

博士學位論文

内容の要旨
および
審査の結果の要旨

薬学研究科

第46号

令和5年5月

徳島文理大学

は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

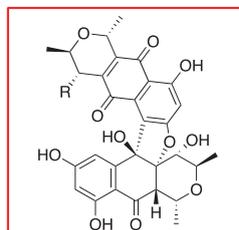
(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
甲第57号	大 境 千 晴	アブラムシから単離したピラノナフトキノン二量体色素の化学変換	1
甲第58号	兵 頭 直	共結晶化を活用した有機化合物の単結晶X線構造解析	8
甲第59号	山 本 一 輝	オリゴヌクレオチド固相合成に利用する新規ユニバーサルユニットの開発とその応用	14

氏名	<small>おおざかい</small> <small>ちはる</small> 大境 千晴
本籍	徳島県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 57 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学位授与の題目	アブラムシから単離したピラノナフトキノン二量体色素の 化学変換
指導教員	教授 加来 裕人
論文審査委員	（主査）教授 今川 洋 （副査）教授 堂上 美和 （副査）教授 山本 博文 （副査）教授 難波 康祐（徳島大学 薬学部）

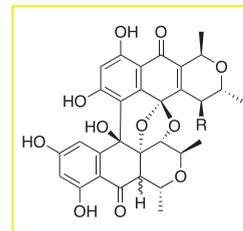
論文の内容要旨

大境 千晴

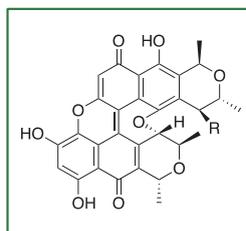
アブラムシは世界に四千種以上が生息しており、赤や緑、黄色など鮮やかな体色をしているものも多く見られる。その体色は主にポリケタイド系色素に由来し、当研究室ではこれまでに、様々なアブラムシから色素化合物の単離、構造決定を行ってきた。例えば、セイタカアワダチソウヒゲナガアブラムシからは uroleuconaphin 類を、ソラマメヒゲナガアブラムシからは viridaphin 類を得ている。



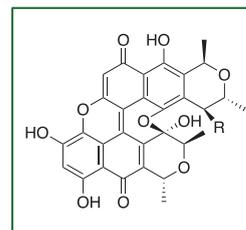
uroleuconaphin A₁ (1): R = H
uroleuconaphin B₁ (2): R = OH



uroleuconaphin A₂ (3): R = H
uroleuconaphin B₂ (4): R = OH



viridaphin A₂ (5): R = H
viridaphin B₂ (6): R = OH



viridaphin A₁ (7): R = H
viridaphin B₁ (8): R = OH

これら色素はいずれもピラノナフトキノン二量体化合物であり、単量体間の結合様式や酸化度が異なる。また、これら色素の生物活性評価を行った結果、赤色色素 uroleuconaphin A₁ (1)および B₁ (2)は、昆虫病原菌に対する成長阻害活性を有していることが明らかとなった。

これは、色素が生体防御物質として機能している可能性を示唆している。アブラムシが色素をもつ意味を解明していくためには、昆虫病原菌以外にも様々な生物活性試験など多面的な研究を継続的に行う必要があり、色素の物質供給は不可欠である。しかし、アブラムシは体長数ミリ程と小さく、採集できる期間も短いため、研究に使用できる色素量は決して多くない。そこで著者は、これら色素の物質供給法の確立を目指し研究に着手した。具体的には、アブラムシ色素の構造類似性に着目し、比較的アブラムシ体内における含有量の多い赤色色素 uroleuconaphin 類の化学変換により、わずかしかな得られない他の色素への誘導を検討した。

まず、赤色色素から黄色色素 uroleuconaphin 類への変換反応を検討した。先行研究により、赤色色素 1 および 2 をピリジン中で加熱することで、黄色色素 uroleuconaphin A₂ (3)および B₂ (4)へ異性化することが明らかになっているものの、その変換効率は低く、C10a 位に関する異性体の分離も成功していなかった。そこで、黄色色素への変換効率向上とそれぞれの異性体

の構造を決定するために、反応条件を再検討することにした。ただし、黄色色素はシリカゲルや極性溶媒に対して不安定であり、精製過程で赤色色素への逆反応が進行したため、TMSジアゾメタンにより C7 位および C7' 位のフェノールをメチル化した誘導体 **9**, **10** へと導いた。これらは、精製条件に対して十分な安定性を示し、C10a 位に関する立体異性体の分離も可能となった。そこで異性化反応後、直ちにそれら誘導体へ導くことで、反応収率と C10a 位異性体比を正確に求めることにした (Table 1)。ピリジンを用いて赤色色素 **1** の異性化を行ったところ、誘導体 **9** を収率 20%、異性体比 4.2:1 で得た。収率向上を目指し、より強い塩基を用いて検討した結果、色素 **1** に対して THF 中、*n*-プロピルアミンを作用させることで、誘導体 **9** を収率 97% で得た (異性体比 3.9:1)。一方、トリエチルアミンなどの第三級アミンを作用させた場合、異性体比は逆転し、*t*-BuOK を用いることで異性体 **9b** がより収率良く得られた。赤色色素 **2** についても同様に検討したところ、ピリジンや *n*-プロピルアミンでは **10a** が、トリエチルアミンを用いた場合には **10b** が優先的に得られた。最終的に、*t*-BuOK を作用させたとき、最も収率良くジメチル化体 **10** を得ることができた。また、化合物 **10b** の単結晶 X 線結晶構造解析により黄色色素の立体構造を確認した (第二章)。

