

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15963

研究課題名（和文）スルホニル構造を有する新規擬プリン塩基の開発

研究課題名（英文）Development of purine-nucleoside mimics with sulfone

研究代表者

淵 靖史（Fuchi, Yasufumi）

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：40748795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：核酸構造の塩基部を化学修飾した人工核酸は、核酸医薬材料の候補となり得る。しかしながら、塩基部を修飾した核酸をオリゴ核酸配列に組み込み、その機能を詳細に調べた例は少ない。そこで本研究では、アデニンやグアニンに疑似した擬プリン塩基をもつ新規人工核酸について、機能性を評価した。これらの人工核酸を組み込んだオリゴ核酸は、天然の核酸塩基と同等の二重鎖安定性を有することが示された。また生体中の代謝酵素に対する安定性が高いことも見出し、蛍光発光することも示された。本研究で開発した人工核酸は、天然と同等の機能を保持しつつ、天然にはない機能も付与された新たな核酸材料になることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した擬プリン塩基をもつヌクレオシド誘導体は、天然の核酸塩基の代替になる核酸材料として有用であることが示された。天然のものよりも高い代謝安定性が示されたことから、新しい核酸医薬材料の候補になり得ると考えられる。すなわち、創薬分野における社会的貢献につながることが期待される。また天然にはない機能性（蛍光性）が見出された点においては、核酸高次構造の詳細な解明など基礎研究に利用できることが期待され、学術的知見の進展に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, novel artificial nucleobase derivatives were synthesized and evaluated. The designed nucleosides were mimics of adenine and guanine nucleobases. These nucleosides were incorporated into oligonucleotides, and the oligonucleotides exhibited comparable duplex stability with the corresponding natural nucleobases. In addition, the developed nucleosides showed high enzymatic stability and fluorescence emission. Therefore, the artificial nucleosides developed in this study would become a new material of oligonucleotide.

研究分野：核酸化学

キーワード：人工核酸 複素環 擬プリン塩基

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命の情報全てをコードする核酸 (DNA と RNA) を標的とした核酸医薬は、疾患の原因遺伝子に対して作用するため、医療において正に「根本治療」といえる。核酸医薬として用いられる遺伝子制御法には、DNA を標的としたアンチジーン核酸、RNA を標的としたアンチセンス核酸や siRNA、タンパク質を標的としたアプタマーなどがある。核酸医薬はヌクレオシド構造による精密な分子認識が可能であるため、低分子医薬品と比べて標的特異性が高く、難病などに対しても治療効果が高い。しかしながら、加水分解酵素などによって容易に代謝されることや、生体内への吸収効率が悪いことなど、薬理効果を発揮するためにはいくつかの障害を乗り越える必要がある。これらを克服するために、ヌクレオシド構造を化学的に修飾した人工核酸分子が多数応用されている。

2. 研究の目的

現在まで、核酸医薬に導入された人工核酸は、ヌクレオシド構造の糖部またはリン酸ジエステル部位を修飾した誘導体がほとんどである。糖部修飾の代表例としては、2'-O-アルキル体や 2',4'-架橋型 (BNA/LNA) ヌクレオシドなどがある。またリン酸ジエステル部位修飾の代表例として、ホスホロチオエート体などが挙げられる。さらに糖・リン酸骨格を変換したモルフォリノ核酸 (PMO) も利用されている。一方で塩基部位を化学修飾した人工核酸自体は多数報告されているが、核酸医薬として展開されている例が少ないのが現状である。しかしながら、最近話題となった COVID-19 に対する mRNA ワクチンには、塩基部修飾体であるシュドウリジンが利用されており、塩基部修飾人工核酸の新たな可能性が注目されつつある。そこで本研究では、現在までに報告されていないオリジナルな塩基部修飾人工核酸を開発し、核酸医薬も視野に入れた新たなヌクレオシドモノマーを提供することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では新たな人工核酸を設計・合成し、それらをオリゴ核酸配列中に組み込んで機能性を評価し、核酸材料としての有用性を明らかにした。

【分子設計】新規人工核酸を開発するにあたり、糖と塩基間に炭素-炭素結合をもつ「C-ヌクレオシド」に着目した。前述のシュドウリジンはピリミジン塩基型の C-ヌクレオシドの一種であり、化学安定性が高い構造となっている。本研究ではプリン塩基型の新規 C-ヌクレオシドとして、Figure 1 に示す誘導体 (^SN 及び $^{\text{SO}_2}\text{N}$, N = A または G) を考案した。

