

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	2'-O-アルキルカルバモイルエチル核酸の効率的合成法ならびに標的RNA結合能とヌクレアーゼ耐性の研究
Title(English)	
著者(和文)	岸村智太
Author(English)	Tomohiro Kishimura
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11894号, 授与年月日:2021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,一瀬 宏,大窪 章寛,秦 猛志
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11894号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

2'-*O*-アルキルカルバモイルエチル核酸の効率的合成法  
ならびに標的 RNA 結合能とヌクレアーゼ耐性の研究

指導教員

清尾 康志 准教授

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系  
生命理工学コース

岸村 智太

## 目次

略語集		1
序論		3
第一章	カルバモイルエチル型修飾を持つ核酸の 効率的合成法の開発	
第一節	緒言	17
第二節	アクリル酸アリルを用いた 3',5'- <i>O</i> -TIPDS アデノシンの オキシマイケル付加反応の検討	20
第三節	アクリル酸アリルを用いた 3',5'- <i>O</i> -TIPDS- 5-メチルウリジンのオキシマイケル付加反応の検討	24
第四節	アクリル酸ベンジルを用いた オキシマイケル付加反応の検討	26
第五節	パラジウム触媒を用いた接触水素化反応および アミド縮合反応の検討	29
第六節	従来法との比較	32
第七節	総括	33
	第一章の引用文献	35
第二章	アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ オリゴヌクレオチドの性質	
第一節	緒言	37
第二節	アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ オリゴヌクレオチドの合成	41
第三節	アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ オリゴヌクレオチドの疎水性の変化	43
第四節	アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ オリゴヌクレオチドの熱力学的安定性の評価	47
第五節	アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ オリゴヌクレオチドの酵素耐性	58
第六節	アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ オリゴヌクレオチドの CD 測定	59
第七節	AMBER を用いたアルキルカルバモイルエチル型修飾の 二重鎖構造の予測	61
第八節	総括	67

第二章の引用文献	69
全体総括	71
実験編(一般的な事項)	74
実験編(第一章)	79
実験編(第二章)	93
講演目録・報文目録	119
謝辞	119

## 略語集

A	Adenine or adenosine	EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)
Ac	Acetyl		carbodiimide
Ago2	Argonaute 2 protein	EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Am	Amyl or n-amyl	ENA	2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid
AMBER	Assisted model building with energy refinement	Et	Ethyl
AmCE	Amylcarbamoylethyl	EtCE	Ethylcarbamoylethyl
AmNA	2'-N,4'-C-bridged nucleic acid	FAM	Fluorescein
ASO	Antisense oligonucleotides	FDA	Food and drug administration
Bu	Butyl or n-butyl	GalNAc	N-Acetylgalactosamine
BuCE	butylcarbamoylethyl	HBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-Oxide
Bn	Benzyl		Hexafluorophosphate
BNA	2'-O,4'-C-bridged oligonucleotides	HPLC	High performance liquid chromatography
BTT	5-benzylthio-1H-tetrazole	<i>i</i> -Am	isoamyl
Bz	Benzoyl	LNA	Locked nucleic acid
C	Cytosine or cytidine	MCE	Methylcarbamoylethyl
CD	Circular dichroism	MD	Molecular dynamics
CPG	Controlled pore glass	Me	Methyl
DDS	Drug delivery system	MS	Mass spectrometry
DIPEA	N,N-diisopropylethylamine	miR	Micro ribonucleic acid
DMAP	4-Dimethylaminopyridine	mRNA	Messenger ribonucleic acid
DMF	N,N-dimethylformamide	NF-κB	nuclear factor-kappa B
DMT-MM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl	Oc	Octyl or n-octyl
DNA	Deoxyribonucleic acid	OcCE	Octylcarbamoylethyle

ODS	Octadecyl	T	Thymine or thymidine or ribothymidine
ON	Oligonucleotides		
Pac	Phenoxyacetyl	<i>t</i> -BuOH	tert-Butyl alcohol
Ph	Phenyl	THF	Tetrahydrofuran
Pr	Propyl or n-propyl	TLC	Thin Layer Chromatography
PrCE	propylcarbamoylethyle	TLR9	Toll-like receptor 9
RISC	RNA-induced silencing complex	$T_m$	Melting temperature
RNA	Ribonucleic acid	TMS	Trimethylsilyl
RNaseH	Ribonuclease H	tR	Retention time
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	tRNA	Transfer ribonucleic acid
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment	U	Uracil or uridine
siRNA	Small interfering ribonucleic acid	UNA	Unlocked nucleic acid
snRNA	Small nuclear ribonucleic acid	UV	Ultra violet
SVPDE-1	Snake venom phosphodiesterase-1	VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 序論

### 核酸の性質とその利用

核酸の生体内での主な役割として、遺伝情報の保持が挙げられる。ゲノム DNA はワトソンとクリックにより解明された二重鎖構造を取り、アデニンはチミンと、シトシンはグアニンと、それぞれ特異的に塩基対(ワトソン・クリック塩基対)を形成する<sup>1</sup>。この高い相補鎖特異性により、生命は誕生から 35 億年にわたって、遺伝情報を保持し続けることが出来ている。近年では核酸分子の持つ高い特異性を応用し、化学修飾を加えた核酸分子を用いた様々な技術が開発されている。

修飾核酸の応用例として、マイクロアレイ法<sup>2</sup>による遺伝子発現の網羅的解析などがある。これは、基板上に固定された検出用配列に対し、生体から抽出して蛍光標識した核酸と、別の色に蛍光標識した標準検体とをハイブリダイゼーションさせ、蛍光強度の比から生体サンプル中の遺伝子の発現量を網羅的に解析する技術である。この技術では「蛍光標識により光る核酸」という修飾核酸を用いている。また、同様の修飾核酸の応用として、DNA origami<sup>3</sup>を用いたナノスケールの三次元構造の構築研究も良く用いられる。例として、DNA からなるプロペラ構造の一つの翼の末端に蛍光分子を標識し、DNA ヘリカーゼが二重鎖を解く際に発生する核酸のねじれを検出する方法などが知られている<sup>4</sup>。

さらに、修飾核酸の応用例の筆頭として、核酸医薬品が挙げられる。従来の低分子医薬は主にタンパク質を標的分子とし、標的に結合することで機能を阻害したり調整したりする事によって薬効を発揮する。これに対し、核酸医薬品の標的分子はセントラルドグマのより上流過程である RNA 分子やゲノム DNA であるため、これまでには存在しなかった治療法を新たに確立するためのブレイクスルーとして注目されている<sup>5</sup>。

2020 年現在、アンチセンス核酸(ASO)<sup>6</sup> や siRNA<sup>7</sup>、アプタマー<sup>8</sup> などの技術を用いた 10 種類以上の核酸医薬品が FDA による承認を受けている<sup>9</sup> 他、CpG オリゴ<sup>10</sup>、デコイ核酸<sup>11</sup>、anti miR<sup>12</sup>、mRNA 医薬<sup>13</sup> などを用いたものも数多く治験段階にあるなど、今後ますます開発が加速していくと見られている。以下これら核酸医薬についてその特徴を説明する。

## 核酸医薬品の種類と特長

ASO とは、16~20 塩基程度の一本鎖核酸からなる分子であり、アンチセンスの名の通り標的とする核酸分子の配列と相補的な配列を持つ。作用機序としては二種類存在し、標的とする核酸分子を分解する場合と、そうでない場合とに分けられる。前者の場合、標的とする RNA に対して相補的な DNA が用いられる。生体内に於いて DNA-RNA からなるヘテロ二重鎖が生成すると、RNaseH や Ago2 などのタンパク質がこれと結合し、RNA 側を選択的に分解する。現在核酸医薬品として承認を受けているものは大半がこの機序を利用したものであり、標的とする RNA に対する結合能を向上させるために ASO の両末端部位に 2' 修飾核酸を用いた gapmer 構造を持つものが多い<sup>14</sup>。後者の機序の場合は標的とする核酸分子と二重鎖を形成することにより、タンパク質との相互作用を低減させることで薬効を発揮する。これにより、標的遺伝子の翻訳を阻害し発現量を減じることが出来る他、mRNA の成熟過程においてスプライシング位置の調節を行なうことによる exon skipping などの方法が知られている<sup>15</sup>。

siRNA は small interfering RNA の略であり、RNA 干渉と呼ばれる現象を利用した遺伝子発現量の調節を行なうことが出来る、通常 21 塩基対前後の二重鎖 RNA である。この RNA 二重鎖は 3' 末端側がそれぞれ 2 塩基分ずつ突出した構造を持ち、5' 末端はリン酸化されている。siRNA 二重鎖が生体内に存在する Ago2 などのタンパク質に取り込まれると、片方の鎖が遊離して一本鎖-タンパク質複合体(RISC 複合体)構造を形成する。この際、タンパク質内に残る鎖をアンチセンス鎖(ガイド鎖)、取り除かれる鎖をセンス鎖(パッセンジャー鎖)と呼ぶ。RISC 複合体はアンチセンス鎖と相補的な配列をもつ mRNA に結合し、分解することで遺伝子の発現量を減じることが出来る。siRNA は疎水性残基である塩基部が二重鎖内部に存在する分 ASO よりも水溶性が高いため、標的細胞内へ取り込ませるためのリガンド修飾や DDS キャリアを用いた応用が研究されている<sup>16</sup>。例えば、2019 年に FDA の承認を受けた急性肝性ポルフィリン症治療薬 Givlaari<sup>®</sup>は、センス鎖の 3' 末端に GalNAc デンドリマー構造を持ち、肝臓細胞への送達に成功している<sup>17</sup>。

アプタマーは、核酸の 2 次元、3 次元的な構造を利用した技術である。生体内に於いても tRNA や rRNA など立体的な構造を持つ核酸分子は多く存在し、タンパク質と協働することで分子認識を行なっている。アプタマーはこれを利用し、金属イオン<sup>18</sup>

やペプチド<sup>19</sup>、タンパク質<sup>20</sup>、細胞表面<sup>21</sup>など様々な標的に対して特異的に結合することで薬効を発揮する。例えばアプタマー型核酸医薬であるマクジェン(ペガブタニブナトリウム)は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に対して結合することにより機能を阻害し、加齢性黄斑変性症の治療を行なうために用いられている<sup>22</sup>。類似の機能を持つものとして抗体分子があるが、アプタマーの場合は SELEX と呼ばれるサイクルを複数回行なうことにより比較的安価かつ容易に十分な結合能を持つアプタマーを選別することが可能である<sup>23</sup>。他、修飾核酸を用いる事により更に活性の高いアプタマーを合成することが出来る<sup>24</sup>など、抗体には無い特長を持つ。

CpG オリゴとは、その名の通り 5'-CG-3' という配列を持つオリゴヌクレオチドである。哺乳類に於いては、ゲノム DNA 中の CpG という並びを持つ配列のほとんどすべてで C の塩基部 5 位がメチル化されていることが知られている。このため、DNA の 5'-CG-3' という配列はバクテリアやウィルスなどの外部遺伝子の検出に用いられており、TLR9 などと結合して炎症反応を引き起こす<sup>10,25</sup>。これを利用して、意図的に CpG 配列を持つオリゴヌクレオチドを体内へ導入し、自然免疫応答反応を引き起こすことで投与したワクチンの効果を増大するなどの研究が行なわれている。Kobiyama らは Dectin-1 タンパク質のリガンドである  $\beta$ -D-グルカンに CpG オリゴをコンジュゲートし、インフルエンザワクチンのワクチンアジュバントとして用いることでワクチンの効能を向上させることが出来ると報告している<sup>26</sup>。

次に、デコイ核酸について触れる。遺伝子が転写される過程において、転写開始因子が転写調節配列の近くに結合する必要があるが、デコイ核酸はこの転写因子に対する「おとり」として働き、目的遺伝子の転写を抑制することが出来る。核酸医薬品への応用が期待されている例としては、免疫応答シグナルに関わる遺伝子群の転写開始因子である NF- $\kappa$ B に対して用いるものが良く研究されている<sup>11</sup>。NF- $\kappa$ B は多くの免疫応答シグナルの転写調節を行なう転写開始因子であるから、これの機能を阻害する事により過剰な炎症反応を抑えることが可能である。転写開始因子は DNA の二重鎖に結合するため、デコイ核酸として用いられる核酸も DNA の二重鎖である。核酸分解酵素に対する耐性を向上させるため、末端を持たないダンベル型デコイ核酸なども研究されている<sup>27</sup>。

最後に mRNA 医薬について説明する。mRNA 医薬とは、メッセンジャーRNA を直接細胞内へ導入し、目的とするタンパク質を発現させることで治療を行なうタイプの医薬

品である。通常、本来持っていない遺伝子を生体内で発現させるためには、ウイルスベクターなどを核内へ輸送して外来遺伝子を挿入する必要があり、場合によっては細胞がガン化する可能性もあるなどの危険が伴う。これに対し、mRNA 医薬は核内への輸送は不要であり、大元の遺伝子に対する変異を与えることも無いため、安全性の面で優れている。近年、mRNA の 5'末端に存在するキャップ構造を化学合成する方法が確立され<sup>28</sup>、様々なドラッグデリバリーシステムが構築されてきたことから研究が進んでいる。以下の Figure 0.1 に、これまでに紹介した核酸医薬品の概略を示す。

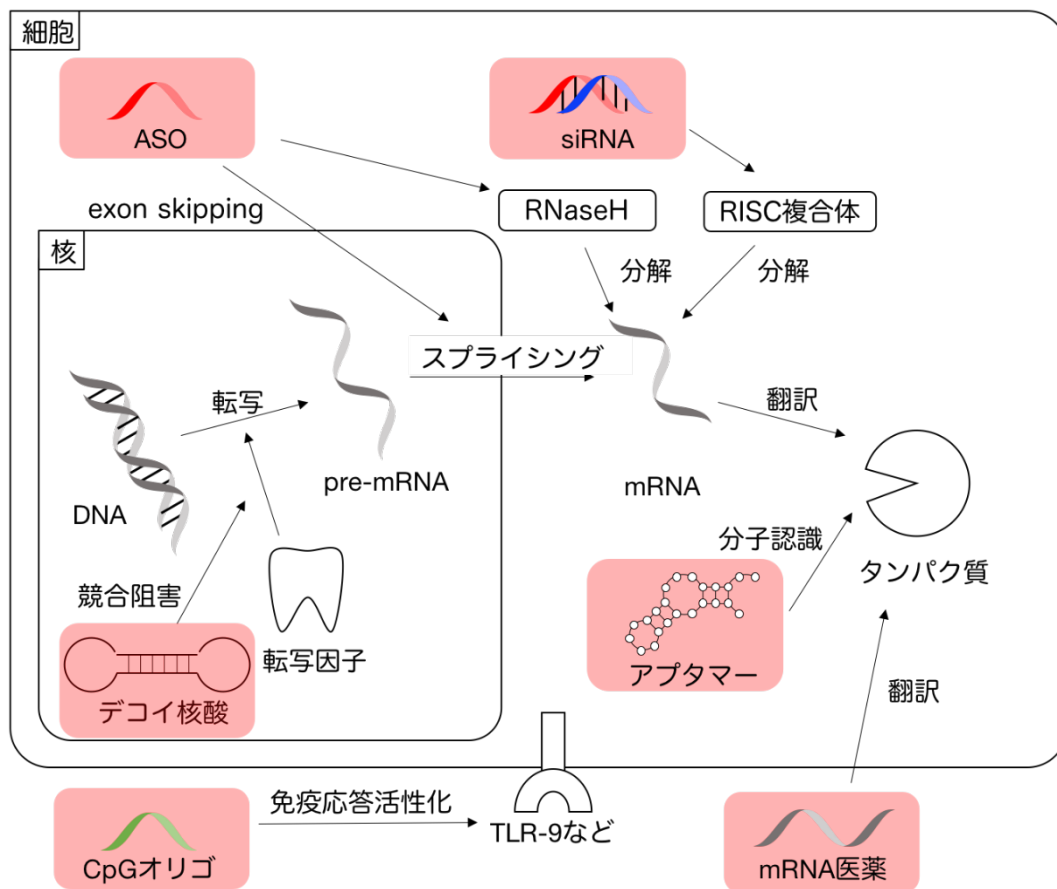


Figure 0.1 これまでに開発されてきた核酸医薬品の標的と作用機序の概略

### 核酸医薬品に必要な化学修飾

次に、核酸医薬品に必要な化学修飾について、Khvorova らは核酸を医薬品として用いる際、従来の低分子医薬とは異なり、Dianophore(分子の生体内組織局在や代謝を決定付ける特徴)と Pharmacophore(分子の標的特異性を決定付ける特徴)をそれぞれ別々に開発可能である点が利点であると指摘しているため、これら二つの観点に基づいて説明す

る<sup>29</sup>。まず、Dianophoreに関連して、天然型の核酸、とりわけRNAは生体内に普遍的に存在しているリボヌクレアーゼ(RNase)などのエキソヌクレアーゼにより迅速に分解を受ける<sup>30</sup>他、腎排出により血中から即座に取り除かれる<sup>31</sup>ため、そのまま医薬品として用いることは出来ない。特に、gap領域にRNA領域を持つASOや、RNAの2重鎖であるsiRNAではその生体内安定性が問題になる。そこで、これらの核酸医薬品では核酸分解酵素耐性を向上させるための化学修飾をされた核酸が用いられている。この修飾は多岐にわたるが、今回はその中でも2'位水酸基への修飾について着目する。核酸の2'位水酸基への修飾は、以下にいくつか例を示すように核酸分解酵素耐性を向上させるものが多い他、蛍光分子<sup>32</sup>やDDSリガンド分子<sup>33</sup>などを導入する目的でも用いられている。

最も単純な2'位修飾オリゴヌクレオシドとしては、2'-O-メチルヌクレオシドが知られる。これは天然においてrRNAやsnRNAなどに含まれていることが知られており、リボソームやスプライソソームの機能に関わっていることが示唆されている<sup>34</sup>。2'-O-メチルヌクレオシドは天然物であるために毒性の懸念も低く、二重鎖の安定性や酵素耐性も通常のリボヌクレオシドより高いことから、核酸医薬品への応用研究が多く行われている<sup>35</sup>。一般的に、2'位水酸基に対してかさ高い修飾を導入すると核酸分解酵素耐性が向上する傾向にあることが分かっており、直鎖アルキル<sup>36</sup>や分岐を持つ不飽和アルキル<sup>37</sup>、フェニル基、ナフチル基<sup>38</sup>などについて、いずれも修飾がかさ高くなるにつれて核酸分解酵素耐性が向上することが知られている。このような2'位修飾核酸の持つ性質については、のちに更に詳しく述べる。

また、Dianophoreに関連して、核酸分子の腎排出の回避と生体内局在の変化については、核酸の疎水性の調節が重要であることが示唆されている。例えば、核酸医薬品に頻用されているホスホロチオエート修飾は、核酸分子の疎水性を向上させることで血中アルブミンへの結合を増強する事により、腎排出を免れ、血中滞留性を向上させることが知られており、ほとんどすべての核酸医薬品で用いられている。現在、核酸の細胞内送達経路や送達に関わるタンパク質については未知な部分も多いため、疎水性の高い修飾核酸を用いることによって相互作用するタンパク質の種類を増やし、送達の効率を向上させようとする研究も行なわれている<sup>39</sup>。また、核酸の末端にドコサヘキサニン酸などの不飽和脂肪酸やパルミチン酸のような飽和脂肪酸を修飾することにより、従来は送

達の難しかった脳神経細胞や筋肉細胞などへの核酸送達が可能になったとされる報告もある<sup>40-42</sup>。

続いて、Pharmacophore に関連して核酸の標的選択性の調節について述べる。核酸はそもそも塩基対形成による相補鎖特異性が非常に高いため、標的選択性は高いと言える。そのため、どのような修飾が核酸の相補鎖特異性に影響を与えるのかについて数多くの研究がなされてきた。相補鎖特異性を評価するためには二重鎖の安定性の指標である二重鎖融解温度が良く用いられるので、以下では修飾が二重鎖融解温度に及ぼす影響について紹介する。まず、2'-*O*-アルキルヌクレオシドの二重鎖の安定性への影響については1993年にLesnikらが報告している<sup>43</sup>。彼らの報告によると、2'-フルオロ修飾および2'-*O*-メチル修飾は二重鎖の安定性を向上させるのに対し、エチル、プロピル、ブチル、アミル、ノニルと修飾をかさ高くしていくと二重鎖の安定性が低下し、2'-*O*-ノニル修飾では平均して修飾一か所辺り3℃程度二重鎖融解温度が下がることが分かっている。

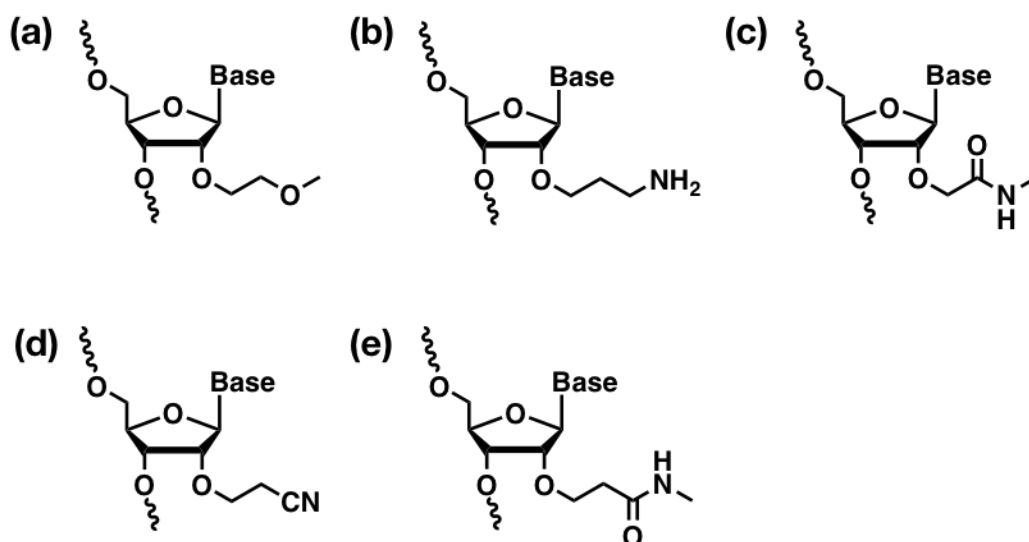


Figure 0.2 (a)メトキシエチル (b)アミノプロピル (c) [2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]  
(d)シアノエチル および (e)メチルカルバモイルエチル修飾核酸

また、その他の2'位修飾のうち、二重鎖の安定性を保持することが可能な修飾としては、2'-*O*-メトキシエチル<sup>44</sup>、2'-*O*-アミノプロピル<sup>45</sup>、2'-*O*-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]<sup>46</sup>、2'-*O*-シアノエチル<sup>47</sup>、2'-*O*-メチルカルバモイルエチル修飾<sup>48</sup>などが知られている(Figure 0.2)。これらの修飾は末端にメトキシ基、アミン、ニトリル、アミドなどの極性官能基を有しており、二重鎖形成時の水素結合に関わる水和水の構造を安定化さ

せているために、二重鎖構造を不安定化しない事が推測される<sup>49</sup>。また、2'位と4'位を架橋した形の核酸である BNA/LNA<sup>50,51</sup> に関しても、数多くの研究がなされている。これらの修飾は架橋部位の立体障害によって核酸分解酵素耐性が向上する他、架橋構造によって糖部のコンホメーションが N 型配座に強く固定化され、RNA に対する親和性が向上するため、主として RNA を標的とする ASO 型の核酸医薬への応用が検討されている。しかしながら、最初に報告された 2'-O,4'-C-Bridged 修飾は肝毒性を示すことが示唆された<sup>52</sup>ため、これを解消するための研究が行なわれている。架橋型アナログとしては他に ENA<sup>53</sup>、cEt-BNA<sup>54</sup>、AmNA<sup>55</sup>、BNA<sup>NC</sup><sup>56</sup> などが開発されているが、2020 年現在 FDA による承認を受けている核酸医薬へ応用された例はない(Figure 0.3)。

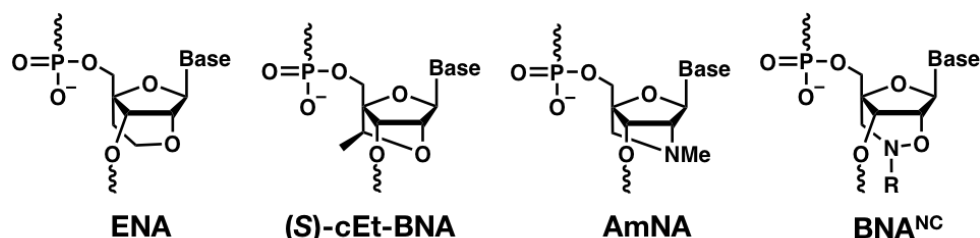


Figure 0.3 BNA/LNA 型の核酸誘導体の例

以上、Dianophore と Pharmacophore の二つの観点に基づいて核酸医薬品に用いられる化学修飾、とりわけ 2'位修飾について紹介した。

### 核酸医薬品開発の問題点と本研究における目的

冒頭でも紹介したように、Khvorova らは核酸医薬品の利点として、Dianophore と Pharmacophore をそれぞれ別々に開発できる点を挙げている。しかし、ここまでで紹介したように、核酸への化学修飾は二重鎖構造の安定性と生体内動態の両方に影響を及ぼすため、これらを別々に開発することは現状困難である。特に、疎水性修飾やドラッグデリバリーシステムの構築などに用いられる機能性官能基は比較的高いものが多いため、これらの修飾を導入するのであれば一部の塩基の塩基部(ピリミジン塩基の 5 位など)<sup>57</sup> や 5',3'末端部<sup>58</sup> などの修飾が二重鎖構造の安定性に影響を与えない箇所に限られるなど、配列設計や修飾位置の制限が存在する。したがって、かさ高い化学修飾を導入しても二重鎖構造の安定性が保持されるような共通構造の開発が求められている。

そのような構造を開発することが出来れば、Dianophore と Pharamacophore を別々に開発することが可能になり、適用可能な化学修飾の幅が広がることが予想される。著者は、この目的を達成しうる構造として、カルバモイルエチル型の修飾に着目した。

2'-O-メチルカルバモイルエチル修飾核酸は2011年に山田らによって報告された修飾であり、核酸医薬品に頻用される2'-O-メトキシエチル修飾と比較しても数倍程度の高い核酸分解酵素耐性を有している点と、原子6つからなる比較的高い修飾である (Figure 0.2(e))にも関わらず二重鎖構造の安定性を低下させない点が特徴である<sup>48</sup>。近年、さらなる酵素耐性の向上を指向し、弱塩基性の修飾を持つカルバモイルエチル型修飾核酸が報告された。これらはカルバモイルエチル型のリンカー構造を介して *N,N*-ジメチルアミノエチル基、2-ピリジニルエチル基、モルフォリノエチル基、ベンズイミダゾール-1-イル-エチル基などのかさ高い修飾を導入したものであるが、いずれも非常に高い酵素耐性を示し、また、二重鎖構造の安定性を保持した<sup>59</sup>。このように、カルバモイルエチル型修飾は二重鎖構造の安定性を保持したままに、核酸に対して新規の機能を付与できる可能性がある。そこで、本研究では核酸医薬品への応用を指向し、核酸の疎水性を調節するための種々のアルキル基を有するカルバモイルエチル型修飾核酸を開発することを目的とした。この目的を達成するために、アルキルカルバモイルエチル型修飾を有する核酸の効率的な合成法を開発し、その二重鎖構造の安定性と核酸分解酵素耐性を明らかにした。また、研究の過程で、修飾をオクチル基までかさ高くしても二重鎖構造の安定性が変化しないという事が明らかになったため、その理由について熱力学および構造学的見地から考察した。

第一章では、複数種類のカルバモイルエチル型修飾を持つ核酸を迅速に合成するための効率的な合成法を開発を行なったので、詳細に報告する。カルバモイルエチル型修飾を持つ核酸の合成は、まず炭酸セシウムを用いてアクリル酸エステルに対するオキシマイケル付加反応を行ない、続いて対応するアミンの20%メタノール溶液中55℃に加熱することによってエステルをアミドへと変換する方法が報告されている<sup>48,59,60</sup>。しか

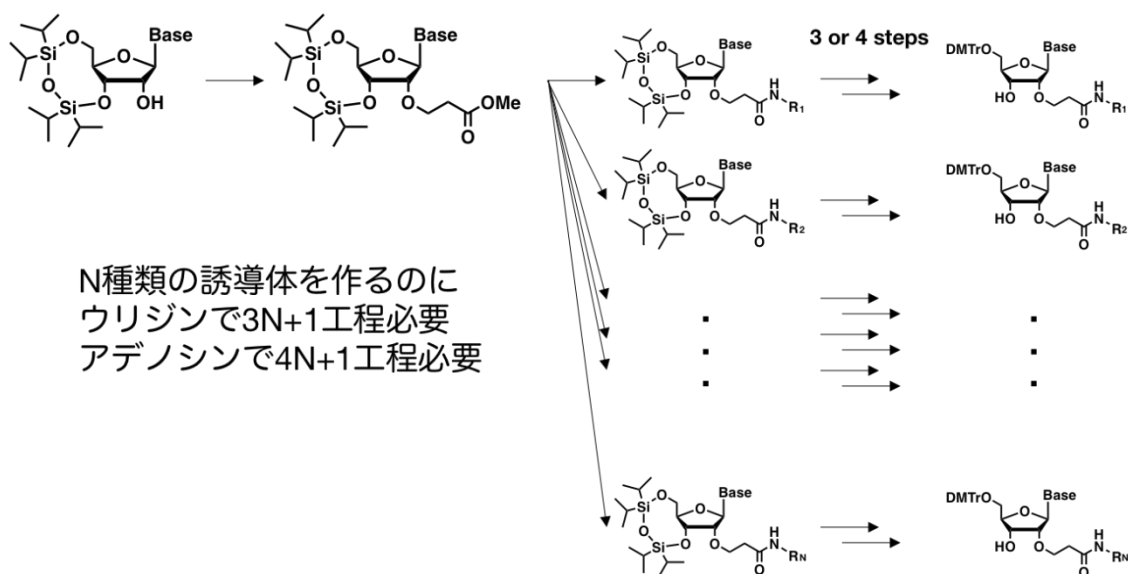


Figure 0.4 従来の合成法と合成に必要な工程数

し、この方法では求核性の低いアミンに対しては用いることが出来ず、過剰量のアミンを必要とするために合成が必要なアミンや高価なアミンに対しては適用することが難しい。さらに、 $\beta$  脱離や塩基部保護基の脱保護などの副反応も起こりやすく、カルバモイルエチル型修飾を導入してからホスホロアミダイトユニットへ変換するまでの工程数も多いため、複数種類の修飾を開発することを考えた際に合成工程数が非常に多くなるといった問題点もある(Figure 0.4)。

また、オキシマイケル付加の反応条件もアクリル酸エステルを 20 当量用いる必要があるなど、反応条件を検討する余地も残されていた。著者はアクリル酸アリルおよびアクリル酸ベンジルに対するオキシマイケル付加反応の条件を検討し、アクリル酸エステルの当量を 5 当量まで削減することに成功した。また、パラジウム触媒による接触水素化反応を用いてベンジル基を脱保護し、当量のアミンと縮合剤を加える事によってカルバモイルエチル型修飾を導入する合成経路を設計した。この方法ではカルバモイルエチル基の導入後、1 工程でホスホロアミダイトユニットへの変換が可能であり、従来法と比較してはるかに迅速に修飾の種類を増やすことが可能である(Figure 0.5)。

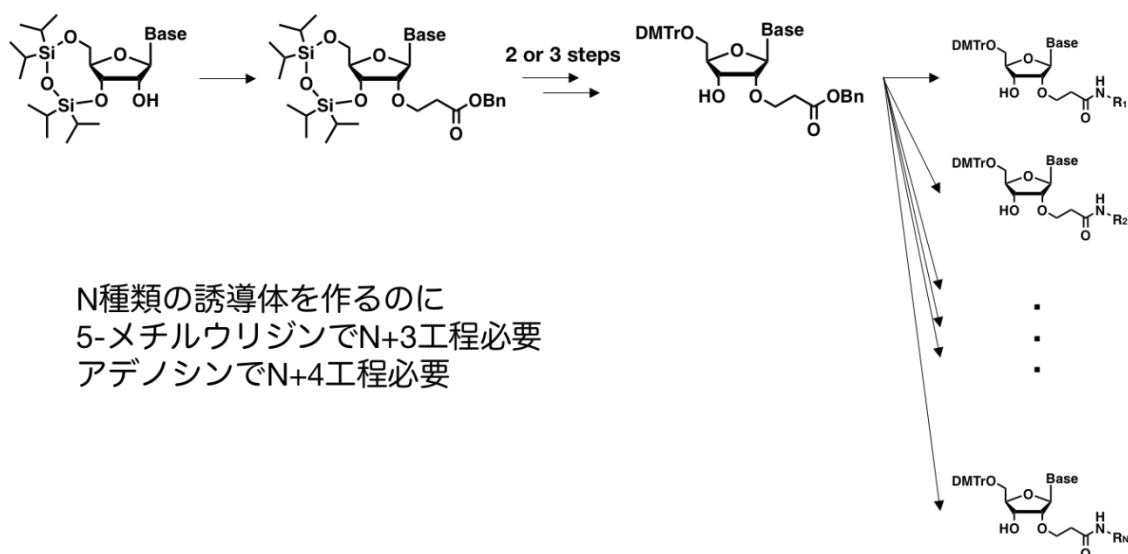


Figure 0.5 改良後の合成法と合成に必要な工程数

第二章では第一章の方法で合成したアルキルカルバモイルエチル修飾ヌクレオシドをオリゴ核酸中に導入し、その二重鎖安定性や熱力学パラメーター、酵素耐性などを評価したので、その詳細を報告する。既に報告のあったメチルカルバモイルエチル(MCE)修飾に加え、エチル、プロピル、ブチル、アミル、オクチルを導入したカルバモイルエチル修飾(それぞれ EtCE, PrCE, BuCE, AmCE, OcCE)をもつ修飾ヌクレオシドをオリゴ核酸中へ導入した。これらの修飾は予期していた通り二重鎖の安定性にほとんど影響を与えず、合成した中で最もかさ高いオクチルカルバモイルエチル修飾を 11 量体の核酸中に 3 か所導入した場合でも、二重鎖融解温度の低下は 3 °C 程度に留まった。また、熱力学パラメーターを測定したところ、エンタルピー変化とエントロピー変化の影響が打ち消し合うエンタルピー-エントロピー補償が起きていることが確認され、37 °C における二重鎖形成反応のギブス自由エネルギー変化の値が保持されるということが明らかになった。また、3'エキソヌクレアーゼである SVPDE-1 に対する酵素耐性を測定したところ、OcCE 修飾は MCE 修飾と比較して 2 倍程度酵素耐性が向上することが明らかになった。MCE 修飾は核酸医薬品に頻用される 2'-O-MOE 修飾と比較しても 3 倍程度高い酵素耐性を持つことがすでに報告されていることから<sup>59</sup>、本研究で開発したアルキルカルバモイルエチル型修飾核酸はいずれも実用に耐えうる非常に優れた核酸分解酵素耐性を持っていることが示された。さらに、修飾の二重鎖全体の立体構造に対する影響を評価するために、MCE 修飾および OcCE 修飾を持つ核酸の CD スペクトルの測

定と AMBER を用いた MD シミュレーションを行なった。これらの結果から、いずれの修飾も糖部コンホメーションを N 型に偏らせ、二重鎖全体としては A 型のらせん構造を安定的に取ることが示唆された。また、カルバモイルエチル型修飾の窒素原子に結合した修飾は二重鎖構造への影響の少ないマイナーグループ側に突き出しているために、かさ高い修飾を導入した場合においても二重鎖の安定性を変化させない可能性が見出された。

以上、本研究では核酸の二重鎖構造の安定性を保持したままに、疎水性や酵素耐性を調整することが可能なアルキルカルバモイルエチル型核酸の効率的な合成を達成した。本研究は、核酸医薬品開発における、2'位にかさ高い修飾を導入した場合には二重鎖構造の安定性が低下するという常識を覆すものであり、今後実用に向けたさらなる応用研究が期待される。以下の各章で本研究の内容について詳細に述べる。

## 序論の引用文献

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738.
- (2) Bumgarner, R. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Ed. Frederick M Ausubel Al* **2013**, *0 22*, Unit-22.1.
- (3) Hong, F.; Zhang, F.; Liu, Y.; Yan, H. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (20), 12584–12640.
- (4) Kosuri, P.; Altheimer, B. D.; Dai, M.; Yin, P.; Zhuang, X. *Nature* **2019**, *572* (7767), 136–140.
- (5) Cohen, J. S. *Pharmacol. Ther.* **1991**, *52* (2), 211–225.
- (6) Bennett, C. F.; Swayze, E. E. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50* (1), 259–293.
- (7) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806–811.
- (8) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822.
- (9) Goyon, A.; Yehl, P.; Zhang, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *182*, 113105.
- (10) Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K.; Akira, S. *Nature* **2000**, *408* (6813), 740–745.
- (11) Morishita, R.; Sugimoto, T.; Aoki, M.; Kida, I.; Tomita, N.; Moriguchi, A.; Maeda, K.; Sawa, Y.; Kaneda, Y.; Higaki, J.; Ogihara, T. *Nat. Med.* **1997**, *3* (8), 894–899.
- (12) Lennox, K. A.; Behlke, M. A. *Gene Ther.* **2011**, *18* (12), 1111–1120.
- (13) Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (10), 759–780.
- (14) Monia, B. P.; Lesnik, E. A.; Gonzalez, C.; Lima, W. F.; McGee, D.; Guinosso, C. J.;

- Kawasaki, A. M.; Cook, P. D.; Freier, S. M. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (19), 14514–14522.
- (15) Siva, K.; Covello, G.; Denti, M. A. *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24* (1), 69–86.
- (16) Crooke, S. T.; Witztum, J. L.; Bennett, C. F.; Baker, B. F. *Cell Metab.* **2018**, *27*(4), 714–739.
- (17) Balwani, M.; Sardh, E.; Ventura, P.; Peiró, P. A.; Rees, D. C.; Stölzel, U.; Bissell, D. M.; Bonkovsky, H. L.; Windyga, J.; Anderson, K. E.; Parker, C.; Silver, S. M.; Keel, S. B.; Wang, J.-D.; Stein, P. E.; Harper, P.; Vassiliou, D.; Wang, B.; Phillips, J.; Ivanova, A.; Langendonk, J. G.; Kauppinen, R.; Minder, E.; Horie, Y.; Penz, C.; Chen, J.; Liu, S.; Ko, J. J.; Sweetser, M. T.; Garg, P.; Vaishnav, A.; Kim, J. B.; Simon, A. R.; Gouya, L. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (24), 2289–2301.
- (18) Qu, H.; Csordas, A. T.; Wang, J.; Oh, S. S.; Eisenstein, M. S.; Soh, H. T. *ACS Nano* **2016**, *10* (8), 7558–7565.
- (19) Chakravarthy, M.; AlShamaileh, H.; Huang, H.; Tannenber, R. K.; Chen, S.; Worrall, S.; Dodd, P. R.; Veedu, R. N. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (36), 4593–4596.
- (20) Deng, B.; Lin, Y.; Wang, C.; Li, F.; Wang, Z.; Zhang, H.; Li, X.-F.; Le, X. C. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *837*, 1–15.
- (21) Cerchia, L.; de Franciscis, V. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (10), 517–525.
- (22) Ng, E. W. M.; Shima, D. T.; Calias, P.; Cunningham, E. T.; Guyer, D. R.; Adamis, A. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (2), 123–132.
- (23) Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510.
- (24) Kimoto, M.; Yamashige, R.; Matsunaga, K.; Yokoyama, S.; Hirao, I. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (5), 453–457.
- (25) Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M. *Nature* **1995**, *374* (6522), 546–549.
- (26) Kobiyama, K.; Aoshi, T.; Narita, H.; Kuroda, E.; Hayashi, M.; Tetsutani, K.; Koyama, S.; Mochizuki, S.; Sakurai, K.; Katakai, Y.; Yasutomi, Y.; Saijo, S.; Iwakura, Y.; Akira, S.; Coban, C.; Ishii, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (8), 3086–3091.
- (27) Miyake, T.; Aoki, M.; Osako, M. K.; Shimamura, M.; Nakagami, H.; Morishita, R. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2011**, *19* (1), 181–187.
- (28) Thillier, Y.; Decroly, E.; Morvan, F.; Canard, B.; Vasseur, J.-J.; Debart, F. *RNA* **2012**, *18* (4), 856–868.
- (29) Khvorova, A.; Watts, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (3), 238–248.
- (30) Shaw, J. P.; Kent, K.; Bird, J.; Fishback, J.; Froehler, B. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (4), 747–750.
- (31) Geary, R. S.; Norris, D.; Yu, R.; Bennett, C. F. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 46–51.
- (32) Yamana, K.; Iwase, R.; Furutani, S.; Tsuchida, H.; Zako, H.; Yamaoka, T.; Murakami, A.

- Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*(11), 2387–2392.
- (33) Yamada, T.; Peng, C. G.; Matsuda, S.; Addepalli, H.; Jayaprakash, K. N.; Alam, Md. R.; Mills, K.; Maier, M. A.; Charisse, K.; Sekine, M.; Manoharan, M.; Rajeev, K. G. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*(5), 1198–1211.
- (34) Kiss, T. *EMBO J.* **2001**, *20*(14), 3617–3622.
- (35) Inoue, H.; Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*(15), 6131–6148.
- (36) Monia, B. P.; Johnston, J. F.; Sasmor, H.; Cummins, L. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*(24), 14533–14540.
- (37) Iribarren, A. M.; Sproat, B. S.; Neuner, P.; Sulston, I.; Ryder, U.; Lamond, A. I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*(19), 7747–7751.
- (38) Sekine, M.; Oeda, Y.; Iijima, Y.; Taguchi, H.; Ohkubo, A.; Seio, K. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *9*(1), 210–218.
- (39) Croke, S. T.; Wang, S.; Vickers, T. A.; Shen, W.; Liang, X. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*(3), 230–237.
- (40) Nikan, M.; Osborn, M. F.; Coles, A. H.; Godinho, B. M.; Hall, L. M.; Haraszti, R. A.; Hassler, M. R.; Echeverria, D.; Aronin, N.; Khvorova, A. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2016**, *5*, e344.
- (41) Prakash, T. P.; Mullick, A. E.; Lee, R. G.; Yu, J.; Yeh, S. T.; Low, A.; Chappell, A. E.; Østergaard, M. E.; Murray, S.; Gaus, H. J.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*(12), 6029–6044.
- (42) Chappell, A. E.; Gaus, H. J.; Berdeja, A.; Gupta, R.; Jo, M.; Prakash, T. P.; Østergaard, M.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*(8), 4382–4395.
- (43) Lesnik, E. A.; Guinosso, C. J.; Kawasaki, A. M.; Sasmor, H.; Zounes, M.; Cummins, L. L.; Ecker, D. J.; Cook, P. D.; Freier, S. M. *Biochemistry* **1993**, *32*(30), 7832–7838.
- (44) Geary, R. S.; Watanabe, T. A.; Truong, L.; Freier, S.; Lesnik, E. A.; Sioufi, N. B.; Sasmor, H.; Manoharan, M.; Levin, A. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*(3), 890–897.
- (45) Griffey, R. H.; Monia, B. P.; Cummins, L. L.; Freier, S.; Greig, M. J.; Guinosso, C. J.; Lesnik, E.; Manalili, S. M.; Mohan, V.; Owens, S.; Ross, B. R.; Sasmor, H.; Wancewicz, E.; Weiler, K.; Wheeler, P. D.; Cook, P. D. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*(26), 5100–5109.
- (46) Prakash, T. P.; Kawasaki, A. M.; Wancewicz, E. V.; Shen, L.; Monia, B. P.; Ross, B. S.; Bhat, B.; Manoharan, M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*(9), 2766–2776.
- (47) Saneyoshi, H.; Seio, K.; Sekine, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*(25), 10453–10460.
- (48) Yamada, T.; Okaniwa, N.; Saneyoshi, H.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Nagata, T.; Aoki, Y.; Takeda, S.; Sekine, M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*(9), 3042–3053.
- (49) Werner, D.; Brunar, H.; Noe, C. R. *Pharm. Acta Helv.* **1998**, *73*(1), 3–10.

