

平成 31 年 5 月 6 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18295

研究課題名(和文)糖部とリン酸部の配座を精密に制御したスピロケタール型人工核酸類の合成と機能評価

研究課題名(英文) Synthesis and properties of artificial nucleic acids with spiroketal moiety based on the control of the conformation of sugar and phosphate backbone

研究代表者

大澤 昂志 (Osawa, Takashi)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：00783226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖部配座をN型に固定し、かつリン酸部の二面角を固定したTricyclic-LNAの構造を単純化したアナログとしてスピロケタール型人工核酸を設計し、チミン塩基を持つスピロケタール型人工核酸類(2'-デオキシ体ならびに2'-メトキシ体)を合成した。合成した2'-デオキシ体の糖部配座をプロトンNMR測定によって解析した結果、5'-S体は望み通り、糖部配座とリン酸部の二面角がTricyclic-LNAと類似した配座をとることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スピロケタール構造によって核酸糖部とリン酸部の配座を適切に固定できることを、世界で初めて見出した。さらに、本人工核酸は原料のチミンや5-メチルウリジンから10工程と、従来の人工核酸と比較して大幅に短い工程数で合成できた。このことは、実用的な高機能性人工核酸を開発するという目標の達成を目指す上で、本研究成果の特筆すべき点である。また今後、スピロケタール型人工核酸が優れた相補鎖RNA結合能を有することを明らかにできれば、本研究の成果が高機能性人工核酸の新しい分子設計の基盤になる可能性が秘められている。

研究成果の概要(英文)：Nucleic acids with spiroketal structure, which were simplified Tricyclic-LNA analogs based on the control of the conformation of sugar and phosphate backbone, were designed. Thymidine derivatives and 2'-O-methyl-5-methyluridine derivatives with spiroketal structure have been synthesized, respectively. The conformational analysis of synthesized thymidine derivatives by ¹H NMR measurements indicated that the conformation of sugar and phosphate backbone of 5'-S-isomer was similar to those of Tricyclic-LNA, as we expected.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖部を N 型配座に固定した架橋型核酸 2',4'-BNA/LNA を導入したオリゴ核酸は、極めて高い相補鎖 RNA 結合能のみならず、架橋環の立体障害により優れた核酸分解酵素耐性能も有する。そのため、架橋型核酸はオリゴ核酸医薬の素材として多大な期待が持たれており、すでにその実用化へ向けた多くの臨床試験が世界中で進められている。

ところで、一本鎖核酸には糖部だけでなく、リン酸部にも構造の揺らぎがあり、例えば 5'位水酸基の向きが精密に制御された、tricyclo-DNA もまた高い相補鎖 RNA 結合能を有することが知られている。このような背景から、核酸の糖部配座を N 型に束縛しながら、5'位水酸基の位置も適切に固定できれば、2',4'-BNA/LNA を上回る優れた機能性人工核酸ができると考えた。実際にこの戦略に基づいて IONIS 社が開発した TriNA (図 1) は、2',4'-BNA を上回る相補鎖 RNA 結合親和性を有することが明らかにされている。しかし、TriNA は構造があまりに複雑で、その合成は出発物質の 5-メチルウリジンから 22 工程要するなど非常に煩雑であった。そこで私たちは、糖部とリン酸部の配座を制御しながら、TriNA より単純な構造で、簡単に合成できる分子の開発を目指した。本研究では、6'位酸素原子が糖部配座を 4'位のアノマー効果によって電子的に N 型に固定する性質と、1,3-ジアキシャルの立体反発によって置換基がエクアトリアル位に向く 6 員環いす型配座の構造的特性を活かしたスピロケタール型人工核酸 **1** を設計し、その合成に着手した (図 1)。

