

図・本館

主論文

アリル保護ホスホロアミダイト法による化学的に不安定なリン酸エステルで
架橋したデオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよび
デオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の高効率合成

坂倉 彰

名古屋大学図書



11344232

目次

1. 緒言	1
2. 合成計画	9
3. アリル保護基を有するホスホロアミダイトの合成	
3-1. デオキシリボヌクレオシド 3'- および 5'-ホスホロアミダイトの合成	14
3-2. アミノ酸ホスホロアミダイト、ペプチドホスホロアミダイトの合成	20
3-3. ジアリルホスホロアミダイト、アクリジニルホスホロアミダイトの合成	26
4. 5'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の固相合成	27
5. 3'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の固相合成	32
5-1. 5'→3' 方向の鎖長伸長法による 3'-末端修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドの高効率合成法の開発	37
5-2. 3'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の固相合成	39
6. リン酸エステル架橋デオキシリボヌクレオチド-ペプチド複合体の塩基に対する安定性	42
7. 結論	43
8. 実験の部	45
9. 参考文献	73

文中および図中に用いた略号

AOC = アリルオキシカルボニル ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OCO}$)

BIT = ベンズイミダゾリウムトリフラート

Boc = *tert*-ブトキシカルボニル ($t\text{-C}_4\text{H}_9\text{OCO}$)

BOP = ヘキサフルオロリン化 (1-ベンズトリアゾリルオキシ) トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム

CNE = 2-シアノエチル (NCCH_2CH_2)

CPG = コントロールドポアグラス (Controlled Pore Glass)

dA = 2'-デオキシアデノシン

DBU = 1,8-ジアザビシクロ [5,4,0]-7-ウンデセン

dC = 2'-デオキシシチジン

DCC = ジシクロヘキシルカルボジイミド

dG = 2'-デオキシグアノシン

DMF = ジメチルホルムアミド

DMTr = *p,p'*-ジメトキシトリチル [$\text{C}_6\text{H}_5(p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4)_2\text{C}$]

MMTr = *p*-メトキシトリチル [$p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}$]

HOBT = 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

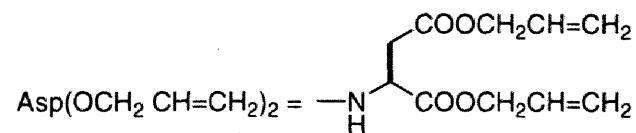
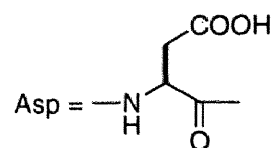
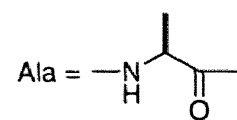
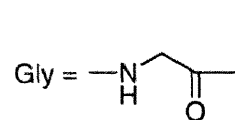
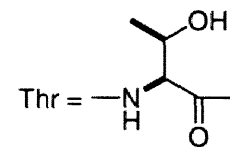
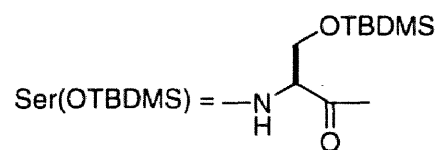
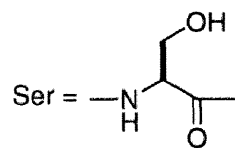
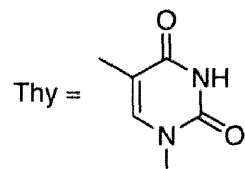
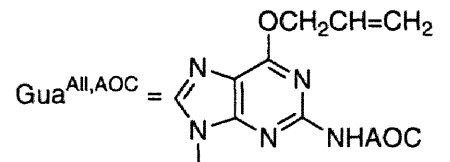
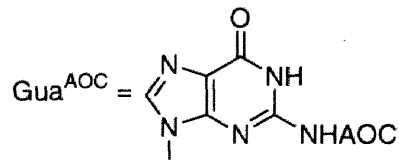
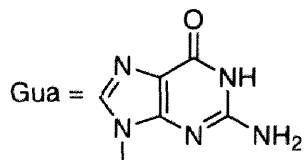
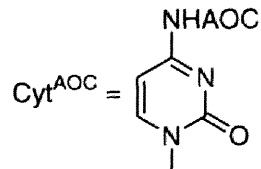
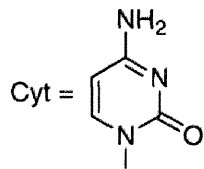
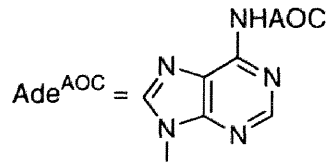
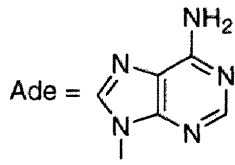
T = チミジン

TBAF = フッ化テトラブチルアンモニウム [$(n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{NF}$]

TBDMS = *tert*-ブチルジメチルシリル [$t\text{-C}_4\text{H}_9(\text{CH}_3)_2\text{Si}$]

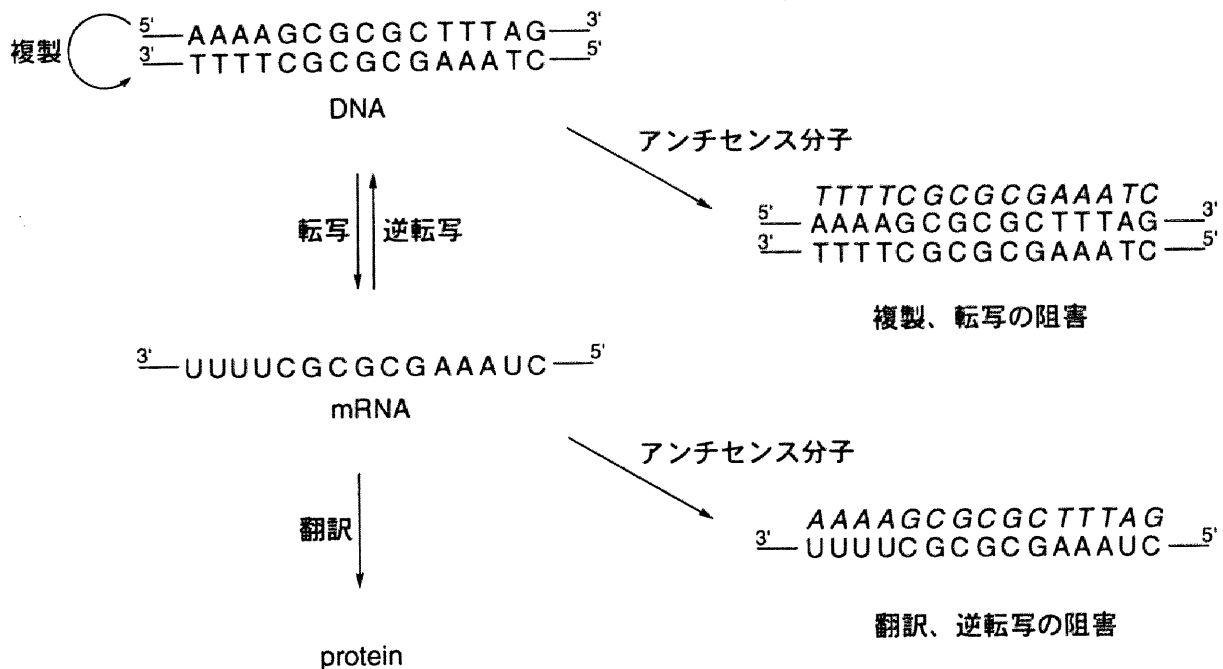
TBHP = *tert*-ブチルヒドロペルオキシド ($t\text{-C}_4\text{H}_9\text{OOH}$)

THF = テトラヒドロフラン



1. 緒言

遺伝子の複製、転写、翻訳などの各段階で、遺伝子の特定の領域に相補的な塩基配列をもつオリゴヌクレオチドあるいはその修飾体、すなわちアンチセンス分子を作用させて遺伝情報の読み取りを阻害し、その遺伝情報由来の機能発現を人工的に抑制する方法をアンチセンス法¹⁻³と言う。アンチセンス分子の作用機構の模式図を図1に示す。



斜体字: アンチセンス分子

図 1. アンチセンス分子の作用機構の模式図

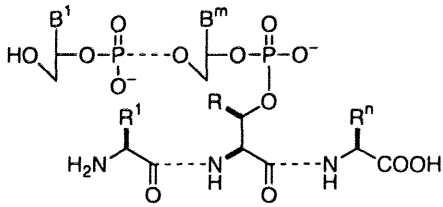
アンチセンス法は、エイズやガンなどに対する有望な化学療法として現在大きな注目を浴びているが、有用アンチセンス法開発研究において解決すべき課題の一つに、アンチセンス分子の創製およびその高効率化学合成法の開発がある。アンチセンス分子には、塩基配列選択性、DNA・RNA に対する高い結合能、優れた細胞膜透過性、適度な水溶性、高い化学的・生物学的安定性、無(低)細胞毒性、適度な代謝性などが要求される。これまでにこれらの要求を考慮した様々な修飾オリゴヌクレオチドがアンチセンス分子として開発されてきたが、なかでも興味深いものに、細胞膜透過能や DNA や RNA に対する結合能の向上などを目的として創製された、非イオン性有機基をオリゴデオキシリボヌクレオチドの 5'-末端あるいは 3'-末端に結合させた化合物がある¹⁻⁵。とりわけ 3'-末端修飾体は、修飾により、生物学的安定性、すなわち酵素に対する耐性の向上も期待できる注目すべき化合物である¹⁻³。

5'-末端あるいは 3'-末端を有機官能基で修飾したオリゴデオキシリボヌクレオチドとして、これまでにインターカレーター⁶、疎水性置換基⁷⁻⁹、発色団¹⁰⁻¹²、ペプチド¹³⁻²¹ 結合体など²² の合成が報告されている。これら修飾オリゴヌクレオチドのうち、ペプチド修飾体すなわちヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体は特に重要と目される化合物で、オリゴヌクレオチドの負電荷を中和するポリカチオン性のペプチド²³⁻²⁸、ウイルス由来の細胞膜融解能をもつペプチド^{13,29,30}、生合成されたタンパクが膜を通過するとき用いるシグナルペプチド^{29,31-34} などの複合体が合成され³⁵、このなかには HIV などに対する高い抗ウイルス活性を示すものもあることが報告されている。

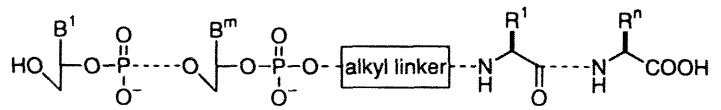
ところで、これまでに報告されたデオキシリボヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体におけるヌクレオチドとペプチドの結合法には、大きく分けてヌクレオチドの末端水酸基とペプチドのセリン、スレオニンあるいはチロシン残基の水酸基とが直接リン酸ジエステル結合で結合したものと、ヌクレオチドの末端水酸基とペプチドの末端アミノ基や側鎖のメルカプト基、アミノ基などを安定なアルキルリンカーで結合したものの 2 種類がある。本論文では、この二つの型の共有結合複合体をそれぞれを A 型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体、B 型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体と呼ぶことにする。また、ヌクレオチドの 3'-末端で結合したヌクレオチド-ペプチド複合体を 3'-末端結合ヌクレオ

チド-ペプチド複合体、ヌクレオチドの 5'-末端で結合したヌクレオチド-ペプチド複合体を 5'-末端結合ヌクレオチド-ペプチド複合体と呼ぶことにする。図 2 にこれまでに報告された A 型および B 型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体の構造を示す。なお、B 型のヌクレオチドとペプチドがアルキルリンカーを介して結合した複合体には、図 2 に示したもの以外にも多くの型の誘導体が考えられるが、本論文ではとくに既報の B 型化合物を例にして以下議論する。報告によると、ヌクレオチドとペプチドとの結合様式はアンチセンス活性発現の強弱に影響を与えるためその選択は重要であるが、現在の所 A、B どちらの結合様式が有効であるか明確な答えは得られていない。A、B 二つの型の複合体のうち、これまでは、その合成のし易さから主に B 型複合体の研究がなされてきた。しかし、B 型複合体はリンカーとしてアルキル基を用いているので代謝されにくく、また代謝されたときにアルキルリンカーに由来する非生体有機化合物を産出し、生体に好ましくないと考えられる。これに対して A 型複合体は代謝されやすく、代謝産物がヌクレオチド、ヌクレオシド、ペプチド、アミノ酸、リン酸など生体内に存在する物質のみであり毒性がない点で、B 型よりも優れた化合物であると考えられる。

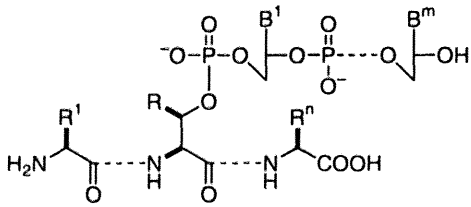
また、A 型ヌクレオチド-ペプチド複合体は、DNA (RNA) 複製の際のプライマーとして働くなどの機能を有するポリオウイルス³⁶ やアデノウイルス³⁷ などのゲノムの重要部分構造としても存在し、アンチセンス法研究のみならず、これらのヌクレオチド関連生体機能物質の機能解明および同族新機能物質の開発研究において重要な化合物である。



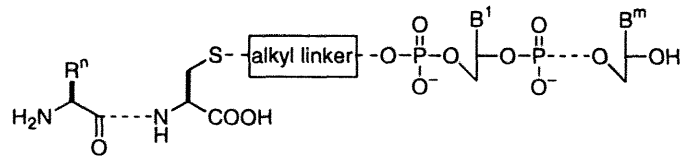
3'-末端結合 A 型ヌクレオチド-
ペプチド共有結合複合体



3'-末端結合 B 型ヌクレオチド-
ペプチド共有結合複合体



5'-末端結合 A 型ヌクレオチド-
ペプチド共有結合複合体



5'-末端結合 B 型ヌクレオチド-
ペプチド共有結合複合体

図 2. これまでに報告された A 型および B 型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体の例

このような理由から、これまでもいくつかのグループによって A 型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体合成研究がなされ、次のような例が報告されている。

まず、Grandas らはペプチド鎖、ヌクレオチド鎖を段階的に伸長させる方法により、Phac-Phe-Val-(TCA^{3'}p)Ser-Gly-OH、Phac-Ser(p^{5'}CATCAT)-Gly-Asp-OH (Phac = フェニルアセチル) を合成している^{14,38-43}。しかしながら、本合成は核酸塩基部の保護基として、シトシンにはイソブチリル (iBu) 基、アデニンにはベンゾイル (Bz) あるいはジメチルアミノメチレン (Dmf) 基を使用し、これらの脱保護を濃アンモニア水-ジオキサン 1:1 混合物処理 (15 時間) によって行っているため、図 3 の粗生成物の HPLC チャート図が示すように目的物の相当量の分解を引き起こす欠点をもつ⁴¹。

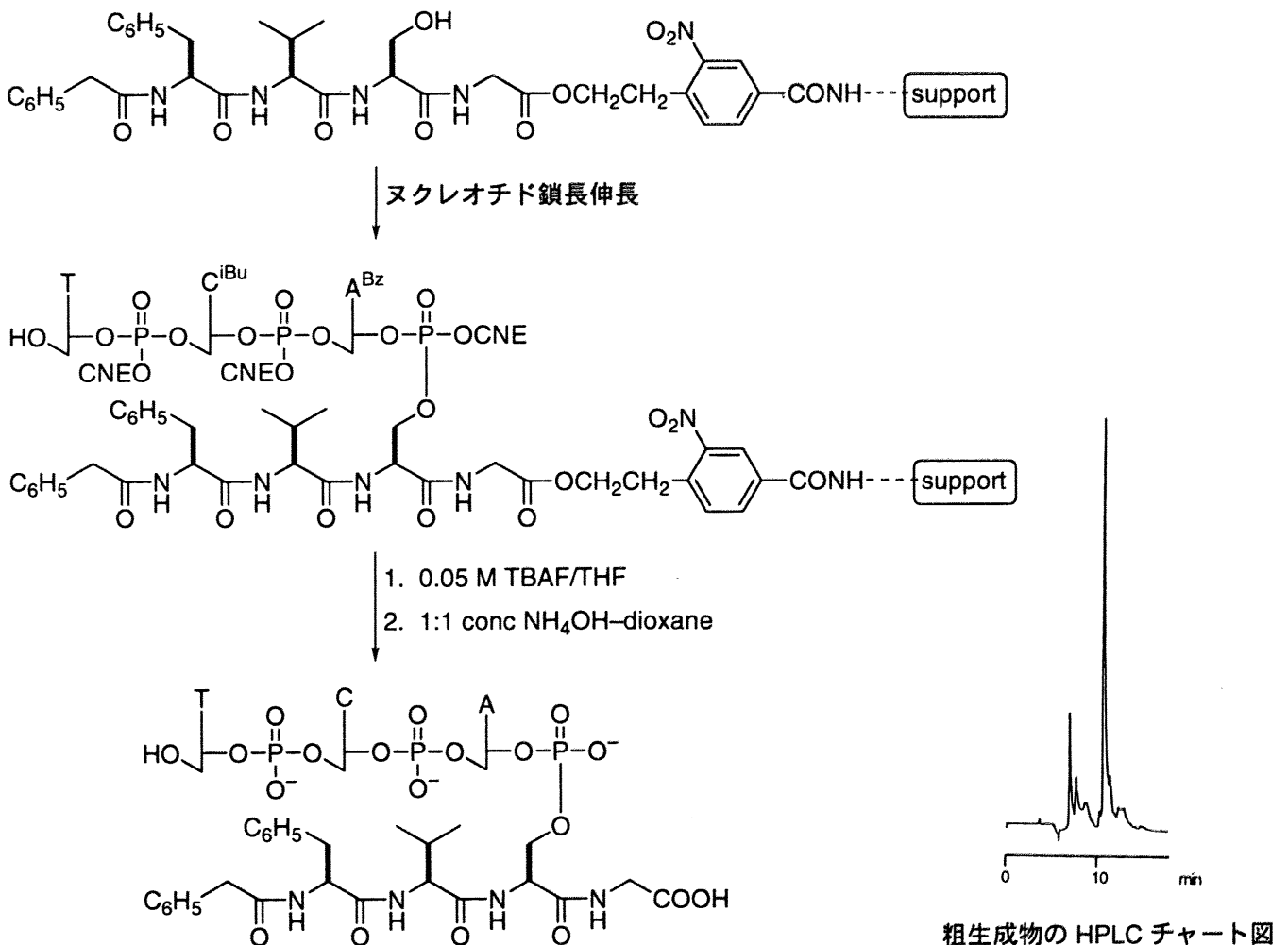
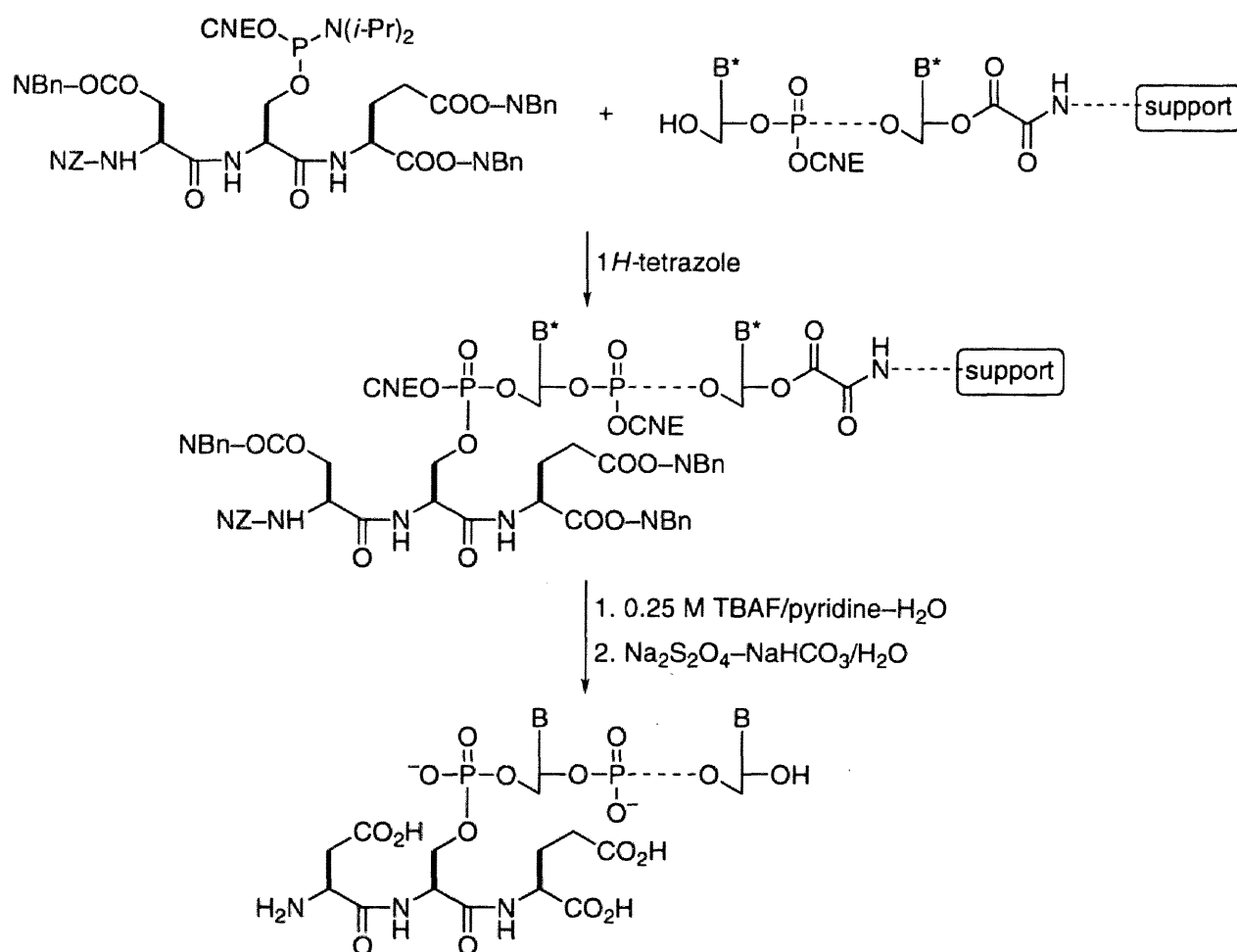


図 3. Grandas らによる合成例

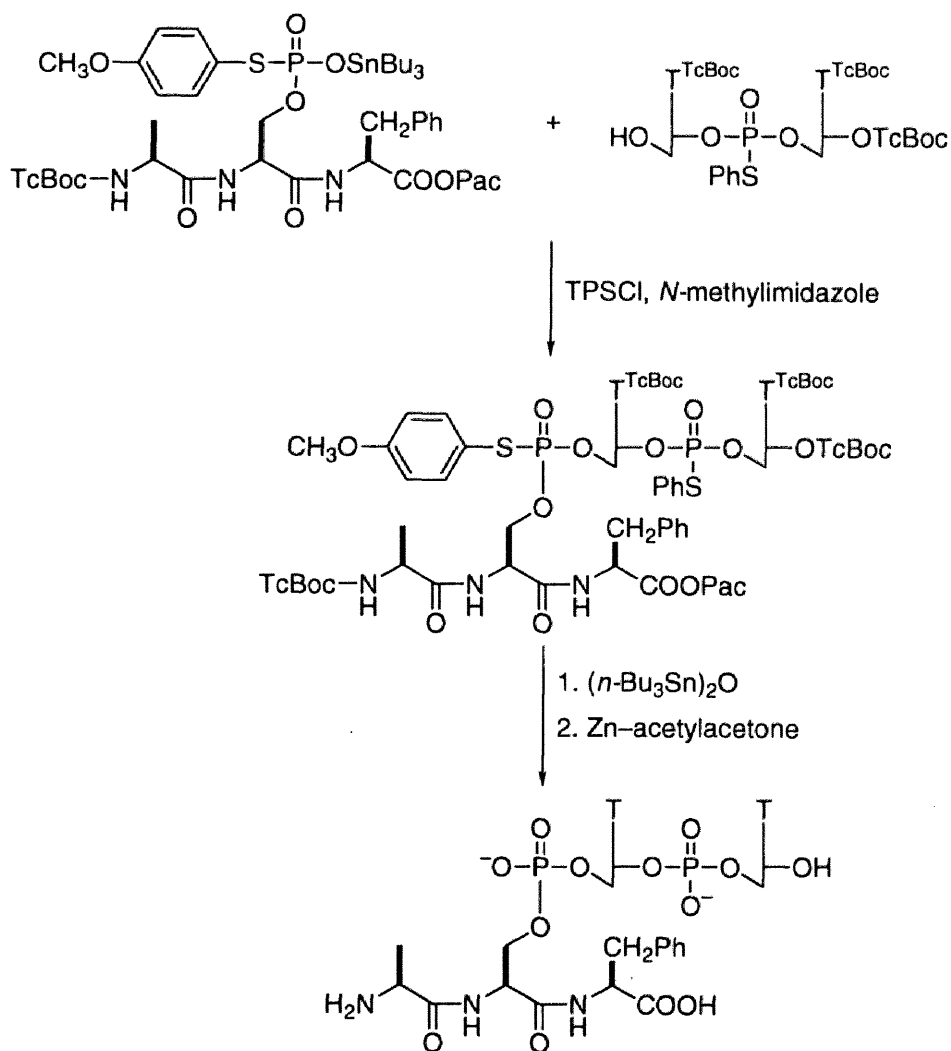
また、van Boom らはオリゴデオキシリボヌクレオチド鎖を固相上で構築させた後、ペプチドのホスホロアミダイトとオリゴヌクレオチド鎖の 5'-末端の水酸基を縮合させることにより H-Asp-Ser(p^{5'}AAAGTAAGCC)-Glu-OH を合成している⁴⁴⁻⁵¹。この合成では、核酸塩基部の保護基として 2-(*t*-ブチルジフェニルシリルオキシメチル)ベンゾイル (SiOMB) 基を用い、TBAF により除去し、また、ペプチドの N-末端の保護基として *p*-ニトロベンジル (NBn) 基、C-末端の保護基として *p*-ニトロベンジルオキシカルボニル (NZ) 基を用い、これらを Na₂S₂O₄-NaHCO₃ で除去している (スキーム 4) が、生成物の純度や収率が報告されておらず、本法が有用なものであるかどうか判断できない。



