

博士論文

syn 配座固定プリンヌクレオチドを含む
オリゴ核酸の合成と非 B 型 DNA 形成能評価

徳島文理大学大学院薬学研究科

薬学専攻 博士課程

花城 帆乃佳

指導教授 張 功幸

令和七年提出

目次

| | |
|--|-------|
| 緒論..... | 1-4 |
| 第一章 <i>syn</i> 配座固定プリンヌクレオチド含有オリゴ核酸の合成 | |
| 第一節 <i>syn</i> 配座固定プリンアナログの合成計画..... | 5 |
| 第二節 <i>syn</i> 型固定プリンヌクレオシドのホスホロアミダイト体の合成..... | 5-11 |
| 第三節 <i>syn</i> 型固定プリンヌクレオチドのオリゴ核酸への導入..... | 12-14 |
| 第二章 <i>syn</i> 配座固定プリンヌクレオチドを含むオリゴ核酸の非 B 型 DNA 形成能評価 | |
| 第一節 Z 型 DNA 形成能の評価..... | 15-25 |
| 第二節 パラレル型フーグスティーン二重鎖形成能の評価..... | 26-34 |
| 総括..... | 35 |
| 謝辞..... | 36 |
| 実験の部..... | 37-53 |
| 発表論文..... | 54 |
| 参考文献..... | 55-56 |

緒論

DNA の高次構造は、一般的に知られている B 型 DNA 二重鎖の他に Z 型 DNA、三重鎖、四重鎖などの「非 B 型 DNA」構造もとる。このような特殊な DNA 構造は細胞内で局所的かつ一時的に形成され、DNA の転写、翻訳、複製などの遺伝子発現の制御において重要な役割を担っていると考えられている。¹⁻³ その多様な核酸高次構造の形成にはプリン塩基部の配向性が関与しており、糖に対して同じ方向の *syn* 型と糖に対して反対側の *anti* 型が知られている (Figure 1)。ヌクレオシドでは通常 *syn* と *anti* の平衡状態であるものの、*syn* 配座は熱力学的に不安定である。そのため、生体内に最も多く存在する B 型 DNA や三重鎖 DNA、パラレル型のグアニン四重鎖など多くの場合、プリン塩基は *anti* 型をとっている。一方、*syn* 型のプリン塩基を含む核酸高次構造として、Z 型 DNA やアンチパラレル型のグアニン四重鎖などが知られている。¹ しかし、*syn* 型のプリン塩基を含むこれら非 B 型 DNA は生体内で形成され重要な役割を担っていると考えられているものの、*in vitro* で形成させるには低 pH や高塩濃度など特殊な条件を必要とする。

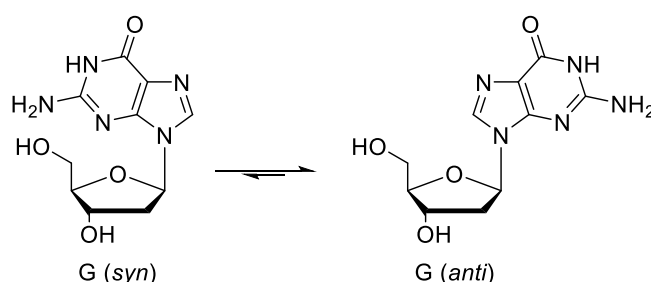


Figure 1. プリン塩基の配向性

そのような背景下、*syn* 型プリンヌクレオチドを含む核酸高次構造の安定性向上を目指し、グアニン塩基 8 位に置換基を導入したアナログが開発された (Figure 2)。⁴⁻⁷ これらは、8 位置換基と糖部との立体障害を避けるため *syn* 型を有利にとる。しかし、メチル基やブromo基のように置換基が小さい場合、*syn* 型だけでなく *anti* 型もとることも知られている。^{8,9} 一方、^{8Ph}G のように大きい置換基の場合、*syn* 型をとりやすくなるものの 8 位置換基のかさ高さゆえにタンパク結合を阻害するなど生物学的機能を保持していない可能性も考えられる。⁶

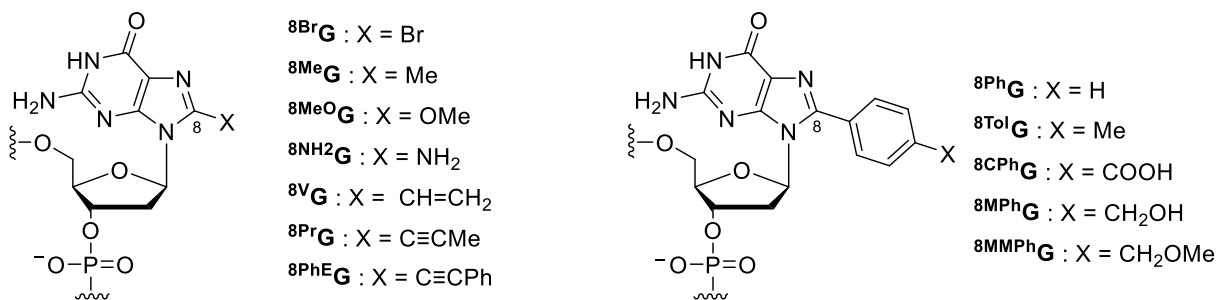


Figure 2. 8位修飾 2'-デオキシグアノシン

そこで、小さい置換基でプリン塩基を *syn* 型に固定できれば、天然の *syn* 型プリン塩基の等価体として機能する新たな核酸材料となることが期待されることから、著者は *syn* 配座固定プリンヌクレオチドを開発することとした。本研究では非 B 型 DNA の中でも Z 型 DNA と平行型フーグスティーン二重鎖に着目し、それら核酸高次構造の形成能評価を行うこととした。

まず、一つ目のターゲットである Z 型 DNA は、1979 年に Rich らによって左巻き DNA 二重鎖の結晶構造が解析により発見された。¹⁰ その論文において、 $d(\text{CG})_n$ のようなプリン塩基とピリミジン塩基が繰り返される配列は通常 B 型 DNA をとるが、塩濃度の上昇に従ってプリン塩基のみ *anti* 型から *syn* 型に反転し Z 型 DNA に遷移することが明らかとなった (Figure 3)。通常この B-Z 遷移は高塩濃度で起こるが、仮に *syn* 型に固定したプリン塩基を用いれば、より低塩濃度で Z 型 DNA を形成することが可能になると考えた。

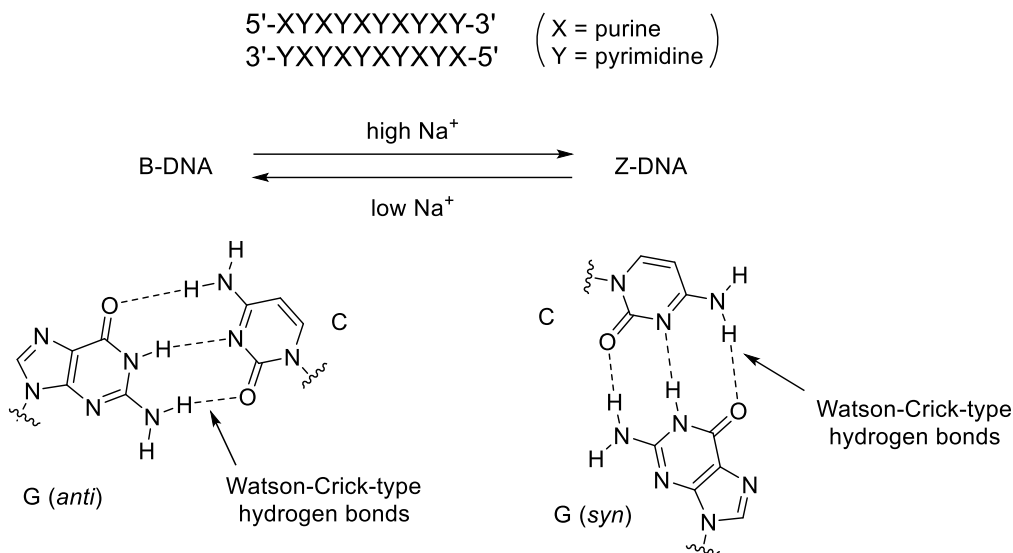


Figure 3. *syn* 型プリン塩基による Z 型 DNA の選択的形成

次に、もう一つのターゲットである平行型フーグスティーン二重鎖は、1993 年に Liu らによって報告され、¹¹ ホモプリン鎖とホモピリミジン鎖からなるオリゴ核酸が平行な二重鎖を形成する。この時、TA 塩基対と CG 塩基対はいずれもフーグスティーン型水素

結合を介して形成しており、特に CG 塩基対では、シトシンがグアニン塩基を認識するためプロトン化される (Figure 4)。この時のプリン塩基は通常 *anti* 型であるが、仮にこれを *syn* 型に固定できれば、フーグスティーン側でワトソンクリック型水素結合を形成できる。それにより、CG 塩基対はシトシンのプロトン化が不要となり、かつ水素結合も三本形成できるため pH に依存しない安定な平行型二重鎖を形成できると考えられる。一方、AT 塩基対も同様にワトソンクリック型水素結合をもつ安定な二重鎖を形成できる可能性がある。

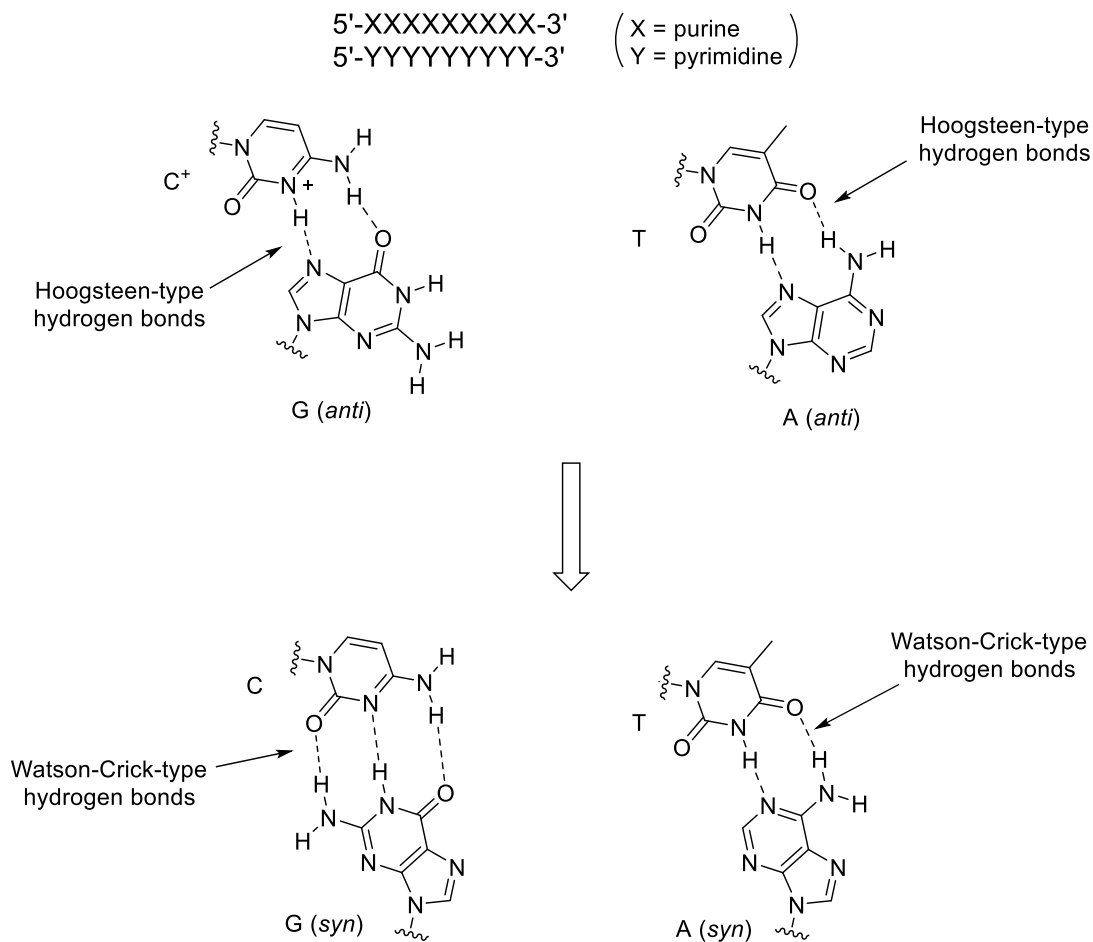


Figure 4. *syn* 型プリン塩基による平行型二重鎖の選択的形成

以上のことを実現するために、分子デザインとして、Figure 5 に示しているような構造を設計した。これらのものはプリン塩基部 8 位と糖部 1'位を小さなエチレンユニットで架橋しているため、生物学的機能を妨げず天然の *syn* 型プリンヌクレオチドの等価体として機能することが期待される。

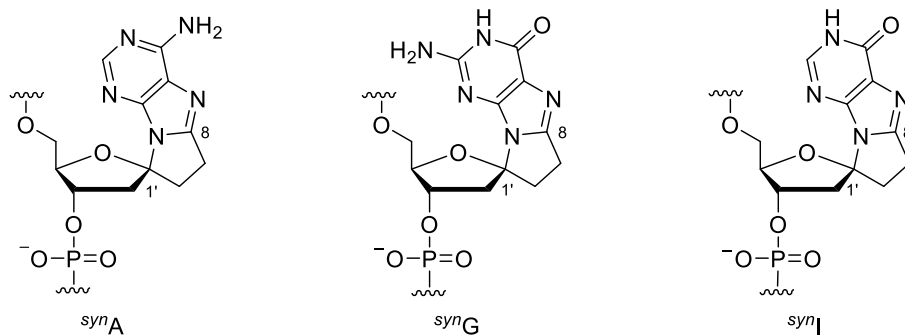


Figure 5. 設計した3種類の *syn* 配座固定プリンヌクレオチド

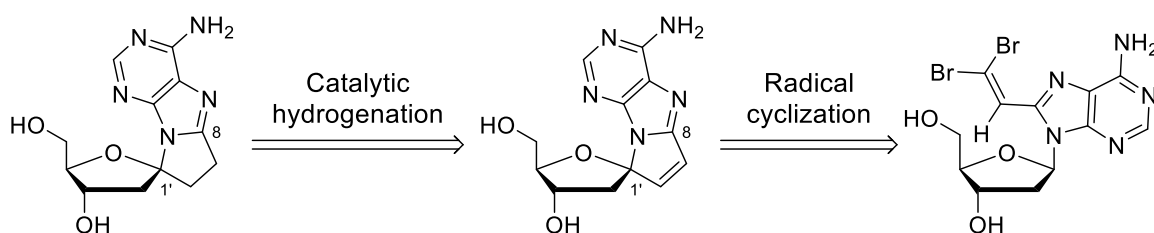
本論文の第一章では、3種類の *syn* 配座固定プリンヌクレオチドの合成を検討した。2'-デオキシグアノシン体の合成は困難であったものの、2'-デオキシアデノシン及びグアニン塩基等価体であるヒポキサンチン塩基をもつ 2'-デオキシイノシンについては、目的とする *syn* 配座固定したホスホロアミダイト体を合成することに成功した。そして、それらホスホロアミダイト体をオリゴ核酸へ導入し、精製方法を検討することで最終的に *syn*A あるいは *syn*I を有する目的のオリゴ核酸を得た。

第二章では、*syn*A あるいは *syn*I 含有オリゴ核酸の非 B 型 DNA 形成能評価を行った。これまで検討されていなかった *syn* 型アデノシン及びイノシンアナログが Z 型 DNA を安定化することを明らかにした。また、これらは中性条件でパラレル型フーグスティーン二重鎖を形成でき、特に *syn*I は、pH に非依存的な形成を可能とした。

第一章 *syn* 配座固定プリンヌクレオチド含有オリゴ核酸の合成

第一節 *syn* 配座固定プリンヌクレオシドの合成計画

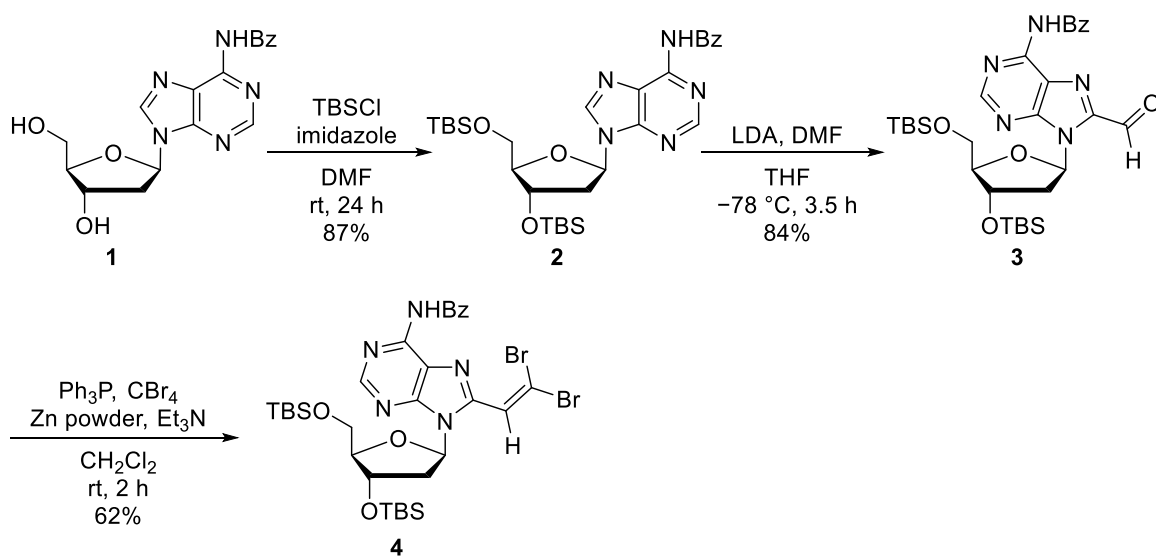
syn 配座固定プリンアナログの逆合成経路を Scheme 1 に示す。架橋部は、8,1'-エテノプリンヌクレオシド合成の報告に従い、¹²⁻¹⁴ 1,5-水素原子移動を利用したラジカル環化反応で構築することとした。オレフィン部は、求核剤によるマイケル付加反応が起こることが報告されており、¹⁵ オリゴ核酸合成および精製過程において架橋部が分解する可能性があるため、接触水素化により還元し、エチレンユニットとすることにした。



Scheme 1. ラジカル環化反応を用いた *syn* 配座固定 2'-デオキシアデノシンの合成

第二節 *syn* 配座固定プリンヌクレオシドのホスホロアミダイトの合成

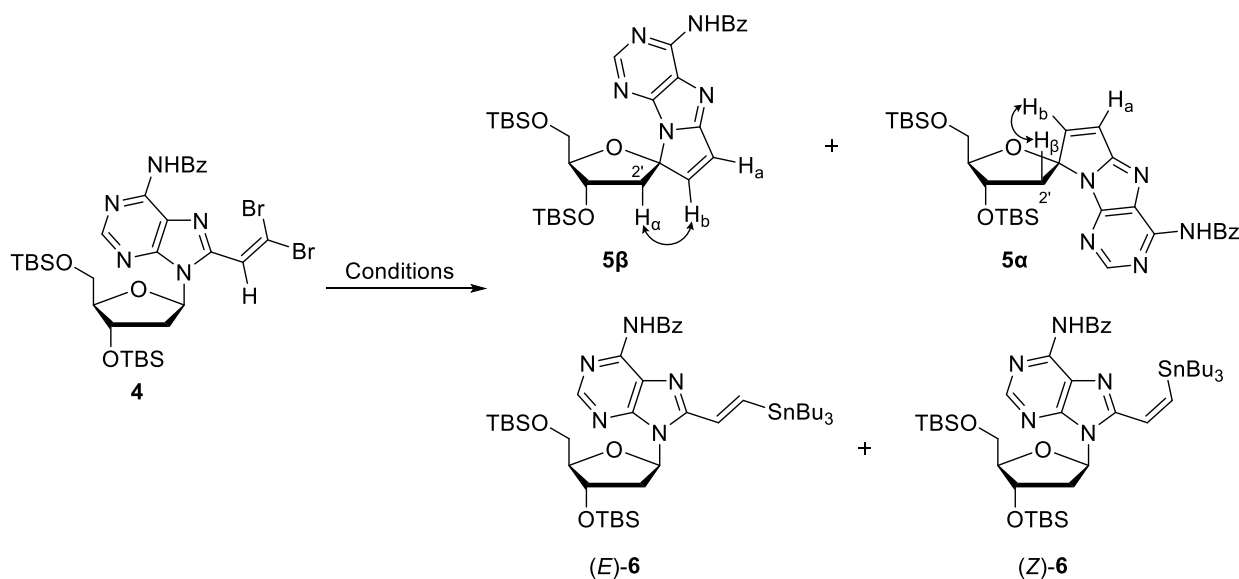
はじめに、*syn* 配座固定 2'-デオキシアデノシンの合成を行った。ラジカル前駆体であるジブロモオレフィン体の合成経路を Scheme 2 に示す。*N*⁶-ベンゾイル-2'-デオキシアデノシンを出発原料として、初めに既知の方法に従い糖部ヒドロキシ基を TBS 化し、¹⁶ 続く 8 位のホルミル化により化合物 **3** を得た。さらに、**3** のジブロモオレフィン化により 62%の収率で化合物 **4** を得た。



Scheme 2. ジブロモオレフィン **4** の合成

続いて、架橋構築の鍵となるラジカル環化反応を検討した (Table 1)。(n-Bu₃Sn)₂ 存在下、400W 高圧水銀灯で照射したが望みの環化体は得られなかった (Entry 1)。次に、n-Bu₃SnH および AIBN で処理すると、目的の環化体 **5β** とそのアノマー体 **5α** がわずかに生成したが、n-Bu₃SnH からの水素引き抜きおよびトリブチルスズラジカルの付加が進行したためか、**(E)-6** 及び **(Z)-6** (49%、E : Z = 1.2 : 1) が主生成物として得られた (Entry 2)。そこで、分子間反応を抑制するため、シリンジポンプを用いて n-Bu₃SnH と AIBN の混合溶液を 1 時間かけて滴下したところ、目的の環化体 **5** の収率は 22% (**5β** : **5α** = 1.8 : 1) に向上し、**(E)-6** 及び **(Z)-6** の収率は 16% に低下した (Entry 3)。さらに、n-Bu₃SnH と AIBN の当量数をそれぞれ 2.2 eq.、0.2 eq. に減らすことにより環化体 **5** の収率は 30% とわずかに向上した (Entry 4)。一方で、このラジカル環化反応において、iPr₂NEt の非存在下では **5** の収率の再現性に乏しかった。それは、おそらく反応中に発生した酸 (HBr) により **5** のグリコシド結合が切断されたためと考えられた。なお、**5β** と **5α** の立体化学は、それぞれ 2'-H_α とオレフィン部 H_b 間、および 2'-H_β とオレフィン部 H_β 間の NOESY 相関が見られたことにより決定した。

