

DNA低コスト合成法の開発

つくば研究所 バイオサイエンス研究部 堀江洋慈・北村昭憲・廣瀬邦彦

DNAオリゴマーは現在PCRプライマーなどに広く使用されているが、医薬・治療の分野でもそれを用いた応用研究が盛んに行われている。しかし、DNAオリゴマーを素材としてみた場合、あまりにも高価であり、このことが今後実用化する際に大きな阻害要因になると考えられている。そのためDNAオリゴマーの合成コストを削減する方法について、米国のベンチャー企業を中心に研究されているが、これを大幅に改善するような成果は得られていないのが現状である。

そこで筆者らはDNAオリゴマーを低コストで合成するための方法を開発する目的で、現在のDNA合成法の主なコスト要因であるDNA合成試薬、それを用いたカップリング反応、さらにその後の硫化工程についてそれぞれ再検討を行った。その結果、現行法のコストに比べ、それを大幅に削減できる新しいタイプの*In situ* DNA合成法を見出した。

1 緒言

DNAの化学合成法はノーベル賞を受賞したKhoranaが1950年代後半にリン酸ジエステル法を見出して以来、より効率の良い方法を求めて種々の改良が成されてきた¹⁾。例えば1981年にCaruthersによってアミダイト法²⁾が、また1986年Matteucciら³⁾およびStawinskiら⁴⁾によりH-ホスホネート法が、筆者らの研究グループにおいても1986年にチオホスファイト法⁵⁾がそれぞれ開発された。反応方法はいずれも固相上にDNA合成試薬を順次反応・結合させ、ヌクレオチド鎖として伸長させていく、いわゆる固相合成反応が用いられている。これらはDNAオリゴマーを迅速にかつ効率よく与えるものであり、その当時のDNAオリゴマーに対するニーズを満足させるものであった。しかし、これらの方法では、固相反応をスムーズに進行させるために、基質であるヌクレオチド鎖に対して化学量論的に、高価なDNA合成試薬を大過剰に用いることが必要であり、そのために合成コストが大きくなるという難点があった。

これを解決するための方法として、Beaucageら⁶⁾およびMoonら⁷⁾はDNA合成試薬の原料であるデオキシリボヌクレオチドとリン酸化剤とを反応させた溶液をそのままDNAオリゴマー合成に用いる、いわゆる*In situ*アミダイト法を開発した。この方法はDNA合成試薬の合成コストを削減する方法として注目されたが、デオキシリボヌクレオチドとリン酸化剤の反応が十分な選択性を持って進行しないことから、この工程の更なる改良が求められていた。

一方筆者らは、反応基質である固相担体に着目し、DNAオリゴマー合成に用いている固相反応系を、Merrifield樹脂を用いてより液相系に近づけることにより、DNA合成試薬の過剰量を小

さくできることを見出した⁸⁾。またBonoraらも同様に、DNAオリゴマー合成に液相系反応を用いることにより、DNA合成試薬の使用量を減ずることができることを報告している⁹⁾。

そこで、我々はデオキシリボヌクレオチドとリン酸化剤との反応について再検討を行い、新しいタイプの*In situ* DNA合成試薬を見出したので、その合成と利用法について報告する。また、コスト的に極めて有利である、同試薬を用いたDNAオリゴマーの液相合成法についても検討したので、その結果を述べる。

2 実験

2.1 試薬

すべての反応はアルゴン雰囲気下、脱水溶媒を用いて行った。N-トリメチルシリルイミダゾールは東京化成社製試薬を蒸留して使用した。その他の試薬は精製をせず、購入品をそのまま利用した。5'-O, N-保護デオキシリボヌクレオチドは有機合成薬品(株)より購入した。DNA自動合成機上でのDNAオリゴマーの合成に必要な試薬類一式は、パーキンエルマー社(旧パーセプティブバイオシステムズ社)製試薬を使用した。ポリエチレングリコールモノメチルエーテル(mPEG)はアルドリッチ社から購入した。その他の試薬はアルドリッチ社、東京化成、和光純薬、キシダ化学、純正化学から購入した。

安息香酸メチル-モノメトキシポリエチレングリコールは大内らの報告¹⁰⁾およびReinhoudtらの報告¹¹⁾を参考にして合成した。また安息香酸クロリド-モノメトキシポリエチレングリコール2は安息香酸-モノメトキシポリエチレングリコールと塩化チオニルとの反応により調製した。

新しい -置換- -シアノエトキシジクロロホスフィン5は畑らの方法¹²⁾を参考にして、対応する -置換- -シア

ノエトキシトリメチルシランと3当量の三塩化リンとを反応させた後、過剰量の三塩化リンを減圧留去し、残渣を減圧蒸留することによりそれぞれ70~90%の収率で得た。

上記 -置換- -シアノエトキシトリメチルシラン誘導体はHorningの方法で得られた -置換- -シアノエトキシリチウム¹³⁾に1.2当量のトリメチルクロロシランを反応させ、生成したリチウムクロリドをアルゴン雰囲気下で過後、ろ液を分別蒸留することにより高収率(80~95%)で得た。

N-トリメチルシリル-2'-メチルイミダゾールおよびN-トリメチルシリル-4'-メチルイミダゾールは文献¹⁴⁾に従って合成した。

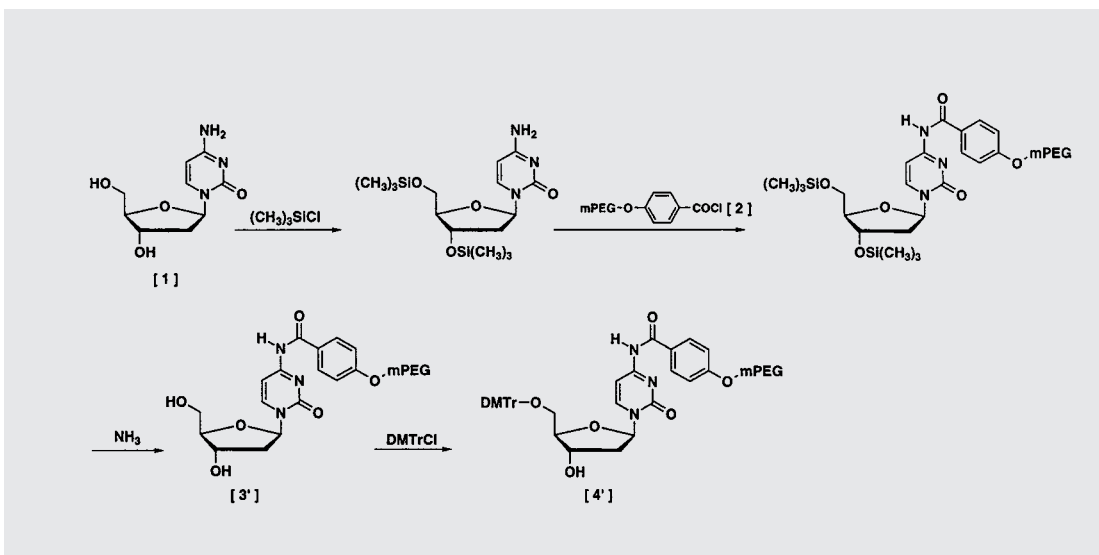
2.2 実験装置

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、日本電子社製JNM-EX400核磁気共鳴測定装置を用いて測定した。³¹P-NMRは日本電子社製1%トリメチルホスファイトの重アセトン溶液を外部標準(=140ppm)として測定した。HPLC分析は、Waters社製LC Module I plusに和光純薬社製Wakopak WS-DNAカラム(4.6mm × 150mm)を装着して分析した。キャピラリー電気泳動装置は大塚電子(株)製CAPI-3100にJ&W Scientific社製μPAGE-5を装着して分析した。DNA自動合成機は、パーキンエルマー社製Expedite™ 8909を使用した。