B* = AdeSiOMB, CytSiOMB, GuaSiOMB, Thy; B = Ade, Cyt, Gua, Thy

スキーム 4. J. H. van Boom らによる合成例

さらに、畑・関根はリン酸エステル部の保護基としてビス(トリブチルチン)オキシドで除去できるフェニルチオ基および *p*-メトキシフェニルチオ基を、また、ペプチドのアミノ基、カルボキシル基および核酸塩基部の保護基として亜鉛により中性条件下除去可能な 2,2,2-トリクロロ-*t*-ブトキシカルボニル (TcBoc) 基およびベンゾイルメチル (Pac) 基を用いて、H-Ala-Ser(pTpT)-Phe-OH の液相合成を達成しているが、収率が約 20% と低い^{52,53} (スキーム 5)。



TPS = 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニル

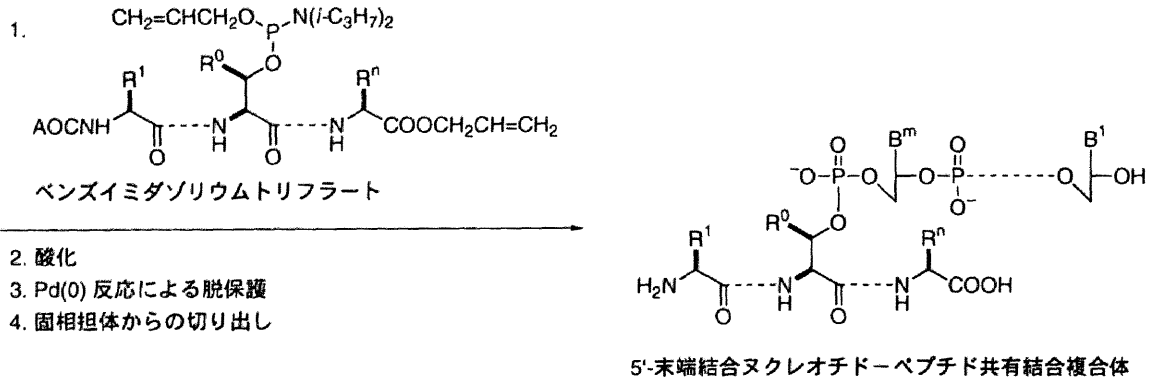
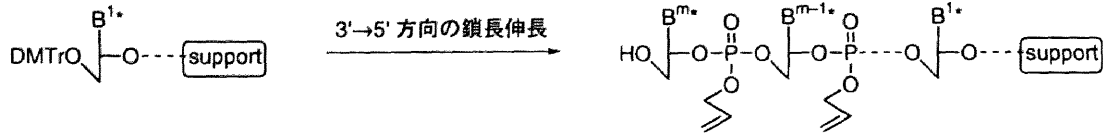
スキーム 5. 畑・関根らによる合成例

このように、これまで報告された A 型ヌクレオチド-ペプチド複合体合成法は、いずれも満足すべき方法とは言い難い。そこで筆者は、以下に述べるような独自の方法論に基づく A 型デオキシリボヌクレオチド-ペプチド複合体の効率良い合成法の開発を行った。さらに、ヌクレオチド-ペプチド複合体の類縁体で興味深い化合物でありながら、これまでに報告例のないデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸 A 型複合体の合成も検討した。

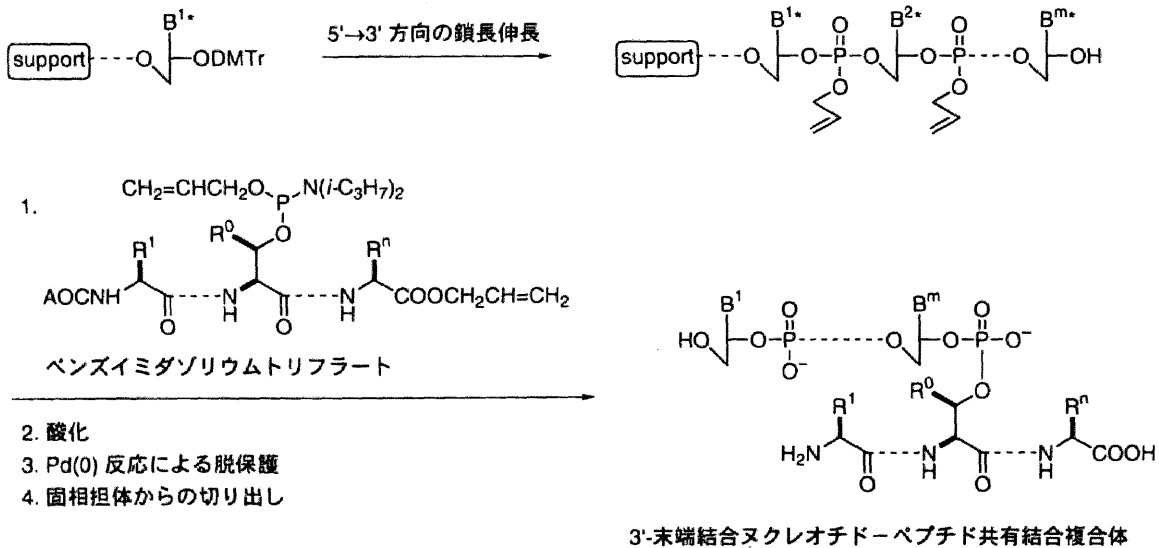
2. 合成計画

ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体の合成戦略としては、ペプチド鎖とヌクレオチド鎖を一構築単位ずつ順次伸長させていく段階的合成法 (stepwise strategy) と、ペプチド鎖とヌクレオチド鎖を別々に合成した後、両者を連結させる集約的合成法 (convergent strategy) の2通りがある。このうち、段階的合成法は集約的合成法に比べて一般に合成経路が長いため、各段階の反応収率が定量的に近いものでなければならないという過酷な条件が要求されるが、各段階の縮合収率が十分に高ければ、固相上で縮合反応を繰り返すことにより合成できるので操作が簡便であり、大きな化合物の合成も可能であるという利点をもつ。一方、集約的合成法では一般に合成経路が短くなるので高収率が望めるが、ペプチド鎖とヌクレオチド鎖が大きくなると有機溶媒に対する溶解度が悪くなるため、両セグメントの連結が困難になることが予想されるなどの欠点をもつ。この様に二つの方法には一長一短があり、研究遂行にどちらの合成戦略がより優れているかを短絡的には決められないが、筆者は目的物の収率を重視し、集約的合成法により合成することにした。

二種類の A 型複合体のうちヌクレオチドの 5'-末端で結合した複合体の合成は、若干の改良は必要であるものの、前述した van Boom らによる合成と同様の戦略、すなわち、3'-水酸基で固相に結合したヌクレオシドを出発物質として 3'→5' 方向に鎖長伸長をおこなって 5'-無置換オリゴデオキシリボヌクレオチドを調製した後、ホスホロアミダイト法によって 5'-末端水酸基にリン酸エステルを介したペプチド鎖を導入することにより達成できると考えられる (スキーム 6) ため、この方法に遵することとした。



スキーム 6. アリル保護ホスホロアミダイト法に基づく A 型 5'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチド複合体の合成計画



B = 核酸塩基; B^* = 保護核酸塩基; $R^0 = H, CH_3$

スキーム 7. アリル保護ホスホロアミダイト法に基づく A 型 3'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチド複合体の合成計画

一方、A型3'-末端修飾オリゴヌクレオチドの合成法としては、これまで、図8に示したように有機基の結合したヌクレオシド3'-リン酸エステルを3'-リン酸部でアルキルジスルフィド基をリンカーとして固相に担持したものを出発物質として、3'→5'方向に鎖長伸長を行いオリゴヌクレオチドを合成した後、脱保護、ジスルフィド結合切断により目的物を切り出す方法(合成法A)⁶と、図9に示したようにアミノアルキル基やメルカプトアルキル基などのリン酸エステルが3'-末端に結合したオリゴヌクレオチドを合成した後、液相で有機官能基をアミノ基やメルカプト基に結合させることにより目的物を得る方法(合成法B)¹⁵の二つが報告されているが、いずれも満足すべき合成法であるとは言い難い。たとえば合成法Aでは、出発物質としてヌクレオシド3'-リン酸エステルをリン酸エステル部位でジスルフィド結合を介して固相に担持したものを合成しなければならないが、リン酸エステル部の有機基がペプチドのような複雑なものの合成は困難であることが予想される。また、その有機基はオリゴヌクレオチドの鎖長伸長の条件、すなわちDMTr基の脱保護に用いるトリクロロ酢酸、インターヌクレオチド結合部を形成する際の亜リン酸エステル部の酸化に用いる酸化剤などに絶えうるものに限定される。一方、合成法Bでは、オリゴヌクレオチドと有機官能基を結合させるためのリンカーが必要であり、また合成経路も固相上で鎖長伸長した後、液相で有機基を連結させるという多段階が必要になる。そこで筆者は、既存の方法に比べて一般性、柔軟性、簡便性において優れた方法になると考えられる3'-末端結合A型デオキシリボヌクレオチド-ペプチド複合体の合成法として、5'-末端でアルキルアミノリンカーを介して固相に結合したヌクレオシドを出発物質とし、5'→3'方向の鎖長伸長法により3'-末端無置換オリゴデオキシリボヌクレオチドを調製した後、ホスホロアミダイト法によってペプチドリソ酸鎖を導入して合成する方法を企画した(スキーム7)。

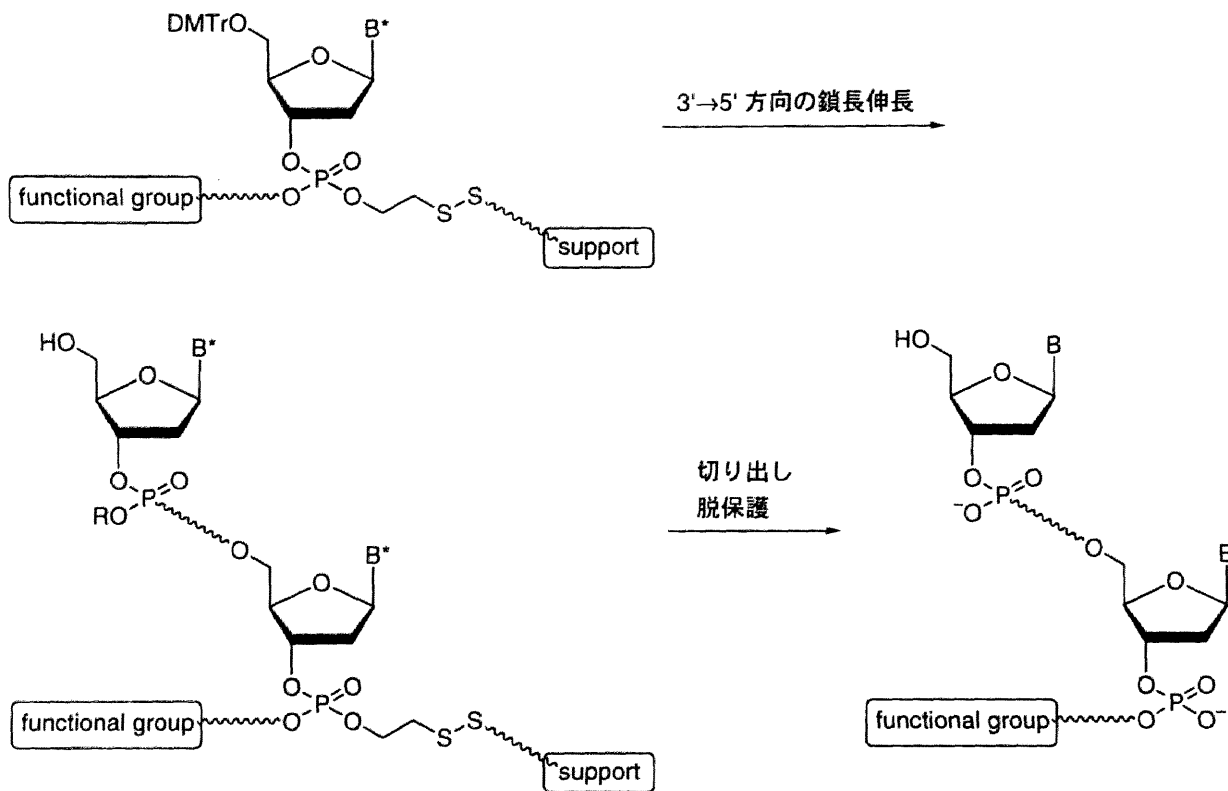
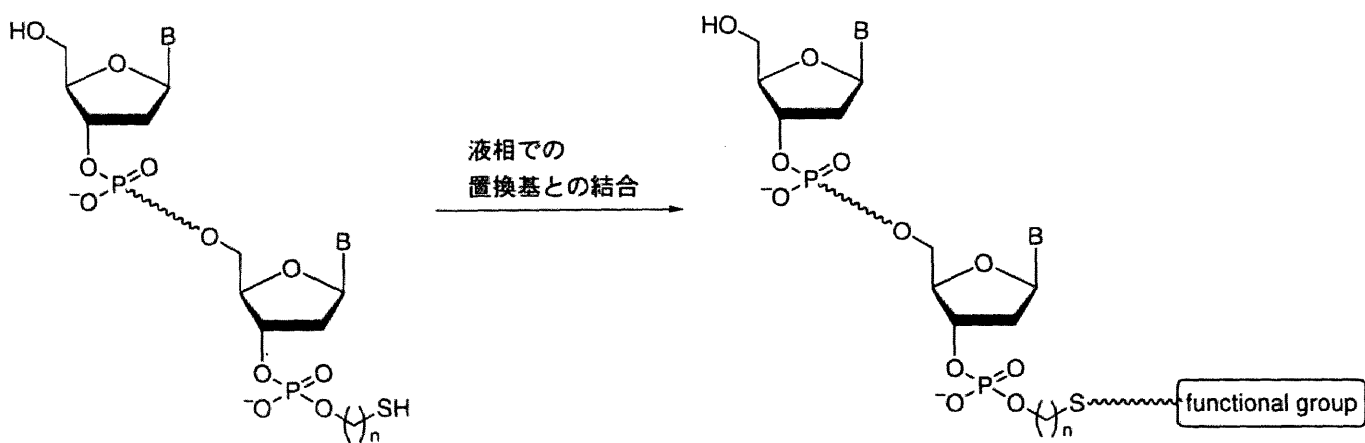


図 8. これまでに報告されている 3'-末端修飾オリゴヌクレオチドの合成法 A

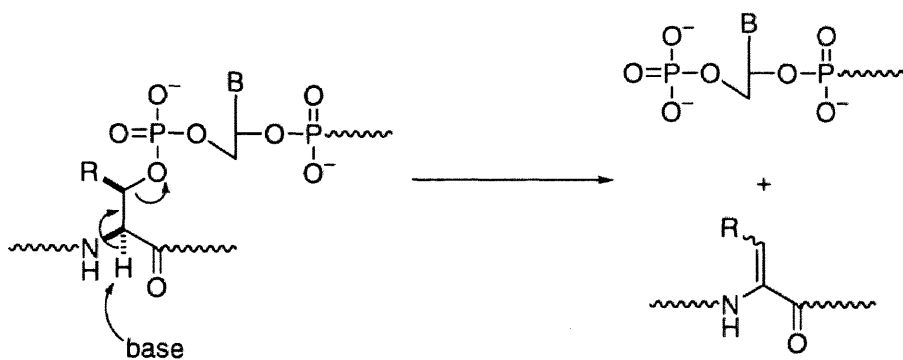


B* = 保護核酸塩基; B = 無保護核酸塩基

図 9. これまでに報告されている 3'-末端修飾オリゴヌクレオチドの合成法 B

ところで、A型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体は過酷な塩基性条件下不安定で、ペプチド鎖のアミノ酸残基のラセミ化、ヌクレオチド-ペプチド間のリン酸ジエステル結合のβ脱離による切断(スキーム10)などが懸念される。したがって、その合成においては保護基の選択がきわめて重要である。たとえば、核酸の化学合成において塩基部に一般に用いられるアシル保護基は、その除去に過酷な塩基性条件である濃アンモニア水中、加熱処理を要するため、その使用は好ましくない。換言すれば、ヌクレオチドの塩基部、リン酸エステル部、ペプチドのN-末端部およびC-末端部の保護基としては、過酷な塩基処理を要せず除去できる基の使用が必須である。

そこで筆者は、そのような要求に応え得る保護基として、以前当研究室で開発された、ほぼ中性で穏和な条件下有機パラジウム反応により除去できるアリル保護基⁵⁴⁻⁵⁶を使用することとした。具体的には、核酸塩基およびペプチドのN-末端アミノ基にはアリルオキシカルボニル基、ヌクレオチドのリン酸エステルおよびペプチドのC-末端カルボキシル基にはアリル基を用いることとした。

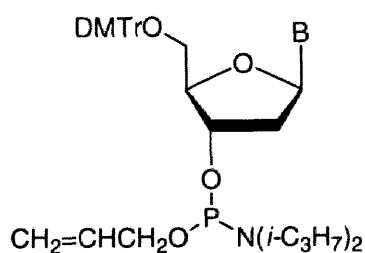


スキーム 10. 塩基性条件下で起こると予想されるβ脱離によるA型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体の分解

3. アリル保護基を有するホスホロアミダイトの合成

3-1. デオキシリボヌクレオシド 3'- および 5'-ホスホロアミダイトの合成

3'→5' 方向の鎖長伸長によるオリゴヌクレオチド合成に必要なヌクレオシド 3'-ホスホロアミダイト **1-4** を、文献既知の方法⁵⁶⁻⁵⁸ で調製した。

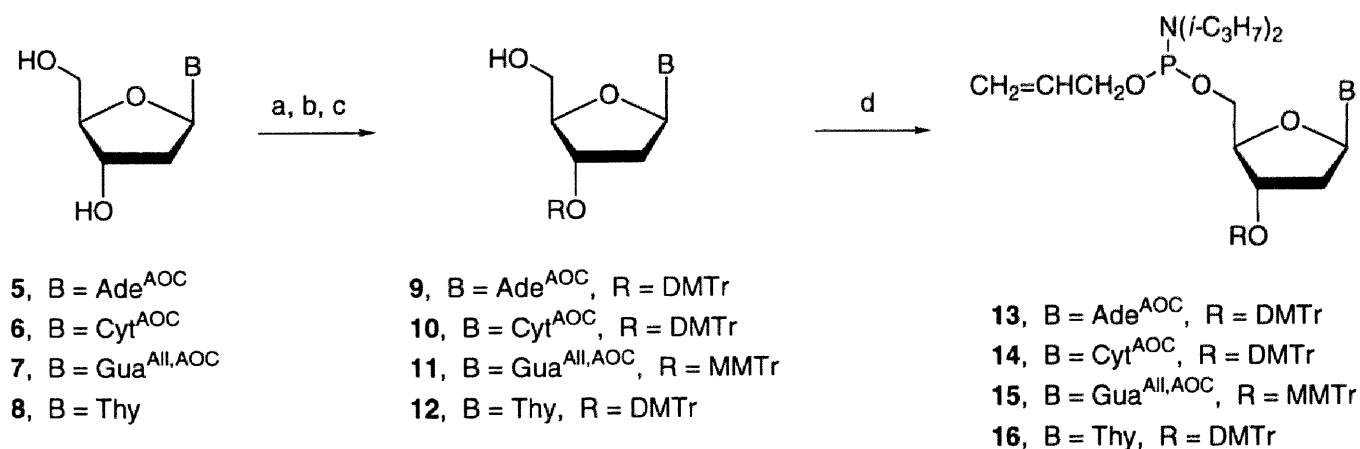


- 1, B = Ade^{AOC}
- 2, B = Cyt^{AOC}
- 3, B = Gua^{All,AOC}
- 4, B = Thy

一方、5'→3' 方向の鎖長伸長を行うために必要なアリル／アリルオキシカルボニル保護ヌクレオシド 5'-ホスホロアミダイト **13-16, 19** は、つぎのように合成した(スキーム 11、12)。

文献記載の方法により調製した *N*⁶-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシアデノシン (**5**)⁵⁷ の 5'-水酸基を、塩化 *tert*-ブチルジメチルシリル (0.90 当量) およびイミダゾール (2.0 当量) を用いてシリル化した後、DBU (2.0 当量) 存在下、塩化 *p,p'*-ジメトキシトリチル (2.0 当量) を用いて 3'-水酸基をトリチル化した。ついで、THF 中、TBAF (2.0 当量) によりシリル保護基を除去して **9** を得た。**9** の構造は ¹H NMR スペクトルにおいて 3.8 (CH₃O-)、6.8-7.5 (芳香族プロトン) ppm に DMTr 基に由来するシグナルが観測され、また TBDMS 基に由来するシグナルが消失したことから確認した。最後に、ジイソプロピルア

ンモニウム 1*H*-テトラゾリド (0.50 当量) を促進剤として、(アリルオキシ)ビス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン (1.8 当量) で **9** をホスホロアミダイト化することにより、目的とするデオキシアデノシンホスホロアミダイト **13** を 2 種類のジアステレオマーの混合物として得た (**5** からの収率 56%)。 **13** の構造は、³¹P NMR スペクトルで 148.6 ppm にアミダイトに由来するシグナルが観測され、また ¹H NMR スペクトルにおいて 3.98–4.17 (CH₂=CHCH₂OP–)、5.08 および 5.12 (cis-CH₂=CHCH₂OP–)、5.20 および 5.25 (trans-CH₂=CHCH₂OP–)、5.83 および 5.92 (CH₂=CHCH₂OP–) ppm にホスホロアミダイト部のアリル基に由来するシグナル、0.99、1.05 および 1.14 [(CH₃)₂CHN–]、3.43–3.52 [(CH₃)₂CHN–] にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナルが観測されたことから決定した。



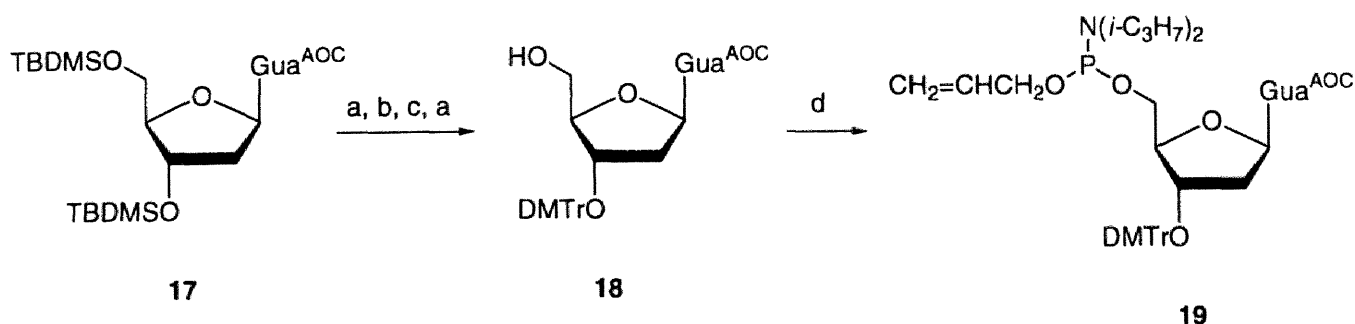
スキーム 11. ヌクレオシド 5'-ホスホロアミダイト **13–16** の合成。

(a) *t*-C₄H₉(CH₃)₂SiCl, imidazole, DMF; (b) C₆H₅(*p*-CH₃OC₆H₄)₂CCl or *p*-CH₃OC₆H₄-(C₆H₅)₂CCl, DBU, pyridine; (c) (*n*-C₄H₉)₄NF, THF; (d) CH₂=CHCH₂OP[(*i*-C₃H₇)₂]₂, diisopropylammonium 1*H*-tetrazolide, CH₃CN.