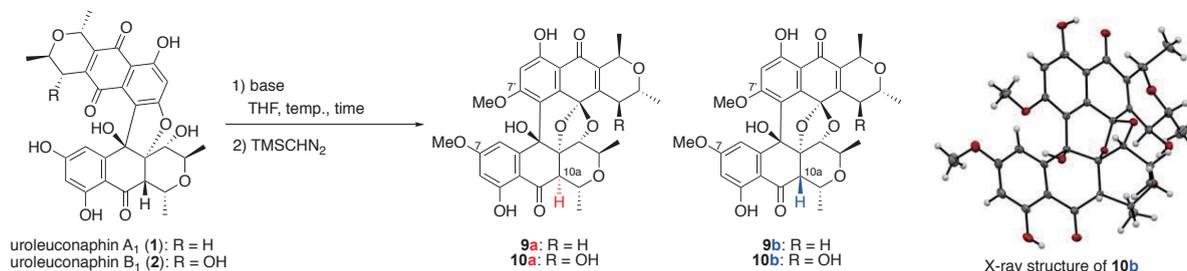


Table 1

entry	substrate	base (equiv)	temp. (°C)	time (h)	yield (%) (9a : 9b)	entry	substrate	base (equiv)	temp. (°C)	time (h)	yield (%) (10a : 10b)
1	1	pyridine ^a (excess)	50	18	20 (4.2:1)	5	2	pyridine ^a (excess)	50	1.0	45 (2.1:1)
2	1	<i>n</i> -PrNH ₂ (15)	rt	0.5	97 (3.9:1)	6	2	<i>n</i> -PrNH ₂ (15)	rt	1.0	71 (2.5:1)
3	1	Et ₃ N (15)	rt	1.5	56 (1:6.3)	7	2	Et ₃ N (15)	rt	1.5	40 (1:5.0)
4	1	<i>t</i> -BuOK (2)	rt	0.5	77 (1:6.7)	8	2	<i>t</i> -BuOK (2)	rt	0.5	89 (1:1)

^a Pyridine was used as a solvent.

次に、赤色色素から異種のアブラムシがもつ緑色色素 viridaphin 類への変換を検討した。これら色素が、同じ単量体からなる二量体化合物であることから、黄色色素への変換反応と同様、単量体間の結合の組み換えにより、赤色色素から緑色色素への変換も可能と考えた。ただし、本変換には脱水反応が必要と考え、酸性条件下での反応を検討した (Table 2)。

まず、赤色色素 **1** に対してクロロホルム/トルエン混合溶媒中、過剰量の TFA を加えて加熱したところ、緑色色素 viridaphin A₂ (**5**) を低収率ながら得ることに成功した。このとき、ほとんどが原料として回収されたため、より酸性度の高いスルホン酸を用いて検討を行った。カンファースルホン酸では目的物がわずかに得られるのみであったが、*p*-トルエンスルホン酸を用いると、目的物の収率は 30% に向上した。さらなる収率向上を期待して、より酸性度の高いトリフルオロメタンスルホン酸を試したが、反応基質が一部分解し、収率、回収率ともに低下する結果となった。そこで、entry 3 の条件で反応を行った後、回収した原料を再利用し、同じ反応を三度繰り返した。これにより、色素 **5** を合計収率 60% で得ることができた。

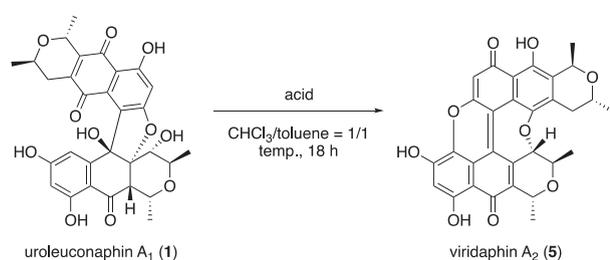
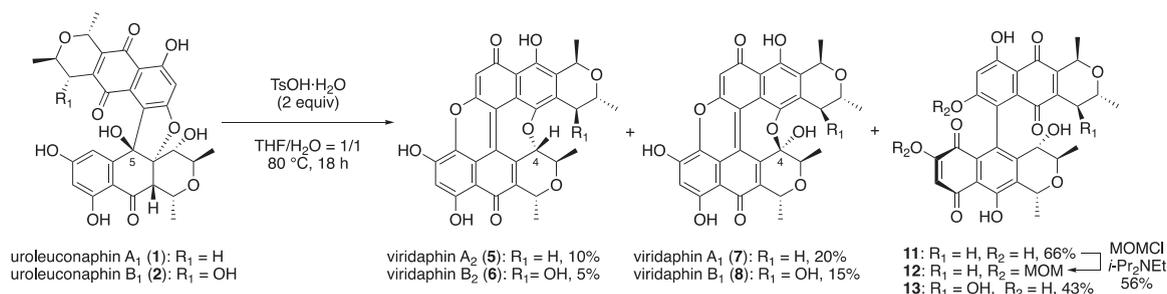


Table 2

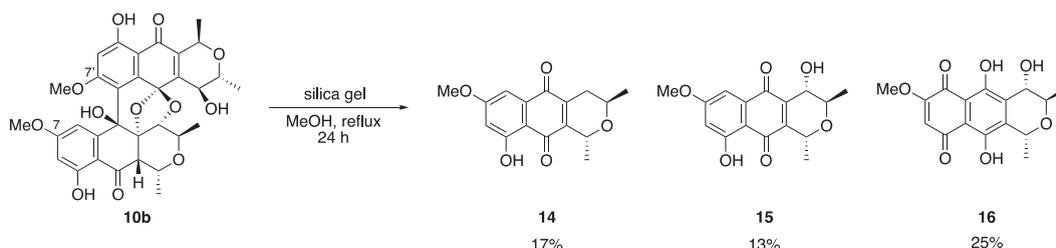
entry	acid (equiv)	temp. (°C)	yield (%)	1 (%)
1	TFA (25)	100	5	95
2	CSA (15)	100	7	70
3	TsOH·H ₂ O (2)	100	30 (60) ^a	67
4	TfOH (2)	80	18	0

^a Combined yield of **5** by recycling of the recovered starting material (three cycles).

