

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                             |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            | 核酸医薬開発に有用な塩基部保護ウリジン誘導体および分岐RNAの効率的合成法に関する研究                                                                                                                                 |
| Title(English)    |                                                                                                                                                                             |
| 著者(和文)            | 田胡信広                                                                                                                                                                        |
| Author(English)   | Nobuhiro Tago                                                                                                                                                               |
| 出典(和文)            | 学位:博士(理学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第10081号,<br>授与年月日:2016年3月26日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,一瀬 宏,相澤 康則,大窪 章寛,関根 光雄                                                |
| Citation(English) | Degree:,<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第10081号,<br>Conferred date:2016/3/26,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文)          | 博士論文                                                                                                                                                                        |
| Category(English) | Doctoral Thesis                                                                                                                                                             |
| 種別(和文)            | 要約                                                                                                                                                                          |
| Type(English)     | Outline                                                                                                                                                                     |

# 核酸医薬開発に有用な塩基部保護ウリジン誘導体および

## 分岐 RNA の効率的合成法に関する研究

田胡 信広

本博士論文では、核酸医薬への応用を目指したウリジン保護体及び分岐 RNA の効率的合成法の検討をおこなった。

第一章では、核酸医薬の修飾として頻用される、2'修飾ヌクレオシドの合成中間体の大量合成を目指し、3',5'水酸基を保護したウリジン誘導体の塩基部 3 位への効率的保護基導入反応を検討した。過去に、2 相系反応を用いてウリジン塩基部 3 位選択的なアシル化(Figure 1)反応が Sekine により報告されている。

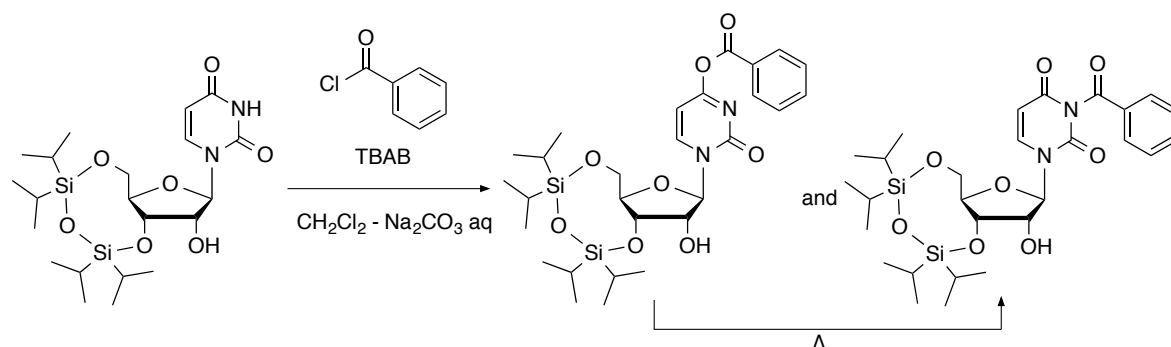


Figure 1. 二相系でのウリジン誘導体塩基部 3 位への選択的アシル化反応

この反応は、収率良く目的物の合成がおこなえるが、その高い反応効率には、激しい攪拌によって実現される二層の広い界面面積が必要であり、攪拌が困難になる大スケールでの反応においては、収率が低下する。そこで本研究では、反応効率を低下させずに大量の合成をおこなう方法としてマイクロフローシステムを利用した。マイクロフローシステムは、ポンプとチューブを用いて細い流路内で反応をおこなうシステムである。二相系反応をマイクロフローシステムで行うと、細い流路内を二層が流れるため、単位体積あたりに広い界面面積が得られ、高い反応効率を実現できる。さらに長時間送液を続けることで高い反応効率のままスケールアップが可能である。本研究ではさらにマイクロフローシステム内で反応効率を向上させる手法として、多孔構造を有する HPLC ガードカラムを導入した新たなマイクロフローシステムを構築した。Figure 2 に本研究で構築したマイクロフローシステムの概略図を示す。本論文では上

記したマイクロフローシステムを利用した、二相系でのウリジン塩基部 3 位選択的アシル化反応について詳細に報告した。

第二章では、ラリアット RNA のミミックとしての人工分岐 RNA の固相合成をおこなった。核内で転写された pre-mRNA がスプライシングされ、成熟 mRNA になる過程でイントロンが切り出される際に生成するラリアット RNA は、RNA ラリアット脱分岐酵素 (Dbr1) によって脱分岐され、直鎖状 RNA へ

と変換される。近年、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスの細胞において、Dbr1 をノックアウトすると TDP-43 凝集体の毒性が減弱されるという報告がなされた。これは Dbr1 がノックアウトされたために細胞質中にラリアット RNA が蓄積し、通常時には mRNA 等と結合して毒性を示す TDP-43 凝集体がラリアット RNA に捕捉されるためにその毒性が抑制されたと考えられる。そのため Dbr1 阻害剤の開発は、新たな ALS の治療法開発のために有用であると考えられる。(Figure 3)

