

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50号

令和8年5月

徳島文理大学

は し が き

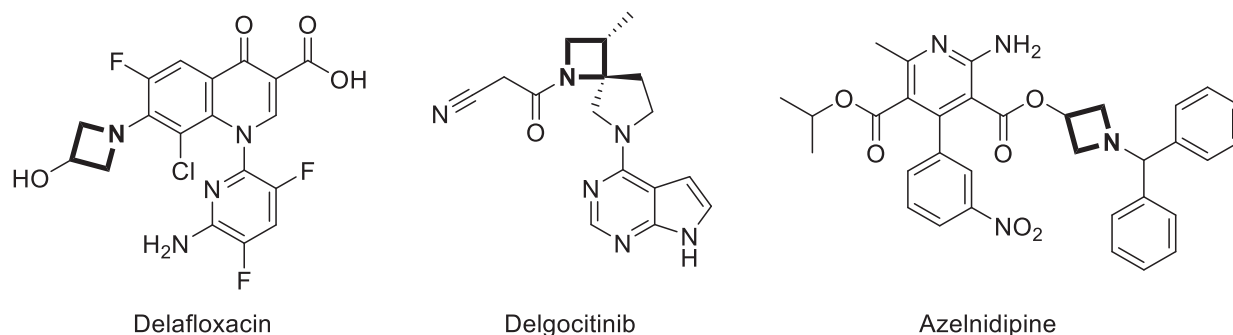
この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
甲第68号	苅 谷 冬 也	アルキニル置換含窒素四員環化合物を合成素子とする複素環構築法の開発	1
甲第69号	川 口 美 帆	蛍光応答変化による核酸高次構造の検出を目的とした蛍光性プリンヌクレオチドの合成と物性評価	8
甲第70号	水 野 功 一	2',4'-架橋型核酸の置換誘導体の合成とオリゴ核酸材料としての物性評価	14

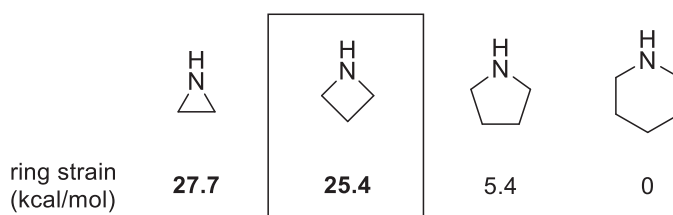
氏名	かりや とうや 苅谷 冬也
本籍	高知県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 68 号
学位授与年月日	令和 8 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学位授与の題目	アルキニル置換含窒素四員環化合物を合成素子とする 複素環構築法の開発
指導教員	教授 吉田 昌裕
論文審査委員	(主査) 教授 今川 洋 (副査) 教授 加来 裕人 (副査) 教授 原田 研一

近年、医薬品の合成研究は飛躍的に発展しており、複雑な化合物であっても医薬品開発が可能になるほど創薬技術は成熟しつつある。多様な生理活性をもつ複素環化合物は合成研究の良いターゲットとなり、中でも含窒素四員環構造をもつアゼチジンは、医薬品開発において重要なビルディングブロックの一つとして注目されている。すなわち、アゼチジン単位を医薬候補化合物に組み込むことにより、脂溶性の低下に基づく代謝安定性の改善や、分子に三次元構造を付与することによって薬理活性を高めることが可能となる。近年、合成手法の進展により供給が容易になったことで、アゼチジンの医薬ユニットとしての有用性はさらに高まりつつあり、アゼチジン骨格を有する医薬品として、デラフロキサシン、デルゴシチニブ、アゼルニジピンなど、さまざまな例が知られている¹⁾。



Scheme 1. アゼチジン骨格を有する医薬品

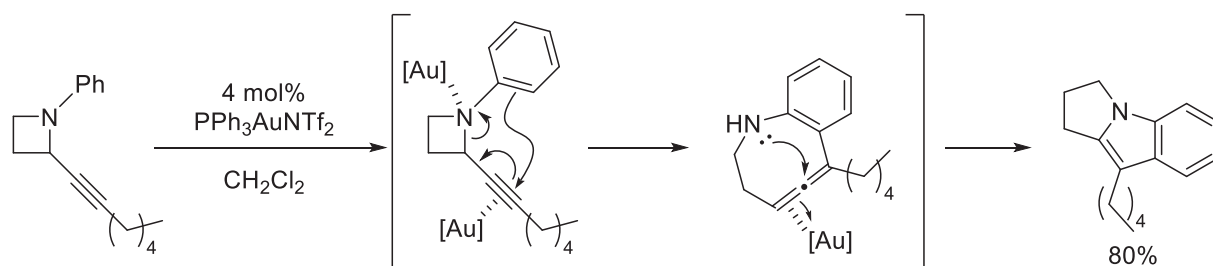
アゼチジンはピロリジンやピペリジンよりも大きな環ひずみエネルギーを有しており、その値は 25.4 kcal/mol と、含窒素三員環構造をもつアジリジンとほぼ同程度となっている²⁾。



Scheme 2. ヘテロ小員環のひずみエネルギー

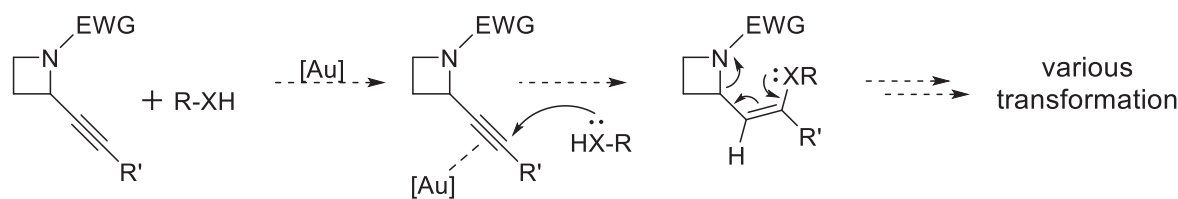
一方で、アジリジンとアゼチジンの環ひずみは同程度であるにもかかわらず、アゼチジンを基盤とする反応の報告例は相対的に少なく、汎用的な変換反応の創出が望まれる。例えば、アゼチジン環にアルキンを導入したアルキニルアゼチジンを用いた反応として、2013年に Pale 等により金触媒を用いた連続反応が報告されている³⁾。本反応はアルキンの π 結合に対し金錯体が配位することで、アゼチジン環の開環を伴う連続的な反応が進行し、置換インドールが一挙に生成する。このようにアゼチジン

