

氏名	すぎはら ゆうた 杉原 悠太
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	博甲第825号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Photo-cross-linking oligonucleotides for bioorthogonal regulation of gene expression (光架橋性核酸を利用した遺伝子発現制御)
審査委員	(主査)准教授 小堀哲生 教授 田中直毅 教授 清水正毅

論文内容の要旨

本論文は、4章から構成される。

第1章では、光反応性分子として光応答性 α -ブromoアルデヒド基を導入した光架橋性核酸(PBA-ODNs)を設計し、その架橋特性について報告している。これまでに報告している光応答性 α -クロロアルデヒド基(PCA)と同じ基本骨格を持ちながら、反応速度が大きく異なる光応答性 α -ブromoアルデヒド基(PBA)を開発し、PBAを導入した光架橋性核酸(PBA-ODNs)の架橋速度、効率について評価した。

第2章では、光応答性 α -ハロアルデヒド基を導入した光架橋性アンチセンス核酸の開発と、その細胞内活性について報告している。緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするmRNAを標的とし、酵素耐性と細胞膜透過性が高い2'-OMeホスホロチオエート型RNAにPXaを導入したアンチセンス核酸(PXA-ORNs)を開発し、細胞内評価に用いた。その結果、アンチセンス活性は、架橋反応速度に大きく依存することが明らかとなった。

第3章では、一塩基変異をもつRNA標的とした光架橋性アンチセンス核酸の開発と架橋特定について報告している。光応答性 α -クロロアルデヒド基をアンチセンス核酸の鎖の中央部に導入したproPCA-ODNを開発し、その架橋特性を評価した結果、proPCA-ODNは、アデニンをproPCAの正面に有するオリゴRNAと高効率で架橋反応を起こすことが明らかとなった。

第4章では、ジアジリン誘導体が導入されたアデノシン(DA)の合成とDAを含む核酸の架橋特性について報告している。光刺激によりカルベンを生じるジアジリン誘導体が糖環2'位に導入されたアデノシン誘導体の化学合成法を新たに開発した。また、DAを含む核酸は、相補鎖DNAと選択的に光架橋反応を起こすことを明らかとした。

論文審査の結果の要旨

DNAやRNAを基本骨格にもつ核酸医薬品は、疾患に関わる遺伝子を直接標的とすることができるため、抗体医薬品に続く次世代分子標的薬として近年大きな注目を集めている。これまでに様々な核酸医薬品候補分子が開発されてきており、VitraveneやKynamro等の核酸医薬品がすでに上

市されている。しかしながら核酸医薬品は未だ汎用性が低く、生体安定性や標的分子との結合親和性、配列選択性について改善の余地を残している。そこで本論文において申請者は、標的核酸と共有結合を介して結合する架橋性核酸を用いることにより配列選択性と結合親和性に起因する問題の解決を試みた。Chapter 1 と Chapter 2 では、 α -ハロアルデヒド基が5'末端に導入された光架橋性核酸の開発とその性質について明らかとした。本章で開発された光架橋性核酸は、標的 RNA と選択的に反応し、細胞内においてもその効果を発揮する。とくに、架橋反応の速度論的解析は興味深く、生体内反応を利用した薬剤の開発に大きな貢献をする研究であると考えられる。Chapter 3 では、抗ガン剤の新しい標的となりうる点変異 mRNA を標的とした核酸誘導体を開発している。また、Chapter 4 では、架橋反応速度の極めて早い光架橋性核酸誘導体を設計し、それら誘導体の架橋特性について明らかとしている。Chapter 3, 4 で開発された誘導体は、その架橋特性が学術的に興味深いだけでなく、新たな創薬ターゲットを開拓する際の足がかりとして医薬品開発分野において重要な知見を与えていると考えられる。以上のように本論文は標的 mRNA の翻訳過程を選択的に制御する核酸医薬品に関する重要な概念、手法開発を論じ、また、核酸-タンパク複合体を標的とした医薬品のシーズとなる核酸誘導体を提案している。その学術的意義は高く、また今後の核酸医薬に関する研究の重要な概念、手法として高く評価される。

本論文は審査を経て掲載された以下の3編の学術論文（うち2篇は申請者が筆頭著者である）並びに現在投稿準備中の論文に基づいて作成されている。

1. A. Kobori, Y. Nagae, Y. Sugihara, A. Yamayoshi, A. Murakami, "Rate-adjusted cross-linking reaction by photoresponsive α -bromoaldehyde (PBA)-conjugated ODN" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23**, 5825-5828 (2013).
2. Y. Sugihara, Y. Nakata, A. Yamayoshi, A. Murakami, A. Kobori, "Inhibition effect of photoresponsive α -haloaldehyde-conjugated oligonucleotides on the gene expression in HeLa cells stably expressing GFP" *in preparation*.
3. Y. Sugihara, Y. Nakata, A. Yamayoshi, A. Murakami, A. Kobori, "Cross-linking antisense oligodeoxyribonucleotides with a photoresponsive α -chloroaldehyde moiety for RNA point mutations" *The Journal of Organic Chemistry*, **81**, 981-986 (2016).
4. Y. Sugihara, S. Tatsumi, A. Kobori, "Development of novel photoresponsive oligodeoxyribonucleotides with a 2'-*O*-diazirine-conjugated adenosine for DNA interstrand crosslinking" *Chemistry Letters*, **46**, 236-239 (2017).