

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780113

研究課題名（和文） 「疎水性ナノ反応場」の原理に基づいたフラグメント核酸合成システムの研究

研究課題名（英文） Development of Oligonucleotide Synthesis by using hydrophobic Nano-Reaction System

研究代表者 金 承鶴（KIM SHOKAKU）

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90537127

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、核酸オリゴマーを有機溶媒中に可溶化することができる疎水性支持体を新たに開発し、これらの分子挙動を制御することによって、これまで合成困難であった核酸配列を効率的に合成することができる、新たな反応システムを確立することに成功した。本システムで用いられる疎水性支持体は、ナノ領域で安定に分散させることが可能であるとともに、反応性が著しく向上することが明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

We have developed a highly efficient and practical method of liquid-phase synthesis of oligonucleotides by using hydrophobic nano-reaction system based on alkyl chain soluble support. Specifically, this approach provides a practical and reliable oligonucleotide synthetic methodology in the development of scaled-up, cost-effective chemical RNA synthesis. The dispersion property of the support was markedly improved by the structural change of the linker moiety and by selection of dispersion media, which enabled enhanced reactivity in the liquid-phase approach.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：合成核酸、RNA、液相法、可溶化

## 1. 研究開始当初の背景

核酸分子の研究は、核酸医薬品、ナノ電子ワイヤー、DNA 折り紙、DNA テンプレート合成など、革新的な機能の発現によって、極めて広い範囲で進められている。一方、これらの合成技術は、ホスホロアミダイト試薬を用いた固相法が広く利用されている。当該技術は、不溶性のポリスチレン樹脂やガラスビーズを支持基盤として核酸モノマーを逐次伸長していく方法であり、現在では多様な自動合成機が市販され、医薬品や

機能性素材の探索において重要な役割を果たしている。しかし、固相合成法の殆どが、少量のプライマー用途に限定されており、近年進展が目覚ましい研究領域においては合成困難な配列が顕著に増加している。とりわけ、各種固相基盤の改善やポリエチレングリコールなどを用いた方法が提案されているものの実践的ではなく、確実に難シークエンスの核酸オリゴマーを合成できる、新たな方法論を確立することが急務となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来の合成法では困難な核酸オリゴマーについて、新規核酸合成システムを構築することによって実践的かつ波及効果の高い合成プロセスを確立することを目的としている。

## 3. 研究の方法

これまでの研究や核酸メーカーとの調査を通じて、数十万種類の合成実績を網羅的に解析し、合成困難なターゲット配列について明らかにした。

- ・40 残基以上の「長鎖核酸オリゴマー」
- ・繰り返し配列を含む「ホモポリマー (G、C 高含量配列)」
- ・2' 位含フッ素核酸アナログ、ペプチド等を含む「ハイブリット型核酸分子」など

これらの合成核酸は、欠損配列、鎖状伸長、脱プリン化等が頻繁に見られ、収率や純度の著しい低下を引き起こす上、分離・精製が非常に困難である。

これらの問題を克服するため、以下の方法によって、研究を進めることとした。

### (1) 液相支持体の開発

上記核酸オリゴマーを効率的に合成するためには、以下の機能を有する新たな液相支持体を設計・開発することが求められる。

- ①反応溶媒に対して高い溶解性を示す。
- ②極性溶媒の選択によって目的物質のみを簡便に析出・分離できる。

これらの条件を満たすため、アルキル鎖を有する液相支持体の設計とその合成方法を確立することを目指した。

### (2) 液相支持体の分子挙動制御

液相支持体が、サブミクロン以下の微細なクラスター構造を形成し反応促進場として機能することで、過剰な試薬等、不必要な副反応が抑制される。これらのことを明らかにするために、本研究で合成された液相支持体について、粒度分布計を用い、支持体同士の相互作用、分散-集積性をナノレベルで解明することにした。

### (3) 核酸フラグメントの合成

合成困難な配列を合成するためには、フラグメント鎖の伸長反応の効率化が求められる。つまり、保護基や多様な側鎖官能基を分解させることなく、これらを維持したまま、目的の配列を合成することで、フラグメント鎖へ化学修飾やフラグメント鎖間のカップリングが効率化する。これにより、

