



7-10
A4S

7-10
A4S



①

金属イオン触媒を用いる核酸関連生理活性物質の合成
およびその物性

群馬大学大学院工学研究科
物質工学専攻

1995年3月

島津 昌光

目次

第1章	ピロリン酸結合を含む核酸関連生理活性物質とその合成	1
1-1	はじめに	1
1-2	核酸と金属イオンとの相互作用	2
1-3	ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質	3
1-4	ピロリン酸結合を有する生理活性物質の化学的合成	4
1-5	金属イオンを用いたピロリン酸結合含有化合物の合成	6
第2章	二価金属イオンを触媒とする酵素モデル的なピロリン酸結合形成反応	9
2-1	ヌクレオシド-5'-ホスホイミダゾリド(ImpN)の合成	9
2-2	各種金属イオン触媒を用いたピロリン酸結合形成反応	9
2-2-1	反応条件の検討	9
2-2-2	核酸塩基の反応に及ぼす影響	15
2-2-3	りん酸基供与体の検討	21
2-3	考察	29
2-3-1	反応条件の最適化	29
2-3-2	反応機構	29
第3章	ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質の構造決定及びその物性	35
3-1	試料の調製	35
3-2	ジヌクレオシドポリりん酸($N_{p_n}N$)のHPLC分析	35
3-3	$N_{p_n}N$ のNMR解析	36
3-4	$N_{p_n}N$ のUV分析	37
第4章	チオリン酸基を有するオリゴヌクレオチドアナログの化学的及び生物学的意義	
4-1	ヌクレオシドチオリン酸アナログについて	39
4-2	2',5'-オリゴチオイノシル酸の合成	40

4-3	2-5A系について	42
4-4	2-5Aとそのアナログ	43
4-5	2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成法とその生物活性	44
4-6	ウラニルイオン触媒を用いた2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成	47
第5章 ウラニルイオン触媒による2',5'-オリゴヌクレオチドチオリン酸アナログの合成		
5-1	ヌクレオシド-5'-チオホスホアゾリド[Xp(S)N]の合成	50
5-1-1	イノシン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)I]の合成	50
5-1-2	アデノシン-5'-チオホスホアゾリド[Xp(S)A]の合成	50
5-2	ウラニルイオン触媒を用いたImp(S)Iの縮重合反応	51
5-2-1	各種金属イオンの触媒効果	51
5-2-2	ウラニルイオンの当量比及び反応pHの影響	52
5-3	ウラニルイオン触媒を用いたXp(S)Aの縮重合反応	55
5-3-1	Imp(S)A縮重合反応におけるウラニルイオン当量比及び反応pHの影響	55
5-3-2	Imp(S)A縮重合反応における反応時間の検討	57
5-3-3	Xp(S)A縮重合反応におけるアゾール基の置換効果	57
5-3-4	Bzimp(S)Aジアステレオマー異性体の立体配置による縮重合反応への影響	59
5-4	考察	60
5-4-1	チオホスホアゾリドの合成法	60
5-4-2	Imp(S)Iの縮重合反応	63
5-4-3	Imp(S)Aの縮重合反応	68
5-4-4	Xp(S)A(X=Bztria, Bzim)の縮重合反応	70
5-4-5	Bzimp(S)Aジアステレオマー分割体の縮重合反応	72
5-4-6	反応機構	73
第6章 オリゴチオイノシル酸の物性		
6-1	試料の調製	81
6-2	UV分析	81
6-3	酵素(SVPD)分解	81

6-4	^1H NMR解析	82
第7章	2',5'-オリゴチオアデニル酸の物性	83
7-1	試料の調製	83
7-2	UV分析	83
7-3	CD測定	83
7-3-1	オリゴマー鎖長及び立体配置の相違によるCDスペクトルの変化	83
7-3-2	CDスペクトルの温度変化	87
7-3-3	考察	89
7-4	酵素分解による構造解析	96
7-4-1	SVPDを用いた加水分解半減期の算出	96
7-4-2	考察	97
7-4-3	RNase T2によるオリゴチオアデニル酸-3',5'-結合異性体の切断	98
7-5	NMR 構造解析	99
7-5-1	測定法	99
7-5-2	オリゴマーの構造解析	99
7-5-3	考察	111
第8章	2',5'-オリゴチオアデニル酸の生物活性	120
8-1	ラジオバインディングアッセイ	120
8-1-1	測定法	120
8-1-2	アッセイ結果	121
8-1-3	考察	122
8-2	細胞内蛋白質合成阻害アッセイ	126
8-2-1	測定法	127
8-2-2	アッセイ結果	127
8-2-3	考察	127
第9章	総括	131

第10章 実験の部	133
10A ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質の合成及び物性	134
10A-1 ヌクレオシド-5'-ホスホイミダゾリド(ImpN)の合成	134
10A-1-1 アデノシン-5'-ホスホイミダゾリド(ImpA)の合成	134
10A-1-2 ImpA以外のImpNの合成	134
10A-1-3 7-メチルグアノシン-5'-ホスホイミダゾリド(Impm ⁷ G)の合成	134
10A-2 ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質の合成	135
10A-2-1 AppA合成反応における反応条件の検討	135
10A-2-2 核酸塩基の検討	137
10A-2-3 リン酸基供与体の検討(N _{p_n} Xの合成)	138
10A-3 ジアデノシンポリリン酸(A _{p_n} A)の単離精製	139
10A-4 A _{p_n} Aの構造解析	140
10A-4-1 ヘビ毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)処理	140
10A-4-2 アルカリ加水分解(NaOH)処理	140
10A-5 NMR解析	141
10A-5-1 ジヌクレオシドポリリン酸(N _{p_n} N)の ¹ H NMR解析	141
10A-5-2 A _{p_n} Aの ³¹ P NMR 解析	141
10A-6 淡色効果(hypochromicity)の算出	141
10B 2',5'-オリゴヌクレオシドチオリン酸アナログの合成及び物性	141
10B-1 ヌクレオシド-5'-チオホスホイミダゾリドの合成	141
10B-1-1 イノシン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)I]の合成	141
10B-1-2 Imp(S)Iの単離精製	142
10B-1-3 アデノシン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)A]の合成	142
10B-1-4 Imp(S)Aの単離精製	142
10B-1-5 アデノシン-5'-チオホスホベンズイミダゾリド[Bzimp(S)A]及びアデノシン -5'-チオホスホベンズトリアゾリド[Bztria-p(S)A]の合成および単離精製	143
10B-1-6 Bzimp(S)Aジアステレオマー体の分割	143
10B-2 Imp(S)N加水分解半減期、及びラセミ化速度の算出	144

10B-2-1	加水分解半減期の算出	144
10B-2-2	Imp(S)Aジアステレオマーのラセミ化速度の算出	144
10B-3	オリゴチオイノシル酸の合成	145
10B-3-1	反応条件の検討	145
10B-3-2	2',5'-オリゴイノシル酸の合成	146
10B-3-3	構造決定用オリゴマーの合成及び単離精製	147
10B-4	オリゴチオイノシル酸の ¹ H NMR解析	148
10B-5	オリゴチオイノシル酸の淡色効果	148
10B-6	2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成	148
10B-6-1	反応条件の検討	148
10B-6-2	Xp(S)Aの縮重合反応	149
10B-6-3	構造決定用オリゴマーの合成	149
10B-7	2',5'-オリゴチオアデニル酸の単離精製	149
10B-7-1	イオン交換クロマトグラフィー	149
10B-7-2	HPLC分取	150
10B-8	2',5'-オリゴチオアデニル酸のCD測定	151
10B-8-1	淡色効果の測定	151
10B-8-2	CD測定	151
10B-8-3	スタッキングエネルギーの算出	154
10B-9	オリゴマーの酵素分解アッセイ	155
10B-10	2',5'-オリゴチオアデニル酸の ¹ H NMR及び ³¹ P NMR 解析	156
10B-11	2',5'-オリゴチオアデニル酸の5'-末端の修飾	157
10B-11-1	5'-末端の二りん酸化反応	157
10B-11-2	5'-末端の脱チオリん酸化反応	159
10B-12	2',5'-オリゴチオアデニル酸の生物活性	160
10B-12-1	ラジオバインディングアッセイ	160
10B-12-2	細胞内蛋白質合成阻害アッセイ	164

謝辞	167
参考文献	168
関連および参考論文	176

第1章 ピロリン酸結合を含む核酸関連生理活性物質とその合成

1-1 はじめに

1869年、F.Miescherにより膿汁中の白血球から発見された核酸は、その後の研究の進展によって、生体の遺伝情報の保持並びに発現を担う高分子物質であることが確立されていった。核酸を構成するモノマーとなるヌクレオチドは、プリン(アデニン及びグアニン)環、またはピリミジン(シトシン、チミン、及びウラシル)環からなる核酸塩基、糖部(RNAはリボース、DNAはデオキシリボース)及びリン酸基から構成されている(Fig.1)。生体内において、核酸(DNA及びRNA)はその合成酵素であるDNAポリメラーゼあるいはRNAポリメラーゼによって、ヌクレオシド三リン酸(dNTPあるいはNTP)から複製または転写などの過程を経由して合成される。

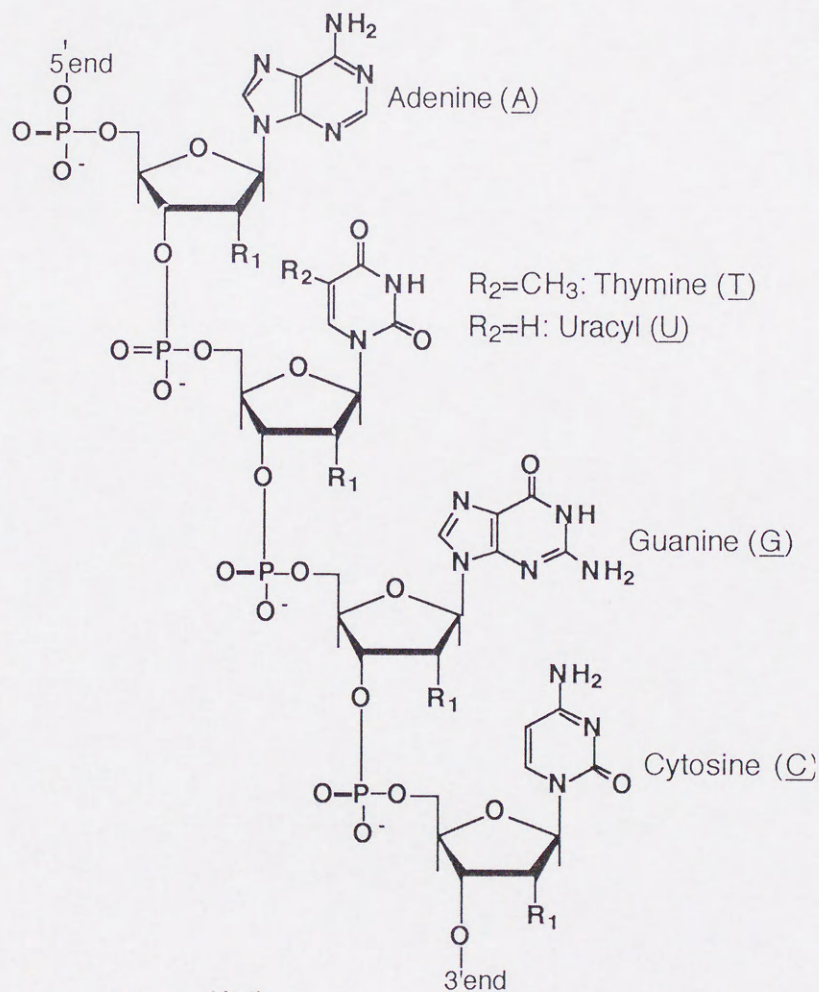


Fig.1 核酸
(DNA: R₁=H; R₂=CH₃, RNA: R₁=OH; R₂=H)

1-2 核酸と金属イオンとの相互作用

核酸はその構造上、主に三箇所金属イオンと配位可能である。即ち、核酸塩基の環窒素及び環外ケト基、糖部の水酸基、及びりん酸基の酸素がこれに該当する。

金属イオンの種類及びその特性に応じて核酸の配位部位は異なり、結果として様々な核酸-金属イオン錯体の形成が可能である。核酸構成成分に配位する金属イオンの種類及びその配位箇所を示した¹⁾ (Table 1)。りん酸基は、主としてハードな金属イオンであるアルカリ金属イオンまたはアルカリ土類金属イオンと結合する。核酸塩基部は Ag^+ , Hg^{2+} イオン等のソフトな金属イオンと優先的に配位する。中間的な固さを有する遷移金属イオンはりん酸基及び核酸塩基の両方に配位することが認められている。また、ウラニルイオンはりん酸基及び糖水酸基に配位するとされている。

核酸による遺伝情報の保持発現機構、及びヌクレオチドが関与する代謝機構においては、特定の金属イオンの存在が重要であり、金属イオンと核酸-ヌクレオチドの配位結合形成によってこれらの機構は制御される。

Table 1 Metal Ion Coordination Sites with the Phosphate, Base and Ribose Moieties of Nucleotides and Nucleic Acids¹⁾

Site	Metal Ions
Phosphate	Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}
Phosphate and ribose	UO_2^{2+}
Phosphate and base*	Co^{2+} Ni^{2+} < Mn^{2+} < Zn^{2+} < Cd^{2+} < Pd^{2+} < Cu^{2+}
Base	Ag^+ , Hg^{2+}

*Increasing Affinity for base relative phosphate

¹⁾ Reed, M. et al., (1971) Chem. Rev., 71.

1-3 ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質

各種代謝におけるエネルギー源であり、かつ核酸合成の基質となるアデノシン三リン酸(ATP)、補酵素の一種であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド²⁾(NAD)、DNA合成の際にプロモーターとして機能するジアデノシン四リン酸³⁾(AppppA)、脂質の生合成中間体であるシチジンコリン二リン酸²⁾(CDP-choline)、更にメッセンジャーRNA(mRNA)のキャップ部位⁴⁾など、ヌクレオチド・核酸に関連した生理活性物質の多くは、生体内においていずれも重要な役割を果たしている(Fig.2)。これらの化合物は構造内に高エネルギーりん酸結合からなるピロリン酸結合を有している。これらは、 Mg^{2+} または Mn^{2+} イオンを補因子とする酵素の触媒作用によって、ヌクレオチド三リン酸ともう一方のりん酸基供与体成分から、ヌクレオチド基転移反応及びりん酸基転移反応を経て生合成される⁵⁾(Table 2)。

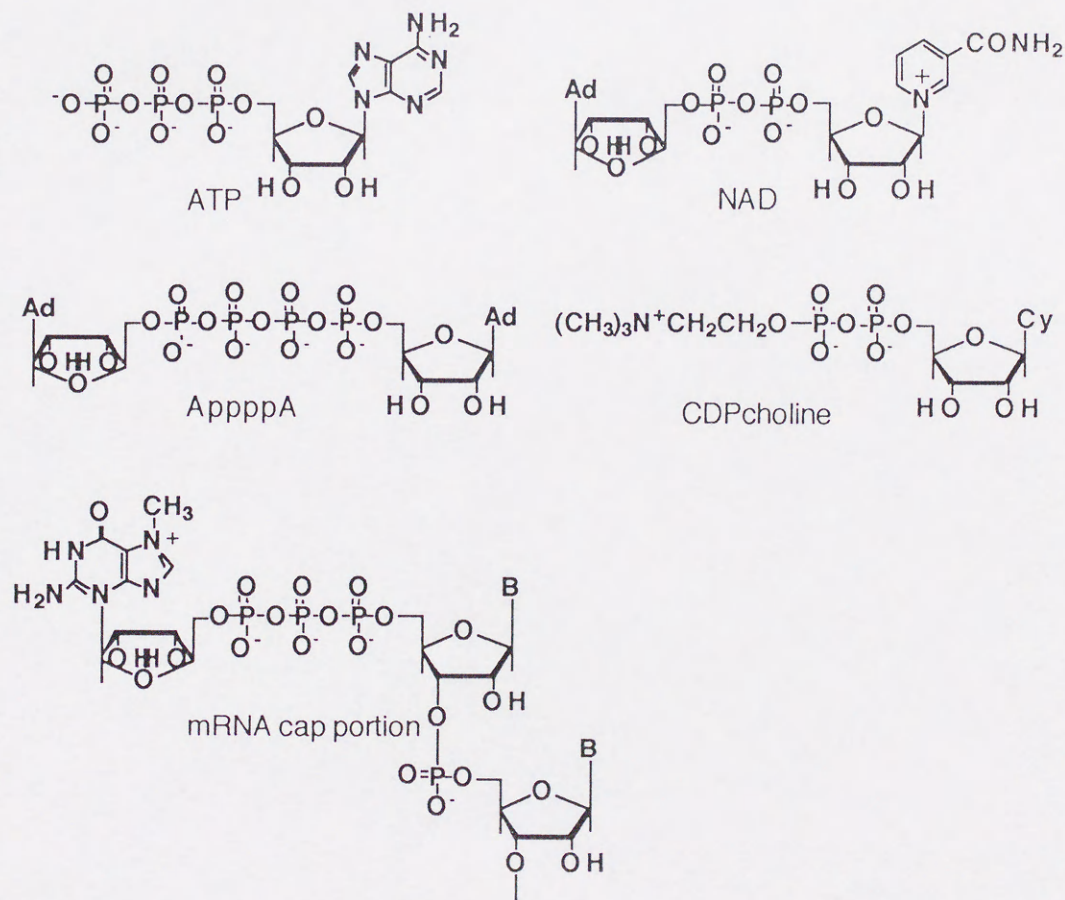


Fig. 2 ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質

Table 2 Enzymatic phosphoryl and nucleotidyl transfer reactions

Substrates	Products	Enzyme
ADP + pi	ATP + H ₂ O	ATPase (ATP synthetase)
ATP + NMN ⁺	NAD⁺ + ppi	ATP: NMN ⁺ adenylyltransferase
CTP + cholinephosphate	CTPcholine + ppi	CTP: cholinephosphate cytidylyltransferase
2ATP	AppppA + ppi	ATP: ATP adenylyltransferase
GTP + ppN-	GpppN- (mRNA cap portion)	GTP: mRNA guanylyltransferase

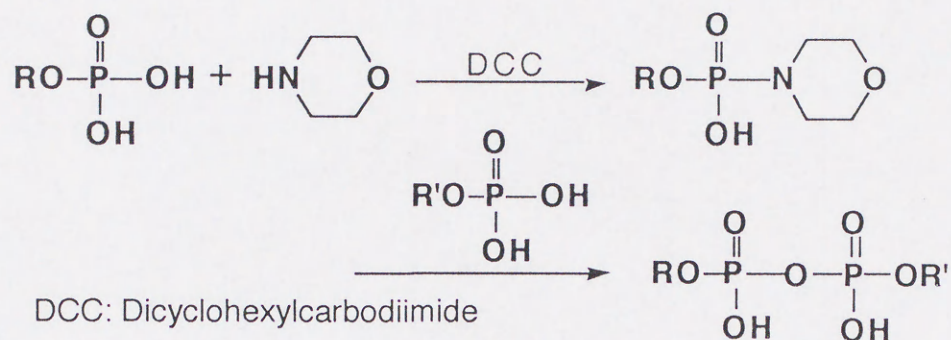
pi: inorganic phosphate; ppi: inorganic pyrophosphate; NMN: nicotiamide ribonucleotide.

1-4 ピロリン酸結合を有する生理活性物質の化学的合成

これらの有用な対称型及び非対称型ピロリン酸エステルの合成に関して、これまでに様々な化学合成的手法が開発されてきた⁶⁻⁸⁾。その代表的な例としてKhoranaらによるホスホホルリデート法⁶⁾、及びMichelsonらのジフェニルホスホクロリデート法⁷⁾があげられる。これらの合成法では、一方の化合物のりん酸基をモルホリデートあるいはジフェニルホスフェートによって活性化した後、もう一方のりん酸基供与体成分と縮合させることによってピロリン酸エステルを得る(Fig.3)。

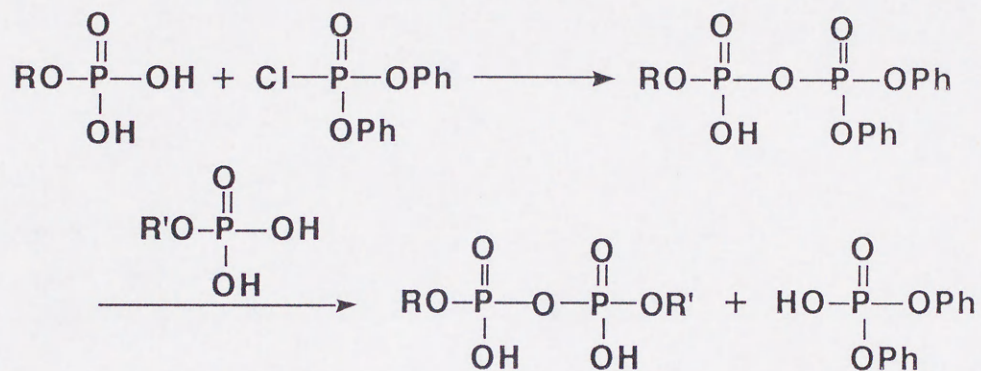
しかしながら、これらの方法を含む大部分の化学合成法は脱水縮合反応に基づいて行われているため、反応に無水ピリジンなどの厳密な無水溶媒が必要である。また原料の可溶化にその対イオンとして、トリ-n-オクチルアミンなどの三級アミンを使用しなければならない。更に目的とする反応を行うために、原料であるヌクレオチドの核酸塩基及び糖部の水酸基を保護することがしばしば要求される。従って、その合成過程は一般的に複雑なステップを伴うことが多い。

a. ホスホホルホリデート法

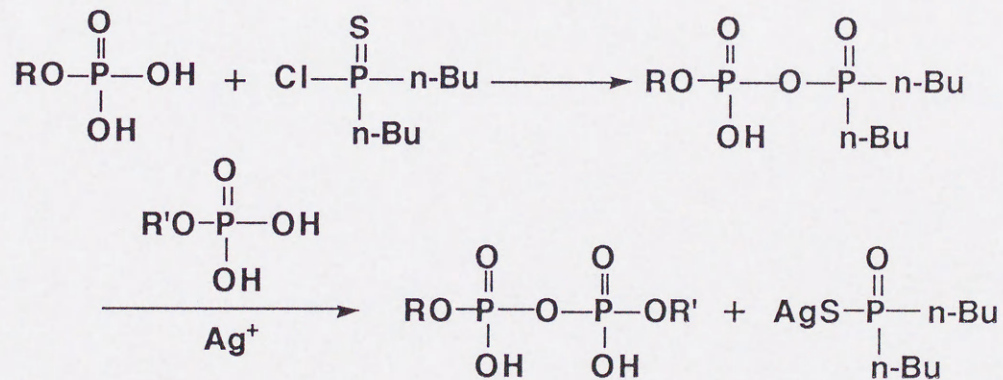


b. ジフェニルホスホクロリデート法

b-1. ジフェニルホスホクロリデート法



b-2. 臭化ジブチルホスフィノチオイル法



(R=nucleoside, R'=H, P(O)(OH)₂, nucleoside)

Fig. 3 ヌクレオシドピロリン酸エステルの化学合成法

1-5 金属イオン触媒を用いたピロリン酸結合含有化合物の合成

生体内におけるピロリン酸結合形成反応、及び核酸合成反応の大部分は金属イオン含有酵素によって触媒されており、酵素中の金属イオンが反応の進行に関与している⁵⁾。例えば、核酸合成酵素はその多くが含亜鉛酵素である^{9,10)}。沢井らはDNAポリメラーゼに含まれる Zn^{2+} イオンの役割に注目して(Fig.4)、核酸合成酵素をモデル化したオリゴヌクレオチド合成反応を検討した。即ち、酵素的なヌクレオチド基転移反応の中間体モデルと

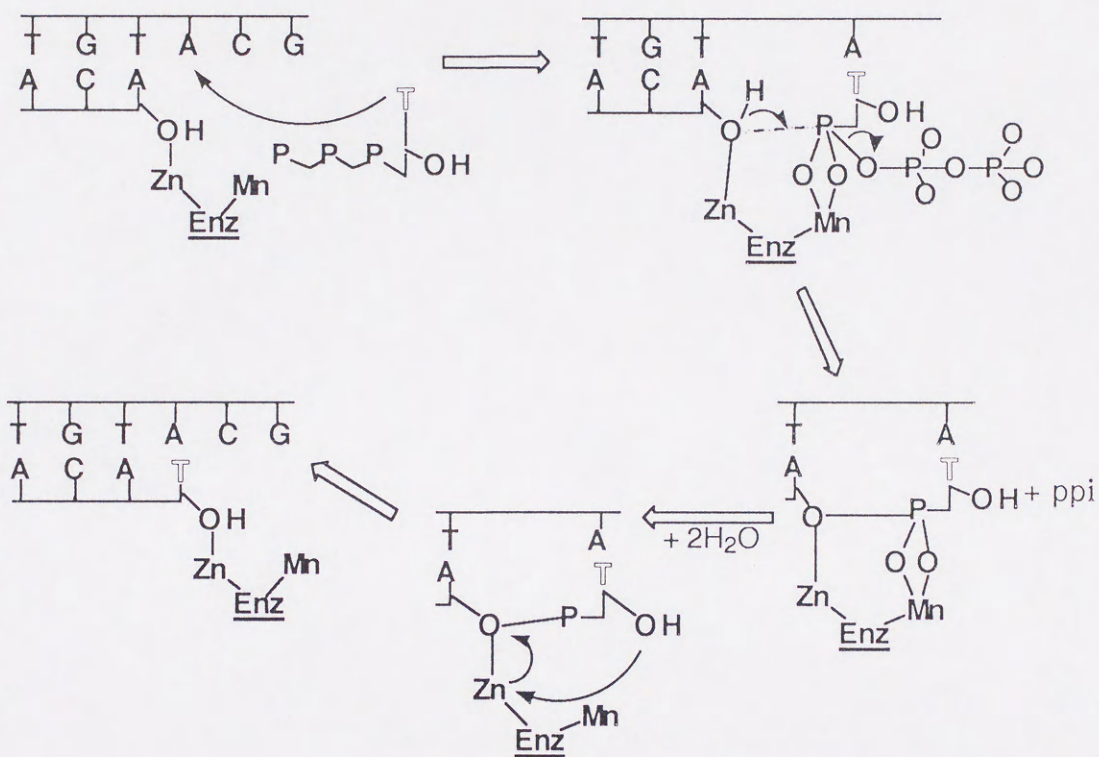


Fig. 4 核酸合成反応の推定機構¹⁰⁾

考えられている、活性型のホスホイミダゾリド結合¹¹⁾を有するアデノシン-5'-ホスホイミダゾリド(ImpA)を中性水溶液中、 Zn^{2+} , Pb^{2+} またはウラニル(UO_2^{2+})イオンを触媒として反応させた結果、縮重合反応が進行して主に2',5'-ヌクレオチド間結合を有するオリゴアデニル酸が生成することを見出した^{12,13)} (Fig.5)。この反応系では、ImpAが金属イオンに配位することによってImpAのリボース環の2'-または3'-水酸基が活性化され、配位圈内において隣接したホスホイミダゾリドと反応してヌクレオチド間結合形成を生じることが示唆されている。金属イオンの水酸基への配位とそれに引き続く活性化は、 Zn^{2+} , Pb^{2+} イオン

触媒によるImpAとグリコール酸とのりん酸ジエステル結合形成反応においても報告されており、反応は金属イオンとグリコール酸の五員環配置による錯体形成を経由することが推定されている¹⁴⁾ (Fig.6)。これらの反応はいずれも金属イオン-ヌクレオチド錯体の

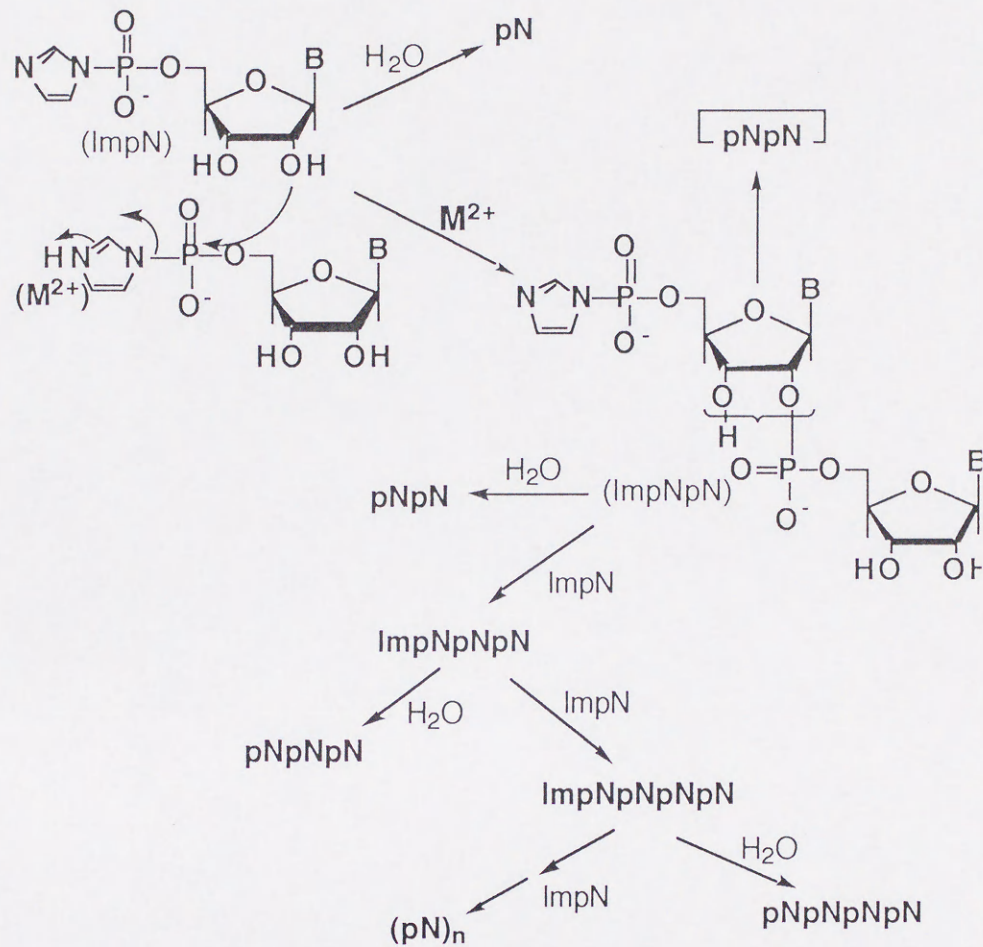


Fig. 5 オリゴヌクレオチド合成反応スキーム

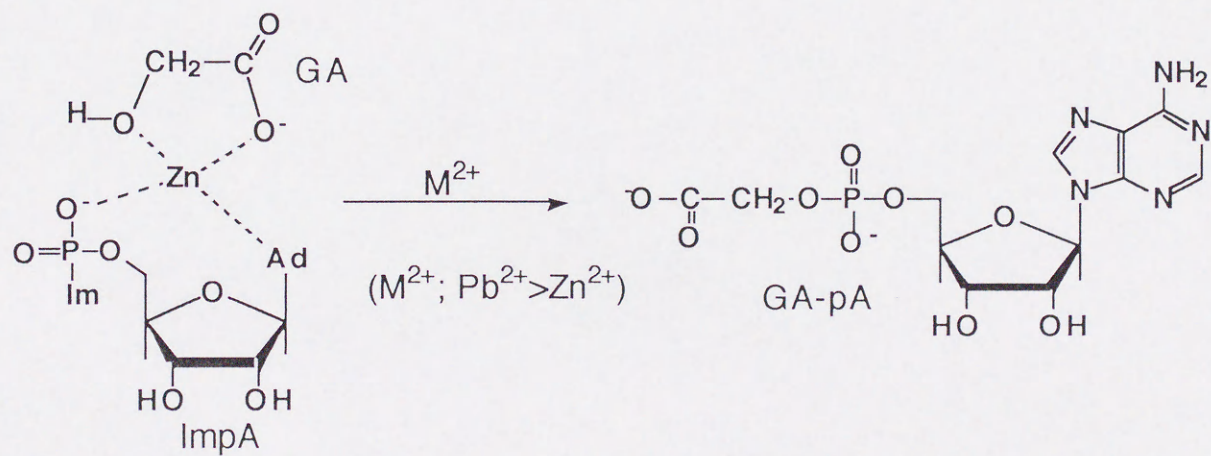


Fig. 6 GA-pAの生成反応スキーム

形成を伴って進行する。ヌクレオチドの配位箇所は金属イオンの種類によって異なる¹⁾。従ってこの様な反応系においては、触媒となる金属イオンを選択することによって、基質の反応部位を制御できると思われる。即ち、金属イオンの特性を巧妙に利用することで、反応基質間において互いのりん酸基を結合するピロりん酸結合形成反応へ誘導することが可能であると考えられる(Fig.7)。

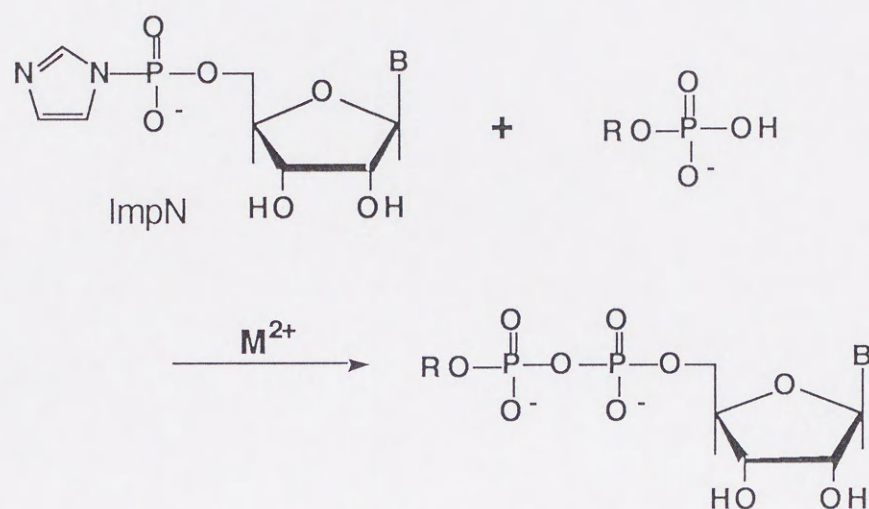


Fig. 7 2価金属イオンを触媒とするピロりん酸結合形成反応

Orgelらは水溶液中、Mg²⁺イオンの存在においてImpAとオリゴヌクレオチドからピロりん酸-キャップ構造中間体が合成されることを報告している¹⁵⁾。また、酵素的なピロりん酸結合形成反応では、Mg²⁺, Mn²⁺イオンが酵素補因子として必要不可欠である⁵⁾。そこで酵素的なモデル反応として、ImpN及びヌクレオチドなどのりん酸化合物を基質に用い、二価金属イオンを触媒とする水溶液中でのピロりん酸結合形成反応を次の二点を研究目標として検討することにした。

- 1) 反応の選択性及び効率に関する二価金属イオン及び基質の種類の影響。
- 2) 本反応系における二価金属イオン機能の解明、並びに酵素反応における補因子機能との関連性。

第2章 二価金属イオンを触媒とする酵素モデル的なピロリン酸結合形成反応

2-1 ヌクレオシド-5'-ホスホイミダゾリド(ImpN)の合成

活性化ヌクレオチドであるImpN (N=A,C,G,I,U) は対応するヌクレオシド-5'-モノリン酸(pN)とイミダゾールを脱水縮合することによって合成した¹⁶⁾(Fig.8)。これには、酸化還元反応を伴う縮合剤であるトリフェニルホスフィン(PPh₃)及び2,2'-ジピリジルジスルフィド(PySSPy)を用いた。7-メチルグアノシン-5'-ホスホイミダゾリド(Impm⁷G)の合成は始めにグアノシン-5'-一りん酸(pG)のグアニン環をdry-DMF中、ヨウ化メチルを用いてメチル化¹⁷⁾、生成した7-メチルグアノシン-5'-一りん酸(pm⁷G)をアニオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて単離生成後、ImpNと同一の方法を用いてイミダゾリド化した(実験の部参照)。

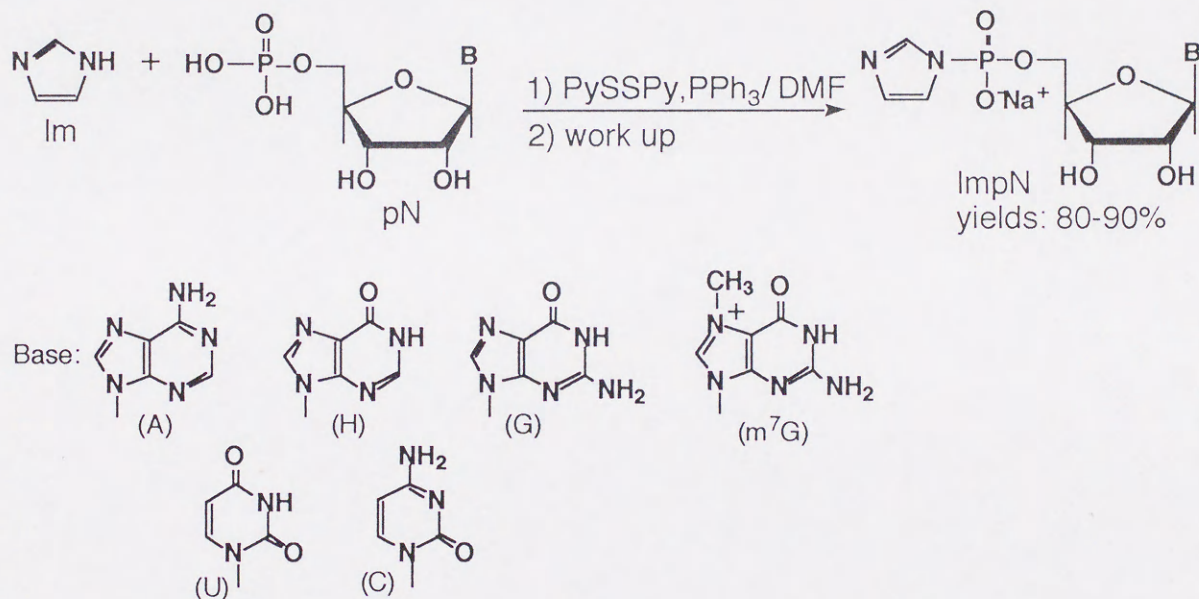


Fig. 8 Preparation of ImpN from pN and Im

2-2 各種金属イオン触媒を用いたピロリン酸結合形成反応

2-2-1 反応条件の検討

(1) 金属イオンの探索

ピロリン酸結合形成反応において有効な触媒を探索するために、ImpAとpAからジアデノシン二りん酸(AppA)の生成反応を各種二価金属イオン(M²⁺)を触媒に用いて検討した。

む混合溶液中、室温8日間で行った。所定時間経過後、反応混合液はversenol溶液を加え、[ヌクレオチド-金属イオン]錯体を[versenol-金属イオン]錯体とすることで反応停止を行った。生成物の分析はRPC-5またはODS-シリカゲルをカラムとするHPLCを用いて、主に標品との比較に基づいて行った。その結果をTable 3及びFig. 9~12に示す。

Table 3 AppA生成反応における金属イオンの触媒活性

Metal salt system	HPLC yield (%)					
	AppA		2',5'-(pA) ₂		2',5'-(pA) ₃	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
MgCl ₂	29.3	19.5	0.4	1.9		
CaCl ₂	17.8		7.2			
MnCl ₂	43.6	39.7		3.0		1.0
(FeCl ₂)	18.4		8.6		3.5	
CoCl ₂	26.2		11.0		4.8	
NiCl ₂	18.4					
CuCl ₂	4.6		3.8		4.0	
ZnCl ₂	12.8					
CdCl ₂	41.4	42.3	4.2	2.9		1.4
BaCl ₂	10.2					
Pb(NO ₃) ₂		9.5		3.0		1.2
HgCl ₂	8.4					
UO ₂ (NO ₃) ₂		9.6		10.2		9.1
none	1.6	4.4				

system-(a): ImpA(20mM) - pA(60mM) - M²⁺(20mM)
system-(b): ImpA(20mM) - pA(20mM) - M²⁺(20mM)
r.t, 8d.

AppA生成反応に関して、Mg²⁺、Mn²⁺及びCd²⁺イオンが高い活性を示すことが見出された。

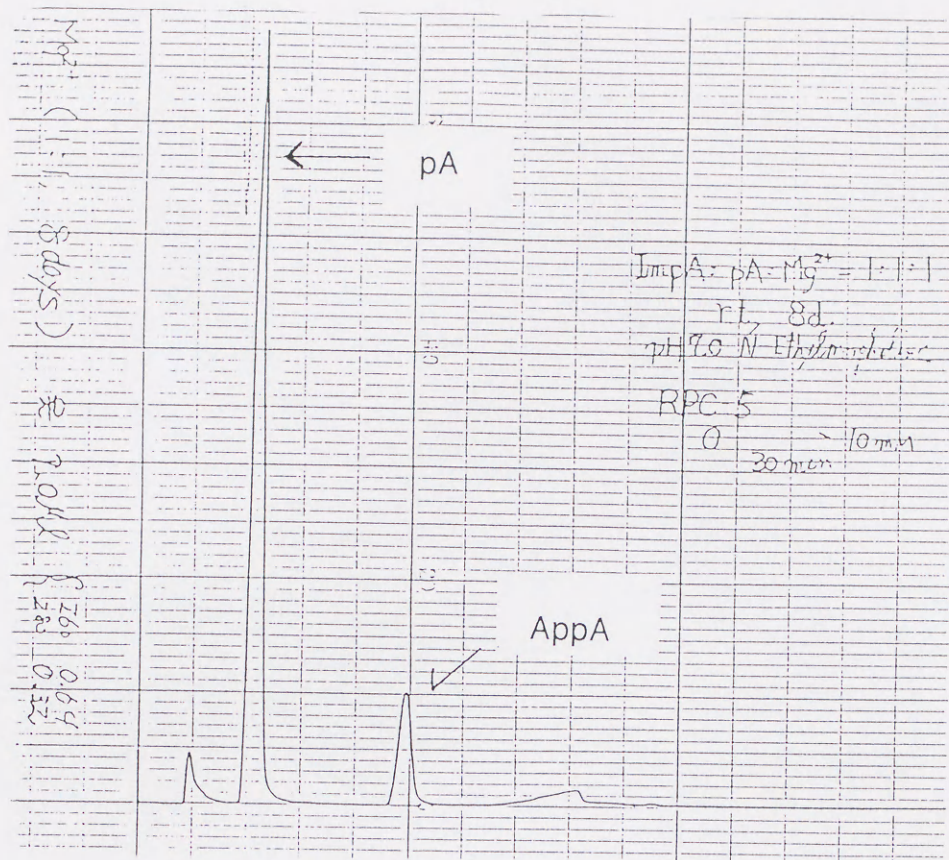


Fig. 9 AppAの合成—Mg²⁺イオン触媒, [ImpA]:[pA]:[Mg²⁺]=1:1:1, r.t., 8d.

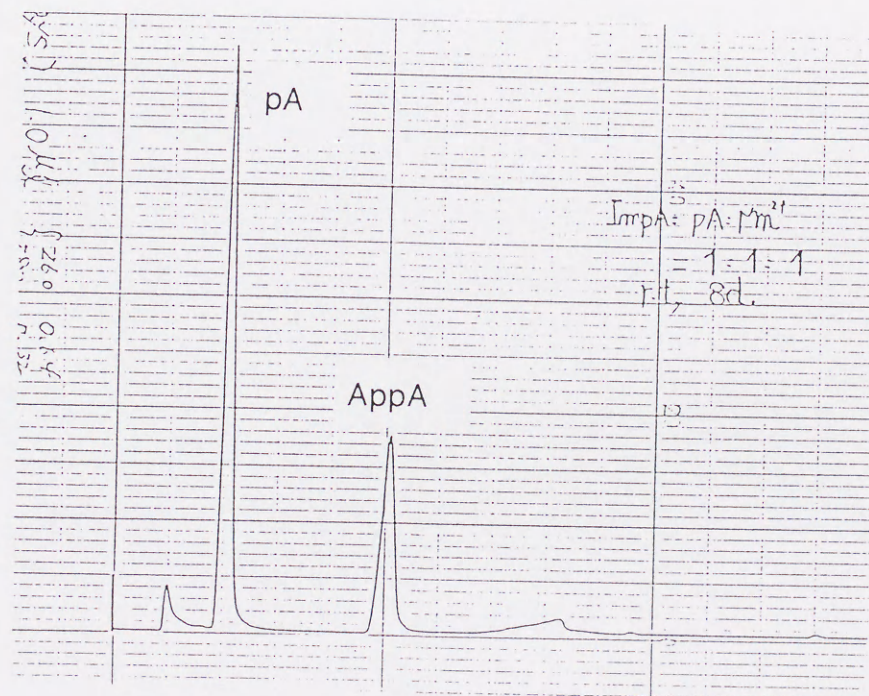


Fig. 10 AppAの合成—Mn²⁺イオン触媒, [ImpA]:[pA]:[Mn²⁺]=1:1:1, r.t., 8d.

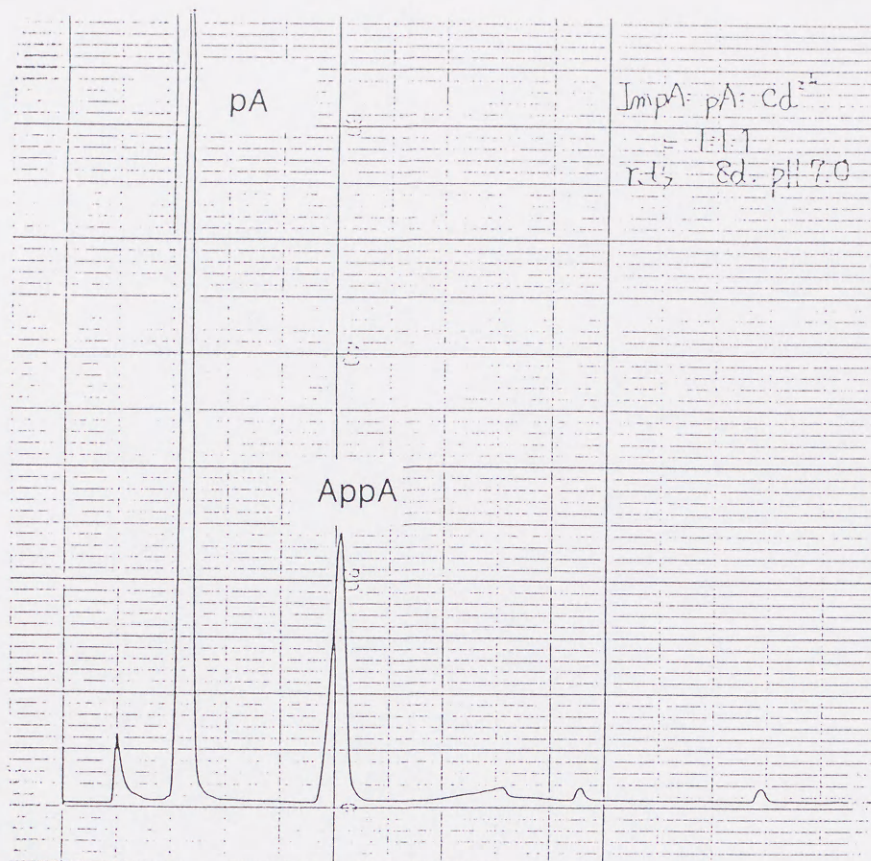


Fig. 11 AppAの合成—Cd²⁺イオン触媒, [ImpA]:[pA]:[Mn²⁺]=1:1:1, r.t., 8d

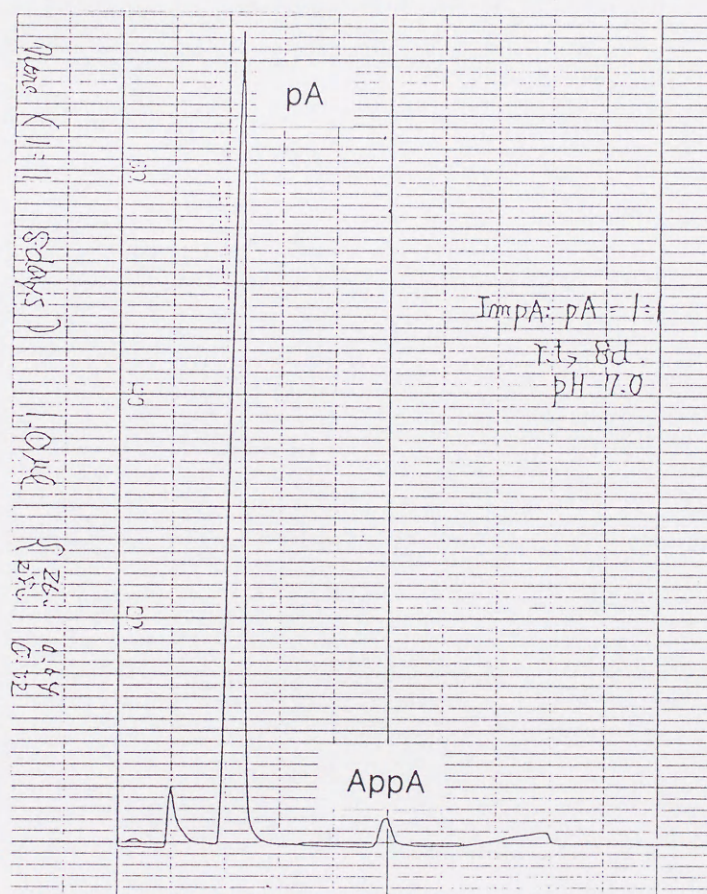


Fig. 12 AppAの合成—コントロール, [ImpA]:[pA]=1:1, r.t., 8d

(2) 反応時間及び反応温度の影響

これらの反応において活性の高い上位3種類の金属イオン(Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+})を用い、室温での反応進行を追跡した。その結果をTable 4に示す。

Table 4 反応時間の検討

Metal ion	HPLC yield (%)							
	1d.		2d.		4d.		8d.	
	AppA	ImpA	AppA	ImpA	AppA	ImpA	AppA	ImpA
Mg^{2+}	17.6	8.6	20.2	1.4	19.5	1.0	20.2	-
Mn^{2+}	37.9	4.6	42.8	4.2	44.4	0.8	39.7	-
Cd^{2+}	26.4	6.4	32.8	8.0	42.3	2.8	37.4	-
none	5.1	19.6	5.9	10.0	6.8	3.6	4.7	-

[ImpA]=20mM, [ImpA] : [pA] : [M^{2+}]=1:1:1, at 25 °C.

結果としていずれの金属イオン存在中においても、反応は室温4日間で原料ImpAがほぼ消失し終了することがわかった。本反応系ではAppA生成反応とImpA加水分解反応が競争すると考えられる。そこで、ImpAの加水分解を抑制する試みとして4°Cで、また、反応時間を短縮する目的として50°Cでの反応を行った。結果をTable 5に示す。

Table 5 反応温度の影響

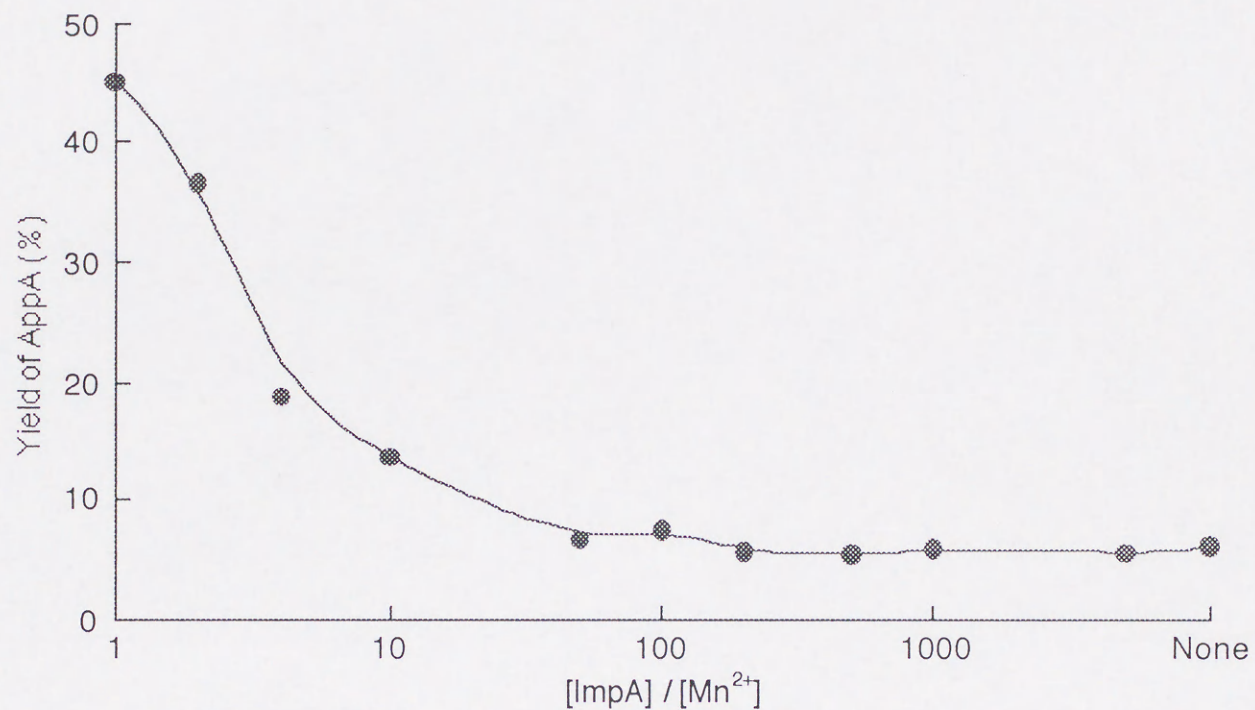
temp.(°C)	HPLC yield of AppA(%)									
	4		25		50		50		50	
	4d	10d	4d	8d	2hr	4hr	8hr	1d	2d	
Mn^{2+}	35.0	42.9	45.0	45.7	35.9	40.8	41.6	35.0	33.9	

[ImpA]=20mM, [ImpA] : [pA] : [M^{2+}]=1:1:1

この結果から、AppAの収率は温度に対して特別に依存しないことが確認された。一方、50°Cでは反応時間の顕著な短縮が認められた。

(3) 金属イオン当量比の影響

ImpA及びpAの濃度を20mMに固定し、金属イオン濃度を変化させることによる影響を検討した。結果をFig.13に示す。



[ImpA]:[pA]=1:1, N-ethylmorpholine-HCl buffer(pH7.0), r.t, 4d.