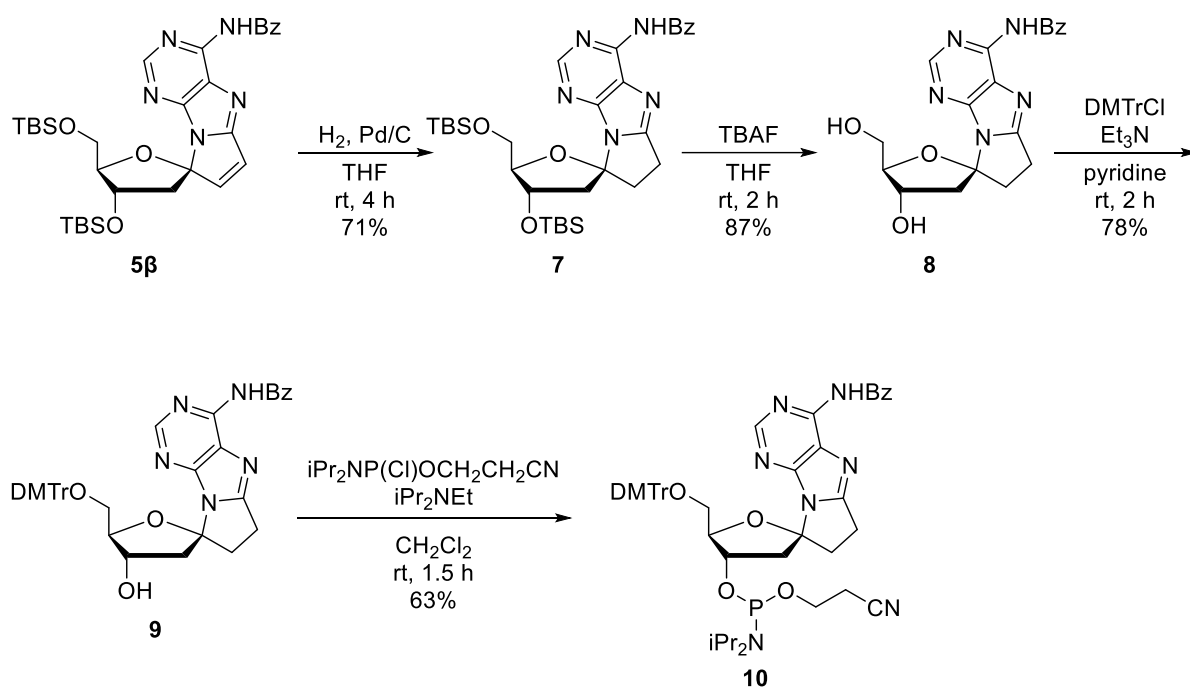
Table 1. ジブromoオレフィン **4** のラジカル環化反応



| Entry | Conditions | Yield (%) | |
|------------------|---|---------------------|---------------------|
| | | 5 (β:α) | 6 (E:Z) |
| 1 | (Bu ₃ Sn) ₂ (3 eq.), benzene, 400W high-pressure mercury lamp, 7 h | n.d. ^[b] | n.d. ^[b] |
| 2 | n-Bu ₃ SnH (4.4 eq.), AIBN (0.4 eq.), iPr ₂ NEt (5 eq.), toluene, reflux, 1 h | trace | 49 (1.2:1) |
| 3 ^[a] | n-Bu ₃ SnH (4.4 eq.), AIBN (0.4 eq.), iPr ₂ NEt (5 eq.), toluene, reflux, 1 h | 22 (1.8:1) | 16 (1.2:1) |
| 4 ^[a] | n-Bu ₃ SnH (2.2 eq.), AIBN (0.2 eq.), iPr ₂ NEt (5 eq.), toluene, reflux, 1 h | 30 (1.7:1) | trace |

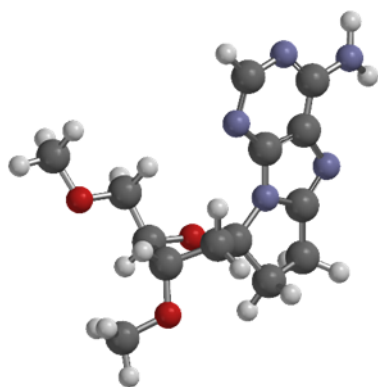
[a] Addition of a solution of n-Bu₃SnH and AIBN in toluene via a syringe pump for over 1 h. [b] n.d. = not detected.

化合物 **5β** からホスホロアミダイト体への合成経路を Scheme 3 に示す。**5β** の架橋部分のオレフィンの接触水素化により、化合物 **7** が 71%の収率で得られた。化合物 **7** の TBS 基の脱保護とそれに続く **8** の 5'位ヒドロキシ基の 4,4'-ジメトキシトリチル (DMTr) 保護により、化合物 **9** を得た。最後に、化合物 **9** の 3'-ヒドロキシ基のホスフィチル化により、オリゴ核酸合成に利用するホスホロアミダイト体 **10** を得ることに成功した。

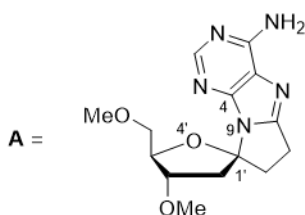


Scheme 3. ホスホロアミダイト **10** の合成

さらに、今回設計した 8,1'-エチレン架橋体のモノマー構造を精査すべく、DFT 計算により、構造を単純化した化合物 **A** の最安定構造を求めた。その結果、アデニン塩基の配向を示す二面角の値は 73° (*syn* 型) であり、Z 型 DNA 形成時のグアニンがとる角度と同等であることが確認された。^{1,17,18} また、糖の配座は S 型 (*C3'-exo*) であり、これは DNA がとりやすい配座と同じであった (Figure 6)。



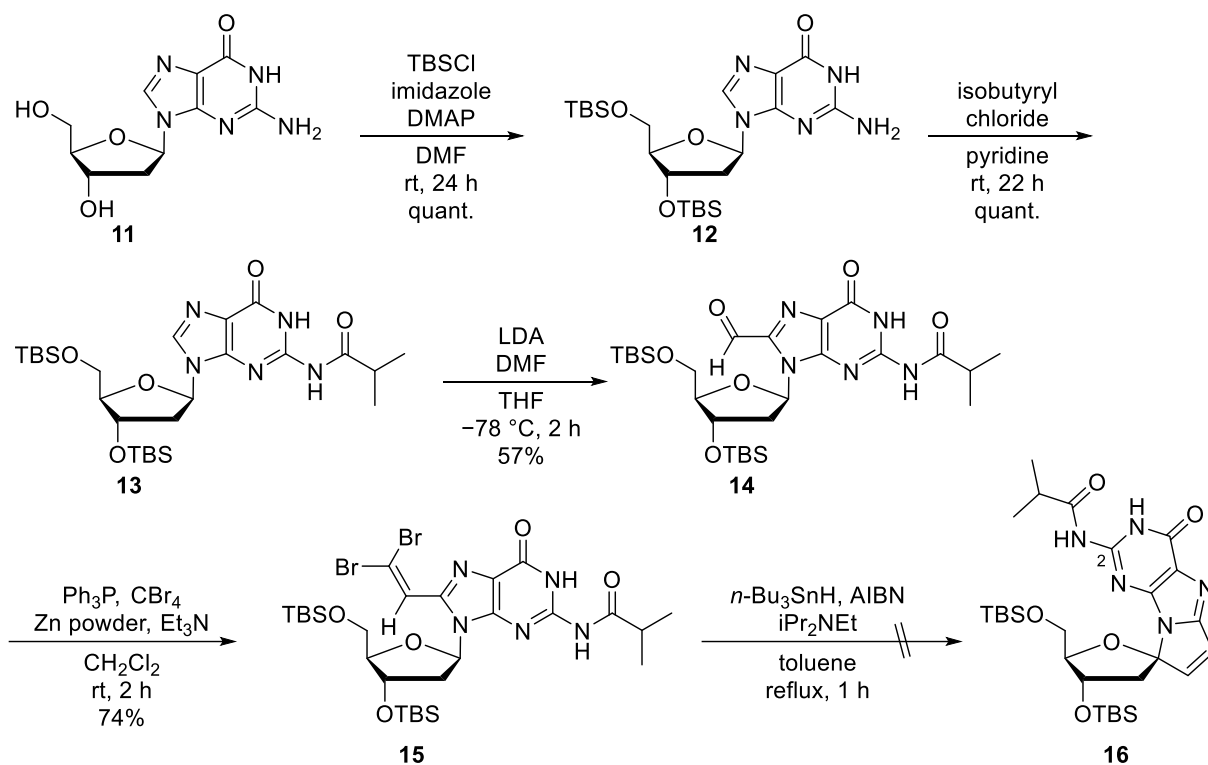
| sugar conformational parameters | deg. |
|---------------------------------|---------------------------|
| v_0 (C4'-O4'-C1'-C2') | -2.95 |
| v_1 (O4'-C1'-C2'-C3') | 21.68 |
| v_2 (C1'-C2'-C3'-C4') | -30.74 |
| v_3 (C2'-C3'-C4'-O4') | 29.45 |
| v_4 (C3'-C4'-O4'-C1') | -16.19 |
| P | 192.94 (<i>C3'-exo</i>) |
| v_{\max} | 31.54 |
| χ (O4'-C1'-N9-C4) | 73.00 (<i>syn</i>) |



Job type: Geometry optimization
 Method: B3LYP
 Basis set: 6-311+G**

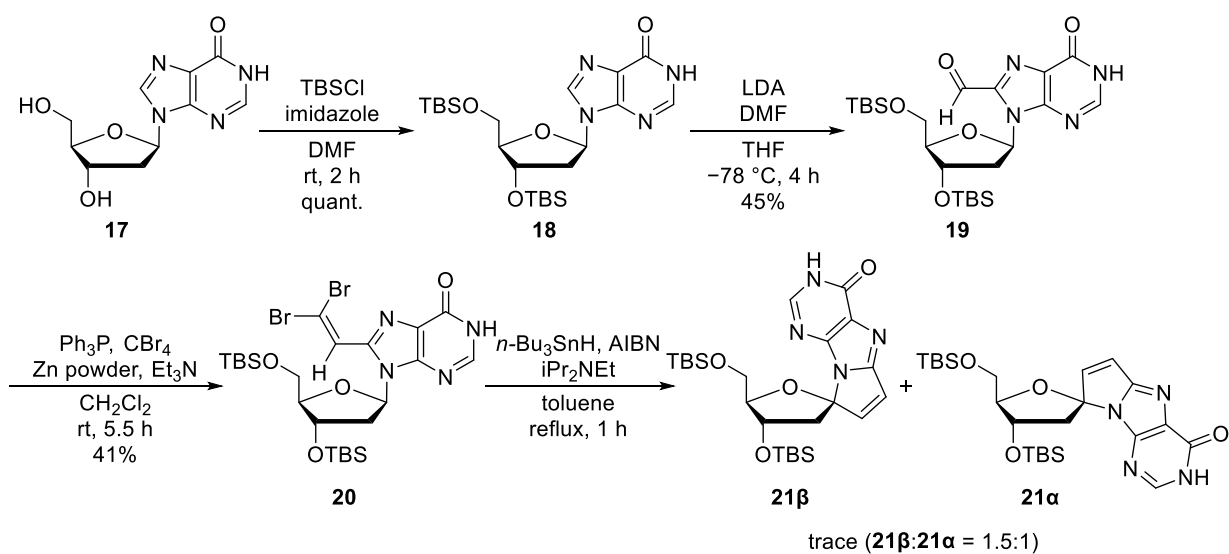
Figure 6. 化合物 **A** のエネルギー最安定構造

次に、*syn* 配座固定 2'-デオキシグアノシンの合成を試みた。その合成経路を Scheme 4 に示す。2'-デオキシグアノシンを出発原料として、既知の方法に従い糖部ヒドロキシ基を TBS 化、続くグアニンの 2-アミノ基のイソブチリル化により、化合物 **13** へと誘導した。¹⁹ その後、8 位のホルミル化、ジブromoオレフィン化により化合物 **15** を合成した。次いで、2'-デオキシアデノシン体と同様の条件にて環化反応を行ったが、目的の環化体 **16** は得られなかった。塩基部 2 位のアミノ基の保護基の立体障害により、*syn* 配座をとりにくいことが想定されたため、保護基を種々検討したが、いずれの場合も望みの環化体を得ることができなかった。



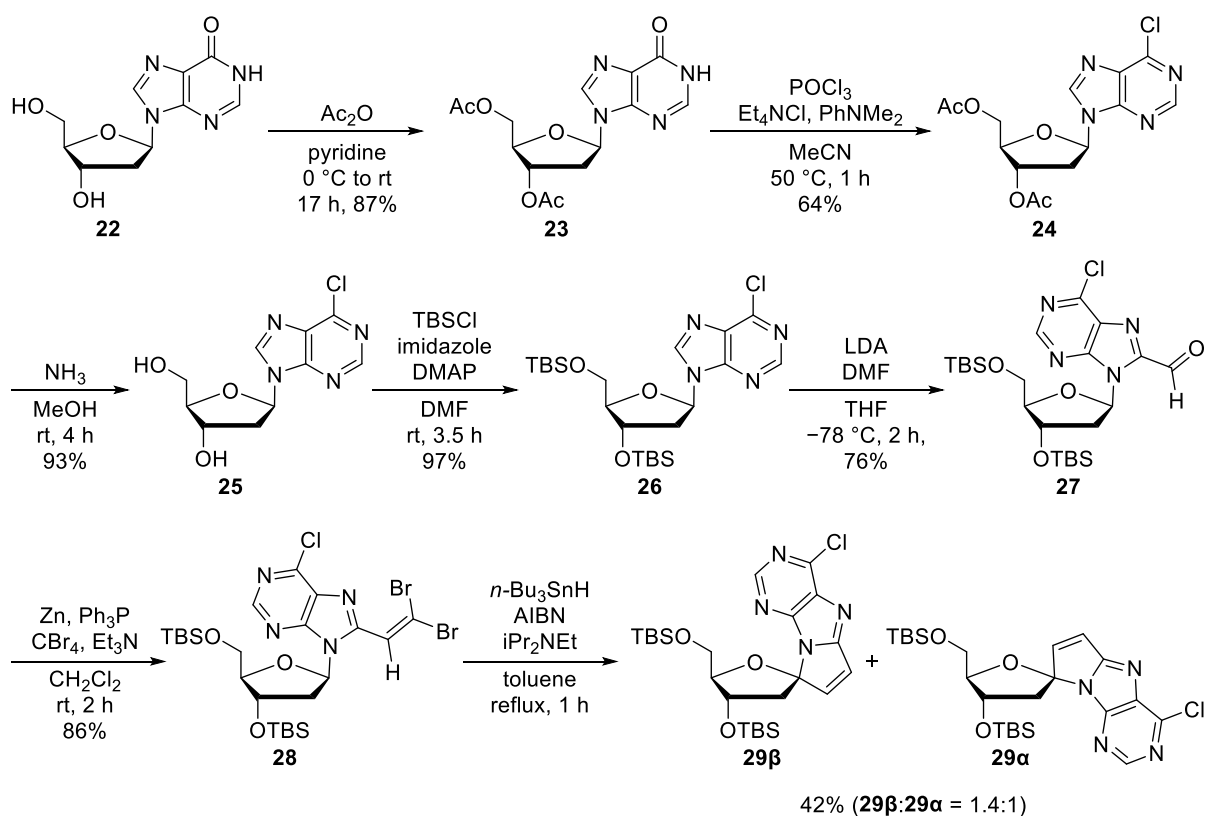
Scheme 4. 環化体 **16** の合成

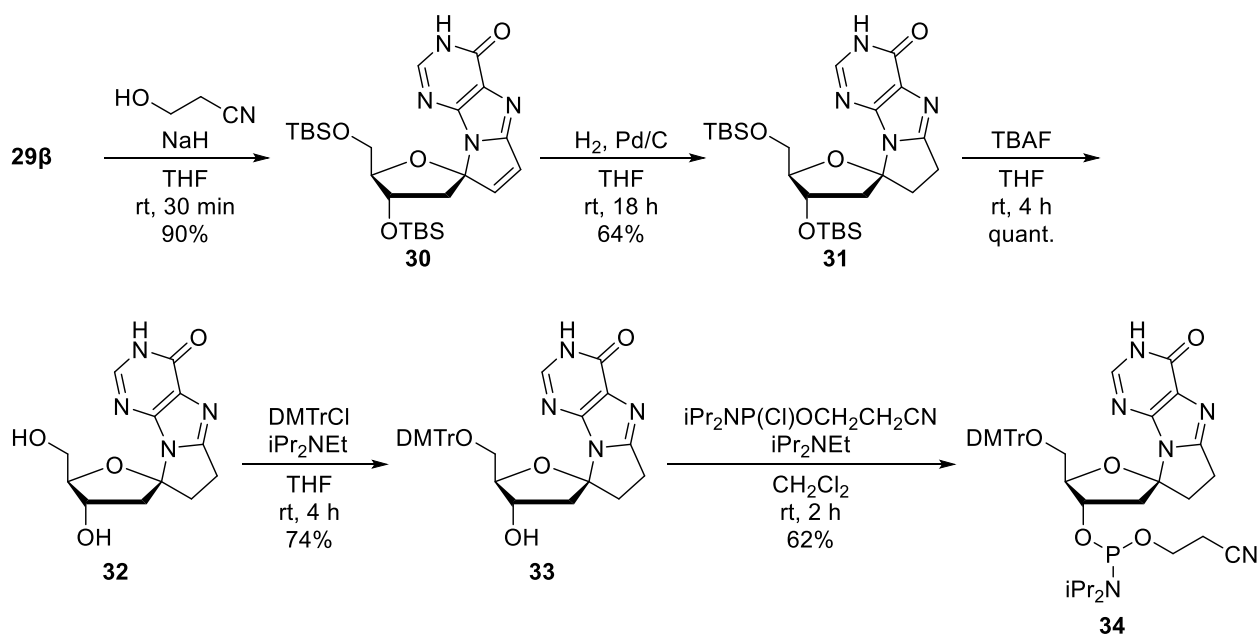
そこで、グアニン塩基等価体として、2 位にアミノ基を持たないヒポキサンチン塩基に着目し、*syn* 配座固定 2'-デオキシイノシンを合成することにした。その合成経路を Scheme 5 に示す。2'-デオキシイノシン **17** を出発原料として、既知の方法に従い糖部ヒドロキシ基の TBS 化を行い、²⁰ 続く塩基部 8 位のホルミル化により、化合物 **19** を得た。次に、ジブromoオレフィン化により 41% と低収率ではあるが化合物 **20** へと変換した。2'-デオキシアデノシン体と同様の条件でラジカル環化を行ったところ、望みの環化体 **21 β** の生成がわずかに確認できたのみで、種々検討したが収率の向上は認められなかった。



Scheme 5. 環化体 **21** の合成

そこで、塩基部が 6-クロロプリンのもので環化反応を行い、後にヒポキサンチンへ変換するることとした。その合成経路を Scheme 6 に示す。2'-デオキシイノシン **22** を出発原料として、既知の方法に従い糖部ヒドロキシ基をアセチル基で保護した後、塩基部を 6-クロロプリンへ変換し化合物 **24** を得た。その後、糖部ヒドロキシ基の保護をアセチル基から TBS 基へと置換し化合物 **26** とした。²¹ 続く塩基部 8 位のホルミル化、ジブromoオレフィン化により化合物 **28** へと誘導した。化合物 **28** のラジカル環化反応は、溶解性の改善のためか効率良く進行し、望みの環化体 **29** を収率 42% ($\beta : \alpha = 1.4 : 1$) で得ることに成功した。その後、エチルシアノヒドリンを用いることで塩基部をヒポキサンチンに変換してイノシンアナログ **30** とし、続く接触水素化によりエチレンユニット架橋を構築した。その後、化合物 **31** の TBS 基の脱保護とそれに続く 5'位ヒドロキシ基の DMTr 化、3'位ヒドロキシ基のホスフィチル化により、望みのホスホロアミダイト **34** を得ることに成功した。



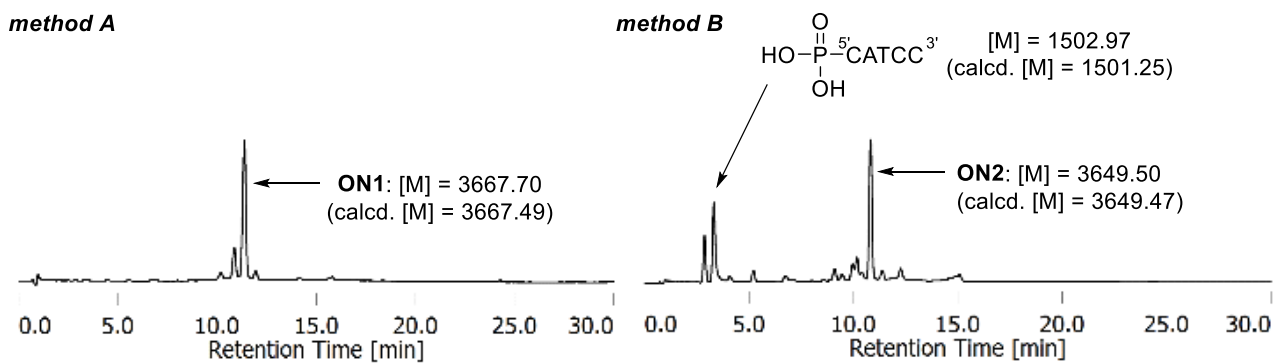
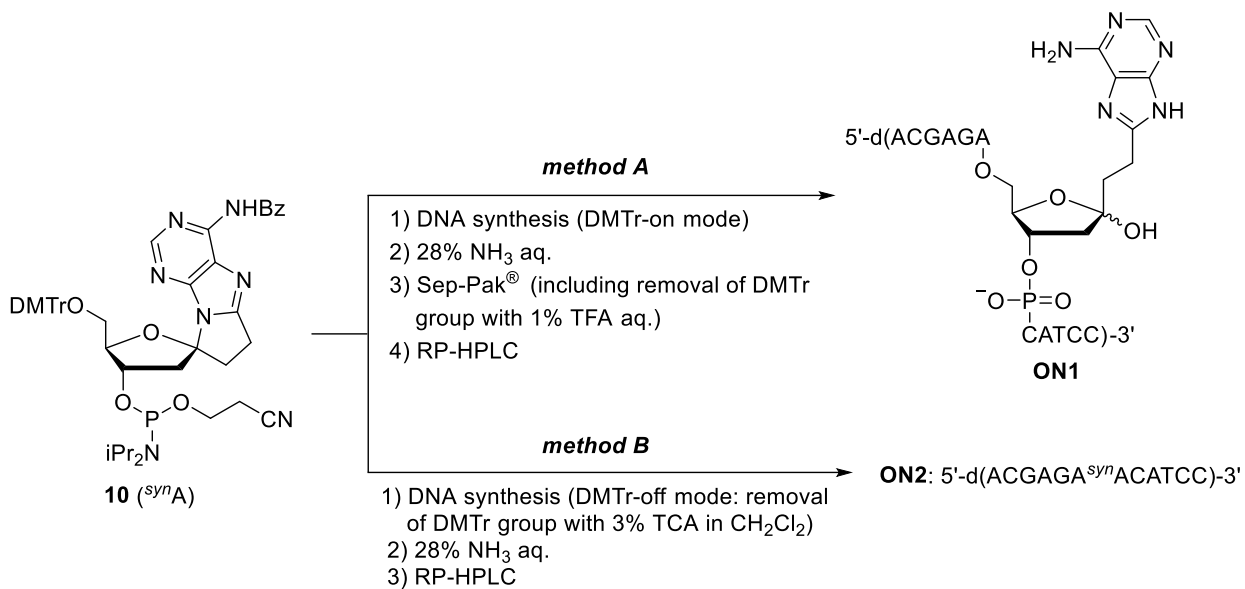


