

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07856

研究課題名(和文) セレン修飾核酸の高効率的合成法の開発とその応用

研究課題名(英文) Development of high efficient synthesis method of selenium nucleosides and its application

研究代表者

額 守 (KOKETSU, Mamoru)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：50178208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、セレンウムを含有する化合物の薬理活性が注目されてきている。我々はまずトリメチルシリルエチル(TSE)セレン基を用いた直接的な官能基導入法による各種5'位セレン修飾核酸の有用な合成法開発に取り組んだ。この方法を応用し、Se-アデノシル-L-セレノメチオニン(SeAM)の合成に成功した。加えて、我々はこの方法を用いて2'位セレン修飾ウリジン誘導体の合成ルートも確立した。さらにTSEセレン基をアミノ酸誘導体合成に応用し、セレノシステインやセレノグルタチオン誘導体の合成に成功した。我々はTSEセレン基が生体物質へのセレン導入試薬として非常に有用で汎用性が高いことを確認した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, selenium-containing biomolecules have been documented as promising pharmacological agents. We initially explored an efficient method for the synthesis of 5'-selenium modified nucleosides based on the idea of direct functionalization of 2-(trimethylsilyl) ethyl (TSE) selenyl groups. This method was successfully applied to the synthesis of highly functionalized nucleoside, Se-adenosyl-L-selenomethionine (SeAM). In addition, we developed a valuable route for the synthesis of 2'-alkylselenouridine derivatives via a 2-(trimethylsilyl) ethylselenation approach. Furthermore, we applied the 2-TSE selenyl group to the synthesis of selenium-containing amino acid derivatives including biologically important selenocysteine (Sec) and selenogluthathione (GSeH) derivatives. Our findings highlight the great utility and versatility of the 2-TSE selenyl group as a selenating reagent into biomolecules.

研究分野：有機合成

キーワード：核酸 セレン元素 アミノ酸 セレン導入試薬 セレノグルタチオン アデノシル-セレノメチオニン
セレン修飾ウリジン

1. 研究開始当初の背景

核酸の医薬品開発において 1998 年世界初のアンチセンス医薬品である Vitravene や RNA アプタマー (アプタマー (Aptamer): 特定の分子と特異的に結合する核酸分子やペプチド) として Macugen が知られており、RNAi 法や SELEX 法によるアプタマーなどの医薬品開発が行われている。核酸の酸素原子を同族元素である硫黄原子やセレン原子に置換した核酸は天然型 RNA との生物学的等価性を維持しながら新たな機能を付加することができるため、医薬品開発においてとても興味深いことであるが、セレン原子を導入した報告例は非常に少ない。

世界三大感染症のひとつである HIV が逆転写を行う際の特定の RNA プライマーである ヒト tRNA^{Lys,3} は HIV ゲノム RNA との RNA-RNA 相互作用による HIV 転写開始複合体を形成しウイルス感染を引き起こす (Nature, Struct. Mol. Biol., 1998, 5, 12)。C. Isel らは、天然のヒト tRNA^{Lys,3} に存在する **ウリジンの硫化修飾体(U9)** が HIV 転写開始複合体の形成に必須であることを提唱した (J. Biol. Chem., 1993, 268, 25269, EMBO J., 1999, 18, 1038)。これは、酸素原子 (O: 原子半径 0.60 Å) に比べ原子半径の大きな硫黄 (S: 原子半径 1.02 Å) と 2' 位水酸基との立体反発により、mcm⁵s²U (U9) のリボースが C3'-endo 型のパッキングフォメーションをとるためである (Fig. 1)。

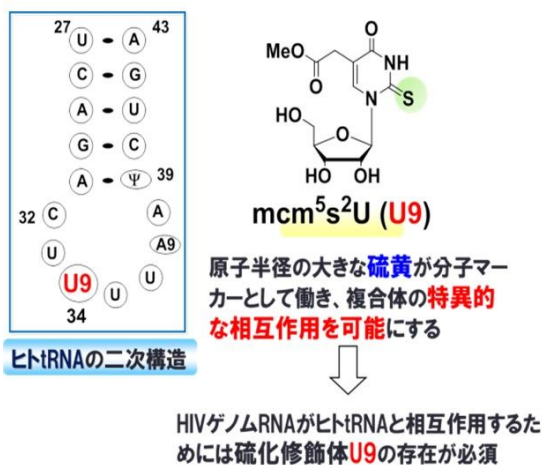


Fig. 1 HIV 転写開始複合体形成に必須の硫化修飾体U9

さらにユタ大学の D. R. Davis らは、E. coli. tRNA^{Lys} に存在する mnm⁵s²U (U8) がこの複合体をさらに強力に安定化させることを報告した (J. Am. Chem. Soc., 2002, 124,

