

論文内容の要旨

論文題目 2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-ホスファイトを モノマーユニットとする新規 DNA 合成法の開発

氏名 加藤有希子

【緒言】

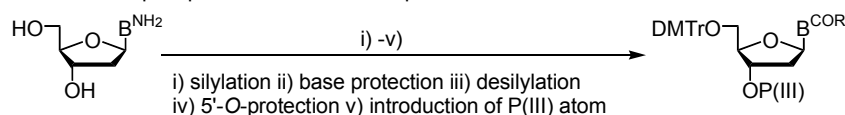
DNA オリゴマーやその誘導体は、PCR のプライマーや遺伝子変異導入などに日常的に使用されており、現在の生化学において必要不可欠な材料となっている。現在の DNA の化学合成では、オリゴマーの伸長方向である 5'-水酸基をジメトキシトリチル基で保護し、3'位に反応性の高い P(III) 原子を有する 2'-デオキシリボヌクレオシドを用いる方法が主流となっている。

本研究では、2'-デオキシリボヌクレオシドの 5'位に、保護基と P(III)原子を同時に有するホスファイトを新しいモノマーユニットとしてデザインし、DNA オリゴマー合成に用いることを検討した。

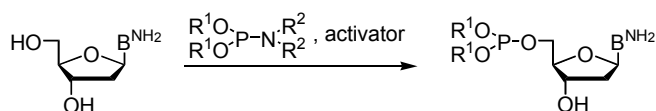
2'-デオキシリボヌクレオシドの 5'-水酸基を選択的にホスフィチル化できれば、保護基と P(III)原子を同時にヌクレオシドに導入でき、一段階でモノマーユニットを合成できるものと考えた。

Scheme 1. Synthesis of monomer units.

- Conventional *H*-phosphonate method - 5 steps



- Present method - *only one step*



一方、本法の合成サイクル (Scheme 2) では、延長鎖の末端のホスファイトを *H*-ホスホネートモノエステルへと変換する新規反応の開発が必要である。

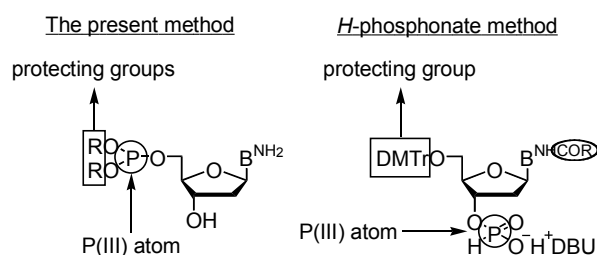
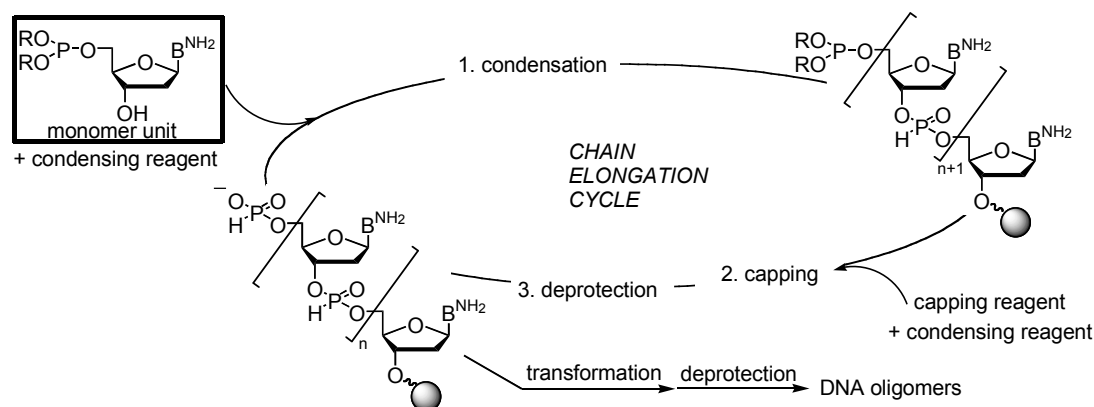


Figure 1. Structures of monomer units.

Scheme 2. Chain elongation cycle for the present method.



