

論文内容の要旨

論文題目 *H*-ホスホネート DNA の立体選択的合成

氏名 岩本 直樹

<序論>

近年、遺伝情報をもとに、遺伝子及びその転写産物を標的とする新しい治療法の開発が盛んにおこなわれている。その手法の一つに、アンチセンス法がある。アンチセンス法とは、標的となる mRNA に相補的な塩基配列を有する核酸誘導体を選択

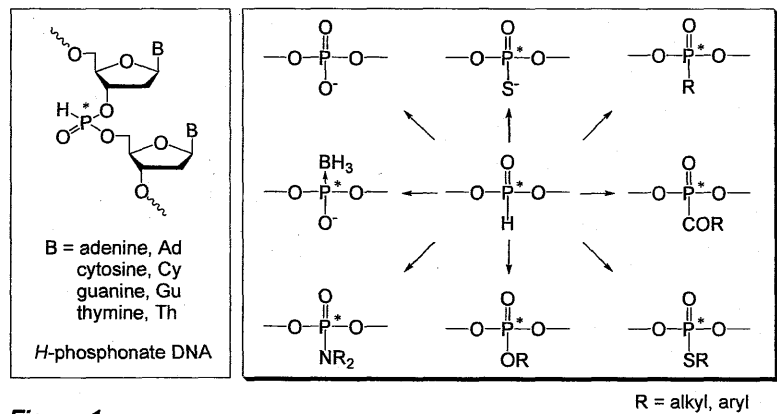


Figure 1.

的に結合させ、タンパク質の翻訳を阻害する手法である。アンチセンス分子として天然型 DNA を用いた場合、生体内の加水分解酵素により容易に加水分解されるという致命的な問題がある。天然型 DNA のリン原子に様々な置換基を修飾した DNA 類縁体 (インターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体) は生体内の加水分解酵素に対する耐性が向上することが知られており、アンチセンス分子として有望視されている。

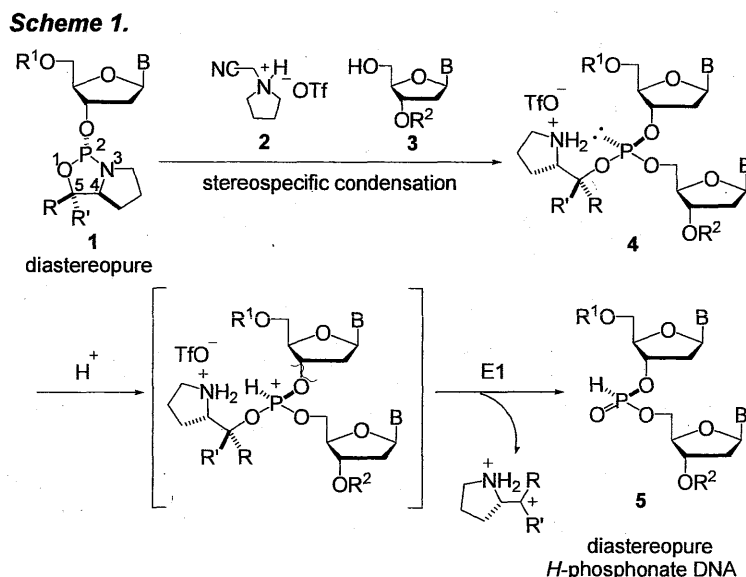
H-ホスホネート DNA は、天然型 DNA の 2 つの非架橋酸素原子のうちの 1 つを水素原子に置換した構造をしており、リン原子にキラリティを有する。また、*H*-ホスホネート DNA は、種々のインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体へと立体特異的に変換可能な有用な合成中間体である (Figure 1)。しかしながら、これまでに *H*-ホスホネート DNA を立体選択的に合成したという報告例はなく、ほとんどのインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体に関しても、立体選択的合成は