Scheme 6. ホスホアミダイト **34** の合成

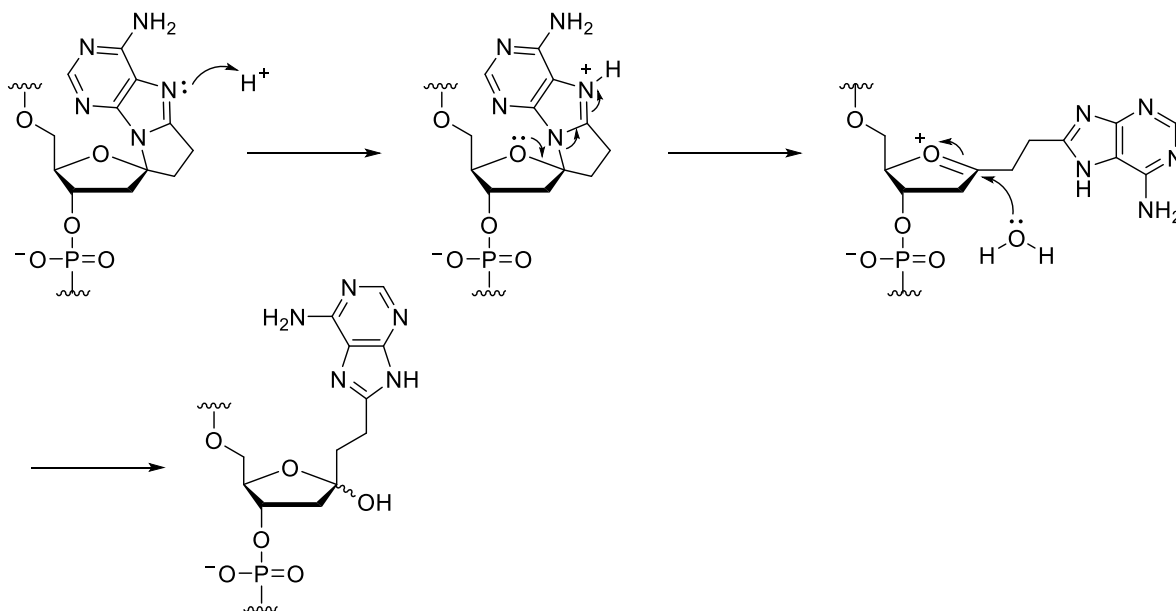
第三節 *syn* 配座固定プリンヌクレオチドのオリゴ核酸への導入

syn 固定プリンヌクレオチドのオリゴ核酸への導入に際し、まずは *syn* 配座固定 2'-デオキシアデノシン (*syn*A) のホスホロアミダイト体 **10** を用いて、4 種の塩基をすべて含むモデル配列 5'-d(ACGAGA^{*syn*}ACATCC)-3' の合成を行った。

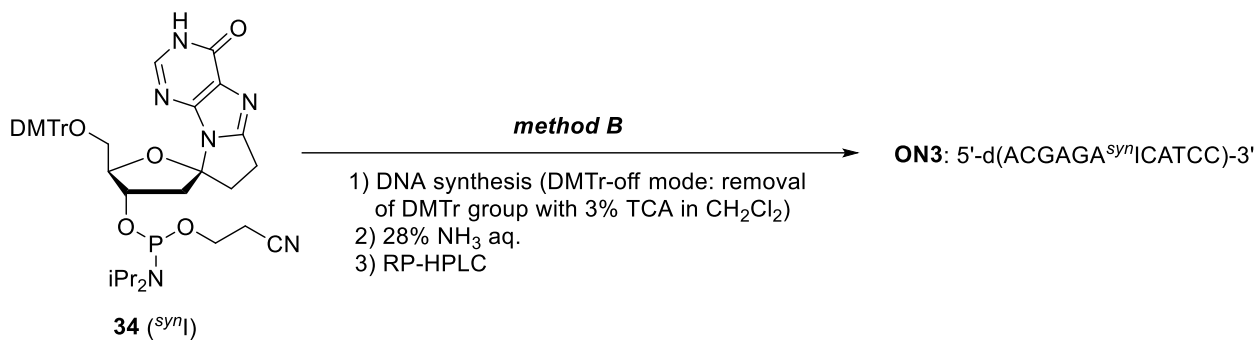
オリゴ核酸の合成条件として、通常用いられるオリゴ核酸の 5'末端の DMTr 基を残す method A の手法を用いた (Scheme 7)。DNA 自動合成機で目的のオリゴ核酸の 5'-DMTr 体を合成後、28% NH₃ aq. 処理により固相担体から切り出した。続いて、Sep-Pak® を用いた簡易精製の際、1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液で 5'末端の DMTr 基を除去し、HPLC 分析を行った。その主生成物である **ON1** を HPLC により単離した後、質量分析を行った結果、**ON1** の質量は 3667.70 であり、目的の *syn*A を含むオリゴ核酸 (calcd. = 3649.47) の質量より 18 大きかった。これは、1% TFA 水溶液の酸処理により *syn*A のグリコシド結合が切断され、続いてオキソカルベニウムイオンに水が付加し **ON1** が生成されたと考えられた (Scheme 8)。そこで、DNA 合成の際に使用する 3% トリクロロ酢酸 (TCA) ジクロロメタン溶液により、DNA 自動合成機上で 5'末端の DMTr 基を除去することにした (Scheme 7, method B)。簡易精製をしていないため、3% TCA 溶液により鎖切断した短鎖オリゴ核酸が観察されたが、目的のオリゴ核酸 **ON2** を主生成物として単離することに成功した。また、*syn* 配座固定 2'-デオキシイノシン (*syn*I) のホスホロアミダイト体 **34** を含むオリゴ核酸も method B を用いて得ることができた (Scheme 9)。その後、method B の条件により、第二章の評価で用いる Z 型 DNA 用配列、及びパラレル型フーグスティーン二重鎖用配列からなる目的のオリゴ核酸を合成した (Table 2)。



Scheme 7. *syn*A を含むオリゴ核酸の合成方法の検討



Scheme 8. **ON1** 生成の推定反応機構



Scheme 9. ^{syn}I を含むオリゴ核酸の合成

Table 2. 合成したオリゴ核酸配列

| Z-DNA | | | |
|-----------------------------|---|-----------------------------|--|
| ON4 | 5'-d(CGCGCGC ^{syn} ACGCG)-3' | ON8 | 5'-d(CGCGC ^{syn} ACGCGCG)-3' |
| ON5 | 5'-d(CGCGTGC ^{syn} ACGCG)-3' | ON9 | 5'-d(CGCGCGC ^{syn} ICGCG)-3' |
| ON6 | 5'-d(CGCGC ^{syn} ATGCGCG)-3' | ON10 | 5'-d(CGCGC ^{syn} ICGCGCG)-3' |
| ON7 | 5'-d(CGCGCGC ^{syn} ACGCG)-3' | | |
| Hoogsteen duplex | | | |
| ON11-^{syn}A | 5'-d(AGAAAA ^{syn} AGAAAGAA)-3' | ON12-^{syn}I | 5'-d(AGAAAA ^{syn} IAAAGAA)-3' |

第二章 *syn* 配座固定プリンヌクレオチドを含むオリゴ核酸の非 B 型 DNA 形成能評価

第一節 Z-DNA 形成能の評価

$d(CG)_n$ のようなピリミジンとプリンが繰り返される配列は通常 B 型 DNA をとっているが、塩濃度 (主に NaCl) の上昇にともない Z 型 DNA へ遷移する。これを B-Z 遷移といい、GC > AC > AT, IC の順に Z 型 DNA を形成しやすい (Figure 7)。²²⁻²⁵ 例えば、CG のみからなる 6 mer の二重鎖 $d(CG)_3$ において、B から Z 型へ 50% 遷移するために必要な NaCl 濃度は 2.6 M であるが、一方で、AT 塩基対を一か所含む二重鎖 $d(CGACGCG)/d(CGCGTGCG)$ は 8 mer であるが、5.0 M の NaCl でも B-Z 遷移は見られない。²⁶

これまで、*syn* 型を有利にとる 8 位修飾 2'-デオキシグアノシンは多く開発されており、低塩濃度での B-Z 遷移を可能としてきた。小さなメチル基で修飾した 8MeG を $d(CG)_3$ 中に一か所導入すると、40 mM まで塩濃度を低下させることを可能とした。また、AT 塩基対を含む配列においても、 8MeG の導入により 700 mM に低下した。²⁶ しかし、メチル基等の小さい置換基は *syn* 配向性が十分ではなくかつ固定されていないため *anti* 型もとれる。^{8,9} 反対に、大きいフェニル基で修飾した 8PhG は、そのかさ高さゆえに *syn* 型をとり Z 型 DNA を安定化するが、天然のグアノシンの形と大きく異なり、タンパクに認識されず生物学的機能を妨げる可能性がある。

このように、*syn* 型グアノシンアナログは多く開発され Z 型 DNA の安定性向上が報告されているが、*syn* 配座をとった天然プリンヌクレオチド等価体として、小さな置換基で *syn* 配座固定されたプリンヌクレオチドはこれまでに例がない。さらに、2'-デオキシアデノシン及び 2'-デオキシイノシンに関しては、*syn* 配座アナログに関する検討もほとんどされていない。そのため、今回開発した *syn* 配座固定 2'-デオキシアデノシン及び 2'-デオキシイノシンヌクレオチドは、Z 型 DNA 研究の新たな核酸材料となる可能性がある。

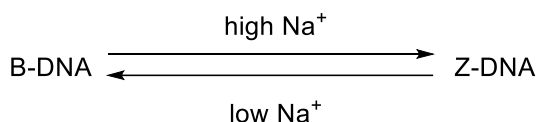
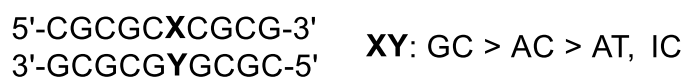


Figure 7. B-Z 遷移

B-Z 遷移は円二色性 (CD) 分散計により観測可能である。B 型 DNA は 280 nm 付近に正、245 nm 付近に負のコットン効果をもつに対し、Z 型 DNA は 290 nm 付近に負、260 nm 付近に正のコットン効果をもつ (Figure 8)。B-Z 遷移は一般的に 295 nm の値を用いて B 型 DNA

と Z 型 DNA の割合が 1 : 1 になる塩濃度を算出する。²⁷ その値を中点とよび、その値が小さいほど低塩濃度で Z 型 DNA を形成できること (Z 型 DNA を形成しやすいこと) を意味する。

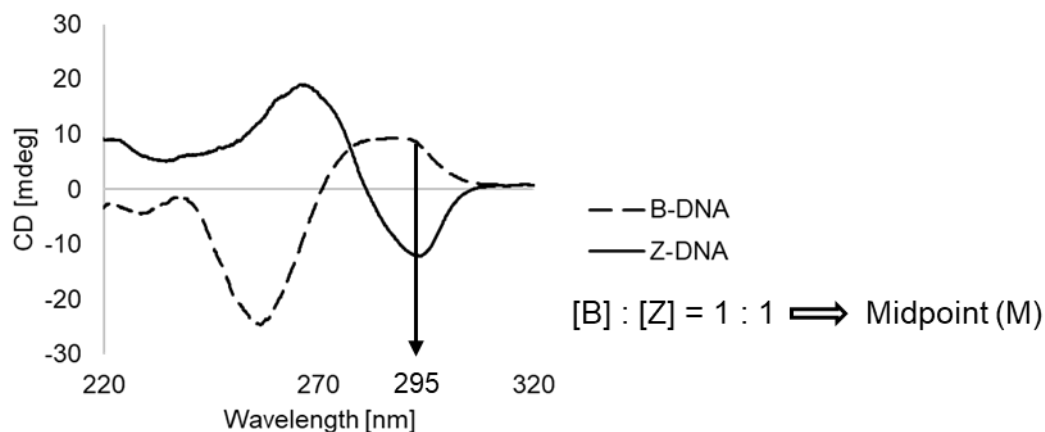
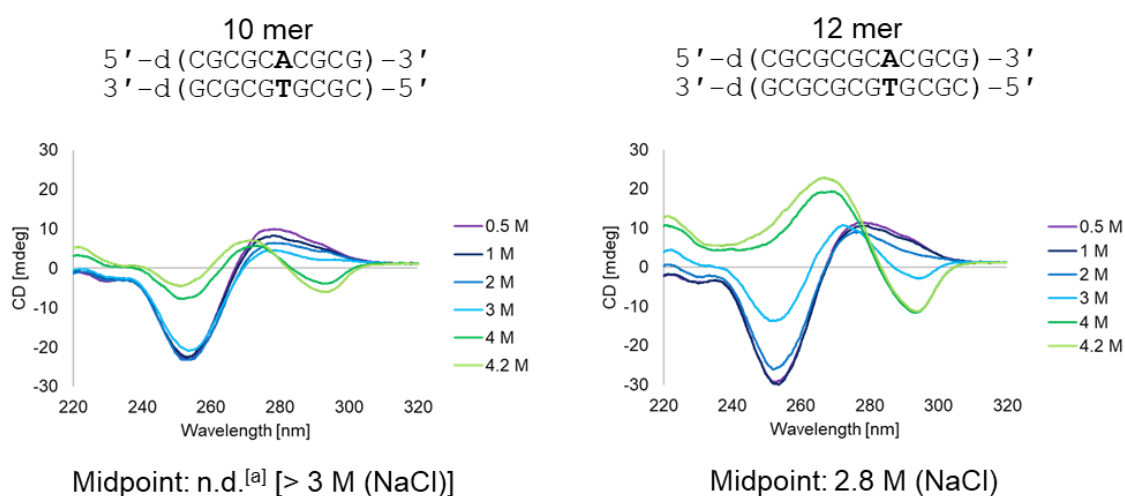


Figure 8. B 型 DNA と Z 型 DNA の CD スペクトル

先のページで述べた通り、AT 塩基対を含む DNA は Z 型 DNA を形成しにくい。²⁸⁻³⁰ そのため、評価系を構築すべく、まずは AT 塩基対を 1 つ含む配列の鎖長を検討した (Figure 9)。10 mer の配列では、295 nm の値を見ると 4.2 M の NaCl 濃度においても完全に Z 型 DNA に遷移していなかった。そのため中点を正確に算出できず 3 M より大きくなると推定された。12 mer では、NaCl が 4 M 以上で完全に Z 型 DNA を形成していることがわかる。中点を算出すると 2.8 M であり、AT 塩基対を一つ含む配列は 12 mer 以上の長さで Z 型 DNA を形成できることがわかった。



[a] n.d. = not determined.

Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5–4.2 M NaCl, and 5 μM of each oligonucleotide at 10 °C.

Figure 9. 鎖長の検討

次に、塩の種類を検討した。その CD スペクトルを Figure 10 に示す。12 mer の配列を用いて NaCl と NaClO₄ の 2 種類の塩で測定し、それぞれの中点を求めたところ、2.8 M と 2.6 M であり NaClO₄ が若干低かった。これは、ClO₄⁻ が Cl⁻ より Z 型 DNA を安定化するという報告と一致していた。³¹

以上の結果から、12 mer の二重鎖を用いることで AT 塩基対を含むオリゴ核酸の Z 型 DNA 形成能を評価できることがわかった。

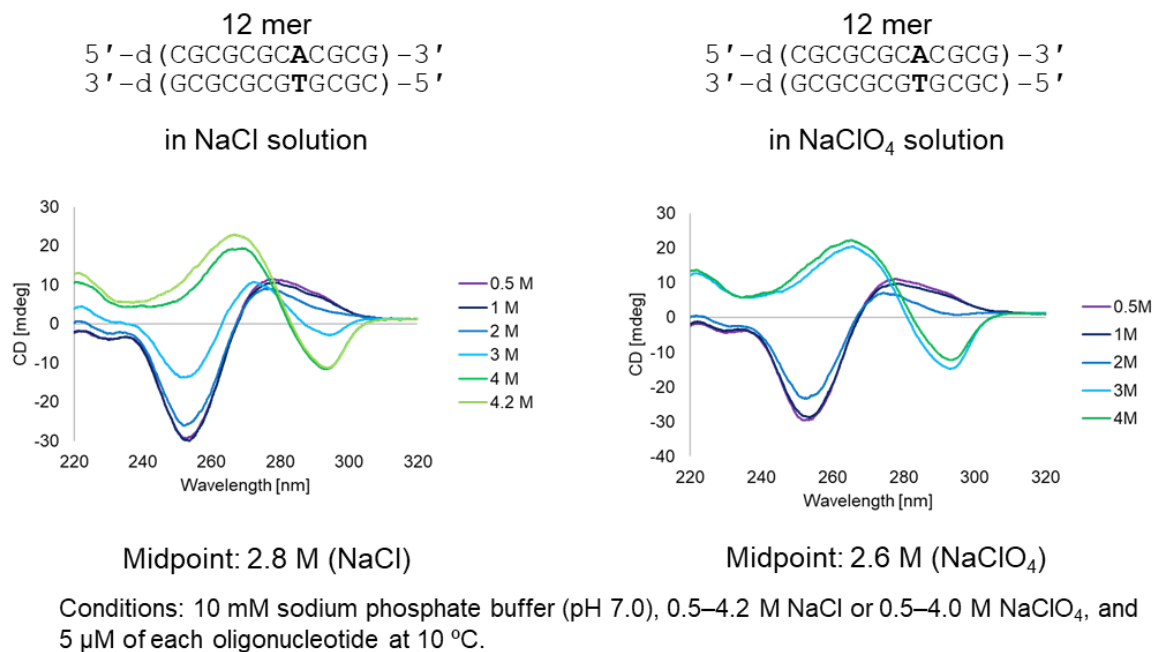
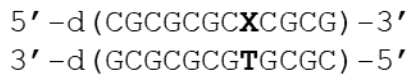
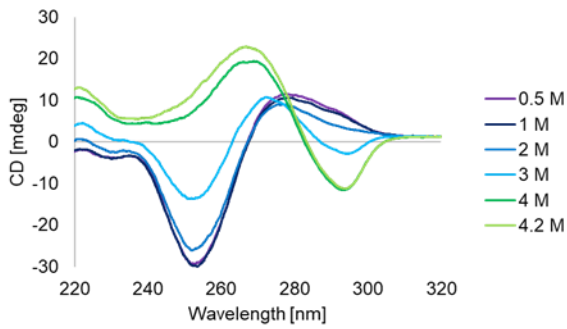


Figure 10. 塩の種類を検討

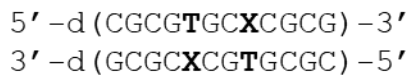
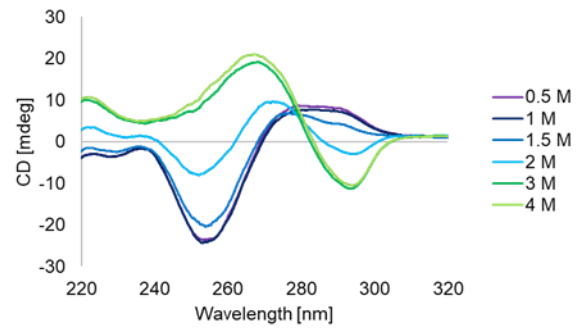
実際に、^{syn}A を導入したオリゴ核酸の B-Z 遷移を CD スペクトルで測定し、その中点を算出した。NaCl 及び NaClO₄ を用いた CD スペクトルの結果を Figure 11 と Figure 12、中点をまとめた結果を Table 3 に示す。NaCl を用いた場合、AT 塩基対、AC 塩基対を含む天然配列は B-Z 遷移が困難であったが、^{syn}A を用いることで 295 nm の負のコットン効果が観察され Z 型 DNA を形成しやすいことが明らかとなった (Figure 11)。



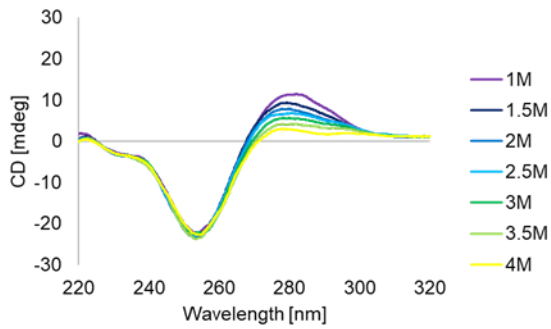
a) X = A



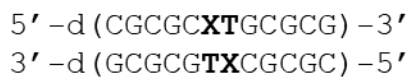
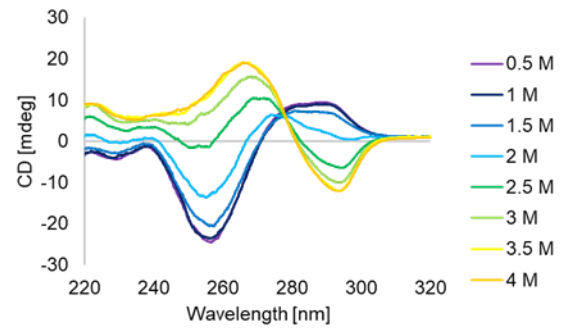
b) X = *syn*A



