

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	2 - N - ヘテロアリアルグアニンおよび α -ヌクレオシドが高次構造形成に与える影響およびトリアゾリルリン酸構造を有する人工核酸の合成
Title(English)	Effects of 2-N-heteroarylguanine and α -deoxynucleoside residues on DNA higher-order structures, and synthesis of oligodeoxynucleotides having triazolylphosphonate backbone
著者(和文)	印出健志
Author(English)	Takeshi Inde
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10736号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,大窪 章寛,林 宣宏,相澤 康則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10736号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

2-*N*-ヘテロアリールグアニンおよび α -ヌクレオシドが
高次構造形成に与える影響
およびトリアゾリルリン酸構造を有する人工核酸の合成

指導教員

清尾 康志 准教授

東京工業大学大学院 生命理工学研究科
分子生命科学専攻

印出 健志

目次

略語表	1	
序論	3	
第 1 章	2- <i>N</i> -ヘテロアリールグアニンを有するオリゴデオキシヌクレオチドの合成と高次構造形成における性質	6
第 1 節	序	7
第 2 節	計算化学による G ^{HA} のコンホメーション解析	9
第 3 節	G ^{HA} のヌクレオシド誘導体、および G ^{HA} を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成	12
第 4 節	G ^{HA} の酸性度	17
第 5 節	G ^{HA} を有するオリゴデオキシヌクレオチドの二重鎖形成における性質	19
第 6 節	G ^{HA} を有するオリゴデオキシヌクレオチドの平行型三重鎖形成における性質	23
第 7 節	G ^{HA} を有するオリゴデオキシヌクレオチドのグアニン四重鎖形成における性質	28
第 8 節	総括	31
第 1 章の引用文献		31
第 2 章	α-デオキシリボヌクレオシドを含むオリゴデオキシヌクレオチドの三重鎖形成能と塩基識別能	34
第 1 節	序	35
第 2 節	A、G、C、T の α-デオキシヌクレオシドを含むアンチ平行型三重鎖形成核酸の合成	37
第 3 節	ゲル電気泳動によるアンチ平行型三重鎖形成核酸の選択性	41
第 4 節	分子動力学計算を用いた三塩基対形成様式についての考察	46
第 5 節	総括	53
第 2 章の引用文献		53

第3章	トリアゾリルホスホネート構造を有する人工核酸の合成法の開発	56
第1節	序	57
第2節	シアノエチル基保護された 5'-T _{TP} G-3'二量体ホスホロアミダイト ユニット合成の問題点	59
第3節	1-ナフチルメチル基保護された 5'-T _{TP} G-3'二量体ホスホロアミ ダイトユニットの合成	62
第4節	5'-T _{TP} G-3'を配列に含むオリゴヌクレオチドの合成	64
第5節	TPを含む様々な配列の二量体の合成	66
第6節	総括	68
	第3章の引用文献	69
	総括	71
	実験編(第1章および第2章における一般的な事項)	73
	実験編(第1章)	77
	実験編(第2章)	105
	実験編(第3章)	114
	講演・報文目録	137
	謝辞	138

略語表

A	adenine or deoxyadenosine	ESI	electrospray ionization
Ac	acetyl	eq	equivalent
A ^{Bz}	6- <i>N</i> -benzoyladenine	G	guanine or deoxyguanosine
α A	alpha-deoxyadenosine	G ^{<i>i</i>Bu}	2- <i>N</i> -isobutyllylguanine
α G	alpha-deoxyguanosine	G ^{py}	2- <i>N</i> -(pyridin-2-ly)-guanine
α C	alpha-deoxycytidine	G ^{Pym}	2- <i>N</i> -(pyrimidin-2-ly)-guanine
α T	alpha-deoxythymidine	G ^{Pyra}	2- <i>N</i> -(pyrazin-2-ly)-guanine
antimiR	anti micro RNA	HP	hair-pin
Ar	aryl or heteroaryl	HPLC	high pressure liquid chromatography
($\pm$)-BINAP	($\pm$)-2,2'-bis(diphenylphosphine)-1,1'-binaphthyl	K _d	dissociation constant
Bn	benzyl	MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization time of flight
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamide	Me	methyl
Bz	benzoyl	NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
C	cytosine or deoxycytidine	NMR	nuclear magnetic resonance
C ^{Bz}	4- <i>N</i> -benzoylcytosine	ODN	oligodeoxyribonucleotide
CE	cyanoethyl	RNA	ribonucleic acid
CuAAC	Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition	T	thymine or thymidine
dba	dibenzylideneacetone	TBHP	<i>t</i> -butylhydroperoxide
DFT	density functional theory	TBS	<i>t</i> -butyldimethylsilyl
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate	TBTA	tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	TFO	triplex-forming oligonucleotide
DMSO	dimethylsulfoxide	THF	tetrahydrofuran
DMTr	4,4'-dimethoxytrityl	TLC	thin layer chromatography
DNA	deoxyribonucleic acid	TMS	trimethylsilyl
T _m	melting temperature		

UV	ultraviolet
Vis	visible light
Xantphos	4,5-bis(diphenylphosphino) -9,9-dimethylxanthene

序論

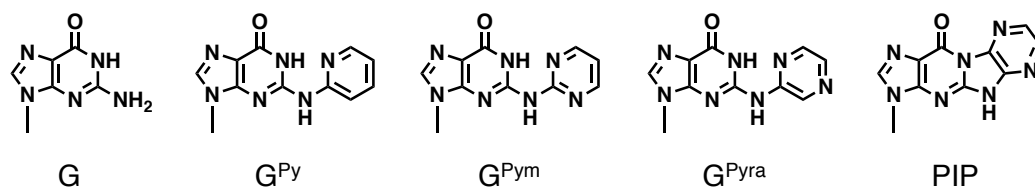
1981年にホスホロアミダイト法^{0.1}が開発されて以降、天然型のオリゴデオキシヌクレオチド(オリゴヌクレオチド)だけでなく修飾核酸を含むオリゴヌクレオチドも合成可能になった。その結果、損傷塩基^{0.2}など我々の体内で生じる修飾核酸、また核酸医薬として薬理活性の向上を志向したホスホロチオエート核酸や2'-修飾RNAなどの人工的に設計された修飾核酸^{0.3}が数多く報告されていて、現在も新たな修飾核酸が発見、または設計されている。

DNA鎖は、自身が二重鎖、四重鎖などの高次構造を形成することで、転写や複製など生体機能や薬理活性を発現する。ゆえに、修飾構造がオリゴヌクレオチドにもたらす性質を予測する際には、類似する修飾オリゴヌクレオチドの構造的性質が明らかになっていることが重要である。また、修飾核酸を設計する際にも、同様にすでに構造的特性が明らかになっている修飾オリゴヌクレオチドが設計の足場になりうる。より具体的にいえば、どのような修飾核酸が特定の高次構造をどれくらい安定化/不安定化するのか、系統立てられた網羅的な研究が必要である。

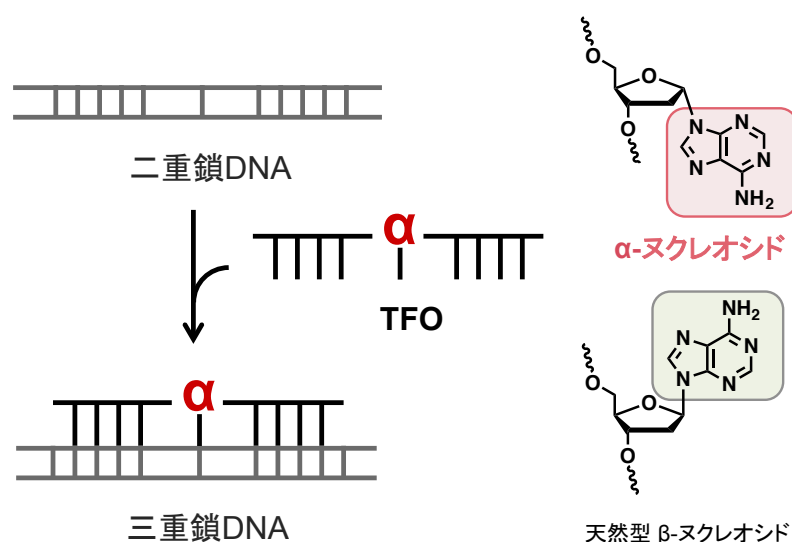
一方、設計された修飾核酸をオリゴヌクレオチドに導入するためには、その合成法の開発が不可欠である。ホスホロアミダイト法は①ホスホロアミダイトと呼ばれるモノマーユニットの合成と②固相上での鎖伸長の主に二段階からなる。鎖伸長反応効率の良さ、そして非常に多種の修飾核酸に適用可能であるという事実からこの手法は現在でもオリゴヌクレオチド合成に用いられているが、設計された人工核酸の構造によっては、保護基を変更するなどの有機化学的なアプローチでホスホロアミダイト法に適応するモノマーユニットを用意する必要がある。

本博士論文では、第1章、第2章では修飾核酸がDNA鎖高次構造に与える影響について系統的な研究を行った。また第3章では、リン酸部に修飾を有するDNA鎖の合成を目指して保護基を変更したホスホロアミダイトユニットの合成について研究を行った。

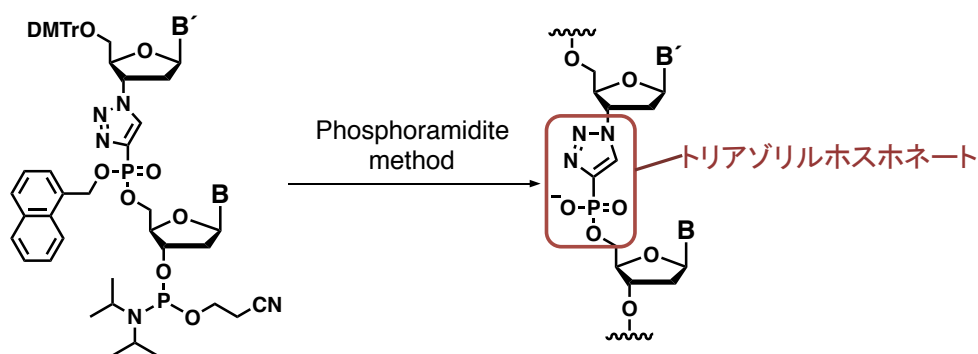
第1章では、グアニン2位アミノ基に置換基が付加した損傷グアニンのモデル基質として2-*N*-ヘテロアールグアニン(G^{HA})を有するオリゴヌクレオチドを合成し、高次構造形成への影響を調べた。これらの G^{HA} は、塩基部のコンホメーションの安定性が大きく異なり、その安定性とフルマッチ二重鎖 DNA およびグアニン四重鎖の不安定化効果の間に関連性を見出した。



第2章では、アンチパラレル型三重鎖における三重鎖形成核酸(triplex-forming oligonucleotide, TFO)と標的二重鎖 DNA の新たな結合様式に期待して、TFO に α -デオキシヌクレオシドを導入した。三重鎖中で TFO の α -ヌクレオシドと標的二重鎖の塩基対の組み合わせを網羅的に調べ、その結果をもとに安定な結合を示すものについては分子動力学計算によるシミュレーションを行った結果、 α -ヌクレオシドと標的塩基対が安定な水素結合形成をしている構造を得ることに成功した。



第3章では、細胞膜透過性を期待して設計された、トリアゾリルホスホネート構造を有する修飾核酸の合成法の開発を行った。修飾構造をオリゴヌクレオチドへ導入するために、修飾構造を含む二量体のホスホロアミダイトユニットの合成を試みたが、修飾部位に用いる保護基としてシアノエチル基は不安定であることがわかった。そこで保護基により安定な 1-ナフチルメチル基を用いたところ、様々な配列の二量体を合成することに成功し、またオリゴヌクレオチド合成にこの保護基が適用可能であることを見出した。



以上、それぞれの研究について、各章で詳細に報告する。

序論の引用文献

- 0-1 Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859–1862.
- 0-2 Dipple, A.; Lipinski, L. J. Exogenous Carcinogen-DNA Adducts and Their Repair in Mammalian Cells, in *DNA Damage and Repair*, Nickoloff, J. A.; Hoekstra, M. F; Humana Press inc.: Totawa, NJ, **1998**, 2, 4, 51–64.
- 0-3 Dowdy, S. F. *Nat. Biotech.* **2017**, 35, 222–229.

第 1 章

2-*N*-ヘテロアリアルグアニンを有する
オリゴデオキシヌクレオチドの合成と
高次構造形成における性質

第1節 序

グアニン塩基は二重鎖 DNA 中で C を相補塩基とし、三箇所の水素結合を介して G-C 塩基対を形成する。2 位アミノ基に対する化学修飾はこの水素結合を保つことができるため、アルキル基¹⁻¹、カルバモイル基¹⁻²、アリール基¹⁻³など様々な修飾基が導入され、物理化学的、生化学的な研究が行われてきた(Figure 1-1)。しかし、2-アミノ基にヘテロアリール基を導入した修飾グアニン(2-*N*-(heteroaryl)-guanine, G^{HA})について、その報告例は一部の損傷グアニン塩基¹⁻⁴に限られる(Figure 1-1d)。

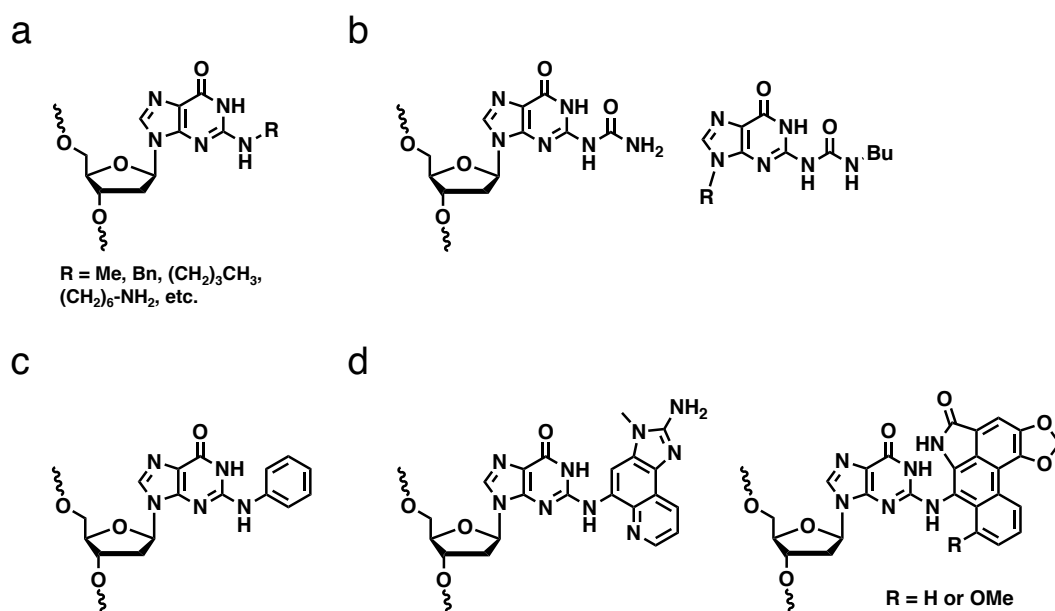


Figure 1-1. 2 位アミノ基に修飾を有するグアニンの報告例。a) アルキル基修飾。b) カルバモイル基修飾。c) アリール基修飾。d) 損傷グアニンの例。

ゲノム DNA は様々な化学物質との化学反応による損傷を受けており、グアニンの 2 位アミノ基だけでも、様々な種類の損傷が知られている。¹⁻⁵ そこで著者は、2 位アミノ基に置換基を有する損傷グアニンの単純なモデル化合物として、種々の G^{HA} を含むヌクレオシドとオリゴヌクレオチド(ODN)を合成し、それらが DNA 鎖の高次構造形成に与える影響を調べた。

G^{HA} の構造的特性として特に興味深いものに、2 位に導入したヘテロアリール環のコンホメーションの影響が考えられる。すなわち、ヘテロアリール環が Watson-Crick 塩基対側にあり塩基対形成を妨げると考えられる closed-type コンホメーションとヘテロアリール環が minor groove 側にあることで C と塩基対形成が可能な open-type コンホメーションの 2 種類である(Figure 1-2)。

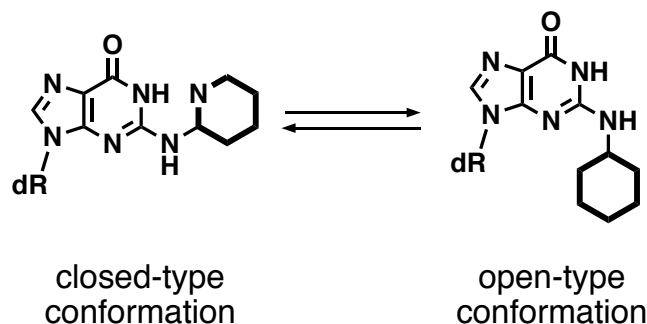


Figure 1-2. G^{HA} のふたつのコンホメーション

G^{HA} を含む ODN が二重鎖、四重鎖などを形成する時には、 G^{HA} は open-type コンホメーションをとる必要があり、closed-type および open-type それぞれのコンホメーションの安定性が高次構造の安定性に大きく影響すると予想される。

本研究では具体的には 2-*N*-(pyridin-2-yl)-guanine (G^{Py})、2-*N*-(pyrimidin-2-yl)-guanine (G^{Pym}) および 2-*N*-(pyrazin-2-yl)-guanine (G^{Pyra}) を含むデオキシヌクレオシドおよびオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、それぞれの修飾構造が高次構造形成にどのような影響を与えるかについて、二重鎖およびグアニン四重鎖および構造や安定性を解析した。また、コンホメーションの影響をより深く理解するため、ヘテロアリアル環が closed-type コンホメーションに固定された誘導体として 3,5-dihydro-11*H*-pyrido[2', 3' :4,5]imidazo[1,2-*a*]purin-11-one (PIP) を含むデオキシヌクレオシドおよびオリゴデオキシヌクレオチドも合成し、DNA 高次構造形成に与える影響を同様に解析した(Figure 1-3)。

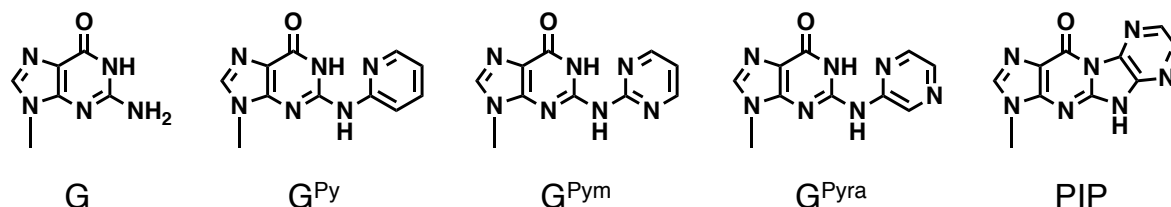


Figure 1-3. 本研究で合成した G^{HA} の構造。

また、二重鎖およびグアニン四重鎖以外の高次構造として、closed-type コンホメーションをとった G^{HA} と平行型三重鎖 DNA 中でチミンとの間の Hoogsteen 型塩基対を形成する可能性に着目した (Figure 1-4)。三重鎖 DNA¹⁻⁶ は二重鎖 DNA と一本鎖 DNA である三重鎖形成核酸(triplex-forming oligonucleotide, TFO)が結合することで形成される。このとき、二重鎖 DNA の標的鎖の 3'および 5'の配向が同じ向きになっているものを平行型と呼ぶ(Figure 1-4a)。平行型三重鎖形成時には、二重鎖 DNA の標的鎖の G に対して TFO のプロトン化された C(C^+)が、標的鎖の A に対して TFO の T が、また標的鎖の T に対して TFO の G が水素結合することで $C^+ : G-C$ 、 $T : A-T$ 、 $G : T-A$ 三塩基対を形成し、標的を配列選択的に認識する(Figure

1-4b)。¹⁻⁷ 三重鎖形成核酸 (TFO) に G^{Pym} を含む 4 種類の G^{HAs} を導入することで DNA 二重鎖中の T を選択的に認識することを期待し、 G^{HAs} の平行型三重鎖形成への影響を調べた。

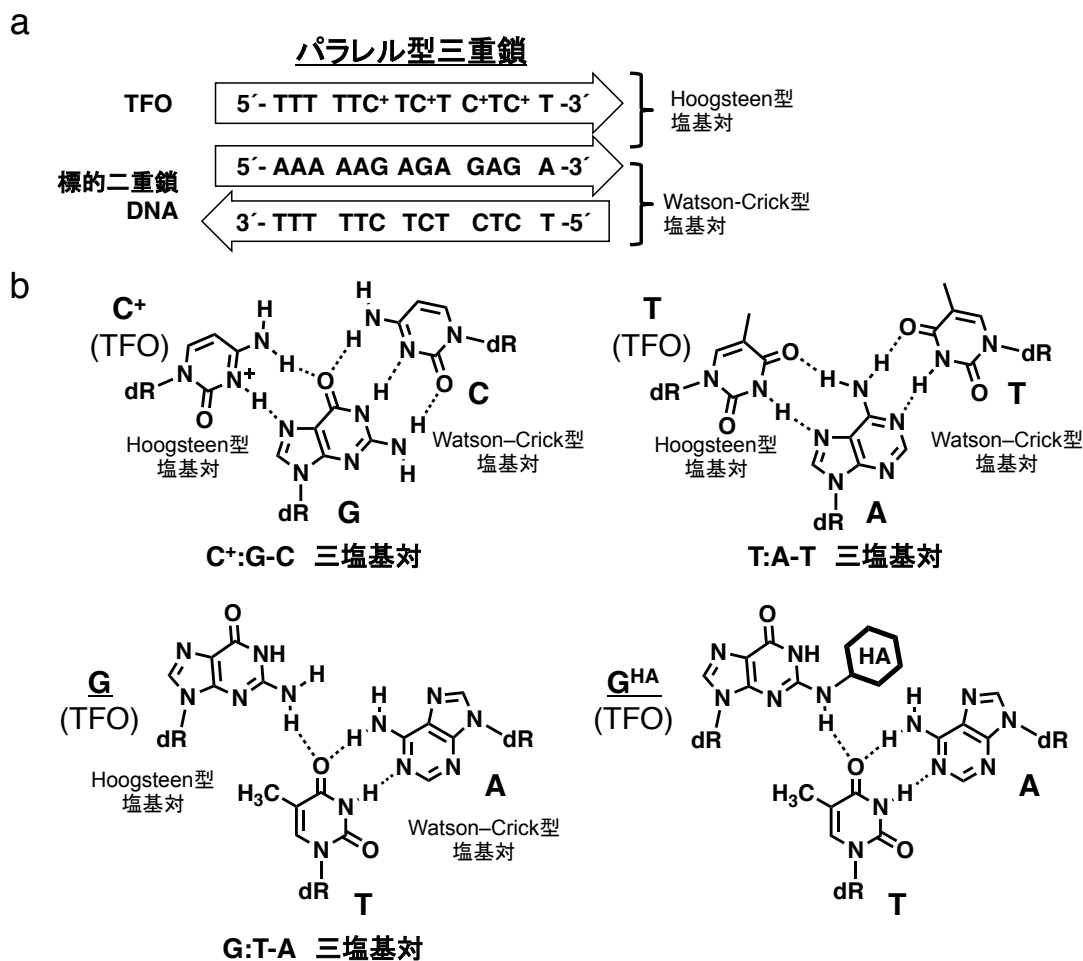


Figure 1-4. G^{HA} を含む TFO による三重鎖形成の可能性。 a) 平行型三重鎖 DNA の鎖の配向。 b) $C^+:G-C$ 、 $T:A-T$ 、 $G:T-A$ 三塩基対の構造と、 G^{HA} が T に結合する予想図。

第 2 節

計算化学による G^{HA} のコンホメーション解析

第 1 節で述べたように、 G^{HA} は closed-type および open-type コンホメーションの平衡状態にあり、ヘテロアリアル分子内水素結合を形成する closed-type の方が安定であると考えられる。過去に、2 位のアミノ基にカルバモイル基を有する 2-*N*-カルバモイルグアニン誘導体が open-type と closed-type のふたつのコンホメーションをとることが報告されている。¹² 佐々見らは、実際に 2-*N*-カルバモイルグアニンを含むオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、2-*N*-カル

バモイルグアニンが二重鎖DNA中でTとのwobble塩基対形成を相対的に不安定化し、Cとの塩基対形成選択性が向上したことが報告されている(Figure 1-5)。^{1-2a,b}

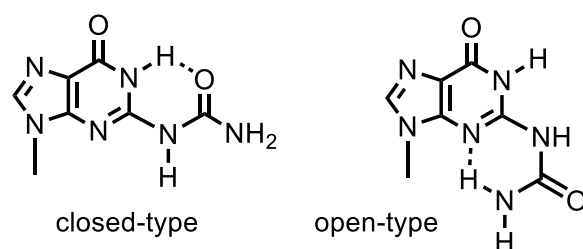


Figure 1-5. カルバモイルグアニンのclosed-typeおよびopen-typeコンホメーション

このように、 G^{HA} の場合も2つのコンホメーションの安定性が塩基対形成の安定性に影響を与えと考えられる。そこで、 G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyr} の各コンホメーションの安定性および G^{HA} -C塩基対の安定性を予測するために、密度汎関数法(DFT)計算によりclosed-type、open-typeコンホメーションおよび G^{HA} -C塩基対塩のエネルギーを予測した。計算のソフトウェアにはGaussian09¹⁻⁸を用い、構造最適化、エネルギー計算のどちらも汎関数は ω B97X-D¹⁻⁹、基底関数は6-31⁺Gdを用い、真空中で計算を行った。

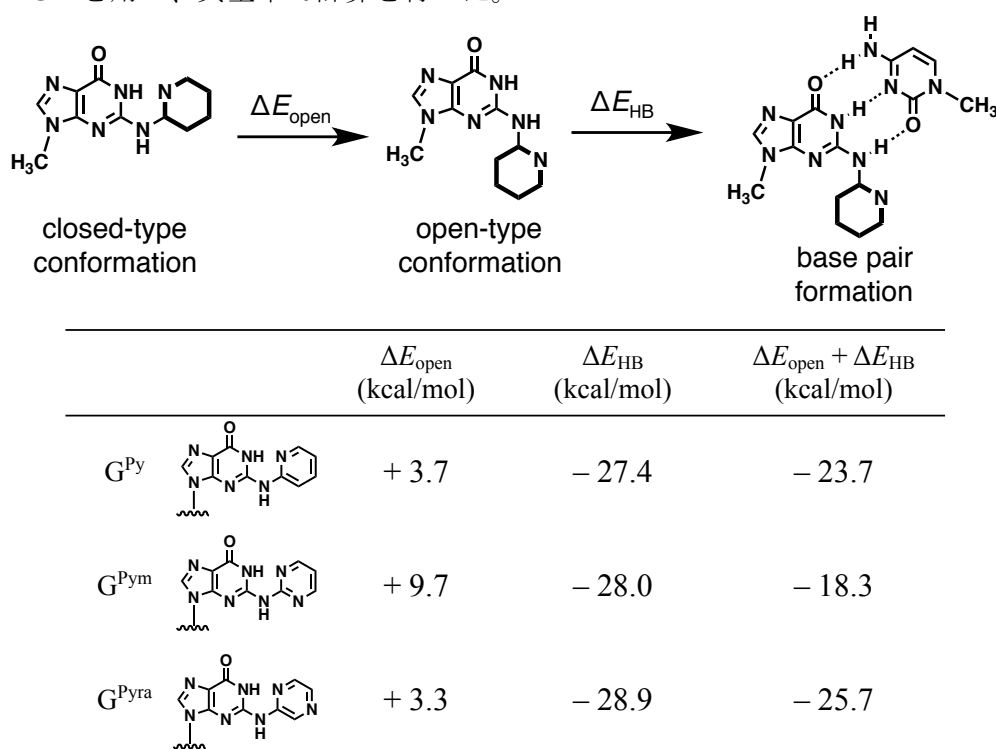


Figure 1-6. 真空中での G^{HA} のコンホメーションおよび塩基対の安定性: closed-typeからopen-typeコンホメーションに変化するのに必要なエネルギー(ΔE_{open})および水素結合エネルギー(ΔE_{HB})

closed-typeコンホメーション、open-typeコンホメーションおよび G^{HA} s-C塩基対の各エネルギーを算出した後、そのエネルギー差を求めることで、closedからopenになるためのエネルギー (ΔE_{open}) および水素結合エネルギー (ΔE_{HB}) を算出した。その結果をFigure 1-6に示す。

G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyra} の ΔE_{open} はそれぞれ+3.7、+9.7、+3.3 kcal/molと正の値であったことから、予想通りopen-typeコンホメーションはclosed-typeコンホメーションと比較して不安定であり、 G^{Pym} の場合は最も不安定であることが分かった。それぞれの最適化構造をFigure 1-7に示す。 G^{Py} および G^{Pyra} の場合グアニン環とヘテロアリアル環が同一平面上にある。このとき、プリン環3位の窒素原子とピリジン環3位またはピラジン環3位の水素原子が分子内でCH-N相互作用をすることでopen-typeコンホメーションを安定化していると考えられる。一方、 G^{Pym} の場合は2つの環がねじれた位置関係にある。このとき、プリン環3位の窒素原子とピリミジン環の窒素原子が反発してopen-typeコンホメーションを不安定化していると考えられる。以上のように、わずかな修飾基の違いがclosed-typeとopen-typeのコンホメーションの構造や安定性を大きく変えることが分かった。

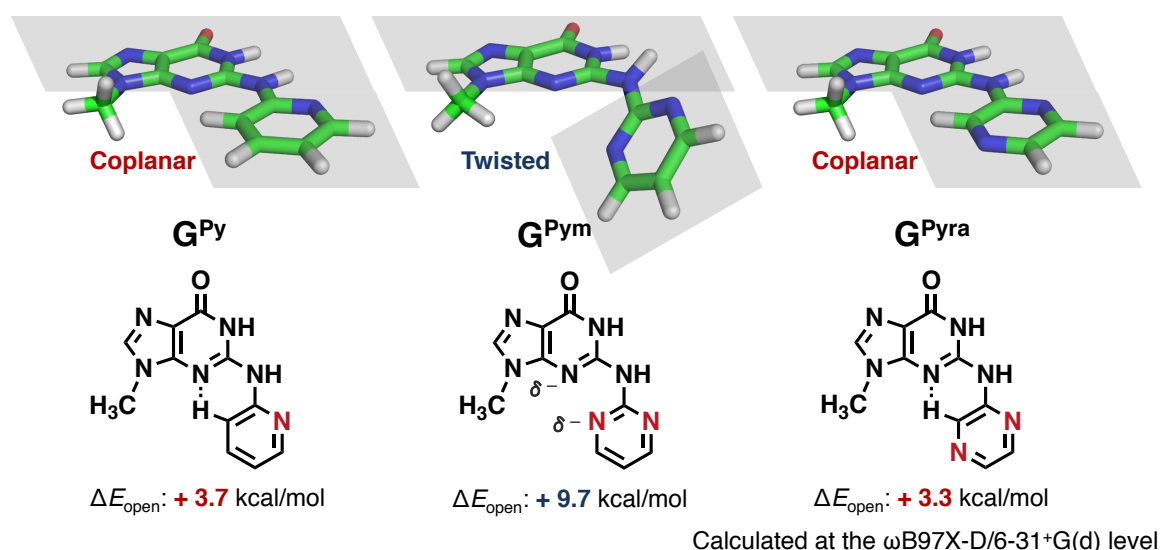


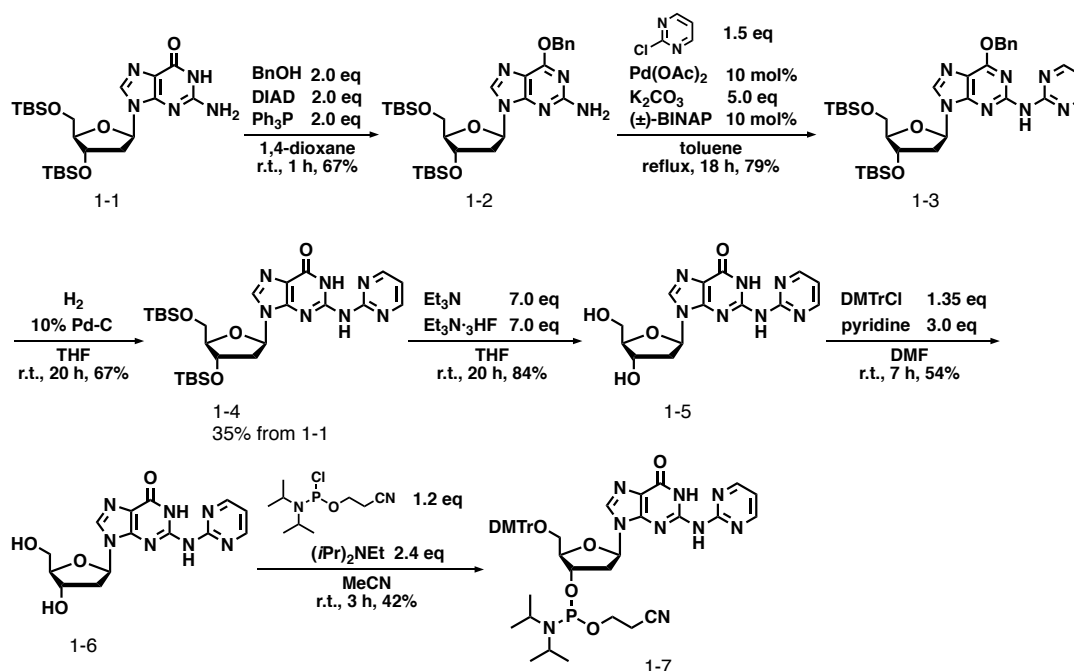
Figure 1-7. DFT 計算により得られた G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyra} の最適化構造

また、水素結合エネルギーについてみると、 G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyra} の ΔE_{HB} はそれぞれ-27.4、-28.0、-28.9 kcal/molであり、修飾構造によって大きな違いは見られなかった。2つのエネルギーの和 ($\Delta E_{open} + \Delta E_{HB}$) は G^{HA} が最安定配座であるclosed-typeコンホメーションからopen-typeコンホメーションに変化し、塩基対を形成するまでの全エネルギーに相当するが、その値は-23.7、-18.3、-25.7 kcal/molであり負の値をとることから、これらの G^{HA} sを含むオリゴデオキシヌクレオチドはopen-typeコンホメーションをとり二重鎖を形成することが示唆された。また、これらの値から G^{Pyra} 、 G^{Py} 、 G^{Pym} の順で安定な塩基対を形成する可能性についても示唆された。

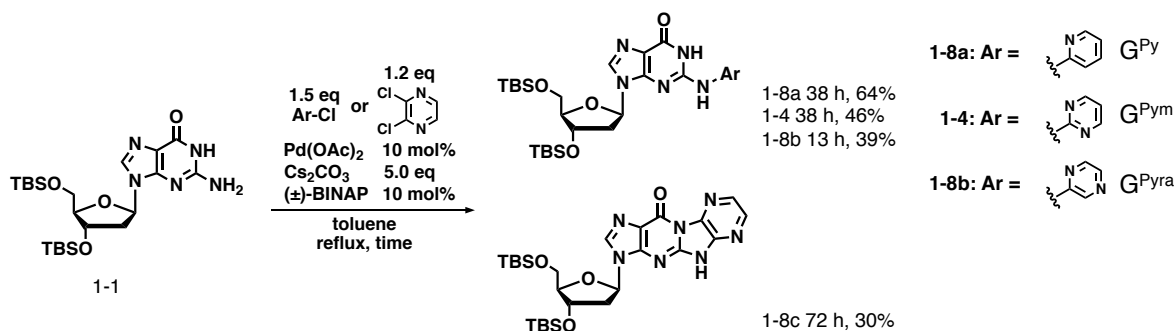
第3節

G^{HA} のヌクレオシド誘導体、および G^{HA} を含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成

第1節で述べた G^{HA} を有するオリゴヌクレオチドを化学合成するために、 G^{HA} のヌクレオシドの合成を行った。当研究室の伊藤は過去に、デオキシグアノシンの糖部 3'、5'位の水酸基を TBDMS 基で、塩基部 6 位のカルボニル基をベンジル基で保護した化合物 **1-2** を用いて Buchwald-Hartwig 反応¹⁻¹⁰を行い、 G^{Pym} の中間体の合成に成功している。(Scheme 1-1)。¹⁻¹¹ また、この反応に用いる塩基は K_2CO_3 よりも Cs_2CO_3 の方がすぐれていることも明らかにしている。今回著者はさらなる短行程での合成を目指し、塩基部無保護の中間体 **1-1** を用いて同じ反応条件によるヘテロアリアル環の導入を試みた。



Scheme 1-1. 伊藤らによって行われた G^{Pym} 誘導体の合成



Scheme 1-2. Buchwald-Hartwig 反応による化合物 **1-8a**、**1-4**、**1-8b** および **1-8c** の合成

Scheme 1-2 に示すように、Pd 試薬、塩基、ホスフィンリガンドとして各々酢酸パラジウム、 Cs_2CO_3 、(±)-BINAP¹⁻¹²を用いることで、 G^{HA} s 誘導体 **1-8a**、**1-4**、**1-8b** および **1-8c** をそれぞれ 64%、46%、39%および 30%で得ることに成功した。ここで、Scheme 1-1 に示すように、伊藤が化合物 **1-1** から **1-4** を 3 行程 35%で合成したのに対し、本手法では 1 行程 46%で得られることから、化合物 **1-4** の合成の効率化に成功した。しかし、PIP ヌクレオシド誘導体 **1-8c** の収率が比較的低収率であることから、これを改善するために、Buchwald-Hartwig 反応の条件を詳細に検討した。50 mg の化合物 **1-8** に対して、2,3-ジクロロピラジンを 1.2 当量、ホスフィンリガンドを 20 mol%、Pd 試薬を 10 mol%、塩基を 5 当量、溶媒をトルエンとし、14 時間 reflux 時点で反応系から 500 μL 採取し、濃縮して DMSO- d_6 に溶かし、 ^1H -NMR を測定した。得られたシグナルからヌクレオシドの 1'位に由来するプロトンのピークに注目し、化合物 **1-1**、**1-8c**、その他の副生成物の比を積分値から算出した。その結果を Figure 1-8 に示す。

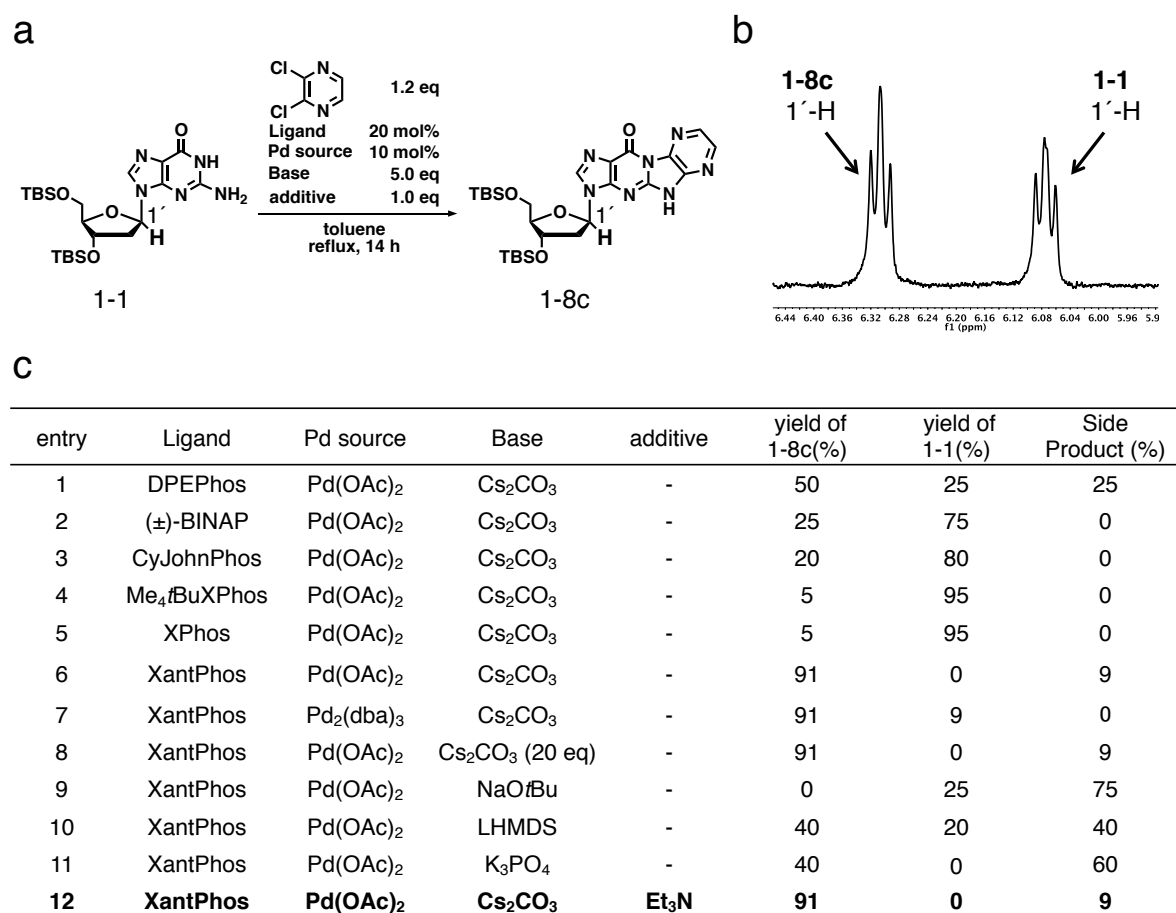
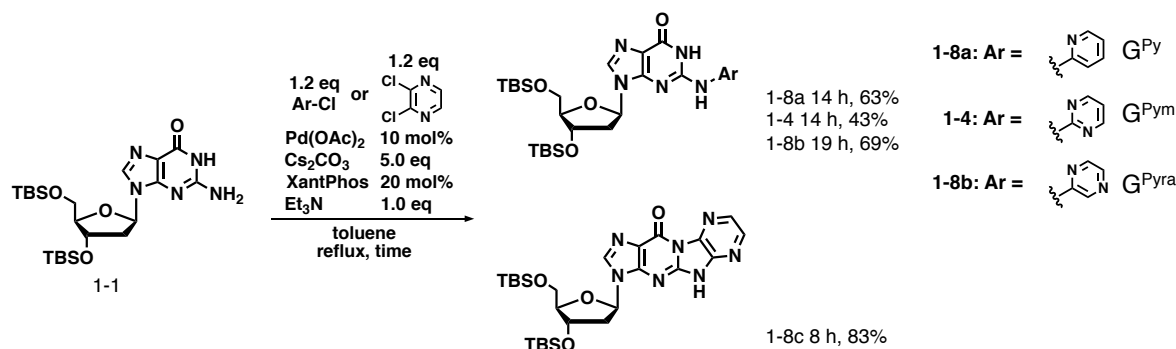


Figure 1-8. 化合物 **1-8c** の合成における Buchwald-Hartwig 反応の条件検討。a) 反応スキーム。定量に用いた 1'位の H を強調して示した。b) ^1H -NMR による比の算出に用いたピークの例。c) 反応の条件検討の結果。

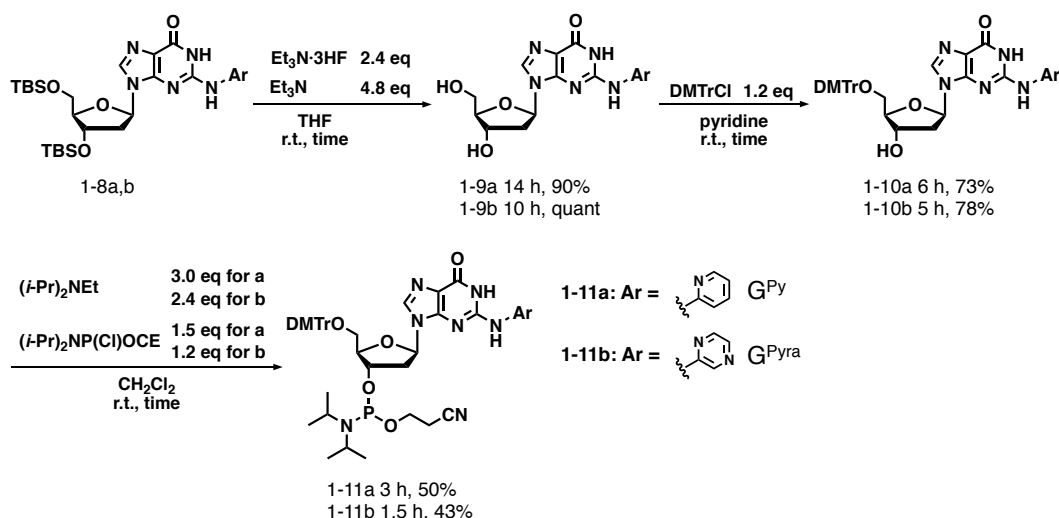
はじめにホスフィンリガンドを種々検討した結果(entry 1~6)、XantPhos がもっとも良好な収率で **1-8c** を生成する。そこで、ホスフィンリガンドを Xantphos に固定し、Pd 試薬について Pd(OAc)₂ と Pd₂(dba)₃ を比較した結果(entry 7,8)、どちらも同程度に良好な収率を示した。そのため、以後の検討はより安価な Pd(OAc)₂ を用いた。つづいて塩基を種々検討した結果(entry 6, 9~11)、Cs₂CO₃ が最も良好な収率を示した。一方、Cs₂CO₃ の当量を増やすことによる収率の改善はみられなかった(entry 6, 8)。ここで、Et₃N を添加すると Pd(II) から Pd(0) への還元が促進される可能性があるという報告例¹⁻¹³があるため、これまでで最も良かった entry 6 の条件に添加物として 1.0 当量のトリエチルアミンを加えた結果(entry 12)、目的物の生成比は変化しなかったが、¹H-NMR 中の芳香環領域(7 ~ 10 ppm)においてピークの数が増加した。そのため、entry 12 の条件の方が、entry 6 の条件と比較して目的物の単離精製が容易になる可能性がある。以上の結果から、リガンドに XantPhos、Pd 試薬に Pd(OAc)₂、塩基に炭酸セシウムを用い、1.0 当量のトリエチルアミンを添加する entry 12 の条件が、本検討で得られた最も良い **1-8c** 合成の条件であると言える。この条件を用いて再度 G^{HA} 誘導体 **1-8a**、**1-4**、**1-8b** および **1-c** の合成を再度試みたところ、それぞれ単離収率 63%、43%、69%、83% で目的物が得られた(Scheme 1-3)。 (±)-BINAP を用いた条件での **1-8a**、**1-4**、**1-8b** および **1-8c** の収率(64%、46%、39%、30%)と比較して、特に **1-8b** および **1-8c** の大幅な収率向上に成功した。



Scheme 1-3. 化合物 **1-1** 酢酸パラジウム、Cs₂CO₃、XantPhos を用いた Buchwald–Hartwig 反応による化合物 **1-8a**、**1-4**、**1-8b** および **1-8c** の合成

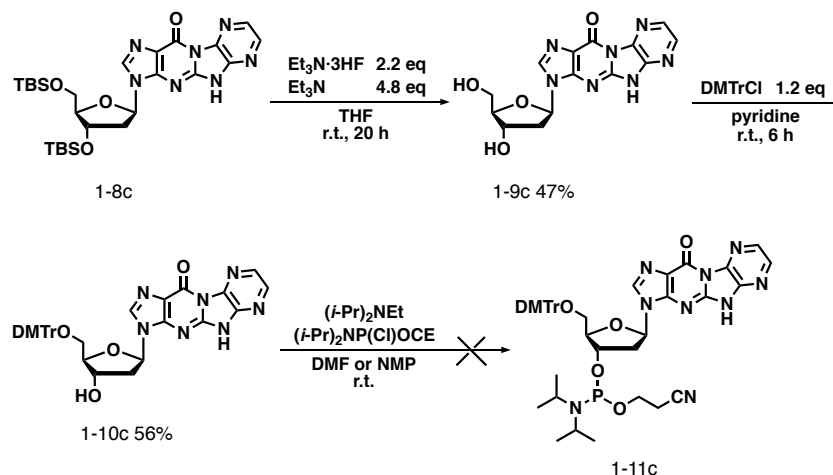
合成された G^{HA} を塩基部にもつヌクレオシドを用いて、伊藤が **1-7** を合成した時に用いたの条件¹⁻¹¹を参考に、G^{Py}、G^{Pyra} を塩基部にもつヌクレオシドのホスホロアミダイトユニットを合成したので、その詳細を伊藤の結果とともに Scheme 1-4 に示す。化合物 **1-8a**、**1-8b** の TBDMS 基を脱保護することで、化合物 **1-9a**、**1-9b** をそれぞれ収率 90%、quant. で得た。つづいて、化合物 **1-9a**、**1-9b** に対して 5'-水酸基を DMTr 基で保護し、化合物 **1-10a**、**1-10b** をそれぞれ収率 73%、78% で得た。最後に、3'-水酸基のホスフィチル化を行い、塩基部の保護基を用いずに目的のホスホロアミダイトユニット化合物 **1-11a**、**1-11b** をそれぞれ収率 50%、43% で得ることに成功した。また、G^{Py} を塩基部にもつヌクレオシドのホスホロアミダイトユニット

1-7 は伊藤の方法¹⁻¹¹に従って合成した。



Scheme 1-4. G^{Py}、G^{Pyra}のホスホロアミダイトユニット**1-11a,b**の合成。

同様に、PIPを塩基部にもつヌクレオシドのホスホロアミダイトユニットの合成を検討した。(Scheme 1-5)。化合物**1-11a**、**1-11b**、**1-7**の場合と同様に、化合物**1-8c**のTBDMS基を脱保護することで、化合物**1-9c**を47%で得た。つぎに、5′水酸基をDMTr基で保護し、化合物**1-10c**を収率56%で得た。



Scheme 1-5. 塩基部無保護のPIPホスホロアミダイトユニット**1-11c**の合成検討

最後に、3′-水酸基のホスフィチル化を試みた。化合物**1-10c**がジクロロメタンおよびアセトニトリルに溶解しなかったため、より高極性で溶解性が高いと考えられるNMPを用いたが、目的のホスホロアミダイト体を得ることができなかった。反応系から回収した試料を³¹P-NMRで分析したところ、ホスホロアミダイトユニットに特徴的な150 ppm付近のピークは観測されず、7.7～8.7 ppm付近に複数のピークが観測された (Figure 1-9)。これは、*H*-ホスホネートに特有のケミカルシフト値であり、ホスホロアミダイトユニットが加水分解して生

成した *H*-ホスホネートが少なくとも試料中に含まれていると考えられる。一方、同じく極性溶媒である DMF を用いて同じ反応を試みた場合、反応の進行はほとんどみられなかった。

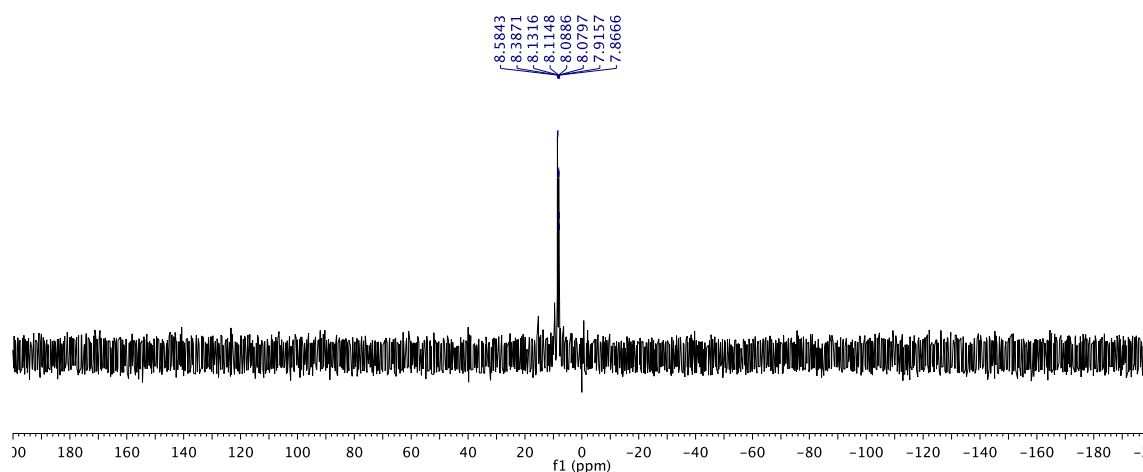
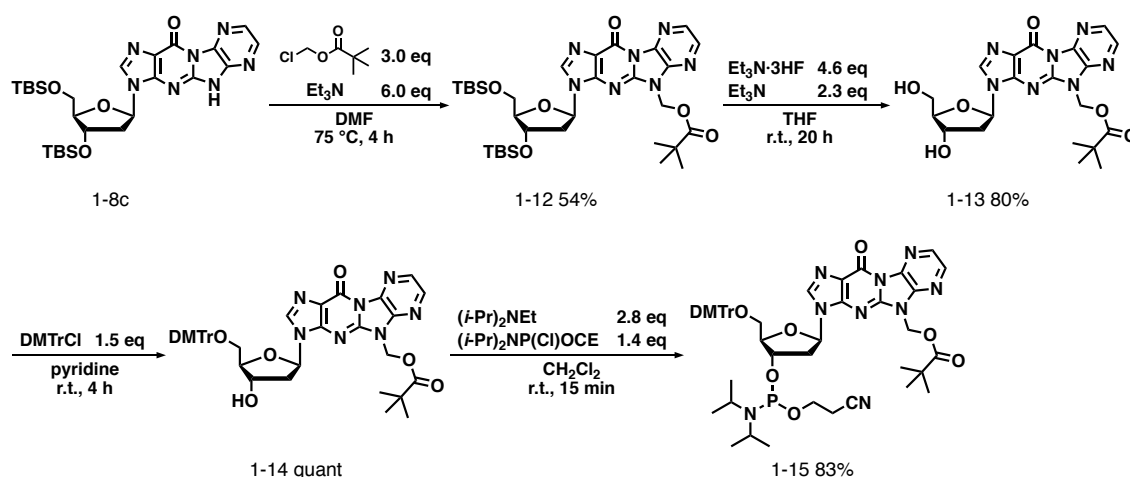


Figure 1-9 化合物 **1-11c** のホスフィチル化反応の回収物の ^{31}P -NMR チャート(CDCl_3)。

ホスホロアミダイトユニットが得られなかった理由として、無保護の塩基部が副反応に関与した可能性が考えられる。そこで、アンモニア水で脱保護可能であり、かつ疎水性を向上させ化合物の取り扱いが容易になると期待される pivaloyloxymethyl 基で塩基部を保護し、ホスホロアミダイトの合成を行うこととした(Scheme 1-6)。

化合物 **1-8c** に対して chloromethyl pivalate を用いることで塩基部保護体(**1-12**)を収率 54% で得た。続く TBDMS 基の脱保護(80%)により **1-13** に変化した後、DMTr 化(quant.)を行い 5' 保護体(**1-14**)を経て、ホスフィチル化(83%)により、目的のアミダイトユニット **1-15** を得ることに成功した。



Scheme 1-6. 塩基部を保護した PIP ホスホロアミダイトユニット **1-15** の合成

最後に、アミダイトユニット **1-11a**、**1-7**、**1-11b** および **1-15** を用いて、オリゴヌクレオチ

ドの合成を行った (Figure 1-10)。G^{HA}を含むヌクレオチド残基のカップリング時間を 300 秒とし、それ以外は通常の DNA 合成法に従って行った。28%アンモニア水を用いて脱保護、切り出しを行い、アンモニアを遠心エバポレーターによって除いた後、逆相カートリッジにより精製を行った。必要な場合、逆相 HPLC を用いてさらに精製を行った。各精製後に逆相 HPLC によってオリゴマーを分析し、MALDI-TOF-MS を用いて目的のオリゴマーが得られたことを確認した。