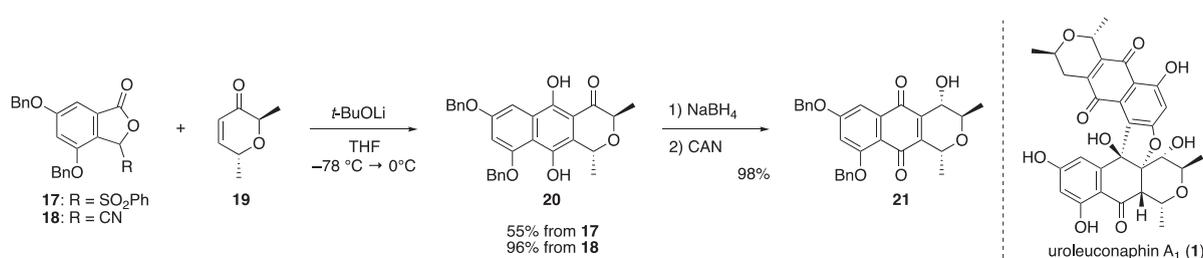
一方、含水溶媒中で反応を行ったところ、色素 **5** に加え、その C4 位が酸化された緑色色素 viridaphin A₁ (**7**) が得られた。また、オレンジ色をしたビスナフトキノ **11** が収率 66% で副生した。赤色色素 **2** に対しても同様の条件で反応を行い、対応する緑色色素 viridaphin B₁ (**6**) および B₂ (**8**) を低収率ながらそれぞれ得た。赤色色素の絶対立体配置が既知であることから、変換により得られた緑色色素の比旋光度および CD スペクトルを天然から得たものと比較することで、不明であった天然物の絶対立体配置を決定できた。副生成物 **11** の詳細な立体構造を確認するため、MOM 化した **12** の X 線結晶構造解析を行い、軸不斉に関する立体化学を *R* 配置と決定した。これにより、原料である赤色色素 **1** の C5 位の中心不斉がナフトキノ **11** の軸不斉へと転写されていることがわかった。(第三章)。



黄色色素 **4** はシリカゲルにさらすことで赤色色素 **2** へと変換されてしまう。この逆反応を抑制するために誘導したジメチル化体 **10** の安定性を確認する過程で、単量体への分解反応を見出した。すなわち、化合物 **10b** に対してメタノール中、シリカゲルを加えて加熱還流すると、上下のピラノナフトキノンをつなぐ炭素-炭素結合が切断され、酸化度の異なる単量体 **14-16** が得られた。本分解反応はシリカゲルで特異的に進行することを見出した。また、単量体生成の推定機構を立案した (第四章)。



赤色色素から黄色および緑色色素への化学変換に成功したが、依然として赤色色素 **1** の天然からの供給には多大な労力を要する。そこで、色素変換反応の起点となる **1** の合成研究に取り組んだ。色素 **1** はピラノナフトキノン **21** を基本単位とする二量体化合物であることから、このものの合成を開始した。そして、置換フタリド **17** および **18** の単段階合成法を開発し、光学活性エノン **19** との Hauser-Kraus 環形成反応により、効率的な単量体 **21** の合成に成功した (第五章)。



以上、本論文ではアブラムシ色素の新たな物質供給法の確立を目指し、色素の化学変換に取り組んだ。その結果、塩基性条件下では赤色色素から黄色色素二種へ、酸性条件下には緑色色素四種へ導くことに成功した。そして、単離段階では不明であった天然物の絶対立体配置を明らかにした。また、シリカゲルによる黄色色素の誘導體から単量体への分解反応を見出した。さらに、化学変換の起点となる赤色色素の合成を検討し、効率的な単量体合成に成功した。本研究により、アブラムシ色素およびピラノナフトキノン二量体化合物に関する新しい知見が得られたと考えている。

論文審査結果の要旨

本論文は五つの章からなり、アブラムシが有するピラノナフトキノン二量体色素の化学変換について述べている。

第一章では、序論として研究背景であるアブラムシ色素の成分研究の概略を述べ、アブラムシが複雑な構造をした色素をもつ意味を考察している。そして、色素が保護色以外に生体防御物質としても機能しているのではないかと考え、これを解明するために、天然含有率の低い色素の量的供給を目指し、色素の化学変換を考案した。

第二章では、赤色色素 uroleuconaphin 類の塩基性条件での反応を検討し、同じアブラムシに含まれる黄色色素 uroleuconaphin 類二種を収率よく得ることに成功した。さらに、黄色色素をジメチル化体に導くことで、未達成であった C10a 位立体異性体の分離にも成功している。これにより、不明であった天然の黄色色素の絶対立体配置を決定した。また、誘導体の X 線結晶構造解析により黄色色素の詳細な立体構造を明らかにした。

第三章では、赤色色素 uroleuconaphin 類の酸性条件での反応を検討し、異種のアブラムシに含まれる緑色色素 viridaphin 類四種を得ることに成功している。これにより、不明であった天然物の絶対立体配置を決定し、一連の天然物は同じ立体化学をもつ単量体から構成されることを明らかにした。また、一連の色素化合物の抗菌活性試験を行い、緑色色素が MRSA や黄色ブドウ球菌に対して強い活性を示すことを見出した。

第四章では、黄色色素の誘導体がシリカゲル存在下、酸化度の異なる単量体へと分解する反応を見出し、その機構について考察している。そして、単量体への分解反応がシリカゲルで特異的に進行することを見出し、本反応の推定機構を立案した。