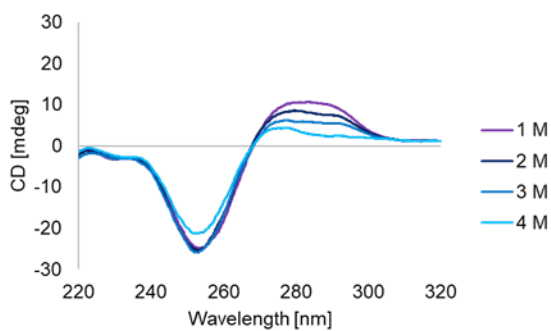
c) X = A



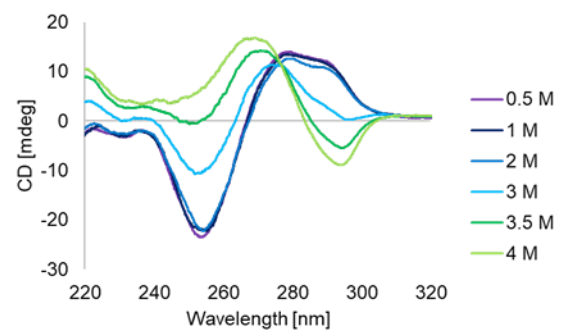
d) X = *syn*A

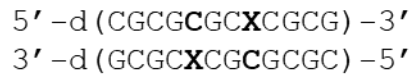


e) X = A

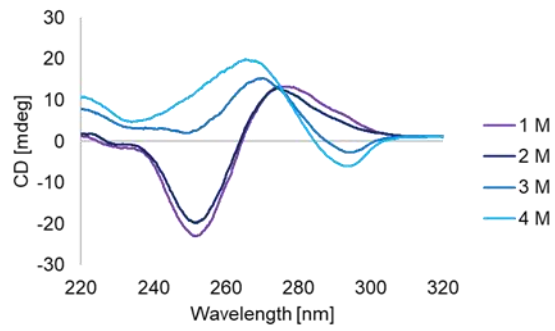


f) X = *syn*A

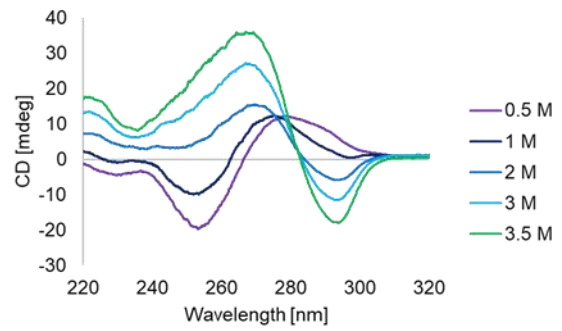




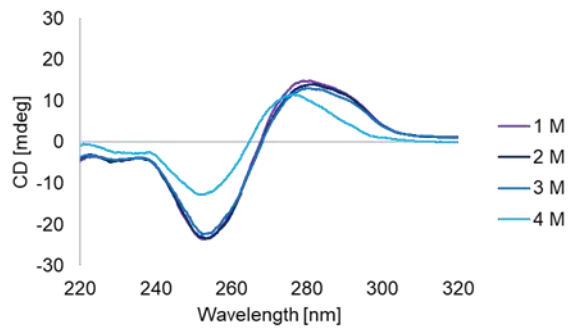
g) X = A



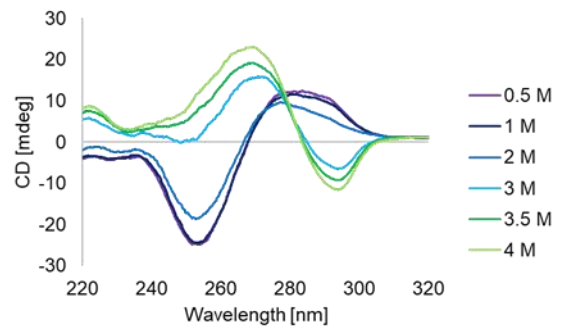
h) X = *syn*A



i) X = A

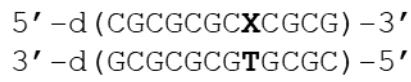


j) X = *syn*A

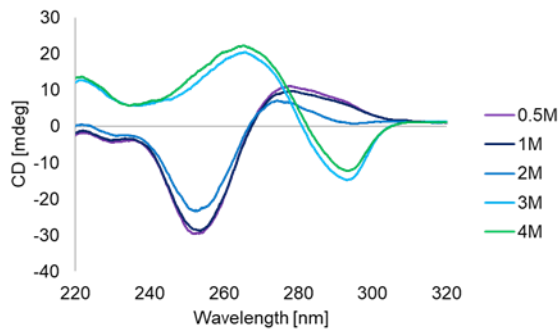


Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5–4.0 M NaCl, and 10 μ M of each oligonucleotide at 10 $^{\circ}$ C.

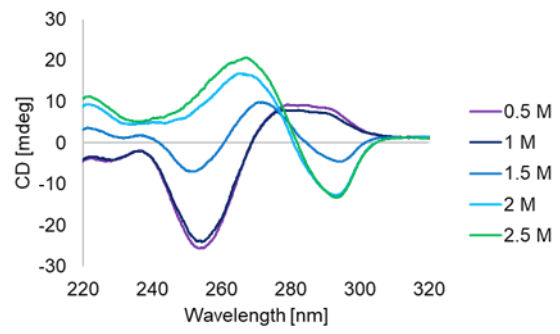
Figure 11. NaCl 水溶液中の CD スペクトル



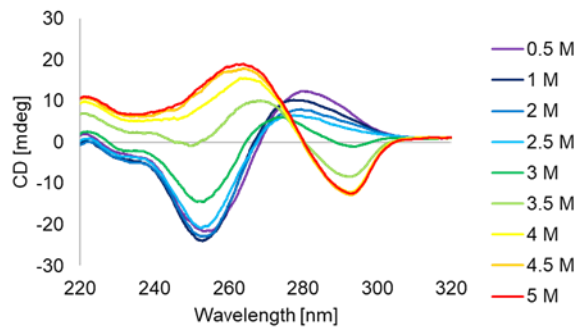
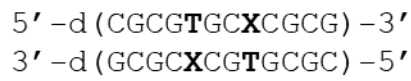
a) X = A



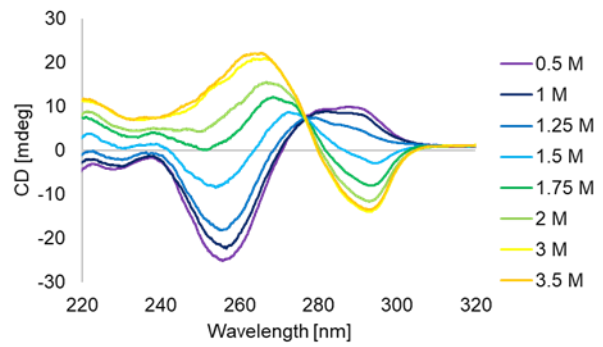
b) X = *syn*A



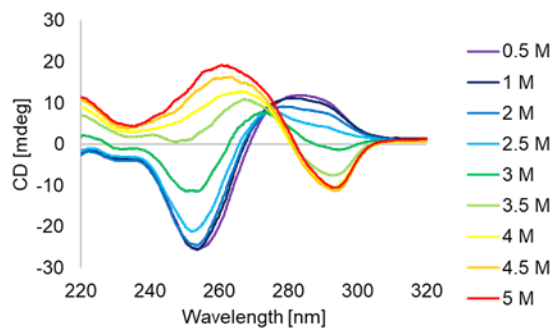
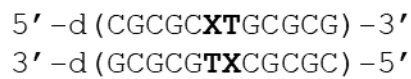
c) X = A



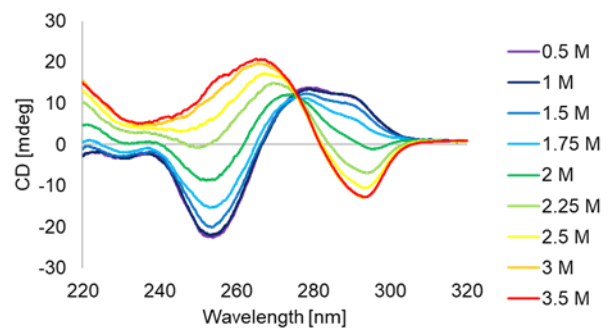
d) X = *syn*A

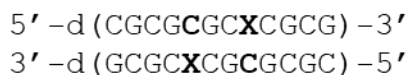


e) X = A

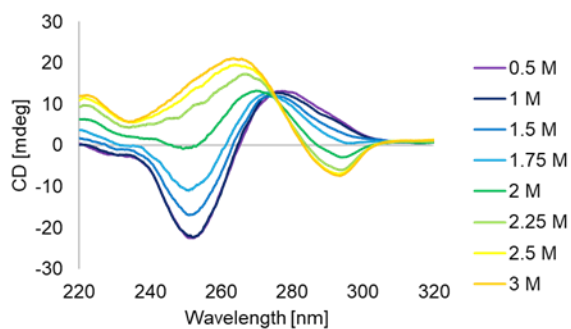


f) X = *syn*A

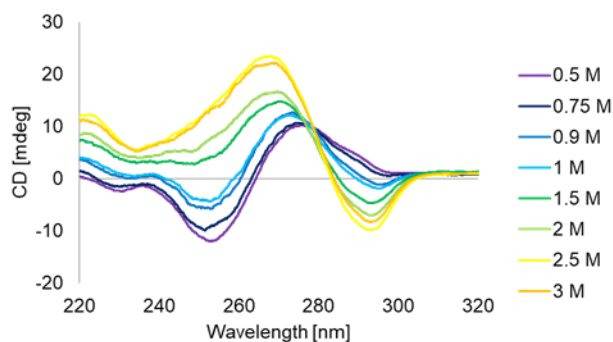




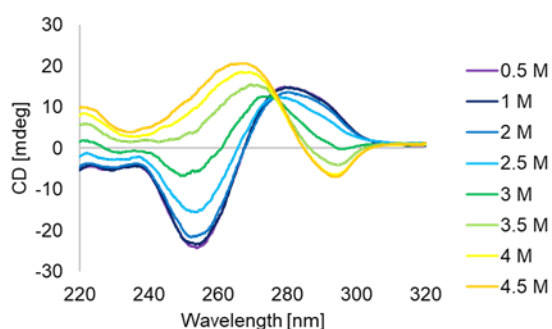
g) X = A



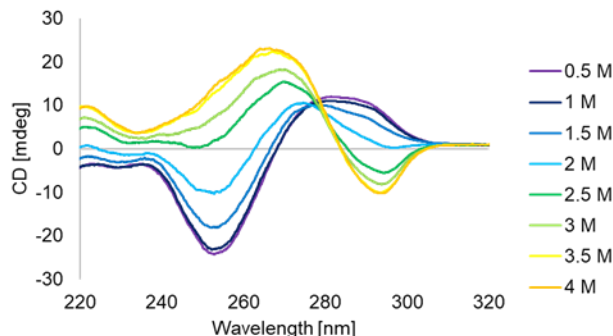
h) X = ^{syn}A



i) X = A



j) X = ^{syn}A



Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5–5.0 M NaClO₄, and 10 μM of each oligonucleotide at 10 °C.

Figure 12. NaClO₄水溶液中の CD スペクトル

NaCl 存在下では、Z 型 DNA を完全に形成せず、中点を算出できないケースがあった。しかし、NaClO₄条件下ではすべての場合において中点を算出できた(Table 3)。結果、AT 塩基対を一つ含む配列において、^{syn}A の導入により中点は 2.6 M から 1.4 M に低下した (Entry 1)。AT 塩基対を二ヶ所含む配列においても、Z 型 DNA が形成しやすくなり、^{syn}A 修飾によりその中点は 2.9 M (天然) から 1.5 M あるいは 2.0 M となった (Entries 2, 3)。また、AC 塩基対を含む配列においても同様の傾向が見られ、天然では 1.8 M あるいは 2.9 M の中点であったものが、^{syn}A を用いることでそれぞれ 1.3 M、2.0 M となり、Z 型 DNA を形成しやすくなっていることが示された (Entries 4, 5)。以上のことから、^{syn}A は AT 塩基対あるいは AC 塩基対を含む二重鎖 DNA において、Z 型 DNA を形成しやすくなることを示された。

また、Z型DNAはCG塩基対のみから成るものが最も安定であるが、Entry 2、4、6からわかるように^{syn}Aを用いることで、AT塩基対、AC塩基対を含む場合でもCGのみの配列と同等以上のZ型DNA安定化能を有することがわかった。

Table 3. ^{syn}Aを含むオリゴ核酸のB-Z遷移の midpoint

| Entry | Oligonucleotides | NaCl | | NaClO ₄ | |
|-------|--|----------------------------|------------------------|--------------------|----------------------|
| | | X = A | X = ^{syn} A | X = A | X = ^{syn} A |
| 1 | 5'-d(CGCGCGC X CGCG)-3' 3'-d(GCGCGCG T GCGC)-5' | 2.8 M | 1.8 M | 2.6 M | 1.4 M |
| 2 | 5'-d(CGCG T GC X CGCG)-3' 3'-d(GCGC X CG T GCGC)-5' | n.d. ^[a] (>4 M) | 2.1 M | 2.9 M | 1.5 M |
| 3 | 5'-d(CGCGC XT GCGCG)-3' 3'-d(GCGCG TX CGCGC)-5' | n.d. ^[a] (>4 M) | 3–3.5 M ^[b] | 2.9 M | 2.0 M |
| 4 | 5'-d(CGCG CGC X CGCG)-3' 3'-d(GCGC X CG CG CGC)-5' | 2.5–3 M ^[b] | 1.5–2 M ^[b] | 1.8 M | 1.3 M |
| 5 | 5'-d(CGCGC XC GCGCG)-3' 3'-d(GCGCG CX CGCGC)-5' | n.d. ^[a] (>4 M) | 2.5–3 M ^[b] | 2.9 M | 2.0 M |
| 6 | 5'-d(CGCGCGCGCGCG)-3' 3'-d(GCGCGCGCGCGC)-5' | 2.4 M | | 1.6 M | |

^[a] n.d. = not determined. ^[b] Estimated midpoint.

次に、*syn* 配座固定 2'-デオキシイノシン (^{syn}I) を含むオリゴ核酸の Z 型 DNA 形成能を CD スペクトルにより評価した。NaCl と NaClO₄ を用いて測定した結果をそれぞれ Figure 13、14 に示す。また、それら結果から得られた中点の結果を Table 4 にまとめた。NaCl を用いて測定したところ、先の AT あるいは AC 塩基対を含む場合と同様、IC 塩基対を含む天然配列は Z 型 DNA 形成能が低く、正確な中点を算出することができなかった。一方で、^{syn}I の導入により低塩濃度で Z 型 DNA を形成することが明らかとなった。さらに、NaCl 非存在下においても、^{syn}I 含有二重鎖は 295 nm 付近に B 型 DNA 特有の正のコットン効果がほとんど観測されないことから、完全な B 型 DNA を形成できていないことが示唆され、その中点は 0.7 M 未満であると推定された (Figures 13b, d)。

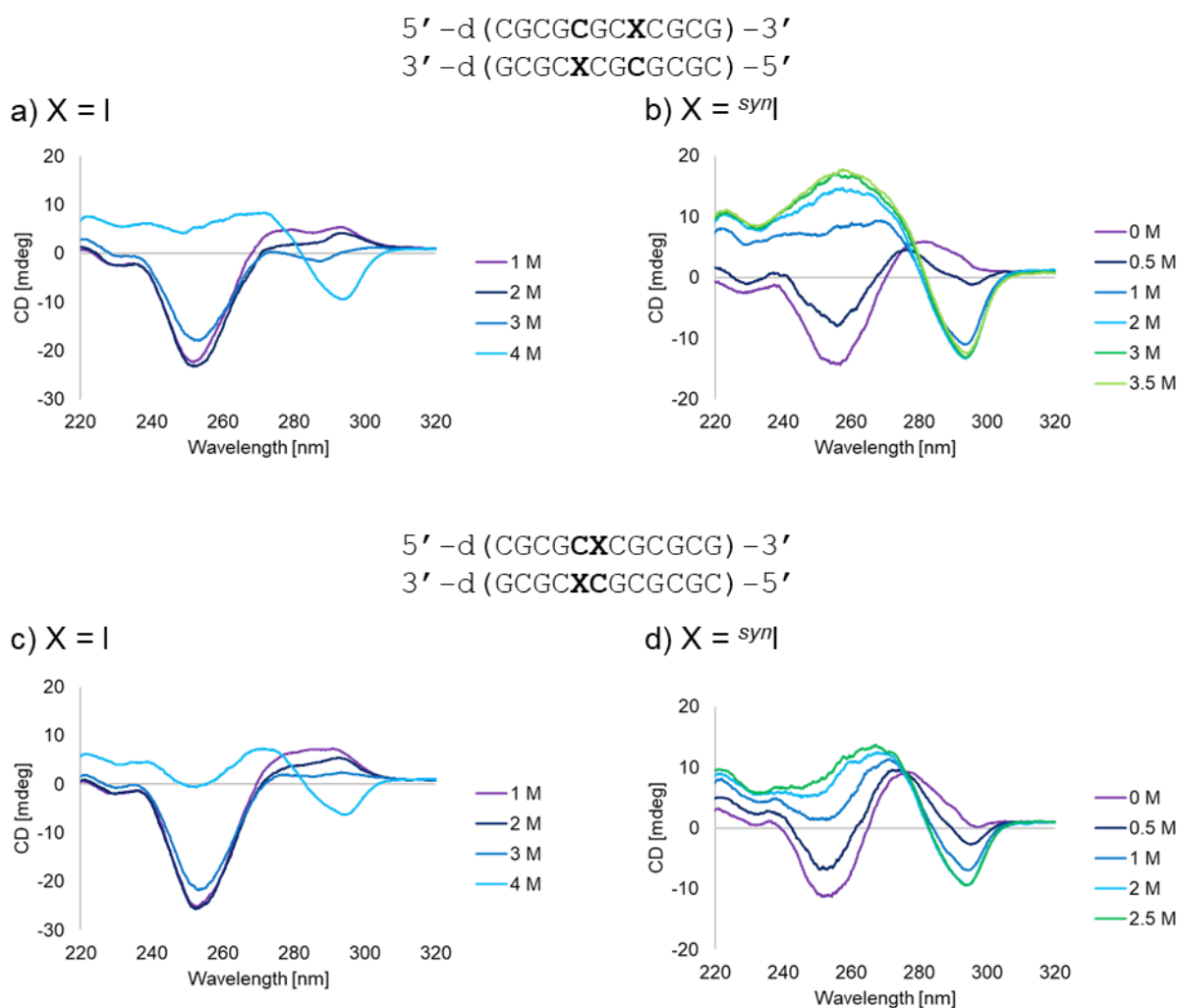
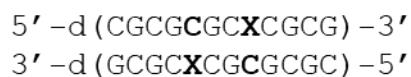
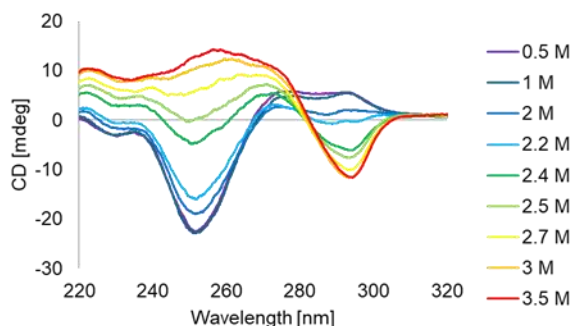


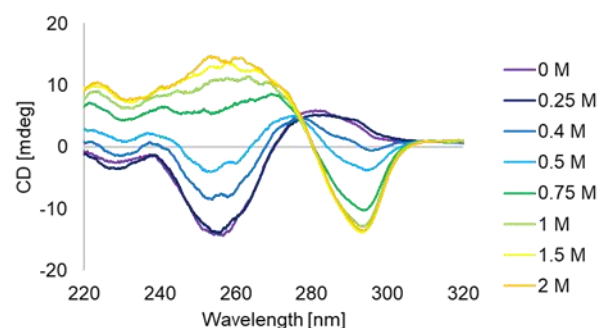
Figure 13. NaCl 水溶液中の CD スペクトル



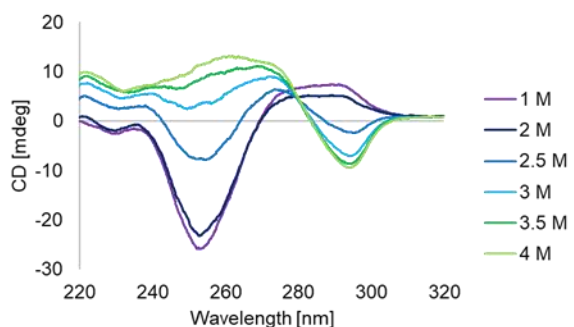
a) X = I



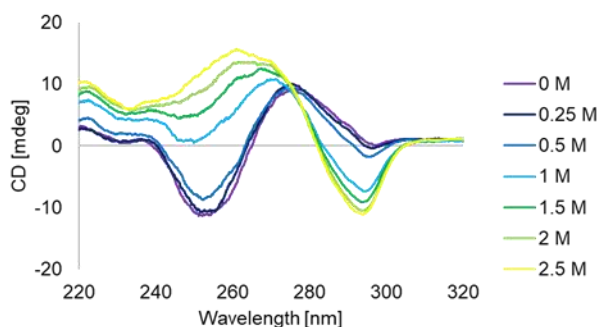
b) X = sy^mI



c) X = I



d) X = sy^mI



Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0–4.0 M NaClO₄, and 10 μM of each oligonucleotide at 10 °C.

