

論文の内容の要旨

論文題目 ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いた新規ペプチド核酸類縁体の合成と汎用的ペプチド固相合成法への展開

氏名 齋藤敬太

研究背景

1991年にNielsenらによって合成されたペプチド核酸PNA (Figure 1)は、側鎖に核酸塩基を有し、主鎖がポリアミドである核酸類縁体である。PNAは、天然型核酸と高い二重鎖形成能を有しており、また、化学的、生物学的に安定であり、アンチセンス分子として用いた医療分野への応用や、マイクロアレイなどの分子デバイスへの応用が期待されている。

一方、PNAの欠点として、天然型核酸と比較して、ミスマッチ認識能が劣ることが知られている。また、PNAと天然型核酸の二重鎖の最安定構造はアンチパラレル配向であるが、準安定構造として、パラレル配向の二重鎖を形成することも可能であることが知られている。

このように、二重鎖形成の配向に自由度が生じる原因として、PNA-DNA二重鎖に生じている歪みに着目した。PNAのポリペプチド主鎖は、天然型核酸の糖-リン酸骨格と比較して直線的であるため、らせんのピッチが長くなり、結果、二重鎖に歪みが生じている (Figure 2)。

そこで、天然型核酸と歪みの少ない二重鎖を形成するペプチド核酸類縁体として、DBNA (Figure 1)をデザインした。前述したらせんのピッチの長さを調節するため、骨格元素数をPNAや天然型核酸と同じ6から一つ減らし、5とすることとした。また、側鎖の結合位置として、 α 位、 β 位、 γ 位の3通りが考えられる

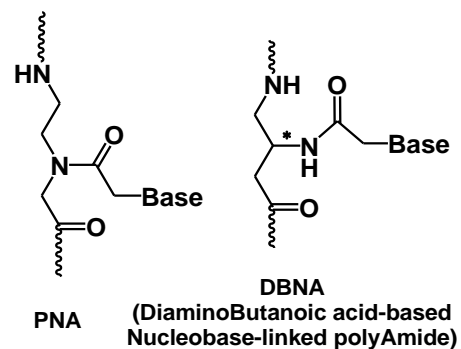


Figure 1. PNA 及び DBNA の構造

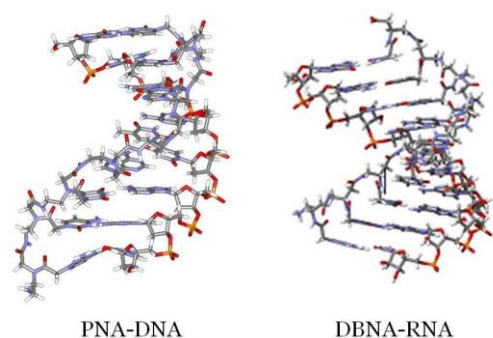


Figure 2. 水溶液中におけるPNA-DNA二重らせんの構造 (NMR) 及び、DBNA-RNAの構造 (分子力学計算)

が、 α 位置換体は縮合時にラセミ化が起こるため、不斉点の立体制御が困難であり、 γ 位置換体は化学的に不安定であることから、 β 位が側鎖の結合位置として適切であると言える。分子力学計算の結果、 β, γ -ジアミノ酸骨格を有する新規ペプチド核酸類縁体は、相補的な RNA と歪みの少ない二重鎖を形成可能なことが示唆された。(Figure 2)

本研究では、新規ペプチド核酸類縁体 DBNA を合成し、物性を評価することを目標とし、その合成法を詳細に検討した。また、ペプチド核酸類縁体の物性を評価するにあたって、10量体程度のオリゴマーの合成が必須となるため、合成目標を DBNA10 量体とした。