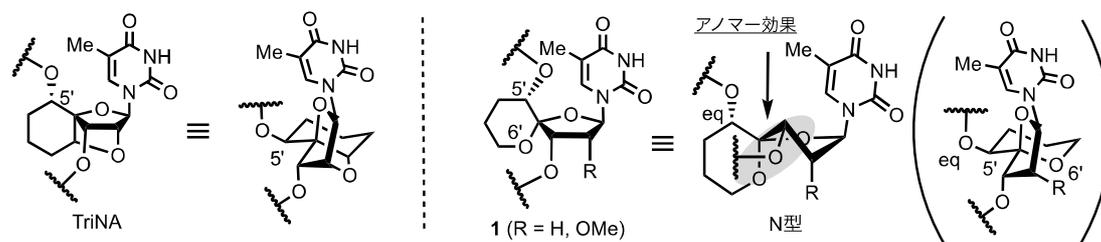


図 1 糖部とリン酸部の配座を固定した TriNA とスピロケタール型人工核酸 **1**

2. 研究の目的

本研究の目的は、2',4'-BNA/LNA を凌ぐ実用的で機能性の高い人工核酸材料を開発することである。その実現に向けて本研究では、糖部とリン酸部の配座を厳密に固定し、かつ短工程で合成可能なスピロケタール型人工核酸を合成し、そのオリゴ核酸中での性質、機能进行评估する。

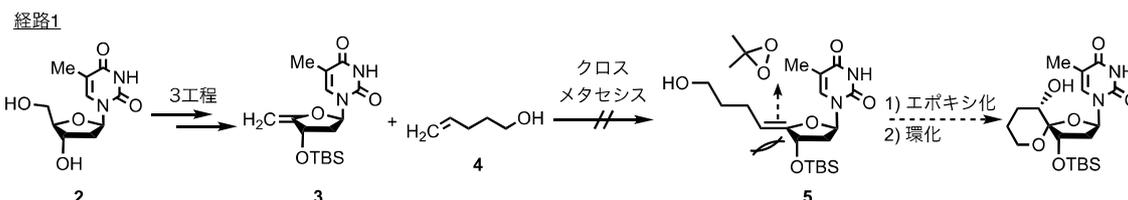
3. 研究の方法

- (1) 糖部とリン酸部の配座を同時に制御したスピロケタール型人工核酸の短工程合成を目指す。続いて、スピロケタール型人工核酸が 2',4'-BNA 類や TriNA と異なり、糖部 2'位の自在な化学修飾が可能であることを利用して、スピロケタール型人工核酸 2'位をメトキシ基で修飾する。2'位のメトキシ基修飾によって強固に糖部を N 型配座に固定することが狙える。また、合成した人工核酸について、モノマーの NMR 測定による構造解析を行う。
- (2) スピロケタール型人工核酸を導入するためにホスホロアミダイト体へと誘導し、オリゴ核酸を合成する。続いて、合成したオリゴ核酸の相補鎖 RNA 結合親和性や核酸分解酵素耐性能を含めた基礎的な物性評価を行う。さらに、本物性評価の結果から、特に優れた物性を示すことが明らかになった誘導体について、オリゴ核酸医薬としての適用可能性を実証する目的で *in vitro* 実験に移行し、脂質異常症の治療標的とされるアポリポタンパクの一種 ApoB を標的としたアンチセンスオリゴ核酸の遺伝子発現抑制効果を調べる。

