



Title	外部刺激応答性人工核酸塩基の開発
Author(s)	森, 翔平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72327
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

外部刺激応答性
人工核酸塩基の開発

大阪大学大学院薬学研究科
創成薬学専攻 生物有機化学分野
森 翔平

略語一覧

ASO	: antisense oligonucleotide
Bn	: benzyl
BNA	: bridged nucleic acid
Cbz	: benzyloxycarbonyl
cDNA	: complementary DNA
CPG	: controlled pore glass
dA	: deoxyadenosine
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
dC	: deoxycytidine
dG	: deoxyguanosine
DIAD	: diisopropyl azodicarboxylate
DIPEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	: dimethylformamide
DMTr	: 4,4'-dimethoxytrityl
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
dT	: deoxythymidine
dU	: deoxyuridine
GFP	: green fluorescent protein
HPLC	: high performance liquid chromatography
ITC	: isothermal titration calorimetry
LNA	: locked nucleic acid
MALDI-TOF-MS	: matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
mRNA	: messenger RNA
miRNA	: micro RNA
NC	: negative control
NPE	: 1-(2-nitrophenyl)ethyl
NPOM	: 6-nitropiperonyloxymethyl
ON	: oligonucleotide
PC	: positive control

PRNA	: peptide ribonucleic acid
<i>i</i> Pr	: isopropyl
qRT-PCR	: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RNA	: ribonucleic acid
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reversed-phase
rt	: room temperature
siRNA	: small interfering ribonucleic acid
TASF	: tris(dimethylamino)sulfonium difluorotrimethylsilicate
TBAF	: tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
THF	: tetrahydrofuran
TIPDS	: tetraisopropyldisiloxanylidene
T_m	: melting temperature
TMS	: trimethylsilyl

目次

序論	5
本論	
第一章 光刺激により高次構造が変化する人工核酸塩基の開発	
第一節 これまでの光応答性人工核酸に関する研究	7
第二節 アゾベンゼン導入型光応答性人工核酸 dU^{Az} 類の合成	9
第三節 dU^{Az} 類導入オリゴヌクレオチドの機能性評価	12
第二章 過酸化水素に応答し塩基対認識能を発現する人工核酸塩基の開発	
第一節 特定の生体内環境に応答し構造を変化させる核酸に関する先行研究	18
第二節 過酸化水素応答性人工核酸の合成	19
第三節 過酸化水素応答性人工核酸の機能性評価	21
第四節 dT^B 導入オリゴヌクレオチドの機能性評価	27
第五節 培養細胞中における過酸化水素依存的なアンチセンス活性の制御	30
結論	32
謝辞	33
実験項	34
参考文献	59

序論

外部刺激応答性を持つ分子は新しい薬物送達システムの開発や生命機能の解明、分子コンピューターの制御など様々な分野においての応用が期待されている。中でも、性質を外部刺激によって制御出来る核酸素材は、遺伝子レベルでの生命現象を自在に制御可能な技術や、相補的水素結合を通じた複雑な高次構造の形成・乖離が任意に可能なナノマシン、特定の臓器・細胞特異的に薬効を発現する核酸医薬品の開発などの発展に大きく寄与すると考えられ、大きな注目を集めている。これまでに、光¹⁻⁶⁾や温度変化⁷⁾、酸化還元条件変化⁸⁾などを外部刺激として性質や構造を変化させる人工核酸が報告されている。また、外部刺激応答性を付与した核酸の応用例としては、外部刺激応答時にのみ血液凝固活性を示すトロンビンアプタマー⁹⁾やRNA切断活性を示すデオキシリボザイム¹⁰⁾、微小構造を任意に構築/開裂可能なDNAオリガミ^{注1)}などが知られる。

核酸に外部刺激応答性を付与する部位としては主に、糖部、リン酸ジエステル部及び塩基部がある。核酸糖部への修飾は、糖部骨格の立体配座や環サイズを変化させ、核酸二重鎖などの高次構造形成に大きな影響を与える。また、RNAの2'位水酸基はリボザイムの触媒活性やタンパク質によるRNA認識に関わっていることから、2'位水酸基への修飾によりそれらの活性を制御できる可能性を持つ。実際に、RNAの2'位水酸基を還元的条件下で脱離するメチルジスルファニル基で修飾した人工核酸¹¹⁾ (Figure 1a) や、細胞内のカルボキシエステラーゼで脱離するピバロイルオキシメチル基で修飾した人工核酸¹²⁾ (Figure 1b) が報告されている。これらの人工核酸は細胞外においては高いヌクレアーゼ耐性を有し、細胞内においては高活性のsiRNAやリボザイムとして働くプロドラッグ型の核酸医薬として利用できる可能性がある。また、リン酸ジエステル部はエンドヌクレアーゼやエキソヌクレアーゼの認識に関わる部分であるため、その化学修飾により核酸分解酵素耐性能を向上させることが出来る。さらに、リン酸ジエステル部の代わりに負電荷を持たないバックボーン^{13,14)}や双性イオンを持つバックボーン¹⁵⁾を用いることで、オリゴヌクレオチド (ON) の静電反発の軽減や脂溶性の向上を図る研究も盛んである。リン酸骨格に外部刺激応答部位をもつ人工核酸としては、光刺激により切断可能な2-ニトロベンゼンをバックボーン骨格に持つもの¹⁶⁾ (Figure 2a) や弱酸性条件下で開裂可能なP3'→N5'ホスホアミダート結合¹⁷⁾及びN3'→P5'ホスホアミダート結合¹⁸⁾を有するもの(Figure 2b) が報告されている。これらの外部刺激応答性核酸は、切断された二重鎖の生体内修復機構の解明や、遺伝子診断といった分野への応用が期待される。一方、核酸塩基部は水素結合能や近傍塩基とのスタッキング

注1 2006年、Rothenmund によって提唱されたDNA鎖によるナノスケールの構造体であり、7000塩基以上の長い一本鎖DNAと32塩基程度の短い相補的DNAから構成される¹⁹⁾。近年、外部刺激に応答し、構造変化を起こすものも報告されており、²⁰⁾薬物送達の担体やナノマシンとしての応用が期待される

相互作用、ポリメラーゼによる認識などに関与する。ピリミジン環5位やプリン環7位に修飾を施した場合、二重鎖構造中で修飾部位がメジャーグループ内に位置し、二重鎖構造全体に大きな影響を及ぼすことなく外部刺激応答性を付与することが可能となる。また、水素結合形成部位に化学修飾を導入した場合、相補塩基との塩基対形成が阻害されるため、核酸高次構造の構築に大きく影響を与えると考えられる。

これらの背景を踏まえ、本研究で筆者は薬効の精密制御が可能な核酸医薬品への応用を目指して、核酸塩基部に外部刺激応答性を有する以下の2つの人工核酸を開発した。まず、ウラシル5位に光応答性アズベンゼンを導入し、二重鎖安定化能を可逆的に光制御可能な人工核酸の開発を行った(第一章)。さらに、水素結合形成部位に過酸化水素応答性官能基を導入し、過酸化水素特異的に応答して構造が変化する各種人工ヌクレオシド(**dA^B**、**dG^B**、**dC^B**、**dT^B**及び**gemcitabine^B**)を開発した(第二章)。

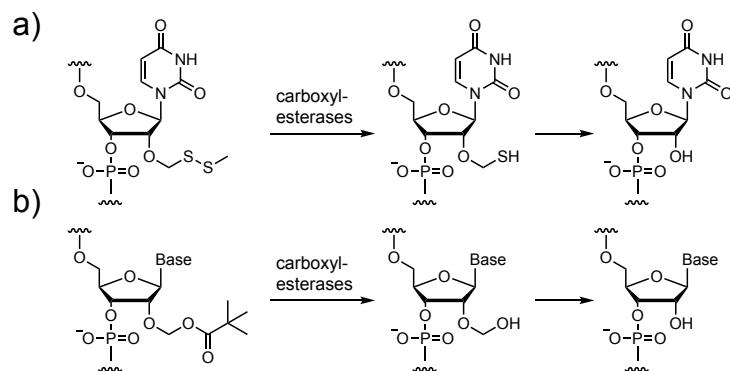


Figure 1. RNA bearing biolabile groups at the 2'-hydroxy group.

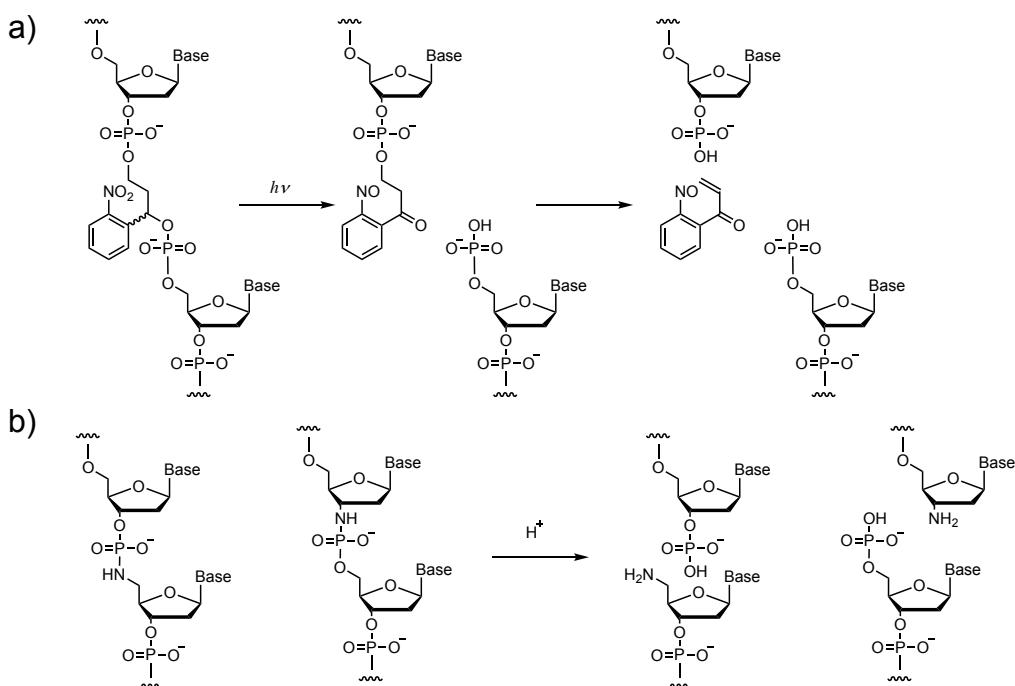


Figure 2. DNA strands bearing a) a photocleavable linker, b) an acid-cleavable linker

第一章 光刺激により高次構造が変化する人工核酸塩基の開発

第一節 これまでの光応答性人工核酸に関する研究

光刺激は、反応系を汚染せず精密な時空間分解能をもつため、特定の分子を生体内で活性化もしくは不活性化するための外部刺激として理想的である。実際、光刺激に応答してその性質を変化させる人工核酸塩基が多く報告されている。その一つにケージド核酸が挙げられる²¹⁾。ケージド核酸は、光分解性官能基を水素結合形成部位に持つことで、光照射前は二重鎖安定化能などが抑制されている。一方、適当な波長の光照射により光分解性官能基が除去されると天然核酸へと変換されるため、再び核酸高次構造が安定化される。即ち、核酸高次構造安定化能をオフからオンへと変換することが可能である。例えば、Heckel らはチミジンの 4 位酸素原子を 1-(2-ニトロフェニル)エチル (NPE) 基により保護した化合物を合成し、これを DNA 中に導入することで T7RNA ポリメラーゼによる翻訳の光制御を達成している²²⁾ (Figure 3a)。また、Deiters らは 1-(3,4-メチレンジオキシ-6-ニトロフェニル)エトキシメチル基で保護したグアノシンやウリジンを導入した siRNA 鎖を用いることで、培養細胞において GFP の発現を光制御することに成功している²³⁾ (Figure 3b)。

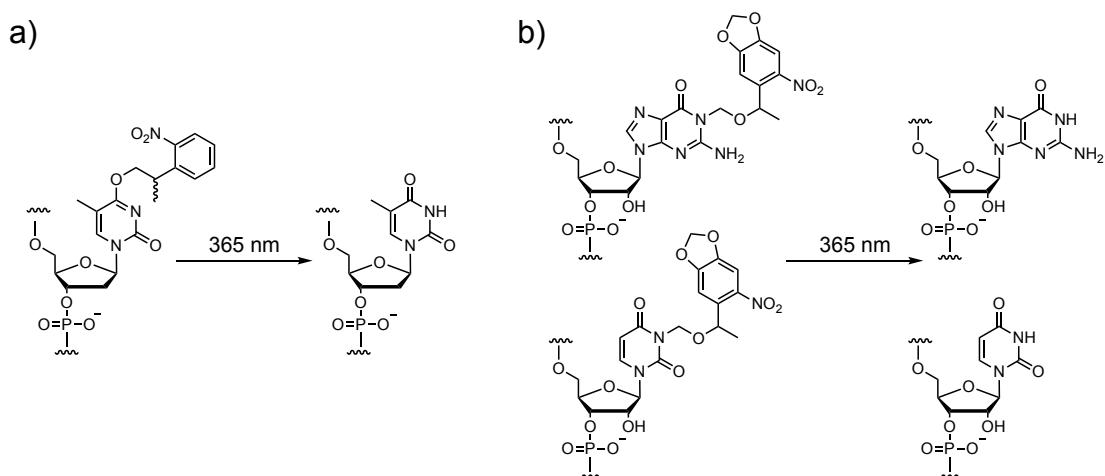


Figure 3. Caged nucleosides developed by a) A. Heckel and b) A. Deiters

一方で、フォトクロミック分子^{注2}を核酸中に導入し、異なる波長の光刺激を併用することで可逆的に核酸の性質を制御する研究も行われている。

Wagenknechtらは塩基部5位にジ

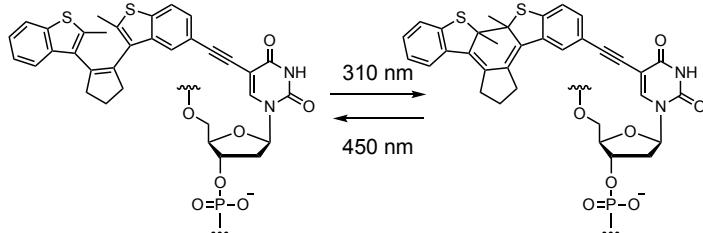


Figure 4. A photochromic nucleotide developed by H. A. Wagenknecht.

アチルエテンを連結した2'-デオキシウリジンアナログを合成し、これを導入したONに光照射を行うことで光学特性が制御可能であることを明らかにした²⁴⁾(Figure 4)。また、浅沼らは核酸の塩基部がアゾベンゼンで置換されたC-スクレオシドを開発し、RNA中に導入することで、室温においてRNA二重鎖のαヘリックス構造の安定性を可逆的に光制御することに成功している²⁵⁾(Figure 5)。さらに、小笠原らはグアノシン8位をアリールビニル基で修飾することで、核酸塩基そのものがフォトクロミズムを持つ人工核酸を開発した(Figure 6)。これらの人工核酸は、グアニン四重鎖構造の形成²⁶⁾、miRNAの翻訳過程²⁷⁾及びタンパク質の発現²⁸⁾の可逆的制御に応用されている。

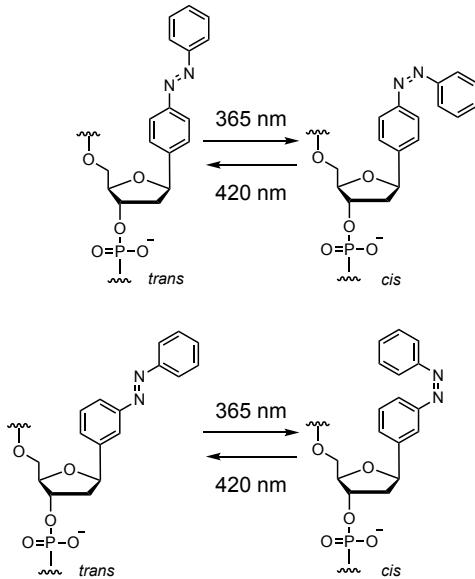


Figure 5. A C-nucleoside bearing an azobenzene-substituted nucleobase developed by H. Asanuma.

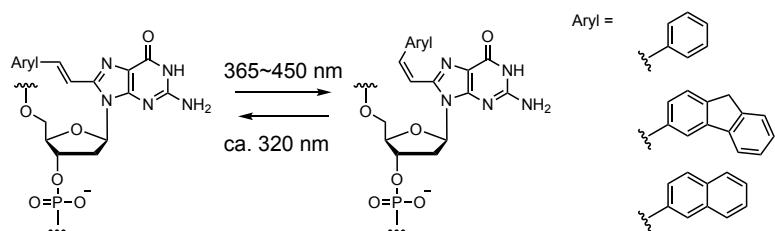


Figure 6. C-8 Substituted photochromic dG developed by S. Ogasawara

ケージド化合物は一度しか構造変換を行えないものの、光照射によりほぼ定量的に反応を行なうことが可能である。一方で、フォトクロミック分子は、光照射に伴い可逆的に光異性化が進行するため、100%の効率で構造変換は行えないものの、繰り返し化学構造や性質を変化させることが可能である。

注2 フォトクロミック分子とは適当な波長の光照射により構造変換を伴い、異なる吸光波形を持つ二つの状態を可逆的に取ることの出来る化合物を指す²⁹⁾。代表的なものとして、アゾベンゼンやスチルベン、スピロピラン、ジアリルエテンなどが挙げられる。

第二節 アゾベンゼン導入型光応答性人工核酸dU^{Az}類の合成

これまでに報告されている光刺激応答性人工核酸塩基は、水素結合形成部位を光分解性官能基で保護する、もしくは立体障害の大きさを光刺激の前後で変化させることで、高次構造形成の制御を達成している。筆者は、これまでにないコンセプトに基づいた光刺激応答性人工核酸の開発がその適応範囲の拡充につながると考え、塩基部5位からアルキンリンカーを介して種々のアゾベンゼン誘導体を有する2'-デオキシリジンアログ dU^{Az}類を設計した (Figure 7a)。トランス型のアゾベンゼンは核酸二重鎖中でメジャーグループから突き出し、水やカチオン種のネットワーク形成を阻害する事で二重鎖の安定性を低下させると予想される。一方で、シス型のアゾベンゼンは折り畳まれ、メジャーグループ内に収納されることでその阻害を解消することが期待される (Figure 7b)。核酸塩基間の水素結合能を制御する、もしくは核酸塩基のスタッキング能を制御する従来の光刺激応答性人工核酸とは異なり、オリゴ核酸が高次構造を形成した際の周囲の水分子やカチオンのネットワーク形成を制御することを目的とした。また、従来のアゾベンゼン骨格を持つ光応答性人工核酸は、アゾベンゼン骨格が立体障害の比較的小さなトランス型を取る際に高次構造を形成し、光照射により嵩高いシス型へと異性化した際に乖離する³⁰⁾。一方で、今回設計したdU^{Az}はシス型を取る際に高次構造を安定化するという異なる性質をもつと考えられる。また、アゾベンゼンの化学的安定性はシス体よりもトランス体の方が高いため、光刺激を行わない場合ではトランス体が主成分となる。そのため、dU^{Az}は光刺激を与えた際にのみ高次構造を安定化する、より扱いやすい核酸分子になり得る。また、アゾベンゼンは導入する置換基により異性化能や熱安定性といった物性が大きく変化することが知られる³¹⁾。例えば、電子供与性の置換基を導入した場合にはシス体への異性化率やシス体の熱異性化速度が向上することが報告されている³²⁾。光異性化置換基を精査することでdU^{Az}の核酸素材としての性質を調節可能であると考え、電子的、立体的に異なるアゾベンゼン誘導体をもつ6種のdU^{Az}

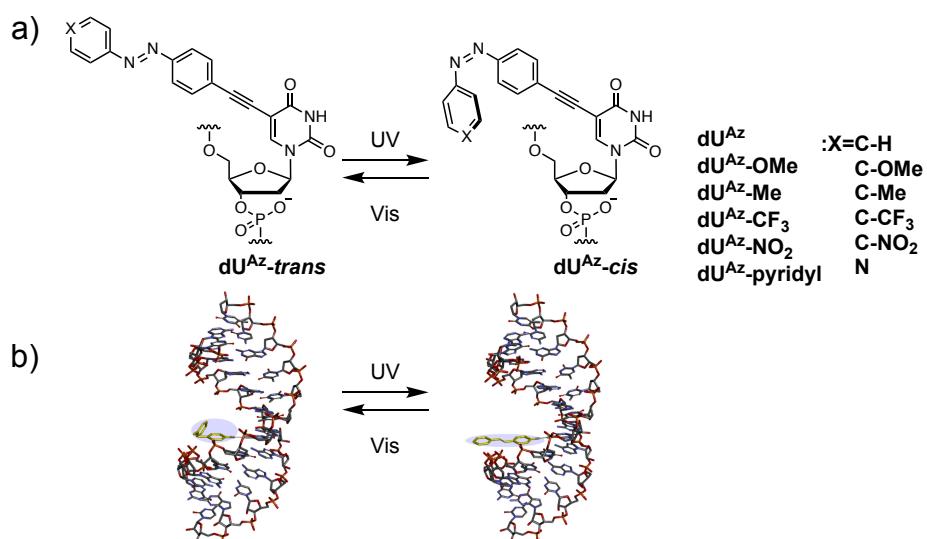
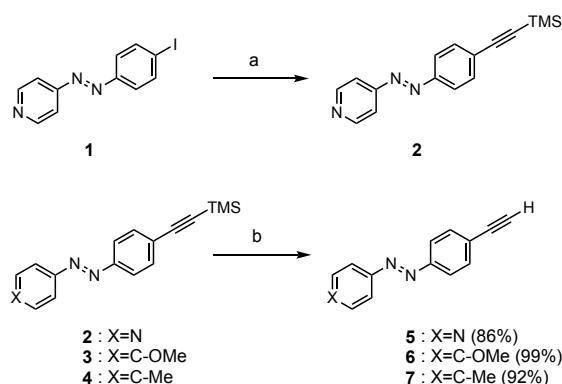


Figure 7. C-5 azobenzene-substituted 2'-deoxyuridine dU^{Az}:
a) Structure and photochromism of dU^{Az}, b) Proposed structure of dU^{Az} in duplex.

