

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21245

研究課題名(和文) インターヌクレオチド結合をスルホンアミドに置換した架橋型アンチセンス核酸の合成

研究課題名(英文) Synthesis of antisense nucleic acid incorporating cyclic sulfonamide backbone

研究代表者

清尾 康志 (SEIO, KOHJI)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：20313356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では核酸のインターヌクレオチド結合をスルホンアミドに置換したアンチセンス核酸の標的RNA結合能を高めることを目指し、スルホンアミドを含むヌクレオシド残基の配座を固定化した環状スルホンアミドヌクレオシドの合成法を行った。デオキシウリジンの5'位と塩基部に各々スルホニルトリアゾール基とアジド基を導入し、アジド基を還元し、目的とする環状スルホンアミド構造を構築した。得られた環状ヌクレオシドの配座は糖部がS型に塩基部がanti型に固定化されていた。また、ここで開発してスルホニルトリアゾールの構築方を応用し、2'水酸基にスルホニルアルキル基を有する人工核酸の合成も併せて達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では人工核酸にスルホンアミド構造を導入するための新規合成法を開発し、当初の目的通り環状構造をもったスルホンアミドヌクレオシドの合成に成功した。また合成したヌクレオシドの配座を調べ、ヌクレオシドの糖部と塩基の配向を同時に固定化されていることも明らかにした。また本研究で開発したスルホンアミド構造形成反応を2'位やヌクレオチド間結合にスルホンアミドを有する人工核酸の合成に応用し、その汎用性を確認した。本研究の成果は人工核酸に様々なスルホンアミド修飾を導入するために有用な基礎研究であり、核酸医薬の発展など医療・生命科学の分野への更なる展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to enhance the target RNA binding ability of antisense nucleic acids in which the internucleotide bond of the nucleic acid is replaced with a sulfonamide. Sulfonyltriazole and azide groups were introduced into the 5' position and the base moiety of deoxyuridine, respectively, and the azide group was reduced to form the desired cyclic sulfonamide structure. The obtained cyclic nucleoside conformation was fixed with the sugar moiety in the S-type and the base orientation in the anti type. In addition, by applying the construction method of sulfonyltriazoles developed here, we also synthesized artificial nucleosides having a sulfonylalkyl group at the 2' hydroxyl group.

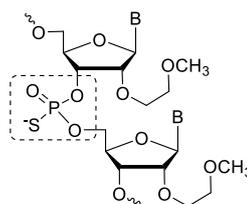
研究分野：生物有機化学(核酸)

キーワード：スルホンアミド核酸 アンチセンス核酸 配座固定 スルホンアミド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

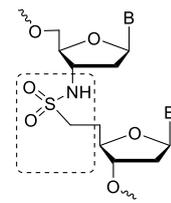
### 1. 研究開始当初の背景

難病治療薬としてアンチセンス核酸 (ASO) が注目されている。ASO はヌクレオチド 15-20 残基が連結した人工核酸である。近年承認された ASO はインターヌクレオチド結合にホスホロチオエート結合 (PS-結合) を有する。PS-結合は核酸分解酵素に安定で、血中タンパク質と高い親和性を有するために体内での持続時間が長い。一方、高いタンパク質親和性に起因する副作用を示す。そのため、ASO 中の PS-結合に置き換わり得る構造の探索が行われている。しかし、その多くはリン酸エステルの誘導体であり、リン原子上に不斉が存在するため、ASO を合成した際に多数のジアステレオマーが生成する欠点がある。



### 2. 研究の目的

起案者は新たな結合としてスルホンアミドをもつ人工核酸 (スルホンアミド核酸) に注目した。スルホンアミドは硫黄原子上に不斉をもたず、かつ結合長や結合角がリン酸エステルに近い。また、スルホンアミドは電荷的に中性であり、PS-結合とはタンパク質との相互作用能が異なる可能性がある。しかし、スルホンアミド核酸は相補的核酸に対する親和性が天然型核酸と比較して低下するため (Widlanski 1994 など)、ASO としての性質は全く調べられていないすなわちスルホンアミド核酸の ASO としての性質を明らかにするには、二重鎖安定性の低下を克服した新規スルホンアミド核酸の開発が必要である。そこで本研究では環状構造により配座を固定化したスルホンアミド含有ヌクレオシドの合成と合成したヌクレオシドの配座解析、および開発したスルホンアミド構築方の新たなスルホンアミド含有人工核酸の合成への応用を検討することにした。



Widlanski, T. S.  
Bioorg. Med. Chem. Lett.  
1994, 4, 1071.

