

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 ボラノホスホトリエステル法によるリン原子の 立体を制御したボラノホスフェート DNA の合成

氏名 内山直樹

#### <1. 諸言>

ボラノホスフェート DNA は、天然型 DNA のリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子のうちの一つをボラノ基 ( $\text{BH}_3$ ) に置換した誘導体である (Figure 1)。ボラノホスフェート DNA は、生体内に存在するヌクレアーゼ耐性に優れ、さらに、アンチセンス法などの遺伝子発現抑制法にも応用可能であることから、癌などの遺伝関連疾病の治療を目的とした「核酸医薬」として極めて有望な核酸類縁体として注目されている。そのため、ボラノホスフェート DNA の大量入手が可能な化学合成法を開発することは、今後の医学および薬学の発展のためにも大きな意義をもつ。

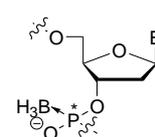


Figure 1.

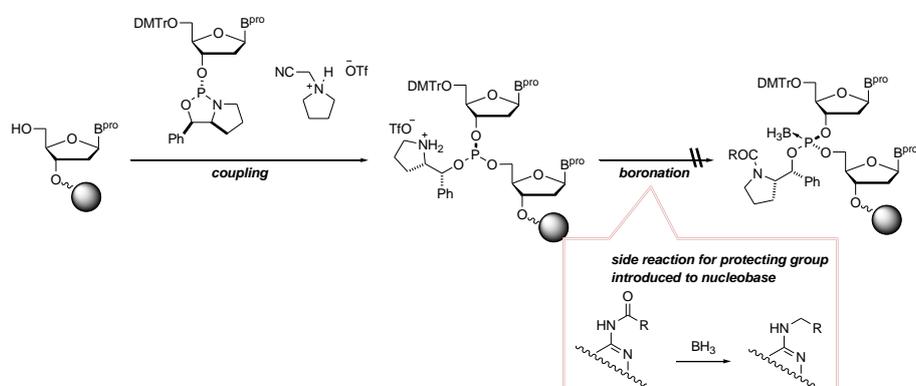
これまでに数多くのボラノホスフェート DNA の合成法が報告されてきたが、未だに解決されていない課題として、ボラノホスフェート DNA の構造中に含まれる不斉リン原子の立体制御が挙げられる。ホスホロチオエート DNA など、ボラノホスフェート DNA と同様に不斉リン原子を有する核酸誘導体は、不斉リン原子の絶対立体配置によって物理化学的および生化学的性質に差が生じることが知られている。そのため、ボラノホスフェート DNA の不斉リン原子の絶対立体配置も、核酸医薬の分子設計を行なう上では極めて重要な要素になると考えられている。

このような背景から、本研究では、これまでに成し得ていない、リン原子の立体を制御したボラノホスフェート DNA の合成法を確立し、今後の当該分野の発展に貢献することを目指すこととした。

## <2. 合成戦略>

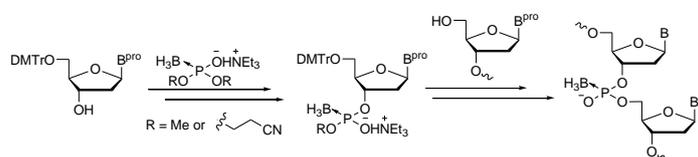
当研究室で開発したオキサザホスホリジン法は、不斉リン原子を有する種々のリン酸部位修飾型核酸の立体制御を可能とする手法であるが、本手法はボラノホスフェート DNA の合成には適さない。その最大の原因となっているのが、ホスファイト誘導体に対するボラノ化の際に進行する副反応である (Scheme 1)。核酸塩基の環外アミノ基に導入されたアシル系保護基に対して、ボラノ化工程の際に還元反応が進行することが確認されている。したがって、オキサザホスホリジン法で合成可能なボラノホスフェート誘導体は、オリゴチミジル酸に限られてしまう。