実現されていない。インターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体の中で、立体選択的合成が達成されているホスホロチオエート DNA は、リン原子の絶対立体配置の違いにより、生理活性や物性が異なることが知られており、そのほかのインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体に関しても、同様に性質の違いが現れることが考えられるが、詳細な検討には至っていない。そこで、*H*-ホスホネート DNA を立体選択的に合成することができれば、立体特異的な変換反応により、立体化学的に純粋なインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体が合成でき、それらのリン原子の絶対立体配置に応じた生理活性や物性を明らかにすることが可能となる。

<研究計画>

本研究室では、これまでにオキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート DNA の立体選択的合成法を開発した。オキサザホスホリジン法とは、立体化学的に純粋な 1,2-アミノアルコールから誘導したオキサザホスホリジン誘導体 **1** を立体選択的に合成し、次に、これを弱酸性の求核性の小さい活性化剤 **2** の存在下、ヌクレオシド **3** と立体特異的に縮合させることで立体の制御されたホスファイト **4** を合成する手法である。そこで、本研究では、オキサザホスホリジン法を *H*-ホスホネート誘導体の立体選択的合成に応用することを検討した。

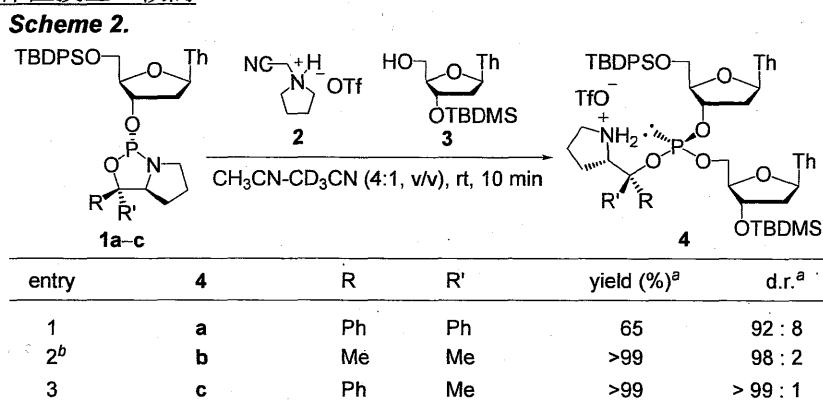
オキサザホスホリジン誘導体 **1** の合成にあたり、オキサザホスホリジン 5 位に 2 つの置換基 (R, R') を導入することとした。この場合、従来のオキサザホスホリジン法に従って得られた立体の制御されたホスファイト **4** から、比較的強い酸性条件下、リン原子がプロトン化されることにより、不斉補助基が安定な第三級カルボカチオンとして E1 脱離し、対応する *H*-ホスホネート **5** を **4** の立体化学純度を損なわずに得られるのではないかと考えた (Scheme 1)。



<実験結果及び考察>

(1) オキサザホスホリジン誘導体置換基の検討

オキサザホスホリジン誘導体 **1** として、2 つの置換基 (R, R') が両方とも Ph 基 (ジフェニル体)、または Me 基 (ジメチル体)、さらに一方が Ph 基、もう一方が Me 基 (フェニルメチル体) の誘導体を合成し、目的の反応について検討をおこなった (Scheme

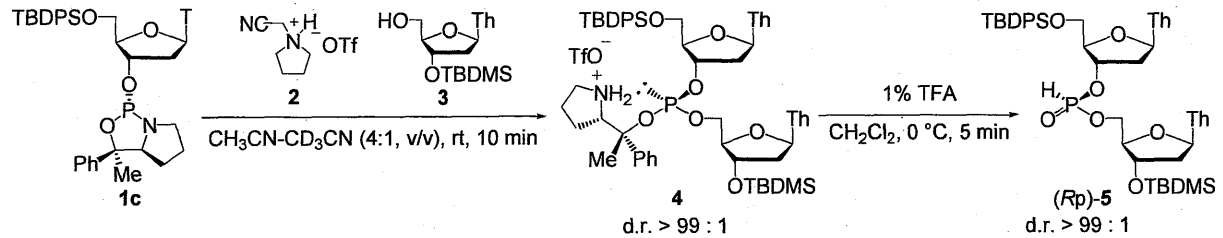


^aDetermined by ³¹P-NMR. ^bThe d.r. value of **1b** was 98 : 2.

