

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

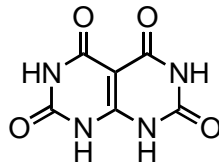
主論文の要旨

論文題目 ピリミド[4,5-*d*]ピリミジン-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-テトラオンを塩基
対する結合親和性：新規ユニバーサル塩基開発に向けての基礎研究
氏名 平野 泰亮

論文内容の要旨

本論文は、核酸科学研究において、近年、天然核酸塩基の使用のみでは不可能な研究を可能にし、あるいは、非効率的であった研究を効率化する可能性をもつため、その重要度が富みに高まっているユニバーサル塩基（4種類の天然核酸塩基を非特異的に認識する人工塩基）として、ピリミド[4,5-*d*]ピリミジン-2,4,5,7-(1*H*,3*H*,6*H*,8*H*)-テトラオン（PPT）を新規に考案、開発し、このものが、既存のすべてのユニバーサル塩基に比べて、より優れた働きをすることを明らかにしたものである。

序では、まず、ユニバーサル塩基の核酸科学研究における重要性を、ユニバーサル塩基を含むオリゴヌクレオチドが、配列未特定遺伝子や不特定遺伝子のクローニング、ヒトゲノム中の一塩基多型の検出、アンチジーン法による不特定遺伝子の発現抑制、核酸成分の高選択的抽出・除去などに利用された研究を例に述べている。ついで、代表的な既存のユニバーサル塩基を種々紹介し、この中から現在最も有効として多用されているヒポキサンチンを代表例として、既存のユニバーサル塩基がもつ問題点を述べるとともに、既存の問題点を取り除いたユニバーサル塩基の新規開発の重要性を述べている。



ピリミド [4,5-*d*]ピリミジン-2,4,5,7-(1*H*, 3*H*, 6*H*, 8*H*)-テトラオン (PPT)

第一章では、まず、既存のユニバーサル塩基の代表格であるヒポキサンチンがもつ欠点について、それが生じる原因を考察し、この考察を基に PPT を設計した過程が述べられている。さらに、PPT をもつリボヌクレオシドの合成と、このものを試料に用いた紫外分光分析法による PPT の酸性度測定および 4 種類の天然リボヌクレオシドと塩基対形成能測定の結果が述べられている。

具体的にはまず、ヒポキサンチンがもつユニバーサル塩基としての最大の欠点、すなわち、シトシンとのみ安定な塩基対を形成し、他の塩基とは安定な塩基対を形成しないことの原因を考察している。その結果、大きな理由は二つあり、一つは、ヒポキサンチンでは、環中のラクタム基のラクチム基への互変異性化に必要なエネルギーが比較的大きく、シトシン以外の核酸塩基と水素結合を形成できるような構造への変化が十分に起こらないこと、もう一つは、ヒポキサンチンはプリン塩基であるため、相対する塩基がアデニン、グアニンのようなプリン塩基の場合、これらの塩基と塩基対を形成するに適した空間距離・位置を占める事ができないことであるとしている。

ついで、ヒポキサンチンがもつこれら二つの問題点を解決する事ができるユニバーサル塩基として PPT を案出した理由が述べられている。すなわち、PPT は環の電子密度が低く、高い酸性度を有すると考えられるため、図 (a) に示したように、4 カ所のアミド部位およびイミド部位で分子内水素移動によるラクタム-ラクチム互変異性化を容易に起こし、相対する天然型 4 核酸塩基と水素結合を形成するに有利な構造を容易に取り得るであろう、また、PPT は、1 位の窒素原子でヌクレオシド骨格に結合した場合、図 (b) に示したように、その結合を軸とした回転により、A 環でも B 環でも塩基対を形成できる、換言すると、相対する塩基がプリン塩基の場合には A 環で塩基対を形成し、相対する塩基がピリミジン塩基の場合には B 環で塩基対を形成するであろうとの推論を述べている。