は巧みに反応デザインすることで多様な反応性を示すことが期待されるが、アジリジンと比較して反応報告例は少なく、アルキニルアゼチジンを用いた反応例に関しては極めて限られている。



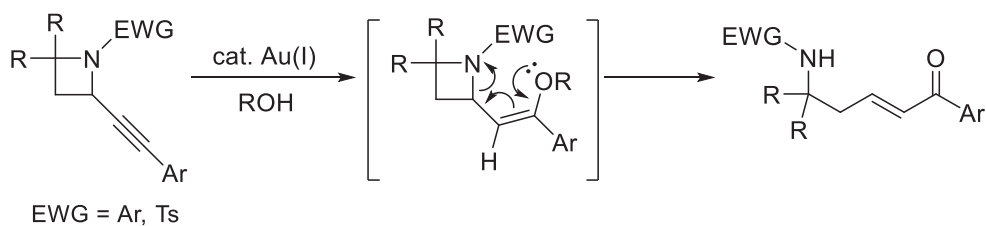
Scheme 3. 金触媒を用いたアルキニルアゼチジンの反応例

以上のような研究背景のもと、著者は、これまで医薬品開発において主にビルディングブロックとして用いられてきたアゼチジン自身のもつ潜在的な反応性に着目し、アルキニル基で置換された含窒素四員環化合物を反応基質に用いた新規反応開発を行った。アルキニルアゼチジンは、金触媒を作用させることで、環歪みの大きいアゼチジン環と π 電子をもつアルキン部の両活性化が進行すると考えられる。すなわち、アルキニルアゼチジンに対し金触媒存在下にて求核剤を作用させることで、アルキン部の活性化、続く求核剤の付加が進行後、アゼチジン環の開環反応が進行するものと考えた。そして更にアゼチジン環上に適切に官能基を導入することで反応を制御し、更なる分子変換が可能であると考え研究に着手した。



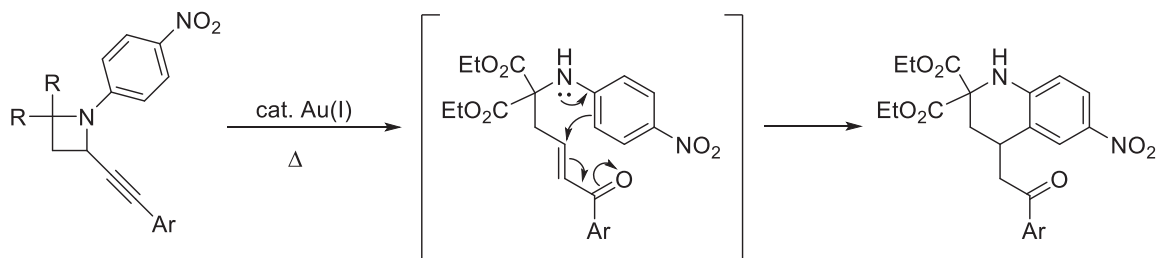
Scheme 4. アルキニルアゼチジンを用いた新規反応開発戦略

窒素原子上に電子求引基が導入された 2-アルキニルアゼチジンに対し、金触媒存在下、求核剤を作用させることで、アルキン部の活性化、続く求核剤の付加が進行後、アゼチジン環の開環反応が進行するものと考えた。検討の結果、窒素原子上に電子求引基を導入したアルキニルアゼチジンに対し、アルコール溶媒中、金触媒を作用させることによって、アルコールの求核攻撃による連続的な開環反応が進行し、 δ -アミノ- α,β -不飽和ケトンが生成することを見出した⁴⁾。生成物である δ -アミノ- α,β -不飽和ケトンはアルカロイド合成の重要な中間体として知られており、本反応は様々な誘導体を合成する有用な反応であるといえる。



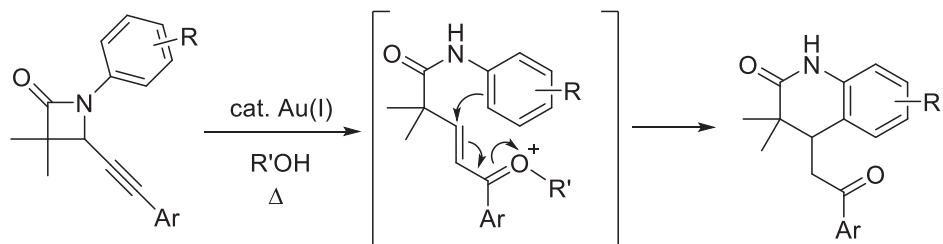
Scheme 5. 2-アルキニルアゼチジンの開環による
δ-アミノ-α,β-不飽和ケトンの生成

更なる展開として、2-アルキニルアゼチジンの連続的開環-環化反応の検討を行うことを計画した。すなわち、窒素原子上にアリール基を持つアルキニルアゼチジンに対し、加熱条件下にて反応を行うことで、開環反応が進行後、生じた α,β-不飽和カルボニルに対する芳香環からの分子内Friedel - Crafts型の共役付加が進行することでテトラヒドロキノリン体が見出された⁵⁾。テトラヒドロキノリン骨格を有する生物活性分子は数多く報告されており、本反応により多様な置換テトラヒドロキノリンが得られることから、未知の生理活性が期待されるテトラヒドロキノリン誘導体の新たな合成手法となると考えられる。



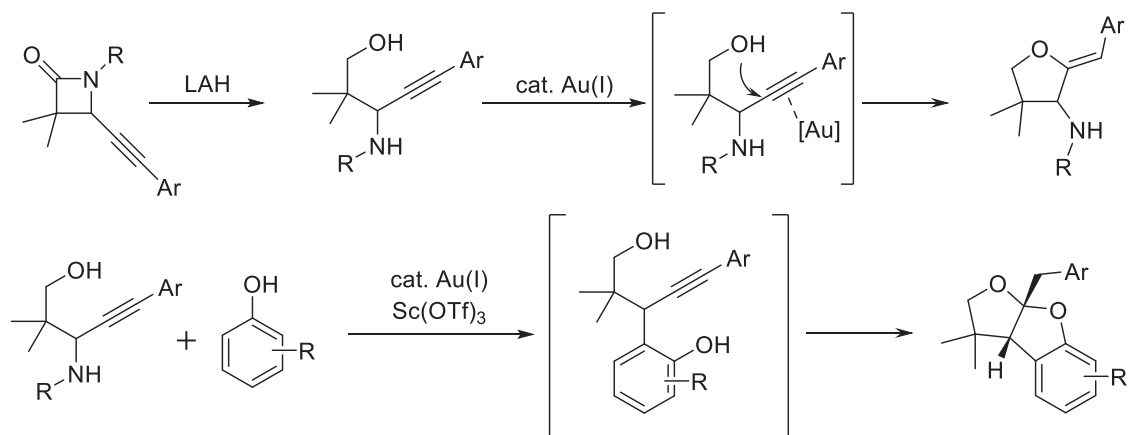
Scheme 6. 2-アルキニルアゼチジンの連続的開環-環化反応による
テトラヒドロキノリンの生成