14302.)。5 位側鎖の **メチルアミノメチル基** の寄与により、U8 は U9 を凌駕するほど強力に HIV ゲノム RNA と相互作用する (Fig. 2)。

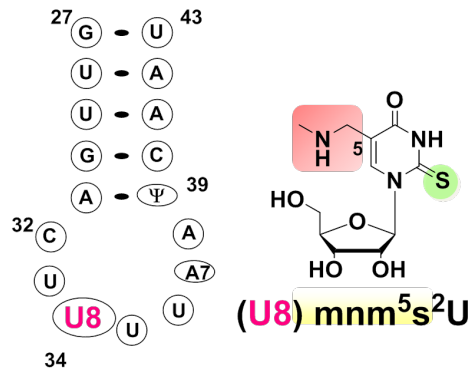


Fig. 2 E. coli. tRNAの二次構造

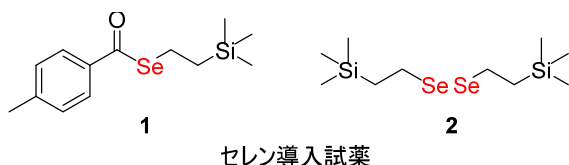
また、現在、**多波長異常分散法 (Multiwavelength Anomalous Diffraction (MAD) 法)** により多くのたんぱく質が解析されている。重原子であるセレン原子の回折能が異なる波長を複数選んでデータを取得し、1つの試料結晶から良好な回折強度データが得られる非常に強力な手法でタンパク質結晶の X 線構造解析の世界を一変させたといっても過言ではない。近年、核酸分子の糖部分にセレン原子を導入することで MAD 法への応用を指向した研究が展開されている (Org. Lett. 2011, 13, 2000, J. Org. Chem., 2010, 75 (3), 637; J. Am. Chem. Soc., 2004, 126 (2), 448.)。

2. 研究の目的

強力なセレン導入試薬を基盤としたセレン修飾核酸の効率的合成法の開発。それらを用いた HIV ゲノム RNA との強力な相互作用が期待されるセレン修飾核酸 mnm⁵se²U (5-methylamino methyl-2-seleno-uridine) RNA モノマーの初の化学合成及びたんぱく質単結晶の飛躍的な効率的解析に導く多波長異常分散法 (MAD 法) への展開のための各種核酸糖部セレン修飾核酸の新規合成。

