

## 論文内容の要旨

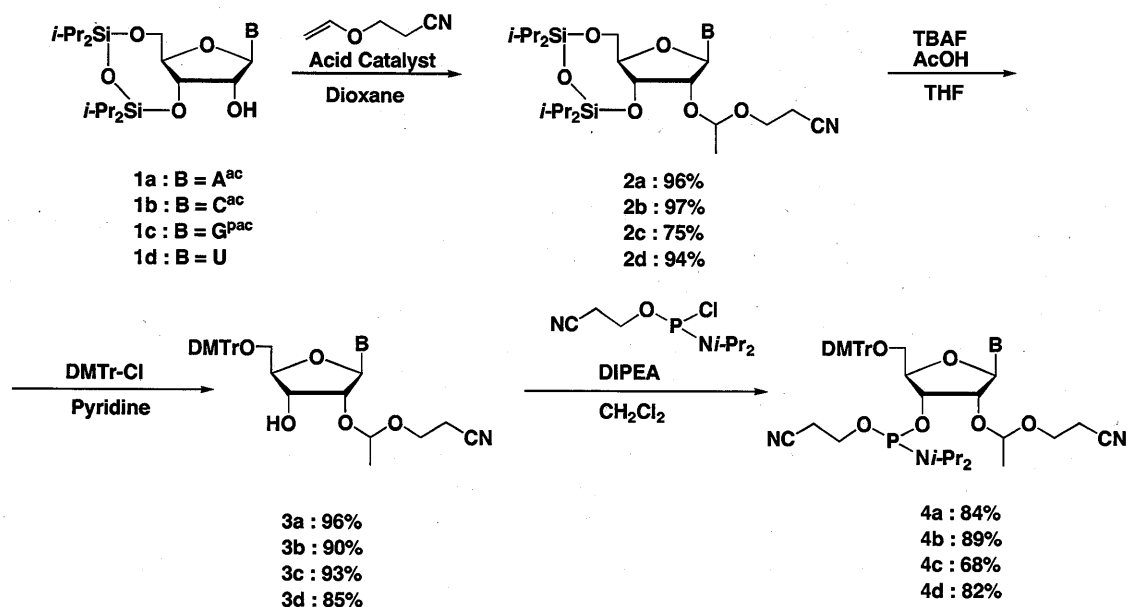
論文題目 塩基性条件下除去可能な 2'-水酸基保護基を用いる新規 RNA 合成法の開発

氏名 梅本 忠士

<序論> siRNA の発見により、化学合成した RNA の需要が急速に高まっている。siRNA は、21-23 量体の 2 本鎖 RNA であり、これら比較的短鎖の RNA は化学的に合成できる。現在、RNA を化学合成する際にはホスホアミダイト法を用いる固相法が汎用されているが、DNA の場合と比較して合成効率が十分であるとはいえない。RNA は 2'位に水酸基を持つため、これに保護基を導入しなければならないが、その保護基の導入効率が悪いこと、さらに保護基の立体障害により鎖長伸長の反応効率が悪いことなどが問題である。本研究では、従来の 2'-水酸基の保護基の欠点を克服した新しい 2'-水酸基保護基を用いる RNA 合成法を開発することを目的とした。

現在、広く用いられている 2'-水酸基保護基には、フッ化物イオンで除去が可能な *t*-ブチルジメチルシリル(TBDMS)基やトリイソプロピルシリルオキシメチル(TOM)基がある。これらのシリル型の保護基は化学的に安定であるという長所を持つが、2'-水酸基に選択的に導入することが困難である。一方、酸性条件下除去可能な保護基としては、アセタール型の保護基であるテトラヒドロピラニル(THP)基や、近年ジアセトキシエトキシメチル(ACE)基などが開発されている。これらの保護基は、5',3'-水酸基を環状のシリルエーテルで保護したヌクレオシド中間体を経由して、2'-水酸基選択的に導入することが可能である。しかし、5'-水酸基の DMTr 基を除去する強酸性条件下、一部脱落するという欠点を持つ。近年、Pfleiderer らは、このようなアセタール骨格に様々な電子吸引性の官能基を導入することによって、アセタール型保護基の酸に対する安定性を向上させている。1-(2-シアノエトキシ)エチル(CEE)基は、酸性条件下安定に存在する保護基の一つであるが、その除去には RNA が分解してしまうような過酷な酸性条件が必要とするため、オリゴマーの合成には用いられてはいない。我々は、この CEE 基のシアノエチル骨格に着目した。シアノエ

Scheme 1.



