

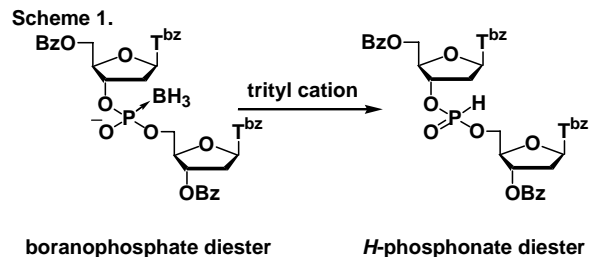
論文内容の要旨

論文題目 ボラノホスフェート DNA を用いる DNA 類縁体 合成法の開発

氏名 川中 俊秀

【序論】現在、天然型 DNA のリン原子上に種々の置換基や官能基を導入したリン酸部位修飾型 DNA 類縁体の合成研究が盛んに行なわれている。これら DNA 類縁体は、天然型 DNA と比較して核酸分解酵素に対する耐性が高いなどの生物学的特性を有し、遺伝子の発現を抑制するアンチセンス分子など医薬への応用が期待されている。*H*-ホスホネート DNA は、天然型 DNA のリン原子上の非架橋酸素原子のひとつを水素原子に置き換えた構造をしており、リン原子上に種々の官能基を導入できるため、DNA 類縁体合成における有用な中間体である。しかしながら、*H*-ホスホネートジエステルは化学的に不安定であり、固相合成中に伸長鎖切断などの副反応が進行する。このため、従来の方法では長鎖 *H*-ホスホネート DNA を高収率で得ることはできない。

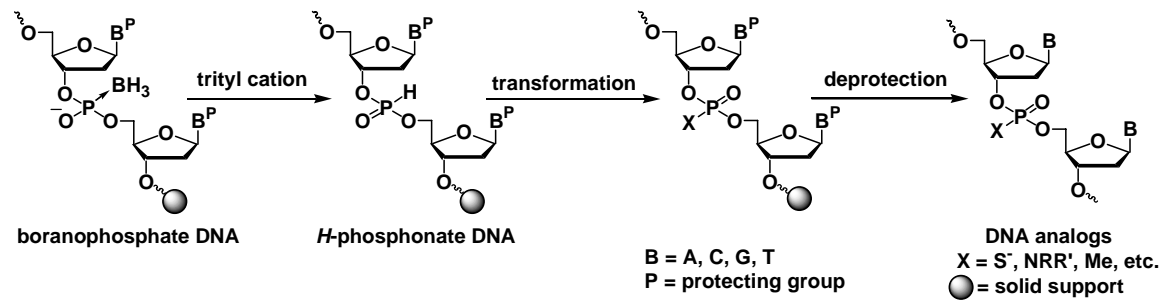
最近、当研究室では、化学的に安定なボラノホスフェートジエステルに対して酸性条件下トリチルカチオンを作用させることで、対応する *H*-ホスホネート誘導体を得る新規反応を見出した (Scheme 1)。



この反応を別の観点からみると、ボランを用いて *H*-ホスホネート、すなわちホスホン酸を保護することができるものと考えられる。そこで本研究では、ボランをホスホン酸の保護基として用いる新しいリン酸部位修飾型 DNA 類縁体合成法を考案した (Scheme 2)。

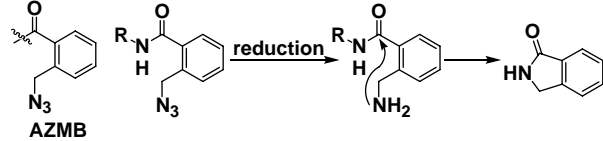
まず、ボランによってホスホン酸が保護された状態で鎖長伸長を行ない、目的の塩基配列を有するボラノホスフェート DNA を合成する。次に、トリチルカチオンを作用させて対応する *H*-ホスホネートへと誘導した後に、種々の変換反応を行ない、目的とする天然型 DNA や様々なリン酸部位修飾型 DNA 類縁体を得る。本研究では、この新規合成法の確立を目指している。

Scheme 2.



