

機能性核酸の創製を指向した 1'-修飾ヌクレオシド合成法の開発

学位論文内容の要旨

【序論】

1'-修飾ヌクレオシドの効率的合成法は少なく、多様な 1'-修飾核酸の合成は困難である。そのため 1'-修飾核酸についての研究は少ない。1'-修飾ヌクレオシドから新たな機能性核酸を創製するためには、様々な 1'-修飾核酸を系統立てて合成しその基本的性質を再検討する必要があると筆者は考えた。本研究ではまず、より多様な 1'-修飾ヌクレオシドを合成可能な新しい合成法を開発した。さらに、様々な 1'-修飾核酸の合成が可能と考えられるヌクレオシドユニットのオリゴデオキシヌクレオチドへの導入を検討した。

【結果】

1.2'-ケトウリジン1'-サマリウムエノラートの高立体選択的アルドール反応

アルドール反応は炭素-炭素結合形成反応のなかでも最も汎用性のある反応の一つである。筆者はヌクレオシド 1'-位でアルドール反応を行うことができれば極めて有用な 1'-炭素置換ヌクレオシドの合成法になると考え、その開発を行った。

まず、3-N-ベンジルオキシメチル(BOM)-1'-フェニルセレネニル-2'-ケトウリジン誘導体を THF 中-78 °C で、2.1 当量のヨウ化サマリウムで処理したところ、フェニルセレネニル基が還元的に脱離し、ウリジン 1'-サマリウムエノラート (I) が生成した。-78 °C で I をアルデヒド処理すると、立体選択的に 1'-位が S 配置の 1'-α-炭素置換-2'-ケトウリジン誘導体 (シン付加体) を与えた。例えば、3 等量のベンズアルデヒドとの反応では 76%の収率で 1'-α-ベンジルアルコール体を与えた。一方、-78 °C で調製した I に 5 当量のアルデヒドを加えたのち 0 °C 付近に昇温すると Tishchenko 反応が効率的に進行し、ベンズアルデヒドとの反応では 74%、アセトアルデヒドとの反応では 83%の収率で 1'-O-アシル-アラビノシルウラシル誘導体をほぼ単一の生成物として与えた。

本反応遷移状態においては、嵩高い BOM-ウラシル部とアルデヒド側鎖の立体反発がフラノース環とアルデヒド側鎖の立体反発よりも大きくなる。結果として相対的に立体反発の小さい、アルデヒド側鎖がフラノース環内に位置する遷移状態を経てアルドール反応が進行したと考えられ、本反応で立体選択的にシン付加体が得られたことを説明できる。

なお、アルドール成績体については 2'-カルボニル基の還元を経て対応するリボ体へ、また Tishchenko 成績体は保護基を除去する事でアラビノ体へと変換することに成功した。

2.3',5'-TIPDS-1'-ヒドロキシメチルアラビノシルウラシル (II) の実用的合成法の開発

1'-修飾ウリジンの重要な合成中間体である II の実用的合成法の開発を行った。ウリジン 1'-リチウムエノラート (III) の THF 溶液にホルムアルデヒドを通じた後、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウムによる還元、さらにアンモニア処理を途中シリカゲルカラム精製することなく連続して行うことで、II を収率 62%で合成できる (ウリジンから通算収率 40%)。

3.1'-フルオロヌクレオシド誘導体の合成研究

フルオロヌクレオシドは生化学的、医薬化学的に重要な性質を示すことから、その合成研究が盛んに行われてきた。しかし、1'-フルオロヌクレオシドの研究報告は一例もない。1'-フルオロヌクレオシドは極めて不安定であることが予想されるが、なんらかの方法で安定化し単離可能になるならば、その生物活性には非常に興味があるため、その合成を検討した。

