

精密有機合成化学に基づいたヌクレオシドと核酸の創薬研究

市川 聡

Medicinal Chemistry Targeting Nucleosides and Nucleic Acids Based on Fine Synthetic Chemistry

Satoshi ICHIKAWA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,
Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan*

(Received June 5, 2008)

Nucleosides and nucleotides are one of the most important elements for cells by the fact that they are components of DNAs and RNAs. In addition, they play important roles in most fundamental cellular metabolic pathways such as energy donors, second messengers, and cofactors for various enzymes. Therefore, there exists a rich source in drug discovery targeting nucleosides and nucleotides. In order to utilize nucleosides and nucleic acids on the drug development, it is very important to develop reactions and methods, by which the highly coordinating and labile nucleoside intermediates can be used. With these in mind, we have been working on synthetic nucleoside and nucleic acid chemistry. First, branched sugar nucleoside derivatives, which are potential antitumor agents, have been synthesized utilizing samarium diiodide (SmI_2) mediated Reformatsky reaction or aldol reaction. 3'- β -Carbamoylmethylcytidine (CAMC) was found to exhibit potent cytotoxicity against various human tumor cell lines. Synthetic methodology of the caprazamycins, which are promising antibacterial nucleoside natural products, was also developed by the strategy including β -selective ribosylation without using a neighboring group participation. Our synthetic route provided a range of key analogues with partial structures to define the pharmacophore. Simplification of the caprazamycins was further pursued to develop diketopiperazine analogs. Medicinal chemistry of oligodeoxynucleotides has been conducted. Thus, novel triazole-linked dumbbell oligodeoxynucleotides and modular bent oligodeoxynucleotides were synthesized. They exhibit excellent binding affinity to NF- κ B or HMGB1 A-box protein, which are important therapeutic targets. Therefore, the results obtained conclusively demonstrated these oligodeoxynucleotides could be proposed as powerful decoy molecules.

Key words—caprazamycin; decoy strategy; antitumor; samarium diiodide; drug-resistant bacteria; oligodeoxynucleotide

はじめに

ヌクレオシドやヌクレオチドは最も重要な生体物質の1つである。これらは遺伝情報の保存・発現をつかさどるDNA・RNAの構成成分であるばかりでなく、補酵素や細胞内情報伝達物質などとして機能したり、細胞内代謝やエネルギー供与にも関与し、多彩かつ重要な役割を担っている。そこで、古くからヌクレオシドやヌクレオチドは創薬化学研究を行う上でよいリードとして認識されており、様々なヌクレオシド系化合物が臨床使用されている。¹⁻⁵⁾

一方、天然には、ヌクレオシドを構造中に含む化合物が存在する。これは、実に多種多様な生物活性、特に、抗がん、抗ウイルス、抗菌、抗真菌活性等の有用な活性を有するものがある。したがって、ヌクレオシド系天然物も創薬開発のよいリードである。⁶⁻¹³⁾ 一方で、バイオテクノロジーの進歩により、様々な高分子を細胞内に直接導入することができるようになった。これにより、細胞内の遺伝子やRNAを標的とした数十量体の核酸分子（オリゴヌクレオチド）そのものが医薬品として使用されつつある。このように、小分子であるヌクレオシドやヌクレオチドから、高分子である核酸まで、創薬リードとしての潜在的な価値は極めて高い。この潜在価値を創薬研究における成果体として具現化するためには、物理的・化学的安定性や活性の向上、構造の

北海道大学大学院薬学研究科（〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目）

e-mail: ichikawa@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は、平成19年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

単純化, 新たな機能の付加等の改変が必要とされる. この担い手が有機合成化学を基盤とした化学修飾である. さて, ヌクレオシド誘導体を合成する方法には, ヌクレオシドを出発原料として化学変換を行う方法と, 修飾糖部及び塩基を別途構築したのちに両者を結合させる方法の2つがあるが, 当然前者の方が効率的な合成法と言える. しかしヌクレオシドを題材とする有機合成には, いくつかの克服すべき問題が存在する. 例えば含窒素芳香環である核酸塩基が基質に含まれているため, その高い配位能から使用できる試薬が限定され, また, 糖部へ増炭反応を行う際の原料となるアルデヒド, ケトン体が, 各種反応条件において, 不安定であることが挙げられる. われわれはヌクレオシド, ヌクレオチド, 核酸を題材として創薬研究を展開する際にこれらの問題の克服が第一の課題と考えており, 有機合成化学を基盤として, 1. 生理活性分枝糖ヌクレオシドの合成研究, 2. 新規作用機序を有する抗菌ヌクレオシド系天然物の合成研究, 3. 新規な構造・機能を有する人工オリゴヌクレオチドの合成とその性質に関する研究をこれまで展開してきた. 本総説ではその概略について順に述べる.

1. 生理活性分枝糖ヌクレオシドの合成

1-1. 3'-β-分枝糖リボヌクレオシド類の合成

抗がん剤であるAraCやゲムシタピン, 抗HIV薬であるAZT, D4Tに代表されるように, 核酸代謝拮抗剤は薬として広く臨床使用されている. これらの修飾ヌクレオシドは, 水酸基の除去・反転ないしはヘテロ原子による置換等の比較的容易な化学修飾を受けたものである. われわれの研究室では, 糖部に炭素置換基が導入された分枝糖ヌクレオシドの生理活性に興味を持ち, その合成研究を行ってきた.¹⁴⁻²¹⁾ その過程で2'分枝糖ヌクレオシドである1-(2-deoxy-2-methylene-β-D-erythro-pentofuranosyl)cytosine²²⁻²⁶⁾ (DMDC, Fig. 1, 1), 2-C-cyano-2-deoxy-1-β-D-arabino-pentofuranosylcytosine²⁷⁻³²⁾ (CNDAC, 2), 3'分枝糖ヌクレオシドである1-(3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine³³⁻³⁷⁾ (ECyd, 3)が*in vitro*, *in vivo*ともに極めて良好な抗腫瘍活性を有することを見い出しており, 2と3は現在第I相臨床試験が行われている. このように分枝糖ヌクレオシドは生理活性物質としての可能性を有しているが, 系統的な構造活性相関情報はほとんど得られて

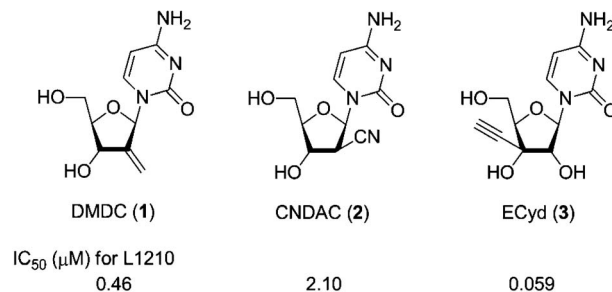


Fig. 1. Structures of Branched-chain Nucleosides Exhibiting Antitumor Activity

いなかった. その主たる原因は, 冒頭でも述べた通り, 合成中間体としてのヌクレオシド誘導体の性質上, あまりよい合成法がなかったことである. ヌクレオシドを出発原料として3のような3'位にα配置の水酸基とβ配置の炭素置換基を有する3'-β-分枝糖リボヌクレオシドを合成する方法としては, まず3'-ケトヌクレオシドに対する炭素求核剤の付加反応が考えられる. しかし本反応では, 一般にα面からの求核攻撃が優先し, α-置換生成物が得られてしまう. このような背景から, 3は, 3-β-C-ethynyl-D-ribo-pentofuranose誘導体を調製してから, グリコシル化反応によりシトシン塩基を導入することで合成されており, その工程は短いとは言い難い. そのため, 3'-β位の炭素置換体の生物活性について十分な検討はなされていなかった. そこで, われわれはFig. 2のような3'-β-分枝糖リボヌクレオシドの効率的な合成法を開発すべく, ヨウ化サマリウムが持つ特性に着目した. ヨウ化サマリウムは, 強力な一電子還元能と強いルイス酸性を有し, 還元反応はもちろんのこと, カルバニオンや炭素ラジカルを活性種とする多彩な炭素-炭素結合形成に有効である.³⁸⁻⁴⁶⁾ これらは中性かつ温和な条件で反応が進行する特徴を有しており, 塩基性条件をはじめとする各種反応条件において極めて不安定な3'-ケトヌクレオシドを基質として用いるには好都合である. さらにScheme 1に示すように, 3'-ケトヌ



市川 聡

北海道大学大学院薬学研究院助教. 1971年北海道生まれ. 北海道大学薬学部卒業. 北海道大学大学院薬学研究科修士・博士課程修了. 1999年米国スクリップス研究所博士研究員. 2001年北海道大学大学院薬学研究院助手. 2007年より現職(改組による). 有機合成化学, 創薬化学.

クレオシドの糖部 β 面に存在する 5'-水酸基に炭素ユニットを導入後、分子内 Reformatsky 型環化反応を行うことで 3'- β 位選択的に炭素-炭素結合を形成し、得られたラクトン体の開環による 3'- β -分枝糖リボヌクレオシド類の合成を計画した (Scheme 2). 分子内 Reformatsky 型反応の基質である 5'-ブromoアセチル-3'-ケトウリジン **9a** 及びそのウラシル塩基部 3 位のベンジルオキシメチル (BOM) 保護体 **9b** は、ウリジンを出発原料としてそれぞれ 4, 5 工程で調製した. まず, **9b** を THF 中, 室温において 2 当量のヨウ化サマリウムで処理したところ, ラクトン体 **10b** が収率 71% で得られた (Table 1, entry 1). 同反応を -78°C で行ったところ **10b** の収率は 85% まで向上した (entry 2). なお, 通常の出発原料を用いた条件でも検討したが, **10b** は全く得られず, 還元体である 5'-アセチル体 (**16**) を与えるのみであった. このようにヨウ化サマリウムの適用は, 極めて不安定な 3'-ケトヌクレオシドを基質の使用や核酸塩基の配位の影響もあまり受けないことが分かり, ヌクレオシド糖部への増炭反応に有効であることを見出した. われわれの知る限り, 本反応は, ヨウ化サマリウムをヌクレオシド化学に適用した初めての例である.⁴⁷⁾ 次に 3 位に酸性プロトンを持つ基質 **9a** に対しても分子内 Reformatsky 型反応を検討した. 化合物 **9a** の THF 溶液に -78°C において 2 当量のヨウ化サマリウムを滴下したところラクトン体 **10a** とともに **16** が副生した (entry 3).

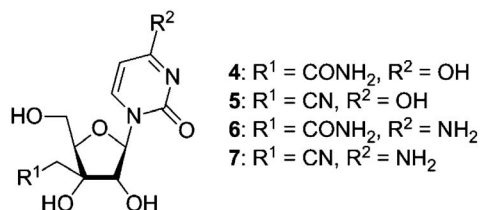
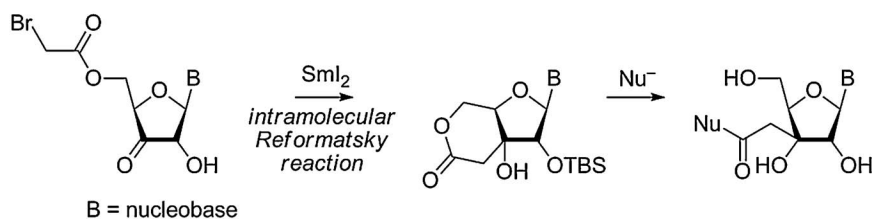


Fig. 2. Structures of Target 3'- β -Branched Ribonucleosides



Scheme 1.

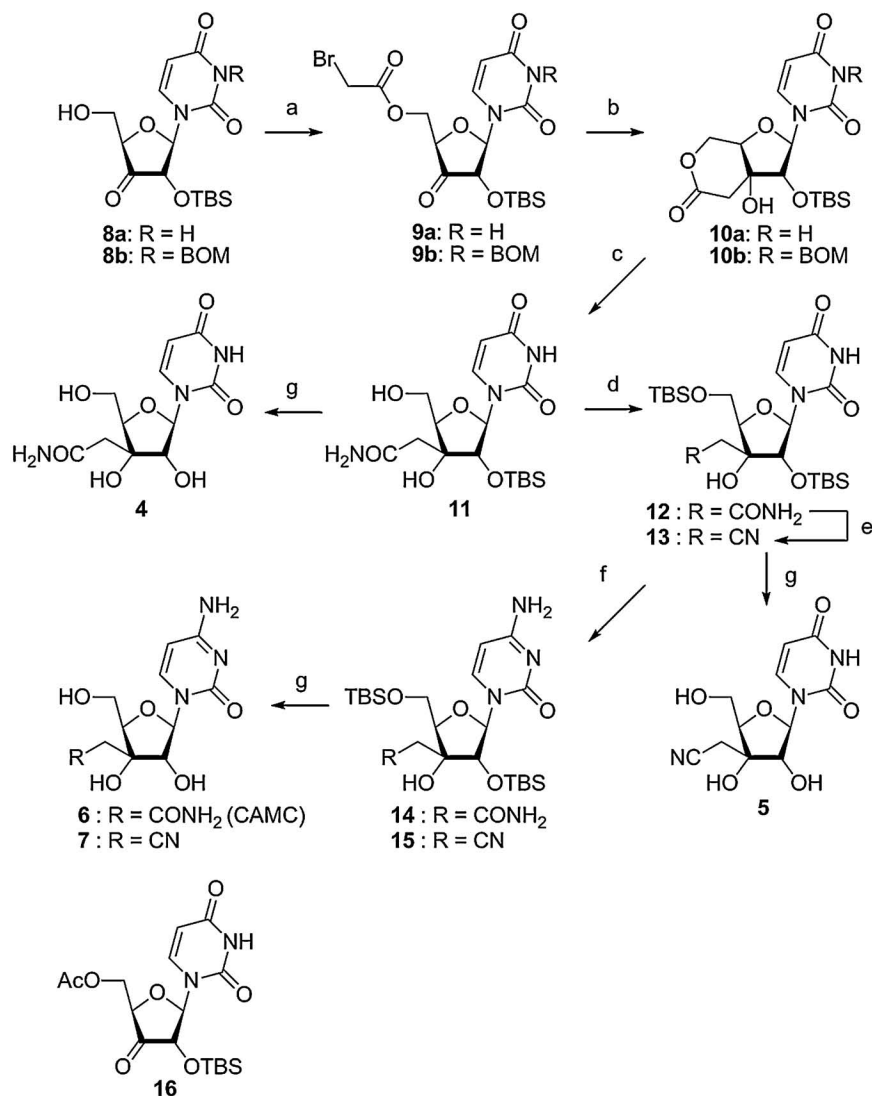
なお, ヨウ化サマリウムの THF 溶液に **9a** を滴下することで **16** の副生を抑えることができ, ウラシル塩基部 3 位を保護することなく合成できることが分かった (entry 4). ラクトン体 **10a** は 3'- β -分枝糖リボヌクレオシド類の有用な合成中間体であり, アンモニアによる開環と TBS 基の除去により **11** を経て 3'- β -カルバモイルメチルウリジン (**4**) へ変換した. また, **11** の 5'位水酸基を TBS 保護した後に, カルバモイル基をシアノ基に変換し, 脱保護により 3'- β -シアノメチルウリジン (**5**) を得た. さらに塩基部分のシトシンへの変換も行い, 3'- β -カルバモイルメチルシチジン (CAMC, **6**) と 3'- β -シアノメチルシチジン (**7**) を得た.

合成した 4 種の 3'- β -分枝糖リボヌクレオシド類のマウス白血病 L1210 細胞とヒト鼻咽癌がん由来 KB 細胞に対する *in vitro* 細胞増殖抑制効果を検討したところ, CAMC (**6**) は双方のがん細胞に対して増殖抑制活性を示すことが分かった (Table 2). さらに CAMC は, 各種ヒト固形がん由来細胞に対しても, 増殖抑制活性を示した. 一般にヌクレオシド系代謝拮抗剤は, 細胞に取り込まれたのちに, ヌクレオシドキナーゼをはじめとするリン酸化酵素による代謝活性化 (5'位リン酸化) を経て, 代謝生物活性を発現する. したがって, ヌクレオシド誘導体

Table 1. Intramolecular Reformatsky-type Reaction of **9** Promoted by SmI_2

Entry	Substrate	Temp. ($^\circ\text{C}$)	Products (yield, %)
1	9b	room temperature	10b (71%)
2	9b	-78	10b (85%)
3 ^{a)}	9a	-78	10a (65%), 16 (18%)
4 ^{b)}	9a	-78	10a (85%), 16 (trace)

a) A solution of SmI_2 in THF was added to a solution of **9a** in THF.
 b) A solution of **9a** in THF was added to a solution of SmI_2 in THF.

Scheme 2^{a)}.

a) Reagents and conditions: (a) BrCH₂COBr, CH₂Cl₂-78°C (70%); (b) see table 1; (c) NH₃/MeOH, -70°C (98%); (d) TBSCl, imidazole, DMF, room temperature (99%); (e) TsCl, pyridine, reflux (81%); (f) TPSCl, DMAP, Et₃N, room temperature, then NH₄OH (76% for **14**, 99% for **15**); (g) NH₄F, MeOH (99% for **4**, 99% for **5**, 79% for **6**, 99% for **7**).

Table 2^{a)}. Growth Inhibitory Effects of 3'-β-Branded Nucleosides against L1210 and KB cells

	IC ₅₀ (μM)	
	L1210	KB
4	>100	>100
5	>100	>100
6 (CAMC)	0.33	5.61
7	74	>100
14	43	>100

^{a)} IC₅₀ (μM) was given as a concentration of 50% inhibitor of cell growth.