2.3 方法

2.3.1 mPEGを保護基にもつ

2'-デオキシリボヌクレオシドの合成



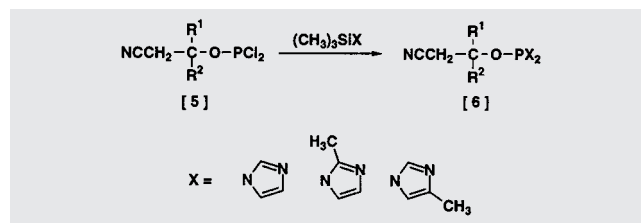
ピリジン共沸(2×20ml)した2'-デオキシシチジンモノ塩酸塩(1, 13.18g, 52mmol)を、アルゴン雰囲気下、無水ピリジン(120ml)に懸濁させ0℃に冷却した。ここにトリメチルクロロシラン(19.0ml, 150mmol)を添加し15分間攪拌した。安息香酸-モノメトキシポリエチレングリコール(Mn=350, 17.60g, 34.9mmol)から調製した安息香酸クロリド-モノメ

トキシポリエチレングリコール2をアルゴン雰囲気下、無水ピリジン(80ml)に溶解し、これを先の反応溶液に添加し、室温にて2時間攪拌した。0℃に冷却し、蒸留水(10ml)を添加して反応を停止し、約1/2に濃縮した後、0℃にて30%アンモニア水(20ml)を加え20分間攪拌した。溶媒を留去し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(200ml)を加え、クロロホルム(3×100ml)で抽出した。有機相は水洗(2×200ml)し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。この溶液の溶媒を留去し、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=100/5)で精製するとデオキシシチジンのmPEG保護体3'が得られた(18.85g, 収率82%)。

同様に2'-デオキシアデノシンのN-mPEG保護体を得た(収率40%)。チミジン誘導体はトリメチルシリル化の際、5当量のジイソプロピルエチルアミンを加え反応させ、脱シリル化はフッ化水素ピリジン錯体を用いて行った(収率92%)¹⁵⁾。

得られたN-mPEG保護体は文献に従ってジメトキシトリチル化を行った(4', 60~90%)¹⁶⁾。

2.3.2 -置換- -シアノエトキシビスアゾリルホスフィン(リン酸化剤)の合成



-置換- -シアノエトキシジクロロ

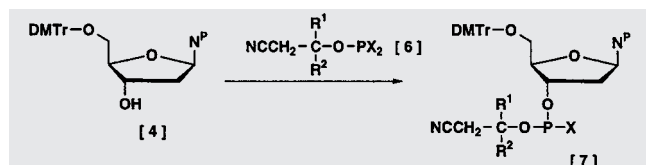
ホスフィン5の0.2Mトルエン溶液に2.2当量のN-トリメチルシリルアゾール化合物をアルゴン雰囲気下、室温で加え、5~10分間攪拌した。副生したクロロトリメチルシラン、トルエンおよび過剰のN-トリメチルシリルアゾール化合物を、まず室温で15

分間減圧留去した後、さらに35~55℃で減圧留去して、目的の -置換- -シアノエトキシビスアゾリルホスフィン6を無色、透明の油状物として定量的に得た。¹H-NMRの測定結果をTable 1に纏めた。このようにして得られたリン酸化剤6は、精製することなく *In situ* でヌクレオシドのリン酸化反応に用いた。

Table 1 -Diorgano- -cyanoethoxy-bis(azolyl)-phosphines
[6] (NCCH₂CR¹R²OPX₂)

