



Title	三環式骨格を核酸塩基に有するシチジン誘導体人工核酸及びチミジン誘導体人工核酸の開発
Author(s)	岸本, 悠希
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/76488">https://doi.org/10.18910/76488</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 学位論文

三環式骨格を核酸塩基に有するシチジン誘導体人工核酸及び  
チミジン誘導体人工核酸の開発

2020 年

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

岸本 悠希



## 略語表

A	adenine
Ac	acetyl
ACN	acetonitrile
aq.	aqueous
Ar	argon
Bn	benzyl
BNA	bridged nucleic acid
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamide
Bu	butyl
C	cytosine
Calcd.	calculated
CAVP	<i>Crotalus adamanteus</i> venom phosphodiesterase
Cbz	benzyloxycarbonyl
CD	circular dichroism
conc.	concentrated
CPG	controlled pore glass
d	2'-deoxyribonucleotide
dba	dibenzylideneacetone
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	dichloromethane
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DFT	density functional theory
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DMTr	4,4'-dimethoxytrityl
DMTrCl	4,4'-dimethoxytrityl chloride
DNA	deoxyribonucleic acid
dR(s)	deoxyribonucleotide(s)
ds	double-stranded
Et	ethyl
G	guanine
HEG	hexaethylene glycol
HMDS	hexamethyldisilazane
HPLC	high-performance liquid chromatography

HR	high-resolution
<i>i</i>	iso
IR	infrared
LNA	locked nucleic acid
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
<sup>m</sup> C	5-methylcytosine
Me	methyl
mRNA	messenger RNA
MS	mass spectroscopy
MW	molecular weight
<i>n</i>	normal
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
<i>o</i>	ortho
ODN	oligodeoxynucleotide
<i>p</i>	para-
Pd	palladium
Ph	phenyl
PNA	peptide nucleic acid
Pr	propyl
PS	phosphorthioate
<i>r</i>	2'-ribonucleotide
RNA	ribonucleic acid
RNase H	ribonuclease H
Rt	room temperature
ss	single-stranded
T	thymine
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TEA	triethylamine
TEAA	triethylammonium acetate
<i>tert</i>	tertiary
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
TFAc	trifluoroacetyl
TFO	triplex-forming oligonucleotide
THF	tetrahydrofuran
<i>T<sub>m</sub></i>	melting temperature

TMS	trimethylsilyl
Tol	tolyl
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
TsCl	<i>p</i> -toluenesulfonyl chloride
U	uracil
UV	ultraviolet

## 目次

序論	1
本論	6
第1章 核酸塩基にフェノキサジン類を有する2',4'-BNA/LNAの合成と機能評価	
第1節 核酸塩基にフェノキサジン類を有する2',4'-BNA/LNA(BNAP, BNAP-AEO)の背景と設計	6
第2節 フェノキサジンを有する2',4'-BNA/LNA(BNAP)導入型オリゴ核酸の合成	7
第3節 9-(アミノエトキシ)フェノキサジンを有する2',4'-BNA/LNA(BNAP-AEO)導入型 オリゴ核酸の合成	11
第4節 BNAP及びBNAO-AEO導入型オリゴ核酸の二重鎖形成能評価	13
第5節 BNAP及びBNAP-AEO導入型オリゴ核酸のCDスペクトル測定	22
第6節 BNAP及びBNAP-AEO導入型オリゴ核酸の熱力学パラメータの算出	24
第7節 BNAP-AEO導入型オリゴ核酸の酵素耐性能評価	26
第2章 フラノース環に三環式骨格を有するチミジン誘導体の合成と機能評価	
第1節 フラノース環に三環式骨格を有するチミジン誘導体(OBN)の背景と設計	28
第2節 チミジン誘導体OBN導入型オリゴ核酸の合成	30
第3節 チミジン誘導体OBN導入型オリゴ核酸の二重鎖形成能評価	32
第4節 OBN導入型オリゴ核酸のCDスペクトル測定	37
第5節 OBN導入型オリゴ核酸の三重鎖形成能評価	38
第6節 OBN導入型オリゴ核酸の酵素耐性能評価	40
結論	41
謝辞	42
実験の部	43
参考文献	60

## 序論

低分子医薬品がこれまでの創薬研究の中心的存在を担ってきた一方で、創薬ターゲットとなる分子が枯渇し、新薬の創出自体が困難を極めている昨今、低分子医薬品に代わる新たな創薬モダリティの台頭が要求されている。その一端を担うものが、抗体医薬や核酸医薬といった高分子、中分子医薬品である。特に後者の核酸医薬においては、疾患の標的となる遺伝子の配列情報が明らかにされれば、その遺伝子の発現を抑制し、疾患の原因となるタンパク質の産生を特異的に阻害することが理論上は可能となる。この、標的遺伝子を特異的に標的とする核酸医薬の作用機序は、特異性が低い低分子医薬品の作用機序と異なるため、これまでに治療法がなかった難治性疾患への治療法にもなり得るとして注目を集めており<sup>1)</sup>、2020年1月現在、世界で11品目が実際に上市されている。

核酸医薬、その中でも盛んに研究が行われているアンチセンス法では、疾患の原因タンパク質の基となる標的メッセンジャー RNA (mRNA) に対して、相補的な配列を有する一本鎖のオリゴデオキシヌクレオチド (以下、オリゴ核酸、或いは ODN) が結合し二重鎖を形成後、DNA/RNA 二重鎖の RNA 鎖のみを特異的に分解する酵素である RNase H によって標的 mRNA が切断される機構を利用する (Figure 1)。また、生体内の DNA 二重鎖を標的とするアンチジーン法と呼ばれる三重鎖核酸を形成する手法も存在する。三重鎖核酸は、三重鎖核酸形成オリゴヌクレオチド (TFO: Triplex-forming oligonucleotide) と呼ばれる一本鎖のオリゴ核酸が二重鎖 DNA に結合することで形成される。三重鎖核酸を二重鎖 DNA の標的遺伝子配列上で形成させ、mRNA への翻訳を阻害することにより、mRNA を標的とするアンチセンス法よりも効率よく遺伝子発現を抑制できると考えられている (Figure 1)。

しかしアンチセンス法とアンチジーン法の双方において、用いるオリゴ核酸を天然の DNA のみで構成した場合、(1) 標的となる mRNA や二重鎖 DNA に対する結合親和性 (二重鎖形成能並びに三重鎖形成能) や、(2) 標的配列への結合選択性、(3) 生体内での核酸分解酵素に対する安定性、(4) 細胞膜透過性等に難点があるため、これら (1) ~ (4) の課題を解決する人工核酸分子の開発が必要不可欠となっている<sup>2)</sup>。特にアンチセンス法とアンチジーン法の双方においては、(1) によって高い薬効を維持しつつ、(2) によって標的配列以外のミスマッチ配列との結合を避けることで、重篤な副作用の惹起を回避しなければならない。

これまでに、核酸の構成成分である糖部、核酸塩基部、並びにリン酸ジエステル結合部 (Figure 2) に化学修飾を施した人工核酸が種々開発されており、現在核酸医薬として承認されている Mipomersen や Macugen にも、糖部やリン酸部が化学修飾された人工核酸が搭載されている。当研究室と Wengel らのグループによって独立的に開発された糖部 2',4'位での架橋構造を有する 2',4'-BNA/LNA<sup>3)</sup> (2'-O,4'-C-

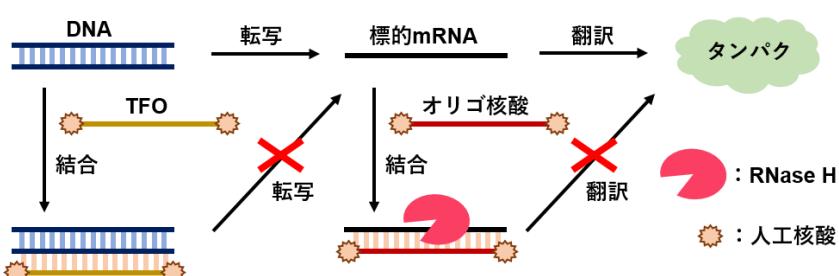


Figure 1. Mechanism of action in antisense and antigen methods.

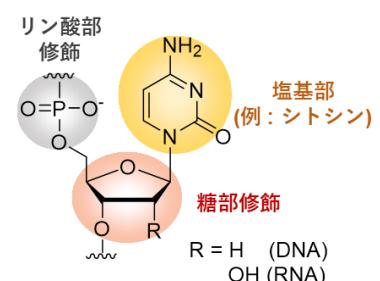
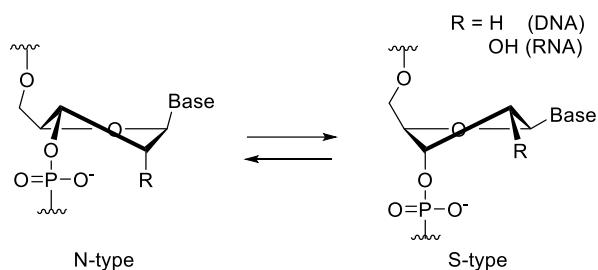


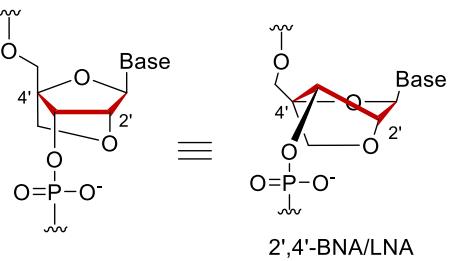
Figure 2. Modification moieties of nucleosides.

methylene bridged nucleic acid / locked nucleic acid) は、N型とS型という平衡状態にある糖部のコンホメーション (Figure 3) を予め RNAと同じN型に固定化した核酸分子である (Figure 4)。2',4'-BNA/LNAは、二重鎖形成時のエントロピー損失を抑制するコンセプトで設計され、実際に相補鎖RNAに対して優れた結合親和性を有することが見出された。また2',4'-BNA/LNAが導入されたオリゴヌクレオチドは優れた遺伝子発現抑制効果を示すことが見出されており<sup>4)</sup>、現在臨床試験にも利用されている<sup>5)</sup>。当研究室では2',4'-BNA/LNAの他に、GuNA<sup>6)</sup> (Guanidine bridged nucleic acid) や AmNA<sup>7)</sup> (Amido-bridged nucleic acid)、scpBNA<sup>8)</sup> (2'-O,4'-C-spirocyclopropylene bridged nucleic acid) といった新たな糖部架橋型人工核酸の開発に成功している (Figure 5)。GuNAはカチオンを有するグアニジノ基により、アンチセンス法におけるオリゴ核酸の細胞膜透過性向上に寄与すると期待される。AmNAを導入したオリゴ核酸では、核酸分解酵素に対する耐性を向上させるのみならず、*in vivo*での実験においても、オリゴ核酸由来の肝毒性を低減させることも明らかになっている<sup>9)</sup>。肝毒性低減に関しては、scpBNA導入型オリゴ核酸<sup>8c)</sup>もその一端を担っており、我々は核酸医薬の種々の目的に適した次世代型の糖部修飾型人工核酸の開発にも成功している<sup>10)</sup>。

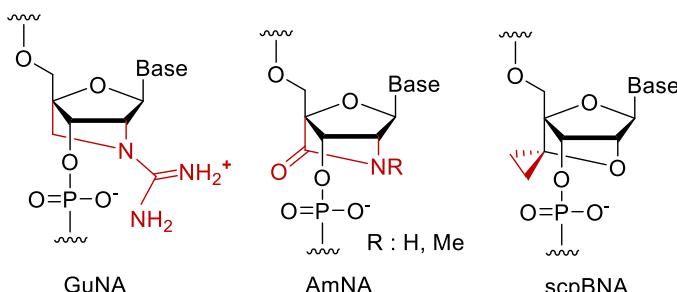
一方、核酸塩基部の特性に着目した場合、核酸の二重鎖構造は主に積層する隣接塩基間でのπ-πスタッキング相互作用<sup>a</sup>と、標的塩基との水素結合形成によって安定化を受けている。従って、化学修飾を



**Figure 3.** Conformation of a sugar moiety in equilibrium state.

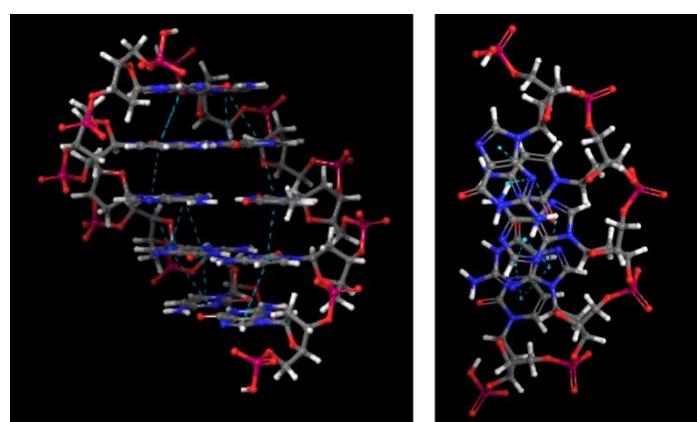


**Figure 4.** Structure of 2',4'-BNA/LNA.

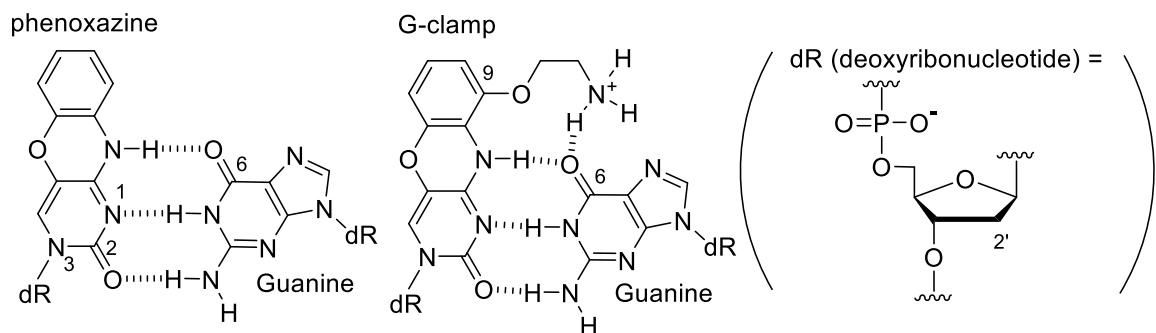


**Figure 5.** Structures of GuNA (left), AmNA (right) and scpBNA (right.).

<sup>a</sup> 核酸二重鎖、特にDNA/DNA二重鎖中において、疎水性が高い核酸塩基同士は、らせん構造内でロンダン分散力を駆動力とするπ-πスタッキング相互作用(右図、水色点線)によって積層し、二重鎖構造を安定化させる。芳香族性を有する核酸塩基が重なり合うことで生まれるスタッキング相互作用の強さは、隣接核酸塩基間との電子密度や分極率の差によって変化する。また、対面する核酸塩基が安定な平面構造と、それに伴う塩基間の水素結合形成を促す際にもスタッキング相互作用は重要な役割を果たしている。

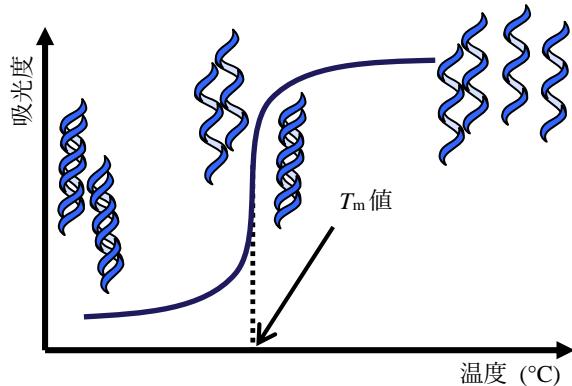


施した人工核酸塩基を含むオリゴ核酸と、標的核酸との二重鎖形成能を向上させる場合は、天然核酸塩基の空間的な水素結合形成面を維持しつつ、これら二点の特性を強化する人工核酸塩基を創製することが合理的な方法となる。具体的な人工核酸塩基の設計戦略としては、(a) 核酸塩基の環サイズを増大させることでスタッキング相互作用を強化する方法や、(b) 標的塩基への水素結合形成数を増加させる方法等によって、水素結合形成能を直接的かつ選択的に強化する手法が挙げられる。実際にシチジン誘導体として三環性の 3-β-D-2'-deoxyribofuranosyl-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (以下、phenoxazine、フェノキサジン) 人工核酸塩基が 1995 年 Matteucci らによって報告されており<sup>11)</sup>、本分子は相補鎖核酸内の標的グアニン塩基に対して高い二重鎖形成能<sup>b</sup>を有することが知られている (Figure 6)。二重鎖構造での安定性を向上させる理由は、本分子の大きく広がった芳香族三環式構造が二重鎖構造中において、隣接する核酸塩基対間と効果的にスタッキング相互作用を増大させるためである。また、フェノキサジンの 9 位がアミノエトキシ基で修飾された G-clamp<sup>12)</sup> (Figure 6) は、プロトン化を受けた末端アミノ基の水素原子が標的グアニンの 6 位のカルボニル基に対して新たに水素結合を形成しつつ、スタッキング相互作用を増大させるため、1 残基でフェノキサジン以上に二重鎖形成能を上昇させる。さらに G-clamp を導入したオリゴ核酸においては、高い二重鎖形成能により標的 RNA と強く結合することで、細胞内に導入後、優れた遺伝子発現抑制効果を示すことも報告されている<sup>13)</sup>。G-clamp 誘導体はアンチセンス法以外にも、PCR プライマーをはじめとした多様なアプリケーションへの展開がなされており<sup>14)</sup>、G-clamp はシチジン誘導体の人工核酸塩基を代表する存在になった。天然チミンを模した誘導体の一つとしては、2001 年



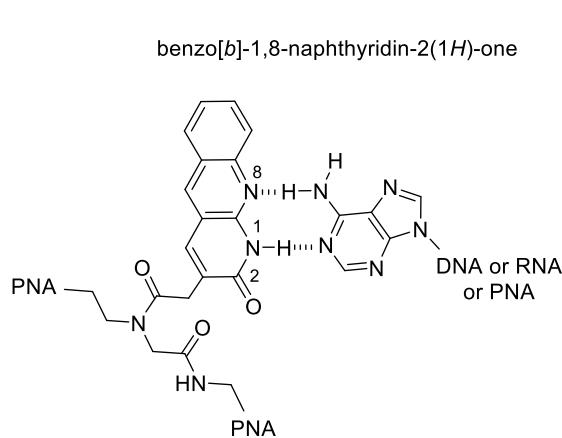
**Figure 6.** Structures of phenoxazine (left) and G-clamp (right)

<sup>b</sup> 核酸の二重鎖形成能は融解温度 ( $T_m$ ) を測定することで評価されている。二重鎖を形成するオリゴヌクレオチドを熱変性により解離させ、50% 解離した温度を  $T_m$  値と定義する。オリゴヌクレオチドは二重鎖を形成することで積層した核酸塩基がスタッキング相互作用を誘発し、全体の吸光度が低下する（淡色効果）。一方、二重鎖が解離し一本鎖になると、個々の核酸塩基の自由度が増し、各々が吸光作用を示すため、それに伴い全体の吸光度が増加する（濃色効果）。それ故、熱変性の過程で、一定の温度毎に吸光度をプロットすると、右図のようなシグモイド曲線が得られる。核酸の二重鎖形成能を議論する上で、このグラフを基に  $T_m$  値を算出する手法が一般的に用いられている。

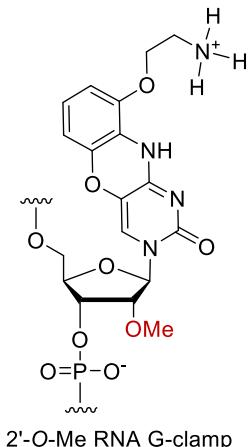


Nielsen らによって、ペプチド核酸（PNA; peptide nucleic acid）の核酸塩基部に三環式の benzo[*b*]-1,8-naphthyridin-2(1*H*)-one (Figure 7) を導入した研究が報告され、彼らはこの PNA が特に相補鎖 DNA との二重鎖形成能を大きく上昇させることを明らかにした<sup>15)</sup>。また天然アデニンの誘導体としても、1999 年 Buhr らによって四環式の quadracyclic adenine (qA)が報告されており<sup>16)</sup>、環構造を拡張した核酸塩基誘導体の有意性も徐々に明らかにされつつある<sup>17)</sup>。また、2',4'-BNA/LNA にもスタッキング相互作用を増大させる効果もあることから<sup>18)</sup>、糖部修飾核酸とフェノキサジン、G-clamp 等の環拡張型人工核酸塩基類は、ともに相補鎖核酸との二重鎖形成能を向上させる点で大きく共通している。こうした背景の下、二重鎖形成能向上を図り、糖部構造が N 型に誘起された 2'-O-Me RNA と G-clamp を組み合わせた分子(2'-O-Me RNA G-clamp)が既に報告されている<sup>19)</sup> (Figure 8)。本報告において、2'-O-Me RNA は 2',4'-BNA/LNA のように共有結合によって糖部構造を束縛していないが故に、2'-O-Me RNA G-clamp には G-clamp を凌ぐ二重鎖形成能の向上が見られなかった。しかしながら、核酸糖部と塩基部を同時に化学修飾し、人工核酸としての機能をこれまで以上に強化する戦略は当研究室を中心に報告されつつあり、糖部修飾核酸に人工核酸塩基を導入することの有用性や有意性が示されてきている<sup>20)</sup>。

結合親和性の向上に関して、糖部修飾核酸では 2',4'-BNA/LNA を、塩基部修飾核酸では G-clamp を超えるものは殆ど存在していない<sup>6)</sup>。従って、2',4'-BNA/LNA 骨格に核酸塩基として G-clamp を有する人工核酸は、糖部、塩基部双方のスタッキング相互作用の向上に伴い、二重鎖形成能を飛躍的に向上させられるのではないかと考えた。こうした背景の下、著者は 2',4'-BNA/LNA 骨格にフェノキサジン並びに、G-clamp を導入したシチジン誘導体 BNAP<sup>21)</sup>(2',4'-BNA with a phenoxazine) 並びに、BNAP-AEO(2',4'-BNA

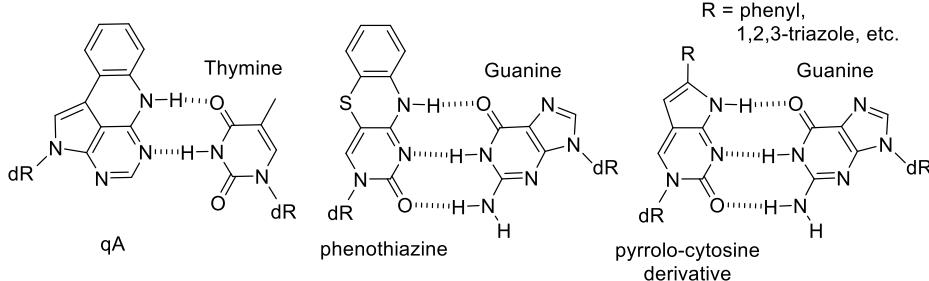


**Figure 7.** Structures of benzo[*b*]-1,8-naphthyridin-2(1*H*)-one in PNA



**Figure 8** Structure of 2'-O-Me RNA G-clamp

④ 環構造拡張型人工核酸塩基の報告例を下に示した(左: アデニン誘導体 qA、中央: シトシン誘導体 phenothiazine、右: シトシン誘導体 pyrrole-cytosineの一例)。



with a 9-(aminoethoxy)phenoxazine) を設計した (Figure 9)。これらをオリゴ核酸へ一残基導入することで、既存の人工核酸と比較して、二重鎖形成能が飛躍的に向上することが見込まれる。核酸医薬への応用においては、これらの機能向上に伴い遺伝子発現抑制効果が向上するのではないかと考えたため、BNAP と BNAP-AEO の二重鎖形成能や二重鎖構造等の物理化学的側面について、各々が 2',4'-BNA/LNA と phenoxazine 並びに G-clamp の効果をどのように獲得しているかを詳細に精査することとした。(第 1 章)

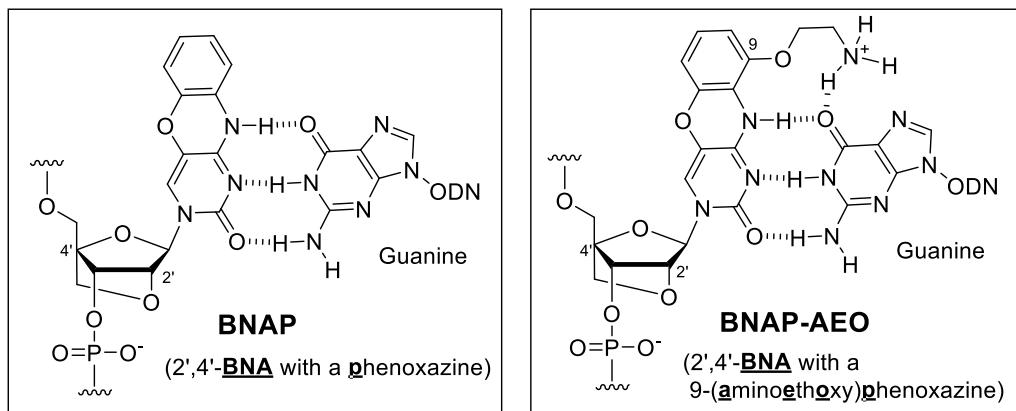


Figure 9. Structures of BNAP (left) and BNAP-AEO (right).

同時に著者は、BNAP や BNAP-AEO と同様の高機能なチミジン誘導体を開発することで、核酸医薬においては、核酸塩基の配列設計に囚われない高活性なオリゴ核酸の創製が可能になると考えた。そこで、核酸糖部のフラノース環に三環式核酸塩基を導入した新規チミジン誘導体 1'- $\beta$ -[3-(1,2-dihydro-2-oxobenzo[b][1,8]naphthyridine)]-2'-deoxy-D-ribofuranose (以下、2-oxobenzo[b][1,8]naphthyridine, OBN) を設計した (Figure 10)。OBN では、共役構造を連続させることにより芳香族性を獲得させることとした。構造的には、2 つの炭素原子を OBN 内に導入している点が、フェノキサジンと異なる点となる。本実験では OBN 含むオリゴ核酸を合成後、本オリゴ核酸の結合親和性や二重鎖形成の際に与える影響を詳細に評価した。(第 2 章)

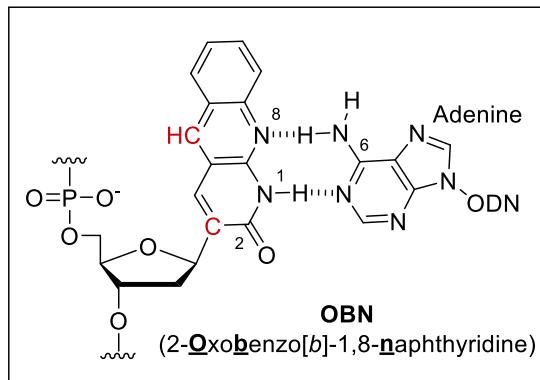
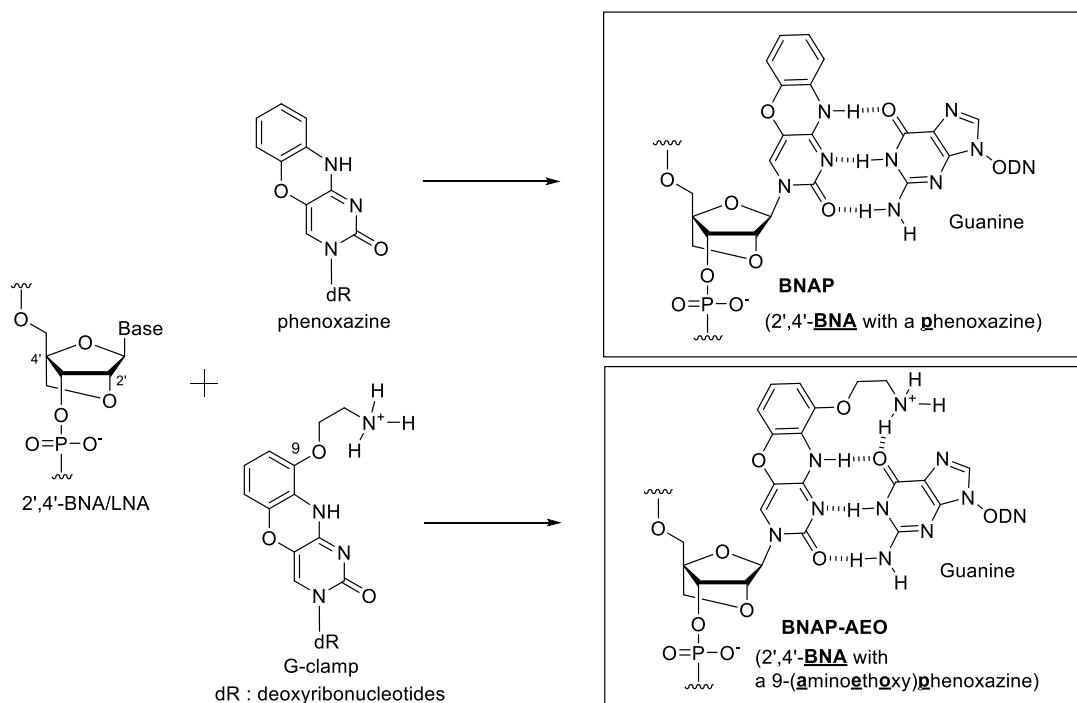


Figure 10. Structures of OBN.

## 第1章 核酸塩基にフェノキサジン類を有する 2',4'-BNA/LNA の合成と機能評価

## 第1節 核酸塩基にフェノキサジン類を有する 2',4'-BNA/LNA (BNAP, BNAP-AEO) の背景と設計

核酸医薬に十分な活性を獲得させるにあたっては、オリゴ核酸内的人工核酸に高い二重鎖形成能と塩基識別能を付与させることが重要となる。そこで著者はまず、2',4'-BNA/LNA 骨格に核酸塩基としてフェノキサジンを導入した BNAP (2',4'-bridged nucleic acid with a phenoxazine, Figure 11) を設計した。2',4'-BNA/LNA とフェノキサジンは共にスタッキング相互作用によって二重鎖形成能を向上させることが報告されていることから、両者を同時に導入した人工核酸 BNAP には、優れた二重鎖形成能の向上が見込まれた。また、フェノキサジン環上にアミノエトキシ基を有する G-clamp は、フェノキサジンによるスタッキング相互作用の向上とアミノエトキシ基による標的グアニンへの結合選択性を向上させる分子である。よって、2',4'-BNA/LNA 骨格に核酸塩基として G-clamp を導入した BNAP-AEO (2',4'-bridged nucleic acid with a 9-(aminoethoxy)phenoxazine, Figure 11) には二重鎖形成能と、グアニン塩基に対する塩基識別能を一挙に向上させることができると予想された。本実験においては BNAP 及び BNAP-AEO のモノマー合成を行った後、BNAP 及び BNAP-AEO を導入したオリゴ核酸を合成し、その物性評価を行った。



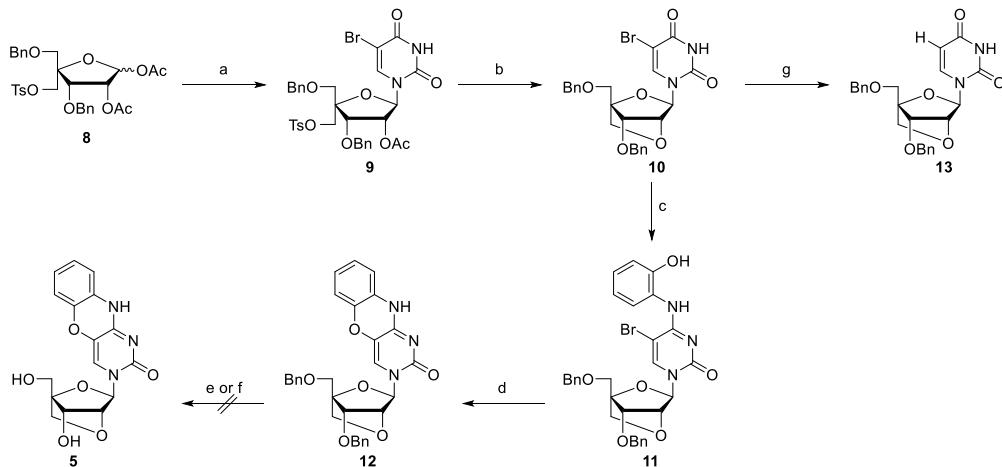
**Figure 11.** Structures of BNAP (up side) and BNAP-AEO (down side).