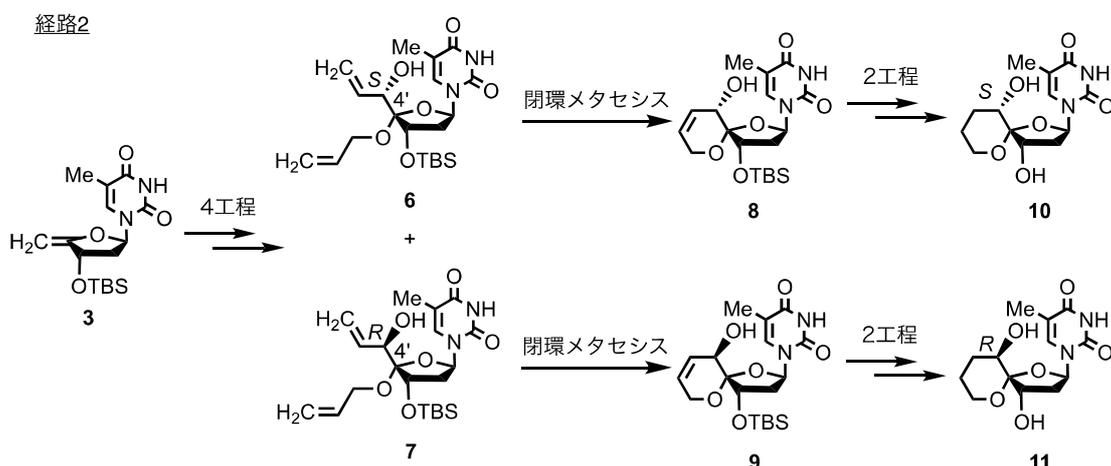
4. 研究成果

(1) スピロケタール型人工核酸の合成

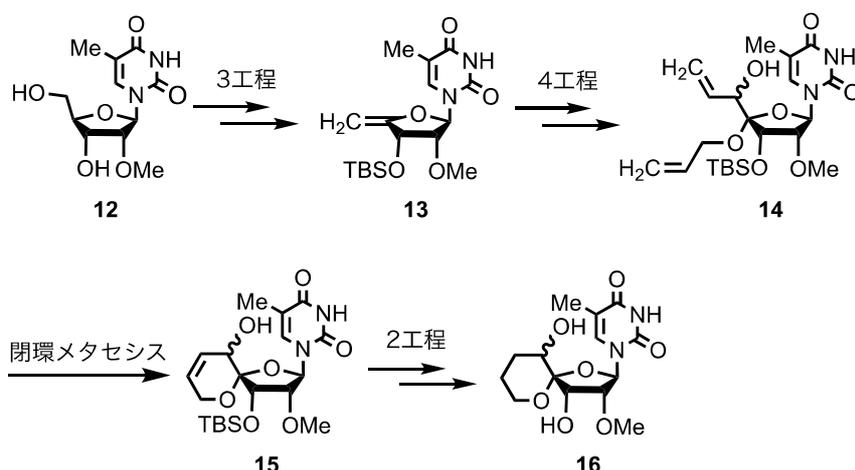
はじめに、Tan 先生らの報告 (Tan, D. S. *et al. Org. Lett.* **2014**, *16*, 2474.) に倣った下の経路 1 に示すようなオレフィン **5** のジアステレオ選択的エポキシ化に続く、ルイス酸性条件下での S_N2 型のエポキシドの開環に伴う環化反応を検討するために、基質となるオレフィン **5** の合成に着手した。原料のチミジン **2** から 3 工程で合成したオレフィン **3** と 4-ペンテン-1-オール **4** のクロスマタセシスによって、環化反応の前駆体 **5** の合成を試みた。しかし、望みの化合物 **5** を得ることができる条件を見いだすことができなかったため、この合成を断念した。



次に、ジアステレオ選択的 4'-アリルオキシ化 (Rosenberg, I. *et al. Org. Lett.* **2015**, *17*, 3426.) と閉環メタセシスを経て環化することを試みた (経路 2)。はじめに、オレフィン 3 のエポキシ化に続くルイス酸性条件下でのジアステレオ選択的 4'-アリルオキシ化によって得られたアルコールから、2 工程かけて閉環メタセシスの基質となるジエン 6 (5'S 体) ならびに 7 (5'R 体) を得た。これらジアステレオマーはシリカゲルカラムによってそれぞれ単離することができた。今回設計した人工核酸は 5'S 体であったが、5'R 体についても糖部構造を明らかにできれば、非常に興味深い知見になるので、得られた化合物 6 と 7 をそれぞれ閉環メタセシス反応条件に付した。その結果、環化体 8 および 9 をそれぞれ良好な収率で得ることができた。その後、2 工程かけてスピロケタール型人工核酸モノマー 10 (5'S 体) ならびに 11 (5'R 体) に導いた。その結果、スピロケタール型人工核酸の合成をチミジンから 10 工程で達成し、TriNA (出発原料から 22 工程) と比較して、合成工程数の大幅な削減を実現できた。また、合成したモノマーの構造は NMR 測定によって解析し、5'S 体 10 については設計通り、TriNA と類似した立体構造をとることを確認した。一方で、5'R 体 11 はフラノース環部分が 5'S 体 10 とは異なる配座をとる可能性が示唆されたが、その詳細はまだ明らかにできていない。今後、X 線結晶構造解析などを用いた詳細な構造解析が必要と考えている。