3. 研究の方法

1) 我々が開発した 2 つの新規セレン導入試薬を用いた核酸への TSE セレノ基の効率的な導入法の開発。

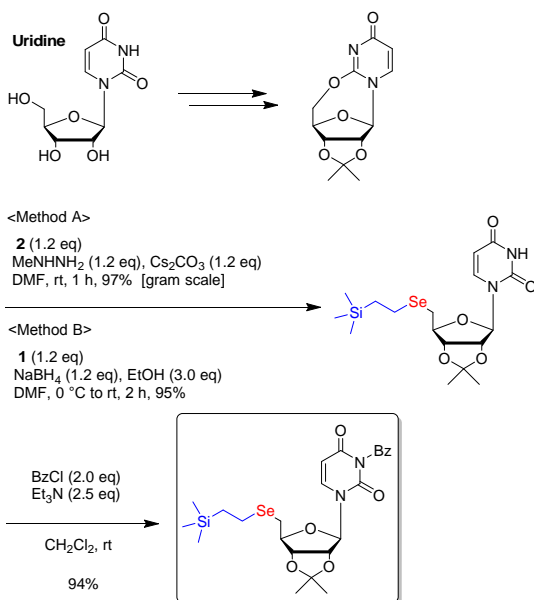


2) TSE セレノ基導入法を活用した新規

セレン修飾核酸とその応用

4. 研究成果

まずはじめにウリジン 5'位へのセレン基の導入を検討した。ウリジンを酸触媒存在下、2,2-ジメトキシプロパン (DMP) を用いて糖部の 2', 3' 位の水酸基をイソプロピリデン保護することにより、収率 95% でイソプロピリデン保護体を得た。続いて、光延らの合成法¹³ に倣い、分子内光延反応により、収率 94% でシクロウリジンを得た。鍵となるセレン導入反応は、2-トリメチルシリルエチル (TSE) セレニル基を活用することとした。核酸分子へ TSE セレニル基の導入を試みたところ、目的とする糖部セレン置換体をセレン導入試薬 1 および 2 いずれを用いても高収率で与えた (Method B: 95%、Method A: 97%)。シクロウリジンとセレン導入試薬 1 および 2 との反応では、塩基部 2 位への攻撃ではなく、糖部の 5' 位の炭素へのセレンラートの攻撃が優先した。続いて、トリエチルアミン存在下、ベンゾイルクロリドとの反応により 3 位窒素のベンゾイル保護を行い収率 94% でベンゾイル保護体を得た (スキーム 1)。



スキーム 1 セレン導入試薬 1 および 2 を用いた鍵中間体の合成

また、5'-TSE セレノウリジンの ⁷⁷Se NMR は 181.9 ppm であり、セレニドのケミカルシフト値と近い値であることを確認した。さらに、この化合物は単結晶を作成することにより、X線構造解析を行いその絶対立体構造を明らかとした (図 1)。

続いて、セレン修飾体合成における鍵中間体と各種ハライドとの反応の反応性について検証した (表 1)。脂肪族のアルキルハライドでは、64 - 80% の収率であった (Entries 1-3)。また、2 級アルキルハライドよりも 1 級アルキルハライドの方が立

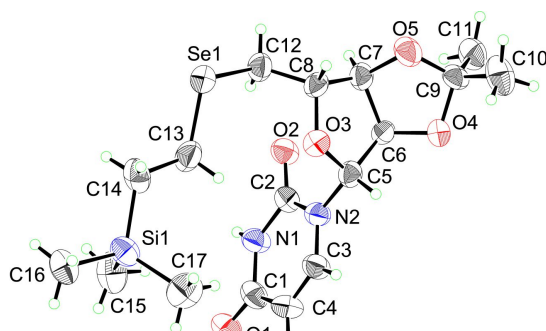
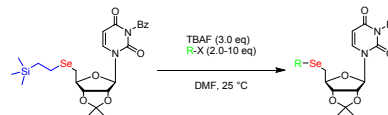


図 1 5'-TSE セレノウリジンの ORTEP 図

体障害の低下による反応性向上により高収率であった。続いて、パラ位に置換基を有するベンジルハライドでは収率 61 - 93% であった (Entries 4-6)。そして、不飽和結合を有するアリルハライドやプロパルギルハライドでは収率 85 - 86% であった (Entries 7, 8)。脂肪族アルキルハライドと比べ、より S_N2 反応が有利な不飽和アルケニルおよびアルキニルハライド、そしてベンジルハライドの方が高収率の結果を与えた。また、極性官能基を有するメトキシエチルハライドやエポキシドとの反応も収率 70 - 74% (Entries 9, 10) であり、官能基適用性が確認された。

表 1 N-Bz-TSE-ウリジンと各種求電子剤との反応



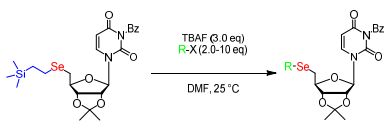
Entry	Electrophile		Time (h)	R	Yield (%) ^a
	R-X	Equiv.			
1	MeI	5.0	1	*-Me	80
2		5.0	2	*-CH ₂ CH ₃	74
3		3.0	3	*-CH(CH ₃) ₂	64
4		2.0	2	*-CH ₂ Ph	81
5		3.0	2	*-CH ₂ Ph-4-CH ₃	93
6		3.0	3	*-CH ₂ Ph-4-NO ₂	61
7		3.0	2	*-CH ₂ CH=CH ₂	85
8		3.0	1	*-CH ₂ C≡CH	86
9		3.0	2	*-CH ₂ CH ₂ OMe	74
10		10	3	*-CH ₂ CH(OH)CH ₃	70

^a isolated yield.