本研究では、モノマーユニット合成反応並びにホスファイトの脱保護反応の開発を行ない、これらを用いて固相法でオリゴマー合成を行なった。

1. 第一級水酸基選択的ホスフィチル化反応の開発

従来の DNA 合成法に用いられるモノマーユニットは、2'-デオキシリボヌクレオシドの位置及び官能基選択的な変換が困難であるため、適切な保護・脱保護の過程が必要であり、数段階の反応工程を必要としている。本法では、嵩高い置換基を有するホスフィチル化剤を用いて、2'-デオキシリボヌクレオシドの 5'-水酸基を位置及び官能基選択的にホスフィチル化する反応を開発し、塩基部位無保護のモノマーユニットを合成する手法を考案した。はじめに、種々の置換基を有するホスフィチル化剤を合成し、酸性活性化剤であるピリジン塩酸塩の存在下、チミジンに対してピリジン中でホスフィチル化を行い、³¹P NMR によって反応の選択性を評価した (Scheme 3, Table 1)。

Scheme 3. 5'-O-Selective phosphitylation of 2'-deoxyribonucleosides.

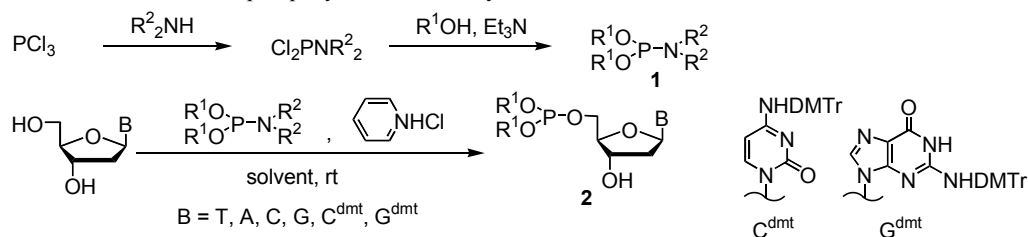


Table 1. Phosphitylation of thymidine by various phosphitylating reagents.

Entry	R ¹	R ²	isolated yield of 1 (%)	ratio of phosphites (%)			dN : amidite : activator	isolated yield of 2 (%)
				5'-	3'-	5',3'-		
1	<i>t</i> -Bu	Et	69	89	4	7	1.0 : 1.2 : 2.3	82
2	1-adamantyl	<i>i</i> -Pr	49	90	5	5	1.0 : 1.1 : 2.5	^{*2}
3	PhMe ₂ C-	<i>i</i> -Pr	^{*1}	-	-	-	-	^{*1}
4	<i>p</i> -FPhMe ₂ C-	<i>i</i> -Pr	76	-	-	-	-	^{*3}
5	Ph(CF ₃) ₂ C-	<i>i</i> -Pr	^{*1}	-	-	-	-	^{*1}
6	PhCH ₂ Me ₂ C-	<i>i</i> -Pr	76	94	3	4	1.0 : 1.0 : 2.0	^{*3}
7	(1-C ₁₀ H ₉)CH ₂ Me ₂ C-	<i>i</i> -Pr	quant	91	8	1	1.0 : 1.0 : 2.0	^{*3}
8	(PhCH ₂) ₃ C-	<i>i</i> -Pr	^{*1}	-	-	-	-	^{*1}

^{*1} Degradation of the phosphitylating reagents. ^{*2} Impossible to separate 5'- and 3'-isomers. ^{*3} Degradation of the resuming phosphite.

ホスフィチル化剤の合成の簡便さや目的物の分離精製の容易さを考慮して、ホスフィチル化剤としてジ(*t*-ブチル) *N,N*-ジエチルホスホロアミダイトを用いることにした。

次に、塩基部位の副反応がないチミジンを用いて位置選択的反応の検討を行なったところ、ホスフィチル化剤の当量が増加しても、3'-体の生成比は増加しないが、5',3'-ジホスファイトの生成比が増加することがわかった (Table 2)。

Table 2. Phosphitylation of thymidine by di(*t*-butyl) *N,N*-diethylphosphoramidite in C₅D₅N-C₅H₅N (1:4, v/v).

entry	equiv of phosphoramidite ^a	ratio of phosphites (%)			conversion (%) ^b
		5'-	3'-	5',3'-	
1	0.5 (0.39)	94	5	1	39
2	0.8 (0.67)	93	5	2	66
3	1.0 (0.82)	92	5	3	80
4	1.5 (1.12)	86	2	12	100

^aIn the parenthesis, the effective equivalent of the phosphitylating reagent is given.

^bThe percentage of the consumed thymidine determined by ³¹P NMR.