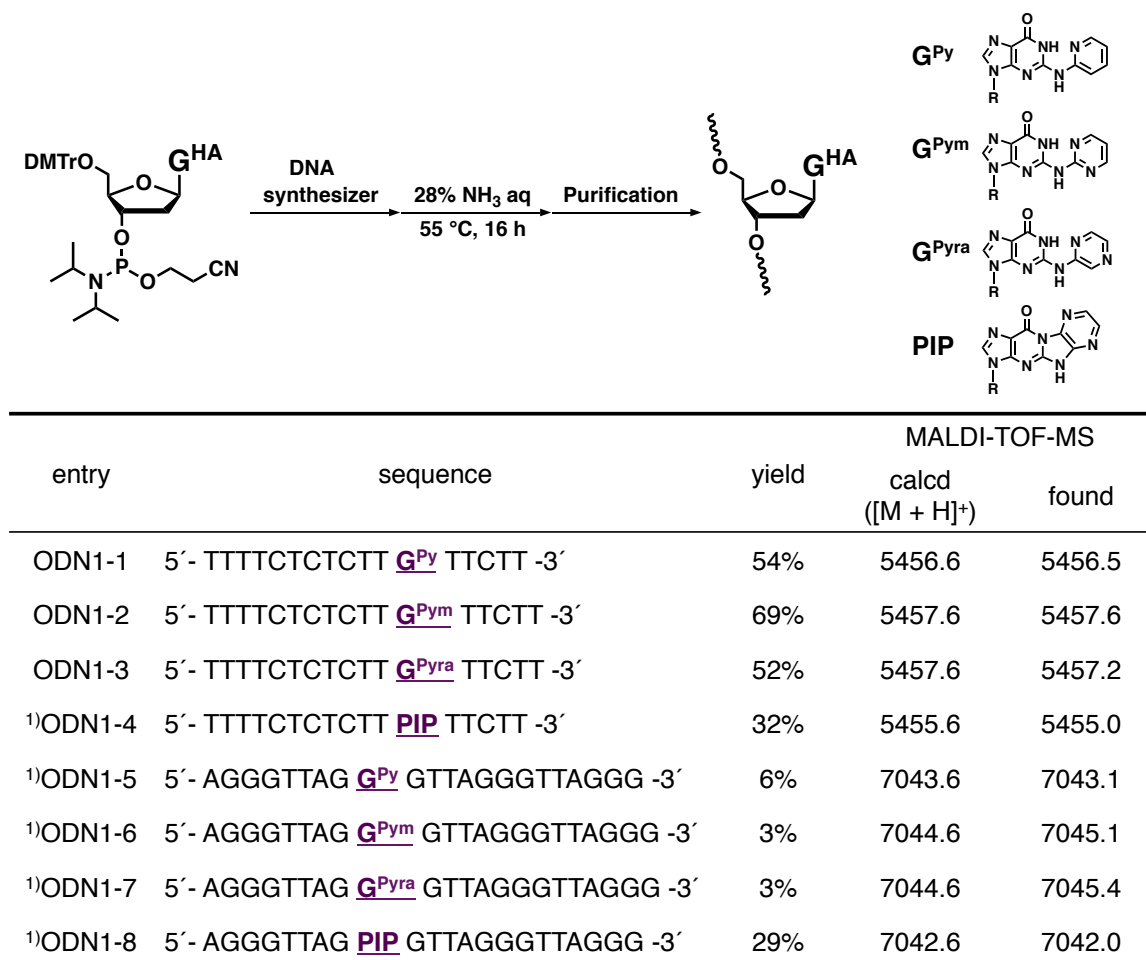


Figure 1-10. オリゴデオキシヌクレオチドの合成法と配列および質量分析の結果と収率。1) 逆相カートリッジ精製に加えて逆相HPLC精製を行った。

第 4 節

G^{HA} の酸性度

G^{HA} の塩基対形成能を実験的に調べるにあたり、1 位のイミノプロトンの酸性度と、付加したヘテロアリアル基窒素原子の塩基性を調べることにした。これらの性質を予測するため、糖部無保護の各ヌクレオシド **1-9a**、**1-6**、**1-9b** および **1-9c** を用いて p*K*_a の測定を行った。

はじめに pH 2~12 まで 1 刻みで UV 吸収スペクトルを測定し、UV 吸収に変化が見られた

領域を pH 0.3 刻みで UV 吸収を測定した。それぞれ酸性条件側、塩基性条件側の最大吸収波長における UV 吸収の比¹⁻¹⁴を酸解離曲線にフィッティングすることでそれぞれの pK_a を求めた (Figure 1-11)。**1-9a** (G^{Py})、**1-6** (G^{Pym})、**1-9b** (G^{Pyra})の pK_a はそれぞれ 9.4、9.4 および 8.7 であり、未修飾のデオキシグアノシン (G) の 9.3 に近い pK_a を示した。よって、ここで観測された G^{HA} の pK_a はグアニンと同様 1 位の N-H 結合の解離に由来すると考えられ、また中性条件下では塩基部は脱プロトン化が起きていないと考えられる。一方 **1-9c** (PIP)の pK_a は 5.0 であり、これはイミダゾール環上に位置する 5 位 N-H 結合の脱プロトン化によると考えられる。

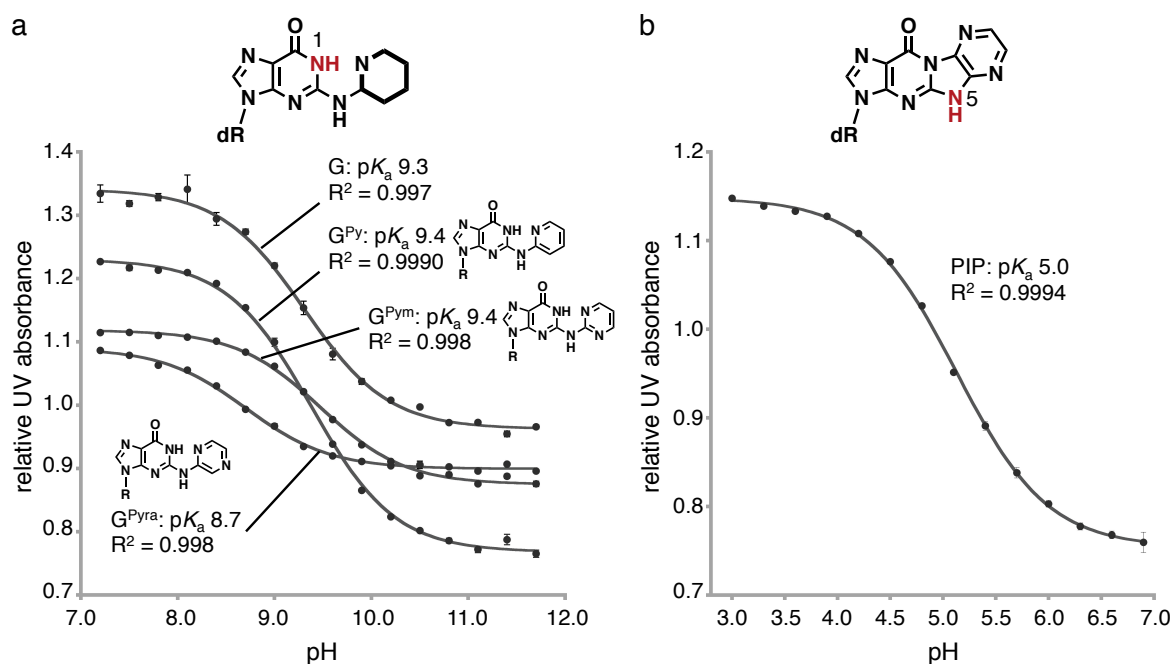


Figure 1-11. G^{HA} の pK_a の測定。条件: デオキシグアノシン (G)、**1-9a** (G^{Py})、**1-6** (G^{Pym})、**1-9b** (G^{Pyra}): 25 μ M、200 mM グリシン-NaOH buffer、1% DMSO。**1-9c** (PIP): 25 μ M、200 mM クエン酸-NaOH buffer、1% DMSO。吸光度比の算出に用いた波長は下記の通り。 G : 254 nm/265 nm、 G^{Py} : 264 nm/275 nm、 G^{Pym} : 266 nm/275 nm、 G^{Pyra} : 266 nm/274 nm、PIP: 268 nm/278 nm。全ての UV 吸収測定は 3 回行い、平均値と標準偏差を示した。

前節で述べたように、塩基部無保護の状態では PIP を塩基部に含むホスホロアミダイト体 **1-11c** を得ることができず、加水分解による H -ホスホネートの生成が ^{31}P -NMR 上でみられた。今回の pK_a の測定結果から、PIP がホスホロアミダイトの窒素原子をプロトン化して活性化するのに十分な酸性をもち、ホスホロアミダイト部位の加水分解を促進した可能性が示唆された (Figure 1-12)。

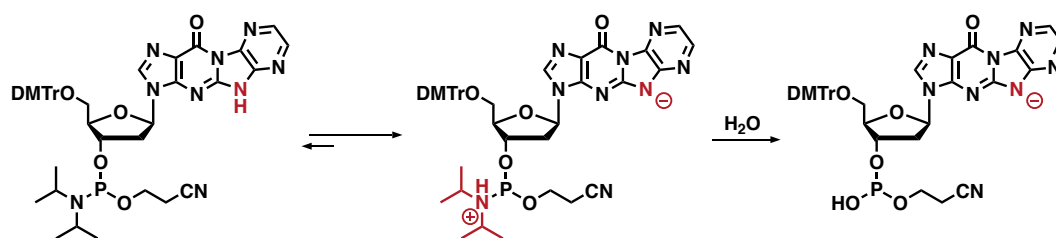


Figure 1-12 化合物**1-12c**の加水分解において考えられる反応機構

つづいて、PIP がオリゴヌクレオチド中でも中性条件下で脱プロトン化されているかを確認した。化合物 **1-10c** は、 $\text{pH} < 3$ の酸性条件下で 268 nm および 348 nm に、 $\text{pH} > 7$ の塩基性条件下では 278 nm および 377 nm にそれぞれ吸収極大を有する (Figure 1-13a)。通常オリゴデオキシヌクレオチド中の核酸塩基は 330 nm~430 nm の領域に吸収を示さないため、PIP の長波長側の吸収はオリゴマー中でも観測可能である。PIP を含む **ODN1-4** の UV 吸収スペクトルを測定した結果、長波長側の領域では 380 nm に吸収極大を示した (Figure 1-13b)。このことから、PIP は中性条件下では、オリゴヌクレオチド中でも脱プロトン化された状態で存在していることが分かった。

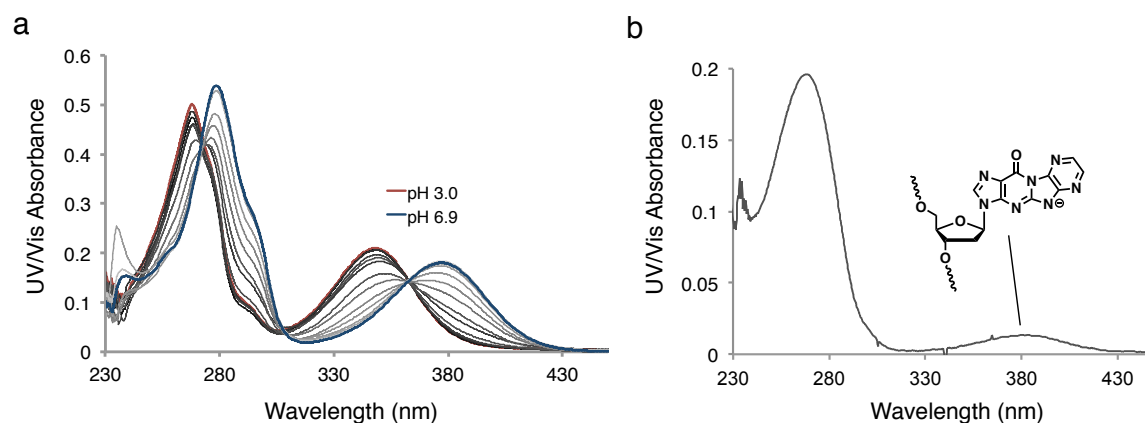


Figure 1-13 a) pH 3.0, 3.3, 3.6, ..., 6.9における化合物**1-10b**のUV吸収スペクトル。b) **ODN1-4**のUV吸収スペクトル。測定条件: 25 μM **ODN1-4**、200 mMクエン酸-NaOH buffer、 pH 7.0。

第5節

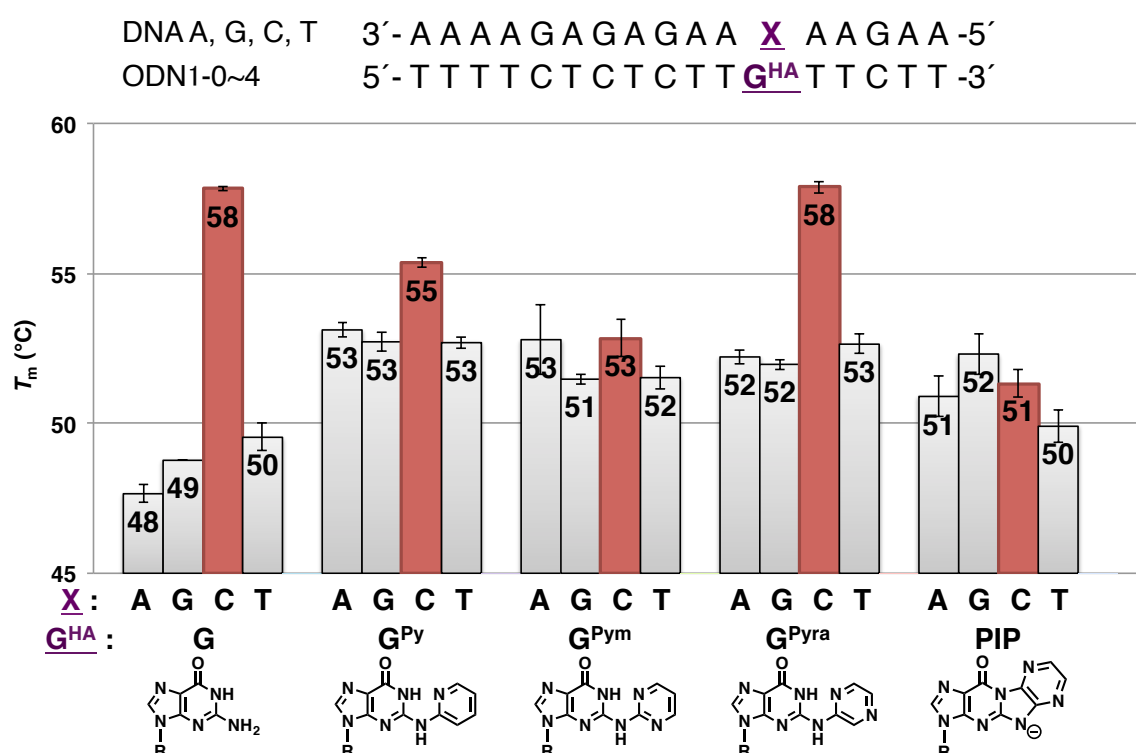
G^{HA} を有するオリゴデオキシヌクレオチドの二重鎖形成における性質

G^{HA} のDNA二重鎖安定性への影響を二重鎖融解温度(T_m)測定により評価した。測定には、**ODN1-1~1-4**の他に、グアニン未修飾の比較対象として**ODN1-0**、および G^{HA} の相手塩基にA、G、C、Tのいずれかがある相補鎖 (DNA(A, G, C, T)) を購入して用いた。その配列を Figure

1-14 示す。

entry	sequence
ODN1-0	5'- TTTTCTCTCTT G TTCTT -3'
DNA A	5'- AAGAA A AAGAGAGAAAA-3'
DNA G	5'- AAGAA G AAGAGAGAAAA-3'
DNA C	5'- AAGAA C AAGAGAGAAAA-3'
DNA T	5'- AAGAA T AAGAGAGAAAA-3'

Figure 14. 二重鎖融解温度(T_m)測定に用いたオリゴデオキシヌクレオチドの配列。



10 mM cacodylate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ 0.5 mM spermine and 1.5 μ M each oligonucleotide.

Figure 1-15. G^{HA}sを含む二重鎖の T_m 値 (°C)。

T_m 測定の結果を Figure1-15 に示す。相手塩基がシトシンのとき(X = C)、未修飾の二重鎖 (ODN1-0/DNA C) の T_m 値が 58 °C であったのに対して、G^{Py}、G^{Pym}、G^{Pyra} および PIP を含む二重鎖 (ODN1-1~4/DNA C) の T_m 値はそれぞれ 55 °C、53 °C、58 °C、51 °C であった。これらの中で PIP が最も低い二重鎖安定性を示したのは、固定されたピラジン環によって Watson-Crick 塩基対形成が完全に阻害されているからであると考えられる。一方、G^{Py}、G^{Pym} および G^{Pyra} は open-type コンホメーションをとることができるにもかかわらず異なる T_m 値を示したことから、修飾構造の違いが二重鎖の安定性に違いをもたらすことがわかった。またこれら

の T_m 値と第2節で計算された塩基対形成エネルギー ($\Delta E_{\text{open}} + \Delta E_{\text{HB}}$) を比較すると (Figure 1-16)、塩基対形成エネルギーが小さい値をとるほど T_m 値が高くなることがわかる。また、 ΔE_{open} だけをみても、 T_m 値との順位相関があることが分かった。このことから、open-type コンホメーションの安定性および水素結合の安定性が $G^{\text{HA}}\text{s}-\text{C}$ 塩基対を含む二重鎖の安定性に大きく寄与していることが示唆された。特に、 G^{Pym} を含む二重鎖が不安定化したことについて、open-type コンホメーションが不安定である ($\Delta E_{\text{open}} = +9.7$ kcal/mol) ことから Watson–Crick 塩基対を形成することのできない closed-type コンホメーションが形成され、二重鎖融解温度が低下した可能性が考えられる。以上のように、2種類のエネルギー ΔE_{open} および ΔE_{HB} を計算することが $G^{\text{HA}}\text{s}$ の二重鎖安定性に対する影響の予測に有用であることが示唆された。

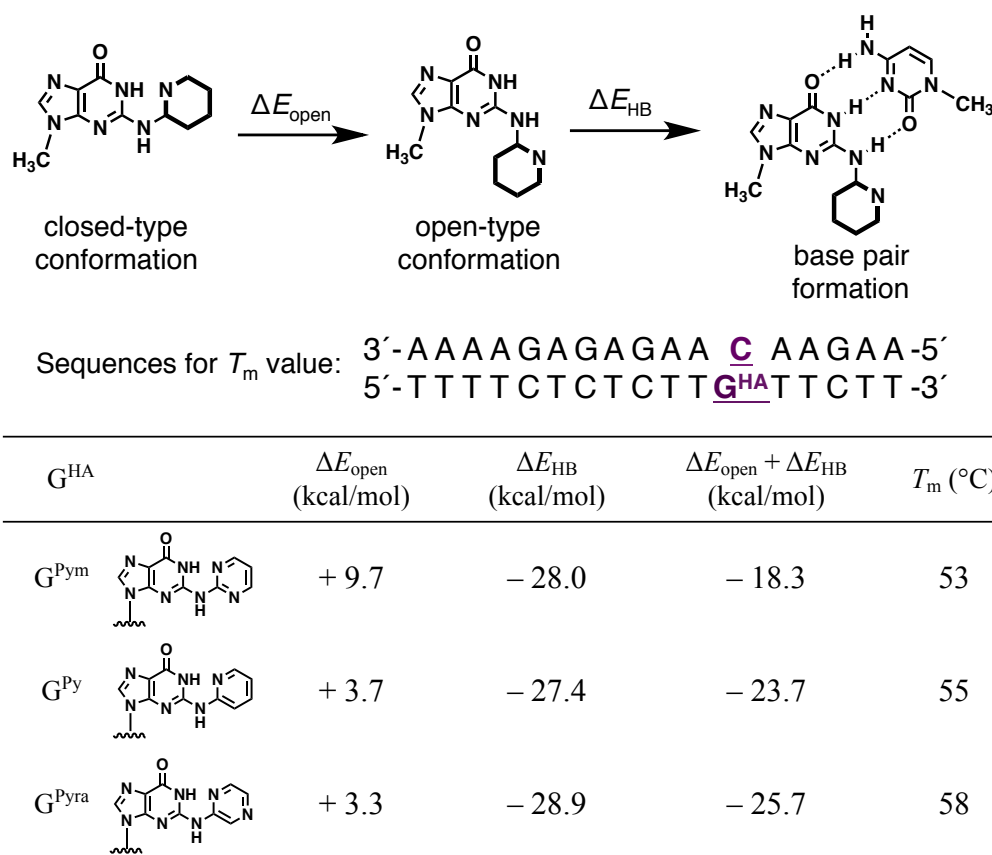


Figure 1-16 G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyra} の ΔE_{open} および ΔE_{HB} と $G^{\text{HA}}\text{s}-\text{C}$ 塩基対を含む二重鎖の T_m 値の比較。

つぎに相手鎖がアデニン、グアニン、チミンのとき ($X = \text{A}, \text{G}, \text{T}$)、すなわちミスマッチを含む二重鎖の T_m 値を測定した (Figure 1-15)。PIP の相手塩基が A、G、T のとき (**ODN1-4/DNA A,G,T**)、二重鎖の T_m 値はそれぞれ 51 °C、52 °C、50 °C であった。この値は、未修飾の G の相手塩基が A、G、T のとき (**ODN1-0/DNA A,G,T**) の T_m 値の 48 °C、49 °C、50 °C と比較してわずかに高かったことから、ミスマッチの塩基対を含む二重鎖がわずかに安定化されたことがわかる。さらに、PIP の相手塩基が C のとき (**ODN1-4/DNA C**) の T_m 値 (51 °C) とほ

ば同等であることも分かった。これらの結果から、PIP は水素結合を介した塩基対を形成する能力をもたないため、相補的位置にある塩基の種類に関わらずほぼ同等の二重鎖結合能をもっていることが分かった。このような性質は、相手塩基が A、G、C、T いずれの場合もほぼ等しい二重鎖安定性を示す universal bases である 5-nitroindole¹⁻¹⁵ や pyrene¹⁻¹⁶ (Figure 1-17)などに類似しているため、PIP は二重鎖中で相手塩基と水素結合をせず、例えばインターカレート¹⁻¹⁷をしている可能性が考えられる。

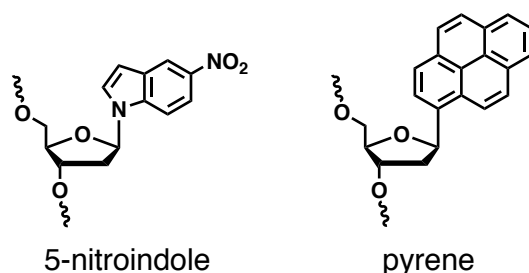


Figure 1-17 5-nitroindoleおよびpyreneを有する人工核酸

また、 G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyr} を含むオリゴデオキシヌクレオチドの場合も、PIP に類似したミスマッチ二重鎖安定性を示した。 G^{Py} の相補的位置にある塩基が A、G、T のとき (**ODN1-1/DNA A,G,T**)、二重鎖の T_m 値はそれぞれ 53 °C、53 °C、53 °C であり、 G^{Pym} の相補的位置にある塩基が A、G、T のとき (**ODN1-2/DNA A,G,T**)、二重鎖の T_m 値はそれぞれ 53 °C、51 °C、52 °C、また G^{Pyr} の相補的位置にある塩基が A、G、T のとき (**ODN1-3/DNA A,G,T**)、二重鎖の T_m 値はそれぞれ 53 °C、52 °C、53 °C であった。これらの T_m 値は、いずれの場合も未修飾の G の相手塩基が A、G、T のとき (**ODN1-0/DNA A,G,T**) の T_m 値 (48 °C、49 °C、50 °C) よりも高かった。そのため、 G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyr} は相補的位置にある塩基が A、G、T のとき、closed-type コンホメーションをとり、PIP の場合と同様にスタッキング相互作用などの非特異的な相互作用によってミスマッチ二重鎖が安定化されたと考えられる。

以上の結果から、 G^{HAs} を含む DNA の二重鎖は、相手塩基が C の場合 open-type コンホメーションの安定性と水素結合エネルギーによって安定性が左右され、その安定性は計算化学を用いることで相対的に予測可能であることが示唆された。また、相手塩基が A、G、T のときは、非特異的な相互作用によってそれぞれほぼ同じ程度まで安定化されることが分かった。

第6節

G^{HA} を有するオリゴデオキシヌクレオチドの平行型三重鎖形成における性質

本節では、**ODN1-1~1-4** を TFO として用い、その三重鎖形成能および"塩基対"選択性について述べる。検討結果に先立ち、本節での三重鎖塩基対の表記について述べる。三重鎖核酸の塩基対は、Hoogsteen 相互作用をする TFO 鎖と第二鎖(標的鎖)の間にコロンの(:)、Watson-Crick 相互作用をする第二鎖と第一鎖(標的鎖の相補鎖)の間にハイフン(-)を挿入する。例えば、G:T-A 塩基対は、最初の G が TFO 中のグアニンを意味し、中央の T は第二鎖に含まれるチミン、最後の A は第二鎖と Watson-Crick 相互作用しているアデニンに対応する (Figure 1-18)。

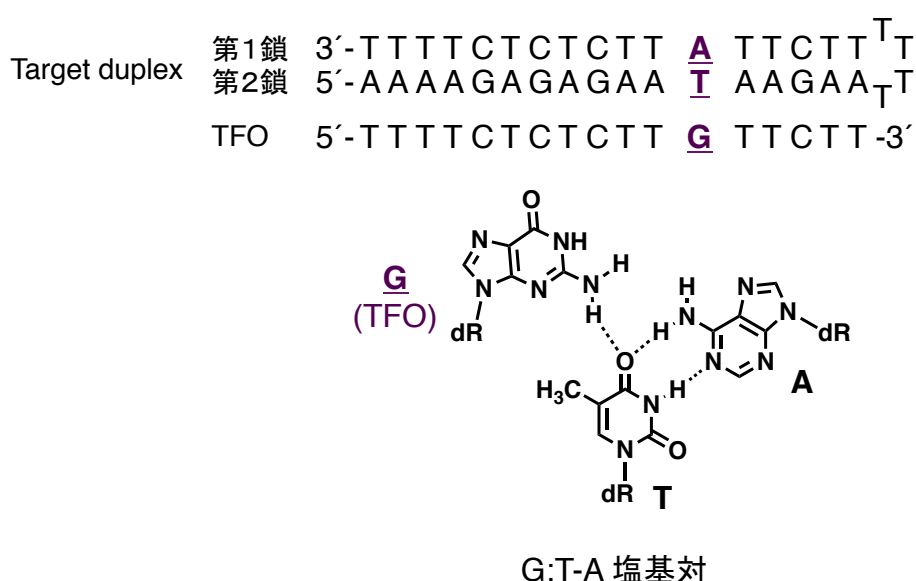


Figure 1-18. G:T-A 塩基対の構造^{1-7b,c}

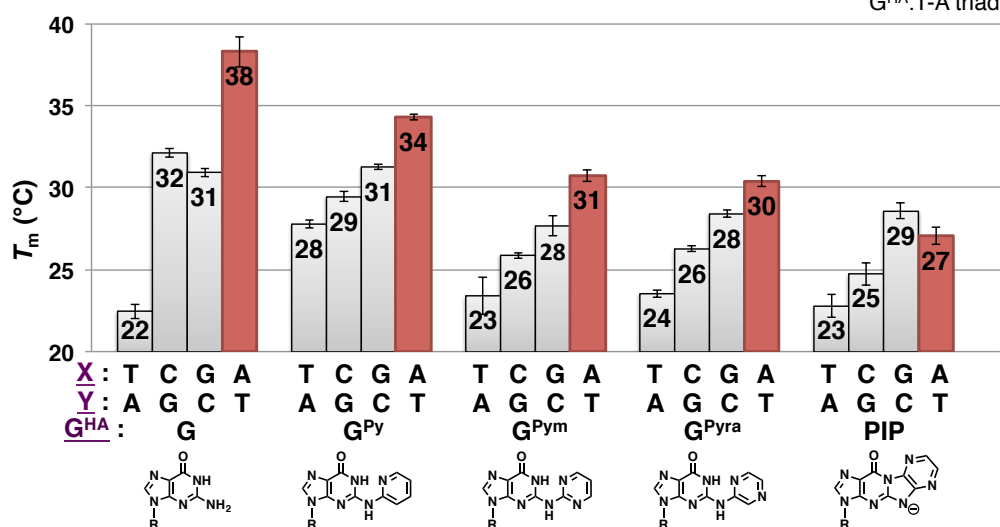
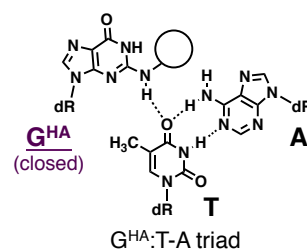
G^{HA} を含む TFO が平行型三重鎖を形成する際の、標的塩基対への結合能および T-A 塩基対への結合選択性を、 T_m 測定により評価した(pH 7.0)。測定には、**ODN1-0~4** の他に標的塩基対が A-T、G-C、C-G および T-A になる二重鎖 DNA として **HP 1-1**、**1-2**、**1-3** および **1-4** を購入して用いた。その配列¹⁻¹⁸を Figure 1-19 に示す。

HP1-1, 1-2, 1-3, 1-4 3'-TTTTCTCTCTT X TTCTTT^T
 (Y = A, G, C, T) 5'-AAAAGAGAGAA Y AAGAA_T
 ODN1-0~4 5'-TTTTCTCTCTT G^{HA} TTCTTT-3'

entry	sequence
HP 1-1	3'-TTTTCTCTCTT <u>T</u> TTCTTT ^T 5'-AAAAGAGAGAA <u>A</u> AAGAA _T
HP 1-2	3'-TTTTCTCTCTT <u>C</u> TTCTTT ^T 5'-AAAAGAGAGAA <u>G</u> AAGAA _T
HP 1-3	3'-TTTTCTCTCTT <u>G</u> TTCTTT ^T 5'-AAAAGAGAGAA <u>C</u> AAGAA _T
HP 1-4	3'-TTTTCTCTCTT <u>A</u> TTCTTT ^T 5'-AAAAGAGAGAA <u>T</u> AAGAA _T

Figure 1-19 三重鎖融解温度(T_m)測定に用いたオリゴデオキシヌクレオチドの配列。

HP1-1, 1-2, 1-3, 1-4 3'-TTTTCTCTCTT X TTCTTT^T
 (Y = A, G, C, T) 5'-AAAAGAGAGAA Y AAGAA_T
 ODN1-0~1-4 5'-TTTTCTCTCTT G^{HA} TTCTTT-3'



10 mM cacodylate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ 0.5 mM spermine and 1.5 μ M each oligonucleotide.

Figure 1-20. G^{HA}sを含む三重鎖のpH 7.0における T_m 値(°C)。

Figure 1-20 に T_m 測定の結果を示す。 G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyr} および PIP の標的塩基対が T-A のとき ($Y = T$, **ODN1-1~1-4/HP1-4**)、三重鎖の T_m 値はそれぞれ 34 °C、31 °C、30 °C および 27 °C であった。これらの T_m 値は未修飾の G の標的塩基対が T-A 塩基対のとき ($Y = T$, **ODN0/HP1-4**) の T_m 値である 38 °C よりも低いことから、 G^{HA} の T-A 塩基対への結合能は未修飾の G と比べて低いことが分かった。PIP を含む TFO を用いたとき (**ODN1-4/HP1-4**) が最も低い T_m 値を示した理由として、第 4 節で述べたように 5 位の N-H 結合の pK_a が 5.0 であり、PIP と標的の T との間で水素結合が最も形成されにくいためであると考えられる (Figure 1-21)。

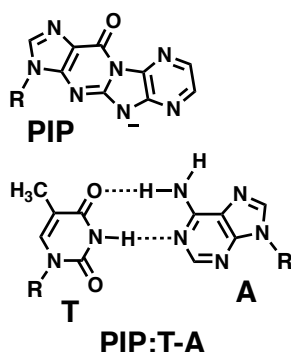


Figure 1-21. pH 7.0での、予測されるPIPとT-A塩基対の相互作用

つぎに、 G^{Py} 、 G^{Pym} 、 G^{Pyr} および PIP の標的が A-T、G-C および C-G 塩基対のときの T_m 値を測定した。 G^{Py} の標的が A-T、G-C および C-G 塩基対のとき (**ODN1-1/HP 1-1, 1-2, 1-3**) の T_m 値はそれぞれ 28 °C、29 °C、31 °C であり、標的が T-A 塩基対のとき (**ODN1-1/HP 1-4**, $T_m = 34$ °C) よりも低い値を示した。 G^{Pym} の標的が A-T、G-C および C-G 塩基対のとき (**ODN1-2/HP 1-1, 1-2, 1-3**) の T_m 値はそれぞれ 23 °C、26 °C、28 °C であり、標的が T-A 塩基対のとき (**ODN1-2/HP 1-4**, $T_m = 31$ °C) よりも低い値を示した。 G^{Pyr} の標的が A-T、G-C および C-G 塩基対のとき (**ODN1-3/HP 1-1, 1-2, 1-3**) の T_m 値はそれぞれ 24 °C、26 °C、28 °C であり、標的が T-A 塩基対のとき (**ODN1-3/HP 1-4**, $T_m = 30$ °C) よりも低い値を示した。以上のように、 G^{Py} 、 G^{Pym} および G^{Pyr} は T-A 塩基対をもっとも強く認識することがわかった。これらとは異なり、PIP の標的が A-T、G-C および C-G 塩基対のとき (**ODN1-4/HP 1-1, 1-2, 1-3**) の T_m 値はそれぞれ 23 °C、25 °C、29 °C であり、標的が T-A 塩基対のとき (**ODN1-4/HP 1-4**, $T_m = 27$ °C) よりも標的が C のときの方が高い値を示した。一方、未修飾の G 標的が A-T、G-C および C-G 塩基対のとき (**ODN0/HP 1-1, 1-2, 1-3**) の T_m 値はそれぞれ 22 °C、32 °C、31 °C であった。ここで、各 G^{HA} の T-A 塩基選択性の指標として、 ΔT_m を (標的が T-A 塩基対のときの T_m 値) - (標的が A-T、G-C、C-G 塩基対のときの T_m 値の中で最も高い値) と定義する。すなわち、 ΔT_m 値が大きいくほど、各 G^{HA} の T-A 塩基選択性が高いと言える。未修飾の G について、 $\Delta T_m = 38 - 32 = 6$ °C である。これに対して、 G^{Py} の場合は $\Delta T_m = 34 - 31 = 3$ °C、 G^{Pym} 場合は $\Delta T_m = 31 - 28 = 3$ °C、 G^{Pyr} の場合は

$\Delta T_m = 30 - 28 = 2^\circ\text{C}$ 、PIP の場合は $\Delta T_m = 27 - 29 = -2^\circ\text{C}$ であり、いずれの場合も T-A 塩基選択性は未修飾の G に劣ることが分かった。

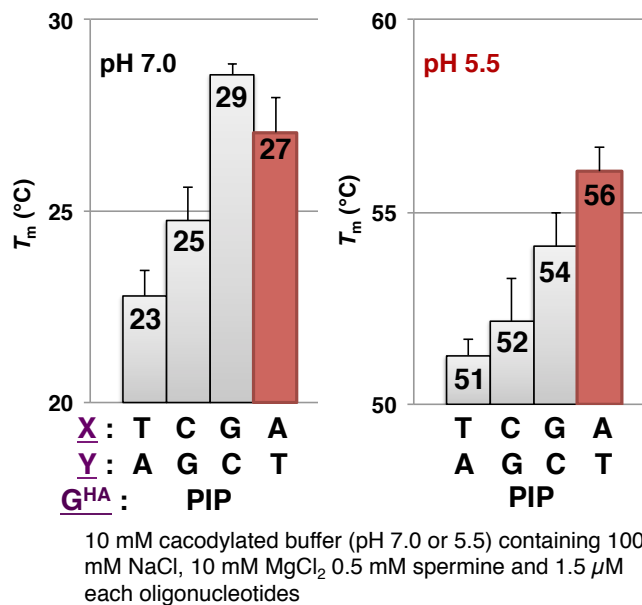
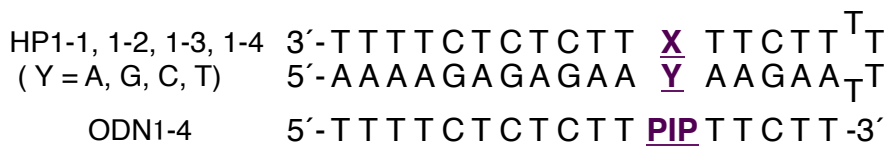


Figure 1-22. (右)G^{HA}sを含む三重鎖のpH 5.5での T_m 値(°C)。比較のため、pH 7.0のときの T_m 値(°C)も示した(左)。

最後に、PIP 5 位の N-H 結合が保持されたときの結合選択性を確認するために、pH 5.5 での三重鎖安定性を同じ配列を用いて T_m 測定により評価した(Figure 1-22 右)。PIP の標的が A-T、G-C、C-G および T-A 塩基対のとき(ODN1-4/HP 1-1, 1-2, 1-3, 1-4)の T_m 値はそれぞれ 51 °C、52 °C、54 °C および 56 °C であった。この結果から、pH 5.5 の条件では 5 位の N-H 結合のプロトン脱離が抑制され、チミンと水素結合をし得るために、相対的に T-A 塩基対に対する結合能が高くなったことが予想される(Figure 1-23)。

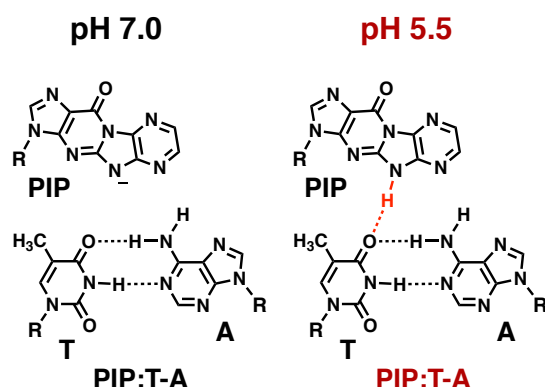


Figure 1-23. pH 7.0および5.5での、予測されるPIPとT-A塩基対の相互作用

しかしながら、pH 5.5 で未修飾の G の標的が T-A 塩基対のとき(ODN1-0/HP 1-4)の T_m 値は約 60 °C 以上であり、未修飾の G の方が PIP よりも標的中の T-A 塩基対に対する結合能が高いことが分かった。このことから、5 位 N-H 結合が維持された場合でも、PIP の T-A 塩基対への結合能は G よりも低い可能性が示唆された。これよりもさらに酸性の強い条件では PIP の T-A 塩基対への結合が相対的に強くなる可能性はあるが、その場合 TFO と標的二重鎖の解離温度が標的二重鎖自体の解離温度に近くなり、それぞれを単独で解析できなくなることが予測されたので、今回は 5.5 よりも小さな pH 条件下での測定は行わなかった。

以上の結果から、二重鎖 DNA の標的配列の T-A 塩基対に対する結合能および選択性は、今回合成したどの G^{HA} よりも未修飾の G の方が高いことが分かった。これは、G に付加したヘテロアリアル基が標的と相互作用せず、立体障害として働いているためと考えられる (Figure 1-24)。

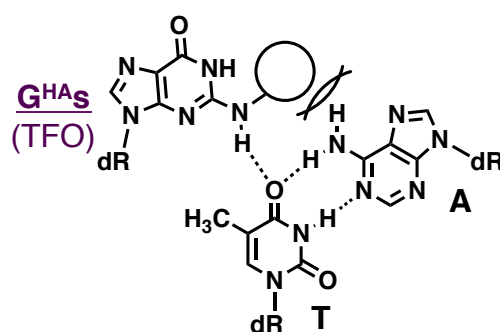


Figure 1-24 G に付加したヘテロアリアル基による立体障害

第 7 節

G^{HA}を有するオリゴデオキシヌクレオチドのグアニン四重鎖形成における性質

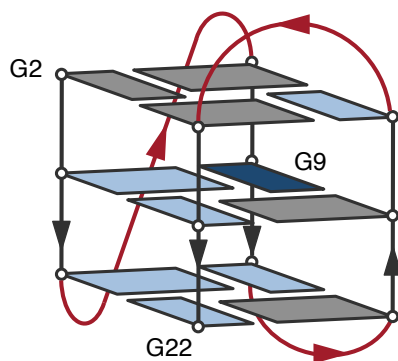
本節では、ヒトテロメア配列における G^{HA}s のグアニン四重鎖形成への影響について、**ODN1-5~1-8**(Figure 1-25)を用いて G-カルテット構造に特徴的な 295 nm における融解温度(T_m)測定、CD スペクトル測定、ゲル電気泳動により評価した。

entry	sequence
ODN1-5	5'-AGGGTTAG G^{Py} GTTAGGGTTAGGG -3'
ODN1-6	5'-AGGGTTAG G^{Pym} GTTAGGGTTAGGG -3'
ODN1-7	5'-AGGGTTAG G^{Pyra} GTTAGGGTTAGGG -3'
ODN1-8	5'-AGGGTTAG PIP GTTAGGGTTAGGG -3'
ODN1-G4	5'-AGGGTTAG G GTTAGGGTTAGGG -3'

Figure 1-25 グアニン四重鎖の解析に用いたオリゴデオキシヌクレオチドの配列。

これらの配列は、K⁺イオン存在下で(3 + 1) hybrid 型のグアニン四重鎖をとることが知られている **ODN1-G4**¹⁻¹⁹ の下線部のグアニンを各種 G^{HA} に置き換えたものである。**ODN1-G4** が形成するグアニン四重鎖を Figure 1-25 に示す。図中に水色および藍色で示される塩基は B 型二重鎖 DNA と同様に糖部 5 員環と塩基部が逆向きになる anti-コンホメーションを、灰色の塩基は糖部 5 員環と塩基部が同じ向きになる syn-コンホメーションをとる (Figure 1-26)。藍色の塩基は、今回 G^{HA}s が導入される配列中の位置を表す。また、G^{HA} が G カルテット構造を形成する場合には、Figure 1-27 のように open-type コンホメーションをとる必要があることを予め述べておく。

a



(3 + 1) hybrid I

b

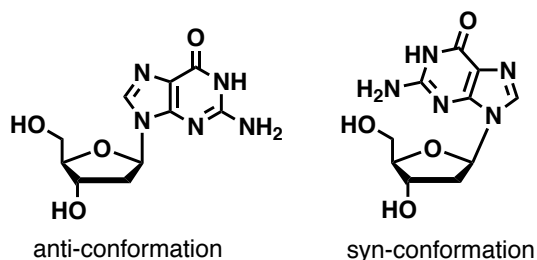


Figure 1-26 a)本節で用いた配列が形成する(3 + 1) hybrid 型グアニン四重鎖の構造。b)ヌクレオシドのコンホメーション。

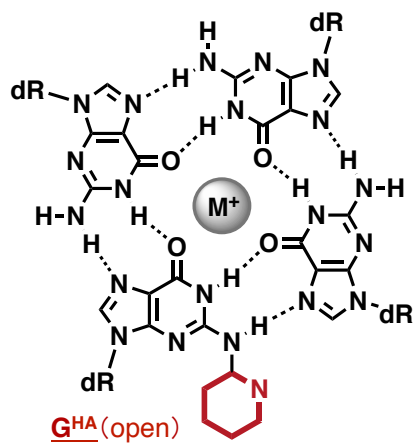
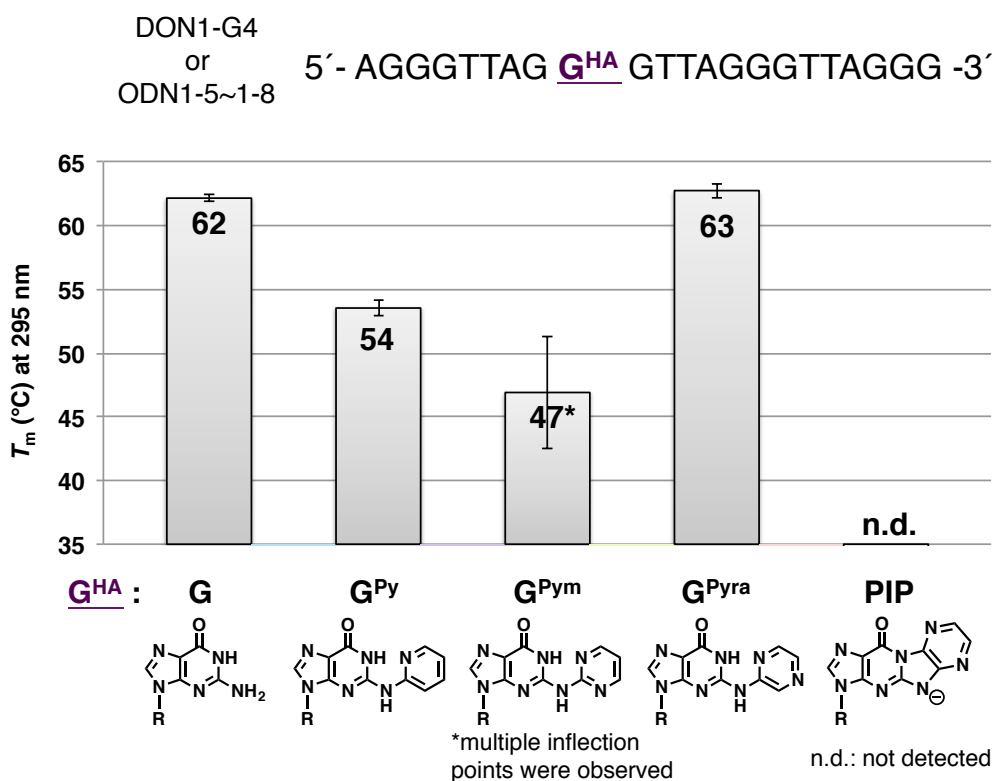


Figure 1-27 予想される、 G^{HA} を含む G カルテット構造。中央の M^+ は、カリウムイオンなどのカチオンを表す。

T_m 測定の結果を示す Figure 1-28 に示す。測定波長は、G-カルテット形成に特徴的な 295 nm を用いた。未修飾の G のみから成る **ODN1-G4** の T_m 値は 62 °C を示し、この値は過去の報告と一致した。¹⁻²⁰ 続いて、配列中に 1 箇所 G^{Py} 、 G^{Pym} および G^{Pyra} を含む **ODN1-5**, **1-6** および **1-7** は 54 °C、47 °C および 63 °C に T_m 値を示したことから、これらのオリゴデオキシヌクレオチドは何らかのグアニン四重鎖構造もしくはそれに類似する高次構造を形成したことが示唆され、その安定性は $G^{Pyra} \approx G > G^{Py} > G^{Pym}$ であった。ここで、第 5 節で測定した G、 G^{Py} 、 G^{Pym} および G^{Pyra} を含む二重鎖の T_m 値が 58 °C、55 °C、53 °C、58 °C であったことから、両者を比較すると共に $G^{Pyra} \approx G > G^{Py} > G^{Pym}$ であることが分かる。このことから、今回用いた **ODN1-5**, **1-6** および **1-7** の高次構造は二重鎖の場合と同様に G^{HA} が open-type コンホメーションをとることで形成されていることが示唆された。また、コンホメーションを closed-type に固定化した PIP を配列中に含む **ODN1-8** は 295 nm において大きな UV 吸収の変化を示さず、このことから open-type での塩基対形成の重要性が示唆された。



40 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 30 mM KCl, 8 mM $MgCl_2$ 2 mM spermidine and 2 μ M oligonucleotide.

Figure 1-28 **ODN1-G4** (G) および **ODN1-5** (G^{Py})、**ODN1-6** (G^{Pym})、**ODN1-7** (G^{Pyra})、**ODN1-8** (PIP) の T_m 値(°C)

第 8 節

総括

本章では、4 種の G^{HA} について、塩基部の closed-type および open-type コンホメーションの安定性および C と塩基対を形成する際の水素結合エネルギーを DFT 計算から予測し、修飾基の窒素原子の位置の違いで open-type コンホメーションの安定性が大きく異なることを見出した。また、相手塩基が C のときの二重鎖、および四重鎖の T_m 値から、これらの構造の安定性に open-type コンホメーションの安定性が大きく関わっていることが示唆された。生体内のゲノム DNA には二重鎖構造とともに四重鎖構造¹⁻²¹ も存在することから、G^{HA} がこれらの高次構造に関わる転写・複製産物の構造や反応速度にどのような影響を与えるかについて、本研究の知見をもとにさらなる研究が望まれる。

第 1 章の引用文献

- 1-1 (a) Eritja, R.; Díaz, A. R.; Saison-behmoaras, E. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1417–1423. (b) Lech, C. J.; Tu, A. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 6265–6274.
- 1-2 (a) Sasami, T.; Odawara, Y.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5325–5329. (b) Sasami, T.; Odawara, Y.; Ohkubo, A.; Sekine M.; Seio, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1398–1403. (c) Park, T.; Zimmerman, S. C.; Nakashima, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6520–6521. (d) Park, T.; Todd, E. M.; Nakashima, S.; Zimmerman, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18133–18142.
- 1-3 Nakatani, K.; Dohno, C.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6802–6803.
- 1-4 (a) Stover, J. S.; Rizzo, C. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1972–1979. (b) Attaluri, S.; Bonala, R. R.; Yang, I.-Y.; Lukin, M. A.; Wen, Y.; Grollman, A. P.; Moriya, M.; Iden C. R.; Johnson, F. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 339–352.
- 1-5 (a) Cheng, S. C.; Hilton, B. D.; Roman J. M.; Dipple, A. *Chem. Res. Toxicol.* **1989**, *2*, 334–340. (b) Panigrahi, G. B. Walker, I. G. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2122–2126. (c) Turesky, R. J.; Rossi, S. C.; Welti, D. H.; Lay J.; Kadlubar, F. F. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 479–490. (d) Turesky, R. J.; Markovic J.; Aeschlimann, J. M. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 397–402. (e) Eoff, R. L.; Stafford, J. B.; Szekely, J.; Rizzo, C. J.; Egli, M.; Guengerich, F. P.; Marnett, L. J. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7079–7088. (f) Linhart, I.; Mikes, P.; Frantík, E.; Mráz, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 383–391. (g) Yun, B. H.; Rosenquist, T. A.; Sidorenko, V.; Iden, C. R.; Chen, C. H.; Pu, Y. S.; Bonala, R.; Johnson, F.; Dickman, K. G.; Grollman A. P.; Turesky, R. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1119–1131. (h) Ghodke, P. P.; Gore, K. R.; Harikrishna, S.; Samanta, B.; Kottur, J.;

- Nair D. T.; Pradeepkumar, P. I. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 502–511.
- 1-6 (a) Thuong, N. T.; Hélèn, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 666–690. (b) Buchini, S.; Leumann, C. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 717–726. (c) Mukherjee, A.; Vasquez, K. M. *Biochimie* **2011**, *93*, 1197–1208.
- 1-7 (a) Griffin, C. L.; Dervan, P. B. *Science* **1989**, *245*, 967–971. (b) Radhakrishnan, I.; Patel, D. J. *Structure* **1994**, *2*, 17–32. (c) Wang, E.; Malek S.; Feigon, J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4838–4846.
- 1-8 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A. Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N. Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09 (Revision E.01), Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2013.
- 1-9 Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6615–6620.
- 1-10 (a) Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6338–6361. (b) Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 27–50.
- 1-11 伊藤優 平成 27 年度博士論文「塩基部を窒素含有芳香環で修飾した新規三重鎖形成核酸の開発」東京工業大学
- 1-12 De Riccardis, F.; Johnson, F. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 293–295.
- 1-13 (a) Zim, D.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2413–2415. (b) So, C. M.; Zhou, Z.; Lau, C. P.; Kwong, F. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6402–6406.
- 1-14 Reijenga, J.; Van Hoof, A.; Van Loon, A.; Teunissen, B. *Anal. Chem. Insights* **2013**, *8*, 53–71. (b) Holmes, W. C.; Snyder, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, *47*, 2232–2236.
- 1-15 Loakes, D.; Brown, D. M. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4039–4043.
- 1-16 Matray, T. J.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6191–6192.
- 1-17 Gallego J.; Loakes, D. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2904–2912.
- 1-18 Guianvarc’h, D.; Benhida, R.; Fourrey, J.-L.; Maurisse, R.; Sun, J.-S. *Chem. Commun.* **2001**, 1814–1815.
- 1-19 Luu, K. N.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Lacroix, L.; Patel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*,

9963–9970.

1-20 Tateishi-Karimata, H.; Isono, N.; Sugimoto, N. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90580.

1-21 (a) Lam, E. Y. N.; Beraldi, D.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1796–1798. (b) Endoh, T.; Kawasaki, Y.; Sugimoto, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5522–5526.