続いて、さらなる官能基適用性の検証を行った (表 1)。まず、オルト位あるいはパラ位に電子求引基を有するフッ化ベンゼンとの S_NAr (芳香族求核置換反応) は収率 60 - 63% (Entries 11, 12) で進行した。既存の水素化ホウ素ナトリウムを用いた有機ジセレニドの活性化による還元導入では還元反応が伴うことが想定される官能基の導入を行うことができた。ケトン は収率 60 - 80% (Entries 13, 14) また、エステルは収率 77 - 90% (Entries 15, 16) そして、ニトリルは収率 67% (Entry 17) で目的物が得られた。さらにはアミノ酸誘導体 (ホモセ

リンヨウ素体)との反応も収率 73% (Entry 18) で進行し、高度に官能基化された基質においても本手法を適用することができた。以上のように本手法を用いることにより多種多様な 5'-セレン修飾核酸を合成することが可能となった。

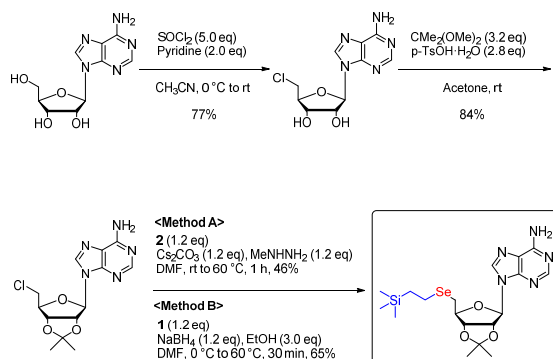
表 1 N-Bz-TSE-ウリジンと各種求電子剤との反応 (続き)



Entry	Electrophile		Time (h)	R	Yield (%) ^a
	R-X	Equiv.			
11		2.0	0.5		60
12		2.0	0.5		63
13		10	5		60
14		3.0	3		80
15		4.0	5		90
16		5.0	10		77
17		3.0	3		67
18		2.0	6		73

^a Isolated yield.

基質適用性の観点からプリン系ヌクレオシドであるアデノシンについても検証することとした。アデノシンを塩化チオニル、ピリジン存在下にて収率 77%で 5'-クロロ体を得た。続いて、酸触媒存在下、2,2-ジメトキシプロパン (DMP) を用いて糖部の 2', 3' 位の水酸基をイソプロピリデン保護することにより収率 84%でイソプロピリデン保護体を得た。この化合物とセレン導入試薬 1 および 2 を反応させることにより、5' 位へ TSE セレニル基を導入した 5'-TSE-アデノシンを合成した (Method B: 65%, Method A: 46%)。5'-TSE-アデノシンを鍵中間体として各種求電子剤との反応を検証することとした (スキーム 2)。

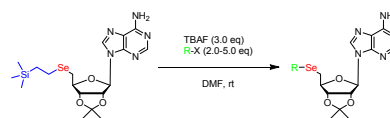


スキーム 2 セレン導入試薬 1 および 2 を用いた鍵中間体の合成

続いて、さらなる基質適用性を検証する

ため、プリン塩基であるアデノシンに対しても本手法を適用することとし、各種求電子剤との反応を検証した (表 2)。

表 2 TSE-アデノシンと各種求電子剤との反応



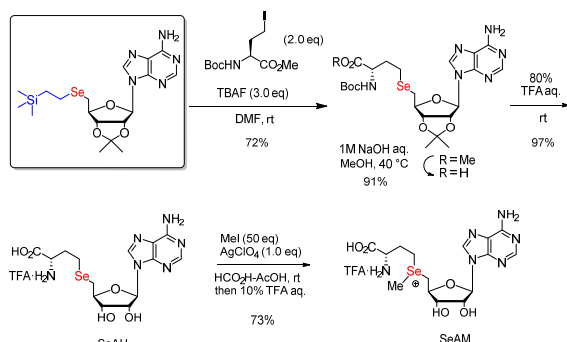
Entry	Electrophile		Time (h)	R	Yield (%) ^a
	R-X	Equiv.			
1	MeI	5.0	5		46
2		3.0	4		71
3		3.0	10		51
4		2.0	4		70
5		3.0	3		61
6		3.0	4		75
7		2.0	10		72

^a Isolated yield.