Fig. 13 AppA生成反応に対するMn²⁺イオン当量比の効果

結果から、基質に対する金属イオンの当量比は反応に多大な影響を及ぼすことが分かった。金属イオンの当量比が低下すると共にAppAの収率は顕著に減少し、生成反応について金属イオンの高い当量比が要求された。

(4) 反応pHの影響

反応pHの影響について

(a) 2,6-Lutidine-HCl buffer (pH5.5~7.0)

(b) N-ethylmorpholine-HCl buffer (pH6.5~8.0)

を緩衝溶液とするAppA生成反応を検討した。AppA収率及び未反応 ImpAの残存率を求めた結果をFig.14に示す。反応はN-ethylmorpholine緩衝溶液中、pH7前後の中性条件が最も好ましく、この領域から離れるにしたがって収率は低下した。

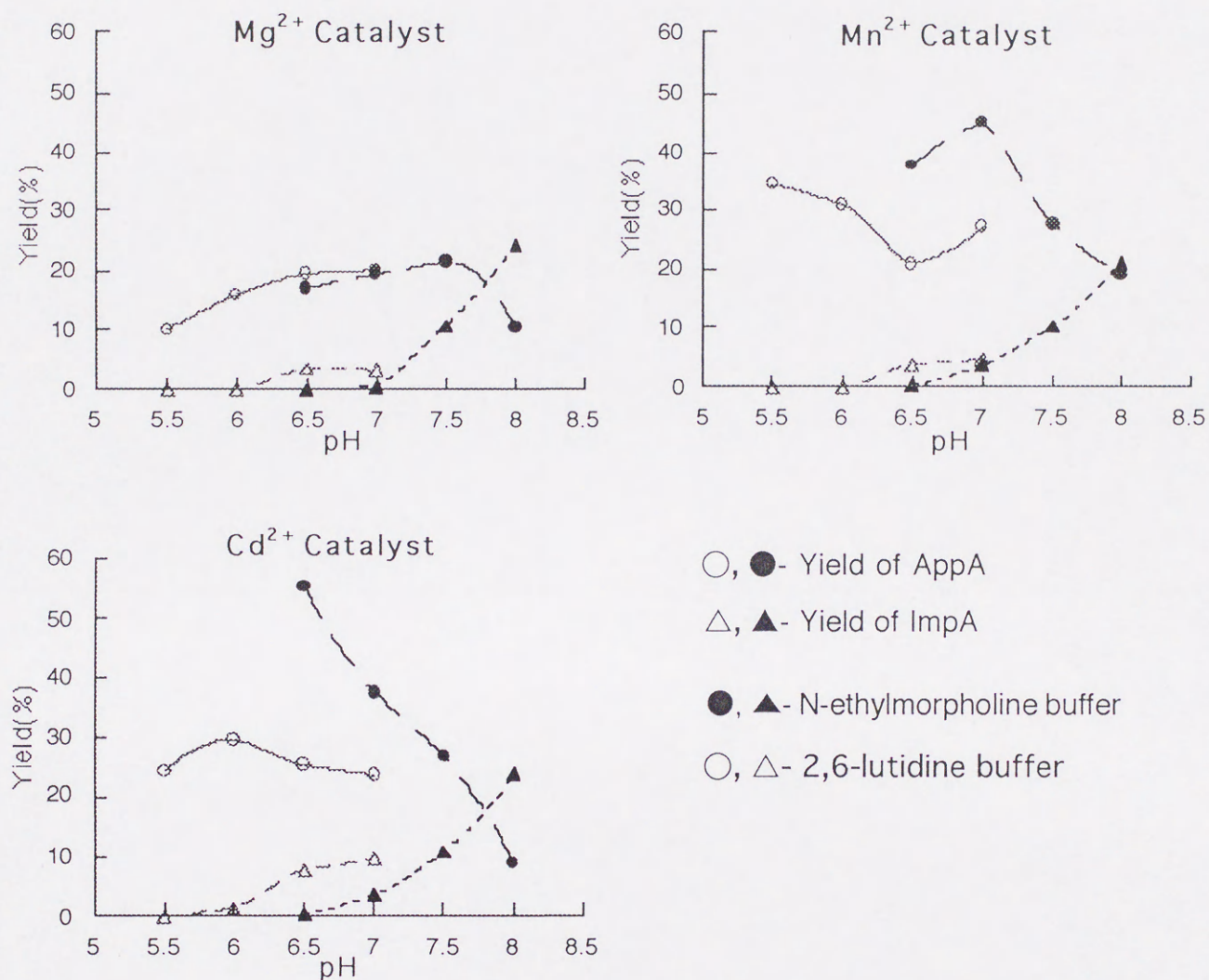


Fig. 14 反応pHの影響

2-2-2 核酸塩基の反応に及ぼす影響について

1-2章で述べたように金属イオンがヌクレオチドへ配位する際、配位部位の一つとして核酸塩基が関与する。そのため、塩基構造の相違は反応に大きな影響を及ぼすと考えられる。そこで各種の ImpN/pNを用いてNppN生成反応を検討した(N=A, C, G, I, U, m⁷G)。結果をTable6~7及びFig.15-18 (UppU合成),19-22 (GppG合成) に示す。

Table 6 NppN 合成反応における金属イオンの触媒活性(1)

Catalyst	HPLC yield (%)			
	AppA ^a	lppi ^c	CppC ^b	UppU ^b
Mg ²⁺	29.3	10.5	11.8	12.3
Ca ²⁺	17.8	7.2	5.8	
Mn ²⁺	43.6	25.8	13.2	18.1
(Fe ²⁺)	18.4	4.2	6.4	
Co ²⁺	26.2	9.9	6.8	
Ni ²⁺	18.4	4.8	4.4	
Cu ²⁺	4.6	7.2	2.2	
Zn ²⁺	12.8	12.4	4.6	
Cd ²⁺	41.4	14.1	13.8	6.5
Ba ²⁺	10.2		2.2	
Hg ²⁺	8.4	2.4	3.8	
none	1.6	2.1	1.1	2.0

[ImpN]=20mM, [ImpN] : [pN] : [M²⁺]=1:3:1, at 25°C for 8d^a or 4d^b.

[ImpN] : [pN] : [M²⁺]=1:1:1, at 25°C for 4d^c.

Table 7 NppN 合成反応における金属イオンの触媒活性(2)

Catalyst	HPLC yield (%)						
	AppA	GppG	lppi	CppC	UppU	Gppm ⁷ G	m ⁷ Gppm ⁷ G
Mg ²⁺	19.5	22.1	10.5	6.5	9.1	12.7	6.9
Mn ²⁺	39.7	39.5	25.8	16.7	11.4	35.5	14.4
Zn ²⁺		18.3	12.4				
Cd ²⁺	42.3	70.1	14.1	9.1	5.5	24.1	11.0
UO ₂ ²⁺	9.6				1.7		
none	4.4	4.3	2.1	1.7	-	1.6	3.0

[ImpN]=20mM, [ImpN] : [pN] : [M²⁺]=1:1:1, at 25°C for 4d.

*Gppm⁷G was synthesized from ImpG and m⁷G.

**m⁷Gppm⁷G was synthesized from Impm⁷G and m⁷G.

Mn²⁺イオンは核酸塩基の種類に係わらず高い活性を示した。Cd²⁺イオンは核酸塩基の種類によって触媒活性が変動し、この金属イオンは塩基とより強い相互作用を伴うことが示唆された。プリン系(N=A, G, I)とピリミジン系(N=C, U)では、前者の塩基を用いた反応系で良好な収率が得られた。

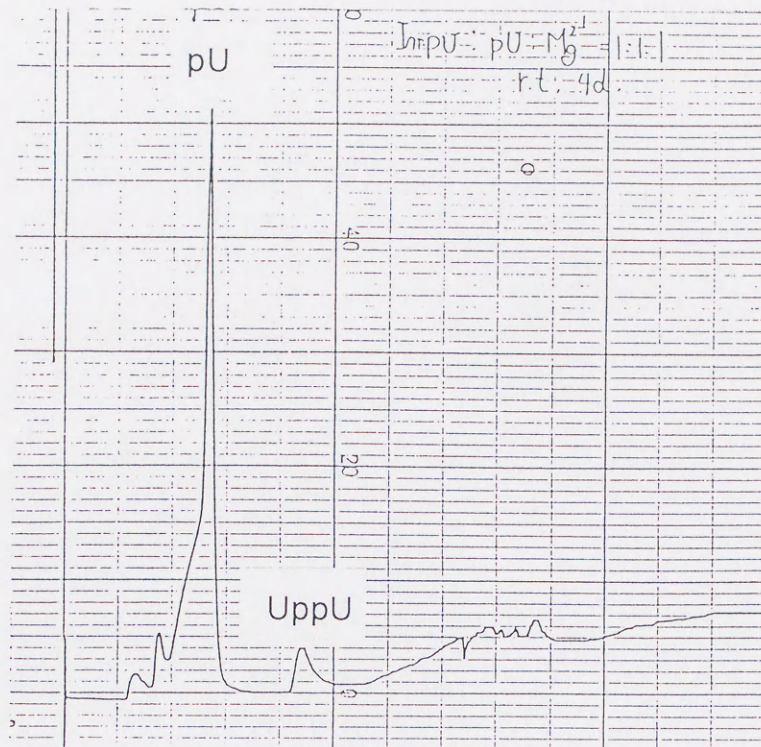


Fig. 15 UppUの合成— Mg^{2+} イオン触媒, $[ImpU]:[pU]:[Mg^{2+}]=1:1:1$, r.t., 4d

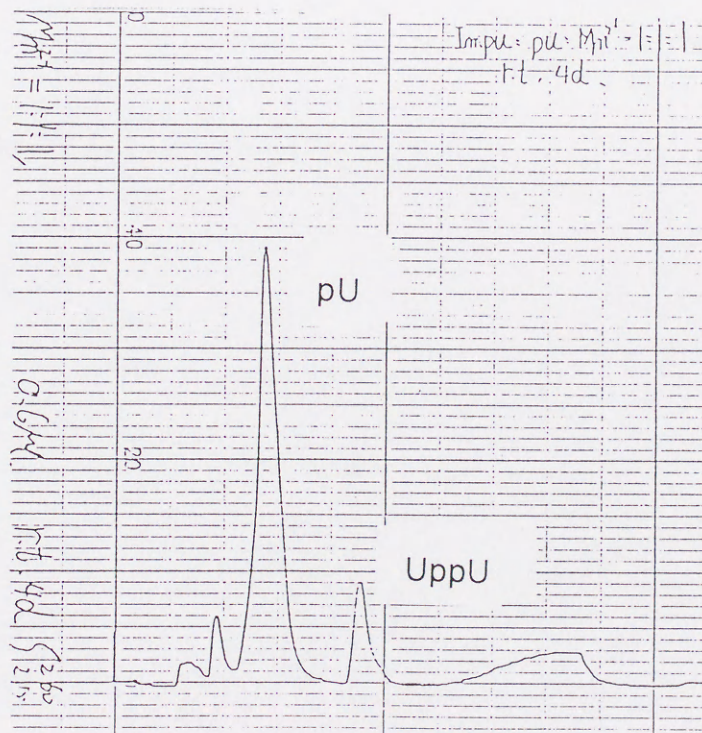


Fig. 16 UppUの合成— Mn^{2+} イオン触媒, $[ImpU]:[pU]:[Mn^{2+}]=1:1:1$, r.t., 4d

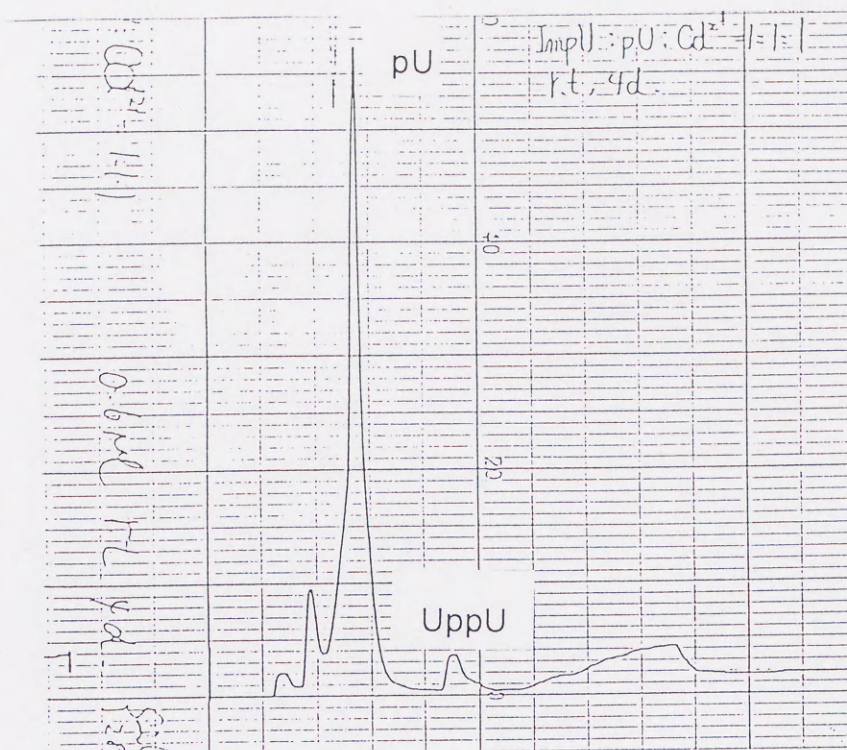


Fig. 17 UppUの合成—Cd²⁺イオン触媒, [ImpU]:[pU]:[Cd²⁺]=1:1:1, r.t., 4d

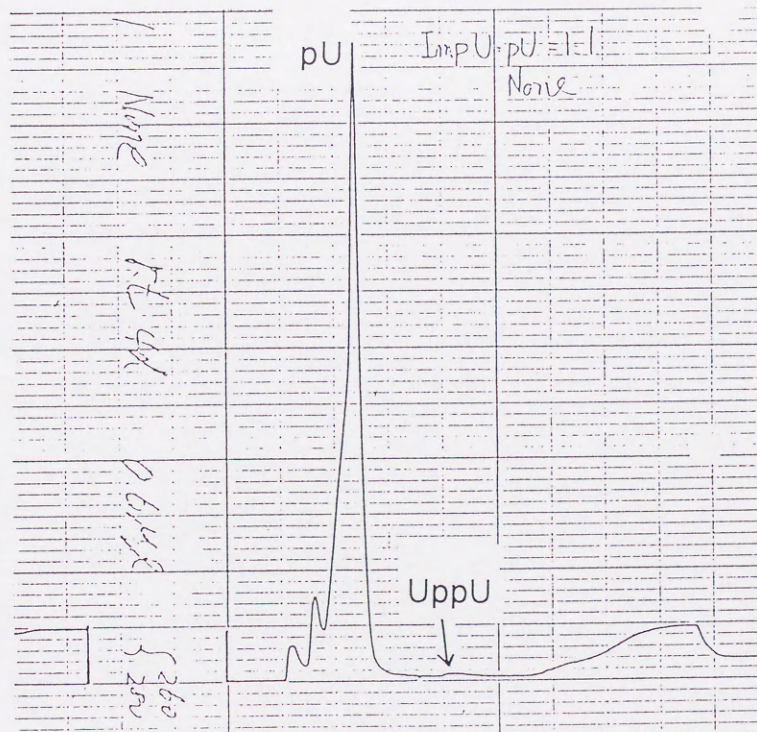


Fig. 18 UppUの合成—コントロール, [ImpU]:[pU]=1:1, r.t., 4d

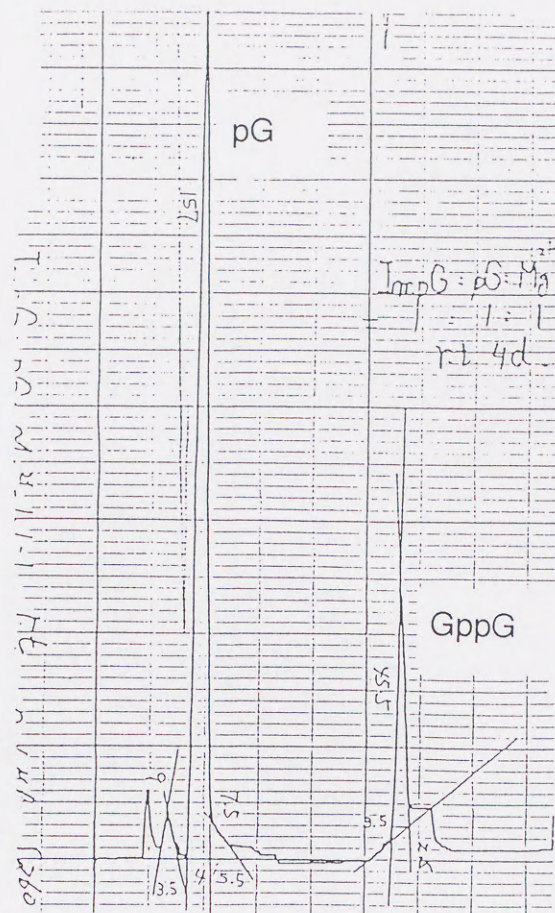


Fig. 19 GppGの合成— Mg^{2+} イオン触媒, $[ImpG]:[pG]:[Mg^{2+}] = 1:1:1$, r.t., 4d

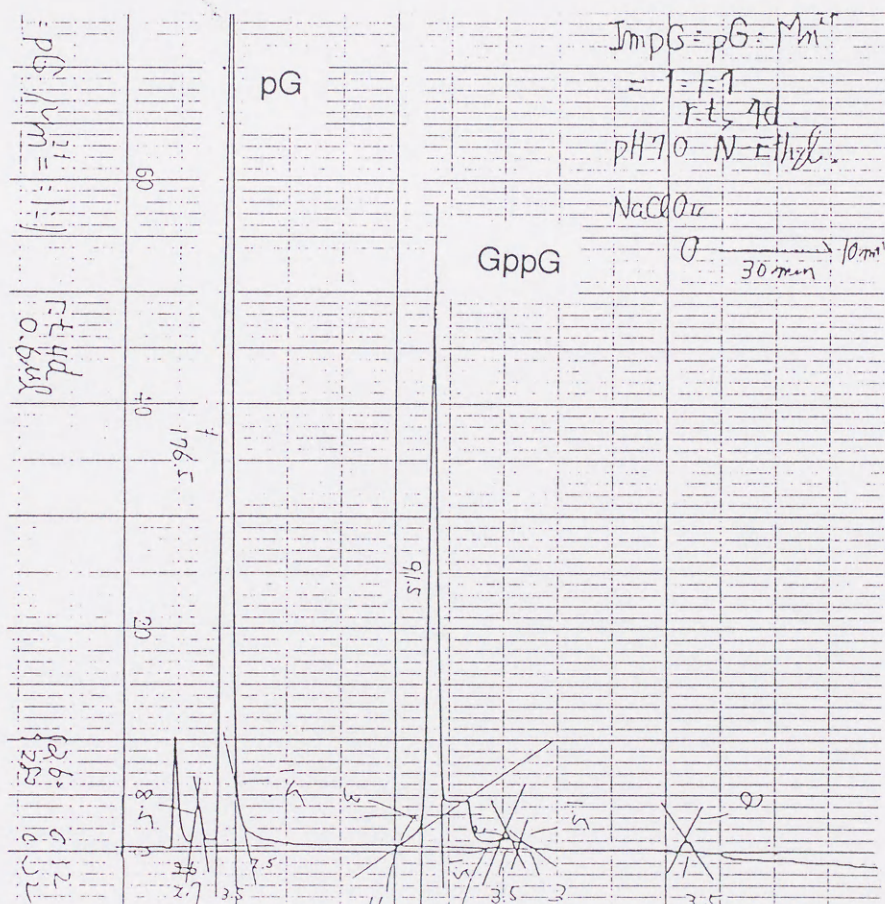


Fig. 20 GppGの合成— Mn^{2+} イオン触媒, $[ImpG]:[pG]:[Mn^{2+}] = 1:1:1$, r.t., 4d

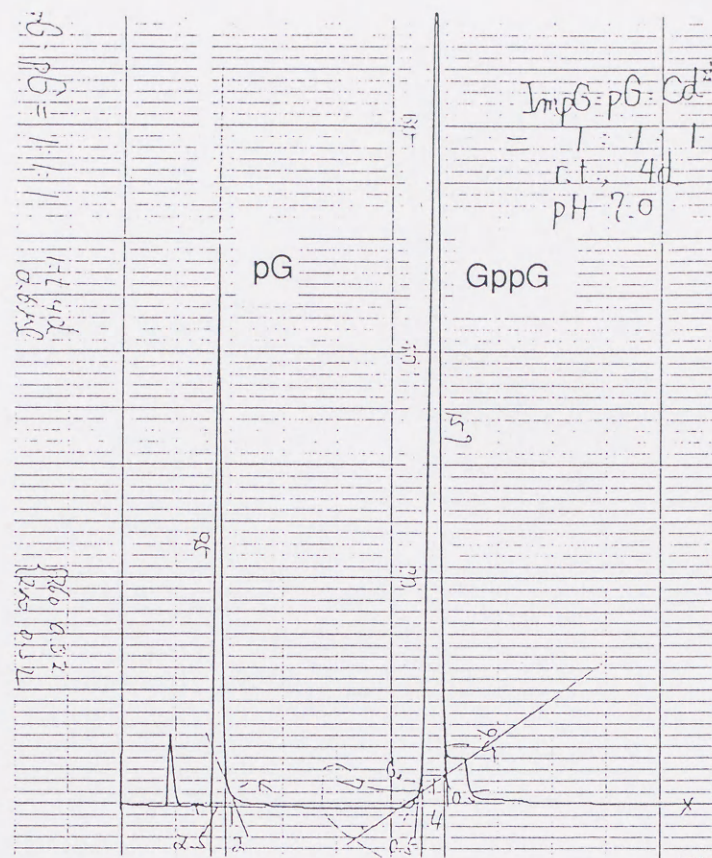


Fig. 21 GppGの合成— Cd^{2+} イオン触媒, $[\text{ImpG}]:[\text{pG}]:[\text{Cd}^{2+}]=1:1:1$, r.t., 4d

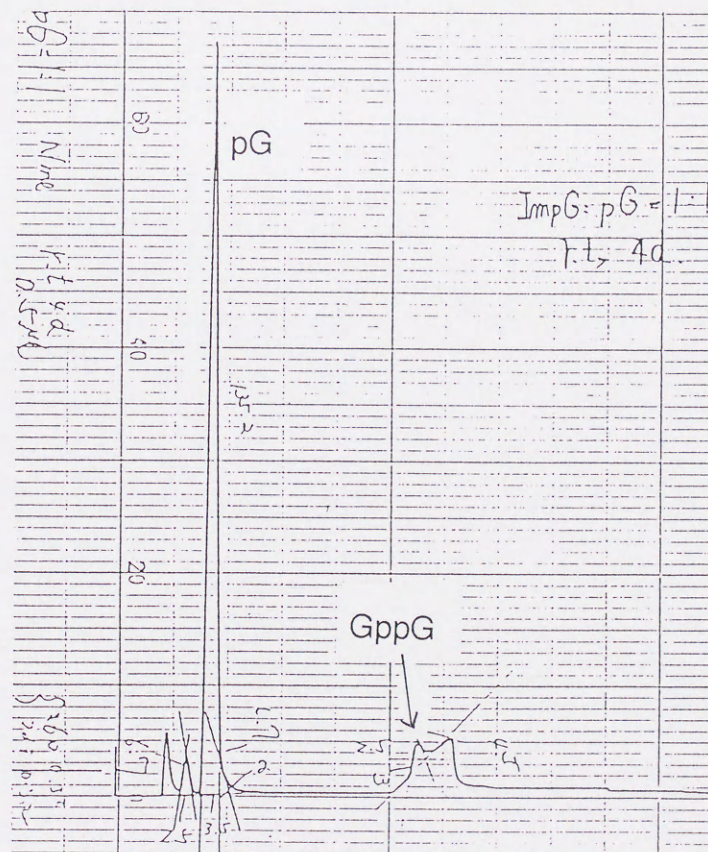


Fig. 22 GppGの合成—コントロール, $[\text{ImpG}]:[\text{pG}]=1:1$, r.t., 4d

2-2-3 リン酸基供与体の検討

これまでの反応



におけるリン酸基供与体成分 pN を以下の p_nX に換えたピロリン酸結合形成反応を検討し、生体内で生理活性機能を有する核酸関連化合物の合成を試みた。種々のリン酸基供与体成分を用いることで、リン酸基部の反応に及ぼす影響について新たな知見を得ることが期待される。

- i) ヌクレオシド-5'-二リン酸/三リン酸(NDP/NTP)
- ii) ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)
- iii) ホスホコリン(pCholine)
- iv) オルトリン酸/ピロリン酸(pi/ppi)

- i) ヌクレオシド-5'-二リン酸/三リン酸(NDP/NTP)

ジアデノシンポリリン酸($\text{A}_{\text{p}_n}\text{A}$)はキナーゼ阻害作用¹⁸⁾及びDNA合成の促進¹⁹⁾、また、ジグアノシンポリリン酸($\text{G}_{\text{p}_n}\text{G}$)は胚形成の調節作用²⁰⁾、蛋白質合成の促進²¹⁾など、多様な生理活性作用が見出されている化合物である。NppN合成と同様に、ApppA及びAppppAの合成としてImpAをADP及びATPとそれぞれ反応させた。また同じように ImpGを金属イオンの存在中においてGDP及びGTPとそれぞれ反応させ、GpppG及びGppppGの合成を検討した。ApppA及びAppppA合成の結果をTable 8に、GpppG及びGppppGの合成結果をTable 9に示す。また、AppppA合成反応のHPLC分析結果をFig.23~26に示す。

Table 8 ApppA 及び AppppA 合成反応

Catalyst	HPLC yield (%)			
	ApppA ^a	ApppA ^b	AppppA ^a	AppppA ^b
Mg ²⁺	32.0	56.0	25.6	54.8
Mn ²⁺	40.3	54.0	30.6	59.0
Cd ²⁺	35.5	59.0	39.2	63.4
none	trace	6.5	1.6	3.5

^a[ImpA]=20mM, ^a[ImpA] : [ADP or ATP] : [M²⁺] = 1:1:1

^b[ImpA] : [ADP or ATP] : [M²⁺] = 3:1:1

in N-ethylmorpholine-HCl buffer (pH7.0) at r.t. for 4d.

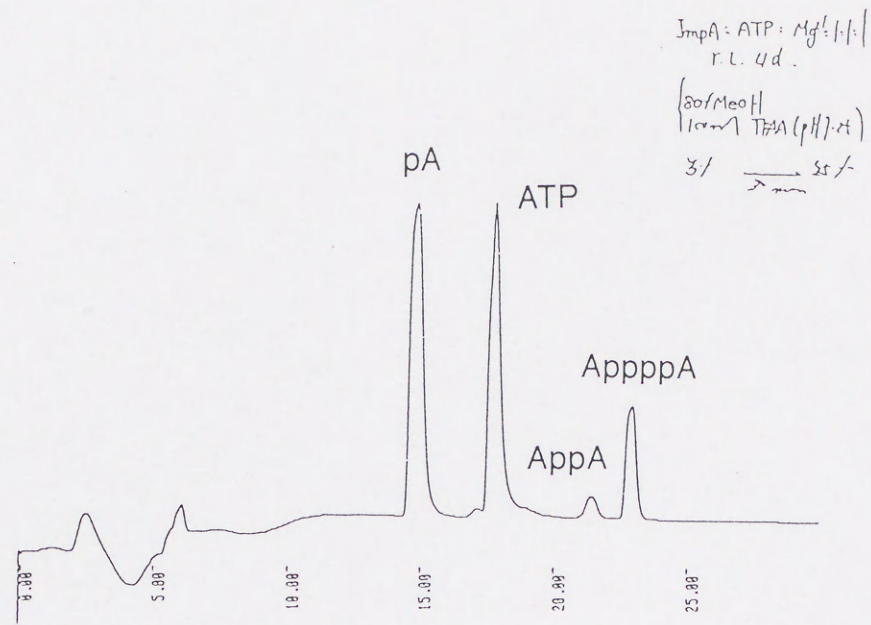


Fig. 23 AppppAの合成— Mg^{2+} イオン触媒, $[ImpA]:[ATP]:[Mg^{2+}]=1:1:1$, r.t., 4d

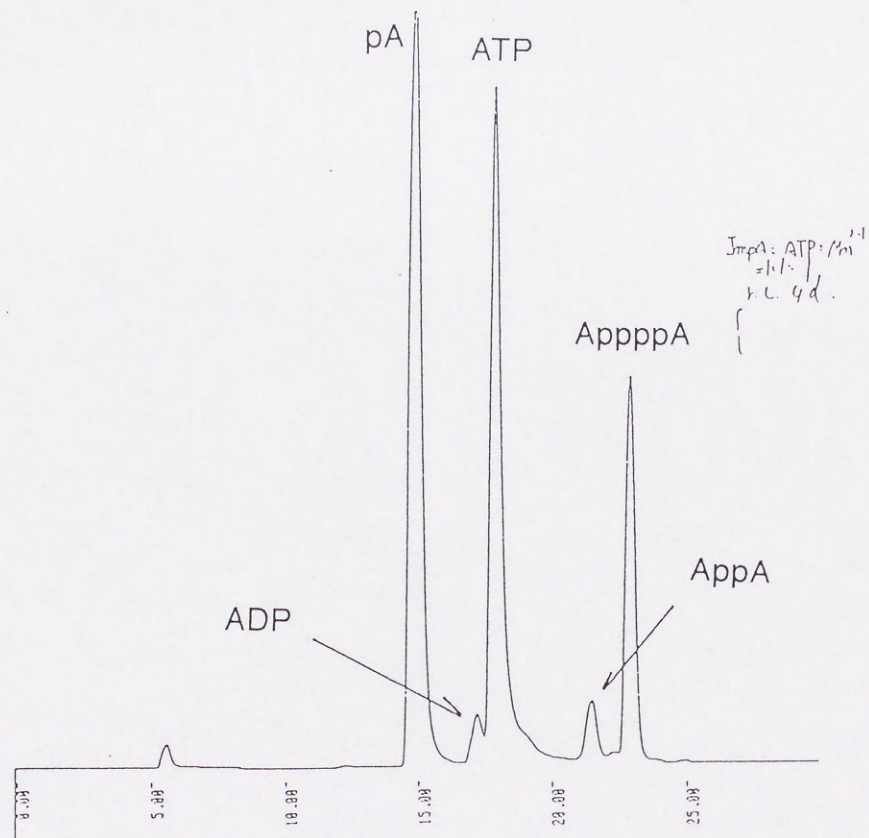


Fig. 24 AppppAの合成— Mn^{2+} イオン触媒, $[ImpA]:[ATP]:[Mn^{2+}]=1:1:1$, r.t., 4d

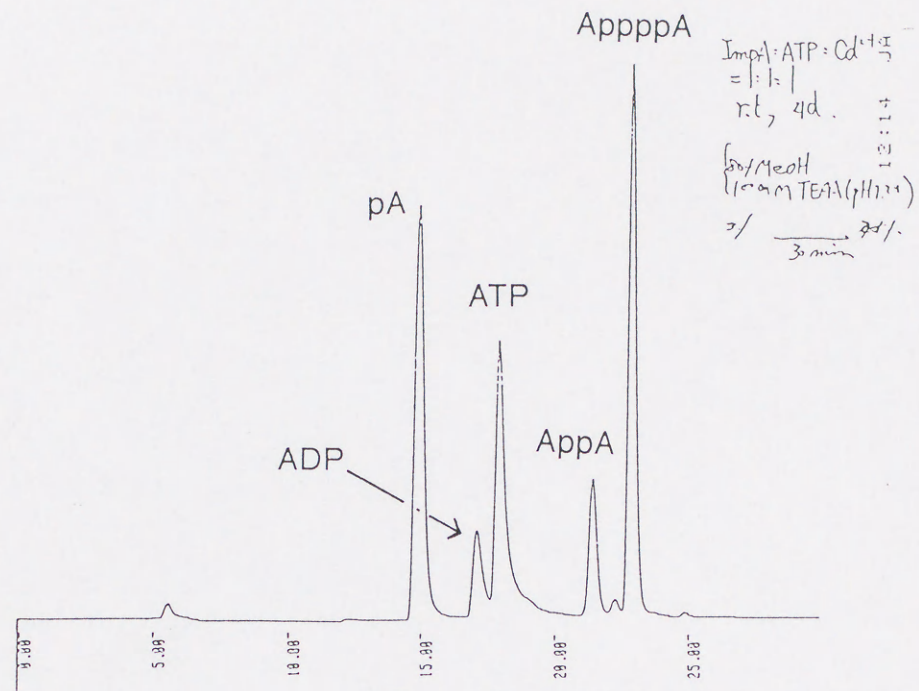


Fig. 25 AppppAの合成— Cd^{2+} イオン触媒, $[ImpA]:[ATP]:[Cd^{2+}]=1:1:1$, r.t., 4d

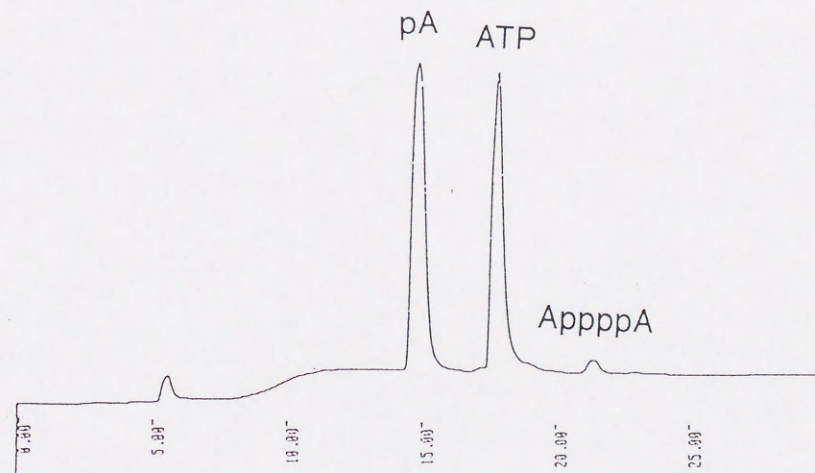


Fig. 26 AppppAの合成—コントロール, $[ImpA]:[ATP]=1:1$, r.t., 4d

Table 9 GpppG 及び GppppG 合成反応

Catalyst	HPLC yield (%)			
	GpppG ^a	GpppG ^b	GppppG ^a	GppppG ^b
Mg ²⁺	35.0	68.5	17.6	39.2
Mn ²⁺	46.1	84.4	20.1	45.4
Cd ²⁺	49.1	73.5	22.8	34.4
none	2.6	4.7	0.4	0.8

[ImpG]=20mM,^a [ImpG] : [GDP or GTP] : [M²⁺] = 1:1:1
^b [ImpG] : [GDP or GTP] : [M²⁺] = 3:1:1
in N-ethylmorpholine-HCl buffer (pH7.0) at r.t. for 4d.

いずれの反応においても副生成物として少量のNppNを得たが、Mn²⁺及びCd²⁺イオンは目的化合物を得るための有効な触媒として機能した。更にmRNAキャップ構造部位m⁷GpppNの合成として、Impm⁷G及び各種のNDPとのピロリン酸結合形成反応を検討した。その結果、NpnN生成反応と同様、Mn²⁺イオンがm⁷GpppNの生成を促進し40%前後の収率で目的物を得ることができた²²⁾。このmRNAキャップ構造部位の合成法は、保護基を必要とせずに水溶液中で簡便に行うことができるため非常に有用であると思われる。

ii) ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)

NMNから、脱水素酵素の主要な補酵素となるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の合成を試みた。結果をTable 10に示す。

Table 10 NAD 合成反応

Catalyst	HPLC yield (%)		
	system(1)	system(2)	*system(1)
Mg ²⁺	3.2	11.5	[ImpA]:[NMN]:[M ²⁺]=1:1:1
Mn ²⁺	8.6	32.4	*system(2)
Cd ²⁺	13.4	34.9	[ImpA]:[NMN]:[M ²⁺]=3:1:3
none	-	-	

in N-ethylmorpholine-HCl buffer (pH7.0) at r.t. for 4d.

NADの収率に対してMn²⁺及びCd²⁺イオンが比較的高い活性を示した。

iii) ホスホコリン(pCholi)

シチジンジホスフェートコリン(CppCholi)は脂質生合成の中間体である。関連するヌクレオシドコリンピロリン酸(NppCholi)の合成をImpNとpCholiのピロリン酸結合形成反応から検討した。結果をTable 11に示す。

Table 11 NppCholine合成反応

Catalyst	HPLC yield (%)			
	AppCholi ^a	AppCholi ^b	CppCholi ^a	CppCholi ^b
Mg ²⁺	4.4	8.4	4.0	8.0
Mn ²⁺	16.8	17.2	14.3	15.2
Cd ²⁺	4.4	6.6	3.0	4.2
none	2.0	2.9	1.8	2.9

[ImpN]=20mM, ^a[ImpN] : [pCholine] : [M²⁺] = 1:1:1

^b[ImpN] : [pCholine] : [M²⁺] = 3:1:1

in N-ethylmorpholine-HCl buffer (pH7.0) at r.t. for 8d.

Mn²⁺イオンが比較的高い活性を示したが、目的物の収率は低く15%前後に留まった。

iv) オルトリン酸/ピロリン酸(pi / ppi)

ImpAとオルトリン酸(pi)からADP合成を、またImpAとピロリン酸(ppi)からATPの合成を検討した。これらの収率をそれぞれFig.27及びFig.28に示す。また、ATP合成におけるHPLC分析プロファイルをFig.29~32に示す。結果はMg²⁺イオンがどちらの系においても比較的高い活性を示した。

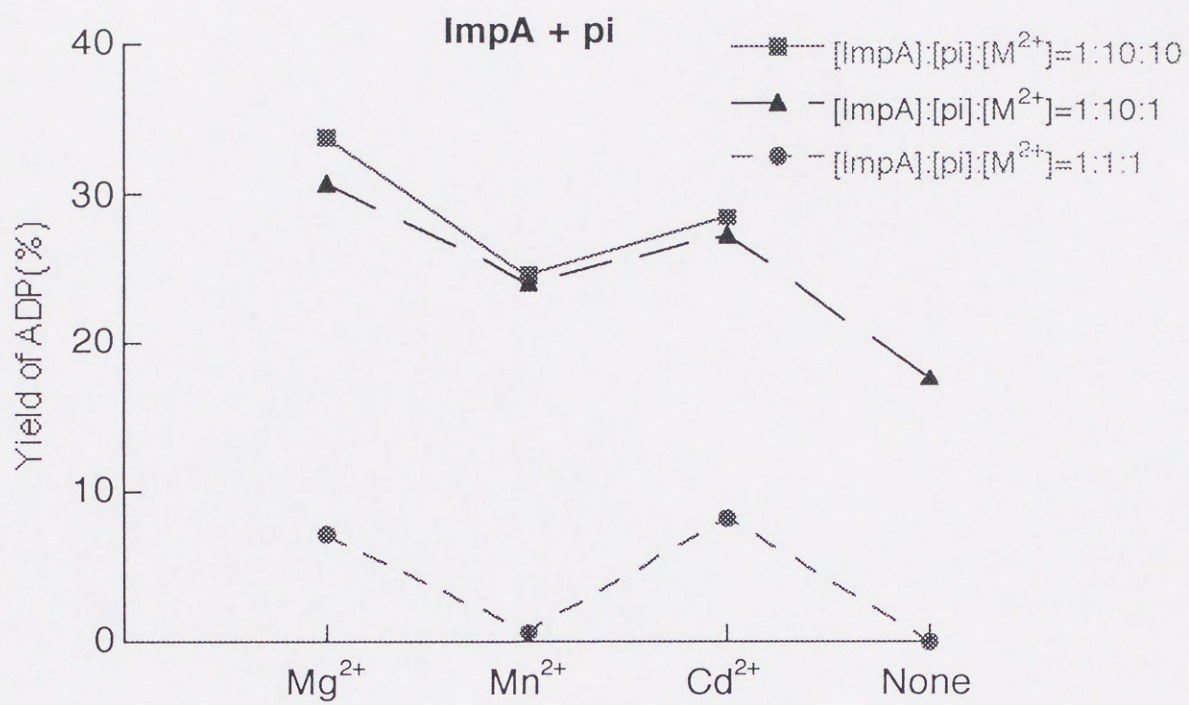


Fig. 27 ADP合成反応 (r.t, 4d, pH7.0)

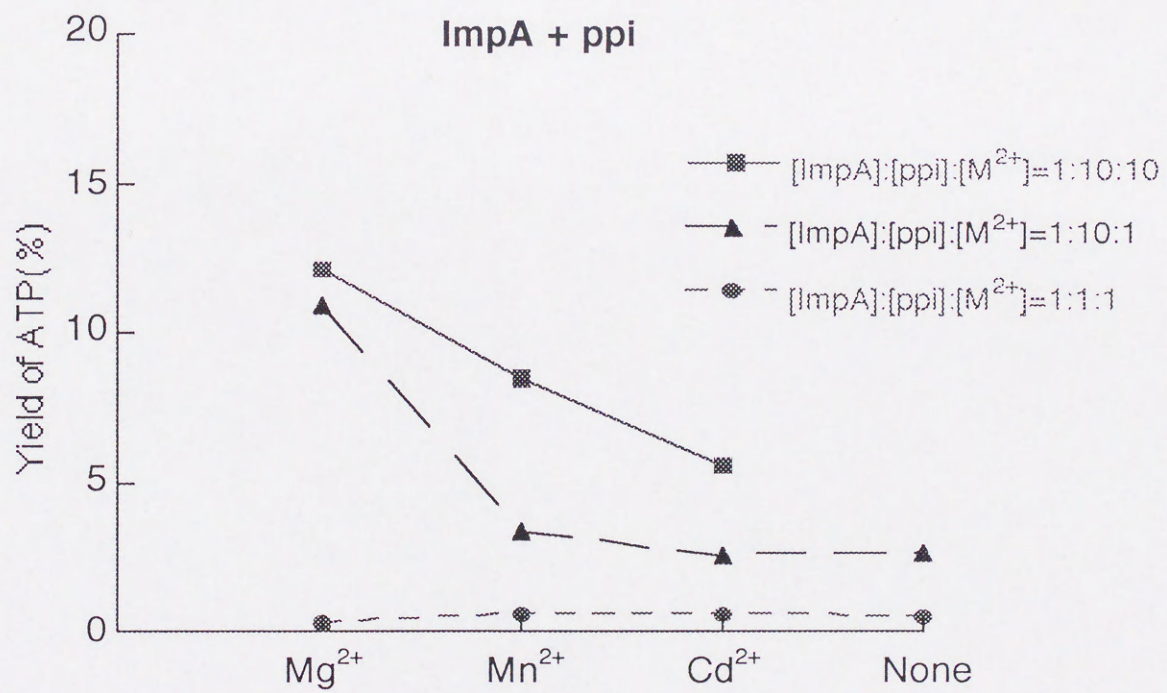


Fig. 28 ATP合成反応 (r.t, 4d, pH7.0)

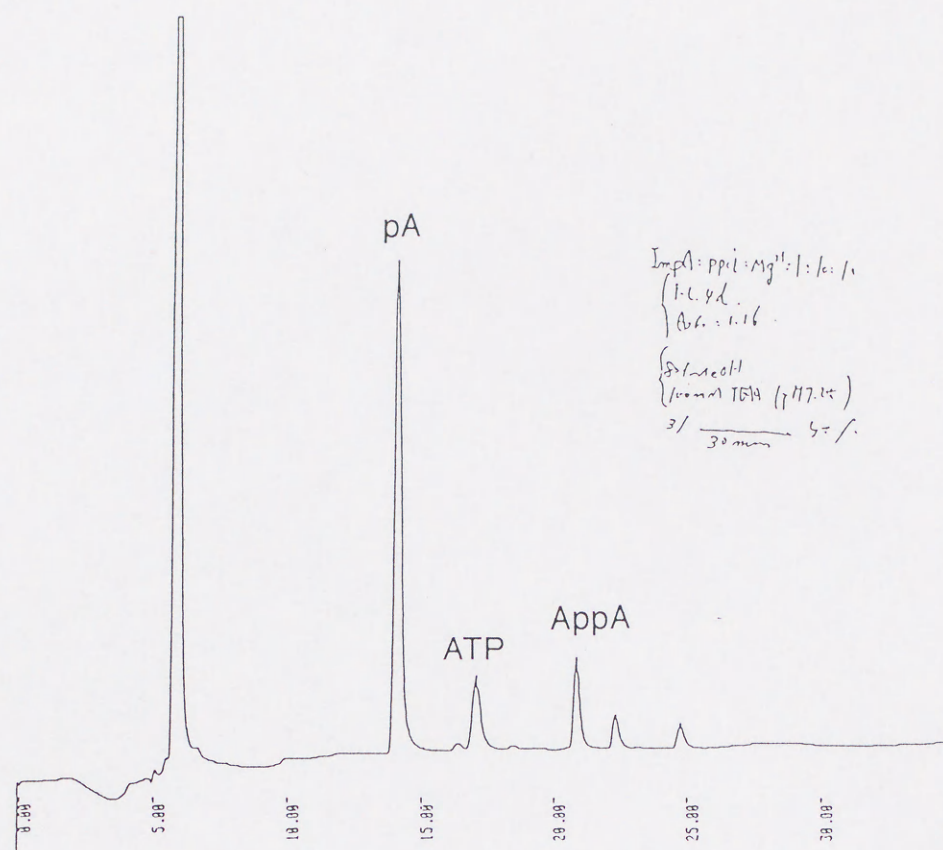


Fig. 29 ATPの合成— Mg^{2+} イオン触媒, [ImpA]:[ppi]:[Mg^{2+}]=1:10:10, r.t., 4d

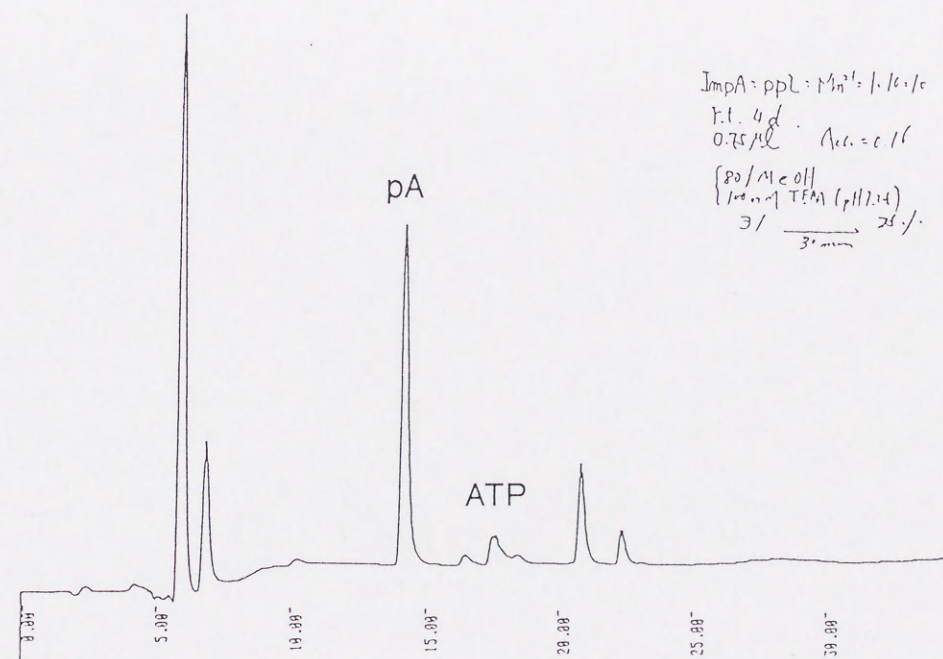


Fig. 30 ATPの合成— Mn^{2+} イオン触媒, [ImpA]:[ATP]:[Mn^{2+}]=1:10:10, r.t., 4d

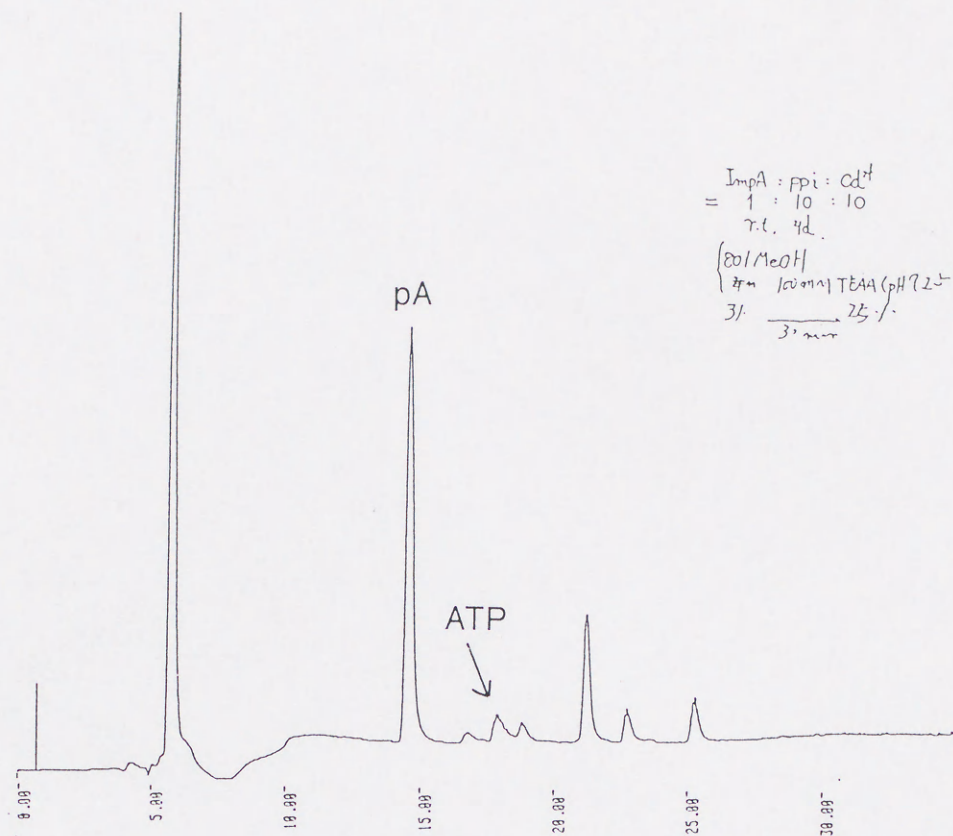


Fig. 31 ATPの合成— Cd^{2+} イオン触媒, $[\text{ImpA}]:[\text{ATP}]:[\text{Cd}^{2+}]=1:10:10$, r.t., 4d

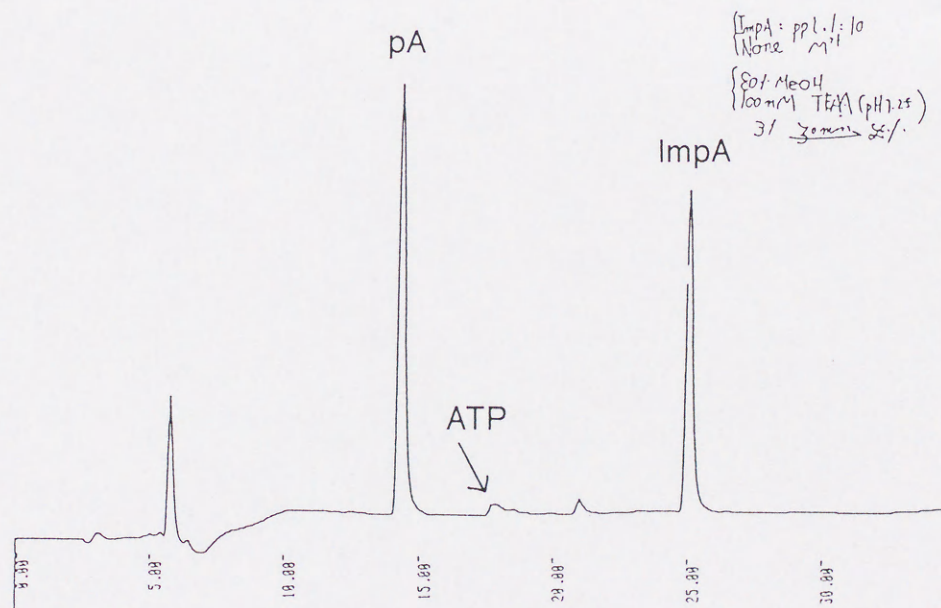
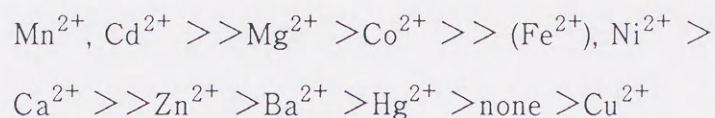


Fig. 32 ATPの合成—コントロール, $[\text{ImpA}]:[\text{ATP}]=1:10$, r.t., 4d.

