



Title	プリン塩基を有する2',4'-BNANCの合成と機能性評価
Author(s)	藤坂, 朱紀
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60072
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【18】

氏 名	藤 坂 朱 紀
博士の専攻分野の名称	博 士（薬学）
学 位 記 番 号	第 2 5 9 7 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	プリン塩基を有する 2' , 4' -BNA [®] の合成と機能性評価
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小比賀 聡 (副査) 教 授 藤岡 弘道 教 授 宇野 公之 教 授 土井 健史

論 文 内 容 の 要 旨

核酸医薬は遺伝子そのものを新たな創薬標的とし、化学合成による修飾が可能な分子標的薬である。これまで修飾オリゴヌクレオチドを適切に設計することで、コンプレックス構造（高次構造や標的核酸との二重鎖構造）を安定化し、薬効を向上させることに成功した。このような背景のもと当研究室では、核酸糖部 2',4'位間を架橋することで糖部コンホメーションを固定した BNA 類を開発し、その修飾によって相補鎖 RNA に対する親和性を向上させることに成功した。特に架橋部にオキサジナン構造を有する 2',4'-BNA^{NC}（以下 NC）は、核酸分解酵素に対する耐性が飛躍的に向上し、*in vivo*でのアンチセンス効果も認められている。しかし、ビリミジン塩基（チミン、5-メチルシトシン）を有する NC が合成されたのみで、プリン塩基（アデニン、グアニン）を有する NC の合成は達成されていない。核酸医薬として様々な標的配列に対し自由にアンチセンス分子を設計するためには、少なくとも 4 種の天然型核酸塩基を有するアナログが必要不可欠である。そこで申請者は、プリン塩基を有する NC の合成経路確立を目的に、各核酸塩基を有する 4 種のアナログを効率よく合成する経路の開発に取り組んだ。

まずプリン塩基の導入には、トランスグリコシル化反応（ビリミジン塩基からプリン塩基に入れ替える反応）を利用する手法を選択した。この方法は糖ドナーとなる基質の選択が必要なものの、一般にビリミジン塩基より反応性の高いプリン塩基を合成後期で導入するという点において、より効率的な合成経路の確立が可能である。また導入する塩基の立体及び位置選択性に関しては、グリコシル化反応で見出されてきた改善法をそのまま利用できると考えた。そこでまず予備検討として、従来のビリミジン合成経路を利用し、トランスグリコシル化の糖ドナーに適した基質の探索を行った。これまでの報告から、様々な 2'位隣接基を有する基質に対してトランスグリコシル化を検討したところ、カルバメート型の置換基を有する化合物で反応が良好に進行することを見出した。一方、これまでの NC 合成法では、合成後期で Bn 基の脱保護を行うと、NC の鍵骨格である架橋構造が開裂する副反応が回避できないという問題があった。そのため合成中期で Bn 保護から TIPDS 保護に変換せざるを得なかったが、これは高価なシリル保護基を必要とする他、経路の延長や後の工程内での反応条件が制限されるため、その改善が強く求められていた。そこで本研究ではより効率的な合成経路の確立を目指し、架橋構造構築後の脱 Bn 化反応を検討した。その結果、架橋部窒素原子にアシル基を導入することで、架橋部を開裂させることなく Bn 基の脱保護が進行することを見出した。以上の結果を踏まえて、プリン塩基を有する NC の合成を行った。

トランスグリコシル化反応では、アデニン及びグアニン誘導体として *N*⁶-ベンゾイルアデニン、2-アミノ-6-クロロプリンを用いることで、立体及び位置選択的にプリン塩基を導入することに成功した。架橋構築後の脱 Bn 化反応では、アデニン塩基 6 位のベンゾイル基の脱保護が必要であることや、グアニン塩基 6 位を先にカルボニル基（またはアルコキシ基）に変換する必要があることなど、それぞれ塩基の特性に合わせた合成経路を構築した。脱 Bn 化反応後は定法に従い、それぞれのアミダイト体の合成を達成した。ここまでの検討は、ビリミジンアナログの既知合成経路の改善にも繋がり、最大 2 工程の短縮と約 2 倍の収率向上に成功した。