第五章では、色素の化学変換の起点となる赤色色素 uroleuconaphin A₁ の合成研究について述べている。赤色色素はピラノナフトキノンを基本単位とする二量体化合物であることから、このものの合成を開始した。そして、置換フタリドの短段階合成法を開発し、光学活性エノンとの Hauser-Kraus 環形成反応により、効率的な単量体の合成に成功した。

以上、著者は赤色色素の化学変換を検討し、天然含有率の低い黄色および緑色色素へ誘導することに成功した。そして、単離段階では不明であった天然物の絶対立体配置を明

らかにした。本変換反応は、アブラムシ色素の構造類似性に着目し、色素を適切な条件で処理することで、別の天然色素化合物へと構造を変換させるという独創性に優れたものである。また、本色素変換および第四章で見出したシリカゲルを介した黄色色素の誘導体から単量体への分解反応の機構を考察し、それぞれの推定生成機構を立案している。これら一連の研究成果は、アブラムシ色素およびピラノナフトキノン二量体化合物に関して新たな知見を提供するものであり、天然物化学の発展に貢献すると考えられる。よって本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査（教授）	今川 洋
	副査（教授）	堂上 美和
	副査（教授）	山本 博文
	副査（外部）	難波 康祐

氏名	ひょうどう ただし 兵頭 直
本籍	愛媛県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 58 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学位授与の題目	共結晶化を活用した有機化合物の単結晶 X 線構造解析

指導教員		教授	山口 健太郎
論文審査委員	（主査）	教授	加藤 善久
	（副査）	教授	代田 修
	（副査）	講師	植木 正二
	（副査）	外部	瀬高 渉（東京都立大学）

単結晶 X 線構造解析は原子レベルで直接分子の構造情報が得られることから、最も信頼性の高い分子構造を明らかにする分析法の一つとして認知されている。しかし、結晶化しない液状化合物や、結晶化を行うに足る量を確保できない試料などには、単結晶 X 線構造解析は適用できない。この問題を解決する新たな手法として、東京大学の藤田らは単結晶を必要としない X 線構造解析法である「結晶スポンジ法 (CS 法)」を報告している。X 線解析による CS 法を用いればゲスト分子を含むホスト骨格を丸ごと構造解析できるが、その空孔内外には溶媒分子が数多く含まれていることがほとんどであり、目的分子とは別に多くの共存小分子を解析しなければならない。そこで、溶媒分子解析の負担が少なくゲスト分子のみを選択的に包接できる方法が必要であった。より小さな多孔質ホスト分子結晶を用いてこれを構造解析に応用したのが当教室で開発した新規 CS 法である。本研究は、非環状または環状分子による共結晶化法を用いた分子認識および構造決定法を確立し、さらにこの手法を種々の医薬品の構造決定に適用できる汎用分析法とすることを目的としている。これを多孔質結晶に実用化した手法が新たな CS 法である。

本研究では、はじめに非環状ホスト分子を用いてゲスト包接能を検討し、そこで得られた知見よりホスト分子の骨格を非環状から環状へ展開し、新規 CS による分子認識と構造決定について詳細に検討した。

本博士論文は 4 つの章からなり、緒論では本研究の背景および目的を示すと共に、本論文の構成について記述した。

第一章では、まず非環状ホスト分子による共結晶を用いた分子認識および構造決定について説明する。ピラジンユニットを持つ配向性の強い非環状アダマンタン分子の二量体環状超分子がゲスト分子であるパラキシレンの形を認識して共結晶を形成し、他の異性体や類似構造体が溶液中に共存しても選択的にパラキシレンのみが分離されることを明らかにした。また、ピリミジンユニットを持つ非環状分子を用いて、低分子ではあるがこれまでに解析困難であったゲスト分子との共結晶化を行い、ホスト分子とゲスト

分子の共結晶形成による分子認識および構造決定を行った。藤田 CS に代わる新しい高効率のホスト分子としてアダマンタンを含む非環状分子を合成し、このホスト分子より溶媒分子とゲスト分子の分離を可能とした。

第二章では、空孔をもった新しい環状ホスト分子の合成に成功し、この環状アダマンタン分子をジクロロメタンより再結晶したところ、単結晶が得られた。さらに、この空孔に生理活性アルコールである青葉アルコールが包接されることが確認された。この青葉アルコールは香料としてだけでなく 2014 年に昆虫生育抑制活性も併せ持つアルコールであることが示されている。X 線構造解析を行ったところ、空孔内部に青葉アルコールやアルデヒドが入ったものが解析された。これらの包接、または共結晶体のホスト-ゲスト相互作用であまり考慮されていない分散力の寄与を調べる試みが始まっている。これらを調べるために Hirshfeld 表面解析を行った。塩素置換したアダマンタン系環状化合物と臭素置換したアダマンタン系環状化合物から、管状構造を持つネットワーク構造からなる多孔性結晶を作製した。さらに、臭素置換したアダマンタン系環状化合物から、筒状構造を持つネットワーク構造からなる恒久的な多孔性結晶を作製した。ゲストの吸脱着により 1 次元空孔の形状や大きさが変化し、環状化合物のコンホメーション変化に伴うフレームワークの動的挙動が示された。一方、他のゲストが多孔性結晶に取り込まれると、その骨格は維持された。これらの過程はホスト結晶を溶かすことなくゲスト分子を包接する手法、即ち SCSC (single crystal to single crystal) 方式で起こり、X 線解析によって構造精密化した。