2-3 考察

2-3-1 反応条件の検討

AppA合成反応を用いて検討した各種金属イオンの活性は、その種類によってかなり異なることが判明した(Table3)。これから、活性の強さを次のように位置づけた。



反応温度の室温における検討結果では、ImpAの消費速度が遅い Cd^{2+} イオンでも4日後に基質ImpAのほぼ完全な消失が確認された(Table4)。4°Cでの反応は、競合的に進行するImpAの加水分解反応を抑制しAppA収率の向上を目指したものであるが、室温での結果と差異は認められなかった。一方、50°Cでの反応は反応時間が短縮され8時間で完結することができた(Table5)。

金属イオンの当量比は反応に大きな影響を及ぼすことが分かった。 Mn^{2+} イオンにおいて $[\text{ImpA}]/[\text{Mn}^{2+}] = 1$ から増加するに従って収率は低下し、 $[\text{ImpA}]/[\text{Mn}^{2+}] = 50$ 以上になると触媒活性をほとんど認めることができなかった(Fig. 13)。反応が進行するためには基質に対してほぼ当量の金属イオンを要求することが判明し、本反応系では金属イオンに配位した基質同士がストイキオメトリックな反応を行うと考えられる。

反応pHも同様に、反応の進行に強い影響を及ぼした(Fig.14)。結果はN-ethylmorpholine-HCl系を緩衝溶液とするpH7付近の中性条件が、ピロリン酸結合形成反応に対して最も適していることを示した。これより酸性側ではプロトン触媒によるホスホイミダゾリドの加水分解が優先して起こる傾向を示した。一方pH7.5以上ではImpAのイミダゾリド結合が安定化することによる反応性の低下から、ImpAが未反応成分として残存する傾向を示し、AppA収率は20%以下に低下した。また $\text{Mn}^{2+}, \text{Cd}^{2+}$ イオンにおいては2,6-Lutidine-HCl系を緩衝溶液とした場合AppA収率の減少が顕著に認められ、金属イオンへの2,6-Lutidineの配位によるピロリン酸結合形成反応の抑制作用が示唆された。

2-3-2 反応機構

本研究のピロリン酸結合形成反応について、 $\text{Mg}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ 及び Cd^{2+} イオンはいずれも高い活性を示した。反応系において、これら金属イオンはいかなる機構で触媒的作用を果たし

ているのであろうか。この反応機構を解明するためには反応中間体となる金属イオン-基質錯体の構造を決定すること、即ち、反応中間錯体である $[M^{2+}-\text{ImpN},\text{pN}]$ を単離してX線構造解析を行うことが最も有効であると思われる。しかしながら一般的に、金属イオン-核酸錯体を結晶として単離することは困難であり、更にこのピロリン酸結合形成反応は、金属イオン、ImpN及びpNなどのりん酸基供与体からなる混合配位子錯体の形成を経由して進行することから、その錯体構造は複雑であることが示唆される。従って、直接的に反応中間錯体の構造を解析する手法は選択できないと思われる。しかしながら本研究で用いた金属イオンの物性の比較から、本反応系で高活性を示した金属イオンに共通する特性を見出しこれについて検討を行う間接的な手段によって、反応機構をある程度推定できると考えられる。そこで本反応系に関する主要な金属イオンの基本的な物性を次に掲示した²³⁾。

1) 有効イオン半径²⁴⁾

Mg²⁺(71ppm; 配位数 4 -tetrahedral, 86ppm; 配位数 6 -octahedral)

Ca²⁺(— 114ppm; 配位数 6 -octahedral)

Mn²⁺(80ppm; 配位数 4 -tetrahedral, 97ppm; 配位数 6 -octahedral)

Fe²⁺(— 92ppm; 配位数 6 -octahedral)

Co²⁺(79ppm; 配位数 4 -tetrahedral, 89ppm; 配位数 6 -octahedral)

Ni²⁺(— 83ppm; 配位数 6 -octahedral)

Zn²⁺(74ppm; 配位数 4 -tetrahedral, 88ppm; 配位数 6 -octahedral)

Cd²⁺(92ppm; 配位数 4 -tetrahedral, 106ppm; 配位数 6 -octahedral)

2) 電子配置

(a) d⁰, d⁵, d¹⁰: Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺

(b) dⁿ(n=1~4,6~9): Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺

3) 優先配位構造

Tetrahedral: Mg²⁺, Zn²⁺

Tetrahedral or Octahedral: Ca²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Co²⁺

Octahedral: Fe²⁺, Ni²⁺

4) O-配位傾向: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}

N-配位傾向: Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}

本反応系のピロリン酸結合形成反応は、次の過程を経由して進行すると思われる(Fig.33)。

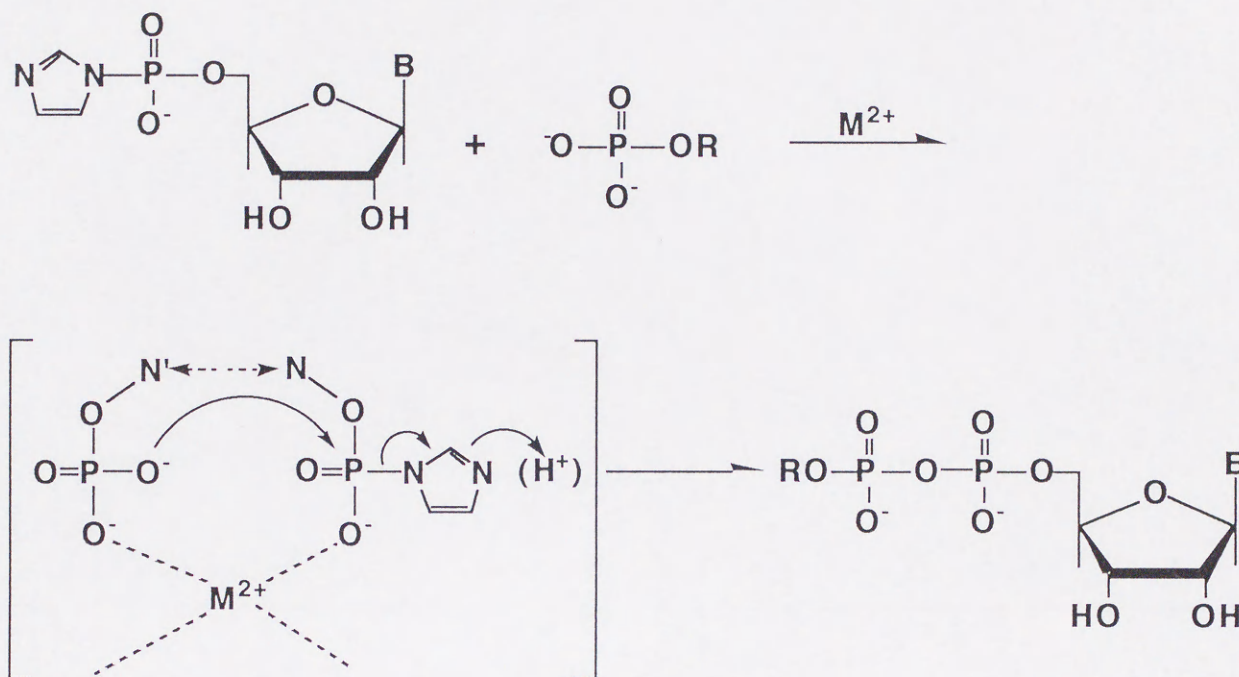


Fig. 33 金属イオン触媒によるピロリン酸結合形成反応の推定機構

- (1) 基質の金属イオンへの配位によって ImpN のホスホイミダゾリド部位とリン酸供与体のリン酸基が接近する。
- (2) ホスホイミダゾリド部位に対し、隣接したリン酸基が求核攻撃を行い、イミダゾールの脱離と共にピロリン酸結合の形成を引き起こす。

更に、この過程における金属イオンの機能として以下のことが推定される。

- (a) 金属イオンは基質に対する鋳型として機能する。
- (b) 金属イオンは疑似プロトンとして働くことで基質の負電荷(主としてリン酸基の電荷)を中和し、求核反応性を増強する。

ハードな金属イオンである Mg^{2+} 及び Mn^{2+} イオンはりん酸基の酸素(O)に対して高い親和性を有しており¹⁾、りん酸基供与体とImpNを互いに近づけることが可能である。 Mg^{2+} のイオン半径と Mn^{2+} のイオン半径は類似している。一方、 Ca^{2+} 及び Ba^{2+} イオンはりん酸に対して同様に高い親和性を保持しているが、これら金属イオンのイオン半径は Mg^{2+} 及び Mn^{2+} イオンのそれよりも大きく、基質が配位しても互いに近接させることができないと思われる²³⁾。また配位様式に関して、 Mg^{2+} イオンはtetrahedralまたはoctahedral型構造の錯体を形成するが、 Mn^{2+} イオンは優先的にoctahedral型の錯体構造をとる。

金属イオンのイオン半径及び配位様式は金属イオン錯体の構造及び反応性を決定する要素であり、よって、ピロりん酸結合形成反応における触媒作用を理解するうえでも重要な要因になると思われる。高い活性を有する Mg^{2+} または Mn^{2+} イオンは、その特性がピロりん酸結合形成を触媒するために適切であると考えられる。一方、他の金属イオンについて、例えば Zn^{2+} イオンはイオン半径において Mg^{2+} イオンと類似しているため、大きさについては適切であるように思われるかも知れない。しかしながら、 Zn^{2+} イオンは核酸塩基部位に結合し、また、tetrahedral型錯体を優先的に形成する特性があるため、本反応系では低い活性を示すにすぎなかった。この結果は、octahedral型の Mg^{2+} または Mn^{2+} イオン錯体がピロりん酸結合形成反応における中間体として機能することを示唆している。

ところで、本反応系において Cd^{2+} イオンは同様に高い活性を示したが、この金属イオンの特性は Mg^{2+} または Mn^{2+} イオンと異なっており、一見すると共通性が無いように思われる。 Cd^{2+} イオンはソフトな金属イオン種に属し、 Zn^{2+} イオンと同様、ヌクレオチドの核酸塩基及びりん酸と配位する¹⁾。ピロりん酸結合形成反応における Cd^{2+} イオンの活性発現の特徴は、核酸塩基の種類に応じて活性が大幅に変化するという点にある。 Cd^{2+} イオンにおいては核酸塩基部位への配位状態がピロりん酸結合形成の反応性に影響を及ぼすと考えられる。そこで、 Cd^{2+} イオンのImpAに対する配位傾向をImpA- M^{2+} の¹H NMR によって定性的に検討した(Table 12)。

Table 12 ^1H NMR chemical shifts of ImpA- M^{2+} complex

sample	[ImpA]	Chemical Shifts of ImpA(ppm)					
	$[\text{M}^{2+}]$	H8	H2	Im,H2''	Im,H4''	Im,H5''	H1'
ImpA	none	8.26	8.25	7.86	7.12	6.92	6.05
ImpA-Mg $^{2+}$	1	8.21	8.14	7.86	7.15	6.95	6.02
ImpA-Cd $^{2+}$	10	8.18	8.13	7.89	7.16	6.93	6.01

[ImpA]=20mM, in D $_2$ O at r.t.

生成錯体が沈澱となるため1/10当量の金属イオンを含む水溶液で測定したにもかかわらず、ImpA-Cd $^{2+}$ 系はImpAのみと比較して塩基H8において0.08ppmの高磁場シフトを示し、Cd $^{2+}$ イオンはImpAの核酸塩基と強い相互作用を行うことが示唆された。

以上結論として、本研究のピロリン酸結合形成反応における金属イオンの役割は、次の二点に集約できる。

1. 配位による基質の秩序化
2. 配位による基質の活性化

ところで、本反応系においてはもう一つの興味深い特徴が認められた。それは、同一金属イオンを触媒に用いた場合でも、基質の核酸塩基の種類または有無に依存して生成物の収率が大きく異なることである。これは、反応過程における基質(ヌクレオチド)間のスタッキング相互作用の重要性を示唆するものである。芳香族間のスタッキング相互作用は、分子会合を約1.5Kcal/mol 安定化することが報告されている^{25,26)}。錯体形成時における複素環、即ち核酸塩基間のスタッキング相互作用は基質であるヌクレオチド間の会合を促進し、結果としてピロリン酸結合形成を強める方向に作用すると思われる。NppN生成反応においてpm 7 G及びピリミジン系ヌクレオチド(N=C,U)を用いた場合に認められた収率の低下は、7-メチルグアニン間及びピリミジン塩基間におけるスタッキング相互作用の低下がそれに寄与していると思われる²⁶⁾。またプリン系ヌクレオチド間において、IppIの収率はAppAまたはGppGの収率よりも低い。これは、イノシンのスタッキング相互作用がアデニンまたはグアニンのそれよりも弱いという事実によるためである。Sigelらは、イノシン系の会合定数が遊離状態及び金属イオン錯体のどちらにおいても、アデニンまたはグア

会合定数より低いことを報告している²⁶⁾。ピロリン酸結合形成反応におけるスタッキング相互作用の重要性は、更にまた、金属イオン触媒を用いた ImpN と非ヌクレオチド系のリン酸供与体間での反応性が低いという結果によって説明できる。例えば ImpA と p_i または p_{pi} の反応による アデノシン-5'-ポリリン酸 (ADP/ATP) の合成、及び ImpN と pCholi のピロリン酸結合形成反応によるヌクレオシドコリン二リン酸 (NppCholi) の合成について、目的物の収率は 10~20% に過ぎない。これらの反応において ImpN とこれらリン酸基供与体間のスタッキング相互作用はほとんど不可能である。Mg²⁺ イオンはヌクレオチド基及びリン酸基転移を触媒する転移酵素及びキナーゼ類にとって必要不可欠な存在である⁵⁾。

生体内においてピロリン酸結合形成反応はこれらの酵素によって触媒される。Mg²⁺ イオンは、しばしば酵素活性を減少させることなしに Mn²⁺ イオンと置換することができる。本研究の非酵素的なピロリン酸結合形成反応における Mg²⁺ 及び Mn²⁺ イオンの作用は、実際の酵素反応において確認されている機能(基質の負電荷を中和する疑似プロトンとして働く)と共通性があると思われる。一方、Cd²⁺ イオンは核酸塩基に配位し易い優先性とその他の物性、例えばイオン半径の大きさ、等がバランスよく釣り合った結果として、ピロリン酸結合形成反応において高い活性を発揮すると思われる。

第3章 ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質の構造決定及び物性

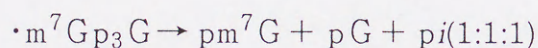
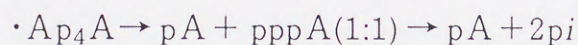
3-1 試料の調製

本反応系で合成したピロリン酸結合を有する各種の核酸関連生理活性物質に関して、同定は主としてRPC-5 またはODS-シリカゲルをカラムとするHPLCによって、標品との保持時間(retention time; R_T)の比較によって行った。なお、構造決定においてジヌクレオシドポリリン酸($N_{p_n}N$; $n=3\sim 4$)系は、合成反応後HPLCを用いて分取するか、または反応後に金属イオンをChelex100キレート樹脂で除去してからQAE-Sephadexイオン交換カラムによって単離精製した(実験の部参照)。

3-2 ジヌクレオシドポリリン酸($N_{p_n}N$)のHPLC分析

ヘビ毒ホスホジエステラーゼ(Snake venom phosphodiesterase; SVPD)分解

SVPDは、DNA及びRNAのリン酸ジエステル結合の3'-末端側から、またはピロリン酸結合を切断して5'-モノヌクレオチドを生成する。この処理から $N_{p_n}N$ は次のように分解される。



単離生成した各種の $N_{p_n}N$ をSVPDによって処理後、HPLC分析を行った。結果をTable 13に示す。

Table 13 SVPD 処理による $N_{p_n}N$ のHPLC分析

sample	SVPD treatment, R_T (min)		
	before	after	products
$A_{p_3}A$	21.7 ^a	14.8+16.6 (1:1)	pA+ppA
$A_{p_4}A$	22.7 ^a	14.7+17.8 (1:1)	pA+pppA
$m^7G_{p_3}G$	14.8 ^b	6.8 + 8.0 (1:1)	pm^7G+pG

column: Wakosil5C18, eluent: ^aMeOH 2.4 →20%(30min)
^bMeOH 2.4 →24%(30min)

切断生成物と標品との R_T の比較からそれぞれの $N_{p_n}N$ を当初の構造として確認することができた。

3-3 $N_{p_n}N$ のNMR解析

(1) 1H NMR

各種 $N_{p_n}N$ を 1H NMR を用いて解析した。結果をTable 14に示す。

Table 14 1H NMR of Dinucleoside 5',5''-Polyphosphates

Compound	Chemical shift(coupling constant, Hz)							
	8H	2H	8H ^a	6H	5H	1'H	1'H ^b	CH ₃
AppA	8.17	8.04				5.95(5.0)		
ApppA	8.29	8.10				6.01(4.1)		
AppppA	8.38	8.14				6.03(5.8)		
UppU				7.92(8.2)	5.94(8.2)	5.96(4.3)		
lppi	8.27	8.13				6.00(5.5)		
CppC				7.91(7.5)	6.05(7.5)	5.98(3.9)		
GppG	7.94					5.79(5.4)		
GpppG	8.01					5.84(4.8)		
GppppG	8.07					5.87(4.8)		
m ⁷ GppG	7.93		8.86 ^c			5.74(5.9)	5.83(3.1)	4.02
m ⁷ GpppG	8.03		N.O. ^d			5.82(6.1)	5.92(2.6)	4.06
m ⁷ Gpppm ⁷ G			N.O. ^d				5.96(3.8)	4.12

a; 8H of 7-methylguanine, b; 1'H of 7-methylguanine, c; weak intensity, d; not observed.

これらの化合物について、核酸塩基及び1'Hプロトンのケミカルシフトは対応するヌクレオシド-5'-りん酸よりも高磁場へシフトしている。これは $N_{p_n}N$ の塩基-塩基スタッキング相互作用によって引き起こされる複素環塩基の環電流効果のためである。またTable 14の中で、7-メチルグアニンを含むヌクレオチドにおける8Hプロトンの共鳴強度は非常に

弱い。即ち、グアニン・N-7位のメチル化は8Hプロトンの低磁場シフトと共鳴線幅の広がりを引き起こした。7位のメチル化による8-CHの酸性度の増加によって、7-メチルグアニンの8Hプロトンは溶媒のD₂Oとの交換が容易になっていると思われる。

(2) ³¹P NMR

核酸は構成単位としてりん酸基を含んでいるため、³¹P NMRを用いた解析によってりん酸基の結合様式などの情報を得ることができる。そこでA_{p_n}A系について³¹P NMR測定を行った。結果をTable 15に示す。

Table 15 ³¹P NMR of Diadenosine-5',5''-polyphosphates

Compound	Chemical shift(ppm)			
	P-α	P-β	P-γ	*Integral value
ImpA	8.20			
pppA	11.0	21.84	6.56	P-α : P-β : P-γ = 1:1:1
AppA	11.35			
ApppA	12.41	23.97		P-α : P-β = 2:1
AppppA	11.50	23.36		P-α : P-β = 1:1

measured in 0.2M Tris-acetate(pH7.8)

A_{p₃}A及びA_{p₄}AについてはP-αとP-βの積分値が所定の比で得られ、これら化合物の構造を裏付ける結果を与えた。

3-4 N_{p_n}NのUV(hypochromicity)分析

代表的なN_{p_n}Nの淡色効果(hypochromicity)を測定した。試料をSVPDによって分解後、緩衝溶液中で酵素処理前後の試料の吸光度を測定し、その比から淡色効果を算出した(実験の部参照)。結果を Table16に示す。

Compound	hypochromicity(%)	hyperchromicity
AppA	26.5	1.36
ApppA	23.6	1.31
AppppA	19.3	1.24
GppG	15.3	1.18
m^7GpppG	8.0	1.08

りん酸基の鎖長の増加に伴って淡色効果の減少が認められた。二つのヌクレオシドを結合するりん酸基数が増加することで塩基-塩基間の距離が遠くなると、スタッキング相互作用が減少する。この作用が淡色効果の減少に寄与すると考えられる。

第4章 チオリン酸基を有するオリゴヌクレオチドアナログの化学的及び生物学的意義

4-1 ヌクレオシドチオリン酸アナログについて

ヌクレオシドチオホスフェートは、核酸を構成する単位であるヌクレオチド・りん酸基の非架橋酸素原子を硫黄原子によって置換した($P=O \rightarrow P=S$)ヌクレオチドアナログの一種である。このアナログ、例えばATP α S及びATP β Sなどがその一例である、は硫黄の導入によってりん酸基部のりん原子周辺に不斉が発現されジアステレオマー対を生成する(Fig.34)。ヌクレオシドチオホスフェートはこの新たに得た特性から、酵素的なヌクレ

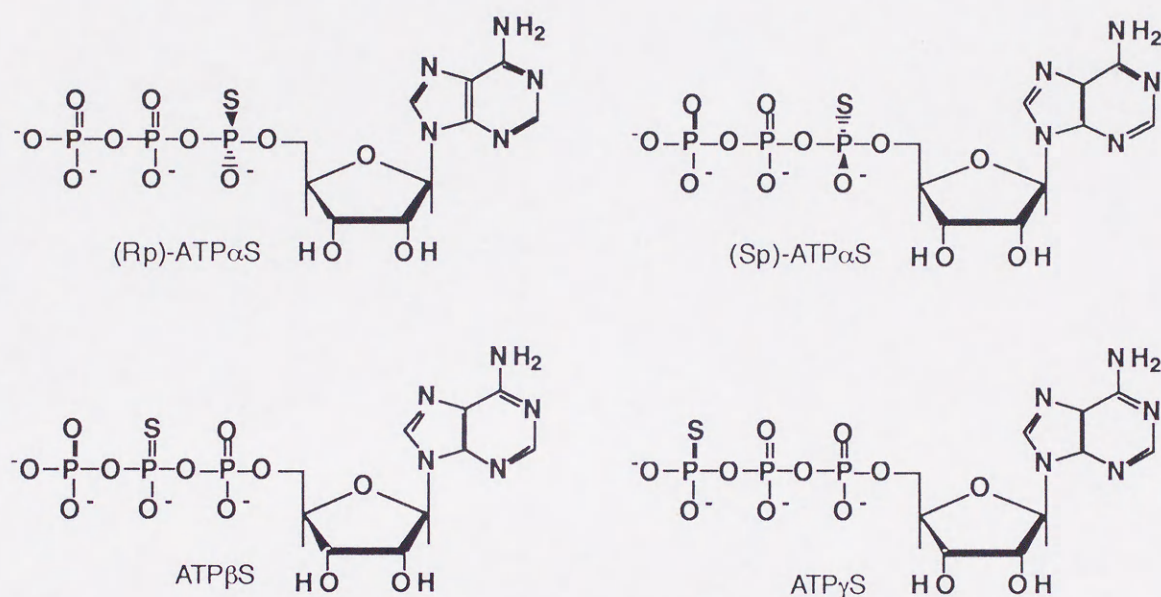


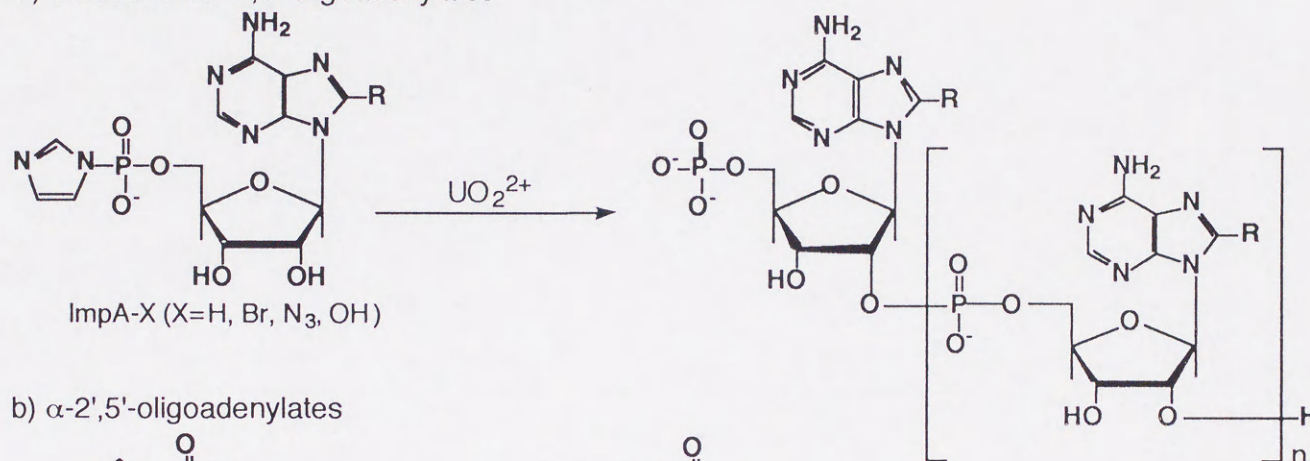
Fig. 34 Phosphorothioate analogues of ATP

オチド基転移反応やりん酸基転移反応の基質に用いることで、反応進行に伴う立体化学的な機構を解明することが可能となる²⁷⁾。更にオリゴヌクレオチド及び核酸ポリマーのチオリン酸アナログは、DNAのコンホメーション並びにDNA/蛋白質相互作用の研究において非常に有用なプローブとして用いられてきた²⁸⁾。また、このアナログのチオリン酸基部位は対応する天然型核酸のりん酸基と比較して、核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)の加水分解作用に対して通常、高い抵抗性を示す。そのため抗ウイルス活性などの生物活性を有するヌクレオチド類のチオリン酸アナログはそれを薬物等に応用した場合、生体内でより長時間に渡って効力を発揮することが期待できる²⁹⁾。

4-2 2',5'-オリゴチオイノシル酸の合成

1・5章で記述したように、当研究室の沢井らはウラニルイオンを触媒とするImpNの縮重合反応から、2',5'-オリゴクレオチドを高収率で合成する方法を見出している¹³⁾。更にこの合成法を応用して、2',5'-オリゴアデニル酸のアデニン環修飾アナログである8-ブロモ-2',5'-オリゴアデニル酸及び8-アジド-2',5'-オリゴアデニル酸の合成法を、また、核酸塩基-リボース間のグリコシド結合において通常の β -アノマーとは 180° 反転した α -アノマーから構成される2',5'- α -オリゴアデニル酸の合成に成功している(Fig.35)。

a) 8-substituted-2',5'-oligoadenylates



b) α -2',5'-oligoadenylates

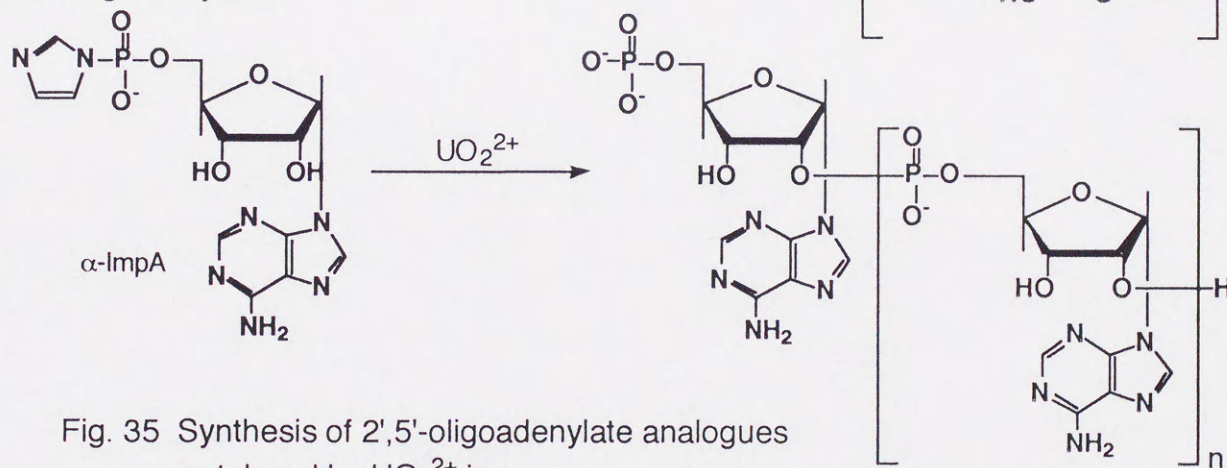


Fig. 35 Synthesis of 2',5'-oligoadenylate analogues catalyzed by UO_2^{2+} ion

このように主としてウラニルイオンを触媒に使用したImpN及びそのアナログの縮重合反応から、オリゴヌクレオチドを合成することが可能である。このことから本反応の応用として、ImpNのりん酸基をチオリん酸基で置換したアナログであるヌクレオシド-5'-チオホスホイミダゾリド [Imp(S)N]を縮重合反応の出発モノマーに用いた場合でも、結果的に

2',5'-ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドのチオリン酸アナログを合成することが期待される。

私は、このチオリン酸アナログの中で抗HIV(human immunodeficiency virus)活性の観点から2',5'-オリゴチオイノシル酸の合成に関心を抱いた。この結合異性体である3',5'-オリゴチオイノシル酸及びそのアナログには、強力な抗HIV活性を有することが報告されている³⁰⁾ (Fig.36)。これらのアナログは一般的に化学合成法を用いて合成されているが、この

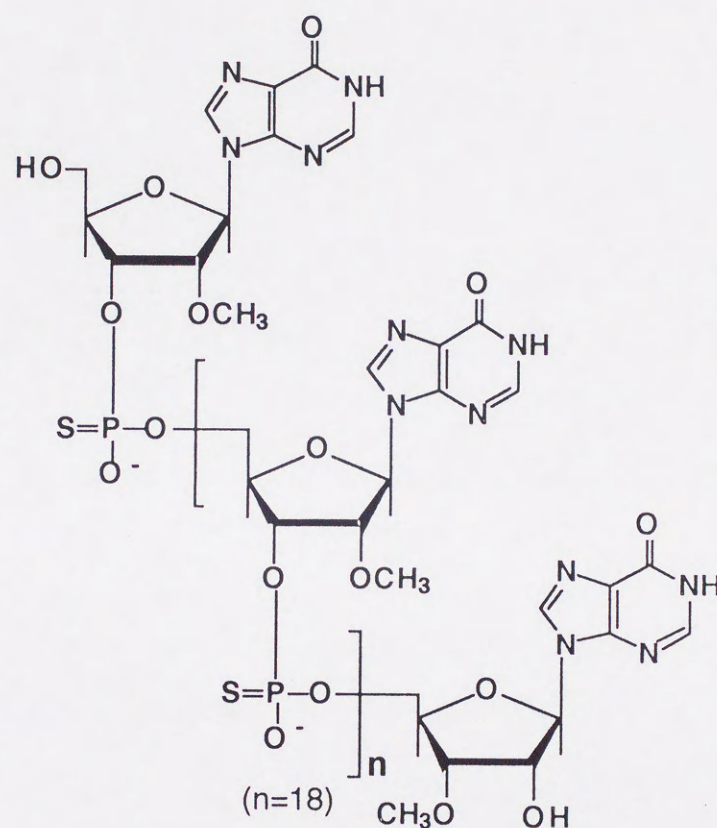


Fig. 36 抗HIV活性を有する(2'-O-メチル)-オリゴチオイノシル酸

手法は各合成段階に応じて特定の官能基の保護及び脱保護操作を必要とし、しかもいずれの合成ステップにおいても無水反応が要求されるなど非常に煩雑である。また、多段階の合成手順による総収率の低下といった問題点を抱えている。しかしながら、当研究室によって開発されたオリゴヌクレオチド合成法は、保護基を必要とすることなく水溶液中で効率良く、かつ簡便に2',5'-オリゴヌクレオチドを合成することができる。そこで、本方法から2',5'-オリゴチオイノシル酸を合成することを目的として次の二点の検討を試みた。

- 1) 活性型モノマーであるイノシン・5'-チオホスホイミダゾリド [Imp(S)I]の合成検討。
- 2) 各種金属イオンを触媒としたImp(S)I縮重合反応の検討。

4-3 2-5A系について

2',5'-オリゴアデニル酸 [2',5'-ppp(Ap)_nA, n=2~4; 2-5A]は1987年、Kerrらによりウイルス感染後のインターフェロン(IFN)処理細胞抽出液から発見された強力な蛋白質合成阻害物質である³¹⁾(Fig.37)。その後の研究発展から、2-5Aを含む2-5Aシンセターゼ/RNase L経路(2-5A系)は哺乳類細胞系においてIFNの抗ウイルス機構の中心を担っていることが

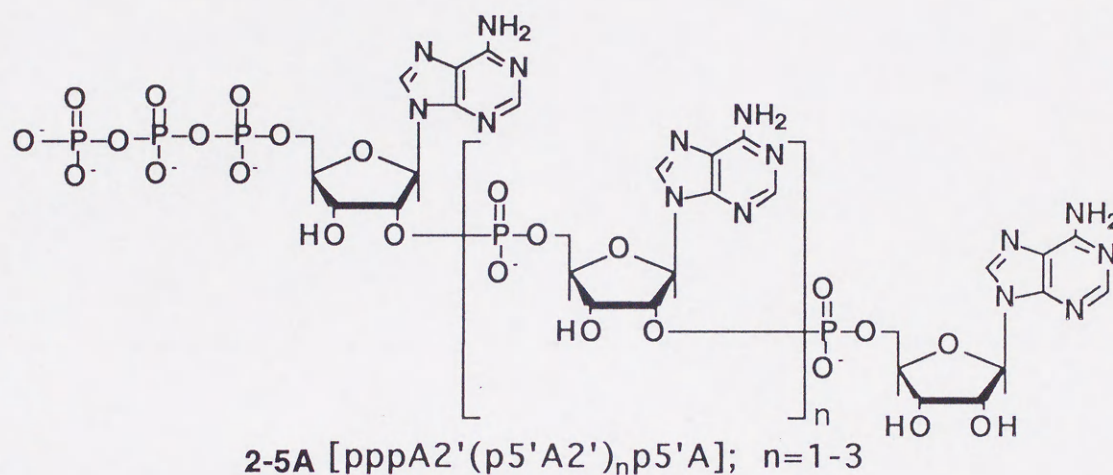
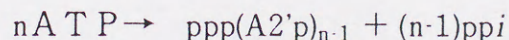


Fig. 37 Structure of 2-5A

確立された³²⁾。また更に、2-5A系は細胞成長及び分化の調節過程において付加的な役割を果たすことが認められている³³⁾。

2-5A系において鍵となる酵素の2-5Aシンセターゼ[EC3.1.26.]は、IFNから誘導されるアロステリック調節酵素であり、二重鎖(ds)RNA及びMg²⁺イオンの存在によって活性化される。活性型2-5AシンセターゼはATPを重合して2-5Aを生成する³⁴⁾。



生成した2-5Aは、2-5A系においてもう一方の中心的な作用を担う酵素であるRNase L (2',5'-オリゴアデニル酸依存エンドリボヌクレアーゼ[EC.3.1.27])に結合してこの酵素を

活性化する。RNase Lは活性化された後、細胞またはウイルス中のmRNAまたはリボソームRNA(rRNA)等の一重鎖(SS)RNAをU-A, U-G, U-UなどのU-N配列の3'側で切断する³⁵⁾。切断に伴うmRNA/rRNAの機能喪失によって蛋白質合成が阻害され、結果的に抗ウイルス作用が発揮される(Fig.38)。

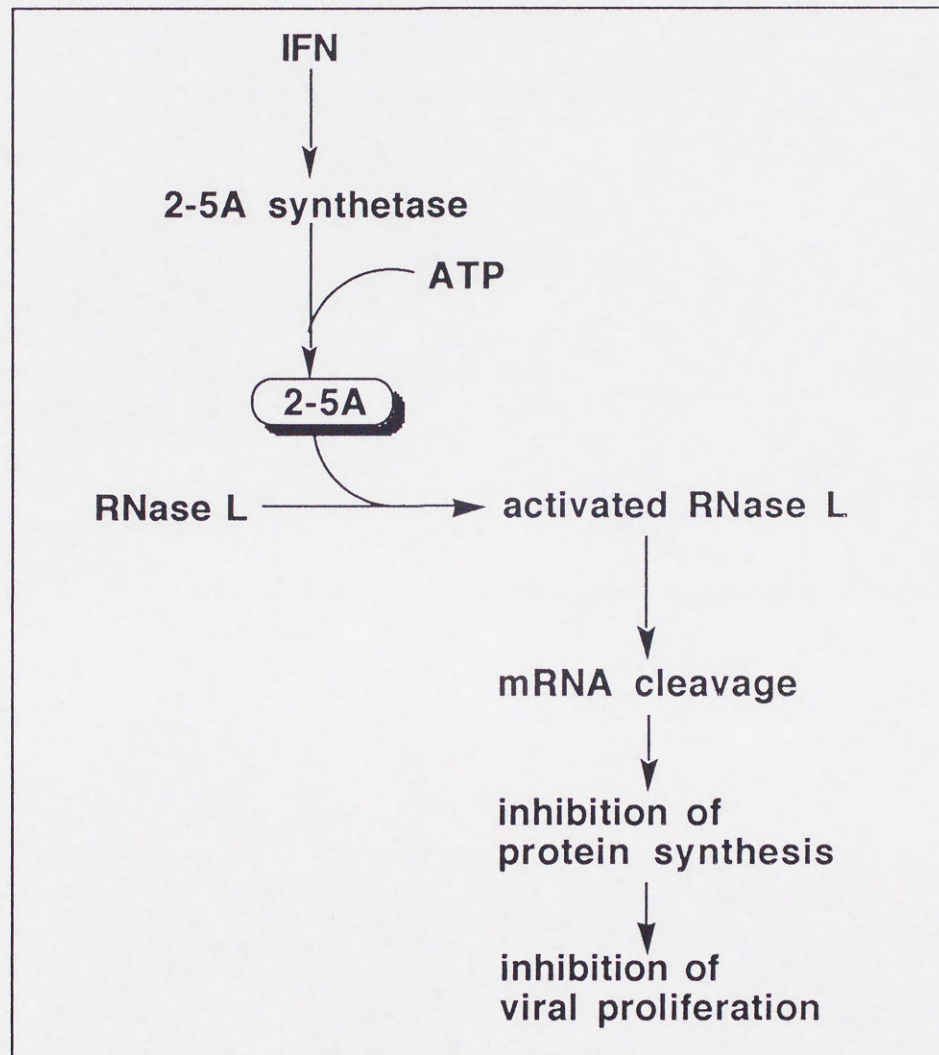


Fig. 38 2-5A system

4-4 2-5Aとそのアナログ

このように2-5Aは、低分子量ながらも強力な蛋白質合成阻害作用を有している³¹⁾。しかしながら、2-5Aは細胞内に存在する2',5'-ホスホジエステラーゼ、及び他のホスホジエステラーゼ類によって急速に加水分解されてしまうため、2-5Aの蛋白質合成阻害作用は

一過性であるに過ぎない³⁶⁾。

従ってこの阻害能力を保持した上で、更にホスホジエステラーゼ類などの核酸分解酵素に対して抵抗性を示すように構造的修飾を受けた2-5Aアナログは、生化学的なプローブとして役立つことが期待される。そこで2-5A系をより詳細に研究するために、あるいは2-5A系との相互作用から抗ウイルス薬剤及び抗腫瘍薬剤に関する新しい知見を得るために、核酸塩基部位³⁷⁻⁴²⁾、リボース環部位⁴³⁻⁵⁰⁾、及びりん酸ジエステル結合部位⁵¹⁻⁵⁶⁾を修飾した種々の2-5Aアナログが酵素的または化学的に合成され、それらの生物学的特性が研究されてきた。

例えば、リボース環部位を修飾した2-5Aコア [2',5'-(Ap)_nA; 2-5Aの5'末端りん酸基を除去し5'-水酸基とした化合物である] アナログに関する初期の研究において、修飾アナログは細胞内ホスホジエステラーゼ類による分解に対して抵抗性を持ち、と同時に不安定な元の2-5Aと比較して強い抗ウイルス活性を示した。しかしながらこれらの"安定"な2-5Aアナログが示した生物活性は、アナログ自体に由来する能力ではなく、実際には"血清"酵素による加水分解の結果として生産された、代謝拮抗性の分解生成物の寄与によることがしばしば指摘された⁵⁷⁾。そこで細胞内においても同様、血清中のホスホジエステラーゼに対して安定であり、もしそれが最終的に分解されたとしても代謝拮抗性のヌクレオチドを生成しないような2-5Aアナログの合成が要求された。

更に2-5Aの構造とRNase Lに対する結合及び活性化との関連性について、RNase Lとの相互作用に必要な2-5Aの構造部位が明らかにされている^{50,58)}(Fig.39)。アナログ合成におけるこれら官能基及び結合の修飾は、RNase Lへの結合及び活性化に重大な影響を及ぼすため、新たな2-5Aアナログを設計する際に注意が必要となる。

4-5 2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成とその生物活性

オリゴヌクレオチドのりん酸ジエステル結合部位の修飾は、しばしば修飾部位のりん原子に新たな立体特異性を与え、この不斉発現が更に生物活性に影響を及ぼすことを可能にする。しかしながら、2-5Aに関してヌクレオチド間結合の修飾を伴うアナログ合成の報告例は比較的少数であった。たとえば、その代表的な例としてメチルホスホトリエステル基を含むコア体アナログの合成が挙げられる^{45,59)}。天然型2-5Aのりん酸ジエステル結合が

負電荷を有するのに対し、メチルホスホトリエステルアナログは電荷を持たない中性であるため細胞に対する導入特性は向上したが、残念ながら生物活性は完全に消失してしまった⁴⁵⁾。

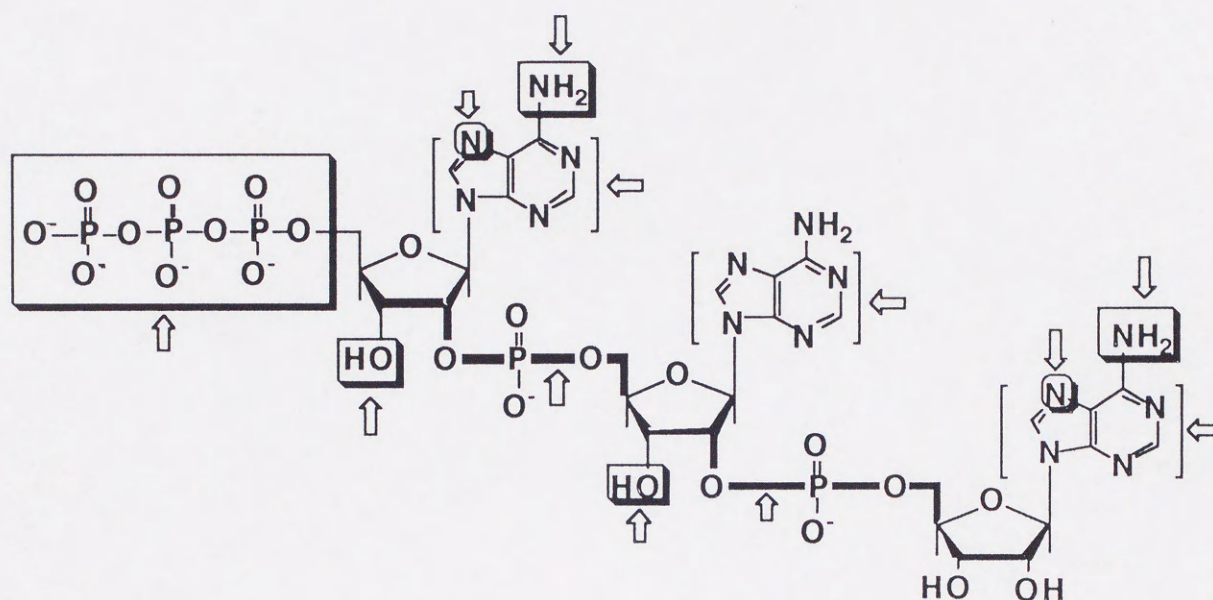


Fig. 39 RNase Lに対する結合及び活性化に必要な2-5Aの官能基 (⇔で示した)

対照的に、ヌクレオチド間結合へチオりん酸基を導入した2-5Aアナログは、修飾したりん酸ジエステル結合部位にイオンの性質を依然として維持することができる。このアナログの化学的合成法については、特にNelsonら及びPfleidererらが、それぞれホスファイトトリエステル法⁵¹⁾及びホスホアミダイト法⁵²⁻⁵⁴⁾を経由し、その後酸化的硫黄化を行うことで二量体及び三量体コアの合成を報告している(Fig.40)。

一方、Leeらは酵素的手法に基づいて、マウスL929細胞抽出液由来の2-5Aシンセターゼから(Sp)-ATP α Sを基質に用いて[(Rp)-ATP α Sではない] 2-5Aチオりん酸アナログの合成を行った⁶⁰⁾ (Fig.41)。

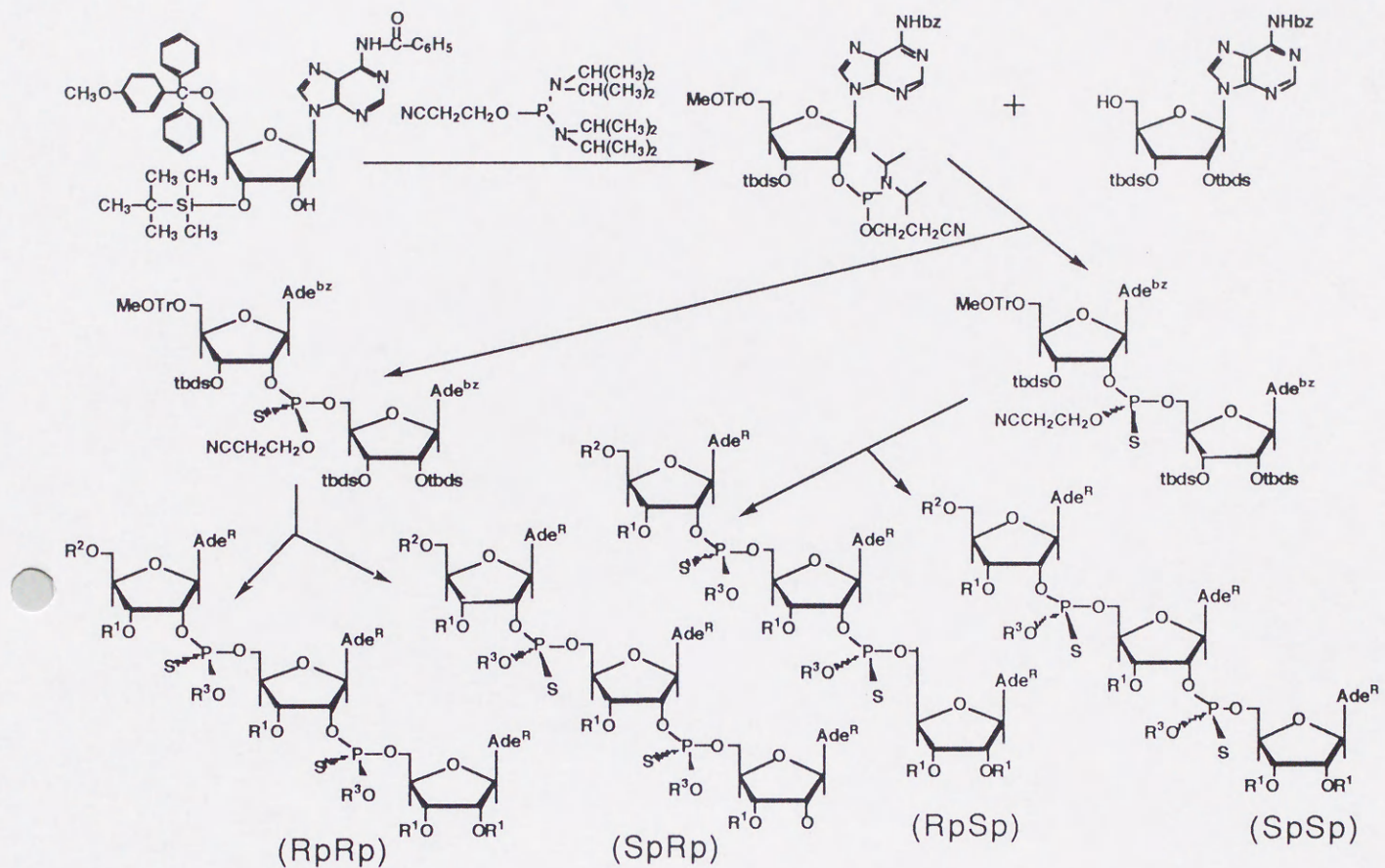


Fig. 40 Chemical synthesis of 2',5'-oligothioadenylate trimers

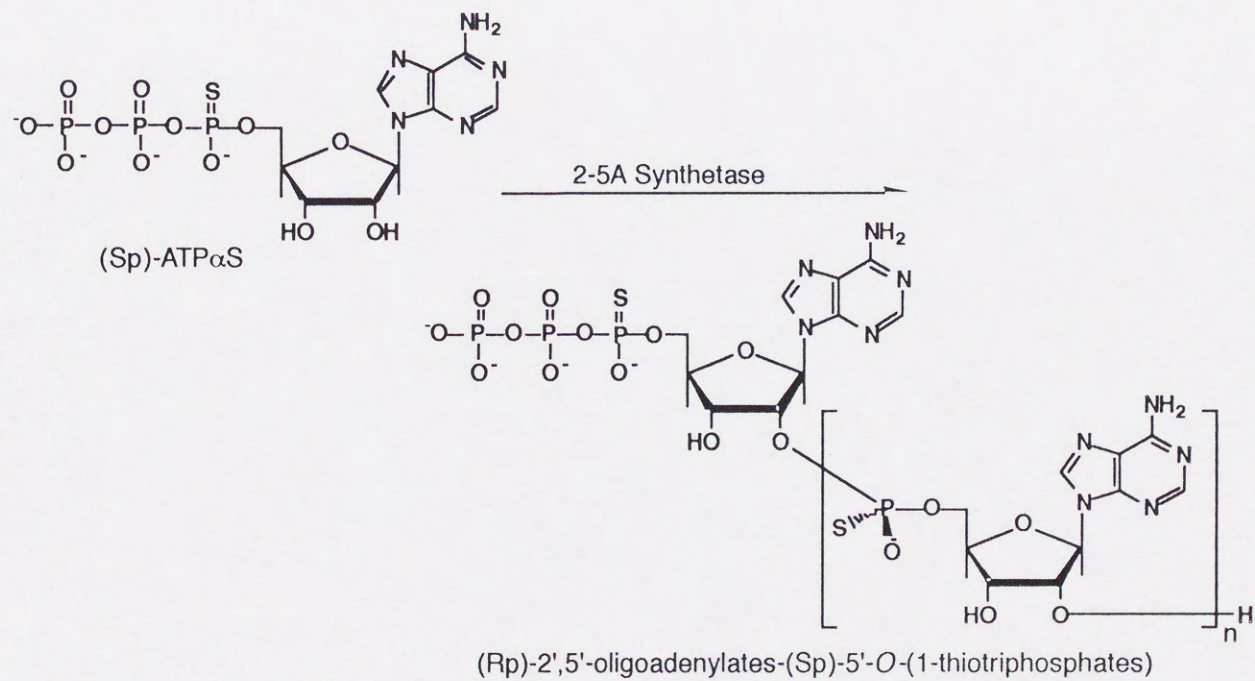


Fig. 41 Enzymatic synthesis of 2',5'-oligothioadenylates

また、オリゴヌクレオシドチオホスフェートに見られる共通の特性として、2-5Aチオリン酸アナログは酵素的な加水分解に対して、導入したチオリン酸基の立体配置(R_pまたはS_p)によってその程度は異なるが、抵抗性を示す。例えば、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)はエキソヌクレアーゼの一種であり、核酸オリゴマーの3',5'-及び2',5'-りん酸ジエステル結合をその5'-末端側で切断する。核酸のチオリン酸アナログについて、SVPDはR_p-ジアステレオマーからなるオリゴマーを選択的に切断することが知られており^{51,52,61}、この酵素はR_pR_p-配置を有する三量体の2',5'-オリゴチオアデニル酸コアを半減期1時間で加水分解する⁵²。しかしながらSVPDに対する天然型の2-5Aコアの半減期は5分間にすぎず⁵²、チオリン酸修飾アナログの酵素分解に対する抵抗性の向上は明らかである。

そして最も重要な生物学的特性として、このアナログはRNase Lに結合及び活性化することが可能であり、その能力は天然型2-5Aと同等またはそれ以上であることが報告されている^{52,60,62-64}。更に興味深いことに、2-5Aチオリン酸アナログはHIV-1逆転写酵素(human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase; HIV-1 RT)の機能及びHIV-1増殖を阻害する能力のあることが見出されている⁶⁴⁻⁶⁵。

4-6 ウラニルイオン触媒を用いた2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成とその生物活性

このように興味深い種々の生物活性を有する2',5'-オリゴチオアデニル酸はこれまで化学的⁵¹⁻⁵⁶及び酵素的⁶⁰手法を用いて合成されてきた。しかしながら、これらの合成手段には改善すべき問題点がある。まず、化学合成法については2',5'-オリゴチオイノシル酸の合成で述べたのと同様、反応を行う際に無水溶媒を必要とし、また合成ステップに応じて保護基の導入及び脱離操作を伴わねばならない。そして多段階におよぶ合成手順の結果として、総収率の低下を引き起こす。更に、これら化学合成法の多くはチオリン酸基に関して立体選択性を保持することができず、ほぼ1:1の比でR_p-及びS_p-ジアステレオマーの混合物を与えてしまう⁵¹⁻⁵⁵(Fig.40)。

一方、酵素的合成法において立体選択性に関する問題は存在しない。なぜなら、2-5Aシンセターゼは(S_p)-ATP αSを基質としてR_p-配置からなる2-5Aチオリン酸アナログを生成するからである⁶⁰。しかしながら、酵素的方法においても欠点は存在する。即ち、この方法からは、立体化学的に可能な他の立体配置を有するオリゴヌクレオチドを合成す

ることができない。例えば、チオリン酸アナログ三量体の合成を行う場合、四種類のジアステレオマー体(RpRp, RpSp, SpRp及びSpSp)の生成が考えられるが、酵素的手法からは一種類(RpRp)しか合成できない(Fig.41)。2',5'-オリゴチオアデニル酸の生物活性は、チオリン酸基の立体配置に強く依存することが報告されている^{52,62-65})。従って、アナログジアステレオマー間において活性の相違を比較しようとする試みは、酵素的合成法を用いて得られる生成物からは実現不可能である。更に酵素的手法では、細胞中の2-5Aシンターゼを精製単離するのに手間がかかり、また、精製した酵素はその安定性及び活性についてしばしば問題点を含んでいる⁶⁶)。

ところで第1章で触れたように、当研究室ではウラニルイオンを触媒とする ImpNの縮重合反応から、2',5'-オリゴクレオチドを合成する方法が開発されている^{12,13})。そこで、2',5'-オリゴチオイノシル酸と同様、2',5'-オリゴチオアデニル酸においても、活性型モノマーであるアデノシン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)A]の合成後、これを縮重合反応させることでオリゴマーの合成が可能になると考えられる(Fig.42)。

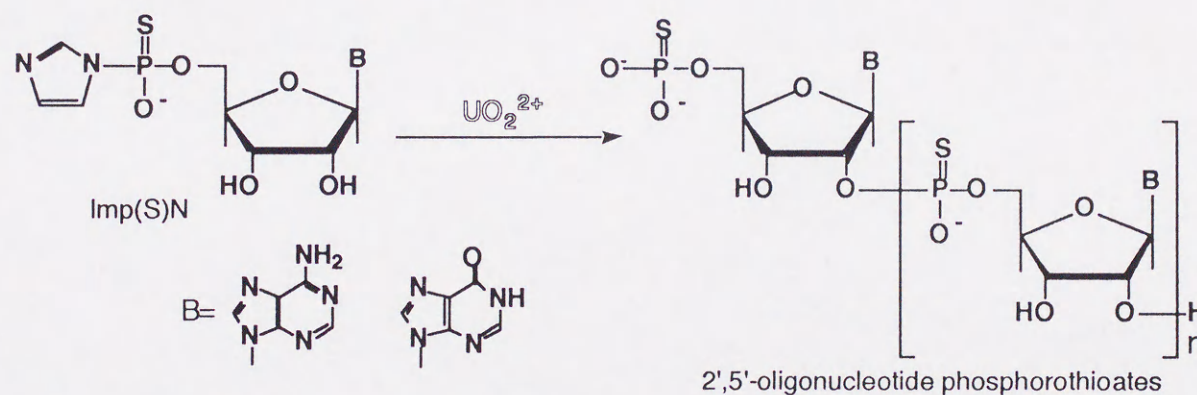


Fig. 42 Synthesis of 2',5'-oligonucleotide phosphorothioates catalyzed by UO_2^{2+} ion

Imp(S)Aの縮重合反応が進行する場合、このとき形成される反応中間錯体はウラニルイオン-ImpN錯体と同様な構造をとることが推定される。Imp(S)Aは不斉なジアステレオマー対を生成する。そこで、Imp(S)Aまたはそれ以外のアゾール基を有するXp(S)Aアナログを合成後、得られるジアステレオマー混合体を更に分離し、そのRp-またはSp-ジアステレオマーのみからなるモノマーの縮重合反応を検討することで、このウラニルイオン触媒による反応の機構を解明する手掛かりが得られると期待される。

ウラニルイオンを触媒とするオリゴヌクレオチド合成法は、保護基を用いることなく、水溶液中において簡便に行えることが魅力である。そこで私は、本合成法から2',5'-オリゴチオアデニル酸を合成するため、以下の点を研究目標とした。

- 1) 活性型ヌクレオチドであるImp(S)Aまたはそのアナログの合成及びジアステレオマー分離の検討
- 2) ウラニルイオン触媒によるImp(S)A縮重合反応及びその最適化条件の検討
- 3) 分離したジアステレオマーを用いることによる縮重合反応機構の解明
- 4) 生成したオリゴヌクレオチドのNMRおよびCDを用いた分光学的研究、及び酵素的分解アッセイなどを用いた構造解析
- 5) 生成したオリゴヌクレオチドの生物活性の検討

第5章 ウラニルイオン触媒による2',5'-オリゴヌクレオチドチオリン酸アナログの合成

5-1 ヌクレオシド-5'-チオホスホアゾリド[Xp(S)N]の合成

5-1-1 イノシン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)I]の合成

Imp(S)Iの合成について、まず原料イノシンの5'-水酸基をりん酸トリエチル中チオホスホリルクロライド(PSCl₃)によってチオホスホリル化した⁶⁸⁾。次にチオホスホリル基の塩素原子2個をイミダゾールを加えることによって置換してジイミダゾリド体とした後、引き続きアルカリ加水分解を行いモノイミダゾリド体を得た。

5-1-2 アデノシン-5'-チオホスホアゾリド[Xp(S)A]の合成

Xp(S)Aの合成は原料のヌクレオシドとしてイノシンの代わりにアデノシンを用いたこと、及びアゾール基(X-)としてイミダゾール(Im)のほかにベンズイミダゾール(Bzim)及びベンズトリアゾール(Bztria)を用いたことを除いて、Imp(S)Iの場合と同様に行った (Fig.43)。

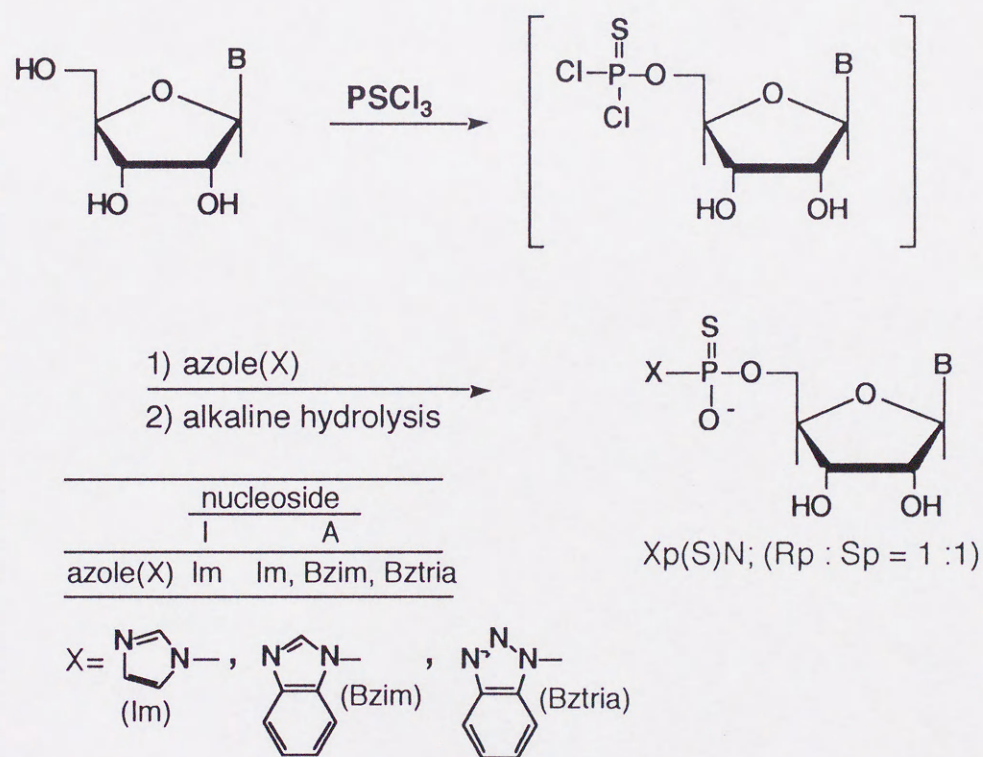


Fig. 43 Preparation of Xp(S)N

得られたImp(S)I及びXp(S)AはいずれもRp-ジアステレオマーとSp-ジアステレオマーの混合体からなり、HPLC分析によるジアステレオマー存在比はRp : Sp=50:50であった。

5-2 ウラニルイオン触媒を用いたImp(S)I縮重合反応(反応条件の検討)

5-2-1 各種金属イオンの触媒効果

通常のりん酸基を有するイミダゾリドであるImpN及びその塩基修飾アナログの縮重合反応について種々の二価金属イオンの触媒能力が検討された結果、ウラニルイオンが触媒として最も効率よいことが明らかにされてきた^{12,13}。しかしながら本研究のImp(S)Iイミダゾリドアナログは、ウラニルイオンが配位する部位とされているヌクレオチドのりん酸基とリボース水酸基のうちりん酸基がチオリン酸基に置換されている。そこでこの置換による影響を考慮して、まず、各種金属イオンを触媒とするImp(S)I縮重合反応を検討した。結果をTable 17に示す。

Table 17 金属イオンのImp(S)I縮重合反応触媒効果

Catalyst	$[M^{2+}]$ [ImpSI]	HPLC yield(%)				
		ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄
Mg ²⁺	1	48.9	34.8			
Mn ²⁺	1	50.0	36.9			
Co ²⁺	1	49.6	34.1			
Zn ²⁺	1	38.0	48.9			
Cd ²⁺	1	5.1	76.8	1.4		
Pb ²⁺	1		63.9			
Pb ²⁺	10	36.6	38.4			
UO ₂ ²⁺	1		62.0	11.9		
UO ₂ ²⁺	10		3.2	14.5	19.6	trace
UO ₂ ²⁺	50		4.1	24.1	20.2	trace
UO ₂ ²⁺	100	20.4	13.1	25.2	4.1	
UO ₂ ²⁺	500	47.9	32.3	5.2		
UO ₂ ²⁺	1000	59.6	31.3	1.0		
UO ₂ ²⁺	5000	58.2	25.4			
none		57.2	30.3			

[Imp(S)I]=20mM, in 0.2M N-ethylmorpholine-HCl (or HNO₃)(pH7.0), r.t, 4d.