チル基は一般に塩基によって容易にβ-脱離を引き起こすことが知られている。そのことからこの CEE 基は、従来の酸性条件下ではなく、塩基性条件下で除去が可能ではないかと考えた。本研究では、CEE 基を 2'-水酸基の保護基として用いる新しい RNA 合成法の開発を行なった。

<結果と考察>5',3'位を環状シリルエーテルで保護したリボヌクレオシド **1** に対し、酸触媒存在下、シアノエチルビニルエーテルを反応させることによって 2'-水酸基が CEE 基で保護されたリボヌクレオシド **2** を良好な収率で得た。次に、常法に従い、シリル基の脱保護、5'位の DMTr 化および 3'位のホスフィチル化を行い、ホスホロアミダイト法のモノマーユニット **4** を合成した。得られた、**4** を、5'-水酸基に遊離の水酸基を持ち 2',3'-水酸基をフェノキシアセチル基で保護したウリジンと縮合反応し、完全に保護された RNA の 2 量体 **5** をほぼ定量的に得た。

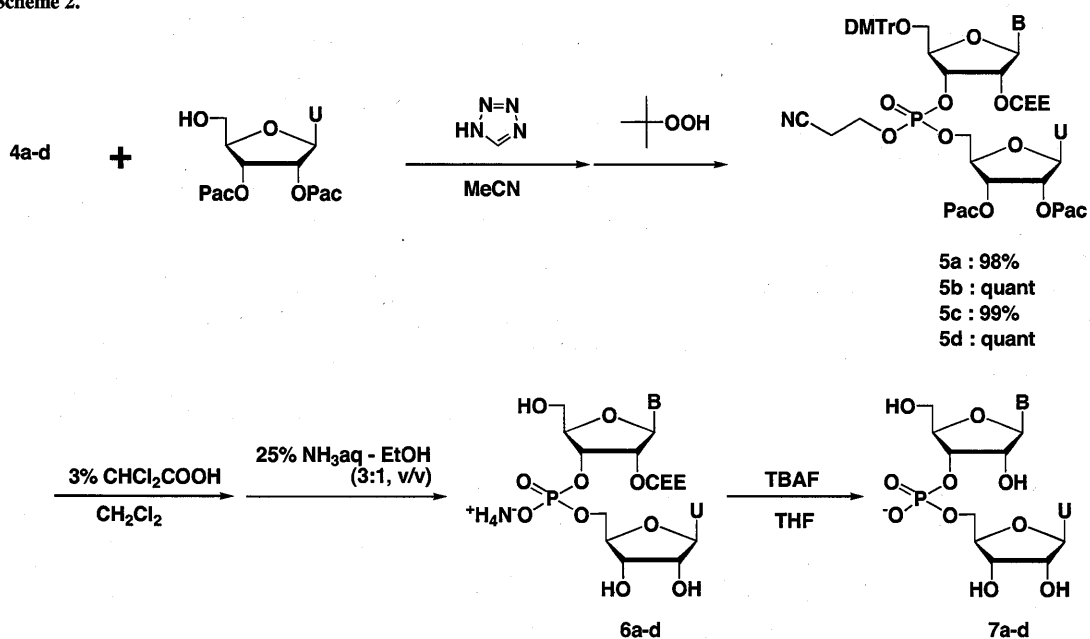
一方、得られた **3** を用いて CEE 基の脱保護条件および安定性の検討を行ったところ、テトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)処理により 5 分程度で脱保護可能であることがわかった。一方、2'位の CEE 基は固相担体からの切り出しやリン酸ジエステルおよび塩基部位の保護基の除去に用いられている 28%NH<sub>3</sub>aq-EtOH (3:1, v/v) に対し極めて安定であることが分かった (Table 1)。これらの結果から、CEE 基は、25%によって固相担体からの切り出し、リン酸および核酸塩基部位の脱保護を行なった後、TBAF を用いて 2'-水酸基の CEE 基を除去する、2 段階の脱保護行程で RNA のオリゴマーを脱保護可能であることが示唆された。