類を設計した。これら種々のdU^{Az}アミダイトブロックを合成した後、DNA自動合成機を用いてON中へと導入して光刺激応答性や二重鎖安定化能、相補塩基認識能といった物性を評価した。

dU^{Az}のアミダイトブロックの合成にあたり、まず、種々のエチニルアゾベンゼン誘導体の合成を行った。4-[4-(トリメチルシリル)エチニルフェニルアゾ]ピリジン (**2**) は文献既知化合物 **1**³³⁾ とトリメチルシリルシリルアセチレンの菌頭カップリングで合成した。得られた化合物 **2** と文献既知化合物 **3,4**³⁴⁾ にそれぞれ炭酸カリウム-メタノールを加えることでシリル基の脱保護を行い、エチニルアゾベンゼン誘導体 **5-7** を得た (Scheme 1)。

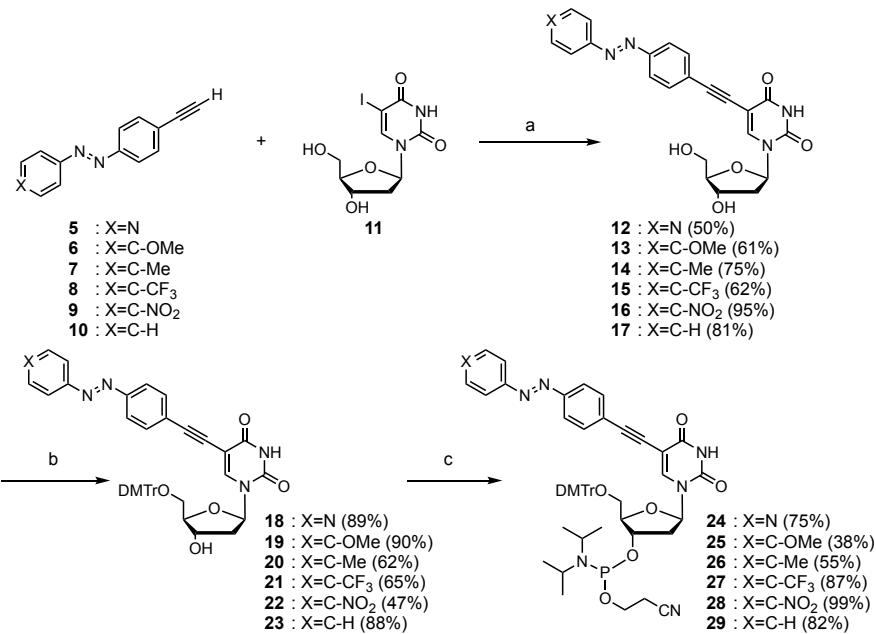


Scheme 1. Synthesis of *para*-substituted ethynyl-azobenzene derivatives. *Reagents and conditions:* a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI , trimethylsilylacetylene, Et_3N , THF, 60°C , 57%; b) K_2CO_3 , MeOH , THF, rt

得られた化合物 **5-7** 及び文献既知化合物 **8-10**³⁵⁻³⁷⁾ をそれぞれ菌頭カップリング条件下、5-ヨード-2'-デオキシウリジン **11** と作用させることで、アゾベンゼン骨格に異なる置換基を有した種々のdU^{Az} ヌクレオシド体 **12-17** の合成を達成した。その後、常法に従い5'位水酸基のジメトキシトリチル化、3'位水酸基のホスホロアミダイト化を行うことで、DNA合成機に適応可能なアミダイト体 **24-29** を得た (Scheme 2)。得られたアミダイト体を用い、DNA自動合成機にて種々のdU^{Az}類を導入したON1-6の合成を行った^{注3}。今回導入を試みたdU^{Az}類はDNAと同様の糖部構造を持つため、いずれのアミダイト体も天然のアミダイト体と同様の条件^{注4}により効率よく縮合することが可能であった。合成したON1-6は、28%アンモニア水を用いて室温にて2時間処理することによりCPG樹脂から切り出した後、更にオリゴ核酸分子を含むアンモニア水を 55°C に加熱し12時間処理することで脱保護を行った。これを簡易逆相カラムにて粗精製し、HPLCを用いて精製後、MALDI-TOF-MSにより分子量を確認した (Table 1)。

^{注3} DNA自動合成機は、1) 脱トリチル化、2) カップリング、3) キャッピング、4) 酸化の各ステップを繰り返すことでONを合成する。今回行った各ステップ条件は 1) トリクロロ酢酸、2) 5-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]テトラゾール、3) 無水酢酸/ピリジン、4) ヨウ素/ピリジン/水/THF である。

^{注4} 通常天然のONを合成する際のカップリング時間はDNAが32秒、RNAが10分である。



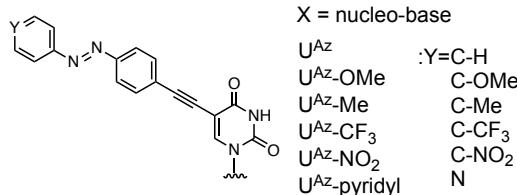
Scheme 2. Route for the synthesis of *para*-substituted **dU^{Az}** phosphoramidites. *Reagents and conditions:* a) Pd(PPh₃)₄, CuI, trimethylsilylacetylene, Et₃N, DMF, 60 °C; b) DMTrCl, pyridine, rt; c) iPr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN, DIPEA, CH₂Cl₂, rt

Table 1. Yields and MALDI-TOF MS data of modified ONs

ON ^a	X ^b	MALDI-TOF MS		
		Yield / % ^c	Calcd. [M-H] ⁺	found [M-H] ⁺
ON1	U^{Az}	29	3822.6	3822.4
ON2	U^{Az}-OMe	21	3852.6	3853.2
ON3	U^{Az}-Me	27	3836.6	3836.2
ON4	U^{Az}-CF₃	15	3890.6	3890.2
ON5	U^{Az}-NO₂	22	3866.6	3866.9
ON6	U^{Az}-pyridyl	21	3823.6	3824.2

^a ON sequence is 5'-d(GCGTTXTTGCT)-3'

^b



^c Oligonucleotides are synthesized with phosphoramidite loaded cpg (0.2 μM) and the yield was calculated based on the obtained amount of ON after reverse phase HPLC purification

第三節 **dU^{Az}**類導入オリゴヌクレオチドの機能性評価

dU^{Az}を導入した**ON1**について、まず紫外可視吸収スペクトルを測定した (Figure 8a)。 **ON1**は光照射前に365 nm付近に極大吸収を示したが、365 nmの光照射によってその吸収強度は減少し、一方で450 nm付近の吸収強度が増加した。この結果は、トランス型のアゾベンゼンがシス型のアゾベンゼンへと異性化する際の吸収スペクトルの変化と良い一致を示しており³⁸⁾、**dU^{Az}**はアゾベンゼンと同じく、紫外線照射によりシス型へと異性化することが示唆された。続いて逆相HPLCを用いて、**dU^{Az}**光異性化の効率と可逆性を評価した (Figure 8b)。逆相HPLCによって**ON1**は二本のピークとして観測された。一般的に、トランス型のアゾベンゼンは疎水性の環状構造が薄く広がる形をとる一方、シス型のアゾベンゼンは折れ曲がりコンパクトな形状を取り、比較的弱い分子間相互作用しか持たないことが知られている。このことから、則包らはアゾベンゼン誘導体が光照射により親水性を制御可能であると提唱している³⁹⁾。今回の**dU^{Az}**についても同様であり、**dU^{Az}**が疎水性のアゾベンゼンが大きく広がった形を取るトランス型の時、逆相HPLCにおける保持時間は長く、アゾベンゼン骨格が比較的コンパクトに折り畳まれた形を取るシス型では比較的保持時間は短かった。実際に紫外線照射を行ったところ保持時間の短いピーク(シス型)の比率が増加した。今回の**dU^{Az}**導入ONは紫外線照射によりアゾベンゼン骨格がトランス型からシス型になることで親水性を増加させる高分子だともいえる。**dU^{Az}**は光照射前、主にトランス体で存在しているが (トランス : シス = 80 : 20)、365 nmの光を10秒間照射することでシス体を優先することが明らかになった (トランス : シス = 40 : 60)。また、続いて450 nmの光を10秒間照射することで、可逆的に光異性化を行えることを確認した。なお、10秒以上の間紫外線、可視光をそれぞれ照射した場合も異性体の割合は変化しなかったため、10秒間の光照射という極めて短い時間で平衡状態に達していた。さらに、光照射を繰り返しても異性化効率は減衰しないことが明らかとなり、**dU^{Az}**が優れた光応答性を有していることが示された (Figure 8c)。

他の**dU^{Az}**類導入ONについても同様の評価を行った (Table 2)。その結果、**ON6** を除く全てのONについて光異性化が確認された。**ON6** については**dU^{Az}**のアゾベンゼン中のベンゼン環がピリジン環へと置換された構造を持っており、アゾ骨格に対してパラ位に窒素原子が位置している。そのため、ピリジン環内の窒素原子に電子が非局在化する傾向にあると共に、共鳴効果によりアゾ骨格上の電子密度も低くなつたため光異性化が進行しなかつたと考えられる。電子供与性の置換基を導入した**ON2**や**ON3**では紫外線照射時シス体への光異性化率はそれぞれ79%、61%を示し、**ON1** (58%) と比較して増加する傾向にあった。また、電子求引性の置換基を導入した**ON4**や**ON5**ではシス体への光異性化率が28%、14%に減少する傾向にあった。これらの結果は置換基の電子供与性または電子求引性がアゾ骨格の電子密度に影響を与えることに起因し、アゾ骨格の電子密度が高いほどシス型への光異性化率が増加したと考えられる。なお、光異性

化が確認された**ON1-5**の全ての場合で逆相HPLCにおけるシス型の保持時間はトランス型のものより短く、オリゴ核酸の親水性はトランス型よりシス型の方が高いと類推される。

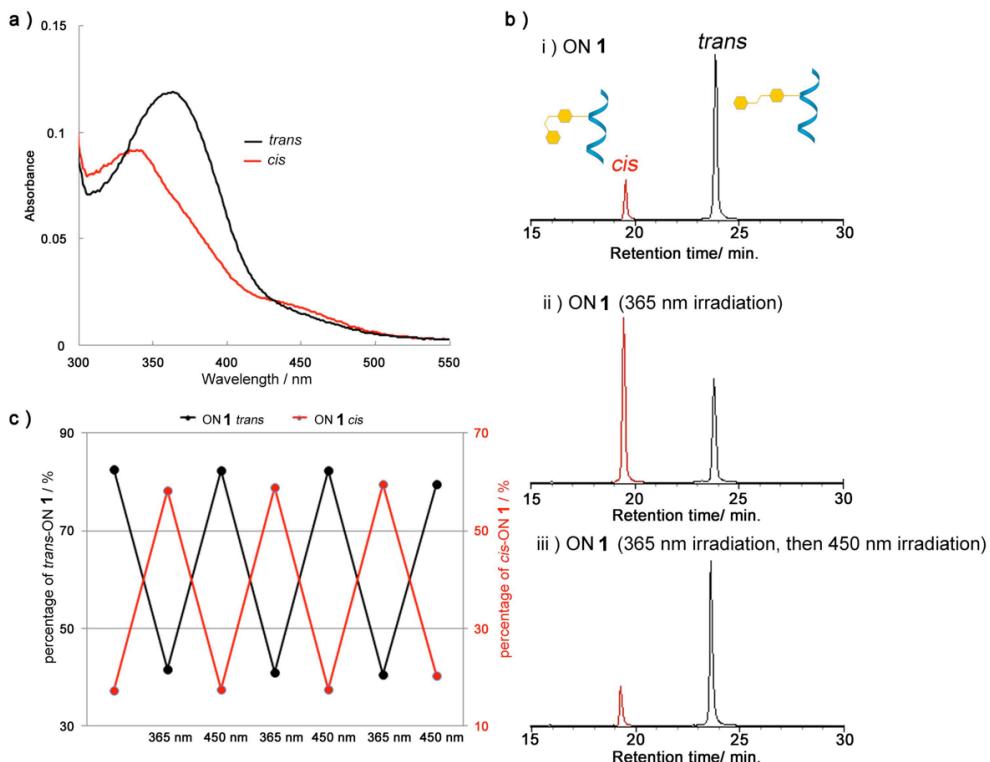


Figure 8. Photoisomerization property of \mathbf{dU}^{Az} in **ON1**.
a) Absorbance spectra of *trans*- (black line) and *cis*- (red line) **ON1**.
b) HPLC analysis of the photoisomerization of **ON1**; (i) Before irradiation, (ii) after 365 nm irradiation for 10 seconds, (iii) subsequent irradiation at 450 nm, 10 seconds. c) Repetitive photoisomerization of **ON1** induced by alternative light irradiation at 365 nm and 450 nm. The percentages of *trans*- (black line) and *cis*- (red line) **ON1** obtained from the HPLC peak areas are shown. Conditions: **ON1** (4.0 μM), NaCl (100mM) in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) was irradiated at room temperature.

Table 2. Photo-isomerization property of \mathbf{dU}^{Az} modified ONs

ON ^b	Before photo-irradiation <i>trans</i> isomer / % ^b	<i>trans</i> to <i>cis</i>		<i>cis</i> to <i>trans</i>	
		Wavelength ^c / nm ^d	<i>cis</i> isomer / % ^d	Wavelength ^c / nm ^d	<i>trans</i> isomer / % ^d
ON1	82	365	58	450	82
ON2	59	365	79	450	59
ON3	77	365	61	450	77
ON4	91	365	28	450	91
ON5	96	400	14	450	96
ON6	100	-	0	-	-

^a Conditions: 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7.0), 100 mM NaCl, 4 μM ON; ^b ON sequence is 5'-d(GCGTTXTTTGCT)-3'; ^c The wavelength of monochromic light corresponds to $\pi-\pi^*$ transition (*trans* to *cis*), $\pi-\pi^*$ (*cis* to *trans*). Photo-irradiation was performed for 10 seconds at room temperature; ^d the ratio of isomer is calculated from peak area of HPLC analysis (260 nm).

シス型のアゾベンゼンは熱刺激によってもトランス型へ異性化することが知られている⁴⁰⁾。そのため、ON中のシス型dU^{Az}類の熱安定性を評価した。熱による異性化が起こりにくい核酸素材ならば、紫外線/可視光の光照射のみによって構造、性質の制御を行うことが出来る。逆に熱によりシス型からトランス型へと素早く異性化するならば、紫外線を照射した瞬間のみ構造を変化させるスイッチとして利用することが可能である。

ON1-5に対して適当な波長の光照射を行った後、サンプルを60 °Cに加熱した。365 nmの吸光度を経時的にプロットすることで、各種dU^{Az}類のシス体の半減期を求めた (Figure 9, Table 3)。アゾベンゼン上に電子供与基を持つ**ON2**及び**3**は、置換基を導入していない**ON1**と比較して、シス体の半減期が短いことが確認された。特にメトキシ基が導入された**ON3**の半減期は9分であり、**ON1**よりも極めて高い熱異性化能を示した。これは、パラ位の電子供与基と核酸塩基部から伸びるエチニルリンカーにより、アゾベンゼン骨格がpush-pull型の電子的構造をとることに起因していると考えられる⁴¹⁾。即ち、アゾベンゼン骨格の二つの芳香環に電子的な偏りが生じ、シス体からトランス体へ異性化する際の活性化エネルギーが小さくなつたため、シス体の熱安定性が低下したと予想される。一方、アゾベンゼン上に電子求引基を持つ**ON4**及び**5**は、無置換体 (**ON1**) と比較して長い半減期を示し、強い電子求引性を示すニトロ基を導入した**ON5**については、60 °Cで5時間加熱しても目立った熱異性化は確認されなかった。一般に、電子求引基をアゾベンゼン骨格に導入するとシス体の熱安定性が低下する傾向にあるが、4,4'位に電子求引基を導入した際にはシス体の熱安定性が増加することが報告されている⁴²⁾。**ON4**及び**5**は核酸塩基部と結合するエチニルリンカーとパラ位の電子求引基を有するため、**ON1**と比較してシス体の熱安定性が向上したと考えられる。

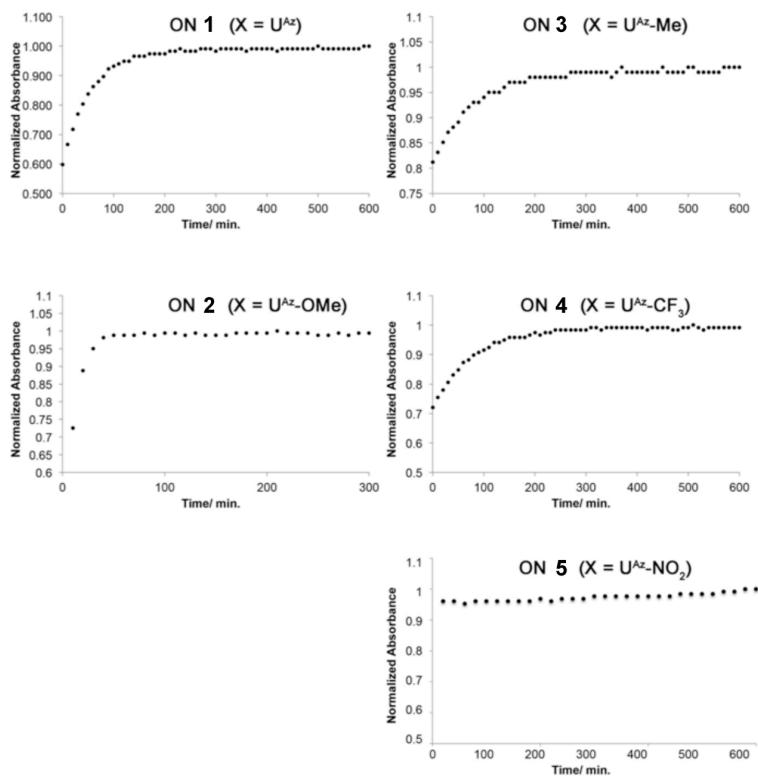


Figure 9. UV absorbance curves for *cis*-dU^{Az} analogues containing **ON1-5** at 60 °C. Conditions: 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaCl, 4 μM ON. ON sequence is 5'-d(GCGTTXTTGCT)-3'. The wavelength of monochromic light corresponds to π-π* transition. Photo-irradiation were performed for 10 seconds at room temperature

Table 3. Half-life time of the *cis*-form of *para*-substituted-**dU^{Az}** at 60 °C^a

ON ^b	t _{1/2} of <i>cis</i> isomer / min. ^{c,d}
ON1	44
ON2	9
ON3	24
ON4	65
ON5	> 300
ON6	- ^e

^a Conditions: 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaCl, 4 μM ON; ^b ON sequence is 5'-d(GCGTTXTTGCT)-3'; ^c *trans*-ODNs were photo-isomerized to *cis*-form by a 10 second irradiation of 365 nm (ONs **1-4**) or 400 nm (ON **5**) monochromic light; ^d Half life times of *cis* isomer were measured at 60 °C; ^e t_{1/2} could not be determined because **dU^{Az}-pyridyl** did not isomerized to *cis*-form.

核酸塩基部に導入した種々のアゾベンゼン誘導体が、核酸二重鎖の安定性に及ぼす影響について、融解温度 (T_m値) を測定することで評価した (Table 4)。その結果、天然二重鎖がT_m値52 °Cを示すのに対して**ON1~6**と相補鎖DNAによる二重鎖のT_m値は44~47 °Cと低い値を示し、今回合成した全てのONが標的DNAと形成する二重鎖は、天然二重鎖と比較して不安定であると分かった。また、**ON2~6**のT_m値の差異はわずかであったことから、置換基が二重鎖の安定性に及ぼす影響は小さく、嵩高いアゾベンゼン骨格が二重鎖のメジャーグループに突き出すことで核酸二重鎖が不安定化されていることが示唆された。同様の傾向は相補鎖RNAに対しても見られ、天然のDNA/RNA二重鎖 (47 °C) と比べ、一様にT_m値は低下した (41~43 °C)。

Table 4. T_m values of duplexes formed by **dU^{Az}** analogue-modified ONs with complementary strands^a

ON	T _m [°C] ^b DNA/DNA	ΔT _m [°C] ^c	T _m [°C] ^a DNA/RNA	ΔT _m [°C] ^e
ON1	47	-5	42	-5
ON2	44	-8	41	-6
ON3	45	-7	43	-4
ON4	45	-7	41	-6
ON5	45	-7	41	-6
ON6	44	-8	42	-5

^a Conditions: 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaCl, 4 μM ON.

^b The complementary ODN sequence is 5'-d(AGCAAAAAACGC)-3'. The T_m values given are the average of at least three data points. The T_m value of natural DNA duplex is 52 °C; ^c The ΔT_m indicates the difference from natural DNA/DNA duplex, ^d The complementary ON sequence is 5'-r(AGCAAAAAACGC)-3'. The T_m values given are the average of at least three data points. The T_m value of natural DNA/RNA duplex is 47 °C; ^e The ΔT_m indicates the difference from natural DNA/RNA duplex.

続いて、優れた光異性化能とシス体の熱安定性を示したON 1について、光異性化が二重鎖安定化能に及ぼす影響を精査した。365 nmの光照射を10秒間行った後に相補鎖DNA/RNA鎖に対する T_m 値を測定した結果、光照射前と比較して T_m 値が上昇した。特に、相補鎖RNA鎖に対してはシス体において47 °Cを示し、天然のDNA/RNA配列と同等の二重鎖安定性を持つことが示された(Table 5)。これは当初の設計通り、トランス体ではアゾベンゼンが二重鎖のメジャーグループに突き出して二重鎖を不安定化させる一方、光照射によりシス体へ異性化することでメジャーグループ内に収まり、二重鎖を不安定化する要因が解消されたためと考えられる。

Table 5. T_m values of duplexes formed by dU^{Az} analogue-modified ONs with complementary RNA^a

Duplex ^b	T_m [°C] <i>trans</i>	T_m [°C] <i>cis</i>	ΔT_m [°C] ^c (T_m <i>cis</i> - T_m <i>trans</i>)
ON 1/DNA	47	49	2
ON 1/RNA	42	47	5

^a All T_m values for the duplexes (4.0 μ M) were determined in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 100 mM NaCl. The T_m values given are the average of at least three data points; ^b The DNA complementary ODN sequence is 5'-d(AGCAAAAAACGC)-3', The RNA complementary ON sequence is 5'-r(AGCAAAAAACGC). ^c The change in the T_m value induced by the *cis-trans* photoisomerization.

