

論文内容の要旨

論文題目：

「ボラノホスフェート型新規アンチセンス核酸の合成」

氏名 清水 護

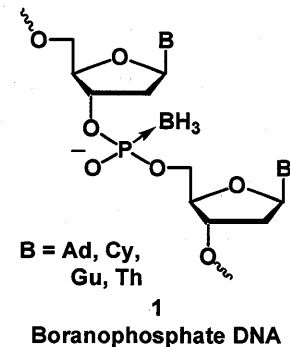
【緒言】

現在、遺伝子治療の分野で注目されている手法の一つにアンチセンス法がある。アンチセンス法とは、mRNA に相補的な塩基配列を持つアンチセンス分子を DNA から転写された mRNA と選択的に二重鎖を形成させ、標的とするタンパク質合成のみを制御する方法である。

ここで、アンチセンス分子が有効に機能するための必要条件として、第一に高い細胞膜透過性を有していること、第二に細胞内でヌクレアーゼにより加水分解されにくいこと、第三に特定の mRNA とのみ選択的に安定な二重鎖を形成できること、などが挙げられる。

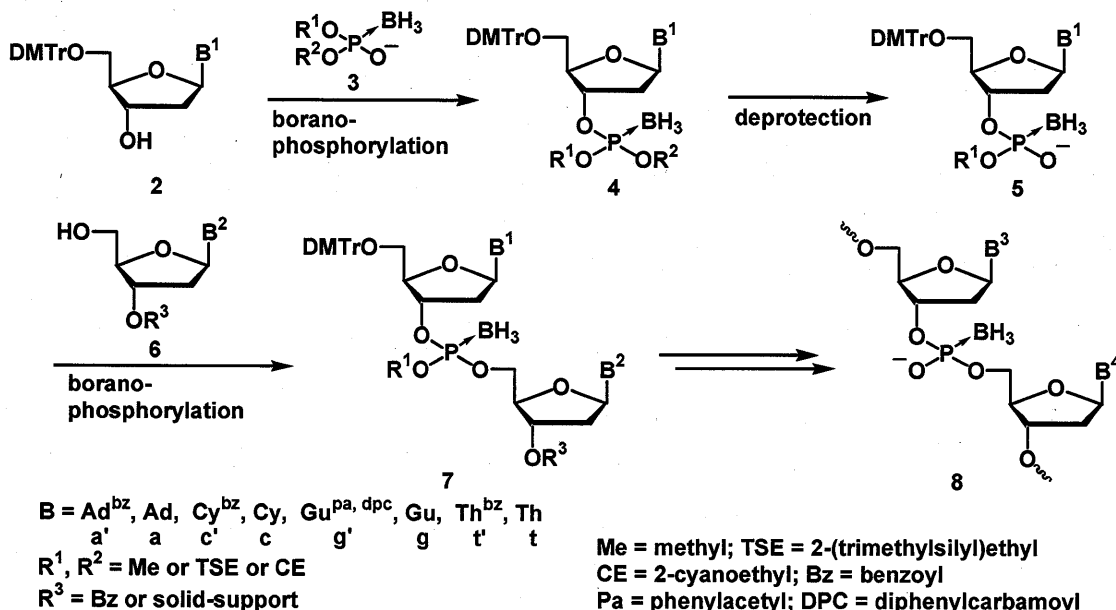
現在、アンチセンス分子として既に実用化されているホスホロチオエート DNA には、細胞毒性や選択性の低さといった問題があり、さらなる改良が求められている。そこで本研究は、新しい骨格を有するアンチセンス分子として、ボラノホスフェート DNA (1) に注目した。この分子の特徴として、1) リン原子にボランが結合しているため、天然型 DNA と比較して脂溶性が高く、高い細胞膜透過性が期待できること、2) 細胞内においてヌクレアーゼによる加水分解を受けにくいこと、3) 標的 mRNA に対する選択性が高いことが期待されること、4) ボラノホスフェート DNA と RNA が形成する二重鎖が RNase H の基質となり、標的 mRNA が効果的に分解されること、5) さらに、ホウ素中性子補足療法 (BNCT) への応用が望めること、などが挙げられる。

