

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14621

研究課題名(和文)オリゴヌクレオチドの連続液相フロー合成

研究課題名(英文)Continuous-flow solution-phase synthesis of oligonucleotides

研究代表者

齋藤 由樹 (Saito, Yuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：70835298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は近年次世代医薬として注目を集める核酸医薬であるオリゴヌクレオチドの触媒的合成を目的とするものである。

亜リン酸のP=O結合の活性化を志向し、種々Lewis酸の検討を行ったところZn(II)種が高活性を有することが明らかとなり、ヌクレオチドの触媒的亜リン酸化が高収率で進行することを見出した。一方で、逐次的反応による2つのヌクレオチドの亜リン酸化は選択性の制御が課題となった。触媒の再検討を行ったところZr(IV)、Hf(IV)を触媒として用いることでヌクレオチドの最小構成単位の触媒的合成が実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年核酸医薬であるオリゴヌクレオチドの環境調和型触媒的合成の第一歩となるものである。従来本化合物群は化学両論量以上の活性化剤を用いた固相合成により合成されてきたが、多量の廃棄物の生成や合成のスケールアップに課題があった。

本研究により、廃棄物を最小限に抑え、かつ、大量合成可能な環境調和型の合成の実現が期待される。また、これまで、P=O結合の触媒的活性化の例はほとんど存在しなかったが、本研究により、適切に設計されたLewis酸を用いることで、触媒的反応が可能であることが示された。今後、さらなる触媒探索により更なる触媒性能の向上や高難易度反応の実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to realize catalytic synthesis of oligonucleotides, which attract much attention as a next generation drug.

Based on the hypothesis of catalytic activation of P=O bond of phosphites, various kinds of Lewis acids were evaluated. As a result Zn(II) was found to exhibit excellent catalytic activity for this reaction. Under the optimized reaction conditions, various kinds of alcohols including nucleotides were phosphorylated in excellent yields. On the other hand, the selectivity was found to be the problem in the second substitution of alcohol. The catalyst structure was investigated again, and unexpectedly Zr(IV) and Hf(IV) were found to be the promising catalyst to realize the catalytic synthesis of the smallest unit of oligonucleotides.

研究分野：有機合成化学

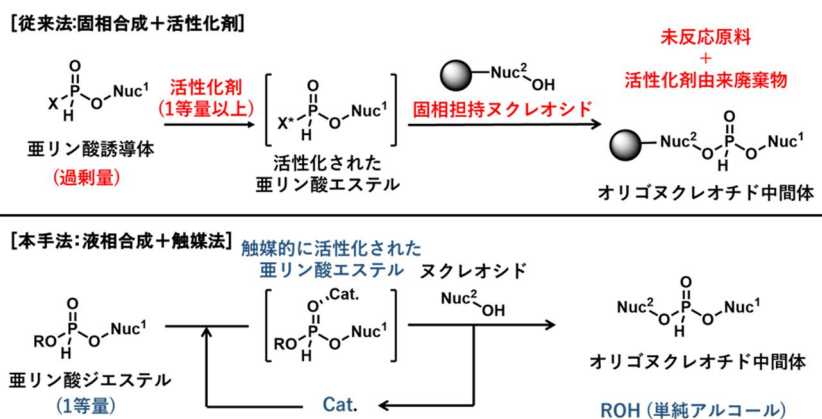
キーワード：核酸医薬 触媒的亜リン酸化 オリゴヌクレオチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オリゴヌクレオチドは DNA や RNA に代表されるヌクレオシド分子がリン酸エステル結合により重合した構造を持つ化合物である。特に 20 量体程度の大きさを持った化合物群は核酸医薬とよばれる次世代の医薬品として注目を集めている。既に 5 種類の医薬品が筋ジストロフィーといった難病に対する治療薬として FDA から承認されており、今後も癌や遺伝性疾患に対する革新的医薬品としての発展が期待されている。

