

## リン酸部位修飾 DNA 類縁体の立体選択的合成に関する研究

西郷研究室 07238 岡 夏央

**1. 序論** 近年、DNA や RNA に対して選択的に結合する分子を用いて、特定の遺伝子からタンパク質への情報伝達を阻害する手法が注目されている。その手法の一つに、標的 mRNA と相補的な DNA 類縁体を生体内に投与し、その mRNA からタンパク質への翻訳を阻害するアンチセンス法がある。天然型 DNA のリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子の一つを置換したリン酸部位修飾 DNA 類縁体は、生体内酵素に対する安定性や、細胞膜透過性の高さなどからアンチセンス分子として期待されているが、これらはリン原子上に不斉点を有し、その絶対立体配置の相違によってアンチセンス効果が異なると考えられているため、リン原子の立体を制御した合成法の開発が求められている。そこで、本研究では現在アンチセンス分子として最も有望視されているホスホロチオエート DNA を中心に、リン原子の立体を制御したリン酸部位修飾 DNA 類縁体の効率的な合成法の開発を目指した。

### 2. オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート DNA の立体選択的合成

**2.1 背景** キラルな 1,2-アミノアルコールから誘導したヌクレオシド 3'-*O*-オキサザホスホリジン誘導体をモノマーユニットとするオキサザホスホリジン法は、立体化学的に純粋なモノマーを立体選択的な反応を用いて効率的に合成できることから、近年、ホスホロチオエート DNA の立体選択的合成法として注目されている。現在までの研究例では、モノマーユニット合成反応において >99 : 1 のジアステレオ選択性を実現した反応系も報告されているが、インターヌクレオチド結合形成反応においてラセミ化が起こることが知られており、オリゴマーの合成には至っていない。このラセミ化は、活性化剤として用いられている求核性の高いテトラゾールが、キラルなリン原子に対して繰り返し求核攻撃することによって起こると考えられている (Scheme 1)。そこで、本研究では、新規活性化剤 **1** を開発した。**1** は求核性が極めて低い構成要素によって成り立っており、**1** によりプロトン化されたモノマーユニットに対して活性化剤由来の求核種がリン原子を攻撃することなく、ヌクレオシドが直接 *in-line* メカニズムで反応することにより、立体特異的に縮合反応が進行するものと期待した (Scheme 2)。

**2.2. ヌクレオシド 3'-*O*-オキサザホスホリジンモノマーユニットの合成** キラルな 1,2-アミノアルコール **2a-f** と三塩化リンから合成したオキサザホスホリジニル化剤 **3a-f** を用いて、ヌクレオシド **4** をオキサザホスホリジニル化した (Table 1)。粗生成物のジアステレオマー比を  $^{31}\text{P}$  NMR により測定したところ、**3a-e** からはトランス体、**3f** からはシス体が優先して生成することが分かった。室温で反応を行なった系では、**5a** が 95 : 5 と最も高いジアステレオ選択性を示した。一方、**5c** は室温では 58 : 42 と低いジアステレオ選択性であったが、加熱することにより *trans-5c* : *cis-5c* = 97 : 3 と大きくトランス体へと偏ることが分かった。**5a-d** については、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって立体化学的に純粋なトランス体を単離し、モノマーユニットとして縮合反応の検討に用いた。