従来、核酸塩基部位の保護基としては、強塩基性条件下除去可能なアシル基が用いられている。しかし、これらの保護基は塩基性条件下不安定な DNA 誘導体の合成には適さない。そこで、本研究では中性条件下脱保護可能な 2-アジドメチルベンゾイル (AZMB) 基を核酸塩基部位の保護基として用いた (Scheme 3)。AZMB 基は、ホ

スフィンと水を用いてアジド基をアミノ基に還元することで除去が可能である。この反応は中性条件下で進行するため、脱保護反応にもちい



る塩基性条件下不安定なオリゴヌクレオチドの分解を抑制することができるものと考えられる。

また、グアノシン O^6 位にも同様に穏和な中性条件下除去可能な保護基の導入が必要となる。そこで、本研究では 4-(2-アジドメチルベンゾイロキシ)ベンジル (AZBn) 基および 4-アジドベンジル (ABn) 基をグアノシン O^6 位の新しい保護基として開発

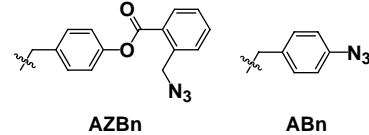


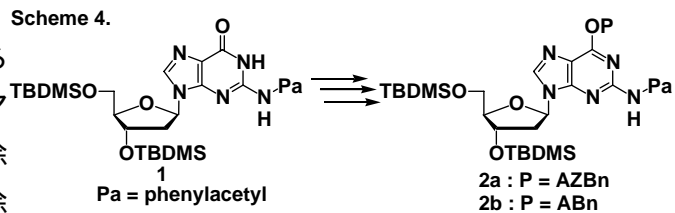
Figure 1.

した (Figure 1)。これらの保護基を用いることで、従来の DNA 合成法では困難であった、様々な DNA 類縁体が合成可能となる。

【結果・考察】

1. グアノシン O^6 位の保護基

4-ヒドロキシベンジル基の水酸基が、AZMB 基で保護された構造を有する AZBn 基の開発を試みた。AZBn 基は、アジド基の還元反応により AZMB 基が除去されるとキノンメチドの生成を伴い除



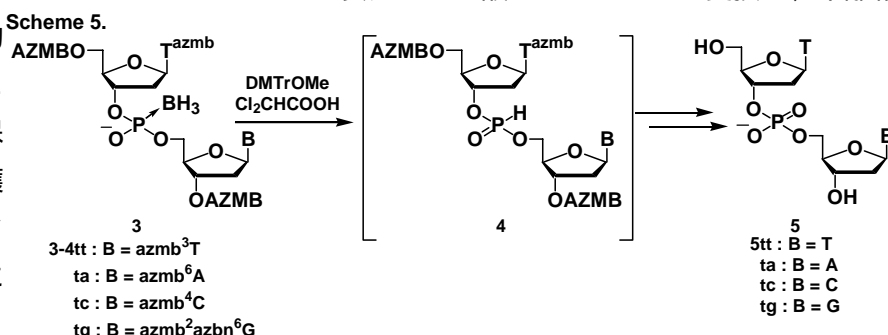
去反応が進行すると考えられる。まず常法により AZBn 基の 2'-デオキシグアノシン誘導体への導入反応を行なったところ、中程度の収率で目的物を得た (Scheme 4)。得られた 2a に対して、AZMB 基の脱保護条件を適用し、AZBn 基の除去を試みた。その結果、脱保護反応時に生成するキノンメチドがグアニン塩基に付加する副反応が観測された。そこで、キノンメチドの捕捉剤を種々検討したところ、2-メルカプトエタノールの存在下で副反応を抑制することに成功した。しかしながら、AZBn 基は立体障害が大きく導入効率が低いため、より骨格の小さい ABn 基に着目した。

ABn 基は、アジド基をアミノ基に還元することで、イミノキノンとして脱離することが予想される。AZBn 基と同様の方法で ABn 基を 2'-デオキシグアノシン誘導体に導入したところ、高収率で目的物を得ることができた。得られた 2b を用いて脱保護反応を検討した結果、AZBn 基とは異なりキノン誘導体のグアニン塩基への付加反応は観測されず、迅速に脱保護反応が完結した。次に、これらの新規保護基を用いる固相合成を検討した。まず固相担体上で $G_{PB}T$ を合成し、液相と同様の反応条件で脱保護反応を行なったところ、イミノキノンがリン酸エステル部位等に付