5-2-2 ウラニルイオン当量比及び反応pHの影響

前項の結果から、Imp(S)Iの縮重合反応においてもウラニルイオンの触媒活性が最も高いことが判明した。そこでウラニルイオン触媒反応における最適条件を決定するためにImp(S)I濃度を20mMとし、ウラニルイオン濃度(0.4~4mM; $[\text{Imp(S)I}]/[\text{UO}_2^{2+}] = 5 \sim 50$)及び反応pH(6.2~7.8)を変化して室温5日間で縮重合反応を行った。一定pHにおけるウラニルイオン当量比変化の結果をTable18~23に、一定当量比におけるpH変化の結果をTable24に示す。また、対照実験としてImpIから2',5'-オリゴイノシル酸を合成した結果をTable25に示す。

Table 18 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=6.2]

$[\text{ImpSI}]$ $[\text{UO}_2^{2+}]$	HPLC yield(%)					
	ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄	(pSI) ₅
5		14.0	22.0	19.3	8.5	
10		10.7	22.9	18.8	8.1	4.2
25		14.1	28.3	16.0	7.0	6.5
50		17.7	28.6	14.4	6.0	5.7
none	57.6	17.4				

in 0.2M imidazole-HNO₃ buffer (pH6.2).

Table 19 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=6.6]

$[\text{ImpSI}]$ $[\text{UO}_2^{2+}]$	HPLC yield(%)					
	ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄	(pSI) ₅
5		12.1	19.4	20.1	8.6	
10		9.0	19.1	19.3	8.8	4.9
25		10.5	22.3	18.4	6.5	3.7
50		12.9	21.7	13.0	6.1	5.9
none	59.8	11.6				

in 0.2M imidazole-HNO₃ buffer (pH6.6).

Table 20 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.0]

[ImpSI]	HPLC yield(%)					
[UO ₂ ²⁺]	ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄	(pSI) ₅
5		9.9	17.1	17.1	5.9	2.4
10		6.8	14.8	17.6	7.3	5.8
25		7.4	15.6	14.4	6.2	6.6
50		9.6	13.6	10.7	5.8	6.9
none	62.9	10.5				

in 0.2M imidazole-HNO₃ buffer (pH7.0).

Table 21 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.0]

[ImpSI]	HPLC yield(%)					
[UO ₂ ²⁺]	ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄	(pSI) ₅
5		6.1	6.5	17.4	9.4	3.8
10		4.1	5.9	22.7	12.1	8.8
25		3.1	7.9	24.5	11.9	10.3
50		3.0	10.3	24.5	8.1	5.0
none	52.8	25.2				

in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.0).

Table 22 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.4]

[ImpSI]	HPLC yield(%)					
[UO ₂ ²⁺]	ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄	(pSI) ₅
5		4.7	8.4	20.1	9.7	3.8
10		3.5	8.4	20.8	9.9	7.6
25	5.3	2.7	8.8	26.5	11.1	7.3
50	13.0	3.2	11.5	24.1	6.4	3.8
none	64.1	14.8				

in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.4).

Table 23 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.8]

[ImpSI]	HPLC yield(%)					
[UO ₂ ²⁺]	ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄	(pSI) ₅
5		4.8	11.4	21.1	9.2	3.1
10	13.7	3.1	12.7	16.6	9.3	7.0
25	31.0	3.5	11.9	17.2	5.6	3.0
50	38.4	3.8	12.3	11.7	4.5	3.1
none	74.4	9.3				

in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.8).

Table 24 反応pHの影響 ([ImpSI]/[UO₂²⁺]=25)

pH	HPLC yield(%)					
	ImpSI	pSI	(pSI) ₂	(pSI) ₃	(pSI) ₄	(pSI) ₅
6.2 ^a		14.1	28.3	16.0	7.0	6.5
6.6 ^a		10.5	22.3	18.4	6.5	3.7
7.0 ^a		7.4	15.6	14.4	6.2	6.6
7.0 ^b		3.1	7.9	24.5	11.9	10.3
7.4 ^b	5.3	2.7	8.8	26.5	11.0	7.3
7.8 ^b	31.0	3.5	11.9	17.2	5.6	3.0

a: 0.2M imidazole-HNO₃ buffer.

b: 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer.

Table 25 ウラニルイオン触媒による ImpI縮重合反応 [pH=7.0]

[ImpI]	HPLC yield(%)							
[UO ₂ ²⁺]	ImpI	pl	(pl) ₂	(pl) ₃	(pl) ₄	(pl) ₅	(pl) ₆	(pl) ^{*n}
1	3.2	9.7	11.2	5.9	3.8	1.5	0.8	0.6
10		2.9	2.8	5.7	7.8	5.8	5.6	16.4
50		0.4	2.1	6.0	5.8	4.9	5.8	17.2
100		0.2	3.6	11.3	8.8	6.5	4.8	7.8
500		2.8	27.2	21.0	4.5	0.4	0.2	0.5
1000		9.1	36.1	14.9	2.0			
5000		68.5	12.4					
none		91.0						

[ImpI]=20mM, r.t, 5d, *n: 7~12量体までの合計収率

5-3 ウラニルイオン触媒を用いたXp(S)A縮重合反応

5-3-1 Imp(S)A縮重合反応におけるウラニルイオン当量比及び反応pHの影響

Imp(S)AとImp(S)I間の構造の相違は、核酸塩基がアデニンであるかヒポキサンチンであるかの僅かな違いにすぎない。しかしながらImpNの縮重合反応は、核酸塩基の種類によってもその最適条件に多少の変化が生じる。そこで、Imp(S)A系について最適条件を探索するため、ウラニルイオン濃度及び反応pHを様々に変更して縮重合反応を行った。Table26～30に一定pHにおける当量比変化の結果を、また一定当量比におけるpH変化の結果をTable 31に示す。

Table 26 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=6.3]

[ImpSA]	HPLC yield(%)							
[UO ₂ ²⁺]	ImpSA	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
5		25.1	24.9	5.6	9.9	2.9	0.6	1.8
10		17.6	31.1	6.8	13.6	3.0	1.0	2.9
25		17.0	34.8	6.8	13.5	2.7	0.8	2.6
50		27.9	36.5	6.5	8.7	1.2		1.3
100		54.2	21.9	4.2	2.4	0.3		0.2

in 0.2M imidazole-HNO₃ buffer (pH6.3).

Table 27 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.0]

[ImpSA]	HPLC yield(%)							
[UO ₂ ²⁺]	ImpSA	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
5		13.8	25.5	4.7	16.4	2.9	1.3	5.0
10		10.6	23.4	5.7	18.3	3.9	1.4	6.2
25		8.6	21.3	4.7	13.5	1.9	0.7	4.4
50		7.4	23.5	4.9	11.9	1.6		3.1
100		18.4	27.3	4.9	8.3	0.9		1.4

in 0.2M imidazole-HNO₃ buffer (pH7.0).

Table 28 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.0]

[ImpSA] [UO ₂ ²⁺]	HPLC yield(%)							
	ImpSA	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
5		11.8	11.9	8.2	18.8	8.3	3.3	6.3
10		10.4	11.0	7.8	17.4	7.1	3.1	5.8
25		7.2	12.6	7.4	20.6	7.4	3.2	7.0
50		7.8	22.4	7.1	20.3	5.7	2.2	5.6
100		10.1	34.7	8.9	15.0	3.9	0.8	2.7

in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.0).

Table 29 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.4]

[ImpSA] [UO ₂ ²⁺]	HPLC yield(%)							
	ImpSA	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
5		11.3	10.6	9.1	17.8	6.9	3.1	6.2
10		8.3	9.7	8.7	19.9	7.1	3.4	7.1
25		6.0	11.6	7.0	22.3	7.4	3.2	8.2
50		6.4	16.6	6.9	22.3	6.6	2.6	7.4
100		8.1	23.6	8.6	20.1	5.3	1.8	5.2

in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.4).

Table 30 ウラニルイオン当量比とpHの影響 [pH=7.8]

[ImpSA] [UO ₂ ²⁺]	HPLC yield(%)							
	ImpSA	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
5		10.5	10.7	10.8	17.8	6.4	2.7	5.9
10		6.8	11.4	11.1	21.5	6.7	2.9	7.3
25	0.5	5.4	17.2	8.6	23.1	6.4	2.6	7.9
50	0.9	3.1	22.6	9.0	22.2	5.7	2.3	6.8
100	5.1	8.5	24.0	9.0	16.5	4.0	0.8	3.3

in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.8).

Table 31 反応pHの影響([ImpSA]/[UO₂²⁺]=25)

pH	HPLC yield(%)							
	ImpSA	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
6.3 ^a		17.0	34.8	6.8	13.5	2.7	0.8	2.6
7.0 ^a		8.6	21.3	4.7	13.5	1.9	0.7	4.4
7.0 ^b		7.2	12.6	7.4	20.6	7.4	3.2	7.0
7.4 ^b		6.0	11.6	7.0	22.3	7.4	3.2	8.2
7.8 ^b	0.5	5.4	17.2	8.6	23.1	6.4	2.6	7.9

a: 0.2M imidazole-HNO₃ buffer.

b: 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer.

5-3-2 Imp(S)A縮重合反応における反応時間の検討

前項よりImp(S)A縮重合反応の最適条件は[Imp(S)A]/[UO₂²⁺]=25~50, N-ethylmorpholine buffer(pH7.0~7.4)であることが判明した。そこでこの条件を用いて反応時間の検討を行った。結果をTable 32に示す。

Table 32 Imp(S)A縮重合反応における生成物の時間推移

time(h)	HPLC yield(%)								
	ImpSA ¹	ImpSA ²	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
0	46.0	46.3	7.7						
0.5	24.3	25.7	3.5	9.0	2.0	5.0	0.9		0.5
4	3.2	3.3	4.0	12.8	6.4	20.6	7.4	1.8	6.3
8	0.6	0.9	3.5	13.6	7.0	22.0	8.4	1.9	7.2
24	0.5	0.4	3.1	15.2	5.6	24.1	8.1	2.1	8.4
72			3.5	15.6	3.9	25.2	8.9	2.0	8.6
120			3.5	15.8	3.2	23.9	8.0	2.1	8.0

[Imp(S)A]=50mM in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.0) at 30°C.

*ImpSA¹=(Rp)-Imp(S)A, ImpSA²=(Sp)-Imp(S)A

5-3-3 Xp(S)A縮重合反応におけるアゾール基の置換基効果

ImpAのアナログであるImp(S)Aはチオリン酸基に不斉を有する。従ってImp(S)Aを更にRp-及びSp-ジアステレオマーのそれぞれに分離後、各ジアステレオマーを縮重合反応に用い

ることで酵素反応の場合と同様、縮重合反応の立体化学的な進行を解明できると考えられる。しかしながらImp(S)Aジアステレオマー異性体間のHPLC分析による R_T はほとんど同一であり、異性体分離はHPLC分取を用いても困難であることが予想される。またImp(S)Aの反応性はチオリン酸基の導入によって低下しているが、依然として活性なイミダゾリド基を含んでいるため、分離操作中に加水分解を引き起こすおそれがある。そこで分離が容易であり、かつ活性を保持したアゾール基(X)を有するXp(S)Aの合成を検討し、更にこれらの縮重合反応について反応性を確認することにした。まずジアステレオマー混合物についてBztria-p(S)A縮重合反応の結果をTable 33に、Bzimp(S)Aの結果をTable 34に示す。

Table 33 Bztria-p(S)A縮重合反応 (diastereomer mixture)

time(d)	HPLC yield(%)				
	Bztria ¹	Bztria ²	pSA	Rp-2	Sp-2
0	44.0	33.9			
1	22.5	9.0	11.9	6.8	2.4
3	16.9	6.0	13.9	6.4	2.7
5	16.6	5.9	13.5	6.6	2.9
7	16.2	5.2	12.1	5.6	2.7

[Bztria-p(S)A] / [UO₂²⁺]=25 in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0) at r.t.

*Bztria-pSA¹=Rp-diastereomer, Bztria-pSA²=Sp-diastereomer

Table 34 Bzimp(S)A縮重合反応 (diastereomer mixture)

time(d)	HPLC yield(%)								
	Bzim ¹	Bzim ²	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	Rp-4
0	47.8	51.2	0.5						
1	35.8	30.5	1.6	5.8	1.2	2.0	1.0		
2	23.9	16.3	1.4	7.8	4.6	6.4	2.8	0.3	1.4
4	11.5	5.0	1.8	10.0	9.1	15.9	6.1	0.9	4.2
7	2.2	1.8	2.5	13.3	13.2	16.8	7.5	1.1	6.2
10			4.0	15.5	14.4	17.2	7.4	1.1	6.2
12			4.5	15.1	13.6	16.9	8.7	2.0	6.4

[Bzimp(S)A] / [UO₂²⁺]=25, in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0) at 30° C,

*BzimpSA¹=Rp-diastereomer, BzimpSA²=Sp-diastereomer

5-3-4 縮重合反応に対するBzimp(S)Aジアステレオマー異性体の立体配置の影響

前項の結果では、反応はBzimp(S)A系において効率よく進行することが判明した。そこでこのジアステレオマー混合体をHPLC分取によってRp-体とSp-体に分割し、それぞれについて縮重合反応を試みた。結果をTable 35及びTable 36に示す。

Table 35 Bzimp(S)A縮重合反応 (Rp-diastereomer)

time(d)	HPLC yield(%)							
	Bzim ¹	Bzim ²	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3
0	93.2	6.5	0.3					
1	70.6	5.1	3.2	1.2	8.0			
2	46.8	6.4	3.1	2.8	17.5		1.4	
4	18.8	6.0	2.7	4.8	26.2	1.2	3.1	
7	5.8	2.1	3.7	7.2	19.2	2.2	3.4	0.9
10	1.6		4.9	8.6	19.7	5.0	4.9	1.0
12			5.3	8.7	21.0	4.6	4.7	0.9

[Rp-Bzimp(S)A] / [UO₂²⁺]=25, in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0) at 30° C,

*BzimpSA¹=Rp-diastereomer, BzimpSA²=Sp-diastereomer

Table 36 Bzimp(S)A縮重合反応 (Sp-diastereomer)

time(d)	HPLC yield(%)									
	Bzim ¹	Bzim ²	pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	Rp-4	Rp-5	Rp-6
0	12.4	86.2	0.7							
1	9.3	50.1	0.9	6.7	0.3	6.6		0.8		
2	9.0	20.7	0.9	8.5	0.6	21.1	0.8	3.9		
4	7.6	10.1	1.0	9.9	1.1	20.6	1.7	9.7	5.1	
7	5.5	2.6	1.7	12.7	1.8	25.0	2.6	14.3	8.3	2.0
10	2.8		2.1	13.7	2.9	27.9	2.7	14.7	9.4	2.3
12			2.6	15.5	3.0	28.2	2.8	15.5	7.3	2.5

[Sp-Bzimp(S)A] / [UO₂²⁺]=25, in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0) at 30° C,

*BzimpSA¹=Rp-diastereomer, BzimpSA²=Sp-diastereomer

5-4 考察

5-4-1 チオホスホアゾリドの合成法

1) Imp(S)Iの合成

Imp(S)I (1)の合成法に関連して、そのデオキシヌクレオチドアナログであるデオキシチミジン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)dT]及びウリジン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)U]の合成がEcksteinらによって報告されている⁶⁷⁾。

当初この報告に従い、トリイミダゾリル-1-ホスフィン硫黄(Im₃P=S) (2)と2',3'-ジ-O-アセチルイノシン(3)から種々の反応条件下で(1)の合成を試みた(Fig.44a)。しかしながら(3)の5'-水酸基が反応せずほとんどイミダゾリド化しなかったことより、この手法

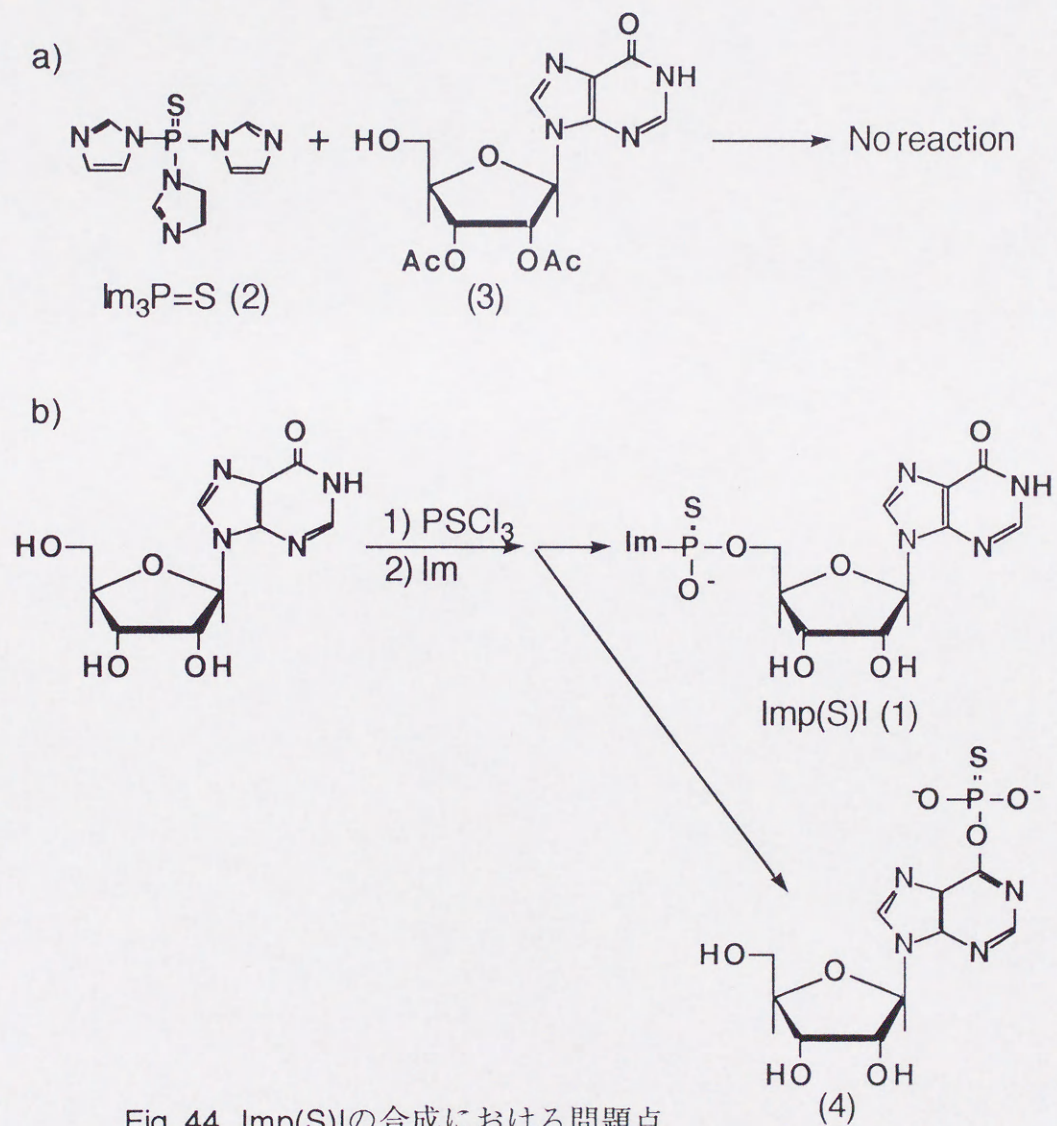


Fig. 44 Imp(S)Iの合成における問題点

から(1)を合成することはできなかった。そこでイノシンを PSCl_3 によってチオホスホリル化した後⁶⁸⁾、この中間体のチオホスホクロリデートを単離せずに若しくは一度単離した後ジイミダゾリド化し、引き続いてアルカリ加水分解を行うことによってモノイミダゾリド体(1)を合成する手段を検討した。その結果、本方法より(1)を合成することができた(Fig.44b)。ところが、本合成法を用いた場合生成物のHPLC分析において副反応物(4)が50%以上生成するという問題点が見出された(Fig.45)。

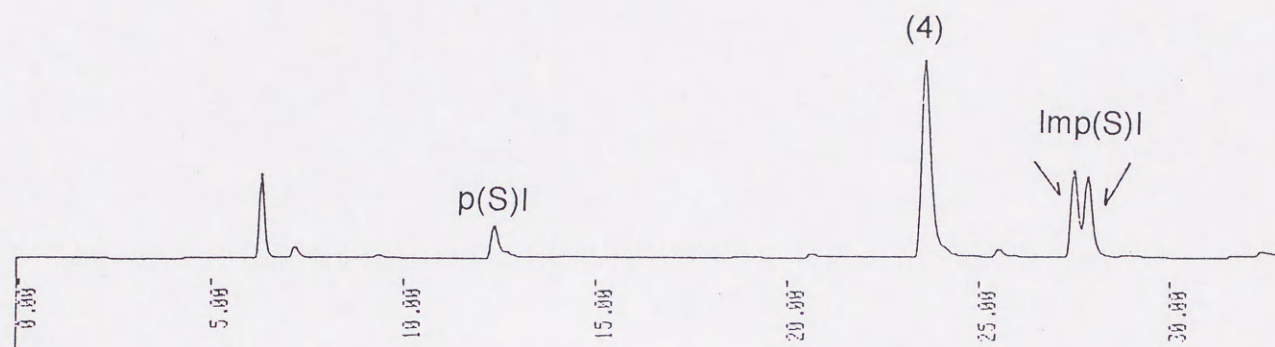


Fig. 45 Imp(S)Iの合成—HPLC分析—

この副反応物を以下の方法を用いて確認したところ [(a)UV測定, (b) ^1H NMR, (c) ^{31}P NMR, (d)無水酢酸/ピリジン処理前後のHPLC R_T の比較, (e)酵素処理(SVPD, Nuclease P1, Nuclease S1)前後のHPLC R_T の比較]、(4)はイノシンをチオホスホリル化する反応の際、イノシンのヒポキサンチン環・O(6)位がチオホスホリル化して生成した6-O-チオホスホリルイノシンであることが判明した(Fig.44b)。

ところで、イノシンの類似プリンヌクレオシドであるアデノシン及びグアノシンについて PSCl_3 を用いたチオホスホリル化反応は、目的物のヌクレオシド-5'-チオリン酸をそれぞれ58%及び35%の収率で生成することが報告されている⁶⁹⁾。更に本研究においてアデノシンからImp(S)Aの合成を検討したところ、Imp(S)AはHPLC分析において収率約60%で得られた。

イノシンに対する本方法の適用は、ヒポキサンチン環が優先的に修飾されるという望ましくない結果を生じた。(1)は合成可能であるが、リボース-5'-水酸基が効率よくチオホスホリル化されないために収率の低下は避けられないと思われる(最終的な単離収率は10%

程度である)。イミダゾリド体は縮重合反応の出発モノマーとなるので、効率よく合成されることが望ましい。よって、本方法を用いた(1)の合成については更なる改善が必要である。即ち、本合成法ではO(6)位のチオホスホリル化が主な副反応であるので、O(6)位を適切な保護基によって保護した後、チオホスホリル化及びイミダゾリド化を行うことで収率の改善が期待できると思われる。

2) Xp(S)Aの合成

Xp(S)Aの合成は、PSCl₃を用いたImp(S)Iの合成法に準じて行った。即ち、アデノシンをりん酸トリエチル中でPSCl₃によってチオホスホリル化した後、生成した中間体を単離せず直接アゾール類(X=Im, Bzim, Bztria)を加えジアゾリド体とした。続いてこれをアルカリ加水分解して目的物を得た(Fig.43)。目的物の収率はジアゾリド化のとき使用したアゾールの反応性に応じて変化した(Xp(S)A yield; Im>Bzim>Bztria)。なお、Bzimp(S)A・Rp及びSp-ジアステレオマーのそれぞれは、HPLC分取によってBzimp(S)Aジアステレオマー混合物を分離することで得られた。

Table 37 Properties of adenosine-5'-thiophosphoazolide [Xp(S)A]

Xp(S)N configuration		³¹ P NMR (ppm)	HPLC retention time (ODS)	total yield (Rp+Sp, %)
Imp(S)A	Rp	47.31	35.7 min	42.3
	Sp	47.15	36.2min	
Bzimp(S)A	Rp	46.75	46.4 min	28.8
	Sp	46.16	47.8 min	
Bztriap(S)A	Rp	—	42.6 min	3.2
	Sp	—	43:1 min	

5-4-2 Imp(S)Iの縮重合反応

1) 各種金属イオンの触媒効果

ウラニルイオンはImpNの核酸塩基及びその修飾の種類に関わらず、これらの縮重合反応を効率よく触媒して、2',5'-りん酸ジエステル結合を有するオリゴヌクレオチドを優先的に生成する。しかしながらチオリン酸基を導入したアナログであるImp(S)Nに関して、金属イオンを触媒とする反応は本研究以前に検討されていなかった。そこでまず、各種金属イオンを触媒としたときのImp(S)Iの反応性(ピロりん酸結合形成反応及び縮重合反応)について検討を行った。その結果、次のことが判明した(Fig.46)。

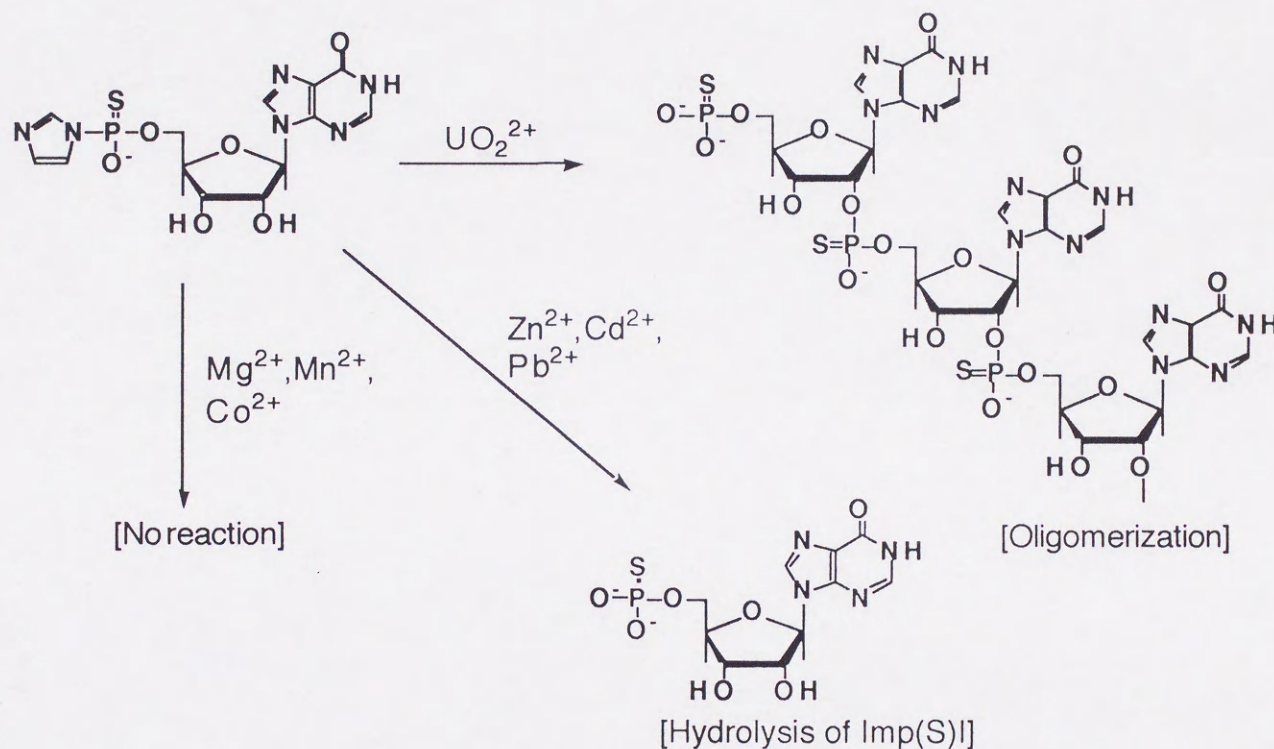


Fig. 46 各種金属イオンに対するImp(S)Iの反応性の相違

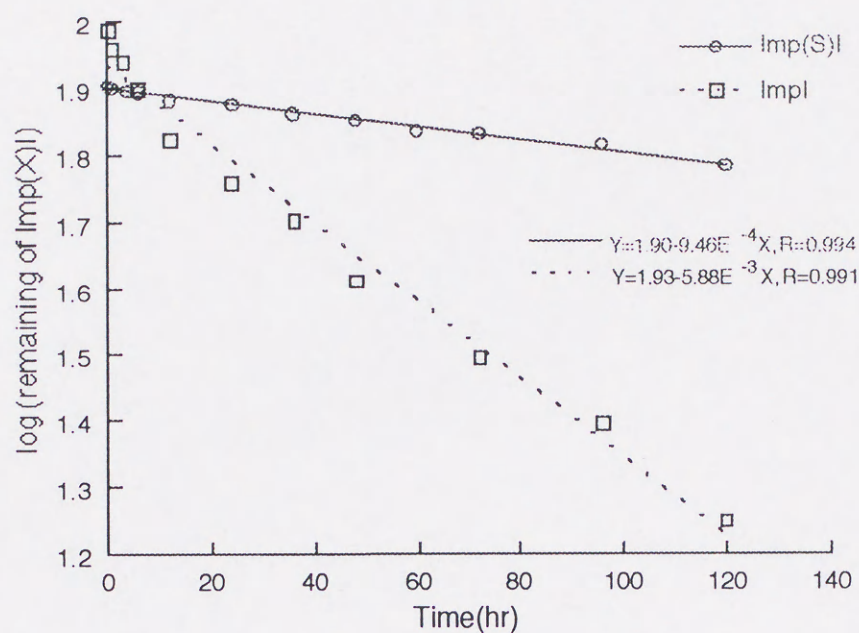
- i) ウラニルイオンは縮重合反応における触媒活性を有する。しかしながら、オリゴマー鎖長の伸長は抑制されていて5量体程度までしか生成しない。
- ii) $Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}$ イオンは縮重合反応触媒としての活性をほとんど示さなかったが、Imp(S)Iの加水分解反応を $Cd^{2+} \geq Pb^{2+} \gg Zn^{2+}$ の順に応じて促進した。ただしこの反応は高い金属イオン当量比を必要とした($[Imp(S)I] / [M^{2+}] = 1$)。
- iii) $Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}$ イオンは縮重合反応及び加水分解活性をほとんど示さなかった。ま

た、ピロリン酸結合形成反応に関する触媒活性も認められなかった。

iv) Imp(S)IはImpIと比較した場合、加水分解に対してより安定であった。

Imp(S)Iはりん酸基に酸素原子よりも電子供与性の低い硫黄原子が導入されていることから、このホスホイミダゾリド結合は通常のImpIよりも安定であることが示唆される。従って、酸加水分解によるImp(S)Iのモノりん酸体への分解はImpIより遅いと思われる。しかしながら、ピロリン酸結合形成反応で高い触媒活性を示す Mg^{2+} , Mn^{2+} イオンにほとんど活性が確認できないほど、ホスホイミダゾリドの反応性が低下しているとは予想し得ないことであった。そこでこの反応性に関して、Imp(S)I及びImpIの加水分解半減期を中性水溶液中(200mM N-ethylmorpholine- HNO_3 buffer, pH7.0)、 $20^{\circ}C$ の条件下で測定した(Fig.47)。その結果、Imp(S)IはImpIと比較して実際に6倍以上安定であり、反応性の乏しいことが分かった(Table 38)。

おそらく Mg^{2+} 及び Mn^{2+} イオンはImp(S)Iが安定であることによって相対的に触媒活性を欠如したと思われる。また Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} イオンが縮重合反応の触媒活性を持たない一方で加水分解触媒として機能できた結果は、これらの金属イオンが比較的ソフトな性質であることから、金属イオンがチオホスホリル基の硫黄原子に配位することでりん原子の電子密度を低下させ、 H_2O の求核攻撃を容易にしたことが示唆される。加水分解活性の強度は、これらイオンの硫黄原子への親和性の違いを直接的に反映していると思われる。



in 0.2M N-ethylmorpholine buffer(pH7.0), at 20°C.

Fig. 47 Hydrolysis of Imp(X)I [X=O, S]

Table 38 Half life of Imp(X)I [X=O, S]

compound	$k(\times 10^{-3} \text{ h}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{h})$
Imp(S)I	2.18	318 (13.3d)
ImpI	13.6	51.0 (2.1d)

in 0.2M N-ethylmorpholine buffer(pH7.0), at 20°C.

ウラニルイオンはImp(S)Iの縮重合反応においても触媒として有効であった(Table 17)。ImpIを基質とする縮重合反応からは十数量体までの2',5'-オリゴイノシル酸が主生成物として、また副生成物として3',5'-結合を含む結合異性体を得られる(Fig.48)。Imp(S)Iの反応性について生成したオリゴマーの4量体までをHPLCによって単離後¹H NMRで構造を解析したところ、いずれも2',5'-ヌクレオチド間結合を有していることが示され、Imp(S)I系においてもヌクレオチド間結合形成反応は優先的に進行することが明らかとなった(Fig.49)。

これはImpN系と同様、ウラニルイオンがImp(S)Iとそのチオリン酸基及び2'-または3'-水酸基で配位したクラスター型の錯体を形成し、配位により活性化したImp(S)Iの3'-水酸基が隣接して配位したImp(S)Iのチオリン酸基を攻撃して2',5'-ヌクレオチド間結合を形成するためと思われる。

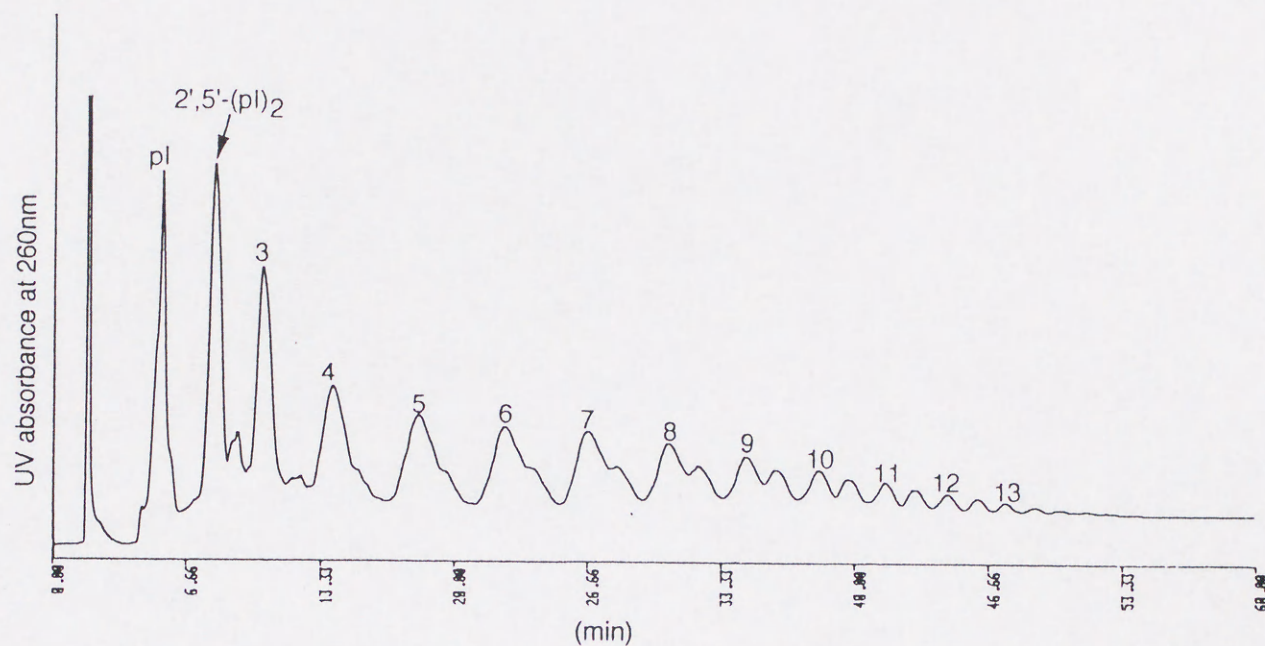


Fig. 48 Oligomerization of ImpI

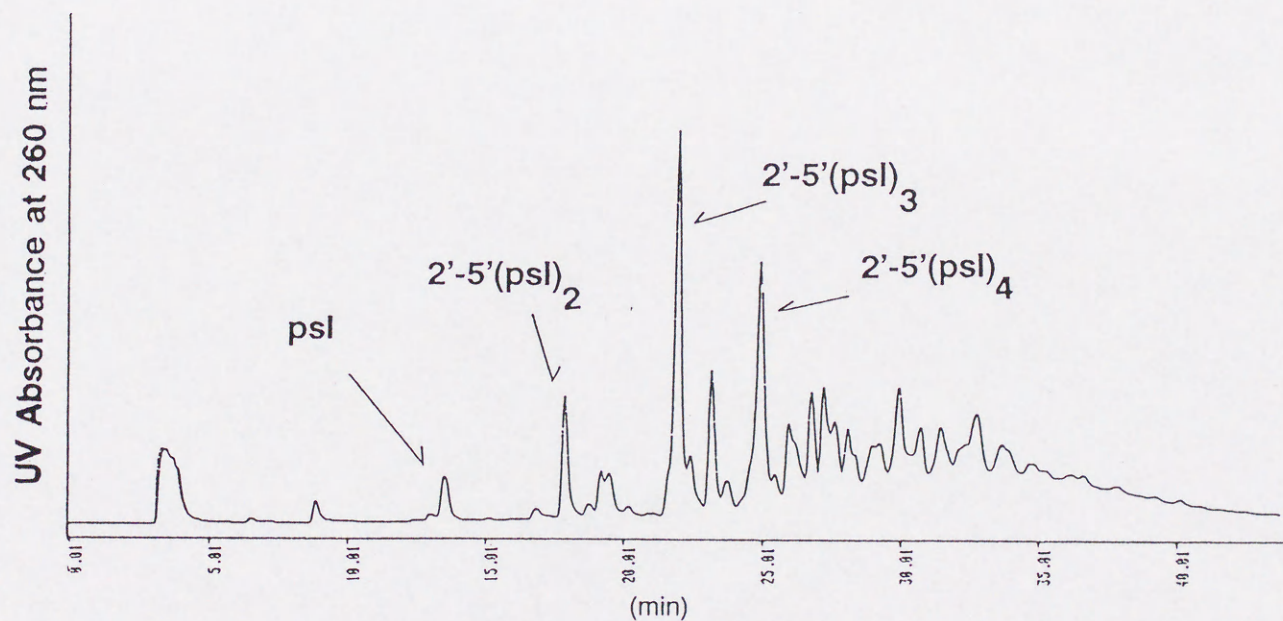


Fig. 49 Oligomerization of Imp(S)I

更に単離精製した2',5'-オリゴチオイノシル酸の2量体及び3量体についてSVPDを用いた酵素分解アッセイを行ったところ、いずれのオリゴマーも短時間で加水分解されることが分かった(Table 39)。この結果はオリゴマー中のチオリン酸基の立体配置がRp-型であることを示唆すると共に、本反応系が立体特異的に進行するという可能性を示している。

Table 39 Stabilities of 2',5'-oligoinosylate analogues

Oligomer	Half-life of SVPD digestion (37°C, hr)	
[p(S)] ₂	33.0	*Reference
[p(S)] ₃	9.5	(1) (Rp)-2mer=1d., (Sp)-2mer=40d.
2',5'-(pl) ₂	< 10min	(2) (Rp)-2mer=3hr, (RpRp)-3mer=1hr
2',5'-(pl) ₃	< 30min	(SpRp)-3mer=8hr

*(1): Nelson, P.S. et al, (1984) *J. Org. Chem.* **49**, 2314.

(2): Kariko, K. et al, (1987) *Biochemistry* **26**, 7127.

2) 反応条件の検討

Imp(S)Iの縮重合反応に関して、ウラニルイオンの触媒当量比はImpI系と比較して高い当量比を必要とした。また、反応pHもImpNの場合と同様、オリゴマーの鎖長伸長に強い影響を及ぼした。鎖長伸長の最も好ましいpHはpH=7.0~7.4の中性領域であった。これに対して、pH6.2の弱酸性条件では2量体生成とImp(S)Iの加水分解反応が優先した。このようなpH領域では基質のイミダズリド結合が活性化して反応性は増加するが、多量体型錯体が形成されにくく錯体の鑄型効果が充分発揮されないため、鎖長の伸長は抑制されることが考えられる。一方、pH7.8では縮重合反応の抑制及び未反応成分としてImp(S)Iの残存が認められた。高いpH領域では、錯体形成の促進によって鑄型効果は有効となるが、それ以上にイミダズリドの活性が低下するため、全体的に反応性は低下すると思われる(Table 24)。また、同一pHにおける緩衝溶液系の比較では(イミダズール緩衝溶液とN-エチルモルホリン緩衝溶液、pH7.0)、N-エチルモルホリン系で鎖長の伸長が促進された。一方のイミダズール緩衝溶液系である程度伸長が抑制された結果は、縮重合反応に伴うImp(S)Iのイミダズール基の脱離過程が、緩衝成分中のイミダズールとの平衡作用によって抑制されることを示唆している。

触媒当量比及び反応pHの検討結果から、オリゴマーの合成について次の最適条件が求められた。

i) オリゴチオイノシル酸 2 量体

$[\text{Imp(S)I}] / [\text{UO}_2^{2+}] = 50$; imidazole buffer (pH6.2)

ii) オリゴチオイノシル酸 3 ~ 4 量体

$[\text{Imp(S)I}] / [\text{UO}_2^{2+}] = 25$; N-ethylmorpholine buffer (pH7.0)

5-4-3 Imp(S)Aの縮重合反応

1) 反応条件の検討

Imp(S)A縮重合反応の検討結果から、Imp(S)I系と同様の傾向が得られた(Table 26~31)。

- a) 酸性領域(pH6.3)では 2 量体オリゴマーの生成及び活性化モノマーの加水分解反応が優先した。
 - b) アルカリ性側(pH7.8)では触媒当量比の低下に伴ってImp(S)Aの残存が認められるようになり、縮重合反応自体が抑制された。
 - c) N-エチルモルホリン緩衝溶液系にて鎖長伸長が効率よく進行した。
 - d) Imp(S)A残存量の追跡から、反応は30°C, 96時間で終了した(Table 32)。
- a)~d)の結果から、オリゴマーの鎖長伸長について次の最適条件を設定した。

$[\text{Imp(S)A}] / [\text{UO}_2^{2+}] = 25$; N-ethylmorpholine buffer (pH7.0)

2) 反応生成物について

Imp(S)Aの縮重合反応においてもImp(S)Iの反応結果と同様、主生成物として2',5'結合のオリゴマーを得た。従ってウラニルイオンを触媒とする縮重合反応では、基質がイミダゾリド体はもちろん修飾したチオホスホイミダゾリド体であっても、2',5'-オリゴヌクレオチドが優先的に生成すると結論できる。しかしながらチオホスホイミダゾリド体が基質となる場合では、鎖長伸長が明らかに抑制される結果を伴った。即ち、ImpI及びImpAはそれぞれ13及び16量体までの2',5'-オリゴヌクレオチドを生成するのに対して、Imp(S)I及びImp(S)Aからのオリゴマー鎖長伸長は4~6量体程度に過ぎなかった(Table 40)。この現象に

はおそらく、チオリン酸基の導入に伴うホスホイミダゾリドの反応性の低下が関与していると思われる。

Table 40 Formation of 2',5'-oligoribonucleotide analogues catalyzed by UO_2^{2+} ion

Substrate	$\frac{[\text{Substrate}]}{[UO_2^{2+}]}$	HPLC yield (%)						
		1mer	2mer	3mer	4mer	5mer	6mer	7mer~
ImpI	50	0.4	2.1	6.0	5.8	4.9	5.8	17.2 ^a
ImpA	50	0.1	6.0	12.8	10.7	6.6	4.1	20.2 ^b
Imp(S)I	25	3.6	7.9	24.5 ^c	11.9			
Imp(S)A	25	3.1	36.2 ^c	34.6 ^c	7.3	1.4		

*Reaction conditions: [Substrate]=50mM, N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.0), 25°C

**^aNumber was summed up to 13mer. ^bNumber was summed up to 16mer.

^cNumber was contained diastereomers.

ところで、チオホスホイミダゾリドモノマーはチオリン酸部に不斉点を有しているため、これを基質に用いることで反応の立体化学的な機構を解明する手掛かりになると思われる。これに関してImp(S)Aを用いた縮重合結果からは非常に興味深い現象が見出された。即ち、モノマーのチオホスホイミダゾリドについてR_p-体とS_p-体のジアステレオマー存在比がほぼ1 : 1であるにもかかわらず、生成物の構造解析からR_p-型の立体配置を有するオリゴチオアデニル酸が優先的に生成する結果を得た(Table26~32, Fig.50)。一方、Imp(S)Iの縮重合反応ではモノマー自体の合成効率が低く生成オリゴマーを大量に得ることが困難であることから、オリゴマーの詳細な構造を決定することができず、反応の立体選択性を詳細に検討することはできなかった。しかしながら、オリゴマーのSVPD切断アッセイ(Table39)、及びImp(S)Aの縮重合反応の結果を考慮すると、Imp(S)Iの縮重合反応も同様に立体選択的に進行すると思われる。

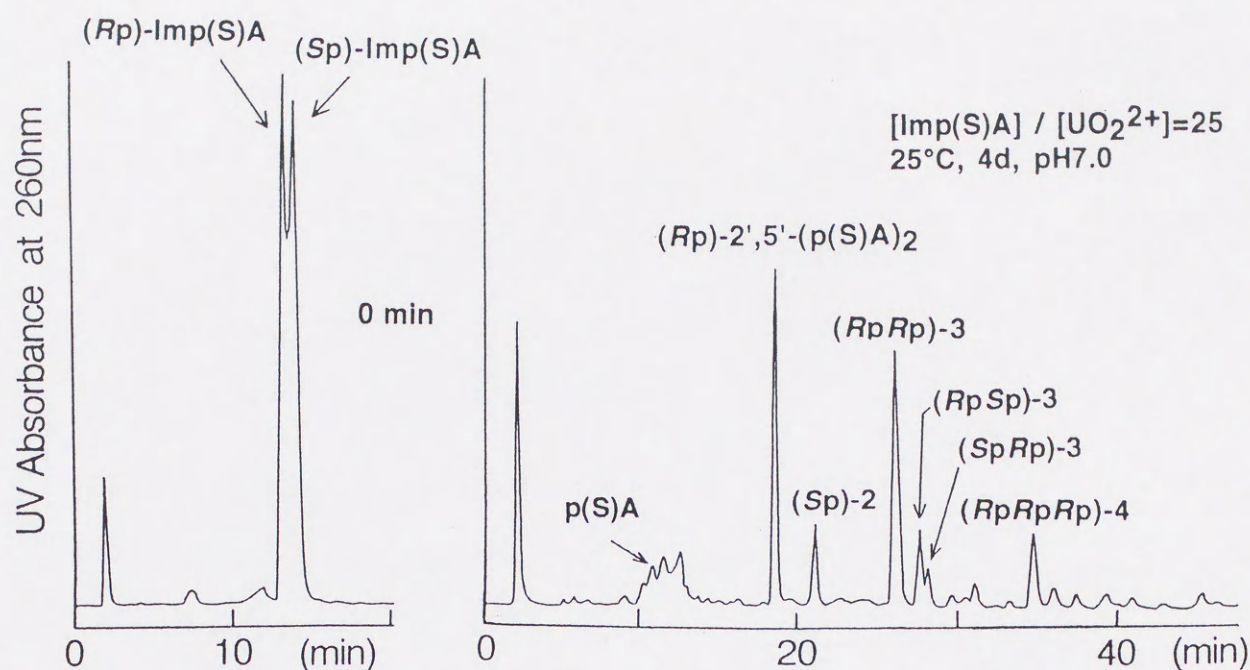


Fig. 50 Oligomerization of Imp(S)A

5-4-4 Xp(S)A(X=Bztria, Bzim)の縮重合反応

分離可能な活性型ジアステレオモノマーについて、Rp-及びSp-ジアステレオマー体のそれぞれに分割後縮重合反応を検討する、及び縮重合反応の結果から反応機構の解明を試みるため、チオリン酸活性基をイミダゾールから他のアゾール基に置換したXp(S)Aを合成し、まずそのジアステレオマー混合体の縮重合反応を行った。

1) Bztriap(S)A

ベンズトリアゾール(Bztria)の窒素原子は構造上、縮合したベンゼン環の電子共鳴寄与によってプロトン親和力が減少している。これによる塩基性の減少から、Bztriap(S)Aにおいてチオリン酸基に結合したBztria基は、Im基の場合と比較して脱離しにくいことが予想される。従ってBztriap(S)Aの反応性は、P-N結合が安定化されることによって低下すると思われる。また、平面性であり比較的嵩高いベンゼン環の存在は反応中間錯体を形成する際、立体的に障害となって反応の進行過程に負の影響を及ぼすと思われる。実際にBztriap(S)Aの反応性はImp(S)A系よりも低下しており、21日後でさえモノマーは完全に消費されていなかった(Table 33, Fig.51)。

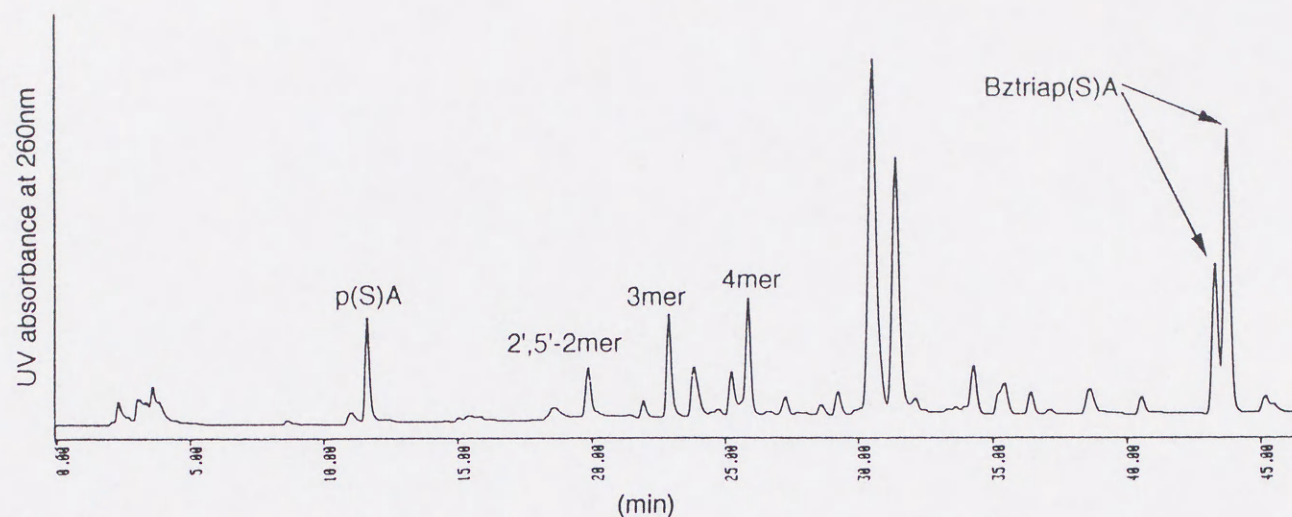


Fig. 51 Oligomerization of Bztriap(S)A
 [Bztriap(S)A] / [UO₂²⁺]=25, r.t, 21d, N-ethylmorpholine-HNO₃ buffer (pH7.0).

ところが興味深い現象として、縮重合反応過程においてジアステレオマー体の一方 [Bztriap(S)A²] が優先的に消費されることがHPLC分析によって確認された。しかしながら本反応系は縮重合効率が低い問題点があり、反応解析の基質として用いることを断念した。

2) Bzimp(S)A

ベンズイミダゾール(Bzim)はBztriaと同様塩基性が低下しているため(pKa;Bzim=5.5, Im=7.0)、これを活性基としたBzimp(S)AはImp(S)Aよりも安定であることが示唆される。縮重合反応にてImp(S)A系は1日間でモノマーが消失するのに対して、Bzimp(S)A系では10日間を要することがこの安定性を裏付けている。縮重合反応はBztriap(S)A系と同様に、本系においてもSp-ジアステレオマー体の優先的な消費傾向が認められた。ところで、Bzimp(S)A系はBztriap(S)A系と対照的に縮重合効率が優れており、かつHPLC解析も容易である(Table33)。そこでジアステレオマー分離体を用いた縮重合反応実験にはBzimp(S)Aを用いることにした。

5-4-5 Bzimp(S)Aジアステレオマー分離体の縮重合反応

1) Sp-Bzimp(S)A

R_p-及びSp-Bzimp(S)AのR_f値はほとんど同一であり、通常のカラムクロマトグラフィーを用いて分離することはできない。しかしながら、HPLC分析上でR_p-及びSp体のR_T間に1分間前後の差が生じることから、これらの分離はHPLC分取を行うことで可能となった。

ジアステレオマー異性体のうち、まずSp-Bzimp(S)Aの縮重合反応においては効率よく鎖長伸長が行われ、HPLC分析で推定6量体までのオリゴチオアデニル酸が生成することを認めた。しかもSVPD処理を行ったオリゴマーについては、いずれのピークも処理後に消失することが確認された。この結果から生成オリゴマーのほとんどすべては、その立体配置がR_p-配置であることが示唆された(Table 41)。

Table 41 HPLC yield of Xp(S)A oligomerization

X	Xp(S)A configuration	reaction time(d.)	HPLC yield (%)							
			pSA	Rp-2	Sp-2	RpRp3	RpSp3	SpRp3	Rp-4	Rp-5~
Im	Rp+Sp	4	3.6	28.5	7.7	27.6	5.1	1.9	7.3	1.4
Bztria	Rp+Sp	7	12.1	5.6	2.7					
Bzim	Rp+Sp	12	4.6	15.1	13.6	16.9	8.7	2.0	6.4	
Bzim	Rp	12	3.6	8.7	21.0	4.6	4.7	0.9		
Bzim	Sp	12	2.6	15.5	3.0	28.2	2.8	0.5	15.5	11.9 ^a

[Xp(S)A]=50mM, [Xp(S)A] / [UO₂²⁺]=25, in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0) at 30°C. ^a Number was summed up to 6mer.