- (50) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, K.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (50), 8735–8738.
- (51) Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron* **1998**, *54* (14), 3607–3630.
- (52) Swayze, E. E.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Migawa, M. T.; Wyrzykiewicz, T. K.; Hung, G.; Monia, B. P.; Bennett, C. F. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (2), 687–700.
- (53) Morita, K.; Hasegawa, C.; Kaneko, M.; Tsutsumi, S.; Sone, J.; Ishikawa, T.; Imanishi, T.; Koizumi, M. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2001**, *1* (1), 241–242.
- (54) Pallan, P. S.; Allerson, C. R.; Berdeja, A.; Seth, P. P.; Swayze, E. E.; Prakash, T. P.; Egli, M. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2012**, *48* (66), 8195–8197.
- (55) Yahara, A.; Shrestha, A. R.; Yamamoto, T.; Hari, Y.; Osawa, T.; Yamaguchi, M.; Nishida, M.; Kodama, T.; Obika, S. *Chembiochem* **2012**, *13* (17), 2513–2516.
- (56) Abdur Rahman, S. M.; Seki, S.; Obika, S.; Yoshikawa, H.; Miyashita, K.; Imanishi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (14), 4886–4896.
- (57) Macíčková - Cahová, H.; Pohl, R.; Hocek, M. *ChemBioChem* **2011**, *12* (3), 431–438.
- (58) 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, S. L.; Murray, S. F.; Gaus, H.; Crosby, J.; Lima, W. F.; Guo, S.; Monia, B. P.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (13), 8796–8807.
- (59) Masaki, Y.; Yamamoto, K.; Yoshida, K.; Maruyama, A.; Tomori, T.; Iriyama, Y.; Nakajima, H.; Kanaki, T.; Seio, K. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (19), 4835–4842.
- (60) Yamada, T.; Masaki, Y.; Okaniwa, N.; Kanamori, T.; Ohkubo, A.; Tsunoda, H.; Seio, K.; Sekine, M. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (33), 6457–6464.

# 第一章 カルバモイルエチル型修飾をもつ核酸の

## 効率的合成法の開発

### 第一節 諸言

カルバモイルエチル型の修飾について、現状報告されている合成方法の問題点に関しては序論で触れたが、ここでも改めてその概略を説明する。現状の合成法は 2006 年に實吉らによって報告された 2'-*O*-シアノエチル修飾核酸の合成法に由来する<sup>1</sup>。核酸の 2' 位水酸基に対する修飾は、2,2'-アンヒドロウリジン等のヌクレオシド環化体に対する開環反応<sup>2</sup>か、水酸基の Williamson エーテル化<sup>3</sup>を行なう方法が一般的である。これらの条件は高温・高圧条件や強酸・強塩基などの激しい反応条件を要するのに対し、2'-*O*-シアノエチル修飾核酸は、炭酸セシウムを用いた常温・弱塩基性の穏やかな条件でのアクリロニトリルに対するオキシマイケル付加反応を用いて合成されている。山田らはこの反応条件に着目し、炭酸セシウムを用いてアクリル酸メチルに対するオキシマイケル付加反応を行なうことでエステルを導入し、メチルアミンで処理することにより 2'-*O*-メチルカルバモイルエチル修飾の導入を達成している(Figure 1.1)<sup>4</sup>。

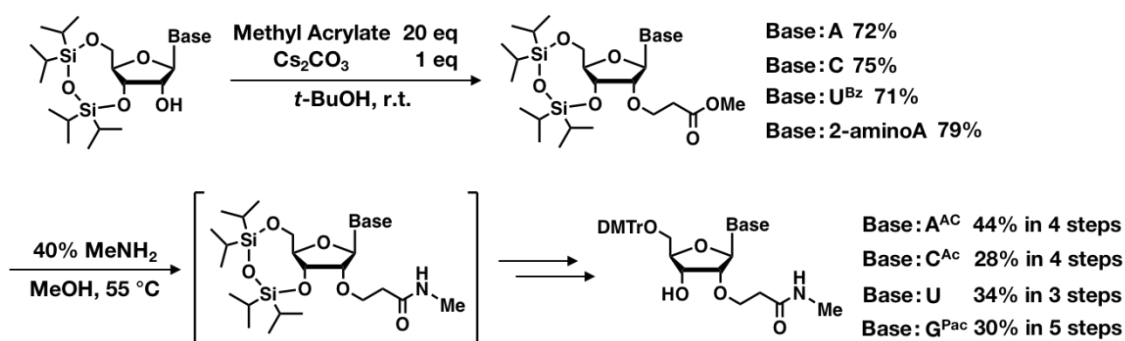


Figure 1.1 メチルカルバモイルエチル修飾を持つヌクレオシドの合成法

しかし、この方法で種々の修飾を持つカルバモイルエチル型修飾を持つヌクレオシドを合成する場合、工程数が非常に多くなるという問題がある。例えば、以下の Figure 1.2 に示すようにこれと同一の方法で  $N$  種類のカルバモイルエチル型修飾を持つヌクレオシドを合成する場合、塩基部保護基の関係上工程数の比較的少ないウリジンでは  $3N+1$  工程、アデノシンでは  $4N+1$  工程がそれぞれ必要になる。これは、メチルエステルをア

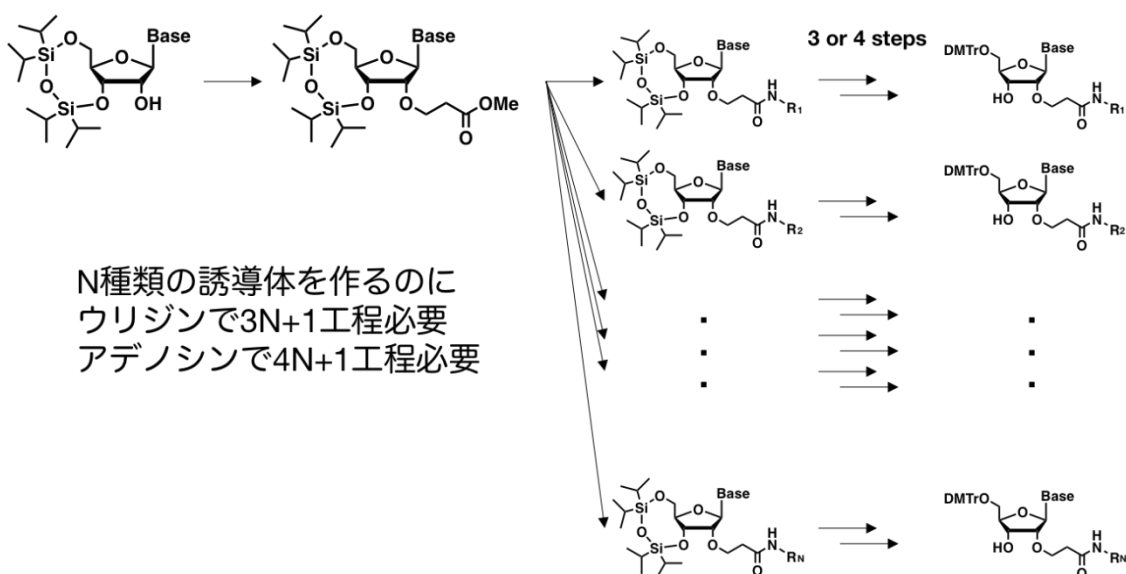


Figure 1.2 カルバモイルエチル型修飾導入に必要な反応工程数

ミドに変換する反応が合成経路の上流にあることが原因であり、この反応はできるだけ合成経路の終盤に置くことが望ましい。実際に、オキシマイケル付加反応によるメチルエステルの導入後、順次反応を進め DMTr 体へ誘導し、対応するアミンの 20%-メタノール溶液で処理することによってカルバモイルエチル型修飾を導入する合成経路が報告されている(Figure 1.3)<sup>5</sup>。この方法であれば種々のアミド化合物への誘導後、1 工程でオリゴヌクレオチド合成に必要なホスホロアミダイトユニットへと変換することが可能である。しかし、アミド結合を形成する際に過剰量のアミンが必要であるため、合成に必要なアミンや高価なアミンに関しては適用が難しい。また、副反応として塩基部保護基の脱保護が進行するため、オリゴヌクレオチドの合成時に保護基の必要ないウリジンやチミジンなどには有用であるが、その他のヌクレオシド誘導体について保護基のつけ直しを行なう必要がある。そこで、本研究においてはカルバモイルエチル型修飾を導入する際に用いるアミンの当量を削減するため、エステルを塩基部保護基を損なわない条件でカルボン酸へと変換したのち、縮合剤を用いてカルボン酸を活性化し、塩基部保護基を損なわない温和な条件でアミド結合を形成できるような合成経路の構築を目指した。そのために著者は、メチルエステル体を用いるのではなく、中性の条件下カルボン酸に変換できるアリルエステル体またはベンジルエステル体を用いた合成経路を考案した。これは、見方を変えればカルボキシ基の保護基としてアリル基やベンジル基を用いているとすることもできる。これらの保護基はいずれもパラジウム触媒を用いた辻

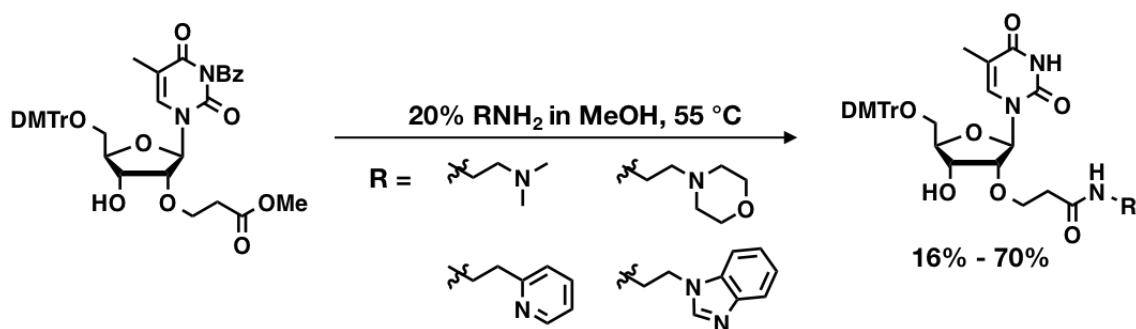


Figure 1.3 正木らにより報告されたカルバモイルエチル型修飾の合成法

-トロスト様反応または接触水素化反応によって容易に脱保護され、エステルをカルボン酸へと変換することが出来る。これを利用してエステルをカルボン酸へと変換し、縮合剤を用いてアミンと反応させることで、過剰量のアミンを用いることなく常温で反応を行なう事ができるのではないかと考えた(Figure 1.4)。

はじめに、オキシマイケル付加反応の反応条件の改良を行なった。オキシマイケル付加反応を用いた 2'-O-シアノエチル修飾の合成報告では、アクリロニトリルの反応性の低さからアクリロニトリルを溶媒量用いる必要があった。2'-O-メチルカルバモイルエチル修飾の合成論文では、アクリル酸メチルを溶媒量までは行かないものの、20 当量用いる必要があると報告されている(Figure 1.1)。筆者が実際にこの条件で合成を試みたところ、悪臭の強いアクリル酸メチルの取り扱いが困難である他、シリカゲルカラムクロマトグラフィーの際に極性の高いアクリル酸メチルがシリカゲルと強く相互作用するため反応生成物が上手くカラムに吸着されないなど、複数の要改善点が確認された。よって、用いるアクリル酸エステルの当量を削減することを主眼とし、アクリル酸アリル、アクリル酸ベンジルを用いて種々の検討を行なった。(第二節、第三節、第四節)。続いて、アデノシン誘導体では塩基部をアセチル基で保護し(第四節)、第五節ではパラジウム触媒を用いたベンジルエステルのカルボン酸への変換を行なうべく溶媒を検討した。結果として、接触水素化反応に頻用されるメタノール溶媒に加え、バッファと有機溶媒からなる二相系の反応条件でも迅速にベンジル基が脱保護されカルボン酸誘導体へと変換されることを明らかにした。さらに、アルコールや水などの溶媒中でも選択的にアミド結合を形成することが可能な縮合剤 DMT-MM を用いることにより、ベンジ

ル基の脱保護からアミド結合の形成までをワンポットで行なうことが可能であるとわかった。以上の事柄を、次節から詳細に報告する。

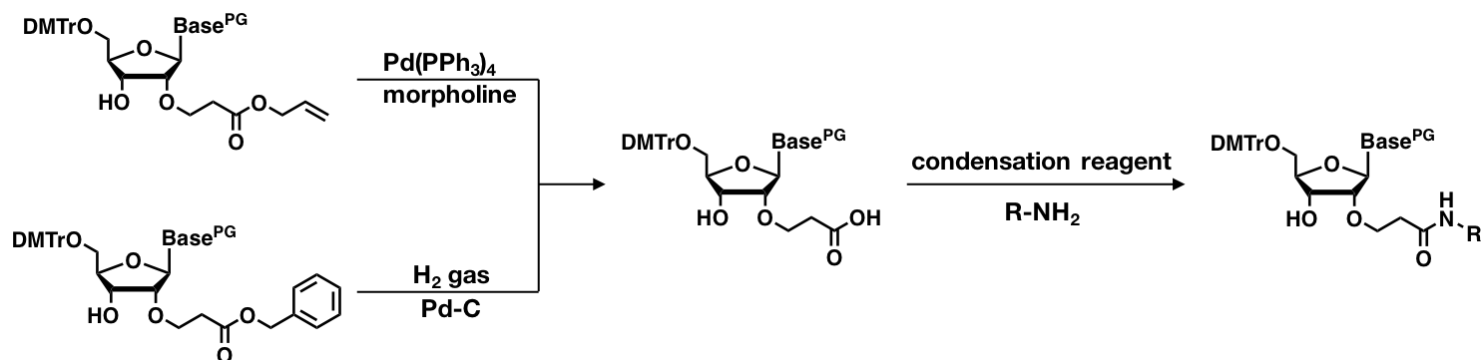
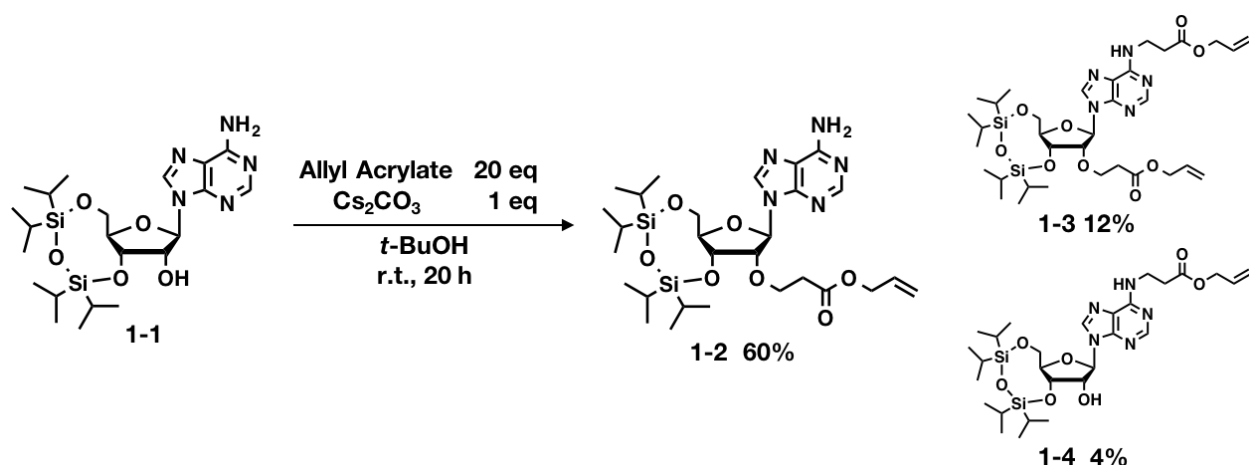


Figure 1.4 本研究での合成戦略

## 第二節 アクリル酸アリルを用いた 3',5'-O-TIPDS アデノシンのオキシマイケル付加反応の検討

初めに、従来の方法に則り、アクリル酸アリルを 20 当量、炭酸セシウムを 1 当量用いて 5'位と 3'位の水酸基がシリル保護基で保護されたアデノシン(1-1)に対するオキシマイケル付加反応を試みた(Scheme 1.1)。溶媒として *t*-ブチルアルコールとジクロロメタンの混合溶媒系を用い、アクリル酸エステルにはアクリル酸アリルを用いた。反応を開始して 1 時間後に TLC を確認したが、反応の進行は確認できなかったため、一晩撹拌をつづけた。反応開始 20 時間後に改めて TLC を確認したところ、わずかではあるが出発原料と目的物の R<sub>f</sub> 値の異なるスポットが観測されたため、反応を停止しシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行なった。

2 回目の合成時には、反応生成物をすべて単離することに成功した。<sup>1</sup>H-NMR を用いて単離した化合物の同定を行ない、それぞれの収率を求めたところ、60%が目的物(1-2)、12%が 2'水酸基および塩基部アミノ基の両方がマイケル付加反応を起こした副生成物 1-3、4%が塩基部のアミノ基のみがマイケル付加反応を起こした副生成物 1-4 であることが分かった。ここで、今後の反応条件の検討を容易に行なうために、<sup>1</sup>H-NMR を用いて精製前混合物の状態から核酸成分の生成量比を求めることが出来ないか考えた。すると、Figure 1.5 に示すように目的物である化合物 1-2 と副生成物である化合物 1-3 に共



Scheme 1.1 アクリル酸アリルを用いたオキシマイケル付加反応

通して存在するオキシマイケル付加反応後の $\alpha$ 位水素原子のピーク(Figure 1.5,  $H_{O\alpha}$ )と、副生成物である化合物 1-3 にのみ存在する塩基部マイケル付加反応後の $\alpha$ 水素原子のピーク(Figure 1.5,  $H_{N\alpha}$ )が異なるケミカルシフトを持つことが明らかになった。よって、これらのピークの積分値の比を用いることにより、化合物 1-2 と 1-3 の生成量比を算出することとした。さらに、Figure 1.6 に示すように出発原料である化合物 1-1 の 3'位水素原子のピーク(Figure 1.6,  $H_{3'_{1-1}}$ )と化合物 1-2 および 1-3 の 3'位水素原子のピーク(Figure 1.6,  $H_{3'_{1-2}}$  および  $H_{3'_{1-3}}$ )が異なるケミカルシフトを持つことから、これらのピークの積分値の比によって出発原料である化合物 1-1 と化合物 1-2 および 1-3 の生成量比を算出することとした。また、以降の検討では化合物 1-4 を含む微量の副生成物の生成は極めて少ないため、生成量比を計算する上では無視した。

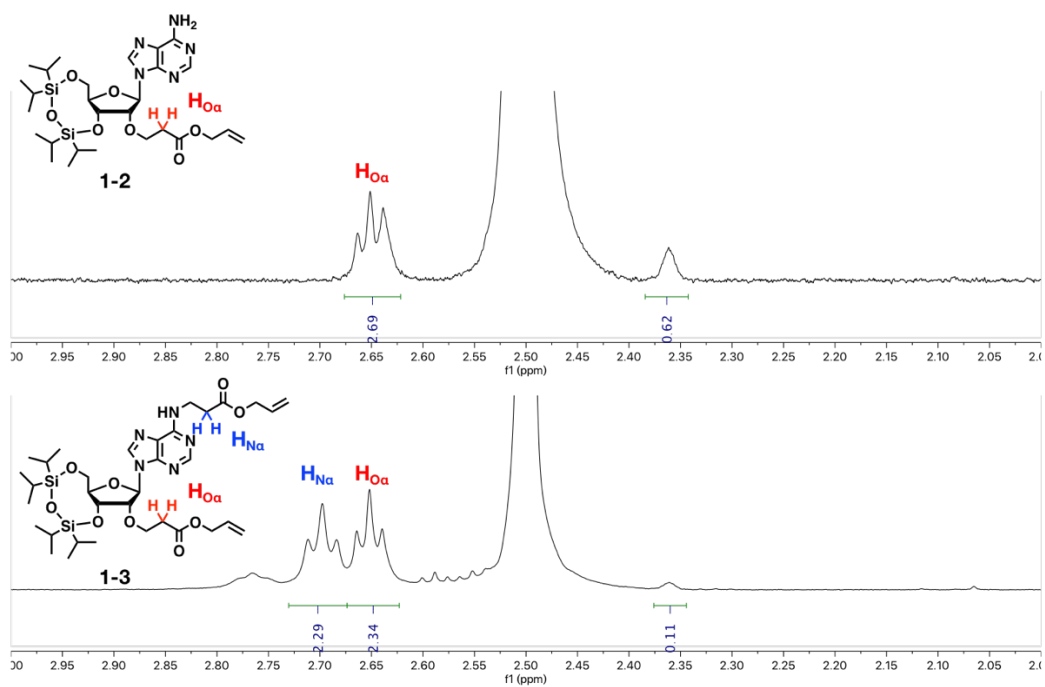


Figure 1.6 化合物 1-2 と 1-3 の  $\alpha$  位水素のケミカルシフト

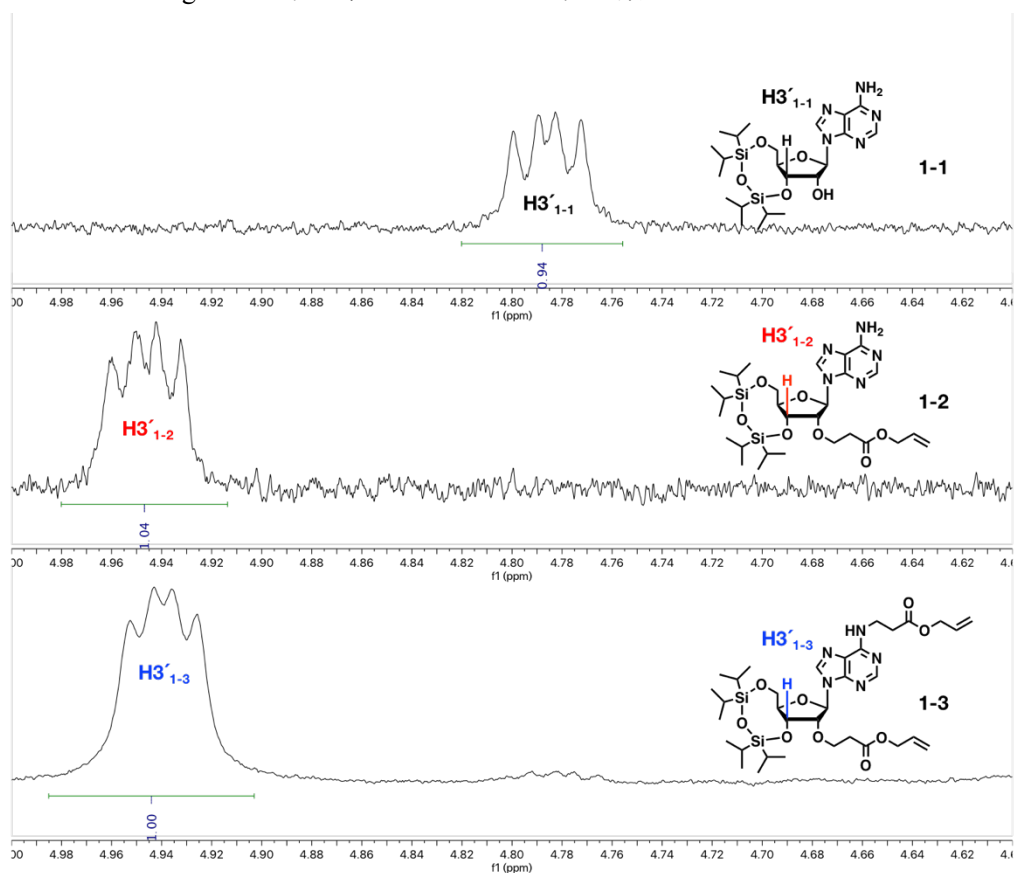
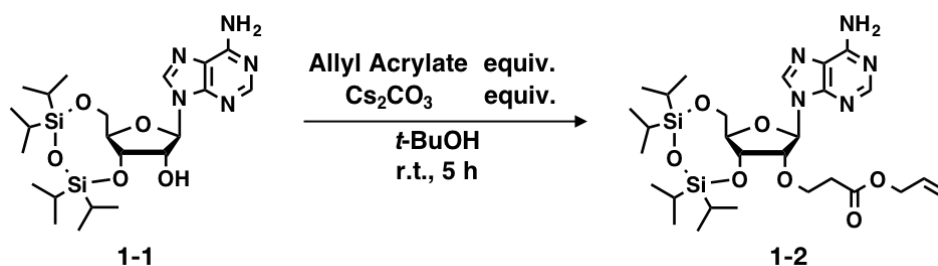


Figure 1.5 化合物 1-1, 1-2 および 1-3 の 3' 位水素原子のケミカルシフト

ところで、これまでの知見により 2'位水酸基へのマイケル付加反応は溶媒に溶けず残存している炭酸セシウムの表面で 2'位水酸基が脱プロトン化され、反応性が高まることで進行する固相-液相反応であることが示唆されている。これに対し、塩基部アミノ基は水素化ナトリウム(pKa = 30)などの強塩基を用いても脱プロトン化しない<sup>3</sup>ため、炭酸セシウム(pKa = 10.3)<sup>6</sup>では活性化されず、アミノ基への副反応はアミノ基が本来持つ求核性に依るものと考えられる。著者はこの点に着目し、炭酸セシウムの当量を増やすことにより 2'位水酸基に対するマイケル付加反応のみを選択的に加速することが出来るのではないかと考えた(Scheme 1.2, Table 1.1)。実際に炭酸セシウムを倍の 2 当量に増やし、1 時間おきに TLC で反応の進行度を確認したところ、5 時間経過時点で原料が消失する前に初めて塩基部マイケル付加体のスポットがうっすらと観察出来るようになった。そこで、5 時間時点で反応を停止させ、分液操作ののちに <sup>1</sup>H-NMR を確認したところ、混合物中の目的物 1-2 の割合はヌクレオシド成分全体の 68%であった。同様の実験を炭酸セシウム 1 当量で行なったところ、目的物の割合は 5%とごく微量にとどまったため、オキシマイケル付加反応の反応速度は炭酸セシウムの増量により確かに速くなったことが分かる。また、炭酸セシウムの当量をさらに倍の 4 当量に増やしたところ、同じ反応時間に於いて化合物 1-3 の生成量がさらに低下したため、オキシマイケル付加反応のみが選択的に加速するという仮説が実証された。

さらなる検討として、アクリル酸アリルの当量を削減することを試みた。オキシマイケル付加反応の反応速度は反応に関わる化合物の濃度の積に比例すると考え、アクリル酸アリルを 20 当量から減じた場合、それに応じて溶媒量を減じてアクリル酸アリルの反応系における濃度を一定に保つことにより反応速度を変化させることなく反応が行なえると考えた。種々条件検討の結果を以下の Table 1.1 に示す。



Scheme 1.2 アデノシンでのマイケル付加条件検討

Table 1.1 アデノシンでのマイケル付加条件検討 実施条件一覧

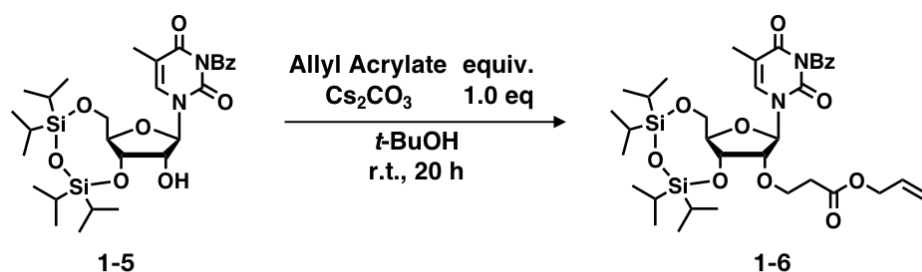
Entry	eq (Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	eq (Acrylate)	Conc. (SM)	Calcd. yield
1	1	20	0.1	5
2	2	20	0.1	68
3	4	20	0.1	73
4	1	10	0.2	49
5	2	10	0.2	66
6	2	5	0.4	68
7	2	2	1.0	54

Entry1 から 3 では、既に述べたように、炭酸セシウムの当量を増加させることによってオキシマイケル付加反応の反応速度を選択的に加速させることができることを示唆している。Entry4 では炭酸セシウムの当量が 1 当量のままであっても、その濃度が倍に上がることにより、反応速度が加速することが示された。Entry5 から 7 では最大でアクリル酸エステルの当量を 2 当量まで減じる事に成功している。今回の検討の結果、溶媒量の兼ね合いによる取り扱い易さと攪拌効率によると考えられる再現性の関係より、entry6 の条件を本研究における至適条件と位置付けることにした。

### 第三節 アクリル酸アリルを用いた 3',5'-*O*-TIPDS-5-メチルウリジンのオキシマイケル付加反応の検討

同様の検討を、5-メチルウリジン誘導体に関しても行なった(Scheme 1.3, Table 1.2)。この結果については既に阿野が 2017 年度の学士論文で報告しているが、ここに再掲する。5-メチルウリジンを出発原料に、定法に従って 3',5'位水酸基へのシリル保護と塩基

部のベンゾイル保護を行ない、化合物 1-5 を 3 工程収率 66% で得た。5-メチルウリジンに関しては塩基部 3 位を保護しない場合、塩基部からのマイケル付加が多く進行するという過去の知見からベンゾイル保護を施している。これにより、アデノシンとは異なり塩基部マイケル付加などの副反応が進行しないため、反応時間を十分に長く取り、20 時間で検討を行なった。Entry1 に示すように、アクリル酸エステルを 20 当量用いた場合、20 時間反応を行なうことで反応が平衡に達し、目的物を収率 74% で得た。また、Entry2 や Entry3 のように、アデノシンの場合と同様アクリル酸エステルの当量を 20, 10, 5 当量と減じて、それに応じて溶媒量を減じることにより目的物 1-6 を得られることを見出した。



2017年度 阿野晃大 学士論文

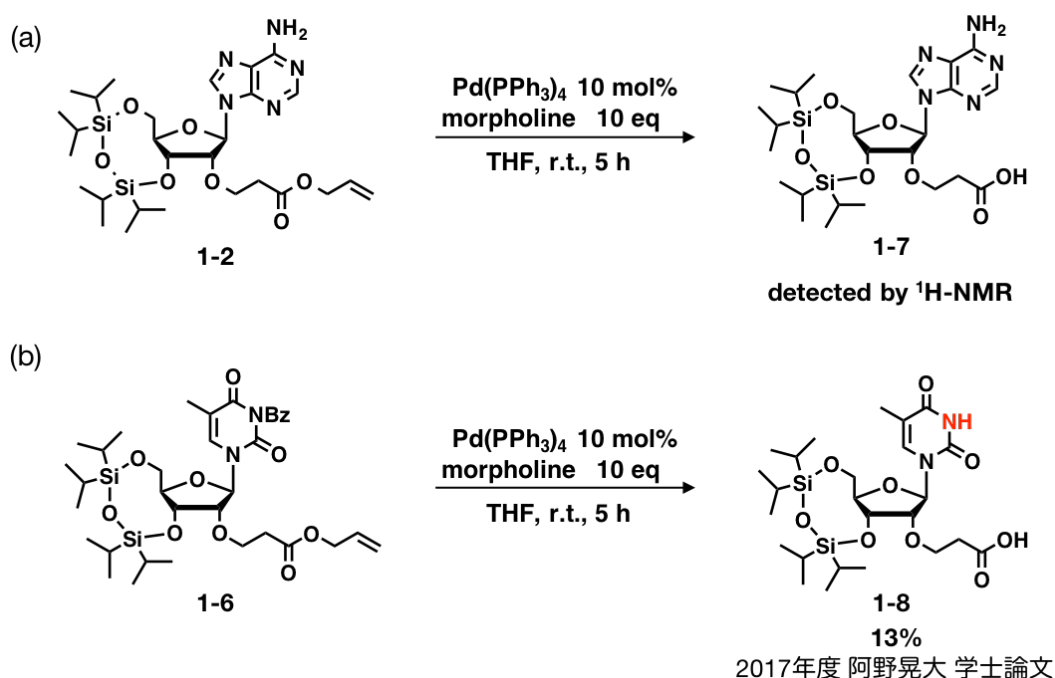
Scheme 1.3 5-メチルウリジンでのマイケル付加条件検討

Table 1.2 5-メチルウリジンでのマイケル付加条件検討 実施条件一覧

Entry	equiv.	Conc. (SM)	yield
1	20	0.1	74
2	10	0.2	54
3	5	0.4	54

続いて、得られたアリルエステル体 1-2 および 1-6 に対し、アリル基の脱保護及び続く縮合反応が実行可能かどうか検討することとした。初めに、アデノシン誘導体 1-2 で検討を行なった(Scheme 1.4(a))。少量のアリルエステル体をテトラキストリフェニルホスフィンパラジウムおよびモルフォリンで処理することで、辻-トロスト反応様の反応が起こり、アリル基が脱保護されたカルボン酸体 1-7 が得られたことを  $^1\text{H-NMR}$  で確認した。しかし、5-メチルウリジン誘導体 1-6 で同様の反応を行なったところ、塩基部保護基の脱保護が起きた化合物 1-8 が主生成物として確認された(Scheme 1.4(b))。これは、

求核剤として用いていたモルフォリンが塩基部保護基と反応したためであると考えられる。5-メチルウリジンに関してはオリゴヌクレオチドへの導入に際し必要なホスホロアミダイトユニットについて塩基部の保護基は必要ではないが、その他の天然型核酸塩基においては保護基の導入が必須である。本来はアリル基の脱保護および続く縮合反応を合成経路の終盤に置き、縮合後1工程でホスホロアミダイトユニットへ変換する予定であったため、アリル基の脱保護に伴い塩基部の保護基が脱保護されてしまう条件は一般的な核酸塩基に対して利用することは出来ない。そこで、カルボキシル基の保護基としてアリル基ではなく、ベンジル基を用いる方法を考案した。



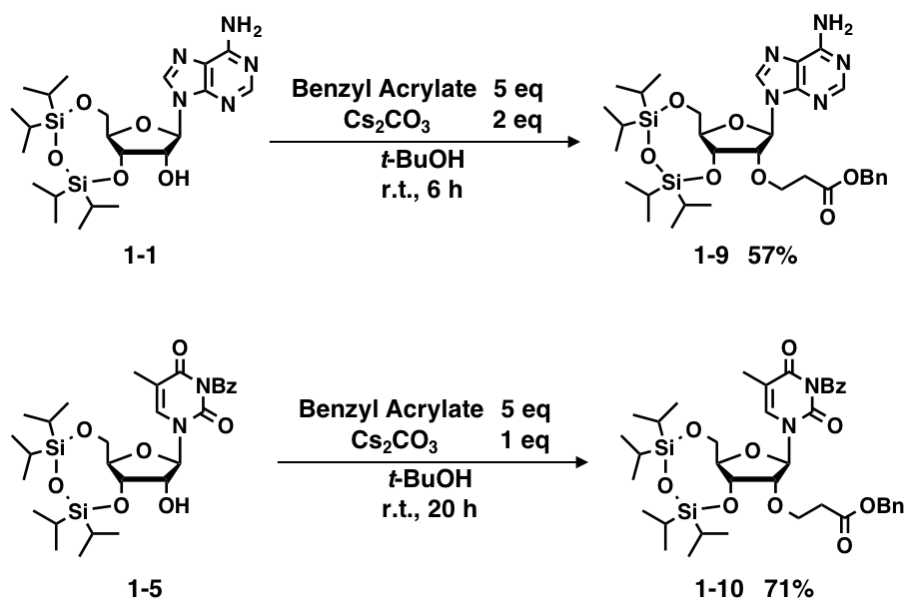
Scheme 1.4 アリル基の脱保護の検討

#### 第四節 アクリル酸ベンジルを用いたオキシマイケル付加反応の検討

ベンジル基は酸性条件や塩基性条件に強く、パラジウムなどの適切な金属触媒存在下において水素ガスによる接触水素化反応により脱保護することが出来る保護基である。塩基部の保護基として一般的に用いられるアシル型の保護基やジメチルアミノメチレン基などの保護基は接触水素化の条件に対して安定であるため、ベンジル基を用いることでカルボキシル基の保護基の脱保護のみを選択的に行なうことが出来るのではない

かと考えた。また、合成に必要なアクリル酸ベンジルはアクリル酸アリルと比較して安価であり、沸点も高いため悪臭などの問題も少なく、より扱いやすい点も利点として考えられる。

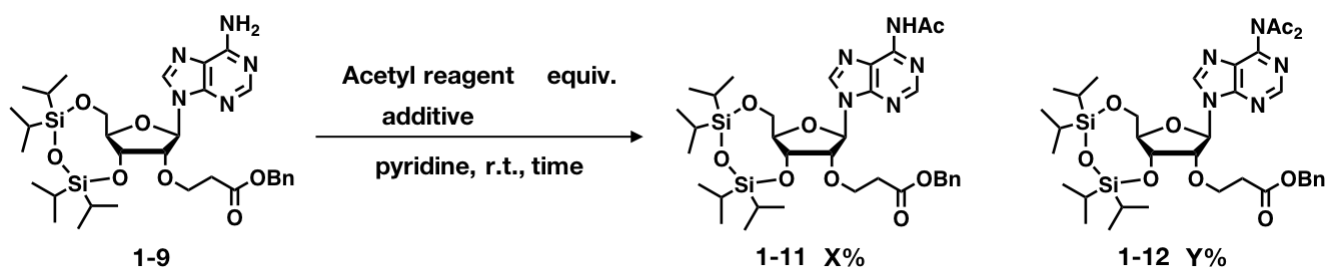
アクリル酸ベンジルを用いたマイケル付加の条件検討については、アクリル酸エステルの当量を減じる検討のみ行なった。アクリル酸エステルの当量を 20 当量、10 当量、5 当量と変化させた場合、目的物であるマイケル付加体 1-9 の収率はそれぞれ 51%、52%、57%であった。アクリル酸アリルを用いた場合より若干変換率が良くない理由として、ベンジル基はアリル基よりも立体障害が大きいため、反応点が近接しにくかったことが考えられる。しかし、いずれにしてもアクリル酸エステルの当量は 5 当量でも問題なく目的物を得られることが明らかになった。また、5-メチルウリジン誘導体についても同様の検討を行ない、マイケル付加体 1-10 を 71%で合成できることを見出している(Scheme 1.5)。



Scheme 1.5 アクリル酸ベンジルを用いたオキシマイケル付加反応

次に、アデノシンの塩基部保護基に対するアセチル化の検討を行なった(Scheme 1.6)。以前、初期検討としてアリルエステル体に対し、ピリジン溶媒中、DMAP を触媒として無水酢酸を作用させる頻用条件を試したところ、目的物であるアセチル体 1-11 が 16%、ジアセチル体 1-12 が 21%の収率でそれぞれ得られることを確認した。収率が低いことも問題ではあるが、ジアセチル保護は不安定である上に酸性条件におけるデプリネーシ

ヨンが起こりやすくなる点も問題であり、アセチル体のみを選択的に合成する方法を開発する必要があった。そこで、化合物 1-9 を用いたさらなる検討を行なった。始めに、触媒として加えた DMAP の触媒能によってアセチル化が過加速された結果、ジアセチル体 1-12 が多く生成したのではないかと考え、DMAP 抜きで無水酢酸によるアセチル化を試みた。しかし、この条件では 80 時間以上反応を行なっても目的物 1-11 の収率は 10%程度に留まった。続いて、無水酢酸よりも反応性は高いが DMAP を加えた無水酢酸よりも反応性が低いと考えられる塩化アセチルを用いたアセチル化を検討した。ピリジン溶媒中、塩化アセチルを 1.5 当量加え、20 時間攪拌したところ、ジアセチル体 1-12 は TLC 上で痕跡量確認されるに留まり、目的物であるアセチル体 1-11 を収率 49%で合成することに成功した。更に、原料の濃度を 0.1 M から 0.5 M に変更したところ、反応時間 3 時間でも収率 67%で目的物 1-11 を合成可能であることを確認した。この条件を本研究におけるアセチル化の至適条件と位置付けることにした。



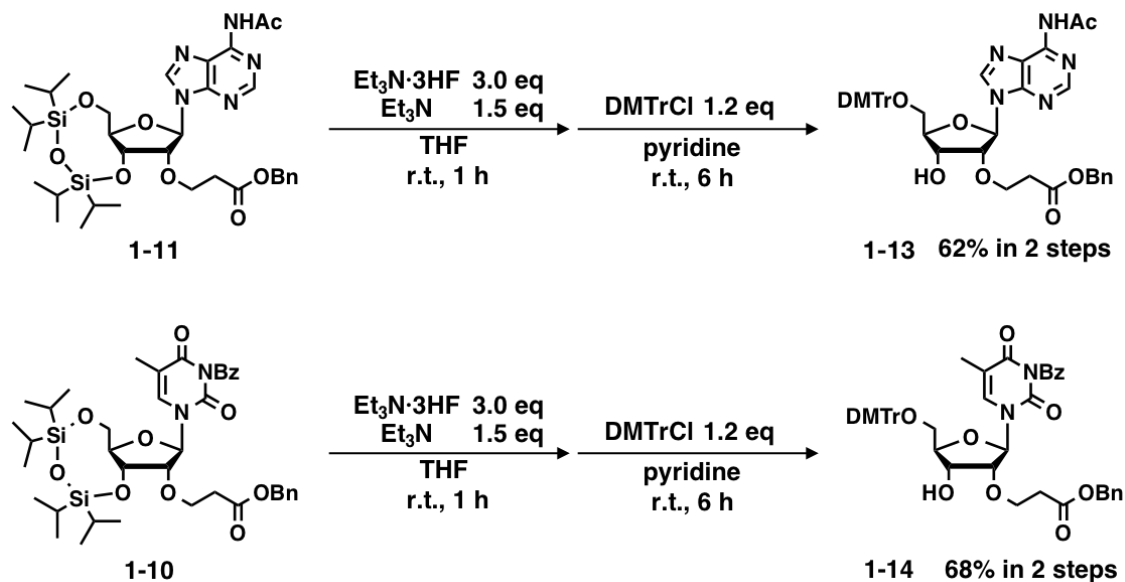
Scheme 1.6 アセチル化の条件検討

Table 1.3 アセチル化の条件検討 実施条件一覧

Entry	Acetyl reagent	equiv.	additive	time	conc(SM)	X	Y
1	Ac <sub>2</sub> O	2.0	DMAP	24 h	0.1 M	16	21
2	Ac <sub>2</sub> O	1.2	–	86 h	0.1 M	10	–
3	AcCl	1.5	–	5 h	0.1M	9	–
4	AcCl	1.5	–	20 h	0.1 M	49	trace
5	AcCl	1.5	–	3 h	0.5 M	67	–

得られたアセチル体をトリエチルアミン三フッ化水素で処理することにより、3'および5'位水酸基のシリル保護基を脱保護したのち、DMTrClを用いて5'位水酸基のDMTr保護を行なった。結果として、重要中間体である化合物 1-13 を 2 工程収率 62%で得た。

また、5-メチルウリジン誘導体である化合物 1-10 についても同様の反応を行ない、重要中間体である化合物 1-14 を 2 工程収率 68% で得た。(Scheme 1.7)。



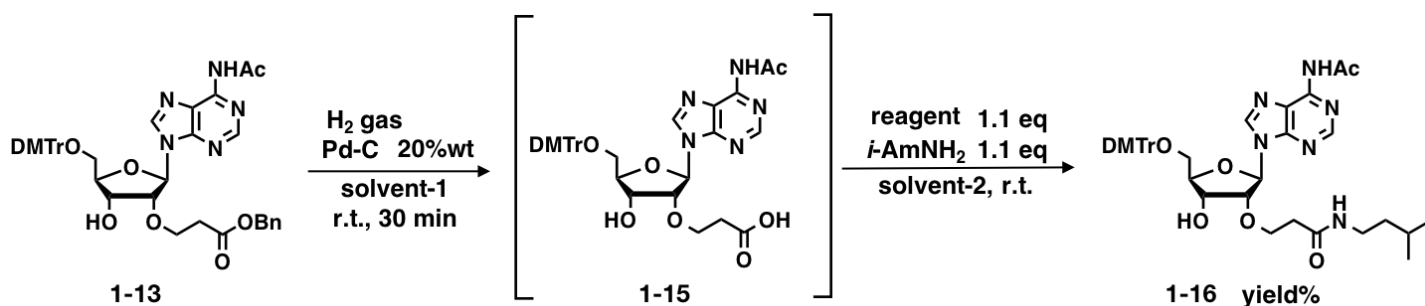
Scheme 1.7 3',5'水酸基の脱保護および 5'水酸基の DMTr 化

## 第五節 パラジウム触媒を用いた接触水素化反応およびアミド縮合反応の検討

化合物 1-13 のベンジル基を、パラジウム触媒を用いた接触水素化反応によって脱保護した場合、生成するカルボキシル基の酸性により DMTr 基の脱保護が副反応として引き起こされることが想定される。そこで、これを中和するため、溶媒として中性のリン酸バッファと有機溶媒からなる系を用いることを考えた<sup>7</sup>。pH を 6.5 に調整した 0.5 M リン酸バッファとテトラヒドロフランおよびアセトニトリルを体積比 3:2:1 で混合し、溶媒とした。実際に接触水素化反応を行なったところ、興味深いことにわずか 30 分で反応の完結が確認された。そこで、セライトろ過によりパラジウムを取り除き、ろ液を濃縮した。完全に溶媒を取り除いてしまった場合、生じたカルボキシル基の酸性により、DMTr 基の脱保護が起きる可能性が考えられたため、途中で得られたアセトニトリル溶液に対し同量程度の milliQ 水を加えたところ、溶液が白濁した。これを遠沈管に移して遠心し、得られた沈殿を酢酸エチルに溶解させ TLC で確認したところ、沈殿物が反応生成物であることが確認された。そこで、この沈殿をリン酸バッファに溶解させ、酢酸エチルで抽出し濃縮することで生成物を回収した。<sup>1</sup>H-NMR により確認したところ、主