R ¹	R ²	X	¹ H NMR (TMS, CDCl ₃)
H	<i>n</i> -C ₂ H ₅	2-Melm	0.75-1.85(m,7H), 2.5(s,6H), 2.7(d,2H,J=5.0Hz), 4.25-4.8(m,1H), 7.05(s,4H)
H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	2-Melm	0.95(d,6H,J=7.0Hz), 1.8-2.35(m,1H), 2.55(s,6H), 2.7(d,2H,J=5.5Hz), 4.1-4.55(m,1H), 7.1(s, 4H)
H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	0.9(d,6H,J=7.0Hz), 1.8-2.25(m,7H), 2.25(s,6H), 2.7(d,2H,J=5.0Hz), 4.1-4.55(m,1H), 6.85-6.95(m,2H), 7.8-7.85(m,2H)
H	<i>i</i> -C ₄ H ₉	4-Melm	0.8-0.9(m,6H), 1.3-1.9(m,3H), 2.15(s,6H), 2.7(d,2H,J=5.0Hz), 4.25-4.75(m,1H), 6.8(s,2H), 7.65-7.7(m,2H)
H	<i>s</i> -C ₄ H ₉	4-Melm	0.85-1.9(m,9H), 2.2(s,6H), 2.7(d,2H,J=6.0Hz), 4.15-4.65(m,1H), 6.8(s,2H), 7.65-7.7(m,2H)
H	<i>t</i> -C ₄ H ₉	2-Melm	0.8(s,9H), 2.5-2.7(m,8H), 2.5(s,6H), 4.05-4.4(m,1H), 7.0(s,4H)
H	<i>t</i> -C ₄ H ₉	4-Melm	0.9(s,9H), 2.25(s,6H), 2.85-2.75(m,2H), 4.05-4.45(m,1H), 6.9-6.95(m,2H), 7.8-7.85(m,2H)
H	<i>n</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	0.75-1.8(m,11H), 2.2(s,6H), 2.75(d,2H,J=5.5Hz), 4.25-4.7(m,1H), 6.9(s,2H), 7.75-7.8(m,2H)
H	CH(CH ₃) ₂	2-Melm	0.7-1.55(m,11H), 2.5(s,6H), 2.7(d,2H,J=6.0Hz), 4.3-4.75(m,1H), 7.05(s,4H)
H	CH(CH ₃) ₂	4-Melm	0.75-1.55(m,11H), 2.2(s,6H), 2.7(d,2H,J=6.0Hz), 4.35-4.75(m,1H), 6.85-6.9(m,2H), 7.8-7.85(m,2H)
H	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	4-Melm	1.05-1.75(m,11H), 2.2(s,6H), 2.75(d,2H,J=5.5Hz), 4.05-4.5(m,1H), 6.85-6.9(m,2H), 7.8-7.85(m,2H)
H	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	4-Melm	0.75-1.95(m,19H), 2.2(s,6H), 2.7(d,2H,J=5.0Hz), 4.25-4.6(m,1H), 6.85(s,2H), 7.7(s,2H)
H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ OH=CH ₂	4-Melm	0.7-0.95(m,8H), 1.15-1.5(m,4H), 2.05(d,2H,J=6.5Hz), 2.25(s,6H), 2.75(d,2H,J=5.5Hz), 4.25-4.6(m,1H), 4.8-5.15(m,2H), 5.4-6.0(m,1H), 6.8-6.85(m,2H), 7.75-7.8(m,2H)
H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ OH=CH ₂	Im	0.8-1.0(m,6H), 1.20(t,4H,J=6.0Hz), 1.95(d,2H,J=6.0Hz), 2.70(d,2H,J=6.0Hz), 4.20-6.0(m,4H), 7.10(brs,4H), 7.80(s,2H)
H	CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	4-Melm	1.75-2.65 (m,12H), 2.15(s,6H), 4.2-4.55 (m,1H), 6.8-7.2 (m,7H), 7.65(s,2H)
H	O(CH ₂) ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	4-Melm	0.85(s,6H), 2.25(s,6H), 2.5(s,2H), 2.65-2.75(m,2H), 4.1-4.45(m,1H), 6.85-7.3(m,7H), 7.75(br,2H)
H	CH ₂ CH ₂ SOCH ₃	4-Melm	1.9-2.55 (m,13H), 2.0(s,3H), 2.2(s,6H), 2.8 (d,2H,J=5.0Hz), 4.6-4.95 (m,1H), 6.9 (s,2H), 7.8 (s,2H)
H	C ₆ H ₅	4-Melm	2.15 (s,6H), 2.9-3.0 (m,2H), 5.2-5.55 (m,1H), 6.8 (s,2H), 7.25 (s,5H), 7.6(s,2H)
CH ₃	<i>n</i> -C ₂ H ₅	4-Melm	0.8-1.9(m,10H), 1.6(s,3H), 2.2(s,6H), 2.75(s,2H), 6.8(s,2H), 7.7(s,2H)
CH ₃	<i>i</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	1.95(dd,6H,J=1.5,8.5Hz), 1.6(s,3H), 2.0-2.45(m,7H), 2.2(s,6H), 2.8(s,2H), 6.85-6.9(m,2H), 7.8-7.85(m,2H)
CH ₃	<i>i</i> -C ₄ H ₉	4-Melm	0.8-1.0(m,8H), 1.55-1.85(m,6H), 1.65(s,3H), 2.25(s,6H), 2.85(s,2H), 6.9-6.95(m,2H), 7.8-7.85(m,2H)

2.3.3 リン酸化剤と保護デオキシリボヌクレオシドとの反応 (*In situ* DNA合成試薬の合成)



2.3.2に従って合成して得たリン酸化剤6を、系内をアルゴン置換した後、適量の重クロロホルムを加えて溶解し、反応溶液の濃度が仕込みのジクロロホスフィン5に対して0.5Mとなるよう調製した。別に5'-O-ジメトキシトリチル-N-保護デオキシリボヌクレオシド4を仕込みのジクロロホスフィンに対して1当量を秤取し、室温で2時間減圧乾燥した。これに先の重クロロホルム溶液をアルゴン雰囲気下で加え、均一になるまで攪拌した後、一晩静置し反応を完結させ、目的とする*In situ* DNA合成試薬7を得た。種々の*In situ* DNA合成試薬の物性値はTable 2、Table 3に纏めた。

目的とする一置換体と副生した二置換体(3'-3'二量体)との成分比は、この反応溶液の約1/2容をNMRサンプルチューブに移し、ここに脱水メタノール約2当量を加えて室温で攪拌し一置換体をメチルエステルに誘導し、この反応溶液の³¹P-NMRスペクトルを測定して、各成分の積分値からモル組成率を算出した(Table 3)。一置換選択性(%)=[メチル

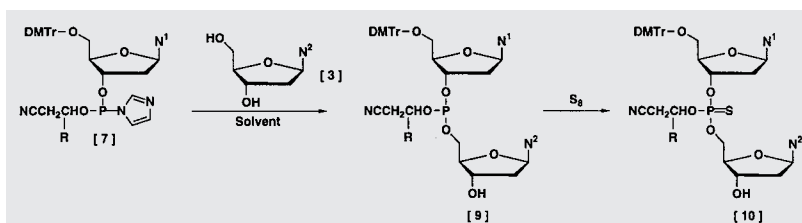


Table 2 Preparation of *In situ* DNA Synthesis Reagents [7]

Entry N°	R ¹	R ²	X	³¹ P Chemical Shift of <i>In situ</i> Reagent 7 δ (ppm)	³¹ P Chemical Shift of Mono Methyl Ester δ (ppm)
1	T	H	H	4-Melm	138.5, 138.6
2	T	H	C ₂ H ₅	4-Melm	123.0, 125.6
3	T	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	123.0, 125.4
4	T	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	Im	124.5, 124.9
5	T	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	124.5, 124.9
6	T	H	<i>t</i> -C ₄ H ₉	2-Melm	127.9, 128.2
7	T	H	<i>t</i> -C ₄ H ₉	4-Melm	127.9, 128.2
8	T	H	C ₆ H ₅	4-Melm	128.4, 130.8
9	T	H	CH(CH ₃) ₂	4-Melm	123.2, 123.7
10	T	CH ₃	<i>i</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	115.0, 116.4
11	T	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	Im	127.1, 129.8
12	T	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	130.5, 133.8
13	C ^{Bz}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	127.3, 129.2
14	A ^{Nc}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	130.4, 133.3
15	G ^{Bu}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	129.8, 130.2
16	C ^{PEG}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	Im	140.9, 141.1
17	T ^{PEG}	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	124.4, 128.0
18	A ^{PEG}	H	<i>t</i> -C ₄ H ₉	Im	128.5, 129.0
19	G ^{PEG}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	Im	128.4, 128.5

エネルギーの最適化を行った。更に半経験的分子軌道法(AM1)により構造の最適化を行い分子構造を確定した。こうして得られた立体構造に基づいて、TSAR™ 3.0(Oxford Molecular Group)の分子体積計算プログラムにより置換基Rのvan der Waals体積和を計算した。その結果(R¹+R²)をTable 3に示した。