## 第2節 フェノキサジンを有する 2',4'-BNA/LNA (BNAP) 導入型オリゴ核酸の合成

BNAP 導入型 ODN を合成するにあたって、BNAP ヌクレオシドのアミダイトユニット(ODN 導入前駆体) が必要となる。BNAP のアミダイトユニットである化合物 **7** は、**1** より変換を行った既知化合物 **2**<sup>21)</sup> より 5 工程を経て総収率 20%で得た (Scheme 1)。Matteucci らの報告<sup>11)</sup>に基づき、ジクロロメタン中、トリフェニルホスフィンと四塩化炭素を作用させることでウラシルの 4 位をクロロ化した後、ウラシル 4 位にアミノフェノールを導入し **3**を得た。その後、アンモニアで処理することで 3' 位と 5' 位ヒドロキシ基上のアセチル基を除去し **4** へと導いた。得られた **4** と DBU とのエタノール溶液を加熱還流すると、閉環反応が進行し、フェノキサジン環を有する **5** が得られた。続いて AgOTf と DMTrCl より得られた DMTrOTf を用いて、**5** の 5' 位ヒドロキシ基がジメトキシトリチル化された **6** を得た後に、アミダイトユニット **7** を得た<sup>d</sup>。BNAP のアミダイトユニット **7** は、DNA 自動合成機によりオリゴ核酸 (ODN **1**)

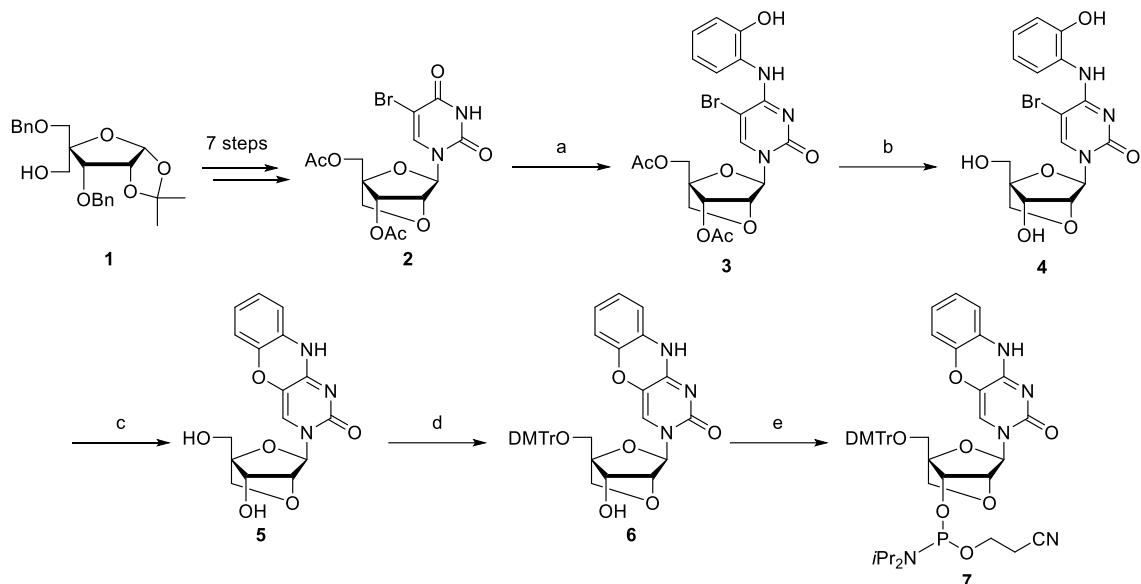
---

<sup>d</sup> 本合成過程 (Scheme 1)において、出発原料 **1** の 5',3'位ヒドロキシ基を保護するベンジル基を一度除去した後、アセチル基による保護を行い、**2**を得た。これは、**5**を得るために **12** の接触還元等を実施した際、**12** の 2',4'-BNA/LNA の環構造が壊れてしまったためである (Scheme 2 a-f)。また、化合物 **2**を合成する過程では、5-ブロモウラシルではなくウラシルを導入することで合成を達成している<sup>21)</sup>。この理由は、ベンジル基を除去し、アセチル基による再保護を行う過程での接触還元によって、5-ブロモウラシルのブロモ基が水素原子に置換され、ウラシルへと戻ってしまうためである (Scheme 2 g)。



Scheme 2. Synthetic trials of BNAP nucleoside **5** (previous route).

Reagents and conditions: (a) 5-Bromouracil, TMSOTf, BSA, ACN, reflux, 6 h (93%); (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 4 h (89%); (c) PPh<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub>, DCM, reflux, 1 h, then 2-aminophenol, DBU, rt, 18 h (94%); (d) CsF, EtOH, reflux, 26 h (54%); (e) palladium catalytic hydrogenerations (various combination with Pd(OH)<sub>2</sub>/C, Pd/C, H<sub>2</sub>, cyclohexene, ammonium citrate) (decomposition); (f) BCl<sub>3</sub>, DCM, -78 °C, 30 h (trace); (g) cyclohexene, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, EtOH, reflux.



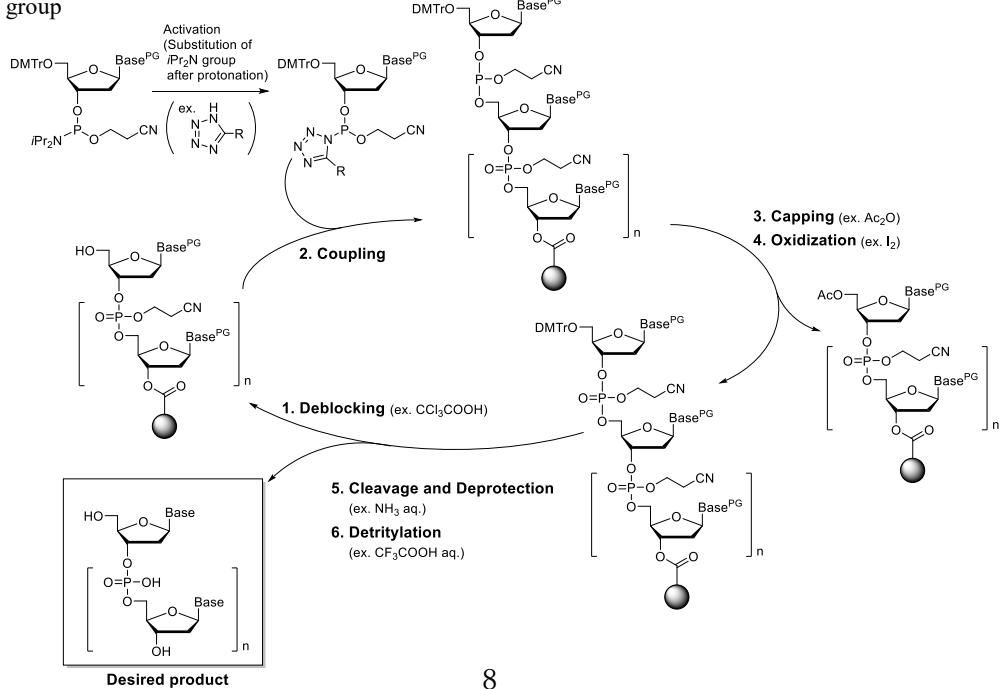
**Scheme 1.** Synthesis of BNAP amidite 7.

*Reagents and conditions:* (a)  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{DCM}$ , reflux, 2 h, then 2-aminophenol,  $\text{DBU}$ , rt, 12 h; (b) 7 M  $\text{NH}_3$  in  $\text{MeOH}$ , rt, 2 h (81% in 2 steps); (c)  $\text{DBU}$ ,  $\text{EtOH}$ , reflux, 30 h (59%); (d)  $\text{DMTrCl}$ ,  $\text{AgOTf}$ , 2,6-lutidine,  $\text{DCM}$ , 0 °C, rt, 3 h (58%); (e)  $i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $\text{DIPEA}$ ,  $\text{DCM}$ , rt, 3 h (74%).

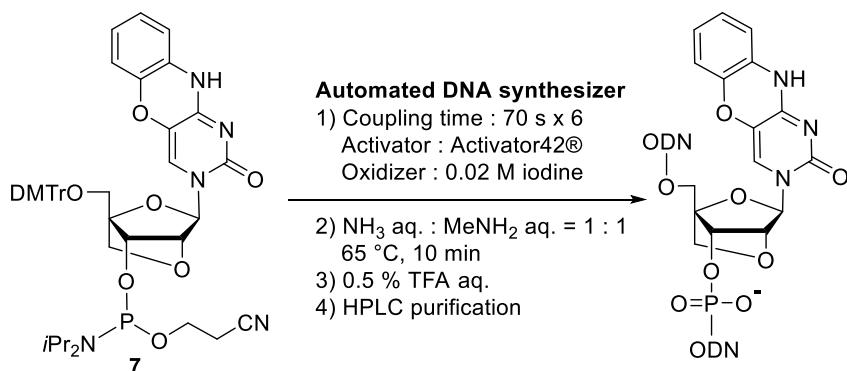
~ODN 8) 内に導入した<sup>e</sup>。7 は糖部の 2',4'-BNA/LNA 構造、塩基部のフェノキサジン環各々の嵩高さのために、オリゴ核酸合成時の反応効率、即ち縮合効率の低下が想定された。故に、天然型アミダイト体

<sup>e</sup> DNA 自動合成機でのオリゴ核酸合成は以下の経路と機構で進行する。まず、CPC 等の固相上に担持されたスクレオチドの 5'位 DMTr 基が酸性条件下で除去され、5'位にヒドロキシ基を露出する。その後、各アミダイト体がテトラゾール誘導体で活性化され、固相上のスクレオチドの 5'位ヒドロキシ基とのカップリング反応が起こる。その後、未反応のスクレオチドの 5'位ヒドロキシ基は次回以降のカップリング反応に関与しないよう、無水酢酸等によりキャッピングされる。続いて固相上で一残基分伸長されたスクレオチドについてはヨウ素等による酸化反応を受け、リン原子が 5 値へと変換される。更に一残基伸長する場合には本サイクルを繰り返すが、目的の残基長までの合成を完了した場合は、アンモニア水溶液等の塩基性条件での加熱を行い、固相の CPG 等からの切り出しと各核酸塩基上やリン酸部上の保護基を除去する。最後に末端の DMTr 基を再び酸性条件で除去後、逆相 HPLC 等での精製を行い、オリゴ核酸の合成と精製が完了する。

\*PG: protecting group



を用いる場合よりも反応時間を延長<sup>f</sup>することで、良好な縮合効率での **7** を含むオリゴ核酸の合成を達成した。BNAP を含むオリゴ核酸について、隣接塩基が BNAP の二重鎖形成能の向上に与える影響を詳細に評価するべく、隣接箇所に様々な核酸塩基を有する配列を設計した。またオリゴ核酸の合成においては、反応の活性化剤として 5-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1*H*-tetrazole (Activator 42<sup>®</sup>)、酸化剤として 0.02 M ヨウ素水溶液を用いた。合成したオリゴ核酸について、28% アンモニア水溶液と 40% メチルアミン水溶液の混合水溶液 (= 1 : 1, v/v) を用いてカラム担体となる CPG から切り出した後、オリゴ核酸内の各核酸塩基とリン酸部の保護基を除去し、逆相 HPLC を用いることでオリゴ核酸を精製した (Scheme 3)。通常、始めに 28% アンモニア水溶液を室温で 1.5 時間反応させることで CPG からのオリゴ核酸の切り出しを行う。その後、この 28% アンモニア水溶液を 55 °C で 9 時間加熱することでオリゴ核酸内の各核酸塩基等の保護基を除去する。しかし BNAP 導入型オリゴ核酸にこの条件を適用すると、導入した BNAP の近傍箇所で核酸鎖が切断された断片が副生成物として生じた。そこで上述の混合水溶液を 65 °C で 10 分間反応させる条件を適用し、極めて短時間での CPC からの切り出しと各核酸塩基等の脱保護を行った。なお逆相 HPLC で分析したところ、上記のような副生成物は確認できなかつたため、本条件を最適条件とした。さらに、得られたオリゴ核酸 (ODN) の命名および表記方法に関して、各種 ODN の番号を 1、各配列中に導入した核酸の種類を a とすると、その ODN を“**ODN 1\_a**”として命名および表記した。なお、二重鎖形成能評価用の配列に関しては、視覚的な見易さのために **ODN 1\_a (TaT)** (例) とし、配列 5'-d(GCGT@TTGCT)-3' 中の実際の導入箇所@を含む中央三残基分を抜粋し、併せて表記した。



**Scheme 3.** Synthesis of BNAP-incorporated ODNs.

<sup>f</sup> 今回用いた DNA 自動合成機 (GeneDesign nS-8 Oligonucleotides Synthesizer) で天然型 DNA を合成する際の反応条件には、5 秒×5 サイクル (0.2 μmol スケール), 5 秒×6 サイクル (1.0 μmol スケール) が初期条件として設定されている。0.2 μmol スケールでの BNAP アミダイトユニットの反応においては反応時間を 70 秒/サイクルに延長し、サイクル数についても 1 サイクル増やした 6 サイクルの条件を適用することで良好な縮合効率で BNAP 導入型 ODN を合成した。

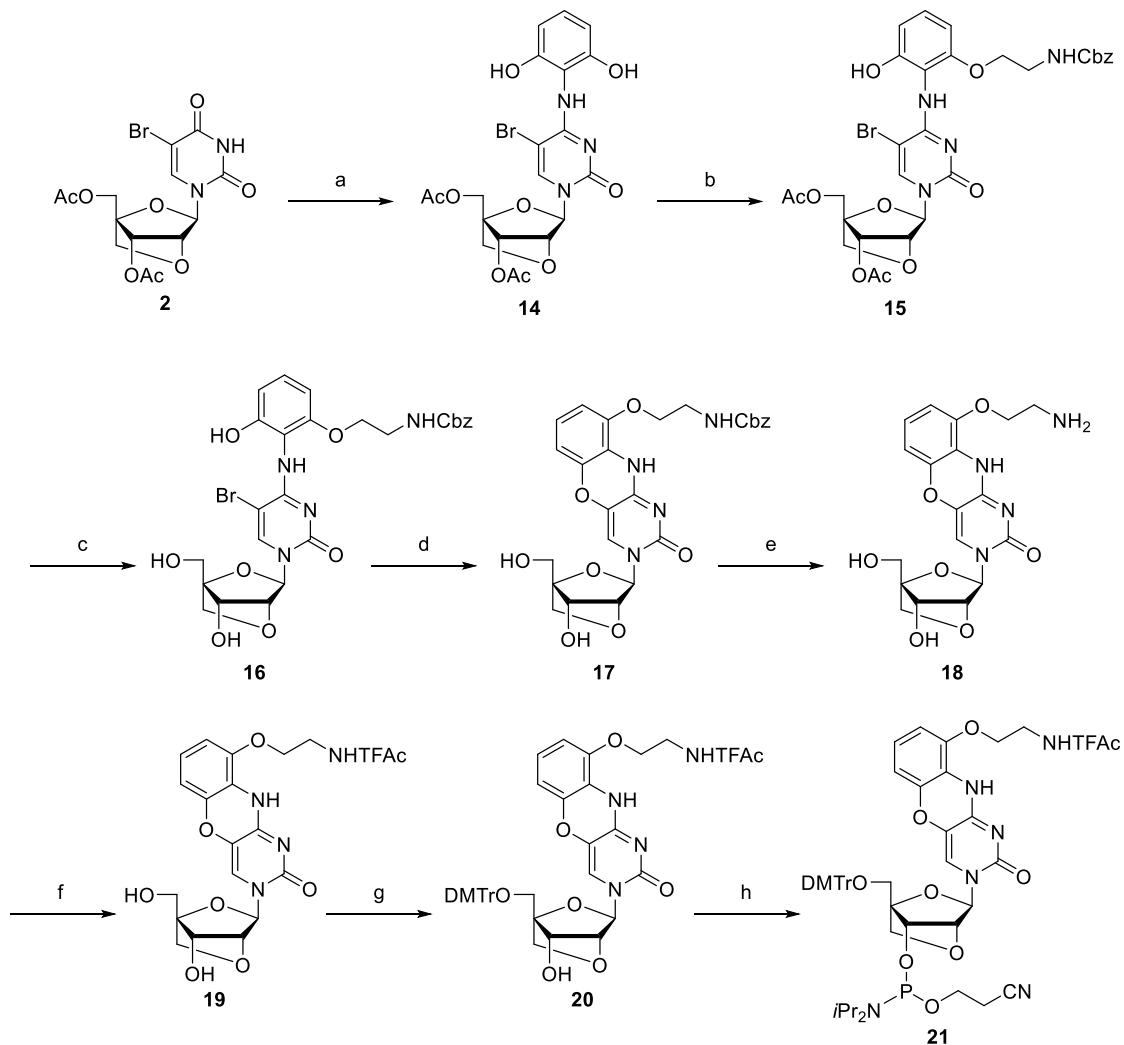
**Table 1.** Sequences and MALDI-TOF-Mass data of BNAP (**B<sup>H</sup>**)-modified oligodeoxynucleotides (**ODN 1-8\_B<sup>H</sup>**).

Sequence	MALDI-TOF-Mass		Yield (%)
	[M-H] <sup>-</sup> Calcd.	[M-H] <sup>-</sup> Found	
5'-d(GCGTTB <sup>H</sup> TTTGCT)-3' ( <b>ODN 1_B<sup>H</sup></b> (TB <sup>H</sup> T))	3735.5	3736.2	4* <sup>1</sup>
5'-d(GCGTCB <sup>H</sup> ATTGCT)-3' ( <b>ODN 2_B<sup>H</sup></b> (CB <sup>H</sup> A))	3729.5	3729.2	7* <sup>1</sup>
5'-d(GCGTCB <sup>H</sup> CTTGCT)-3' ( <b>ODN 3_B<sup>H</sup></b> (CB <sup>H</sup> C))	3705.4	3705.1	38* <sup>2</sup>
5'-d(GCGTAB <sup>H</sup> ATTGCT)-3' ( <b>ODN 4_B<sup>H</sup></b> (AB <sup>H</sup> A))	3753.5	3754.5	9* <sup>1</sup>
5'-d(GCGTGB <sup>H</sup> GTTGCT)-3' ( <b>ODN 5_B<sup>H</sup></b> (GB <sup>H</sup> G))	3785.5	3786.5	9* <sup>1</sup>
5'-d(GCGTB <sup>H</sup> CB <sup>H</sup> TTGCT)-3' ( <b>ODN 6_B<sup>H</sup></b> (B <sup>H</sup> CB <sup>H</sup> ))	3823.5	3824.2	3* <sup>1</sup>
5'-d(GCGTCB <sup>H</sup> B <sup>H</sup> TTGCT)-3' ( <b>ODN 7_B<sup>H</sup></b> (CB <sup>H</sup> B <sup>H</sup> ))	3823.5	3823.4	12* <sup>1</sup>
5'-d(GCGTB <sup>H</sup> B <sup>H</sup> B <sup>H</sup> TTGCT)-3' ( <b>ODN 8_B<sup>H</sup></b> (B <sup>H</sup> B <sup>H</sup> B <sup>H</sup> ))	3941.6	3941.9	17* <sup>1</sup>

**B<sup>H</sup>** = BNAP; \*<sup>1</sup> indicates the yield when deprotection was performed with 28% aqueous ammonia solution at 55 °C for 9 h; \*<sup>2</sup> indicates the yield when deprotection was performed with 40% aqueous methylamine and 28% aqueous ammonia solution (= 1 : 1) at 65 °C for 10 min.

### 第3節 9-(アミノエトキシ)フェノキサジンを有する 2',4'-BNA/LNA (BNAP-AEO) 導入型オリゴ核酸の合成

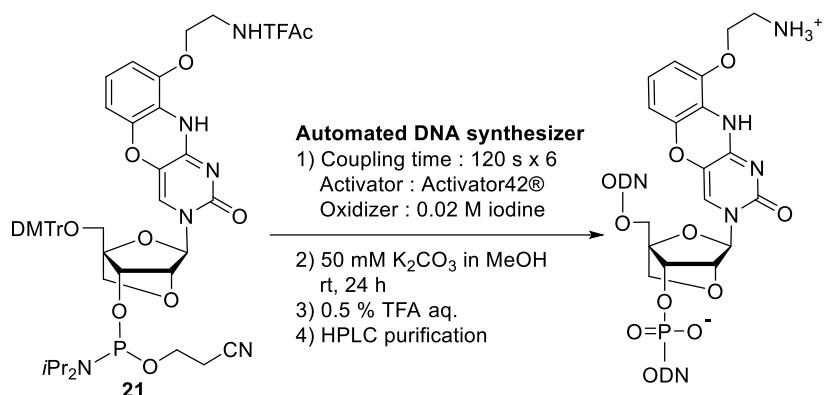
BNAP-AEO の合成は、下記の合成経路に従い行った (Scheme 4)。化合物 **2** より、8 工程を経て BNAP-AEO のアミダイト体である化合物 **21** を総収率 16%で得た。第 2 節での BNAP モノマー合成の際と同様、ウラシルの 4 位をジクロロメタン中、トリフェニルホスフィンと四塩化炭素によりクロロ化した後、2-アミノレゾルシノールを導入し、**14**を得た。その後、2-アミノレゾルシノールの一方のヒドロキシ基に対して、ベンジル-N-(2-ヒドロキシエチル)カルバメートを光延反応によって導入し **15**とした。続いてメタノール中、アンモニアで処理することで 3'位と 5'位のアセチル基を除去し **16**を得た。その後、BNAP での場合と同様に、**16**と DBU のエタノール溶液を加熱還流し、フェノキサジン環を構築した **17**を得た。得られた **17** の Cbz 基を  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  とシクロヘキセンを用いる接触還元によって除去し **18**とした後、ピリジン中、無水トリフルオロ酢酸で処理すると、アミノ基をトリフルオロアセチル基で再保護した **19**が得られた。以降 BNAP の合成経路と同様、 $\text{AgOTf}$  と  $\text{DMTrCl}$  から調製した  $\text{DMTrOTf}$  を用いて、



**Scheme 4.** Synthesis of BNAP-AEO amidite **21**.

*Reagents and conditions:* (a)  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{DCM}$ , reflux, 2 h, then 2-aminoresorcinol,  $\text{DBU}$ , rt, 6 h (73%) (b) benzyl-N-(2-hydroxyethyl)carbamate,  $\text{DEAD}$ ,  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{DCM}/\text{THF}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 5 h (95%); (c) 7 N  $\text{NH}_3$  in  $\text{MeOH}$ , rt, 3 h; (d)  $\text{DBU}$ ,  $\text{EtOH}$ , reflux, 5 h (2 steps in 57%); (e)  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ , cyclohexene,  $\text{MeOH}$ , reflux 5 h (93%); (f)  $\text{TFAA}$ , pyridine,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 2 h; (g)  $\text{DMTrCl}$ ,  $\text{AgOTf}$ , 2,6-lutidine,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 2 h (2 steps, 47%); (h)  $i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $\text{DIPEA}$ ,  $\text{DCM}$ , rt, 2 h (77%).

**19** の 5' 位ヒドロキシ基をジメトキシトリル化した化合物 **20** へと変換し、最後にアミダイトユニット **21** を得た。BNAP-AEO のアミダイトユニット **21** も前節と同様、DNA 自動合成機によって ODN 内に導入した。反応の活性化剤としては先と同様、5-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1*H*-tetrazole (Activator 42<sup>®</sup>) を、酸化剤としては 0.02 M ヨウ素水溶液を用いた。BNAP-AEO は塩基部のアミノエトキシ基の影響で、BNAP よりも立体的に嵩高いため、BNAP と比較して縮合効率の低下が予想された。そのため、BNAP アミダイトユニット **7** の合成時以上に反応時間を延長<sup>g</sup>したところ、BNAP と同様の高い縮合効率での合成に成功した。合成した BNAP-AEO 導入型 ODN の CPG からの切り出し、各核酸塩基、リン部上の保護基の除去には BNAP での条件よりも更に穏和な条件 (50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH, rt, 24 h) を選択した。この条件で処理を行った後、逆相 HPLC によって BNAP-AEO 導入型 ODN を精製した (Scheme 5)。得られた ODN の分子量は MALDI-TOF-Mass により確認した (Table 2)。



**Scheme 5.** Synthesis of BNAP-AEO-incorporated ODNs.

<sup>g</sup> 0.2 μmol スケールでの BNAP-AEO アミダイトユニットの反応においては、反応時間を 120 秒/サイクルまで延長し、かつ 6 サイクルでの反応条件を適用することで良好な縮合効率で BNAP-AEO 導入型 ODN を合成した。

**Table 2.** Sequences and MALDI-TOF-Mass data of BNAP-AEO (**B<sup>AEO</sup>**)-modified oligodeoxynucleotides (**ODN 1 - 8\_B<sup>AEO</sup>**).

Sequence	MALDI-TOF-Mass			Yield (%)
	[M-H] <sup>-</sup>	Calcd.	[M-H] <sup>-</sup>	Found
5'-d(GCGTT <b>B<sup>AEO</sup></b> TTTGCT)-3' ( <b>ODN 1_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>TB<sup>AEO</sup>T</b> ))	3795.5		3796.6	58* <sup>2</sup>
5'-d(GCGTC <b>B<sup>AEO</sup></b> ATTGCT)-3' ( <b>ODN 2_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>CB<sup>AEO</sup>A</b> ))	3789.5		3788.1	24* <sup>2</sup>
5'-d(GCGTC <b>B<sup>AEO</sup></b> CTTGCT)-3' ( <b>ODN 3_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>CB<sup>AEO</sup>C</b> ))	3765.5		3766.1	49* <sup>2</sup>
5'-d(GCGT <b>B<sup>AEO</sup></b> ATTGCT)-3' ( <b>ODN 4_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>AB<sup>AEO</sup>A</b> ))	3813.6		3812.9	32* <sup>2</sup>
5'-d(GCGT <b>B<sup>AEO</sup></b> GTTGCT)-3' ( <b>ODN 5_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>GB<sup>AEO</sup>G</b> ))	3845.6		3745.1	11* <sup>1</sup>
5'-d(GCGT <b>B<sup>AEO</sup></b> CB <sup>AEO</sup> TTGCT)-3' ( <b>ODN 6_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>B<sup>AEO</sup>CB<sup>AEO</sup></b> ))	3943.7		3942.9	10* <sup>2</sup>
5'-d(GCGTC <b>B<sup>AEO</sup></b> B <sup>AEO</sup> TTGCT)-3' ( <b>ODN 7_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>CB<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup></b> ))	3943.7		3942.8	13* <sup>2</sup>
5'-d(GCGT <b>B<sup>AEO</sup></b> B <sup>AEO</sup> B <sup>AEO</sup> TTGCT)-3' ( <b>ODN 8_B<sup>AEO</sup></b> ( <b>B<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup></b> ))	4121.9		4121.5	7* <sup>2</sup>
5'-d(TTTTTTTTB <sup>AEO</sup> )-3' ( <b>ODN 9_B<sup>AEO</sup></b> )	3141.1		3141.3	20* <sup>2</sup>

**B<sup>AEO</sup>**= BNAP-AEO; \*<sup>1</sup> indicates the yield when deprotection was performed with 40% aqueous methylamine and 28% aqueous ammonia solution (= 1 : 1) at 65 °C for 10 min.; \*<sup>2</sup> indicates the yield when deprotection was performed with 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH solution at room temperature for 14 h.

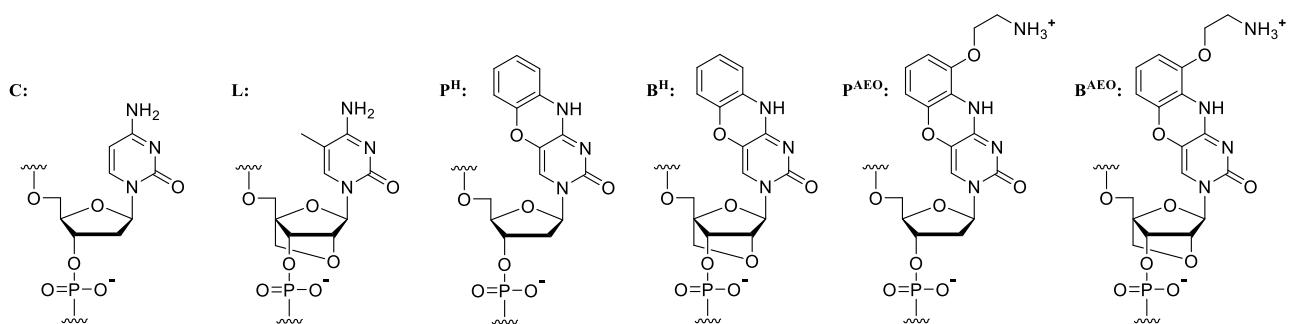
#### 第4節 BNAP 及び BNAO-AEO 導入型オリゴ核酸の二重鎖形成能評価

本節では BNAP 及び BNAP-AEO 導入型 ODN の相補鎖 DNA に対する二重鎖形成能を融解温度 (*T<sub>m</sub>*) 測定によって評価した (Table 3)。フェノキサジン人工核酸塩基類は、隣接する核酸塩基間とのスタッキング相互作用の向上に伴って、二重鎖形成能を向上させることが報告されていることから<sup>11, 12, 22)</sup>、導入箇所の隣接塩基に様々な核酸塩基を導入した配列を用いての評価を試みた。ここでは、BNAP (**B<sup>H</sup>** と表記) や BNAP-AEO (**B<sup>AEO</sup>** と表記) の二重鎖形成能の向上効果を詳細に検証することを目的に、天然シチジン (**C** と表記)、2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C (**L** と表記、塩基部は 5'-メチルシチシン: <sup>m</sup>C)、フェノキサジン (**P<sup>H</sup>** と表記、糖部は 2'-デオキシリボース)、G-clamp (**P<sup>AEO</sup>** と表記、糖部は 2'-デオキシリボース) を導入した 4 種類の ODN を併せて評価した。

**Table 3.**  $T_m$  values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of ODN 1–8 containing each nucleoside with complementary DNA strand.

Test ODN = 5'-d (GCGT $\text{YYY}$ TTGCT) - 3'  
 Target DNA = 3'-d (CGCA $\text{ZGZ}$ AACGA) - 5'

Sequence (YYY)	$T_m$ value ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ ) <sup>a</sup> ( $^{\circ}\text{C}$ )					
	X = C	L	P <sup>H</sup>	B <sup>H</sup>	P <sup>AEO</sup>	B <sup>AEO</sup>
<b>ODN 1_X (TXT)</b>	40	44 (+4)	44 (+4)	46 (+6)	50 (+10)	53 (+13)
<b>ODN 2_X (CXA)</b>	44	48 (+4)	49 (+5)	50 (+6)	55 (+11)	53 (+9)
<b>ODN 3_X (CXC)</b>	45	51 (+6)	51 (+6)	54 (+9)	61 (+16)	64 (+19)
<b>ODN 4_X (AXA)</b>	41	45 (+4)	38 (-3)	40 (-1)	43 (+2)	42 (+1)
<b>ODN 5_X (GXG)</b>	46	48 (+2)	46 ( $\pm$ 0)	48 (+2)	54 (+8)	51 (+5)
<b>ODN 6_X (XCX)</b>	45	55 (+5.0)	54 (+4.5)	59 (+7.0)	69 (+12.0)	75 (+15.0)
<b>ODN 7_X (CXX)</b>	45	53 (+4.0)	56 (+5.5)	57 (+6.0)	65 (+10.0)	63 (+9.0)
<b>ODN 8_X (XXX)</b>	45	58 (+4.3)	61 (+5.3)	60 (+5.0)	77 (+10.7)	70 (+8.3)



UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ . Z indicated each match nucleotide corresponding with each nucleotide of Y. X = C: 2'-deoxycytidine; L: 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; P<sup>H</sup>: 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; B<sup>H</sup>: BNAP; P<sup>AEO</sup>: 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; B<sup>AEO</sup>: BNAP-AEO.

