

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893305

研究課題名(和文)複合体形成に伴うエントロピー損失を高度に抑制したノルボルナン型人工核酸の開発

研究課題名(英文)Development of highly constrained nucleic acid analogue based on norbornane structure

研究代表者

森廣 邦彦(Morihiro, Kunihiko)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬支援スクリーニングセンター・特任研究員

研究者番号：70713890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核酸複合体形成の際に生じるエントロピー損失を最小限に抑制した人工核酸の設計・開発を行った。まず、核酸糖部のフラノースをノルボルナンに置換し、バックボーンを短縮化することで揺らぎを抑制した誘導体の合成に取り組んだ結果、重要中間体を得ることに成功した。しかし、それ以降の誘導体化の進行が難しかったため、ノルボルナン骨格の炭素原子の1つを酸素原子に置換した誘導体を設計、合成を開始した。現在核酸塩基部の導入まで行っており、さらなる誘導体化を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this research, I designed and developed nucleic acid analogues for minimizing the loss of entropy with the formation of nucleic acid complexes. I firstly attempted to develop a highly constrained nucleic acid analogue based on a norbornane structure. As a result, I synthesized an important intermediate for the construction of norbornane structure. However, it was difficult to proceed with further derivatization. Therefore, I newly designed a nucleic acid analogue based on oxi-norbornane structure. I successfully introduced a nucleobase and further derivatization is now proceeding.

研究分野：核酸化学

キーワード：人工核酸 ノルボルナン エントロピー 遺伝子発現制御 オリゴヌクレオチド

1. 研究開始当初の背景

DNA や RNA などの核酸分子は構造中に回転可能な単結合を多く有しており、ゆらいだ状態にある。この構造の「ゆらぎ」は核酸どうしが複合体を形成する過程において大きく制限され、エントロピーの損失というエネルギー的に不利な状況を生じる。複合体形成に伴うエントロピーの損失を抑制することができれば、高い標的核酸親和性を有する人工核酸の開発が期待できる。

このコンセプトに基づき申請者らの研究グループが世界に先駆けて開発した人工核酸 2', 4'-BNA は、高い標的核酸親和性の獲得に成功している (Obika, S. *et al. Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 5401)。2', 4'-BNA の標的核酸親和性は既に核酸医薬品の素材となっている 2'-O-メトキシエチル RNA を凌ぐものであり、次なる核酸医薬候補物質として大きな期待を集めている (Yamamoto, T. *et al. Future Med. Chem.* 2011, 3, 339)。2', 4'-BNA 開発コンセプトのポイントは、架橋化により糖部フラノース環内のねじれ角 ($\nu_0 \sim \nu_4$) を固定し、複合体形成に伴うエントロピーの損失を大きく抑制した点にある (図 1A)。

また、我々は 2', 4-BNA の 2' 位酸素を低極性のセレンに置換した人工核酸 SeLNA が、2', 4-BNA を上回る標的核酸親和性を示すことを明らかにしている (図 1B; 研究業績 1)。SeLNA と標的核酸が形成する複合体の熱力学的パラメーター (ΔH , ΔS 及び ΔG) を算出した結果、SeLNA は複合体形成に伴うエントロピーの損失を 2', 4'-BNA よりもさらに強く抑制していることが分かった。これは、水素結合に関与しない低極性のセレン原子が、複合体形成時に系から取り込む水分子の数を減少させたためであると考えられる (Pallan, P. S. *et al. Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 3482)。実際、SeLNA を酸化することで得られる高極性の SeOLNA は、複合体形成に伴うエントロピーの損失が増大し、標的核酸親和性が低下する結果が得られた。

以上のことから、核酸どうしが複合体を形成する際に生じるエントロピーの損失を軽減するためには、構造の「ゆらぎ」と水分子の取り込みの制御が有効な手段であることが示唆される。

2. 研究の目的

化学的な修飾を施すことで天然核酸にはない性質を付与した「人工核酸」が創薬やナノテクノロジー研究の素材として注目を集めている。特に標的核酸に対する結合親和性を高めた人工核酸は、細胞内のゲノム DNA や mRNA の機能を直接制御できることから、医薬品や遺伝子解析ツールとしての利用が大きく期待されている。また人工核酸を介して遺伝子のエピジェネティックな修飾を操作できれば、細胞の発生や分化などを自在に制御できる全く新しい技術の発展が期待で

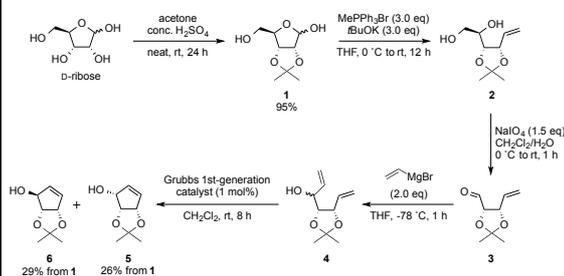
きる。本研究では標的核酸に対する親和性の飛躍的な向上を目指し、核酸の複合体形成に伴うエントロピーの損失を極めて高度に抑制した人工核酸を開発する。開発した人工核酸の高い標的核酸親和性を利用して細胞系で翻訳系を阻害し、これまでにない高効率な遺伝子発現制御システムを構築するとともに核酸医薬の素材として優れた分子を創出する。