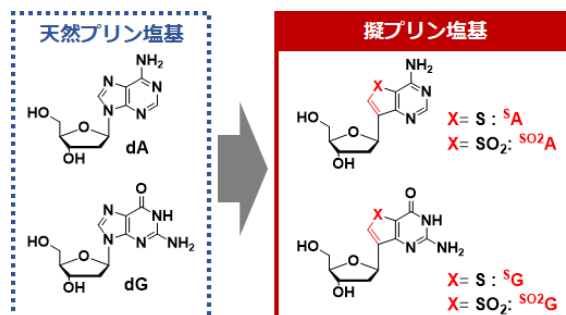


Figure 1 新規人工核酸の分子設計

これらはチエノ [3,2-d]ピリミジンを母骨格として、天然の核酸塩基 A、G を模倣した設計となっており、天然と同様の塩基対形成が可能と予想される。チオフェン環部分は脂溶性を向上させ、二重鎖中でスタッキング相互作用を高めることを期待した。さらに酸化してチオフェン S,S -ジオキソド (SO_2 型) とすることで、水素結合受容体としての機能を付与する狙いとした。これら S 原子や SO_2 基は、二重らせん構造に組み込んだ際、主溝側に当たる面 (Hoogsteen 面) に位置し、この面において二次的な相互作用 (水素結合やファンデルワールス力) が機能することが予想される。そのため標的核酸配列との安定な二重鎖形成だけでなく、三重鎖核酸、核酸-タンパク質複合体などのより複雑な高次構造形成に関与することも期待している。

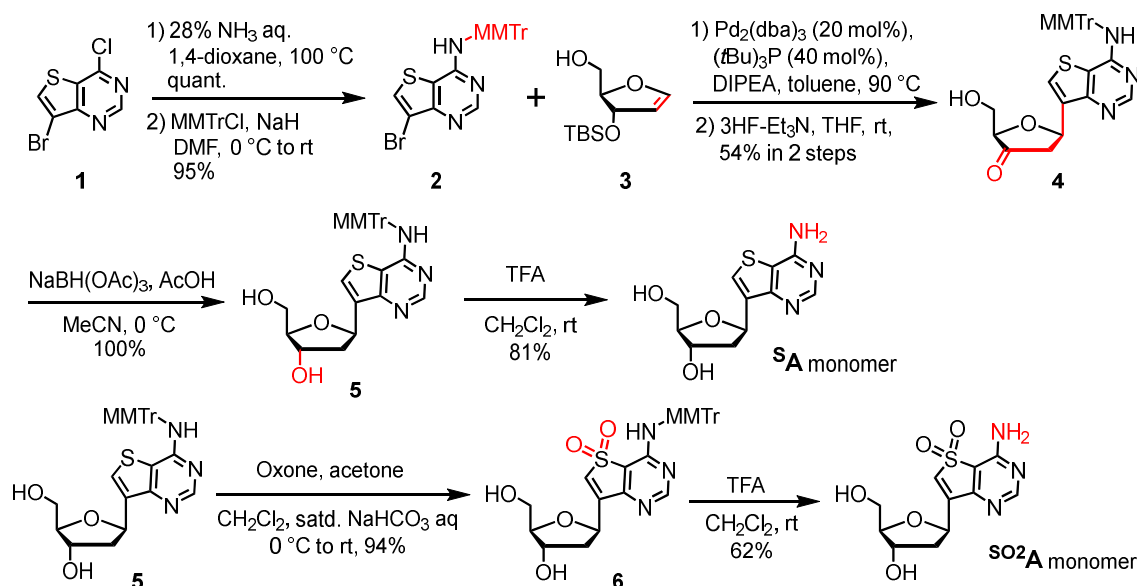
【合成計画】設計したヌクレオシドは、塩基部のプロモ体と糖部のグリカールを Heck 反応によりカップリングさせ、チオフェン体 (^SN) を合成した。またチオフェン環の S 原子を酸化することで、チオフェンジオキソド体 ($^{\text{SO}_2}\text{N}$) を合成した。これらは基本構造であるヌクレオシドモノマー (3',5'-ジオール体) を構築した後に、5'位をジメトキシトリチル保護、3'位をホスホロアミダイト化することで、オリゴ核酸固相合成のためのモノマーを合成した。