<sup>a</sup>Varidation of  $T_m$  value per modification relative to C containing ODN.

標的 DNA との二重鎖形成において、BNAP-AEO を導入した ODN 1\_B<sup>AEO</sup> ~ ODN 8\_B<sup>AEO</sup> は概して天然シチジンを導入した ODN 1\_C ~ ODN 8\_C の  $T_m$  値を上回った。初めに、隣接配列にチミンが存在する ODN 1\_B<sup>AEO</sup> (TB<sup>AEO</sup>T) の結果から言及する。ODN 1\_B<sup>AEO</sup> (TB<sup>AEO</sup>T) は 53  $^{\circ}\text{C}$  の  $T_m$  値を示し、天然シチジンを含む ODN 1\_C (TCT) の  $T_m$  値 : 40  $^{\circ}\text{C}$  と比較した  $\Delta T_m$  値は +13  $^{\circ}\text{C}$  となった。また 2',4'-BNA/LNA-mC を含む ODN 1\_L (TLT) は 44  $^{\circ}\text{C}$ 、G-clamp を含む ODN 1\_P<sup>AEO</sup> (TP<sup>AEO</sup>T) は 50  $^{\circ}\text{C}$  の  $T_m$  値を与え、BNAP-AEO は 2',4'-BNA/LNA-mC を 9  $^{\circ}\text{C}$ 、G-clamp を 3  $^{\circ}\text{C}$  上回る結果となった。本配列において、BNAP-AEO は 2',4'-BNA/LNA-mC と G-clamp の双方を上回る高い二重鎖形成能を獲得した。また BNAP を含む ODN 1\_B<sup>H</sup> (TB<sup>H</sup>T) の  $T_m$  値は 46  $^{\circ}\text{C}$  となり、フェノキサジンを含む ODN 1\_P<sup>H</sup> (TP<sup>H</sup>T) の  $T_m$  値 : 44  $^{\circ}\text{C}$  からの 2  $^{\circ}\text{C}$  の  $T_m$  値上昇が見られた。なお BNAP は、2',4'-BNA/LNA-mC の  $T_m$  値 : 44  $^{\circ}\text{C}$  をも 2  $^{\circ}\text{C}$  上回り、隣接にチミンを含む配列下では BNAP も 2',4'-BNA/LNA とフェノキサジンの両者を超える二重鎖形成能を獲得した。

BNAP-AEO を含む ODN が最も高い二重鎖形成能を示した配列は、隣接にシトシン塩基を含む **ODN 3** であり、**ODN 3\_B<sup>AEO</sup> (CB<sup>AEO</sup>C)** での  $\Delta T_m$  値 : +19 °C は、本測定で得た中で最も高い結果となった。隣接する 5'側にシトシン、3'側にアデニン塩基を含む **ODN 2** においても、**ODN 2\_B<sup>AEO</sup> (CB<sup>AEO</sup>A)** は **ODN 3\_C (CCA)** を  $T_m$  値として 9 °C 上回ったが<sup>3</sup>、**ODN 2\_P<sup>AEO</sup> (CP<sup>AEO</sup>A)** の  $T_m$  値を 2 °C 下回った。この結果より、プリン塩基を含む配列で BNAP-AEO を含む ODN の  $\Delta T_m$  値が低下することが示唆された。この傾向は隣接にアデニン、グアニン塩基を含む **ODN 4\_B<sup>AEO</sup> (AB<sup>AEO</sup>A)** と **ODN 5\_B<sup>AEO</sup> (GB<sup>AEO</sup>G)** で特に顕著であり、各々の  $\Delta T_m$  値は +1°C, +5°C となった。しかしながら、G-clamp を含む **ODN 4\_P<sup>AEO</sup> (AP<sup>AEO</sup>A)** と **ODN 5\_P<sup>AEO</sup> (GP<sup>AEO</sup>G)** での  $\Delta T_m$  値も各々 +2°C, +8°C となった。このことから、隣接にプリン塩基が導入された配列下で BNAP-AEO は G-clamp の影響を受け、 $\Delta T_m$  値の向上が抑制されることが分かった。なお、オリゴ核酸の塩基数や測定条件等は異なるものの、フェノキサジンと G-clamp を含む ODN の二重鎖形成能は 2007 年に Pedroso, Robles らが評価している。本実験で得られた傾向は、隣接塩基（特に 5'側）にプリン塩基が存在する場合に、顕著に  $T_m$  値が向上しないという彼らの報告と概ね一致するものとなった<sup>22</sup>。また、**ODN 4\_B<sup>AEO</sup> (AB<sup>AEO</sup>A)** の  $T_m$  値 : 42 °C は **ODN 4\_L (ALA)** の  $T_m$  値 : 45 °C を 3 °C 下回る結果となった。この値は **ODN 4\_P<sup>AEO</sup> (AP<sup>AEO</sup>A)** の  $T_m$  値 : 43 °C を 1 °C 下回っており、本配列では BNAP-AEO 内の 2',4'-BNA/LNA 骨格が  $T_m$  値向上に寄与していないことが明らかになった。一般にプリン塩基のスタッキング相互作用はピリミジン塩基よりも強いと考えられており、BNAP-AEO はプリン塩基と強力にスタッキングをした結果、BNAP-AEO の構造的な剛直さと嵩高さが二重鎖構造を不安定化するように ( $T_m$  値を低下させるように) 導いていることが推察される。

続いて配列中に複数残基の導入を行うことで、BNAP 及び BNAP-AEO 導入型 ODN 内の効果的なスタッキング相互作用が  $T_m$  値向上に寄与するかを評価した。その結果、シチジンを介して二残基の BNAP-AEO を導入した **ODN 6\_B<sup>AEO</sup> (B<sup>AEO</sup>CB<sup>AEO</sup>)** ( $\Delta T_m/\text{mod.} : +15.0$  °C) では、二連続で導入した **ODN 7\_B<sup>AEO</sup> (CB<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup>)** ( $\Delta T_m/\text{mod.} : +9.0$  °C) や三連続で導入した **ODN 8\_B<sup>AEO</sup> (B<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup>)** ( $\Delta T_m/\text{mod.} : +8.3$  °C) よりも一残基あたりの  $\Delta T_m/\text{mod.}$  値が大幅に上昇した。この結果は 2',4'-BNA/LNA や G-clamp を含む ODN と同様の傾向であり、BNAP-AEO が 2',4'-BNA/LNA や G-clamp の効果を綿密に反映していることが示唆された。

以上より、BNAP-AEO や BNAP を含む ODN は、隣接にピリジン塩基（チミン、シトシン）を存在させることで、相補鎖 DNA との  $T_m$  値を格段に向上させられることが示された。ODN 内に二残基以上 BNAP を導入する際も、一残基の隔たりを加えることで本来の高い二重鎖形成能が維持されることが明らかになった。

続いて著者は、相補鎖 RNA に対する二重鎖形成能評価を評価した (Table 4)。

**Table 4.**  $T_m$  values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of ODN 1–8 containing each nucleoside with complementary RNA strands.

Test ODN = 5'-d (GCGT $\text{YYY}$ TTGCT) - 3'  
Target RNA = 3'-r (CGCA $\text{ZGZ}$ AACGA) - 5'

Sequence (YYY)	$T_m$ value ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ ) <sup>a</sup> ( $^{\circ}\text{C}$ )					
	X = C	L	P <sup>H</sup>	B <sup>H</sup>	P <sup>AEO</sup>	B <sup>AEO</sup>
<b>ODN 1_X (TXT)</b>	41	48 (+7)	45 (+4)	50 (+9)	52 (+11)	57 (+16)
<b>ODN 2_X (CXA)</b>	46	53 (+7)	49 (+3)	54 (+8)	59 (+13)	62 (+16)
<b>ODN 3_X (CXC)</b>	54	61 (+7)	56 (+2)	62 (+8)	67 (+13)	72 (+18)
	43*				56 (+13)	61 (+18)
<b>ODN 4_X (AXA)</b>	38	44 (+6)	36 (-2)	40 (+2)	45 (+7)	47 (+9)
<b>ODN 5_X (GXG)</b>	46	51 (+5)	45 (-1)	49 (+3)	48 (+2)	53 (+7)
<b>ODN 6_X (XCX)</b>	54	67 (+6.5)	59 (+2.5)	69 (+7.5)	74 (+10.0)	n.d.
	43*				62* (+9.5)	73* (+15.0)
<b>ODN 7_X (XXC)</b>	54	65 (+5.5)	64 (+5.0)	67 (+6.5)	76 (+11.0)	80 (+13.0)
	43*				66* (+11.5)	68* (+12.5)
<b>ODN 8_X (XXX)</b>	54	71 (+5.7)	70 (+5.3)	73 (+6.3)	n.d.	n.d.
	43*				74* (+10.3)	76* (+11.0)

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ . In the case of \*, UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) without NaCl aq. **Z** indicates each nucleotide corresponding with each nucleotide of **Y**. **X** = C: 2'-deoxycytidine; L: 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; P<sup>H</sup>: 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; B<sup>H</sup>: BNAP; P<sup>AEO</sup>: 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; B<sup>AEO</sup>: BNAP-AEO. n.d. means not detected.

<sup>a</sup> Variation of  $T_m$  value per modification relative to C containing ODN.

ここでは、最も高い  $T_m$  値が示された **ODN 3\_B<sup>AEO</sup> (CB<sup>AEO</sup>C)** について言及する。**ODN 3\_B<sup>AEO</sup> (CB<sup>AEO</sup>C)** は 72  $^{\circ}\text{C}$  の  $T_m$  値を示し、**ODN 3\_C (CCC)** での 54  $^{\circ}\text{C}$  の  $T_m$  値を 18  $^{\circ}\text{C}$  上回る結果を得た。この 72  $^{\circ}\text{C}$  という  $T_m$  値は、**ODN 3\_L (CLC)** の  $T_m$  値 : 61  $^{\circ}\text{C}$  からは 11  $^{\circ}\text{C}$  高く、**ODN 3\_P<sup>AEO</sup> (CP<sup>AEO</sup>C)** の  $T_m$  値 : 67  $^{\circ}\text{C}$  からは 5  $^{\circ}\text{C}$  高い値となった。また、**ODN 3\_B<sup>H</sup> (CB<sup>H</sup>C)** が示した 62  $^{\circ}\text{C}$  の  $T_m$  値は、**ODN 3\_L (CLC)** の  $T_m$  値: 61  $^{\circ}\text{C}$  から 1  $^{\circ}\text{C}$  高く、**ODN 3\_P<sup>H</sup> (CP<sup>H</sup>C)** の  $T_m$  値: 56  $^{\circ}\text{C}$  から 6  $^{\circ}\text{C}$  高いものとなった。本実験では、全配列で BNAP はフェノキサジンの  $T_m$  値を上回り、BNAP-AEO は 2',4'-BNA/LNA-mC と G-clamp の  $T_m$  値を上回る結果を与えた。よって、相補鎖 RNA との二重鎖形成においては、相補鎖 DNA との二重鎖形成よりも隣接塩基の影響を受けにくい傾向にあった。また、一残基の導入を行った **ODN 1~ODN 5** の中では、特に導入箇所の隣接にチミジンやシチジンが存在する **ODN 1\_B<sup>AEO</sup> (TB<sup>AEO</sup>T)**、**ODN 2\_B<sup>AEO</sup> (CB<sup>AEO</sup>A)**、**ODN 3\_B<sup>AEO</sup> (CB<sup>AEO</sup>C)** でこの傾向が顕著であった。

続いて、BNAP-AEO を二残基以上導入した配列 **ODN 6\_B<sup>AEO</sup> (B<sup>AEO</sup>CB<sup>AEO</sup>)** 等では測定限界以上の  $T_m$  値が観測されたため (n.d.と記載)、当該配列と比較対象配列において、塩化ナトリウムを含まない ( $T_m$  値を故意に低下させる) 系で再度  $T_m$  値を測定した。再測定の結果は Table 4 中の斜字 (イタリック体)+

アスタリスク(\*)で示した。本配列に BNAP-AEO を二残基以上導入した場合、シチジンを介して導入した **ODN 6\_B<sup>AEO</sup>** (**B<sup>AEO</sup>C<sup>B<sup>AEO</sup></sup>**) ( $\Delta T_m/\text{mod.} : +15.0\text{ }^\circ\text{C}$ ) は、二、三連続で導入した **ODN 7\_B<sup>AEO</sup>** (**CB<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup>**) ( $\Delta T_m/\text{mod.} : +12.5\text{ }^\circ\text{C}$ ) や **ODN 8\_B<sup>AEO</sup>** (**B<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup>B<sup>AEO</sup>**) ( $\Delta T_m/\text{mod.} : +11.0\text{ }^\circ\text{C}$ ) よりも一残基あたりの  $\Delta T_m/\text{mod.}$  値は上昇した。BNAP や 2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C を含む ODN でも同様の結果が得られており、この傾向は、標的 DNA に対して二重鎖を形成する場合と類似するものであった。

以上より、BNAP-AEO 導入型 ODN は、非常に高い二重鎖形成能を有する人工核酸であることが検証された。特に導入部位の隣接箇所にピリミジン塩基を有する **ODN 1\_B<sup>AEO</sup>** (**T<sup>B<sup>AEO</sup>T</sup>**) や **ODN 3\_B<sup>AEO</sup>** (**CB<sup>AEO</sup>C**)において、2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C や、更には G-clamp をも上回る、相補鎖との優れた二重鎖形成能を獲得した。BNAP 導入型 ODN についても、構造中で 2',4'-BNA/LNA 骨格の効果を維持し、フェノキサジン導入型 ODN の二重鎖形成能を全配列で上回った。なお BNAP-AEO は、アミノエトキシ基の影響を保持することで BNAP 以上の二重鎖形成能を獲得させることに成功した。

アンチセンス法等に代表される核酸医薬において、用いるオリゴ核酸が標的配列と正確かつ選択的に結合することは不可欠である。よって著者は、BNAP 及び BNAP-AEO 導入型 ODN の相補鎖 DNA との二重鎖形成時におけるミスマッチ塩基識別能を  $T_m$  値測定により評価した (Table 5)。なお、本実験においては、BNAP や BNAP-AEO 導入型 ODN で二重鎖形成能が最も向上していた **ODN 3\_X (CXC)** を用いて評価し、天然シチジン、2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C (塩基部は 5-メチルシトシン：<sup>m</sup>C) や、フェノキサジン(糖部は 2'-デオキシリボース)、G-clamp(糖部は 2'-デオキシリボース)を導入した ODN の 4 種類の ODN を含む評価も併せて実施した。なお配列表記について、全配列が **ODN 3\_X (CXC)** であり、隣接塩基の影響を考慮しないため、**ODN\_X** とする。

**Table 5.**  $T_m$  values ( $^\circ\text{C}$ ) of **ODN\_X** containing each nucleoside shown below with DNA strands including mismatch base pairs.

Test ODN = 5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3' (**ODN\_X**)  
Target DNA = 3'-d(CGCA~~G~~**Y**GAACGA)-5'

Nucleobase	$T_m$ value ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) ( $^\circ\text{C}$ )						
	<b>Y</b>	<b>X = C</b>	<b>L</b>	<b>P<sup>H</sup></b>	<b>B<sup>H</sup></b>	<b>P<sup>AEO</sup></b>	<b>B<sup>AEO</sup></b>
G	45	51	51	54	61	64	
A	32 (-13)	37 (-14)	39 (-12)	39 (-15)	38 (-23)	38 (-26)	
T	29 (-16)	33 (-18)	39 (-12)	39 (-15)	34 (-27)	35 (-29)	
C	24 (-21)	27 (-24)	28 (-23)	26 (-28)	24 (-37)	28 (-36)	

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5  $^\circ\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ . Test ODN = 5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3'; Target RNA = 3'-d(CGCAGNGAACGA)-5'  
**X = C**: 2'-deoxycytidine; **L**: 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>**: 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>**: BNAP; **P<sup>AEO</sup>**: 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>**: BNAP-AEO.

BNAP-AEO を導入した **ODN\_B<sup>AEO</sup>** の A, T, C の各ミスマッチ対形成における  $T_m$  値は 38  $^\circ\text{C}$  [**Y = A**]、35  $^\circ\text{C}$  [**Y = T**]、28  $^\circ\text{C}$  [**Y = C**] となり、完全相補鎖と比較した際の  $\Delta T_m$  値は各々、-26  $^\circ\text{C}$  [**Y = A**]、-29  $^\circ\text{C}$  [**Y = T**]、-36  $^\circ\text{C}$  [**Y = C**] となった。これらの  $\Delta T_m$  値は、2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C を導入した **ODN\_L** の各々の  $\Delta T_m$

値 -14 °C [Y = A], -18 °C [Y = T], -24 °C [Y = C] を大きく上回る結果となった。また **ODN\_L** の  $T_m$  値は 37 °C [Y = A], 33 °C [Y = T], 27 °C [Y = C] を示し、**ODN\_B<sup>AEO</sup>** の  $T_m$  値と殆ど変化が無いことが分かる。このことから BNAO-AEO は、2',4'-BNA/LNA-mC と同程度まで  $T_m$  値を低下させることでミスマッチ塩基識別能を向上させたと言える。なおこの高いミスマッチ塩基識別能は、G-clamp を導入した **ODN\_P<sup>AEO</sup>** の  $\Delta T_m$  値に由来するものであることが分かる。BNAP を導入した **ODN\_B<sup>H</sup>** の  $\Delta T_m$  値は各々、-15 °C [Y = A], -15 °C [Y = T], -28 °C [Y = C] となつたが、フェノキサジンを導入することで低下した **ODN\_P<sup>H</sup>** の各  $\Delta T_m$  値を、2',4'-BNA/LNA 骨格の導入によって改善させていることが分かる<sup>3e)</sup>。

さらに著者は、同様の方法で BNAP 及び BNAP-AEO 導入型 ODN の相補鎖 RNA との二重鎖形成における塩基識別能も  $T_m$  測定により評価した (Table 6)。

**Table 6.**  $T_m$  values (°C) of **ODN\_X** containing each nucleoside shown below with RNA strands including mismatch base pairs.

Test ODN = 5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3' (**ODN\_X**)  
Target RNA = 3'-r(CGCAGNGAACGA)-5'

Nucleobase	$T_m$ value ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) (°C)						
	<b>Y</b>	<b>X = C</b>	<b>L</b>	<b>P<sup>H</sup></b>	<b>B<sup>H</sup></b>	<b>P<sup>AEO</sup></b>	<b>B<sup>AEO</sup></b>
G	54	61	56	62	67	72	
A	39 (-15)	45 (-16)	43 (-13)	48 (-14)	44 (-23)	47 (-25)	
U	31 (-23)	40 (-21)	39 (-17)	44 (-18)	41 (-26)	45 (-27)	
C	32 (-22)	38 (-23)	35 (-21)	39 (-23)	38 (-29)	42 (-30)	

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5 °C/min at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2 μM for each strand. The error in  $T_m$  values was ± 0.5 °C. Test ODN = 5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3'; Target RNA = 3'-r(CGCAGNGAACGA)-5'

**X = C:** 2'-deoxycytidine; **L:** 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>:** BNAP; **P<sup>AEO</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>:** BNAP-AEO.

**ODN\_B<sup>AEO</sup>** の  $T_m$  値は 47 °C [Y = A], 45 °C [Y = U], 42 °C [Y = C] となり、完全相補配列との比較における  $\Delta T_m$  値は -25 °C [Y = A], -27 °C [Y = U], -30 °C [Y = C] となつた。本結果では、各ミスマッチ塩基対形成時に **ODN\_L** が示す  $T_m$  値 : 45 °C [Y = A], 40 °C [Y = U], 38 °C [Y = C] を僅かに上昇させているものの、**ODN\_L** での各々の  $\Delta T_m$  値 -16 °C [Y = A], -21 °C [Y = U], -23 °C [Y = C] を大きく上回る結果を得た。標的 RNA との二重鎖形成においても BNAP-AEO は、G-clamp に由来する優れた  $\Delta T_m$  値によるミスマッチ塩基識別能を維持することが出来ていた。また BNAP を含む **ODN\_B<sup>H</sup>** の  $\Delta T_m$  値は各々、-14 °C [Y = A], -18 °C [Y = T], -23 °C [Y = C] となり、フェノキサジンによって低下した  $\Delta T_m$  値が 2',4'-BNA/LNA 骨格の導入で僅かに改善される点は、標的 DNA との二重鎖形成における場合と同様であった。

以上より、完全相補配列に対して高い  $T_m$  値を示す **ODN\_B<sup>AEO</sup>** は、標的 DNA 及び RNA 鎮内のミスマッチ塩基に対して **ODN\_L** と同程度まで  $T_m$  値を下げる事が明らかになった。このミスマッチ塩基識別能向上の要因としては、BNAP-AEO が 2',4'-BNA/LNA 骨格と G-clamp の効果を維持出来ている点が挙げられる。**ODN\_B<sup>H</sup>** についても 2',4'-BNA/LNA 骨格の導入により **ODN\_P<sup>H</sup>** のミスマッチ塩基識別能を上

回る結果が得られた。

フェノキサジン環を含む人工核酸は隣接塩基間とのスタッキング相互作用により二重鎖構造を安定化させる。そこで著者は BNAP-AEO の 5'側や 3'側の隣接塩基対がミスマッチ塩基対となっている場合、二重鎖形成能にどのように影響するかを評価した (Figure 12)。本実験においては BNAP-AEO を導入した箇所の両斜向かい（相補鎖の一残基分 5' 側並びに 3' 側の位置）にミスマッチ塩基を有する 6 種類の DNA 配列を用い、 $T_m$  値測定によってミスマッチ塩基識別能を評価した (Table 7)。なお、このような現象を解明した例はなく、フェノキサジンや G-clamp を導入したオリゴ核酸のみならず、天然核酸塩基や 2',4'-BNA/LNA を導入したオリゴ核酸においても、どのような影響が与えられるかを同時に検証することとした。



Figure 12. Designed concept of duplex-B<sup>AEO</sup> with flanking mismatch base pairs.

BNAP-AEO を導入した **ODN\_B<sup>AEO</sup>** について、標的 DNA 鎖の 5'側に C-A, C-T, C-C の隣接ミスマッチ塩基対が存在する場合の  $T_m$  値は 40 °C [C-A], 29 °C [C-T], 25 °C [C-C] となり、完全相補配列との比較における各々の  $\Delta T_m$  値は -24 °C [C-A], -35 °C [C-T], -39 °C [C-C] となった。本結果は、天然シチジンを導入した **ODN\_C** の  $\Delta T_m$  値 : -16 °C [C-A], -24 °C [C-T], -25 °C [C-C] を大きく上回る結果となり、今回測定を実施した 6 種類の ODN 中で、**ODN\_B<sup>AEO</sup>** に最も優れた  $\Delta T_m$  値が見られた。2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C を導入した **ODN\_L** の場合も、 $\Delta T_m$  値は -20 °C [C-A], -26 °C [C-T], -34 °C [C-C] を示し、**ODN\_C** の  $\Delta T_m$  値を改善する結果を得た。このことから ODN 中で 2',4'-BNA/LNA 骨格を有する人工核酸は、隣接部位にミスマッチ塩基対が存在する場合、本来の高い  $T_m$  値を示さないことが分かった。この結果について、ODN 中の 2',4'-BNA/LNA にはスタッキング相互作用を増強させる効果があることで説明され得る<sup>18)</sup>。G-clamp を導入した **ODN\_P<sup>AEO</sup>** の  $\Delta T_m$  値は -22 °C [C-A], -34 °C [C-T], -37 °C [C-C] となり、ここでも BNAP-AEO は G-clamp の影響を大きく受けることで隣接ミスマッチ塩基識別能を向上させていた。

BNAP を導入した **ODN\_B<sup>H</sup>** についても、**ODN\_C** と比較して  $\Delta T_m$  値 (-19 °C [C-A], -32 °C [C-T], -37 °C [C-C]) の改善が見られた。フェノキサジンを導入した **ODN\_P<sup>H</sup>** の  $\Delta T_m$  値は、-16 °C [C-A], -32 °C [C-T], -32 °C [C-C] となり、特に C-T, C-C の隣接ミスマッチ塩基対形成の際に **ODN\_C** の結果を上回った。この結果は、フェノキサジン骨格が適切にスタッキング出来ないことに帰着するものと思われる。なお **ODN\_B<sup>H</sup>** が **ODN\_P<sup>H</sup>** の  $\Delta T_m$  値を上回った要因は、2',4'-BNA/LNA 骨格の導入にあると推察する。

また **ODN\_P<sup>AEO</sup>** の  $\Delta T_m$  値は、全てのミスマッチ塩基対の場合に **ODN\_P<sup>H</sup>** の  $\Delta T_m$  値を上回っていることから、これがアミノエトキシ基の効果によるものであると言える。厳密にはフェノキサジン骨格による効果的なスタッキング相互作用が作用している状況下でのみ、アミノエトキシ基がグアニン塩基に対して選択的に水素結合を形成するということである。

**Table 7.**  $T_m$  values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of **ODN\_X** with ssDNA with flanking mismatch nucleobases.

Test ODN = 5'-d(GCGTCxCTTGCT)-3' ( <b>ODN_X</b> )		Target DNA = 3'-d(CGCAYGYAACGA)-5'				
Sequence CXC YGY	<b>X = C</b>	$T_m$ value ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) ( $^{\circ}\text{C}$ )				
		<b>L</b>	<b>P<sup>H</sup></b>	<b>B<sup>H</sup></b>	<b>P<sup>AEO</sup></b>	<b>B<sup>AEO</sup></b>
match	CXC GGG	45	51	51	54	61
5' mismatch	CXC AGG	29 (-16)	31 (-20)	35 (-16)	35 (-19)	39 (-22)
	CXC TGG	21 (-24)	25 (-26)	19 (-32)	22 (-32)	27 (-34)
	CXC CGG	20 (-25)	17 (-34)	19 (-32)	17 (-37)	24 (-37)
	CXC GGA	31 (-14)	35 (-16)	34 (-17)	35 (-19)	39 (-22)
3' mismatch	CXC GGT	32 (-13)	34 (-17)	36 (-15)	36 (-18)	37 (-24)
	CXC GGC	29 (-16)	34 (-17)	31 (-20)	35 (-19)	37 (-24)
						39 (-25)

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The error in  $T_m$  value was  $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ . Test ODN = 5'-d(GCGTCxCTTGCT)-3'; Target DNA = 3'-d(CGCAYGYAACGA)-5'

**X = C:** 2'-deoxycytidine; **L:** 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>:** BNAP; **P<sup>AEO</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>:** BNAP-AEO.

人工核酸の 3'側にミスマッチ塩基対が存在する場合も、5'側にミスマッチ塩基対が存在する場合と同様の傾向が見られる。そのため隣接塩基にミスマッチ塩基対が存在する際は、BNAP-AEO を構成する 2',4'-BNA/LNA 骨格、フェノキサジン環、フェノキサジン環上のアミノエトキシ基の各々が、二重鎖安定化に寄与出来ないと考えられる。これら三成分が総合的に二重鎖形成能の向上を阻害することで、**ODN\_B<sup>AEO</sup>**の場合には  $\Delta T_m$  値を特に大きく減少させることが示唆された。なお本結果について、3'側よりも 5'側にミスマッチ塩基対が存在する場合の方が、 $\Delta T_m$  値の減少幅が大きくなつた。このことから、本配列を用いた DNA との二重鎖形成の際、導入箇所の隣接位 5'側にミスマッチ塩基対が存在する場合に、BNAP や BNAP-AEO がとりわけ大きな不安定化効果を生み出し得ることが分かる。Kool の報告によると、比較的短鎖の DNA/DNA 二重鎖においては、5'側の核酸塩基がスタッキング相互作用の増大に関与することが知られている<sup>23)</sup>。ここでは導入箇所の 5'側にミスマッチ塩基対が存在することでスタッキング相互作用が乱れないと考えられ、本結果は Kool の報告に支持されるものであることが示唆された。

**Table 8.**  $T_m$  values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of **ODN\_X** with ssRNA with flanking mismatch nucleobases.

Test ODN = 5'-d(GCGTC**C**XCTTGCT)-3' (**ODN\_X**)  
 Target RNA = 3'-r(CGCAY**G**YAACGA)-5'

Sequence CXC GYG	$T_m$ value ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) ( $^{\circ}\text{C}$ )					
	<b>X = C</b>	<b>L</b>	<b>P<sup>H</sup></b>	<b>B<sup>H</sup></b>	<b>P<sup>AEO</sup></b>	<b>B<sup>AEO</sup></b>
match CXC GGG	54	61	56	62	67	72
5' mismatch CXC AGG	39 (-15)	44 (-17)	42 (-14)	46 (-16)	50 (-17)	53 (-19)
	CXC UGG	31 (-23)	39 (-22)	34 (-22)	39 (-23)	42 (-25)
	CXC CGG	30 (-24)	36 (-25)	32 (-24)	38 (-24)	41 (-26)
3' mismatch CXC GGA	CXC GGA	37 (-17)	45 (-16)	40 (-16)	45 (-17)	49 (-18)
	CXC GGU	33 (-21)	39 (-22)	33 (-23)	40 (-22)	42 (-25)
	CXC GGC	33 (-21)	39 (-22)	34 (-22)	40 (-22)	42 (-25)

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The error in  $T_m$  value was  $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ . Test ODN = 5'-d(GCGTCxCTTGCT)-3'; Target RNA = 3'-r(CGCAYGYAACGA)-5'

**X = C:** 2'-deoxycytidine; **L:** 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>:** BNAP; **P<sup>AEO</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>:** BNAP-AEO.

