様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３６１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０５９４３

研究課題名（和文）核酸のピンポイント官能基化法の開発

研究課題名（英文）Development of a pinpoint functionalization method of nucleic acids

研究代表者
張　功幸（Hari, Yoshiyuki）

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：５０３４７４２３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、可視光照射によって他の物質を酸化や還元できるイリジウム触媒を連結したオリゴ核酸を合成し、そのオリゴ核酸を用いることでヨードウラシルを含むオリゴ核酸の脱ヨード化（還元反応）に成功しました。さらに、チオエステル（アシルチオ基）を連結したオリゴ核酸の合成も行い、そのオリゴ核酸を用いることでをアミノメチルウラシルを含むオリゴ核酸のアミノ基へのアシル基転位反応に成功しました。また、アシル基転位が効果的に進行する位置についても明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義
狙った核酸の望みの位置の核酸塩基のみをピンポイントで直接的に官能基化することができれば、既存の機能性オリゴ核酸の更なる機能性向上や期待できます。本研究成果はそれを実現するためのはじめの一歩となる研究です。本研究で開発した可視光照射により酸化還元能を示すイリジウム連結オリゴ核酸やアシル基転位能を有する活性エステル連結オリゴ核酸は他の技術への応用も期待でき、今後の核酸化学研究の発展に寄与することが考えられます。

研究成果の概要（英文）：In this research, iridium-conjugated oligonucleotides were synthesized and we found that the conjugated oligonucleotides could deiodinate (reduce) target oligonucleotides including iodouracil bases. Oligonucleotides bearing acylthio groups were also synthesized and it was achieved that acyl transfer from the acylthio group to the amino group of a target oligonucleotide where aminomethyluracil bases are contained. Moreover, the position suitable for acyl transfer was examined.

研究分野：核酸有機化学

キーワード：コンジュゲートオリゴ核酸　オリゴ核酸上の化学反応

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

一本鎖あるいは二重鎖核酸の望みの部位を特異的に官能基化（化学修飾）できる手法は、核酸（DNA や RNA）の機能改変、遺伝子発現制御などの新規核酸基盤技術開発に向けた展開が期待できる。これまで、多くの研究者によって核酸の化学修飾法の開発が検討されてきた。例えば、酵素反応を利用した手法として、*S*-アデノシル-L-メチオニンアナログとメチル化酵素を利用した二重鎖 DNA への置換基導入が報告されている。しかし、核酸上の望みの部位のみでの官能基化は難しい等の酵素反応に起因する課題がある。

別のアプローチとして、酵素反応を利用しない化学反応性基を連結したオリゴ核酸の利用も盛んに検討されている。この手法では、オリゴ核酸により標的核酸の配列を認識できるため、望みの位置でのピンポイント官能基化が可能となるが、これまでの報告では、標的核酸の構造・機能を大きく損ねる、核酸塩基間の水素結合形成（塩基対形成）の阻害を引き起こすような化学修飾が殆どである。

２．研究の目的

標的核酸の望みの位置の核酸塩基をピンポイントで直接的に化学修飾する手法を開発する。その際、標的核酸の大きな構造変化を伴わない、塩基対形成に影響を与えない官能基化を実現する。

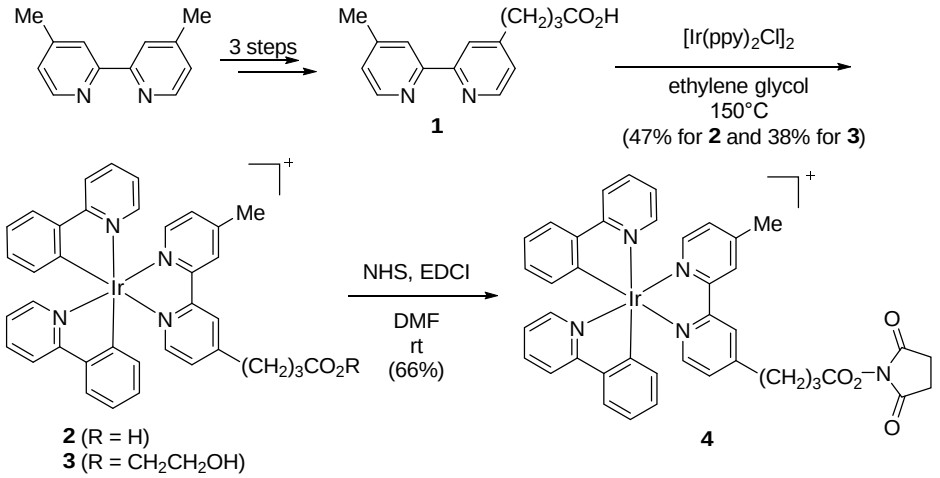
３．研究の方法

ラジカル前駆体などの化学反応性基や光酸化還元触媒を連結したオリゴ核酸をコンジュゲート核酸合成法により、化学合成する。次いで、開発したオリゴ核酸と標的核酸との配列選択的複合体形成を利用し、光酸化還元触媒と可視光照射により、望みの位置の核酸塩基の官能基化反応（ピリミジン塩基の 5 位などの官能基化）を達成する。