生成物はプロトンフォームの目的物 1-15 であり、予期に反して DMTr 基の脱保護は全く確認されなかった。さらに、この化合物はクルードの状態のまま冷凍庫で一週間保管しても安定であることが確認された。得られたプロトンフォームを DMF に溶解させ、HBTU を縮合剤として *i*-アミルアミンと反応させることによりアミド体 1-16 を 2 工程収率 43% で得た。また、縮合剤を EDC·HCl に変更したところ収率は最大で 32% に留まった。

これまでの検討により、ベンジル基の脱保護により生じるカルボキシル基の酸性によって DMTr 基が脱保護される現象は起こりにくいことが考えられた。そこで、バッファと有機溶媒を用いた系ではなく、通常用いられるような有機溶媒中での接触水素化反応も検討してみることにした。溶媒としてはテトラヒドロフラン、酢酸エチル、メタノールを用いた。TLC により反応を追跡したところ、テトラヒドロフラン溶媒では 4 時間で 7 割程度進行したが、それ以上の進行は見られなかった。また、酢酸エチル溶媒では 2 割程度しか進行しなかった。メタノールを溶媒として用いた場合は混合系の場合と同様に 30 分程度で原料の消失が確認された。しかし、セライトろ過により目的物を回収したところ、粗収率は 67% 程度に留まった。これは、生成したカルボン酸体 1-15 がメタノールに溶けにくく、セライトろ過の際に十分に回収しきれなかったためであると考えられる。得られた粉体をメタノールに溶解し、縮合剤として DMT-MM を用いて縮合反応を行なったところ、2 工程収率は 47% となり、これまでで最大となった。ここまでの検討結果を以下の Scheme 1.8 および Table 1.4 にまとめる。なお、これまでの検討により、一般的にアデノシン誘導体よりも 5-メチルウリジン誘導体の方が有機溶媒に対する溶解性が良かったため、検討のやりやすさを考えて以降の検討は 5-メチルウリジン誘導体 1-14 で行なうこととした。



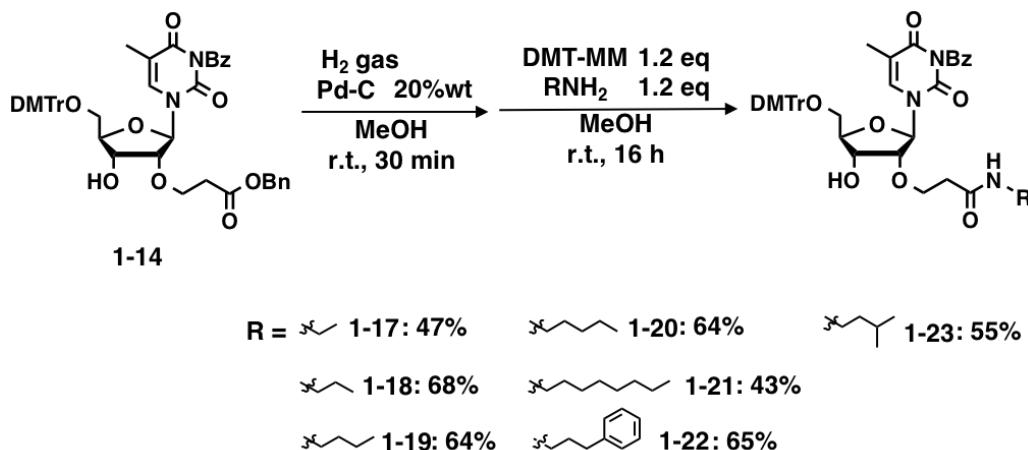
Scheme 1.8 ベンジル基の脱保護およびカルバモイルエチル修飾の導入

Table 1.4 ベンジル基の脱保護およびカルバモイルエチル修飾の導入

Entry	solvent-1	reagent	solvent-2	yield
1	0.5 M phosphate buffer (pH = 6.5)-THF-MeCN (3:2:1, v/v/v)	HBTU	DMF	43
2	0.5 M phosphate buffer (pH = 6.5)-THF-MeCN (3:2:1, v/v/v)	EDC·HCl	DMF	32
3	MeOH	DMT-MM	MeOH	47

初めに、アデノシン誘導体で行なった条件と同様にメタノール溶媒中で接触水素化反応を行ない、セライトろ過によりパラジウムを除去した後、DMT-MM を用いて *i*-アミルアミンとの縮合反応を試みたが、アミド体 1-17 の 2 工程収率は 29% と思わしくなかった。低収率の原因として、セライトは主成分として珪藻土と炭酸ナトリウムを含んでいるため、これにより得られたカルボン酸体が吸着されてしまっている可能性が考えられた。そこで、次の反応ではセライトろ過の際、溶出溶媒に 1% のトリエチルアミンを加えて反応を行なってみた。すると、2 工程収率は 40% まで向上した。さらに、セライトを用いずにろ過を行なってみたところ、2 工程収率は 51% とさらに向上した。また、ろ過操作を一切行わず、パラジウムが含まれている反応系に対して接触水素化反応の後すぐに DMT-MM とアミンを加える検討も行なったところ、2 工程収率は 55% とさらに向上した。以上の検討により、カルボン酸体は溶解度や極性などの観点から回収が困難であるため、ワンポットでアミド化まで行なってから精製することでより収率を向上させることが出来ると分かった。現在、この方法を用いてエチルアミン、プロピルアミ

ン、*n*-ブチルアミン、*n*-ペンチルアミン、*n*-オクチルアミンなどのアルキルアミンの導入に成功している(Scheme 1.9)。また、共同研究者によりジフェニルメチルアミンのような非常にかさ高いアミンやメチルチオプロピルアミン、メトキシプロピルアミンなどのヘテロ原子を持つアミンにも適用可能なことが示されている。本手法の開発により合成可能なカルバモイルエチル型修飾の種類を大幅に拡張することが出来たと言える。



Scheme 1.9 ワンポットで導入に成功した化合物

## 第六節 従来法との比較

最後に、従来法と本研究で開発した合成法とを比較する。まず、合成経路の工程数に関して言えば、序論および第一節でも触れたように、アデノシン誘導体では  $4N+1$  工程から  $N+4$  工程に、5-メチルウリジン誘導体では  $3N+1$  工程から  $N+3$  工程に、それぞれ削減することに成功した。本研究では7種類のカルバモイルエチル型修飾を持つ核酸を合成したが、従来法ではアデノシン誘導体で29工程、5-メチルウリジン誘導体では22工程が必要であったのに対し、本研究の方法ではそれぞれ11工程、10工程と半分以下の工程数での合成を達成している(Figure 1.7)。

続いて、収率に関して比較する。アデノシン誘導体において、従来法では化合物 1-1 からアミダイトユニット前駆体まで5工程収率32%であるのに対し、本研究では5工程収率11%と下回っている(Figure 1.7)。これは、アクリル酸ベンジルに対するオキシマイケル付加反応の収率が57%と低いためである。これは、5-メチルウリジン誘導体でのオキシマイケル付加反応の収率71%と比較しても低いため、この低収率の原因は

アデノシンの塩基部マイケル付加体の生成に由来するものと考えられる。したがって、塩基部アミノ基をジメチルアミノメチレン基などで保護し、塩基部マイケル付加反応を完全に抑制した上で十分時間反応を行なうことで収率を改善できるかもしれない(Figure 1.8)。また、5-メチルウリジン誘導体に関しては、従来法では化合物 1-5 からアミダイトユニット前駆体まで 4 工程収率 24%であるのに対し、本研究では 4 工程収率 24~38%となった(Figure 1.7)。カルバモイルエチル型修飾導入反応の収率により変化するが、カルバモイルエチル型修飾導入前までが 3 工程収率 56%であるため、従来法よりも収率は改善されたと言える。

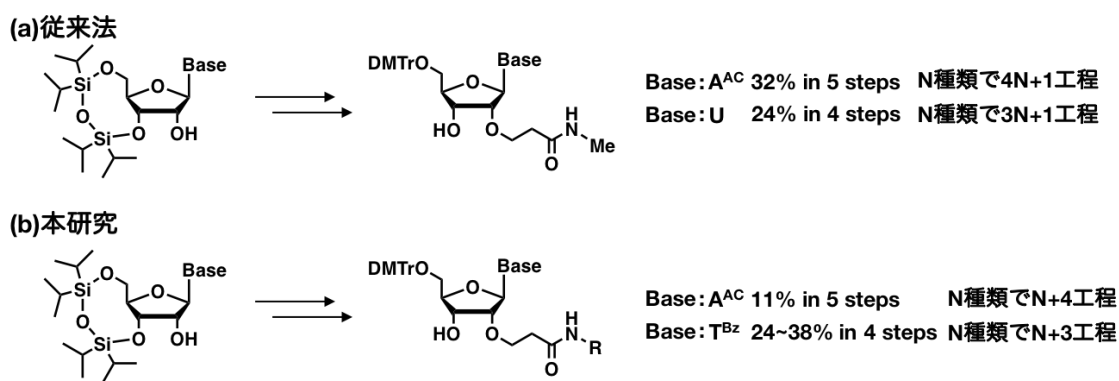


Figure 1.7 従来法と本研究の比較

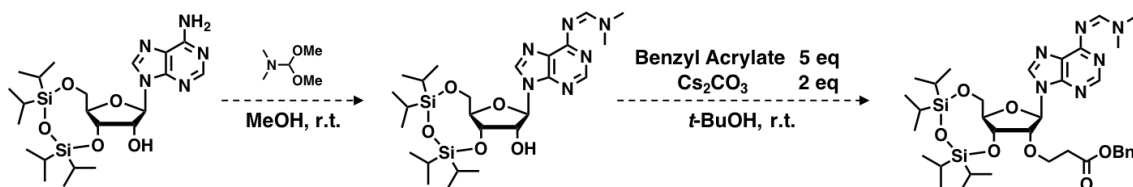
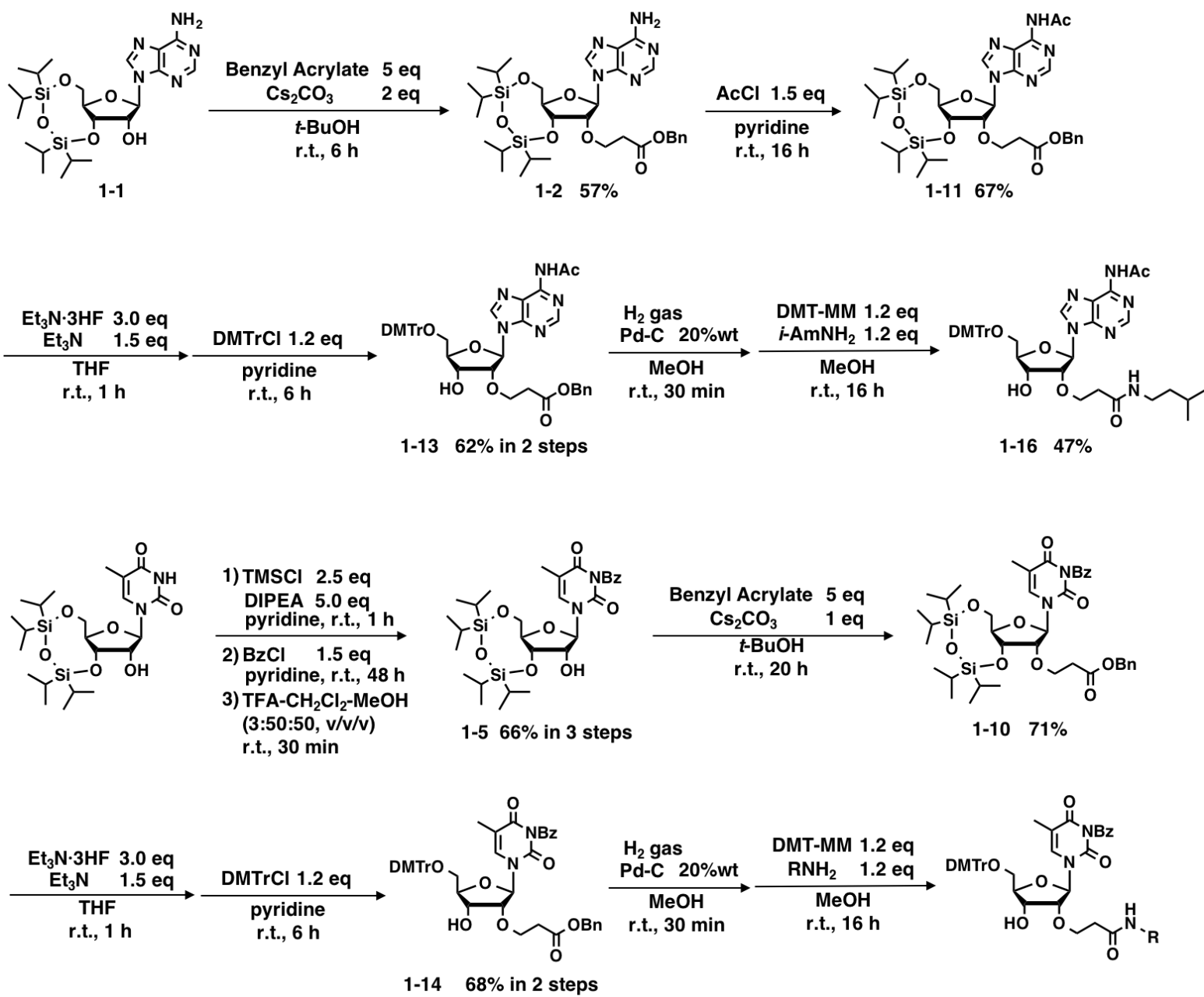


Figure 1.8 塩基部を完全保護したアデノシン誘導体を用いた合成

## 第七節 総括

第一章において、2'位に種々のカルバモイルエチル型修飾を持つアデノシン誘導体および5-メチルウリジン誘導体の効率的な合成経路を確立した。まず、過去に報告されていたアクリル酸エステルへのオキシマイケル付加反応の条件を検討し、悪臭や毒性が強く、シリカゲルカラムクロマトグラフィー時に化合物がシリカゲルに吸着しにくくなる一因でもあるアクリル酸エステルの使用量を従来の四分の一にまで削減することに成功した。また、塩基部アミノ基のアザマイケル付加反応との競合に関しては炭酸セシウ

ムの当量を増やすことによって劇的に改善することが明らかになったため、今後シチジン誘導体や 5-メチルシチジン誘導体、ジアミノプリン誘導体に対してカルバモイルエチル修飾を導入する際にも本手法が応用可能であることが考えられる。さらに、ベンジルエステルを接触水素化反応によってカルボキシル基へと変換したのち、精製操作を行わずに縮合剤および対応するアミンと反応させることによって、ワンポットでカルバモイルエチル型修飾を形成可能であることが明らかになった。反応生成物は精製後一工程でオリゴヌクレオチドへの導入に必要なホスホロアミダイトユニットへと変換出来るため、本手法を用いることで様々なカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドを迅速に合成し、比較検討を行なうことが可能である。以下の Scheme1.10 に本研究で確立した合成スキームを示す。



Scheme 1.10 確立した合成経路

## 第一章の引用文献

- (1) Saneyoshi, H.; Seio, K.; Sekine, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (25), 10453–10460.
- (2) Roy, S. K.; Tang, J. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4* (3), 170–171.
- (3) Wagner, E.; Oberhauser, B.; Holzner, A.; Brunar, H.; Issakides, G.; Schaffner, G.; Cotten, M.; Knollmüller, M.; Noe, C. R. *Nucleic Acids Res* **1991**, *19* (21), 5965–5971.

- (4) Yamada, T.; Okaniwa, N.; Saneyoshi, H.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Nagata, T.; Aoki, Y.; Takeda, S.; Sekine, M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (9), 3042–3053.
- (5) Masaki, Y.; Yamamoto, K.; Yoshida, K.; Maruyama, A.; Tomori, T.; Iriyama, Y.; Nakajima, H.; Kanaki, T.; Seio, K. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (19), 4835–4842.
- (6) Evans\_pKa\_table.Pdf.
- (7) Venkatesan, A. M.; Agarwal, A.; Abe, T.; Ushiroguchi, H.; Ado, M.; Tsuyoshi, T.; Dos Santos, O.; Li, Z.; Francisco, G.; Lin, Y. I.; Petersen, P. J.; Yang, Y.; Weiss, W. J.; Shlaes, D. M.; Mansour, T. S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16* (4), 1890–1902.

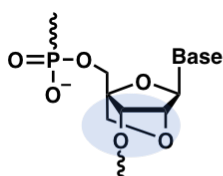
## 第二章 アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ

### オリゴヌクレオチドの性質

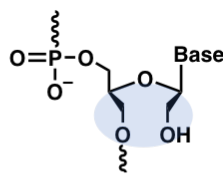
#### 第一節 諸言

核酸を医薬品として用いるためには、天然の核酸にはない生体内の安定性や標的細胞内到達性などの性質を化学修飾により付与する必要があることは序論でも触れたが、ここでも改めてその概略を説明する。核酸医薬品に用いられる修飾には、標的選択性を調節するための修飾と、生体内での動態を調節するための修飾の二つに大別できる。

まず、標的選択性を調節するための修飾について述べる。核酸は本来ワトソン・クリック塩基対の形成による高い相補鎖選択性を持っているが、タンパク質翻訳の際のコードンの「3文字目のゆらぎ」に代表されるように、ワトソン・クリック塩基対以外の塩基対も形成することが知られている<sup>1</sup>。また、バルジの形成などでも完全に相補的でない配列と塩基対を形成することがありうる。このような作用機序で標的配列以外とも結合してしまうような核酸を生体内に導入した場合は、非標的配列との結合による副作用が起きてしまう。これを回避するために標的選択性を向上させるための多くの研究が行われており、とりわけ二重鎖構造を安定化させる修飾は非常に多く存在する(序論参照)。例えば、糖部 2'位酸素原子と 4'位炭素原子をメチレンで架橋した LNA<sup>2</sup> と呼ばれる核酸は、標的とする配列が RNA の場合のみ選択的に二重鎖融解温度を大きく向上させることが知られており、数多くの類縁体が合成されている(Figure 2.1)。しかしながら、近年の研究では二重鎖構造を安定化させすぎると逆に副作用が増えるといったこと



$\Delta T_m = +5\text{ }^\circ\text{C}$



$\Delta T_m = -5 \sim -8\text{ }^\circ\text{C}$

Figure 2.1 LNA と UNA

も分かっている。Papargyri らは、末端から LNA が 5 mer、DNA が 10 mer、LNA が 5 mer の順番に並んでいるアンチセンス核酸について、配列と両末端の LNA は変えずに、LNA 領域を DNA に置換することによって合成した  $2^8 = 256$  種類の二

重鎖融解温度とアンチセンス活性および細胞毒性の相関を評価した。その結果、二重鎖

融解温度が高すぎても低すぎてもアンチセンス活性が低下することが明らかになった。実際に活性が高かった上位 10 種類の  $T_m$  は 62 °C から 73 °C の範囲に存在し、およそ 10 °C 程の至適な温度範囲があると報告されている。また、細胞毒性は二重鎖融解温度が高いアンチセンス核酸ほど高い傾向にあるということもわかった<sup>3</sup>。さらに、Laursen らは siRNA の鎖中に UNA(Figure 2.1) という二重鎖融解温度を低下させるような修飾を組み合わせることで導入することにより、標的外遺伝子のノックダウン効率を減弱させることができるということを見出している<sup>4</sup>。このように、近年は二重鎖の安定性のある一定の範囲内にとどめることが重視されてきている。

次に、生体内での動態を調節するための修飾について述べる。核酸の薬物としての生体内動態については不明な点も多かったが、研究の積み重ねにより徐々に明らかになってきており、2016 年以降、毎年新たな核酸医薬品が FDA による承認を受けるなど開発速度の加速を後押ししている。天然の核酸分子は腎臓で迅速に血中から排出され尿として排泄されてしまうため、核酸の生体内動態を調節するためにはまず核酸の血中滞留性を向上させる必要がある。ホスホロチオエート修飾は、血中においてアルブミンなどの包接タンパク質と疎水性相互作用により結合することにより腎排出を免れることが知られており、2'-O-MOE 修飾とともにほとんどの承認済み核酸医薬品で用いられるなど頻用されている(Figure 2.2)。また、現在でも核酸の細胞内取り込みに関わるタンパク質やそのメカニズムは明らかになっていないため、LNA の類縁体である cEt 修飾などを用いて疎水性を向上させることで相互作用するタンパク質の種類を増やし、細胞内へ取り込まれるための経路を増やすといった研究も行なわれている<sup>5</sup>。さらに近年では疎水

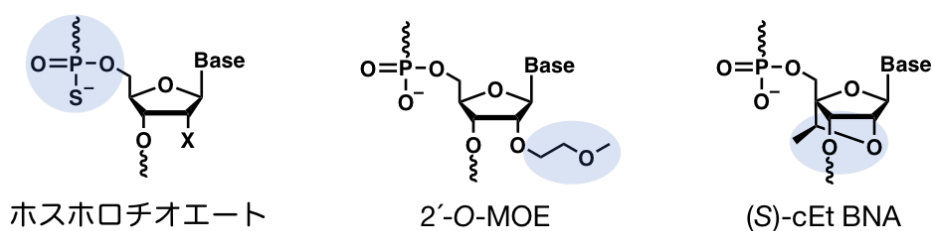


Figure 2.2 核酸医薬品に頻用される修飾の例

性の高い飽和・不飽和脂肪酸のような化合物を末端に導入された核酸が、細胞中への導入が難しいとされていた筋肉細胞や神経細胞への核酸の取り込みを促進するといった研究成果も出ており、着目されている<sup>6-8</sup> (Figure 2.3)。この他、標的細胞表面で過剰発現している受容体のリガンド分子を核酸の末端に導入する研究も行なわれている。例えば、

核酸の末端に N-アセチルガラクトサミンを導入した核酸は、アシアロ糖タンパク質シセプターの過剰発現しているマウス肝臓ガン細胞に対し、無修飾のもの 10 倍多く取り込まれることが報告されている<sup>9</sup> (Figure 2.3)。

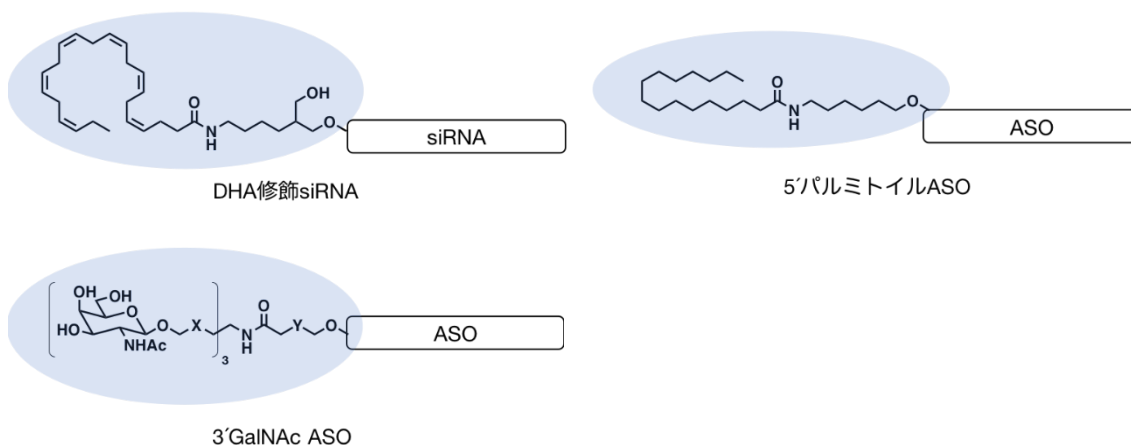


Figure2. 3 細胞内送達のための核酸修飾の例

加えて、核酸分解酵素に対する耐性の付与も生体内動態を調節する重要な修飾である。天然の核酸は生体内に存在している核酸分解酵素によって容易に分解を受けるため、核酸の生体内における化学的安定性を向上させる必要がある。先に述べたホスホロチオエート修飾は核酸分解酵素の作用点であるリン酸部への修飾であり、核酸分解酵素耐性を向上されるため最も有用な修飾の一つである。また、2'位水酸基に対する修飾も核酸分解酵素の作用点を塞ぐため、酵素耐性を向上させることが知られている。例えば、2'位水酸基に対してアルキル基を修飾した場合、核酸分解酵素耐性は向上する。さらに、そのかさ高さと核酸分解酵素耐性の間には正の相関が存在することが Monia らや Iribarren らによって報告されている<sup>10,11</sup> (Figure 2.4)。

これまでに述べたように、核酸を医薬品として用いるためには「標的選択性を調節」するための修飾と「生体内動態を調節」するための修飾が必要である。しかし、これまでの化学修飾では、これら二つの修飾を切り離して個別に開発することは困難である。例えば、先述の 2'位水酸基に対するアルキル修飾を例に説明すると、アルキル基がかさ高くなるにつれて核酸分解酵素耐性は向上するが、同時に立体障害により核酸の二重鎖構造の安定性は低下してしまうことが報告されている<sup>12</sup>(Figure 2.4)。著者はこの問題を鑑み、性質の異なる置換基を導入した場合にも二重鎖構造の安定性に影響を与えないようなリンカーとなるような構造を開発することができれば、標的とする遺伝子との二重

鎖構造の安定性を変化させずに核酸全体の物理化学的性質を変化させることが可能になるため、核酸医薬品の開発がより容易になると考えた。本研究では、そのような構造としてカルバモイルエチル型修飾に着目し、実際に第一章でその効率的な合成方法を確立した。第二章では、カルバモイルエチル型修飾を持つ核酸の熱力学的・生化学的性質についての研究結果をまとめる。

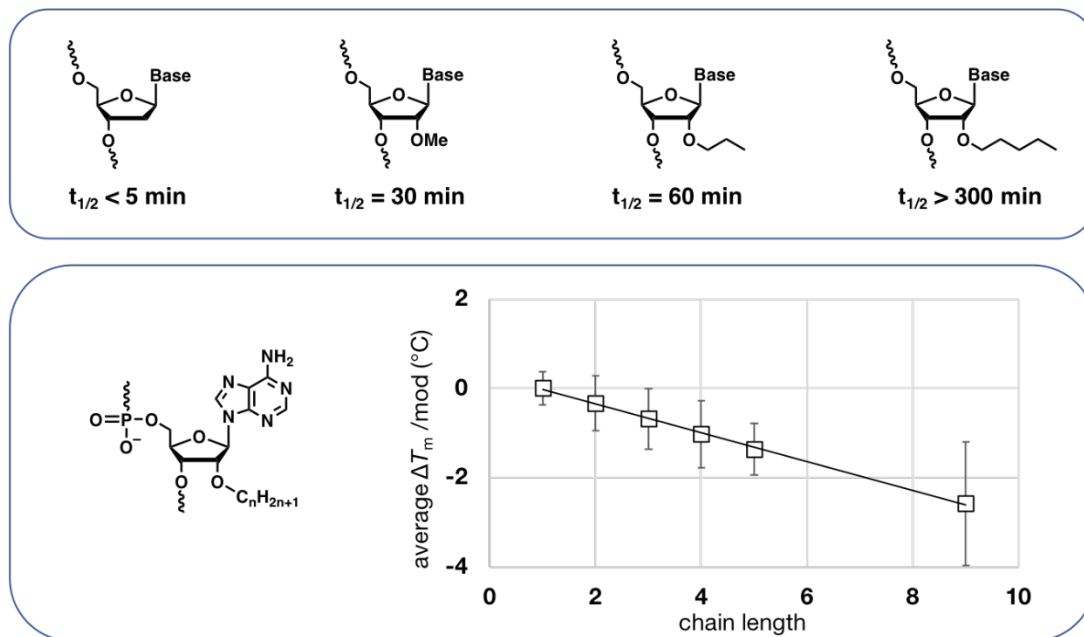


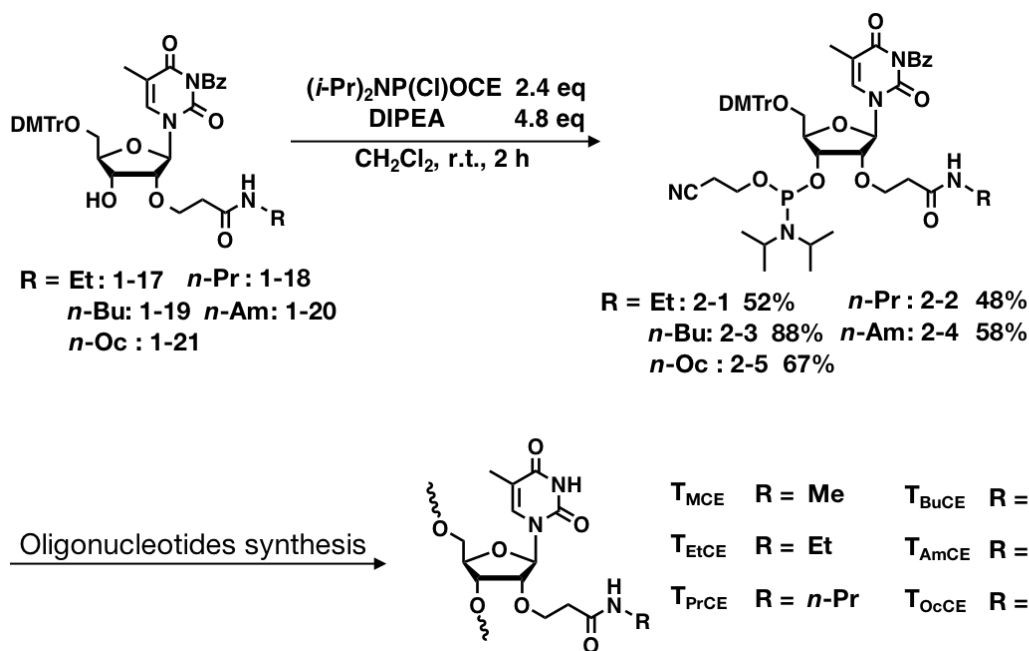
Figure 2.4 2'修飾のかさ高さ、酵素耐性および二重鎖融解温度との関係

まず、第二節では第一章で合成したカルバモイルエチル型修飾を持つ核酸のうち、特に直鎖アルキル基を有するものについてホスホロアミダイトユニットへと誘導し、オリゴヌクレオチド中へと導入した。一般に、修飾が二重鎖安定性に与える影響は鎖の中央に導入するほど大きいため、修飾を鎖の中央に一か所導入したオリゴヌクレオチドを合成した(ON2)。更に、複数個所導入した場合の影響を評価するため、鎖の中央に三か所導入したオリゴヌクレオチドを合成した(ON3)。また、連続して修飾した場合、修飾がかさ高くなると隣り合うヌクレオチドに導入した修飾同士での相互作用が起こることが考えられる。そこで、その影響を評価するために不連続に三か所導入したオリゴヌクレオチドを合成した(ON4)。また、核酸分解酵素に対する耐性を評価するため、5'末端に蛍光残基である FAM を持ち、3'末端の一塩基上流に種々のアルキルカルバモイルエチル型修飾を持つチミジル酸 10 量体も合成した(ON5)。第三節ではアルキルカルバモイルエチル型修飾の導入によって核酸全体の疎水性がどのように変化したのかを逆相

液体クロマトグラフィーによって評価した。第四節ではこれら合成したオリゴヌクレオチドの二重鎖安定性を評価するため、相補鎖 RNA との二重鎖融解温度および二重鎖形成反応の熱力学的パラメーターの測定を行なった。第五節では ON5 を用いて 3' エキソヌクレアーゼの一つである SVPDE-1 に対する酵素耐性をゲル電気泳動により評価した。第五節までの研究で、これらのアルキルカルバモイルエチル修飾核酸は二重鎖の安定性にほぼ影響を与えず、疎水性や酵素耐性といった物理化学的・生化学的性質を調節することが可能であることが明らかになったので、その原因について詳細に議論するために円偏光二色性スペクトル(CD)の測定(第六節)および AMBER を用いた分子動力的シミュレーション(第七節)を行ない、二重鎖の構造についての研究を行なった。

## 第二節 アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドの合成

得られたアミド体を定法に従いホスフィチル化し、オリゴヌクレオチド合成に必要なホスホロアミダイトユニットへと変換した。第一章で合成した化合物 1-19, 1-20, 1-21, 1-22 および 1-23 をピリジンおよびトルエンで共沸した後、ジクロロメタン中で 1.2 当量の 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite と混和し、室温で 1 時間反応させた。しかし、TLC を用いて反応を追跡したところ、予期に反して反応は 3 割程度しか進行していないことが分かった。そこで、さらに同量の試薬を追加したところ、追加から 1 時間で原料が消失した。このような現象は今回ホスフィチル化した全ての基質で再現性良く発生した。原因として、原料のもつカルバモイル基に水素結合した水分子が共沸操作で充分に取り除けず、最初に加えた 1.2 当量の試薬が水と反応し消費されてしまった可能性が考えられるが、これを実証する実験は行なっていない。最終的に、収率 48-88% で目的とするホスホロアミダイトユニット 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 および 2-5 を得ることに成功した(Scheme 2.1)。



Scheme 2. 1 アミダイトユニットおよびオリゴヌクレオチドの合成

Table 2. 1 合成したオリゴヌクレオチドの配列

Name	Sequence
ON1	5'-CGTTTTTTTGC-3'
ON2a-f	5'-CGTTT $\underline{X}$ TTTGC-3'
ON3a-f	5'-CGTT $\underline{XXX}$ TTGC-3'
ON4a-f	5'-CG $\underline{XTT}$ $\underline{XTT}$ $\underline{XGC}$ -3'
ON5a-f	5'-(FAM)-ttttttt $\underline{X}$ t-3'

ON2a, 3a, 4a, 5a: X =  $T_{MCE}$ , ON2b, 3b, 4b, 5b: X =  $T_{EICE}$ , ON2c, 3c, 4c, 5c: X =  $T_{PRCE}$ , ON2d, 3d, 4d, 5d: X =  $T_{BUCE}$ , ON2e, 3e, 4e, 5e: X =  $T_{AMECE}$ , ON2f, 3f, 4f, 5f: X =  $T_{OCE}$ , FAM: 5- or 6-carbamoylfluorescein,  $\underline{N}$ : 2'-*O*-methylnucleosides,  $\underline{T}$ : 2'-*O*-methylribothymidine, t: thymidine

合成した各種アルキルカルバモイルエチル修飾を持つホスホアミダイトユニットおよび購入品のホスホアミダイトユニットを用いて、Table2.1 に示す配列をそれぞれ合成した。ON2 は鎖の中央に 1 ヶ所修飾を持つオリゴヌクレオチドである。ON3 および ON4 はいずれも修飾を 3 ヶ所持ち、連続して修飾を導入した場合の隣り合う修飾同士の相互作用の影響を評価するため、ON3 は連続に、ON4 は間隔を開けてそれぞれ導

入してある。また、ON5 は 3'エキソヌクレアーゼに対する酵素耐性を評価するためのオリゴヌクレオチドであり、5'末端に蛍光基である FAM を持ち、3'末端から二番目の残基に修飾核酸を持つチミジル酸 10 量体である。また、ON1 は全て 2'-OMe 修飾ヌクレオシドで構成されたコントロール用配列である。固相には Glen research 社の UnySupport™ または dT-CPG を用い、カップリング反応の活性化材として 5-benzylthio-1*H*-tetrazole(BTT)を用いた。先述のようにカルバモイル部が空气中・溶媒中の水分子と強く水素結合する可能性が考えられ、修飾の導入が困難であると思われたが、反応時間を通常の RNA 合成手法で用いられる 6 分から 30 分へ延長することで問題なく導入することに成功した。切り出しを行なう前にトリエチルアミン-アセトニトリル(1:1 v/v)で処理することでリン酸部シアノエチル基の脱保護を行ない、ついでアンモニア水による切り出しを行なった後、アンモニア水中 55 °C に加熱し 20 時間脱保護を行なった。遠心エバポレーターを用いてアンモニアを除去した後、sep-pak™ を用いた簡易精製を行ない、純度を確認した。不純物が含まれていた場合は逆相 HPLC を用いて更なる精製を行なった。生成物の純度確認は HPLC および MS により行なった。

### 第三節 アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドの疎水性の変化

第一節にて、核酸の疎水性をコントロールすることで生体内動態を調節できる可能性があることに触れた。そこで、今回合成したオリゴヌクレオチドの疎水性について評価を行なった。核酸の疎水性が向上すれば疎水性相互作用が強くなり、ODS カラムを用いた逆相 HPLC における保持時間(*t*R)が遅れることが考えられる。そこで、合成したオリゴヌクレオチドの保持時間を測定し、全て 2'-OMe 修飾核酸で構成されている ON1 の保持時間と ON2a-f, ON3a-f, ON4a-f の保持時間の差を求めた。溶媒は A 液に 0.03M 酢酸アンモニウムバッファを、B 液にアセトニトリルを用い、B 液の割合を 40 分かけて 40%まで線形に変化させた。結果を Table 2.2 にまとめる。また、縦軸に *t*R、横軸に修飾したアルキル基の長さを取ったグラフを Figure 2.5 に示す。興味深いことに、MCE 修飾および EtCE 修飾を持つオリゴヌクレオチド(ON2a, ON2b, ON3a, ON3b, ON4a, ON4b)はいずれも OMe 修飾より保持時間が短くなった。MCE 修飾や EtCE 修飾は疎水

性的アルキル基を有するが、親水性のカルバモイル基も有しており、これら修飾の兼ね合いによって疎水性が低下したことが考えられる。また、MCE, EtCE, PrCE および BuCE 修飾を 3ヶ所持つ ON3a と ON4a, ON3b と ON4b, ON3c と ON4c および ON3d と ON4d の保持時間はほとんど差がないのに対し、AmCE 修飾をもつ ON3e と ON4e および OcCE 修飾をもつ ON3f と ON4f では保持時間に明確な差が見られた。このことから、カルバモイルエチル基を介して炭素数 5 以上の修飾を連続で導入した場合、隣接する修飾同士での相互作用が生じる可能性が示唆される。また、Figure 2.5 に示したように、修飾を 1ヶ所持つ ON2 series では導入したアルキル基の長さとは保持時間との間に高い相関が見られた。

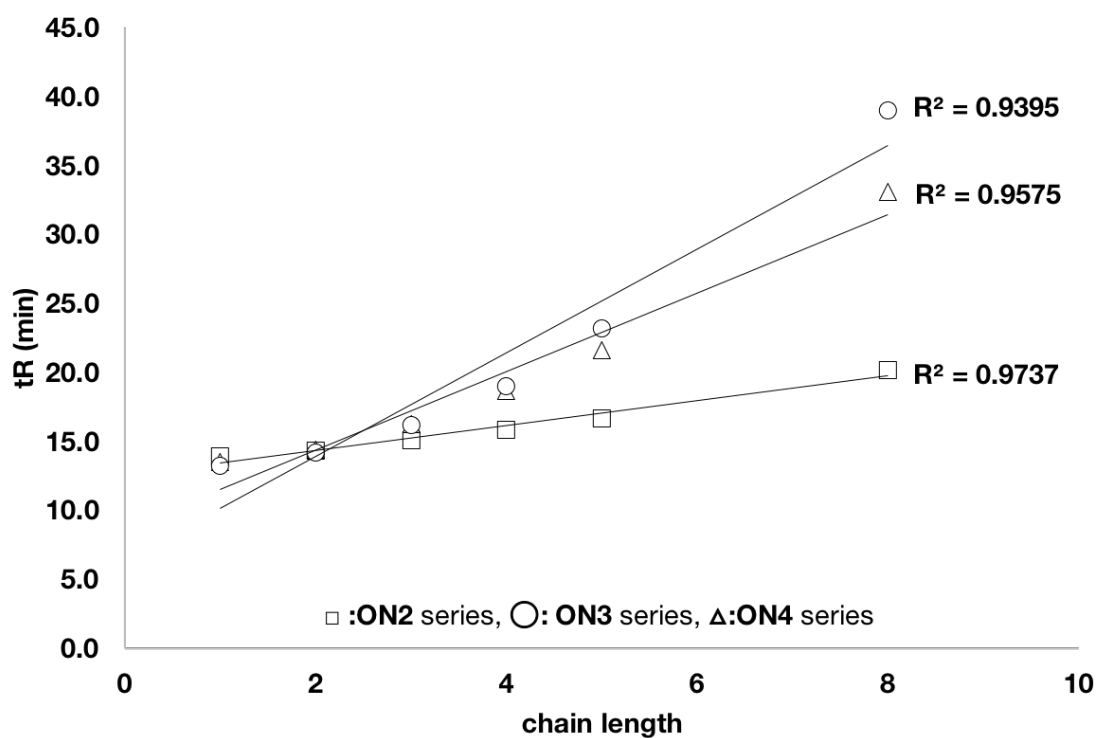


Figure2. 5 アルキル基の長さとは保持時間

Table2. 2 各オリゴヌクレオチドの保持時間

Name	tR (min)	$\Delta$ tR (min)
<b>ON1</b>	14.7	—
<b>ON2a</b>	13.9	-0.8
<b>ON2b</b>	14.3	-0.4
<b>ON2c</b>	15.1	0.4
<b>ON2d</b>	15.8	1.2
<b>ON2e</b>	16.7	2.0
<b>ON2f</b>	20.2	5.5
<b>ON3a</b>	13.2	-1.4
<b>ON3b</b>	14.2	-0.5
<b>ON3c</b>	16.2	1.5
<b>ON3d</b>	19.0	4.3
<b>ON3e</b>	23.2	8.5
<b>ON3f</b>	39.0	24.3
<b>ON4a</b>	13.5	-1.2
<b>ON4b</b>	14.4	-0.3
<b>ON4c</b>	16.2	1.6
<b>ON4d</b>	18.6	4.0
<b>ON4e</b>	21.6	6.9
<b>ON4f</b>	33.1	18.4

更なる疎水性プロパティの探索のため、それぞれの修飾を導入したヌクレオシドの MiLogP を求め、保持時間との相関を求めた。MiLogP とは Molinspiration 社によって開発されたプログラムにより求まる疎水性の指標である<sup>13</sup>。疎水性の指標としてよく用いられる LogP(オクタノール/水分配係数)を予測するためのプログラムであり、12,000 以上の実験データを基に 35 の部分構造と分子内水素結合や電荷相互作用を考慮した 185 の部分構造のフラグメントデータを作成し、入力された分子をこれらの組み合わせで評価することにより LogP の値を推定する。今回、それぞれの修飾を持つヌクレオシドに

ついて MiLogP を算出し、オリゴヌクレオチド全体の疎水性を評価することとした。以下の Figure 2.6 に算出した MiLogP の値を示す。ON1 の疎水性は 2'-OMe リボチミジンの MiLogP と同一であるとし、ON2a から ON2f の疎水性は 2'-O-MCE リボチミジンから 2'-O-OcCE リボチミジンの MiLogP と同一であるとした。次に、疎水性の変化について考察を行なうために ON2a から ON2f までの各オリゴヌクレオチドと ON1 との MiLogP の差( $\Delta$ MiLogP)を求めた。修飾を 3 ヶ所持つ ON3 や ON4 の場合については、求めた  $\Delta$ MiLogP の値を 3 倍することで疎水性の変化を定量化した。算出した  $\Delta$ MiLogP の値を用いて横軸に各オリゴヌクレオチドの  $\Delta$ MiLogP、縦軸に保持時間を取ったグラフを以下の Figure 2.7 に示す。図に赤丸で示した ON3f を除いて、算出した  $\Delta$ MiLogP と保持時間の間には正の相関があることが示された。以上の結果より、アルキルカルバモイルエチル型修飾は修飾のかさ高さや個数、順序を変えることによりオリゴヌクレオチド全体の疎水性を大きく変化させることが明らかになった。また、疎水性の指標の一つである MiLogP と保持時間の間には高い相関があり、比較的容易に疎水性を予測可能であることから、アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドを核酸医薬品として利用する際、至適な疎水性に調節することができる可能性が示された。