第三章では、SCSC 法による油状医薬品分子、イソフルラン及びホメピゾール、3-メチルピラゾールの高分解能 X 線構造解析を行い、これらの高分解能 3 次元構造解析に成功し、全身麻酔薬等の構造多様性を明らかにしている。また、既に藤田らが開発した CS 内におけるサリチル酸メチル分子を解析し、結晶格子内部空間に取り込まれた分子は特徴的な数種類のコンホマーで存在していることを示した。このことは、活性を示す分子の構造多様性を初めて原子の分解能で解明した例である。このサリチル酸メチルを独自に開発したテトラジンユニットを有する環状アダマンタンホスト分子を用いて再度サリチル酸メチルの X 線解析を行なったところ、このホストではサリチル酸メチルのコンホメーションを一義的に決定することができた。さらにこの結晶スポンジを用いて生理活

性を有する他のフェノール誘導体であるグアイアコールやオイゲノールについて構造解析を行なった結果、ホスト-ゲスト間の水素結合などの有無により空孔における配置が異なることが示された。結晶スポンジを用いた構造解析による医薬品の分子親和性の検出は独自のものであり、今後の構造活性相関の研究に寄与すると考えられる。テトラジンユニットを有するアダマンタン含有環状化合物の多孔性結晶は、液状医薬品やその関連化合物の取り込みや構造解明に適したホスト分子であることを示された。

第四章では、水溶性医薬品への応用を目指し、従来の結晶スポンジでは困難であった水溶性有機化合物の包接を実現するため、水分子自身の取り込みを行った。ピラジンまたはテトラジンユニットを有する3つのアダマンタン系環状化合物によって、1次元の空孔を有する多孔性有機結晶を生成し、空気または溶液中の水分子をSCSC方式で複数取り込むことが可能となった。

最後に第一章から第四章までで得られた主要な知見をまとめて、本論文の総括とした。

論文審査結果の要旨

本論文は4章からなり、単結晶 X 線構造解析によりこれまで困難とされてきた液体医薬品の構造解析を目的として行われた研究について論じられている。単結晶 X 線構造解析は、分子の構造を三次元で精密に構造解析できる方法である。しかし、この手法には名前の通り良質な単結晶を必要とする、と言う問題点がある。これを解決することを可能としたのが結晶スポンジ法である。この結晶スポンジ法により様々な有機化合物の解析例が報告されているが、解析可能な分子種は限定的であり、広範囲にわたる有機化合物に適用できる汎用性を備えた手法は知られていなかった。そこで、本研究で著者は、共結晶化を用いた新たな結晶スポンジによる単結晶 X 線構造解析法を確立し、さらにこれを液体医薬品の構造解明に応用した。

第一章では、まず非環状ホスト分子による共結晶を用いた分子認識および構造決定について検討している。ピラジンユニットを持つ配向性の強い非環状アダマンタン分子の二量体環状超分子がゲスト分子であるパラキシレンの形を認識して共結晶を形成し、他の異性体や類似構造体が溶液中に共存しても選択的にパラキシレンのみが分離されることを明らかにした。また、ピリミジンユニットを持つ非環状分子を用いて、低分子ではあるがこれまでに解析困難であったゲスト分子との共結晶化を行い、ホスト分子とゲスト分子の共結晶形成による分子認識および構造決定を行った。藤田結晶スポンジに代わる新しい高効率のホスト分子としてアダマンタンを含む非環状分子を合成し、このホスト分子より溶媒分子とゲスト分子の分離を可能とした。

第二章では、空孔を持つ新しい環状ホスト分子の合成に成功し、単結晶を得ている。さらに、この空孔内部の溶媒除去を行い空の空孔を持った安定な結晶の作製に成功した。この空孔に生理活性アルコールである青葉アルコールが包接されることを確認している。これらの包接、または共結晶体のホスト-ゲスト相互作用を調べるために Hirshfeld 表面解析を行った。さらに、臭素置換したアダマンタン系環状化合物から、筒状構造を持つネットワーク構造からなる恒久的な多孔性結晶を作製した。ゲストの吸脱着により 1 次元空孔の形状や大きさが変化することを見出し、環状化合物のコンホメーション変化に伴うフレームワークの動的挙動が示された。一方、他のゲストが多孔性結晶に取り

込まれると、その骨格は維持された。これらの過程はホスト結晶を溶かすことなくゲスト分子を包接する手法、即ち SCSC (single crystal to single crystal)方式で起こり、X 線解析によって構造精密化を行っている。

第三章では、SCSC 法による油状医薬品分子、イソフルラン及びホメピゾール、3-メチルピラゾールの X 線構造解析を行い、これらの 3 次元構造解析に成功し、全身麻酔薬等の精密構造を明らかにしている。さらに、この新規結晶スポンジを用いて生理活性を有するフェノール誘導体であるサリチル酸メチル、グアイアコールやオイゲノールについて構造解析を行なった結果、ホスト-ゲスト間の水素結合などにより空孔における構造配置が示された。テトラジンユニットを有するアダマンタン含有環状化合物の多孔性結晶は、液状医薬品やその関連化合物の取り込みや構造解明に適したホスト分子であることが示された。

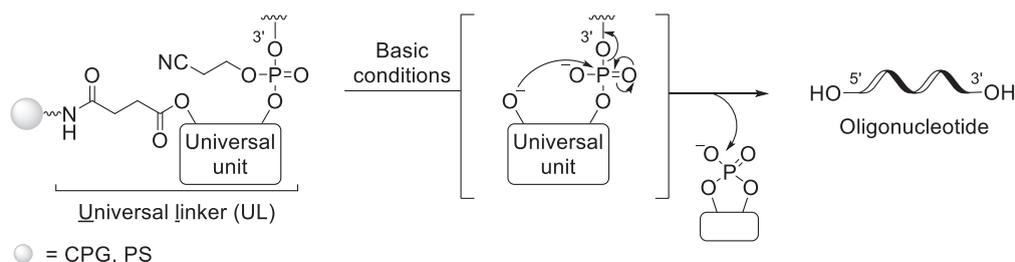
第四章では、水溶性医薬品への応用を目指し、従来の結晶スポンジでは困難であった水溶性有機化合物の包接を実現するため、水分子自身の取り込みを行った。ピラジンまたはテトラジンユニットを有する 3 つのアダマンタン系環状化合物によって、1 次元の空孔を有する多孔性有機結晶を創成し、空気または溶液中の水分子を SCSC 方式で複数取り込むことを明らかとした。さらに、これを基に幾つかの水溶性医薬品の構造解析を行っている。