【ヌクレオシドモノマーの物性評価】合成したヌクレオシドモノマーを用いて、物性評価を行った。まずは紫外可視吸光スペクトルを測定し、基底状態における天然核酸塩基との違いを比較した。アデノシン類縁体の ^SA 及び $^{\text{SO}_2}\text{A}$ については、生体中の代謝酵素であるアデノシンデアミナーゼ (ADA) に対して代謝活性を示すかを調べた。

【修飾オリゴ核酸の物性評価】DNA/RNA 自動合成装置を使用し、合成したホスホロアミダイト体から修飾オリゴ核酸を合成した。合成した修飾オリゴ核酸を用い、相補的な DNA または RNA 配列に対する二重鎖安定性を、融解温度 (T_m) 測定により評価した。また修飾オリゴ核酸による高次構造形成に関する知見を調べるために、三重鎖核酸の T_m 測定も行った。

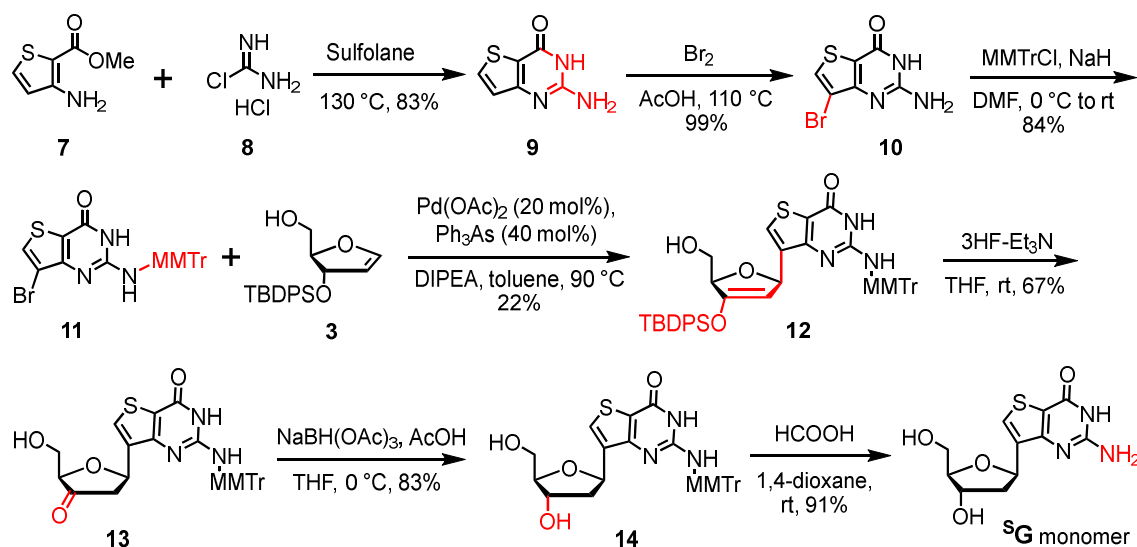
4. 研究成果

【塩基部修飾人工核酸の合成】設計した新規人工核酸の合成は、下記 Schem 1, 2 に従って合成した。まず Scheme 1 に示すアデノシン類縁体の合成は、市販の化合物 **1** を出発原料として用い、2 工程でアミノ基を保護した塩基部ユニット **2** を構築した。化合物 **2** と、別途合成した糖部ユニットのグリカル **3** を Heck 反応によりカップリングすることで化合物 **4** を合成した。その後、還元することでジオール体 **5** を得た後、MMTr 基を脱保護することで ^sA モノマーを合成した。中間体 **5** を酸化し、同様に脱保護することで ^{so2}A モノマーも合成した。



Scheme 1 ^sA 及び ^{so2}A モノマーの合成経路

^sG モノマーの合成は Scheme 2 に従って行った。^{so2}G モノマーは現在も合成検討中である。初めに市販の化合物 **7** と **8** を縮合し、チエノピリミジン体 **9** を合成した。その後、プロモ化と MMTr 保護を経て塩基部ユニット **11** を合成した。その後は上記と同様、グリカル **3** と反応させることで化合物 **12** を合成し、脱保護、還元反応を経て ^sG モノマーを合成した。