2) Rp-Bzimp(S)A

R_p-Bzimp(S)Aの縮重合反応結果はSp-体の場合と対照的であり、明瞭な鎖長伸長を確認することができなかった。その主要な生成オリゴマーはSp-2量体及びSp配置を含む3量体であった(Table 41)。

5-4-6 反応機構

一連のチオホスホイミダゾリドアナログ、特にBzimp(S)Aを用いた結果は、ウラニルイオン触媒による2',5'-オリゴヌクレオチド合成反応の機構解明について有用な知見を与えた。縮重合反応において、Sp-Bzimp(S)Aは2',5'-結合型のRp-オリゴマーを非常に効率よく誘導し(Fig.52-1)、一方、Rp-Bzimp(S)Aは主としてSp-配置を含む2量体及び3量体を生成した(Fig.52-2)。これらの結果は、反応出発物と生成物との間でチオリン酸基の立体配置が反転することを示しており、本質的に本反応系が反応の前後において基質のチオリン酸の反転を伴う、SN₂(P)機構によって進行することを示唆している(Table 42)。

Table 42 Stereoselectivity of Xp(S)A oligomerization

X	Xp(S)A		[Rp-2]	[Rp-oligomers]	oligomers d.e. (%)
	configuration	[d.e.(%)]	[Sp-2]	[Sp-oligomers]*	
Im	Rp+Sp	[0]	3.7 : 1.0	4.4 : 1.0	Rp, 63.0
Bzim	Rp+Sp	[0]	1.1 : 1.0	1.6 : 1.0	Rp, 22.5
Bzim	Rp	[92.0]	1.0 : 2.4	1.0 : 2.0	Sp, 33.3
Bzim	Sp	[79.5]	5.2 : 1.0	11.3 : 1.0	Rp, 83.7

*oligomers which contained (Sp) only or (Sp)+(Rp) configurations.
d.e.; diastereomer excess.

ところで既に記述したように、(Rp+Sp)-Imp(S)A ジアステレオマー混合物[diastereomer excess (d.e.)=0%]からはRp-オリゴマーが選択的に生成した[d.e.=63.0%] (Table 42及びFig.53-1)。しかしながら(Rp+Sp)-Bzimp(S)A [d.e.=0%]の縮重合反応においては、立体選択的なオリゴマー生成反応はそれほど顕著に認められなかった[d.e.=22.5%] (Table42 及びFig.53-2)。

そこで本現象に関して検討を加えたところ、Rp-Imp(S)A及びSp-Imp(S)Aジアステレオマー間における相互の異性化が立体選択性の発現に関与することを見出した。即ち、HPLC分取により分離したRp-Imp(S)A及びSp-Imp(S)Aのそれぞれは、その加水分解半減期よりも短い時間で異性化して平衡状態を生じることが明らかとなった(Table43, Fig.54)。

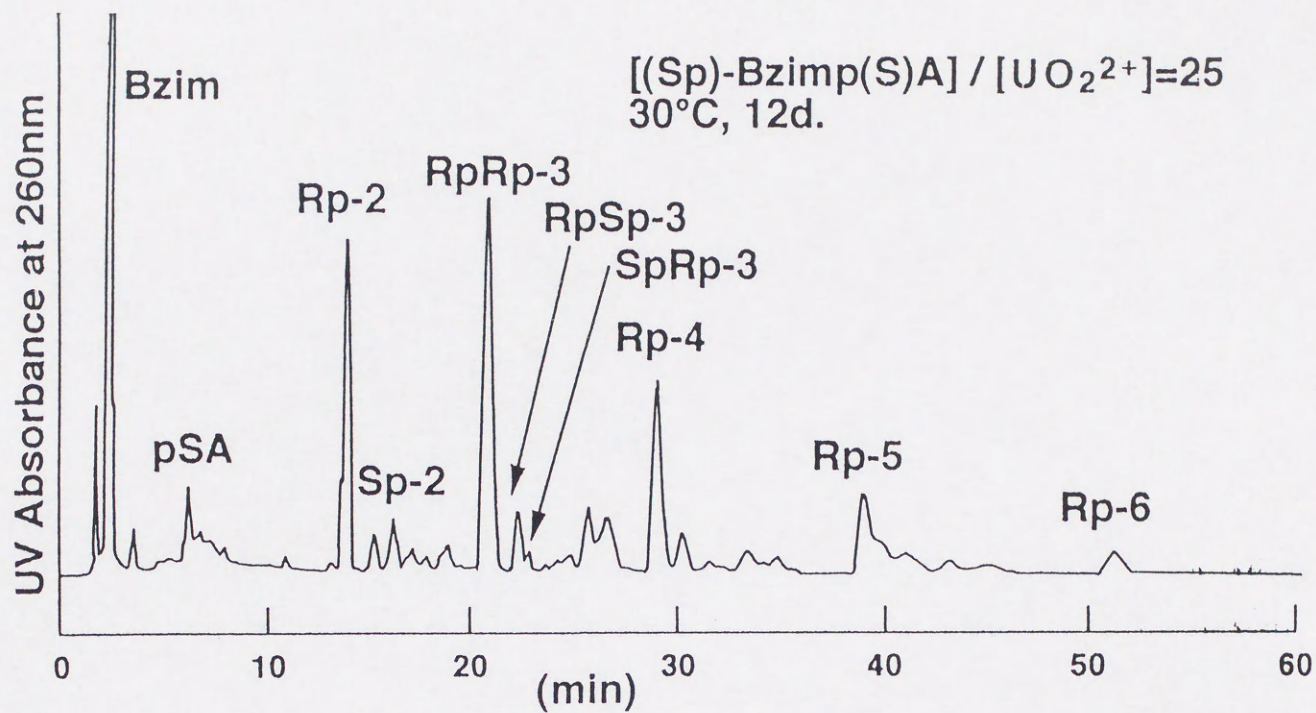


Fig. 52-1 Oligomerization of Sp-Bzimp(S)A

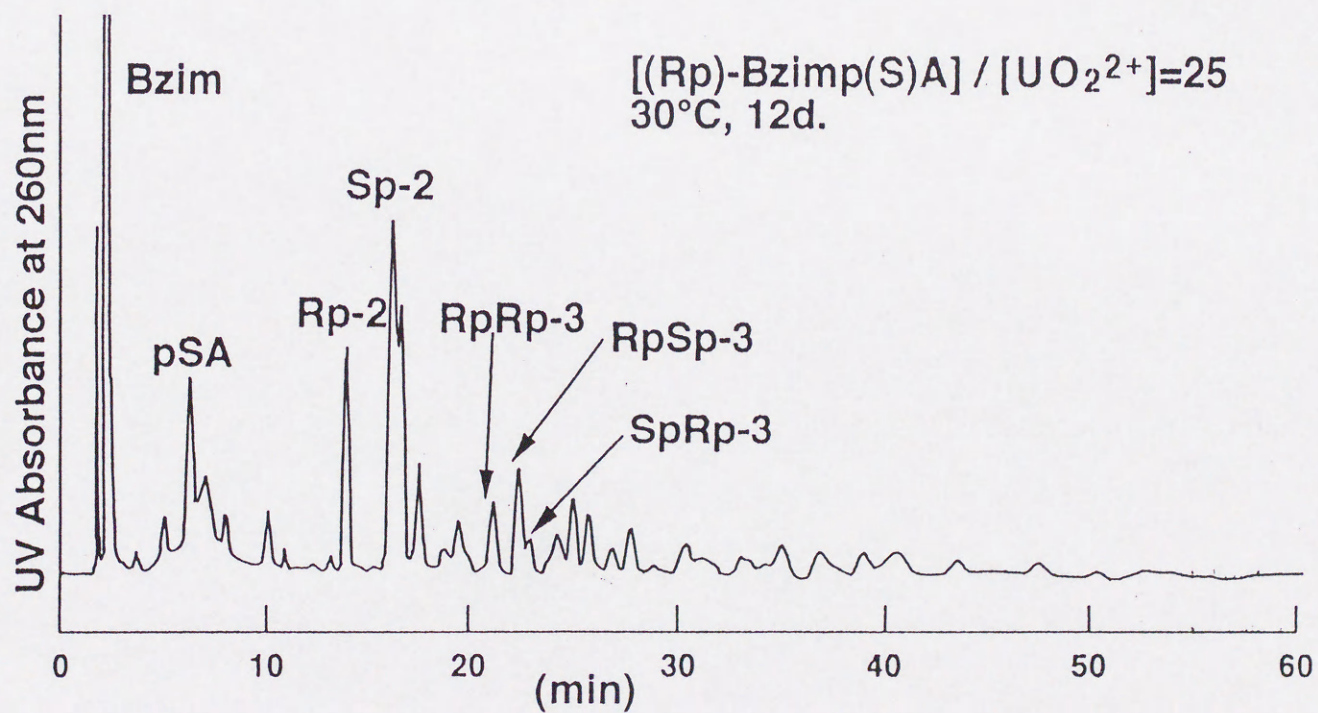


Fig. 52-2 Oligomerization of Rp-Bzimp(S)A

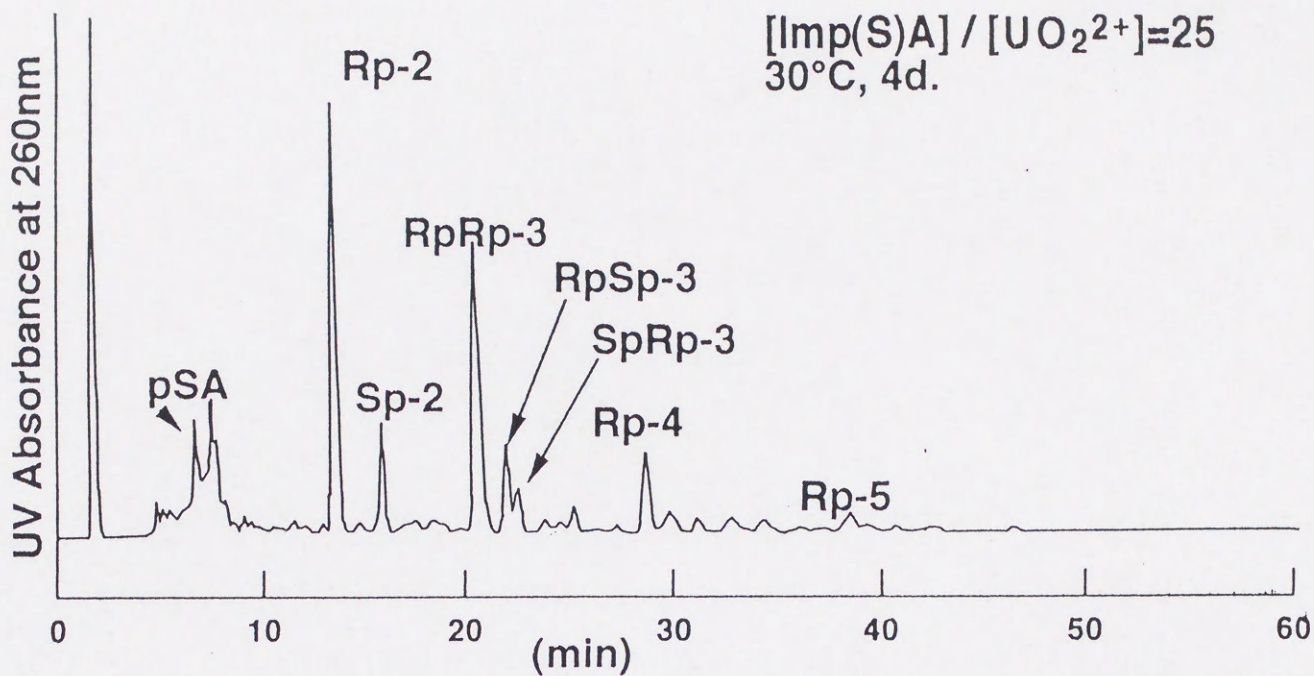


Fig. 53-1 Oligomerization of (Rp+Sp)-Imp(S)A

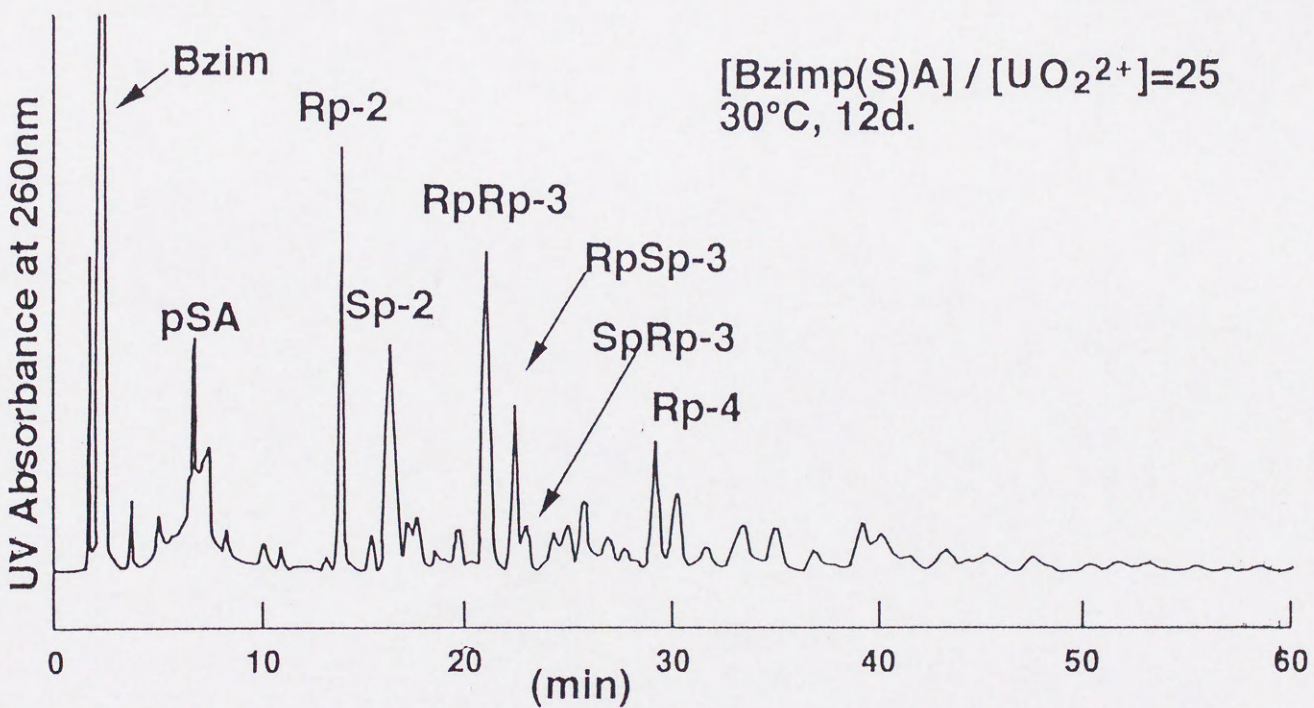
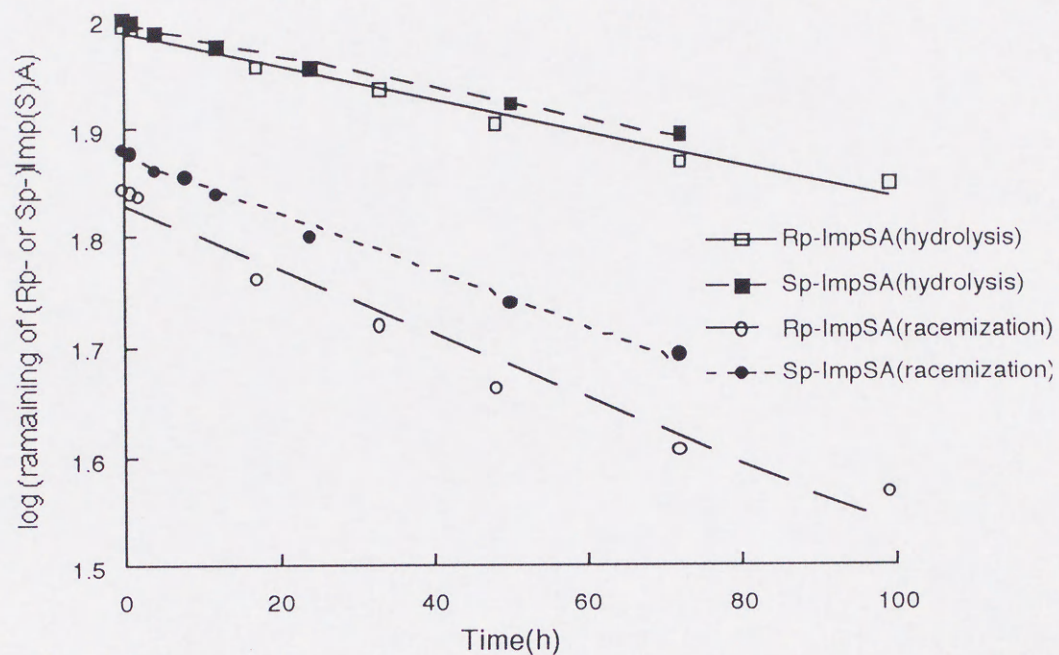


Fig. 53-2 Oligomerization of (Rp+Sp)-Bzimp(S)A



in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0) buffer, at 25°C

Fig. 54 Racemization of (Rp- or Sp-) Imp(S)A

Table 43-1 Racemization time of Imp(S)A

compound	racemization		*half-life of hydrolysis(d.)
	course	time(d.)	
(Rp)-Imp(S)A	Rp → Sp	4.3	8.2
(Sp)-Imp(S)A	Sp → Rp	4.7	8.6

measured at 25°C
in 0.2M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0) buffer

Table 43-2 Half life of Imp(X)A[X=O,S]

compound	k($\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$)	t _{1/2} (h)	temp.(°C)
Imp(S)A	3.45	201(8.4d)	25
ImpA	13.8	50.2(2.1d)	20

in 0.2M N-ethylmorpholine buffer(pH7.0).

甲斐荘ら⁷⁰⁾及びFeldmanら⁷⁰⁾は、NMRを用いたウラニルイオン-pA錯体の研究において、pAのりん酸基及び3'-水酸基がウラニルイオンに配位し、更にこれらのウラニルイオンが連なったクラスター型の錯体が形成されることを報告している(Fig.55)。

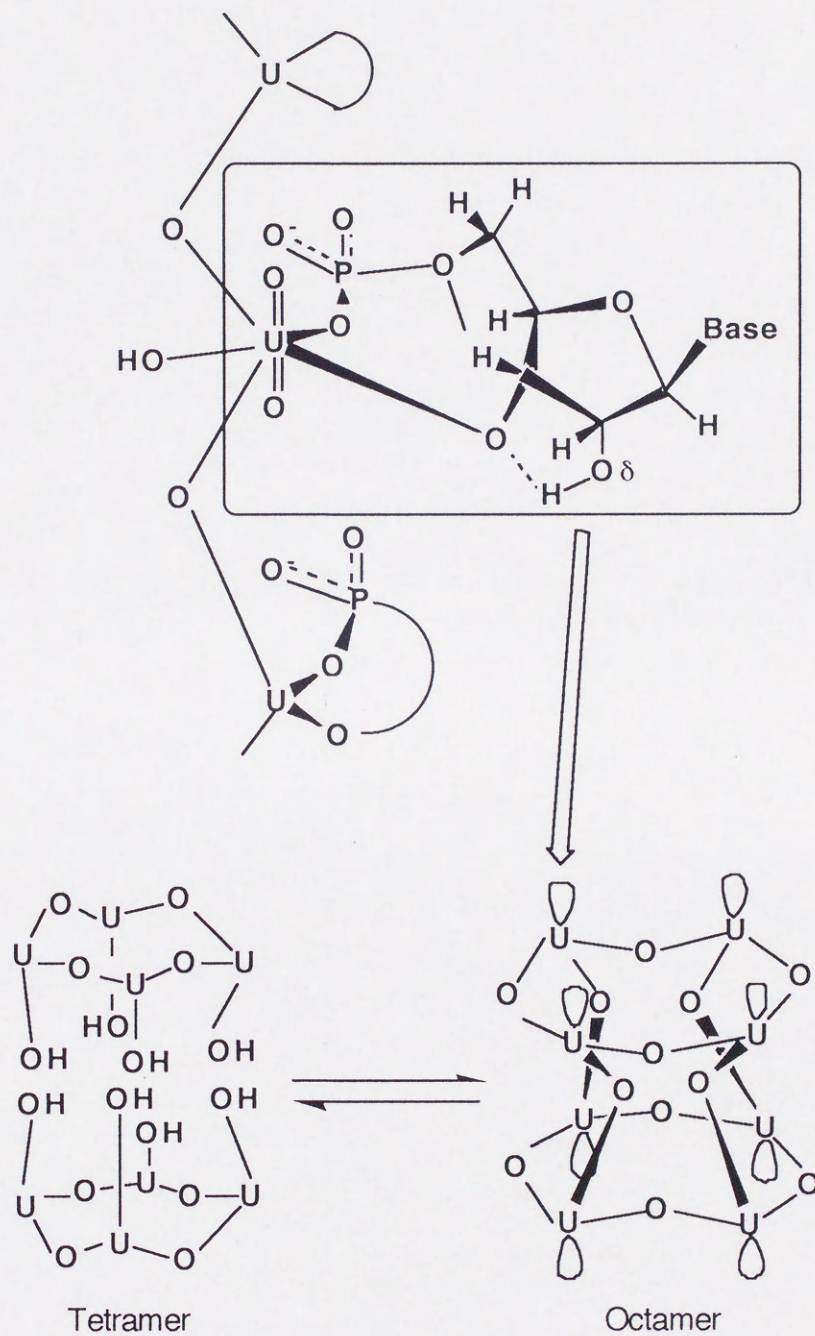


Fig. 55 Structure of the uranyl ion-pA complex⁷⁰⁾

おそらく本反応系の縮重合反応も、ウラニルイオン・Imp(S)A間でウラニルイオン・pA錯体に類似した錯体構造を形成して進行すると思われる。従って、ウラニルイオンへの配位部位はImp(S)Aのチオリン酸基及びリボースの3'-水酸基であることが示唆される。しかしながら、酸素は硫黄よりも電子供与性が強いこと、またHSAB則において「硬い」ウラニルイオンは「硬い」酸素陰イオンに対する親和性が大きいことから、チオリン酸基部位では酸素が硫黄に対して優先的にウラニルイオンに配位すると推定される⁷¹⁾。この場合、想定される配向状態を満たす条件として、Imp(S)AはSp-型の立体配置をとることが必要である。

縮重合反応は、同一クラスター錯体内の隣接して配位したImp(S)A・2分子間で起こる。配位したImp(S)AのSp-型チオリン酸基に対して、隣接するImp(S)Aの2'-水酸基が求核攻撃すると、Im基の脱離と同時に2'-水酸基と5'-チオリン酸との間で2',5'-りん酸ジエステル結合が形成される。このときチオリン酸基は反転してRp-型になる。この2',5'-ヌクレオチド間結合形成は、HPLCを用いた反応の追跡から逐次的に進行することが判明している。

結合形成反応過程では、配位状態においてリボース部位で形成されるアニオン性の水素結合環によって2'-水酸基の求核性が増大し、これが反応の推進に寄与すると考えられる⁷²⁾。ImpN/Imp(S)Nの縮重合反応でウラニルイオンに高い触媒活性が認められた結果は、この2'-水酸基の「活性化」が有効に機能していることを示唆している。

結論として、Imp(S)A系における立体選択的なオリゴマー生成反応は、次の過程を経て発現すると考えられる(Fig.56)。

- 1) Im(S)Aの立体特異的な配向がウラニルイオンへの配位によって引き起こされる。即ち、ウラニルイオンに対して優位に配位可能な立体配置をとるSp-Imp(S)Aが、異性化によって生じる。
- 2) 形成されたクラスター錯体中のImp(S)AのSp-チオリン酸基に対し、更に隣接して配位したImp(S)Aの2'水酸基が求核攻撃する。
- 3) Im基の脱離と同時にチオリン酸基の反転を伴う2',5'-ヌクレオチド間結合が $SN_2(P)$ 機構によって形成し、(Rp)-2',5'-オリゴチオアデニル酸が生成する。生成したオリゴマーへ次のImp(S)Aが付加することによって逐次的に鎖長が伸長する。

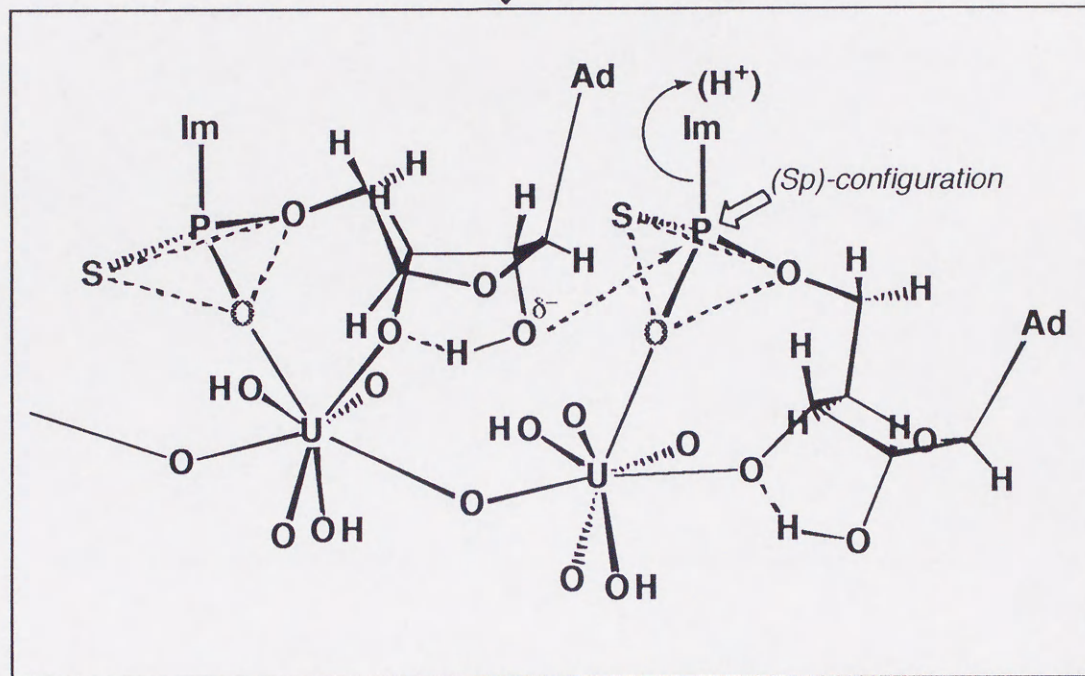
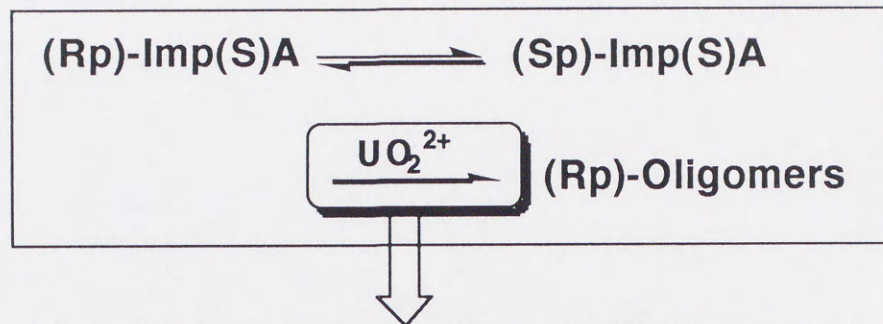


Fig. 56 Proposed mechanism of Imp(S)A oligomerization

Imp(S)Aを含むすべてのXp(S)N系において、縮重合反応は同様の反応機構を経て進行すると考えられる。ここで、チオリン酸基の酸素原子が容易に配位できる、また配位する際アゾール基が立体的に障害とならない立体配置をとるチオホスホアゾリド、即ちSp-Xp(S)Aが基質である場合、効率のよい反応進行が示唆されるが、実際にBzimp(S)Aジアステレオマー分離体を用いた検討でSp-Bzimp(S)Aの縮重合反応がスムーズに進行したことから裏付けられる。一方、配位・配向状態が不利となるRp-Xp(S)Aでは縮重合反応の抑制が予想されるが、これはRp-Bzimp(S)Aにおいてモノマーの消費速度が低下したこと、更に縮重合効率が低く鎖長伸長が抑制された結果によって支持でき得る。

更に、 $(R_p+Sp)\text{-Imp(S)A}$ 系におけるジアステレオマーの異性化現象と立体選択的なオリゴマー生成反応との関連性について、これまでの記述を含めて次のことが示唆される。

- a) Sp -体が R_p -体よりもウラニルイオンに対して配位しやすいことによって優先的に消費される。
- a') R_p -体もウラニルイオンに配位するが、 $SN_2(P)$ 機構によるオリゴヌクレオチド合成が起こりにくいため消費されず、一方の Sp -体のみが消費される。
- b) a)またはa')のどちらかの要因から R_p -体濃度が Sp -体濃度よりも高まることで、残った R_p -体モノマーは R_p -体と Sp -体間のラセミ化平衡作用によって Sp -体に異性化する。
- c) 異性化した Sp -体が再び縮重合反応に消費されるため、結果的に R_p -配置を有するオリゴヌクレオチドが優先的に生成する。

一方、同様なジアステレオマー混合体からなる $(R_p+Sp)\text{-Bzimp(S)A}$ 系で立体選択的なオリゴマー生成反応が明瞭に確認できなかった結果は、 $Bzimp(S)A$ ジアステレオマー間で異性化反応が観測されなかった現象を反映しているためと思われ、基質ジアステレオマー間における異性化が生成物の立体選択性を発現するために重要であることを示唆している。

ところでりん酸基における異性化反応は、一般的に脱離-付加機構によって進行し中間にメタりん酸を経由するとされている⁷³⁾。従って Imp(S)A ジアステレオマーの異性化についても、同様に安定なチオメタりん酸経由⁷⁴⁾で反応が進行しているのかもしれない。しかしながらこの異性化反応機構の詳細は不明であり、今後更に検討する必要があると思われる。

第6章 オリゴチオイノシル酸の物性

6-1 試料の調製

オリゴチオイノシル酸の構造決定、及び物性測定に関する試料は、縮重合反応後、反応溶液から各生成物を逆相系HPLCによって分取することで調製した(実験の部参照)。

6-2 UV分析

淡色効果(hypochromicity)とは、核酸がらせん構造などの高次構造を形成するとき、核酸塩基が隣接して積み重なるスタッキング相互作用(stacking)によって、UV吸収における見かけ上の吸光係数が減少する現象である。オリゴチオイノシル酸の淡色効果は以下の方法を用いて算出した。まず1 ODのオリゴマーを1.0M NaOH溶液中、室温で2日間アルカリ加水分解した。りん酸緩衝液でpH6.7に調整後、加水分解前後における試料の吸光度(260nm)を測定、及び比較することから算出した(実験の部参照)。各オリゴマーの淡色効果をTable 44に示す。

Table 44 オリゴチオイノシル酸の淡色効果

oligomer	hypochromicity(%) (hyperchromicity)			
	1st.	2nd.	3rd.	average
pSI	2.35 (1.02)	2.07 (1.02)	-7.08 (0.93)	-0.89 (0.99)
(pSI) ₂	9.86 (1.11)	10.0 (1.11)	8.00 (1.09)	9.29 (1.10)
(pSI) ₃	15.7 (1.19)	14.4 (1.17)	14.9 (1.17)	15.0 (1.18)
(pSI) ₄	16.9 (1.20)	16.7 (1.20)	16.2 (1.19)	16.6 (1.20)

オリゴマー鎖長の伸長と共に淡色効果が増大し、塩基間スタッキング相互作用の鎖長伸長に伴った増強が示された。

6-3 酵素(SVPD)分解

ヘビ毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)はR_p-配置型のチオリン酸基をもった2',5'-または3',5'-ヌクレオチド間結合を優先的に切断する。そこで、単離したオリゴマーにSVPDを加

え37°Cでインキュベーション後、HPLCによって分解生成物を分析し酵素分解による半減期を算出した。結果はTable 39(5章4-2)に前もって示した。

結果として、オリゴチオイノシル酸2量体及び3量体のどちらも比較的短時間の半減期を示したことから、これらオリゴマーのヌクレオチド間結合はR_p配置型のチオリン酸基から構成されていると思われる。

6-4 ¹H NMR 解析

オリゴマーの鎖長を¹H NMR解析によって決定した。結果をTable 45に示す。4量体までの鎖長を有するオリゴチオイノシル酸が帰属された。また、ヌクレオチド間結合の結合部位においては、リボース環H2'のケミカルシフトからいずれのオリゴマーも2',5'-ヌクレオチド間結合を有することが推定された。

Table 45 オリゴチオイノシル酸の¹H NMR解析

oligomer	H2	δ (ppm)	($J_{1',2'}$ (Hz)) H1'	H2'
pSI	8.23	6.16(6.1)		4.81
(pSI) ₂	8.07, 8.20	6.24(3.4), 5.94(3.7)		5.43~5.52*
(pSI) ₃	8.04, 8.07, 8.19	6.15(2.9), 6.06(4.5), 5.91(4.1)		5.22~5.28*
(pSI) ₄	8.04~8.19, 4signals	6.15(1.9), 6.04(5.0), 5.99(3.7), 5.91(3.7)		5.0~5.06* 5.21~5.3*

measured in D₂O

* broad peaks

第7章 2',5'-オリゴチオアデニル酸の物性

7-1 試料の調製

構造決定、及び物性測定に用いた2',5'-オリゴチオアデニル酸は、Imp(S)Aを大量スケールで用いた縮重合反応から以下の単離精製法を組み合わせることで調製した(実験の部参照)。

- 1) DEAE-Sephadex anion交換カラムクロマトグラフィー
- 2) ODS-silica中圧カラムクロマトグラフィー
- 3) RPC-5中圧カラムクロマトグラフィー
- 4) ODS-silicaカラムを用いたHPLC分取

7-2 UV分析

2',5'-オリゴチオアデニル酸の淡色効果(hypochromicity)はオリゴチオイノシル酸の場合と同様に算出した。(6章-2及び実験の部参照)。各オリゴマーの淡色効果をTable 46に示す。

Table 46 2',5'-オリゴチオアデニル酸の淡色効果

oligomer	hypochromicity(%) (hyperchromicity)			
	1st.	2nd.	3rd.	average
pSA	0.43 (1.00)	-0.31 (1.00)	0.49 (1.00)	0.20 (1.00)
Rp-2	19.5 (1.24)	16.2 (1.19)	16.8 (1.21)	17.5 (1.21)
Sp-2	17.6 (1.21)	17.6 (1.21)	15.2 (1.18)	16.8 (1.20)
RpRp-3	20.7 (1.26)	21.0 (1.27)	20.1 (1.25)	20.6 (1.26)
RpSp-3	24.6 (1.33)	23.0 (1.30)	20.9 (1.26)	22.8 (1.30)
SpRp-3	20.8 (1.26)	21.3 (1.27)	21.5 (1.27)	21.2 (1.27)
RpRpRp-4	23.1 (1.30)	25.2 (1.34)	24.3 (1.32)	24.2 (1.32)

cf. 2',5'-(pA)₂= 18.6%(1.23) ; 2',5'-(pA)₃= 23.2%(1.30); 2',5'-(pA)₄= 25.2%(1.34)

鎖長の伸長に伴って淡色効果の増大が認められ、塩基間スタッキング相互作用の増大が鎖長に依存することを示唆した。各鎖長における2',5'-オリゴマーの淡色効果は対応する非修飾型オリゴマーの値とほぼ同一であった。また、同一鎖長を有する立体異性体間にお

いて、淡色効果はほぼ一致しており、特にチオリン酸基周辺の立体配置の違いを反映しなかった。

7-3 CD測定

CD(circular dichroism)スペクトルの強度は吸光度に依存する。そこで各オリゴマーについてモノヌクレオチド残基当りの濃度が同一になるように、UVの淡色効果を用いて補正した試料を調製し測定に使用した。測定は、光路長0.2cmの石英セルを用いて行った。

7-3-1 オリゴマー鎖長及び立体配置の相違によるCDスペクトルの変化

本縮重合反応で得られた2～4量体までのオリゴチオアデニル酸の、25°CにおけるCDの測定結果をTable 47に示す。スペクトルの極大値及び極小値を分子楕円率 $[\theta]$ によって示している。更に2量体 (Fig.57)、3量体 (Fig.58)及び4量体 (Fig.59)のCDスペクトルを非修飾オリゴマーとの比較を含めて示す。また、Rp配置を有するオリゴマー2～4量体のCDスペクトルを示した(Fig.60)。

oligomer	2',5'-オリゴチオアデニル酸の分子楕円率	
	[θ]: 分子楕円率($\times 10^{-4}$)	
	$\lambda_{\max}([\theta])_{\text{nm}}$	
Rp-2	269.9 (+1.57)	251.5 (-1.47)
Sp-2	270.2 (+0.68)	251.7 (-0.93)
*2',5'-(pA) ₂	270.2 (+1.57)	251.2 (-1.49)
RpRp-3	270.2 (+1.94)	250.8 (-2.02)
RpSp-3	270.4 (+1.91)	250.9 (-1.83)
SpRp-3	270.0 (+1.44)	250.4 (-1.70)
*2',5'-(pA) ₃	270.3 (+2.11)	250.3 (-1.88)
RpRpRp-4	270.1 (+2.17)	250.2 (-2.24)
*2',5'-(pA) ₄	270.3 (+2.18)	250.4 (-1.86)

measured in 10mM NaH₂PO₄-NaOH(pH6.7) buffer at 25°C.

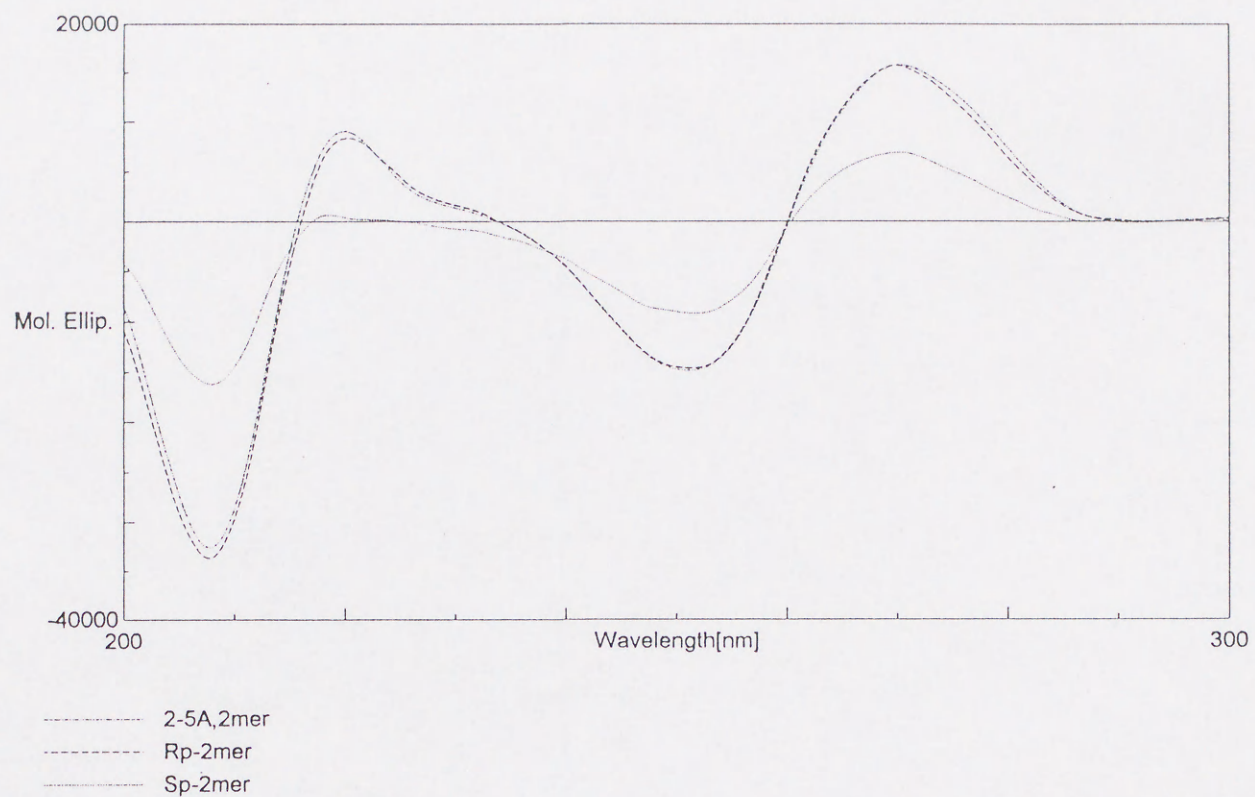


Fig. 57 CD spectra of 2',5'-oligoadenylate dimer analogues

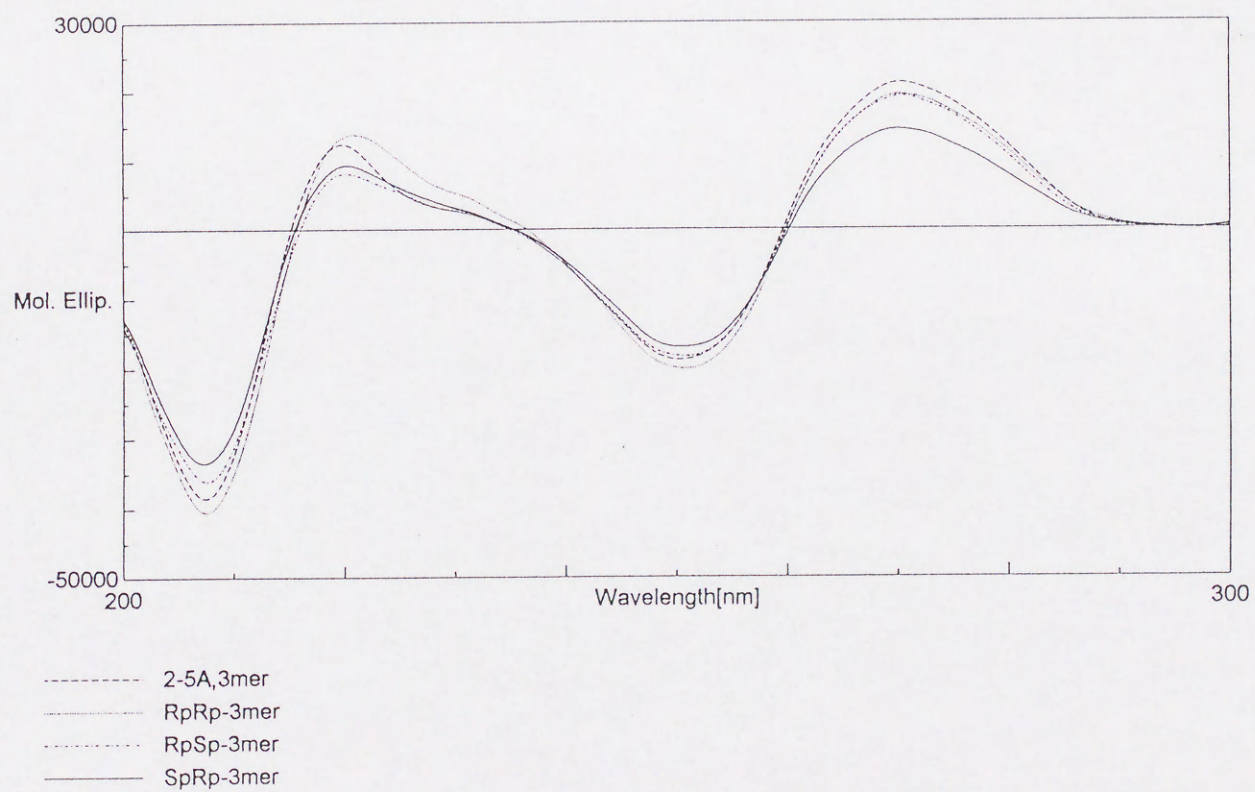
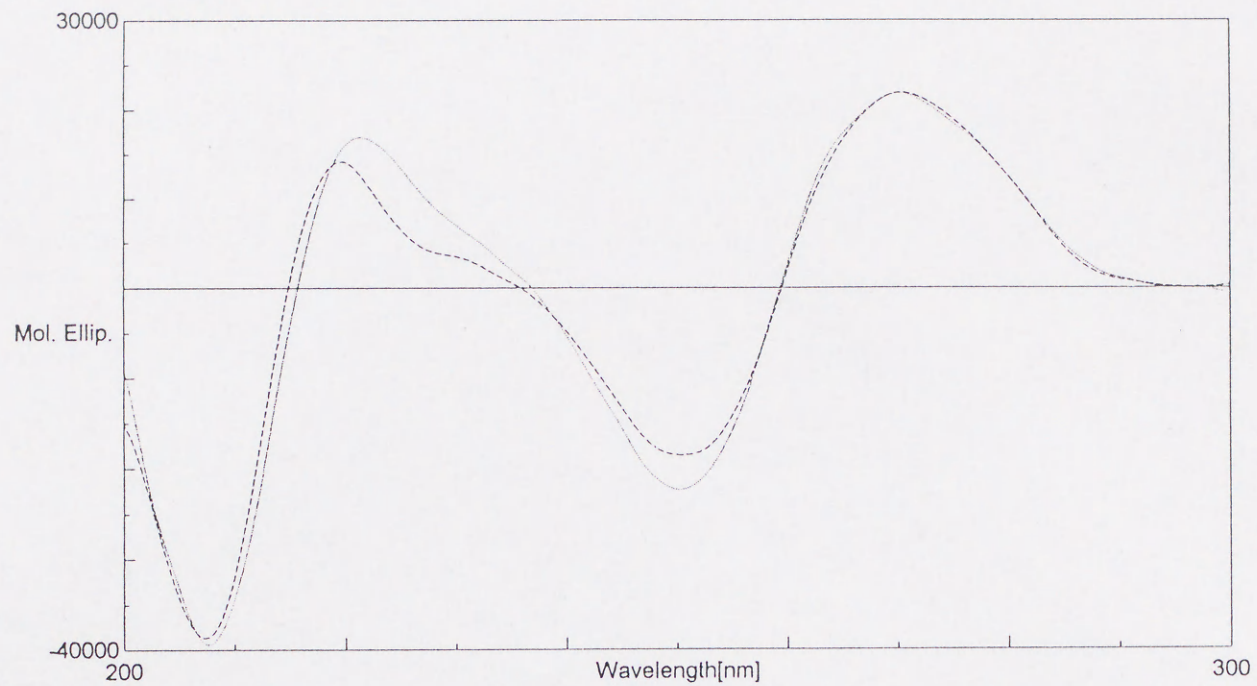
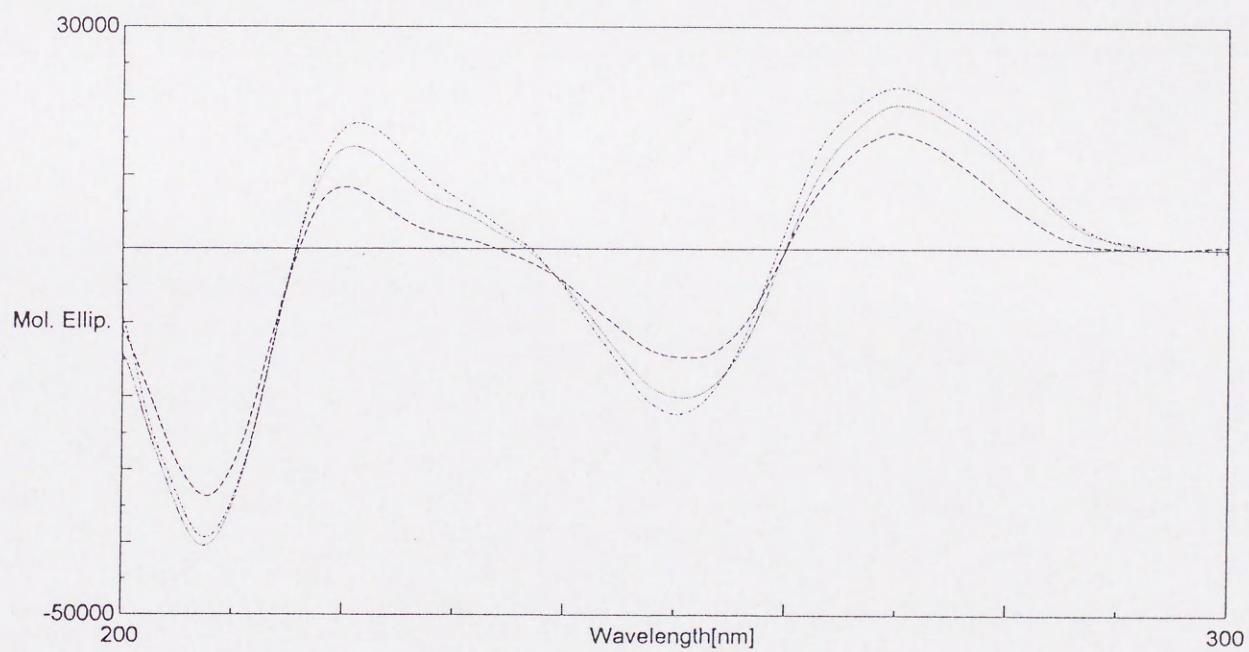


Fig. 58 CD spectra of 2',5'-oligoadenylate trimer analogues



----- 2-5A,4mer
 ----- RpRpRp-4mer

Fig. 59 CD spectra of 2',5'-oligoadenylate tetramer analogues



----- Rp-2mer
 ----- RpRp-3mer
 RpRpRp-4mer

Fig. 60 CD spectra of 2',5'-Rp-oligothioadenylates

7-3-2 CDスペクトルの温度変化

2',5'-オリゴチオアテニル酸・2~4量体について、5~75°Cの間で温度可変を行いCDを測定した。これらの内、代表的な結果をFig.61~64に示す。

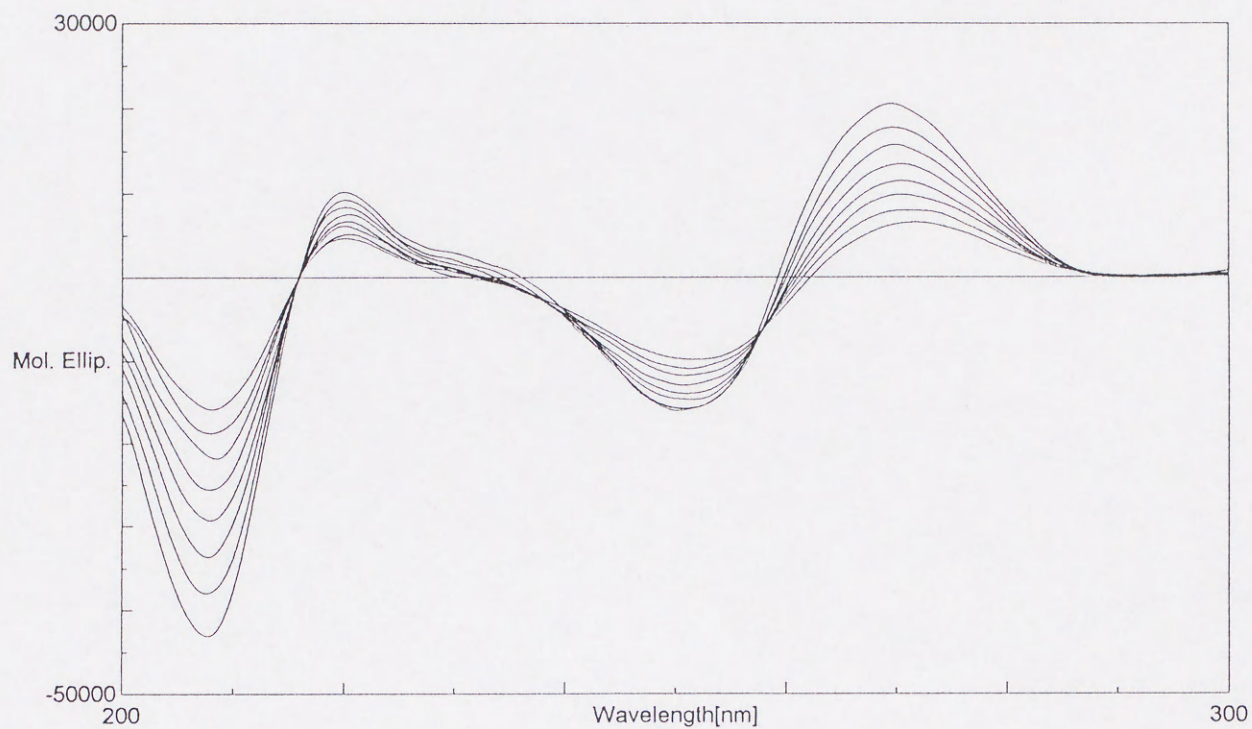


Fig. 61 CD spectra of Rp-2mer at various temperatures

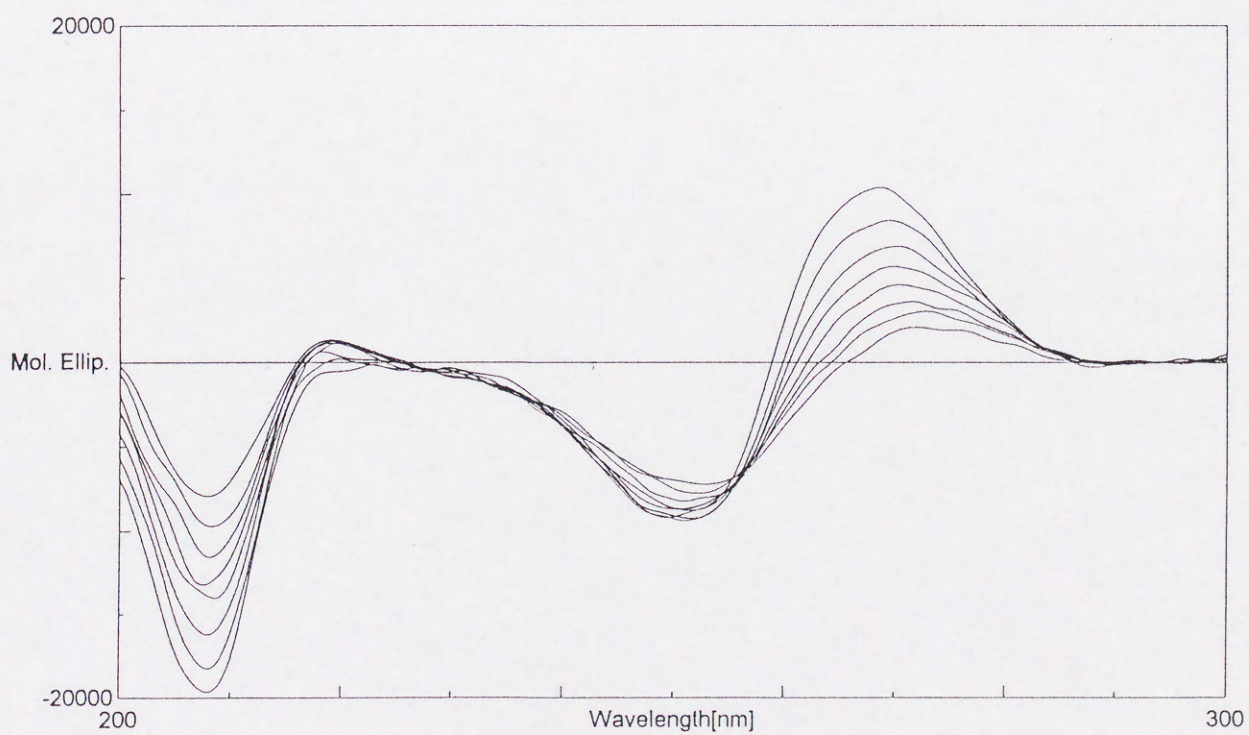


Fig. 62 CD spectra of Sp-2mer at various temperatures

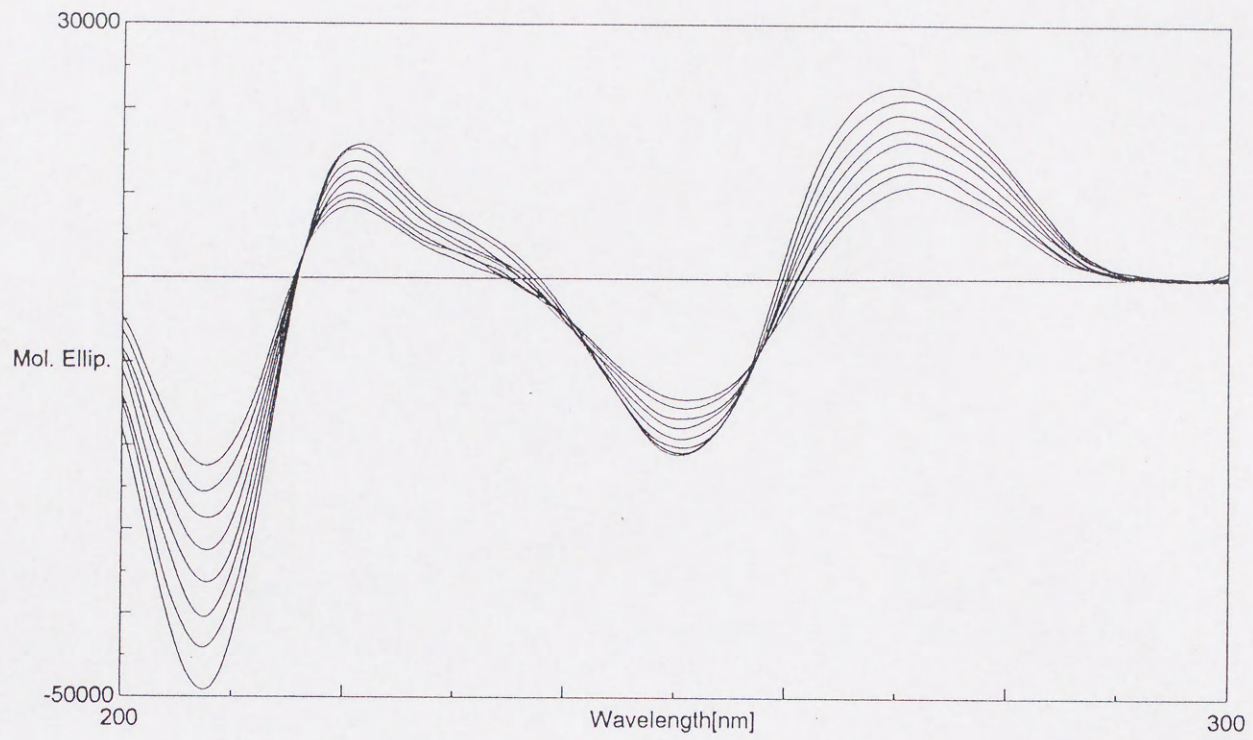


Fig. 63 CD spectra of RpRp-3mer at various temperatures

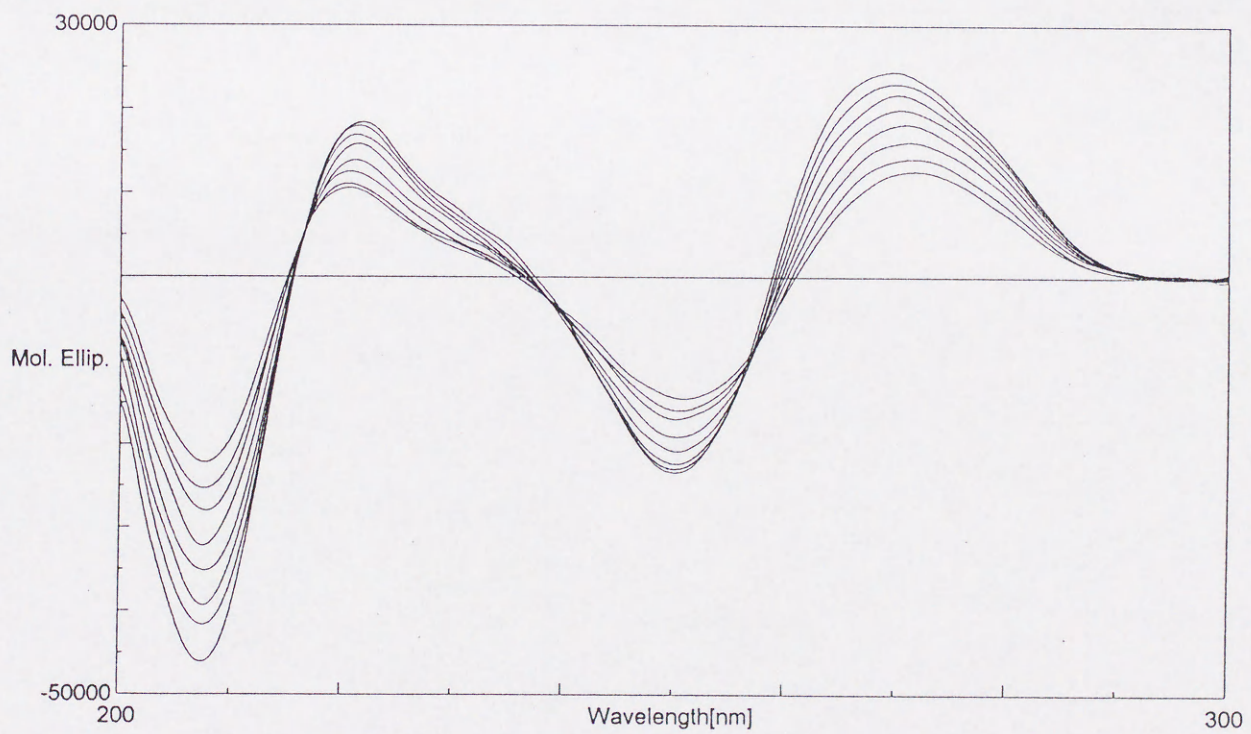


Fig. 64 CD spectra of RpRpRp-4mer at various temperatures

7-3-3 考察

一重鎖からなるオリゴ/ポリヌクレオチドについて以前の研究から、核酸塩基のスタッキング相互作用の程度はヌクレオチド鎖の淡色効果、並びにCDスペクトルのバンド強度に直接関与することが報告されている⁷⁵⁾。3',5'-オリゴヌクレオチドの淡色効果及びCDスペクトルのバンド強度は、10量体程度まで鎖長の増大に従って増加すること、また温度上昇に伴ってスタッキング相互作用が破壊されることによって、CDバンドの強度は温度上昇と共に急速に減少する。またCDから、3',5'-オリゴヌクレオチドのスタッキング相互作用は、対応する2',5'-結合異性体よりも強いことが推測されている⁷⁵⁾。一方、2',5'-オリゴアデニル酸及び2',5'-オリゴウリジル酸を用いた研究より、黒田らは、