第 2 章

α -デオキシリボヌクレオシドを含むオリゴデオキシヌクレオチドの
三重鎖形成能と塩基識別能

第1節 序

第1章でも述べたように、DNA 三重鎖は、二重鎖 DNA に対して1本鎖 DNA である三重鎖形成核酸(triplex-forming oligonucleotide、TFO)が結合することで形成される。この三重鎖形成は、標的特異的な遺伝子制御や変異、相同組み替えなどへの応用が期待されている。¹⁻⁶ 三重鎖を形成する際、TFO と標的鎖の配向によって三重鎖はパラレル型とアンチパラレル型に分類される。

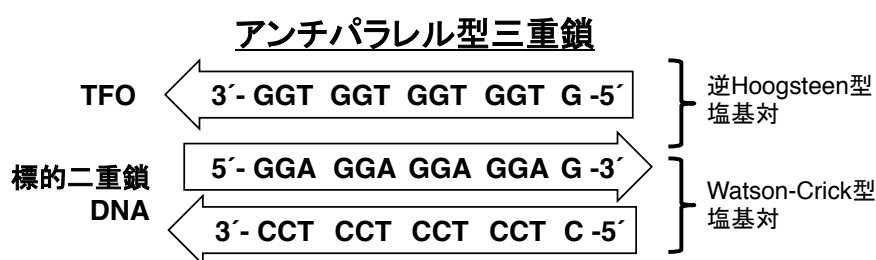


Figure 2-1 アンチパラレル型三重鎖における、各鎖の配向。

Figure 2-1 に示したのは標的鎖と TFO の3'および5'の配向が逆向きになっているアンチパラレル型三重鎖である。三重鎖形成時には、標的鎖の G に対して TFO の G が、二重鎖 DNA の標的鎖の A に対して TFO の A または T が水素結合することで G:G-C、A:A-T および T:A-T 三塩基対を形成し、標的配列を認識する(Figure 2-2)。ここで、三重鎖核酸の塩基対は、reverse-Hoogsteen 相互作用をする TFO 鎖と第二鎖(標的鎖)の間にコロロン (:)、Watson-Crick 相互作用をする第二鎖と第一鎖(標的鎖の相補鎖)の間にハイフン (-) を挿入して表すこととする。

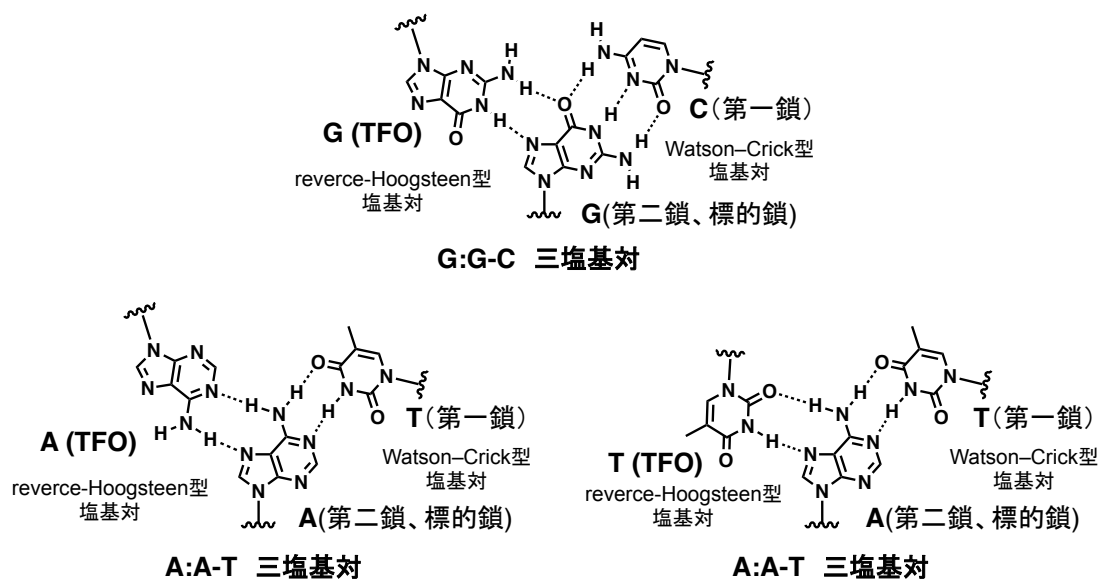


Figure 2-2 アンチパラレル型三重鎖中での TFO と DNA 二重鎖の相互作用様式。

このアンチパラレル型三重鎖は、パラレル型三重鎖とは異なり、TFO の塩基部のプロトン化(Figure 1-4)が必要ないため、中性条件下でも三重鎖形成が可能であるという利点がある。そのため、生体内への応用に関しては、パラレル型よりもアンチパラレル型の方が広く用いられてきた。例えば三重鎖形成による転写抑制について数多く報告されている。²¹ またアンチパラレル型三重鎖は転写抑制に限らず、部位特異的な変異導入や相同組み替えにも使用することができる。例えば Glazer らは三重鎖形成核酸をマウスに全身投与し、体細胞中での変異の導入について報告をしている。²² このことは、外因性のタンパク質が必要な CRISPR-Cas9 や TALEN などのゲノム編集とは異なり、TFO と内在性のタンパク質のみを使用したゲノム編集が可能であることを強く示唆している。しかし、アンチパラレル型三重鎖にも課題が数多く存在し、汎用されているとは言い難いのが現状である。

アンチパラレル型三重鎖の課題としてまず挙げられるのが標的配列の制限である。アンチパラレル型三重鎖を形成する標的配列は、パラレル型三重鎖と同様、ポリプリン配列である必要がある。これは、ポリプリン配列中のプリン塩基の 7 位の窒素原子や 6 位の官能基が、TFO の核酸塩基と reverse-Hoogsteen 相互作用することで三重鎖形成していることに起因している。すなわち、プリン塩基である G および A は 7 位の窒素原子や 6 位の官能基がある Hoogsteen 側に水素結合可能な箇所が二箇所ある(Figure 2-2)のに対して、ピリミジン塩基である C および T には一箇所しかなく、また T の 5 位メチル基は立体障害として働くため、²³ 水素結合による TFO との強い相互作用が期待できない(Figure 2-3)。²⁴

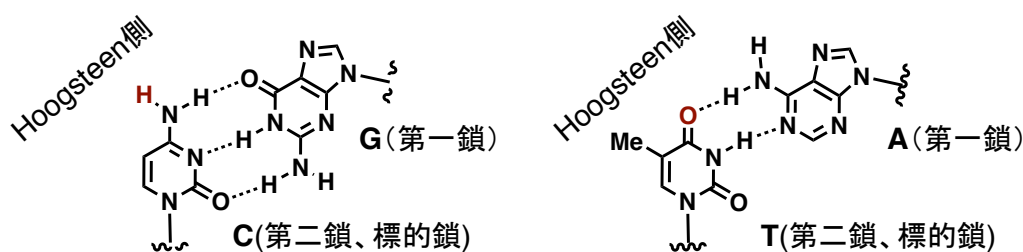


Figure 2-3 C および T の Hoogsteen 面と、利用可能な水素結合サイト（赤字）。

加えて、安定なアンチパラレル型三重鎖形成にはポリプリン配列中にグアニンが多く含まれている必要がある。Figure 2-2 に示すように、DNA 二重鎖のグアニンと対を形成する TFO 中の塩基はグアニンであるため、TFO もグアニンが数多く含まれた分子になる。しかし、グアニンを多く含む核酸は、グアニン四重鎖構造をはじめとする自己凝集体をとりやすく、取り扱いに難がある。²⁵ そのため、アンチパラレル型三重鎖を形成可能な新たな塩基対様式の探索に対する期待は大きい。

本研究では新たな結合様式の探索として、 α -デオキシヌクレオシド(以後 α -ヌクレオシドと呼ぶ)に着目した。 α -ヌクレオシドは、天然型である β -デオキシヌクレオシド(以後 β -ヌ

クレオシドと呼ぶ)と比較してグリコシド位の不斉が異なる立体異性体である(Figure 2-4a)。この α -ヌクレオシドを β -ヌクレオシドからなる TFO に導入すると、 α -ヌクレオシドは標的三重鎖 DNA の第二鎖だけでなく第一鎖にも接近するため、利用可能な水素結合サイトが増加し、 β -ヌクレオシドとは異なる三塩基対形成をする可能性がある(Figure 2-4b)。²⁻⁶

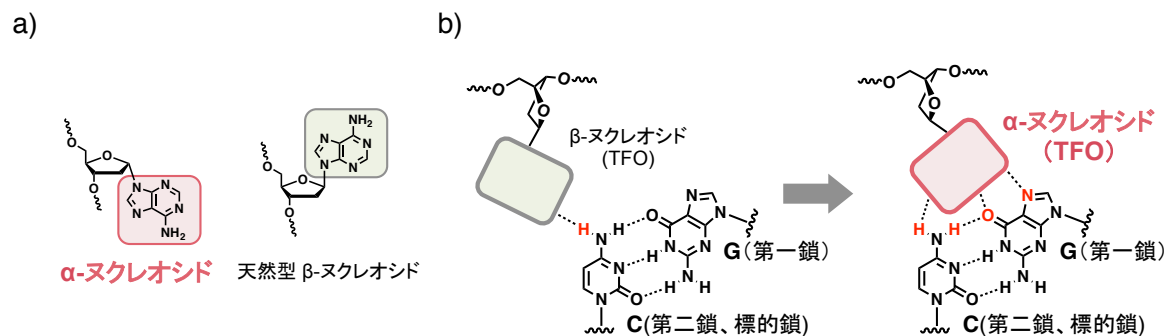


Figure 2-4 a) α -ヌクレオシドと β -ヌクレオシドの構造例。b) アンチパラレル型三重鎖中での α -ヌクレオシドの塩基部の位置の違いの模式図。

塩基部が天然型の α ヌクレオシドを含むアンチパラレル型 TFO について、Timofeev らは、 α C:T-A、 α T:T-A および α G:C-G 三塩基対を含むアンチパラレル型三重鎖の形成を報告している。²⁻⁷ これらの報告から α ヌクレオシドは新たなアンチパラレル型三重鎖を形成する TFO のユニットとして有望であると考えられる。しかしながら、これらとは異なる三塩基対を含む三重鎖の安定性や、 α ヌクレオシドの標的塩基対選択性について網羅的に調べられたことはなく、また、三塩基対中での各塩基同士の水素結合様式は知見が得られていない。

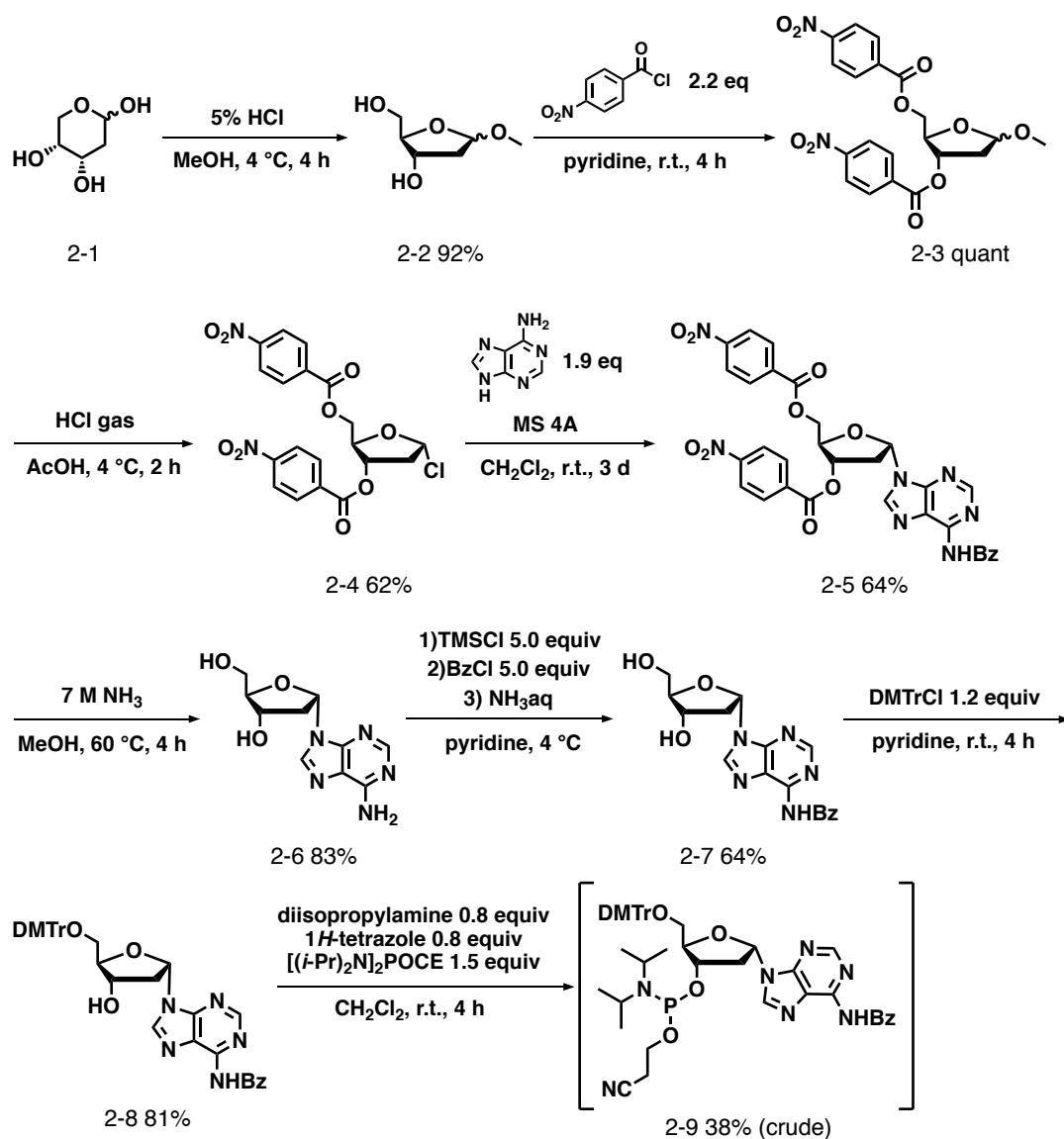
本章では、A, G, C, T それぞれの α -ヌクレオシドを含むアンチパラレル型三重鎖の安定性および標的塩基対選択性について系統的に解析した。すなわち、各 α -ヌクレオシドがどの標的塩基対 (A-T、T-A、C-G、G-C) と塩基対形成をしやすいかを明らかにし、また各塩基対にどの α -ヌクレオシドが最も安定に結合するかも明らかにした。後者で得られた三塩基対の組み合わせ対しては、分子動力学計算を用いて結合様式について検討した。その詳細について述べる。

第 2 節

A、G、C、T の α -デオキシヌクレオシドを含むアンチパラレル型三重鎖形成核酸の合成

はじめに、 α -デオキシアデノシン(α A)、 α -デオキシグアノシン(α G)、 α -デオキシシチジン(α C)および α -デオキシチミジン(α T)を TFO に導入するため、 α A、 α C および α T のホスホロ

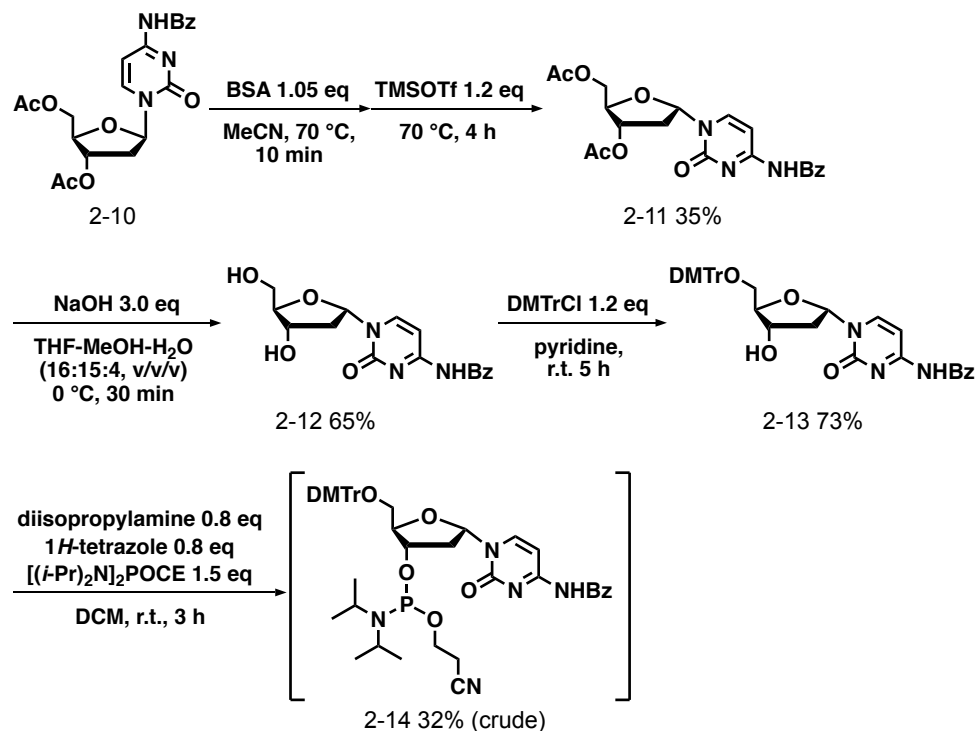
アミダイトユニットの合成を行った。



Scheme 2-1 αA ホスホロアミダイトユニットの合成

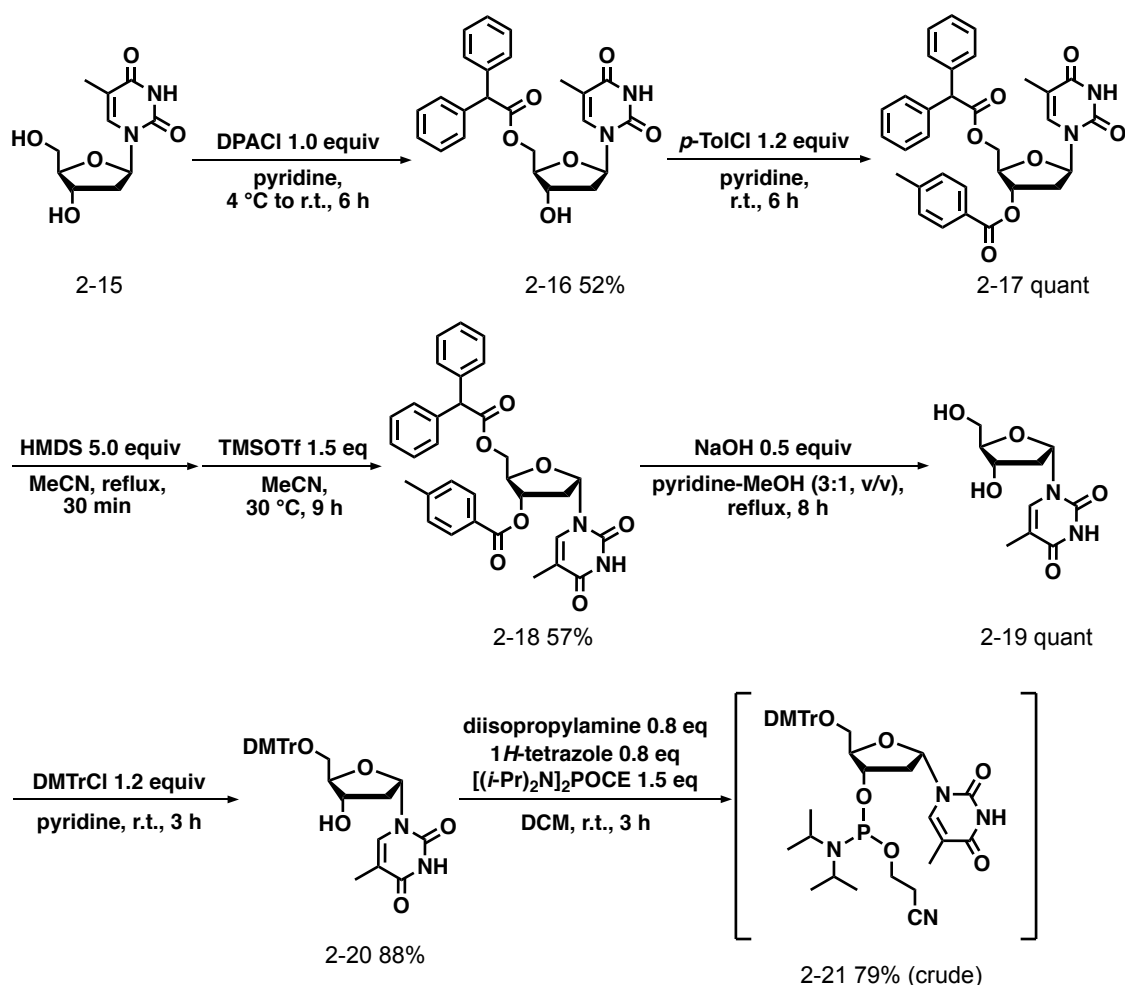
αA ホスホロアミダイトユニットの合成法を Scheme 2-1 に示す。前駆体 **2-8** までは、過去の報告に従って合成を行った。すなわち、Ness らの手法²⁻⁸に従ってデオキリリボース(**2-1**)を塩酸メタノール溶液中でメチルアセタール化し(**2-2**, 92%)、続いて3位および5位水酸基を *p*-ニトロベンゾイル基で保護(**2-3**, quant)、その後氷酢酸中で HCl ガスをバブリングすることによって、塩化糖 **2-4** を収率 62%で得た。次に、Morvan らの手法²⁻⁹に従って、*N*⁶-ベンゾイルアデニン (**2-5**)^{ref} をジクロロメタン中でモレキュラーシーブとともに攪拌することで、αA の誘導体 **2-5** を収率 64%で得た。続いて、Yamaguchi らの手法²⁻¹⁰に従って3',5'位水酸基および6位アミノ基の脱保護を行い、αA ヌクレオシド **2-6** を収率 83%で得た。さらに、Morvan らの手法²⁻¹¹に従って塩基部6位アミノ基のみをベンゾイル基で保護し(**2-7**, 64%)、Morvan らの

手法²⁻¹²に従って 5' 位に DMTr 基を導入することで前駆体 **2-8** を収率 81% で得た。最後に、定法に従い 3' 位水酸基をホスフィチル化することで、目的の α A ホスホロアミダイトユニット **2-9** を試薬由来の加水分解体を含む混合物（粗収率 38%）で得た。合成した混合物のホスホロアミダイトユニットを、そのまま DNA 自動合成機による TFO の合成に用いた。



Scheme 2-2 α C ホスホロアミダイトユニットの合成

つぎに、 α C ホスホロアミダイトユニットの合成法を Scheme 2-2 に示す。前駆体 **2-13** までは、過去の報告に従って合成を行った。すなわち、3', 5' 位水酸基をアセチル基で、4 位アミノ基をベンゾイル基で保護したデオキシシチジン誘導体 **2-10** を出発原料に、Morvan らの手法²⁻⁹に従ってグリコシド化反応を行い α C の誘導体 **2-11** を収率 35% で得た後、3', 5' 位水酸基の脱保護を行い化合物 **2-12** を収率 65% で得た。つづいて、Morvan らの手法²⁻¹²に従って 5' 位に DMTr 基を導入することで前駆体 **2-13** を収率 73% で得た。最後に、定法に従い 3' 位水酸基をホスフィチル化することで、目的の α C ホスホロアミダイトユニット **2-14** を試薬由来の加水分解体を含む混合物（粗収率 32%）で得た。化合物 **2-9** の場合と同様、合成した混合物のホスホロアミダイトユニットを、そのまま DNA 自動合成機による TFO の合成に用いた。



Scheme 2-3 α T ホスホロアミダイトユニットの合成

つづいて、 α T ホスホロアミダイトユニットの合成法を Scheme 2-3 に示す。前駆体 **2-20** までは、過去の報告に従って合成を行った。すなわち、Sato らの手法²⁻¹³に従い、デオキシチミジン(**2-15**)の 5'位水酸基にジフェニルアセチル基(**2-16** 52%)、5'位水酸基に *p*-トルオイル基(**2-17**, quant)を導入し、グリコシド化反応によって α T 誘導体へと変換し(**2-18**, 57%)、3', 5'位水酸基の脱保護を行い α T ヌクレオシド **2-19** を定量的に得た。つづいて、Morvan らの手法²⁻¹²に従って 5'位に DMTr 基を導入することで前駆体 **2-20** を収率 88%で得た。最後に、定法に従い 3'位水酸基をホスフィチル化することで、目的の α C ホスホロアミダイトユニット **2-21** を試薬由来試薬由来の加水分解体を含む混合物（粗収率 79%）で得た。化合物 **2-9** および **2-14** の場合と同様、合成した混合物のホスホロアミダイトユニットを、そのまま DNA 自動合成基による TFO の合成に用いた。

α G のホスホロアミダイトアミダイトユニットは ChemGenes 社から購入したものを用いた。得られたアミダイトユニットを用いて、DNA 自動合成基による鎖伸長反応を行った。 α -ヌクレオシドのカップリング時間を 300 秒とし、それ以外は通常の DNA 合成法に従って行った。

28%アンモニア水を用いて脱保護、切り出しを行い、アンモニアを遠心エバポレーターによって除いた後、逆相カートリッジにより精製を行った。その後、陰イオン交換 HPLC を用いてさらに精製を行った。精製後に陰イオン交換 HPLC によってオリゴマーを分析し、MALDI-TOF-MS を用いて精製したサンプルの分子量を確認した。その結果を Figure 2-4 に示す。

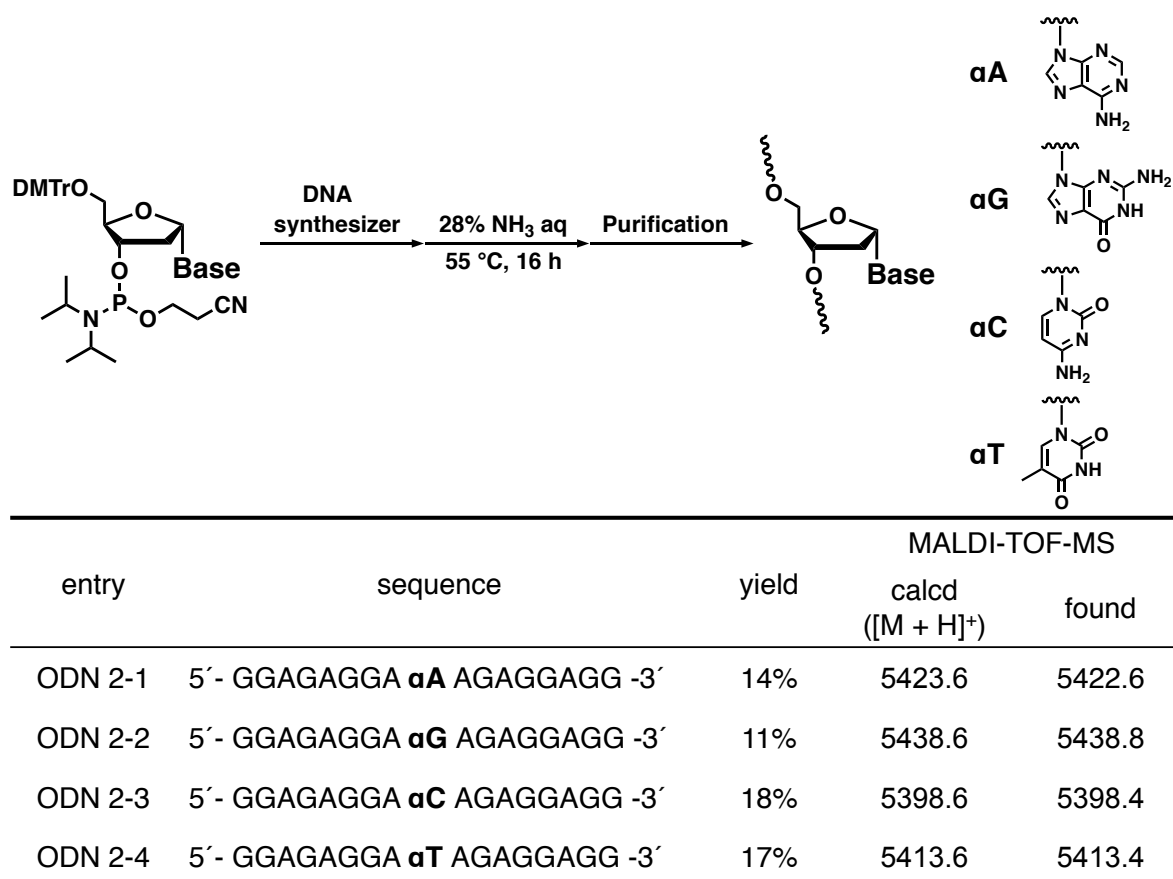


Figure 2-5 α -ヌクレオシドを含む TFO の合成手法と配列、質量分析の結果および収率。

質量分析により観測された分子量は、目的物の計算値と一致していたことから、精製したサンプルは目的のオリゴヌクレオチドであると同定した。ここで、 α ヌクレオシドのオリゴ中のモル吸光度係数は β ヌクレオシドと同じであると仮定し、UV 吸収より単離収率を算出したところ、11~18%の収率であった。

第 3 節

ゲル電気泳動によるアンチパラレル型三重鎖形成核酸の選択性

本節では、合成した α ヌクレオシドを含む TFO の三重鎖形成能および"塩基対"選択性について述べる。検討結果に先立ち、本章での三重鎖中の三塩基対の表記について再度述べる。

三重鎖核酸の塩基対は、reverse-Hoogsteen 相互作用をする TFO 鎖と第二鎖(標的鎖)の間にコロン (:), Watson-Crick 相互作用をする第二鎖と第一鎖(標的鎖の相補鎖)の間にハイフン (-) を挿入する。例えば、G:G-C 三塩基対は、最初の G が TFO 中のグアニン塩基を意味し、中央の G は第二鎖に含まれるグアニン塩基、最後の C は第二鎖と Watson-Crick 相互作用しているシトシン塩基に対応する (Figure 2-6, Figure 2-2 の一部に同じ)。ここで、本章で着目している α ヌクレオシドの塩基は通常のヌクレオシドの塩基と構造上の違いはない。そこで塩基対中の α ヌクレオシドの塩基を明確にするために、 α ヌクレオシドの核酸塩基の接頭語として α をつける。すなわち、塩基対表記中で α T と記載されている場合、 α -チミジンのチミン塩基を指す。

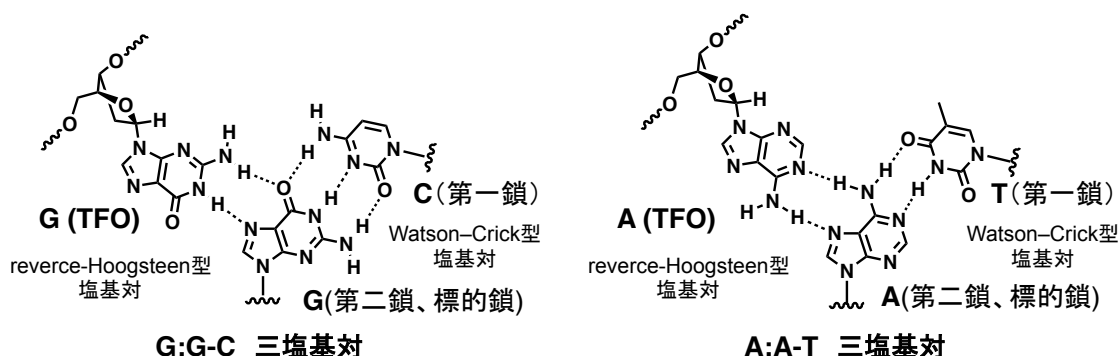


Figure 2-6 アンチパラレル型三重鎖中での TFO と DNA 二重鎖の相互作用様式。

α ヌクレオシドを含む TFO の三重鎖形成能および塩基対選択性はゲルシフトアッセイにより評価した。三重鎖は、蛍光基 (FAM) 付きのヘアピン型二重鎖 (HP) 100nM に対し、2 種類の異なる濃度 (100 nM および 1000 nM) の TFO を作用させることで形成させた。ここで使用した合成 TFO の配列およびヘアピン型二重鎖 (HP) の塩基配列を Figure 2-7a に示す。なお、蛍光基(FAM)付きの標的二重鎖 DNA (HP2-1, 2-2, 2-3, 2-4) は IDT 社から購入した。

得られた泳動像の三重鎖および二重鎖のバンド強度を Image J で数値化し、その値の比から、三重鎖の存在比をパーセントで算出し、それぞれの測定条件における三重鎖形成能とした (Figure 2-7b, c)。算出した三重鎖形成能をまとめたものを Table 2-1a (TFO 100 nM)および 2-1b (TFO 1000nM)に示す。

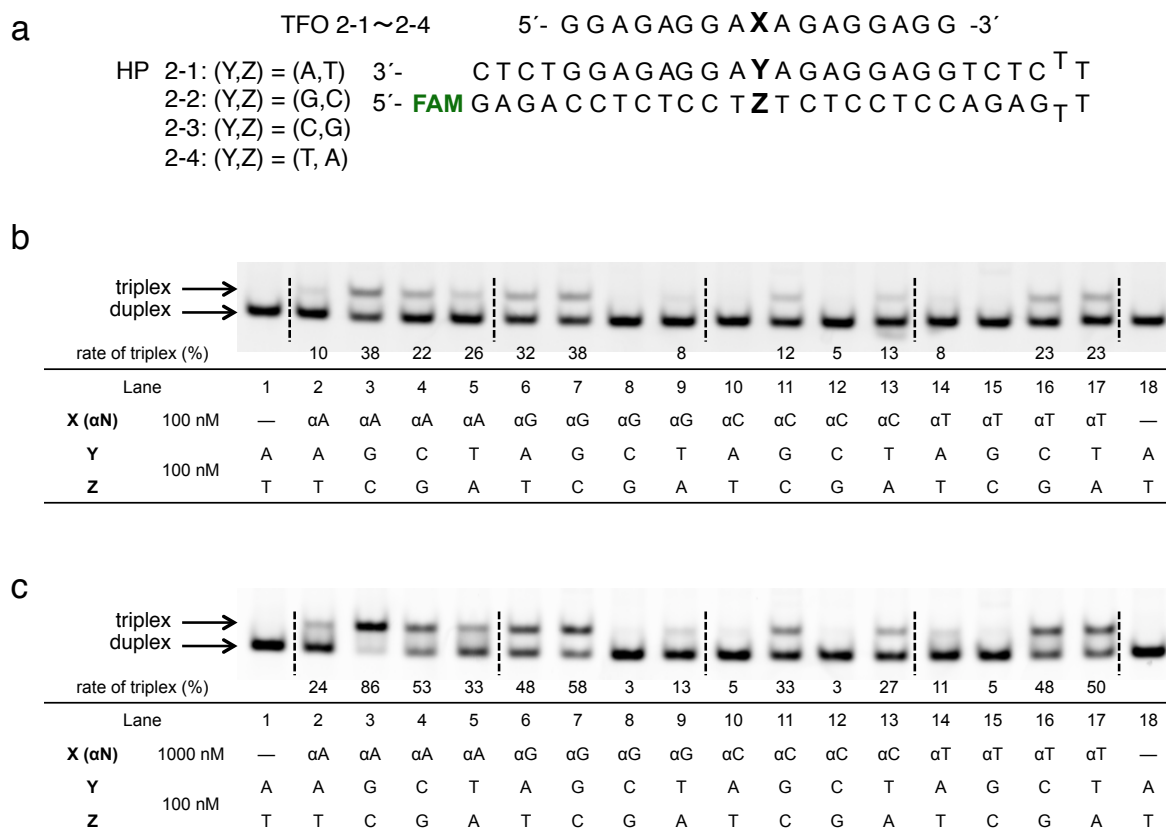


Figure 2-7 ゲルシフトアッセイによる、α-ヌクレオシドを含む TFO の結合能、結合選択性の評価。a)用いた TFO および標的三重鎖 DNA の配列。b) TFO の濃度が 100 nM の場合の結果。c) TFO の濃度が 1000 nM の場合の結果。 b)および c)のいずれも、Lane1 および 18 は TFO を加えていないコントロール。実験回数はそれぞれ 1 回。実験条件は下記の通り。Incubation: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine, 10% sucrose, 4 °C, 90 min. Electrophoresis: 10% Native gel containing 20 mM Tris-borate, 20 mM MgCl₂, 180V, 4 °C, 2 h.

TFO 2-1~2-4		5'- GGAGAGGAXAGAGGAGG -3'			
HP 2-1~2-4		3'- CTCTGGAGAGGAYAGAGGAGGTCTC ^T T 5'- FAM GAGACCTCTCCT ^T ZTCTCCTCCAGAG _T T			
a	rate of triplex (%)	X (TFO, 100 nM)			
		αA	αG	αC	αT
	AT	10	32	n.d.	8
	GC	38	38	12	n.d.
	CG	22	n.d.	5	23
	TA	26	8	13	23
b	rate of triplex (%)	X (TFO, 1000 nM)			
		αA	αG	αC	αT
	AT	24	48	5	11
	GC	86	58	33	5
	CG	53	3	3	48
	TA	33	13	27	50

Table 2-1 α-ヌクレオシドを含む TFO の結合能および結合選択性 (Figure 2-7c より引用)。a)TFO の濃度が 100 nM の場合 b)TFO の濃度が 1000 nM の場合。n.d.: not detected

まず各 α ヌクレオシドの三重鎖結合能および塩基対選択性について述べる。 α A を含む TFO 濃度 100 nM の結果 (Figure2-7b lane 2-5) に着目すると、A-T 塩基対に対する三重鎖結合能を示す α A:A-T は 10%であった。同様に、 α A:G-C、 α A:C-G、および α A:T-A は、それぞれ 38%、22%、26%であった。最も高い三重鎖形成能を示した三塩基対は、 α A:G-C 塩基対であることから、 α A は G-C 塩基対に対する選択性を有していることがわかる。しかし、すべての塩基対と三重鎖を形成していることから、その選択性はあまり高くない。同様に α G での三重鎖形成能 (Figure2-7b lane 6-9)は、 α G:A-T(32%)、 α G:G-C (38%)、 α G:C-G(n.d.)、 α G:T-A(8%)であり、G-C 塩基対に対する選択性を有している。 α C (Figure2-7b lane 10-13)は α C:A-T(n.d.)、 α C:G-C (12%)、 α C:C-G(5%)、 α C:T-A(13%)であり、T-A 塩基対および G-C 塩基対に対する選択性を有している。 α T (Figure2-7b lane 14-17)は α T:A-T(8%)、 α T:G-C (n.d.)、 α T:C-G(23%)、 α T:T-A(23%)であり、C-G 塩基対および T-A 塩基対に対する選択性を有している。それぞれの α ヌクレオシドで三重鎖形成能が高かった三塩基対を比較すると、 α A:G-C (38%) = α G:G-C (38%) > α T:C-G(23%) = α T:T-A(23%) > α C:T-A(13%) $\approx$ α C:G-C (12%)となっている。

同様な傾向は、より三重鎖を形成しやすい TFO 濃度 1000nM の条件でも見られた。すなわち、 α A (Figure2-7c lane 2-5)は α A:A-T(24%)、 α A:G-C (86%)、 α A:C-G(53%)、 α A:T-A(33%)であり G-C 塩基対に対する選択性を有し、 α G (Figure2-7c lane 6-9)は G-C 塩基対に対する選択性 (α G:A-T(48%)、 α G:G-C (58%)、 α G:C-G(3%)、 α G:T-A(13%))、 α C (Figure2-7c lane 10-13)は T-A 塩基対および G-C 塩基対に対する選択性 (α C:A-T(5%)、 α C:G-C (33%)、 α C:C-G(3%)、 α C:T-A(27%))、 α T (Figure2-7c lane 14-17)は C-G 塩基対および T-A 塩基対に対する選択性 (α T:A-T(11%)、 α T:G-C (5%)、 α T:C-G(48%)、 α T:T-A(50%)) を有していることがわかり、この傾向は 100nM の実験と一致している。また、それぞれの α ヌクレオシドで三重鎖形成能が高かった三塩基対を比較すると、 α A:G-C (86%) = α G:G-C (58%) > α T:T-A(50%) $\approx$ α T:C-G(48%) > α C:G-C (33%) > α C:T-A(27%)となっており、TFO 濃度 100nM の実験結果と同様な傾向であった。

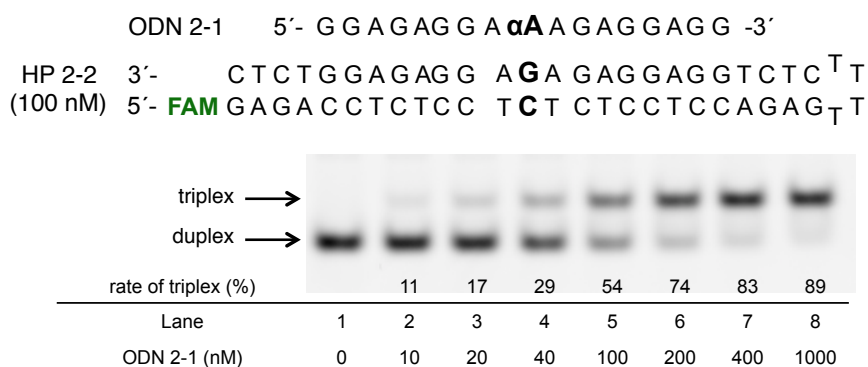
これらの結果より、プリン体の α ヌクレオシド (α A と α G) は G-C 塩基対への選択性を示し、 α ピリミジンヌクレオシドのうち α T は T-A および C-G 塩基対に、 α C は G-C および T-A 塩基対に結合する傾向にあることが分かった。また三重鎖形成能の高かった三塩基対を比較した場合、プリン体の α ヌクレオシドは、ピリミジン体の α ヌクレオシドよりも安定な三重鎖を形成していることが明らかになった。

次に、各塩基対に対しどの α ヌクレオシドが最も安定に結合するか、比較を行った。A-T 塩基対に着目すると、1000nM の条件で α A:A-T(24%)、 α G:A-T(48%)、 α C:A-T(5%)、 α T:A-T(11%)であり、 α G が最も安定に三重鎖形成することが分かる (Table 2-1b)。同様に、G-C 塩基対では、 α A:G-C(86%)、 α G:G-C (58%)、 α C:G-C (33%)、 α T:G-C (5%)であり、 α A が好ましい。C-G 塩基対では、 α A:C-G(53%)、 α G:C-G (3%)、 α C:C-G (3%)、 α T:G-C (48%)であり、 α A が好まし

い。T-A 塩基対では、 α A:T-A(33%)、 α G:T-A (13%)、 α C:T-A (27%)、 α T:T-A (50%)であり、 α Tが好ましい。これらをまとめると、 α G:A-T(48%)、 α A:G-C(86%)、 α A:C-G(53%)、 α T:T-A(33%)の三塩基対が最も安定な三重鎖形成をする組み合わせであると言える。

ここで、全ての組み合わせの中で最も安定な三塩基対である α A:G-C、すなわち ODN2-1 と HP2-2 の組み合わせについて、三重鎖の解離定数(K_d 値)の評価をゲルシフトアッセイにより試みた(Figure 2-8)。100 nM の標的三重鎖 DNA(HP 2-2)に対して、濃度を 0~1000 nM まで変えて TFO に作用させ、二重鎖と三重鎖の存在比率を imageJ により算出した。得られた値を TFO の濃度に対してプロットし、カーブフィッティングにより K_d 値を算出した。その結果、 $K_d = 48$ nM であることが分かった。この値は、過去に HeLa 細胞取り込み後に hTERT 遺伝子の転写阻害を行った例に用いられた TFO の三重鎖形成能に匹敵する。^{2-1d} このことから、 α -ヌクレオシドを含むアンチパラレル型 TFO についても、細胞中で 転写抑制を示すのに十分な三重鎖安定性を有することが示唆された。

a



Incubation: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 1 mM spermidine, 2.5 % sucrose, 14 °C, 90 min.
Electrophoresis: 10% Native gel containing 20 mM Tris-borate, 20 mM MgCl₂, 180V, 14 to 17 °C, 2 h.

b

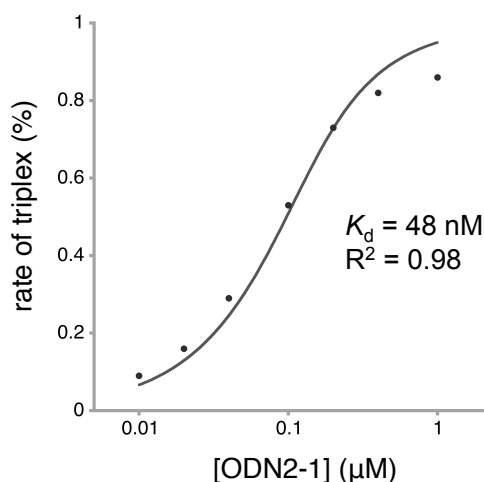


Figure 2-8 ゲル電気泳動による、ODN2-1 と HP2-2 の K_d 値の評価。a)泳動条件およびその結果。b)カーブフィッティングによる K_d 値の算出。

以上をまとめる。本節では合成した α ヌクレオシドを含む TFO の三重鎖形成能および塩基対選択性について評価を行った。その結果、各塩基対に対し適切な α ヌクレオシドの組み合わせは $\alpha\text{G:A-T}$ 、 $\alpha\text{A:G-C}$ 、 $\alpha\text{A:C-G}$ 、 $\alpha\text{T:T-A}$ の三塩基対であった。塩基対選択性はあまり高くないものの、 αA および αG は G-C 塩基対を好み、 αC は T-A 塩基対および G-C 塩基対、 αT は C-G 塩基対および T-A 塩基対に対する選択性を有していた。三重鎖形成能を α ヌクレオシド間で比較した場合、プリン体の α ヌクレオシドは、ピリミジン体の α ヌクレオシドよりも安定な三重鎖を形成する傾向が明らかになった。これらの結果を踏まえ、次節では計算化学の手法により考察を行う。

第 4 節

分子動力学計算を用いた三塩基対形成様式についての考察

第 3 節で述べたように、各塩基対に対し適切な α ヌクレオシドの組み合わせは $\alpha\text{G:A-T}$ 、 $\alpha\text{A:G-C}$ 、 $\alpha\text{A:C-G}$ 、 $\alpha\text{T:T-A}$ であった。それぞれの結合様式を探索するために分子動力学計算によるシミュレーションを行った。初期構造として、Vlieghe らによって作成された 12mer の G:G-C 三塩基対のみからなるアンチパラレル型三重鎖を用いた。²⁻¹⁴ 本研究の実験で使用したアンチパラレル型三重鎖の配列は α ヌクレオシドの 5' 上流および 3' 下流の三塩基対は A:A-T である。そこで、分子動力学計算においては第一鎖の 5' 末端から数えて 5、および 7 番目の塩基対を A:A-T に置き換え、6 番目に α ヌクレオシドを導入した。コントロールとして、6 番目に α ヌクレオシドの代わりに天然型の G および A を導入した G:G-C および A:A-T を含む天然型アンチパラレル型三重鎖も用意し、計算条件の妥当性の評価に用いた。それらの配列を Figure 2-9 に示す。

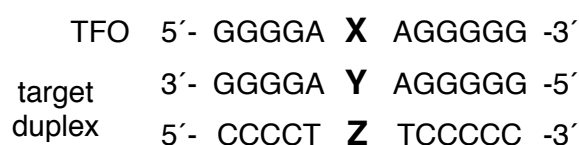


Figure 2-9 分子動力学計算に用いた配列

分子動力学計算は本学のスーパーコンピューターTSUBAME 3.0 上にある AMBER 16²⁻¹⁵ を用いた。構造の構築には AmberTools に含まれている teLeap を用いた。 α ヌクレオシドの電荷は β ヌクレオシドの電荷をそのまま用いた。核酸の力場としては三重鎖構造に適用可能な leaprc.DNA.OL15²⁻¹⁶ を用いた。構造の妥当性の検証のため、leaprc.DNA.BSC1²⁻¹⁷ および leaprc.ff14SB²⁻¹⁸ も使用している。水分子は剛体水分子モデルである TIP3P²⁻¹⁹ を使用した。周期境界条件は、基質から 10.5Å であり、約 5000 の水分子が系内に存在している。ナトリウム

イオンは Joung および Cheatham らが 2008 年に報告している力場 (frcmod.ionsjc_tip3p)²⁻²⁰ を用いた。なお、ナトリウムイオンは三重鎖構造の中和に用いているのみであり、追加の塩は系に含めていない。

分子動力学計算の平衡化では Dixit らが報告した手法²⁻²¹に基づいて行った。この方法では各原子に位置拘束として $25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ をかけ、0 K から 300K まで 100 ピコ秒かけ加温する。その後、300K を維持したまま位置拘束を段階的に減らしていく ($5, 4, 3, 2, 1, 0.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$) 方法である。それぞれのシミュレーションは 50 ピコ秒と 1000 step 構造最適化を定圧条件で行っている。そして最後に位置拘束を解除して 1 ナノ秒、構造の平衡化を行っている。なお温度をコントロールする熱源としては Berendsen 法²⁻²²を用い、水素原子は SHAKE 法²⁻²³を適用した。長距離の静電相互作用は particle-mesh Ewald 法²⁻²⁴を適用している。

データの解析用の分子動力学計算は 50 ナノ秒行っている。ここで圧力調整および温度調整は 5 ピコ秒ごとに行っている。構造解析では Cpptraj ver 17.00²⁻²⁵を用いた。

まず、50 ナノ秒計算した最後の構造に対し構造最適化を行い、それぞれの塩基対の構造を確認した。Figure 2-9 に OL15 力場、BSC1 力場および ff14SB 力場で計算した天然型三塩基対の構造を示す。

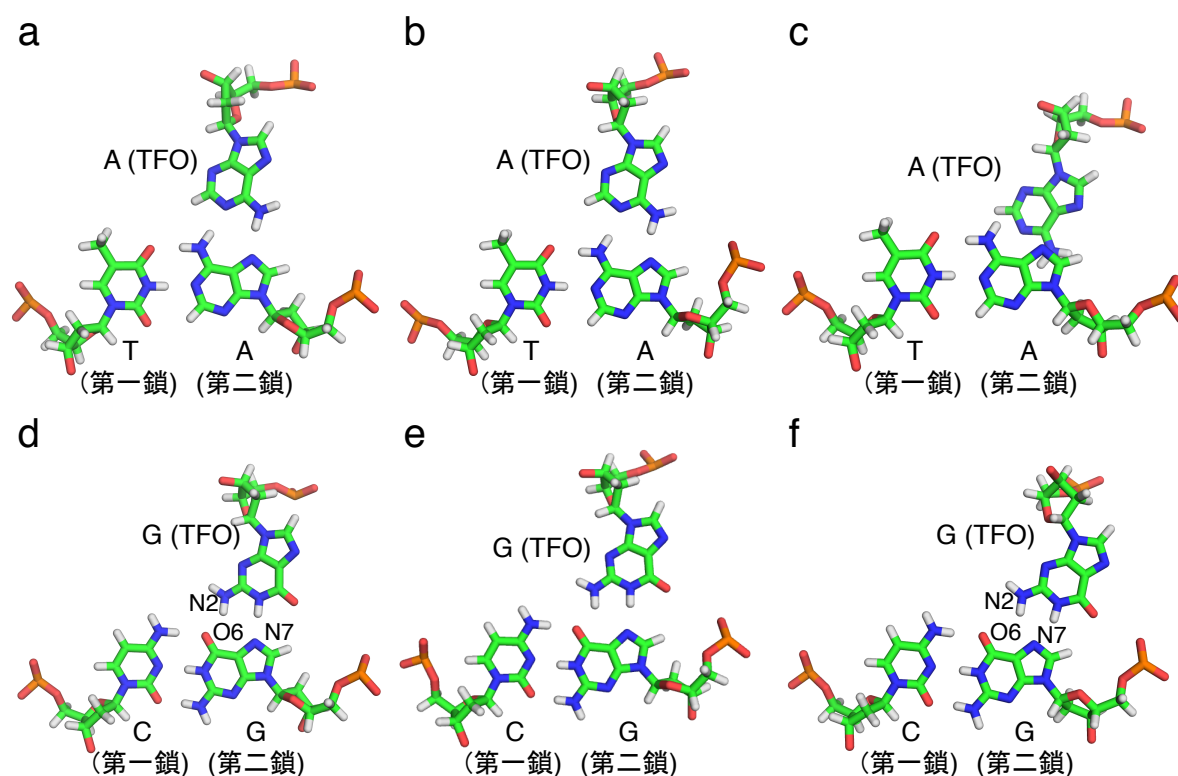


Figure 2-10 天然型アンチパラレル型三重鎖で見られる三塩基対構造。a) A:A-T 三塩基対 (OL15 力場) b) A:A-T 三塩基対 (BSC1 力場) c) A:A-T 三塩基対 (ff14SB 力場) d) G:G-C 三塩基対 (OL15 力場) e) G:G-C 三塩基対 (BSC1 力場) f) G:G-C 三塩基対 (ff14SB 力場)。d) および f) のアルファベットと数字はそれぞれグアニンのナンバリングを表す。

ff14SB は AMBER 14 以前で標準の核酸力場として使用されていたものであり、OL15 および BSC1 はともに三重鎖や四重鎖等の非標準構造のシミュレーションにも使用できるように調整された核酸力場である。

A:A-T 三塩基対をみたとき、Figure 2-10a と Figure 2-10b のように OL15 力場および BSC1 力場では塩基対を形成していたが、従来の標準力場である ff14SB(Figure 2-10c)では塩基対形成していないことがわかる。また G:G-C 三塩基対では、Figure 2-10d, e では TFO の G の 2 位のアミノ基(N2)は第二鎖の G の 6 位の酸素(O6)と水素結合していたことがわかるが、ff14SB の力場(Figure 2-10f)では第二鎖の G の 7 位の窒素(N7)との距離が 6 位の酸素よりも近く、7 位の窒素と水素結合していたと言える。アンチパラレル型三重鎖の X 線結晶構造解析では、TFO の G の 2 位のアミノ基と第二鎖の G のカルボニル酸素が水素結合していたことから、アンチパラレル型三重鎖の分子動力学計算では OL15 力場もしくは BSC1 力場が適していると考えられる。AMBER16 のマニュアル p38 には、DNA のシミュレーションには OL15 の力場が推奨されていたことから、今後の検討では OL15 の力場を用いた。

つづいて α ヌクレオシドの分子動力学計算を行った。 α ヌクレオシドの初期構造はリン酸骨格の座標を基準に決めた。それぞれの α G:A-T、 α A:G-C、 α A:C-G、 α T:T-A の三塩基対構造、および塩基対を側面からみた図を次ページに示す (Figure 2-11a, c, e, g)。

まず、 α G:A-T 三塩基対に着目する(Figure 2-11a)。水素結合形成は、TFO のグアニン O6 位と第二鎖アデニン N6 位 (以降 3O6...2N6 と呼称) および TFO グアニン N1 位と第二鎖アデニン N7 位 (3N1...2N7) の間の二箇所で見られた。一方、 α A:G-C(Figure 2-11c)では TFO のアデニンは第二鎖のグアニンではなく、第一鎖のシトシン間と 3N1...1N4 の一箇所で見られた。また、 α A:C-G(Figure 2-11e)では TFO のアデニンと第二鎖のシトシン間で 3N1...2N4 の水素結合が一箇所見られた。最後に α T:T-A (Figure 2-11g)では TFO のチミン塩基と第二鎖のチミン塩基および第一鎖のアデニン塩基と 3O4...1N6 および 3N3...2O4 の二箇所で見られた。

つづいて、TFO 中の 5'上流および 3'下流のヌクレオシドと α ヌクレオシドの塩基間のスタッキング相互作用について調べるために、 α ヌクレオシドの核酸塩基を側面から見た。(Figure 2-11b, d, f, h) まず α G:A-T (Figure 2-11b)の場合、通常のアンチパラレル型三重鎖の A:A-T および G:G-T の三塩基対と同様に Hoogsteen 側での相互作用をしており、標準的なスタッキング構造を示していた。しかし α ヌクレオシドであるため、核酸塩基が標準的な位置へ移動するために、TFO のリン酸骨格に大幅なひずみが導入されていた。その一方、 α A:G-C の場合 (Figure 2-11d)、リン酸骨格は規則正しい構造を維持していたことが分かる。このことにより、5'上流の核酸塩基とのスタッキング相互作用は欠失し、3'下流の核酸塩基との相互作用が主となっていることがわかる。なお、 α A:G-C 三塩基対は今回用いた α ヌクレオシドの中で、最も

安定な三重鎖を形成している。このことから、リン酸骨格の歪みはアンチパラレル型三重鎖構造の安定性を予測する上で重要な要素であると言える。 α A:C-G 三塩基対では(Figure 2-11f)第二鎖のシトシン N4 位と相互作用するために、リボースの位置が α G:A-T 三塩基対と同じ様にシフトし、リン酸骨格のひずみが出たと同時に、水素結合が一本しかないため、5'上流側の空いている空間を利用して核酸塩基が回転している構造が得られた。興味深いことに 3'下流側の核酸塩基と α ヌクレオシドの塩基は平行であり、スタッキング相互作用は維持していた一方、5'上流とは異なる向きになっており、相互作用が著しく弱くなっていることがわかった。最後に、 α T:T-A の三塩基対構造(Figure 2-11h)について述べる。この α ヌクレオシドは第一鎖および第二鎖、両方と相互作用していた。 α A:G-C と同様に、もともとのリボースの位置を保持していることからリン酸骨格の歪みは小さい。そのため、5'上流側の核酸塩基とのスタッキング相互作用ができる位置にはなかった。

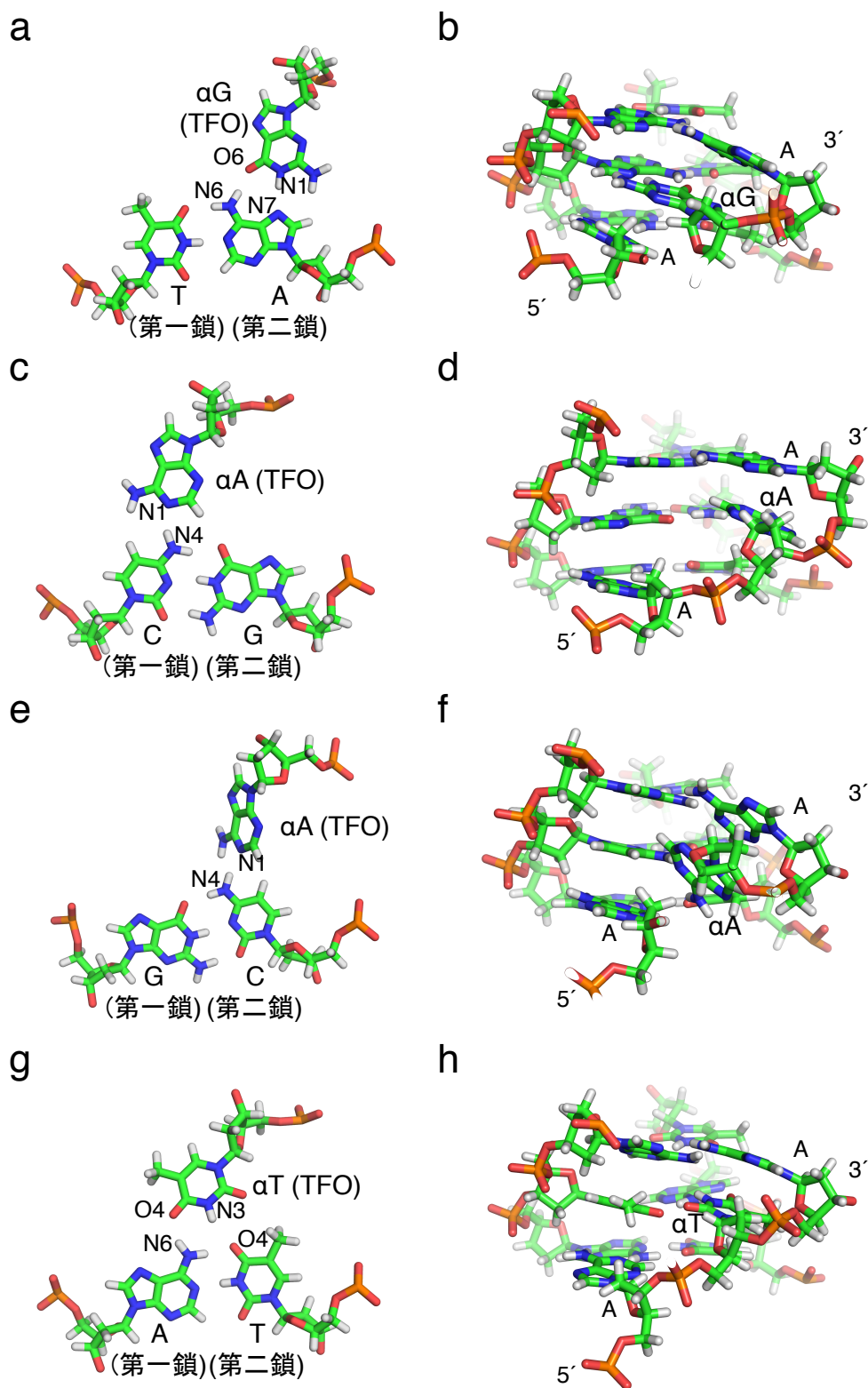


Figure 2-11 分子動力学計算で求めた構造。a) $\alpha G:A-T$ の三塩基対構造。b) a を TFO αG からみた構造。c) $\alpha A:G-C$ の三塩基対構造。d) c を TFO αA からみた構造。e) $\alpha A:C-G$ の三塩基対構造。f) e を TFO αA からみた構造。g) $\alpha T:T-A$ の三塩基対構造。h) g を TFO αT からみた構造。a), c), e), g) のアルファベットと数字は各塩基のナンバリングを表す。