Table 1. Deprotection conditions and stability of the 2'-O-CEE group.

reagent	temp	half-life (min)
0.5 M DBU / MeCN	rt	240
0.5 M DBU / MeCN	55 °C	20
0.5 M DBU, 0.5 M BSA / MeCN	rt	50
0.5 M TBAF / THF	rt	< 1
25% NH <sub>3</sub> aq	rt	stable <sup>a</sup>
25% NH <sub>3</sub> aq - EtOH (3:1, v/v)	rt	stable <sup>a</sup>
2 M NH <sub>3</sub> / EtOH	rt	stable <sup>a</sup>

<sup>a</sup> No degradation was observed at least for 30 h.

Scheme 2.



そこで、**5a-d** の脱保護反応を検討した。ジクロロ酢酸により DMTr 基を除去した後に  $\text{NH}_3\text{aq-EtOH}$  を用いて CEE 基以外の保護基を除去した後に RP-HPLC で分析した (Figure 2)。いずれの場合も RNA 鎖を分解することなく脱保護反応が進行し、CEE 基を有する 2 量体(**6a-d**)のピークが観察された。さらに、CEE 基を脱保護するため、TBAF によって脱保護反応を行なったところ、**6c,d** については脱保護された RNA の 2 量体のピークを得た(**7c,d**)。しかし、**6a,b** については目的とするピークのほかに、副反応生成物と思われるピークが検出された。ヌクレオシドとアクリロニトリルを用いたモデル実験から、TBAF 存在下アクリロニトリルはヌクレオシドの塩基部位と副反応し得ることが明らかとなった。そこで、CEE 基を脱保護する際に副生するアクリロニトリルが TBAF の塩基性条件下、Michael 付加によって塩基部位に反応していることが明らかとなった。この副反応を抑制するために、核酸塩基部位よりもさらに反応性の高い化合物を共存さ

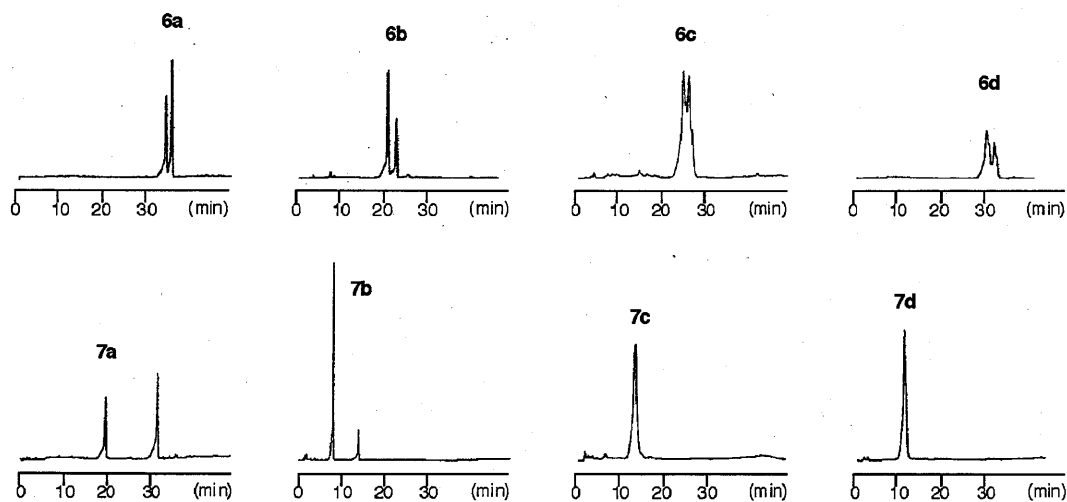


Figure 2. RP-HPLC analysis of the crude mixture of deprotected dimers

せ、アクロニトリルを捕捉することを検討した。塩基性条件下において容易にプロトンを放出しカルバニオンとなり、さらにアクリロニトリルに Michael 付加するような化合物を反応系に種々添加してアデノシンとウリジンを含む 2 量体の脱保護を検討した (Table 2)。ニトロメタンの存在下で脱保護反応を行なったところ、副反応をほとんど抑制することができた。そこで、以後オリゴマーの合成ではこの脱保護条件を用いることとした。