また、アゼチジン環上にカルボニル基が導入されたアルキニルアゼチジンを反応基質として用いて検討を行った。検討の結果、アルコール溶媒中金触媒を作用させることで連続的開環-環化反応が進行し、ジヒドロキノリノン体が見出された。すなわち、アルキニルアゼチジンに対し、アルコール溶媒中、加熱条件下にて金触媒を作用させることで、アルコールの求核的な付加、続く開環反応が進行後、分子内環化が進行することで置換ジヒドロキノリノン体が見出されたと考えられる。ジヒドロキノリノン骨格を有する生物活性分子はこれまで様々報告されており、本反応は多様な置換ジヒドロキノリノン合成する新たな方法であるといえる。



Scheme 7. 4-アルキニルアゼチジノンの連続的開環-環化反応によるジヒドロキノリノンの生成

アルキニルアゼチジノンは、ヒドリド還元することにより 3-アミノ-4-ペンチノールへと変換が可能である。著者は、ヒドロキシ基、アミノ基およびアルキン部位が適切に導入された 3-アミノ-4-ペンチノールの反応性に着目し、金触媒を用いた反応開発を行った。すなわち金触媒により基質が活性化され、分子内環化や他の求核剤と様々な反応性を示すと考えた。検討の結果、金触媒存在下、アルキン部の活性化により分子内環化反応が進行し 3-アミノテトラヒドロフランが生じることを見出した。また、金触媒に加え、ルイス酸と求核剤として置換フェノールを添加することで、置換反応に続く連続的な分子内環化反応が進行し、ジヒドロフロベンゾフランが合成できることを見出した⁶⁾。本反応は 3-アミノテトラヒドロフランや環状アセタール骨格を持つような生理活性物質の合成における新たな合成手法として有用である。



Scheme 8. 4-アルキニルアゼチジノンから導かれる 3-アミノ-4-ペンチノールの分子内環化反応

以上のように著者は、アルキニルアゼチジンおよびアルキニルアゼチジノンを含むアルキニル置換含窒素四員環化合物の反応性に着目し、金触媒によるアルキン部の活性化と環ひずみによる開環反応を制御することで、環拡大を伴う新規複素環骨格構築法を確立した。本研究成果は、医薬品シーズを含む複素環化合物の合成への応用が期待され、創薬化学分野の発展に大きく貢献できるものと考えられる。

参考文献

- 1) (a) Oizumi, K.; Nishino, H.; Koike, H.; Sada, T.; Miyamoto, M.; Kimura, T.; *Jpn. J. Pharmacol.* **1989**, *51*, 57-64. (b) Tanimoto, A.; Shinozaki, Y.; Nozawa, K.; Kimoto, Y.; Amano, W.; Matsuo, A.; Yamaguchi, T.; Matsushita, M.; *BMC. Musculoskelet. Disord.* **2015**, *16*, 339. (c) Tomioka, H.; Sato, K.; Kajitani, H.; Akaki, T.; Shishido, S.; *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2000**, *44*, 283-286.
- 2) Mughal, H.; Szostak, M.; *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, *19*, 3274-3286.
- 3) Kern, N.; Hoffmann, M.; Blanc, A.; Weibel, J. -M.; Pale, P.; *Org. Lett.* **2013**, *15*(4), 836–839.
- 4) Hirokane, T.; Kariya, T.; Takata, M.; Matsumoto, K.; Yoshida, M.; *J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 12455–12459.
- 5) Kariya, T.; Hirokane, T.; Yoshida, M.; *Tetrahedron*, **2024**, *150*, 133777.
- 6) Kariya, T.; Yuraki, H.; Hayashi, M.; Hirokane, T.; Shiomi, S.; Yoshida, M.; *Eur. J. Org. Chem.* **2025**, *28*, e202500498.

論文審査結果の要旨

本論文は、歪みを有する含窒素四員環化合物であるアゼチジンとアルキンを組み合わせた化合物、アルキニルアゼチジンを基質とし、その特性を利用して多様な複素環化合物へ変換する手法の開発について論じている。

著者の荻谷氏は、金塩触媒がアルキンと高い親和性を有し、選択的に活性化する性質を利用して、アルキンの活性化と隣接するアゼチジン環の環開裂反応を連続的に進行させる手法の開発に成功した。すなわち、アルキニルアゼチジンに金塩触媒を作用させ、アルキン部位にアルコールを求核剤として位置選択的に付加させた後、生成したエノールエーテルの求核的性質を利用して、 β 位に配置したアゼチジン環中の窒素を脱離させることにより、 δ -アミノ- α, β -不飽和ケトンの合成に成功した。

また荻谷氏は、本反応をアゼチジンの窒素上に芳香環を有する基質に応用し、生成した δ -アミノ- α, β -不飽和ケトンの β 位に芳香環からの Michael 反応が進行するよう設計することで、ジヒドロキノリン骨格へ一挙に導く手法へと発展させた。さらに、アゼチジン環をアゼチジノンへ変更したアルキニルアゼチジノンを基質として用いることで、同様の反応経路により反応が進行し、ジヒドロキノリノンが合成可能であることを見出した。

アルキニルアゼチジノンは還元反応に付すことで、3-アミノ-4-ペンチノールへ容易に変換できる。そこで荻谷氏は、3-アミノ-4-ペンチノールを基質とする反応開発にも取り組み、その結果、金塩触媒を作用させることで分子内環化反応が進行し、3-アミノ-ジヒドロフランが合成できることを明らかにした。さらに、フェノール系化合物を求核剤として反応系に共存させることで、3-アミノ-4-ペンチノールのアミノ基の置換反応が優先して進行し、続いてアルキン部位のアセタール化が進行することにより、ジヒドロフロベンゾフランへ導く反応の開発にも成功した。

これらの研究成果は、創薬化学分野において有用な含窒素複素環化合物、ならびに生物活性が期待されるジヒドロフロベンゾフラン骨格の新規構築法を提示するものであり、既存手法に代わり得る新たな合成戦略を示した点で大変意義深い。よって、荻谷氏の本研究は博士（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）加来 裕人