デオキシシチジンホスホロアミダイト **14** も、文献記載の方法に従い調製した *N*⁴-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシシチジン (**6**)⁵⁷ より同様に合成した。すなわち、**6** の 5'-水酸基を塩化 *tert*-ブチルジメチルシリル (1.0 当量) およびイミダゾール (2.0 当量) を用いてシリル化した後、3'-水酸基を塩化 *p,p'*-ジメトキシトリチル (2.0 当量) および DBU (1.9 当量) によりトリチル化、ついで、TBAF (1.7 当量) を用いて脱シリル化を行い **10** とした。最後に (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (1.8 当量)、ジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド (0.50 当量) を用いてホスホロアミダイト化して **14** を得た (**6** からの収率 81%)。 **14** は、³¹P NMR スペクトルで 148.5, 148.8 ppm にホスホロアミダイトのジアステレオマーに由来する 2 本シグナルが観測され、また ¹H NMR スペクトルにおいて 3.96–4.13 (CH₂=CHCH₂OP–), 5.06 および 5.14 (*cis*-CH₂=CHCH₂OP–), 5.17 および 5.24 (*trans*-CH₂=CHCH₂OP–), 5.74–5.98 (CH₂=CHCH₂OP–) ppm にホスホロアミダイト部のアリル基に由来するシグナル、1.01, 1.07, 1.12 および 1.14 [(CH₃)₂CHN–], 3.40–3.55 [(CH₃)₂CHN–] ppm にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナル、3.78 (CH₃O–), 6.4–7.5 (芳香族プロトン) ppm に DMTr 基に由来するシグナルを与えたことからその構造が支持された。

*N*² 位をアリルオキシカルボニル基で保護したデオキシグアノシンホスホロアミダイト **19** は、*N*²-アリルオキシカルボニル-3',5'-ビス-*O-tert*-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシグアノシン (**17**)⁵⁶ の、(1) TBAF (2.2 当量) を用いた脱シリル化、(2) 塩化 *tert*-ブチルジメチルシリル (1.0 当量) およびイミダゾール (3.1 当量) を用いた 5'-水酸基のシリル化、(3) 塩化 *p,p'*-ジメトキシトリチル (1.6 当量) および DBU (1.6 当量) を用いた 3'-水酸基のトリチル化、(4) TBAF (1.2 当量) を用いた脱シリル化、(5) (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (1.7 当量) およびジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド (0.53 当量) を用いたホスホロアミダイト化により合成した (**17** からの収率 28%)。 **19** の構造は、³¹P NMR スペクトルで 148.5 ppm にホスホロアミダイトに由来するシグナルが観測され、また ¹H NMR スペクトルにおいて 3.99–4.21 (CH₂=CHCH₂OP–), 5.06 および 5.13 (*cis*-CH₂=CHCH₂OP–), 5.19 および 5.26 (*trans*-CH₂=CHCH₂OP–), 5.77–5.98 (CH₂=CHCH₂OP–)

ppm にホスホロアミダイト部のアリル基に由来するシグナル、1.00、1.08 および 1.14 [(CH₃)₂CHN-]、3.47–3.56 [(CH₃)₂CHN-] ppm にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナル、3.74 (CH₃O-)、6.7–7.4 (芳香族プロトン) ppm に DMTr 基に由来するシグナルが観測されたことから決定した。



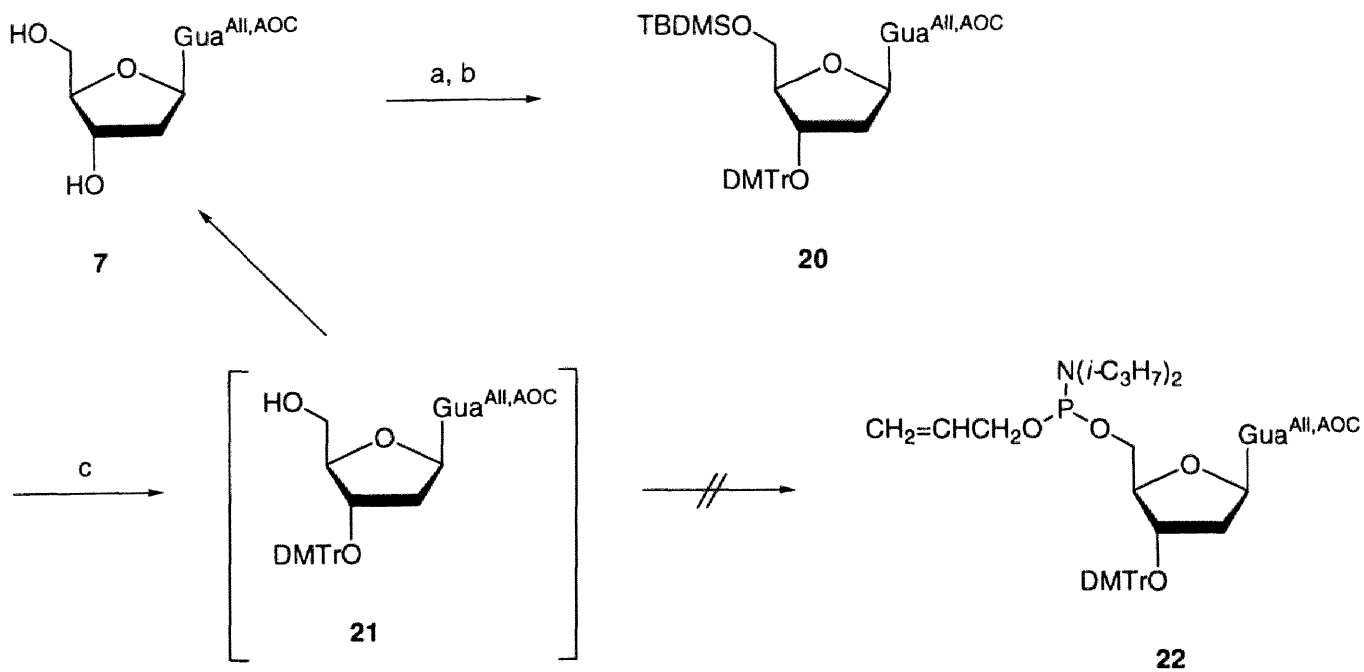
スキーム 12. ヌクレオシド 5'-ホスホロアミダイトモノマーユニット **19** の合成。

(a) (*n*-C₄H₉)₄NF, THF; (b) *t*-C₄H₉(CH₃)₂SiCl, imidazole, DMF; (c) C₆H₅(*p*-CH₃OC₆H₄)₂CCl, DBU, pyridine; (d) CH₂=CHCH₂OP[(*i*-C₃H₇)₂]₂, diisopropylammonium 1*H*-tetrazolide, CH₃CN.

また、N²位をアリルオキシカルボニル基、O⁶位をアリル基で保護したデオキシグアノシンホスホロアミダイト **15** を、文献記載の方法により合成した N²-アリルオキシカルボニル-O⁶-アリル-2'-デオキシグアノシン (**7**)⁵⁸ を出発物質として以下のように合成した。7 の 5'-水酸基を塩化 *tert*-ブチルジメチルシリル (1.0 当量) とイミダゾール (2.0 当量) を用いて TBDMS 基で保護した後、塩化 *p*-メトキシトリチル (1.4 当量) および DBU (1.4 当量) により 3'-水酸基を MMTTr 基で保護し、さらに TBAF (2.0 当量) を用いて 5'-水酸基のシリル基を除去して **11** を得た。11 の構造は、¹H NMR スペクトルにおいて 3.77 (CH₃O-)、6.84 および 7.2–7.5 (芳香族プロトン) ppm に MMTTr 基に由来するシグナルが観測されたことか

ら確認した。ついで、(アリルオキシ)ピス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(1.5当量)とジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド(0.52当量)を用いてホスホロアミダイト化することにより、**15**を得た(**7**からの収率47%)。**15**の構造は、³¹P NMR スペクトルで148.6 ppm にホスホロアミダイトに由来するシグナルが観測され、また ¹H NMR スペクトルにおいて 3.96–4.17 (CH₂=CHCH₂OP–)、5.04–5.12 (cis-CH₂=CHCH₂OP–)、5.19 および 5.22–5.27 (trans-CH₂=CHCH₂OP–)、5.82 および 5.91 (CH₂=CHCH₂OP–) ppm にホスホロアミダイト部のアリル基に由来するシグナル、0.99、1.04 および 1.12 [(CH₃)₂CHN–]、3.43–3.57 [(CH₃)₂CHN–] ppm にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナルが観測されたことから決定した。なお、**15**の類縁体である 3'-水酸基が DMTr 基で保護された化合物 **22**の合成も、スキーム 13 に示した経路により検討したが、**20**の脱シリル化反応によって生成する **21**が非常に不安定(すみやかに脱トリチル化し **7**に変化)であったため、目的を達することができなかった。

チミジンホスホロアミダイト **16**は、3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチルチミジン (**12**)の(アリルオキシ)ピス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(1.4当量)とジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド(0.47当量)を用いるホスホロアミダイト化により、収率92%で合成した。**16**の構造は、³¹P NMR スペクトルで148.4, 148.6 ppm にアミダイトのジアステレオマーに由来する2本シグナルが観測され、また ¹H NMR スペクトルにおいて 4.01–4.14 (CH₂=CHCH₂OP–)、5.07 および 5.10 (cis-CH₂=CHCH₂OP–)、5.17 および 5.22 (trans-CH₂=CHCH₂OP–)、5.80 および 5.86 (CH₂=CHCH₂OP–) ppm にアリル基に由来するシグナル、0.99、1.08、1.13 および 1.15 [(CH₃)₂CH–]、3.45–3.56 [(CH₃)₂CH–] ppm にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナルが観測されたことから決定した。

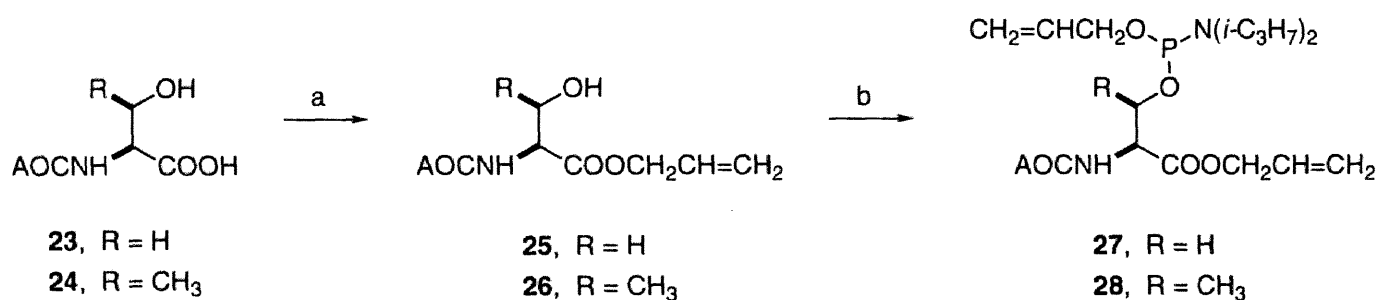


スキーム 13. N² 位をアリルオキシカルボニル基で、O⁶ 位をアリル基で保護したデオキシグアノシンホスホロアミダイト **22** 合成の試み。(a) *t*-C₄H₉(CH₃)₂SiCl, imidazole, DMF; (b) C₆H₅(*p*-CH₃OC₆H₄)₂CCl, DBU, pyridine; (c) (*n*-C₄H₉)₄NF, THF.

3-2. アミノ酸ホスホロアミダイト、ペプチドホスホロアミダイトの合成

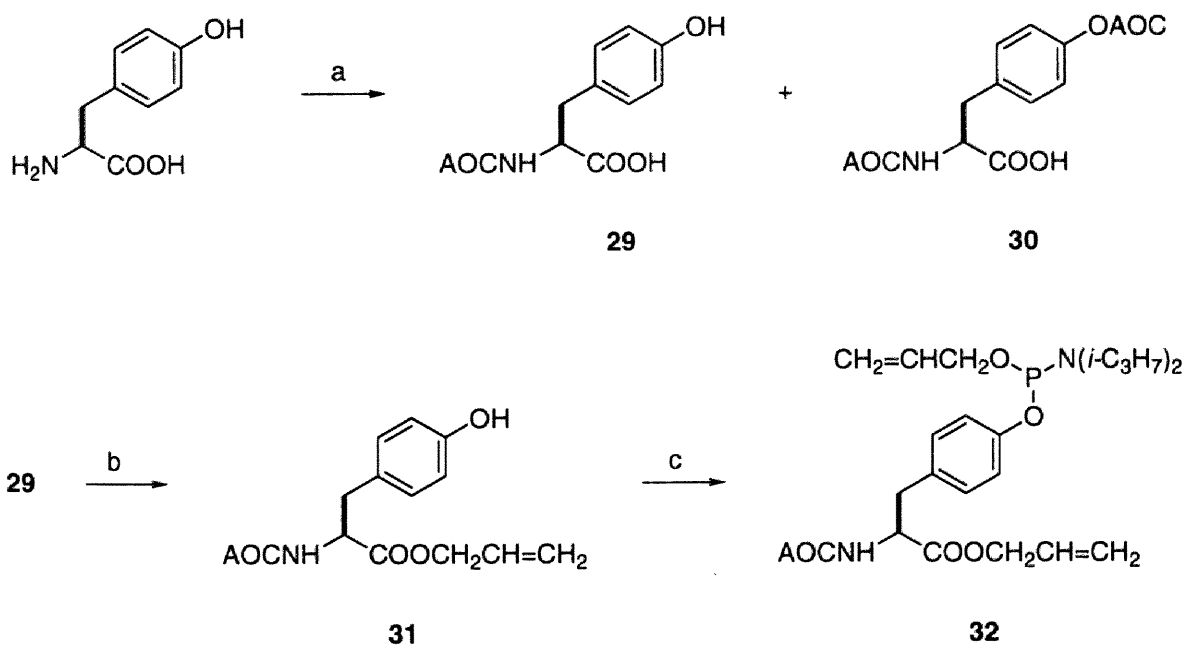
ヌクレオチド-アミノ酸複合体、ヌクレオチド-ペプチド複合体の合成に必要な、アミノ基をアリルオキシカルボニル基で、カルボキシル基をアリルエステルとして保護したアミノ酸ホスホロアミダイト **27**、**28**、**32**、ペプチドホスホロアミダイト **36**、**37**、**41** の合成を以下の様におこなった。

スキーム 14 に、セリンホスホロアミダイト **27** およびスレオニンホスホロアミダイト **28** の合成経路を示した。*N*-アリルオキシカルボニル-L-セリン⁵⁹ (**23**) を、還流トルエン中、*p*-トルエンスルホン酸 (0.10 当量) を触媒に用いてアリルアルコール (10 当量) と反応させてアリルエステルとした後、アセトニトリル中、ジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド (1.0 当量) 存在下に (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (1.5 当量) と反応させ、**27** を収率 59% で得た。また、スレオニンホスホロアミダイト **28** を *N*-アリルオキシカルボニル-L-スレオニン⁵⁹ (**24**) から同様の手順により合成した (**24** からの収率 47%)。



スキーム 14. アミノ酸ホスホロアミダイト **27**、**28** の合成。(a) $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OH}$, *p*- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}\cdot\text{H}_2\text{O}$, toluene, reflux; (b) $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}[\text{N}(i\text{-C}_3\text{H}_7)_2]_2$, diisopropylammonium 1*H*-tetrazolide, CH_3CN .

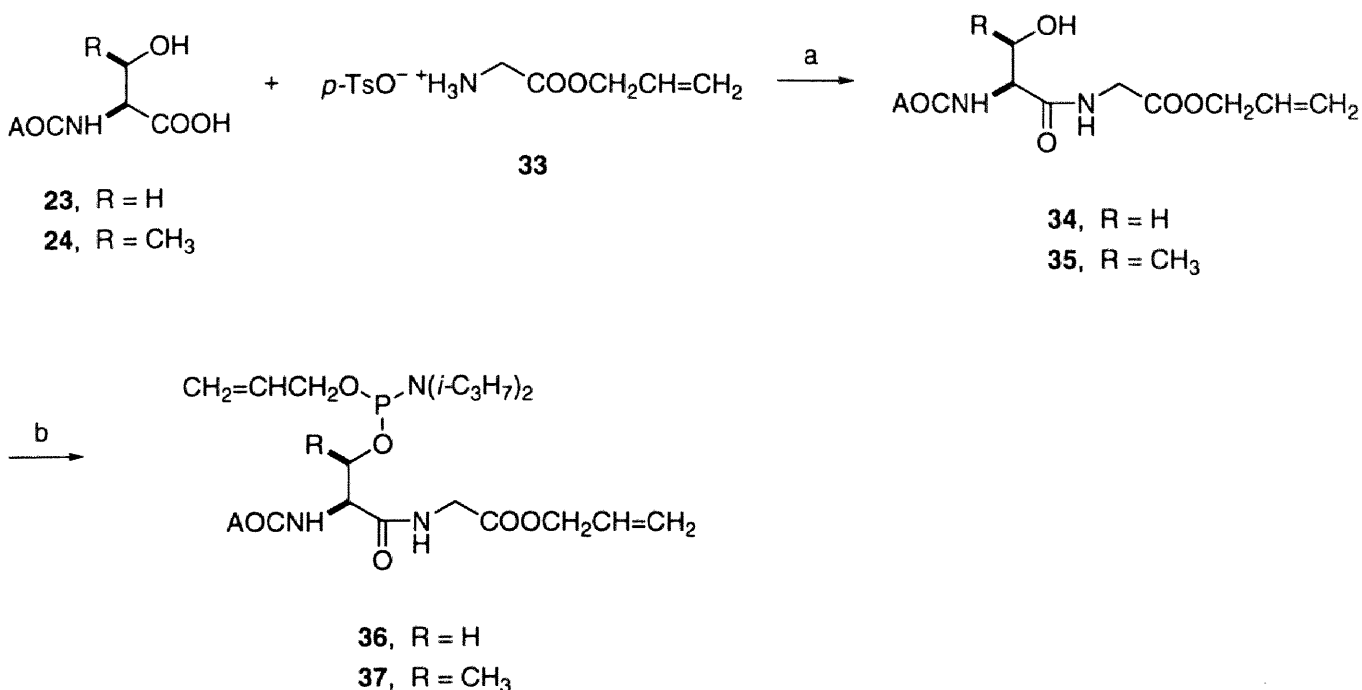
チロシンホスホロアミダイト **32** の合成は、スキーム 15 に従って行った。まず、L-チロシンを水酸化ナトリウム (2.0 当量) 水溶液中、クロロギ酸アリル (1.0 当量) と反応させて、*N*-アリルオキシカルボニル-L-チロシン (**29**) を得た (収率 29%)。この反応の際、副生成物として *N,O*-ビス (アリルオキシカルボニル)-L-チロシン (**30**) が得られた (収率 35%)。ついで **29** を、還流トルエン中、*p*-トルエンスルホン酸 (0.11 当量) を触媒に用いてアリルアルコール (10 当量) と反応させて、アリルエステル **31** に変換した (収率 86%)。最後に、**31** をジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド (1.0 当量) を促進剤として (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (1.5 当量) と反応させて、チロシンホスホロアミダイト **32** を収率 100% で得た。



スキーム 15. チロシンホスホロアミダイトアミダイト **32** の合成。(a) CH₂=CHCH₂OCOCl, NaOH, H₂O; (b) CH₂=CHCH₂OH, *p*-CH₃C₆H₄SO₃H•H₂O, toluene, reflux; (c) CH₂=CHCH₂O-P[N(*i*-C₃H₇)₂]₂, diisopropylammonium 1*H*-tetrazolide, CH₃CN.

アミノ酸ホスホロアミダイト **27**, **28**, **32** の構造は、 ^{31}P NMR スペクトルで 140–150 ppm にホスホロアミダイトに帰属されるシグナルが観測され、 ^1H NMR スペクトルにおいて 4.0–4.3 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}-$), 5.1–5.4 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}-$) および 5.8–6.0 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}-$) ppm にホスホロアミダイト部のアリル基に由来するシグナル、1.1–1.2 [$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$] および 3.5–3.8 [$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$] ppm にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナル、4.5–4.7 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}-$), 5.1–5.4 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}-$) および 5.8–6.0 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}-$) ppm にアリルオキシカルボニル基およびアリルエステル基に由来するシグナルが観測されたこと、また IR スペクトルで 1730 cm^{-1} にウレタンおよびカルボン酸エステルに由来する吸収が観測されたことから決定した。

ジペプチドホスホロアミダイト **36**, **37** は以下のように調製した (スキーム 16)。THF 中、トリエチルアミン (1.0 当量) 存在下、DCC (1.9 当量) および HOBT (1.3 当量) を用いて、グリシンアリルエステルの *p*-トルエンスルホン酸塩 (**33**)⁶⁰ (1.0 当量) と *N*-アリルオキシカルボニル-L-セリン (**23**) (1.3 当量) を縮合させて **34** とした後、ジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド (1.0 当量) を促進剤として、(アリルオキシ)ビス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン (1.5 当量) と反応させ、ジペプチドホスホロアミダイト **36** を得た (**33** からの収率 64%)。また、**23** の代わりに *N*-アリルオキシカルボニル-L-スレオニン (**24**) を用い、同様の操作を施すことにより、ジペプチドホスホロアミダイト **37** を得た (通算収率 60%)。ジペプチドホスホロアミダイト **36**, **37** の構造は、 ^{31}P NMR スペクトルで 150 ppm 付近にホスホロアミダイトに由来するシグナルが観測され、 ^1H NMR スペクトルにおいて 3.9–4.3 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}-$), 5.1–5.4 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}-$) および 5.8–6.0 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}-$) ppm にホスホロアミダイト部のアリル基に由来するシグナル、1.1–1.3 [$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$] および 3.5–3.7 [$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$] ppm にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナル、4.6–4.7 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}-$), 5.1–5.4 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}-$) および 5.8–6.0 ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}-$) ppm にアリルオキシカルボニル基およびアリルエステル基に由来するシグナルが観測されたこと、また IR スペクトルで 1730 cm^{-1} にウレタンおよびカルボン酸エステル、1680 および $1530\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ にアミドに由来する吸収が観測されたことから決定した。

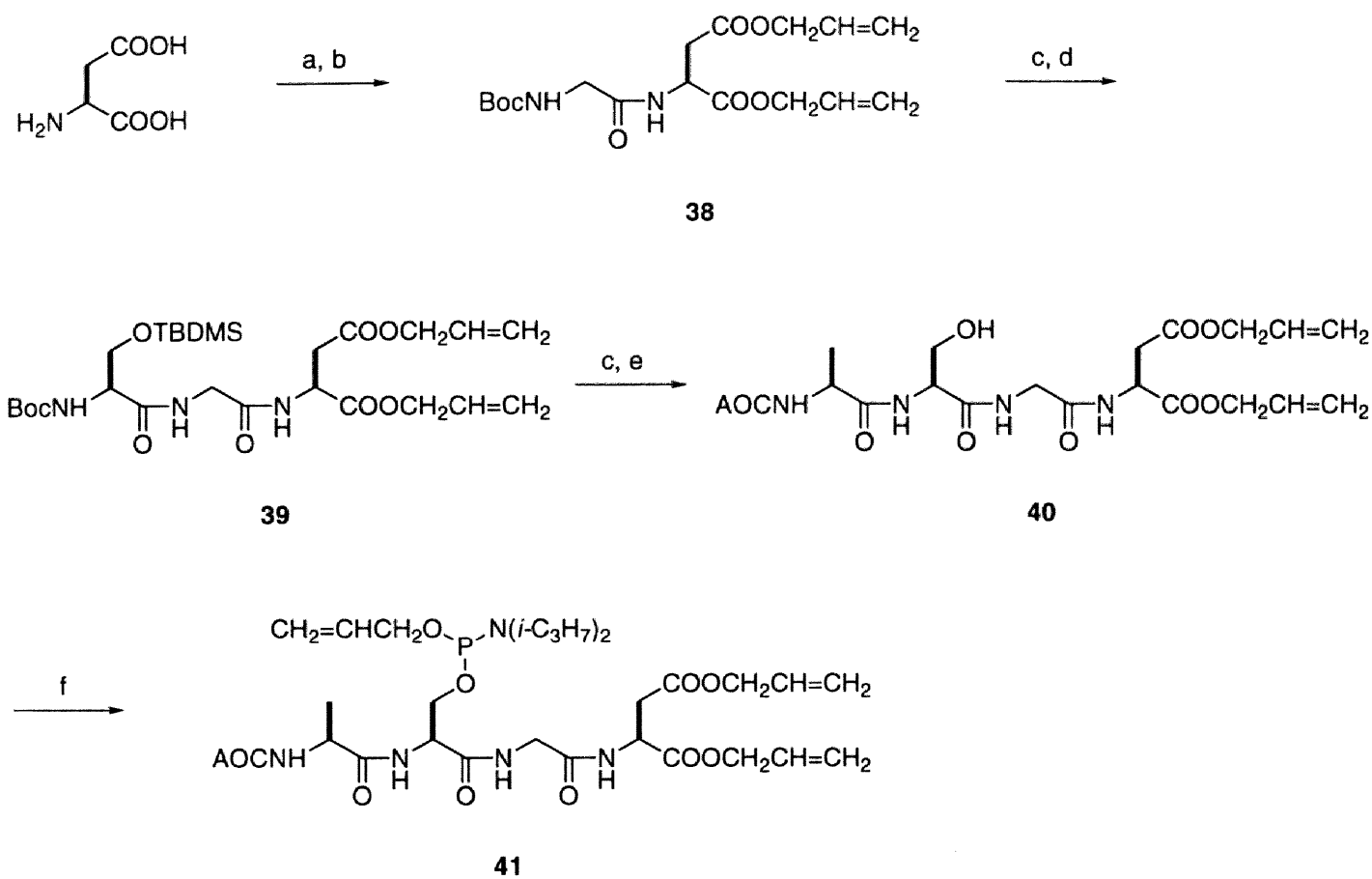


スキーム 16. ジペプチドホスホロアミダイト **36**, **37** の合成。(a) DCC, HOBT, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, CH_2Cl_2 ; (b) $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OP}[(i\text{-C}_3\text{H}_7)_2]_2$, diisopropylammonium 1*H*-tetrazolide, CH_3CN .

