

令和 4 年 4 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15401

研究課題名(和文) 核酸糖部とリン酸部の立体配座を固定化した2',3'-架橋型核酸の開発と機能評価

研究課題名(英文) Development and evaluation of 2',3'-bridged nucleic acid with constrained conformation of sugar and phosphate backbone

研究代表者

大澤 昂志(Osawa, Takashi)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00783226

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)：短工程で合成可能で、かつ糖部とリン酸部の配座を厳密に固定した人工核酸は今までにない実用的な核酸医薬材料になるという考えのもと、5員環-6員環のトランス縮環骨格を利用した2',3'-架橋型核酸を設計し、その合成を行った。その結果、ホスホン酸エステル構造を持たない1,4-ジオキサン環で5員環-6員環のトランス縮環骨格を構築することに成功した。一方で、ホスホン酸エステル構造を有する2',3'-架橋型核酸については、環化前駆体となる亜リン酸ジエステルが酸性条件、塩基性条件に対して極めて不安定であったため、環化体を得る条件を確立することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖部2'位と3'位の間で架橋した5員環-6員環トランス縮環骨格を有する人工核酸の合成例は世界初である。合成した2',3'-架橋型核酸は糖部とリン酸部の配座が高度に固定された特徴的な構造を有しており、核酸医薬をはじめとするオリゴ核酸を基盤とする技術への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：An artificial nucleic acid that can be synthesized in a short process and that has a strictly fixed conformation of the sugar and the phosphate moieties will be a practical nucleic acid pharmaceutical material that has never existed before. In this study, 2',3'-bridged nucleic acid with a 5,6-trans-fused ring was designed and synthesized. As the results, we succeeded in constructing a bicyclic skeleton with a 1,4-dioxane ring that does not have a phosphate structure. On the other hand, since the nucleoside derivatives with a phosphonate ester was extremely unstable to acidic and basic conditions, 2',3'-bridged nucleic acids having a phosphonate ester could not be synthesized.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸化学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖部を RNA 二重鎖中と同じ N 型配座に固定した架橋型核酸 2',4'-BNA 類は、高い標的 RNA 結合能だけでなく、架橋環の立体障害により優れた核酸分解酵素耐性能も有する。そのため、2',4'-BNA 類は核酸医薬の素材として、すでにその実用化へ向けた臨床試験が進められている。一方で、リン酸部の配座を適切に固定した人工核酸も概して相補鎖 RNA と安定な二重鎖を形成できる。以上を踏まえ、糖部とリン酸部の両方の配座を精密に固定できれば、2',4'-BNA を凌駕する核酸素材ができると考えた。実際にこの戦略で、糖部配座とリン酸部の二面角  $\gamma$  を固定した TriNA は、2',4'-BNA を上回る RNA 結合能を示した (Seth, P. P. and Hanessian, S. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2034.)。しかし、TriNA は構造が複雑で、その合成に出発原料から 22 工程かかるなど供給面に課題を残している。そのため、真に実用的な素材の開発には、糖部とリン酸部の配座を固定でき、かつ簡便に合成できる分子設計が求められる。

### 2. 研究の目的

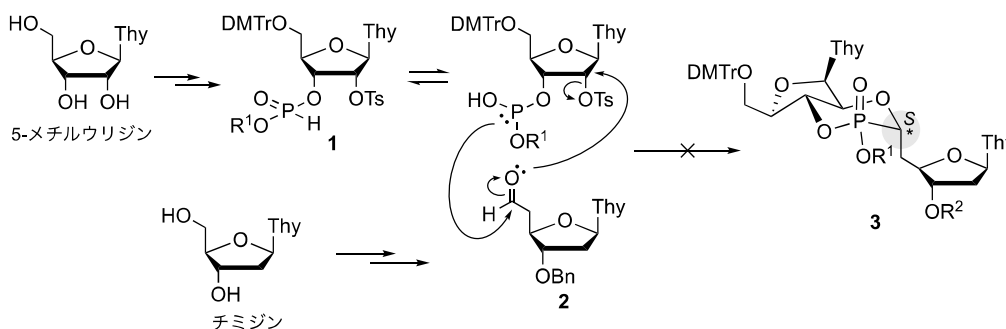
本研究課題では、核酸医薬素材として有用な人工核酸の開発を目的に、5 員環-6 員環のトランス縮環骨格を利用した 2',3'-架橋型核酸を合成し、2',3'-架橋型核酸のモノマー構造、オリゴマー中での構造を詳細に明らかにする。また、オリゴ核酸の RNA 結合能などの基礎的な物性評価や、mRNA の遺伝子発現抑制能などの機能性評価により、5 員環-6 員環のトランス縮環骨格により、核酸の糖部、リン酸部の配座を固定した効果について精査する。