鍵中間体とアルキルハライドの反応では、収率 46 - 71% (Entries 1-3) であった。また、2 級アルキルハライドよりも 1 級アルキルハライドの方が立体障害の低下による反応性向上から高収率の結果となった。続いて、ベンジルハライドは収率 70% (Entry 4) 不飽和結合を有するアリルハライドは収率 61% (Entry 5) やプロパルギルハライドは収率 75% (Entry 6) という結果であり、脂肪族アルキルハライドと比べ、高収率の結果を与えた。また、高度に官能基化されたアミノ酸誘導体 (ホモセリンヨウ素体) も収率 72% (Entry 7) にて本手法を適用することができた。この結果、プリン系ヌクレオシドであるアデノシンにおいてもセレン修飾体の合成に成功した。

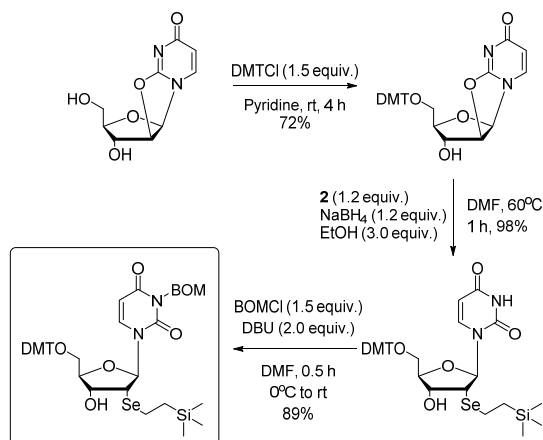
エピゲノム創薬における DNA メチル化機構を利用した抗ガン剤研究において、S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) の硫黄原子をセレン原子で置換した Se-アデノシル-L-セレノメチオニン (SeAM) は非常に高いメチル化能を有するためプローブとして非常に有用である。SeAM 合成における既存の方法は、諸問題が散見されるため本研究では、これらの課題を解決した方法の開発を目指した。上記で得たホモセリン体を塩基性条件でメチルエステル基の加水分解により収率 91%でカルボン酸を得た。Boc 基およびイソプロピリデン基を含水 TFA で脱保護することにより、収率 97%で SeAH を得た。本工程はジエチルエーテルによる結晶化・ろ取で得ていることから、操作性ならびに精製効率の向上が行えた。最終工程の 3 価セレンを生成させるメチル化反応は、過塩素酸銀存在下、ヨウ化メチルとの反応により収率 73%で SeAM を合成することができた (スキーム 3)。¹H NMR において、SeAM の新たに構築した 3 価セレンのメチル基に相当するピークはそれぞ

れ、 $\delta = 2.81$ ppm、 2.77 ppm であり、Se-エピマーの比率は 47 : 53 であった。



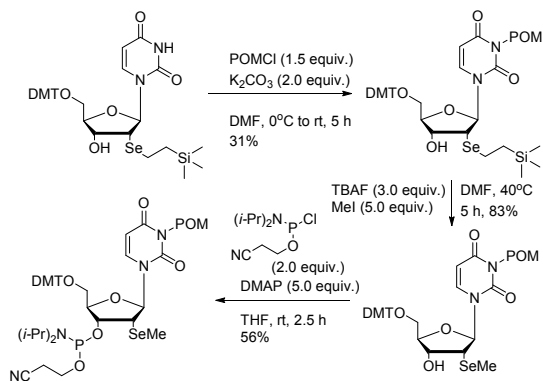
スキーム 3 SeAH と SeAM の合成

次にウリジン 2' 位へのセレノ基の導入を試みた。2,2'-*O*-シクロウリジンの 1 級アルコールを DMT 保護した後、セレン導入試薬 2 を用いて 2' 位へ TSE セレノ基を導入することに成功した。収率も 98% と良好であった (スキーム 4)。