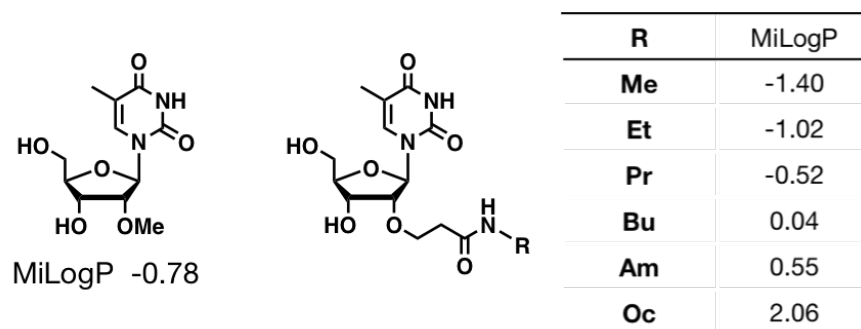


Figure2.6 各ヌクレオシドの MiLogP

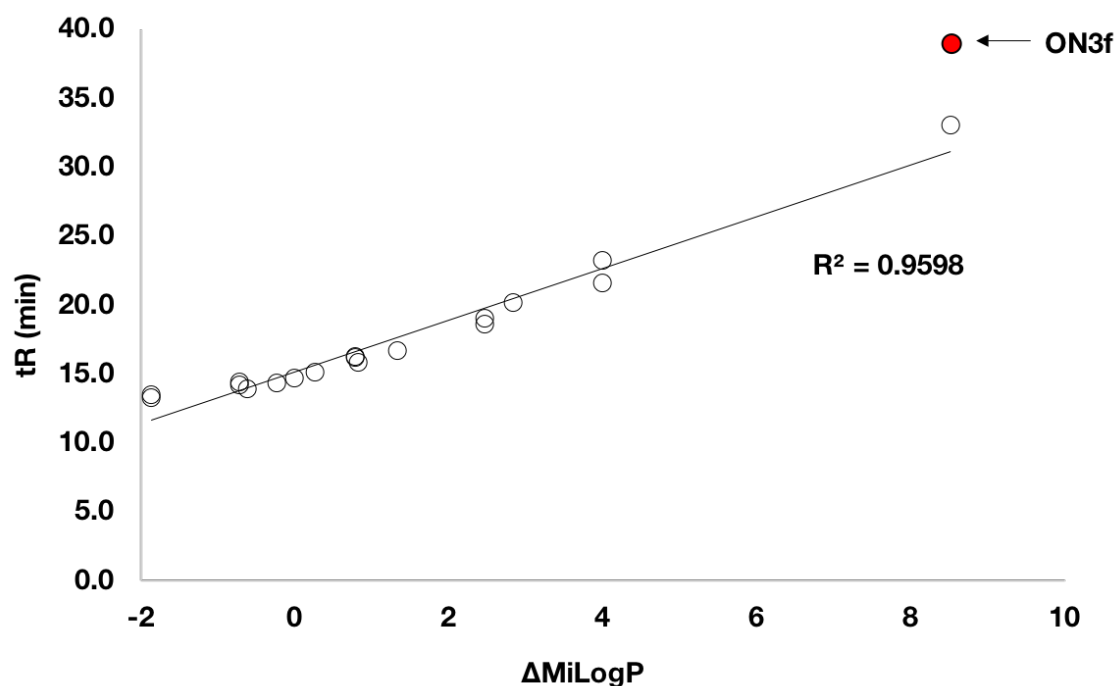


Figure2.7  $\Delta$ MiLogP と保持時間の関係

#### 第四節 アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドの熱力学的安定性の評価

第二節で合成したオリゴヌクレオチドのうち、ON1, ON2a-f, ON3a-f および ON4a-f を用いて相補鎖 RNA(5'-rGCAAAAAAACG-3')に対する二重鎖融解温度( $T_m$ )の測定を行った。測定に用いる緩衝液の組成は 10 mM リン酸バッファ(pH 7.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA とし、各オリゴヌクレオチドの濃度は 2  $\mu$ M とした。また、各測定は 3 回ずつ行なった。結果を以下の table2.3 に示す。まず、中央に一か所修飾を導入した ON2 について、 $T_m$  の変化を ON1 と比較した。 $T_m$  の値がもっとも大きく変化したのは BuCE 修飾を持つ ON2d であり、全て 2'-OMe 修飾ヌクレオチドで構成されている ON1 と比較して 1.0  $^{\circ}$ C 上昇した。ついで  $T_m$  の変化が大きかったのは MCE 修飾を持つ ON2a および AmCE 修飾を持つ ON2e であり、MCE では 0.7  $^{\circ}$ C 上昇、AmCE では 0.7  $^{\circ}$ C 低下した。また、最もかさ高い OcCE 修飾を持つ ON2f では 0.6  $^{\circ}$ C 低下した。EtCE 修飾を持つ ON2b および PrCE 修飾を持つ ON2c ではそれぞれ 0.1  $^{\circ}$ C および 0.2  $^{\circ}$ C 上昇した。次に、中央に 3 ヶ所連続で導入した ON3 について同様に ON1 と比較した。 $T_m$  の変化量

を修飾の個数で割った  $\Delta T_m/\text{mod.}$  を比較すると、OcCE 修飾を持つ ON3f が最も安定性への寄与が大きく、1 修飾あたり  $0.8^\circ\text{C}$  低下することが分かった。ついで、MCE 修飾を持つ ON3a が 1 修飾あたり  $0.5^\circ\text{C}$  の  $T_m$  上昇を観測した。また、EtCE 修飾、PrCE 修飾、BuCE 修飾および AmCE 修飾を持つ ON3b-e では  $0.1 - 0.3^\circ\text{C}$  の  $T_m$  上昇を観測した。さらに、修飾を間を開けて 3 ヶ所導入した ON4a-f では、OcCE 修飾を持つ ON4f 以外の全てのオリゴヌクレオチドで  $T_m$  が上昇し、合成した全ての修飾において 1 修飾あたりの  $T_m$  変化は  $0.3 - 0.5^\circ\text{C}$  の範囲に留まった。過去に文献で報告されている 2' 位に直接アルキル基を導入した場合と<sup>12</sup>、今回合成した 2'-O-アルキルカルバモイルエチル基を導入した場合の 1 修飾あたりの  $T_m$  変化を比較したグラフを示す(Figure 2.8a, 8b)。グラフより、本研究で合成したアルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドは、直接アルキル基を導入した場合と比較して有意に二重鎖の安定性を変化させていないことが分かった。第一節で述べたように、二重鎖融解温度とアンチセンス活性との間には相関があり、およそ  $10^\circ\text{C}$  程度の至適な温度範囲が存在する。本研究において合成したアルキルカルバモイルエチル型修飾が  $T_m$  に与える影響は最大でも 1 修飾あたり  $0.8^\circ\text{C}$  であることから、これらの修飾はアンチセンス活性に影響を与えるほど二重鎖安定性の変化を引き起こさないことが期待される。

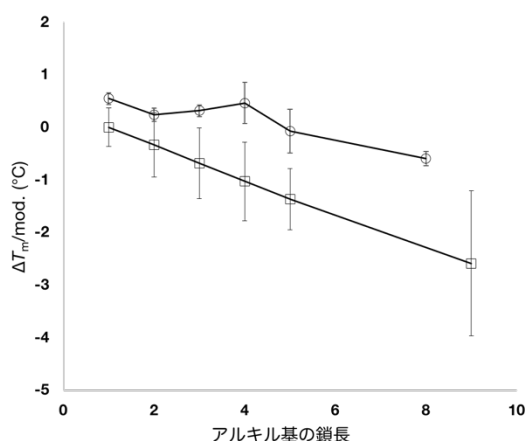


Figure2. 8a アルキル基の長さ と  $\Delta T_m/\text{mod.}$   
 ○:2'-O-alkylcarbamoylethyl □:2'-O-alkyl

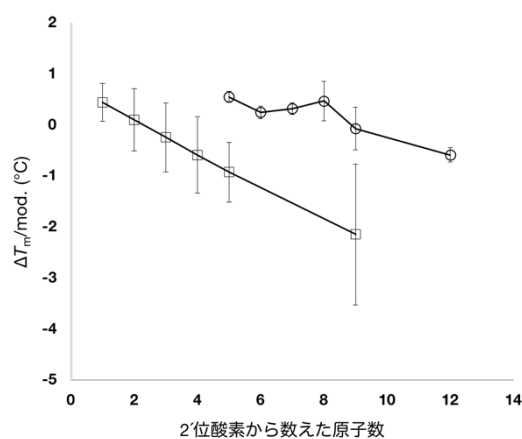


Figure2. 8b 修飾のかさ高さ と  $\Delta T_m/\text{mod.}$   
 ○:2'-O-alkylcarbamoylethyl □:2'-O-alkyl

Table2. 3 合成したオリゴヌクレオチドの  $T_m$  および  $\Delta T_m / \text{mod.}$  の値

Name	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m (\Delta T_m / \text{mod.})$ (°C)
<b>ON1</b>	54.4 ± 0.2	-(-)
<b>ON2a</b>	55.1 ± 0.1	0.7 (0.7)
<b>ON2b</b>	54.5 ± 0.1	0.1 (0.1)
<b>ON2c</b>	54.6 ± 0.1	0.2 (0.2)
<b>ON2d</b>	55.4 ± 0.2	1.0 (1.0)
<b>ON2e</b>	53.7 ± 0.1	-0.7 (-0.7)
<b>ON2f</b>	53.8 ± 0.1	-0.6 (-0.6)
<b>ON3a</b>	55.8 ± 0.1	1.4 (0.5)
<b>ON3b</b>	55.1 ± 0.3	0.7 (0.2)
<b>ON3c</b>	55.2 ± 0.0	0.8 (0.3)
<b>ON3d</b>	54.6 ± 0.1	0.2 (0.1)
<b>ON3e</b>	54.9 ± 0.1	0.5 (0.2)
<b>ON3f</b>	52.1 ± 0.1	-2.3 (-0.8)
<b>ON4a</b>	55.8 ± 0.1	1.4 (0.5)
<b>ON4b</b>	55.6 ± 0.1	1.2 (0.4)
<b>ON4c</b>	55.8 ± 0.2	1.4 (0.5)
<b>ON4d</b>	55.4 ± 0.3	1.0 (0.3)
<b>ON4e</b>	55.2 ± 0.2	0.8 (0.3)
<b>ON4f</b>	53.1 ± 0.0	-1.3 (-0.4)

続いて、二重鎖を形成する反応の標準エンタルピー変化、標準エントロピー変化および標準ギブス自由エネルギー変化について測定を行なった。まず、van't Hoff plot 法について説明する。これらのパラメーターの間には以下の関係式が成り立つことが知られている。ただし、標準エンタルピー変化と標準エントロピー変化は温度によらず一定であると仮定している。

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \dots (1)$$

これは、気体定数  $R$  および反応の結合定数  $K_a$  を用いて以下のように書き直せる。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad \dots (2)$$

相補鎖を  $cON$ 、二重鎖を  $dsON$  と書くとき、合成した  $ON$  と  $cON$  の相補鎖形成は以下のような平衡反応である。



以下では分子種  $X$  の濃度を  $[X]$  で表すと約束する。平衡に達しているときの結合度を  $\alpha$ 、 $[ON]$  および  $[cON]$  の初期濃度の和を  $c_0$  とすれば、平衡時の結合定数  $K_a$  は以下の式で表せる。

$$K_a = \frac{2\alpha}{c_0(1-\alpha)^2} \quad \dots (3)$$

$T_m$  の定義から  $T_m$  の時  $\alpha = 0.5$  であるので、これを代入して

$$K_a = \frac{4}{c_0}$$

これと式(2)より

$$\Delta G^\circ = -RT_m \ln \frac{4}{c_0}$$

これと式(1)から

$$\Delta H^\circ - T_m \Delta S^\circ = RT_m \ln \frac{c_0}{4}$$

変形して

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^\circ} \ln \frac{c_0}{4} + \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ} \quad \dots (4)$$

これより、濃度を変化させて  $T_m$  を測定し、縦軸に  $T_m^{-1}$ 、横軸に  $\ln(c_0/4)$  を取ってプロットすることでその傾きおよび切片から熱力学パラメーターを決定できる。本研究においては各オリゴヌクレオチドの初期濃度の和が  $20 \mu\text{M}$  になるように調整したマスターミックスを作成し、バッファを用いて順次希釈することで濃度の異なる7つのサンプルを用意して二重鎖融解温度測定を行なった。各サンプルの濃度は  $95^\circ\text{C}$  における吸光度の比より求めた。測定は一つのオリゴヌクレオチドに対して3回ずつ行なった。また、気体定数  $R$  は  $R = 1.986 [\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}]$  とした。

さらに、熱力学パラメーターを求める手法としては、van't Hoff plot 法の他に curve fitting による方法が知られている。先述の式(2)(3)より

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{2\alpha}{c_0(1-\alpha)^2}$$

である。これを整理すると

$$\frac{c_0(1-\alpha)^2}{2\alpha} = e^{\frac{\Delta G^\circ}{RT}} \Leftrightarrow \alpha^2 - 2\left(1 + \frac{e^{\frac{\Delta G^\circ}{RT}}}{c_0}\right)\alpha + 1 = 0$$

となるから、これを $\alpha$ の二次方程式として解いて

$$\alpha = 1 + \frac{e^{\frac{\Delta G^\circ}{RT}}}{c_0} - \sqrt{\frac{e^{\frac{\Delta G^\circ}{RT}}}{c_0} \left( \frac{e^{\frac{\Delta G^\circ}{RT}}}{c_0} + 2 \right)}$$

がわかる。さらに、(1)式より $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ であるので、これを代入して

$$\alpha = 1 + \frac{e^{\frac{1}{R}\left(\frac{\Delta H^\circ}{T} - \Delta S^\circ\right)}}{c_0} - \sqrt{\frac{e^{\frac{1}{R}\left(\frac{\Delta H^\circ}{T} - \Delta S^\circ\right)}}{c_0} \left( \frac{e^{\frac{1}{R}\left(\frac{\Delta H^\circ}{T} - \Delta S^\circ\right)}}{c_0} + 2 \right)}$$

のように、 $\alpha$ を $T$ の関数で表すことができる。 $T_m$ 測定では $c_0 = 4 \mu\text{M}$ であり、得られた  $T_m$  曲線に対して $\Delta H^\circ$ と $\Delta S^\circ$ をフィッティングすることで熱力学的パラメーターの値を決定することができる。しかし、フィッティングを行なうためには得られた  $T_m$  曲線を正規化する必要がある。そこで、本研究ではインターポレーションと Savitzky-Golay 法によるスムージングの後、得られたデータの上下 10%の値を用いてベースラインを作成し、これを用いて  $T_m$  曲線の正規化を行なった。なお、一本鎖および二本鎖核酸の定圧熱容量は温度変化によらず一定であると仮定した。

ON1, ON2a-f, ON3a-f および ON4a-f と相補鎖 RNA を用いて測定した二重鎖形成反応のエンタルピー変化 $\Delta H^\circ$ 、エントロピー変化 $\Delta S^\circ$ 及びギブス自由エネルギー変化 $\Delta G_{37^\circ}$ の測定結果を以下の Table 2.4 に示す。まず、それぞれの方法で求めたパラメーターに関して、横軸に  $\Delta H$ 、縦軸に  $\Delta S$  をとったグラフを Figure 2.9 に示す。グラフより、 $\Delta H$  の変化による熱力学的安定性の変化を  $\Delta S$  の変化が打ち消すエンタルピー-エントロピー補償(enthalpy-entropy compensation)が起きていることが示唆される。このような現象が起きる原因はいくつか考えられる。例えば、ある程度修飾がかさ高くなってきた場合、隣接する修飾残基同士での疎水性相互作用が起きたり、二重鎖を形成する際に相手鎖と相互作用をしたりすることが考えられる。また、二重鎖形成時の塩基対間の水和状態に影響を与え、二重鎖形成時に格納/放出される水分子の個数の変化がエンタルピーとエン

トロピーの変化に寄与している可能性もある。しかし、導入したアルキル基のかさ高さや修飾のパターンとエンタルピー、エントロピーの変化との間に明確な傾向は見られないことから、これらの複数の要因が複合的に作用することによってエンタルピーエントロピー補償が起きていると思われる。

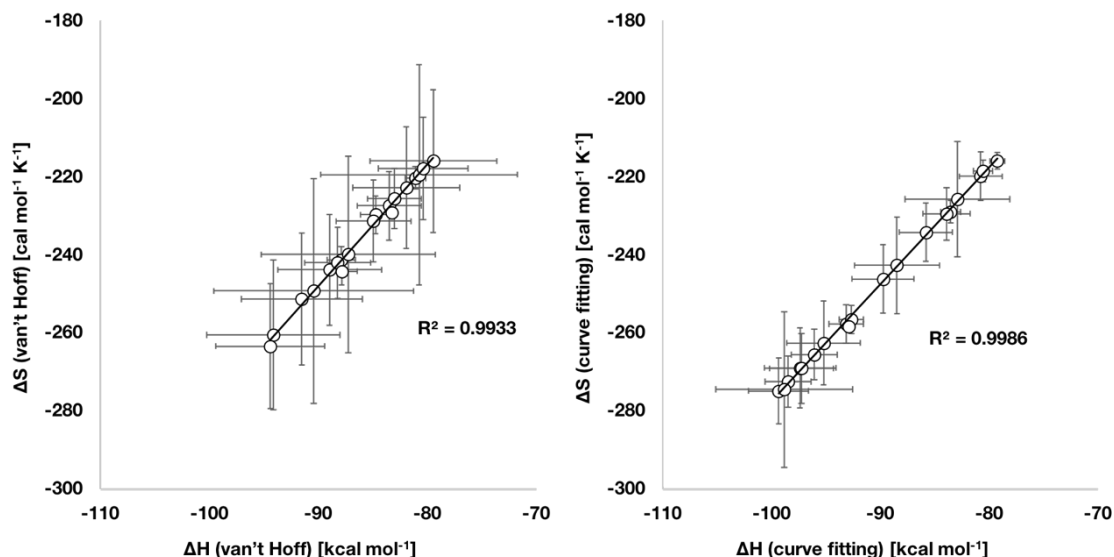


Figure 2.9 van't Hoff 法(左)および curve fitting 法(右)で測定した  $\Delta H$  と  $\Delta S$

次に、二つの方法で測定した  $\Delta H$  および  $\Delta S$  の値を比較した。横軸に van't Hoff plot 法で測定したパラメーター、縦軸に curve fitting 法で測定したパラメーターをとったグラフを Figure 2.10 に示す。一般に、curve fitting 法を用いて測定した熱力学的パラメーターの方が測定誤差が大きくなる傾向にあることが知られている<sup>14</sup>。Curve fitting 法を用いて熱力学的パラメーターを測定するためには、得られた  $T_m$  曲線を正規化する必要があることは先述した。これは、各々の状態における UV 吸収の変化量は温度に依らず一定であり、ベースラインの線形近似が可能であるという前提に成り立っている。しかしながら、実際には高温領域の一本鎖状態における UV 吸収の変化量は、温度に依存する塩基間のスタッキング状態などにより変化しているため、線形近似が十分に行えない場合がある。Kierzek らは、curve fitting 法で得られたパラメーターと van't Hoff 法で得られたパラメーターとの間には 15%程度の誤差が生じることを報告している<sup>15</sup>。そこで、本研究において求めたパラメーター間の誤差を求めたところ、19 個中 14 個でその誤差は 15%以内に収まった。15%以内に収まらなかった 5 組のデータについては、例えば以下の Figure 2.11 に示すように高温領域の  $T_m$  曲線の乱れが原因で curve fitting による

誤差が大きく出てしまったためであると考えられる。

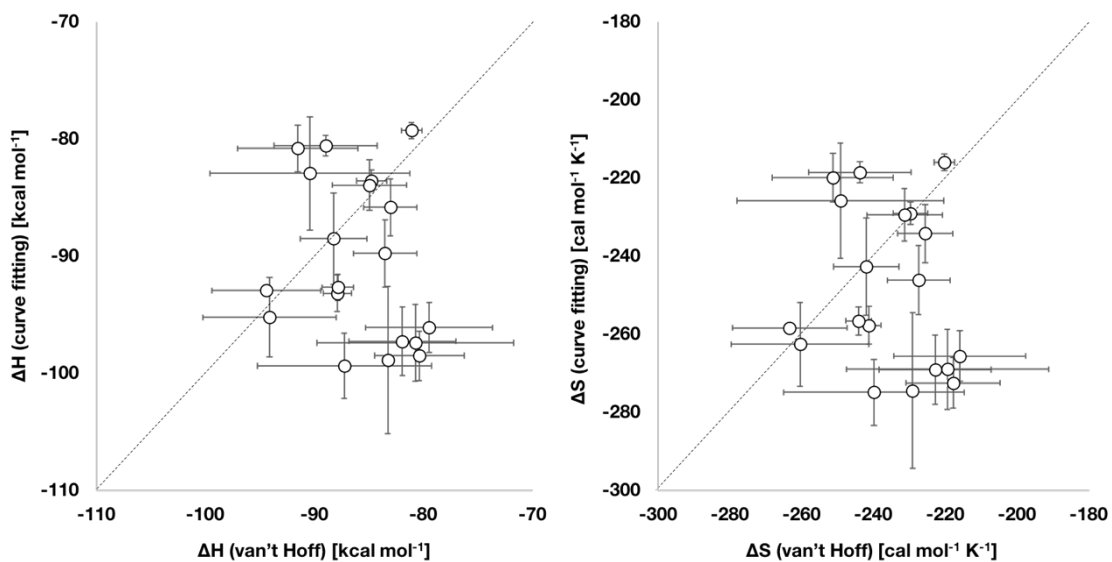


Figure 2.10 それぞれの方法で求めた  $\Delta H$  および  $\Delta S$  の相関

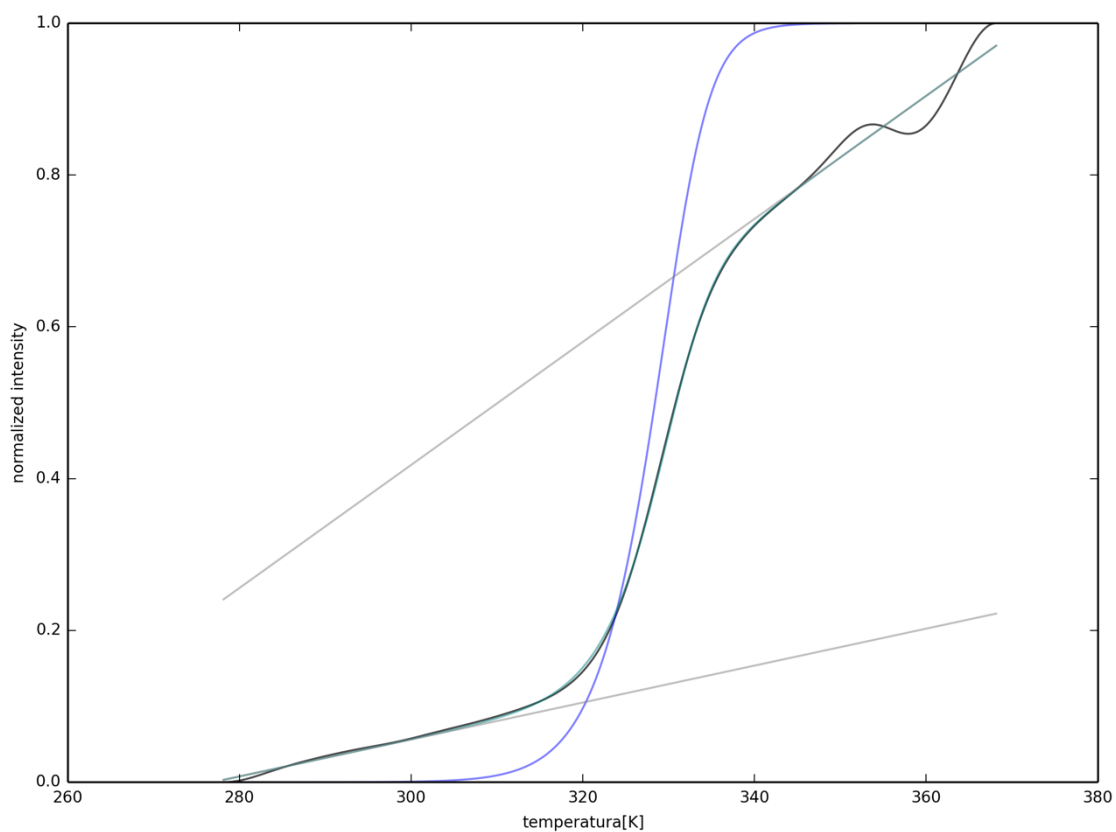


Figure 2.11 高温領域の乱れによるフィッティング時の誤差

黒:実測値 緑:フィッティング後 青:結合度

Table 2.4 測定した熱力学的パラメーターの値( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ )

Name	$\Delta H$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]			$\Delta S$ [cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]		
	van't Hoff plot	curve fitting	% of difference	van't Hoff plot	curve fitting	% of difference
<b>ON1</b>	-84.8 ± 1.4	-83.6 ± 0.9	1.41	-229.7 ± 4.8	-229.0 ± 2.9	0.32
<b>ON2a</b>	-83.5 ± 2.9	-89.8 ± 2.9	7.47	-227.4 ± 8.7	-246.2 ± 8.8	8.23
<b>ON2b</b>	-85.0 ± 3.4	-83.9 ± 2.2	1.21	-231.4 ± 10.5	-229.5 ± 6.7	0.82
<b>ON2c</b>	-91.5 ± 5.5	-80.8 ± 2.0	11.73	-251.3 ± 16.8	-219.9 ± 6.2	12.51
<b>ON2d</b>	-89.0 ± 4.7	-80.6 ± 0.9	9.46	-243.9 ± 14.2	-218.5 ± 2.8	10.40
<b>ON2e</b>	-81.1 ± 0.9	-79.3 ± 0.7	2.26	-220.3 ± 2.9	-215.9 ± 2.1	1.98
<b>ON2f</b>	-87.2 ± 1.3	-93.2 ± 1.6	5.97	-240.2 ± 3.3	-257.7 ± 4.9	6.81
<b>ON3a</b>	-94.1 ± 9.0	-95.2±3.3	1.17	-260.5 ± 28.2	-262.6 ± 10.2	0.80
<b>ON3b</b>	-83.0 ± 9.2	-85.8±4.8	3.36	-225.6 ± 28.8	-234.2 ± 14.8	3.81
<b>ON3c</b>	-81.9 ± 4.1	-97.3±2.1	18.70	-222.8 ± 13.2	-269.1 ± 6.5	20.78
<b>ON3d</b>	-83.3 ± 3.0	-98.9±3.9	18.71	-229.1 ± 9.1	-274.5 ± 12.4	19.79
<b>ON3e</b>	-79.5 ± 8.0	-96.1±2.8	20.92	-216.0 ± 25.1	-265.6 ± 8.5	22.96
<b>ON3f</b>	-94.4 ± 1.4	-92.9±1.1	1.56	-263.4 ± 3.5	-258.4 ± 3.6	1.91
<b>ON4a</b>	-80.8 ± 6.1	-97.4 ± 3.4	20.61	-219.4 ± 19.2	-269.0 ± 10.7	22.57
<b>ON4b</b>	-90.4 ± 2.4	-82.9 ± 2.4	8.29	-249.3 ± 7.7	-225.8 ± 7.5	9.43
<b>ON4c</b>	-80.4 ± 4.9	-98.5 ± 2.9	22.52	-217.9 ± 15.6	-272.5 ± 8.9	25.06
<b>ON4d</b>	-88.2 ± 0.5	-88.5 ± 6.3	0.29	-242.1 ± 0.6	-242.7 ± 19.9	0.25
<b>ON4e</b>	-87.3 ± 5.8	-99.4 ± 2.1	13.86	-239.9 ± 18.3	-274.9 ± 6.5	14.58
<b>ON4f</b>	-87.9 ± 5.0	-92.7 ± 0.1	5.47	-244.2 ± 15.9	-256.6 ± 0.3	5.07

Table 2.4 測定した熱力学的パラメーターの値( $\Delta G_{37}$ )

Name	$\Delta G_{37}$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]			$\Delta\Delta G_{37}/\text{mod.}$
	van't Hoff plot	curve fitting	% of difference	van't Hoff plot
<b>ON1</b>	-13.1 ± 0.1	-12.5 ± 0.0	7.17	–
<b>ON2a</b>	-13.0 ± 0.2	-13.4 ± 0.1	3.37	0.5
<b>ON2b</b>	-13.2 ± 0.2	-12.8 ± 0.1	3.30	0.3
<b>ON2c</b>	-13.6 ± 0.3	-12.6 ± 0.0	7.26	-0.1
<b>ON2d</b>	-13.4 ± 0.3	-12.8 ± 0.0	4.14	0.2
<b>ON2e</b>	-12.8 ± 0.1	-12.3 ± 0.0	3.78	0.7
<b>ON2f</b>	-12.7 ± 0.3	-13.2 ± 0.1	1.17	0.4
<b>ON3a</b>	-13.3 ± 0.3	-13.8 ± 0.1	3.40	0.1
<b>ON3b</b>	-13.1 ± 0.2	-13.2 ± 0.2	0.98	0.1
<b>ON3c</b>	-12.8 ± 0.1	-13.8 ± 0.1	7.54	0.2
<b>ON3d</b>	-12.2 ± 0.3	-13.7 ± 0.1	12.47	0.4
<b>ON3e</b>	-12.5 ± 0.2	-13.7 ± 0.1	9.98	0.3
<b>ON3f</b>	-12.7 ± 0.3	-12.8 ± 0.0	0.68	0.3
<b>ON4a</b>	-12.7 ± 0.2	-14.0 ± 0.1	10.12	0.3
<b>ON4b</b>	-13.1 ± 0.1	-12.9 ± 0.1	1.60	0.1
<b>ON4c</b>	-12.8 ± 0.1	-14.0 ± 0.2	9.12	0.2
<b>ON4d</b>	-13.2 ± 0.3	-13.2 ± 0.1	0.46	0.1
<b>ON4e</b>	-12.9 ± 0.1	-14.1 ± 0.2	9.67	0.2
<b>ON4f</b>	-12.1 ± 0.1	-13.1 ± 0.0	7.96	0.5

さらに、van't Hoff 法を用いて求めた  $\Delta G_{37}$  について、各オリゴヌクレオチドの ON1 からの変化を求めた。Table 2.4 に示すように、ON2c 以外の全てで  $\Delta\Delta G_{37} > 0$  であることから、37 °C における二重鎖の安定性は不安定化することがわかった。しかし、最大でも 1 修飾あたり 0.5 kcal 程度の不安定化であり、2'-OMe RNA と相補鎖 RNA ではオリゴヌクレオチドの長さが 1 mer 変化すると  $\Delta G_{37}$  は平均  $1.9 \pm 0.7$  kcal 変化することを考えると<sup>15</sup>、二重鎖の安定性に与える影響は十分に小さいと言える。

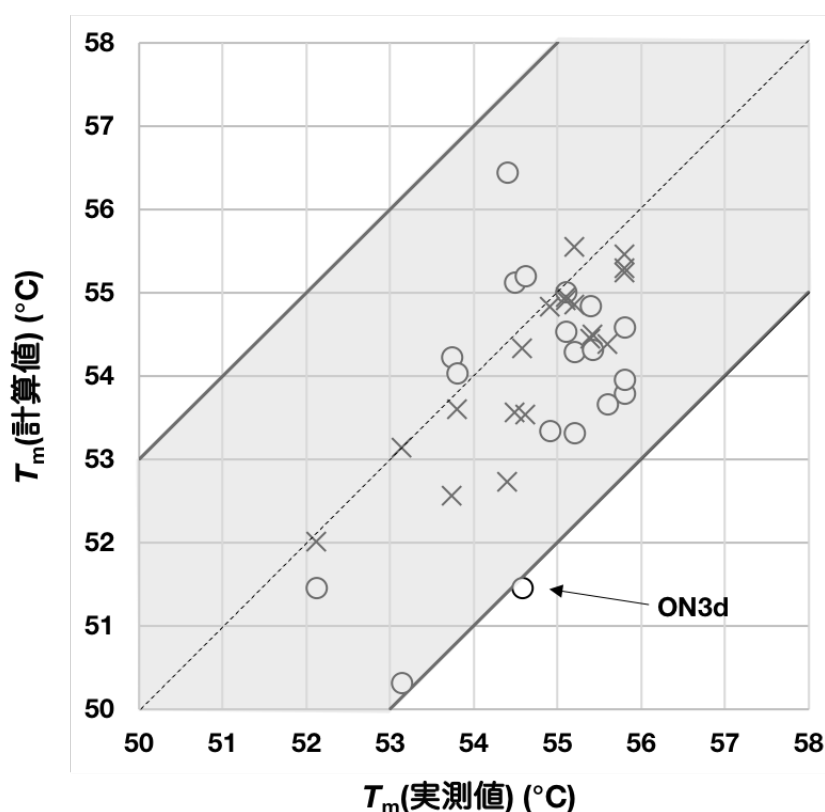


Figure 2.12  $T_m$  の計算値と実測値 (○:van't hof plot, ×: curve fitting)

次に、算出した熱力学的パラメーターの値を用いて  $T_m$  を計算した。(4)式より

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ}{R \ln \frac{c_0}{4} + \Delta S^\circ} \cong \frac{\Delta H^\circ}{-27.44 + \Delta S^\circ} \dots (4')$$

であるから、求めたパラメーターの値を代入することで  $T_m$  を計算することができる。横軸に  $T_m$  の実測値、縦軸に van't Hoff 法および curve fitting 法のそれぞれで求めた熱力学的パラメーターの値を用いて算出した  $T_m$  の値を取ったグラフを Figure 2.12 に示す。また、実測値と計算値の誤差が 3 °C 以内の範囲をグレーに着色してある。このグラフから明らかなように、van't Hoff 法で求めたパラメーターを用いて算出した 1 つの値を

除いて、計算値と実測値の誤差は3°C以内であった。Curve fitting法で求めたパラメータを使用した方が計算値と実測値の誤差は小さかったが、これは $T_m$ の実測値を求めるために使用した $T_m$ 曲線を用いてフィッティングを行なったためであると考えられる。また、van't Hoff法で求めたパラメータを使用した場合、実測値よりも若干低く見積もられる傾向が明らかになった。

Table2. 5 熱力学的パラメータの値を用いて算出した $T_m$ 値

Name	real $T_m$ (°C)	calcd $T_m$ (°C)	
		with plot	with fitting
<b>ON2a</b>	55.1	54.5	54.9
<b>ON2b</b>	54.5	55.1	53.6
<b>ON2c</b>	54.6	55.2	53.5
<b>ON2d</b>	55.4	54.8	54.4
<b>ON2e</b>	53.7	54.2	52.6
<b>ON2f</b>	53.8	54.0	53.6
<b>ON3a</b>	55.8	53.8	55.2
<b>ON3b</b>	55.1	55.0	54.9
<b>ON3c</b>	55.2	54.3	54.9
<b>ON3d</b>	54.6	51.5	54.3
<b>ON3e</b>	54.9	53.3	54.8
<b>ON3f</b>	52.1	51.5	52.0
<b>ON4a</b>	55.8	54.0	55.5
<b>ON4b</b>	55.6	53.7	54.4
<b>ON4c</b>	55.8	54.6	55.3
<b>ON4d</b>	55.4	54.3	54.5
<b>ON4e</b>	55.2	53.3	55.5
<b>ON4f</b>	53.1	50.3	53.1

## 第五節 アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドの酵素耐性

次に、アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドの核酸分解酵素に対する酵素耐性を評価した。ヒト血中においては鎖の中央から切断するエンドヌクレアーゼよりも末端、とりわけ 3'末端から順に切断していく 3'エキソヌクレアーゼの活性が高いことが知られているため<sup>16</sup>、本研究では 3'エキソヌクレアーゼの一つであるスネークベノムホスホジエステラーゼ(SVPDE-1)を酵素として用いた。5'末端を FAM により蛍光修飾した ON5a-f をバッファ中で SVPDE-1 と反応させ、完全長オリゴ残存率の経時変化をゲル電気泳動により評価した。さらに、残存率が 50%を下回る時刻の前後の直線の傾きと切片を用いて、各オリゴヌクレオチドの半減期  $t_{1/2}$  を算出した。また、MCE 修飾を持つ ON5a の半減期に対する各オリゴヌクレオチドの半減期の比 relative  $t_{1/2}$  も算出した。その結果を Figure2.13 に示す。まず、EtCE 修飾を持つ ON5b および PrCE 修飾を持つ ON5c の半減期は ON5a とほとんど変わらず、いずれも 10 分程度であった。これに対し、BuCE 修飾を持つ ON5d および AmCE 修飾を持つ ON5e ではおよそ 1.5 倍の 15 分に延長した。さらに、よりかさ高い OcCE 修飾を持つ ON5f では半減期がおおよそ 2 倍の 20 分まで延長した。このことは、2'位へ修飾したアルキル基がかさ高くなるにつれて核酸分解酵素耐性が向上するという過去の知見に一致するため、カルバモイルエチル型修飾を介してアルキル基を導入した場合でも「かさ高さと酵素耐性に正の相関がある」という性質が変化していないことが示唆された。また、MCE 修飾は核酸医薬品に頻用されている 2'-O-MOE 修飾と比較しても 3 倍程度高い核酸分解酵素耐性を持っていることが過去に報告されており<sup>17</sup>、本研究で合成したアルキルカルバモイルエチル修飾核酸はいずれも実用に耐えうる非常に高い核酸分解酵素耐性を持っていることが示唆された。

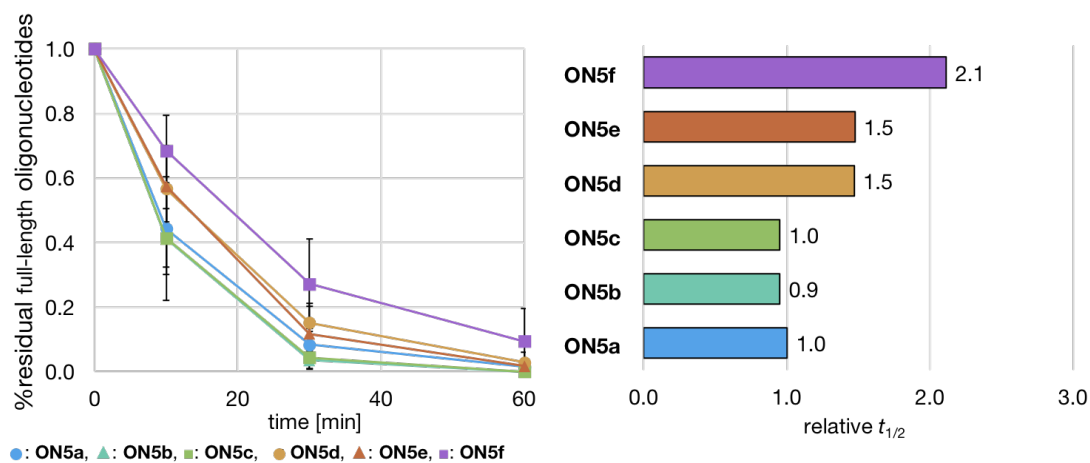


Figure2. 13 合成したオリゴヌクレオチドの核酸分解酵素耐性

## 第六節 アルキルカルバモイルエチル型修飾を持つオリゴヌクレオチドの CD 測定

続いて、アルキルカルバモイルエチル基の二重鎖構造への影響を評価するため、CD スペクトルの測定を行なった。測定は、合成したアルキルカルバモイルエチル型修飾の中でもっともかさ高い  $O_cCE$  修飾を持つ ON2f, ON3f および ON4f と、もっとも小さい

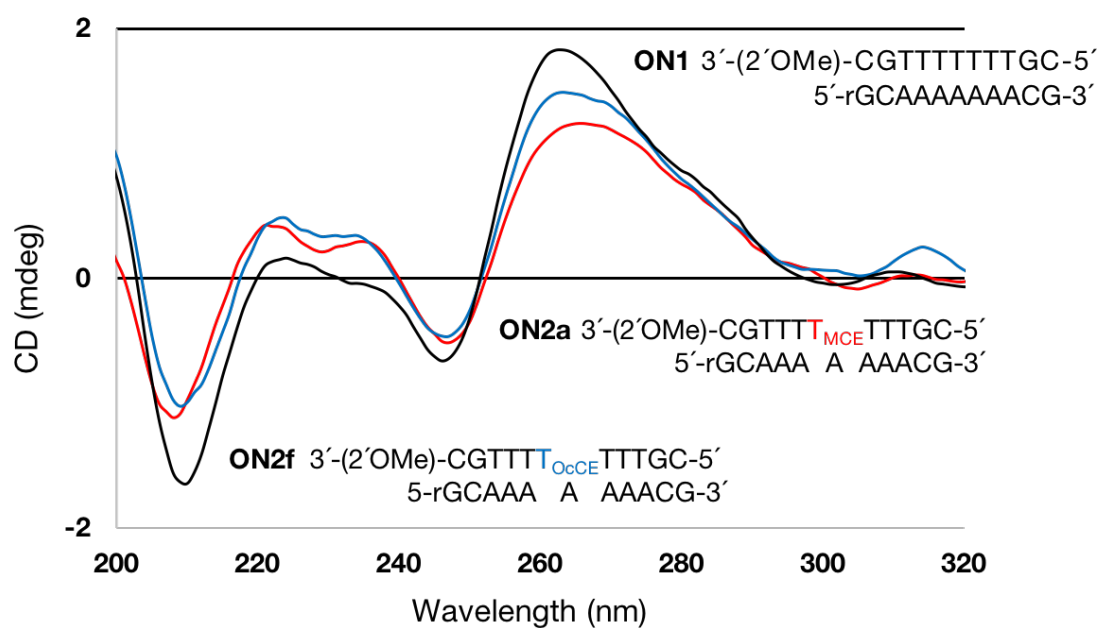


Figure2. 14 ON1, ON2a および ON2f の CD スペクトル

MCE 修飾を持つ ON2a, ON3a および ON4a、および相補鎖 RNA を用い、 $T_m$  測定に用いたバッファと同様の条件で 25 °C で行なった。さらに、比較として 2'-OMe 修飾のみを持つ ON1 と相補鎖 RNA でも測定した。初めに、ON1, ON2a および ON2f の結果を Figure 2.14 に示す。ON1(黒線)、ON2a(赤線)および ON2f(青線)はいずれも 260 nm 付近の正のコットンと 210 nm 付近の負のコットンを持つ A 型らせん構造に特徴的な CD スペクトルを示した。このことから、修飾を中央に 1 ヶ所導入した場合において二重鎖構造に大きな変化はみられず、A 型らせん構造を維持することがわかった。続いて、中央に 3 ヶ所連続して修飾を持つ ON3a および ON3f の結果を Figure 2.15 に示す。修飾を 3 ヶ所連続で導入した場合でも、1 ヶ所導入した場合と同様に 260 nm 付近の正のコットンと 210 nm 付近の負のコットンが見られ、全体的には A 型らせん構造を取っていることが示唆された。また、ON2a と比較して ON3a(赤線)ではスペクトル強度が若干増強した。CD スペクトルの強度は濃度以外に構造の安定性に依存すると考えられ、アルキルカルバモイルエチル型修飾を連続して導入することは二重鎖の A 型のらせん構造をより安定化させる効果がある可能性が考えられる。また、220 nm から 240 nm 付近の波形には変化が見られた。この波形の変化が二重鎖の局所的な構造の変化によるものなのか、導入されたアルキル基が取りうる何らかの構造によるものなのかについては第七

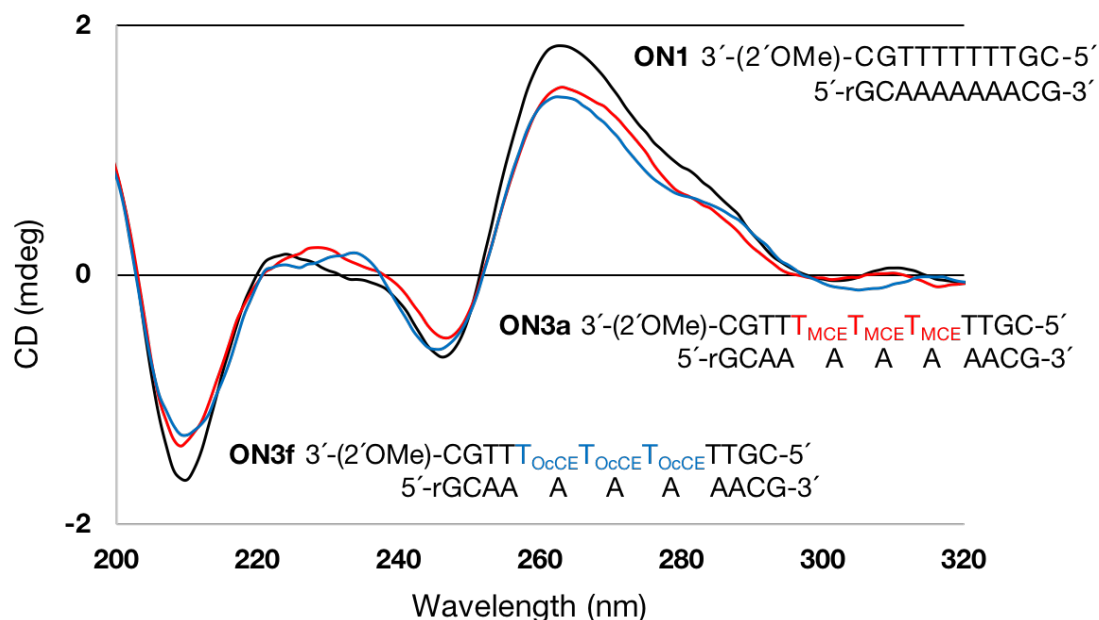


Figure 2.15 ON1, ON3a および ON3f の CD スペクトル

節で考察する。

最後に、不連続に3ヶ所の修飾を持つ ON4a および ON4f の測定結果を Figure 2.16 に示す。これまでと同様に、不連続に修飾した場合でも A 型のらせん構造を取ることが示された。興味深いことに、もっともかさ高い OcCE 修飾を持つ ON4f(青線)のスペクトル強度が ON2f や ON3f と比較して増強され、2'-OMe 修飾を持つ ON1 と同等の強度を示した。