### 3. 研究の方法

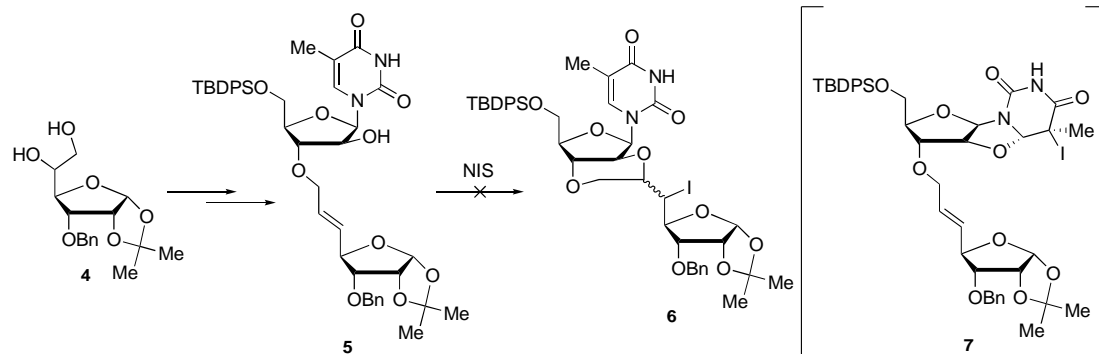
糖部とリン酸部の配座を固定した 2',3'-架橋型核酸の短工程合成を目指し、その検討を行った。

### 4. 研究成果

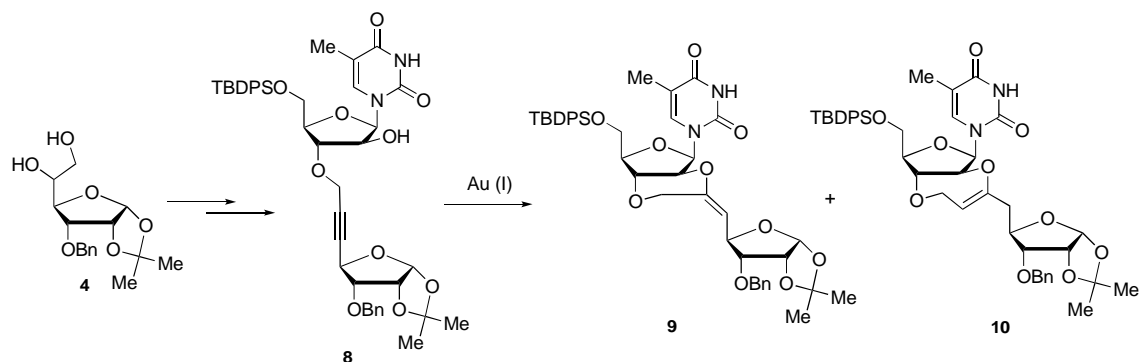
5 員環-6 員環トランス縮環の構築については、下図に示すような亜リン酸ジエステル 1 のアルデヒド 2 への求核付加 (Pudovik 反応) に続く  $S_N2$  型の分子内環化が、最も成功する可能性が高い方法だと考え、検討を行った。5-メチルウリジンとチミンから環化前駆体となる化合物 1 と 2 をそれぞれ合成し、トリエチルアミンなどの塩基を用いて環化反応を検討した。その結果、望みの環化体 3 を得る条件を確立することはできなかった。その後、保護基と脱離基の検討を兼ねて数種類の環化前駆体を合成しそれぞれの安定性を確認したところ、亜リン酸ジエステル構造を有するチミンが弱酸、弱塩基に対して非常に不安定であることが明らかになり、環化の反応条件下で安定に存在できないことが示唆された。そのため、ホスホン酸エステル構造を有する環化体 3 の合成を断念し、よりシンプルな 1,4-ジオキサン環で縮環骨格を構築する方針に変更した。



