

平成 22 年 4 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20750127

研究課題名 (和文) H-ボラノホスホン酸誘導体を用いる含ホウ素新規核酸類縁体の創製

研究課題名 (英文) Development of novel boron-containing nucleotide analogues by using nucleoside H-boranophosphonate derivatives as precursors.

研究代表者 岡 夏央 (OKA NATSUHISA)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50401229

研究成果の概要 (和文)：リン原子上に BH_3 基などを有する含ホウ素核酸類縁体は、癌やエイズ等の疾病に対する核酸医薬として働くことが期待されるが、入手可能な類縁体は極めて限られる。本研究では、リン原子上に BH_3 基と H 基の両方を持つヌクレオシド H-ボラノホスホン酸誘導体の合成に世界で初めて成功し、その H 基を硫黄または酸素に変換する方法の開発にも成功した。この手法は、現在入手が困難な含ホウ素核酸類縁体の新しい合成法になると期待される。

研究成果の概要 (英文)：P-Boronated nucleotide analogues have attracted much attention as potential therapeutic agents against various diseases, such as cancer and AIDS. However, only a few kinds of P-boronated nucleotide analogues are currently available. In this project, we have developed a new P-boronated nucleotide analogue, which contains a BH_3 group and an H group on the phosphorus atom. In addition, we found that this nucleotide analogue (nucleoside H-boranophosphonate) works as a precursor of other P-boronated nucleotides including currently unavailable compounds by substituting the H group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学

キーワード：核酸・ホウ素・ホスホン酸・DNA・ヌクレオシド・核酸類縁体・ボラノホスホン酸・核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

近年、癌を始めとする様々な疾病と遺伝子発現の異常との関係が明らかとなるにつれ、短鎖 DNA やその類縁体を生体内に投与し、

特定の遺伝子や、その転写産物である mRNA と塩基配列特異的に結合させて遺伝子の発現を制御する手法が、疾病の新たな治療法として注目されている。この手法に用いる核酸

類縁体は、生体内でヌクレアーゼによって加水分解させることなく長時間存在し、標的遺伝子や mRNA と選択的に結合する必要がある。このような理想的な分子の候補として、リン原子上に修飾官能基を導入し、ヌクレアーゼ耐性を高めた核酸類縁体が種々考案された。中でも、リン原子を硫黄で修飾したホスホチオエート DNA (PS-DNA) は、AIDS 患者を対象とする網膜炎治療薬として実用化されている。しかしながら、この PS-DNA は、その硫黄原子に起因する高い毒性などの問題点を有し、対象とする疾病は極めて限られたものである。

この問題点を克服すべく、最近注目を集めている核酸類縁体が、リン原子上をボラノ基で修飾したボラノホスフェート DNA (PB-DNA) である。PB-DNA は、リン原子の修飾を硫黄原子からボラノ基に変えたことによって、PS-DNA よりヌクレアーゼ耐性が向上し、細胞毒性が低下するなど、生体への投与に際して理想的な性質を備えている。しかしながら、PB-DNA は標的 DNA や mRNA との結合能が低く、核酸医薬としての実用化にはこの問題点の克服が必要である。

ここで、PB-DNA の長所を生かしつつ、そのリン酸部位に更なる修飾を施し、標的 DNA や mRNA との結合能の向上を目指すことは、有機合成化学的に妥当な戦略と考えられる。しかしながら、ボラノ基を有するリン酸誘導体に関する基礎研究は極めて限られており、有機リン化学における既存の反応によってこの目的を達成することは困難である。

2. 研究の目的

前項で述べた背景を踏まえ、本研究では、

- 1) 含ホウ素リン酸誘導体の新しい化学合成法の開発と種々の含ホウ素核酸類縁体の合成
- 2) 得られた含ホウ素核酸類縁体の性質の解明

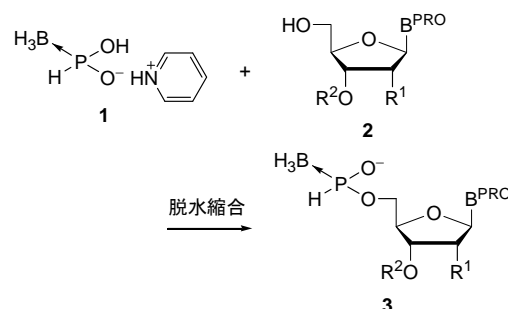
の2点を行い、実用的核酸医薬開発の基盤とすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) ヌクレオシド 5'-H-ボラノホスホン酸の合成