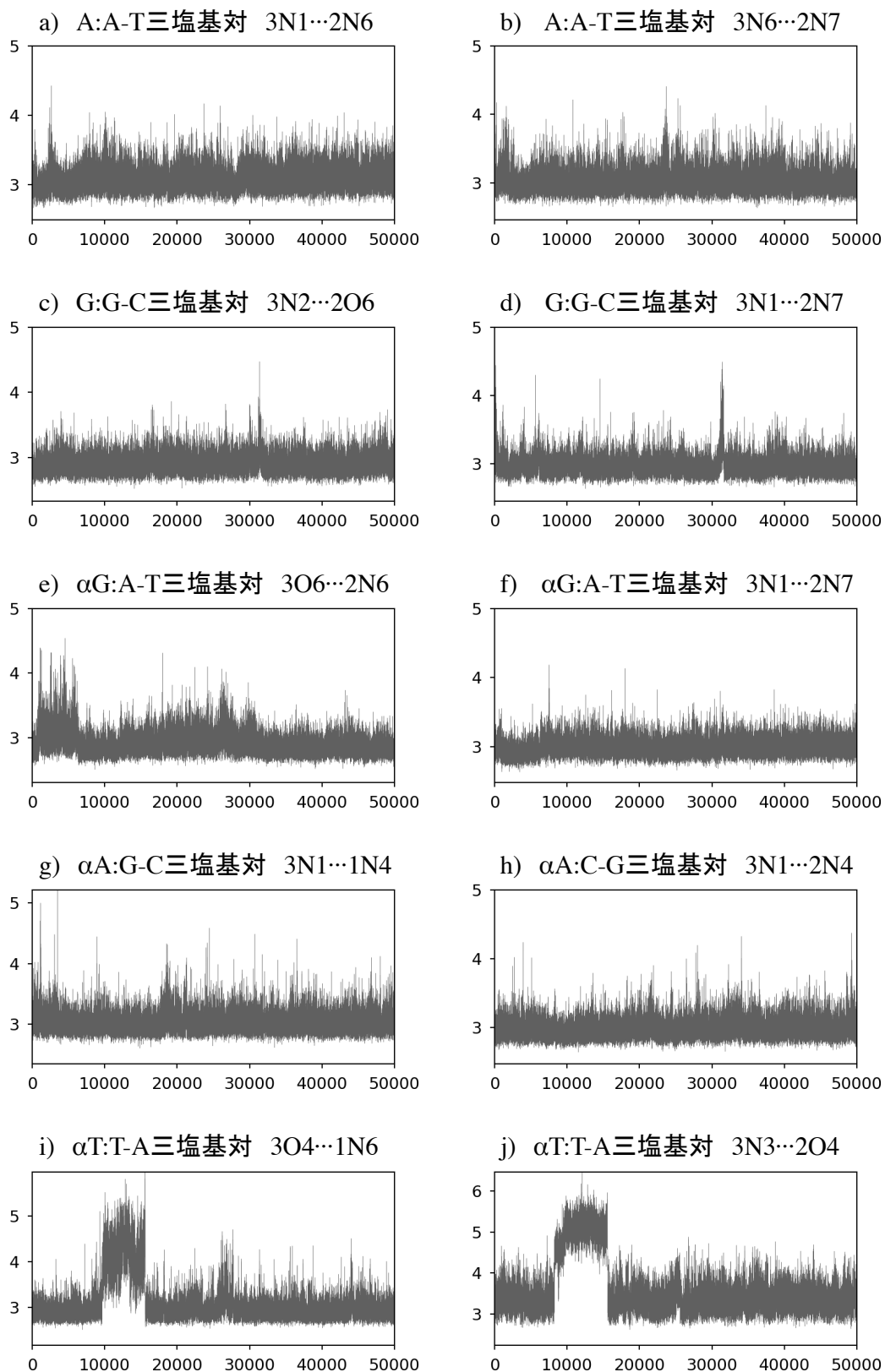


Figure 2-12 分子動力学計算中の各塩基対における水素結合していると考えられるヘテロ原子間の距離。縦軸はヘテロ原子間の距離[Å]を表し、横軸は分子動力学計算の経過時間[psec]に対応する。

このように観測された構造がどの程度分子動力学計算中で安定に存在していたかを検討するために、それぞれの観測された水素結合の経時変化を評価した。評価には、水素結合の対となるヘテロ原子間の距離を用いた。通常、3.5Å 以下の距離にある場合、水素結合していると判定される。その結果を Figure 2-12 に示す。

まず、ポジティブコントロールとして未修飾のアンチパラレル型三重鎖構造である A:A-T および G:G-C の三塩基対での TFO と第二鎖の間の相互作用を評価した。(Figure 2-12a, b, c, d) A:A-T 三塩基対における 3N1...2N6 および 3N6...2N7 距離を見てみると、分子動力学計算中ほとんどの構造が 3.5Å 以下であった。このことは、この二つの水素結合が安定に水素結合が存在しており、TFO 中のアデニン塩基は第二鎖のアデニン塩基の Hoogsteen 側と対を形成していることを意味する。同様に G:G-C 三塩基対における 3N2...2O6 および 3N1...2N7 の距離を見てみると、安定な水素結合であることがわかり、安定な塩基対形成が行われていることを示唆している。

これらの塩基対と比べて α ヌクレオシドの塩基対のヘテロ原子間の距離を解析した。 α G:A-T 三塩基対における 3O6...2N6 (Figure 2-12e) および、3N1...2N7 (Figure 2-12f) では、未修飾の三塩基対と比較して 3O6...2N6 の距離のゆらぎが大きいものの、安定して 3.5 Å 以下の値を取っていた。同様に α A:G-C 三塩基対の 3N1...1N4 (Figure 2-12g) および α A:C-G 三塩基対の 3N6...2N4 (Figure 2-12h) においても安定した水素結合であると言える。その一方、 α T:T-A 三塩基対の 3O4...1N6 (Figure 2-12i) および 3N3...2O4 (Figure 2-12j) の距離を解析した結果、3O4...1N6 は 9.6 ナノ秒から 15.6 ナノ秒の間、また 3N3...2O4 は 8.2 ナノ秒から 15.6 ナノ秒の間、解離していたことがわかった。また解離構造を取っていたにもかかわらず、元の構造に戻っていた。このことから、分子動力学計算中でみられた三塩基対構造は、古典力場の環境下で安定に存在することが示唆された。本研究で分子動力学計算した 4 種類の三塩基対の相対的な安定性は、前節の実験より α A:G-C(86%) > α A:C-G(53%) $\approx$ α G:A-T(48%) > α T:T-A(33%) であると考えられる。分子動力学計算中、唯一解離がみられた α T:T-A は計算した中で最も不安定な三塩基対と考えられ、実験結果と矛盾しない。

以上をまとめる。本節では、実験で各核酸塩基対に対してもっとも安定に結合した α ヌクレオシドの結合様式を明らかにするために分子動力学計算を行った。予備検討より分子動力学計算における核酸の力場として、OL15 もしくは BSC1 が好ましく、本節では OL15 を用いて解析を行った。 α G:A-T、 α A:G-C、 α A:C-G、 α T:T-A の三塩基対構造を解析したところ、安定な水素結合が観測された。

第 5 節

総括

本章では α ヌクレオシドを含む三重鎖形成核酸 (TFO) によるアンチパラレル型三重鎖について系統的に三重鎖構造の安定性と選択性について評価を行い、その結合様式について分子動力学計算を用いて推定した。もちいた α -ヌクレオシドは、 α -デオキシアデノシン (α A)、 α -デオキシグアノシン (α G)、 α -デオキシシチジン (α C)、 α -デオキシチミジン (α T) である。これらの α ヌクレオシドと、DNA 二重鎖中に含まれる 4 種類の塩基対 (A-T、G-C、C-G、T-A) との全ての組み合わせについて、三重鎖形成能を評価した。その結果、A-T 塩基対には α G (α G:A-T)、G-C 塩基対には α A (α A:G-C)、C-G 塩基対にも α A (α A:C-G)、T-A 塩基対には α T (α T:T-A) が最も安定に結合した。それぞれの結合様式を分子動力学計算で推定したところ、安定な水素結合形成を含む三塩基対構造が見られた。過去にアンチパラレル型三重鎖における α ヌクレオシドの結合様式について検討した例はなく、今後の修飾核酸開発における礎となる成果である。

本研究の成果を元にする事で新たな修飾核酸を合理的に設計することが可能になり、高い安定性および選択性を有するアンチパラレル型三重鎖形成核酸の開発、ひいては TFO をもちいたゲノム編集法開発への貢献が期待される。

第 2 章の引用文献

- 2-1 (a) Mayfield, C.; Ebbinghaus, S.; Gee, J.; Jones, D.; Rodu, B.; Squibb, M.; Miller, D. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 18232–18238. (b) Joseph, J.; Kandala, J. C.; Veerapanane, D.; Weber, K. T.; Guntaka, R. V. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2182–2188. (c) McGuffie, E. M.; Catapano, C. V. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 2701–2709. (d) Okamura, H.; Taniguchi, Y.; Sasaki, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 12445–12449.
- 2-2 Vasquez, K. M.; Narayanan, L.; Glazer, P. M. *Science* **2000**, 290, 530–533.
- 2-3 (a) Gowers, D. M.; Fox, K. R. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 1569–1577. (b) Malnuit, V.; Duca, M.; Benhida, R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 326–336. (c) Hari, Y.; Obika, S.; Imanishi, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2875–2887.
- 2-4 (a) Beal, P. A.; Dervan, P. B. *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 2773–2776. (b) Greenberg, W. A.; Dewan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5016–5022.
- 2-5 (a) Rao, T. S.; Durland, R. H.; Seth, D. M.; Myrick, M. A.; Bodepudi, V.; Revankar, G. R. *Biochemistry* **1995**, 34, 765–772. (b) Gee, J. E.; Revankar, G. R.; Rao, T. S.; Hogan, M. E. *Biochemistry* **1995**, 34, 2042–2048. (c) Olivas, W. M.; Maher, L. J. *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23,

- 1936–1941.
- 2-6 (a) Doronina, S. O.; Behr, J.-P. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 63–71. (b) Doronina, S. O.; Behr, J.-P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 547–550.
- 2-7 (a) Timofeev, E. N.; Borisova, O. F.; Shchylolkina, A. K. *J. BioMol. Struct. Dyn.* **2000**, 17, 655–664. (b) Timofeev, E. N.; Kochetkova, S. V.; Florentiev, V. L. *Mol. Biol.* **2004**, 38, 547–552. (c) Timofeev, E. N.; Goryaeva, B. V.; Florentiev, V. L. *J. BioMol. Struct. Dyn.* **2006**, 24, 183–188. (d) Kolganova, N. A.; Shchylolkina, A. K.; Chudinov, A. V.; Zasedatelev, A. S.; Florentiev V. L.; Timofeev, E. N. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 8175–8185.
- 2-8 Ness, R. K.; MacDonald, D. L.; Fletcher, H. G. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2895–2899.
- 2-9 Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J.-L. Chapter 13 α -Oligodeoxynucleotides, in *Methods in Molecular Biology, Protocols for Oligonucleotides and Analogs*: Agrawal, S, Ed.; Human Press Inc.: Totawa, **1993**, 20, 261-283.
- 2-10 Yamaguchi, T.; Saneyoshi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 1441–1450.
- 2-11 Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J.-L.; Thenet, S.; Bertrand, J.-R.; Paoletti, J.; Malvy, C.; Paoletti, C. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 3421–3437.
- 2-12 Morvan, F.; Rayner, B.; Leonetti, J.-P.; Imbach J.-L. *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 833–847.
- 2-13 Sato, Y.; Tateno, G.; Seio, K.; Sekine, M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3251–3254.
- 2-14 Vlieghe, D.; Meervelt, L. Van; Dautant, A.; Gallois, B.; Precigoux, G.; Kennard, O. *Science* **1996**, 273, 1702–1705. The pdb file used in this chapter, m2udj049.pdb is available from <http://pdb-k-linux-1.rutgers.edu/files/ftp/pub/models/m2udj049/>.
- 2-15 Case, D.A.; Cerutti, D.S.; Cheatham, T.E. III; Darden, T.A.; Duke, R.E.; Giese, T.J.; Gohlke, H.; Goetz, A.W.; Greene, D.; Homeyer, N.; Izadi, S.; Kovalenko, A.; Lee, T.S.; LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Mermelstein, D.; Merz, K. M.; Monard, G.; Nguyen, H.; Omelyan, I.; Onufriev, A.; Pan, F.; Qi, R.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Simmerling, C. L.; Botello-Smith, W. M.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Xiao, L.; York, D. M.; Kollman, P. A. (2017), AMBER 2017, University of California, San Francisco.
- 2-16 (a) Yildirim, I.; Kennedy, S. D.; Stern, H. A.; Hart, J. M.; Kierzek, R.; Turner, D. H. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 172–181. (b) Krepl, M.; Zgarbova, M.; Stadlbauer, P.; Otyepka, M.; Banáš, P.; Koča, J.; Cheatham, T. E.; Šponer, J. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 2506–2520. (c) Zgarbová, M.; Luque, F. J.; Šponer, J.; Cheatham, T. E.; Otyepka, M.; Jurečka, P. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, 9, 2339–2354.
- 2-17 Ivani, I.; Dans, P. D.; Noy, A.; Pérez, A.; Faustino, I.; Hopsital, A.; Walther, J.; Andrio, P.; Goñi, R.; Balaceanu, A.; Portella, G.; Battistini, F.; Gelpí, J.; González, C.; Vendruscolo, M.; Laughton, C.; Harris, S. A.; Case, D. A.; Orozco, M. *Nature Meth.* **2016**, 13, 55–58.

- 2-18 Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.; Simmerling, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696–3713.
- 2-19 Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- 2-20 (a) Joung, I. S.; Cheatham, T. E. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 13279–13290. (b) Joung, I. S.; Cheatham, T. E. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 9020–9041.
- 2-21 (a) Dixit, S. B.; Beveridge, D. L.; Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Giudice, E.; Lankas, F.; Lavery, R.; Maddocks, J. H.; Osman, R.; Sklenar, H.; Thayer, K. M.; Varnai, P. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3721–3740. (b) Masaki, Y.; Sekine, M.; and Seio, K. 2017. Deformability calculation for estimation of the relative stability of chemically modified RNA duplexes. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 68:7.27.1-7.27.10.
- 2-22 Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- 2-23 (a) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341. (b) Miyamoto, S.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 952–962.
- 2-24 Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- 2-25 Roe, D. R.; Cheatham, T. E. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095.

第 3 章

トリアゾリルホスホネート構造を有する人工核酸の合成法の開発

第1節 序

オリゴデオキシヌクレオチド(オリゴヌクレオチド)などの DNA 鎖の主たる機能は、標的鎖との塩基対形成と高次構造形成により他の生体分子と相互作用することある。それ以外の機能をオリゴヌクレオチドに持たせるためには、他の分子とオリゴヌクレオチドを共有結合により結びつける、いわゆるバイオコンジュゲーションが行われる。たとえば、天然型の核酸は細胞膜透過性に欠けるため、antimiR や antisense などを核酸医薬として応用するために cell-penetrating peptide ³⁻¹や *N*-acetylgulcosamine ³⁻²などの修飾基をコンジュゲートした核酸医薬が開発されている。

一方、オリゴヌクレオチドや RNA オリゴマーなどに修飾基をコンジュゲートする手法の一つとして、一価の銅を触媒としたアジド-アルキン環化付加反応 (Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, CuAAC) がよく用いられる。³⁻³ この反応はアジドとアルキンが 1,3-双極子環化付加反応を起こして 1,4 置換 1,2,3-トリアゾールを形成するもので、非常に高い立体選択性、基質選択性および幅広い基質許容性を示すことが知られている。そのため、Figure 3-1 に示すように核酸塩基部や糖部からリンカーを介して末端アルキンを導入し、CuAAC によって官能基をオリゴマーに導入した例はこれまでに数多く報告されている。³⁻⁴

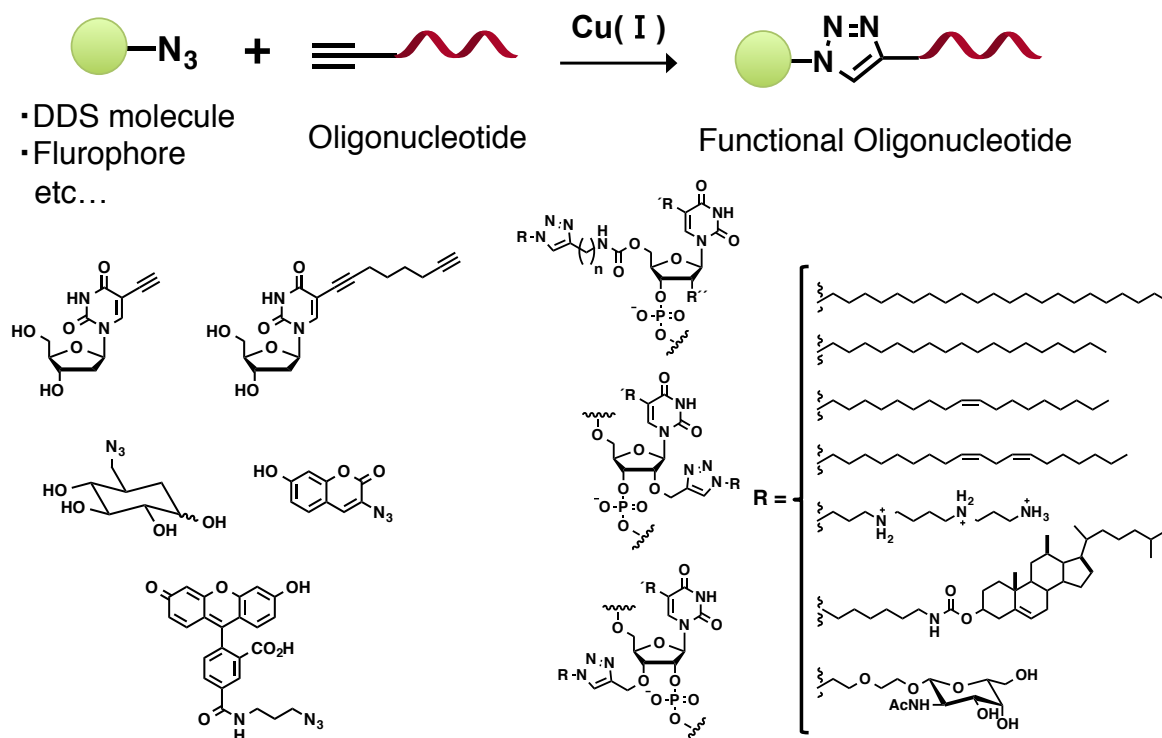


Figure 3-1 塩基部 ^{3-4a}や糖部 ^{3-4b}に CuAAC を用いて修飾を導入した例。

一方、このような修飾をリン酸部に導入するための手法として、リン酸ジエステル構造の非架橋性酸素原子をエチニル基に置換したエチニルホスホネート型修飾核酸が報告されている(Figure 3-2b)。³⁻⁵ この修飾核酸は、通常の核酸合成法ホスホロアミダイト法^{0-0,3-6}を用いてエチニルホスホネートをオリゴヌクレオチドに導入することで合成される。また、鎖伸長後にアジド基を有する基質と CuAAC を行うことで修飾基を導入している。Figure 3-2c に示すように、カチオン性修飾基を導入することで、これらの修飾核酸はインフェクション試薬を用いずにモデル細胞中に取り込まれている。このとき、トリアゾールのみを有する修飾核酸(Figure 3-2d)も比較対象として用意されたが、驚くべきことにこの修飾核酸も細胞取り込み能をもつことが明らかになった。この修飾構造は、一般に細胞取り込み能をもたらすとされるカチオン性修飾や疎水性修飾ではないため、細胞取り込みに関わる生体分子と相互作用している可能性が示唆された。そこで、さらに良い細胞取り込み能を有する人工核酸の開発を目指し、類似構造としてリン酸ジエステル構造の非架橋性酸素原子(Figure 3-2d)ではなく架橋性酸素原子をトリアゾリル基に置換した Figure 3-2e の修飾核酸を設計した。

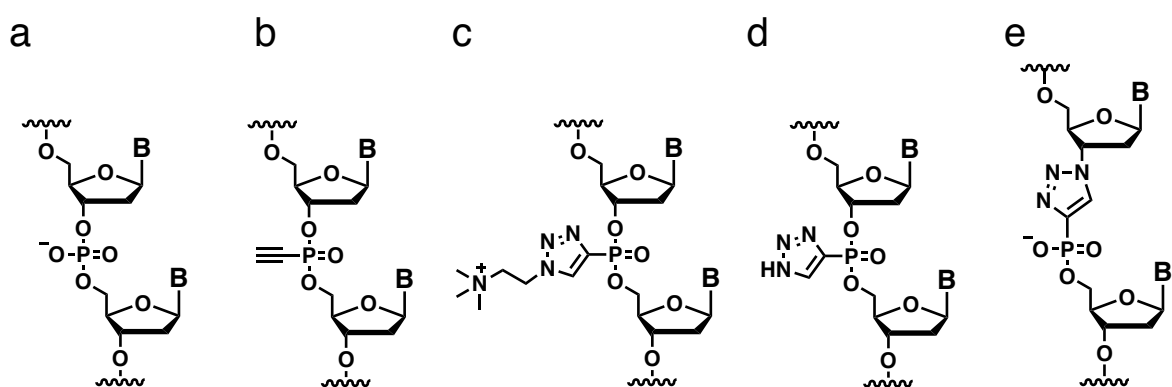
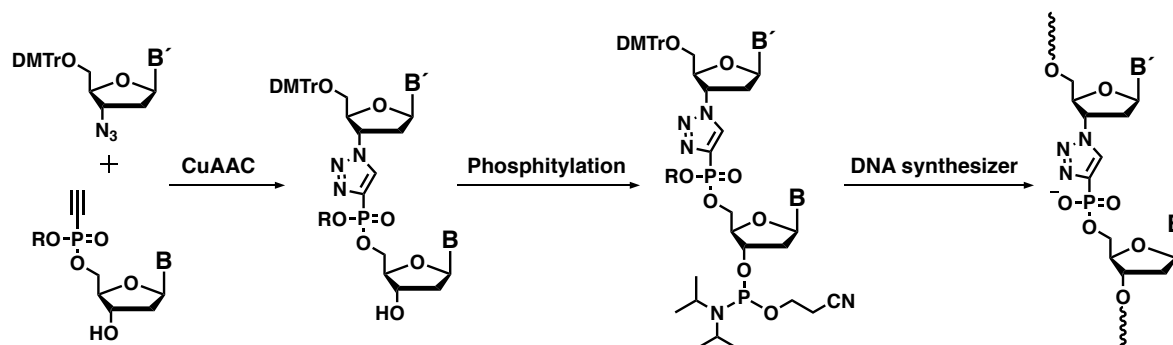


Figure 3-2 過去の研究および本章で合成された修飾核酸の構造。a)天然型 DNA の構造。b)エチニルホスホネート構造。c)カチオン性のトリメチルアミノエチルホスホネート構造。d)非架橋性の酸素原子をトリアゾールに置換したトリアゾリルホスホネート構造。e) 架橋性の酸素原子をトリアゾールに置換したトリアゾリルホスホネート構造。

本研究では、Figure 3-2e に示す構造をもつ修飾オリゴヌクレオチドの合成法を開発した。具体的には、Scheme 3-1 に示すように、先に 3'-アジド-2',3'-デオキシヌクレオシドと、エチニルホスホネート部位に保護基を有するヌクレオチド誘導体を別途合成し、CuAAC によって二量体を合成する。つづいて 3'ホスフィチル化反応を行ってホスホロアミダイトユニットを合成し、自動合成機によりオリゴヌクレオチドの合成を行う。以後本章では、トリアゾリルホスホネート構造は 1,2,3-トリアゾールの 1 位窒素原子がデオキシヌクレオシドのリボフラノースの 3'位炭素原子と、4 位炭素原子が 5'-ホスホネートのリン原子と結合した Figure 3-3a の構造を指す。また、2 量体もしくはオリゴヌクレオチド内のトリアゾリルホスホネート構

造は、Figure 3-3b のように下付き文字で TP と表す。また、合成中間体の塩基部については、Figure 3-3 のように保護基とともに A^{Bz} 、 G^{tBu} 、 C^{Bz} および T と略す。



Scheme 3-1 本章における化学合成の概要。

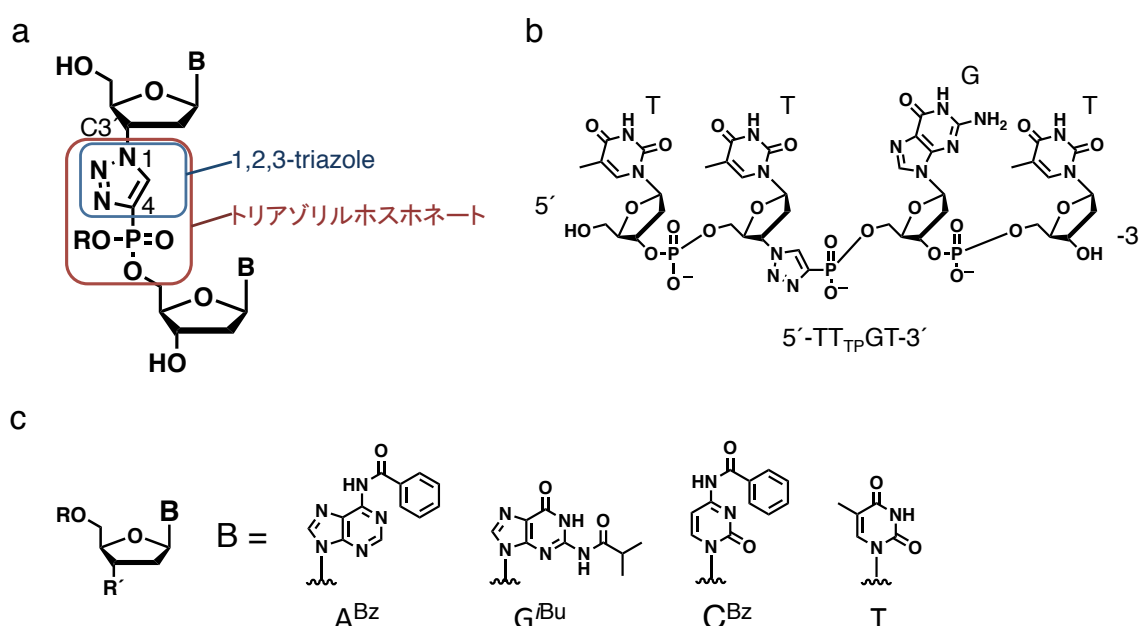


Figure 3-3 本章で用いる、構造についての表記および省略表記。a) トリアゾリルホスホネート構造が示す構造。b) 下付きで TP と表記される二量体もしくはオリゴヌクレオチド内のトリアゾリルホスホネート構造 c) 塩基部の省略表記

第2節

シアノエチル基保護された $5'\text{-T}_{\text{TP}}\text{G-3'}$ 二量体ホスホロアミダイトユニット合成の問題点

前節で述べたように、修飾 2 量体のホスホロアミダイトユニットの合成を試みた。今回、anti hsa-mir-15b 配列($5'\text{-TGTAACCATGATGTGCTGCTA-3'}$)に最も多く含まれる TG 配列に対応して、最初に $5'\text{-T}_{\text{TP}}\text{G-3'}$ 2 量体のホスホロアミダイトユニット合成を行った。トリアゾリ

ルホスホネート部位の保護基は、5 価のリン酸トリエステル構造を有するチミジンダイマー合成中間体³⁻⁷ (Figure 3-4a)などにも保護基として利用されているシアノエチル基を用いた (Figure 3-4b)。しかし、シアノエチル基は今回のトリアゾリルホスホネート構造の保護基としての安定性に欠けたので、最終的にはより安定な 1-ナフチルメチル基が用いられた (Figure 3-4c)。本節では、1-ナフチルメチル基を用いた合成の前提として、シアノエチル基を用いた場合の合成ルートとその問題点について解説する。

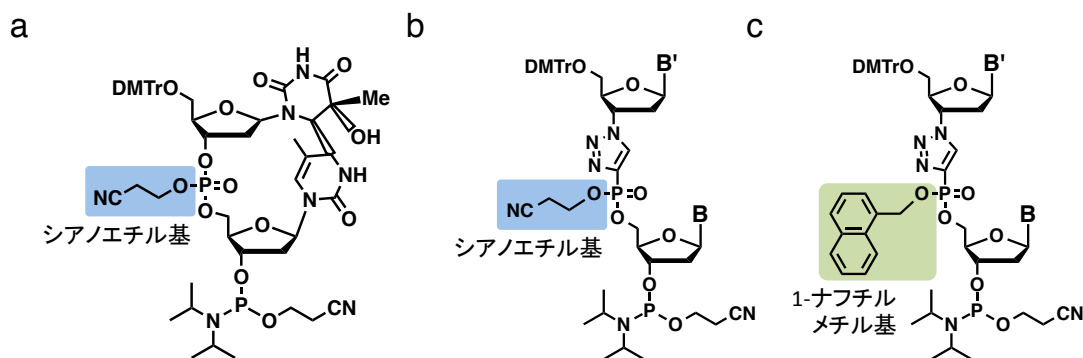
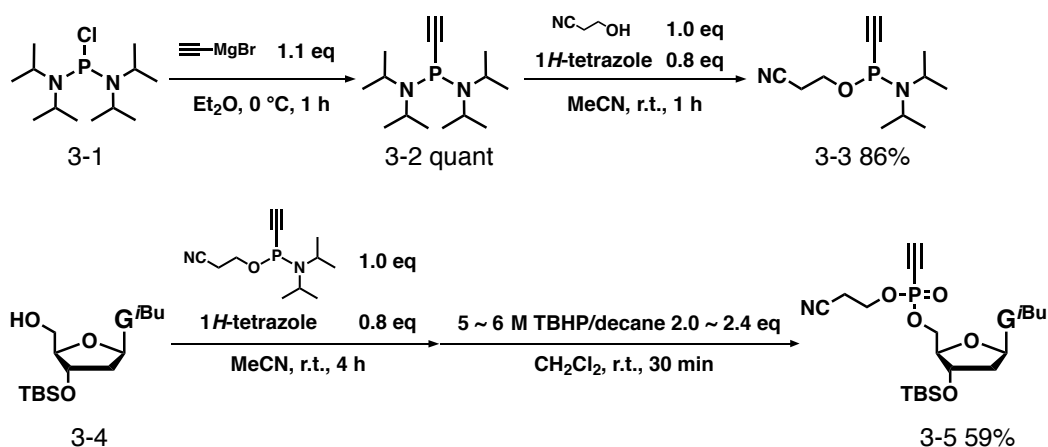


Figure 3-4 リン酸の保護基の例。a)シアノエチル基を用いた過去の報告。b)シアノエチル基を用いた場合の、本章の目的化合物(ホスホロアミダイトユニット)の構造。c) 1-ナフチルメチル基を用いた場合の、本章の目的化合物(ホスホロアミダイトユニット)の構造。

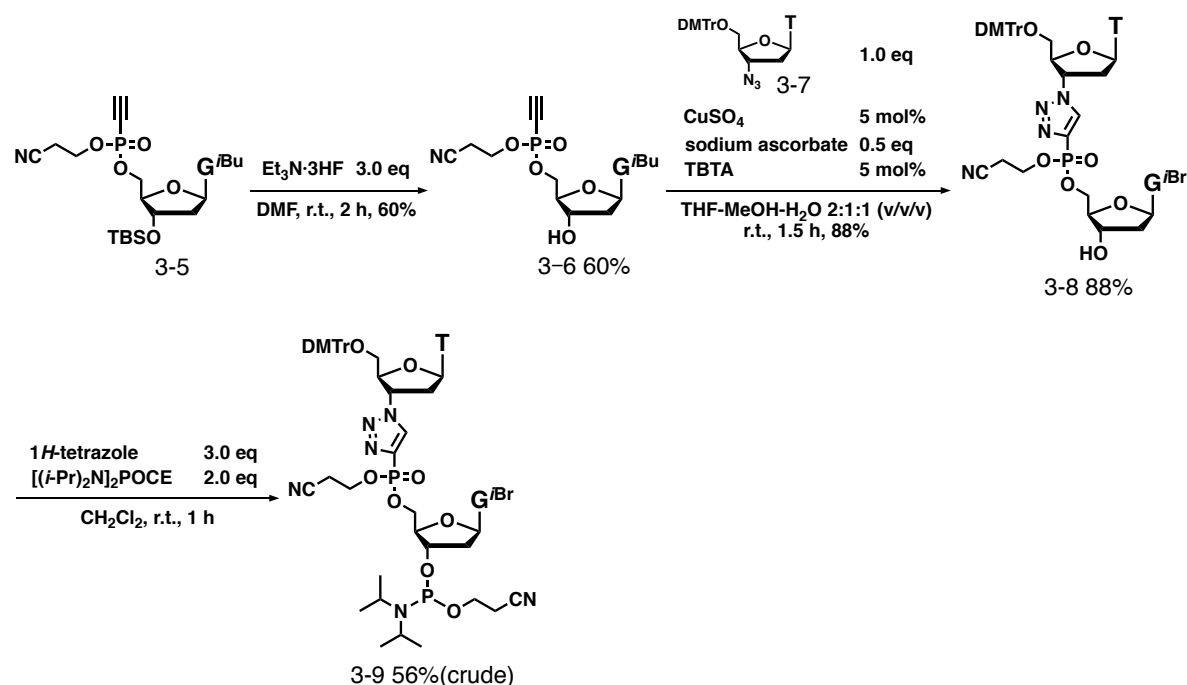
シアノエチル基保護された二量体ホスホロアミダイトユニットの合成検討は、はじめに Scheme 3-2 に従ってエチニルホスホネート誘導体 **3-5** の合成から行った。クロロホスフィン誘導体 **3-1** から、過去の報告³⁻⁵に従い Grignard 反応を用いてエチニルホスフィノジアミダイト誘導体 **3-2** を合成し、シアノエトキシ基を一つ導入することでエチニルホスフィノアミダイト誘導体 **3-3** を収率 86%で得た。つづいて誘導体 **3-3** を用いてデオキシグアノシン誘導体 **3-4** の 5'位をエチニルホスフィネートエステル化し、TBHP³⁻⁸を用いてリン原子を酸化することで、化合物 **3-5** を収率 59%で得た。



Scheme 3-2 化合物 **3-5** の合成。

つぎに、二量体 **3-8** の合成およびホスホロアミダイトユニット **3-9** の合成検討を Scheme 3-3 に示す。化合物 **3-5** の 3'位水酸基の脱保護をして化合物 **3-6** を 60%で得た。その後 3'-デオキシ-3'-アジドチミジン誘導体 **3-7**³⁻⁹、CuSO₄ と TBTA³⁻¹⁰を用いて³⁻¹¹ CuAAC を行い、化合物 **3-8** を 88%で得た。最後に、3'位水酸基のホスフィチル化を行ったところ、反応中に複数の生成物が TLC 分析によって確認された。TLC 分析でメインスポットだったものをシリカゲルクロマトグラフィーで分離し³¹P-NMR で分析した結果を Figure 3-5 に示す。15 ppm 付近に大きく見える試薬残渣由来のピーク以外にも多数のピークが確認された。過去の報告³⁻⁵から 8 ppm 付近のピークは保護基が分解していないトリアゾリルホスホネートジエステル構造に由来し、150 ppm 付近のピークはホスホロアミダイト部位に由来すると考えられる。このことから、目的物である **3-9** が主生成物として含まれていると考えられ、またこの時点での収率は 56%(crude)だった(Scheme 3-3)。しかしながら、副生成物由来のピークが多数存在することから、この crude の化合物 **3-9** をそのまま自動合成基によるオリゴデオキシヌクレオチドの合成に用いることは不適切であると判断した。シリカゲルクロマトグラフィーの溶媒系の変更、また貧溶媒中で沈殿させてろ過によってさらに精製する方法を試みたが、純度の向上にはつながらなかった。

反応系および化合物 **3-9** の crude の回収物の TLC において、非常に高極性な副生成物が見られたことから、シアノエチル基が脱離する副反応が生じた可能性が高いと考え、対策として今後はより安定な保護基を用いることとした。



Scheme 3-3 二量体 **3-8** の合成およびホスホロアミダイトユニット **3-9** の合成検討。

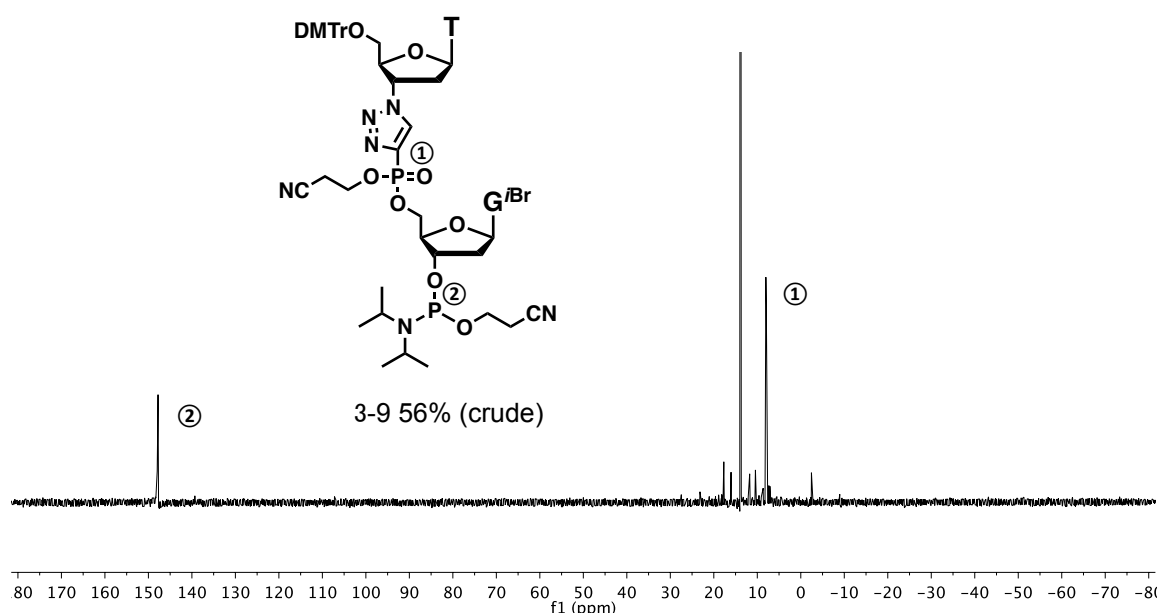
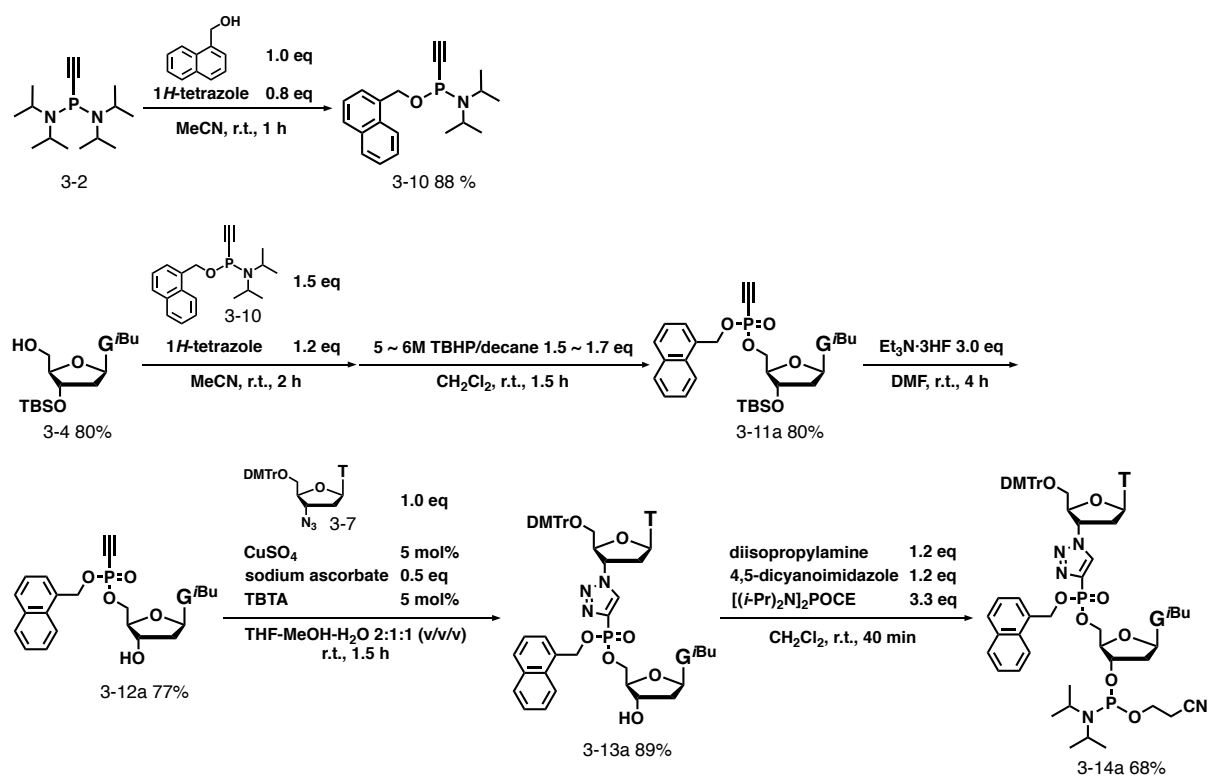


Figure 3-5 1-シアノエチル基保護された 5'-T_{TP}G-3'二量体ホスホロアミダイトユニット **3-9** の、シリカゲルクロマトグラフィー後の回収物。図中の番号は、ピークとその由来となるリン原子の対応を表す。

第 3 節

1-ナフチルメチル基保護された 5'-T_{TP}G-3'二量体ホスホロアミダイトユニットの合成

第 2 節で述べたように、シアノエチル基はトリアゾリルホスホネート部位の保護基として不安定であり、ホスホロアミダイトユニットの単離精製が困難であった。そこで、より安定な保護基として 1-ナフチルメチル基に着目した。1-ナフチルメチル基は現在開発中のリン酸部保護基のひとつで、ベンジル基、ナフチルメチル基の誘導体のなかで最も脱保護がされやすく、かつシアノエチル基やメチル基と比較してより安定である。³⁻¹² この保護基をエチニルホスフィノアミダイト試薬に用い、第 3 節と同様なルートによる合成を試みた。その詳細を Scheme 3-4 に示す。



Scheme 3-4 1-ナフチルメチル基保護された 5'-T_{TP}G-3'二量体ホスホロアミダイトユニット **3-14a** の合成

前節で合成した化合物 **3-2** に対して、1-ナフチルメタノールを用いることでエチニルホスフィノアミダイト誘導体 **3-10** を 88% で得た。誘導体 **3-10** を用いてデオキシグアノシン誘導体の 5' 位をエチニルホスフィネートエステル化し、TBHP を用いてリンを酸化することで、化合物 **3-11a** を収率 80% で得た。つぎに、3'-TBS 基を脱保護し、化合物 **3-12a** を 77% の収率で得た。つづいて、アジドチミジン **3-7** との CuAAC を行い、5'-T_{TP}G-3'二量体 **3-13a** を 89% の収率で得た。最後に、二量体 3'末端部水酸基のホスフィチル化を行い、目的の 5'-T_{TP}G-3'二量体ホスホロアミダイトユニット **3-14a** を得ることに成功した。ここで、化合物 **3-14a** の精製にヘキサン中で沈殿を得てろ過がする手法が有効であることを見出し、³¹P-NMR 上で不純物が確認されないほど高い純度でアミダイトユニットを得ることができた(Figure 3-6)。

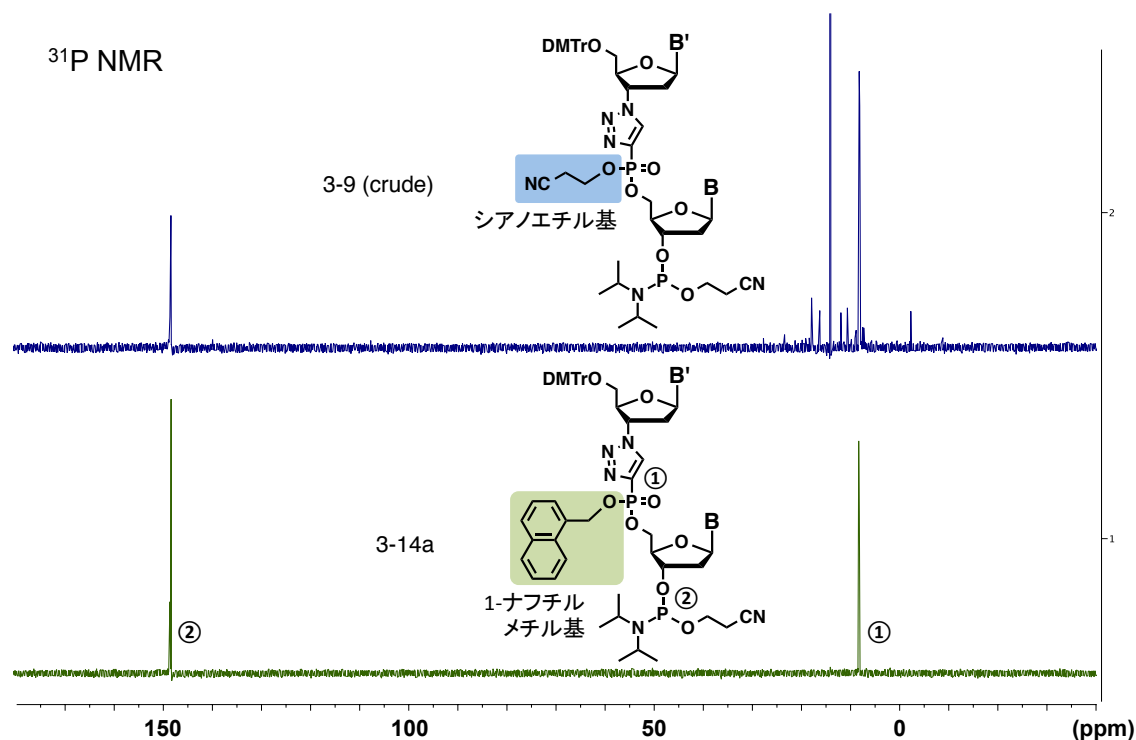


Figure 3-6 シアノエチル基を用いた二量体ホスホロアミダイトユニット **3-9**(crude)と本節で合成した **3-14a** の ^{31}P -NMR の比較。図中の番号は、ピークとその由来となるリン原子の対応を表す。

第4節

5'-T_{TP}G-3'を配列に含むオリゴヌクレオチドの合成

第4節で得られた 5'-T_{TP}G-3'二量体ホスホロアミダイトユニットを用いて、オリゴヌクレオチドの合成を行った。修飾二量体のアミダイトユニットを除く全ての試薬、および反応条件は ABI 社の推奨メソッドに従った。合成した配列を Table 3-1 に示す。

entry	sequence
ODN 3-1	5'-TTT _{TP} GTT-3'
ODN 3-2	5'-T _{TP} GTAACCAT _{TP} GAT _{TP} GT _{TP} GCT _{TP} GCTA-3'

Table 3-1 本節で合成した修飾オリゴヌクレオチドの配列。

はじめに、ODN3-1 の合成を行い、修飾二量体ホスホロアミダイトユニットのカップリング反応条件について検討した。活性化剤に 5-ethylthio-1*H*-tetrazole を用い、反応時間は 120 秒および 600 秒の2条件を検討した。その結果、いずれも配列の前後にある天然型の T と同程

度のカップリング収率を示した。そのため、修飾二量体ホスホロアミダイトユニットのカップリング反応時間は 120 秒で問題なく鎖伸長を行うことができると判断した。

つぎに、anti hsa-mir-15b 配列(5'-TGTAACCATGATGTGCTGCTA-3')に 5'-T_{TP}G-3'修飾を導入した配列 ODN3-2 を合成した。自動合成機で鎖伸長反応の後、5'末端の DMTr 基を保持したまま 28%アンモニア水、室温、1 h で固相からの切り出しを行い、固相を除いた後に 55 °C、16 h の条件での脱保護を行った。アンモニア水を減圧留去した後、LC-MS による分析を行った。その結果を Figure 3-7 に示す。

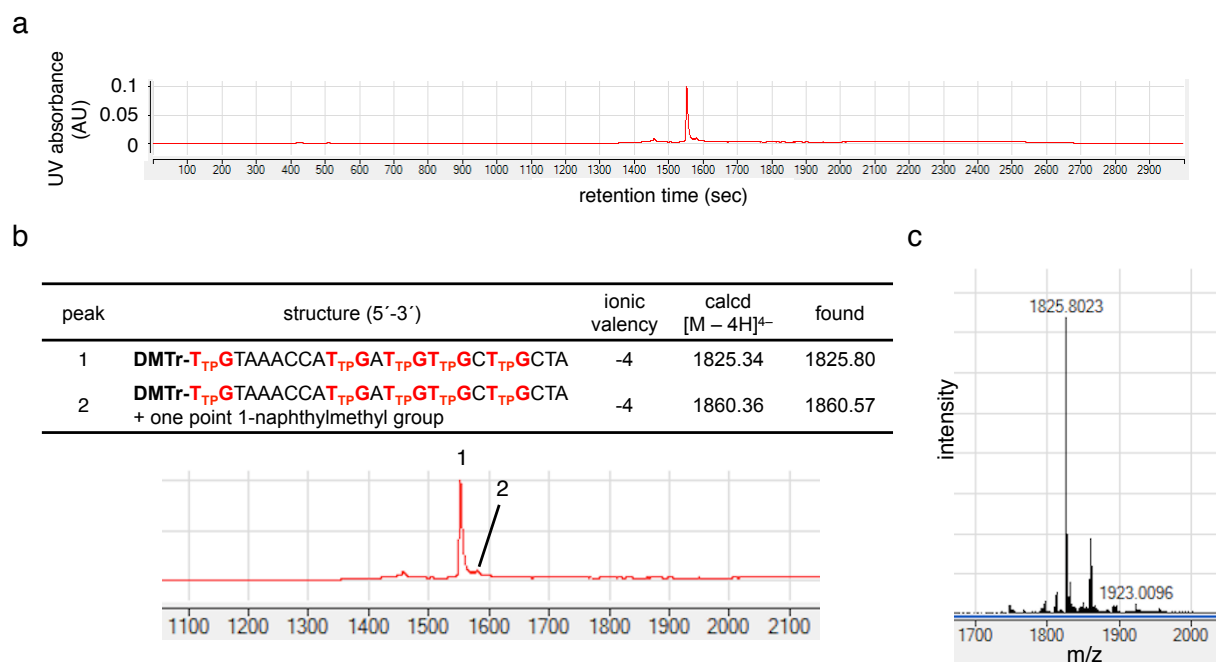


Figure 3-7 ODN3-2 の固相からの切り出し、脱保護後の LC-MS 分析結果。a)HPLC による分析結果。b)完全な脱保護体のピーク(peak1)および 1-ナフチルメチル基が 1 つ脱保護されていない脱保護不十分体(peak2)の質量分析の計算値と実測値。下部のチャートは a)の拡大図。c) peak1 における質量分析の結果。

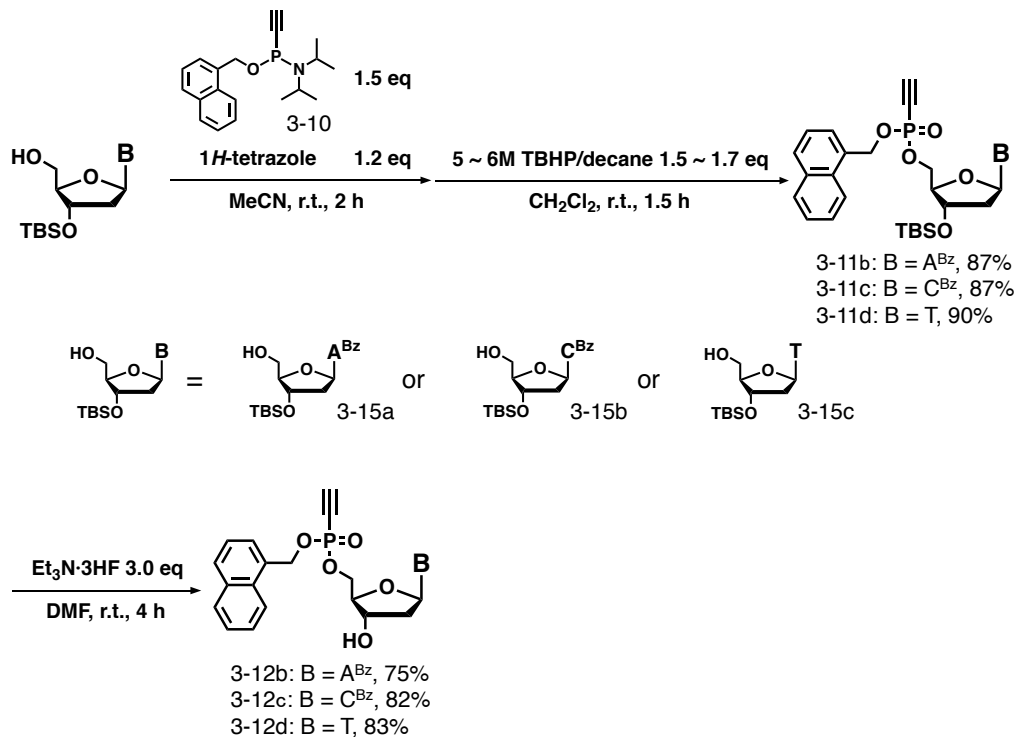
Figure 3-7a, b に示されるように、HPCL チャートには主生成物である peak1 と微量な副生成物である peak2 が主に観測されたこと、peak1 の質量分析結果が ODN3-2 の完全脱保護体と一致したことから、目的の構造を有するオリゴヌクレオチドが効率よく得られたことが分かった。また、peak2 の質量分析結果、1-ナフチルメチル基が 1 つ脱保護されていない脱保護不十分体であることが分かった。

以上の結果から、本節で用いた手法により目的のトリアゾリルホスホネート構造を有する修飾オリゴヌクレオチドの合成が可能であると判断し、さらに別の配列からなる二量体ホスホロアミダイトユニットの合成を行うこととした。

第5節

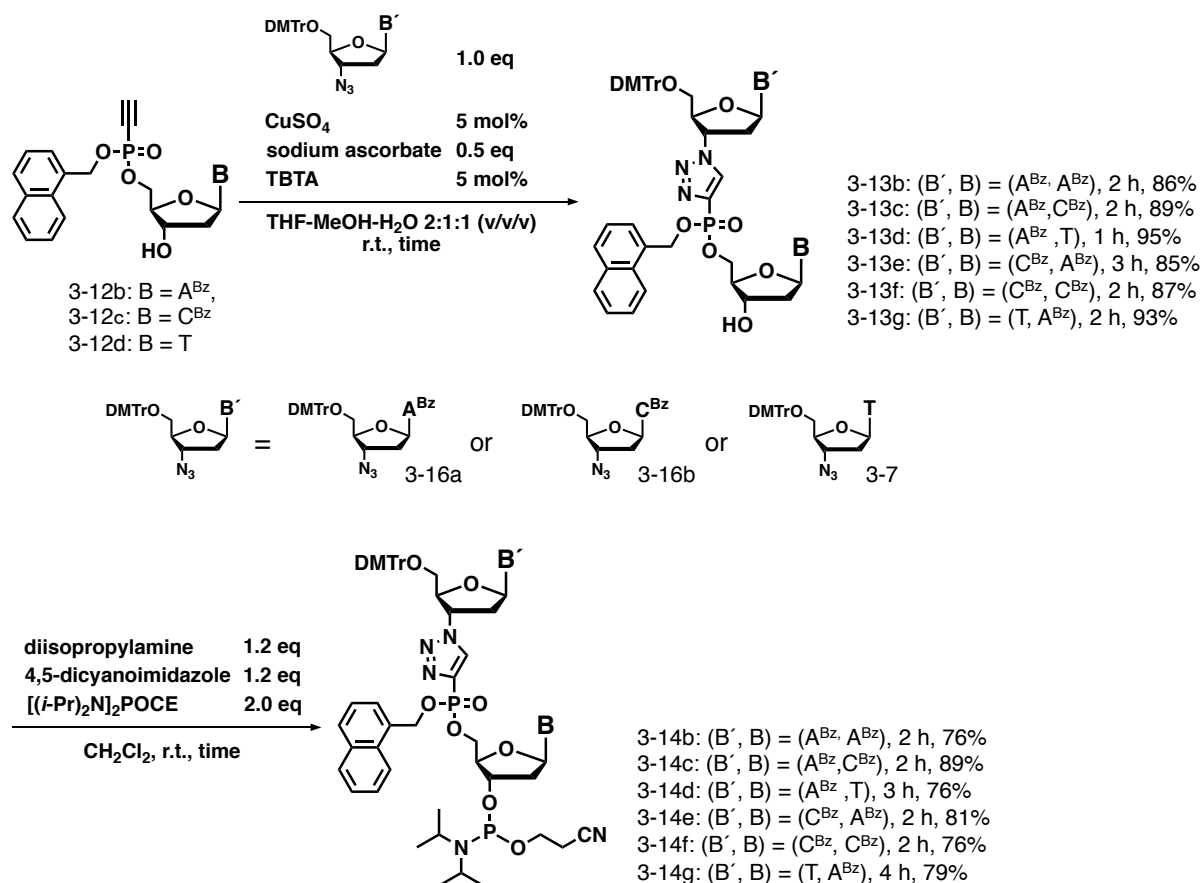
TPを含む様々な配列の二量体の合成

第4節の結果から、ナフチルメチル基を保護基とする二量体を用いることでトリアズリルホスホネート構造を含むオリゴヌクレオチドの合成が可能であると考え、様々な配列の二量体の合成を行った。