まず、III と NFSI の反応を検討した。その結果、THF 中 -78°C の反応では収率 87% で 1'-フルオロ 2'-ケト体 (IV) が生成することが分かった。溶媒効果について検討したところ、多くの溶媒中では望みとしない β -フルオロ体 IVb が主生成物として得られるが、DMF を用いた時にのみ目的の α -フルオロ体 IVa が主生成物として得られることが分かった。目的の IVa については、その 2'-カルボニル基を DIBAL-H で還元後、生じた水酸基をアセチル化することで 1'- α -フルオロアラビノ体トリガ体 (arabino:ribo = 4:1) へと変換した。

つぎに、1'-フェニルセレネニルトリアセチルウリジン (V) の脱フェニルセレネニル化—フッ素化を検討した。はじめに、V を DAST-NBS で処理したところ、収率 70% で 1'-フルオロトリアセチルウリジン (VI) が生成した。反応条件を種々検討したが、多くの場合で 2'-アセチル基の隣接基関与で生成すると考えられる β -フルオロ体 VIb が立体選択的に生成した。一方、塩化メチレン中 MS3A 存在下キセノンジフルオリド (XeF_2) で処理すると、わずかに目的の α -フルオロ体 VIa を優先して与えた (収率 43%, VIa:VIb = 2:1)。

1'-フルオロヌクレオシド誘導体を安定に得るには少なくとも 2'-位に電子吸引基の必要性が示唆された。そこでヌクレオシドの構造および性質を大きく変化させることなく強い電子吸引性を示すフッ素原子を 2'-位にも持つ 1',2'-ジフルオロウリジン誘導体 VII を新たな合成標的とした。3',5'-DTBS-1',2'-不飽和ウリジン誘導体 (VIII) の塩化メチレン溶液を MS3A 存在下 2.0 当量の XeF_2 で処理すると、フッ素分子が付加した望みの VII が 46% の収率で得られた。光照射や加熱、ルイス酸の添加は、原料の消費を促進するが反応を複雑化し、収率を低下させた。溶媒は 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノールが適当で、収率 85% で VII を与えた。最後に VII のシリル基を TBAF-酢酸で除去することで 1',2'-ジフルオロ-2'-デオキシウリジンを約 80% の収率で得ることに成功した。これは保護基のない 1'-フルオロヌクレオシド誘導体を得た初めての例である。

4.1'-修飾ウリジンを含むオリゴデオキシヌクレオシド (ODN) の合成

核酸構造上の一定部位に多様な置換基を簡便かつ同一の方法論で導入する事は、導入した置換基が核酸の性質に与える影響を系統的に解明する有効な手段であり、機能性核酸の創製に重要である。筆者は、1'-メトキシカルボニル-2'-デオキシウリジン (IX) を DNA 自動合成機で ODN に導入後、ODN の樹脂からの切り出しと同時に官能基変換をすることで 1'-修飾ウリジンを含む ODN を合成するポスト合成法の確立を計画した。本研究では方法論の確立を目的として 1'-位にカルボキシル基 (ODN-a)、カルバモイル基 (ODN-b)、およびメトキシカルボニル基 (ODN-c) を持つ ODN を合成し、その基本的性質を検討することにした。また小さな疎水性残基としてメチル基を持つ ODN-d を別途合成し、その性質を比較した。

まず IX のアミダイトユニット用いて IX を含む ODN を CPG 樹脂に担持された状態で合成した。この CPG 樹脂に担持された IX を含む ODN は、室温下、水酸化カリウム水溶液で処理する事で樹脂から切り出され、同時に ODN-a に変換された。同様に、無水条件下飽和アンモニアメタノールで処理する事で ODN-b、炭酸カリウムメタノール溶液で処理する事で ODN-c を得ることが出来た。次に、合成した ODN の二本鎖高次構造の熱的安定性を T_m 値で評価した。その結果、1'-修飾体を一残基持つすべての二本鎖 ODN は天然型 ODN のみからなる二本鎖 DNA と比較し熱的に不安定になった。わずかに一残基導入することで T_m 値を約 23°C 低下させた 1'-カルボキシル体は興味深い。次に、ExoI による ODN の加水分解速度を比較した。たとえば、ODN-u が 30 分以内にほぼ全て分解された条件下、ODN-a や ODN-b は修飾体の導入された位置で ExoI 耐性を示した。120 分後において完全に分解された ODN は 6% 以下であった。また、合成した ODN のウラシル-DNA グリコシラーゼ (UNG) 阻害剤としての性質を検討した。その結果、ODN-d は UNG のウラシル除去活性を競合阻害することを明らかにした。