Scheme 1 に従い、研究代表者らがごく最近開発に成功した H-ボラノホスホン酸誘導体 **1** と、核酸塩基部位及び 3'位水酸基を適切に保護したヌクレオシド (**2**) とを脱水縮合剤の存在下縮合させ、ヌクレオシド 5'-H-ボラノホスホン酸誘導体 (**3**) を合成する。化合物 **3** は、抗癌剤や抗ウイルス剤として働くことが期待される含ホウ素ヌクレオチド誘導体の前駆体として働くことが期待される。ここでは、リボヌクレオシド、2'-デオキシリボヌク

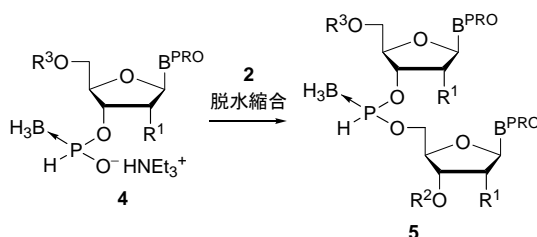
レオシドに対応する 8 種類のヌクレオシド 5'-H-ボラノホスホン酸誘導体を合成標的とした。



Scheme 1. ヌクレオシド 5'-H-ボラノホスホン酸 (**3**) の合成計画

- 2) H-ボラノホスホン酸ジエステルを主骨格として有する DNA、RNA 類縁体の合成法の開発

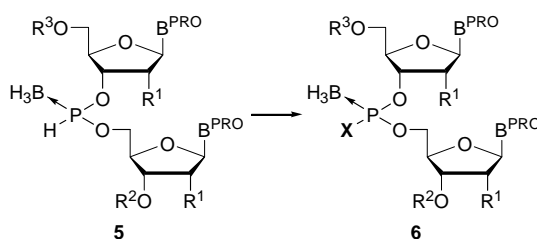
ヌクレオシド 3'-H-ボラノホスホン酸誘導体 (**4**) を化合物 **3** と同様の手法に従って合成し、Scheme 2 に示す様にヌクレオシド **2** と脱水縮合させることで、H-ボラノホスホン酸ジエステルを主骨格とする DNA、RNA 類縁体の合成を行う。



Scheme 2. ジヌクレオシド H-ボラノホスホン酸ジエステル (**5**) の合成計画

- 3) H-ボラノホスホン酸ジエステルの変換反応の検討

前項で得られたジヌクレオシド H-ボラノホスホン酸ジエステル (**5**) の P-H 結合の変換反応の開発を試みる。各種塩基により P-H 結合を活性化し、求電子剤と反応させることによりリン原子に対する官能基の導入を試みる (Scheme 3)。

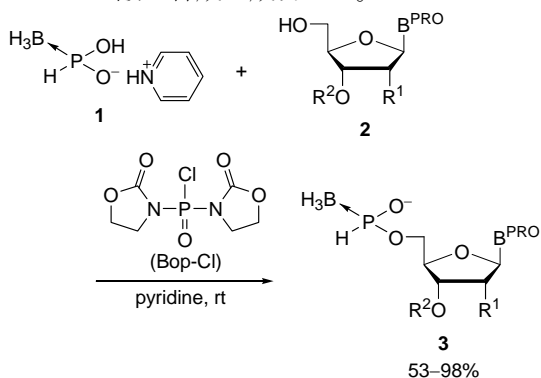


Scheme 3. ジヌクレオシド H-ボラノホスホン酸ジエステル (**5**) の変換反応の開発

4. 研究成果

1) ヌクレオシド 5'-*H*-ボラノホスホン酸の合成

H-ボラノホスホン酸誘導体 **1** と、核酸塩基部位及び3'位水酸基を適切に保護したヌクレオシド (**2**) との縮合反応について反応条件を検討したところ、ヌクレオシドのリン酸化によく用いられる条件 (アセトニトリル中塩化ピバロイル、*i*-Pr₂NEt、ニトロトリアゾールを使用など) では、目的生成物 **3** の収率は低いことが分かった。これは、化合物 **1** に対し2分子の **2** が縮合する副反応のためであった。これに対し、縮合剤として Bop-Cl を用い、反応をピリジン中で行ったところ、前述の副反応はほとんど観測されず、目的生成物 **3** が中程度から良好な収率で生成した (Scheme 4)。この最適化した反応条件を用い、リボヌクレオシド、2'-デオキシリボヌクレオシドに対応する合計 8 種類のヌクレオシド 5'-*H*-ボラノホスホン酸の合成に成功した。