オリゴヌクレオチドは一般にヌクレオシド分子と亜リン酸誘導体を原料とする固相合成により製造されている。特にホスホロアミダイト法やと呼ばれる P-O 結合生成反応を鍵反応とするサイクルを繰り返すことでヌクレオシド鎖の伸長を行う合成法が主流である。しかしながら、従来までの合成手法では化学量論量以上の試薬を基質の活性化に用いる必要がある。また各反応は固相合成であるため、大量の反応剤を用いる必要があり、スケールアップも容易ではない。これらの要因により、従来までの合成法では大量の廃棄物を生み出してしまいうことが大きな問題であり、高コスト化の要因にもなっている。今後増々需要が拡大すると考えられるオリゴヌクレオチドの効率的かつ大量生産のためには廃棄物を最小限に抑えた液相合成法の開発が強く望まれている。



一方で、近年カルボン酸の触媒的エステル化・アミド化反応や触媒的エステル交換反応が環境調和型のエステル合成として注目を集めている。同様の反応形式がリン酸・亜リン酸の触媒的エステル化・エステル交換反応へ展開することができれば、オリゴヌクレオチド合成への応用も期待される。しかしながら、現在のところこのような反応に有効な触媒は殆ど報告例がなく、過酷な反応条件や特殊な基質を用いる必要がある。

2. 研究の目的

本研究では

1. ヌクレオシドとリン酸ジエステルを基質とする液相触媒的亜リン酸化反応を開発
2. 上記反応で得られる生成物に対し、もう一分子のヌクレオシドを反応させる触媒的亜リン酸化反応を確立することを目的とする。

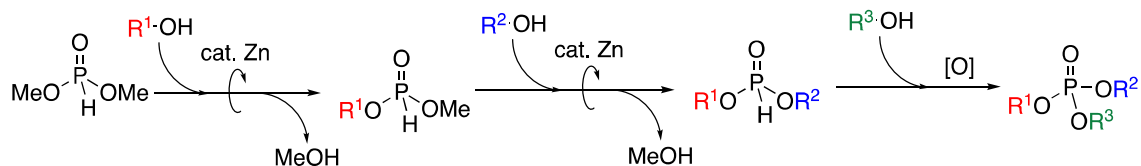
これまで原料として用いる亜リン酸誘導体の合成・安定性向上のための構造の改良や、活性化剤の反応性・選択性向上のための検討に焦点が当てられ研究が行われてきた。しかしながら、このようなアプローチでは等量以上の試薬を用いる必要があり、多量の廃棄物を生じるという問題は解決できない。本研究では、亜リン酸化剤の活性化を Lewis 酸を用いて触媒的に行うことで、これまで報告例のないアルコールのみを副生成物とするヌクレオシドの不均一系触媒による亜リン酸化を実現しようとする点で学術的独自性を有している。特に粗生成物段階で高純度が求められる液相合成に適用可能な高活性・高選択的な触媒開発を目標とする。

3. 研究の方法

本研究では亜鉛錯体触媒によるアルコールの亜リン酸化反応を活用する。後述する通り、申請者はこれまでにジケトナート型の配位子を有する亜鉛(II)錯体が単純アルコールと亜リン酸ジメチルとの亜リン酸エステル交換反応において非常に高い触媒活性を示すことを報告している。本亜鉛触媒は空气中安定かつ安価・低毒性であるため理想的な金属触媒種であり、反応も 0 から室温といった温和な反応条件で進行する。本研究では、本触媒系をさらに発展させることで、ヌクレオシド二置換亜リン酸エステルの触媒的合成に取り組む。

まず、反応・合成設計について述べる。第一段階では 5 位が保護されたヌクレオシドと亜リン酸ジエステルとの亜鉛触媒反応によりヌクレオシド一置換亜リン酸エステルの合成を行う。本反応はこれまでに申請者が開発した亜リン酸化反応と同様の反応形式である。この際、原料とし