【結語】

1) ヌクレオシド 1'-位を求核種とした 1'-位での初めての炭素-炭素結合形成反応としてウリジン 1'-サマリウムエノラートを用いるアルドール反応を開発した。2) 1'-ヒドロキシメチルアラビノシルウラシル誘導体の実用的合成法を確立した。3) 1',2'-ジフルオロウリジンを設計し、保護基のない 1'-フルオロヌクレオシドの初めての合成に成功した。4) 1'-メトキシカルボニル-2'-デオキシウリジンを用いた、1'-修飾ヌクレオシドを含む ODN の新しい合成法を確立した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松田	彰
副査	教授	橋本	俊一
副査	助教授	中島	誠
副査	助教授	周東	智

学位論文題名

機能性核酸の創製を指向した

1'-修飾ヌクレオシド合成法の開発

1'-修飾ヌクレオシドの効率的合成法は余り知られていない。そのため 1'-修飾核酸についての研究は少ない。1'-修飾ヌクレオシドから新たな機能性核酸を創製するためには、様々な 1'-修飾核酸を系統立的に合成しその基本的性質を調べる必要がある。本研究ではまず、より多様な 1'-修飾ヌクレオシドを合成可能な新しい合成法を開発した。さらに、様々な 1'-修飾核酸の合成が可能と考えられるヌクレオシドユニットをオリゴデオキシヌクレオチドへ導入し、その性質を検討した。

1. 2'-ケトウリジン 1'-サマリウムエノラートの高立体選択的アルドール反応

3-N-ベンジルオキシメチル(BOM)-1'-フェニルセレネニル-2'-ケトウリジン誘導体を THF 中-78 °C で、2.1 当量のヨウ化サマリウムで処理したところ、フェニルセレネニル基が還元的に脱離し、ウリジン 1'-サマリウムエノラート (I) が生成した。-78 °C で I をアルデヒド処理すると、立体選択的に 1''-位が S 配置の 1'α-炭素置換-2'-ケトウリジン誘導体 (シン付加体) を与えた。一方、-78 °C で調製した I に 5 当量のアルデヒドを加えたのち 0 °C 付近に昇温すると Tishchenko 反応が進行し、高収率で 1''-O-アシル-アラビノシルウラシル誘導体をほぼ単一の生成物として与えた。アルドール成績体については 2'-カルボニル基の還元を経て対応するリボ体へ、また Tishchenko 成績体は保護基を除去する事でアラビノ体へと変換した。

2. 3',5'-TIPDS-1'-ヒドロキシメチルアラビノシルウラシル (II) の実用的合成法の開発

1'-修飾ウリジンの重要な合成中間体である II の実用的合成法の開発を行った。ウリジン 1'-リチウムエノラート (III) の THF 溶液にホルムアルデヒドガスを通じた後、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウムによる還元、さらにアンモニア処理を途中シリカゲルカラム精製することなく連続して行うことで、II を収率 62% で合成できることを明らかにした。

3. 1'-フルオロヌクレオシド誘導体の合成研究

まず、III と NFSI の反応を検討した。その結果、THF 中-78 °C の反応では

収率 87%で 1'-フルオロ-2'-ケト体 (IV) が生成することが分かった。化合物 IV の 2'-カルボニル基を還元後、生じた水酸基をアセチル化することで 1'- α -フルオロアラビノ体とリボ体へと変換した。つぎに、1'-フェニルセレネニルトリアセチルウリジン (V) の脱フェニルセレネニル化—フッ素化を検討した。はじめに、V を DAST-NBS で処理したところ、収率 70%で 1'-フルオロトリアセチルウリジン (VI) が得られた。