**2.3. 縮合反応におけるオキサザホスホリジン環上の置換基効果の検討** 立体化学的に純粋なモノマー

**5a-d** を、活性化剤 **1d** の存在下、ヌクレオシド **6** と反応させ、 $^{31}\text{P}$  NMR で反応を追跡した。反応時間はオキサザホスホリジンの 4 位の置換基に大きく影響を受け、 $\text{R}^4 = \text{H}$  の場合、反応は迅速に進行し、5 分以内で縮合反応は完結した。それに対し、 $\text{R}^4 = \text{Me}$  の場合は反応時間 15 分、 $\text{R}^4 = \text{Ph}$  の場合は 5 時間が必要であり、 $\text{R}^4$  の立体障害、電子求引性が増すにつれて反応性が低下した。これは、 $\text{R}^4$  の立体障害、電子求引性によって、オキサザホスホリジンの 3 位の窒素原子に対するプロトン化が妨げられるためと考えられる。一方、3 位の置換基を  $\text{R}^3 = \text{Me}$  (**5a**) から  $\text{R}^3 = \text{iPr}$  (**5d**) に変えても反応時間はほとんど影響を受けず、5 分以内に反応は完結した。これは、イソプロピル基が自由回転することにより、その二つのメチル基がオキサザホスホリジン環の 3 位の窒素原子の孤立電子対とは環に対して逆に配向し、3 位の窒素原子のプロトン化に対する立体障害がメチル基とほぼ同等になっているためと考えられる。反応のジアステレオ選択性についても、 $\text{R}^4 = \text{H}$  の場合がもっとも高く、ジアステレオマー比は 96 : 4 ~ >99 : 1 と極めて良好な結果が得られた。

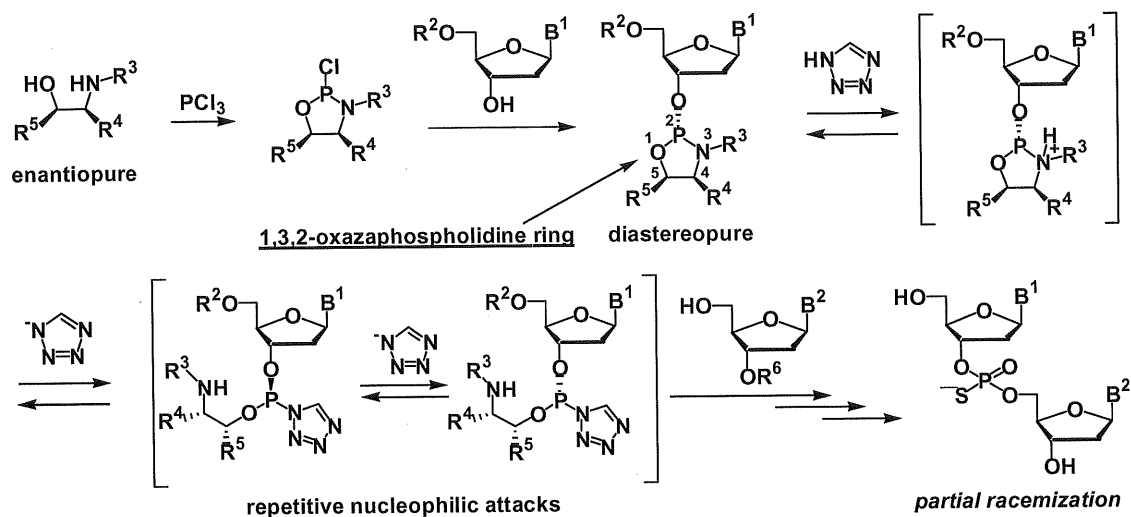
**2-4. 活性化剤の検討 1a-m** の存在下、**5a** と **6** を縮合させ、反応を  $^{31}\text{P}$  NMR により追跡した (Table 3)。反応はいずれも 5 分以内に完結した。反応のジアステレオマー比は、**1** のカウンターアニオンにはほとんど影響されなかったが、ジアルキル(シアノメチル)アミンの構造に大きく依存し、**1k-n** を用いた場合、ジアステレオマー比は 1 : 1 に近い値であったが、**1a-j** を用いた場合、ジアステレオマー比は 96 : 4 以上と極めて高い値が得られた。特に、**1a-c,e,f** の場合、ジヌクレオシドホスファイト **7** のシグナルは 1 本しか観測されず、単一のジアステレオマーが生成していることが分かった。