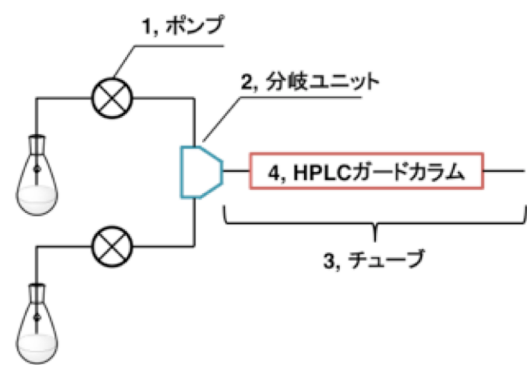


Figure 2. HPLC ガードカラムを導入したマイクロフローシステム

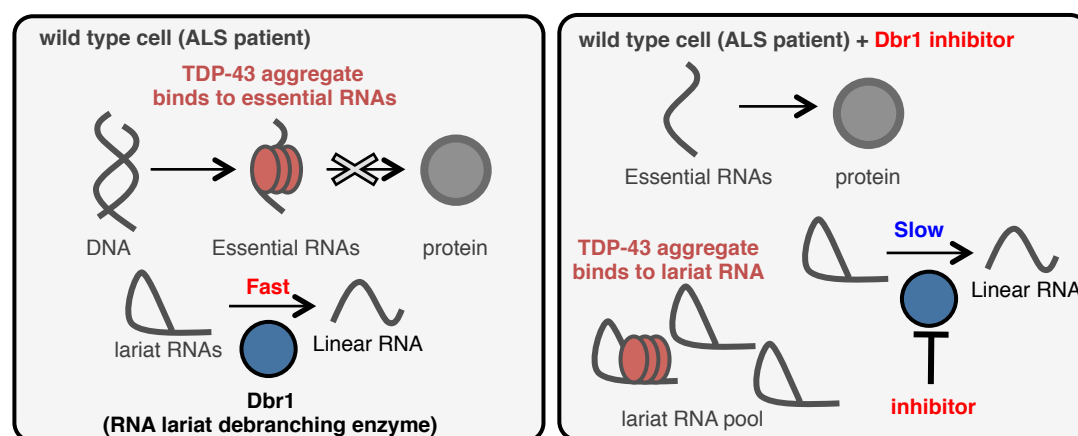


Figure 3 ALS 患者細胞および Dbr1 阻害剤を導入した細胞の予想される mRNA の代謝

過去にラリアット RNA のミミックとしてアデノシン 2' 水酸基からホスホジエステル結合を介して分岐した分岐 RNA が合成されており、Dbr1 の基質になることがわかっている。さらに分岐部位に修飾を加えた修飾分岐 RNA は、Dbr1 に対してシュード基質として作用し、その脱分岐能を阻害できる事が報告されている。そこで本研究では、ALS の治療を目指し、新たな修飾分岐 RNA を合成し、Dbr1 の阻害能を調べた。修飾分岐 RNA として、分岐部位のリン酸ジエステル結合の代わりにリン酸アミデート結合

を介して分岐した 2 種類の修飾分岐 RNA、2′N-bRNA および 5′N-bRNA を固相合成し、2′N-bRNA の Dbr1 の基質および阻害剤としての性質を調べた。Figure 4 に合成した 2′N-bRNA, 5′N-bRNA の構造を示す。本論文ではその合成法および Dbr1 に対する性質について詳細に報告した。

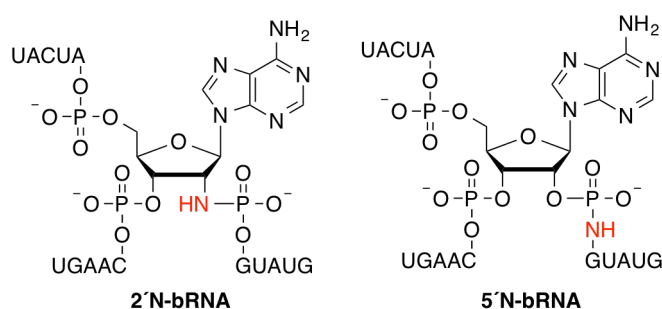


Figure 4, 2′N-bRNA および 5′N-bRNA の構造

#### 【論文発表】

- 1, Tago, N.; Masaki, Y.; Nagasawa, H.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. *Synlett*, **2015**, 26, 2578-2582.
- 2, Tago, N.; Katolik, A.; Clark, N. E.; Montemayor, E. J.; Seio, K.; Sekine, M.; Hart, P. J.; Damha, M. J. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 10108-10118.

#### 【学会発表】

##### 口頭発表

- 1, 田胡信広, Adam Katolik, Nathaniel E. Clark, Eric J. Montemayor, P. John Hart, 正木慶昭, 金森功吏, 大窪章寛, 清尾康志, 関根光雄, Masad J. Damha. “ALS 治療を目指した修飾人工分岐 RNA の合成及び性質” 日本 RNA 学会第 16 回年会 2014 年 7 月 愛知ポスター発表

- 1, Nobuhiro Tago, Adam Katolik, Nathaniel E. Clark, Eric J. Montemayor, P. John Hart, Kohji Seio, Mitsuo Sekine, Masad J. Damha. “Solid-phase synthesis of artificial branched RNAs containing 2′-5′ phosphoramidate linkages” XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Poznan, Poland, August 2014.

- 2, Nobuhiro Tago, Yoshiaki Masaki, Akihiro Ohkubo, Hiroshi Nagasawa, Takashi Kanamori, Kohji Seio, Mitsuo Sekine. “Effective N-benzoylation of uridine derivatives using a two-phase microfluidic system” The 41<sup>st</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu Fukuoka, November 2014.

- 3, 田胡信広, Adam Katolik, 正木慶昭, Nathaniel E. Clark, Eric J. Montemayor, P. John Hart, 清尾康志, 関根光雄, Masad J. Damha. “ホスホロアミデート結合を有する人工分岐 RNA の合成及び脱分岐酵素 Dbr1 の阻害剤としての性質” 日本核酸医薬学会第一回年会 2015 年 12 月 京都