

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16330

研究課題名（和文）5-トリフルオロメチルピリミジン塩基の反応性を利用した機能性オリゴ核酸の開発

研究課題名（英文）Development of functional oligonucleotides by utilizing the reactivity of 5-trifluoromethyl pyrimidine bases

研究代表者

伊藤 勇太 (Ito, Yuta)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：90783225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、5-トリフルオロメチルウラシルを有するオリゴ核酸を2カ所の求核部位を持つ求核剤で処理することでトリフルオロメチル基をヘテロ芳香環へと変換する新規オリゴ核酸合成後修飾法の開発に成功しました。また、5-モノフルオロメチルウラシルや5-ジフルオロメチルウラシルを有するオリゴ核酸もオリゴ核酸合成後修飾法に適用できることを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピリミジン塩基5位の官能基は水素結合やスタッキング相互作用に大きく影響を及ぼすため、この位置に様々な修飾を施して評価することで、より機能性の高いオリゴ核酸を創出できると考えられます。しかし、現在一般的に用いられているオリゴ核酸合成法では修飾塩基毎に対応するホスホロアミダイトモノマーを多工程かけて合成しなければならないため、十分な構造探索を行うことは困難です。本研究で開発したオリゴ核酸合成後修飾法は酸化度の異なる様々な官能基をウラシル塩基の5位に導入でき、機能性オリゴ核酸の探索を効率化するため、今後の核酸医薬開発の発展に資する方法論となることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：In this research, we developed a novel post-synthetic modification of oligonucleotide containing 5-trifluoromethyluracil base for converting a trifluoromethyl group to a heteroaromatic ring by treatment with bis-nucleophiles. Moreover, we found that oligonucleotides containing 5-mono- and 5-di-fluoromethyluracils can also be applied to post-synthetic modification.

研究分野：核酸有機化学

キーワード：5-トリフルオロメチルピリミジン オリゴ核酸合成後修飾法 5-モノフルオロメチルウラシル 5-ジフルオロメチルウラシル

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ピリミジン塩基の 5 位に導入されたトリフルオロメチル(CF₃)基は興味深い反応性を有している。例えば、2'-デオキシ-5-CF₃-ウリジンは酵素と複合体を形成することや、塩基性条件下で CF₃ 基がカルボキシ基へと加水分解されることが報告されている。最近、私はこの反応性をオリゴ核酸合成後修飾法に利用できると考え、5-CF₃-ピリミジン塩基をオリゴ核酸に導入後、酸素および窒素求核剤で処理することにより、CF₃ 基を様々なカルボン酸誘導体へと変換することに成功した[Ito, Y. *et al. Tetrahedron*, **2018**, 74, 6854.]. また、5-CF₃-シトシンおよび 5-メチルシトシンを 1 カ所導入したそれぞれのオリゴ核酸の二重鎖および三重鎖形成能を評価したところ、二重鎖の熱安定性にほとんど差はないものの、三重鎖の熱安定性には 13 °C の差があることが明らかになった[Ito, Y. *et al. Chem. Pharm. Bull.*, **2017**, 65, 982.]. これらの知見から、5-CF₃-ピリミジン導入オリゴ核酸の CF₃ 基変換反応と、化学変換前後の二重鎖や三重鎖の熱安定性の違いを利用すれば、遺伝子発現を制御する新たな機能をオリゴ核酸に付与できると期待した。

2. 研究の目的

5-CF₃-ピリミジン導入オリゴ核酸を利用した新たなオリゴ核酸合成後修飾法を開発し、本手法を用いて機能性オリゴ核酸の探索を行う。また、オリゴ核酸合成後修飾法に利用できる前駆体は未だ限定的であることから CF₃ 基以外にも本手法に利用可能な官能基を見出す。

3. 研究の方法

(1) 5-CF₃-ピリミジン導入オリゴ核酸を 2 カ所の求核部位を持つ求核剤と反応させることによりピリミジン塩基の 5 位にヘテロ芳香環を導入したオリゴ核酸の合成を検討する。また、得られたオリゴ核酸の三重鎖形成能の評価を行う。