しかしながら、これまでに報告されてきた合成法では、核酸塩基とボラノ化剤が反応する副反応が問題となっており、比較的副反応を受けにくいオリゴチミジル酸誘導体しか合成されていない。そこで本研究ではこの問題を解決するため、Scheme 1 に示すように、予めボラノ化したホスホリル化剤を用いてヌクレオシド 3'位の水酸基をボラノホスホリル化する (2→4) ことにより、DNA 骨格内にボランを導入するという全く新しい合成手法 (ボラノホスホトリエステル法) を考えた。このような合成法を



用いることにより、従来の合成法で問題となっていた核酸塩基部位へのボラノ化剤による副反応の問題を解決することができ、また、合成不可能であった4種類の核酸塩基を含むボラノホスフェート DNA を合成できると考えた。

Scheme 1



【実験・結果】

§ 液相法

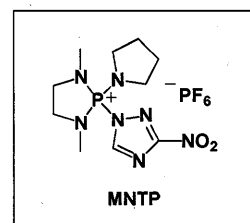
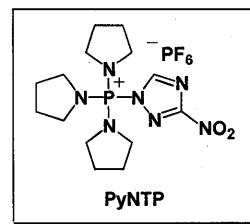
始めに、液相法によるジヌクレオシドボラノホスフェートの合成を試みた。モノマーユニット前駆体 (4) を合成するため、予めボラノ化したホスホリル化剤 (3) と縮合剤を用いて、ヌクレオシドの 3' 位をボラノホスホリル化することを試みた。その結果、これまで合成例のないデオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン誘導体 (4 a', c', g') についても、チミジン誘導体 (4 t) と同様に目的物を高収率で得ることができた (2 → 4)。

次に、2量体の合成を行うため、化合物 (4) のリン酸部位の保護基である R² を適切な条件で除去し (4 → 5)、上述のボラノホスホリル化と同様の反応を用いて縮合させることにより、高収率で4種類の核酸塩基を含む2量体を得ることができた (5 → 7)。

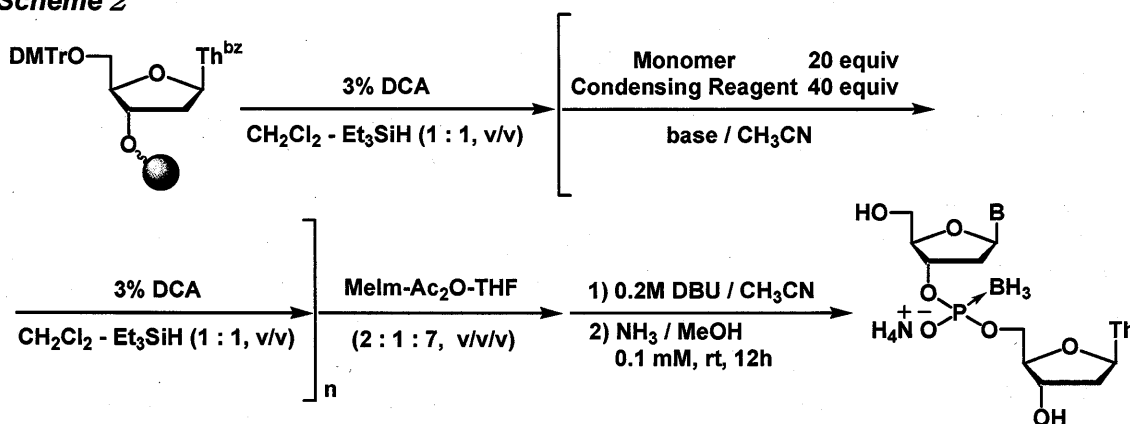
塩基部が完全に保護された4種類の核酸塩基を含む2量体を得ることができたので、常法に従い、アンモニア水による保護基の除去を試みた。しかしながら、AT、CT、GT、TT いずれの場合にも良好な収率で脱保護された目的物を得ることはできなかった。この原因として、リン酸部位の保護基であるメチル基が選択的に除去されず、ボラノホスフェートエステル結合の分解が起こっていることが、RP-HPLC による分析から示唆された。そこで2段階での脱保護反応を検討した。すなわち、アンモニア処理の前に PhSH 処理を行ない、メチル基を除去することによって2量体の分解が抑制された。さらに、アンモニア水の代わりにアンモニア性メタノールを用いたところ、2量体の分解はさらに抑制され、良好な収率で完全に脱保護された2量体を得ることに成功した (7 → 8)。