その合成については D-グルコースから 5 工程で誘導可能なジオール 4 から、過ヨウ素酸ナトリウム処理に続く Horner-Wadsworth-Emmons 反応により増炭した。続いて LAH 還元と 1 級ヒドロキシ基のヨウ素化によりアリルヨードへと変換した。その後、TBDPS 基で保護した 5-メチルウリジンとカップリングすることにより環化前駆体 5 を合成した。はじめに、化合物 5 の内部オレフィン部分を活性化するために種々ルイス酸やプレンステッド酸で処理したところ、環化は進行せずアセトニドが除去された生成物を得られた。また、mCPBA や DMDO を用いて化合物 5 のエポキシ化を試みたが、エポキシドを得ることはできず原料 5 を回収した。続いて、種々ハロゲン化試薬を用いて環化反応を検討したところ、化合物 5 を NIS で処理したときにヨウ素化された生成物を得ることができた。しかし、得られた生成物は望みの 5 員環-6 員環のトランス縮環骨格を形成した化合物 6 ではなく、チミンの 5 位がヨウ素化して 5 員環を形成した化合物 7 であった。この結果から、化合物 5 の内部オレフィンを活性化して 1,4-ジオキサン環を形成するのは困難であると判断した。



次に環化前駆体として化合物 8 を立案し、その合成を行った。はじめに化合物 4 を過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて得たアルデヒドを大平-Bestmann 試薬で処理することにより末端アルキンへと変換した。続いて、末端アルキンのヒドロキシメチル化と 1 級ヒドロキシ基のヨウ素化によりプロパルギルヨードへと変換した。その後、TBDPS 基で保護した 5-メチルウリジンとカップリングすることにより環化前駆体 8 を合成した。得られた化合物 8 を種々ルイス酸で処理したところ、1 価の金触媒を用いたときに環化が進行し、6-*exo* 環化体 9 と 7-*endo* 環化体 10 を 1:2 の比率、合計約 40% の収率で得ることができた。現状さらなる構造変換は必要であるものの、糖部 2'位と 3'位の間で架橋した 5 員環-6 員環トランス縮環骨格を有する人工核酸の合成例はいままでになく、核酸化学だけでなく基礎化学としても興味深い分子を合成することができた。今後研究費が得られた際に引き続き検討していきたい。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hari Yoshiyuki, Yamamoto Kazuki, Fuchi Yasufumi, Okabe Masaya, Osawa Takashi, Ito Yuta	4. 巻 53
2. 論文標題 New cleavable spacers for tandem synthesis of multiple oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Synthesis	6. 最初と最後の頁 4440 ~ 4448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1538-9883	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 Hari Yoshiyuki, Ito Yuta, Hama Chisa, Osawa Takashi	4. 巻 103
2. 論文標題 The effect of the base triplets adjacent to a T-CG or 5-methylC-CG triplet in the triplex DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-20-S(K)16	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 Osawa Takashi, Kawaguchi Miho, Jang Ye-Jin, Ito Yuta, Hari Yoshiyuki	4. 巻 31
2. 論文標題 Synthesis and properties of oligonucleotides bearing thymidine derivatives with 1,6-dioxaspiro[4.5]decane skeleton	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115966	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 Yamashita Shoko, Nishida Kodai, Osawa Takashi, Nakanishi Ayumi, Ito Yuta, Hari Yoshiyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Synthesis of oligonucleotides containing 2'-N-alkylaminocarbonyl-2'-amino-LNA (2'-urea-LNA) moieties using post-synthetic modification strategy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25020346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hari Yoshiyuki, Osawa Takashi, Onishi Yoshinori, Ito Yuta	4. 巻 101
2. 論文標題 Synthesis and hybridizing property of oligonucleotides including 2'-C,4'-C-ethyleneoxy-bridged 2'-deoxyadenosine with an exocyclic methylene unit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-19-S(F)24	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 ○喜多良介, 大澤昂志, 小比賀聡
2. 発表標題 Ugi反応を基盤としたDNAコード化ライブラリー合成法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○宮田康介, 大澤昂志, 小比賀聡
2. 発表標題 細胞内還元条件で糖部配座が固定化されるアミド架橋型核酸の開発
3. 学会等名 第71年会日本薬学会関西支部大会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○矢野夏実, 大澤昂志, 小比賀聡
2. 発表標題 1-オキサスピロ[4.5]デカン構造を有するチミジンアナログの合成と物性評価
3. 学会等名 第71年会日本薬学会関西支部大会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○Taiki Akino, Takashi Osawa, Satoshi Obika
2. 発表標題 Synthesis of an amide-linked dinucleotide containing a 3', 4'-bridged nucleic acid and duplex-forming ability of the modified oligonucleotides
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
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