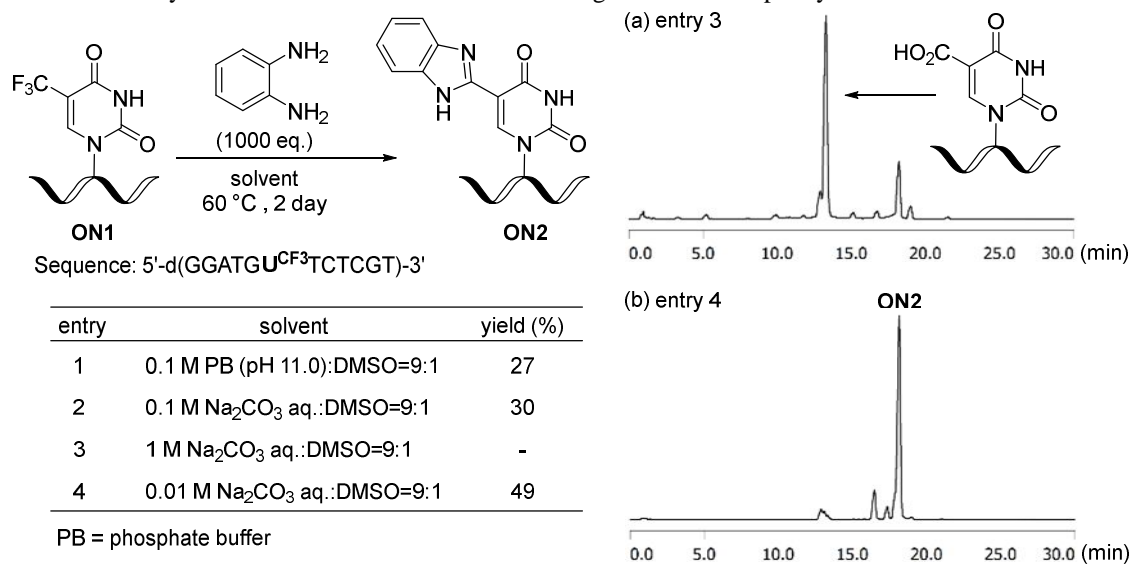
(2) ピリミジン塩基の 5 位にモノフルオロメチル(CH₂F)基およびジフルオロメチル(CHF₂)基を持つヌクレオシドをオリゴ核酸へと導入し、これを利用したオリゴ核酸合成後修飾法を検討する。

4. 研究成果

4-1. 2 カ所の求核部位を持つ求核剤による 5-CF₃-ウラシル塩基含有オリゴ核酸合成後修飾法

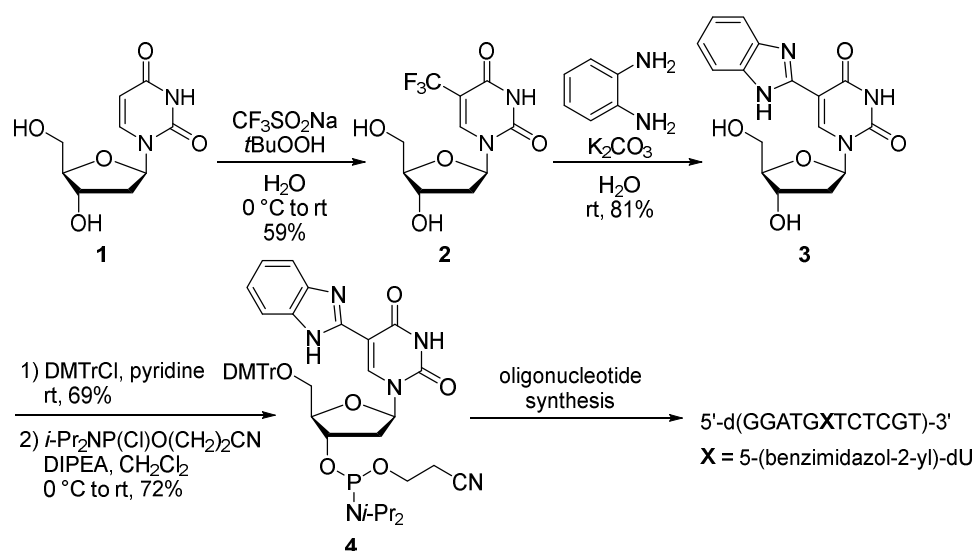
まず、求核剤として *o*-フェニレンジアミンを用いて反応条件の検討を行った。リン酸バッファー(pH 11)/DMSO=9:1 の溶液中、5-CF₃-ウラシル塩基(dU^{CF₃})含有オリゴ核酸 ON1 を *o*-フェニレンジアミン(1000 eq.)存在下、60 °C で 2 日間処理したところ、CF₃ 基がベンズイミダゾリル基へと変換されたオリゴ核酸 ON2 が生成した (Table 1, entry 1)。次に、収率の向上を目指して、様々な塩基を用いて反応を検討したところ、0.1 M の炭酸ナトリウム水溶液を用いると 30% と最も収率よく反応が進行した (entry 2)。そこで、炭酸ナトリウム水溶液の濃度について検討したところ、1 M の溶液では目的の反応よりも加水分解が優先して進行し、カルボン酸へと変換された (entry 3)。一方、0.01 M の溶液を用いて反応を行うと、5-(ベンズイミダゾール-2-イル)ウラシルを含むオリゴ核酸が 49% の収率で得られた (entry 4)。

Table 1. Post-synthetic modification of ON1 containing dU^{CF₃} with *o*-phenylenediamine.