次に、他の塩基を有する 2'-デオキシリボヌクレオシドを用いてホスフィチル化を行なったところ、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジンは、ピリジンに対する溶解度が低く、溶媒に溶解した少量の基質に対して大過剰のホスフィチル化剤が反応したため、5',3'-ジホスファイトが主に生成した。しかし、塩基部位の環外アミノ基にはホスフィチル化は起こらなかった。そこで、シトシン塩基とグアニン塩基のアミノ基にジメトキシトリチル基 (DMTr 基) を導入することで溶解度を向上させたところ、選択性が飛躍的に向上した。これらの実験結果から、反応の選択性は、基質の溶解度が十分にあれば極めて高く、また、反応の選択性はモル比に依存することがわかった。

以上の結果から、2'-デオキシシチジン及び 2'-デオキシグアノシンに関しては、基質を完全に溶解する溶媒を用いることで、位置選択的の反応を実現できるものと考えて、種々の溶媒を検討した。その結果、*N*-メチルピロリドン (NMP) とピリジンの混合溶媒を用いることで選択的に 5'-水酸基をホスフィチル化することができた (Table 3)。

Table 3. Chemo- and regioselective phosphitylation of 2'-deoxyribonucleosides.

entry	B	solvent ^a	equiv of phosphoramidite ^b	ratio of products ^c (%)			conversion (%) ^d	yield (%) ^e
				5'-	3'-	5',3'		
1	T	A	1.1 (1.05)	89	4	7	98	82
2	A	A	1.2 (1.11)	95	1	4	100	74
3	4- <i>N</i> -DMTr-C	A	1.0 (0.72)	89	7	4	83	45
4	2- <i>N</i> -DMTr-G	A	0.6 (0.57)	97	2	1	56	55
5	C	B	1.2 (1.13)	84	3	13	86	49
6	G	C	1.2 (0.96)	92	1	7	91	52

^asolvent: A pyridine, B pyridine-NMP (1:2, v/v), C pyridine-NMP (1:1, v/v). ^bIn the parenthesis, effective equivalent of di(*t*-Bu)

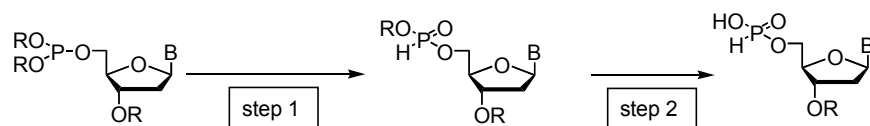
N,N-diethylphosphoramidite is given. ^cThe ratio of the products was estimated after extraction of the reaction mixture. ^dThe

percentage of the consumed nucleosides determined by ³¹P NMR. ^eThe isolated yield of **2**.

2. 脱保護条件の検討

次に、2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-ホスファイトの保護基の除去条件を検討した。

本法では、オリゴマーの合成サイクルでオリゴマーの末端をホスファイトから *H*-ホスホネートモノエステルへ変換することが必要となるが、このような反応はこれまでに知られていない。しかし、モノマーユニットの保護基として用いている *t*-ブチル基は最も単純な第 3 級アルキル基であり、酸性条件下 E1 脱離によって除去できるものと考えた (Scheme 4)。

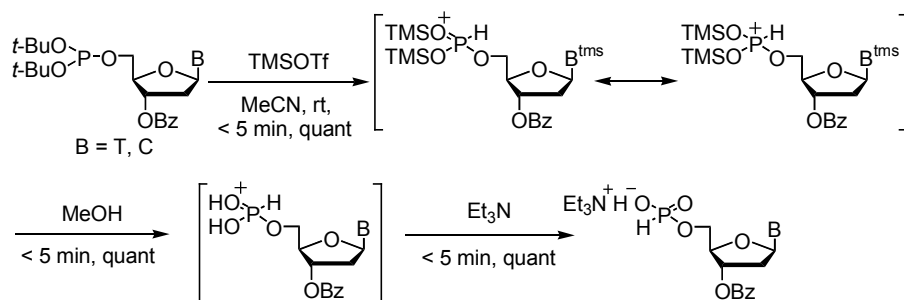
Scheme 4. Deprotection of a phosphite into an *H*-phosphonate monoester.