Figure 14. NaClO₄ 水溶液中の CD スペクトル

NaClO₄を用いた中点の結果を Table 4 に示す。sy^mI の導入により 2.3 M から 0.5 M 未満に (Entry 1)、2.5 M から 0.7 M 未満に (Entry 2) 塩濃度を大幅に低下させた。これは、Entry 3 の CG のみの配列よりも Z 型 DNA を大きく安定化させた。この場合も、NaClO₄ 非存在下で sy^mI を含む二重鎖は完全な B 型 DNA を形成できていないと考えられるため、中点を正確に算出することは困難であった。

Table 4. *syn*I を含むオリゴ核酸の B-Z 遷移の midpoint

| Entry | Oligonucleotides | NaCl | | NaClO ₄ | |
|-------|--|------------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | | X = I | X = <i>syn</i> I | X = I | X = <i>syn</i> I |
| 1 | 5'-d(CGCG C GC X CGCG)-3' 3'-d(GCGC X CG C GCGC)-5' | 3–3.5 M ^[a] | <0.7 M | 2.3 M | <0.5 M |
| 2 | 5'-d(CGCGC X C C GCGCG)-3' 3'-d(GCGCG C X C GCGCG)-5' | 3–3.5 M ^[a] | <0.7 M | 2.5 M | <0.7 M |
| 3 | 5'-d(CGCGCGCGCGCG)-3' 3'-d(GCGCGCGCGCGC)-5' | 2.4 M | | 1.6 M | |

^[a] Estimated midpoint.

以上の結果から、*syn* 配座固定 2'-デオキシアデノシン及び 2'-デオキシイノシンは天然より低塩濃度で Z 型 DNA を形成できることが明らかとなった。

第二節 パラレル型フーグスティーン二重鎖形成能の評価

パラレル型フーグスティーン二重鎖は、ホモプリンとホモピリミジンの鎖がフーグスティーン型水素結合を介して形成する平行な二重鎖である。その際の CG 塩基対は、シトシンがプロトン化される必要があるため酸性条件で形成しやすい。しかし、中性条件下ではシトシンのプロトン化が難しくなるため、ミスマッチを生じるにも関わらずワトソックリック塩基対をもつ逆平行型の B 型 DNA 二重鎖を形成することが知られている (Figure 13)。

11

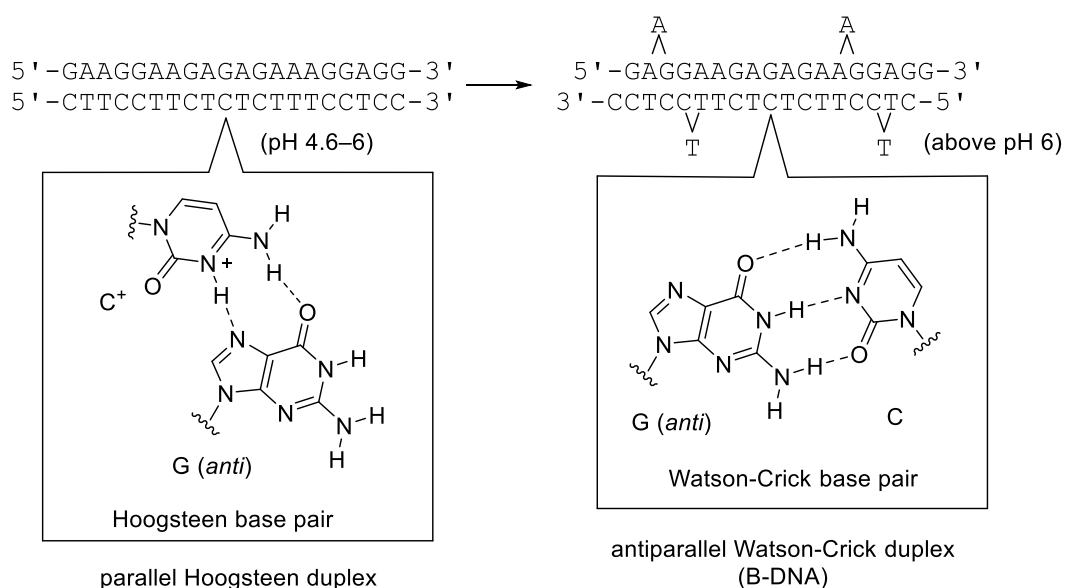


Figure 13. パラレル型フーグスティーン二重鎖の pH 依存性

そのような背景下、フーグスティーン二重鎖のみを形成させる研究が行われてきた。例えば、ワトソックリック二重鎖の形成を防ぐため、パラレル型フーグスティーン二重鎖をリンカーでつないだヘアピン構造とすることが試みられた。^{32,33} パラレル型フーグスティーン二重鎖の熱安定性は向上したものの、pH 依存性の解決には至らなかった。また、インターカレーターであるベンゾピリドインドール誘導体がフーグスティーン二重鎖の熱安定性を向上することが見出されたが、中性条件での形成はやはり困難であった。³⁴ 別のアプローチとして、修飾核酸による安定化もいくつか検討されている。プリン塩基 2 位を修飾した核酸は、ワトソックリック型水素結合及び逆ワトソックリック型水素結合の形成を妨げ、パラレル型フーグスティーン二重鎖を選択的に形成することが示唆された。^{35,36} さらに、プリン塩基 8 位をアミノ基修飾した核酸は、酸性条件と中性条件のいずれの条件下においてもフーグスティーン型水素結合を介したパラレル型二重鎖を形成することが示唆された。^{37,38}

そのような背景下、著者は、パラレル型フーグスティーン二重鎖を形成する新たな戦略

として、*syn* 配座固定プリンヌクレオシドを用いれば、フーグスティーン側でワトソクリック型水素結合を形成できるのではないかと考えた。結果、CG 塩基対形成におけるシトシンのプロトン化も不要となり、中性条件でパラレル型フーグスティーン二重鎖を形成できると考えられた (Figure 14)。

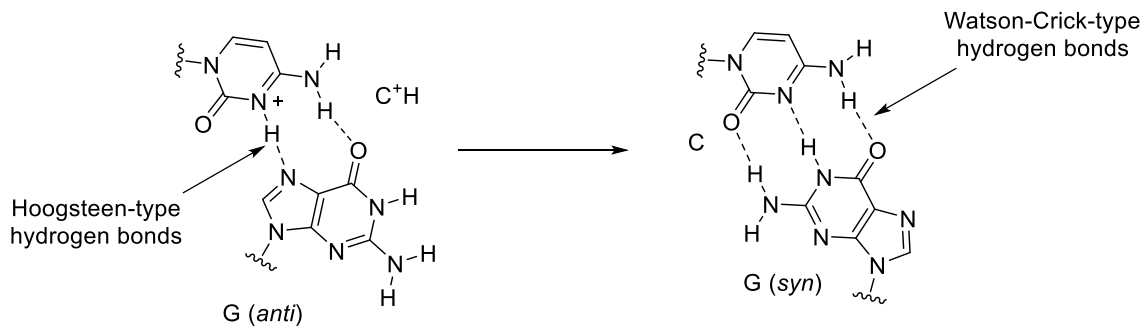
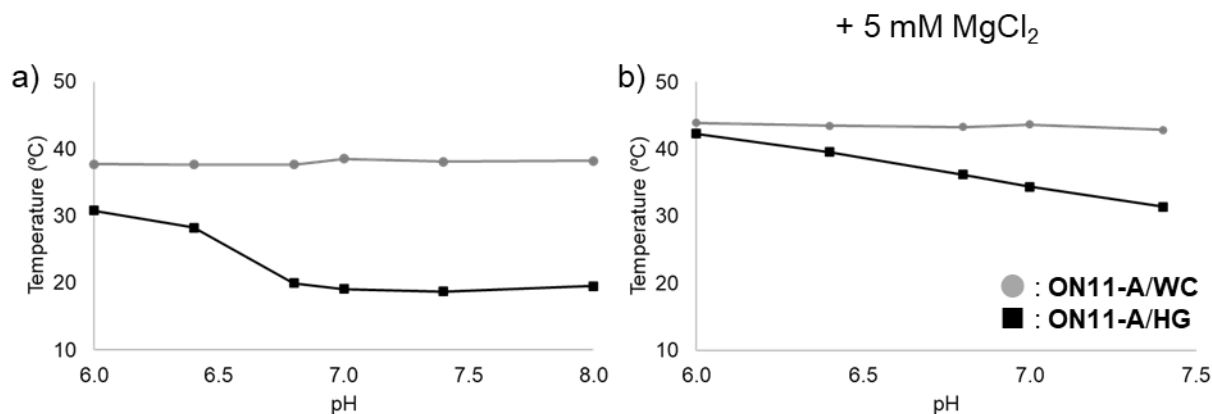


Figure 14. *syn* 配座グアノシンのワトソクリック型水素結合

まずは、天然の配列を用いて、中性条件でフーグスティーン二重鎖を形成できる評価系の構築を試みた。使用したオリゴ核酸は、B 型 DNA のワトソクリック二重鎖を形成する **ON11-A** と **WC**、フーグスティーン二重鎖を形成する **ON11-A** と **HG** である。これら二つの二重鎖を pH 6.0 から 8.0 の条件下で融解温度測定を行い、 T_m 値をプロットした。その結果、**ON11-A/WC** は pH の変化にかかわらず一定の T_m 値を示した。これはワトソクリック二重鎖の熱安定性は pH の影響をほとんど受けないことを意味しており、これまでの知見と一致する。^{11,34} 一方、**ON11-A/HG** は pH 6.8 以下の範囲において、酸性になるにつれ T_m 値の上昇が見られたためフーグスティーン二重鎖を形成していると考えられた。それに対し、pH 7.0 以上の範囲では pH の変化に関わらず一定の値を示していることから、ワトソクリック二重鎖を形成していることが示唆された (Figure 15a)。そこで、フーグスティーン二重鎖を安定化することが知られている塩化マグネシウムを添加することで、中性条件下でのフーグスティーン二重鎖の形成を狙った。ワトソクリック二重鎖を形成している **ON11-A/WC** は $MgCl_2$ 添加により T_m 値が約 5 °C 上昇したのに対して、**ON11-A/HG** は 10 °C 以上の上昇が認められた。さらに、 $MgCl_2$ 添加によって **ON11-A/HG** は今回測定した pH 6.0–7.4 の範囲において T_m 値の pH 依存性が見られたことから、フーグスティーン二重鎖を形成していると考えられた (Figure 15b)。そこで、pH 7.0 において **ON11-A/HG** がフーグスティーン塩基対形成していることを確認するために、295 nm での融解温度測定を行うことにした。

ON11-A 5' -d (AGAAAAAGAAAGAA) -3'
WC 3' -d (TCTTTTCTTTCTT) -5'
 antiparallel Watson-Crick duplex
 (ON11-A/WC)

ON11-A 5' -d (AGAAAAAGAAAGAA) -3'
HG 5' -d (TCTTTTCTTTCTT) -3'
 parallel Hoogsteen duplex
 (ON11-A/HG)



Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 6.0–8.0), 100 mM KCl, and 2.5 μM of each oligonucleotide.

Figure 15. ON11-A/WC と ON11-A/HG の T_m 値

通常、DNA 二重鎖の融解温度測定は 260 nm の波長を用いて測定し、二重鎖が解離することで吸光度が増加し、シグモイド曲線が観察される。しかし、ワトソクリック塩基対かフーグスティーン塩基対かを区別することは困難である。一方、295 nm 波長を同時に測定することで、フーグスティーン二重鎖が解離する時、シトシンの脱プロトン化がシグモイド形の吸光度低下として観測されることが知られている (Figure 16)。³⁴ この検出方法を用いて、ON11-A/HG の水素結合様式を確認した。

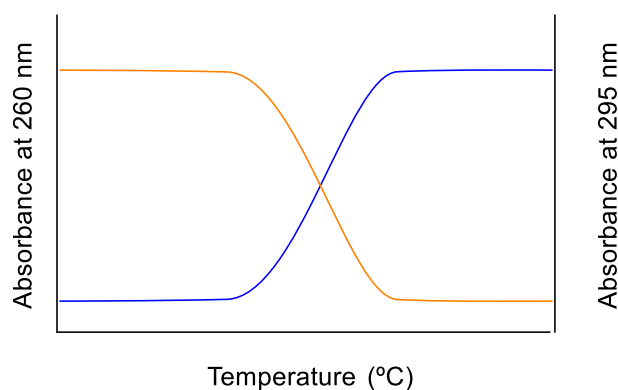
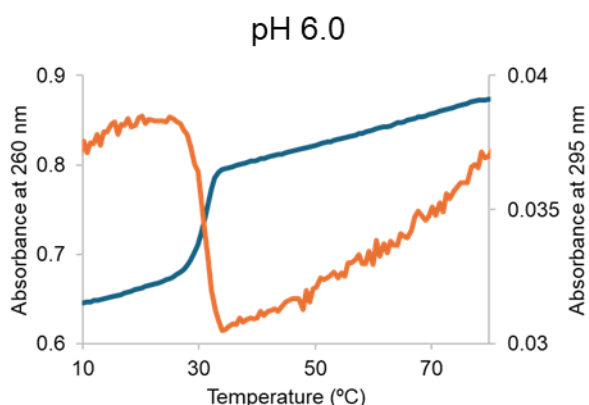


Figure 16. フーグスティーン二重鎖の波長 260 nm (青) と 295 nm (オレンジ) の融解曲線

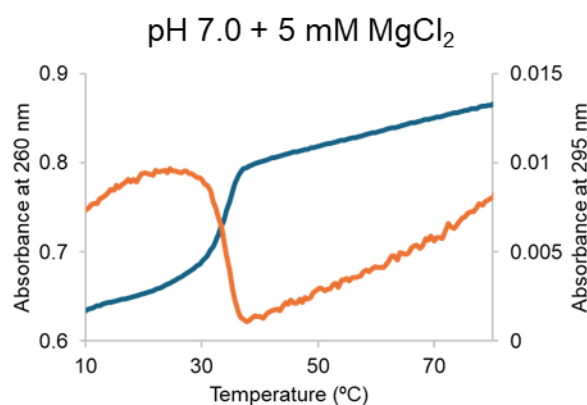
260 nm 及び 295 nm で測定した融解曲線の結果を一部 Figure 17 に示す。ON11-A/HG は pH 6.0 の酸性条件下、フーグスティーン二重鎖を形成するため、想定通り 260 nm 及び 295 nm のシグモイド曲線が観察された (Figure 17a)。MgCl₂ 存在下、pH7.0 条件においても、

ON11-A/HG は同様の融解曲線が観察され、フーグスティーン二重鎖を形成していることが確認できた (Figure 17b)。一方、 MgCl_2 非存在下 pH 7.0 条件では、295 nm の明らかなシグモイド曲線が認められないことから、フーグスティーン二重鎖を形成していないと考えられた (Figure 17c)。また、**ON11-A/WC** のワトソンクリック二重鎖を確認したところ、pH 6.0 条件でもやはり Figures 17 a), b) とは異なり、はっきりとした 295 nm のシグモイド曲線は観察されなかった (Figure 17d)。以上の結果から、**ON11-A/HG** の配列は MgCl_2 を添加することで中性条件でもフーグスティーン二重鎖を形成できることがわかった。

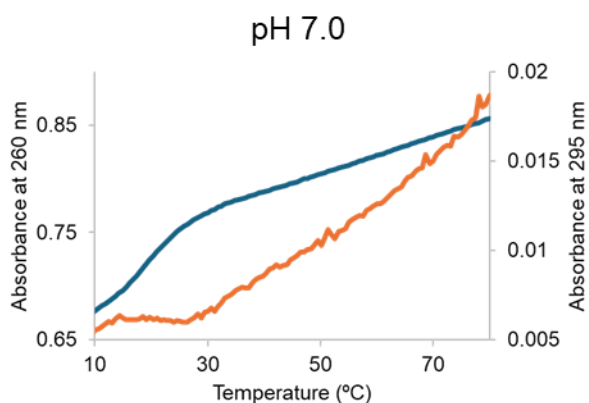
a) **ON11-A/HG**



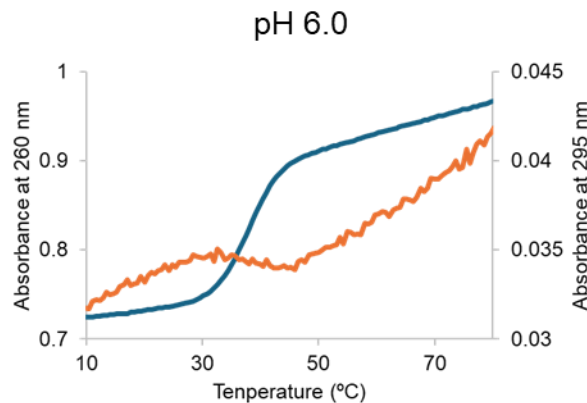
b) **ON11-A/HG**



c) **ON11-A/HG**



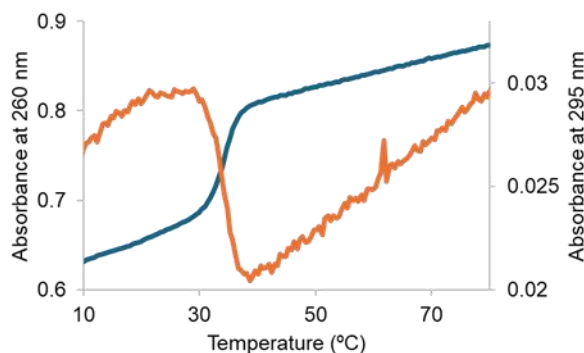
d) **ON11-A/WC**



Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 6.0 or 7.0), 100 mM KCl, and 2.5 μM of each oligonucleotide.

Figure 17. **ON11-A/ HG**、**ON11-A/ WC** の波長 260 nm (青) と 295 nm (オレンジ) の融解曲線

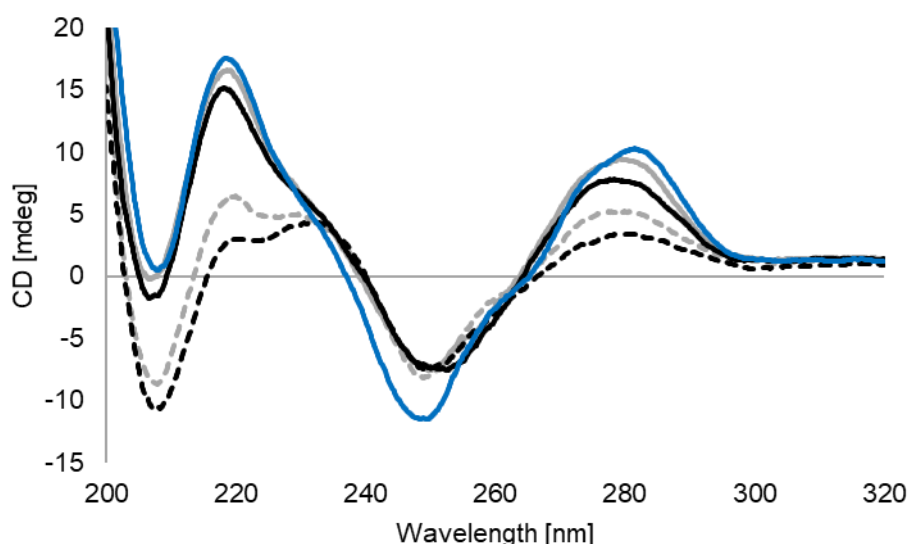
構築した評価系を用いて、*syn*A を含む **ON11-*syn*A/HG** の平行型フーグスティーン二重鎖形成能を評価した。その結果、MgCl₂ 存在下 pH 7.0 において、260 nm 及び 295 nm のいずれにおいてもシグモイド曲線が観察されたことから、フーグスティーン二重鎖を形成していることが示された (Figure 18)。



Conditions: 2.5 μ M of each strand in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂.

Figure 18. **ON11-*syn*A/HG** の波長 260 nm (青) と 295 nm (オレンジ) の融解曲線

フーグスティーン塩基対を介した平行二重鎖の CD スペクトルは、210–220 nm に負のコットン効果をもつことが報告されている。³⁹⁻⁴² そこで、**ON11-*syn*A/HG**、**ON11-A/HG**、及び **ON11-A/WC** の pH 7.0 条件下の CD スペクトルを測定した (Figure 19)。ワトソクリック二重鎖を形成している **ON11-A/WC** の結果と比較すると、**ON11-*syn*A/HG** と **ON11-A/HG** はいずれも MgCl₂ 添加条件で 210 nm 付近に強い負のコットン効果が見られた。このことから、**ON11-*syn*A/HG** と **ON11-A/HG** は平行型フーグスティーン二重鎖を形成していることが示された。一方、MgCl₂ 非存在下では、天然の **ON11-A/HG** は 210 nm 付近の負のコットン効果は見られずワトソクリック二重鎖様のスペクトルが観察されたが、**ON11-*syn*A/HG** は小さな負のコットン効果が見られたことから、*syn*A 導入により、平行型フーグスティーン二重鎖が若干形成しやすくなっている可能性が示唆された。



Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, and 2.5 μ M of each oligonucleotide (solid line), and 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 2.5 μ M of each oligonucleotide (dashed line).

Figure 19. ON11-*syn*A/HG、ON11-A/HG、ON11-A/WC の CD スペクトル

続いて、ON11-*syn*A/HG の熱学的パラメーターを算出した (Table 5)。 T_m 値は天然と同じ 34°C であった。これは、*syn*A がフーグスティーン側でワトソクリック型水素結合を形成し、天然と同じ二本の水素結合を形成しているためだと考えられた (Figure 20)。また、ON11-*syn*A/HG は ΔH が有利であり、 ΔS が不利であった (Table 5)。 ΔS が不利になった理由として、通常の水素結合二重鎖中の水素結合に比べ距離や角度がずれるため、二重鎖が歪みをもつことに起因していると考えた。

Table 5. ON11-*syn*A/HG と ON11-A/HG 二重鎖の熱学的パラメーター

| 5' -AGAAAAA X GAAAAGAA-3' 5' -TCTTTTTTCTTTCTT-3' | T_m (°C) | ΔH (kcal/mol) | ΔS (cal/mol/K) |
|--|------------|-----------------------|------------------------|
| ON11-<i>syn</i>A | 34 | -201 \pm 2 | -629 \pm 7 |
| ON11-A | 34 | -188 \pm 4 | -585 \pm 14 |

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 2.5 μ M of each oligonucleotide.