また、dU^{Az}の光異性化が相補塩基認識能に影響を与えるかを調べるために、ON1中dU^{Az}の相補的な位置にミスマッチ塩基を含むDNA鎖、RNA鎖に対する T_m 値を測定した (Figure 10)。相補鎖DNAがミスマッチを含む場合、ON 1 は光照射前後のどちらの場合においてもフルマッチ鎖と比較して13~14 °Cの T_m 値の低下を示した。また、相補鎖RNAがミスマッチを含む場合もフルマッチ鎖と比べて大きく T_m 値が低下した。このことから、dU^{Az}をON中に導入しても相補塩基認識能は損なわれないことが確認され、dU^{Az}は核酸二重鎖の安定性を光制御する有用な素材であることが示された。

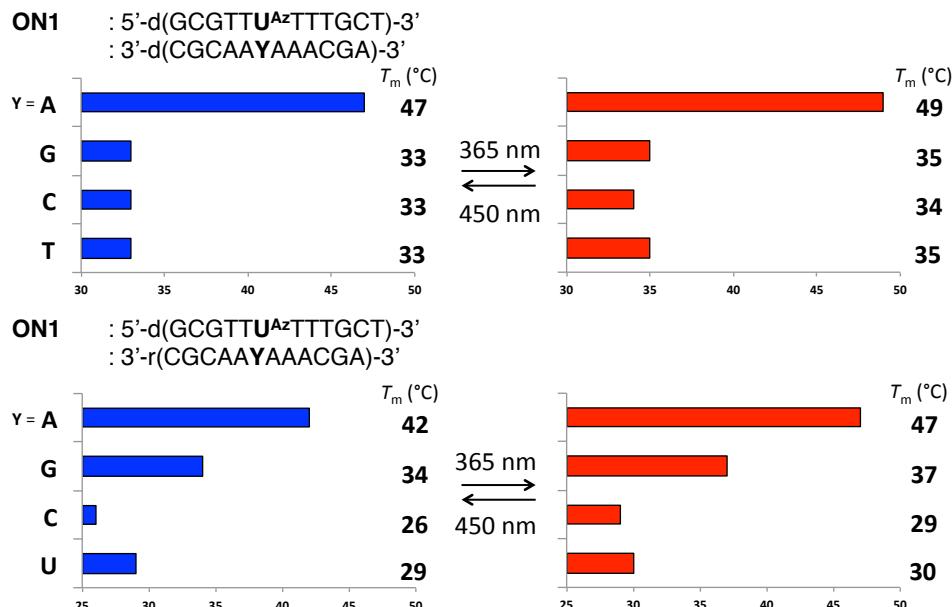


Figure 10. T_m values of duplexes formed by ON 1 with mismatch DNA, RNA.

最後に、充分な光異性化能を有しているがシス体が熱に対して不安定なON2及び3について、等温滴定型熱量計^{注5} (ITC) を用いて光照射による二重鎖安定化能の変化を評価した (Table 6)。相補鎖RNAとの二重鎖形成の際のギブス自由エネルギー変化 (ΔG) を算出した結果、光照射前はON2と3の ΔG は各々 -9.38 kcal/mol と -10.0 kcal/mol であった。光照射後ではON2及び3の両方ににおいて ΔG はより大きな負の値 ($\Delta G = -9.93\text{ kcal/mol}$, -10.4 kcal/mol) を示した。このことから、dU^{Az}-OMe及びdU^{Az}-Meがシス体を取る場合に熱力学的により安定な二重鎖を形成することが示唆された。dU^{Az}-OMeやdU^{Az}-Meは熱異性化によりトランス体に戻りやすい特性を生かして、光照射時のみ二重鎖を安定化するスイッチとしての利用が可能であると考えられる。今回合成したdU^{Az}類を導入したオリゴヌクレオチドは光照射によって幾何学的性質を大きく変化させる結果、二重鎖安定性を制御可能であることが明らかになった。光照射により薬効を制御可能な核酸医薬品への応用を考えた場合、オリゴ鎖の高次構造が薬効に大きく作用するアプタマー核酸^{注6}への応用が最も適していると考えられ、紫外線照射の有無により特定のタンパク質と結合する核酸分子の創成が期待される。また、アズベンゼン部がトランス体の時に結合するタンパク質とシス体の時に結合するタンパク質が変化するアプタマーを設計できれば、一つのアプタマーナucleic acidを用いて複数の生理活性を持たせることができると考えられる。例えば、紫外線照射を行わない時は特定の細胞表面に発現するタンパク質に対する結合能を有するアプタマーとして用いて病変部位に集積させ、紫外線照射を行った際に特異的に薬効を発現できるアプタマーに変化させることができれば、ターゲティング能と優れた薬効の両方を併せ持つ核酸医薬品が創成できる。

Table 6. Thermodynamic parameters for the hybridization of ON 2,3 and complementary RNA measured by ITC^a

ON ^b		K_a [$10^7 * \text{M}^{-1}$]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [kcal/mol/deg]	ΔG [kcal/mol]
ON2	<i>trans</i>	2.65	-54.1	-0.150	-9.38
	<i>cis</i>	3.03	-54.8	-0.148	-10.0
ON3	<i>trans</i>	2.17	-55.3	-0.140	-9.93
	<i>cis</i>	4.12	-52.1	-0.152	-10.4

^a All thermodynamic parameters were determined in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 50 mM NaCl. The complementary RNA sequence is 5'-r(AGCAAAAAACGC)-3'.

^b ONs were photo-isomerized from *trans*- to *cis*-form by a 10 second irradiation of 365 nm and from *cis*- to *trans*-form by a 10 second irradiation of 450 nm.

注5 一定温度条件で滴定に伴い発生する熱量変化を検出する装置であり、分子間相互作用解析に用いられる。分子同士が結合する際に発生する微弱な熱量変化を計測し、得られる滴定曲線より、結合比 (n)、結合定数 (K_a)、結合に伴うエンタルピー変化 (ΔH)を導出できる。

注6 特定の分子と特異的に結合する一本鎖のオリゴ核酸分子の総称。2018年12月現在、上市されている核酸医薬品としては OSI Pharmaceutical 社により開発された、血管内皮増殖因子(VEGF)への結合能をもつ黄斑変性治療薬の pegaptanib (MACUGENTM)がある。

第一節 特定の生体内環境に応答し構造を変化させる核酸に関する先行研究

細胞内部の環境の違いを感じて薬効を発揮する核酸医薬は、病理解析が困難な疾病を選択的に治療できる可能性を秘めている。このような外部環境応答型の人工核酸として、和田らが開発したペプチドリボヌクレオシド (PRNA) が挙げられる⁴³⁾。彼らはホウ酸類が *cis*-1,2-ジオールと可逆的にエステルを形成することを利用して、核酸塩基部のanti / syn 配向をpH変化により制御することに成功した。PRNAはホウ酸エステルを形成した状態では糖部骨格が固定され、糖部-核酸塩基部水素結合により核酸塩基部が塩基認識に不利なsyn型に固定される。一方で、pH低下に伴い、ホウ酸エステル部が加水分解した場合には、一般のピリミジンヌクレオシドと同じく核酸塩基がanti型を優先し塩基認識能が回復する (Figure 11)。がん細胞中ではシアル酸などの酸性多糖類が過剰発現し、正常細胞よりpHが低下していることから⁴⁴⁾、PRNAはがん細胞特異的な核酸医薬として利用できる可能性がある。

また、当研究室では酸化還元条件により性質が変化する人工核酸として、ジスルフィド型BNA⁴⁵⁾ (Figure 12a) や、架橋部にセレノメチレン構造を有するSeLNA⁴⁶⁾ (Figure 12b)を報告している。ジスルフィド型BNAは酸化的環境下では架橋構造を構築するため相補鎖核酸に対し高い二重鎖安定化能を示すが、還元的条件下では架橋構造が開裂するため結合親和性が大きく低下する。一方、SeLNAは酸化還元に伴いセレノキシド型との可逆的な構造変換が可能であり、架橋骨格の極性が変化することで二重鎖の安定性を制御可能である。細胞内では還元剤のグルタチオン濃度が細胞外に比べ高いため、酸化還元条件応答性核酸は細胞内外で性質を変化させる核酸素材としての利用が期待できる。

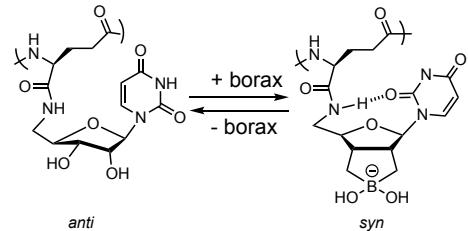


Figure 11. Reversible control of recognition behavior of PRNA by borax.

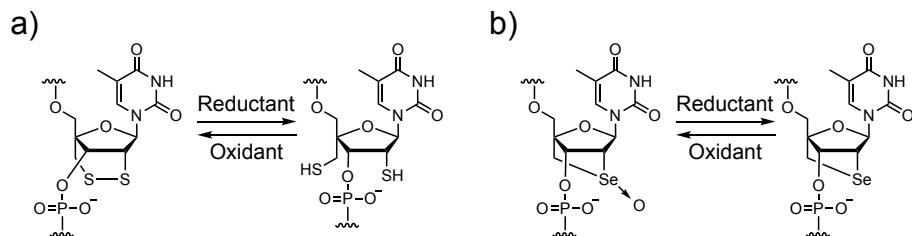
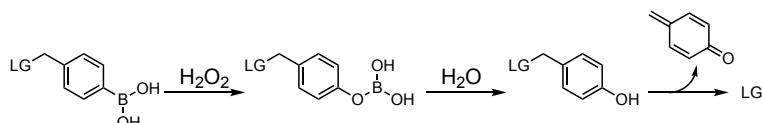


Figure 12. Change in structure of a) disulfide-type BNA and b) SeLNA by reductant and oxidant.

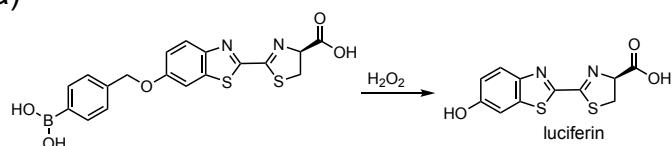
第二節 過酸化水素応答性人工核酸の設計

これまでに様々な外部刺激応答性核酸が開発されてきたが、病変細胞や特定組織のみで薬効を発現する核酸医薬の実現には至っていない。筆者は、そのような核酸医薬の実現には、1) 病変部位特異的に過剰発現するマーカーに対し高い反応性と選択性を併せ持ち、2) 反応の前後で核酸の構造及び性質を大きく変化させることのできる外部刺激応答性核酸の開発が肝要であると考えた。そのような新規外部刺激応答性人工核酸の設計のため、まずは外部刺激として利用可能な生体内小分子を精査することとした。外部刺激とする生体内小分子は、病変部位において常に高濃度でありながら化学的に安定な化学種が望ましい。例えば、がん細胞は内因性の酸化ストレスにより活性酸素種 (ROS) が増加しているが、外部刺激としては不安定なラジカル種や生体内発現量の少ない一重項酸素よりも過酸化水素を用いるのが合理的である。実際に様々ながん細胞で過酸化水素濃度の上昇が見られることが知られており⁴⁷⁾ (最大0.5 nmol/10⁴ cells/h)、過酸化水素濃度はがん細胞と正常細胞を識別するマーカーになるといえる。つまり、過酸化水素選択的に反応する官能基を核酸塩基部に付与することが出来れば、今までにないがん細胞選択的な核酸医薬の創製が可能となる。そこで筆者は、Scheme 3 に示すホウ素酸化と続く脱離反応を利用することとした。この反応は、過酸化水素選択的にかつ迅速に進行することが知られており、実際に過酸化水素の *in vivo* イメージング⁴⁸⁾ やがん細胞選択的なクロスリンク剤⁴⁹⁾に用いられている (Scheme 4a,b)。本反応を核酸に応用することが出来れば、がん細胞選択的なアンチセンス医薬やアプタマー、ヌクレオシド製剤の発展に大きく寄与することが期待できる。

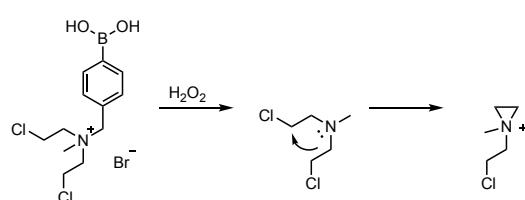


Scheme 3. The mechanism of aryl boronic acids cleavage by H₂O₂

a)

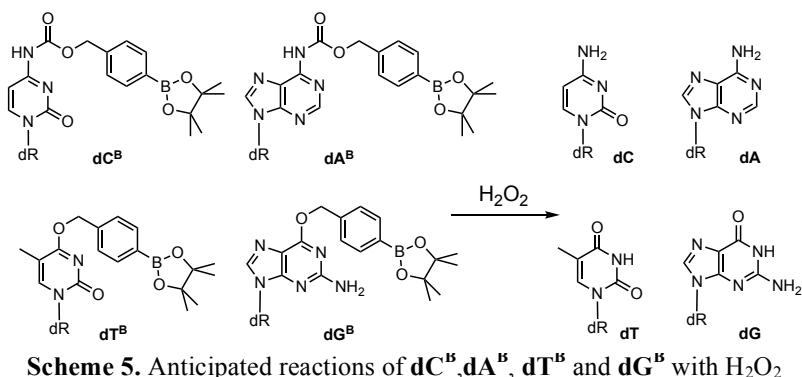


b)

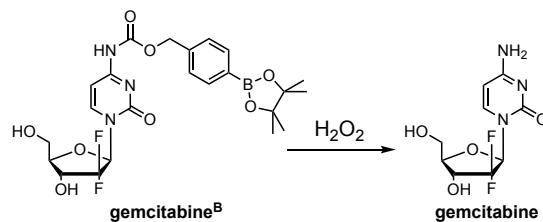


Scheme 4. a) H₂O₂-mediated release of a) firefly luciferin for *in vivo* imaging and b) nitrogen mustard as a DNA cross-linking agent.

このような背景をふまえ、種々の天然核酸塩基の水素結合形成部位を 4-(ボロン酸ピナコールエステル)フェニルメチル基及び 4-(ボロン酸ピナコールエステル)フェニルメチルオキシカルボニル基で保護した人工核酸 **dC^B**、**dG^B**、**dC^B** 及び **dT^B** を設計した。これらの人工核酸は一時的に二重鎖安定化能などの性質を失っているが、過酸化水素存在下では天然核酸へと変換されてその機能が回復すると考えた (Scheme 5)。これらの人工核酸を例えればアンチセンス核酸 (ASO) に導入することで、過酸化水素が過剰に発現しているがん細胞特異的に特定の遺伝子発現を抑制できると期待できる。また、過酸化水素応答型ヌクレオチド製剤の開発を目指し、シチジンアナログ構造を持つゲムシタビンに注目した。ゲムシタビンはシチジンのリボース環 2'位水酸基が二つのフッ素原子で置換された構造を持ち、ポリメラーゼに取り込まれた際に伸長作用を阻害することでアポトーシスを誘導する抗がん剤である⁵⁰⁾。しかし、ゲムシタビンは正常細胞でも DNA 合成を阻害するため、副作用の発現が懸念されている⁵¹⁾。ゲムシタビンに過酸化水素応答性を付与することにより、がん細胞選択的にアポトーシスを惹起できるのではないかと考え、**gemcitabine^B** を設計した。**gemcitabine^B** は過酸化水素濃度が低い環境下ではボロン酸エステル部が除去され、ゲムシタビンとして機能すると期待した (Scheme 6)。また、それぞれの過酸化水素応答型人工核酸についてボロン酸エステル骨格を持たない類縁体についても合成し、過酸化水素に対する応答性を比較した。



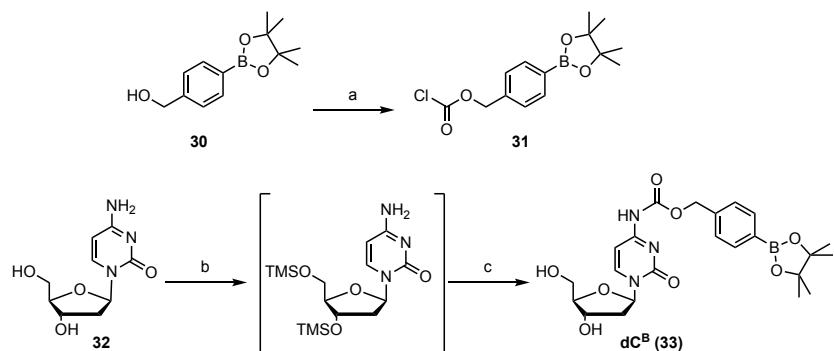
Scheme 5. Anticipated reactions of **dC^B**, **dA^B**, **dT^B** and **dG^B** with H_2O_2



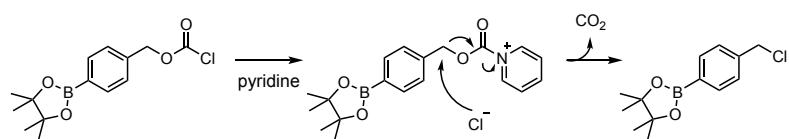
Scheme 6. Anticipated reaction of **gemcitabine^B** with H_2O_2

第二節 過酸化水素応答性人工核酸の合成

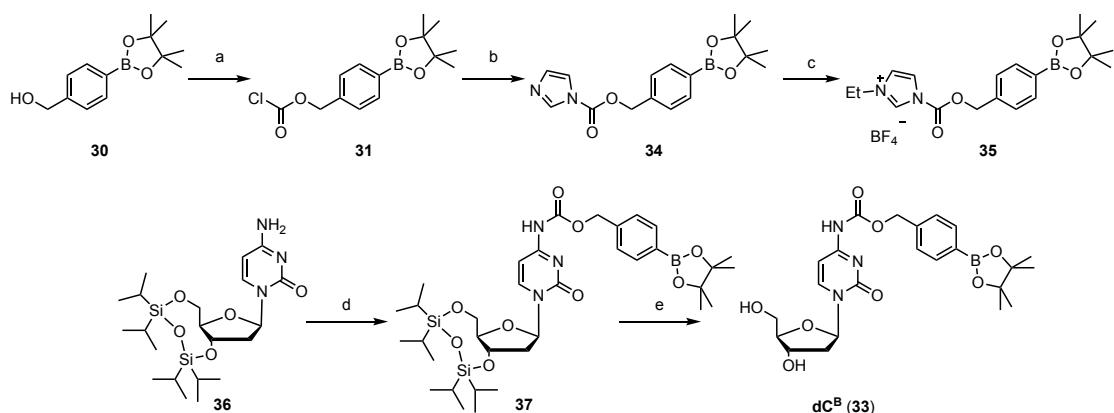
まず、**dC^B**の合成を検討した。文献に従い、2-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-4,4,5,5,-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン (**30**) に炭酸ナトリウム存在下、トリホスゲンを作用させることでクロロホルマート **31** を合成した⁵²⁾。2'-デオキシシチジン (**32**) にピリジン溶媒中クロロトリメチルシランを作用させ、糖部骨格水酸基をTMS基で保護した後に反応系にクロロホルマート **31** を加えたところ、望みの反応はほぼ進行せず、クロロホルマート **31** の分解がTLC上で確認された。反応系を水/メタノールで処理したところ、望みの化合物 **33** がわずかに得られるのみであった (Scheme 7)。これは溶媒として用いたピリジンと化合物 **31** が反応することが原因と考え (Scheme 8)、合成計画を変更した。即ち、化合物 **31** にイミダゾールを作用させて化合物 **34** を合成した後、化合物 **34** へメーヤワイン試薬を作用させることでイミダゾリウム塩 **35** へと変換した。イミダゾリウム塩 **35** を文献既知化合物 **36**⁵³⁾ に作用させたところ、核酸塩基部へフェニルボロン酸エステルを効率良く導入することに成功した。その後、フッ化水素-ピリジン (ca. 65% フッ化水素 w/w) を作用させることでTIPDS基を除去し、**dC^B**ヌクレオシド (**33**) を得た (Scheme 9)。



Scheme 7. An unsuccessful route for the synthesis of **dC^B**. *Reagents and conditions:* a) triphosgene, Na_2CO_3 , toluene, rt, crude; b) TMSCl , pyridine, rt; c) **31**, CH_2Cl_2 , -78°C then $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, rt.

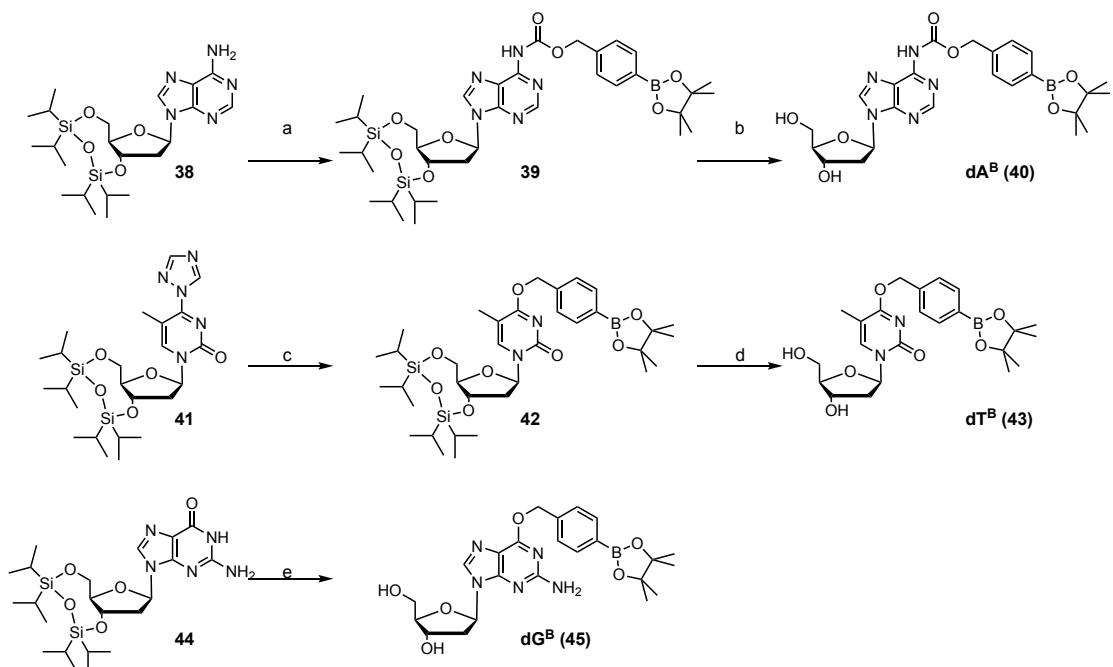


Scheme 8. A plausible reaction of **31** with pyridine.