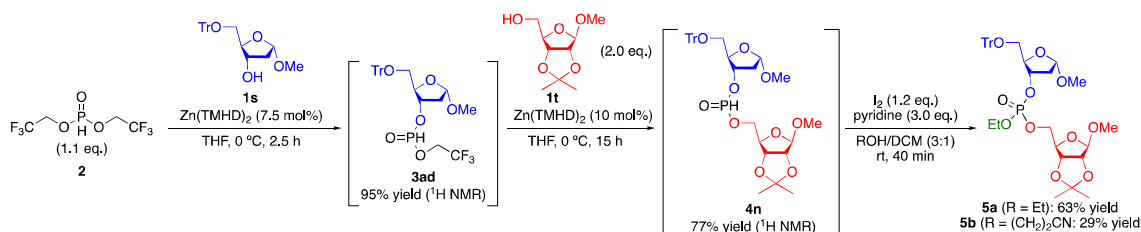
て用いる亜リン酸ジエステルをこれまでの亜リン酸ジメチルからフッ素置換基を有するアルコールを置換基とすることにより、脱離するアルコールが求核性を持たないため、これまで問題であった逆反応等を抑制できると考えられる。このように合成された一置換亜リン酸エステルに対して5位無保護のヌクレオチドを亜鉛触媒を用いて反応させることで第二の置換反応を行いオリゴヌクレオチド二置換亜リン酸エステルの合成を行う。この二段階の反応により、オリゴヌクレオチド合成の鍵中間体の合成が可能となる。得られた化合物に酸化反応・5位の脱保護を施すことにより一分子伸長した5位無保護のヌクレオチドが得られるため、このプロセスを繰り返すことでヌクレオチド鎖の伸長を行う。



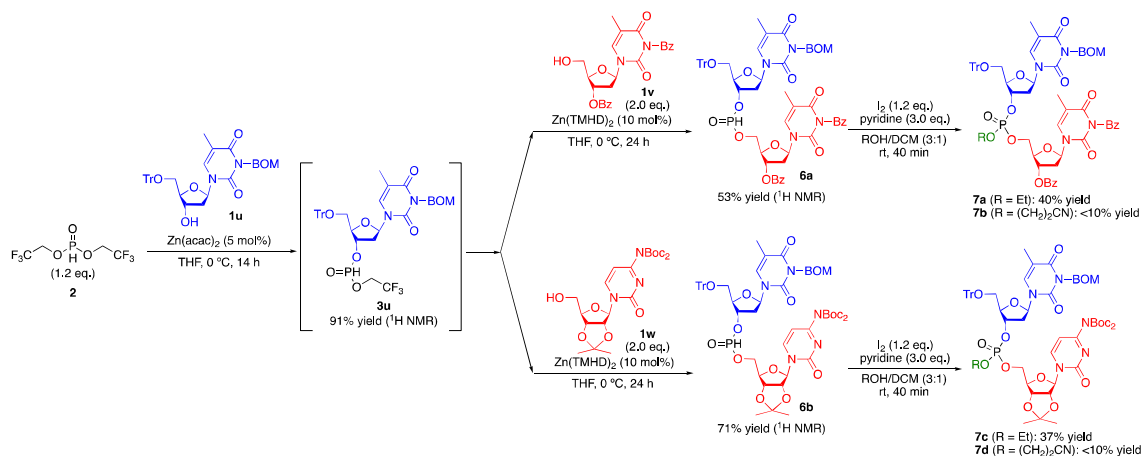
次に、均一系亜鉛(II)触媒の設計について述べる。これまでの単純アルコールと亜リン酸ジメチルとの反応の検討において、比較的高い置換基を有する二座配位型の対アニオンが有効な触媒であることが分かっている。ヌクレオチドを基質として用いる場合には、ピリミジン・プリン塩基部位の Lewis 塩基性により触媒活性が失われてしまうことが大きな問題として想定される。そこで、比較的高く平面四配位な触媒を設計することにより、嵩高いヌクレオチド分子との相互作用を立体障害により抑制し、選択的に亜リン酸部位のみを活性化することが期待される。最後に、液相合成の合成戦略上の利点として収束的合成が可能となることが挙げられる。液相合成ではフラグメント同士の反応により、これまでの固相合成と比較し最長直線工程の大幅な削減が可能となる。