続いて著者は、標的 RNA との二重鎖形成における隣接ミスマッチ識別能を同様に評価した(Table 8)。標的 RNA 内、導入箇所の 5'側に隣接ミスマッチ塩基対が存在する場合の **ODN\_B<sup>AEO</sup>** の  $T_m$  値は 53  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], 47  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], 46  $^{\circ}\text{C}$  [C-C] となり、完全相補鎖との二重鎖形成時と比較した際の  $\Delta T_m$  値は -19  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], -25  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], -26  $^{\circ}\text{C}$  [C-C] となった。ここでも全 6 種類の核酸を導入した ODN の中で、**ODN\_B<sup>AEO</sup>** 最も優れた  $\Delta T_m$  値を与えた。**ODN\_B<sup>AEO</sup>** の結果について、2',4'-BNA/LNA 骨格の影響に加え、フェノキサジン環上のアミノエトキシ基も好影響を与えている。この原因として、**ODN\_P<sup>AEO</sup>** の  $\Delta T_m$  値は -17  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], -25  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], -26  $^{\circ}\text{C}$  [C-C] となり、**ODN\_P<sup>H</sup>** の  $\Delta T_m$  値と比較すると 3  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], 3  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], 2  $^{\circ}\text{C}$  [C-C] の改善が見られたためだと考えられる。また **ODN\_B<sup>H</sup>** の  $\Delta T_m$  値は -16  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], -23  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], -24  $^{\circ}\text{C}$  [C-C] であった。**ODN\_C** の  $\Delta T_m$  値は -15  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], -23  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], -24  $^{\circ}\text{C}$  [C-C]、**ODN\_L** の  $\Delta T_m$  値は -17  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], -22  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], -25  $^{\circ}\text{C}$  [C-C]、また **ODN\_P** の  $\Delta T_m$  値は -14  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], -22  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], -24  $^{\circ}\text{C}$  [C-C] であり、これらの値を比較すると 2',4'-BNA/LNA 骨格導入で C-A ミスマッチの  $\Delta T_m$  値が 2  $^{\circ}\text{C}$  改善することが分かった。

各 ODN 中の導入箇所の 3'側に隣接ミスマッチ塩基対が存在する場合、三種類のミスマッチ塩基が存在する際の  $\Delta T_m$  値を **ODN\_B<sup>AEO</sup>** と **ODN\_B<sup>H</sup>** の間で比較すると、**ODN\_B<sup>AEO</sup>** の場合に 2  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], 3  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], 4  $^{\circ}\text{C}$  [C-C]  $T_m$  値が改善し、**ODN\_P<sup>AEO</sup>** と **ODN\_P<sup>H</sup>** 間で比較した際は、**ODN\_P<sup>AEO</sup>** の場合に 2  $^{\circ}\text{C}$  [C-A], 2  $^{\circ}\text{C}$  [C-U], 3  $^{\circ}\text{C}$  [C-C]  $T_m$  値が改善した。このことから、特にフェノキサジン環上のアミノエトキシ基 (G-clamp) の存在が  $\Delta T_m$  値の向上に関与することが考えられた。DNA/DNA 二重鎖においては、隣接塩基の 5'側にミスマッチ塩基対が存在する場合により大きな不安定化効果が生み出された一方、DNA/RNA

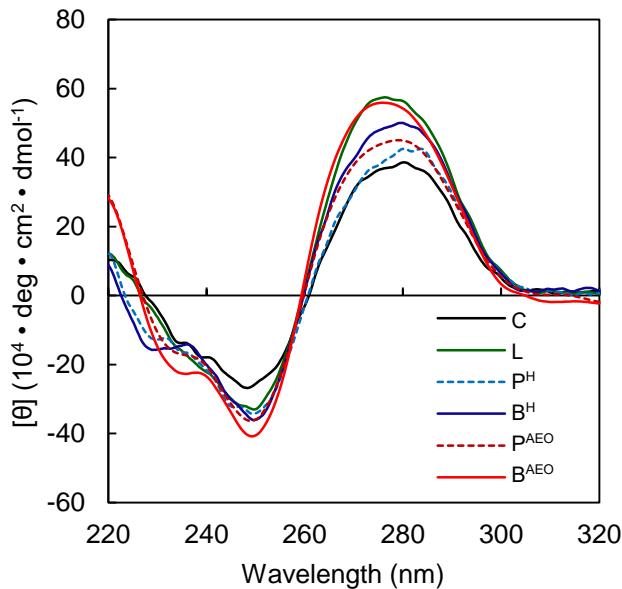
二重鎖においては、5'側、3'側のどちらにミスマッチ塩基対が存在しても、BNAP や BNAP-AEO が同程度に二重鎖を不安定化することが分かった。先述と同様、Kool は短鎖の RNA 二重鎖においては 3'側の核酸塩基がスタッキング相互作用の向上に寄与することに言及している<sup>23)</sup>。本測定では DNA/RNA 二重鎖を用いたことより、導入箇所の 3'側のみならず、5'側にミスマッチ塩基対が存在する場合にも二重鎖構造が不安定されていることが示唆された。

本結果から、DNA/DNA 二重鎖中において、BNAP-AEO は 2',4'-BNA/LNA 骨格、フェノキサジン環、フェノキサジン環上のアミノエトキシ基の影響を二重鎖形成能向上に寄与させているが、この効果は隣接塩基にミスマッチ塩基対が存在する場合に減弱されるものであることが分かった。具体的には、スタッキング相互作用に関わる 2',4'-BNA/LNA 骨格とフェノキサジン環周辺の積層構造が崩された場合には、対面にグアニン塩基が存在しても、正しく水素結合出来ないということ、更にそのスタッキングが失われている状態では、本来グアニン塩基と結合するアミノエトキシ基も副次的に正しく水素結合を形成出来ないということである。なお、DNA/RNA 二重鎖中においては、フェノキサジン環上のアミノエトキシ基 (G-clamp) の影響が隣接ミスマッチ塩基識別能の向上には特に重要な役割を果たすことが明らかになった。以上より、BNAP や BNAP-AEO が示すスタッキング相互作用が非特異的に作用してしまう場合は、隣接ミスマッチ塩基識別能を低下させてしまうことが考えられたが、完全相補配列に対する結合選択性は十分に確保されていることが示された。

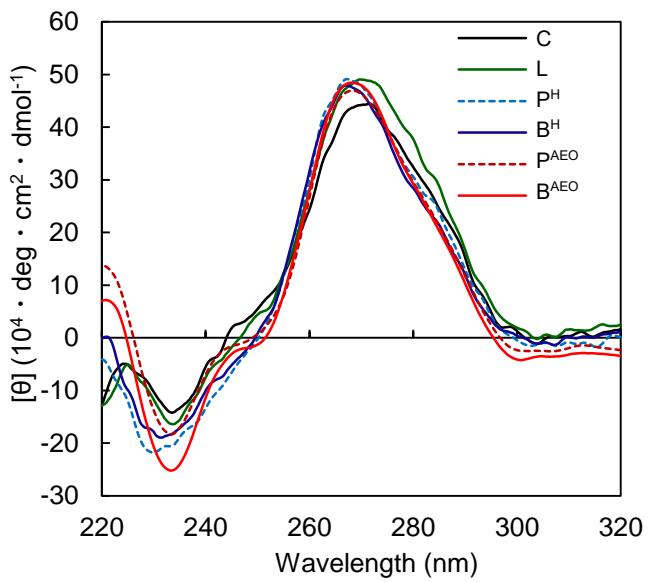
## 第 5 節 BNAP 及び BNAP-AEO 導入型オリゴ核酸の CD スペクトル測定

これまでに著者は、BNAP-AEO 導入型 ODN が 2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C 導入型 ODN や G-clamp 導入型 ODN を卓越する二重鎖形成能を有することを明らかにした。そこで、本要因を二重鎖構造による視点から解説すべく、BNAP-AEO 導入型 ODN の相補鎖 DNA および RNA との二重鎖構造を CD スペクトルにより評価した (Figure 13)。比較対象として、天然シチジン、2',4'-BNA /LNA-<sup>m</sup>C 導入型 ODN (塩基部は 5-メチルシトシン : <sup>m</sup>C) や、フェノキサジン(糖部は 2'-デオキシリボース)、G-clamp (糖部は 2'-デオキシリボース) を導入した ODN の評価も併せて行った。

(a) DNA/DNA duplex



(b) DNA/RNA duplex

**Figure 13.** CD spectra of the DNA/DNA (panel a) and DNA/RNA (panel b) duplexes.

Conditions: 2 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM NaCl aq., each strand 2  $\mu$ M, at 10 °C. Test ODN = 5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3'; Target DNA = 3'-d(GCCAGGGAACGA)-5'; Target RNA = 3'-r(GCCAGGGAACGA)-5'. X = C: 2'-deoxycytidine (**ODN\_C**, black); L: 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine (**ODN\_L**, green); P<sup>H</sup>: 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine (**ODN\_P<sup>H</sup>**, light blue, dashed); B<sup>H</sup>: BNAP (**ODN\_B<sup>H</sup>**, deep blue); P<sup>AEO</sup>: 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp (**ODN\_P<sup>AEO</sup>**, dark red, dashed); B<sup>AEO</sup>: BNAP-AEO (**ODN\_B<sup>AEO</sup>**, red).

相補鎖 DNA との二重鎖 (DNA/DNA 二重鎖) 形成において (Figure 13 a)、**ODN\_B<sup>AEO</sup>**/DNA 二重鎖は **ODN\_C**/DNA 二重鎖と比較し、280 nm 付近の正のコットンバンドの増大や 250 nm 付近の負のコットンバンドの増大が見られるものの、**ODN\_C**/DNA と同様の B 型らせん構造を示した。また **ODN\_B<sup>H</sup>**/DNA 二重鎖のみならず、**ODN\_L**, **ODN\_P<sup>H</sup>**, **ODN\_P<sup>AEO</sup>**/DNA 二重鎖の各々に、目立ったスペクトルの変化は見られず B 型らせん構造を維持していた。(なお、240 nm 付近のスペクトル変化はフェノキサジン骨格の影響に起因するものであると考えられ、Ortega らもフェノキサジン導入型 ODN 及び G-clamp 導入型 ODN と相補鎖 DNA との二重鎖の CD スペクトル結果を報告した際、同様の傾向を示すスペクトルを得ている<sup>22)</sup>。)

続いて、著者は相補鎖 RNA との二重鎖 (DNA/RNA 二重鎖) 形成における CD スペクトルを評価した (Figure 13 b)。一般に DNA/RNA 二重らせん構造は RNA/RNA 二重鎖のような比較的 A 型らせん構造に近い構造を有することが知られており、**ODN\_C**/RNA 二重鎖で 270 nm 付近の正のコットンバンドや 230 nm 付近の負のコットンバンドが確認された。また **ODN\_B<sup>H</sup>**/RNA 二重鎖や、**ODN\_B<sup>AEO</sup>**/RNA 二重鎖をはじめ、**ODN\_L**, **ODN\_P<sup>H</sup>**, **ODN\_P<sup>AEO</sup>**/RNA 二重鎖の全ての結果において、極めて類似したスペクトルを得た。

以上より、**ODN\_B<sup>AEO</sup>** や **ODN\_B<sup>H</sup>** は顕著な構造変化の乱れを誘起することなく、相補鎖 DNA 及び相補鎖 RNA との二重鎖構造を安定化させ、二重鎖形成能を向上させていることが明らかになった。

## 第6節 BNAP 及び BNAP-AEO 導入型オリゴ核酸の熱力学パラメータの算出

著者はまた、BNAP-AEO 導入型 ODN が獲得した二重鎖安定化効果を物理化学的観点から詳細に検討すべく、熱力学的パラメータを算出した (Table 9, 10)。ここでは各濃度 (0.45, 0.74, 1.26, 2.00, 3.26, 6.80 μM) における  $T_m$  値から van't Hoff plot を行うことで  $\Delta H^\circ$ 、 $\Delta S^\circ$ 、 $\Delta G^\circ$ を導き<sup>24)</sup>、標準反応ギブズエネルギー $\Delta G^\circ$ と結合定数  $K_a$ との間に成立する関係式  $\Delta G^\circ = -RT\ln K_a$  ( $R$ : 気体定数、 $T$ : 温度、ここでは 37 °C (= 310.15 K) を適用) より、各種核酸を導入した ODN と相補鎖 DNA や RNA との  $K_a$ を導いた<sup>h</sup>。

**Table 9.** Thermodynamic parameters of duplexes between ODN\_X and complementary ssDNA.

Test ODN = 5'-d (GCGT**CX**CTTGCT) -3' (ODN\_X)  
Target DNA = 3'-d (CGCA**GGG**AACGA) -5'

Modification X	$\Delta H^\circ$ <sub>(37 °C)</sub> kcal/mol	$\Delta S^\circ$ <sub>(37 °C)</sub> cal/mol•K	$\Delta G^\circ$ <sub>(37 °C)</sub> kcal/mol	$\Delta\Delta H^\circ$ <sub>(37 °C)</sub> kcal/mol	$\Delta\Delta S^\circ$ <sub>(37 °C)</sub> cal/mol•K	$\Delta\Delta G^\circ$ <sub>(37 °C)</sub> kcal/mol	$K_a$ (M <sup>-1</sup> )
<b>C</b>	-93.3	-265	-11.0	-	-	-	$5.65 \times 10^7$
<b>L</b>	-78.2	-213	-12.1	+15.1	+52	-1.1	$3.37 \times 10^8$
<b>P<sup>H</sup></b>	-94.2	-263	-12.6	-0.9	+2	-1.6	$7.58 \times 10^8$
<b>B<sup>H</sup></b>	-91.1	-251	-13.4	+2.2	+14	-2.4	$2.77 \times 10^9$
<b>P<sup>AEO</sup></b>	-79.8	-211	-14.2	+13.5	+54	-3.2	$1.02 \times 10^{10}$
<b>B<sup>AEO</sup></b>	-79.2	-208	-14.8	+14.1	+57	-3.8	$2.69 \times 10^{10}$

Conditions: 2 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM NaCl aq., and 0.45–6.8 μM each oligonucleotide (six data points). The  $T_m$  values reflect the average of at least three measurements. These values are calculated by van't Hoff plots with six data points.

**X = C:** 2'-deoxycytidine; **L:** 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>:** BNAP; **P<sup>AEO</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>** = BNAP-AEO.

相補鎖 DNA との二重鎖形成において、ODN\_B<sup>AEO</sup> は ODN\_C と比較しエントロピー的な安定性を獲得 ( $\Delta\Delta S^\circ = +57$  cal/mol•K,  $\Delta\Delta H^\circ = +14.1$  kcal/mol) した。2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>C を含む ODN\_L ( $\Delta\Delta S^\circ = +52$  cal/mol•K,  $\Delta\Delta H^\circ = +15.1$  kcal/mol) や G-clamp を含む ODN\_P<sup>AEO</sup> ( $\Delta\Delta S^\circ = +54$  cal/mol•K,  $\Delta\Delta H^\circ = +13.5$  kcal/mol) も、共にエントロピー有利となるように  $\Delta G^\circ$ 値を向上させたことから、BNAP-AEO は、G-clamp と 2',4'-BNA/LNA 双方の二重鎖形成能向上効果をエントロピー的側面から合理的に獲得したと言える。ODN\_B<sup>H</sup>においても ODN\_C と比較するとエントロピー的な安定性を獲得 ( $\Delta\Delta S^\circ = +14$  cal/mol•K,  $\Delta\Delta H^\circ = +2.2$  kcal/mol) していた。ただし ODN\_B<sup>H</sup> における  $\Delta\Delta S^\circ$  や  $\Delta\Delta H^\circ$  の変化量は、ODN\_B<sup>AEO</sup> と比較すると小さく、ODN\_B<sup>H</sup>, ODN\_P<sup>H</sup>, ODN\_C の三者の  $\Delta H^\circ$  や  $\Delta S^\circ$  の値は非常に近いものであった。このことから、相補鎖 DNA との二重鎖形成において ODN\_B<sup>H</sup> は、2',4'-BNA/LNA 骨格よりもフェノキサジンの効果を

<sup>h</sup> エンタルピー項 ( $\Delta H^\circ$ ) は水素結合形成のしやすさや、静電的相互作用、二重鎖形成時のスタッキング相互作用等に寄与しており、一方のエントロピー項 ( $\Delta S^\circ$ ) の寄与は一本鎖の状態の pre-organization や二重鎖形成時の脱水和の効果に寄与していることが知られている<sup>25)</sup>。また自由エネルギー ( $\Delta G^\circ$ ) の値が低いほど、その二重鎖が安定に存在できることを意味している。

大きく受けた二重鎖形成能を向上させていることが分かった。

また  $K_s$  の算出結果より、**ODN\_B<sup>AEO</sup>** の結合定数は  $2.69 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  となり、**ODN\_P<sup>AEO</sup>** ( $1.02 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) の結果を更に 2.64 倍上回る値を与えた。これを **ODN\_C** と比較した場合は 476 倍の二重鎖形成能の向上となり、 $T_m$  値測定の結果を反映する非常に高い結合定数を示すことが分かった。また **ODN\_B<sup>H</sup>** の結合定数は  $2.77 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  となり、**ODN\_L** ( $3.37 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) や、**ODN\_P<sup>H</sup>** ( $7.58 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) の結果を各々 8.22 倍、36.5 倍上回る高い値を与えた。本結果には、 $T_m$  値測定の結果との相関が見られ、結合親和性の向上を判断するに相応しい結果となった。

著者は、相補鎖 RNA との二重鎖形成における熱力学的パラメータを算出した (Table 10)。その結果、**ODN\_B<sup>AEO</sup>** は RNA との二重鎖形成の際にはエンタルピー的な安定性を獲得 ( $\Delta\Delta H^\circ = -5.6 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta\Delta S^\circ = +1 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$ ) していた。BNAP-AEO を構成する **ODN\_P<sup>AEO</sup>** ( $\Delta\Delta H^\circ = -4.0 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta\Delta S^\circ = +1 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$ ) や **ODN\_L** ( $\Delta\Delta H^\circ = -7.2 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta\Delta S^\circ = -15 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$ ) でも同様の傾向が見られた。また  $\Delta H^\circ$  や  $\Delta S^\circ$  の値に着目してもこの三者が示す各値は近く、特に  $\Delta S^\circ$  の値においては殆ど変化がない。従って相補鎖 RNA との二重鎖形成においても、BNAP-AEO は、G-clamp と 2',4'-BNA/LNA の二重鎖形成能の向上効果を合理的に獲得し、エンタルピー的側面から  $\Delta G^\circ$  値の低下に繋げていた。また **ODN\_B<sup>H</sup>** について、**ODN\_C** と比較してエンタルピー的な安定性を獲得 ( $\Delta\Delta H^\circ = -12.4 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta\Delta S^\circ = -29 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$ ) しており、この傾向は **ODN\_L** ( $\Delta\Delta H^\circ = -7.2 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta\Delta S^\circ = -15 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$ ) と同様であった。加えて、**ODN\_B<sup>H</sup>** の  $\Delta H^\circ$  や  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$  の値に着目すると、**ODN\_L** が示す値に近いものであった。これは標的 DNA との二重鎖形成の際とは異なり、標的 RNA との二重鎖形成における BNAP は、フェノキサジンよりも、2',4'-BNA/LNA 構造の効果を大きく受け、エンタルピー的に有利となるように二重鎖形成の向上に寄与していた点が示された。

**Table 10.** Thermodynamic parameters of duplexes between **ODN\_X** and complementary ssRNA.

Test ODN = 5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3' (**ODN\_X**)  
Target RNA = 3'-r(CGCA~~G~~GGAACGA)-5'

Modification <b>X</b>	$\Delta H^\circ_{(37^\circ\text{C})}$ kcal/mol	$\Delta S^\circ_{(37^\circ\text{C})}$ cal/mol·K	$\Delta G^\circ_{(37^\circ\text{C})}$ kcal/mol	$\Delta\Delta H^\circ_{(37^\circ\text{C})}$ kcal/mol	$\Delta\Delta S^\circ_{(37^\circ\text{C})}$ cal/mol·K	$\Delta\Delta G^\circ_{(37^\circ\text{C})}$ kcal/mol	$K_s (\text{M}^{-1})$
<b>C</b>	-97.4	-271	-13.4	-	-	-	$2.77 \times 10^9$
<b>L</b>	-104.6	-286	-16.0	-7.2	-15	-2.6	$1.89 \times 10^{11}$
<b>P<sup>H</sup></b>	-96.0	-264	-14.1	+1.4	+7	-0.7	$8.64 \times 10^9$
<b>B<sup>H</sup></b>	-109.8	-300	-16.7	-12.4	-29	-3.3	$5.87 \times 10^{11}$
<b>P<sup>AEO</sup></b>	-101.4	-270	-17.6	-4.0	+1	-4.2	$2.53 \times 10^{12}$
<b>B<sup>AEO</sup></b>	-103.0	-270	-19.1	-5.6	+1	-5.7	$2.88 \times 10^{13}$

Conditions: 2 mM phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM NaCl aq., and 0.45-6.8  $\mu\text{M}$  each oligonucleotide (six data points). The  $T_m$  values reflect the average of at least three measurements. These values are calculated by van't Hoff plots with six data points.

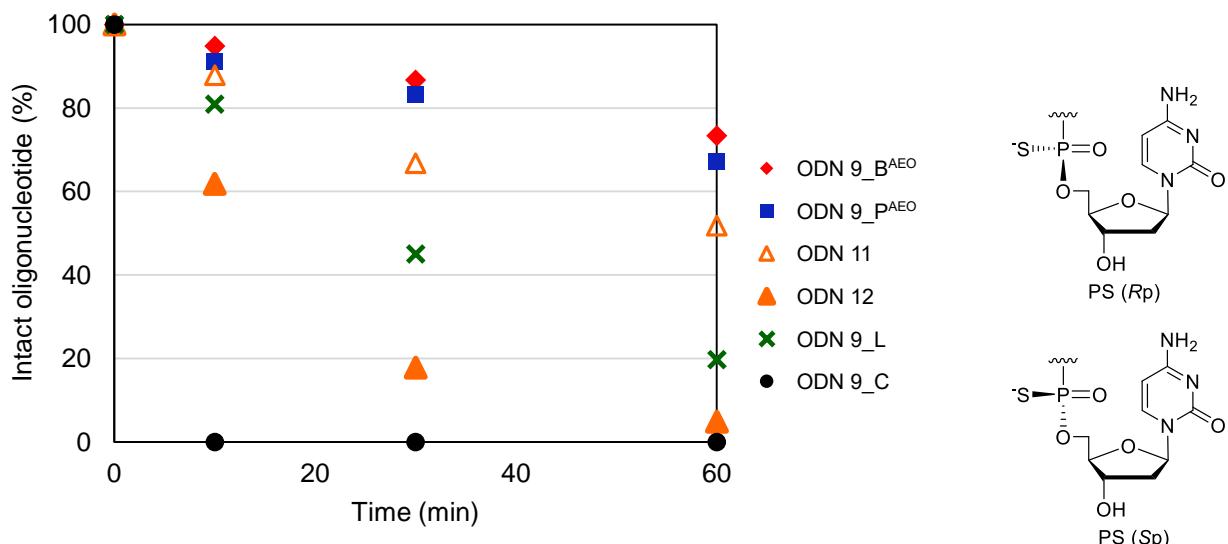
**X = C:** 2'-deoxycytidine; **L:** 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>:** BNAP; **P<sup>AEO</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>:** BNAP-AEO.

$K_s$  値を算出したところ、ODN\_B<sup>AEO</sup> は  $2.88 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$  となった。ODN\_C と比較すると、これは  $1.04 \times 10^4$  倍の二重鎖形成能の向上となり、極めて最も高い結合親和性を示すことが考えられる。なお、ODN\_B<sup>H</sup> の結合定数  $K_s$  は  $5.87 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  となり、ODN\_C ( $2.77 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) と比較した場合、二重鎖形成能を 212 倍向上させた。

以上より、BNAP-AEO は相補鎖 DNA、RNA の双方との二重鎖形成において G-clamp と 2',4'-BNA/LNA の効果を合理的に獲得し、二重鎖形成能向上に繋げていたことが検証された。BNAP に関して、相補鎖 DNA との二重鎖形成においてはフェノキサジンの効果を、相補鎖 RNA との二重鎖形成においては 2',4'-BNA/LNA 影響を大きく受けて二重鎖形成能向上に寄与させるという興味深い結果を得た。特に BNAP-AEO については、 $T_m$  値測定の結果を反映する極めて高い結合定数が算出され、当初の設計通りの優れた二重鎖形成能を獲得させることに成功した。

## 第 7 節 BNAP-AEO 導入型オリゴ核酸の酵素耐性能評価

核酸分子を *in vitro* 或いは *in vivo* で用いる際には細胞内や生体内での安定性が不可欠となるため、著者は BNAP-AEO 導入型 ODN の核酸分解酵素に対する耐性能を評価した。酵素には、ODN 中の 3'側末端に存在するリン酸ジエステル結合を順に加水分解する 3'-エキソヌクレアーゼ (*Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase; CAVP) を用いた。評価用 ODN には、天然チミジン 10 残基から構成された ODN の 3'側末端の 1 残基を BNAP-AEO に置換した ODN 9\_B<sup>AEO</sup> を用いた。またその比較対象として、BNAP-AEO の導入箇所に G-clamp を導入した ODN 9\_P<sup>AEO</sup>、2',4'-BNA/LNA-mC を導入した ODN 9\_L、天然シチジンを導入した ODN 9\_L、更には 3'末端のリン酸部にホスホロチオエート (Phosphorthioate; PS) 修飾を有するチミジンで置換した ODN 11, ODN 12 を併せて評価した (Figure 14)。



**Figure 14.** Enzymatic stability of 5'-(TTTTTTTTT<sup>X</sup>)-3' to 3'-exonuclease (*Crotalus Admanteus* Venom Phosphodiesterase; CAVP). <sup>X</sup> means phosphorthioate linkage only applied for PS (Rp) (ODN 11) and PS (Sp) (ODN 12). **B<sup>AEO</sup>** = BNAP-AEO (red diamond, ODN 9\_B<sup>AEO</sup>), 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp (blue square, ODN 9\_P<sup>AEO</sup>), phosphorthioate((R)-optical isomer)-modified 2'-deoxycytidine (orange opened triangle, ODN 11), phosphorthioate((S)-optical isomer)-modified 2'-deoxycytidine (orange closed triangle, ODN 12), 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine (green cross mark, ODN 9\_L) and 2'-deoxycytidine (black circle, ODN 9\_C).

Conditions: 0.13  $\mu\text{g/mL}$  of CAVP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 2  $\mu\text{M}$  each oligonucleotide at 37 °C.

本実験では、各ODNの溶液中にCAVP加えたサンプルを37°Cで60分間インキュベートし、一定インキュベート時間に対する完全長の各ODNの残存率(%)を逆相HPLCで定量した。天然チミジンとシチジンのみで構成される**ODN 9\_C**は、10分以内に全ODNが分解されたことに対し、BNAP-AEOを導入した**ODN 9\_B<sup>AEO</sup>**は、60分間のインキュベート後でも73%以上もの完全長ODNが残存するという良好な結果を与えた。また、60分後におけるG-clampを導入した**ODN 9\_P<sup>AEO</sup>**の残存率は67%、2',4'-BNA/LNA-<sup>m</sup>Cを導入した**ODN 9\_L**の残存率は20%、R,S体の異性体を含むPS修飾型チミジンで置換した**ODN 11, ODN 12**の残存率はそれぞれ52%, 5%であったことから、BNAP-AEOを導入した**ODN 9\_B<sup>AEO</sup>**は、今回用いた全ての人工核酸よりも優れた核酸分解酵素耐性を有することが明らかになった。G-clamp導入型ODNの酵素耐性能を報告したManoharanらの結果にもあるように<sup>26)</sup>、この要因には特に塩基部の構造的な嵩高さが挙げられる。即ち、核酸分解酵素が標的リン酸ジエステル結合を切断する際、BNAP-AEOの嵩高さが酵素の近接を阻害していると思われる。なお、このBNAP-AEOの阻害作用はG-clampと同等以上のものであり、これにはG-clamp以上の本化合物の構造的な嵩高さが起因することが示唆された。

本節の結果より、非常に高い結合親和性とミスマッチ塩基識別能を獲得したBNAP-AEOは、現在上市されている核酸医薬に用いられているPS修飾以上の優れた核酸分解酵素耐性能を有することが明らかになった。特に、糖部修飾核酸では核酸分解酵素耐性能の向上に限度があり、塩基部修飾との組み合わせによって、より嵩高い化学修飾を施すことの重要性が示唆された。

以上、BNAP-AEO導入型ODNは高い二重鎖形成能、ミスマッチ塩基識別能を獲得していた。特にRNAとの二重鎖形成においては結合定数を約一万倍まで向上させ、この結合定数向上の背景には2',4'-BNA/LNA構造とG-clampの双方の影響を、BNAO-AEOが合理的に獲得していたことが挙げられる。ミスマッチ塩基識別能についてBNAP-AEOは、隣接箇所を含めたミスマッチ塩基対をも広く識別し、完全相補配列との二重鎖形成能のみを選択的に向上させることが期待される。これによりアンチセンス法等、標的配列のみを選択的に認識しなければならない全ての核酸関連のアプリケーションに重要な要素となる塩基識別能の高さをBNAP-AEOが獲得することが示された。また同時にBNAP-AEOは2',4'-BNA/LNA構造と、特に構造的に嵩高いG-clampの構造を一挙に獲得することで、核酸分解酵素に対する耐性能についても向上させることに成功した。

## 第1節 フラノース環に三環式骨格を有するチミジン誘導体 (OBN) の背景と設計

著者は序説で述べた背景の下、三環式チミジン誘導体 1'- $\beta$ -[3-(1,2-Dihydro-2-oxobenzo[b][1, 8]naphthyridine)]-2'-deoxy-D-ribofuranose (以下、2-oxobenzo[b][1, 8]naphthyridine, OBN) を設計した(Figure 15)。序説でも言及した通り、2001 年 Nielsen らによって本塩基部骨格を有する PNA は相補鎖 DNA との二重鎖形成能を向上させることを明らかにした<sup>15)</sup>。また 2018 年 Grøtli らによって、二環式チミジン誘導体 bT (bicyclic thymidine, Figure 16) が報告されており、bT を導入した ODN は相補鎖 DNA との二重鎖形成能を低下させないことが明らかにされた<sup>27)</sup>。この結果と第 1 章でのフェノキサジン等の背景から著者は、更に塩基部の環構造を増大させることで、二重鎖形成能を向上させられるのではないかと考えた。第 1 章の結果を受け、積層塩基間のスタッキング相互作用向上を目指して、塩基部に三環式骨格を導入した。この際、OBN の塩基部 8 位に窒素原子を用いることで、天然チミジンの 4 位酸素原子 ( $sp^2$  混成軌道) が担っていた非共有電子対による水素結合形成を OBN 内で再現した。また共役系によって平面性を獲得する過程で、通常の核酸糖部と塩基部間で見られる N-グリコシド結合から C-グリコシド結合に変更することが必要となったため、OBN にはこれを採用した。三環式構造のスタッキング相互作用の増大による二重鎖形成能の向上が見込まれた OBN の実際の合成に先立ち、密度関数計算を行うことで OBN の相補塩基となるアデニン塩基との水素結合形成と、その際の平面性が維持されることを確認した (Figure 17)。なお、OBN は糖部にフラノース環を有する人工核酸である。アンチセンス法のみならず、siRNA やデコイ核酸、アプタマー等、他の核酸医薬においても天然糖部フラノース環を有する核酸が精力的に用いられることを考えると、OBN の機能や特性を解明することは核酸医薬の発展を考えた場合、重要な研究となる。そのため、まず始めに OBN を含むオリゴ核酸の二重鎖形成能やミスマッチ塩基識別能等を詳細に評価することとした。

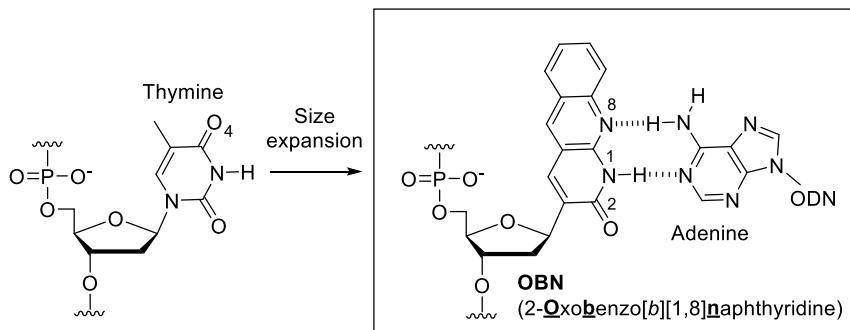


Figure 15. Structure of 2-oxobenzo[b][1,8]naphthyridine (OBN).

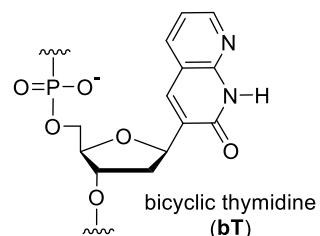
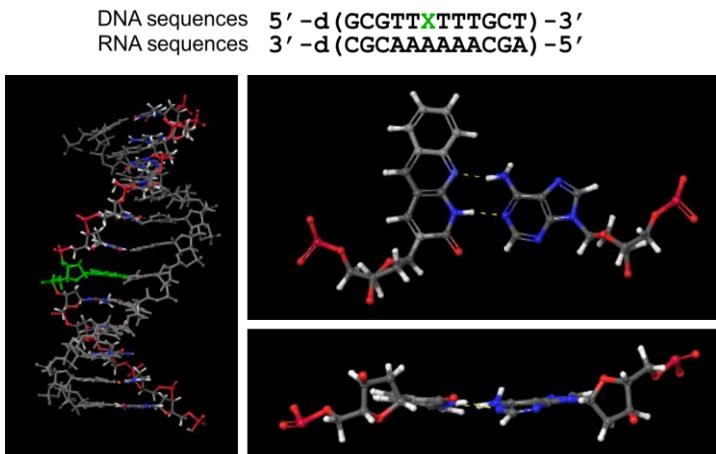
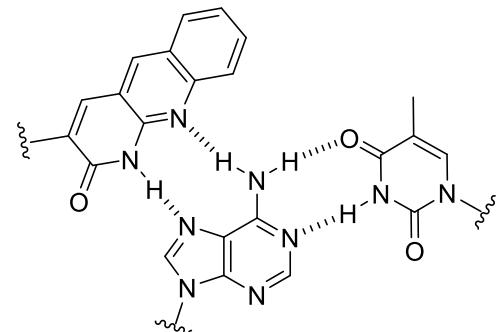


Figure 16. Structure of bicyclic thymidine (bT).