Table 3 Evaluation of *In situ* DNA Synthesis Reagents [7]

Entry N°	R ¹	R ²	X	Estimated Volume of Substitution Groups (R ¹ +R ²) (Å ³)	Mono Substitution Reaction Selectivity (%)	Average Coupling Yield in Solid Phase Oligo Synthesis (%)	
1	T	H	H	4-Melm	6.34	83	93.0
2	T	H	C ₂ H ₅	4-Melm	36.65	92	92.5
3	T	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	49.36	92	97.5
4	T	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	Im	49.88	95	
5	T	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	49.88		97.9
6	T	H	<i>t</i> -C ₄ H ₉	2-Melm	64.27	98	97.1
7	T	H	<i>t</i> -C ₄ H ₉	4-Melm	64.27	98	97.2
8	T	H	C ₆ H ₅	4-Melm	73.16	87	97.3
9	T	H	CH(CH ₃) ₂	4-Melm	76.19	96	98.0
10	T	CH ₃	<i>i</i> -C ₃ H ₇	4-Melm	78.29	98	97.2
11	T	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	Im	114.39	98	98.0
12	T	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	114.39	98	98.2
13	C ^{Bz}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	114.39	99	96.8
14	A ^{Nc}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	114.39	>97	
15	G ^{Bu}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	4-Melm	114.39	98	
16	C ^{PEG}	H	O(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂	Im	114.39	99	

2.3.5 *In situ* DNA合成試薬を用いた2量化反応 (ジデオキシリボヌクレオチドの合成)

エステル]/([メチルエステル]+[3'-3'二量体])×100。

2.3.4 リン酸化剤の置換基の体積和の算出

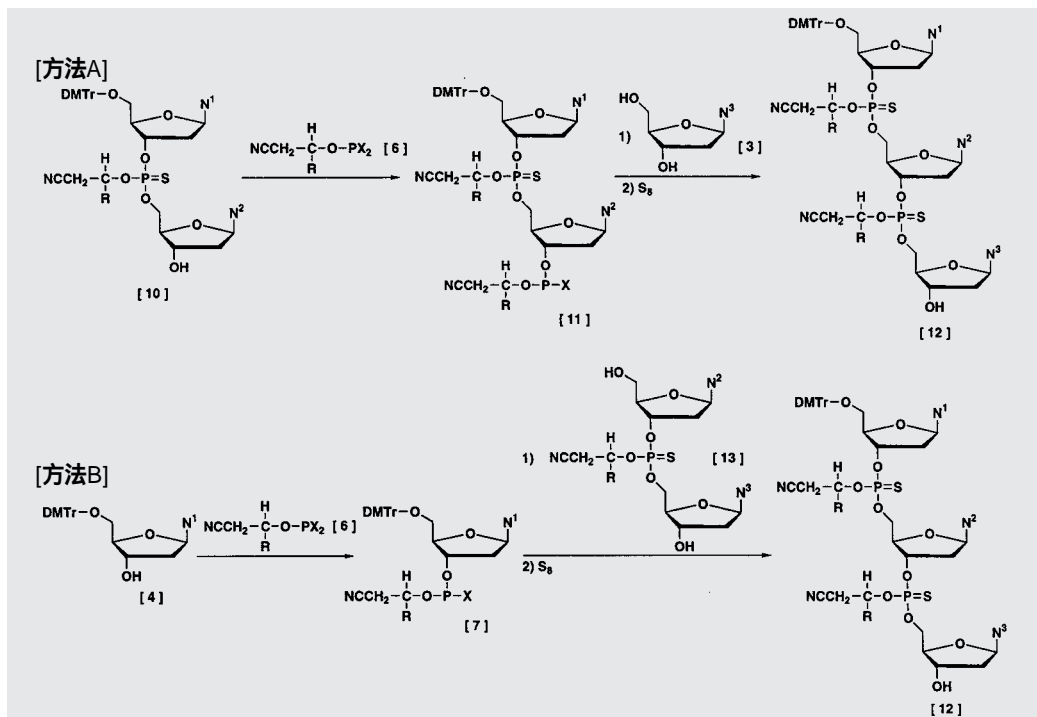
-モノ(もしくはジ)置換- -シアノエトキシピス(4-メチルイミダゾリル)ホスフィン、ROPX₂(6, X=4-メチルイミダゾリル)において、まず SPARTAN™ Version4.1.1

(Wavefunction, Inc.)により三次元分子構造を組み立て、MM力場を使って立体エ

2.3.3に従い合成した *In situ* DNA合成試薬7を、濃度が0.25Mとなるように適当な反応溶媒で溶解した1.0~2.0当量のN-保護デオキシリボヌクレオシド3に氷冷下加えた。反応混合物を4で一晩放置した後、その一部をアルゴン雰囲気下で採取し、トリエステル9の³¹P-NMRを測定した。そのスペクトルから上記合成試薬のN-保護デオキシリボヌクレオシドの5'水酸基への反応性選択率を求めた (Table 4)。その後³¹P-NMR測定に用いたサンプルと反応混合物を合わせ、これに1.5当量の単体イオウを加え30分間室温で反応させた。反応混合物を5%炭酸水素ナトリウムおよび飽和食塩水で洗浄した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、目的のジデオキシリボヌクレオチド(ダイマー)10を得た (Table 4)。