**2-5. 液相法による二量体の合成** 活性化剤 **1f** の存在下、(**Rp**)-**5a** と **6** を縮合させ、メチルアミノ基のアセチル化、硫化、脱保護を行なうことによって、ほぼ立体化学的に純粋な二量体(**Sp**)-**12** を得た。また、モノマーユニットとして(**Sp**)-**5a** を用い、同様に立体化学的に純粋な(**Rp**)-**12** を得た (Scheme 3)。

**2-6. 固相法の検討** サクシニルリンカーを介して高架橋ポリスチレンに担持したチミジンに対し、活性化剤 **1f** の存在下モノマーユニット **13** を縮合させ、硫化した後、濃アンモニア水処理によって不斉源の除去、リンカーの切断及び核酸塩基部位の脱保護を同時に行ない目的の二量体を縮合収率 98 ~ >99%、ジアステレオマー比 97 : 3 ~ 99 : 1 で得た (Scheme 4)。また、同様の反応条件を用いて 4 量体、10 量体の合成に成功した。

以上述べた様に、本研究において開発したオキサザホスホリジン法によりリン原子の立体を制御したホスホロチオエート DNA オリゴマーの固相合成に成功した。この方法は、(i) 5'-O-DMTr 基の除去 (ii) 縮合反応 (iii) 無水酢酸によるキャップ化 (iv) 硫化の各ステップと、最終的な濃アンモニア水による脱保護の過程が、用いる試薬が多少異なるものの、現在自動合成機によるホスホロチオエート DNA の合成法として用いられているホスホロアミダイト法とまったく等しいことから、自動合成機を用いた長鎖ホスホロチオエート DNA の合成にそのまま適用可能であると思われる、リン原子の立体を制御したホスホロチオエート DNA の大量合成法として期待される。

Scheme 1. Oxazaphospholidine method using 1*H*-tetrazole as an activator.



Scheme 2. Oxazaphospholidine method using 1 as an activator.

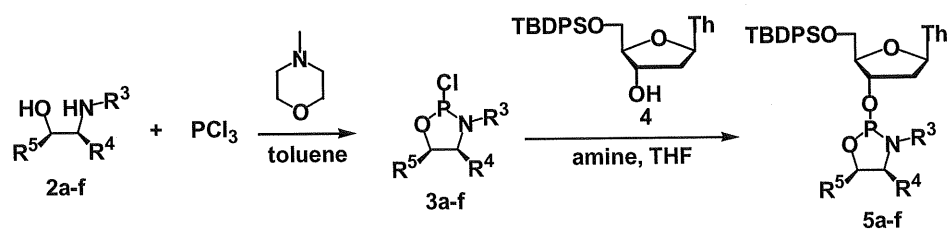
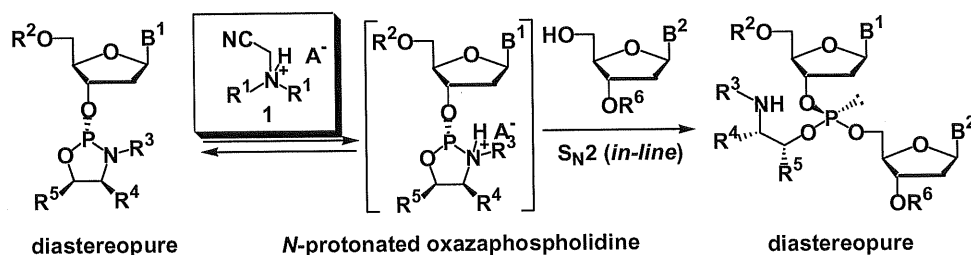
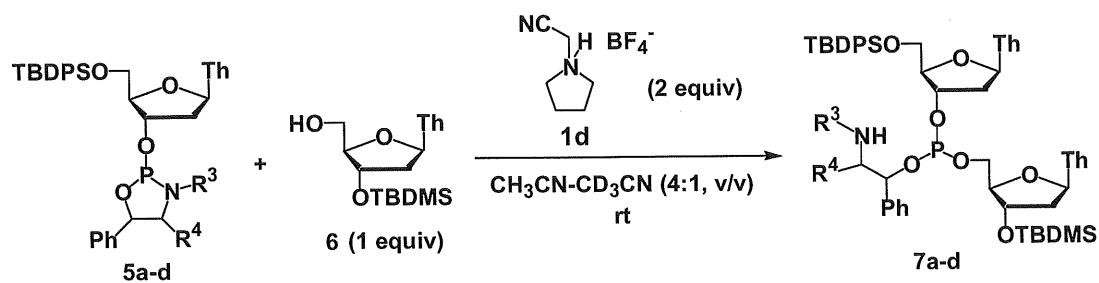