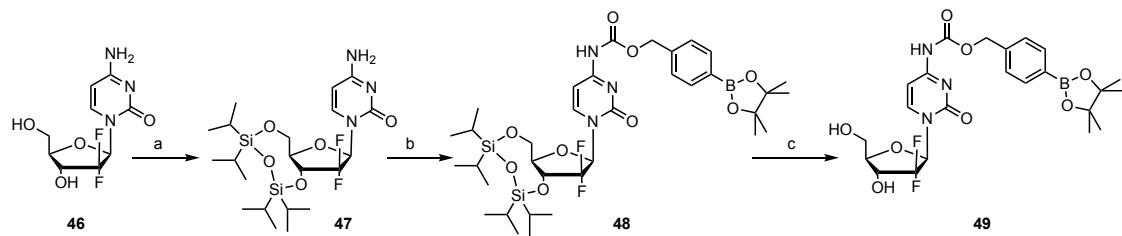
Scheme 9. A successful route for the synthesis of **dC^B**. *Reagents and conditions:* a) triphosgene, Na₂CO₃, toluene, rt, crude; b) imidazole, toluene, rt, 87%; c) Et₃O⁺BF₄⁻, CH₂Cl₂, rt, crude; d) **35**, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 92%; e) HF-pyridine, 60 °C, 52%.

dA^Bヌクレオシド **40** の合成は、**dC^B** と同様にイミダゾリウム塩 **35** を文献既知化合物 **38**⁵³⁾ に作用させ、続いて TIPDS 基を除去することで達成した。**dT^B**ヌクレオシド **43** は、文献既知化合物 **41**⁵⁴⁾ に DBU 存在下、化合物 **30** を作用させた後に TIPDS 基を脱保護することで合成した。**dG^B**ヌクレオシド **45** は、文献既知化合物 **44**⁵³⁾ に光延反応条件下、化合物 **30** を作用させ、続けて TIPDS 基を脱保護することで合成した (Scheme 10)。以上のように、各種天然核酸塩基に過酸化水素応答性フェニルボロン酸エステルを導入した 4 種の修飾ヌクレオシドの合成に成功した。



Scheme 10. Synthesis of **dA^B**, **dT^B** and **dG^B**. *Reagents and conditions:* a) **35**, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 91%; b) TASF, DMF, 0 °C, 62%; c) **30**, DBU, MeCN, rt, 98%; d) TBAF, THF, 0 °C, 72%; e) **30**, DIAD, PPh₃, 1,4-dioxane, rt, then TBAF, 10%.

ヌクレオシド製剤としての応用を志向した **gemcitabine^B (49)** は 2',2'-ジフルオロ-2'-デオキシシチジン (**46**) を出発原料とし、TIPDS 基で糖部骨格水酸基を保護した後に、イミダゾリウム塩 **35** を作用させ、続いて TIPDS 基を除去することで合成を達成した (Scheme 11)。また、文献に従い、ボロン酸エステル骨格を持たないヌクレオシド **50-54** をそれぞれ合成した⁵⁵⁻⁵⁸⁾ (Figure 13)。



Scheme 11. Route for the synthesis of **gemcitabine^B**. *Reagents and conditions:* a) TIPDSCl, pyridine, RT, quant; b) **35**, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 80%; c) HF-pyridine, 60 °C, 57%.

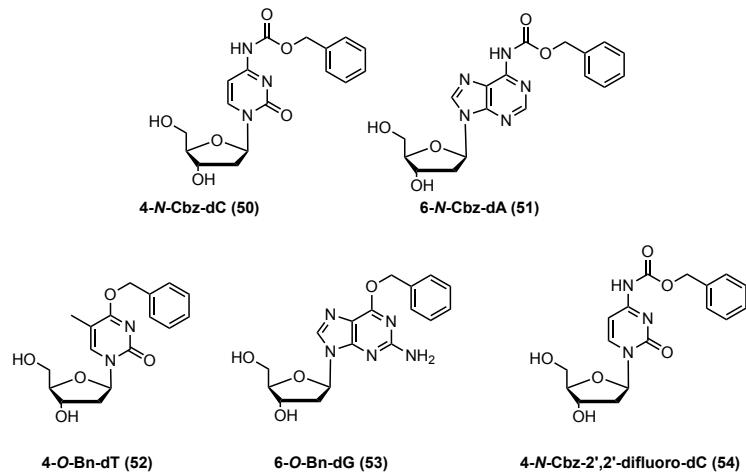
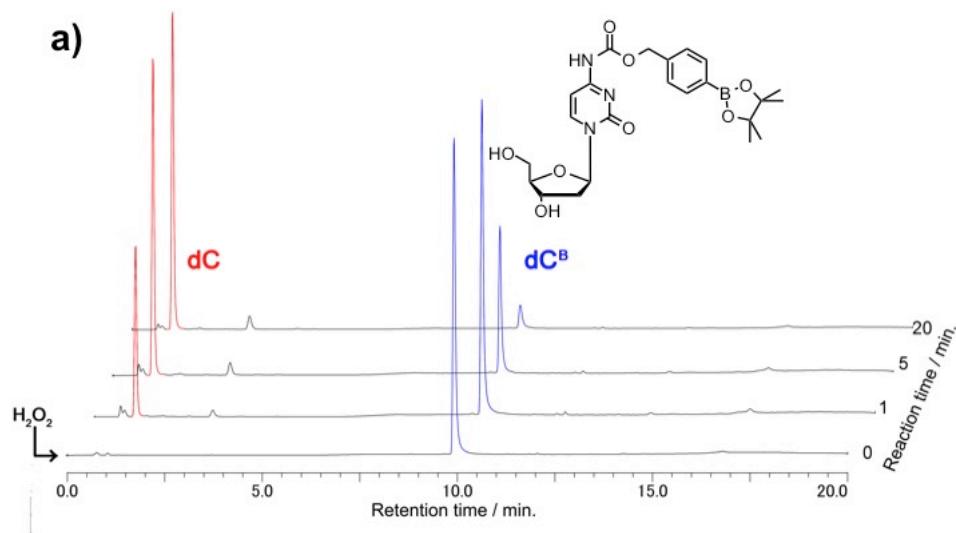


Figure 13. Nucleobase-protected nucleosides **50-54**.

第三節 過酸化水素応答性人工核酸の機能性評価

合成した各種ヌクレオシドについて、過酸化水素応答性を評価した。まず **dC^B** (33) に室温下リン酸カリウム緩衝液中で過酸化水素 1 当量分の過酸化水素水を作用させ逆相 HPLC で追跡したところ、わずか 20 分間で 2'-デオキシシチジンへ 88%と高い効率で変換されることを確認した (Figure 14a)。また、ボロン酸エステル骨格を持たない類縁体、4-N-(ベンジルオキシカルボニル)-2'-デオキシシチジン (**46**) を用いて同様の条件で過酸化水素に対する応答性を評価したところ、全く変化がなかったことから (Figure 14b)、修飾基の除去はボロン酸エステルの酸化と続く脱離反応により進行しているものと思われる。他のフェニルボロン酸エステル修飾核酸についても同様の評価を行ったところ、対応する天然の核酸およびゲムシタビンへと 20 分以内に 67~96%の効率で変換されることを確認した (Figure 15)。天然の核酸への変換効率が比較的低い **dG^B** (45)については過酸化水素に暴露することで一部が 8-oxo-dG アナログへと変換されたと考えられる^{59, 60)} (Figure 16)。天然の核酸への変換効率が 96%と特に良好な **dT^B** については更に、過酸化水素以外の ROS に暴露した際のチミジンへの変換効率も確認することとした。ROS としては TBHP、ClO⁻、HO⁻、'BuO⁻、O₂⁻および NO を用いることとした。**dT^B** を pH7.0 のリン酸カリウム緩衝液に溶解させ、1 当量の ROS を作用させたサンプル(**dT^B**、ROS の各終濃度:1mM)を調製した。サンプルを室温下で 12 時間静置した後、逆相 HPLC で解析したところ、各サンプル中に含まれる **dT^B** の大部分は反応せず、天然の核酸への変換効率は 2-14%程であった (Figure 17)。このことより、当初の分子設計の通り、フェニルボロン酸部位の酸化と続く 1,6-脱離により天然の核酸への変換が起こっていることが確かめられた。これを受け、**dT^B** を ON 中に導入し、更に詳細な評価を行うこととした。



b)

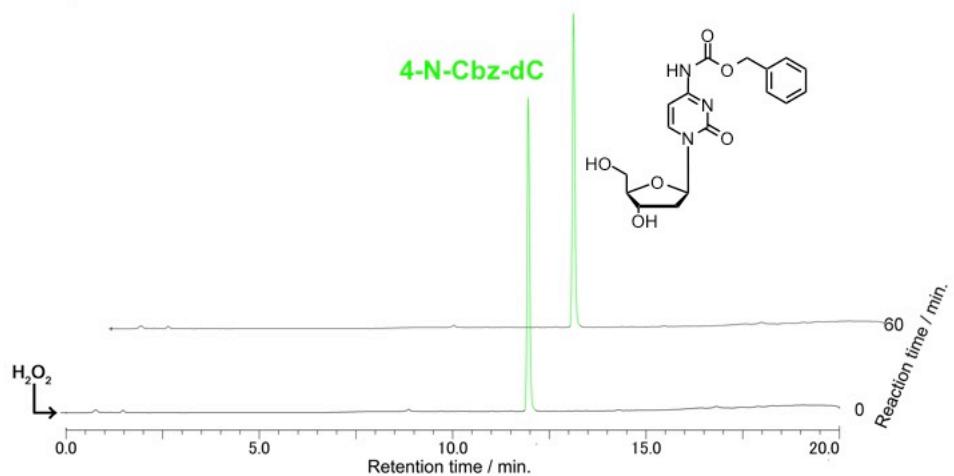


Figure 14. HPLC chromatograms of a) dC^{B} or b) 4-N-Cbz-dC after H_2O_2 addition at different time points
Conditions: nucleoside (1 mM), 5% DMSO sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0), NaCl (100 mM), H_2O_2 (1 mM), rt. Observed by RP-HPLC.

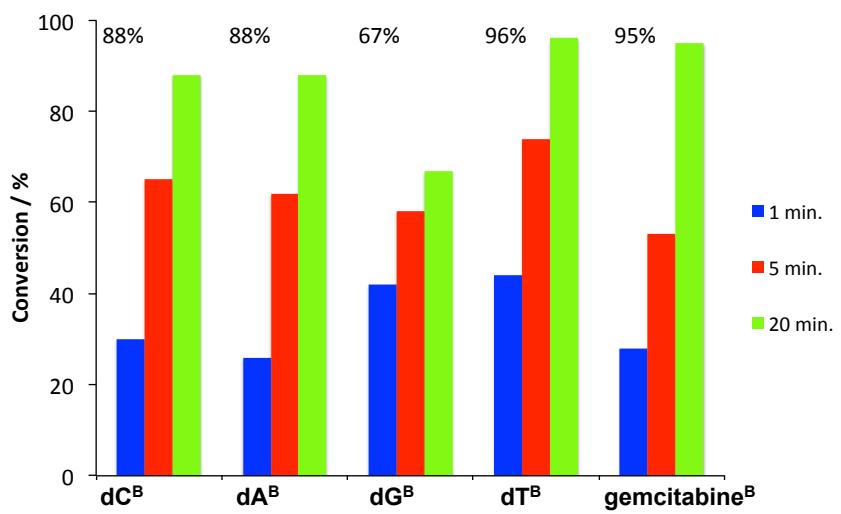


Figure 15. Conversion rate of boronated nucleoside analogues to the corresponding nucleosides or gemcitabine.
Conditions: 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7.0), 100 mM NaCl, 1 mM nucleoside. One chemical equivalent of H_2O_2 were added at room temperature and the conversion rate of nucleoside was calculated from peak area of HPLC analysis (260 nm).

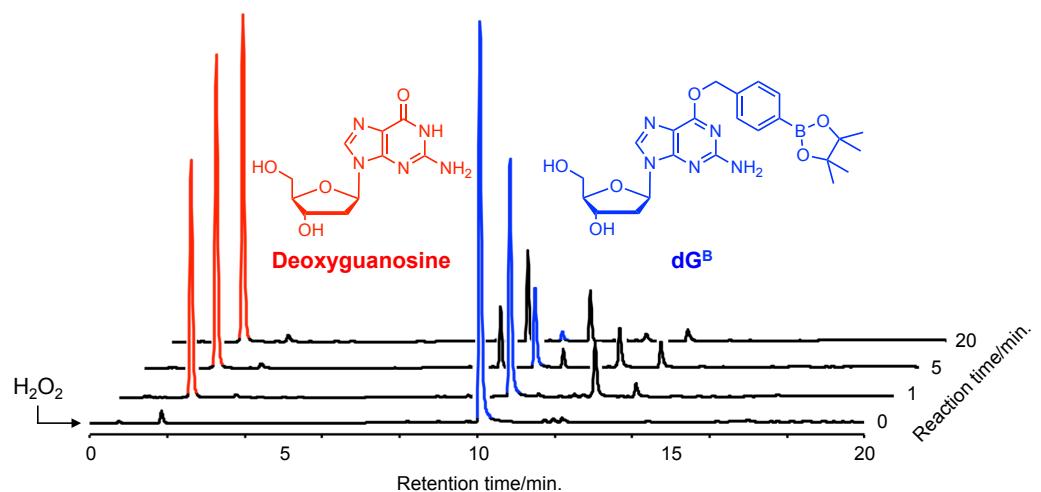


Figure 16. HPLC chromatograms of **dG^B** after H_2O_2 addition at different time points
 Conditions : nucleoside (1 mM), 5% DMSO sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.2),
 NaCl (100 mM), H_2O_2 (1 mM), rt. Observed by RP-HPLC.

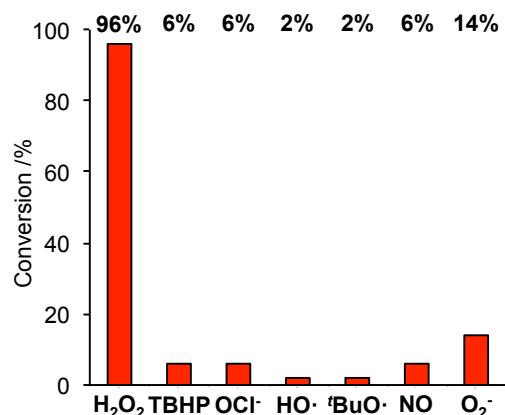
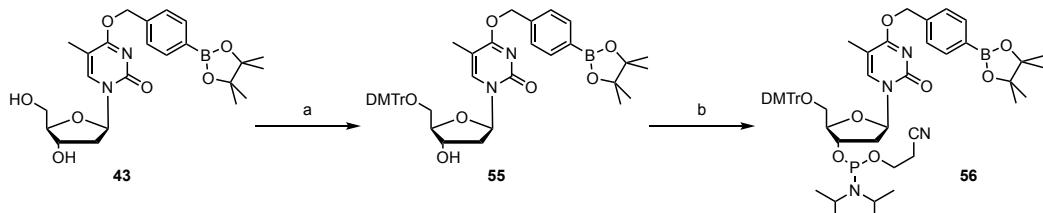


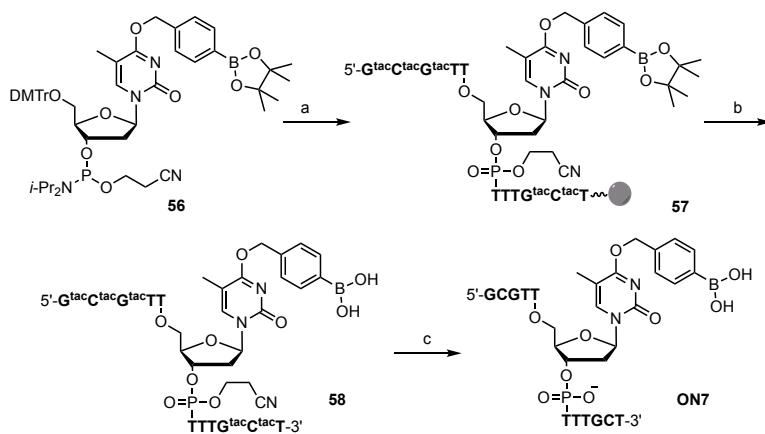
Figure 17. The reactivity of **dT^B** toward various ROS.
 Conditions : nucleoside (1 mM), 5% DMSO sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.2),
 NaCl (100 mM), ROS (1 mM). The samples are subjected to RP-HPLC after 12 h
 exposure of the ROS.

第四節 **dT^B**導入オリゴヌクレオチドの機能性評価

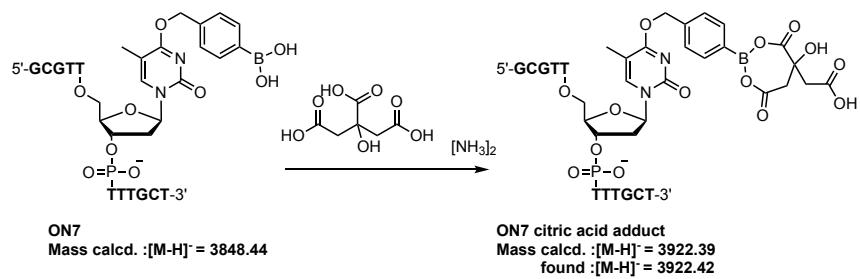
dT^BをON中へと導入するべく、アミダイトブロックの合成を行った。**dT^B**ヌクレオシド**43**の第一級水酸基をジメトキシトリチル化、残る第二級水酸基のホスホロアミダイト化を順次行うことで、目的のアミダイトブロック**56**へと変換した (Scheme 12)。得られたアミダイトブロック**51**を用い、DNA自動合成機によってオリゴ核酸鎖中に**dT^B**を導入した。CPGに結合したオリゴ核酸鎖は、室温下28%アンモニア水で2時間処理することによりCPG上から切り出した。その後、50 mMの炭酸カリウムメタノール溶液に室温条件下12時間暴露することでリン酸バックボーンおよび核酸塩基部の脱保護を行い、**ON7**を得た (Scheme 13)。これを簡易逆相カラムにて粗精製し、更に逆相HPLCを用いて精製を行った。精製後、マトリックスを3-ヒドロキシピコリン酸、添加剤をクエン酸二水素アンモニウムとしてMALDI-TOF-MS測定を行ったところ、望みの配列を持つON中のピナコールエステルが加水分解され、1当量のクエン酸がボロン酸部に脱水縮合したと推察される分子量(理論値:[M-H]⁻ = 3848.44に対して、実測値:[M-H]⁻ = 3922.42)が観測された。これは、ONの精製工程における28%アンモニア水での処理中にピナコールエステル部が加水分解され、MALDI-TOF-MS測定の際にプレート上でクエン酸二水素アンモニウムとの脱水縮合が進行した結果であると考えられる (Scheme 14)。



Scheme 12. Route for the synthesis of **dT^B** phosphoramidite **56**. *Reagents and conditions:* a) DMTrCl, pyridine, rt, 96%; b) *i*Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 48%.



Scheme 13. Route for the synthesis of **dT^B** incorporated **ON7**. *Reagents and conditions:* a) automated DNA synthesizer; b) 28% NH₃aq, rt, 2 h; c) 50 mM K₂CO₃ in MeOH, rt, 12 h



Scheme 14. Plausible reaction of **ON7** with diammonium hydrogenate on MALDI-Mass plate

続いて、**ON7**を用いて過酸化水素応答性の評価を行った。37 °Cで1 mMの過酸化水素条件(オリゴヌクレオチド鎖に対して250当量)に付したところ、30分後に修飾基が98%脱離することが確認された(Figure 18)。ヌクレオシド体の場合と比較して過酸化水素に対する応答性が低下した原因として、リン酸バックボーン上の負電荷とホウ素原子上の空軌道が相互作用し、過酸化水素の求核反応が妨げられていると考えられる

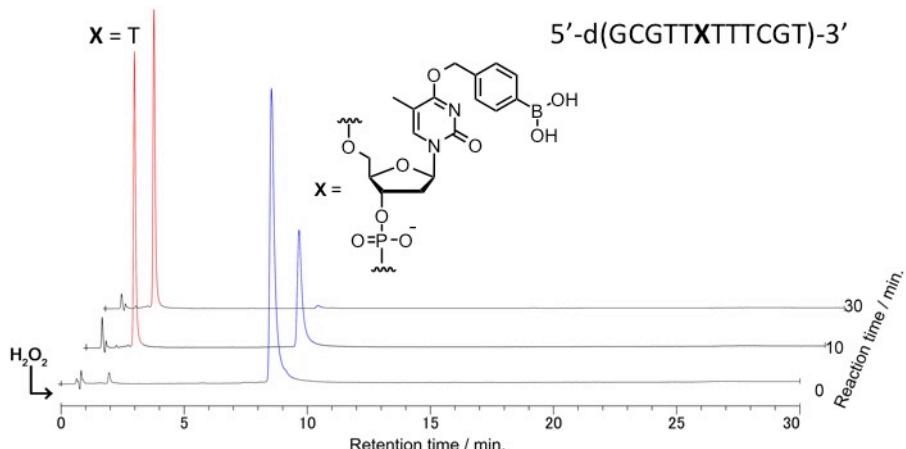


Figure 18. The reactivity of **dT^B** modified ON toward H_2O_2 observed by RP-HPLC.
Conditions : ON (4 μM), sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.2), NaCl (100 mM), H_2O_2 (1 mM), 37 °C. ON sequence is 5'-d(GCGTT^BTTTGCT)-3'

続いて、合成した **dT^B** 修飾 ON を用いて、過酸化水素の添加により二重鎖安定化能を制御できるか検討した。まず、**dT^B** の相補的な位置に各種天然核酸塩基を有する DNA 鎮に対する T_m 値を測定した結果、31 °C から 35 °C の値が得られた (Table 8a)。これらの値は天然のミスマッチ塩基対を含む二重鎖の T_m 値 (37-41 °C) よりも低く、**dT^B** が効率よく二重鎖を不安定化していることが分かった。一方、過酸化水素添加後に T_m 値を測定した結果、**dT^B** の相補的な位置に A を含む場合においてのみ二重鎖の大幅な安定化が見られた ($T_m = 31$ °C → 52 °C)。これは天然の T:A 塩基対を含む DNA 二重鎖の T_m 値と同じであり、過酸化水素の添加により **dT^B** が T へと変換されたことが示唆された。また、相補鎖が RNA の場合にも同様に二重鎖安定化能を過酸化水素の

添加によって制御できることを確認した (Table 8b)。以上の結果から、今回開発したフェニルボロン酸修飾人工核酸塩基は、細胞内 mRNA を標的とした ASO の活性を過酸化水素濃度によって制御できる、有用な核酸医薬素材となり得ることが示された。

Table 8. T_m values of duplexes formed by **dT^B**-modified ON with complementary strands or mismatch strands^a.

dT ^B modified ON 5'-d(GCGTTXTTTCGT)-3' DNA 3'-d(CGCAAYAAAGCA)-5'					dT ^B modified ON 5'-d(GCGTTXTTTCGT)-3' RNA 3'-r(CGCAAYAAAGCA)-5'						
ON	X	Y				ON	X	Y			
		A	G	C	T			A	G	C	U
ON7		31	35	33	34	ON7		32	39	30	31
ON7		52	41	36	38	ON7		46	39	30	32
ON8		52	41	37	40	ON8		47	37	29	30

^a Conditions: 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0), 100 mM NaCl, 4 μ M ON.
The T_m values given are the average of at least three data points.