DBNA オリゴマーの合成を検討する過程で、従来のペプチド固相合成反応とは異なる効率的な反応条件を見出した。本論文では、その詳細についても述べる。

実験結果

(1)モノマーユニットの合成

DBNA オリゴマーを合成するために、N 末端の保護基の検討を行い、Fmoc 基を有するモノマーが、最も合成が簡便であり、脱保護も問題なく行われることから、有用であることが示唆された。また、側鎖にウラシル、シトシンを有する 2 種類の Fmoc 法に適用可能なモノマーユニットに加え、水への溶解度を増大させるためのカチオン性リンカーをデザインした。(Figure 3)

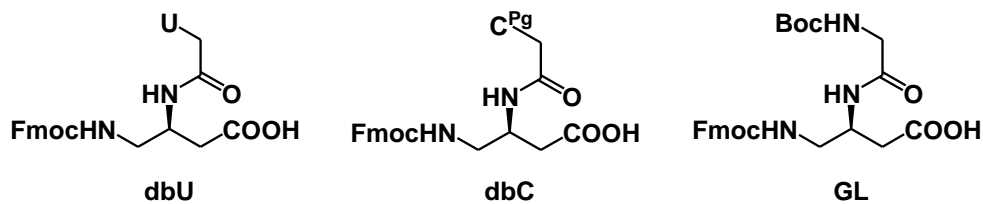


Figure 3. 側鎖にウラシル、シトシン、グリシンを有するモノマーユニットの構造

(2)固相合成による DBNA オリゴマーの合成

得られたモノマーユニットを用いて、縮合条件の最適化を試みた。汎用されている標準的

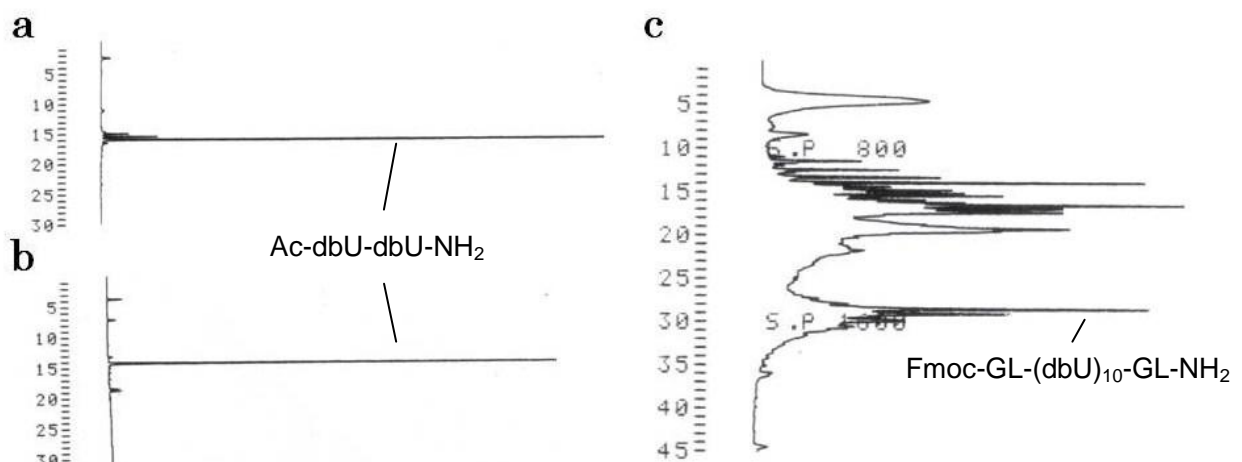
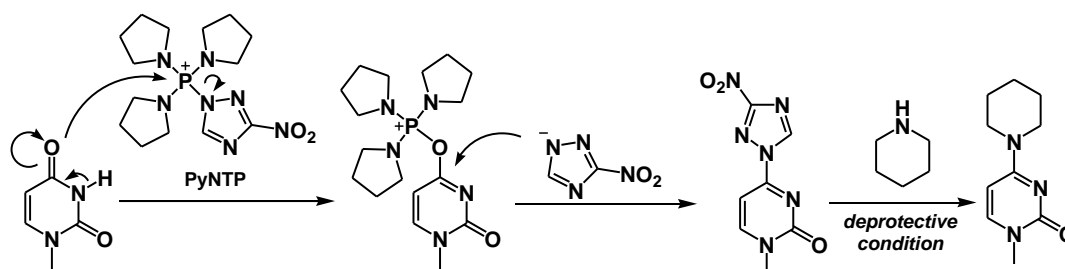