Table 1. Synthesis of nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidines.

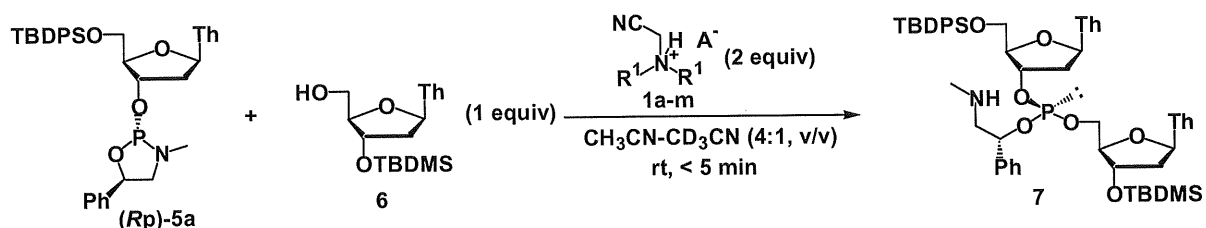
entry	5	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	amine	reaction conditions	<i>trans</i> -5 : <i>cis</i> -5	isolated yield/%
1	a	Me	H	Ph	Et <sub>3</sub> N	-78 °C, then rt, 30 min	95 : 5	77
2	b	Me	Me	Ph	Et <sub>3</sub> N	-78 °C, then rt, 30 min	70 : 30	—
3					iPr <sub>2</sub> NEt	-78 °C, then rt, 30 min	82 : 18	64
4	c	Me	Ph	Ph	Et <sub>3</sub> N	-78 °C, then rt, 30 min	58 : 42	—
5					iPr <sub>2</sub> NEt	-78 °C, then reflux, 1h	97 : 3	96
6	d	iPr	H	Ph	Et <sub>3</sub> N	-78 °C, then rt, 30 min	93 : 7	64
7	e	Me	H	iPr	Et <sub>3</sub> N	-78 °C, then rt, 30 min	85 : 15	—
8	f	Me	iPr	H	Et <sub>3</sub> N	-78 °C, then rt, 30 min	20 : 80	—



**Table 2. Condensations of 5a-d with 6 in the presence of 1d.**

entry	5	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	configuration <sup>a</sup>	reaction time	d.r. of 7
1	a	Me	H	(2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )	< 5 min	>99 : 1
2		Me	H	(2 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	< 5 min	96 : 4
3	b	Me	Me	(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	< 15 min	95 : 5
4	c	Me	Ph	(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	5 h	93 : 7
5	d	iPr	H	(2 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	< 5 min	98 : 2