テトラペプチドホスホロアミダイト **41** は、スキーム 17 に示した経路によって合成した。還流トルエン中、*p*-トルエンスルホン酸 (1.1 モル当量) を触媒に用いて *L*-アスパラギン酸にアリルアルコール (10 モル当量) を作用させてアスパラギン酸ジアリルエステルとした後、ジクロロメタン中、DCC (1.8 当量) および HOBT (1.8 当量) を用いて *N*-*tert*-ブトキシカルボニルグリシン (Boc-Gly-OH) (**42**) (1.2 当量) と縮合させることによりジペプチド Boc-Gly-Asp(OCH₂CH=CH₂)₂ (**38**) を得た (収率 63%)。38 の構造は、¹H NMR スペクトルにおいて 4.6–4.7 (CH₂=CHCH₂O–)、5.2–5.4 (CH₂=CHCH₂O–) および 5.8–5.9 (CH₂=CHCH₂O–) ppm にアリルエステル基に由来するシグナル、2.89、3.07 (β 位) および

4.91 (α 位) ppm にアスパラギン酸残基由来のシグナル、3.7–4.0 ppm (α 位) にグリシン残基由来のシグナルが観測され、また IR スペクトルで 1740 cm^{-1} にカルボン酸エステルおよびウレタンに、 1685 および 1520 cm^{-1} にアミドに由来する吸収が観測されたことから決定した。ついで、**38** の Boc 保護基をジクロロメタン中、トリフルオロ酢酸を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で作用させることにより除去した後、BOP⁶¹ (1.8 当量) およびトリエチルアミン (4.9 当量) を用いて、*N-tert*-ブトキシカルボニル-*O-tert*-ブチルジメチルシリル-L-セリン⁶² [Boc-Ser(OTBDMS)-OH] (**43**) (1.2 当量) を働かせ、トリペプチド **39** とした (収率 91%)。 **39** の構造は、¹H NMR スペクトルにおいて 0.88 [(CH₃)₃CSi-], 0.08 (CH₃Si-) ppm に TBDMS 基由来のシグナル、3.71 (α 位)、3.99–4.03 および 4.19 ppm (β 位) にセリン残基由来のシグナルが観測されたことから決定した。さらに、トリペプチド **39** の Boc 基を除去した後、文献記載の方法⁵⁹ で合成した *N*-アリルオキシカルボニル-L-アラニン (AOC-Ala-OH) (**44**) と縮合させ、さらに TBAF と酢酸の 1:1 混合物処理によって TBDMS 基を除去してテトラペプチド **40** を得た (収率 51%)。 **40** の構造は、¹H NMR スペクトルにおいて 4.5–4.8 (CH₂=CHCH₂OCO-), 5.2–5.3 (CH₂=CHCH₂OCO-) および 5.9–6.0 (CH₂=CHCH₂OCO-) ppm にアリルオキシカルボニル基由来のシグナル、1.36 (CH₃), 4.15 (α 位) ppm にアラニン残基由来のシグナルが観測されたこと、また TBDMS 基由来のシグナルが消失したことから決定した。最後に、ジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド (1.0 当量) を促進剤として、テトラペプチド **40** をビス (ジイソプロピルアミノ) アリルオキシホスフィン (1.5 当量) と反応させ、テトラペプチドホスホロアミダイト **41** を得た (収率 63%)。 **41** の構造は、³¹P NMR スペクトルで 149.3, 149.6 ppm にホスホロアミダイトのジアステレオマーに由来する 2 本のシグナルが観測され、¹H NMR スペクトルにおいて 3.9–4.3 (CH₂=CHCH₂OP-), 5.2–5.4 (CH₂=CHCH₂OP-) および 5.8–6.0 (CH₂=CHCH₂OP-) ppm にホスホロアミダイト部のアリル基に由来するシグナル、1.2–1.1 [(CH₃)₂CH-] および 3.5–3.6 [(CH₃)₂CH-] ppm にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナルが観測されたこと、また IR スペクトルで 1750 , 1710 cm^{-1} にカルボン酸エステルおよびウレタンに、 1640 , 1510

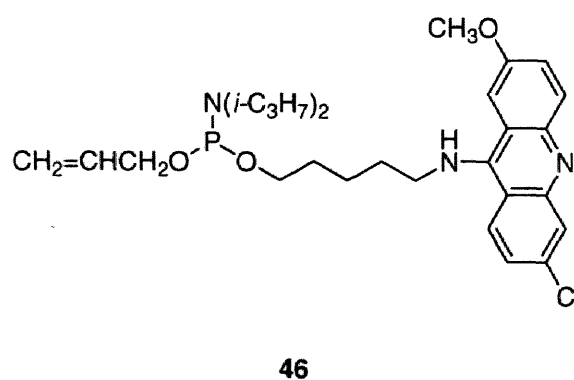
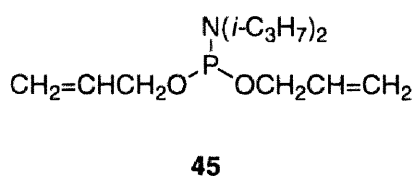
cm⁻¹ にアミドに由来する吸収が観測されたことから決定した。



スキーム 17. ペプチドホスホロアミダイト **41** の合成。(a) CH₂=CHCH₂OH, *p*-CH₃C₆H₄SO₃H·H₂O, toluene, reflux; (b) Boc-Gly-OH (**42**), DCC, HOBT, (C₂H₅)₃N, CH₂Cl₂; (c) CF₃COOH, CH₂Cl₂; (d) Boc-Ser(OTBDMS)-OH (**43**), BOP, (C₂H₅)₃N, THF; (e) AOC-Ala-OH (**44**), BOP, (C₂H₅)₃N, THF; (f) CH₂=CHCH₂OP[(*i*-C₃H₇)₂]₂, diisopropylammonium 1*H*-tetrazolide, CH₃CN.

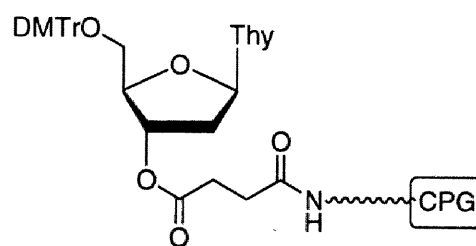
3-3. ジアリルホスホロアミダイト、アクリジニルホスホロアミダイトの合成

3'-末端修飾オリゴヌクレオチドの合成に用いるジアリルホスホロアミダイト **45** を文献記載の方法⁶³ により合成した。また、アクリジニルホスホロアミダイト **46** を 6-クロロ-2-メトキシ-9-(ヒドロキシペンチルアミノ)アクリジン⁶⁴ の、1*H*-テトラゾール (0.51 当量)、(アリルオキシ)ピス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン (1.0 当量) を用いるホスホロアミダイト化により合成した (収率 52%)。アクリジニルホスホロアミダイト **46** の構造は、³¹P NMR スペクトルで 146.9 ppm にホスホロアミダイトに由来するシグナルが観測され、また ¹H NMR スペクトルにおいて 4.21–4.06 (CH₂=CHCH₂OP-), 5.11 (cis-CH₂=CHCH₂OP-), 5.27 (trans-CH₂=CHCH₂OP-) および 5.94 (CH₂=CHCH₂OP-) ppm にアリル基に由来するシグナル、1.15 ppm および 1.17 ppm [(CH₃)₂CH₂-] にジイソプロピルアミノ基に由来するシグナルが観察されたことから決定した。



4. 5'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の固相合成

5'-末端結合 A 型デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸共有結合複合体を、Applied Biosystems 社製 392 型 DNA/RNA 合成機を用いて合成した。その代表例として、Ala-Ser(p^{5'}TGTCGACACCCAATT^{3'})-Gly-Asp (47) の合成を示す。まず、3'-水酸基で長鎖アルキルアミノリンカーを介して固相担体 (CPG) と結合したチミジン **48** を出発物質、ヌクレオシド 3'-ホスホロアミダイト **1-4** をモノマーユニット、BIT⁶⁵ を促進剤に用い、表 1 に示す合成サイクルに従って 3'→5' 方向に鎖長伸長を行い、固相担持 5'-末端無置換オリゴヌクレオチド 15 量体 5'[']TGTCGACACCCAATT^{3'} を合成した。トリチルカチオン定量によるヌクレオチド鎖長伸長の平均縮合収率は 99.2%、通算収率は 89% であった。



48

表 1. 5'→3' 方向の鎖長伸長法によるオリゴデオキシリボヌクレオチド固相合成の反応サイクル

step	operation	reagent	time, min
1	washing	CH ₃ CN	0.4
2	deprotection	3% Cl ₃ CCOOH/CH ₂ Cl ₂	1.3
3	washing	CH ₃ CN	0.8
4	coupling	0.1 M phosphoramidite/CH ₃ CN + 0.2 M benzimidazolium triflate/CH ₃ CN	1.0
5	washing	CH ₃ CN	0.2
6	capping	Ac ₂ O–2,6-lutidine–THF (1:1:8) + 16% <i>N</i> -methylimidazole/THF	0.3
7	washing	CH ₃ CN	0.2
8	oxidation	1.0 M <i>t</i> -C ₄ H ₉ OOH/toluene	0.5
9	washing	CH ₃ CN	0.6

ついで、BIT を促進剤としたペプチドホスホロアミダイト **41** との反応と TBHP⁶⁶ を用いる酸化によってヌクレオチドの 5'-末端にリン酸エステルで架橋したペプチド鎖を導入した。その後、トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム–クロロホルム錯体 [Pd₂(dba)₃•CHCl₃] (2.5 当量/アリル)、トリフェニルホスフィン (25 当量/アリル) およびギ酸ジエチルアンモニウム (150 当量/アリル) の混合物を用いてアリル保護基を除去し (50 °C、1 時間)、最後に濃アンモニア水処理して (室温、1 時間)、目的とするヌクレオチド–ペプチド共有結合複合体 **47** を固相から切り出した。HPLC およびキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) のチャート (図 18) が示すように、**47** の粗生成物の純度は非常に高い。また、スキーム 10 に示したような **47** の分解反応によって生成するオリゴヌクレオチド 5'-リン酸モノエステル体 p^{5'}TGTCGACACCCAATT^{3'} (保持時間 14 分) が粗生成物中に観察されなかったことから、合成中にそのような分解が起こっていないこともわかった。オリゴヌクレオチド 15 量体 5'TGTCGACACCCAATT^{3'} を標準物質として HPLC により求めた

47 の収率は 82% であった。47 を HPLC により単離した後、エレクトロスプレーイオン化マス (ESI-MS) スペクトルを測定したところ、 $2460.5 (M-2H)^{2-}$ および $1640.3 (M-3H)^{3-}$ に分子イオンピークが観察された。これらは、分子量 4922.23 の 47 に矛盾せず、その構造を支持した。セリンおよびチロシンが 5'-末端に結合したヌクレオチド-アミノ酸複合体、およびこれらのアミノ酸残基の水酸基を介してリン酸エステル結合したヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体も、ホスホロアミダイトとして 27、32 および 36 を用いることにより、同様に高い収率で合成できた (表 2)。

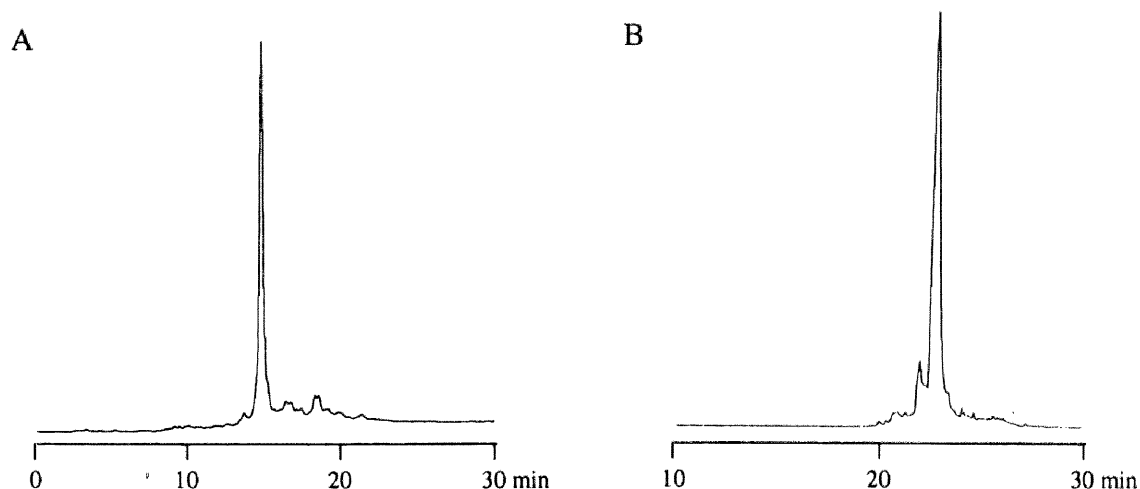


図 18. Ala-Ser(p^{5'}TGTCGACACCCAATT^{3'})-Gly-Asp (47) の粗生成物の (A) HPLC および (B) キャピラリーゲル電気泳動のチャート

ペプチドのスレオニン残基の水酸基を介してリン酸エステル結合したヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体、Thr(p^{5'}TGTCGACACCCAATT^{3'})-Gly (49) も、上記固相担持 5'-末端無置換オリゴヌクレオチド 15 量体とペプチドホスホロアミダイト 37 との反応を鍵に同様の手順によって合成できた。しかし収率は低く、69% であった。HPLC (図 19) によると 49 の粗生成物中にはいくつかの不純物が存在するが、このうち保持時間 18 分に見られるピークに相当する不純物は、標準物質との比較により、3',5'-両末端無置換オリゴヌクレ

オチド 5'TGTCGACACCCAATT3' であることがわかった。このことは、ペプチドホスホロアミダイト **37** は反応性が低く、固相担持オリゴヌクレオチドと上記の条件下では十分に反応しなかったことを示唆している。そこで、縮合収率の向上を目指して縮合時間を長くするなど様々な試みを行ったが、改良することはできなかった。なお、HPLC (図 19) でオリゴヌクレオチド 5'-リン酸モノエステル体のピークが見られなかったことから、本合成において **49** のスキーム 10 のような分解は起こっていないことがわかった。スレオニンがヌクレオチドの 5'-末端に結合した複合体も、ホスホロアミダイトとして **28** を用いることにより合成できたが、やはり **28** の反応性が低いために目的物の収率は低かった (表 2)。

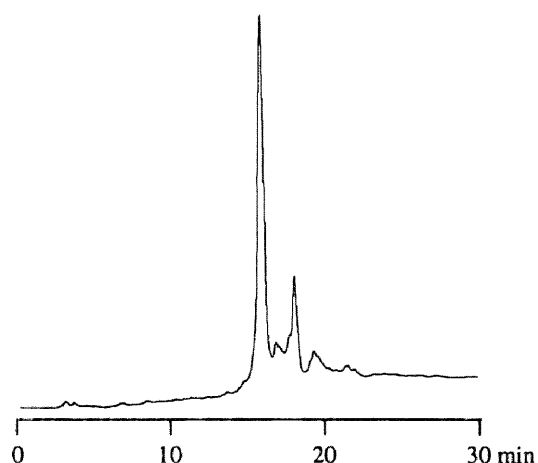


図 19. Thr(p⁵TGTCGACACCCAATT³)-Gly (**49**) の粗生成物の HPLC チャート

合成した 5'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体と HPLC 分析によって求めたそれらの収率を表 2 に示した。

表 2. 5'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の合成

conjugate	yield, % ^a
Ala-Ser(p ^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'})-Gly-Asp (47)	82
Ala-Ser(p ^{5'} CATCAT ^{3'})-Gly-Asp	89
Ser(p ^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'})-Gly	79
Ser(p ^{5'} CATCAT ^{3'})-Gly	90
Ser(p ^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'})	84
Ser(p ^{5'} CATCAT ^{3'})	90
Thr(p ^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'})-Gly (49)	69
Thr(p ^{5'} CATCAT ^{3'})-Gly	78
Thr(p ^{5'} TTTTT ^{3'})	83
Tyr(p ^{5'} TTTTT ^{3'})	95

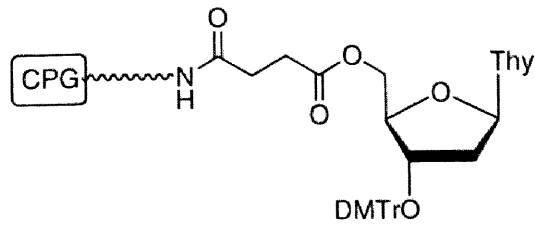
^a Determined by HPLC analysis

5. 3'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の合成

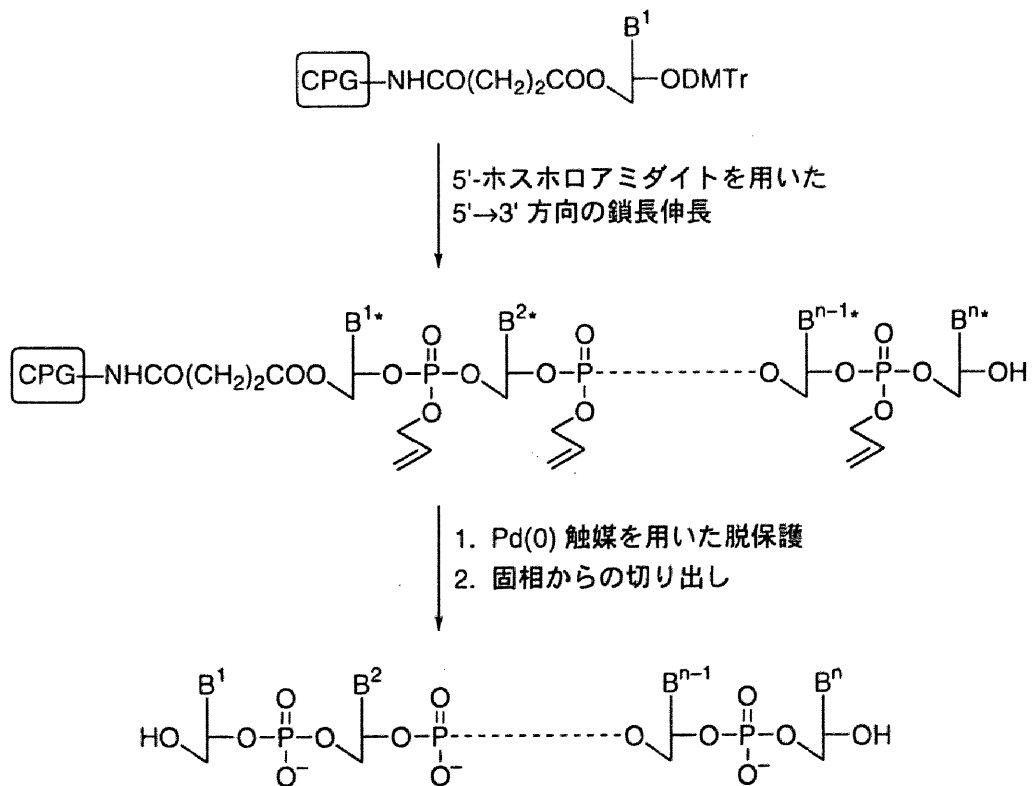
5-1. 5'→3' 方向の鎖長伸長法による 3'-末端修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドの高効率合成法の開発

まず、3'-末端結合ヌクレオチドとペプチドおよびアミノ酸の共有結合複合体合成を達成する上で必要な、5'→3' 方向の鎖長伸長による固相担持 3'-末端無置換オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成法の開発とそれを基盤にした 3'-末端修飾オリゴデオキシリボヌクレオチド合成法の開発を、オリゴデオキシリボヌクレオチド 3'-モノリン酸モノエステル **53** および DNA のインターカレーターであるアクリジンを 3'-末端に有するオリゴデオキシリボヌクレオチド **54** の合成を例に検討した。

5'-水酸基で固相 (CPG) に結合したヌクレオシド **50** を出発物質、ヌクレオシド 5'-ホスホロアミダイト **13**、**14**、**16**、**19** をモノマーユニット、BIT を促進剤に用い、Applied Biosystems 社製 392 型 DNA/RNA 合成機で 5'-末端固相担持オリゴヌクレオチド 12 量体 5'TCACCATATGC3' (**51**) の合成を検討した (スキーム 20)。鎖長伸長反応サイクルを表 3 に示した。まず、step 4 の縮合時間を 1.0 分としてヌクレオチドの鎖長伸長を行ったところ、トリチルカチオン定量によって求めた縮合収率は、平均収率 90.3%、通算収率 33% であった。鎖長伸長終了後、THF 中、Pd₂(dba)₃•CHCl₃ (2.5 当量/アリル)、トリフェニルホスフィン (25 当量/アリル)、およびギ酸ジエチルアンモニウム (150 当量/アリル) の混合物と 50 °C で 1 時間処理してアリル系保護基を除去した後、濃アンモニア水処理 (室温、1 時間) によってオリゴヌクレオチド **51** を固相から切り出した。



50



スキーム 20. 5'→3' 方向の鎖長伸長法によるオリゴデオキシリボヌクレオチドの固相合成

表 3. 5'→3' 方向の鎖長伸長法によるオリゴデオキシリボヌクレオチド固相合成の反応サイクル

step	operation	reagent	time, min
1	washing	CH ₃ CN	0.4
2	deprotection	3% Cl ₃ CCOOH/CH ₂ Cl ₂	1.3
3	washing	CH ₃ CN	0.8
4	coupling	0.1 M phosphoramidite/CH ₃ CN + 0.2 M benzimidazolium triflate/CH ₃ CN	1.0 or 2.0
5	washing	CH ₃ CN	0.2
6	capping	Ac ₂ O-2,6-lutidine-THF (1:1:8) + 16% <i>N</i> -methylimidazole/THF	0.3
7	washing	CH ₃ CN	0.2
8	oxidation	1.0 M <i>t</i> -C ₄ H ₉ OOH/toluene	0.5
9	washing	CH ₃ CN	0.6

しかしながら、粗生成物の HPLC (図 21 A) により、本合成では目的物 **51** がほとんど生成していないことがわかった。そこで、表 3 の合成サイクルにおける step 4 の縮合時間を 2.0 分にして再度合成を試みたところ、縮合収率が平均収率 97.9%、通算収率 79% と向上し、粗生成物の HPLC チャート (図 21 B) では、**51** と思われる主生成物 [ピーク (a)] (純度 68%) と約 25% の副生成物 [ピーク (b)] の混在が認められた。粗生成物を蛇毒ホスホジエステラーゼおよびバクテリアアルカリ性ホスファターゼで加水分解し、その生成物を HPLC 分析 (図 22) に供したところ、上記の合成オリゴヌクレオチドにおける四塩基の比は dA:dC:dG:T = 3.12:4.00:0.74:4.14 であり、計算値 dA:dC:dG:T = 3:4:1:4 に比べデオキシグアノシンの含有量が少ないことがわかった。また保持時間 17 分に構造不明の化合物のピークが見られた。このものを純粋な形で単離することはできなかったためその詳細な構造は不明であるが、その保持時間は、一般に核酸塩基部が何らかの修飾を受けた化合物が検出される領域である。したがって、筆者は副生成物はデオキシグアノシン残基の O⁶ 位に何らかの副反応が起こったことにより生じた化合物であると推測した。