Scheme 3-5 1-ナフチルメチル基保護されたヌクレオシド 5'-エチニルホスホネート誘導体 **3-12b, c, d** の合成

はじめに、ヌクレオシド 5'-エチニルホスホネート誘導体 **3-12b, c, d** の合成法を Scheme 3-5 に示す。化合物 **3-12a** の合成法と同様に、エチニルホスフィノアミダイト誘導体 **3-10** を各デオキシヌクレオシド誘導体 **3-15a, b, c** の 5'位をエチニルホスフィネートエステル化し、TBHPを用いてリンを酸化することで、化合物 **3-11b, c, d** を 2 行程収率 87%、87%、90%で得た。つぎに、化合物 **3-11b, c, d** の合成法と同様に、3'-TBDMS 基を脱保護し、化合物 **3-12b, c, d** を 75%、82%、83%の収率で得た。



Scheme 3-6 1-ナフチルメチル基保護された各二量体ホスホロアミダイトユニット **3-14b~14g** の合成

つづいて、各二量体ホスホロアミダイトユニット **3-14b~14g** の合成法を Scheme 3-6 に示す。過去の報告に従って合成した各 3'-アジド-2',3'-デオキシヌクレオシド誘導体 **3-16a**³⁻¹³、**3-16b**³⁻¹³ または **3-7** とヌクレオシド 5'-エチニルホスホネート誘導体 **3-12b, c, d** を用いて CuAAC を行い、2 量体 **3-13b, c, d, e, f, g** をそれぞれ収率 86%、89%、95%、85%、87%、93% で得た。最後に、二量体 3'末端部水酸基のホスフィチル化を行い、DNA 自動合成に利用可能な 2 量体ホスホロアミダイトユニットを、**3-14b, c, d, e, f, g** をそれぞれ収率 76%、89%、76%、81%、76%、79% で得ることに成功した。

以上の結果から、第 3 節で開発した二量体の合成法は、多くの配列の二量体について適応可能であることが分かった。今後は、これらのアミダイトユニットを用いて様々な箇所に修飾を導入したオリゴヌクレオチドが合成可能になると考えられる。

第 6 節

総括

本章では、トリアゾリルホスホネート構造を有する修飾オリゴヌクレオチドを合成するために、7 種類の修飾二量体ホスホロアミダイトユニットを合成した。また、合成中間体のトリアゾリルホスホネート部位の保護基として 1-ナフチルメチル基が十分な安定性を示すことを見出した。5'- T_{TP}G -3'二量体のホスホロアミダイトユニットを用いてオリゴヌクレオチドの合成検討を行い、通常ホスホロアミダイト法による鎖伸長反応と、アンモニア水による 1-ナフチルメチル基の脱保護の進行を確認した。今後は、修飾オリゴヌクレオチドを数種類合成し、二重鎖安定性、核酸分解酵素への耐性、細胞取り込み能などについての研究が行われる予定である。

また、今回合成された修飾構造(Figure 3-2c)は長鎖 DNA 合成に応用できる可能性がある。近年、長鎖 DNA の合成法として CuAAC を用いたオリゴヌクレオチド同士のライゲーションが注目されている。³⁻¹⁴ すなわち、アジド基を有するオリゴヌクレオチドと末端アルキンを有するオリゴヌクレオチドを用いてより長いオリゴヌクレオチドを合成する技術である (Figure 3-88)。このようなトリアゾールを含む修飾バックボーンの開発において、転写や複製時にポリメラーゼによって修飾オリゴヌクレオチドの配列が正確に認識されるかどうかは非常に重要である。³⁻¹⁵ しかしながら、トリアゾールとリン酸をヌクレオシド間に両方有する修飾核酸は合成例がないため、今回設計した修飾構造(Figure 3-2c)がオリゴマー同士のライゲーションに応用可能か、また転写や複製においてどのような性質を示すのか、今後のさらなる研究が望まれる。

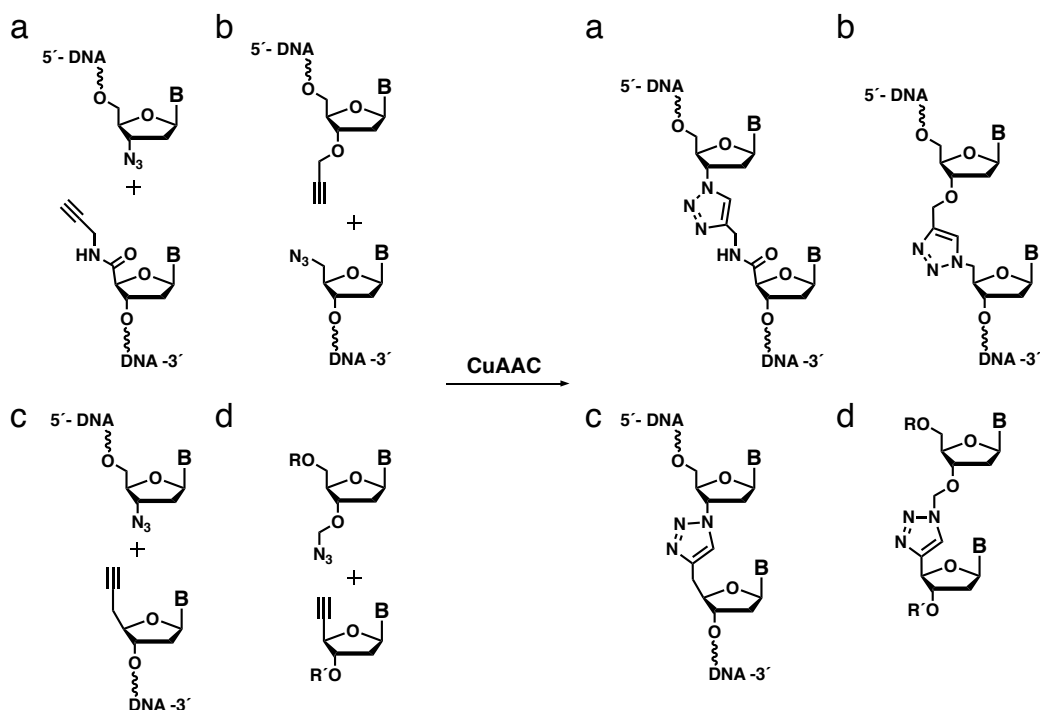


Figure 3-8 CuAAC による DNA 間の結合形成の例。

第 3 章の引用文献

- 3-1 (a) Boisguérin, P.; Deshayes, S.; Gait, M. J.; Donovan, L. O.; Godfrey, C.; Betts, C. A.; Wood, M. J. A.; Lebleu, B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 87, 52–67. (b) Guidotti, G.; Brambilla, L.; Rossi, D. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, 38, 406–424.
- 3-2 Prakash, T. P.; Graham, M. J.; Yu, J.; Carty, R.; Low, A.; Chappell, A.; Schmidt, K.; Zhao, C.; Aghajan, M.; Murray, H. F.; Riney, S.; Booten, L.; Murray, S. F.; Gaus, H.; Crosby, J.; Lima, W. F.; Guo, S.; Monia, P.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, 8796–8807.
- 3-3 (a) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064. (b) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599. (c) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, 340, 457–460.
- 3-4 (a) Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639–3642. (b) Yamada, T.; Peng, C. G.; Matsuda, S.; Addepalli, H.; Jayaprakash, K. N.; Alam, M. R.; Mills, K.; Maier, M. A.; Charisse, K.; Sekine, M.; Manoharan, M.; Rajeev, K. G. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 1198–1211.
- 3-5 Krishna, H.; Caruthers, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 11618–11631.
- 3-6 Caruthers, M. H. *Science* **1985**, 230, 281–285.
- 3-7 Iwai, S.; Shimizu, M.; Kamiya, H.; Ohtsuka, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7642–7643.

- 3-8 Hayakawa, Y.; Uchiyama, M.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4191–4194.
- 3-9 Czernecki, S.; Valéry, J.-M. *Synthesis* **1991**, 3, 239–240.
- 3-10 Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2853–2855.
- 3-11 Mutisya, D.; Selvam, C.; Kennedy, S. D.; Rozners, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 3420–3422.
- 3-12 Monfregola, L.; Caruthers, M. H. unpublished data.
- 3-13 Eisenhuth, R.; Richert, C. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 26–37.
- 3-14 For Figure 3-8a, b, c, El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1258–1267.; for Figure 3-8b, (a)Kukwikila, M.; Gale, N.; El-sagheer, A. H.; Brown, T.; Tavassoli, A. *Nat. Chem.* **2017**, 9, 1089–1098. (b)Birts, C. N.; Sanzone, A. P.; El-Sagheer, A. H.; Blaydes, J. P.; Brown, T.; Tavassoli, A. For Figure 3-8d, Varizhuk, A. M.; Kaluzhny, D. N.; Novikov, R. A.; Chizhov, A. O.; Smirnov, I. P.; Chuvilin, A. N.; Tatarinova, O. N.; Fisunov, G. Y.; Pozmogova, G. E.; Florentiev, V. L. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 5964–5969.
- 3-15 Shivalingam, A.; Tyburn, A. E. S.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 1575–1583.

総括

DNA は生体内で二重鎖、三重鎖、四重鎖などの高次構造を形成することで生体内での機能を発現する。そのため、損傷塩基や修飾核酸の高次構造安定性、およびそれらの合成法に関する研究は、DNA の損傷が DNA 自体の機能にもたらす変化を知るだけでなく、核酸医薬に対する適切な化学修飾構造を知る上で非常に重要である。本博士論文では、修飾核酸の合成法とその高次構造に着目し研究を行った。

第1章では、損傷グアニン塩基のモデル基質として 2-*N*-ヘテロアリールグアニン(G^{HA})を用い、塩基部のコンホメーションに着目して二重鎖、三重鎖および四重鎖の安定性に与える影響を調べた。DFT 計算の結果からは、ヘテロアリール環のわずかな構造の違いによって open-type コンホメーションの安定性が大きく異なることが示された。また、 G^{HA} の open-type コンホメーションが安定であるほど G^{HA} を含む二重鎖は安定であることがわかった。さらに、 G^{HA} を含む四重鎖形成配列の高次構造安定性も二重鎖の場合と同様の傾向を示し、open-type コンホメーションの安定性が四重鎖構造の安定性における重要な要素であることが示された。またこれらの結果から、二重鎖を不安定化するグアニン 2 位アミノ基損傷は四重鎖構造も不安定化することが示唆された。また、 G^{HA} を含むパラレル型三重鎖は未修飾のものより不安定であることが分かった。

第2章では、アンチパラレル型三重鎖形成において、 α -ヌクレオシドを含む TFO の性質を評価した。TFO 中の α -ヌクレオシドと標的塩基対が三塩基対を形成する際の安定な組み合わせを網羅的に調べた結果、これまでに報告例のない安定な三塩基対の組み合わせを見出した。また、4つの三塩基対を含む三重鎖構造の分子動力学計算を行った結果、 α -ヌクレオシドが第一鎖の塩基と水素結合をする可能性が示され、また三重鎖の安定性は三塩基対の構造だけでなくバックボーンの歪みなども考慮するべきであることが示唆された。

第3章では、二重鎖を形成する核酸医薬として、細胞膜透過能が期待されるトリアゾリルホスホネート修飾オリゴヌクレオチドの合成法を開発した。修飾部位を含む二量体ホスホロアミダイトユニットの合成において、トリアゾリルホスホネート部位の有用な保護基として 1-ナフチルメチル基を見出した。またこの保護基は修飾オリゴヌクレオチドの合成にも適用

可能であることを示し、核酸医薬への応用に向けた実験などへの道がひらかれた。

これらの研究によって得られた修飾核酸の合成法、および高次構造形成への影響の知見が、損傷塩基の影響予測や修飾核酸の設計に役立つことが期待される。

実験編(第 1 章および第 2 章における一般的な事項)

第 1 章および第 2 章の実験で用いた試薬、機器は以下の通りである。

有機合成試薬、有機溶媒

和光純薬工業、東京化成、関東化学、Sigma-Aldrich より購入した。

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC)

Kieselgel 60 F-254 (Merck) を用いた。展開溶媒には、ヘキサン:ジクロロメタン系、ジクロロメタン:メタノール系、ヘキサン:酢酸エチル系などを用いた。化合物の検出には、UV (254 nm)、あるいは発色試薬としてヨウ素、5%硫酸メタノール溶液、アニスアルデヒド溶液、ニンヒドリン溶液、モリブデン酸アンモニウムセリウム溶液などを用いた。

シリカゲルクロマトグラフィー

Wakogel C-200、Wakogel C-300、Silica Gel N60 (関東化学)、NH-DM1020 CHROMATOREX(Fuji Silysia)を使用した。溶媒溶出には、ヘキサン:ジクロロメタン系、ジクロロメタン:メタノール系、ヘキサン:酢酸エチル系などを用い、必要であれば pyridine あるいは Et₃N を添加した。

サイズ排除クロマトグラフィー

LC-908 (日本分析工業) にゲル濾過カラム (JAIGEL GS-310) をつなぎ用いた。容出溶媒には、ジクロロメタン、アセトニトリルなどを用いた。

¹H-NMR スペクトル

Varian AS500 (500 MHz) または Bruker biospin・AVANCE III HD500 型(500 MHz)を用いて測定した。有機溶媒中では、測定溶媒に由来するピークを内部標準として用いた。

¹³C-NMR スペクトル

Varian AS500 (126 MHz) または Bruker biospin・AVANCE III HD500 型(126 MHz)を用いて測定した。有機溶媒中では、テトラメチルシラン (TMS) あるいは測定溶媒に由来するピークを内部標準として用いた。

³¹P-NMR スペクトル

Varian AS500 (202 MHz) または Bruker biospin・AVANCE III HD500 型(202 MHz)を

用いて測定した。Varian AS500 を用いたときは、85%正リン酸を外部標準とした。

ESI-TOF-MS 分析計

東京工業大学技術部分析支援センター（すずかけ台）に依頼して測定した。測定には micrOTOFII (Bruker)を用いた。

MALDI-TOF-MS 分析計

東京工業大学技術部分析支援センター（すずかけ台）に依頼して測定した。測定には AXIMA-CFRPlus (SHIMADZU)または UltrafleXtreme(Bruker)を用いた。

DNA/RNA 自動合成機、DNA オリゴマー合成

ジーンデザイン社の nS8-II を使用した。天然型ホスホロアミダイトユニットおよびその他の必要な試薬は Glen Reserch Inc.より購入し、推奨される手法に従って用いた。本研究において合成した修飾体ホスホロアミダイトユニットは無水アセトニトリルまたは無水ジクロロメタン（0.1 M）に溶解し、DNA/RNA 自動合成機に適用した。修飾体ホスホロアミダイトユニットを用いた鎖伸長反応のみ時間を 300 秒に変更し、それ以外の反応はすべてジーンデザイン社の推奨する方法により行った。合成した全てのオリゴヌクレオチドにおいて、脱保護、切り出しは 28%アンモニア水、55 °C、16 h の条件で行い、遠心エバポレーターを用いてアンモニアを除去した。合成した DNA オリゴマーの精製法については別途各章の実験項で詳細に述べる。天然型核酸のみからなる DNA オリゴマーは IDT 社から購入した。

UV 吸収スペクトル

Nano Drop ND-1000 および UV-1800(SHIMADZU)で測定した。

ヌクレオシドの pK_a の測定、算出

PIP ヌクレオシド誘導体(化合物 1-9c)を例に説明する。はじめに 1-9c を DMSO に溶解させ、イオン交換水で希釈することで H₂O-DMSO (92:2, v/v)溶液(50 μ M)とした。これと pH を調製した buffer と希釈することで、pH が 2, 3, 4, ..., 12 に調製された 1-9c の 25 μ M 溶液 (pH 2~7: 200 mM クエン酸-NaOH buffer、1% DMSO、pH 8~12: 200 mM グリシン-NaOH buffer、1% DMSO) を作成した。これを用いて UV スペクトル測定を行い、吸収スペクトルに大きな変化があった pH 3.0~7.0 の領域に着目して、再度 pH 3.0, 3.3, 3.6, ..., 6.9 と 0.3 刻みの測定を行った(200 mM クエン酸-NaOH buffer、1% DMSO)。ここで、化合物 1-9c の酸性条件側での最大吸収波長および塩基性条件側での最大吸収波長が 268 nm および 278 nm であったので(Figure 1-13)、この 2 つの吸光度比 Abs₂₆₈/Abs₂₇₈ の測定データを pH の関数(1)にフィッテ

イングし、 pK_a を算出した(Figure 1-11)。

$$\frac{Abs_{268}}{Abs_{278}} = \frac{10^{-pH} + \frac{\epsilon'_{268}}{\epsilon_{268}} 10^{-pK_a}}{\frac{\epsilon_{278}}{\epsilon_{268}} 10^{-pH} + \frac{\epsilon'_{278}}{\epsilon_{268}} 10^{-pK_a}} \quad (1)$$

ここで、 ϵ_{268} および ϵ_{272} は脱プロトン化されていない 1-9c の 268 nm および 278nm におけるモル吸光度係数、 ϵ'_{268} および ϵ'_{272} は脱プロトン化された 1-9c の 268 nm および 278nm におけるモル吸光度係数を表す。単一波長の吸光度を用いた場合、値の誤差が非常に大きくなった。

デオキシグアノシン(G)、化合物 1-9a(G^{Py})、1-5(G^{Pym})および 1-9b(G^{Pyra})については、pH 1 刻みの UV 測定は化合物 1-9c と全く同様に行った。pH 0.3 刻みの UV 測定では、測定条件を pH 7.2, 7.5, 7.8, …, 11.7 として、それぞれの 25 μ M ヌクレオシド溶液(200 mM グリシン-NaOH buffer、1% DMSO)を測定に用いた。(酸性条件側での最大吸収波長/塩基性条件側での最大吸収波長)の組み合わせはそれぞれ G: (254 nm/265 nm)、G^{Py}: (264 nm/275 nm)、G^{Pym}: (266 nm/275 nm)、G^{Pyra}: (266 nm/274 nm)であった。これらの波長を用いて、化合物 1-9c と同様に各 pH ごとの吸光度の比を算出し、カーブフィッティングを行い pK_a を算出した。

全ての吸光度測定は 3 回行い、その平均値と標準偏差を示した。

二重鎖/三重鎖/四重鎖融解温度(T_m 値)の測定

各 DNA オリゴマーのモル吸光度係数は、Oligo Analyzer 3.1 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>)を用い、nearest-neighbor 法を用いて計算した。第 1 章では G^{Py}, G^{Pym}, G^{Pyra} and PIP を未修飾の G とみなして計算した。第 2 章では α A、 α G、 α C、 α T をそれぞれ天然型(β -ヌクレオシド)の A、G、C、T とみなして計算した。得られた値をもとに、DNA オリゴマーの濃度を決定し、測定試料を調製した。

Pharma Spec UV-1700(島津製作所)を用いて T_m 値の測定をおこなった。まず試料を 95 $^{\circ}$ C に 20 分間保ち、1.0 $^{\circ}$ C/ min (四重鎖の場合は 0.5 $^{\circ}$ C/ min)で温度を 5 $^{\circ}$ C まで変化させた後、5 分間 5 $^{\circ}$ C を保ち、1.0 $^{\circ}$ C/ min (四重鎖の場合は 0.5 $^{\circ}$ C/ min)で 95 $^{\circ}$ C まで昇温させ、1.0 $^{\circ}$ C ごとに 260 nm の吸光度(四重鎖の場合は 295 nm)を測定した。校正波長には 350 nm または 500 nm を用いた。260 nm の吸光度(四重鎖の場合は 295 nm)を温度に対してプロットし二重鎖融解曲線とした。Stavitzky-Golay 法 (25 point) を用いてスムージングした後、微分することにより二重鎖/三重鎖/四重鎖融解温度(T_m 値)を求めた。各測定は 3 回行い、平均値と標準偏差を算出して示した。

量子化学計算

全ての量子化学計算は Gaussian09 を用いて密度汎関数法により行った。計算レベルは、

構造最適化およびエネルギー計算のどちらも ω B97X-D/6-31⁺Gd を用いた。作画には pymol 1.7.6.0.を用いた。

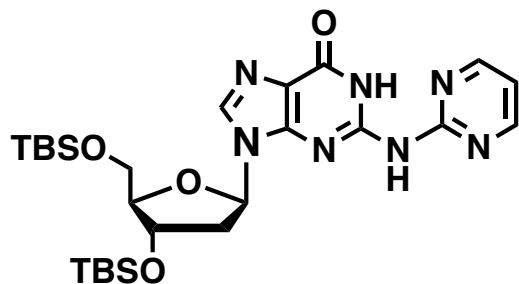
分子動力学計算

全ての分子動力学計算には AMBER16 (AMBER 16 Update 1, AMBER Tools 16 Update 1) を用いた。また、データ処理には Cpptraj ver 17.00、作画には pymol 1.7.6.0.を用いた。

実験編(第 1 章)

新規化合物、あるいは従来法とは異なる方法で合成した化合物について、その合成法を示す。

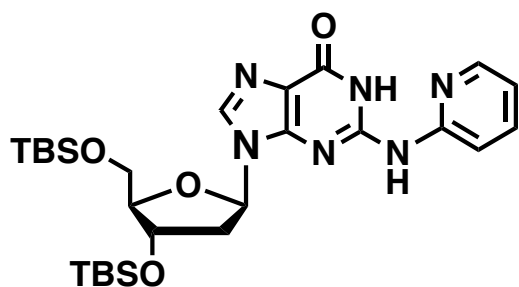
化合物 1-4



3',5'-O-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-*N*-(pyrimidin-2-yl)-2'-deoxyguanosine.

Compound **1-1** (250 mg, 0.5 mmol), Cs₂CO₃ (815 mg, 2.5 mmol), (±)-BINAP (31 mg, 50 μmol), Pd(OAc)₂ (11 mg, 50 μmol) were mixed in anhydrous toluene (2.5 mL) under argon atmosphere. To the mixture was added 2-chloropyrimidine (67 μL, 0.75 mmol). The resulting mixture was heated under reflux and stirred for 38 h. The mixture was cooled to room temperature, poured into CH₂Cl₂ and washed twice with H₂O and sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (60N) with CH₂Cl₂-MeOH to afford compound **1-4** (132 mg, 46%) as yellow solid. ¹H NMR profile was identical to that reported by Ito¹⁻⁵.

化合物 1-8a

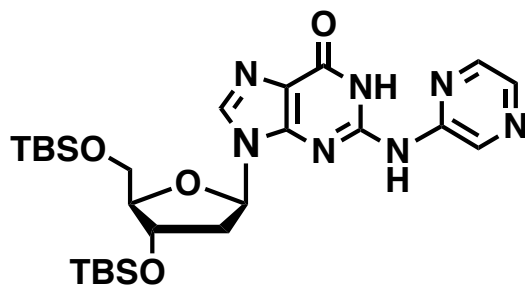


3',5'-O-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)- 2-*N*-(pyridin-2-yl)-2'-deoxyguanosine.

Compound **1-1** (250 mg, 0.5 mmol), Cs₂CO₃ (815 mg, 2.5 mmol), (±)-BINAP (31 mg, 50 μmol), Pd(OAc)₂ (11 mg, 50 μmol) were mixed in anhydrous toluene (2.5 mL) under argon atmosphere. To the mixture was added 2-chloropyridine (70 μL, 0.75 mmol). The resulting mixture was heated under reflux and stirred for 38 h. The mixture was cooled to room temperature, poured into CH₂Cl₂ and washed with H₂O twice and sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and

concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (NH) with CH₂Cl₂-MeOH to afford compound **1-8a** (183 mg, 64%) as pale yellow solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.05–0.13 (m, 12H, Si-CH₃), 0.88–0.96 (m, 18H, Si-C-CH₃), 2.31–2.40 (m, 1H, 2H'), 2.45–2.54 (m, 1H, 2H''), 3.73–3.79 (m, 2H, H5' and H5''), 3.96–4.01 (m, 1H, H4'), 4.56–4.61 (m, 1H, H3'), 6.26 (t, 1H, *J* = 6.5, H1'), 6.73–6.75 (m, 1H, Ar-H), 6.99–7.04 (m, 1H, Ar-H), 7.39–7.44 (m, 1H, N-H), 7.66–7.72 (m, 1H, Ar-H), 7.90 (s, 1H, H8), 8.28–8.32 (m, 1H, , Ar-H), 13.60 (s, 1H, N-H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: -5.4, -5.2, -4.6, -4.6, 18.1, 18.6, 25.9, 26.1, 41.3, 63.0, 72.0, 83.4, 87.9, 111.9, 118.1, 120.0, 136.0, 139.1, 146.6, 149.3, 149.7, 152.6, 156.7; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₇H₄₄N₆NaO₄Si₂ [M + Na]⁺: 595.2855, found 595.2848.

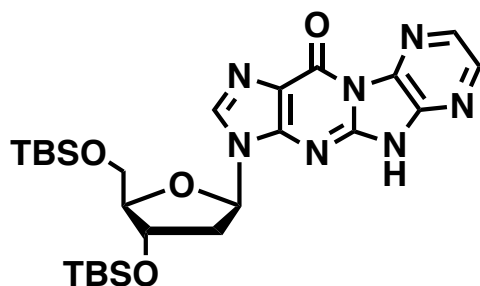
化合物 **1-8b**



3',5'-O-bis-(tert-butyldimethylsilyl)-2-N-(pyrazin-2-yl)-2'-deoxyguanosine.

Compound **1-1** (1.0 g, 2.0 mmol) was rendered anhydrous by coevaporation five times with dry pyridine, and then with dry toluene five times, and the residue was dissolved in dry toluene (20 mL). To the mixture was added Cs₂CO₃ (3.3 g, 10 mmol), XantPhos (234 mg, 400 μmol), Pd(OAc)₂ (45 mg, 200 μmol), triethylamine (280 μL, 2.0 mmol) and 2-chloropyrazine (214 μL, 2.4 mmol). The resulting mixture was heated under reflux and stirred for 19 h. The mixture was cooled to room temperature and dissolved with ethyl acetate (40 mL), then filtered on celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (60N) with CH₂Cl₂-MeOH to afford compound **1-8b** (800 mg, 69%) as dark green solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -0.04–0.13 (m, 12H, Si-CH₃), 0.80–0.91 (m, 18H, Si-C-CH₃), 2.29–2.37 (m, 1H, H2'), 2.67–2.76 (m, 1H, H2''), 3.60–3.76 (m, 2H, H5' and H5''), 3.81–3.89 (m, 1H, H4'), 4.48–4.55 (m, 1H, H3'), 6.23 (t, 1H, *J* = 6.5, H1'), 8.11 (s, 1H, Ar-H), 8.25–8.31 (m, 1H, Ar-H), 8.33–8.38 (m, 1H, Ar-H), 8.70–8.76 (m, 1H, Ar-H), 10.91 (s, 1H, N-H), 12.34 (s, 1H, N-H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: -5.4, -5.3, -4.7, -4.6, 18.1, 18.5, 25.8, 26.1, 41.5, 62.7, 71.6, 83.7, 87.8, 119.8, 136.5, 136.7, 137.9, 140.1, 149.0, 149.1, 149.4, 157.2; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₆H₄₃N₇NaO₄Si₂ [M + Na]⁺: 596.2807, found 596.2804.

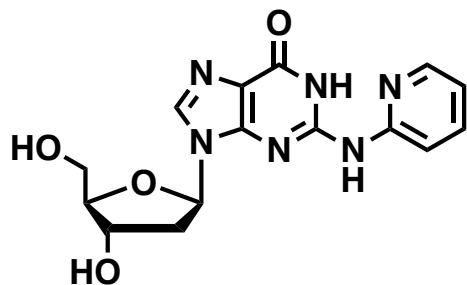
化合物 1-8c



3-(2-deoxy-3,5-*O*-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-β-*D*-ribofuranosyl)-3,5-dihydro-11*H*-pyrido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]purin-11-one.

Compound **1-1** (500 mg, 1.0 mmol) was rendered anhydrous by coevaporation five times with dry pyridine, and then with dry toluene five times, and the residue was dissolved in dry toluene (10 mL). To the mixture was added Cs₂CO₃ (1.6 g, 5.0 mmol), XantPhos (120 mg, 200 μmol), Pd(OAc)₂ (23 mg, 200 μmol), triethylamine (140 μL, 1.0 mmol) and 2,3-dichloropyrazine (126 μL, 1.2 mmol). The resulting mixture was heated under reflux and stirred for 8 h. The mixture was cooled to room temperature and dissolved with ethyl acetate (40 mL), then filtered on celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (NH) with CH₂Cl₂-MeOH to afford compound **1-8c** (576 mg, 83%) as orange solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -0.05–0.18 (m, 12H, Si-CH₃), 0.75–0.98 (m, 18H, Si-C-CH₃), 2.23–2.32 (m, 1H, *H*₂'), 2.69–2.79 (m, 1H, *H*₂'), 3.65–3.71 (m, 1H, *H*₅'), 3.75–3.81 (m, 1H, *H*₅'), 3.83–3.88 (m, 1H, *H*₄'), 4.54–4.58 (m, 1H, *H*₃'), 6.31 (t, 1H, *J* = 6.8, *H*₁'), 7.88 (d, 1H, *J* = 6.8, Ar-*H*), 7.92 (s, 1H, Ar-*H*), 8.16 (d, 1H, *J* = 6.8, Ar-*H*); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -5.5, -5.4, -4.9, -4.7, 17.8, 18.0, 25.7, 25.8, 62.9, 72.4, 82.3, 86.9, 115.2, 129.7, 134.9, 138.4, 138.5, 151.2, 151.7, 154.7, 157.3; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₆H₄₁N₇NaO₄Si₂ [M + Na]⁺: 594.2651, found 594.2638.

化合物 1-9a

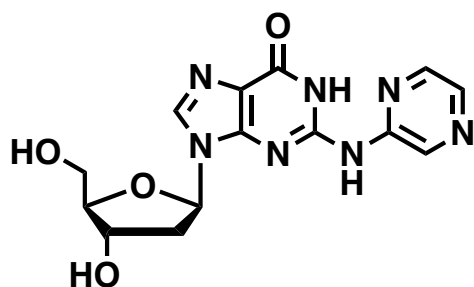


2-*N*-(pyridin-2-yl)-2'-deoxyguanosine.

Compound **1-8a** (973 mg, 1.7 mmol) was dissolved in dry THF (18 mL). To the solution was added triethylamine (1.1 mL, 8.1 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (602 μL, 4.1 mmol). The

resulting mixture was stirred at room temperature. After 14 h, ethoxytrimethylsilane (3.0 mL, 19 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue was precipitated in hexane-ethyl acetate (1:1, v/v) to afford compound **1-9a** (523 mg, 90%) as white powder. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.23–2.32 (m, 1H, *H2*'), 2.53–2.61 (m, 1H, *H2*''), 3.47–3.61 (m, 2H, *H5*' and *H5*''), 3.79–3.87 (m, 1H, *H4*'), 4.33–4.40 (m, 1H, *H3*'), 4.93–5.01 (s, 1H, *OH5*'), 5.30–5.36 (s, 1H, *OH3*'), 6.22 (t, 1H, *J* = 6.5, *H1*'), 7.06–7.12 (m, 1H, *Ar-H*), 7.21–7.27 (m, 1H, *Ar-H*), 7.79–7.88 (m, 1H, *Ar-H*), 8.14 (s, 1H, *H8*), 8.32–8.38 (m, 1H, *Ar-H*), 10.80 (s, 1H, *N-H*), 13.38 (s, 1H, *N-H*); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 40.3, 62.0, 71.0, 83.2, 88.1, 113.1, 118.2, 118.9, 136.9, 139.7, 146.6, 150.0, 150.2, 153.7, 156.1; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₅H₁₆N₆NaO₄ [*M* + Na]⁺: 367.1125, found 367.1124.

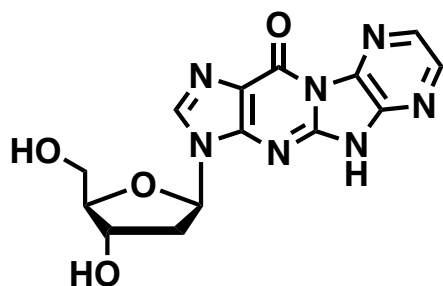
化合物 **1-9b**



2-*N*-(pyrazin-2-yl)-2'-deoxyguanosine.

Compound **1-8b** (1.5 g, 2.6 mmol) was dissolved in dry THF (30 mL). To the solution was added triethylamine (1.7 mL, 12 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (950 μL, 6.2 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature. After 10 h, ethoxytrimethylsilane (5 mL, 32 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 11 h. The mixture was concentrated under reduced pressure, and the resulting powder was filtered, washed with CH₂Cl₂ to afford compound **1-9b** (885 mg, quant.) as white powder. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.25–2.33 (m, 1H, *H2*'), 2.55–2.62 (m, 1H, *H2*''), 3.47–3.61 (m, 2H, *H5*' and *H5*''), 3.80–3.87 (m, 1H, *H4*'), 4.34–4.40 (m, 1H, *H3*'), 4.96 (t, 1H, *J* = 5.0, *OH5*'), 5.34 (d, 1H, *J* = 3.1, *OH3*'), 6.24 (t, 1H, *J* = 6.8, *H1*'), 8.17 (s, 1H, *Ar-H*), 8.27–8.33 (m, 1H, *Ar-H*), 8.35–8.41 (m, 1H, *Ar-H*), 8.75–8.81 (m, 1H, *Ar-H*), 10.89 (s, 1H, *N-H*), 12.30 (s, 1H, *N-H*); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 40.9, 62.0, 71.0, 83.3, 88.2, 119.3, 136.4, 137.2, 138.0, 140.9, 149.3, 149.6, 149.8, 156.0; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₄H₁₅N₇NaO₄ [*M* + Na]⁺: 368.1078, found 368.1078.

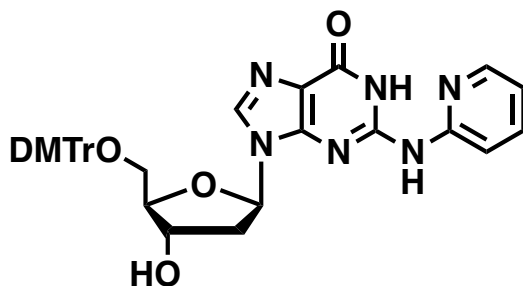
化合物 1-9c



3-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-3,5-dihydro-11H-pyrido[2',3':4,5]imidazo[1,2-a]purin-11-one

Compound **1-8c** (570 mg, 1.0 mmol) was dissolved in dry THF (9.6 mL). To the solution was added triethylamine (313 μ L, 2.2 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (732 μ L, 4.5 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature. After 20 h, ethoxytrimethylsilane (4.7 mL, 30 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated under reduced pressure, and the resulting powder was filtered, washed with MeOH to afford compound **1-9c** (160 mg, 47%) as yellow powder. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.16–2.27 (m, 1H, $H2'$), 2.65–2.75 (m, 1H, $H2''$), 3.50–3.59 (m, 1H, $H5'$), 3.59–3.68 (m, 1H, $H5''$), 3.84–3.92 (m, 1H, $H4'$), 4.38–4.43 (m, 1H, $H3'$), 5.26–5.34 (m, 1H, $OH3'$), 5.35–5.43 (m, 1H, $OH5'$), 6.26–6.35 (m, 1H, $H1'$), 7.84–7.19 (m, 1H, Ar-H), 7.91–7.98 (m, 1H, Ar-H), 8.13–8.21 (m, 1H, Ar-H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 62.6, 71.6, 84.0, 88.3, 116.0, 130.2, 136.1, 138.9, 151.4, 152.1, 155.1, 157.6; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_7\text{O}_4$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 342.0956, found 342.0949.

化合物 1-10a

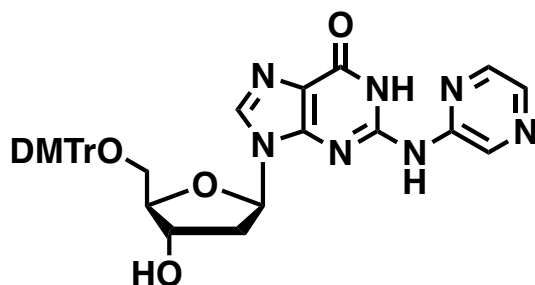


5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-N-(pyridin-2-yl)-2'-deoxyguanosine.

Compound **1-9a** (344 mg, 1.0 mmol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine four times. The residue was dissolved in dry DMF (10 mL) and dry pyridine (600 μ L). To the solution was added 4,4'-dimethoxytrityl chloride (416 mg, 1.2 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 6 h. The reaction mixture was quenched with MeOH, then poured to CH_2Cl_2 . The solution was washed with K_2CO_3 and sat. NaCl. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel

chromatography (60N) with CH₂Cl₂-MeOH to afford compound **1-10a** (473 mg, 73%) as white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.30–2.38 (m, 1H, *H*2'), 2.70–2.78 (m, 1H, *H*2''), 3.09–3.21 (m, 2H, *H*5' and *H*5''), 3.65–3.72 (m, 6H, OCH₃), 3.92–3.98 (m, 1H, *H*4'), 4.37–4.44 (m, 1H, *H*3'), 5.33–5.39 (m, 1H, OH3'), 6.26 (t, 1H, *J* = 6.2, *H*1'), 6.75–6.84 (m, 4H, Ar-*H*), 7.06–7.11 (m, 1H, Ar-*H*), 7.14–7.34 (m, 10H, Ar-*H*), 7.80–7.85 (m, 1H, Ar-*H*), 8.01 (s, 1H, Ar-*H*), 8.33–8.37 (m, 1H, Ar-*H*), 10.78 (s, 1H, N-*H*), 13.34 (s, 1H, N-*H*); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 39.4, 55.4, 55.4, 64.6, 70.9, 83.2, 85.9, 86.3, 113.1, 113.5, 113.5, 118.2, 119.3, 127.1, 128.1, 128.2, 130.1, 130.2, 135.9, 136.0, 136.9, 139.6, 145.3, 146.7, 150.1, 150.1, 153.7, 156.1, 158.4, 158.5; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₆H₃₄N₆NaO₆ [M + Na]⁺: 669.2432, found 669.2430.

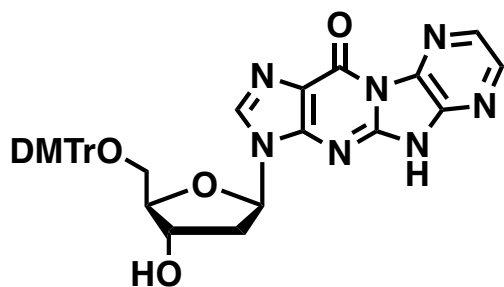
化合物 **1-10b**



5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-N-(pyrazin-2-yl)-2'-deoxyguanosine.

Compound **1-9b** (345 mg, 1.0 mmol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine four times. The residue was dissolved in dry DMF (10 mL) and dry pyridine (600 μL). To the solution was added 4,4'-dimethoxytrityl chloride (417 mg, 1.2 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h. The reaction mixture was quenched with MeOH, then poured to CH₂Cl₂. The solution was washed with K₂CO₃ and sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (60N) with CH₂Cl₂-MeOH to afford compound **1-10b** (506 mg, 78%) as white solid. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.29–2.39 (m, 1H, *H*2'), 2.69–2.81 (m, 1H, *H*2''), 3.06–3.22 (m, 2H, *H*5' and *H*5''), 3.60–3.73 (m, 6H, OCH₃), 3.90–4.00 (m, 1H, *H*4'), 4.32–4.42 (m, 1H, *H*3'), 5.29–5.44 (m, 1H, OH3'), 6.28 (t, 1H, *J* = 6.3, *H*1'), 6.70–6.84 (m, 4H, Ar-*H*), 7.10–7.36 (m, 9H, Ar-*H*), 8.03 (s, 1H, Ar-*H*), 8.28 (s, 1H, Ar-*H*), 8.36 (s, 1H, Ar-*H*), 8.81 (s, 1H, Ar-*H*), 10.84 (s, 1H, N-*H*), 12.28 (s, 1H, N-*H*); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55.4, 55.4, 64.6, 70.9, 83.5, 85.9, 86.4, 113.5, 113.5, 119.7, 127.0, 128.1, 128.2, 130.1, 130.2, 135.9, 136.0, 136.4, 137.3, 138.0, 141.0, 145.3, 149.3, 149.7, 149.8, 158.4, 158.4; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₅H₃₃N₇NaO₆ [M + Na]⁺: 670.2385, found 670.2388.

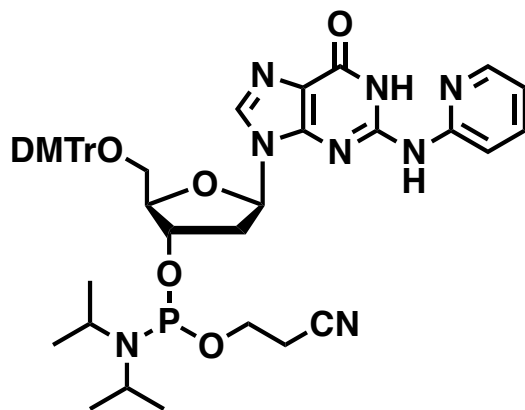
化合物 1-10c



3-(2-deoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-*D*-ribofuranosyl)-3,5-dihydro-11*H*-pyrido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]purin-11-one.

Compound **1-9c** (150 mg, 440 μmol) was rendered anhydrous by coevaporation five times with dry pyridine. The residue was dissolved in dry pyridine (4.4 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 6 h. The reaction mixture was quenched with MeOH, then poured to CH₂Cl₂. The solution was washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to give yellow precipitate. The precipitate was filtered, washed with CH₂Cl₂ and dried *in vacuo* to give compound **1-10c** (157 mg, 56 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.32–2.42 (m, 1H, *H*2'), 2.70–2.80 (m, 1H, *H*2''), 3.10–3.17 (m, 1H, *H*5'), 3.22–3.29 (m, 1H, *H*5''), 3.61–3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.67–3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.95–4.04 (m, 1H, *H*4'), 4.36–4.46 (m, 1H, *H*3'), 5.41 (d, 1H, *J* = 4.0, OH3'), 6.35 (t, 1H, *J* = 6.3, *H*1'), 6.76 (d, 2H, *J* = 8.8, Ar-*H*), 6.81 (d, 2H, *J* = 8.8, Ar-*H*), 7.11–7.27 (m, 7H, Ar-*H*), 7.33 (d, 2H, *J* = 8.8, Ar-*H*), 8.11 (s, 1H, Ar-*H*), 8.32 (d, 1H, *J* = 3.0, Ar-*H*), 8.37 (d, 1H, *J* = 3.0, Ar-*H*), 13.6 (br s, 1H, N-*H*); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55.0, 55.0, 64.2, 70.6, 83.1, 85.5, 86.1, 113.0, 113.1, 118.2, 126.6, 127.7, 127.7, 129.7, 129.8, 135.3, 135.5, 135.5, 136.7, 137.0, 139.1, 139.9, 144.9, 148.2, 148.4, 152.7, 158.0, 158.0; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₅H₃₀N₇O₆ [M – H][–]: 644.2263, found 644.2249.

化合物 1-11a



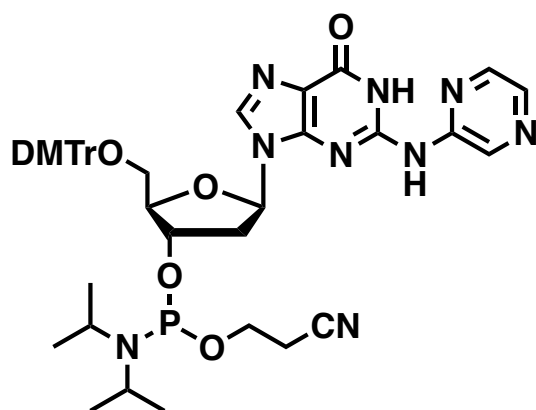
5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-N-(pyridin-2-yl)-2'-deoxyguanosine

3'-(2-cyanoethyl

***N,N*-diisopropylphosphoramidite).**

Compound **1-10a** (238 mg, 370 μmol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine three times, with dry toluene three times and the residue was dissolved in dry MeCN (4.7 mL). To the solution was added diisopropylethylamine (200 μL , 1.1 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (120 μL , 0.55 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was poured to ethyl acetate, and washed with sat. NaHCO_3 , H_2O and sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (60N) with hexane-ethyl acetate, and the eluent was concentrated under reduced pressure and further purified using size-exclusion chromatography with MeCN to afford compound **1-11a** (156 mg, 50%) as white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.08–1.22 (m, 12H), 2.30–3.01 (m, 4H), 3.25–3.35 (m, 1H), 3.35–3.47 (m, 1H), 3.53–3.92 (m, 10H), 4.21–4.34 (m, 1H), 4.65–4.87 (m, 1H), 6.17–6.27 (m, 1H), 6.47–6.59 (m, 1H), 6.71–6.81 (m, 4H), 6.91–6.97 (m, 1H), 7.12–7.36 (m, 8H), 7.39–7.47 (m, 2H), 7.54–7.62 (m, 1H), 7.65–8.00 (m, 2H), 8.21–8.26 (m, 1H), 13.56–13.72 (m, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 20.4, 20.5, 20.6, 20.6, 24.6, 24.7, 24.7, 24.7, 24.8, 31.1, 39.5, 39.9, 39.9, 43.3, 43.3, 43.4, 43.4, 55.3, 57.7, 57.8, 57.9, 58.1, 63.8, 64.2, 74.0, 74.1, 74.7, 74.8, 84.7, 84.9, 85.9, 85.9, 86.2, 86.2, 86.4, 86.5, 111.8, 111.9, 113.2, 113.3, 117.8, 117.8, 117.8, 117.9, 120.4, 120.8, 127.0, 127.0, 127.9, 128.0, 128.2, 128.4, 130.1, 130.2, 130.2, 135.8, 135.8, 136.0, 136.0, 136.4, 137.2, 138.7, 144.8, 144.9, 146.4, 149.3, 149.3, 149.4, 149.6, 152.7, 152.8, 156.7, 156.8, 158.6, 158.6, 158.6, 158.7; ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 148.4, 148.9; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{NaO}_7\text{P}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 869.3511, found 869.3493.

化合物 1-11b



5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)

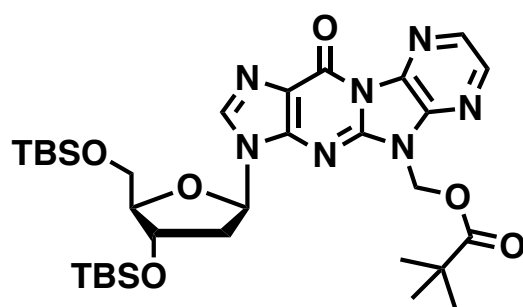
2-N-(pyrazin-2-yl)-2'-deoxyguanosine

3'-(2-cyanoethyl

***N,N*-diisopropylphosphoramidite).**

Compound **1-10b** (500 mg, 772 μmol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine five times, with dry toluene five times with CH_2Cl_2 five times, then the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (7.7 mL). To the solution was added diisopropylethylamine (315 μL , 1.83 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (207 μL , 956 μmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was poured to CH_2Cl_2 , and washed with sat. NaHCO_3 three times and sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with CH_2Cl_2 (4.2 mL) and precipitated in hexane to afford compound **1-11b** (280mg, 43%) as white powder. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.02–1.30 (m, 12H), 2.25–3.05 (m, 4H), 3.25–3.92 (m, 12H), 4.22–4.35 (m, 1H), 4.66–4.90 (m, 1H), 6.16–6.26 (m, 1H), 6.66–6.81 (m, 4H), 7.10–7.35 (m, 8H), 7.38–7.47 (m, 2H), 7.70–7.82 (m, 1H), 7.95–8.65 (m, 4H), 12.70–13.00 (m, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 19.4, 20.3, 20.4, 20.4, 20.5, 24.5, 24.5, 24.6, 24.6, 24.6, 24.7, 39.8, 39.8, 40.1, 43.2, 43.2, 43.3, 43.3, 47.2, 55.2, 57.7, 57.8, 57.9, 58.1, 63.7, 63.9, 73.5, 73.7, 74.2, 74.3, 84.4, 84.6, 85.7, 85.8, 85.9, 85.9, 86.3, 86.4, 113.0, 113.1, 117.8, 117.9, 120.1, 120.4, 126.8, 126.9, 127.8, 127.9, 128.1, 128.2, 130.0, 130.0, 130.1, 130.1, 135.6, 135.6, 135.8, 135.8, 136.2, 136.3, 136.6, 137.6, 140.2, 144.6, 144.7, 149.2, 149.5, 158.5, 158.5, 158.5; ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 148.3, 148.8; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{50}\text{N}_9\text{NaO}_7\text{P}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 870.3463, found 870.3449.

化合物 **1-12**

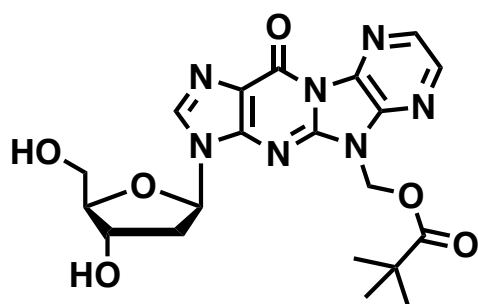


3-(3,5-*O*-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-*N*⁵-pivaloyloxymethyl-3,5-dihydro-11*H*-pyrido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]purin-11-one.

Compound **1-8c** (1.15 mg, 2.0 mmol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine five times, and then with dry toluene five times, and the residue was dissolved in dry DMF (20 mL). To the solution was added triethylamine (1.68 mL, 12 mmol), chloromethyl pivalate (874 μL , 6.0 mmol). The resulting mixture was heated at 75 $^\circ\text{C}$ and stirred for 4 h. The mixture was cooled to room temperature, poured to ethyl acetate and extracted with sat. NaHCO_3 , washed with H_2O and sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (C300) with CH_2Cl_2 -MeOH to afford compound

1-12 (720 mg, 54%) as pale yellow foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.07–0.14 (m, 12H, Si- CH_3), 0.86–0.96 (m, 18H, C- CH_3), 1.14–1.21 (m, 9H, C- CH_3), 2.42–2.52 (m, 2H, $H2'$ and $H2''$), 3.80 (dd, 1H, $J = 2.6, 9.2$, $H5'$), 3.86 (dd, 1H, $J = 3.6, 9.2$, $H5''$), 4.03 (q, 1H, $J = 3.5$, $H4'$), 4.60 (dd, 1H, $J = 4.6, 8.3$, $H3'$), 6.30–6.40 (m, 2H, N- CH_2), 6.41 (t, 1H, $J = 6.4$, $H1'$), 8.09 (s, 1H, Ar- H), 8.37 (d, 1H, $J = 2.8$, Ar- H), 8.48 (d, 1H, $J = 2.8$, Ar- H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : -5.3, -5.2, -4.6, -4.5, 18.2, 18.6, 25.9, 26.1, 27.1, 39.1, 42.2, 62.9, 63.6, 72.0, 84.3, 88.2, 119.8, 136.7, 137.1, 138.1, 138.2, 139.6, 146.6, 147.4, 152.8, 177.3; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{NaO}_6\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 708.3332, found 708.3312.

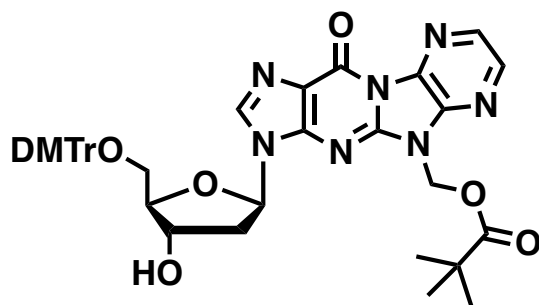
化合物 1-13



3-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)- N^5 -pivaloyloxymethyl-3,5-dihydro-11H-pyrido[2',3':4,5]imidazo[1,2-a]purin-11-one.

Compound **1-12** (980 mg, 1.4 mmol) was dissolved in dry THF (14 mL). To the solution was added triethylamine (448 μL , 3.2 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (1.05 mL, 6.4 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature. After 20 h, ethoxytrimethylsilane (6.7 mL, 43 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was concentrated under reduced pressure, and the resulting powder was filtered, washed with MeOH to afford compound **1-13** (520 mg, 80%) as white powder. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.05–1.19 (m, 9H, C- CH_3), 2.26–2.34 (m, 1H, $H2'$), 2.67–2.76 (m, 1H, $H2''$), 3.50–3.67 (m, 2H, $H5'$ and $H5''$), 3.85–3.93 (m, 1H, $H4'$), 4.37–4.46 (m, 1H, $H3'$), 4.90–4.96 (m, 1H, OH5'), 5.35–5.42 (m, 1H, OH3'), 6.20–6.30 (m, 2H, N- CH_2), 6.33 (t, 1H, $J = 6.6$, $H1'$), 8.30 (s, 1H, Ar- H), 8.45 (d, 1H, $J = 2.6$, Ar- H), 8.48 (d, 1H, $J = 2.6$, Ar- H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 27.1, 38.9, 62.2, 63.9, 71.4, 84.0, 88.5, 119.4, 137.1, 137.3, 138.4, 138.8, 139.5, 147.3, 147.8, 152.8, 176.9; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{NaO}_6$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 480.1602, found 480.1594.

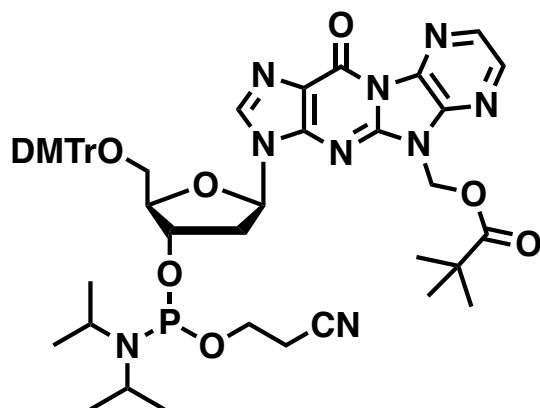
化合物 **1-14**



3-(2-deoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl)-*N*⁵-pivaloyloxymethyl-3,5-dihydro-11*H*-pyrido[2',3':4,5]imidazo[1,2-*a*]purin-11-one.