Scheme 2 ^sG モノマーの合成経路

【ヌクレオシドモノマーの物性評価】合成した ^sA、^{so2}A、^sG モノマーを用いて、まずはメタノール溶液中と水溶液中で紫外可視吸光スペクトルを測定した (Table 1)。これらの分子は天然の A や G (≒ 260 nm) よりも長波長側に吸収極大波長を有することが示された (≧ 297 nm)。また興味深いことに、これらの分子は蛍光発光を示したため、溶液中での蛍光スペクトルも測定した。^sA や ^sG モノマーではそれぞれ波長 330、370 nm 付近の紫外領域に蛍光発光が観測され、相対蛍光量子収率は 2~5%であった。一方、^{so2}A では波長 450 nm 付近の可視光領域に蛍光発光が観測されたが、蛍光量子収率は 1% 以下であり、蛍光発光が極めて低いことが明らかとなった。

Table 1 ^SA、^{SO2}A、^SG モノマーのスペクトルデータ

	Solvent	$\lambda_{\text{Abs.}}$ (nm)	λ_{em} (nm)	QY ^a
^{SO2} A	MeOH	331	452	<0.01
	Water	331	465	<0.01
^S A	MeOH	298	333	0.03
	Water	297	334	0.02
^S G	MeOH	314	371	0.05
	Water	312	373	0.03

^a measured using tryptophan as a standard (0.13)

次にアデノシン類縁体の ^SA 及び ^{SO2}A について、生体中の代謝酵素であるアデノシンデアミナーゼ (ADA) に対して代謝活性を示すかを調べた。ADA はアデノシン類の塩基部を加水分解し、イノシン (I) 類へ変換させる酵素である。実際に ADA と反応させて HPLC 追跡した結果、天然の A では反応開始後 40 分以内で完全に変換されたのに対し、^SA 及び ^{SO2}A では ADA による変換反応が全く起こらなかった。また、^SA 及び ^{SO2}A を A と同じ濃度で共存させた条件下、ADA を反応させてみたが、A の変換反応速度に変化がなかった (Figure 2)。すなわち、^SA 及び ^{SO2}A は ADA の基質にはならず、生体中で代謝安定性の高いヌクレオシドになることが示唆された。

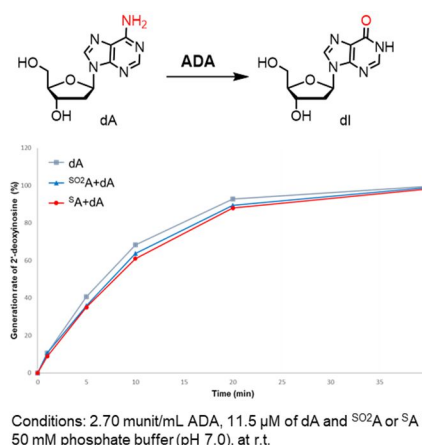


Figure 2 ADA による代謝活性の評価

【修飾オリゴ核酸の物性評価】合成した ^SA、^{SO2}A、^SG モノマーの 5'位をジメトキシトリチル保護、3'位をホスホロアミダイト化することで、オリゴ核酸固相合成のためのモノマーへと誘導化することに成功した。その後 DNA/RNA 自動合成装置を使用し、1 か所から複数か所修飾したオリゴ核酸を合成した。しかしながら、^{SO2}A ではオリゴ核酸合成後の、塩基を用いた固相からの切り出しの際、分解反応が進行して目的の修飾オリゴ核酸を得ることが出来なかった。実際、^{SO2}A モノマーのみで塩基処理して反応を HPLC 追跡した結果、濃アンモニア水 (28%) で 2 時間処理しただけでも分解が進行することが分かった。詳細は不明であるが、^{SO2}A は構造中にマイケルアクセプターを有しており、塩基性条件下で付加反応が進行したと考えられる。一方、^SA や ^SG では修飾オリゴ核酸を問題無く得ることが出来たので、これらを用いて物性評価を行った。まずはこれらの修飾オリゴ核酸を用い、相補的な DNA または RNA 配列に対する二重鎖安定性を、融解温度 (T_m) 測定により評価した (Table 2、3)。Table 2 に示すように、^SA を導入した修飾オリゴ核酸では、相補的な RNA 及び DNA に対して天然と同等の二重鎖安定性 (T_m 値) を示した。