第五節 培養細胞中における過酸化水素依存的なアンチセンス活性の制御

前節で示した通り、dT^B導入オリゴヌクレオチドは過酸化水素添加の有無に応じて相補鎖との高次構造形成能を大幅に変化させる。そこで、dT^B導入 ASO を作成し、特定の mRNA に対するノックダウン活性を制御可能か確かめることとした。ASO の設計は 2013 年に米国で承認された核酸医薬品である Kynamro に見られるように全てのリン酸ジエステル結合をホスホロチオアート結合に改変し、アンチセンス配列の両末端部のみに標的 mRNA 鎖と結合親和性の高い人工核酸を組み込むギャップマー配列^{注7}を採用することとした。標的 mRNA 配列はがん細胞において過剰発現することで知られるスカベンジャー受容体クラス B タイプ 1 (*Scarb1*)とし、ギャップマー配列の設計は 2012 年に Seth らによって報告されたものを参考にギャップ部を LNA とする 2-10-2 (Gap-Wing-Gap)の配列を用いた⁶⁰⁾ (Figure 19a)。なお、リン酸部は全てホスホロチオアート結合となっており、シトシン塩基の代わりに 5-メチルシトシン塩基を用いている。Wing 部への dT^Bの導入数がそれぞれ 1~3 塩基の配列、S₁-S₃を合成し、positive control (PC)としては dT^Bを含まない配列 S₀、negative control (NC)としては *Scarb1* を標的としないアンチセンス鎖 S_Aを用いた。マウス肝癌由来の培養細胞である Hepa-1c1c7 を 48 時間 CaCl₂ とそれぞれの ASO を含む培地において 1)H₂O₂ free、2)H₂O₂(終濃度 10 μM)の 2 条件でそれぞれ培養後、*Scarb1* の mRNA 量を qRT-PCR を用いて定量した (Figure 19b)。

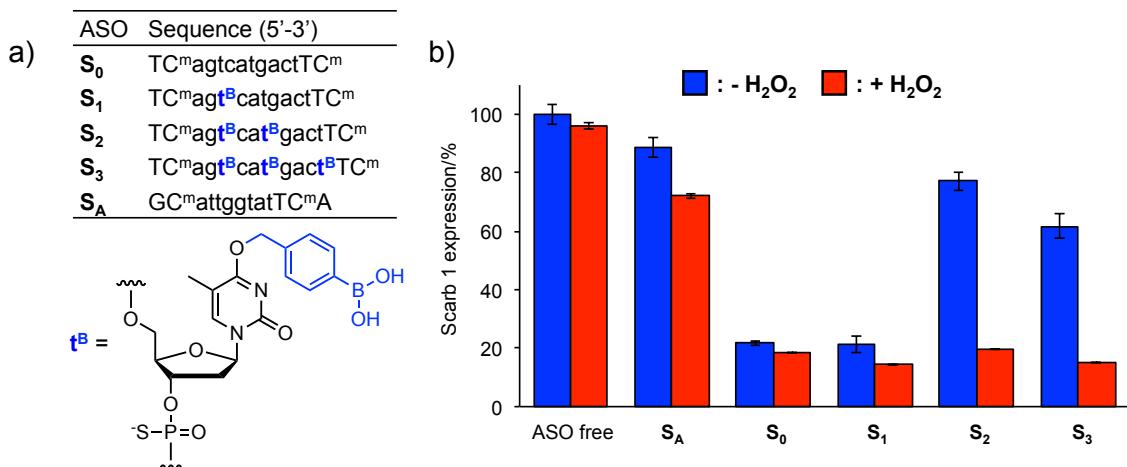


Figure 19. (a) Sequences of ASOs. n = DNA, N = LNA (C^m = LNA-5-Me-cytidine), all internucleosidic linkages are phosphorothioated. (b) Intercellular gene silencing triggered by H₂O₂ using boronate ASOs. Three independent experiments were averaged and the error bars represent standard deviation.

^{注7} ギャップマー配列はエンドヌクレアーゼ耐性および相補鎖 mRNA との結合親和性の向上を志向した人工核酸で構成される両末端部(Wing 部)と mRNA とハイブリット二重鎖を形成した際に RNaseH に認識される中央部の連続した DNA 配列(Gap 部)から成る。RNaseH は細胞質および核内に存在し、RNA/DNA 鎖を認識し、加水分解的に RNA 鎖を切断し、3'-OH 末端と 5'-リン酸末端を生じる。RNaseH の働きにより、ギャップマー型アンチセンス鎖は触媒的に標的 mRNA のノックダウン作用を示す。エンドヌクレアーゼ耐性を高めるために、リン酸ジエステル結合はホスホロチオアート結合へと改変されることが多い。

H_2O_2 を添加しない条件においては **S₁** による mRNA ノックダウン活性は **S₀** と大きな差は見られなかった。一方で、**S₂** や **S₃** を用いる条件においては顕著に標的 mRNA のノックダウンが抑制され、**S_A(NC)**によるものと同程度に収まることが確認された。今回の実験系においては 2 箇所以上 **dT^B** を導入することがノックダウン抑制には肝要であると考えられる。加えて、10 μM の H_2O_2 を添加した条件下においては **S₁-S₃** の **dT^B** を配列中に含有するいずれの配列においても **S₀** を用いた場合と同程度のノックダウン活性を確認できた。以上より、**S₂**、**S₃** の ASO を用いた場合に標的 mRNA 発現の H_2O_2 量依存的な制御を達成した。なお、ASO を添加していない条件においては H_2O_2 free 、 H_2O_2 添加の二条件間で *Scarb1* の発現量に大差がなかったことから H_2O_2 の添加そのものは *Scarb1* の発現に大きな影響はないと考えられる。本技術は生体内において正常細胞とがん細胞を精細に識別し、病変部位特異的にアンチセンス活性を示す核酸医薬品の基盤技術開発への発展が期待される。

結論

本研究において筆者は、薬効を精密に制御可能な核酸医薬品への応用を目指して二種類の外部刺激応答性人工核酸を開発した。

1) 光刺激により二重鎖の安定性を制御可能な人工核酸の開発を目指し、塩基部 5 位よりアルキルリンカーを介してアゾベンゼン誘導体を導入した 2'-デオキシリジンアログ (**dU^{Az}** 類) を合成した。**dU^{Az}** 類導入オリゴヌクレオチド(ON)は異なる波長の光照射により繰り返し異性化し、光応答性核酸として機能することを明らかにした。**dU^{Az}**、**dU^{Az}-Me** 及び **dU^{Az}-OMe** に関しては相補鎖 RNA に対しトランス体よりもシス体をとる際に高い二重鎖安定化能を示すことを見出し、光刺激によりオリゴ核酸の高次構造形成能を制御可能であることを明らかにした。そして、光刺激により繰り返しアンチセンス活性を制御可能なアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)やアプタマー核酸への応用可能性を示した。

2) ボロン酸エステル基をピリミジン塩基4位及びプリン塩基6位にもつヌクレオシド **dC^B**、**dA^B**、**dT^B**、**dG^B** 及び **gemcitabine^B** を合成し、これらのヌクレオシドが過酸化水素と反応し対応する天然のヌクレオシド及びゲムシタビンに効率よく変換されることを明らかにした。特に、**dT^B** に関してはその他の活性酸素種(ROS)との反応性も確認し、H₂O₂特異的な応答性を示した。また、**dT^B** 誘導体を導入した ON は、相補鎖 DNA 及び RNA に対する二重鎖安定化能を過酸化水素の添加により制御可能であることを見出した。同様の化学修飾をギャップマー型 ASO に施すことで、培養細胞系において標的 mRNA の H₂O₂依存的なノックダウン活性制御を達成し、**dT^B** ががん細胞特異的にアンチセンス活性を示す人工核酸として有用な素材である可能性を示した。

本研究で開発した二種類の人工核酸を用いて、既存の核酸分子を用いては不可能だった、薬効を精密制御可能な核酸医薬品の開発につながることを期待したい。

謝辞

本研究の遂行に際し、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました
大阪大学大学院薬学研究科 小比賀 聰 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、多大なるご指導とご助言を頂きました
東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻
森廣 邦彦 助教に心より感謝致します。

本論文の審査をして頂きました大阪大学大学院薬学研究科 赤井 周司 教授、
ならびに、高木 達也 教授に深く感謝致します。

本研究に様々な観点からご意見賜りました
大阪大学薬学研究科生物有機化学分野の山口 卓男 講師、中川 治 特任講師、
下條 正仁 特任准教授、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の笠原 勇矢 博士、
星野 秀和 博士、徳島文理大学薬学研究科 張 功幸 教授
長崎大学薬学研究科 山本 剛史 准教授に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、ご協力を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科生物有機化学分野の
奥田 匠 修士、長谷川 治 修士に感謝致します。

元素分析、なら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感謝致します。

本研究に際し、ご協力を頂きました
大阪大学大学院薬学研究科生物有機化学分野の皆様に感謝致します。

最後に、著者の長きに渡る大学院生活において、常日頃よりご支援頂きました
家族、友人に感謝致します。

2019年3月

森 翔平

実験の部

旋光度は日本分光 DIP370 型旋光度計、日本分光 P-2200 型旋光度計を用いて測定した。

赤外線吸収 (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。

質量分析について FAB-MS は日本電子 JMS-600 型、日本電子 JMS-700 型を用いて測定し、 MALDI-TOF-MAS は日本電子 JMS-S3000 型を用いて測定した。

NMR スペクトルは日本電子 JNM-ECS500 型 (500 MHz)、日本電子 JNM-ECS400 型 (400 MHz)、日本電子 JNM-ECS300 型 (300 MHz) を用い、¹H-NMR 及び¹³C-NMR はテトラメチルシラン (0.00 ppm) とクロロホルム (7.26 ppm)、メタノール (3.30 ppm)、ジメチルスルホキシド (2.50 ppm) を内部標準として測定し、³¹P-NMR はリン酸 (0.00 ppm) を外部標準として用いた。分裂様式は singlet、doublet、triplet、multiplet、broad singlet をそれぞれ s, d, t, m, brs と略した。

TLC プレートは Merck Kieselgel 60 F254 を使用した。

シリカゲルクロマトグラフィーの吸着剤は富士シリシア化学 PSQ-100B (0.110 mm)、富士シリシア化学 FL-100D (0.100 mm) を用いた。フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーの吸着剤は富士シリシア化学 FL-PSQ-60B (0.060 mm)、富士シリシア化学 FL-60D (0.060 mm) を用いた。DNA 合成機は、Gene Design nS-8 Oligonucleotides Synthesizer、Gene Design nS-8 II Oligonucleotides Synthesizer を用い、0.2μmol のスケールで行った。

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-10_{VP} を用いた。HPLC 分析カラムは Waters XBridgeTM Shield RP18 2.5μm (4.6 × 50 mm) を、分取カラムは Waters XBridgeTM Prep Shield RP18 2.5μm (10 × 50 mm) を用いて行った。 MALDI-TOF MS は Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF 及び Bruker Daltonics ultrafleXtreme を用いて測定した。UV 吸収測定は SHIMADZU UV-1650B を用いて行った。

T_m 値測定は SHIMADZU UV-1650B、SHIMADZU UV-1650PC、SHIMADZU UV-1800 を用いて行った。

光照射実験は朝日分光株式会社の 300W キセノン光源 MAX-303 と HQBP 365-VIS ø25 光学フィルター、400-VIS ø25 光学フィルター及び 450-VIS ø25 光学フィルターを用いて行った。

第一章第二節の実験

光応答性人工核酸dU^{Az}類の合成

4-[4-(Trimethylsilyl)ethynylphenylazo]pyridine (2)

アルゴン雰囲気下、化合物**1** (950 g, 3.07 mmol) の無水THF溶液 (30 mL) に、テトラキスホリフレニルホスフィンパラジウム(0) (358 mg, 0.310 mmol)、ヨウ化銅(I) (59 mg, 0.31 mmol)、トリエチルアミン (2.1 mL, 15 mmol) 及び、トリメチルシリルアセチレン (1.1 mL, 7.7 mmol) を加え、60 °Cで6時間攪拌した。セライト濾過し、溶媒を減圧留去し、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 = 8 : 1) で精製し、化合物**2** (485 mg, 57%) を赤色液体として得た。

IR (KBr): ν 2156 (C≡C), 1250 (N=N) cm^{-1} ; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.81 (2H, dd, *J* = 2.0, 4.5 Hz), 7.91 (2H, dd, *J* = 1.5, 6.5 Hz), 7.70 (2H, dd, *J* = 1.5, 4.5 Hz), 7.63 (2H, dd, *J* = 2.0, 6.5 Hz), 0.28 (9H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 151.5, 151.4, 133.0, 132.5, 130.4, 129.3, 123.5, 123.4, 116.33, 116.31; MS (FAB) *m/z* 280 [M+H]⁺; HRMS (FAB): Calcd for C₁₆H₁₈N₃Si [M+H]⁺: 280.1265. Found: 280.1272.

4-(4-Ethynylphenylazo)pyridine (5)

アルゴン雰囲気下、化合物**2** (319 mg, 1.14 mmol) の無水THF溶液 (5 mL) に炭酸カリウム (79 mg, 0.57 mmol)、メタノール (5 mL) を加え、室温で2時間攪拌した。酢酸エチル/水を加え、分液した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して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 = 3 : 1) で精製し、化合物**5** (205 mg, 86%) を赤色固体として得た。

M.p. 160 °C (decomposed); IR (KBr): ν 2092 (C≡C), 1263 (N=N) cm^{-1} ; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.82 (2H, dd, *J* = 1.5, 4.5 Hz), 7.92 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.71 (2H, dd, *J* = 1.5, 4.5 Hz), 7.66 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 3.28 (1H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 157.0, 151.8, 151.4, 133.1, 126.2, 123.3, 116.2, 83.0, 80.3; MS (FAB) *m/z* 208 [M+H]⁺; HRMS (FAB): Calcd for C₁₃H₁₀N₃ [M+H]⁺: 208.0869. Found: 208.0855.

4-Ethynyl-4'-methoxyazobenzene (6)

アルゴン雰囲気下、化合物**3** (750 mg, 2.44 mmol) の無水THF溶液 (10 mL) に炭酸カリウム (169 mg, 1.22 mmol)、メタノール (10 mL) を加え室温で2時間攪拌した。酢酸エチル/水を加え、分液した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して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**6** (576 mg, 99%) を橙色固体として得た。

M.p. 76–78 °C; IR (KBr): ν 2102 (C≡C), 1252 (N=N) cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.81 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.73 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.51 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.89 (2H, d, J = 9.0 Hz), 3.76 (3H, s), 3.11 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 162.3, 152.3, 146.9, 132.9, 124.9, 123.9, 122.4, 114.2, 83.4, 79.1, 55.5; MS (FAB) m/z 237 [M+H] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ [M+H] $^+$: 237.1022. Found: 237.1021.

4-Ethynyl-4'-methylazobenzene (7)

アルゴン雰囲気下、化合物4 (403 mg, 1.38 mmol) の無水THF溶液 (6 mL) に炭酸カリウム (95 mg, 0.69 mmol)、メタノール (6 mL) を加え室温で2時間攪拌した。酢酸エチル/水を加え、分液した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られた粗成績体をn-ヘキサンを溶離液として用い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、化合物7 (203 mg, 92%) を橙色固体として得た。

M.p. 138–140 °C; IR (KBr): ν 2156 (C≡C), 1250 (N=N) cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.87–7.81 (4H, m), 7.61 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.30 (2H, d, J = 8.5 Hz), 3.21 (1H, s), 2.42 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 152.2, 150.7, 142.0, 132.9, 129.8, 124.3, 123.0, 122.7, 83.3, 79.3, 21.5; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2$ [M+H] $^+$: 221.1073. Found: 221.1073.

5-[4-(4-Pyridyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (12)

アルゴン雰囲気下、化合物5 (281 mg, 1.35 mmol) の無水N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) にテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) (156 mg, 0.135 mmol)、ヨウ化銅(I) (26 mg, 0.14 mmol)、トリエチルアミン (0.94 mL, 0.67 mmol) 及び化合物 11 (465 mg, 1.35 mmol) を加えて60 °Cで12時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、溶媒を留去して粗成績体を得た。N,N-ジメチルホルムアミドを溶離液としシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、化合物12 (295 mg, 50%) を赤色固体として得た。

M.p. 235 °C (decomposed); IR (KBr): ν 3250 (NH, OH), 1636 (C=O); $[\alpha]_D^{24}$ −19.6 (c 1.00, DMSO); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.7 (1H, brs, NH), 8.82 (2H, d, J = 4.5 Hz), 8.48 (1H, s, H-6), 7.96 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.75–7.68 (4H, m), 6.13 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-1'), 5.27 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-3'), 5.21 (1H, t, J = 4.5 Hz, H-4'), 4.29–4.25 (1H, m, OH), 3.84–3.82 (1H, m, OH), 3.67–3.58 (2H, m, H-5'), 2.21–2.17 (2H, m, H-2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 161.3, 156.5, 151.5, 150.8, 149.4, 144.68, 132.3, 126.8, 123.5, 115.9, 97.7, 91.4, 87.6, 85.4, 85.0, 69.8, 60.8, 40.3; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5$ [M+H] $^+$: 434.1459. Found: 434.1459.

5-[4-(4-Methoxyphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (13)

アルゴン雰囲気下、化合物6 (303 mg, 1.28 mmol) の 無水N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) にテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) (148 mg, 0.128 mmol)、ヨウ化銅(I) (24 mg, 0.13 mmol)、トリエチルアミン (1.0 mL, 0.72 mmol) 及び化合物11 (441 mg, 1.28 mmol)を加えて60 °Cで12時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、溶媒を留去して粗成績体を得た。シリカゲル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、化合物13 (360 mg, 61%) を淡橙色固体として得た。

M.p. 253 °C (decomposed); IR (KBr): ν 3345 (NH, OH), 2102 (C≡C), 1638 (C=O) cm⁻¹; $[\alpha]_D^{24}$ -21.6 (c 1.00, DMSO); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.7 (1H, brs, NH), 8.47-8.44 (1H, m, H-6), 7.90-7.85 (4H, m), 7.64 (2H, d, *J*= 6.0 Hz), 7.13 (2H, d, *J*= 5.0 Hz), 6.18-6.11 (1H, m, H-1'), 5.31-5.25 (1H, m, H-3'), 5.24-5.18 (1H, m, H-4'), 4.32-4.24 (1H, m, OH), 3.89-3.81 (4H, m, OH, Ph-OMe), 3.70-3.59 (2H, m, H-5'), 2.23-2.14 (2H, m, H-2'); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.3, 161.3, 151.2, 149.4, 146.2, 144.3, 132.2, 124.8, 122.6, 114.7, 97.9, 91.6, 87.6, 85.1, 84.9, 69.9, 60.8, 55.6, 40.3; MS (FAB) *m/z* 463 [M+H]⁺; HRMS (FAB): Calcd for C₂₄H₂₃N₄O₆ [M+H]⁺: 463.1612. Found: 463.1613.

5-[4-(4-Methylphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (14)

アルゴン雰囲気下、化合物7 (280 mg, 1.27 mmol) の 無水N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (13 mL) にテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) (173 mg, 0.127 mmol)、ヨウ化銅(I) (29 mg, 0.13 mmol)、トリエチルアミン (1.3 mL, 0.64 mmol) 及び化合物11 (292 mg, 0.846 mmol) を加えて60 °Cで12時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、溶媒を留去して粗成績体を得た。シリカゲル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、化合物13 (284 mg, 75%) を淡橙色固体として得た。

M.p. 255 °C (decomposed); IR (KBr): ν 3345 (NH, OH), 2091 (C≡C), 1641 (C=O) cm⁻¹; $[\alpha]_D^{24}$ -20.6 (c 1.00, DMSO); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.7 (1H, brs, NH), 8.47-8.44 (1H, m, H-6), 7.92-7.79 (4H, m), 7.69-7.63 (2H, m), 7.43-7.38 (2H, m), 6.17-6.11 (1H, m, H-1'), 5.30-5.24 (1H, m, H-3'), 5.22-5.16 (1H, m, H-4'), 4.30-4.23 (1H, m, OH), 3.85-3.79 (1H, m, OH), 3.71-3.57 (2H, m, H-5'), 2.40 (3H, s), 2.22-2.13 (2H, m, H-2'); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.3, 151.1, 150.1, 149.4, 144.4, 142.2, 132.2, 130.0, 125.1, 122.8, 97.7, 91.4, 87.6, 85.4, 85.0, 69.8, 60.8, 40.3, 21.1; HRMS (MALDI-TOF) *m/z* : Calcd for C₂₄H₂₃N₄O₅ [M+H]⁺: 447.1663. Found: 447.1663.