^a RP-HPLC chromatogram of the crude mixture of entry 3. ^b RP-HPLC chromatogram of the crude mixture of entry 4. HPLC conditions: a linear gradient of 5-15% MeCN in 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH 7.0) for 30 min.

次に、望みの化学変換が進行していることを確認するため、5-(ベンズイミダゾール-2-イル)ウラシル含有オリゴ核酸の別途合成を行った (Scheme 1)。まず、市販の 2'-デオキシウリジン 1 を *tert*-ブチルヒドロペルオキシドとトリフルオロメチルスルフィン酸ナトリウムで処理すると、ウラシル塩基 5 位への CF₃ ラジカル付加反応が進行し、2 が得られた。続いて、2 を *o*-フェニレンジアミンと反応させた後、生成した白色沈殿をろ取したところ 5-(ベンズイミダゾール-2-イル)-2'-デオキシウリジン 3 が 81% の収率で得られた。なお、本手法は既存の合成法と比較して最も短工程かつ容易な精製操作で 3 を合成できる。さらに、5'位水酸基のジメトキシトリチル化および 3'位水酸基のホスフィチル化を行うことによりホスホロアミダイト体 4 へと変換し、これを DNA 合成機を用いてオリゴ核酸へと導入した。得られたオリゴ核酸を HPLC により分析したところ、dU^{CF₃} 含有オリゴ核酸の化学変換により得られたオリゴ核酸のピークと保持時間が一致することを確認した。



Scheme 1. Alternative synthesis of an oligonucleotide containing a 5-(benzimidazol-2-yl)uracil base.

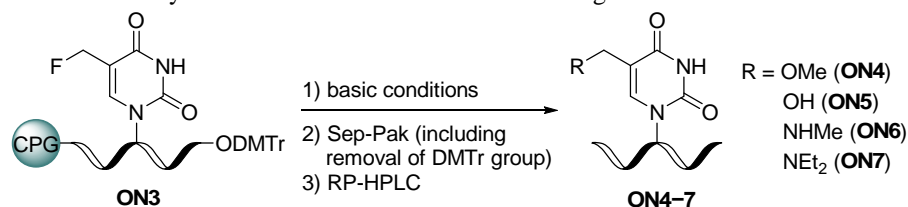
さらに、いくつかの求核剤を用いてオリゴ核酸合成後修飾法を検討した。その結果、2-アミノチオフェノールやエチレンジアミンを用いると効率的に反応が進行し、対応する 5 位修飾体が生成した。一方、2-アミノフェノールを用いた場合には望みのオリゴ核酸は得られなかった。

また、ピリミジン塩基のみの配列から成るオリゴ核酸中に 5-(ベンズイミダゾール-2-イル)ウラシルを導入し、その三重鎖形成能を T_m 測定により評価した。その結果、5-(ベンズイミダゾール-2-イル)ウラシル含有オリゴ核酸は同じ位置にチミン塩基を持つオリゴ核酸と比較して T_m 値が 1 °C 低下した。さらに、5-(ベンズイミダゾール-2-イル)ウラシルを連続または 1 つ置きで 3 ヲ所導入したオリゴ核酸は三重鎖を形成しないことが明らかとなった。このように、現在のところ熱安定性の高い三重鎖形成核酸を見出すことはできていないが、今後本研究により確立した手法を用いてピリミジン塩基の 5 位に様々な官能基を導入することで遺伝子発現の制御を可能にする機能性オリゴ核酸の開発を進めていく予定である。また、研究期間内に dC^{CF₃} を含むオリゴ核酸の化学変換を検討することができなかったため、引き続き研究を行う予定である。

4-2. 5-モノおよび5-ジ-フルオロメチルウラシル塩基を前駆体とするオリゴ核酸合成後修飾法

多様な 5 位置換ウラシル塩基を含むオリゴ核酸の創出を目指し、5-CH₂F-ウラシル(dU^{CH₂F})および 5-CHF₂-ウラシル(dU^{CHF₂})塩基を前駆体とするオリゴ核酸合成後修飾法を検討した。まず、2'-デオキシ-5-CH₂F-ウリジンおよび 2'-デオキシ-5-CHF₂-ウリジンのアミダイト体を合成し、これらをオリゴ核酸へと導入することに成功した。