**Scheme 1.** オキサザホスホリジン法



このような問題を解決する手法として、ボラノホスホトリエステル法に注目した (Scheme 2)。当研究室で開発されたボラノホスホトリエステル法は、リン原子の立体制御は行なえないものの、核酸塩基部位への副反応なく、A、C、G を含むオリゴマーを効率的に合成可能な手法である。本手法の縮合反応に立体選択性を発現させることに成功すれば、リン原子の立体を制御したうえで効率的なボラノホスフェート DNA の合成が可能な、極めて魅力的な手法になると考えられる。

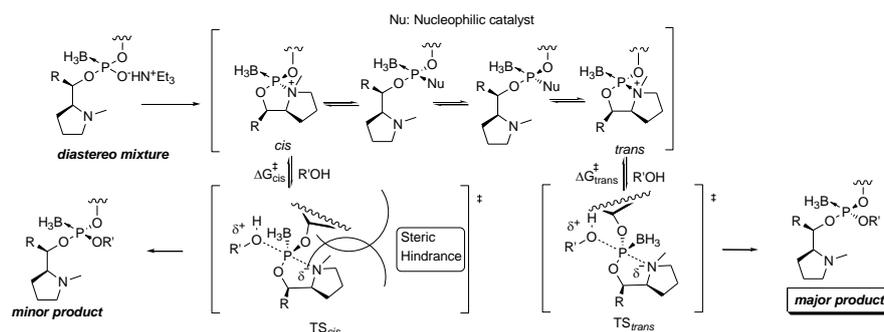
**Scheme 2.** ボラノホスホトリエステル法



ボラノホスホトリエステル法に立体選択性を発現させる手法として、リン酸部位に不斉補助基を導入することを考えた (Scheme 3)。ジアステレオマー混合物の出発物質を縮合剤によって活性化し、不斉補助基が分子内不斉求核触媒として作用することで反応系中に存在する複数の反応中間体および遷移状態にエネルギー差が生じ、最も活性化エネルギーの低い  $TS_{trans}$  を経由した縮合反応が優先して進行することで、立体選択性が発現すると考えた。本研究では、Scheme 3 に示す反応機構による不斉リン原子の立体制御を期待し、検討を行なったので、

その結果を報告する。

### Scheme 3. ボラノホスホトリエステル法による立体選択性発現機構



#### <3.実験結果>

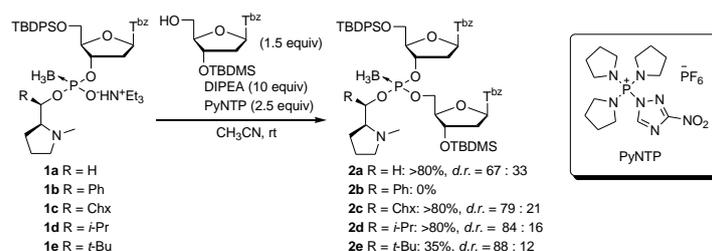
不斉補助基の骨格、縮合反応に用いる求核触媒をそれぞれ検討し、立体選択性および縮合効率の最適化を行なった。

#### 3-1. 不斉補助基の骨格の検討

ボラノホスフェート結合の酸素原子に結合する炭素原子上に種々の置換基を導入した不斉補助基を用いて、縮合反応の立体選択性を見積もった。その結果、*i*-Pr 基や *t*-Bu 基といった嵩高いアルキル鎖を導入することで立体選択性が向上することを見出した。Scheme 3 の機構から考察すると、嵩高い官能基が導入されることで、TS<sub>cis</sub> が立体障害により不安定化し、TS<sub>trans</sub> を経由する縮合反応がより優先して進行したために立体選択性が向上したものと考えられる。

一方、3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP) を縮合剤とすると、*i*-Pr 基を有する **1a** からの縮合反応は速やかに進行したが、*t*-Bu 基を有する **1b** からの縮合効率は 35%に留まった (Scheme 4)。

