

論文内容の要旨

セリン骨格を有する新規核酸類縁ポリエステルの固相合成

村田 亜沙子

序論

自然界で見られる分子認識で最も重要なもののひとつに、核酸塩基同士の相互作用がある。核酸塩基は、水素結合によりアデニンとチミン(ウラシル)あるいはグアニンとシトシンといった相補的な塩基対を形成し、それらが規則的に配列することで、遺伝情報の貯蔵や伝達という生物の最も重要な生命活動を可能にしている。また、塩基配列間の特異的な相互作用を利用することで、標識プローブなどの生物学的ツールとして、またアンチセンス分子や siRNA などの医薬としての応用が期待されている。一方、核酸やタンパク質をはじめとする生体分子は光学活性体であり、そのキラリティーは生体機能の発現に重要な役割を果たしている。このような分子の不斉認識能は、不斉触媒による不斉合成などの反応開発の分野、あるいはクロマトグラフィーカラムによる光学活性体の分離などの分離精製技術への応用など、他の分子に対する認識機構のひとつとして広く研究されている分野である。

そこで本研究では、新しいタイプの核酸類縁体として、アミノ酸である光学活性セリンを基本骨格とし、そこに核酸塩基を規則的に導入した核酸類縁ポリエステル (serine-based nucleobase-linked polyester: SNE)(Figure 1)をデザインし、それを合成することを目的とした。

SNE には次のような特徴がある。まずひとつは、ポリエステルであるということである。エステル結合を有することにより、オリゴマーは、比較的高い水溶性を有することが期待される。もうひとつは、基本骨格に不斉炭素を有することである。立体化学的に純粋なモノマーが縮合したオリゴマーには、主鎖のキラリティーに基づいた規則正しいらせん構造が誘起されることが期待される。核酸塩基同士の相互作用に加え、骨格のキラリティーにより誘起される不斉な環境により、他の分子に対する不斉認識能が発現し、

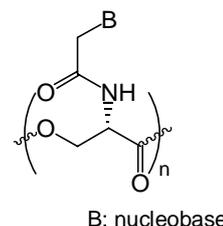


Figure 1 Structure of SNE

アンチセンス分子や不斉重合のテンプレートとしても応用可能な、新たな機能性高分子の創成が可能であると考えられる。また、塩基性条件下で加水分解されやすいエステル結合を有するこのような核酸類縁体の合成はこれまでにほとんど報告例がなく、その化学合成法を開発することで、有機合成上極めて有用な知見が得られるものと考えられる。

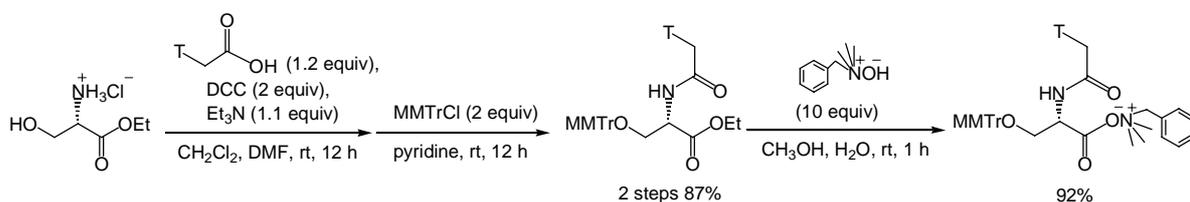
本研究では、SNE オリゴマーの合成を目指し、4種類の核酸塩基を含むオリゴマーの合成に適用可能な固相法の開発を行った。