Table 2 ^SA 修飾オリゴ核酸の相補鎖 RNA 又は DNA に対する二重鎖安定性

	vs RNA target		vs DNA target	
	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
5'-d(ACGAGA <u>A</u> CATCC)-3'	46.0	+1.3	50.4	-0.4
5'-d(ACGAGA <u>A</u> ACATCC)-3'	45.9	+1.2	49.9	-0.9
5'-d(ACGAGA <u>A</u> ACATCC)-3'	46.5	+0.9	49.2	-0.8
5'-d(ACGAGA <u>A</u> ACATCC)-3'	45.9	+0.6	48.5	-1.2
5'-d(ACGAGAACATCC)-3'	44.7	-	50.8	-

A = ^SA. Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 200 mM NaCl, and 2.5 μ M of each oligonucleotides.

^SG を導入した修飾オリゴ核酸の二重鎖安定性も、^SA の場合と同様に相補鎖 RNA 及び DNA に対して天然と同等の T_m 値を示した。 T_m 値を詳しく見てみると、^SA、^SG 修飾オリゴ核酸ではどちらも相補鎖 RNA に対してわずかに安定性が向上した ($\Delta T_m/\text{mod.} = 0.6\text{--}1.8$ °C)。この要因としては、DNA-RNA ヘテロ二重鎖において、チオフェン環構造によるスタッキング相互作用が強く働いたためと考察している。また、^SA や ^SG 修飾の相補的な位置にミスマッチ塩基を導入した配列との二重鎖安定性も評価した結果、天然と同様の塩基選択性をもつことも示された。さらに ^SG 修飾オリゴ核酸では、核酸配列中でも強い蛍光発光が観測されたため、蛍光測定を利用した二重鎖核酸の T_m 値測定も行った。この場合も UV で測定した T_m 値と同様の値を示し、二重鎖安定性の測定方法を拡張することが出来た。

Table 3 ^SG 修飾オリゴ核酸の相補鎖 RNA 又は DNA に対する二重鎖安定性

	vs RNA target		vs DNA target	
	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
5'-d(ACGAGAGCATCC)-3'	52.8	+1.8	55.4	0.0
5'-d(ACGAGAGCATCC)-3'	53.6	+1.3	55.7	+0.2
5'-d(ACGAGAGCATCC)-3'	54.4	+1.1	54.1	-0.4
5'-d(ACGAGAGCATCC)-3'	51.0	-	55.4	-

G = ^SG. Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 200 mM NaCl, and 2.5 μM of each oligonucleotides.

さらに修飾オリゴ核酸による高次構造形成に関する知見を調べるために、三重鎖核酸の T_m 測定を行った。まずパラレル型三重鎖のうちのプリン鎖中に ^SA を組み込み、TFO (三重鎖形成オリゴ核酸) との三重鎖安定性を評価した。その結果 ^SA を組み込んだ配列では、天然の三重鎖と異なる挙動が観測された。^SA の Hoogsteen 面にはチオフェン環の S 原子が存在するため、水素結合以外の何らかの相互作用が関連していると考えられ、現在その詳細を調べている。^SG については TFO 中に組み込み、パラレル型三重鎖の G-TA ミスマッチ塩基対の安定性を評価した。その結果、天然のものよりも三重鎖安定性が大幅に低下することが明らかとなった。これは、^SG が C-ヌクレオシド構造を有しているため、糖部のコンフォメーションが天然と異なり、G-TA 塩基対形成に不利な構造をとったのが要因と考察している。

