

氏 名	かね はら ひで ゆき 金 原 秀 行
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 103 号
学位授与の日付	平成 8 年 3 月 25 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	工芸科学研究科機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	オリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートの構造と機能相関 の分光学的研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 田 中 信 男 教 授 村 上 章 助教授 井 出 博

論 文 内 容 の 要 旨

申請者の論文は、特定の遺伝子から転写された mRNA と二重鎖を形成して遺伝子の発現を制御することのできるアンチセンス分子として注目され、現在多くの臨床応用研究が行われているオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートに関して、その機能発現の基本である構造的な特徴を分光学的に解析した基礎研究の結果をまとめたものである。特に本研究では、オリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートのチオホスフェート結合の持つ立体異性がオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートと標的 DNA あるいは RNA とのハイブリッドの構造にどのような影響を与えるかについての詳細な研究結果が示されている。以下、論文内容を章別に概説する。

第 1 章では、本研究を理解するために必要なオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートに関する背景ならびにこの研究を遂行する上で基本とした基本構想を述べている。

第 2 章には、本研究を遂行する上で重要な試料の選択とその調製法が述べられている。ここでは、チオホスフェート結合の立体異性がオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートのつくる二重鎖の構造にどのような影響を及ぼすかを調べるために、1 ないし 2 個のチオホスフェート結合を持ったオリゴ DNA (S-オリゴと呼ぶ) を試料として採用し、この異性体を分離する方法が検討された。これまでは、異性体分離には逆相高速液体クロマトグラフィーが用いられてきたが、この方法で分離できる試料の塩基配列は限られているために、申請者は DEAE イオン交換カラムを用いた分離法を新しく考案し、これと逆相高速液体クロマトグラフィーとを組み合わせることによって 30 種類程度の試料を個々の異性体に分離することに成功している。したがって、以降の研究にはこの方法で分離精製した S-オリゴ異性体を試料として用いた。

第 3 章では、S-オリゴとこれに相補的塩基配列を持つ標的 DNA あるいは RNA との間で生成するハイブリッドの二重鎖安定性を、淡色効果を UV 分光法によって測定して決定した二重鎖融解温度 (T_m) を用いて評価した。その結果、DNA を標的として用いた場合は、これまでに報告されたように、チオホスフェート結合が Sp 体の場合に Rp 体よりも高い T_m を持ち、この T_m 値は天然型同士のそれよりも低いという結果を得たが、一方 RNA が標的のときは、Rp 体が Sp 体よりも高い T_m が生じることもあり得ることを証明した。さらには RNA を標的とした場合は、二重鎖の T_m 値は天然型同士の場合の T_m 値と匹敵することもあり得るという新しい結果を得た。さらに、DNA および RNA と S-オリゴとの間で形成した二重鎖の円偏光二色性スペクトル測定を行い、DNA が標的の場合は B 型、RNA が標的の場合は A 型と B 型の間の中間の構造をとることを証明した。なおこの結果は、S-オリゴの代わりに天然型 DNA を用

いて形成した二重鎖のとり構造と同様である。

第4章では、チオホスフェート結合の立体異性がS-オリゴと標的の二重鎖の溶液構造にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、核磁気共鳴法(NMR)と分子動力学計算による詳細な解析を行った。試料を選択するにあたり、チオホスフェート基の構造の影響が顕著にT_m値に現れるDNAとのハイブリッドを試料として選択し、過去の論文で報告された結果を参考に、T_m値の等しい異性体においてもチオホスフェート結合の構造的影響は保持されることと仮定し、天然型、Rp体およびSp体S-オリゴの標的DNAとつくるハイブリッドのT_m値がほぼ同程度の塩基配列を選択し、S-オリゴとしてはチオホスフェート結合を1個持った6量体を選択した。解析の結果、イオウ原子近傍の特異的プロトンにはケミカルシフト値の変化が現れるが、これらの3種類の試料の作るハイブリッドはすべてB型であり非常によく似た構造をとることが明らかになった。したがって、S-オリゴ異性体は天然型D-オリゴと同様に、標的D-オリゴとB型の二重鎖を形成するが、おそらくこれらの二重鎖のエネルギー値が異なっており、これが一本鎖への解離平衡に影響してD-オリゴならびにS-オリゴ異性体のハイブリッドのT_m値の差が生じるのではないかと考察している。3者の二重鎖の構造の安定性を区別する唯一の現象としては、試料のT_m値より低い温度でスピン-スピン緩和時間(T₂)の上昇による線幅の増加が特異的プロトンに現れることを見出した。この小さなT₂値の変化もまたS-オリゴ異性体間のT_m値の異なりの原因である可能性を示唆した。

第5章では、オリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートに特有の結果である、ホモオリゴマーであるオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエート poly(dC) が抗ウイルス性を示す現象を理解するために、分子レベルでの構造解析を行っている。オリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエート poly(dC) の円偏光二色性スペクトル解析を行い、これが4重鎖を形成することによって特異的溶液構造を持ち、このためにオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエート poly(dC) が生体中でも安定に存在し、種々のタンパク質と相互作用してこれらを不活性化することによって抗ウイルス性を示すのではないかと示唆した。またこの構造について、Sp体の方がRp体よりも安定であることも明らかにした。

第6章は、結論であり、本論文の総括である。

論文審査の結果の要旨

本学大学院工学科学研究科機能科学専攻3回生 金原秀行氏は、「オリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートの構造と機能相関の分光学的研究」という課題で学位論文を提出しており、この論文について慎重かつ詳細な審査を行った。論文は詳細かつ論理的にまとめられていると評価する。

本論文に記載された内容は、新しい概念に基づいた医薬であるアンチセンス核酸として多くの臨床応用に用いられているが分子レベルでの研究が希薄なオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートの詳細な分子構造解析の結果やそれに基づく機能発現機構解析に関する重要な知見を多く含むものである。特にこの分子のチオホスフェート結合に由来する異性体のつくる二重鎖の構造に関して、多くの知見を含む。本研究では、1あるいは2個のチオホスフェート結合を持ったDNAオリゴマー(S-オリゴ)をオリゴデオキシヌクレオシドホスホロチオエートのモデルとして用いているが、まずDEAEイオン交換クロマトグラフィー法と逆相高速液体クロマトグラフィー法を用いた分離を組み合わせ、この分子の異性体を巧みに分離精製する方法を確立した。このようにして得たS-オリゴ異性体を試料として用い、二重鎖融解温度(T_m)測定、円偏光二色性分光法、核磁気共鳴法、分子動力学解析などの方法を組み合わせて詳細な分子構造解析を行い、これがDNAとつくる二重鎖構造は、異性体の構造を問わず天然型同士をつくる二重鎖の構造とほぼ同一であることを明らかにし、二重鎖のエネルギー状態の異なりが一本鎖への解離を支配してS-オリゴ異性体二重鎖のT_mを決定するのではないかと提案をした。また標的がRNAのときも同様の傾向を示すが、旧来の知見と異なり、Rp型がSp型よりも高いT_mを与えることもあることを

示し、アンチセンス分子設計においては立体異性を考慮しなくてもよい可能性があるなどの新しい考え方を提案しており、全般として高い独創性を持った研究が行われたと評価する。

よって本審査委員会は、金原秀行 氏の提出された学位論文が本学の博士号（学術）を授与するに十分値するものと結論する。