S 固相法

次に、オリゴマーを固相合成するために、液相法で確立したボラノホスホトリエステル法の固相合成への応用を試みた。まず液相法で用いた縮合剤である Bop-Cl は、反応系内に不溶の塩酸塩を多量に生成するため、固相法においては反応効率が著しく低下することが懸念される。さらに、Bop-Cl は活性が十分ではないため、系内に強塩基と求核触媒として 3-nitro-1,2,4-tirazole (NT) を加える必要がある。そこで、これらの問題点を解決するため、塩酸塩を生成せず、反応系内で求核触媒として作用する NT を生成することができる新規縮合剤、PyNTP と MNTP を新たに合成した。液相においてこれらの縮合剤を用いてボラノホスホリル化反応を行なったところ、いずれの縮合剤を用いた場合にも反応は Bop-Cl の場合と異なり、弱塩性条件下で迅速に進行することがわかった。反応を 2,6-lutidine などの弱塩基の存在下でも進行させることが可能となった



Scheme 2



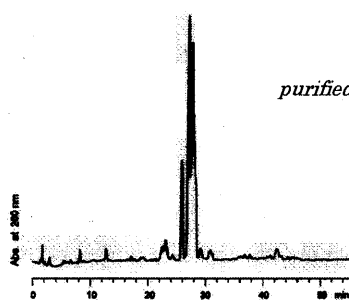
ので、これまで用いることのできなかつた、無水塩基性条件下、迅速且つ選択的に除去可能な 2-cyanoethyl (CE) 基をメチル基の代わりにリン酸部位の保護基として使えることが示唆された。そこで、縮合剤として PyNTP、塩基として 2,6-lutidine を用いてリン酸部位を CE 基で保護した 4 種類の核酸塩基を含むモノマー (5, R¹=CE) を合成した。

固相合成用の新しいモノマーユニットが合成できたので、固相合成を試みた (Scheme 2)。縮合剤、塩基、反応時間、脱保護条件など種々検討した結果、Ad、Cy、Gu、Th いずれの核酸塩基を用いた場合にも 94~96% の収率で縮合反応が進行することがわかった。

次に、オリゴマーの合成を試みた。Scheme 2 に従い、4 種類の核酸塩基を含むボラノホスフェート DNA 4 量体; d(C_{PBA}P_{BP}G_{PBT}) の合成を行な

Figure 1

RP-HPLC profile of crude d(C_{PBA}P_{BP}G_{PBT})

