

## 博士論文審査結果の要旨

博士論文審査委員会

主 査 濱崎 啓太

審査委員 六車 仁志

審査委員 中村 朝夫

審査委員 松村 一成

審査委員 小出 隆規

氏 名	井上 亮
論文題目	Design, synthesis and binding study of the amino saccharide derivatives as a ligand for the hairpin RNAs
〔論文審査の要旨〕 本論文は 5 章で構成され、120 頁にわたり英文で記述されている。 本論文は天然物ネアミンが多くのアミノグリコシド抗生物質にみられる共通構造を有することに着目し、これを模倣または出発物質として複数のアミノグリコシド型小分子化合物を設計合成した。また、それら化合物の RNA-タンパク質複合体に対する結合阻害能を分光学的に評価したものである。 ネアミンの模倣体として立体配座の異なるトレハロサミン 3 種 ( $\alpha\alpha$ , $\alpha\beta$ , $\beta\beta$ ) を、またネアミンを出発物質としてリジンをスペーサーとする 4 種の核酸塩基修飾ネアミン(NbK $\epsilon$ -ネアミン)を合成した。これら 7 種類の化合物の RNA-タンパク質複合体形成に対する阻害能を評価した結果、3 種のトレハロサミン ( $\alpha\alpha$ , $\alpha\beta$ , $\beta\beta$ ) はいずれも HIV-1 の転写活性因子である TAR RNA と Tat ペプチドとの結合阻害剤としては働かないことが示され、RNA 結合分子の設計を行うにあたっては、ネアミン骨格が最小単位でかつ不可欠であることが示された。また、4 種の NbK $\epsilon$ -ネアミンは上記の TAR-Tat 複合体の形成をマイクロモラーレベルで阻害し、阻害効果も核酸塩基の種類に依存しており、これら 4 種の NbK $\epsilon$ -ネアミンのうち GbK $\epsilon$ -ネアミンが TAR-Tat 複合体形成を Tat ペプチドと比較しうる結合力で阻害することが示された。一方、これら NbK $\epsilon$ -ネアミンは同じく HIV-1 の転写活性因子である RRE-Rev に対して化学量論的な結合は認められるものの Rev ペプチドに対する結合阻害は認められず、NbK $\epsilon$ -ネアミンが TAR-Tat 結合に特異的な阻害剤であることが示されている。 公聴会では博士論文の内容に関する口頭発表に続いて聴講者との質疑応答がなされた。その後の最終審査では、審査委員との間で質疑応答を含めた最終試験を実施した。以上の審査の結果、本博士論文は RNA を標的とする新たな薬剤の開発のみならず、糖誘導体の合成法の開発の見地からも工業的にも有用と認められ、博士(工学)に資すると認められた。	