更に著者は、フェノキサジン誘導体が実際に TFO として三重鎖形成能を向上させている背景の下<sup>28)</sup>、新たなチミジン誘導体となる OBN も TFO としても機能し、アンチジーン法での不可欠な指標となる三重鎖形成能を向上させられないかと考えた (Figure 18)<sup>g</sup>。よって、本章での実験においては OBN 導入型 ODN の  $T_m$  値測定による二重鎖形成能、三重鎖形成能を同時に評価した。二重鎖形成能においては、ミスマッチ塩基識別能を評価した後、CD スペクトル測定を行い、二重鎖構造と二重鎖形成能がどのように関連するかを精査した。また最後に、OBN を含む ODN について、核酸分解酵素に対する耐性能を評価した。

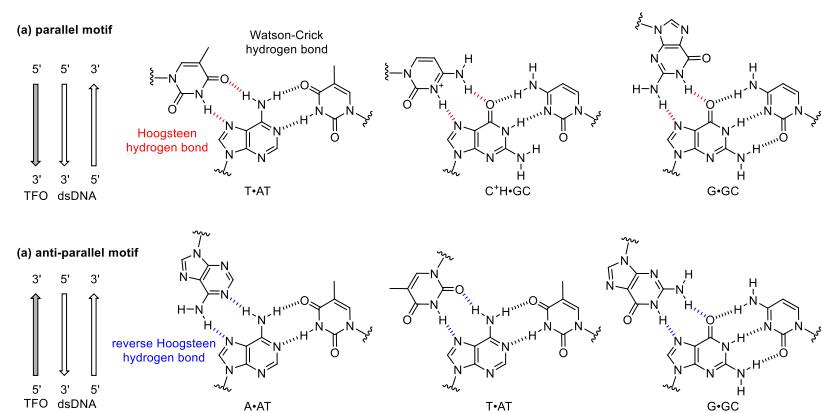


**Figure 17.** Molecular dynamics calculation was conducted by MacroModel software [Schrödinger, LLC]; OPLS3 force field (in water at 300 K for 30 ns). Overview (left), top view (right, up side) and side view (right, down side).



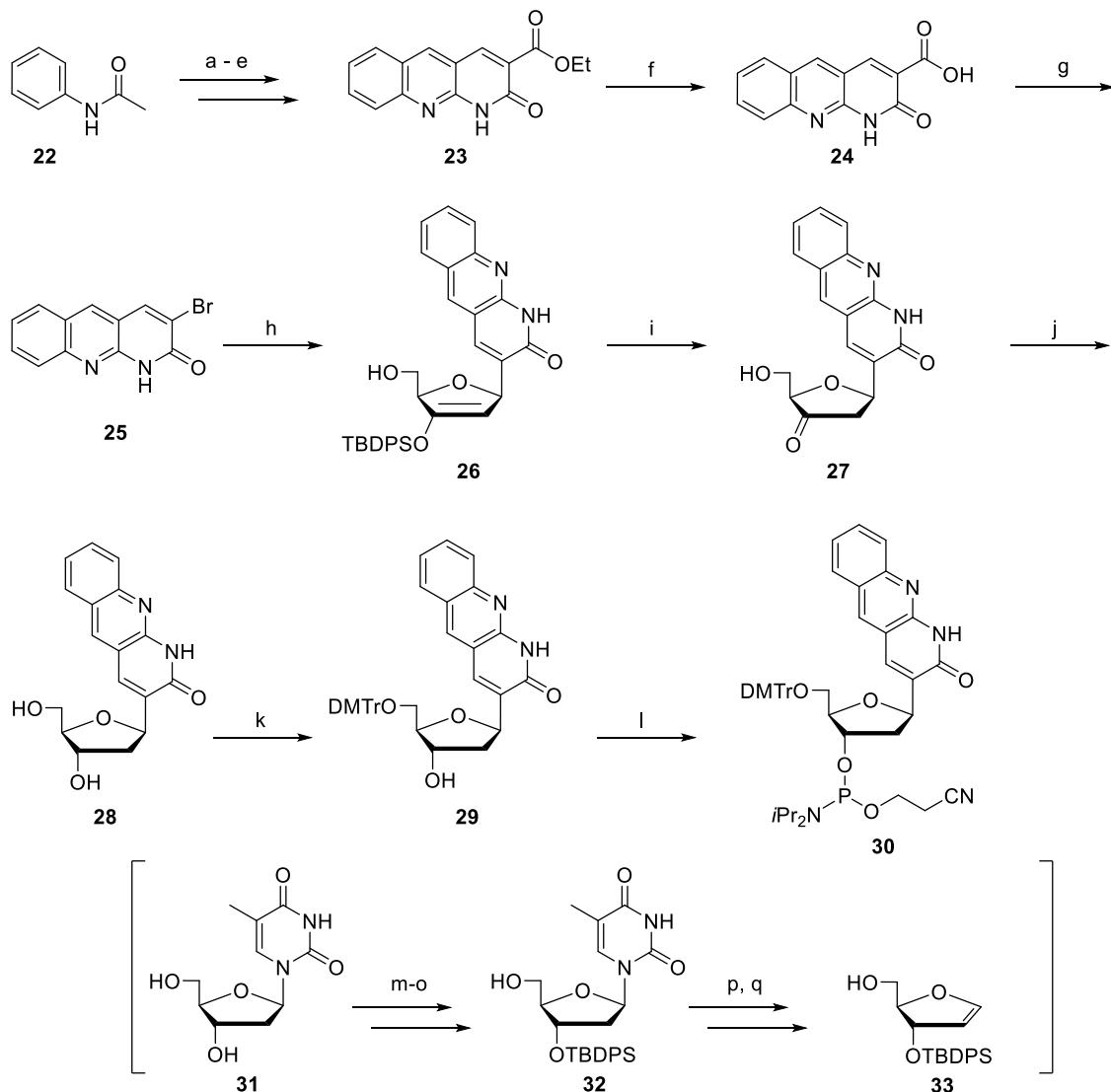
**Figure 18.** Binding style for A:T base pair of OBN in TFO.

<sup>g</sup> TFO は通常の二重鎖核酸中で確認される Watson-Crick 型水素結合に加えて、Hoogsteen 型、並びに reverse-Hoogsteen 型の水素結合形成が提唱されている。三重鎖核酸における TFO の結合様式は、(a)パラレル型と(b)アンチパラレル型に大別される(右図)。今回設計、合成を行った OBN については、(a)パラレル型 TFO のチミジンが形成する T•AT 塩基対と同様の塩基対形成が可能になるとを考えた。



## 第2節 チミジン誘導体 OBN 導入型オリゴ核酸の合成

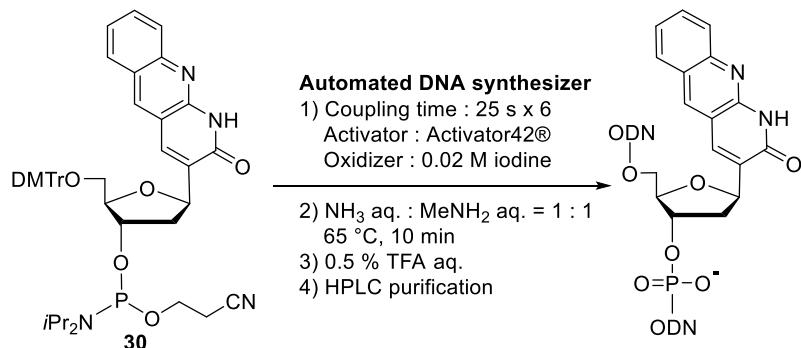
OBN モノマーの合成はアセトアニリド(22)を出発原料として、12 工程を経て DNA 自動合成機に適用可能な OBN アミダイトユニット 30 を総収率 9%で得た (Scheme 6)。



Scheme 6. Synthetic scheme of OBN amidite 30.

*Reagents and conditions:* (a) POCl<sub>3</sub>, DMF, 75 °C, 18 h (81%); (b) NaN<sub>3</sub>, DMF, 55-70 °C (98%); (c) PPh<sub>3</sub>, chlorobenzene, reflux, 10 h; (d) MeOH/HCl aq. reflux, 2 h; (e) diethyl malonate, piperidine, EtOH, reflux, 2 h (76%, 3 steps); (f) LiOH, THF/H<sub>2</sub>O, 70 °C, 2 h (85%); (g) Br<sub>2</sub>, pyridine/DMF, 105°C, 1 h (81%); (h) 32, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, P(*o*-tol)<sub>3</sub>, *n*Bu<sub>3</sub>N, 1,4-dioxane, reflux 18 h; (i) TBAF, AcOH, THF, 0 °C, 20 min; (j) NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, ACN, -20 °C, 20 min, (23%, 3 steps); (k) DMTrCl, pyridine, rt, 4 h (87%); (l) iPr<sub>2</sub>NP(Cl)OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>CN, DIPEA, DCM, rt, 3 h, (98%); (m) DMTrCl, pyridine, rt, 2 h; (n) TBDPSCl, imidazole, DMF, rt, 12 h; (o) TsOH, MeOH, DCM, 0 °C, 30 min (80%, 3 steps); (p) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HMDS, reflux, 4 h (q) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, rt, 30 min (74%, 2 steps)

本分子の合成においては、まず核酸塩基部 **25** を合成し、合成経路の後半にて既知化合物 **32**<sup>30)</sup>に対するグリコシリ化反応を行うことで **26**を得た。はじめに Jachak らの報告に従い<sup>29)</sup>、アセトアニリド (**22**)から 5 工程を経て、2-オキソベンゾ[b][1,8]ナフチリジン骨格を構築し **23**へと導いた。**23**のエチルエステルを水酸化リチウムでカルボン酸へと加水分解し、**24**を得た後、DMF/ピリジンの混合溶媒中、臭素を用いて脱炭酸的臭素化を行い、**25**を得た（反応機構として、脱炭酸を経て発生したイプソ位上の非共有電子対が臭素分子を攻撃する、という機構が考えられる）。ここで核酸塩基部 **25**と核酸糖部 **32**とのHeck 反応によるグリコシリ化反応<sup>31)</sup>を行うことでシリルエノールエーテル体 **26**を得た。その後は TBDPS 基を TBAF によって除去し、ケトン体 **27**へと変換後、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムによって立体選択的なヒドロキシ基への還元を行い、OBN のスクレオシド体 **28**を得た。最後は常法に従い、5'位ヒドロキシ基を DMTr 基で選択的に保護し **29**へと導いた後、3'位ヒドロキシ基のホスフィチル化を経て DNA 自動合成機に適用可能な OBN のアミダイトユニット **30**へと変換した。**30**は DNA 自動合成機により OBN を含むオリゴ核酸 (ODN 1-17\_N) の合成を試みた。ODN 合成においては、反応時間を延長<sup>i</sup>することで、良好な縮合効率で ODN 中に導入した。合成した ODN はアンモニア水溶液とメチルアミン水溶液の混合水溶液 (1 : 1, v/v) による CPG カラム担体からの切り出し、核酸塩基部とリン酸部の脱保護を行った後 (65 °C, 10 分間)、逆相 HPLC によって精製した (Scheme 7)。精製後の ODN の分子量は MALDI-TOF-Mass により確認した (Table 11)。



Scheme 7. Synthesis, deprotection and purification conditions of OBN-incorporated ODNs.

<sup>i</sup> 0.2 μmol スケールでの OBN アミダイトユニットの反応において、反応時間を 20 秒/サイクルに延長し、サイクル数に関しても、天然型 DNA の合成条件から 1 サイクル増やした 6 サイクルの条件を適用することで、良好な縮合効率での OBN 導入型 ODN の合成を達成した。

**Table 11.** Sequence and MALDI-TOF-Mass data of OBN (N)-modified oligodeoxynucleotides (**ODN 1-17\_N**).

Sequence	MALDI-TOF-Mass		Yield (%)
	[M-H] <sup>-</sup> Calcd.	[M-H] <sup>-</sup> Found	
5'-d(GCGTTNTTGCT)-3' ( <b>ODN 1_N</b> )	3702.5	3703.8	22
5'-d(GCGTCNATTGCT)-3' ( <b>ODN 2_N</b> )	3696.5	3697.3	32
5'-d(GCGTCNCTTGCT)-3' ( <b>ODN 3_N</b> )	3672.5	3673.5	18
5'-d(GCGTANATTGCT)-3' ( <b>ODN 4_N</b> )	3720.5	3722.4	37
5'-d(GCGTGNGTTGCT)-3' ( <b>ODN 5_N</b> )	3752.5	3753.2	37
5'-d(GCGTNTNTTGCT)-3' ( <b>ODN 6_N</b> )	3772.6	3772.7	22
5'-d(GCGTTNNNTTGCT)-3' ( <b>ODN 7_N</b> )	3772.6	3772.4	21
5'-d(GCGNTNTNTGCT)-3' ( <b>ODN 10_N</b> )	3842.7	3843.4	19
5'-d(GCGTNNNNTTGCT)-3' ( <b>ODN 8_N</b> )	3842.7	3843.8	11
5'-d(TTTT <u>C</u> TNT <u>C</u> T <u>C</u> T)-3' ( <b>ODN 13_N</b> )	4566.1	4567.3	7
5'-d(TTTTN <u>C</u> TT <u>C</u> T <u>C</u> T <u>C</u> T)-3' ( <b>ODN 14_N</b> )	4566.1	4565.0	20
5'-d(TTTTC <u>N</u> TT <u>C</u> T <u>C</u> T <u>C</u> T)-3' ( <b>ODN 15_N</b> )	4566.1	4565.6	40
5'-d(TTTTN <u>C</u> TT <u>N</u> TT <u>C</u> T <u>C</u> T <u>C</u> T)-3' ( <b>ODN 16_N</b> )	4636.2	4638.8	32
5'-d(TTTTN <u>C</u> TTN <u>C</u> T <u>C</u> T <u>C</u> T)-3' ( <b>ODN 17_N</b> )	4636.2	4636.6	30
5'-d(TTTTC <u>C</u> NN <u>T</u> CT <u>C</u> T <u>C</u> T)-3' ( <b>ODN 18_N</b> )	4636.2	4637.0	28
5'-d(TTTTC <u>C</u> NNN <u>C</u> T <u>C</u> T <u>C</u> T)-3' ( <b>ODN 19_N</b> )	4706.3	4706.8	28
5'-d(TTTTTTTTN)-3' ( <b>ODN 9_N</b> )	3049.1	3049.0	17

N = OBN, C = 2'-deoxy-5-methylcytidine

### 第3節 チミジン誘導体 OBN 導入型オリゴ核酸の二重鎖形成能評価

OBN は環構造の拡張に伴うスタッキング相互作用によって二重鎖形成能の向上を目指した人工核酸分子である。二重鎖形成能の評価において、隣接塩基の影響をどのように受けるかを詳細に精査すべく、OBN 含む様々なオリゴ核酸での評価を実施した。まず著者は OBN を導入した **ODN 1\_B ~ ODN 8\_B**, **ODN 10\_B** と相補鎖 DNA との二重鎖形成能を  $T_m$  値測定により評価した (Table 12)。この際、比較対象として、天然チミジンを導入した **ODN 1\_T ~ ODN 8\_T**, **ODN 10\_T** の評価も併せて行った。

**Table 12.**  $T_m$  values (°C) of duplexes formed between ODNs containing OBN and DNA complement.

Test ODN = 5'-d(GCG~~Y~~**Y****Y****Y****Y**TGCT)-3'  
 Target DNA = 3'-d(CGCA**Z**AZAAACGA)-5'

Sequence	$T_m$ value ( $\Delta T_m$ /mod.) (°C)	
	X = T	N
5'-d(GCGTTXTTGCT)-3' ( <b>ODN 1_X</b> (TTXTT))	40	40 ( $\pm 0$ )
5'-d(GCGTCXATTGCT)-3' ( <b>ODN 2_X</b> (TCXAT))	40	40 ( $\pm 0$ )
5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3' ( <b>ODN 3_X</b> (TCXCT))	44	41 (-3)
5'-d(GCGTAXATTGCT)-3' ( <b>ODN 4_X</b> (TAXAT))	36	34 (-2)
5'-d(GCGTGXGTTGCT)-3' ( <b>ODN 5_X</b> (TGXGT))	46	44 (-2)
5'-d(GCGTXXTTGCT)-3' ( <b>ODN 6_X</b> (TXTXT))	40	35 (-2.5)
5'-d(GCGTTXXTTGCT)-3' ( <b>ODN 7_X</b> (TTXXT))	40	41 (+0.5)
5'-d(GCGXTXTXTGCT)-3' ( <b>ODN 10_X</b> (XTXTX))	40	27 (-4.3)
5'-d(GCGTXXXTTGCT)-3' ( <b>ODN 8_X</b> (TXXXT))	40	44 (+1.3)

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5 °C/min at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2 μM for each strand. The  $T_m$  values reflect the average of three measurements and the error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5$  °C. The sequences of each ssDNA is 5'-d(AGCAAZZZACGC)-3' and Z indicated each match nucleotide corresponding with each nucleotide of A, G, C and T. T = thymidine; N = OBN. n.d. indicates not detected.

$\Delta T_m$  / mod.: the change in  $T_m$  value ( $\Delta T_m$ ) per modification relative to the unmodified standard strand (**ODN 1-9\_T**).

相補鎖 DNA との二重鎖形成能評価において、OBN の隣接箇所にピリミジン塩基(チミン、シトシン)が含まれる **ODN 1\_N** (TTNTT), **ODN 2\_N** (TCNAT), **ODN 3\_N** (TCNCT)の  $T_m$  値は各々 40 °C, 40 °C, 41 °C となり、天然チミジンを導入した場合と比較し  $T_m$  値を維持 (**ODN 1\_N**, **ODN 2\_N** での  $\Delta T_m$  :  $\pm 0$  °C) 或いは下げる (**ODN 3\_N** での  $\Delta T_m$  値: -3 °C) 結果となった。この  $T_m$  値の低下傾向は OBN の隣接にプリン塩基が存在する **ODN 4,5\_N** を用いた場合にも見られ、**ODN 4\_N** (TANAT)と **ODN 5\_N** (TGNGT) の双方で共に  $T_m$  値が 2 °C 低下した。

次に OBN を二、または三残基導入した配列 **ODN\_6,7,8,10\_N** を用いた場合、一残基のチミジンを介して導入した **ODN 6\_N** (TNTNT) や **ODN 10\_N** (NTNTN) と、連続で導入した **ODN 7\_N** (TTNNT) や **ODN 8\_N** (TNNNT) では、 $T_m$  値に明確な違いが見られた。**ODN 6\_N** (TNTNT) や **ODN 10\_N** (NTNTN) では導入数を増やすにつれ、一残基あたりの  $\Delta T_m$ /mod. 値が -2.5 °C, -4.3 °C と低下したことに対し、**ODN 7\_N** (TTNNT) や **ODN 8\_N** (TNNNT) では導入数の増加に伴い、一残基あたりの  $\Delta T_m$ /mod. 値が +0.5 °C, +1.3 °C と  $T_m$  値は維持、及び僅かに上昇した。同配列に OBN を一残基導入した **ODN 1\_N** (TTNTT) の結果と、連続導入を行った **ODN 7\_N** (TTNNNT) や **ODN 8\_N** (TNNNT) の結果より、OBN 導入型 ODN が相補鎖 DNA との二重鎖形成能を向上させる際は、隣接、並びに連続する OBN 同士が生み出すスタッキング相互作用の増強が重要な役割を果たすことが示唆された。

次に、OBN を導入したオリゴ核酸と相補鎖 RNA との二重鎖形成能評価を行った (Table 13)。

**Table 13.**  $T_m$  values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of duplexes formed between ODNs containing OBN and RNA complement.

Test ODN = 5'-d(GCG~~YYYYY~~YTGCT)-3'  
Target RNA = 3'-d(CGCA~~ZAZAACGA~~)-5'

Sequence (YYYYY)	$T_m$ value ( $\Delta T_m$ / mod.) ( $^{\circ}\text{C}$ )	
	X = T	N
5'-d(GCGTTXTTGCT)-3' ( <b>ODN 1_X (TTXTT)</b> )	37	41 (+4)
5'-d(GCGTCXATTGCT)-3' ( <b>ODN 2_X (TCXAT)</b> )	40	41 (+1)
5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3' ( <b>ODN 3_X (TCXCT)</b> )	47	48 (+1)
5'-d(GCGTAXATTGCT)-3' ( <b>ODN 4_X (TAXAT)</b> )	33	30 (-3)
5'-d(GCGTGXGTTGCT)-3' ( <b>ODN 5_X (TGXGT)</b> )	44	40 (-4)
5'-d(GCGTXXTTGCT)-3' ( <b>ODN 6_X (TXTXT)</b> )	37	41 (+2.0)
5'-d(GCGTTXXTTGCT)-3' ( <b>ODN 7_X (TTXXT)</b> )	37	46 (+4.5)
5'-d(GCGXTXTXTGCT)-3' ( <b>ODN 10_X (XTXTX)</b> )	37	35 (-0.7)
5'-d(GCGTXXXTTGCT)-3' ( <b>ODN 8_X (TXXXT)</b> )	37	51 (+4.7)

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The  $T_m$  values reflect the average of three measurements and the error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ . The sequences of each ssRNA is 5'-r(AGCAA~~ZZZ~~ZACGC)-3' and Z indicated each match nucleotide corresponding with each nucleotide of A, G, C and T. T = thymidine; N = OBN. n.d. indicates not detected.

$\Delta T_m$  / mod.: the change in  $T_m$  value ( $\Delta T_m$ ) per modification relative to the unmodified standard strand (**ODN 1-9\_T**).

OBN 導入型 ODN と相補鎖 RNA との二重鎖形成において、OBN の隣接にピリミジン塩基（チミン、シトシン）を含む **ODN 1\_N (TTNTT)**, **ODN 2\_N (TCNAT)**, **ODN 3\_N (TCNCT)** のそれぞれの  $T_m$  値は 41  $^{\circ}\text{C}$ , 41  $^{\circ}\text{C}$ , 48  $^{\circ}\text{C}$  となった。天然チミジンを導入した結果との比較における  $\Delta T_m$  値は各々 +4  $^{\circ}\text{C}$ , +1  $^{\circ}\text{C}$ , +1  $^{\circ}\text{C}$  であった。一方で、OBN の隣接にアデニンが存在する **ODN 4\_N (TANAT)** とグアニンが存在する **ODN 5\_N (TGNGT)** で  $T_m$  値は低下し、**ODN 4\_N (TANAT)** では  $\Delta T_m$  値 : -3  $^{\circ}\text{C}$ 、**ODN 5\_N (TGNGT)** では  $\Delta T_m$  値 : -4  $^{\circ}\text{C}$  という結果を得た。相補鎖 RNA 鎖との二重鎖形成においても OBN 導入型 ODN は、ピリミジン塩基、特にチミン塩基を隣接させる配列を設計することで、顕著に二重鎖形成能が向上することが示された。

OBN を複数導入した配列 **ODN 6, 7, 8, 10\_N** を用いた場合、一残基の OBN を導入した **ODN 1\_N (TTNTT)** の結果 ( $\Delta T_m$  : +4  $^{\circ}\text{C}$ ) と比較すると、一残基のチミジンを介して二、三残基の OBN を導入した **ODN 6\_N (TNTNT)** や **ODN 10\_N (NTNTN)** では、一残基あたりの  $\Delta T_m/\text{mod.}$  値がそれぞれ +2.0  $^{\circ}\text{C}$ 、-0.7  $^{\circ}\text{C}$  となった。その一方で、二、及び三残基の OBN を連續で導入した **ODN 7\_N (TCNNT)** や **ODN 8\_N (TNNNT)** では導入数を増やすにつれて、 $\Delta T_m/\text{mod.}$  値が +4.5  $^{\circ}\text{C}$ , +4.7  $^{\circ}\text{C}$  と上昇した。これら **ODN 7, 8\_N** の各配列が示す  $\Delta T_m/\text{mod.}$  値は、相補鎖 DNA との二重鎖形成の際に示す  $\Delta T_m/\text{mod.}$  値を更に上回るものであった。従って OBN は連續導入した配列において、相補鎖核酸（特に RNA）との二重鎖形成能を向上させることができ、この効果は OBN に由来するスタッキング相互作用の強化によるものであ

ると推察される。

続いて著者は、OBN導入型ODNの標的DNAとの二重鎖形成時におけるミスマッチ塩基識別能を $T_m$ 値測定により評価した(Table 14)。なお、本実験では、天然チミジン導入型ODNと比べ、OBN導入型ODNで二重鎖形成能が最も向上していた**ODN 1\_X (TTXTT)**を用いた評価を実施した。なお、天然チミジンを導入したODNもOBN導入型ODNの比較対象として併せて評価した。なお本実験以降の配列表記については、隣接塩基の影響を考慮する必要がないため**ODN 1\_X (TTXTT)**から**ODN\_X**へと表記を改めた。

**Table 14.**  $T_m$  values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of duplexes of **ODN\_T** and **N** formed with ssDNA including one base mismatch or not.

Test ODN = 5'-d(GCGTTXTTGTGCT)-3' (**ODN\_X**)  
Target DNA = 3'-d(CGCAAYAACGA)-5'

Sequence	$T_m$ value ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) ( $^{\circ}\text{C}$ )			
	Y = A	G	T	C
5'-d(GCGTTTTTGCT)-3' ( <b>ODN_T</b> )	40	25 (-15)	24 (-16)	23 (-17)
5'-d(GCGTTNTTGCT)-3' ( <b>ODN_N</b> )	40	30 (-10)	27 (-13)	23 (-17)

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The  $T_m$  values reflect the average of three measurements and the error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ . The sequences of each ssDNA is 5'-d(AGCAAAYAACGC)-3'. T = thymidine; N = OBN.

$\Delta T_m$  / mod.: the change in  $T_m$  value ( $\Delta T_m$ ) per modification relative to the unmodified standard strand (**ODN 1-9\_T**).

**ODN\_N**が各ミスマッチ塩基対を有する標的DNAと二重鎖を形成する際の $T_m$ 値は30  $^{\circ}\text{C}$  [Y = G], 30  $^{\circ}\text{C}$  [Y = T], 30  $^{\circ}\text{C}$  [Y = C]となり、完全相補配列と比較した際の $\Delta T_m$ 値は-10  $^{\circ}\text{C}$  [Y = G], -13  $^{\circ}\text{C}$  [Y = T], -17  $^{\circ}\text{C}$  [Y = C]であった。これらの $\Delta T_m$ 値を**ODN\_T**の $\Delta T_m$ 値:-15  $^{\circ}\text{C}$  [Y = G], -16  $^{\circ}\text{C}$  [Y = T], -17  $^{\circ}\text{C}$  [Y = C]と比較すると、**ODN\_N**のミスマッチ塩基識別能はグアニンに対して5  $^{\circ}\text{C}$ 、チミンに対して3  $^{\circ}\text{C}$ 低下した。一方で、シトシンとのミスマッチ塩基対形成の際は $\Delta T_m$ 値に変化はなかった。このことから、OBNはアデニン塩基との水素結合を優先的に形成する一方で、天然チミジンと比べると他のミスマッチ塩基対形成を安定化させることができた。

次に、OBN導入型ODNと標的RNAとの二重鎖形成における塩基識別能を評価した(Table 15)。

**Table 15.**  $T_m$  values ( $^{\circ}\text{C}$ ) of duplexes of **ODN 1\_T** and **N** formed with ssRNA including one base mismatch or not.

Test ODN = 5'-d(GCGT**T**XTTTGCT)-3' (**ODN\_X**)  
Target RNA = 3'-r(CGCA**A**YAAACGA)-5'

Sequence	$T_m$ value ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) ( $^{\circ}\text{C}$ )			
	Y = A	G	U	C
5'-d(GCGTTTTTGCT)-3' ( <b>ODN_T</b> )	37	31 (-6)	21 (-16)	18 (-19)
5'-d(GCGTTNTTGCT)-3' ( <b>ODN_N</b> )	41	36 (-5)	26 (-15)	25 (-16)

UV melting profiles were measured in 2 mM sodium phosphate buffer ( $\text{pH}7.2$ ) containing 20 mM NaCl aq. at a scan rate of  $0.5\ ^{\circ}\text{C}/\text{min}$  at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 2  $\mu\text{M}$  for each strand. The  $T_m$  values reflect the average of three measurements and the error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5\ ^{\circ}\text{C}$ . The sequences of each ssDNA is 5'-d(AGCAAA**Y**AACGC)-3'. T = thymidine; N = OBN.

$\Delta T_m$  / mod.: the change in  $T_m$  value ( $\Delta T_m$ ) per modification relative to the unmodified standard strand (**ODN 1-9\_T**).