5-[4-(4-Trifluoromethylphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (15)

アルゴン雰囲気下、化合物8 (369 mg, 1.35 mmol) の 無水N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) にテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) (156 mg, 0.135 mmol)、ヨウ化銅(I) (26

mg, 0.14 mmol)、トリエチルアミン (1.0 mL, 0.68 mmol) 及び化合物**11** (465 mg, 1.35 mmol) を加えて60 °Cで12時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、溶媒を留去して粗成績体を得た。シリカゲル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、化合物**15** (415 mg, 62%) を淡橙色固体として得た。

IR (KBr): ν 3365 (NH, OH), 1659 (C=O) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ -16.7 (c 1.00, DMSO); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.8 (1H, brs, NH), 8.50 (1H, s, H-6), 8.08 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.99 (4H, d, J = 8.5 Hz), 7.71 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.15 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-1'), 5.29 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-3'), 5.24-5.21 (1H, m, H-4'), 4.29 (1H, s, OH), 3.84 (1H, d, J = 3.5 Hz, OH), 3.71-3.61 (2H, m, H-5'), 2.22-2.18 (2H, m, H-2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ 161.3, 154.0, 150.8, 149.4, 144.6, 132.3, 130.9, 126.8, 126.3, 123.4, 123.2, 97.7, 91.4, 87.6, 86.2, 85.0, 79.2, 69.8, 60.8, 40.3; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_5\text{F}_3\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 523.1200. Found: 523.1200.

5-[4-(4-Nitrophenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (**16**)

アルゴン雰囲気下、化合物**9** (302 mg, 1.20 mmol) の 無水 N,N -ジメチルホルムアミド溶液 (15 mL) にテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) (139 mg, 0.120 mmol)、ヨウ化銅(I) (23 mg, 0.12 mmol)、トリエチルアミン (1.0 mL, 0.72 mmol) 及び化合物**10** (414 mg, 1.20 mmol) を加えて60 °Cで12時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、溶媒を留去して粗成績体を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 5 : 1) で精製し、化合物**15** (545 mg, 95%) を赤色固体として得た。

M.p. 270 °C (decomposed); IR (KBr): ν 3403 (NH, OH), 1631 (C=O) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ -22.5 (c 1.00, DMSO); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.8 (1H, brs, NH), 8.50-8.44 (3H, m), 8.10-8.08 (2H, m), 8.02-7.97 (2H, m), 7.74-7.68 (2H, m), 6.17-6.11 (1H, m, H-1'), 5.30-5.28 (1H, m, H-4'), 5.22 (1H, d, J = 4.5 Hz, H-3'), 4.28 (1H, m, OH), 3.84 (1H, m, OH), 3.68-3.62 (2H, m, H-5'), 2.22-2.18 (2H, m, H-2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ 161.3, 155.0, 150.9, 149.4, 148.6, 144.7, 132.3, 126.7, 125.1, 123.6, 123.5, 97.7, 91.5, 87.6, 86.5, 85.0, 69.8, 60.8, 40.3; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_7\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 500.1177. Found: 500.1177.

5-(4-Phenyldiazenylphenyl)ethynyl-2'-deoxyuridine (**17**)

アルゴン雰囲気下、4-エチニルアゾベンゼン (**10**) (1.06 g, 5.12 mmol) の 無水 N,N -ジメチルホルムアミド溶液 (50 mL) にテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0) (592 mg, 0.512 mmol)、ヨウ化銅(I) (113 mg, 0.512 mmol)、トリエチルアミン (3.6 mM, 25.8 mmol) 及び2'-デオキシ-5-ヨードウリジン (**11**) を加えて60 °Cで4時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過し、溶媒を

留去して粗成績体を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 20 : 1) で精製し、化合物**17** (1.80 g, 81%) を淡橙色固体として得た。

M.p. 208–210 °C; IR (KBr): ν 3439 (NH, OH), 1617 (C=O), 1289 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ -3.7 (c 1.00, DMSO); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.4 (1H, brs), 8.47 (1H, s), 7.94–7.90 (4H, m), 7.69–7.60 (5H, m), 6.14 (1H, dd, J = 6.5 Hz), 5.27 (1H, d, J = 4.5 Hz), 5.20 (1H, dd, J = 5.0 Hz), 4.30–4.26 (1H, m), 3.82 (1H, q, J = 3.0 Hz), 3.71–3.58 (2H, m), 2.21–2.17 (2H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ 161.3, 151.9, 151.0, 149.4, 132.2, 131.8, 129.5, 125.4, 122.9, 122.6, 97.8, 91.5, 87.6, 85.6, 84.9, 69.8, 60.8, 40.2; MS (FAB) m/z 433 [M+H] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_5$ [M+H] $^+$: 433.1506. Found: 433.1524.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[4-(4-pyridyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (18)

アルゴン雰囲気下、化合物**12** (147 mg, 0.339 mmol) の無水ピリジン溶液 (4 mL) に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (138 mg, 0.406 mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。反応液にメタノールを加えて更に10分間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルムと水を加え、分液した。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し、溶媒を留去した。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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**16** (223 mg, 89%) を赤色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3323 (NH, OH), 1705 (C=O), 1252 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ -4.3 (c 1.00, DMSO); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.7 (1H, brs, NH), 8.67 (2H, d, J = 4.5 Hz), 8.05 (1H, s, H-6), 7.68 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.59 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.28 (2H, d, J = 7.0 Hz), 7.17–7.09 (8H, m), 7.02–7.00 (1H, m), 6.70–6.68 (4H, m), 6.01 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-1'), 5.23–5.21 (1H, m, H-3'), 4.19–4.17 (1H, m, H-4'), 3.82 (1H, s, OH), 3.49 (6H, s, OMe), 3.06–3.04 (2H, m, H-5'), 2.16–2.13 (2H, m, H-2'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ 161.3, 158.1, 156.5, 151.6, 150.7, 149.3, 144.7, 143.7, 135.5, 135.4, 132.2, 129.6, 127.9, 127.6, 126.7, 126.6, 123.1, 115.9, 113.2, 98.1, 86.1, 86.0, 85.8, 85.3, 70.35, 63.5, 54.96, 40.4; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_7$ [M+H] $^+$: 736.2766. Found: 736.2766.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[4-(4-methoxyphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (19)

アルゴン雰囲気下、化合物**12** (101 mg, 0.218 mmol) の無水ピリジン溶液 (3 mL) に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (89 mg, 0.26 mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。反応液にメタノールを加えて更に10分間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルムと水を加え、分液した。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し、溶媒を留去した。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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**17** (152 mg, 90%) を橙色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3437, 3410(NH, OH), 1701 (C=O), 1272 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 28.4 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 10.2 (1H, brs, NH), 8.28 (1H, s, H-6), 7.88 (2H, d, $J=7.0$ Hz), 7.64 (2H, d, $J=7.0$ Hz), 7.46 (2H, d, $J=7.0$ Hz), 7.36 (4H, d, $J=7.5$ Hz), 7.26-7.24 (3H, m), 7.11 (1H, d, $J=8.0$ Hz), 6.81-6.74 (4H, m), 6.45-6.37 (1H, m, H-1'), 4.60-4.58 (1H, m, H-3'), 4.22-4.19 (1H, m, H-4'), 3.84 (3H, s), 3.49 (6H, s, OMe), 3.45 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-5'), 3.31 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-5'), 2.68-2.57 (1H, m, H-2'), 2.40-2.28 (1H, m, H-2'), 1.29-1.19 (1H, m, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 162.1, 161.8, 158.4, 151.6, 149.5, 146.9, 144.4, 135.5, 135.4, 132.3, 129.9, 129.8, 128.0, 127.8, 124.3, 122.1, 114.1, 113.2, 100.3, 93.5, 86.9, 86.0, 86.0, 82.2, 72.2, 60.3, 55.4, 55.0, 41.6; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 765.2919. Found: 765.2919.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[4-(4-methylphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (20)

アルゴン雰囲気下、化合物**14** (200 mg, 0.446 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 (182 mg, 0.536 mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。反応液にメタノールを加えて更に10分間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルムと水を加え、分液した。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し、溶媒を留去した。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 : 2) により精製し、化合物**20** (208 mg, 62%) を橙色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3425 (NH, OH), 1707 (C=O), 1253 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ -27.9 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.09 (1H, brs, NH), 8.27 (1H, s, H-6), 7.80 (2H, d, $J=8.0$ Hz), 7.67 (2H, d, $J=7.5$ Hz), 7.45 (2H, d, $J=8.0$ Hz), 7.35 (4H, d, $J=8.5$ Hz), 7.31-7.24 (4H, m), 7.15 (1H, t, $J=7.0$ Hz), 7.11 (2H, d, $J=8.5$ Hz), 6.81-6.78 (4H, m), 6.38 (1H, t, $J=4.0$ Hz, H-1'), 4.60-4.57 (1H, m, H-3'), 4.17-4.09 (1H, m, H-4'), 3.77-3.65 (6H, m, OMe), 3.50-3.46 (1H, m, H-5'), 3.40-3.28 (1H, m, H-5'), 2.67-2.52 (2H, m, H-2'), 1.86-1.82 (1H, m, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 161.2, 158.6, 151.7, 150.7, 149.2, 144.4, 141.9, 135.4, 132.4, 130.0, 129.9, 129.8, 128.1, 127.9, 127.1, 124.7, 122.9, 122.3, 113.4, 100.4, 93.6, 87.1, 86.8, 85.9, 72.4, 63.5, 55.2, 41.2, 21.5; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 771.2789. Found: 771.2789.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[4-(4-trifluoromethylphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (21)

アルゴン雰囲気下、化合物**15** (114 mg, 0.228 mmol) の無水ピリジン溶液 (3 mL) に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (93 mg, 0.27 mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。反応液にメタノールを加えて更に10分間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルムと水を加え、分液した。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し、溶媒を留去した。得られた

粗成績体を0.5%トリエチルアミン含有クロロホルムを溶離液としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物**21** (118 mg, 65%) を赤色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3372 (NH, OH), 1669 (C=O), 1253 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 26.9 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10.04 (1H, brs, NH), 8.25 (1H, s, H-6), 7.85 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.69-7.55 (4H, m), 7.41-7.12 (8H, m), 7.07-6.95 (3H, m), 6.71-6.69 (4H, m), 6.36-6.29 (1H, m, H-1'), 4.55-4.47 (1H, m, H-3'), 4.15-4.07 (1H, m, H-4'), 3.57 (6H, s, OMe), 3.42-3.34 (1H, m, H-5'), 3.25-3.18 (1H, m, H-5'), 2.60-2.42 (2H, m, H-2'), 2.32-2.21 (1H, m), 0.99-0.90 (1H, m, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 161.7, 158.5, 154.2, 151.2, 149.5, 135.5, 132.4, 129.8(8), 129.8(6) 128.0, 127.9, 127.0, 126.2(2), 126.1(8), 126.0, 125.9, 123.0, 122.7, 113.3, 100.2, 93.3, 87.0, 86.9, 86.1, 83.7, 83.1, 75.2, 72.3, 55.1, 24.7; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_7\text{F}_3\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 825.2507. Found: 825.2507.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-[4-(4-nitrophenyl)diaz恒基phenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (22)

アルゴン雰囲気下、化合物**16** (150 mg, 0.324 mmol) の無水ピリジン溶液 (3 mL) に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (128 mg, 0.377 mmol) を加え、室温で16時間搅拌した。反応液にメタノールを加えて更に10分間搅拌した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルムと水を加え、分液した。有機層を水、飽和食塩水で洗净後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**22** (115 mg, 47%) を赤色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3452 (NH, OH), 1703 (C=O), 1251 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ -16.9 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.98 (1H, brs, NH), 8.38-8.22 (3H, m), 7.95 (2H, d, J = 7.0 Hz), 7.69 (2H, d, J = 7.0 Hz), 7.49-7.14 (8H, m), 7.06 (2H, d, J = 7.0 Hz), 6.83-6.72 (5H, m), 6.43-6.38 (1H, m, H-1'), 4.61-4.57 (1H, m, H-3'), 4.21-4.16 (1H, m, H-4'), 3.65 (6H, s, OMe), 3.50-3.45 (1H, m, H-5'), 3.33-3.26 (1H, m, H-5'), 2.66-2.59 (1H, m, H-2'), 2.34-2.27 (1H, m, H-2'), 1.28-1.17 (1H, m, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 161.6, 158.5, 155.5, 151.2, 148.6, 144.4, 135.5, 135.4, 132.4, 132.3, 129.9, 128.0, 127.9, 127.8, 127.0, 124.6, 124.5, 123.4, 123.3, 123.0, 122.9, 113.3, 113.2, 100.1, 87.0, 86.9, 72.2, 55.1; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_9\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 802.2483. Found: 802.2484.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(4-phenyldiaz恒基phenyl)ethynyl-2'-deoxyuridine (4)

アルゴン雰囲気下、化合物**17** (141 mg, 0.324 mmol) の無水ピリジン溶液 (3 mL) に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (131 mg, 0.389 mmol) を加え、室温で4時間搅拌した。反応液にメタノールを加えて更に10分間搅拌した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルムと水を加え、分液した。有機層を水、飽和食塩水で洗净後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**23** (239 mg, 88%) を橙色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3437, 3410(NH, OH), 1701 (C=O), 1272 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 36.2 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.51 (1H, brs), 8.29 (1H, s), 7.90 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.70 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.52-7.45 (5H, m), 7.37-7.28 (6H, m), 7.16 (1H, dd, J = 6.5 and 1.0 Hz), 7.10 (2H, d, J = 8.0 Hz) 6.82-6.79 (4H, m) 6.38 (1H, dd, J = 6.5 Hz), 4.60-4.59 (1H, m), 4.14-4.13 (1H, m), 3.70 (3H, s), 3.69 (3H, s), 3.50 (1H, dd, J = 8.0 and 3.0 Hz), 3.34 (1H, dd, J = 8.0 and 3.0 Hz), 2.57-2.53 (1H, m), 2.40-2.34 (1H, m), 2.09 (1H, brs), 1.62 (1H, brs); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 158.6, 152.6, 151.7, 148.8, 144.3, 135.4, 132.4, 131.3, 129.9, 129.1, 128.1, 127.9, 127.1, 125.1, 122.9, 122.5, 113.4, 100.4, 93.6, 87.2, 86.7, 85.9, 82.2, 72.4, 63.3, 55.2, 41.7; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 757.2633. Found: 757.2633.

3'-O-[2-Cyanoethyl(diisopropylamino)phosphino]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-[4-(4-pyridyl)diazepinylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (24)

アルゴン雰囲気下、化合物**18** (223 mg, 0.312 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (3 mL) に N,N -ジイソプロピルアミン (0.16 mL, 0.94 mmol) と 2-シアノエチル N,N' -ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (0.11 mL, 0.47 mmol) を加えて室温で3時間攪拌した。反応溶液に水を加えて酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**24** (219 mg, 75%) を赤色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3603 (NH), 1712 (C=O), 1251 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 32.3 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.84 (2H, m), 8.42 (0.3H, s, H-6), 8.37 (0.7H, s, H-6), 7.74-7.70 (4H, m), 7.51-7.50 (2H, m), 7.41-7.35 (4H, m), 7.31-7.16 (3H, m), 7.04 (2H, dd, J = 9.0, 8.5 Hz), 6.83-6.77 (4H, m), 6.42-6.36 (1H, m, H-1'), 4.72-4.61 (1H, m, H-3'), 4.27-4.19 (1H, m, H-5'), 3.93-3.74 (1H, m, H-5'), 3.71 (6H, s, OMe), 3.67-3.49 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.36-3.24 (1H, m, H-4'), 2.72-2.52 (2H, m, H-2'), 2.49-2.35 (2H, m, $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{N}$)), 1.28 (8.4 H, t, J = 7.0 Hz, $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{N}$), 1.17 (3.6H, t, J = 7.0 Hz, $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{N}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 158.5, 157.1, 151.1, 144.3(3), 144.2(9), 132.8, 135.5, 135.4, 135.3, 132.4, 132.3, 129.9, 128.0, 127.9, 127.8, 127.0, 126.8, 122.9(1), 122.8(9), 117.5, 116.2, 113.2, 100.1, 93.0, 87.0, 85.8, 63.1, 58.4, 58.2, 58.1, 57.9, 55.1, 43.2(3), 43.1(7), 43.0(7), 43.0(1), 40.9, 24.6, 24.5(4), 24.4(8), 24.4(4), 24.3(9), 21.5, 20.4, 20.3, 20.2; $^{31}\text{P-NMR}$ (120 MHz, CDCl_3): δ 148.80, 148.37; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_8\text{NaP} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 958.3664. Found: 958.3664.

3'-O-[2-Cyanoethyl(diisopropylamino)phosphino]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-[4-(4-methoxyphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (25)

アルゴン雰囲気下、化合物**19** (152 mg, 0.199 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に*N,N*-ジイソプロピルアミン (0.10 mL, 0.60 mmol) と2-シアノエチル*N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (67 μ L, 0.30 mmol) を加えて室温で3時間攪拌した。反応溶液に水を加えて酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**25** (72 mg, 38%) を橙色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3624 (NH), 1700 (C=O), 1253 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 19.4 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.76 (1H, brs, NH), 8.37-8.28 (1H, m, H-6), 7.89 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.66 (2H, t, J = 8.0 Hz), 7.51-7.47 (2H, m), 7.41-7.31 (4H, m), 7.31-7.25 (2H, m), 7.19-7.12 (1H, m), 7.08 (2H, dd, J = 6.0, 10.0 Hz), 7.01-6.96 (2H, m), 6.84-6.78 (4H, m), 6.41-6.31 (1H, m, H-1'), 4.70-4.62 (1H, m, H-3'), 4.31-4.29 (0.25H, m, H-4'), 4-18-416 (0.75H, m, H-4'), 3.87-3.82 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.82 (3H, s), 3.68 (6H, s, OMe), 3.64-3.48 (2H, m, H-5'), 2.76-2.58 (2H, m, H-2'), 2.47-2.35 (2H, m, ((CH_3)₂ CH)₂N)), 1.28 (9H, t, J = 7.0 Hz, ((CH_3)₂ CH)₂N)), 1.17 (3H, t, J = 7.0 Hz, ((CH_3)₂ CH)₂N)); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 162.0, 158.4, 151.6, 149.2, 146.8, 144.2, 144.2, 135.2(8), 135.2(5), 132.1(8), 132.1(7), 129.8, 129.7(8), 129.7(5), 127.9, 127.8(5), 127.8(2), 127.7, 126.9, 124.6, 124.3, 121.9(7), 121.9(5), 117.3, 114.1, 113.2, 100.2, 100.1, 93.3, 86.8 (d, J (C, P) = 3.5 Hz), 77.2, 77.0, 76.7, 63.0, 62.9, 58.2, 58.1, 55.4, 54.9, 44.9 (d, J (C, P) = 5.0 Hz), 24.4, 24.3, 22.8, 22.7, 20.2 (d, J (C, P) = 7.0 Hz); $^{31}\text{P-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 149.52, 149.14; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_9\text{NaP}$ [M+Na]⁺: 987.3822. Found: 987.3817.

3'-O-[2-Cyanoethyl(diisopropylamino)phosphino]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-[4-(4-methylphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (26)

アルゴン雰囲気下、化合物**20** (170 mg, 0.227 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (3 mL) に*N,N*-ジイソプロピルアミン (0.12 mL, 0.68 mmol) と2-シアノエチル*N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (78 μ L, 0.34 mmol) を加えて室温で3時間攪拌した。反応溶液に水を加えて酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**26** (120 mg, 55%) を橙色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3610 (NH), 1699 (C=O), 1272 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 29.6 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.74 (1H, brs, NH), 8.35-8.26 (1H, m, H-6), 7.84-7.77 (2H, m), 7.71-7.63 (2H, m), 7.51-7.44 (2H, m), 7.41-7.33 (4H, m), 7.32-7.25 (5H, m), 7.12-7.03 (2H, m), 6.84-6.75 (4H, m), 6.41-6.31 (1H, m, H-1'), 4.72-4.60 (1H, m, H-3'), 4.29-4.19 (1H, m, H-4'), 3.93-3.74 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.70 (4H, s, OMe), 3.63 (2H, s, OMe), 3.37-3.12 (2H, m, H-5'), 2.72-2.50 (2H, m, H-2'), 2.50 (3H, s), 2.41-2.26 (2H, m, ((CH_3)₂ CH)₂N)), 1.22-1.14 (8H, m, ((CH_3)₂ CH)₂N)), 1.12-1.06 (4H, m, ((CH_3)₂ CH)₂N)); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 153.6, 146.7, 145.7, 139.3, 137.4, 136.8, 130.4, 127.4, 124.9(3), 124.9(1), 124.7(4), 124.7(2), 123.0, 122.9, 122.0, 121.9, 119.8, 117.9, 119.3, 112.5, 108.3, 88.5, 82.1, 80.9 (d, J (C, P) = 3.5 Hz), 68.8, 68.7, 58.2, 53.4, 53.3, 50.2, 48.4, 38.2, 35.9, 35.8, 19.5 (d, J (C, P) = 7.0 Hz), 16.5, 15.4, 15.3; $^{31}\text{P-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 149.62, 149.22; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_8\text{NaP}$ [M+Na]⁺: 971.3873. Found: 971.3868.