が代謝拮抗剤として機能する場合、その活性はヌクレオシドキナーゼによるリン酸化効率に大きく依存することになる。しかしながら、CAMCの細胞増殖抑制活性は、高濃度のいずれの天然ヌクレオシドの添加によっても減弱しなかったことから、その活性発現にはヌクレオシドキナーゼによるリン酸化は関与せず、従来のヌクレオシド系代謝拮抗剤とは全く異なる作用機序を有することが示唆された。5'位にTBS基を有する化合物**14**にも弱いながら細胞増殖抑制活性がみられることは、この結果を支持する。このような特徴を持つ抗腫瘍活性ヌクレオシド誘導体は非常に珍しく、新しい創薬開発アプローチ

となり得ると考えている。⁴⁸⁾

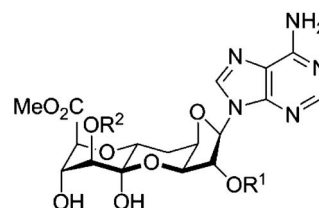
1-2. 1'- α -分枝糖ヌクレオシド類の合成 本研究過程で、われわれはヨウ化サマリウムによる還元アルドール反応を開発した。⁴⁹⁾ すなわち α -フェニルチオケトン **17** をヨウ化サマリウムにより二電子還元することで、カルバニオンの形成と引き続く β 脱離によりサマリウムエノラート **18** を生成させる。このエノラートを求核剤としてアクセプターとなるカルボニル化合物との間でアルドール反応を行うものである (Scheme 3)。本反応は、温和な条件で反応が進行すること、エノラート源となる α -フェニルチオケトンは安定かつ調製が簡便であること、位置及び立体選択的にアルドール反応が進行することを特徴とする。本反応により 3'-ケトヌクレオシドよりさらに取扱い困難な 5'-アルデヒド体を広くアクセプターとすることが可能になり、ヌクレオシド系天然物 herbicidine B (Fig. 3, **20**) の初の全合成⁵⁰⁾ や tunicamycins (Fig. 4, **21**) のコア構造である tunicaminylluracil の効率的合成^{51,52)} を達成した (筆者らの以前の総説⁵³⁾ を参照されたい)。さて、サマリウムエノラートをヌクレオシド糖部 1' 位に生成させてアルドール反応を行えば、1'- α -分枝糖ヌクレオシド類が合成できるはずである (Scheme 4)。ウラシル塩基部 3 位が無保護の 1'-フェニルセレネニル-2'-ケトウリジン誘導体 **22** を、THF 中、 -78°C で 2 当量のヨウ化サマリウムで処理してサマリウムエノラートを発生させたのち後、ベンズアルデヒドと処理したところアルドール成績体 **24** と **26** が収率 89% で得られた。しかし、1' 位における立体選択性は全く見られなかった。次に、BOM 基を有する誘導体 **23** を用いて反応させたところ、目的とする 1'- α 体 **25** (76%)、そのジアステレオマーである 1'- β 体 **27** (10%) で得られ、 α 選択性が観察された (Table 3, entry 1)。この選択性はアルデヒドを替えた場合にも、同じ傾向がみられた (entries 2, 3, 5)。対照的に、リチウムエノラー

ト **28** (Fig. 5) や 2'-*O*-シリルケテンアセタール **29** を用いた一般的なアルドール反応は全く進行せず、化合物 **30** を始めとするいくつかの分解物を与えた。このことから、ヌクレオシド糖部に対する増炭反応において、ヨウ化サマリウムが極めて有効であることが分かった。⁵⁴⁾

以上のように、中性かつ温和な条件で進行するヨウ化サマリウムを用いた反応の特徴を十分に活用することで、合成中間体としてのヌクレオシドアルデヒド・ケトン体の汎用性を拡張できた。

2. 新規作用機序を有する抗菌ヌクレオシド系天然物の合成研究

Fleming によるペニシリンの発見以降多くの抗生



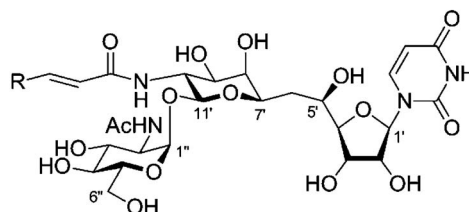
Herbicidins (**20**)

A: R¹ = Me, R² = CO(CH₂OH)C=CHMe

B: R¹ = Me, R² = H

C: R¹ = H, R² = H

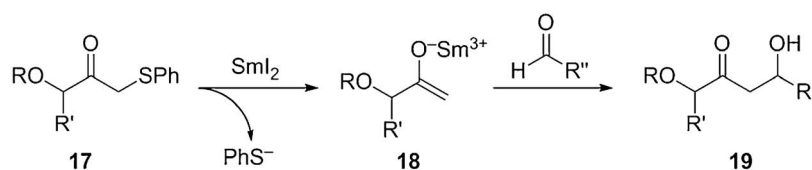
Fig. 3. Structure of Herbicidins



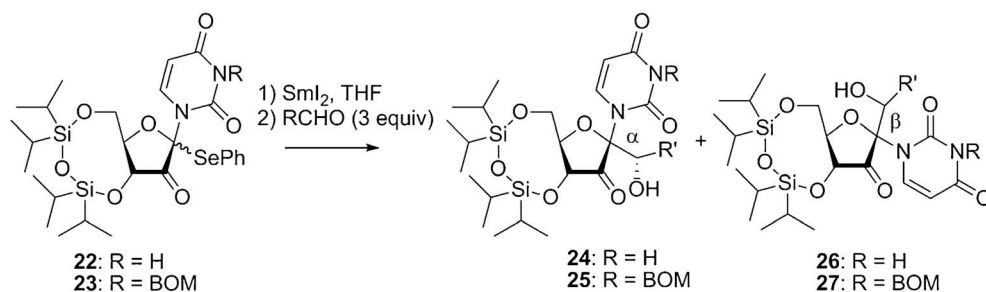
Tunicamycins (**21**)

I: R = (CH₂)₇CH(CH₃)₂ V: R = (CH₂)₉CH(CH₃)₂
 II: R = (CH₂)₈CH(CH₃)₂ VI: R = (CH₂)₁₁CH(CH₃)₂
 III: R = (CH₂)₁₀CH₃ VII: R = (CH₂)₁₀CH(CH₃)₂
 IV: R = C₁₂H₂₅ VIII: R = (CH₂)₁₂CH₃

Fig. 4. Structure of Tunicamycins



Scheme 3.



Scheme 4.

Table 3. SmI₂-Promoted Aldol Reaction between **23** and Aldehydes

Entry	Electrophile	Temp. (°C)	Products (yield, %)		α/β
1	phCHO	-78	25 (76%)	27 (10%)	7.6 : 1
2	MeCHO	-78	25 (29%)		β only
3	<i>i</i> -PrCHO	-78	25 (48%)		β only
4	<i>t</i> -BuCHO	-78→rt	—		—
5	(CHO) _n	-78→0	25 (57%)	27 (12%)	4.8 : 1

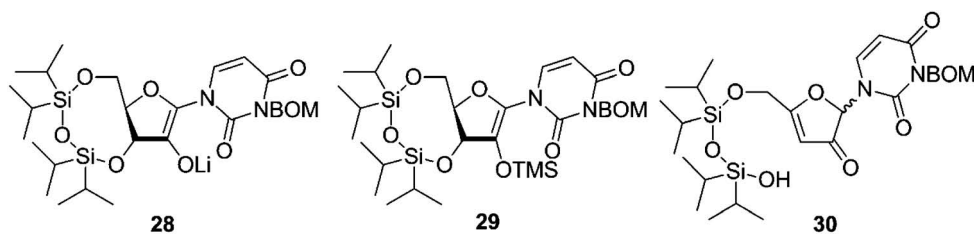


Fig. 5.

物質が誕生し、それらは細菌による感染症から人々を救ってきた。しかしながら、これらの抗生物質を用いる薬物治療には常に薬剤耐性菌の出現が伴い、現代の医療における新たな脅威となっている。⁵⁵⁻⁵⁷⁾ 実際にわが国の医療現場でも、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) による院内感染が大きな問題となっている。また、世界3大感染症の1つである結核は、世界人口の約1/3が感染しており、年間死者数は200万人以上に上る。この結核も例外にもれず、既存の薬が全く効かない「超薬剤耐性菌の出現」が近年問題となっており、WHOが最も注意すべき結核菌として喚起を促している。⁵⁸⁾ このような状況であることは、広く認知されているにも係わらず、製薬会社における抗菌剤開発はひとところに比べて停滞しており、開発中の感染症治療薬、特に新規な作用機序を有する薬物系統の数は著しく少ない。こと抗結

核薬に関しては、1965年に開発されたりファンピシンを最後に、臨床使用にまで到達した新規抗結核薬は全くないのが現状である。感染症に対する治療の第一選択は言うまでもなく化学療法であり、他の疾病と比べて新規薬剤の開発の必要性は大きく、かつ継続されなければならない。

2-1. 抗菌剤開発の新たな標的：MraYとその阻害剤 ペプチドグリカン細胞壁の主要構成成分であり、細菌細胞膜の外側を取り囲んで細胞外からの異物の侵入や、細胞内浸透圧による溶菌を防いでいる。N-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミルペンタペプチドが1,4-β-グリコシド結合により重合し、ペプチド部で架橋することで網目状の頑丈な細胞壁が構築される。細胞内で合成されたUDP-N-アセチルムラミルペンタペプチドは細胞内膜酵素トランスロカーゼI (MraY) の触媒反応により、細胞膜内のリン脂質 (ウンデカプレニルリン酸) に

縫い付けられ、ウンデカプレノールニリン酸 *N*-アセチルムラミルペンタペプチド (リポド I) を生成する (Fig. 6). リポド I はさらに糖転移酵素 MurG によってペプチドグリカン前駆体であるリポド II に変換される. リポド II は細胞膜外に転移されたのち, トランスグリコシダーゼやトランスペプチダーゼ等により重合されて成熟したペプチドグリカンとなる. *MraY* はペプチドグリカンの生合成に必須な酵素であり, ペプチドグリカン生合成に係わる酵素の中で近年抗菌剤開発の新たな標的として注目されている酵素の 1 つである.⁵⁹⁻⁶¹ 現在臨床で広く利用されているグリコペプチド系 (バンコマイシン, テイコプラニン) や β -ラクタム系抗生物質の標的よりも生合成経路において上流に位置するため, *MraY* 阻害剤は, MRSA や VRE と呼ばれた薬剤耐性菌を含む細菌に対して広く有効な薬剤の創製につながることを期待される.

1985 年に磯野らによって放線菌 *Streptomyces griseoporeus* の培養液から単離されたリポシドマイシン類⁶²⁻⁶⁹ (LPM, Fig. 7, 31) は *MraY* を強力に阻害し ($IC_{50}=0.03 \mu\text{g/ml}$ for *MraY* of *E. coli*), 中でも LPM-B は *in vitro* 活性試験において抗酸菌を

はじめとする病原菌に抗菌活性を示す ($MIC=1.6 \mu\text{g/ml}$, for *Mycobacterium. phlei* IFO 3158). また, 勲微生物研究会の五十嵐らは, 2003 年に放線菌 *Streptomyces* sp. の一種からヌクレオシド系天然物カプラザマイシン類 (CPZs, 32) を分離した.⁷⁰⁻⁷³ CPZ B は多剤耐性株を含む結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) と非結核性抗酸菌 (*Mycobacterium. avium-intracellulare* complex; MAC) に対して特異的な抗菌活性 ($MIC=3.13-12.5 \mu\text{g/ml}$) を示し, 抗酸菌症の治療薬として理想的な狭域の抗菌スペクトルを持つ化合物である. さらに, マウス肺結核感染モデルにおいて用量依存的な治療効果を示し, 細胞毒性等の副作用も認められなかったため, 新規化学構造を有する抗結核薬の候補化合物として注目されている. その化学構造は, 特徴的な 3 つの不斉中心を有する 7 員環ジアゼパノン, 脂溶性長鎖アシル側鎖, 5-アミノリボースそしてウリジンが複雑に縮合したものである.

FR-900493 (Fig. 8, 33) は 1989 年に藤沢薬品工業株式会社によって木枯菌 (*Bacillus cereus*) から単離された広い抗菌スペクトル ($MIC=6.25 \mu\text{g/ml}$ for *S. aureus*, $MIC=12.5 \mu\text{g/ml}$ for *E. coli*) を示すヌクレ

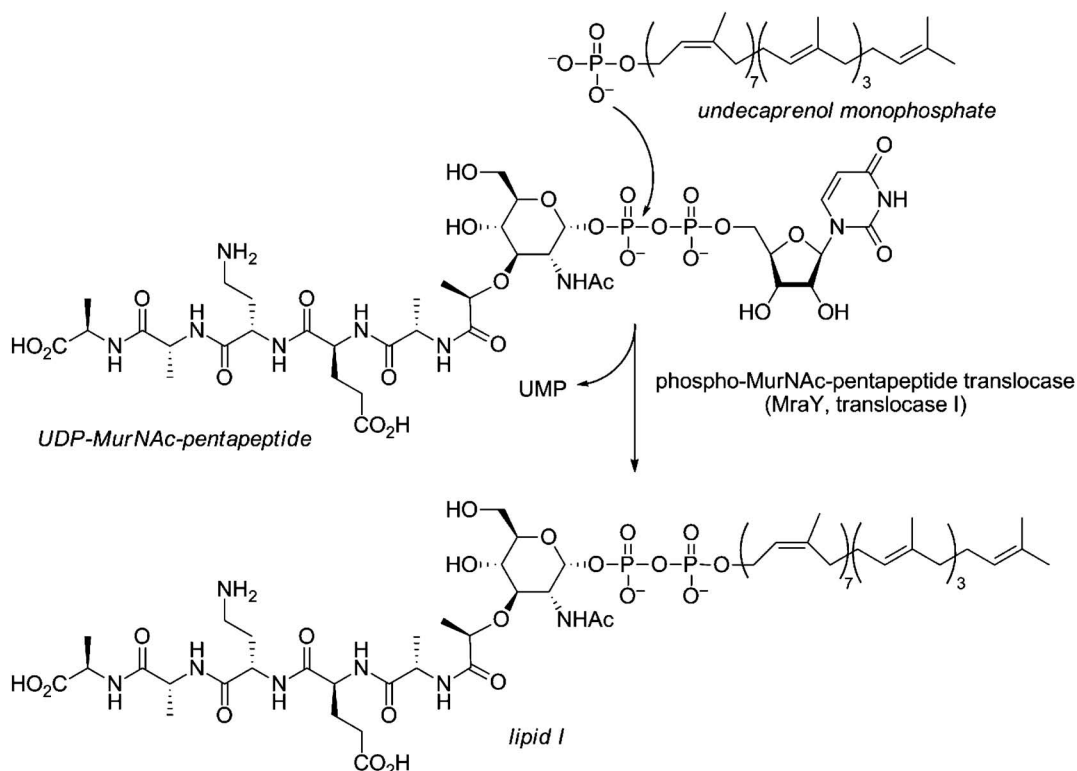


Fig. 6. Formation of Lipid I Catalyzed by *MraY* (Translocase I)

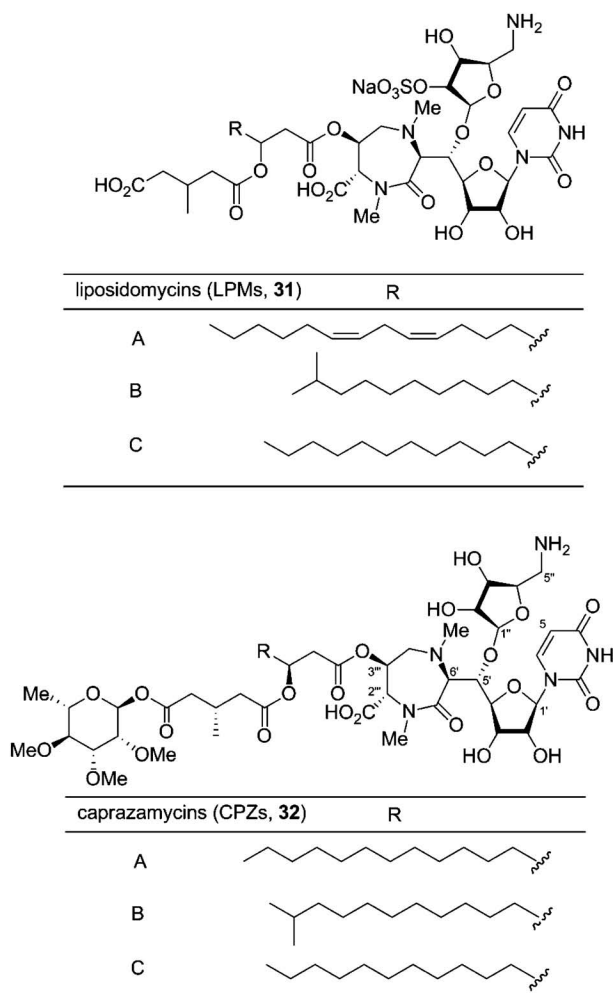


Fig. 7. Structures of Nucleoside Antibiotics Possessing the 6'-N-Alkyl-5'-O-aminoribosyl-C-glycyluridine

オシド系天然物である。^{74,75)} またムライマイシン類 (MRY, **34**) は 2002 年に米国の Wyeth 社によって単離された天然物であり、強力な *MraY* 阻害活性 ($IC_{50}=0.027 \mu\text{g/ml}$ for *MraY* of *E. coli*) と黄色ブドウ球菌感染マウスを用いた *in vivo* 活性試験で優れた治療効果を示した。また *in vivo* 実験において毒性等の副作用は報告されておらず、新規抗菌剤開発のリードとして期待されている。⁷⁶⁾

2-2. 隣接基関与を用いない β 選択的ナリボシル化反応の開発とカプラゾールの全合成 われわれは新規ヌクレオシド系天然物の化学構造、並びにその生理活性に興味を持ち、その合成過程を通して医薬化学的展開を行うことにした。Figures 7 and 8 に示した類縁天然物の合成研究は数多く報告されているが、その全合成に到達したものはない。⁷⁷⁻⁹⁵⁾ そこ