以上のように、本論文は SCSC 法が単結晶 X 線構造解析において極めて有用な手法であることを明らかにした独創性の高い研究であり、ホスト-ゲスト化学の発展に寄与する重要な新規の知見を含む内容である。本研究の内容は主論文 5 報として公表され、さらに本研究に関連する学術論文 23 報を公表しており、業績としても充分である。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査（教授）	加藤	善久
	副査（教授）	代田	修
	副査（講師）	植木	正二
	副査（外部）	瀬高	渉

氏名	やまもと かずき 山本 一輝
本籍	徳島県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 59 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学位授与の題目	オリゴヌクレオチド固相合成に利用する 新規ユニバーサルユニットの開発とその応用
指導教員	教授 張 功幸
論文審査委員	(主査) 教授 田中 好幸 (副査) 教授 山本 博文 (副査) 教授 吉田 昌裕 (副査) 教授 南川 典昭 (徳島大学大学院医歯薬研究部)

現在、オリゴヌクレオチドの固相合成では、固相担体としてヌクレオシドがあらかじめ担持された樹脂に加え、ユニバーサルユニット (1,2-ジオール構造) を含むリンカー (ユニバーサルリンカー、UL) で表面修飾した樹脂がしばしば利用されている (Scheme 1)。UL は天然の核酸塩基を有するヌクレオシドのホスホロアミダイト体だけでなく、様々な非天然型ホスホロアミダイト体と縮合できる。そのため、3'末端に様々な基質を含むオリゴヌクレオチドの合成が可能である。一般的に UL は塩基条件下加熱処理することで除去されるが、①熱に不安定な基質 (例えば RNA など) を持つオリゴヌクレオチドの合成に適用困難である、②処理が不十分である場合、中間体であるユニバーサルユニット付加体が生じ、目的のオリゴヌクレオチドとの分離がしばしば困難となるなどの問題がある。そこで著者は、新たな材料の開発によりこれら問題の改善を目指した。



Scheme 1. Solid-phase oligonucleotide synthesis using a UL-attached resin.

まず、精製の問題を改善することを目指し、新たな UL としてビスクロ[2.2.2]オクタン-2,3-ジオール骨格を持つジベンゾ型 UL1 を開発した (Figure 1)。このものはオリゴヌクレオチドを放出するために長時間の塩基処理 (濃アンモニア水、55 °C、48 時間) を必要とするものの、ユニバーサルユニットの高い脂溶性や化学安定性により、HPLC 上で目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体を脂溶性の差を利用して分離することが可能であった。その結果の一例として、UL1 をホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチド^{1),2)}の合成に適用したところ、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体のピークを完全に分離できることが示された。一方、市販 UL を用いた場合には、一つの幅広いピーク中にユニバーサルユニット付加体のピークが重なり、目的のオリゴヌクレオチドと分離することができなかった。

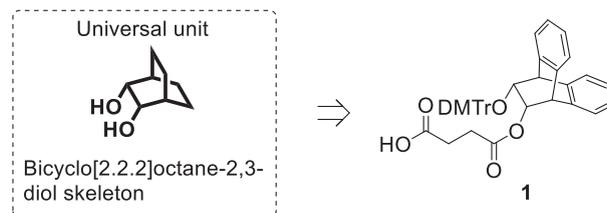


Figure 1. Dibenzo-fused type UL1 developed in this study.

続いて、より短時間でオリゴヌクレオチドを放出することを目指し、UL の基本骨格として 7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオール骨格に脂溶性ユニットとしてフェナンスレン構造を付与したユニバーサルユニットを持つ UL2 を開発した (Figure 2)。本骨格は現在汎用されている UL (UnyLinker™、Glen UnySupport™または CUTAG™)^{1), 2)} の基本骨格であることから、それらに利用される塩基条件 (濃アンモニア水、55 °C、8 時間) でオリゴヌクレオチドを放出可能であった。さらに、オリゴヌクレオチドを放出する過程で生じるユニバーサルユニットの環状リン酸体を HPLC 上で高感度に検出できることも見出した。また、UL2 が持つフェナンスレン構造により、先に述べた UL1 と同様、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体を脂溶性の差を利用して容易に分離できることが示された。以上の結果から、UL2 は目的のオリゴヌクレオチドを高純度で得るために有用であると考えられる。

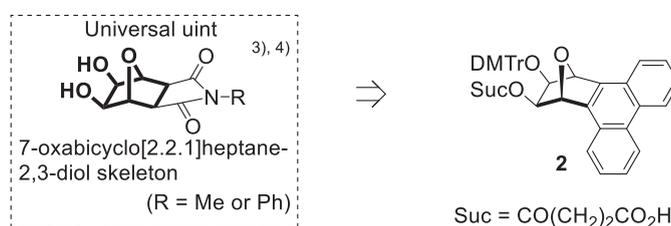


Figure 2. Phenanthrene-fused type UL2 developed in this study.