これまで問題となっていた配列依存的な溶解性の変化を克服し、保護基を活用した実質的な合成スキームを構築することが可能になる。特に核酸合成に用いられる保護基は、塩基性条件に不安定である一方、ヌクレオシド部位の核酸塩基は酸性条件で脱離してしまう。ここでは、「疎水性ナノ反応場」の原理を用いた反応プロセスを利用し RNA 配列を実際に合成し、分解することなく反応が進行しているか検証する。

これらを検証し、新規合成プロセスを確立することで、多様な用途に応じて、効率的に機能の改善が進めらる。

## 4. 研究成果

### (1) 液相支持体の構造及び分子挙動：

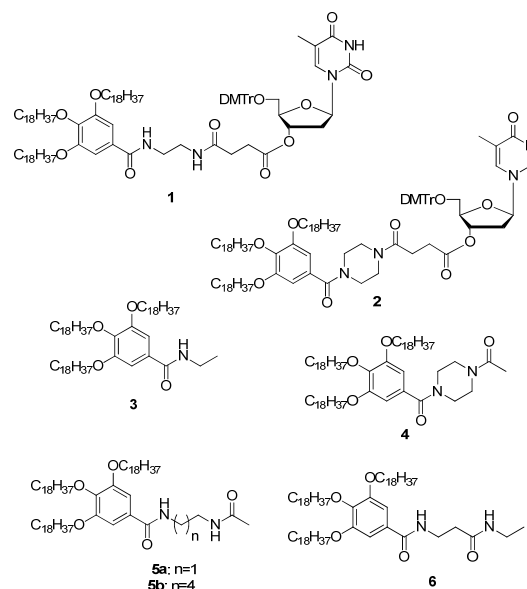


図1 疎水性基を有する核酸可溶化支持体

疎水性アルキル鎖を有するとともに、反応有機溶媒へ可溶性な液相支持体について、以下7種類調製し(図1)、溶解性を調査した。その結果、化合物2が極めて高い溶解性を示すことが明らかになった。特に、アルキル鎖近傍に1級アミド結合を持つ化合物と比較して、100倍以上の溶解度を示した。また、化合物2、4は、他の支持体と比較して、ジクロロメタン中で50 $\mu$ m程度と極めて微細な凝集構造を保持したまま安定に分散することが分かった。さらに、アセトニトリル等の極性溶媒を展開した場合においても、混合比を制御することによって、同様の性質を示す。これにより、化合物2が核酸合成、特にホスホロアミダイト法で効率良く応用できることが明らかになった。

(2) 核酸フラグメント合成反応：  
フラグメント鎖の伸長反応は、図2に示すとおり、脱トリチル化、カップリング、酸化の3段階で実施した。また反応操作の簡易化を図るため、通常行われるキャッピング工程（アセチル化）や溶媒を乾燥材させるためのモレキュラーシーブスは使用しなかった。

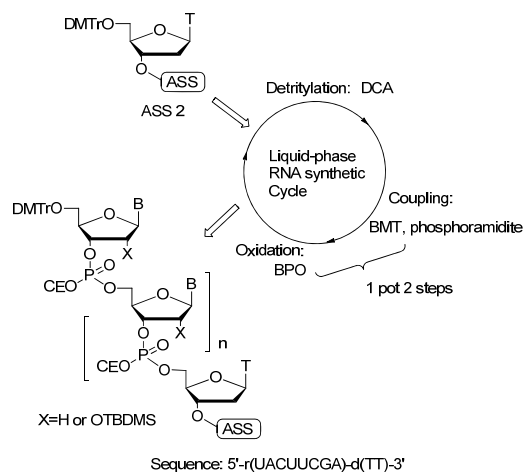


図2 フラグメント合成スキーム

その結果、カップリング平均カップリング効率が99%で進行することが明らかになった。さらに、高価なRNAホスホロアミダイト試薬を2当量以下と、理想的な化学量論量で反応が進行する。これは、「疎水性ナノ反応場」によって、反応試薬が核酸配列に濃縮されたため、著しく反応が促進することに起因していると考えられる。