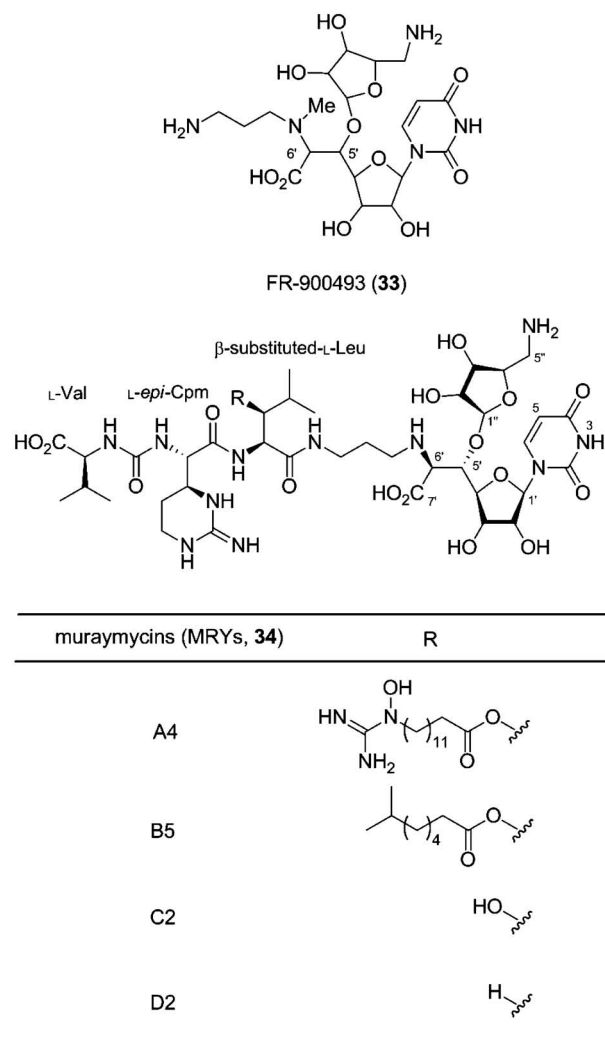
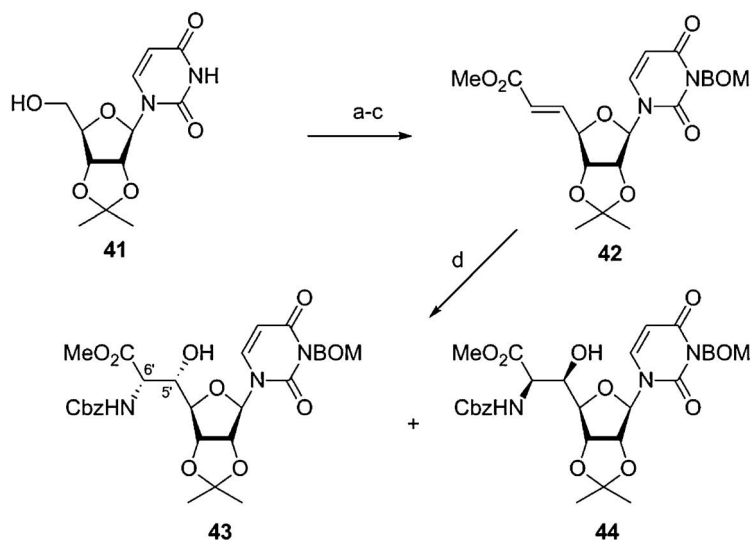
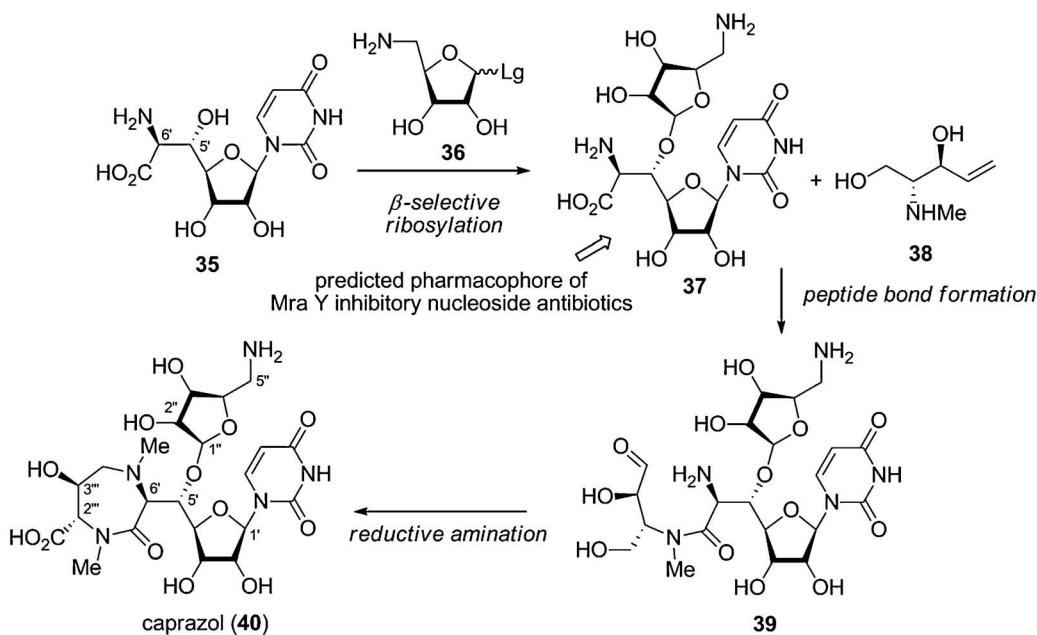


Fig. 8. Structures of FR-900493 and Muraymycins

で、われわれは天然物 **31-33** の *MraY* 阻害活性発現に必須な共通構造 **37** を基軸とする合成研究を展開した (Scheme 5)。まず、最近 X 線結晶構造解析により全立体配置が決定されたカプラゾール (**40**) の全合成を行った。^{96,97)}

2',3'-O-イソプロピリデンウリジン **41** の 5'位水酸基を *o*-iodoxybenzoic acid (IBX) 酸化して得られるアルデヒド体を Wittig 反応によりメトキシメチリデン化し、ウラシル塩基部 3 位を BOM 基で保護して化合物 **42** を調製した。次に **42** に対して、[DHQD]₂AQN をリガンドとする Sharpless らによるアミノヒドロキシル化⁹⁸⁾ を行くと、86 : 14 の比で望む 5'S,6'S 配置を有する化合物 **43** が優先して得られた (Scheme 6)。

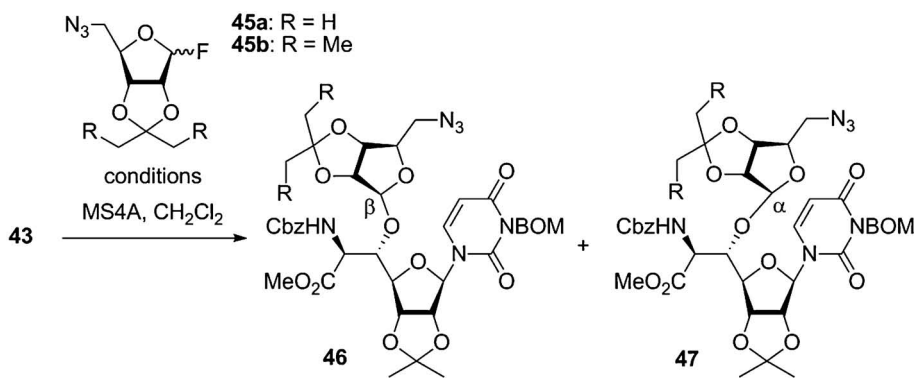
次に化合物 **43** の 5'位水酸基へのアミノリボース



a) **Reagents and conditions:** (a) IBX, MeCN, 80°C; (b) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Me}$, CH_2Cl_2 , -30°C; (c) BOMCl, Na_2CO_3 , Bu_4NI , $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$, room temperature (70%, 3 steps); (d) CbzNH_2 , $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$, $(\text{DHQD})_2\text{AQN}$, NaOH , $t\text{-BuOCl}$, $n\text{-PrOH-H}_2\text{O}$, 5°C-room temperature (52% for **43**, 9% for **44**).

の導入を検討した (Scheme 7). グリコシル化反応により β -グリコシドを構築するためには, アシル基の隣接基関与を用いるのが一般である. しかしながら, LPM 類の構造決定研究において, 塩基処理によりジアゼパノン部, β -アシロキシカルボン酸部が容易に β -脱離を起こすことが報告されているために, アシル基による隣接基関与を利用した β -リボースの導入は, アシル基の脱保護の際に問題を生じる可能性が高い. したがって, 塩基性条件を用

いず脱保護可能で, かつ β 選択的なりボシル化を行う必要が生じた. われわれはアセタール保護したリボース誘導体の α 面に存在する保護基をかき高くすれば β 面選択的に求核剤が反応し β -リボシドを与えると予想した. まず糖供与体として, イソプロピリデン保護した 5-アジドリボシルフルオリド **45a** を用いたリボシル化反応を検討した. まず, **43** を $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ⁹⁾ や過塩素酸銀などトリフルオロメタンスルホニウムイオンを含まない活性化剤処理



Scheme 7.

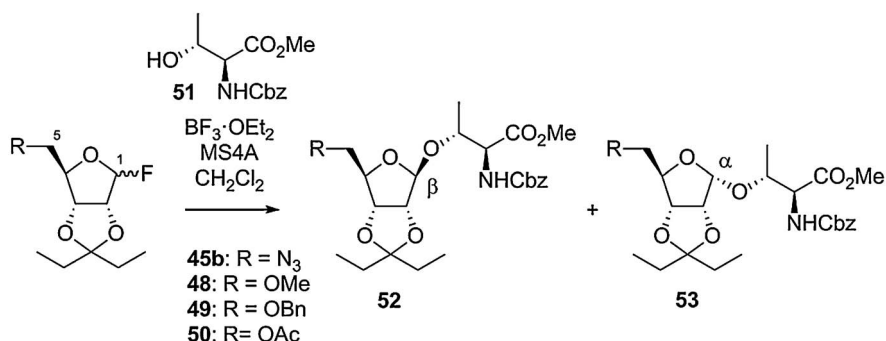
Table 4. Ribosylation Reactions of 5'-C-Glycylluridine **43**

Entry	Donor	Activator (eq.)	Temp. (°C)	Yield (%)	Ratio (46/47)
1	45a	BF ₃ · OEt ₂ (1.5)	0	72	2.8/1
2	45a	BF ₃ · OEt ₂ (1.2)	-30	78	2.7/1
3	45a	TMSOTf (1.0)	0	trace	—
4	45a	AgOTf (1.5)/Cp ₂ HfCl ₂ (1.5)	-40	quant.	1.2/1
5	45a	AgOTf (1.5)/SnCl ₂ (1.5)	0	60	2.0/1
6	45a	AgClO ₄ (1.5)/SnCl ₂ (1.5)	0	40	2.6/1
7	45b	BF ₃ · OEt ₂ (1.5)	0	80	24.0/1

したところ、 β -リボシド体 **46** が優先して得られたが、その立体選択性は約 3 : 1 と満足できるものではなかった (Table 4, entries 1–6). 他の糖供与体として、対応するスルホキシド体、トリクロロアセトイミデート体を用いたリボシル化反応も検討したが、 β 選択性は全く認められなかった。そこで、2,3 位水酸基にさらにかさ高い 3-ペンチリデン基を有するリボース糖供与体 **45b** のリボシル化反応を検討した。すなわち、**45b** を BF₃ · Et₂O を活性化剤として反応させたところ、立体選択性は、飛躍的に向上し、 β/α 比 24/1 で望む β -リボシド **46b** を得ることができた (entry 7)。次に糖供与体の 5 位の置換基の種類が立体選択性に与える影響を調べるために、それぞれアセトキシ、ベンジルオキシ及びメトキシ基を導入したペンチリデン保護糖供与体 **48**, **49** 及び **50** を用いて L-スレオニン誘導体 **51** のリボシル化反応を行った (Scheme 8, Table 5)。5 位の置換基をアジド基からベンジル基あるいはメトキシ基に変換しても β 選択性は $\beta/\alpha=96/4$ と変わらず、5 位置換基の高さはそれほど立体選択性に影響を与えないことが分かった (entries 1–3)。一方、アセトキシ基を導入した場合は、アルコキシ基に比べ

てわずかに β 選択性の低下が観察された (entry 4, $\beta/\alpha=91/9$)。恐らく、5 位のアセトキシ基からの隣接基関与が働き、 β 選択性が低下したと考えられる。

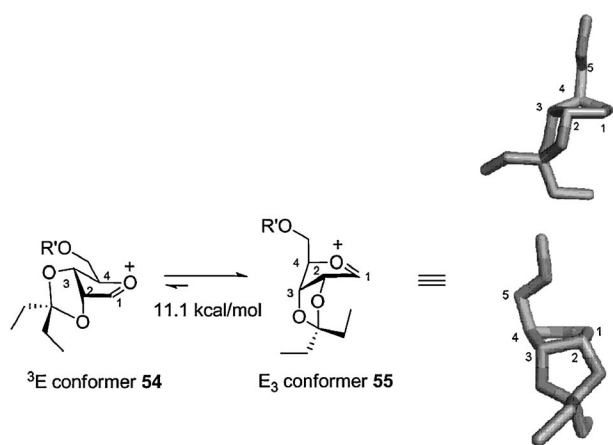
リボシル化反応において生じるオキソカルベニウムイオン中間体は、1 位炭素原子とフラノース酸素原子間の結合が二重結合性を帯びているため、3 位炭素原子が β 面側に上がった ³E コンホマー **54** と α 面側に下がった E₃ コンホマー **55** との平衡状態にあると考えられる (Fig. 9)。そこで立体選択性の発現機構を詳細に考察するために、密度汎関数法^{100–102} (DFT 法) による構造最適化計算を行い、オキソカルベニウムイオン中間体のそれぞれのコンホマーにおける最安定構造及び全電子エネルギーを算出した。その結果、最安定構造は E₃ コンホマー **55** であり、³E コンホマー **54** に比べて 10 kcal/mol 以上安定であることが示唆された。フラノース誘導体を糖供与体とする C-グリコシル化反応における立体選択性発現に関して、Woerpel らは立体選択性を次のように説明している (Fig. 10).¹⁰³ フラノース誘導体から生じるオキソカルベニウムイオン中間体は、3 位炭素原子を頂点とする E₃ コンホマーと ³E コンホマーとの平衡状態にあるが、立体電子効



Scheme 8.

Table 5. Effect of a Substituent at the 5-Position on the Stereoselectivity

Entry	Donor	R	Yield (%)	Ratio (52/53)
1	45b	N ₃	95	97/3
2	48	OMe	99	96/4
3	49	OBn	94	96/4
4	50	OAc	96	91/9

Fig. 9. Optimized Geometries (B3LYP/6-31G**) of the E₃ Conformers of the Oxocarbenium Ions 2,3-O-3-Pentylidene-5-methyl-D-ribofuranose

果により、E₃ コンホマーがよりエネルギー的に安定なコンホマーとして存在している。このE₃ コンホマーに対して求核付加反応は、すべての置換基の配座が *staggered* である生成物を与えるように3位炭素原子側 (*inside attack*) から主に進行する。逆側の *outside attack* が進行した場合は、置換基が *eclipsed* 配座となるものがあるため遷移状態は不安定化される。その結果、生成物としてはα体 56 を選択的に与える。これらを考慮すると、3-ペンチリ

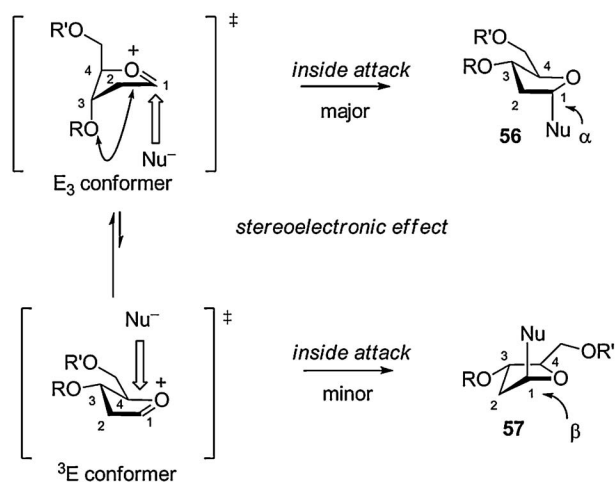


Fig. 10. Schematic Representation of the Stereoselectivity of the Nucleophilic Attack to Oxocarbenium Ions of C-3-Alkoxyfuranosides

デン保護糖供与体を用いるリボシル化反応は、生じるオキソカルベニウムイオン中間体のE₃ コンホマーが³E コンホマーより 10 kcal/mol 以上安定化されているものの、α面に存在する3-ベンチリデン基の立体障害により *inside attack* が抑制されるため、通常みられない *outside attack* が進行して、β選択性を発現したと考えることができる (Fig. 11)。

隣接基関与を必要としないβ選択的なりボシル化反応を開発することができたので、次にCPZ類の特徴的構造であるジアゼパノンの構築を行った (Scheme 9)。まず、βリボシド 46b をカルボン酸 61 へと導き、3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4 (3*H*)-one (DEPBT)¹⁰⁴ を用いてD-セリンから調製したアミン誘導体 62 と脱水縮合して化合物 63 を得た。さらに末端オレフィン部をアルデヒドへと変換して環化前駆体である化合物 64 へ導いた。ここで 64 の接触還元によるCbz基の脱保護