Table 4 Preparation of Di- and Tri-deoxyribonucleotides

Entry	R	N ¹	N ²	Reaction solvent	³¹ P Chemical shift of 9 or 12 δ (ppm)	³¹ P Chemical shift of 10 δ (ppm)	S-Selectivity (%)	Isolated Yield of 10 (%)
1	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	C ^{Bz} (1.03)	C ^{Bz} (1.1)	CDCl ₃ +Py	140.8, 141.0, 141.7	65.6, 66.1, 66.2	92	
2	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	T	T	CDCl ₃ +Py	140.6, 140.7, 141.0, 141.9	65.3, 65.4, 66.2, 66.4	>91	
3	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	A ^{Bz} (1.05)	A ^{Bz} (1.15)	CDCl ₃ +Py	140.0, 141.1, 141.3, 141.7	65.2, 65.5, 65.8, 65.9	94	88
4	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	G ^{Bz} (1.03)	G ^{Bz} (1.1)	CDCl ₃ +Py	140.7, 141.3, 142.0, 142.8	64.9, 65.7, 66.1, 66.3	96	
5	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	A ^{Bz} (1.03)	A ^{Bz} (1.0)	CDCl ₃ +Py	139.9, 141.3, 141.4, 141.6		93	
6	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	T	T ^{Bz}	CDCl ₃ +Py	141.3, 142.1, 142.4(bz)		87	
7	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	T	T ^{Bz}	Py-d ₅ +CH ₃ CN	142.4, 143.0(bz), 143.3, 143.4(bz)		88	
8	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	T	T ^{Bz}	CD ₂ CN+CH ₃ CN	142.3, 143.1, 143.3, 144.0		>82	
9	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	T	T ^{Bz}	CDCl ₃ +CHCl ₃	142.3, 142.5, 142.8		>77	
10	t-C ₄ H ₉	T	T ^{Bz}	CDCl ₃ +Py	141.0, 141.3, 141.6(bz), 141.7(bz)		>79	
11	i-C ₄ H ₉	T	T	CDCl ₃ +Py	138.7, 139.0, 139.3	64.7, 64.8, 65.2	>84	77
12	t-C ₄ H ₉	T	T	CDCl ₃ +Py		66.2, 66.3, 66.6, 66.9	88	84
13	t-C ₄ H ₉	C ^{Bz} (1.03)	C ^{Bz} (2.0)	CDCl ₃ +Py	140.6, 140.9, 141.1, 141.2	65.7, 65.8, 65.9	85	
14	t-C ₄ H ₉	T	T ^{Bz}	CDCl ₃ +Py		65.6, 66.1, 66.2	97	90
15	t-C ₄ H ₉	A ^{Bz} (1.03)	G ^{Bz} (1.2)	CDCl ₃ +Py		65.4, 65.9, 66.0, 66.2	96	80
16	t-C ₄ H ₉	T	A ^{Bz} (1.03)	CDCl ₃ +Py		65.7, 66.0, 66.3, 66.5	87-92	
17	t-C ₄ H ₉	A ^{Bz} (1.03)	T	CDCl ₃ +Py		65.8, 66.3, 66.6	81-87	74
18	t-C ₄ H ₉	T	C ^{Bz} (1.03)	CDCl ₃ +Py		65.8, 66.0, 66.2, 66.5	86	
19	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	A ^{Bz} (1.05)	C ^{Bz} (1.2)	CDCl ₃	140.8, 142.0, 142.6, 142.8	66.6, 66.8, 66.9, 67.8	89	
20	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	A ^{Bz} (1.05)	C ^{Bz} (1.2)	CDCl ₃	140.8, 142.6, 142.8, 143.1	66.6, 66.8, 66.9, 67.8	86	
21	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	C ^{Bz} (1.1)	C ^{Bz} (1.1)	CDCl ₃	140.4, 140.8, 141.0, 141.7		92	
22	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	A ^{Bz} (1.1)	A ^{Bz} (1.24)	CDCl ₃ +Py		65.6, 66.0, 66.3	88	
23	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	G ^{Bz} (1.1)	G ^{Bz} (1.24)	CDCl ₃ +Py		65.5, 65.8, 66.2, 66.6	81	
24	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	T	T ^{Bz} (1.1)	CDCl ₃ +Py			>94	82
25	C(C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH=CH ₂	T ^{Bz} (1.1)	T	CDCl ₃ +Py			>94	
26	t-C ₄ H ₉	T ^{Bz} (1.1)	A ^{Bz} (1.1)	CDCl ₃ +Py			>85	80



2.3.6 *In situ* 法を用いた3量化反応

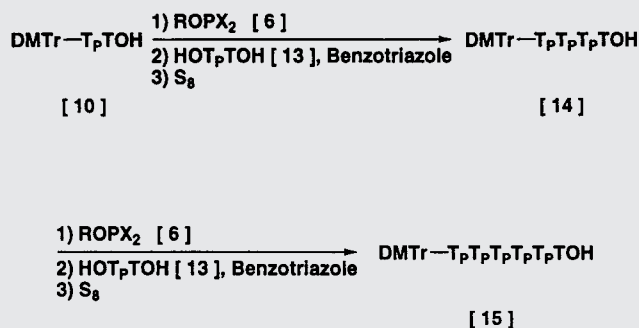
(トリデオキシリボヌクレオチドの合成)

[方法A] 2.3.5で合成したチミジンダイマー10と2.3.2で得たリン酸化剤6とから2.3.3に記載した方法に従って合成した *In situ* チミジンダイマー合成試薬11の重クロロホルム溶液を、1.0~1.5当量のN-保護デオキシリボヌクレオシド3の0.25Mピリジン溶液に氷冷下加え、4で一晩反応させた。ダイマー合成試薬のN-保護デオキシリボヌクレオシドの5'水酸基への反応選択率はチミジントリマー (T_pT_pT) の場合は³¹P-NMRスペクトルから求めた (Table 4) またチミジン-デオキシアデノシンを含むトリデオキシリボヌクレオチド (T_pT_pA) については、上記反応混合物を単体イオウを用いて2.3.5に示した方法でチオリン酸トリエステル12に変換した後、30%アンモニア水で脱保護したサンプルをキャピラリー電気泳動で分析し、その測定結果から求めた (Table 4)。

[方法B] 2.3.3で合成した *In situ* チミジン合成試薬7の重クロロホルム溶液を1.2当量のチミジンダイマー (T_pT) 13の0.25Mピリジン溶液に氷冷下加え、4で一晩放置した。チミジン合成試薬のチミジンダイマーの5'水酸基への反応選択率は³¹P-NMRスペクトルから求めた (Table 4) またチミジントリマー (T_pT_pT) 12は2.3.5に示した方法により精製、単離した。

2.3.7 *In situ* 法を用いたヘキサマーの液相合成

2.3.2に記載した方法で合成したリン酸化剤 (6, R¹=H, R²=t-ブチル, X=イミダゾリル, 0.33mmol) のクロロホルム溶液 (0.7ml) を、2.3.5で合成した5'-O-保護チミジンダイマー (10, 0.29g, 0.3mmol) に加え室温で1時間反応させた。この溶液をチミジンダイマー (13, 0.22g, 0.33mmol) とベンゾトリアゾール (0.07g, 0.56mmol) のピリジン溶液



(1.5ml) に氷冷下加えた。室温で1時間反応させた後、単体イオウ (0.02g, 0.6mmol) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応生成物を5%炭酸水素ナトリウムおよび飽和食塩水で洗浄した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、目的のテトラマー14を得た (0.48g, 収率87%, Rf = 0.38 (クロロホルム/メタノール = 10/1))。

同様にしてリン酸化剤 (6, R¹ = H, R² = t-ブチル, X = イミダゾリル, 0.28mmol)、5'-O-保護チミジンテトラマー (14, 0.46g, 0.25mmol)、チミジンダイマー (13, 0.19g, 0.28mmol) とベンゾトリアゾール (0.07g, 0.56mmol) とから目的のヘキサマー15を得た (0.57g, 収率85%, Rf = 0.35 (クロロホルム/メタノール = 10/1))。