４．研究成果

4-1. 光酸化還元触媒を連結したオリゴ核酸の合成

まず、光酸化還元触媒として 2 種類の Ir 触媒部分を合成した。その一例として、ビピリジン配位子を含む Ir 触媒部の合成について Scheme 1 に示す。4,4′-ジメチル-2,2′-ビピリジルを出発原料として既知化合物 **1** へと誘導後、エチレングリコール中、$[Ir(ppy)_2Cl]_2$ と処理することで錯体 **2** を構築した（Scheme 1）。その際、エチレングリコール付加体 **3** が副生したが、アルカリ処理で **2** へと変換可能であった。その後、オリゴ核酸とコンジュゲートするために *N*-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて活性エステル **4** へと変換した。



Scheme 1. Synthesis of an iridium catalyst bearing an activated ester.

合成した **4** と 5′末端にアミノスペーサーを持つオリゴ核酸のコンジュゲート反応を行った。検討の結果、80% DMSO 水溶液中、オリゴ核酸を **4**（100 eq.）、*i*-Pr_2NEt（100 eq.）で室温下 6 時間処理したところ、望みのコンジュゲートオリゴ核酸を合成することに成功した。

また、別の Ir 触媒としてトリス(フェニルピリジン)型触媒も同様の方法にて、望みのコンジュゲートオリゴ核酸を合成することができた。いずれのオリゴ核酸の純度並びに分子量は HPLC および ESI-MS で全く問題ないことを確認した。

一方、今回の Ir 触媒が光酸化還元能を持つことを確認するため、モデル基質として 3′,5′-ジ-*O*-ベンゾイル-5-ヨード-2′-デオキシウリジンの還元反応を試みた。MeCN 中、Ir 触媒（1 mol%）、ギ酸（5 eq.）と Bu_3N（5 eq.）共存下、青色 LED 照射したところ、ビピリジン型触媒 **2**、フェニルピリジン型触媒いずれも脱ヨード化された還元体を得ることができた。特に、フェニルピリジン型触媒の方が原料の消失とともに高収率で目的の還元体が生成することを確認できた。

4-2. 光酸化還元触媒を連結したオリゴ核酸の機能評価

Ir 触媒を連結したオリゴ核酸が相補核酸と複合体形成できるかを融解温度（T_m）測定に評価した。ビピリジン型 Ir 触媒連結オリゴ核酸を用いた結果、同じ長さの一本鎖 DNA に対しては Ir 触媒により形成される二重鎖が安定化することが明らかとなった。また、より長鎖 DNA との二重鎖形成では、その安定化能がさらに向上することが判明した。一方、二重鎖 DNA を標的とした三重鎖核酸形成では、同じ長さの二重鎖 DNA では若干安定化するものの、より長い二重鎖 DNA に対してはその安定性が著しく低下することが明らかとなった。これは、Ir 触媒と突出した二重鎖 DNA 間で立体反発が生じたため、安定性が低下したものと考えられた。この結果は、Ir 触媒を連結したオリゴ核酸による標的核酸の官能基化を実施する場合、その標的核酸は一本鎖核酸が適していることを示唆している。

次に、Ir 触媒連結オリゴ核酸を用いて、5-ヨード-2′-デオキシウリジン（IdU）を含む一本鎖 DNA の還元反応を検討した。用いた配列の一例を Figure 1a に示す。種々検討した結果、フェニルピリジン型触媒連結オリゴ核酸において、10% MeCN／リン酸緩衝液（pH 7.0）中、ギ酸と Bu_3N 共存下青色 LED 照射により、オリゴ核酸の分解が確認されたものの還元反応が進行した脱ヨード化一本鎖 DNA が得られることが明らかとなった（Figure 1b）。

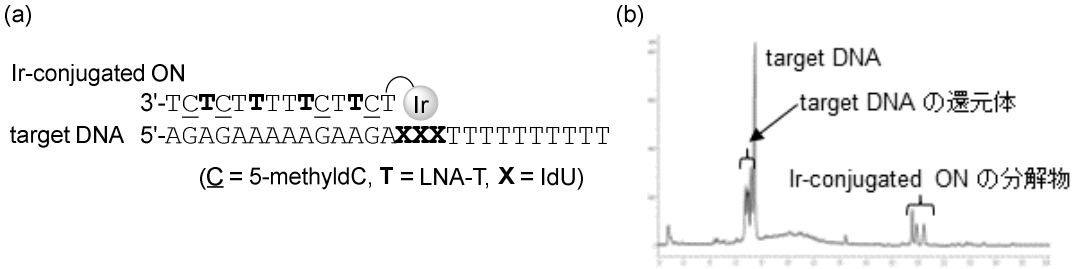


Figure 1. (a) Oligonucleotides used for the functionalization of target DNA. (b) HPLC chart of the reaction mixture.