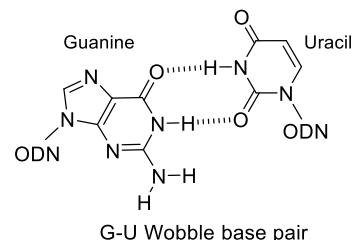
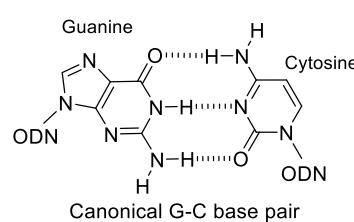
**ODN 1\_N**が各ミスマッチ塩基対に対して示す $T_m$ 値は $36\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = G],  $26\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = U],  $25\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = C]となり、完全相補配列との比較において示された $\Delta T_m$ 値は $-5\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = G],  $-15\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = U],  $-16\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = C]となった。**ODN 1\_T**が示した $\Delta T_m$ 値： $-6\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = G],  $-16\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = U],  $-19\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = C]と比較して、グアニン、ウラシル、シトシン全てのミスマッチ塩基を含む二重鎖形成の場合に $\Delta T_m$ 値による塩基識別能が各々 $1\ ^{\circ}\text{C}$ ,  $1\ ^{\circ}\text{C}$ ,  $3\ ^{\circ}\text{C}$ 低下した。これは標的DNAの場合と同様、OBNが非特異的なスタッキング相互作用を生み出すことにより、ミスマッチ塩基対形成を安定化することが示唆される。またグアニン塩基をミスマッチ配列として含む標的RNAとの二重鎖形成において、**ODN 1\_N**の $\Delta T_m$ 値は $-5\ ^{\circ}\text{C}$ となり、特にその値が小さくなっている。これはチミン（ウラシル）-グアニン塩基間で安定化されることが知られるwobble（揺らぎ）塩基対の影響であり、チミジン誘導体であるOBNの場合にもwobble塩基対形成による効果によると考える<sup>32)</sup>。

**ODN 1\_N<sup>COOH</sup>**の $T_m$ 値によるミスマッチ塩基識別能は、各々 $34\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = G],  $23\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = U],  $20\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = C]となり、完全相補配列比較した際の $\Delta T_m$ 値は $\pm 0\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = G],  $-11\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = U],  $-14\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = C]となった。

**ODN\_N**が示す $\Delta T_m$ 値と比較して、 $5\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = G],  $4\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = U],  $2\ ^{\circ}\text{C}$  [Y = C]のミスマッチ塩基識別能の低下が見られ、この低下傾向は標的DNA鎖とのミスマッチ塩基識別能の場合と同様の傾向となった。

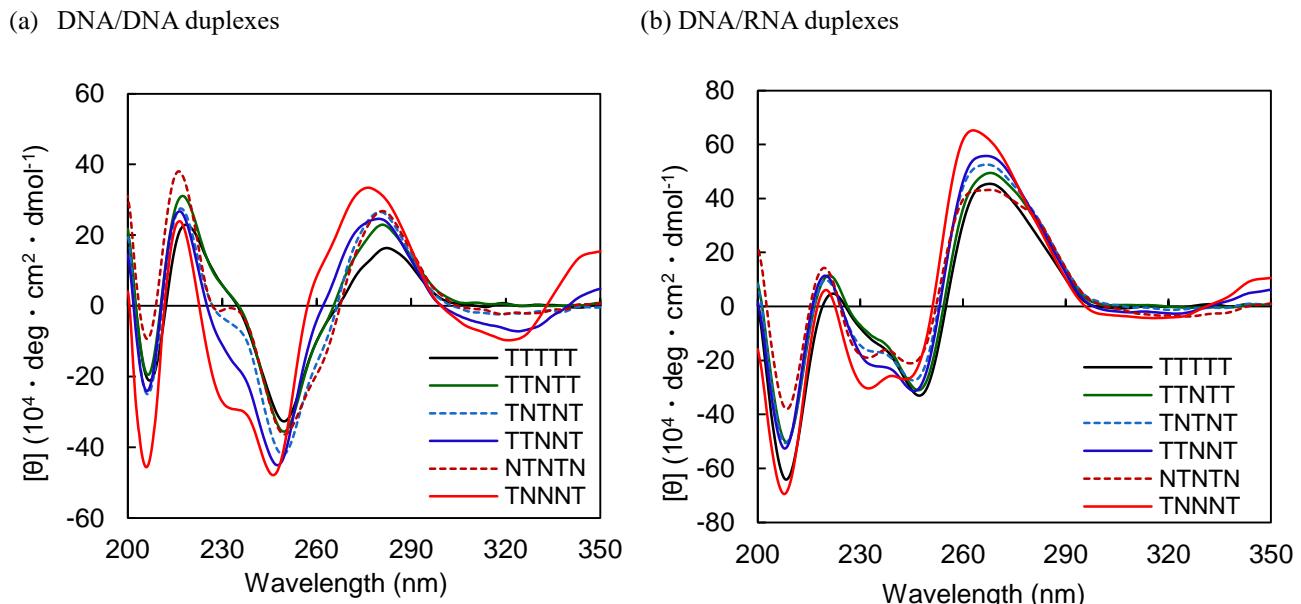
以上より、OBNは天然チミジンと比較し塩基識別能は低下するものの、チミジン誘導体として、天然チミジンと同様の傾向のミスマッチ識別能を獲得させることに成功した。またOBNの8位へのカルボキシメトキシ基の導入はミスマッチ塩基識別能を低下させることを明らかにした。

j グアニン塩基についてはRNA鎖内のシトシン塩基とのWatson-Crick型塩基対形成（左）に加えて、ウラシル塩基ともWobble（揺らぎ）塩基対を形成することが知られている。



#### 第4節 OBN導入型オリゴ核酸のCDスペクトル測定

前節のOBN導入型ODNの $T_m$ 値測定結果から、OBNが連続した配列を設計することで有意に $T_m$ 値は向上した。一方でOBNの間に一残基のチミジンが存在する場合においては、その効果が減弱する傾向にあった。そこで、本原因を二重鎖構造による視点から解明するべく、OBN導入型ODN(**ODN 1\_N**, **ODN 6\_N**~**ODN 8\_N**, **ODN 10\_N**)の相補鎖DNAおよびRNAとの二重鎖構造をCDスペクトルにより評価した(Figure 19)。本評価においては比較対象として、天然チミジンを導入した**ODN 1\_T**も併せて評価した。



**Figure 19.** CD spectra of the ODN/DNA (panel a, left) and ODN/RNA (panel b, right) duplexes containing 5'-d(GCGTTTTTGCT)-3' (black line, **ODN 1\_T**), 5'-d(GCGTTNTTGCT)-3' (green line, **ODN 1\_N**), 5'-d(GCGTNTNTGCT)-3' (light blue line, dashed, **ODN 6\_N**), 5'-d(GCGTTNNNTGCT)-3' (blue line, **ODN 7\_N**), 5'-d(GCGNTNTNTGCT)-3' (dark red line, dashed, **ODN 8\_N**), 5'-d(GCGTNNNTTGCT)-3' (red line, **ODN 9\_N**) in the ODN. Conditions: 2 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM NaCl, each strand 2 μM at 10 °C. T = thymidine; N = OBN.

相補鎖DNAとの二重鎖形成において、特に顕著なスペクトル変化が見られたものは、三残基のOBNを連続導入した**ODN 8\_N**(TNNNT)/DNA二重鎖であった。280 nm付近の正のコットンバンドのピークが、B型らせん構造を示した**ODN 1\_T**(TTTTT)/DNA二重鎖のスペクトルと比較し、短波長側に僅かにシフトした。また、同数のOBNを導入した**ODN 10\_N**(NTNTN)/DNA二重鎖と比較すると、正のコットンバンドの増大が見られた。260~280 nm付近の正のコットンバンドの増大と核酸塩基間のスタッキング相互作用の強度には相関があることから<sup>33)</sup>、**ODN 8\_N**(TNNNT)と**ODN 10\_N**(NTNTN)の比較において、相補鎖DNAとの二重鎖形成における**ODN 8\_N**(TNNNT)は連続するOBNの影響でスタッキング相互作用を増大させたことが考えられる。一方で、二重鎖形成能が低下した**ODN 6\_N**(TNTNT)/DNA二重鎖と**ODN 10\_N**(NTNTN)/DNA二重鎖について、B型らせんの特徴的なスペクトルからの変化が見られない。OBNは二重鎖形成能を低下させる配列においても、二重鎖構造の大きな変化は見られなかった。ここから、スタッキング相互作用の向上により一本鎖状態でのpre-organizationが、通常とは異なる

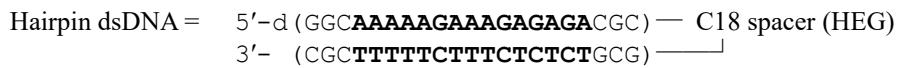
形で強く形成されており、二本鎖状態よりも一本鎖状態の方が安定的に存在するようになっている可能性が推察される。

また相補鎖 RNA に対する二重鎖形成 (Figure 18 b) については、安定化、或いは安定化の減少に関わるスペクトル変化は見出されなかった。しかし Figure 18 a での考察から、安定化効果が大きい **ODN 1\_N** (TTNTT), **ODN 7\_N** (TTNNNT), **ODN 8\_N** (TNNNN) では pre-organization が二重鎖形成に有利な方向で形成される一方で、安定化効果が減弱した **ODN 6\_N** (TNTNT), **ODN 10\_N** (NTNTN) では二重鎖形成に不利な方向で pre-organization が形成されていることが予想される。

## 第 5 節 OBN 導入型オリゴ核酸の三重鎖形成能評価

著者は、OBN が TFO へと応用出来る可能性を検証するべく、OBN 導入型 ODN と相補的な二重鎖 DNA との三重鎖形成能を  $T_m$  値測定により評価した (Table 16)。

**Table 16.**  $T_m$  values of triplets ( $^{\circ}$ C) formed between TFO and hairpin-double strand (ds) DNA.



Sequence	$T_m$ values ( $\Delta T_m$ /mod.) ( $^{\circ}$ C)	
	pH 7.0	pH 6.0
5'-d(TTTT <u>TTT<u>CT<u>CT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 20</b>)</u>	39	60
5'-d(TTTT <u>CT<u>NT<u>CT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 13_N</b> (TT<u>CT<u>NT<u>TC</u></u></u></u> ))	42 (+3)	61 (+1)
5'-d(TTTT <u>N<u>TT<u>CT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 14_N</b> (TN<u>CT<u>TT<u>TC</u></u></u></u> ))	36 (-3)	57 (-3)
5'-d(TTTT <u>C<u>NT<u>CT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 15_N</b> (TC<u>NT<u>TC</u></u></u> ))	38 (-1)	59 (-1)
5'-d(TTTT <u>N<u>NT<u>CT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 16_N</b> (TN<u>NC<u>NT<u>TC</u></u></u></u> ))	36 (-1.5)	56 (-2.0)
5'-d(TTTT <u>N<u>CT<u>NT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 17_N</b> (TN<u>CT<u>TT<u>NC</u></u></u></u> ))	32 (-3.5)	53 (-3.5)
5'-d(TTTT <u>C<u>NN<u>CT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 18_N</b> (TC<u>NN<u>NT<u>TC</u></u></u></u> ))	44 (+2.5)	68 (+4.0)
5'-d(TTTT <u>C<u>NNN<u>CT<u>CT<u>CT</u></u></u></u>) -3' (<b>ODN 19_N</b> (TC<u>NNN<u>NC</u></u></u> ))	42 (+1.0)	68 (+2.7)

Condition: 7 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0 or 6.0) containing 140 mM KCl and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5  $\mu$ M of each oligonucleotide at a scan rate of 0.5  $^{\circ}$ C/min at 260 nm. C: 2'-deoxy-5-methylcytidine; N: OBN.

TFO forms triplex structure at the bold sequences in ds DNA.

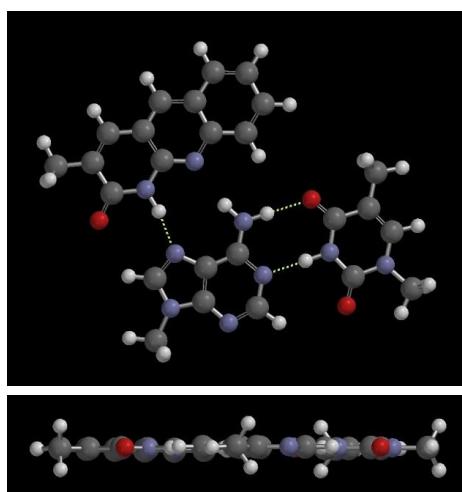
本実験においては **ODN 20** を比較対象とし、OBN の導入箇所と導入数が異なる OBN 導入型 ODN を 7 種類 (**ODN 13~19\_N**) を作製した。pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた測定条件において **ODN 20** の  $T_m$  値は 39  $^{\circ}$ C となり、OBN を一残基導入した **ODN 13\_N** (TTCTNTTC), **ODN 14\_N** (TNCTTTTC), **ODN 13\_N** (TCNTTC) について、**ODN 20** との比較における  $\Delta T_m$  値は各々 +3  $^{\circ}$ C, -3  $^{\circ}$ C, -1  $^{\circ}$ C となった。この 3 種類の配列における OBN の導入数は変わらないことから、OBN が隣接塩基の影響を大きく受けることが分かる。まず OBN の 5' 側と 3' 側の双方にチミジンが存在する **ODN 13\_N** (TTCTNTTC) においては、 $T_m$  値が 3  $^{\circ}$ C 上昇したことから、OBN とチミジンとのスタッキング相互作用は効果的に作用して

いることが分かる。一方で **OBN** の 5' 側にチミジン、3' 側に 5-メチルシチジンが存在する **ODN 14\_N** (TNCTTC) では、 $T_m$  値は 3°C 低下した。次に、**OBN** の 5' 側に 5-メチルシチジン、3' 側にチミジンが存在する **ODN 15\_N** (TTCNTTC) について、**ODN 20** と比較し  $T_m$  値は 1°C 低下する結果に留まった。このことから、5' 側の 5-メチルシチジンは **OBN** 導入型 ODN の三重鎖形成能向上に関与しないことが示された。同時に本結果から、三重鎖形成における ODN 中の **OBN** は 3' 側の核酸塩基の種類によって  $T_m$  値は大きく変動し、これは **OBN** の三環式のスタッキング相互作用に起因することが示唆された。

続いて、**OBN** を複数導入した **ODN 16\_N** (TNCNTTC)、**ODN 17\_N** (TNCTTNC)、**ODN 18\_N** (TTCNNTC)、**ODN 19\_N** (TTCNNNN) においても **ODN 13\_N**~**ODN 15\_N** と同様の傾向が見られた。二残基の **OBN** の間に一残基の 5-メチルシチジンを介した **ODN 16\_N** (TNCNTTC) では **OBN** 一残基あたりの  $\Delta T_m$  ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ ) 値が -1.5 °C となった。これは一方の **OBN** の 3' 側に 5-メチルシチジン、もう一方の **OBN** の 3' 側にチミジンが存在するため、 $T_m$  値の増減が相殺されると考えられる。二残基の **OBN** の双方の 3' 側に 5-メチルシチジンが存在する **ODN 17\_N** (TNCTTNC) では、一残基あたりの  $\Delta T_m$  ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ ) 値が 3.5 °C まで低下している。次に **OBN** を二連続で導入した **ODN 18\_N** (TTCNNTC) では **OBN** の一残基あたりの  $\Delta T_m$  ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ ) 値が +2.5 °C となり、三重鎖形成能評価に用いた配列の中で最も高い  $T_m$  を示した。この要因としては、**OBN** の 3' 側に 5-メチルシチジンではなくチミジンが存在している点が挙げられる。最後に三連続で **OBN** を導入した **ODN 19\_N** (TTCNNNN) では  $\Delta T_m$ :+1.0°C となった。**ODN 18\_N** (TTCNNTC) と比較して  $T_m$  値が低下した主な原因には **OBN** の 3' 側に 5-メチルシチジンが存在することが考えられる。

以上より、**OBN** 導入型 ODN は TFO としても機能し、特に **OBN** の 3' 側にシチジンを含まない配列を設計することで三重鎖形成能を向上させられることが明らかになった。

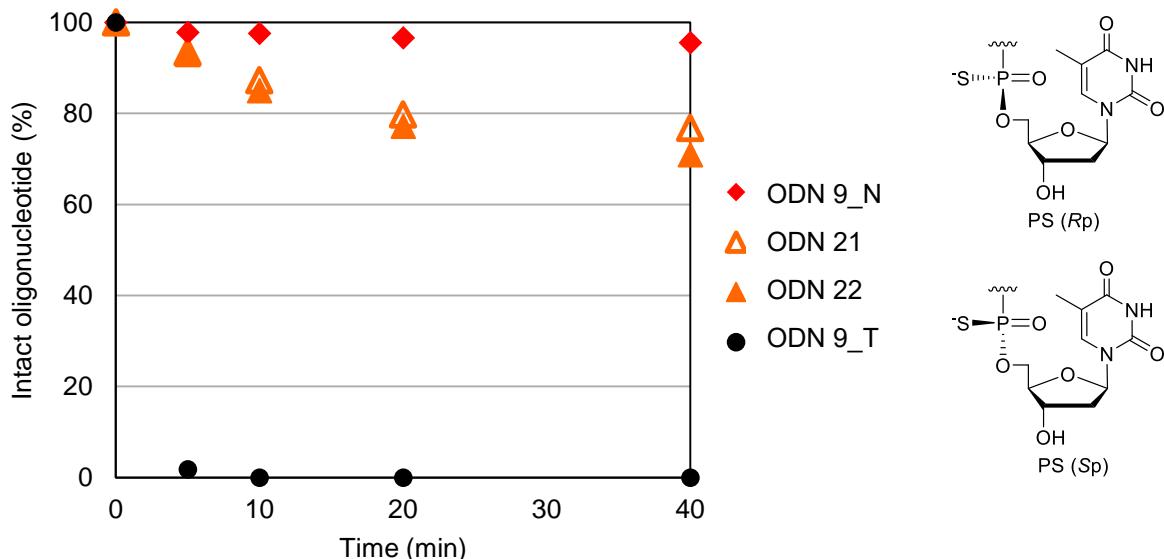
またここで著者は、**OBN** が TFO 中で T•AT 様 Hoogsteen 型塩基対形成が行えるかを密度関数計算によって考察した (Figure 20)。その結果、**OBN** は標的となる A:T 塩基対に対して一点ではあるものの Hoogsteen 面からの水素結合を形成していた。またその際に核酸塩基の平面性が確保されることが示唆された。よって本実験における **OBN** 導入型 ODN の三重鎖形成能いにおける  $T_m$  値向上の要因としては、配列中に連続で存在する **OBN** 同士が平面性を維持し、スタッキング相互作用を増大させることが要因であると思われる。



**Figure 20.** Binding style of **OBN** for A:T base pair in TFO.  
Calculation method: Density functional, B3LYP, 6-31G\* in vacuum, Spartan'06 (Wavefunction, Inc.).

## 第6節 OBN導入型オリゴ核酸の酵素耐性能評価

本項目では、BNAP-AEO導入型ODNと同様、OBN導入型オリゴ核酸(ODN 9\_N)の核酸分解酵素に対する耐性能を評価した。ここで比較対象として用いたODNは、天然チミジン10残基から構成されるODN 9\_Tと、3'側末端のチミジン5'側リン酸部にPS修飾を有するODN 21, ODN 22である。本実験においては、40分間のインキュベートを行い、各インキュベート時間に対して残存する完全長の各オリゴ核酸の残存率(%)を逆相HPLCで追跡した(Figure 21)。



**Figure 21.** Enzymatic stability of 5'-(TTTTTTTT<sup>X</sup>)-3' to 3'-exonuclease (*Crotalus Admanteus* Venom Phosphodiesterase; CAVP). <sup>X</sup> means phosphorthioate linkage only applied for PS\_Rp (ODN 21) and PS\_Sp (ODN 22). X = OBN (red diamond, ODN 9\_N), phosphorthioate((R)-optical isomer)-modified thymidine (orange opened triangle, ODN 21), phosphorthioate((S)-optical isomer)-modified thymidine (orange closed triangle, ODN 22), and natural thymidine (black circle, ODN 9\_T).

Conditions: 0.4 μg/mL of CAVP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 4 μM each oligonucleotide at 37 °C.

天然チミジンのみから構成されるODN 9\_Tは10分以内に全て分解されたことに対し、OBNを導入したODN 9\_Nは40分経過後でも95%以上の完全長のオリゴ核酸が残存していた。また、R,S体の異性体を含むPS修飾型チミジンで置換したODN 21, ODN 22の40分後の残存率はそれぞれ77%, 71%であったことから、OBNはPS修飾よりも高い核酸分解酵素耐性を有していることが明らかになった。この要因としては、BNAP-AEOと同様の塩基部の構造的な嵩高さが考えられる。OBNにおいても、標的のリン酸ジエステル結合の切断部位をOBNが阻害していると推察される。

## 結論

第1章では、オリゴ核酸への一残基導入で飛躍的に二重鎖形成能を向上させることを目指し、糖部架橋型人工核酸 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA) / locked nucleic acid (LNA) に 1,3-diaza-2-oxophenoxazine (phenoxazine)、並びに G-clamp を導入したシチジン誘導体となる人工核酸 BNAP (2',4'-BNA with a phenoxazine) と BNAP-AEO (2',4'-BNA with a 9-(aminoethoxy)phenoxazine) を開発した。BNAP 及び BNAP-AEO を導入したオリゴ核酸に関する物性評価を行い、以下のことを明らかにした。

- BNAP 及び BNAP-AEO を導入したオリゴ核酸は、二重鎖の顕著な構造変化を誘起することなく、二重鎖形成能を飛躍的に向上させた。特に BNAP-AEO を導入したオリゴ核酸は相補鎖 RNA との二重鎖形成の際、最大で約一万倍まで結合定数を向上させた。
- 熱力学パラメータの算出結果より、オリゴ核酸内の BNAP-AEO は構成成分となる 2',4'-BNA/LNA 骨格と G-clamp の効果を合理的に獲得する形で、二重鎖形成能の向上にはたらいていた。
- BNAP-AEO 導入型オリゴ核酸は、ミスマッチ塩基対を含む標的 DNA 並びに RNA に対して大幅にミスマッチ塩基識別能を向上させた。
- BNAP-AEO を有するオリゴ核酸は、核酸分解酵素に対する耐性能を大きく向上させることが出来た。

第2章では、BNAP や BNAP-AEO と同様に、塩基部修飾によって二重鎖形成能を向上させることを目指して、核酸糖部フラノース環に三環式骨格を導入したチミジン誘導体となる人工核酸 OBN [3-(1,2-dihydro-2-oxobenzo[b][1,8]naphthyridine)]-2'-deoxy-D-ribofuranose を開発した。OBN を導入したオリゴ核酸に関しての物性評価を行ったところ、以下のような結果が得られた。

- OBN を導入したオリゴ核酸について、OBN を連続導入した配列を設計することで、相補鎖 DNA 並びに RNA との二重鎖形成能を有意に向上させることを明らかにした。また二重鎖を形成する際に大きな二重鎖構造の変化を誘起しないことが分かった。
- OBN 導入型オリゴ核酸は、OBN を連続させた配列を設計することで、標的となる二重鎖 DNA に対しても三重鎖形成能を向上させることができた。
- OBN を含むオリゴ核酸は、核酸分解酵素への耐性能を大幅に向上させていた。

以上より、BNAP-AEO はオリゴ核酸中で高い二重鎖形成能、ミスマッチ塩基識別能、核酸分解酵素耐性能を一举に獲得出来る、新たなシチジン誘導体人工核酸分子となり得ることが示された。また OBN についても三環式チミジン誘導体の基盤分子として、二重鎖、及び三重鎖形成能を向上させることが見出された。また OBN の三環式骨格上ヘリンカー等の塩基部修飾や、BNAP-AEO のような糖部修飾を加えることによって、OBN に BNAP-AEO と同等の機能が獲得できる可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究の遂行に際し、終始懇切なるご指導と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 教授に心から御礼申し上げます。

研究のみならず、学生生活における様々な場面で有益なご指導、ご助言を頂き、  
著者の研究者としての礎を築いてくださいました  
大阪大学大学院薬学研究科 中川 治 特任講師に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なるご助言を頂きました  
山口 卓男 講師、大澤 昂志 助教、  
永田 龍 特任准教授、下條 正仁 特任准教授に厚く御礼申し上げます。

本学位論文の審査をしていただきました  
大阪大学大学院薬学研究科 赤井 周司 教授、有澤 光弘 教授に心から厚く御礼申し上げます。

質量分析スペクトルを測定していただきました  
大阪大学大学院薬学研究科 質量分析室の皆様に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、ご助言をいただきました  
藤井 茜 修士、中辻 悠輔 学士、三上 敦士 学士、  
野崎 夏実 氏、松村 朋紀 氏、山路 凌平 氏 をはじめとした  
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、著者の大学院生活において、常日頃よりご支援いただきました  
家族、友人に心より感謝致します。

2020年3月  
岸本 悠希

## 実験の部 (Experimental)

### General

Dehydrated acetone, acetonitrile, ethanol, dichloromethane, *N,N*-dimethylformamide (DMF), methanol, pyridine, tetrahydrofuran (THF) were used as purchased. 2,6-Lutidine, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), *n*-tributylamine, and tetrachloromethane were used for reaction after distilled from mixture of calcium hydride. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>31</sup>P-NMR were recorded on JEOL JNM-AL300, JNM-ECS400, and JNM-ECA500 spectrometers. Chemical shift values are reported in part per million (ppm) relative to internal tetramethylsilane (0.00 ppm), residual CHD<sub>2</sub>OD (3.31 ppm), CHD<sub>2</sub>CN (1.94 ppm) or CHD<sub>2</sub>S(=O)D<sub>3</sub> (2.50 ppm) for <sup>1</sup>H-NMR. For <sup>13</sup>C-NMR, chemical shift values are reported in ppm relative to chloroform-*d*<sub>1</sub> (77.2 ppm), methanol-*d*<sub>4</sub> (49.0 ppm), acetonitrile-*d*<sub>3</sub> (1.32 ppm) or DMSO-*d*<sub>6</sub> (39.5 ppm). Moreover, chemical shift values are reported in ppm relative to 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.00 ppm) and trifluoroacetic acid (-78.5 ppm) as external standard for <sup>31</sup>P-NMR and <sup>19</sup>F-NMR, respectively. Gene Design nS-8 Oligonucleotides Synthesizer was used as an automated DNA synthesizer (for 0.2 and 1.0 μmol scale). UV melting experiments were carried out on a SHIMADZU UV-1650PC and UV-1800 spectrometers equipped with a *T<sub>m</sub>* analysis accessory quartz cuvettes of 1 cm optical path length. IR spectra were recorded on a JASCO FT/IR-4200 spectrometers. CD spectra were measured using a spectrophotometer, JASCO J-720W. Optical rotations were recorded on a JASCO DIP-370 instrument. MALDI-TOF mass of all new compounds were recorded on JEOL SpiralTOF JMS-S3000. MALDI-TOF mass of all oligonucleotides were recorded on a Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF mass spectrometer. For column chromatography, Fuji Silysia PSQ-100B, PSQ-60B, or FL-100D silica gel were utilized. For high performance liquid chromatography (HPLC), SHIMADZU CBM-20A, DGU-20A<sub>3</sub>, LC-20AT, CTO-20A, SPD-20A, and FRC-10A were utilized. For UV absorbance measurement, SHIMADZU UV-1800 spectrometers was utilized.

All complementary DNA or RNA sequences used for UV melting experiments (containing **ODN 1~9\_C**, **ODN 1~9\_L**, **ODN 1~5\_T**, **ODN 9\_T**, and **ODN 20**) were purchased from GeneDesign, Inc. **ODN 1~8\_P<sup>H</sup>**, and **ODN 1~9\_P<sup>AEO</sup>** were synthesized following reported papers<sup>11,12</sup>.

### 第1章

#### 第2節の実験 (Chapter 1, Section 2)

##### **3',5'-Di-*O*-acetyl-5-bromo-2'-*O,4'-C*-methyleneuridine (2)**

To an ice-cold solution of compound 3,5-di-*O*-Acetyl-2'-*O,4'-C*-methyleneuridine<sup>21</sup> (6.69 g, 19.7 mmol) in anhydrous dimethylformamide (DMF) (190 ml) was added *N*-bromosuccinimide (NBS) (5.20 g, 29.0 mmol), and the resultant mixture was stirred at 0°C for 1.5 h under an Ar atmosphere. Then, the mixture was stirred at room temperature for 1 h. After removal of DMF in vacuo with some heat, the residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>3</sub>Cl / MeOH = 97 / 3) to give compound **2** (6.45 g, 81%) as a white solid; Mp: 122-125 °C. [α]<sub>D</sub><sup>27</sup> +3.5 (*c* 0.4, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 1056, 1094, 1133, 1232, 1370, 1438, 1619, 1697, 1749, 2343, 2359, 2376, 2823, 3084, 3190 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.15 (3 H, s), 2.24 (3 H, s), 3.95, 4.03 (2 H, ABq, *J* = 8.5 Hz), 4.40, 4.46 (2 H, ABq, *J* = 12.8 Hz), 4.68 (1 H, s), 4.86 (1 H, s), 5.68 (1 H, s), 7.99 (1 H, s), 8.56 (1 H, s); <sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, CD<sub>3</sub>S(=O)CD<sub>3</sub>): δ 20.5, 20.6, 58.7, 70.7, 71.2, 77.4, 85.4, 86.7, 95.8, 138.2, 149.3, 159.3, 169.6, 169.8; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>NaBr [M+Na]<sup>+</sup>: 440.9904, Found: 440.9903.

### **5-Bromo-N<sup>4</sup>-(2''-hydroxyphenyl)-2'-O,4'-C-methylenecytidine (4)**

To a solution of compound **2** (850 mg, 2.00 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90 ml) was added triphenyl phosphine (Ph<sub>3</sub>P, 1.23 g, 4.70 mmol), then CCl<sub>4</sub> (20 ml) was added to the mixture. The resultant mixture was refluxed for 2 h under Ar atmosphere. After that, the reaction mixture was cooled to room temperature. Then, 2-aminophenol (533 mg, 4.88 mmol) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (0.60 ml, 4.0 mmol) were added to reaction mixture, and it was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was concentrated to remove the reaction solution under reduced pressure, and the residue was dissolved in CHCl<sub>3</sub> again. This organic solution was washed with 5% citric acid aqueous solution, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (n-hexane / AcOEt = 1 / 1 to 1 / 2) to give compound **3** contaminated with triphenyl phosphineoxide (Ph<sub>3</sub>P=O) (1.93 g). Compound **3** comtaminated with Ph<sub>3</sub>P=O (1.93 g) was dissolved in 7 M NH<sub>3</sub> in MeOH (12 ml) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. It was concentrated to remove MeOH under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (n-hexane / AcOEt = 1 / 3 to 0 / 1) to give compound **4** (693 mg, 81% in 2 steps), as a white solid; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +84.6 (c 0.1, 1,4-dioxane); IR ν<sub>max</sub> (KBr): 1051, 1083, 1117, 1232, 1290, 1460, 1494, 1558, 1618, 1646, 1716, 2956, 3355 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.76, 3.96 (2 H, ABq, *J* = 7.5 Hz), 3.89, 3.92 (2 H, ABq, *J* = 12.8 Hz) 4.06 (1 H, s), 4.36 (1 H, s), 5.59 (1 H, s), 6.85 (1 H, t, *J* = 7.8 Hz), 6.87 (1 H, d, *J* = 8 Hz), 6.99 (1 H, t, *J* = 7 Hz), 8.28 (1 H, s), 8.40 (1 H, d, *J* = 7.5 Hz); <sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 55.5, 68.1, 70.5, 78.7, 87.3, 88.7, 88.7, 113.9, 118.7, 121.2, 124.6, 125.4, 139.9, 147.5, 154.7, 157.2; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>NaBr [M+Na]<sup>+</sup>: 448.0115, Found: 448.0113.

### **3-(2'-O,4'-C-Methylene-β-D-ribofuranosyl)-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (5)**

To a solution of compound **4** (1.20 g, 2.80 mmol) in EtOH (300 ml) was added DBU (0.46 ml, 3.1 mmol), and the resultant mixture was refluxed for 30 h. The reaction mixture was concentrated to remove the reaction solution under reduced pressure, and the residue was purified by trituration with MeOH to give compound **5**. Furthermore, after this trituration, the residue containing compound **5** was purified by silica gel column chromatography (AcOEt / MeOH = 1 / 0 to 9 / 1) to obtain another crop of compound **5** (569 mg, 59%) as an orange solid; [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> -76.7 (c 0.1, EtOH); IR ν<sub>max</sub> (KBr): 1049, 1085, 1231, 1260, 1337, 1421, 1472, 1508, 1577, 1636, 1677, 2328, 2338, 2362, 2961, 3299, 3392 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>S(=O)CD<sub>3</sub>): δ 3.53, 3.73 (2 H, ABq, *J* = 7.8 Hz), 3.66 (2 H, s), 3.86 (1 H, s), 4.04 (1 H, s), 5.20 (1 H, s), 5.27 (1 H, s), 5.61 (1 H, s), 6.71-6.82 (4 H, m), 7.39 (1 H, s), 10.5 (1 H, s); <sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, CD<sub>3</sub>S(=O)CD<sub>3</sub>): δ 55.7, 68.3, 70.9, 78.8, 86.6, 88.8, 115.2, 116.6, 121.4, 123.7, 123.8, 126.9, 142.2, 152.6, 154.0; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 346.1034, Found: 346.1027.

### **3-(5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O,4'-C-methylene-β-D-ribofuranosyl)-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (6)**

To a solution of silver trifluoromethanesulfonate (AgOTf) (364 mg, 1.42 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) was added 4,4'-dimethoxy chloride (DMTrCl) (515 mg, 1.52 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), and the resultant mixture was stirred for 1 h at room temperature under Ar atmosphere to give DMTrOTf in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Then, to the solution of compound **5** (99 mg, 0.28 mmol) in anhydrous 2,6-lutidine (8 mL) was added DMTrOTf solution of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.8 ml) at 0 °C, and the mixture was stirred for 3 h. After addition of aqueous NaHCO<sub>3</sub> at 0 °C, the mixture was extracted with AcOEt.

The organic extracts were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and aqueous solution of copper (II) sulfate (3.0 g in 20 ml H<sub>2</sub>O), and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0.5% triethylamine in n-hexane / AcOEt = 1 / 9 to 0 / 1) to give compound **6** (105 mg, 58%) as a yellow amorphous solid; [α]<sub>D</sub><sup>27</sup> -81.9 (*c* 0.3, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 1048, 1082, 1178, 1254, 1282, 1331, 1389, 1419, 1472, 1499, 1576, 1607, 1640, 1677, 2334, 2357, 2838, 2852, 3086, 3413 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.44 (2 H, ABq, *J* = 4.5 Hz), 3.73, 3.88 (2 H, ABq, *J* = 7.5 Hz), 3.78 (3 H, s), 3.79 (3 H, s), 4.40 (1 H, s), 4.78 (1 H, s), 5.63 (1 H, s), 6.60-6.70 (3 H, m), 6.87 (4 H, dd, *J* = 8.8, 3.2 Hz), 7.20 (1 H, t, *J* = 7.2 Hz), 7.33 (2 H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.37 (4 H, dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz), 7.47 (2 H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.73 (1 H, s), 11.2 (1 H, s); <sup>13</sup>C NMR (125.8 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 55.2, 58.6, 70.3, 72.1, 79.9, 86.5, 87.2, 87.8, 113.3, 114.7, 118.0, 120.2, 123.3, 124.2, 126.4, 126.8, 127.5, 127.9, 128.0, 130.1, 130.2, 135.2, 135.4, 142.5, 144.9, 153.3, 155.3, 158.5, 158.5; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 670.2160, Found: 670.2162.