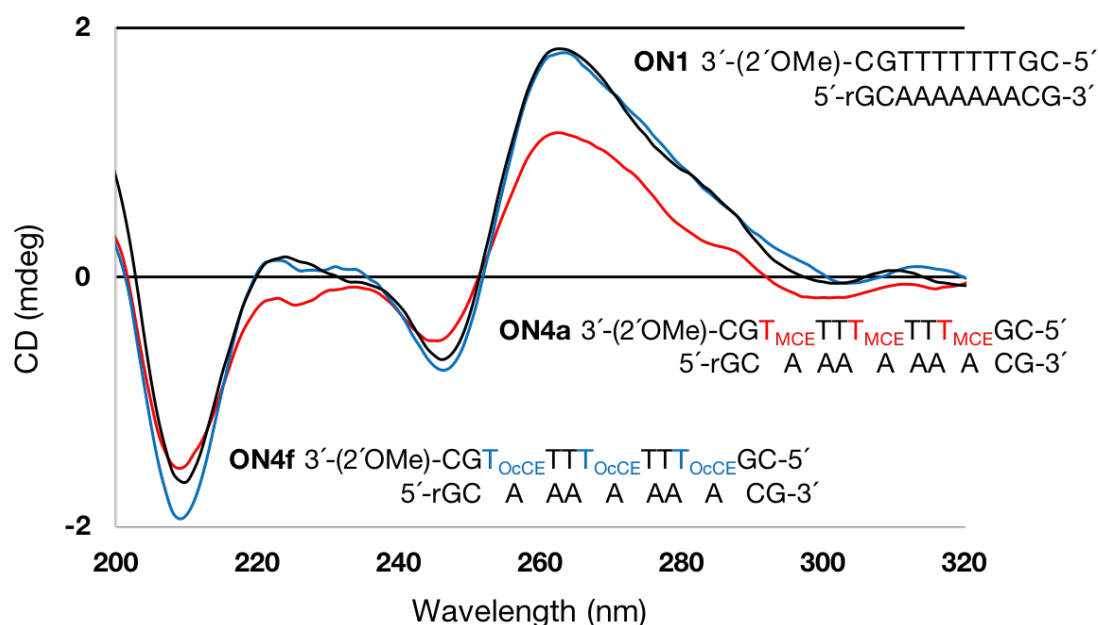


Figure 2. 16 ON1, ON4a および ON4f の CD スペクトル

以上の結果より、今回合成したアルキルカルバモイルエチル型修飾を持つ核酸は核酸二重鎖全体の構造には大きな影響を及ぼさず、全体としては A 型らせん構造を維持することがわかった。Lesnik らは、ノニル基のようなかさ高い修飾を複数導入した場合には CD スペクトルも変化することを報告しており<sup>12</sup>、今回の結果とは異なる傾向である。そこで、より詳細に修飾付近での局所構造を考察するために、第七節では AMBER を用いた分子動力学計算を行なうこととした。

## 第七節 AMBER を用いたアルキルカルバモイルエチル型修飾の二重鎖構造の予測

アルキルカルバモイルエチル型修飾の二重鎖構造の安定性への影響を考察するため

に、AMBER を用いた分子動力学シミュレーションを行なった。シミュレーションを行なうにあたり必要なオリゴヌクレオチドのパラメーターの作成および計算実行プログラムの作成は当研究室の正木慶昭 助教に依頼した。計算の際、二重鎖配列の両末端から 3 mer 程度は二重鎖乖離による誤差が大きく含まれるため、正確なデータが得られにくい。そこで、修飾の二重鎖構造への影響を評価するための配列としては、鎖の中央付近に 3 ヶ所連続で修飾を持つ ON3a および ON3f を用いることとした。

はじめに、修飾が導入されたオリゴヌクレオチドの糖部立体配座の変化について調べた。核酸糖部フラノース環の立体配座はパッカリングと呼ばれ、複雑な立体構造を取り得るため、簡便に表記するために擬回転位相角(Pseudorotation phase angle)がよく用いられる。これは Figure 2.17 に示すように、糖部 5 員環の 5 つのねじれ角を  $v_0, v_1, v_2, v_3, v_4$  とし、Figure 2.17 中の式により定義される。核酸の糖部では主に N 型( $0^\circ$ 付近)配座と S 型( $180^\circ$ 付近)配座を多く取ることが知られており、通常リボヌクレオシドの糖部立体配座は 2' 位水酸基と塩基部の立体反発により N 型構造へと偏っている。また、2' 位に対して修飾を加えた場合は立体反発の増強によってより偏りが大きくなることが知られている。

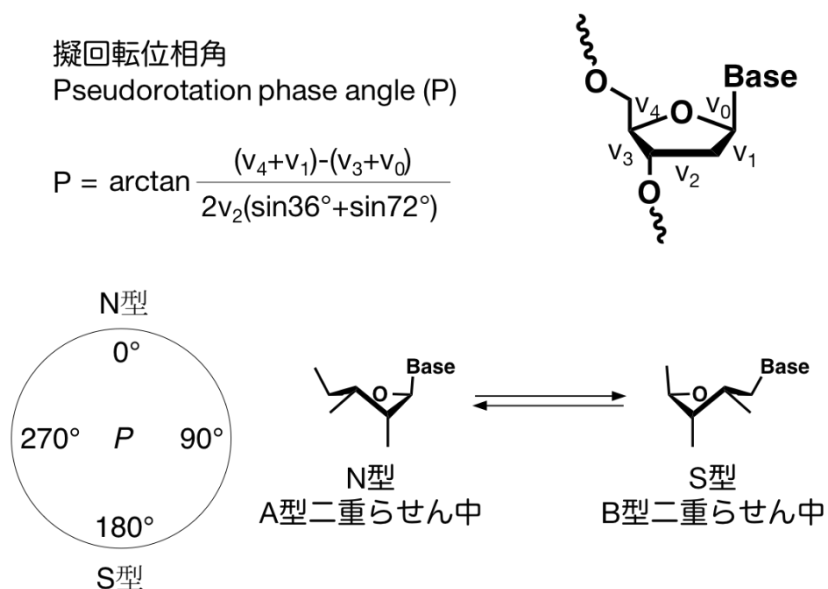


Figure 2. 17 擬回転位相角と核酸糖部のパッカリング

本研究では、2' 位水酸基に対するアルキルカルバモイルエチル型修飾が糖部立体配座へ与える影響を考察するため、ON3a および ON3f と相補鎖 RNA との二重鎖構造を水溶

液中 200 ns に渡ってシミュレーションし、1 ps 毎に各ヌクレオシドの擬回転位相角を調べた。以下では、塩基番号および塩基対番号、塩基対間番号は Figure 2.18 に示したものをを用いる。

塩基(対)番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
5'-(2'OMe)-	C	G	T	T	X	X	X	T	T	G	C	-3'
3'-r-	G	C	A	A	A	A	A	A	A	C	G	-5'
		22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12
塩基対間番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

Figure 2.18 計算時の塩基対および塩基対間のナンバリング

まず、鎖の中央に 3 箇所連続して MCE 修飾を持つ ON3a の糖部立体構造について調べたところ、2'-OMe 修飾を持つ第 4 塩基、第 8 塩基と比較して、MCE 修飾を持つ第 5 塩基から第 7 塩基では擬回転位相角が平均して 1°程度増加した。同様に、典型的な N 型構造である C3'-endo 型の糖部構造を取っている時間割合は最大で 2%程度増加した。これは、2'位に導入された修飾基と核酸塩基部の立体反発の増加によるものと思われる。また、鎖の中央に 3 箇所連続して OcCE 修飾を持つ ON3f についても同様の傾向を示した。このことより、本研究で開発したアルキルカルバモイルエチル修飾は、2'-OMe 修飾と比較して、より糖部コンホメーションを N 型に安定化することがわかった。しかし、これらの変化は二重鎖全体の構造変化から見れば CD スペクトルの変化などにより直接観測されないほど極めて小さな変化であり、二重鎖構造全体への影響はないと判断した。詳細なデータは実験編に記載する。

続いて、個々の塩基対単位での立体構造について考察するため、塩基対パラメーター、塩基対間パラメーターおよびらせんパラメーターを求めた。塩基対パラメーターは文字通り塩基対の変位や回転を評価するためのパラメーターであり、 $x, y, z$  軸方向への変位(それぞれ Shear, Stretch, Stagger)と  $x, y, z$  軸周りの回転(それぞれ Buckle, Propeller, Opening)からなる。また、塩基対間パラメーターは塩基対同士の変位や回転を表すものであり、塩基対パラメーターと同じ要領で 6 種ある(それぞれ Shift, Slide, Rize, Tilt, Roll, Twist)。らせんパラメーターはより局所的ならせん構造についての情報を与えるパラメーターであり、塩基対パラメーターや塩基対間パラメーターと同様に 6 種ある(X-displacement, Y-displacement, Helical Rise, Inclination, Tip, Helical Twist)。これら各種パラメーターの概念図および実際に測定された値を Figure 2.19 および Figure 2.20 にまとめた<sup>18,19</sup>。先述し

たように、両末端は二重鎖乖離による影響を受けやすいため、いくつかのパラメーターでは鎖の中央付近と比較して大きく異なる値を取っていることがわかる。この影響を鑑みて、塩基対パラメーターでは第4塩基対から第8塩基対まで、塩基対間パラメーターとらせんパラメーターでは塩基対間番号3(第3塩基対と第4塩基対の間)から塩基対間番号8(第8塩基対と第9塩基対の間)までを用いることにした(Figure 2.21)。

Table 2.6 各ヌクレオシドの擬回転位相角とパッカリング

Name	塩基番号	擬回転位相角(°)	C3'-endo(%)	C4'-exo(%)	C2'-exo(%)
<b>ON3a</b>	4	10.4 ± 8.0	90.3	0.1	9.6
	5	11.4 ± 8.1	92.0	0.1	7.9
	6	11.2 ± 8.0	91.9	0.1	8.1
	7	11.4 ± 8.0	92.0	0.1	7.9
	8	10.8 ± 8.1	91.0	0.1	8.9
<b>ON3f</b>	4	10.4 ± 8.0	90.4	0.1	9.5
	5	11.8 ± 8.2	92.4	0.2	7.4
	6	11.4 ± 8.1	91.8	0.1	8.1
	7	11.2 ± 8.1	91.6	0.1	8.3
	8	10.8 ± 8.1	90.9	0.1	9.0

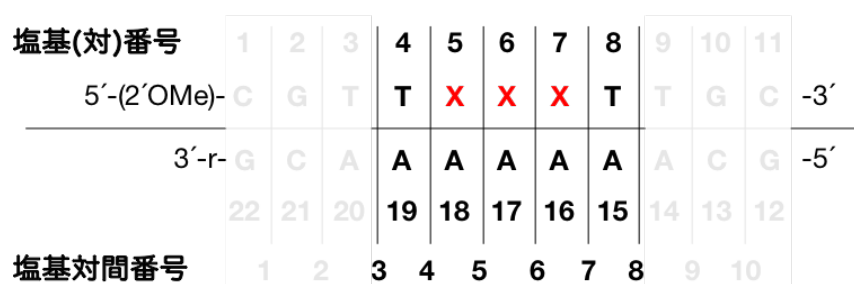


Figure 2.21 解析に用いた塩基対

各パラメーターを比較したところ、ON3a と ON3f で大きく差異が見られたパラメーターは存在しなかった。すなわち、MCE 修飾を導入した場合と OcCE 修飾を導入した場合では、局所的な構造にも差異がほとんど無いことが明らかになった。詳細なデータは実験編に記載する。

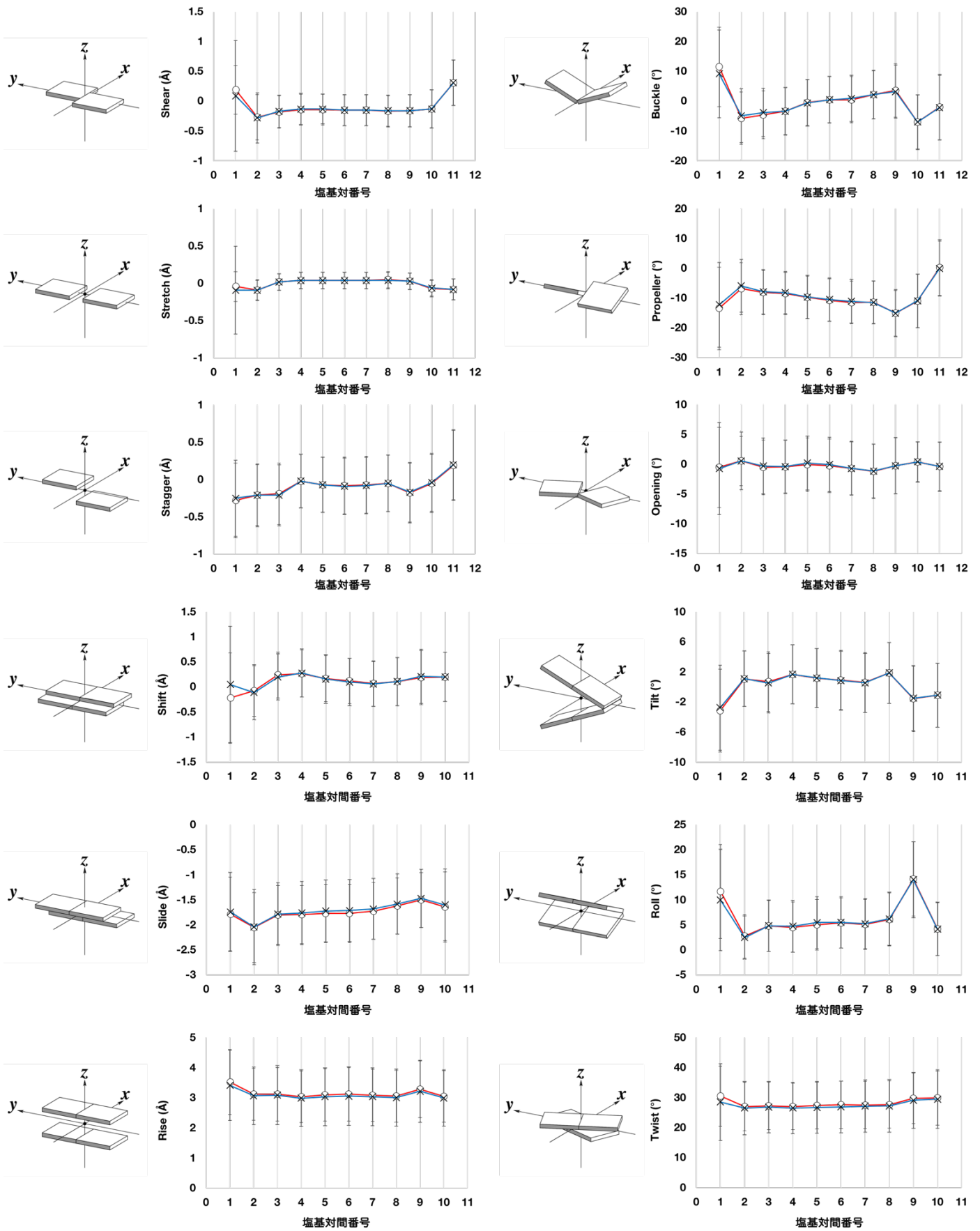


Figure 2.19 塩基対パラメーターおよび塩基対間パラメーター(概念図は ref 15 より)

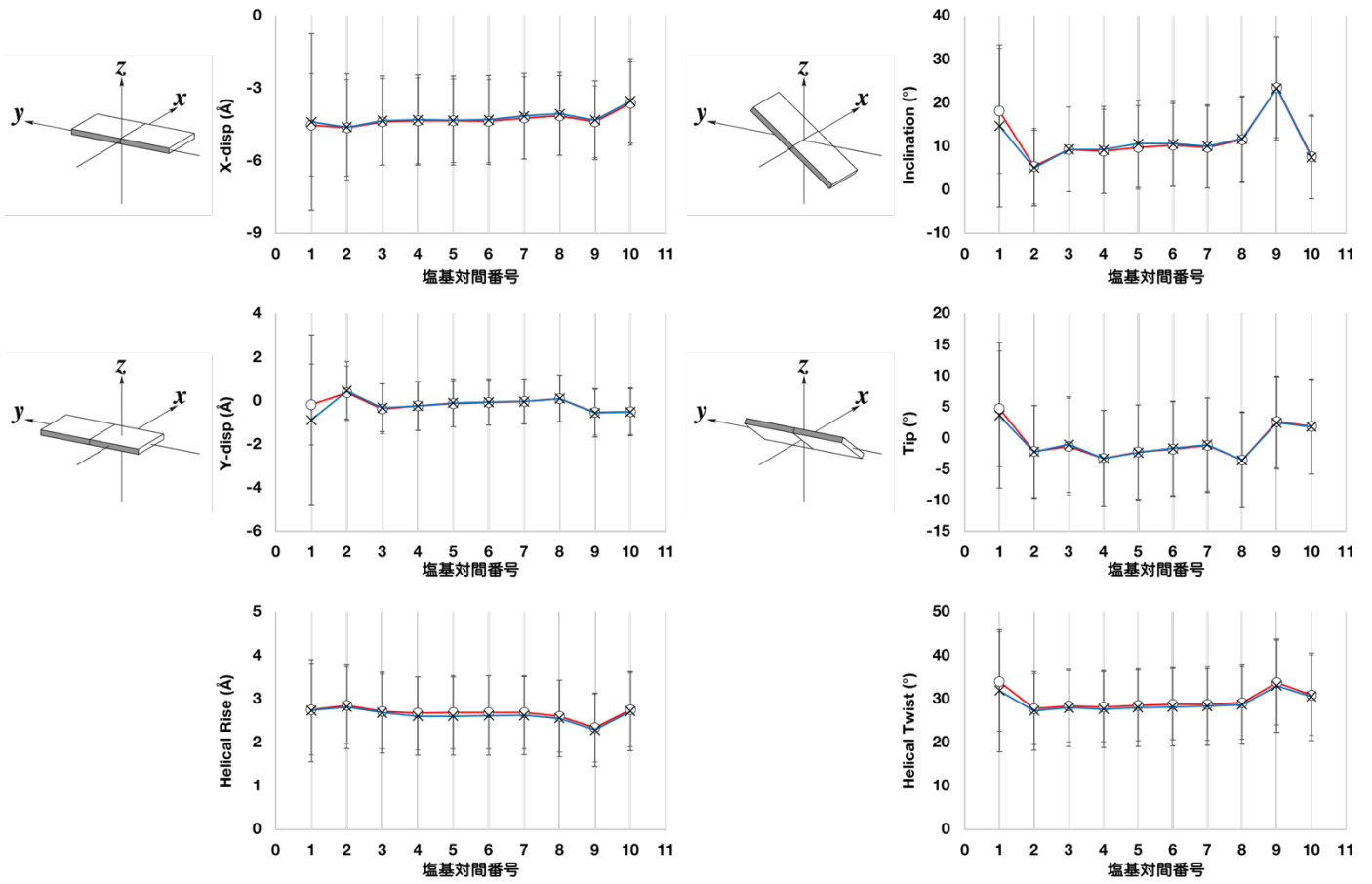


Figure 2.20 らせんパラメーター(概念図は ref 15 より)

最後に、ON3fと相補RNAとの二重鎖を200 ns シミュレーションした後の構造を Figure 2.21 に示す。まず、これらの修飾は Figure 2.21 中に赤色で示したメジャーグループ側ではなく、青色で示したマイナーグループ側に突き出しており、核酸塩基部とは相互作用をほとんどしていないことが示唆された。これにより、アルキル基の部分が変化した場合、二重鎖構造から外側へ飛び出た部分の構造が変化するだけになるため、二重鎖の安定性が変化しなかったことが考えられる。しかし、Figure 2.21 の右図のように、外側へ突き出たオクチル基はらせん構造に巻きつくような位置に存在しているため、相補鎖や自身の核酸糖部と疎水性の相互作用をしている可能性がある。したがって、マイナーグループ側を認識するタンパク質と二重鎖の相互作用に影響を与える可能性がある他、三重鎖や四重鎖などのより複雑な立体構造を変化させることも考えられる。

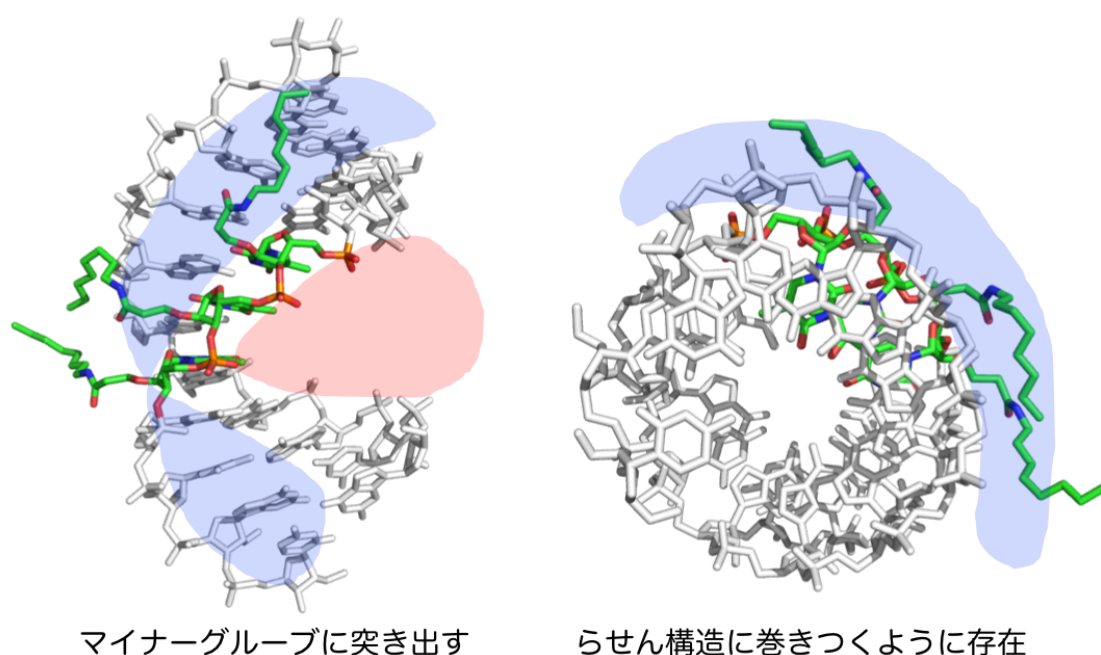


Figure 2.21 水中での ON3f 二重鎖の構造

## 第八節 総括

第二章では、第一章で確立した合成法を用い、種々の直鎖アルキルカルバモイルエチル修飾を持つホスホロアミダイトユニットを合成し、実際にオリゴヌクレオチド中へと導入した。これらの修飾ホスホロアミダイトユニットは、特別な活性化材を用いずとも、

鎖伸長の反応時間を 30 分に延長するだけで容易に導入可能であることがわかった。まず、合成したアルキルカルバモイルエチル型修飾が核酸全体の疎水性に与える影響について評価した。今回合成したオリゴヌクレオチドはいずれも同一の配列を持つにも関わらず、HPLC の保持時間が 13 分台から 39 分台まで幅広く変化した。興味深いことに、2'-O-MCE 修飾と 2'-O-EtCE 修飾を持つオリゴヌクレオチドは 2'-OMe 修飾を持つものよりも疎水性が低下し、保持時間が早まることがわかった。さらに、MiLogP を疎水性の指標とした際、保持時間と MiLogP との間には高い相関があることも明らかになった。このことから、これらの修飾を組み合わせることで、同一の配列を持つオリゴヌクレオチドの疎水性を自在にコントロールできる可能性が示唆された。第一節で述べたように、疎水性のコントロールは核酸医薬品の生体内動態を調節するために重要であると考えられており、本研究で用いたアルキルカルバモイルエチル型修飾は核酸の生体内動態の調節に有用であることが期待される。

また、アルキルカルバモイルエチル型修飾は当初予期していた通り、従来とは異なりかさ高いアルキル基を導入した場合にも高度に二重鎖構造の安定性を保持することが二重鎖融解温度測定より明らかになった。さらなる考察を行なうため、熱力学的パラメーターの測定および CD スペクトルの測定を行なった。熱力学的パラメーターを測定したところ、37 °C における二重鎖形成反応のギブス自由エネルギー変化の値  $\Delta G_{37}$  もほとんど変化していないことが示され、エンタルピー-エントロピー保障が観測された。このような現象が起こる原因としては、二重鎖形成時に取り込まれる水分子の量が変わる事による影響や、疎水性の修飾残基同士および相補鎖との疎水性相互作用の影響などが考えられるが、修飾のかさ高さや修飾パターンとエンタルピーおよびエントロピーの変化の間に一定の傾向が見られなかったことから、複数の要因が複雑に絡み合っていることが予想される。また、CD スペクトルの観測結果から、今回開発した修飾オリゴヌクレオチドは RNA-RNA 二重鎖および RNA-DNA ヘテロ二重鎖などの安定構造として知られる A 型のらせん構造を保つことが示唆された。さらに、MD シミュレーションの結果、アルキルカルバモイルエチル型修飾は二重鎖構造の全体構造および局所構造のどちらも変化させないことがわかった。

また、3'エキソヌクレアーゼであるスネークベノムホスホジエステラーゼを用いて核酸分解酵素耐性を評価したところ、アルキル基のかさ高さに応じて酵素耐性が向上する

という結果が得られた。2'-O-MCE 修飾は核酸医薬品に頻用される 2'-O-MOE 修飾と比較しても高い酵素耐性を持つことが知られているため、今回合成したアルキルカルバモイルエチル型修飾はいずれも実用に耐えうる非常に優れた酵素耐性を持つことがわかった。

以上より、カルバモイルエチル型の修飾を用いることで核酸全体の疎水性や酵素耐性などの物理化学的性質を、二重鎖融解温度を変えずにコントロールできることが示された。また、鎖の中央に導入しても二重鎖融解温度が変化しないことから、配列中の修飾導入位置にも制限がないと言える。従って、カルバモイルエチル型修飾を介して機能性残基を導入し、導入する個数によって機能の強度の調節を行なう、または複数の機能を組み合わせて用いるなど、これまでには不可能だった研究が行えるようになる可能性がある。

## 第二章の引用文献

- (1) Parker, J. *MICROBIOL. REV.* **1989**, *53*, 26.
- (2) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, K.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38* (50), 8735–8738.
- (3) Papargyri, N.; Pontoppidan, M.; Andersen, M. R.; Koch, T.; Hagedorn, P. H. *Mol Ther Nucleic Acids* **2019**, *19*, 706–717.
- (4) Laursen, M. B.; Pakula, M. M.; Gao, S.; Fluiter, K.; Mook, O. R.; Baas, F.; Langklær, N.; Wengel, S. L.; Wengel, J.; Kjems, J.; Bramsen, J. B. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6* (5), 862–870.
- (5) Crooke, S. T.; Wang, S.; Vickers, T. A.; Shen, W.; Liang, X. *Nature Biotechnology* **2017**, *35* (3), 230–237.
- (6) Nikan, M.; Osborn, M. F.; Coles, A. H.; Godinho, B. M.; Hall, L. M.; Haraszti, R. A.; Hassler, M. R.; Echeverria, D.; Aronin, N.; Khvorova, A. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **2016**, *5*, e344.
- (7) Prakash, T. P.; Mullick, A. E.; Lee, R. G.; Yu, J.; Yeh, S. T.; Low, A.; Chappell, A. E.; Østergaard, M. E.; Murray, S.; Gaus, H. J.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (12), 6029–6044.
- (8) Chappell, A. E.; Gaus, H. J.; Berdeja, A.; Gupta, R.; Jo, M.; Prakash, T. P.; Østergaard, M.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48* (8), 4382–4395.
- (9) Prakash, T. P.; Graham, M. J.; Yu, J.; Carty, R.; Low, A.; Chappell, A.; Schmidt, K.; Zhao, C.; Aghajani, M.; Murray, H. F.; Riney, S.; Booten, S. L.; Murray, S. F.; Gaus, H.; Crosby, J.; Lima,

- W. F.; Guo, S.; Monia, B. P.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (13), 8796–8807.
- (10) Iribarren, A. M.; Sproat, B. S.; Neuner, P.; Sulston, I.; Ryder, U.; Lamond, A. I. *PNAS* **1990**, *87* (19), 7747–7751.
- (11) Monia, B. P.; Johnston, J. F.; Sasmor, H.; Cummins, L. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (24), 14533–14540.
- (12) Lesnik, E. A.; Guinosso, C. J.; Kawasaki, A. M.; Sasmor, H.; Zounes, M.; Cummins, L. L.; Ecker, D. J.; Cook, P. D.; Freier, S. M. *Biochemistry* **1993**, *32* (30), 7832–7838.
- (13) logP - octanol-water partition coefficient calculation  
<https://www.molinspiration.com/services/logp.html> (accessed Dec 27, 2020).
- (14) Borer, P. N.; Dengler, B.; Tinoco, I.; Uhlenbeck, O. C. *Journal of Molecular Biology* **1974**, *86* (4), 843–853.
- (15) Kierzek, E.; Mathews, D. H.; Ciesielska, A.; Turner, D. H.; Kierzek, R. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34* (13), 3609–3614.
- (16) Shaw, J. P.; Kent, K.; Bird, J.; Fishback, J.; Froehler, B. *Nucleic Acids Res* **1991**, *19* (4), 747–750.
- (17) Masaki, Y.; Yamamoto, K.; Yoshida, K.; Maruyama, A.; Tomori, T.; Iriyama, Y.; Nakajima, H.; Kanaki, T.; Seio, K. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (19), 4835–4842.
- (18) Lu, X.; Olson, W. K. *Nucleic Acids Research* **2003**, *31* (17), 5108–5121.
- (19) Lu, X.-J.; Olson, W. K. *Nature Protocols* **2008**, *3* (7), 1213–1227.

## 全体総括

核酸医薬品には、用いる核酸の二重鎖構造の安定性の保持と、生体内動態の調節との両立が必要不可欠である。しかしながら、現状これらの性質のどちらか一方だけを変化させることは困難である。こうした状況から、本研究では核酸医薬品のさらなる開発の簡易化を目指すべく、生体内動態と二重鎖構造の安定性とを別個に調節できるような修飾の確立を目指した。そのような修飾として、カルバモイルエチル型の修飾に着目した。

第一章では、カルバモイルエチル型修飾を持つ核酸の効率的な合成法の確立を目指した。初めに、最重要工程であるオキシマイケル付加反応の反応条件を見直し、必要な試薬の当量を4分の1にまで削減することに成功した。アクリル酸エステルは一般的に悪臭が強く毒性も高い化合物であり、使用量の削減は重要な成果の一つである。続いて、カルバモイルエチル型修飾の導入を、従来のエステルに対するアミノリシスではなく、一度カルボン酸体を經由し、縮合剤を用いる経路へと変更することにより、溶媒量必要だったアミンをわずか1.2当量まで削減することに成功した。本手法は、理論上あらゆる第一級、第二級アミンに対して適用可能であり、今後さらなる応用が期待される。また、カルバモイルエチル型修飾の導入からオリゴヌクレオチド合成に必要なホスホロアミダイトユニットへの誘導はわずか一工程であり、三工程から四工程を要していた従来法と比較して迅速にオリゴヌクレオチド合成が可能である。今後は、塩基部の5-メチルシトシンへの変換や、塩基部グアニンでの合成経路の確立を行ない、主要な四塩基全てでの合成を可能にするなどの発展が見込まれる。

第二章では、第一章で確立した合成法を用いて、種々のアルキルカルバモイルエチル修飾を持つ核酸を合成し、その性質を評価した。予期していた通り、これらの修飾は非常にかさ高いにも関わらず、二重鎖融解温度にはほとんど影響を与えないことが明らかになった。また、二重鎖形成によるエンタルピー変化とエントロピー変化が相互の影響を打ち消しあうエンタルピー-エントロピー補償が観測された。エンタルピー変化およびエントロピー変化の傾向とアルキル鎖の長さとの間に明確な相関は見られなかったこ

とから、アルキル側鎖の疎水的相互作用や塩基対形成時の水和状態の変化がかさ高さの変化によるエネルギー的不利を打ち消していると結論付けた。続いて、二重鎖の立体構造に関するさらなる考察のため、CD スペクトルの測定および AMBER を用いた分子動力学シミュレーションを行なった。CD スペクトルはその強度に若干の変化は見られたものの、ピークトップを与える波長には変化は見られず、RNA 二重鎖に見られる A 型らせん構造を取っていることが明らかになった。また、分子動力学シミュレーションの結果から、局所的な糖部のパッキングや塩基対間パラメーターにも変化は見られなかった。したがって、アルキルカルバモイルエチル修飾は核酸の構造に影響を与えないことが示された。なお、分子動力学シミュレーションの結果より、修飾は二重鎖のマイナーグループ側に突き出すように存在し、アルキル側鎖は二重らせんに対して巻きつくように存在していることも明らかになった。このことより、アルキルカルバモイルエチル修飾は、二重鎖構造には影響を与えず、マイナーグループ側を認識するようなタンパク質との相互作用や、三重鎖、四重鎖構造の形成については影響を与える可能性が示唆された。次に、逆相 HPLC の保持時間を用いて核酸の脂溶性を評価したところ、修飾の種類や個数、場所によって核酸全体の疎水性が劇的に変化することが明らかになった。また、保持時間とヌクレオシドの疎水性の指標である MiLogP との間にはある程度の相関が見られたことから、アルキルカルバモイルエチル修飾を用いることによって核酸全体の疎水性をある程度コントロールできる可能性が示された。核酸分子の疎水性のコントロールは核酸の生体内局在と大きく関わるため、核酸医薬品として応用する際には極めて有用な特性であると言える。さらに、3'エキソヌクラーゼである SVPDE-1 に対する酵素耐性も修飾のかさ高さに応じて向上し、いずれの修飾も核酸医薬品として頻用される 2'-O-MOE 修飾と比較しても 3 倍以上の酵素耐性を示したことから、十分実用に耐えうることが明らかになった。

以上より、アルキルカルバモイルエチル修飾核酸は核酸の標的選択性を変化させず、疎水性や酵素耐性などの生体内動態に関わる機能を劇的に変化させることが可能であると示された。また、カルバモイルエチル型修飾が二重鎖の外側に突き出しており、その先にかさ高い残基を修飾しても二重鎖構造には影響しないことも明らかになった。本研究により、カルバモイルエチル型修飾を介してリガンド分子を修飾するなど、さらな

る核酸医薬への応用へ向けた実験への道がひらかれた。

## 実験編

### 一般的な事項

本実験で用いた試薬、機器は以下の通りである。

#### 有機合成試薬、有機溶媒

和光純薬工業株式会社、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:酢酸エチル系、トルエン:酢酸エチル系、ジクロロメタン:メタノール系、ジクロロメタン: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、ヨウ素などを用いた。

#### 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)を使用した。溶出溶媒にはヘキサン:酢酸エチル系、トルエン:酢酸エチル系、ジクロロメタン:メタノール系、ジクロロメタン:酢酸エチル系などを用いた。

#### サイズ排除クロマトグラフィー

LC-9201(日本分析工業)にゲル濾過カラム(JAIGEL GS-310)をつなぎ用いた。溶出溶媒にはジクロロメタンを用いた。

#### <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

Varian 製 AS500 (500 MHz)、クライオプローブを搭載した Bruker 製 biospin・AVANCE III HD500 (500 MHz)または Bruker 製 biospin・AVANCE II (400 MHz)を用いて測定した。測定溶媒としては DMSO-*d*<sub>6</sub> および CDCl<sub>3</sub> を使用し、それぞれの測定溶媒に由来するピ

ークを内部標準とした。(DMSO- $d_6$ : 2.50 ppm, CDCl<sub>3</sub>: 7.26 ppm)

### <sup>13</sup>C-NMR スペクトル

クライオプローブを搭載した Bruker 製 biospin・AVANCE III HD500 (126 MHz)または Bruker 製 biospin・AVANCE II (101 MHz)を用いて測定した。測定溶媒としては CDCl<sub>3</sub> または DMSO- $d_6$  を使用し、測定溶媒に由来するピークを内部標準とした(CDCl<sub>3</sub>: 77.16 ppm, DMSO- $d_6$ : 39.52 ppm)

### <sup>31</sup>P-NMR スペクトル

クライオプローブを搭載した Bruker 製 biospin・AVANCE III HD500 (202 MHz)を用いて測定した。測定溶媒としては CDCl<sub>3</sub> を使用した。また、測定は全て <sup>1</sup>H-デカップリングの条件で行なった。

### DNA/RNA 自動合成機、RNA オリゴマー

ジーンデザイン社製の自動オリゴヌクレオチド合成装置 nS-II8 を用いて行なった。天然型および 2'-OMe 修飾ホスホロアミダイトユニットおよび合成に用いる固相、カップリング剤、酸化剤、デブロッキング溶液は Glen Reserce Inc.より購入し、2'-OMCE ホスホロアミダイトは GeneACT Inc.より購入した。本研究において合成したホスホロアミダイトユニットは脱水ピリジン、脱水トルエンで十分に共沸操作を行なった後、無水アセトニトリルに 0.1 M になるよう溶解して用いた。カップリング剤にはベンジルチオテトラゾール(BTT)のアセトニトリル溶液を用い、カップリング時間はアルキルカルバモイルエチル型修飾を含むアミダイトユニットでは 30 分、2'-OMe 修飾のものでは 6 分、天然型の DNA では 1 分、5'-FAM アミダイトでは 15 分のダブルカップリングとした。酸化剤には 0.02 M ヨウ素溶液(THF-pyridine-H<sub>2</sub>O 70:30:10, v/v/v)を用いた。固相からの切り出しの前にトリエチルアミン-アセトニトリル 1:1 溶液で処理することでリン酸部シアノエチル基の脱保護を行なったのち、28%アンモニア水中 55 °C で 20 時間処理することで切り出しと脱保護を行なった。その後、遠心エバポレーターを用いてアンモニアを除去し、Sep-Pak(Waters 社)を用いて簡易生成をしたのち、RP-HPLC を用いて精製と純度確認を行なった。また、天然型核酸のみからなる RNA オリゴマーは IDT 社か

ら購入した。

### RP-HPLC

RP-HPLC は、JASSO 社の MD4010(PDA 検出器)、PU4580(pump)、CO4060(カラムオーブン)、LCNetII/ADC を接続して用いた。カラムには Waters 社製の XBridge C18 5  $\mu\text{m}$  10  $\times$  250 mm を用いた。カラム温度 30  $^{\circ}\text{C}$  において流速を 1 ml/min、溶出溶媒として 0.03 M 酢酸アンモニウム水溶液にアセトニトリルを加え濃度勾配をかけて流した。

### MALDI-TOF-MS 分析

Bruker 製 UltrafleXtreme を用いて、すずかけ台 OFC に依頼して行なった。

### ESI-TOF-MS 分析

Bruker Daltonics 製 micrOTOF II を用いて、すずかけ台 OFC に依頼して行なった。

### 二重鎖融解温度( $T_m$ 値)の測定

UV-1850 および UV-1900i(共に島津製作所)を用いて測定した。測定は、測定溶媒(100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、10 mM リン酸緩衝溶液(pH = 7.0))に各オリゴヌクレオチドを 2  $\mu\text{M}$  になるように溶解させ、まず 95  $^{\circ}\text{C}$  の状態を 10 分保ち、0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で温度を 5  $^{\circ}\text{C}$  まで高温させたのち、同様に昇温して 1  $^{\circ}\text{C}$  ごとに UV 吸光度を測定した。UV 吸光度を温度に対してプロットした後、インターポレーションによりデータ点を 1000 点へ増やし、Stavitzky-Golay 法(2 次式、101 points)を用いてスムージングをし、微分することで二重鎖融解温度( $T_m$  値)を求めた。

### 熱力学的パラメーターの測定(van't Hoff plot 法)

UV-1850 および UV-1900i(共に島津製作所)を用いて測定した。測定は、測定溶媒に各オリゴヌクレオチドを 10  $\mu\text{M}$  になるように溶解させ、それを測定溶媒を用いて順次希釈することで濃度の異なる 7 種類のオリゴヌクレオチド溶液を作り、先述の方法を用いて  $T_m$  値を決定した。それぞれのオリゴヌクレオチド溶液の濃度は 95  $^{\circ}\text{C}$  における UV 吸光度の比より求めた。得られた  $T_m$  値とオリゴヌクレオチド溶液の濃度  $c$  について、

$T_m^{-1}$  を  $R \ln(c/4)$  に対してプロットし、得られた近似直線の傾きと切片からエンタルピー変化  $\Delta H$  およびエントロピー変化  $\Delta S$  を決定した。さらに、これらの値を用いて 37 °C におけるギブス自由エネルギー変化  $\Delta G_{37}$  を算出した。

#### 熱力学的パラメーターの測定(curve fitting 法)

二重鎖融解温度の測定で得られた  $T_m$  曲線を用いて行なった。まず、得られた  $T_m$  曲線に対し、 $\Delta H = -80 \text{ kcal mol}^{-1}$  および  $\Delta S = -200 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  を初期値としてフィッティングを行なった。続いて、上下の 10%の値を用いてベースラインを作成し、これを用いて乖離度を温度に対してプロットした曲線を得たのち、ベースラインを固定した状態でフィッティングを行ない、 $\Delta H$  と  $\Delta S$  のより良い初期値を探索した。この値を用いて最終的に固定などの制限を無しにフィッティングを行なうことで最終的な  $\Delta H$  および  $\Delta S$  の値を決定した。なお、フィッティング解析用の Python コードの作成は正木 慶昭 助教に依頼した。

#### CD スペクトル測定

日本分光製の J-1100 を用いて測定した。 $T_m$  測定と同じ組成の測定溶媒を用いた。

#### 核酸分解酵素耐性試験

3'エキソヌクラーゼである SVPDE-1 は Worthington Biochemical Corporation より購入した。10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、50 mM トリス塩酸緩衝液(pH = 8.0) 200  $\mu\text{L}$  にオリゴヌクレオチドを 5 pmol 加え、SVPDE-1 を 0.002 Unit 加えた後、37 °C で保持した。反応開始前(0 分)、反応開始後 10 分、30 分、60 分、120 分のタイミングで反応混合液を 2  $\mu\text{L}$  分取し、8  $\mu\text{L}$  のローディングバッファ(10 M 尿素、50 mM EDTA、ブROMOフェノールブルー)の入ったチューブに加え、60 °C で保持することで酵素を失活させ反応を停止した。各サンプルを 20%アクリルアミドゲル(TBE バッファー、7 M 尿素)を用いて 40 W, 55 °C の定温でゲル電気泳動を行なった。泳動後、FAM 基の蛍光検出により完全長オリゴの残存率を定量した。

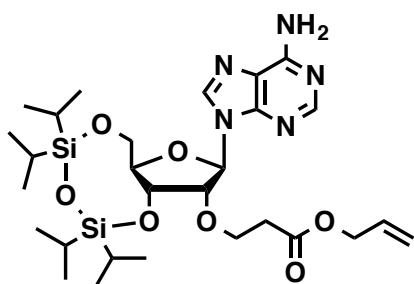
#### 分子動力学シミュレーション

計算には AMBER 16 を用いた。初期構造としては NAB により作成した A 型 RNA 構造の座標を用いた。2'-O-MCE 基および 2'-O-OcCE 基に対する部分電荷は RESP チャージフィッティング法を用いて算出した値を用いた。足りない力場は parm10 力場のパラメーターを用いた。分子動力学シミュレーションに必要なファイルは xleap を用いて作成した。まず、リン酸部のアニオンを中和するための Na<sup>+</sup>を加え、10 Å の周期境界条件を用いて水分子を導入し、初期構造のファイルとした。まず、核酸に 25 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> の位置拘束をかけてエネルギー最小化計算を 1000 サイクル行ない、続いて位置拘束なしで 1000 サイクルの最小化計算を行なった。次に、再び 25 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> の位置拘束をかけて系の温度を 0 K から 300 K まで昇温し(100 ps)、位置拘束を 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 と弱めながら各 50 ps ずつ緩和した後、位置拘束なしで 1 ns 計算を行なった。この系を用いてさらに 200 ns の計算を行ない、各パラメーターの値を 1 ps ずつ記録した。