4-3. 化学反応性基を連結したオリゴ核酸の合成

はじめに、求電子ラジカル前駆体を連結したオリゴ核酸の合成を検討した。求電子ラジカル前駆体としては、ブロモマロン酸エステルとコンジュゲートユニット（アジドや活性エステル）を持つアナログやブロモジフルオロ酢酸エステルとコンジュゲートユニット（アジドや活性エステル）を持つアナログを合成した。さらに、トリフルオロメチルラジカル前駆体となるユニットの合成も試みたが、その化学安定性の問題から合成困難であった。

合成に成功した求電子ラジカル前駆体については、末端アルキン、高度に歪みを持ったアルキンや末端アミンを持つオリゴ核酸とコンジュゲート反応を行った。種々検討したが、求電子ラジカル前駆体自体の分解や求電子ラジカル前駆体が欠落したコンジュゲートオリゴ核酸などが得られ、目的とする求電子ラジカル前駆体を連結したオリゴ核酸を得ることはできなかった。そこで、化学反応性基を導入したオリゴ核酸についてはその安定性の問題からアシル基転位を含めたより広範な反応性ユニットを検討することにした。結果、コンジュゲート反応に click chemistry を利用することで、チオエステル型をはじめ複数のアシル基転位能を持つことが期待できるコンジュゲートオリゴ核酸の合成に成功した。

4-4. 化学反応性基を連結したオリゴ核酸の機能評価

4-3 で合成したコンジュゲートオリゴ核酸を用いて、標的一本鎖 DNA へのアシル基転位反応を検討した。最終的には、高活性な 5-アミノメチルウラシル塩基を含む一本鎖 DNA に対してチオ酢酸を連結したオリゴ核酸を利用することで、リン酸緩衝液（pH 11.0）中 100 mM NaCl 存在下、室温でアシル基転位の進行が確認できた。5-アミノメチルウラシル塩基の導入数、導入場所等を精査した結果、Figure 2 の X_1 の位置の 5-アミノメチルウラシル塩基に最も効率的にアセチル基が移動することが明らかとなった。

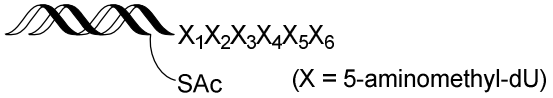


Figure 2. The acyl transfer reaction to 5-aminomethyluracil bases in target DNA.

4-5. その他のコンジュゲートオリゴ核酸の合成

脱ヨード化、アシル基転位の成功例を示すことができたが、その基質は5-ヨードウラシルや5-アミノメチルウラシルといった特殊な核酸塩基である。研究目的のとおり、本変換反応はその塩基対形成等に影響を与えないものの、基質が修飾塩基であるためその利用は限定的であ

る。そこで、その他のコンジュゲートオリゴ核酸として、酸化還元能やルイス酸能を持つ銅触媒連結オリゴ核酸とラジカル種を持つオリゴ核酸の合成を達成した。今後は、これらコンジュゲートオリゴ核酸の機能評価も行い、オリゴ核酸のピンポイント官能基化反応の開発研究を引き続き行っていく。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2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 Yuta Ito, Koichi Mizuno, Kohei Domoto, Yoshiyuki Hari	４．巻 39
２．論文標題 Synthesis and hybridization properties of iridium(III) polypyridyl complex-conjugated oligonucleotide	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids	６．最初と最後の頁 69-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15257770.2019.1690150	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 Yuta Ito, Misaki Matsuo, Takashi Osawa, Yoshiyuki Hari	４．巻 65
２．論文標題 Triplex- and duplex-forming abilities of oligonucleotides containing 2'-deoxy-5-trifluoromethyluridine and 2'-deoxy-5-trifluoromethylcytidine	５．発行年 2017年
３．雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	６．最初と最後の頁 982-988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c17-00530	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2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 堂本晃平、伊藤勇太、大澤昂志、張　功幸
２．発表標題 イリジウム錯体コンジュゲートオリゴ核酸の合成
３．学会等名 日本薬学会第139年会
４．発表年 2019年

１．発表者名 堂本晃平，伊藤勇太，大澤昂志，張　功幸
２．発表標題 イリジウム錯体を導入したオリゴ核酸の合成とその応用
３．学会等名 第2回 日本核酸化学会 中四国地区セミナー
４．発表年 2019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