結果

1. モノマーユニットの合成

まず、L-セリンを基本骨格とし、核酸塩基部位に保護基を必要としないチミン誘導体の合成を目指し、そのモノマーユニットの合成を行った (Scheme 1)。

Scheme 1

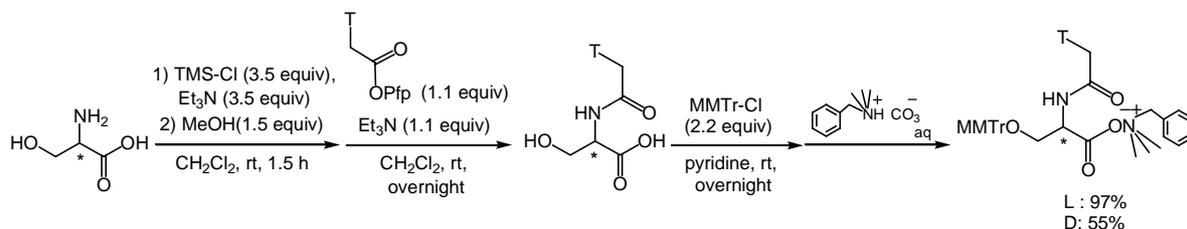


セリンとチミニル酢酸をジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)存在下で縮合し、次いで水酸基のモノメトキシトリチル(MMTTr)基による保護、最後にエチルエステルの加水分解を経て、目的とするモノマーユニットを良好な収率で得ることができた。また、ウラシル、シトシン、アデニンを含むモノマーユニットも、同様の方法で合成した。

次に、このようにして合成したモノマーユニットの光学純度を検定した。逆相キラルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (キラル RP-HPLC)により、チミンを含むモノマーユニットの両対掌体を分析したところ、20%程度のラセミ化が起こっていることがわかった。そこで、新たなモノマーユニットの合成経路を検討した。

前述のモノマーユニットの合成経路で最もラセミ化が起こる可能性が高いのは、第4級アンモニウムヒドロキsidによるエチルエステルの加水分解の過程である。そこで、この過程を経ない新しい合成経路を考えた (Scheme 2)。

Scheme 2

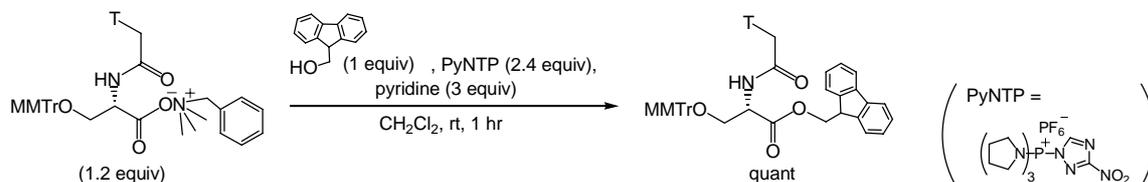


チミニル酢酸ペンタフルオロフェニルエステルによるセリンのアミノ基のアシル化、水酸基の MMTTr 基による保護、カルボキシル基の塩交換を経て、目的とするモノマーユニットを良好な収率で得ることができた。先程と同様にキラルカラムを用いた RP-HPLC による分析を行った結果、L 体は 98% e.e.、D 体は 97% e.e.と高い光学純度でモノマーユニットを合成できた。

2. 縮合反応の検討

得られたモノマーユニットを用いて、アルコールとのエステル結合生成反応を検討した (Scheme 3)。

Scheme 3



種々の縮合剤を用いて反応条件を検討した結果、当研究室で開発した新規縮合剤 (3-ニトロ-1,2,4-トリアゾリルトリスピロリジニルホスホニウムヘキサフルオロホスフェート: PyNTP) を用い、ピリジン存在下、ジクロロメタン中で反応を行なった場合に、短時間かつ高収率で目的とする生成物が得られることがわかった。

3. 新規リンカーの合成と固相法への応用

本研究でデザインした SNE は、ポリエステルであるため、塩基性条件下で容易に加水分解される。そこで、オリゴマー上のエステル結合を切断することなく固相担体からの切り出しが可能な新しいタイプのリンカーをデザインし、合成することにした。

