

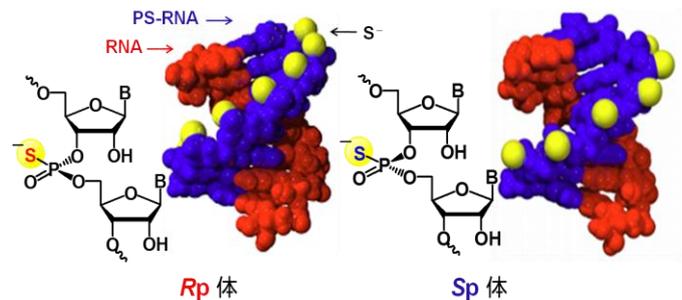
論文の内容の要旨

論文題目 オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート RNA の立体選択的合成

氏 名 額 賀 陽 平

【序論】

ホスホロチオエート RNA (PS-RNA) は、高いヌクレアーゼ耐性、細胞膜透過性や薬物動態の向上が期待できるため、siRNA などの RNA 型核酸医薬として最も有望視されている。一方、PS-RNA には、リン原子上にキラル中心が存在するため、絶対立体配置の異なる二つの立体異性体、*Rp* 及び



Sp 体が存在する。ごく最近の研究から、これらのジアステレオマー間では、相補的な RNA と形成する二重鎖の高次構造が大きく異なり、リン原子のキラリティーが生化学的性質、物理化学的性質に多大な影響を及ぼすことが明らかとなっている。この結果を踏まえると、*Rp*, *Sp* 体のジアステレオマー間では、RNAi 活性が大きく異なることが予想される。しかしながら、これまでにリン原子の立体を制御した PS-RNA の合成が達成されていないため、リン原子の絶対立体配置の違いが RNAi 医薬としての機能に与える影響について解明されていない。そこで、本研究では、PS-RNA の立体選択的合成法を開発し、リン原子の立体を制御した PS 結合をもつ siRNA の機能を評価することにより、実用的な RNAi 医薬を開発することを目的とする。

【研究計画】

これまでに、当研究室では、PS-DNA の立体選択的合成法として開発されたオキサザホスホリジン法を PS-RNA の立体選択的合成に応用している。しかしながら、この合成法には、克服すべき問題点

TABLE 1. Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of PS-ORN 12mers

entry	product	activator	coupling time	coupling yield (%) ^{a,b}	isolated yield (%)	
1	All-(<i>Rp</i>)-PS-U ₁₂	1a	CMPT	15 min	99	12
2	All-(<i>Sp</i>)-PS-U ₁₂	1b	CMPT	15 min	99	14
3	All-(<i>Rp</i>)-PS-(CAGU) ₃	1c	CMPT	15 min	90 (68)	–
4	All-(<i>Rp</i>)-PS-(CAGU) ₃	1c	CMPT	15 min	92 (75 ^c)	–
5	All-(<i>Sp</i>)-PS-(CAGU) ₃	1d	CMPT	15 min	93 (80)	–
6	All-(<i>Rp</i>)-PS-(CAGU) ₃	1c	PhIMT	15 min	94 (86)	6
7	All-(<i>Sp</i>)-PS-(CAGU) ₃	1d	PhIMT	15 min	97 (92)	10

^a Average coupling yield. ^b Average coupling yields of C^{5C}-monomers are given in parentheses. ^c Double coupling.

成功し、単離することができた。(Table 1, entries 6-7) しかしながら、PhIMT は、求核性の高い活性化剤であるため、繰り返しリン原子を求核攻撃することによって、モノマーユニットのエピマー化を引き起こし、立体選択性を低下させる可能性がある。そこで、PhIMT を用いたときに発現する立体選択性を、ウリジル酸 2 量体 [(*Rp*)-UpsU (**2a**) and (*Sp*)-UpsU (**2b**)] を固相合成することにより評価した。RP-HPLC の保持時間からジアステレオマーを同定して立体選択性を見積もったところ、PhIMT を酸性活性化剤とした場合でも、(*Rp*)-**2a** の場合、dr 98:2、(*Sp*)-**2b** の場合に dr >99:1 で立体特異的に縮合反応が進行し、いずれの立体においても高い立体選択性で目的物が得られた。

2. PO/PS-キメラ RNA オリゴマーの立体選択的合成

オキサザホスホリジン法と従来の RNA 化学合成法であるホスホロアミダイト法を組み合わせることにより、任意のリン酸ジエステル結合に立体選択的にホスホロチオエート修飾を加えた、PO/PS キメラ RNA オリゴマーの化学合成法を確立することを目指した。はじめに、ホスホロアミダイト法の酸化工程で PS 結合の脱硫反応が起こるのか検討した。(Sp)-UpsU 2 量体 (**2b**) を合成した後、ホスホロ