## 第一章

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。

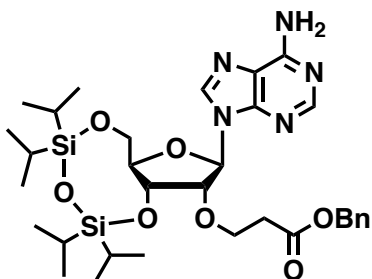
### Synthesis of compound 1-2



**Compound 1-1** (103 mg, 0.2 mmol) was dissolved in *tert*-Butyl alcohol (0.5 ml), then cesium carbonate (150 mg, 0.4 mmol) and allyl acrylate (120  $\mu$ l, 1 mmol) were added into this solution and stirred at ambient temperature for 5 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with water and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -ethyl acetate, and obtained **compound 1-2** (50 mg, 40%) as a colorless gum.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  0.94-1.09 (m, 28H), 2.65 (t, 2H  $J = 7$  Hz), 3.90-3.94 (m, 3H), 4.02-4.10 (m, 2H), 4.49-4.51 (m, 3H), 4.95 (q, 1H  $J = 4.5$  Hz), 5.14 (d, 1H  $J = 10.5$  Hz), 5.25 (d, 1H  $J = 17.5$  Hz), 5.81-5.87 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 7.35 (bs, 2H), 8.07 (s, 1H), 8.19 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.73, 12.88, 13.02, 13.48, 16.96, 17.01, 17.12, 17.16, 17.29, 17.37, 17.39, 17.43, 17.44, 17.51, 17.54, 35.50, 59.96, 65.28, 67.09, 69.67, 81.38, 82.55, 88.68, 118.24, 120.31, 132.18, 139.21, 149.02, 152.40, 155.43, 171.03; ESI-TOF-MS: calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{NaO}_7\text{Si}_2^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  644.2906 found 644.2899

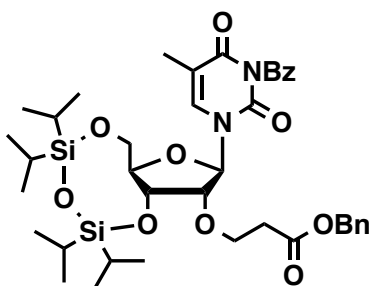
### Synthesis of compound 1-9



**Compound 1-1** (102 mg, 0.2 mmol) was dissolved in *tert*-Butyl alcohol (500  $\mu$ l), then cesium carbonate (130 mg, 0.4 mmol) and benzyl acrylate (153  $\mu$ l, 0.1 mmol) were added into this solution and stirred at ambient temperature for 6 h. The reaction was quenched with sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aq and diluted with ethyl acetate, and washed with water and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, and obtained **compound 1-9** (77 mg, 57%) as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.98-1.10 (m, 28H), 2.69-2.79 (m, 2H), 3.97-4.08 (m, 3H), 4.17-4.26 (m, 3H), 4.86 (dd, 1H  $J = 4.5$  Hz, 9 Hz), 5.14 (s, 2H), 5.53 (bs, 2H), 5.94 (s, 1H), 7.31-7.35 (m, 5H), 8.03 (s, 1H), 8.29 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.76, 12.91, 13.05, 13.50, 16.99, 17.03, 17.14, 17.18, 17.29, 17.31, 17.40, 17.42, 17.45, 17.47, 17.57, 35.61, 59.95, 66.44, 67.15, 69.67, 81.41, 82.57, 88.77, 120.30, 128.27, 128.33, 128.63, 135.97, 139.59, 148.93, 151.57, 154.94, 171.24; ESI-TOF-MS: calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{NaO}_7\text{Si}_2^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  694.3063 found 694.3047

### Synthesis of compound 1-10

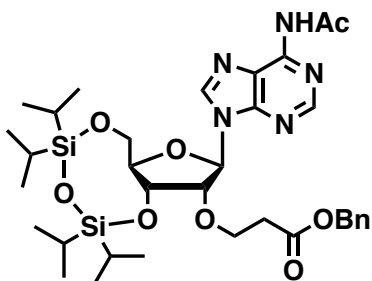


**Compound 1-5** (500 mg, 0.83 mmol) was dissolved in *tert*-Butyl alcohol (2 ml), then cesium carbonate (282 mg, 0.83 mmol) and benzyl acrylate (630  $\mu$ l, 4.13 mmol) were added into this

solution and stirred at ambient temperature for 20 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with water and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-10** (451 mg, 71%) as a colorless gum.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.95-1.13 (m, 28H), 1.95 (s, 3H), 2.57-2.70 (m, 2H) 3.91 (d, 1H J = 4 Hz), 3.94-3.98 (dd, 1H J = 4Hz, 16Hz), 4.05-4.08 (m, 3H), 4.20-4.26 (m, 2H), 5.05-5.11 (dd, 2H J = 12.4 Hz, 14.4 Hz), 5.70 (s, 1H), 7.28-7.32 (m, 5H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.63-7.67 (m, 1H), 7.70 (d, 1H J = 1.6 Hz), 7.91-7.94 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.76, 12.88, 12.95, 13.05, 13.69, 17.05, 17.17, 17.24, 17.36, 17.41, 17.43, 17.55, 17.62, 35.58, 59.44, 66.38, 66.82, 68.43, 81.82, 82.72, 89.48, 110.26, 128.23, 128.30, 128.60, 129.31, 130.69, 131.66, 134.95, 135.25, 136.07, 149.10, 163.10, 169.22, 171.22; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>39</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>10</sub>Si<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 789.3209 found 789.3198

### Synthesis of compound 1-11

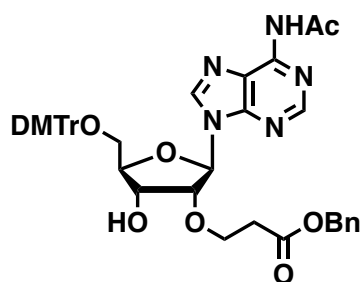


**Compound 1-9** (797 mg, 1.2 mmol) was co-evaporated with dry pyridine for five times and dissolved in pyridine (2.4 ml), then acetyl chloride (135 μl, 1.4 mmol) was added into this solution and stirred at ambient temperature for 3 h. The reaction was quenched with MeOH (3 ml) and concentrated in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-ethyl acetate and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, and obtained **compound 1-11** (568 mg, 67%) as a colorless syrup.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.96-1.07 (m, 28H), 2.24 (s, 3H), 2.69 (t, 2H, 6 Hz), 3.90-3.95 (m, 3H), 4.04-4.12 (m, 2H), 4.58 (d, 1H J = 4.5 Hz), 4.93 (dd, 1H J = 4 Hz, 5 Hz), 5.06 (s,

2H), 6.02 (s, 1H), 7.32 (bs, 5H), 8.47 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 10.75 (bs, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.71, 12.82, 12.98, 13.43, 16.97, 17.08, 17.12, 17.25, 17.29, 17.34, 17.35, 17.50, 25.72, 35.56, 59.87, 66.38, 67.16, 69.69, 81.43, 82.40, 88.84, 122.42, 128.19, 128.27, 128.56, 135.90, 141.73, 149.27, 150.38, 152.37, 170.69, 171.15; ESI-TOF-MS: calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{NaO}_8\text{Si}_2^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  736.3168 found 736.3154

### Synthesis of compound 1-13

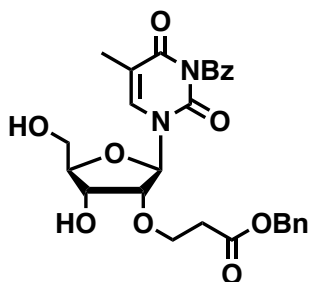


Triethylamine (108  $\mu\text{l}$ , 0.8 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (254  $\mu\text{l}$ , 1.56 mmol) were added to a solution of **compound 1-11** (374 mg, 0.5 mmol) in dry THF (5.2 ml). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The reaction was quenched with triethylethoxysilane (2.4 ml, 15.4 mmol). The mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with dichloromethane-MeOH, and obtained a white powder. After that, the white powder was co-evaporated with dry pyridine for three times and dissolved in dry pyridine (5.2 ml) under an argon atmosphere. Then, 4,4'-dimethoxytrityl chloride (216 mg, 0.6 mmol) was added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 2 h. The reaction was quenched with MeOH (5 ml). The solvent was removed in vacuo and the residue was diluted with ethyl acetate and washed three times with sat.  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, and obtained **compound 1-13** (248 mg, 62% in 2 steps) as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2.25 (s, 3H), 2.62-2.65 (m, 2H), 3.21-3.28 (m, 2H), 3.72 (bs, 6H), 3.76-3.81 (m, 1H), 3.86-3.90 (m, 1H), 4.09 (q, 1H  $J = 4.5$  Hz), 4.45-4.48 (m, 1H), 4.70 (t, 1H  $J = 5$  Hz), 4.99 (dd, 2H  $J = 12.5$  Hz, 21 Hz), 5.24 (d, 1H  $J = 5.5$  Hz), 6.11 (d, 1H  $J = 4.5$  Hz), 6.79-6.84 (m, 4H), 7.17-7.36 (m, 14H), 8.56 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 10.72 (bs, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  24.35, 34.46, 55.00, 63.49, 65.43, 65.69, 69.00, 69.10, 80.39, 83.52, 85.50, 86.18, 113.11, 123.62, 126.65, 127.66, 127.76, 127.78, 127.92, 128.35, 129.68, 135.42, 135.53, 136.00, 142.85, 144.79, 149.62, 151.48, 151.70, 158.03, 158.04, 168.79, 170.90; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>43</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>9</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 796.2953 found 796.2950

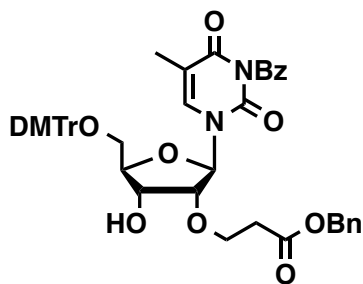
### Synthesis of compound S1-1



Triethylamine (1.1 ml, 7.7 mmol) and triethylamine trihydrofluoride (2.5 ml, 15.4 mmol) were added to a solution of **compound 1-10** (3.94 g, 5.1 mmol) in dry THF (52 ml). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The reaction was quenched with triethylethoxysilane (24 ml, 154 mmol). The mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, and obtained **compound S1-1** (2.35 g, 87%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.94 (d, 1H J = 1 Hz), 2.57-2.62 (m, 1H), 2.70-2.76 (m, 1H), 2.81 (bs, 1H), 3.66 (d, 1H J = 5.5 Hz), 3.85-3.92 (m, 2H), 3.93-3.97 (m, 1H), 4.03-4.05 (m, 1H), 4.23 (bs, 1H), 4.39 (q, 1H J = 5 Hz), 5.15 (dd, 2H J = 12.5 Hz, 16.5 Hz), 5.66 (bs, 1H), 7.31-7.38 (m, 5H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.58 (bs, 1H), 7.63-7.66 (m, 1H), 7.91-7.93 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR(126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  12.67, 34.47, 61.79, 65.62, 67.06, 69.03, 81.01, 85.44, 110.98, 128.56, 128.61, 128.76, 129.30, 130.63, 131.55, 135.28, 135.48, 137.74, 149.55, 162.92, 168.92, 172.42; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>9</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 547.1687 found 547.1681

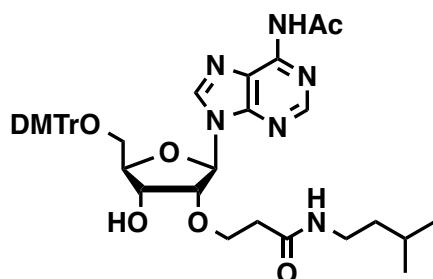
### Synthesis of compound 1-14



**Compound S1-1** (4.3 g, 8.2 mmol) was co-evaporated with dry pyridine for three times and dissolved in dry pyridine (82 ml) under an argon atmosphere. Then, 4,4'-dimethoxytrityl chloride (3.34 g, 9.8 mmol) was added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 2 h. The reaction was quenched with MeOH (10 ml). The solvent was removed in vacuo and the residue was diluted with ethyl acetate and washed three times with sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-14** (5.73 g, 84%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.39 (s, 3H), 2.58-2.77 (m, 2H), 3.46-3.51 (m, 2H), 3.55 (d, 1H J = 11 Hz), 3.81 (s, 6H), 3.93-3.98 (m, 1H), 4.03-4.11 (m, 3H), 4.55 (q, 1H J = 6 Hz), 5.14 (dd, 2H J = 12 Hz, 20.5 Hz), 5.95 (bs, 1H), 6.86-6.88 (m, 4H), 7.28-7.35 (m, 12H), 7.45 (d, 2H J = 9.5 Hz), 7.49 (t, 2H J = 7.5 Hz), 7.64 (t, 1H J = 7.5 Hz), 7.81 (s, 1H), 7.94 (d, 2H J = 7.5 Hz); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.93, 34.56, 55.36, 62.03, 66.00, 66.94, 69.01, 82.56, 83.63, 87.01, 87.98, 111.05, 113.43, 127.28, 128.15, 128.28, 128.51, 128.52, 128.70, 129.24, 130.21, 130.23, 130.62, 131.63, 135.17, 135.27, 135.36, 135.50, 135.52, 144.41, 149.42, 158.82, 158.85, 162.98, 169.12, 172.15; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>48</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>11</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 849.2994 found 849.2968

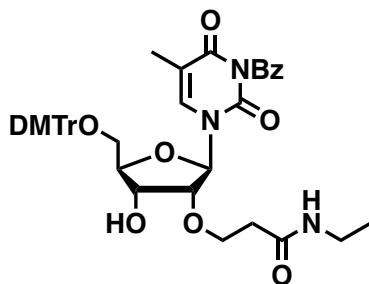
### Synthesis of compound 1-16



**Compound 1-13** (155 mg, 0.2 mmol) was dissolved in dry MeOH (2 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (34 mg) was dispersed into dry MeOH (10 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. After that, the residue was dissolved in MeOH (2 ml), *i*-AmNH<sub>2</sub> (26  $\mu$ l, 0.22 mmol) and DMT-MM (61 mg, 0.22 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 17 h. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, and obtained **compound 1-16** (70 mg, 47%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.83 (dd, 6H J = 2 Hz, 6.5 Hz), (q, 2H J = 7 Hz), 1.49-1.55 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.33-2.36 (m, 2H), 3.01 (q, 2H J = 6.5 Hz), 3.21-3.29 (m, 2H), 3.69-3.73 (m, 7H), 3.81-3.85 (m, 1H), 4.09 (q, 1H J = 5 Hz), 4.50 (q, 1H J = 5 Hz), 4.71 (t, 1H J = 5 Hz), 5.38 (d, 1H J = 5.5 Hz), 6.10 (d, 1H J = 5 Hz), 6.81-6.85 (m, 4H), 7.18-7.27 (m, 7H), 7.35-7.37 (m, 2H), 7.85 (t, 1H J = 5.5 Hz), 8.58 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 10.73 (bs, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  22.31, 24.34, 25.09, 35.56, 36.70, 37.96, 55.00, 63.57, 66.05, 69.11, 69.20, 80.13, 83.64, 85.52, 86.05, 112.76, 113.12, 123.67, 126.65, 127.65, 127.77, 129.67, 135.42, 135.53, 142.89, 144.78, 149.66, 151.55, 151.71, 158.03, 158.04, 168.83, 170.13; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>41</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>8</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 775.3426 found 775.3416

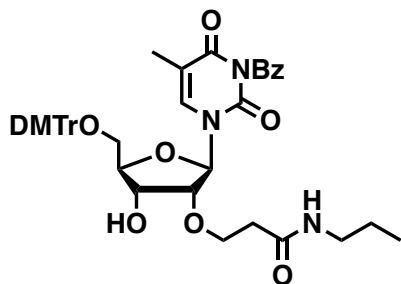
### Synthesis of compound 1-17



**Compound 1-14** (515 mg, 0.6 mmol) was dissolved in dry MeOH (20 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (115 mg) was dispersed into dry MeOH (10 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. After that, 2 M of EtNH<sub>2</sub> solution in THF (360  $\mu$ l, 0.72 mmol) and DMT-MM (265 mg, 0.72 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-17** (222 mg, 47%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.07 (t, 3H J = 7.5 Hz), 1.37 (s, 3H), 2.34-2.39 (m, 1H), 2.47-2.53 (m, 1H), 3.20-3.26 (m, 2H), 3.45-3.53 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.83-3.86 (m, 1H), 4.00-4.05 (m, 1H), 4.12-4.16 (m, 2H), 4.61 (t, 1H J = 5 Hz), 5.96 (t, 1H J = 5.5 Hz), 6.00 (d, 1H J = 4.5 Hz), 6.85-6.88 (m, 4H), 7.24-7.27 (m, 1H), 7.30-7.34 (m, 6H), 7.41-7.44 (m, 2H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.62-7.65 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.92-7.95 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.85, 14.69, 34.69, 35.54, 55.40, 62.90, 65.99, 69.61, 82.55, 84.26, 87.19, 87.41, 111.40, 113.48, 127.34, 128.20, 128.30, 129.28, 130.24, 130.26, 130.65, 131.67, 135.22, 135.33, 135.51, 135.55, 144.41, 149.67, 158.87, 158.90, 163.00, 169.31, 171.39; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>43</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 786.2997 found 786.2991

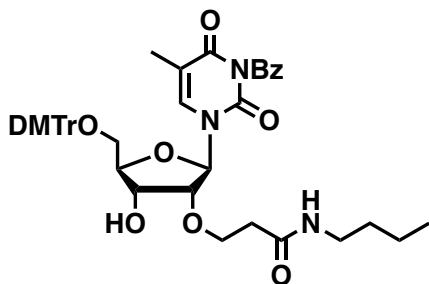
### Synthesis of compound 1-18



**Compound 1-14** (827 mg, 1.0 mmol) was dissolved in dry MeOH (30 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (176 mg) was dispersed into dry MeOH (30 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. After that, *n*-PrNH<sub>2</sub> (99  $\mu$ l, 1.2 mmol) and DMT-MM (426 mg, 1.2 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-18** (532 mg, 68%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.85 (t, 3H J = 7.5 Hz), 1.37 (s, 3H), 1.41-1.48 (m, 2H), 2.35-2.40 (m, 1H), 2.48-2.54 (m, 1H), 3.10-3.21 (m, 2H), 3.45-3.53 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.83-3.86 (m, 1H), 4.00-4.05 (m, 1H), 4.12-4.16 (m, 2H), 4.61 (q, 1H J = 5 Hz), 4.72 (d, 1H J = 5 Hz), 5.98-6.00 (m, 2H), 6.85-6.88 (m, 4H), 7.24-7.27 (m, 1H), 7.30-7.34 (m, 6H), 7.41-7.44 (m, 2H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.62-7.65 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.92-7.94 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.43, 11.84, 22.74, 35.56, 41.42, 55.40, 62.88, 66.03, 69.61, 82.55, 84.24, 87.18, 87.45, 111.37, 113.47, 127.33, 128.19, 128.30, 129.27, 130.23, 130.26, 130.65, 131.67, 135.21, 135.33, 135.51, 135.55, 144.41, 149.66, 158.87, 158.90, 163.00, 169.30, 171.51; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>44</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 800.3153 found 800.3169

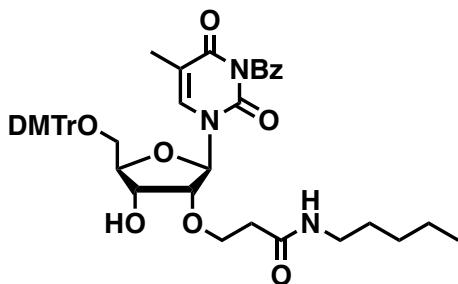
### Synthesis of compound 1-19



**Compound 1-14** (828 mg, 1.0 mmol) was dissolved in dry MeOH (30 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (161 mg) was dispersed into dry MeOH (30 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. After that, *n*-BuNH<sub>2</sub> (118  $\mu$ l, 1.2 mmol) and DMT-MM (424 mg, 1.2 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-19** (510 mg, 64%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.86 (t, 3H J = 7.5 Hz), 1.23-1.31 (m, 2H), 1.36-1.42 (m, 5H), 2.34-2.39 (m, 2H), 2.47-2.53 (m 1H), 3.12-3.25 (m, 2H), 3.45-3.53 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.83-3.86 (m, 1H), 4.00-4.04 (m, 1H), 4.12 (t, 1H J = 5 Hz), 4.14-4.16 (m, 1H), 4.61 (q, 1H J = 4 Hz), 4.72 (bs, 1H), 5.98-6.01 (m, 2H), 6.85-6.88 (m, 4H), 7.24-7.27 (m, 1H), 7.30-7.34 (m, 6H), 7.41-7.44 (m, 2H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.62-7.65 (m, 1H), 7.80 (d, 1H J = 1.5 Hz), 7.92-7.94 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.83, 13.78, 20.09, 31.49, 35.52, 39.53, 55.39, 62.88, 66.02, 69.59, 82.55, 84.24, 87.17, 87.44, 111.36, 113.26, 113.46, 127.32, 128.18, 128.29, 129.24, 129.27, 130.22, 130.25, 130.63, 131.65, 135.21, 135.32, 135.5, 135.55, 144.4, 149.65, 158.86, 158.89, 162.99, 169.29, 171.47; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>45</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 814.3310 found 814.3317

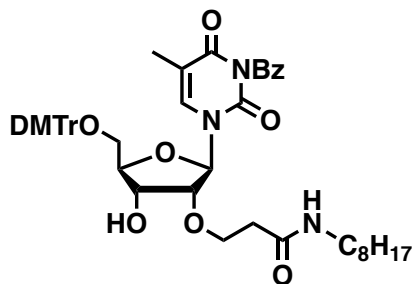
### Synthesis of compound 1-20



**Compound 1-14** (826 mg, 1.0 mmol) was dissolved in dry MeOH (30 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (162 mg) was dispersed into dry MeOH (30 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. After that, *n*-AmNH<sub>2</sub> (139  $\mu$ l, 1.2 mmol) and DMT-MM (414 mg, 1.2 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-20** (514 mg, 64%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.84 (t, 3H J = 7.5 Hz), 1.18-1.30 (m, 4H), 1.38-1.45 (m, 5H), 2.33-2.38 (m, 1H), 2.47-2.53 (m, 1H), 3.09-3.24 (m, 2H), 3.45-3.53 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.82-3.85 (m, 1H), 4.00-4.04 (m, 1H), 4.12-4.16 (m, 2H), 4.62 (q, 1H J = 5 Hz), 4.81 (d, 1H J = 5 Hz), 6.01 (d, 1H J = 4.5 Hz), 6.03 (t, 1H J = 5.5 Hz), 6.85-6.88 (m, 4H), 7.24-7.28 (m, 1H), 7.30-7.34 (m, 6H), 7.42-7.44 (m, 2H), 7.47-7.50 (m, 2H), 7.61-7.65 (m, 1H), 7.80 (d, 1H J = 1.5 Hz), 7.92-7.94 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.82, 14.04, 22.36, 29.08, 29.11, 35.45, 39.80, 55.38, 62.91, 65.97, 69.60, 82.54, 84.26, 87.17, 87.37, 111.37, 113.45, 127.31, 128.18, 128.28, 129.26, 130.21, 130.24, 130.62, 131.65, 135.19, 135.31, 135.49, 135.56, 144.40, 149.65, 158.85, 158.88, 162.98, 169.29, 171.46; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>46</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 828.3467 found 828.3445

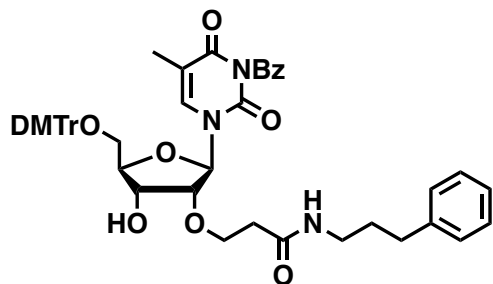
### Synthesis of compound 1-21



**Compound 1-14** (828 mg, 1.0 mmol) was dissolved in dry MeOH (30 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (165 mg) was dispersed into dry MeOH (20 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. After that, *n*-OcNH<sub>2</sub> (199  $\mu$ l, 1.2 mmol) and DMT-MM (428 mg, 1.2 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-21** (365 mg, 43%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.85 (t, 3H J = 7 Hz), 1.23-1.28 (m, 10H), 1.38 (s, 3H), 1.41-1.44 (m, 2H), 2.35-2.39 (m, 1H), 2.48-2.54 (m, 1H), 3.11-3.25 (m, 2H), 3.46-3.53 (m, 2H), 3.81 (s, 6H), 3.83-3.87 (m, 1H), 4.01-4.05 (m, 1H), 4.11-4.15 (m, 2H), 4.61 (q, 1H J = 4.5 Hz), 4.71 (bs, 1H), 5.96 (t, 1H J = 5.5 Hz), 6.00 (d, 1H J = 4 Hz), 6.86 (d, 4H J = 8.5 Hz), 7.24-7.27 (m, 1H), 7.31-7.34 (m, 6H), 7.43 (d, 2H J = 8 Hz), 7.49 (t, 2H J = 7.5 Hz), 7.64 (t, 1H J = 7.5 Hz), 7.80 (s, 1H), 7.94 (d, 2H J = 8 Hz); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  11.84, 14.19, 22.72, 26.99, 29.28, 29.30, 29.47, 31.87, 35.54, 39.88, 55.39, 62.84, 66.02, 69.58, 82.56, 84.23, 87.17, 87.47, 111.35, 113.46, 127.32, 128.18, 128.29, 129.26, 130.23, 130.25, 130.64, 131.67, 135.19, 135.33, 135.51, 135.55, 144.41, 149.64, 158.86, 158.89, 163.00, 169.29, 171.43; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>49</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 870.3936 found 870.3911

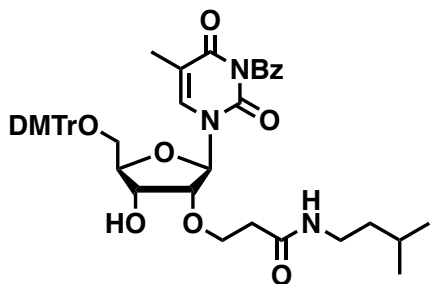
### Synthesiss of compound 1-22



**Compound 1-14** (419 mg, 0.5 mmol) was dissolved in dry MeOH (10 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (94 mg) was dispersed into dry MeOH (20 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. After that, phenylpropylamine (85  $\mu$ l, 0.6 mmol) and DMT-MM (213 mg, 0.6 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through a pad of NH-silica, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-22** (276 mg, 65%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.45 (s, 3H), 1.64-1.70 (m, 2H), 2.40 (t, 2H J = 6 Hz), 2.54-2.55 (m, 2H), 3.03-3.06 (m, 2H), 3.22-3.35 (m, 1H), 3.28-3.29 (m, 1H), 3.75 (s, 6H), 3.83 (t, 2H J = 6 Hz), 3.98-4.00 (m, 1H), 4.15 (t, 1H J = 4.5 Hz), 4.34-4.38 (m, 1H), 5.31 (d, 1H J = 6.5 Hz), 5.79 (d, 1H J = 4 Hz), 6.92-6.95 (m, 4H), 7.13-7.17 (m, 3H), 7.21-7.31 (m, 7H), 7.33-7.36 (m, 2H), 7.41-7.44 (m, 2H), 7.58-7.62 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.77-7.81 (m, 1H), 7.95 (t, 1H J = 5.5 Hz), 7.98-8.00 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  11.75, 30.87, 33.25, 35.55, 39.41, 55.28, 62.70, 66.05, 69.47, 82.50, 84.10, 87.09, 87.51, 111.24, 113.39, 125.94, 127.21, 128.07, 128.22, 128.34, 128.42, 129.15, 130.15, 130.51, 131.65, 135.03, 135.31, 135.38, 135.46, 141.40, 144.34, 149.56, 158.82, 162.86, 169.14, 171.31; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>50</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 876.3467 found 876.3455

### Synthesiss of compound 1-23



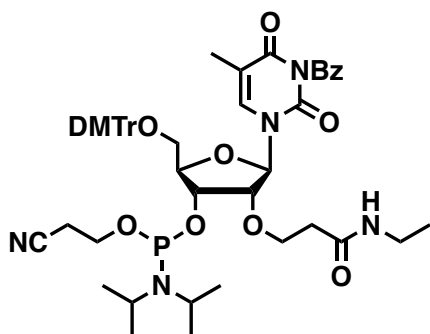
**Compound 1-14** (165 mg, 0.2 mmol) was dissolved in dry MeOH (4 ml) under an argon atmosphere. Pd-C (33 mg) was dispersed into dry MeOH (8 ml) and the solution was added to reaction mixture. The reaction mixture was stirred at ambient temperature under a hydrogen atmosphere for 30 min. Reaction was monitored by checking TLC. After that, *i*-AmNH<sub>2</sub> (28  $\mu$ l, 0.22 mmol) and DMT-MM (88 mg, 0.22 mmol) were added to the solution. The mixture was stirred at ambient temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Cellite, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was diluted with ethyl acetate and washed with 1% citric acid, sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was collected, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 1-23** (93 mg, 55%) as a white powder.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.83 (d, 6H J = 4 Hz), 1.27 (q, 2H J = 7 Hz), 1.48 (s, 3H), 1.50-1.58 (m, 1H), 2.39 (t, 2H J = 6.5 Hz), 3.03-3.07 (m, 2H), 3.25-3.27 (m, 1H), 3.31-3.33 (m, 1H), 3.76 (s, 6H), 3.80-3.85 (m, 2H), 4.00-4.02 (m, 1H), 4.16 (t, 1H J = 4.5 Hz), 4.36 (q, 1H J = 5.5 Hz), 5.32 (d, 1H J = 6.5 Hz), 5.80 (d, 1H J = 4 Hz), 6.93 (dd, 4H J = 1.5 Hz, 9 Hz), 7.25-7.32 (m, 5H), 7.34-7.37 (m, 2H), 7.43-7.45 (m, 2H), 7.59-7.62 (m, 2H), 7.73 (bs, 1H), 7.77-7.81 (m, 1H), 7.87 (t, 1H J = 5.5 Hz), 7.99-8.01 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.64, 22.30, 25.11, 35.70, 36.73, 37.98, 38.00, 55.06, 62.89, 66.24, 68.72, 80.92, 82.99, 85.97, 87.43, 109.43, 113.33, 126.85, 127.71, 128.00, 129.48, 129.77, 130.39, 131.08, 135.12, 135.37, 135.51, 136.41, 144.59, 148.94, 158.20, 158.22, 162.41, 169.49, 170.03, 170.12; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>46</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 828.3467 found 828.3451

## 第二章

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。また、得られたオリゴヌクレオチド関連のデータを示す。

### Synthesis of compound 2-1

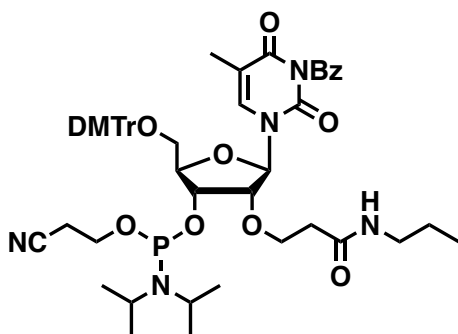


**compound 1-17** (222 mg, 0.29 mmol) was co-evaporated with pyridine and toluene, and dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.9 ml) under an argon atmosphere. *N,N*-Diisopropylethylamine (244  $\mu\text{l}$ , 1.4 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (160  $\mu\text{l}$ , 0.70 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 2-1** (145 mg, 52%) as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.97-1.01 (m, 5H), 1.12-1.17 (m, 10H), 1.32-1.35 (m, 3H), 2.35-2.52 (m, 3H), 2.65 (t, 1H  $J = 6$  Hz), 3.11-3.21 (m, 2H), 3.33-3.40 (m, 1H), 3.50-3.59 (m, 2H), 3.66-3.76 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 7H), 3.92-4.09 (m, 2H), 4.10-4.28 (m, 2H), 4.54-4.64 (m, 1H), 5.92-5.94 (m, 1H), 6.28-6.35 (m, 1H), 6.84-6.88 (m, 4H), 7.27-7.35 (m, 7H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.50 (t, 2H  $J = 7.5$  Hz), 7.65 (t, 1H  $J = 7.5$  Hz), 7.89 (d, 1H  $J = 13.5$  Hz), 7.97 (t, 2H  $J = 6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.82, 11.97, 14.68, 14.75, 20.46, 20.68, 24.64, 24.70, 24.79, 24.85, 34.37, 34.41, 37.29, 37.32, 43.26, 43.35, 43.44, 55.40, 55.45, 57.83, 58.01, 58.19, 58.34, 61.28, 61.63, 67.44, 67.89, 70.11, 70.21, 70.51, 70.62, 81.40, 82.19, 82.90, 87.06, 87.13, 88.97,

89.15, 111.26, 111.36, 113.39, 113.41, 113.43, 117.62, 118.01, 123.88, 127.42, 128.16, 128.48, 128.50, 129.24, 129.27, 130.42, 130.44, 130.77, 131.70, 131.77, 135.20, 135.35, 144.29, 144.36, 149.69, 149.74, 158.97, 163.04, 169.20, 170.85;  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  150.51, 149.85; ESI-TOF-MS: calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{NaO}_{11}\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  986.4076 found 986.4074

### Synthesiss of compound 2-2

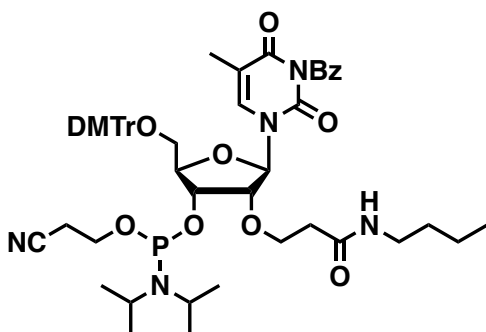


**compound 1-18** (283 mg, 0.36 mmol) was co-evaporated with pyridine and toluene, and dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.6 ml) under an argon atmosphere. *N,N*-Diisopropylethylamine (300  $\mu\text{l}$ , 1.7 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (200  $\mu\text{l}$ , 0.8 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 2-2** (169 mg, 48%) as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.78 (t, 3H  $J = 7.5$  Hz), 0.99 (d, 3H  $J = 6.5$  Hz), 1.13-1.17 (m, 10H), 1.32-1.40 (m, 5H), 2.35-2.44 (m, 3H), 2.65 (t, 1H  $J = 6$  Hz), 3.06-3.12 (m, 2H), 3.33-3.41 (m, 1H), 3.50-3.59 (m, 2H), 3.67-3.76 (m, 2H), 3.79-3.91 (m, 7H), 3.93-4.10 (m, 2H), 4.16-4.28 (m, 2H), 4.55-4.65 (m, 1H), 5.91-5.92 (m, 1H), 6.31-6.40 (m, 1H), 6.83-6.88 (m, 4H), 7.27-7.35 (m, 7H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.49 (t, 2H, 7.5 Hz), 7.64 (t, 1H,  $J = 7.5$  Hz), 7.89 (d, 1H  $J = 10.5$  Hz), 7.97 (t, 2H  $J = 6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.42, 11.79, 11.95, 20.44, 20.50, 20.59, 20.65, 22.70, 22.75, 24.60, 24.66, 24.75, 24.81, 37.23, 37.29, 41.23, 41.28, 43.22, 43.31, 43.41, 55.36, 55.41, 57.78, 57.83, 57.95, 58.01, 58.13, 58.28, 61.21, 61.54, 67.44, 67.51, 67.94,

70.07, 70.11, 70.17, 70.21, 70.45, 70.51, 70.57, 70.62, 81.33 82.12, 82.55, 82.82, 87.01, 87.08, 89.06, 89.24, 111.19, 111.29, 113.35, 113.37, 113.40, 117.62, 117.99, 127.38, 128.13, 128.15, 128.21, 128.45, 129.20, 129.24, 130.39, 130.73, 131.66, 131.72, 135.10, 135.14, 135.16, 135.32, 135.35, 135.37, 144.26, 144.35, 149.65, 149.70, 158.90, 158.93, 163.02, 169.16, 169.18, 170.95, 170.97;  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  150.52, 149.73; ESI-TOF-MS: calcd for  $\text{C}_{53}\text{H}_{64}\text{N}_5\text{NaO}_{11}\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1000.4232 found 1000.4206

### Synthesiss of compound 2-3

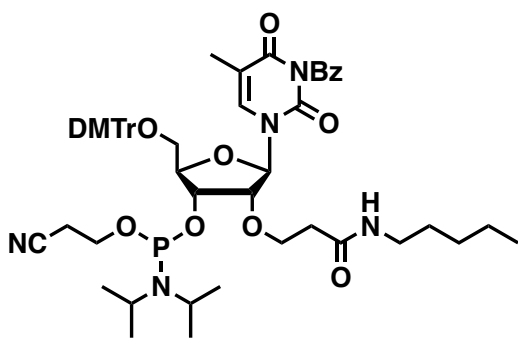


**compound 1-19** (499 mg, 0.63 mmol) was co-evaporated with pyridine and toluene, and dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6.3 ml) under an argon atmosphere. *N,N*-Diisopropylethylamine (530  $\mu\text{l}$ , 3.0 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (340  $\mu\text{l}$ , 1.5 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 2-3** (551 mg, 88%) as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.81 (t, 3H  $J = 7.5$  Hz), 0.99 (d, 3H  $J = 7.5$  Hz), 1.12-1.18 (m, 10H), 1.19-1.26 (m, 2H), 1.31-1.36 (m, 5H), 2.35-2.52 (m, 3H), 2.65 (t, 1H  $J = 6$  Hz), 3.10-3.15 (m, 2H), 3.33-3.41 (m, 1H), 3.51-3.58 (m, 2H), 3.70-3.77 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 7H), 3.93-4.09 (m, 2H), 4.16-4.28 (m, 2H), 4.54-4.65 (m, 1H), 5.91-5.92 (m, 1H), 6.27-6.36 (m, 1H), 6.84-6.88 (m, 4H), 7.27-7.35 (m, 7H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.48-7.51 (m, 2H), 7.63-7.66 (m, 1H), 7.88-7.90 (m, 1H), 7.96-7.98 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.82, 11.98, 13.84, 20.14, 20.47,

20.52, 20.63, 20.68, 24.64, 24.69, 24.78, 24.84, 29.84, 31.54, 31.60, 37.27, 37.33, 39.29, 39.33, 43.25, 43.35, 43.44, 55.40, 55.44, 57.81, 57.98, 58.16, 58.31, 61.24, 61.55, 67.55, 67.58, 67.97, 70.12, 70.21, 70.47, 70.59, 81.36, 82.17, 82.53, 82.83, 87.04, 87.11, 89.10, 89.28, 111.22, 111.32, 113.38, 113.43, 113.58, 117.63, 118.00, 127.41, 128.16, 128.17, 128.24, 128.40, 128.48, 128.53, 129.23, 129.27, 130.35, 130.42, 130.77, 131.70, 131.76, 135.12, 135.15, 135.18, 135.35, 135.38, 135.41, 144.30, 144.38, 149.68, 149.73, 158.93, 158.96, 159.03, 163.05, 169.19, 170.92, 170.94;  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  150.53, 149.73; ESI-TOF-MS: calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{62}\text{N}_{11}\text{NaO}_9\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1014.4389 found 1014.4361

#### Synthesiss of compound 2-4

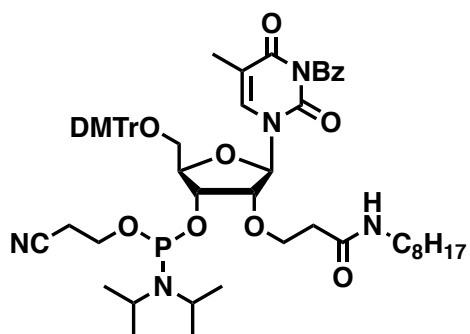


**compound 1-20** (319 mg, 0.40 mmol) was co-evaporated with pyridine and toluene, and dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 ml) under an argon atmosphere. *N,N*-Diisopropylethylamine (340  $\mu\text{l}$ , 1.9 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (210  $\mu\text{l}$ , 1.0 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 2-4** (233 mg, 58%) as a white powder.

$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.80-0.84 (m, 3H), 0.99 (d, 3H  $J = 7$  Hz), 1.12-1.24 (m, 14H), 1.32-1.38 (m, 5H), 2.35-2.53 (m, 3H), 2.65 (t, 1H  $J = 6$  Hz), 3.09-3.14 (m, 2H), 3.33-3.40 (m, 1H), 3.50-3.59 (m, 2H), 3.67-3.76 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 7H), 3.94-4.10 (m, 2H), 4.16-4.28 (m, 2H), 4.54-5.65 (m, 1H), 5.91-5.93 (m, 1H), 6.26-6.36 (m, 1H), 6.83-6.88 (m, 4H), 7.27-7.35 (m,

7H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.50 (t, 2H J = 7.5 Hz), 7.64 (t, 1H J = 7.5 Hz), 7.89 (d, 1H J = 10 Hz), 7.97 (t, 2H J = 6.5 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.82, 11.98, 14.11, 20.62, 20.68, 22.42, 24.64, 24.69, 24.78, 24.84, 29.14, 29.17, 29.24, 37.28, 37.33, 39.58, 39.62, 43.25, 43.34, 43.44, 55.39, 55.44, 57.80, 57.98, 58.16, 58.31, 61.23, 61.56, 67.54, 67.96, 70.10, 70.20, 70.46, 81.39, 82.20, 82.56, 82.82, 87.04, 87.11, 89.08, 89.25, 111.21, 111.32, 113.38, 113.39, 113.42, 113.43, 117.63, 118.00, 127.40, 128.15, 128.17, 128.48, 129.23, 129.26, 130.41, 130.42, 130.77, 131.70, 131.76, 135.12, 135.17, 135.35, 135.38, 135.40, 144.29, 144.37, 149.67, 149.72, 158.93, 158.96, 163.05, 169.19, 170.90, 170.92;  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  150.53; ESI-TOF-MS: calcd for  $\text{C}_{55}\text{H}_{68}\text{N}_5\text{NaO}_{11}\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1028.4545 found 1028.4527

### Synthesiss of compound 2-5



**compound 1-21** (34 mg, 0.04 mmol) was co-evaporated with pyridine and toluene, and dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 ml) under an argon atmosphere. *N,N*-Diisopropylethylamine (17  $\mu\text{l}$ , 0.1 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (11  $\mu\text{l}$ , 0.5 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The organic layer was collected, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuo. After that, the residue was purified with silica gel column chromatography, eluted with hexane-ethyl acetate, and obtained **compound 2-5** (28 mg, 67%) as a white powder.