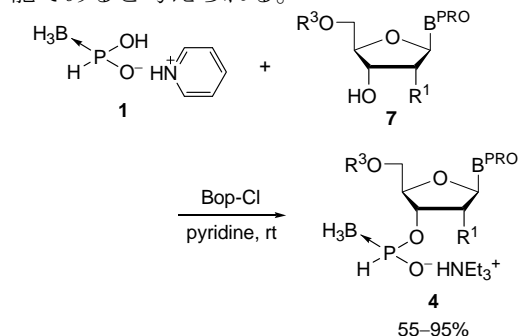
Scheme 4. Bop-Cl を用いたヌクレオシド 5'-*H*-ボラノホスホン酸 (**3**) の合成

2) *H*-ボラノホスホン酸ジエステルを主骨格として有する DNA、RNA 類縁体の合成法の開発

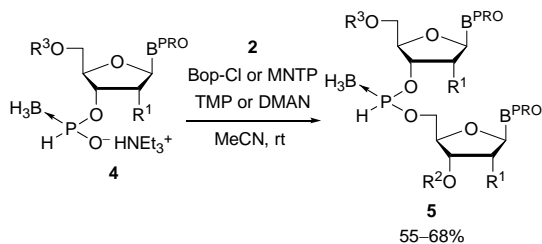
まず、ヌクレオシド 5'-*H*-ボラノホスホン酸 (**3**) の合成に用いた反応条件下、ヌクレオシド 3'-*H*-ボラノホスホン酸 (**4**) の合成を行った。反応は円滑に進行し、リボヌクレオシド、2'-デオキシリボヌクレオシドに対応する合計 8 種類の目的生成物 **4** を 55-95% の収率で得た (Scheme 5)。

次に、化合物 **4** を用いジヌクレオシド *H*-ボラノホスホン酸ジエステルの合成を試みた。目的生成物の P→B 結合は比較的不安定であるため、ピリジン等の配位性溶媒を用いることはできないと予想される。つまり、化合物 **3**、**4** の合成に用いた反応条件を用いることはできない。また、縮合剤として Bop-Cl を用いると、2'-デオキシリボヌクレオシド誘導体では比較的良好な結果が得られたが、リボヌクレオシド誘導体の場合、目的生成物の収率は低下した。そこで、反応条件の詳細な

検討を行い、リボヌクレオシド誘導体の場合、縮合剤として 1,3-dimethyl-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphosphorin-ium hexafluorophosphate (MNTP) が最も良い結果を与えることを見出した。また、溶媒はアセトニトリルが良く、共存する塩基としては 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TMP) または 1,8-dimethylaminonaphthalene (DMAN) が良いことが分かり、結果目的とするジヌクレオシド *H*-ボラノホスホン酸ジエステル (**5**) を良好な単離収率で得た。このような *H*-ボラノホスホン酸ジエステルはこれまで極めて不安定な化合物と考えられており、この様に安定な形での単離はもちろん世界で初めての例となる。この様に、本研究ではヌクレオシド 3'-*H*-ボラノホスホン酸とヌクレオシドとの縮合を用いるジヌクレオシド *H*-ボラノホスホン酸ジエステルの合成法を確立した。化合物 **5** はシリカゲルカラムクロマトグラフィー中部分的に分解するため、単離収率は中程度であるが、単離の必要が無い固相法を用いることで、*H*-ボラノホスホン酸ジエステルを骨格とするオリゴヌクレオチドの合成も可能であると考えられる。