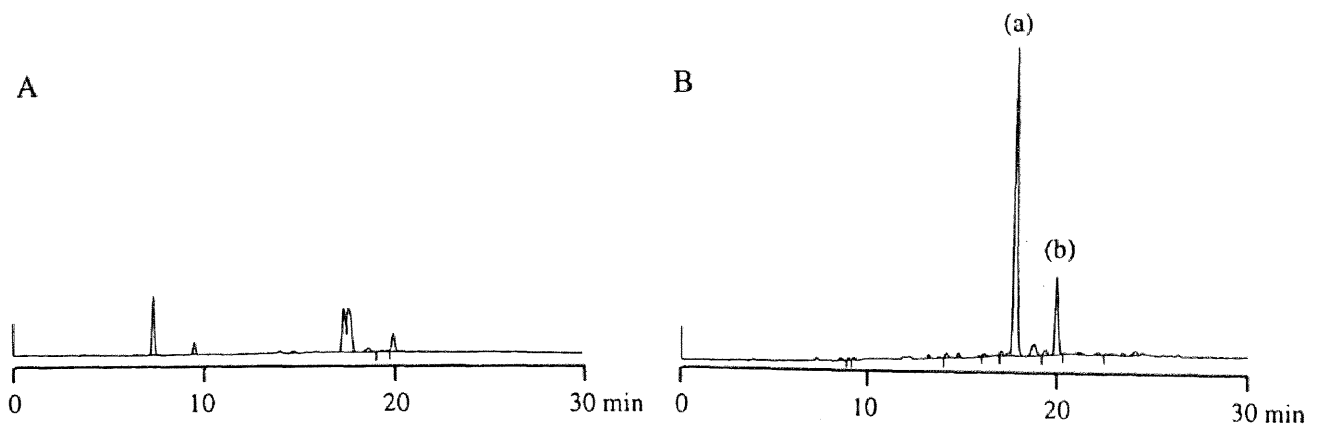


図 21. オリゴヌクレオチド 51 の粗生成物の HPLC チャート。A: 縮合時間 1.0 分、B: 縮合時間 2.0 分。

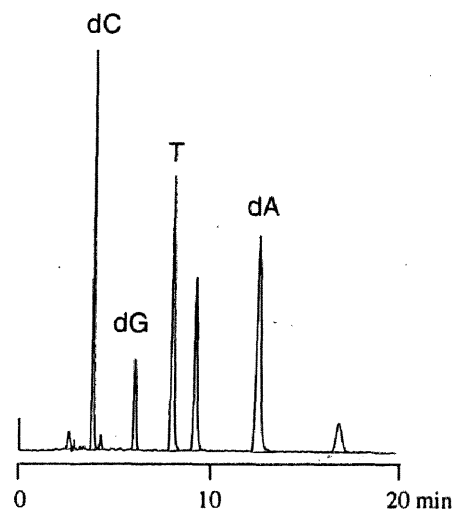


図 22. オリゴヌクレオチド 12 量体 $d^5TCACCATTATGC^3'$ 合成における生成物の酵素による加水分解生成物の HPLC チャート。

この推測を基に、デオキシグアノシンの構築単位として核酸塩基部の N² 位のみでなく O⁶ 位もアリル基で保護した **15** を用いるオリゴヌクレオチド 12 量体 **51** の固相合成を再度試みた。その結果、トリチルカチオン定量によって求めた平均縮合収率 99.9%、通算収率 99% で合成を達成することができた。図 23 A に示した粗生成物の HPLC チャートによると、目的物 **51** の純度は 85% であり、副生成物のピークは観察されなかった。同様に、**15** をデオキシグアノシンモノマーユニットに用いてオリゴヌクレオチド 15 量体 5'TGTCGACACCCAATT^{3'} (**52**) を、トリチル発色により求めた平均縮合収率 99.9%、通算収率 99%、HPLC により求めた純度 80% で合成した (図 23 B)。

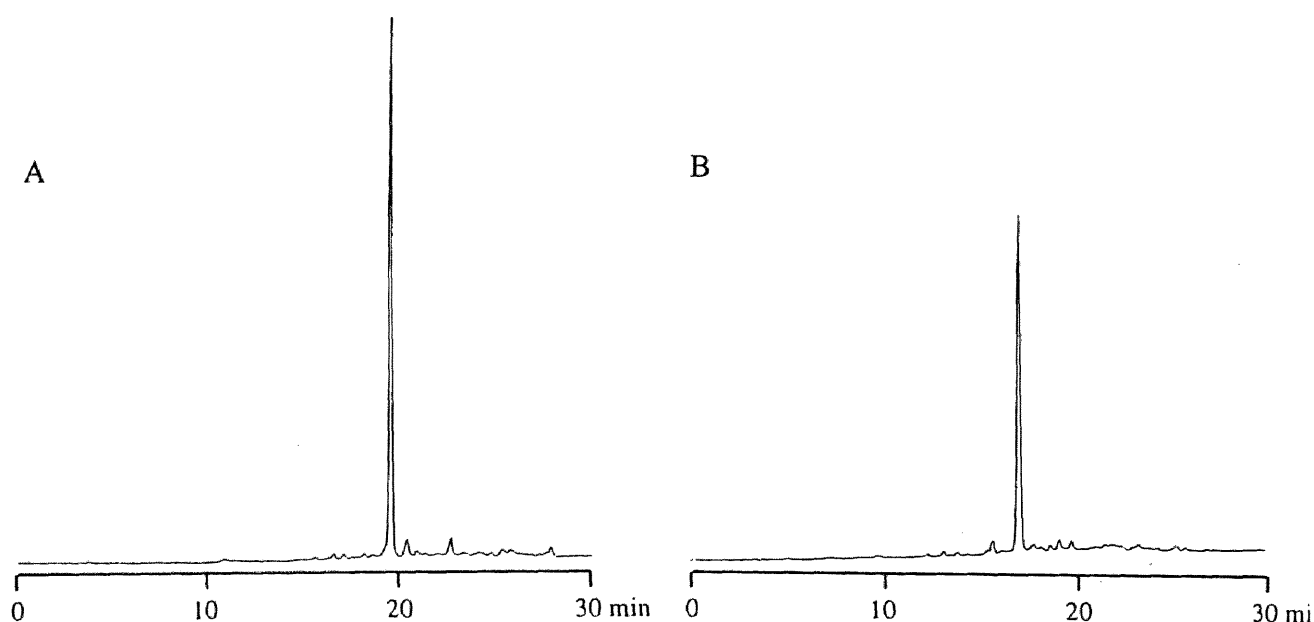


図 23. オリゴヌクレオチドの粗生成物の HPLC チャート。A: **51**、B: **52**。

このように、デオキシグアノシンモノマーユニットとして N² 位、O⁶ 位をアリルオキシカルボニル/アリル保護した **15** を用いる 5'→3' 方向の鎖長伸長法により、5'-末端固相担持 3'-末端無置換オリゴデオキシリボヌクレオチドの高収率・高純度合成を実現した。

上記のように 5'→3' 方向の鎖長伸長法により調製した固相担持 3'-末端無置換オリゴヌクレオチドに、ホスホロアミダイト **45** を BIT を促進剤として縮合させ、ついで、TBHP による酸化、有機パラジウム触媒を用いるアリル保護基の除去、濃アンモニア水を用いる固相からの切り出しを行いオリゴヌクレオチド 3'-リン酸 **53** を合成した。また、**54** をアクリジニルホスホロアミダイト **46** を用いて、同様の手順により合成した。粗生成物の HPLC チャート (図 25) が示すように、**53** および **54** は非常に高い純度で得られ、収率はそれぞれ 80%、70% であった。

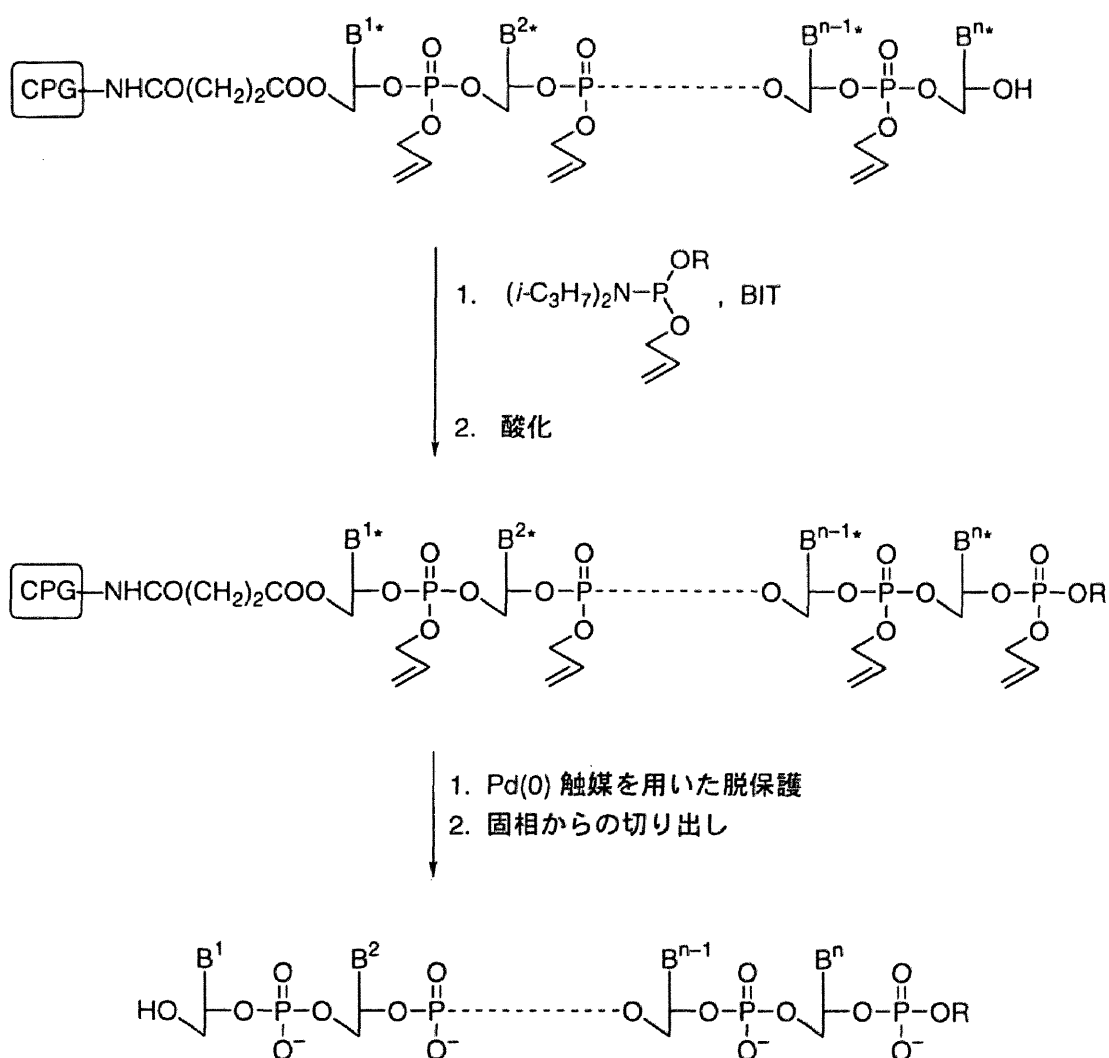
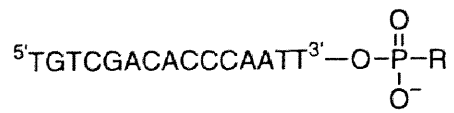


図 24. 5'→3' 方向の鎖長伸長法による 3' 末端修飾オリゴヌクレオチドの合成



53, R = H

54, R = CH₂(CH₂)₄NH-

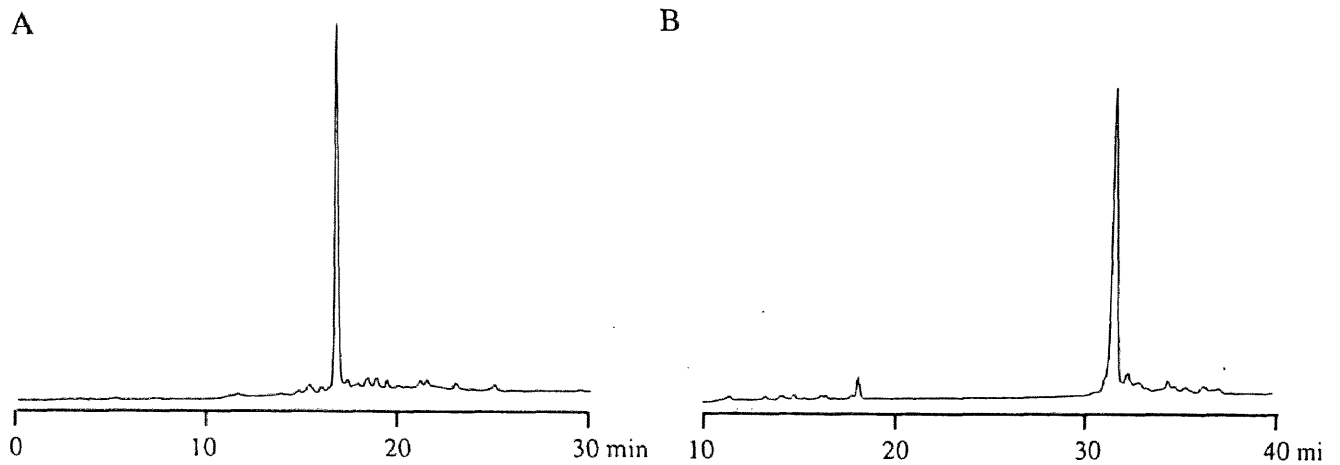
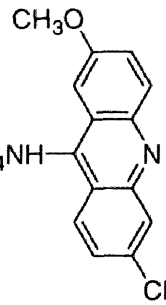


図 25. 3'-末端修飾オリゴヌクレオチドの粗生成物の HPLC チャート。A: 53、B: 54。

5-2. 3'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体の固相合成

3'-末端結合 A 型ヌクレオチド-ペプチドおよびヌクレオチド-アミノ酸複合体合成の代表例として、(5' TGTCGACACCCAATT^{3'} p)Ser-Gly (**55**) の合成を示す。5'-末端で固相担体 (CPG) に長鎖アルキルアミノリンカーを介して結合したヌクレオシド **50** を出発物質とし、ヌクレオシド 5'-ホスホロアミダイト **13-16** をモノマーユニット、BIT を反応促進剤に用いる表 3 の反応サイクルに従った 5'→3' 方向の鎖長伸長を行い、固相担持 3'-末端無置換オリゴヌクレオチドを得た。その後、ペプチドホスホロアミダイト **36** を用いたペプチド鎖の導入、パラジウム触媒を用いるアリル保護基の除去および濃アンモニア水処理による固相担体からの切り出しを行い、目的とする 3'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチド複合体 **55** を得た。HPLC のチャート (図 26) が示すように、**55** の粗生成物の純度は非常に高い。また、スキーム 10 に示すような **55** の分解によるオリゴヌクレオチド 3'-モノリン酸モノエステル体 5' TGTCGACACCCAATT^{3'} p の生成は見られなかった。チロシン、セリンおよびテトラペプチド (Ala-Ser-Gly-Asp) が 3'-末端に結合した A 型ヌクレオチド-アミノ酸、ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体も同様に、ホスホロアミダイト **27**、**32** および **41** を用いることにより、高い収率で合成することができた。

しかし、スレオニン残基で結合した複合体 (5' TTTTT^{3'} p)Thr (**56**) の合成では、粗生成物の HPLC (図 27) において、固相担持 3'-末端無置換オリゴヌクレオチドとスレオニンホスホロアミダイト **28** との縮合反応が起こらなかった結果の成績体 5' TTTTT^{3'} [ピーク (a)] と構造未確認の副反応生成物に由来するピークが観測されたのみで、目的物の生成は確認できなかった。

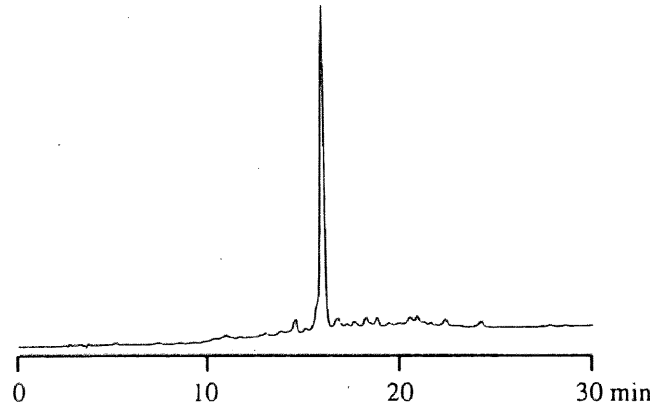


図 26. (5'-TGTCGACACCCAATT^{3'}p)Ser-Gly (55) の粗生成物の HPLC チャート

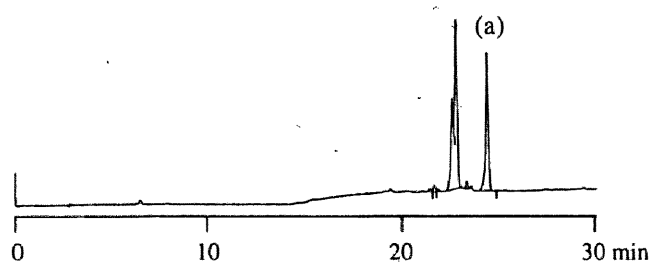


図 27. (5'-TTTTT^{3'}p)Thr (56) の粗生成物の HPLC チャート

合成した 3'-末端結合 A 型デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸複合体と HPLC 分析により求めたそれらの収率を表 4 に示した。

表 4. 3'-末端結合デオキシリボヌクレオチド-ペプチドおよびデオキシリボヌクレオチド-アミノ酸共有結合複合体の合成

conjugate	yield, % ^a
Ala-(5'CATCAT3' p)Ser-Gly-Asp	81
(5'TGTCGACACCCAATT3' p)Ser-Gly (55)	76
(5'CATCAT3' p)Ser-Gly	82
(5'TGTCGACACCCAATT3' p)Ser	78
(5'CATCAT3' p)Ser	85
(5'TTTTT3' p)Tyr	95

^a Determined by HPLC analysis

6. リン酸ジエステル架橋デオキシリボヌクレオチド-ペプチド複合体の塩基に対する安定性

前述のように、A型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体は化学的に、とくに塩基に対して不安定であることが予想される。そこで、ヌクレオチドの5'-末端でジペプチドと結合したA型複合体 Ser(p^{5'}CATCAT^{3'})-Gly を例として、種々の条件下その塩基に対する安定性を調べた。まず、生成物の固相担体からの切り出し条件、すなわち室温で濃アンモニア水と1時間処理したところ、複合体の分解は全く観測されなかった。また、この条件下でアミノ酸残基のラセミ化は全く観察されなかった。したがって、この程度の条件の塩基処理は合成上全く問題がないことがわかった。これに対し、核酸塩基部のアシル保護基の脱保護条件である、濃アンモニア水、55 °C、12時間処理によっては、粗生成物の HPLC (図 28) からわかるように、Ser(p^{5'}CATCAT^{3'})-Gly [ピーク (a)] がスキーム 10 に示したような分解を起こした結果の化合物である p^{5'}CATCAT^{3'} [ピーク (b)] の生成 (約 30%) が確認された。このことにより、A型ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体の合成にアシル保護基を用いると、その脱保護の際に相当量の分解が起こり、高効率合成を達成することが困難であることが示唆された。一方、今回著者の開発したアリル保護基を用いる合成法における、ギ酸ジエチルアンモニウム存在下パラジウム錯体を用いる脱保護条件 (50 °C、1時間) では、アミノ酸残基のラセミ化や複合体の分解は全く起こらなかった。

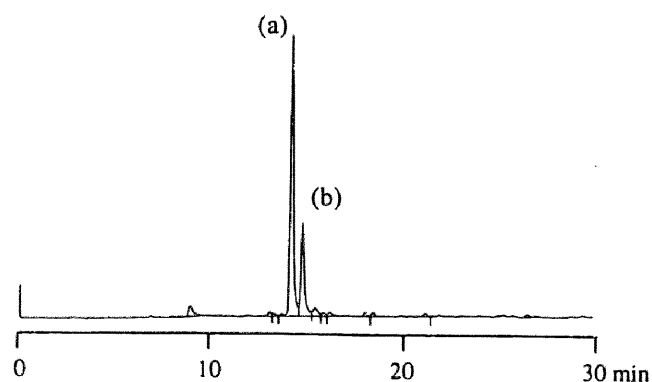


図 28. Ser(p^{5'}CATCAT^{3'})-Gly の強塩基処理による粗生成物の HPLC チャート

7. 結論

筆者は、アリル系保護基を用いるホスホロアミダイト法を基盤にして、アンチセンス分子として期待されている、オリゴデオキシリボヌクレオチドの5'-あるいは3'-末端水酸基とペプチドのセリン、スレオニン、チロシン残基の水酸基とが直接リン酸ジエステル結合で結合した、化学的に不安定なヌクレオチド-ペプチド、ヌクレオチド-アミノ酸共有結合複合体の高効率的合成法を開発した。本法は、塩基部をアリルオキシカルボニル基、ホスホロアミダイト部をアリル基で保護したヌクレオシドホスホロアミダイトをモノマーユニットに用いて、3'→5'方向の鎖長伸長法で3'-末端で固相担体に結合した5'-O-無置換オリゴデオキシリボヌクレオチドを、あるいは5'→3'方向の鎖長伸長法で5'-末端で固相担体に結合した3'-O-無置換オリゴデオキシリボヌクレオチドを合成した後、これらに対し、アミノ基をアリルオキシカルボニル基、カルボキシル基をアリル基で保護したペプチドホスホロアミダイトあるいはアミノ酸ホスホロアミダイトを縮合させ、ついで酸化、有機パラジウム反応によるアリル系保護基の脱保護、室温での濃アンモニア処理による固相からの切り出しを行い、標的化合物を得るもので、得られる目的物の収率、純度は、脱保護に過酷な塩基性条件を必要とする既存のアシル保護基を用いる方法のそれに比べて格段に高い。この優位性は、アリル保護法では穏和なほぼ中性条件に保護基が除去できるため、上記ヌクレオチド-ペプチド複合体の、塩基に対して不安定なヌクレオチド-ペプチド間のリン酸ジエステル結合の開裂が起こらないことに起因する。

さらに著者は、標的複合体合成の過程で、これまで優れた方法がなかった5'→3'方向の鎖長伸長法によるオリゴデオキシリボヌクレオチドの新規高効率合成法を開発した。本法実現の鍵は、従来法に従いデオキシグアノシンモノマーユニットとしてN²位のみを保護したホスホロアミダイトを用いると、O⁶位に副反応が起こることを見出し、それを基にN²位のほかO⁶位をアリル基で保護したデオキシグアノシンホスホロアミダイトをモノマーユニットに用いたことにある。

また、この 5'→3' 方向のオリゴデオキシリボヌクレオチド鎖長伸長法を基盤に、これまでに報告されている合成法よりも一般性および柔軟性の高い 3'-末端修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドの高効率合成法も開拓した。

8. 実験の部

一般事項

可視紫外線吸収 (UV) スペクトルは、メタノール溶液中、日本分光社製 Ubsset-55 型分光光度計により測定した。赤外吸収 (IR) スペクトルは、KBr 法あるいは液膜法により日本分光社製 FT/IR-5300 赤外分光光度計で測定した。 ^1H , ^{13}C , ^{31}P 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、日本電子社製 EX-270 型 NMR 装置あるいは α -400 型 NMR 装置を用い、記載がない限り重クロロホルム溶液で測定した。化学シフトは、テトラメチルシランを内部標準として δ 値として ppm 単位で示した。スピンスピン結合による分裂様式は、一重線は s、二重線は d、三重線は t、四重線は q、多重線あるいは複雑に重なったシグナルは m とし、また幅の広いピークは br と略した。 ^{31}P NMR スペクトルは、85% リン酸水溶液を外部標準として測定し、化学シフトは δ 値で示した。旋光度 ($[\alpha]_{\text{D}}$) は、日本分光社製 DIP-140 型装置を用い、記載がない限りクロロホルム溶液で測定した。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は、名古屋大学化学測定機センターで測定した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、日本分光社製 UV-970 型検出器付き PU-980 クロマトグラム装置を用いて行った。カラムはナカライテスク社製 COSMOSIL (ODS-5 μm , 4.6 ϕ \times 250 mm) を使用した。溶離液としては、合成したオリゴヌクレオチドの分析には 5 \rightarrow 13% アセトニトリル-0.1 M 酢酸アンモニウム水溶液 (v/v) (直線勾配、30 分) を用い、酵素分解反応生成物の分析には 10% メタノール水溶液を用いた。分析シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) は、Merck 社製 Kieselgel 60 F254 (厚さ 0.25 mm) を用いて行った。スポットは、UV (254 nm)、およびリンモリブデン酸の 5% エタノール溶液噴霧後、熱板上で発色させ検出した。カラムクロマトグラフィーは、フジシリシア社製シリカゲル BW-300S を用いた。キャピラリー電気泳動は、大塚電子社製 CAPI-3200 型装置を用い、ゲル充填キャピラリー β -GF5 (5%T) により測定した。元素分析は、名古屋大学農学部元素分析室に依頼した。無水条件下の反応は、すべて減圧下 (1-3 mmHg) で加熱乾燥した容器を用い、アルゴン雰囲気下、無水溶媒を用いて行った。反応は、特記しない限り室温にて行った。溶媒

抽出後の乾燥には、無水硫酸マグネシウムを用いた。溶媒の濃縮は減圧下、ロータリーエバポレーターを用いて行った。固相合成は、Applied Biosystems 社製 392 型 DNA/RNA 合成機で行った。合成したオリゴヌクレオチドの酵素による加水分解反応は、既存の方法にしたがって行った。

溶媒および使用した物質

2'-デオキシヌクレオシド (ヤマサ)、アミノ酸 (ナカライ)、*N*-*tert*-ブトキシカルボニルグリシン (42) (ナカライ) は、市販品を使用した。*N*⁶-アリルオキシカルボニル-5'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシアデノシン 3'-(アリル *N,N'*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (1)^{56,57}、*N*⁴-アリルオキシカルボニル-5'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシシチジン 3'-(アリル *N,N'*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (2)^{56,57}、*O*⁶-アリル-*N*²-アリルオキシカルボニル-5'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシグアノシン 3'-(アリル *N,N'*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (3)⁵⁸、5'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチルチミジン 3'-(アリル *N,N'*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (4)⁵⁶、*N*⁶-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシアデノシン (5)⁵⁷、*N*⁴-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシシチジン (6)⁵⁷、*O*⁶-アリル-*N*²-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシグアノシン (7)⁵⁸、*N*²-アリルオキシカルボニル-3',5'-ビス-*O*-*tert*-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシグアノシン (17)⁵⁶、*N*-アリルオキシカルボニル-*L*-セリン (23)⁵⁹、*N*-アリルオキシカルボニル-*L*-スレオニン (24)⁵⁹、グリシンアリルエステル *p*-トルエンスルホン酸塩 (33)⁶⁰、*N*-*tert*-ブトキシカルボニル-*O*-*tert*-ブチルジメチルシリル-*L*-セリン (43)⁶²、ビス (アリルオキシ) ジイソプロピルアミノホスフィン (45)⁶³、6-クロロ-2-メトキシ-9-(ヒドロキシペンチルアミノ) アクリジン⁶⁴、ベンズイミダゾリウムトリフラート⁶⁵ は文献記載の方法により調製した。アセトニトリルおよびジクロロメタンは、水素化カルシウムから蒸留して用いた。THF は、ナトリウムおよびベンゾフェノンから蒸留して用いた。特記しない限り市販の物質は精製せずにそのまま使用した。ホスホロアミダイト (0.1 M) およびベンズイミダゾリウムトリフラート (0.2 M) のアセトニトリル溶液は、調製後直ちに使用した。無水酢酸-2,6-ルチジン-THF (1:1:8)

および *N*-メチルイミダゾールの 16% THF 溶液は、使用直前に新たに調製した。

***N*⁶-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシアデノシン (9):**

*N*⁶-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシアデノシン (5) (7.24 g, 21.6 mmol) およびイミダゾール (2.95 g, 43.3 mmol) の DMF (22 mL) 溶液に、0 °C で塩化 *t*-ブチルジメチルシリル (2.92 g, 19.4 mmol) を 3 回に分けて加え、室温で 6 時間かくはんした。反応溶液に水 (50 mL) を加え、酢酸エチル (100 mL × 4 回) で抽出した。有機層を合わせて飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [200 g, メタノール-酢酸エチル-ヘキサン (1:100:100)→(1:10:10)] で精製し、5'-*O*-シリル体 (7.53 g, 78%) を得た。5'-*O*-シリル体 (8.88 g, 19.8 mmol) のピリジン (45 mL) 溶液に、1,8-ジアザビシクロ [5.4.0]-7-ウンデセン (6.01 g, 5.90 mL, 39.5 mmol) および塩化 *p,p'*-ジメトキシトリチル (13.4 g, 39.5 mmol) を 0 °C で加え、室温に昇温して 24 時間かくはんした。反応溶液を減圧濃縮した後、残渣を酢酸エチル (500 mL) に溶解した。この溶液を水 (100 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (100 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [100 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:2)→(1:1)] で精製し、3'-*O*-ジメトキシトリチル体 (11.0 g, 74%) を得た。3'-*O*-ジメトキシトリチル体 (11.0 g, 14.6 mmol) のテトラヒドロフラン (THF) (40 mL) 溶液に、フッ化テトラブチルアンモニウム (TBAF) の 1.0 M THF 溶液 (30.0 mL, 30.0 mmol) を加え、1.5 時間かくはんした。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL) を加えた後、水層を酢酸エチル (100 mL × 3 回) で抽出した。有機層を合わせて飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [100 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:1)→(1:0)] に供し、*N*⁶-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシアデノシン (9) (9.33 g, 100%) を得た。

UV: λ_{\max} 268 nm (ϵ 21500), 237 nm (ϵ 25400).