Compound **1-13** (250 mg, 155 μmol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine five times. The residue was dissolved in dry pyridine (5.5 mL). The solution was cooled in ice bath, then 4,4'-dimethoxytrityl chloride (225 mg, 660 μmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h, then 4,4'-dimethoxytrityl chloride (56 mg, 170 μmol) again. After 1 h, the reaction mixture was poured to ethyl acetate. The solution was washed with sat. NaHCO₃, H₂O and sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (60N) with CH₂Cl₂-MeOH to afford compound **1-14** (415 mg, quant.) as white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.15–1.18 (m, 9H, C-CH₃), 2.60 (ddd, 1H, *J* = 4.5, 6.4, 13.5, *H*2'), 2.79 (ddd, 1H, *J* = 6.4, 6.4, 13.5, *H*2'), 3.17 (d, 1H, *J* = 3.6, *H*4'), 3.35 (dd, 1H, *J* = 4.2, 10.2, *H*5'), 3.48 (dd, 1H, *J* = 5.2, 10.2, *H*5'), 3.62–3.76 (m, 6H, O-CH₃), 4.17–4.25 (m, 1H, *H*3'), 4.77–4.84 (m, 1H, OH3'), 6.15–6.25 (m, 2H, N-CH₂), 6.41 (t, 1H, *J* = 6.4, *H*1'), 6.67–6.77 (m, 4H, Ar-*H*), 7.07–7.40 (m, 9H, Ar-*H*), 7.87 (s, 1H, Ar-*H*), 8.37 (d, 1H, *J* = 3.0, Ar-*H*), 8.47 (d, 1H, *J* = 3.0, Ar-*H*); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 27.0, 39.0, 40.2, 55.2, 63.1, 63.9, 72.3, 84.3, 86.0, 86.6, 113.1, 120.0, 126.9, 127.8, 128.1, 130.1, 130.1, 135.5, 135.5, 136.4, 137.6, 138.0, 138.1, 139.6, 144.4, 146.1, 147.2, 152.7, 158.5, 158.5, 177.4; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₄₁H₄₁N₇NaO₈ [M + Na]⁺: 782.2909, found 782.2898.

化合物 **1-15**



3-(3-O-((2-cyanoethoxy)-diisopropylaminophosphinyloxy)-2-deoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl)-N⁵-pivaloyloxymethyl-3,5-dihydro-11H-pyrido[2',3':4,5]imidazo[1,2-a]purin-11-one.

Compound **1-14** (70 mg, 740 μmol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine five times, with dry toluene five times, and with dry CH₂Cl₂ five times, then the residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (4.7 mL). To the solution was added diisopropylethylamine (190 μL, 1.1 mmol), and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphordiamidite. The resulting mixture was stirred at room temperature for 15 min. The reaction mixture was poured to CH₂Cl₂, and washed with sat. NaHCO₃, H₂O and sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (C-200) with CH₂Cl₂-ethyl acetate, and the eluent was concentrated under reduced pressure and precipitated in hexane to afford compound **1-15** (370 mg, 83%) as yellow powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.10–1.24 (m, 21H), 2.44–2.52 (m, 1H), 2.54–2.82 (m, 3H), 3.25–3.50 (m, 2H), 3.55–3.92 (m, 10H), 4.28–4.39 (m, 1H), 4.62–4.72 (m, 1H), 6.14–6.28 (m, 2H), 6.36–6.46 (m, 1H), 6.70–6.82 (m, 4H), 7.12–7.44 (m, 9H), 7.87–7.93 (m, 1H), 8.35–8.41 (m, 1H), 8.46–8.52 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 20.3, 20.4, 20.5, 20.6, 24.6, 24.7, 24.7, 24.7, 24.8, 27.1, 27.1, 39.1, 39.1, 40.0, 40.0, 40.1, 40.1, 43.4, 43.4, 43.5, 43.5, 55.3, 58.4, 58.4, 58.5, 58.6, 63.4, 63.9, 64.0, 74.0, 74.1, 74.3, 74.5, 84.7, 86.0, 86.1, 86.3, 86.4, 86.7, 113.3, 117.5, 117.6, 120.0, 120.1, 127.0, 127.1, 128.0, 128.3, 130.2, 130.2, 130.3, 135.6, 135.6, 136.6, 136.6, 137.2, 137.3, 138.0, 138.1, 138.2, 138.2, 139.7, 139.7, 144.5, 146.3, 146.4, 147.5, 147.5, 152.8, 152.8, 158.6, 158.6, 158.7, 158.7, 177.2, 177.3; ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ: 149.9, 150.0; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₅₀H₅₈N₉NaO₉P [M + Na]⁺: 982.3987, found 982.3971.

ODN1-1~1-8 の精製

entry	sequence	yield	MALDI-TOF-MS	
			calcd ([M + H] ⁺)	found
ODN1-1	5'-TTTTCTCTCTT G_{Py} TTCTT -3'	54%	5456.6	5456.5
ODN1-2	5'-TTTTCTCTCTT G_{Pym} TTCTT -3'	69%	5457.6	5457.6
ODN1-3	5'-TTTTCTCTCTT G_{Pyra} TTCTT -3'	52%	5457.6	5457.2
¹⁾ ODN1-4	5'-TTTTCTCTCTT PIP TTCTT -3'	²⁾ 32%	5455.6	5455.0
¹⁾ ODN1-5	5'-AGGGTTAG G_{Py} GTTAGGGTTAGGG -3'	6%	7043.6	7043.1
¹⁾ ODN1-6	5'-AGGGTTAG G_{Pym} GTTAGGGTTAGGG -3'	3%	7044.6	7045.1
¹⁾ ODN1-7	5'-AGGGTTAG G_{Pyra} GTTAGGGTTAGGG -3'	3%	7044.6	7045.4
¹⁾ ODN1-8	5'-AGGGTTAG PIP GTTAGGGTTAGGG -3'	²⁾ 29%	7042.6	7042.0

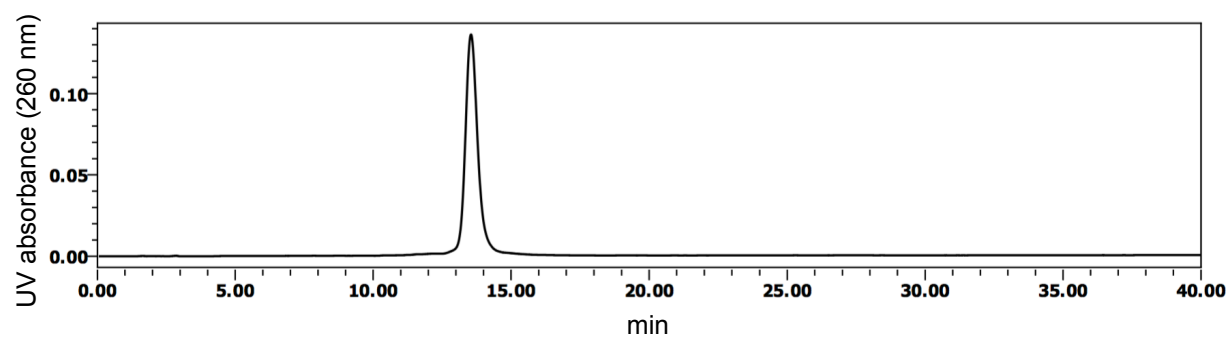
各 ODN の合成は一般的な事項に記載された通りに行った。切り出し、脱保護後にアンモニアを除去した残渣を、0.1 M NH₄OAc に溶解させて Sep-pak C-18 カートリッジに吸着させた後、CH₃CN-0.1 M NH₄OAc (1:9, v/v)を用いて伸長不十分なオリゴヌクレオチドを除いた。その後 2% TFA 水溶液を用いて 5'末端の DMTr 基を脱保護し、0.1 M NH₄OAc を用いて洗浄し、目的のオリゴヌクレオチドを 40% CH₃CN 水溶液を用いて溶出した。**ODN1-4~1-8** はさらに逆相 HPLC による精製を行った。精製装置は、Shimazu SCL-10 に LC-10AD、CTO-10A SPD-M10A を接続して用いた。カラムは XBridge™ Prep C18 (10 x 250 mm) を用いた。**ODN1-4** については、溶媒 I (MeCN) を溶媒 II (0.03 M NH₄OAc) に対して 0%から 0.5%/min で増加させ、30 °C で 3.0 mL/min の速度で 40 分間流した。**ODN1-5~1-8** については、溶媒 I (MeOH) を溶媒 II (0.1 M triethylammonium hexafluoroisopropanol) に対して 0%から 40%まで 1%/min で増加させ、30 °C で 3.0 mL/min の速度で 40 分間流した。

各種測定に用いた精製後のオリゴヌクレオチドの HPLC 分析結果を以下に示す。

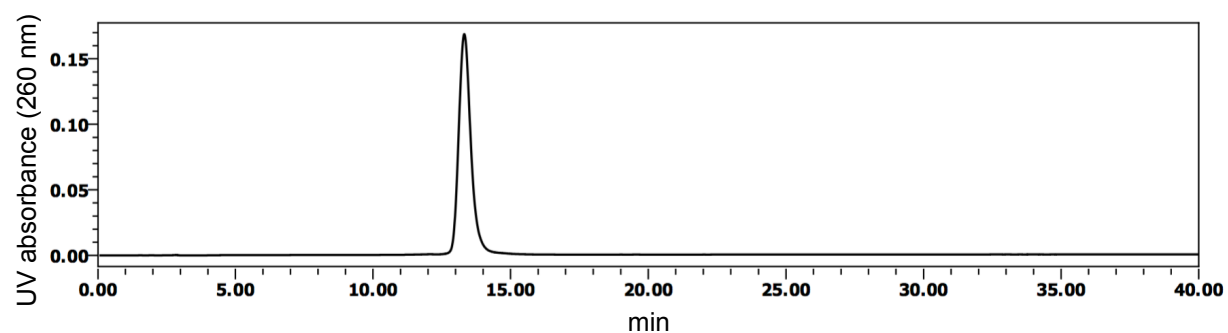
HPLC analysis of ODN1-1~1-8

For **ODN1-1~1-4**, reversed phase HPLC was performed on a Waters Alliance system with a Waters 3D UV detector and a Waters XBridge™ C₁₈ column (4.6 × 150 mm). A linear gradient (0-20%, 0.5 %/min) of solvent I (MeCN) in solvent II (0.03 M ammonium acetate buffer) was used at 30 °C at a flow rate of 1.0 mL/min for 40 min.

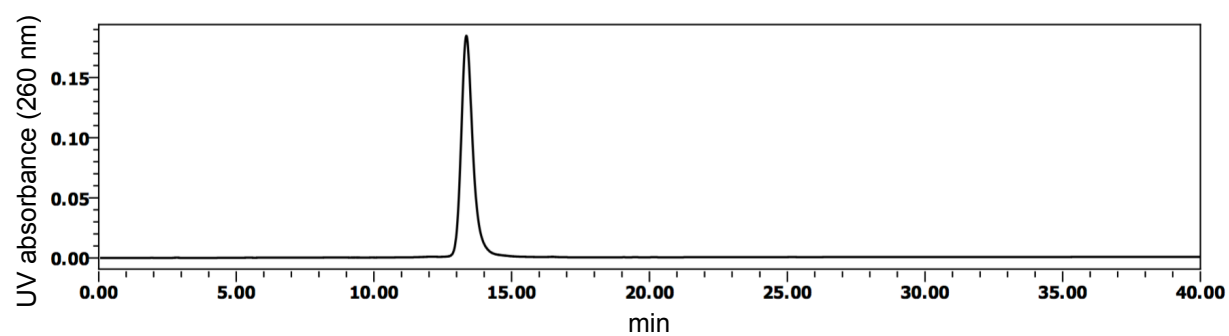
ODN1-1: 5'-TTTTCTTCTCTT **G^{Py}** TTCTT-3'



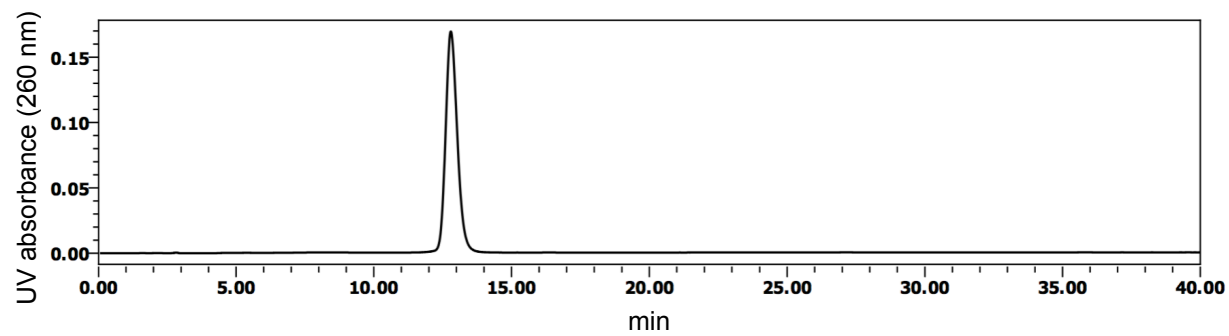
ODN1-2: 5'-TTTTCTTCTCTT **G^{Pym}** TTCTT-3'



ODN1-3: 5'-TTTTCTTCTCTT **G^{Pyra}** TTCTT-3'

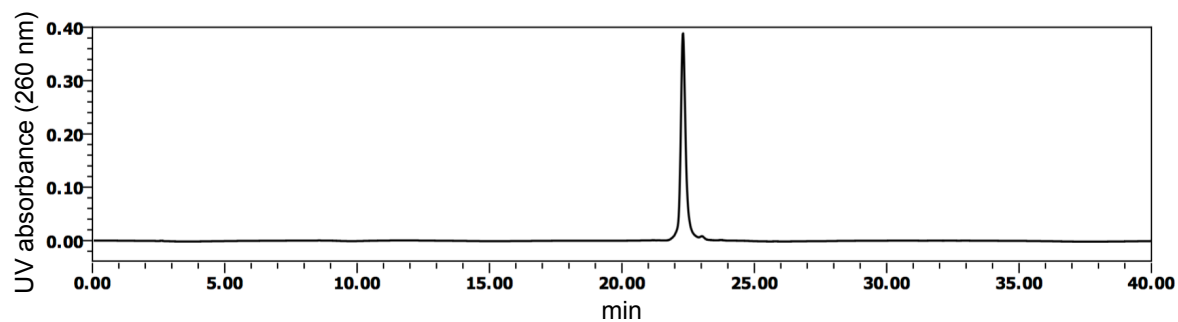


ODN1-4: 5'-TTTTCTTCTCTT **PIP** TTCTT-3'

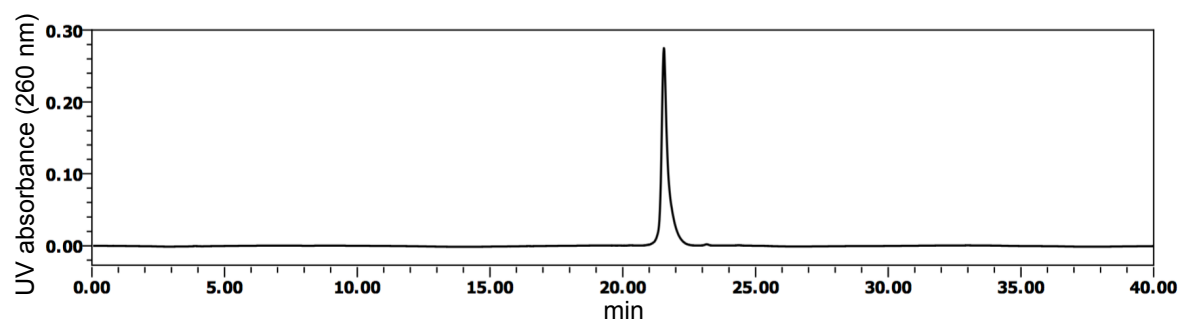


For ODN1-5~1-8, reversed phase HPLC was performed on a Waters Alliance system with a Waters 3D UV detector and a Waters XBridge™ C₁₈ column (4.6 × 150 mm). A linear gradient (0-40%, 1 %/min) of solvent I (MeOH) in solvent II (0.1 M triethylammonium hexafluoroisopropanol buffer) was used at 30 °C at a flow rate of 1.0 mL/min for 40 min.

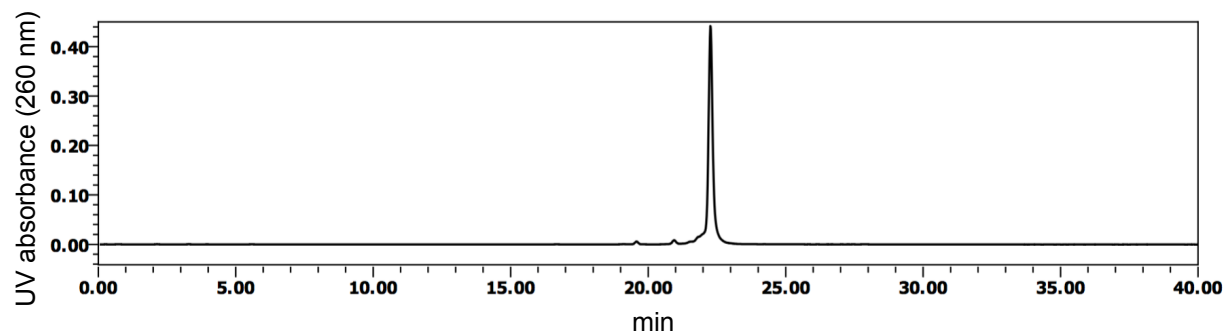
ODN1-5: 5'-AGGGTTAG G^{Py}GTTAGGGTTAGGG -3'



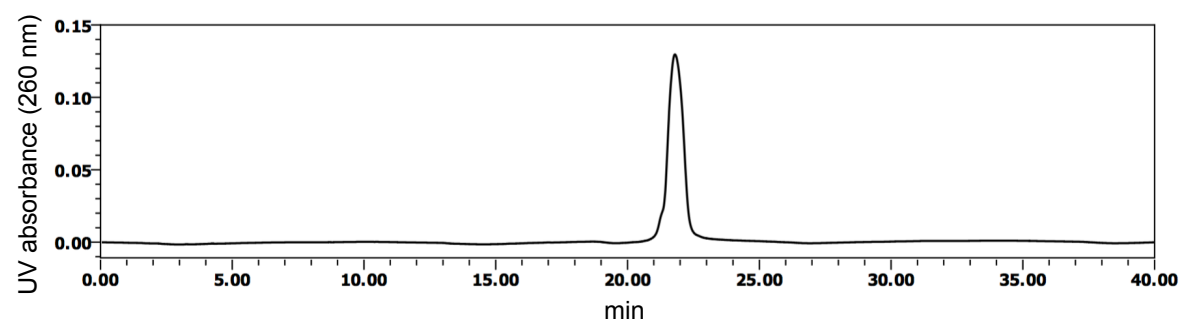
ODN1-6: 5'-AGGGTTAG G^{Pym}GTTAGGGTTAGGG -3'



ODN1-7: 5'-AGGGTTAG G^{Pyra}GTTAGGGTTAGGG -3'



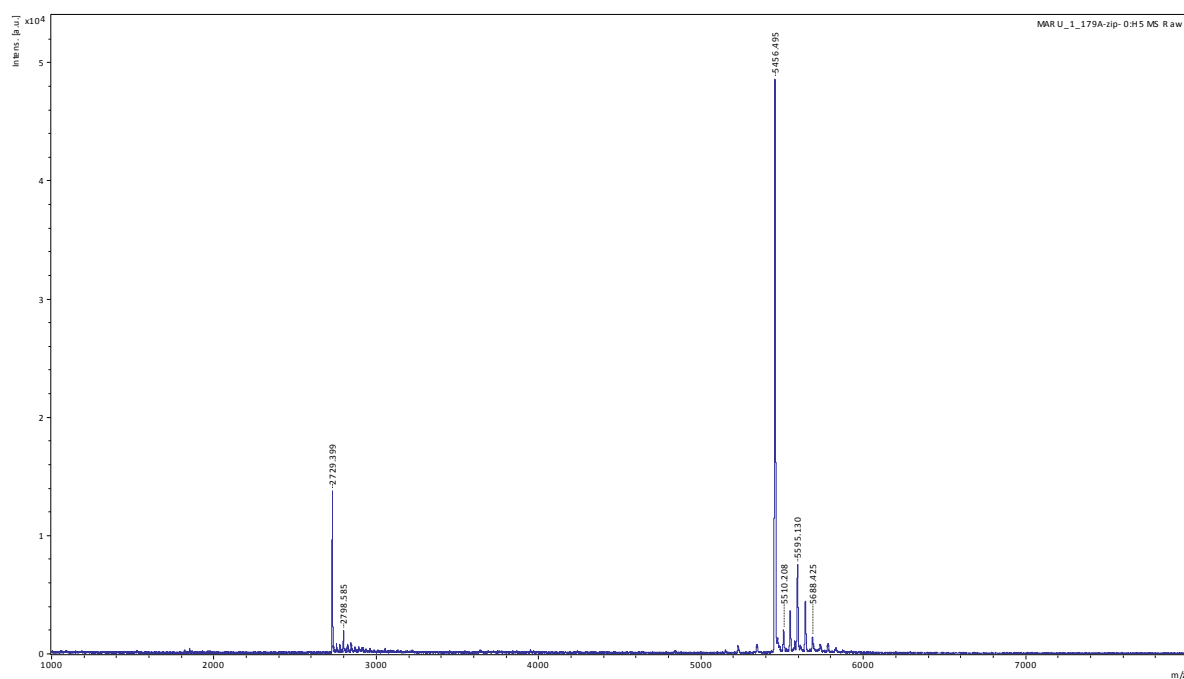
ODN1-8: 5'-AGGGTTAG **PIP** GTTAGGGTTAGGG -3'



MALDI-TOF Mass spectrometry of ODN1-1~1-8

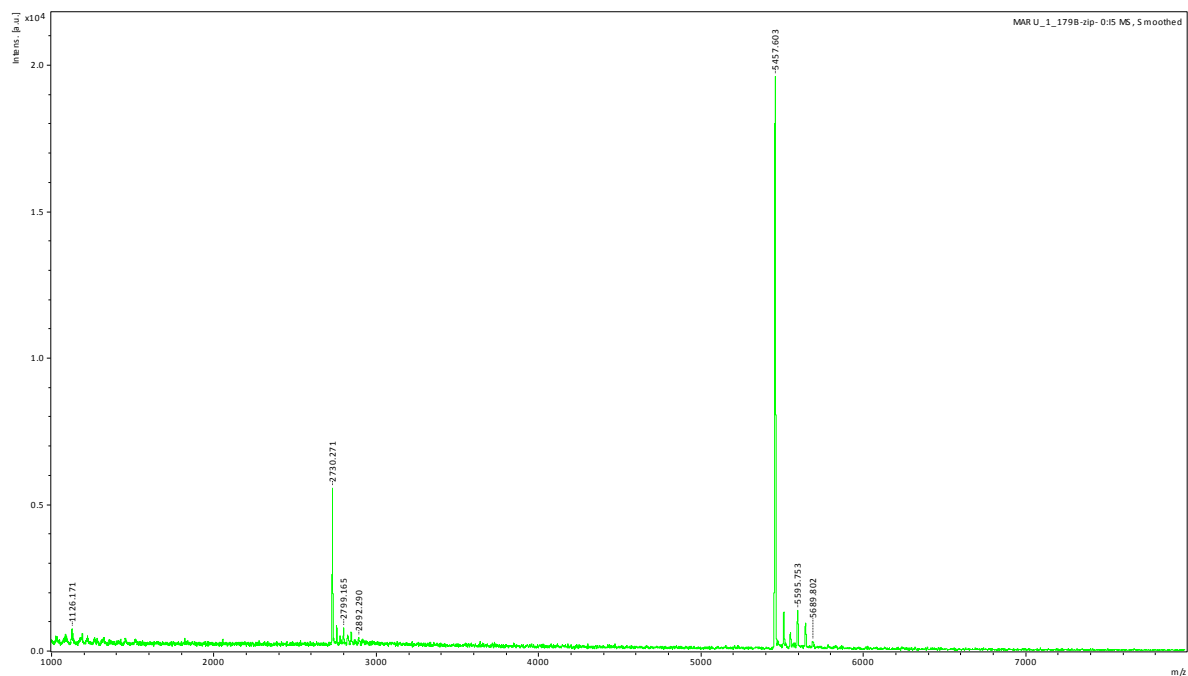
ODN1-1: 5'-TTTTCTTCTCTT **G^{Py}** TTCTT-3'

calculated for $[M + H]^+$: 5456.6, found 5456.5.



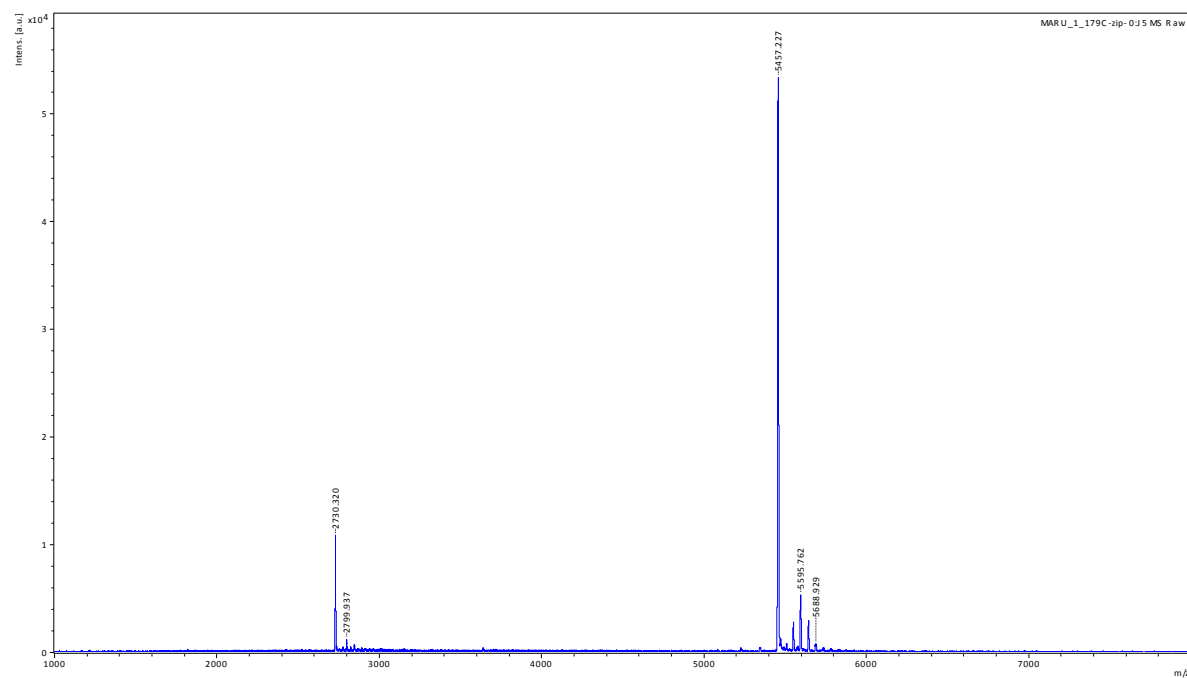
ODN1-2: 5'-TTTTCTTCTCTT **G^{Pym}** TTCTT-3'

calculated for $[M + H]^+$: 5457.6 found 5457.6.



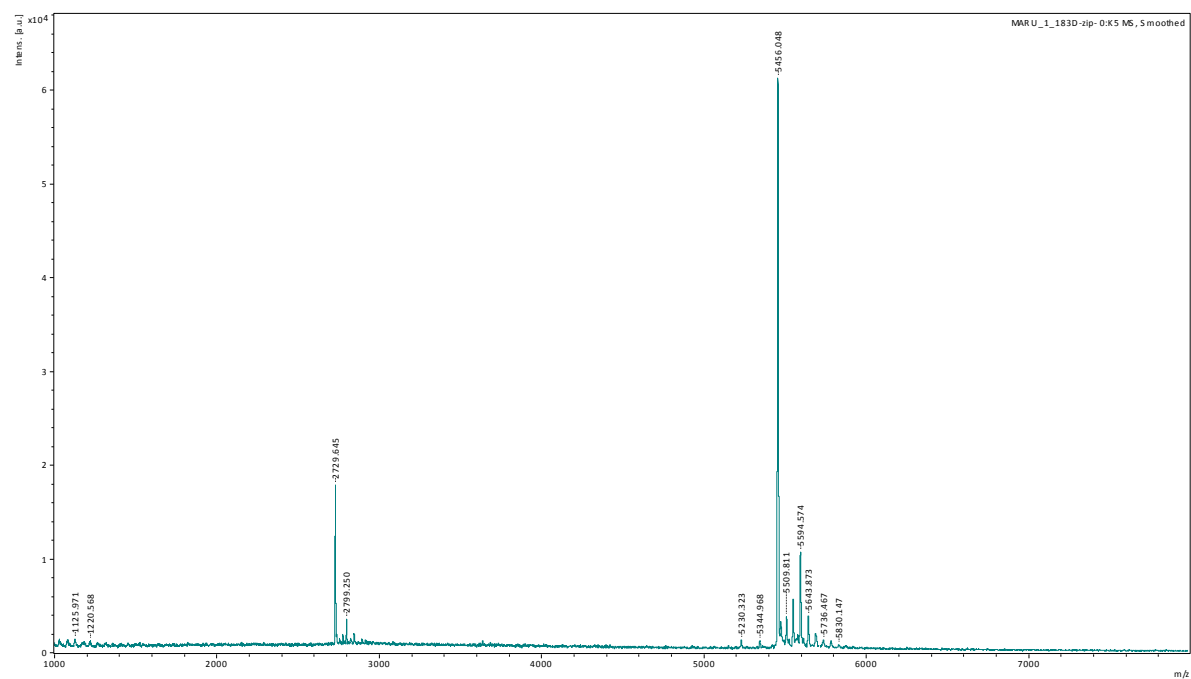
ODN1-3: 5'-TTTTCTTCTCTT **G^{Pyr}** TTCTT-3'

calculated for $[M + H]^+$: 5457.6, found 5457.2.



ODN1-4: 5'-TTTTCTTCTCTT **PIP** TTCTT-3'

calculated for $[M + H]^+$: 5455.6, found 5456.0.



ODN1-5(top): 5'-AGGGTTAG **G^{Py}** GTTAGGGTTAGGG -3'

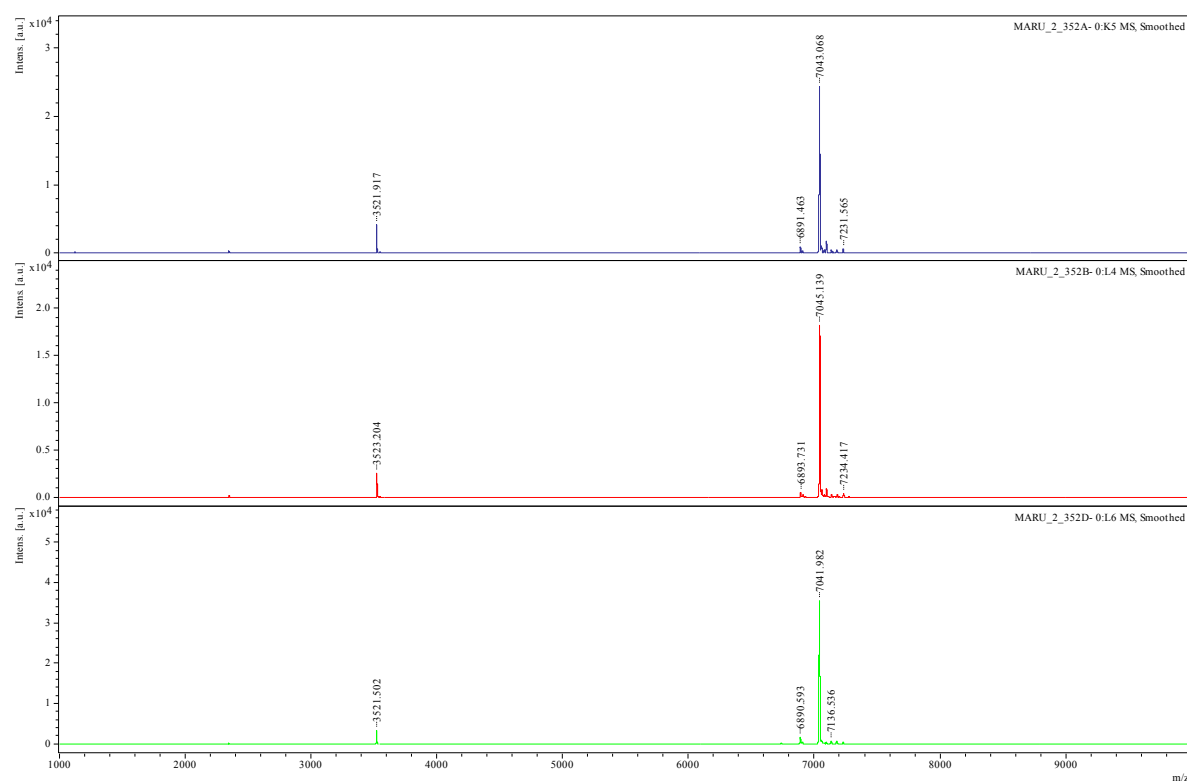
calculated for $[M + H]^+$: 7043.6, found 7043.1.

ODN1-6(middle): 5'-AGGGTTAG **G^{Pym}** GTTAGGGTTAGGG -3'

calculated for $[M + H]^+$: 7044.6, found 7045.1.

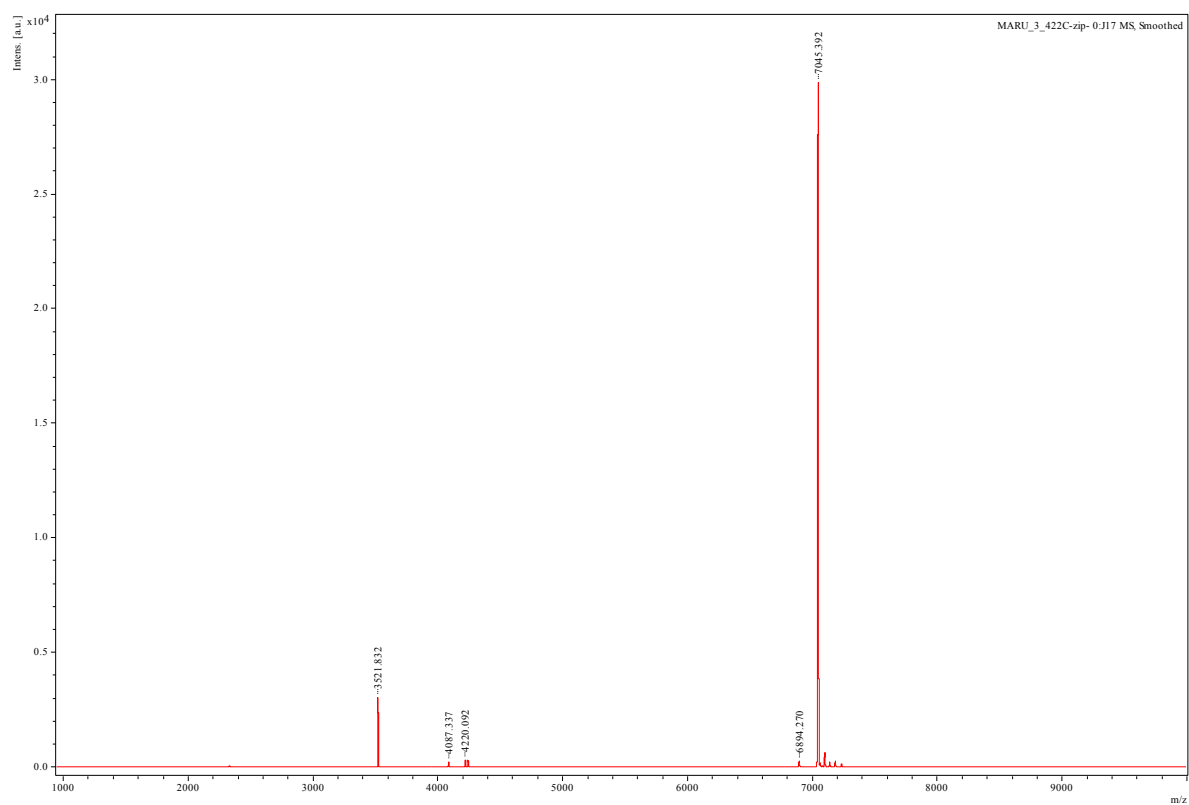
ODN1-8(bottom): 5'-AGGGTTAG **PIP** GTTAGGGTTAGGG -3'

calculated for $[M + H]^+$: 7042.6, found 7042.0.



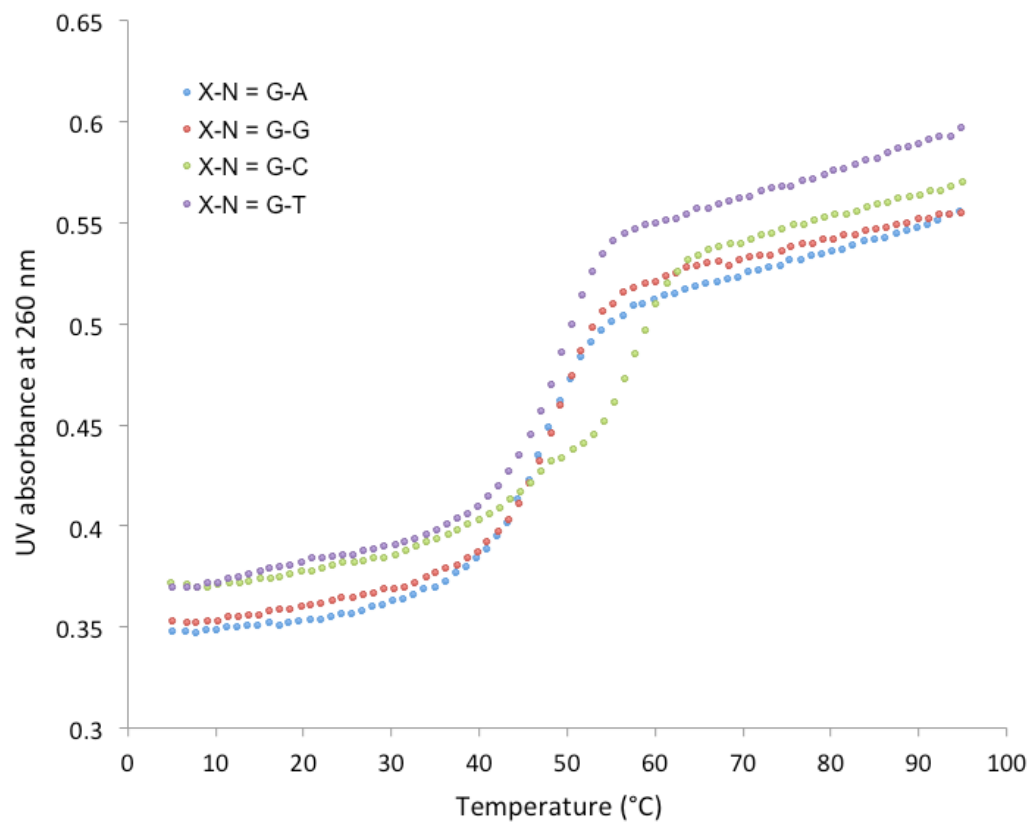
ODN1-7: 5'-AGGGTTAG G^{Pyra}GTTAGGGTTAGGG -3'

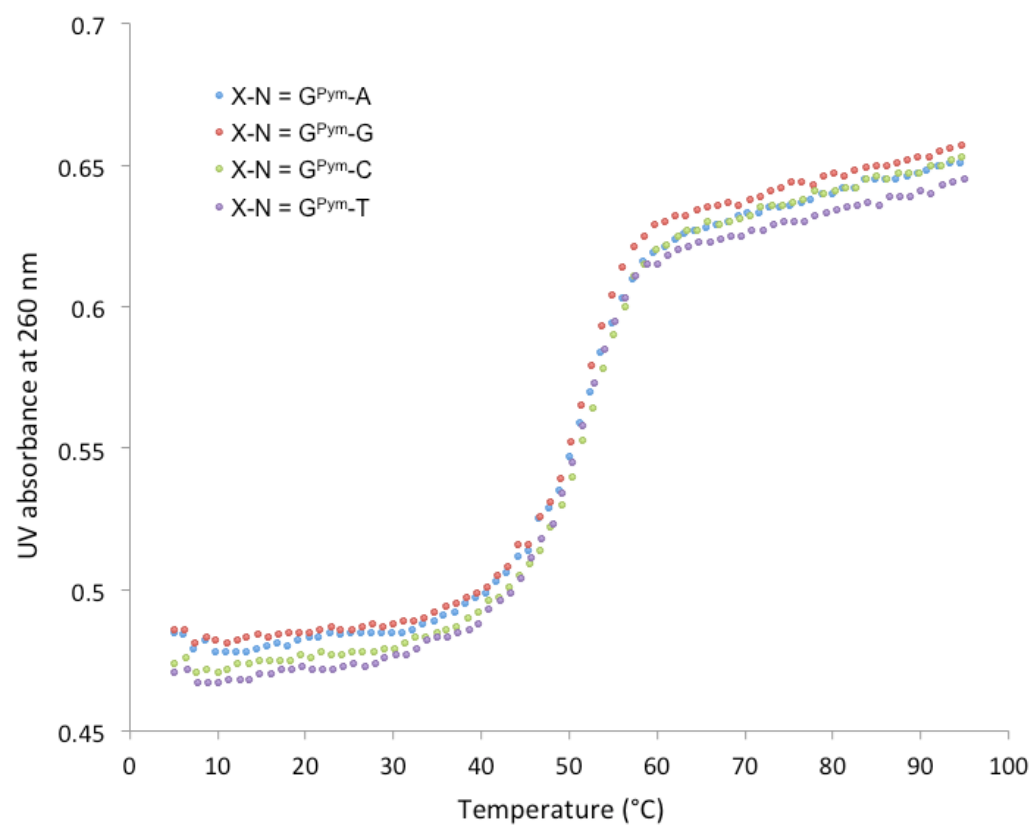
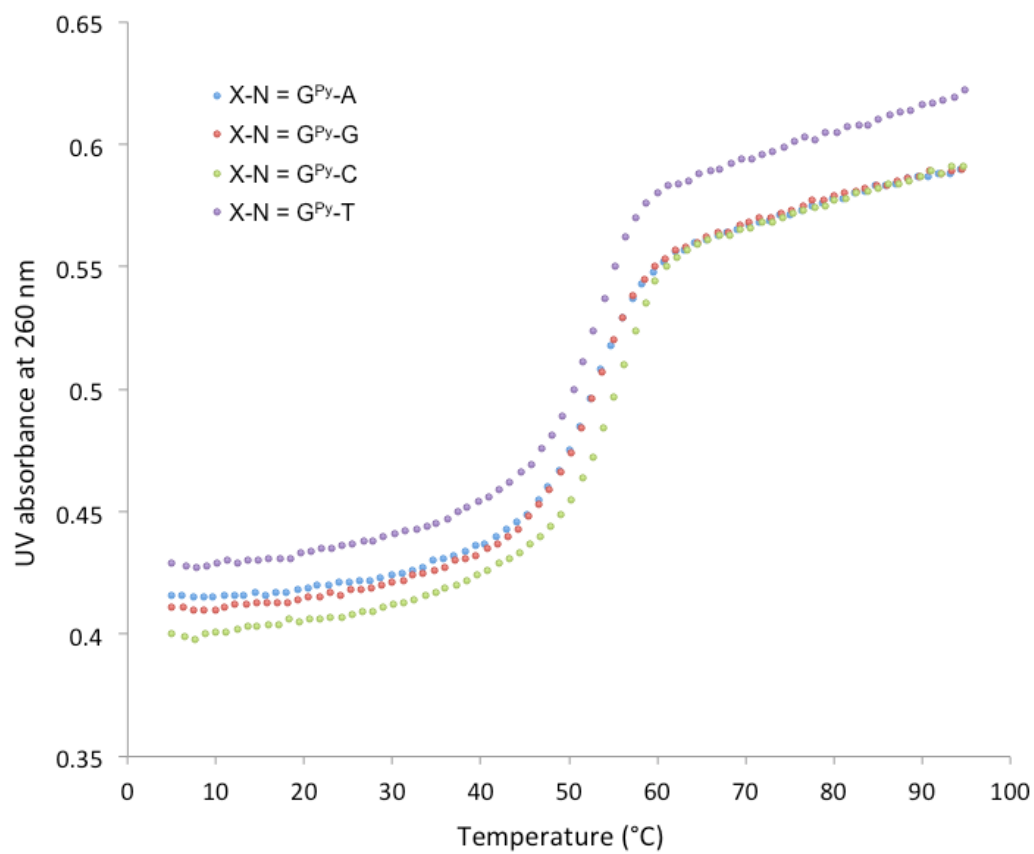
calculated for $[M + H]^+$: 7044.6, found 7045.4.

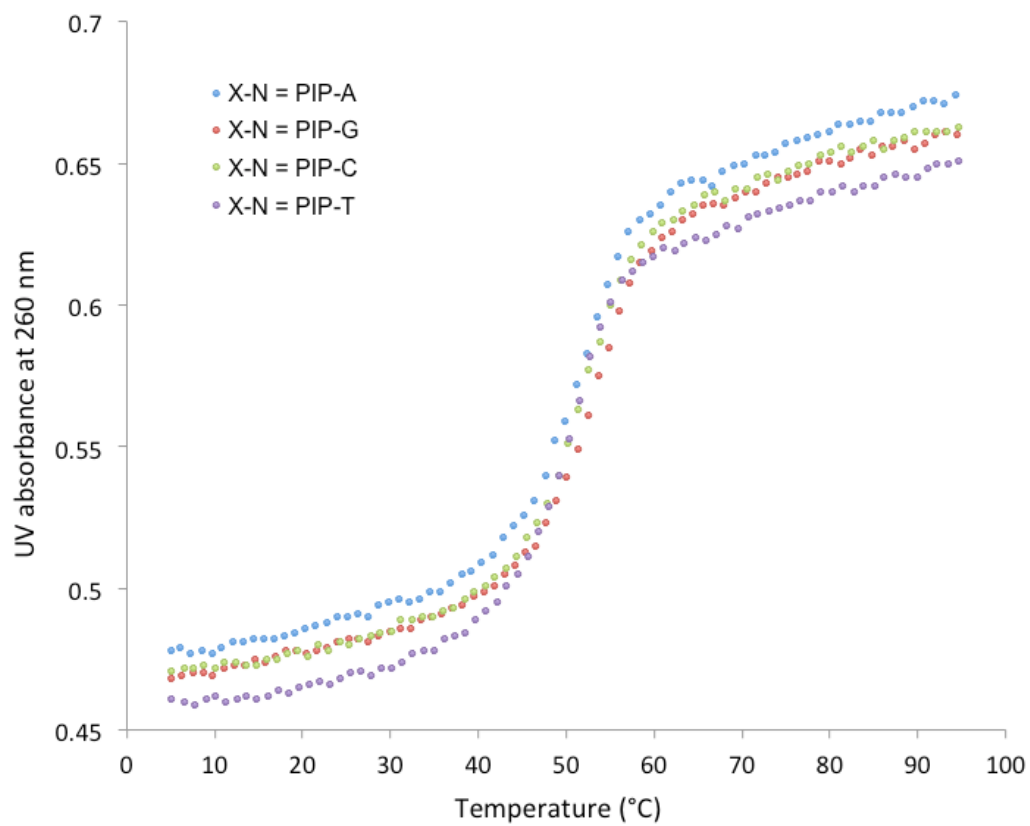
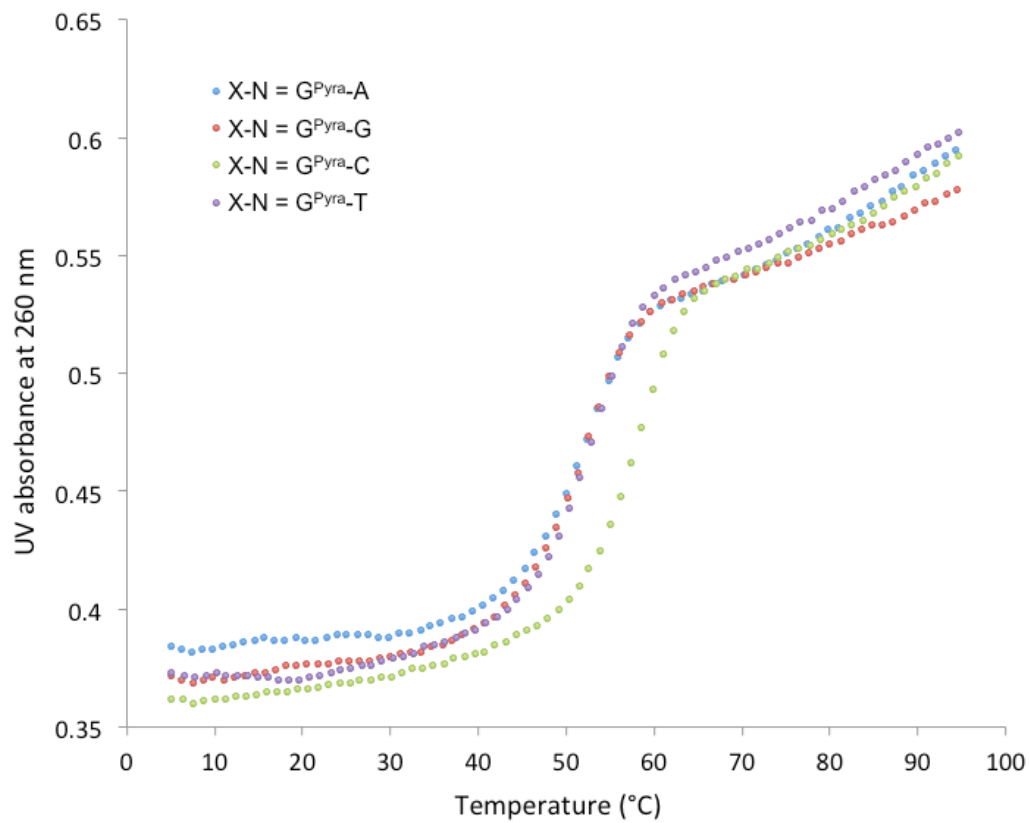


Representative melting curves of the duplexes (pH 7.0)

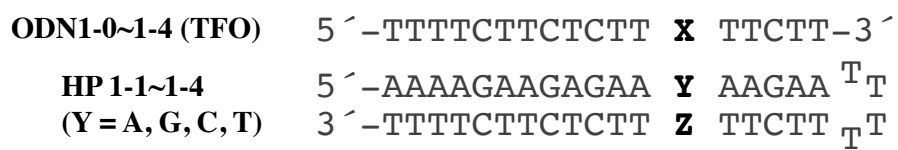
ODN1-0~1-4 5'-TTTTCTTCTCTT **X** TTCTT-3'
DNA(A, G, C, T) 3'-AAAAGAAGAGAA **N** AAGAA-5'



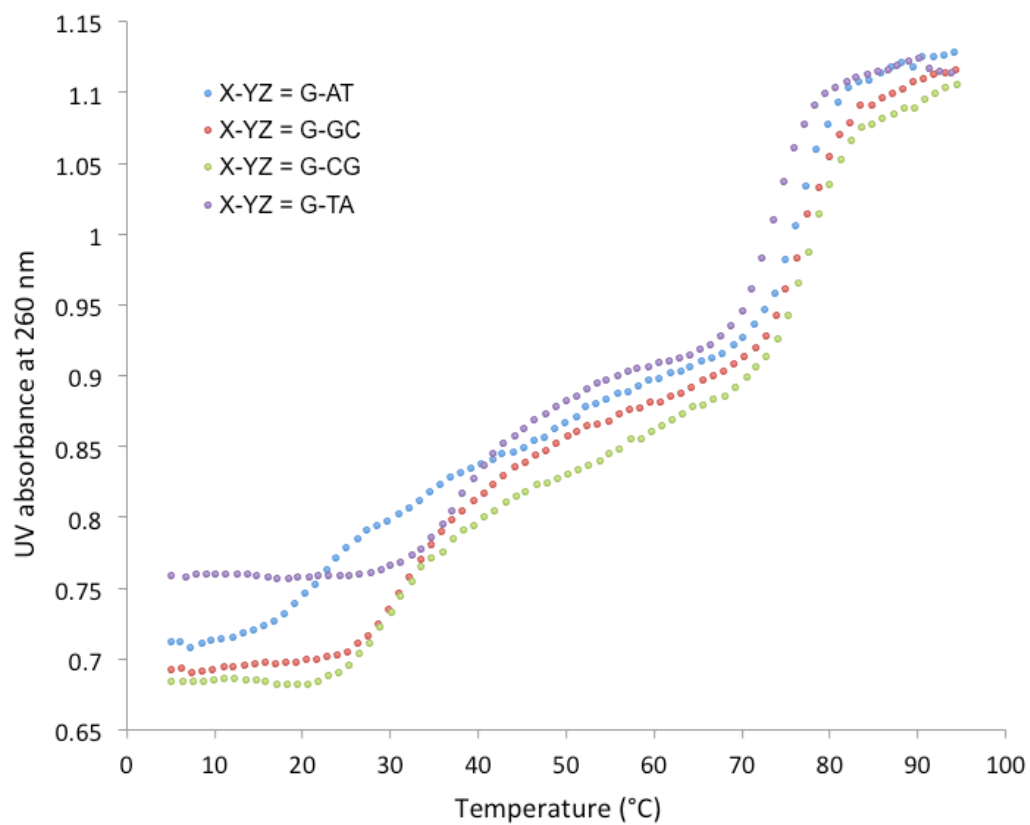


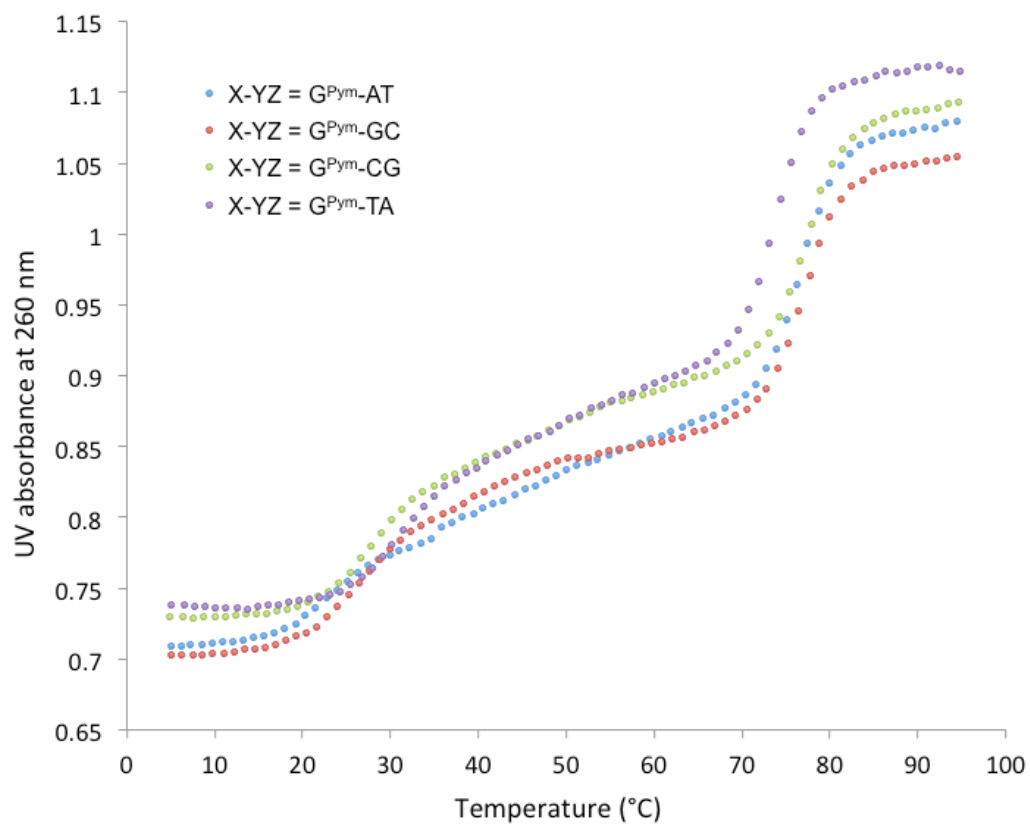
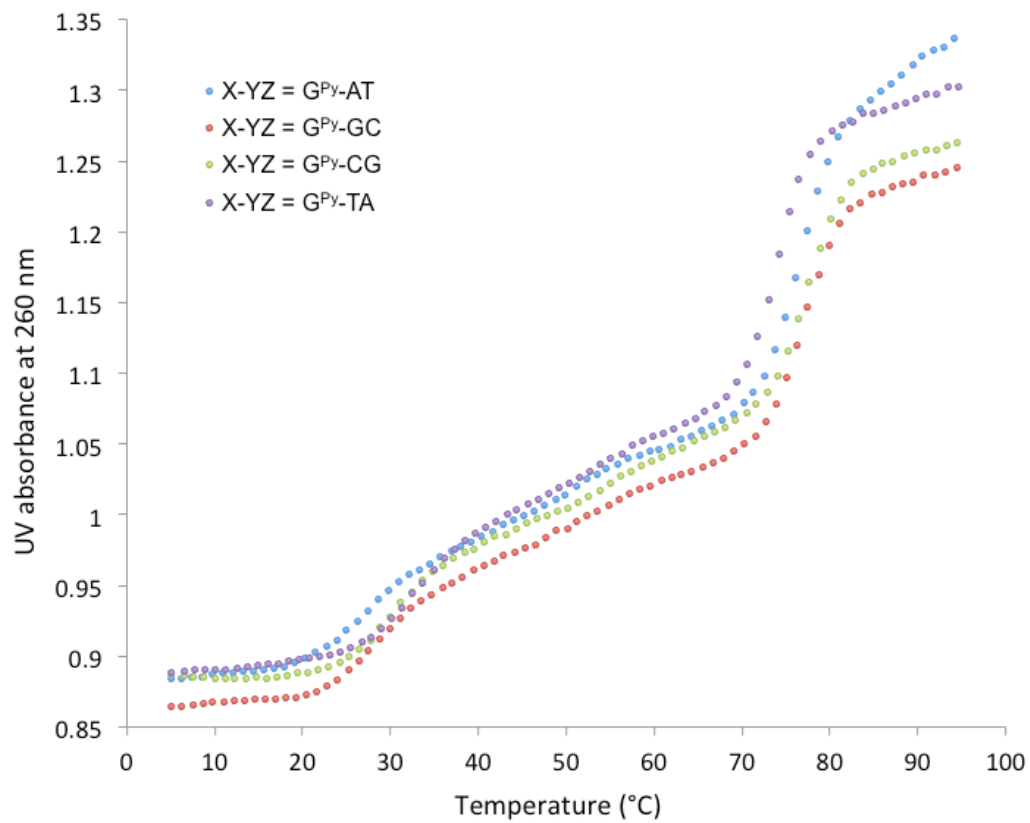