Scheme 5. ヌクレオシド 3'-*H*-ボラノホスホン酸 (**4**) の合成

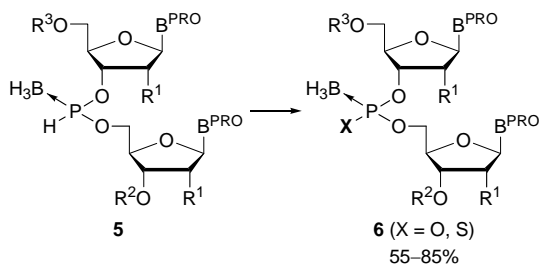


Scheme 6. ジヌクレオシド *H*-ボラノホスホン酸ジエステル (**5**) の合成

3) *H*-ボラノホスホン酸ジエステルの変換反応の検討

最後に、*H*-ボラノホスホン酸ジエステルの P-H 結合の変換反応について検討した。まず、*i*-Pr₂NEt などの塩基存在下、化合物 **5** に対し硫黄を反応させたところ、予想通り P-H 結合が P-S 結合に変換された目的化合物を良好な収率で得た。また、硫黄の代わりに CCl₄ を用いたところ、P-H 結合は P-Cl 結合に変換され、次いで加水分解することにより P-O-

結合に変換されることも見出した。この様に、*H*-ボラノホスホン酸ジエステルの P-H 結合は、塩基と求電子試薬によって他の置換基へと変換できることを見出した。



Scheme 7. ジヌクレオシド *H*-ボラノホスホン酸ジエステル (5) の変換反応

以上述べた通り、本研究では、これまで極めて不安定であり化学合成は難しいと考えられてきたヌクレオシド *H*-ボラノホスホン酸モノエステル、及びジエステルの化学合成法を確立し、その P-H 結合が他の官能基へと変換できることも見出した。これらはいずれも世界で初めての例であり、核酸医薬として有望視されている含ホウ素核酸類縁体の新しい合成ルートを拓く重要な研究成果であると言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Matsumura, F.; Tatsumi, S.; Oka, N.; Wada, T. Rapid glycosylations under extremely mild acidic conditions. Use of ammonium salts to activate glycosyl phosphites via *P*-protonation. *Carbohydr. Res.* **2010**, in press. 査読有
2. Sato, K.; Oka, N.; Fujita, S.; Matsumura, F.; Wada, T. 1,2-*Trans*-Selective Synthesis of Glycosyl Boranophosphates and Their Utility as Building Blocks for the Synthesis of Phosphodiester-Linked Disaccharides. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2147–2156. 査読有
3. Oka, N.; Maizuru, Y.; Shimizu, M.; Wada, T. Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides without base protection utilizing *O*-selective reaction of oxazaphospholidine derivatives. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2010**, *75*, 144–154. 査読有
4. Oka, N.; Nakamura, M.; Soeda, N.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of tertiary silanes via optically pure 1,3,2-oxazasilolidine derivatives. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 2171–2178. 査読有
5. Higashida, R.; Oka, N.; Kawanaka, T.; Wada, T. Nucleoside *H*-boranophosphonates: a new class of boron-containing nucleotide analogues. *Chem. Commun.* **2009**, 2466–2468. 査読有
6. Oka, N.; Kondo, T.; Fujiwara, S.; Maizuru, Y.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of oligoribonucleoside phosphorothioates by an oxazaphospholidine approach. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 967–970. 査読有
7. Iwamoto, N.; Oka, N.; Sato, T.; Wada, T. Stereocontrolled solid-phase synthesis of oligonucleoside *H*-phosphonates by an oxazaphospholidine approach. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 496–499. 査読有
8. Oka, N.; Higashida, R.; Takayama, Y.; Ando, K.; Wada, T. Chemical synthesis of nucleoside *H*-boranophosphonates and their application as precursors of *P*-modified nucleotide analogs. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 111–112. 査読無
9. Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates via stereo-defined *H*-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 9–10. 査読無
10. Oka, N.; Yamamoto, M.; Sato, T.; Wada, T. Solid-phase synthesis of stereoregular oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates using bicyclic oxazaphospholidine derivatives as monomer units. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16031–16037. 査読有
11. Matsumura, F.; Oka, N.; Wada, T. Stereoselective synthesis of α -glycosyl phosphites and phosphoramidites via *O*-selective glycosylation of *H*-phosphonate derivatives. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5297–5300. 査読有
12. Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of backbone-modified oligonucleotides via diastereopure *H*-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 333–334. 査読無
13. Oka, N.; Yamamoto, M.; Sato, T.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of oligonucleoside phosphorothioates and PO/PS-chimeric oligonucleotides by using oxazaphospholidine derivatives. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 335–336. 査読無