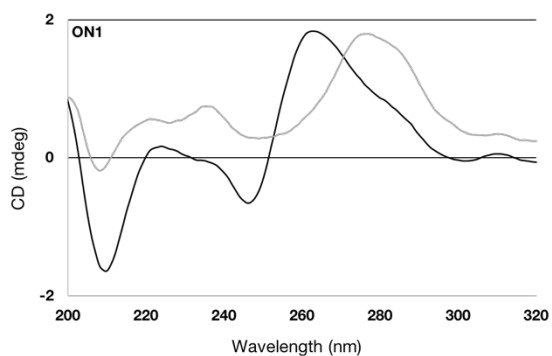
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.84-0.88 (m, 3H), 0.99 (d, 3H J = 6.5 Hz), 1.12-1.27 (m, 20H), 1.31-1.38 (m, 5H), 2.34-2.53 (m, 3H), 2.65 (t, 1H J = 6.5 Hz), 3.09-3.14 (m, 2H), 3.33-3.40 (m, 1H), 3.50-3.58 (m, 2H), 3.67-3.77 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 7H), 3.93-4.10 (m, 2H), 4.55-4.64 (m,

1H), 5.91-5.92 (m, 1H), 6.27-6.37 (m, 1H), 6.83-6.88 (m, 4H), 7.27-7.35 (m, 7H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.49 (t, 2H J = 7.5 Hz), 7.64 (t, 1H J = 7.5 Hz), 7.89 (d, 1H J = 10 Hz), 7.97 (t, 2H J = 6.5 Hz); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.80, 11.96, 14.23, 20.46, 20.51, 20.61, 20.67, 22.77, 24.62, 24.68, 24.77, 24.83, 27.02, 29.34, 29.50, 29.56, 31.93, 37.25, 37.31, 39.61, 39.64, 43.24, 43.33, 43.42, 55.38, 55.42, 55.48, 57.79, 57.96, 58.14, 58.29, 61.18, 61.52, 67.53, 67.95, 70.06, 70.15, 70.42, 70.54, 81.35, 82.18, 82.50, 82.81, 87.02, 87.09, 89.10, 89.26, 111.18, 111.29, 113.36, 113.38, 113.41, 117.62, 118.00, 127.39, 128.14, 128.15, 128.23, 128.46, 129.21, 129.25, 130.40, 130.75, 131.69, 131.75, 135.11, 135.15, 135.33, 135.37, 135.39, 144.28, 144.37, 149.65, 149.70, 158.91, 158.93, 158.94, 163.04, 169.17, 170.89, 170.91; <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 150.53, 149.69; ESI-TOF-MS: calcd for C<sub>58</sub>H<sub>74</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>11</sub>P<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 1070.5015 found 1070.4992

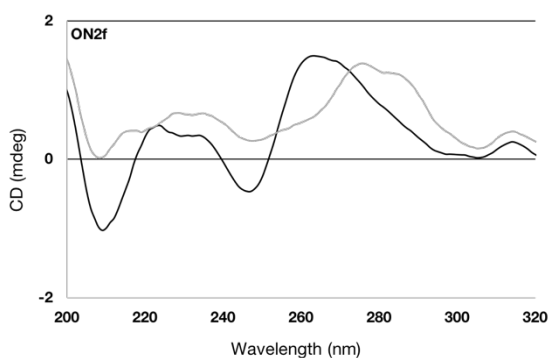
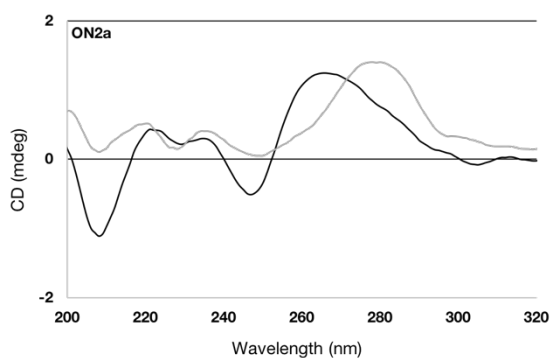
Summary of mass values of synthesized oligonucleotide

Name	Sequence	calcd for [M+H] <sup>+</sup>	found
<b>ON1</b>	3'-(2'-OMe)-CGTTTTTTTGC-5'	3633.7	3634.5
<b>ON2a</b>	3'-(2'-OMe)-CGTTT <b>T<sub>MCE</sub></b> TTTGC-5'	3706.6	3705.7
<b>ON2b</b>	3'-(2'-OMe)-CGTTT <b>T<sub>EtCE</sub></b> TTTGC-5'	3718.7	3719.7
<b>ON2c</b>	3'-(2'-OMe)-CGTTT <b>T<sub>PrCE</sub></b> TTTGC-5'	3732.8	3733.9
<b>ON2d</b>	3'-(2'-OMe)-CGTTT <b>T<sub>BuCE</sub></b> TTTGC-5'	3747.6	3747.6
<b>ON2e</b>	3'-(2'-OMe)-CGTTT <b>T<sub>AmCE</sub></b> TTTGC-5'	3762.7	3761.7
<b>ON2f</b>	3'-(2'-OMe)-CGTTT <b>T<sub>OcCE</sub></b> TTTGC-5'	3804.7	3803.7
<b>ON3a</b>	3'-(2'-OMe)-CGTT <b>T<sub>MCE</sub>T<sub>MCE</sub>T<sub>MCE</sub></b> TTGC-5'	3848.7	3847.7
<b>ON3b</b>	3'-(2'-OMe)-CGTT <b>T<sub>EtCE</sub>T<sub>EtCE</sub>T<sub>EtCE</sub></b> TTGC-5'	3889.8	3889.6
<b>ON3c</b>	3'-(2'-OMe)-CGTT <b>T<sub>PrCE</sub>T<sub>PrCE</sub>T<sub>PrCE</sub></b> TTGC-5'	3931.9	3931.7
<b>ON3d</b>	3'-(2'-OMe)-CGTT <b>T<sub>BuCE</sub>T<sub>BuCE</sub>T<sub>BuCE</sub></b> TTGC-5'	3973.9	3973.7
<b>ON3e</b>	3'-(2'-OMe)-CGTT <b>T<sub>AmCE</sub>T<sub>AmCE</sub>T<sub>AmCE</sub></b> TTGC-5'	4017.0	4015.7
<b>ON3f</b>	3'-(2'-OMe)-CGTT <b>T<sub>OcCE</sub>T<sub>OcCE</sub>T<sub>OcCE</sub></b> TTGC-5'	4143.3	4142.8
<b>ON4a</b>	3'-(2'-OMe)-CG <b>T<sub>MCE</sub>TT<sub>MCE</sub>TT<sub>MCE</sub></b> GC-5'	3848.7	3847.1
<b>ON4b</b>	3'-(2'-OMe)-CG <b>T<sub>EtCE</sub>TT<sub>EtCE</sub>TT<sub>EtCE</sub></b> GC-5'	3889.8	3889.6
<b>ON4c</b>	3'-(2'-OMe)-CG <b>T<sub>PrCE</sub>TT<sub>PrCE</sub>TT<sub>PrCE</sub></b> GC-5'	3931.9	3931.9
<b>ON4d</b>	3'-(2'-OMe)-CG <b>T<sub>BuCE</sub>TT<sub>BuCE</sub>TT<sub>BuCE</sub></b> GC-5'	3973.9	3973.8
<b>ON4e</b>	3'-(2'-OMe)-CG <b>T<sub>AmCE</sub>TT<sub>AmCE</sub>TT<sub>AmCE</sub></b> GC-5'	4017.0	4015.8
<b>ON4f</b>	3'-(2'-OMe)-CG <b>T<sub>OcCE</sub>TT<sub>OcCE</sub>TT<sub>OcCE</sub></b> GC-5'	4143.3	4142.7
<b>ON5a</b>	3'-t <b>T<sub>MCE</sub></b> ttttttt-FAM-5'	3617.7	3618.5
<b>ON5b</b>	3'-t <b>T<sub>EtCE</sub></b> ttttttt-FAM-5'	3661.7	3663.8
<b>ON5c</b>	3'-t <b>T<sub>PrCE</sub></b> ttttttt-FAM-5'	3675.7	3677.8
<b>ON5d</b>	3'-t <b>T<sub>BuCE</sub></b> ttttttt-FAM-5'	3659.7	3661.9
<b>ON5e</b>	3'-t <b>T<sub>AmCE</sub></b> ttttttt-FAM-5'	3703.8	3705.8
<b>ON5f</b>	3'-t <b>T<sub>OcCE</sub></b> ttttttt-FAM-5'	3715.8	3717.6

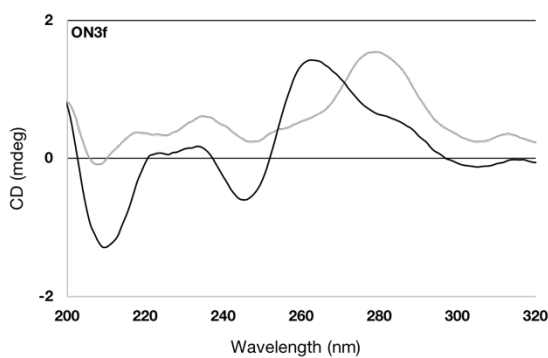
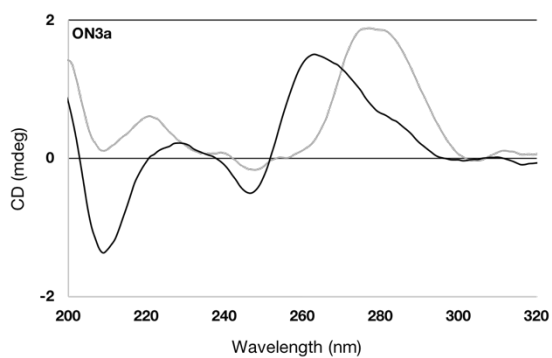
Observed CD spectrum of **ON1** (Gray: single strand/Black: double strand)



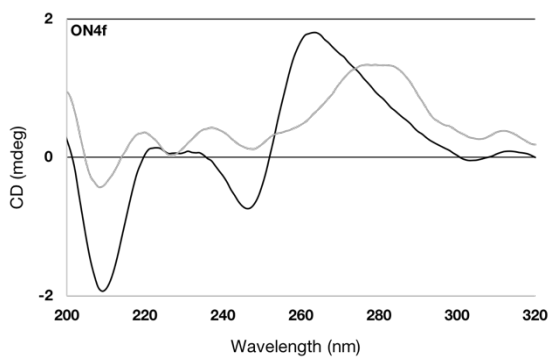
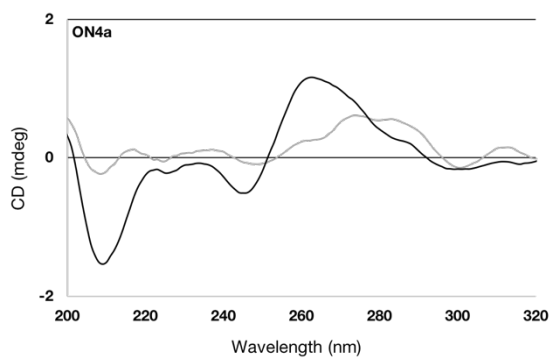
Observed CD spectra of **ON2a** and **ON2f** (Gray: single strand/Black: double strand)



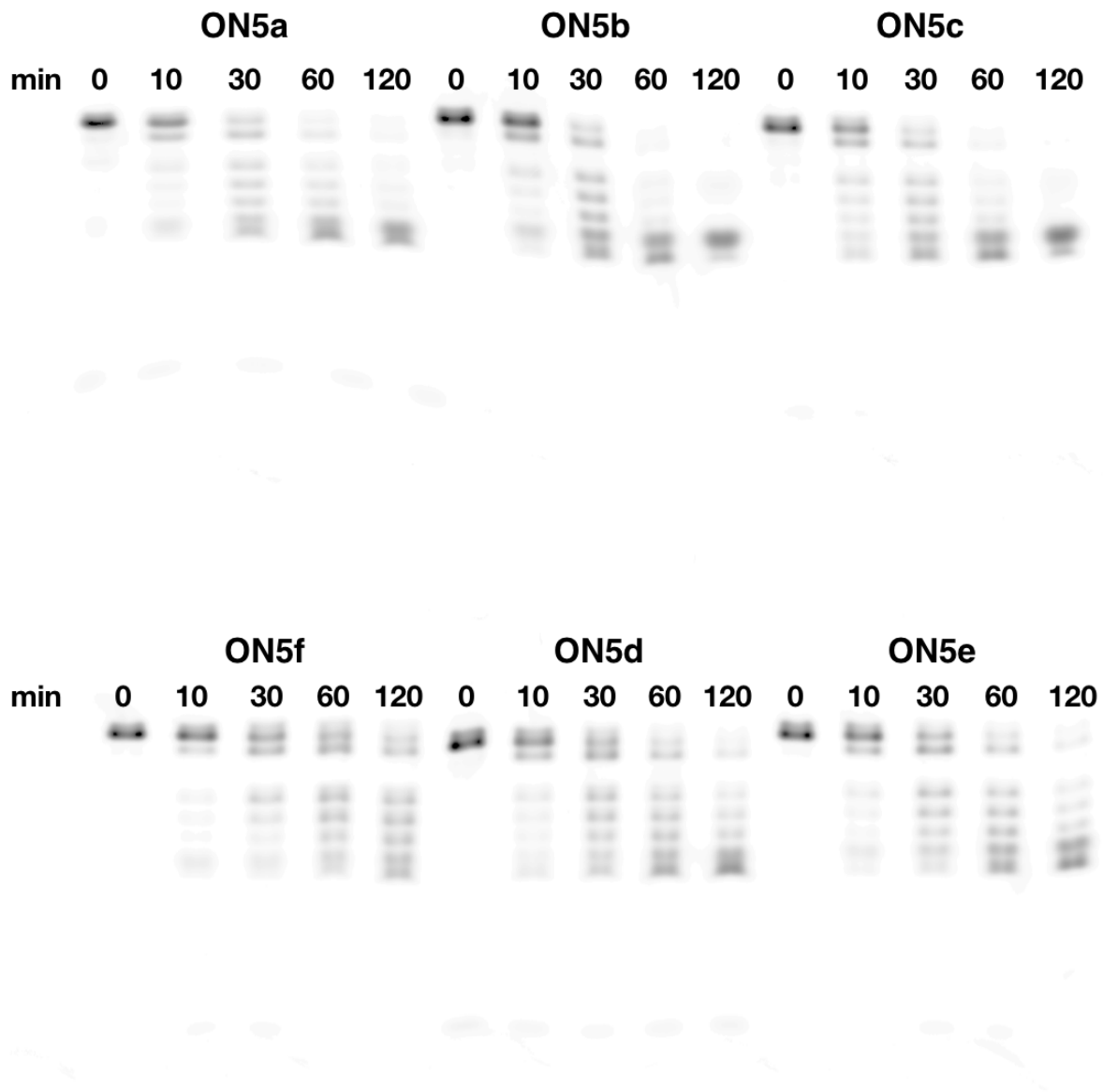
Observed CD spectra of **ON3a** and **ON3f** (Gray: single strand/Black: double strand)



Observed CD spectra of **ON4a** and **ON4f** (Gray: single strand/Black: double strand)

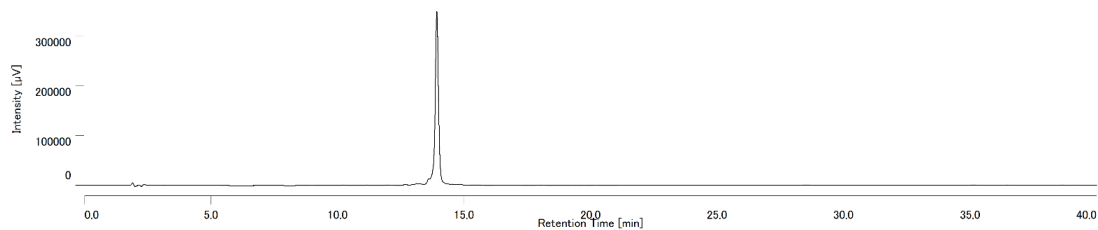


Native PAGE of ON5a, ON5b, ON5c, ON5d, ON5e and ON5f

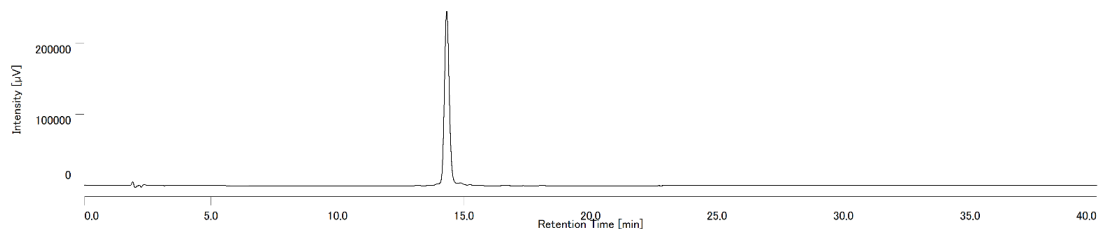


HPLC conditions: 1 ml/min, a linear gradient (0-40%) of solvent B in solvent A. A: 0.03M NH<sub>4</sub>OAc buffer, B: MeCN

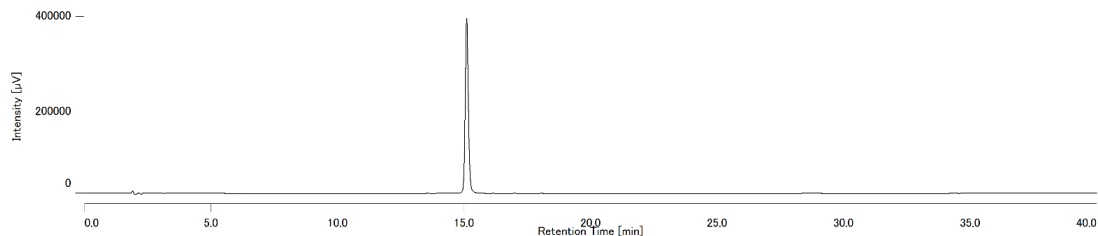
**ON2a:** 3'-(2'-OMe)-CGTTTT<sub>MCE</sub>TTTGC-5' (PDA = 254 nm)



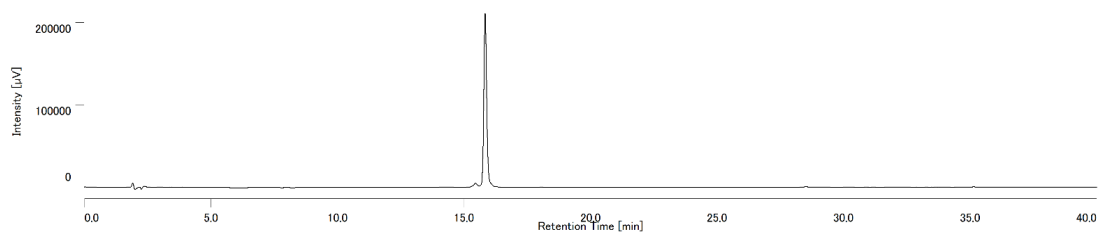
**ON2b:** 3'-(2'-OMe)-CGTTTT<sub>EiCE</sub>TTTGC-5' (PDA = 254 nm)



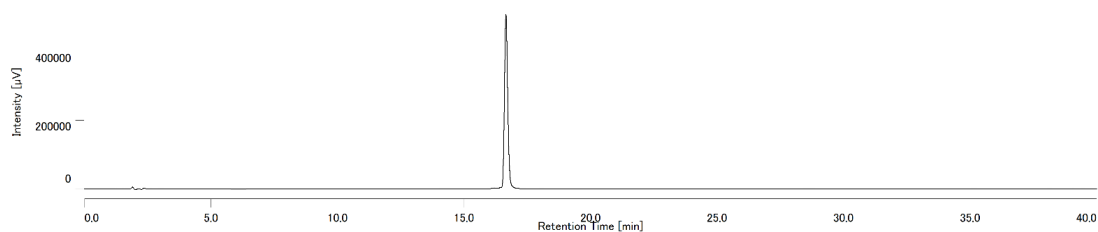
**ON2c:** 3'-(2'-OMe)-CGTTTT<sub>PrCE</sub>TTTGC-5' (PDA = 254 nm)



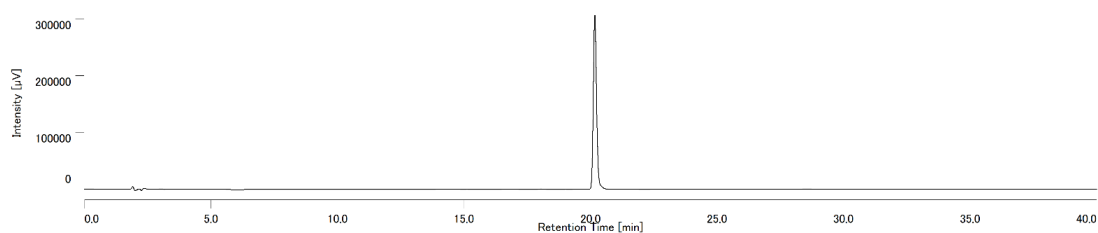
**ON2d:** 3'-(2'-OMe)-CGTTTT<sub>BuCE</sub>TTTGC-5' (PDA = 254 nm)



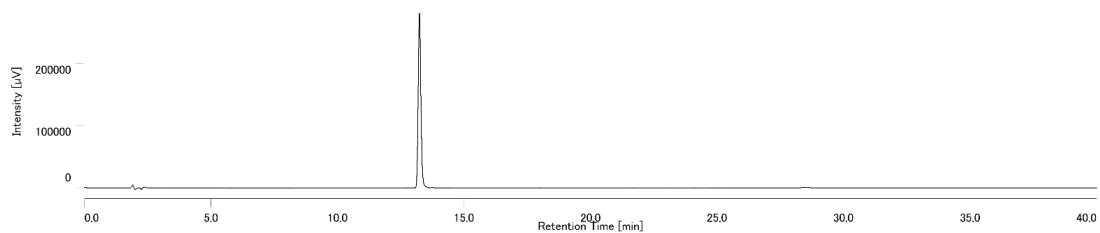
**ON2e:** 3'-(2'-OMe)-CGTTTT<sub>AmCE</sub>TTTGC-5' (PDA = 254 nm)



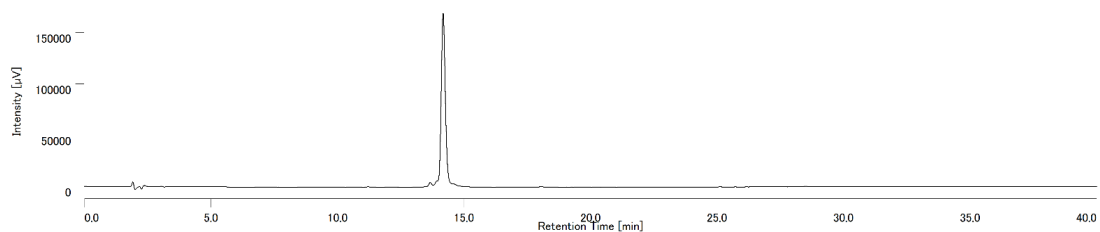
**ON2f:** 3'-(2'-OMe)-CGTTTT<sub>OcCE</sub>TTTGC-5' (PDA = 254 nm)



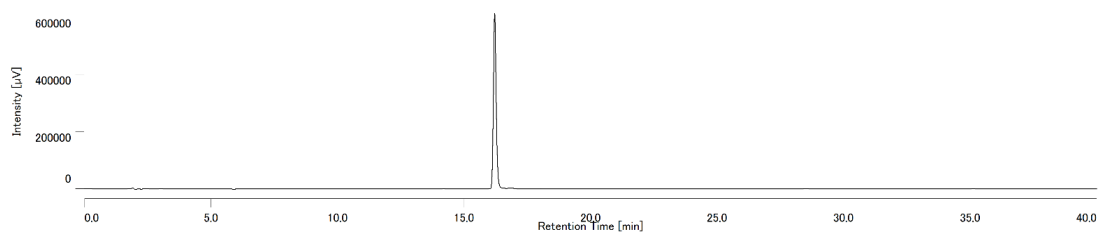
**ON3a:**3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>MCE</sub>T<sub>MCE</sub>T<sub>MCE</sub>TTGC-5' (PDA = 254 nm)



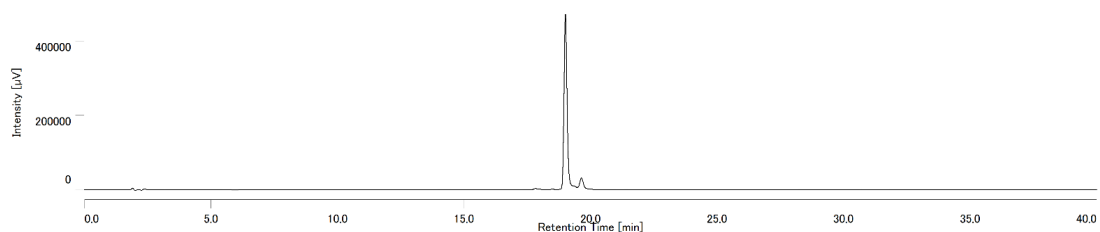
**ON3b:**3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>EiCE</sub>T<sub>EiCE</sub>T<sub>EiCE</sub>TTGC-5' (PDA = 254 nm)



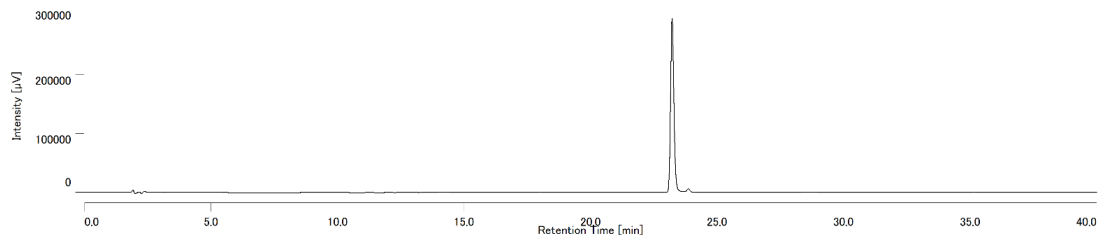
**ON3c:**3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>PrCE</sub>T<sub>PrCE</sub>T<sub>PrCE</sub>TTGC-5' (PDA = 254 nm)



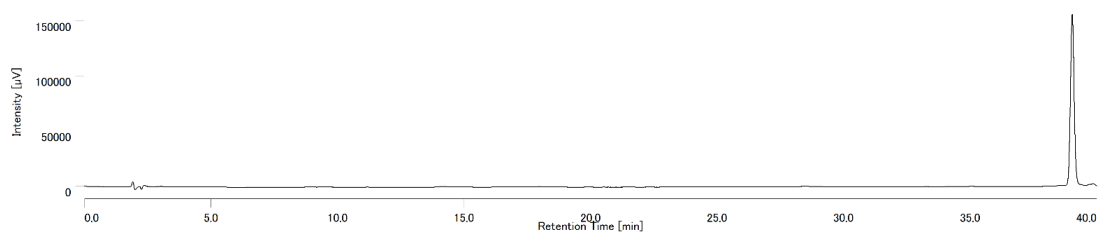
**ON3d:**3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>BuCE</sub>T<sub>BuCE</sub>T<sub>BuCE</sub>TTGC-5' (PDA = 254 nm)



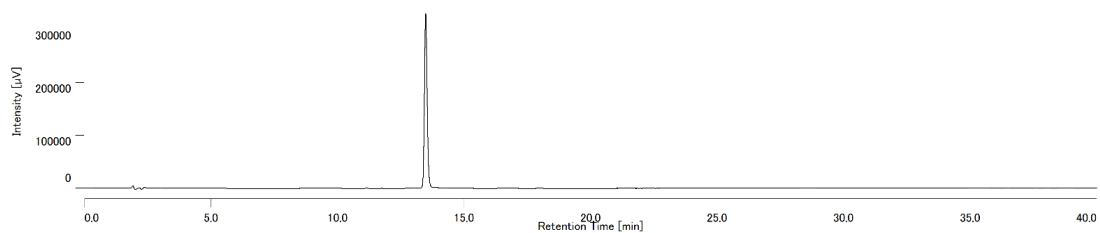
**ON3e:**3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>AmCE</sub>T<sub>AmCE</sub>T<sub>AmCE</sub>TTGC-5' (PDA = 254 nm)



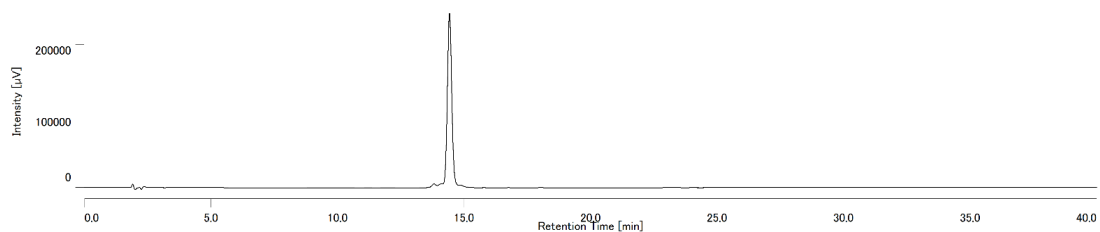
**ON3f:**3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>OcCE</sub>T<sub>OcCE</sub>T<sub>OcCE</sub>TTGC-5' (PDA = 254 nm)



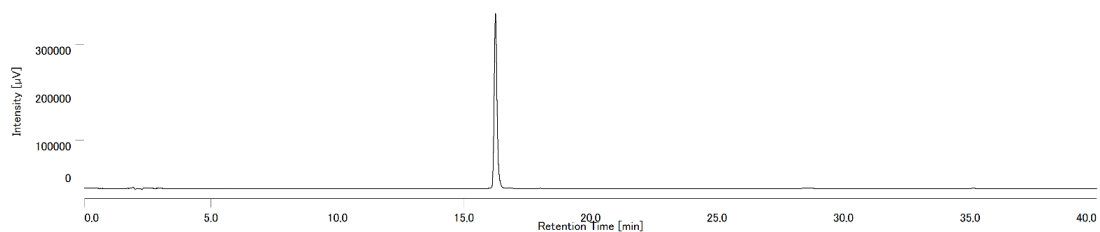
**ON4a:**3'-(2'-OMe)-CGT<sub>MCE</sub>TTT<sub>MCE</sub>TTT<sub>MCE</sub>GC-5' (PDA = 254 nm)



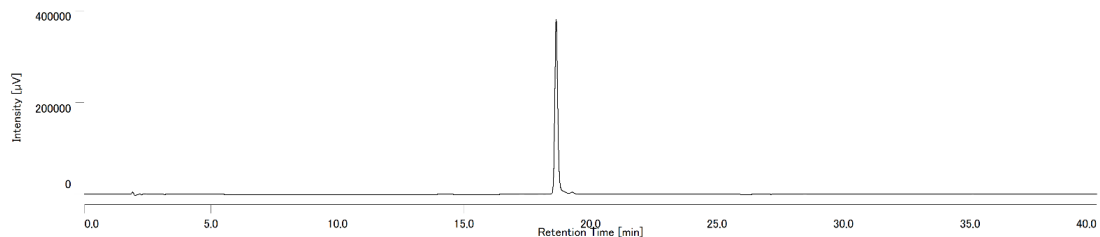
**ON4b:**3'-(2'-OMe)-CGT<sub>EtCE</sub>TTT<sub>EtCE</sub>TTT<sub>EtCE</sub>GC-5' (PDA = 254 nm)



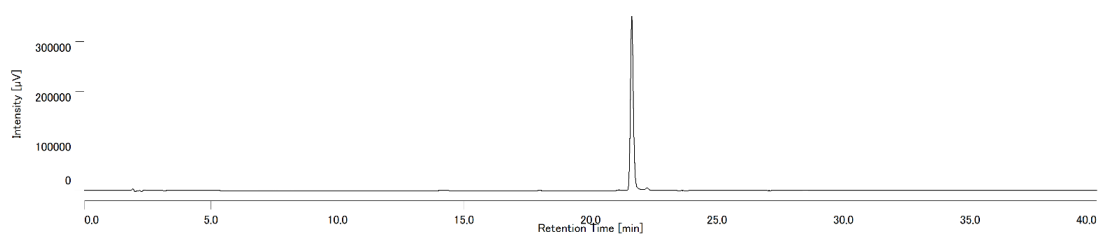
**ON4c:**3'-(2'-OMe)-CGT<sub>PrCE</sub>TTT<sub>PrCE</sub>TTT<sub>PrCE</sub>GC-5' (PDA = 254 nm)



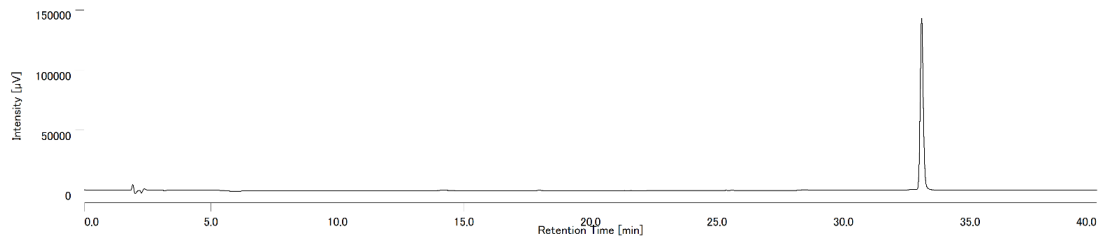
**ON4d:**3'-(2'-OMe)-CGT<sub>BuCE</sub>TTT<sub>BuCE</sub>TTT<sub>BuCE</sub>GC-5' (PDA = 254 nm)



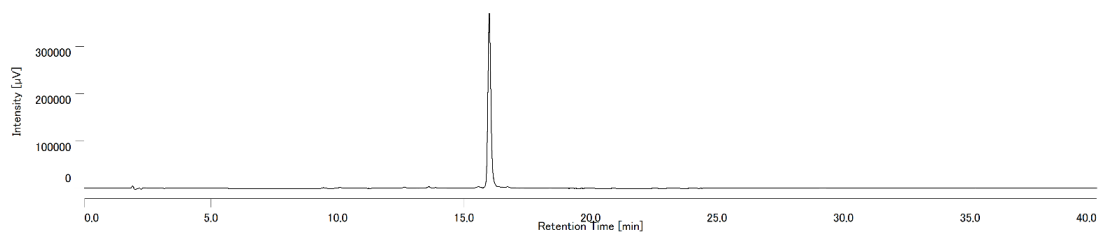
**ON4e:**3'-(2'-OMe)-CGT<sub>AmCE</sub>TTT<sub>AmCE</sub>TTT<sub>AmCE</sub>GC-5' (PDA = 254 nm)



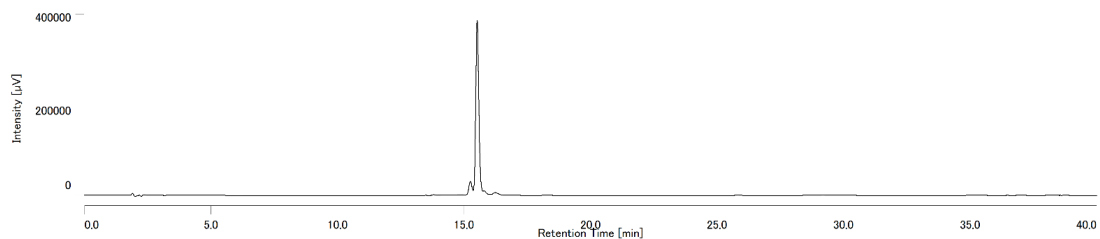
**ON4f:**3'-(2'-OMe)-CGT<sub>OcCE</sub>TTT<sub>OcCE</sub>TTT<sub>OcCE</sub>GC-5' (PDA = 254 nm)



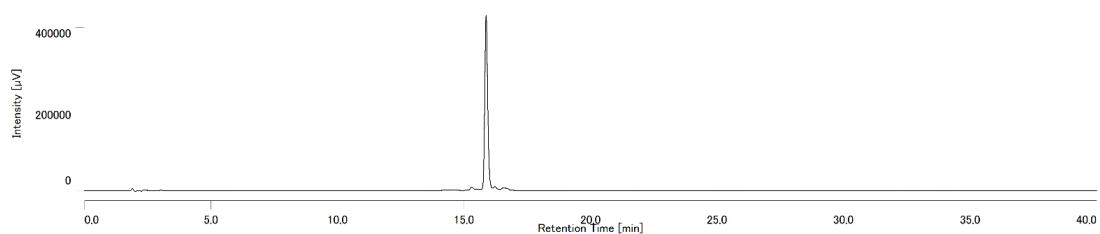
**ON5a:**3'-t<sub>MCE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 254 nm)



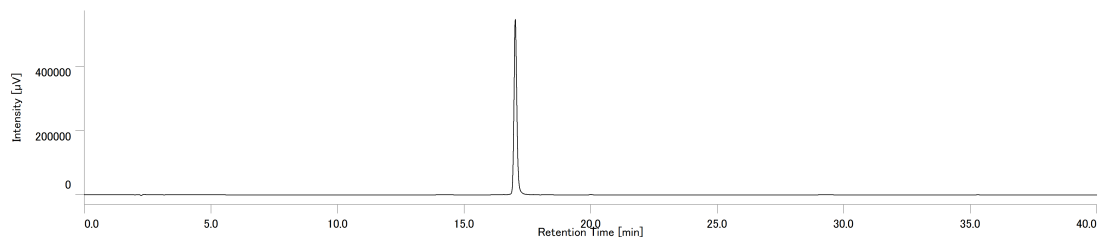
**ON5b:**3'-t<sub>EICE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 254 nm)



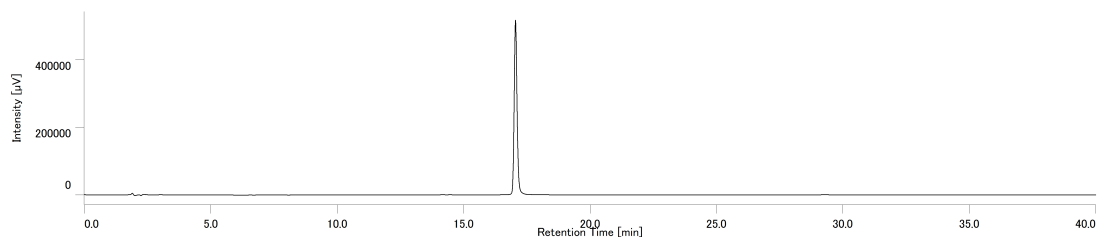
**ON5c:**3'-t<sub>PrICE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 254 nm)



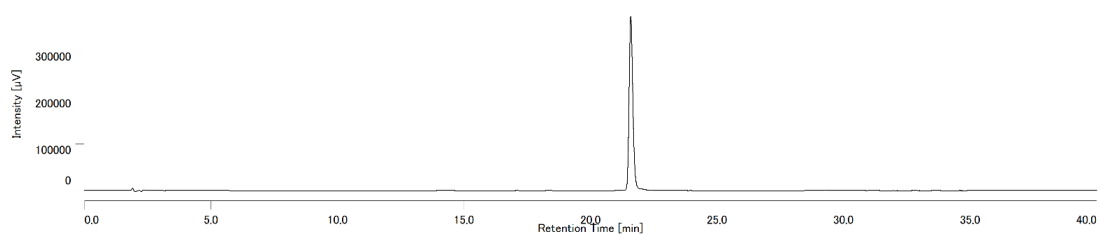
**ON5d:**3'-t<sub>BuICE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 254 nm)



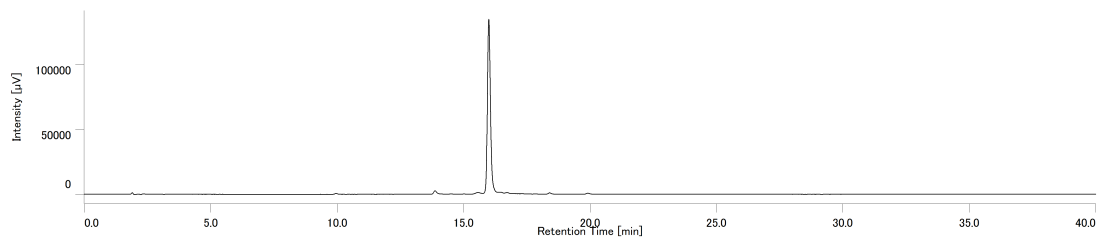
**ON5e:**3'-t<sub>AmICE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 254 nm)



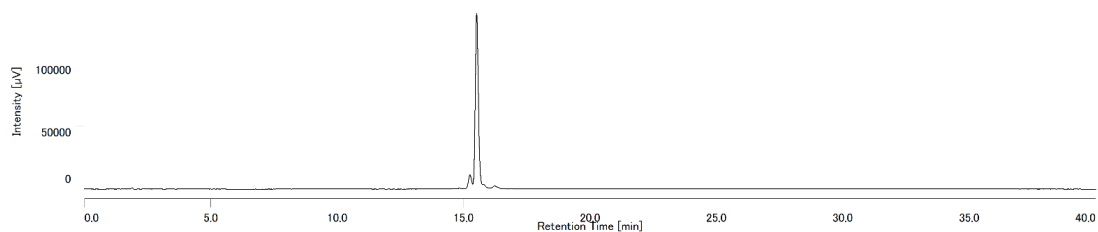
**ON5f:**3'-t<sub>OICE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 254 nm)



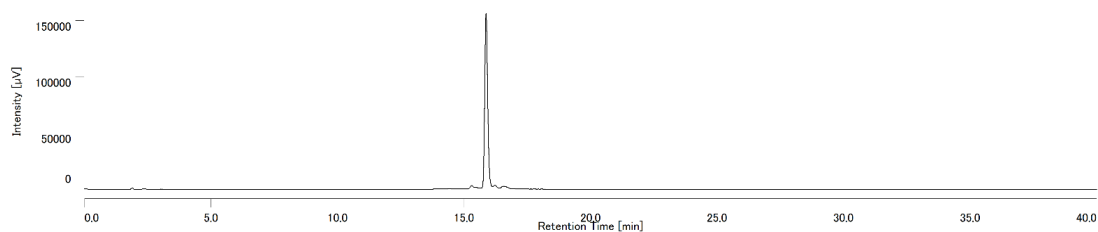
**ON5a:**3'-t<sub>MCE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 500 nm)



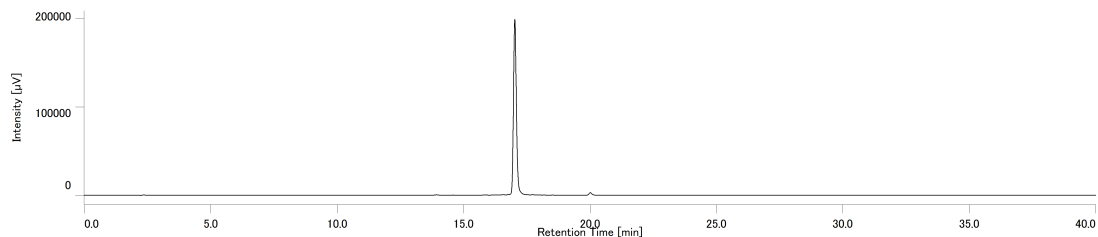
**ON5b:**3'-t<sub>EiCE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 500 nm)



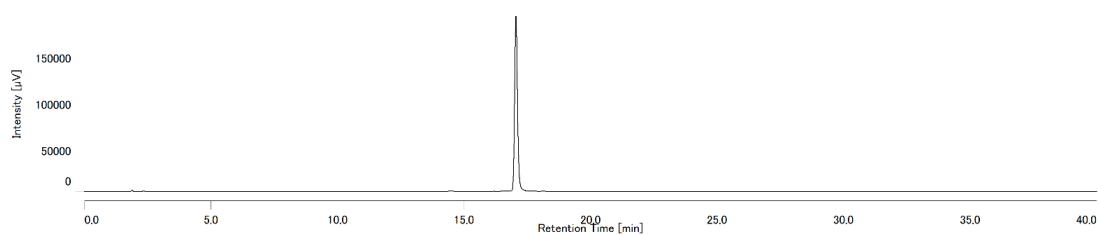
**ON5c:**3'-t<sub>PrCE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 500 nm)



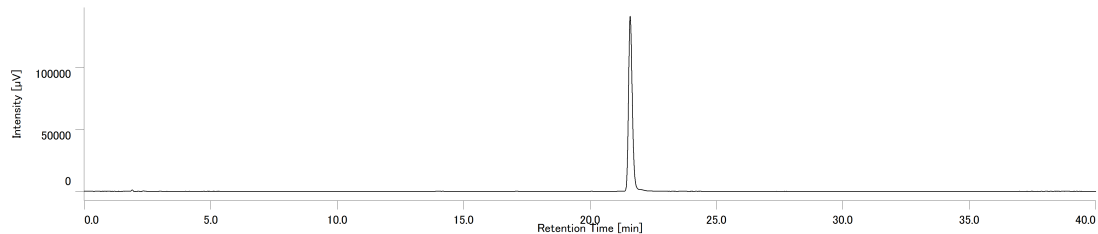
**ON5d:**3'-t<sub>BuCE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 500 nm)



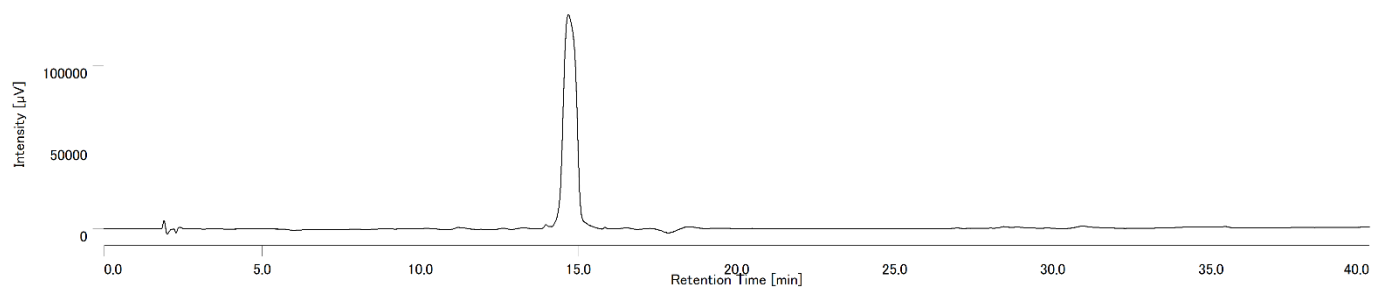
**ON5e:**3'-t<sub>AmCE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 500 nm)



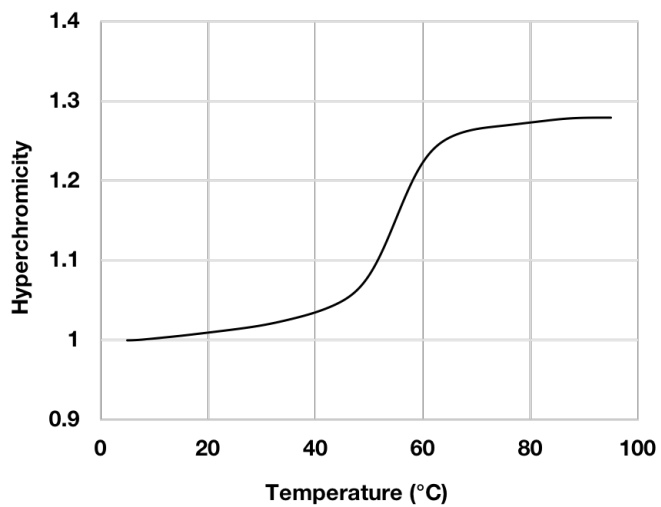
**ON5f:**3'-t<sub>OcCE</sub>ttttttt-FAM-5' (PDA = 500 nm)