(i) 2',5'-オリゴヌクレオチドのCDスペクトルの分子楕円率 $[\theta]$ はオリゴマー鎖長の伸長にも関わらず僅かな増大しか示さない。

(ii) 温度上昇に伴う分子楕円率の減少は、3',5'-オリゴマーと比較して僅かであり、温度変化による影響は小さい。

という結果を示し、2',5'-オリゴマーは分子内相互作用が強く外部環境の影響を受けにくいこと、及び鎖長が増大してもコンホメーションの変化に影響を及ぼさないような安定な三次構造を保っていると推定した⁷⁶⁾。更にこのような特性は、核酸塩基部を修飾した各種2',5'-オリゴアデニル酸アナログにおいても確認されている⁷⁷⁾。

ところで、本研究の2',5'-オリゴチオアデニル酸のCD測定からは次のような結果を得た。

(a) 同一鎖長のジアステレオマー間において、Sp-配置を有するチオリン酸基の導入は分子楕円率 $[\theta]$ の減少をもたらした。

$$(1) \text{Rp} \cdot 2\text{mer} > \text{Sp} \cdot 2\text{mer}$$

$$(2) \text{RpRp} \cdot 3\text{mer} \geq \text{RpSp} \cdot 3\text{mer} > \text{SpRp} \cdot 3\text{mer}$$

(b) Rp-配置からなるオリゴマー (Rp-3mer, RpRp-3mer 及びRpRpRp-4mer) に関して、分子楕円率は鎖長の伸長と共に増大した。

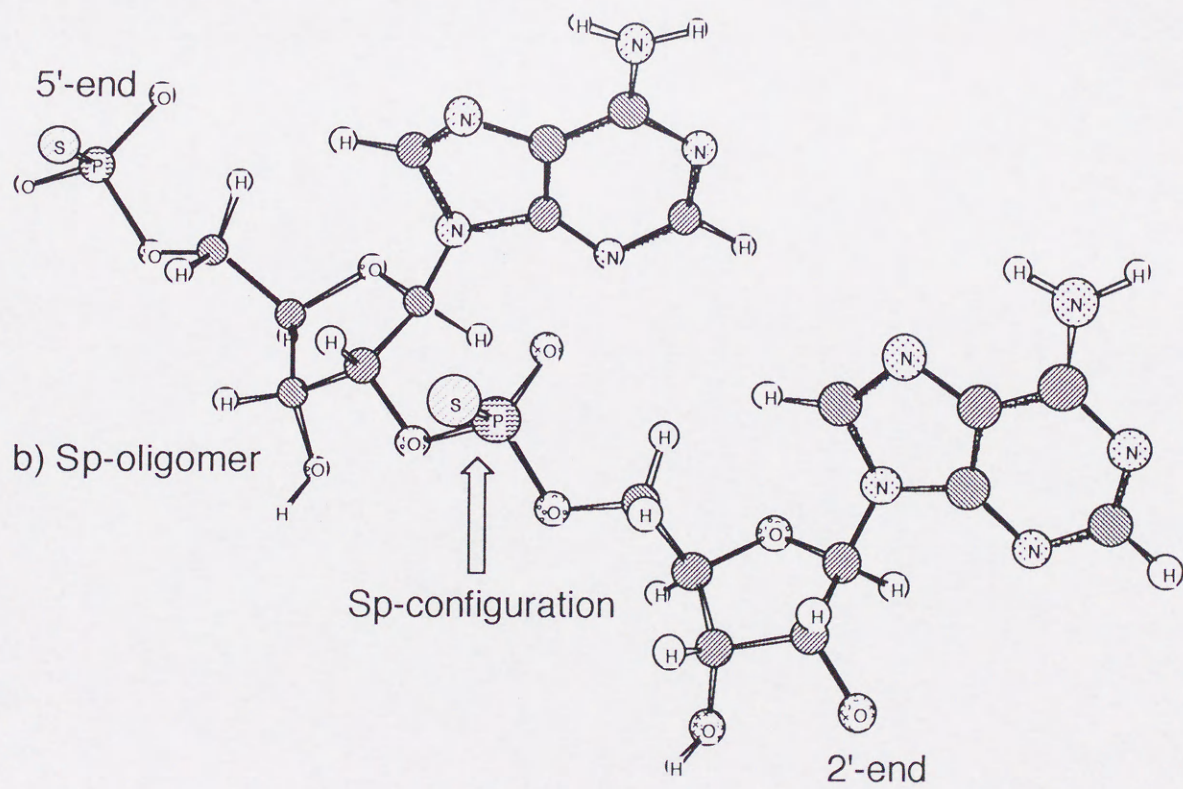
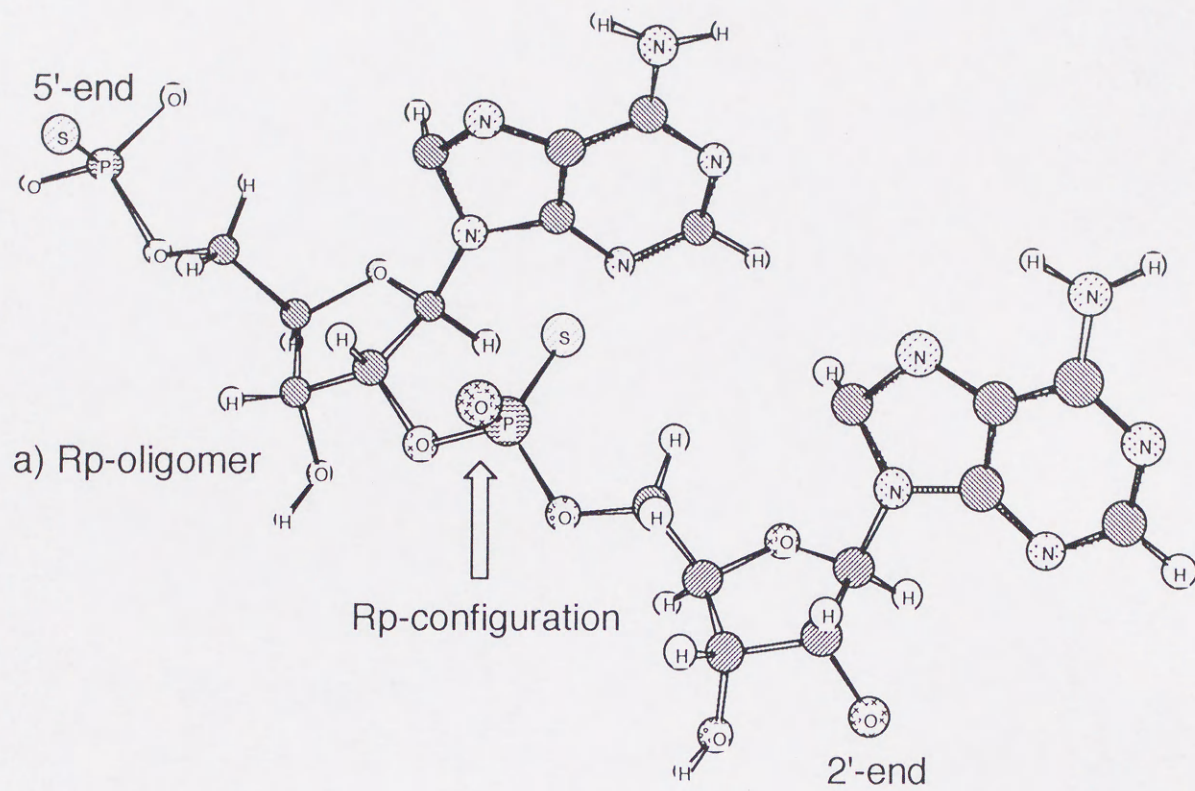


Fig. 65 Configuration of 2',5'-oligothioadenylate

オリゴチオアデニル酸は、チオリン酸基の導入によって糖-りん酸骨格が修飾されている。天然の核酸の構成単位であるりん酸基と異なり、チオリン酸基はその酸素-硫黄置換から構造的な特殊性を生じる。例えばP-S結合距離は1.8Åであり、P-O間よりも約0.3Å長い。また硫黄のvan der Waals半径は1.85Åで酸素より0.45Å大きい。両方の特徴を合わせると、硫黄は酸素よりも約0.8Å外側に突き出ることになる⁷⁸⁾。また、硫黄と酸素間での電気陰性度の違い及び分極性の相違などを考慮すると、チオリン酸基はりん酸基と比較して性質・構造ともかなり異なっているといえる。更に、チオリン酸基の立体配置がR_pであるかまたはS_pであるかによって、この置換基を含む周辺の立体構造は微妙に変化すると考えられる(Fig.65)。

2',5'-オリゴチオアデニル酸のCD測定より見いだされた(a)項は、R_p-とS_p-オリゴマー間の配座状態の相違を反映していると思われる。しかしながら、S_p配置の存在が分子楕円率の減少を生じる機構については不明であり、更に詳細に検討する必要がある。また(b)項は、天然型2-5Aの測定結果(i)と異なっている(Fig.66)。チオリン酸アナログと天然型オリゴマー間での鎖長伸長に伴って生じる構造的な相違を反映しているのかもしれない。これに関連して、各種2',5'-オリゴチオアデニル酸の温度可変によるCD測定を行い、各オリゴマーにおけるスタッキングエネルギーの算出を検討した。

一重鎖核酸はスタッキングによって安定した規則構造を保つことができる。オリゴマーが規則構造と、温度上昇によって生じるランダムコイル構造の間の平衡状態にあると仮定した場合、この二状態モデルにおける平衡定数Kは、

$$K = (\theta_s - \theta_t) / (\theta_t - \theta_u) \quad (7.1)$$

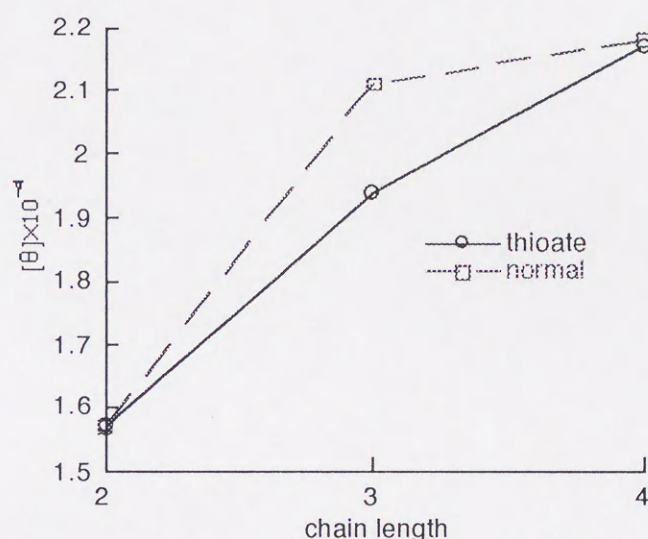


Fig. 66 2-5Aアナログ間での鎖長伸長に伴う分子楕円率の相違

で与えられる⁷⁵⁾。ここで、 θ はCDピークの $[\theta]_{\max}$ であり、 θ_s ; 完全な規則構造、 θ_u ; ランダムコイル状態、 θ_t ; 温度 t のときの $[\theta]_{\max}$ とする。(7.1)より $\ln K$ と $1/T$ を両端にとつた van't Hoff 式を用いることでスタッキングの熱力学的定数 ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG° を求めることができる^{74,75)}。

$$\ln K = \Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R \quad (7.2)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (7.3)$$

オリゴマーのCDを波長270nm、及び5~75°Cで測定し(7.1)式から K を求めた。ただし、 θ_s 及び θ_u は温度に対して θ_t をプロットした直線から、0°C及び80°Cにおける値をそれぞれ外挿して求めた(Fig.67~69)。続いて(7.2)式を用いて van't Hoffプロットを行い(Fig.70~72)、熱力学定数を算出した。結果をTable 48に示す。

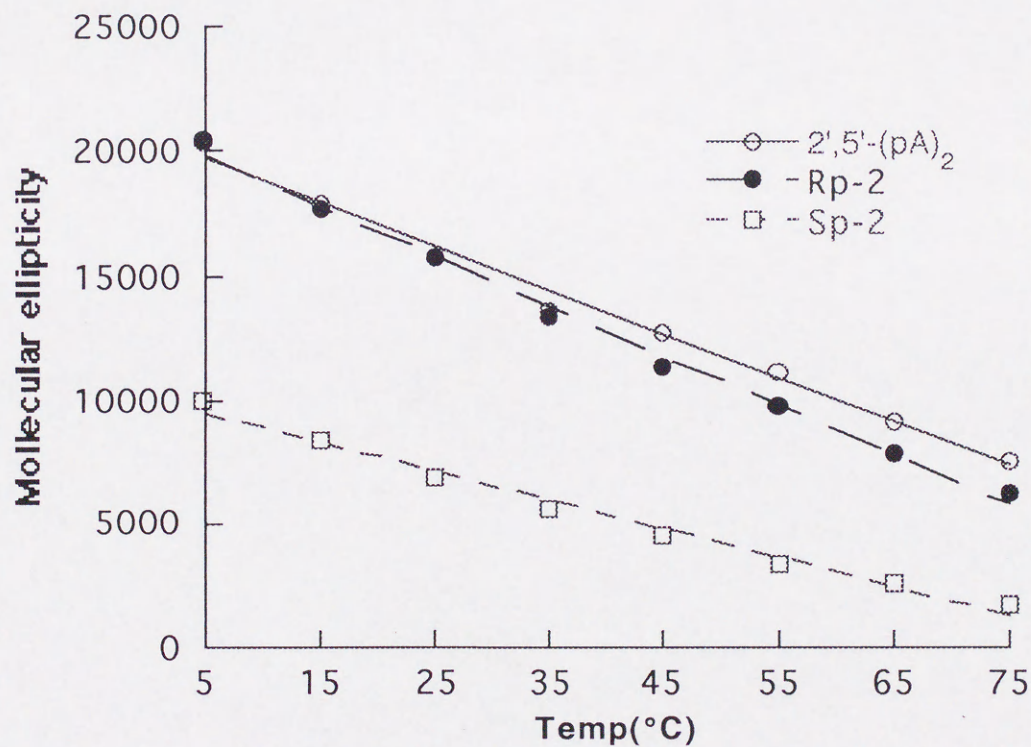


Fig. 67 $[\theta]$ Vs Temp plot for 2-5A dimer analogues

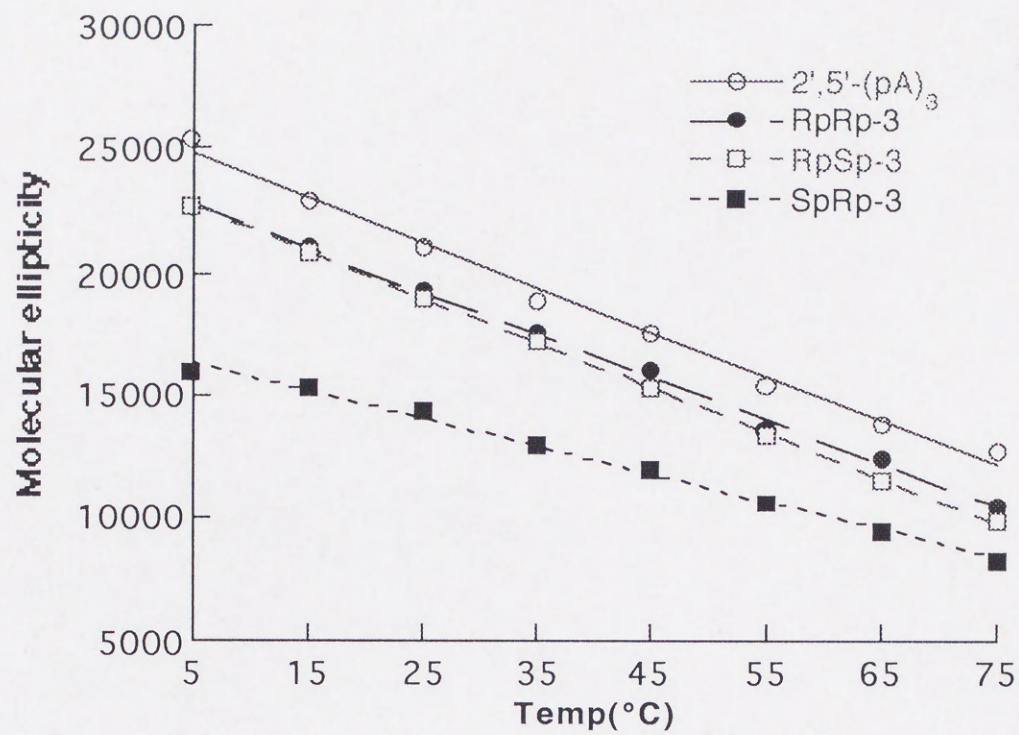


Fig. 68 [θ] Vs Temp for 2-5A trimer analogues

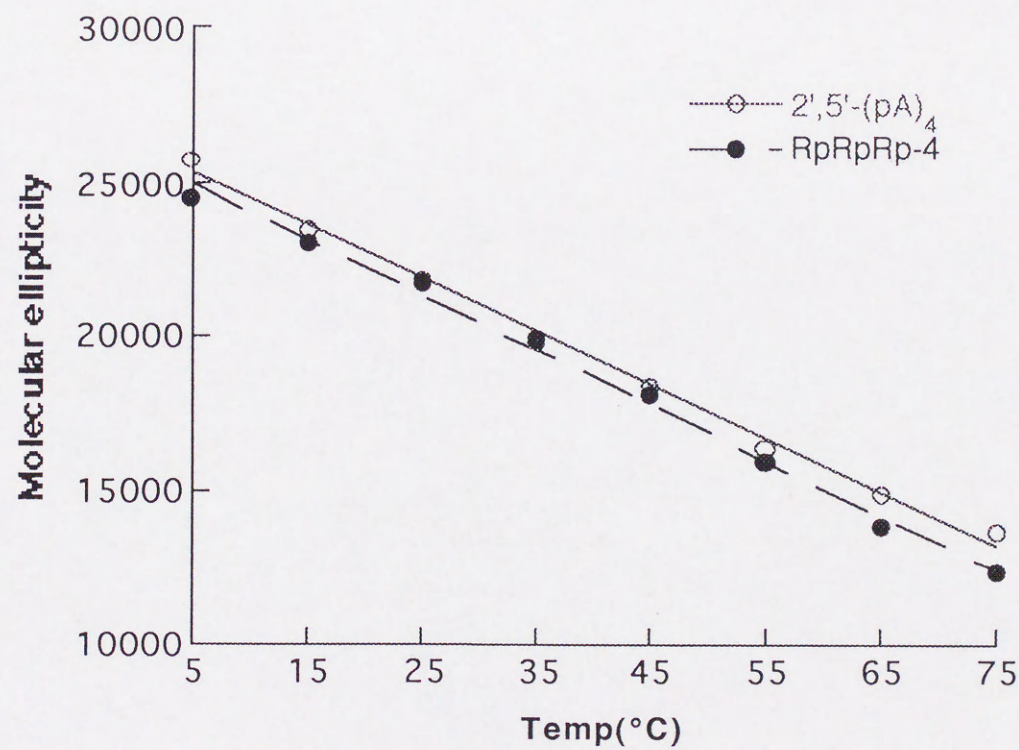


Fig. 69 [θ] Vs Temp for 2-5A tetramer analogues

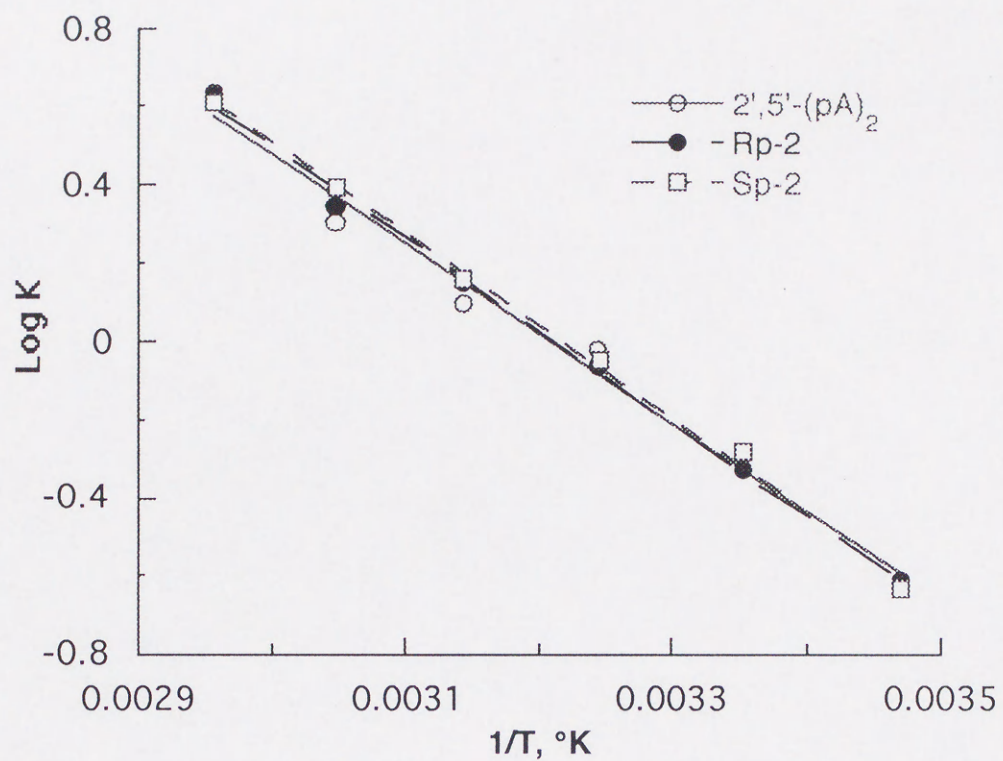


Fig. 70 Van't Hoff plot of 2-5A dimer analogues

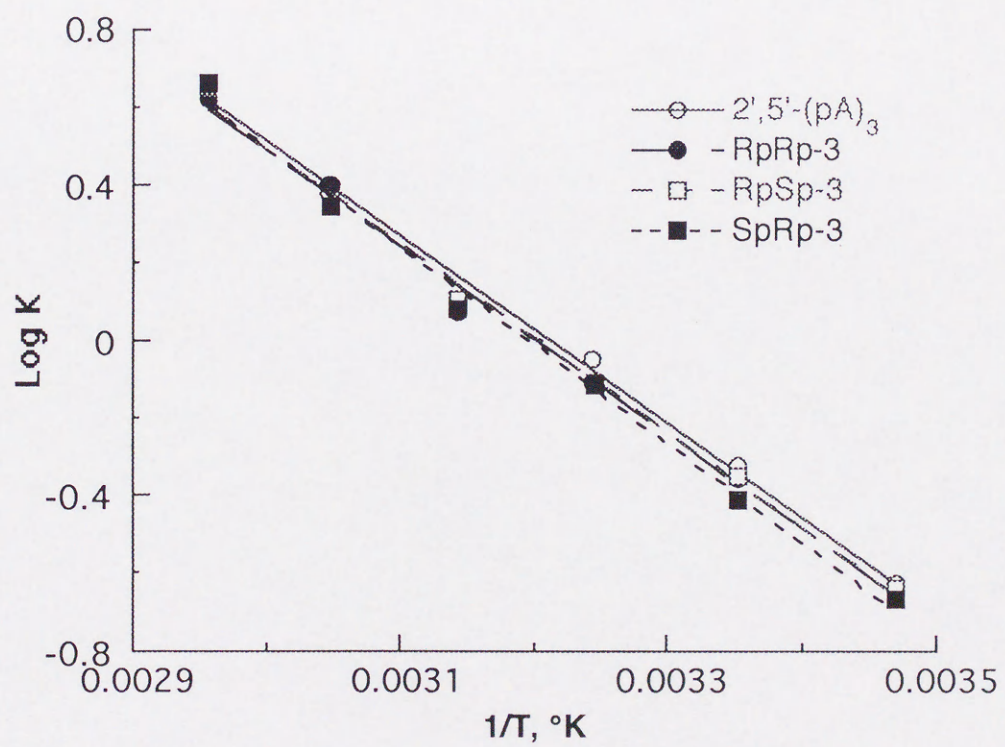


Fig. 71 Van't Hoff plot of 2-5A trimer analogues

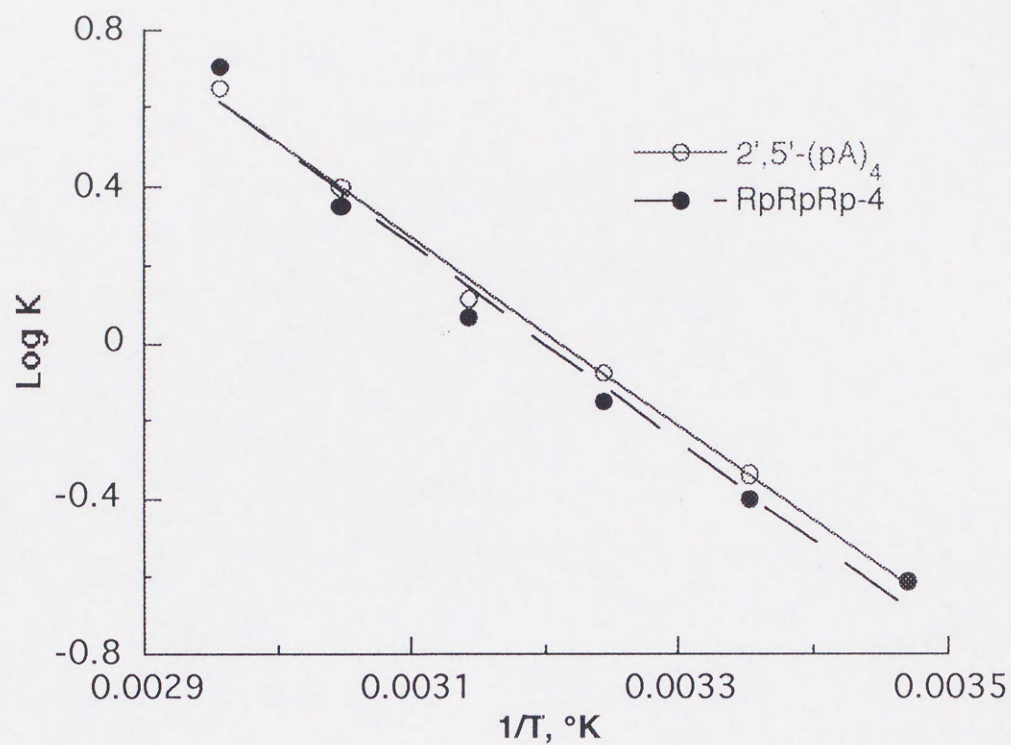


Fig. 72 Van't Hoff plot of 2-5A tetramer analogues

Table 48 Circular Dichroism melting thermodynamic data

Compound	ΔH° (Kcal / mole)	ΔS° (eu / mole)	ΔG° (Kcal / mole)	T_m (°K)
2',5'-pA ₂	4.53	14.5	0.56	311.4
Rp-2	4.68	15.0	0.58	311.4
Sp-2	4.67	15.0	0.56	310.7
2',5'-pA ₃	4.81	15.4	0.59	311.2
RpRp-3	4.83	15.5	0.61	312.3
RpSp-3	4.85	15.5	0.61	312.2
SpRp-3	5.04	16.1	0.64	313.0
2',5'-pA ₄	4.81	15.4	0.59	311.3
RpRpRp-4	5.01	16.0	0.63	312.4

本方法によるスタッキングエネルギーの算出は、オリゴマー間での相対的なエネルギーレベルの傾向を検討するものであり、個々のオリゴマーについて絶対的なエネルギーを評価するものではない。更に θ_S 及び θ_U はあくまでも推定値であり、またこれらの値の算出方法は文献等によって異なっている^{74,75,79})。従って、本法のCD-melting dataにより求めた各熱力学定数それぞれ(Table 47)が確実な数値であると断定することはできない。しかしながら、いずれのオリゴマーもほぼ同一の ΔH° 、 ΔS° 、 ΔG° 及び融解温度 T_m を示したことから、2-5A及びそのチオリン酸アナログは熱力学的に類似した特性を有していると思われる。また、チオリン酸アナログ・ジアステレオマー間での比較においても、立体配置の相違は各熱力学的数値に反映しなかった。

CDの比較から2-5A及びチオリン酸アナログは類似した形状のスペクトルを示すことより、両者は分子全体としてよく似た構造をとっていると考えられる。しかしながらチオリン酸アナログについては、導入した置換基の立体配置の相違によって置換基を含む周辺の立体配置は微妙に異なっていると推定される。そしてこれがRp-及びSp-アナログ間で認められたCDスペクトル(分子楕円率)の相違を導くと思われる。

7-4 酵素分解による構造解析

オリゴヌクレオチドチオリン酸アナログは、構造内に存在するりんの不斉がりん酸基の反応に関与する酵素、例えばりん酸基転移酵素、ヌクレオチド基転移酵素、及びホスファターゼなどによって認識されることから、これら酵素の立体化学的な反応機構を解明するツールとして利用されてきた^{80,81,82})。そこでこれとは反対に不斉認識が既に確立した酵素を用いることで、2',5'-オリゴチオアデニル酸のチオリン酸基配置の決定を試みた。

7-4-1 ヘビ毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)を用いた2',5'-オリゴチオアデニル酸の加水分解半減期の算出

SVPDはRp-配置をもつ2',5'-オリゴチオアデニル酸コア体を優先的に加水分解する。そこで、SVPDによる $X_p(S)A$ 縮重合反応生成物の酵素分解を行い、オリゴマー・チオリン酸基の立体配置について検討を行った。

オリゴマーにSVPDを加えインキュベーション後、HPLCによって分解生成物を分析した。元のオリゴマーの残存率をインキュベーション時間に対してプロットし、オリゴマーの加水分解半減期を算出した(実験の部参照)。結果をTable 49に示す。

Table 49 SVPDによる2-5Aアナログの加水分解半減期

2-5A Analogues	Half-Life(hr,37°C)
Parent 2-5A	
pA ₂	<0.17 ^a
pA ₃	<0.17 ^a
Phosphorothioate analogues	
Rp-2	8.5
Sp-2	>48.0 ^b
RpRp-3	5.5
RpSp-3	>24.0 ^b
SpRp-3	6.0
RpRpRp-4	5.4

a: Complete digestion by time indicated.

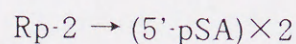
b: No digestion detected by time indicated.

7-4-2 考察

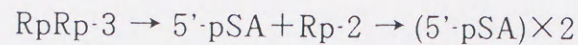
SVPDはエキソヌクラーゼであり、Rp配置のチオリン酸基を有する2',5'-ヌクレオチド間結合を2'-末端側から切断するが、Sp-2',5'-オリゴチオアデニル酸を基質として認識しない。従って、本酵素によるオリゴマーの2'→5'方向への逐次的な切断はRp配置のみを対象とし、オリゴマーの5'-上流側にSp配置のチオリン酸基が存在するとその部分で切断は中断される。

本研究で合成した2',5'-オリゴチオアデニル酸のSVPDを用いた分解実験は、これら基質に対するSVPDの立体選択性を考慮することでオリゴマー中のチオリン酸基の立体配置を以下のように明らかにした。

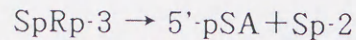
- 1) Sp-2mer及びRpSp-3merはSVPDの基質とならず、切断されなかった。
- 2) Rp-2merは、半減期 $t_{1/2}=8.5\text{hr}$ で切断され 5'-pSAを生成した。



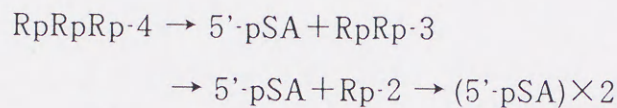
- 3) Rp-3merは、 $t_{1/2}=5.5\text{hr}$ で切断された。



4) SpRp \cdot 3merは、 $t_{1/2}=6.0\text{hr}$ で切断された。



5) RpRpRp \cdot 4merは、 $t_{1/2}=5.4\text{hr}$ で切断された。



これらの結果は、オリゴマーのHPLC及び ^{31}P NMR分析結果から推定されるチオリン酸基の立体配置(9・5章参照)と一致した。

ところで、本研究はSVPDによる2',5'-オリゴチオアデニル酸コア体の切断結果と比較して、部分的に異なった結果を示した。例えば、K arikoらはSpRp \cdot 3merコアがRpRp \cdot 3merコアの8倍安定であることを報告している⁵²⁾。しかしながら本結果において、SpRp \cdot 3merとRpRp \cdot 3merの安定性はほぼ同一であった。本実験で用いたオリゴマーは5'-末端にチオリン酸基を有しているので、SVPDに対してコア体と異なる結合親和性を示すことが予想される。おそらく、これが安定性の差異を生じる要因となっているのであろう。

7・4・3 RNase T2 によるオリゴチオアデニル酸 \cdot 3',5'結合異性体の切断

RNase T2はRNAを加水分解する非特異的なエンドリボヌクレアーゼであり、RNA配列中のA残基の3'-りん酸ジエステル結合を切断する。更にRNase T2は、Rp-及びSp-配置のチオリン酸基を有するA残基の3',5'-りん酸ジエステル結合を切断することが報告されている⁷⁹⁾。

そこで、Imp(S)A縮重合反応から得られるオリゴマー混合物についてRNase T2を用いた切断アッセイを行い、3',5'結合を有する異性体オリゴマーがどの程度生成しているかを定性的に検討した。その結果、インキュベーション24時間後で部分的なオリゴマーの減少がHPLC分析によって認められたのみで、その他のほとんどのピークは残存したままであった。従って、Imp(S)A縮重合反応から生成するオリゴマー中の3',5'結合異性体の存在比は僅かであり、これから本反応系はほぼ選択的に2',5'-ヌクレオチド間結合形成を行うことが示唆された(データは示さない)。

7-5 NMR構造解析

2',5'-オリゴチオアデニル酸の構造解析について各種NMR測定法による検討を行った。

7-5-1 測定法

次の測定方法を適宜組み合わせることによって測定を行った。

[a] 1D ^1H NMR(normal)	[f] 2D HOHAHA
[b] 1D ^1H NMR (^{31}P complete decoupling)	[g] 2D NOESY
[c] 1D ^1H NMR (^{31}P selective decoupling)	[h] 1D ^{31}P NMR (^1H decoupling)
[d] 2D ^1H - ^1H COSY	[i] 2D ^{31}P - ^1H COSY
[e] 2D ^1H - ^1H DQF-COSY	

7-5-2 オリゴマーの構造解析

(1) Rp-2mer (7-5-1: [a], [d], [f], [h])

⇒ [p(S)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A] (Fig.73)

Rp-2merを構成する2個のアデノシン残基の帰属に関して、5'-末端側リボース環の2'Hプロトンでは、チオリン酸基が結合していることによる ^{31}P -2'Hの直接連結のシグナルが観測される。一方2'-末端側の2'Hプロトンはフリーであるため、りんとの間のカップリングは認められない。これに基づいてリボース環プロトンの帰属を[d]及び[f] (Fig.74)を用いて行った。チオリン酸基の立体配置は、Rp-2mer及びSp-2mer間のHPLC- R_T の比較、SVPD切断結果、及び[h]のケミカルシフト(Table 50)を比較することによって決定した。

(2) Sp-2mer (7-5-1: [a], [d], [f], [h])

⇒ [p(S)A-2'-(Sp)-5'-p(s)A] (Fig.75)

Sp-2merの構造は、Rp-2merの場合と同様にリボース環プロトンの帰属([d]-Fig.76, [f])及びチオリン酸基の立体配置の検討(Table 50)を行うことで決定した。

RP-2, 10

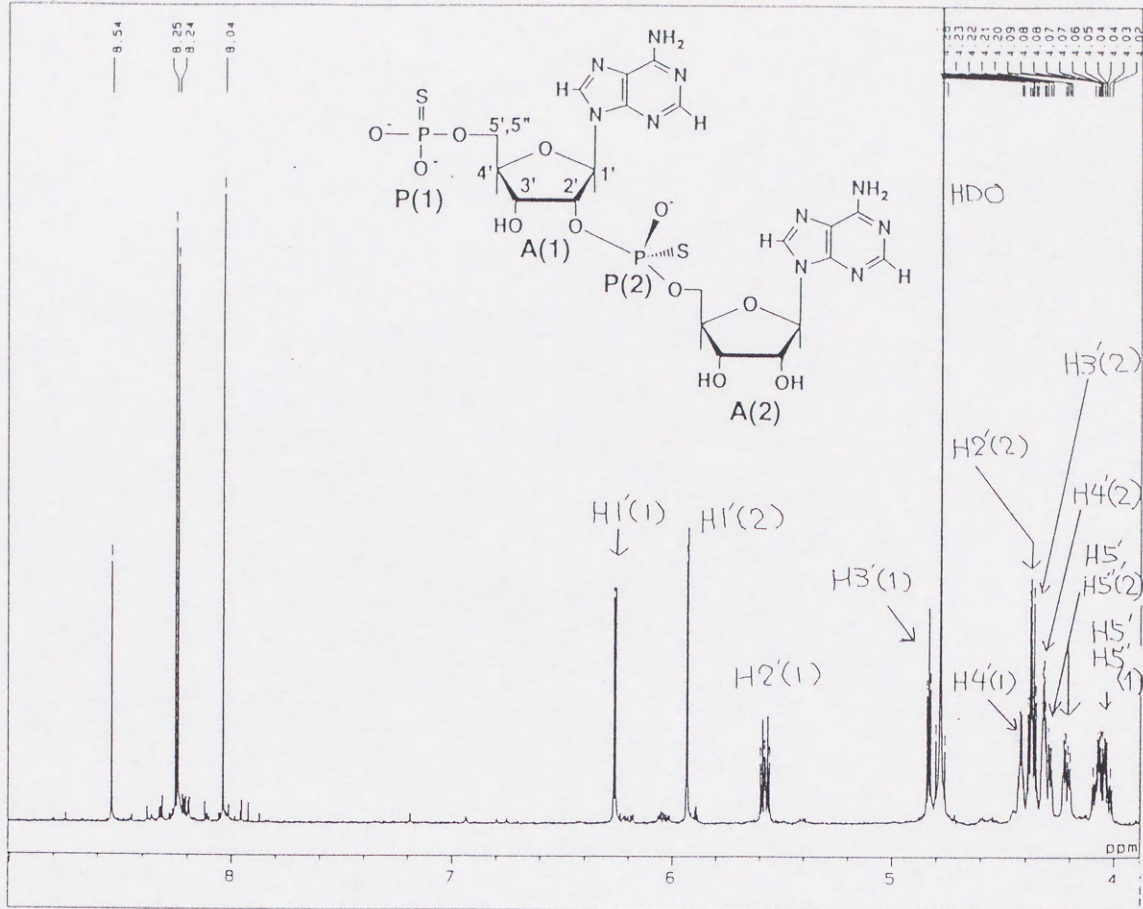


Fig. 73 ¹H NMR spectrum of Rp-2mer

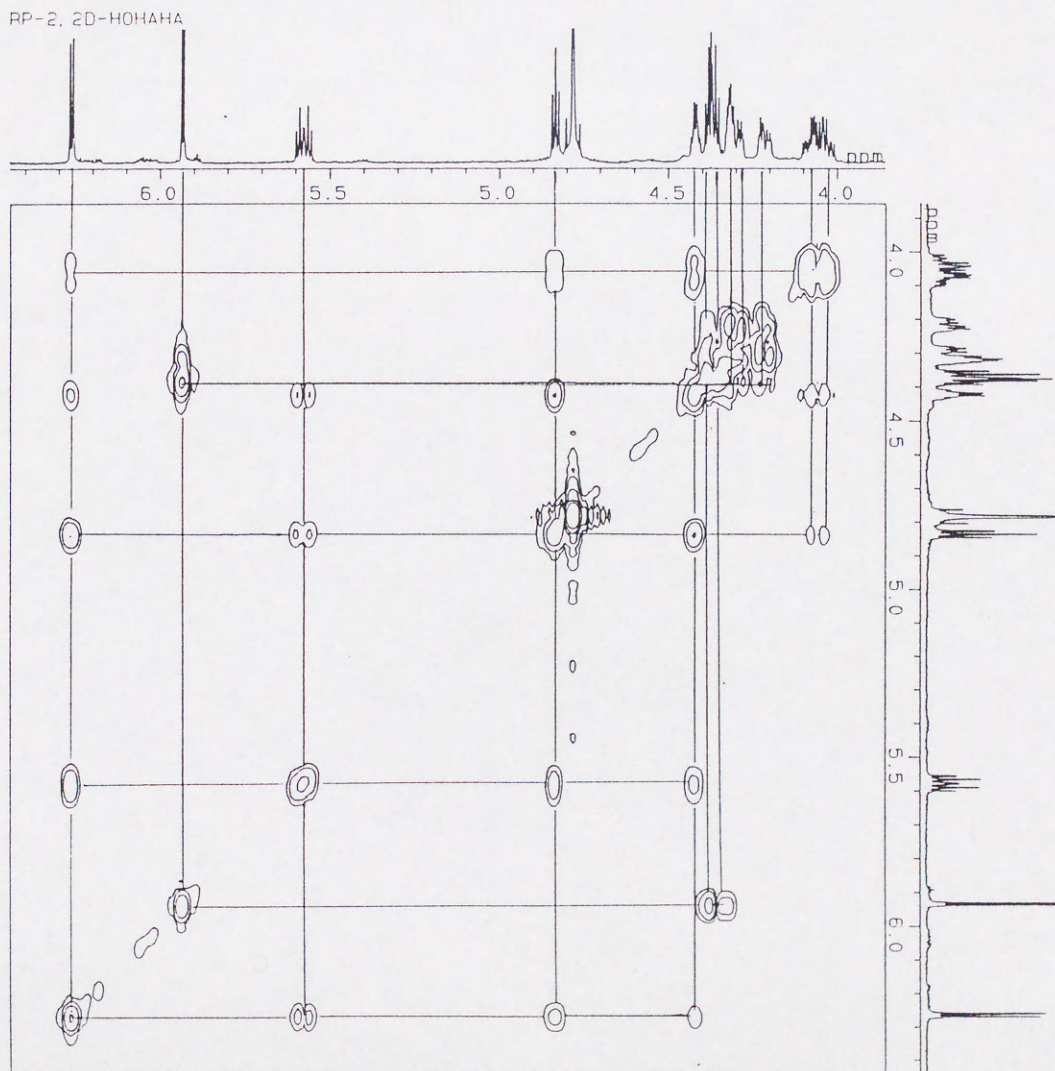


Fig. 74 ¹H HOHAHA spectrum of Rp-2mer

SP-2.10

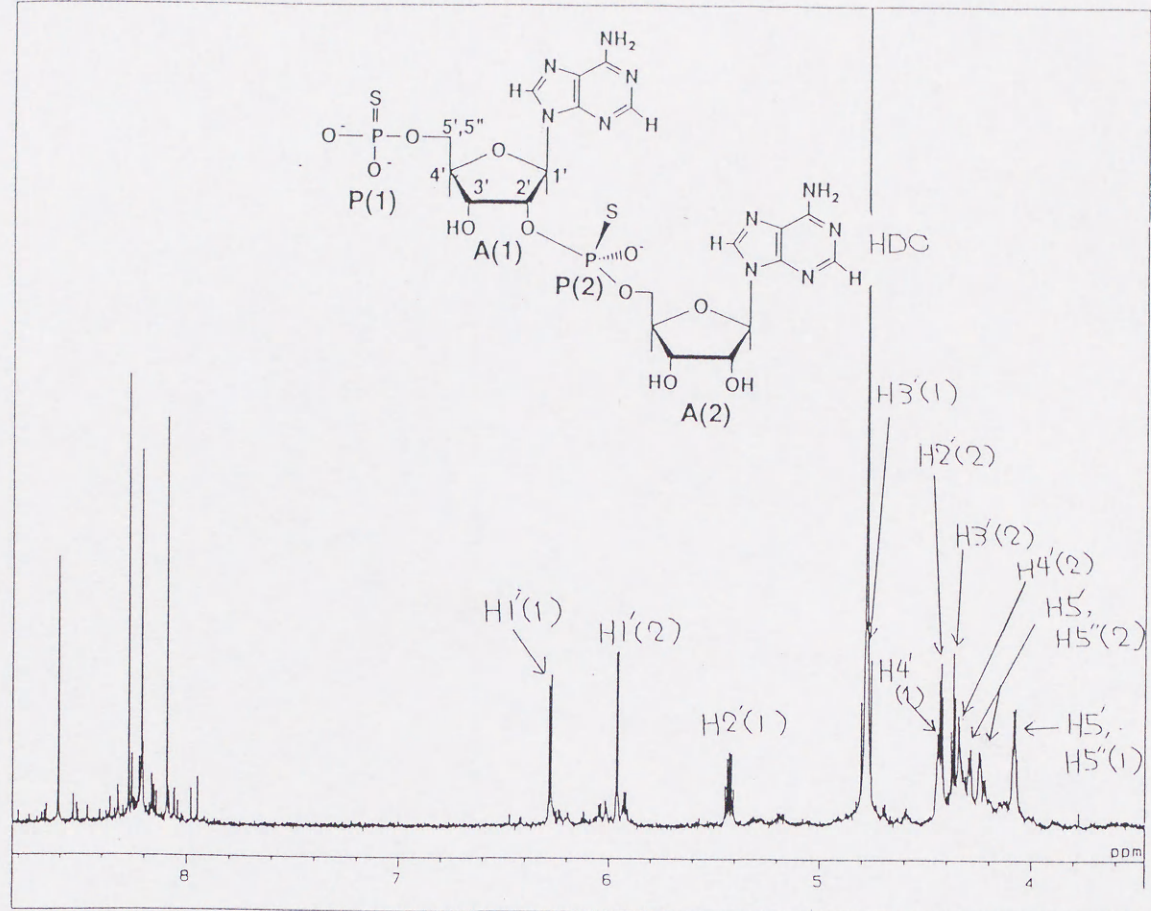


Fig. 75 ¹H NMR spectrum of Sp-2mer

SP-2

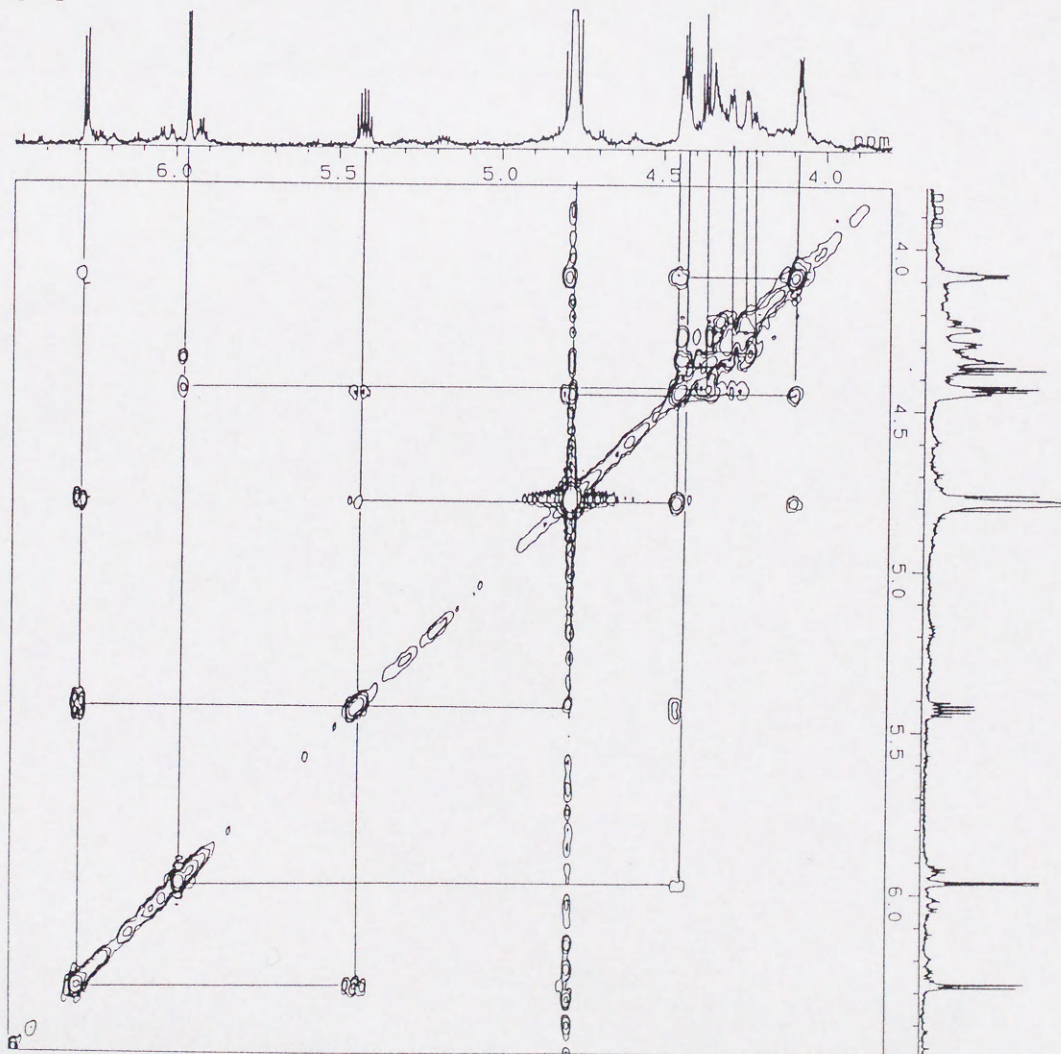


Fig. 76 ¹H COSY spectrum of Sp-2mer

Table 50 Analytical data on 2',5'-oligothioadenylate dimers

Dimer	³¹ P NMR (ppm) ^{a)}		R _T (min) ^{b)}	SVPD digestion half life(hr)
	P(1)	P(2)		
Rp-2	44.17	57.66	13.4	8.5
Sp-2	44.17	56.73	15.7	>>48.0 ^{c)}

a) Decoupled spectra.

b) HPLC retention times on RPC-5 column.

c) No digestion detected by the time indicated.