IR (KBr): 1755, 1610, 1585, 1510, 1465, 1250, 1220 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$: δ 1.75 (dd, $J = 5.4, 13.7$ Hz, 1 H), 2.70 (ddd, $J = 5.4, 10.2, 13.7$ Hz, 1 H), 3.31 (br dd, $J = 11.2, 12.7$ Hz, 1 H), 3.72 (br d, $J = 12.7$ Hz, 1 H), 3.78 (s, 3 H), 3.79 (s, 3 H), 4.06 (s, 1 H), 4.63 (d, $J = 5.4$ Hz, 1 H), 4.75 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 5.28 (dd, $J = 1.5, 10.2$ Hz, 1 H), 5.40 (dd, $J = 1.5, 17.1$ Hz, 1 H), 5.64 (br d, $J = 11.2$ Hz, 1 H), 5.98 (tdd, $J = 5.9, 10.2, 17.1$ Hz, 1 H), 6.32 (dd, $J = 5.4, 10.2$ Hz, 1 H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 6.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.23 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 7.31 (dd, $J = 7.3, 7.3$ Hz, 2 H), 7.36 (d, $J = 8.8$ Hz, 4 H), 7.47 (d, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 7.99 (s, 1 H), 8.45 (s, 1 H), 8.65 (s, 1 H).

$\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_7$ としての計算値: C, 65.92; H, 5.53; N, 10.98.

分析値: C, 65.96; H, 5.56; N, 10.79.

***N*⁴-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシシチジン (10):**

*N*⁴-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシシチジン (6) (11.8 g, 37.9 mmol) およびイミダゾール (5.18 g, 76.1 mmol) の DMF (38 mL) 溶液に、塩化 *t*-ブチルジメチルシリル (5.73 g, 38.0 mmol) を 3 回に分けて 0 °C にて加え、室温で 12 時間かくはんした。反応溶液を 0 °C に冷却し、水 (50 mL) を加えた後、酢酸エチル (100 mL \times 4 回) で抽出した。有機層を合わせて飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [200 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:1) \rightarrow (5:1)] に供し、5'-*O*-シリル体 (14.9 g, 92%) を得た。5'-*O*-シリル体 (10.7 g, 25.1 mmol) のピリジン (100 mL) 溶液に、DBU (7.13 g, 7.00 mL, 46.8 mmol) および塩化 *p,p'*-ジメトキシトリチル (16.8 g, 49.6 mmol) を 0 °C で加え、室温で 24 時間かくはんした。反応溶液を減圧濃縮し、水 (500 mL) を加えた後、酢酸エチル (500 mL \times 2 回) で抽出した。有機層を合わせて 0.1 M 硫酸銅水溶液 (200 mL \times 2 回)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL \times 3 回)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (200 mL \times 2 回) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [320 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:3) \rightarrow (1:1)] に供し、3'-*O*-トリチル体 (18.2 g, 99%) を得た。3'-*O*-トリチル体 (7.57 g, 10.4 mmol) の THF (50

mL) 溶液に TBAF の 1.0 M THF 溶液 (18.0 mL, 18.0 mmol) を加え、2 日間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、水 (150 mL × 2 回)、飽和塩化アンモニウム水溶液 (150 mL × 2 回)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (150 mL × 2 回)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (150 mL × 2 回) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [200 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:1)→(5:1)] に供し、*N*⁴-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p*,*p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシシチジン (**10**) (6.00 g, 89%) を得た。

UV: λ_{\max} 284 nm (ϵ 9300), 238 nm (ϵ 35000).

IR (KBr): 1750, 1655, 1560, 1510, 1250, 1200 cm^{-1} .

¹H NMR: δ 1.96 (m, 1 H), 2.18 (m, 1 H), 2.97 (br s, 1 H), 3.23 (dd, $J = 2.4, 11.7$ Hz, 1 H), 3.62 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 3.76 (s, 6 H), 3.90 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H), 4.35 (d, $J = 6.4$ Hz, 1 H), 4.64 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 5.27 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.33 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.91 (tdd, $J = 5.9, 10.7, 17.1$ Hz, 1 H), 6.22 (dd, $J = 6.4, 7.8$ Hz, 1 H), 6.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 4 H), 7.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 7.18–7.22 (m, 1 H), 7.27 (dd, $J = 6.8, 7.3$ Hz, 2 H), 7.34 (d, $J = 8.3$ Hz, 4 H), 7.44 (d, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 8.06 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H).

C₃₄H₃₅N₃O₈としての計算値: C, 66.55; H, 5.75; N, 6.85 .

分析値: C, 66.48; H, 5.98; N, 6.61.

06-アリル-*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p*-メトキシトリチル-2'-デオキグアノシン (11):

06-アリル-*N*²-アリルオキシカルボニル-2'-デオキグアノシン (**7**) (3.30 g, 8.43 mmol) およびイミダゾール (1.16 g, 17.0 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に、塩化 *t*-ブチルジメチルシリル (1.27 g, 8.43 mmol) を 4 回に分けて 0 °C で加え、室温で 12 時間かくはんした。反応溶液に水 (50 mL) を加え、酢酸エチル (50 mL × 3 回) で抽出した。有機層を合わせて飽和塩化ナトリウム水溶液 (20 mL) で洗浄した後、乾燥し、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリ

カゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:1)→(5:1)] に供し、5'-*O*-シリル体 (3.75 g, 89%) を得た。5'-*O*-シリル体 (3.75 g, 7.42 mmol) のピリジン (40 mL) 溶液に、DBU (1.58 g, 1.55 mL, 10.4 mmol) および塩化 *p*-メトキシトリチル (3.21 g, 10.4 mmol) を2回に分けて 0 °C で加え、室温で 24 時間かくはんした。反応溶液を減圧濃縮した後、酢酸エチル (400 mL) に溶解した。この溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [100 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:5)→(2:1)] に供し、3'-*O*-モノメトキシトリチル体 (4.10 g, 71%) を得た。3'-*O*-メトキシトリチル体 (4.10 g, 5.27 mmol) の THF (15 mL) 溶液に、TBAF の 1.0 M THF 溶液 (10.5 mL, 10.5 mmol) を加え、1.5 時間かくはんした。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL) を加えた後、水層を酢酸エチル (50 mL × 3 回) で抽出した。有機層を合わせて飽和塩化ナトリウム水溶液 (20 mL) で洗浄した後、乾燥し、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [100 g, メタノール-酢酸エチル-ヘキサン (1:20:20)→(1:5:5)] に供し、*O*⁶-アリル-*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p*-メトキシトリチル-2'-デオキグアノシン (**11**) (3.50 g, 100%) を得た。

IR (KBr): 1755, 1720, 1610, 1510, 1245, 1195 cm⁻¹.

¹H NMR: δ 1.76 (dd, *J* = 5.4, 13.2 Hz, 1 H), 2.69 (ddd, *J* = 5.4, 9.8, 13.2 Hz, 1 H), 3.29 (br dd, *J* = 9.8, 13.2 Hz, 1 H), 3.68 (br d, *J* = 13.2 Hz, 1 H), 3.77 (s, 3 H), 4.00 (s, 1 H), 4.65 (d, *J* = 5.9 Hz, 2 H), 4.62–4.66 (m, 1 H), 4.88 (br d, *J* = 9.8 Hz, 1 H), 5.06 (d, *J* = 5.9 Hz, 2 H), 5.22 (dd, *J* = 1.0, 10.7 Hz, 1 H), 5.26 (dd, *J* = 1.0, 10.2 Hz, 1 H), 5.32 (dd, *J* = 1.0, 17.1 Hz, 1 H), 5.44 (dd, *J* = 1.0, 17.1 Hz, 1 H), 5.92 (tdd, *J* = 5.9, 10.7, 17.1 Hz, 1 H), 6.11 (tdd, *J* = 5.9, 10.2, 17.1 Hz, 1 H), 6.24 (dd, *J* = 5.4, 9.8 Hz, 1 H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 7.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 7.30 (dd, *J* = 7.3, 7.3 Hz, 4 H), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 7.41 (s, 1 H), 7.48 (d, *J* = 7.3 Hz, 4 H), 7.82 (s, 1 H).

C₃₇H₃₇N₅O₇ としての計算値: C, 66.96; H, 5.62; N, 10.55

分析値: C, 66.96; H, 5.69; N, 10.51

*N*⁶-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシアデノシン 5'-(ア
リル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (13):

9 (1.13 g, 1.78 mmol) のアセトニトリル (10 mL) 溶液にジイソプロピルアミン (90.3 mg, 125 μ L, 0.892 mmol)、1*H*-テトラゾール (62.2 mg, 0.887 mmol)、および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (940 mg, 3.26 mmol) を順次加え、室温で3時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (70 mL \times 2回) で洗浄した。有機層を乾燥した後、減圧濃縮した。残渣をジクロロメタン (8 mL) に溶かして -78 $^{\circ}$ C に冷却したペンタン (300 mL) 中に滴下した。生じた沈殿をろ過して集め、*N*⁶-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシアデノシン 5'-(ア
リル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (13) (1.42 g, 97%) を得た。

UV: λ_{\max} 268 nm (ϵ 21800), 238 nm (ϵ 24900), 212 nm (ϵ 42500).

IR (KBr): 1760, 1730, 1610, 1585, 1510, 1460 cm^{-1} .

¹H NMR: δ 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.14 (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 2.07–2.11 (m, 1 H), 2.23 (ddd, $J = 5.4, 8.3, 13.7$ Hz, 0.5 H), 2.30 (ddd, $J = 5.4, 9.3, 13.7$ Hz, 0.5 H), 3.29 (ddd, $J = 2.9, 6.3, 11.2$ Hz, 0.5 H), 3.39 (ddd, $J = 2.4, 7.3, 11.7$ Hz, 0.5 H), 3.43–3.52 (m, 2 H), 3.55 (ddd, $J = 2.4, 4.9, 11.7$ Hz, 0.5 H), 3.66 (ddd, $J = 2.4, 5.9, 11.2$ Hz, 0.5 H), 3.78 (s, 6 H), 3.98–4.17 (m, 3 H), 4.46 (d, $J = 5.4$ Hz, 0.5 H), 4.49 (d, $J = 5.4$ Hz, 0.5 Hz), 4.76 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 5.08 (br d, $J = 10.3$ Hz, 0.5 H), 5.12 (br d, $J = 10.3$ Hz, 0.5 H), 5.20 (dd, $J = 2.0, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.25 (dd, $J = 2.0, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.28 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H), 5.40 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.83 (tdd, $J = 4.9, 10.3, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.92 (tdd, $J = 4.9, 10.3, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.99 (tdd, $J = 4.9, 10.3, 17.1$ Hz, 1 H), 6.61 (dd, $J = 5.9, 8.3$ Hz, 0.5 H), 6.62 (dd, $J = 5.9, 9.3$ Hz, 0.5 H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 4 H), 7.32–7.21 (m, 3 H), 7.36 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.37 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.46–7.49 (m, 2 H), 8.35 (s, 0.5 H), 8.37 (s, 0.5 H), 8.76 (s, 1 H).

³¹P NMR: δ 148.6.

C₄₄H₅₃N₆O₈P としての計算値: C, 64.07; H, 6.48; N, 10.19.

分析値: C, 64.03; H, 6.50; N, 10.09.

*N*⁴-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシシチジン 5'-(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (14):

10 (5.60 g, 9.13 mmol) のアセトニトリル (50 mL) 溶液にジイソプロピルアミン (462 mg, 640 μ L, 4.57 mmol)、1*H*-テトラゾール (318 mg, 4.54 mmol)、および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (3.37 g, 11.7 mmol) を順次加え、室温にて1時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (400 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [100 g, 酢酸エチル-ヘキサン-トリエチルアミン (1:5:trace)→(2:1:trace)] に供し、*N*⁴-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシシチジン 5'-(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (14) (7.35 g, 100%) を得た。

UV: λ_{\max} 284 nm (ϵ 8800), 238 nm (ϵ 31900), 212 nm (ϵ 38900).

IR (KBr): 1745, 1670, 1630, 1555, 1505, 1250, 1200 cm^{-1} .

¹H NMR: δ 1.01 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), 1.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), 1.12 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), 1.14 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), 1.68 (ddd, $J = 6.4, 7.8, 14.2$ Hz, 0.5 H), 1.75 (ddd, $J = 5.9, 8.8, 14.2$ Hz, 0.5 H), 2.28–2.48 (m, 1 H), 3.14–3.18 (m, 0.5 H), 3.25 (ddd, $J = 2.9, 7.8, 10.7$ Hz, 0.5 H), 3.55–3.40 (m, 2.5 H), 3.60 (m, 0.5 H), 3.78 (s, 6 H), 3.86 (m, 0.5 H), 3.89 (m, 0.5 H), 3.96–4.13 (m, 2 H), 4.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 0.5 H), 4.34 (d, $J = 5.9$ Hz, 0.5 H), 4.66 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 5.06 (d, $J = 10.2$ Hz, 0.5 H), 5.14 (d, $J = 10.2$ Hz, 0.5 H), 5.17 (d, $J = 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.24 (d, $J = 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.27 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H), 5.35 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.74–5.98 (m, 2 H), 6.44 (dd, $J = 7.3, 7.8$ Hz, 0.5 H), 6.45 (dd, $J = 7.3, 8.8$ Hz, 0.5 H), 6.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 4 H), 7.12 (br s, 1 H), 7.19–7.30 (m, 3 H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H), 8.18 (br s, 0.5 H), 8.20 (br s, 0.5 H).

³¹P NMR: δ 148.8, 148.5.

C₄₃H₅₃N₄O₉P としての計算値: C, 64.49; H, 6.67; N, 7.00.

分析値: C, 64.49; H, 6.70; N, 6.89.

*O*⁶-アリル-*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p*-メトキシトリチル-2'-デオキグアノシン 5'-
(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (15):

11 (1.10 g, 1.66 mmol) のアセトニトリル (16 mL) 溶液にジイソプロピルアミン (86.6 mg, 120 μL, 0.86 mmol)、1*H*-テトラゾール (60.2 mg, 0.859 mmol)、および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (717 mg, 2.49 mmol) を順次加え、室温で2時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (100 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (20 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [30 g, 酢酸エチル-ヘキサントリエチルアミン (3:1:trace)→(2:1:trace)] に供し、*O*⁶-アリル-*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p*-メトキシトリチル-2'-デオキグアノシン 5'-(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (15) (1.05 g, 74%) を得た。

IR (KBr): 1755, 1605, 1510, 1460, 1410, 1240, 1185 cm⁻¹.

¹H NMR: δ 0.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.04 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 6 H), 2.05–1.99 (m, 1 H), 2.19–2.31 (m, 1 H), 3.29 (ddd, *J* = 2.9, 6.3, 11.2 Hz, 0.5 H), 3.38 (ddd, *J* = 2.9, 7.3, 11.2 Hz, 0.5 H), 3.43–3.57 (m, 2.5 H), 3.63 (ddd, *J* = 2.4, 5.9, 11.2 Hz, 0.5 H), 3.78 (s, 3 H), 4.17–3.96 (m, 3 H), 4.44–4.51 (m, 1 H), 4.71 (d, *J* = 5.9 Hz, 2 H), 5.08 (d, *J* = 5.9 Hz, 2 H), 5.04–5.12 (m, 1 H), 5.19 (d, *J* = 17.1 Hz, 0.5 H), 5.22–5.27 (m, 0.5 H), 5.27 (d, *J* = 10.7 Hz, 2 H), 5.40 (d, *J* = 17.1 Hz, 1 H), 5.44 (d, *J* = 17.1 Hz, 1 H), 5.82 (tdd, *J* = 4.9, 10.2, 17.1 Hz, 0.5 H), 5.91 (tdd, *J* = 4.9, 10.2, 17.1 Hz, 0.5 H), 5.99 (tdd, *J* = 5.9, 10.7, 17.1 Hz, 1 H), 6.14 (tdd, *J* = 5.9, 10.7, 17.1 Hz, 1 H), 6.49 (dd, *J* = 5.9, 8.8 Hz, 1 H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 7.21–7.25 (m, 2 H), 7.28–7.32 (m, 4 H), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 7.48–7.50 (m, 5 H), 8.12 (s, 0.5 H), 8.14 (s, 0.5 H).

³¹P NMR: δ 148.6.

C₄₆H₅₅N₆O₈P としての計算値: C, 64.93; H, 6.51; N, 9.88.

分析値: C, 65.00; H, 6.62; N, 9.78.

3'-*O-p,p'*-ジメトキシトリチルチミジン 5'-(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (16):

3'-*O-p,p'*-ジメトキシトリチルチミジン (12) (1.21 g, 2.22 mmol) のアセトニトリル (10 mL) 溶液に、ジイソプロピルアミン (86.6 mg, 120 μ L, 0.856 mmol)、1*H*-テトラゾール (72.9 mg, 1.04 mmol)、および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (894 mg, 3.10 mmol) を順次加え、室温で3時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (100 mL \times 2 回) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。残渣をベンゼン (8 mL) に溶かして -78 $^{\circ}$ C に冷却したペンタン (300 mL) 中に滴下した。生じた沈殿をろ過して集め、3'-*O-p,p'*-ジメトキシトリチルチミジン 5'-(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (16) (1.50 g, 92%) を得た。

UV: λ_{\max} 268 nm (ϵ 11300), 236 nm (ϵ 21300), 210 nm (ϵ 34000).

IR (KBr): 1695, 1610, 1510, 1465, 1250 cm^{-1} .

¹H NMR: δ 0.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.13 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.72 (ddd, $J = 5.9, 9.3, 13.7$ Hz, 1 H), 1.86 (s, 3 H), 1.86–1.92 (m, 1 H), 3.22–3.30 (m, 1 H), 3.45–3.56 (m, 2.5 H), 3.64 (m, 0.5 H), 3.79 (s, 6 H), 4.01–4.14 (m, 2 H), 4.33 (d, $J = 5.9$ Hz, 0.5 H), 4.35 (d, $J = 5.9$ Hz, 0.5 H), 5.07 (d, $J = 10.3$ Hz, 0.5 H), 5.10 (d, $J = 10.3$ Hz, 0.5 H), 5.17 (dd, $J = 2.0, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.22 (dd, $J = 2.0, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.80 (tdd, $J = 5.4, 10.3, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.86 (tdd, $J = 5.4, 10.3, 17.1$ Hz, 0.5 H), 6.41 (dd, $J = 5.4, 9.3$ Hz, 0.5 H), 6.46 (dd, $J = 5.4, 9.3$ Hz, 0.5 H), 6.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 6.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.21–7.35 (m, 5 H), 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.43–7.46 (m, 2 H), 7.52 (s, 0.5 H), 7.65 (s, 0.5 H), 8.17 (br s, 1 H).

³¹P NMR: δ 148.6, 148.4.

C₄₀H₅₀N₃O₈P としての計算値: C, 65.65; H, 6.89; N, 5.74 .

分析値: C, 65.61; H, 6.78; N, 5.69.

***N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシグアノシン (18):**

*N*²-アリルオキシカルボニル-3',5'-*O*-ビス-*O*-*t*-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシグアノシン (17) (10.3 g, 17.8 mmol) の THF (120 mL) 溶液に、TBAF の 1.0 M THF 溶液 (40.0 mL, 40.0 mmol) を加え、室温で 24 時間かくはんした。反応溶液にピリジン-メタノール-水 (3:3:1) (50 mL) および Dowex 50×8 (30 mL) を加えて 30 分間かくはんした後、Dowex 50×8 をろ取し、ろ液を減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [300 g, メタノール-ジクロロメタン (1:20)] に供し、*N*²-アリルオキシカルボニル-2'-デオキシグアノシン (6.10 g, 98%) を得た。このものの DMF 溶液に、イミダゾール (3.69 g, 54.2 mmol) および塩化 *t*-ブチルジメチルシリル (2.66 g, 17.6 mmol) を 0 °C で加え、室温に昇温して 24 時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル-ヘキサン (1:1) (600 mL) で希釈し、水 (300 mL)、飽和塩化アンモニウム水溶液 (200 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (200 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [300 g, メタノール-ジクロロメタン (1:30)] に供し、5'-*O*-シリル体 (3.36 g, 42%) を得た。5'-*O*-シリル体 (2.35 g, 5.04 mmol) のピリジン (30 mL) 溶液に、DBU (2.40 mL, 8.04 mmol) および塩化 *p,p'*-ジメトキシトリチル (5.30 g, 15.7 mmol) を加え、室温で 24 時間かくはんした。反応溶液を減圧濃縮した後、水 (600 mL) を加え、ジクロロメタン (400 mL, 150 mL × 2 回) で抽出した。有機層を合わせて、0.1 M 硫酸銅水溶液 (200 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (200 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [200 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:2)→(5:1)] に供し、3'-*O*-ジメトキシトリチル体 (3.30 g, 85%) を得た。3'-*O*-ジメトキシトリチル体 (3.90 g, 5.08 mmol) の THF (40 mL) 溶液に、TBAF の 1.0 M THF 溶液 (6.00 mL, 6.00 mmol) を加え、室温で 22 時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (400 mL) で希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液 (200 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL)、飽和塩化ナトリウ

ム水溶液 (200 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をジクロロメタンから再結晶し、*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシグアノシン (**18**) (2.66 g, 80%) を得た。

UV: λ_{\max} 237 nm (ϵ 24200).

IR (KBr): 1695, 1610, 1510, 1385, 1250, 1175 cm^{-1} .