開発した新たな UL により、UL 修飾樹脂を用いるオリゴヌクレオチド合成における精製問題を改善することができた。一方、UL の除去条件は未だ加熱処理を必要とした。そこで、著者は UL をより温和な条件で迅速に除去するために、UL からオリゴヌクレオチドが放出する反応のメカニズムに着目し、塩基処理に安定な *O*-アルキルホスホロアミダイト体 **3** を開発した (Figure 3)。これらを UL との縮合に用いることで、分子内環化反応がリン酸トリエステルを直接介して進行し、速やかにオリゴヌクレオチドが放出されることを見出した。特に、リン酸部の保護基としてネオペンチル基 (Np) やイソプロピル基 (iPr) を用いた場合、オリゴヌクレオチド合成において最も温和な 3 種類の塩基条件下、市販の UL (Universal Support™、cleavage condition: e.g. 28% NH₃ aq., 80 °C, 8 h) から 9 割以上目的のオリゴヌクレオチドを放出できることが明らかとなった (従来のシアノエチル基ではいずれの条件でも 2 割以下)。さらに、*O*-アルキルホスホロアミダイト体は本研究で開発したフェナンスレン型 UL や市販の Universal Support III™にも適用可能であり、汎用性があることも示された。

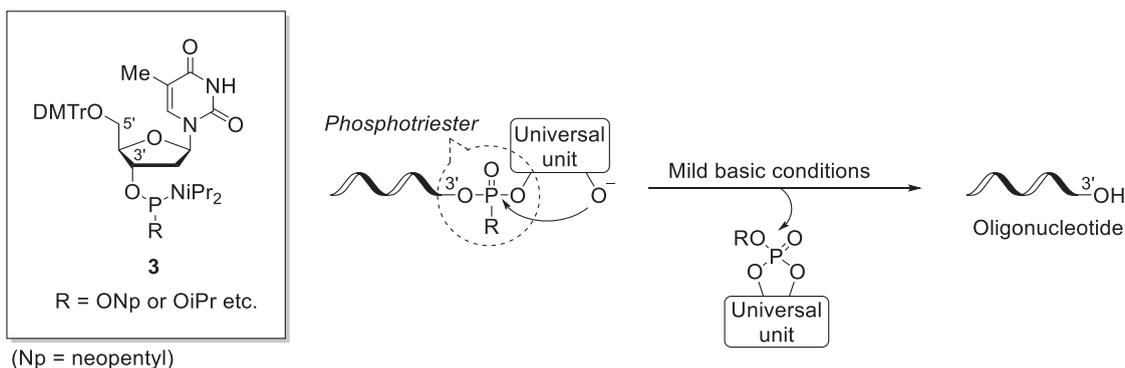


Figure 3. Release of oligonucleotide from UL via a phosphotriester.

最後に、ビスクロ型ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイト体 **4** を開発し、UL 修飾樹脂を利用しない 3'末端修飾オリゴヌクレオチドの合成やオリゴヌクレオチドのタンデム合成を新たに試みた (Figure 4)。まず、**4** を 3'末端に含むオリゴヌクレオチドを表面が水酸基修飾された樹脂を用いて合成し、塩基処理を行った (Figure 4、上段)。その結果、樹脂から 8 割以上オリゴヌクレオチドが放出されることが分かった。この結果から、UL 修飾樹脂を用いないオリゴヌクレオチド合成が可能であることが示唆された。また、**4** をオリゴヌクレオチドのタンデム合成に適用した (Figure 4、下段)。本合成法は、塩基処理後鎖切断により複数のオリゴヌクレオチドを一挙に得ることができ、McLean が開発した TOPS^{TM3}) や最近我々が報告した CS-1⁴⁾ といった鎖切断型スペーサー分子を用いて行う。このタンデム合成に **4** を利用したところ、従来のタンデム合成では利用できないオリゴヌクレオチド合成における温和な塩基条件 (炭酸カリウムメタノール溶液、室温、4 時間) で目的の 2 種類のオリゴヌクレオチドのみが得られることを見出した。さらに、**4** を二重鎖核酸のタンデム合成に適用したところ、従来の二重鎖核酸の合成で必要な 2 種類のオリゴヌクレオチドの正確な混合、複数回の精製を簡略化し、鎖切断後一挙に二重鎖核酸として得られることを見出した。

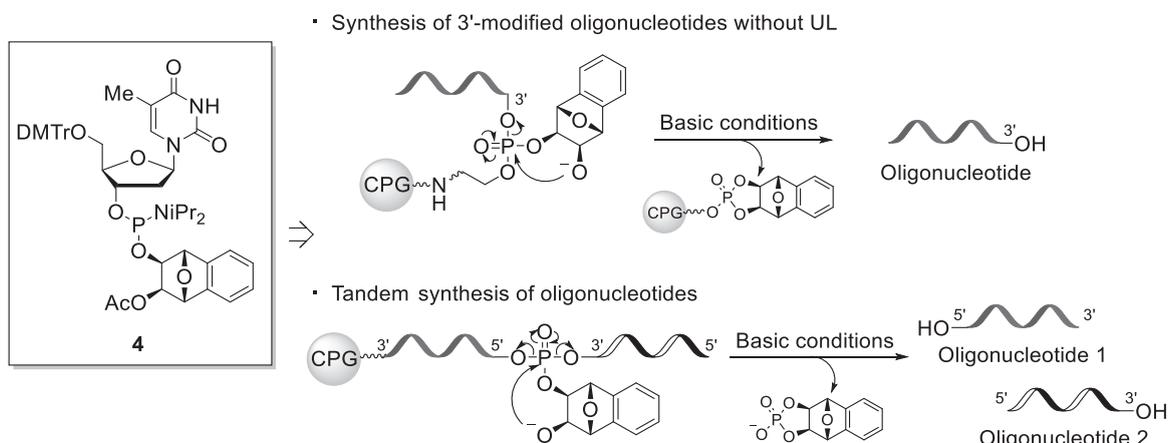


Figure 4. Strategy for oligonucleotide synthesis using universal unit-conjugated phosphoramidite **4**.