3'-O-[2-Cyanoethyl(diisopropylamino)phosphino]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-[4-(4-trifluoromethylphenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (27)

アルゴン雰囲気下、化合物21 (98 mg, 0.12 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に *N,N*-ジイソプロピルアミン (63 μL , 0.37 mmol) と 2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホジアミダイト (41 μL , 0.18 mmol) を加えて室温で3時間攪拌した。反応溶液に水を加えて酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (0.5% トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物27 (106 mg, 87%) を橙色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3640 (NH), 1674 (C=O), 1251 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 32.3 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.39 (0.4H, s, H-6), 8.34 (0.6H, s, H-6), 8.01-7.95 (2H, m), 7.81-7.68 (4H, m), 7.51-7.45 (2H, m), 7.41-7.32 (4H, m), 7.21-7.13 (1H, m), 7.09-6.99 (2H, m), 6.85-6.75 (6H, m), 6.42-6.31 (1H, m, H-1'), 4.70-4.59 (1H, m, H-3'), 4.29-4.15 (1H, m, H-4'), 3.75-3.64 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.48 (6H, s, OMe), 3.43-3.18 (2H, m, H-5'), 2.70-2.60 (2H, m, H-2'), 2.50-2.33 (2H, m, ((CH_3)₂ CH)₂N)), 1.21-1.14 (7.2H, m, ((CH_3)₂ CH)₂N)), 1.10-1.04 (4.8H, m, ((CH_3)₂ CH)₂N)); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 161.2, 158.6, 154.3, 151.3, 149.1, 146.9, 144.4, 144.3, 142.7, 135.5, 135.4, 132.4, 132.3, 32.0, 129.9(7), 129.9(2), 129.7, 128.0, 127.9, 127.8, 127.0, 126.3, 126.2, 126.0, 125.9, 125.6, 123.0, 122.7, 120.3, 117.6, 117.4, 116.7, 113.3, 100.4, 100.2, 93.2, 87.2, 87.0, 86.3, 85.9, 85.8, 83.0, 77.4, 77.2, 77.0, 76.6, 75.0, 74.9, 73.7, 63.1, 58.4, 58.2, 58.1, 55.2, 55.4, 53.4, 50.7, 43.3, 43.2, 43.1, 43.0, 40.8, 24.8, 24.6, 24.5(6), 24.5(1), 24.4(7), 24.4(1), 22.8, 20.4, 20.3, 20.1; $^{31}\text{P-NMR}$ (120 MHz, CDCl_3): δ 148.85, 148.44; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_8\text{F}_3\text{NaP}$ [M+Na]⁺: 1025.3591. Found: 1025.3585.

3'-O-[2-Cyanoethyl(diisopropylamino)phosphino]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-[4-(4-nitrophenyl)diazenylphenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine (28)

アルゴン雰囲気下、化合物 **20** (111 mg, 0.142 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に *N,N*-ジイソプロピルアミン (74 μ L, 0.43 mmol) と2-シアノエチル*N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (48 μ L, 0.21 mmol) を加えて室温で3時間攪拌した。反応溶液に水を加えて酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**28** (137 mg, 99%) を赤色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3576 (NH), 1712 (C=O), 1252 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24} -15.0$ (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.45 (1H, brs, NH), 8.45-8.29 (3H, m), 8.04-7.99 (2H, m), 7.76-7.70 (2H, m), 7.53-7.47 (2H, m), 7.42-7.36 (4H, m), 7.31-7.26 (2H, m), 7.20-7.14 (1H, m), 7.11-7.03 (2H, m), 6.85-6.79 (4H, m), 6.42-6.35 (1H, m, H-1'), 4.71-4.63 (1H, m, H-4'), 4.30-4.25 (0.33H, m, H-3'), 4.24-4.20 (0.67H, m, H-3'), 3.89-3.75 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.72-3.69 (6H, m, OMe), 3.65-3.50 (2H, m, H-5'), 2.75-2.61 (2H, m, H-2'), 2.47-2.35 (2H, m, $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{N}$)), 1.22-1.16 (8H, m, $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{N}$), 1.16-1.06 (4H, m, $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{N}$)); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 156.5, 153.3, 150.6, 146.2, 144.3, 143.7, 139.4, 137.8, 130.5, 127.5, 124.9, 123.0, 122.9, 122.0, 121.8, 119.7, 119.5(3), 119.5(2), 118.0, 112.6, 103.3, 93.2, 81.9 (d, J (C, P) = 3.5 Hz), 68.7, 68.4, 62.9, 62.8, 58.1, 58.0, 55.4, 54.9, 38.9 (d, J (C, P) = 5.0 Hz), 24.4, 24.3, 22.8, 22.7, 19.5 (d, J (C, P) = 7.0 Hz); $^{31}\text{P-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 149.62, 149.25; HRMS (MALDI-TOF) m/z : Calcd for $\text{C}_{53}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{NaP}$ [M+Na] $^+$: 1002.3567. Found: 1002.3562.

3-O-[2-Cyanoethyl(diisopropylamino)phosphino]-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-5-(4-phenyldiazenylphenyl)ethynyl-2'-deoxyuridine (29)

アルゴン雰囲気下、化合物 **23** (188 mg, 0.26 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (5 mL) に *N,N*-ジイソプロピルアミン (0.13 mL, 0.76 mmol) と2-シアノエチル*N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (90 μ L, 0.40 mmol) を加えて室温で1.5時間攪拌した。反応溶液に水を加えて酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**29** (324 mg, 82%) を橙色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3610 (NH), 1699 (C=O), 1272 (N=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24} 32.5$ (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 9.08 (1.15H, brs), 8.35 (1H, s), 8.30 (0.15H, s), 7.89 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.67 (2H, d, J = 8.5

Hz), 7.55-7.14 (14.4H, m), 7.04 (2H, d, $J= 8.5$ Hz), 6.67-6.75 (4.6H, m), 6.60 (0.3H, d, $J= 8.5$ Hz), 6.35 (1.15H, dd, $J= 7.5, 6.0$ Hz), 4.68-4.61 (1.15H, m), 4.26 (1.15H, s), 3.70 (3.45H, s), 3.69 (3.45H, s), 3.67-3.53 (5.75H, m), 3.31 (1.15H, dd, $J= 8.6, 2.4$ Hz), 2.65-2.56 (1.15H, m), 2.47-2.36 (3.45H, m), 1.18 (13.8H, d, $J= 6.5$ Hz); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 161.2, 158.5(9), 158.5(6), 152.6, 151.5, 149.1, 144.35, 142.5, 135.4, 132.3, 132.0, 131.1, 130.0 (d, $J(\text{C, P}) = 6.0$ Hz), 129.1, 128.7, 128.0, 127.9, 127.0, 125.1, 122.8, 122.4, 120.5, 117.3, 113.3, 100.3, 93.4, 86.3 (d, $J(\text{C, P}) = 3.5$ Hz), 85.9, 82.4, 77.3, 77.0, 76.8, 73.4, 73.2, 63.0, 58.2, 58.1, 55.1, 43.2 (d, $J(\text{C, P}) = 13.0$ Hz), 40.8 (d, $J(\text{C, P}) = 5.0$ Hz), 25.6, 24.5(9), 24.5(3), 24.4(8), 20.2 (d, $J(\text{C, P}) = 7.0$ Hz); ^{31}P -NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 149.09, 148.66; MS (FAB) m/z 957 [M+Na] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{53}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_8\text{NaP}$ [M+Na] $^+$: 957.3711. Found: 957.3711.

dU^{Az}類導入ONの合成

ONの合成はアミダイトブロック**24-29**と市販のdA(Bz)、dG(*i*Bu)、dC(Bz)、Tのホスホロアミダイトを0.1 M の無水アセトニトリル溶液として調整し、GeneDesign nS-8 Oligonucleotides Synthesizer を用いて通常のホスホロアミダイト法に従って行った。合成スケールは 0.2 μ mol とし、トリチルオン条件で行った。活性化剤にはActivator 42 (0.25 M アセトニトリル溶液) を用い、縮合時間は全てのアミダイトブロックで32秒間とした。合成完了後、28%アンモニア水で1.5時間処理してカラム担体からの切り出しを行い、引き続き55 °Cで12時間静置することで塩基部及びリン酸ジエステル部の脱保護を行った。続いて簡易逆相カラム (Waters, Sep-pak® Cartridge) により簡易精製した後、逆相HPLC精製を行った。

dU^{Az}類導入ONの精製

ONの精製および純度の確認は逆相HPLCにより以下の条件で行った。

カラム : Waters XBridge™ Prep Shield RP18 5.0 μ m (10 × 50 mm) (精製)

Waters XBridge™ Shield RP18 2.5 μ m (4.6 × 50 mm) (純度確認)

移動相 : A液 : 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液 (pH 7.0)

B液 : 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液 : アセトニトリル = 1 : 1 (pH 7.0)

グラジエント : B液濃度 20-40% (ON **1-4**)、40-60% (ON **5**)、10-40% (ON **6**)

流速 : 4.5 mL/min (精製)

1.0 mL/min (純度確認)

カラム温度 : 50 °C

検出: UV (260 nm)

dU^{Az}類導入ONの組成確認

ONの組成はMALDI-TOF MSを用いて確認した。3-ヒドロキシピコリン酸 (1.0 mg/mL in H₂O) とクエン酸アンモニウム (1.0 mg/mL in H₂O) を1 : 1の割合で混合したマトリックス1.0 μ Lをプレートの上で乾燥させ、その後ON水溶液1.0 μ L (濃度: 約40 pmol) を載せて乾燥させ、測定を行った。測定は全てネガティブモードで行った。なお、外部標準としてオリゴチミジル酸 (7 mer, 15 mer、23 mer) を使用した。

dU^{Az}類導入ONの定量

合成したONの定量は吸光度測定器を用いて260 nmの紫外外部吸収を測定することで行った。

第一章第三節の実験

光応答性の評価

1. ON1-6 (終濃度 4 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM) のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0, 100 μ L) を調整し、紫外可視分光光度計を用いて吸光度スペクトルを得た。それにより $\pi-\pi^*$ 遷移に相当する光波長を同定し、相当する光波長の光照射を5 cmの距離から10秒間行うことでトランス体からシス体への光異性化を行い、さらに吸光度スペクトル測定を行うことで $n-\pi^*$ 遷移に相当する光波長を同定した。以下の実験においてはONのシス体からトランス体への光異性化は同定された光波長の光照射を5 cmの距離から10秒間行うことで行っている。
2. ON1-6 (終濃度 4 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM) のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0, 100 μ L) に対して、前項で同定した光波長を用いてトランス体からシス体、シス体からトランス体への光異性化を行い、逆相HPLCで分析した。

シス型dU^{Az}類の熱安定性評価

ON1-5 (終濃度 4 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM) のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0, 130 μ L) を適当な光照射によりそれぞれシス体への異性化し、60 °C条件下でON 1-4は365 nmの吸光度変化を、ON 5は400 nmの吸光度変化を測定し、経時変化をプロットすることでシス体の半減期を算出した。

熱融解温度 (T_m) 測定

各ON (終濃度 4 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM) のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0, 130 μ L) を沸騰水中に浴し、室温までゆっくりと冷ました後、窒素気流下、サンプル溶液を5 °Cまで冷却して測定を開始した。毎分0.5 °Cの割合で90 °Cまで昇温し、0.5 °C間隔で260 nmにおける吸光度をプロットした。 T_m 値は全て中線法で算出し、3回の独立した測定結果の平均値を用いた。

シス型ON 1の熱融解温度 (T_m) 測定

前項と同様にサンプルを調整し、5 °Cまで冷却した後、適当な光照射によるシス異性化を行い、測定を行った。

等温滴定型熱量測定

ON (終濃度0.1 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度50 mM) のリン酸ナトリウム緩衝液 (5 mM, pH 7.0, 300 μ L)を被滴定溶液とし、相補鎖RNA (終濃度1 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度50 mM) のリン酸ナトリウム緩衝液 (5 mM, pH 7.0, 60 μ L) を2 μ Lずつ滴定した際に生じる熱量を測定し、

結合比、結合定数、エンタルピー変化を求め、ギブス自由エネルギー、エントロピー変化を算出した。被滴定溶液は測定の直前に可視光もしくは紫外線を照射することで光異性化を行った。

第二章第二節の実験

過酸化水素応答性人工核酸の合成

4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl) 1*H*-imidazole-1-carboxylate (34)

アルゴン雰囲気下、化合物31 (1.09 g, 3.70 mmol) の無水トルエン溶液 (20 mL) に、イミダゾール (1.00g, 14.8 mmol) を加え、室温で4時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチル、水を加えて分液後、有機層を飽和食塩水で洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥した。組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 = 2 : 1) で精製し、化合物34 (1.06g, 87%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3130 (Ar C-H), 1762 (C=O), 1615 (C=N) cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.15 (1H, s), 7.87 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.48-7.41 (3H, m), 7.05 (1H, s), 5.04 (2H, s), 1.34 (12H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 148.2, 136.8, 136.5, 134.9, 130.4, 127.4, 116.8, 83.6, 69.3, 24.6; FAB-LRMS m/z = 329 (MH^+); FAB-HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{B}$ = 329.1676, found 329.1668.

MS (FAB) m/z 329 [$\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{B}$ [$\text{M}+\text{H}]^+$: 329.1676. Found: 329.1668.

3-Ethyl-1-(((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)carbonyl-1*H*-imidazol-3-ium tetrafluoroborate (35)

アルゴン雰囲気下、化合物34 (1.21 g, 3.70 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (40 mL) を0 °C に氷冷し、トリエチルオキソニウムテトラフルオロボレート (669 mg, 3.52 mmol) を加えた。その後、室温で16時間攪拌した。TLCを用いて原料の消失を確認し、未精製のまま後の反応に用いた。

(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxycarbonyl-3,5-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxane-1,3,diyl)-2'-deoxy cytidine (37)

アルゴン雰囲気下、化合物36 (416 mg, 0.880 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) を0 °C に氷冷し、化合物35 (1.15 g, 3.50 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) を滴下した。室温で24時間攪拌後、反応溶液に飽和重曹水を加えて分液した。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し、溶媒を留去した。粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフ

イー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1) で精製し、化合物**37** (593 mg, 92%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3151 (Ar C-H), 1747 (C=O), 1622 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 27.7 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.80 (1H, drs), 8.22 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.81 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.37 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.23 (1H, d, J = 7.5 Hz), 6.03 (1H, d, J = 7.0 Hz), 5.21 (2H, s), 4.43-4.30 (1H, m), 4.21 (1H, d, J = 13.0 Hz), 4.02 (1H, dd, J = 3.0, 13.0 Hz), 3.81 (1H, d, J = 8.0 Hz), 2.63-2.49 (1H, m), 2.41-2.28 (1H, m), 1.34 (12H, s), 1.13-0.92 (28H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 162.4, 137.9, 135.0, 134.8, 134.7, 134.6, 126.9, 125.7, 85.3, 84.9, 83.5(4), 83.5(1), 83.4, 77.2, 67.3, 66.1, 59.5, 39.3, 24.6, 17.2, 17.1(6), 17.0(8), 17.0(1), 16.7(5), 16.6(9), 16.6(5), 16.6, 13.1, 12.7, 12.6, 12.1; FAB-LRMS m/z = 752 (MNa^+); FAB-HRMS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_9\text{N}_3\text{BSi}_2\text{Na}$ = 752.3546, found 752.3553.

MS (FAB) m/z 752 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_9\text{BSi}_2\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 752.3546. Found: 752.3553.

(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxycarbonyl-2'-deoxy cytidine (33)

アルゴン雰囲気下、化合物**37** (1.99 g, 2.70 mmol) の無水ピリジン溶液 (20 mL) にフッ化水素-ピリジン (ca. 65% フッ化水素 w/w, 0.60 mL, 11 mmol) を加え、60 °Cで12時間攪拌した。反応液に炭酸水素ナトリウムを加え、更に30分攪拌し、セライト濾過した。溶媒を減圧留去し、粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 9 : 1) で精製し、化合物**33** (684 mg, 52%)を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3331 (-OH), 2979 (Ar C-H), 1750 (C=O), 1651 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 55.7 (c 1.00, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.37 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.68 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.22 (H, d, J = 7.5 Hz), 6.15 (1H, t, J = 6.0 Hz), 5.14 (2H, s), 4.37-4.29 (1H, m), 4.00-3.92 (1H, m), 3.79 (1H, dd, J = 3.0, 12.0 Hz), 3.69 (1H, dd, J = 3.0, 12.0 Hz), 2.49-2.38 (1H, m), 2.17-2.06 (1H, m), 1.26 (12H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 163.7, 156.6, 156.5, 153.4, 144.9, 139.2, 134.9, 128.5, 128.4, 128.2, 127.2(3), 127.1(6), 95.6, 88.3, 87.5, 84.1, 70.5, 67.3, 61.4, 41.4, 24.2, 24.0, 17.4; FAB-LRMS m/z = 488 (MH^+); FAB-HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{B}$ = 488.2119, found 488.2216.

MS (FAB) m/z 488 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8\text{B}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 488.2119. Found: 488.2119.

(6-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxycarbonyl-3,5-O-(1,1,3,3-tetraisopropylideneoxane-1,3,diyl)-2'-deoxy adenosine (39)

アルゴン雰囲気下、化合物**38** (357 mg, 1.00 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) を0 °Cに氷冷し、化合物**38** (124 mg, 0.254 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) を滴下した。室

温で24時間攪拌後、反応溶液に飽和重曹水を加えて分液した。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し、溶媒を留去した。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**39** (172 mg, 91%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 1758 (C=O), 1615 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24} -23.4$ (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10.24 (1H, s), 8.74 (1H, s), 8.04 (1H, s), 7.81 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.39 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.00 (1H, d, J = 6.5 Hz), 5.36-5.23 (2H, m), 5.16-5.08 (1H, m), 4.03-3.98 (2H, m), 3.92-3.84 (1H, m), 2.81-2.56 (2H, m), 1.36 (12H, s), 1.13-1.02 (28H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 152.3, 151.1, 149.9, 149.5, 144.1, 141.9, 138.1, 134.8, 134.6, 127.6, 125.7, 122.4, 84.9, 83.6, 83.4, 83.3, 77.2, 70.0, 67.2, 64.4, 61.7, 39.4, 24.6(2), 24.5(9), 17.3, 17.0(9), 17.0(7), 17.0(6), 16.9, 16.8, 16.7, 16.6, 13.0, 12.8, 12.5, 12.2; MS (FAB) m/z 754 [M+H] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_8\text{BSi}_2$ [M+H] $^+$: 754.3839. Found: 754.3846.

(6-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxycarbonyl-2'-deoxy adenosine (40)

アルゴン雰囲気下、化合物 **39** (1.19 g, 1.59 mmol) の無水 *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) を0 °Cに氷冷し、ジフルオロトリメチルケイ酸トリス(ジメチルアミノ)スルホニウム (1.00 g, 3.63 mmol) を加えた。0 °Cで1時間攪拌し、クロロホルム : 2-プロパノール = 3 : 1 と水で分液した。有機層を集め、溶媒を留去し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 (クロロホルム : メタノール = 19 : 1) で精製し、化合物**40** (520 mg, 62%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3293 (-OH), 2977 (Ar C-H), 1757 (C=O), 1619 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24} 1.2$ (c 1.00, DMSO); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 10.80 (1H, brs), 8.66 (1H, s), 8.63 (1H, s), 7.68 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.46 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.44 (1H, dd, J = 6.5, 7.0 Hz), 5.23 (2H, s), 4.47-4.39 (1H, m), 3.91-3.84 (1H, m), 3.66-3.46 (2H, m), 2.82-2.70 (1H, m), 2.39-2.25 (1H, m), 1.29 (12H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 152.1, 151.6, 151.5, 149.7, 142.8, 139.8, 134.5, 126.9, 123.8, 88.0, 83.7(5), 83.7(2), 70.7, 66.0, 61.6, 48.6, 25.5, 24.7; MS (FAB) m/z 512 [M+H] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_7\text{B}$ [M+H] $^+$: 512.2317. Found: 512.2321.

(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)-

3,5-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylsiloxy-1,3,diyl)-2'-deoxy thymidine (42)

アルゴン雰囲気下、化合物**41** (160 mg, 0.297 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (5 mL) に2-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン (**30**) (139 mg, 0.594 mmol) と1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデカ-7-エン (89 μL , 0.59 mmol) を加えて室温で4時間攪

拌した。溶媒を留去し、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 : 3) で精製し、化合物**42** (204 mg, 98%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 2943 (Ar C-H), 1670 (C=O), 1532 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 25.0 (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.86-7.75 (3H, m), 7.39 (2H, dd, J = 12.0, 7.5 Hz), 6.05 (H, d, J = 6.5 Hz), 5.43 (2H, dd, J = 13.0, 16.0 Hz), 4.46-4.38 (1H, m), 4.19 (1H, d, J = 13.0 Hz), 4.03-4.00 (1H, m), 3.80-3.78 (1H, m), 2.62-2.52 (1H, m), 2.38-2.31 (1H, m), 1.99 (3H, s), 1.34 (12H, s), 1.14-0.95 (28H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 169.9, 155.4, 144.5, 139.4, 138.7, 134.7, 134.6, 126.9, 125.7, 103.8, 84.9, 84.8, 83.5, 83.4, 83.5, 83.4, 77.2, 68.3, 66.3, 64.4, 59.5, 39.6, 24.6, 17.2, 17.1, 17.0, 16.8, 16.7, 16.6, 13.2, 12.7, 12.4, 12.2, 12.1; MS (FAB) m/z 723 [M+Na] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_8\text{BSi}_2\text{Na}$ [M+Na] $^+$: 723.3644. Found: 723.33651.

(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)-2'-deoxy thymidine (43)

アルゴン雰囲気下、化合物**42** (160 mg, 0.227 mmol) の無水THF溶液 (2.5 mL) を0 °Cに氷冷し、1 M フッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (0.48 mL, 0.48 mmol) を滴下した。反応溶液をクロロホルムと飽和食塩水で分液し、有機層を水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (酢酸エチル : メタノール = 97 : 3) で精製し、化合物**43** (78 mg, 72%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3335 (-OH), 2977 (Ar C-H), 1752 (C=O), 1660 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 33.5 (c 1.00, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.08 (1H, s), 7.64 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.14 (1H, dd, J = 6.0, 6.5 Hz), 5.31 (2H, s), 4.30-4.26 (1H, m), 3.88-3.84 (1H, m), 3.74 (1H, dd, J = 3.0, 12.0 Hz), 3.64 (1H, dd, J = 3.0, 12.0 Hz), 2.95-2.90 (1H, m), 2.34-2.28 (1H, m), 2.10-2.03 (1H, m), 1.89 (3H, s), 1.22 (12H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 171.7, 158.0, 142.4, 140.4, 135.9, 128.1, 106.5, 89.1, 87.9, 85.1, 79.5, 71.6, 69.6, 62.4, 54.0, 42.2, 27.1, 25.2, 21.0, 14.0, 12.3; MS (FAB) m/z 481 [M+Na] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7\text{BNa}$ [M+Na] $^+$: 481.2122. Found: 481.2126.