【研究成果のまとめ】本研究では、設計した塩基部修飾核酸 ^SA、^SO₂A、^SG について、合成と物性評価を行った。^SA、^SO₂A、^SG とともに、Heck 反応を利用してヌクレオシドモノマーを合成することに成功した。^SA、^SO₂A、^SG のスペクトル測定より、これらは天然の塩基にはない蛍光発光性を示すことが明らかとなった。ADA を用いた評価より、^SA、^SO₂A は生体中で代謝安定性の高いヌクレオシドであることが示唆された。オリゴ核酸合成において、^SA と ^SG は核酸配列中に導入出来たが、^SO₂A を導入することが出来ず別の方法を模索する必要があった。^SA または ^SG を導入したオリゴ核酸は、相補的な配列に対して天然と同等の二重鎖安定性を示した。一方、三重鎖核酸においては、天然と異なる物性が示された。以上、本研究で開発された ^SA、^SG モノマーは、天然と同等の性質 (二重鎖安定性) を持ちながら、天然にはない性質 (代謝安定性や蛍光特性) を持つことが明らかとなり、核酸医薬材料としてだけでなく、基礎研究における核酸材料としても有用であることが示された。今後はこれらヌクレオシドのトリリン酸体を合成し、さらに有用性を拡張したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hari Yoshiyuki, Yamamoto Kazuki, Fuchi Yasufumi, Okabe Masaya, Osawa Takashi, Ito Yuta	4. 巻 53
2. 論文標題 New Cleavable Spacers for Tandem Synthesis of Multiple Oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Synthesis	6. 最初と最後の頁 4440 ~ 4448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1538-9883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Kazuki, Fuchi Yasufumi, Ito Yuta, Hari Yoshiyuki	4. 巻 92
2. 論文標題 Bicyclo[2.2.2]octane-2,3-diol as an universal linker for the solid-phase synthesis of oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 132261 ~ 132261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2021.132261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fuchi Yasufumi, Umeno Tomohiro, Abe Yuichiro, Ikeno Keita, Yamasaki Ryu, Okamoto Iwao, Usui Kazuteru, Karasawa Satoru	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of Push/Pull-Type Benzo[X]quinoline Derivatives (X =gorf): Environmentally Responsive Fluorescent Dyes with Multiple Functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 13177 ~ 13190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fuchi Yasufumi, Murase Hirotaka, Kai Ryosuke, Kurata Kakeru, Karasawa Satoru, Sasaki Shigeki	4. 巻 32
2. 論文標題 Artificial Host Molecules to Covalently Capture 8-Nitro-cGMP in Neutral Aqueous Solutions and in Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 385 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoji Misa, Fuchi Yasufumi, Osawa Takashi, Kim Han, Ito Yuta, Hari Yoshiyuki	4. 巻 87
2. 論文標題 Synthesis and Properties of Oligonucleotides Containing 2'-Methylthio-4-Methyleneoxy-Bridged Pyrimidine Derivatives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11743 ~ 11750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c01409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hari Yoshiyuki, Fuchi Yasufumi, Yamamoto Kazuki, Ito Yuta	4. 巻 55
2. 論文標題 Benzo-Fused 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane-2,3-diol Derivatives as Universal Linkers for Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Synthesis	6. 最初と最後の頁 1112 ~ 1122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0042-1751405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Kazuki, Fuchi Yasufumi, Ito Yuta, Hari Yoshiyuki	4. 巻 88
2. 論文標題 Expansion of Phosphoramidite Chemistry in Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Rapid 3'-Dephosphorylation and Strand Cleavage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 2726 ~ 2734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c02195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 ○石川楓子, 淵 靖史, 伊藤勇太, 張 功幸
2. 発表標題 4'-置換チミジンを含むオリゴヌクレオチドのRNase H活性とヌクレアーゼ耐性能
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Yamamoto, Yasufumi Fuchi, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
2. 発表標題 Solid-phase oligonucleotide synthesis using a universal linker with bicyclo[2.2.2]octan-2,3-diol skeleton
3. 学会等名 第48回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 淵靖史、渡部滉生、伊藤勇太、張功幸
2. 発表標題 連続アセタール構造を有する架橋型アデノシンアナログの合成
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口美帆, 淵 靖史, 伊藤勇太, 張 功幸
2. 発表標題 チエノピリミジン骨格を有する疑アデノシンアナログの合成と物性評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金山公樹, 淵 靖史, 川口美帆, 伊藤勇太, 張 功幸
2. 発表標題 チエノピリミジン骨格を有する2'-デオキシグアノシンミミックの合成
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 淵 靖史, 渡部滉生, 小路美彩, 伊藤勇太, 張 功幸
2. 発表標題 3連続アセタール構造をもつ架橋型プリンヌクレオシドの合成
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関