2)。ジフェニル体については **3** との縮合反応が完結しなかった。2 つの Ph 基の立体障害、また電子求引効果が原因であると考えられる。ジメチル体の場合、**3** との縮合反応は速やかに進行したものの、*H*-ホスホネート **5** へと変換することはできなかった。不斉補助基の第三級カルボカチオ

ンの安定性が不十分であったために、E1 反応が進行しなかったのではないかと考えられる。これらの知見から、フェニルメチル体を用いたところ、縮合反応、*H*-ホスホネートジエステルへの変換反応のいずれもが迅速に完結した。さらに、高い立体選択性で目的とする反応が進行し、立体化学的に純粋なジチミジル酸 *H*-ホスホネート **5** を得ることができた (Scheme 3)。

Scheme 3.



(2) *H*-ホスホネート DNA オリゴマーの立体選択的固相合成 (Scheme 4)

オキサザホスホリジン誘導体の置換基の検討の結果、もつとも良好な結果を与えたフェニルメチル体を用いて、固相合成により、*H*-ホスホネート DNA の立体選択的合成を検討した。まず、モノマーユニット **6** の合成をおこなったところ、4 種類の核酸塩基いずれの場合においても、比較的良好な収率、かつ優れた立体選択性でモノマーユニット **6** を得ることができた (43–83%, d.r. > 99:1)。次に、得られたモノマーユニット **6** を用いて、ジヌクレオシド *H*-ホスホネートを固相担体上で合成し、つづいて種々のインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体 (**9** + **10**) へと変換した後、固相担体から切り出しをおこない、得られた混合物について、逆相高速液体カラムクロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いて収率、立体化学純度の評価をおこなった。RP-HPLC による解析の結果、いずれのインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体 (**9** + **10**) についても、優れた収率、及び高い立体化学純度で目的物を得ることができた (Table 1)。さらに、本手法を用いて、*H*-ホスホネー

Scheme 4.

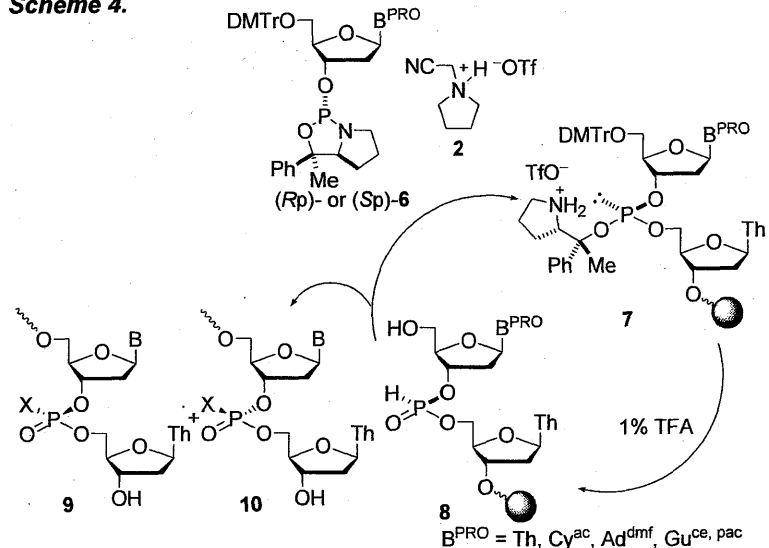


Table 1.