[学会発表] (計 13 件)

1. 和田猛、巽志朗、松村史子、岡夏央 グリコシルボラノホスフェートをを用いた新規グリコシル化反応の開発 日本化学会第90春季年会 2010年3月27日 近畿大学
2. 日浦進吾、東田廉平、岡夏央、和田猛 リ

- ボヌクレオシド H-ボラノホスホネートの合成と性質 日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 27 日 近畿大学
3. Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates via stereo-defined H-phosphonate intermediates. 第 6 回国際核酸化学シンポジウム 2009 年 9 月 29 日 高山市民文化会館
 4. Oka, N.; Higashida, R.; Takayama, Y.; Ando, K.; Wada, T. Chemical synthesis of nucleoside H-boranophosphonates and their application as precursors of P-modified nucleotide analogs. 第 6 回国際核酸化学シンポジウム 2009 年 9 月 29 日 高山市民文化会館
 5. 藤田正一、岡夏央、松村史子、和田猛 オリゴ (α -D-グリコシルボラノホスフェート) の合成と天然型ホスホグリカンへの変換 第 29 回日本糖質学会年会 2009 年 9 月 10 日 飛騨・世界生活文化センター
 6. 佐藤一樹、岡夏央、藤田正一、松村史子、和田猛 グリコシルボラノホスフェート誘導体の立体選択的合成 第 29 回日本糖質学会年会 2009 年 9 月 10 日 飛騨・世界生活文化センター
 7. 和田猛・佐藤一樹・岡夏央・藤田正一・松村史子 グリコシルボラノホスフェート誘導体の立体選択的合成 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 27 日 日本大学 (船橋)
 8. 藤田正一・岡夏央・松村史子・和田猛 オリゴ (α -D-グリコシルボラノホスフェート) の合成 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 27 日 日本大学 (船橋)
 9. 岩本直樹・岡夏央・和田猛 H-ホスホネート DNA の立体選択的合成と変換反応 日本化学会第 89 春季年会 2009 年 3 月 27 日 日本大学 (船橋)
 10. 東田廉平・川中俊秀・岡夏央・和田猛 ボラノホスホネート型核酸類縁体の合成と性質第 18 回アンチセンスシンポジウム 2008 年 11 月 17 日 岐阜大学
 11. Oka, N.; Yamamoto, M.; Sato, T.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of oligonucleoside phosphorothioates and PO/PS-chimeric oligonucleotides by using oxazaphospholidine derivatives. 第 18 回 International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids および第 35 回国際核酸化学シンポジウム合同シンポジウム 2008 年 9 月 10 日 京都大学
 12. Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T. Stereocontrolled synthesis of

backbone-modified oligonucleotides via diastereopure H-phosphonate intermediates. 第 18 回 International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids および第 35 回国際核酸化学シンポジウム合同シンポジウム 2008 年 9 月 10 日 京都大学

13. Matsumura, F.; Oka, N.; Wada, T. Synthesis of glycosyl boranophosphate derivatives and their applications as stable precursors of a variety of glycosyl phosphate analogs. XXIV International Carbohydrate Symposium 2008 年 7 月 28 日 University of Oslo

〔図書〕 (計 1 件)

岡夏央、松村 史子、和田 猛 複合糖質の化学と最新応用技術 第 3 章 糖-1-リン酸誘導体の化学合成 (2009, シーエムシー出版)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 糖1-リン酸化合物の製造方法
 発明者: 和田 猛、松村 史子、岡夏央
 権利者: 和田 猛、松村 史子、岡夏央
 種類: 特願
 番号: 2008-190982
 出願年月日: 2008/07/24
 国内外の別: 国内

名称: 糖ボラノホスフェート化合物及びその用途
 発明者: 和田 猛、松村 史子、岡夏央
 権利者: 和田 猛、松村 史子、岡夏央
 種類: 特願
 番号: 2008-150792
 出願年月日: 2008/06/09
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://apchem.gifu-u.ac.jp/~kinou1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岡夏央 (OKA NATSUHISA)
 研究者番号: 50401229

(2) 研究分担者
 ()
 研究者番号:

(3) 連携研究者
 ()
 研究者番号: