

# 細胞内環境で活性化されるプロドラッグ型 siRNA の開発

2015

越智 洋輔

## 略語一覽

DCM: Dichloromethane

DMF: *N,N*-Dimethylformamide

DMSO: Dimethylsulfoxide

DMTr: 4,4'-Dimethoxytrityl

DMTSF: Dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate

dsRNA: Double stranded RNA

DTBS: Di-*tert*-butylsilyl

DTT: DL-Dithiothreitol

ETT: 5-Ethylthio-1*H*-tetrazole

FBS: Fetal bovine serum

MDTM: Methylthiomethyl

NMP: *N*-methyl-2-pyrrolidone

ODN: Oligodeoxynucleotide

REDUCT RNA: Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA

RISC: RNA-induced silencing complex

RNAi: RNA interference

siRNA: Small interfering RNA

TBS: *tert*-Butyldimethylsilyl

TCA: Trichloroacetic acid

TEAA: Triethylammonium acetate

TMBTM: 2,4,6-Trimethoxybenzylthiomethyl

TMS: Tetramethylsilane

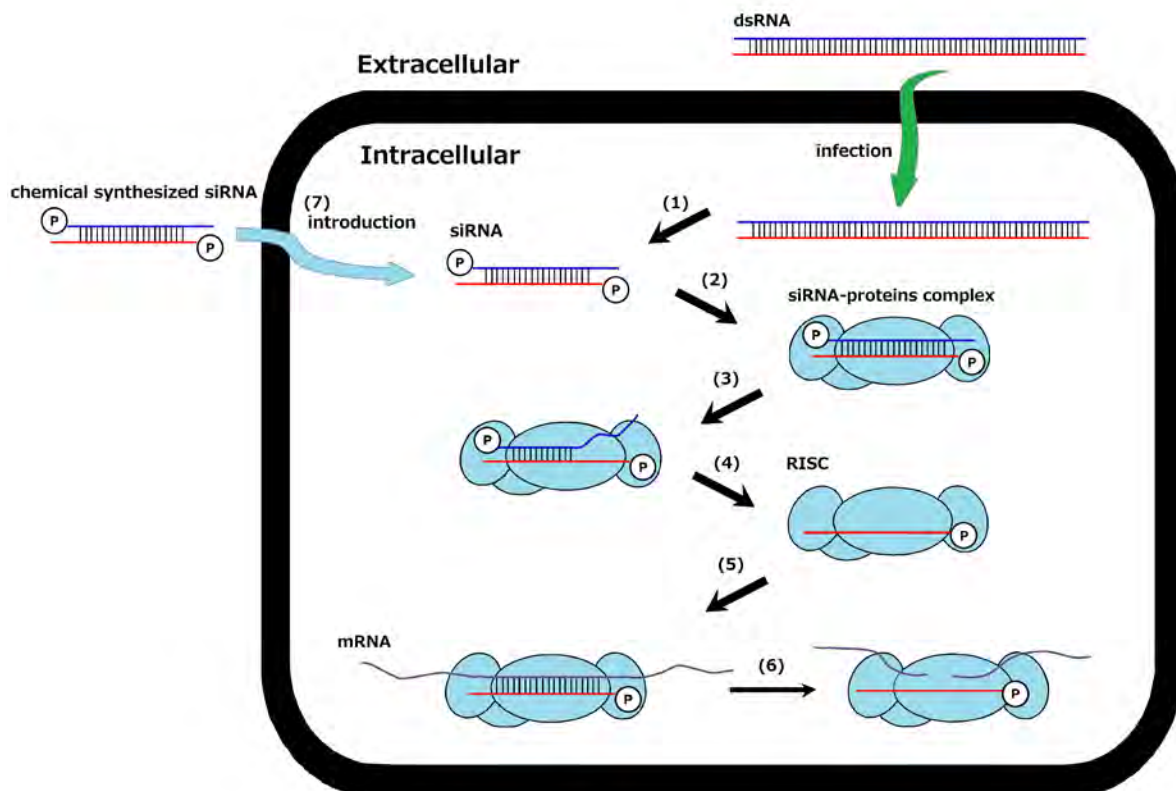
TMSETM: 2-(Trimethylsilyl)ethylthiomethyl

# 目次

緒論	1
本論	6
第一章 オリゴ合成後修飾法による Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Ttransforming RNA (REDUCT RNA) 合成法の開発	6
第一節 Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Ttransforming RNA (REDUCT RNA) へ 変換可能なウリジン誘導体の開発	8
第二節 2'-O-メチルジチオメチルオリゴヌクレオチドの合成とその性質	17
第二章 プロドラッグ型 RNA を利用した RNA 干渉	34
第一節 2'-O-メチルジチオメチル修飾核酸の酵素耐性能の評価	35
第二節 2'-O-メチルジチオメチル-RNA の合成	36
第三節 二本鎖 2'-O-メチルジチオメチル-RNA の性質	41
第四節 Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Ttransforming (REDUCT)-siRNA の 遺伝子抑制効果の評価	46
結語	50
謝辞	51
実験の部	52
第一章第一節の実験	54
第一章第二節の実験	63
第二章第一節の実験	70
第二章第二節の実験	71
第二章第三節の実験	73
第二章第四節の実験	74
引用文献	77

## 緒論

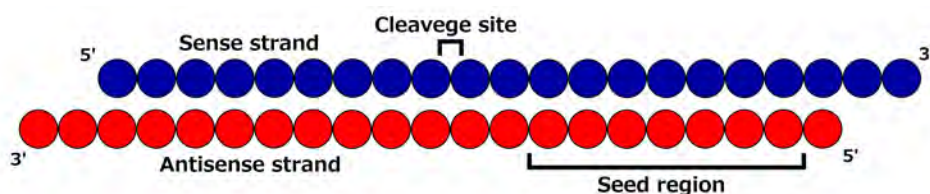
合成オリゴヌクレオチドを基盤とした核酸医薬は、低分子医薬、抗体医薬に続く医薬品として期待されており、代表として核酸アプタマー、アンチセンス核酸、低分子干渉 RNA (small interfering RNA; siRNA) が開発されている。これまでに、アンチセンス核酸医薬として AIDS 患者におけるサイトメガロウイルス網膜症治療薬・fomivirsen<sup>1)</sup> (商品名: Vitravene, 現在は市販されていない) と、核酸アプタマーとして加齢黄斑変性症治療剤・pegaptanib<sup>2)</sup> (商品名: Macugen) が承認されており、現在、他に多くのアンチセンス医薬 (ディシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬・NS-065/NCNP-01), siRNA 医薬 (治療抵抗性乳がん治療薬・TDM-812) の臨床試験が行われている。核酸アプタマーは,<sup>3)</sup> 標的分子に対して特異的な高次構造を形成して結合する抗体様の機能を示す分子である。アンチセンス核酸は,<sup>4)</sup> 標的



**Figure 1.** RNAi mechanism: (1) Processing of dsRNA by Dicer; (2) Formation of siRNA-proteins complex; (3)-(4) Dissociation of single stranded RNA from complex by helicase; (5) Binding to mRNA; (6) Cleavage of mRNA by active RISC; (7) Introduction of synthetic siRNA into cell.

mRNA に相補的に設計されたオリゴヌクレオチドで、細胞内にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入すると、標的配列を持つ mRNA と結合することでセントラルドグマの翻訳過程を阻害し遺伝子発現を抑制する。siRNA は、二本鎖 RNA (double stranded RNA; dsRNA) からなる核酸で、この作用機序として Figure 1 に示した RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) の一部が利用される。この RNAi は Fire と Mello らによって線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* で発見され、<sup>5)</sup> その後、ヒトを始めとする哺乳類にも見出され、<sup>6)</sup> ウイルス等が感染した際の宿主細胞の防御機構であると考えられている。<sup>7)</sup> RNAi のメカニズムは、<sup>8)</sup> (1) 細胞内に侵入した長鎖 dsRNA が Dicer の切断によって siRNA となり、(2) 内因性タンパク質複合体に取り込まれる。(3) 複合体のヘリカーゼが siRNA の一本鎖 RNA (センス鎖または passenger strand) を解離し、(4) RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる一本鎖 RNA-タンパク質複合体となる。(5) RISC は、RISC 中の RNA 鎖 (アンチセンス鎖または guide strand) と相補的な塩基配列を持つ標的 RNA と結合し、(6) RISC に含まれる Argonaute 2 (Ago2) のヌクレアーゼ活性によって標的 RNA が切断される。RISC が特定の mRNA と結合した場合、対応する遺伝子の発現が抑制される。siRNA を疾病の治療に応用する場合、(7) 標的となる mRNA に対して設計された siRNA を細胞へ導入することで、(2)~(4) の段階を経て遺伝子発現の抑制が可能である。

siRNA は 3' 末端が 2 塩基突出した 21 塩基の二本鎖 RNA で構成される (Figure 2)。アンチセンス鎖の 5' 末端から 2-8 番目の領域は seed region と呼ばれ、修飾核酸による Ago2 との相互作用の変化によって遺伝子発現抑制効果に影響が起りやすい重要な領域である。<sup>9)</sup> 標的 RNA のホスホジエ



**Figure 2.** siRNA structure: A siRNA consists of two 21-nucleotides sense and antisense strands, with two 2-nucleotides overhangs at 3' ends. Positions 2-8 in the antisense strand constitute the seed region of the siRNA. Target mRNA is incorporated into the RISC followed by its cleavage by Ago2 at the cleavage site on the position opposing from positions 10-11 of the antisense strand.

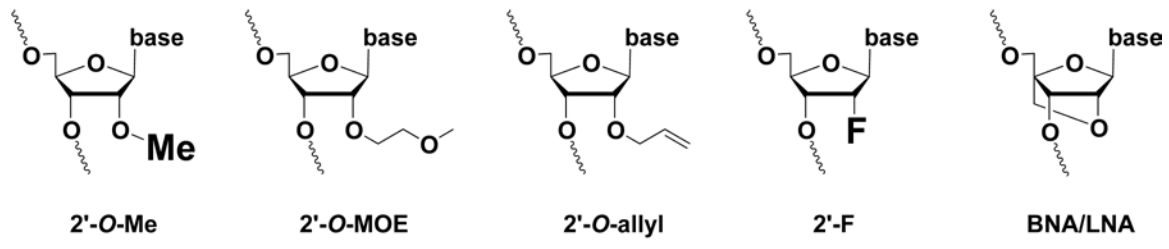


Figure 3. Various chemical modifications of sugar moiety used in siRNAs.

エステル結合の切断部位はアンチセンス鎖の 10–11 番目の対面に存在している. siRNA はアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも少量でより強力な遺伝子発現抑制効果をあらわすため, 近年, 遺伝子発現抑制の手段としてアンチセンス法よりも RNAi 法が有望視されている.

以上の様に RNA 医薬が有望視されている一方で, 一般的に核酸は化学的, 生物学的安定性に問題がある. 特に RNA は 2' 位に水酸基を有するため, 隣接基関与によりホスホジエステル結合が加水分解されやすく化学的に不安定であるだけでなく,<sup>10)</sup> 生体内に存在する多数のヌクレアーゼのヒスチジン残基に触媒され, 分解されやすいという点で DNA よりはるかに不安定である.

そこで RNA の安定性向上を目的とした核酸の糖部修飾として 2' 位水酸基への様々なアルキル修飾や 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleoside (2'-F), 2',4'-架橋型核酸 (bridged nucleic acid/locked nucleic acid, BNA/LNA) 等の導入が行われている (Figure 3).<sup>11)-15)</sup> 核酸に修飾を施すとヌクレアーゼに対する安定性の向上がみられ, 2' 位水酸基に最も短いアルキル基であるメチル基を導入しても RNA より安定で,<sup>11)</sup> さらに長いアルキル鎖を導入するとより高いヌクレアーゼ耐性を示す.<sup>12)</sup> 一方, siRNA としての活性は, アンチセンス鎖の修飾によって, 低下またはほぼ消失することが報告されており (Figure

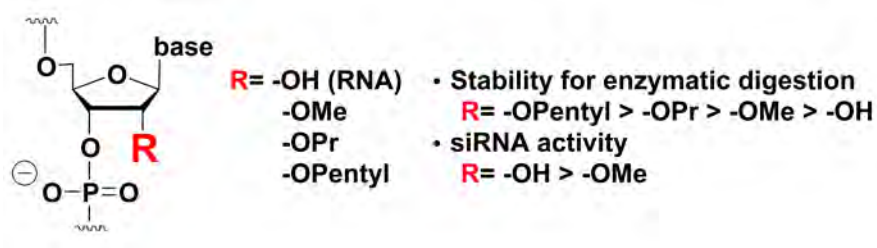
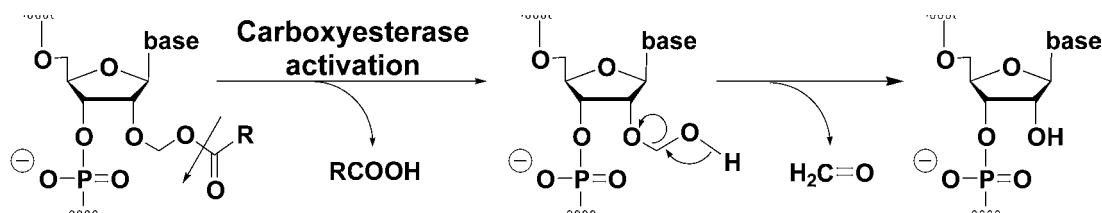


Figure 4. Effects of 2'-O-modification of oligonucleotides.

4),<sup>11), 13)-16)</sup> 特にアンチセンス鎖の 5' 末端および *seed region* への修飾は siRNA 活性の顕著な低下を引き起こす。<sup>15)-16)</sup> そのため、ヌクレアーゼ耐性を獲得しつつ siRNA 活性も保持できる siRNA 分子の開発が必要と考えられる。

これまでに酵素耐性と siRNA 活性の両立を指向して開発されたプロドラッグ型核酸修飾として、2'-*O*-アシルオキシメチル基が Debart らによって報告されている。<sup>17)</sup> 2'-*O*-アシルオキシメチル修飾 RNA はカルボキシエステラーゼや細胞抽出液によってエステル結合が加水分解されて天然型 RNA まで変換されることが示されている (Scheme 1).<sup>18)</sup> 2'-*O*-アシルオキシメチル修飾によってヌクレアーゼに対する安定性は向上し、修飾の影響を受けやすい *seed region* に修飾しても siRNA 活性の大幅な低下を示すことなく天然型 siRNA と同等の効果を示した。<sup>17)</sup> しかし、カルボキシエステラーゼは細胞内だけでなく血液中にも存在しているため、<sup>19)</sup> 標的細胞に到達する前に天然型 RNA へ変換されることが問題となる。

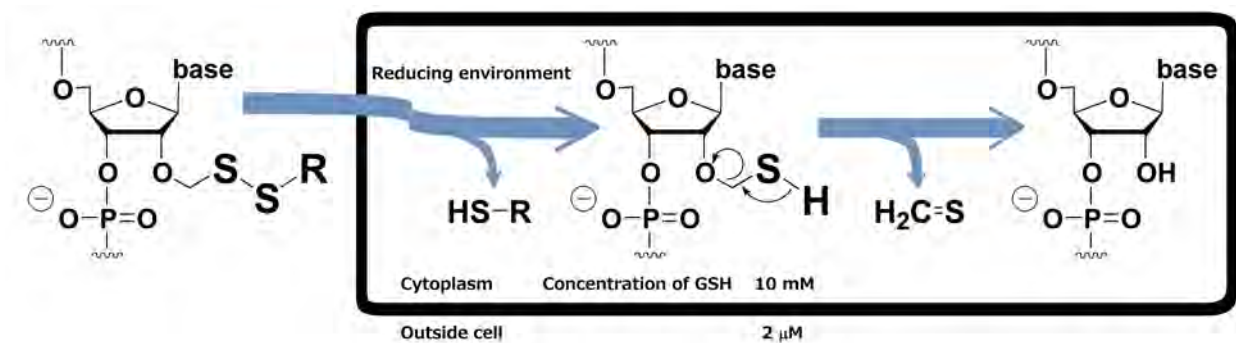


**Scheme 1.** Parent RNA release from 2'-*O*-acyloxymethyl-RNA by carboxyesterase hydrolysis.

ところで、薬物送達分野において輸送担体 (抗体) と薬物 (低分子化合物) から構成される複合体、抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate, ADC) が多数開発されている (gemtuzumab ozogamicin, 商品名: Mylotarg).<sup>20)</sup> これらは細胞内へ送達後、薬物が遊離されるよう設計されており、ジスルフィド結合が抗体と薬物との間のリンカーとして利用されている。<sup>21)-22)</sup> ジスルフィド結合は還元的環境下で容易に切断されることが知られており、細胞内のグルタチオン濃度が 2 – 10 mM で、細胞外 (血漿中濃度約 2 μM) に比べ還元的環境であることを利用して、<sup>23)-26)</sup> 細胞内でのジスルフィド結合の切断が可能であるとされている。

そこで、筆者は細胞内で活性化されるプロドラッグ型 siRNA を設計し、活性の向上を指向し、2' 位

水酸基に 2'-O-(S-アルキルジチオメチル) 基を持つ修飾 RNA の合成を計画した. アルキルジチオメチル基はその構造中にジスルフィド結合を持つため, 還元的条件下ではジスルフィド結合が容易に切断され, 遊離した不安定なチオヘミホルムアセタールは, チオホルムアルデヒドとして自発的に脱離し, 2' 位が水酸基へと戻ることが期待できる (Scheme 2). このため, この修飾 siRNA は細胞外においてヌクレアーゼ耐性を示しつつ, 細胞内の還元的環境によって修飾基が脱離し天然型 siRNA へ変換できる点で, アルキルジチオメチル基を持つオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼ耐性の向上と siRNA 活性の保持の両立が可能なプロドラッグ型機能性分子となりうると考えた. このように, 還元環境に応答して非酵素的に天然型 RNA へ化学変換できる RNA を Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA (REDUCT RNA) と名づけ, 2'-O-アルキルジチオメチル修飾 RNA の合成とその性質の評価に着手した.



**Scheme 2.** Reductive cleavage of 2'-O-alkyldithiomethyl group, GSH: glutathione.



# 本論

## 第一章 オリゴ合成後修飾法による Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA (REDUCT RNA) 合成法の開発

2' 位水酸基にジスルフィド結合を持つ側鎖を導入した例として, RNA を化学合成する際の 2' 位水酸基の新たな保護基として 2'-*O-tert*-ブチルジチオメチル基が導入された例が Semenyuk らによって報告されている (Figure 5).<sup>27)</sup> この方法において, オリゴヌクレオチド伸長合成反応に使用されるアミダイト体 **6** はジスルフィド結合と 3 価のリンが共存した形で合成されている (Scheme 3).<sup>27)</sup> しかし, 分子内にジスルフィド結合とアミダイトが共存する化合物は分子内で酸化還元反応が起こり, 安定性の面で問題があると指摘されているが,<sup>28)</sup> このようなジスルフィド結合を持つアミダイトユニットを用いるオリゴヌクレオチド合成は, Semenyuk らの方法では, *tert*-ブチル基が硫黄原子に結合しているため, *tert*-ブチル基からの電子供与性およびジスルフィド結合の隣接部位 (*tert*-ブチル基) の立体障害によりアミダイトユニットは比較的安定であると報告されている.<sup>27)</sup> しかし, 他のアルキル基を持つ 2'-*O*-アルキルジチオメチル基を有するアミダイト体およびそれを用いた RNA の合成法としては安定性の点で課題が残る. こうした問題を回避するために, Semenyuk らの方法でオリゴヌクレオチド合成後にアルキルジチオメチル基を導入する方法は実用的でない. その理由として, オリゴヌクレオチドは水溶性で有機溶媒にはほとんど溶解せず, Scheme 3 に示したように, Semenyuk らのアルキルジチオメチル化は無水条件で反応性の高い試薬を用いて行われるため (iii-v), この方法のオリゴヌクレ

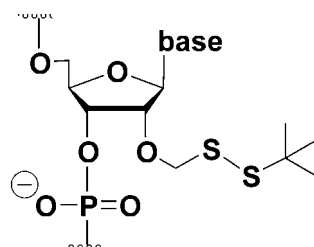
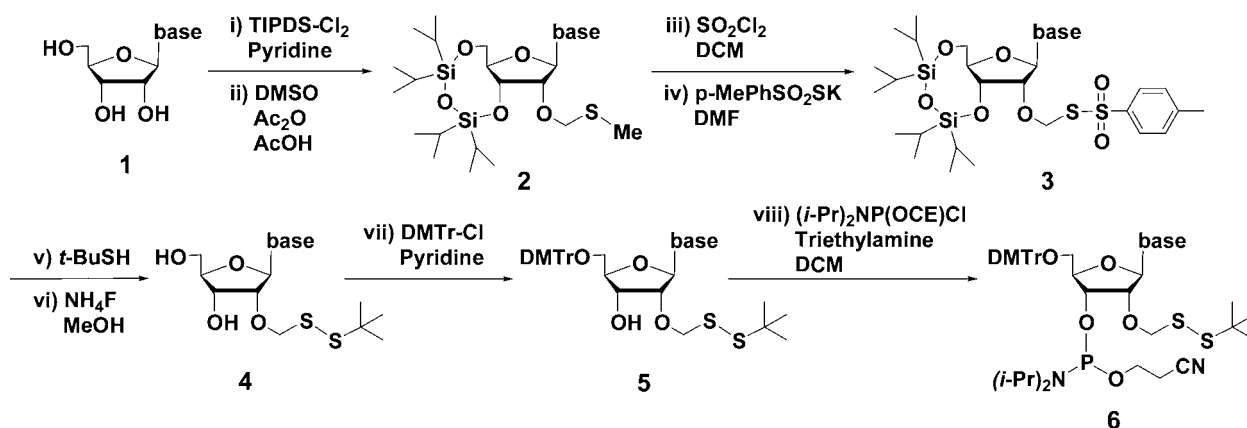


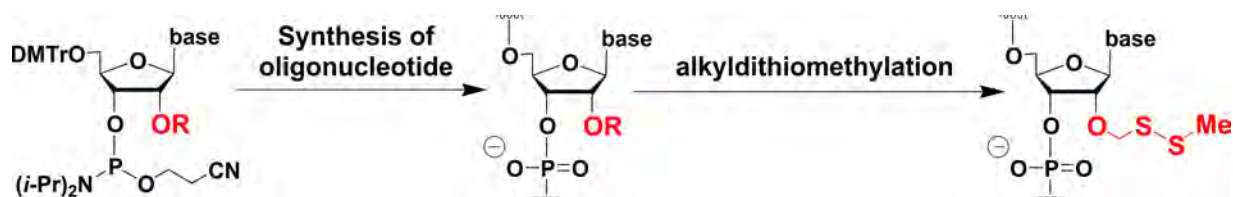
Figure 5. Structure of 2'-*O-tert*-butylidithiomethyl-RNA.



Scheme 3. Pre-synthetic alkyldithiomethylation.<sup>27)</sup>

オチド合成後修飾への応用は困難である。筆者はジスルフィド結合を持たない修飾オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド合成後にジスルフィド化する方法論を開発することで、好ましくない副反応を回避することができ、様々なアルキルジチオメチル基の導入が可能になるのではないかと考えた。そこで、還元環境で非酵素的に天然型 RNA へ化学変換できる Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA (REDUCT RNA) としてオリゴヌクレオチド合成後修飾法を利用した新規 2'-O-アルキルジチオメチル-RNA の開発に着手した (Scheme 4)。

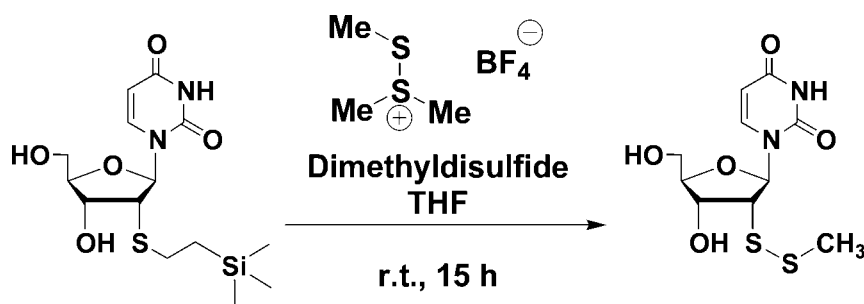
本章では、オリゴヌクレオチド合成後修飾による、核酸の塩基部、糖部、リン酸ジエステル部に副反応を起こさず、緩和な条件でジスルフィドに変換できる修飾前駆体の設計、合成およびオリゴヌクレオチド上でアルキルジチオメチル体への変換を検討することにした。



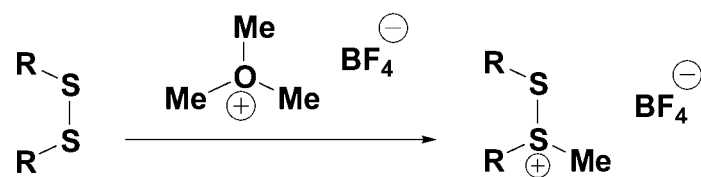
Scheme 4. Formation of disulfide bond by post-synthetic method.

## 第一節 Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA (REDUCT RNA) へ変換可能なウリジン誘導体の開発

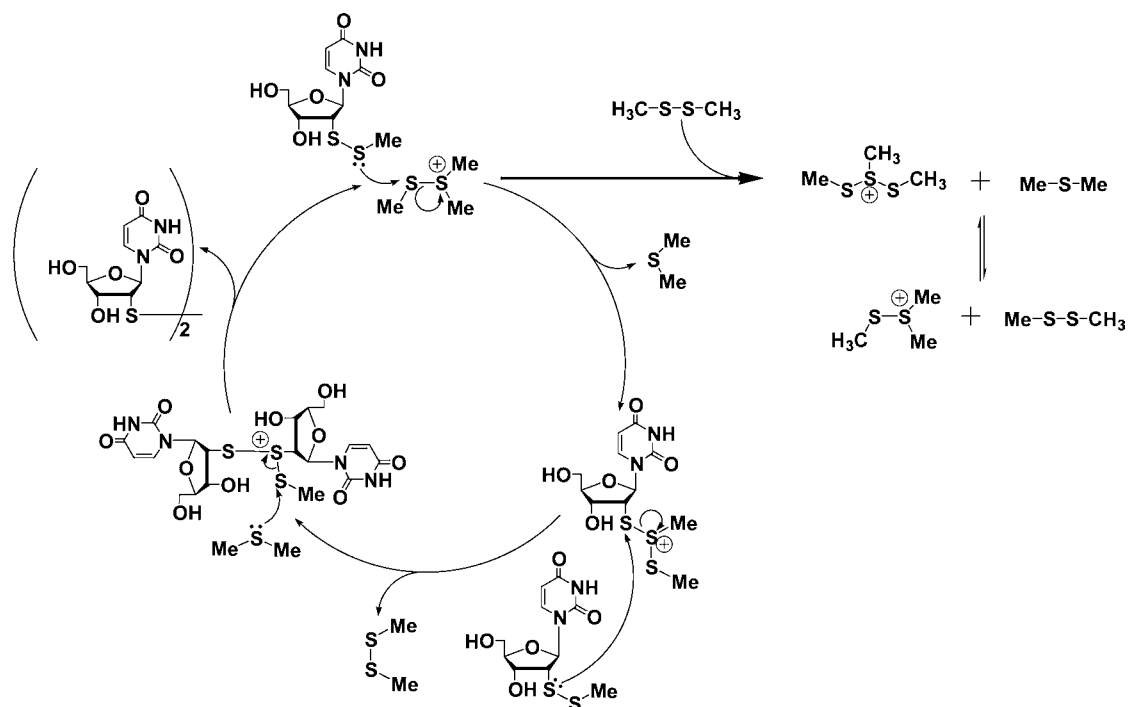
筆者は REDUCT RNA の合成にあたり、末端にメチル基を有するメチルジチオメチル (methylthiomethyl, MDTM) 基を 2'-水酸基に置換したウリジン誘導体を設計し、オリゴヌクレオチド合成時、塩基部位に保護基を必要としないウリジンをベースに MDTM 前駆体を合成することにした。ジスルフィド化法として、Chambert らが過剰のジメチルジスルフィド存在下、糖部水酸基や塩基部を無保護の 2'-deoxy-2'-[2-(trimethylsilyl)ethyl]thiouridine に dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate (DMTSF) を作用させることでジスルフィド誘導体を合成しており (Scheme 5),<sup>29</sup> 筆者はこの方法をオリゴヌクレオチド合成後修飾に応用することを考えた。DMTSF をメチルジチオメチル化試薬に選んだ理由は、ホモアルキルジスルフィドに Meerwein 試薬を作用させることで alkylmethyl(alkylthio)sulfonium tetrafluoroborate を合成することができ、<sup>30</sup> 他のアルキルジチオメチル基への変換も可能であると考えたからである (Scheme 6)。この DMTSF を利用したジスルフィド化では、合成した非対称ジスルフィドに DMTSF がさらに作用することで副反応が連鎖的に生じる可能性があるが、過剰のジメチルジスルフィドを添加することで、この副反応を防いでいる (Scheme 7).<sup>29-31</sup> そこで、2'-O-MDTM-ウリジン誘導体を合成するために逆合成解析を行い、まず 3', 5' 位を保護し、Chambert らの方法に従い 2' 位に 2-(trimethylsilyl)ethylthiomethyl (TMSETM) 基を導入し、3', 5' 位の脱保護後に 2'-O-MDTM 基へ変換する計画を立てた (Scheme 8)。



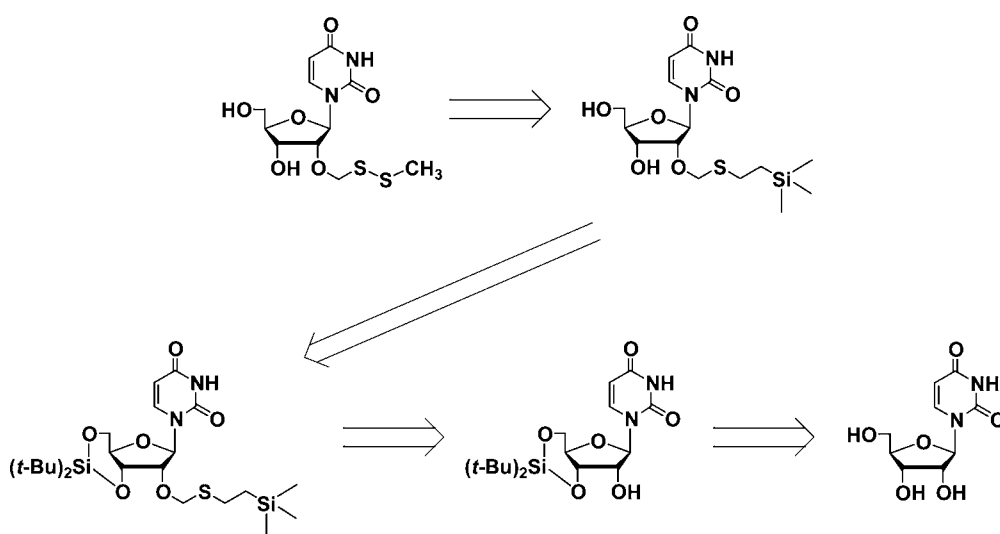
Scheme 5. Chambert's disulfide formation from 2'-S-[2-(trimethylsilyl)ethyl] group.



**Scheme 6.** Synthesis of alkyldithiomethylation reagents from dialkyldisulfide with Meerwein's reagent.

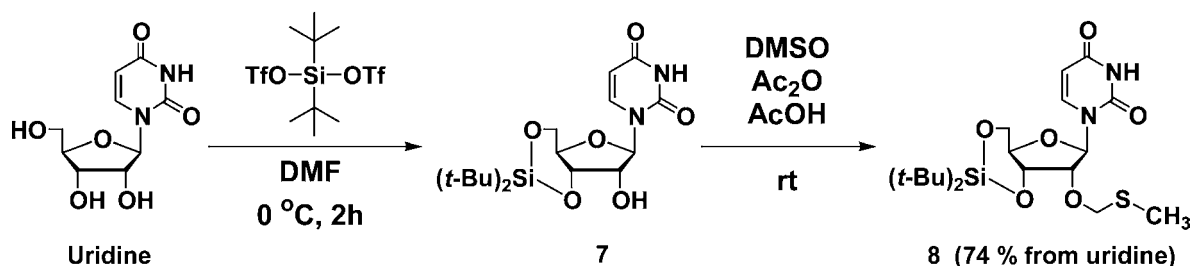


**Scheme 7.** Symmetric disulfide formation.



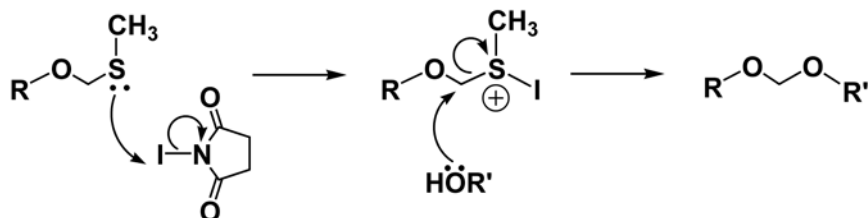
**Scheme 8.** Retrosynthesis of 2'-*O*-MDTM-uridine.

逆合成解析に従い、まず、ウリジンの 3', 5' 位水酸基を同時に保護する目的で、二官能性シリル基である di-*tert*-butylsilyl (DTBS) 基で保護した後、2' 位水酸基をメチルチオメチル (methylthiomethyl, MTM) 化した化合物 **8** を合成した (Scheme 9).<sup>18), 27), 32)</sup>



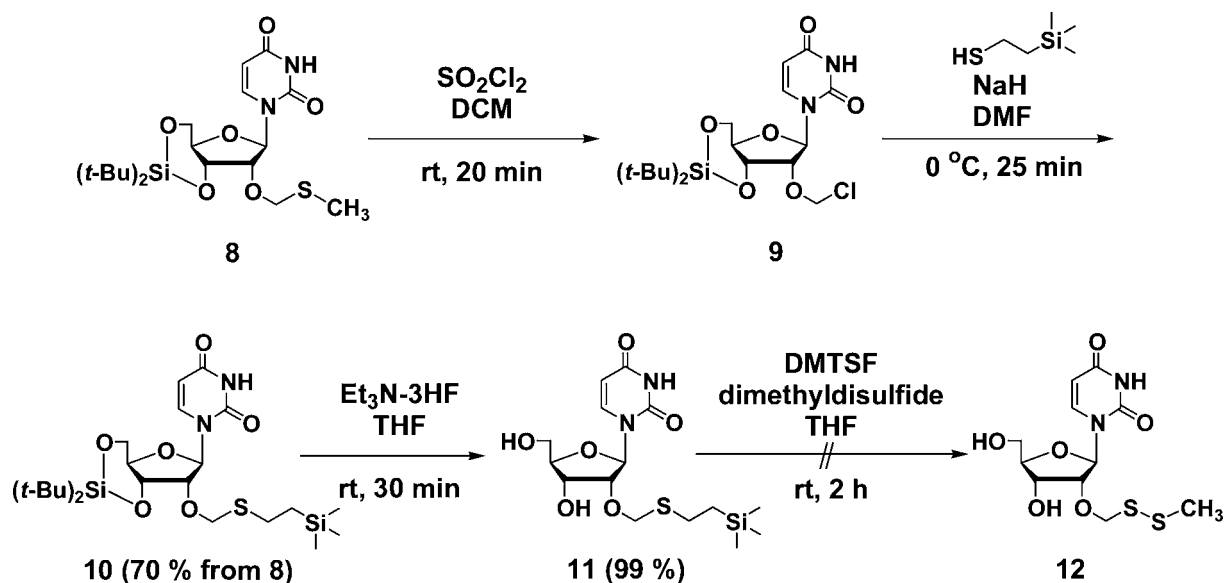
**Scheme 9.** Synthesis of 2'-*O*-MTM-uridine derivative.

得られた化合物 **8** の MTM 基から TMSETM 基への変換は、Veeneman らのアセタール交換反応を参考にした (Scheme 10).<sup>33)</sup> 実際に MTM 体 **8** に対して 2-(trimethylsilyl)ethanethiol, *N*-ヨードスクシンイミドおよびトリフルオロメタンスルホン酸を作用させ 2'-*O*-TMSETM 化反応を行ったが、目的とする TMSETM 体は得られなかった。



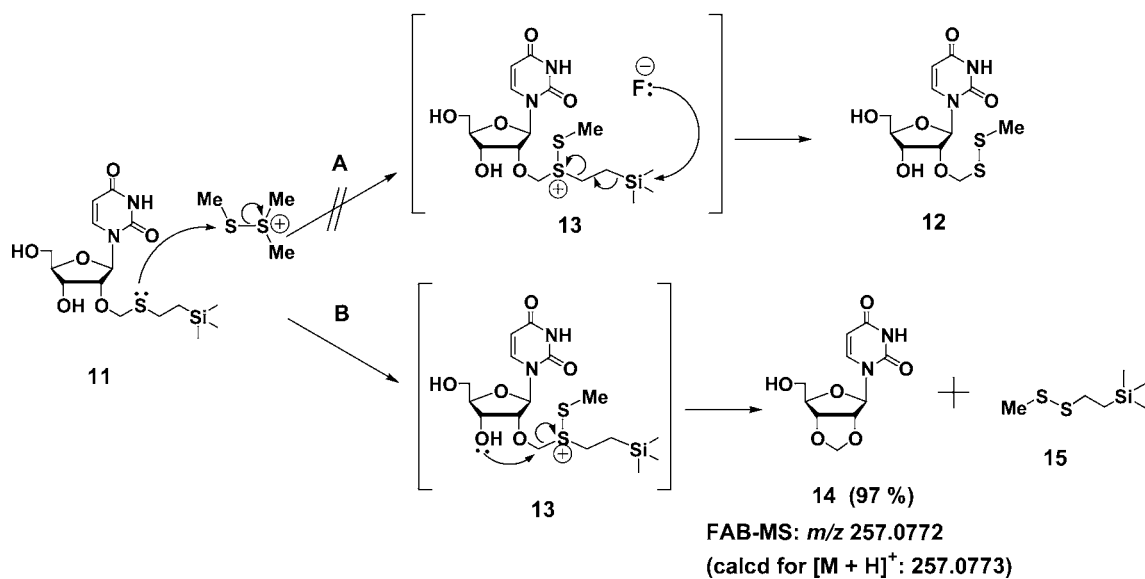
**Scheme 10.** Veeneman's acetal exchange reaction by *N*-iodosuccinimide.

そこで筆者は、Williamson のエーテル合成を応用し、MTM 基をクロロメチル基に変換してから、チオールを水酸化ナトリウムで処理したチオラートアニオンを作用させ、2'-*O*-TMSETM 誘導体を合成することにした (Scheme 11).<sup>34)</sup> 化合物 **8** に対して塩化スルフィリルを作用させた後、水酸化ナトリウムで処理した 2-(trimethylsilyl)ethanethiol を作用させたところ、目的の 2'-*O*-TMSETM-ウリジン誘導体 **10** を合成することに成功した。続いて化合物 **10** の 3', 5' 位の DTBS 基を三フッ化水素トリエチルアミンで脱保護し化合物 **11** を定量的に得た。



Scheme 11. Preparation of 2'-*O*-TMSETM-uridine.

化合物 **11** の 2'-*O*-TMSETM 基の MDTM 化を行うために、テトラヒドロフラン (THF) 中で DMTSF を作用させたところ、目的の化合物 **12** は得られず、<sup>1</sup>H-NMR、質量スペクトルより 2',3'-*O*-メチレンウリジン (**14**)<sup>35-36</sup> が生成したと考えられた (Scheme 12). この原因として、反応 A に示したフッ素アニオンの求核攻撃による中間体 **13** の TMSETM 基の β 脱離よりも、反応 B に示した 2' 位酸素とスルホニウムカチオンに隣接するメチレン炭素への 3' 位水酸基の分子内求核攻撃が優先

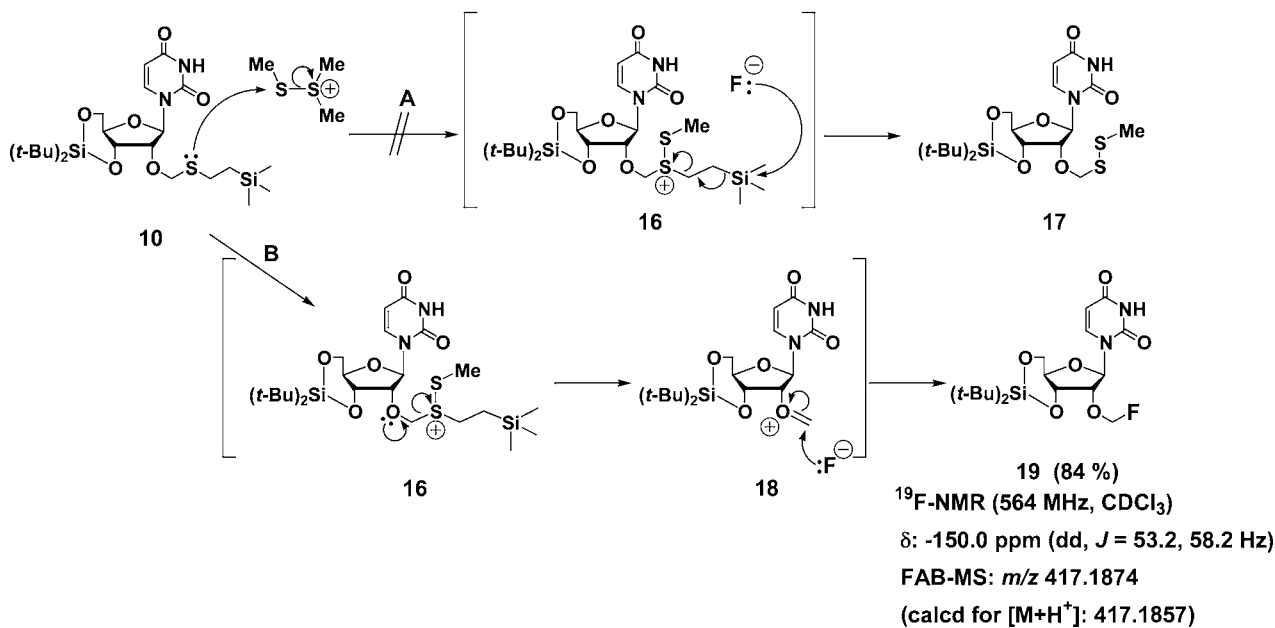


Scheme 12. Reaction of 2'-*O*-TMSETM-uridine with DMTSF.

し、ジスルフィド **15** が脱離することで、2',3'-メチレンウリジンを形成したと考えられた (Scheme 12).

筆者は 3' 水酸基の求核性を抑えることにより、Scheme 12 に示した反応 B ではなく、反応 A が進行するのではないかと考えた。そこで、3', 5' 位に保護基を導入した化合物 **10** から MDTM 化を行ったが目的物 **17** は得られなかった (Scheme 13). 得られた化合物は  $^1\text{H-NMR}$  で 5-6 ppm 付近に 2 つのダブルダブレットシグナル ( $J = 2.7 \text{ Hz}, 53.2 \text{ Hz}$  と  $2.7 \text{ Hz}, 58.2 \text{ Hz}$ ) が見られ、 $^{13}\text{C-NMR}$  で 100 ppm 付近にダブルレットシグナル ( $J_{\text{CF}} = 216 \text{ Hz}$ ) が見られ、*O*-フルオロメチル基を持つ既知化合物と同様のシグナルが見られた.<sup>37)</sup> そこで、 $^{19}\text{F-NMR}$  を測定するとフッ素と 2'-*O*-メチレンのプロトンのカップリングが観測され、質量スペクトルの結果から 2'-*O*-フルオロメチルウリジン誘導体 **19** が生成していることがわかった。やはり、2' 位の酸素原子からメチレン炭素への電子供与性が強く、ジスルフィドが脱離して中間体 **18** となり、オキソニウムカチオンに隣接するメチレン炭素へフッ素アニオンが付加することにより化合物 **19** が生成したと考えられた (Scheme 13).

以上より、目的とするジスルフィド化法には、反応中間体 **13**, **16** 形成後における、2' 位の置換基末端からメチルチオスルホニウムへの電子供与性が鍵となるのではないかと考え、さらに強力な電子供

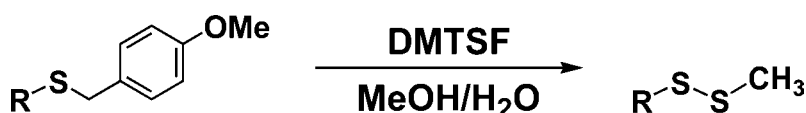


Scheme 13. Reaction of 3',5'-*O*-protected-2'-*O*-TMSETM-uridine derivative with DMTSF.

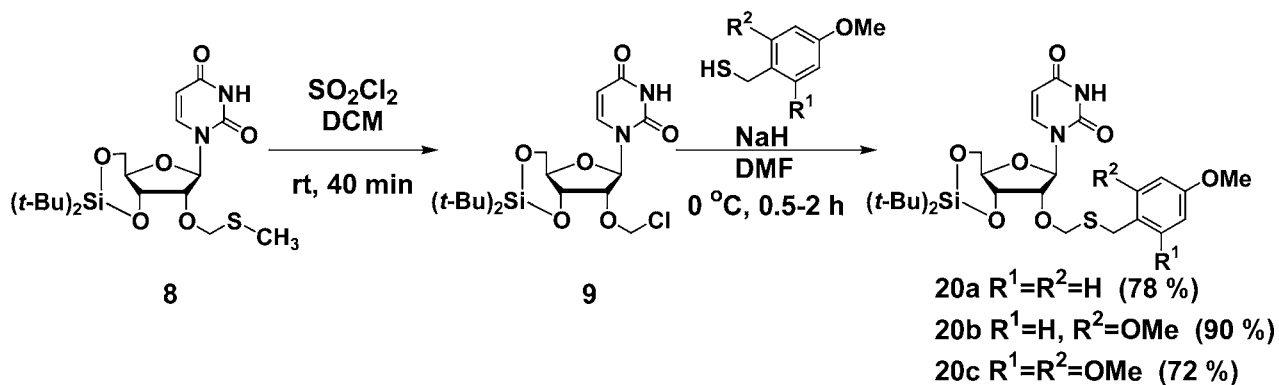
与性が期待できる置換基を用いた検討をすることにした。

筆者は、Bishop らが *p*-モノメトキシベンジルチオ基からメチルジチオ基へ変換している方法 (Scheme 14)<sup>38)</sup> を参考にできるのではないかと考え、電子供与性が強いモノメトキシベンジルチオメチル基を 2' 位水酸基へ導入後、MDTM 基への変換を試みた。まず、MDTM 化前駆体である 化合物 20a は、Scheme 11 に示した化合物 10 の場合と同様の方法で、2'-*O*-MTM 体 8 をクロロメチル化後、水素化ナトリウム存在下、4-メトキシベンジルメルカプタンを作用させ合成した (Scheme 15)。

得られた化合物 20a に DMTSF を作用させたところ、目的の 2'-*O*-MDTM-ウリジン誘導体 17 は得られず、<sup>1</sup>H-NMR、質量スペクトルから化合物 19 が生成していることがわかった (Table 1, Entry 1)。



Scheme 14. Bishop's disulfide formation from *S-p*-methoxybenzyl group.

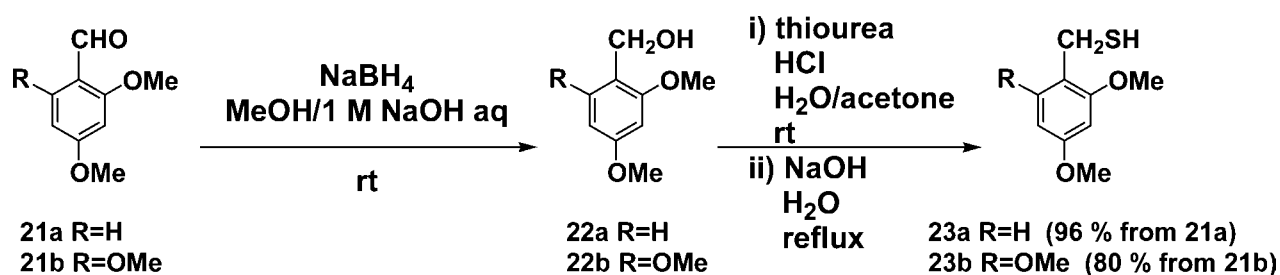


Scheme 15. Preparation of 2'-*O*-benzylthiomethyluridine derivatives.

モノメトキシ体 20a から 2'-*O*-MDTM-ウリジン誘導体は合成出来なかったが、メトキシ基を 2 つ、3 つに増やした、2'-*O*-2,4-ジメトキシベンジルチオメチルウリジン誘導体 20b、2'-*O*-2,4,6-トリメトキシベンジルチオメチル (2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl, TMBTM) ウリジン誘導体 20c を合成し、これらに DMTSF を作用させて MDTM 体 17 に変換する検討を行うことにした。化合物 20b、20c を合成する前に試薬の 2,4-ジメトキシベンジルメルカプタン 23a、2,4,6-トリメトキシベンジルメルカプタ

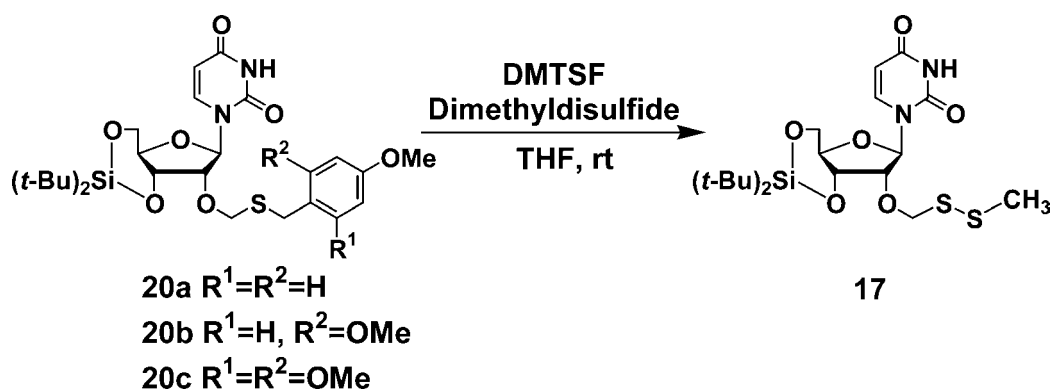


ン **23b** を対応するアルデヒド体 **21a**, **21b** から還元, チオール化し (Scheme 16),<sup>39)</sup> これらを 2'-*O*-ベンジルチオメチルウリジン誘導体 **20b**, **20c** の合成に使用した (Scheme 15).



Scheme 16. Synthesis of 2,4-di- and 2,4,6-trimethoxybenzylmercaptan.

Table 1. Conversion of 2'-*O*-benzylthiomethyluridine derivatives into 2'-*O*-MDTM-uridine derivative.<sup>a</sup>



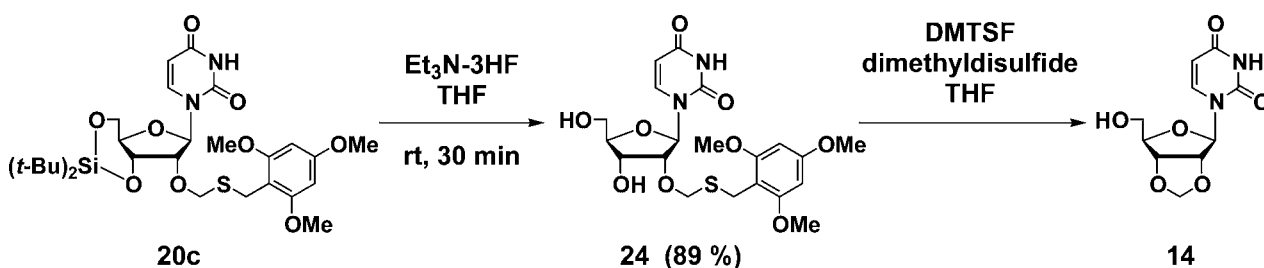
Entry	Starting material	Reagent (DMTSF) <sup>b</sup>	Reaction time (min)	Yield of <b>17</b> (%)
1	<b>20a</b>	3.0 equiv	30	0 ( <b>19</b> : 53 %)
2	<b>20b</b>	2.5 equiv	30	90
3	<b>20c</b>	2.5 equiv	30	91

<sup>a</sup> Reactions were carried out by adding DMTSF to THF solution of starting materials in the presence of dimethyldisulfide (27-28 equiv) at room temperature.

<sup>b</sup> DMTSF/THF suspension was added dropwise to reaction solution.

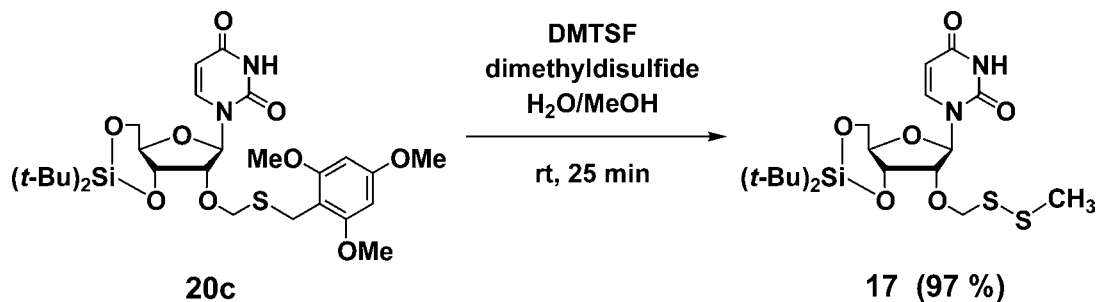
得られた化合物 **20b**, **20c** に DMTSF を作用させたところ、収率 90 %, 91 % で目的の 2'-*O*-MDTM-ウリジン誘導体 **17** を得た (Table 1). ジメトキシ体 **20b** と、トリメトキシ体 **20c** では 2'-*O*-MDTM-ウリジン誘導体の収率にほとんど差は見られなかった. 従って、本反応にはジメトキシベンジル基の電子供与性でほぼ十分であると考えられる. 一方、化合物 **20b**, **20c** に比べてモノメトキシ体 **20a** からは目的の **17** は全く得られなかったことから、MDTM 基への変換は、置換基末端からモノメトキシベンジル基よりも強力な電子供与性が必要であることが分かった.

また、化合物 **20c** を 3', 5' 位の DTBS 基を三フッ化水素トリエチルアミンで脱保護した後、このジオール体 **24** を用いて MDTM 化を行ったところ、Scheme 12 に示した TMSETM 基の時と同様、2',3'-*O*-メチレンウリジン (**14**) が生成していることが分かった (Scheme 17).



Scheme 17. Formation of 2',3'-*O*-methyleneuridine.

2'-*O*-TMBTM-ウリジン誘導体 **20c** を MDTM 化する際、溶媒に THF を用い無水条件で反応を行ったが、オリゴヌクレオチドは水溶性のため、THF 溶媒中無水条件での反応は困難であると考えられる. そこで反応溶媒を水/メタノール (1:10) に変更し、化合物 **20c** の MDTM 化を行ったところ、化合物 **17** を収率 97 % で得ることに成功し、水存在下でも TMBTM 基から MDTM 基への変換が可能であることが示唆された (Scheme 18).



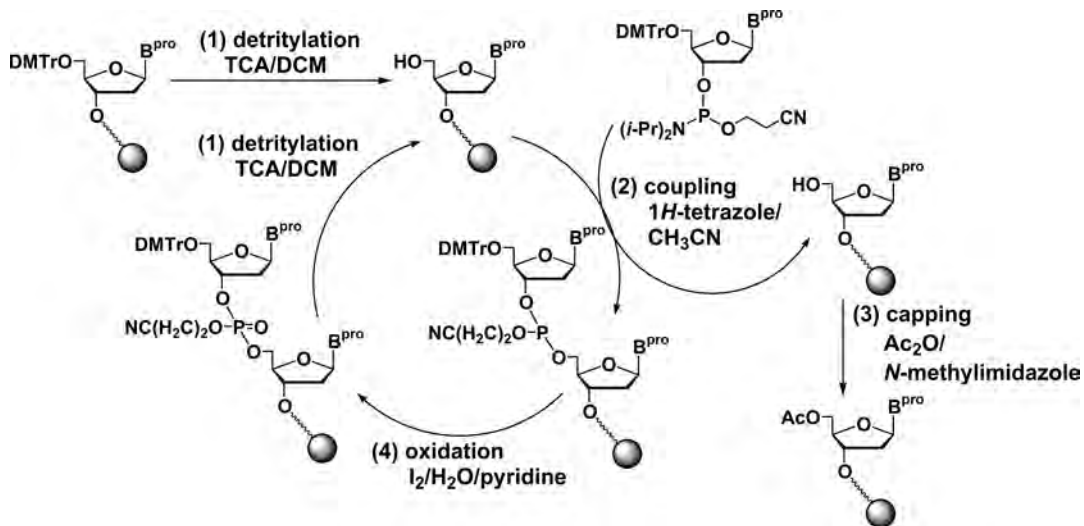
**Scheme 18.** Reaction of **20c** in H<sub>2</sub>O/MeOH.

以上に示したように、ヌクレオシドレベルで DMTSF を使用し、2'-*O*-TMBTM-ウリジン誘導体 **20c** を 2'-*O*-MDTM-ウリジン誘導体 **17** に変換することに成功した。本反応において、DMTSF を作用させた中間体の硫黄原子への電子供与性がジメトキシベンジル基以上の置換基を修飾前駆体の置換基末端に、あらかじめ組み込んでおくことで、目的の MDTM 化が効率よく進行することが示唆された。

## 第二節 2'-O-メチルジチオメチルオリゴヌクレオチドの合成とその性質

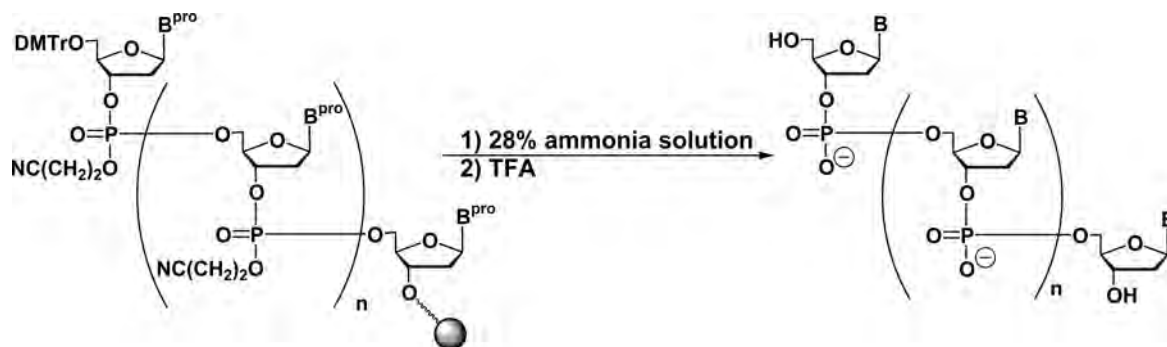
前節では、2'-O-TMBTM-ウリジン誘導体 **20c** に DMTSF を作用させ 2'-O-MDTM-ウリジン誘導体 **17** の合成に成功し、水存在下における **17** への変換にも成功した。本節では 2'-O-TMBTM-ウリジンを含むオリゴヌクレオチド (oligodeoxynucleotide, ODN) の合成と、ヌクレオシドでの実験結果に基づいたオリゴヌクレオチド合成後修飾法による 2'-O-MDTM 化の検討を行うことにした。

安定前駆体として 2'-O-TMBTM-ウリジン **24** を ODN に導入するにあたり、必要な前駆体へ変換する必要がある。一般的な ODN の化学合成法として、試薬の安定性と反応性において優れた  $\beta$ -シアノエチルアミダイト法が確立されている。<sup>40)</sup> ODN の固相合成は、Scheme 19 に示すように、(1) トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) による 4,4'-ジメトキシトリチル (DMTr) 基の脱保護 (detritylation)、(2)  $\beta$ -シアノエチルアミダイト体との縮合 (coupling)、(3) 無水酢酸による未反応 5' 末端水酸基のアセチル化 (capping)、(4) ヨウ素によるリン原子の酸化 (oxidation) の 4 工程を 1 サイクルとする。



Scheme 19. Solid phase synthesis of oligonucleotides.

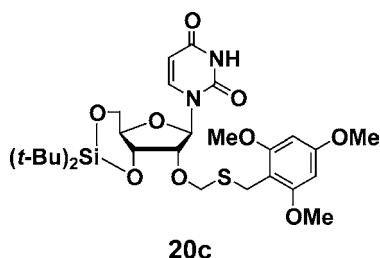
ODN 合成終了後, Scheme 20 に示したように 28% アンモニア水 (55 °C, 8 時間) で固相担体 CPG (controlled pore glass) からの ODN の切り出し, リン酸部と塩基部の脱保護と, トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid, TFA) による 5' 末端の DMTr 基の脱離が行われる. 本研究においてもこの方法を利用した ODN の合成に着手した.



Scheme 20. Removal of CPG and protecting groups.

ODN を合成するにあたり, 2'-O-TMBTM 基が合成機での反応条件および脱保護条件で安定であることが要求される. そこでまず, ヌクレオシドレベルで各条件での安定性を評価した (Table 2). まず, 脱 DMTr 化条件である, 3% TCA/ジクロロメタン (dichloromethane, DCM) 溶液中での安定性の確認を行う目的で, 化合物 **20c** に 3% TCA/DCM 溶液を加えたところ, 酸による加水分解のため, TMBTM 基が脱離した化合物 **7** が現れ, 化合物 **20c** は, 3 時間位内に消失した. ODN 合成中, 脱 DMTr 化に要する時間は 1 塩基あたり約 1 分であり, 長い ODN ほど 3% TCA/DCM 溶液との接触時間が長くなることから, TMBTM 基の分解が懸念される. そこで, TCA より酸性度が低い 3% ジクロロ酢酸 (dichloroacetic acid, DCA)/DCM 溶液<sup>41)</sup> に変更したところ, 化合物 **7** を生じるものの, 化合物 **20c** は 2 時間後でも 90% 以上安定に存在していた. よって, 脱 DMTr 化には 3% DCA/DCM 溶液を使用すれば, 2'-O-TMBTM 基を含む ODN は問題なく合成可能であることが示唆された.

Table 2. Stability of 20c.



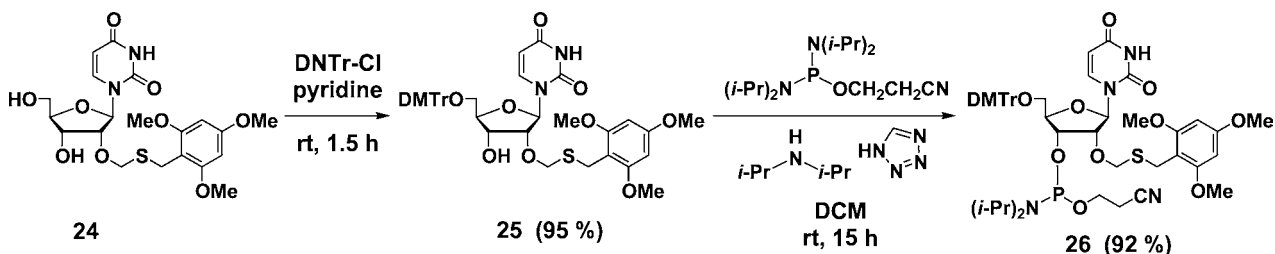
Condition	Result
3 % TCA/DCM	Cleavage into 7 (2'-OH)
3 % DCA/DCM	Stable
0.02 M Iodine	Stable
Conc. NH <sub>3</sub> /MeOH	Stable

次に、リン原子の酸化条件である 0.02 M ヨウ素-THF/ピリジン/水 (78:20:2) 溶液中での安定性を確認した。自動合成機中での 1 塩基あたりの接触時間である 30 秒程度では全く変化はなく、1 時間後の TLC でも分解する様子は見られなかった。

固相から ODN を切り出すアンモニア処理条件は、本来 28 % アンモニア水を使用するが、化合物 **20c** は水にほとんど溶解しないため、アンモニアを飽和させたメタノール中で確認した。55 °C, 8 時間処理したところ、化合物 **20c** は分解されていないことが確認できた。

以上の結果より、ヌクレオシドレベルにおいて、自動 DNA/RNA 合成機による合成の条件下、TMBTM 基の安定性に問題がないこと、そして水系溶媒で MDTM 基への変換が可能であることが確認できた。

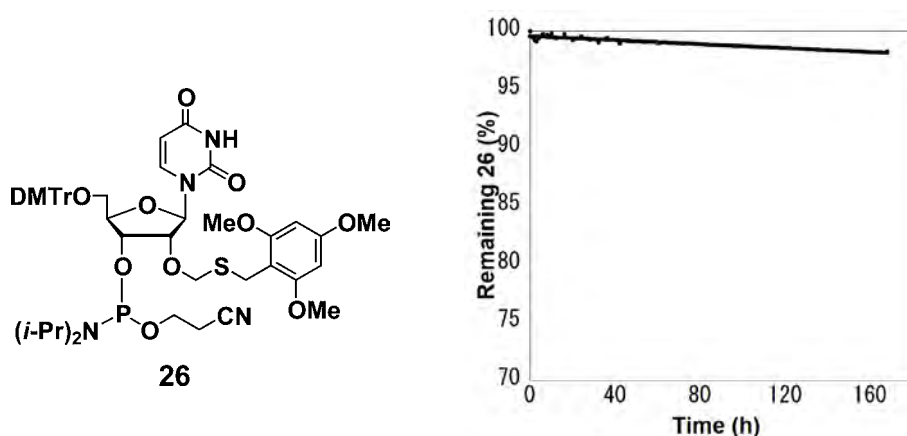
そこで、ODN への導入にあたり、オリゴヌクレオチド合成ユニットであるアミダイト体 **26** の合成を試みた。ジオール体 **24** をピリジン中、4,4'-ジメトキシトリチルクロリドを作用させ 5' 位水酸基を選択的に DMTr 化した。次に、DCM 中、2-シアノエチル-*N,N,N',N'*-テトライソプロピルホスホロジアミ



Scheme 21. Synthesis of 2'-O-TMBTM-uridine phosphoramidite derivative **26** from **24**.

ダイトとジイソプロピルアンモニウムテトラゾリドを反応させることにより, 15 時間, 92 % で, 効率よく化合物 **26** を得た (Scheme 21).

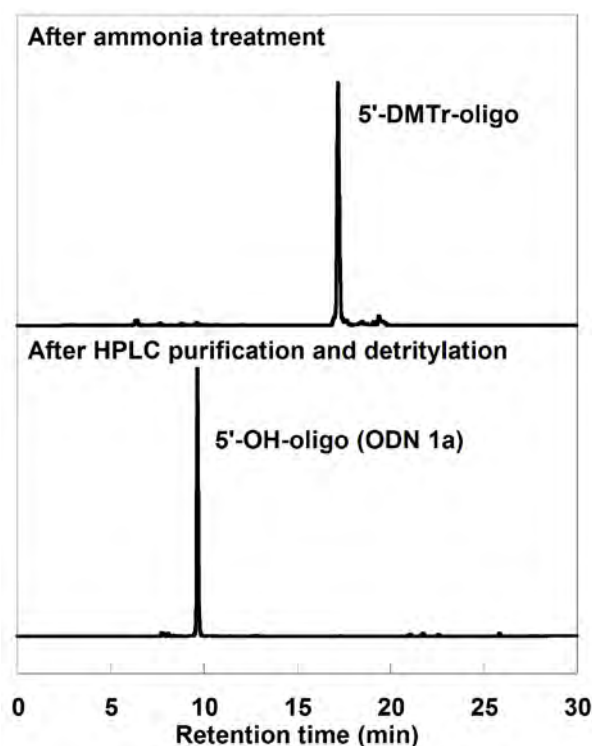
筆者はアミダイトユニット **26** をアミダイトの 3 価のリン原子とジスルフィド結合との副反応を回避する目的で設計しており, アミダイト **26** の安定性を評価することが必要であった. そこで, 自動 DNA/RNA 合成機での使用を想定して **26** の 0.1 M 無水アセトニトリル溶液の安定性を評価するため, **26** の 0.1 M アセトニトリル- $d_3$  溶液を調製後,  $^{31}\text{P}$ -NMR を経時的に測定し, 残存する **26** の割合をプロットした (Figure 6). **26** は 168 時間後 (7 日後) においても 98 % 以上も残存しており, ODN の合成に対して十分な安定性を有し, 非常に安定なアミダイトであることがわかった.



**Figure 6.** Stability of 2'-O-TMBTM-uridine phosphoramidite **26** in acetonitrile- $d_3$  (0.1 M) at 25 °C.  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra were periodically measured and the ratios of remaining phosphoramidite unit **26** were plotted.

次に, 核酸塩基の保護基を必要とせず緩和な条件下で脱保護が可能なチミジン (T)-10 mer の配列中に, 修飾前駆体である 2'-O-TMBTM-ウリジンを組み込み, 修飾 ODN の合成および精製中に問題が生じないか, さらにメチルジチオメチル化および, 還元的条件下における脱保護 (2'-OH 化) の検討を行うことにした. 2'-O-TMBTM-ウリジンアミダイト体 **26** を ODN に導入するにあたり, 縮合反応時の活性化剤として, 2' 位にかさ高い置換基を有する核酸の導入によく利用される, 5-エチルチオ-1H-テトラゾール (5-ethylthio-1H-tetrazole, ETT) を用いた.<sup>42)</sup> また, 酸化剤には 0.02 M ヨウ素を用いた. Table 3 に示すように, 2'-O-TMBTM-ウリジンを ODN の中央, 5' 末端および 3' 末端から 2 番目に 1 つ導入したもの (ODN **1a**, **2a**, **3a**), また 2 つ導入したもの (ODN **4a**) を合成した (Scheme 21).

ODN 合成後, CPG を 28 % アンモニア水 (55 °C, 2 時間) で処理し, CPG からの ODN の切り出しおよびリン酸部の 2-シアノエチル基の脱保護を行った. 逆相カラムによる HPLC 分析の結果, 天然型 DNA を合成した場合と同様に, 純度よく合成できていることが確認でき (Figure 7 上段), これを HPLC にて分取・精製した. 精製後の ODN を簡易 C18 カラム (Waters Sep-Pak plus) 上で, 2 % トリフルオロ酢酸処理により 5' 末端の DMTr 基を脱保護し, その後, 脱塩処理することで目的の ODN を得た. HPLC 測定による ODN の純度確認 (Figure 7 下段) と UV スペクトルを用いた定量を行った. 最後に, matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) MS 測定し, 理論値と実測値がより一致を示したことから, その ODN の構造を確認した (Table 3).

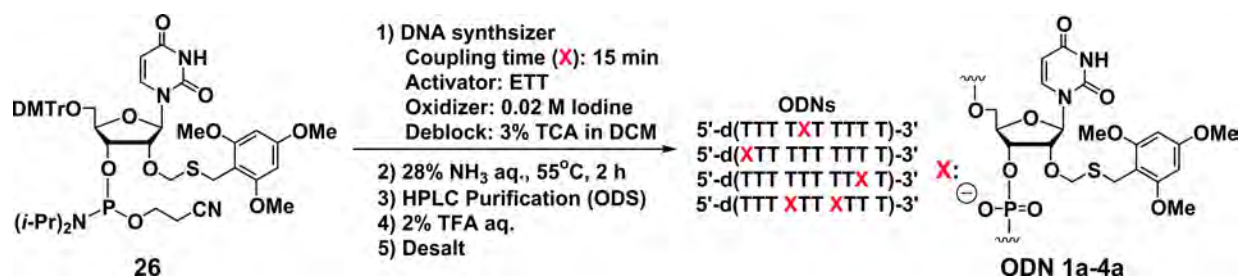


HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, Gradient: B conc.: 10-50 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), Temperature: 25 °C.

**Figure 7.** HPLC data of ODN 1a.





Scheme 22. Introduction of 2'-O-TMBTM-uridine into ODNs.

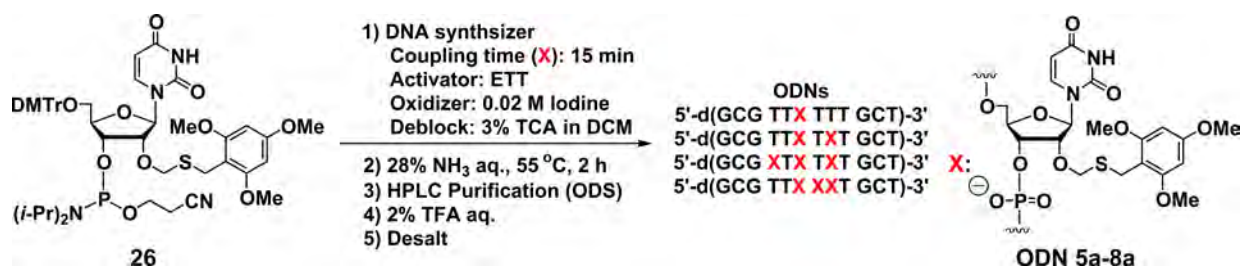
Table 3. Yields and MALDI-TOF MS analysis of 10 mer ODN 1a-4a.

ODN	Sequence	Isolated yield (%)	MALDI-TOF Mass	
			Calcd. [M - H] <sup>-</sup>	Found
ODN 1a	5'-d(TTT <b>X</b> TT TTT T)-3'	73	3207.6	3207.3
ODN 2a	5'-d( <b>X</b> TT TTT TTT T)-3'	60	3207.6	3207.3
ODN 3a	5'-d(TTT TTT TT <b>X</b> T)-3'	55	3207.6	3207.4
ODN 4a	5'-d(TTT <b>X</b> TT <b>X</b> TT T)-3'	65	3435.6	3436.0

**X**: 2'-O-[(2,4,6-trimethoxybenzyl)thiomethyl]uridine.

Table 3 に示したように、目的の各 ODN を良好な収率で合成することに成功した。この結果より、TMBTM 基は、オリゴヌクレオチド合成条件の 3% TCA/DCM および 2% トリフルオロ酢酸の酸性条件および、28% アンモニア水 (55°C, 2 時間) でも問題なく十分安定であることが示された。

続いて、他の核酸塩基を含む (G, C) 配列に化合物 26 を組み込むことが可能か検討するため、Scheme 22 と同様の方法で DNA 12 mer に 2'-O-TMBTM-ウリジンを組み込んだ (Scheme 23)。分取精製後、UV スペクトルを用いた定量を行った。最後に、各 ODN を MALDI-TOF MS 測定したところ、理論値と実測値がより一致を示したことから、その ODN の構造を確認した (Table 4)。



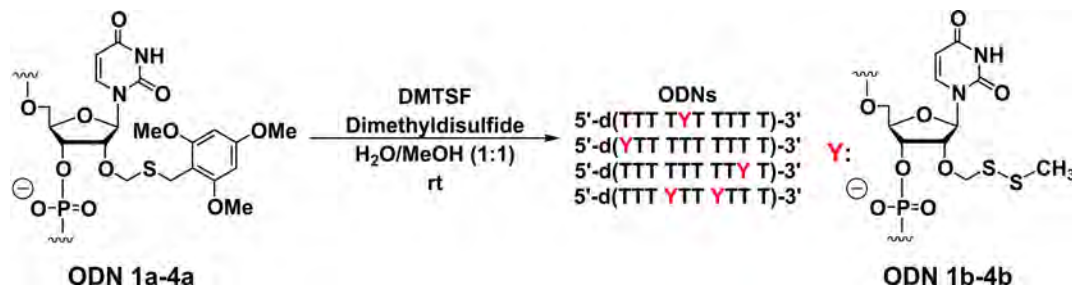
**Scheme 23.** Synthesis of 12 mer **ODN 5a-8a** bearing 2'-*O*-TMBTM-uridines.

**Table 4.** Yields and MALDI-TOF MS analysis of 12 mer **ODN 5a-8a**.

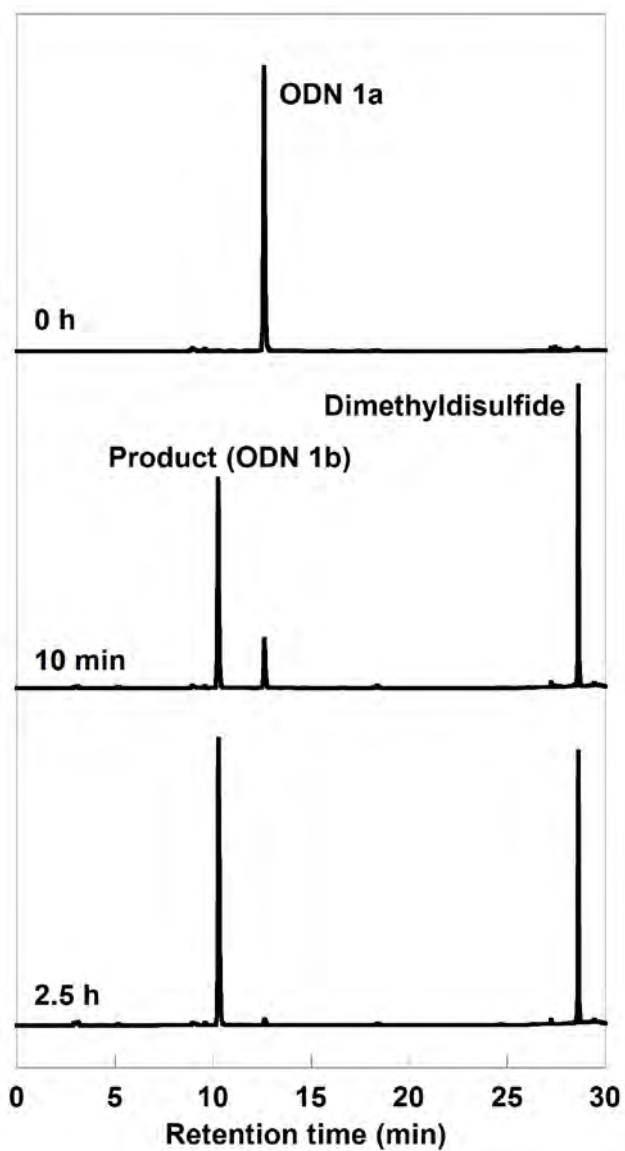
ODN	Sequence	Isolated yield (%)	MALDI-TOF Mass	
			Calcd. [M – H] <sup>-</sup>	Found
<b>ODN 5a</b>	5'-d(GCG TT(X) TTT GCT)-3'	61	3860.6	3859.1
<b>ODN 6a</b>	5'-d(GCG TT(X) TXT GCT)-3'	60	4088.9	4090.0
<b>ODN 7a</b>	5'-d(GCG X(TX) TXT GCT)-3'	58	4317.2	4316.4
<b>ODN 8a</b>	5'-d(GCG TT(X) XXT GCT)-3'	57	4317.2	4314.4

**X:** 2'-*O*-[(2,4,6-trimethoxybenzyl)thiomethyl]uridine.

筆者は前節で、含水条件下におけるヌクレオシドレベルで 2'-*O*-TMBTM-ウリジン誘導体 **20c** から 2'-*O*-MDTM-ウリジン誘導体 **17** への合成に成功したが (Scheme 18), 3'-位にリン酸ジエステル結合を有した状態での MDTM 化は確認していない。そこで筆者は、DMTSF を用いるオリゴヌクレオチド合成後修飾法によって、2'-*O*-TMBTM 基から 2'-*O*-MDTM 基へ変換可能かを試みた。



**Scheme 24.** Disulfide formation of **ODN 1b-4b**.



HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, Gradient: B conc.: 10-30 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), Temperature: 25 °C.

**Figure 8.** HPLC analysis of conversion of **ODN 1a** into **ODN 1b**. Reaction condition: 20  $\mu$ M **ODN 1a**, 6 mM DMTSF, 60 mM dimethyldisulfide in H<sub>2</sub>O/methanol (1:1).

まず、**ODN 1a** を用いて水/メタノール (1:1) 中で DMTSE, ジメチルジスルフィドを作用させ、MDTM 化を行った (Scheme 24). 反応の進行を HPLC で確認したところ、反応開始から 10 分後には原料の約 80 % が消失し、保持時間 (RT) 10 分に目的のオリゴヌクレオチドのピークが見られた (Figure 8). 反応 2.5 時間後には、この中間体と思われるピークが消失し、生成物のピークのみとなった (Figure 8). 反応終了後、HPLC にて分取・精製し、生成物の構造は MALDI-TOF MS にて解析し、理論値と実測値が一致したことからこの構造を確認した (Table 5). 同様に、5' 末端に入れた **ODN 2a**, 2 箇所に入れた **ODN 4a** も同様な方法により効率よく合成可能であった.

**Table 5.** Yields and MADI-TOF MS analysis of 10 mer **ODN 1b-4b**.

ODN	Sequence	Isolated yield (%)	MALDI-TOF Mass	
			Calcd. [M – H] <sup>-</sup>	Found
<b>ODN 1b</b>	5'-d(TTT <b>TYT</b> TTT T)-3'	30	3073.1	3072.6
<b>ODN 2b</b>	5'-d( <b>YTT</b> TTT TTT T)-3'	36	3073.1	3072.9
<b>ODN 3b</b>	5'-d(TTT TTT <b>TTY</b> T)-3'	40	3073.1	3073.4
<b>ODN 4b</b>	5'-d(TTT <b>YTT YTT</b> T)-3'	45	3167.3	3167.6

**Y:** 2'-O-Methyldithiomethyluridine.

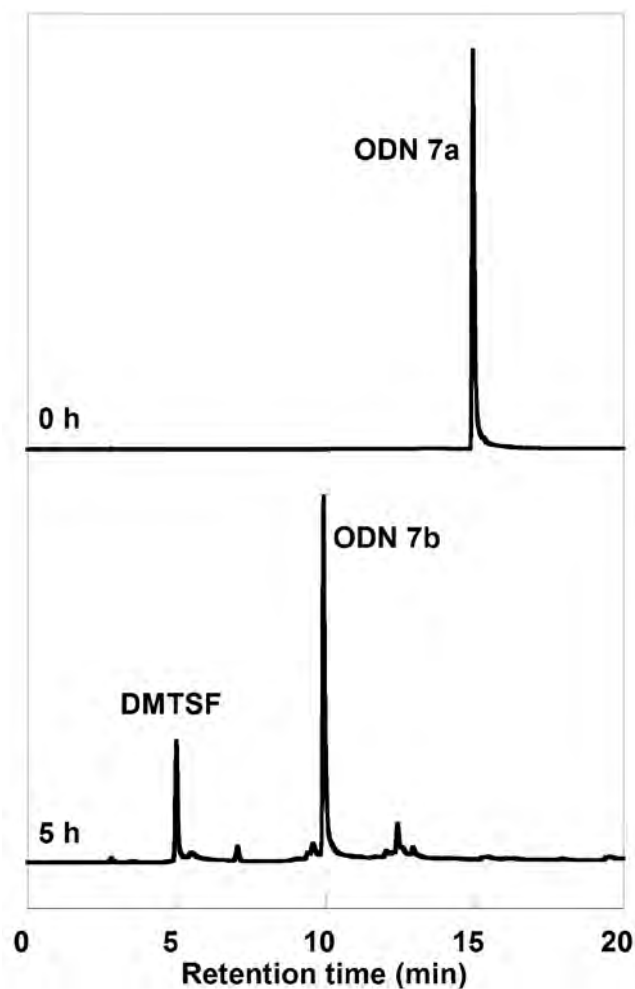
当初、オリゴヌクレオチドにはリン酸ジエステル結合を有しており、中性水溶液中で負電荷を持つため、ジスルフィド化反応時に副反応が起こるのではないかと懸念された。しかし、ODN のジスルフィド化は、副生成物を生じることなく、非常にきれいに反応が進行し目的のオリゴヌクレオチドを得ることが可能であった。

ODN 1a-4a の MDTM 化においては水/メタノール (1:1, v/v) 中, ジメチルジスルフィド存在下で反応を行ったが, 反応の再現性に問題があることが明らかになってきたため, 反応条件の最適化を行った. その結果, 200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) 中, 0.1 mM TMBTM-ODN, 30 mM DMTSF が最も良いことが明らかになった. 続いて, G, C, T 含有 12 mer ODN 5a-8a には, 本 MDTM 化条件を適用した.

まず, ODN 7a を用いて 200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) 中で DMTSF を作用させ, MDTM 化を行った (Scheme 25). 反応の進行を HPLC で確認したところ, 反応開始前 RT 14 分のピークは, 反応 5 時間までに完全に消失し, RT 12 分に目的のオリゴヌクレオチドのピークが見られた (Figure 9). 反応終了後, HPLC にて分取・精製し, 生成物の構造は MALDI-TOF MS にて解析し, 理論値と実測値が一致したことからこの構造を確認した (Table 6). 同様に, ODN 5b-6b, 8b も同様な方法により効率よく変換可能であった.



Scheme 25. Disulfide formation of ODN 5b-8b.



HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, Gradient: B conc.: 10-40 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), Temperature: 50 °C.

**Figure 9.** HPLC analysis of formation of **ODN 7b**. Reaction condition: 0.1 mM **ODN 7a**, 30 mM DMTSF in 200 mM sodium acetate buffer (pH 4), rt.

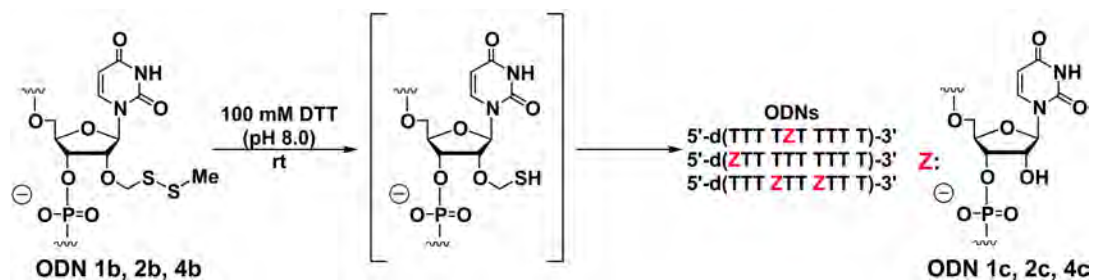
**Table 6.** Yields and MALDI-TOF MS analysis of 10 mer **ODN 5b-8b**.

ODN	Sequence	Isolated yield (%)	MALDI-TOF Mass	
			Calcd. [M – H] <sup>-</sup>	Found
<b>ODN 5b</b>	5'-d(GCG TTY TTT GCT)-3'	45	3726.5	3727.9
<b>ODN 6b</b>	5'-d(GCG TTY TYT GCT)-3'	39	3820.7	3820.2
<b>ODN 7b</b>	5'-d(GCG YTY TYT GCT)-3'	26	3914.8	3914.4
<b>ODN 8b</b>	5'-d(GCG TTY YYT GCT)-3'	25	3914.8	3914.4

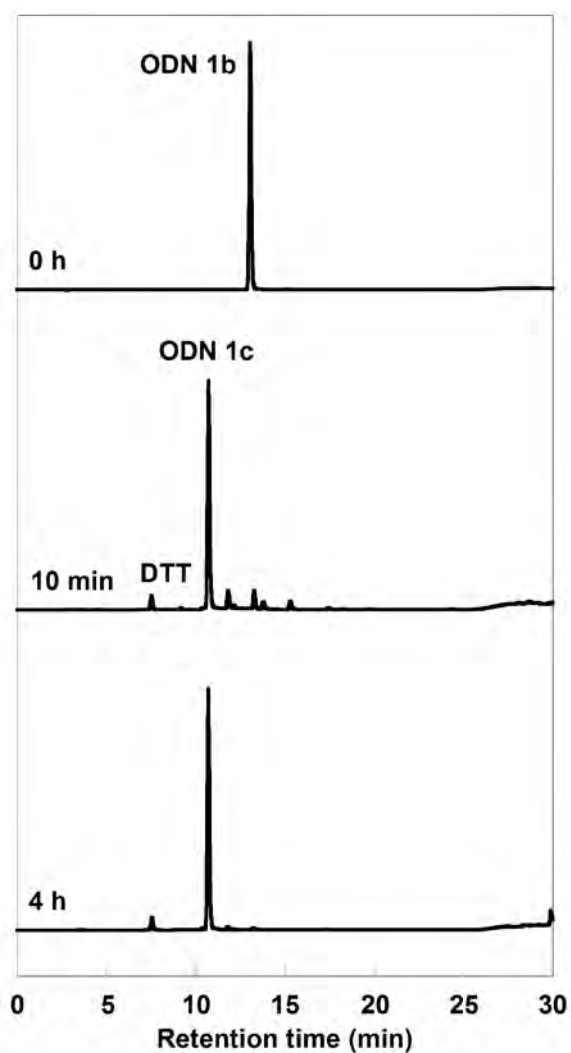
**Y:** 2'-O-Methylthiomethyluridine.

2'-O-MDTM 修飾核酸は緒論で述べたように、細胞内還元環境でジスルフィド結合が切断され、MDTM 基が核酸から除去されることにより核酸本来の活性を示すように設計している。そのため、チオール性還元条件における MDTM-ODN から 2'-OH 体へ変換を評価することが必要である。

そこで、**ODN 1b**, **2b** および **4b** に還元剤である DL-ジチオスレイトール (DL-dithiothreitol, DTT) を作用させ、2'-O-MDTM 基を 2' 水酸基に変換可能かを検討した (Scheme 26)。まず、MDTM-ウリジンを中央に 1つ導入した **ODN 1b** を用いて検討を行った。1% トリエチルアミンを添加した 100 mM 酢酸トリエチルアンモニウム (triethylammonium acetate, TEAA) 緩衝液 (pH 7) 中、ODN に 100 mM DTT を作用させ、室温にて静置し反応させた。反応開始 10 分後に HPLC で反応を確認したところ、既に、原料は完全に消失しており、チオヘミホルムアセタール体と思われるピークがわずかに見られた (Figure 10)。反応 4 時間後の分析では既にチオヘミホルムアセタール体は消失し生成物のピークのみであった (Figure 10)。反応終了後、簡易ゲル濾過カラムにて過剰の DTT を除去した。ODN の構造は MALDI-TOF MS によって解析し、2' 水酸基に変換された構造の理論値と実測値が一致を示したことから、目的の生成物が得られたことを確認した (Table 7)。また、同様に 5' 末端に入れたもの、真ん中に 2 箇所に入れたものも、DTT で処理したところ、**ODN 1b** と同様にきわめて速やかに 2' 水酸基へと変換されることがわかった。



**Scheme 26.** Reductive conversion of ODN 1b, 2b and 4b into ODNs 1c, 2c and 4c.



HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, Gradient: B conc.: 10-20 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), Temperature: 25 °C.

**Figure 10.** HPLC analysis of reductive conversion of ODN 1b into 1c. Reaction condition: 100 mM DTT with 1 % triethylamine in 100 mM TEAA buffer (pH 7).

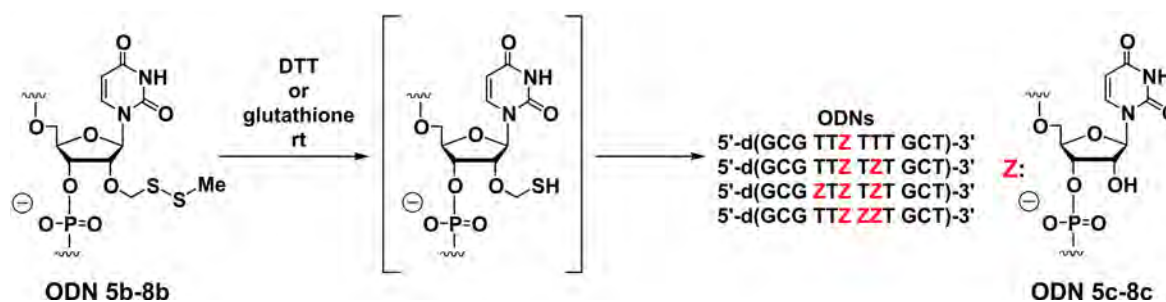


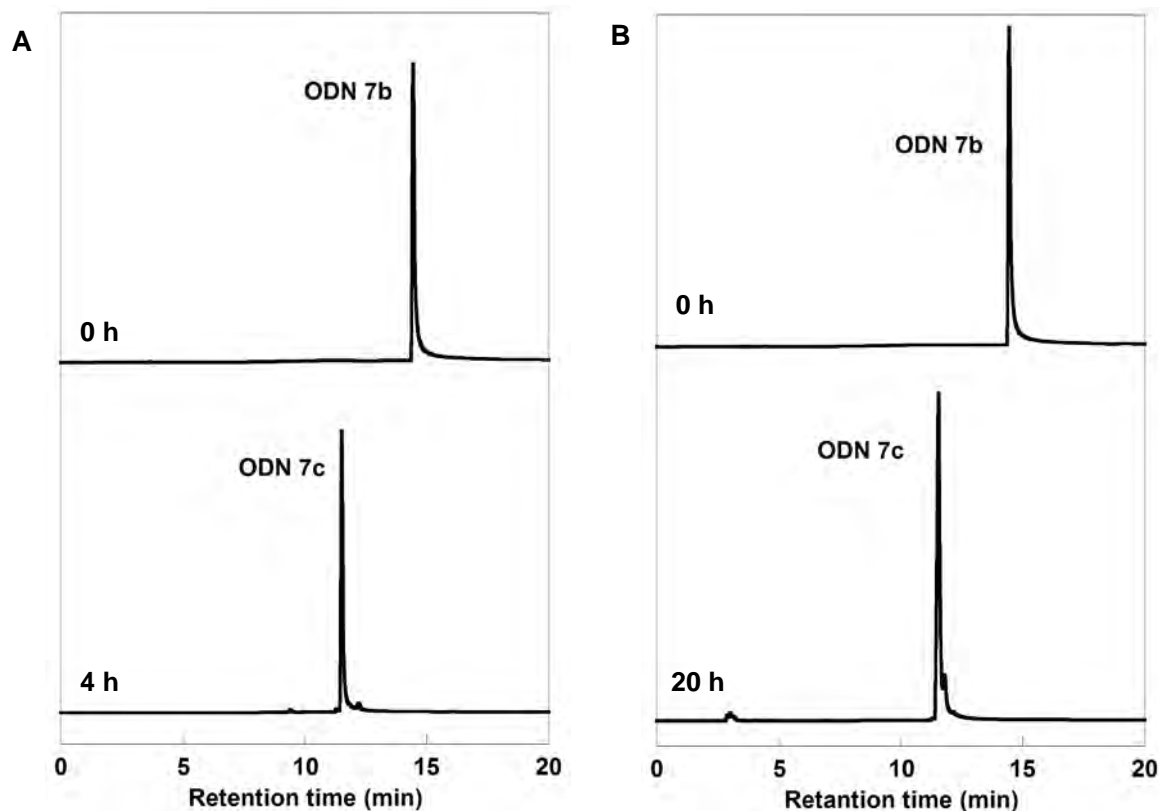
**Table 7.** Yields and MALDI-TOF MS analysis of 10 mer **ODN 1c**, **2c** and **4b**.

ODN	Sequence	Yield (%)	MALDI-TOF Mass	
			Calcd. [M – H] <sup>-</sup>	Found
<b>ODN 1c</b>	5'-d(TTT <b>TZ</b> T TTT T)-3'	28	2980.9	2981.7
<b>ODN 2c</b>	5'-d( <b>Z</b> TT TTT TTT T)-3'	83	2980.9	2979.8
<b>ODN 4c</b>	5'-d(TTT <b>Z</b> TT <b>Z</b> TT T)-3'	88	2982.9	2982.7

**Z:** 2'-OH (uridine).

次に、塩基として T, C, G を含む MDTM 体 **ODN 5b-8b** を用いて 2'-OH 体への変換反応を DTT またはグルタチオン存在下で行った (Scheme 27). 筆者が 100 mM Tris-HCl (pH 8) 中, 0.1 mM **ODN 7b** に室温で 10 mM DTT を作用させたところ, 4 時間後には RT 14 分の **ODN 7b** は RT 11 分の脱保護された 2'-OH 体 **ODN 7c** へ完全に変換された (Figure 11A). 反応液をゲル濾過カラムにて試薬等を除去し, 生成物の構造を MALDI-TOF MS で測定したところ **ODN 7c** が確認された (Table 8). 同様の条件で **ODN 5b-6b**, **8b** にも DTT を作用させたところ, 対応する 2'-OH 体を確認された (Table 8).

**Scheme 27.** Reductive conversion of **ODN 5b-8b** into **ODN 5c-8c**.



HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, Gradient: B conc.: 5-30 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), Temperature: 50 °C.

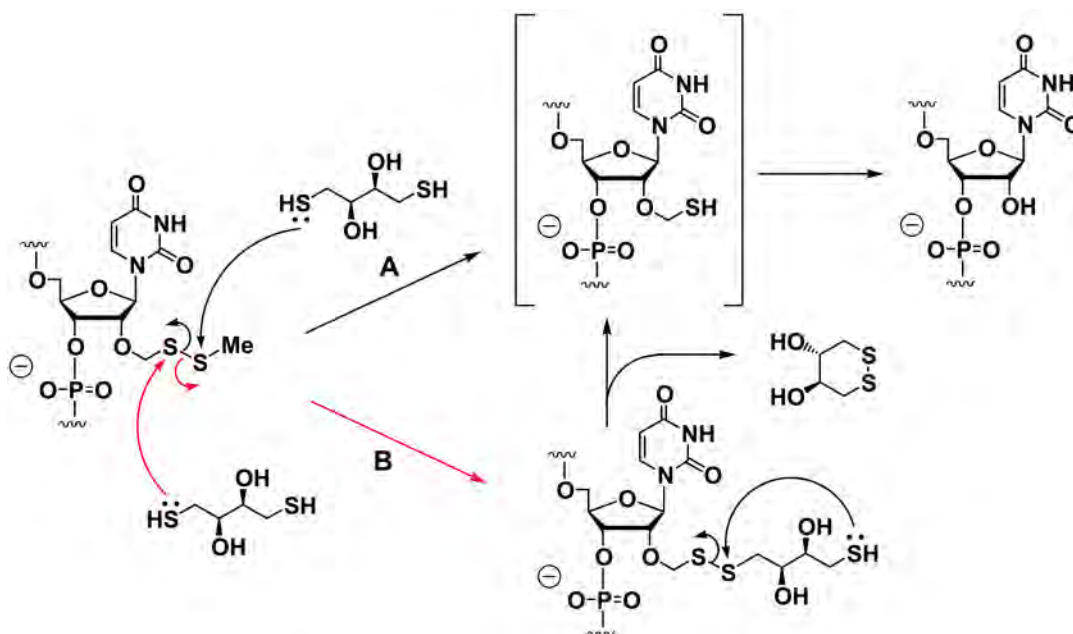
**Figure 11.** HPLC analysis of conversion of **ODN 7b** into **ODN 7c**; **A**: 0.1 mM **ODN 7b**, 10 mM DTT in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), rt, **B**: 0.1 mM **ODN 7b**, 10 mM glutathione in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), rt.

**Table 8.** Yields and MADI-TOF MS analysis of 10 mer **ODN 5c-8c**.

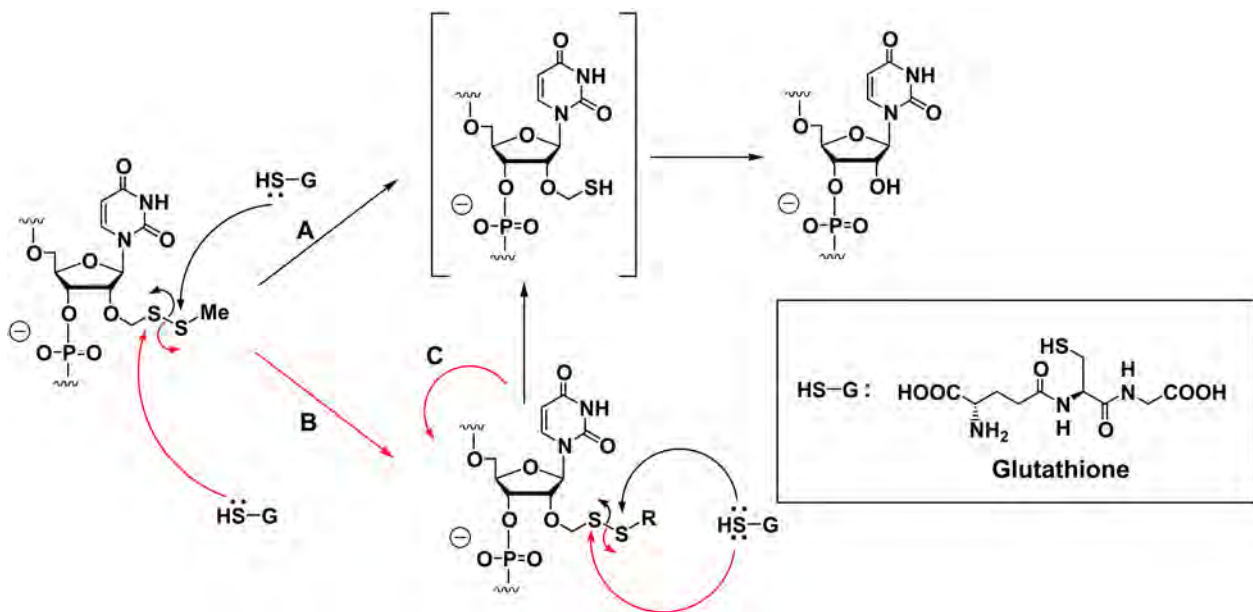
ODN	Sequence	Yield (%)		MALDI-TOF Mass	
		DTT	glutathione	Calcd. [M – H] <sup>-</sup>	Found
<b>ODN 5c</b>	5'-d(GCG TT <b>Z</b> TTT GCT)-3'	72	55	3634.3	3634.6
<b>ODN 6c</b>	5'-d(GCG TT <b>Z</b> T <b>Z</b> T GCT)-3'	73	n/a	3636.3	3636.9
<b>ODN 7c</b>	5'-d(GCG <b>Z</b> T <b>Z</b> T <b>Z</b> T GCT)-3'	64	60	3638.3	3637.1
<b>ODN 8c</b>	5'-d(GCG TT <b>Z</b> <b>Z</b> ZT GCT)-3'	77	69	3638.3	3638.6

**Z**: 2'-OH (uridine), n/a: not available.

ここまで DTT で 2'-OH 体への変換反応を行ってきたが、DTT はチオール基を 2 つ有しており、チオール基と MDTM 基のジスルフィド結合との反応機会が増加する。それだけでなく、DTT の一方のチオール基が 2'-O-MDTM 基の糖部側の硫黄を攻撃した場合、他方のフリーのチオール基が形成されたジスルフィド結合の硫黄を攻撃して 6 員環となり不安定中間体を経て 2'-OH 体へ変換され得る (Scheme 28)。一方で、グルタチオンのようにチオール基を 1 つしか持たない化合物で還元した場合、置換基末端側の硫黄を攻撃する 2 分子目のチオール基が必要であり、2 分子目のチオール基が糖部側の硫黄を攻撃し、2'-OH 体への変換の競合が懸念される (Scheme 29)。そこで、より細胞内環境に近い還元条件での変換を確認するため、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) 中、10 mM グルタチオン存在下で 2'-OH 体への変換反応を行った。ODN 7b にグルタチオンを作用させたところ、ジスルフィド結合が切断され、2'-OH 体 ODN 7c へ脱保護された (Figure 11B)。



**Scheme 28.** Reduction of 2'-O-MDTM-ODN with DTT. **A:** Direct formation of thiohemiacetal intermediate, **B:** Formation of thiohemiacetal intermediate via DTT-ODN disulfide.



**Scheme 29.** Reduction of 2'-O-MDTM-ODN with monothiol compound. **A:** Directive formation of thiohemiacetal intermediate, **B:** Formation of DTT-ODN disulfide, **C:** Thiol exchange reaction.

今回、2'-O-TMBTM-ウリジンをオリゴヌクレオチドへの導入、そして、TMBTM 基の MDTM 基への変換および、還元条件下における 2' 水酸基への変換に成功した。筆者は 2'-OH 体を良好で純度よく、副反応を生じることなく得ることに成功した。以上の結果より、MDTM-RNA は細胞内で天然型 RNA へ変換可能であることが示唆され、MDTM-siRNA による有効性が期待される。

本章で得られた結果は、2'-O-MDTM-RNA の生体内での挙動に極めて重要な知見を与えるものであり、次章では、RNA に MDTM 基を導入したプロドラッグ型 siRNA を細胞に導入し、標的遺伝子に対する遺伝子発現の抑制効果の評価を行った。

## 第二章 プロドラッグ型 RNA を利用した RNA 干渉

これまでの検討により 2'-O-MDTM 修飾核酸は、細胞内環境を模倣したグルタチオン濃度において MDTM 基の脱離が可能であり、実際に細胞内においても MDTM 基の脱保護が可能であることが考えられた。これらの結果から 2'-O-MDTM-RNA はプロドラッグ型 RNA としての応用が期待できる。そこで、核酸分解酵素や血清を用いた 2'-O-MDTM 修飾核酸の酵素耐性の評価と、firefly ルシフェラーゼ遺伝子を人工的に組み込んだヒト由来肺がん細胞 A549 細胞 (A549-Luc) に対し、恒常的に発現しているルシフェラーゼの mRNA を標的とした 2'-O-MDTM-siRNA の遺伝子発現抑制効果について評価することにした (Figure 12).

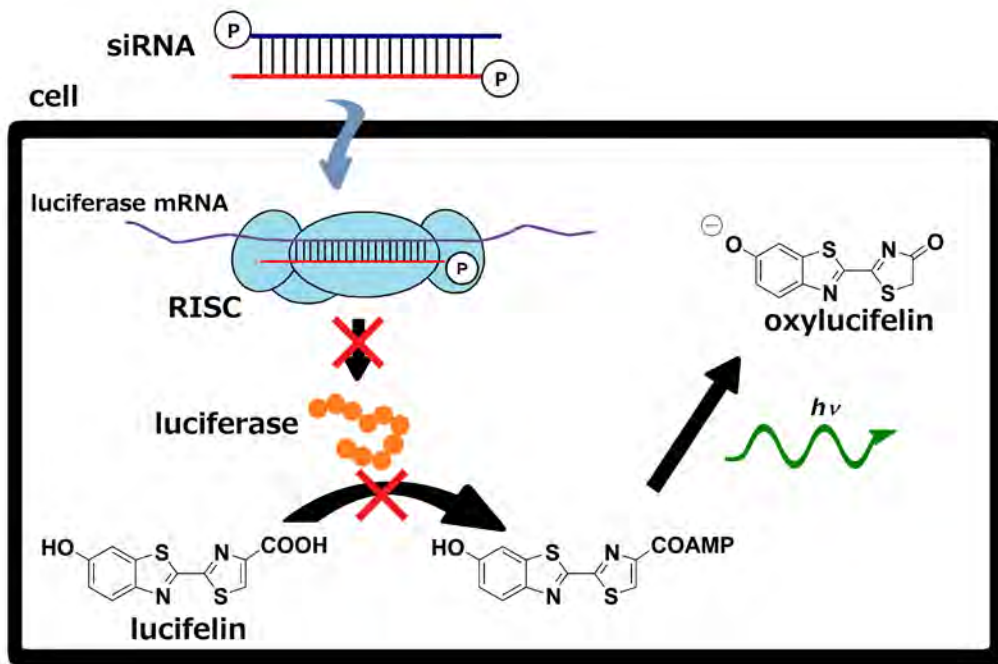
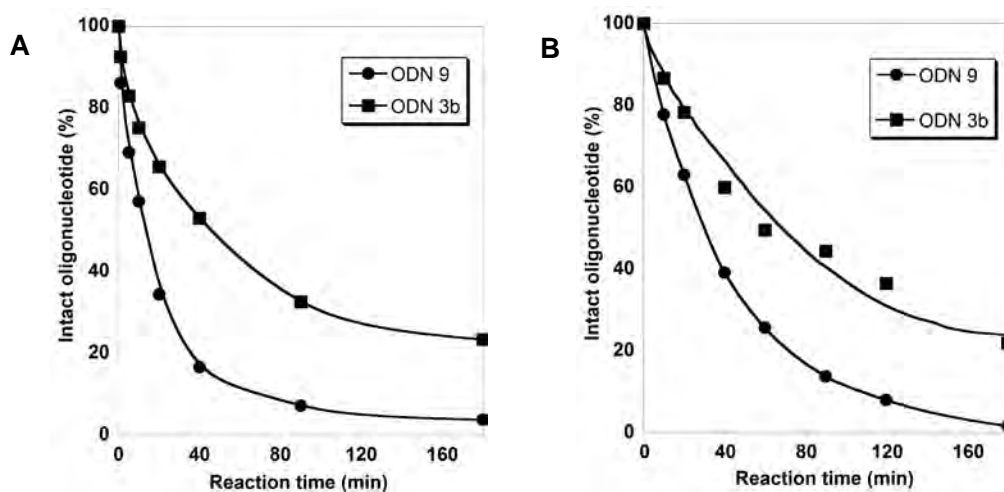


Figure 12. Chemiluminescence of luciferin by luciferase and silencing of luciferase by RNAi.

## 第一節 2'-O-メチルジチオメチル修飾核酸の酵素耐性能の評価

筆者はオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性を付与する目的で MDTM-ODN を設計しており、MDTM-ODN のヌクレアーゼに対する安定性を評価することが必要である。そこで、T-10 mer [5'-d(TTT TTT TTT T)-3', ODN 9] を対照として、前章で合成した MDTM 修飾体である ODN 3b および ODN 9 の各々に 37 °C でヌクレアーゼを作用させ、反応液を HPLC で経時的に測定し、残存する各 ODN の割合をプロットした (Figure 13)。各 ODN にヘビ毒由来ホスホジエステラーゼ (snake venom phosphodiesterase, SVPDE) を作用させたところ、ODN 9 の半減期 ( $t_{1/2}$ ) が 14 分だったのに対して、MDTM 修飾された ODN 3b は 44 分だった (Figure 13A)。5 % ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 存在下でも同様に、ODN 3b の半減期 ( $t_{1/2} = 68$  min) は ODN 9 ( $t_{1/2} = 30$  min) を大きく上回った (Figure 13B)。これらの結果から、MDTM 修飾は 3' 末端を修飾すれば 1 修飾でも半減期を 2 倍以上に延長することが可能であり、ヌクレアーゼ耐性に大きく寄与する修飾であることが示唆された。

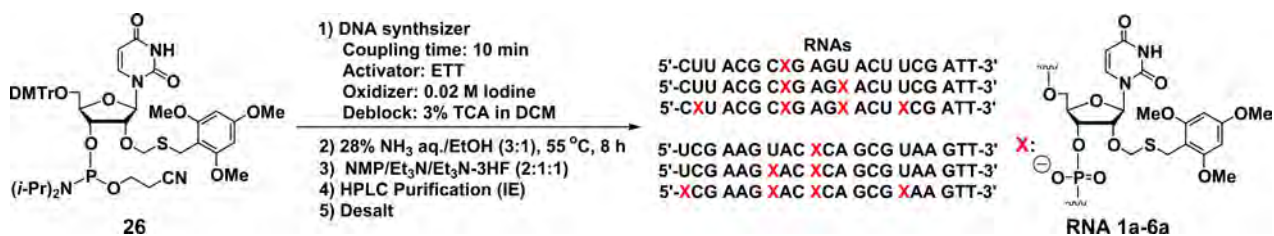


**Figure 13.** Kinetics of degradation of 2'-O-MDTM-modified 10 mer ODN 3b and T-10 mer ODN 9 with SVPDE (A) and in 5% FBS (B)

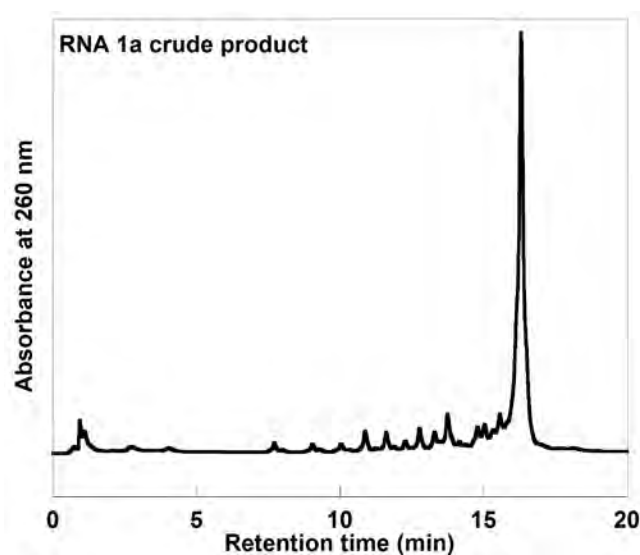
## 第二節 2'-O-メチルジチオメチル-RNA の合成

前章では、2'-O-TMBTM-ウリジンを含む DNA、および DMTSF を用いた 2'-O-MDTM-ウリジンを含む DNA の合成に成功したが、RNAi 実験には RNA が使用され、2'-O-MDTM-RNA の合成が必要である。そこで、ルシフェラーゼ pGL3 の mRNA の 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A-3' を標的配列とした siRNA を設計し、<sup>9),15)</sup> センス鎖、アンチセンス鎖、各々のウリジン残基の 1, 2, 4 箇所を修飾を施した RNA を合成することにした。

前章で 2'-O-TMBTM-ODN の合成に使用した反応条件のうち、カップリング時間を 900 秒 (15 分) から 600 秒 (10 分) に変更し、チミジン以外の天然型 RNA の残基には市販の 2'-O-tert-ブチルジメチルシリル (*tert*-butyldimethylsilyl, TBS) 基を有するアミダイトユニットを用い、自動 DNA/RNA 合成機で修飾 RNA の固相合成を行った (Scheme 30)。2'-O-TMBTM-ウリジンアミダイトユニット **26** はカップリング時間を短縮しても他のアミダイトユニットと遜色ない効率で縮合可能であった。RNA 合成後、CPG を 28 % アンモニア水/エタノール (3:1, v/v) (55 °C, 8 時間) で CPG からの RNA の切り出し、およびリン酸部と塩基部の脱保護を行った。アンモニア処理後、*N*-メチル-2-ピロリドン (*N*-methyl-2-pyrrolidone, NMP)/トリエチルアミン/トリエチルアミン・三フッ化水素で RNA の 2'-O-TBS 基を除去した。反応の進行を陰イオン交換カラムによる HPLC で分析したところ、小ピークが多数見られるものの、単一のメインピークとして得られた (Figure 14)。続いて、陰イオン交換カラムによる HPLC にて分取・精製を行った後、簡易ゲルろ過カラム (NAP-25, GE Healthcare) で脱塩処理することで目的の RNA を得た。HPLC 測定による RNA の純度確認を行ったのち、MALDI-TOF MS 測定し、理論値と実測値がより一致を示したことから、その修飾 RNA の構造を確認した (Table 9)。



**Scheme 30.** Introduction of 2'-O-TMBTM-uridine into RNAs by solid phase synthesis.



HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 10 mM NaClO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10% acetonitrile (B): 600 mM NaClO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10% acetonitrile, Gradient: B conc.: 0-90 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOGEL IEX TypeQ (4.6 × 50 mm), Temperature: 60 °C.

**Figure 14.** HPLC data of crude **RNA 1a** after treatment with NMP/Et<sub>3</sub>N/Et<sub>3</sub>N-3HF (2:1:1) at 65 °C for 3 h.



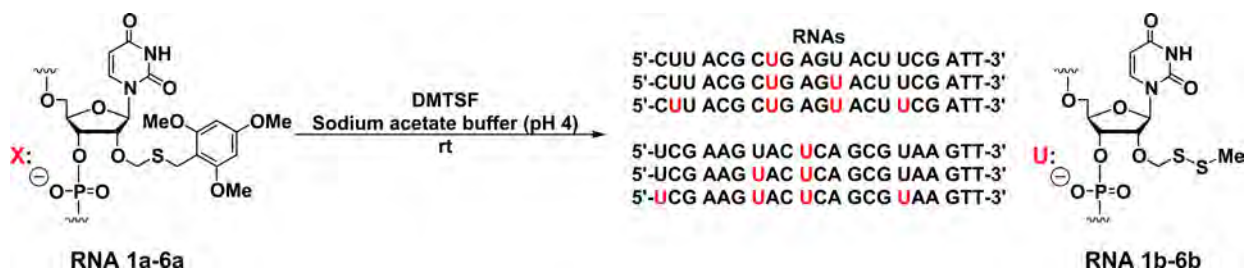
**Table 9.** Sequences of RNAs containing 2'-*O*-TMBTM-uridines and results of MALDI-TOF MS analysis<sup>a</sup>

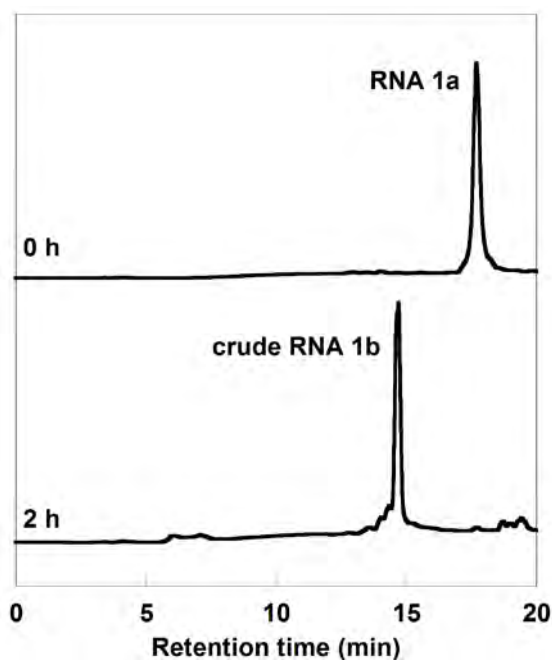
No.	Sequence (5'-3')	Isolated yield (%)	MALDI-TOF MS	
			Calcd. [M - H] <sup>-</sup>	found
<b>RNA 1a</b>	CUU ACG <b>CXG</b> AGU ACU UCG ATT	25	6832.3	6833.3
<b>RNA 2a</b>	CUU ACG <b>CXG</b> AG <b>X</b> ACU UCG ATT	27	7144.7	7144.2
<b>RNA 3a</b>	<b>CXU</b> ACG <b>CXG</b> AG <b>X</b> ACU <b>XCG</b> ATT	27	7511.1	7510.1
<b>RNA 4a</b>	UCG AAG UAC <b>XCA</b> GCG UAA GTT	36	6918.4	6917.4
<b>RNA 5a</b>	UCG AAG <b>XAC</b> <b>XCA</b> GCG UAA GTT	19	7144.7	7144.2
<b>RNA 6a</b>	<b>XCG</b> AAG <b>XAC</b> <b>XCA</b> GCG <b>XAA</b> GTT	28	7597.2	7598.6

<sup>a</sup> **X**: 2'-*O*-TMBTM-uridine

2'-*O*-TMBTM-ウリジンを含む RNA の合成に成功し、前章では 2'-*O*-TMBTM-ウリジンを含む ODN から 2'-*O*-MDTM-ウリジンを含む ODN の合成に成功している。そこで、2'-*O*-TMBTM-RNA も ODN と同様に DMTSF を用いて、siRNA に使用する 2'-*O*-MDTM-RNA への変換を行うことにした。

まず、**RNA 1a** を用いて 200 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) 中で DMTSF を作用させ、MDTM 化を行った (Scheme 31)。反応の進行を逆相 HPLC で確認したところ、反応開始前 RT 18 分のピークは、反応 2 時間までに完全に消失し、RT 15 分に目的のオリゴヌクレオチドのピークが見られた (Figure 15)。反応終了後、逆相 HPLC にて分取・精製し、生成物の構造は MALDI-TOF MS にて解析し、理論値と実測値が一致したことからこの構造を確認した (Table 10)。同様に、**RNA 2b-6b** も同様の方法により効率よく変換可能であった。

**Scheme 31.** Conversion of 2'-*O*-TMBTM-RNAs into 2'-*O*-MDTM-RNAs with DMTSF.



HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, Gradient: B conc.: 5-20 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOSIL MS-II 5C18 (4.6 × 250 mm), Temperature: 60 °C.

**Figure 15.** HPLC data of conversion of **RNA 1a** into **RNA 1b**. Reaction condition: 0.1 mM **RNA 1a**, 38.6 mM DMTSF in 200 mM sodium acetate buffer (pH 4) at rt.

**Table 10.** Sequences of RNAs containing 2'-*O*-MDTM-uridines and results of MALDI-TOF MS analysis<sup>a</sup>

RNA	Sequence (5'-3')	Isolated yield (%)	MALDI-TOF MS	
			Calcd. [M – H] <sup>-</sup>	found
<b>RNA 1b</b>	CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT	42	6698.2	6698.4
<b>RNA 2b</b>	CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT	29	6790.4	6790.3
<b>RNA 3b</b>	CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT	18	6974.8	6974.9
<b>RNA 4b</b>	UCG AAG UAC UCA GCG UAA GTT	42	6784.3	6784.4
<b>RNA 5b</b>	UCG AAG UAC UCA GCG UAA GTT	22	6876.5	6876.6
<b>RNA 6b</b>	UCG AAG UAC UCA GCG UAA GTT	13	7060.8	7060.6

<sup>a</sup> **U**: 2'-*O*-MDTM-uridine.

以上の結果から 2'-*O*-TMBTM-ウリジンを RNA に導入し, DMTSF を用いた 2'-*O*-MDTM-RNA への変換に成功した. 今回得られた 2'-*O*-MDTM-修飾核酸 **RNA 1b-6b** に天然型 RNA のセンス鎖, アンチセンス鎖を加えた 16 通りの siRNA を設計し, 細胞培養温度である 37 °C で二重鎖の保持が可能か確認するため, 各 siRNA の融解温度 (melting temperature,  $T_m$ ) を測定することにした.

### 第三節 二本鎖 2'-O-メチルジチオメチル-RNA の性質

siRNA は二重鎖状態で遺伝子発現を抑制するため、一本鎖での遺伝子抑制は困難である。さらに、血清中における RNA のヌクレアーゼ耐性は、一本鎖 RNA よりも二本鎖 RNA の方が高いと報告されている。<sup>43)</sup> そこで、前節で述べたように、合成した **RNA 1b-6b** に天然型 RNA を加えたセンス鎖 4 種類、アンチセンス鎖 4 種類、合計 16 通りの二本鎖 RNA の熱安定性を評価することにした。

核酸は二重らせん構造を形成すると塩基同士のスタッキング相互作用により淡色効果 (hypochromicity) を示し、核酸の二重らせんは温度上昇に伴い、塩基対を形成している水素結合が切断され、二重らせん構造の融解によって吸光度の増加が観測される。融解温度測定はこの現象を測定するものであり、50 % の二本鎖が一本鎖に解離する温度である  $T_m$  値は吸光度の融解曲線 (melting curve) を微分した時の極大の温度である。

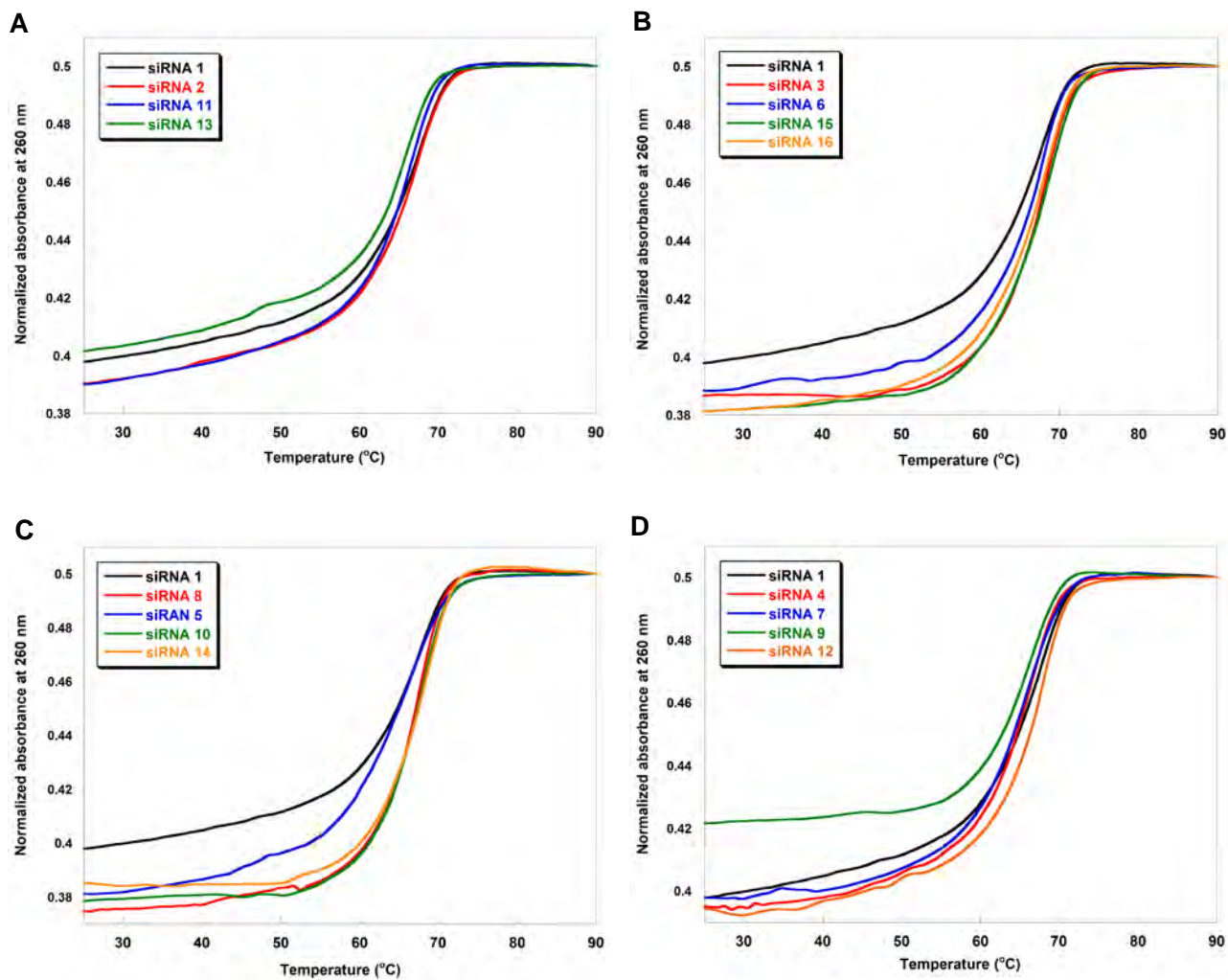
$T_m$  値の測定は、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中、100 mM 塩化ナトリウム存在下で行い、各 siRNA の  $T_m$  値、融解曲線を Table 11, Figure 16 に示した。天然型 siRNA である **siRNA 1** と比較した  $\Delta T_m$  は  $-1.8 \sim +0.6$  °C であり、修飾部位によって二重鎖安定性への寄与が異なることが明らかとなった。さらに、1 修飾あたりの  $\Delta T_m$  ( $\Delta T_m$  /modification) は、 $\pm 0.6$  °C 以内であり、2'-O-MDTM 修飾による二重鎖安定性への影響は極めて小さいと言える (Table 11)

以上の結果から、2'-O-MDTM 基は dsRNA の熱安定性に影響しない修飾であることが明らかとなった。今回使用した siRNA の  $T_m$  値は各々約 70 °C であり、ヒトの体温である 37 °C でも二本鎖を保持したまま存在できることが明らかとなった。

**Table 11.** Sequences and  $T_m$  values (°C) of natural and 2'-*O*-MDTM-modified siRNAs used in this study<sup>a</sup>

siRNA	Sense strand (5'-3') Antisense strand (3'-5')	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ / modification (°C)
siRNA 1	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	68.0	-	-
siRNA 2 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	68.6	+ 0.6	+ 0.60
siRNA 3 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.9	- 0.1	- 0.03
siRNA 4 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.2	- 0.8	- 0.13
siRNA 5 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.8	- 0.2	- 0.05
siRNA 6 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	68.2	+ 0.2	+ 0.10
siRNA 7 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.8	- 0.2	- 0.04
siRNA 8 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.0	- 1.0	- 0.17
siRNA 9 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	66.1	- 1.9	- 0.24
siRNA 10 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	68.3	+ 0.3	+ 0.10
siRNA 11 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	68.4	+ 0.4	+ 0.20
siRNA 12 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	66.2	- 1.8	- 0.45
siRNA 13 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.3	- 0.7	- 0.18
siRNA 14 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	66.8	- 1.2	- 0.60
siRNA 15 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.6	- 0.4	- 0.40
siRNA 16 <sup>b</sup>	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	66.9	- 1.1	- 0.22

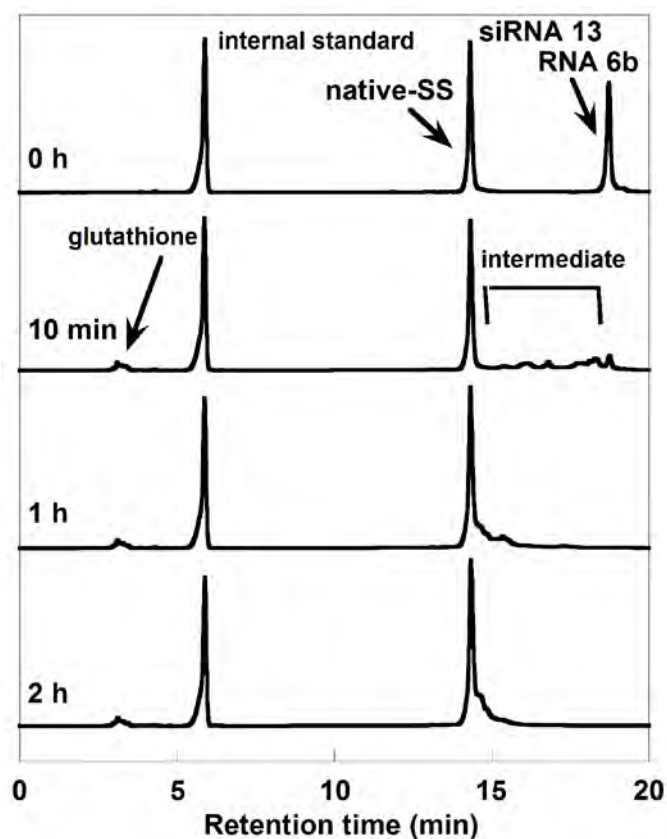
<sup>a</sup> Conditions: 1  $\mu$ M duplex in 100 mM NaCl, and 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2).<sup>b</sup> U: 2'-*O*-MDTM-uridine.



**Figure 16.** Melting curves for 16 unmodified and 2'-O-MDTM-modified dsRNAs in the anti-luciferase siRNA. **A:** Unmodified sense strand, **B:** 1 modified sense strand, **C:** 2 modified sense strand, **D:** 4 modified sense strand.

筆者は、第一章第二節において還元条件下での 2'-*O*-MDTM 基の脱保護に成功している。しかし、siRNA は二本鎖 RNA で細胞内に移行するが、二本鎖を形成することで 2'-*O*-MDTM-RNA は、グルタチオンによるジスルフィド結合の切断を受けにくくなることも予想された。そこで、二本鎖での 2'-*O*-MDTM 基の脱保護が可能か検討するため、siRNA 13 (センス鎖: 天然型, アンチセンス鎖: RNA 6b) を用い、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、37 °C で 10 mM グルタチオンを作用させた。

HPLC で反応の進行を確認すると、siRNA 13 のアンチセンス鎖である RNA 6b は反応開始 10 分



HPLC conditions:

Detection: UV 260 nm, Flow rate: 1.0 mL/min, Mobile Phase (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, Gradient: B conc.: 5-20 % (0-20 min), Column: Nacalai COSMOSIL MS-II 5C18 (4.6 × 250 mm), Temperature: 60 °C.

**Figure 17.** HPLC analysis of conversion of 2'-*O*-MDTM-siRNA (siRNA 13) into unmodified siRNA (siRNA 1) in the presence of 10 mM glutathione containing 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at 37 °C. Deoxyadenosine was contained at the concentration of 120 μM as internal standard.

後に 17% まで減少し, **RNA 6b** および中間体は反応 2 時間後までにほぼ消失した (Figure 17) (**RNA 6b** は脱保護を経て RT 14 分のセンス鎖 RNA のピークと重複した). この結果は, 2'-O-MDTM-RNA が二本鎖を保持していても, 細胞内環境でグルタチオンによる 2'-O-MDTM 基の脱保護が進行し, 天然型 siRNA (**siRNA 1**) として機能することが期待できる.

次節では, 16 通り siRNA を A549-Luc 細胞にトランスフェクションし, ルシフェラーゼ発現量を測定することで, siRNA の活性を評価することにした.

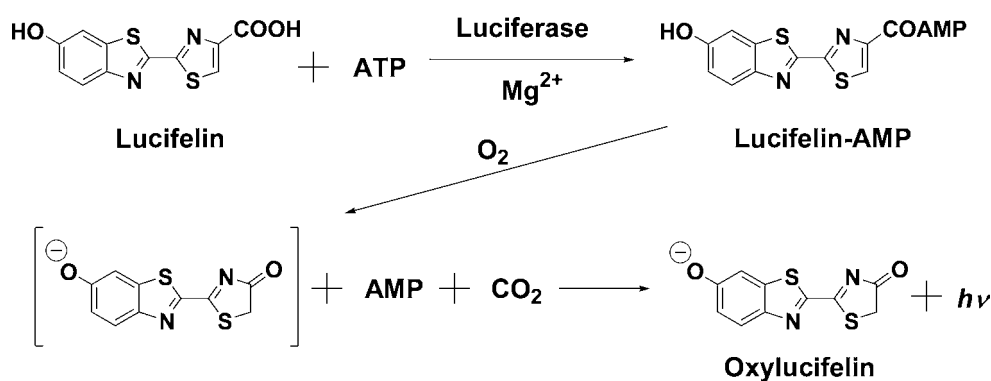


#### 第四節 Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming

##### (REDUCT)-siRNA の遺伝子抑制効果の評価

第二章第二節で 2'-O-MDTM-RNA の合成に成功した。前節では二本鎖 2'-O-MDTM-RNA の  $T_m$  値を測定し、2'-O-MDTM 基は二本鎖 RNA の熱安定性に影響しない修飾であることが確認された。筆者は、本章の冒頭で述べた firefly ルシフェラーゼ遺伝子を人工的に組み込んだヒト由来肺がん細胞 A549 細胞 (A549-Luc) を用い、抗ルシフェラーゼ siRNA 中の 2'-O-MDTM-ウリジン修飾がルシフェラーゼの発現に及ぼす影響について評価することにした。

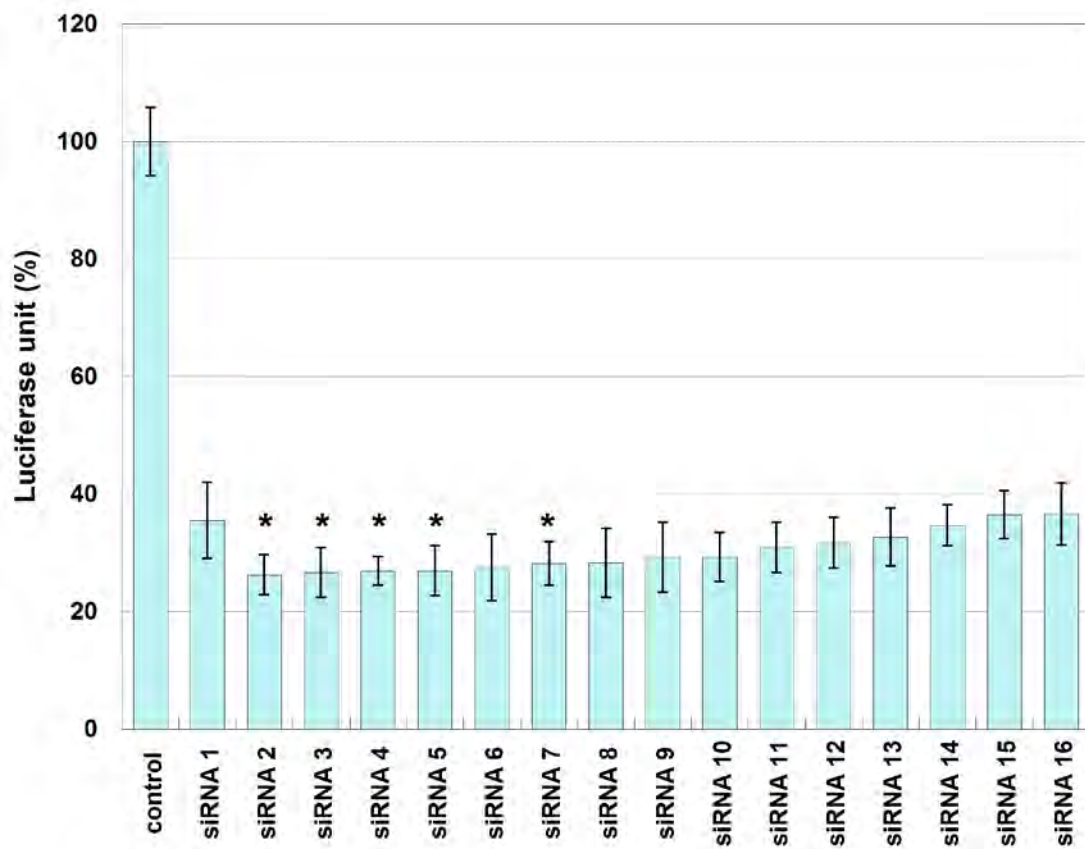
siRNA のトランスフェクション試薬に Lipofectamine 2000 (3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) を用い、4 時間かけて A549-Luc 細胞へ siRNA の導入を行った。トランスフェクション後、siRNA を含む培地を除去し、10 % ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 含有培地中で 24 時間培養した。ルシフェラーゼ活性を化学発光の測定によって評価した。化学発光強度の測定には細胞溶解液に添加された luciferin がルシフェラーゼの触媒作用によって AMP 化され、酸化後、AMP の脱離および脱炭酸され、oxylucifelin に変換される際の発光を利用した (Scheme 32)。



Scheme 32. Chemiluminescence of luciferin by luciferase.

ルシフェラーゼ mRNA に非相補的なランダム配列 (control, 5'-GACGUAAACGGCCACAAGUTT-3' と 5'-ACUUGUGGCCGUUUACGUCTT-3') を control 配列として、天然型 siRNA (siRNA 1) および 2'-O-MDTM-siRNA (siRNA 2-16) とともにルシフェラーゼの発現量を大きく減少させた (Figure 18)。さ

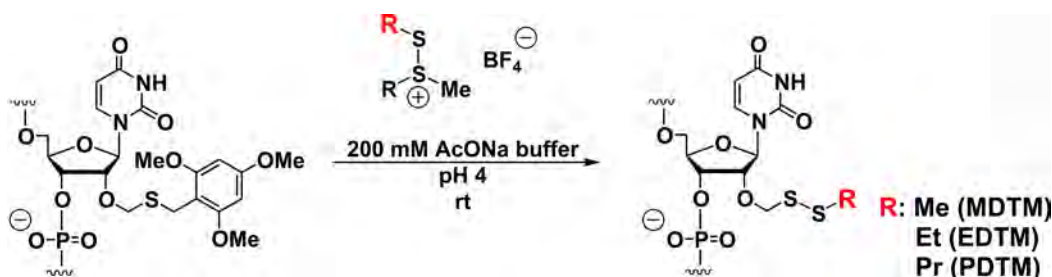
らに, siRNA 2-5, 7 の 2'-O-MDTM 修飾 siRNA は非修飾 siRNA (siRNA 1) の遺伝子抑制効果を有意に上回った (Figure 18; \*). 特に, 2'-修飾の影響を受けやすいアンチセンス鎖の 5'-末端および seed region に修飾した siRNA (siRNA 3-5, 8-9, 11, 13, 16) であっても, siRNA 1 と同等かそれ以上のルシフェラーゼ発現抑制を示した. 今回開発した 2'-O-MDTM 修飾は, 2'-O-MOE 基と同程度のかさ高さであるにもかかわらず, 天然型 siRNA と同等かそれ以上の遺伝子抑制効果を示した. この結果から, 2'-O-MDTM-siRNA はプロドラッグ型 siRNA として細胞内でも, その還元環境により天然型 siRNA へ変換されていることが強く示唆された. また 2'-O-MDTM-siRNA は修飾位置に関係なく A549-Luc 細胞のルシフェラーゼ発現を効果的に抑制した. この結果は 2'-O-MDTM 修飾は siRNA の任意の位



**Figure 18.** Effect of 2'-O-MDTM-modified siRNAs (siRNA 2-16) on luciferase activity of A549-Luc cells. The cells were transfected with siRNAs for 4 h and the luciferase activity was assessed at 24 h after transfection. The siRNAs were used 10 nM with 3  $\mu$ L/mL Lipofectamine 2000. Data are shown in mean and SD which were derived from three or more experiments. \*Statistical analyses were carried out by using Welch's *t*-test. A significant decrease was observed in A549-Luc cells receiving siRNAs 2-5 and 7 relative to siRNA1 ( $P < 0.01$ ).

置にも修飾可能であると示唆された。2'-O-MDTM 修飾核酸はヌクレアーゼ耐性と効果的な遺伝子発現抑制効果を示すことから、今後、2'-O-MDTM 修飾によって持続的に活性を示す siRNA としての有用性が期待される。

これまでにオリゴレベルでの確認実験として、オリゴヌクレオチド合成後修飾法による末端のメチル基をエチル基やプロピル基で置き換えた 2'-O-エチルジチオメチル (ethyldithiomethyl, EDTM) 基や 2'-O-プロピルジチオメチル (propyldithiomethyl, PDTM) 基への変換にも成功している (Scheme 33). 別途合成した *tert*-ブチルジチオメチル (*tert*-butyldithiomethyl, TDTM) 基も含め 2'-O-アルキルジチオメチル基の還元的脱脱離反応は、10 mM グルタチオン存在下において、末端アルキル基のかさ高さの増加に伴い反応速度の低下が確認された (Figure 19). これは末端アルキル基を変更することでアルキルジチオメチル基の還元的切断速度の制御が可能になることを示唆している。



**Scheme 33.** Conversion of 2'-O-TMBTM-ODN into 2'-O-alkyldithiomethyl-ODNs with alkylmethyl-(alkylthio)sulfonium tetrafluoroborate.

今回、筆者が開発した Reducing Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA (REDUCT RNA) である 2'-O-メチルジチオメチル (MDTM)-RNA は、2'-O-トリメトキシベンジルチオメチル (TMBTM) 基を有する安定なアミダイトユニット **26** をオリゴヌクレオチドに導入し、オリゴヌクレオチド合成後修飾法によって、容易に合成が可能であった。2'-O-MDTM 基を有するオリゴヌクレオチドは天然型オリゴヌクレオチドと比較して高いヌクレアーゼ耐性を示し、2'-O-MDTM-RNA は二本鎖形成状態でも細胞内還元環境で脱保護が可能で、2'-O-MDTM 修飾した siRNA は天然型 siRNA と比較して同等以上の遺伝子発現抑制効果を示した。2'-O-MDTM 修飾核酸はヌクレアーゼ耐

性と生物学的活性の向上の両立が可能で、プロドラッグ型核酸分子として機能することが明らかとなった。現在、ウリジン以外にもアデノシン誘導体、シチジン誘導体、グアノシン誘導体についてもアミダイトユニットの合成法も確立しており、今後、多様な配列にアルキルジチオメチル基を導入することでプロドラッグ型核酸の機能拡張が期待される。

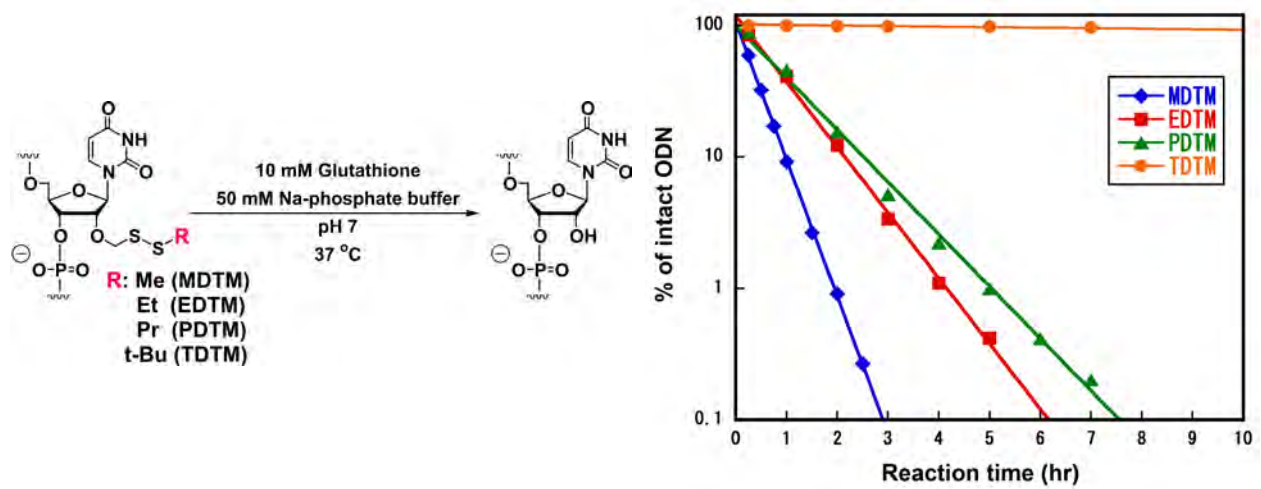


Figure 19. Deprotection of 2'-O-alkyldithiomethyl groups by glutathione.

## 結語

ウリジンを出発物質とし、2' 位水酸基にメチルチオメチル基を導入後、ジスルフィド化前駆体である 2'-*O*-トリメトキシベンジルチオメチル (TMBTM) ウリジン誘導体 **20c** を合成し、オリゴヌクレオチド合成ユニットであるアミダイト体 **26** へ誘導した。26 をオリゴヌクレオチド (ODN) に組み込んだ ODN **1a-8a** を効率良く合成することに成功した。

2'-*O*-TMBTM-ウリジン誘導体 **20c** から 2'-*O*-メチルジチオメチルウリジン (MDTM) 誘導体 **17** への変換反応をふまえ、2'-*O*-TMBTM 基を含む ODN に DMTSF を作用させることで、副反応を生じることなく極めてすみやかに MDTM 化することに成功した (ODN **1b-8b**)。DTT を用いた還元条件下において 2'-*O*-MDTM 基を容易に脱保護可能なことが確認でき (ODN **1c-2c, 4c-8c**)、さらに細胞内グルタチオン濃度でも脱保護可能なことが明らかになった (ODN **5c-8c**)。

SVPDE 存在下および、FBS 中での 2'-*O*-MDTM-ODN の半減期は、天然型 DNA の半減期よりも 2 倍以上長く、2'-*O*-MDTM 修飾はヌクレアーゼ耐性に大きく寄与することが明らかにされた。

2'-*O*-TMBTM-RNA は合成可能かつ、2'-*O*-MDTM-RNA への変換が可能であることが明らかにされた。2'-*O*-MDTM 基が二本鎖の安定性に与える影響は極めて小さく、さらに、二本鎖を形成した状態でも 2'-*O*-MDTM 基はグルタチオンによって容易に除去された。

A549-Luc のルシフェラーゼ発現量は天然型 siRNA および 2'-*O*-MDTM-siRNA によって効果的に抑制され、2'-*O*-MDTM-siRNA は天然型と同等以上の遺伝子抑制効果を示した。さらに、アンチセンス鎖の seed region に 2'-*O*-MDTM 基を導入した場合でも siRNA 活性を低下させることなく遺伝子抑制効果を示した。これらの結果から、2'-*O*-MDTM 基は細胞内での脱離によって修飾位置に制約されない新規の修飾であると示唆された。

## 謝辞

本研究の遂行並びに論文作成にあたり、直接指導を賜りました大阪薬科大学 浦田秀仁 教授に深謝致します。

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻下さいました大阪薬科大学 和田俊一 准教授および中川治 助手 (現: 大阪大学大学院薬学研究科 特任講師) に深く感謝致します。

NMR 測定していただきました大阪薬科大学 箕浦克彦 准教授, MS スペクトルを測定していただきました大阪薬科大学 藤嶽美穂代 講師に感謝致します。

A549-Luc (JCRB1414) を御供与いただきました独立行政法人 医薬基盤研究所に御礼申し上げます。

本研究に御助力下さいました坂口勝則氏, 清水純一氏, 今井美恵子氏, 谷崎彩奈氏, 森田康之氏, 伊藤秀剛氏ならびに機能分子創製化学研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

## 実験の部

無水条件反応は、アルゴンガス気流下、反応溶媒にナカライテスク社製モレキュラーシーブス 4A 1/6 で乾燥させた特級溶媒を使用した。アミダイト体合成に使用した亜リン酸化剤は、和光純薬工業 2-シアノエチル-*N,N,N',N'*-テトライソプロピルアミノホスホロジアミダイトを使用した。薄層クロマトグラフィーは、Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> を使用し、カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは、和光純薬工業 Wakosil C-200 (64-210 μm)、あるいは、Wakogel C-400HG (20-40 μm) を使用した。Wakogel C-400HG を使用する場合は、フラッシュカラムクロマトグラフィーで精製した。NMR スペクトルは、Varian UNITY INOVA-500, Varian Mercury-300, Agilent NMR System 600-DD2 もしくは、Agilent 400-MR-DD2 を用い、測定溶媒にクロロホルム-*d*<sub>1</sub> (Merck), DMSO-*d*<sub>6</sub> (Merck), メタノール-*d*<sub>4</sub> (ISOTEC), アセトニトリル-*d*<sub>3</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を使用し、<sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C-NMR スペクトル測定ではテトラメチルシランを内部標準とし、<sup>31</sup>P-NMR スペクトルでは 85 % リン酸 (0 ppm), <sup>19</sup>F-NMR スペクトル測定ではトリフルオロ酢酸 (-76.55 ppm) を外部標準とし、ケミカルシフトは δ (ppm) 値で示した。シグナルの多重線の表示は s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = double doublet, m = multiplet, br = broad を用いた。MS スペクトルは、JOEL JMS-700 を使用し、電子衝撃イオン化 (EI) 法または高速原子衝撃 (FAB) 法により測定し、FAB 法のマトリックスには *m*-ニトロベジルアルコール (NBA) またはトリエタノールアミン (TEOA) を用いた。

オリゴヌクレオチド合成のカップリング試薬には 0.25 M 5-エチルチオ-1*H*-テトラゾール (ETT)/アセトニトリル溶液 (Glen Research), アミダイト体の溶解剤には無水アセトニトリル (Glen Research), 非修飾アミダイト体およびチミジン-CPG は Glen Research 社製を使用した。オリゴヌクレオチドの合成は、Model 392 DNA/RNA synthesizer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) により行った。高速液体クロマトグラフィーは、LC-10A, LC-20A (島津製作所) を使用し、逆相カラムである COSMOSIL 5C18 MS-II φ 4.6 × 250 mm (Nacalai tesque) を使用し、μ-Bondasphere φ 3.9 × 250 mm (Waters) で分析、COSMOSIL 5C18 MS-II φ 10.0 × 250 mm (Nacalai tesque) で分取精製した。また、陰イオン交換カラム

には COSMOGEL IEX TypeQ  $\phi$  4.6×50 mm (Nacalai tesque) を使用した。オリゴヌクレオチドの脱トリチル化には、Sep-Pak Plus (C18) (Waters) を、脱塩操作には NAP-25 (GE Healthcare) を用いた。MALDI-TOF MS は、Voyager-DE STR (Perkin-Elmer Applied Biosystem) を用い、マトリックスに 500 mM 2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノン・一水和物/エタノール : 100 mM クエン酸水素二アンモニウム (2:1, v/v) を使用し、ネガティブ・リニアモードで測定した。UV スペクトルは BioSpec-mini (島津製作所) および JASCO V-560, JASCO V-660 (日本分光) で測定した。

細胞の観察に倒立型顕微鏡 OLYMPUS CK30, 培地には RPMI 1640, DMEM (High Glucose) (Nacalai tesque), 細胞剥離試薬には 0.25 % トリプシン/1 mM EDTA (Nacalai tesque), 細胞洗浄液にリン酸緩衝生理食塩水 (10×) (超純水で 10 倍希釈し、オートクレーブ滅菌してから使用, Phosphate buffer saline, PBS, Nacalai tesque) を用いた。トランスフェクション試薬には Lipofectamine 2000 (1 mg/mL, invitrogen, Life Technologies), 細胞溶解液に Reporter Lysis 5× Buffer (超純水で 5 倍希釈してから使用, Promega), タンパク質発色試薬に Pierce Protein Assay Reagent A および B (Thermo Scientific), ルシフェラーゼ発光基質に Luciferase Assay Reagent (Promega) を用いた。細胞培養は CO<sub>2</sub> インキュベーター BNS-110 (ESPEC) で行い、遠心機に KUBOTA 2410 および Cetrifuge 5415 R (eppendorf) を用いた。ルミノメーターに TriStar LB941 (Berthold Technologies), マイクロプレートリーダーに BIO-RAD Model 680 microplate reader を用いた。



## 第一章第一節の実験

### 3',5'-*O*-Di-*tert*-butylsilanediyl-2'-*O*-methylthiomethyluridine (8)

無水条件下, 100 °C, 8 時間減圧乾燥させたウリジン (4.89 g, 20 mmol) の DMF (40 mL) 懸濁液に氷冷攪拌下, di-*tert*-butylsilyl ditriflate (7.18 mL, 22 mmol, 1.1 当量) を滴下し 1 時間反応させた. 原料消失を確認した後, メタノールで反応を停止し, トリエチルアミン (7.0 mL, 50 mmol) で反応液を中和した. 中和後, 酢酸エチルで希釈, 抽出し, 飽和重曹水, 蒸留水, 飽和食塩水で洗浄した後, 有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣を DMSO (62 mL, 0.88 mol, 44 当量) で溶解し, 無水酢酸 (41 mL, 0.39 mol, 19 当量), 酢酸 (63 mL, 1.11 mol, 55 当量) を加え攪拌し, 室温で 24 時間反応させた. 反応終了後, 酢酸を留去し, 酢酸エチルで希釈, 抽出し, 飽和重曹水, 水, 飽和食塩水で洗浄した. 有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakosil C-200, 180 g) に付し, 70-90 % クロロホルム/ヘキサンで **8** (6.62 g, 74 %) を溶出し白色粉末として得た.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.02 (9H, s, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 1.06 (9H, s, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 2.19 (3H, s, SCH<sub>3</sub>), 3.94-4.02 (2H, m, H-4', 5'), 4.09-4.18 (1H, m, H-3'), 4.48-4.53 (2H, m, H-2', 5'), 4.93 (1H, d, *J* = 11.6 Hz, OCH<sub>2</sub>S), 4.98 (1H, d, *J* = 11.6 Hz, OCH<sub>2</sub>S), 5.74 (1H, s, H-1'), 5.77 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 7.27 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-6), 8.58 (1H, br s, 3-NH). <sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 13.5, 20.5, 23.0, 27.3, 27.5, 67.6, 74.8, 75.1, 76.4, 76.9, 91.5, 102.8, 139.5, 150.1, 163.7. HR-FAB-MS (NBA) *m/z*: 445.1828 (Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>SSi [M + H]<sup>+</sup>: 445.1828).

### 3',5'-*O*-Di-*tert*-butylsilanediyl-2'-*O*-[2-(trimethylsilyl)ethylthiomethyl]uridine (10)

無水条件下, 五酸化リン存在下減圧乾燥させた **8** (445 mg, 1.0 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に 1 M 塩化スルフリル (89.1 μL, 1.1 mmol, 1.1 当量) /ジクロロメタン (1 mL) 溶液を滴下し, 1.5 時間反応させた. 反応終了後, 溶媒等を減圧留去し **9** を得た. 水素化ナトリウム (62 mg, 1.6 mmol, 1.6

当量) の DMF (5mL) 懸濁液に、氷冷攪拌下、2-(trimethylsilyl)ethanethiol (316  $\mu$ L, 2.0 mmol, 2.0 当量) を加えた。30 分後、**9** の DMF (5mL) 溶液を加え 25 分間反応させた。反応終了後、酢酸エチルで希釈、抽出し、0.5 M リン酸二水素カリウムと飽和食塩水で洗浄した。有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 13 g) に付し、40-60 % クロロホルム/ヘキサンで **10** (373 mg, 70 %) を溶出し、白色粉末として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.03 (9H, s,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.84-0.96 (2H, m,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.02 (9H, s, *t*-Bu- $\text{CH}_3$ ), 1.06 (9H, s, *t*-Bu- $\text{CH}_3$ ), 2.64-2.75 (2H, m,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.96-4.01 (2H, m, H-4', 5'), 4.09-4.14 (1H, m, H-3'), 4.47-4.52 (2H, m, H-2', 5'), 5.04 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 4.95 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.72 (1H, s, H-1'), 5.75 (1H, dd,  $J = 2.4$  Hz, 8.1 Hz, H-5), 7.23 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-6), 8.26 (1H, br s, 3-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -1.8, 17.1, 20.3, 22.7, 25.9, 27.0, 27.3, 67.3, 72.7, 74.8, 76.2, 76.7, 91.3, 102.5, 139.5, 149.5, 163.1. HR-FAB-MS (TEOA + NaCl)  $m/z$ : 553.2198 (Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6\text{SSi}_2\text{Na}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ : 553.2200).

### 2'-O-[2-(Trimethylsilyl)ethylthiomethyl]uridine (**11**)

無水条件下、**10** (451 mg, 0.85 mmol) の THF (2.5mL) 溶液に三フッ化水素トリエチルアミン (92  $\mu$ L, 0.57 mmol, 0.67 当量) を加え室温で 30 分間反応させた。原料消失を確認した後、飽和重曹水で反応を停止した。反応終了後、酢酸エチルで希釈、抽出し、飽和重曹水、蒸留水、飽和食塩水で洗浄した後、有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 9.5 g) に付し、2-3 % メタノール/クロロホルムで **11** (329 mg, 99 %) を溶出し白色粉末として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.03 (9H, s,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.84-0.89 (2H, m,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.60-2.71 (4H, m,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2$ , 3'-OH, 5'-OH), 3.82-3.86, 3.98-4.01 (2H, m, H-5'), 4.11-4.14 (1H, m, H-4'), 4.38 (1H, dd,  $J = 4.9$  Hz, 9.6 Hz, H-3'), 4.53 (1H, t,  $J = 5.1$  Hz, H-2'), 4.87 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 4.90 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.73-5.77 (2H, m, H-5, 1'), 7.67 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-6), 8.61 (1H, br s, 3-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : -1.6, 17.6, 27.1, 61.5, 69.0, 74.0, 79.3, 85.4, 89.5, 102.6, 142.0, 150.8, 164.3. HR-FAB-MS (NBA)  $m/z$ : 391.1362 (Calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>SSi [M + H]<sup>+</sup>: 391.1359).

### 2',3'-O-Methyleneuridine (14)

無水条件下, **11** (197 mg, 0.50 mmol) の THF (10 mL) 溶液にジメチルジスルフィド (1.3 mL, 14 mmol, 29 当量) を加え攪拌し, DMTSF (246 mg, 1.3 mmol, 2.5 当量) の THF (30 mL) 懸濁液を滴下し, 室温で 2 時間反応させた. 原料消失を確認した後, 飽和重曹水で反応を停止した. 反応終了後, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 13 g) に付し, 2-3 % メタノール/クロロホルムで **15** (125 mg, 97 %) を溶出し白色粉末として得た.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 3.73-3.82 (2H, m, H-5'), 4.13-4.16 (1H, m, H-4'), 4.77-4.80 (1H, m, H-3'), 4.84-4.87 (1H, m, H-2'), 5.09 (1H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.13 (1H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.69 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5), 5.82 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-1'), 7.78 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-6). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.56-3.63 (2H, m, H-5'), 4.02 (1H, q,  $J = 4.4$  Hz, H-4'), 4.70 (1H, dd,  $J = 4.3$  Hz, 6.8 Hz, H-3'), 4.82 (1H, dd,  $J = 2.9$  Hz, 6.8 Hz, H-2'), 5.11 (3H, m, OCH<sub>2</sub>O, 5'-OH), 5.65 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 5.81 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-1'), 7.77 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 11.41 (1H, br s, 3-NH). <sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 63.1, 81.8, 85.0, 86.5, 93.6, 96.8, 102.7, 144.1, 152.0, 166.2. HR-FAB-MS (NBA)  $m/z$ : 257.0772 (Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 257.0773).

### 3',5'-O-Di-*tert*-butylsilanediyl-2'-O-fluoromethyluridine (19)

無水条件下, **10** (199 mg, 0.37 mmol) の THF (10 mL) 溶液にジメチルジスルフィド (1.3 mL, 14 mmol, 38 当量) を加え攪拌し, DMTSF (247 mg, 1.3 mmol, 3.4 当量) の THF (40 mL) 懸濁液を滴下し, 室温で 1.5 時間反応させた. 原料消失を確認した後, 飽和重曹水で反応を停止し. 反応終了後, 酢酸エチルで希釈, 抽出し, 飽和重曹水, 蒸留水, 飽和食塩水で洗浄した後, 有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 8.4 g) に付し, 80-100 % クロロホルム/ヘキサンで **19** (131 mg, 84 %) を溶出し白色粉末として得た.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.01 (9H, s, *t*-Bu-SiCH<sub>3</sub>), 1.07 (9H, s, *t*-Bu-SiCH<sub>3</sub>), 3.97-4.07 (2H, m, H-4', 5'), 4.18-4.22 (1H, m, H-3'), 4.45-4.49 (1H, dd, *J* = 4.1, 8.5 Hz, H-5'), 4.51 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, H-2'), 5.47 (1H, dd, *J* = 2.7 Hz, 53.0 Hz, FCH<sub>2</sub>), 5.51 (1H, dd, *J* = 2.7 Hz, 58.5, FCH<sub>2</sub>), 5.62 (1H, s, H-1'), 5.75 (1H, dd, *J* = 2.2 Hz, 8.0 Hz, H-5), 7.23 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 8.46 (1H, br s, 3-NH). <sup>13</sup>C-NMR (125.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.3, 22.7 (2s, *t*-Bu-CCH<sub>3</sub>), 27.0, 27.3 (2s, *t*-Bu-CCH<sub>3</sub>), 67.1 (C-5'), 74.5 (C-4'), 75.7 (C-3'), 79.3 (C-2'), 93.1 (C-1'), 102.7 (C-5), 102.9 (d, *J* = 216 Hz, FCH<sub>2</sub>), 140.8 (C-6), 149.4 (C-4). <sup>19</sup>F-NMR (564 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: -150.0 (dd, *J* = 53.2 Hz, 58.2 Hz). HR-FAB-MS (NBA) *m/z*: 417.1874 (Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>FSi [M + H]<sup>+</sup>: 417.1857).

### 3',5'-*O*-Di-*tert*-butylsilanediyl-2'-*O*-(4-methoxybenzylthiomethyl)uridine (20a)

無水条件下、五酸化リン存在下減圧乾燥させた **8** (220 mg, 0.495 mmol) のジクロロメタン (2.5 mL) 溶液に 1 M 塩化スルフリル (44.6 μL, 0.55 mmol, 1.1 当量) /ジクロロメタン (0.5 mL) 溶液を滴下し、0.5 時間反応させた。反応終了後、溶媒等を減圧留去し **3** を得た。水素化ナトリウム (36 mg, 0.90 mmol, 1.8 当量) の DMF (2.5 mL) 懸濁液に、氷冷攪拌下、4-Methoxybenzylmercaptan (138 μL, 1.0 mmol, 2.0 当量) を加えた。30 分後、**9** の DMF (1 mL) 溶液を加え 30 分間反応させた。反応終了後、酢酸エチルで希釈、抽出し、0.5 M リン酸二水素カリウム、水、飽和食塩水で洗浄した。有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 9.2 g) に付し、60-80 % クロロホルム/ヘキサンで **20a** (212 mg, 78 %) を溶出し、白色粉末として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.02, 1.06 (18H, 2s, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 3.80 (5H, m, SCH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>), 3.95-4.03 (2H, m, H-4', 5'), 4.11-4.20 (1H, m, H-3'), 4.49-4.54 (2H, m, H-2', 5'), 4.86 (2H, s, OCH<sub>2</sub>S), 5.74- 5.78 (2H, m, H-5, 1'), 6.81-6.87 (2H, m, Ar-H), 7.23-7.29 (3H, m, H-6, Ar-H), 8.51 (1H, br s, 3-NH). <sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 20.3, 22.7, 27.0, 27.3, 32.6, 55.2, 67.3, 71.2, 74.8, 76.2, 76.6, 91.0, 102.4, 113.8, 129.6, 130.3, 139.0, 149.7, 158.5, 163.3. HR-FAB-MS (TEOA + NaCl) *m/z*: 573.2061 (Calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SSiNa [M + Na]<sup>+</sup>: 573.2066).

### 2,4-Dimethoxybenzylmercaptan (23a)

2,4-ジメトキシベンズアルデヒド (**21a**) (3.34 g, 20 mmol) の 1 M 水酸化ナトリウム/メタノール (1:1) (40mL) 溶液に水素化ホウ素ナトリウム (1.16 g, 30 mmol, 1.5 当量) を加え、室温で 20 分間反応させた。反応終了後、メタノールを減圧留去し、得られた水溶液をジエチルエーテルで抽出した。有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去し、**22a** を得た。得られた残渣の水/アセトン(1:1) (40 mL) 溶液にチオ尿素 (3.11 g, 41 mmol, 2.0 当量) を加え、室温で攪拌し、5 N 塩酸 (6 mL) を滴下し、2.5 時間反応させた。反応終了後、反応液をジエチルエーテルで洗浄した。得られた水層に水酸化ナトリウム (2.44 g, 61.1 mmol) を加え攪拌し、還流下、2.5 時間反応させた。反応終了確認後、室温まで冷却し、溶液が酸性を示すまで 5 N 塩酸を加えた。pH 試験紙で酸性を確認し、酢酸エチルで抽出した。有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 81 g) に付し、20-30 % クロロホルム/ヘキサンで **23a** (3.55 g, 19.3 mmol, 96 %) を溶出し、無色油状物質として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.86 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, SH), 3.69 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, SCH<sub>2</sub>), 3.80, 3.85 (6H, 2s, OCH<sub>3</sub>), 6.40-6.45, 7.11-7.17 (3H, m, Ar-H). <sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23.4, 55.2, 55.3, 98.6, 104.1, 122.0, 129.6, 157.7, 160.0. HR-EI-MS *m/z*: 184.0559 (Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>S [M]<sup>+</sup>: 184.0558).

### 2,4,6-Trimethoxybenzylmercaptan (23b)

2,4,6-トリメトキシベンズアルデヒド (**21b**) (1.98 g, 10 mmol) の 1 M 水酸化ナトリウム/メタノール (1:1) (20mL) 溶液に水素化ホウ素ナトリウム (0.554 g, 15 mmol, 1.5 当量) を加え、室温で 2 時間反応させた。反応終了後、メタノールを減圧留去し、得られた水溶液をジエチルエーテルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去し、**22b** を得た。得られた残渣の水/アセトン(1:1) (20 mL) 溶液にチオ尿素 (1.50 g, 20 mmol, 2.0 当量) を加え、室温で攪拌し、5 N 塩酸 (3 mL) を滴下し、2 時間反応させた。反応終了後、反応液をジエチルエーテルで洗浄した。得られた水層に水酸化ナトリウム (1.30 g, 32 mmol) を加え攪拌し、還流下、2.5 時間反応させた。反応終了確認後、

室温まで冷却し、溶液が酸性を示すまで 5 N 塩酸を加えた。pH 試験紙で酸性を確認し、酢酸エチルで抽出した。有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 35 g) に付し、20-30 % クロロホルム/ヘキサンで **23b** (1.72 g, 8.0 mmol, 80 %) を溶出し、無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.95 (1H, t,  $J = 7.9$  Hz, SH), 3.73 (2H, d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 3.81 (3H, s,  $p\text{-OCH}_3$ ), 3.84 (6H, s,  $o\text{-OCH}_3$ ), 6.12 (2H, s, Ar-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 16.6, 55.3, 55.6, 90.4, 110.4, 158.0, 160.2. HR-EI-MS  $m/z$ : 214.0665 (Calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}]^+$ : 214.0664).

### **3',5'-O-Di-tert-butylsilanediyl-2'-O-(2,4-dimethoxybenzylthiomethyl)uridine (20b)**

無水条件下、**8** (888 mg, 2.0 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に 1 M 塩化スルフリル (162  $\mu\text{L}$ , 2.0 mmol, 1.0 当量) /ジクロロメタン (2 mL) 溶液を滴下、0.5 時間反応させた。反応終了後、溶媒等を減圧留去し **9** を得た。水素化ナトリウム (206 mg, 5.1 mmol, 2.6 当量) の DMF (5mL) 懸濁液に、氷冷攪拌下、**23a** (744 mg, 4.0 mmol, 2.0 当量) を加えた。5 分後、**9** の DMF (5mL) 溶液を加え 4.5 時間反応させた。反応終了後、酢酸エチルで希釈、抽出し、0.5 M リン酸二水素カリウムと飽和食塩水で洗浄した。有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 40 g) に付し、60-80 % クロロホルム/ヘキサンで **20b** (1.04 g, 90 %) を溶出し、白色粉末として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.02 (9H, s,  $t\text{-Bu-CH}_3$ ), 1.06 (9H, s,  $t\text{-Bu-CH}_3$ ), 3.80, 3.83 (8H, 2s,  $\text{SCH}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ), 3.95-4.04 (2H, m, H-4', 5'), 4.11-4.19 (1H, m, H-3'), 4.48-4.55 (2H, m, H-2', 5'), 4.88 (1H, d,  $J = 11.8$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 4.93 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.72- 5.77 (2H, m, H-5, 1'), 6.39-6.47 (2H, m, Ar-H), 7.14-7.25 (2H, m, H-6, Ar-H), 8.50 (1H, br s, 3-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.3, 22.7, 27.0, 27.3, 27.8, 55.3, 55.5, 67.3, 71.9, 74.8, 76.2, 76.6, 91.5, 98.8, 102.4, 103.7, 118.5, 131.1, 139.5, 149.6, 158.2, 160.1, 163.3. HR-FAB-MS (NBA)  $m/z$ : 580.2278 (Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8\text{SSi}$   $[\text{M}]^+$ : 580.2274).

### 3',5'-*O*-Di-*tert*-butylsilanediyl-2'-*O*-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)uridine (20c)

無水条件下, **8** (756 mg, 1.7 mmol) のジクロロメタン (7.5 mL) 溶液に 1 M 塩化スルフリル (138  $\mu$ L, 1.7 mmol, 1.1 当量) /ジクロロメタン (1.6 mL) 溶液を滴下し, 45 分間反応させた. 反応終了後, 溶媒等を減圧留去し **9** を得た. 水素化ナトリウム (162 mg, 4.0 mmol, 2.4 当量) の DMF (7.5 mL) 懸濁液に, 氷冷攪拌下, **23b** (903  $\mu$ g, 4.2 mmol, 2.5 当量) を加え, **9** の DMF (5mL) 溶液を加え 2 時間反応させた. 反応終了後, 酢酸エチルで希釈, 抽出し, 0.5 M リン酸二水素カリウムと飽和食塩水で洗浄した. 有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した, 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 37 g) に付し, 70-100 % クロロホルム/ヘキサンで **20c** (747 mg, 72 %) を溶出し, 白色粉末として得た.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.02, 1.05 (18H, 2s, *t*-Bu- $\text{CH}_3$ ), 3.81 (9H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.86 (2H, d,  $J = 3.3$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 3.91-4.16 (3H, m, H-3', 4', 5'), 4.36-4.80 (1H, m, H-2'), 4.53 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz, H-5'), 4.95 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.08 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.59 (1H, s, H-1'), 5.72 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 6.12 (2H, s, Ar-H), 7.16 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 8.36 (1H, br s, 3-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.2, 22.5, 22.6, 27.0, 27.2, 36.4, 55.3, 55.7, 67.2, 74.0, 74.6, 76.6, 90.5, 92.7, 102.2, 108.3140.9, 149.5, 158.7, 160.2, 163.4. HR-FAB-MS (TEOA + NaCl)  $m/z$ : 633.2276 (Calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_9\text{SSiNa}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ : 633.2278).

### 3',5'-*O*-Di-*tert*-butylsilanediyl-2'-*O*-methyldithiomethyluridine (17)

(方法 1) 無水条件下, **20b** (117 mg, 0.20 mmol) の THF (4 mL) 溶液にジメチルジスルフィド (0.5 mL, 5.5 mmol, 27 当量) を加え攪拌し, DMTSF (97.6 mg, 0.50 mmol, 2.5 当量) の THF (12 mL) 懸濁液を滴下し, 室温で 30 分間反応させた. 反応は飽和重曹水で停止後, クロロホルムで希釈, 抽出し, 飽和重曹水, 飽和食塩水で洗浄した後, 有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 9.6 g) に付し, 70-80 % クロロホルム/ヘキサンで **17** (86.4 mg, 90 %) を溶出し白色粉末として得た.

(方法 2) 無水条件下, **20c** (127 mg, 0.21 mmol) の THF (4 mL) 溶液にジメチルジスルフィド (0.5

mL, 5.5 mmol, 27 当量) を加え攪拌し, DMTSF (101 mg, 0.51 mmol, 2.5 当量) の THF (12 mL) 懸濁液を滴下し, 室温で 30 分間反応させた. 反応は飽和重曹水で停止後, クロロホルムで希釈, 抽出し, 飽和重曹水, 飽和食塩水で洗浄した後, 有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 11 g) に付し, 80-90 % クロロホルム/ヘキサンで **17** (90.6 mg, 91 %) を溶出し白色粉末として得た.

(方法 3) **20c** (120 mg, 0.20 mmol) の 水/メタノール(2:3) (10 mL) 溶液にジメチルジスルフィド (0.52 mL, 5.7 mmol, 29 当量) を加え攪拌し, DMTSF (111 mg, 0.57 mmol, 2.9 当量) の メタノール (12 mL) 溶液を滴下し, 室温で 30 分間反応させた. 反応は飽和重曹水で停止し, 溶媒を減圧留去後, 酢酸エチルで希釈, 抽出し, 飽和重曹水, 水, 飽和食塩水で洗浄した. 得られた有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 9.5 g) に付し, 80-90 % クロロホルム/ヘキサンで **17** (90.9 mg, 97 %) を溶出し白色粉末として得た.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.03 (9H, s, *t*-Bu- $\text{CH}_3$ ), 1.05 (9H, s, *t*-Bu- $\text{CH}_3$ ), 2.53 (3H, s,  $\text{SCH}_3$ ), 3.86-4.14 (3H, m, H-3', 4', 5'), 4.47-4.52 (2H, m, H-2', 5'), 5.15 (1H, d,  $J = 11.5$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.22 (1H, d,  $J = 11.5$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.71 (1H, s, H-1'), 5.77 (1H, dd,  $J = 2.2$  Hz, 8.2 Hz, H-5), 7.25 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-6), 8.59 (1H, br s, 3-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.3, 22.7, 23.7, 27.0, 27.2, 67.2, 74.8, 76.4, 77.5, 80.1, 91.4, 102.7, 139.7, 149.7, 163.4. HR-FAB-MS (NBA)  $m/z$ : 477.1551 (Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Si}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 477.1549).

#### **2'-O-(2,4,6-Trimethoxybenzylthiomethyl)uridine (24)**

**20c** (348 mg, 0.57 mmol) の THF (13 mL) 溶液に三フッ化水素トリエチルアミン (131  $\mu\text{L}$ , 0.81 mmol, 1.4 当量) を加え, 室温で 20 分間反応させた. 飽和重曹水で反応を終了させ, 酢酸エチルで希釈, 抽出し, 飽和重曹水と飽和食塩水で洗浄した. 得られた有機相を無水芒硝で乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 10 g) に付し, 2-3 % メタノール/クロロホルムで **24** (239 mg, 89 %) を溶出し, 白色粉末として得た.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.71-2.74 (1H, m, 5'-OH), 3.07 (1H, d,  $J = 4.9$  Hz, OH-3'), 3.81, 3.83 (9H, 2s,



OCH<sub>3</sub>), 3.88 (2H, s, SCH<sub>2</sub>), 3.68-3.87, 3.94-3.99 (2H, m, H-5'), 4.05-4.09 (1H, m, H-4'), 4.34-4.43 (2H, m, H-2', 3'), 4.76 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, OCH<sub>2</sub>S), 4.95 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, OCH<sub>2</sub>S), 5.68-5.73 (2H, m, H-5, 1'), 6.14 (2H, s, Ar-H), 7.60 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-6), 8.61 (1H, br s, 3-NH). <sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23.4, 55.3, 55.8, 61.4, 68.8, 74.5, 79.9, 85.1, 89.9, 90.6, 102.2, 106.6, 141.8, 150.3, 158.7, 160.5, 163.7. HR-FAB-MS (NBA) *m/z*: 470.1360 (Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S [M]<sup>+</sup>: 470.1359).

## 第一章第二節の実験

### Stability of 20c in acidic conditions

**20c** (60.9 mg, 0.10 mmol) に 3 % トリクロロ酢酸 (TCA)/DCM (5 mL) を加え攪拌し, 室温で反応させた. 3 % TCA/DCM を加えるのと同時に反応液が淡黄色に変化した. TLC 上で反応の進行を確認していくと 3 時間以内に **20c** が完全に消失し, 2'-OH 体 **7** と一致した.

**20c** (61.7 mg, 0.10 mmol) に 3 % ジクロロ酢酸 (DCA)/DCM (5 mL) を加え攪拌し, 室温で反応させた. 3 % DCA/DCM を加えると反応液の色は変化した. TLC 上で反応の進行を確認したところ 2 時間以内で **20c** はほぼ完全に残り, 2' 水酸基体 **7** はほとんど見られなかった.

### Stability of 20c in oxidative condition

**20c** (61.3 mg, 0.10 mmol) に 0.2 M ヨウ素-THF/ピリジン/水 (78:20:2) (10 mL) を加え攪拌し, 室温で反応させた. TLC 上で反応の進行を確認したところ, **20c** は 1 時間以内でほぼ完全に残り, 他にスポットは見られなかった.

### Stability of 20c in ammonia basic condition

**20c** (2.6 mg) の メタノール (2 mL) 溶液にアンモニアガスをバブリングさせ, 飽和アンモニア/メタノール溶液とし, 55 °C で 8 時間静置し反応させた. 反応終了後, TLC 上で反応の進行を確認したところ, **20c** の他にスポットは見られなかった.

### 2'-O-(2,4,6-Trimethoxybenzylthiomethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)uridine (25)

無水条件下, **24** (243 mg, 0.52 mmol) のピリジン (2.5 mL) 溶液に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (211 mg, 0.62 mmol, 1.2 当量) を加え, 室温で 1.5 時間反応させた. エタノールで反応を停止し, 溶媒

を減圧留去後、クロロホルムで希釈、抽出し、飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 12 g) に付し、50-60 % 酢酸エチル/ヘキサンで **25** (378 mg, 95 %) を溶出し、白色粉末として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.97 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, OH-3'), 3.51 (2H, d,  $J = 2.2$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 3.74-3.92 (2H, m, H-5'), 3.79, 3.80, 3.81 (15H, 3s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.03-4.06 (1H, m, H-4'), 4.35-4.39 (1H, m, H-3'), 4.44-4.51 (1H, m, H-2'), 4.80 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 4.99 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{S}$ ), 5.26 (1H, dd,  $J = 2.2$  Hz, 8.1 Hz, H-5), 5.96 (1H, d,  $J = 3.1$  Hz, H-1'), 6.13 (2H, s, Bn-CH), 7.24-7.40 (13H, m, DMTr-CH), 7.92 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 8.24 (1H, br s, 3-NH).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 23.0, 55.2, 55.3, 55.8, 61.9, 68.8, 73.8, 79.6, 83.7, 87.0, 87.2, 90.6, 102.0, 106.7, 113.2, 127.1, 128.0, 128.1, 130.1, 130.2, 135.0, 135.3, 140.1, 144.3, 150.1, 158.6, 158.8, 160.5, 163.3. HR-FAB-MS (NBA)  $m/z$ : 772.2670 (Calcd. for  $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}$   $[\text{M}]^+$ : 772.2665).

**3'-O-[(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidyl]-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)uridine (26)**

無水条件下、**25** (645 mg, 0.83 mmol) の DCM (8 mL) 溶液に 2-シアノエチル-*N,N,N',N'*-テトライソプロピルアミノホスホロジアミダイト (503  $\mu\text{L}$ , 0.16 mmol, 1.9 当量) および ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (71 mg, 0.42 mmol, 0.64 当量) を加え、室温で 15 時間反応させた。反応終了後、クロロホルムで希釈、抽出し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機相を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 23 g) に付し、50-60 % 酢酸エチル/ヘキサン (1 % トリアチルアミン) で **26** (750 mg, 92 %) を溶出し、白色粉末として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.02 (1H, br s), 7.84 (1H, d,  $J = 9.4$  Hz), 7.42-7.23 (9H, m), 6.82-6.87 (4H, m), 6.13-6.08 (3H, m), 5.28-5.23 (1H, m), 5.01 (1H, m), 4.83-4.68 (2H, m), 4.53-4.48 (1H, m), 3.37-4.30 (26H, m), 2.67 (1H, t,  $J = 6.3$  Hz), 2.42 (1H, t,  $J = 6.3$  Hz) 1.29-1.03 (12H, m).  $^{31}\text{P-NMR}$  (121.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 150.8,

151.1. HR-FAB-MS (NBA)  $m/z$ : 973.3828 (Calcd. for  $C_{50}H_{62}N_4O_{12}SP [M + H]^+$ : 973.3822).

#### Synthesis of ODNs containing 2'-O-TMBTM group (ODN 1a-8a)

合成したアミダイト体 (26) を無水アセトニトリルに溶解し、フィルター (片山化学工業 KC プレップオムニ13 孔径 0.5  $\mu\text{m}$ ) で濾過し、溶媒を減圧留去後、室温で3日間減圧乾燥した。無水アセトニトリルで 0.1 M になるように溶解し、それを DNA 合成機に装着した。活性化剤として 0.25 M ETT/無水アセトニトリル を使用し、酸化剤として 0.02 M ヨウ素-THF/ピリジン/水、脱 DMTr 化剤として 3 % TCA/DCM, キャッピング試薬として THF/ピリジン/無水酢酸と 10 % 1-メチルイミダゾール/THF を使用した。合成は、チミジン-CPG (500 Å) を用い、1  $\mu\text{mol}$  スケール、DMTr-ON モードで合成し、カップリング反応時間は、2'-O-TMBTM-ウリジンは900秒、その他の残基は 55秒で 10 mer および 12 mer のオリゴヌクレオチドを合成した。反応終了後、CPG をバイアルに移し、28 % アンモニア水 (1.5 mL) を加え、55 °C で 2 時間静置し、CPG からの切り出し、シアノエチル基の脱保護を行った。その後、室温まで冷却し、空気の吹き付けによってアンモニアを留去し、メンブランフィルター (Millex-LG 0.20  $\mu\text{m}$ ) で CPG を除去した、得られた濾液を、逆相カラム HPLCで 2-3 回に分けて分取精製した。目的のオリゴヌクレオチドを含む分画を、遠心濃縮機にて溶媒を濃縮し、1 つにまとめた。そして、サンプルを簡易型逆相カートリッジカラム Waters Sep-Pak Plus (C18) を用いて、まず 100 mM TEAA (5 mL) で平衡化し、サンプルをアプライした後、2 % トリフルオロ酢酸 (TFA) (10 mL) で DMTr 基の脱保護を行った。その後、100 mM TEAA (5 mL) で洗浄し、超純水 (10 mL) で水溶性の塩を除去した。最後に、50 % アセトニトリル水溶液でオリゴヌクレオチドを溶出させ、オリゴヌクレオチドを含む分画を遠心濃縮機にて溶媒を留去した。得られたオリゴヌクレオチドの純度を、HPLC で確認した。オリゴヌクレオチドの収量は、UV スペクトルにて 260 nm における吸光度から求めた。

オリゴヌクレオチドの組成を、MALDI-TOF-MS を用いて決定した。

### HPLC conditions (ODN 1a-8a)

#### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配: B conc.: 10-50 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), 温度: 25°C.

#### Purified condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配: B conc.: 10-50 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 × 250 mm), 温度: 25°C.

### Synthesis of T-10 mers containing 2'-O-MDTM group (ODN 1b-4b)

ODN 1a-4a の水溶液に, メタノールに溶解した DMTSF (30 当量) と, 同じくメタノールに溶解したジメチルジスルフィド (300 当量) を加え, 最終的に水/メタノール (1/1, v/v) となるように調製した (ODN 3b のみ 300 mM TEAA を含有). 攪拌後, 室温で静置し, 一定時間ごとに HPLC にて反応を追跡した. 反応終了後, 反応液をフィルター (片山化学工業 KC プレップオムニ 13 孔径 0.5 μm) にてろ過した後, HPLC にて分取精製した. 精製後, UV スペクトルにて, 260 nm の吸光度から, オリゴヌクレオチドの収量および収率を求めた.

ODN 1b-4b の組成を, MALDI-TOF MS にて決定した.

### HPLC conditions (ODN 1b-4b)

#### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 1b, 3b-4b): B conc.: 10-30 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 2b): B conc.: 10-40 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), 温度: 25°C.

**Purified condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 1b, 3b-4b): B conc.: 10-30 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 2b): B conc.: 10-40 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 × 250 mm), 温度: 25°C.

**Synthesis of 12 mer ODNs containing 2'-O-MDTM group (ODN 5b-8b)**

ODN 5a-8a の水溶液に, 最終的に 200 mM となるように酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) を加え, 最後に DMTSF (300 当量) を加え, 攪拌後, 室温で静置し, 一定時間ごとに HPLC にて反応を追跡した. 反応終了後, 簡易ゲル濾過カラム GE Healthcare NAP-25 で過剰の DMTSF を除去し, HPLC にて分取精製した. 精製後, UV スペクトルにて, 260 nm の吸光度から, オリゴヌクレオチドの収量および収率を求めた.

ODN 5b-8b の組成を, MALDI-TOF MS にて決定した.

**HPLC conditions (ODN 5b-8b)****Analytical condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 5b, 3b): B conc.: 10-20 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 6b): B conc.: 10-30 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 7b): B conc.: 10-40 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 8b): B conc.: 10-50 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18 MS-II (4.6 × 250 mm), 温度: 50 °C.

**Purified condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 5b): B conc.: 5-15 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 6b-7b): B conc.: 10-20 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 8b): B conc.: 10-30 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18 MS-II (10 × 250 mm), 温度: 50 °C.

### **Reductive deprotection of 2'-O-MDTM group (ODN 1c-2c, 4c)**

ODN 1b-2b, 4b に 100 mM DTT の 1% トリエチルアミン 100 mM TEAA 溶液を加え、攪拌後、室温にて静置し反応させた。一定時間ごとに HPLC にて反応を追跡した。反応終了後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (GE Healthcare NAP-25) にて過剰の DTT を除去し、その後、HPLC にて分取精製した。生成物の純度を HPLC にて確認した後、超純水に溶解したオリゴヌクレオチドの波長 260 nm における吸光度から、収量および収率を求めた。なお、ODN 2c の精製は、HPLC の分取後、NAP-25 で精製した。

得られた ODN 1c-2c, 4c の組成を、MALDI-TOF MS にて決定した。

### **HPLC conditions (ODN 1c-2c, 4c)**

#### **Analytical condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配: B conc.: 10-20 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18 MS-II (4.6 × 250 mm), 温度: 25°C.

#### **Purified condition (ODN 2c):**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配: B conc.: 8-16 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 × 250 mm), 温度: 25°C.

### **Reductive deprotection of 2'-O-MDTM group with DTT (ODN 5c-8c)**

ODN 5b-4b 水溶液に、最終的に 100 mM となるように Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加え、最後に DTT (最終濃度 10 mM) を加え、攪拌後、室温で静置し、一定時間ごとに HPLC にて反応を追跡した。反応終了後、簡易ゲル濾過カラム GE Healthcare NAP-25 で過剰の DTT を除去した。UV スペクトルにて、260 nm の吸光度から、オリゴヌクレオチドの収量および収率を求め、生成物の純度を HPLC にて確認した。

得られた ODN 1c-2c, 4c の組成を、MALDI-TOF MS にて決定した。

### HPLC conditions (ODN 5c-8c)

#### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 5c): B conc.: 5-20 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 6c): B conc.: 5-25 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 7c): B conc.: 5-30 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 8c): B conc.: 5-35 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18 MS-II (4.6 × 250 mm), 温度: 50 °C.

### Reductive deprotection of 2'-O-MDTM group with glutathione (ODN 5c, 7c-8c)

ODN 5b, 7b-8b 水溶液 (最終濃度 0.1 mM) に, 最終的に 50 mM となるようにリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を加え, 最後にグルタチオン (最終濃度 10 mM) を加え, 攪拌後, 室温で静置し, 一定時間ごとに HPLC にて反応を追跡した. 反応終了後, 簡易ゲル濾過カラム GE Healthcare NAP-25 で過剰の DTT を除去した. UV スペクトルにて, 260 nm の吸光度から, オリゴヌクレオチドの収量および収率を求め, 生成物の純度を HPLC にて確認した.

得られた ODN 5c, 7c-8c の組成を, MALDI-TOF MS にて決定した.

### HPLC conditions (ODN 5c, 7c-8c)

#### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 5c): B conc.: 5-20 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 7c): B conc.: 5-30 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 8c): B conc.: 5-35 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18 MS-II (4.6 × 250 mm), 温度: 50 °C.



## 第二章第一節の実験

### **Evaluation of resistance of REDUCT-ODN to SVPDE (ODN 3b and 9)**

各 ODN 5 nmol (最終濃度 12.5  $\mu$ M) を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0), 10 mM 塩化マグネシウムに溶解した. 続いて SVPDE (8  $\mu$ g/mL) を 5  $\mu$ L 加え, 最終濃度 0.1  $\mu$ g/mL にした. 反応は 37  $^{\circ}$ C で行い, 一定時間毎にサンプリングし, サンプルを 90  $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し, SVPDE を失活させた. 室温まで冷却した後に, HPLC で反応液の分析を行った.

#### **HPLC conditions**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 0.8 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 3b): B conc.: 10-18 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 9): B conc.: 8-16 % (0-20 min), カラム: Waters  $\mu$ -Bondasphere (3.9  $\times$  150 mm), 温度: 25  $^{\circ}$ C.

### **Evaluation of resistance of REDUCT-ODN to fetal bovine serum (FBS) (ODN 3b and 9)**

各 ODN 5 nmol (最終濃度 12.5  $\mu$ M) に 5% FBS を 加え, 反応を 37  $^{\circ}$ C で行った. 一定時間毎にサンプリングし, サンプルにホルムアミド 20  $\mu$ L で反応を停止した. 室温まで冷却した後に, HPLC で分析を行った.

#### **HPLC conditions**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (ODN 3b): B conc.: 10-18 % (0-20 min), 濃度勾配 (ODN 9): B conc.: 8-16 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18 MS-II (4.6  $\times$  250 mm), 温度: 25  $^{\circ}$ C.

## 第二章第二節の実験

### Synthesis of RNAs bearing 2'-*O*-TMBTM group (RNA 1a-6a)

合成したアミダイト体 **26** を無水アセトニトリルに溶解し、フィルター (Millex-LG 0.20  $\mu\text{m}$ ) で濾過し、溶媒を減圧留去後、室温で3日間減圧乾燥した。無水アセトニトリルで 0.1 M になるように溶解し、それを DNA 合成機に装着した。活性化剤として 0.25 M ETT/無水アセトニトリルを使用し、酸化剤として 0.02 M ヨウ素-THF/ピリジン/水、脱 DMT<sub>r</sub> 化剤として 3 % TCA/DCM, キャッピング試薬として THF/ピリジン/無水酢酸と 10 % 1-メチルイミダゾール/THF を使用した。合成は、チミジン-CPG (500 Å) を用い、1  $\mu\text{mol}$  スケールで DMT<sub>r</sub>-OFF モード合成し、カップリング時間は、600 秒で 21 mer の修飾 RNA を合成した。反応終了後、CPG をバイアルに移し、28 % アンモニア水/エタノール (3:1) (1.5 mL) を加え、55 °C で 8 時間静置し、CPG からの切り出し、シアノエチル基の脱保護を行った。その後、室温まで冷却し、空気の吹き付けによってアンモニアを留去し、メンブランフィルター (Millex-LG 0.20  $\mu\text{m}$ ) で CPG を除去した。得られた濾液の溶媒を遠心エバポレーターで留去し、乾固した。DMSO 150  $\mu\text{L}$  に懸濁したオリゴヌクレオチドを 65 °C で 1 時間加温し、続いて、*N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP)/トリチルアミン/トリエチルアミン-三フッ化水素 (2:1:1) を加え 3-5 時間反応を行った。反応終了後は NAP-25 を用いて過剰の試薬を除去した。陰イオン交換カラムを用いて HPLC で約 10 回に分けて分取・精製した。目的のオリゴヌクレオチドを含む分画を、遠心エバポレーターにて濃縮し、1 つにまとめた。NAP-25 にて脱塩を行い、RNA を含む分画の凍結乾燥にて溶媒を留去した。得られたオリゴヌクレオチドの純度を HPLC で確認した。オリゴヌクレオチドの収量は、UV スペクトルにて、260 nm における吸光度から求めた。

RNA 1a-6a の組成を、MALDI-TOF-MS にて決定した。

### HPLC conditions (RNA 1a-6a)

#### Analytical and purified condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 10 mM NaClO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 %

アセトニトリル (B): 600 mM NaClO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 % アセトニトリル, 濃度勾配: B conc.: 0-90 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOGEL IEX TypeQ (4.6 × 50 mm), 温度: 60 °C.

### Synthesis of 21 mer RNAs containing 2'-O-MDTM group (RNA 1b-6b)

RNA 1a-6a の水溶液に, 最終的に 200 mM となるように酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) を加え, 最後に DMTSF (300 当量) を加え, 攪拌後, 室温で静置し, 一定時間ごとに HPLC にて反応を追跡した. 反応終了後, 簡易ゲル濾過カラム GE Healthcare NAP-25 で過剰の DMTSF を除去し, HPLC にて分取精製した. 精製後, UV スペクトルにて, 260 nm の吸光度から, オリゴヌクレオチドの収量および収率を求めた.

RNA 1b-6b の組成を, MALDI-TOF MS にて決定した.

### HPLC conditions (RNA 1b-6b)

#### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (RNA 1b-2b, 4b): B conc.: 5-20 % (0-20 min), 濃度勾配 (RNA 3b, 6b): B conc.: 10-30 % (0-20 min), 濃度勾配 (RNA 5b): B conc.: 10-20 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 × 250 mm), 温度: 60 °C.

#### Purified condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配 (RNA 1b-2b, 4b-6b): B conc.: 5-20 % (0-20 min), 濃度勾配 (RNA 3b): B conc.: 10-20 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 × 250 mm), 温度: 60 °C.

## 第二節第三章の実験

### **Evaluation of thermal stability of siRNAs (siRNAs 1-16)**

50  $\mu\text{M}$  のセンス鎖, アンチセンス鎖を各 8  $\mu\text{L}$  に 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 100  $\mu\text{L}$ , 500 mM NaCl 40  $\mu\text{L}$  に超純水を加えて 200  $\mu\text{L}$  にした. siRNA 溶液を攪拌・遠心し, 90  $^{\circ}\text{C}$  で 1 分間加熱し, 37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間加熱し, 二本鎖 RNA をアニーリングした. 各 siRNA 120  $\mu\text{L}$  をセルにセットし, 吸光度計 JASCO V-660 で測定した.

#### **Analytical condition:**

測定機器: JASCO V-660 (日本分光), 検出波長: UV 260 nm, バンド幅: 2 nm, 測定温度: 25 ~ 90  $^{\circ}\text{C}$  (0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), 測定時間: 5 秒.

### **Conversion of RNA 6b into unmodified RNA in siRNA 13 with glutathione (siRNA 13)**

siRNA 13 水溶液 (最終濃度 各 8  $\mu\text{M}$ ) が入ったマイクロチューブに, 最終的に 50 mM となるように 500 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 20  $\mu\text{L}$  を加えて超純水で 180  $\mu\text{L}$  にした. オリゴ溶液を攪拌・遠心した後, 沸騰した水でマイクロチューブを 1 分間加熱し, 37  $^{\circ}\text{C}$  の恒温槽で 1 時間加熱した. 加熱後, 100 mM グルタチオン (最終濃度 10 mM) 20  $\mu\text{L}$  を加え, ピペッティングによって攪拌し, 37  $^{\circ}\text{C}$  で静置した. 反応の進行状況を一定時間ごとに HPLC にて追跡した.

#### **HPLC conditions**

##### **Analytical condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): アセトニトリル, 濃度勾配: B conc.: 5-20 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6  $\times$  250 mm), 温度: 60  $^{\circ}\text{C}$ .

## 第二節第四章の実験

### Evaluation of gene silencing activity of 2'-O-MDTM-siRNAs in A549-Luc (siRNA 1-16 and control siRNA)

#### Cell culture and transfection of siRNA with Lipofectamine 2000:

CO<sub>2</sub> インキュベーター ESPEC BNS-110 で培養した A549-Luc 細胞を顕微鏡 OLYMPUS CK30 で観察した後、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) (Phosphate Buffer Saline, PBS) で 2 回洗浄し、細胞を 0.25 % トリプシン/1 mM EDTA (Nacalai tesque) 1 mL で 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 5 分間処理し、細胞をディッシュからはがした。10 % FBS 含有 RPMI 1640 (Nacalai tesque) を 2 mL 加え、トリプシンを失活させた後、細胞培地をピペッティングし、VIORAMO 15 mL 遠心管に移した。KUBOTA 2410 で 1500 rpm で遠心分離後、上澄みを除去した。10 % FBS 含有 RPMI 1640 10 mL を加えピペッティングし、その細胞懸濁液を Improved Neubauer 計算盤にアプライし細胞数をカウントした。VIORAMO 50 mL 遠心管に細胞を 80000 cells/mL となるように 10 % FBS 含有 RPMI 1640 で希釈し、35 mm FALCON 細胞培養ディッシュに希釈した細胞液 2 mL (160000 cells) を入れ、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 時間インキュベーションした。

下記に記載した方法 (**Preparation of siRNAs**) で調製した siRNA 2 μL を DMEM 38 μL で希釈した。また、別のマイクロチューブに Lipofectamine 2000 30 μL に DMEM 370 μL を加えて溶液を調製した。siRNA 溶液/Lipofectamine 2000 溶液を 10 μL : 40 μL の割合で混合し、20 分間室温放置し、siRNA/Lipofectamine 2000 複合体を形成させた。

CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養した A549-Luc 細胞の培地を除去し、DMEM で 3 回洗浄した。20 分間静置した siRNA/Lipofectamine 2000 複合体に 37 °C の DMEM 950 μL を加え混合し、全量 1 mL (10 nM siRNA, Lipofectamine 2000 3 μg/mL) を A549-Luc 細胞に加え、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 4 時間、siRNA をトランスフェクションした。4 時間後、培地を除去し、10 % FBS 含有 DMEM 1.5 mL を加え、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 時間培養した。

## Luciferase assay

24 時間培養した A549-Luc 細胞を顕微鏡で観察した後、スクレーパーでディッシュから細胞を剥離した。細胞をピペッティングして 2 mL マイクロチューブ (BIO-BIK SC-0200) に移し、遠心器 Centrifuge 5415 (Eppendorf) を用い 4 °C, 3000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、氷冷した PBS 1 mL で懸濁し、4 °C, 3000 rpm で 5 分間遠心分離し、この操作をもう一度行った。上清を除去し、Reporter Lysis Buffer (RLB, Promega) 200  $\mu$ L を加えてボルテックスミキサーで攪拌後、5 分間氷冷した。−85 °C で一晩凍結し、細胞ライセートを作成した。ライセートを解凍し、ボルテックスミキサーで攪拌し、4 °C, 12000 rpm で 2 分間遠心分離して、その後、上澄み 180  $\mu$ L を 1.5 mL マイクロチューブ (アシスト A150) に移した。白色 96 well プレートに 1 well あたりライセート 20  $\mu$ L を 3 well に移し、TriStar LB941 で化学発光強度の測定によってルシフェラーゼ発現量を測定した。残ったライセートから 25  $\mu$ L を別の 1.5 mL マイクロチューブに移し、氷冷した PBS 175  $\mu$ L で希釈し、タンパク質の定量を行った。透明 96 well プレートに 1 well あたり希釈したライセート 25  $\mu$ L を 3 well に移し、Pierce BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) を 200  $\mu$ L を加えた。透明 96 well を 37 °C で 30 分間加温し、30 分室温で空冷後、マイクロプレートリーダー BIO-RAD Model 680 microplate reader で吸光度の測定によって細胞タンパク質量を測定した。化学発光強度をタンパク質量で除し、化学発光強度/タンパク質量 ( $\mu$ g) として数値化し比較した。1 回の実験に 1 サンプルあたり 35 mm ディッシュ を 3 枚使用し、各ディッシュのライセートから得られた結果を平均した。少なくとも 3 回以上実験を行った。本統計解析は、Welch の *t*-検定を行った。

## Preparation of siRNAs:

各 50  $\mu$ M RNA 30  $\mu$ L にアニーリングバッファー (500 mM 酢酸カリウム, 150 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM 酢酸マグネシウム) 15  $\mu$ L を加えて 20  $\mu$ M siRNA とした。siRNA は攪拌・遠心後、マイクロチューブを 1 分間 95 °C で加熱し、37 °C で 1 時間加温しアニーリングした。

**Measurement of chemiluminescent intensity of luciferase with luciferase:**

測定機器: TriStar LB941 (Berthold Technologies), マイクロプレート: 白色 96 well プレート, ライセート: 20  $\mu$ L, 発光試薬: Luciferase Assay Reagent 50  $\mu$ L, delay: 2 秒, counting time: 10 秒.

**Measurement of absorbance of protein:**

測定機器: BIO-RAD Model 680 microplate reader (BIO-RAD), マイクロプレート: 透明 96 well プレート, 検出波長: 560 nm, 希釈ライセート: 25  $\mu$ L/well, 発色試薬: Pierce BCA Protein Assay Reagent A/B (10 mL:200  $\mu$ L) 200  $\mu$ L/well,

## 引用文献

- 1) Azad R. F., Brown-Driver V., Buckheit R. W. Jr., Anderson K. P., *Antiviral Res.*, **28**, 101-111 (1995).
- 2) Gryziewicz L., *Advanced Drug Delivery Rev.*, **57**, 2092-2098 (2005).
- 3) Sun H., Zhu X., Lu P. Y., Rosato R. R., Tan W., Zu Y., *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, **3**, e182 (2014).
- 4) Sharma V. K., Sharma R. K., Singh S. K., *Med. Chem. Commun.*, **5**, 1454-1471 (2014).
- 5) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Nature*, **391**, 806-811 (1998).
- 6) Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., *Nature*, **411**, 494-498 (2001).
- 7) Capodici J., Karikó K., Weissman D., *J. Immunology*, **169**, 5196-5201 (2002).
- 8) Manoharan M., *Current Opinion in Chem. Biol.*, **8**, 570-579 (2004).
- 9) Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Tuschl T., Patel D. J., *Nature*, **456**, 921-926 (2008).
- 10) Watts J. K., Katolik A., Viladoms J., Damha M. J., *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 1904-1910 (2009).
- 11) Czaderna F., Fechtner M., Dames S., Aygün H., Klippel A., Pronk G. J., Giese K., Kaufmann J., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2705-2716 (2003).
- 12) Cummins L. L., Owens S. R., Risen L. M., Lesnik E. A., Freier S. M., McGee D., Guinosso C. J., Cook P. D., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2019-2024 (1995).
- 13) Chiu Y., Rana T. M., *RNA*, **9**, 1034-1048, (2003).
- 14) Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 589-595 (2003).
- 15) Abdur Rahman S. M., Sato H., Tsuda N., Haitani S., Narukawa K., Imanishi T., Obika S., *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 3474-3480 (2010).
- 16) Prakash T. P., Allerson C. R., Dande P., Vickers T. A., Sioufi N., Jarres R., Baker B. F., Swayze E. E., Griffey R. H., Bhat B., *J. Med Chem.*, **48**, 4247-4253 (2005).
- 17) Lavergne T., Baraguey C., Dupouy C., Parey N., Wuensche W., Sczakiel G., Vasseur J.-J., Debart F., *J. Org.*



- Chem.*, **76**, 5719-5731 (2011).
- 18) Parey N., Baraguey G., Vasseur J.-J., Debart F., *Org. Lett.*, **8**, 3869-3872 (2006).
  - 19) Tsujita T., Okuda H., *Eur. J. Biochem.*, **133**, 215-220 (1983).
  - 20) Bildstein L., Dubernet C., Couvreur P., *Advanced Drug Delivery Rev.*, **63**, 3-23 (2011).
  - 21) Lewis Phillips G. D., Li G., Dugger D. L., Crocker L. M., Parsons K. L. Mai E., Blättler W. A., Lambert J. M., Chari R. V.J., Lutz R. J., Wong W. L. T., Jacobson F. S., Koeppen H., Schwall R. H., Kenkare-Mitra S. R., Spencer S. D., Sliwkowski M. X., *Cancer Res.*, **68**, 9280-9290 (2008).
  - 22) Navath R. S., Kurtoglu Y. E., Wang B., Kannan S., Romero R., Kannan R. M., *Bioconjugate Chem.*, **19**, 2446-2455 (2008).
  - 23) Hong R., Han G., Fernández J. M., Kim B., Forbes N. S., Rotello V. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1078-1079 (2006).
  - 24) Anderson M. E., *Chem.-Biol. Interact.*, **112**, 1-14 (1998).
  - 25) Jones D. P., Carlson J. L., Samiec P. S., Sternberg P. Jr., Mody V. C. Jr., Reed R. L., Brown L. A. S., *Clin. Chim. Acta*, **275**, 175-184 (1998).
  - 26) Meister A., Anderson M. E., *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760 (1983).
  - 27) Semenyuk A., Földesi A., Johansson T., Estmer-Nilsson C., Blomgren P., Brännvall M., Kirsebom L. A., Kwiatkowski M., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12356-12357 (2006).
  - 28) Semenyuk A., Kwiatkowski M., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 469-472 (2007).
  - 29) Chambert S., Gautier-Luneau I., Fontecave M., Décout J., *J. Org. Chem.*, **65**, 249-253 (2000).
  - 30) Smallcombe S. H., Caserio M. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5826-5833 (1971).
  - 31) Anderson M. B., Ranasinghe M. G., Palmer J. T., Fuchs P. L., *J. Org. Chem.*, **53**, 3125-3127 (1988).
  - 32) Zavgorodny S. G., Pechenov A. E., Shvets V. I., Miroshnikov A. I., *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **19**, 1977-1991 (2000).
  - 33) Veeneman G. H., Van Der Marel G. A., Van Den Elst H., Van Boom J. H., *Tetrahedron*, **47**, 1547-1562

(1991).

- 34) Rastogi H., Usher D. A., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4872-4877 (1995).
- 35) Norman D. G., Reese C. B., Serafinowska H. T., *Synthesis*, (8), 751-754 (1985).
- 36) Kimura J., Taira K., Goto S., Sensui Y., *Nippon Kagaku Kaishi*, (7), 1122-1123 (1988).
- 37) Munro T. A., Duncan K. K., Xu W., Wang Y., Liu-Chen L., Carlezon W. A., Jr., Cohen B. M., Béguin C., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 1279-1286 (2008).
- 38) Bishop P., Jones C., Chmielewski J., *Tetrahedron Lett.*, **34**, 4469-4472 (1993).
- 39) Vetter S., *Synth. Commun.*, **28**, 3219-3223 (1998).
- 40) Nielsen J., Taagaard M., Marugg J. E., Van Boom J. H., Dahl O., *Nucleic Acids Res.*, **14**, 7391-7403 (1986).
- 41) Septak M., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3053-3058 (1996).
- 42) Wincott F., DiRenzo A., Shaffer C., Grimm S., Tracz D., Workman C., Sweedler D., Gonzalez C., Scaringe S., Usman N., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2677-2684 (1995).
- 43) Braasch D. A., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M. A., Corey D. R., *Biochemistry*, **42**, 7967-7975 (2003).