3 結果と考察

3.1 mPEGを有するデオキシリボヌクレオシド誘導体の合成とその性質

液相系反応に適用可能なヌクレオシドとして、核酸塩基の保護基に可溶性ポリマーであるポリエチレングリコールメチルエーテル (mPEG)¹⁷⁾ を導入した新規ヌクレオシドを合成した。

mPEGの活性カルボン酸誘導体をデオキシリボヌクレオシドの塩基に導入する方法としては、反応操作が容易である Transient Protection法を利用した¹⁶⁾。その結果、活性カルボン酸誘導体としてmPEGの安息香酸クロリド誘導体2を用いると、N-アシル化反応が進行し、3', 5'-O-ビス(トリメチルシリル) 2'-デオキシシチジンおよびデオキシアデノシンのアミノ基にmPEG残基を導入することができた。チミジンについても基本的には同様であるが、イミノ基のアシル化反応においてはプロトンスカベンジャーであるジイソプロピルエチルアミンが存在しないと全く反応は進行しなかった¹⁵⁾。2'-デオキシグアノシンの場合は、mPEGの末端オキシアセチル誘導体とピバロイルクロリドから生ずる混合酸無水物をアシル化剤として用いると、反応が速やかに進行し、目的物を得ることができた。アシル化反応の後、水酸基の脱シリル化を行い、カラムクロマトグラフィーで精製すると、目的とするN-mPEG

保護-デオキシリボヌクレオシド3'の高純度品が得られた。こうして得られたN-mPEG保護-デオキシリボヌクレオシドは常法に従って5'-O-ジメトキシトリチル化することができた。

この方法によりmPEG残基をデオキシリボヌクレオシドの核酸塩基に導入できたことは、ポリマーであるmPEGを含むアシル化剤が、通常のアシル化のための試薬、例えばアニソイルクロリドと同様に、均一系反応に用いられ得ることを意味している。

また今回得られたN-mPEG保護-デオキシリボヌクレオシド3'の高分解能NMRの測定・解析の結果、mPEGポリマー1分子とヌクレオシド1分子から成る化合物が一連の反応で得られたことが支持された。これはN-mPEG保護-デオキシリボヌクレオシド3'が、基本的には完全な1分子として今後取り扱うことができることを意味している。この点は従来法の固相担体とは大いに異なる。従ってこのヌクレオシドはmPEGという固相部分を有していながら、例えばN-ベンゾイル-2'-デオキシシチジンなどの保護ヌクレオシド3と等価体として取り扱うことができ、mPEGが可溶性ポリマーであるため、化学量論的反応の設計が比較的容易に成るものと考えられる。

3.2 -置換-シアノエトキシビスアゾリルホスフィン (新規リン酸化剤)の合成とその性質

一般にリン-アゾリド化合物はアルコール性水酸基と反応し、リン-アルコキッド結合を形成することが知られている。そこで-置換-シアノエトキシジクロロホスフィン5を対応するビスアゾリド化合物に誘導する反応について検討した。その結果、化合物5をトルエン中で2.2当量のN-トリメチルシリルアゾール類を反応させた後、溶媒と過剰量のN-トリメチルシリルアゾール類を減圧留去すると、残渣として対応するビスアゾリド化合物6が定量的に得られることが判った。これらの化合物6は水に対して不安定であるが、窒素雰囲気下、-20℃で保存すれば1週間程度は使用可能である。

3.3 新規DNA合成試薬の合成とその反応

3.3.1 5'-O-N-保護デオキシリボヌクレオシド-3'-O-(-置換-シアノエトキシアゾリルホスフィン) (In situ DNA合成試薬)の合成

3.2に示したビスアゾリルホスフィン6 (リン酸化剤) は5'-O, N-保護デオキシリボヌクレオシド化合物4の3'-水酸基と反応し、モノアゾリルホスフィン7、即ちDNA合成試薬を与える (Table 2)。

In situ DNA合成試薬として利用するためには、リン酸化剤6と保護デオキシリボヌクレオシド4が過も不足もなく反応する必要があり、そうした反応を可能にするリン酸化剤を選択することが肝心である (一置換選択性)。そこで、種々の-置換-シアノエトキシビスアゾリルホスフィン6と5'-O-

ジメトキシトリチルチミジンとの反応を検討した結果、アゾリル基として(置換)イミダゾイル基が有効であり、また位の置換基が高い方が目的とするDNA合成試薬を効率よく発生させられることが判った(Table 3)。特に位に1,1-ジエチル-3-ブテニル基などの立体的に高価な置換基をもつリン酸化剤は、一置換選択性が4種類のデオキシリボヌクレオシドのいずれの場合にも98%以上であり、この値は従来の*In situ*法で得られていた95~98%のそれを凌ぐものである。また上記選択性はリン酸化剤に対して小過剰量(1.03当量)の5'-O, N-保護デオキシリボヌクレオシド化合物4を用いると99%以上に向上することが明らかとなっている。

3.3.2 *In situ* DNA合成試薬を用いたDNAオリゴマーの固相合成

3.3.1に示した種々の*In situ* DNA合成試薬7の純度、即ち種々のリン酸化剤の5'-O, N-保護デオキシリボヌクレオシド化合物4に対する一置換選択性が、DNAオリゴマー合成の収率にどのような影響を及ぼすかについて検討した。DNA自動合成機上で通常のアミダイト法のプロトコールに従って、DNA合成試薬7を用い、固相法によりDNAオリゴマー(チミジン20量体またはデオキシチミジン20量体)を合成した。その結果、従来のリン酸保護基である-シアノエトキシ基では平均縮合収率は高々93.0%であり有用性は認められなかったが、位に高価なアルキル置換基を有する場合はいずれも96.8%以上であり、明らかに平均収率が向上した(Table 3)。

Table 3より、*In situ* DNA合成試薬7を用いたDNAオリゴマーの固相合成の平均縮合収率は、各DNA合成試薬を製造する際の一置換選択性が高くなるに従って高くなる傾向があり、また、置換基のvan der Waals体積の和ともかなり良い相関があることが見出された。即ち、リン酸化剤のうち、置換基のvan der Waals体積の和が49Å³以上であるものは、*In situ* DNA合成試薬として有用であることが明らかとなった。

3.3.3 モノアルキルアミノ型アミダイト試薬を用いたDNAオリゴマーの固相合成

3.3.1に示した*In situ* DNA合成試薬7は固相法によるDNAオリゴマーの合成に用いられ得ることを前節で示した。しかしその平均縮合収率は実用レベルに到っておらず、比較的長鎖のオリゴマーを合成する場合には、目的物の収率が低くなるという不利な面がある。そこで平均縮合収率を更に向上させるための方法について探索した。その結果、化合物7は1級アミンと反応し、新しいタイプの垂リン酸アミド8を与え、これをDNA合成試薬として用いると、DNAオリゴマーが効率よく合成できることが判った(Fig.1)。特に化合物7において塩基がピリミジンの場合にはR¹として2-メチルブチル基、1級アミンとして*i*-プロピルを用い、また塩基がプリンの場合にはR¹およびアミンがそれぞれ*n*-プロピル基、*t*-ブチルアミンであると、1サイ