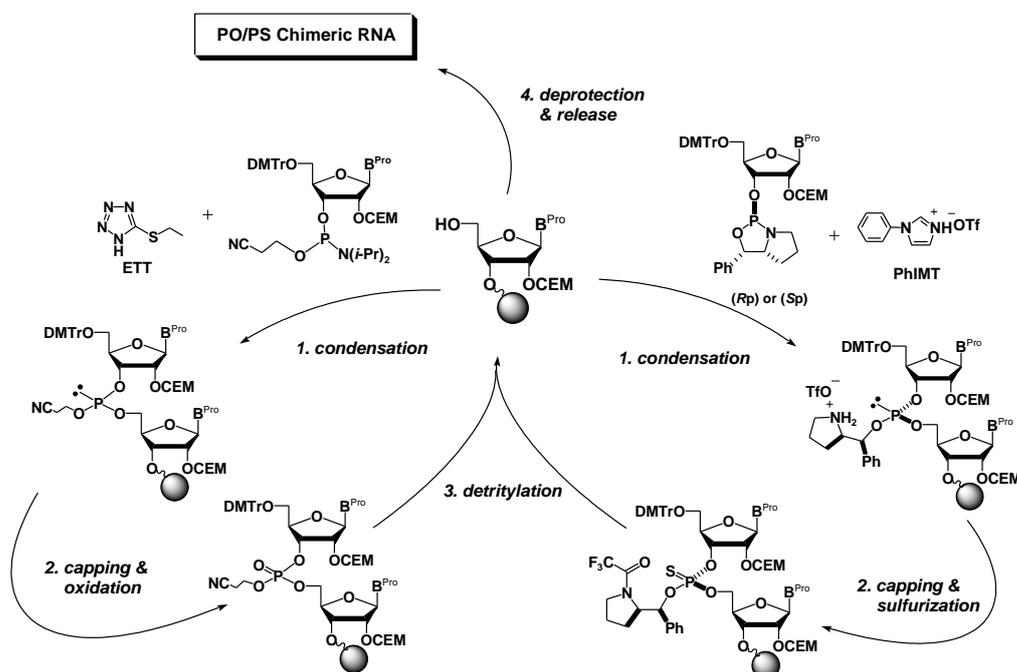
SCHEME 2. Synthetic Cycle for PO/PS Chimeric ORNs


TABLE 2. Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of PO/PS Chimeric ORNs

entry	product	isolated yield (%)
1	(<i>Rp</i>)-5'-UCGAAGUACUCAG \underline{C} -ps-GUAAGUU-3' 3a	6
2	(<i>Sp</i>)-5'-UCGAAGUACUCAG \underline{C} -ps-GUAAGUU-3' 3b	6
3	(<i>Rp</i>)-5'-UCGAAGUACUCAGCGU \underline{A} -ps-AGUU-3' 4a	3
4	(<i>Sp</i>)-5'-UCGAAGUACUCAGCGU \underline{A} -ps-AGUU-3' 4b	4

アミダイト法で使用されるヨウ素溶液、*tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)、(1*S*)-(+)-(8,8-dichlorocamphor-sulfonyl)oxaziridine (DCSO) のそれぞれの酸化剤を 1 時間、室温で反応させ、RP-HPLC により、PS 結合が脱硫した割合を見積もったところ、不斉補助基のアミノ基が遊離である場合、いずれの酸化条件下においても大幅に脱硫反応が進行したが、アミノ基をアシル化剤でキャップ化することにより、脱硫反応をほぼ抑制できることがわかった。そこで次に、Scheme 2 の鎖長伸長サイクルに従い、核酸自動合成機で、オキサザホスホリジンモノマーまたは、アミダイトモノマーを用いて縮合反応を行い、オリゴマー中の 1 か所に立体選択的にホスホロチオエート修飾を加えた PO/PS キメラ RNA21 量体 (**3a-b**, **4a-b**) を固相合成した。目的の配列に合わせて鎖長伸長反応を繰り返し、固相合成した後、RNA オリゴマーをリンカーからの切り出し、保護基の脱保護を行い、立体化学的に純粋な目的物を単離することができた。(Table 2, entries 1-4) 次に、単離精製した PO/PS キメラ RNA21 量体 (**3a-b**, **4a-b**) の生化学的性質を調べた。まず、PO/PS キメラ RNA21 量体 (**3a-b**, **4a-b**) を guide 鎖、天然型 RNA21 量体を passenger 鎖とした siRNA をそれぞれ RNase 溶液で処理したところ、*Rp* 体 (**3a**, **4a**) と *Sp* 体 (**3b**, **4b**) の二つの立体異性体間で RNase に対する安定性が異なるという結果が得られた。最後に、これらの siRNA を乳がん細胞に導入して、立体選択的にホスホロチオエート修飾を加えた siRNA の遺伝子制御効果をそれぞれ評価した。細胞に導入してから 48 時間後、いずれの siRNA においても遺伝子制御効果を確認することができたが、*Rp* 体と *Sp* 体の間で比較したとき、遺伝子制御効果の有意な差は得られなかった。このように、一か所の修飾では、立体異性体間で RNAi 活性にほとんど差がないことから、今後は、ホスホロチオエート修飾を増やした siRNA で検討する予定である。

【結論】

本研究では、RNA2'-水酸基の保護基として、CEM 基を導入したオキサザホスホリジン型モノマーユニットを用いることにより、4 種類の核酸塩基を含んだ PS-RNA オリゴマーの効率的な固相合成法を確立した。さらに、オキサザホスホリジン法と従来の RNA 化学合成法と組み合わせることにより、任意の位置に修飾を加えた PO/PS キメラオリゴリボヌクレオシドの立体選択的合成を達成した。さらに、本合成法により固相合成した、オリゴマー中の 1 か所に立体選択的にホスホロチオエート修飾を加えた siRNA の遺伝子制御効果を *in vitro* の実験系で評価した。

【発表論文】

Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligoribonucleotides Using 2'-*O*-(2-Cyanoethoxymethyl)-Nucleoside 3'-*O*-Oxazaphospholidine Monomers.

Nukaga, Y., Yamada, K., Ogata, T., Oka, N., Wada, T. *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 7913-22.