### 3. 研究の方法

#### 【環状スルホンアミド含有ヌクレオシドに関する研究】

デオキシウリジンを出発原料に用い、核酸塩基部へのアジドアルキル基の導入と 5' 位へのスルホン酸基の導入を行い、さらにスルホン酸基の活性化と環化反応を検討する。また、合成したスルホンアミドヌクレオシドについては 1H-NMR、量子化学計算、CD スペクトル測定などを用いて配座の解析を行う。

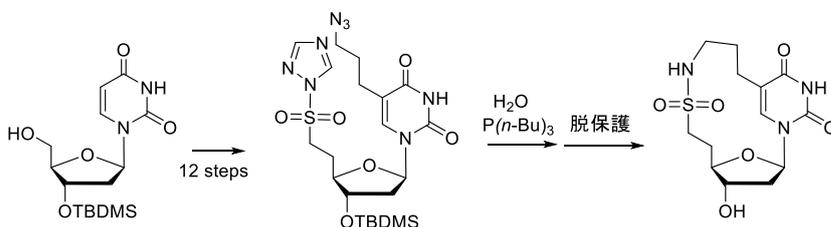
#### 【新規スルホンアミド核酸に関する研究】

上記研究で開発したスルホンアミド形成反応の応用として 2' 位のアルクルスルファモイル基を有する新規人工核酸を合成し、アンチセンス核酸としての性質を調べる。

### 4. 研究成果

#### 【環状スルホンアミド含有ヌクレオシドの合成】

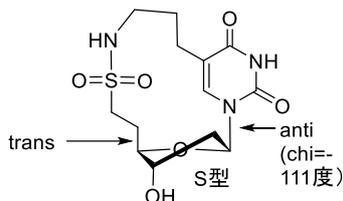
上記方法方法に従いデオキシウリジンから 12 工程を経て脱離基としてスルホニルトリアゾリル基を有する中間体を合成した。ついでこの分子のアジド基をトリブチルホスフィンで還元することに環化体を得、最後に *t*-ブチルジメチルシリル基 (TBDMS) を脱保護することで目的物を得た。



#### 【環状スルホンアミド含有ヌクレオシドの配座解析】

得られた環状ヌクレオシドの配座を 1H-NMR を用いて行ったその結果 1' プロトンと 2' プロトンのカップリング定数が 9.2 Hz と大きく、また 3' プロトンと 4' プロトンのカップリング定数がほぼ 0 Hz と非常に小さく、これらを勘案し、糖部配座は S 型をとっていることが分かった。この結果は量子化学計算を用いて環状ヌクレオシドの最安定配座を計算した結果とも一致した。また、この最安定配座から C4' -C5' 結合は trans 型であることが示唆され、塩基の配向は C1' と N の結合に関して二面角が -111 度の anti 型をとっていることが分かった。この塩基の配向を実験的に確かめるために、CD スペクトルを測定してところ、270nm 付近に負のコットン効果を示し、236nm 付近に正のコットン効果を示し、一般的なチミジンとは異なる塩基配向を示唆する結果を得た。また、この結果は上記量子化学計算で得られた構造について CD スペクトルを計算した結果、255nm 付近の負のコットン効果と 223nm 付近の正のコットン効果が得られたことから確認された。また、既に報告のある C1' と N の結合に関する二面角が -95 度の 6-3' メチレンウ