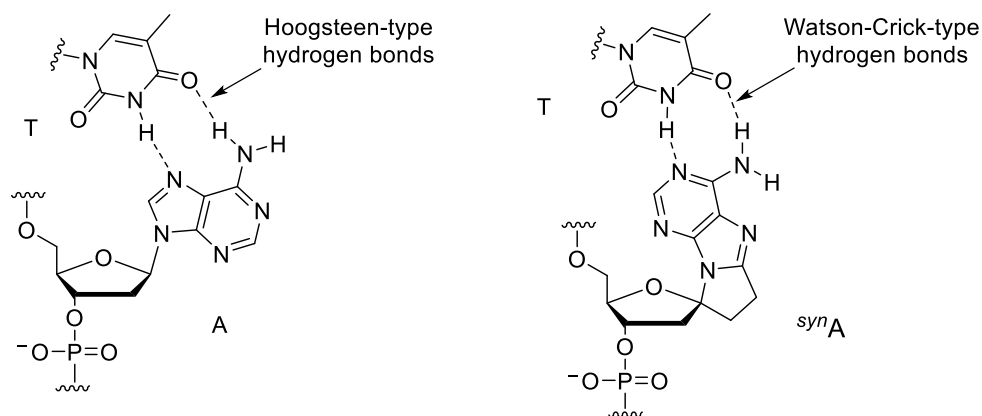
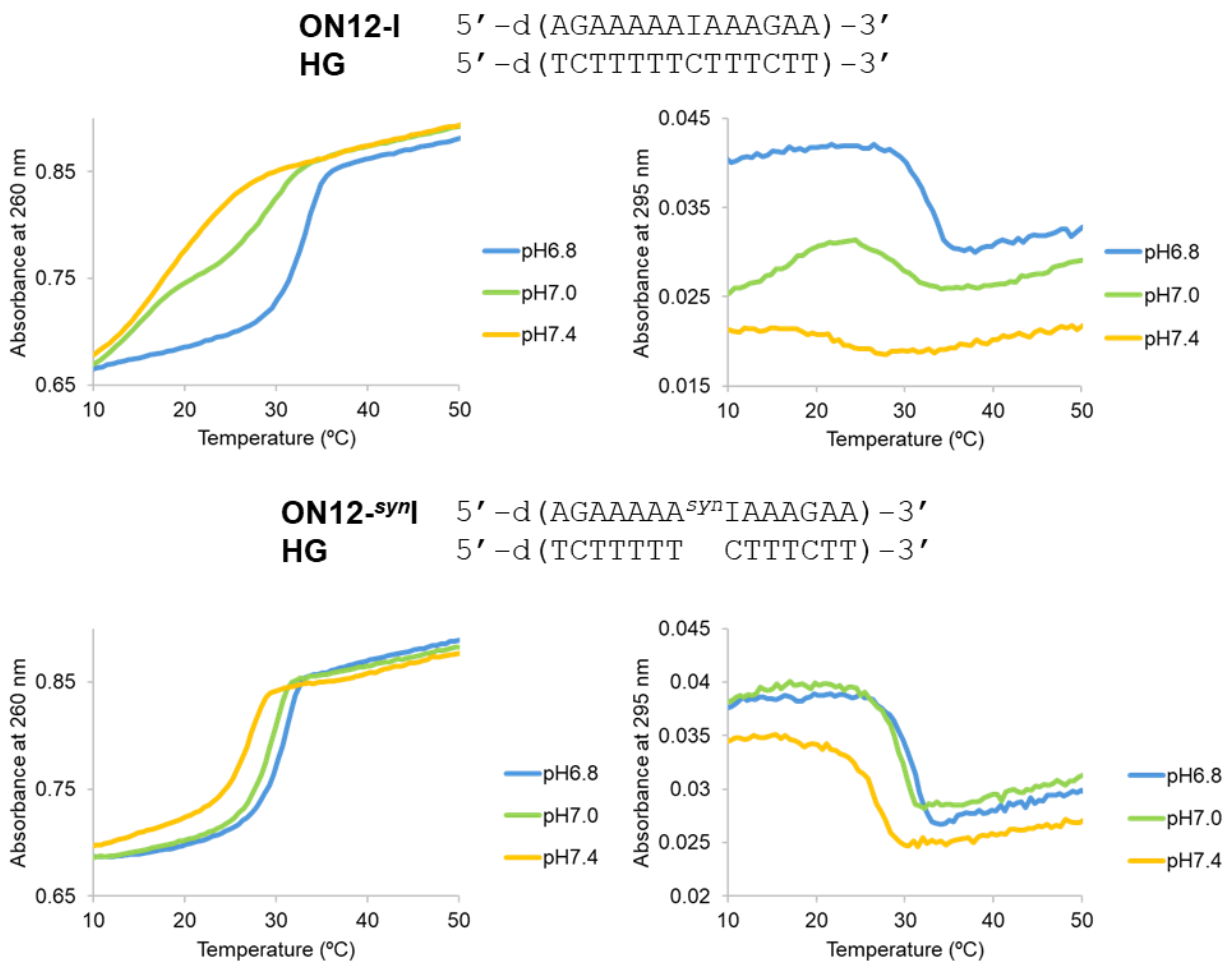


Figure 20. AT 塩基対と *syn*AT 塩基対

次に、*syn*I を含むオリゴ核酸の平行型フーグスティーン二重鎖形成能評価を行いました。天然配列 (**ON12-I/HG**) と *syn*I を含むオリゴ核酸 (**ON12-*syn*I/HG**) の中性付近における 260 nm 及び 295 nm の融解曲線を Figure 21 に示す。**ON12-I/HG** の 260 nm の融解曲線を見ると、pH が上昇するにつれ T_m 値は低下した。また、右側の 295 nm の融解曲線を見ると、pH 6.8 のみ明らかな吸光度の低下が観測でき、それより高い pH ではシグモイド曲線が認められなかった。一方、*syn*I を含む **ON12-*syn*I/HG** では、今回測定したいずれの pH においても 260 nm 及び 295 nm で明瞭なシグモイド曲線が観測され、平行型フーグスティーン二重鎖を形成していることが明らかとなった。



Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 6.8–7.4), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 2.5 μM of each oligonucleotide.

Figure 21. ON12-I/HG と ON12-*sym*I/HG の波長 260 nm と 295 nm の融解曲線

Table 6 にはそれぞれの T_m 値の結果を示している。天然配列の ON12-I/HG では、pH 6.8 の時 33 °C であったが、pH の上昇によりフーグスティーン二重鎖は見られなくなり不完全なワトソンクリック二重鎖が形成され、pH 7.4 では 18 °C と大きく低下した。一方、*sym*I を含む ON12-*sym*I/HG は、配列の 5'末端と 3'末端側に CG 塩基対を一ヶ所ずつ含むためそれに由来する若干の T_m 値の低下が認められるものの、30 °C 近い T_m 値を維持していた。これは、当初予定した通り、*sym*I はプロトン化が不要となるため pH 依存性が低下したためと考えられた (Figure 22)。

Table 6. **ON12-^{syn}I/HG** と **ON12-I/HG** 二重鎖の T_m 値

| | | T_m (°C) | |
|------------------------------------|--------|------------------------|---------------------|
| 5'-d (AGAAAAA X AAAAGAA)-3' | | | |
| 5'-d (TCTTTTTCTTTCTT)-3' | pH 6.8 | 7.0 | 7.4 |
| ON12-^{syn}I | 30 | 29 | 27 |
| ON12-I | 33 | 29 (15) ^[a] | (18) ^[a] |

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 6.8–7.4), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 2.5 μM of each oligonucleotide. ^[a] No transition curve at 295 nm.

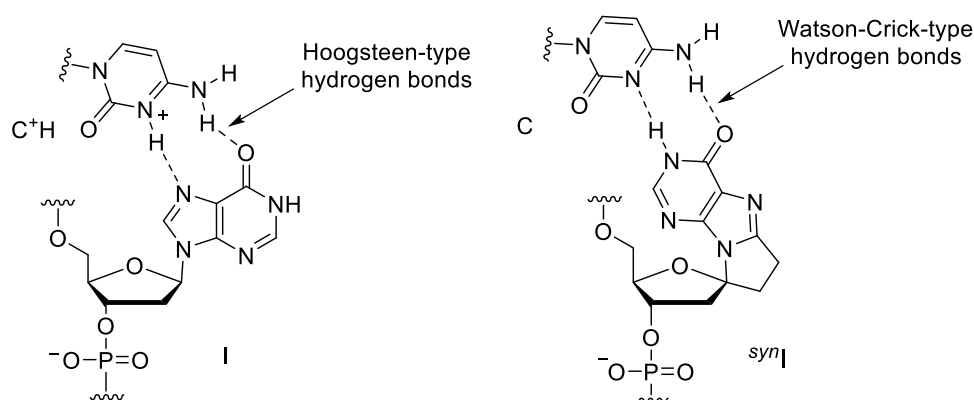


Figure 22. IC⁺H 塩基対と ^{syn}IC 塩基対

最後に、^{syn}I を含むフーグスティーン二重鎖の熱力学的パラメーターを Table 7 に示す。測定条件は、天然配列がフーグスティーン二重鎖を形成できる pH 6.8 の条件を使用した。その結果、**ON12-^{syn}I/HG** は ΔS が有利に働いていることがわかった。これは、C^{syn}I 塩基対形成時にシトシンのプロトン化が不要となったことに起因している可能性がある。

Table 7. **ON12-^{syn}I/HG** と **ON12-I/HG** 二重鎖の熱力学的パラメーター

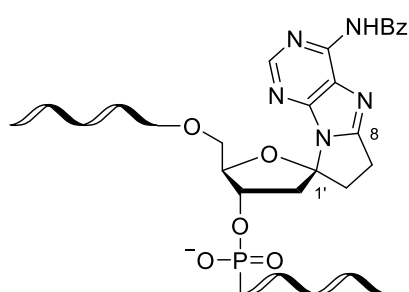
| 5'-AGAAAAA X AAAAGAA-3' | 5'-TCTTTTTCTTTCTT-3' | T_m (°C) | ΔH (kcal/mol) | ΔS (cal/mol/K) |
|--------------------------------|----------------------|------------|-----------------------|------------------------|
| ON12-^{syn}I | | 30 | -197 ± 8 | -620 ± 27 |
| ON12-I | | 33 | -213 ± 9 | -670 ± 30 |

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 6.8), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 2.5 μM of each oligonucleotide.

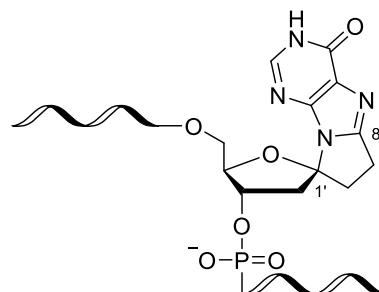
以上のことから、^{syn}型配座固定ヌクレオチドである ^{syn}A と ^{syn}I は中性条件下でのパラレルフーグスティーン二重鎖形成にも有用な材料であることが示唆された。

総括

第一章では、8位と1'位をエチレン架橋した *syn* 配座固定 2'-デオキシアデノシン及び 2'-デオキシイノシンの合成と、それらを含むオリゴ核酸の合成に成功した。



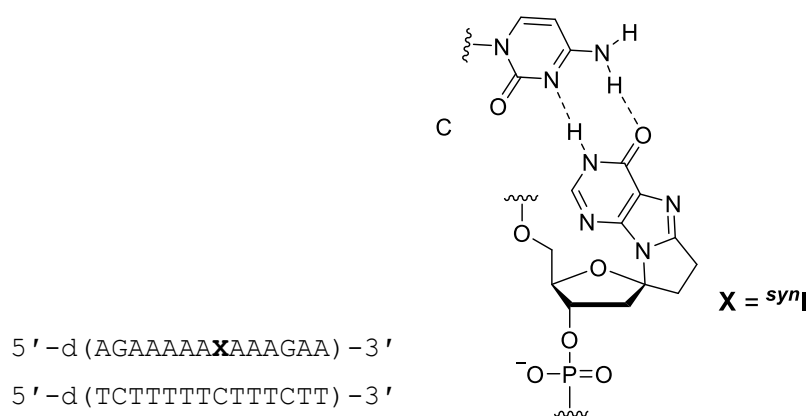
*syn*配座固定2'-デオキシアデノシン
(^{*syn*}A)



*syn*配座固定2'-デオキシイノシン
(^{*syn*}I)

第二章の Z 型 DNA 形成能評価では、Z 型 DNA を形成しにくいと言われる AT 塩基対、IC 塩基対を含む配列において、^{*syn*}A 及び ^{*syn*}I を利用することで、天然より低塩濃度で Z 型 DNA を形成させることに成功した。

また、パラレル型フーグスティーン二重鎖形成能の評価では、^{*syn*}A 及び ^{*syn*}I はどちらも中性条件でパラレル型二重鎖を形成でき、さらに、^{*syn*}I に関しては pH 非依存的な二重鎖が形成できることが示唆された。



この *syn* 配座固定プリンヌクレオチドは、*syn* 配座をとったプリンヌクレオチド等価体として、Z 型 DNA やパラレル型フーグスティーン二重鎖に限らず、多方面に利活用できることが期待される。

謝辞

本研究に際し、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました張 功幸教授に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、数々の御助力、御助言を頂きました伊藤 勇太講師、刈 靖史講師に深く感謝致します。

本研究の論文審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました主査の田中 好幸教授、及び副査の今川 洋教授、加来 裕人教授に深く感謝致します。

質量分析スペクトルを測定して頂きました岡本 育子講師に深く感謝致します。

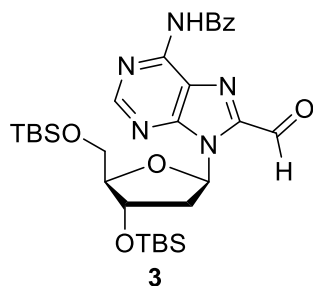
また、本研究の遂行に際し、公益社団法人大塚芳満記念財団奨学助成により御支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

更に、共に学び、多くの御助言と御協力を頂いた徳島文理大学薬学部放射薬品学教室の卒業生、在学生の皆様に深く感謝致します。

最後に、著者の長きにわたる学生生活を温かく支えてくださった家族に心から感謝致します。

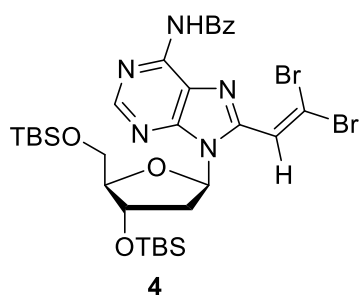
実験の部

^1H NMR、 ^{13}C NMR および ^{31}P NMR スペクトルは、BBO クライオプローブ™を装着した Bruker AVANCE III HD-500 を用いて測定した。測定溶媒は、重クロロホルム (CDCl_3)、重ジメチルスルホキシド ($\text{DMSO}-d_6$) および重メタノール (CD_3OD) を用い、 ^1H NMR はテトラメチルシラン (0.00 ppm)、または非重水素化体 (ジメチルスルホキシド: 2.50 ppm、メタノール: 3.31 ppm)、 ^{13}C NMR はそれぞれの重水素化体 (重クロロホルム: 77.0 ppm、重ジメチルスルホキシド: 39.5 ppm、重メタノール: 49.0 ppm) を内部標準として用い、 ^{31}P NMR は 5 v/v% リン酸水溶液 (0.00 ppm) を外部標準として用いた。分裂様式は singlet、doublet、triplet、double doublet、double double doublet、double triplet、septet、multiplet、broad singlet をそれぞれ s、d、t、dd、ddd、dt、sept、m、br s と略した。赤外吸収 (IR) スペクトルは、日本分光 FT/IR-4200 を用い、ATR 法にて測定した。高分解能質量分析 (HRMS) スペクトルは、日本電子 JMS-S3000 (MALDI-TOF)、Waters SYNAPT G2-Si HDMS (ESI-TOF) を用いて測定した。反応は、薄層クロマトグラフィー (富士フィルム和光純薬シリカゲル 70F₂₅₄TLC プレート-Wako および Merk シリカゲル 60F₂₅₄TLC プレート) にて追跡した。フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーの吸着剤は、富士シリシア化学 FL-PSQ60B (平均粒子径 60 μm) を用いた。オリゴヌクレオチド合成は、大日本精機 nS-8II を用い、0.2 μmol または 1.0 μmol のスケールで行った。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、日本分光 EXTREMA (PU-4180、CO-4060 または CO-4061、UV4075、AS-4050) を用いて行い、分析カラムには Waters XBridge™ Prep Shield RP18 (10 mm \times 50 mm) または Waters XBridge™ Shield RP18 (4.6 mm \times 50 mm) を用いて行った。なお、サンプルの回収は ADVANTEC CHF122SC を用いた。円二色性 (CD) スペクトルは、水冷ペルチェセルホルダ PTC-514 を装着した日本分光 J-1100 を用いて測定した。紫外線 (UV) スペクトルは、日本分光 V-730 を用いて測定した。



化合物 **3**: アルゴン気流下、化合物 **2** (9.5 g, 16.2 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (160 mL) に、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 2 M リチウムジイソプロピルアミドのテトラヒドロフラン/ヘプタン/エチルベンゼン溶液 (40.5 mL, 80.9 mmol) を加えて同温にて 1 時間攪拌した後、ジメチルホルムアミド (31 mL, 404.5 mmol) を加えてさらに 2.5 時間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止させ、0.1 M 塩酸を加え酸性にし、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 2 : 1) にて精製し、化合物 **3** (8.3 g, 84%) を得た。

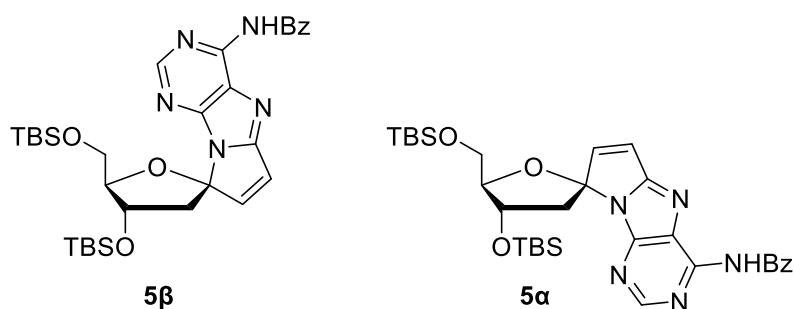
A white foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 10.09 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.65 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.19 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.89–4.86 (m, 1H), 4.00–3.97 (m, 1H), 3.93 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.43 (dt, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 1H), 2.35 (ddd, $J = 13.0, 6.5, 4.5$ Hz, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.82 (s, 9H), 0.15 (s, 6H), -0.01 (s, 3H), -0.05 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 183.6, 164.3, 155.2, 152.3, 151.9, 146.0, 133.4, 133.1, 129.0, 127.8, 123.3, 87.9, 84.8, 72.1, 62.6, 38.4, 25.83, 25.79, 18.3, 18.0, -4.6 , -4.7 , -5.4 , -5.5 . IR (ATR) cm^{-1} : 2953, 2929, 2857, 1702, 1604, 1249. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 610.2881, found 610.2882.



化合物 **4**: アルゴン気流下、トリフェニルホスフィン (3.60 g, 13.7 mmol) と亜鉛粉末 (898 mg, 13.7 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (40 mL) に $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて四臭化炭素 (4.55 g, 13.7 mmol) を加えた。室温で 15 時間攪拌後、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ でトリエチルアミン (3.8 mL, 27.4 mmol) を加えた。同温にて 10 分攪拌後、化合物 **3** (4.20 g, 6.86 mmol) のジクロロメタン溶液 (40 mL) を滴下した。室温にて 2 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得

られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 4 : 1 から 3 : 1) にて精製し、化合物 **4** (3.24 g, 62%) を得た。

A white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.02 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.35 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.80–4.77 (m, 1H), 3.98–3.95 (m, 1H), 3.85 (dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 11.0, 4.5 Hz, 1H), 3.39 (dt, *J* = 13.0, 6.5 Hz, 1H), 2.35 (ddd, *J* = 13.0, 6.5, 4.0 Hz, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.82 (s, 9H), 0.16 (s, 6H), 0.01 (s, 3H), -0.03 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 164.4, 152.8, 151.4, 149.4, 148.1, 133.9, 132.7, 128.9, 127.7, 125.0, 122.5, 101.6, 87.6, 84.3, 71.9, 62.6, 38.2, 25.84, 25.81, 18.4, 18.0, -4.6, -4.8, -5.4 (C2). IR (ATR) cm⁻¹: 2954, 2928, 2856, 1700, 1606, 1251. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₃₁H₄₄Br₂N₅O₄Si₂ [M - H]⁻ 764.1299, found 764.1298.

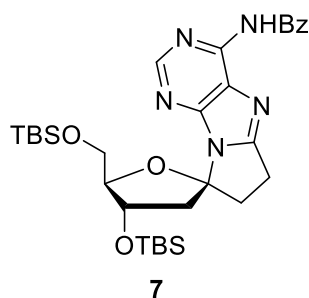


化合物 **5α**, **5β**: アルゴン気流下、還流した化合物 **4** (500 mg, 0.65 mmol) とジイソプロピルアミン (568 μL, 3.25 mmol) のトルエン溶液 (65 mL) に、シリンジポンプを用いて 2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) (21 mg, 0.13 mmol) とトリブトルスズ (375 μL, 1.43 mmol) のトルエン溶液 (14 mL) を 1 時間かけて滴下した。反応溶液を室温まで冷却後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 4 : 1 から 2 : 1) にて精製し、化合物 **5β** (75.6 mg, 19%) と化合物 **5α** (42.7 mg, 11%) を得た。

化合物 **5β**: A white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.89 (s, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, A2), 8.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ph), 7.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ph), 7.51 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ph), 7.07 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_b), 6.68 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_a), 4.91 (dt, *J* = 5.0, 2.5 Hz, 1H, 3'), 4.23 (ddd, *J* = 8.0, 5.5, 2.5 Hz, 1H, 4'), 4.16 (dd, *J* = 10.5, 8.0 Hz, 1H, 5'), 3.90 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H, 5'), 3.05 (dd, *J* = 13.5, 5.0 Hz, 1H, 2'β), 2.30 (dd, *J* = 13.5, 2.5 Hz, 1H, 2'α), 0.94 (s, 9H, *t*-Bu), 0.93 (s, 9H, *t*-Bu), 0.16 (s, 3H, SiCH₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃), 0.10 (s, 3H, SiCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 64.5, 159.2, 152.2, 151.0, 150.4, 148.7, 133.7, 132.7, 128.8, 128.3, 127.8, 120.0, 98.3, 89.6, 73.5, 63.2, 40.3, 25.9, 25.8, 18.4, 17.9, -4.76, -4.83, -5.3, -5.4. IR (ATR) cm⁻¹: 2952, 2928, 2856, 1694, 1619, 1250. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₃₁H₄₄N₅O₄Si₂ [M - H]⁻ 606.2932, found 606.2933.