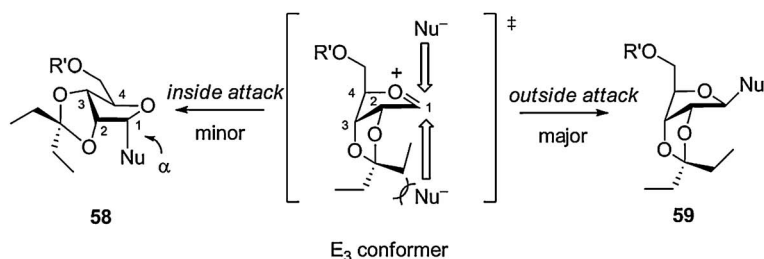
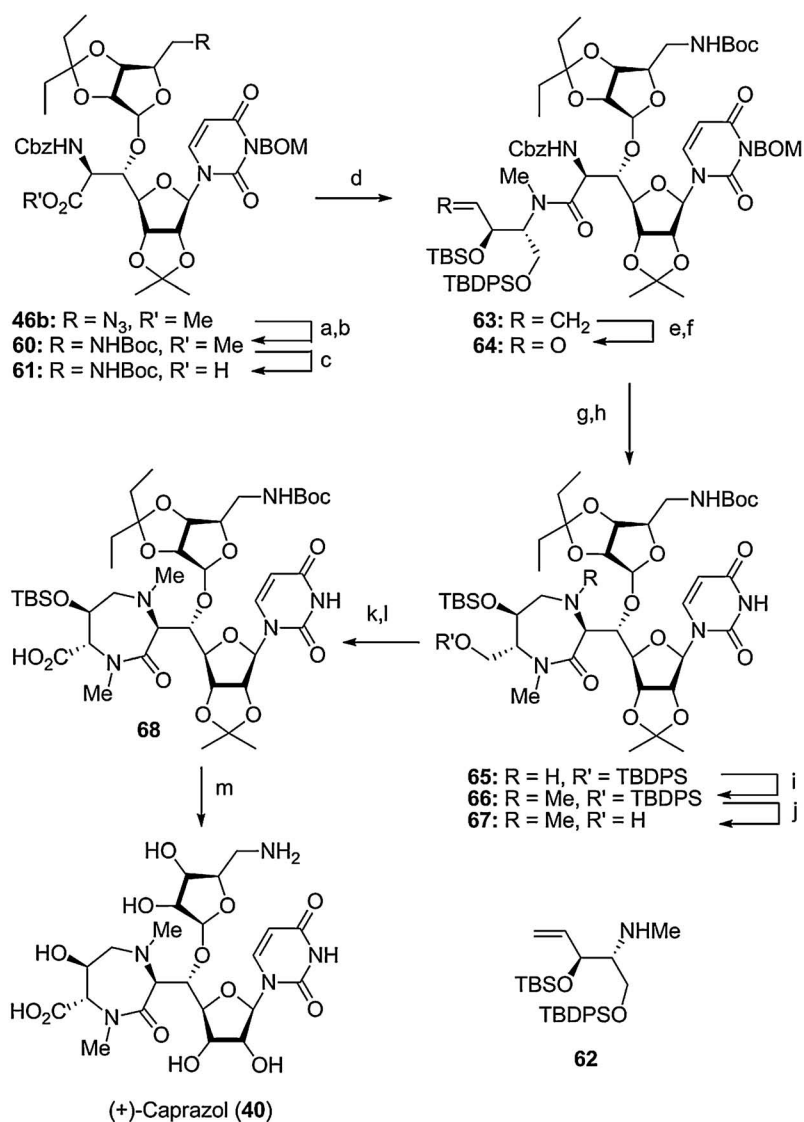


Fig. 11. Schematic Representation of the β -Streoselectivity of the Nucleophilic Attack to Oxocarbenium Ions of 3-Pentylidene Protected Ribofuranoside



Scheme 9^a).

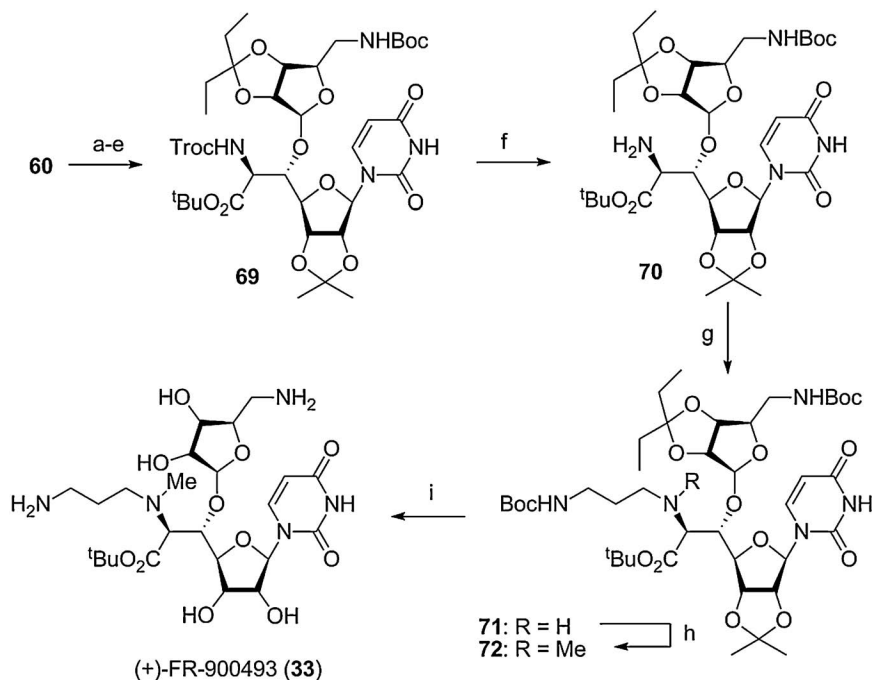
a) **Reagents and conditions:** (a) Ph₃P, H₂O, benzene-THF, 50°C; (b) (Boc)₂O (95%, 2 steps); (c) Ba(OH)₂, THF-H₂O, room temperature (50%) (d) **62**, DEPBT, NaHCO₃, THF, 0°C-room temperature (81%); (e) OsO₄, NMO, *t*-BuOH, acetone-H₂O, room temperature; (f) NaIO₄, acetone-H₂O, room temperature (61%, 2 steps); (g) H₂, Pd black, *i*-PrOH, room temperature; (h) NaBH(OAc)₃, AcOH, AcOEt, room temperature (34% for **65**, 24% for **66**); (i) (CH₂O)_n, NaBH(OAc)₃, AcOH, AcOEt, room temperature (65%); (j) NH₄F, MeOH, room temperature (60%); (k) Dess-Martin periodinane, CH₂Cl₂, room temperature; (l) NaClO, NaH₂PO₄, *t*-BuOH-H₂O (56%, 2 steps); (m) HF-H₂O (50%).

に続く、環化によるシッフ塩基形成とイミンの還元を一挙に行うことを試みた。化合物 **64** を水素雰囲気下でメタノール中、パラジウム黒を触媒として反応させると、ジアゼパノン環は構築できたものの、ウラシル塩基部 5,6-位の二重結合が還元された化合物が低収率で得られるのみであった。本反応を詳細に検討したところ、シッフ塩基形成による環化とシッフ塩基の還元が 5,6-位二重結合の還元に比べて遅いことが分かった。そこで、Cbz 基の除去に続く反応にヒドリド還元を用いることとした。種々条件を検討したところ、第一段階目の接触還元による Cbz 基の除去をイソプロパノール中で行い、続いて $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ 処理すると、目的とするジアゼパノン体 **65** が得られることが分かった。次のステップはジアゼパノン上の 2 級アミンのメチル化であるが、興味深いことに本変換で既にメチル化が進行した化合物 **66** が得られた。なお、メチル化の炭素源は、BOM 基の除去の際に生じたホルムアルデヒドであると考えられる。引き続き、ジゼパノン体 **66** の TBDPS 基を選択的に除去したのち、第一級水酸基をカルボン酸へ酸化して化合物 **68** を得た。最後にフッ化水素酸ですべての保護基を脱保護すること

で (+)-caprazol (**40**) の初の全合成を達成した。^{96,97)} 合成品は、旋光度をはじめとする各種機器データが標品のそれと一致した。⁷¹⁾

2-3. FR-900493 の全合成 FR-900493 (**33**) は、平面構造は明らかとなっているものの、相対・絶対立体配置は未決定であった。そこで、われわれは、**33** も **40** と同様の立体配置を有すると予想して、天然物の推定構造の合成を行った (Scheme 10)。まず化合物 **60** の保護基を適切に変換して、化合物 **69** を得た。**69** の亜鉛処理により Troc 基を除去して得られるアミン体 **70** に対して、段階的に還元的アルキル化反応を行い 6'-*N,N*-ジアルキル体 **72** を得た。最後に含水 80% トリフルオロ酢酸ですべての保護基を除去した。得られた合成品の比旋光度を含む各種機器データは標品と完全に一致した。ここにわれわれは FR-900493 (**33**) の初の全合成を達成するとともに、その立体化学が一連の *MraY* 阻害天然物と同じ 1'*R*, 2'*R*, 3'*R*, 4'*S*, 5'*S*, 6'*S*, 1''*S*, 2''*R*, 3''*R*, 4''*R* であることを明らかにした。¹⁰⁵⁾ 本合成経路を利用すればさらに強力な *MraY* 阻害活性を有する *MRV* 類の合成も可能であると考えている。

2-4. カプラザマイシン類の構造・活性相関研究



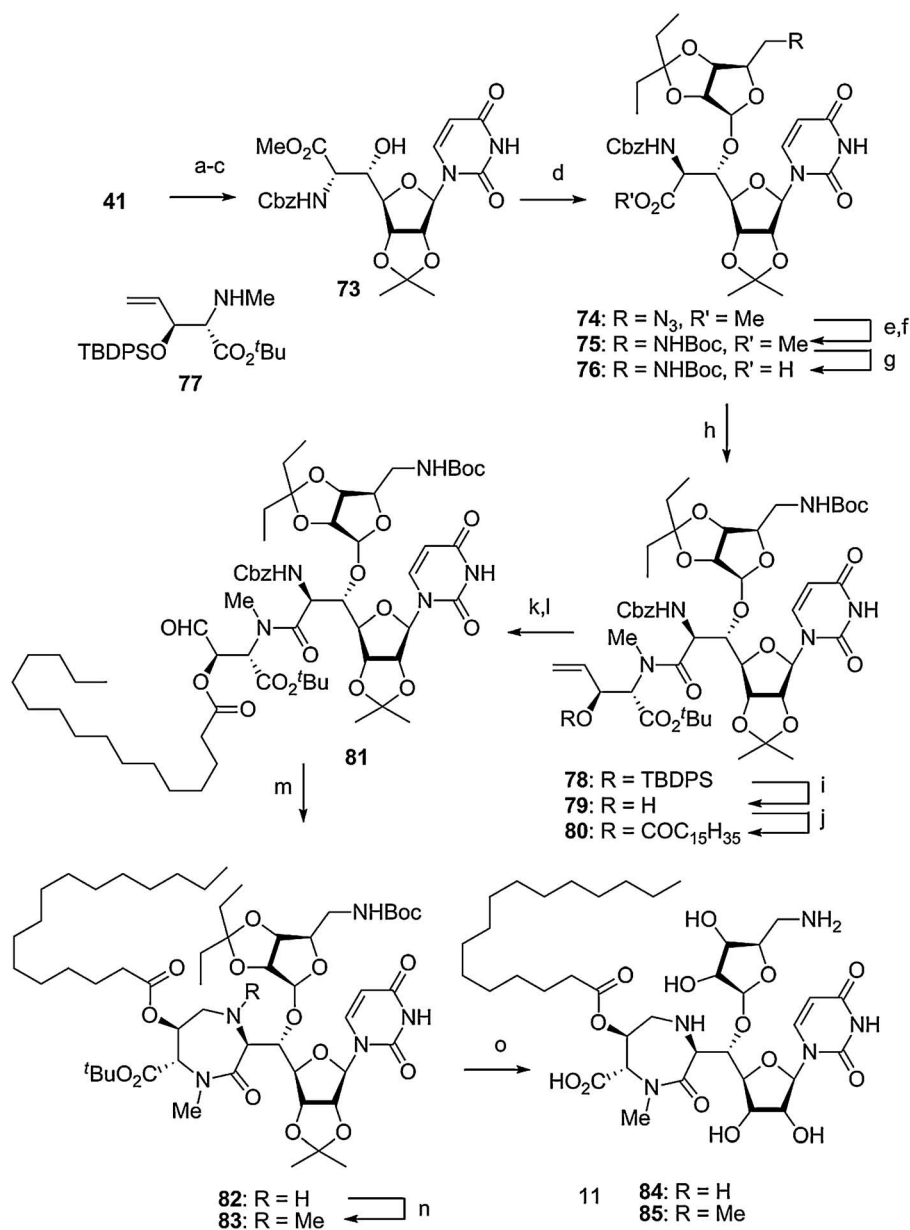
Scheme 10^{a)}.

a) Reagents and conditions: (a) $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, aq. THF; (b) $t\text{BuOC}(\text{NH})\text{CCl}_3$, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , (46%, 2 steps); (c) H_2 , Pd/C, MeOH; (d) TrocCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , (79%, 2 steps); (e) H_2 , Pd(OH)₂/C, TCA, MeOH (92%); (f) activated Zn powder, NH_4Cl , MeOH (95%); (g) $\text{BocHNCH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH, CH_2Cl_2 , (80%); (h) $(\text{CH}_2\text{O})_n$, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH, AcOEt (70%); (i) aq. 80% TFA (quant.).

創薬展開の第一歩としてカプラザマイシンの構造活性相関研究及びファーマコフォアの探索を行うこととした。まず CPZ 類が有する複雑な脂肪酸側鎖構造をパルミトイル側鎖で置き換えたパルミトイルカプラゾール (**85**) を設計し、脂肪酸側鎖の単純化を図った。ジアゼパノン環構築後のパルミトイル基導入も考えられるが、導入時の β -脱離等の副反応を避けるため、ジアゼパノン環化前に行うことと

し、前述の (+)-カプラゾールの全合成経路を利用して **85** を合成した (Scheme 11)。

85 とそのデスメチル体 **84** の抗菌活性を、MIC (最小発育阻害濃度) を求めることにより評価した (Table 6)。その結果、**85** と **84** はいずれもグラム陽性菌に対して特異的に抗菌活性を示すことが分かった。この活性は、より複雑な脂肪酸側鎖を有する天然物 CPZ D と同等であった。興味深いことに、



Scheme 11^{a)}.

a) **Reagents and conditions:** (a) IBX, MeCN 80°C; (b) Ph₃P=CHCO₂Me, CH₂Cl₂, -30°C (90%, 2 steps); (c) CbzNH₂, K₂OsO₂(OH)₄, (DHQD)₂AQN, NaOH, *t*-BuOCl, *n*-PrOH-H₂O, 5°C-room temperature (96%); (d) **45b**, BF₃·OEt₂, MS4A, CH₂Cl₂, -30°C (71%); (e) Ph₃P, H₂O, benzene-THF, 50°C; (f) (Boc)₂O (90%, 2 steps); (g) Ba(OH)₂, THF-H₂O, room temperature (73%); (h) **77**, DEPBT, NaHCO₃, THF, 0°C-room temperature (66%); (i) TBAF, THF (78%); (j) palmitic acid, EDCl, DMAP, CH₂Cl₂; (k) OsO₄, NMO, *t*-BuOH, acetone-H₂O, room temperature; (l) NaIO₄, acetone-H₂O, room temperature (83%, 3 steps); (m) H₂, Pd black, *i*-PrOH, room temperature; (n) NaBH(OAc)₃, AcOH, AcOEt, room temperature (96%, 2 steps); (o) (CH₂O)_n, NaBH(OAc)₃, AcOH, AcOEt, room temperature (65%); (o) *aq.* TFA (quant.).