#### Scheme 4.



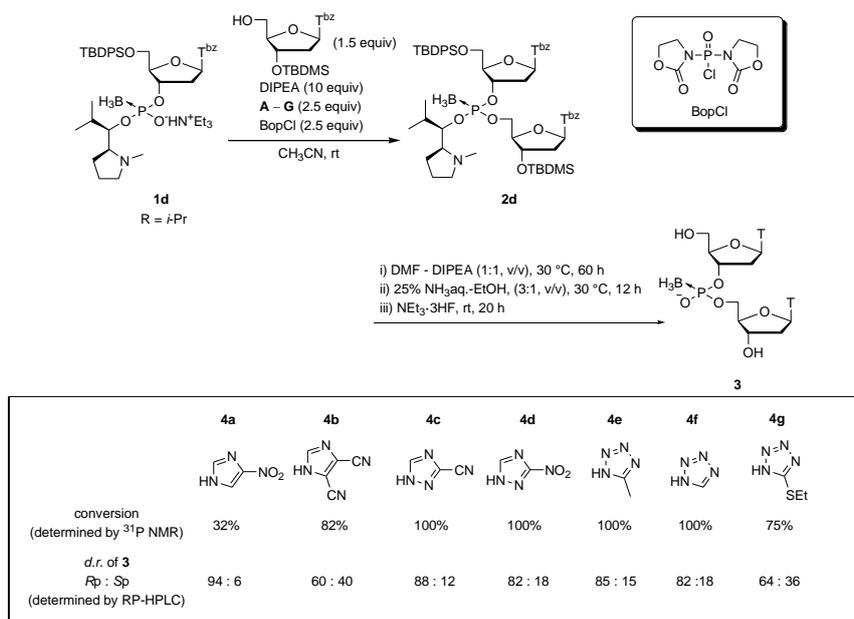
#### 3-2. 求核触媒の検討

3-1 の検討で良好な縮合効率および立体選択性を示した **1a** を出発物質とし、種々の求核触媒 **A-G** を用いて、立体選択性の向上を試みた。これらの検討から、縮合反応に用いるアゾール系求核触媒の求核性の高さが縮合効率を、アゾリド中間体からのアゾールの脱離能の低さが縮合反応の立体選択性を向上させることを見出した。

このような傾向から、比較的酸性度が低く、求核性にも優れている 3-cyanotriazole (**4c**) を縮合反応に用いたところ、優れた立体選択性および縮合効率を発現させることに成功した。得られた二量体 **2a** から不斉補助基および他の官能基の保護基を定量的に除去し、得られた **3** に対して逆相 HPLC による分析を行なうことで、生成物のジアステレオマー比を  $R_p : S_p =$

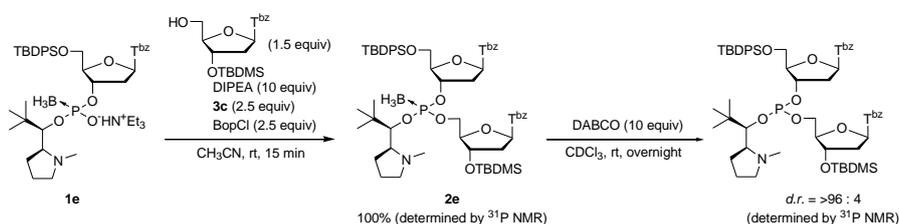
88:12 と算出した (Scheme 5)。

### Scheme 5.



さらに、PyNTP では縮合効率の低かった **1e** を出発物質としても、3-cyanotriazole (**4c**)を用いて反応を行なうと速やかに縮合反応が進行し、立体選択性も 96:4 以上と優れたものであることが確認された (Scheme 6)。

### Scheme 6.



### <4.結論>

本検討により、従来、立体制御のなされていなかったボラノホスホトリエステル法に立体選択性を発現させることにはじめて成功した。本手法は、既存の手法では合成困難であった、シチジン、アデノシン、グアノシンを含み、かつリン原子の立体を制御したボラノホスフェート DNA の合成も可能になると考えられる。今後、シチジン、アデノシン、グアノシン誘導体への応用を試みる予定である。

### <5.発表論文>

1. Naoki Uchiyama.; Toshihiko Ogata; Natsuhisa Oka; Takeshi Wada. *Nucl. Nucl. Nucleic Acid*, **2011**, *30*, 446 – 456.
2. Koichiro Arai; Naoki Uchiyama; Takeshi Wada. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **2011**, *21*, 6285 - 6287.