まずはじめに、塩基部位無保護 DNA オリゴマー合成で 5'-末端のジメトキシトリチル基を除去する条件として一般的に用いられるジクロロメタン中、1%トリフルオロ酢酸によって保護基の除去を試みた。1 段階目は 5 分以内に迅速に進行したが、2 段階目の反応の完了までには 2 時間と長時間を要した。従って、この条件は迅速なオリゴマー合成には適さないと考えた。

そこで、アセトニトリル中でトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (TMSOTf) を用いて保護基の除去を試みたところ、各ステップ 5 分以内に定量的に反応が進行することが、³¹P NMR によって確認された。しかし、2'-デオキシアデノシンの誘導体を用いて脱保護反応を行なったとこ

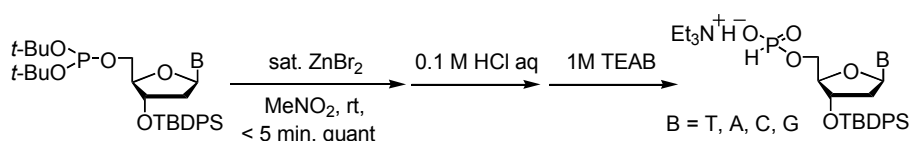
ろ、系中に発生するトリフルオロメタンスルホン酸によってアデニン塩基が脱離するデプリネーションが起こった (Scheme 5)。

Scheme 5. Deprotection of a phosphite by TMSOTf



そこで、デプリネーションが起こらないと報告されている ZnBr_2 を用いて脱保護反応を行なったところ、5 分以内に反応が終結することがわかった。本反応は迅速かつ定量的に進行し、塩基部位への副反応は観測されなかった (Scheme 6)。

Scheme 6. Removal of *t*-Bu groups introduced to a phosphite by ZnBr_2 .

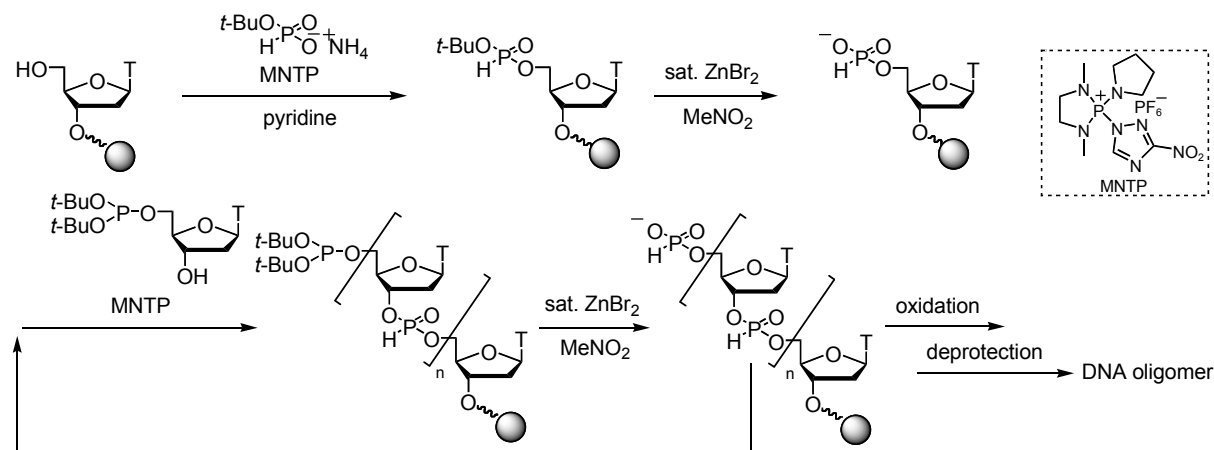


以上の結果から、 ZnBr_2 を用いた固相法によるオリゴマー合成が可能と考えた。

3. 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て、アンモニウム *t*-ブチルホスホネートを用いてホスホニル化を行ない、 ZnBr_2 を用いて伸長鎖の末端を *H*-ホスホネートモノエステルへと誘導した。その後、モノマーユットとの縮合と ZnBr_2 による脱保護を繰り返すことでオリゴマー合成を行なった。逆相 HPLC による分析の結果、チミジル酸 4 量体が良好な収率で生成していることがわかった。

Scheme 7. Solid-phase synthesis of DNA oligomers.



【結論】

本研究では、高高い置換基を有するホスフィチル化剤を用いて、2'-デオキシリボヌクレオシドの第一級水酸基を 84%以上の高選択性でホスフィチル化する新しい手法を開発した。また、ホスファイトに導入した保護基である *t*-ブチル基を、 ZnBr_2 を用いて迅速かつ定量的に脱保護する反応を初めて開発した。これらの反応を用いて、固相法によってチミジル酸 4 量体を良好な収率で合成することができた。本法で得た DNA は、塩基部位無保護 *H*-ホスホネート DNA オリゴマーを中間体として合成している。塩基部位無保護 *H*-ホスホネート DNA オリゴマーは、塩基性条件下不安定な種々のリン原子修飾型 DNA の中間体として有用であり、本法はこれら DNA 類縁体の新規合成法として期待される。