ジアゼパノン上の *N*-メチル基の欠損は、結核菌が属する抗酸菌属のスメグマティスに対する抗菌活性を大きく低下させたが、その他の細菌に対する抗菌活性には影響を与えなかった。抗酸菌属は他のグラム陽性細菌とは異なる性質の細胞壁を有しており、この細胞壁の構造の違いが活性に影響を及ぼしていると思われる。以上の結果から、CPZ 類の複雑な脂肪酸側鎖構造を単純なパルミトイル側鎖で置き換えることが可能であることが分かった。また MRSA や VRE などの薬剤耐性菌に対しても抗菌活

Table 6. Antibacterial Activity of **84** and **85**

Test organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	85	84
<i>M. smegmatis</i> ATCC607	6.25	25
<i>S. aureus</i> FDA 209P	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> MS9610 (MDR)	3.13	3.13
<i>S. aureus</i> MRSA No. 5 (MRSA)	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> MRSA No. 17 (MRSA)	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> MS16526 (MRSA)	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> TY04282 (MRSA)	6.25	12.5
<i>E. faecalis</i> NCTC 12201 (VRE)	12.5	12.5

性を示したことから、*MraY* を標的とした CPZ 類をリードとする新規抗菌剤の開発研究の妥当性を示すことができた。¹⁰⁶⁾

次に、CPZ 類の有するウリジン、アミノリボース、ジアゼパノン、長鎖脂肪酸の各部分構造が活性発現に必要かどうかを調べるために、これらを欠如させた各種アミノリボース欠如誘導体 **86**、ウリジン欠如誘導体 **87**、ジアゼパノン環が開裂した誘導体 **88** をそれぞれ合成し (Fig. 12)、長鎖脂肪酸欠如誘導体とみなせるカプラゾール (**40**)、パルミトイルカプラゾールと併せて抗結核菌活性を評価した (Table 7).¹⁰⁷⁾ その結果、カプラゾール (**40**)、**86**、及び **87** の活性は完全に消失した。一方、ジアゼパノン環が開裂した誘導体 **88** は、抗菌活性は減弱するものの活性を保持していることが分かった。した

Table 7. Antibacterial Activity of CPZ Analogs against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Test prganism	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)				
	40	85	86	87	88
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	>100	2.50	>100	>100	6.25

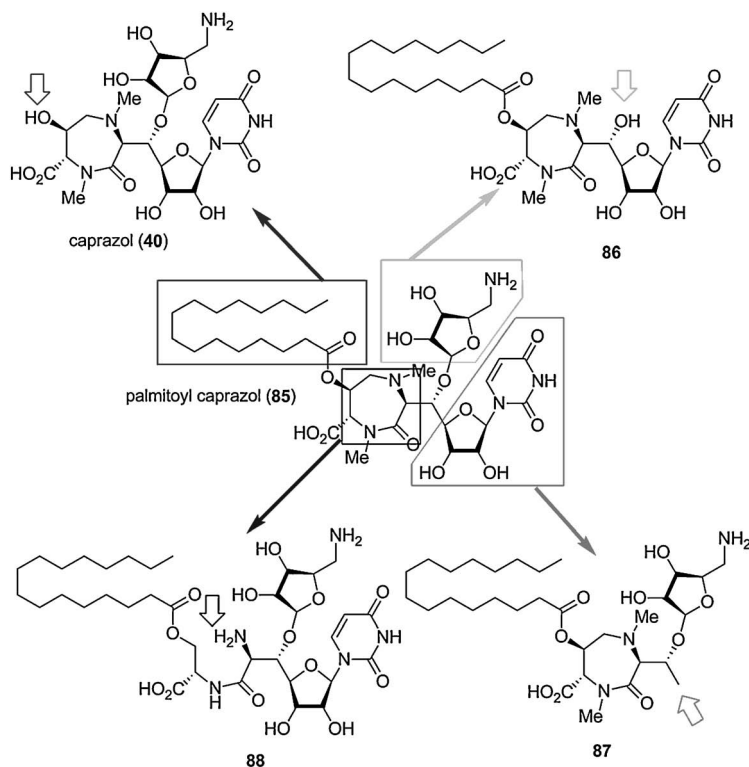


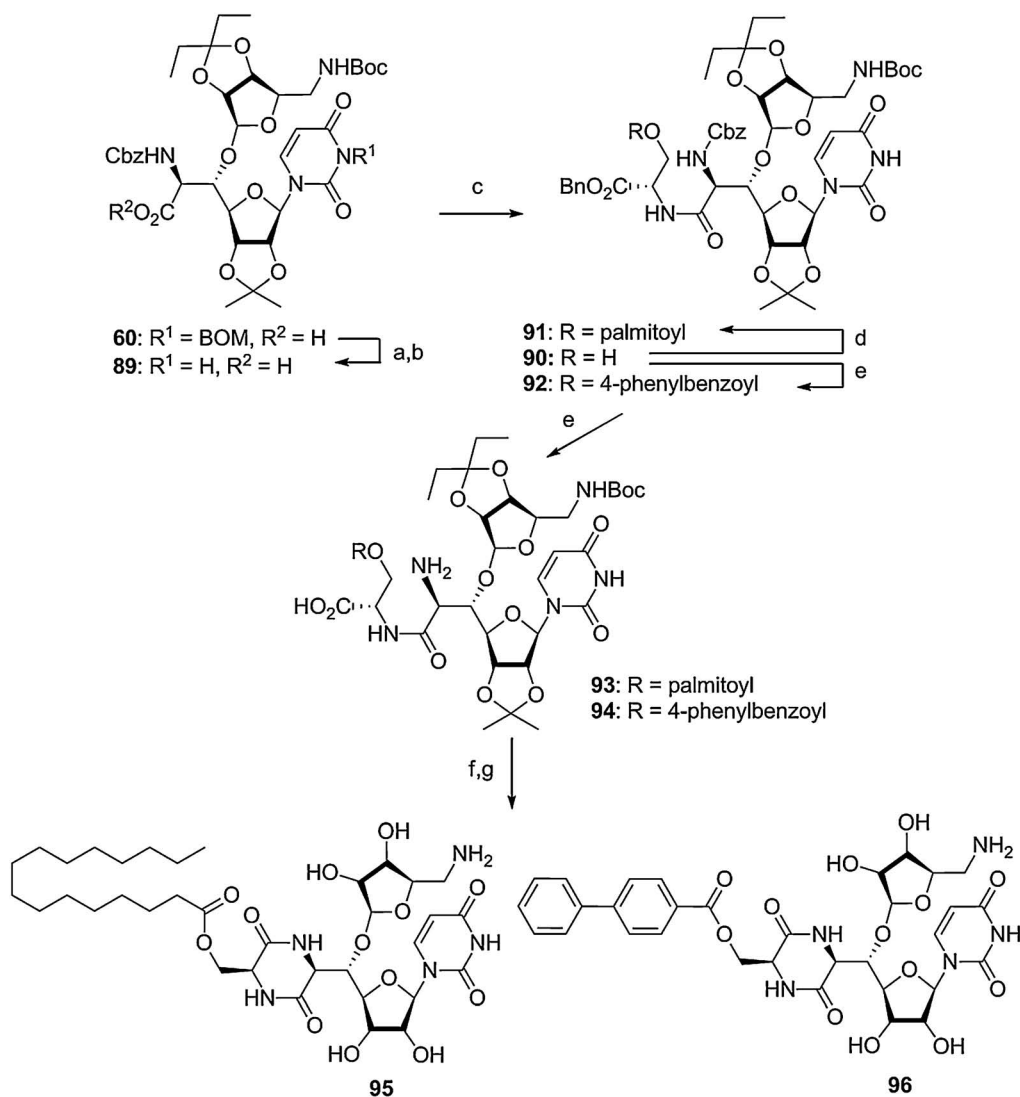
Fig. 12. Structures of Truncated Analogs of CPZs

がって、ウリジン、アミノリボース、長鎖脂肪酸は活性発現に必須であり、ジアゼパノン部はこれらの脂溶性側鎖とリボシルウリジン部を、適切な3次元配置に配置させる役割を担っていると考えられる。つまり、CPZ類の構造単純化を行う上で、このジアゼパノン部位は改変可能であることを示す。そこでジアゼパノン部をさらに単純なジケトピペラジンに変換し、脂肪酸側鎖として、パルミトイル基とフェニルベンゾイル基を有する誘導体 **95** と **96** を新たに設計した (Scheme 12)。これらの化合物は、カルボン酸 **89** とセリン誘導体を用いて、簡便に合成することができた。これらの抗菌活性を評価したと

ころ、パルミトイル基を有する **95** が各種菌体に対して中程度の活性を示すことが分かった (Table 8).¹⁰⁸⁾ 活性を向上すべく今後さらなる構造最適化が必要であるが、一連の研究を通じて、複雑な構造を有する親化合物 CPZ の単純化を行うことができた。

3. 新規な構造・機能を有する人工オリゴヌクレオチドの合成とその性質

これまでは主にヌクレオシドやヌクレオシド系天然物という小分子化合物の合成を通じた創薬化学研究について述べてきた。最近では、数十量体の核酸分子 (オリゴヌクレオチド) そのものを医薬品とし



Scheme 12^{a)}.

a) Reagents and conditions: (a) H₂, Pd(OH₂/C), MeOH; (b) CbzCl, NaHCO₃; aq. THF (79%, 2 steps); (c) L-Ser(OBn)·HCl, EDCl, HOBT, DMF; (d) palmitic acid, EDCl, DMAP, CH₂Cl₂ (89%); (e) 4-phenylbenzoic acid, EDCl, DMAP, CH₂Cl₂ (87%); (f) EDCl, HOBT, CH₂Cl₂; (g) 80% aq. TFA (3 steps, 70% for **95**, 84% for **96**).

Table 8. Antibacterial Activity of Diketopiperazine Analogs

Test organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	95	96
<i>S. aureus</i> Smith	25	>100
<i>S. aureus</i> MS9610 (MDR)	100	>100
<i>S. aureus</i> MRSA No. 5 (MRSA)	100	>100
<i>Micrococcus luteus</i> FDA16	25	>100
<i>Micrococcus luteus</i> PCI 1001	50	>100
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-558	25	>100
<i>Corynebacterium bovis</i> 1810	50	>100

て開発する研究が広範に行われている。例えば、セントラルドグマの流れ（転写又は翻訳）において、二本鎖 DNA を標的としその機能を阻害することで DNA の複製や DNA から mRNA への転写を抑制するアンチジーン法¹⁰⁹⁾ mRNA を標的とし mRNA を分解することでタンパク質の発現を抑制する方法であるアンチセンス法¹¹⁰⁾や RNAi (RNA 干渉)法¹¹¹⁾などがあり、これらの方法は臨床応用を指向して精力的に研究がなされている。さらに、DNA から mRNA への転写を活性化させるタンパク質である転写因子 (TF) を標的とするデコイ法や、¹¹²⁻¹¹⁴⁾ 核酸抗体と称されるアプタマー医薬の開発研究も行われている。¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾ アプタマーは、タンパク質をはじめとする標的分子に特異的に結合する核酸分子で、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) と呼ばれるスクリーニング法を用いて獲得される。これまで培ってきたヌクレオシド合成化学をオリゴヌクレオチドの化学に展開することで、核酸に新たな構造・機能を付与し、核酸医薬品開発に貢献できないかと考え、以下に述べる 2 つの研究に着手した。

3-1. NF- κ B 結合能を有する新規ダンベル DNA の合成 転写因子は DNA から mRNA への転写が行われる際、上流の DNA に作用するタンパク質である。この転写因子が配列特異的に DNA 上の転写因子結合配列 (シスエレメント) に結合し下流にシグナルが伝わることで、RNA ポリメラーゼによる mRNA への転写が活性化される [Fig. 13(a)]. デコイ法は、シスエレメントを持つ数十量体の二本鎖 DNA を“おとり (デコイ)”として加えることでこの転写因子を捕捉し、それにより本来の DNA 上のシスエレメントに転写因子が結合することを阻

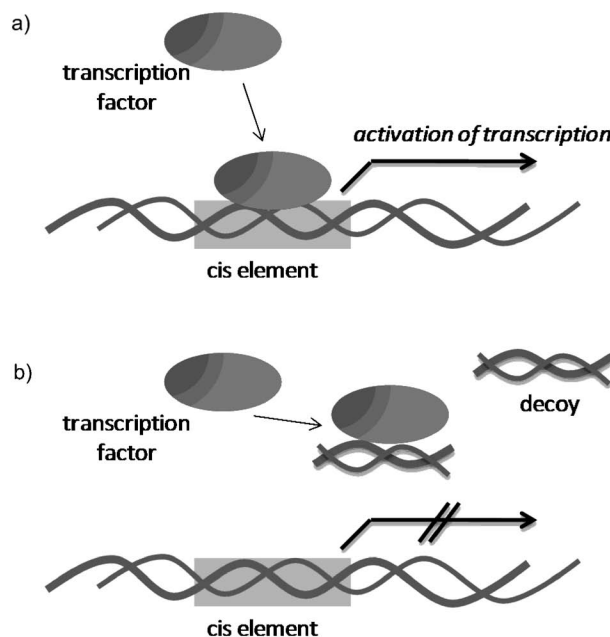


Fig. 13. Schematic Representation of Transcription Decoy Strategy

害する方法であり、結果としてタンパク質の発現を抑制できる [Fig. 13(b)].¹¹²⁻¹¹⁴⁾ 転写因子は数多くの種類、機能またそのシスエレメントが知られており、デコイ分子の配列を、標的とする転写因子のシスエレメントに対応させることで様々な転写因子に対してその機能のみを選択的に抑制することができる。しかしデコイ法は通常短鎖二本鎖核酸を用いるために、本来の長い DNA 鎖に比べ二本鎖構造を維持するために必要な熱的安定性が低く、また生体内核酸加水分解酵素であるヌクレアーゼに対する抵抗性が低いいため、未修飾 DNA を用いたデコイ DNA は *in vivo* でその機能が十分に発揮できないことが知られている。これらの問題点を克服するために、これまで様々な試みがなされているが、最もよく用いられるのはダンベル型の 2 次構造を有するデコイ DNA¹¹⁸⁻¹²⁰⁾ である。環状体とすることで、DNA の熱的安定性とエキソヌクレアーゼ耐性を同時に獲得できる。しかし、その調製には酵素を用いるためコストがかかる上に、スケールアップが困難で大量供給が難しい。化学修飾法も報告されているが、簡便さ・安定性に問題点を有している。われわれは、Fig. 14 に示すように、トリアゾール架橋形成によるダンベル型 DNA 合成法を考案した。すなわち、2 本鎖 DNA の両末端にアジド基、エチニル基を導

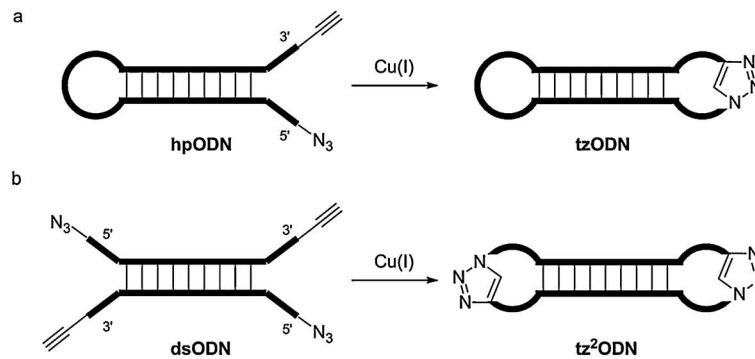


Fig. 14. Formation of Triazole Cross-linked Dumbbell-like ODNs (**tzODN** and **tz²ODN**) by the Copper Catalyzed Alkyne-azide Cycloaddition

(a) Cross-linking of hairpin ODN (**hpODN**) at a single site. (b) Cross-linking of double-stranded ODNs (**dsODN**) at both termini.

入し、DNA上で銅触媒によるクロスカップリング¹²¹⁻¹²⁵⁾ (copper-catalyzed azide acetylene coupling, CuAAC)を行うことで、新規ダンベル型DNAが得られるはずである。

まずCuAACを用いたDNA鎖末端部の架橋法を確立するために、モデル実験として反応点が1つである短鎖ヘアピン型オリゴデオキシヌクレオチド (Fig. 15, hpODN 1) を合成することとした。架橋部位を形成する3'末端ユニットとして固相担持されたN-3-プロパルギルチミジンを、5'末端ユニットとしては、アジド体の前駆体としてN-3-ヨードエチルチミジンのホスホロアミダイトユニットを合成した (Scheme 13)。これらを用いて、DNA自動合成機によりオリゴデオキシヌクレオチド **106** を合成した。固相担体上で、アジド基への変換を行い、目的とするダンベル型DNAの前駆体となるオリゴヌクレオチド hpODN 1 を調製した。次にCuAAC反応条件の最適化を検討した結果、50 μMの濃度に調製した hpODN 1 をバッファー (100 mM MOPS buffer, pH 7.0, 1 M NaCl) 中でアニーリングしたのち、500 μM 硫酸銅-tris (benzyltriazolyl) amine¹²⁶⁾ (TBTA)、5 mM アスコルビン酸ナトリウムで処理する条件が最適な結果を与え、tzODN 1 がほぼ単一生成物 (92%) として得られ、効率的に反応が進行することが分かった [Fig. 16(a), (b)]。生成物を酵素加水分解し、ヌクレオシド組成を分析した結果、構成塩基であるdC, dG, dT, dAのほかにも標品である[1,4]-環化付加体 **T-tz(1,4)-T** のピークが観察されたこと、構成塩基のピーク面積比が理論値と一致したことからその構造を確認した [Fig. 17

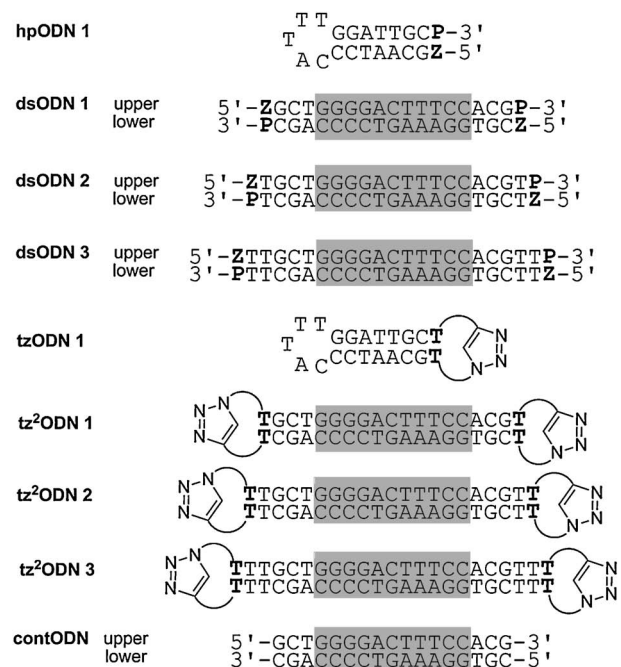
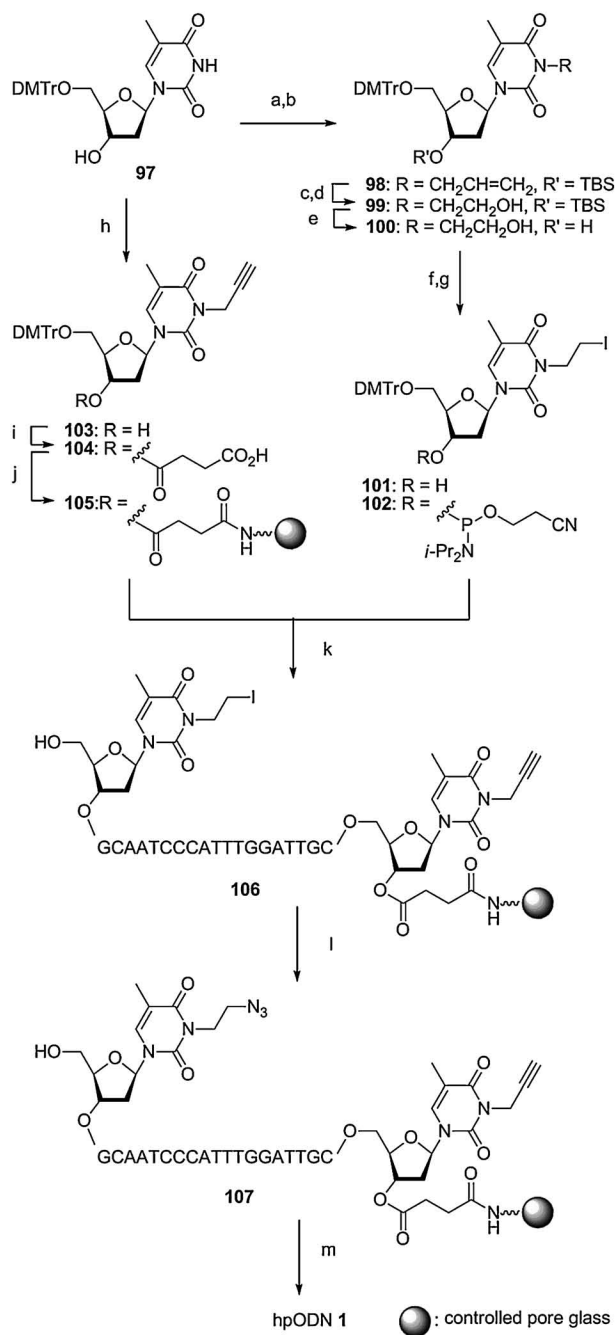


Fig. 15. Sequences of the ODNs

P = N-3-Propargylthymidine residue, Z = N-3-Azidoethylthymidine residue, T = N-3-Substituted thymidine residue. NF-κB recognition regions are marked with a gray box.