4. 研究成果

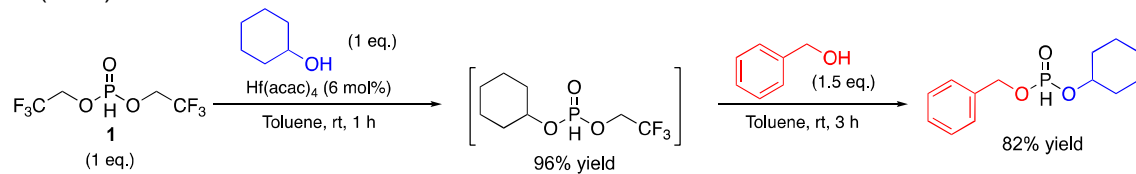
まず、炭水化物由来のアルコールを用いて、ワンポット二段階の亜リン酸ジエステル合成の検討を行った。種々触媒の検討を行ったところ、一段階目の反応で $Zn(TMHD)_2$ を 7.5 mol% 用いることで、アルコールの亜リン酸化反応が 95% 収率で進行することが明らかとなった。また、二段階目の反応においても追加の触媒 10 mol% 存在下反応を行うことで、目的の亜リン酸ジエステルが 77% 収率で得られた。得られた化合物は空气中不安定であったため、ヨウ素酸化を行うことで安定なリン酸トリエステルへと導いた。



本結果を受け、次に実際のヌクレオチドの合成の検討を開始した。一段階目の亜リン酸下反応では、選択性が問題となったため、 $Zn(TMHD)_2$ の代わりに $Zn(acac)_2$ を触媒として使い、91%の収率で目的物が得られた。二段階目の反応では、 $Zn(TMHD)_2$ 10 mol% 存在下、3' 保護のヌクレオチドを反応させることで、53% 収率で目的物が得られた。ここで得られる生成物をヨウ素用いて酸化することで、初のオリゴヌクレオチドの最小構成単位の触媒的合成が達成された。同様に、二段階目の反応において RNA 誘導体を用いることで、DNA/RNA ハイブリッドのヌクレオチドも触媒的合成が可能であることが示された。



また、更なる触媒検討を行った結果、モデル基質を用いた反応において、予想外に $Zr(acac)_4$ や $Hf(acac)_4$ が Zn 触媒と同等やそれ以上の触媒活性を有することが明らかとなった。



本研究成果により、廃棄物を最小限に抑え、かつ、大量合成可能な環境調和型の合成の実現が期待される。また、これまで、 $P=O$ 結合の触媒的活性化の例はほとんど存在しなかったが、本研究成果により、適切に設計された Lewis 酸を用いることで、触媒的反応が可能であることが示された。今後、さらなる触媒探索により更なる触媒性能の向上や高難易度反応の実現が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松永晃・齋藤由樹・小林修
2. 発表標題 糖リン酸エステルおよびヌクレオチドの触媒的合成法の開発
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松永 晃・Dario Mrdovic・齋藤 由樹・小林 修
2. 発表標題 オリゴヌクレオチド合成を志向したワンポット反応による触媒的亜リン酸ジエステル合成
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Dario Mrdovic・松永 晃・齋藤 由樹・小林 修
2. 発表標題 Catalytic phosphorylation with bis(2,2,2-trifluoroethyl) phosphite for the synthesis of dinucleoside phosphite diesters
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2023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
---------	---------