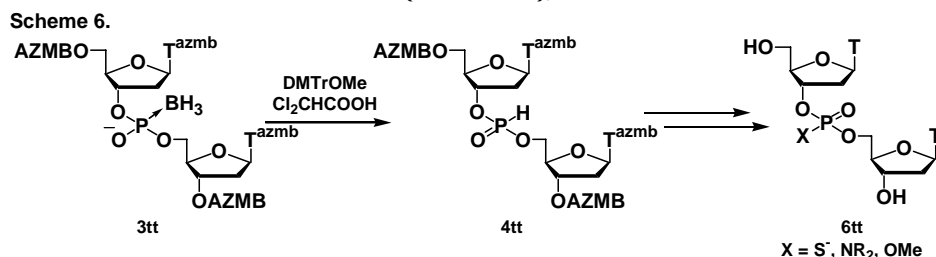
加したと考えられる副生成物が観測された。そこで、捕捉剤の添加など脱保護反応の検討を行なったところ、高収率で脱保護反応が進行する条件を確立した。

2. 液相合成

まず、液相法によるリン酸部位修飾型 DNA 類縁体合成を検討した。水酸基および核酸塩基部位を AZMB 基で保護したジチミジンボラノホスフェート 3tt をモデル化合物として用い、ボラノホスフェートジエステルから *H*-ホスホネートジエステルへの変換反応を検討した。種々反応条件の検討を行なったところ、トリチルカチオン源として DMTrOMe を、酸としてジクロロ酢酸を用いると、定量的に目的とする変換反応が進行することがわかった (Scheme 5)。そこで、他の核酸塩基を有するジヌクレオシドボラノホスフェートを合成し、最適化した変換反応条件を用いてこれらに対応する *H*-ホスホネートジエステルへ変換する反応を試みた。その結果、全てのジヌクレオシドボラノホスフェートを高収率で目的とする *H*-ホスホネートに変換することができた。ここで、*H*-ホスホネートジエステルは化学的に不安定であり、精製の際に分解反応が起こることが知られている。そこで、*H*-ホスホネートジエステルを安定なリン酸ジエステルへと変換し、単離精製を試みたところ、目的物を良好な収率で得ることができた。さらに脱保護反応を行ない、無保護のジヌクレオシドホスフェートを合成することに成功した。



次に、種々のリン酸部位修飾型 DNA 類縁体合成を試みた。ジチミジンボラノホスフェートを用いて *H*-ホスホネートへと変換した後に、種々の誘導化反応を行なった。その結果、様々な DNA 類縁体を良好な収率で得ることができた (Scheme 6)。



3. 固相合成

液相法で確立した新規 DNA 類縁体合成法の固相法への応用を検討した。まず、固相担体上に担持されたチミジン誘導体の 5'水酸基とシチジンのモノマーユニットとを縮合した後に、ボラノホスフェートエステル部位の保護基である 2-シアノエチル基を除去し、ジヌクレオシドボラノホスフェートを固相担体上で合成した。得られた 9 を用いて *H*-ホスホネートジエステルへの変換反応を行なった。*H*-ホスホネートジエステルは、固相担体からの切り出し条件下分解するため、リン酸ジエステルへと誘導した後に切り出し反応を行ない、逆相 HPLC による分析を行なった。まず、液相で確立した変換反応条件で反応を行なったところ、変換反応が完結していないことが確認された。そこで、種々のトリチルカチオン源を用いて変換反応を試みた。その結果、トリチルカチオン源として TrBF₄ を用いることでほぼ定量的に目的物を得ることができた (Table 1)。次に、他の核酸塩基を含むジヌクレオシドボラノホスフェートを合成し、同様の反応条件で変換反応を行なったところ、アデノシンおよびグアノシンを含む場合に副反応が観測された。このため、再