(c)].

次に2本鎖DNAの両末端でのCuAACによるダンベル型オリゴデオキシヌクレオチド tz²ODN 1 (Fig. 15) の合成を検討した。シスエレメントにはNF-κB結合配列を選択した。NF-κBはアレルギーなどの自己免疫疾患や細胞増殖、さらにはがんに関与するとされ、現在創薬標的として注目を浴びている転写因子である。¹²⁷⁻¹³¹⁾ 架橋部導入によって末端部の構造の自由度を少なくするとDNAのタンパク質との結合能が下がることも懸念されたために、末

Scheme 13^{a)}.

a) Reagents and conditions: (a) allyl bromide, K_2CO_3 , DMF, 91%; (b) TBSCl, imidazole, DMF, 90% in 2 steps; (c) OsO_4 , NMO, *aq.* acetone, NaIO_4 ; (d) NaBH_4 , MeOH, 71% in 2 steps; (e) TBAF, THF, 87%; (f) I_2 , PPh_3 , pyridine, toluene, 85%; (g) $\text{NCCH}_2\text{CH}_2\text{OPCINi-Pr}_2$, $i\text{-Pr}_2\text{NET}$, CH_2Cl_2 82%; (h) propargyl bromide, K_2CO_3 , DMF, 93%; (i) succinic anhydride, DMAP, Et_3N , MeCN, quant.; (j) EDCl, amino-CPG, DMF, 34.2 $\mu\text{mol/g}$; (k) oligonucleotide synthesis; (l) NaN_3 , DMF; (m) NH_4OH .

端部に不対塩基対を導入することで自由度を大きくした末端部架橋型デコイ DNA である $\text{tz}^2\text{ODN 2, 3}$ も同時に合成することにした。dsODN 1-3 を先と同様にして合成し、hpODN 1 を用いて最適化した

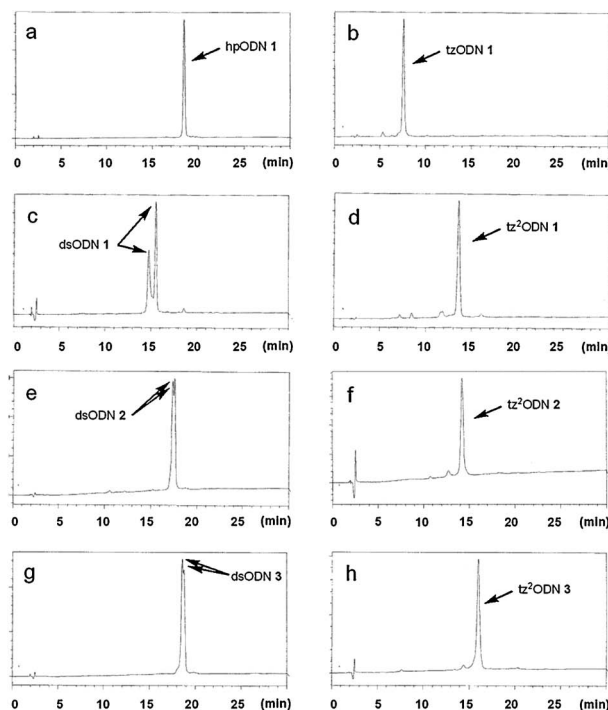


Fig. 16. Denaturing Reverse-phase HPLC Chromatograms (UV absorbance vs time) of the Cross-linking Reaction of hpODN 1, dsODNs 1, 2, and 3

(a) hpODN 1 in the absence of Cu[I] catalysis, (b) after the CuAAC of hpODN 1, (c) dsODN 1 in the absence of Cu[I] catalysis, (d) after the CuAAC of dsODN 1, (e) dsODN 2 in the absence of Cu[I] catalysis, (f) after the CuAAC of dsODN 2, (g) dsODN 3 in the absence of Cu[I] catalysis, (h) after the CuAAC of dsODN 3. All the reactions were performed with a 50 μM ODN in 100 mM MOPS-NaOH (pH 7, 1 M NaCl-BuOH) in the presence of 500 μM $\text{CuSO}_4\text{-TBTA}$ complex and 5 mM sodium ascorbate for 6 h to afford tzODN 1 , $\text{tz}^2\text{ODN 1, 2}$, and 3 (indicated as arrows), respectively.

条件下でそれぞれ反応を行った。その結果、反応前には C18 逆相 HPLC チャート上で 2 本のピークとして検出される dsODN 1-3 は、反応後 1 本のピークに収束し、 $\text{tz}^2\text{ODN 1-3}$ のいずれもほぼ単一生成物として得られた [Fig. 16(d), (f), (h)]. この結果から、トリアゾール架橋形成反応は、オリゴデオキシヌクレオチドの両末端で効率よく進行する上に、末端部での不対塩基対の導入に影響されることが分かった。CD スペクトル測定による構造解析の結果、合成したダンベル型 $\text{tz}^2\text{ODN 1-3}$ は、天然の DNA が一般に有する B 型構造を保持していることも分かった。

次にダンベル型 $\text{tz}^2\text{ODN 1-3}$ の熱的安定性について検討すべく、50% 融解温度 (T_m) を測定した。その結果、 $\text{tz}^2\text{ODN 1-3}$ はいずれも 80°C 以上の T_m 値を示し、架橋形成前の dsODN 1-3 に比べて 35-37°C の T_m 値の上昇がみられ、熱的安定性が大幅に向

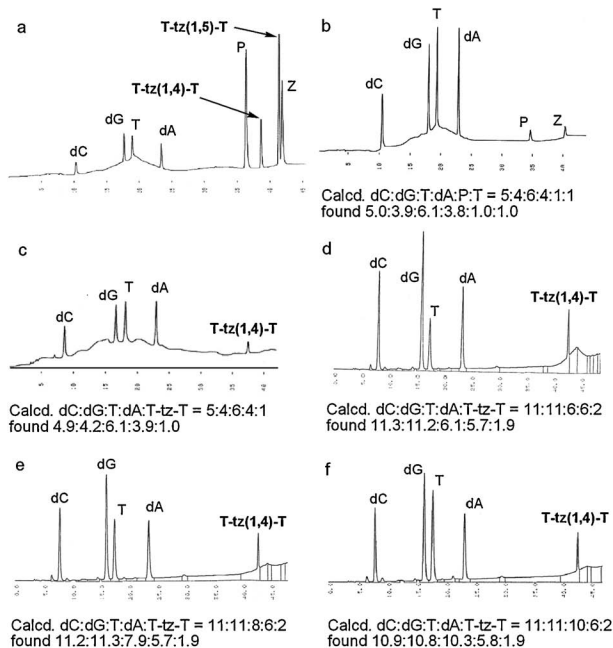


Fig. 17. HPLC Profiles (UV absorbance vs. time) of Enzymatic Digestion of ODNs and Their Nucleoside Compositions

(a) A mixture of authentic nucleosides, (b) hpODN 1, (c) tzODN 1, (d) tzODN 1, (e) tzODN 2, (f) tzODN 3.

Table 9. Thermal Stability of the Triazole Cross-linked Dumbbell ODNs

	T_m (°C) ^{a)}	ΔT_m (°C) ^{b)}
contODN	55.7	—
dsODN 1	52.7	-3.0
dsODN 2	50.3	-5.4
dsODN 3	47.0	-8.7
tz ² ODN 1	89.8	+34.1
tz ² ODN 2	85.2	+29.5
tz ² ODN 3	81.7	+26.0

^{a)} Conditions, 3 μ M each ODN, 1 mM sodium cacodylate-HCl (pH 7.0), 1 mM NaCl. Average of three measurements. ^{b)} T_m (modified)- T_m (control).

上していることが分かった (Table 9).

ヒト血清中で DNA は主に、3'末端より加水分解する酵素である 3'-エキソヌクレアーゼによって分解されることが知られている。そこで、tz²ODN 1-3 の 3'-エキソヌクレアーゼである蛇毒ホスホジエステラーゼ (SVPD) に対する耐性を検討した。コントロールの天然型オリゴデオキシヌクレオチドが半減期 10 分で分解される条件下において、tz²ODN 1-3 はいずれも実験開始後 8 時間を経過しても全く ODNs の切断断片は観察されず、24 時間経過後も

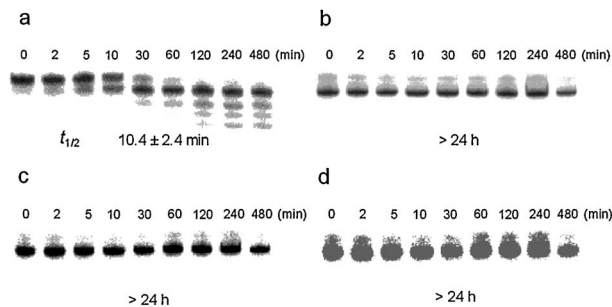


Fig. 18. Susceptibility to Snake Venom Phosphodiesterase Degradation of Triazole Cross-linked Dumbbell ODNs

5'-³²P-labeled control contODN and tz²ODNs 1-3 were incubated for different lengths of time, as indicated, with 64 mU snake venom phosphodiesterase in 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 37°C and then submitted to electrophoretic separation on 20% denatured polyacrylamide gels. (a) contODN, (b) tz²ODN 1, (c) tz²ODN 2, (d) tz²ODN 3.

90%以上が残存し、3'-エキソヌクレアーゼに対する抵抗性も大幅に上昇することが明らかとなった (Fig. 18).

合成した tz²ODN 1-3 がデコイ分子として機能するかを確かめるべく、NF- κ B (p50 ホモダイマー) との結合能について検討することとした。³²P-ラベルした tz²ODN 1-3 (2 nM) 存在下、NF- κ B の濃度を変化させて NF- κ B/tz²ODN 1-3 複合体に相当するバンドと解離状態の tz²ODN 1-3 に相当するバンドの割合の変化を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 法により測定し、tz²ODN 1-3 の NF- κ B に対する親和性を評価した。その結果、合成した tz²ODN 1-3 は、天然型 2 本鎖オリゴデオキシヌクレオチドと同様に、濃度依存的に NF- κ B と結合することが分かった (Fig. 19)。天然型並びに各 tz²ODN 1-3 の K_d 値は、それぞれ 12 nM, 18 nM, 14 nM, 9 nM であり、不對塩基対数の増加に伴う K_d 値の低下、すなわち NF- κ B に対する親和性の向上がみられた。両末端部に架橋部位を導入したことによりデコイ DNA の構造が固定されてしまい、そのため NF- κ B と DNA との複合体状態が取り難くなり、tz²ODN 1 は NF- κ B との親和性が最も低くなる。しかしながら末端不對塩基対の導入により、DNA の構造の自由度が上がり、tz²ODN 2, 3 のように NF- κ B との親和性が回復したと考えられる。これは末端不對塩基対を調節することで、内部の DNA 2 本鎖の微妙な構造変化を制御し得ることを示している。

以上のように、DNA 上での CuAAC によるトリ

アゾール形成反応を利用することにより新規ダンベル型 DNA の効率的な合成法を開発した. 新規ダンベル型オリゴデオキシヌクレオチドは, 熱的安定性, 3'-エキソヌクレアーゼ耐性とタンパク結合能を有しており, デコイ分子への応用が期待される.¹³²⁾

3-2. HMGB1 A-box 結合能を有する新規ペント DNA の合成 転写・複製・修復などの細胞の基本機能の発現には, 転写因子などのタンパク質が DNA に結合することに端を発する. そのため, 核酸-タンパク質の相互作用を理解することは極めて重要である.¹³³⁾ 核酸-タンパク質の相互作用は, 核酸の塩基配列に依存的なものと,¹³⁴⁻¹³⁶⁾ 非依存的なもの^{137,138)} とに大別することができる. 後者は DNA の特殊な 3 次構造を認識要因とするものであ

り, 例えば 2 重らせん折れ曲がり (bent) や巻き戻し (unwinding) などが含まれる. よく知られている例として, シスプラチン架橋 DNA とクロマチンタンパク質の 1 つである high mobility group B1 (HMGB1) の相互作用がある.¹³⁹⁾ シスプラチン (*cis*-DDP) は睾丸がん, 卵巣がん, 膀胱がんを適応症として広く用いられている. その抗腫瘍活性は, シスプラチンが DNA 鎖内の隣接グアニン塩基部 7 位間を架橋することにより DNA が折れ曲がり (Fig. 20, G^{Pt}_pG , Fig. 21), この構造変化が転写, 翻訳の過程を阻害すると考えられている.¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾ Box タンパク質と呼ばれる 2 つの DNA 結合モチーフを持つ HMGB1 は, この折れ曲がり構造や, 他に, four-way junction (4WJ; Holliday junction), プラスミドスーパーコイルなど構造異常を来した DNA に配列非依存的に親和性を有する. しかし, このような配列非依存的な核酸-タンパク質の相互作用に関する詳細な研究は, 配列依存的なそれと比べて, あまりなされていない. われわれは, このような特殊な 3 次構造を有する DNA のうち, 折れ曲がり構造を有する新規人工 DNA を合成すること

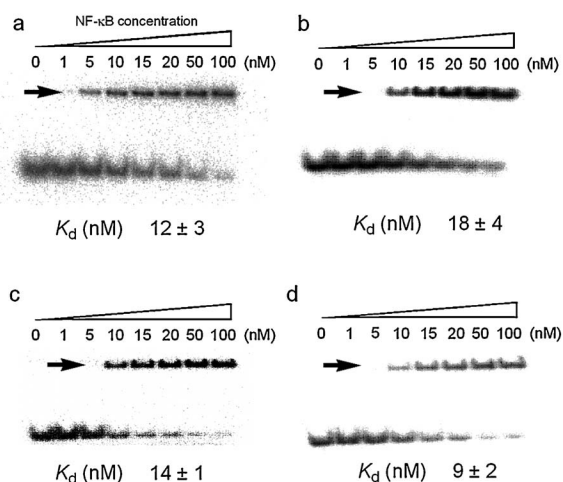


Fig. 19. Effects of the Triazole Cross-linked Dumbbell ODNs on the Interaction with the NF- κ B p50 Homodimer and the Electromobility Shift Assay with NF- κ B

40 fmol of ^{32}P -radiolabelled triazole cross-linked dumbbell ODNs were incubated at 0°C for 30 min in 10 mM HEPES buffer (pH 7.5) in the presence of the indicated concentration of NF- κ B p50 homodimer. (a) contODN, (b) tz²ODN 1, (c) tz²ODN 2, (d) tz²ODN 3. Protein-ODN complexes are marked with an arrow.