副査（教授）原田 研一

氏名	かわぐち みほ 川口 美帆
本籍	徳島県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 69 号
学位授与年月日	令和 8 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	蛍光応答変化による核酸高次構造の検出を目的とした 蛍光性プリンヌクレオチドの合成と物性評価
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）講師 岡本 育子

DNA は生体内で、基本的な構造の B 型 DNA だけではなく、Z 型 DNA、三重鎖、グアニン四重鎖など様々な高次構造を局所的に形成する。核酸高次構造は疾患への関連性が示唆されていることもあり、その機能を解明するために多くの蛍光プローブが開発されてきた。中でも、核酸の塩基部への化学修飾により蛍光特性を付与した蛍光性核酸塩基類似体 (FBA: Fluorescent base analog) は、オリゴ核酸の配列中に位置特異的に挿入できるため、核酸の局所的な変化を解明するためのツールとして注目されている。しかし、蛍光発光に影響を及ぼす因子は複雑であるため、新規 FBA の開発には未だ経験的かつ反復的なプロセスが要求されている。それゆえ、用途に応じた機能の最適化を目指して多様な FBA の探索を行うことが重要である。このような背景下、著者は、周辺環境の変化に対する蛍光応答変化により核酸高次構造を検出できる新たな FBA の探索を行うこととした。特に、天然の核酸塩基の中でもプリン塩基は核酸高次構造形成への寄与が大きいことから、核酸高次構造の検出を目的とする FBA の基本骨格として最適であると考え、プリン骨格を基にした 2 つの分子設計を行った。

第一章の分子設計では、同形型 FBA に着目した。これらは、塩基部を天然の核酸塩基の骨格に近似した蛍光性複素環化合物で代替しているため、核酸高次構造の形成を妨げずに蛍光による高次構造形成の検出が期待できる。そこで著者は、蛍光性のチエノ [3,2-*d*]ピリミジン骨格を塩基部に持つ誘導体に着目し、チエノピリミジン骨格を有するアデノシンミミックである $d^S A$ および $d^{SO_2} A$ を設計した (Figure 1)。これらは蛍光性に加え、塩基選択性の保持、糖部と塩基部が炭素-炭素結合した C-ヌクレオシド構造による安定性の向上などが期待される。本章では、 $d^S A$ および $d^{SO_2} A$ を含む修飾オリゴ核酸の合成と相補鎖核酸との二重鎖安定性の評価および蛍光スペクトルの測定を行った。

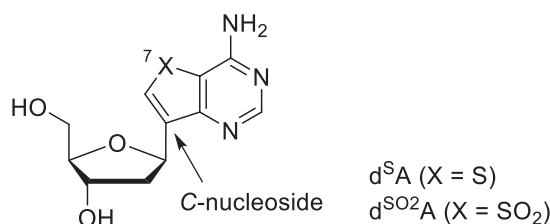


Figure 1. $d^S A$ および $d^{SO_2} A$ の分子設計

$d^S A$ と $d^{SO_2} A$ の合成は、7-ブロモチエノ [3,2-*d*]ピリミジン-4-アミンを出発原料として合成した塩基部と糖部グリカールを Heck 反応によりカップリングした後、得られた共通中間体を介して各々の官能基化により達成した。また、 $d^S A$ および $d^{SO_2} A$ のホスホロアミダイト体を合成し、DNA 自動合成機を用いたオリゴ核酸への導入を試みた。 $d^S A$ は

問題なくオリゴ核酸に組み込まれたものの、 $d^{SO_2}A$ では目的の修飾オリゴ核酸が得られなかった。そこで、以降は合成できた d^SA 修飾体を用いた物性評価を行った。

d^SA 修飾オリゴ核酸と相補鎖核酸との二重鎖の熱安定性および塩基識別能を融解温度測定により評価した。 d^SA 修飾オリゴ核酸は天然のオリゴ核酸と同等の二重鎖形成能を有しており、 d^SA の塩基部がアデニンと同様、チミンやウラシル塩基に対する十分な核酸塩基選択性を持つことも示された。

続いて、オリゴ核酸中の d^SA の蛍光特性を蛍光スペクトルの測定により調べた。 d^SA の導入箇所の異なる複数の修飾オリゴ核酸の一本鎖での測定結果より、 d^SA の隣接塩基にグアニン塩基を有する配列において顕著な蛍光消光が見られた。従って、 d^SA の蛍光発光は周辺の塩基配列に影響を受けることが示唆された。続いて、一本鎖で最も高い蛍光強度を示した d^SA 修飾オリゴ核酸を用いて相補鎖 DNA との二重鎖形成時の測定を行った結果、一本鎖での結果と比較して蛍光消光が見られた。このことから、オリゴ核酸中の d^SA は高次構造の変化などの周辺環境に対して蛍光消光によって応答する FBA であることが示唆された。

以上、第一章では、 d^SA がこれまでに報告された FBA で見られる特徴と同様に、近接塩基や二重鎖形成などの周辺環境に影響を受けて消光する性質を持つ FBA であることを見出した。

第二章では、高次構造のより高感度な検出を目指して、蛍光強度の増強によって応答する FBA の探索を行った。分子設計にあたり蛍光性分子ローターに着目した。これらのは多くは、自由回転が可能な部分が π 共役ユニットで架橋された分子構造を持つ。さらに、分子内回転を緩やかになるように制御することで蛍光強度が増強するという性質を有している。そこで著者は、蛍光性分子ローターの機能を応用すれば、核酸高次構造のように分子の込み合った環境においてその形成を蛍光強度の増強によって検出できると考えた。さらに、様々な置換基を導入したオリゴ核酸を効率的に合成する戦略として、オリゴ核酸合成後修飾法 (PSM; Post-synthetic modification) を利用した。本章では、多様な 7-アリールエテニル-7-デアザプリン誘導体を含む修飾オリゴ核酸を簡便に合成し、物性評価を行い、核酸高次構造を検出できる有用な FBA の探索を目指した (Figure 2)。