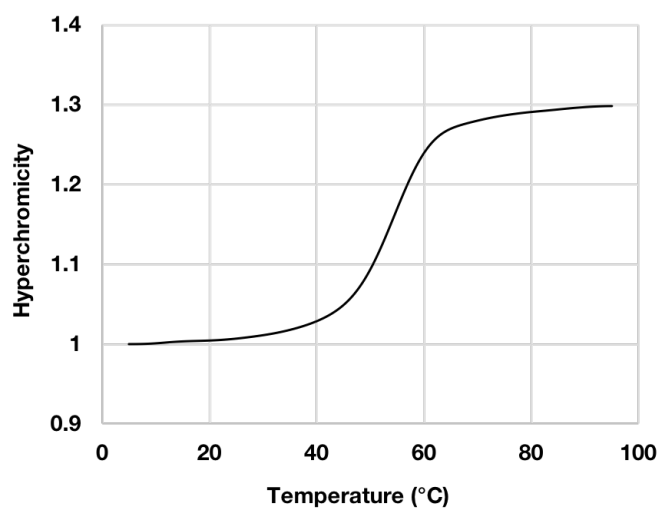
**ON1:3'-(2'-OMe)-CGTTTTTTTGC-5'(PDA = 254 nm)**



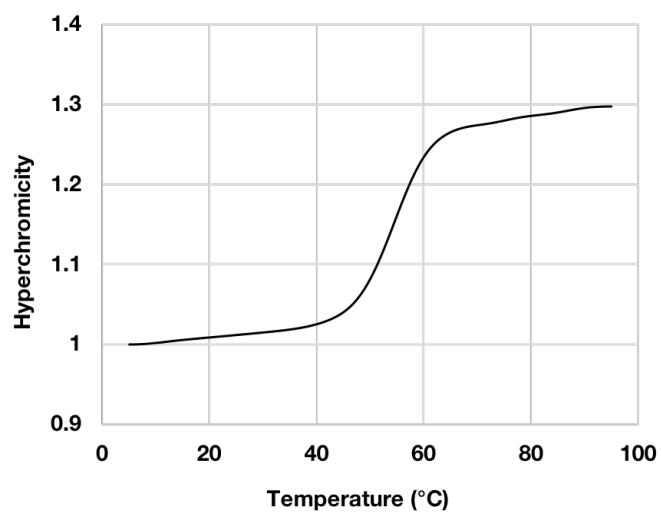
UV melting curve of **ON2a**:3'-(2'-OMe)-CGTTT<sub>MCE</sub>TTTGC-5'



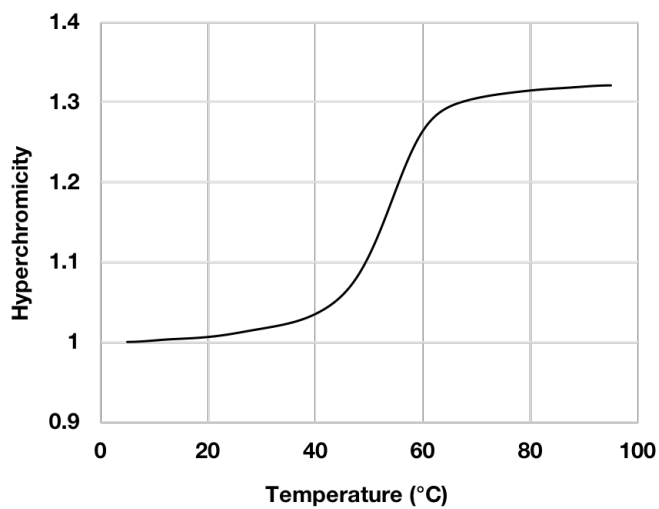
UV melting curve of **ON2b**:3'-(2'-OMe)-CGTTT<sub>EICE</sub>TTTGC-5'



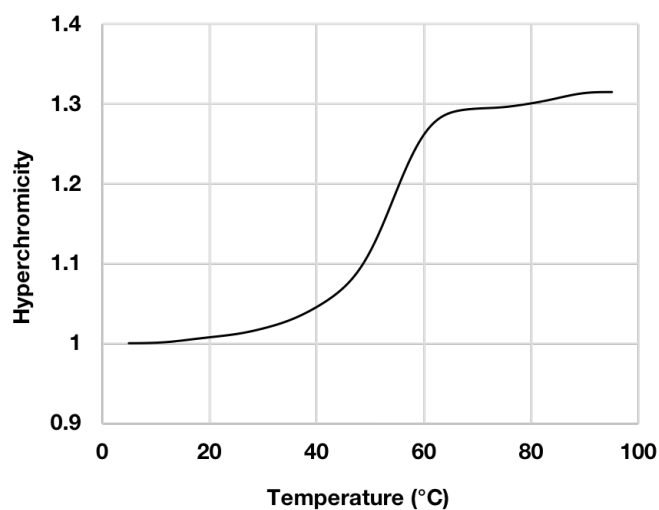
UV melting curve of **ON2c**:3'-(2'-OMe)-CGTTT<sub>PtCE</sub>TTTGC-5'



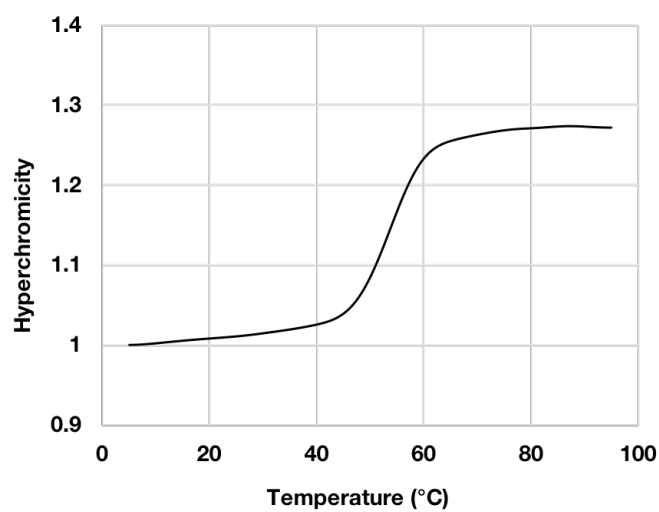
UV melting curve of **ON2d**:3'-(2'-OMe)-CGTTT**T<sub>BuCE</sub>**TTTGC-5'



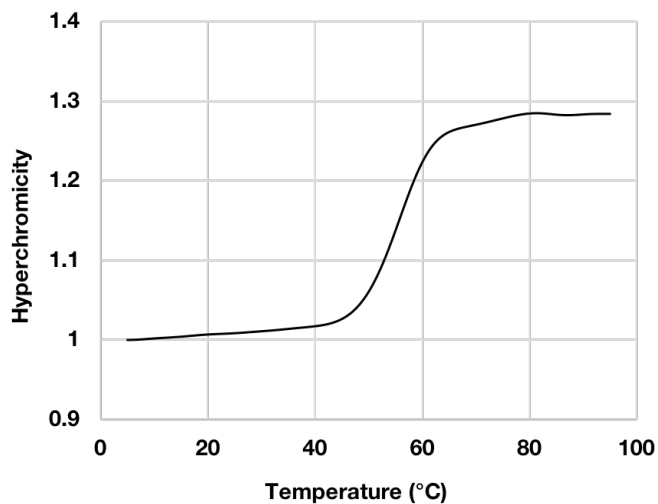
UV melting curve of **ON2e**:3'-(2'-OMe)-CGTTT**T<sub>AmCE</sub>**TTTGC-5'



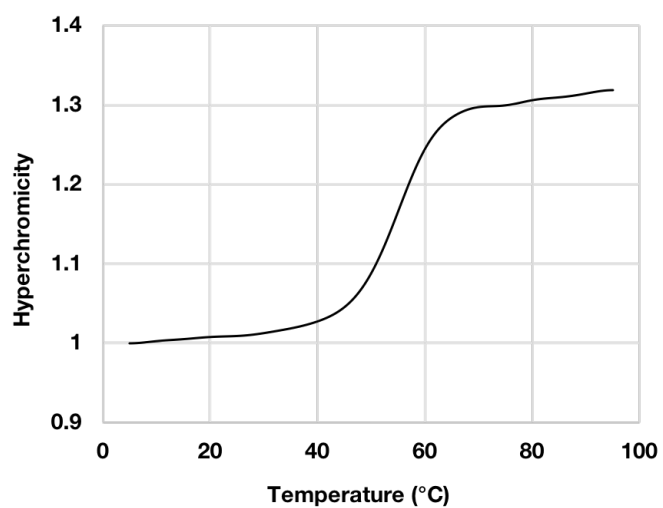
UV melting curve of **ON2f**:3'-(2'-OMe)-CGTTT**T<sub>OcCE</sub>**TTTGC-5'



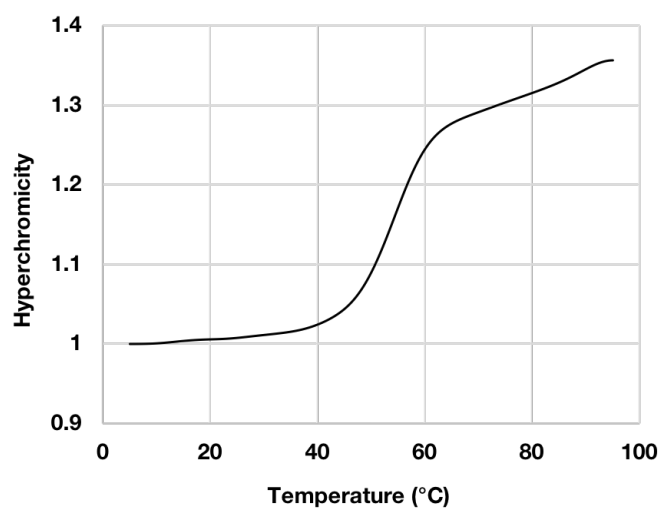
UV melting curve of **ON3a**:3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>MCE</sub>T<sub>MCE</sub>T<sub>MCE</sub>TTGC-5'



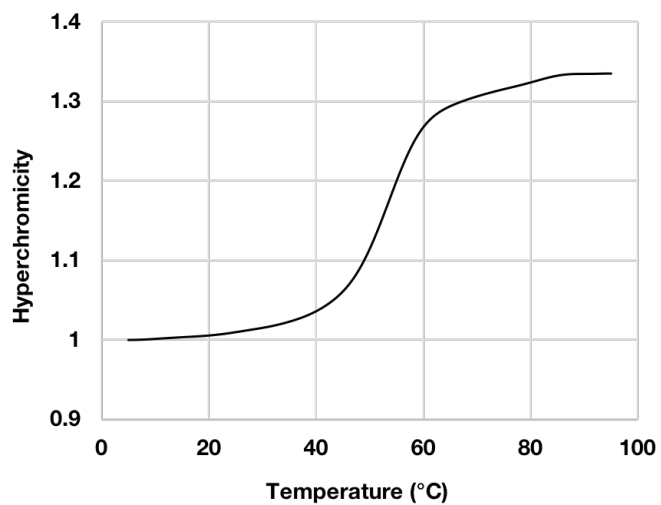
UV melting curve of **ON3b**:3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>EICE</sub>T<sub>EICE</sub>T<sub>EICE</sub>TTGC-5'



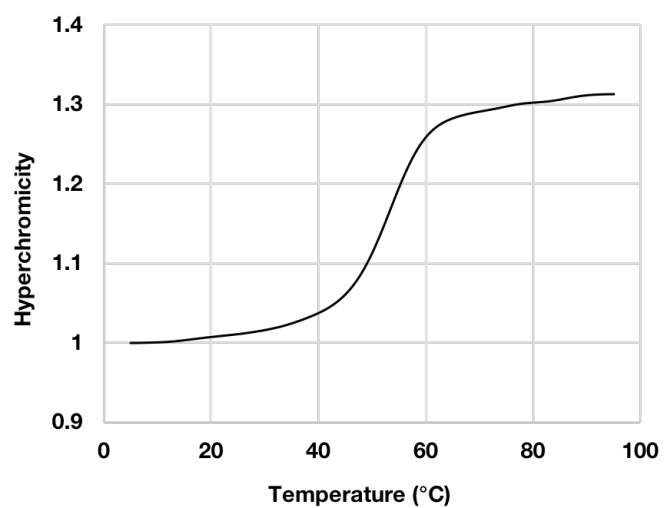
UV melting curve of **ON3c**:3'-(2'-OMe)-CGTT<sub>PrCE</sub>T<sub>PrCE</sub>T<sub>PrCE</sub>TTGC-5'



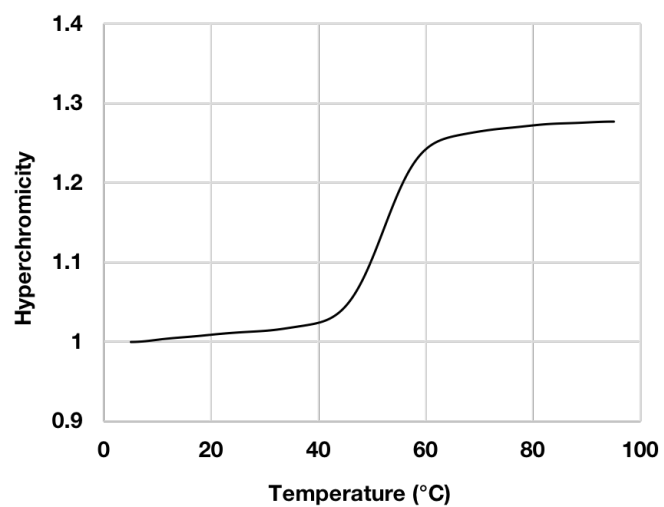
UV melting curve of **ON3d**:3'-(2'-OMe)-CGTTT**T<sub>BuCE</sub>T<sub>BuCE</sub>T<sub>BuCE</sub>**TTGC-5'



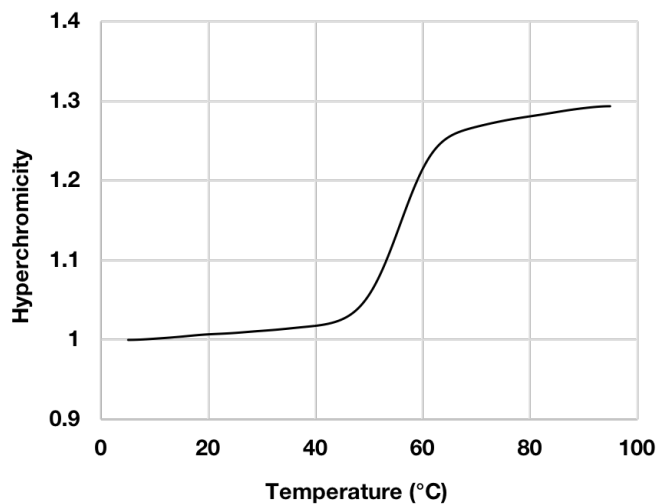
UV melting curve of **ON3e**:3'-(2'-OMe)-CGTT**T<sub>AmCE</sub>T<sub>AmCE</sub>T<sub>AmCE</sub>**TTGC-5'



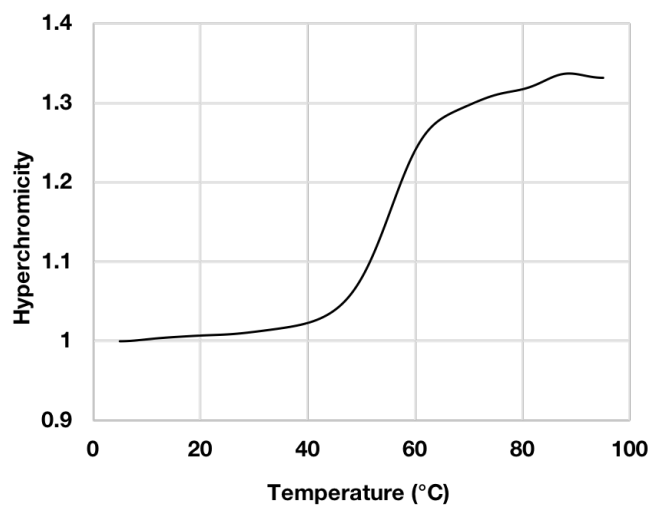
UV melting curve of **ON3f**:3'-(2'-OMe)-CGTT**T<sub>OcCE</sub>T<sub>OcCE</sub>T<sub>OcCE</sub>**TTGC-5'



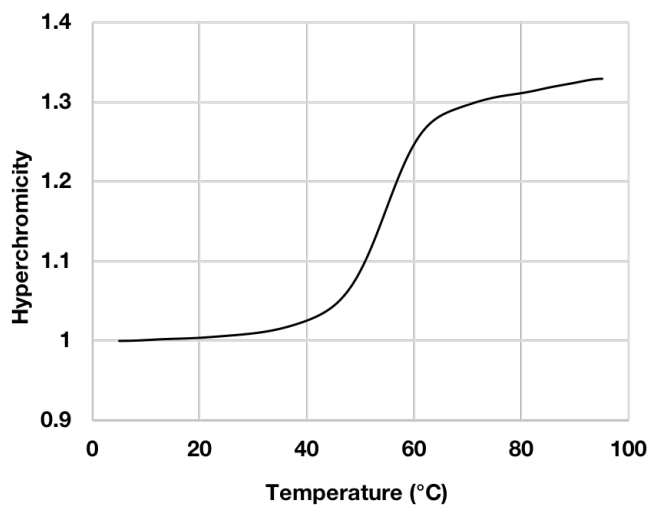
UV melting curve of **ON4a**:3'-(2'-OMe)-CGT<sub>MCE</sub>TTT<sub>MCE</sub>TTT<sub>MCE</sub>GC-5'



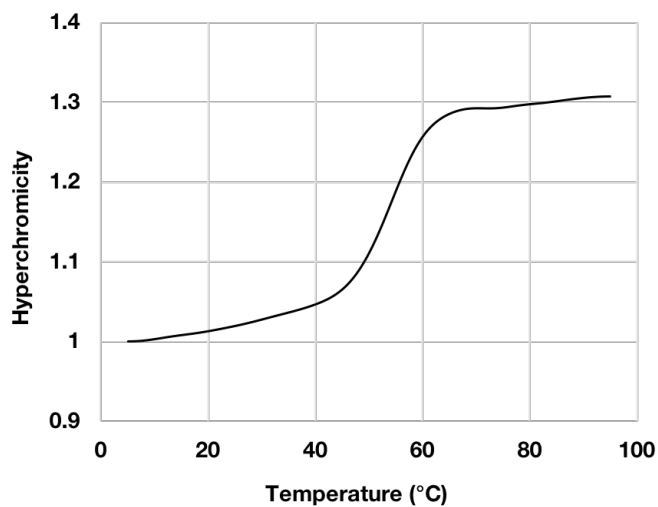
UV melting curve of **ON4b**:3'-(2'-OMe)-CGT<sub>EICE</sub>TTT<sub>EICE</sub>TTT<sub>EICE</sub>GC-5'



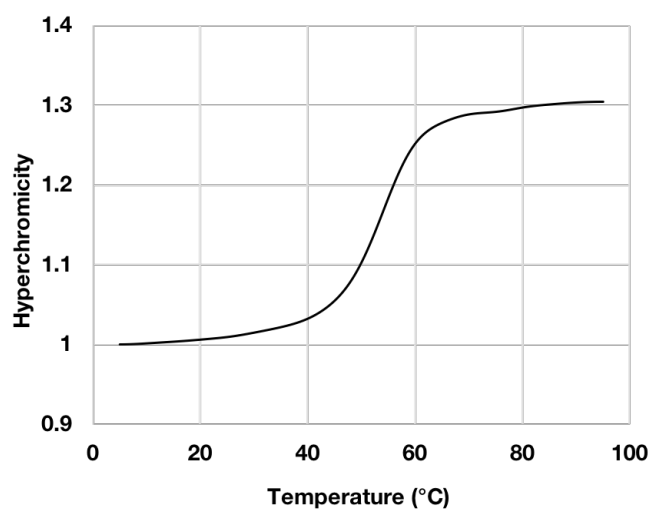
UV melting curve of **ON4c**:3'-(2'-OMe)-CGT<sub>PrCE</sub>TTT<sub>PrCE</sub>TTT<sub>PrCE</sub>GC-5'



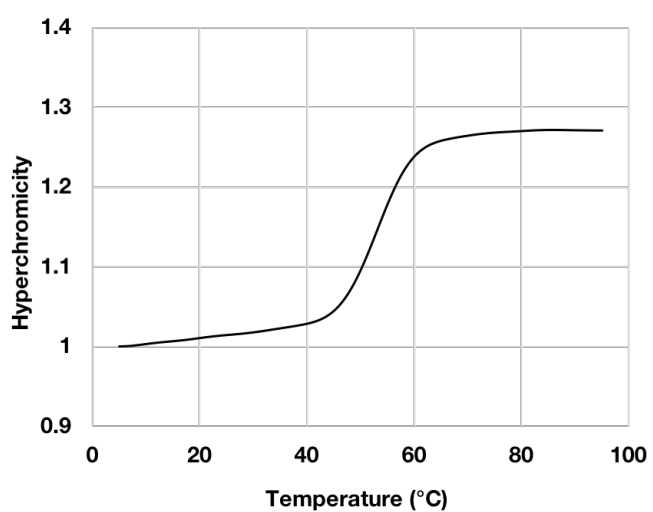
UV melting curve of **ON4d**:3'-(2'-OMe)-CGT<sub>BuCE</sub>TT<sub>BuCE</sub>TT<sub>BuCE</sub>GC-5'



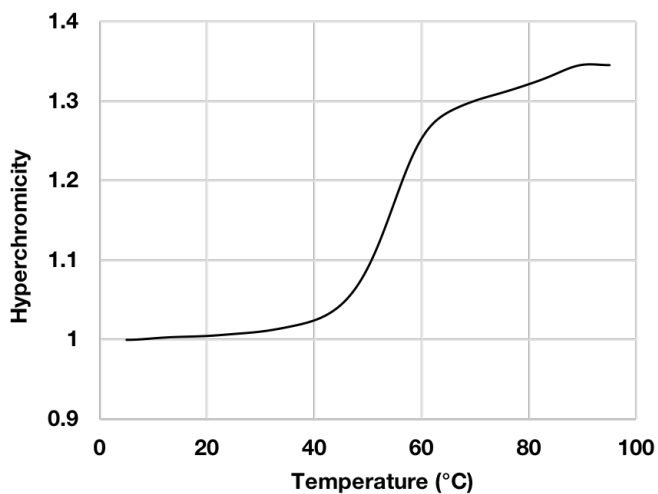
UV melting curve of **ON4e**:3'-(2'-OMe)-CGT<sub>AmCE</sub>TT<sub>AmCE</sub>TT<sub>AmCE</sub>GC-5'



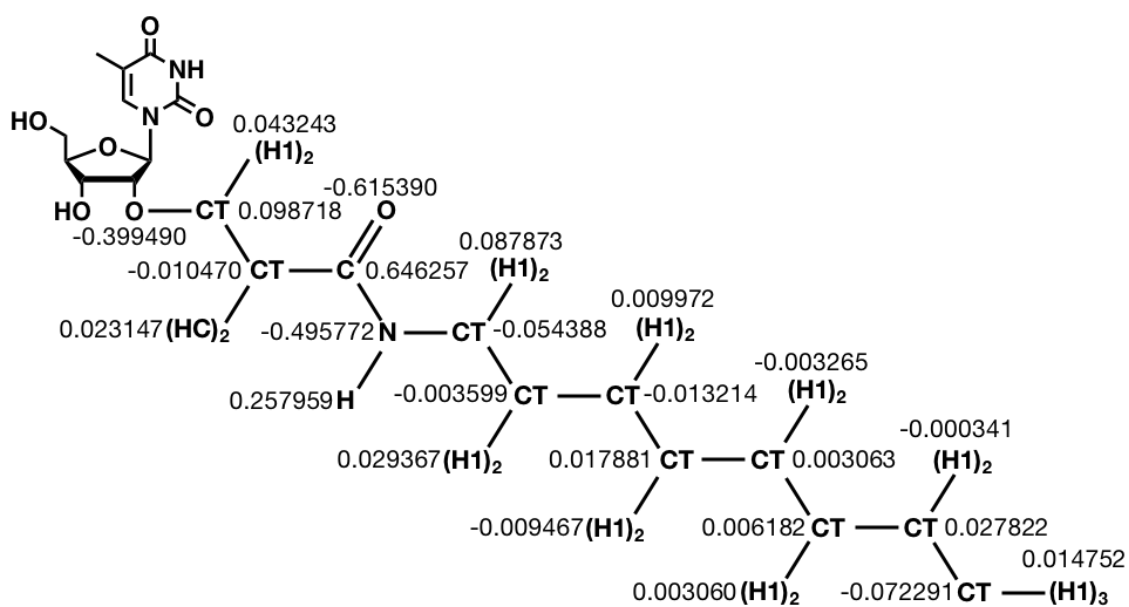
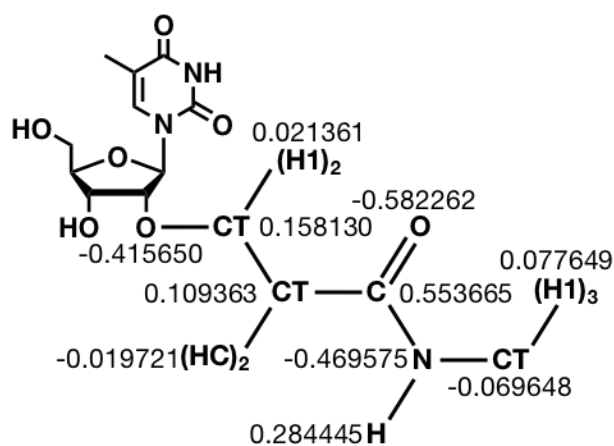
UV melting curve of **ON4f**:3'-(2'-OMe)-CGT<sub>OcCE</sub>TT<sub>OcCE</sub>TT<sub>OcCE</sub>GC-5'



UV melting curve of **ON1:3'-(2'-OMe)-CGTTTTTTTGC-5'**



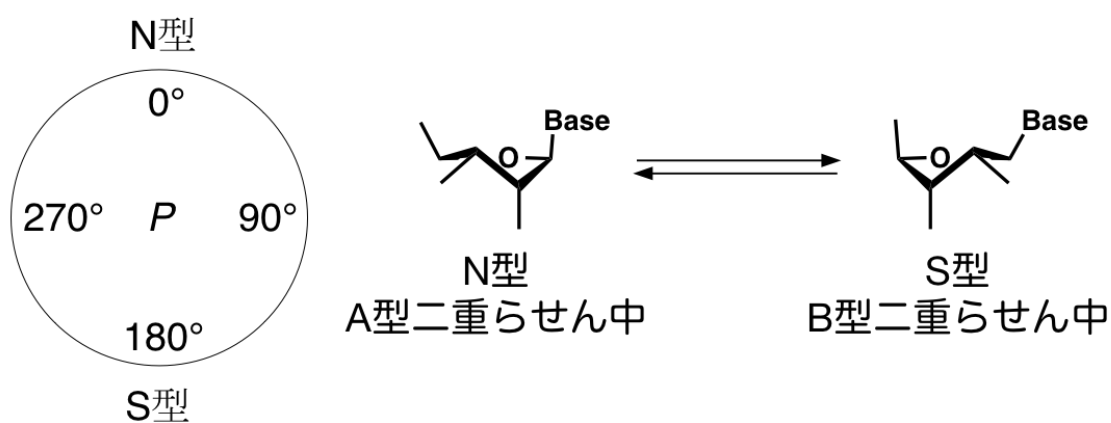
Resp charge distributions and atom types of the 2'-*O*-MCE and 2'-*O*-OcCE groups.



The pseudorotation phase angle of ON3a and ON3f

塩基番号	擬回転位相角 ON3a (°)	擬回転位相角 ON3f (°)
1	10.2 ± 8.2	10.2 ± 8.3
2	5.7 ± 10.5	6.3 ± 10.7
3	48.3 ± 106.0	48.4 ± 106.0
4	10.4 ± 8.0	10.4 ± 8.0
5	11.4 ± 8.1	11.8 ± 8.2
6	11.2 ± 8.0	11.4 ± 8.1
7	11.4 ± 8.0	11.2 ± 8.1
8	10.8 ± 8.1	10.8 ± 8.1
9	11.4 ± 8.1	11.5 ± 8.1
10	11.0 ± 10.0	11.0 ± 10.1
11	43.4 ± 59.8	42.6 ± 59.0

塩基(対)番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5'-(2'OMe)- C	G	T	T	X	X	X	T	T	G	C	-3'
3'-r- G	C	A	A	A	A	A	A	A	C	G	-5'
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12
塩基対間番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	



The base pair step parameters of **ON3a**

塩基対間番号	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
1	-0.22 ± 0.90	-1.78 ± 0.74	3.53 ± 1.08	-3.12 ± 5.51	11.68 ± 9.35	30.50 ± 9.97
2	-0.07 ± 0.52	-2.05 ± 0.70	3.12 ± 0.86	1.10 ± 3.69	2.75 ± 4.36	27.00 ± 8.03
3	0.24 ± 0.46	-1.80 ± 0.59	3.12 ± 0.89	0.72 ± 3.97	4.83 ± 5.08	27.25 ± 7.90
4	0.27 ± 0.47	-1.79 ± 0.58	3.04 ± 0.85	1.68 ± 3.93	4.55 ± 5.02	27.07 ± 7.78
5	0.17 ± 0.46	-1.77 ± 0.58	3.10 ± 0.87	1.17 ± 3.93	5.07 ± 5.05	27.39 ± 7.81
6	0.12 ± 0.45	-1.77 ± 0.58	3.12 ± 0.88	0.95 ± 3.95	5.40 ± 5.03	27.60 ± 7.85
7	0.07 ± 0.45	-1.72 ± 0.57	3.09 ± 0.87	0.62 ± 3.96	5.13 ± 4.97	27.57 ± 7.84
8	0.11 ± 0.48	-1.62 ± 0.56	3.06 ± 0.86	1.86 ± 4.07	6.12 ± 5.29	27.69 ± 7.90
9	0.19 ± 0.54	-1.50 ± 0.55	3.29 ± 0.94	-1.55 ± 4.36	14.2 ± 7.42	29.77 ± 8.45
10	0.20 ± 0.49	-1.64 ± 0.70	3.05 ± 0.85	-1.09 ± 4.28	4.24 ± 5.32	29.86 ± 9.02

The base pair step parameters of **ON3f**

塩基対間番号	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
1	0.05 ± 1.16	-1.74 ± 0.79	3.42 ± 1.17	-2.74 ± 5.67	9.97 ± 10.1	28.54 ± 12.77
2	-0.11 ± 0.54	-2.04 ± 0.75	3.07 ± 0.95	1.11 ± 3.69	2.52 ± 4.31	26.55 ± 8.89
3	0.20 ± 0.46	-1.78 ± 0.63	3.09 ± 0.98	0.53 ± 3.96	4.85 ± 5.11	26.84 ± 8.58
4	0.28 ± 0.48	-1.76 ± 0.63	2.99 ± 0.94	1.69 ± 3.92	4.75 ± 5.15	26.53 ± 8.55
5	0.16 ± 0.49	-1.72 ± 0.62	3.04 ± 0.96	1.22 ± 3.93	5.49 ± 5.21	26.76 ± 8.59
6	0.10 ± 0.47	-1.71 ± 0.62	3.06 ± 0.97	0.86 ± 3.93	5.52 ± 5.11	26.92 ± 8.65
7	0.06 ± 0.45	-1.68 ± 0.61	3.04 ± 0.96	0.57 ± 3.92	5.26 ± 5.03	27.20 ± 8.69
8	0.11 ± 0.48	-1.58 ± 0.60	3.01 ± 0.95	1.89 ± 4.05	6.24 ± 5.33	27.26 ± 8.72
9	0.21 ± 0.54	-1.47 ± 0.58	3.22 ± 1.03	-1.46 ± 4.34	14.04 ± 7.56	29.13 ± 9.32
10	0.20 ± 0.49	-1.60 ± 0.72	3.00 ± 0.93	-1.07 ± 4.25	4.16 ± 5.27	29.50 ± 9.78

塩基(対)番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
5'-(2'OMe)-	C	G	T	T	X	X	X	T	T	G	C	-3'
3'-r-	G	C	A	A	A	A	A	A	A	C	G	-5'
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	
塩基対間番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

The base pair parameters of **ON3a**

塩基対番号	Shear (Å)	Stretch (Å)	Stagger (Å)	Buckle (°)	Propeller (°)	Opening (°)
1	0.19 ± 0.41	-0.04 ± 0.20	-0.28 ± 0.50	11.52 ± 13.34	-13.4 ± 13.84	-0.52 ± 6.74
2	-0.27 ± 0.38	-0.09 ± 0.13	-0.21 ± 0.41	-5.73 ± 8.78	-6.78 ± 8.70	0.56 ± 4.13
3	-0.18 ± 0.27	0.02 ± 0.11	-0.19 ± 0.41	-4.58 ± 8.02	-8.12 ± 7.45	-0.52 ± 4.57
4	-0.14 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.02 ± 0.36	-3.32 ± 7.88	-8.44 ± 7.06	-0.45 ± 4.48
5	-0.14 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.07 ± 0.37	-0.40 ± 7.70	-9.75 ± 7.10	-0.07 ± 4.50
6	-0.15 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.08 ± 0.38	0.51 ± 7.74	-10.69 ± 7.14	-0.23 ± 4.49
7	-0.15 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.07 ± 0.38	0.49 ± 7.77	-11.44 ± 7.17	-0.67 ± 4.50
8	-0.17 ± 0.26	0.05 ± 0.11	-0.05 ± 0.38	2.26 ± 8.12	-11.38 ± 7.09	-1.20 ± 4.56
9	-0.16 ± 0.27	0.03 ± 0.11	-0.18 ± 0.40	3.58 ± 8.95	-15.07 ± 7.68	-0.22 ± 4.70
10	-0.13 ± 0.32	-0.07 ± 0.11	-0.05 ± 0.39	-7.03 ± 9.15	-10.98 ± 8.96	0.41 ± 3.31
11	0.31 ± 0.38	-0.08 ± 0.14	0.19 ± 0.47	-1.98 ± 10.99	0.27 ± 9.37	-0.40 ± 4.15

The base pair parameters of **ON3f**

塩基対番号	Shear (Å)	Stretch (Å)	Stagger (Å)	Buckle (°)	Propeller (°)	Opening (°)
1	0.09 ± 0.93	-0.09 ± 0.59	-0.25 ± 0.51	9.21 ± 14.71	-12.2 ± 14.24	-0.74 ± 7.70
2	-0.28 ± 0.42	-0.09 ± 0.14	-0.21 ± 0.42	-4.88 ± 9.00	-5.87 ± 8.88	0.57 ± 4.81
3	-0.17 ± 0.27	0.02 ± 0.11	-0.21 ± 0.41	-3.80 ± 8.13	-7.85 ± 7.42	-0.29 ± 4.67
4	-0.13 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.02 ± 0.36	-3.38 ± 7.99	-8.15 ± 7.07	-0.40 ± 4.45
5	-0.13 ± 0.25	0.04 ± 0.11	-0.07 ± 0.37	-0.57 ± 7.77	-9.59 ± 7.27	0.21 ± 4.50
6	-0.15 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.09 ± 0.38	0.51 ± 7.81	-10.43 ± 7.29	-0.03 ± 4.55
7	-0.15 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.08 ± 0.38	0.92 ± 7.75	-11.04 ± 7.28	-0.69 ± 4.47
8	-0.16 ± 0.26	0.04 ± 0.11	-0.05 ± 0.38	2.18 ± 8.12	-11.43 ± 7.23	-1.15 ± 4.52
9	-0.16 ± 0.27	0.03 ± 0.11	-0.17 ± 0.40	3.22 ± 8.88	-15.02 ± 7.91	-0.25 ± 4.68
10	-0.13 ± 0.32	-0.06 ± 0.11	-0.04 ± 0.39	-6.95 ± 9.10	-10.9 ± 8.96	0.40 ± 3.37
11	0.31 ± 0.38	-0.08 ± 0.14	0.20 ± 0.47	-2.10 ± 10.88	-0.01 ± 9.24	-0.37 ± 4.05



The helical parameters of **ON3a**

塩基対間番号	X-disp (Å)	Y-disp (Å)	Helical rise (Å)	Incl. (°)	Tip (°)	Helical twist (°)
1	-4.52 ± 2.12	-0.17 ± 1.85	2.75 ± 1.04	18.09 ± 14.38	4.71 ± 9.28	33.95 ± 11.52
2	-4.64 ± 2.00	0.37 ± 1.21	2.85 ± 0.88	5.43 ± 8.67	-2.18 ± 7.37	27.70 ± 8.18
3	-4.39 ± 1.79	-0.37 ± 1.13	2.71 ± 0.86	9.29 ± 9.76	-1.38 ± 7.78	28.32 ± 8.18
4	-4.35 ± 1.77	-0.23 ± 1.12	2.67 ± 0.84	8.82 ± 9.70	-3.28 ± 7.74	28.13 ± 8.05
5	-4.35 ± 1.73	-0.14 ± 1.06	2.69 ± 0.84	9.73 ± 9.62	-2.24 ± 7.62	28.50 ± 8.09
6	-4.36 ± 1.72	-0.09 ± 1.04	2.69 ± 0.84	10.29 ± 9.50	-1.81 ± 7.58	28.75 ± 8.14
7	-4.23 ± 1.69	-0.04 ± 1.04	2.68 ± 0.83	9.80 ± 9.42	-1.19 ± 7.63	28.66 ± 8.12
8	-4.14 ± 1.65	0.10 ± 1.09	2.60 ± 0.82	11.53 ± 9.84	-3.51 ± 7.75	29.06 ± 8.27
9	-4.39 ± 1.48	-0.53 ± 1.04	2.34 ± 0.79	23.50 ± 11.52	2.63 ± 7.40	33.67 ± 9.74
10	-3.64 ± 1.72	-0.51 ± 1.09	2.75 ± 0.85	7.60 ± 9.56	1.87 ± 7.70	30.86 ± 9.22

The helical parameters of **ON3f**

塩基対間番号	X-disp (Å)	Y-disp (Å)	Helical rise (Å)	Incl. (°)	Tip (°)	Helical twist (°)
1	-4.40 ± 3.65	-0.89 ± 3.92	2.73 ± 1.17	14.67 ± 18.55	3.64 ± 11.69	31.85 ± 14.01
2	-4.61 ± 2.20	0.45 ± 1.34	2.81 ± 0.96	5.02 ± 8.68	-2.20 ± 7.46	27.22 ± 9.04
3	-4.34 ± 1.84	-0.32 ± 1.09	2.68 ± 0.93	9.30 ± 9.72	-1.02 ± 7.69	27.91 ± 8.90
4	-4.31 ± 1.87	-0.24 ± 1.13	2.60 ± 0.90	9.19 ± 9.93	-3.30 ± 7.73	27.64 ± 8.88
5	-4.33 ± 1.84	-0.10 ± 1.09	2.60 ± 0.90	10.55 ± 9.93	-2.35 ± 7.63	27.97 ± 8.94
6	-4.31 ± 1.84	-0.06 ± 1.06	2.61 ± 0.91	10.59 ± 9.73	-1.66 ± 7.60	28.11 ± 8.98
7	-4.15 ± 1.77	-0.04 ± 1.03	2.62 ± 0.90	9.99 ± 9.48	-1.07 ± 7.51	28.30 ± 9.01
8	-4.06 ± 1.72	0.10 ± 1.08	2.55 ± 0.88	11.71 ± 9.86	-3.54 ± 7.68	28.65 ± 9.14
9	-4.32 ± 1.63	-0.56 ± 1.11	2.28 ± 0.84	23.27 ± 11.80	2.46 ± 7.41	33.00 ± 10.72
10	-3.53 ± 1.75	-0.51 ± 1.06	2.71 ± 0.91	7.42 ± 9.43	1.82 ± 7.59	30.47 ± 10.01

塩基(対)番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
5'-(2'OMe)-	C	G	T	T	X	X	X	T	T	G	C	-3'
3'-r-	G	C	A	A	A	A	A	A	A	C	G	-5'
	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	
塩基対間番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

## 講演目録

### 第 98 回日本化学会春季年会(船橋)

Synthesis and Properties of Oligonucleotides Having Various Carbamoylethyl Group at 2' Position. ○Tomohiro Kishimura, Keita Yoshida, Akihiro Ano, Takahito Tomori, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio.

### 第 99 回日本化学会春季年会(岡本)

Synthesis and properties of oligonucleotides having alkyl carbamoylethyl groups at 2' position. ○KISHIMURA, Tomohiro; TOMORI, Takahito; MASAKI, Yoshiaki; SEIO, Kohji

### 第 100 回日本化学会春季年会(野田)

Synthesis and Properties of Oligonucleotides Having 2'-O-Alkylcarbamoylethyl Modification. ○KISHIMURA, Tomohiro; TOMORI, Takahito; MASAKI, Yoshiaki; SEIO, Kohji.

### 第 101 回日本化学会春季年会(オンライン)

Synthesis of oligonucleotides containing 2'-O-alkylcarbamoyl ethyl modifications and their properties. ○KISHIMURA, Tomohiro; TOMORI, Takahito; MASAKI, Yoshiaki; SEIO, Kohji.

## 報文目録

Synthesis of 2'-O-alkylcarbamoylethyl-modified oligonucleotides with enhanced nuclease resistance that form isostable duplexes with complementary RNA. ○Kishimura, T.; Tomori, T.; Masaki, Y. and Seio, K.

*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, 35, 127779.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127779>

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、時に厳しく、時に暖かいご指導ご鞭撻を賜りました、本学生命理工学院生命理工学系准教授 清尾康志 先生に心より感謝いたします。清尾研究室ですごした 6 年半を心の支えとし、これからも精進して参ります。

いつも気軽にディスカッションに応じて下さり、一人では考えつかないようなアイデアを下さった、本学生命理工学院生命理工学系助教 正木 慶昭 博士に心より感謝いたします。また、MD シミュレーションの実験における全面的な協力を感謝いたします。

糖化学の専門家の立場から様々な助言を頂き、本研究を暖かく見守って下さりました、本学生命理工学院生命理工学系教授 湯浅 英哉 先生に深く感謝いたします。

お忙しい中、適切な助言や激励を頂き、本研究を温かく見守って下さりました、本学生命理工学院生命理工学系准教授 大窪 章寛 先生に深く感謝いたします。

分野の異なる本研究に関して、別の視点から様々なご助言をいただき、本博士論文の審査員を引き受けて下さりました、本学生命理工学院生命理工学系教授 一瀬 宏 先生および、本学生命理工学院生命理工学系准教授 秦 猛志 先生のご両名に深く感謝いたします。

実験室でお会いしたとき、実験の進捗や私の体調をいつも気にかけて下さり、博士学生としての体調管理などアドバイスを下さりました、本学生命理工学院生命理工学系助教 金森 功吏 先生に深く感謝いたします。

早期卒業で研究室に所属し、右も左も分からなかった私に、一から有機合成の基礎を丁寧に叩き込んで下さりました、印出 健志 博士に感謝いたします。「NMR は鮮度が命」という言葉、忘れません。

学部4年生の頃から実験指導をして下さり、有機合成についての熱い議論を活発に行なって下さりました、研究員の友利 貴人 博士に感謝いたします。博士は本研究の共同研究者であります。博士の協力を感謝いたします。

博士課程の同期として苦楽を共にして下さりました、竹下 玲央 博士、西澤 周平 博士に感謝いたします。お二人のおかげで楽しく研究室生活を送ることができました。卒業してからも友人としてよろしくお願いします。

同じ研究テーマのチームとして共に実験を進めて下さりました、阿野 晃大氏、植草 宏哉氏に感謝いたします。至らないところも多い先輩だったと思いますが、文句を言わずに実験をしてくれてありがとうございました。

研究のみならず、就活や趣味の面でも公私ともに良くしていただきました、小田 雄貴氏に深く感謝いたします。またライブに行けましたら幸いです。

研究生生活を共にして下さりました、徳川 宗史 博士、伊藤 優 博士、多胡 信広 博士、大野 健太郎 博士、伊藤 比祐吾氏、高村 亮宏氏、針山 智氏、吉村 貴一氏、金子 和平氏、山本 恵士氏、宮村 大地氏、山崎 綾乃氏、宮武 佑哉氏、北川 諒氏、長岡 健斗氏、Canggihbrata Jan Christian 氏、竹下 直輝氏、牧尾 直明氏、塩沢 貴史氏、関谷 彰太氏、吉田 圭汰氏、井上 敦氏、杉山 大樹氏、丸山 敦也氏、山田 悠司氏、枝村 亘氏、宮崎 翔氏、赤井 恒氏、服部 詩萌里氏、井分 彩乃氏、小山 彩氏、若月 駿介氏、大西 里絵氏、矢形 太一氏に深く感謝いたします。

試薬の購入やゲル電気泳動など、様々な点でお世話になりました、本研究室秘書の大西 有希子氏に深く感謝いたします。

質量分析測定および NMR 測定に関して、貴重なデータを提供していただきました、本学すずかけ台 OFC の小泉 公人氏、清 悦久氏に感謝いたします。

最後になりましたが、日々の生活を健康面と経済面の両面からいつも支えてくださりました、祖父 岸村家光、祖母 岸村千恵、父 岸村高洋、母 岸村祐子、弟 岸村真央、岸村光熙、猫 モル、イヴに深く感謝いたします。

岸村 智太