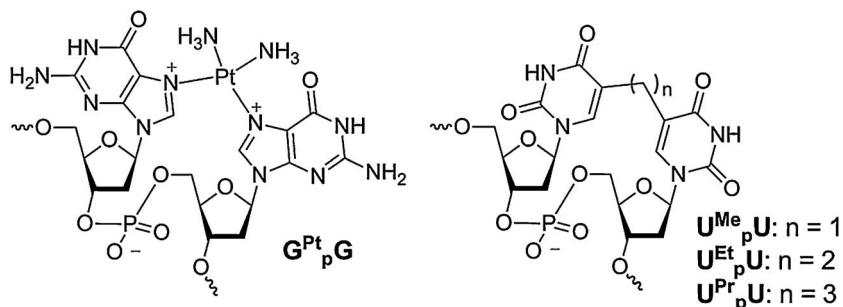


Fig. 20. Structure of 1,2-d(G^{Pt}_pG) Cross-link and Designed Alkylene Cross-linked Cyclic 2'-Deoxyuridylate Dimers

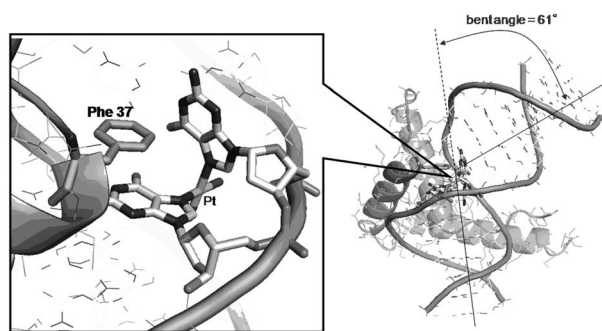
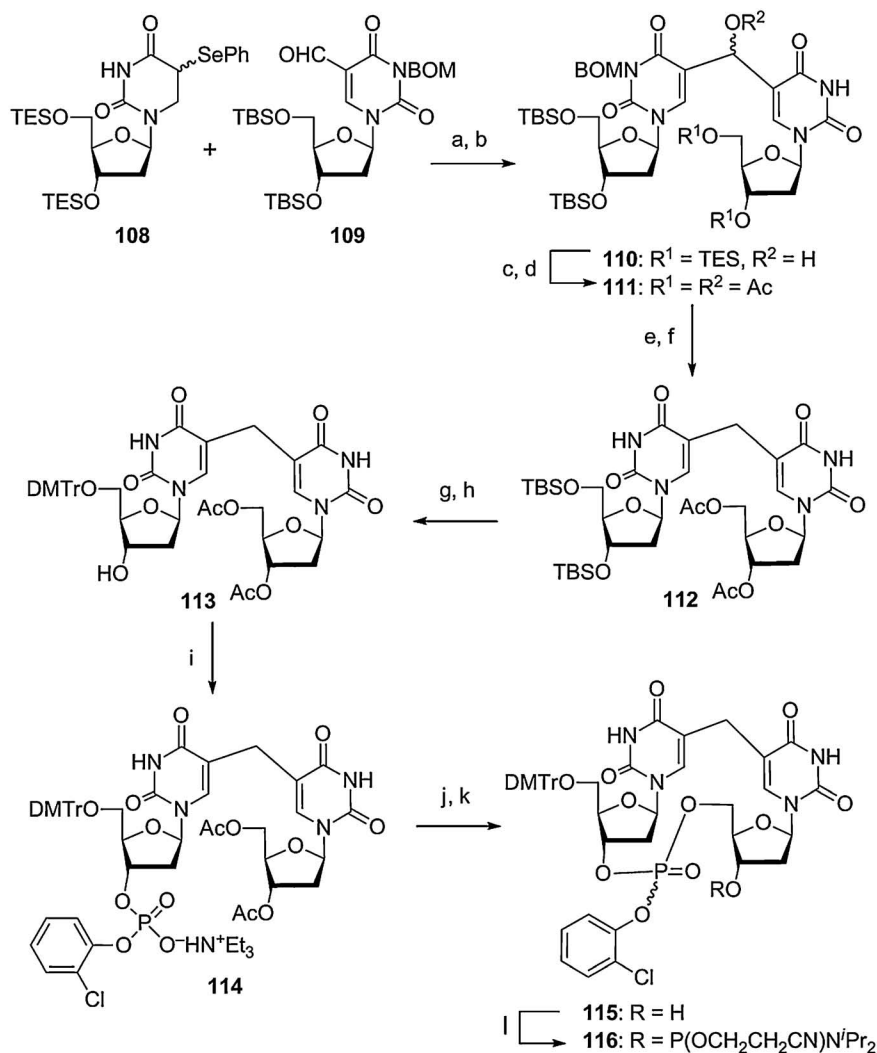


Fig. 21 X-Ray Crystal Structure of 1,2-d(G^{Pt}_pG) Cross-linked DNA and HMGB1 A-box Complex

で、配列非依存的な核酸-タンパク質の相互作用の理解の一助とすることを計画した。新規折れ曲がり人工 DNA を合成すべく、シスプラチン架橋構造 G^pU を模倣し、隣接ウリジンの塩基部 5 位をメチレン、エチレン、プロピレン架橋した、環状ウリジル酸 2 量体 U^{Me}_pU , U^{Et}_pU , U^{Pr}_pU (Fig. 20) を折れ曲がり素子として設計し、これらを組み込んだ DNA を系統的に合成してその諸性質を検討することとした。¹⁴³⁾

オリゴデオキシヌクレオチド化学合成に必要な各種環状ウリジル酸 2 量体のアミダイトブロックの合成は、架橋部の効率的な構築が鍵段階となる。

U^{Me}_pU のアミダイトブロックの合成を Scheme 14 に示した。フェニルセレンニルウリジン誘導体 **108** より調製したエノラートと 2'-デオキシ-5-ホルミルウリジン誘導体 **109** との間でのアルキル化反応を行ったのち、セレノキシドへの酸化と *syn*-脱離により化合物 **110** を得た。官能基及び保護基を適切に調整して **113** を得たのちに、3'位水酸基をクロロフェニルホスホリル化して環化前駆体 **114** を得た。1-(*m*-methylene-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) を用いたリン酸ジエステル形成による環化反応を行ったのちに、常法に従い、目的とするアミダイトブロック **116** を得た。対応する U^{Et}_pU , U^{Pr}_pU のアミ



Scheme 14^{a)}.

a) Reagents and conditions: (a) LDA, THF, $-60^\circ C$; (b) *m*CPBA, CH_2Cl_2 , $0^\circ C$; (c) HF, *aq.*, THF, $-10^\circ C$; (d) Ac_2O , Et_3N , DMAP, MeCN, room temperature; (e) HCO_2NH_4 , Pd/C, EtOH, room temperature; (f) H_2 , Pd(OH)₂/C, EtOH, room temperature (26% over 4 steps); (g) TFA, *aq.*, THF, room temperature; (h) DMTrCl, pyridine, room temperature (83% over 2 steps); (i) 2-chlorophenyl dichlorophosphate, 1*H*,2,4-triazole, Et_3N , THF, pyridine, room temperature; (j) $NH_3/MeOH$, $CHCl_3$, room temperature; (k) MSNT, pyridine, room temperature (36% over 3 steps); (l) 2-cyanoethyl chlorodiisopropylaminophosphoramidite, DIPEA, CH_2Cl_2 , room temperature (68%).

ダイトブロックも同様にして調製し（省略），これらを用いて各種オリゴデオキシヌクレオチドを合成した．

まず合成した DNA の折れ曲がり度合を FRET (fluorescence resonance energy transfer) 実験により測定すべく，中央部に各折れ曲がり素子 U^{Me}_pU , U^{Et}_pU , U^{Pr}_pU を，両末端にそれぞれ蛍光発色団である 6FAM, Cy3 を有する 2 本鎖オリゴデオキシヌクレオチド ODN C1-C3 を合成した.¹⁴⁴⁻¹⁴⁵⁾ ドナー分子である 6FAM からアクセプター分子である Cy3 への FRET 効率から両発色団の距離を算出し，2 本鎖オリゴデオキシヌクレオチドを円柱状の分子とみなして，オリゴデオキシヌクレオチドの折れ曲がり角度を算出した．その結果，各 ODN C1-C3 の折れ曲がり角度はそれぞれ 94, 86, 84° と算出され，ほぼ直角に折れ曲がっていることが示唆された (Table 10)．また折れ曲がり角度は，アルキレン架橋子長に逆相関し，アルキレン架橋子長が短くなるにつれて，折れ曲がり角度は深くなることが分かった．この結果は，局所の微細な化学修飾により，系統的に DNA の折れ曲がり角度を調節できることを示している．これらの折れ曲がりオリゴデオキシヌクレオチドの局所における構造に関する情報を得るために，ODN C1-C3 の熱的安定性を T_m 値を指標として評価した．ODN C1-C3 の T_m 値はそれぞれ，46.4, 50.4, 53.4 °C であり，コントロールであるオリゴヌクレオチドと比較すると熱的安定性

Table 10. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Experiments
5'-6FAM-d(TCTCCTTCAXXACTTCCTCT)-3'
3'-d(AGAGGAAGTYTGAAGGAGA)-Cy3-5'

ODN	XX	YY	Energy transfer (F_e ^{a)})	Absolute distance ^{b)} (Å)	Bending angle ^{c)} (°)
TT	TT	AA	0.272	65.0	n.d. ^{d)}
Pt	$G_p^{Pr}G$	CC	0.477	56.9	58
C1	$U_p^{Me}U$	AA	0.794	44.7	94
C2	$U_p^{Et}U$	AA	0.714	48.1	86
C3	$U_p^{Pr}U$	AA	0.688	49.1	84
C2'	$U_p^{Et}U$	AA	0.436	58.5	52

a) F_e =FRET efficiencies. F_e were determined by measuring the intensity of the sensitized emission of the donor (F_{sa}) normalized to the fluorescence of the donor alone (F_d) and the acceptor alone (F_a), b) The distances were calculated from the energy transfer efficiencies with a Forster distance R_0 of 56Å, c) The angles were calculated by the way a ODN was deemed to a cylinder molecule, d) not determined.

の減少が観察された (Table 11)． T_m 値の減少度はアルキレン架橋子長によく相関し，メチレン架橋子を有する ODN C1 は最も熱的に不安定であった．環状ウリジル酸 2 量体の相補配列にミスマッチ配列を有するオリゴヌクレオチドは，オリゴヌクレオチドの T_m 値の減少を引き起こし，ミスマッチ配列を 2 つ含むものではさらなる T_m 値の減少がみられた．これらの結果から， U^{Me}_pU , U^{Et}_pU , U^{Pr}_pU の 2 つのウリシル塩基は，アルキレン架橋により通常の DNA と比べて大きくその相対配置が変化しているものの，水素結合もしくはスタッキング相互作用により相補塩基との塩基対形成を維持していることを示している．

次にこれらの HMGB1 A-box タンパクとの結合能について検討した．³²P ラベルした ODN C1-C3 と各種濃度の HMGB1 A-box を 4°C で 30 分間インキュベートしたのちに，EMSA 法により K_d 値を算出することでタンパク結合能を評価した．その結果，ODN C1 と C2 に関しては，タンパク濃度依存的にタンパク-オリゴヌクレオチド複合体の形成が観察され， K_d 値はそれぞれ 1.9 nM, 2.2 nM であり，シスプラチン架橋オリゴヌクレオチド ODN Pt の親和性 (3.1 nM) を上回った [Fig. 22(a), (b), (c)]．

Table 11. Thermal Stability of the Double Standards ODNs Incorporating Cross-linked 2'-Deoxyuridylylate Dimers^{a)}
5'-d(TCTCCTTCAXXACTTCCTCT)-3'
3'-d(AGAGGAAGTYTGAAGGAGA)-5'

XX	YY	T_m (°C) ^{a)}	ΔT_m (°C)
GG	CC	59.1	—
$G_p^{Pr}G$ (ODN Pt)	CC	56.2	-2.9 ^{b)}
TT	AA	56.4	—
$U_p^{Me}U$ (ODN C1)	AA	46.4	-12.0 ^{c)}
$U_p^{Me}U$	CA	42.2	-14.2
$U_p^{Me}U$	AC	43.7	-12.7
$U_p^{Me}U$	CC	39.7	-16.7
$U_p^{Et}U$ (ODN C2)	AA	50.4	-6.0 ^{c)}
$U_p^{Et}U$	CA	46.2	-10.2
$U_p^{Et}U$	AC	46.2	-10.2
$U_p^{Et}U$	CC	41.5	-14.9
$U_p^{Pr}U$ (ODN C3)	AA	53.4	-3.0 ^{c)}
$U_p^{Pr}U$	CA	47.5	-8.9
$U_p^{Pr}U$	AC	47.2	-9.3
$U_p^{Pr}U$	CC	40.5	-15.9

a) 1 μ M each ODN, 10 μ M sodium cacodylate-HCl (ph 7.0), 100 μ M NaCl. b) Average of three times measurements. c) T_m (modified)- T_m (GG/CC). d) T_m (modified)- T_m (TT/AA).

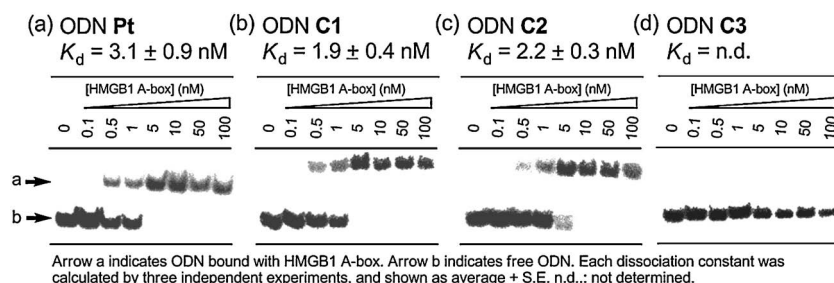


Fig. 22. Electromobility Shift Assay (EMSA) of Oligodeoxynucleotide (ODN) with High Mobility Group Protein A-box (HMGB1 A-box)

(a) ODN Pt, (b) ODN C1, (c) ODN C2, and (d) ODN C3.

さらに HMGB1 A-box と ^{32}P ラベルしたシスプラチン架橋オリゴヌクレオチドの複合体形成が、ODN C1 と C2 の添加により同じく濃度依存的に阻害されたことから、シスプラチン架橋オリゴヌクレオチドと同様な様式で、ODN C1 と C2 が HMGB1 A-box に認識されていることも確認した。一方、プロピレン架橋子を有する ODN C3 は、 $0.1\ \mu\text{M}$ の高濃度でもタンパク複合体の形成が全く認められなかった [Fig. 22(d)]. ODN C1–C3 間でのこのような HMGB1 A-box 結合能の違いは、微細な局所化学構造の違い、若しくはそれによって引き起こされる DNA の全体構造のゆがみによるものであることが示唆される。事実、ODN C1, C2 の CD スペクトルと ODN C3 の CD スペクトルには明らかな相違が認められる。今後、詳細な構造解析が必要とされる。

われわれは折れ曲がり素子にウラシル塩基を選択したが、これらを含む ODN C1 と C2 が、グアニン塩基を有するシスプラチン架橋オリゴヌクレオチドを凌駕する結合能を示したことは興味深い。と言うのも、HMGB1 は光損傷により生じた *cis-syn*-シクロブタンチミン 2 量体を含む DNA とも結合能を有することが知られているが、その結合能は $1.2\ \mu\text{M}$ とはるかに低い。¹⁴⁶⁾ HMGB1 A-box とシスプラチン架橋オリゴヌクレオチド複合体の X 線結晶構造解析がなされている。シスプラチン架橋された 2 つのグアニン塩基は L 字型を取り、ここに HMGB1 A-box の Phe137 側鎖が、一方のグアニン塩基と π - π 相互作用を、もう一方のグアニン塩基とは CH- π 相互作用している。¹⁴²⁾ 一方、*cis-syn*-シクロブタンチミン 2 量体は、塩基部の芳香族性が失われているため、スタッキング能は大きく減少しており、

HMGB1 A-box の Phe137 側鎖との相互作用が消失していると考えられることができる。*cis-syn*-シクロブタンチミン 2 量体の構造は、われわれが設計したアルキレン架橋環状ウリジル酸 2 量体と類似はしているものの、塩基部の芳香族性の有無に相違がある。実に 3 オーダーにも及ぶ HMGB1 A-box 結合能の違いは、この芳香族性によるスタッキング相互作用によるものであり、われわれの設計した新規折れ曲がりオリゴヌクレオチドは、シスプラチン架橋オリゴヌクレオチドをよく模倣していると言える。近年、血中に遊離した HMGB1 は敗血症を誘発することが知られており、HMGB1 が傷害を受けた組織で能動的又は受動的に細胞外に放出され、サイトカイン様の炎症因子として機能することが明らかになってきている。^{147–149)} 本研究で合成した新規折れ曲がり人工 DNA が HMGB1 のデコイ分子として機能し、敗血症等の炎症に対する核酸医薬品として応用できると期待される。

4. 結語

創薬研究を行う際に、あるリードとなる分子に対して、物理的・化学的安定性や活性の向上、構造の単純化、新たな機能の付加等の改変が必要となる。これは広義の化学修飾であり、想像したものを自在に創るための有機合成化学が非常に重要である。われわれは、生理活性分枝糖ヌクレオシド、抗菌ヌクレオシド系天然物、新規な構造・機能を有する人工オリゴヌクレオチドの合成研究を通じて、創薬化学研究を行ってきた。小分子であるヌクレオシドやヌクレオチドから、複雑な構造を有するヌクレオシド系天然物、高分子である核酸まで、創薬リードとしての潜在的な価値は極めて高い。本研究が新規な薬の開発につながることを期待しながら、現在その研

究をさらに展開している。

謝辞 本研究は北海道大学大学院薬学研究科において多くの研究協力を得て行われました。終始暖かいご指導を賜りました松田 彰教授、周東 智教授に厚く御礼申し上げます。また本研究の成果は、児玉哲也博士、水村葉子さん、平野慎平博士、村田俊平博士、日野香織さん、中根正憲君達の惜しみない努力の賜物であるにほかなりません。本紙面を通じて、厚く御礼申し上げます。NMR 測定、質量分析、元素分析を行って頂いた本学機器分析センターの皆様にご御礼申し上げます。なお、本研究は日本学術振興会若手研究 B 並びに文部科学賞科学研究費補助金特定領域研究「生体機能分子の創製」の補助により行われたものです。