(6-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxycarbonyl-2'-deoxy guanosine (45)

アルゴン雰囲気下、化合物**44** (300 mg, 0.585 mmol) の無水1,4-ジオキサン溶液 (6 mL) に、トリフェニルホスフィン (184 mg, 0.702 mmol)、アゾジカルボン酸ジイソプロピル (140 μL , 0.70 mmol) 及び化合物 **30** (144 mg, 0.614 mmol) を加え室温で4時間攪拌した。反応液を0 °Cに氷冷し、1 M フッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (1.21 mL, 1.21 mmol) を滴下し更に0 °Cで1分間攪拌した。溶媒を留去し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 (酢酸エチル : メタノール = 19 : 1) で精製し、化合物**45** (28 mg, 10%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3329 (-OH), 1585 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24} -3.6$ (c 1.00, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.03 (H, s), 7.91 (2H, s), 7.60 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.40 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.30 (1H, dd, $J = 6.5, 9.0$ Hz), 5.50 (2H, s), 4.58-4.51 (1H, m), 4.06-4.00 (1H, m), 3.86-3.67 (2H, m), 2.85-2.70 (1H, m), 2.38-2.27 (1H, m), 1.27-1.20 (12H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 180.1, 162.2, 161.4, 154.2, 140.0, 134.6, 128.3, 115.9, 89.7, 86.8, 79.5, 73.1, 69.4, 63.7, 47.4, 41.2, 24.1, 9.4, 9.3; MS (FAB) m/z 754 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_6\text{BNa}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 506.3219. Found: 506.3224.

3,5-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylsilyl)-2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (47)

アルゴン雰囲気下、2',2'-ジフルオロ-2'-デオキシシチジン (**46**) (1.00 g, 3.80 mmol) の無水ピリジン溶液 (40 mL) に、1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン (1.25 mL, 3.99 mmol) を加え、室温で4時間攪拌した。反応溶液をクロロホルムで薄め、飽和重曹水を加えて分液した。有機層を飽和食塩水、水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 (クロロホルム : メタノール = 4 : 1) で精製し、化合物**47** (1.93 g, quant.) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3855, 3837 (-NH₂) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24} 14.4$ (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7.54 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 6.05 (1H, m), 5.83 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 4.33-4.20 (1H, m), 4.10 (1H, d, $J = 13.5$ Hz), 3.98 (1H, dd, $J = 2.5, 13.0$ Hz), 3.91-3.85 (1H, m), 1.07-0.88 (28H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 167.6, 157.6, 140.7, 123.1, 96.6, 80.4, 70.8, 61.1, 17.9, 17.8, 17.7(9), 17.7(1), 17.6(9), 17.6(6), 17.4, 17.3, 17.2, 14.6, 14.4, 14.1, 13.9, 13.7; MS (FAB) m/z 506 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 506.2318. Found: 506.2318.

(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxycarbonyl-3,5-*O*-

(1,1,3,3-tetraisopropylsilyl)-2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (48)

アルゴン雰囲気下、化合物**35** (1.39 g, 3.14 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (30 mL) を0 °C に氷冷し、化合物**47** (799 mg, 1.57 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mmol) を滴下した。室温で 24時間攪拌後、反応溶液に飽和重曹水を加えて分液した。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し、溶媒を留去した。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 = 2 : 1) で精製し、化合物**48** (961 mg, 80%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 2946 (Ar C-H), 1752 (C=O), 1656 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24} 18.5$ (c 1.00, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 9.22 (1H, brs), 7.93 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 7.78 (2H, dd, $J = 5.5, 7.0$ Hz), 7.32 (2H, dd, $J = 5.5, 7.0$ Hz), 6.28-6.18 (1H, m), 5.20 (2H, s), 4.69 (1H, s), 4.39-4.19 (2H, m), 4.08-3.95 (1H, m), 1.33 (12H, s), 1.16-1.00 (28H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 163.0, 154.2, 152.3, 144.3, 137.8, 134.8,

134.7(7), 134.7(6), 134.6, 127.0, 126.9, 126.7, 125.8, 95.4, 83.6, 83.4, 79.2, 77.2, 67.4, 64.4, 59.2, 24.6, 17.1, 17.0, 16.9(8), 16.9(7), 16.6, 16.5, 16.4, 13.1, 12.6, 12.5, 12.1; MS (FAB) m/z 766 [M+H]⁺; HRMS (FAB): Calcd for $C_{35}H_{55}F_2N_3O_9BSi_2$ [M+H]⁺: 766.3538. Found: 766.3545.

(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxygenocarbonyl-2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (49)

アルゴン雰囲気下、化合物**48** (700 mg, 0.911 mmol) の無水ピリジン溶液 (10 mL) にフッ化水素-ピリジン (ca. 65% フッ化水素 w/w, 0.20 mL, 3.6 mmol) を加え、60 °Cで12時間攪拌した。反応液に炭酸水素ナトリウムを加え、更に30分攪拌し、セライト濾過した。溶媒を減圧留去し、粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 19 : 1) で精製し、化合物**49** (283 mg, 57%) を白色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3277 (-OH), 2979 (Ar C-H), 1751 (C=O), 1659 (C=N) cm^{-1} ; $[\alpha]_D^{24}$ 42.3 (c 1.00, MeOH); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.20 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.63 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.29-7.20 (4H,m), 6.14 (1H, t, J = 7.5 Hz), 5.09 (2H, s), 4.28-4.15 (1H, m), 3.92-3.82 (2H, m), 3.75- 3.67 (1H, m), 1.21 (12H, s); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 165.3, 157.3, 145.5, 140.0, 136.9, 135.9, 129.5, 129.4, 129.3, 128.2, 97.0, 85.1, 82.7, 82.6(7), 82.6(1), 70.0, 69.7, 68.6, 68.4, 60.1, 58.3, 25.2, 25.0, 18.3; FAB-LRMS m/z = 524 (MH⁺); FAB-HRMS calcd for $C_{23}H_{29}BF_2N_3O_8$ = 524.2016, found 524.2020.

MS (FAB) m/z 524 [M+H]⁺; HRMS (FAB): Calcd for $C_{23}H_{29}F_2N_3O_8B$ [M+H]⁺: 524.2016. Found: 524.2020.

第二章第三節の実験

合成したヌクレオシド (**dC^B**、**dA^B**、**dT^B**、**dG^B**) の過酸化水素応答性の評価

ヌクレオシド (終濃度: 1 mM) と塩化ナトリウム (終濃度: 100 mM) の10% DMSO-リン酸ナトリウム緩衝液 (終濃度: 10 mM, pH 7.2) に過酸化水素水溶液 (終濃度: 1 mM) を加え、室温で一定時間静置した後に逆相HPLCで分析した。対応する天然の核酸への変換率は260 nmにおける各化合物由来の吸光度ピーク面積比から決定した。

H₂O₂応答性チミジンアナログdT^Bの活性酸素種に対する応答性の評価

ヌクレオシド (終濃度: 1 mM) と塩化ナトリウム (終濃度: 100 mM) の10% DMSO-リン酸ナトリウム緩衝液 (終濃度: 10 mM, pH 7.2) にそれぞれ活性酸素種 (終濃度: 1 mM) を加え、室温で12時間静置した後に逆相HPLCで分析した。なお、*tert*-ブチルペルオキシド (TBHP)は70%水溶液として、次亜塩素酸イオン(ClO⁻)については10%次亜塩素酸ナトリウム水溶液として市販されている試薬を用いた。ヒドロキシラジカル(HO[·])、*tert*-ブトキシラジカル('BuO[·])については5mMの(NH₄)₂Fe(SO₄)₂と10 mMのEDTAをH₂O₂やTBHPとそれぞれ反応させることで発生させて用いた。一酸化窒素(NO)はPROLI NONOateをリン酸緩衝液(pH 7.2)中で分解させることで生成させた。スーパーオキシドイオン(O₂[·])はキサンタンオキシターゼ (4.5*10⁻³ mg/100μL)とカタラーゼ (0.4 mg/mL)にヒポキサンチン(2mM)を作用させることで生成させた。チミジンへの変換率は260 nmにおける各化合物由来の吸光度ピーク面積比から決定した。

第二章第四節の実験

dT^Bアミダイトブロックの合成

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)-2'-deoxythymidine (55)

アルゴン雰囲気下、化合物**41** (450 mg, 0.945 mmol) の無水ピリジン溶液 (10 mL) に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (384 mg, 1.13 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液にメタノールを加えて更に10分間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、クロロホルムと水を加え、分液した。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し、溶媒を留去した。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 (0.5%トリエチルアミン含有 クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物**55** (705 mg, 96 %) を淡黄色泡状固体として得た。

IR (KBr): ν 3455 (-OH), 2978 (Ar C-H), 1700 (C=O), 1642 (C=N) cm^{-1} $[\alpha]_D^{24}$ 8.8 (c 1.00, CHCl₃); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.54-8.50 (2H, m), 7.79-7.74 (2H, m), 7.69-7.63 (2H, m), 7.51-7.38 (4H, m), 7.32-7.18 (6H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 6.50-6.42 (1H, m), 5.11 (2H, s), 4.63-4.57 (1H, m), 4.12-4.07 (1H, m), 3.74 (6H, s), 3.51-3.45 (1H, m), 3.38-3.31 (1H, m), 2.48-2.24 (2H, m), 1.55 (3H, s), 1.31 (12H,

s); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 163.3, 163.2, 158.4, 150.7, 150.6, 149.1, 144.2, 139.8, 136.7, 136.2, 135.2, 135.1, 134.7, 133.8, 129.9, 128.9, 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.3, 126.9, 123.8, 113.0, 110.1, 110.0, 86.6, 86.1, 85.3, 83.5, 77.2, 74.7, 71.4, 63.3, 55.0, 44.3, 41.0, 24.6, 12.4; MS (FAB) m/z 783 [$\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_9\text{BNa}$ [$\text{M}+\text{Na}]^+$: 783.3429. Found: 783.3436.

3-*O*-(2-Cyanoethyl(diisopropylamino)phosphino)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)-2'-deoxy thymidine (56)

アルゴン雰囲気下、化合物 **50** (663 mg, 0.850 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) に N,N -ジイソプロピルアミン (0.44 mL, 2.6 mmol) と2-シアノエチル N,N' -ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (0.23 mL, 1.0 mmol) を加えて室温で2時間攪拌した。反応溶液に水を加えて酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し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 = 6 : 4) により精製し、化合物**56** (400 mg, 48%) を淡黄色泡状固体として得た。IR (KBr): ν 2244 (C≡N), 1671 (C=N) cm^{-1} ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.03-7.93 (1H, m), 7.83 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.48-7.39 (4H, m), 7.35-7.24 (7H, m), 6.89-6.79 (4H, m), 6.49-6.36 (1H, m), 5.43 (2H, s), 4.78-4.59 (1H, m), 4.30-4.17 (1H, m), 3.77 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.66-3.45 (4H, m), 3.45-3.27 (2H, m), 2.79-2.26 (4H, m), 1.49 (3H, s), 1.34 (12H, s), 1.26-1.03 (12H, m); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 169.8, 169.7, 158.3, 155.5, 155.4, 144.0, 139.6, 138.6, 135.0, 134.9, 134.7, 129.9, 129.8, 127.9, 127.8, 127.6, 126.8, 117.4, 117.2, 112.9, 104.6, 104.5, 86.5, 86.4, 85.9, 83.5, 77.2, 74.5, 68.2, 58.0, 57.8, 54.9, 54.8, 42.9, 42.8 (d, J (C, P) = 5.0 Hz), 42.7, 24.5, 24.4, 24.3, 24.2, 24.1 (d, J (C, P) = 7.0 Hz), 20.1, 19.9, 19.8, 19.7, 11.3, 44.9 (d, J (C, P) = 5.0 Hz), 24.4, 24.3, 22.8, 22.7, 20.2; ^{31}P -NMR (120 MHz, CDCl_3): δ 149.57, 148.96; FAB-LRMS m/z = 961 (MH^+); FAB-HRMS calcd for $\text{C}_{53}\text{H}_{67}\text{BN}_4\text{O}_{10}\text{P}$ = 961.4688, found 961.4697.

dT^B導入ONの合成

Gene Design nS-8 II Oligonucleotides Synthesizer を用い、第一章第二節の条件から活性化剤を5-エチルチオ-1*H*-テトラゾール (0.25 M アセトニトリル溶液) へと変更して行った。

dT^B導入ONの精製

グラジェント : B液濃度 16-32% として、他の条件は、第一章第二節と同様にして行った。

dT^B導入ONの組成確認

第一章第二節と同様にして行った。加えて、ESI-MSを用いて多価イオンを検出することでも目的のONの生成を確認した。

dT^B導入ONの定量

第一章第二節と同様にして行った。

dT^B導入ONの過酸化水素応答性の評価

ON (終濃度: 4 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度: 200 mM) のリン酸ナトリウム緩衝液 (終濃度: 10 mM, pH 7.0) に過酸化水素水溶液 (終濃度: 1 mM) を加え、37 °Cで一定時間静置した後に逆相HPLCで分析した。

熱融解温度 (T_m) 測定

第一章第三節と同様にして行った。

各ON (8 μ M)と塩化ナトリウム (200 mM) のリン酸ナトリウム緩衝液 (20 mM, pH 7.0, 100 μ L) を沸騰水中に浴し、室温までゆっくりと冷ました後、過酸化水素 2 mMの水溶液を100 μ L加え、後37 °Cで30分間静置した。これを窒素気流下、5 °Cまで冷却して測定することで、過酸化水素と反応後のdT^B導入ONの T_m 値を算出した。

第二章第五節の実験

dT^B導入ASOの合成

Gene Design nS-8 II Oligonucleotides Synthesizer を用い、第二章第四節と同様の条件を用いて行った。ホスホロチオエート修飾のための硫化工程は0.05 M ((ジメチルアミノメチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアザオリン-3-チオン (DDTT)のピリジン/アセトニトリル (1:1, v/v)溶液を用いた。

dT^B導入ONの精製

グラジェント : B液濃度 20-80% として、他の条件は、第一章第二節と同様にして行った。

dT^B導入ONの組成確認

ESI-MSを用いて多価イオンを検出することで目的のONの生成を確認した。

dT^B導入ONの定量

第一章第二節と同様にして行った。

細胞培養

マウス肝癌由来細胞株Hepa-1c1c7は英国ソールズベリーのEuropean Collection of Authenticated Cell Culuturesより入手した。37°C、5%CO₂雰囲気下で10% FBSおよび1%PSを含むDMEM培地を用いて培養した。

培養細胞系におけるdT^B含有ASOによるmRNAノックダウン活性評価

Hepa-1c1c7細胞を5.0*10³/wellで96-ウェルプレートに播種し、24時間培養後、洗浄、ASOとCaCl₂、H₂O₂を含む培地へと交換し更に48時間培養した (終濃度 ASO: 100 nM、CaCl₂: 9 mM、H₂O₂: 10 μMもしくは0 μM)。総RNAをQIAGEN RNeasy kitを用いて回収し、One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR kitとプライマーを用いてStepOnePlus system (Applied Biosystems)によりqRT-PCRにかけることでサンプル中のmRNA量を定量した。なお、各サンプルにおける*Scarb1*のmRNA量はGAPDHのmRNA量を元に正規化されている。

プライマー:

mouse *Scarb1* (forward: 5'-TGACAACGACACCGTGTCC-3',
reverse: 5'-ATCGACTTGTCAAGGCTGG-3')
mouse *GAPDH* (forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
reverse: 5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3')

参考文献

- 1) Letsinger, R. L.; Wu, T. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 811-812.
- 2) Yamana, K; Yoshikawa, A; Nakano, H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 637-640
- 3) Asanuma, H.; Ito, T.; Yoshida, T.; Liang, X., Komiyama, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393-2395.
- 4) Deiters, A., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 678-686.
- 5) Rodrigues-Correia, A.; Weyel, X. M. M.; Heckel, A. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5500-5503.
- 6) Rodrigues-Correia, A.; Knapp-Buhle, D.; Engeis, J. W.; Heckel, A. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5128-5131.
- 7) Tashiro, R.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2094-2097.
- 8) Hatano, A.; Makita, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1723-1730.
- 9) Heckel, A.; Mayer, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822-823.
- 10) Lusic, H.; Young, D. D.; Lively, M. O.; Deiters, A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1903-1906.
- 11) Ochi, Y.; Nakagawa, O.; Sakaguchi, K.; Wada, S.; Urata, H. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7620-7622.
- 12) Lavergne, T.; Baraguey, C.; Dupouy, C.; Parey, N.; Wuensche, W.; Sczakiel, G.; Vasseur, J.J.; Debart, F. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5719-5731.
- 13) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science*, **1991**, *254*, 1497-1500.
- 14) Zhilina, Z. V.; Ziembka, A. J.; Ebbinghaus, S. W. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1119-1131.
- 15) Schmidtgall, B.; Spork, A. P.; Wachowius, F.; Hobartner, C.; Ducho, C. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13742-13745.
- 16) Prdoukhanian, P.; Taylor, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570-9571.
- 17) Bannwarth, W. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1517-1527.
- 18) Shultz, R. G.; Gryaznov, S. M. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2966-2973.
- 19) Rothmund, P. W. K. *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- 20) Yang, Y.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20645-20653.
- 21) Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900-4921.
- 22) Krock, L.; Heckel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471-473.
- 23) Govan, J. M.; Young, D. D.; Lusic, H.; Liu, Q.; Lively, M. O.; Deiters, A. *Nucl. Acids Res.* **2013**, *41*, 10518-10528.
- 24) Barrois, S.; Wagenknecht, H. A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 905-914.
- 25) Goldau, T.; Murayama, K.; Brieke, C.; Steinwand, S.; Mondal, P.; Biswas, M.; Burghardt, I.; Wachtveitl, J.; Asanuma, H.; Heckel, A. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 1-11.
- 26) Ogasawara, S.; Maeda, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6671-6674.

- 27) Ogasawara, S.; Maeda, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5457-5459.
- 28) Ogasawara, S. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2652-2655.
- 29) Dugave, C.; Demange, L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475.
- 30) Kamiya, Y.; Asanuma, H. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1663-1672.
- 31) Beharry, A. A.; Woolley, G. A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422-4437.
- 32) Albini, A.; Fasani, E.; Pietra, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 1021-1024.
- 33) Zenkina, O.; Altman, M.; Leitus, G.; Shimon, L. J. W.; Cohen, R.; Van Der Boom, M. E. *Organometallics* **2007**, *26*, 4528-4534.
- 34) Kubischke, J.; Nather, C.; Herges, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *26*, 5041-5055.
- 35) Miao, Z.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Wang, Z.; Wang, D. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2014**, *591*, 10-18.
- 36) McDonagh, A. M.; Cifuentes, M. P.; Lucas, N. T.; Humphrey, M. G.; Houbrechts, S.; Persoons, A. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *605*, 193-201.
- 37) Shirai, Y.; Sasaki, T.; Guerrero, J. M.; Yu, B.; Hodge, P.; Tour, J. M. *ACS Nano* **2008**, *2*, 97-106.
- 38) Birnbaum, P. P.; Linford, J. H.; Style, D. W. G. *Trans. Faraday Soc.*, **1953**, *49*, 735-744.
- 39) Ishikawa, M.; Ohzono, T.; Yamaguchi, T.; Norikane, Y. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6909.
- 40) Dhammadika, H. M.; Burdette, S. C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809-1825.
- 41) Gracia-Amoros, J.; Velasco, D. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1003-1017.
- 42) Dokic, J.; Gothe, M.; Wirth, J.; Peters, M. V.; Schwarz, J.; Hecht, S.; Saalfrank, P. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 6763-6773.
- 43) Wada, T.; Kikkawa, M.; Sato, H.; Inoue, Y. *Nucleic Acids Symposium Series* **2005**, *49*, 9-10.
- 44) Bischof, G.; Cosentini, E.; Hamilton, G.; Riegler, M.; Zacherl, J.; Teleky, B.; Feil, W.; Schiessel, R.; Machen, T. E.; Wenzl, E. *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1282*, 131-139.
- 45) 馬場武, 学位論文, 2012 年
- 46) Morihiro, K.; Kodama, T.; Kentefu, Moai, Y.; Veedu, R. N.; Obika, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5074-5078.
- 47) Szatrowski, T. P.; Nathan, C. F. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 794-798.
- 48) Van de Bittner, G. C.; Dubikovskaya, E. A.; Bertozzi, C. R.; Chang, C. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21316-21321.
- 49) Kuang, Y.; Balakrishnan, K.; Gandhi, V.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19278-19281.
- 50) Cerqueira, N. M. F. S. A.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8507-8515.
- 51) Berlin, J. D.; Catalano, P.; Thomas, J. P.; Kugler, J. W.; Haller, D. G.; Benson, A. B. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 3270-3275.
- 52) Chung, C.; Srikun, D.; Lim, C. S.; Chang, C. J.; Cho, B. R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9618-9620.

- 53) Waldmann, H.; Reidel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 647-649.
- 54) Kawashima, E.; Aoyama, Y.; Sekine, T.; Miyahara, M.; Radwan, M. F.; Nakamura, E.; Kainosho, M.; Kyogoku, Y.; Ishido, Y. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6980-6986.
- 55) Watkins, B. E.; Kiely, J. S.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5702-5708.
- 56) Kroeck, L.; Heckel, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471-473.
- 57) Zajc, L.; Sayer, J. *Tetrahedron lett.* **1992**, *33*, 3409-3412.
- 58) Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Rybski, C. F. W.; Torres-Sanchez, C.; Bradley, M.; Patton, E. E.; Carragher, O. O.; Unciti-Broceta, A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5395-5404.
- 59) Zhao, P.; Zhou, L.; Nie, Z.; Xu X.; Li, W.; Huang, Y.; He, K.; Yao, S. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6279-6286.
- 60) Sekiguchi, T.; Ito, R.; Hayakawa, H.; Sekiguchi, M. *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 8128-8135.
- 61) Murray, S.; Ittig, D.; Koller, E.; Berdeja, A.; Chappell, A.; Prakash, T. P.; Norrbom, M.; Swayze, E.E.; Leumann, C. J.; Seth. P. P. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, 6135-6143.