### **3-(3'-*O*-β-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-*O,4'*-C-methylene-β-D-ribofuranosyl)-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (7)**

To a solution of compound **6** (107 mg, 0.16 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.1 mL) were added *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.085 mL, 0.48 mmol) and *N,N*-diisopropylamino-2-cyanoethylphosphino chloridite (0.080 mL, 0.36 mmol) at 0 °C and the resultant mixture was stirred for 3 h at room temperature under an Ar atmosphere. After addition of saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution at 0 °C, the mixture was extracted with AcOEt. The organic extracts were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0.5% triethylamine in n-hexane / AcOEt = 1 / 1 to 3 / 7) to give compound **7** (100 mg, 74%) as a yellow amorphous solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.99-1.29 (12 H, m), 2.38 (13/20 H, t, *J* = 6.5 Hz), 2.55 (7/20 H, t, *J* = 6.3 Hz), 3.35-3.85 (14 H, m), 4.28 (7/20 H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.39 (13/20 H, d, *J* = 15 Hz), 4.65 (13/20 H, s), 4.72(7/10 H, s), 5.72 (1 H, s), 6.55-6.60 (1 H, m), 6.80-6.92 (6 H, m), 7.26-7.41 (7 H, m), 7.47-7.65 (4 H, m); <sup>31</sup>P NMR (202.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149.7, 149.8; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>NaP [M+Na]<sup>+</sup>: 870.3238, Found: 870.3240.

### **Synthesis and identification of the BNAP-incorporated oligonucleotides**

Synthesis of the BNAP-incorporated oligonucleotides was performed on an automated DNA synthesizer (GeneDesign nS-8 Oligonucleotides Synthesizer) Nucleic Acid Synthesis System at 0.2 or 1.0 μmole scale. Then, 5-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1H-tetrazole was used for all coupling steps as the activator. The coupling time of standard phosphoramidite coupling protocol was increased from 25 s to 7 min. The BNAP phosphoramidite **7** was prepared with 0.10 M in ACN solution, and other unmodified phosphoramidites were also prepared with 0.10 M in ACN and their coupling times were 25 s (as a standard protocol). The oligonucleotides synthesis was performed on DMTr-on mode. Solid (CPG) - supported oligonucleotides were cleavaged and their protected groups of each nucleobase and phosphodiester linkages were removed with mixed solution; aqueous methylamine (40%) and aqueous ammonia (28%) solution (the ratio was 1:1 for v/v) at 65 °C for 10 min. The crude oligonucleotides bearing a DMTr group were detritylated and purified with a Sep-Pak® Plus C18 Cartridge and Sep-Pak® Plus C18 Environmental Cartridge (Waters); washed with 10% ACN aqueous solution, detritylated with 0.5% aqueous trifluoro acetic acid solution, and eluted with 35% aqueous MeOH solution, followed by reverse-phase HPLC on a

Waters XBridge<sup>TM</sup> OST C18 2.5  $\mu\text{m}$  (10  $\times$  50 mm) using 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH = 7.0) as buffer A, and 50% ACN in 0.1 M TEAA buffer (pH = 7.0) as buffer B. The composite confirmation of purified oligonucleotides was performed by reverse-phase HPLC on a Waters XBridge<sup>TM</sup> OST C18 2.5  $\mu\text{m}$  (4.6  $\times$  50 mm) and by MALDI-TOF mass spectrometry. The overall yields were shown in **Table 1** calculated from the UV absorbance at 260 nm. Measurement method and conditions in reverse-phase HPLC are shown below.

General conditions;

For preparative chromatography: Waters XBridge<sup>TM</sup> OST C18 2.5  $\mu\text{m}$  (10  $\times$  50 mm)

For analytical chromatography: Waters XBridge<sup>TM</sup> OST C18 2.5  $\mu\text{m}$  (4.6  $\times$  50 mm)

Flow rate for preparative conditions: 4.0 mL/min

Flow rate for analytical conditions: 1.0 mL/min

Wavelength of UV for oligonucleotides detections: 260 nm

Temperature of column oven: 50 °C

Gradient of ACN in both preparative and analytical conditions (30 min) and Retention time (Rt) (min)

4-8%; **ODN 5\_B<sup>H</sup>** (Rt : 17.3 min)

6-9%; **ODN 2\_B<sup>H</sup>** (Rt : 9.7 min)

6-12%; **ODN 1\_B<sup>H</sup>** (Rt : 10.4 min), **ODN 3\_B<sup>H</sup>** (Rt : 12.5 min), **ODN 4\_B<sup>H</sup>** (Rt : 7.0 min), **ODN 6\_B<sup>H</sup>** (Rt : 13.2 min), **ODN 7\_B<sup>H</sup>** (Rt : 11.4 min), **ODN 8\_B<sup>H</sup>** (Rt : 13.6 min)

第3節の実験 (Section 3)

### **3',5'-Di-O-acetyl-5-bromo-N<sup>4</sup>-(2'',6''-dihydroxyphenyl)- 2'-O,4'-C-methylenecytidine (14)**

To a solution of compound **2** (3.40 g, 8.11 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90 ml) was added triphenyl phosphine (Ph<sub>3</sub>P, 4.30 g, 16.4 mmol), then CCl<sub>4</sub> (80 ml) was added to it. The resultant mixture was refluxed for 2 h under Ar atmosphere. After that, the reaction mixture was cooled to room temperature. Then, 2-aminoresorcinol (2.08 g, 16.7 mmol) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (2.4 ml, 16 mmol) were added to reaction mixture, and the mixture was stirred at room temperature for 6 h. The reaction mixture was concentrated to remove the reaction solution under reduced pressure, and the residue was dissolved in CHCl<sub>3</sub> again. This organic solution was washed with 5% citric acid aqueous solution, dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 97 / 3 to 95 / 5) to give compound **14** as a yellow amorphous solid (3.10 g, 73%);  $[\alpha]_D^{25} +14.4$  (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>CN); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 1025, 1057, 1092, 1129, 1232, 1292, 1346, 1372, 1422, 1447, 1500, 1586, 1650, 1758, 1853, 2359, 2569, 2763, 2895, 2955, 3020, 3088, 3299 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  2.06 (3 H, s), 2.14 (3 H, s), 3.93, 3.99 (2 H, ABq, *J* = 8.0 Hz), 4.37, 4.47 (2 H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.57 (1 H, s), 4.94 (1 H, s), 5.59 (1 H, s), 6.48 (2 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.97 (1 H, t, *J* = 8.0 Hz), 8.01 (1 H, s), 8.05 (1 H, s), 9.28 (1 H, s); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  20.9, 21.0, 59.7, 71.7, 72.5, 78.5, 86.8, 88.6, 89.2, 109.7, 115.5, 118.3, 128.4, 141.8, 151.1, 153.2, 158.3, 170.7, 171.0; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Br [M+H]<sup>+</sup>: 526.0456, Found: 526.0450.

**3',5'-Di-O-acetyl-N<sup>4</sup>-{2''-(2-N-benzylcarbamyl-ethoxy)-6''-hydroxyphenyl}-5-bromo-2'-O,4'-C-methylenecytidine (15)**

To a solution of compound **14** (3.10 g, 5.89 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF (130/65 ml) were added triphenyl phosphine (Ph<sub>3</sub>P, 1.72 g, 6.54 mmol) and benzyl-*N*-(2-hydroxyethyl)carbamate (1.28 g, 6.57 mmol), then diethyl azodicarboxylate (DEAD, 3.0 ml, 16 mmol) was added slowly. The resultant mixture was refluxed for 5 h under Ar atmosphere. After addition of saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> at 0°C, the mixture was extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic extracts were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and H<sub>2</sub>O, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub> / AcOEt = 8 / 2 to 6 / 4). Afterwards, obtained mixture containing compound **15** was purified by silica gel column chromatography again (CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 95 / 5 to 93 / 7) to give compound **15** (3.94 g, 95%) as a yellow amorphous solid; [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> +5.5 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 1058, 1094, 1129, 1238, 1281, 1331, 1369, 1391, 1419, 1508, 1570, 1622, 1677, 1716, 1749, 2359, 2570, 2765, 2890, 2954, 3011, 3086, 3329 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.12 (3 H, s), 2.20 (3 H, s), 3.66-3.70 (2 H, m), 3.96, 4.01 (2 H, ABq, *J* = 8.0 Hz), 4.10-4.16 (2 H, m), 4.39, 4.46 (2 H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.73 (1 H, s), 4.85 (1 H, s), 5.12 (2 H, s), 5.48-5.51 (1 H, m), 5.70 (1 H, s), 6.40 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.67 (1 H, dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz), 7.00 (1 H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.30-7.35 (5 H, m), 7.92 (1 H, s), 8.09 (1 H, s), 11.05 (1 H, s); <sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 20.9, 20.9, 40.8, 58.5, 67.0, 67.7, 70.6, 71.7, 77.4, 77.6, 85.8, 85.8, 87.8, 89.0, 102.6, 114.2, 115.6, 127.3, 128.2, 128.3, 128.6, 136.4, 140.1, 150.1, 150.2, 151.8, 156.3, 156.5, 169.7, 170.1; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>NaBr [M+Na]<sup>+</sup>: 725.1065, Found: 725.1085.

**3-(2'-O,4'-C-Methylene-β-D-ribofuranosyl)-9-(2-N-benzylcarbamyl-ethoxy)-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (17)**

To a compound **15** (3.50 g, 4.98 mmol) was added 7 N NH<sub>3</sub> in MeOH (30 mL). The resultant mixture was stirred for 3 h at room temperature under Ar atmosphere. After that, the reaction mixture was concentrated to remove the reaction solution under reduced pressure, and the residue was utilized for next reaction directly (3.00 g). To a solution of compound **16** (3.00 g) in EtOH (300 ml) was added 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (0.80 ml, 5.4 mmol), and the mixture was refluxed for 5 h. The reaction mixture was concentrated to remove the reaction solution under reduced pressure, and the residue was dissolved in CHCl<sub>3</sub> again. This organic solution was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub> / MeOH = 97/ 3 to 90 / 10) to give compound **17** (1.53 g, 57 % in 2 steps) as an orange amorphous solid; Mp: Decomposition or carbonization near 210-220 °C. [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> -7.3 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 1015, 1055, 1075, 1098, 1147, 1233, 1254, 1280, 1333, 1363, 1382, 1418, 1476, 1510, 1559, 1611, 1671, 1699, 2359, 2884, 2947, 3091, 3275 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.48-3.59 (2 H, m), 3.75, 3.95 (2 H, ABq, *J* = 6.0 Hz), 3.90 (2 H, s), 4.02 (2 H, t, *J* = 4.0 Hz), 4.08 (1 H, s), 4.31 (1 H, s), 5.10, 5.14 (2 H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 5.49 (1 H, s), 6.38 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.54 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.79 (1 H, t, *J* = 10.0 Hz), 7.23-7.33 (5 H, m), 7.51 (1 H, s); <sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 41.2, 57.6, 67.5, 69.6, 70.2, 72.4, 80.7, 88.7, 90.4, 108.2, 109.3, 116.8, 123.1, 124.9, 128.6, 128.9, 129.4, 129.6, 138.4, 144.3, 147.8, 155.8, 156.2, 159.1; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 561.1592, Found: 561.1595.

### **3-(2'-O,4'-C-Methylene- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-9-(2-aminoethoxy)-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (18)**

To a solution of compound **17** (45 mg, 0.084 mmol) in MeOH (10 ml) were added Pd(OH)<sub>2</sub>/C (20 mg) and cyclohexene (8 ml), and the mixture was refluxed for 3 h. After the reaction mixture was cooled to room temperature, the reaction mixture was filtrated to remove Pd(OH)<sub>2</sub>/C. The residue was concentrated under reduced pressure to give compound **18** (31.6 mg, 93 %) as a yellow solid; Mp: Decomposition or carbonization near 230-250 °C.  $[\alpha]_D^{27}$  -3.7 (*c* 1.0, DMSO); IR  $\nu_{max}$  (KBr): 1009, 1052, 1075, 1094, 1120, 1130, 1202, 1237, 1261, 1282, 1316, 1335, 1368, 1411, 1435, 1475, 1512, 1562, 1608, 1634, 1666, 2343, 2954, 3302 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  2.85-2.88 (2 H, m), 3.61, 3.80 (2 H, ABq, *J* = 6.0 Hz), 3.73 (2 H, s), 3.87-3.89 (2/10 H, m), 3.91 (8/10 H, s), 3.92 (2/10 H, s), 4.03-4.06 (8/10 H, m), 4.11 (8/10 H, s), 4.12 (2/10 H, s), 5.32 (8/10 H, s), 5.35 (2/10 H, s), 6.38 (8/10 H, d, *J* = 4.0 Hz), 6.45 (2/10 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.56 (8/10 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.61 (2/10 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.70 (8/10 H, t, *J* = 8.0 Hz), 6.80 (2/10 H, t, *J* = 6.0 Hz), 7.36 (8/10 H, s), 7.47 (2/10 H, s); <sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  51.1, 55.7, 68.3, 70.9, 73.6, 78.8, 86.6, 88.8, 108.1, 109.3, 117.3, 123.1, 123.2, 126.7, 142.6, 146.9, 152.5, 153.4; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 427.1224, Found: 427.1226.

### **3-(5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O,4'-C-methylene- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-9-(2-trifluoroacetamidoethoxy)-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (20)**

To a solution of compound **18** (64 mg, 1.6 mmol) in anhydrous pyridine (60 ml) was added trifluoroacetic acid anhydride (TFAA, 12 ml, 3.8 mmol) at 0 °C. The resultant mixture was stirred for 2 h under Ar atmosphere at room temperature. After that, the reaction mixture was concentrated with toluene to remove pyridine and to give crude mixture of compound **19** (702 mg). To a solution of silver trifluoromethanesulfonate (AgOTf) (936 mg, 3.64 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) was added 4,4'-dimethoxy chloride (DMTrCl) (1.25 g, 3.68 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), and the resultant mixture was stirred for 1 h at room temperature under Ar atmosphere to give DMTrOTf in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Then, to a solution of crude mixture of **19** (702 mg) in anhydrous 2,6-lutidine (35 mL) was added DMTrOTf solution of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (17 ml) at 0 °C, and the mixture was stirred for 2 h. After addition of H<sub>2</sub>O at 0°C, the mixture was extracted with AcOEt. The organic extracts were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and copper (II) sulfate aqueous solution (3.0 g in 20 ml H<sub>2</sub>O) to remove 2,6-lutidine, and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0.5% triethylamine in n-hexane / AcOEt = 2 / 8 to 0 / 1) to give compound **20** (597 mg, 47% in 2 steps) as a yellow amorphous solid;  $[\alpha]_D^{25}$  -8.1 (*c* 1.0, CH<sub>3</sub>CN); IR  $\nu_{max}$  (KBr): 1017, 1057, 1081, 1104, 1155, 1190, 1228, 1261, 1287, 1329, 1363, 1383, 1418, 1446, 1480, 1517, 1566, 1612, 1676, 1726, 1969, 2048, 2177, 2300, 2359, 2428, 2548, 2601, 2837, 2949, 3091, 3275 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  3.39 (2 H, s), 3.66, 3.77 (2 H, ABq, *J* = 8.0 Hz), 3.68-3.72 (2 H, m) 3.74 (6 H, s), 4.03-4.11 (2 H, m), 4.18 (1 H, d, *J* = 4.0 Hz), 4.30 (1 H, d, *J* = 4.0 Hz), 4.39 (1 H, s), 5.40 (1 H, s), 6.21 (1 H, dd, *J* = 8.3, 0.8 Hz), 6.49 (1 H, dd, *J* = 8.4, 0.7 Hz), 6.75 (1 H, t, *J* = 8.0 Hz), 6.88 (4 H, m), 7.23-7.27 (1 H, m), 7.31-7.38 (6 H, m), 7.47-7.50 (3H, m), 8.00 (1 H, s), 8.24 (1 H, t, *J* = 6.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  39.9, 55.9, 59.1, 68.1, 70.4, 72.4, 80.0, 87.2, 87.2, 88.4, 88.6, 88.6, 107.6, 109.1, 114.1, 115.7, 116.4, 123.1, 124.4, 127.9, 128.7, 129.0, 131.0, 136.6, 136.6, 136.6, 143.6, 143.6, 145.8, 146.9, 154.8, 155.0, 158.0, 158.4, 159.7; <sup>19</sup>F NMR (376.2 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  -77.2; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>F<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 825.2354, Found: 825.2364.

**3-(3'-*O*-β-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2'-*O,4'*-C-methylene-β-D-ribofuranosyl)-9-(2-trifluoroacetamidoethoxy)-1,3-diaza-2-oxophenoxazine (21)**

To a solution of compound **20** (97 mg, 0.12 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) were added *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.042 mL, 0.24 mmol) and *N,N*-diisopropylamino-2-cyanoethylphosphino chloridite (0.032 mL, 0.14 mmol) at 0 °C and the resultant mixture was stirred for 2 h at room temperature under an Ar atmosphere. After addition of H<sub>2</sub>O at 0°C, the mixture was extracted with AcOEt / n-hexane. The organic extracts were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (0.5% triethylamine in n-hexane / AcOEt = 3 / 7 to 2 / 8) to give compound **21** (93 mg, 77%) as a yellow amorphous solid; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.97-1.29 (12 H, m), 2.38 (7/8 H, t, *J* = 6.0 Hz), 2.55 (1/8 H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.36 (8/10 H, d, *J* = 12.0 Hz), 3.40 (2/10 H, d, *J* = 12.0 Hz), 3.46-3.57 (5 H, m), 3.76-3.82 (10 H, m), 4.13-4.17 (2 H, m), 4.25 (2/10 H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.33 (8/10 H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.60 (17/20 H, s), 4.64 (3/20 H, s), 5.59 (3/20 H, s), 5.61 (17/20 H, s), 6.28 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.45 (1 H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.79 (1 H, t, *J* = 12.0 Hz), 6.83-6.87 (4 H, m), 7.22 (1 H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.31 (2 H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.36 (4 H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.47 (2 H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.54 (1 H, s), 8.29 (1 H, s), 8.40 (1 H, s); <sup>19</sup>F NMR (376.2 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -76.8, -76.7; <sup>31</sup>P NMR (161.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149.1, 149.4; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) Calcd. for C<sub>50</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>F<sub>3</sub>NaP [M+Na]<sup>+</sup>: 1025.3433, Found: 1025.3440.

**Synthesis and identification of the BNAP-AEO-incorporated oligonucleotides**

Synthesis of the BNAP-AEO-incorporated oligonucleotides was performed on an automated DNA synthesizer (GeneDesign nS-8 Oligonucleotides Synthesizer) Nucleic Acid Synthesis System at 0.2 μmole scale. Then, 5-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1H-tetrazole were used for all coupling steps as the activator. The coupling time of standard phosphoramidite coupling protocol was increased from 25 s - 12 min. The BNAP-AEO phosphoramidite **21** was prepared with 0.10 M in ACN/THF (3:1, v/v), and other unmodified phosphoramidites were also prepared with 0.10 M in ACN solution and their coupling times were 25 s (as a standard protocol). The oligonucleotides synthesis was performed on DMTr-on mode. Solid (CPG) - supported oligonucleotides were cleaved and their protected groups of each nucleobase were removed with 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> of MeOH solution at rt for 24 h. The crude oligonucleotides bearing a DMTr group were detritylated and purified with a Sep-Pak® Plus C18 Cartridge and Sep-Pak® Plus C18 Environmental Cartridge (Waters); washed with 10% ACN aqueous solution, detritylated with 0.5% aqueous trifluoro acetic acid solution, and eluted with 35% aqueous MeOH solution, followed by reverse-phase HPLC on a Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (10 × 50 mm) using 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH = 7.0) as buffer A, and 100% ACN as buffer B. The compositive confirmation of purified oligonucleotides was performed by reverse-phase HPLC on a Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6 × 50 mm) and by MALDI-TOF-MS. The overall yields were shown in **Table 2** calculated from the UV absorbance at 260 nm.

General conditions;

For preparative chromatography: Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (10 × 50 mm)

For analytical chromatography: Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6 × 50 mm)

Flow rate for preparative conditions: 4.0 mL/min

Flow rate for analytical conditions: 1.0 mL/min

Wavelength of UV for oligonucleotides detections: 260 nm

Temperature of column oven: 50 °C

Gradient of ACN in both preparative and analytical conditions (30 min) and Retention time (Rt) (min)

5-9%; **ODN 8\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 12.1 min)

5-10%; **ODN 5\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 9.9 min), **ODN 6\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 17.5 min), **ODN 7\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 20.0 min)

6-12%; **ODN 1\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 14.4 min), **ODN 2\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 9.5 min), **ODN 3\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 11.8 min), **ODN 4\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 8.8 min), **ODN 9\_B<sup>AEO</sup>** (Rt : 19.8 min)

#### 第4節の実験 (Section 4)

##### Thermal denaturation experiments

The UV melting profiles were recorded in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl to give final concentration of each oligonucleotide in 2 μM. The samples were annealed by heating at 100 °C followed by slow cooling to room temperature. The melting profile was recorded at 260 nm from 5 to 90 °C at a scan rate of 0.5 °C /min. The  $T_m$  values were calculated as the temperature of the half dissociation of the formed duplex based on the first derivative of the melting curve.

#### 第5節の実験 (Section 5)

##### CD spectrum measurement

These spectra were recorded at 10 °C in the quartz cuvette of 1cm optical path length. The samples were prepared in the same manner as described in the UV melting experiments. The molar ellipticity was calculated from the equation  $[\theta] = \theta/c l$ , where  $\theta$  indicates the relative intensity,  $c$  is the sample concentration, and  $l$  means the cell path length in centimeters.

#### 第6節の実験 (Section 6)

##### Thermodynamic analysis

The UV melting profiles for thermodynamic analysis were recorded in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl to give final concentration of each oligonucleotide in 0.45, 0.74, 1.22, 2.00 μM for 130 μL, and 3.26 and 6.80 μM for 50 μL. These samples were annealed by heating at 100 °C followed by slow cooling to room temperature. The melting profile was recorded as same method as thermal denaturing experiments. van't Hoff plots were recorded by  $T_m$  values in each concentration, and each value of  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  and  $\Delta G$  were calculated according to equation below.

$$1/T_m = (R/\Delta H^\circ) \cdot \ln(C_t/4) + \Delta S^\circ / \Delta H^\circ$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

In these equations, R indicates gas constant, and  $C_t$  indicates total concentration of oligonucleotides.

The results of van't Hoff plot and  $T_m$  measurements were shown below.

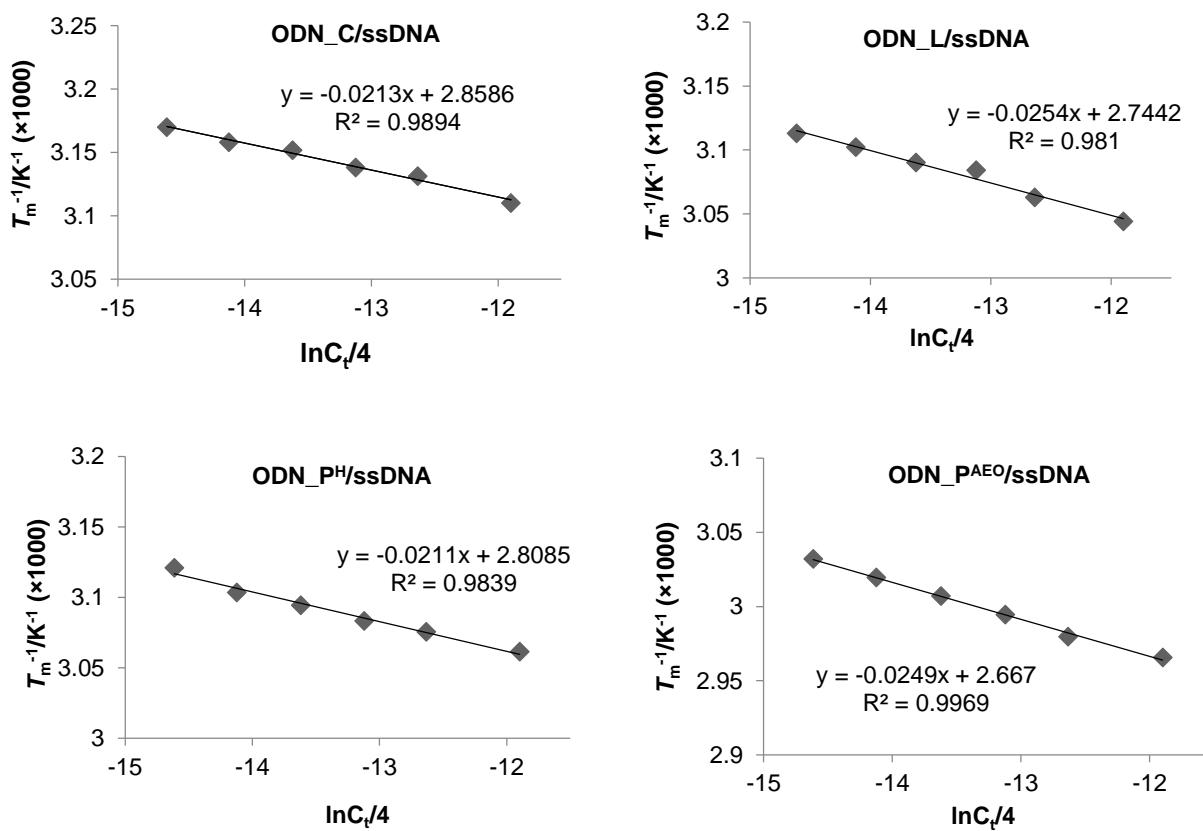
**Table S1.**  $T_m$  values of ODN\_X containing each nucleotide with complementary DNA in ordered concentration.

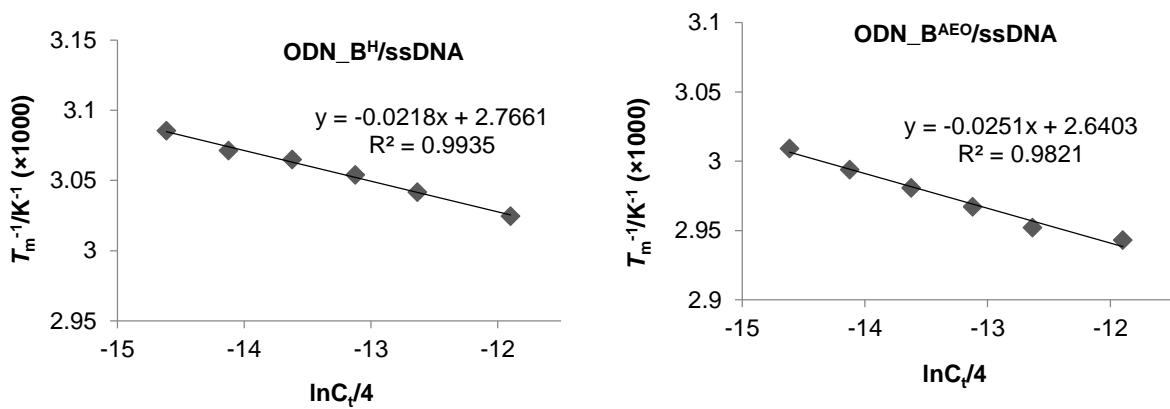
Test ODN = 5'-d (GCGTCXCTTGCT) -3' (ODN\_X)  
 Target DNA = 3'-d (CGCA~~G~~GGAACGA) -5'

Modification <b>X</b>	Concentration of oligonucleotides ( $\mu\text{M}$ )					
	0.45	0.74	1.22	2.00	3.26	6.80
<b>C</b>	42.3 °C	43.5 °C	44.1 °C	45.5 °C	46.2 °C	48.4 °C
<b>L</b>	48.1 °C	49.2 °C	50.5 °C	51.1 °C	53.3 °C	55.4 °C
<b>P<sup>H</sup></b>	47.3 °C	49.1 °C	50.0 °C	51.2 °C	52.0 °C	53.5 °C
<b>B<sup>H</sup></b>	51.0 °C	52.5 °C	53.1 °C	54.3 °C	55.6 °C	57.5 °C
<b>P<sup>AEO</sup></b>	56.7 °C	58.0 °C	59.4 °C	60.8 °C	62.5 °C	64.1 °C
<b>B<sup>AEO</sup></b>	59.2 °C	60.8 °C	62.3 °C	63.9 °C	65.6 °C	66.6 °C

Conditions: 2 mM phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM NaCl aq., at a scan rate of 0.5 °C/min at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 0.45-6.80  $\mu\text{M}$  each oligonucleotide. The  $T_m$  values reflect the average of at least three measurements. The error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5$  °C.

**X = C:** 2'-deoxycytidine; **L:** 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>:** BNAP; **P<sup>AEO</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>** = BNAP-AEO.





**Figure S1.** Van't Hoff plot of duplex of **ODN\_X** containing each nucleoside and complementary single-stranded (ss) DNA.

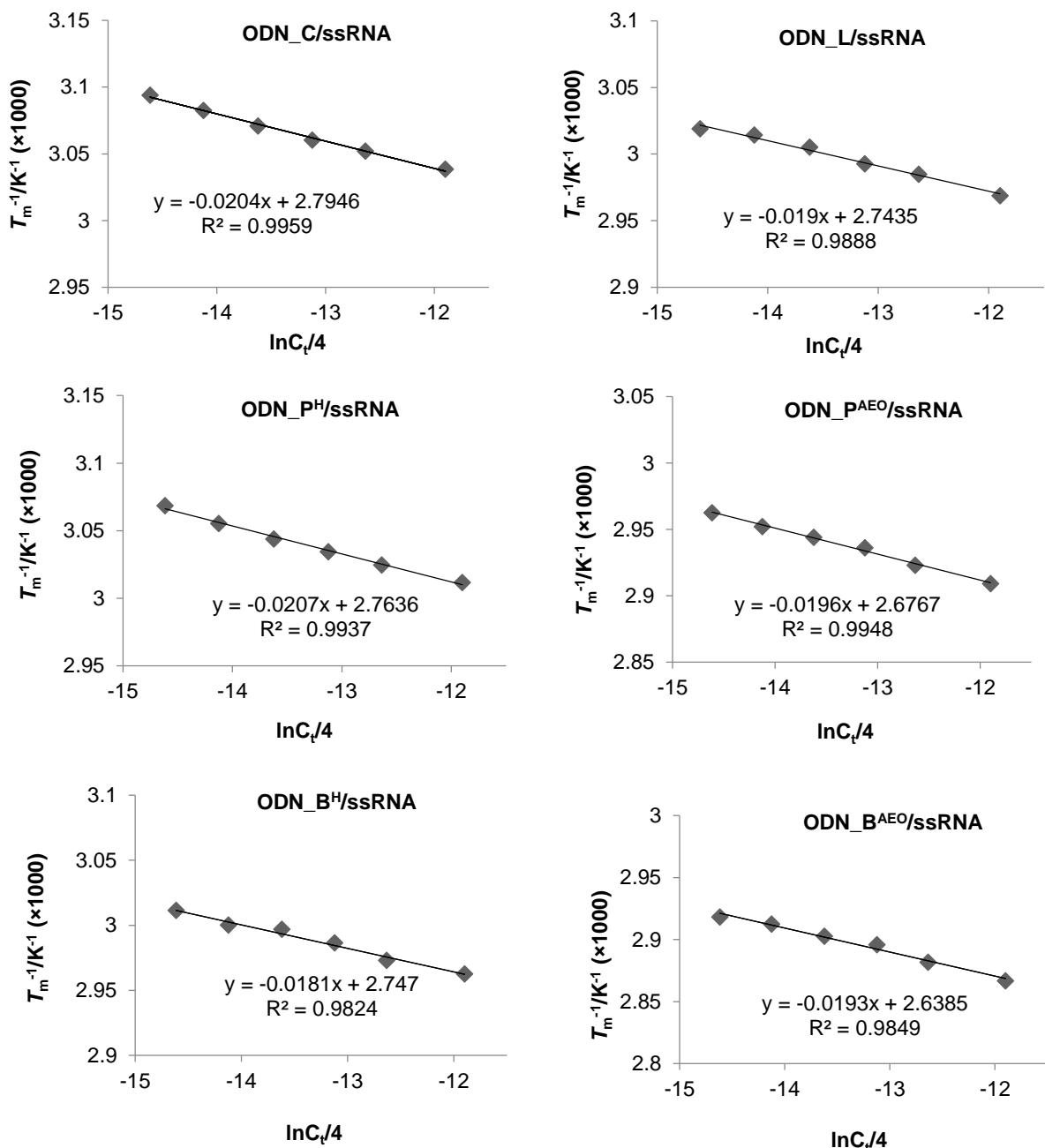
**Table S2.**  $T_m$  values of **ODN\_X** containing each nucleotide with complementary RNA in ordered concentration.