クル当たりの収率が98.5%に向上した。この結果得られたプライマーサイズ(15~30量体)のDNAオリゴマーは従来法(アミダイト法)で得られたものと純度的に遜色なく、またPCRプライマーとしても利用可能であることが判った。

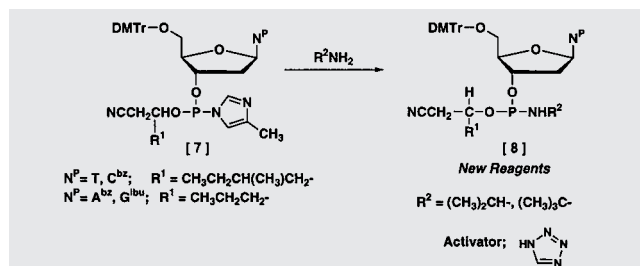


Fig.1 Preparation of *In situ* Reagents for solid phase oligonucleotide synthesis

3.4 DNAオリゴマーの液相合成

デオキシリボヌクレオシドと新規リン酸化剤との反応で得られる*In situ* DNA合成試薬7およびそのアミド誘導体8は、固相法によるDNAオリゴマーの合成の原料に成り得ることを示したが、更にその有用性を確かめるために、これらを用いたDNAオリゴマーの液相合成について検討した。

3.4.1 *In situ* DNA合成試薬を用いたジおよびトリデオキシリボヌクレオチドの合成

Table 4に示した通り、*In situ* DNA合成試薬7と3', 5'の水酸基が無保護のデオキシリボヌクレオシド3との反応では、5'の水酸基への反応性が大きく、3'水酸基と反応した生成物が5~15%であるのに対して、目的とする5'へのそれは85~95%であった。またこの反応に影響を及ぼす要因、例えば反応溶媒、*In situ* DNA合成試薬7と3', 5'-O-無保護-N-保護-デオキシリボヌクレオシド3の量比および反応温度等については次のことが判った。

- 1) 反応溶媒としてピリジンを用いると5'の水酸基への反応選択性が上がった。
- 2) *In situ* DNA合成試薬7と3', 5'-O-無保護-N-保護-デオキシリボヌクレオシド3の量比と5'-選択性は相関が無かった。
- 3) 反応温度を0 から -40 に下げても5'-選択性は向上しなかった。
- 4) 3', 5'-O-無保護-N-保護-デオキシリボヌクレオシド3としてプリン塩基誘導体を用いた場合、ピリミジン塩基誘導体のときよりも5'-選択性は向上した。
- 5) 3', 5'-O-無保護-N-保護-デオキシリボヌクレオシドとして、塩基に通常保護基を有するヌクレオシド3とmPEGを有するもの3'とは、5'-選択性に差は認められなかった。

一方、*In situ* DNA合成試薬7と塩基をmPEGで保護したヌクレオシド3'との反応で得られたジデオキシリボヌクレオチドは、ジエチルエーテル等のmPEGが不溶の溶媒を用いることにより、それを効率よく回収できることが判った。例えば、*In situ*

法により合成したmPEG分子を2個有するデオキシシチジンダイマー^{9'}は、その反応溶液を10倍容量のジエチルエーテル中に投入し一晩4で放置し再沈殿させると、90%でmPEGに由来する生成物が回収された。このことは、従来この種のジデオキシリボヌクレオチドは反応終了後、生成物を炭酸水素ナトリウム水溶液等で洗浄し、適当な方法で精製した後に得るのが一般的であるが、これらの手段を経ずに目的とするジデオキシリボヌクレオチドを効率よく回収できることを意味しており、本法はその低コスト合成法として有効であることを示している。

このようにして得られたジデオキシリボヌクレオチド誘導体^{9'}は、単体イオウとの反応で容易にチオリン酸トリエステル体¹⁰へ変換することができた。現在硫化反応を行うための試剤としてはBeaucage試薬¹⁸⁾等が用いられているが、これらは単体イオウに比べ非常に高価であり、DNAオリゴマーの合成コストを大きくしている一因となっている。硫化剤の選択が広範になり、高価な硫化剤を必要としない本法は、DNAオリゴマーの合成コスト削減において極めて有用であると思われる。

また*In situ* DNA合成試薬⁷と3', 5' - O - 無保護 - N - 保護 - 2' - デオキシリボヌクレオチド³との反応で、その5' - 選択性はモノマー同士を反応させてジデオキシリボヌクレオチドを合成した場合よりも、一方にジデオキシリボヌクレオチドを用いてトリデオキシリボヌクレオチド¹²を合成したときの方が良いことが示唆された。このことからこの反応にはヌクレシ(チ)ドの立体的な嵩高さも関与しているのではないと思われる。

従来、デオキシリボヌクレオチドを得るためには下記に示したようなルートを経るのが一般的であった (Fig.2)

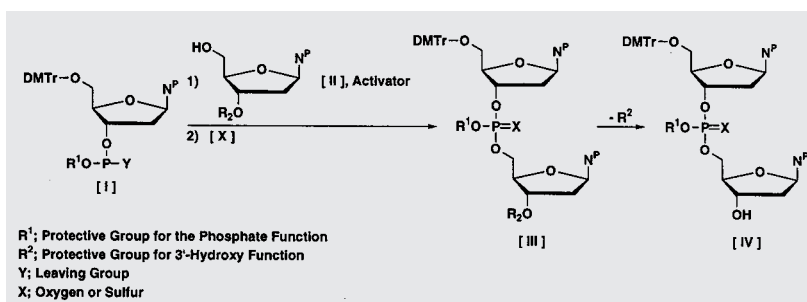


Fig.2 General procedure for the preparation of dimeric building block for oligonucleotide synthesis

この方法によれば、収率良く保護されたジデオキシリボヌクレオチド^{IV}を得ることができるが、そのためには3'水酸基への保護基の導入および同脱保護とその工程が多く、それだけ

コストが高むという難点があった。

今回我々が開発した方法によれば、これらの工程を省くことができる。またDNAオリゴマーを合成する方法として、従来は3' 5'方向にヌクレオチド鎖を伸長していたが、当法を用いれば5' 3'方向に合成できる可能性がある。

3.4.2 *In situ* 法を用いたDNAオリゴマーの液相合成

今回開発した*In situ*法が従来のもとは異なり、5' 3'方向へヌクレオチド鎖を伸ばす方法として有用であるか否かについて検討した。

本検討ではDNAオリゴマーを効率よく合成するために、まず*In situ* DNA合成試薬⁷と3', 5' - O - 無保護 - N - 保護デオキシリボヌクレオチド³ (あるいはデオキシリボヌクレオチド¹³) とのカップリング反応を促進させる方法について探索した。