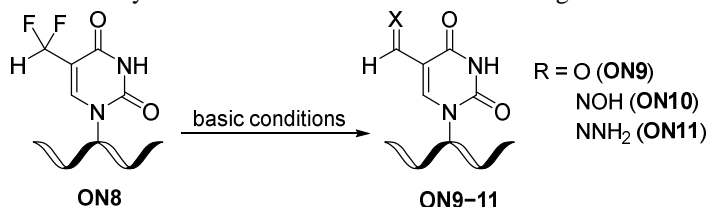
次に、dU^{CH₂F} 含有オリゴ核酸を用いて CH₂F 基の変換反応を検討した (Table 2)。まず、オリゴ核酸を固相から切り出すために一般的に利用される 50 mM の炭酸カリウム-メタノール溶液を用いて室温で 24 時間処理したところ、フッ素原子がメトキシ基へと変換された (entry 1)。また、反応時間を 1 時間に短縮しても、メトキシ体へと変換されることから CH₂F 基の化学変換と固相担体からの切り出しは同時に行うことにした。続いて、求核剤として水酸化ナトリウムやメチルアミン、ジエチルアミンを用いて反応を検討したところ、対応する 5 位修飾ウラシルを含むオリゴ核酸が生成した (entries 2-4)。

Table 2. Post-synthetic modification of **ON3** containing dU^{CH₂F}Sequence: 5'-d(GGATGU^{CH₂F}TCTCGT)-3'

entry	basic conditions	isolated yield ^a (%)
1	50 mM K ₂ CO ₃ in MeOH, rt, 24 h	37 (ON4)
2	0.1 M NaOH aq., rt, 24 h	19 (ON5)
3	40% MeNH ₂ aq., rt, 2 h	39 (ON6)
4	20% Et ₂ NH in MeCN, 60 °C, 2 h then 28% NH ₃ aq., rt, 24 h	41 (ON7)

^a Calculated from the CPG resin (0.2 μmol) used for oligonucleotide synthesis.

さらに、dU^{CH₂F}含有オリゴ核酸を用いたオリゴ核酸合成後修飾法を検討した。固相担体に担持された未精製の dU^{CH₂F}含有オリゴ核酸を 50 mM の炭酸カリウム-メタノール溶液を用いて室温で 4 時間処理したところ、dU^{CH₂F}含有オリゴ核酸の場合とは異なり、CHF₂基の化学変換はほとんど進行せず、固相担体から切り出されたフリーの dU^{CH₂F}含有オリゴ核酸 **ON8** が単離された。この結果から、CHF₂体は、CH₂F体よりも塩基に対する安定性が高いことが明らかとなった。そこで、**ON8**を炭酸カリウム-メタノール溶液中、60 °Cで 24 時間処理したところ、5-ホルミルウラシル含有オリゴ核酸が 70%の収率で得られた (Table 3, entry 1)。さらに、求核剤としてヒドロキシルアミンやヒドラジンを用いたところ、CHF₂基をオキシムやヒドラゾンへと変換することに成功した (entries 2 and 3)。

Table 3. Post-synthetic modification of **ON8** containing dU^{CH₂F}Sequence: 5'-d(GGATGU^{CH₂F}TCTCGT)-3'

entry	basic conditions	isolated yield (%)
1	50 mM K ₂ CO ₃ in MeOH, 60 °C, 24 h	70 (ON9)
2	0.1 M NH ₂ OH·HCl in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0), rt, 24 h	27 (ON10)
3	0.1 M NH ₂ NH ₂ aq., 60 °C, 6 h	29 (ON11)

以上のように、5-CH₂Fおよび 5-CHF₂-ウラシル塩基を前駆体とするオリゴ核酸合成後修飾法の開発に成功した。5-CF₃-ウラシル塩基を前駆体とするオリゴ核酸合成後修飾法と併せると、ウラシル塩基の 5 位に酸化度の異なる様々な官能基を導入したオリゴ核酸を合成できるため、機能性オリゴ核酸の探索を効率化する実用的な手法となる。今後は、シトシン塩基にも本手法を適用し、エピジェネティック修飾シトシンを含む 5 位修飾体を容易に合成可能なオリゴ核酸合成後修飾法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ito Yuta, Hayashi Honoka, Fuchi Yasufumi, Hari Yoshiyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 Post-synthetic modification of oligonucleotides containing 5-mono- and 5-di-fluoromethyluridines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 131769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tet.2020.131769	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 林穂乃佳、伊藤勇太、張 功幸
2. 発表標題 オリゴ核酸合成後修飾法による -モノフルオロおよび、 -ジフルオロチミン塩基の化学変換
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤勇太、林穂乃佳、淵 靖史、張 功幸
2. 発表標題 5-モノ-および5-ジ-フルオロメチルウラシル塩基のオリゴ核酸合成後修飾法
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
---------	---------