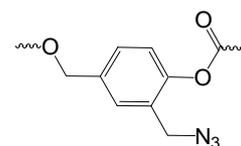
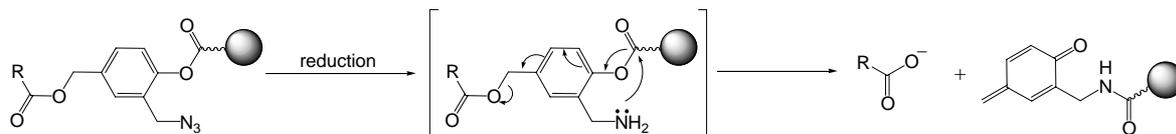


Figure 2

本研究でデザインしたリンカー (Figure 3)は、アジド基の還元により生じたアミノ基が隣接するカルボニル炭素を求核攻撃することで 1,6 脱離反応が起こり、穏和な中性条件下、オリゴマーの切り出しが可能であると考えた (Scheme 4)。そこで、このリンカーの合成を試みた。まず、4-ヒドロキシイソフタル酸を出発原料として、全 8 工程収率 52% で目的とするリンカーを合成することに成功した。

Scheme 4

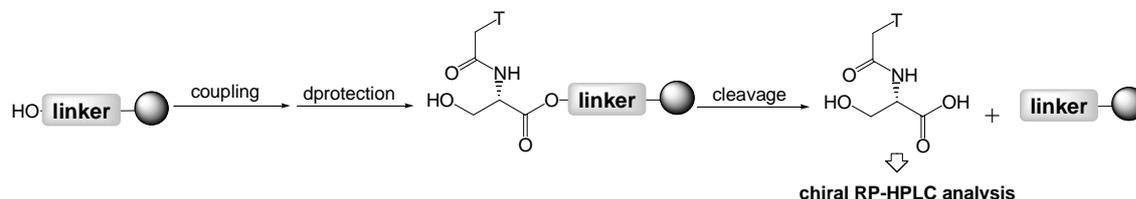


次に、高架橋ポリスチレン樹脂 (HCP)へのリンカーの導入反応を行い、固相担体からのオリゴマーの切り出し反応について、反応条件の検討を行った。その結果、還元剤としてメチルジフェニルホスフィンを用い、ジオキサン-水中で反応を行った場合に、高効率で切り出し反応が進行することがわかった。さらに、固相担体上でダイマーを合成し、検討した切り出し条件でダイマー上のエステル結合が切断されるかどうかを確認した。RP-HPLC による分析の結果、エステル結合を切断することなくダイマーを固相担体から切り出すことができた。

4. 固相担体上での縮合反応とラセミ化の検討

本研究で開発した新規リンカーを用いて、固相担体からエステル結合を切断することなく SNE ダイマーを切り出すことができたので、次に固相担体上での縮合反応およびラセミ化の検討を行った。固相担体へモノマーを様々な縮合反応条件で縮合し、MMTr 基の除去、固相担体からの切り出しを行った (Scheme 5)。

Scheme 5



切り出し後、キラルカラムを用いた RP-HPLC による生成物の分析を行い、その光学純度を検定した。その結果、液相法で最適化した縮合反応条件では、若干のラセミ化が起こっていることがわかった。そこで、種々の縮合剤および塩基、求核触媒を検討した結果、縮合剤として PyNTP、塩基としてキノリンを用いた場合に、縮合収率およびラセミ化ともに良好な結果が得られた。N-アシルアミノ酸はカルボキシ基の活性化に伴うラセミ化が起こりやすいとされ、本研究で見いだした効率的なエステル結合生成反応の条件は、N-アシルアミノ酸の縮合反応に関する研究にも極めて重要な知見となるものである。

結論

本研究では、セリン骨格を有する新規核酸類縁ポリエステルをデザインし、その合成について検討した。まず、光学活性なモノマーユニットの合成法を確立した。次に、それらを用いた迅速なエステル結合生成反応条件を見いだした。また、オリゴマー合成を目指し、還元反応を用いた穏和かつ中性条件下で切り出しが可能である新規リンカーを合成した。さらに、固相担体上でラセミ化を抑制した縮合反応条件を見いだした。