また、2'位をメトキシ基で修飾した人工核酸 16 の合成も行なった。具体的には、上記の経路 2 を参考にした合成経路を経て、原料の 2'-O-メチル-5-メチルウリジン 12 から 10 工程でその合成を達成した。しかし、合成中間体 14 や 15 を含め、合成した 2'-メトキシ体の 5'S 体と 5'R 体をシリカゲルカラムでそれぞれ単離することができず、2'-メトキシ体 16 の糖部配座の解析を試みることができなかった。



続いて、合成したスピロケタール型人工核酸 10 と 11 をオリゴ核酸に導入するためにホスホロアミダイト体への変換を試みた。しかし、10 や 11 の 5'位水酸基の反応性が予想以上に悪く、オリゴ核酸合成に一般的に利用されるジメトキシトリチル基やレプリニル基で 5'位水酸基を保護することができず、研究期間内に望みのホスホロアミダイト体を得ることができなかった。今後研究費が得られた際に引き続き検討していきたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Osawa, T.; Hitomi, Y.; Wakita, S.; Kim, H.; Ito, Y.; Hari, Y. Synthesis and hybridizing properties of *iso*DNAs including 3'-O,4'-C-ethyleneoxy-bridged 5-methyluridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 3875–3881 (査読あり)

DOI: 10.1016/j.bmc.2018.05.043

Osawa, T.; Hitomi, Y.; Wakita, S.; Kim, H.; Dohi, M.; Horiba, M.; Ito, Y.; Obika, S.; Hari, Y. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 3'-O,4'-C-ethyleneoxy-bridged 5-methyluridines. *Heterocycles* **2018**, 97, 306–313 (査読あり)

DOI: 10.3987/COM-18-S(T)20

[学会発表] (計 7 件)

Takashi Osawa, Han Kim, Misa Shoji, Masakazu Dohi, Yuta Ito, Satoshi Obika, Yoshiyuki Hari, Synthesis and properties of oligonucleotides including 2'-C,4'-C-methyleneoxy-bridged thymidines, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018, 2018/11/7-9, Kyoto University (Kyoto)

大澤昂志、脇田佐和子、人見優香、金 ハン、伊藤勇太、張 功幸、3',4'-エチレンオキシ架橋型核酸の合成とその二重鎖核酸形成能、日本核酸医薬学会第 4 回年会、2018/7/9-12、九州大学 (福岡県福岡市)

張 睿珍、大澤昂志、伊藤勇太、張 功幸、スピロケタール構造を有するチミジン誘導体の合成、第 138 回日本薬学会学会、2018/3/25-28、石川県金沢市

大澤昂志、脇田佐和子、人見優香、金 ハン、伊藤勇太、張 功幸、アデニン塩基を持つ 3',4'-EoNA で修飾したオリゴ核酸の合成とその二重鎖形成能、第 138 回日本薬学会学会、2018/3/25-28、石川県金沢市

金 ハン、大澤昂志、土肥正和、伊藤勇太、小比賀 聡、張 功幸、メチレンオキシ架橋をもつチミジンの合成およびそれを導入したオリゴ核酸の二重鎖核酸形成能、第 138 回日本薬学会学会、2018/3/25-28、石川県金沢市

Takashi Osawa, Yuka Hitomi, Sawako Wakita, Masakazu Dohi, Yuta Ito, Satoshi Obika, Yoshiyuki Hari, Synthesis and 3',4'-ethyleneoxy-bridged 5-methyluridines with a 7'-methyl substituent and duplex-forming ability of their modified oligonucleotides, The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2017, 2017/11/14-16, Tokyo University of Science (Tokyo)

大澤昂志、人見優香、脇田佐和子、土肥正和、伊藤勇太、小比賀 聡、張 功幸、3',4'-エチレンオキシ架橋型 5-メチルウリジンを導入したオリゴ核酸の合成とその相補鎖 RNA 結合能、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2017/10/21-22、徳島大学 (徳島県徳島市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。