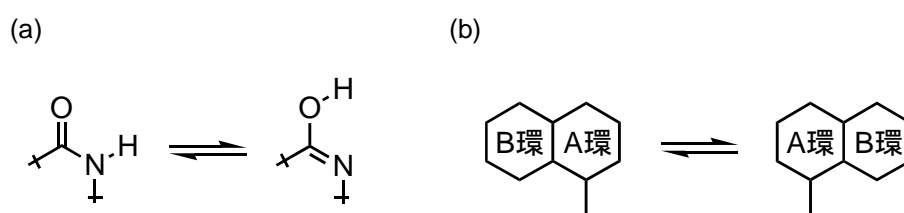


図 ラクタム-ラクチム互変異性と軸回転による回転異性

続いて、PPT を含むヌクレオシドの合成し、PPT が予想したように高い酸性度をもつかどうか、4 種類の天然核酸塩基と安定な塩基対を形成するかどうかを、合成品を用いた紫外・可視吸光分光法により調査している。その結果、PPT は、pH 7 付近で、一価の陰イオンとして存在しており、容易にラクタム-ラクチム互変異性化を起こすこと、また、結合様式は不明だが、4 種類の天然核酸塩基と安定な塩基対形成をすることを明らかにしている。

第二章では、PPT のユニバーサル塩基として有効性を、PPT を導入したオリゴリボヌクレオチドにより調べる事を目指し、第一章で合成した PPT を塩基にもつりボヌクレオチドを原料とした PPT 含有オリゴリボヌクレオチド合成を試みたが、PPT 含有リボヌクレオチドが、合成過程で使用するほとんどの有機溶媒に溶けない事、また、合成過程で使用が回避な酸に対して非常に不安定である事を見出し、PPT を有するオリゴリボヌクレオチドの合成を断念したことが述べられている。

第三章では、標的基質を PPT 含有オリゴヌクレオチドから PPT 含有ペプチド核酸 (PNA) オリゴマーに変更した理由、PPT 含有 PNA 合成に必要な PPT 含有アミノ酸の合成、同アミノ酸と天然核酸塩基をもつアミノ酸を構築単位とする PPT 含有 PNA オリゴマーの合成、合成品を用いた相補的 DNA 鎖との二重鎖形成能、PNA-DNA 二重鎖中における PPT と 4 種の天然塩基との塩基対結合様式についての考察が述べられている。

具体的には、まず、PNA とは何かを紹介し、ついで、PNA の核酸科学研究における重要性を説明しながら、標的基質を PPT 含有ペプチド核酸 (PNA) オリゴマーに変更した理由を述べている。次いで、PPT 含有 PNA オリゴマーの合成に必要な PPT 含有アミノ酸誘導体の調製および同アミノ酸と天然核酸塩基含有アミノ酸を構築単位としたマニュアル固相法による PPT を鎖中央に 1 個もつ PNA オリゴマー、 $\text{H}_2\text{N-Lys-CCT(PPT)TCC-Gly-NH}_2$ および、PPT を鎖末端に連続して 2 個もつ PNA オリゴマー、 $\text{H}_2\text{N-CCTTTC(PPT)(PPT)-Gly-NH}_2$ の合成について、詳細が述べられている。その後、これらの PPT 含有 PNA と相補的 DNA 鎖との二重鎖形成能を、両者の 1:1 混合物が形成する二重鎖の融解温度を測定することにより調べ、測定に供したすべての PPT 含有 PNA が (PPT が PNA 鎖中央に 1 個導入された場合でも、末端に 2 個導入された場合でも) 相補的 DNA 鎖と安定な二重鎖を形成する能力をもつことを明らかにしている。すなわち、PPT は、4 種類すべての核酸塩基と安定な塩基対を形成する一般性の高いユニバーサル塩基である可能性を示している。さらに PNA-DNA 二重鎖中における、PPT と 4 種の天然核酸塩基との塩基対構造について、上記 PPT 含有 PNA と相補的 DNA 鎖との二重鎖の融解温度の値を基に計算によって求めた ΔG 値を参考に、考察し、PPT は、天然核酸塩基対に見られるような水素結合を介して 4 種類の天然核酸塩基を形成している可能性があるかと推測している。

最後に、研究のまとめとして、PPT は、4 種類すべての天然核酸塩基をほぼ同等に認識し、これらと安定な塩基対を形成する、これまでに例をみない一般性に優れるユニバーサル塩基である可能性があることが再度述べられ、PPT 含有 PNA の核酸科学研究における幅広い利用への期待が述べられている。