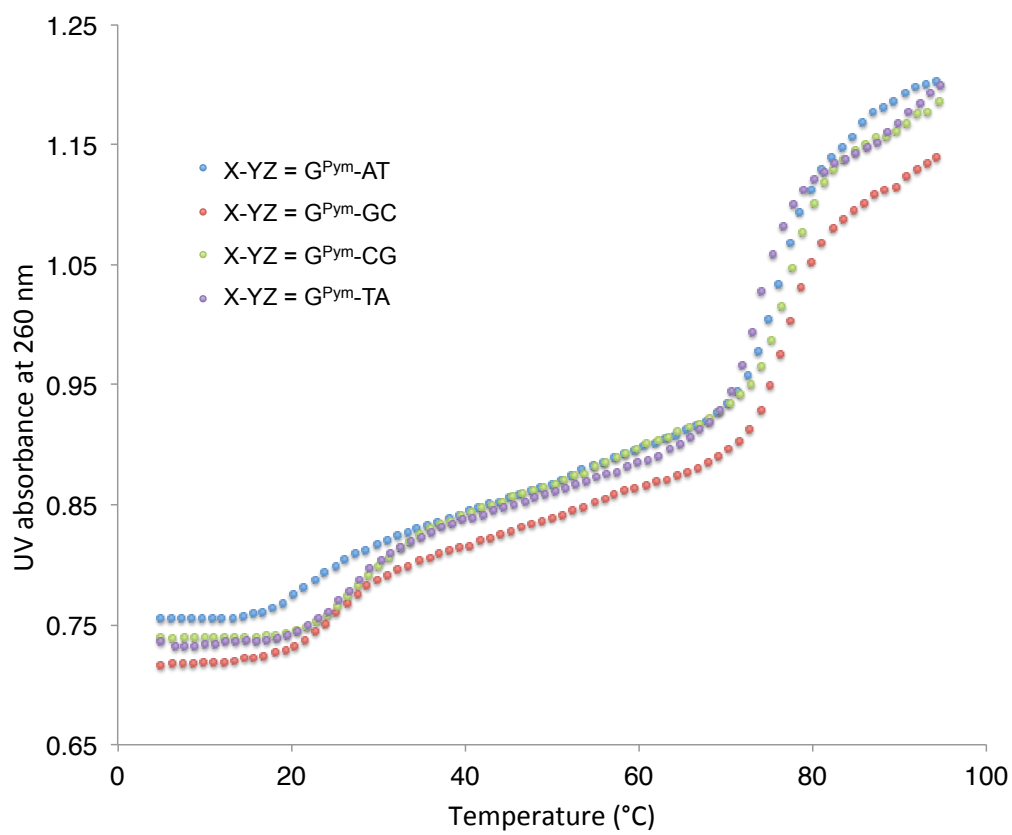
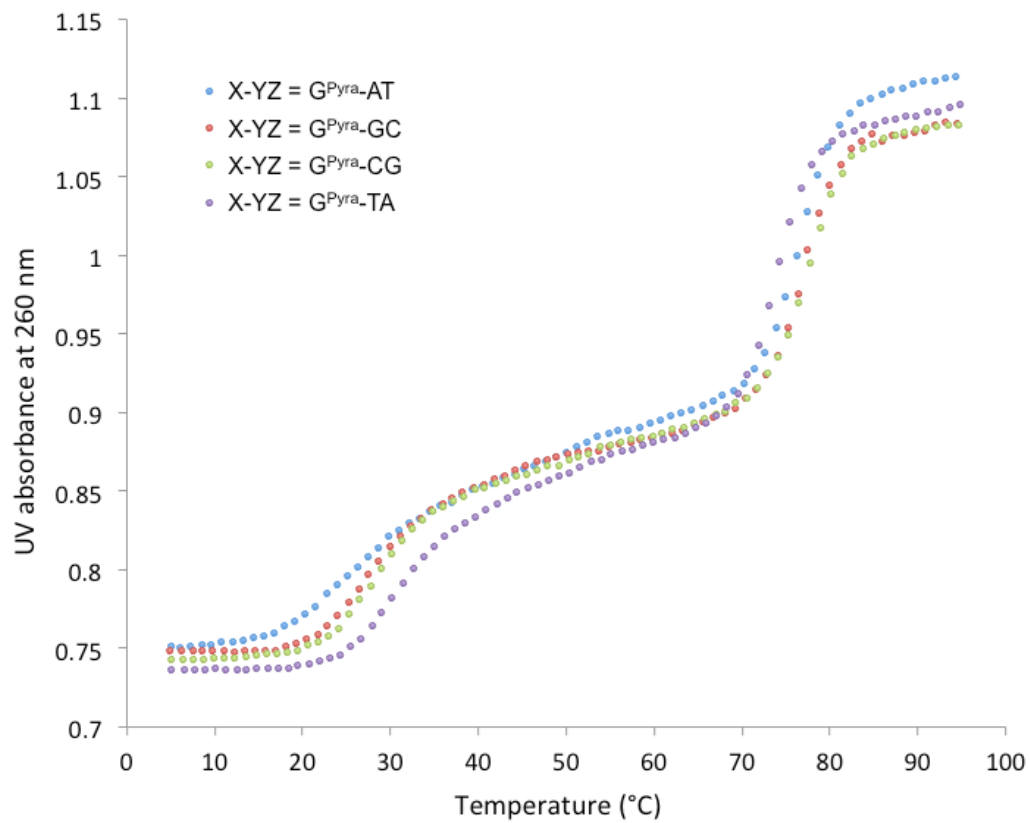
Representative melting curves of the triplexes (pH 7.0)



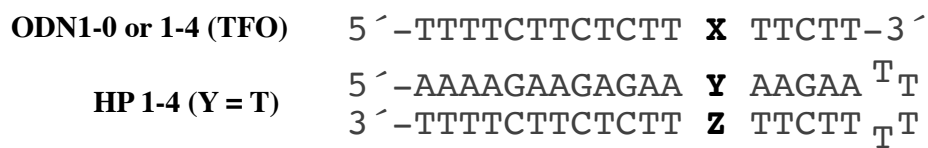
70 °C~80 °C に観測される UV 吸収の大きな変化は、**HP 1-1~1-4** 自体の二重鎖の融解である。



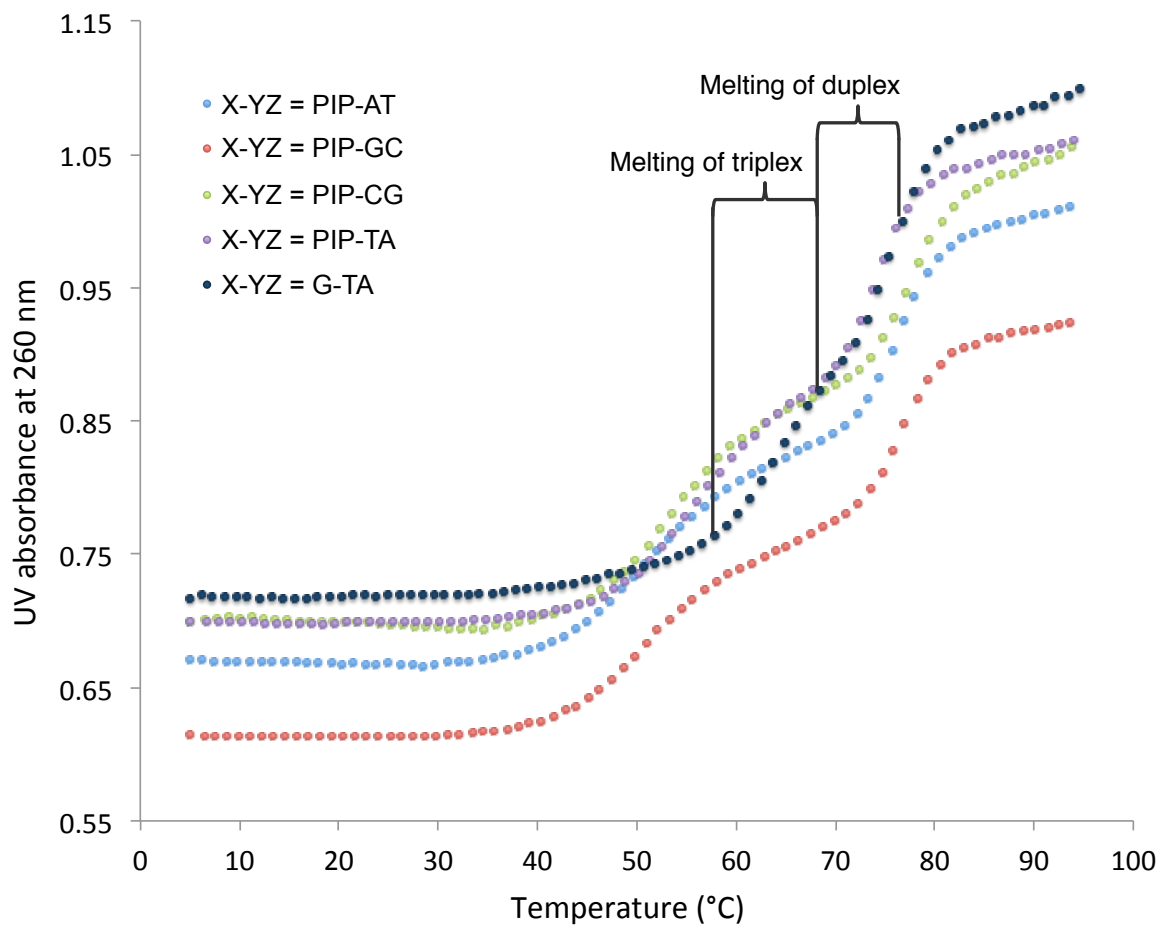




Representative melting curves of the triplexes (pH 5.5)



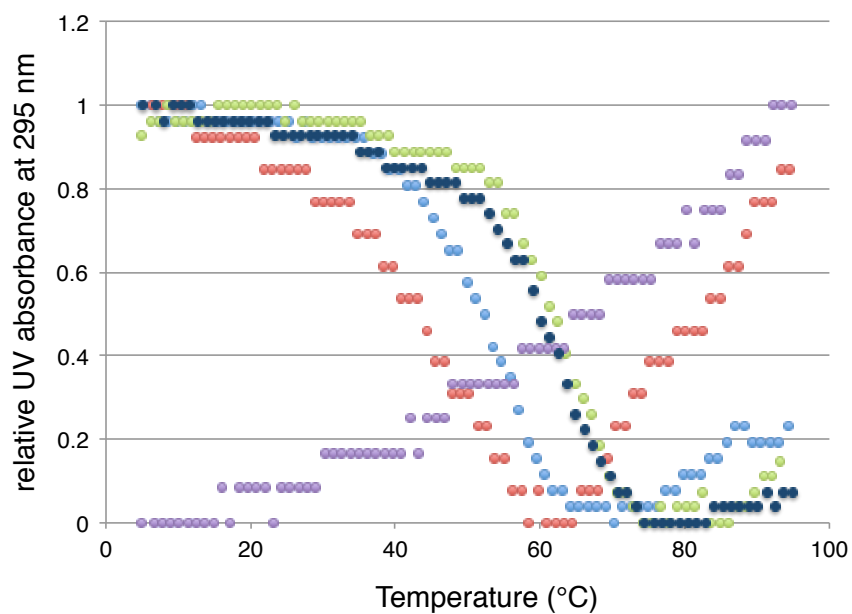
ODN1-0/ HP 1-4 の融解曲線と HP1-4 自体の二重鎖の融解曲線が接近していたため、正確な三重鎖の T_m 値を算出することができなかった。



Representative melting curves of ODN1-G4 and ODN1-5~1-8

ODN1-G4 ($G^{HA} = G$)
 or
ODN1-5~1-8
 ($G^{HA} = G^{Py}, G^{Pym}, G^{pyra}, PIP$)

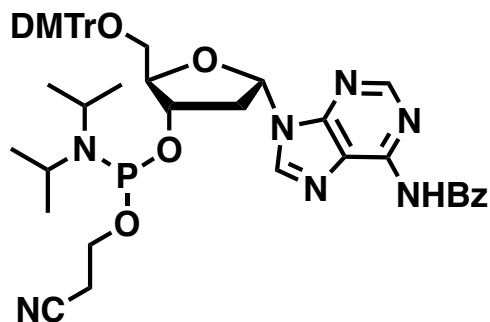
5'-AGGGTTAG G^{HA} GTTAGGGTTAGGG-3'



実験編(第 2 章)

新規化合物、あるいは従来法とは異なる方法で合成した化合物について、その合成法を示す。

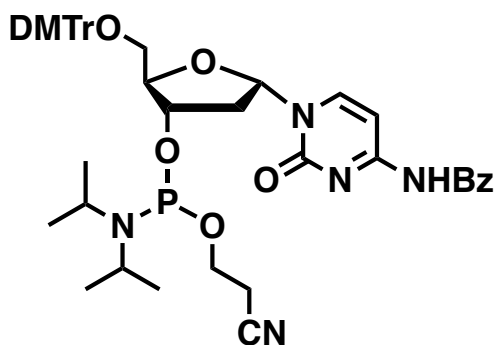
化合物 2-9 (crude)



Synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- α -deoxyadenosine 3'-(2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylphosphoramidite).

Compound **2-8** (630 mg, 957 μ mol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine five times, with dry toluene five times and the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (10 mL). To the solution was added diisopropylamine (107 μ L, 766 μ mol), 1*H*-tetrazole (53 mg, 766 μ mol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidite (456 μ L, 1.44 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was poured to ethyl acetate, and washed with sat. NaHCO_3 , H_2O and sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (C200) with hexane-ethyl acetate (0.5% triethylamine), and the eluent was concentrated under reduced pressure and further purified using size-exclusion chromatography with MeCN to afford crude compound **2-9** (256 mg, 38%) as white foam. The crude product was used for synthesis of ODN2-1 without further purification.

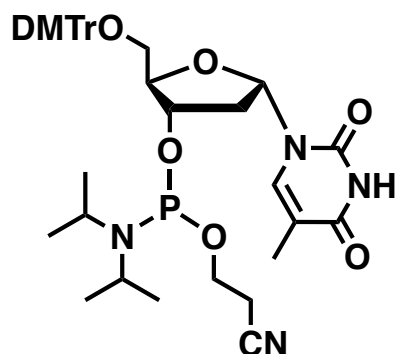
化合物 2-14 (crude)



Synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- α -deoxycytidine 3'-(2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylphosphoramidite).

Compound **2-13** (500 mg, 789 μ mol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine five times, with dry toluene five times and the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (8 mL). To the solution was added diisopropylamine (88 μ L, 631 μ mol), 1*H*-tetrazole (44 mg, 631 μ mol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidite (374 μ L, 1.18 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was poured to ethyl acetate, and washed with sat. NaHCO_3 , H_2O and sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (C200) with hexane-ethyl acetate (0.5% triethylamine), and the eluent was concentrated under reduced pressure and further purified using size-exclusion chromatography with MeCN to afford crude compound **2-14** (210 mg, 32%) as white foam. The crude product was used for synthesis of ODN2-3 without further purification.

化合物 2-21 (crude)



Synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- α -thymidine 3'-(2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylphosphoramidite).

Compound **2-20** (420 mg, 771 μ mol) was rendered anhydrous by coevaporation with dry pyridine five times, with dry toluene five times and the residue was dissolved in dry CH_2Cl_2 (7.7 mL). To the solution was added diisopropylamine (87 μ L, 617 μ mol), 1*H*-tetrazole (43 mg, 617 μ mol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidite (366 μ L, 1.15 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was poured to ethyl acetate, and washed with sat. NaHCO_3 , H_2O and sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (C200) with hexane-ethyl acetate (0.5% triethylamine), and the eluent was concentrated under reduced

pressure and further purified using size-exclusion chromatography with MeCN to afford crude compound **2-21** (456 mg, 79%) as white foam. The crude product was used for synthesis of ODN2- without further purification.

ODN2-1~2-4 の精製

entry	sequence	yield	MALDI-TOF-MS	
			calcd ([M + H] ⁺)	found
ODN 2-1	5'- GGAGAGGA aA AGAGGAGG -3'	14%	5423.6	5422.6
ODN 2-2	5'- GGAGAGGA aG AGAGGAGG -3'	11%	5438.6	5438.8
ODN 2-3	5'- GGAGAGGA aC AGAGGAGG -3'	18%	5398.6	5398.4
ODN 2-4	5'- GGAGAGGA aT AGAGGAGG -3'	17%	5413.6	5413.4

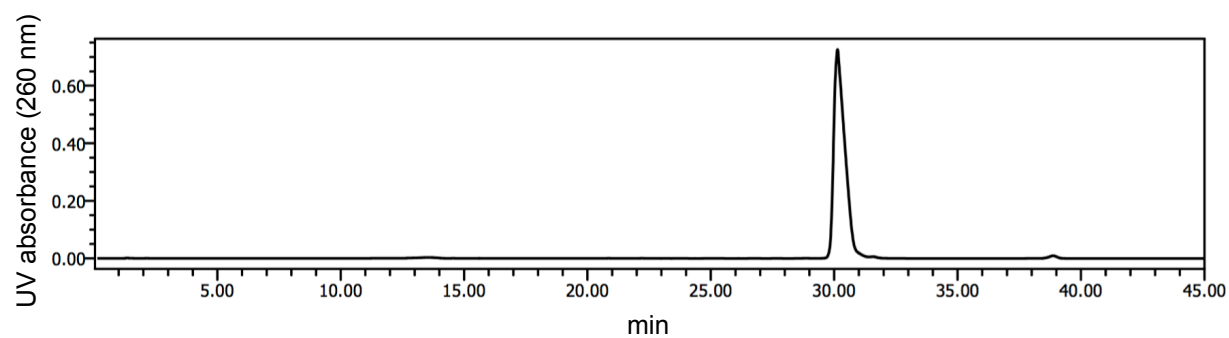
各 ODN の合成は、実験編(第 1 章および第 2 章における一般的な事項)に記載された通りに行った。切り出し、脱保護後にアンモニアを除去した残渣を、0.1 M NH₄OAc に溶解させて Sep-pak C-18 カートリッジに吸着させた後、CH₃CN-0.1 M NH₄OAc (1:9, v/v)を用いて伸長不十分なオリゴヌクレオチドを除いた。その後 2% TFA 水溶液を用いて 5'末端の DMTr 基を脱保護し、0.1 M NH₄OAc を用いて洗浄し、目的のオリゴヌクレオチドを 40% CH₃CN 水溶液を用いて溶出した。ODN1-4~1-8 はさらに逆相 HPLC による精製を行った。精製装置は、Shimazu SCL-10 に LC-10AD、CTO-10A SPD-M10A を接続して用いた。カラムは DNAPac PA-100 (DIONEX, 9 × 250 mm)を用いた。溶媒 I (1M 塩化ナトリウム-25 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0、10% CH₃CN) を溶媒 II (25 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0、10% CH₃CN) に対して 0%から 0.5%/min で増加させ、30 °C で 3.0 mL/min の速度で 40 分間流した。

各種測定に用いた精製後の DNA オリゴマーの HPLC 分析結果を次に示す。

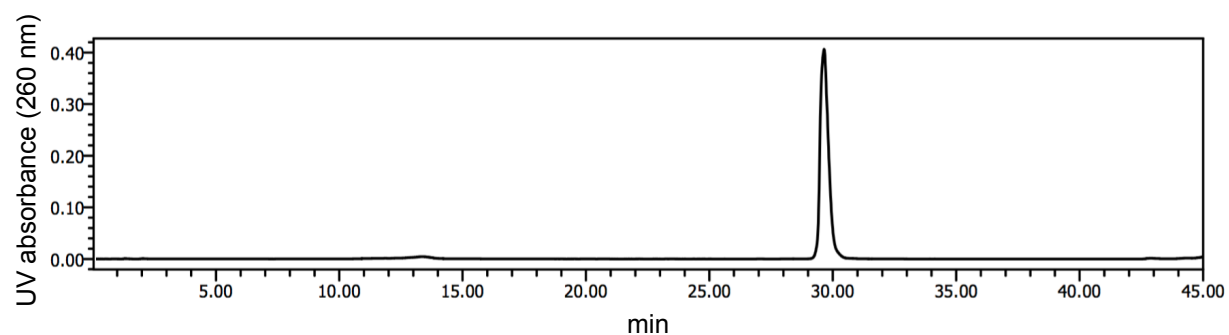
HPLC analysis of ODN2-1~2-4

For ODN2-1~2-4, anion exchange HPLC was performed on a Waters Alliance system with a Waters 3D UV detector and a DNAPac PA-100 column (DIONEX, 4 × 250 mm). A linear gradient (0-60%, 1.3 %/min) of solvent I (25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, 1 M NaCl, 10% CH₃CN) in solvent II (25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, 10% CH₃CN) was used at 50 °C at a flow rate of 1.0 mL/min for 45 min.

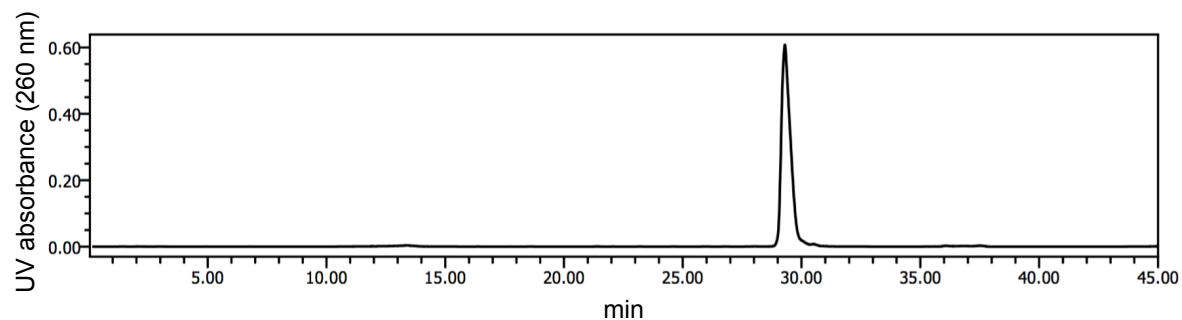
ODN2-1: 5'- GGAGAGGA **α A** AGAGGAGG -3'



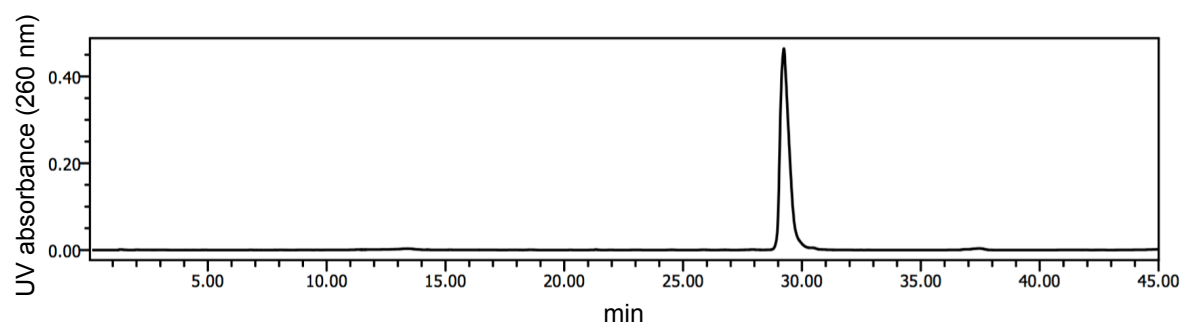
ODN2-2: 5'- GGAGAGGA **α G** AGAGGAGG -3'



ODN2-3: 5'- GGAGAGGA **α C** AGAGGAGG -3'



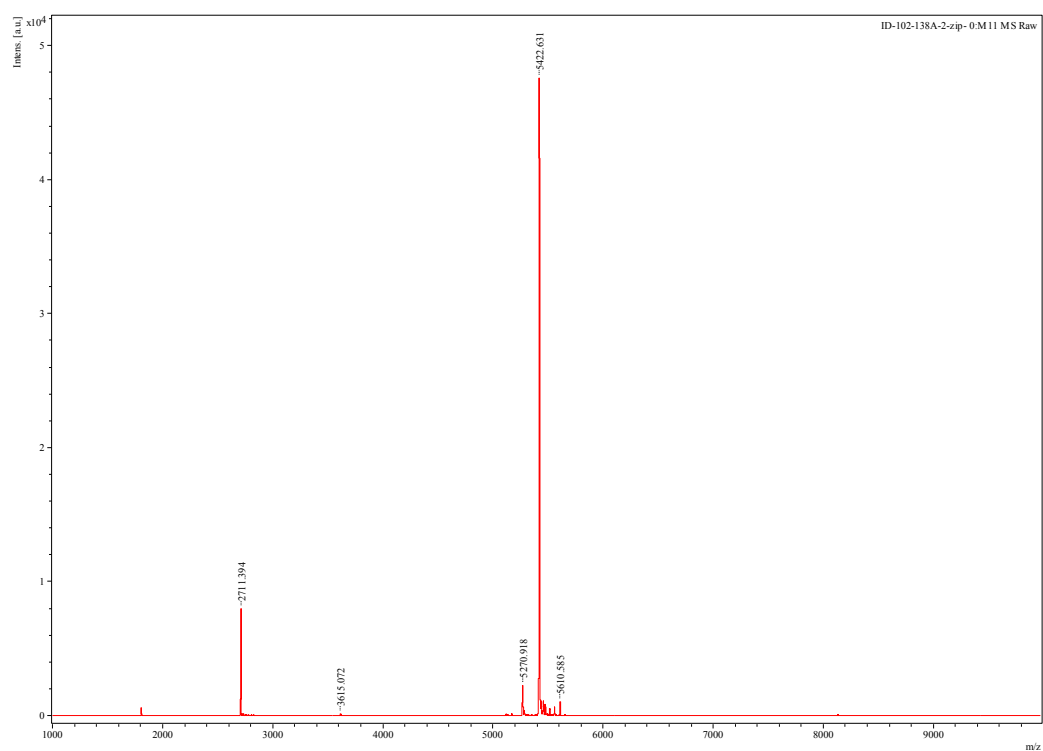
ODN2-4: 5'- GGAGAGGA **α T** AGAGGAGG -3'



MALDI-TOF Mass spectrometry of ODN2-1~2-4

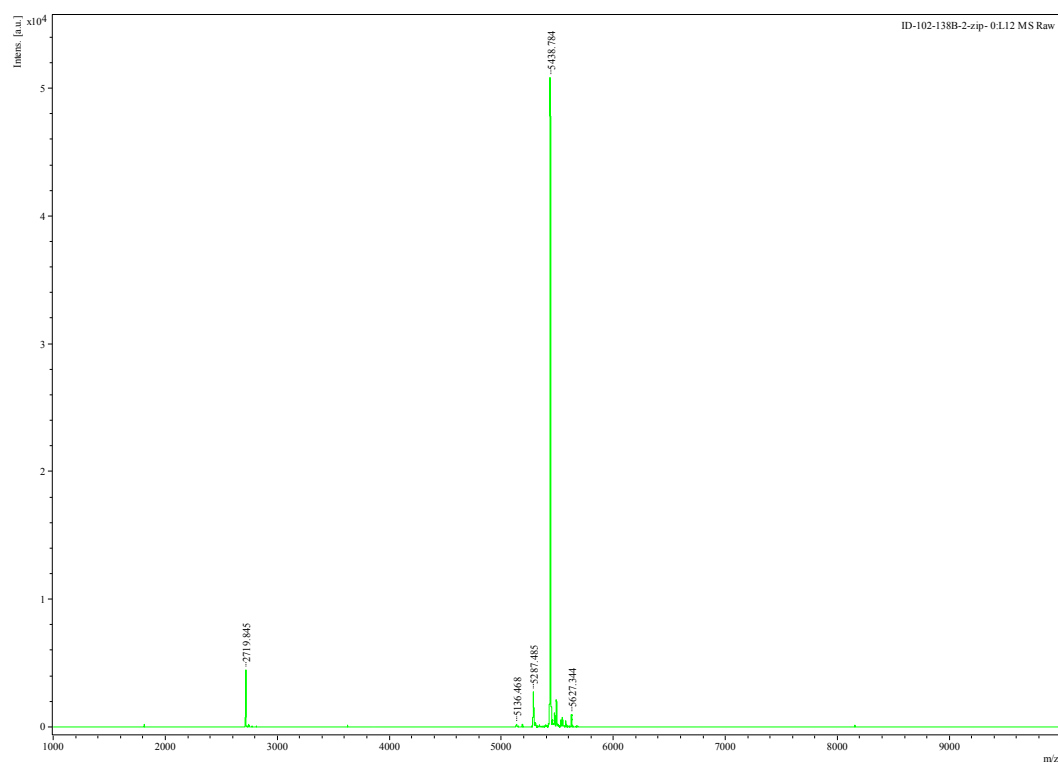
ODN2-1: 5'- GGAGAGGA α A AGAGGAGG -3'

calculated for $[M + H]^+$: 5423.6, found 5422.6.



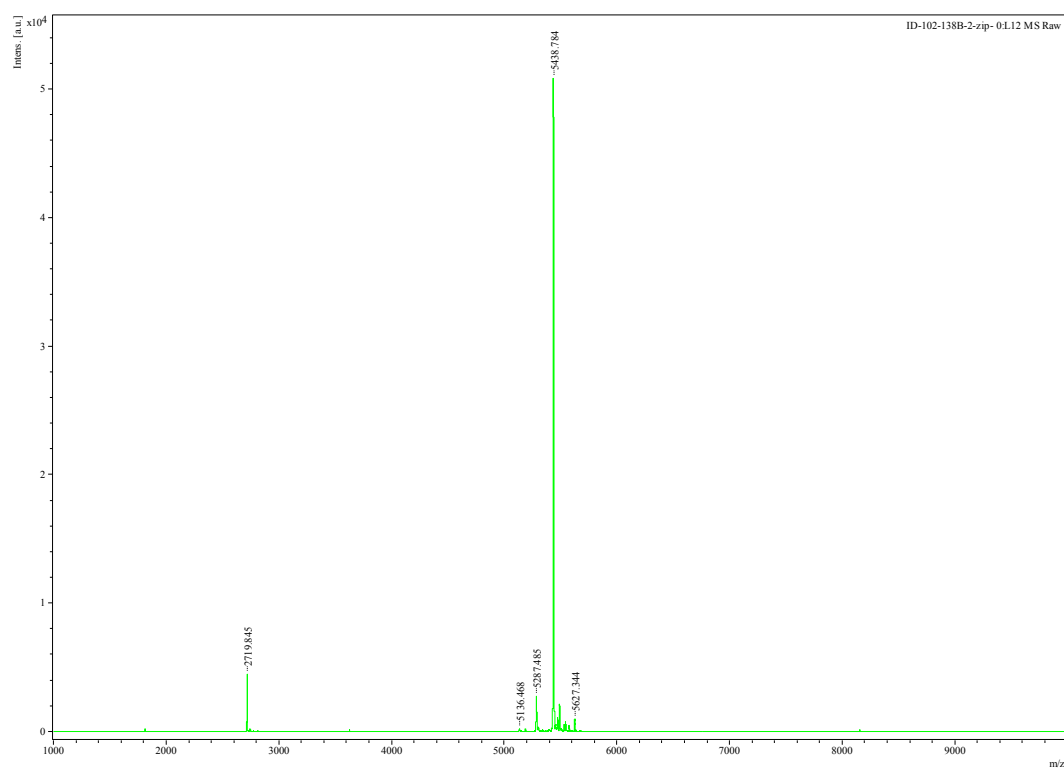
ODN2-2: 5'- GGAGAGGA α G AGAGGAGG -3'

calculated for $[M + H]^+$: 5438.6, found 5438.6.



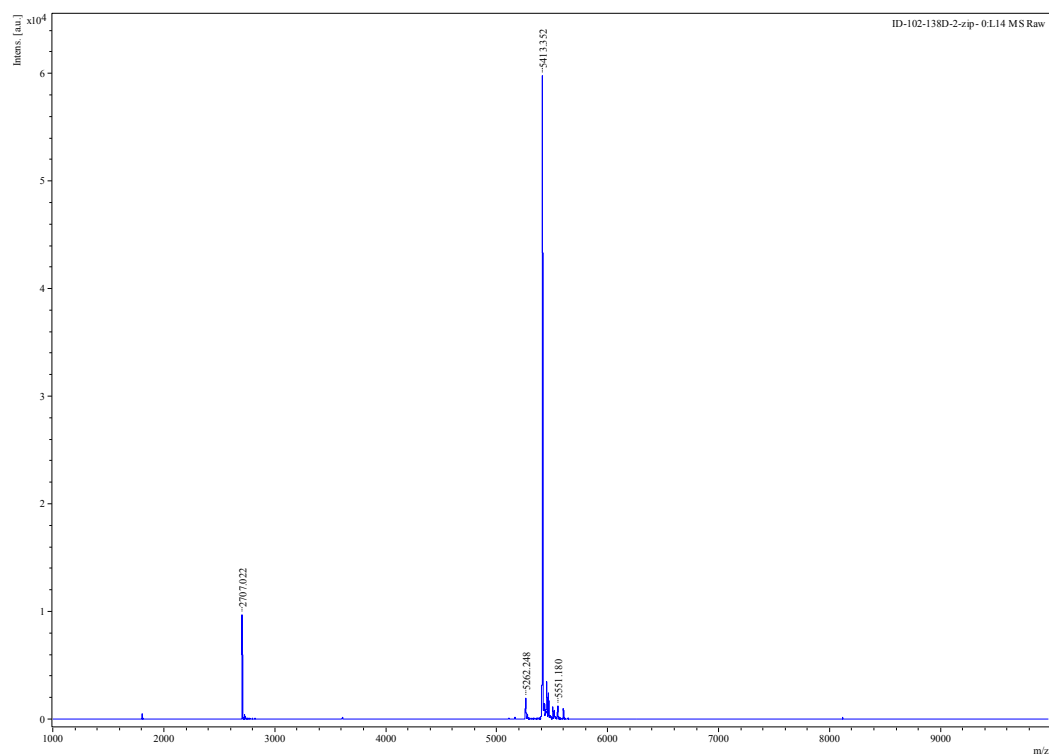
ODN2-3: 5'- GGAGAGGA **α C** AGAGGAGG -3'

calculated for $[M + H]^+$: 5398.6, found 5398.4.



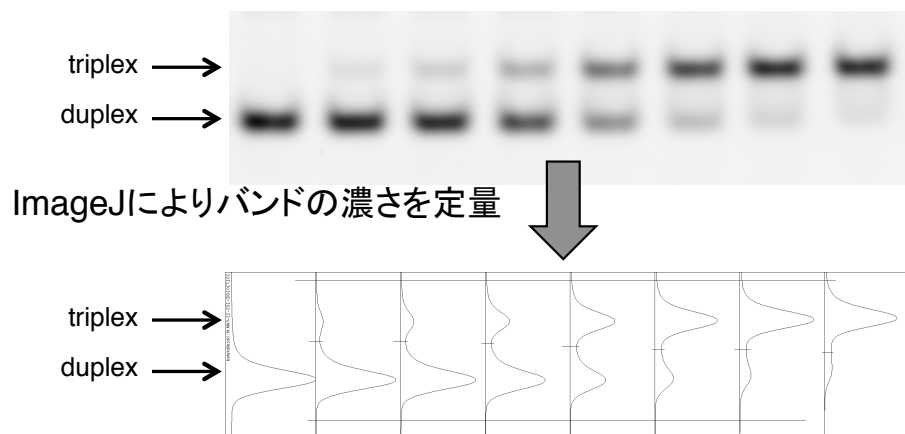
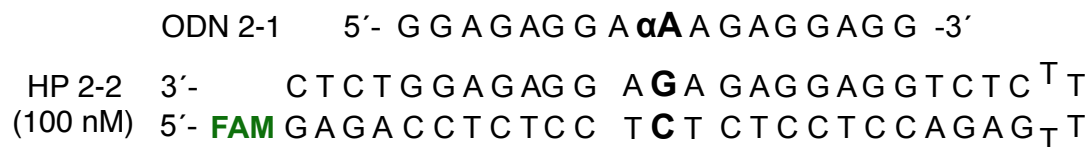
ODN2-4: 5'- GGAGAGGA **α T** AGAGGAGG -3'

calculated for $[M + H]^+$: 5423.6, found 5422.6.



TFO の K_d 値の算出

まず、40 nM の蛍光ラベル化されたヘアピン型二重鎖 DNA(HP2-2)に対して、TFO の濃度を変えた条件を複数用意し、ゲルシフトアッセイを行った。得られた図から、HP-2-2 全量に対する三重鎖が形成されている割合(rate of triplex, 以後 Tr と表す)を ImageJ によって定量した。



rate of triplex (%)		11	17	29	54	74	83	89
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
ODN 2-1 (nM)	0	10	20	40	100	200	400	1000

Incubation: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM MgCl₂, 1 mM spermidine, 2.5 % sucrose, 14 °C, 90 min.
Electrophoresis: 10% Native gel containing 20 mM Tris-borate, 20 mM MgCl₂, 180V, 14 to 17 °C, 2 h.

ここで、HP-DNA と TFO の相互作用を $\text{duplex} + \text{TFO} \rightleftharpoons \text{triplex}$ のみであると仮定すると、

$$K_d = \frac{[\text{duplex}][\text{TFO}]}{[\text{triplex}]}$$

と K_d 値が定義される。ここで、系に加えた HP-DNA および TFO の全量の濃度をそれぞれ $[\text{HP}]_{\text{all}}$ 、 $[\text{TFO}]_{\text{all}}$ とすると、

$$[\text{duplex}] = [\text{HP}]_{\text{all}} \times (1 - \text{Tr})$$

$$[\text{triplex}] = [\text{HP}]_{\text{all}} \times \text{Tr}$$

$$[\text{TFO}] = [\text{TFO}]_{\text{all}} - [\text{HP}]_{\text{all}} \times \text{Tr}$$

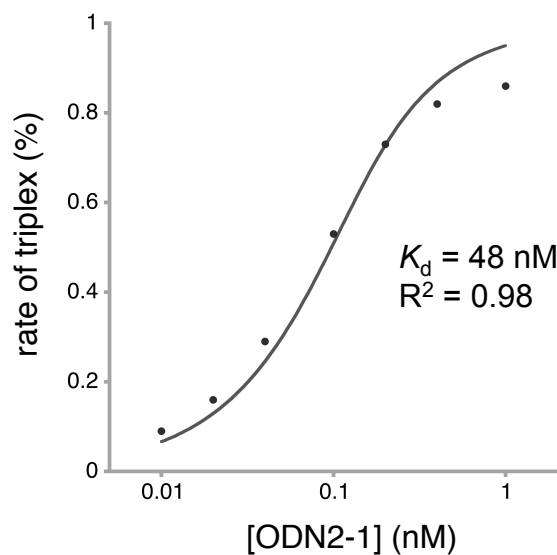
であることから、

$$K_d = \frac{[\text{HP}]_{\text{all}} \times (1 - \text{Tr}) \times ([\text{TFO}]_{\text{all}} - [\text{HP}]_{\text{all}} \times \text{Tr})}{[\text{HP}]_{\text{all}} \times \text{Tr}}$$

と表される。ここで、Tr を $[\text{TFO}]_{\text{all}}$ の関数として考えると、

$$\text{Tr} = \frac{[\text{TFO}]_{\text{all}} + [\text{HP}]_{\text{all}} + K_d - \sqrt{([\text{TFO}]_{\text{all}} + [\text{HP}]_{\text{all}} + K_d)^2 - 4[\text{TFO}]_{\text{all}} [\text{HP}]_{\text{all}}}}{2 \times [\text{HP}]_{\text{all}}}$$

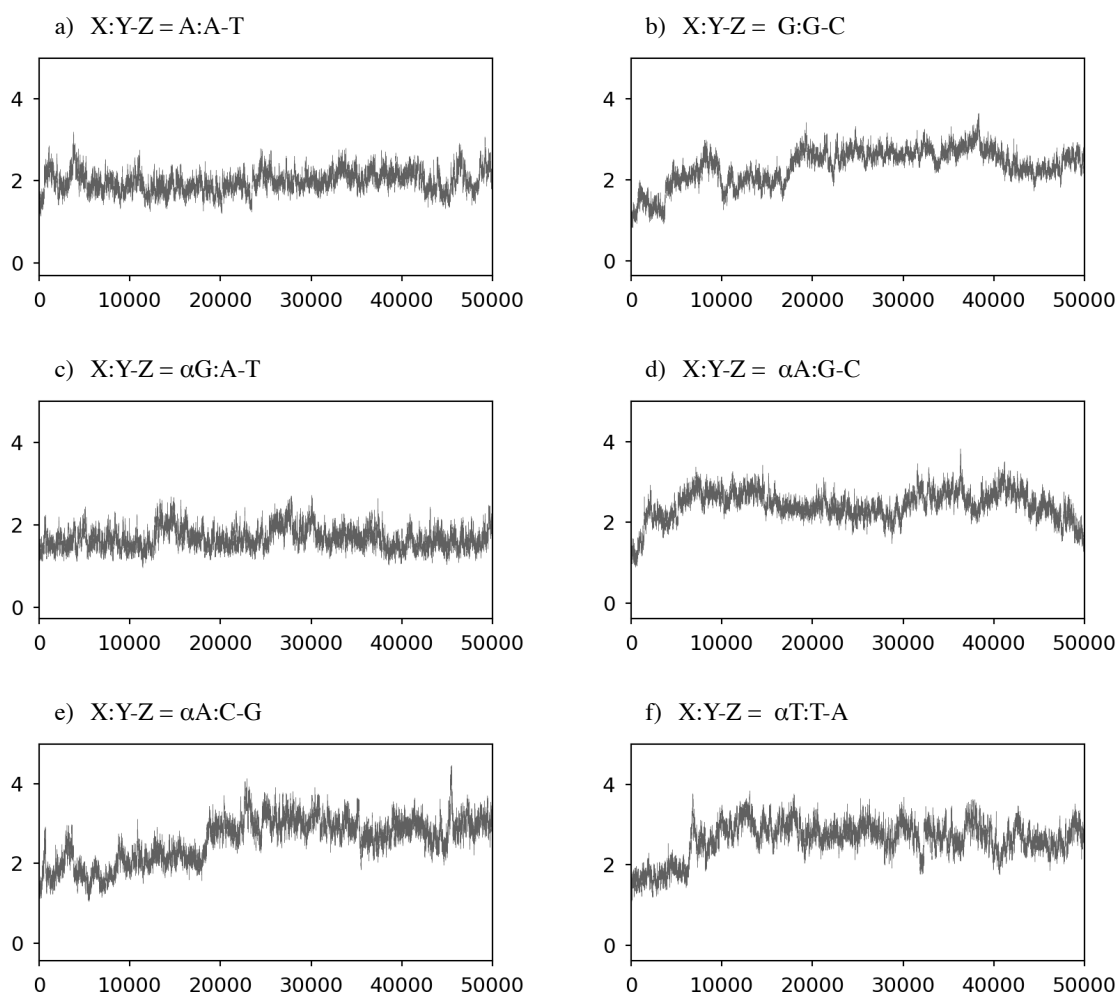
が得られるので、これを回帰曲線として、ゲルシフトアッセイから得た $[\text{TFO}]_{\text{all}}$ および Tr の値を用いてフィッティングして K_d 値を得た。



分子動力学計算中の三重鎖構造の RMSD

分子動力学計算中の三重鎖構造の、計算開始時からの構造の崩れの指標である root-mean-square distance (RMSD)を示す。今回の計算では、構造に大きな崩れは見られなかった。

	TFO	5'- GGGGA	X	AGGGGG	-3'
target		3'- GGGGA	Y	AGGGGG	-5'
duplex		5'- CCCCT	Z	TCCCCC	-3'



実験編(第3章)

第3章の実験で用いた試薬、機器は以下の通りである。

有機合成試薬、有機溶媒

Sigma-Aldrich、TCI America などから購入した。

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC)

Kieselgel 60 F-254 (Merck) を用いた。展開溶媒には、ヘキサン:ジクロロメタン系、ジクロロメタン:メタノール系、ヘキサン:酢酸エチル系などを用いた。化合物の検出には、UV (254 nm)、あるいは発色試薬として、5%硫酸メタノール溶液、アニスアルデヒド溶液、モリブデン酸アンモニウムセリウム溶液などを用いた。

シリカゲルクロマトグラフィー

60Å silicagel (SORBTECH)を使用した。溶媒溶出には、ヘキサン:ジクロロメタン系、ジクロロメタン:メタノール系、ヘキサン:酢酸エチル系などを用い、必要であれば pyridine あるいは Et₃N を添加した。

¹H-NMR スペクトル

Bruker Avance-III 400 (400 MHz)を用いて測定した。有機溶媒中では、測定溶媒に由来するピークを内部標準として用いた。

¹³C-NMR スペクトル

Bruker Avance-III 400 (101 MHz) を用いて測定した。有機溶媒中では、テトラメチルシラン (TMS) あるいは測定溶媒に由来するピークを内部標準として用いた。

³¹P-NMR スペクトル

Bruker Avance-III 400 (162 MHz)を用いて測定した。

ESI-TOF-MS 分析計

CU-Boulder Central Analytical Laboratory & Mass Spectrometry Core Facility に依頼して測定した。測定には Synapt G2 HDMS mass spectrometer (Waters)を用いた。

LC-MS 分析計

Agilent 6120 を用いた。カラムは Agilent Hypersil ODS 5 μm column (4.0 mm i.d. $\times$ 250 mm) を用いた。溶媒 I (CH_3CN) を溶媒 II (0.05 M triethylammonium bicarbonate buffer, pH 8.5.) に対して 0% から 100% まで増加させ、室温で 1.5 mL/min の速度で 50 分間流した。

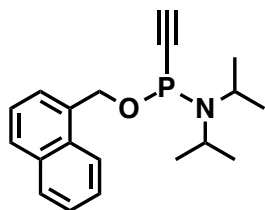
DNA/RNA 自動合成機、DNA オリゴマー合成

ABI 社の 394 DNA Synthesizer を使用した。天然型ホスホロアミダイトユニットおよびその他の必要な試薬は Glen Reserch Inc. より購入し、推奨される手法に従って用いた。本研究において合成した修飾体ホスホロアミダイトユニットは無水アセトニトリル 0.1 M) に溶解し、DNA 自動合成機に適用した。

新規化合物について、その合成法を示す。化合物 **3-10**、**3-11a~d**、**3-12a~d**、**3-13a~g**、**3-14a~g** はホスホネート部位およびホスホロアミダイト部位の不斉に由来するジアステレオマーの混合物である。

化合物 **3-10**

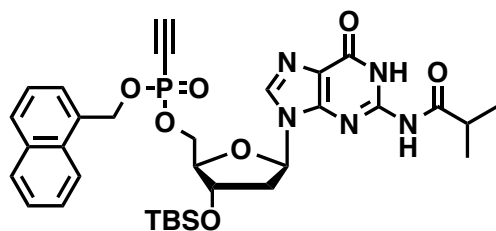
1-Naphthylmethyl *N,N*-diisopropylethynylphosphinoamidite



Bis(*N,N*-diisopropylamino)-ethynylphosphine (**3-2**) (13.8 g, 53.9 mmol) was dissolved in anhydrous MeCN (130 mL). To the solution were added 1-naphthalenemethanol (8.52 g, 53.9 mmol) and 0.45 M 1*H*-tetrazole solution in MeCN (95.8 mL, 43.1 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was poured into *n*-hexane, and extracted with water and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The resulting yellow oil was purified by silica gel chromatography using 0-3% gradient of EtOAc in hexane to afford the compound **3-10** (14.8 g, 88%) as colorless oil. ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.22 (d, 12H, J = 6.8), 3.12 (d, 3H, J = 2.0), 3.80 (br, 2H), 5.20 (d, 2H, J = 8.0), 7.41-7.57 (m, 4H), 7.77-7.81 (m, 1H), 7.84-7.88 (m, 1H), 8.04-8.08 (d, 1H, J = 4.6); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 24.3, 48.1, 66.8, 66.9, 85.6, 85.8, 91.8, 91.9, 123.9, 125.4, 125.8, 126.2, 128.5, 128.7, 131.4, 133.8, 134.6, 134.7; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 94.8; HRMS (ESI) m/z ($\text{M}+\text{Li}$): calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NOPLi}]^+$, 320.1756; found, 320.1751.

化合物 **3-11a**

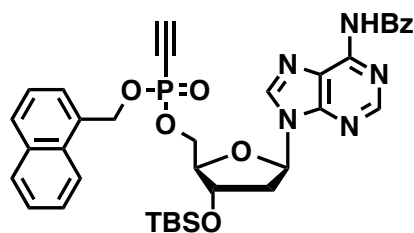
***N*²-Isobutylryl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyguanosine-5'-yl 1-naphtylmethyl ethynylphosphonate**



Compound **3-10** (3.11 g, 9.95 mmol) was dissolved in anhydrous MeCN (15 mL). To the solution was added *N*²-isobutylryl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyguanosine (3.00 g, 6.64 mmol) and 1*H*-tetrazole solution 0.45 M in MeCN (17.7 mL, 7.97 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-2% gradient of MeOH in CHCl₃ and concentrated under reduced pressure. The residue (3.56 g) was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL). To the solution was added *tert*-butyl hydroperoxide solution 5.0-6.0 M in decane (2.41 mL, 10.7-12.9 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction mixture was concentrated and purified by silica gel chromatography using 0-4% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-11a** (3.60 g, 80% for 2 steps) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.02-0.09 (m, 6H), 0.82-0.87 (m, 9H), 1.06-1.14 (m, 6H), 2.24-2.35 (m, 1H), 2.65-2.80 (m, 2H), 3.98-4.04 (m, 1H), 4.07-4.17 (m, 1H), 4.17-4.26 (m, 1H), 4.48-4.54 (m, 1H), 4.65-4.72 (m, 1H), 5.50-5.56 (m, 2H), 6.18-6.26 (m, 1H), 7.45-7.53 (m, 1H), 7.53-7.62 (m, 3H), 7.94-8.09 (m, 3H), 8.20-8.23 (m, 1H), 11.56-11.62 (m, 1H), 12.02-12.08 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ -5.1, -5.1, -4.9, 17.6, 18.8, 18.8, 18.9, 25.6, 34.8, 38.7, 65.9, 66.0, 66.0, 66.7, 66.8, 66.8, 66.8, 71.8, 71.9, 72.0, 72.0, 74.7, 74.8, 82.8, 82.8, 84.8, 84.9, 84.9, 85.0, 93.2, 93.4, 93.7, 93.9, 120.3, 120.3, 123.3, 123.4, 125.2, 125.3, 126.1, 126.7, 126.7, 127.5, 127.6, 128.6, 129.6, 129.7, 130.7, 130.7, 130.8, 130.8, 133.2, 133.2, 137.4, 137.4, 148.1, 148.5, 154.8, 180.0, 180.0; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ -8.1, -8.1; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₃₃H₄₂N₅NaO₇PSi]⁺, 702.2489; found, 702.2479.

化合物 3-11b

***N*⁶-Benzoyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyadenosine-5'-yl 1-naphtylmethyl ethynylphosphonate**

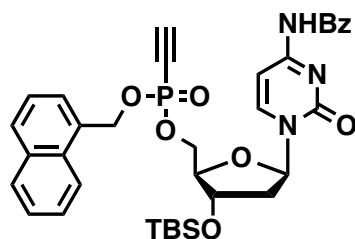


Compound **3-15a** (4.91 g, 15.7 mmol) was dissolved in anhydrous MeCN (40 mL). To the solution was added *N*⁶-Benzoyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyadenosine (4.92 g, 10.5 mmol) and 1*H*-tetrazole solution 0.45 M in MeCN (27.8 mL, 12.5 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature. After 2 h, compound xx (3.32 g, 10.5 mmol) was added to the reaction mixture and stirred for another 1 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-2% gradient of MeOH in CHCl₃ and concentrated under reduced pressure. The residue (6.34 g) was dissolved in CH₂Cl₂ (80 mL). To the solution was added *tert*-butyl hydroperoxide solution 5.0-6.0 M in decane (3.4 mL, 17-20 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated and purified by silica gel chromatography using 0-3% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-11b** (6.38 g, 87% for 2 steps) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.07-0.10 (m, 6H), 0.85-0.90 (m, 9H), 2.32-2.42 (m, 1H), 2.89-3.01 (m, 1H), 4.04-4.10 (m, 1H), 4.13-4.22 (m, 1H), 4.25-4.35 (m, 1H), 4.61-4.72 (m, 2H), 5.50-5.57 (m, 2H), 6.47-6.54 (m, 1H), 7.44-7.51 (m, 1H), 7.52-7.60 (m, 5H), 7.62-7.68 (m, 1H), 7.93-7.99 (m, 2H), 8.03-8.09 (m, 3H), 8.64-8.69 (m, 1H), 8.70-8.74 (m, 1H), 11.21-11.26 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ -4.6, -4.4, 18.1, 26.1, 38.8, 66.3, 67.2, 67.2, 67.3, 72.3, 72.4, 72.5, 75.2, 75.3, 84.3, 84.4, 85.2, 85.3, 93.5, 93.7, 94.0, 94.2, 123.8, 125.7, 126.4, 126.6, 127.2, 128.0, 128.1, 128.9, 129.0, 129.0, 130.1, 131.2, 131.3, 131.3, 132.9, 133.7, 133.8, 143.8, 150.9, 152.0, 152.3, 166.1; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ -8.2, -8.1; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₃₆H₄₀N₅NaO₆PSi]⁺, 720.2383; found, 720.2370.

化合物 **3-11c**

***N*⁴-Benzoyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-deoxycytidine-5'-yl ethynylphosphonate**

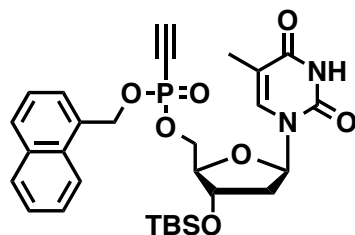
1-naphtylmethyl



Compound **3-15b** (7.58 g, 24.2 mmol) was dissolved in anhydrous MeCN (100 mL). To the solution was added *N*⁴-Benzoyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-deoxycytidine (7.18 g, 16.1 mmol) and 1*H*-tetrazole solution 0.45 M in MeCN (53.8 mL, 24.2 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-2% gradient of MeOH in CHCl₃ and concentrated under reduced pressure. The residue (9.87 g) was dissolved in CH₂Cl₂ (140 mL). To the solution was added *tert*-butyl hydroperoxide solution 5.0-6.0 M in decane (6 mL, 30-36 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated and purified by silica gel chromatography using 0-2% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-11c** (9.43 g, 87% for 2 steps) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.00-0.08 (m, 6H), 0.77-0.90 (m, 9H), 2.03-2.17 (m, 1H), 2.20-2.32 (m, 1H), 4.00-4.08 (m, 1H), 4.17-4.28 (m, 2H), 4.32-4.40 (m, 1H), 4.70-4.77 (m, 1H), 5.56-5.63 (m, 2H), 6.10-6.17(m, 1H), 7.28-7.38 (m, 1H), 7.45-7.68 (m, 7H), 7.92-8.04 (m, 4H), 8.04-8.18 (m, 2H), 11.23-11.33 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ -5.1, -4.9, 17.6, 25.6, 65.8, 65.8, 66.9, 66.9, 67.0, 71.5, 71.8, 71.9, 74.7, 74.8, 84.8, 84.9, 86.4, 93.3, 93.4, 93.8, 93.9, 96.3, 123.4, 125.3, 126.1, 126.7, 126.8, 127.6, 127.6, 128.4, 128.6, 129.7, 129.7, 130.7, 130.8, 130.8, 130.8, 130.9, 132.8, 133.1, 133.3, 144.7, 154.3, 163.2, 167.3; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ -8.1; HRMS (ESI) *m/z* (M+H): calcd for [C₃₅H₄₀N₃O₇PSi]⁺, 674.2451; found, 674.2452.