entry	6	B	X	9 : 10 ^a	yield ^a
1		Th, Cy, Ad, Gu	S ⁻	> 99 : 1	94–97%
2		Th	BH ₃ ⁻	> 99 : 1	90%
3		Th	CH ₂ OH	> 99 : 1	86%
4		Th	NH ₂	1 : 99	95%
5		Th	NHPr	1 : 99	93%
6		Th	NH(CH ₂) ₂ NMe ₂	2 : 98	95%
7		Th, Cy, Ad, Gu	S ⁻	> 1 : 99	95–96%
8		Th	BH ₃ ⁻	> 1 : 99	89%
9		Th	CH ₂ OH	> 1 : 99	84%
10		Th	NH ₂	99 : 1	95%
11		Th	NHPr	99 : 1	93%
12		Th	NH(CH ₂) ₂ NMe ₂	> 99 : 1	93%

^aDetermined by HPLC.

Table 2.

entry	6	oligonucleotide sequence ^a	yield (%) ^b
1		all-(Sp)-d[C ₅ A ₅ G ₅ T]	92
2		all-(Rp)-T _B T _B T _B T	66
3		all-(Sp)-T _N T _N T _N T	65
4		all-(Sp)-T _S T _S T _S T _S T _S T _S T _S T	67
5		all-(Rp)-d[C ₅ A ₅ G ₅ T]	86
6		all-(Sp)-T _B T _B T _B T	69
7		all-(Rp)-T _N T _N T _N T	56
8		all-(Rp)-T _S T _S T _S T _S T _S T _S T _S T	63

^aSubscript "S" = phosphorothioate diester, "B" = boranophosphate diester, and "N" = *N*-[(2-dimethylamino)ethyl]-phosphoramidate. ^bDetermined by HPLC.

ト DNA オリゴマーの立体選択的合成をおこなった。Scheme 4 に示すサイクルを繰り返すことで、目的の塩基配列を有する、リン原子の絶対立体配置を制御した *H*-ホスホネート DNA オリゴマーを合成した後、立体特異的な変換反応をおこなうことで、インターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体オリゴマーの立体選択的合成をおこなった。得られた混合物について、RP-HPLC を用いて解析したところ、いずれの場合も高立体選択的、かつ良好な収率で、目的とする種々のインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体オリゴマーを合成することができた (Table 2)。

<結論>

本研究では、オキサザホスホリジン法を応用し、モノマーユニットのオキサザホスホリジン 5 位に 2 つの置換基を導入することで、リン原子の絶対立体配置を制御したホスファイトから、E1 脱離を経由して、目的とする *H*-ホスホネート DNA を高立体選択的、かつ高収率で合成することが可能な優れた手法を確立した。さらに、この方法を固相合成へと応用することで、立体選択的に *H*-ホスホネート DNA オリゴマーを合成し、立体特異的な変換反応をおこなうことにより、立体化学的に純粋な種々のインターヌクレオチド修飾型 DNA 類縁体オリゴマーを合成した。

<発表論文など>

1. “Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Oligonucleoside *H*-Phosphonates by an Oxazaphospholidine Approach”
Iwamoto, N.; Oka, N.; Sato, T.; Wada, T.
Angew. Chem. Int. Ed. in press. DOI: 10.1002/anie.200804408
2. “Stereocontrolled Synthesis of Backbone-modified Oligonucleotides via Diastereopure *H*-Phosphonate Intermediates”
Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T.
Nucleic Acids Symp. Ser. **2008**, 52, 333–334.
3. “Stereocontrolled Synthesis of *H*-Phosphonate DNA”
Iwamoto, N.; Sato, T.; Oka, N.; Wada, T.
Nucleic Acids Symp. Ser. **2006**, 50, 159–160.
4. “立体規則性の高いリボヌクレオチド類縁体及びデオキシリボヌクレオチド類縁体の製造法”
西郷 和彦、和田 猛、藤原 聡、佐藤 輝聰、岩本 直樹
PCT/JP2005/003812