¹H NMR: δ 1.72 (dd, $J = 5.4, 13.7$ Hz, 1 H), 2.42 (ddd, $J = 5.9, 9.8, 13.7$ Hz, 1 H), 3.24 (dd, $J = 10.7, 11.7$ Hz, 1 H), 3.68 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 3.79 (s, 6 H), 4.06 (s, 1 H), 4.50 (d, $J = 5.9$ Hz, 1 H), 4.71 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 4.87 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.32 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.38 (d, $J = 17.2$ Hz, 1 H), 5.90 (tdd, $J = 5.9, 10.7, 17.2$ Hz, 1 H), 6.16 (dd, $J = 5.4, 9.8$ Hz, 1 H), 6.84 (dd, $J = 1.5, 8.8$ Hz, 4 H), 7.15–7.46 (m, 10 H), 7.65 (s, 1 H), 11.28 (s, 1 H).

C₃₅H₃₅N₅O₈ としての計算値: C, 64.31; H, 5.40; N, 10.71.

分析値: C, 64.45; H, 5.22; N, 10.60.

*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシグアノシン 5'-(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (**19**):

*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシグアノシン (**18**) (1.23 g, 1.88 mmol) のアセトニトリル (15 mL) 懸濁液に、ジイソプロピルアミン (101 mg, 140 μL , 0.989 mmol)、1*H*-テトラゾール (66.3 mg, 0.947 mmol) および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (940 mg, 3.26 mmol) を順次加え、室温で3時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (100 mL) で希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL \times 2回) で洗浄した後、乾燥し、減圧濃縮した。残渣をジクロロメタン (6 mL) に溶かして -78 °C に冷却したペンタン (300 mL) 中に滴下した。生じた沈殿をろ過して集めた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, 酢酸エチル–ヘキサン–ジイソプロピルアミン (1:1:trace) \rightarrow (5:1:trace)] に供し、*N*²-アリルオキシカルボニル-3'-*O*-*p,p'*-ジメトキシトリチル-2'-デオキシグアノシン 5'-(アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (**19**) (1.59 g,

100%) を得た。

UV: λ_{\max} 239 nm (ϵ 29200), 211 nm (ϵ 40700).

IR (KBr): 1700, 1610, 1510, 1465, 1250 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.00 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.14 (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 2.02–2.08 (m, 1 H), 2.32–2.40 (m, 1 H), 3.27 (ddd, $J = 2.4, 6.3, 11.2$ Hz, 0.5 H), 3.36 (ddd, $J = 2.9, 7.8, 11.2$ Hz, 0.5 H), 3.47–3.56 (m, 2.5 H), 3.61 (ddd, $J = 2.0, 4.9, 11.2$ Hz, 0.5 H), 3.74 (s, 6 H), 3.81 (m, 0.5 H), 3.84 (m, 0.5 H), 3.99–4.21 (m, 2 H), 4.43 (d, $J = 9.8$ Hz, 0.5 H), 4.45 (d, $J = 9.8$ Hz, 0.5 H), 4.67 (m, 2 H), 5.06 (d, $J = 10.3$ Hz, 0.5 H), 5.13 (d, $J = 10.3$ Hz, 0.5 H), 5.19 (dd, $J = 2.0, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.26 (dd, $J = 2.0, 17.1$ Hz, 0.5 H), 5.30 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H), 5.35 (d, $J = 17.6$ Hz, 1 H), 5.77–5.98 (m, 2 H), 6.56 (dd, $J = 5.9, 8.3$ Hz, 1 H), 6.73 (dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz, 2 H), 6.75 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.17–7.22 (m, 3 H), 7.27–7.33 (m, 4 H), 7.38–7.44 (m, 2 H), 8.10 (s, 1 H).

^{31}P NMR: δ 148.5.

$\text{C}_{44}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$ としての計算値: C, 62.83; H, 6.37 ; N, 10.00.

分析値: C, 62.76; H, 6.56 ; N, 9.93.

***N*-アリルオキシカルボニル-L-セリンアリルエステル (25):**

N-アリルオキシカルボニル-L-セリン (23) (4.64 g, 24.5 mmol) のトルエン (150 mL) 溶液に、アリルアルコール (14.5 g, 17.0 mL, 250 mmol) および *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (476 mg, 2.50 mmol) を加え、Deam-Stark 装置を用いて水を除きながら 2.5 時間還流した。放冷した後、酢酸エチル (100 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (30 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (30 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [30 g, 酢酸エチル–ヘキサン (4:1)→(1:1)] に供し、*N*-アリルオキシカルボニル-L-セリンアリルエステル (25) (4.25 g, 76%) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}}^{29} -19.2^\circ$ (c 1.04, CHCl_3).

IR (neat): 3340, 1725, 1670, 1530, 1200 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 3.65 (br s, 1 H), 3.72 (dd, $J = 4.9, 10.7$ Hz, 1 H), 4.04 (dd, $J = 3.4, 11.2$ Hz, 1 H), 4.05–4.10 (m, 2 H), 4.33 (br s, 1 H), 4.58 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.64 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 5.22 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H), 5.27 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.31 (d, $J = 19.0$ Hz, 1 H), 5.34 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.85–5.95 (m, 2 H), 6.07 (br d, $J = 6.3$ Hz, 1 H), 7.31 (s, 1 H).

^{13}C NMR: δ 41.3, 55.8, 62.9, 66.1, 66.2, 118.0, 119.1, 131.3, 132.3, 156.4, 169.7, 171.4.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ としての計算値: C, 50.35; H, 6.34; N, 9.79.

分析値: C, 50.35; H, 6.51; N, 9.71.

N-アリルオキシカルボニル-L-スレオニンアリルエステル (26):

N-アリルオキシカルボニル-L-スレオニン (24) (1.43 g, 7.04 mmol) のトルエン (50 mL) 溶液に、アリルアルコール (4.10 g, 4.80 mL, 70.6 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物 (135 mg, 0.710 mmol) を加え、Dean-Stark 装置を用いて水を除きながら 3 時間還流した。放冷後、反応溶液に 0.02 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) を加え、水層を酢酸エチル (50 mL \times 3 回) で抽出し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, ヘキサン–酢酸エチル (1:3) \rightarrow (1:2)] に供し、*N*-アリルオキシカルボニル-L-スレオニンアリルエステル (26) (942 mg, 55%) を無色油状物として得た。

$[\alpha]_D^{29} -17.7^\circ$ (c 1.09, CHCl_3).

IR (neat): 3420, 1730, 1650, 1525, 1455, 1380, 1275 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.27 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H), 2.15 (br s, 1 H), 4.30–4.40 (m, 2 H), 4.60 (ddd, $J = 1.5, 1.5, 5.4$ Hz, 2 H), 4.68 (ddd, $J = 1.5, 1.5, 5.9$ Hz, 2 H), 5.23 (dd, $J = 1.0, 10.2$ Hz, 1 H), 5.27 (dd, $J = 1.0, 10.2$ Hz, 1 H), 5.33 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.35 (dd, $J = 1.5, 17.6$ Hz, 1 H), 5.60 (br d, $J = 8.3$ Hz, 1 H), 5.87–5.98 (m, 2 H).

^{13}C NMR: δ 19.9, 59.1, 66.0, 66.2, 68.0, 117.9, 118.9, 131.4, 132.5, 156.6, 170.9.

$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ としての計算値: C, 54.31; H, 7.04; N, 5.76.

分析値: C, 54.19; H, 7.27; N, 5.83.

***N*-アリルオキシカルボニル-*L*-セリンアリルエステル *O*-アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト (27):**

N-アリルオキシカルボニル-*L*-セリンアリルエステル (25) (1.04 g, 4.54 mmol) のアセトニトリル (10 mL) 溶液に、ジイソプロピルアミン (462 mg, 640 μ L, 4.57 mmol)、1*H*-テトラゾール (318 mg, 4.54 mmol)、および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (1.96 g, 6.80 mmol) を順次加え、室温で2時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, 酢酸エチル-ヘキサントリエチルアミン (1:20:trace)] に供し、*N*-アリルオキシカルボニル-*L*-セリンアリルエステル *O*-アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト (27) (1.80 g, 95%) を得た。

IR (neat): 1730, 1510, 1200 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.13–1.18 (m, 12 H), 3.52–3.63 (m, 2 H), 3.84–3.94 (m, 1 H), 4.05–4.22 (m, 3 H), 4.48–4.52 (m, 1 H), 4.59 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.64–4.66 (m, 2 H), 5.12–5.36 (m, 5.5 H), 5.61 (br d, $J = 8.8$ Hz, 0.5 H), 6.00–5.85 (m, 3 H).

^{31}P NMR: δ 149.1, 149.3.

$\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ としての計算値: C, 54.80; H, 7.99; N, 6.73.

分析値: C, 54.70; H, 8.22; N, 6.75.

***N*-アリルオキシカルボニル-*L*-スレオニンアリルエステル *O*-アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト (28):**

N-アリルオキシカルボニル-*L*-スレオニンアリルエステル (26) (135 mg, 0.555 mmol) のアセトニトリル (3.0 mL) 溶液に、1*H*-テトラゾール (39.0 mg, 0.557 mmol)、ジイソプロピル

アミン (56.3 mg, 78.0 μ L, 0.557 mmol)、(アリルオキシ)ピス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン (240 mg, 0.832 mmol) を順次加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル (50 mL) で希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL \times 2回) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 g, 酢酸エチル-ヘキサントリエチルアミン (1:4:trace)] に供し、*N*-アリルオキシカルボニル-*L*-スレオニンアリルエステル *O*-アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト (**28**) (204 mg, 85%) を無色油状物として得た。

IR (neat): 1730, 1510, 1200, 1180 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.13–1.25 (m, 12 H), 1.30 (d, $J = 6.3$ Hz, 1.5 H), 1.34 (d, $J = 6.3$ Hz, 1.5 H), 4.00–4.20 (m, 2 H), 3.51–3.61 (m, 2 H), 4.32 (dd, $J = 2.4, 9.3$ Hz, 0.5 H), 4.34 (dd, $J = 2.4, 9.3$ Hz, 0.5 H), 4.48–4.68 (m, 5 H), 5.11–5.37 (m, 6 H), 5.47 (br d, $J = 9.3$ Hz, 0.5 H), 5.55 (br d, $J = 9.3$ Hz, 0.5 H), 5.98–5.86 (m, 3 H).

^{31}P NMR: δ 147.6, 148.4.

$\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ としての計算値: C, 55.80; H, 8.19; N, 6.51.

分析値: C, 55.82; H, 8.28; N, 6.61.

N-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシン (**29**):

L-チロシン (1.80 g, 10.0 mmol) を 2.0 M 水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL, 20.0 mmol) に溶解し、クロロギ酸アリル (1.10 mL, 10.0 mmol) を加えて、室温で1時間攪拌した。この溶液に濃塩酸を pH が約 1 になるまで加え、さらに塩化ナトリウムを飽和になるまで加えた後、ジエチルエーテル (50 mL \times 5回) で抽出した。有機層をあわせて 1 M 塩酸の飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL)、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, ジクロロメタン-メタノール-酢酸 (20:1:1)] に供し、*N*-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシン (**29**) (776 mg, 29%) を得た。なお、副生成物として *N,O*-ピス(アリルオキシカルボニル)-*L*-

チロシン (30) (1.2 g, 35%) が得られた。

$[\alpha]_{\text{D}}^{27} +12.1^\circ$ (c 1.01, CH₃OH).

IR (neat): 3330, 1700, 1515, 1230 cm⁻¹.

¹H NMR: δ 2.84 (dd, $J = 8.8, 13.7$ Hz, 1 H), 3.08 (dd, $J = 5.4, 13.7$ Hz, 1 H), 4.35 (dd, $J = 5.4, 8.8$ Hz, 1 H), 4.46 (d, $J = 4.9$ Hz, 1 H), 5.12 (dd, $J = 1.5, 10.3$ Hz, 1 H), 5.22 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.86 (m, 1 H), 6.71 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H),

¹³C NMR : δ 37.8, 57.0, 66.6, 116.2, 117.4, 129.2, 131.3, 134.3, 157.3, 158.2, 175.3.

C₁₃H₁₅NO₅ としての計算値: C, 58.86; H, 5.70; N, 5.28.

分析値: C, 58.90; H, 5.84; N, 5.21.

***N,O*-ビス (アリルオキシカルボニル)-*L*-チロシン (30):**

mp: 104–105 °C (dec.) (Hex-EtOAc).

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} +51.5^\circ$ (c 1.00, CHCl₃).

IR (KBr): 1755, 1695, 1540, 1510, 1265 cm⁻¹.

¹H NMR: δ 3.09 (dd, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 3.20 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1 H), 4.55 (d, $J = 5.3$ Hz, 2 H), 4.65 (m, 1 H), 4.73 (ddd, $J = 1.3, 1.3, 5.8$ Hz, 2 H), 5.21 (dd, $J = 1.2, 10.4$ Hz, 1 H), 5.28 (m, 1 H), 5.33 (tdd, $J = 1.3, 1.3, 10.4$ Hz, 1 H), 5.42 (tdd, $J = 1.3, 1.3, 17.2$ Hz, 1 H), 5.89 (m, 1 H), 5.99 (tdd, $J = 5.8, 10.4, 17.2$ Hz, 1 H), 7.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.19 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H).

¹³C NMR: δ 37.1, 54.5, 66.1, 69.2, 118.0, 119.4, 121.1, 130.3, 131.0, 132.3, 133.4, 150.1, 153.3, 155.7, 175.2.

C₁₇H₁₉NO₇ としての計算値: C, 58.45; H, 5.48; N, 4.01.

分析値: C, 58.49; H, 5.59; N, 4.05.

***N*-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシンアリルエステル (31):**

N-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシン (29) (753 mg, 2.84 mmol) のトルエン (20 mL) 溶液に、アリルアルコール (2.00 mL, 29.4 mmol) および *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (57.0

mg, 0.300 mmol) を加え、Dean-Stark 装置を用いて水を除きながら 5 時間還流した。放冷後、反応溶液に水 (50 mL) を加え、水層を酢酸エチル (50 mL × 4 回) で抽出し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [20 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:3)→(1:2)] に供し、*N*-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシンアリルエステル (**31**) (744 mg, 86%) を無色油状物として得た。

$[\alpha]_D^{30} +27.8^\circ$ (c 1.02, CHCl₃).

IR (neat): 3350, 1700, 1650, 1615, 1595, 1515, 1445, 1340, 1220 cm⁻¹.

¹H NMR: δ 3.01 (dd, *J* = 5.9, 14.2 Hz, 1 H), 3.07 (dd, *J* = 5.4, 14.2 Hz, 1 H), 4.55 (d, *J* = 5.4 Hz, 2 H), 4.61 (d, *J* = 5.9 Hz, 2 H), 4.61–4.65 (m, 1 H), 5.19–5.34 (m, 4 H), 5.83–5.93 (m, 2 H), 6.10 (br s, 1 H), 6.72 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H).

¹³C NMR: δ 14.1, 37.4, 54.9, 66.1, 115.5, 117.9, 119.1, 127.1, 130.4, 131.3, 132.4, 155.2, 155.7, 171.5.

C₁₆H₁₉NO₅ としての計算値: C, 62.94; H, 6.27; N, 4.59.

分析値: C, 62.93; H, 6.40; N, 4.66.

***N*-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシンアリルエステル *O*-アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト (**32**):**

N-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシンアリルエステル (**31**) (244 mg, 0.799 mmol)、1*H*-テトラゾール (56.0 mg, 0.799 mmol)、ジイソプロピルアミン (86.6 mg, 120 mL, 0.856 mmol) のアセトニトリル (4.0 mL) 溶液に、(アリルオキシ)ビス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン (350 mg, 1.21 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル (50 mL) で希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL × 2 回) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:4)] に供し、*N*-アリルオキシカルボニル-*L*-チロシンアリルエステル *O*-アリル *N,N*-ジイソプロピルホスホロアミダイト (**32**) (418 mg, 100%) を無色油状物として得た。

IR (neat): 1730, 1510, 1230, 1200 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.17 (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 1.22 (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 3.00–3.10 (m, 2 H), 3.68–3.77 (m, 2 H), 4.18–4.31 (m, 2 H), 4.55 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 4.59 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 4.59–4.65 (m, 1 H), 5.14–5.33 (m, 6 H), 5.81–6.02 (m, 3 H), 6.97 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H), 7.02 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H).

^{31}P NMR: δ 141.3.

$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ としての計算値: C, 60.96; H, 7.57; N, 5.69.

分析値: C, 60.81; H, 7.66; N, 5.74.

ジペプチド AOC-Ser-Gly-OCH₂CH=CH₂ (**34**):

グリシンアリルエステルの *p*-トルエンスルホン酸塩 (**33**) (3.70 g, 12.9 mmol) の THF (27 mL) 溶液に、トリエチルアミン (1.38 g, 1.90 mL, 13.6 mmol)、1-ヒドロキシベンズトリアゾール (HOBT) (2.20 g, 16.3 mmol)、および *N*-アリルオキシカルボニル-L-セリン (**23**) (3.06 g, 16.2 mmol) の THF (13.5 mL) 溶液を加えた後、0 °C でジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (5.01 g, 24.3 mmol) の THF (13.5 mL) 溶液を加え、室温に昇温して 12 時間かくはんした。不溶物をろ別し、ろ液を減圧濃縮した後、酢酸エチル (800 mL) の溶解した。この溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL)、10% クエン酸水溶液 (100 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL)、および飽和塩化ナトリウム水溶液 (100 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:1)→(5:1)] に供し、ジペプチド **34** (3.63 g, 98%) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}}^{29} -19.2^\circ$ (c 1.04, CHCl_3).

IR (neat): 3340, 1725, 1670, 1530, 1200 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 3.65 (br s, 1 H), 3.72 (dd, $J = 4.9, 10.7$ Hz, 1 H), 4.04 (dd, $J = 3.4, 11.2$ Hz, 1 H), 4.05–4.10 (m, 2 H), 4.33 (br s, 1 H), 4.58 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.64 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 5.22

(d, $J = 10.3$ Hz, 1 H), 5.27 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.31 (d, $J = 19.0$ Hz, 1 H), 5.34 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.85–5.95 (m, 2 H), 6.07 (br d, $J = 6.3$ Hz, 1 H), 7.31 (s, 1 H).

^{13}C NMR: δ 41.3, 55.8, 62.9, 66.1, 66.2, 118.0, 119.1, 131.3, 132.3, 156.4, 169.7, 171.4.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ としての計算値: C, 50.35; H, 6.34; N, 9.79.

分析値: C, 50.35; H, 6.51; N, 9.71.

ジペプチド AOC-Thr-Gly-OCH₂CH=CH₂ (35):

グリシンアリルエステル *p*-トルエンスルホン酸塩 (33) (4.30 g, 15.0 mmol) の THF (30 mL) 溶液にトリエチルアミン (1.52 g, 2.10 mL, 15.1 mmol)、*N*-アリルオキシカルボニルスレオニン (24) (3.65 g, 18.0 mmol) の THF (15 mL) 溶液、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (2.43 g, 18.0 mmol) を加えた後、DCC (5.56 g, 26.9 mmol) の THF (15 mL) 溶液を 0 °C で加え、室温に昇温して 12 時間攪拌した。不溶物を濾別し、濾液を減圧濃縮した後、酢酸エチル (800 mL) に溶解した。この溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL)、10% クエン酸水溶液 (100 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL)、および飽和塩化ナトリウム水溶液 (100 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [100 g, 酢酸エチル–ヘキサン (1:1)→(1:3)] に供し、ジペプチド 35 (3.02 g, 67%) を無色油状物として得た。

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} -32.8^\circ$ (c 1.01, CHCl_3).

IR (neat): 3340, 1726, 1665, 1530, 1200 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.20 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H), 3.82 (br s, 1 H), 4.06 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.25 (d, $J = 6.3$, 1 H), 4.34 (m, 1 H), 4.58 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.63 (d, $J = 5.9$ Hz, 2 H), 5.26 (dd, $J = 10.2$, 1.0 Hz, 1 H), 5.31 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 5.33 (dd, $J = 17.6$, 1.5 Hz, 1 H), 5.85–5.96 (m, 2 H), 6.06 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H).

^{13}C NMR: δ 18.1, 41.2, 59.0, 66.0, 66.0, 67.1, 117.8, 118.9, 131.3, 132.3, 156.6, 169.5, 171.3.

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ としての計算値: C, 51.99; H, 6.71; N, 9.33.

分析値: C, 52.05; H, 6.86; N, 9.08.

ジペプチドホスホロアミダイト 36:

ジペプチド AOC-Ser-Gly-OCH₂CH=CH₂ (**34**) (978 mg, 3.42 mmol) のアセトニトリル (10 mL) 溶液に、ジイソプロピルアンモニウム 1*H*-テトラゾリド (580 mg, 3.39 mmol) および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (1.50 g, 5.20 mmol) を順次加え、2時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, 酢酸エチル-ヘキサントリエチルアミン (1:1:trace)→(5:1:trace)] に供し、ジペプチドホスホロアミダイト **36** (1.10 g, 68%) を得た。

IR (neat): 1730, 1680, 1530, 1185 cm⁻¹.

¹H NMR: δ 1.14–1.18 (m, 12 H), 3.52–3.67 (m, 2 H), 3.68–3.83 (m, 1 H), 3.97–4.25 (m, 5 H), 4.36–4.43 (m, 1 H), 4.60 (d, *J* = 5.3 Hz, 2 H), 4.65 (d, *J* = 5.8 Hz, 2 H), 5.13–5.36 (m, 6 H), 5.70 (br s, 0.5 H), 5.84–6.03 (m, 3.5 H), 6.93 (br s, 0.5 H), 7.01 (br s, 0.5 H).

³¹P NMR: δ 149.0, 149.9.

C₂₁H₃₆N₃O₇P としての計算値: C, 53.27; H, 7.66; N, 8.87.

分析値: C, 53.31; H, 7.90; N, 9.02.

ジペプチドホスホロアミダイト 37:

ジペプチド AOC-Thr-Gly-OCH₂CH=CH₂ (**35**) (248 mg, 0.826 mmol) のアセトニトリル (3.2 mL) 溶液に、ジイソプロピルアミン (86.6 mg, 120 mL, 0.856 mmol)、1*H*-テトラゾール (58.0 mg, 0.828 mmol)、および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (360 mg, 1.25 mmol) を順次加え、室温で1時間かくはんした。反応溶液を酢酸エチル (50 mL) で希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL × 2回) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮し

た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 g, 酢酸エチル-ヘキサン-トリエチルアミン (1:3:trace)] に供し、ジペプチドホスホロアミダイト **37** (360 mg, 89%) を無色油状物として得た。

IR (neat): 1760 (sh), 1730, 1680, 1510, 1185 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.17–1.29 (m, 15 H), 3.48–3.71 (m, 2 H), 3.94–4.37 (m, 5 H), 4.45–4.51 (m, 1 H), 4.59 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.65 (d, $J = 5.7$ Hz, 2 H), 5.11–5.37 (m, 6 H), 5.77–6.02 (m, 4 H), 7.09 (br s, 0.5 H), 7.21 (br s, 0.5 H).

^{31}P NMR: δ 147.5, 150.0.

$\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$ としての計算値: C, 54.20; H, 7.86; N, 8.62.

分析値: C, 54.25; H, 7.92; N, 8.77.

ジペプチド Boc-Gly-Asp(OCH₂CH=CH₂)₂ (**38**):

L-アスパラギン酸 (1.33 g, 10.0 mmol) のトルエン (80 mL) けん濁液に、アリルアルコール (5.81 g, 6.80 mL, 100 mmol) および *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (2.10 g, 11.0 mmol) を加え、Dean-Stark 装置を用いて水を除きながら 3 時間還流した。放冷後、反応溶液を減圧濃縮し、L-アスパラギン酸ジアリルエステルの *p*-トルエンスルホン酸塩 (4.43 g) を得た。このもののジクロロメタン (10 mL) 溶液に、トリエチルアミン (1.02 g, 1.40 mL, 10.0 mmol)、*N*-tert-ブトキシカルボニルグリシン (**42**) (2.11 g, 12.0 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (2.43 g, 18.0 mmol) を加えた後、DCC (3.71 g, 18.0 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液を 0 °C で加え、室温に昇温して 19 時間かくはんした。不溶物をろ別し、ろ液を減圧濃縮した。得られた油状物を酢酸エチル (300 mL) で希釈し、10% クエン酸水溶液 (50 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL)、および水 (50 mL) で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [50 g, 酢酸エチル-ヘキサン (1:2)→(1:1)] に供し、ジペプチド **38** (2.35 g, 63%) を無色油状物として得た。

$[\alpha]^{30}_{\text{D}} +32.6^{\circ}$ (c 1.01, CHCl_3).

IR (neat): 3340, 1740, 1685, 1520, 1370, 1170 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.45 (s, 9H), 2.89 (dd, $J = 4.6, 7.2$ Hz, 1 H), 3.07 (dd, $J = 4.6, 7.2$ Hz, 1 H), 3.70–3.95 (m, 3 H), 4.57–4.66 (m, 4 H), 4.91 (td, $J = 4.6, 8.3$ Hz, 1 H), 5.20–5.40 (m, 5 H), 5.81–5.91 (m, 2 H), 7.20 (br d, $J = 8.3$ Hz, 1 H).

^{13}C NMR: δ 28.3, 36.2, 44.1, 48.5, 65.7, 66.4, 80.2, 118.6, 118.7, 131.2, 131.4, 155.7, 169.4, 169.9, 170.2.

$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$ としての計算値: C, 55.13; H, 7.07; N, 7.56.

分析値: C, 54.14; H, 7.22; N, 7.60.