REFERENCES

- 1) Secrist J. A., III, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 15–16 (2005).
- 2) Parker W., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **5**, 592–596 (2004).
- 3) Grem J., *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.*, **18**, 1–38 (1999).
- 4) Plunkett W., *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.*, **19**, 21–45 (2001).
- 5) Pui C.-H., Jeha S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 149–165 (2007).
- 6) Suhadolnik R. J., “Nucleoside Antibiotics,” Wiley Interscience, New York, 1970.
- 7) Suhadolnik R. J., “Nucleosides as Biological Probes,” Wiley Interscience, New York, 1979.
- 8) Suhadolnik R. J., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **22**, 193–272 (1979).
- 9) Goodchild J., *Top. Antibiot. Chem.*, **6**, 99–228 (1982).
- 10) Buchanan J. G., Wightman R. H., *Top. Antibiot. Chem.*, **6**, 229–339 (1982).
- 11) Isono K., *J. Antibiot.*, **41**, 1711–1739 (1988).
- 12) Isono K., *Pharmacol. Ther.*, **52**, 269–286 (1991).
- 13) Ichikawa S., Matsuda A., *Expert Opin. Therapeutic*, **17**, 487–498 (2007).
- 14) Matsuda A., Sasaki T., *Cancer Sci.*, **95**, 105–111 (2004).
- 15) Sukeda M., Shuto S., Sugimoto I., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **65**, 8988–8996 (2000).
- 16) Sukeda M., Ichikawa S., Matsuda A., Shuto S., *J. Org. Chem.*, **68**, 3465–3475 (2003).
- 17) Sukeda M., Ichikawa S., Matsuda A., Shuto S., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 4748–4750 (2002).
- 18) Shuto S., Kanazaki M., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **62**, 5676–5677 (1997).
- 19) Shuto S., Kanazaki M., Ichikawa S., Minakawa N., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **63**, 746–754 (1998).
- 20) Shuto S., Kanazaki M., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **62**, 5676–5677 (1997).
- 21) Nomura M., Shuto S., Tanaka M., Sasaki T., Mori S., Shigeta S., Matsuda A., *J. Med. Chem.*, **42**, 2901–2908 (1999).
- 22) Matsuda A., Itoh H., Takenuki K., Sasaki T., Ueda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 945–953 (1988).
- 23) Matsuda A., Satoh M., Nakashima H., Yamamoto N., Ueda T., *Heterocycles*, **27**, 2545–2548 (1988).
- 24) Ueda T., Matsuda A., Yoshimura Y., Takenuki K., *Nucleosides Nucleotides*, **8**, 743–752 (1989).
- 25) Takenuki K., Itoh H., Matsuda A., Ueda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2947–2952 (1990).
- 26) Matsuda A., Takenuki K., Sasaki T., Ueda T., *J. Med. Chem.*, **34**, 234–239 (1991).
- 27) a) Matsuda A., Nakajima, Y., Azuma A., Tanaka M., Sasaki T. *J. Med. Chem.*, **34**, 2917–2919 (1991).
- 28) Azuma A., Nakajima Y., Nishizono N., Minakawa N., Suzuki M., Hanaoka K., Kobayashi T., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A., *J. Med. Chem.*, **36**, 4183–4189 (1993).
- 29) Tanaka M., Matsuda A., Terao, T., Sasaki T., *Cancer Lett.*, **64**, 67–74 (1992).
- 30) Azuma A., Hanaoka K., Kurihara A., Kobayashi T., Miyauchi S., Kamo N., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A., *J. Med. Chem.*, **38**, 3391–3397 (1995).
- 31) Matsuda A., Azuma A., *Nucleosides Nucleotides*, **14**, 461–471 (1995).
- 32) Liu X., Guo Y., Li Y., Jiang Y., Chubb S., Azuma A., Huang P., Matsuda A., Hittelman W., Plunkett W., *Cancer Res.*, **65**, 6874–6881 (2005).
- 33) Matsuda A., Hattori H., Tanaka M., Sasaki

- T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 1887–1892 (1996).
- 34) Hattori H., Tanaka M., Fukushima M., Sasaki T., Matsuda A., *J. Med. Chem.*, **39**, 5005–5011 (1996).
- 35) Takatori S., Kanda H., Takenaka K., Wataya Y., Matsuda A., Fukushima M., Shimamoto Y., Tanaka M., Sasaki T., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **44**, 97–104 (1999).
- 36) Shimamoto Y., Koizumi K., Okabe H., Kazuno H., Murakami Y., Nakagawa F., Matsuda A., Sasaki T., Fukushima M., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 825–833 (2002).
- 37) Hattori H., Nozawa E., Iino T., Yoshimura Y., Shuto S., Shimamoto Y., Nomura M., Fukushima M., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A., *J. Med. Chem.*, **41**, 2892–2902 (1998).
- 38) Molander G. A., Etter J. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6556–6558 (1987).
- 39) Molander G. A., Etter J. B., Zinke P. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 453–463 (1987).
- 40) Girard P., Namy J. L., Kagan H. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2693–2698 (1980).
- 41) Molander G. A., “In Comprehensive Organic Synthesis,” Vol. 1, ed. by Shereiber S. L., Pergamon Press, New York, pp. 251–282.
- 42) Soderquist J. A., *Aldrichim. Acta*, **24**, 15–23 (1991).
- 43) Molander G. A., *Chem. Rev.*, **92**, 29–68 (1992).
- 44) Molander G. A., Harris C. R., *Chem. Rev.*, **96**, 307–338 (1996).
- 45) Tabuchi T., Kawamura K., Inanaga J., Yamaguchi M., *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3889–3890 (1986).
- 46) Moriya T., Handa Y., Inanaga J., Yamaguchi M., *Tetrahedron Lett.*, **29**, 6947–6948 (1988).
- 47) Ichikawa S., Shuto S., Minakawa N., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **62**, 1368–1375 (1997).
- 48) Ichikawa S., Minakawa N., Shuto S., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A., *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 1284–1294 (2006).
- 49) Ichikawa S., Shuto S., Matsuda A., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4525–4528 (1998).
- 50) Ichikawa S., Shuto S., Matsuda A., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10270–10280 (1999).
- 51) Ichikawa S., Matsuda A., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 319–329 (2005).
- 52) Ichikawa S., Matsuda A., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **23**, 239–253 (2004).
- 53) Ichikawa S., *Yakugaku Zasshi*, **126**, 579–596 (2006).
- 54) Kodama T., Shuto S., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **67**, 7706–7715 (2002).
- 55) Russell D. G., *Nature*, **2**, 1–9 (2001).
- 56) Espinal M. A., *Tuberculosis*, **83**, 44–51 (2003).
- 57) Perri G. D., Bonora S., *J. Antimicrob. Chemother.*, **54**, 593–602 (2004).
- 58) Barry C., Cole S., Fourie B., Geiter L., Gosey L., Grosset J., Kanyok T., Laughon B., Mitchison D., Numnn P., O’Brienn R., Robinson T., “Scientific Blueprint for Tuberculosis Drug Development,” 2001. (<http://www.tballiance.org/>)
- 59) Bugg T. D. H., Lloyd A. J., Roper D. I., *Infect. Disord. Drug Targets*, **6**, 85–106 (2006).
- 60) Kimura K., Bugg T. D. H., *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 252–273 (2003).
- 61) Dini C., *Curr. Top. Med. Chem.*, **5**, 1221–1236 (2005).
- 62) Isono K., Uramoto M., Kusakabe H., Kimura K., Izaki K., Nelson C. C., McCloskey J. A., *J. Antibiot.*, **38**, 1617–1621 (1985).
- 63) Ubukata M., Kimura K., Isono K., Nelson C. C., Gregson J. M., McCloskey J. A., *J. Org. Chem.*, **57**, 6392–6403 (1992).
- 64) Ubukata M., Isono K., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4416–4417 (1988).
- 65) Kimura K., Ikeda Y., Kagami S., Yoshihama M., Suzuki K., Osada H., Isono K., *J. Antibiot.*, **51**, 1099–1104 (1998).
- 66) Muroi M., Kimura K., Osada H., Inukai M., Takatsuki A., *J. Antibiot.*, **50**, 103–104 (1997).
- 67) Kimura K., Ikeda Y., Kagami S., Yoshihama M., Ubukata M., Esumi Y., Osada H., Isono K., *J. Antibiot.*, **51**, 647–654 (1998).
- 68) Kimura K., Kagami S., Ikeda Y., Takahashi H., Yoshihama M., Kusakabe H., Osada H., Isono K., *J. Antibiot.*, **51**, 640–646 (1998).
- 69) Kimura K., Miyata N., Kawanishi G., Kamio Y., Izaki K., Isono K., *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1811–1815 (1989).
- 70) Igarashi M., Nakagawa N., Doi N., Hattori S., Naganawa H., Hamada M., *J. Antibiot.*, **56**, 580–583 (2003).
- 71) Igarashi M., Takahashi Y., Shitara T.,

- Nakamura H., Naganawa H., Miyake T., Akamatsu Y., *J. Antibiot.*, **58**, 327–337 (2005).
- 72) Takeuchi T., Igarashi M., Naganawa H., Hamada M., JP 2003012687 (2001).
- 73) Miyake M., Igarashi M., Shidara T., Takahashi Y., WO 2004067544 (2004).
- 74) Ochi K., Ezaki M., Morita I., Komori T., Kohsaka M., ER 0333177, 1989, A2.
- 75) Yoshida Y., Yamanaka H., Sakane K., JP H05–78385 (1993).
- 76) McDonald L. A., Barbieri L. R., Carter G. T., Lenoy E., Lotvin J., Petersen P. J., Siegel M. M., Singh G., Williamson R. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10260–10261 (2002).
- 77) Spada M. R., Ubukata M., Isono K., *Heterocycles*, **34**, 1147–1167 (1992).
- 78) Knapp S., Morriello G. J., Doss G. A., *Org. Lett.*, **4**, 603–606 (2002).
- 79) Knapp S., Morriello G. J., Nandan S. R., Emge T. J., Doss G. A., Mosley R. T., Chen L., *J. Org. Chem.*, **66**, 5822–5831 (2001).
- 80) Knapp S., Nandan S., Resnick L., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 5485–5486 (1992).
- 81) Knapp S., Morriello G. J., Doss G. A., *Tetrahedron Lett.*, **43**, 5797–5800 (2002).
- 82) Nakajima N., Isobe T., Irida S., Ubukata M., *Heterocycles*, **59**, 107–113 (2003).
- 83) Kim K. S., Ahn Y. H., *Tetrahedron: Asymmetry*, **9**, 3601–3605 (1998).
- 84) Kim K. S., Cho I. H., Ahn Y. H., Park J. I., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1783–1785 (1995).
- 85) Kim K. S., Cheong C. S., Hahn J. S., Park J. I., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **18**, 465–467 (1997).
- 86) Sarabia F., Martin-Ortiz L., Lopez-Herrera F. J., *Org. Lett.*, **5**, 3927–3930 (2003).
- 87) Gravier-Pelletier C., Milla M., Merrer Y. L., Depezay J., *Eur. J. Org. Chem.*, 3089–3096 (2001).
- 88) Gravier-Pelletier C., Dumas J., Merrer Y. L., Depezay J. C., *J. Carbohydr. Chem.*, **11**, 969–998 (1992).
- 89) Merrer Y. L., Gravier-Pelletier C., Gerrouache M., Depezay J. C., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 385–388 (1998).
- 90) Gravier-Pelletier C., Ginisty M., Merrer Y. L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 189–193 (2004).
- 91) Ginisty M., Gravier-Pelletier C., Merrer Y. L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **17**, 142–150 (2004).
- 92) Drouillat B., Poupardin O., Bourdreux Y., Greck C., *Tetrahedron Lett.*, **44**, 2781–2783 (2004).
- 93) Bourdreux Y., Drouillat B., Greck C., *Lett. Org. Chem.*, **3**, 368–370 (2006).
- 94) Moore W. J., Luzzio F. A., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 6599–6602 (2006).
- 95) More J. D., Finny N. S., *Org. Lett.*, **4**, 3001–3003 (2002).
- 96) Hirano S., Ichikawa S., Matsuda A., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 1854–1856 (2005).
- 97) Hirano S., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **72**, 9936–9946 (2007).
- 98) Rudolph J., Sennhenn P. C., Vlaar C. P., Sharpless K. B., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 2810–2817 (1996).
- 99) Mukaiyama T., Murai Y., Shoda S., *Chem. Lett.*, 431–432 (1981).
- 100) Becke A. D., *Phys. Rev.*, **38**, 3098–3100 (1998).
- 101) Becke A. D., *Phys. Rev.*, **37**, 785–789 (1998).
- 102) Becke A. D., *J. Phys. Chem.*, **98**, 1372–1377 (1993).
- 103) Chamberland S., Ziller J. W., Woerpel K. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5322–5323 (2005).
- 104) Jiang H., Li X., Fan Y., Ye C., Romoff T., Goodman M., *Org. Lett.*, **1**, 91–93 (1999).
- 105) Hirano S., Ichikawa S., Matsuda A., *Tetrahedron*, **63**, 2798–2804 (2007).
- 106) Hirano S., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **73**, 569–577 (2008).
- 107) Hirano S., Ichikawa S., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 5123–5133 (2008).
- 108) Hirano S., Ichikawa S., Matsuda A., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 428–436 (2008).
- 109) Helene C., Toulme J. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 99–125 (1990).
- 110) Kurreck J., *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1628–1644 (2003).
- 111) Meister G., Tuschl T., *Nature*, **431**, 343–349 (2004).
- 112) Cho-Chung Y. S., Park Y. G., Lee Y. N., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 386–392 (1999).
- 113) Morishita R., Higaki J., Tomita N., Ogihara T., *Circ. Res.*, **82**, 1023–1028 (1998).
- 114) Mann M. J., Dzau T. J., *J. Clin. Invest.*, **106**, 1071–1075 (2000).

- 115) Ellington A. D., Szostak J. W., *Nature*, **346**, 818–822 (1990).
- 116) Robertson D. L., Joyce G. F., *Nature*, **344**, 467–468 (1990).
- 117) Tuerk C., Gold L., *Science*, **249**, 505–510 (1990).
- 118) Hosoya T., Takeuchi H., Kanasaki Y., Yamakawa H., Miyano-Kurosaki N., Takai K., Yamamoto N., Takaku H., *FEBS Lett.*, **461**, 136–140 (1999).
- 119) Erie D., Sinha N., Olson W., Jones R., Breslauer K., *Biochemistry*, **26**, 7150–7159 (1987).
- 120) Chu B. C. F., Orgel L. E., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5857–5858 (1992).
- 121) Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M., *J. Org. Chem.*, **67**, 3057–3064 (2002).
- 122) Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 2596–2599 (2002).
- 123) Kolb H. C., Sharpless K. B., *Drug Disc. Today*, **8**, 1128–1137 (2003).
- 124) Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 2004–2021 (2001).
- 125) Kolb H. C., Sharpless K. B., *Drug Discov. Today*, **8**, 1128–1137 (2003).
- 126) Chan T. R., Hilgraf R., Sharpless K. B., Fokin V. V., *Org. Lett.*, **6**, 2853–2855 (2004).
- 127) Khaled A. R., Butfiloski E. J., Sobel E. S., Schiffenbauer J., *Cell. Immunol.*, **185**, 49–58 (1998).
- 128) Ono S., Date I., Onoda K., Shiota T., Ohmoto T., Ninomiya Y., Asari S., Morishita R., *Hum. Gene Ther.*, **9**, 1003–1011 (1998).
- 129) Tomita N., Morishita R., Tomita S., Gibbons G. H., Zhang L., Horiuchi M., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T., Dzau V. J., *Gene Ther.*, **7**, 1326–1332 (2000).
- 130) Suzuki J., Morishita R., Amano J., Kaneda Y., Isobe M., *Gene Ther.*, **7**, 1847–1852 (2000).
- 131) Sharma H. W., Perez J. R., Higgins-Sochaski K., Hsiao R., Narayanan R., *Anticancer Res.*, **16**, 61–69 (1996).
- 132) Nakane M., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Org. Chem.*, **73**, 1842–1851 (2008).
- 133) Pabo C. O., Sauer R. T., *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 1053–1095 (1992).
- 134) Seeman N. C., Rosenberg J. M., Rich A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 804–808 (1976).
- 135) Garvie C. W., Wolberger C., *Mol. Cell*, **8**, 937–946 (2001).
- 136) Luscombe N. M., Thornton J. M., *J. Mol. Biol.*, **320**, 991–1009 (2002).
- 137) Pohler J. R. G., Norman D. G., Bramham J., Bianchi M. E., Lilly D. M. L., *EMBO J.*, **17**, 817–826 (1998).
- 138) Wolfe S. A., Ferentz A. E., Grantcharova V., Churchill M. E. A., Verdine G. L., *Chem. Biol.*, **2**, 213–221 (1995).
- 139) Thomas J. O., Travers A. A., *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 167–174 (2001).
- 140) Yang D., van Boom S. S. G. E., Reedijk J., van Boom J. H., Wang A. H.-J., *Biochemistry*, **34**, 12912–12920 (1995).
- 141) Huang H., Zhu L., Reid B. R., Drobny G. P., Hopkins P. B., *Science*, **270**, 1842–1845 (1995).
- 142) Ohndorf U.-M., Rould M. A., He Q., Pabo C. O., Lippard S., *Nature*, **399**, 708–712 (1999).
- 143) Murata S., Mizumura Y., Hino K., Ueno Y., Ichikawa S., Matsuda A., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 10300–10301 (2007).
- 144) Norman D. G., Grainger R. J., Uhrin D., Lilly D. M. J., *Biochemistry*, **39**, 6317–6324 (2000).
- 145) Bassi G. S., Murchie A. I. H., Walter F., Clegg R. M., Lilley D. M. J., *EMBO J.*, **16**, 7481–7489 (1997).
- 146) Pasheva E. A., Pashev I. G., Favre A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 24730–24736 (1998).
- 147) Andersson U., Erlandsson-Harris H., Yang H., Tracey K. J., *J. Leuk. Biol.*, **72**, 1084–1091 (2002).
- 148) Dumitriu I. E., Baruah P., Manfredi A. A., Bianchi M. E., Rovere-Querini P., *Trends Immunol.*, **26**, 381–387 (2005).
- 149) Yang H., Ochani M., Li J., Qiang X., Tanovic M., Harris H. E., Susarla S. M., Ulloa L., Wang H., DiRaimo R., Czura C. J., Wang H., Roth J., Warren H. S., Fink M. P., Fenton M. J., Andersson U., Tracey K. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 296–301 (2004).