Test ODN = 5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3' (**ODN\_X**)  
Target RNA = 3'-r(CGCA~~G~~GGAACGA)-5'

Modification	Concentration of oligonucleotides ( $\mu M$ )						
	X	0.45	0.74	1.22	2.00	3.26	6.80
<b>C</b>	50.1 °C	51.3 °C	52.5 °C	54.0 °C	54.5 °C	56.0 °C	
<b>L</b>	58.1 °C	58.6 °C	59.6 °C	61.0 °C	61.9 °C	63.7 °C	
<b>P<sup>H</sup></b>	52.7 °C	54.1 °C	55.4 °C	56.4 °C	57.5 °C	58.9 °C	
<b>B<sup>H</sup></b>	58.9 °C	60.2 °C	60.5 °C	61.7 °C	63.2 °C	64.4 °C	
<b>P<sup>AEO</sup></b>	64.4 °C	65.6 °C	66.5 °C	67.4 °C	69.0 °C	70.6 °C	
<b>B<sup>AEO</sup></b>	69.5 °C	70.2 °C	71.3 °C	72.1 °C	73.9 °C	75.7 °C	

Conditions: 2 mM phosphate buffer (pH 7.2), 20 mM NaCl aq., at a scan rate of 0.5 °C/min at 260 nm. The concentration of oligonucleotides used was 0.45-6.80  $\mu M$  each oligonucleotide. The  $T_m$  values reflect the average of at least three measurements. The error in  $T_m$  values was  $\pm 0.5$  °C.

**X = C:** 2'-deoxycytidine; **L:** 2',4'-BNA/LNA with 5-methylcytosine; **P<sup>H</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with phenoxazine; **B<sup>H</sup>:** BNAP; **P<sup>AEO</sup>:** 2'-deoxyribonucleotide with G-clamp; **B<sup>AEO</sup>** = BNAP-AEO.



**Figure S2.** Van't Hoff plot of duplex of **ODN\_X** containing each nucleoside and complementary single-stranded (ss) RNA.

## 第7節の実験 (Section 7)

### Assessment of enzymatic stability of BNAP-AEO-incorporated oligonucleotides

After sample solutions (300 µL) containing **ODN 9\_C**, **ODN 9\_L**, **ODN 11**, **ODN 12**, **ODN 9\_P<sup>AEO</sup>**, and **ODN 9\_B<sup>AEO</sup>** (final concentration of each ODN was 2 µM) were prepared with MgCl<sub>2</sub> aq. (final concentration was 10 µM), Tris-HCl buffer (final concentration was 50 µM), and 3'-exonuclease (CAVP; 0.13 µg/mL), these solutions were stood at 37 °C. Since the reaction was started, solutions of 50 µL from each same were picked up and 3'-exonuclease was inactivated to heat under 90 °C for 5 min at each time points (10, 30, 60 min). The remained amounts of each intact (full length) oligonucleotides was analyzed and quantified by reverse-phase HPLC.

Moblie phase: 0.1 M TEAA buffer (pH 7.0) as buffer A

100% ACN as buffer B

For analytical chromatography: Waters XBridge<sup>TM</sup> OST C18 2.5 µm (4.6 × 50 mm)

Flow rate for analytical conditions: 1.0 mL/min

Wavelength of UV for oligonucleotides detections: 260 nm

Temperature of column oven: 50 °C

#### **ODN 9\_C, ODN 9\_L**

Gradient of ACN in analytical conditions: 4-12% (20 min)

#### **ODN 11, 12**

Gradient of ACN in analytical conditions: 5-12% (20 min)

#### **ODN 9\_P<sup>AEO</sup>, ODN 9\_B<sup>AEO</sup>**

Gradient of ACN in analytical conditions: 6-12% (20 min)

## 第2章

### 第1節の実験 (Section 1)

#### Snapshots of molecular dynamics

In **Figure 17**, calculation of molecular dynamics was performed by MacroModel software [Maestro 11.2, Schrödinger, LLC]; OPLS3 force field (in water at 300 K for 30 ns, Time steps: 1.5 fs, Equilibration time: 1.0 ps, Simulation time 2000 ps)

### 第2節の実験 (Section 2)

#### 1,2-Dihydro-2-oxobenzo[*b*][1,8]naphthyridine-3-carboxylic acid (**24**)

To a suspended solution of ethyl-1,2-dihydro-2-oxobenzo[*b*][1,8]naphthyridine-3-carboxylate (**23**) (2.69 g, 10.0 mmol) in THF/H<sub>2</sub>O (15 ml each) was added lithium hydroxide monohydrate (2.02 g, 48.1 mmol), and the resultant mixture was stirred at 70 °C for 2 h. Afterwards, this mixture was cooled to room temperature. After addition of saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution following aqueous HCl (1N, 40 mL) solution to neutralize pH, the yellow precipitate was filtrated under reduced pressure. The precipitate was wash well by H<sub>2</sub>O and THF, then dried up *in vacuo* to afford compound **24** as a yellow solid (2.05 g, 8.53 mmol, 85%); Mp: >300 °C.  $[\alpha]_D^{24} +1.78$  (*c* 0.1, DMSO); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3161, 1662, 1624, 1564, 1506, 1479, 1400, 1313, 1279, 1246, 1223, 1184, 967 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.24 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 7.57 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 7.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.84 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.29 (1H, s), 8.42 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 115.5, 125.1, 127.1, 129.0, 132.1, 139.0, 142.0, 148.1, 149.0, 165.1, 165.3; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 241.0608, Found: 241.0608.

#### 3-Bromo-1,2-dihydro-2-oxobenzo[*b*][1,8]naphthyridine (**25**)

Br<sub>2</sub> (0.035 mL, 6.8 mmol) was mixed in DMF/pyridine (5 mL/2.5mL) at 0 °C in advance, which was prepared as a Br<sub>2</sub> solution for the reaction. To the Br<sub>2</sub> solution was added compound **24**, and the reaction mixture was stirred at 105 °C for 1 h under Ar atmosphere. After the resultant mixture was cooled to room temperature, which was poured into crushed ice. Then, brown precipitate was filtrated under reduced pressure, and wash well by MeOH following by H<sub>2</sub>O. The filtrate at the time of a wash by MeOH was concentrated to obtain brown solid, and the brown solid was washed well by MeOH following by H<sub>2</sub>O again. These procedure was needed several times to afford compound **25** as a brown solid (136 mg, 0.494 mmol, 81 %); Mp: Decomposition or carbonization near 200 °C.  $[\alpha]_D^{24} -16.6$  (*c* 1.0, DMSO); IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 3617, 3518, 3114, 3061, 1964, 1672, 1614, 1588, 1504, 1471, 1452, 1389, 1304, 1273, 1237, 1177, 1011 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7.55 (1H, td, *J* = 7.5, 1.3 Hz), 7.83 (1H, td, *J* = 7.5, 1.5 Hz), 7.90 (1H, bd, *J* = 8.0 Hz), 8.06 (1H, bd, *J* = 8.0 Hz), 8.66 (1H, s), 8.73 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 115.7, 118.7, 124.7, 125.2, 127.1, 128.9, 131.8, 136.6, 140.3, 147.4, 148.3, 158.9; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sup>79</sup>Br [M+H]<sup>+</sup>: 274.9819, Found: 274.9815.

#### 1'- $\beta$ -[3-(1,2-Dihydro-2-oxobenzo[*b*][1,8]naphthyridine)-2'-deoxy-D-ribofuranose (**28**)

Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (190 mg, 0.208 mmol) and P(*o*-tol)<sub>3</sub> (196 mg, 0.645 mmol) was weighed and transferred to flask in a glove box. Then 1,4-dioxane (after freeze-pump-thaw cycling) was poured into the flask, and stirred for 30 min at room temperature under Ar atmosphere. To a compound **25** (403 mg, 1.46 mmol) and **32** (1,4-anhydro-3-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2-deoxy-D-*erythro*-pent-1-enitol)<sup>28)</sup> (500 mg, 1.41 mmol) were added the solution above and

distilled Bu<sub>3</sub>N (0.070 μL, 2.9 mmol), and stirred at 75 °C for 18 h under Ar atmosphere. After the reaction mixture was filtrated with Celite, the filtrate was concentrated under reduced pressure and purified roughly by silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 95:5). After drying up of contaminated compounds containing **26** (855 mg), which were dissolved in AcOH/THF (1.5 mL/10 mL) for next reaction. To this solution of AcOH/THF was added TBAF (1 M in THF, 1.5 mL, 1.5 mmol) at 0 °C, and resultant solution was stirred at 0 °C for 20 min under Ar atmosphere. After addition of saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution at 0 °C, the resultant mixture was extracted with AcOEt. The organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then contaminated compounds containing **27** were concentrated under reduced pressure. The residue was purified roughly again by silica gel column chromatography (*n*-hexane : AcOEt = 1:3) to afford contaminated compound **27** (145 mg). Afterwards, obtained compounds containing **27** (145 mg) were dissolved AcOH/ACN (2 mL/10 mL) for the next reaction. To this solution of AcOH/ACN was added NaBH(OAc)<sub>3</sub> (305 mg, 1.44 mmol) at -20 °C, and the reaction mixture was stirred for 20 min at -20 °C under Ar atmosphere. After addition of MeOH at -20 °C, the resultant mixture was concentrated with toluene to remove all solvents under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt : MeOH = 95:5) to afford compound **28** as a yellow solid (103 mg, 0.328 mmol, 23% over 3 steps); Mp: 122-126 °C. [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> +62.5 (c 0.2, MeOH); IR ν<sub>max</sub> (KBr): 3354, 3056, 2925, 2338, 2073, 1653, 1618, 1584, 1569, 1505, 1463, 1398, 1325, 1245, 1177, 1053 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.88-1.98 (1H, m), 2.46-2.54 (1H, m), 3.69-3.79 (2H, m), 3.99-4.03 (1H, m), 4.32-4.36 (1H, m), 5.25-5.30 (1H, m), 7.49-7.55 (1H, m), 7.75-7.81 (1H, m), 7.95 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.99 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 8.22 (1H, bs), 8.62 (1H, bs); <sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 42.7, 64.0, 74.2, 77.0, 88.8, 117.1, 126.2, 126.9, 128.5, 129.6, 132.5, 134.8, 136.9, 138.1, 149.1, 149.4, 164.8; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 313.1184, Found: 313.1183.

### 1'-β-[3-(1,2-Dihydro-2-oxobenzo[*b*][1,8]naphthyridine)]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxy-D-ribofuranose (**29**)

To a solution of compound of **28** (144 mg, 0.462 mmol) in pyridine (5 mL) was added 4,4'-dimethoxytrityl chloride (DMTrCl) (204 mg, 0.601 mmol) at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 4 h at room temperature under Ar atmosphere. After addition of saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution at 0 °C, the resultant mixture was extracted with AcOEt. The organic extracts were washed with H<sub>2</sub>O and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then they were concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane : AcOEt = 1:3) to give compound **29** (248 mg, 0.402 mmol, 87%) as a yellow amorphous solid; Mp: 122-126 °C. [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> -20.5 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>); IR ν<sub>max</sub> (KBr): 3412, 3121, 3060, 3007, 2930, 2836, 2046, 1903, 1660, 1619, 1572, 1508, 1463, 1443, 1395, 1301, 1249, 1176, 1152, 1085, 1038 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.85 (1H, d, *J* = 4.2 Hz), 2.03-2.10 (1H, m), 2.60-2.66 (2H, m), 3.38-3.45 (2H, m), 3.75 (3H, s), 3.75 (3H, s), 4.11-4.15 (1H, m), 4.45-4.49 (1H, m), 5.39 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 6.83 (4H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.21-7.24 (1H, m), 7.27-7.31 (2H, m), 7.38 (4H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.47-7.52 (3H, m), 7.74-7.81 (2H, m), 8.00 (2H, t, *J* = 4.1 Hz), 8.12 (1H, d, *J* = 1.4 Hz), 9.36 (1H, bs); <sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 41.8, 55.0, 55.3, 64.0, 73.6, 75.2, 77.4, 85.6, 86.4, 113.3, 115.9, 125.2, 125.5, 127.0, 127.8, 128.0, 128.4, 128.4, 130.3, 131.4, 132.9, 136.1, 136.2, 136.8, 136.8, 145.0, 147.6, 148.2, 158.6, 163.1; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 637.2309, Found: 637.2305.

**1'- $\beta$ -[3-(1,2-Dihydro-2-oxobenzo[b][1,8]naphthyridine)]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxy-D-ribofuranose-3'-(2-cyanoethyl tetraisopropylphosphoramidite) (30)**

To a solution of compound of **29** (171 mg, 0.277 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) were added *N*-ethyldiisopropylamine (DIPEA) (0.012  $\mu$ L, 0.69 mmol) and 2-cyanoethyl diisopropyl chlorophosphoramidite (0.080  $\mu$ L, 0.36 mmol) at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature under Ar atmosphere. After addition of H<sub>2</sub>O at 0 °C, the resultant mixture was extracted with AcOEt. The organic extracts were washed with H<sub>2</sub>O and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then they were concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (*n*-hexane : AcOEt = 1:1 to 1:2) to obtain compound **30** (220 mg, 0.270 mmol, 98%) as a yellow amorphous solid; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.83-1.39 (12H, m), 2.00-2.12 (1H, m), 2.44 (6/10 2H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.64 (4/10 2H, t, *J* = 6.0 Hz), 2.68-2.81 (1H, m), 3.30-3.38 (1H, m), 3.43-3.64 (4H, m), 3.74 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.77-3.91 (1H, m), 4.20-4.26 (1H, m), 4.50-4.65 (1H, m), 5.40 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 6.80-6.86 (4H, m), 7.19-7.26 (1H, m), 7.27-7.33 (2H, m), 7.36-7.43 (4H, m), 7.45-7.54 (3H, m), 7.74-7.80 (2H, m), 7.84 (6/10H, s), 7.83(4/10H, s), 8.04-8.05 (6/10H, m), 8.07-8.07 (4/10H, m), 8.17 (4/10H, d, *J* = 1.3 Hz), 8.23 (6/10H, d, *J*=1.3Hz), 9.77 (6/10H, bs), 9.85 (4/10H, bs); <sup>31</sup>P NMR (121.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  147.8, 148.6; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NaP [M+Na]<sup>+</sup>: 837.3388, Found: 837.3405.

**Synthesis and identification of the OBN-incorporated oligonucleotides**

Synthesis of the OBN-incorporated oligonucleotides was performed on an automated DNA synthesizer (GeneDesign nS-8 Oligonucleotides Synthesizer) Nucleic Acid Synthesis System at 0.2  $\mu$ mol scale. Then, 5-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1H-tetrazole was used for all coupling steps as the activator. The coupling time of standard phosphoramidite coupling protocol was increased from 25 s to 2.5 min. The OBN phosphoramidite **30** was prepared with 0.10 M in ACN solution, and other unmodified phosphoramidites were also prepared with 0.10 M in ACN and their coupling times were 25 s (as a standard protocol). The oligonucleotides synthesis was performed on DMTr-on mode. Solid (CPG) - supported oligonucleotides were cleavaged and their protected groups of each nucleobase and phosphodiester linkages were removed with mixed solution; aqueous methylamine (40%) and aqueous ammonia (28%) solution (the ratio was 1:1 for v/v) at 65°C for 10 min. The crude oligonucleotides bearing a DMTr group were detritylated and purified with a Sep-Pak® Plus C18 Cartridge and Sep-Pak® Plus C18 Environmental Cartridge (Waters); washed with 10% ACN aqueous solution, detritylated with 0.5% aqueous trifluoro acetic acid solution, and eluted with 35% aqueous MeOH solution, followed by reverse-phase HPLC on a Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu$ m (10 × 50 mm) using 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH = 7.0) as buffer A, 100% ACN as buffer B. The compositive confirmation of purified oligonucleotides was performed by reverse-phase HPLC on a Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu$ m (4.6 × 50 mm) and by MALDI-TOF mass spectrometry. The overall yields were shown in **Table 11** calculated from the UV absorbance at 260 nm.

General conditions;

For preparative chromatography: Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu$ m (10 × 50 mm)

For analytical chromatography: Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu$ m (4.6 × 50 mm)

Flow rate for preparative conditions: 4.0 mL/min

Flow rate for analytical conditions: 1.0 mL/min

Wavelength of UV for oligonucleotides detections: 260 nm

Temperature of column oven: 50 °C

Gradient of ACN in both preparative and analytical conditions (20 min) and retention time (Rt) (min)

6-12%; **ODN 2\_N** (Rt : 12.9 min), **ODN 3\_N** (Rt : 13.1 min), **ODN 4\_N** (Rt : 13.2 min), **ODN 5\_N** (Rt : 11.6 min)

7-13%; **ODN 1\_N** (Rt : 11.6 min)

9-14%; **ODN 13\_N** (Rt : 9.4 min)

9-15%; **ODN 6\_N** (Rt : 10.0 min), **ODN 7\_N** (Rt : 10.3 min)

9-18%; **ODN 9\_N** (Rt : 10.4 min), **ODN 14\_N** (Rt : 8.1 min), **ODN 15\_N** (Rt : 8.2 min), **ODN 16\_N** (Rt : 12.5 min), **ODN 17\_N** (Rt : 11.5 min), **ODN 18\_N** (Rt : 12.2 min), **ODN 19\_N** (Rt : 15.8 min)

10-15%; **ODN 10\_N** (Rt : 11.8 min)

11-16%; **ODN 8\_N** (Rt : 11.0 min)

### 第3節の実験 (Section 3)

#### **Thermal denaturation experiments**

The UV melting profiles were recorded in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl to give final concentration of each oligonucleotide in 2 μM. The samples were annealed by heating at 100 °C followed by slow cooling to room temperature. The melting profile was recorded at 260 nm from 5 to 90 °C at a scan rate of 0.5 °C /min. The  $T_m$  values were calculated as the temperature of the half dissociation of the formed duplex based on the first derivative of the melting curve.

### 第4節の実験 (Section 4)

#### **CD spectrum measurement**

These spectra were recorded at 10 °C in the quartz cuvette of 1cm optical path length. The samples were prepared in the same manner as described in the UV melting experiments. The molar ellipticity was calculated from the equation  $[\theta] = \theta/cl$ , where  $\theta$  indicates the relative intensity,  $c$  is the sample concentration, and  $l$  means the cell path length in centimeters.

### 第5節の実験 (Section 5)

#### **Thermal denaturation experiments**

The UV melting profiles were recorded in 2 mM sodium phosphate buffer (pH7.2) containing 20 mM NaCl to give final concentration of each oligonucleotide in 2 μM. The samples were annealed by heating at 100 °C followed by slow cooling to room temperature. The melting profile was recorded at 260 nm from 5 to 90 °C at a scan rate of 0.5 °C /min. The  $T_m$  values were calculated as the temperature of the half dissociation of the formed duplex based on the first derivative of the melting curve.

## **Quantum mechanics**

Quantum mechanics were performed by Spartan'06 for Windows. In **Figure 20**, after the structure was minimized, this structure was optimized by calculation of Equilibrium Geometry at Ground state with Density Functional Theory (started from initial geometry, B3LYP, 6-31G\*).

## 第 6 節の実験 (Section 6)

### **Assessment of enzymatic stability of OBN-incorporated oligonucleotides**

After sample solutions (250 μL) containing **ODN 9\_T**, **ODN 21**, **ODN 22**, **ODN 9\_N** (final concentration of each ODN was 4 μM) were prepared with MgCl<sub>2</sub> aq. (final concentration was 10 μM), Tris-HCl buffer (final concentration was 50 μM), and 3'-exonuclease (CAVP; 0.40 μg/mL), these solutions were standed at 37 °C. Since the reaction was started, solutions of 50 μL from each same were picked up and 3'-exonuclease was inactivated to heat under 90 °C for 5 min at each time points (5, 10, 20, 40 min). The remained amounts of each intact (full length) oligonucleotides was analyzed and quantified by reverse-phase HPLC.

Moblie phase: 0.1 M TEAA buffer (pH 7.0) as buffer A

100% ACN as buffer B

For analytical chromatography: Waters XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6 × 50 mm)

Flow rate for analytical conditions: 1.0 mL/min

Wavelength of UV for oligonucleotides detections: 260 nm

Temperature of column oven: 50 °C

### **ODN 9\_T**

Gradient of ACN in analytical conditions: 5-12% (20 min)

### **ODN 21, 22**

Gradient of ACN in analytical conditions: 5-13% (20 min)

### **ODN 9\_N**

Gradient of ACN in analytical conditions: 8-13% (20 min)

## 参考文献

- 1) (a) Osako, M. K.; Nakagami, H.; Morishita, R. *Adv. Polym. Sci.* **2012**, *249*, 49-59. (b) Sundaram, P.; Kurniawan, H.; Byrne, M. E.; Wower J. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 259-271. (c) Li, Z.; Rana, T. M. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 622-638. (d) Deng, Y.; Wang, C. C.; Choy, K. W.; Du, Q.; Chen, J.; Wang, Q.; Lin, L.; Chung, T. K. H.; Tang, T. *Gene* **2014**, *538*, 217-227. (e) Sharma, V. K.; Sharma, R. K.; Singh, S. K. *MedChemComm.* **2014**, *5*, 1454-1471.
- 2) Yamamoto, T.; Nakatani, M.; Narukawa, K.; Obika, S. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 339-365.
- 3) (a) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, K.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735-8738. (b) Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **1998**, *4*, 455-456. (c) Imanishi, T.; Obika, S. *Chem. Commun.* **2002**, *16*, 1653-1659. (d) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401-5404; (e) Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.
- 4) Yamamoto, T.; Harada-Shiba, M.; Nakatani, M.; Wada, S.; Yasuhara, H.; Narukawa, K.; Sasaki, K.; Shibata, M.; Torigoe, H.; Yamaoka, T.; Imanishi, T.; Obika, S. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e22.
- 5) Rottiers, V.; Obad, S.; Petri, A.; McGarrah, R.; Lindholm, M. W.; Black, J. C.; Sinha, S.; Goody, R. J.; Lawrence, M. S.; deLemos, A. S.; Hansen, H. F.; Whittaker, S.; Henry, S.; Brookes, R.; Najafi-Shoushtari, S. H.; Chung, R. T.; Whetstone, J. R.; Gerszten, R. E.; Kauppinen, S.; Näär A. M. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 212ra162.
- 6) (a) Shrestha, A. R.; Kotobuki, Y.; Hari, Y.; Obika, S. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 575-577. (b) Horie, N.; Kumagai, S.; Kotobuki, Y.; Yamaguchi, T.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 6531-6536.
- 7) (a) Yamamoto, T.; Yahara, A.; Waki, R.; Yasuhara, H.; Wada, F.; Harada-Shiba, M.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3757-3765. (b) Yahara, A.; Shrestha, A. R.; Yamamoto, T.; Hari, Y.; Osawa, T.; Nishida, M.; Kodama, T.; Obika, S. *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 2513-2516.
- 8) (a) Yamaguchi, T.; Horiba, M.; Obika, S. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9737-9740. (b) Horiba, M.; Yamaguchi, T.; Obika, S. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 11000-11008. (c) 堀場昌彦, 博士論文, 2018 年度 (大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻, 14401 甲第 20045 号)
- 9) (a) Setoguchi, K.; Cui, L.; Hachisuka, N.; Obchoei, S.; Shinkai, K.; Hyodo, F.; Kato, K.; Wada, F.; Yamamoto, T.; Harada-Shiba, M.; Obika, S.; Nakano, K. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *9*, 170-181. (b) Cui, L.; Nakano, K.; Obchoei, S.; Setoguchi, Kiyoko.; Matsumoto, M.; Yamamoto, T.; Obika, S.; Shimada, K.; Hiraoka, N. *Gastroenterology* **2017**, *153*, 292-306.e2. (c) Shimojo, M.; Kasahara, Y.; Inoue, M.; Tsunoda, S.; Shudo, Y.; Kurata, T.; Obika, S. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7618. (d) Uehara, T.; Choong, C.; Nakamori, M.; Hayakawa, H.; Nishiyama, K.; Kasahara, Y.; Baba, K.; Nagata, T.; Yokota, T.; Tsuda, H.; Obika, S.; Mochizuki, H. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7567. (e) Harada, T.; Matsumoto, S.; Hirota, S.; Kimura, H.; Fujii, S.; Kasahara, Y.; Gon, H.; Yoshida, T.; Itoh, T.; Haraguchi, N.; Mizushima, T.; Noda, T.; Eguchi, H.; Nojima, S.; Morii, E.; Fukumoto, T.; Obika, S.; Kikuchi, A. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 602-612. (f) Matsumoto, S.; Yamamichi, T.; Shinzawa, K.; Kasahara, Y.; Nojima, S.; Kodama, T.; Obika, S.; Takehara, T.; Morii, E.; Okuyama, H.; Kikuchi, A. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3882.
- 10) (a) Morihiro, K.; Kodama, T.; Kentefu; Moai, Y.; Veedu, R. N.; Obika, S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 5074-5078. (b) Fujii, A.; Nakagawa, O.; Kishimoto, Y.; Okuda, T.; Nakatsuji, Y.; Nozaki, N.; Kasahara, Y.; Obika, S. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 7443-7448. (c) Habuchi, T.; Yamaguchi, T.; Obika, S. *Heterocycles* **2019**, *98*,

- 11) Lin, K. -Y.; Jones, R. J.; Matteucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873-3874.
- 12) Lin, K. -Y.; Matteucci, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8531-8532.
- 13) (a) Stanton, R.; Sciabola, S.; Salatto, C.; Weng, Y.; Moshinsky, D.; Little, J.; Walters, E.; Kreeger, J.; DiMatta, D.; Chen, T.; Clark, T.; Liu, M.; Qian, J.; Roy, M.; Dullea, R. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 344-359. (b) Flanagan, W. M.; Wolf, J. J.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, *96*, 3513-3518. (c) Flanagan, W. M.; Wagner, R. W.; Grant, D.; Lin, K. -Y.; Matteucci, M. D. *Nat. Biotech.* **1999**, *17*, 48-52.
- 14) Varizhuk, A. M.; Zatsepin, T. S.; Golovin, A. V.; Belyaev, E. S.; Kostyukevich, Y. I.; Dedkov, V. G.; Shipulin, G. A.; Shpakovski, G. V.; Aralov, A. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3597-3605.
- 15) (a) Eldrup, A. B.; Nielsen, B. B.; Haaima, G.; Rasmussen, H.; Kastrup, J. S.; Christensen, C.; Nielsen, P. E. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1781-1790. (b) Eldrup, A. B.; Christensen, C.; Haaima, G.; Nielsen, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3254-3262.
- 16) (a) Buhr, C. A.; Matteucci, M. D.; Froehler, B. C. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8969-8970. (b) Dierckx, A.; Miannay, F.-A.; Gaied, N. B.; Preus, S.; Björck, M.; Brown, T.; Wilhelmsson, L. M. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5987-5997.
- 17) (a) Wojciechowski, F.; Hudson, R. H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12574-12575. (b) Ming, X.; Ding, P.; Leonard, P.; Budow, S.; Seela, F. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1861-1869.
- 18) (a) McTigue, P. M.; Peterson, R. J.; Kahn, J. D.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 5388-5405. (b) Kaur, H.; Arora, A.; Wengel, J.; Maiti, S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7347-7355. (c) Chattacharyya, J.; Maiti, S.; Muhuri, S.; Nakano, S.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N. *Biochemistry* **2011**, *50*, 7414-7425.
- 19) Holmes, S. C.; Arzumanov, A. A.; Gait, M. J. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 2759-2768.
- 20) (a) Hara, T.; Kodama, T.; Takegaki, Y.; Morihiro, K.; Ito, K. R.; Obika, S. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 25-36. (b) Habuchi, T.; Yamaguchi, T.; Aoyama, H.; Ito, K. R.; Obika, S. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 1430-1439. (c) Obika, S.; Hari, Y.; Morio, K.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 215-219. (d) Hari, Y.; Obika, S.; Sasaki, M.; Morio, K.; Yamagata, Y.; Imanishi, T. *Tetrahedron* **2000**, *58*, 3051-3063. (e) Hari, Y.; Kashima, S.; Inohara, H.; Ijitsu, S.; Imanishi, T.; Obika, S. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6381-6391.
- 21) Kishimoto, Y.; Fujii, A.; Nakagawa, O.; Nagata, T.; Yokota, T.; Hari Y.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8145-8152.
- 22) Ortega, J. -A.; Blas, J. R.; Orozco, M.; Grandas, A.; Pedroso, E.; Robles J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4503-4506.
- 23) Kool, E. T. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 1-22.
- 24) (a) Marky, L. A.; Blumenfeld, K. S.; Kozlowski, S.; Breslauer, K. J. *Biopolymers*, **1983**, *22*, 1247-1257. (b) Marky, L. A.; Breslauer, K. J. *Biopolymers*, **1987**, *26*, 1601-1620.
- 25) (a) H. Kaur, J. Wengel, S. Maiti *Biochemistry*, **2008**, *47*, 1218-1227. (b) C. B. Hughesman, R. F. B. Turner, C. A. Haynes *Biochemistry*, **2011**, *50*, 5354-5368.
- 26) Maier, M. A.; Leeds, J. M.; Balow, G.; Springer, R. H.; Bharadwaj, R.; Manoharan, M. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1323-1327.
- 27) Lawson, C. P.; Füchtbauer, A. F.; Wranne, M. S.; Giraud, T.; Floyd, T.; Dumat, B.; Andersen, N. K.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Gradén, H.; Wilhelmsson, L. M.; Grøtli, M. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1-9.

- 28) Fujii, A.; Nakagawa, O.; Kishimoto, Y.; Nakatsuji, Y.; Nozaki, N.; Obika, S. *ChemBioChem*, **2019**, *in press*.  
(DOI= 10.1002/cbic.201900536)
- 29) (a) Shelar, D. P.; Birari, D. R.; Rote, R. V.; Patil, S. R.; Toche, R. B.; Jachak, M. N. *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, *24*, 203-211. (b) Shelar, D. P.; Patil, S. R.; Rote, R. V.; Toche, R. B.; Jachak, M. N. *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 1033-1047.
- 30) (a) Cameron, M. A.; Cush, S. B.; Hammer, R. P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065-9069. (b) Lan, T.; McLaughlin, L. W. *Bioorg. Chem.* **2001**, *29*, 198-210.
- 31) Lee, A. H. F.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9219-9230.
- 32) (a) Kennard, O. *Biochem. Soc. Trans.* **1986**, *14*, 207-210. (b) Varani, G.; McClain, W. H. *EMBO Rep.* **2000**, *1*, 18-23.
- 33) (a) McTigue, P. M.; Peterson, R. J.; Kahn, J. D.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 5388-5405. (b) Kaur, H.; Arora, A.; Wengel, J.; Maiti, S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7347-7355. (c) Chattacharyya, J.; Maiti, S.; Muhuri, S.; Nakano, S.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N. *Biochemistry* **2011**, *50*, 7414-7425.