続いて 4 種の天然型核酸塩基を有する NC を導入したオリゴヌクレオチド（以下 ON）の特性を評価するため、各種のアミダイト体を用いて、部分修飾、または全修飾した 12mer の ON を DNA 自動合成機にて合成し、それぞれの相補鎖 DNA および RNA に対する二重鎖形成能を融解温度測定 (*T_m* 測定) によって評価した。まず、NC のチミアナログとアデニンアナログをそれぞれ 1 残基導入した ON の *T_m* 値を比較した結果、両方とも共通して DNA に対する親和性の向上はほとんど見られず、RNA 選択的に *T_m* 値が 4.0–6.0℃ 上昇した。次に、NC で 1, 3, 12 箇所それぞれ修飾した ON の *T_m* 値を比較した結果、相補鎖 RNA では配列や修飾塩基の種類に依存することなく 1 修飾辺り *T_m* 値が 4–6℃ 上昇したことから、修飾数に応じて *T_m* 値が上昇することが確認された。続いて、12 箇所修飾した ON の配列選択性を調べるため、ミスマッチ配列を持つ標的 RNA との *T_m* 値測定を行った。その結果、天然 DNA 及び RNA よりも大きく *T_m* 値が低下したことから、標的 RNA に対して天然を上回る配列選択性を有することを示した。最後に NC 同士の二重鎖形成能を評価するため、対応する箇所をそれぞれ 1, 3, 12 箇所それぞれ NC で修飾した ON 二重鎖の *T_m* 値を測定した。その結果、1 カ所ずつ修飾した二重鎖では天然 DNA 二重鎖と比較して、*T_m* 値はほとんど変化しなかった一方で、3 カ所ずつ連続で修飾すると、その *T_m* 値はそれぞれが相補鎖 RNA と二重鎖を組んだ際の *T_m* 値よりも大きく上昇した。さらに 12 箇所修飾した ON 同士の二重鎖は、*T_m* 値の測定温度限界である 100℃ を超える熱力学的安定性を有していることがわかった。

今回著者は、4 種の天然型核酸塩基を有する NC の効率的な合成経路の確立に成功し、それらで修飾したオリゴヌクレオチドがアンチセンス分子として有望な化合物であることを再確認した。また NC 同士が非常に安定な二重鎖を組むことから、アンチセンス核酸としての機能だけでなくデコイ核酸、あるいは DNA を素材とした高次構造体の構築など、様々な DNA ナノテクノロジーに利用できる可能性を示した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

新たな創薬手法としての期待が高まる核酸医薬の開発において、優れた機能性を示す人工核酸素材の合成研究は非常に重要なものである。核酸糖部 2', 4' 位間を架橋することで糖部コンホメーションを固定した架橋型人工核酸は相補鎖 RNA に対する高い親和性を有することから、その有用性が大いに期待されている。特に架橋部にオキサジナン構造を有する 2', 4' -BNA^{NC}（以下 NC）は、核酸分解酵素に対する耐性が飛躍的に向上し、*in vivo*での優れた薬効も認められているものの、その合成法には検討の余地を残していた。申請者は、プリン塩基（アデニン、グアニン）を有する NC の合成を基軸とした

有機合成化学的及び生物有機化学的研究を展開し、以下の成果を得た。

様々な 2' 位隣接基を有する基質に対してトランスグリコシル化反応（ビリミジン塩基をプリン塩基に変換する反応）を検討したところ、カルバメート型の置換基を有する化合物で反応が良好に進行することを見出した。

上記で見いだした反応を利用して、NC のアデニン、グアニン誘導体の合成に成功した。

NC 合成時で大きな課題となっていた保護基の付け替えを回避する新たな合成経路を構築し、NC 合成の大幅な効率化を達成した。

合成した各種塩基含有 NC のオリゴヌクレオチドへの導入に成功するとともに、NC 搭載オリゴヌクレオチドが極めて安定な二重鎖を形成することを見いだした。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものであると判断した。