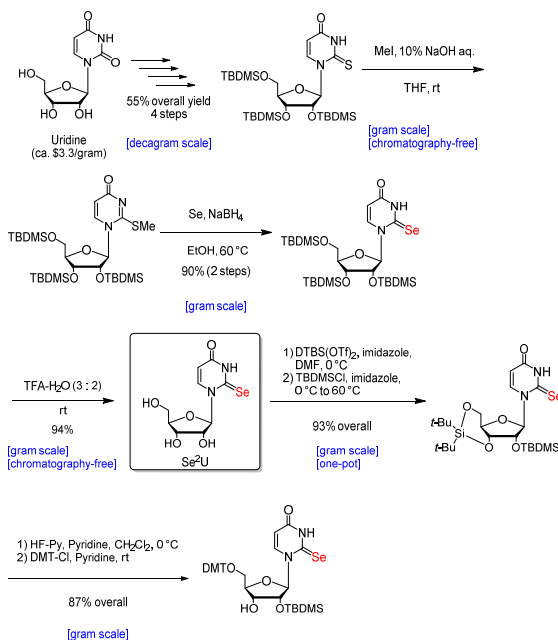
スキーム 4 セレン導入試薬 1 および 2 を用いた鍵中間体の合成 2

さらにこの鍵中間体を用いて 2'-メチルウリジンのホスホラミダイト誘導体の合成に取り組んだ。まず、TBAF と MeI を用いて 89% の収率でセレンメチル体を得た後、3' 位の水酸基をホスホラミダイト化し、目的生成物の調製を行った (スキーム 5)。



スキーム 5 2'-メチルウリジンホスホラミダイトの合成

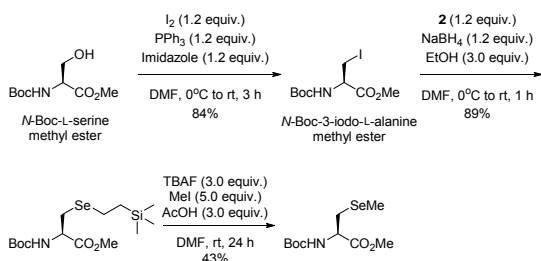
次に 2-セレノウリジンの効率的な合成ルートを開発する。現在報告されている方法では分離精製が非常に煩雑であったり、ミリグラムスケールでの合成報告にとどまっており、我々はこれらの諸問題を解決しグラムスケール合成を行える堅牢な合成法の確立を目指すこととした。



スキーム 6 2-セレノウリジンの効率的な合成

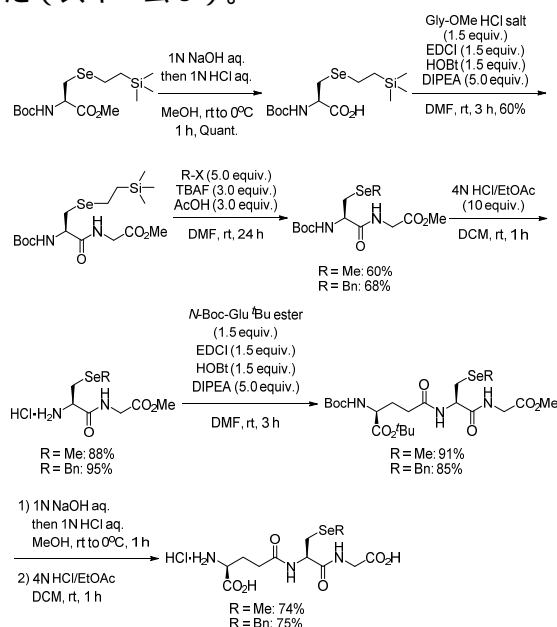
まず、関根らの方法に倣い、安価に購入可能なウリジンより 2',3',5'-*O*-TBDMS-2-チオウリジンを 10.4 g スケール、収率 55% で合成した後、*S*-アルキル化反応を行い、2',3',5'-*O*-TBDMS-2-メチルチオウリジンを高収率にて得た。続いて、Se と NaBH₄ により調製した NaHSe と EtOH 中 60 °C にて反応させることにより 6.5 g の 2',3',5'-*O*-TBDMS-2-セレノウリジンを収率 90% で得た。TBDMS 基の脱保護は、含水 TFA を用いることにより 2.3 g の 2-セレノウリジンを収率 94% で合成することができた。続いて、Se²U-アミダイト前駆体の合成を検討することとした。2-セレノウリジン (1.2 g) の 3'- および 5'-水酸基を 1.1 等量のジ-*tert*-ブチルシリルビス (トリフルオロメタンスルホナート) (DTBS (OTf)₂) と DMF 中、0 °C で反応させることにより 3',5'-*O*-保護体を得た。それを one-pot で 2' 水酸基を TBDMS 化することで 2.0 g の TBDMS 体を収率 93% で得た。その後、選択的に DTBS 基を脱保護し 2'-*O*-TBDMS-2-セレノウリジンを得た。最後に DMT 化して 2.3 g の 2-セレノウリジンアミダイトモノマー前駆体収率 87% で合成することができた。この前駆体は既知の方法にてアミダイトモノマーへと誘導可能である。以上より、2-セレノウリジンアミダイトモノマー前駆体を 10 工程、収率 38% で安価なウリジンよりグラムスケールで合成することができた (スキーム 6)。