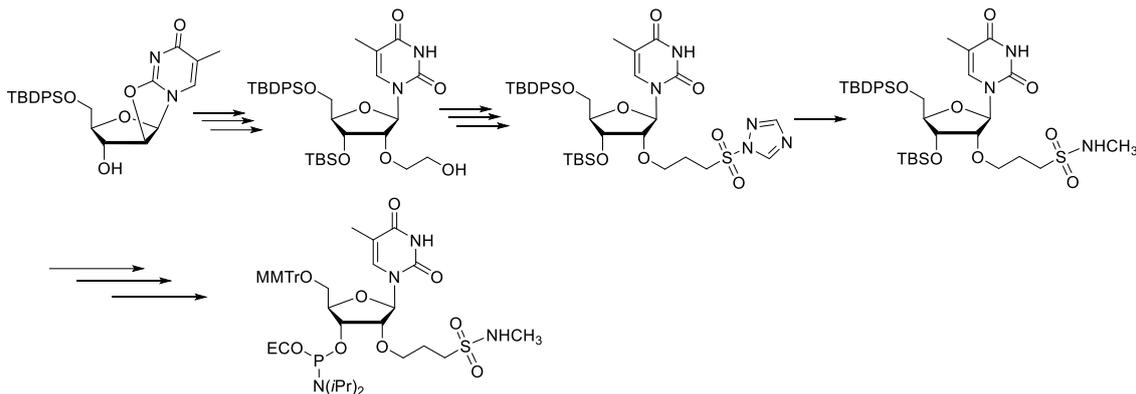
リジンが類似の CD スペクトルを示すことから確認された。



以上の結果から本研究では核酸にスルホンアミド構造を導入するために有用なスルホニルトリアゾールの構築反応と、それを用いた環状ヌクレオシドの合成、ならびに導入した環化反応がヌクレオシドの配座に与える影響を明らかにすることができた。

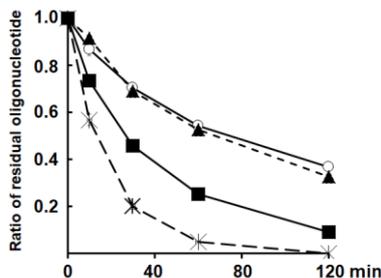
#### 【新規スルホンアミド核酸の合成】

上記の研究で見出したスルホニルトリアゾールはアミンなどのとの反応性を有する一方でシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどによる単離が可能であり、核酸などの複雑な分子にスルホンアミドを導入するための有用な方法論となり得る。以上のことから、新たな人工核酸として 2' 水酸基にスルファモイルアルキル基を有する新規人工核酸の合成を検討した。出発物質として 5' -*t*-ブチルジフェニルシリル-5-メチル-2'-*O*, 2' -シクロウリジンを選び、3 工程をかけて 2' -ヒドロキエチル体へと誘導したい。ついでその化合物の水酸基を Dess-Martin 酸化し、Honer-Wadsworth-Emmons 反応によりビニルスルホネート誘導体へと誘導した。ついでビニル基を還元後スルホネートをスルホン酸に変換し、環状ヌクレオシド合成で開発した方法を用いてスルホニルトリアゾールへと誘導した。引き続き、この中間体にメチルアミンを反応させた後、脱保護、保護、ホスフィチル化を行い、2' 水酸基にスルファモイルプロピル基を有するホスホロアミダイト誘導体を合成した。



合成したホスホロアミダイトユニットを用いて、2' -*O*-メチルリボオリゴヌクレオチドに一箇所もしくは三か所スルファモイル修飾 (X) を導入したものを合成した。配列は CGTTTXXTTTGC および CGTXXXTTGX、CGTXXTTXGC これらを用いて相補鎖 RNA との二重鎖形成能を調べたところ、全て 2' -*O*-メチル体のオリゴヌクレオチドと比べ、一修飾あたり最大でも 0.3 度程度の二重鎖融解温度の低下しか示さなかった。

また、核酸分解酵素耐性を調べるためにオリゴチミジル酸の末端にスルファモイル修飾を導入した。配列は FAM-ttttttttXt である (FAM はフルオレセイン修飾)。このオリゴチミジル酸誘導体の蛇毒ホスホジエステラーゼに対する耐性を調べたところ、未修飾の場合にくらべ半減期が 14 分から 69 分に延長することが分かり、また新たに合成した構造類似体であるメチルカルバモイルエチル体修飾オリゴと匹敵する核酸分解酵素耐性を有することが示された。



