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 7100-7111.