参考文献

- 1) Ravikumar, V. T.; Kumar, R. K.; Zhu, X. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2269–2274.
- 2) Ravikumar, V. T.; Kumar, R. K.; Olsen, P.; Moore, M. N.; Carty, R. L.; Andrade, M.; Gorman, D.; Zhu, X.; Cedillo, I.; Wang, Z.; Mendez, L.; Scozzari, A. N.; Aguirre, G.; Somanathan, R.; Berneès, S. *Org. Proc. Res. Dev.* **2008**, *12*, 399–410.
- 3) Hardy, P. M.; Holland, D.; Scott, S.; Garman, A. J.; Newton, C. R.; Mclean, M. J. R. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2998–3004.
- 4) Yamamoto, K.; Fuchi, Y.; Okabe, M.; Osawa, T.; Ito, Y.; Hari, Y. *Synthesis* **2021**, *53*, 4440–4448.

論文審査結果の要旨

本論文は、核酸合成に用いられているユニバーサルリンカー (UL) の改良と応用を目指した論文である。その具体的内容として、①オリゴヌクレオチドの固相合成に利用される現行のユニバーサルリンカー (UL) の問題を、新たなリンカー分子の開発により改善できること、②UL と同等の基本骨格 (ユニバーサルユニット) を持つホスホロアミダイト体を開発し、これを用いた効率的なオリゴヌクレオチド合成が実現すること、これら二つの内容に関して論じられている。これらの内容をまとめた本論文は、次の4つの章から構成されている。

まず、第一章では、精製の問題 (目的のオリゴヌクレオチドと、副産物であるユニバーサルユニット付加体の分離ができない問題) を改善するため、著者は新たな UL としてビシクロ[2.2.2]オクタン-2,3-ジオール骨格を持つジベンゾ型 UL を開発した。このものはオリゴヌクレオチドを放出するために長時間の塩基処理 (濃アンモニア水、55 °C、48時間) を必要とするものの、ユニバーサルユニットの高い脂溶性や化学安定性により、HPLC 上で目的のオリゴヌクレオチドと、副産物であるユニバーサルユニット付加体を脂溶性の差を利用して分離することを容易にした。

第二章では、第一章で得た知見を基に、より短時間でオリゴヌクレオチドを放出できる 7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオール骨格に脂溶性ユニットとしてフェナンスレン構造を持つ UL を開発した。このものは現在汎用されている UL (UnyLinker™ など) で利用される塩基条件下 (濃アンモニア水、55 °C、8時間)、ユニバーサルユニット付加体を完全に除去できる特徴を持つ。さらに、脂溶性の差を利用して容易にユニバーサルユニット付加体を分離できるだけでなく、オリゴヌクレオチドが放出される過程で生じるユニバーサルユニットの環状リン酸体を HPLC 上で高感度に検出可能である。以上の結果は、フェナンスレン型 UL が目的のオリゴヌクレオチドを高純度で得るために有用であることを示している。第一章、第二章で開発された UL により、既存の UL で問題であった精製の難しさを解決し、UL 使用時の高純度サンプルの調製へと道を拓いた。

第三章では、長時間の加熱処理を必要とする UL の除去を、より温和な条件で行うこ

とを目指している。ここで著者は UL からオリゴヌクレオチドが放出される反応のメカニズムに着目し、塩基処理に安定な *O*-アルキルホスホロアミダイト体を複数開発した。これらを市販の UL (Universal Support™ や Universal Support III™) との縮合に用いることで、速やかにオリゴヌクレオチドを放出できることを見出した。さらに、本研究で開発したフェナンスレン型 UL にも適用可能であり、*O*-アルキルホスホロアミダイト体は汎用性のある UL であることも示した。

第四章では、ビスクロ型ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイト体を開発した。このものをオリゴヌクレオチドの 3'末端に用いることで、UL 修飾樹脂を利用しない新たな 3'末端修飾オリゴヌクレオチドの合成が可能となった。また、オリゴヌクレオチド鎖中に導入することで、複数のオリゴヌクレオチドを一挙に得ることができるオリゴヌクレオチドのタンデム合成を行うことができ、従来よりも温和な条件下で利用可能であった。さらに、オリゴヌクレオチドのタンデム合成では、二重鎖核酸の合成に応用することで、二重鎖核酸を調製するときに必要な 2 種類のオリゴヌクレオチドの正確な混合、複数回の精製などの工程を簡略化し、鎖切断後一挙に二重鎖核酸として得られることを見出した。

以上、これらの研究結果により、UL を用いたオリゴヌクレオチド固相合成における問題点である副産物との分離の問題・UL からの切り出し効率の問題を大幅に改善している。また、温和な条件下で切断されるリンカーの分子設計では、反応機構に基づいて論理的な改変指針が導出されており、極めてロジカルに実験が進められている。このように、本論文を通じて全ての実験が UL の改良という目的に沿って実施されており、UL を用いたオリゴヌクレオチド合成が、今後本手法に置き換わることが十分期待される結果であると考えられる。よって、本論文は博士 (薬学) の学位に値するものと認める。

論文審査委員 主査 (教授) 田中 好幸
副査 (教授) 山本 博文
副査 (教授) 吉田 昌裕
副査 (外部) 南川 典昭

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第46号)

令和5年5月 発行

編集・発行

徳島文理大学大学院薬学研究科
徳島市山城町西浜傍示180
〒770-8514 TEL 088-602-8210

印刷

原田印刷出版株式会社
徳島市西大工町4丁目5
〒770-0903 TEL 088-622-2356
FAX 088-622-2357
E-mail: haradapp@khf.biglobe.ne.jp