CEE 基は、これまでに開発された 2' 水酸基の保護基の中で比較的立体障害が小さいため、固相合成での縮合効率の向上が期待できる。(2'-水酸基の保護基として TBDMS 基を用いた RNA 合成において、その縮合反応は、1*H*-テトラゾールを用いた 12 分の反応で縮合は 98% しか進行しない。) CEE 基を 2'-水酸基の保護基として用いた RNA 合成では、縮合反応の活性化剤として 5-エチルチオ-1*H*-テトラゾールを用い、縮合反応時間は 3 分で行なった。その他の条件は、通常の RNA

合成で用いられている合成サイクルをそのまま適応した。固相合成によって合成したオリゴヌクレオチド鎖を NH<sub>3</sub>aq-EtOH と TBAF-MeNO<sub>2</sub> によって 2 段階で脱保護を行なった。反応混合物の HPLC 分析の結果から、縮合反応収率は 98-99% であることが判明した。

<まとめ> CEE 基は、TBAF で除去可能であるが、アンモニア水に対して安定に存在することがわかった。TBAF を用いる CEE 基の脱保護反応において、副生するアクリロニトリルが塩基部位と反応するが、ニトロメタンを添加することによって、この副反応をほとんど抑制することができた。NH<sub>3</sub>aq-EtOH および TBAF を用いた 2 段階の脱保護を行なうことによって、RNA のオリゴマーを脱保護することができた。従来の RNA 合成法と比較して、この合成法は、効率よくモノマーユニットの合成が可能であり、さらに、その立体障害の軽減によってその縮合効率の向上が見られた。今後は、さらに縮合効率を向上させるため合成サイクルを最適化し、長鎖の RNA オリゴマーの合成を目指す。

<発表論文>

1. Umemoto, T., Wada, T. Oligoribonucleotide synthesis by the use of 1-(2-cyanoethoxy)ethyl as a 2'-hydroxy protecting group. *Tetrahedron Lett. in press.*
2. Umemoto, T., Wada, T. *Nucleic Acid Res. Suppl.* **2004**, *4*, 9-10
3. 和田猛 梅本忠士 西郷和彦 リボヌクレオシド誘導体及びリボヌクレオチド誘導体 特願 2003-310589 PCT/JP2004/002533
4. Umemoto, T., Wada, T. Carbanion as a scavenger of acrylonitrile *in preparation.*
5. Umemoto T., Wada, T. Synthesis of long oligoribonucleotide by the use of 1-(2-cyanoethoxy)ethyl as a 2'-hydroxy protecting group (full) *in preparation.*

Table 2. Carbanion as a scavenger of acrylonitrile

scavenger	equiv	ratio of A <sup>cep</sup> U (%)
control	—	61
1,1'-diphenylacetone	2.5	35
1,3-diphenylacetone	2.5	15
2-indanone	2.5	12
indene	2.5	9.8
indene	5	not determined <sup>a</sup>
nitromethane	2.5	0.5

<sup>a</sup> Deprotection was not completed.

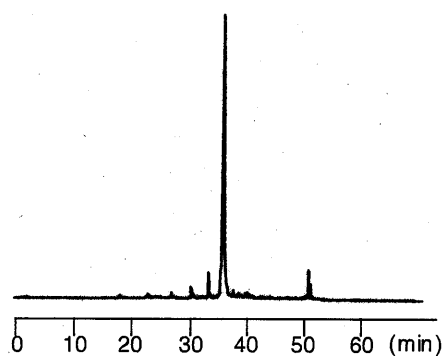


Figure 3. AE-HPLC analysis of crude mixture of deprotected (Up)<sub>5</sub>U.