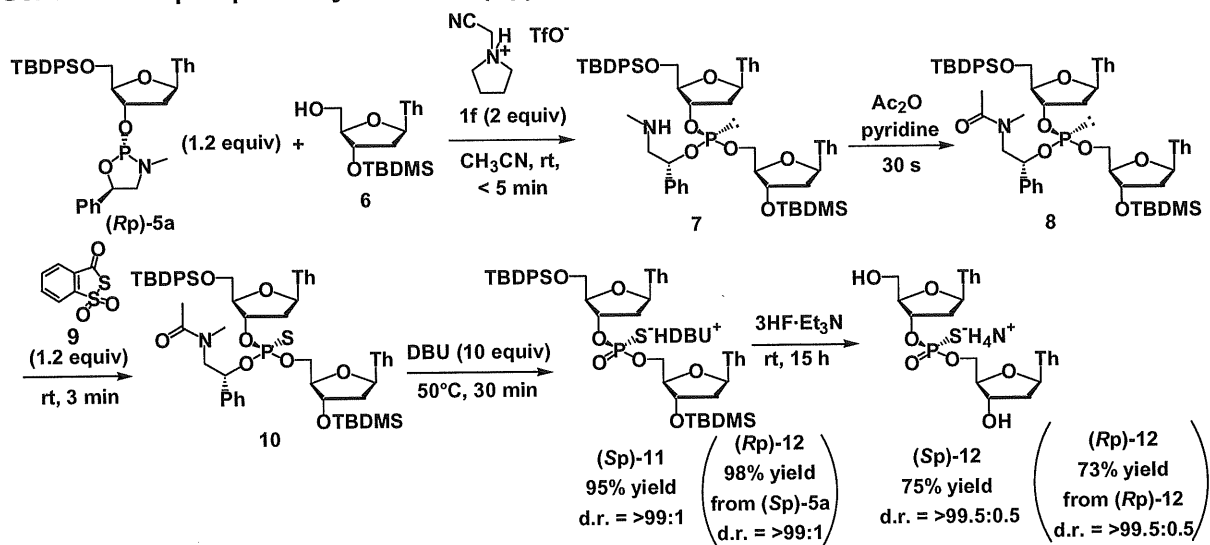
<sup>a</sup>Configuration of the oxazaphospholidine ring



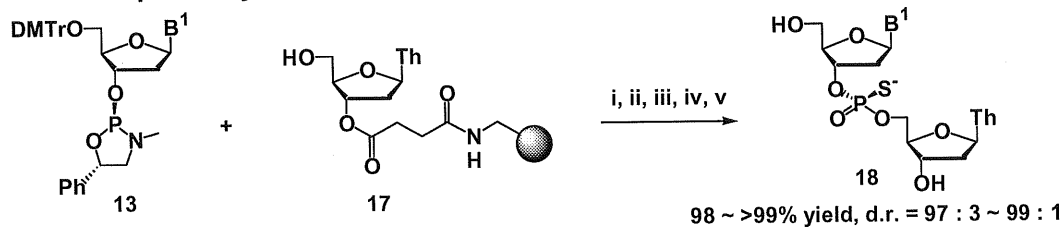
**Table 3. Condensations of (*Rp*)-5a with 6 in the presence of 1a-n.**

entry	1	R <sup>1</sup>	A <sup>-</sup>	d.r. of 7	entry	1	R <sup>1</sup>	A <sup>-</sup>	d.r. of 7
1	a	CH <sub>3</sub>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	>99 : 1	8	h	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	96 : 4
2	b		PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	>99 : 1	9	i		PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	97 : 3
3	c		TfO <sup>-</sup>	>99 : 1	10	j		TfO <sup>-</sup>	99 : 1
4	d	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	96 : 4	11	k	iPr	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	55 : 45
5	e		PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	>99 : 1	12	l		PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	56 : 44
6	f		TfO <sup>-</sup>	>99 : 1	13	m		TfO <sup>-</sup>	39 : 61
7	g		Tf <sub>2</sub> N <sup>-</sup>	98 : 2	14	n		Tf <sub>2</sub> N <sup>-</sup>	34 : 66

**Scheme 3. Liquid-phase synthesis of (Rp)- and (Sp)-dithymidine phosphorothioates.**



**Scheme 4. Solid-phase synthesis of dinucleoside phosphorothioates.**



**Reagents and conditions:** (i) 1f, CH<sub>3</sub>CN, rt, 90 s (ii) Ac<sub>2</sub>O, *N*-methylimidazole, THF, rt, 30 s (iii) Beaucage reagent, CH<sub>3</sub>CN, rt, 1 min (iv) 3% TCA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt (v) 25% NH<sub>3</sub> aq.-pyridine (9:1, v/v), 55 °C