*チオりん酸基の立体配置はTable 50に示したオリゴマーの分析結果より決定された。

i) HPLC-R_Tの比較 (Rp-体はSp-体よりも早く溶出する)

ii) SVPD切断結果 (Rp-体は基質となるので切断されるが、Sp-体は切断されない)

iii) ³¹P NMRケミカルシフト (Rp-体はSp-体よりも低磁場側で共鳴する)

(3) RpRp-3mer (7-5-1: [a], [b], [c], [e], [f], [g], [h])

⇒ [p(S)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A] (Fig.77)

リボース環プロトンのスカラー結合の帰属は、[e]及び[f]より決定した。アデノシン残基の帰属 (A1,A2,A3)は [c] (Fig.78)、[e]及び[f] (Fig.79)から推定した。チオりん酸ジエステル結合の結合部位については、[c]及び[e]のケミカルシフトとシグナルの分裂状態から決定した。また、アデニン環H8プロトンの帰属を[g](Fig.80)から行った。チオりん酸基の立体配置は、3量体ジアステレオマー間のHPLC-R_Tの比較、SVPD切断結果及び[h]のケミカルシフトの比較を検討することによって決定した(Table 51)。

(4) RpSp-3mer (9-5-1: [a], [b], [c], [e], [h])

⇒ [p(S)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A-2'-(Sp)-5'-p(s)A] (Fig.81)

SVPDによって切断できない2',5'-オリゴチオアデニル酸3量体として、RpSp-3merあるいはSpSp-3merのどちらかが考えられる。オリゴマーのリボース環プロトンの帰属を[c]及び[e] (Fig.82)から行った。チオりん酸基の結合部位は[c]及び[h]を組み合わせで決定した。チオりん酸基はHPLC-R_Tの比較、及びりんのケミカルシフトを比較検討してRpSp-配置であることを確認した(Table 51)。

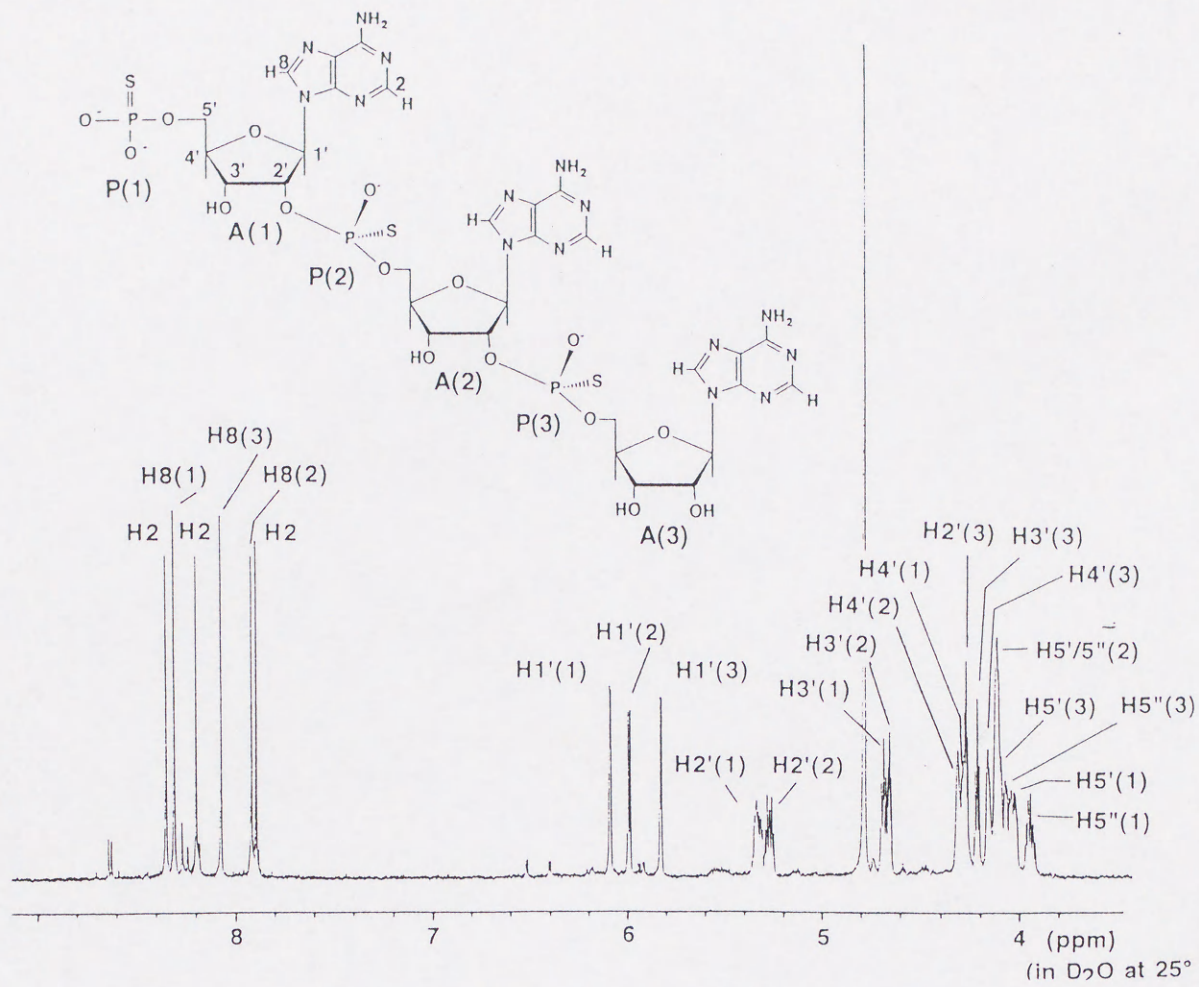


Fig. 77 ^1H NMR spectrum of RpRp-3mer

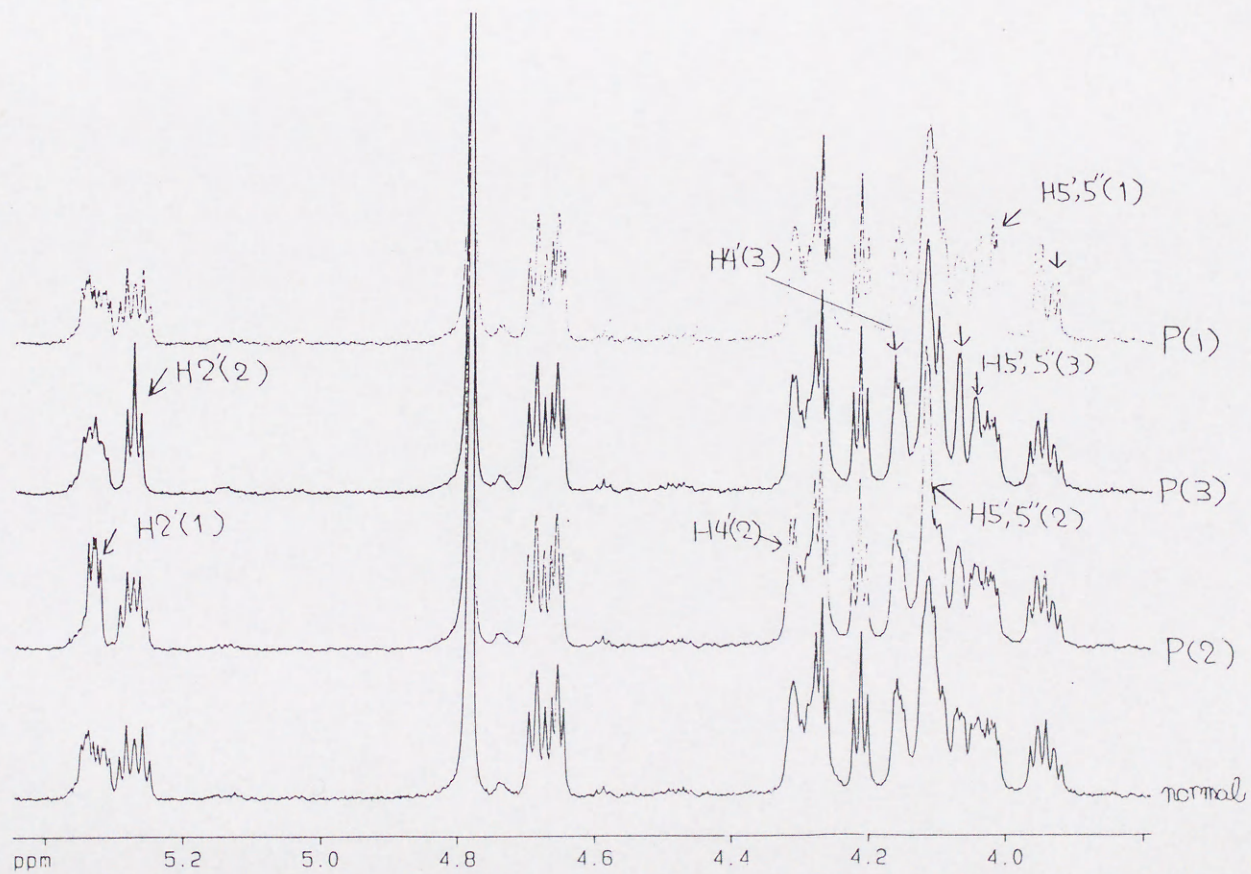


Fig. 78 ^1H NMR spectra of RpRp-3mer with ^{31}P selective decoupling

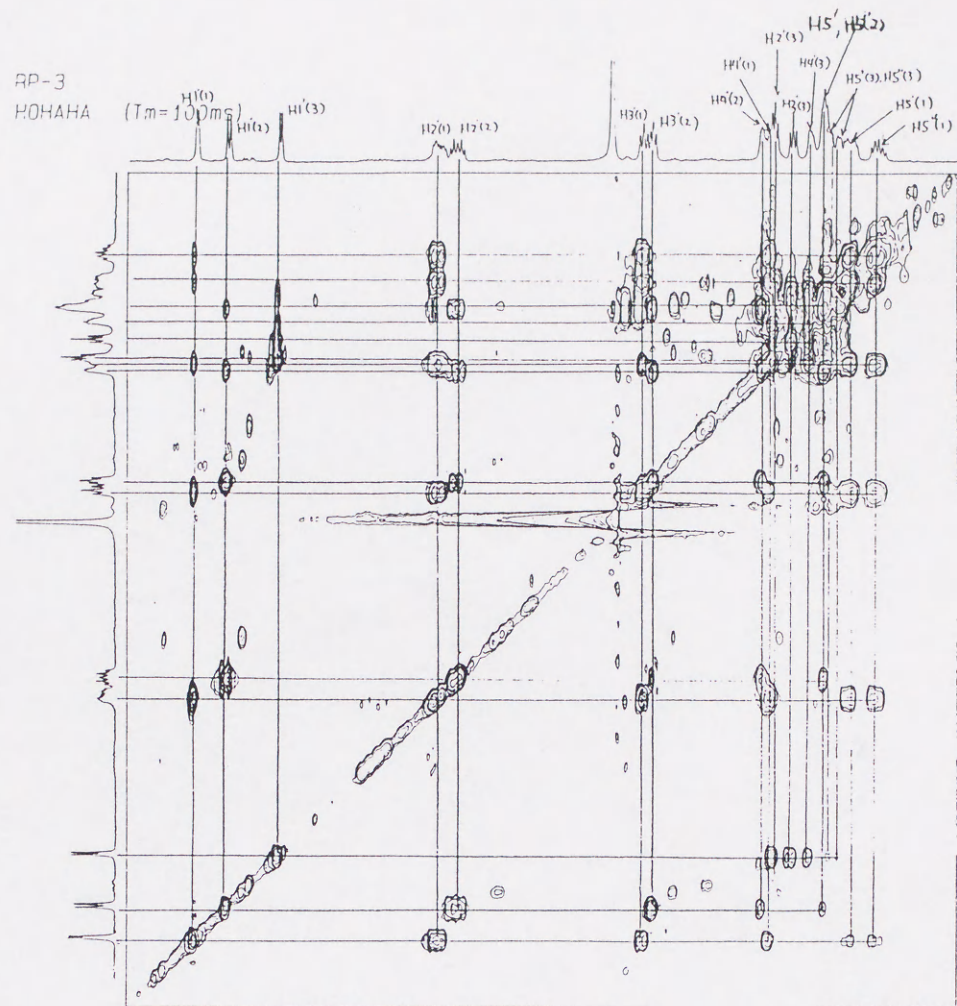


Fig. 79 ¹H HOHAHA spectrum of RpRp-3mer

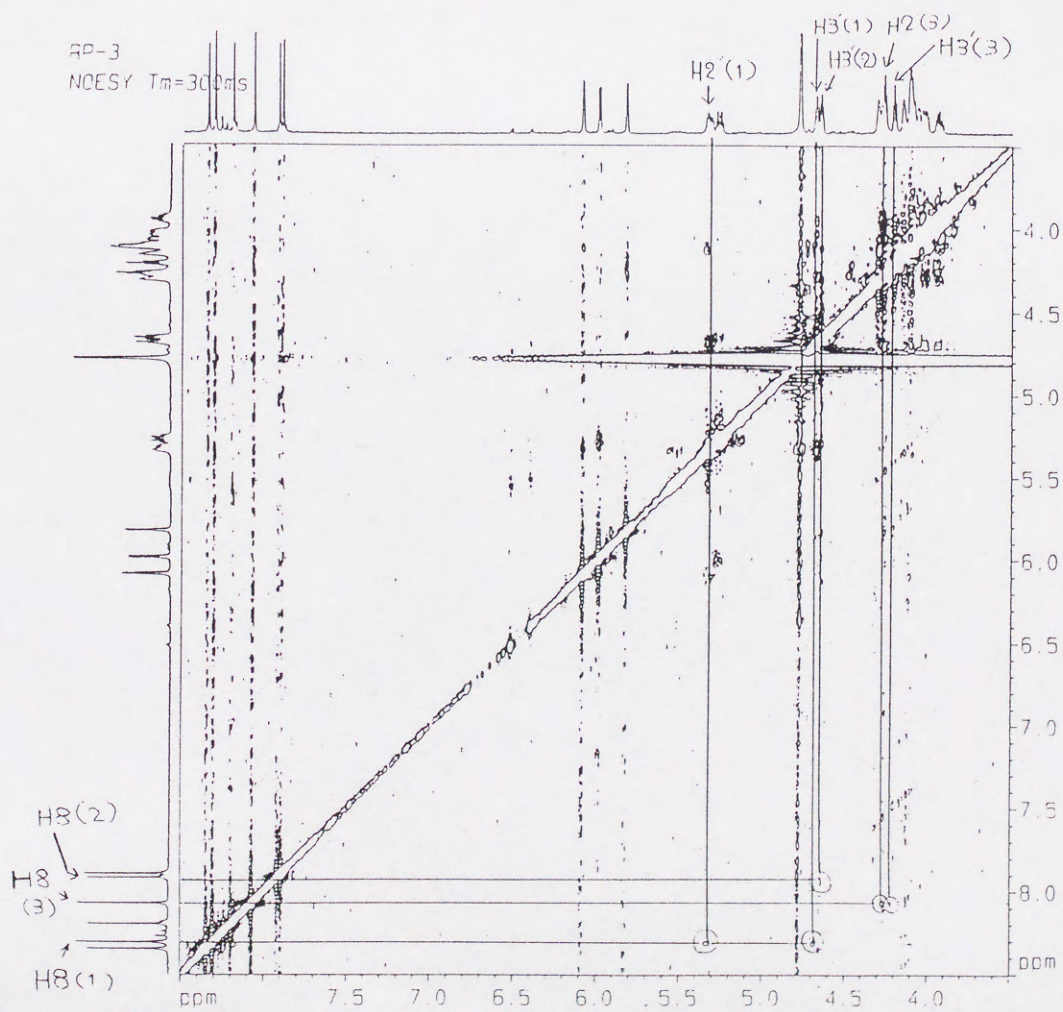


Fig. 80 ¹H NOESY spectrum of RpRp-3mer

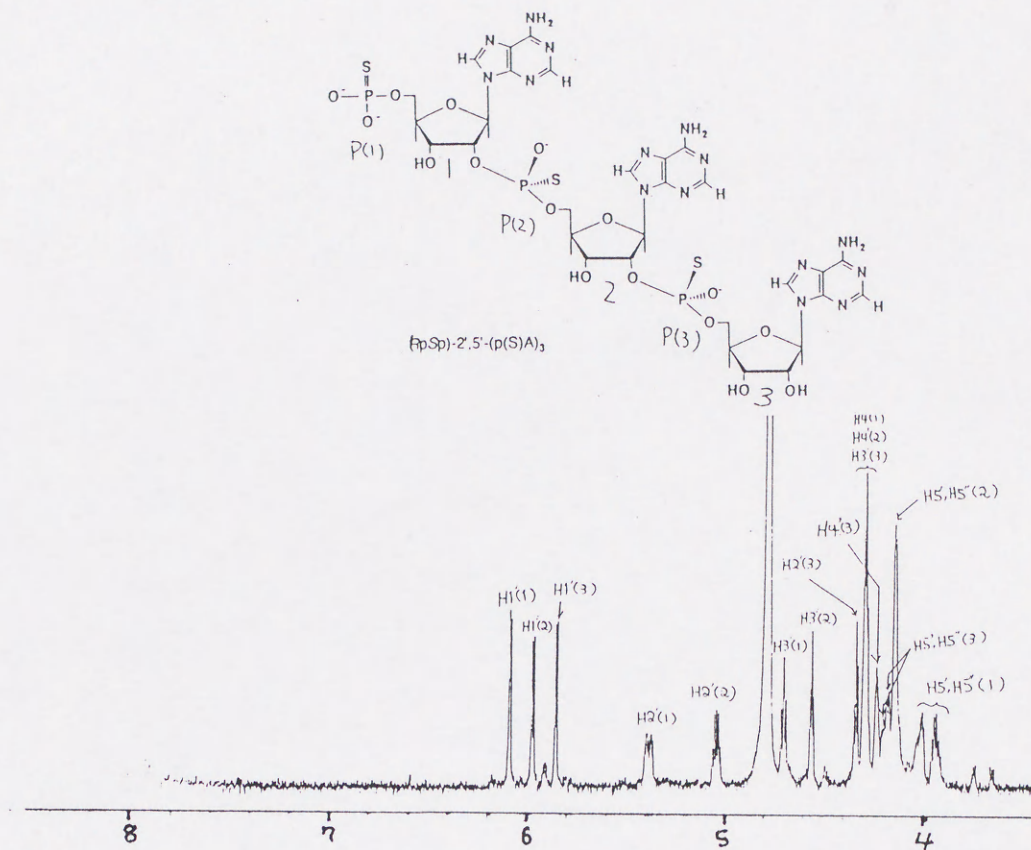


Fig. 81 ^1H NMR spectrum of RpSp-3mer

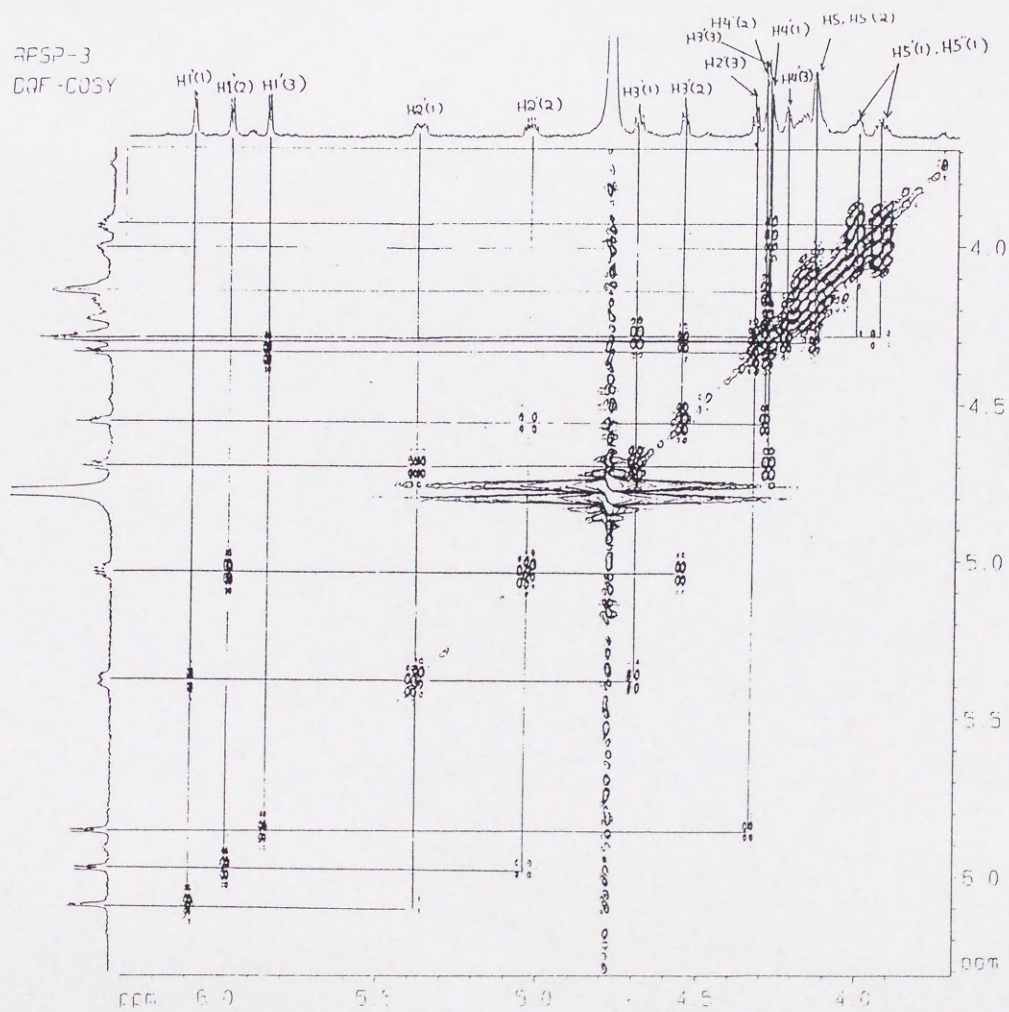


Fig. 82 ^1H DQF-COSY spectrum of RpSp-3mer

(5) SpRp-3mer (9-5-1: [a], [c], [f], [h])

→ [p(S)A-2'-(Sp)-5'-p(s)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A] (Fig.83)

リボース環プロトン及びチオりん酸基・結合部位の帰属を[c]及び[f](Fig.84)から決定した。更にチオりん酸基の立体配置は、SVPD切断実験及びりんのケミカルシフトを比較することでSpRp型であると決定した。

Table 51 Analytical data on oligothioadenylate trimer analogues

Trimer	³¹ P NMR (ppm) ^{a)}			R _T (min) ^{b)}	SVPD digestion half life(hr)
	P(1)	P(2)	P(3)		
RpRp-3	44.65	58.35	58.08	20.2	5.5
RpSp-3	44.65	58.34	57.35	21.7	>>24.0 ^{c)}
SpRp-3	44.66	56.68	58.20	22.3	6.0
Linkade isomer	44.58	58.91	56.58	24.0	—

a) Decoupled spectra.

b) HPLC retention times on RPC-5 column.

c) No digestion detected by the time indicated.

*2',5'-オリゴマーのチオりん酸基・立体配置はTable 51に示した分析結果より決定された。

- i) HPLC-R_Tの比較 (Rp-配置はSp-配置よりも早く溶出する)
- ii) SVPD切断結果 (Rp-配置は切断されるが、Sp-配置は切断されない)
- iii) ³¹P NMRケミカルシフト (Rp-配置はSp-配置よりも低磁場側で共鳴する)

(6) 3量体結合異性体 (9-5-1: [a], [b], [c], [e], [h])

⇒ [p(S)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A-3',5'-p(s)A] (Fig.85)

HPLC分析で R_T=24min前後に検出される(Table 51)オリゴマーは、RNase T2によって分解されることから、構造中に3',5'結合を含む異性体であると思われる。オリゴマーについてNMR測定を行い、[c]及び[e](Fig.86)からリボース環プロトン及びチオりん酸基結合部位の帰属を行った。ただしA3残基のプロトン帰属に対しては、[e]のDQF-COSY測定のみでは不十分であり、完全に行うことができなかった。これらの解析の結果より、オリゴマーは2',5'-3',5'結合異性体であることが判明した。

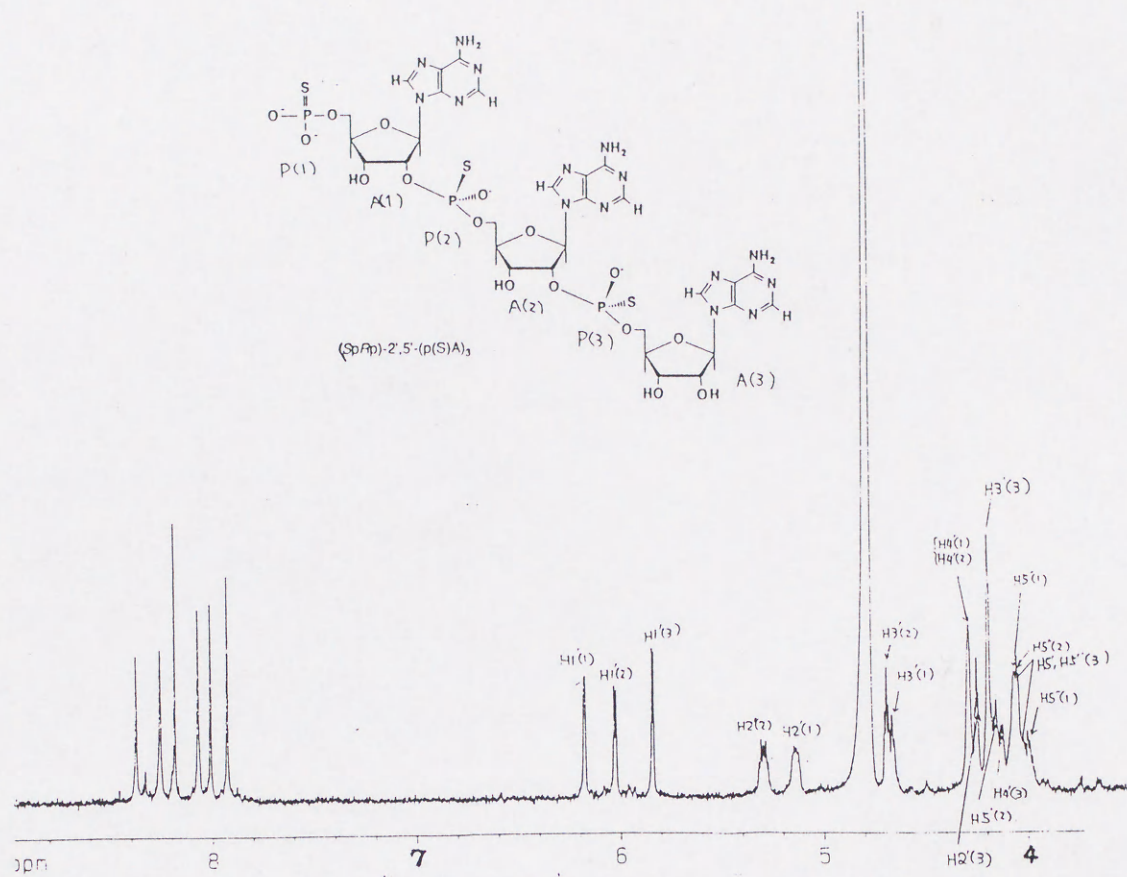


Fig. 83 ¹H NMR spectrum of SpRp-3mer

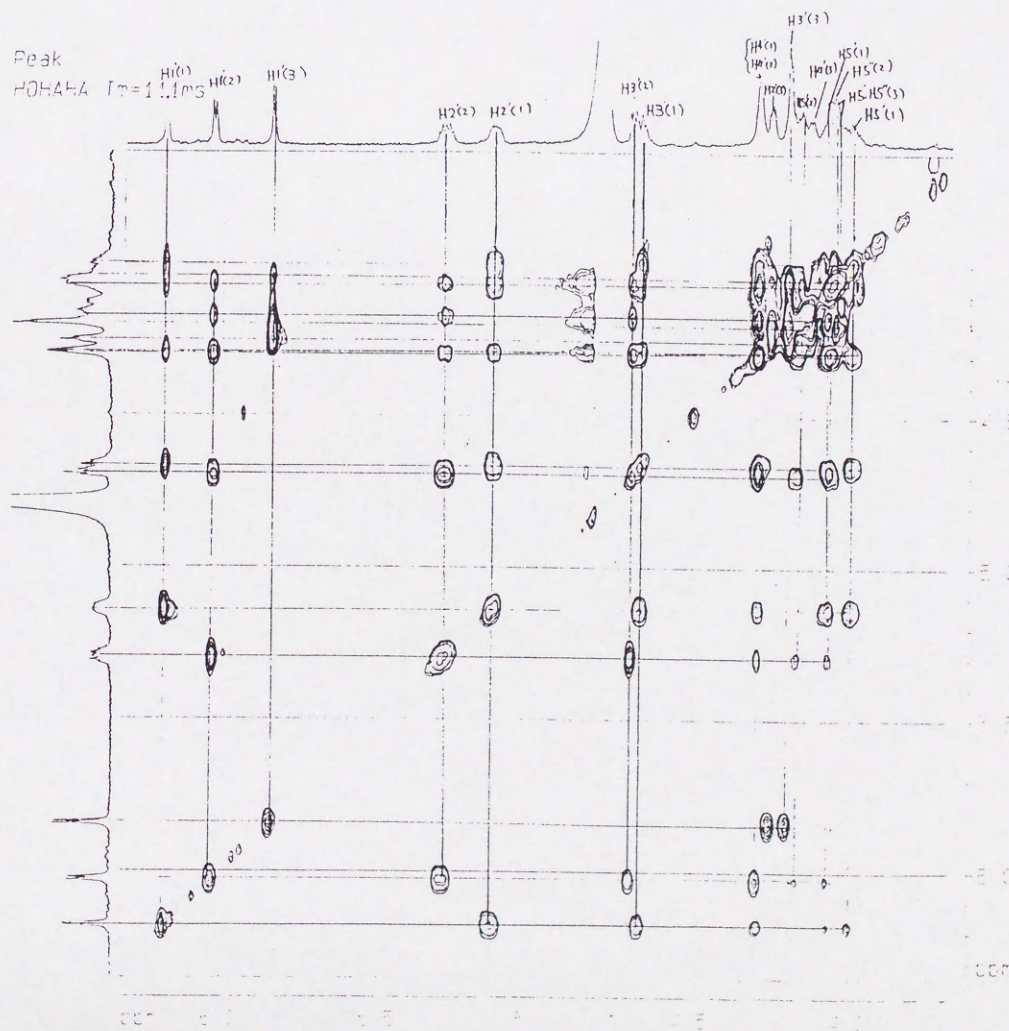


Fig 84 ¹H HOHAHA spectrum of SpRp-3mer

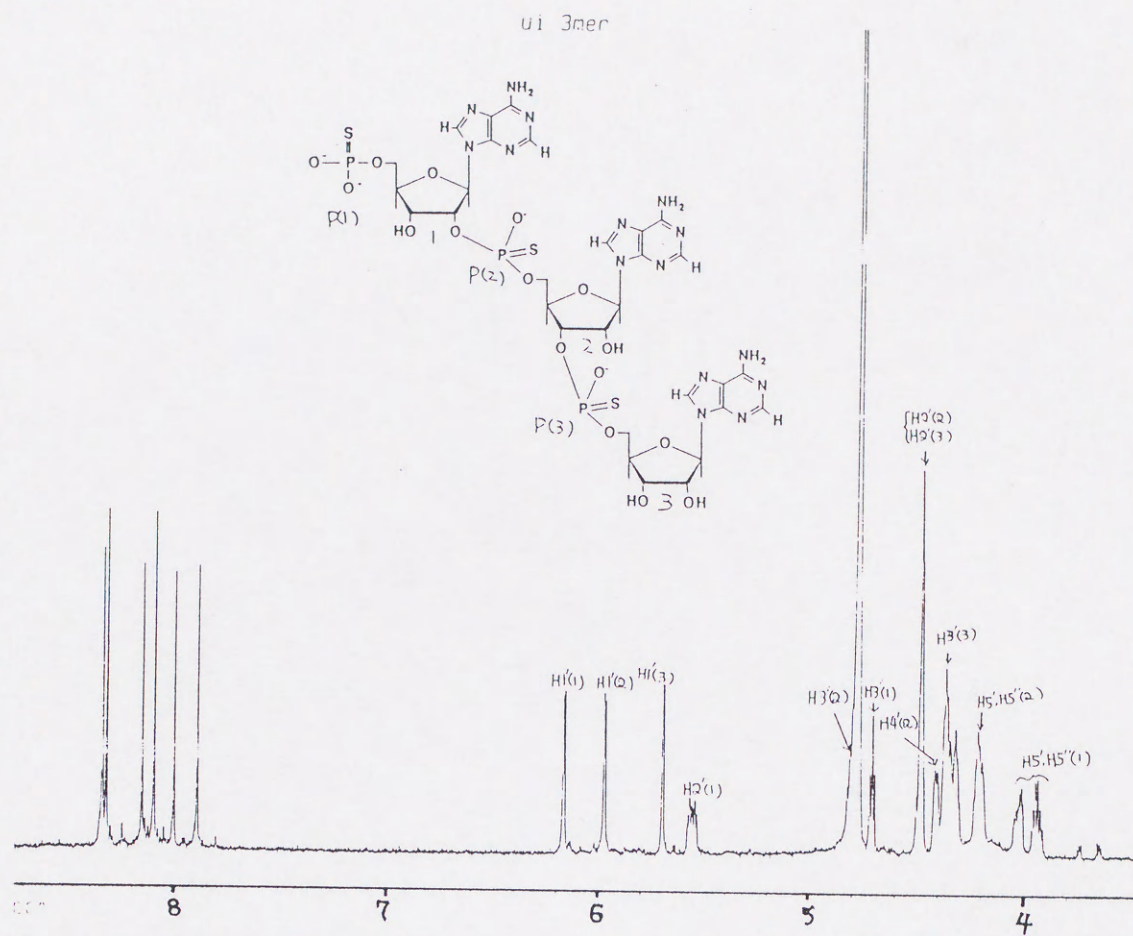


Fig. 85 ^1H NMR spectrum of 2',5'-; 3',5'-likage isomer

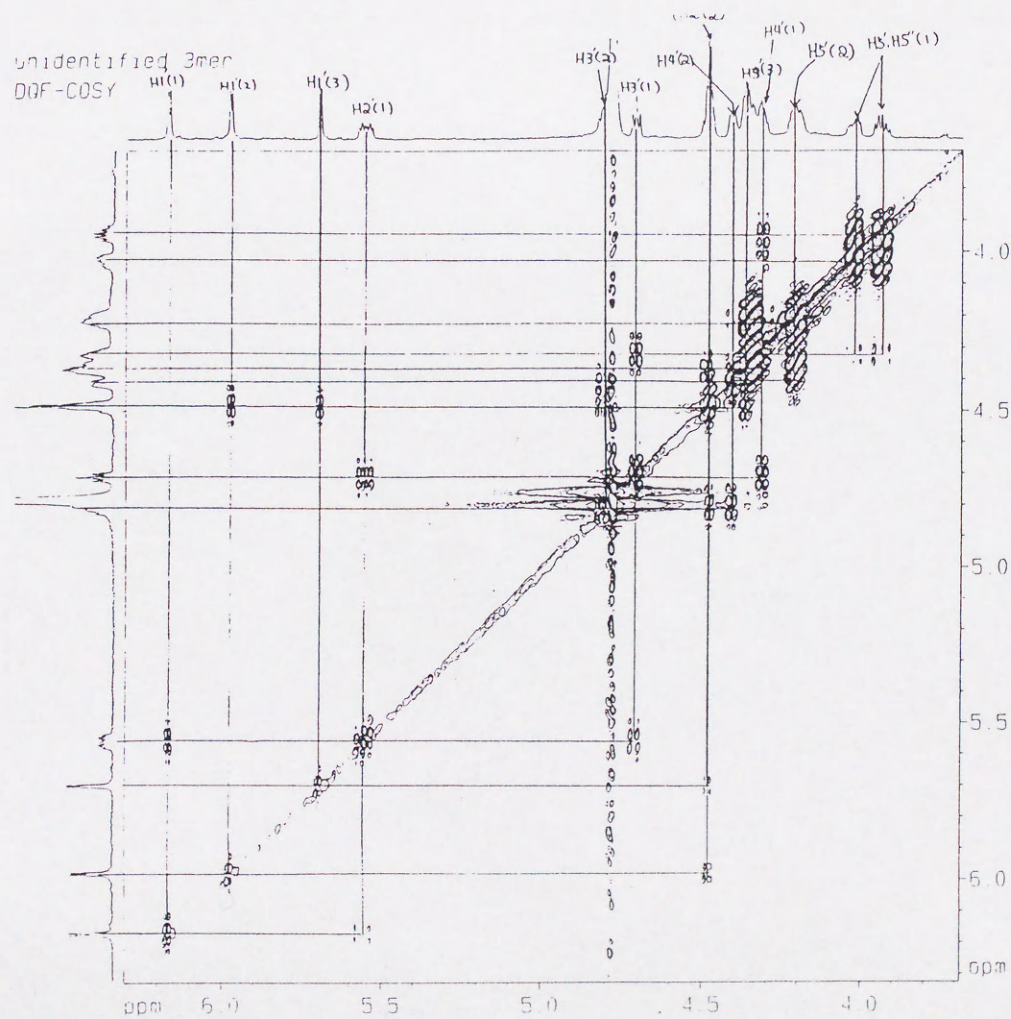


Fig. 86 ^1H DQF-COSY spectrum of 2',5'-; 3',5'-likage isomer

(7) RpRpRp-4mer (9-5-1: [a], [e], [h], [i])

→ [p(S)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A-2'-(Rp)-5'-p(s)A] (Fig.87)

各リボース環プロトンの帰属は、[e](Fig.88)を用いて行った。更にアデノシン残基及びチオリン酸基の配列決定を[h]及び[i](Fig.89)から行い構造を決定した(Table52参照)。

Table 52 Analytical data on RpRpRp-4mer

Tetramer	³¹ P NMR (ppm) ^{a)}				R _T (min) ^{b)}	SVPD digestion half life(hr)
	P(1)	P(2)	P(3)	P(4)		
RpRpRp-4	44.60	58.75	58.04	58.10	28.4	5.4

a) Decoupled spectra.

b) HPLC retention times on RPC-5 column.

c) No digestion detected by the time indicated.

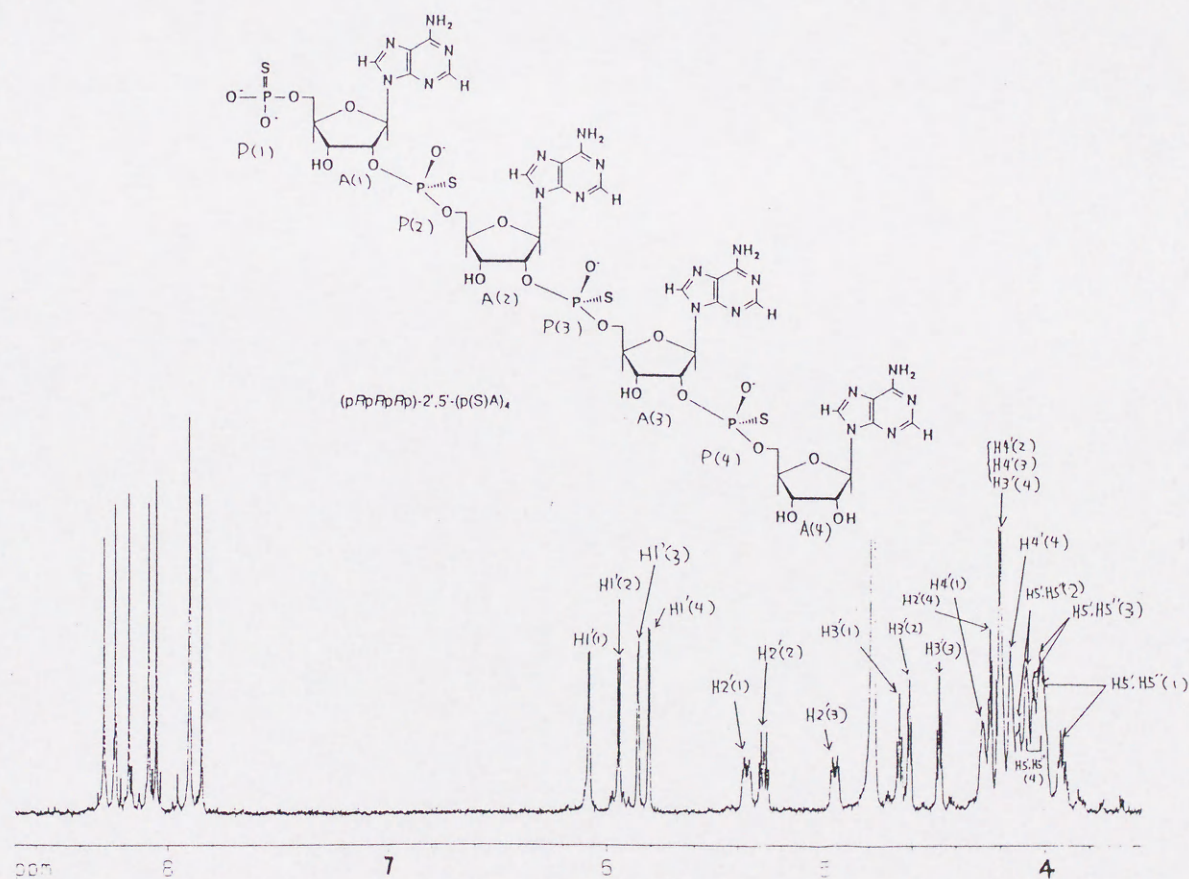


Fig. 87 ¹H NMR spectrum of RpRpRp-4mer

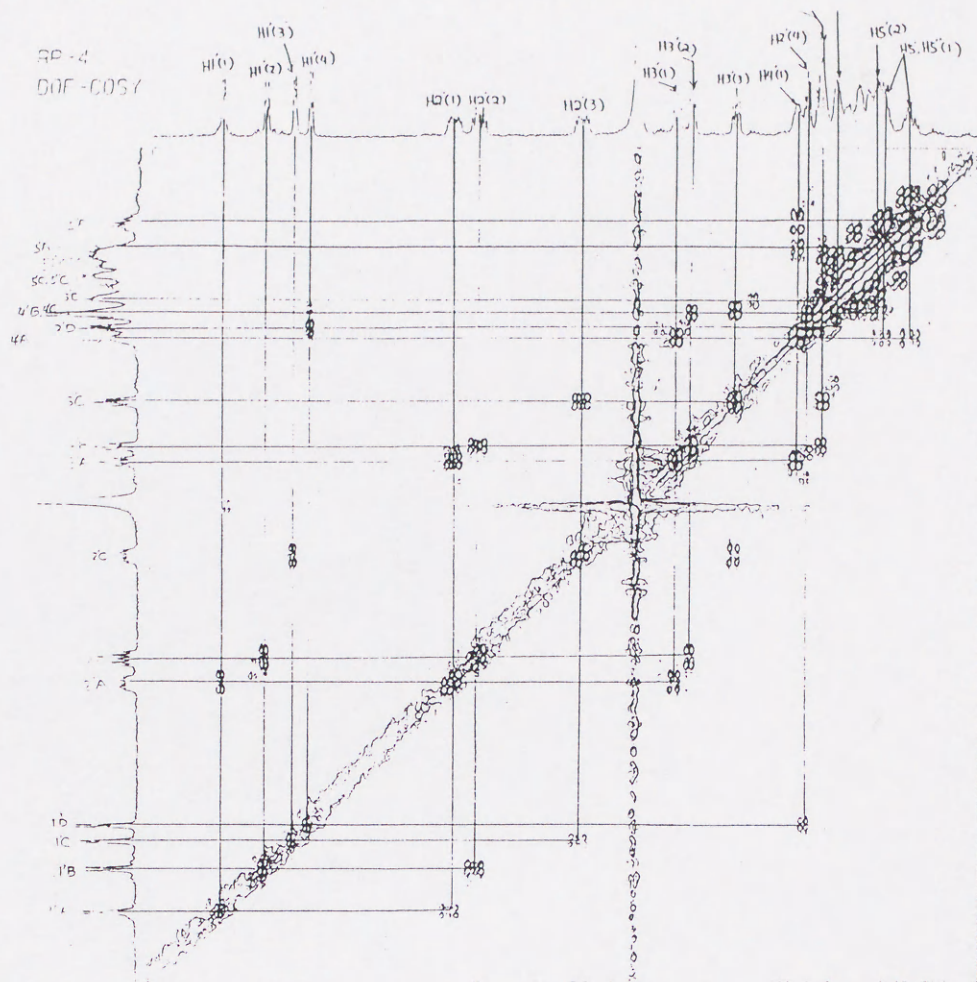


Fig. 88 ^1H DQF-COSY spectrum of RpRpRp-4mer

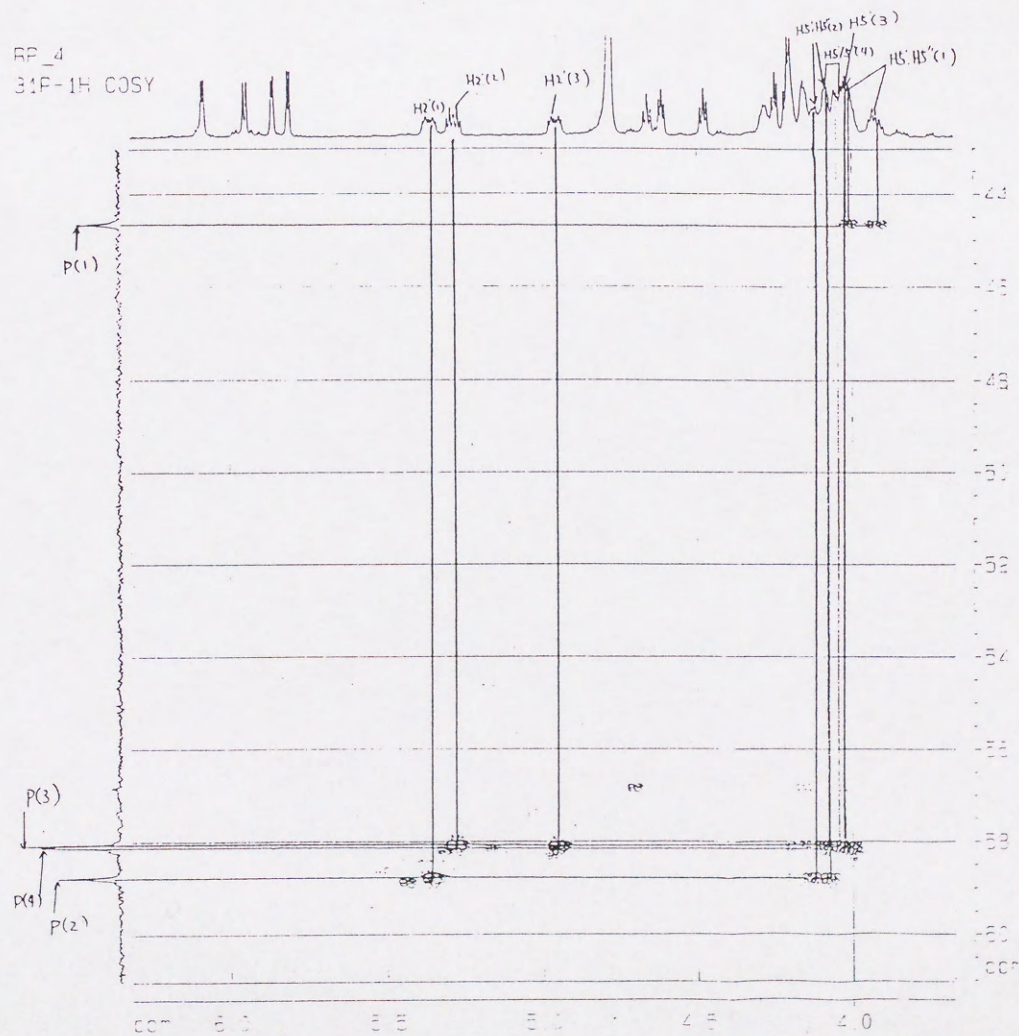


Fig 89 ^{31}P - ^1H COSY spectrum of RpRpRp-4mer

7-5-3 考察

(1) 2',5'結合2量体ジアステレオマー

リボース環プロトンのケミカルシフト(1'H~4'Hまでの値、5'H及び5''Hは確定できなかった)を示す(Table 53)。更にこれから隣接プロトン間のスピンスピン結合定数Jを求めることによって、リボース環のコンホメーション(パッカリング)に関する解析を試みた。

パッカリング様式は一般的に2つの状態 C2'endo (S-type)とC3'endo (N-type) で示され、結合定数JからC2'endo/C3'endoの分布状態を求めることができる^{83,84}(Fig.90)。C2'endo⇌C3'endoのコンホメーションは速い平衡にあり、この平衡定数 K_{eq} はかなりよい近似で与えられる⁸⁴。これより K_{eq} を求め、N-typeの分布状態を概算した(Table 53)。

$$K_{eq} = \text{C2'endo} / \text{C3'endo} \doteq J_{1',2'} / J_{3',4'} \quad (7.4)$$

$$\begin{aligned} \text{N-type conformer} &= [\text{N-type}] / ([\text{N-type}] + [\text{S-type}]) \times 100 (\%) \\ &= 1 / (1 + K_{eq}) \times 100 (\%) \end{aligned} \quad (7.5)$$

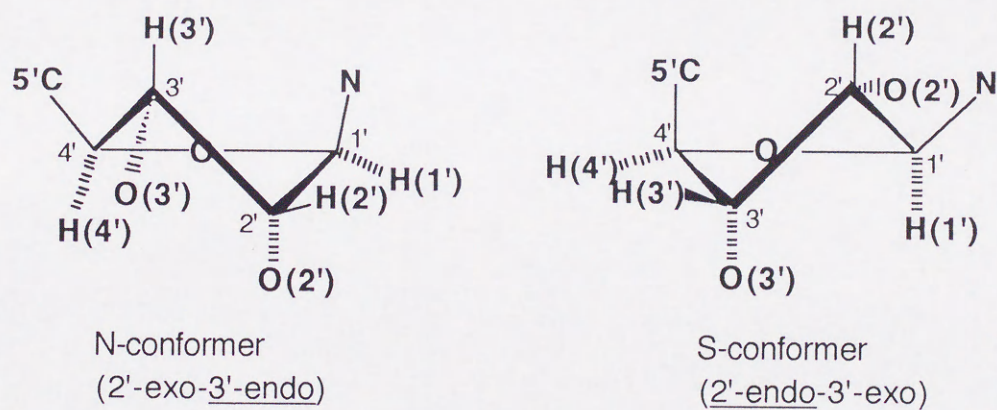


Fig. 90 Conventional projection of the N and S sugars

Table 53 ¹H chemical shifts and coupling constants of 2-5A dimer analogues

H (ppm)	Rp-2		Sp-2	
	A(1)	A(2)	A(1)	A(2)
(2H, 8H)	8.04	8.24	8.09	8.21
	8.25	8.54	8.27	8.61
1'H	6.26	5.93	6.28	5.96
2'H	5.58	4.38	5.43	4.43
3'H	4.83	4.36	4.78	4.37
4'H	4.42	4.32	4.44	4.34
J (Hz)				
1',2'	4.9	3.4	5.5	4.0
2',3'	4.9	4.1		4.7
3',4'	4.9	4.9		4.9
1',2' + 3',4'	9.8	8.3		8.9
1',2' / 3',4'	1.0	0.69	1.1	0.82
N-type conformer(%)	50	59	48	55

Rp-及びSp-2量体はパッカリングの算出結果から、類似したリボース環配座構造をとることが示唆された。

(2) 2',5'-結合3量体ジアステレオマー

(a) RpRp-3merについてNOESY測定(Fig.80)から、各アデノシン残基(A)のアデニン環-8Hとリボースプロトン-2'Hまたは3'H間でNOE(nuclear overhauser enhancement)が観測された。NOEは核間距離が4.5 Å以内であれば観測可能となる。従って、測定結果は8 Hと2'Hの空間的な接近を示唆しており、これからアデニン環の配向はすべてanti配座であることが推定された(Fig.91)。また、NOEからアデニン環とリボースプロトンの空間的な位置関係を考慮すると、各アデノシン残基のリボース環は次のようなパッカリングをとっていると推定される(Table 54)。

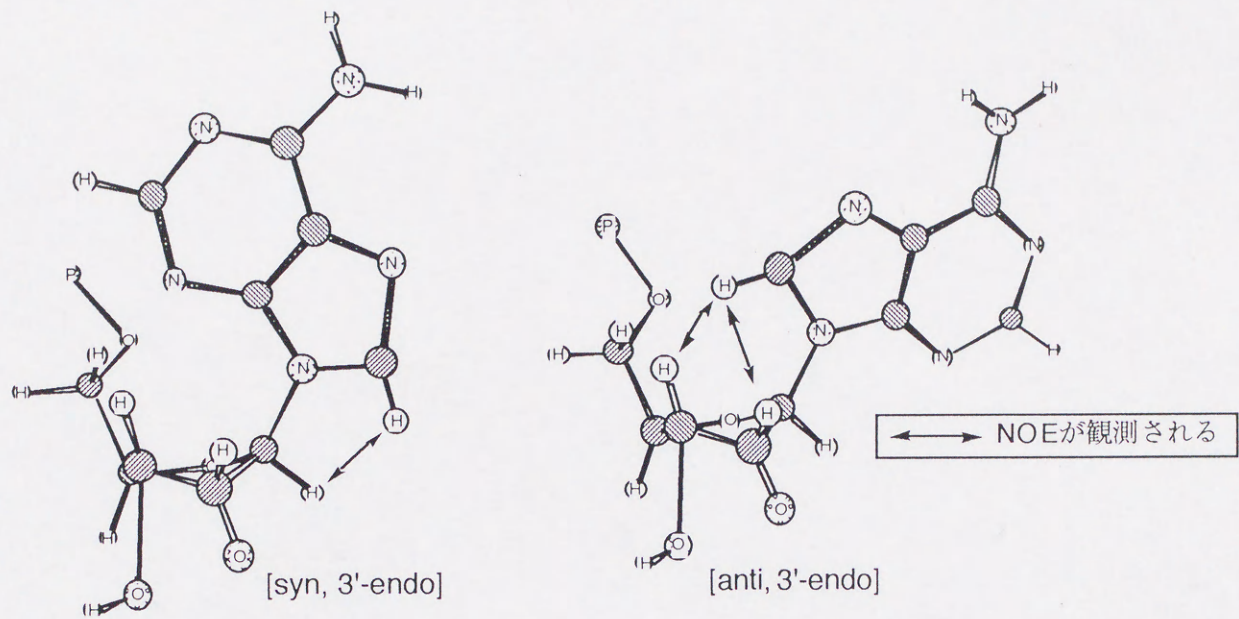


Fig. 91 ヌクレオチドモノマーのコンホメーション

Table 54 NOEから推定されるRpRp-3量体の立体配座

NOE	conformation
A 1: 8H-2'H, 8H-3'H	anti- / N-type
A 2: 8H-3'H (negative peak)	anti- / -
A 3: 8H-2'H, 8H-3'H	anti- / N-type

(b) オリゴマー・チオリン酸残基の³¹P ケミカルシフトをまとめて示す(Table 55)。

Table 55 ³¹P chemical shifts of 2',5'-oligothioadenylates

oligomer	P(1)	P(2)	P(3)	P(4)
Rp-2	44.17	57.66		
Sp-2	44.17	56.73		
RpRp-3	44.65	58.35	58.08	
RpSp-3	44.65	58.34	57.35	
SpRp-3	44.66	56.68	58.20	
3mer's isomer	44.58	58.91	56.58	
RpRpRp-4	44.60	58.75	58.04	58.10

りんのケミカルシフトはチオりん酸残基の立体配置に依存しており、Sp-配置はRp-配置と比較した場合、より高磁場側で共鳴することが知られている⁸²⁾。三種類の2',5'-オリゴマー3量体ジアステレオマーにおいて、RpSp-3merのP(3)、及びSpRp-3merのP(2)はいずれも高磁場でのケミカルシフトを示し、これらのチオりん酸基がSp-配置であることを示している(Fig.92-2)。