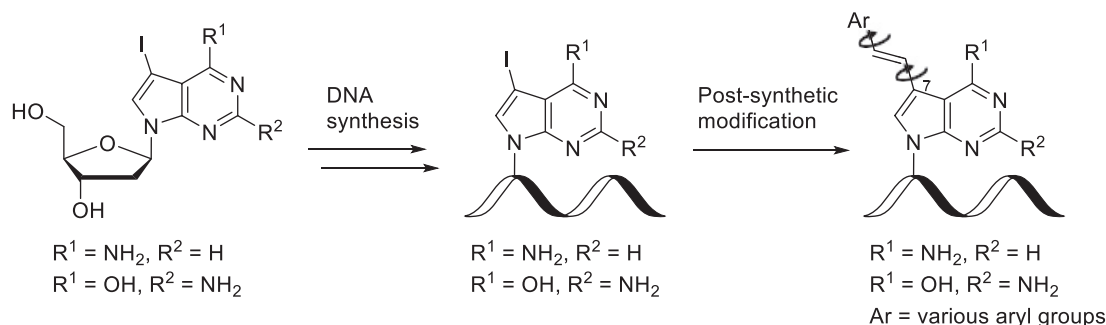


Figure 2. 7-アリールエテニル-7-デアザプリン誘導体の分子設計と合成アプローチ

合成では、7-ヨード-7-デアザ-2'-デオキシアデノシンおよび7-ヨード-7-デアザ-2'-デオキシグアノシンを導入した前駆体修飾オリゴ核酸を合成し、PSMによりボロン酸ピナコールエステルとのカップリングを行った。アデニン誘導体では単一の化合物を得られなかったものの、グアニン誘導体では目的の化合物を安定に得ることに成功した。

合成したグアニン誘導体修飾オリゴ核酸と相補鎖 DNA との二重鎖の熱安定性および塩基識別能を融解温度測定により評価した。グアニン誘導体修飾オリゴ核酸は天然よりわずかに安定性は低いものの、天然と同様の塩基識別能を有することが示された。

続いて、グアニン誘導体修飾オリゴ核酸の蛍光スペクトルを測定した。一本鎖ではシアノ基を導入した配列において長波長側かつ高い蛍光強度での発光が観察された。またこれらの配列は、二重鎖形成時において相補塩基がチミンあるいはグアニン塩基の場合に一本鎖での結果よりも高い蛍光強度での発光が観察された。

次に、二重鎖 DNA を配列特異的に認識して結合する三重鎖形成核酸に注目し、グアニン塩基と塩基対を形成する TA 塩基対を識別して蛍光検出できる誘導体を探索した。三重鎖形成の物性評価に用いるグアニン誘導体修飾オリゴ核酸は PSM によって単環芳香族および二環式芳香族を導入することで合成した。

得られた修飾オリゴ核酸と二重鎖 DNA との三重鎖の熱安定性を融解温度測定で評価した。オリゴ核酸中のグアニン誘導体は TA 塩基対に対して天然のグアニンと同等の安定性で三重鎖を形成できることが示された。さらに、二環式芳香族を導入した配列ではミスマッチ (CG, GC, AT) 塩基対に対して天然よりも高い三重鎖の安定性を示した。

続いて、三重鎖形成を確認した修飾オリゴ核酸の蛍光スペクトルを測定した。一本鎖ではシアノ基を導入した配列において無置換の芳香族を導入した配列よりも長波長側かつ高い蛍光強度での発光が観察された。また、TA 塩基対を持つ二重鎖 DNA との三重鎖形成時に一本鎖での結果と比較して特異的に高い蛍光増強を示す無置換の二環式芳香族を有する修飾オリゴ核酸を見出した。

以上、第二章では、設計した合成アプローチが 7-アリールエテニル-7-デアザグアニン誘導体を含む修飾オリゴ核酸の簡便な合成方法として有用であることを示した。さらに、TA 塩基対を特異的に認識して三重鎖形成時に蛍光増強により応答する誘導体を見出した。

本研究では化学的な手法により種々の FBA の合成を達成したが、今後これらの FBA のヌクレオシド三リン酸化体を合成して酵素的なオリゴ核酸合成に利用できれば、細胞内への応用にも期待が高まる。このように、今回得られた知見は今後の FBA の開発への一助になると考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は2つの章から構成されており、蛍光応答変化による核酸高次構造の検出を目的とした蛍光性核酸塩基類似体 (FBA: Fluorescent base analog) を設計し、その合成と物性評価について論じている。

第一章では、核酸高次構造の形成を妨げにくく、より安定性の高いFBAの開発を目的として、核酸の塩基部をチエノピリミジン骨格で代替したアデノシンミミックである $d^S A$ および $d^{SO_2} A$ を設計し、それらを含む修飾オリゴ核酸の物性評価を行っている。 $d^S A$ においては修飾オリゴ核酸の合成が達成されている。一方で、 $d^{SO_2} A$ 修飾オリゴ核酸は得られていない。著者はこの要因について、 $d^{SO_2} A$ の塩基性条件下における安定性の低さが原因であることを明らかにしている。以降、 $d^S A$ 修飾オリゴ核酸を用いて標的核酸との二重鎖の熱安定性の評価を行い、これが天然のオリゴ核酸と同等の二重鎖形成能を維持していることを示している。また、 $d^S A$ の修飾塩基部がアデニン塩基と同様、チミンおよびウラシル塩基に対する核酸塩基選択性を有していることも明らかにしている。さらに、 $d^S A$ のオリゴ核酸中における蛍光スペクトルを測定することで、 $d^S A$ が二重鎖形成および近接塩基などの周辺環境に影響を受けて消光する性質を持つことを見出している。

第二章では、核酸高次構造のより高感度な検出を目指して、蛍光強度の増強によって応答するFBAの探索を行った結果について述べている。著者は、蛍光性分子ローターが持つ、分子内回転の抑制により蛍光強度が増強する性質に着目し、様々な芳香族置換基を導入した7-アリアルエテニル-7-デアザプリン誘導体を設計した。さらに、これら誘導体を含む種々の修飾オリゴ核酸の効率的な合成手法として、鈴木-宮浦カップリング反応を応用したオリゴ核酸合成後修飾法を適用している。これにより、7-アリアルエテニル-7-デアザグアニン誘導体を含む修飾オリゴ核酸の簡便な合成を達成している。合成した修飾オリゴ核酸を用いた標的核酸との二重鎖の熱安定性の評価では、天然のオリゴ核酸よりわずかに安定性が低いものの、グアニン誘導体の塩基部分がシトシン塩基に対する十分な塩基識別能を有することを示している。また、蛍光スペクトルの測定を行い、合