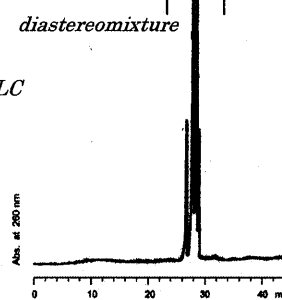


MALDI TOF-MS

calcd for [M-H]⁻: 1166.35; found: 1166.37

RP-HPLC profile after purification by IE-HPLC

purified by IE-HPLC



isolated yield: 30%

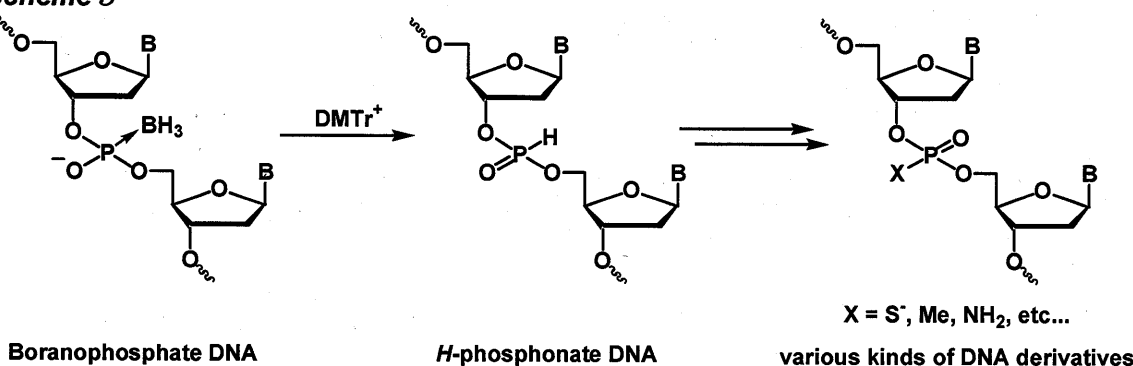
った。その結果、RP-HPLC による分析から各合成サイクルの平均収率は 97%で、4 量体を約 90%の収率で得ることができた。そこで、IE-HPLC を用いて精製を行なったところ、30%の収率で目的物を単離することができた (Figure 1)。

これまで4種類の核酸塩基を含むボラノホスフェートDNAのオリゴマーは合成された例がないため、その物性値を調べるために、12 量体; $d(C_{PBAPBG_{PB}}T)_3$ 及び $T(PBT)_{11}$ の合成を試みた。4 量体を合成した際にはIE-HPLCにより分離・分取が可能であったが、12 量体の場合、その脂溶性の高さからIE-HPLCによる精製は不可能であった。そこで、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) による精製を試みた。その結果、MALDI TOF-MS による分析から $d(C_{PBAPBG_{PB}}T)_3$ 、 $T(PBT)_{11}$ いずれも目的物が合成できていることを確認した。現在、得られた 12 量体を用いて、 T_m 値等、物性値の測定を行なっている。

§ 核酸類縁体の新規合成法の開発

ボラノホスフェート DNA の合成において、5'位水酸基の保護基である DMTr 基の除去条件について種々検討していた際、ボラノホスフェートジエステル誘導体の場合、速やかに脱ボラノ化が起こり、対応する *H*-ホスホネートに変換されるという、新反応を見出した (Scheme 3)。これは、ボラノホスフェート DNA を合成していく上では不都合な副反応であるが、見方を変えればボランが *H*-ホスホネートの保護基として機能しているとも考えることもできる。*H*-ホスホネート DNA は化学的に不安定であるため、長鎖のオリゴマーを合成することは困難である。しかし、ボランを *H*-ホスホネートの保護基として用いることができれば、化学的に極めて安定な長鎖ボラノホスフェート DNA を *H*-ホスホネート DNA の前駆体として合成し、これを經由して容易に長鎖 *H*-ホスホネート DNA を合成することが可能である。この *H*-ホスホネート DNA はホスホロチオエート DNA 等、様々なアンチセンス核酸の合成中間体として利用されていることから、極めて利用価値が高く、その合成法が確立されれば、修飾核酸合成のスタンダードとして利用されていくことも考えられる。そこでこの変換反応について検討を行なったところ、液相で、ジヌクレオシドボラノホスフェートから対応する *H*-ホスホネートに定量的に変換できる条件を見出すことに成功した。

Scheme 3



【総括】

本研究で新たに開発したボラノホスホトリエステル法により、これまで合成が困難であった Ad、Cy、Gu の核酸塩基を含むボラノホスフェート DNA の合成が可能となった。また、ボラノホスフェートを *H*-ホスホネートの前駆体として用いることにより、これまで合成が困難であった種々の核酸類縁体の合成につながるものと期待できる。