

二国間交流事業 共同研究報告書

平成23年4月14日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 大阪大学・薬学研究科

職・氏名 ^(ふりがな)教授・小比賀 聡 ^(おびか、さとし)

1. 事業名 相手国 (バングラデシュ) との共同研究 振興会対応機関 (UGC)

2. 研究課題名 様々なゲノムテクノロジー創出に向けた新規な架橋型人工核酸の合成

3. 全採用期間

平成 21年 4月 1日 ~ 平成 23年 3月 31日 (2年 0ヶ月)

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 6,000 千円

初年度経費3,000 千円、 2年度経費 3,000 千円、 3年度経費 0 千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 0 千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 (ふりがな)	所属・職名	研究協力テーマ
おびか さとし 小比賀 聡	大阪大学・教授	研究統括・人工核酸の合成と機能評価
こだま てつや 兒玉 哲也	大阪大学・助教	人工核酸の合成と機能評価
ばば たけし 馬場 武	大阪大学・大学院生	人工核酸の合成と機能評価
もりひろ くにひこ 森廣 邦彦	大阪大学・大学院生	人工核酸の合成
やはら あいこ 矢原 愛子	大阪大学・大学院生	人工核酸の合成
あさだ あきこ 浅田 安紀子	大阪大学・大学院生	人工核酸の機能評価
もり かずと 森 和土	大阪大学・大学院生	人工核酸の機能評価

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 ダッカ大学・准教授・S. M. Abdur Rahman

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○ S. M. Abdur Rahman	ダッカ大学・准教授 (バングラデシュ)	人工核酸の合成と機能評価
Jakir Ahmed Chowdhury	ダッカ大学・講師 (バングラデシュ)	人工核酸の合成
Md. Ariful Islam	ダッカ大学・大学院生 (バングラデシュ)	人工核酸の合成と機能評価
Rinton Chakraborti	ダッカ大学・大学院生 (バングラデシュ)	人工核酸の合成
Md. Ahsan	ダッカ大学・大学院生 (バングラデシュ)	人工核酸の合成

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

我々は、これまでに数多くの架橋型人工核酸 BNA の合成を手がけてきたが、本研究ではこれまでに得られた知見を最大限に利用し、BNA の構造のファインチューニングを行うことで、次世代核酸医薬品に最も適した人工核酸を創製することを目的としている。すなわち、これまで開発してきた BNA においては、エントロピー項の寄与によって標的 RNA との結合親和性を飛躍的に高めることに成功したが、今回はそれに加えてエンタルピー項の寄与を考慮し、新たな架橋型人工核酸 BNA の分子設計、合成を行うとともに、その化学的、物理化学的特性を明らかにすることを目的とした。エントロピー項とエンタルピー項の両方の寄与により安定化される人工核酸の開発は、エントロピー項、エンタルピー項の各項から結合親和性の向上を試みたのち、それらの研究で得られた知見を組み合わせることで達成することとした。

エントロピー項については、架橋型人工核酸 BNA の架橋構造が大きく寄与しているため、まずこれまでに知見を基に、より高い結合親和性を有する架橋型人工核酸の設計を行った。具体的には、架橋型人工核酸 BNA の架橋構造を構成する原子の種類や結合距離、架橋構造の環の大きさなどを検討することで、複数の人工核酸が候補に挙がった。それらの合成経路は両国で立案し、頻繁に意見交換を行うことで、効率的な経路の構築を行った。人工核酸の構造とその物理化学的性質については、高精度 NMR 解析などを行い詳細に解析した。また、DNA や RNA に対する結合親和性の評価より、これら人工核酸が標的となる DNA や RNA に対して高い結合親和性を獲得することを確認した。

エンタルピー項については、二重鎖または三重鎖の構造を安定化させる分子が大きく寄与する。DNA または RNA のリン酸ジエステル結合は負の電荷を有しているため、二重鎖を組む際に互いの鎖間で斥力を生じるが、生理条件下で正の電荷を有するアミノ基は、核酸の負の電荷を打ち消すことで斥力を弱め、二重鎖を安定化させることが知られている。そこで、オリゴヌクレオチドへのアミノアルキル基の導入を試みた。アミノアルキル基はオリゴヌクレオチドの合成後に導入することとし、ホスホロチオアート結合を有するオリゴヌクレオチドと 2-アミノエチルブロミドをはじめとする数種のアミノアルキル化剤との反応を検討した。その結果、目的通りリン酸部分へのアミノアルキル基の導入を効率よく行うことができた。合成したオリゴヌクレオチドの二重鎖または三重鎖形成能を評価したところ、ホスホロチオアートの立体に応じてその効果に差が見られるという知見が得られた。この結果をもとに、適切な立体配置を選択し、アミノアルキル基を導入することにより二重鎖または三重鎖形成能を向上させることに成功した。

エントロピー項への寄与とエンタルピー項への寄与について十分な知見が得られたため、架橋型人工核酸 BNA を含み、且つリン酸部分にアミノアルキル基を有するオリゴヌクレオチドの合成を行った。架橋構造が嵩高いため、架橋構造に近いリン酸部位にアミノアルキル基を導入する際には若干反応性の低下が見られたものの、十分な量のオリゴヌクレオチドを得ることができた。二重鎖または三重鎖形成能は、架橋型人工核酸 BNA とアミノアルキル基を導入したホスホロチオアートの位置により変動したが、架橋型人工核酸 BNA の前後の 2 つのリン酸部位のうち、架橋構造から遠い方にアミノアルキル基を導入した場合は、架橋型人工核酸 BNA を含まない配列を用いた時と類似した二重鎖形成能の向上がみられた。この結果から、適切な部位にアミノアルキル基を導入することで、架橋型人工核酸 BNA の結合親和性を維持したまま、アミノアルキル基による安定化効果を獲得可能であることを明らかにした。