成した全てのグアニン誘導体修飾オリゴ核酸が蛍光発光することを明らかにするとともに、シアノ基のような電子求引性基を導入した配列において、他の誘導体より長波長側で、かつ、より強く蛍光発光することを明らかにしている。さらに、これらシアノ基を導入した配列は、相補核酸との二重鎖形成時に一本鎖と比較して蛍光強度が増強することを見出している。また、三重鎖形成の蛍光検出も試みており、グアニン塩基が認識可能な TA 塩基対を特異的に蛍光検出できる誘導体の探索を行っている。三重鎖の熱安定性の評価により、二環式芳香族を導入したグアニン誘導体修飾オリゴ核酸では、二重鎖 DNA と第三鎖のグアニン誘導体との塩基対によらず安定化することを示している。さらに、無置換の二環式芳香族を導入した配列において、TA 塩基対を持つ二重鎖 DNA との三重鎖形成時に、一本鎖の蛍光強度と比較して、より強く蛍光発光することを見出している。

これらの研究により、新規 FBA として核酸の高次構造形成を蛍光消光により検出するアデノシンミミックに加えて、蛍光強度の増強によって三重鎖形成を配列特異的に蛍光検出できるグアニン誘導体を見出している。本論文で開発された FBA を含むオリゴ核酸は、生体内におけるゲノム DNA の機能構造を検出するためのプローブとしての応用も期待できる。以上、本論文で得られた知見は今後の FAB 開発の発展に寄与するものである。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

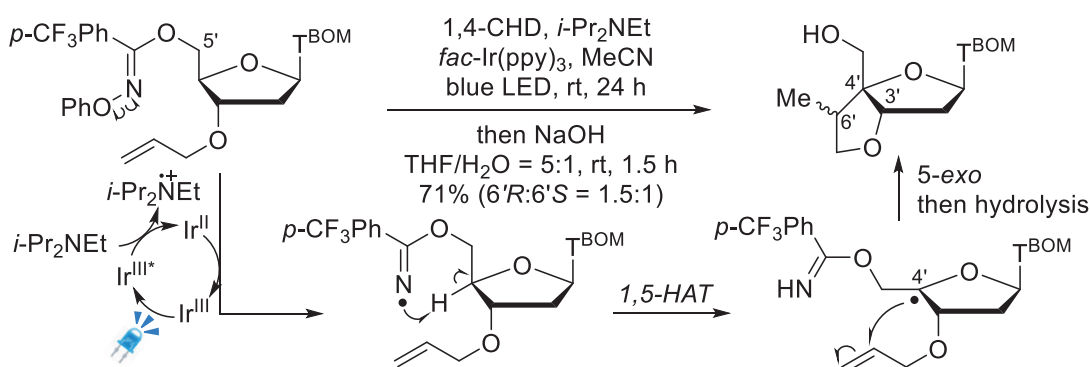
副査（教授） 山本 博文

副査（講師） 岡本 育子

氏名	みずの こういち 水野 功一
本籍	徳島県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 70 号
学位授与年月日	令和 8 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	2',4'-架橋型核酸の置換誘導体の合成と オリゴ核酸材料としての物性評価
指導教員	教授 張 功幸
論文審査委員	（主査）教授 堂上（久保） 美和 （副査）准教授 葛西 祐介 （副査）講師 北村 圭

核酸医薬品は、標的 DNA や mRNA 等に直接作用し、遺伝子発現を制御するため、従来の低分子医薬品より高い治療効果が期待できる新しい創薬モダリティとして注目されている。中でも、アンチセンス核酸は、臨床開発および実用化が進展しており、その材料として、様々な修飾核酸が利用されている。特に、核酸の糖部立体配座を N 型に固定した 2',4'-架橋型核酸は、オリゴ核酸に導入することで、RNA と安定な二重鎖核酸を形成し、さらに、架橋部の立体的なかさ高さにより、高いヌクレアーゼ抵抗性を示す。したがって、2',4'-BNA/LNA や ENA に代表される 2',4'-架橋型核酸は、mRNA を標的とするアンチセンス核酸の材料として期待されている。近年では、これらのメチルアナログである *S*-cEt や 6'*S*-Me-ENA を含むオリゴ核酸が、RNA との高い結合親和性を保持したまま、架橋部 6'位のメチル基の立体効果により極めて高いヌクレアーゼ抵抗性を示すことが報告されている。しかし、既知の架橋部 6'位にメチル基を有する 2',4'-架橋型核酸の合成法は、糖部 4'位に架橋構築のための置換基を導入するまでに多工程を要する。それゆえ、架橋構築の足掛かりとなる置換基の導入工程を短縮できれば、合成工程の効率化が見込める。このような背景下、Nagib らは、アルコールとイミドイルクロリドとの反応により容易に調製したオキシムイミデートを用いて、フォトドックス触媒存在下、青色 LED を照射すると、イミニルラジカルの分子内環化が進行することを報告している。そこで、本手法で発生するイミニルラジカルを糖部 4'位の水素原子引き抜きに利用できれば、予め糖部 4'位に置換基を導入することなく、簡便に糖部 4'-炭素ラジカルが発生し、短工程で 2',4'-架橋型核酸の合成が可能になると考えた。

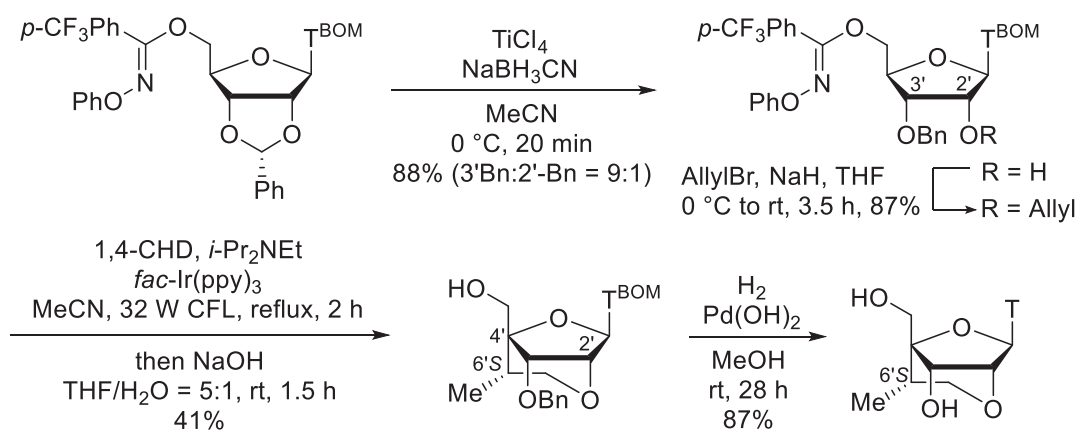
第一章では、初めに、糖部 4'-炭素ラジカルの発生を確認するため、入手容易なチミジンを用いて、糖部 5'位にパラトリフルオロメチルフェニル基を持つオキシムイミデート体へと誘導し、ラジカル環化反応を検討した。その結果、オキシムイミデートから発生するイミニルラジカルの 1,5-水素移動を介して、望みの糖部 4'-炭素ラジカルの発生に成功し、3',4'-架橋体が得られた (Scheme 1)。



Scheme 1. Radical cyclization of 3'-O-allyl-2'-deoxynucleoside.

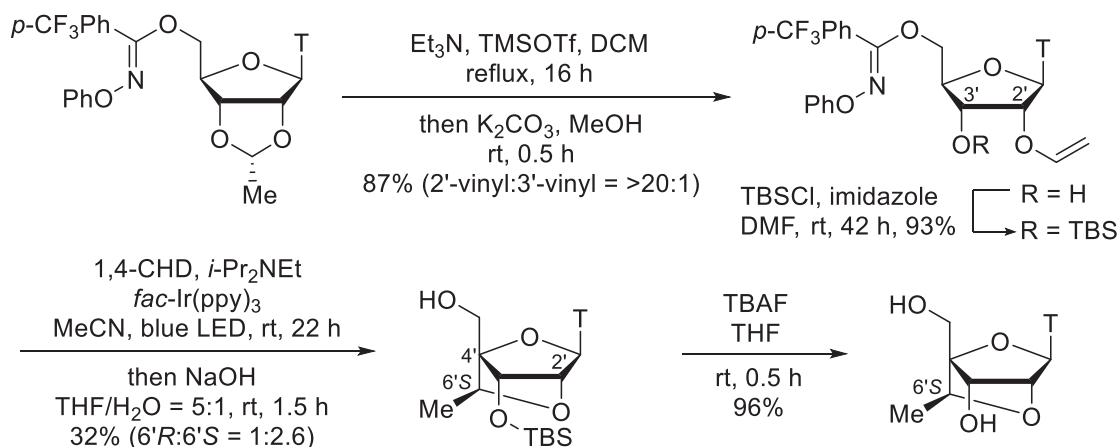
次に、糖部 4'-炭素ラジカルの発生を介して、2',4'-架橋体の構築が実現可能か確認するため、3'-デオキシ体から糖部 2'位にアリル基を持つラジカル前駆体を合成し、分子内環化反応を行った。その結果、環化様式が異なる化合物が副生したが、主生成物として、2',4'-架橋体を得ることに成功した。そこで、アンチセンス核酸の材料として有望な架橋部 6'位にメチル基を持つ 2',4'-架橋型核酸の合成へと展開した。

まず、6'S-Me-ENA の合成を検討した (Scheme 2)。市販の 5-メチルウリジンから 3 工程で誘導したイミデート体のベンジリデンアセタール部分を、四塩化チタンとシアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元的に開裂させ、3'-*O*-ベンジル体を主生成物として得た。続いて、糖部 2'位ヒドロキシ基をアリル化した後、分子内ラジカル環化反応を行い、目的の 6'S-Me-ENA の骨格を持つ化合物が立体選択的に得られた。さらに、保護基を除去することで、6'S-Me-ENA が 8 工程総収率 11%で得られ、以前当研究室で報告した合成法 (18 工程総収率 7%) と比較して、工程数の大幅な短縮と総収率の向上を実現した。



Scheme 2. Synthesis of 6'S-Me-ENA.

次に、*S*-cEt の合成を検討した (Scheme 3)。5-メチルウリジンから 2 工程で誘導したイミデート体のアセタール部分を、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリルとトリエチルアミンで処理し、2'-*O*-ビニル体をほぼ一方的に得た。続いて、糖部 3'位ヒドロキシ基を *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) 基で保護した後、分子内ラジカル環化反応を行い、目的の *S*-cEt の骨格を持つ化合物を単離することに成功した。さらに、TBS 基を除去することで、*S*-cEt が 8 工程総収率 15%で得られ、既知の合成法 (10 工程総収率 7%) と比較して、工程数の短縮と総収率の向上を実現した。

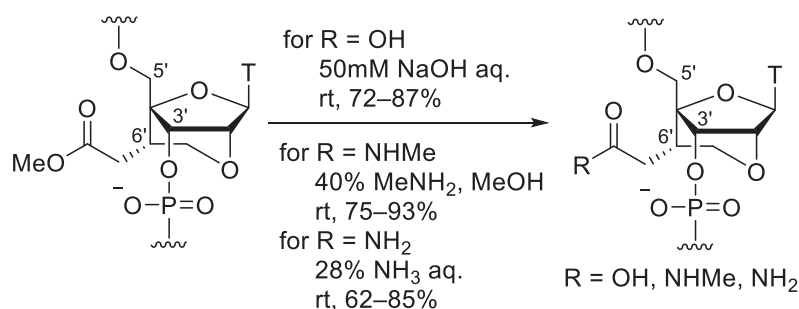


Scheme 3. Synthesis of *S*-cEt.

続いて、新たな機能分子として、架橋部 6'位が官能基化された 2',4'-架橋型核酸の開発も試みた。Scheme 2 で得られた 2'-*O*-アシル体とアクリル酸メチルとのメタセシス反応により、糖部 2'位にメチルエステル部分を持つラジカル前駆体を合成した。その後、分子内環化反応を行い、5% 酢酸-メタノール溶液で処理することで、メチルエステル部分は分解されず、6'*S*-Me-ENA と同じ立体配置を持つ 6'*S*-メトキシカルボニルメチル-ENA が立体選択的に得られた。

以上第一章では、糖部 4'位上に予め置換基を導入することなく簡便に糖部 4'-炭素ラジカルが発生することを見出した。本手法は、2',4'-架橋型核酸の合成を簡便化できるだけでなく、4'-修飾核酸や架橋部が官能基化された 2',4'-架橋型核酸の合成にも応用できる。

第二章では、既知のアンチセンス核酸材料として期待される 2',4'-架橋型核酸より優れた物性を有するアナログを簡便に見出すことを目指した。初めに、第一章で合成した架橋部 6'位が官能基化された 6'*S*-メトキシカルボニルメチル-ENA をオリゴ核酸に導入し、種々の塩基で処理することで、カルボン酸やその等価体を含むオリゴ核酸へと変換することに成功した (Scheme 4)。次に、2',4'-架橋型核酸の置換誘導体を含むオリゴ核酸の物性を評価するため、天然型オリゴ核酸や ENA、6'*S*-Me-ENA を含むオリゴ核酸との比較を行った。



Scheme 4. Post-synthetic modification of oligonucleotides.

まず、標的核酸に対する二重鎖の熱安定性を融解温度測定により評価した。その結果、標的一本鎖 RNA に対して、2',4'-架橋型核酸の置換誘導体を含むオリゴ核酸が、天然型オリゴ核酸より大幅に安定化し、中でも、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有するオリゴ核酸は、カルボン酸等価体や ENA、6'S-Me-ENA を含むものより高い安定性を示した。一方、標的一本鎖 DNA に対して、いずれの 2',4'-架橋型核酸を含むものも、標的一本鎖 RNA に対する場合と比較して安定化度合いが低く、それら修飾体により安定性に変化がなかった。したがって、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有するオリゴ核酸は、アンチセンス核酸材料として都合の良い RNA 選択性を有することが示唆された。

次に、ヌクレアーゼ抵抗性を評価した。その結果、6'S-Me-ENA および架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有する ENA の 3'側が、天然型核酸や ENA、カルボン酸等価体より、ヌクレアーゼ分解に対し高い安定性を示した。また、架橋部 6'位に置換基を有する 2',4'-架橋型核酸の 5'側が、ENA より、ヌクレアーゼ分解に対し極めて高い安定性を示した。したがって、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有する ENA は、6'S-Me-ENA と同様、3'側、5'側のいずれにおいても高いヌクレアーゼ抵抗性を示した。

以上第二章では、架橋部 6'位が官能基化された 2',4'-架橋型核酸をオリゴ核酸に導入した後、オリゴ核酸合成後修飾法を用いて、簡便に 2',4'-架橋型核酸の置換誘導体へと変換した。中でも、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有する ENA は、アンチセンス核酸材料として期待される ENA や 6'S-Me-ENA より高い RNA 選択性と結合力をもち、6'S-Me-ENA と同等の優れたヌクレアーゼ抵抗性を示した。

本研究で見出した糖部 4'-炭素ラジカルの簡易発生法と 2',4'-架橋型核酸の架橋部置換基変換は、新たなオリゴ核酸材料の開発促進に寄与するものと考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は 2 つの章から構成されており、糖部 4'-炭素ラジカルの簡易発生法を利用した架橋部 6'位に置換基を有する 2',4'-架橋型核酸モノマーの合成と、それを含むオリゴ核酸の置換誘導体の合成および物性評価について論じている。

mRNA を標的とするアンチセンス核酸は、すでに実用化されており、その材料として、RNA に対する高い結合親和性とヌクレアーゼ抵抗性を持つ 2',4'-架橋型核酸の利用が期待されている。中でも、*S*-cEt や 6'*S*-Me-ENA は、架橋部 6'位のメチル基の立体効果により優れたヌクレアーゼ抵抗性を示すことから、アンチセンス核酸材料として有望である。しかし、これらの合成は、糖部 4'位に架橋構築のための置換基を導入するまでに多くの工程を必要とする。したがって、架橋構築の足掛かりとなる置換基導入工程を短縮できれば、合成工程の効率化が期待できる。

第一章では、チミジンの糖部 5'位にパラトリフルオロメチルフェニル基を持つオキシムイミデートを導入し、イミニルラジカルの 1,5-水素移動を介して、糖部 4'位の水素原子を引き抜くことで、糖部 4'位に予め置換基を導入することなく、簡便に糖部 4'-炭素ラジカルが発生することを見出した。また、本手法を用いて、市販の 5-メチルウリジンから 6'*S*-Me-ENA および *S*-cEt の合成に成功し、既知の合成法と比較して、工程数の大幅な短縮と総収率の向上を実現した。さらに、新たな機能分子として、架橋部 6'位が官能基化された 2',4'-架橋型核酸の 6'*S*-メトキシカルボニルメチル-ENA を開発した。

第二章では、第一章で合成した架橋部 6'位が官能基化された 2',4'-架橋型核酸をオリゴ核酸に導入し、塩基条件下で処理することで、カルボン酸およびその等価体を含むオリゴ核酸へと変換した。さらに、これらの物性を評価するため、天然型オリゴ核酸に加え、アンチセンス核酸材料として有望な ENA や 6'*S*-Me-ENA を含むオリゴ核酸との比較を行った。二重鎖安定性の評価では、標的一本鎖 RNA に対して、本章で合成した 2',4'-架橋型核酸の置換誘導体を含むオリゴ核酸が、天然型オリゴ核酸より大幅に安定化し、中でも、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を持つオリゴ核酸が、カルボン酸等価体や ENA、6'*S*-Me-ENA を含むものより安定化することが明らかとなった。一方、標的一本鎖 DNA に対して、いずれの 2',4'-架橋型核酸を含むものにおいて

も、標的一本鎖 RNA に対する場合と比較して安定化度合いが低く、それら修飾体により安定性に変化がないことが明らかとなった。したがって、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を持つものが、アンチセンス核酸材料として都合の良い RNA 選択性を有することが示唆された。また、ヌクレアーゼ分解に対する安定性の評価では、6'S-Me-ENA と架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有する ENA の 3'側が、天然型核酸や ENA、カルボン酸等価体より、高いヌクレアーゼ抵抗性を示すことが明らかとなった。さらに、架橋部 6'位に置換基を持つ 2',4'-架橋型核酸の 5'側が、ENA より、極めて高いヌクレアーゼ抵抗性を示すことが明らかとなった。したがって、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有する ENA は、6'S-Me-ENA と同様、3'側、5'側のいずれにおいてもヌクレアーゼ分解に対する高い安定性を持つことが明らかとなった。

以上、著者は、糖部 4'位上に予め置換基を導入することなく、簡便に 4'-炭素ラジカルを発生させる手法を見出した。本手法は、2',4'-架橋型核酸の合成を効率化できるだけでなく、4'-修飾核酸や架橋部が官能基化された 2',4'-架橋型核酸の合成にも応用できる。さらに、架橋部 6'位が官能基化された 2',4'-架橋型核酸を、オリゴ核酸合成後修飾法を利用することで、簡便に置換誘導体へと変換できることを示した。中でも、架橋部 6'位にカルボキシメチル基を有する ENA は、アンチセンス核酸材料として期待される ENA や 6'S-Me-ENA と同等以上の RNA 結合力とヌクレアーゼ抵抗性を持つことが明らかとなった。

本研究で、著者が見出した新たな糖部 4'-炭素ラジカル発生法と 2',4'-架橋型核酸の架橋部置換基変換は、新規オリゴ核酸材料の開発促進に寄与するものと考えられる。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)	堂上 (久保)	美和
	副査 (准教授)	葛西	祐介
	副査 (講師)	北村	圭

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第50号)

令和8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