最後に TSE セレノ基導入法をセレノアミノ酸誘導体合成に応用することに取り組んだ。N-Boc-L-セリンメチルエステルを Appel 反応にてヨウ素化し、セレン導入試薬 2 を用いて鍵中間体の調製に成功した。また、セレノメチル化も恙無く進んだ (スキーム 7)。



スキーム 7 セレノ導入試薬 1 および 2 を用いた鍵中間体の合成 3

次にトリペプチドの一種であるセレノグルタミン誘導体の化学合成に挑戦した。これはグルタミン酸、セレノシステイン、グリシンから構成され、細胞内の酸化還元状態を制御する重要なトリペプチドである。鍵中間体へのグリシンの導入には TSE セレノ基を保持したまま、良好に反応が進行した。セレノメチル化およびセレノベンジル化後、Boc の脱保護およびグルタミン酸の導入時もセレノアルキル基を保持したまま反応を順調に行うことが可能であった。最後に全保護基を除去して目的とする生成物を鍵中間体から 21% (Glu-Sec(SeMe)-Gly) および 34% (Glu-Sec(SeBn)-Gly) の収率で得た。TSE セレノ基導入法は十分にペプチド合成にも応用可能であることが証明された (スキーム 8)。



スキーム 8 セレノグルタチオン誘導体の合成

このように調製した各種セレノ修飾核酸誘導体は、現在、生理機能の評価を進めている。また、さらに生体分子への TSE セ

レノ基の導入にも取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Application of bis-2-(trimethylsilyl)ethyl diselenide to the synthesis of selenium-containing amino acid derivatives (Tsubasa Yonezawa, Masahito Yamaguchi, Masayuki Ninomiya, and Mamoru Koketsu) *Tetrahedron*, **73**, 6085-6091 (2017). 査読有

DOI: 10.1016/j.tet.2017.09.004

Preparation of 2'-alkylselenouridine derivatives via a 2-(trimethylsilyl)ethylselenation approach (Shota Fukuno, Masayuki Ninomiya, and Mamoru Koketsu) *Synlett*, **28**, 831-834 (2017). 査読有

DOI: 10.1055/s-0036-1588937

An efficient synthesis of 2-selenouridine and its phosphoramidite precursor (Masakazu Kogami, Darrell R. Davis, and Mamoru Koketsu) *Heterocycles*, **92**, 64-74 (2016). 査読有

DOI: 10.3987/COM-15-13349

An efficient method for the synthesis of selenium modified nucleosides: Its application to the synthesis of Se-adenosyl-L-selenomethionine (SeAM) (Masakazu Kogami and Mamoru Koketsu) *Organic & Biomolecular Chemistry*, **13**, 9405-9417 (2015). 査読有

DOI: 10.1039/C5OB01316J

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www1.gifu-u.ac.jp/~kulab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

纈纈 守 (KOKETSU, Mamoru)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号: 50178208