× : FAM-tttttttt ■ : FAM-ttttttttUt (U は 2' -*O*-メチル修飾) ▲ : FAM-ttttttttYt (Y は 2' -*O*-メチルカルバモイルエチル修飾) ○ : FAM-ttttttttXt (U は 2' -*O*-スルファモイルプロピル修飾)

また、gapmer 型アンチセンス核酸の両末端にスルファモイル修飾を導入した化合物も合成した。配列は XCG(gaatcatagt)AGX である（下線部は LNA、小文字は DNA、リン酸は全てホスホチオエート修飾）。このアンチセンス核酸を Lipofectamine2000 を用いて HeLa 細胞に導入し、別途導入したルシフェラーゼの発現を指標にアンチセンス活性を調べたところ、IC50 値が数倍程度低下するものの X の代わりに I を導入したアンチセンス核酸に匹敵する活性を示した。

以上の結果から本研究ではスルホニルトリアゾールを用いたスルホンアミド形成反応が 2' 修飾核酸の合成に有用であることを示し、また合成した 2' スルファモイルプロピル核酸がアンチセンス核酸の素材として好ましい性質を有していることをあらかじめ示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tomohiro Kishimura, Takahito Tomori, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio	4. 巻 35
2. 論文標題 Synthesis of 2'-O-alkylcarbamoylethyl-modified oligonucleotides with enhanced nuclease resistance that form isostable duplexes with complementary RNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 12779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.127779	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 Yoshiaki Masaki, Athuya Maruyama, Keita Yoshida, Takahito Tomori, Tomohiro Kishimura, Kohji Seio	4. 巻 33
2. 論文標題 Oligodeoxynucleotides Modified with 2'-(Cysteinyllaminobutyl)carbamoylethylribothymidine Residues for Native Chemical Ligation with Peptide at Internal Positions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 272-278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00575	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 Takahito Tomori, Koya Uekusa, Aya Koyama, Takayuki Kanagawa, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio	4. 巻 73
2. 論文標題 Synthesis of 2'-O-[3-(N-methylsulfamoyl)propan-1-yl]ribothymidine as a potentially applicable 2'-modified nucleoside for antisense oligonucleotides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.117002	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 Yoshiaki Masaki, Ayano Tabira, Shihori Hattori, Shunsuke Wakatsuki, Kohji Seio	4. 巻 20
2. 論文標題 Insertion of a methylene group into the backbone of an antisense oligonucleotide reveals the importance of deoxyribose recognition by RNase H	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic and Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 8917-8924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob01667b.	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大西里絵 清尾康志 正木慶昭 関谷彰太 枝村亘
2. 発表標題 スルホンアミド骨格を含む人工核酸の合成とアンチセンス活性の評価
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金川峻幸 立花茂哉 大西里絵 正木慶昭 清尾康志
2. 発表標題 塩基部と5'位をスルホンアミド結合で架橋したチミジン誘導体の合成法の検討
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清尾康志 大西里絵 関谷彰 枝村亘、正木 慶昭
2. 発表標題 スルホンアミド結合を含む人工核酸の合成と塩基対形成能
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植草宏哉 友利貴人 正木慶昭 清尾康志
2. 発表標題 2'-O-スルファモイルアルキル修飾を導入したオリゴヌクレオチドの合成と性質
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金川峻幸 立花茂載 大西里絵 正木慶昭 清尾 康志
2. 発表標題 スルホンアミド構造を有する環状チミジン誘導体の合成とその構造解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koya Uekusa, Takahito Tomori, Aya Koyama, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio
2. 発表標題 Synthesis of nucleoside and oligonucleotide derivatives incorporating 2'-O-sulfamoylpropyl or 2'-O-sulfamoylbutyl modifications
3. 学会等名 The 49th international Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigetoshi Tachibana, Takayuki Kanagawa, Rie Ohnishi, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio
2. 発表標題 Synthesis and the structural analysis of a cyclic sulfonamide thymidine derivative
3. 学会等名 The 49th international Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rie Ohnishi, Shota Sekiya, Wataru Edamura, Shigetoshi Tachibana, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio
2. 発表標題 Synthesis and structural analysis of sulfonamide linkage-containing oligonucleotides for the development of antisense nucleic acids
3. 学会等名 The 49th international Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
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
---------	---------