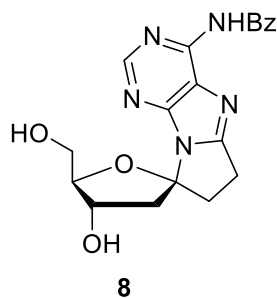
化合物 **5α**: A white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.88 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, A2), 8.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ph), 7.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ph), 7.51 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ph), 6.80 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_b), 6.69 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_a), 4.66 (dt, *J* = 9.0, 8.0 Hz, 1H, 3'), 4.54 (ddd, *J* = 8.0, 2.5, 1.5 Hz, 1H,

4'), 3.94 (dd, $J = 12.0, 1.5$ Hz, 1H, 5'), 3.82 (dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, 1H, 5'), 2.88 (dd, $J = 13.0, 9.0$ Hz, 1H, 2' α), 2.64 (dd, $J = 13.0, 8.5$ Hz, 1H, 2' β), 0.93 (s, 9H, *t*-Bu), 0.92 (s, 9H, *t*-Bu), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.10 (s, 3H, SiCH₃), 0.07 (s, 3H, SiCH₃), 0.06 (s, 3H, SiCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 164.5, 158.8, 152.6, 151.0, 148.9, 148.7, 133.7, 132.6, 128.8, 128.1, 127.8, 120.6, 96.2, 86.0, 69.3, 60.1, 41.2, 25.9, 25.7, 18.3, 18.0, -4.7, -4.9, -5.3, -5.5. IR (ATR) cm⁻¹: 2953, 2928, 2856, 1694, 1619, 1251. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₃₁H₄₆N₅O₄Si₂ [M + H]⁺ 608.3088, found 608.3090.



化合物 **7**: 水素気流下、化合物 **5 β** (184 mg, 0.30 mmol) と 10%パラジウム-活性炭素 (180 mg) のテトラヒドロフラン懸濁液 (4 mL) を室温にて 4 時間激しく攪拌した。反応液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) にて精製し、化合物 **7** (130 mg, 71%) を得た。

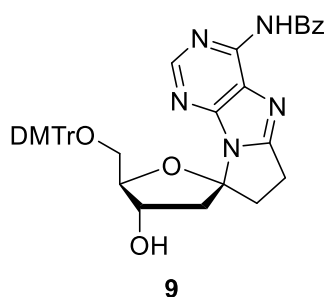
A white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.94 (br s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.59 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.92 (ddd, $J = 6.5, 5.5, 3.5$ Hz, 1H), 4.05 (ddd, $J = 7.0, 6.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.92 (dd, $J = 11.0, 7.0$ Hz, 1H), 3.64 (dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 13.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.28 (dt, $J = 17.5, 9.0$ Hz, 1H), 3.02 (ddd, $J = 17.5, 9.0, 2.0$ Hz, 1H), 2.95 (ddd, $J = 13.5, 9.0, 2.0$ Hz, 1H), 2.83 (dt, $J = 13.5, 9.0$ Hz, 1H), 2.25 (dd, $J = 13.5, 3.5$ Hz, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.16 (s, 3H), 0.14 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), 0.00 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 164.5, 161.3, 151.3, 149.8, 148.1, 133.8, 132.6, 128.8, 128.2, 127.8, 98.0, 88.4, 72.7, 63.0, 42.3, 42.2, 25.9, 25.7, 23.1, 18.4, 17.9, -4.77, -4.80, -5.4, -5.5. IR (ATR) cm⁻¹: 2953, 2928, 2856, 1697, 1614, 1249. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₃₁H₄₆N₅O₄Si₂ [M - H]⁻ 608.3088, found 608.3089.



化合物 **8**: アルゴン気流下、化合物 **7** (130 mg, 0.21 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (2 mL) に室温にて 1 M フッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液 (0.46 mL,

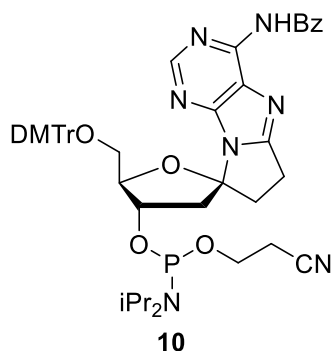
0.46 mmol) を加えた。同温にて 2 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 50 : 1 から 20 : 1) にて精製し、化合物 **8** (70 mg, 87%) を得た。

A white foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 11.07 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.64 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 5.35 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.82 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.76–4.72 (m, 1H), 3.92–3.89 (m, 1H), 3.66 (dt, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.44 (dt, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.19 (dd, $J = 13.5, 6.5$ Hz, 1H), 3.12 (dt, $J = 17.0, 8.5$ Hz, 1H), 2.98 (ddd, $J = 17.0, 8.5, 2.5$ Hz, 1H), 2.90 (dt, $J = 13.0, 8.5$ Hz, 1H), 2.77 (ddd, $J = 13.0, 8.5, 2.5$ Hz, 1H), 2.34 (dd, $J = 13.5, 5.5$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 165.5, 161.4, 150.4, 149.8, 148.9, 133.4, 132.4, 131.1, 128.44, 128.37, 97.5, 88.0, 70.7, 62.0, 42.2, 41.3, 22.4. IR (ATR) cm^{-1} : 3290, 3003, 2934, 1696, 1616, 1252. HRMS (MALDI-TOF): calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 382.1510, found 382.1502.



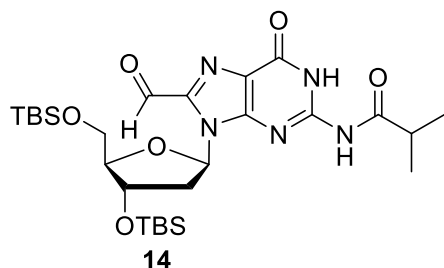
化合物 **9**: アルゴン気流下、化合物 **8** (50.0 mg, 0.13 mmol) のピリジン溶液 (1.3 mL) に、0 °C にてトリエチルアミン (90 μL , 0.65 mmol) と 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (68 mg, 0.20 mmol) を加えた。室温にて 2 時間攪拌した後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウムを加え反応を停止した。酢酸エチルで希釈し、有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 50 : 1) にて精製し、化合物 **9** (69.7 mg, 78%) を得た。

A white foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.89 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.59 (t, d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.26–7.15 (m, 7H), 6.75 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 5.21–5.17 (m, 1H), 4.19–4.16 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.39 (dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 13.5, 6.5$ Hz, 1H), 3.26 (dt, $J = 17.0, 8.5$ Hz, 1H), 3.02 (ddd, $J = 17.0, 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 2.92 (ddd, $J = 13.5, 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 2.84 (dt, $J = 13.5, 8.5$ Hz, 1H), 2.49 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 2.39 (dd, $J = 13.5, 6.5$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 164.5, 161.0, 158.43, 158.35, 151.1, 149.4, 148.0, 144.7, 135.9, 135.7, 133.8, 132.6, 130.1, 129.8, 128.8, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7, 126.8, 112.98, 112.96, 97.4, 86.3, 86.0, 73.1, 64.4, 55.20, 55.18, 42.7, 41.6, 23.1. IR (ATR) cm^{-1} : 3265, 2999, 2931, 1697, 1612, 1506, 1246. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 684.2822, found 684.2824.



化合物 **10**: アルゴン気流下、化合物 **9** (64 mg, 0.094 mmol) のジクロロメタン溶液 (1 mL) に、0 °C にて *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (66 μ L, 0.38 mmol) と 2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (29 μ L, 0.13 mmol) を加えた。室温にて 1.5 時間攪拌した後、反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで希釈した。有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) にて精製し、化合物 **10** (52.2 mg, 63%) を得た。

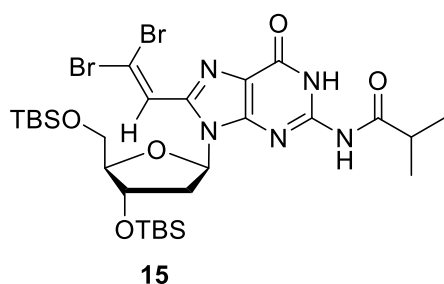
A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.81 (s, 0.5H), 8.80 (s, 0.5H), 8.48 (s, 0.5H), 8.46 (s, 0.5H), 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.61 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.53 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.37–7.34 (m, 2H), 7.26–7.14 (m, 7H), 6.73 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.10–5.04 (m, 1H), 4.41–4.37 (m, 1H), 3.89–3.57 (m, 10H), 3.41–3.29 (m, 4H), 3.09–3.04 (m, 1H), 2.99–2.84 (m, 2H), 2.62 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 2.52–2.41 (m, 2H), 1.21–1.15 (m, 12H). ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3): δ 148.4, 148.3. IR (ATR) cm^{-1} : 2966, 2931, 1698, 1611, 1507, 1248. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 884.3901, found 884.3902.



化合物 **14**: アルゴン気流下、化合物 **13** (1.03 g, 1.82 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (10 mL) に、-78 °C で 2 M リチウムジイソプロピルアミドのテトラヒドロフラン/ヘプタン/エチルベンゼン溶液 (4.33 mL, 8.65 mmol) を加えて同温にて 1 時間攪拌した後、ジメチルホルムアミド (3.33 mL, 43.25 mmol) を加えてさらに 2 時間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止させ、0.1 M 塩酸を加え酸性にし、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1 から 2 : 1) にて精製し、化合物 **14** (613 mg, 57%) を

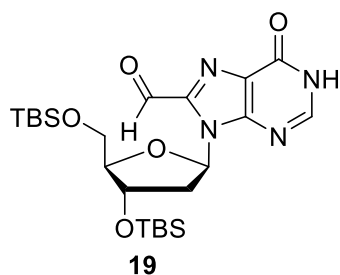
得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 12.14 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 6.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.72 (dt, $J = 7.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.90–3.88 (m, 1H), 3.85 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.74 (dd, $J = 11.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.09 (dt, $J = 13.0, 7.0$ Hz, 1H), 2.61 (sept, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.21 (ddd, $J = 13.0, 7.0, 4.0$ Hz, 1H), 1.29 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), 0.13 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), -0.01 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 182.7, 178.2, 155.4, 150.1, 148.6, 144.0, 123.3, 87.4, 83.9, 72.0, 62.6, 38.4, 36.8, 25.9, 25.8, 19.0, 18.8, 18.4, 18.0, -4.55 , -4.63 , -5.4 (C2). IR (ATR) cm^{-1} : 3160, 2953, 2929, 2856, 1678, 1603, 1552, 1430, 1249. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 592.2987, found 592.2988.



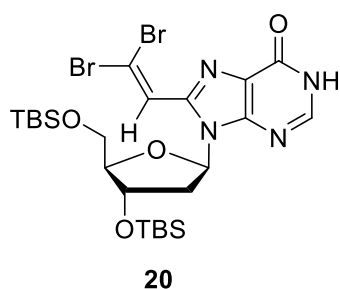
化合物 **15**: アルゴン気流下、トリフェニルホスフィン (236 mg, 0.90 mmol) と亜鉛粉末 (59 mg, 0.90 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (3 mL) に 0°C にて四臭化炭素 (298 mg, 0.90 mmol) を加える。室温で 17 時間攪拌後、 0°C でトリエチルアミン (250 μL , 1.80 mmol) を加えた。同温にて 30 分攪拌後、化合物 **14** (267 mg, 0.45 mmol) のジクロロメタン溶液 (3 mL) を滴下した。室温にて 4 時間半攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : 酢酸エチル = 7 : 1 から 3 : 1) にて精製し、化合物 **15** (250 mg, 74%) を得た。

A white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 11.98 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 6.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.58 (dt, $J = 7.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.90–3.87 (m, 1H), 3.78–3.76 (m, 2H), 2.77 (dt, $J = 13.5, 7.0$ Hz, 1H), 2.61 (sept, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.23 (ddd, $J = 13.5, 7.0, 4.0$ Hz, 1H), 1.28 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.140 (s, 3H), 0.136 (s, 3H), 0.07 (s, 3H), 0.04 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 178.0, 155.1, 148.1, 147.1, 143.7, 125.1, 121.2, 98.6, 87.1, 83.3, 71.6, 62.6, 39.3, 36.7, 25.9, 25.8, 19.0, 18.9, 18.5, 18.0, -4.6 , -4.7 , -5.31 , -5.34 . IR (ATR) cm^{-1} : 3153, 2954, 2928, 2856, 1672, 1604, 1554, 1251. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{Br}_2\text{N}_5\text{NaO}_5\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 770.1380, found 770.1379.



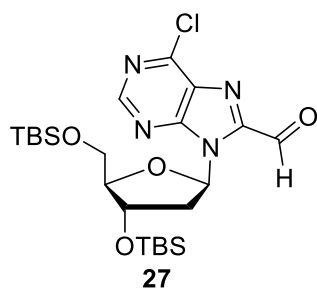
化合物 **19**: アルゴン気流下、化合物 **18** (1.0 g, 2.08 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (20 mL) に、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 2 M リチウムジイソプロピルアミドのテトラヒドロフラン/ヘプタン/エチルベンゼン溶液 (5.2 mL, 10.4 mmol) を加えて同温にて 1 時間攪拌した後、ジメチルホルムアミド (4.0 mL, 52.0 mmol) を加えてさらに 4 時間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止させ、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 50 : 1 から 20 : 1) にて精製し、化合物 **19** (471 mg, 45%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 12.91 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.18 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.80 (dt, $J = 6.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.98–3.95 (m, 1H), 3.90 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.74 (dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.24 (dt, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 1H), 2.31 (ddd, $J = 13.0, 6.5, 4.5$ Hz, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.84 (s, 9H), 0.141 (s, 3H), 0.136 (s, 3H), 0.02 (s, 3H), -0.02 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 183.2, 159.4, 150.7, 146.5, 144.7, 126.3, 87.9, 84.7, 72.0, 62.7, 38.6, 25.9, 25.8, 18.4, 18.0, -4.66 , -4.73 , -5.40 , -5.44 . IR (ATR) cm^{-1} : 3061, 2953, 2929, 2857, 1693, 1253. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5\text{Si}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 507.2459, found 507.2459.



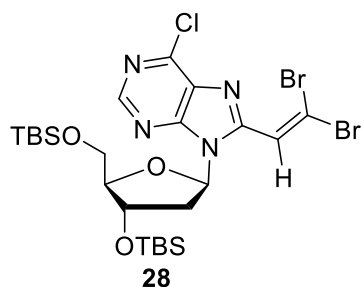
化合物 **20**: アルゴン気流下、トリフェニルホスフィン (400 mg, 0.79 mmol) と亜鉛粉末 (103 mg, 1.57 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (5 mL) に $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて四臭化炭素 (521 mg, 7.57 mmol) を加える。室温で 21 時間攪拌後、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ でトリエチルアミン (436 μL , 3.14 mmol) を加えた。同温にて 10 分攪拌後、化合物 **19** (400 mg, 0.79 mmol) のジクロロメタン溶液 (5 mL) を滴下した。室温にて 5 時間半攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : 酢酸エチル = 1 : 1) にて精製し、化合物 **20** (216 mg, 41%) を得た。

A pale yellow foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 13.2 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 6.32 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.70 (dt, $J = 6.5, 4.0$ Hz, 1H), 3.96–3.93 (m, 1H), 3.81 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.75 (dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.09 (dt, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 1H), 2.31 (ddd, $J = 13.0, 6.5, 4.0$ Hz, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.14 (s, 6H), 0.04 (s, 3H), 0.01 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 159.1, 149.0, 145.4, 144.7, 124.8, 124.7, 99.7, 87.5, 84.1, 71.8, 62.6, 38.9, 25.9, 25.8, 18.4, 18.0, -4.65, -4.73, -5.38 (C2). IR (ATR) cm^{-1} : 3061, 2953, 2928, 2856, 1675, 1253. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{Br}_2\text{N}_4\text{NaO}_4\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 685.0583, found 685.0852.



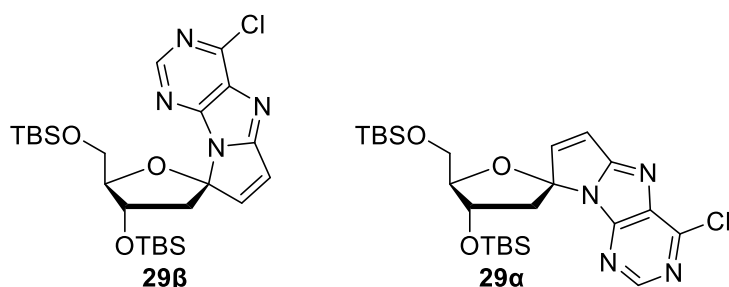
化合物 **27**: アルゴン気流下、化合物 **26** (6.25 g, 12.5 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (50 mL) に、 -78 $^{\circ}\text{C}$ で 2 M リチウムジイソプロピルアミドのテトラヒドロフラン/ヘプタン/エチルベンゼン溶液 (11.85 mL, 23.7 mmol) を加えて同温にて 1 時間攪拌した後、ジメチルホルムアミド (9.12 mL, 118.5 mmol) を加えてさらに 2 時間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止させ、0.1 M 塩酸を加え酸性にし、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン: 酢酸エチル = 7 : 1) にて精製し、化合物 **27** (5.0 g, 76%) を得た。

A yellow oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 10.14 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.18 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.90 (dt, $J = 6.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.96 (q, $J = 4.5$ Hz, 1H), 3.88 (dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 11.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.41 (dt, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 1H), 2.36 (ddd, $J = 13.0, 6.5, 4.5$ Hz, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.77 (s, 9H), 0.15 (s, 6H), -0.14 (s, 3H), -0.10 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 183.9, 154.7, 153.9, 152.1, 147.7, 131.8, 87.7, 85.0, 71.7, 62.3, 38.2, 25.77, 25.75, 18.3, 18.0, -4.7, -4.8, -5.5, -5.6. IR (ATR) cm^{-1} : 2953, 2928, 2857, 1714, 1584, 1556, 1252. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{NaO}_4\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 549.2096, found 549.2096.



化合物 **28**: アルゴン気流下、トリフェニルホスフィン (3.60 g, 13.7 mmol) と亜鉛粉末 (898 mg, 13.7 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (40 mL) に 0 °C にて四臭化炭素 (4.55 g, 13.7 mmol) を加えた。室温で 15 時間攪拌後、0 °C でトリエチルアミン (3.8 mL, 27.4 mmol) を加えた。同温にて 10 分攪拌後、化合物 **27** (3.5 g, 6.64 mmol) のジクロロメタン溶液 (35 mL) を滴下した。室温にて 40 分攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出し、有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10 : 1) にて精製し、化合物 **28** (3.88 g, 86%) を得た。

A pale brown oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.71 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 6.33 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.81 (dt, *J* = 6.5, 4.5 Hz, 1H), 3.95 (dt, *J* = 5.5, 4.5 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 11.0, 4.5 Hz, 1H), 3.34 (dt, *J* = 13.0, 6.5 Hz, 1H), 2.36 (ddd, *J* = 13.0, 6.5, 4.5 Hz, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.79 (s, 9H), 0.159 (s, 3H), 0.156 (s, 3H) –0.01 (s, 3H), –0.06 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 151.8, 151.5, 151.1, 150.6, 131.5, 124.7, 103.0, 87.5, 84.5, 71.6, 62.3, 38.2, 25.79, 25.78, 18.3, 18.0, –4.7, –4.8, –5.47, –5.49. IR (ATR) cm⁻¹: 2953, 2928, 2856, 1588, 1556, 1340, 1250. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₂₄H₄₀Br₂ClN₄O₃Si₂ [M + H]⁺ 681.0694, found 681.0698.

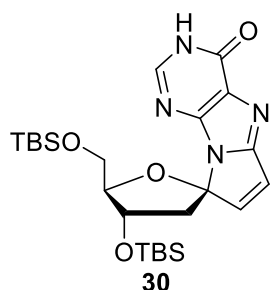


化合物 **29β**, **29α**: アルゴン気流下、還流した化合物 **28** (1.0 g, 1.46 mmol) とジイソプロピルアミン (1.28 mL, 7.30 mmol) のトルエン溶液 (145 mL) に、シリンジポンプを用いて 2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) (48 mg, 0.29 mmol) とトリブトルスズ (842 μL, 3.21 mmol) のトルエン溶液 (30 mL) を 1 時間かけて滴下した。反応溶液を室温まで冷却後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 6:1) にて精製し、化合物 **29β** (185 mg, 24%) と化合物 **29α** (137 mg, 18%) を得た。

化合物 **29β**: A pale yellow solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.61 (s, 1H, 2), 7.13 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_b), 6.71 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_a), 4.90–4.88 (m, 1H, 3'), 4.23 (ddd, *J* = 8.0, 5.5, 2.0 Hz, 1H, 4'), 4.12 (dd, *J* = 10.5, 8.0 Hz, 1H, 5'), 3.86 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H, 5'), 3.02 (dd, *J* = 13.5, 5.0 Hz, 1H, 2'β), 2.31 (dd, *J* = 13.5, 2.5 Hz, 1H, 2'α), 0.94 (s, 9H, *t*-Bu), 0.93 (s, 9H, *t*-Bu), 0.16 (s, 3H, SiCH₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃), 0.10 (s, 3H, SiCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161.1, 151.6, 151.5, 150.5, 149.7, 137.1, 119.9, 98.7, 89.7, 73.4, 63.1, 40.4, 25.9, 25.7, 18.4, 17.9, –4.76,

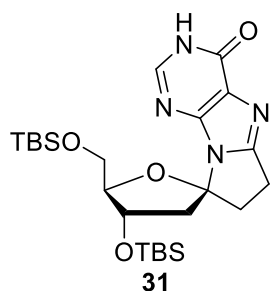
-4.84, -5.3, -5.4. IR (ATR) cm^{-1} : 2953, 2929, 2857, 1612, 1556, 1429, 1251. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{NaO}_3\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 545.2147, found 545.2147.

化合物 **29 α** : A pale yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.69 (s, 1H, 2), 6.85 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H_b), 6.72 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H_a), 4.68–4.63 (m, 1H, 3'), 4.53 (dt, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, 4'), 3.93 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 5'), 3.82 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 5'), 2.81 (dd, $J = 13.0, 9.0$ Hz, 1H, 2' α), 2.67 (dd, $J = 13.0, 7.5$ Hz, 1H, 2' β), 0.924 (s, 9H, *t*-Bu), 0.920 (s, 9H, *t*-Bu), 0.13 (s, 3H, SiCH_3), 0.10 (s, 3H, SiCH_3), 0.07 (s, 3H, SiCH_3), 0.06 (s, 3H, SiCH_3). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 160.7, 152.0, 150.5, 149.9, 149.8, 136.8, 120.7, 96.6, 86.2, 69.4, 60.2, 41.4, 25.9, 25.7, 18.3, 18.0, -4.7, -4.9, -5.3, -5.5. IR (ATR) cm^{-1} : 2953, 2929, 2857, 1614, 1556, 1250. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{NaO}_3\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 545.2147, found 545.2144.