1'-フルオロヌクレオシド誘導体を安定に得るには 2'-位に電子吸引基の存在が必要であることが示唆された。そこでヌクレオシドの構造および性質を大きく変化させることなく強い電子吸引性を示すフッ素原子を 2'-位に持つ 1',2'-ジフルオロウリジン誘導体 VII を新たな合成標的とした。3',5'-DTBS-1',2'-不飽和ウリジン誘導体 (VIII) の 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール溶液を MS3A 存在下 2.0 当量の XeF_2 で処理すると、フッ素分子が付加した望みの VII が 85%の収率で得られた。最後に VII のシリル基を TBAF-酢酸で除去することで 1',2'-ジフルオロ-2'-デオキシウリジンを約 80%の収率で得ることに成功した。これは保護基のない 1'-フルオロヌクレオシド誘導体を得た初めての例である。

4. 1'-修飾ウリジンを含むオリゴデオキシヌクレオシド (ODN) の合成

DNA 上の決められた位置に多様な置換基を簡便かつ同一の方法で導入する事ができれば、導入した置換基の核酸の性質に与える影響を系統的に調べることができる。1'-メトキシカルボニル-2'-デオキシウリジン (IX) を DNA 自動合成機で ODN に導入後、ODN の樹脂からの切り出しと同時に官能基変換をすることで 1'-修飾ウリジンを含む ODN を合成するポスト合成法を計画した。本研究では 1'-位にカルボキシル基 (ODN-a)、カルバモイル基 (ODN-b)、およびメトキシカルボニル基 (ODN-c) を持つ ODN を合成し、その基本的性質を検討した。また小さな疎水性残基としてメチル基を持つ ODN-d を別途合成し、その性質を比較した。

まず IX を含む ODN を CPG 樹脂に担持された状態で合成した。この CPG 樹脂に担持された IX-ODN は、室温下、KOH 水溶液で処理する事で樹脂から切り出しと同時に ODN-a に変換された。同様に、無水条件下飽和アンモニアメタノールで処理する事で ODN-b を、炭酸カリウムメタノール溶液で処理する事で ODN-c を得ることが出来た。合成した ODN の二本鎖高次構造の熱的安定性を T_m 値で評価した。その結果、1'-修飾体を一残基持つすべての二本鎖 ODN は天然型 ODN のみからなる二本鎖 DNA より熱的に不安定になった。わずかに一残基導入することで T_m 値を約 23 °C 低下させた 1'-カルボキシル体は興味深い。次に、ExoI による ODN の加水分解速度を比較した。たとえば、未修飾の ODN が 30 分以内にほぼ全て分解された条件下、ODN-a や ODN-b は修飾体の導入された位置で ExoI 耐性を示した。120 分後において完全に分解された ODN-a, -b は 6%以下であった。また、合成した ODN のウラシル-DNA グリコシラーゼ (UNG) 阻害剤としての性質を検討した。その結果、ODN-d は UNG のウラシル除去活性を競合阻害することを明らかにした。

以上のように、本研究では、1) ヌクレオシド 1'-位を求核種とした 1'-位での初めての炭素-炭素結合形成反応としてウリジン 1'-サマリウムエノラートを用いるアルドール反応を開発したこと、2) 1'-ヒドロキシメチルアラビノシルウラシル誘導体の実用的合成法を確立したこと、3) 1',2'-ジフルオロウリジンを設計し、保護基のない 1'-フルオロヌクレオシドの初めての合成に成功したこと、4) 1'-メトキシカルボニル-2'-デオキシウリジンを用いた、1'-修飾デオキシウリジンを含む ODN の新しい合成法を確立したことから、博士 (薬学) の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。