

論文審査の結果の要旨

氏名 額賀 陽平

本論文は、オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート RNA の立体選択的合成法の開発、オキサザホスホリジン法とホスホロアミダイト法を組み合わせた PO/PS キメラオリゴヌクレオチドの立体選択的合成法を開発及び塩基性条件下不安定な機能性核酸の合成を可能とする RNA2'水酸基の新規保護基の開発について述べたものであり、序論及び三章からなる本論より構成されている。

序論では、はじめに RNAi 医薬の概要とこれに施される化学修飾の特徴とその意義について述べている。続いて、これまでの先行研究を踏まえ、ホスホロチオエート RNA の絶対立体配置の違いが医薬としての機能に及ぼす影響について論じ、本研究の合成標的である立体制御したホスホロチオエート RNA の重要性について説明している。最後に、ホスホロチオエート RNA 及び、PO/PS キメラオリゴヌクレオチドの立体選択的な合成方法、RNA2'水酸基の保護基をそれぞれ列挙し、既存の合成法の課題点とともに、これらの課題を克服するための合成戦略を論じ、本研究の目的と意義を述べている。

第一章では、オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート RNA の立体選択的合成法の開発及び、立体制御したホスホロチオエート RNA の性質について述べている。RNA2'水酸基の保護基として、立体障害が小さい 2-シアノエトキシメチル基 (CEM 基) を導入したオキサザホスホリジンモノマーを用いて、ホスホロチオエート RNA オリゴマーの立体選択的合成を行い、良好な縮合反応効率でウリジル酸 12 量を固相合成したことについて述べている。しかしながら、4 種類の核酸塩基を含む 12 量体の固相合成では、シチジンモノマーの反応性が特異的に低下したため、縮合反応の酸活性化剤を検討し、*N*-シアノメチルピロリジニウムトリフラート (CMPT) よりも求核性が高い、強力な酸性活性化剤である *N*-フェニルイミダゾリウムトリフラート (PhIMT) を用いることによって、ジアステレオ選択性をほぼ損なわずに、シチジンモノマーの反応性が大幅に向上することを明らかにしている。この結果を踏まえて、PhIMT を酸性活性化剤として、4 種類の核酸塩基を含む 12 量体を核酸自動合成機で固相合成し、良好な縮合反応効率で 12 量体の合成を達成している。次に、立体制御したホスホロチオエート RNA と相補的な配列をもつ天然型 RNA と形成する RNA 二重鎖の T_m 値を測定し、 R_p 体は、天然型 RNA よりも安定な二重鎖を形成する ($\Delta T_m = \text{ca. } +0.3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{修飾}$) のに対して、 S_p 体は、二重鎖を大きく不安定化する ($\Delta T_m = \text{ca. } -1.0 \text{ }^\circ\text{C}/\text{修飾}$) ことを明らかにしている。このように、リン原子の絶対立体配置の違いによって、RNA 二重鎖の安定性が大きく異なることを示した。

第二章では、オキサザホスホリジン法とホスホロアミダイト法を組み合わせた PO/PS キメラオリゴヌクレオチドの立体選択的合成法を開発し、この手法により合成した立体制御したホスホロチオエート修飾を含む siRNA の RNase に対する安定性、RNAi 活性を

検討した結果について述べている。短鎖オリゴマーの合成で検討した鎖長伸長反応条件を用いて、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 RNA 21 量体を自動合成機で固相合成し、縮合反応をほぼ定量的に進行させ、RNAi 活性の検討に十分な量の RNA オリゴマーを獲得することに成功している。精製した PO/PS キメラ RNA 21 量体をガイド鎖、天然型 RNA 21 量体をパッセンジャー鎖とした siRNA の RNase 耐性試験を行い、ホスホロチオエート RNA の Rp 体と Sp 体の立体異性体間で、RNase に対する安定性が異なることを示した。次に、これらの siRNA の RNAi 活性を検討し、いずれの修飾体からも遺伝子制御効果が得られたが、Rp 体と Sp 体で比較したとき、一か所の化学修飾では、RNAi 活性に有意な差はないという結果を得ている。

第三章では、塩基性条件下不安定な機能性核酸の合成を可能とする RNA2'水酸基の新規保護基の開発について述べている。はじめに、ベンジルオキシメチル骨格の置換基を検討することによって、穏和な酸性条件下、脱保護できる保護基の開発を目指したが、ベンジルオキシメチル骨格を含む保護基は、酸性条件下において極めて安定であったため、RNA 鎖の分解反応を伴わない穏和な条件で脱保護することは困難であることを述べている。一方、ベンジルオキシメチル骨格にメトキシ基を導入した 4-メトキシベンジルオキシメチル基 (MBOM 基) は、2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノベンゾキノン (DDQ) を用いた穏和な脱保護条件下で定量的に脱保護できることを示した。MBOM 基は、DMTr 基の脱保護条件下で安定であること、DDQ によって定量的に脱保護できることから、RNA オリゴマー合成に適用できることを述べている。次に、ウリジル酸 4 量体を固相合成して脱保護条件を検討し、反応溶媒として DDQ の分解と伴わない非極性溶媒と有機酸の混合溶媒を用いることにより、定量的に MBOM 基を脱保護することに成功している。さらに、本条件をウリジル酸 10 量体のオリゴマー合成に応用し、縮合時間 1 分という短時間で 99%以上の縮合反応効率が得られ、MBOM 基を導入したモノマーユニットは、極めて高い反応性を有していることを明らかにした。最後に、合成したウリジル酸 10 量体の脱保護条件を検討し、反応溶媒として非極性溶媒と有機酸の混合溶媒を用いることにより、MBOM 基をほぼ定量的に脱保護し、目的とするオリゴマーを獲得することに成功し、本合成法が RNA オリゴマーの合成に適用可能であることを示している。

以上のように、本研究では、4種類の核酸塩基を含む長鎖のホスホロチオエート RNA 及び、任意の位置に立体制御したホスホロチオエート結合を導入した PO/PS キメラオリゴヌクレオチドの立体選択的自動合成をはじめ達成し、本合成法が立体制御されたホスホロチオエート RNA の実用的な合成手法となることを示した。また、塩基性条件下不安定な機能性核酸の合成を可能とする RNA2'水酸基の新規保護基として MBOM 基を開発し、RNA オリゴマーの合成に応用できることを明らかにした。

これらの成果は、有機合成化学、核酸化学、医学、薬学などの諸分野の発展に大きく寄与することが期待される。

よって本論文は、博士 (生命科学) の学位請求論文として合格と認められる。