トリペプチド **Boc-Ser(OTBDMS)-Gly-Asp(OCH₂CH=CH₂)₂ (39):**

ジペプチド Boc-Gly-Asp(OCH₂CH=CH₂)₂ (**38**) (380 mg, 1.03 mmol) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液に、0 °C でトリフルオロ酢酸 (3.0 mL) を加え 1.5 時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮した後、得られた油状物を THF (5.0 mL) に溶解した。この溶液に *N-tert*-ブトキシカルボニル-*O-tert*-ブチルジメチルシリル-L-セリン (**43**) (383 mg, 1.20 mmol) およびトリエチルアミン (508 mg, 0.70 mL, 5.02 mmol) を加えた後、BOP (810 mg, 1.83 mmol) を 0 °C で加え、室温に昇温して 3 時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮した後、酢酸エチル (80 mL) に溶解した。この溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (20 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [30 g, 酢酸エチル–ヘキサン (1:4)→(1:1)] に供し、トリペプチド **39** (533 mg, 91%) を無色固体として得た。

$[\alpha]^{29}_{\text{D}} +2.81$ (c 1.01, CHCl_3).

IR (neat): 1750, 1710, 1645, 1540, 1510, 1210, 1175 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 0.08 (s, 9 H), 0.88 (s, 9 H), 1.46 (s, 9 H), 2.89 (dd, $J = 4.9, 17.1$ Hz, 1 H), 3.05 (dd,

$J = 4.4, 17.1$ Hz, 1 H), 3.71 (dd, $J = 6.3, 9.8$ Hz, 1 H), 3.99–4.03 (m, 1 H), 4.00 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.19 (m, 1 H), 4.58 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.64 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H), 4.89 (ddd, $J = 4.4, 4.9, 8.3$ Hz, 1 H), 5.25 (d, $J = 10.3$ Hz, 2 H), 5.31 (dd, $J = 1.0, 17.1$ Hz, 2 H), 5.39 (br s, 1 H), 5.83–5.94 (m, 2 H), 7.09 (br d, $J = 8.3$ Hz, 1 H), 7.14 (br t, $J = 5.4$ Hz, 1 H).

$C_{26}H_{45}N_3O_9Si$ としての計算値: C, 54.62; H, 7.93; N, 7.35.

分析値: C, 54.64; H, 7.93; N, 7.29.

テトラペプチド AOC-Ala-Ser-Gly-Asp(OCH₂CH=CH₂)₂ (40):

トリペプチド Boc-Ser(OTBDMS)-Gly-Asp(OCH₂CH=CH₂)₂ (39) (605 mg, 1.06 mmol) のジクロロメタン (3.0 mL) 溶液に、0 °C でトリフルオロ酢酸 (3.0 mL) を加え 0.5 時間かくはんした。反応溶液を減圧濃縮した後、得られた油状物を THF (5.0 mL) に溶かした。この溶液に *N*-アリルオキシカルボニル-L-アラニン (44) (225 mg, 1.30 mmol) およびトリエチルアミン (537 mg, 0.74 mL, 5.31 mmol) を加えた後、BOP (853 mg, 1.93 mmol) を 0 °C で加え、室温に昇温して 3 時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮した後、酢酸エチル (80 mL) に溶解した。この溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (20 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [30 g, メタノール–酢酸エチル–ヘキサン (1:40:40)→(1:10:10)] に供し、無色固体 (722mg) を得た。このものを THF (8.0 mL) に溶かし、酢酸 (120 mg, 114 mL, 1.99 mmol) およびフッ化テトラブチルアンモニウムの 1.0 M THF 溶液 (2.00 mL, 2.00 mmol) を順次加えて、室温にて 2 時間かくはんした。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 mL) を加え、酢酸エチル (50 mL × 3 回) で抽出した。有機層を合わせて飽和塩化ナトリウム水溶液 (20 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [30 g, アセトン–トルエン (1:2)→(2:1)] に供し、テトラペプチド 40 (368 mg, 74%) を得た。

$[\alpha]_D^{29} -2.36$ (c 1.03, CH₃OH).

IR (KBr): 1740, 1710, 1675, 1635, 1525, 1220, 1185 cm^{-1} .

^1H NMR (CD_3OD): δ 1.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), 2.87 (dd, $J = 6.3, 17.1$ Hz, 1 H), 2.93 (dd, $J = 5.9, 17.1$ Hz, 1 H), 3.78 (dd, $J = 4.9, 11.2$ Hz, 1 H), 3.87 (dd, $J = 5.4, 11.2$ Hz, 1 H), 3.89 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 3.94 (d, $J = 17.1$ Hz, 1 H), 4.15 (q, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 4.36 (dd, $J = 4.9, 5.4$ Hz, 1 H), 4.54–4.83 (m, 6 H), 4.86 (dd, $J = 5.8, 6.3$ Hz, 1 H), 5.16–5.23 (m, 3 H), 5.28–5.34 (m, 3 H), 5.87–5.98 (m, 3 H).

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}$ としての計算値: C, 51.56; H, 6.29; N, 10.93.

分析値: C, 51.55; H, 6.30; N, 10.91.

テトラペプチドホスホロアミダイト 41:

テトラペプチド Ala-Ser-Gly-Asp($\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)₂ (40) (284 mg, 672 μmol) のアセトニトリル (6.0 mL) 溶液に、1*H*-テトラゾール (23.6 mg, 337 μmol)、ジイソプロピルアミン (34.0 mg, 47.0 mL, 340 μmol)、および (アリルオキシ) ビス (ジイソプロピルアミノ) ホスフィン (254 mg, 881 μmol) を加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル (80 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) および飽和塩化ナトリウム水溶液 (10 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [20 g, 酢酸エチル–ヘキサントリエチルアミン (1:4:trace)] に供し、テトラペプチドホスホロアミダイト 41 (266 mg, 63%) を得た。

IR (KBr): 1750, 1710, 1640, 1510, 1240, 1225, 1185 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.14–1.18 (m, 12 H), 1.41 (d, $J = 6.8$ Hz, 1.5 H), 1.43 (d, $J = 6.8$ Hz, 1.5 H), 2.90 (dd, $J = 4.9, 17.1$ Hz, 0.5 H), 2.91 (dd, $J = 4.9, 17.1$ Hz, 0.5 H), 3.00 (dd, $J = 4.9, 17.1$ Hz, 0.5 H), 3.02 (dd, $J = 4.9, 17.1$ Hz, 0.5 H), 3.51–3.63 (m, 2 H), 3.77–3.84 (m, 1.5 H), 3.94–4.29 (m, 5.5 H), 4.44–4.64 (m, 7 H), 4.89–4.94 (m, 1 H), 5.15–5.35 (m, 8 H), 5.39 (br s, 1 H), 5.83–6.02 (m, 4 H), 7.13 (br s, 0.5 H), 7.15 (br s, 0.5 H), 7.22 (br s, 1 H), 7.47 (br s, 0.5 H), 7.48 (br s, 0.5 H).

^{31}P NMR: δ 149.3, 149.6.

C₃₁H₅₀N₅O₁₁P としての計算値: C, 53.21; H, 7.20; N, 10.01.

分析値: C, 53.33; H, 7.25; N, 10.21.

***N*-アリルオキシカルボニル-L-アラニン (44):**

L-アラニン (1.78 g, 20.0 mmol) を 1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液 (20 mL, 20 mmol) に溶かし、クロロギ酸アリル (2.50 mL, 23.6 mmol) を加え、室温でかくはんした。この溶液に 2.0 M 水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL, 20 mmol) を 4 回に分けて加えながら、室温で 3 時間かくはんした。反応溶液に、濃塩酸を pH が約 1 になるまで加え、さらに塩化ナトリウムを飽和になるまで加えた後、ジエチルエーテル (150 mL × 5 回) で抽出した。有機層を合わせて飽和塩化ナトリウム水溶液 (100 mL) で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮することにより、*N*-アリルオキシカルボニル-L-アラニン (44) (3.45 g, 100%) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}}^{27} -2.49$ (c 1.09, CH₃OH).

IR (neat): 3325, 1715, 1535, 1455, 1410, 1240 cm⁻¹.

¹H NMR (CD₃OD): δ 1.38 (d, *J* = 7.3 Hz, 3 H), 4.17 (q, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 4.53 (d, *J* = 5.4 Hz, 2 H), 5.17 (dd, *J* = 1.5, 10.2 Hz, 1 H), 5.30 (dd, *J* = 1.5, 17.1 Hz, 1 H), 5.92 (ddd, *J* = 5.4, 10.2, 17.1 Hz, 1 H).

C₇H₁₁NO₄ としての計算値: C, 48.55; H, 6.40; N, 8.09.

分析値: C, 48.61; H, 6.55; N, 8.14.

アクリジニルアルキルホスホロアミダイト 46:

6-クロロ-2-メトキシ-9-(ヒドロキシペンチルアミノ)アクリジン (1.00 g, 2.90 mmol) のアセトニトリル (15 mL) 溶液に、1*H*-テトラゾール (104 mg, 1.48 mmol) および(アリルオキシ)ピス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィン (856 mg, 2.97 mmol) を順次加え、室温で 1 時間かくはんした。反応溶液に飽和炭酸水をナトリウム水溶液 (50 mL) を加え、ジクロロメタン (100 mL × 4 回) で抽出した。有機層を合わせて、飽和塩化ナトリウム水溶液 (50 mL)

で洗浄し、乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [30 g, メタノール-酢酸エチル-ヘキサン-トリエチルアミン (1:100:100:10)] に供し、アクリジニルアルキルホスホロアミダイト **46** (809 mg, 52%) を得た。

IR (neat): 3325, 1630, 1560, 1465, 1235 cm^{-1} .

^1H NMR: δ 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 1.17 (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 1.51–1.59 (m, 2 H), 1.63–1.70 (m, 2 H), 1.76–1.83 (m, 2 H), 3.54–3.73 (m, 6 H), 3.96 (s, 3 H), 4.06–4.21 (m, 2 H), 4.67 (br s, 1 H), 5.11 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H), 5.27 (dd, $J = 1.5, 17.1$ Hz, 1 H), 5.94 (tdd, $J = 5.4, 10.2, 17.1$ Hz, 1 H), 7.21 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H), 7.31 (dd, $J = 9.3, 2.0$ Hz, 1 H), 7.42 (dd, $J = 9.3, 2.4$ Hz, 1 H), 7.99 (d, $J = 9.3$ Hz, 1 H), 8.02 (d, $J = 9.3$ Hz, 1 H), 8.07 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H).

^{31}P NMR: d 146.9.

$\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{P}$ としての計算値: C, 63.21; H, 7.39; N, 7.90.

分析値: C, 63.27; H, 7.50; N, 7.79.

固相合成したオリゴヌクレオチドおよびヌクレオチド-アミノ酸、-ペプチド共有結合複合体のアリル保護基の脱保護および固相からの切り出し:

まず、 $\text{Pd}_2[(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH})_2\text{CO}]_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (20.7 mg, 20.0 μmol)、トリフェニルホスフィン (52.5 mg, 200 μmol)、ジエチルアミン (87.7 mg, 124 mL, 1.20 mmol)、およびギ酸 (55.3 mg, 45.3 mL, 1.20 mmol) と THF (2.0 mL) の混合物を、透明な橙色になるまで加熱することにより、パラジウム触媒の THF 溶液を調製した。固相担体 (CPG) に結合した保護ヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体 (0.2 μmol) をアセトニトリル (1 mL \times 3 回) で洗浄した後、減圧下で乾燥させた。この固相担体に、新たに調製した上記パラジウム触媒 (アリル基およびアリルオキシカルボニル基に対して 2.5 当量) を加え、時々かくはんしながら 50 $^\circ\text{C}$ に加温した。1 時間後、上澄み液を除き、文献記載の方法^{55,56} により固相担体を洗浄した。洗浄した固相担体を濃アンモニア水 (0.5 mL \times 4 回) で 1 時間処理することにより、目的とするヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体を得た。収率は、5'-, 3'-両末端無保護オリゴヌクレオチド 5'^{3'}TGTCGACACCCAATT^{3'} を内部標準として加えて HPLC を測定し、そ

それぞれのピークの面積比より算出した。

代表的なヌクレオチド-ペプチド共有結合複合体の分子量および分子イオンピーク

nucleotide-peptide conjugate	molecular weight	molecular ion ^a
Ser(p ^{5'} CATCAT ^{3'})-Gly	1975.31	1974.4 (M-H)-1
Ser(p ^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'})-Gly	4736.07	4734.3 (M-H)-1
Ala-Ser(p ^{5'} CATCAT ^{3'})-Gly-Asp	2161.47	2160.8 (M-H)-1
Ala-Ser(p ^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'})-Gly-Asp (47)	4922.23	2460.7 (M-2H)-2
Thr(p ^{5'} CATCAT ^{3'})-Gly	1989.33	1988.2 (M-H)-1
Thr(p ^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'})-Gly (49)	4750.09	4748.8 (M-H)-1
(^{5'} CATCAT ^{3'} p)Ser-Gly	1975.31	1974.5 (M-H)-1
(^{5'} TGTCGACACCCAATT ^{3'} p)Ser-Gly (55)	4736.07	4734.3 (M-H)-1
Ala-(^{5'} CATCAT ^{3'} p)Ser-Gly-Asp	2161.47	2161.7 (M-H)-1

^a Obtained by ESI-MS analysis.

9. 参考文献

1. Ratajczak, M. Z.; Gewirtz, A. M. *Nucl. Acids Mol. Biol.* **1994**, *8*, 298–326.
2. Englisch, U.; Gauss, D. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613–722.
3. Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
4. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1925–1963.
5. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6123–6194.
6. Asseline, U.; Bonfils, E.; Kurfürst, R.; Chassignol, M.; Roig, V.; Thuong, N. T. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1233–1254.
7. Wagner, T.; Pfeleiderer, W. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1657–1660.
8. Manoharan, M.; Johnson, L. K.; Bennet, C. F.; Vickers, T. A.; Ecker, D. J.; Cowsert, L. M.; Freier, S. M.; Cook, P. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1053–1060.
9. Zhou, J. H.; Pai, B. S.; Reed, M. W.; Gamper, H. B.; Lukhtanov, E.; Podyminogin, M. Meyer, R. B. Jr.; Cheng, Y.-C. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5783–5787.
10. Mullah, B.; Andrus, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5751–5754.
11. Mergny, J.-L.; Boutorine, A. S.; Garestier, T.; Belloc, F.; Rougée, M.; Bulychev, N. V.; Koshkin, A. A.; Bourson, J.; Lebedev, A. V.; Valeur, B.; Thuong, N. T.; Hélène, C. *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 920–928.
12. Zuckermann, R.; Corey, D.; Schultz, P. *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 5303–5321.
13. Soukchareun, S.; Tregear, G. W.; Haralambidis, J. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 43–53.
14. Robles, J.; Maseda, M.; Beltrán, M.; Concernau, M.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 785–788.
15. McMinn, D. L.; Greenberg, M. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 547–550.
16. De Napoli, L.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Benedetti, E.; Bucci, E.; Rossi, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 395–400.
17. Truffert, J.-C.; Asseline, U.; Brack, A.; Thuong, N. T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3005–3016.
18. Basu, S.; Wickstrom, E. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4943–4946.
19. De la Torre, B. G.; Aviñó, A.; Tarrason, G.; Piulats, J.; Albericio, F.; Eritja, R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2733–2736.
20. Juby, C. D.; Richardson, C. D.; Brousseau, R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 879–882.
21. Haralambidis, J.; Duncan, L.; Angus, K.; Tregear, G. W. *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 493–499.

22. ほかにモノリン酸エステル基、DNA/RNA 切断活性基が 3'-末端に結合したオリゴヌクレオチドの合成が報告されている。モノリン酸エステル基: (a) McMinn, D. L.; Hirsch, R.; Greenberg, M. M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4155–4158. (b) Zhang, X.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 3980–3983. (c) Dell'Aquila, C.; Imbach, J.-L.; Rayner, B. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *30*, 5289–5292. (d) Guzaev, A.; Lönnberg, H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3989–3992. (e) Gryaznov, S. M.; Letsinger, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4127–4128. (f) Eritja, R.; Robles, J.; Fernandez-Forner, D.; Albericio, F.; Giralt, E.; Pedroso, E. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1511–1514. (g) Gupta, K. C.; Sharma, P.; Kumar, P.; Sathyanarayana, S. *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19*, 3019–3025. (h) Markiewicz, W. T.; Wyrzykiewicz, T. K. *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*, 7149–7158. DNA/RNA 切断活性基: (i) Armitage, B. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171–1200. (j) Trawick, B. N.; Daniher, A. T.; Bashkin, J. K. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 939–960.
23. Bordier, B.; Perala-Heape, M.; Degols, G.; Lebleu, B.; Litvak, S.; Sarih-Cottin, L.; Hélène, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9383–9387.
24. Degols, G.; Leonetti, J.-P.; Benkirane, M.; Devaux, C.; Lebleu, B. *Antisense Res. Dev.* **1992**, *2*, 293–301.
25. Leonetti, J.-P.; Degols, G.; Lebleu, B. *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 149–153.
26. Stevenson, M.; Iversen, P. L. *J. Gen. Virol.* **1989**, *70*, 2673–2682.
27. Leonetti, J.-P.; Rayner, B.; Lemaitre, M.; Gagnor, C.; Milhaud, P. G.; Imbach, J. L.; Lebleu, B. *Gene*, **1989**, *72*, 323–332.
28. Lemaitre, M.; Bayard, B.; Lebleu, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 648–652.
29. Chaloin, L.; Vidal, P.; Méry, J.; Lautredou, N.; Divita, G.; Heitz, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 601–608.
30. Bongartz, J.-P.; Aubertin, A.-M.; Milhaud, P. G.; Lebleu, B. *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 4681–4688.
31. Arar, K.; Aubertin, A.-M.; Roche, A.-C.; Monsigny, M.; Mayer, R. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 573–577.
32. Reed, M. W.; Fraga, D.; Schwartz, D. E.; Scholler, J.; Hinrichsen, R. D. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 101–108.
33. Arar, K.; Monsigny, M.; Mayer, R. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8087–8090.

34. Eritja, R.; Pons, A.; Escarceller, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4113–4120.
35. ほかに次のような報告がある。(a) Vivès, E.; Lebleu, B. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1183–1186. (b) Juby, C. D.; Richardson, C. D.; Brousseau, R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 879–882.
36. Kitamura, N.; Semler, B. L.; Rothberg, P. G.; Larsen, G. R.; Adler, C. J.; Dorner, A. J.; Emini, E. A.; Hanecak, R.; Lee, J. J.; van der Werf, S.; Anderson, C. W.; Wimmer, E. *Nature* **1981**, *291*, 547–553.
37. Stillman, B. W. *Cell* **1983**, *35*, 7–9.
38. Beltrán, M.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4115–4118.
39. Beltrán, M.; Maseda, M.; Pérez, Y.; Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1487–1488.
40. Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Nucl. Acids Res.* **1995**, *23*, 4151–4161.
41. Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2482–2486.
42. Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4449–4452.
43. Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4389–4392.
44. Filippov, D.; Kuyl-Yeheskiely, E.; van der Marel, G. A.; Tesser, G. I.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3597–3600.
45. Dreef-Tromp, C. M.; van der Maarel, J. C. M.; van den Elst, H.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 4015–4020.
46. Dreef-Tromp, C. M.; van den Elst, H.; van den Boogaart, J. E.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 2435–2439.
47. Kuyl-Yeheskiely, E.; Dreef-Tromp, C. M.; Geluk, A.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*, 2897–2905.
48. Kuyl-Yeheskiely, E.; Tromp, C. M.; Lefeber, A. W. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6515–6523.
49. Kuyl-Yeheskiely, E.; Tromp, C. M.; Schaeffer, A. H.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 1807–1818.
50. Kuyl-Yeheskiely, E.; van der Klein, P. A. M.; Visser, G. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1986**, *105*, 69–70.
51. Schattenkerk, C.; Wreesmann, C. T. J.; de Graaf, M. J.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5197–5200.

52. Ueno, Y.; Saito, R.; Hata, T. *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*, 4451–4457.
53. Hotoda, H.; Ueno, Y.; Sekine, M.; Hata, T. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2117–2120.
54. Hayakawa, Y.; Kataoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11758–11762.
55. Hayakawa, Y.; Hirose, M.; Hayakawa, M.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 925–930.
56. Hayakawa, Y.; Wakabayashi, S.; Kato, H.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1691–1696.
57. Heidenhain, S. B.; Hayakawa, Y. *Synlett* **1998**, 853–854.
58. Heidenhain, S. B.; Hayakawa, Y. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1771–1787.
59. Paulsen, H.; Mertz, G.; Brockhausen, I. *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 719–739.
60. Waldmann, H.; Kunz, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1712–1725.
61. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219–1222.
62. Ueda, Y.; Mikkilineni, A.; Partyka, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1541–1546.
63. Bannwarth, W.; Küng, E.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4219–4222.
64. Asseline, U.; Thuong, N. T.; Hélène, C. *Nucleosides Nucleotides* **1986**, *5*, 45–63.
65. Hayakawa, Y.; Kataoka, M.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7996–7997.
66. Hayakawa, Y.; Uchiyama, M.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4191–4194.

謝辞

本研究は、早川芳宏教授の御指導のもとに1995年4月から2000年7月まで名古屋大学大学院人間情報学研究科生物情報論講座において行ったものであります。

本研究の遂行にあたり絶えず適切な御指導と御助言をいただき、また本論文作成にあたりご多忙中のところ貴重な時間をさいて御指導いただきました早川芳宏教授に心より御礼申し上げます。本研究の進行を温かく見守り、また多大な協力と御助言を頂きました村田静昭教授、杉本隆教授をはじめとする名古屋大学大学院人間情報学研究科の先生方に心から感謝いたします。本研究の遂行にあたり、共同研究者としてご協力いただきました早川研究室の皆様、村田研究室、杉本研究室の皆様には御礼致します。最後に、大学院に進学し研究を行うことに理解を示し、心の支えになっていただいた両親と婚約者酒井智帆さんに心から感謝し、御礼いたします。

2000年7月

坂倉 章

論文リスト

副論文

Akira Sakakura, Yoshihiro Hayakawa

A novel synthesis of oligonucleotide–peptide conjugates with a base-labile phosphate linker between the two components according to the allyl-protected phosphoramidite strategy
Tetrahedron, in press (2000)

Yoshihiro Hayakawa, Akira Sakakura, Sophie B. Heidenhain, Masanori Kataoka

A Facile Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides and Their Amino Acid Conjugates via the Allyl-Protected Phosphoramidite Approach with Benzimidazolium Triflate as a Promoter
Collection Symposium Series (A. Holy and M. Hocek, Eds), Vol. 2, pp 105–108, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague (1999)

Akira Sakakura, Yoshihiro Hayakawa, Hitoshi Harada, Masaaki Hirose, Ryoji Noyori

A Novel Approach to Oligodeoxyribonucleotides Bearing Phosphoric Acid Esters at the 3'-Terminals via the Phosphoramidite Method with Allyl Protection: an Efficient Synthesis of Base-Labile Nucleotide–Amino Acid and –Peptide Conjugates
Tetrahedron Letters, Vol. 40, No. 23, pp. 4359–4362 (1999)

Akira Sakakura, Yoshihiro Hayakawa

Preparation of phosphate-linked nucleotide–amino acid and –peptide conjugates via phosphoramidite approach with allyl/allyloxycarbonyl protection
Nucleic Acids Symposium Series, No. 39, pp. 25–26 (1998)

参考論文

Hideo Kigoshi, Kiyotake Suenaga, Tsuyoshi Mutou, Takeshi Ishigaki, Toshiyuki Atsumi, Hiroyuki Ishiwata, Akira Sakakura, Takeshi Ogawa, Makoto Ojika, Kiyoyuki Yamada, Aplyronine A, a Potent Antitumor Substance of Marine Origin, Aplyronines B and C, and Artificial Analogues: Total Synthesis and Structure–Cytotoxicity Relationships
The Journal of Organic Chemistry, Vol. 61, No. 16, pp. 5326–5351 (1996)

Kiyotake Suenaga, Takeshi Ishigaki, Akira Sakakura, Hideo Kigoshi, Kiyoyuki Yamada
Absolute Stereochemistry and Synthesis of Aplyronine B and C, the Congeners of Aplyronine A, a Potent Antitumor Substance of Marine Origin
Tetrahedron Letters, Vol. 36, No. 28, pp. 5053–5056 (1995)

Hideo Kigoshi, Makoto Ojika, Takeshi Ishigaki, Kiyotake Suenaga, Tsuyoshi Mutou, Akira Sakakura, Takeshi Ogawa, Kiyoyuki Yamada,
Total Synthesis of Aplyronine A, a Potent Antitumor Substance of Marine Origin
Journal of the American Chemical Society, Vol. 116, No. 16, pp. 7443–7444 (1994)

Hideo Kigoshi, Makoto Ojika, Kiyotake Suenaga, Tsuyoshi Mutou, Junko Hirano, Akira Sakakura, Takeshi Ogawa, Masanori Nisiwaki, Kiyoyuki Yamada,
Synthetic Studies on Aplyronine A, a Potent Antitumor Substance of Marine Origin:
Stereocontrolled Synthesis of the C21–C34 Segment
Tetrahedron Letters, Vol. 35, No. 8, pp. 1247–1250 (1994)