その結果、上記カップリング反応を行う際にベンゾトリアゾール誘導体を存在させておくと、同試薬の5' - 水酸基への反応選択性を損なうことなく、同反応をスムーズに進行させることが判った。例えばチミジン合成試薬 (7, R¹ = H, R² = t - ブチル, X = イミダゾリル) とチミジンとの反応では、それが完結するのに約6時間要するが、ベンゾトリアゾールを2倍当量存在させると、その反応は約1時間で終了した。また5' - 水酸基への反応選択性は前者が88%であるのに対し、後者は89%であった。

また3.4.1で示したように、*In situ* DNA合成試薬⁷と3', 5' - 無保護, N - 保護デオキシリボヌクレオチド³ (あるいはデオキシリボヌクレオチド¹³) との反応では、その5' - 反応選択性は、モノマー同士を反応させた場合よりも、一方にジデオキシリボヌクレオチドを用いてトリデオキシリボヌクレオチドを合成したときの方が良い。従って本検討では、同合成試薬に反応させる

3'成分として、ジデオキシリボヌクレオチド¹³を用いる方法、いわゆるブロック合成法を採用した。

その結果、Fig.3に示したサイクルに従ってチミジンヘキサマーを70%程度の全収率で合成することができた。このことは、従来法とは逆の方向で、ヌクレオチド鎖を伸長させ得ること、また従来法に比べて工程数が少なく、コスト的にも有利な合成法であることを示している。このように当法を用いた場合のDNAオリゴマーの合成コストは、概算ではあるが、従来のその50%程度であると見積もられる。この

*In situ*法を一般化するための方法、例えばmPEGの物理化学的性質を利用して、Fig.3に示した各工程を自動的に行わせる方法について検討し、いくつかの成果が得られているが、本報告では割愛させていただいた。

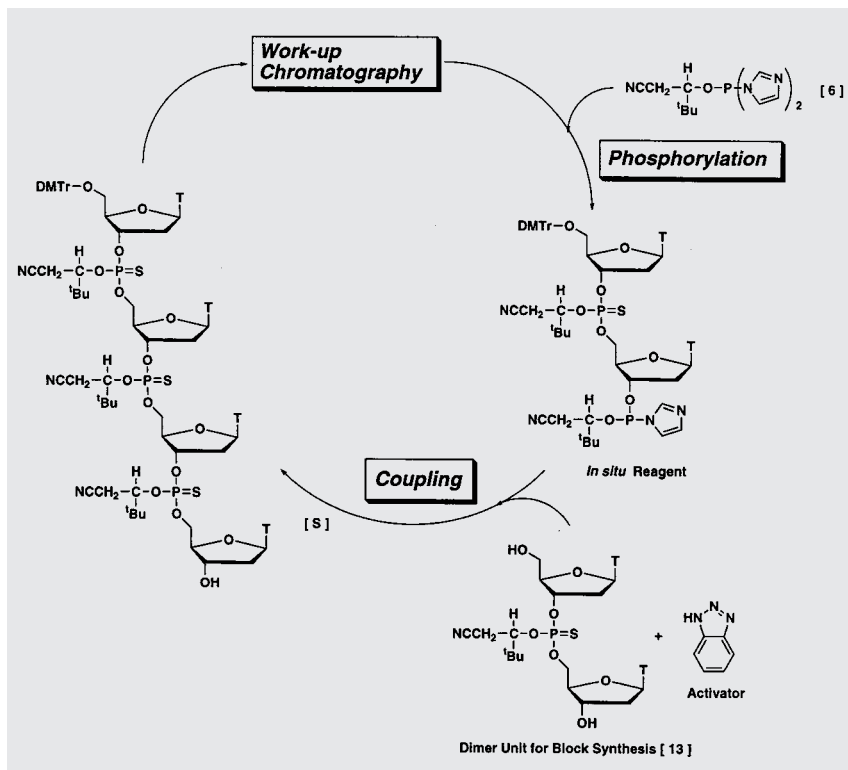


Fig.3 Reaction cycle for the synthesis of oligonucleotides based on *In situ* Reagents and dimeric building block

4 結 言

これまでの研究によって以下の点を明らかにした。

- 1) 位が高い -アルキル- -シアノエトキシビスアゾリルホスフィンと保護デオキシリボヌクレオシドとの反応によって新たな*In situ* DNA合成試薬を合成した。この新たな方法は、DNA合成試薬の合成コストを大きく削減でき、極めて有用であることが判った。また、この*In situ* DNA合成試薬を用いると、高収率でジあるいはトリデオキシリボヌクレオチドが得られることが判った。
- 2) 上記*In situ* DNA合成試薬はDNAオリゴマーの液相合成に適用でき、その結果チミジンヘキサマーが高収率で得られた。この方法は工程が短く、また特殊な硫化剤を全く必要としないため、コスト的にも従来法より有利となることが判った。
- 3) 一連の研究成果を活かしてDNAオリゴマーを液相法で合成した場合のコストは、従来法のその50%程度であると概算された。

引用文献

- 1) S. Agrawal (Ed.), " *Protocols for Oligonucleotides and Analogs (Methods in Molecular Biology Vol.20)* ", Humana Press, Totowa, NJ (1995).
- 2) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859 (1981).
- 3) B. C. Froehler, P. G. Ng, M. D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.*, 14, 5399 (1986).

- 4) P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stronberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.*, 27, 4051 (1986).
- 5) 吉田祇生, 木村馨, 日本特許第2508006号 .
- 6) M. F. Moore, S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 50, 2019 (1985).
- 7) H.-J. Lee, S.-H. Moon, *Chem. Lett.*, 1984, 1229.
- 8) 堀江洋慈, 吉田祇生, 未発表.
- 9) G. M. Bonora, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 54, 3 (1995).
- 10) M. Ouchi, Y. Inoue, Y. Liu, S. Nagamune, S. Nakamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63, 1260 (1990).
- 11) C. J. van Staveren, J. van Eerden, F. C. J. van Veggel, S. Harkema, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 4994 (1988).
- 12) H. Nagai, T. Fujiwara, M. Fujii, M. Sekine, T. Hata, *Nucleic Acids Res.*, 17, 8581 (1989).
- 13) E. C. Horning, A. F. Finell, "Organic Syntheses", Coll. Vol. IV, p.461 (1963).
- 14) L. Birkofer, P. Richter, A. Ritter, *Chem. Ber.*, 93, 2804 (1960).
- 15) M. Sekine, M. Fujii, H. Nagai, T. Hata, *Synthesis*, 1987, 1119.
- 16) G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Amer. Chem. Soc.*, 104, 1316 (1982).
- 17) D. J. Gravert, K. D. Janda, *Chem. Rev.*, 97, 489 (1997).
- 18) R. P. Iyer, L. R. Phillips, W. Egan, S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 55, 4693 (1990).

現在坂出工場技術開発グループ勤務 .