Figure 4. (a)膨潤性ポリスチレン担体、縮合剤 HATU を用いた dbU2 量体の HPLC プロファイル(b)非膨潤性ポリスチレン担体、PyNTP を用いた dbU2 量体の HPLC プロファイル (c)dbU10 量体を合成した際の HPLC プロファイル

なペプチド固相合成反応の条件をウラシル誘導体の2量体の合成に適用したところ、予想に反して多くの副生成物が観測されたが、縮合反応条件について、縮合剤や固相担体を種々検討した結果、ペプチド固相合成反応では従来用いられたことのない縮合剤 PyNTP と固相担体を用いることで、高収率で2量体を得ることに成功した (Figure 4a, Figure 4b)。

この条件を用いて、ウラシル塩基を有する DBNA10 量体の合成を試みた (Figure 4c)。この際、目的物の他に、Scheme 1 に示す副反応由来の生成物が観測され、目的とする DBNA オリゴマーの単離は困難であった。

Scheme 1. 観測された副反応の反応機構



(3) シトシン塩基を有する DBNA10 量体の合成

Scheme 1 に示した副反応を抑えるためには、塩基部位に保護基を導入するのが最良であるが、Fmoc 法に適用可能な、酸性条件下除去可能なウラシル塩基の保護基は報告例がないため、保護基の開発から行う必要がある。一方でシトシン塩基は、酸性条件下除去可能な保護基が多数知られているため、その中で PNA オリゴマーの合成に適用例のある、F-Bhoc 基をアミノ基の保護基として用いてシトシン誘導体 10 量体の合成を試みた。

ウラシル塩基を有する DBNA の場合と異なり、N 末端に Fmoc 基を有する DBNA10 量体を得ることに成功した。現在、天然型核酸との二重鎖融解温度を始めとした物性の測定中である。

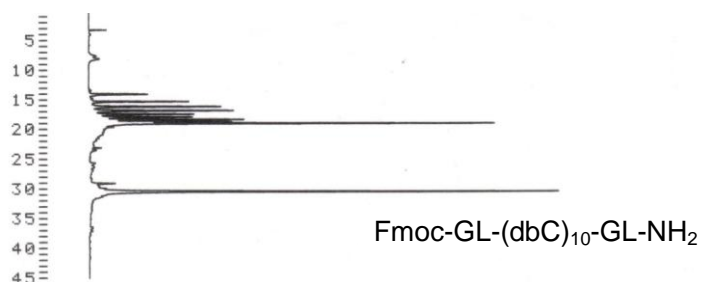


Figure 5. dbC10 量体を合成した際の HPLC プロファイル

(4) 新規ペプチド固相合成法への展開

DBNA の合成の際に開発した PyNTP を用いたペプチド合成法は、核酸類縁体の合成に用いられる条件を基盤としており、現在主流のペプチド合成法と、使用する縮合剤、溶媒、固相担体すべて異なる。

一方、核酸合成における縮合反応では、求核種が水よりも求核性の低い水酸基であることから、厳密な禁水条件が要求される。そこで、真空乾燥が容易な非膨潤性の担体を用い、厳

密な脱水操作を行い、かつ、大過剰のモノマーを用いることで、水分の影響を最小限に抑える戦略がとられている。一見、核酸合成の方が大量のモノマーを用いており、非効率的だが、非膨潤性担体は、溶媒の制限が無く、幅広い溶媒が適用可能であり、さらに、水分の影響を受けやすい反応への応用も可能であるという利点がある。