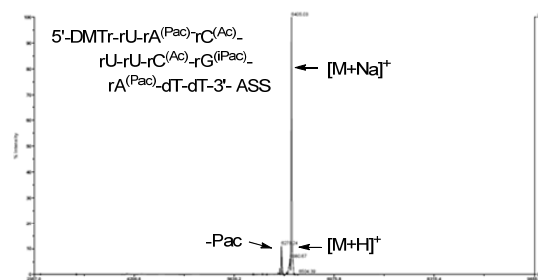


図3 フラグメント鎖のMALDI-TOF/MS

10 残基の核酸フラグメントをMALDI-TOF/MSにて測定した結果、保護基が分解することなく、伸長していることが明らかになった(図3)。通常固相法を用いた方法では、合成過程での洗浄操作や過剰の試薬を用いることによって、脱プリン化や脱保護が進行してしまうため、保護基を有する形でフラグメント鎖を入手することが困

難である。一方、本手法は、「疎水性ナノ反応場」の原理を用いた反応システムであるため、過剰な試薬や洗浄溶媒を必要とせず、効率的にフラグメント鎖を構築することが可能である。さらに、液相支持体は、核酸配列に依存することなく有機溶媒に可溶化することが可能であるため、保護基の性質、有無を利用することによって、より実質的な合成戦略をデザイン、計画することが可能になる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

(1) Shokaku Kim, Takao Shoji, Yoshikazu Kitano, Kazuhiro Chiba, Electrochemical Synthesis of Azanucleoside Derivatives using Lithium Perchlorate-Nitromethane System, *Chem. Commun.*, **2013**, in press. DOI: 10.1039/c3cc43273d. (査読有)

(2) Kim, Shokaku; Matsumoto, Masanori; Chiba, Kazuhiro, Liquid-Phase RNA Synthesis using Alkyl Chain Soluble Support, *Chem. Eur. J.* **2013**, in press. DOI: 10.1002/chem.201300655. (査読有)

(3) Okada, Y.; Suzuki, H.; Nakae, T.; Fujita, S.; Abe, H.; Nagano, K.; Yamada, T.; Ebata, N.; Kim, S.; Chiba, K. Tag-Assisted Liquid-Phase Peptide Synthesis Using Hydrophobic Benzyl Alcohols as Supports, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 320. DOI: 10.1021/jo302127d. (査読有)

(4) Kitada, S.; Fujita, S.; Okada, Y.; Kim, S.; Chiba, K. Total synthesis of  $\alpha$ -conotoxin MII using a soluble-tag-assisted method, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 2555. DOI: 10.1016/j.tet.2013.01.068 (査読有)

(5) Kim, Shokaku; Hirose, Kumi, Uematsu, Jumpei; Chiba, Kazuhiro, Electrochemically active crosslinking reaction for fluorescent labeling of aliphatic alkenes, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 6284. DOI: 10.1002/chem.201103630. (査読有)

[学会発表] (計6件)

(1) ○小路貴生、金承鶴、千葉一裕、有機電解法を用いた効率的なアザヌクレオシド合成法の確立、電気化学会第80回大会、20130329、東北大学、川内北キャンパス

(2) ○小路貴生、金承鶴、千葉一裕、陽極酸化を用いたアザヌクレオシドの効率的な合成法の開発、日本農芸化学会2013年度大会、20130326、東北大学、川内北キャンパス

(3) ○松本政憲、竹西壮一郎、千葉一裕、金承鶴、有機電解法による可溶性タグ核酸合成システムの開発、第 36 回有機電子移動化学討論会、20120621、東京農工大学、府中キャンパス

(4) ○島田恒平、岡田洋平、金承鶴、千葉一裕、有機電解反応による脂肪族オレフィンの蛍光標識システムの構築、第 36 回有機電子移動化学討論会、20120621、東京農工大学、府中キャンパス

(5) ○小路貴生、岡田洋平、金承鶴、千葉一裕、電気化学的に発生させたイミニウムカチオンを利用するイミノ糖ヌクレオシドの合成、第 36 回有機電子移動化学討論会、201206021、東京農工大学、府中キャンパス

(6) ○小路貴生、岡田洋平、金承鶴、千葉一裕、陽極酸化を用いたアザヌクレオシドの効率的な合成法の開発、20120324、日本農芸化学会 2012 年度大会、京都女子大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金 承鶴 (KIM SHOKAKU)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：90537127

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし