



Title	クリックケミストリーによるオリゴ核酸上での非天然型塩基の構築とその物性評価
Author(s)	中原, 基
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54711
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

クリックケミストリーによるオリゴ核酸上での非天然型塩基の構築と
その物性評価

大阪大学大学院薬学研究科

応用医療薬科学専攻 生物有機化学分野

中原 基

クリックケミストリーによるオリゴ核酸上での非天然型塩基の構築と
その物性評価

大阪大学大学院薬学研究科
応用医療薬科学専攻 生物有機化学分野

中原 基

略語一覽

A	: adenine
C	: cytosine
G	: guanine
T	: thymine
CuAAC	: copper(I)-catalyzed azide alkyne 1,3-dipolar cycloaddition
DCI	: 4,5-dicyanoimidazole
DIBAL	: diisobutylaluminum hydride
DMTr	: 4,4'-Dimethoxytrityl
DIPEA	: <i>N</i> -ethyldiisopropylamine
EDC•HCl	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
<i>i</i> -Pr	: isopropyl
HOMO	: highest occupied molecular orbital
LUMO	: lowest unoccupied molecular orbital
MALDI-TOF mass	: matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
PEM	: post-elongation modification
ROS	: reactive oxygen species
RP-HPLC	: reversed-phase high-performance liquid chromatography
TBTA	: tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
T_m	: melting temperature
TFO	: triplex-forming oligonucleotide
Tol	: <i>p</i> -toluoyl
Ts	: <i>p</i> -toluenesulfonyl

目次

緒論	1
本論	4
第一章 オリゴ核酸上での非天然型塩基構築法の確立	4
第一節 エチニル基を有するオリゴ核酸の合成とクリックケミストリーによる 非天然型塩基の構築	4
第二節 基質一般性の検討	6
第三節 トリアゾール型核酸塩基を有するオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能評価	8
第二章 新規開発アプローチの三重鎖形成核酸への展開	10
第一節 CG塩基対認識のための非天然型核酸塩基スクリーニング研究	10
第二節 TA塩基対認識のための糖部合成とオリゴ核酸上での塩基部位構築	14
第三節 TA塩基対認識能の評価	18
結論	29
謝辞	30
実験の部	31
引用文献	55

緒論

化学修飾を施した核酸（人工核酸）を有するオリゴヌクレオチド（オリゴ核酸）は、高度な生命現象の解明や有効性・安全性に優れた医薬品の開発、遺伝子診断用プローブ等への応用が期待されている。人工核酸はその化学修飾部位により、糖部修飾、塩基部修飾、リン酸ジエステル部修飾に大別できるが、塩基部位は核酸塩基識別能や核酸の高次構造の安定性に大きく関与していることから、化学修飾を施すことによりその性質を大きく変化させることが可能である。実際に、三重鎖核酸を用いたテクノロジー開発のための基礎研究¹⁾や、リボザイムの機能解明への応用²⁾、人工塩基対の開発による新たな遺伝情報システムの開発³⁾等、非天然型塩基を有する人工核酸は、それぞれの目的に応じて世界中で数多く設計・合成され、その物性評価が行われてきた (Figure 1)。

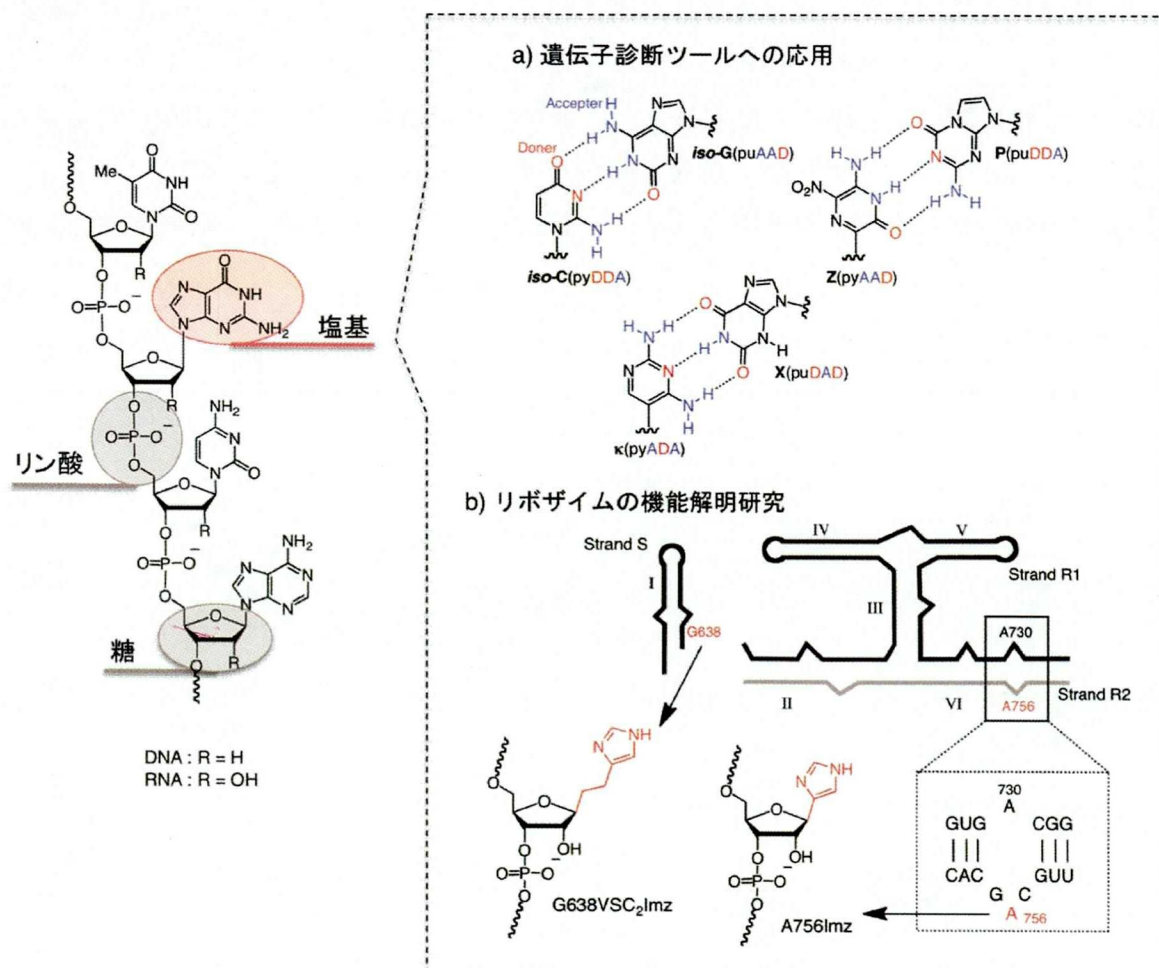
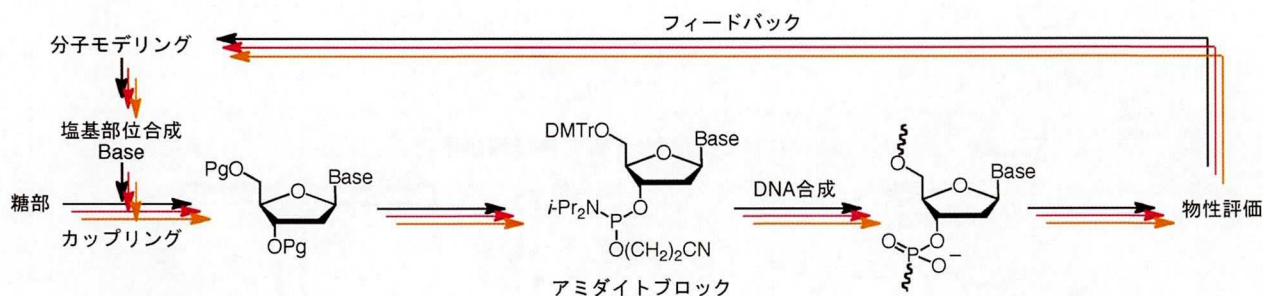


Figure 1. Application of artificial nucleobases. a) Non-natural nucleobase pairs as tools to monitor the levels of HIV and Hepatitis C virus(HCV). b) Replacement of G638 and A756 of VS ribozyme by imidazole nucleobases.

これら人工核酸の開発は、従来 Figure 2a に示したように行われてきた。すなわち、まず塩基部を分子モデリング等で設計、合成後、核酸糖部とカップリングさせる。続いて、アミダイトブロックへの誘導とオリゴ核酸への導入を経て、人工核酸塩基の物性評価を行う。通常は、さらに機能性の高い分子の開発を目指し、得られたデータを次の分子設計へと応用し、このサイクルを繰り返し行う。この従来の開発法では、新たな非天然型塩基を開発するたびにこれら一連の工程を経る必要があり、特に化合物の合成に長時間を費やすため、十分に構造を最適化するまでこのサイクルを繰り返し行うことは困難である。つまり、非天然型塩基のより迅速な開発法の確立は、望みの機能を有する人工核酸を開発する上で非常に価値があると考えられる。

そこで著者は、伸長後修飾法（PEM 法: post-elongation modification method）⁴⁾ を活用した新たな非天然型塩基の開発アプローチを考案した（Figure 2b）。伸長後修飾法とは、あらかじめ反応部位を導入したヌクレオチドをオリゴ核酸へと導入し、オリゴ核酸上で化学修飾を行う手法である。本手法は古くから核酸の分野において用いられており、トリアゾリル化したピリミジン塩基への求核置換による置換基の導入が主であった。また、近年では主に機能性分子とのコンジュゲートにも多用されるようになった。著者は、塩基部前駆体をもつオリゴ核酸を合成後、伸長後修飾により誘導体化することで種々の核酸塩基アナログを簡便に合成可能であると考えた。このアプローチでは、誘導体合成の大幅な効率化が可能であり、「得られた人工核酸の物性評価→新たな人工核酸のデザイン→合成」のサイクルに要する時間が大幅に短縮化

a)従来の開発アプローチ



b)新たな開発アプローチ

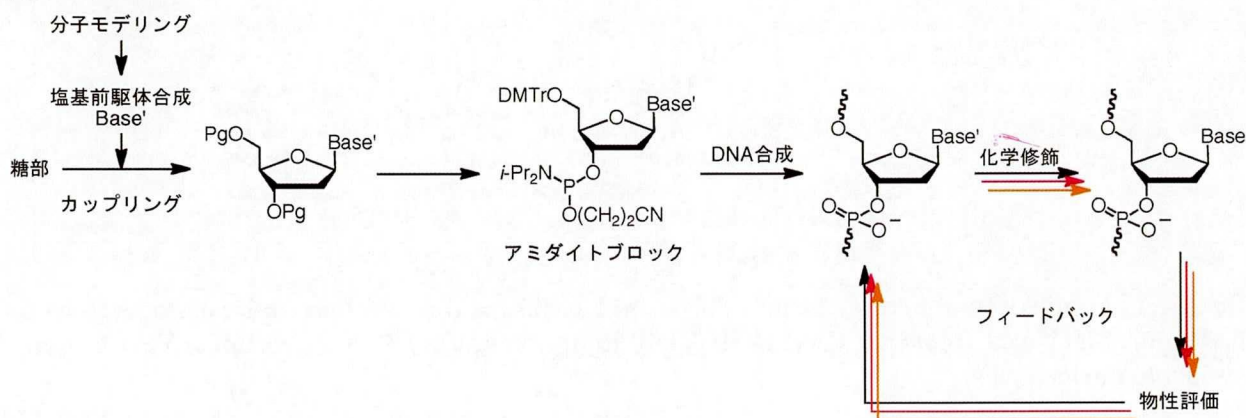


Figure 2. Traditional and new approaches of oligonucleotides bearing nonnatural nucleobase.

できる。さらに、DNA 合成後に化学変換を行うため、例えば、オリゴ核酸合成時に利用される様々な反応条件に適応困難な不安定な構造も導入することが可能になると考えられる。これにより、より論理的で緻密な分子の探索をスムーズに行うことが可能になると考えた。

一方、近年 Sharpless らと Meldal らにより報告された一価の銅触媒を用いた Huisgen 反応 (CuAAC) ^{5-7, 注 1} は、様々な分野において広く用いられている (Figure 3)。本反応は、アジドと末端アルキンから 1,4-置換-1-*H*-トリアゾール環を位置異性体選択的に与える反応であり、高い化学選択性を有している。溶媒に水を用いることが可能であり、かつ化学選択性が高いことからオリゴ核酸のような高極性で多官能基を有する生体高分子を基質とする反応に適していると考えた。

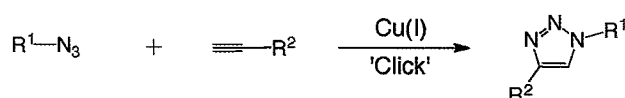
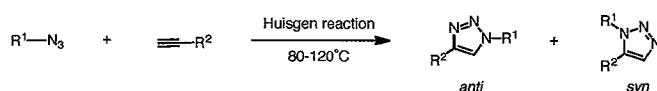


Figure 3. Copper(I)-catalyzed alkyne-azide 1,3-dipolar cycloaddition (CuAAC).

まずはじめに、著者はクリックケミストリーを用いた人工塩基構築法の確立を目指した (第一章) ⁸⁾。塩基部位にエチニル基を有するオリゴ核酸を合成し、ベンジルアジドとの CuAAC 反応をモデル実験として行い、反応条件を最適化した (第一章第一節)。続いて最適化した条件下、種々のアジド試薬 (1 級, 2 級, 3 級, 芳香族アジド) を用いることで本法の基質一般性を確認した (第一章第二節)。また、物性評価の一例として、得られた非天然型塩基の塩基認識能を一本鎖 DNA との融解温度測定 (T_m 測定) により評価した (第一章第三節)。次に、今回確立した新規開発アプローチを三重鎖形成核酸のための非天然型塩基開発へと展開した (第二章)。三重鎖形成核酸は、標的二重鎖 DNA に結合して三重らせん構造を形成することが知られているが、CG、TA 塩基対をそれぞれ選択的に認識する核酸塩基が存在しない。そこで、本アプローチを用いて種々の非天然型塩基を合成し、CG 塩基対選択的な非天然型塩基の探索を行った。(第二章第一節) ⁹⁾。続いて、TA 塩基対認識のための塩基部位スクリーニング研究に着手した。はじめに、末端アルキンを有する糖部構造を設計・合成し、オリゴ核酸へと導入した。次に、クリックケミストリーを利用して非天然型塩基の構築を行った (第二章第二節)。そして、得られたオリゴヌクレオチドの三重鎖形成能を T_m 測定により評価した (第二章第三節)。

注 1 Huisgen 反応 ¹⁰⁾ は古くから知られている有用な 1,3-双極子付加環化反応の一つで、一般的には 80°C~120°C の高温を要し、生成物は多くの場合位置異性体の混合物となるが (下図)、1 価の銅触媒を用いることで *anti* 体のみを選択的に得ることが可能となった。



本論

第一章 オリゴ核酸上での非天然型塩基構築法の確立

まずはじめに、塩基部前駆体となるエチニル基を導入したオリゴ核酸を合成し、CuAACにより塩基部位を構築することで、1*H*-1,2,3-トリアゾール骨格を非天然型塩基としてもつ C-ヌクレオシド型人工核酸の合成を行うこととした。この手法は、アジド試薬を種々変更するだけで、様々なトリアゾール型核酸塩基の構築が可能であり、本手法を確立することで、より短時間で種々の非天然型塩基を有するオリゴ核酸の合成が可能になると考えられる (Figure 4)。

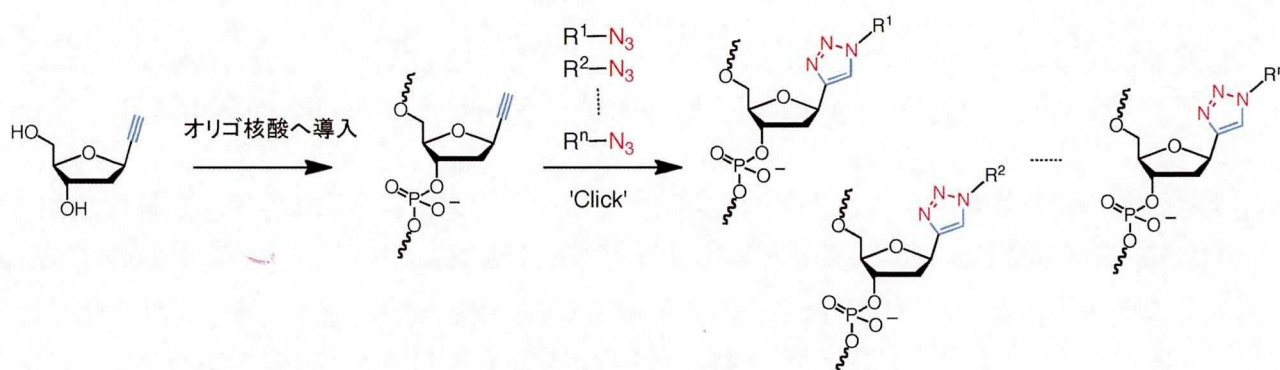


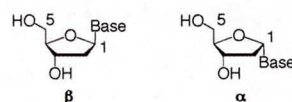
Figure 4. Synthesis of triazole nucleobases using CuAAC.

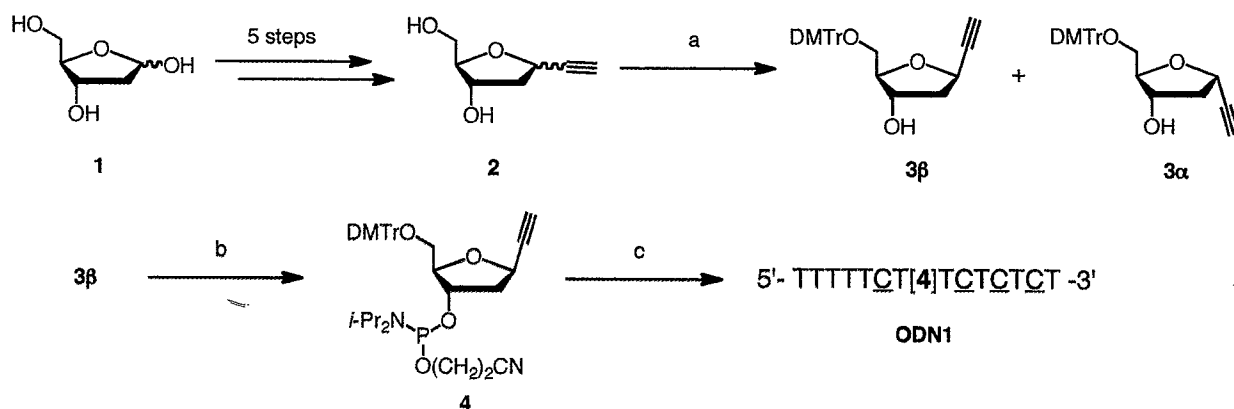
第一章第一節 エチニル基を有するオリゴ核酸の合成とクリックケミストリーによる非天然型塩基の構築

まず、塩基部位にエチニル基を有するヌクレオシドを合成し、オリゴ核酸へ導入することとした (Scheme 1)。市販の 2-deoxy-D-ribose (1) から 5 工程を経てエチニル基を有するヌクレオシドをアノマー-異性体混合物^{注2} (2)¹¹⁾として得た。5'位水酸基のジメトキシトリチル化を行い異性体 (3 α , 3 β) を分離精製した後、3 β をホスホロアミダイト体へ誘導した (4)。得られたアミダイト体 4 は、DNA 自動合成機を用いて 15 mer のオリゴ核酸の中心に導入した。

続いて、ODN1 とベンジルアジドを用いたモデル実験により、クリックケミストリーによ

注2 通常、天然の核酸糖部であるフラノース環は 4 つの不斉炭素中心をもつ。この不斉炭素中心のうち、1 位の立体配置のみが異なるジアステレオマーを相互にアノマー-異性体と呼ぶ。 α と β の名称は、アノマー位の炭素の立体配置と D、L を決定する炭素の立体配置の相対的關係で決められる。構造を Haworth 式で記述したとき、D 系列の化合物は 5 位炭素原子とアノマー位置換基が同じ側になる場合、 β アノマーとなる。





Scheme 1. Reagents and conditions : a) DMTrCl, pyridine, rt, 2 h, 56% for **3α** and 18% for **3β**. b) (*i*-Pr₂N)₂PO(CH₂)₂CN, diisopropylammonium tetrazolide, MeCN/THF = 3:1, rt, 4h, 69%. c) automated DNA synthesizer. Coupling time : 10 min, activator : Activator 42™ or DCI activator, Coupling efficiency : quant. In the sequences, C stands 2'-deoxy-5-methylcytidine ^{注 3}. The composition of the ODNs was confirmed by MALDI-TOF Mass analysis. MALDI-TOF Mass data ([M-H]⁺) for ODN1 : found 4395.91 (calcd 4395.39).

るトリアゾール型核酸塩基構築の反応条件を検討した (Table 1, Figure 5)。反応は RP-HPLC を用いて追跡した。なお、MALDI TOF Mass により化合物の同定を行った。はじめに、10% THF 水溶液を用いて反応を行い (Entry 1)、反応液を HPLC で分析した。結果、原料 (ODN1) と、目的の化合物 (ODN1-a) がほぼ 1:1 の割合で現れることを確認した (Figure 5a)。また、

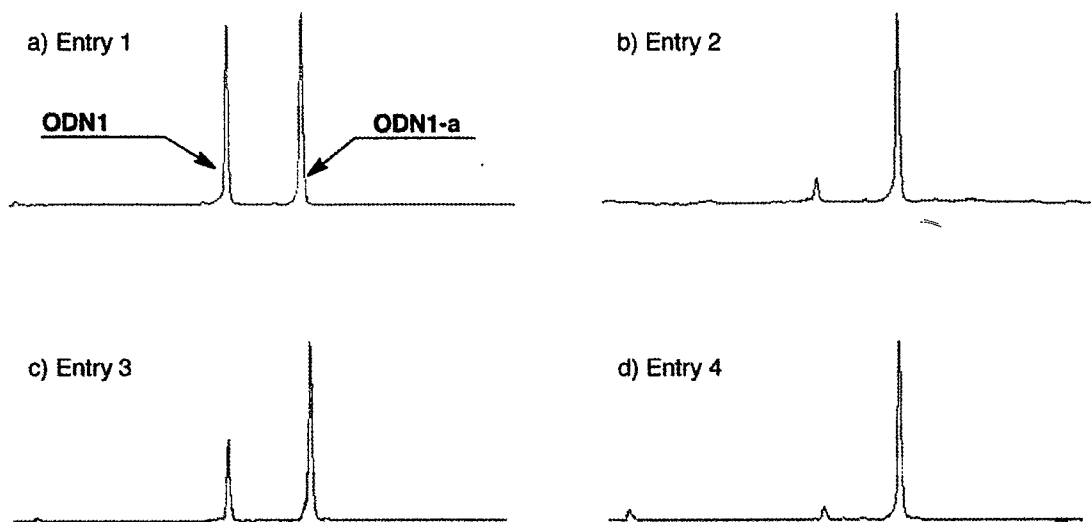
Table 1. Optimization of the reaction conditions for CuAAC.

ODN1		ODN1-a		
Entry	Reagents (eq.)	Solv.	Time	Conv. (%)
1	CuSO ₄ (2.0), Na ascorbate(2.0), BnN ₃ (2.2)	10%THFaq.	15 h	51
2	CuSO ₄ (4.0), Na ascorbate(4.0), BnN ₃ (5.0)	10%THFaq.	15 h	85
3	CuSO ₄ (2.0), Na ascorbate(4.0), BnN ₃ (10), TBTA(4.0)	10%DMSOaq.	2 min	71
4	CuSO ₄ (2.0), Na ascorbate(4.0), BnN ₃ (10), TBTA(4.0)	30%DMSOaq.	5 min	95

[a] The conversion efficiency was evaluated by reversed-phase HPLC analysis from the peak areas of ODN-1 and ODN-1a. C ; 2'-deoxy-5-methylcytidine.

^{注3} 2'-deoxy-5-methylcytidineは、シチジン類縁体である。三重鎖形成オリゴ核酸 (TFO) において、シトシンのかわりに導入することで三重鎖を安定化することが知られており、現在では広く用いられている。

Figure 5. HPLC analysis of CuAAC between ODN-1 and benzylazide.



HPLC condition: reversed-phase HPLC (Waters Xterra RP column) with acetonitrile/water containing 100 mM triethylamine-acetic acid (TEAA) buffer (pH 7.0) as mobile phase, linear gradient 8–20% acetonitrile/water (30 min, 1.0 mL/min).

試薬の当量を増加させることで反応効率の向上が見られた (Entry 2, Figure 5b)。しかしながら、これらの条件はいずれも 15 時間と比較的長時間を必要とした。また、反応効率にも大きなばらつきがあり、再現性を得ることが難しかった。加えて、一部オリゴ核酸の分解も認められた。今回の実験系では、反応スケールが非常に小さいため (反応溶液も 10 μ L 程度と非常に少量)、THF が揮発し、反応液中のベンジルアジドが分離したことが原因として考えられる。また、一価の銅触媒は不安定であり触媒が容易に不均化すること^{注4}や、ラジカルの発生によるオリゴ核酸の分解が報告されており¹²⁾、これらも原因の一つであると考えた。そこで、一価の銅触媒のリガンドとして 2004 年に Fokin らによって報告された TBTA (トリス[(1-ベンジル-1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル]アミン)¹³⁾を用いることにした。また、溶媒の有機層として DMSO を用いることとした^{注5}。結果、銅に対して TBTA を 2 当量以上用いることで再現性よく、かつ非常に短時間で反応が進行することを見いだした (Entries 3–4, Figures 5c–5d)。最終的に、Entry 3 と同条件下、溶媒の DMSO の割合を 30%とした Entry 4 の条件で以降の実験を進めることとした。

第一章第二節 基質一般性の検討

第一節で見いだした非天然型塩基構築のための条件の基質一般性について種々のアジド試薬^{注6} (1 級、2 級、3 級、芳香族アジド) を用いて検討を行った (Table 2)。結果、脂肪族の

1 級、2 級アジドでは効率よく反応が進行しそれぞれ対応するトリアゾール型核酸塩基を有する目的のオリゴ核酸が得られた (Entries 1-4:ODN1-a-d)。一方で、脂肪族の 3 級アジドを用いた場合は、その立体障害のためか低収率にとどまった (Entry 5:ODN1-e 8%, Entry 6:ODN1-f 38%)。しかしながら、嵩高い 3 級アジドを基質として用いた場合も反応時間を延

Table 2. Examination of substrate generality.

ODN1 → ODN1-a - ODN1-o

Entry	R-N ₃	Yield (%)	Entry	R-N ₃	Yield (%)	Entry	R-N ₃	Yield (%)
1 (ODN1-a)		94	6 (ODN1-f)		38 (80) ^a	11 (ODN1-k)		74
2 (ODN1-b)		89	7 (ODN1-g)		76	12 (ODN1-l)		73
3 (ODN1-c)		64	8 (ODN1-h)		78	13 (ODN1-m)		64
4 (ODN1-d)		77	9 (ODN1-i)		65	14 (ODN1-n)		-
5 (ODN1-e)		8	10 (ODN1-j)		81	15 (ODN1-o)		-

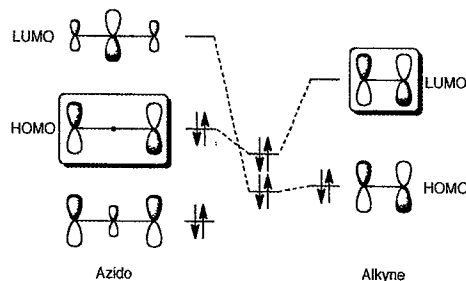
^a reaction time : 48 h. C ; 2'-deoxy-5-methylcytidine.

注 4 銅(I)イオン触媒は、酸素と反応して銅(II)イオンとスーパーオキシドやヒドロキシラジカルのような ROS (活性酸素種) を生成したり、銅(I)イオン同士が不均化反応を起こして銅(0)と銅(II)が生成することが知られている。これらの反応は、触媒サイクルの妨げとなり、ROS は DNA のような生体高分子に作用して DNA の切断などを引き起こす。

注 5 TBTA 添加時における反応溶媒の検討; Kuboyama *et al. Bioorg. Med. Chem.* 2011, **19**, 249.

注 6 一部の芳香族アジドの合成に関しては引用文献を参照 14, 15)。

注 7 フロンティア軌道論において、CuAAC ではアジドの HOMO と末端アルキンの LUMO の相互作用が反応性を支配する。よって、電子供与性置換基を有するアジド、または、電子求引性置換基を有する末端アルキンを用いた場合は、無置換のアジド、または、末端アルキンを用いた場合と比較して HOMO-LUMO 間のエネルギー差が小さくなり、反応は加速される。



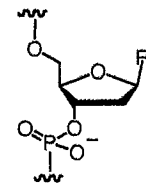
長することで収率が改善されることが明らかとなった (Entry 6)。芳香族アジドを用いて反応を行った場合、フェニルアジドに加えて、電子供与基 (メチル基)、電子求引基 (カルボキシル基) を有するアジド試薬も首尾よく反応が進行し、高収率で目的物が得られた (Entries 7-10: ODN1-g-j)。さらに、アジドのオルト位に置換基を有するような立体的にかさ高いアジド試薬を用いても収率よく目的物が得られることが分かった (Entries 11-12: ODN1-k-l)。芳香環がピリジン環の場合、Entry 13 (ODN1-m) では反応が進行し、高収率で目的のオリゴ核酸を得ることができたが、一方で、無置換のものや、ニトロ基を有するアジド試薬では反応が進行せず原料回収となった (Entries 14-15: ODN1-n-o)。反応が進行しなかった原因の一つとしてピリジン環によりアジド基の電子密度が下がり反応性を低下させた可能性が考えられる²⁷。以上の結果より、今回見いだしたクリックケミストリーの反応条件下、多くのアジド試薬から多様なトリアゾール型塩基をオリゴ核酸上で簡便に合成できることを確認した。

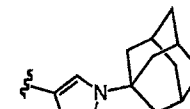
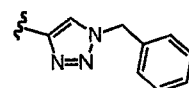
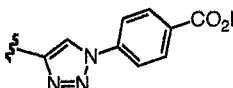
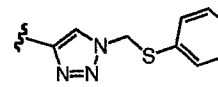
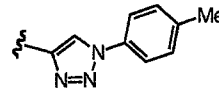
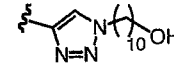
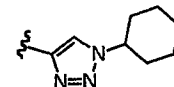
第一章第三節 トリアゾール型核酸塩基を有するオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能評価

実際、本手法の有用性を確認するために、合成したトリアゾール型核酸塩基の塩基対形成能を融解温度測定 (T_m 測定²⁸) により評価した (Table 3)。配列中の **X** には今回合成したトリ

Table 3. T_m values (°C) of duplexes.

target DNA
 5' -TTTTTCT**X**TC**TCTCTCT**-3'
 3' -AAAAAGAYAGAGAGA-5'

$X =$


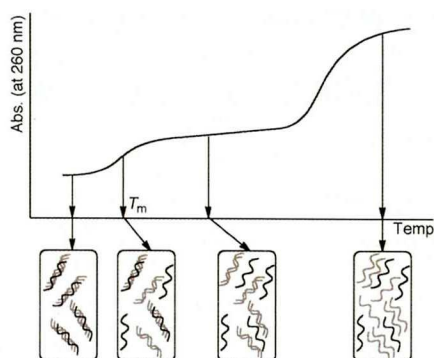
X (R)	Y				X (R)	Y			
	A	G	C	T		A	G	C	T
	32	32	29	31		30	37	34	34
	32	38	34	33		33	38	33	33
	37	40	40	38		39	42	36	38
	35	39	39	39	T	52	42	39	42
	34	37	34	33					

Conditions ; 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl, 3 μ M each oligonucleotide. **C** ; 2'-deoxy-5-methylcytidine.

アゾール型核酸塩基を、Y の位置に 4 種類の天然の核酸塩基 (A、G、C、T) を用いることで塩基対形成能を評価した。結果、トリアゾール型核酸塩基は天然のフルマッチ塩基対の T_m 値 (52°C) と比べて 10°C 以上低い値となった。しかし一方で、トリアゾール環構築前よりもその T_m 値が上昇することも明らかとなった。これは、トリアゾール環の若干のスタッキング効果により、二重鎖の安定性が向上したと考えられる。また、1-フェニルチオメチル-1*H*-1,2,3-トリアゾールを塩基部位に持つオリゴ核酸の T_m 値は、 37°C - 40°C と全ての塩基対してトリアゾール環構築前より大きく向上し、またその塩基対選択性はほとんど見られなかった。これは、硫黄原子の導入により塩基部位の疎水性が向上したことで、よりスタッキング効果を獲得できたのではないかと推測される。このような非特異的認識能を有する核酸塩基は、ユニバーサル塩基^{16, 17)}として知られており、今後詳細な検討は必要であるが、ユニバーサル塩基としての機能を有する非天然型塩基 (1-フェニルチオメチル-1*H*-1,2,3-トリアゾール) の発見に至った。このように、非天然型塩基の一部の置換基を簡便にスクリーニング可能になったことで、分子モデリング等では発見することが困難な構造をもつ有用な分子の探索を迅速に行うことが可能になった。

以上、著者は、伸長後修飾法に CuAAC を活用することで、オリゴ核酸上での非天然型塩基構築法を確立し、その基質一般性についても確認した。また、本手法を用いて一本鎖 DNA 認識能を T_m 測定により評価した。これにより、従来よりも迅速、簡便に非天然型塩基の合成とその物性評価が可能になったことを示した。

注⁸ T_m 測定は、温度上昇に伴う UV 吸収の変化を測定したものである。二重鎖の T_m 値とは、二本鎖 DNA の半分が一本鎖 DNA に解離する温度であり、三重鎖の T_m 値とは、標的二重鎖 DNA と結合している TFO の半分が解離するときの温度である。これらは、それぞれ二重鎖、三重鎖の安定性の指標となる。



第二章 新規開発アプローチの三重鎖形成核酸への展開

非天然型塩基を有する人工核酸は、遺伝子治療や診断薬、その他核酸を用いたテクノロジーの研究等、多岐に渡って利用されている。中でも三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO ; triplex-forming oligonucleotide) は、遺伝子本体である二重鎖 DNA を直接標的とできることから遺伝子発現の抑制だけでなく、転写の促進や複製阻害、変異誘発等の様々な核酸テクノロジーへ応用可能な魅力的な分子である¹⁸⁾。

TFO は、標的二重鎖 DNA の片側の鎖の核酸塩基を識別することで配列特異的に三重らせん構造を形成することが知られており、その塩基対結合様式は Figure 6 に示した通りである。すなわち、TFO の T が AT 塩基対の A を、プロトン化した C (C^+H) が GC 塩基対の G をそれぞれ 2 本の Hoogsteen 型水素結合を介して認識する。しかしながら、TA または CG 塩基対を選択的かつ強固に識別する天然の核酸塩基が存在しないことから、標的とできる配列は DNA のホモプリン・ホモピリミジン領域に限られるという問題点がある。そこで、三重鎖形成核酸の実用化を達成するために、数多くの非天然型塩基が合成され、その物性評価がなされてきた¹⁹⁾。しかしながら、まだ実用化可能な十分な機能を有する人工核酸の開発には至っておらず、より選択的に塩基対を認識する人工核酸の開発が求められている。そこで、著者は今回確立したアプローチを三重鎖形成核酸のための非天然型塩基開発へと展開し、有用な分子の探索を行うこととした。

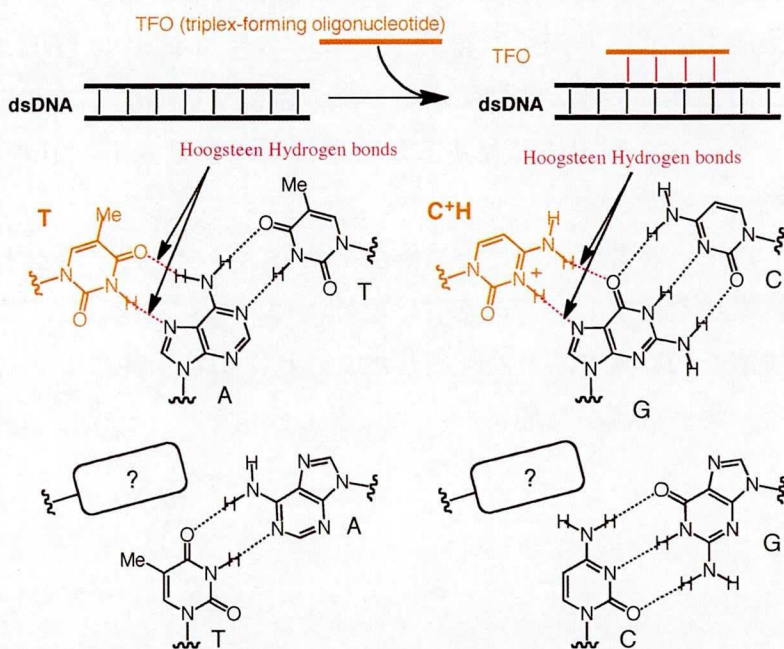


Figure 6. Structure of base triplets in triplex DNA.

第二章第一節 CG 塩基対認識のための非天然型核酸塩基スクリーニング研究

三重鎖核酸における CG 塩基対の認識において、天然の核酸であるチミン (T) は、一本の水素結合を介して CG 塩基対を認識することが知られている (Figure 7) が、T は AT 塩基対とより強固に塩基対を形成するため CG 塩基対認識に利用することはできない。当研究室においてこれまでにイミダゾールとオキサゾールを塩基部位に持つ人工核酸が開

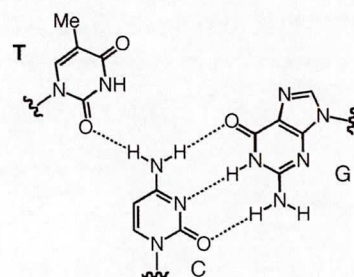


Figure 7. Plausible structure of T·CG triplet.

発され、既に物性評価が行われている (Figure 8)^{19,20}。その結果、**I^B** の場合は **CG** 塩基対に対する選択性、親和性が得られなかったのに対して、**O^B** は若干の **CG** 塩基対選択性と中程度の親和性を有することがわかった。以上のことから、オキサゾールを有する人工核酸 (**O^B**) のグリコシル結合の α 位に存在する酸素原子が、水素結合受容体としてシトシン 4 位アミノ基と水素結合していることが考えられた (Figure 8)。今回第一章で合成したトリアゾール型核酸塩基も、グリコシル結合の α 位に水素結合受容体となる窒素原子を持つことから、**O^B** と同様に **CG** 塩基対に対して親和性を有するのではないかと考えた。さらに、クリックケミストリーを用いた本法を利用し、トリアゾール環 1 位の置換基をスクリーニングすることでより **CG** 塩基対に対する選択性を向上させることができるのではないかと考えた。

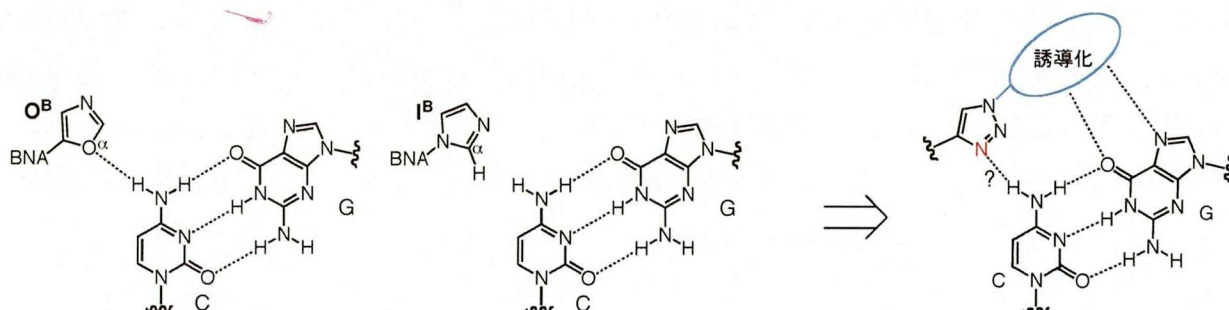


Figure 8. Prospective structures of **O^B**-CG, **I^B**-CG and triazole-CG.

そこで、 T_m 測定を用いて非天然型塩基を有するオリゴ核酸の物性を評価した。Table 中の **X** は今回合成した非天然型塩基、**YZ** は標的となる塩基対を示した。まずはじめに比較的単純な構造を有するアジド試薬を用いた非天然型塩基及び天然のチミン (T) を **X** に導入したオリゴ

Table 4. T_m values ($^{\circ}\text{C}$) of triplexes.

TFO
target DNA

5' -TTTTTCTXTCTCTCT-3'
5' -GGCAAAAAGAYAGAGACGC-3'
3' -CCGTTTTTCTZTCTCTCTGCG-5'

X =

Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT

1		14	20	12	<10
---	--	----	----	----	-----

2		14	20	<10	<10
---	--	----	----	-----	-----

3		12	20	<10	<10
---	--	----	----	-----	-----

4		11	17	<10	<10
---	--	----	----	-----	-----

Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT

5		11	19	<10	<10
---	--	----	----	-----	-----

6		<10	18	<10	<10
---	--	-----	----	-----	-----

7		17	25	<10	<10
---	--	----	----	-----	-----

8		21	21	16	15
---	--	----	----	----	----

9	T	17	25	20	44
---	---	----	----	----	----

Conditions ; 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 140 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1.89 μM each oligonucleotide. C ; 2'-deoxy-5-methylcytidine.

核酸の T_m 測定を行った (Table 4)。先にも述べたが、チミンは CG 塩基対に対して 1 本の水素結合を介してトリプレットを形成することが知られており、その T_m 値は 25°C の値を示した (Entry 9)。一方で、AT 塩基対に対して 44°C と高い T_m 値を示しており、チミンは AT 塩基対選択性を有していることを示した。合成した非天然型塩基は全て CG 塩基対とその他の塩基対との T_m 値に差が見られ ($\Delta T_m = 6 \sim 8^{\circ}\text{C}$)、中程度の CG 塩基対選択性を示した (Entries 1–7)。このことから、当初の設計通りトリアゾール環が CG 塩基対選択的に相互作用している可能性が考えられる。また、1-アダマンチル基を有するかさ高い置換基を持つ非天然型塩基も、その T_m 値は 17°C と低いものの、三重鎖を形成することが明らかとなった (Entry 4)。これら 7 種類のトリアゾール型核酸塩基の中で、芳香族アジドであるフェニルアジドを用いて合成した非天然型塩基は、CG 塩基対に対して最も高い値を示し、その値は 25°C と (Entry 7)、T•CG トリプレットと同程度の値を示した。また、その他の塩基対 (TA、GC、AT) に対する T_m 値は 17°C 以下であることから高い塩基対選択性を有することがわかった。そこで、フェニルトリアゾール骨格を基本骨格として、ベンゼン環に置換基を種々導入した非天然型塩基を合成し、さらなる CG 塩基対に対する選択性の向上を試みた (Table 5)。ベンゼン環オルト位にヒドロ

Table 5. T_m values ($^{\circ}\text{C}$) of triplexes.

TFO
target DNA

5' - TTTTCT**X**TCTCTCT - 3'
5' - GGCAAAAAGAYAGAGAGACGC - 3'
3' - CCGTTTTTCT**Z**TCTCTCTGCG - 5'

X =

Entry	X (R)	YZ				Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT			TA	CG	GC	AT
1		17	25	<10	<10	8		14	23	<10	<10
2		15	25	<10	17	9		13	21	<10	<10
3		15	17	12	<10	10		<10	21	<10	<10
4		15	24	15	12	11		18	23	<10	<10
5		14	21	<10	<10	12		16	24	<10	<10
6		17	22	<10	<10	13		13	24	12	12
7		15	22	<10	<10						

Conditions ; 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 140 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1.89 μM each oligonucleotide. **C** ; 2'-deoxy-5-methylcytidine.

キシ基を有する Entry 2 や、ピリドン構造を有する Entry 4 では、無置換ベンゼンと比較して CG 塩基対に対し同程度の T_m 値 (24–25°C) を示し、TA 塩基対に対し若干の T_m 値の減少が見られた。一方で、カルボキシ基を持つ非天然型塩基は、CG 塩基対に対する T_m 値が大きく低下した ($T_m = 17^\circ\text{C}$, Entry 3)。メタ位に置換基を有するものは、その置換基による T_m 値の変化があまり観察されず、全体的に三重鎖を若干不安定化する結果となった (Entries 5–8)。一方で、Entries 9–10 の結果からパラ位の置換基が TA 塩基対に対する親和性に大きく影響することが明らかとなった。特にパラ位にカルボキシ基を有する非天然型塩基は、CG 塩基対に対して若干親和性が低下したものの TA 塩基対に対する T_m 値が大きく低下した (Entry 10)。パラ位置置換基は、三重らせん構造のリン酸ジエステル骨格の方向に位置していると考えられ、より詳細な検討は必要であるが、置換基とリン酸ジエステル骨格間での立体反発や静電的反発等の要因により塩基対認識能に影響を与えているのではないかと推察される。そこで、さらにパラ位置置換基を変換した結果、ウレイド基を有するものが、CG 塩基対に対してチミンと同程度の親和性を保ったまま ($T_m = 24^\circ\text{C}$)、TA 塩基対に対する親和性が低下し、結果として高い塩基対選択性を示した。この CG 塩基対選択性を確認するため、異なる測定条件下、 T_m 測定を行った (Table 6, Figure 9)。結果、チミンは CG 塩基対に対して 28°C 、AT 塩基対に対して 44°C

の T_m 値となり、 $\Delta T_m = 16^\circ\text{C}$ を示した。一方、*p*-ウレイドフェニルトリアゾールを塩基部位に持つ人工核酸は、CG 塩基対に対し 29°C と T•CG と同程度であり、 $\Delta T_m = 11^\circ\text{C}$ を示した。以上の結果から、今回見いだした非天然型塩基は、T•AT の塩基対選択性には及ばなかったものの、CG 塩基対に対して良好な選択性を有することがわかった。また、推測ではあるが、Figure 9b に示したようなトリプレットを形成しているのではないかと考えられる。

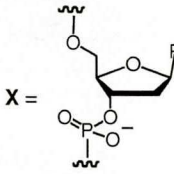
Table 6. T_m values ($^\circ\text{C}$) of triplexes.

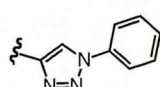
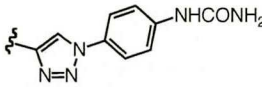
TFO 5' -TTTTTCTXTCTCTCT-3'

target DNA 5' -GGCAAAAAGAYAGAGACGC-3'

3' -CCGTTTTTCTZTCTCTCTGCG-5'

X =



Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT
1		23	29	17	19
2		18	29	17	18
3	T	21	28	22	44

Conditions ; 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 6.8), 100 mM KCl, 50 mM MgCl_2 , 1.89 μM each oligonucleotide. C ; 2'-deoxy-5-methylcytidine.

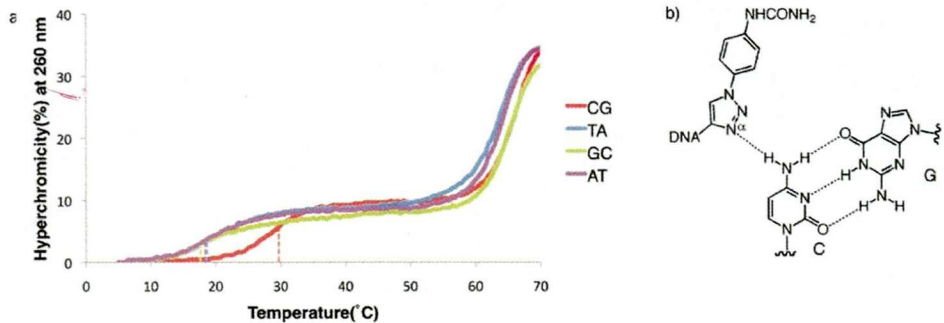


Figure 9. a) UV melting profiles for triplexes. b) Plausible structure of triplet.

第二章第二節 TA 塩基対認識のための糖部合成とオリゴ核酸上での塩基部位構築

三重鎖形成核酸の実用化に向け、TA 塩基対を認識する塩基の開発はこれまでに幾つか報告されているものの²¹⁾、CG 塩基対認識塩基の開発に比べて非常に少なく研究はあまり進展していない。先のトリアゾール環を核酸塩基骨格に持つ人工核酸は、CG 塩基対選択的であった。そのため TA 塩基対認識に向けた新たな糖部構造が必要となるが、TA 塩基対認識核酸塩基の開発においては、コアとなる構造がこれまでの研究から未だ明らかとなっていない (Figure 10)。その大きな原因として、TA 塩基対のチミン 5 位メチル基の存在があげられる。TFO の核酸塩基は、チミン 5 位メチル基の立体反発を受けやすく、チミンを認識することが難しい。そこで今回著者は、Figure 11

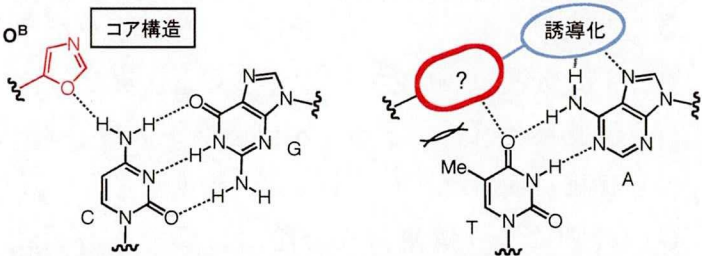


Figure 10. Core structure for recognition of py•pu base pair.

に示したように、コア構造の代わりにチミンをスキップするスペーサーを導入し、スペーサー部位の末端でクリックケミストリーを用いた伸長後修飾法によりアデニンを認識する構造 (R) をスクリーニングすることとした。これらの検討により TA 塩基対を認識する人工核酸の開発、または人工核酸開発に向けた有用な構造情報を得ることができるのではないかと考えた。

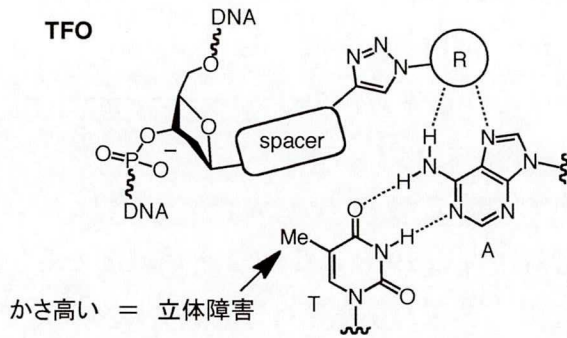


Figure 11. New strategy for recognition of TA base pair.

糖部構造のスペーサー部位は分子モデリング等により設計し、芳香族スペーサー、脂肪族スペーサーの両方を考案した (Figure 12)。芳香族スペーサーとしては、チエニルスペーサー (Spacer a) を用いることとした。分子モデリングの結果から、チオフェン等の五員環はチミン 5 位メチル基との立体障害が小さく、またチオフェン部位のスタッキング効果による三重鎖構造の安定化が期待できると考えられる。一方、脂肪族スペーサーは、5 種類のスペーサー構造 Spacer b-f を設計した。これらは自由度の高さから三重鎖構造自体の安定性を低下させる可能性があるものの、スペーサーの長さをそれぞれ変化させ、その構造に適度な自由度をもたせることで、アデニンの認識にうまく作用する可能性が十分にあると考えた。まず、それぞれの

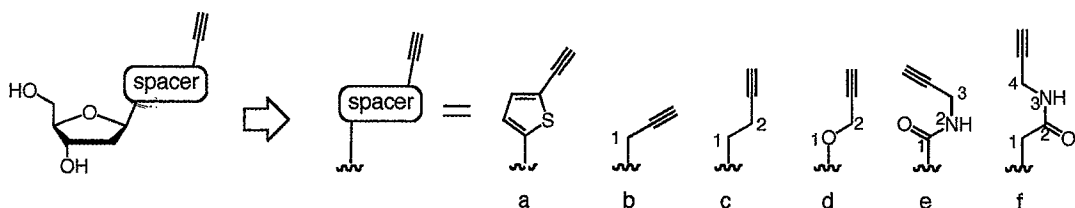
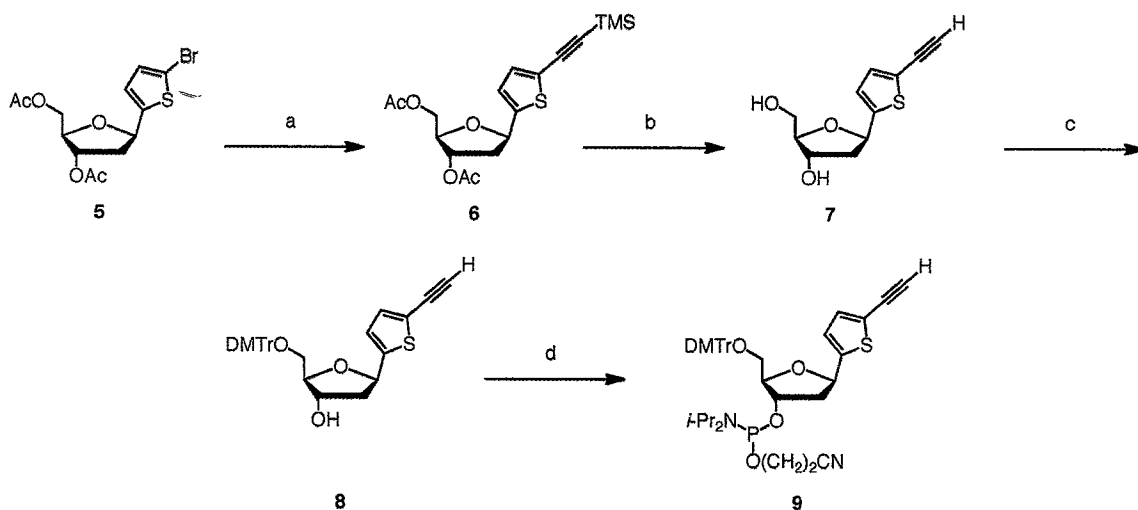


Figure 12. Structures of Spacer a – Spacer f.

スパーサーを有するアミダイトブロックを合成した。チオフエン部位をスパーサーに持つ化合物の合成を Scheme 2 に示した。文献既知化合物 **5**²²⁾ を合成後、トリメチルシリルアセチレンとの園頭カップリング反応によりアセチレンユニットを導入し化合物 **6** を得た。炭酸カリウム-メタノール条件下、トリメチルシリル基とアセチル基の除去を行いヌクレオシド **7** とした後、5'位水酸基のジメトキシトリチル化 (**8**)、3'位水酸基のホスホロアミダイト化を経て、DNA 合成機に適用可能なアミダイトブロック **9** へと誘導した。続いて、5'位水酸基をジメトキシトリ

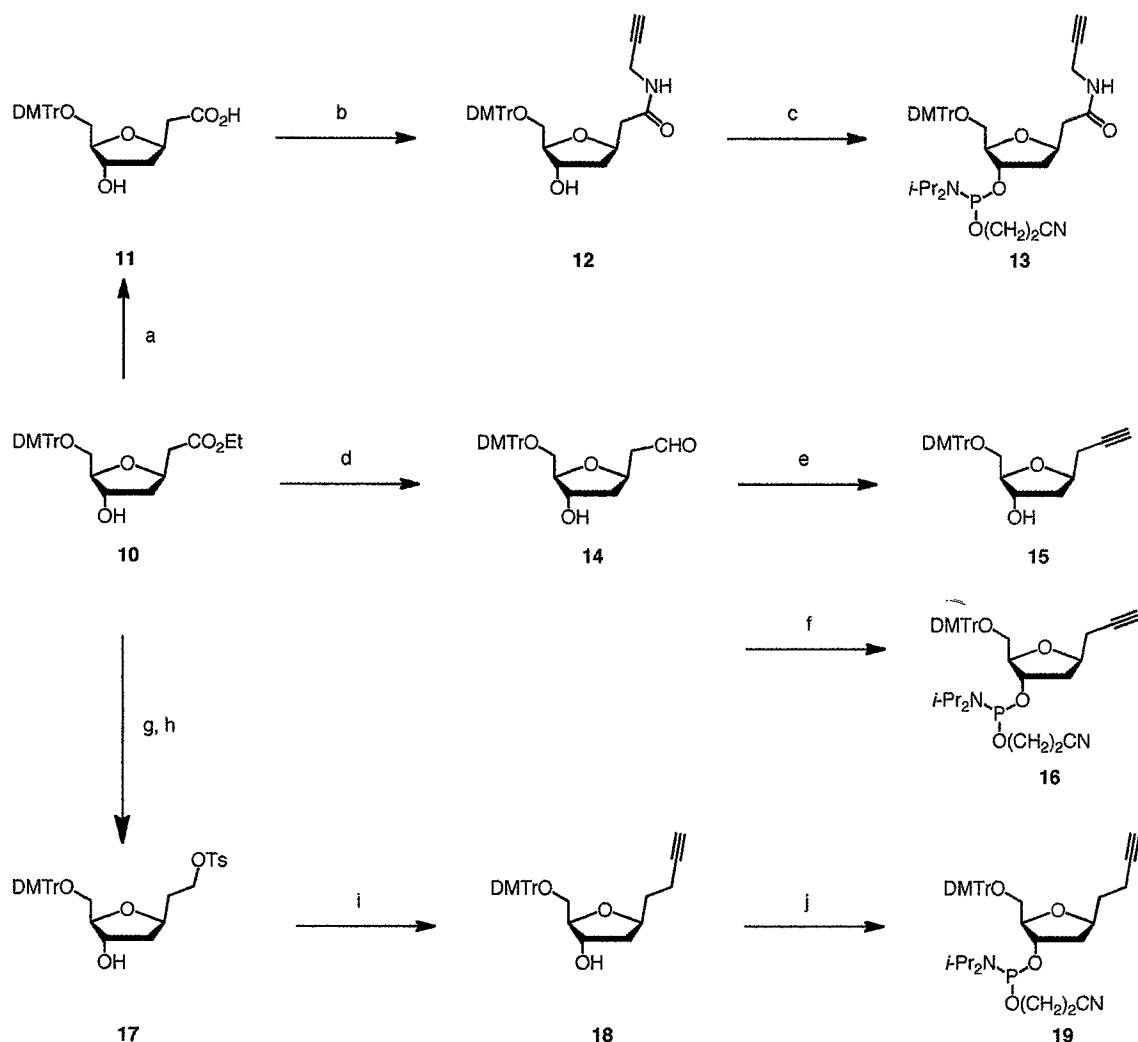


Scheme 2. Reagents and conditions : a) TMS-C≡CH, Pd(PPh₃)₄, CuI, THF/Et₃N = 7:2, rt, 22 h, quant. b) K₂CO₃, MeOH, rt, 0.5 h, quant. c) DMTrCl, pyridine, rt, 5 h, 94%. d) *i*-Pr₂NP(=O)(Cl)O(CH₂)₂CN, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 5h, 89%.

チル基で保護したエステル体 **10**²³⁾ から、3 種類のスパーサー (spacer b, c, f) を有するアミダイト体の合成を行った (Scheme 3)。アミド構造を有する spacer f は、まず文献既知化合物のエステル体 **10** を塩基性条件で加水分解し、96%の収率でカルボン酸誘導体 **11** へと導き、EDC・HCl を用いてプロパルギルアミドと縮合させアミド体 **12** を得た。その後、3'位水酸基のホスホロアミダイト化を行い spacer f を持つアミダイト体 **13** を収率 90%で得た。Spacer b を有するアミダイト体の合成は、まず化合物 **10** を DIBAL により還元しアルデヒド **14** を 91%の収率で合成し、続いて大平-ベストマン試薬との反応により末端アセチレン **15** を構築した。続いて、3'位水酸基のホスホロアミダイト化により spacer b を有するアミダイト体 **16** へと導

いた。最後に、spacer c を有するアミダイト体 **19** の合成は、まず LiAlH_4 を用いて化合物 **10** のエステルを 1 級アルコールへと還元し、続いてトシル化を行い化合物 **17** へと 2 工程 81% の収率で誘導した。次いで $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応により末端アセチレンを導入し化合物 **18** とした後、ホスホロアミダイト化によりアミダイト体 **19** の合成を達成した (Scheme 3)。

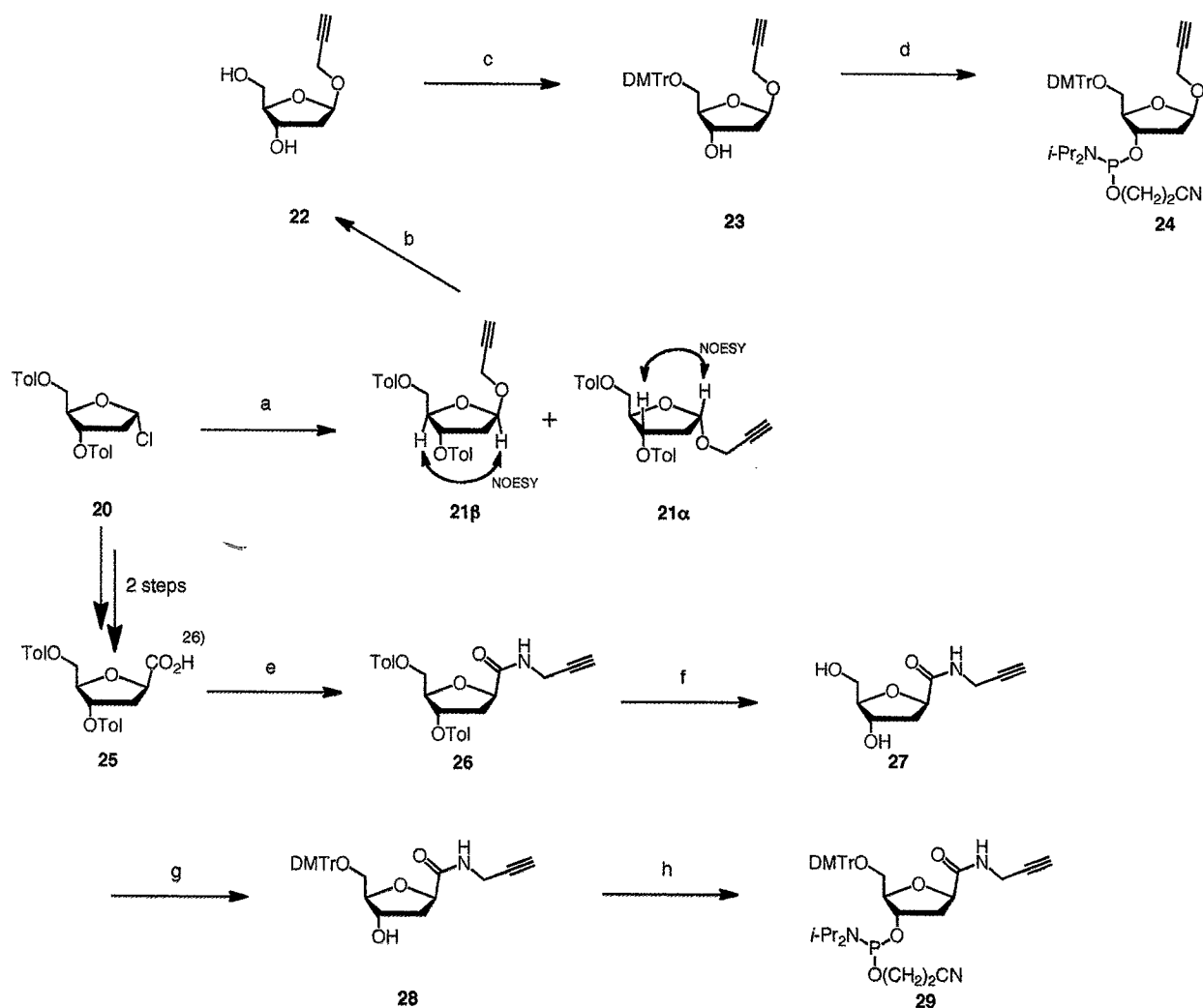
また、 α ハロ糖 **20** から spacer d, e を有する 2 種類のアミダイト体の合成も同時に行った。spacer d を有するアミダイト体の合成では、化合物 **20** に対してプロパルギルアルコールを反応させてアノマー異性体 **21 α** 、**21 β** を分離精製することで、それぞれ 34%、39% の収率で得た。得られた化合物の立体は、糖部 1' 位水素と 4' 位水素 (**21 β**)、または糖部 1' 位水素と 3' 位水素 (**21 α**) の相関を NOESY 測定により観測することで決定した。続いて **21 β** の 5' 位水酸基、3' 位水酸基の脱保護をソジウムメトキシドを用いて行い収率よくヌクレオシド **22** を得た。得ら



Scheme 3. Reagents and conditions : a) KOH , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O} = 1:1$, rt, 12 h, 96%. b) Propargylamine, $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$, DMAP , CH_2Cl_2 , rt, 11 h, 93%. c) $i\text{-Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$, DIPEA , CH_2Cl_2 , rt, 3 h, 90%. d) DIBAL , CH_2Cl_2 , -78°C , 0.5 h, 91%. e) Ohira-Bestmann reagent, K_2CO_3 , MeOH , rt, 5 h, 90%. f) $i\text{-Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$, DIPEA , CH_2Cl_2 , rt, 1.5 h, 87%. g) LiAlH_4 , THF , 0°C , 4 h. h) TsCl , pyridine, rt, 12 h, 81% for 2 steps. i) $\text{LiCCH} \cdot \text{EDA}$, THF , rt, 9 h, 65%. j) $i\text{-Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$, DIPEA , CH_2Cl_2 , rt, 5 h, 97%.

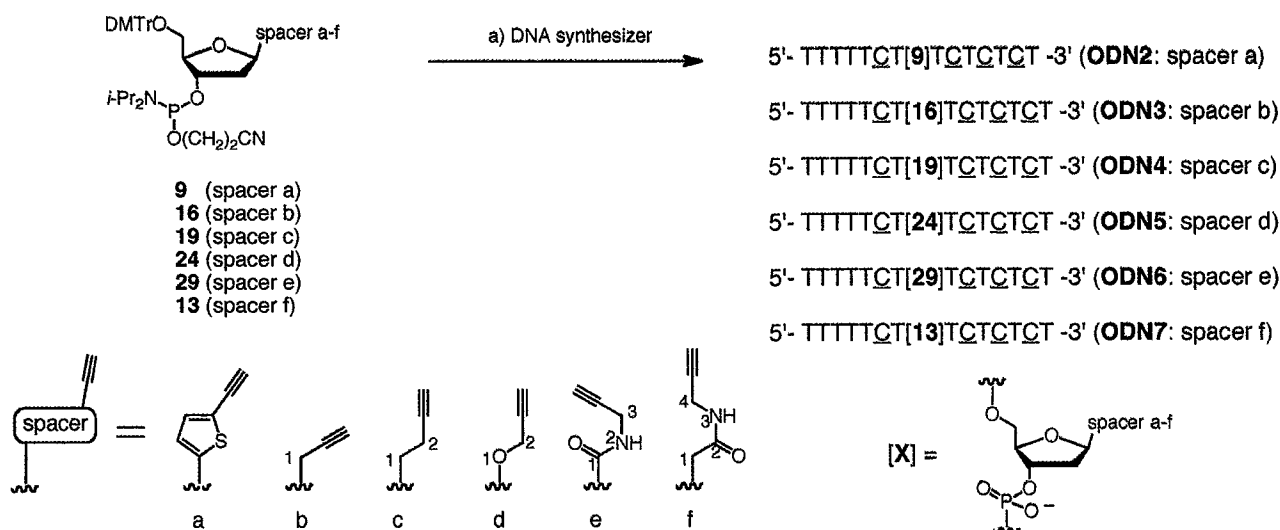
れた化合物 **22** の 5' 位水酸基のジメトキシトリチル化によりトリチル体 **23** へと誘導し、続く 3' 位水酸基のホスホロアミダイト化を経て spacer d を有するアミダイト体 **24** の合成を達成した。最後に、spacer e を有するアミダイト体 **29** の合成を記す。 α ハロ糖 **20** から文献に従い 2 工程で導いたカルボン酸誘導体 **25**²⁴⁾ とプロパルギルアミンとの縮合によりアミド体 **26** を収率 96% で合成した後、ソジウムメトキシドを用いた水酸基の脱保護によりヌクレオシド **27** へと導いた。その後、これまでの化合物と同様に 5' 位水酸基のジメトキシトリチル化 (**28**)、3' 位水酸基のホスホロアミダイト化を行いアミダイト体 **29** を得た。

以上合成した 6 種類のアミダイト体 (**9**, **13**, **16**, **19**, **24**, **29**) を 15-mer のオリゴ核酸へと導入した (Scheme 5)。オリゴ核酸は通常の DNA 合成プロトコルを用いて合成し、RP-HPLC により精製後、MALDI-TOF Mass によりそれぞれ分子量測定を行うことでオリゴ核酸の同定



Scheme 4. Reagents and conditions : a) Propargyl alcohol, MeCN, rt, 4 h, 34% for **21 α** and 39% for **21 β** . b) NaOMe, MeOH, rt, 5 h, quant. c) DMTrCl, pyridine, rt, 6 h, 98%. d) *i*-Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 15 h, 90%. e) Propargylamine, EDC·HCl, DMAP, CH₂Cl₂, rt, 2 h, 96%. f) NaOMe, MeOH, rt, 12 h, quant. g) DMTrCl, pyridine, rt, 6 h, 82%. h) *i*-Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 16 h, 92%.

を行った。結果、いずれのオリゴ核酸においても (ODN2-ODN7) も収率良く得ることに成功した。^{注9}



Scheme 5. Reagents and conditions : a) automated DNA synthesizer. Coupling time : 90 sec, activator : Activator 42™ or DCI activator, Coupling efficiency : quant. In the sequences, C stands 2'-deoxy-5-methylcytidine. The composition of the ODNs was confirmed by MALDI-TOF Mass analysis.

第二章第三節 TA 塩基対認識能の評価

続いて得られたオリゴ核酸 ODN2-ODN7 と種々のアジド試薬を用いて、本研究で開発した手法により種々の非天然型塩基の構築を行った (Figure 13)^{注10}。そして、得られたオリゴ

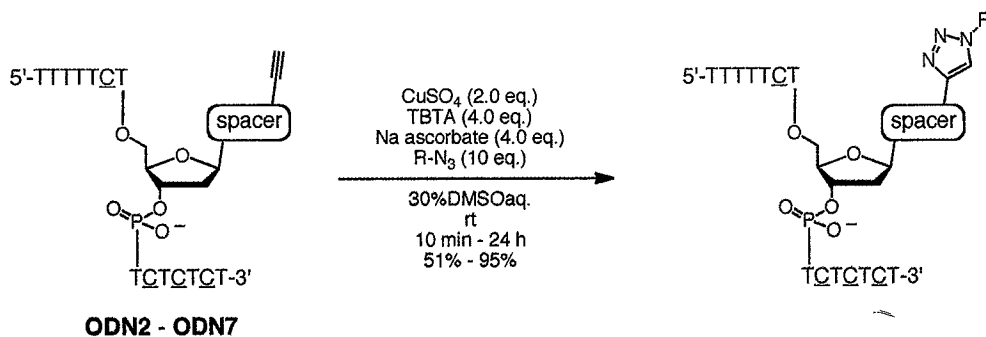


Figure 13. CuAAC reaction using ODN2 – ODN7.

^{注9} オリゴ核酸の合成と分子量測定 (MALDI-TOF Mass) の結果については、実験項に詳細を記載。

^{注10} クリックケミストリーを利用した非天然型塩基の構築による各種オリゴ核酸の収率と分子量測定による化合物の同定については実験項に詳細を記載。

核酸を用いて T_m 測定を行った。まずはじめに芳香族スパーサーであるチオフェン骨格を有する非天然型塩基の T_m 値と天然のグアニン(G)の結果を Table 7 に示した。かっこ内に示した数字はベンゼン環に置換基を持たないフェニルトリアゾール骨格を有する Entry 6 の非天然型塩基の T_m 値を基準とした場合の置換基の導入による T_m 値の増減を示したものである。天然のグアニンは 4 種類の塩基対の中で TA 塩基対に対して最も親和性が高いことが知られており、その水素結合様式は Figure 14 に示した構造が示唆されている²⁵⁾。今回の T_m 測定の条件においては TA 塩基対に対して 32°C の値を示した (Entry 1)。クリックケミストリー適用前のチエニル基を有する非天然型塩基では塩基対非特異的に T_m 値が低い結果となった (Entry 2)。また、脂肪族アジドを用いて合成した非

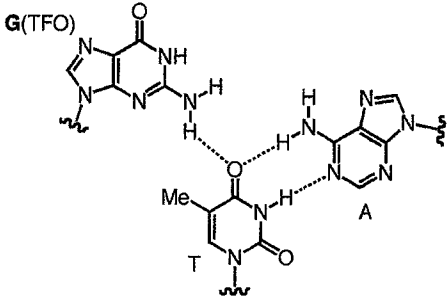


Figure 14. Structure of G•TA triad.

Table 7. T_m values (°C) of triplexes (thienyl spacer)

TFO targetDNA						5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3' 5'-GGCAAAAAGAYAGAGACGC 3'-CCGTTTTTCTTCTCTCTGCG						C18 spacer		X =	
Entry	X (R)	YZ				Entry	X (R)	YZ				TA	CG	GC	AT
1	G	32	25	27	19	10		24 (-7)	28 (-7)	21 (-6)	20 (-8)				
2		<15	<15	18	<15	11		32 (+1)	35 (±0)	28 (+1)	29 (+1)				
3		<15	<15	17	<15	12		29 (-2)	32 (-3)	25 (-2)	24 (-4)				
4		<15	<15	17	<15	13		32 (+1)	35 (±0)	29 (+2)	28 (±0)				
5		<15	<15	17	<15	14		30 (-1)	34 (-1)	26 (-1)	27 (-1)				
6		31	35	27	28	15		32 (+1)	34 (-1)	31 (+4)	28 (±0)				
7		29 (-2)	32 (-3)	26 (-1)	26 (-2)	16		32 (+1)	33 (-2)	31 (+4)	28 (±0)				
8		<15 (>-16)	<15 (>-20)	17 (>-10)	<15 (>-13)	17		37 (+6)	39 (+4)	34 (+7)	32 (+4)				
9		15 (-16)	17 (-18)	16 (-11)	<15 (>-13)										

Conditions ; 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1.89 μM each oligonucleotide. C; 2'-deoxy-5-methylcytidine. As a target, hairpin dsDNA linked to a hexa(ethylene glycol) unit (C18 spacer) was employed to stabilize the duplex and prevent the transition of duplex into ssDNA from overlapping with that of duplex into triplex.

天然型塩基においても T_m 値はクリックケミストリー適用前と同様の値を示した (Entries 3-5)。一方でフェニルアジドを用いて合成した Entry 6 においてはその T_m 値が 10°C - 20°C 上昇し、TA 塩基対に対しては 31°C と G・TA と同程度の値を示した。これら Entries 3-6 の結果から、4-(チオフェン-2-イル)トリアゾール骨格と隣接塩基間でのスタッキングによる三重鎖の安定化は、観察されなかったものの、さらにベンゼン環とトリアゾール環が連続することで、スタッキング効果による三重鎖の安定化効果を獲得できたと考えられる。そこで次に、ベンゼン環に官能基を導入し、TA 塩基対選択性の向上を試みた。まず、トリアゾール環-ベンゼン環の C-N 結合のオルト位に置換基を導入した場合、塩基対の種類によらず T_m 値は低下する結果となった (Entries 7-9)。特に、カルボキシ基やアミド基を有する Entries 8-9 においてはその T_m 値の減少が顕著に現れた。また、ヒドロキシピリジン骨格を有する Entry 10 ではヒドロキシ基 (Entry 7) と比べてより T_m 値の減少が観察されたが、これはピリドンとヒドロキシピリジンが互変異性することが原因の一つであると考えられる。また、ベンゼン環メタ位に置換基を有する非天然型塩基においては無置換のものとは比べて多少の T_m 値の差は見られたものの、その塩基対選択性、親和性に大きな変化は観察されなかった (Entries 11-16)。これらの結果から、チオフェン骨格を有する非天然型塩基のベンゼン環上の官能基は、TA 塩基対のアデニンを認識する部位に空間的に位置していないことが考えられる。また、Entry 17 のナフチル基へと環を拡大した非天然型塩基は、塩基対選択性については変化が見られないものの、 T_m 値はさらに上昇し TA 塩基対に対しては 37°C の高い値を示した。以上の結果から、チオフェンを有する非天然型塩基はアデニン塩基を認識していないと考えられる。おそらく、芳香環が連なることによって塩基部位がインターカレーターとして作用し、塩基対の種類に関わらず非特異的な三重鎖の安定化が生じたと考えられる。

続いて、メチレンスペーサー (spacer b) を有するオリゴ核酸 (ODN3) を用いて合成した非天然型塩基の融解温度測定の結果を Table 8 に示した。まず、脂肪酸アジドを用いて合成した非天然型塩基は、 20°C 前後と全体的に低い T_m 値を示した (Entries 1-2)。この原因として、自由度の高いスペーサーの導入により三重鎖形成時にエントロピーの損失による三重鎖の不安定化、またトリアゾール骨格と隣接の塩基対間での十分なスタッキング効果が得られていないことが考えられる。一方で、Entry 3 で示したフェニルトリアゾール骨格を有する非天然型塩基は、先のチオフェン骨格を有する非天然型塩基の結果とは異なり、Entries 1-2 で示した脂肪酸アジドを用いた場合の T_m 値と同程度の値を示した。(脂肪酸スペーサーを有する spacer b-f では) 脂肪酸アジドを用いた非天然型塩基と芳香族アジドであるフェニルアジドを用いて合成した非天然型塩基で T_m 値に大きな変化が見られていないことから、脂肪酸スペーサーの場合は、フェニルトリアゾール骨格のスタッキング効果による三重鎖の安定化効果は得られなかったと考えられる。また、第二章第一節においてトリアゾール環が直接糖部とグリコシル結合した非天然型塩基の物性評価を行ったが、先の実験結果と比較しても明らかなように糖部とトリアゾール環の間にメチレンを介することで CG 塩基対に対する選択性は失われる結果とな

Table 8. T_m values ($^{\circ}\text{C}$) of triplexes (methylene spacer)

TFO
targetDNA

5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'
5'-GGCAAAAAGAYAGAGAGACGC
3'-CCGTTTTTCTZTCTCTCTGCG

C18 spacer

X =

Entry	X (R)	YZ				Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT			TA	CG	GC	AT
1		19	21	20	18	6		23 (+6)	25 (+4)	23 (+5)	20 (+2)
2		20	21	20	16	7		20 (+3)	22 (+1)	19 (+1)	19 (+2)
3		17	21	18	17	8		17 (±0)	21 (±0)	17 (-1)	17 (±0)
4		17 (±0)	21 (±0)	20 (+2)	20 (+2)	9		22 (+5)	23 (+2)	22 (+4)	19 (+1)
5		17 (±0)	20 (-1)	19 (+1)	18 (+1)	10		17 (±0)	22 (+1)	18 (±0)	18 (+1)

Conditions were shown in the footnote of Table 7.

った。続いて、ベンゼン環上の官能基による塩基対認識能の変化を調べた。ベンゼン環オルト位に置換基を有する非天然型塩基は、 T_m 値に大きな影響は見られず、アミド基のような大きな置換基を有する場合においても T_m 値に変化は見られなかった (Entries 4-5)。一方で、Entry 6 に示したメタ位に水酸基を有する非天然型塩基は、無置換のものと比較して T_m 値に大きな変化が見られた。 T_m 値は塩基対によらず上昇したが、特に TA 塩基対に対しては 6°C もの上昇が観察されたことから、TA 塩基対と十分相互作用している可能性が考えられる。そこで、その他のメタ位置置換基を検討した結果、メチレンを介し水素結合部位を一原子のばしたヒドロキシメチル基やアミド基を有する場合は T_m 値の大きな上昇は見られなかったものの (Entries 7-8)、ウレイド基を有する Entry 9 においては先のヒドロキシ基の場合と同程度の T_m 値の向上が見られた。また、パラ位にヒドロキシメチル基を有する非天然型塩基についても評価を行ったが、結果、 T_m 値に変化は見られなかった。以上の結果をもとに、無置換の非天然型塩基 (Entry 3) の T_m 値を基準としたときの、メタ位置置換基の導入による T_m 値の増減をグラフに示した (Figure 15)。このグラフからも分かるように、ヒドロキシ基やウレイド基を有する非天然型塩基において特に TA 塩基対に対する T_m 値が大きく向上したことから ($+6^{\circ}\text{C}$ と $+5^{\circ}\text{C}$)、それぞれの官能基は TA 塩基対のアデニンと相互作用している可能性は十分に考えられる。しかし、ヒドロキシ基のような水素結合受容体と水素結合供与体としての両方の役割を果たすことが可能な場合においては、どの塩基対に対しても非特異的に T_m 値の上昇が観察された。また、一方でウレイド基を有する場合においては先のヒドロキシ基と比較して CG 塩基対と AT

塩基対に対する T_m 値の上昇が若干ではあるが抑えられる結果となった ($+2^\circ\text{C}$)。

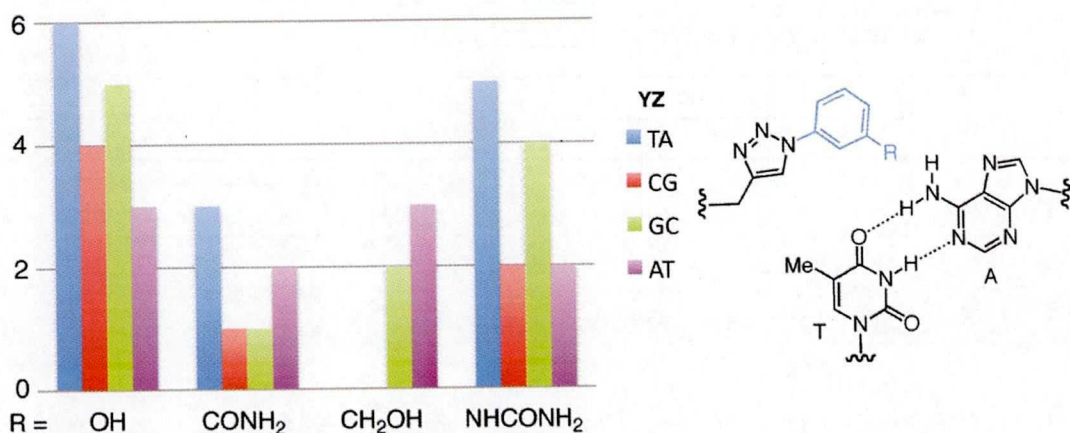


Figure 15. Comparison of effect of substituents on T_m values (methylene spacer).

次に、エチレンスペーサー (Spacer c) を有する非天然型塩基の T_m 測定の結果を Table 9 に示す。脂肪族アジドを用いて合成した非天然型塩基は、先のメチレンスペーサーと比較すると (Table 8, Entries 1-2) 若干ではあるが全体的に T_m 値が高い傾向が見られた (Entries 1-6)。また、6 種類の中ではヒドロキシエチル基を有する Entry 4 がピリミジン・プリン塩基対 (CG、TA 塩基対) に対する親和性が最も高く 23°C の T_m 値を示した。一方で、トリアゾール環置換基において窒素原子を有する非天然型塩基はピリミジン・プリン塩基対に対する T_m 値が低い傾向にあった (Entries 2,3,5: $T_m = 19-21^\circ\text{C}$)。また、フェニルアジドを用いて合成した Entry 7 の非天然型塩基は、TA 塩基対に対する T_m 値が 22°C であった。先にも述べたが、フェニルトリアゾール骨格によるスタッキング効果は得られていないものと考えられる。続いて、ベンゼン環の置換基による T_m 値の変化を調べた。カッコ内の数字は、先と同様にベンゼン環無置換の Entry 7 を基準とした場合の T_m 値の増減を示している。結果、オルト位に置換基を有する非天然型塩基においては、 T_m 値が全体的に減少する結果となった (Entries 8-9)。メタ位に水酸基を有する Entry 10 においては、無置換のものと比較して T_m 値の変化が観察されず、先のメチレンスペーサーの場合とは異なる結果となった (Table 8, Entry 6)。また、同じ位置に水素結合部位を有する Entry 11 のアミノピリミジンも同様の T_m 値を示し、大きな変化は見られなかった。一方で、メタ位にアミド基を有する非天然型塩基は、TA 塩基対に対する親和性が無置換の Entry 7 と比べて $+3^\circ\text{C}$ と若干向上した (Entry 12)。ヒドロキシメチル基では TA 塩基対に対する同程度 T_m 値の上昇が見られなかったことから (Entry 13, $+1^\circ\text{C}$)、アミド構造が持つ平面性は T_m 値の上昇に重要であることが考えられる。また、置換基にウレイド基を有する非天然型塩基は、さらに TA 塩基対に対する T_m 値が向上し、その値は 28°C と $+6^\circ\text{C}$ の変化が観察された (Entry 14)。以上の結果より、Entries 10-11 のようなメタ位にヒドロキシ基やアミノ基を有する場合は T_m 値の上昇が見られずに、アミド基、ウレイド基と官能基

のヘテロ原子の位置を一原子ずつ伸ばすことで T_m 値の上昇が観察されたことから、ベンゼン環メタ位置換基の X1 に位置に存在するヘテロ原子はアデニンと相互作用しないことが推測される。一方で、ヘテロ原子が X2、または、X3 に位置する場合、TA 塩基対のアデニン 6 位アミノ基または 7 位窒素原子と相互作用している可能性が考えられる (Figure 16)。そこで、さらなる置換基の検討を行った。まず C2 対称構造を有するビスウレア体の非天然型塩基を評価した (Entry 15)。結果、更なる T_m 値の上昇には繋がらなかったものの、TA 塩基対に対して 27°C と Entry 14 と同程度の親和性を示した。また、官能基を環固定したテトラヒドロキノリン骨格を有するアジドを用いて構築した非天然型塩基 (Entry 16) も、TA 塩基対に対して 27°C

Table 9. T_m values (°C) of triplexes (ethylene spacer)

TFO

5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'

targetDNA

5'-GGCAAAAAGAYAGAGACGC-

3'-CCGTTTTTCTZTCTCTCTGCG-

C18 spacer

X =

Entry	X (R)	YZ				Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT			TA	CG	GC	AT
1		21	22	21	17	10		22 (±0)	22 (-2)	21 (+1)	21 (±0)
2		19	21	20	16	11		22 (±0)	24 (±0)	22 (+2)	22 (+1)
3		19	21	20	17	12		25 (+3)	25 (+1)	22 (+2)	22 (+1)
4		23	23	20	20	13		23 (+1)	23 (-1)	20 (±0)	19 (-2)
5		19	20	19	16	14		28 (+6)	27 (+3)	23 (+3)	23 (+2)
6		19	21	19	<15	15		27 (+5)	27 (+3)	23 (+3)	22 (+1)
7		22	24	20	21	16		27 (+5)	26 (+2)	21 (+1)	21 (±0)
8		18 (-4)	22 (-2)	19 (-1)	20 (-1)	17		22 (±0)	23 (-1)	19 (-1)	19 (-2)
9		18 (-4)	20 (-4)	19 (-1)	16 (-5)	18		36 (+14)	36 (+12)	32 (+12)	33 (+11)

Conditions were shown in the footnote of Table 7.

と同程度の T_m 値が観察された。Entry16 では、Entries 14-15 で示した非天然型塩基とは異なり水素結合供与体となる構造が存在していない。しかしながら、TA 塩基対に対して同程度の親和性を示しており、このことから（更なる詳細な検討は必要であるが）カルボニル基がアデニン 6 位と水素結合している可能性が考えられる（Figure 17）。続いて、無置換のフェニルトリアゾール骨格（Entry 7）を有する非天然型塩基を基準に置換基の違いによる T_m 値の変化の比較を示した（Figure 18）。この結果から、先のメチレンスペーサーの場合とは異なり、TA 塩基対に対する T_m 値の上昇度合いはその他の塩基対と比べて大きい傾向にあることが明らかとなった。また、環固定等の修飾を施すことで、その他の塩基対（CG、GC、AT）に対する親和性が低下する結果となり、より TA 塩基対選択的に T_m 値が向上することが分かった。また、Entry 18 で示したナフタレン環を有するものでは、チエニルスペーサーの時と同様に大きく T_m 値が向上し、またその上昇は塩基対に非特異的であった。

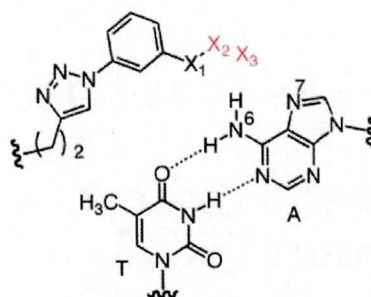


Figure 16. Prospective spatial positions of atoms for TA recognition.

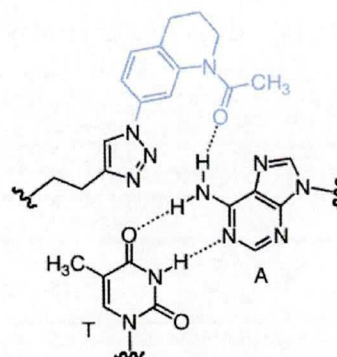


Figure 17. Proposed structure of TA base pair recognition.

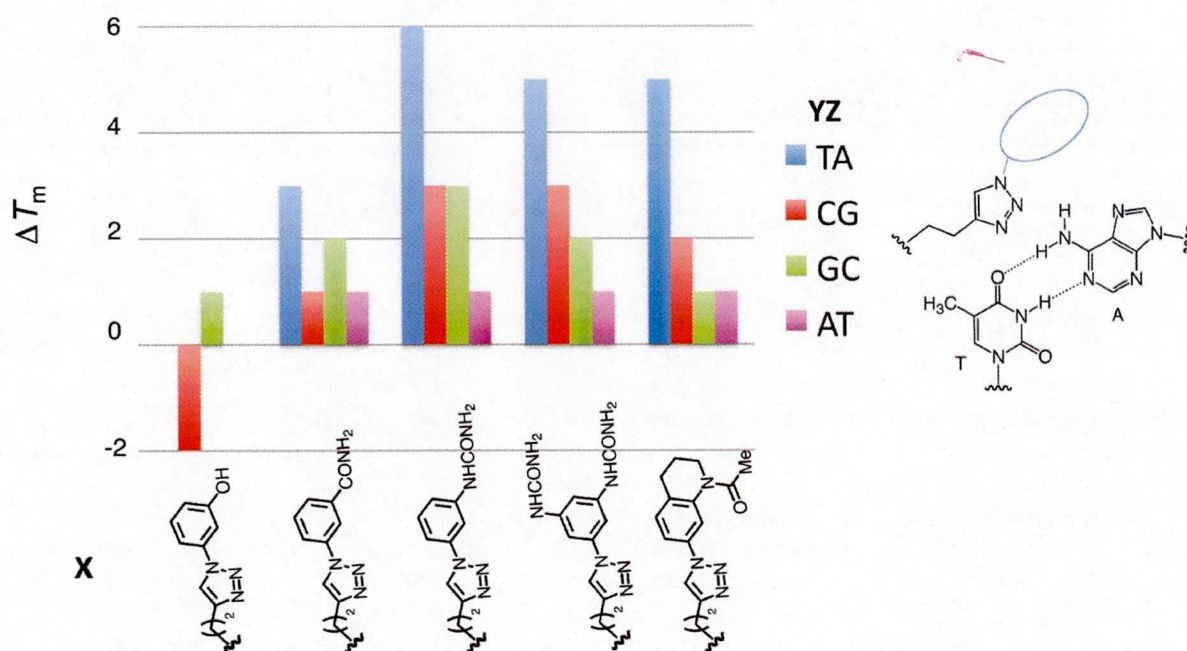


Figure 18. Comparison of effect of substituents on T_m values (methylene spacer).

Table 10 にはオキシメチレンスパーサーを有する非天然型塩基の融解温度測定の結果を示した。まず、脂肪族アジドを用いて合成した非天然型塩基 Entries 1-2 とフェニルアジドを用いて合成した非天然型塩基 Entry 3 を比較して T_m 値に変化は見られなかった。また、ベンゼン環オルト位に置換基を有する化合物の T_m 値は、先のエチレンスパーサー (Table 9, Entries 8-9) と同様に無置換の化合物 (Entry 3) と比較して大きな変化は見られなかった。さらに、メタ位においても官能基を検討したが、際立って T_m 値が変化するという結果は得られなかった。興味深いことに、先のエチレンスパーサーにおいてはメタ位の官能基により TA 塩基対に対する T_m 値の増大が観察され、特にウレイド基を有するものは無置換のものに比べて 6°C の上昇が見られていたが (Table 9, Entry 7 と Entry 14 の比較)、一方で、メチレンオキシスパーサーではその T_m 値の上昇度合いは $+3^{\circ}\text{C}$ と小さく (Table 10, Entry 3 と Entry 9 の比較)、また T_m 値の絶対値も 23°C (Table 10, Entry 9) と先の 28°C (Table 9, Entry 14) に比べて低い値を示した (Figure 19, 赤で示した数値の比較)。この結果から、アノマー位の原子の違いにより T_m 値が変化することが明らかとなり、スパーサー部位の構成原子が三重らせん構造における塩基部位の空間配置に大きく影響することがわかった。また、エチレンスパーサーの方がメチレンオキシスパーサーと比べて T_m 値が全体的に高い傾向にあることから、エチレンスパーサーは適度に自由度が抑制されていることが可能性として考えられる (Figure 19, 青で示した数値の比較)。

Table 10. T_m values ($^{\circ}\text{C}$) of triplexes (oxymethylene spacer)

TFO targetDNA

5' -TTTTTCTXTCTCTCT-3'

5' -GGCAAAAAGAYAGAGAGACGC

3' -CCGTTTTTCTZTCTCTCTGCG

C18 spacer

X =

Entry	X (R)	YZ				Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT			TA	CG	GC	AT
1		19	22	20	19	6		21 (+1)	24 (+2)	21 (-1)	20 (±0)
2		20	23	22	20	7		22 (+2)	25 (+3)	23 (+1)	23 (+3)
3		20	22	22	20	8		19 (-1)	23 (+1)	20 (-2)	19 (-1)
4		20 (±0)	23 (+1)	20 (-2)	20 (±0)	9		23 (+3)	25 (+3)	23 (+1)	21 (+1)
5		17 (-3)	21 (-1)	19 (-3)	18 (-2)	10		19 (-1)	22 (±0)	19 (-3)	19 (-1)

Conditions were shown in the footnote of Table 7.

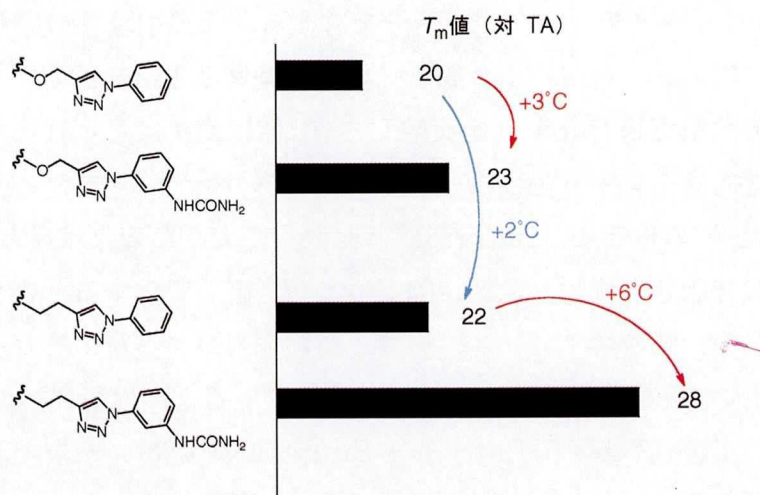


Figure 19. Comparison of effect of spacer moieties on T_m values.

次に、spacer e についての実験結果を示す (Table 11)。まずはじめに Entry 1, 2 の結果から、先の脂肪族スペーサーと同様に芳香環のスタッキング効果による三重鎖の安定化効果は得られていないと考えられる。Table 11 の中で最も顕著に T_m 値に変化が見られたのはメタ位にアミド基を有するもので、TA 塩基対に対して無置換のものと比較して +4°C の値を示した (Entry 5)。一方でメタ位置換基をウレイド基へと変換した Entry 6 では、TA 塩基対に対して同程度の親和性の向上は見られたものの (+3°C)、その他の塩基対においても T_m 値の向上が見られた。

Table 11. T_m values (°C) of triplexes (acetamidomethyl spacer)

TFO
targetDNA

5' -TTTTTCT**X**TCTCTCT-3'
5' -GGCAAAAAGAYAGAGACGC
3' -CCGTTTTTCT**Z**TCTCTCTGCG

C18 spacer

X =

Entry	X (R)	YZ				Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT			TA	CG	GC	AT
1		19	23	21	15	6		21 (+3)	24 (+3)	21 (+2)	21 (+4)
2		18	21	19	17	7		18 (-1)	21 (-1)	19 (±0)	18 (+1)
3		19 (+1)	22 (+1)	19 (±0)	19 (+2)	8		18 (-1)	21 (-1)	19 (±0)	17 (±0)
4		19 (+1)	22 (+1)	18 (-1)	18 (+1)	9		29 (+10)	28 (+6)	27 (+8)	27 (+10)
5		22 (+4)	23 (+2)	19 (±0)	19 (+2)						

Conditions were shown in the footnote of Table 7.

また、これまでの知見と同様にナフタレン環を有する Entry 9 では T_m 値が塩基対非特異的に上昇したことから、高いスタッキング能を有することが分かる。以上の知見から、Entry 5 においては TA 塩基対のアデニンと相互作用している可能性は考えられるが、それを裏付けるだけの証拠は不十分であり、更なる検討が必要であると考えられる。また、これまでのスペーサーと比較して特徴的な T_m 値の変化が見られなかったことから、スペーサー構造がアデニン認識部位の探索には適していないことも示唆される結果となった。

最後に、spacer f についての結果を Table 12 に示す。まず、脂肪族アジド、ベンジルアジド、フェニルアジドを用いて合成した非天然型塩基はいずれも 20°C 前後と低い T_m 値を示し、その値に大きな違いは見られなかった (Entries 1-3)。ベンゼン環オルト位に置換基を有する非天然型塩基は標的塩基対によらずどれも T_m 値が低下する結果となった。一方でメタ位に置換基を有する化合物は全体的に 3-4°C T_m 値が上昇し、塩基対選択的な変化は見られなかった (Entry 7-10)。また、ヒドロキシ基 (Entry 7) 以外の非天然型塩基塩基においては CG 塩基対に対する親和性の向上が見られなくなる結果となった。以上の結果から、TA 塩基対認識のための有用な情報を得ることはできなかった。

Table 12. T_m values(°C) of triplexes (propionamidomethyl spacer)

TFO
targetDNA

5' -TTTTTCTXTCTCTCT-3'
5' -GGCAAAAAGAYAGAGAGACGC
3' -CCGTTTTTCTZTCTCTCTGCG

C18 spacer

X =

Entry	X (R)	YZ				Entry	X (R)	YZ			
		TA	CG	GC	AT			TA	CG	GC	AT
1		20	23	22	17	7		23 (+2)	25 (+3)	23 (+3)	21 (+3)
2		20	21	21	21	8		23 (+2)	22 (±0)	24 (+4)	21 (+3)
3		21	22	20	18	9		23 (+2)	22 (±0)	24 (+4)	21 (+3)
4		20 (-1)	20 (-2)	20 (±0)	18 (±0)	10		23 (+3)	23 (±0)	23 (+3)	22 (+4)
5		17 (-4)	20 (-2)	19 (-1)	14 (-4)	11		23 (+3)	23 (±0)	22 (+2)	21 (+3)
6		19 (-2)	21 (-1)	20 (±0)	16 (-2)						

Conditions were shown in the footnote of Table 7.

以上、PEM 法を利用したクリックケミストリーによる新たなアプローチを用いて、TA 塩基対のアデニンと相互作用する構造を探索した。結果、メチレンスパーサーとエチレンスパーサーをもつ非天然型塩基の融解温度測定の結果から、アデニンと相互作用している可能性を有する分子の発見に至った。このことから、TFO の塩基と TA 塩基対との空間的な配置が推測できると考えられる。また、スパーサーの原子の種類によって、三重らせん構造の安定性が変化することを明らかとした。今回得られた知見は、今後の TA 塩基対認識の開発に十分役立つものと考えられる。

結論

核酸化学の分野において、これまで種々の非天然型塩基が合成され、その物性評価がなされてきた。しかし、大工核酸開発に多大な時間と労力を要するため、実用的な化合物の開発に至る例は少ない。このような背景のもと、著者は PEM 法に基づくオリゴ核酸上での非天然型塩基構築法の開発に着手した。本手法にはクリックケミストリーによる Hisgen 反応を活用し、その反応条件の最適化や基質一般性についても確認した。これにより従来に比べ種々の非天然型塩基の合成に要する時間が大幅に短縮可能になった。また、本手法を三重鎖形成核酸における非天然型塩基の開発へと展開した。そして、その物性を T_m 測定により評価し、CG 塩基対に対しチミンと同程度の親和性と高い塩基対選択性を有する人工核酸の開発に成功した。また、TA 塩基対認識の足がかりとなる有用な情報を得ることに成功した。これにより、伸長後修飾法を活用した非天然型塩基の構築法が、目的の非天然型塩基を開発する上で、候補化合物の探索や部分構造のスクリーニング研究に非常に有用であることを示した。

以上、著者は本研究において、クリックケミストリーを利用してオリゴ核酸上で非天然型塩基を構築する新たな開発アプローチの確立に成功し、本手法を三重鎖形成核酸のための非天然型塩基開発へと応用することに成功した。

謝辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 小比賀 聡 教授に心から感謝致します。

本研究の実施にあたり、多大なる御指導と御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科 張 功幸 特任准教授に心から感謝致します。

本研究の討論に加わり、有益な御助言及び御指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科 今西 武 名誉教授、名古屋大学大学院創薬科学研究科 兒玉哲也 准教授に深く感謝致します。

本研究に際しご協力頂きました協和発酵キリン株式会社 窪山 剛之 博士 に深く感謝致します。

本研究に際しご協力頂いた 赤羽 昌明 氏、 加島 聖史 氏をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科 生物有機化学分野の皆様には感謝致します。

元素分析並びに質量分析スペクトルを測定して頂きました、大阪大学大学院薬学研究科 元素分析室、質量分析室の皆様には感謝致します。

末筆ながら、著者の長きにわたる学生生活を支援して頂きました両親、祖父母、姉、妹、また研究活動に理解を示して支えて頂きました 妻 由佳 に深く感謝致します。

実験の部

旋光度は日本分光 P-2200 旋光計を用いて測定した。赤外吸収 (IR) スペクトルは、日本分光 FT/IR-4200 型分光光度計を用いて測定した。水素核磁気共鳴 (^1H -NMR) スペクトルは日本電子 JNM-EX300 型、日本電子 JNM-EX400 型を用い、テトラメチルシラン (0.00 ppm) を内部標準として測定した。分裂様式は singlet, doublet, triplet, double doublet, double double doublet, double triplet, quintet, multiplet, をそれぞれ s, d, t, dd, ddd, dt, quin., m, と略した。炭素核磁気共鳴 (^{13}C -NMR) スペクトルは日本電子 JNM-EX300 型、日本電子 JNM-EX400 型を用い、重クロロホルム (77.0 ppm)、重メタノール (49.0 ppm) を内部標準として測定した。リン核磁気共鳴 (^{31}P -NMR) スペクトルは、日本電子 JNM-EX400 型を用い、5% リン酸・重水溶液 (0.00 ppm) を外部標準として測定した。質量分析は日本電子 JMS-600、日本電子 JMS-700、日本電子 JMS-S3000 Spiral TOFTM を用いて測定した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーの吸着剤は富士シリシア化学 FL-60D (0.06 mm)、富士シリシア化学 FL-100D (平均 0.100 mm)、富士シリシア化学 PSQ-60B (0.060 mm)、富士シリシア化学 FL-60D (0.060 mm) を用いた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は SHIMADZU LC-10AT_{VP}, SHIMADZU SPD-10A_{VP}, SHIMADZU CTO-10A_{VP} を用いて行った。融解温度 (T_m) 測定は島津 UV-1650、島津 UV-1800 を用いて行った。オリゴ核酸の質量分析は、Bruker Daltonics[®] Autoflex II TOF/TOF を用いて測定した。

緩衝液の調整方法

100 mM リン酸バッファ (pH 7.0)

リン酸二水素ナトリウム二水和物 (156 mg, 1.00 mmol) を milli Q に溶解して 100 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (①) を、リン酸水素二ナトリウム (155 mg, 1.09 mmol) を milliQ に溶解して 100 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液 (②) を、それぞれ調整する。①と②を混合することで pH 7.0 の 100 mM リン酸バッファとした。

100 mM カコジル酸バッファ (pH 6.8)

カコジル酸ナトリウム三水和物 (2.14 g, 10.0 mmol) を milli Q (80 mL) に溶解する。0.2 N HCl 水溶液を加えて pH 6.8 に調整し、100 mL にメスアップして pH 6.8 の 100 mM カコジル酸バッファとした。

第一章第一節の実験

1-(α)-Ethynyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (3 α)

1-(β)-Ethynyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (3 β)

窒素気流下、化合物 **2** (280 mg, 1.97 mmol) の無水ピリジン溶液 (60 mL) に、4,4'-ジメトキシ

トリチルクロリド (1.21 g, 2.95 mmol) を加えて 2 時間撹拌した。飽和重曹水を加え酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 4:1) で精製し、**3 α** (461 mg, 56%)、**3 β** (159 mg, 18%) をそれぞれ得た。

Colorless oil. $[\alpha]_D^{26}$ 24.4 (c 1.03, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ (**3 α**): 2.07 (1H, dt, *J* = 3.5, 13.5 Hz), 2.11 (1H, d, *J* = 6.5 Hz), 2.45 (1H, ddd, 6.5, 8.0, 13.5 Hz), 2.51 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.10 (1H, dd, *J* = 5.5, 10.0 Hz), 3.16 (1H, dd, *J* = 4.5, 10.0 Hz), 3.72 (6H, s), 4.09-4.12 (1H, m), 4.21-4.25 (1H, m), 4.80-4.85 (1H, m), 6.78-6.83 (4H, m), 7.12-7.40 (9H, m); HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₈H₂₈NaO₅ [M+Na]⁺: 467.1834. found 467.1840.

Colorless oil. $[\alpha]_D^{25}$ 0.93 (c 0.98, CHCl₃); IR $\nu_{\max}$ (KBr) 3280, 2934, 2044, 1611, 1509, 1251, 1221, 1177, 1085, 1034 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ (**3 β**): 1.80 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 2.15 (1H, ddd, *J* = 3.0, 6.5, 17.0 Hz), 2.24 (1H, ddd, *J* = 6.0, 8.5, 17.0 Hz), 2.46 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 3.15 (1H, dd, *J* = 6.0, 13.0 Hz), 3.26 (1H, dd, *J* = 4.5, 13.0 Hz), 3.78 (6H, s), 3.86-3.91 (1H, m), 4.35-4.38 (1H, m), 4.76 (1H, m), 6.78-6.83 (4H, m), 7.16-7.69 (9H, m); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 41.8, 55.2, 64.0, 67.3, 73.9, 74.6, 84.0, 86.2, 113.1, 126.8, 127.8, 128.0, 130.0, 135.8, 144.7, 158.4; HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₈H₂₈NaO₅ [M+Na]⁺: 467.1834. found 467.1827.

1-(β)-Ethynyl-3-*O*-[2-cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphinol]-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (**4**)

窒素気流下、**3 β** (76.5 mg, 0.172 mmol) 及びジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (35.1 mg, 0.174 mmol) の無水アセトニトリル-テトラヒドロフラン溶液 (3:1, 2.4 mL) に 2-シアノエチル-*N,N,N',N'*-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (0.10 mL, 0.330 mmol) を室温にて滴下し、4 時間撹拌した。溶媒を減圧留去後、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 5:1) にて精製し、**4** (80 mg, 69%) を得た。

Colorless oil. ³¹P-NMR(CDCl₃) δ_P : 148.5, 149.1; HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₇H₄₅N₂NaO₆P [M+Na]⁺: 667.2913. found 667.2915.

オリゴヌクレオチドの合成

標準的なホスホロアミダイト法に従い、オリゴヌクレオチドの合成を行った。合成機は Applied Biosystems Expedite™ 8909 を使い、0.2 μ mol スケールで行い、反応活性化剤には 4,5-ジシアノイミダゾール (DCI Activator, Proligo®) または 5-[3,5-ジ(トリフルオロメチル)フェニル]-2H-1,2,3,4-テトラゾール (Activator 42™, Proligo®) を用いた。合成したオリゴヌクレオチドは 28%アンモニア水 (室温、1.5 時間) で処理して固相カラムからの切り出しを行い、引き続き 28%アンモニア水 (55°C、12 時間) で処理し、脱保護を行った。ゲル濾過 (Amersham Biosciences, Nap™ 10 Columus) または固相抽出 (Sep-pak® Plus C18 Cartridge) により簡易精製した後、逆

相 HPLC 精製を行った。

HPLC による精製及び純度確認

オリゴヌクレオチドの精製及び純度確認は以下の条件で行った。

カラム： Waters Xterra® MS C₁₈ 2.5 µmol (4.6 mm x 50 mm)
Waters Xterra® MS C₁₈ 2.5 µmol (10 mm x 50 mm)
移動相： A 液：0.1 M Triethylammonium acetate (TEAA) Buffer (pH 7.0)
B 液：0.1 M TEAA Buffer : Acetonitrile = 1 : 1
gradient： B 液濃度 8-20% (30 min)
流速： 3 mL/min for preparation
1 mL/min
温度： 50 °C
検出： UV (254 nm)

MALDI-TOF Mass スペクトル測定

オリゴヌクレオチドの組成は、MALDI-TOF Mass 測定にて確認した。Bruker Daltonics® Autoflex TOF/TOF を用いて、以下の条件で測定した。マトリックス (2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン-水和水物:クエン酸三アンモニウム = 1:1) 1 µL をサンプルプレート上で乾燥させ、その後オリゴヌクレオチド 1 µL を添加して乾燥させることで、測定サンプルを調整した。測定はネガティブモードで行った。

オリゴヌクレオチドの定量

260 nm での紫外吸収を測定し、オリゴヌクレオチドの定量を行った。なお、天然型ヌクレオシドのモル吸光係数 ϵ_{260} は以下の値を用いた。²⁶⁾

ϵ_{260} : A, 15400 ; G, 11500 ; C, 7400 ; T, 8700 ; C(2'-deoxy-5-methylcytidine), 6000.

クリックケミストリーによる Huisgen 反応

試薬は番号順にエッペンドルフチューブに入れて、混和した。全ての試薬を混和した反応液は、遮光下、室温でシェイカーを用いて攪拌した (1000 rpm)。

反応条件 1

反応時間 15 時間

1. 2 mM 硫酸銅水溶液 (2.0 eq.)
2. 2 mM アスコルビン酸ナトリウム水溶液 (2.0 eq.)
3. 100 mM リン酸バッファ (pH 7.0)

4. ODN1

5. アジド試薬 THF 溶液 (2.2 eq.) 全量 10 μ L 10%THF 溶液、ODN1 終濃度 100 μ M

反応条件 2

反応時間 15 時間

1. 2 mM 硫酸銅水溶液 (4.0 eq.)
2. 2 mM アスコルビン酸ナトリウム水溶液 (4.0 eq.)
3. 100 mM リン酸バッファ (pH 7.0)

4. ODN1

5. アジド試薬 THF 溶液 (5.0 eq.) 全量 10 μ L 10%THF 溶液、ODN1 終濃度 100 μ M

反応条件 3

反応時間 2 分

1. 2 mM 硫酸銅水溶液 (2.0 eq.)
2. TBTA DMSO 溶液 (4.0 eq.)
3. 2 mM アスコルビン酸ナトリウム水溶液 (4.0 eq.)
4. 100 mM リン酸バッファ (pH 7.0)

5. ODN1

6. アジド試薬 DMSO 溶液 (10 eq.) 全量 10 μ L 10%DMSO 溶液、ODN1 終濃度 100 μ M

反応条件 4

反応時間 5 分

1. 2 mM 硫酸銅水溶液 (2.0 eq.)
2. TBTA DMSO 溶液 (4.0 eq.)
3. 2 mM アスコルビン酸ナトリウム水溶液 (4.0 eq.)
4. 100 mM リン酸バッファ (pH 7.0)

5. ODN1

6. アジド試薬 DMSO 溶液 (10 eq.) 全量 10 μ L 30%DMSO 溶液、ODN1 終濃度 100 μ M

HPLC による Huisgen 反応の分析

Huisgen 反応の分析は以下の条件で行った。

カラム : Waters Xterra® MS C₁₈ 2.5 μ mol (4.6 mm x 50 mm)

移動相 : A 液 : 0.1 M Triethylammonium acetate (TEAA) Buffer (pH 7.0)

 B 液 : 0.1 M TEAA Buffer : Acetonitrile = 1 : 1

gradient : B 液濃度 8-20% (30 min) または 7-14% (30 min)

流速： 1 mL/min
温度： 50 °C
検出： UV (254 nm)

HPLC による Huisgen 反応の分取

Huisgen 反応による生成物の精製は以下の条件で行った。

カラム： Waters Xterra® MS C₁₈ 2.5 μmol (4.6 mm x 50 mm)
移動相： A 液： 0.1 M Triethylammonium acetate (TEAA) Buffer (pH 7.0)
B 液： 0.1 M TEAA Buffer : Acetonitrile = 1 : 1
gradient： B 液濃度 8-20% (30 min) または 7-14% (30 min)
流速： 1 mL/min for preparation
温度： 50 °C
検出： UV (254 nm)

MALDI-TOF Mass スペクトルデータ

実験項の最後にまとめて記載。

第一章第二節の実験

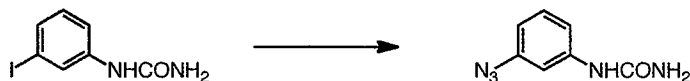
第一章第一節の反応条件 4 と同条件下、各種アジド試薬を用いて基質一般性の検討を行った。ただし、Entry9 に示した 4-アジドアニリン塩酸塩は水溶液とし、リン酸バッファの代わりに DMSO を用いることで、最終的に 30%DMSO 溶液とした。また、RP-HPLC による ODN1-a-ODN1-o の分析・分取、MALDI-TOF Mass 条件も第一節と同条件を用いた。

第一章第三節の実験

融解温度(T_m)測定 (二重鎖形成能の評価)

終濃度をそれぞれ塩化ナトリウム 100 mM、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 10 mM、各オリゴヌクレオチド鎖 3.0 μM としたサンプル溶液 (130 μL) を沸騰水中に浴し、12 時間かけて室温まで冷ました。窒素気流下、サンプル溶液を 20 °C に 5 分間保った後測定を開始した。毎分 0.5 °C の割合で 90 °C まで昇温し、0.5 °C の間隔で 260 nm における吸光度をプロットした。また、 T_m 値は微分法により算出した。

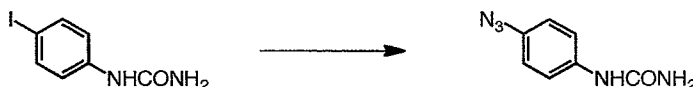
第二章第一節の実験



1-(3-Azidephenyl)urea

1-(3-ヨードフェニル)-ウレア (20 mg, 76.6 μmol) のジメチルスルホキシド-水混合溶液 (5:1, 1.0 mL) にアジ化ナトリウム (10 mg, 15.3 mmol)、ヨウ化銅(I) (1.5 mg, 7.66 μmol)、アスコルビン酸ナトリウム (3.5 mg, 17.7 μmol)、*N,N'*-ジメチルエチレンジアミン (1.0 μL , 9.23 μmol) を加えて室温で 10 時間攪拌した。水を加えて酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層を減圧留去した後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン:アセトン = 3:1) にて精製し、目的の化合物 (12.6 mg, 93%) を得た。

Yellow solids. mp 137–139 °C; IR ν_{max} (KBr) 3508, 3376, 3318, 3201, 3141, 3086, 2116, 1659, 1592, 1552, 1487, 1439, 1349, 1317, 1307 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CD_3OD) δ 6.67 (1H, ddd, J = 2.0, 8.0, 10.0 Hz), 7.04 (1H, ddd, J = 2.0, 8.5, 10.0 Hz), 7.24 (1H, dd, J = 8.0, 8.5 Hz), 7.31 (1H, dd, J = 2.0, 2.0 Hz); ^{13}C -NMR (CD_3OD) δ : 110.3, 113.8, 116.4, 131.1, 141.9, 142.6, 159.1; MS (FAB) m/z 178 [$M+\text{H}$] $^+$; Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_5\text{O}$: C, 47.46; H, 3.98; N, 39.53. Found: C, 47.61; H, 4.10; N, 39.30.



1-(4-Azidophenyl)urea

1-(4-ヨードフェニル)-ウレア (40 mg, 153 μmol) のジメチルスルホキシド-水混合溶液 (5:1, 3.0 mL) にアジ化ナトリウム (20 mg, 30.5 μmol)、ヨウ化銅(I) (2.9 mg, 15.3 μmol)、アスコルビン酸ナトリウム (6.5 mg, 32.8 μmol)、*N,N'*-ジメチルエチレンジアミン (1.7 μL , 15.6 μmol) を加えて室温で 12 時間攪拌した。水を加えて酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層を減圧留去した後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル = 4:1) にて精製し、目的の化合物 (23.8 mg, 88%) を得た。

Yellow solids. mp 174–177°C; IR ν_{max} (KBr) 3418, 3351, 3318, 2575, 2491, 2449, 2141, 1613, 1581, 1534, 1512, 1485 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CD_3OD) δ 6.96 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.38 (2H, d, J = 8.0 Hz); ^{13}C -NMR (CD_3OD) δ : 120.3, 121.9, 135.5, 138.1, 159.3. MS (FAB) m/z 178 [$M+\text{H}$] $^+$; Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_5\text{O}$: C, 47.46; H, 3.98; N, 39.53. Found: C, 47.44; H, 4.09; N, 39.13.

融解温度(T_m)測定 (三重鎖形成能の評価)

終濃度をそれぞれ塩化カリウム 140 mM、塩化マグネシウム 10 mM、リン酸ナトリウム緩衝液

(pH 7.0) 7 mM、各オリゴヌクレオチド鎖 1.5 μ M としたサンプル溶液 (130 μ L) を沸騰水中に浴し、12 時間かけて室温まで冷ました。窒素気流下、サンプル溶液を 5 $^{\circ}$ C まで冷却し、さらに 20 分間 5 $^{\circ}$ C に保った後測定を開始した。毎分 0.5 $^{\circ}$ C の割合で 85 $^{\circ}$ C まで昇温し、0.5 $^{\circ}$ C の間隔で 260 nm における吸光度をプロットした。また、 T_m 値は微分法により算出した。

融解温度(T_m)測定 (三重鎖形成能の評価)

終濃度をそれぞれ塩化カリウム 100 mM、塩化マグネシウム 50 mM、カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) 10 mM、各オリゴヌクレオチド鎖 1.89 μ M としたサンプル溶液 (130 μ L) を沸騰水中に浴し、6-12 時間かけて室温まで冷ました。窒素気流下、サンプル溶液を 5 $^{\circ}$ C まで冷却し、さらに 30 分間 5 $^{\circ}$ C に保った後測定を開始した。毎分 0.5 $^{\circ}$ C の割合で 90 $^{\circ}$ C まで昇温し、0.5 $^{\circ}$ C の間隔で 260 nm における吸光度をプロットした。また、 T_m 値は中線法により算出した。

MALDI-TOF Mass スペクトルデータ

実験項の最後にまとめて記載。

第二章第二節の実験

2-[3',5'-Di-*O*-acetyl-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)]-5-(trimethylsilyl)ethynylthiophene (6)

アルゴン気流下、化合物 5 (310 mg, 0.856 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (7 mL) に、トリエチルアミン (2 mL)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) (100 mg, 0.0856 mmol)、ヨウ化銅(I) (33 mg, 0.171 mmol) を加えて脱気、アルゴン置換した。トリメチルシリルアセチレン (360 μ L, 2.57 mmol) を加えて室温で 22 時間攪拌した。セライト濾過後、溶媒留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 5:1) で精製し、化合物 6 (187 mg, quant.) を得た。

Brown oil. $[\alpha]_D^{25}$ -3.9 (c 1.24, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr) 2960, 2145, 1438, 1370, 1165, 1065, 1022 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.24 (9H, s), 2.05 (3H, s), 2.10 (1H, ddd, J = 2.5, 10.0, 14.5 Hz), 2.16 (3H, s), 2.23 (1H, ddd, J = 2.5, 5.0, 14.5 Hz), 3.86 (1H, dd, J = 10.0, 11.0 Hz), 3.91 (1H, dd, J = 5.0, 11.0 Hz), 4.94 (1H, dd, J = 2.5, 10.0 Hz), 5.02 (1H, ddd, J = 3.0, 5.0, 10.0 Hz), 5.46 (1H, ddd, J = 2.5, 3.0, 5.0 Hz), 6.81 (1H, d, J = 4.0 Hz), 7.08 (1H, d, 4.0 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : -0.19, 20.8, 21.1, 36.1, 64.1, 66.7, 67.3, 70.3, 97.3, 99.1, 123.0, 123.8, 132.3, 145.5, 169.9, 170.1; MS (EI) m/z 380 (M^+ , 25); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{SSi}$: 380.1114. Found 380.1101.

2-(2'-Deoxy-D-ribofuranosyl)-5-ethynylthiophene (7)

窒素気流下、化合物 6 (240 mg, 0.631 mmol) の無水メタノール溶液 (5 mL) に、炭酸カリウム (44 mg, 0.316 mmol) を加えて室温で 30 分間攪拌した。溶媒留去後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 1:3) で精製し、化合物 7 (142 mg, quant.) を得た。

Light yellow solids. mp 82–84 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ 8.5 (c 1.23, CHCl₃); IR ν_{max} (KBr) 3289, 2924, 1340, 1228, 1077, 1005 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.97 (1H, ddd, J = 2.5, 11.0, 14.0 Hz), 2.07 (1H, s), 2.25 (1H, ddd, J = 2.5, 4.5, 14.0 Hz), 2.36 (1H, d, J = 1.0 Hz), 3.32 (1H, s), 3.75 (1H, dd, J = 10.0, 10.0 Hz), 3.85–3.90 (2H, m), 4.20 (1H, m), 4.97 (1H, dd, J = 2.5, 11.0 Hz), 6.80 (1H, d, J = 3.5 Hz), 7.13 (1H, d, J = 3.5 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 38.7, 66.3, 66.8, 66.9, 69.4, 76.9, 81.3, 121.2, 123.5, 129.3, 132.8, 146.9; MS (EI) m/z 224 (M⁺, 49); HRMS (EI) m/z Calcd for C₁₁H₁₂O₃S: 224.0507. Found 224.0484.

2-[5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)]-5-ethynylthiophene (8)

窒素気流下、化合物 7 (68 mg, 0.304 mmol) の無水ピリジン溶液 (5 mL) に、氷冷下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (123 mg, 0.364 mmol) を加えて室温で 6 時間攪拌した。氷冷下、水を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒留去後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 5:1) で精製し、化合物 8 (150 mg, 95%) を得た。

Colorless syrup. $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -9.7 (c 1.01, CHCl₃); IR ν_{max} (KBr) 1607, 1509, 1461, 1300, 1251, 1177, 1059, 1034 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.61 (1H, dddd, J = 2.0, 2.5, 11.5, 14.0 Hz), 2.05 (1H, ddd, J = 2.5, 6.0, 14.0 Hz), 2.49 (1H, d, J = 2.0 Hz), 3.18–3.22 (1H, m), 3.28 (1H, s), 3.40–3.43 (1H, m), 3.78–3.80 (8H, m), 4.88 (1H, dd, J = 2.5, 11.5 Hz), 6.70 (1H, d, J = 4.0 Hz), 6.82–6.86 (4H, m), 7.07 (1H, d, J = 4.0 Hz), 7.24–7.48 (9H, m); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 38.7, 55.3, 65.5, 66., 68.9, 69.3, 81.1, 86.9, 113.0, 113.4, 121.0, 123.3, 127.1, 127.9, 128.1, 130.0, 132.8, 136.1, 136.3, 145.2, 158.8; MS (EI) m/z 526 (M⁺, 48); HRMS (EI) m/z Calcd for C₃₂H₃₀O₅S: 526.1814. Found 526.1806.

2-[3'-O-{2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino}-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)]-5-ethynylthiophene (9)

窒素気流下、化合物 7 (50 mg, 0.0949 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (1 mL) に、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (50 μ L, 0.285 mmol) を加えた。氷冷下、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (26 μ L, 0.114 mmol) を加えて室温で 5 時間攪拌した。氷冷下、飽和重層水を加え室温で 30 分間攪拌後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和重層水、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒留去後、フラッシュシリカゲルカラム

クロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 7:1) で精製し、化合物 **9** (62 mg, 89%) を得た。
Colorless syrup. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.14 (4.4H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.21-1.28 (6H, m), 1.36 (1.6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.61-1.70 (1H, m), 1.98-2.05 (0.74H, m), 2.10-2.16 (0.26H, m), 2.52-2.65 (2H, m), 3.06-3.14 (1H, m), 3.67-4.08 (14H, m), 4.82-4.87 (1H, m), 6.67-6.73 (1H, m), 6.80-6.85 (4H, m), 7.06-7.11 (1H, m), 7.20-7.44 (9H, m); $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ : 147.6, 149.8; MS (FAB) m/z 727 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (FAB) m/z Calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 727.2965. Found 727.2963.

2-[5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)]-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-propionamide (12)

窒素気流下、化合物 **11** (170 mg, 0.355 mmol) の無水ジクロロメタン (3 mL) 溶液に、プロパルギルアミン (27 μL , 0.426 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (82 mg, 0.426 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (9 mg, 0.0711 mmol) を加え、11 時間撹拌した。水を加えてジクロロメタンで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒留去後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 1:3) で精製し、化合物 **12** (170 mg, 93%) を得た。

Colorless syrup. $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -13.8 (c 1.12, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr) 3288, 2931, 1656, 1607, 1509, 1444, 1300, 1251, 1082, 1034 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.72 (1H, d, $J = 3.5$ Hz), 1.83 (1H, ddd, $J = 5.5, 9.5, 13.0$ Hz), 2.00 (1H, ddd, $J = 2.0, 4.0, 13.0$ Hz), 2.13 (1H, t, $J = 2.5$ Hz), 2.44 (1H, dd, $J = 8.5, 15.5$ Hz), 2.55 (1H, dd, $J = 3.0, 15.5$ Hz), 3.16 (1H, dd, $J = 5.5, 10.0$ Hz), 3.24 (1H, dd, $J = 5.0, 10.0$ Hz), 3.80 (6H, s), 3.98 (1H, ddd, $J = 2.5, 5.0, 5.0$ Hz), 4.31-4.36 (1H, m), 4.41-4.51 (1H, m), 6.70 (1H, brs), 6.81-6.86 (4H, m), 7.22-7.44 (9H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 28.9, 40.7, 42.0, 55.2, 64.3, 71.3, 73.8, 74.7, 79.6, 86.2, 86.4, 113.1, 126.8, 127.8, 128.1, 130.0, 135.8, 144.7, 158.5, 170.5; MS (EI) m/z 515 (M^+ , 100); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{NO}_6$: 515.2308. Found 515.2307.

2-[3'-*O*-{2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino}-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)]-*N*-(prop-2-yn-1-yl)-propionamide (13)

窒素気流下、化合物 **12** (100 mg, 0.194 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (100 μL , 0.582 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロホスホロアミダイト (52 μL , 0.233 mmol) を加えて 3 時間撹拌した。飽和重層水を加えて室温で 0.5 時間撹拌した後、溶媒留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 1:1) で精製し、化合物 **13** (125 mg, 90%) を得た。

Colorless syrup. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.08 (4H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.12-1.18 (8H, m), 1.75-1.84 (1H, m), 2.05-2.21 (2H, m), 2.40-2.48 (2H, m), 2.56-2.60 (2H, m), 3.14-3.20 (2H, m), 3.51-3.88 (10H, m), 3.95-4.00 (2H, m), 4.10-4.13 (1H, m), 4.40-4.45 (2H, m), 6.68 (1H, brs), 6.81-6.85 (4H, m),

7.20-7.34 (7H, m), 7.42-7.45 (2H, m); ^{31}P -NMR (CDCl_3) δ : 147.7, 148.2; HRMS (MALDI-TOF) m/z Calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{P}$ [$M+\text{Na}$] $^{+}$: 738.3279. Found 738.3297.

1-(β)-Prop-2-ynyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (15)

窒素気流下、化合物 13 (1.2 g, 2.37 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) に、 -78°C で水素化ジイソブチルリチウム (5.1 mL, 4.74 mmol) を 5 分間かけて滴下し、 -78°C で 30 分撹拌した。飽和重層水を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去後、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン/酢酸エチル = 1:2) で簡易精製し、化合物 14 (1.0 g, 92%) を得た。

続いて、窒素気流下、化合物 14 (500 mg, 1.08 mmol) の無水メタノール溶液 (10 mL) に炭酸カリウム (450 mg, 3.24 mmol)、大平-ベストマン試薬 (250 mg, 1.30 mmol) を加え、室温で 5 時間撹拌した。溶媒を減圧留去後、水を加えて酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を水、飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去後、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン/酢酸エチル = 2:1) で精製し、化合物 15 (420 mg, 90%) を得た。

Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ 8.4 (c 1.06, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr) 2932, 1607, 1509, 1462, 1444, 1301, 1251, 1177, 1085, 1035 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.92-2.02 (3H, m), 2.43-2.49 (2H, m), 3.09 (1H, dd, J = 6.0, 10.0 Hz), 3.24 (1H, dd, J = 4.5, 10.0 Hz), 3.77 (6H, s), 3.93-3.94 (1H, m), 4.29-4.34 (2H, m), 6.81-6.83 (4H, m), 7.22-7.44 (9H, m); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 25.0, 39.7, 55.1, 64.5, 70.0, 74.4, 76.3, 80.2, 85.9, 86.1, 113.0, 126.7, 127.7, 128.1, 130.0, 136.0, 144.8, 158.4; MS (EI) m/z 458 (M^+ , 100); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_5$: 458.2093. Found 458.2089.

1-(β)-Prop-2-ynyl-3-*O*-(2-cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino)-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (16)

窒素気流下、化合物 15 (190 mg, 0.414 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (5 mL) に N,N -ジイソプロピルエチルアミン (210 μL , 1.24 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (120 μL , 0.539 mmol) を加え、室温で 1.5 時間撹拌した。水を加えて、溶媒を減圧留去後、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン/酢酸エチル = 5:1) で精製し、化合物 16 (237 mg, 87%) を得た。

Colorless syrup. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.08 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.13-1.18 (9H, m), 1.91-1.96 (2H, m), 2.06-2.21 (1H, m), 2.43-2.46 (1H, m), 2.50-2.55 (2H, m), 2.60 (1H, t, J = 6.5 Hz), 3.11-3.16 (2H, m), 3.52-3.81 (10H, m), 4.10-4.15 (1H, m), 4.30-4.33 (1H, m), 4.44-4.48 (1H, m), 6.79-6.83 (4H, m), 7.19-7.36 (7H, m), 7.44-7.47 (2H, m); ^{31}P -NMR (CDCl_3) δ : 147.1, 147.7; MS (FAB) m/z 681 [$M+\text{Na}$] $^{+}$; HRMS (FAB) m/z Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{P}$ [$M+\text{Na}$] $^{+}$: 681.3069. Found 681.3093.

1-(β)-But-3-ynyl-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (18)

窒素気流下、化合物 13 (1.2 g, 2.37 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (20 mL) に水素化アルミニウムリチウム (360 mg, 9.47 mmol) を加え、室温で 9 時間撹拌した。水を加えて、酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去後、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 5:1) で簡易精製し、アルコール体 (1.1g, quant) を得た。この化合物は一部そのまま次の反応に用いた。

窒素気流下、アルコール体 (500 mg, 1.08 mmol) の無水ピリジン溶液 (10 mL) に *p*-トルエンスルホンクロリド (246 mg, 1.29 mmol) を加えて室温で 12 時間撹拌した。水を加えて酢酸エチルで抽出した後、水、飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥させた。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 3:2) で精製し、化合物 17 (539 mg, 81%) を得た。この化合物は一部そのまま次の反応に用いた。

窒素気流下、化合物 17 (250 mg, 0.404 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (3 mL) に、リチウムアセチリド・エチレンジアミン錯体 (82 mg, 0.889 mmol) を加えて室温で 9 時間撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後ジエチルエーテルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒留去後、得られた粗成績体をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 3:2) で精製し、化合物 18 (124 mg, 65%) を得た。

Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ 3.0 (*c* 0.31, CHCl₃); IR ν_{max} (KBr) 2933, 1607, 1509, 1445, 1301, 1251, 1177, 1074, 1034 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.73-1.80 (2H, m), 1.92-1.99 (3H, m), 2.27-2.36 (2H, m), 3.06 (1H, dd, *J* = 6.0, 10.0 Hz), 3.20 (1H, dd, *J* = 5.0, 10.0 Hz), 3.77 (6H, s), 3.86-3.90 (1H, m), 4.26-4.33 (2H, m), 6.80-6.83 (4H, m), 7.17-7.44 (9H, m); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 15.3, 34.5, 40.4, 55.1, 64.4, 68.5, 74.6, 83.9, 85.6, 86.1, 113.1, 126.7, 127.6, 128.1, 130.0, 136.0, 144.8, 158.4; HRMS (MALDI-TOF) *m/z* Calcd for C₃₀H₃₂NaO₅ [*M*+Na]⁺: 495.2142. Found 495.2141.

1-(β)-But-3-ynyl-3-*O*-(2-cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino)-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (19)

窒素気流下、化合物 18 (90 mg, 0.190 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (97 μ L, 0.571 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (51 μ L, 0.223 mmol) を加え、室温で 5 時間撹拌した。水を加えて、溶媒を減圧留去後、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 1:1) で精製し、化合物 19 (124 mg, 97%) を得た。

Colorless oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.17 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.13-1.18 (9H, m), 1.74-1.89 (3H, m), 1.97-2.13 (2H, m), 2.30-2.46 (3H, m), 2.44 (1H, m), 3.07-3.18 (2H, m), 3.52-3.85 (10H, m), 4.05-4.11 (1H, m), 4.26-4.32 (1H, m), 4.40-4.47 (1H, m), 6.80-6.84 (4H, m), 7.16-7.46 (9H, m); ³¹P-NMR (CDCl₃) δ : 147.5, 147.7; MS (FAB) *m/z* 673 [*M*+H]⁺; HRMS (FAB) *m/z* Calcd for C₃₉H₅₀N₂O₆P [*M*+H]⁺: 673.3407. Found 673.3434.

1-(β)-Prop-2-ynoxy-3,5-di-*O*-toluoyl-2-deoxy-D-ribofuranose (21 β)

窒素気流下、化合物 **20** (3.0 g, 7.71 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (75 mL) に氷冷下、プロパルギルアルコール (360 μ L, 9.25 mmol) を加えて室温で 6 時間攪拌した。水を加えた後酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重層水、水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒留去後、得られた粗成績体をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 5:1) で精製し、化合物 **21 β** (1.2 g, 39%) を得た。

Colorless oil. $[\alpha]_D^{26}$ 138.0 (*c* 1.00, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr) 1718, 1611, 1273, 1178, 1109, 1020 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.29 (1H, dd, J = 2.0, 14.5 Hz), 2.40-2.41 (7H, m), 2.54-2.61 (1H, m), 4.28 (1H, dd, J = 2.5, 15.5 Hz), 4.50-4.56 (2H, m), 4.62-4.66 (1H, m), 5.42-5.46 (1H, m), 5.51 (1H, d, J = 5.5 Hz), 7.21-7.24 (4H, m), 7.90-7.95 (4H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 21.6, 21.7, 39.2, 54.2, 64.1, 74.2, 74.4, 81.5, 102.2, 122.4, 126.9, 127.0, 129.1, 129.1, 129.6, 129.8, 143.8, 143.9, 166.2, 166.4; MS (EI) m/z 408 (M^+ , 100); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_6$: 408.1573. Found 408.1580.

1-(β)-Prop-2-ynoxy-2-deoxy-D-ribofuranose (22)

窒素気流下、化合物 **21 β** (600 mg, 1.47 mmol) の無水メタノール溶液 (5 mL) に、ソジウムメトキシド (240 mg, 4.41 mmol) を加えて室温で 5 時間攪拌した。溶媒留去後、得られた粗成績体をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 1:7) で精製し、化合物 **22** (251 mg, quant) を得た。

Colorless oil. $[\alpha]_D^{26}$ 216.4 (*c* 1.00, CD_3OD); IR ν_{max} (KBr) 3284, 2928, 1086, 1034 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.78 (1H, ddd, J = 1.5, 3.5, 14.0 Hz), 2.26 (1H, ddd, J = 5.0, 8.0, 14.0 Hz), 2.70 (1H, t, J = 2.5 Hz), 3.48 (1H, dd, J = 5.0, 12.0 Hz), 3.57 (1H, dd, J = 3.5, 12.0 Hz), 3.80-3.84 (1H, m), 4.02-4.06 (1H, m), 5.25 (1H, dd, J = 1.5, 5.5 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 42.2, 54.7, 63.0, 72.2, 75.4, 80.5, 87.0, 103.1; MS (FAB) m/z 174 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (FAB) m/z Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 173.0814. Found 173.0809.

1-(β)-Prop-2-ynoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribofuranose (23)

窒素気流下、化合物 **22** (120 mg, 0.697 mmol) の無水ピリジン溶液 (5 mL) に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (283 mg, 0.836 mmol) を加えて室温で 6 時間攪拌した。水を加えた後酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒留去後、得られた粗成績体をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 2:1) で精製し、化合物 **23** (324 mg, 98%) を得た。

Colorless oil. $[\alpha]_D^{23}$ 86.5 (*c* 1.03, CDCl_3); IR ν_{max} (KBr) 1607, 1509, 1444, 1301, 1251, 1177, 1084, 1034 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.07 (1H, d, J = 13.5 Hz), 2.25-2.31 (1H, m), 2.43 (1H, t, J = 2.5

Hz), 3.16 (2H, d, $J = 4.5$ Hz), 3.77 (6H, s), 4.19-4.24 (2H, m), 4.28 (1H, dd, $J = 1.0, 2.5$ Hz), 5.46 (1H, d, $J = 5.0$ Hz), 6.80-6.83 (4H, m), 7.17-7.32 (7H, m), 7.40-7.42 (2H, m). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 14.1, 41.1, 53.9, 55.1, 63.9, 73.2, 74.3, 79.3, 86.0, 86.9, 102.7, 113.0, 126.7, 127.7, 128.0, 130.0, 135.8, 135.9, 144.7, 158.4; MS (FAB) m/z 697 $[M+\text{Na}]^+$; HRMS (FAB) m/z Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{NaO}_6$ $[M+\text{Na}]^+$: 497.1935. Found 497.1944.

1-(β)-Prop-2-ynoxy-3-*O*-{2-cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino}-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-deoxy-D-ribose (24)

窒素気流下、化合物 **23** (70 mg, 0.148 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (75 μL , 0.443 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (40 μL , 0.177 mmol) を加え、室温で 15 時間攪拌した。水を加えて、溶媒を減圧留去後、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 4:1) で精製し、化合物 **24** (90 mg, 90%) を得た。

Colorless oil. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.00 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 1.11-1.16 (9H, m), 1.86-1.98 (3H, m), 2.52-2.62 (1H, m), 3.08-3.14 (1H, m), 3.28-3.41 (1H, m), 3.51-3.60 (3H, m), 3.78 (6H, s), 4.12-4.34 (4H, m), 5.43 (1H, m), 6.80-6.84 (4H, m), 7.19-7.35 (7H, m), 7.42-7.46 (2H, m); ^{31}P -NMR (CDCl_3) δ : 147.3, 148.2; MS (FAB) m/z 697 $[M+\text{Na}]^+$; HRMS (FAB) m/z Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{P}$ $[M+\text{Na}]^+$: 697.3019. Found 697.3049.

2-{3',5'-Di-*O*-toluoyl-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)}-N-(prop-2-yn-1-yl)-acetamide (26)

窒素気流下、化合物 **25** (180 mg, 0.452 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (3 mL) に、4-ジメチルアミノピリジン (11 mg, 0.108 mmol)、プロパルギルアミン (35 μL , 0.542 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (104 mg, 0.542 mmol) を加えて室温で 1 時間攪拌した。水を加えた後ジクロロメタンで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒留去後、得られた粗成績体をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 3:1) で精製し、化合物 **26** (138 mg, 70%) を得た。

Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 22.3 (c 0.96, CDCl_3); IR ν_{max} (KBr) 1718, 1679, 1272, 1105 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 2.14 (1H, t, $J = 2.5$ Hz), 2.27 (1H, ddd, $J = 4.0, 10.5, 14.0$ Hz), 2.42 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.53 (1H, ddd, $J = 1.0, 6.5, 14.0$ Hz), 3.92 (1H, ddd, $J = 2.5, 5.5, 17.5$ Hz), 4.03 (1H, ddd, $J = 2.5, 6.0, 17.5$ Hz), 4.51-4.74 (4H, m), 5.51-5.54 (1H, m), 7.03 (1H, dd, $J = 5.5, 6.0$ Hz), 7.26 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.93 (2H, d, $J = 8.0$ Hz); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 21.7, 21.7, 28.5, 37.0, 64.1, 71.5, 76.0, 78.7, 78.9, 84.4, 126.5, 126.6, 129.2, 129.3, 129.7, 129.7, 144.3, 144.4, 166.0, 166.6, 171.0; MS (EI) m/z 435 (M^+ , 100); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_6$: 435.1682. Found 435.1677.

2-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)-N-(prop-2-yn-1-yl)-acetamide (27)

窒素気流下、化合物 **26** (80 mg, 0.184 mmol) の無水メタノール溶液 (2 mL) に、ソジウムメトキシド (30 mg, 0.551 mmol) を加えて室温で 10 時間撹拌した。溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製し、化合物 **27** (25 mg, 68%) を得た。

Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 42.1 (c 0.97, CH_3OH); IR ν_{max} (KBr) 3295, 1660, 1536, 1095, 1059 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 2.06 (1H, ddd, J = 6.0, 8.0, 13.0 Hz), 2.23 (1H, ddd, J = 4.0, 8.0, 13.0 Hz), 2.58 (1H, t, J = 2.5 Hz), 3.58 (1H, dd, J = 5.0, 12.0 Hz), 3.68 (1H, dd, J = 4.0, 12.0 Hz), 3.89 (1H, ddd, J = 3.0, 4.0, 5.0 Hz), 3.98 (1H, dd, J = 2.5, 7.5 Hz), 3.99 (1H, dd, J = 2.5, 7.5 Hz), 4.21 (1H, ddd, J = 3.0, 4.0, 6.0 Hz), 4.51 (1H, t, J = 8.0 Hz); ^{13}C -NMR (CD_3OD) δ : 29.0, 40.3, 62.8, 72.2, 72.3, 78.8, 80.3, 89.1, 175.2; MS (EI) m/z 199 (M^+ , 33); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_4$: 199.0845. Found 199.0862.

2-{5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)}-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)}-N-(prop-2-yn-1-yl)-acetamide (28)

窒素気流下、化合物 **27** (21 mg, 0.105 mmol) の無水ピリジン溶液 (2 mL) に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (50 mg, 0.148 mmol) を加え、室温で 11 時間撹拌した。水を加えた後酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン/酢酸エチル = 1:2) で精製し、化合物 **28** (49 mg, 93%) を得た。

Colorless syrup. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 31.1 (c 10.3, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr) 1667, 1510, 1251, 1177, 1034 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 2.09 (1H, t, J = 2.5 Hz), 2.25 (1H, ddd, J = 6.0, 8.0, 13.0 Hz), 2.33 (1H, ddd, J = 4.0, 8.0, 13.0 Hz), 3.26 (1H, dd, J = 4.5, 10.0 Hz), 3.68 (1H, dd, J = 4.0, 10.0 Hz), 3.74 (1H, ddd, J = 2.5, 5.0, 17.5 Hz), 3.79 (6H, s), 3.96-4.04 (2H, m), 4.34 (1H, dt, J = 4.0, 6.0 Hz), 4.59 (1H, t, J = 8.0 Hz), 6.82-6.86 (4H, m), 7.08 (1H, t, J = 5.0 Hz) 7.22-7.43 (9H, m); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 28.5, 39.1, 55.2, 63.0, 71.5, 72.2, 77.5, 79.1, 86.0, 86.6, 113.2, 126.9, 127.9, 128.0, 130.0, 135.5, 144.4, 158.5, 172.7; MS (EI) m/z 501 (M^+ , 35); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{NO}_6$: 501.2151. Found 501.2158.

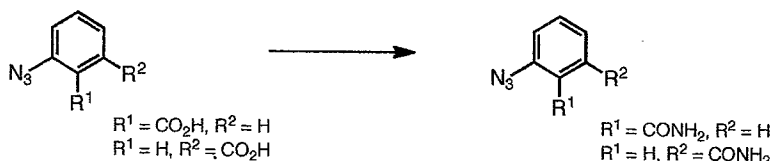
2-[3'-O-{2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino}-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)}-(2'-deoxy-D-ribofuranosyl)]-N-(prop-2-yn-1-yl)-acetamide (29)

化合物 **28** (40 mg, 0.0798 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン (41 μL , 0.239 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (21 μL , 0.0957 mmol) を加え、室温で 3 時間撹拌した。飽和重層水を加えて室温で 30 分撹拌後、酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン/酢酸エチル = 3:1) で精製し、化合物 **29**

(51 mg, 91%) を得た。

Colorless syrup. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.06-1.19 (12H, m), 2.08-2.09 (1H, m), 2.25-2.32 (1H, m), 2.34-2.51 (2H, m), 2.60 (1H, t, $J = 6.5$ Hz), 3.20-3.38 (2H, m), 3.51-3.89 (11H, m), 4.02-4.18 (2H, m), 4.42-4.51 (1H, m), 4.56-4.62 (1H, m), 6.82-6.87 (4H, m), 7.05-7.20 (1H, m), 7.23-7.44 (9H, m); $^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ : 148.2, 148.9; HRMS (MALDI-TOF) m/z Calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 724.3122. Found 724.3124.

アジド合成



窒素気流下、2-アジド安息香酸 (200 mg, 1.23 mmol) に塩化チオニル (1 mL) を加えて 2 時間加熱還流した。溶媒留去後、氷冷下 10%アンモニア水溶液 (3 mL) を加え、0.5 時間攪拌した。クロロホルムで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧留去後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 10:1) で精製し、2-アジドベンズアミド (185 mg, 93%) を得た。

2-Azidobenzamide: Yellow solids. mp 130–131 °C; IR ν_{max} (KBr) 3368, 3168, 2130, 2103, 1655, 1620, 1599, 1574, 1483, 1452, 1403, 1230, 1163, 1127, 1084 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 7.25 (1H, dt, $J = 1.5, 7.5$ Hz), 7.33 (1H, dd, $J = 1.5, 7.5$ Hz), 7.50 (1H, dt, $J = 1.5, 7.5$ Hz), 7.56 (1H, brs), 7.57 (1H, dd, $J = 1.5, 7.5$ Hz), 7.73 (1H, brs); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 119.7, 124.8, 128.3, 129.7, 131.4, 136.6, 167.1; MS (EI) m/z 162 (M^+ , 100); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_4\text{O}$: 162.0542. Found 162.0550.

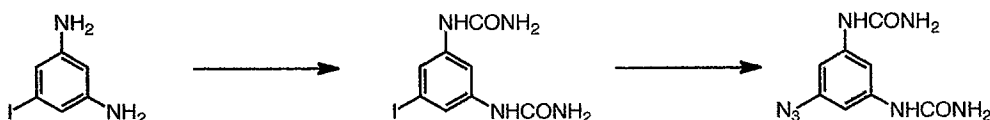
3-Azidobenzamide: Brown solids. mp 135–136 °C; IR ν_{max} (KBr) 3358, 3171, 2198, 2113, 1658, 1624, 1581, 1483, 1444, 1395, 1314, 1288, 1164, 1129 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 7.25 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.46 (1H, brs), 7.48 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.58 (1H, s), 7.68 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 8.06 (1H, brs); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 118.0, 121.9, 124.2, 130.0, 136.0, 139.6, 167.1; MS (EI) m/z 162 (M^+ , 100); HRMS (EI) m/z Calcd for $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_4\text{O}$: 162.0542. Found 162.0546.



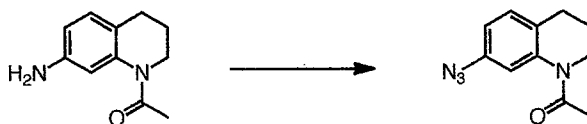
$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$ (41 mg, 0.1 mmol) に 4N 塩酸-ジオキサン溶液 (1 mL) を加えて 80 °C で 1 時間攪拌した。減圧留去後、得られた化合物をジメチルスルホキシド/水 = 1:1 の溶液 2 mL に溶かし、そのまま Huisgen 反応に用いた。



$\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_4$ (44 mg, 0.1 mmol) に 4N 塩酸・ジオキサン溶液 (1 mL) を加えて 80°C で 1 時間攪拌した。減圧留去後、得られた化合物をジメチルスルホキシド/水 = 2:1 の溶液 2 mL に溶かし、そのまま Huisgen 反応に用いた。



3,5-ジアミノヨードベンゼン (160 mg, 0.680 mmol) の 2N 塩酸水溶液 (1 mL) に水 (4 mL)、シアン酸カリウム (170 mg, 2.04 mmol) を加えて室温で 12 時間攪拌した。析出固体を濾過し、2N 塩酸水溶液、冷トルエンで洗浄した。得られた固体のジメチルスルホキシド/水混合溶液 (5:1, 3.0 mL) にアジ化ナトリウム (50 mg, 76.3 μmol)、ヨウ化銅(I) (6.0 mg, 31.0 μmol)、アスコルビン酸ナトリウム (15 mg, 75.6 μmol)、*N,N'*-ジメチルエチレンジアミン (4 μL , 36.7 μmol) を加えて室温で 12 時間攪拌した。水を加えて酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層を減圧留去した後、10 mM ジメチルスルホキシド溶液として Huisgen 反応に利用した。



N-アセチル-7-アミノテトラヒドロキノリン (270 mg, 1.42 mmol) のアセトニトリル溶液 (10 mL) に氷冷下、亜硝酸 *tert*-ブチル (270 μL , 2.28 mmol)、トリメチルシリルアジド (240 μL , 1.51 mmol) を加えて室温で 15 時間攪拌した。水を加えて酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和重層水、水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機層を減圧留去した後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 1:1) で精製し、*N*-アセチル-7-アジドテトラヒドロキノリン (280 mg, 91%) を得た。

Light yellow solids. mp 53–55 °C; IR ν_{max} (KBr) 2944, 2109, 2050, 1656, 1606, 1576, 1498, 1454, 1406, 1352, 1300, 1263, 1231, 1209, 1136, 1019 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.96 (2H, quin., J = 7.0 Hz), 2.72 (2H, t, J = 7.0 Hz), 3.76 (2H, t, J = 7.0 Hz), 6.79 (1H, d, J = 7.0 Hz), 6.94 (1H, brs), 7.12 (1H, d, J = 7.0 Hz); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 23.2, 23.6, 26.3, 43.2(br), 115.1, 115.2, 129.4, 137.5, 139.9(br), 169.7; MS (FAB) m/z 216 [$M+\text{Na}$] $^+$; HRMS (FAB) m/z Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$ [$M+\text{H}$] $^+$: 217.1084. Found 217.1087.