PyNTP はカルボン酸エステルの合成にも極めて有効な縮合剤であり、PyNTP を用いた縮合反応は、活性エステルや酸無水物よりも反応性の高い、カルボン酸アゾリド中間体を経由すると考えられる。そのため、反応系は厳密な禁水条件が要求されるが、一方で高活性な中間体を経由するため、高い縮合効率を見込むことができる。本研究では DBNA の合成で開発した縮合条件を、従来法では合成が困難な、低反応性アミノ酸を含むオリゴペプチドの合成へ適用することを検討した。

アミノイソブチル酸 (Aib) は、立体障害が大きく反応性の低いアミノ酸として知られており、Aib 残基を多く有するオリゴペプチドは合成が極めて困難である。そこで、本手法の有用性を示すため、5 量体 H-(Aib)₄-Tyr-NH₂ を合成し、その縮合効率を比較した。(Figure 6)

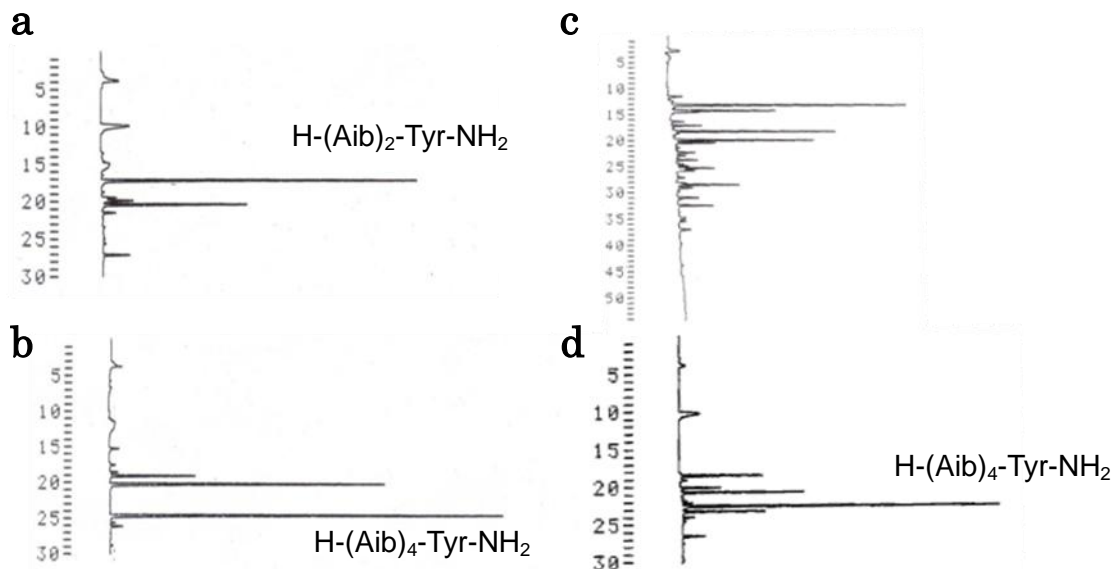


Figure 6. H-(Aib)₄-Tyr-NH₂ の HPLC プロファイル (a)膨潤性担体及び COMU を用いた場合 (b)膨潤性担体及び PyNTP を用いた場合 (c)非膨潤性担体及び COMU を用いた場合 (d)非膨潤性担体及び PyNTP を用いた場合

既知のペプチド縮合剤の中で最も高い縮合効率を与えることで知られている COMU を用いた場合でも、目的とする 5 量体 H-(Aib)₄-Tyr-NH₂ を得るのには不十分であったのに対し、PyNTP を用いた場合には縮合効率が大きく改善し、目的とする 5 量体 H-(Aib)₄-Tyr-NH₂ を得ることができた。この縮合効率は、非膨潤性の固相担体を用いる、本研究で開発した条件を適用することでさらに改善したが、COMU に対してこの条件を適用しても、目的物を得ることはできなかった。

今回合成を行なった Aib₄ 量体は合成報告例が存在するが、過去の合成例は液相法を用いており、今回初めて Fmoc 法を用いて合成に成功した。今後、従来法では合成が困難な、生物学的に重要なオリゴペプチドの合成を検討する。