化合物 3-11d

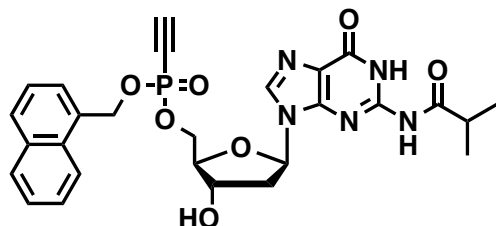
3'-O-*tert*-Butyldimethylsilylthymidine-5'-yl 1-naphtylmethyl ethynylphosphonate



Compound **3-15c** (659 mg, 2.10 mmol) was dissolved in anhydrous MeCN (10.0 mL). To the solution was added 3'-O-*tert*-butyldimethylsilylthymidine (500 mg, 1.40 mmol) and 1*H*-tetrazole solution 0.45 M in MeCN (3.72 mL, 1.68 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-2% gradient of MeOH in CHCl₃ and concentrated under reduced pressure to afford the colorless residue (740 mg). A portion of the residue (668 mg) was dissolved in CH₂Cl₂ (11 mL). To the solution was added *tert*-butyl hydroperoxide solution 5.0-6.0 M in decane (448 μ L, 2.2-2.7 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was concentrated and purified by silica gel chromatography using 0-2% of MeOH in CH₂Cl₂ to afford the compound **3-11d** (668 mg, 90% for 2 steps) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 0.01-0.05 (m, 6H), 0.80-0.86 (m, 9H), 1.65-1.73 (m, 3H), 1.95-2.18 (m, 2H), 3.88-3.94 (m, 1H), 4.09-4.24 (m, 2H), 4.30-4.38 (m, 1H), 4.68-4.76 (m, 1H), 5.56-5.62 (m, 2H), 6.12-6.18 (m, 1H), 7.40-7.45 (m, 1H), 7.48-7.54 (m, 1H), 7.54-7.66 (m, 3H), 7.96-8.02 (m, 2H), 8.05-8.12 (m, 1H), 11.33-11.36 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ -5.0, -5.0, -4.9, 12.1, 17.6, 25.6, 38.7, 38.8, 65.9, 66.0, 66.8, 66.8, 66.9, 67.0, 71.7, 71.7, 71.8, 71.9, 74.7, 74.8, 84.0, 84.1, 84.2, 93.2, 93.5, 93.7, 94.0, 109.8, 123.3, 123.4, 125.3, 126.2, 126.7, 126.7, 127.6, 127.7, 128.6, 129.7, 129.7, 130.7, 130.8, 130.8, 130.8, 130.9, 130.9, 133.3, 135.7, 150.4, 163.6; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ -8.0, -8.0; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₂₉H₃₇N₂NaO₇PSi]⁺, 607.2006; found, 607.2007.

化合物 3-12a

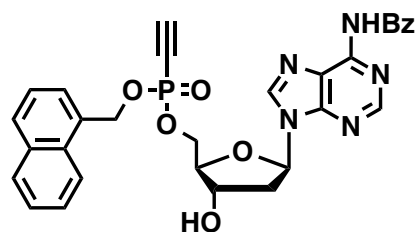
*N*²-Isobutyryl-2'-deoxyguanosine-5'-yl 1-naphtylmethyl ethynylphosphonate



Compound **3-11a** (3.17 g, 4.66 mmol) was dissolved in *N,N*-dimethylformamide (15 mL). To the solution was added triethylamine trihydrofluoride (2.28 mL, 14.0 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with extracted with sat. NaHCO₃, water and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue dissolved in CHCl₃ (8 mL) and was purified by silica gel chromatography using 0-6% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-12a** (2.02 g, 77%) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.05-1.14 (m, 6H), 2.27-2.37 (m, 1H), 2.57-2.68 (m, 1H), 2.68-2.78 (m, 1H), 4.01-4.07 (m, 1H), 4.13-4.22 (m, 1H), 4.22-4.31 (m, 1H), 4.38-4.46 (m, 1H), 4.61-4.66 (m, 1H), 5.48-5.56 (m, 3H), 6.25 (t, 1H, *J* = 7.8), 7.44-7.52 (m, 1H), 7.52-7.62 (m, 3H), 7.93-8.07 (m, 3H), 8.16-8.18 (m, 1H), 11.58-11.62 (m, 1H), 12.02-12.05 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 18.8, 18.8, 18.8, 18.9, 34.8, 38.8, 38.9, 66.7, 66.7, 66.8, 70.2, 70.2, 71.9, 72.0, 74.7, 74.9, 83.1, 83.1, 84.7, 84.8, 93.1, 93.3, 93.6, 93.7, 120.4, 120.4, 123.3, 123.4, 125.3, 125.3, 126.1, 126.1, 126.7, 126.7, 126.8, 127.5, 127.6, 128.6, 129.6, 129.6, 130.7, 130.7, 130.8, 133.2, 133.2, 137.4, 148.1, 148.4, 154.8, 180.0, 180.1; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ -8.1, -8.1; HRMS (ESI) *m/z* (*M*+*H*): calcd for [C₂₇H₂₉N₅O₇P]⁺, 566.1805; found, 566.1799.

化合物 3-12b

*N*⁶-Benzoyl-2'-deoxyadenosine-5'-yl 1-naphtylmethyl ethynylphosphonate

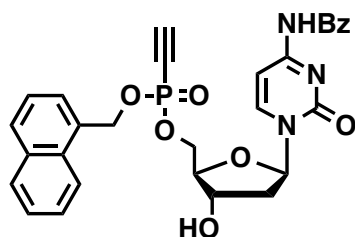


Compound **3-11b** (6.82 g, 9.14 mmol) was dissolved in *N,N*-dimethylformamide (45 mL). To the solution was added triethylamine trihydrofluoride (4.46 mL, 27.4 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was poured into EtOAc,

and extracted with sat. NaHCO_3 , water and washed with sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue dissolved in CHCl_3 (20 mL) and precipitated in Et_2O (400 mL). The resulting white powder was again dissolved in CHCl_3 (20 mL) and precipitated in Et_2O (400 mL) to afford the compound **3-12b** (3.99 g, 75%) as white powder. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2.35-2.45 (m, 1H), 2.80-2.92 (m, 1H), 4.06-4.11 (m, 1H), 4.16-4.24 (m, 1H), 4.27-4.36 (m, 1H), 4.48-4.55 (m, 1H), 4.57-4.64 (m, 1H), 5.49-5.54 (m, 2H), 5.57-5.63 (m, 1H), 6.49-6.55 (m, 1H), 7.43-7.50 (m, 1H), 7.51-7.61 (m, 5H), 7.61-7.69 (m, 1H), 7.93-8.00 (m, 2H), 8.01-8.07 (m, 3H), 8.63-8.66 (m, 1H), 8.70-8.73 (m, 1H), 11.22 (s, 1H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 38.4, 66.6, 66.6, 66.6, 66.7, 66.7, 66.7, 66.7, 70.3, 70.3, 71.9, 72.0, 74.8, 74.9, 83.8, 83.8, 84.8, 84.8, 84.9, 84.9, 93.0, 93.2, 93.5, 93.7, 123.4, 125.3, 125.9, 126.1, 126.8, 127.6, 127.6, 128.5, 128.5, 128.6, 129.6, 130.8, 130.8, 130.8, 130.9, 132.5, 133.2, 133.3, 143.1, 150.4, 151.6, 151.9, 165.6; ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ -8.1, -8.2; HRMS (ESI) m/z ($\text{M}+\text{H}$): calcd for $[\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}]^+$, 584.1699; found, 584.1702.

化合物 **3-12c**

***N*⁴-Benzoyl-2'-deoxycytidine-5'-yl 1-naphthylmethyl ethynylphosphonate**

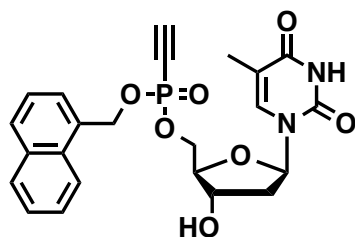


Compound **3-11c** (9.43 g, 14.0 mmol) was dissolved in *N,N*-dimethylformamide (140 mL). To the solution was added triethylamine trihydrofluoride (6.84 mL, 42.0 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was poured into EtOAc , and extracted with extracted with sat. NaHCO_3 , water and washed with sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-4% gradient of MeOH in CHCl_3 to afford the compound **3-12c** (6.43 g, 82%) as white foam. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.98-2.11 (m, 1H), 2.25-2.37 (m, 1H), 4.03-4.09 (m, 1H), 4.18-4.33 (m, 3H), 4.67-4.75 (m, 1H), 5.48-5.53 (m, 1H), 5.55-5.63 (m, 2H), 6.12-6.20 (m, 1H), 7.29-7.35 (m, 1H), 7.47-7.67 (m, 7H), 7.94-8.03 (m, 4H), 8.05-8.11 (m, 1H), 8.11-8.18 (m, 1H), 11.25-11.29 (m, 1H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 66.4, 66.4, 66.5, 66.8, 66.9, 66.9, 69.9, 69.9, 71.9, 72.0, 74.8, 74.9, 84.8, 84.9, 85.0, 86.5, 93.2, 93.4, 93.7, 93.9, 96.3, 123.4, 125.3, 126.2, 126.8, 126.8, 127.6, 127.6, 128.5, 128.6, 129.7,

130.8, 130.8, 130.8, 130.9, 132.8, 133.1, 133.3, 144.7, 154.3, 163.1, 167.3; ^{31}P NMR (DMSO- d_6) δ -8.0, -8.0; HRMS (ESI) m/z ($M+\text{Na}$): calcd for $[\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{P}]^+$, 582.1406; found, 582.1414.

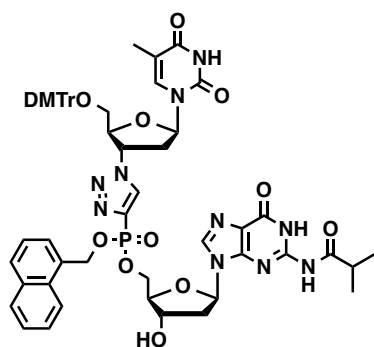
化合物 **3-12d**

Thymidine-5'-yl 1-naphthylmethyl ethynylphosphonate



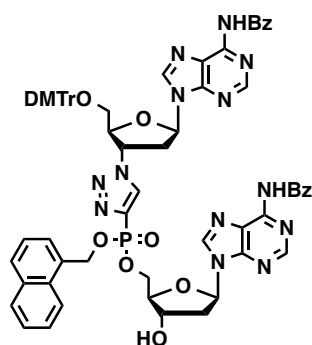
Compound **3-11d** (663 mg, 1.13 mmol) was dissolved in *N,N*-dimethylformamide (5.0 mL). To the solution was added triethylamine trihydrofluoride (546 μL , 3.39 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with extracted with sat. NaHCO_3 , water and washed with sat. NaCl . The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-3% gradient of MeOH in CHCl_3 to afford the compound **3-12d** (442 mg, 83%) as white foam. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.64-1.70 (m, 3H), 1.96-2.12 (m, 2H), 3.90-3.97 (m, 1H), 4.14-4.29 (m, 3H), 4.65-4.72 (m, 1H), 5.43-5.48 (m, 1H), 5.54-5.62 (m, 2H), 6.14-6.24 (m, 1H), 7.40-7.45 (m, 1H), 7.48-7.54 (m, 1H), 7.54-7.64 (m, 3H), 7.94-8.02 (m, 2H), 8.04-8.12 (m, 1H), 11.29-11.36 (m, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 12.0, 38.7, 38.7, 66.5, 66.6, 66.6, 66.7, 66.8, 66.8, 66.9, 70.1, 70.1, 71.8, 72.0, 74.7, 74.9, 83.9, 84.1, 84.1, 84.2, 84.2, 93.1, 93.4, 93.6, 93.9, 109.8, 123.4, 123.4, 125.3, 125.3, 126.2, 126.2, 126.7, 126.7, 127.6, 127.6, 128.6, 129.7, 130.8, 130.8, 130.8, 130.9, 133.3, 135.6, 135.6, 150.4, 163.6, 163.6; ^{31}P NMR (DMSO- d_6) δ -8.0, -8.0; HRMS (ESI) m/z ($M+\text{Na}$): calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{P}]^+$, 493.1140; found, 493.1145.

化合物 **3-13a**



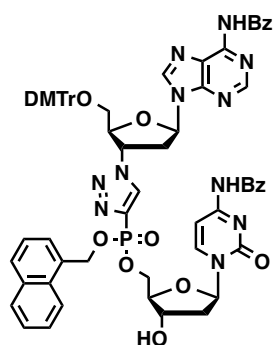
Compound **3-12a** (2.30 g, 4.06 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (15 mL). To the solution was added 3'-azido-5'-*O*-(dimethoxytrityl)-3'-deoxythymidine (**3-7**) (2.32 g, 4.06 mmol) and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (110 mg, 207 μ mol) and the solution of CuSO₄ (32.5 mg, 2.07 mmol) and (+)-sodium L-ascorbate (402 mg, 2.07 mmol) in water (7.5 ml) and MeOH (7.5 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 1.5 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-7% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-13a** (4.12 g, 89%) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.05-1.14 (m, 6H), 1.52-1.62 (m, 3H), 2.26-2.36 (m, 1H), 2.58-2.68 (m, 1H), 2.68-2.86 (m, 3H), 3.26-3.38 (m, 2H), 3.65-3.73 (m, 6H), 4.05-4.12 (m, 1H), 4.17-4.39 (m, 3H), 4.40-4.46 (m, 1H), 5.47-5.58 (m, 3H), 5.58-5.70 (m, 1H), 6.21-6.28 (m, 1H), 6.38-6.47 (m, 1H), 6.81-6.88 (m, 4H), 7.13-7.34 (m, 9H), 7.37-7.55 (m, 4H), 7.63-7.68 (m, 1H), 7.87-8.05 (m, 3H), 8.13-8.20 (m, 1H), 8.85-8.95 (m, 1H), 11.38-11.44 (m, 1H), 11.57-11.65 (m, 1H), 11.98-12.07 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 11.8, 18.8, 18.8, 18.8, 18.8, 34.8, 37.2, 37.2, 38.9, 55.0, 55.0, 59.9, 63.1, 65.9, 66.0, 66.0, 66.1, 66.3, 66.4, 70.3, 70.3, 78.6, 79.0, 79.3, 82.2, 82.2, 83.1, 83.2, 83.9, 84.0, 84.9, 85.0, 85.1, 86.0, 86.0, 109.9, 113.2, 120.3, 120.4, 123.3, 123.4, 125.2, 125.2, 126.0, 126.0, 126.6, 126.6, 126.8, 127.1, 127.3, 127.6, 127.9, 128.4, 129.3, 129.4, 129.7, 130.7, 130.8, 131.0, 131.1, 131.2, 131.2, 131.2, 131.2, 131.4, 131.4, 133.1, 133.1, 134.7, 134.8, 135.1, 135.2, 136.2, 136.3, 137.1, 137.2, 137.4, 137.5, 144.5, 148.0, 148.0, 148.3, 148.4, 150.3, 154.8, 158.1, 158.1, 163.7, 180.0, 180.0; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.0, 8.1; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₅₈H₅₉N₁₀NaO₁₃P]⁺, 1157.3899; found, 1157.3879.

化合物 **3-13b**



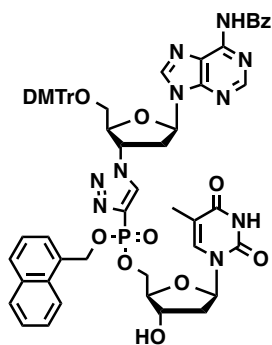
Compound **3-12b** (1.00 g, 1.71 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (6 mL). To the solution was added 3'-azido-*N*⁴-benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyadenosine (**3-16a**) (1.16 g, 1.71 mmol) and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (45.3 mg, 85.5 μ mol) and the solution of CuSO₄ (13.7 mg, 85.5 μ mol) and (+)-sodium L-ascorbate (163 mg, 855 μ mol) in water (3 mL) and MeOH (3 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 2 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-7% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-13b** (1.86 g, 86%) as pale yellow foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.36-2.46 (m, 1H), 2.77-2.91 (m, 1H), 3.16-3.19 (m, 1H), 3.22-3.35 (m, 2H), 3.41-3.53 (m, 1H), 3.63-3.70 (m, 6H), 4.11-4.19 (m, 1H), 4.22-4.34 (m, 1H), 4.34-4.43 (m, 1H), 4.43-4.60 (m, 2H), 5.52-5.58 (m, 2H), 5.58-5.63 (m, 1H), 5.92-6.05 (m, 1H), 6.50-6.58 (m, 1H), 6.67-6.73 (m, 1H), 6.73-6.82 (m, 4H), 7.07-7.14 (m, 5H), 7.14-7.20 (m, 2H), 7.21-7.26 (m, 2H), 7.37-7.45 (m, 1H), 7.47-7.70 (m, 9H), 7.88-7.96 (m, 2H), 7.96-8.09 (m, 5H), 8.64-8.68 (m, 1H), 8.69-8.74 (m, 3H), 8.90-8.98 (m, 1H), 11.20-11.28 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 36.6, 36.7, 38.6, 38.7, 54.9, 55.0, 60.3, 63.1, 66.1, 66.1, 70.4, 70.5, 82.9, 82.9, 83.6, 83.6, 83.7, 85.1, 85.2, 85.7, 113.1, 123.4, 123.5, 125.2, 125.3, 125.8, 125.8, 126.0, 126.1, 126.7, 126.7, 127.3, 127.3, 127.5, 127.7, 128.5, 128.5, 128.5, 129.4, 129.6, 130.8, 130.8, 131.0, 131.1, 131.2, 131.4, 132.4, 132.5, 133.2, 133.3, 133.3, 134.8, 134.9, 135.2, 135.2, 135.3, 137.2, 137.3, 142.9, 143.0, 143.6, 144.5, 150.4, 150.5, 151.6, 151.7, 151.9, 158.0, 165.6; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.0, 8.1; HRMS (ESI) *m/z* (M+H): calcd for [C₆₈H₆₁N₁₃O₁₁P]⁺, 1266.4351; found, 1266.4343.

化合物 **3-13c**



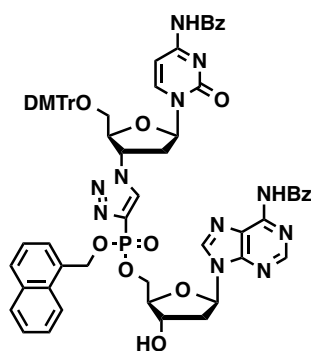
Compound **3-12c** (2.50 g, 4.46 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (20 mL). To the solution was added 3'-azido-*N*⁴-benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyadenosine (**3-16a**) (3.05 g, 4.46 mmol) and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (118 mg, 223 μ mol) and the solution of CuSO₄ (35.7 mg, 223 μ mol) and (+)-sodium L-ascorbate (442 mg, 2.23 mmol) in water (10 ml) and MeOH (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 2 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-7% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-13c** (4.95 g, 89%) as pale yellow foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.97-2.11 (m, 1H), 2.25-2.37 (m, 1H), 3.10-3.20 (m, 1H), 3.23-3.32 (m, 2H), 3.42-3.54 (m, 1H), 3.62-3.71 (m, 6H), 4.06-4.13 (m, 1H), 4.22-4.38 (m, 3H), 4.45-4.58 (m, 1H), 5.48-5.52 (m, 1H), 5.55-5.67 (m, 2H), 5.93-6.05 (m, 1H), 6.13-6.20 (m, 1H), 6.69-6.79 (m, 5H), 7.07-7.14 (m, 5H), 7.14-7.20 (m, 2H), 7.21-7.28 (m, 3H), 7.42-7.49 (m, 3H), 7.49-7.62 (m, 6H), 7.62-7.69 (m, 1H), 7.87-7.96 (m, 4H), 8.02-8.10 (m, 3H), 8.13-8.22 (m, 1H), 8.66-8.77 (m, 2H), 8.95-9.05 (m, 1H), 11.21-11.32 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 36.7, 36.8, 40.4, 54.9, 60.3, 63.0, 63.1, 65.8, 65.8, 65.9, 66.2, 66.3, 66.3, 69.9, 82.8, 82.9, 83.6, 83.6, 85.1, 85.1, 85.2, 85.7, 86.4, 86.4, 96.2, 113.1, 123.5, 123.5, 125.3, 125.3, 126.0, 126.1, 126.1, 126.7, 126.7, 127.3, 127.4, 127.5, 127.7, 128.4, 128.5, 128.5, 129.4, 129.4, 129.6, 130.8, 130.8, 131.2, 131.2, 131.3, 131.3, 131.3, 131.5, 132.5, 132.7, 133.0, 133.2, 133.4, 134.9, 135.2, 135.2, 135.3, 137.2, 137.3, 143.6, 144.5, 144.7, 150.5, 151.6, 151.8, 154.3, 158.0, 163.1, 165.6, 167.2; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.2; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₆₇H₆₀N₁₁NaO₁₂P]⁺, 1264.4058; found, 1264.4055.

化合物 3-13d



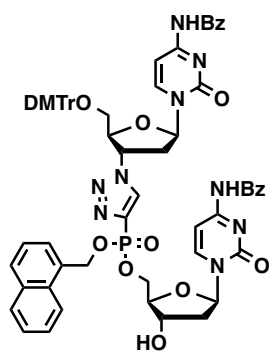
Compound **3-12d** (2.50 g, 5.32 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (20 mL). To the solution was added 3'-azido-*N*⁴-benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxyadenosine **3-16a** (3.63 g, 5.32 mmol) and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (141 mg, 266 μ mol) and the solution of CuSO₄ (42.6 mg, 266 μ M mmol) and (+)-sodium L-ascorbate (527 mg, 2.66 mmol) in water (10 ml) and MeOH (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 1 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-6% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-13d** (5.83 g, 95%) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.55-1.63 (m, 3H), 2.00-2.10 (m, 2H), 3.06-3.19 (m, 1H), 3.23-3.32 (m, 2H), 3.42-3.52 (m, 1H), 3.62-3.71 (m, 6H), 3.94-4.01 (m, 1H), 4.19-4.33 (m, 3H), 4.43-4.53 (m, 1H), 5.41-5.46 (m, 1H), 5.52-5.65 (m, 2H), 5.94-6.04 (m, 1H), 6.17-6.24 (m, 1H), 6.68-6.74 (m, 1H), 6.74-6.82 (m, 4H), 7.07-7.15 (m, 5H), 7.15-7.21 (m, 2H), 7.21-7.26 (m, 2H), 7.41-7.59 (m, 7H), 7.62-7.68 (m, 1H), 7.91-7.98 (m, 2H), 8.02-8.09 (m, 3H), 8.70-8.74 (m, 2H), 8.96-9.02 (m, 1H), 11.17-11.28 (m, 1H), 11.28-12.37 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 11.9, 36.7, 36.8, 38.8, 55.0, 55.0, 60.3, 63.1, 66.1, 66.1, 66.2, 66.3, 66.3, 70.3, 70.3, 82.9, 82.9, 83.6, 83.6, 83.8, 84.0, 84.4, 84.5, 84.6, 85.7, 109.9, 113.1, 123.4, 123.5, 125.3, 125.3, 126.0, 126.1, 126.1, 126.6, 126.7, 127.3, 127.4, 127.6, 127.7, 128.5, 128.5, 129.4, 129.5, 129.6, 130.8, 130.8, 131.1, 131.2, 131.2, 131.2, 131.3, 131.3, 131.3, 131.5, 131.5, 132.5, 133.2, 133.4, 134.8, 134.9, 135.3, 135.7, 137.2, 137.3, 143.6, 144.5, 150.4, 150.5, 151.6, 151.8, 158.1, 163.7, 165.7; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.1, 8.2; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₆₁H₅₇N₁₀NaO₁₂P]⁺, 1175.3793; found, 1175.3788.

化合物 **3-13e**



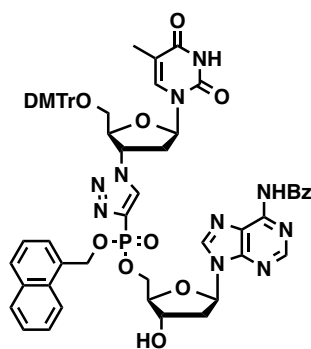
Compound **3-12b** (1.00 g, 1.71 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (6 mL). To the solution was added 3'-azido-*N*⁴-benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxycytidine (**3-16b**) (1.13 g, 1.71 mmol) and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (45.3 mg, 85.5 μ mol) and the solution of CuSO₄ (13.7 mg, 85.5 μ mol) and (+)-sodium L-ascorbate (163 mg, 855 μ mol) in water (3 mL) and MeOH (3 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 3 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-6% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-13e** (1.81 g, 85%) as pale yellow foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2.37-2.46 (m, 1H), 2.73-2.91 (m, 2H), 2.97-3.10 (m, 1H), 3.28-3.42 (m, 2H), 3.64-3.73 (m, 6H), 4.11-4.18 (m, 1H), 4.22-4.33 (m, 1H), 4.33-4.42 (m, 1H), 4.44-4.59 (m, 2H), 5.48-5.72 (m, 4H), 6.30-6.38 (m, 1H), 6.50-6.58 (m, 1H), 6.82-6.90 (m, 4H), 7.13-7.36 (m, 10H), 7.37-7.45 (m, 1H), 7.46-7.58 (m, 7H), 7.60-7.67 (m, 2H), 7.99-8.08 (m, 5H), 8.33-8.42 (m, 1H), 8.60-8.72 (m, 2H), 8.85-8.94 (m, 1H), 11.22 (s, 1H), 11.33 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 38.5, 38.5, 38.6, 38.7, 55.0, 58.9, 58.9, 62.3, 62.3, 66.0, 66.1, 66.2, 66.2, 66.3, 70.4, 70.5, 83.0, 83.0, 83.7, 83.8, 85.1, 85.2, 86.2, 86.4, 96.2, 113.2, 123.4, 123.5, 125.2, 125.3, 126.0, 126.1, 126.6, 126.7, 126.8, 127.2, 127.3, 127.7, 127.9, 128.5, 129.4, 129.6, 129.7, 130.8, 130.8, 131.1, 131.2, 131.2, 131.3, 131.4, 131.5, 132.4, 132.8, 133.1, 133.2, 133.3, 134.8, 134.9, 135.0, 135.2, 137.2, 137.3, 143.0, 144.2, 145.3, 145.3, 150.4, 151.6, 151.9, 154.3, 158.1, 163.3, 165.6, 167.3; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.9, 8.0; HRMS (ESI) *m/z* (M+H): calcd for [C₆₇H₆₁N₁₁O₁₂P]⁺, 1242.4238; found, 1242.4240.

化合物 **3-13f**



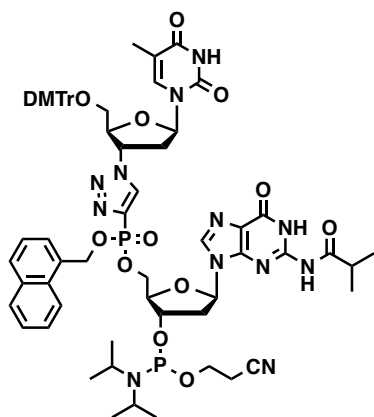
Compound **3-12b** (2.50 g, 4.46 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (20 mL). To the solution was added 3'-azido-*N*⁴-benzoyl-5'-*O*-(dimethoxytrityl)-2',3'-dideoxycytidine (**3-16b**) (2.94 g, 4.46 mmol) and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (118 mg, 223 μ mol) and the solution of CuSO₄ (35.7 mg, 223 μ mol) and (+)-sodium L-ascorbate (442 mg, 2.23 mmol) in water (10 ml) and MeOH (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 2 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-6% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-13f** (4.85 g, 87%) as pale yellow foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.98-2.12 (m, 1H), 2.26-2.40 (m, 1H), 2.80-2.92 (m, 1H), 3.02-3.14 (m, 1H), 3.28-3.44 (m, 2H), 3.64-3.72 (m, 6H), 4.07-4.13 (m, 1H), 4.23-4.40 (m, 3H), 4.50-4.60 (m, 1H), 5.49-5.54 (m, 1H), 5.54-5.67 (m, 2H), 5.67-5.76 (m, 1H), 6.14-6.21 (m, 1H), 6.32-6.39 (m, 1H), 6.81-6.88 (m, 4H), 7.13-7.25 (m, 6H), 7.25-7.30 (m, 2H), 7.30-7.35 (m, 2H), 7.41-7.66 (m, 10H), 7.88-8.18 (m, 8H), 8.35-8.44 (m, 1H), 8.94-9.01 (m, 1H), 11.25 (s, 1H), 12.38 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 38.5, 40.4, 55.0, 58.8, 58.9, 62.1, 62.2, 65.8, 65.8, 65.9, 66.2, 66.2, 66.3, 69.8, 69.8, 83.0, 83.0, 85.1, 85.1, 85.2, 86.2, 86.4, 96.2, 113.2, 123.5, 125.3, 125.3, 126.1, 126.1, 126.6, 126.7, 126.8, 127.3, 127.3, 127.7, 127.9, 128.4, 128.5, 129.4, 129.4, 129.6, 129.7, 130.8, 130.8, 131.2, 131.2, 131.3, 131.3, 131.3, 131.5, 131.6, 132.7, 132.8, 133.1, 133.2, 133.2, 134.8, 134.9, 135.0, 135.0, 135.2, 135.3, 137.2, 137.3, 144.2, 144.2, 144.6, 144.6, 145.3, 145.3, 154.3, 154.3, 158.1, 163.0, 163.3, 167.2, 167.3; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.1; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₆₆H₆₀N₉NaO₁₃P]⁺, 1240.3945; found, 1240.3943.

化合物 **3-13g**



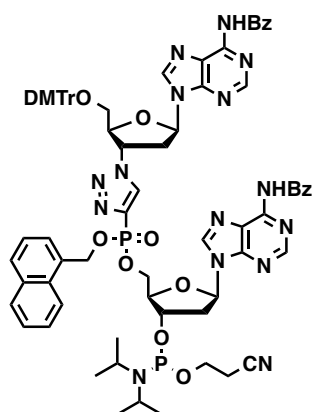
Compound **3-12b** (1.90 g, 3.25 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (10 mL). To the solution was added 3'-azido-5'-*O*-(dimethoxytrityl)-3'-deoxythymidine (1.82 g, 3.25 mmol) (**3-7**) and tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (86.2 mg, 163 μ mol) and the solution of CuSO₄ (26.1 mg, 163 μ mol) and (+)-sodium L-ascorbate (321 mg, 1.63 mmol) in water (5 ml) and MeOH (5 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 2 h. The reaction mixture was poured into CHCl₃, and extracted with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-5% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-13g** (3.46 g, 93%) as pale yellow foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.50-1.60 (m, 3H), 2.34-2.44 (m, 1H), 2.70-2.88 (m, 3H), 3.22-3.32 (m, 2H), 3.65-3.72 (m, 6H), 4.08-4.15 (m, 1H), 4.19-4.40 (m, 3H), 4.48-4.57 (m, 1H), 5.46-5.55 (m, 2H), 5.55-5.68 (m, 2H), 6.35-6.45 (m, 1H), 6.47-6.55 (m, 1H), 6.80-6.88 (m, 4H), 7.12-7.21 (m, 5H), 7.21-7.27 (m, 2H), 7.27-7.34 (m, 2H), 7.36-7.44 (m, 1H), 7.44-7.57 (m, 5H), 7.60-7.67 (m, 2H), 7.86-7.96 (m, 2H), 7.96-8.06 (m, 3H), 8.61-8.67 (m, 1H), 8.67-8.72 (m, 1H), 8.84-8.93 (m, 1H), 11.19-11.25 (m, 1H), 11.40-11.45 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 11.9, 37.2, 38.6, 38.7, 55.0, 55.0, 59.9, 63.2, 66.0, 66.1, 66.2, 66.2, 70.4, 82.2, 83.7, 83.7, 83.9, 85.1, 85.2, 86.0, 109.9, 113.2, 123.4, 123.5, 125.2, 126.0, 126.1, 126.6, 126.7, 126.8, 127.2, 127.3, 127.6, 127.9, 128.4, 128.5, 129.3, 129.7, 130.8, 130.8, 131.0, 131.1, 131.2, 131.3, 131.4, 131.4, 132.5, 133.2, 134.7, 134.9, 135.1, 135.2, 136.2, 136.3, 137.1, 137.3, 143.0, 144.5, 150.4, 151.6, 158.1, 158.1, 163.7, 165.6; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.0, 8.1; HRMS (ESI) *m/z* (*M*+*H*): calcd for [C₆₁H₅₈N₁₀O₁₂P]⁺, 1153.3973; found, 1153.3975.

化合物 **3-14a**



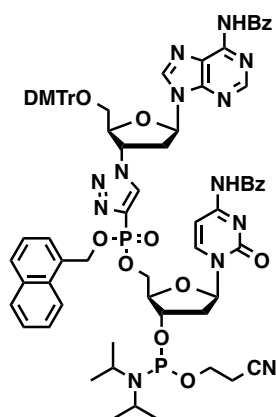
Compound **3-13a** (3.10 g, 2.73 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (27 mL). To the solution was added diisopropylamine (485 μ L, 3.28 mmol), 4,5-dicyanoimidazole (387 mg, 3.28 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (1.30 mL, 8.91 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 40 min. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 0-3% gradient of MeOH in CHCl₃ to afford the compound **3-14a** (2.50 g, 68%) as white foam. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.10-1.17 (m, 18H), 1.55-1.60 (m, 3H), 2.36-2.56 (m, 1H), 2.66-2.88 (m, 6H), 3.25-3.35 (m, 2H), 3.45-3.62 (m, 2H), 3.62-3.80 (m, 8H), 4.17-4.38 (m, 4H), 4.58-4.68 (m, 1H), 5.45-5.58 (m, 2H), 5.58-5.68 (m, 1H), 6.21-6.28 (m, 1H), 6.38-6.47 (m, 1H), 6.80-6.89 (m, 4H), 7.12-7.34 (m, 9H), 7.37-7.55 (m, 4H), 7.63-7.68 (m, 1H) 7.86-8.05 (m, 3H), 8.13-8.21 (m, 1H), 8.85-8.95 (m, 1H), 11.37-11.45 (m, 1H), 11.50-11.65 (m, 1H), 11.95-12.12 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 11.8, 18.8, 18.8, 18.8, 18.8, 19.7, 19.8, 19.8, 19.9, 24.1, 24.2, 24.3, 24.3, 24.3, 24.4, 34.8, 37.2, 37.2, 37.7, 42.6, 42.7, 55.0, 58.2, 58.3, 58.4, 58.5, 60.0, 63.1, 65.5, 65.5, 65.6, 65.7, 65.7, 65.8, 65.9, 66.0, 66.0, 66.1, 66.2, 72.9, 73.1, 73.2, 73.4, 78.6, 79.0, 79.3, 82.2, 82.2, 83.1, 83.2, 83.2, 83.3, 84.0, 84.2, 84.3, 86.0, 109.9, 113.2, 118.9, 119.0, 120.4, 120.5, 123.3, 123.4, 125.1, 125.2, 126.0, 126.0, 126.5, 126.6, 126.7, 127.0, 127.0, 127.2, 127.6, 127.8, 128.5, 129.3, 129.3, 129.4, 129.7, 130.7, 130.7, 130.7, 130.8, 131.1, 131.2, 131.5, 133.1, 134.5, 134.5, 134.6, 135.1, 135.2, 136.2, 136.9, 136.9, 137.1, 137.3, 137.3, 137.4, 137.4, 144.5, 148.1, 148.1, 148.5, 150.4, 154.7, 158.1, 158.1, 163.7, 180.0, 180.0; ³¹P NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.0, 8.1, 8.1, 8.1, 147.8, 148.0; HRMS (ESI) *m/z* (M+Na): calcd for [C₆₇H₇₆N₁₂NaO₁₄P₂]⁺, 1357.4977; found, 1357.4985.

化合物 **3-14b**



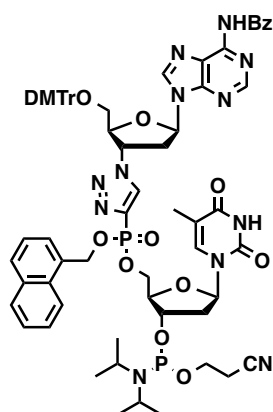
Compound **3-13b** (1.78 g, 1.41 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL). To the solution was added diisopropylamine (237 μL , 1.69 mmol), 4,5-dicyanoimidazole (199 mg, 1.69 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (896 μL , 2.82 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 20% acetone in CHCl_3 then 30% MeCH in EtOAc and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CHCl_3 (10 mL) and added dropwise to *n*-hexane (200 mL) to afford the compound **3-14b** (2.30 g, 76%) as white precipitation. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.04-1.24 (m, 12H), 2.52-2.69 (m, 1H), 2.73-2.86 (m, 2H), 2.94-3.22 (m, 2H), 3.25-3.38 (m, 2H), 3.44-3.88 (m, 11H), 4.25-4.60 (m, 4H), 4.79-4.98 (m, 1H), 5.51-5.65 (m, 2H), 5.95-6.07 (m, 1H), 6.51-6.60 (m, 1H), 6.69-6.84 (m, 5H), 7.08-7.28 (m, 9H), 7.38-7.69 (m, 10H), 7.88-7.98 (m, 2H), 8.00-8.12 (m, 5H), 8.64-8.77 (m, 3H), 8.91-9.02 (m, 1H), 11.20-11.35 (m, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 19.8, 19.8, 19.9, 19.9, 24.1, 24.2, 24.3, 24.3, 24.3, 24.4, 24.4, 36.7, 37.5, 37.6, 42.6, 42.8, 54.9, 54.9, 58.4, 58.5, 60.3, 63.1, 65.6, 65.7, 66.1, 66.1, 72.8, 73.0, 73.1, 73.3, 82.9, 83.6, 83.9, 83.9, 84.0, 84.0, 84.1, 84.2, 85.7, 113.1, 119.0, 119.0, 123.4, 123.4, 125.2, 125.9, 126.0, 126.0, 126.6, 127.2, 127.2, 127.3, 127.5, 127.7, 128.4, 128.5, 128.5, 129.4, 129.6, 130.8, 130.8, 130.8, 131.1, 131.2, 131.2, 131.3, 131.3, 131.4, 132.4, 132.5, 133.2, 133.3, 133.4, 134.7, 134.8, 134.8, 134.8, 135.2, 135.2, 135.3, 137.1, 137.2, 137.2, 137.2, 143.1, 143.1, 143.2, 143.6, 144.5, 150.5, 150.5, 151.6, 151.7, 151.8, 158.0, 165.6; ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 7.9, 8.0, 8.0, 8.1, 147.7, 147.8, 147.8; HRMS (ESI) m/z ($\text{M}+\text{Na}$): calcd for $[\text{C}_{77}\text{H}_{77}\text{N}_{15}\text{NaO}_{12}\text{P}_2]^+$, 1488.5249; found, 1488.5261.

化合物 **3-14c**



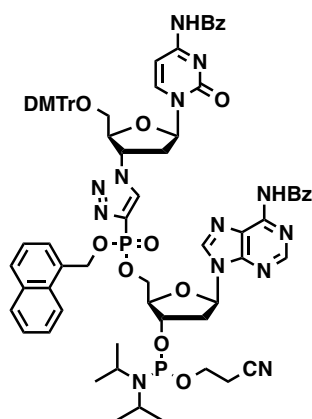
Compound **3-13c** (2.50 g, 2.01 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL). To the solution was added diisopropylamine (337 μL , 2.41 mmol), 4,5-dicyanoimidazole (284 mg, 2.41 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (1.28 mL, 4.02 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 20% acetone in CHCl_3 then 30% MeCN in EtOAc and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CHCl_3 (10 mL) and added dropwise to *n*-hexane (200 mL) to afford the compound **3-14c** (2.59 g, 89%) as white precipitation. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0.98-1.22 (m, 12H), 2.03-2.31 (m, 1H), 2.36-2.60 (m, 1H), 2.68-2.84 (m, 2H), 3.08-3.24 (m, 1H), 3.24-3.40 (m, 2H), 3.44-3.81 (m, 11H), 4.22-4.45 (m, 3H), 4.45-4.63 (m, 2H), 5.53-5.72 (m, 2H), 5.93-6.10 (m, 1H), 6.13-6.27 (m, 1H), 6.68-6.83 (m, 5H), 7.04-7.34 (m, 10H), 7.40-7.70 (m, 10H), 7.82-8.00 (m, 4H), 8.01-8.14 (m, 3H), 8.14-8.25 (m, 1H), 8.64-8.80 (m, 2H), 8.95-9.10 (m, 1H), 11.15-11.40 (m, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 19.8, 19.8, 19.8, 24.2, 24.2, 24.2, 24.2, 24.3, 24.4, 36.7, 36.7, 36.8, 42.6, 42.8, 54.9, 58.3, 58.4, 60.2, 60.2, 60.3, 63.1, 63.1, 65.4, 65.5, 66.3, 66.3, 72.7, 72.9, 82.9, 83.0, 83.6, 84.1, 84.4, 85.7, 85.7, 86.6, 96.3, 113.1, 119.0, 123.4, 125.2, 126.0, 126.1, 126.6, 126.7, 127.2, 127.2, 127.3, 127.7, 128.4, 128.5, 128.5, 129.4, 129.6, 130.8, 131.2, 131.3, 131.6, 132.5, 132.7, 133.0, 133.2, 133.4, 134.7, 134.7, 134.8, 135.2, 137.1, 137.2, 143.6, 144.5, 144.6, 144.7, 150.5, 150.5, 151.6, 151.7, 154.3, 154.3, 158.0, 163.2, 165.6, 167.2; ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8.1, 8.1, 8.2, 147.7, 147.8, 147.9, 148.1, 148.1, 148.2; HRMS (ESI) m/z ($\text{M}+\text{Na}$): calcd for $[\text{C}_{76}\text{H}_{77}\text{N}_{13}\text{NaO}_{13}\text{P}_2]^+$, 1464.5137; found, 1464.5142.

化合物 **3-14d**



Compound **3-13d** (2.57 g, 2.22 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL). To the solution was added diisopropylamine (372 μL , 2.66 mmol), 4,5-dicyanoimidazole (314 mg, 2.66 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (1.41 mL, 4.44 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 20% acetone in CHCl_3 then 20-30% gradient of MeCN in EtOAc and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CHCl_3 (10 mL) and added dropwise to *n*-pentane (200 mL) to afford the compound **3-14d** (2.30 g, 76%) as white precipitation. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.02-1.19 (m, 12H), 1.60-1.68 (m, 3H), 2.12-2.36 (m, 2H), 2.70-2.82 (m, 2H), 3.08-3.20 (m, 1H), 3.44-3.61 (m, 3H), 3.62-6.79 (m, 8H), 4.10-4.42 (m, 3H), 5.52-5.70 (m, 2H), 5.95-6.08 (m, 1H), 6.17-6.29 (m, 1H), 6.70-6.86 (m, 5H), 7.08-7.30 (m, 9H), 7.41-7.49 (m, 1H), 7.49-7.61 (m, 6H), 7.61-7.70 (m, 1H), 7.90-7.99 (m, 2H), 8.02-8.12 (m, 3H), 8.70-8.80 (m, 2H), 8.97-9.07 (m, 1H), 11.22-11.45 (m, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 11.9, 19.7, 19.8, 19.8, 19.8, 24.1, 24.2, 24.3, 24.3, 24.3, 24.4, 36.7, 36.7, 36.7, 36.7, 37.6, 37.6, 37.7, 37.7, 37.7, 37.8, 37.8, 39.7, 42.6, 42.7, 55.0, 58.2, 58.4, 60.3, 63.1, 65.6, 65.6, 65.7, 65.8, 65.8, 65.9, 65.9, 66.2, 66.2, 66.3, 66.3, 73.0, 73.0, 73.0, 73.1, 73.1, 73.2, 73.2, 82.9, 83.0, 83.3, 83.3, 83.6, 84.0, 84.0, 84.1, 84.1, 85.7, 109.9, 110.0, 110.0, 110.0, 113.1, 119.0, 123.4, 123.4, 125.2, 125.2, 126.0, 126.1, 126.1, 126.6, 127.2, 127.3, 127.3, 127.5, 127.7, 128.5, 128.5, 129.5, 129.6, 130.8, 130.8, 131.2, 131.2, 131.3, 131.3, 131.6, 132.5, 133.2, 133.3, 134.7, 134.7, 134.7, 134.8, 135.3, 135.6, 135.7, 135.8, 135.8, 137.0, 137.1, 137.1, 137.2, 143.6, 144.5, 150.4, 150.5, 151.6, 151.8, 158.0, 163.6, 165.6; ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8.1, 8.1, 8.2, 8.2, 147.7, 147.8, 147.9, 147.9; HRMS (ESI) m/z ($\text{M}+\text{Na}$): calcd for $[\text{C}_{70}\text{H}_{74}\text{N}_{12}\text{NaO}_{13}\text{P}_2]^+$, 1375.4872; found, 1375.4867.

化合物 **3-14e**

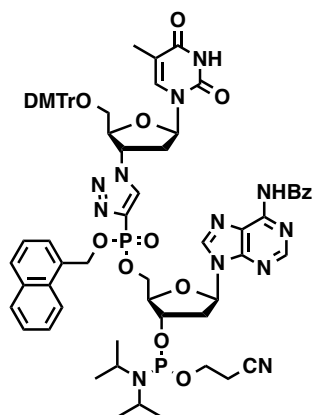


Compound **3-13e** (1.74 g, 1.40 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL). To the solution was added diisopropylamine (237 μL , 1.69 mmol), 4,5-dicyanoimidazole (1.99 mg, 1.69 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (869 μL , 2.82 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 20% acetone in CHCl_3 then 50-70% gradient of MeCN in EtOAc to afford the compound **3-14e** 1.63 g, 81%) as white precipitation. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.04-1.21 (m, 12H), 2.51-2.65 (m, 1H), 2.72-2.86 (m, 3H), 2.93-3.08 (m, 2H), 3.27-3.40 (m, 2H), 3.52-3.65 (m, 2H), 3.67-3.84 (m, 8H), 4.22-4.43 (m, 4H), 4.75-4.85 (m, 1H), 5.47-5.57 (m, 2H), 5.60-5.71 (m, 1H), 6.29-6.36 (m, 1H), 6.47-6.56 (m, 1H), 6.82-6.88 (m, 4H), 7.12-7.36 (m, 10H), 7.36-7.45 (m, 1H), 7.45-7.57 (m, 7H), 7.60-7.67 (m, 2H), 7.87-7.96 (m, 2H), 7.98-8.06 (m, 5H), 8.31-8.40 (m, 1H), 8.62-8.70 (m, 2H), 8.94-9.12 (m, 1H), 11.13-11.42 (m, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 19.8, 19.8, 19.9, 24.1, 24.2, 24.3, 24.3, 24.3, 24.4, 37.4, 37.5, 38.5, 42.6, 42.8, 55.0, 58.4, 58.5, 58.9, 62.2, 65.6, 65.7, 66.1, 66.1, 69.8, 72.8, 73.0, 73.1, 73.3, 83.1, 84.0, 84.2, 86.2, 86.4, 96.2, 113.2, 119.0, 119.0, 123.4, 123.4, 125.2, 125.9, 126.0, 126.6, 126.8, 127.2, 127.2, 127.2, 127.7, 127.9, 128.5, 129.4, 129.6, 129.7, 130.8, 130.8, 131.2, 131.2, 131.3, 131.3, 131.5, 132.4, 132.8, 133.1, 133.2, 133.3, 134.7, 134.7, 134.8, 134.8, 135.0, 135.3, 137.1, 137.1, 137.2, 137.2, 143.2, 144.3, 145.3, 150.5, 151.6, 151.8, 154.3, 158.1, 163.3, 165.6, 167.4; ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 7.9, 7.9, 8.0, 8.0, 147.7; HRMS (ESI) m/z ($\text{M}+\text{Na}$): calcd for $[\text{C}_{76}\text{H}_{77}\text{N}_{13}\text{NaO}_{13}\text{P}_2]^+$, 1464.5137; found, 1464.5140.

The chemical structure shows the 5'-phosphate of the 12S rRNA primer. It consists of a 5' triphosphate group (ATP) and a 3' terminal adenosine (A). The 5' triphosphate is shown as a chain of three phosphate groups: a gamma-phosphate (top) with a dimethyl triphenylsilyl (DMTrO) protecting group, a middle phosphate, and a beta-phosphate (bottom) with a dimethylamino group. The 3' terminal adenosine is shown as a ribose sugar with an adenine base and a phosphate group. The 3' terminal adenosine is linked to the 5' triphosphate via a 3'-5' phosphodiester bond.

135

化合物 **3-14g**



Compound **3-13g** (3.39 g, 2.94 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (25 mL). To the solution was added diisopropylamine (494 μL , 3.53 mmol), 4,5-dicyanoimidazole (416 mg, 3.53 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (1.74 mL, 5.88 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was poured into EtOAc, and extracted with water twice and washed with sat. NaCl. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography using 20% acetone in CHCl_3 then 50-70% gradient of MeCN in EtOAc to afford the compound **3-14g** (3.15 g, 79%) as white foam. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1.00-1.20 (m, 12H), 1.52-1.60 (m, 3H), 2.50-2.65 (m, 1H), 2.68-2.84 (m, 4H), 2.90-3.08 (m, 1H), 3.22-3.34 (m, 2H), 3.48-3.84 (m, 10H), 4.20-4.46 (m, 4H), 4.74-4.86 (m, 1H), 5.45-5.57 (m, 2H), 5.57-5.67 (m, 1H), 6.37-6.45 (m, 1H), 6.47-6.55 (m, 1H), 6.78-6.90 (m, 4H), 7.12-7.35 (m, 9H), 7.36-7.59 (m, 6H), 7.60-7.68 (m, 2H), 7.86-7.96 (m, 2H), 7.97-8.07 (m, 3H), 8.60-8.70 (m, 2H), 8.82-8.93 (m, 1H), 11.20-11.26 (m, 1H), 11.39-11.45 (m, 1H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 11.9, 19.8, 19.8, 19.9, 24.1, 24.2, 24.3, 24.3, 24.4, 37.2, 37.4, 37.6, 42.6, 42.8, 55.0, 58.4, 58.5, 59.9, 63.1, 65.6, 65.6, 65.7, 65.7, 66.1, 66.1, 72.8, 73.0, 73.1, 73.3, 82.2, 84.0, 84.3, 86.0, 109.9, 113.2, 119.0, 119.0, 123.4, 123.4, 125.2, 125.9, 126.0, 126.6, 126.8, 127.2, 127.2, 127.2, 127.6, 127.9, 128.4, 128.5, 129.4, 129.7, 130.8, 130.8, 131.1, 131.2, 131.2, 131.2, 131.3, 131.4, 132.4, 133.2, 133.3, 134.7, 134.7, 134.8, 134.8, 135.1, 135.2, 136.3, 137.1, 137.1, 137.1, 137.2, 143.1, 143.2, 143.2, 144.5, 150.4, 150.5, 151.6, 151.8, 158.1, 158.2, 163.7, 165.6, 165.6; ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 7.9, 8.0, 8.1, 147.7, 147.8; HRMS (ESI) m/z ($\text{M}+\text{Na}$): calcd for $[\text{C}_{70}\text{H}_{74}\text{N}_{12}\text{NaO}_{13}\text{P}_2]^+$, 1375.4872; found, 1375.4869.

講演・報文目録

講演目録

1. Base Pair Recognition of Alpha-deoxyribonucleosides with Unmodified Nucleobase and 8-Oxo-adenine in Antiparallel DNA Triplex. ○Takeshi Inde, Yoshiaki Masaki, Mitsuo Sekine, Kohji Seio. The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 熊本大学, 2016. 9. 2-29 (ポスター発表).
2. 塩基部へテロ環修飾されたデオキシグアノシンを有するオリゴヌクレオチドの合成と性質、印出健志・○丸山敦也・伊藤優・牧尾直明・友利貴人・宮武佑弥・正木慶昭・関根光雄。清尾康志 日本化学第 97 回春季年会、慶応義塾大学 日吉キャンパス、2017.3.16-19.(口頭発表)
3. Synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing 2-*N*-heteroarylguanine residues and their effect on higher-order structure stability. ○Takeshi Inde, Yoshiaki Masaki, Atsuya Maruyama, Yu Ito, Naoaki Makio, Yuya Miyatake, Takahito Tomori, Mitsuo Sekine and Kohji Seio. The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry & The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, 東京理科大学 葛飾キャンパス、2017. 11. 14-16. (口頭発表)
4. α -デオキシリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドのアンチパラレル型三重鎖形成能と塩基識別能、○印出健志・正木慶昭・宮武佑弥・関根光雄・清尾康志 日本化学第 98 回春季年会、日本大学 船橋キャンパス、2018.3.20-23. (口頭発表予定)

報文目録

1. Synthesis of oligonucleotides containing 2-*N*-heteroarylguanine residues and their effect on duplex/triplex stability. Takeshi Inde, Yoshiaki Masaki, Atsuya Maruyama, Yu Ito, Naoaki Makio, Yuya Miyatake, Takahito Tomori, Mitsuo Sekine and Kohji Seio. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8371-8383.

謝辞

本研究を行うにあたり、時に厳しく、時に暖かい御指導後鞭撻を頂き、研究哲学や研究者としてあるべき姿などとても多くのことを教えて下さいました、本学生命理工学研究科 分子生命科学専攻 清尾康志准教授に心より感謝いたします。

常に有益な御助言をいただき、博士2年時の留学についても尽力して下さいました、本学関根光雄名誉教授に心より感謝いたします。

本研究の細部に渡って貴重な助言をして頂き、様々な面で親身になって支えて下さいました、本学生命理工学研究科 分子生命科学専攻 正木慶昭助教に心より感謝いたします。

糖化学の専門家の立場から様々な助言を下さいました、本学生命理工学研究科 分子生命科学専攻 湯浅英哉教授に深く感謝いたします。

私の博士過程以前は関根研究室助教として、また独立された後も親身になって助言を下さいました、本学生命理工学研究科 分子生命科学専攻 大窪章寛准教授に心より感謝いたします。

ACLS の活動や日々の刺激的なディスカッションを通して私の博士課程をより深く充実したものにして下さいました、本学生命理工学研究科 分子生命科学専攻 金森功吏助教、本学情報生命博士教育院 矢野貴久特任助教に深く感謝いたします。

留学生として私を温かく受け入れて下さいました、University of Colorado Boulder 栄誉教授 Marvin H. Caruthers 博士に心より感謝いたします。また、ともに研究を行う中で研究者としてのあり方を示して下さいました Heera Krishna 博士、Caruthers 研究室の皆様、また JSCBB Mass Spectrometry Facility の皆様に深く感謝いたします。

日々熱いディスカッションを交わして下さいました、関根・清尾研究室の先輩である 浅見祐也博士、飯島良紘博士、徳川宗史博士、伊藤優博士、田胡信広博士、友利貴人博士に深く感謝いたします。また、研究室生活の中で競い合い、支え合って下さいました、同期の大野健太郎氏に深く感謝いたします。

研究生生活の苦楽を共にし、私自身の成長を促して下さいました、共同研究者の竹下直輝

氏、岸村智太氏、宮武佑弥氏に深く感謝いたします。また、不撓不屈の精神で日々研究を積み重ね、私の背中を強く押してくださいました丸山敦也氏に深く感謝いたします。

研究生生活を常に楽しく盛り上げてくださいました、竹下玲央氏、塩澤貴史氏、関谷彰太氏、吉田圭汰氏、井上敦氏、杉山大樹氏、阿野晃大氏、山田悠司氏、また関根・清尾研 OB・OG の皆様に深く感謝いたします。

研究に専念するための環境を万全のサポートで整えてくださいました、清尾研秘書 大西有希子様、元関根研秘書 伊藤優子様、情報生命博士教育院事務室の皆様に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、貴重な質量分析測定データを提供してくださいました、本学技術部分析支援センター 小泉公人様、NMR 等の構造解析にご助力くださいました本学技術部分析支援センター 清悦久様に深く感謝いたします。

最後に、長い学生生活を経済面、精神面で支えてくださいました、印出雅昭、知子、亮太、洋樹、タカ子に心より感謝いたします。また、常に私を応援してくださいました、故 印出春夫に心より感謝いたします。