3. 研究の方法

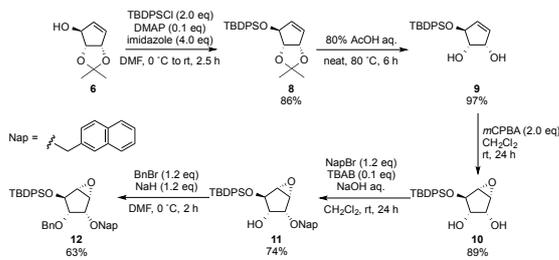
本研究では、核酸どうしの複合体形成に伴うエントロピーの損失を高度に抑制し、標的核酸に対する結合親和性を大きく向上させた人工核酸を開発する。そのために、既に申請者らが実証してきた①糖部の固定化と②低極性化に加え、新たなコンセプトとして③バックボーンの短縮化を導入する。まず、①~③を実現可能な素材として、ノルボルナンを基本骨格に持つ新規人工核酸 (NoNA) の合成を行う。各種核酸塩基を有する NoNA を導入したオリゴヌクレオチドを合成した後、非細胞系において標的核酸との複合体の融解温度を測定することで NoNA の標的核酸親和性を評価する。また複合体の熱力学的パラメーター (ΔH , ΔS 及び ΔG) を算出し、複合体形成に伴うエントロピー損失の抑制効果を調べる。さらにアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-xL の mRNA を標的としたオリゴヌクレオチドを設計・合成し、培養細胞系において翻訳の阻害効率を評価することで高効率な遺伝子発現制御システムの構築を達成する。

4. 研究成果

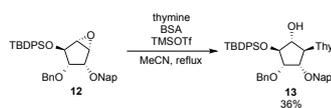
まず、設計したノルボルナン型人工核酸のヌクレオシド合成を行った。市販の D-リボースを出発原料とし、当初立案した合成経路に従ってヌクレオシド合成を試みた。文献 (*Org. Lett.* 2005, 7, 5075.) に従って化合物 **6** を 5 工程で合成した後、さらに 5 工程を経て核酸塩基導入に必要なエポキシ体 **12** の合成に成功した (Scheme 1, 2)。



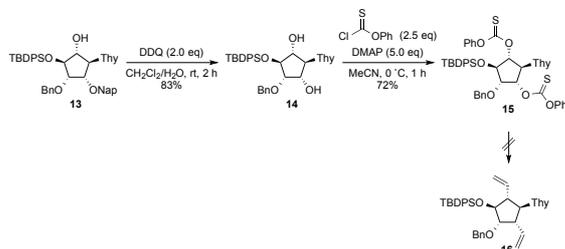
Scheme 1



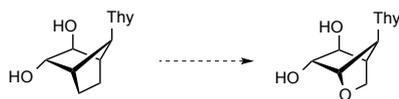
続いて、得られたエポキシ体 **12** に対してチミン塩基の導入を検討した結果、当初計画していた塩基性条件下では反応が進行しないことが明らかとなった。そこで、種々条件を検討した結果、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸存在下でチミン塩基をもつ目的物 **13** を得ることに成功した (Scheme 3)。



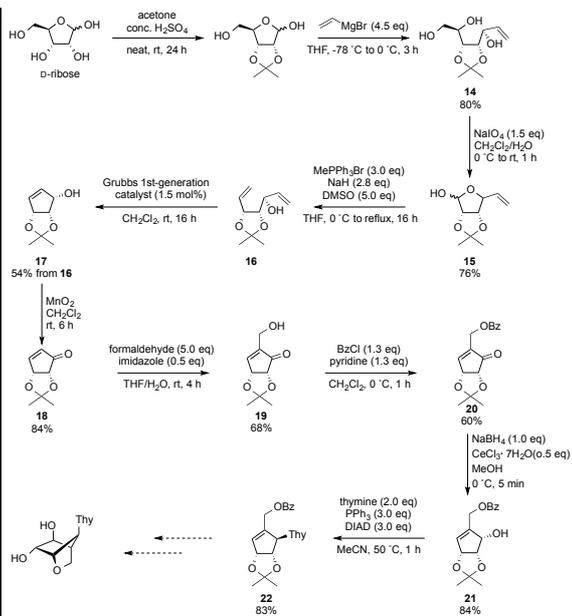
続いて、ノルボルナン構造を構築するべく、架橋形成前駆体への誘導体化を検討した。ジオール体 **14** へと導いた後、ラジカル反応によって2つのビニル基の導入を試みた。種々反応条件や保護基を検討したものの、目的とするジビニル体 **16** の合成には至らなかった (Scheme 4)。



そこで架橋構造の構築をより容易に行うべく、ノルボルナン骨格中の1つの炭素原子を酸素原子に置換した誘導体の合成に着手した (Figure 1)。本誘導体は酸素原子からの求核置換反応により、架橋構造の構築をより容易に行えると考えた。



同様に市販のD-リボースを出発原料とし、文献 (*Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1189; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6216.) に従って9工程で核酸塩基導入の前駆体 **21** を得ることに成功した。核酸塩基部の導入は光延反応によって容易に進行し、現在さらなる誘導体化をおこなっている (Scheme 5)。



Scheme 5

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森廣 邦彦 (MORIHITO, Kunihiko)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬支援ス

クリーニングセンター・特任研究員

研究者番号：70713890

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：