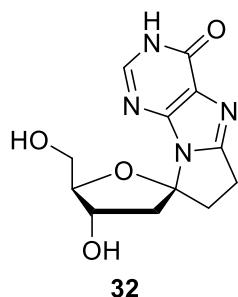
化合物 **30**: アルゴン気流下、エチレンシアノヒドリン (116 μL , 1.71 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (13 mL) に、0 $^\circ\text{C}$ にて水素化ナトリウム (68.4 mg, 1.71 mmol) を加えた。室温にて 30 分攪拌した後、化合物 **29 β** (200 mg, 0.38 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (13 mL) を 0 $^\circ\text{C}$ で加え室温で 1 時間半攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え反応を停止させ、水層をクロロホルムで 2 回、クロロホルム : メタノール = 10 : 1 溶液で 1 回抽出した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 50 : 1) にて精製し、化合物 **30** (137 mg, 71%) を得た。

A white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 13.21 (br s, 1H), 8.06 (s, 1H), 6.92 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.85–4.83 (m, 1H), 4.20 (ddd, $J = 8.0, 5.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 11.0, 8.0$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J = 13.5, 5.0$ Hz, 1H), 2.29 (dd, $J = 13.5, 2.5$ Hz, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.93 (s, 9H), 0.15 (s, 3H), 0.12 (s, 3H), 0.10 (s, 3H), 0.09 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 159.3, 156.1, 148.5, 147.7, 144.7, 129.2, 120.3, 98.6, 89.5, 73.4, 63.2, 40.6, 25.9, 25.8, 18.4, 17.9, -4.75, -4.82, -5.3, -5.4. IR (ATR) cm^{-1} : 2953, 2928, 2856, 1709, 1592, 1251, 1073, 1032. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 503.2510, found 503.2510.



化合物 **31**: 水素気流下、化合物 **30** (137 mg, 0.27 mmol) と 10%パラジウム-活性炭素 (100 mg) の THF 懸濁液 (3 mL) を室温にて 18 時間激しく攪拌した。反応液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチルから クロロホルム : メタノール = 100 : 1) にて精製し、化合物 **31** (88 mg, 64%) を得た。

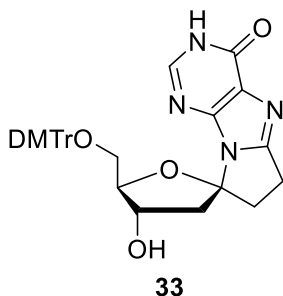
A white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 13.15 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 4.84 (ddd, $J = 5.5, 4.0, 3.0$ Hz, 1H), 4.02 (ddd, $J = 7.0, 5.5, 3.0$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J = 11.0, 7.0$ Hz, 1H), 3.63 (dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 13.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.19 (dt, $J = 17.0, 8.5$ Hz, 1H), 2.94 (ddd, $J = 17.0, 9.0, 2.0$ Hz, 1H), 2.90 (ddd, $J = 13.5, 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 2.78 (dt, $J = 13.5, 9.0$ Hz, 1H), 2.22 (dd, $J = 13.5, 4.0$ Hz, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), 0.13 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), -0.01 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 159.1, 157.7, 146.5, 143.5, 129.6, 98.1, 88.3, 72.6, 62.9, 42.5, 42.4, 25.9, 25.7, 22.7, 18.4, 17.9, -4.77 , -4.80 , -5.37 , -5.44 . IR (ATR) cm^{-1} : 3041, 2953, 2929, 2857, 1719, 1590, 1253. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 505.2666, found 505.2665.



化合物 **32**: アルゴン気流下、化合物 **31** (76 mg, 0.15 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (2 mL) に室温にて 1 M フッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液 (0.33 mL, 0.15 mmol) を加えた。室温にて 4 時間半攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 20 : 1 から 10 : 1 から 5 : 1) にて精製し、化合物 **32** (43 mg, quant.) を得た。

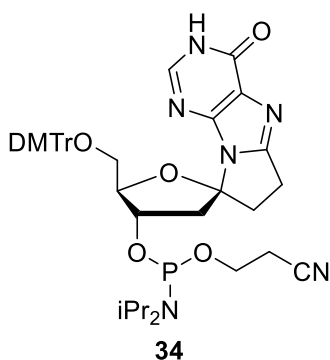
A white solid. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 7.99 (s, 1H), 4.80 (ddd, $J = 6.5, 4.5, 4.0$ Hz, 1H), 4.05 (ddd, $J = 5.5, 4.0, 3.5$ Hz, 1H), 3.80 (dd, $J = 12.0, 3.5$ Hz, 1H), 3.68 (dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, 1H), 3.16 (dd, $J = 13.5, 6.5$ Hz, 1H), 3.13–3.07 (m, 1H), 2.99–2.93 (m, 2H), 2.89–2.83 (m, 1H), 2.40 (dd, $J = 13.5, 4.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD): δ 159.0, 158.7, 147.2, 146.0, 130.2, 100.3, 89.9,

72.9, 63.9, 44.4, 43.1, 23.3. IR (ATR) cm^{-1} : 3283, 2930, 2873, 1682, 1586, 1379. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 277.0937, found 277.0938.



化合物 **33**: アルゴン気流下、化合物 **32** (40 mg, 0.14 mmol) のピリジン溶液 (1.5 mL) に、 0°C にてトリエチルアミン (97 μL , 0.70 mmol) と 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (71 mg, 0.21 mmol) を加えた。室温にて 24 時間攪拌した後、反応液にメタノールを加え反応を停止した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 30 : 1 から 10 : 1 から 5 : 1) にて精製し、化合物 **33** (45 mg, 55%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 7.67 (s, 1H), 7.34–7.32 (m, 2H), 7.21 (d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 7.15–7.12 (m, 3H), 6.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.92–4.89 (m, 1H), 4.20–4.17 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.37 (dd, $J = 10.0, 7.5$ Hz, 1H), 3.24–3.14 (m, 3H), 2.99–2.89 (m, 3H), 2.37 (dd, $J = 13.5, 6.5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD): δ 160.0, 159.9, 159.2, 158.7, 147.3, 146.5, 145.2, 137.3, 137.2, 131.3, 131.2, 130.1, 129.3, 128.5, 127.6, 113.8, 113.7, 99.7, 88.2, 87.2, 79.5, 72.9, 66.0, 55.7, 44.0, 42.7, 23.3. IR (ATR) cm^{-1} : 3272, 2930, 2836, 1682, 1508, 1249. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 603.2220, found 603.2220.



化合物 **34**: アルゴン気流下、化合物 **33** (41 mg, 0.071 mmol) のジクロロメタン溶液 (1 mL) に、 0°C にて *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (50 μL , 0.28 mmol) と 2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (22 μL , 0.099 mmol) を加えた。室温にて 2 時間半攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 50 : 1) にて精製し、化合物 **34** (34 mg, 61%)

を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 12.87 (br s, 1H), 7.70 (s, 0.4H), 7.68 (s, 0.6H), 7.39–7.36 (m, 2H), 7.27–7.24 (m, 4H), 7.20–7.13 (m, 3H), 6.74–6.69 (m, 4H), 5.02–4.98 (m, 0.4H), 4.96–4.92 (m, 0.6H), 4.38–4.33 (m, 1H), 3.93–3.55 (m, 10H), 3.36–3.20 (m, 4H), 2.99–2.77 (m, 3H), 2.64–2.60 (m, 1.4H), 2.48–2.37 (m, 1.6H), 1.21–1.14 (m, 12H). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ 148.7, 148.5. IR (ATR) cm^{-1} : 2966, 1702, 1680, 1508, 1250. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_7\text{P} [\text{M} - \text{H}]^-$ 779.3322, found 779.3318.

オリゴ核酸合成: dA^{Bz} 、 dG^{iBu} または dC^{Bz} が担持された多孔質ガラス (CPG) を用い、標準的なホスホロアミダイト法により $0.2 \mu\text{mol}$ または $1.0 \mu\text{mol}$ スケールにて合成した。ヌクレオシドのホスホロアミダイト体は、 dA^{Bz} 、 dG^{iBu} 、 dC^{Bz} 、 dT 、化合物 **10** を 0.1 M 無水アセトニトリル溶液として用い、化合物 **34** は 0.1 M 無水ジクロロメタン溶液として用いた。脱 DMTr 工程は $3 \text{ w/v} \%$ トリクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液を用い、縮合工程は ETT activator (0.25 M 5-エチルチオ-1*H*-テトラゾール/アセトニトリル溶液) を用い、キャップ工程は Cap A [テトラヒドロフラン/無水酢酸 = $90.9 : 9.1$ (v/v)] と Cap B [テトラヒドロフラン/*N*-メチルイミダゾール/ピリジン = $8 : 1 : 1$ (v/v/v)] を用い、酸化工程は Oxidizer [テトラヒドロフラン/水/ピリジン/ヨウ素 = $90.54 : 9.05 : 0.43 : 0.41$ (v/v/v/w)] を用いて、これらの工程を順に繰り返すことで、任意の配列のオリゴ核酸を合成した。なお、各工程は基本的に、通常の反応時間 (脱 DMTr 工程: 8 秒、縮合工程: 25 秒、キャップ工程: 45 秒、酸化工程: 10 秒) で行ったが、化合物 **10** および化合物 **34** の縮合工程は 5 分、その次の縮合工程は 10 分に延長した。オリゴ核酸の 5'末端 DMTr 基を脱保護しない方法で **ON1** を、脱保護する方法で **ON2** から **ON12-*syn*I** の 11 種類を合成した。その後、オリゴ核酸が担持された CPG に対して、濃アンモニア水により室温で 36 時間処理を行い、CPG からの切り出し、核酸塩基部とリン酸部の脱保護を行った。反応溶液からアンモニアを遠心式濃縮機 (TAITEC VA-1405) を用いて減圧留去した。その後、**ON1** の粗成績体は Sep-Pak[®] を用いて、短鎖オリゴ核酸の除去および 1% トリフルオロ酢酸水溶液による 5'末端 DMTr 基の脱保護を行い、HPLC により単離精製を行った。**ON2** から **ON12-*syn*I** の粗成績体は直接 HPLC により主生成物の単離精製を行った。HPLC は、 0.1 M トリエチルアンモニウム酢酸緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルの混合溶液を移動相に用いて、30 分間、流速 2 mL/min の条件で実施した。それぞれのオリゴ核酸の精製で使用したアセトニトリルのグラジエントと温度の条件は以下に示す。

ON1-3: 5–15%, $40 \text{ }^\circ\text{C}$

ON4, 7, 8: 2–10%, $40 \text{ }^\circ\text{C}$

ON5: 2–10%, $20 \text{ }^\circ\text{C}$

ON6: 5–13%, $20 \text{ }^\circ\text{C}$

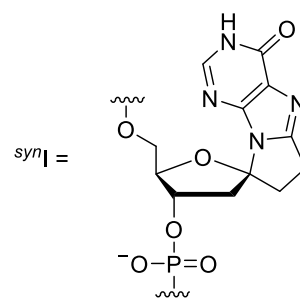
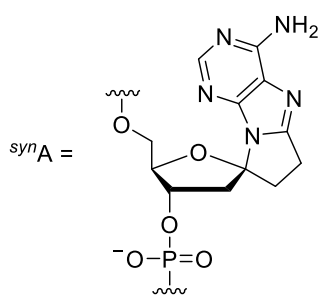
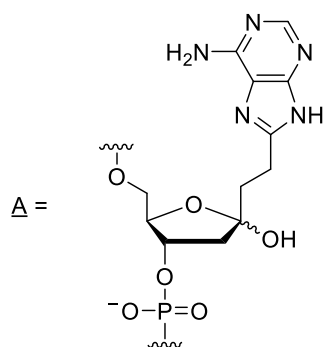
ON9, 10: 5–13%, $40 \text{ }^\circ\text{C}$

ON11-*syn*A, ON12-*syn*I: 5–10%, $40 \text{ }^\circ\text{C}$

これらの新規オリゴ核酸の構造は、ESI-TOF-MS 測定 (ネガティブモード) にて決定した (Table S1)。

Table S1. Sequences and ESI-MS analysis data of new oligonucleotides.

| Sequence | Formula | Calcd. [M] | Found [M] |
|--|---|------------|-----------|
| ON1 5'-d(ACGAGA <u>A</u> CATCC)-3' | C ₁₁₈ H ₁₄₈ N ₄₉ O ₆₆ P ₁₁ | 3667.4858 | 3667.7002 |
| ON2 5'-d(ACGAGA ^{syn} ACATCC)-3' | C ₁₀₆ H ₁₃₃ N ₄₄ O ₆₃ P ₁₁ | 3649.4708 | 3649.5002 |
| ON3 5'-d(ACGAGA ^{syn} ICATCC)-3' | C ₁₀₆ H ₁₃₃ N ₄₄ O ₆₃ P ₁₁ | 3650.4548 | 3649.5002 |
| ON4 5'-d(CGCGCGC ^{syn} ACGCG)-3' | C ₁₁₆ H ₁₄₇ N ₄₈ O ₆₉ P ₁₁ | 3658.4308 | 3658.5002 |
| ON5 5'-d(CGCGTGC ^{syn} ACGCG)-3' | C ₁₀₅ H ₁₃₃ N ₄₂ O ₆₇ P ₁₁ | 3673.4418 | 3672.5002 |
| ON6 5'-d(CGCGC ^{syn} ATGCGCG)-3' | C ₁₀₅ H ₁₃₃ N ₄₂ O ₆₇ P ₁₁ | 3673.4418 | 3672.5002 |
| ON7 5'-d(CGCGCGC ^{syn} ACGCG)-3' | C ₁₀₄ H ₁₃₂ N ₄₃ O ₆₆ P ₁₁ | 3658.4308 | 3656.5002 |
| ON8 5'-d(CGCGC ^{syn} ACGCGCG)-3' | C ₁₀₄ H ₁₃₂ N ₄₃ O ₆₆ P ₁₁ | 3658.4308 | 3657.5002 |
| ON9 5'-d(CGCGCGC ^{syn} ICGCG)-3' | C ₁₀₄ H ₁₃₂ N ₄₃ O ₆₆ P ₁₁ | 3659.4148 | 3658.5002 |
| ON10 5'-d(CGCGC ^{syn} ICGCGCG)-3' | C ₁₀₄ H ₁₃₂ N ₄₃ O ₆₆ P ₁₁ | 3659.4148 | 3658.5002 |
| ON11-^{syn}A 5'-d(AGAAAA ^{syn} AGAAAGAA)-3' | C ₁₄₂ H ₁₇₁ N ₇₀ O ₇₁ P ₁₃ | 4397.0084 | 4396.0000 |
| ON12-^{syn}I 5'-d(AGAAAAA ^{syn} IAAAGAA)-3' | C ₁₃₀ H ₁₅₆ N ₆₅ O ₆₇ P ₁₃ | 4381.9934 | 4383.0000 |



CD 測定: 日本分光 J-1100 を用いて、測定用のセルとして円筒型マイクロセル (JASCO, MODEL MAC-10) を用いた。測定領域は 200 nm–340 nm、取り込み間隔は 0.1 nm、積算回数は 10 回、感度は 200 mdeg、走査速度は 50 nm/min、温度は 10 °C にて行った。Z 型 DNA 測定用溶液は、オリゴ核酸を 0–4.2 M 塩化ナトリウム、または 0–5.0 M 過塩素酸ナトリウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、各鎖の濃度が 5.0 μ M、自己相補鎖の場合 10 μ M になるように調製した。パラレル型フーグステーション二重鎖測定用溶液は、100 mM 塩化カリウム、5 mM 塩化マグネシウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、各鎖の濃度が 2.5 μ M になるように調製した。なお、中点は CD 測定のデータを用いて既知の方法に従い算出した。²⁷

T_m 測定: 日本分光 V-730 を用いて、測定用のセルとして 8 連マイクロセルを使用して測定を行った。DNA 二本鎖を含む溶液を 10 °C から 80 °C まで 0.5 °C/min の速度で昇温し、260 nm 及び 295 nm の吸光度変化を測定した。溶液は、オリゴ核酸を 100 mM 塩化カリウム、5 mM 塩化マグネシウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0–8.0) に溶解し、各鎖の濃度が 2.5 μ M になるように調製した。 T_m 値は中線法により算出し、3 回の測定値の平均を最終値とした。なお、熱力学的パラメーターは、日本分光 V-730 に付属している解析ソフトを基に算出した。

発表論文

主論文

- Oligonucleotides Containing 8,1'-Ethano-2'-deoxyadenosine: Synthesis and Properties
Honoka Hanashiro, Yuta Ito, Yasufumi Fuchi, Yoshiyuki Hari
Eur. J. Org. Chem. **2024**, 27, e202400849.
- Synthesis of 8,1'-ethano-2'-deoxyinosine-containing oligonucleotides, and their antiparallel Watson–Crick and parallel Hoogsteen duplex-forming abilities
Honoka Hanashiro, Yuta Ito, Yasufumi Fuchi, Yoshiyuki Hari
Tetrahedron **2025**, 175, 134538.

参考文献

1. Doluca, O.; Withers, J. M.; Filicjev, V. V. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3044–3083.
2. Wang, G. L.; Vasquez, K. M. *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 4424–4438.
3. Chambers, V. S.; Marsico, G.; Boutell, J. M.; Antonio, M. D.; Smith, G. P.; Balasubramanian, S. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 877–881.
4. Sugiyama, H.; Kawai, K.; Matsunaga, A.; Fujimoto, K.; Saito, I.; Robimson, H.; Wang, A. H. J. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1272–1278.
5. Fabrega, C.; Macias, M. J.; Eritja, R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 251–260.
6. Gannet, P. M.; Heavner, S.; Daft, J. R.; Shaughnessy, K. H.; Epperson, J. D.; Greenbaum, N. L. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1385–1394.
7. Vongsutilers, V.; Phillips, D. J.; Train, B. C.; McKelvey, G. R.; Thomsen, N. M.; Shaughnessy, K. H.; Lewis, J. P.; Gannett, P. M. *Biophys. Chem.* **2011**, *154*, 41–48.
8. Ikehara, M.; Limn, W.; Fukui, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 2702–2707.
9. Dudycz, L.; Stolarski, R.; Pless, R.; Shugar, D.
10. Wang, A. H.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; van Boom, J. H.; van der Marel, G.; Rich, A. *Nature*, **1979**, *282*, 680–686.
11. Liu, K. Miles, H. T. Frazier, J. Sasisekharan, V. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11802–11809.
12. Kittaka, A.; Tanaka, H.; Yamada, N.; Miyasaka, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2801–2804.
13. Kittaka, A.; Asakura, T.; Kuze, T.; Tanaka, H.; Yamada, N.; Nakamura, K. T.; Miyasaka, T. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7081–7093.
14. Strohmeier, J.; Nadler, A. Heinrich, D.; Fitzner, A. Diederichse, U. *Heterocycles* **2010**, *82*, 713–728.
15. Gaied, N. B.; Glasser, N.; Ramalanjaona, N. Beltz, H.; Wolff, P.; Marquet, R.; Burger, A.; Mély, Y. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1031–1039.
16. Suzuki, M.; Sekido, T.; Matsuoka, S.; Takagi, K. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1449–1259.
17. Coll, M.; Saal, D.; Frederick, C. A.; Aymami, J.; Rich, A.; Wang, A. H. J. *Nucleic Acids Research* **1989**, *17*, 911–923.
18. Neidle, S. DNA Structure as Observed in Fibers and Crystals. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Academic Press, **2008**, 64–69.
19. Nagatsugi, F.; Uemura, K.; Nakashima, S.; Maeda, M.; Sasaki, S. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 3035–3044.
20. Schäfer, F.; Joshi, K. B.; Ficht, M. A. H.; Mack, T.; Wachtveitl, J.; Heckel, A. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
21. Maruenda, H.; Chenna, A.; Liem, L. K.; Singer, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4385–4389.
22. Kagawa, T. F.; Howell, M. L.; Tseng, K.; Ho, P. S. *Nucleic Acids Research* **1993**, *21*, 5978–5986.

23. Ellison, M. J. Feigon, J.; Kelleher, R. J. 3rd; Wang, A. H.; Habener, J. F.; Rich, A. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3648–3655.
24. Ho, P. S.; Quigley, G. J.; Rich, A. *EMBO* **1986**, *5*, 2737–2744.
25. McLean, M. J. Blaho, J. A.; Kilpatrick, M. W. Wells, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 5884–5888.
26. Balasubramaniam, T.; Ishizuka, T.; Xu, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 364–369.
27. Reich, Z.; Friedman, P.; Levin-Zaidman, S.; Minsky, A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8261–8266.
28. Chen, F. M. *Nucleic Acids Research* **1988**, *16*, 2269–2281.
29. Dang, L. X.; Pearlman, D. A.; Kollman, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4630–4634.
30. Krall, J. B.; Nichols, P. J.; Henen, M. A. Vicens, Q. Vogeli, B. *Molecules* **2023**, *28*, 843.
31. Bae, S.; Son, H.; Kim, Y. G.; Hohng, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 15829–15832.
32. Kandimalla, E. R.; Agrawal, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6416–6417.
33. Kandimalla, E. R.; Agrawal, S. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15332–15339.
34. Escude, C.; Mohammadi, S.; Sun, J. S.; Nguyen, C. H.; Bisagni, E.; Liquier, J.; Taillandier, E.; Garestier, T.; Helene, C. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 57–65.
35. Ikehara, M.; Hattori, M.; Fukui, T. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *31*, 329–334.
36. Hakoshima, T.; Fukui, T.; Ikehara, M.; Tomita, K.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 7309–7313.
37. Aviño, A.; Morales, J. C.; Frieden, M.; de la Torre, B. G.; Güimil-García, R.; Cubero, E.; Luque, F. J.; Orozco, M.; Azorín, F.; Eritja, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1761–1763.
38. Cubero, E.; Aviño, A.; de la Torre, B. G.; Frieden, M.; Eritja, R.; Luque, F. J.; Gonzalez, C.; Orozco, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3133–3142.
39. Ohmichi, T.; Kawamoto, Y.; Peng, W.; Miyoshi, D.; Karimata, H.; Sugimoto, N. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7125–7130.
40. Li, W.; Miyoshi, D.; Nakano, S.; Sugimoto, N. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11736–11744.
41. Okumoto, Y.; Tanabe, Y.; Sugimoto, N. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2158–2165.
42. Bhattacharyya, J.; Souvik, M.; Muhuri, S.; Nakano, S.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N. *Biochemistry* **2011**, *50*, 7414–7425.