オリゴヌクレオチドの合成

標準的なホスホロアミダイト法に従い、オリゴヌクレオチドの合成を行った。合成機は nS-8 を使い、0.2 μmol または 1.0 μmol スケールで行い、反応活性化剤には 5-[3,5-ジ(トリフルオロメチル)フェニル]-2H-1,2,3,4-テトラゾール (Activator 42TM, Proligo[®])を用いた。合成したオリゴヌクレオチドは 28%アンモニア水 (室温、1.5 時間) で処理して固相カラムからの切り出しを行い、引き続き 28%アンモニア水 (55°C、12 時間) で処理し、脱保護を行った。固相抽出 (Sep-pak[®] Plus C18 Cartridge) により簡易精製した後、逆相 HPLC 精製を行った。

HPLC による精製及び純度確認

オリゴヌクレオチドの精製及び純度確認は以下の条件で行った。

カラム : Waters Xbridge[®] MS C₁₈ 2.5 μmol (4.6 mm x 50 mm)
 Waters Xbridge[®] MS C₁₈ 2.5 μmol (10 mm x 50 mm)
移動相 : A 液 : 0.1 M Triethylammonium acetate (TEAA) Buffer (pH 7.0)
 B 液 : 0.1 M TEAA Buffer : Acetonitrile = 1 : 1
gradient : B 液濃度 8-20% (30 min) または 7-15% (30 min)
流速 : 3 mL/min for preparation
 1 mL/min
温度 : 50 °C
検出 : UV (254 nm)

MALDI-TOF Mass スペクトル測定

オリゴヌクレオチドの組成は、MALDI-TOF Mass 測定にて確認した。Bruker Daltonics[®] Autoflex II TOF/TOF を用いて、以下の条件で測定した。マトリックス (2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン-水和物:クエン酸三アンモニウム = 1:1) 1 μL をサンプルプレート上で乾燥させ、その後オリゴヌクレオチド 1 μL を添加して乾燥させることで、測定サンプルを調整した。測定はネガティブモードで行った。

オリゴヌクレオチドの定量

第一章と同様に行った。

Huisgen 反応

試薬は番号順にエッペンドルフチューブに入れて、混和した。全ての試薬を混和した反応液は、遮光下、室温で放置した。反応条件は、第一章の反応条件 4 を参考に行った。

HPLC による Huisgen 反応の分析

Huisgen 反応の分析は以下の条件で行った。

カラム : Waters Xterra® MS C₁₈ 2.5 μ mol (4.6 mm x 50 mm)
移動相 : A 液 : 0.1 M Triethylammonium acetate (TEAA) Buffer (pH 7.0)
B 液 : 0.1 M TEAA Buffer : Acetonitrile = 1 : 1
gradient : B 液濃度 8-20% (30 min) または 7-15% (30 min) または 7-13% (30 min)
流速 : 1 mL/min
温度 : 50 °C
検出 : UV (254 nm)

HPLC による Huisgen 反応の分取

Huisgen 反応による生成物の精製は以下の条件で行った。

カラム : Waters Xterra® MS C₁₈ 2.5 μ mol (4.6 mm x 50 mm)
移動相 : A 液 : 0.1 M Triethylammonium acetate (TEAA) Buffer (pH 7.0)
B 液 : 0.1 M TEAA Buffer : Acetonitrile = 1 : 1
gradient : B 液濃度 8-20% (30 min) または 7-15% (30 min) または 7-13% (30 min)
流速 : 1 mL/min for preparation
温度 : 50 °C
検出 : UV (254 nm)

MALDI-TOF mass スペクトルデータ

ODN-2 : Calcd.[M-H]⁺, 4478.03; Found[M-H]⁺, 4478.11.

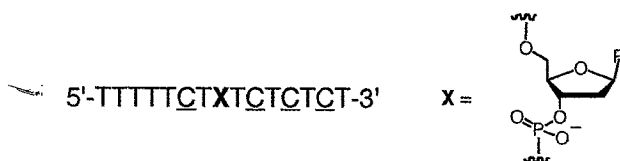
ODN-3 : Calcd.[M-H]⁺, 4409.93; Found[M-H]⁺, 4409.26.

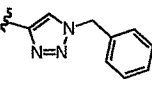
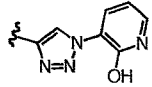
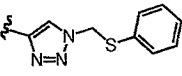
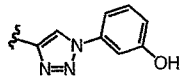
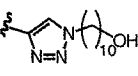
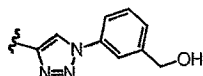
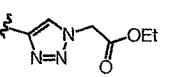
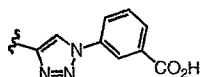
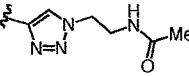
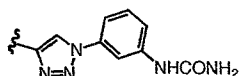
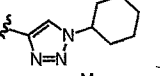
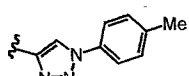
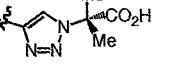
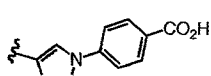
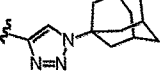
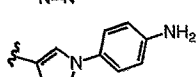
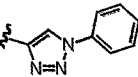
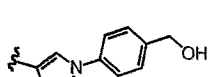
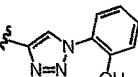
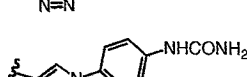
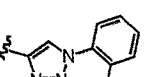
ODN-4 : Calcd.[M-H]⁺, 4423.96; Found[M-H]⁺, 4424.31.

ODN-5 : Calcd.[M-H]⁺, 4423.94; Found[M-H]⁺, 4423.01.

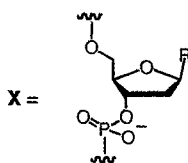
ODN-6 : Calcd.[M-H]⁺, 4452.96; Found[M-H]⁺, 4453.48.

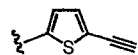
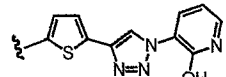
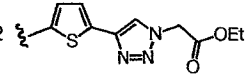
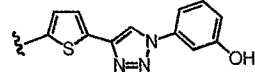
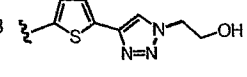
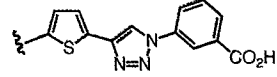
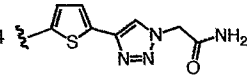
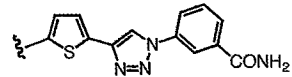
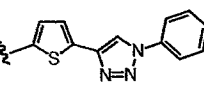
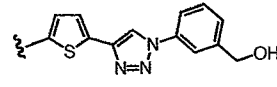
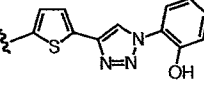
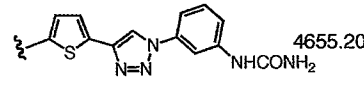
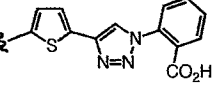
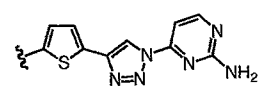
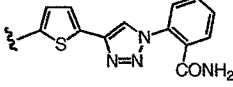
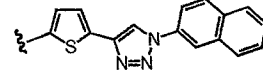
ODN-7 : Calcd.[M-H]⁺, 4466.99; Found[M-H]⁺, 4467.01.



Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)	Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)
		Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻				Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻	
1		4529.06	4528.47	94	12		4532.02	4532.35	64
2		4561.13	4562.37	89	13		4531.03	4531.39	80
3		4595.20	4596.19	88	14		4545.06	4545.62	3
4		4525.03	4525.32	64	15		4559.04	4558.90	67
5		4524.04	4523.65	61	16		4573.07	4573.21	72
6		4521.08	4522.96	77	17		4529.06	4531.03	78
7		4525.03	4524.28	8	18		4559.04	4559.13	81
8		4573.16	4573.22	38	19		4530.05	4527.82	65
9		4515.03	4515.98	76	20		4545.06	4545.18	82
10		4531.03	4530.16	74	21		4573.07	4573.53	88
11		4559.04	4559.93	73					

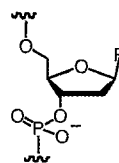
5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'



Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)	Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)
		Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻				Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻	
1		4478.03	4478.11	81	9		4614.15	4615.02	66
2		4607.15	4606.79	73	10		4613.16	4614.14	76
3		4578.11	4578.04	73	11		4641.17	4640.78	79
4		4565.11	4565.53	88	12		4640.18	4641.06	83
5		4597.16	4597.49	79	13		4627.18	4627.19	87
6		4613.16	4614.49	62	14		4655.20	4654.57	95
7		4641.17	4642.45	90	15		4565.11	4566.00	71
8		4640.18	4640.33	74	16		4647.22	4647.55	80

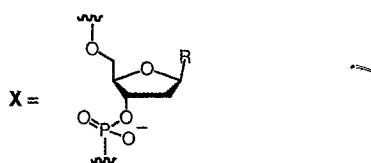
5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'

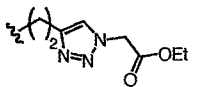
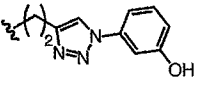
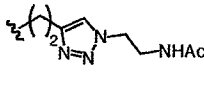
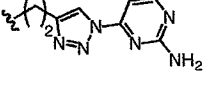
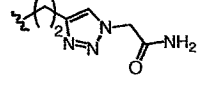
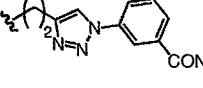
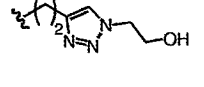
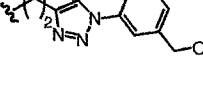
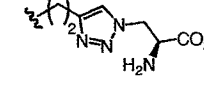
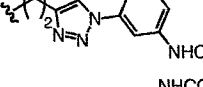
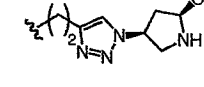
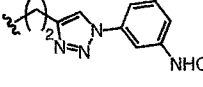
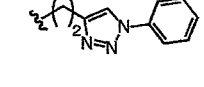
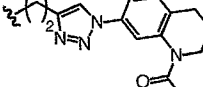
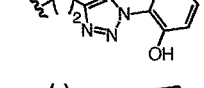
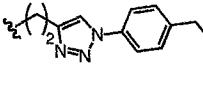
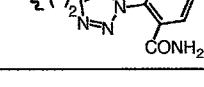
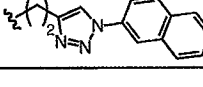
X =



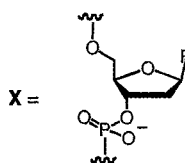
Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)	Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)
		Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻				Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻	
1		4539.00	4538.78	63	6		4545.01	4545.11	78
2		4538.01	4537.65	76	7		4572.03	4572.12	84
3		4529.06	4529.21	77	8		4559.03	4559.43	72
4		4545.01	4545.93	71	9		4587.05	4588.02	71
5		4572.03	4571.01	65	10		4559.03	4559.62	71

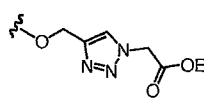
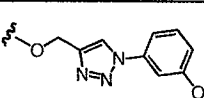
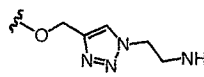
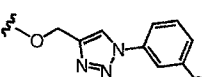
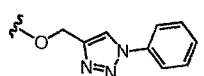
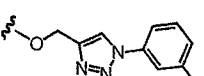
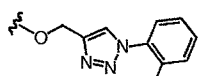
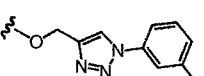
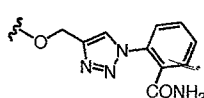
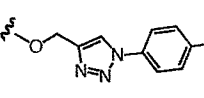
5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'



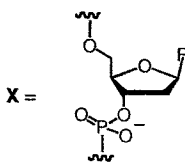
Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)	Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)
		Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻				Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻	
1		4553.08	4553.22	85	10		4559.09	4559.51	83
2		4552.10	4552.87	86	11		4600.10	4600.14	70
3		4602.11	4601.46	82	12		4586.11	4586.99	71
4		4511.04	4511.02	75	13		4573.11	4573.72	74
5		4554.07	4554.49	77	14		4601.13	4602.02	77
6		4580.11	4581.32	61	15		4659.17	4659.83	71
7		4543.09	4543.77	80	16		4640.20	4640.51	90
8		4559.09	4559.18	83	17		4573.11	4573.90	82
9		4586.11	4586.26	82	18		4593.15	4593.63	81

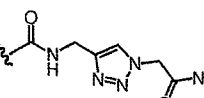
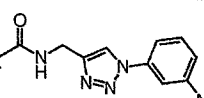
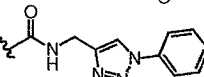
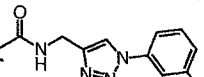
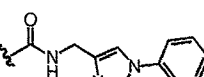
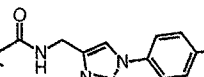
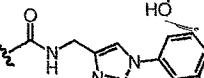
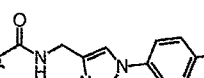
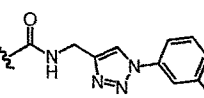
5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'



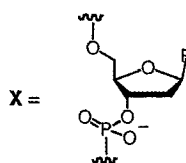
Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)	Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)
		Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻				Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻	
1		4555.05	4555.07	67	6		4561.06	4561.66	85
2		4554.07	4554.38	74	7		4588.09	4587.89	69
3		4545.06	4545.85	91	8		4575.09	4575.27	86
4		4561.06	4560.24	58	9		4603.10	4603.52	79
5		4588.09	4588.03	70	10		4575.09	4574.77	74

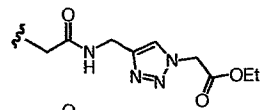
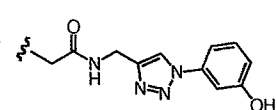
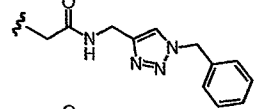
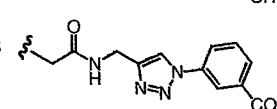
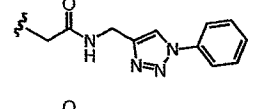
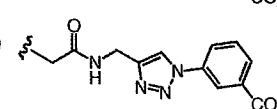
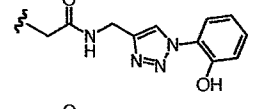
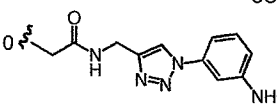
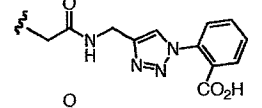
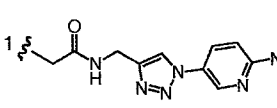
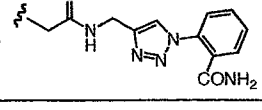
5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'



Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)	Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)
		Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻				Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻	
1		4553.04	4553.08	72	6		4630.13	4631.12	75
2		4572.09	4572.85	68	7		4602.11	4601.55	78
3		4588.09	4588.91	84	8		4602.11	4603.31	73
4		4588.09	4587.72	82	9		4622.14	4622.12	90
5		4615.11	4614.34	71					

5'-TTTTTCTXTCTCTCT-3'



Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)	Entry	X (R)	MALDI-TOF Mass		Yield(%)
		Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻				Calcd.[M-H] ⁻	Found[M-H] ⁻	
1		4596.11	4596.13	64	7		4602.11	4602.54	81
2		4600.14	4600.88	72	8		4630.12	4630.71	86
3		4586.11	4586.41	75	9		4629.14	4629.49	80
4		4630.12	4630.72	73	10		4644.15	4644.31	89
5		4630.12	4629.21	74	11		4602.11	4602.01	86
6		4629.14	4628.68	74					

引用文献

- 1) For recent Reviews: Y. Hari, S. Obika, T. Imanishi, *Eur. J. Org. Chem.* 2012, **15**, 1875; I. Luyten, and P. Herdewijn, *Eur. J. Med. Chem.* 1998, **33**, 515; M. G. M. Purwanto, and K. Weisz, *Curr. Org. Chem.* 2003, **7**, 427.
- 2) L. Araki, K. Morita, M. Yamaguchi, Z. Zhao, T. J. Wilson, D. M. J. Lilley, and S. Harusawa, *J. Org. Chem.* 2009, **74**, 2350; S. Harusawa, H. Yoneyama, D. Fujisue, M. Nishiura, M. Fujitake, Y. Usami, Z. Zhao, S. A. McPhee, T. J. Wilson, and D. M. J. Lilley, *Tetrahedron Lett.* 2012, **53**, 5891.
- 3) H. P. Rappaport, *Nucleic Acids Res.* 1988, **16**, 7253; E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* 2002, **35**, 936; M. Ishikawa, I. Hirao, and S. Yokoyama, *Tetrahedron Lett.* 2000, **41**, 3931; I. Hirao, Y. Harada, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, and S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**, 13298; N. Minakawa, N. Kojima, S. Hikishima, T. Sasaki, A. Kiyosue, N. Atsumi, Y. Ueno, and A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125**, 9970; A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003, **7**, 727; N. Minakawa, K. Kuramoto, S. Hikishima, and A. Matsuda, *ARKIVOC* 2006, 326; Z. Yang, D. Hutter, P. Sheng, A. M. Sismour, and S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* 2006, **34**, 6095; Z. Yang, A. M. Sismour, P. Sheng, N. L. Puskar, and S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* 2007, **35**, 4238; Z. Yang, A. M. Sismour, and S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* 2007, **35**, 3118.
- 4) W. L. Sung, *Nucleic Acids Res.* 1981, **9**, 6139.; W. L. Sung, *J. Org. Chem.* 1982, **47**, 3622.; T. R. Webb, and M. K. Mateucci, *Nucleic Acids Res.* 1986, **14**, 7661.; D. Fernandez-Fornier, Y. Palom, S. Ikuta, E. Pedroso, and R. Eritja, *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**, 5729.; Y.-Z. Xu, Q. Zheng, and P. F. Swann, *J. Org. Chem.* 1992, **57**, 3839.
- 5) C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, *J. Org. Chem.* 2002, **67**, 3057.
- 6) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2002, **41**, 2596.
- 7) For recent reviews, see: Reviews: H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, **40**, 2004; H. C. Kolb, and K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* 2003, **8**, 1128.
- 8) M. Nakahara, T. Kuboyama, A. Izawa, Y. Hari, T. Imanishi, and S. Obika, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, **19**, 3316.
- 9) Y. Hari, M. Nakahara, J. Pang, M. Akabane, T. Kuboyama, and S. Obika, *Bioorg. Med. Chem.* 2011, **19**, 1162.
- 10) R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1963, **2**, 633; R. Huisgen, G. Szeimies, and L. Moebius, *Chem. Ber.* 1967, **100**, 2494.
- 11) D. Heinrich, T. Wagner, and U. Diederichsen, *Org. Lett.* 2007, **9**, 5311.
- 12) M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sakurai, T. M. Synder, and D. R. Liu, 2004, **431**, 545.
- 13) T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin, *Org. Lett.* 2004, **6**, 2853.

- 14) K. Barral, A. D. Morhouse, and J. E. Moses, *Org. Lett.* 2007, **9**, 1809.
- 15) S. Saito, H. Tamai, Y. Usui, M. Inaba, and T. moriwake, *Chemistry Lett.* 1984, 1243.
- 16) R. Nichols, P. C. Andrews, P. Zhang, and D. E. Bergstrom, *Nature*, 1994, **369**, 492.
- 17) D. Loakes, and D. M. Brown, *Nucleic Acids Res.* 1994, **22**, 4039.
- 18) Reviews: D. Praseuth, A. L. Guieysse, and C. Hélène, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1489**, 181; M. Faria and C. Giovannangeli, *J. Gene Med.*, 2001, **3**, 299; M. P. Knauert and P. M. Glazer, *Hum. Mol. Genet.*, 2001, **10**, 2243; M. M. Seidman and P. M. Glazer, *J. Clin. Invest.*, 2003, **112**, 487; J. Y. Kuan and P. M. Glazer, *Methods Mol. Biol.*, 2004, **262**, 173; R. I. Mahato, K. Chen, and R. V. Guntaka, *Expert Opin. Drug Delivery*, 2005, **2**, 3; J. Y. Chin, E. B. Schleifman, and P. M. Glazer, *Front. Biosci.*, 2007, **12**, 4288; P. Simon, F. Cannata, J.-P. Concordet, and C. Giovannangeli, *Biochimie*, 2008, **36**, 5123; J. Y. Chin and P. M. Glazer, *Mol. Carcinog.*, 2009, **48**, 389; A. Mukherjee and K. M. Vasquez, *Biochimie*, 2011, **93**, 1197.
- 19) S. Obika, Y. Hari, K. Morio, and T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* 2000, **41**, 221.
- 20) Y. Hari, S. Obika, H. Inohara, M. Ikejiri, D. Une, and T. Imanishi, *Chem. Pharm. Bull.* 2005, **53**, 843.
- 21) D. Guianvarc'h, R. Benhida, J.-L. Fourrey, R. Maurisse, and J.-S. Sun, *Chem. Commun.* 2001, 1814.; D. Guianvarc'h, J.-L. Fourrey, R. Maurisse, J.-S. Sun, and R. Benhida, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, **11**, 2751.; D. Guianvarc'h, J.-L. Fourrey, R. Maurisse, J.-S. Sun, and R. Benhida, *Org. Lett.* 2002, **4**, 4209.; M. Sollogoub, R. A. J. Darby, B. Cuenoud, T. Brown, and K. R. Fox, *Biochemistry* 2002, **41**, 7224.; S.D. Osborne, V. E. C. Powers, D. A. Rusling, O. Lack, K. R. Fox, and T. Brown, *Nucleic Acids Res.* 2004, **32**, 4439.; D. A. Rusling, V. E. C. Powers, R. T. Ranasinghe, Y. Wang, S. D. Osborne, T. Brown, and K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.* 2005, **33**, 3025.; Y. Wang, D. A. Rusling, V. E. C. Powers, O. Lack, S. D. Os- borne, K. R. Fox, and T. Brown, *Biochemistry* 2005, **44**, 5884.; C. Lou, Q. Xiao, R. R. Taylor, N. B. Gaied, N. Gale, M. E. Light, K. R. Fox, and T. Brown, *Med. Chem. Commun.* 2011, **2**, 550.; C. Lou, M. Shelbourne, K. R. Fox, and T. Brown, *Chem. Eur. J.* 2011, **b**, 14851.; O. A. Amosova, and J. R. Fresco, *Nucleic Acids Res.* 1999, **27**, 4632.; A. B. Eldrup, O. Dahl, and P. E. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, **119**, 11116.
- 22) M. Sapdafora, V. Y. Postupalenko, V. V. Shvadchak, A. S. Klymchenko, Y. Mèly, Y. Burger, and R. Benhida, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 7809.
- 23) D. Guianvarc'h, J.-L. Fourrey, R. Maurisse, J.-S. Sun, and R. Benhida, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, **11**, 2751.
- 24) J. D. Frazer, S. M. Horner, and S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* 1998, **39**, 1279.
- 25) K. Yoon, C. A. Hobbs, J. Koch, M. Sardaro, R. Kutny, and A. L. Weis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, **89**, 3840.; L. C. Griffin, and P. B. Dervan, *Science* 1989, **245**, 967.; I. Radhakrishnan, X. Gao, C. de los Santos, D. Live, and D. J. Patel, *Biochemistry* 1991, **30**, 9022–9030; I. Radhakrishnan, D.

J. Patel, *Biochemistry* 1992, **31**, 2514.; E. Wang, S. Malek, and J. Feigon, *Biochemistry* 1992, **31**, 4838.; I. Radhakrishnan, and D. J. Patel, *Structure* 1994, **2**, 17.; L. Jiang, and I. M. Russu, *Nucleic Acids Res.* 2001, **29**, 4231.

26) Oligo@SIGMA Genosys.