<p>※報告番号</p>	<p>甲 第 179号</p>	<p>氏 名</p>	<p>井上 亮</p>
<p>主論文題名</p> <p>Design, synthesis and binding study of the amino saccharide derivatives as a ligand for the hairpin RNAs</p>			
<p>本論文は、6章で構成し、125頁にわたり英文で記述したものである。</p> <p>本論文の内容は、アミノグリコシド抗生物質とその作用機構に着目し、ヘアピン型 RNA に結合する小分子化合物の設計合成、及び RNA 結合能の分光学的な評価に関するものである。</p> <p>内容の要旨 (1948 字)</p> <p>ヒトゲノムの解読完了が宣言され、現在はゲノムの遺伝情報の活用の研究に関心が移ってきており、その一つとして遺伝情報の発現を調整する方法論の獲得は急務とされている。遺伝情報の発現は DNA から RNA、タンパク質を介して行われている。中でも RNA は DNA とタンパク質の橋渡しとしてだけでなく、生体内の代謝物質、小分子化合物と相互作用することにより発現の調節を担っているということが近年明らかになり、特定の RNA と特異的に結合する分子の探索により新たな薬物の獲得が期待されている。天然には特定の RNA と結合する小分子が報告されており、その中でもアミノグリコシド抗生物質はヒト免疫不全ウイルス (HIV) の転写活性因子であるヘアピン型 RNA (TAR RNA、RRE RNA) と Tat、Rev ペプチドの結合阻害剤として働き、増殖を抑制することが知られている。しかしながら、従来のアミノグリコシド抗生物質には強い副作用があることや、耐性ウイルスの出現が課題となっており、HIV のヘアピン型 RNA を特異的に認識して結合する新たな小分子化合物が求められている。</p> <p>本研究では、TAR RNA、RRE RNA と特異的に結合して、HIV の増殖機構である TAR-Tat、RRE-Rev 結合を阻害する小分子化合物を探索することとし、アミノグリコシド抗生物質の基本骨格であるネアミンに着目した。ネアミンは、2,6-diaminoglucose 構造と 2-deoxystreptamine 構造とからなり、ネアミン骨格の改変、及びネアミン骨格への修飾について検討した。新規な小分子化合物として、①ネアミンを 2,6-diaminoglucose 二分子からなる非還元性二糖構造で模倣したトレハロサミン、②ネアミンの 2-deoxystreptamine 構造を 1,3-diaminophenol で置換した芳香族アミノグリコシド、③ネアミンの 6 位のアミノ基にリジンを通して核酸塩基を導入した核酸塩基修飾ネアミンを設計し、HIV のヘアピン型 RNA (TAR RNA、RRE RNA) に対する結合力の向上を目指すと共に、結合特異性について検討した。</p> <p>第 2 章では、非還元性二糖構造を有するトレハロサミンの合成に先駆けて、簡便な脱水縮合型グリコシル化反応による非還元性二糖骨格の構築について検討した。一般的なグリコシル化反応は、糖供</p>			

与体のアノマー水酸基に脱離基を導入する必要があるが、ビスマス(Ⅲ)トリフレートを用いることで、アノマー水酸基が遊離の1-ヒドロキシ糖を活性化して収率よく脱水縮合型グリコシル化反応が進行することを見出した。さらに、本脱水縮合型グリコシル化反応を用いて、種々の非還元性二糖を簡便に合成する手法を確立した。

第3章では、トレハロサミン、芳香族アミノグリコシドの合成について検討した。トレハロサミンは、第2章で合成した非還元性二糖へのアミノ基の導入について検討し、2,6位にアミノ基を有するトレハロサミンを3種の構造異性体(□□、□□、□□)として合成することに成功した。芳香族アミノグリコシドは *N*-acetyl-**D**-glucosamine と 1,3-diaminophenol を出発物質として、保護基を導入した4つのアミノ基を有する芳香族アミノグリコシド前駆体を合成した。しかしながら脱保護が進行せず、目的とした芳香族アミノグリコシドを得るまでに至らなかった。

第4章では、核酸塩基修飾ネアミンの合成について検討した。4種の核酸塩基(Ab、Cb、Tb、Gb)をリジンの□位に導入した核酸塩基修飾ネアミンの合成に成功した。

第5章では、第3,4章でそれぞれ合成したトレハロサミンと核酸塩基修飾ネアミンの TAR-Tat、RRE-Rev 結合阻害剤としての評価について検討した。蛍光修飾ペプチドをトレーサーとして用いた RNA 結合評価の結果、3種のトレハロサミンは、いずれも HIV の転写活性因子である TAR-Tat 結合阻害剤としては働かないことが示された。これは RNA 結合分子設計を行うにあたり、ネアミン骨格が不可欠であることが示唆された。また、4種の核酸塩基修飾ネアミンは TAR-Tat 複合体の形成を阻害し、阻害効果も核酸塩基の種類に依存していた。一方、これら核酸塩基修飾ネアミンは同じく HIV の転写活性因子である RRE-Rev に対して RRE との結合は確認されたものの、Rev ペプチドに対する結合阻害能は認められず、これら核酸塩基修飾ネアミンが塩基の種類に依存した特異的な TAR-Tat 結合阻害剤であることが示された。

本研究結果によって、HIV の増殖抑制を目指した、HIV RNA と特異的に結合する小分子化物の探索研究に重要な情報を与えることができたと考えられる。