度トリチルカチオン源の検討を行ない、A、C、G、T 全ての誘導体に対しても適応可能な反応条件を見出した (entry 5、6)。

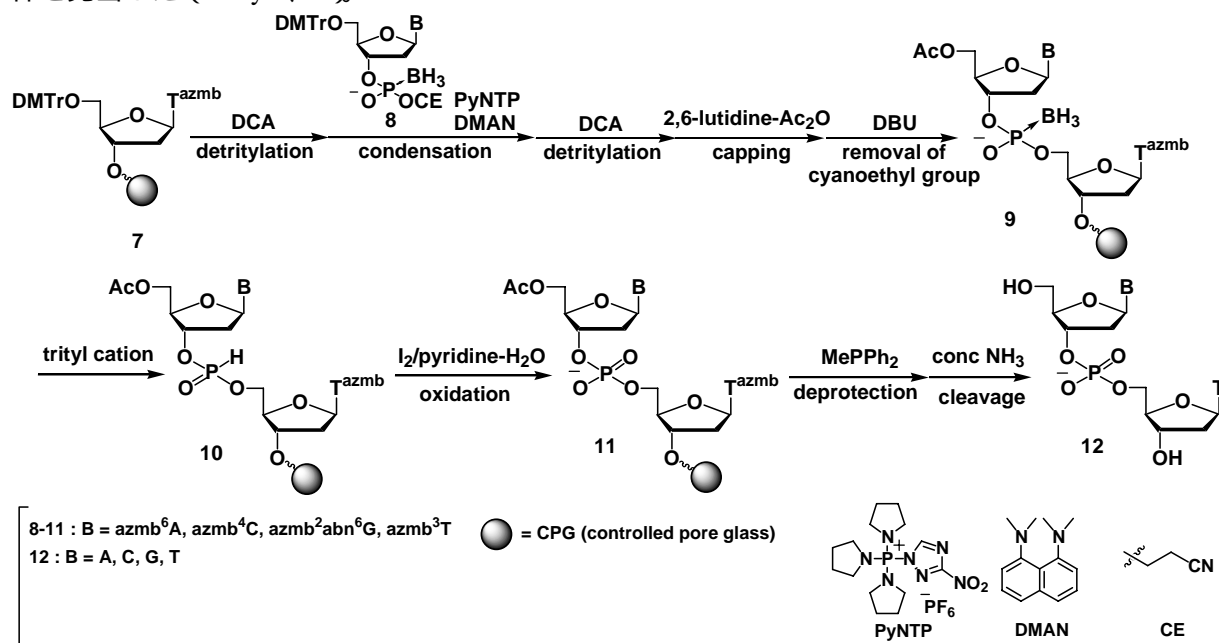


Table 1.

entry	B	trityl reagent	yield of 9 ^a	yield of 12 ^a
1	C	0.01 M TrBF ₄	97%	97%
2	T	0.01 M TrBF ₄	93%	93%
3	A	0.01 M TrBF ₄	93%	72%
4	A	0.01 M DMTrBF ₄	90%	80%
5 ^b	A	0.01 M DMTrBF ₄	93%	87%
6 ^b	G	0.01 M DMTrBF ₄	92%	83%

^aestimated by RP-HPLC

^btransformed after deprotection

さらに、ボラノホスフェート三量体、四量体を用いて反応条件の検討を行ない、高収率で変換反応が進行することを確認した。

【総括】

本研究では、液相および固相法によるボラノホスフェート DNA を経由する新規 DNA 類縁体合成法を確立した。また、グアニン 6 位の保護基として、新たに穏和な中性条件下除去可能な AZBn 基および ABn 基を開発した。これら合成法および保護基の開発により、従来の合成法では困難であった様々な DNA 類縁体合成が可能になるものと期待できる。

【発表論文】

- 1) Kawanaka, T.; Shimizu, M.; Saigo, K.; Wada, T. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 27-28: "A novel method for the synthesis of DNA and its analogs by the use of BH₃ as a protecting group for phosphonic acid".
- 2) Kawanaka, T.; Shimizu, M.; Wada, T. "Synthesis of dinucleoside phosphates and their backbone-modified analogs by the boranophosphotriester method" *submitted*.
- 3) Kawanaka, T.; Shimizu, M.; Shintani, N.; Wada, T. "Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the boranophosphotriester method using new protecting groups for nucleobases" *in preparation*.