(c) リボース環プロトンのケミカルシフトをまとめた(Table 56)。

Table 56 ^1H chemical shifts of 2',5'-oligothioadenylate trimer analogues

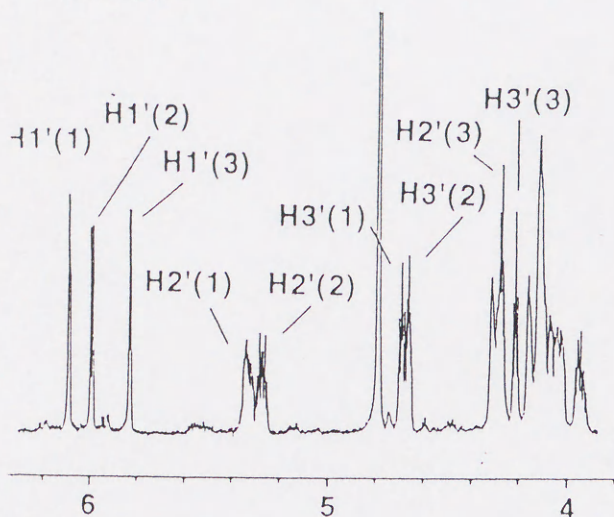
H	RpRp-3			RpSp-3			SpRp-3		
	A(1)	A(2)	A(3)	A(1)	A(2)	A(3)	A(1)	A(2)	A(3)
	ppm								
1'	6.09	5.99	5.83	6.09	5.97	5.86	6.16	6.02	5.83
2'	5.33	5.27	4.27	5.38	5.04	4.34	5.13	5.28	4.24
3'	4.68	4.65	4.21	4.70	4.56	4.29	4.67	4.69	4.19

2'H及び3'Hのケミカルシフトは、結合しているチオりん酸基の立体配置によって大きく異なっている(Fig.92-1)。 ^{31}P NMRの場合と同様、Sp-配置のチオりん酸基が結合していると2'H及び3'Hは高磁場シフトを、一方Rp-配置が結合していると低磁場シフトを示した。磁気核に近接している電気陰性度の大きい原子は、核の遮蔽を減らすことが予想される。おそらくこの現象は、チオりん酸基の立体配置によって配向規制された酸素または硫黄原子のどちらか一方がリボース環2'H及び3'Hの近傍に接近することで、これら原子の遮蔽能力の相違がリボース環プロトンのケミカルシフトに反映した結果と思われる(7-3章, Fig.65)。なお、リボース環プロトンの4'H, 5'H及び5''Hが現れるスペクトル領域は複雑に込み入っているため、ケミカルシフトを求めることができなかった。

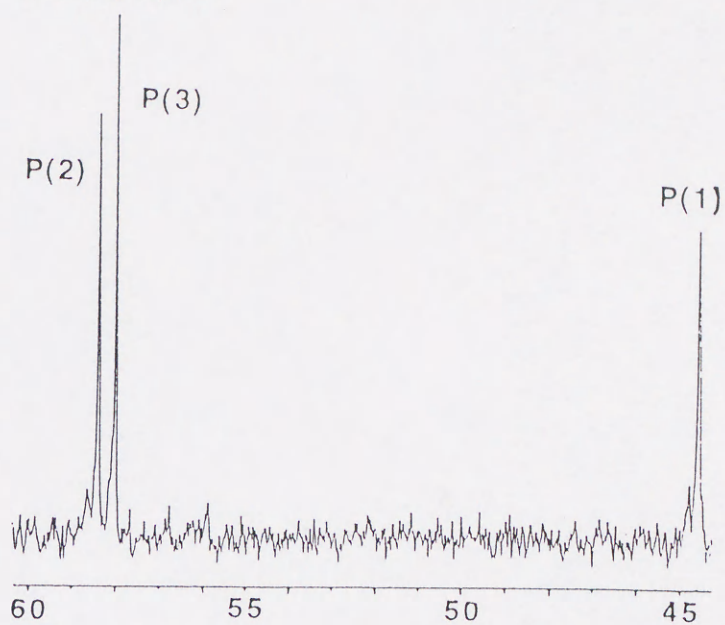
(1) ^1H NMR Spectra

(2) Decoupled ^{31}P NMR Spectra

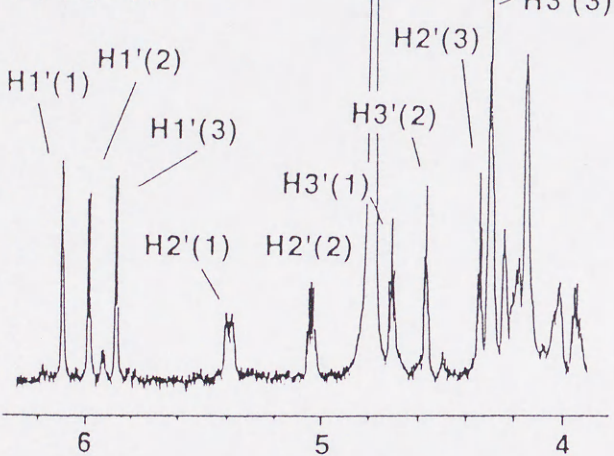
A) (*RpRp*)-3



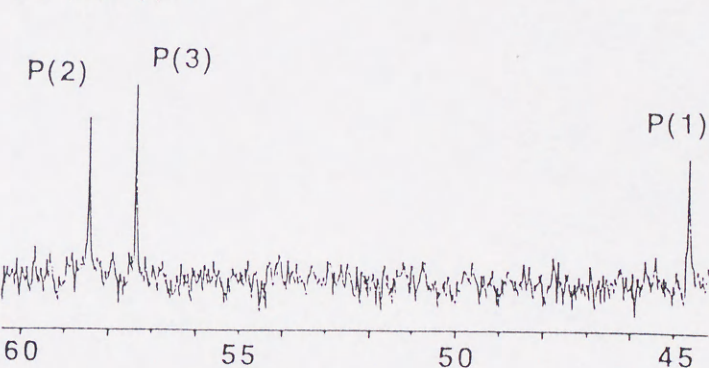
(A) (*RpRp*)-3



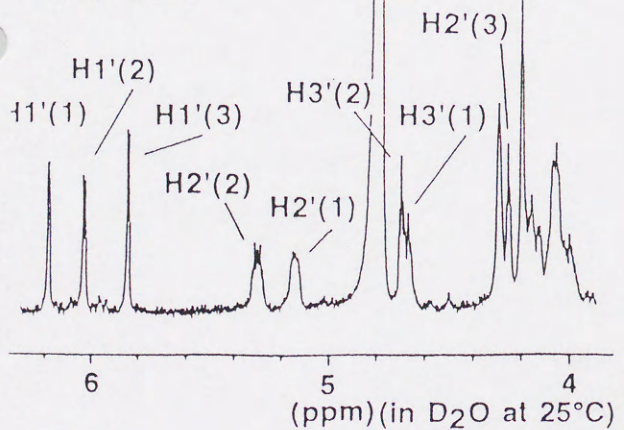
(B) (*RpSp*)-3



(B) (*RpSp*)-3



(C) (*SpRp*)-3



(C) (*SpRp*)-3

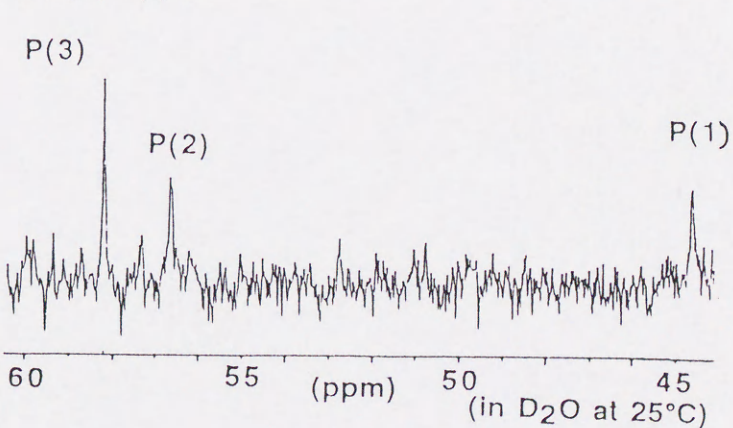


Fig. 92 NMR spectra of 2',5'-oligothioadenylate trimer analogues

(d) 結合定数 J を求め、これからパッカリングの推定を試みた。結果を Table 57 に示す。

Table 57 Coupling constants and population of N-type conformer for 2',5'-oligothioadenylate trimer analogues

J (Hz)	RpRp-3			RpSp-3			SpRp-3		
	A(1)	A(2)	A(3)	A(1)	A(2)	A(3)	A(1)	A(2)	A(3)
1',2'	3.1	5.3	3.8	3.0	5.1	4.6	2.2	5.0	3.7
2',3'	5.9	5.6	4.3	6.1	4.2	4.6	5.8	4.0	4.0
3',4'	5.9	4.3	5.1	5.7	4.4	4.9	5.0	4.6	4.0
$J_{1',2'} + J_{3',4'}$	9.0	9.6	9.4	8.7	9.5	9.5	7.2	9.6	7.7
$J_{1',2'} / J_{3',4'}$	0.53	1.23	0.75	0.53	1.16	0.94	0.44	1.09	0.93
N-type(%)	65	45	57	65	46	52	69	48	52

算出したデータより、いずれの3量体も類似したリボース環コンホメーションをとっていることが示唆された。即ち、5'-末端のA残基はN-typeであり、中央及び2'-末端A残基はN-type/S-typeの混合コンホメーション状態であると思われる。

今回行った¹H NMR測定からは、これらのジアステレオマー間でパッカリングの相違を確認することができず、パッカリング状態とチオリン酸基の立体配置の配向との間に直接的な関連性を見出すことはできなかった。おそらくチオリン酸基の導入による糖-りん酸骨格のコンホメーション変化は、例えばねじれ角 β [C4'-C5'-O5'-P]、ねじれ角 α 、ねじれ角 ζ [P-O5'·O2'-Pエステル結合回りの配向] のように、チオリン酸残基周辺のみに限定されていると思われる (Fig.93)。一方、NMRと同様にオリゴマーの高次構造変化を反映できるCD測定からは、2量体及び3量体ジアステレオマー間でスペクトルの異なる結果が得られた (7-3章; Fig.57, 58参照)。チオリン酸基の立体配置が関与するオリゴマーの構造変化を、CDにおいては観測できたと思われる。

結果的に、パッカリング様式とチオリン酸基立体配置の関係を本法で用いたNMR測定からは検討できなかった。しかしながらこれらの骨格構造は、より発展的なNMR手法によって、例えばねじれ角 β はプロトン-りん間のビシナル結合定数³ J_{5P} と³ $J_{5'P}$ を求めることから決定可能である⁸³⁾。NMRを用いた更に詳細な検討によって、オリゴマーのコンホメーションを解析することが望まれる。

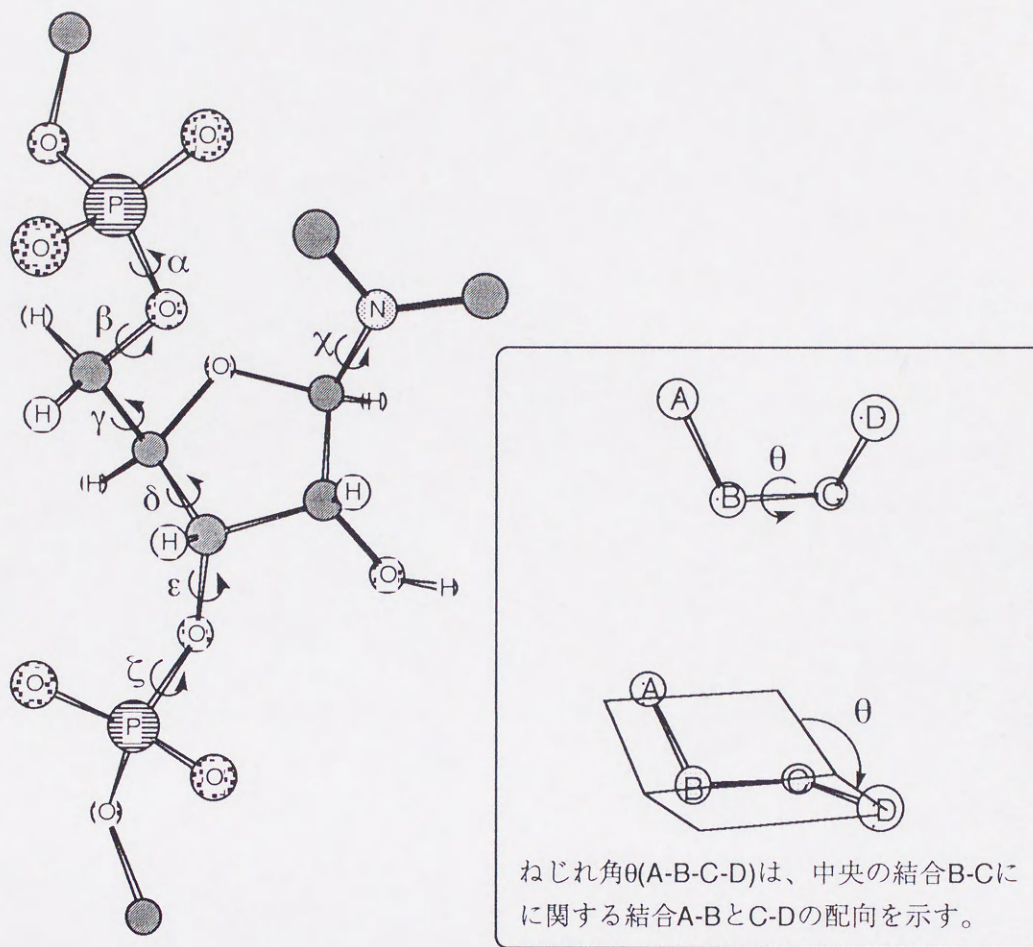


Fig. 93 ヌクレオチド鎖のねじれ角の定義

(3) 2',5'-; 3',5'結合 3量体

2',5'-;3',5'結合を有する異性体のリボースプロトン1'H~3'Hのケミカルシフト及びカップリング定数を示す(Table58)。異性体のケミカルシフト及びカップリング定数は、2',5'結合 3量体とはっきり異なっている。例えば、A (2)のリボース残基C 3にはチオリン酸基が結合しているため、その3'Hは2'Hよりも低磁場側で共鳴している。またパッカリングについて、A残基すべてがN-typeであることを示唆した(Table54)。異性体の3',5'結合部位のチオリン酸残基P(3)の立体配置は得られた情報が少なく特定できなかったが、2',5'結合部

位のP(2)は ^{31}P -ケミカルシフト及びA(1)-2'Hケミカルシフト値からRp-配置をとっていることが示唆された。

Table 58 Coupling constant and population of N-type conformer for linkage isomer of 2',5'-oligothioadenylate trimer

H	chemical shifts (ppm)			coupling constants (Hz)			
	A(1)	A(2)	A(3)	J	A(1)	A(2)	A(3)
1'	6.17	5.98	5.70	1',2'	3.7	3.3	2.7
2'	5.56	4.49	4.49	2',3'	5.6		
3'	4.71	4.80	4.37	3',4'	5.8		
				$J_{1',2'}+J_{3',4'}$	9.5		
				$J_{1',2'}/J_{3',4'}$	0.64	0.66	0.54
				N-type (%)	61	60	65

(4) RpRpRp-4量体

RpRpRp-4量体リボース環のケミカルシフトカップリング定数(Table 59)を示す。

Table 59 Chemical shifts and coupling constants of 2',5'-oligothioadenylate tetramer

H	chemical shifts (ppm)				coupling constants (Hz)				
	A(1)	A(2)	A(3)	A(4)	J	A(1)	A(2)	A(3)	A(4)
1'	6.08	5.95	5.86	5.81	1',2'	3.5	5.2	3.3	4.2
2'	5.36	5.28	4.96	4.25	2',3'	5.8	4.5	5.5	4.0
3'	4.66	4.61	4.48	4.21	3',4'	5.8	4.3	5.5	
					$J_{1',2'}+J_{3',4'}$	9.3	9.5	8.8	
					$J_{1',2'}/J_{3',4'}$	0.60	1.20	0.60	0.84
					N-type(%)	63	45	63	54

4量体の構造決定を次のように検討した。オリゴマーのチオリン酸基がいずれもRp-配置であることから、このRpRpRp-4merと先程解析したRpRp-3merとの間にNMRスペクトルの類似性があると推定した。RpRp-3merのA残基についてA残基の順位が5'→2'方向へ向かうと共に、リボース環プロトンの1'H及び2'Hは低磁場側から高磁場側へ順序よく配列して

いたので、これを適用して ^{31}P - ^1H COSYのプロトン側からRpRpRp-4merのA残基を順位付けた。しかしながら、ここで ^{31}P - ^1H COSYのりん側より4量体の配列決定を試みると、プロトン側から帰属した場合と異なり、A(2)とA(3)との位置が入れ替わる結果を得られる。4量体のP(3)とP(4)はケミカルシフトの差が僅か0.06ppmであり、ほとんど同一環境にあると思われる。

従って、本方法から帰属した4量体の構造が正確であると完全に断言することはできない。そこでより確実な帰属を行うためには、例えば ^{31}P - ^1H COSYについて、 ω_2 軸における各 ^{31}P の共鳴線の位置で ^1H 周波数の軸に沿ってとった断面図を検討することが必要と思われる。

第8章 2',5'-オリゴチオアデニル酸の生物活性

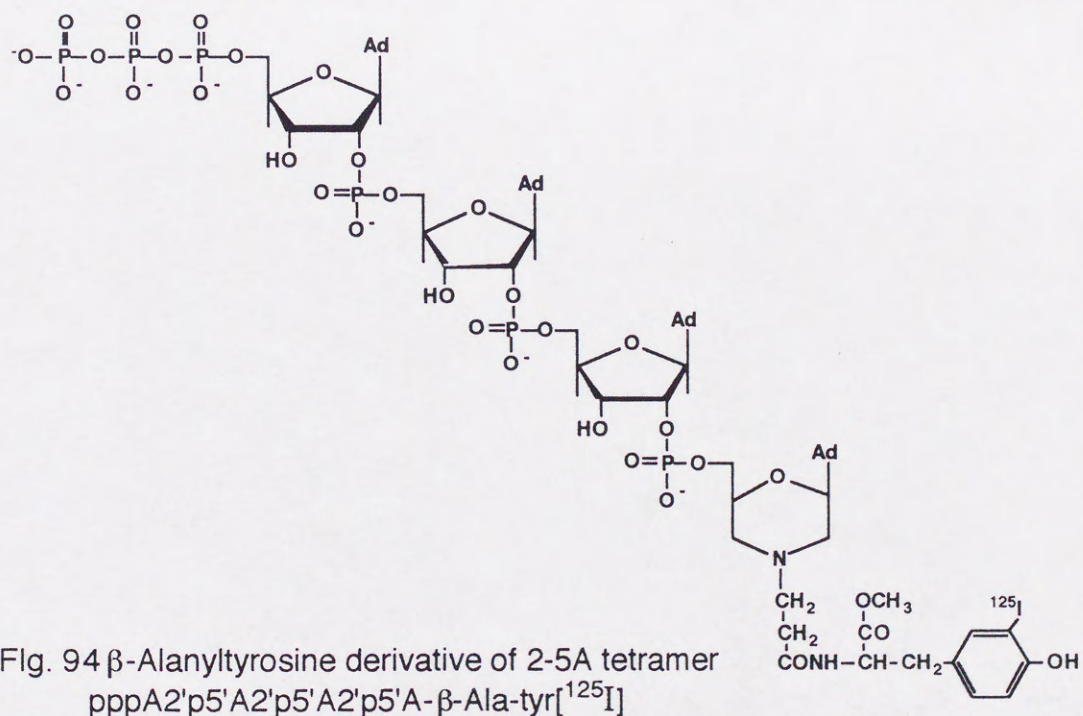
8-1 ラジオバイディングアッセイ

度々記述してきたように、2-5Aはインターフェロンの抗ウイルス作用に直接関与する物質であり、その機能はRNase Lへ結合しこれを活性化することにある。

2-5Aの有するこれらの生物学的機能のうち、まずRNase Lに対する結合能力に関して、本研究で合成した2',5'-オリゴチオアデニル酸の能力をラジオバイディングアッセイを用いて検討した。

8-1-1 測定法

ラジオバイディングアッセイは、RNase Lへ結合した放射能標識プローブに対して、検体とするオリゴヌクレオチドが置換する能力を測定する競争アッセイに基づいて2-5A及びそのアナログの親和性を評価する方法である⁸⁶⁾。このアッセイに用いる放射能標識プローブとして、酵素的に合成した³²P-標識2-5Aアナログが幅広く使用されている。しかしながら³²Pは放射線量が比較的強いので遮蔽を必要とし、また半減期が短いなどの問題点から、³²P-標識化合物の取り扱いには注意が要求される。そこで本研究では、沢井らによって開発された¹²⁵I-標識化2-5Aアナログ(2-5A・4量体-β-アラニルチロシン誘導体；pppA2'p5A2'p-5'A2'p5A-β-Ala-Tyr[¹²⁵I], Fig.94)をプローブとして用いることにした⁸⁷⁾。



RNase LはマウスL929細胞抽出液 (mouseL cell extract)、またはウサギ網状赤血球ライセート (rabbit reticulocyte lysate) を由来源として使用した。アッセイ終了後、RNase Lへ結合することによって残存した¹²⁵I標識プローブの放射能はウェル型γ-カウンターを用いて計測した(実験の部参照)。

8-1-2 アッセイ結果

¹²⁵I 標識プローブのみを用いてバインディングアッセイを行ったときを基準(100%)として、2',5'-オリゴチオアデニル酸が各種濃度で存在するときの¹²⁵I 標識プローブの結合量を求めた。RNase L源としてマウスL929細胞抽出液を用いた場合の結果をFig.96-(1)に、ウサギ網状赤血球ライセートにおける結果をFig.96-(2)に示す。更に本研究で通常得られる5'-モノチオりん酸体の他に5'-末端修飾体として、

a) アルカリホスファターゼ処理により5'-末端を脱りん酸化した3量体コア [RpRp-3(core)]

b) ジフェニルホスホクロリデートによって5'-末端を活性化した後もう一つのりん酸基を導入した5'-O-(1-チオピロりん酸)体 [Rp-p(pSA)₂, RpRp-p(pSA)₃]

を合成し(Fig. 95)アッセイを行った。

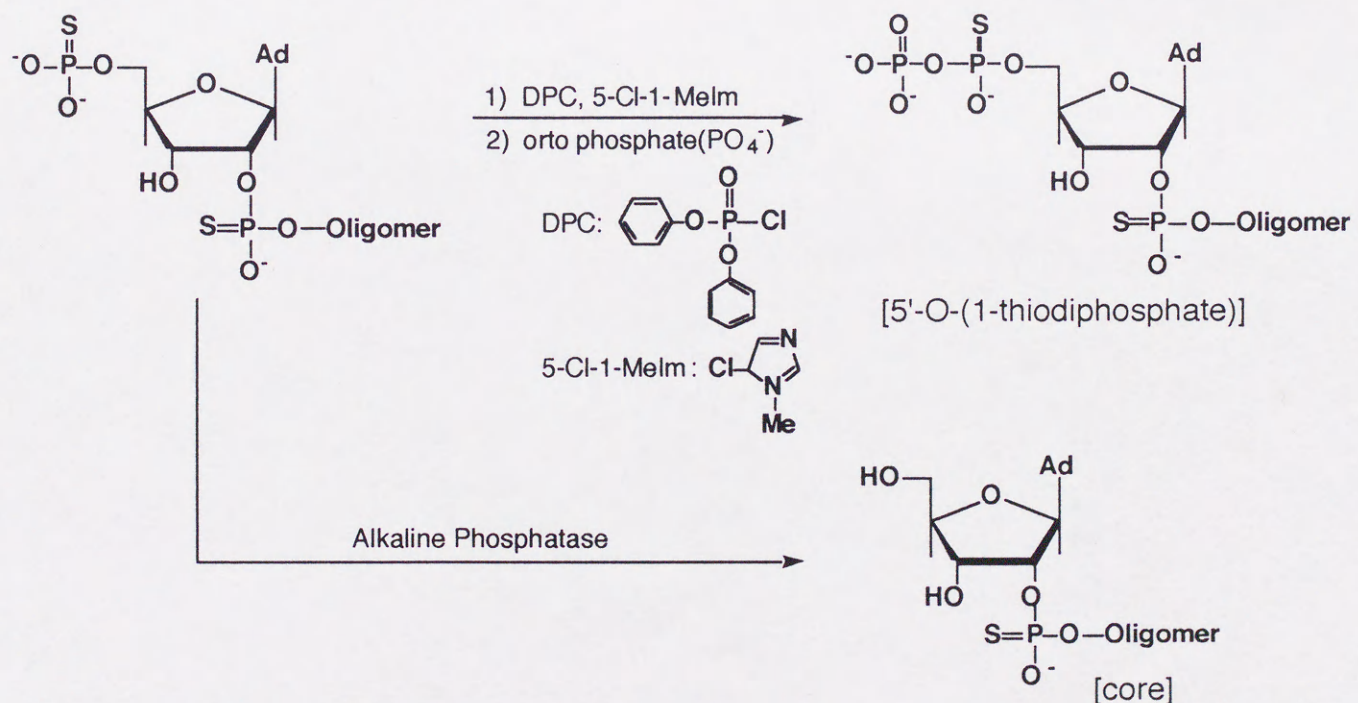


Fig. 95 Modification of 2',5'-oligothioadenylate at the 5'-terminal

結果をFig.97に示す。これらの結果から、各オリゴマーについてその結合能力を評価する指標である $IC_{50}(M)$ (プローブとRNase L間との最大結合量の50%を阻害するのに必要なオリゴマー濃度) を算出した(Table 60)。

8-1-3 考察

(1) オリゴマーの結合能力はRNase Lの種類に依存するため、同一オリゴマーを用いた場合でもRNase Lの由来によって IC_{50} が異なる結果を得た。結合親和性は、

mouse L cell-RNase L > rabbit reticulocyte lysate-RNase L

のようにマウスL細胞系の方がより強い値を示した。

(2) ウサギ網状赤血球ライセート系では天然型の p_3A_3 が最も強い結合活性を示した。これ以外のオリゴマーはいずれも5'末端がモノりん酸化またはモノチオリん酸化されているが、 p_3A_3 より強い結合親和性を示さなかった。 p_3A_3 は5'末端が三りん酸化されていることより、ウサギ網状赤血球RNase Lへの結合には5'末端の三りん酸基の存在が重要であることを示唆している。しかしながら p_3A_3 を除く5'-モノりん酸体オリゴマー間の比較において、2',5'-オリゴチオアデニル酸3量体(及び4量体)は対応する構造をもつ天然型 p_3A_3 に対し、0.2~5倍の結合能力を示した。従ってチオリん酸基の導入は、ウサギ網状赤血球RNase Lに対する結合親和性の増大について部分的に有効であることを示唆した。

(3) マウスL細胞系で、RpSp-3mer及びRpRpRp-4merは天然型 p_3A_3 と同レベル以上の結合能力を示した。更に2',5'-オリゴチオアデニル酸3量体及び4量体は、天然型 p_3A_3 と比較した場合、約5~17倍の結合親和性の増大を示した。また2量体オリゴマーに関して、天然型 $p_3A_2(pppA_2'p_5A)$ と比較すると⁵²⁾、Rp-2merは12倍、一方Sp-2merは1.3倍の結合能力を示した。これらの結果はウサギ網状赤血球RNase Lの場合と同様、チオリん酸基の導入が結合親和性の増強について非常に有効であることを示した。

(4) 2',5'-オリゴアデニル酸の5'脱りん酸化は、RNase Lに対する結合親和性を大幅に低下させることが報告されている^{32,88)}。マウスL細胞RNase Lに対するオリゴマー5'末端の修飾効果について、5'末端チオリん酸基の除去は同様に結合能力を1/10000に減少させた(RpRp-3 > RpRp-3(core))。一方、5'末端の二りん酸化はほとんど影響を示さなかった。

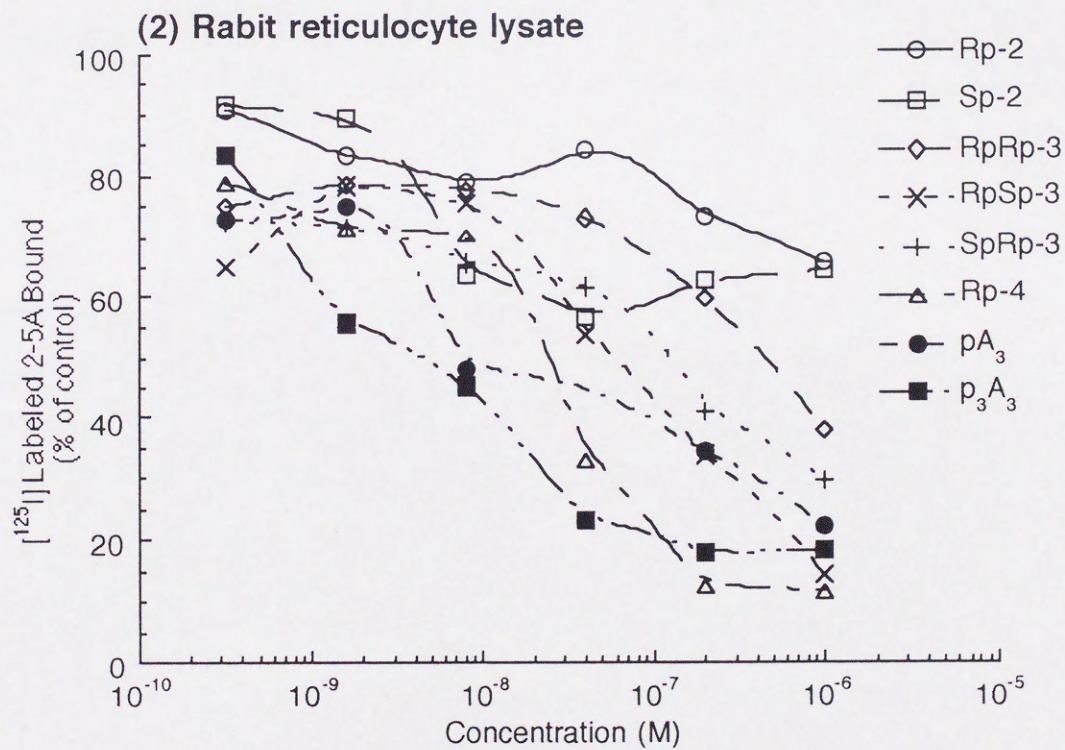
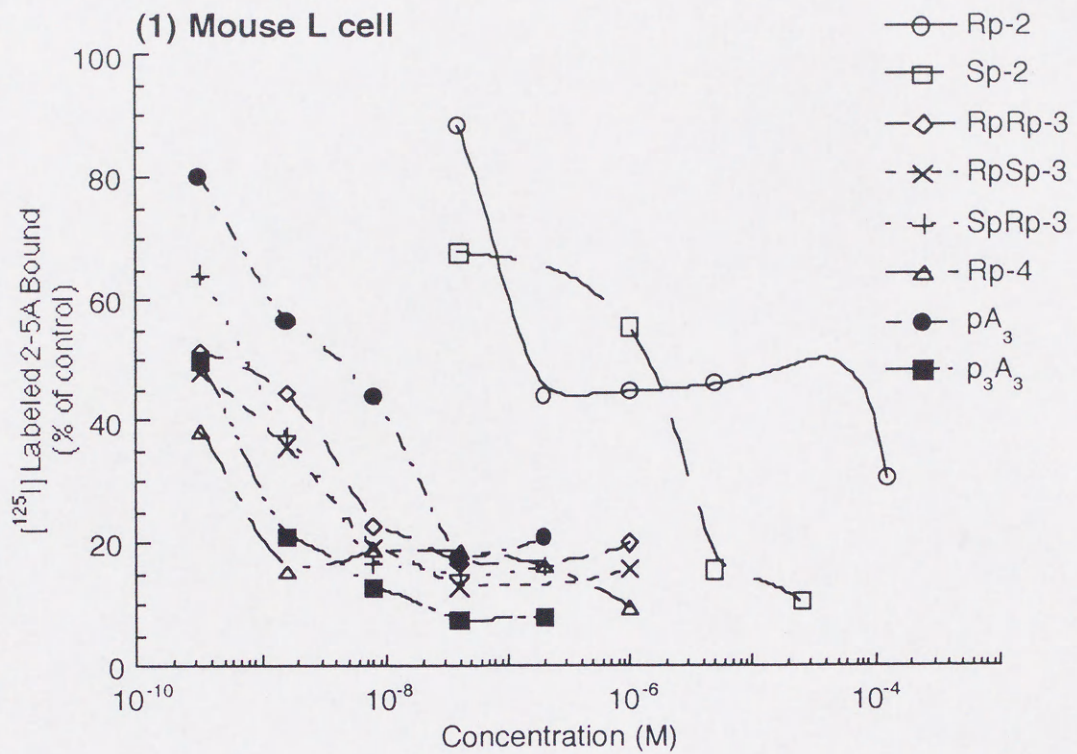


Fig.96 Radiobinding assay of 2',5'-oligothioadenylates

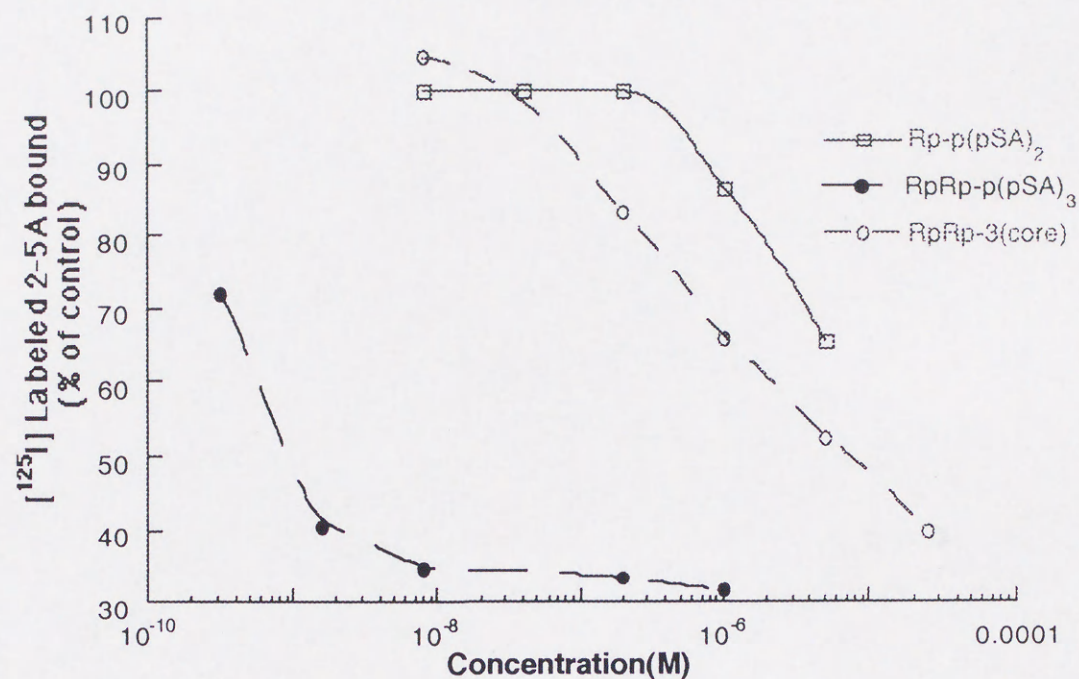
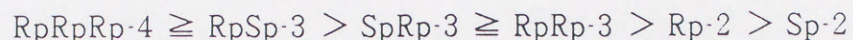


Fig. 97 Radiobinding assay of 5'-substituted oligothioadenylates

Table 60 Binding Ability of 2-5A Analogues to RNase L

Compound	IC ₅₀ (M)	
	Rabbit reticulocyte lysate	L cell extract
p ₃ A ₃	5×10 ⁻⁹	4×10 ⁻¹⁰
pA ₃	1×10 ⁻⁷	5×10 ⁻⁹
Rp-4	2×10 ⁻⁸	<3×10 ⁻¹⁰
RpSp-3	6×10 ⁻⁸	<3×10 ⁻¹⁰
RpRp-3	5×10 ⁻⁷	8×10 ⁻¹⁰
SpRp-3	1×10 ⁻⁷	1×10 ⁻⁹
Rp-2	>1×10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁷
Sp-2	>1×10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁶
RpRp-3(core)		8×10 ⁻⁶
RpRp-p(pSA) ₃		9×10 ⁻¹⁰
Rp-p(pSA) ₂		>5×10 ⁻⁶

(5) これら二系統のRNase Lに対するラジオバイディングアッセイの結果から、オリゴチオアデニル酸系は次のような順序で結合能力を示すと考えられる。



Sobolらは、オリゴチオアデニル酸におけるチオリン酸基の立体配置の変更がRNase Lに対する結合親和性の強度に影響を及ぼさないことを報告している(89)。しかしながら、本研究においては3量体間で8倍 (rabbit reticulocyte lysate; $\text{RpSp-3} > \text{RpRp-3}$)、また2量体間で10倍 (mouse L cell; $\text{Rp-2} > \text{Sp-2}$) の結合能力の差が認められた。本研究で用いたアナログ(5'-モノチオリン酸体)とSobolらが用いたアナログ(コア体及び5'-モノリン酸体)では5'-末端部の構造が異なっている。しかしながらRNase Lは機能的に立体選択性を示す酵素であることから、2-5Aアナログが結合するときRNase Lの結合部位がアナログオリゴマーの立体化学を認識する、即ち、オリゴマーの立体配置の相違がRNase Lへの結合能力に反映される現象が、本研究において認められたように生じることはむしろ自然であると思われる。

8-2 細胞内蛋白質合成阻害アッセイ

2-5Aの結合によって活性化したRNase Lは、ウイルスまたは細胞のmRNA/rRNAをUpNp配列の3'-側で切断する。切断されたmRNA/rRNAはその本来持っている機能を失うため、結果として蛋白質の合成阻害が引き起こされる。これが2-5A系における抗ウイルス機構または細胞成長抑制機構である³⁵⁾。

8-1章では、RNase Lに対する2',5'-オリゴチオアデニル酸の結合能力をラジオバインディングアッセイによって検討した。そこで本節では、2',5'-オリゴチオアデニル酸のRNase L活性化能力について細胞内蛋白質合成阻害アッセイを用いて検討することにした。

8-2-1 測定法

細胞内蛋白質合成阻害アッセイでは、生細胞内へ2-5Aアナログを取り込ませることでRNase Lを活性化し、蛋白質合成の阻害を行わせる⁹⁰⁾。しかしながら細胞内への2-5Aアナログの取り込みはアナログの有するりん酸基の負電荷によって、疎水的な細胞膜からの浸透を困難にしている。そこで本研究におけるオリゴマーの細胞への導入は、りん酸カルシウム共沈法^{90,91)}を用いて行うことにした。この方法では、オリゴマー溶液中にCa²⁺とりん酸を共存させるとCaPO₄とオリゴマーが共沈澱する現象を利用して培養細胞上に生成した沈殿物を重層し、細胞内へオリゴマーを取り込ませる。

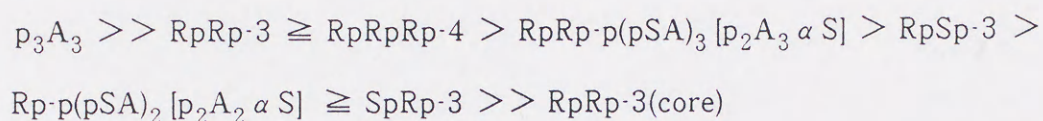
オリゴマーの蛋白質合成阻害能力の測定は、次のような手順で実行した。オリゴマーの導入後、まず、放射能標識したアミノ酸である^[35S]メチオニンを含む培地中で細胞を所定時間培養した。続いて細胞を溶解後、トリクロロ酢酸(TCA)によって細胞中のポリペプチド/蛋白質を酸不溶性沈殿物とした。最後にこの沈殿物をフィルター上に濾過後、蛋白質中に含まれる^[35S]メチオニン量を液体シンチレーションカウンター(LSC)を用いて計測した。アッセイ用の細胞としてはマウスL929細胞(3.6 × 10⁵ cells/well)を使用した。オリゴマーとして、縮重合反応から得られた5'-モノチオリん酸体の他に、ラジオバインディングアッセイで用いた5'-末端修飾体として、3量体コア[RpRp-3(core)]、及び2量体及び3量体の5'-O-(1-チオピロりん酸)体 [Rp-p(pSA)₂, RpRp-p(pSA)₃] を用いた(実験の部参照)。

8-2-2 アッセイ結果

LSCを用いて計測した酸不溶性ポリペプチド中の $[^{35}\text{S}]$ メチオニン量を、対照実験と比較することによって蛋白質合成阻害能力を求めた。結果をFig.98に示す。また、これから算出した $\text{IC}_{50}(\text{M})$ ($[^{35}\text{S}]$ メチオニンの取り込みを50%阻害するのに必要なオリゴマー濃度)をTable61に示す。

8-2-3 考察

(1) IC_{50} からオリゴマーの蛋白質合成阻害能力は次のような順位を示した。



(2) マウスL細胞由来のRNase Lは、2-5A分子によって活性型エンドヌクレアーゼとなるために、一般に2-5Aの5'-末端ピロリン酸/三リン酸部位の存在が必要とされている。また、5'-ピロリン酸基は細胞内で5'-三リン酸基へ修飾可能であることが報告されている³³⁾。5'-末端にリン酸基のないRpRp-3merコアはほとんど阻害活性を示さなかった。天然型2-5Aの3量体コアは、RNase Lに対する結合能力及び活性化能力をもたないことが報告されており^{31,88)}、RpRp-3merコア体において得られた結果もこれに一致することが確認された。

(3) コアRpRp-3merを除く他の2',5'-オリゴチオアデニル酸は、オリゴマーの用量依存に従って蛋白質合成を阻害した。この結果は蛋白質の合成阻害が、実際にオリゴマーの結合により誘導されるRNase Lの活性化によって行われていることを示唆している。

(4) Rp-2merのピロリン酸体であるRp-p(pSA)₂ [p₂A₂ α S] は $\text{IC}_{50}=1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ を示した。一方、天然型2-5Aの2量体(pppA2'p5A, p₃A₂)はRNase Lを活性化できないとされている⁹¹⁾。この結果から、アナログにおけるチオリン酸基の導入はRNase Lの活性化に寄与しているといえる。

(5) 3量体の5'-モノチオリン酸アナログ (RpRp-3, RpSp-3, SpRp-3) はいずれもRNase L活性化能力を示した。一方で天然型モノリン酸3量体 (pA₃) はRNase Lと結合できるが、活性化することができない⁹¹⁾。従って、3量体アナログについてもチオリン酸基の導入は、

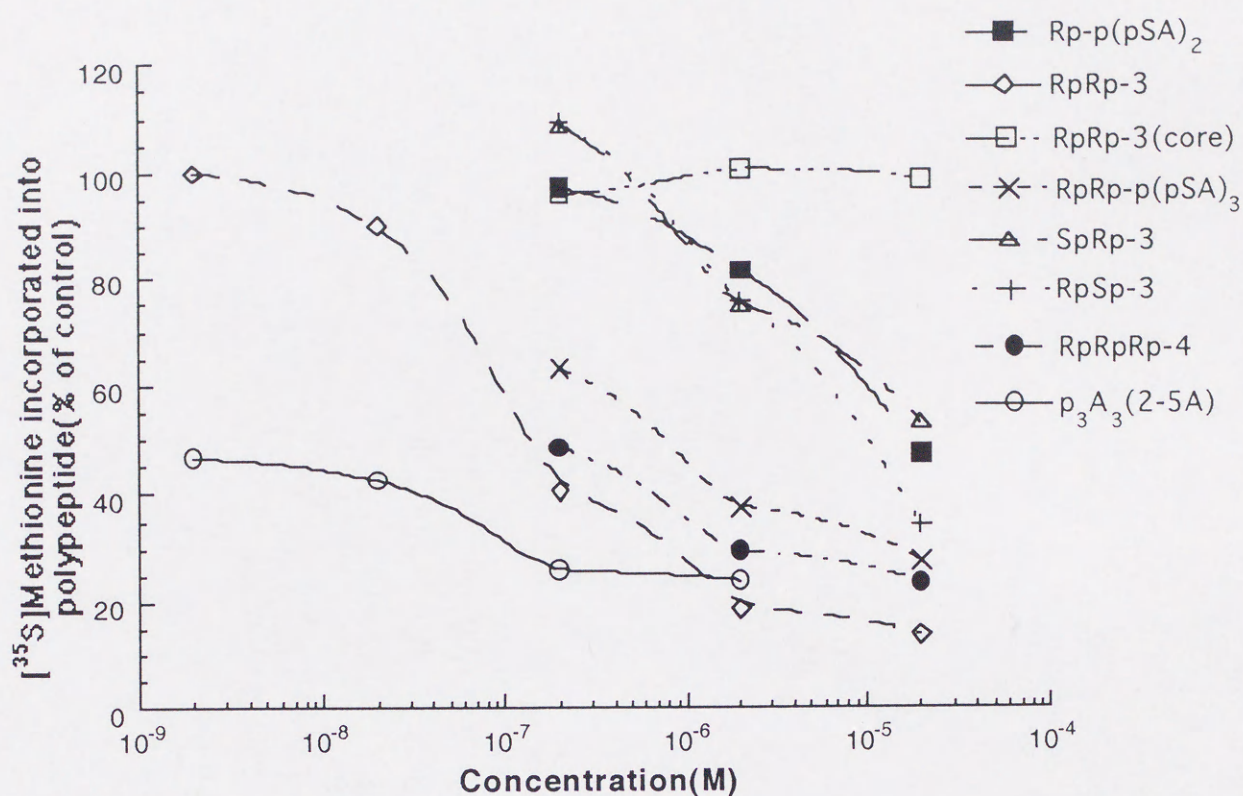


Fig. 98 Inhibition of cellular protein synthesis

Table 61 Ability of 2-5A Analogues to Inhibition of Cellular Protein Synthesis

Compound	IC ₅₀ (M) Mouse L929 Cells
p ₃ A ₃	<2×10 ⁻⁹
pA ₃	N.A. ¹⁾
RpRp-3	1.5×10 ⁻⁷
RpRpRp-4	2×10 ⁻⁷
RpRp-p(pSA) ₃	6.5×10 ⁻⁷
RpSp-3	8.5×10 ⁻⁶
Rp-p(pSA) ₂	1.5×10 ⁻⁵
SpRp-3	>2×10 ⁻⁵
RpRp-3(core)	N.A. ²⁾

1) Torrence, P.F.; Imai, J.; Johnston, M.I (1981) *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5993.

2) No activated up to 2×10⁻⁵(M).

RNase L活性化能力の増強にとって有効であった。しかしながら、その能力はチオリン酸基の立体配置に大きく依存する結果を得た ($RpRp\cdot 3 > RpSp\cdot 3 > SpRp\cdot 3$)。RNase Lは先程も述べたように基質の立体化学を認識する。2-5Aチオリン酸アナログについてヌクレオチド間結合へのRp-チオリン酸基の導入は、RNase Lとオリゴマーの活性複合体の形成を促進するが、一方でSp-配置の導入は活性化能力を逆に抑制し、アンタゴニスト活性を発現することが報告されている^{52,63})。本結果においてRpRp-3merの阻害活性を1とすると、RpSp-3merは0.018であり、またSpRp-3merは0.0075となる。従って、本研究でもオリゴマー中のSp-チオリン酸基の存在はRNase Lに対する活性化能力を減少させたことから、以前の報告を裏付けることになった。

(6) 2-5Aの5'-ピロリン酸体は5'-モノリン酸体よりもRNase Lを強力に活性化する³¹)。そこでRpRp-3merを更によりリン酸化してピロリン酸体としたRpRp-p(pSA)₃ [$p_2A_3\alpha S$]を合成し、RNase Lに対する活性化能力を検討した。しかしながら結果は、予想に反して元のRpRp-3merよりも低いIC₅₀値を示すに過ぎなかった。

Suhadolnikらは、天然型2-5A・3量体の5'-末端修飾アナログである5'-β-チオ三リン酸($p_3A_3\beta S$)のRp-及びSp-ジアステレオマー体を合成後そのRNase L活性化能力を検討している⁶²)。その結果はRp-p₃A₃βSとSp-p₃A₃βSとの間で活性化能力に約1000倍の差があることを示し(Sp>Rp)、5'-末端三リン酸残基を修飾することで生じるβ-位チオリン酸基の不斉点が、RNase Lの活性化能力に強く影響することを見出した。

本研究で合成したRpRp-p(pSA)₃は5'-モノチオリン酸体へのリン酸基の付加によってα-位チオリン酸基のりん原子に新たに不斉を発現するため、5'-α-Rp-または5'-α-Sp-配置を含むジアステレオマー混合体として得られるはずである。しかしながら得られたピロリン酸体の収量が僅かであり、詳細に構造解析を行うことはできなかった。おそらく、蛋白質合成阻害アッセイにおいて確認された本ピロリン酸体アナログの活性低下は、5'-β-チオ三リン酸について報告された現象と同様に、アナログの5'-α-Rp-体または5'-α-Sp-体のどちらか一方がRNase L活性化を抑制する方向に作用したことが原因であると思われる。

(7) 2',5'-オリゴチオアデニル酸 4 量体は $IC_{50} = 2 \times 10^{-7} M$ で $[^{35}S]$ メチオニンの取り込みを阻害したが、天然型 p_3A_3 と比較すると活性化能力は 1/100 に留まった。ところでオリゴチオアデニル酸 4 量体の 5'-末端モノリン酸体について、他の *in vitro* アッセイ法から p_3A_3 とほぼ同レベルで RNase L を活性化して RNA を切断することが報告されている⁶⁴⁾。本法で用いたリン酸カルシウム共沈法は簡便に行える一方、生細胞中への 2-5A コア及び 2-5A-5'-モノリン酸体の導入は困難であることが報告されている⁹⁴⁾。従って 4 量体アナログで示された IC_{50} 値の低さは、アナログ自体の活性化能力の低下よりもむしろ細胞中へ導入されにくいことが原因となっているのかも知れない。しかしながら、本アッセイを用いて実際に阻害活性が確認できた結果は、チオリン酸基による天然型 2-5A の修飾が 2-5A の機能を更に高めるのに有効であることを示唆している。

第9章 総括

核酸関連生理活性物質の合成に関して、金属イオンを触媒とする水溶液系での簡便な合成を目指して検討を重ねてきた(Fig.99)。

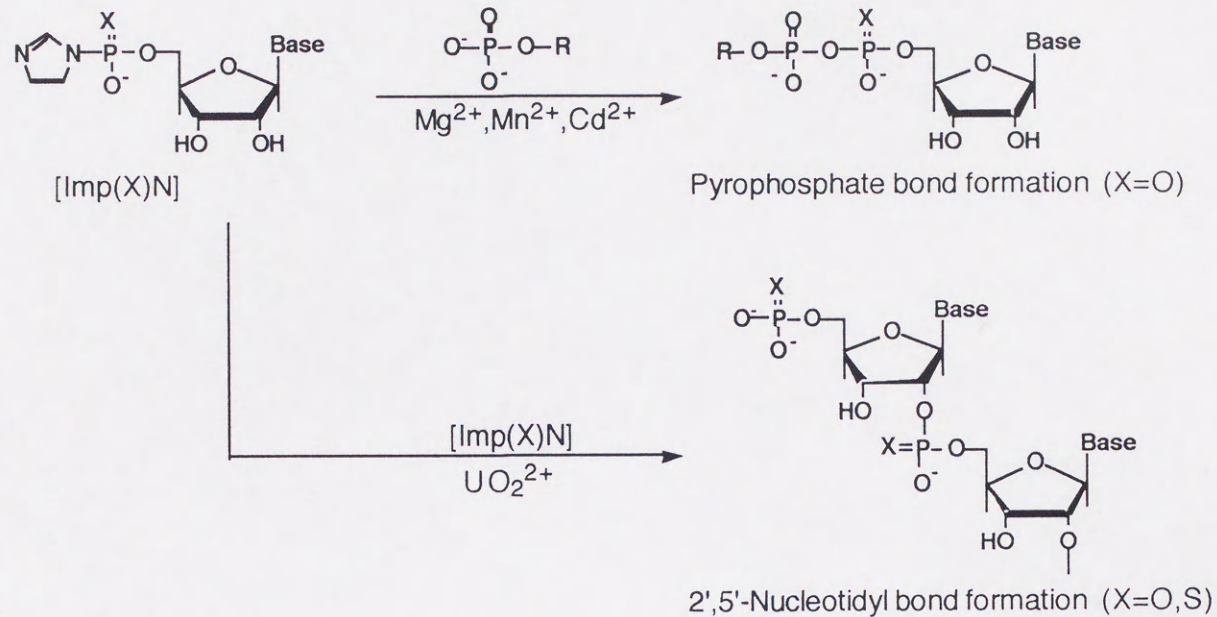


Fig.99 金属イオンを触媒とする核酸関連生理活性物質の合成

このうち、ピロリン酸結合含有化合物の合成については Mg^{2+} 、 Mn^{2+} または Cd^{2+} イオンを触媒に用いることより、ImpNとりん酸基供与体(pX)から保護基をまったく使用せずにこれらを簡便に生成することが可能となった。目的物の収率は反応基質の種類に依存して様々な値を与えたが、一般にヌクレオチド系、特にプリンヌクレオチド系基質間において高く、この場合従来の無水溶媒系での有機合成法に匹敵する良好な結果を示した。本反応系の反応機構は、金属イオンが基質に対する鋳型として機能することをポイントとする。 Mg^{2+} 及び Mn^{2+} イオンと Cd^{2+} イオンでは基質への配位様式が異なり、特に Cd^{2+} イオンの触媒機構についてはまだはっきりしない点が多い。しかしながら、生体内においてピロリン酸結合形成反応を触媒するヌクレオチド基及びりん酸基転移酵素の補因子となる Mg^{2+} 、 Mn^{2+} イオンが、本研究のような最も単純なモデル系においても高活性を示したことは非常に興味

深く、両者の反応系に多くの共通点が存在することを示唆している。反応機構の詳細な解明は、金属活性化酵素における金属イオンの役割を理解するのに有用となるであろう。

更に、金属イオン-核酸錯体の形成による反応制御の検討から、当研究室で見いだされた金属イオン触媒によるオリゴヌクレオチド合成反応を応用して、2',5'-ヌクレオチド間結合を有するオリゴチオイノシル酸及びオリゴチオアデニル酸を合成することに成功した。オリゴチオイノシル酸に関しては出発モノマーであるImp(S)Iの合成に問題があり、それから結果的に得られるオリゴマーの収量が低下することから、その物性については詳細に検討することができなかった。しかしながら、一方のオリゴチオアデニル酸の合成に関する検討結果からは、いくつかの重要な知見が得られた。すなわち、これら縮重合反応の触媒としてウラニルイオンが唯一有効な金属イオンであること、反応は基質のチオリン酸基の反転を伴う $SN_2(P)$ 機構を経由して進行すること、更にウラニルイオンが酵素反応以外にはあまり例が見られないような、高度な結合部位かつ立体選択性を伴って縮重合反応を制御していることが明らかとなった。縮重合反応から立体選択的に生成するオリゴマーは、残念ながら抗HIV活性を示さなかったものの(データ未載)、RNase Lに対する結合及びその活性化について高い生物活性能力を発揮した。本反応系を用いた2',5'-オリゴチオイノシル酸及びオリゴチオアデニル酸合成法は、従来の有機合成法と比較して非常に簡便であり、かつ生成するオリゴマーは生化学的に魅力である。本反応系の応用から、新たな興味深い特性を有する2',5'-オリゴヌクレオチドの合成が期待される。

第10章 実験の部

アデノシン、グアノシン、イノシン、シチジン、及びウリジン-5'-モノリン酸(pA, pG, pI, pC, pU)は生化学工業から得た。ADP, ATP, GDP及びGTPはBoeringer Mannheim GmbHから得た。

ヘビ毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)はWorthington Biochemical Corp.から得た。子ウシ腸由来アルカリホスファターゼ(AP)はWorthington Biochemical Corp.から得た。RNase T2はsigmaから得た。

^{125}I 2-5Aプローブは栄研化学から得た。

溶媒は常法に基づき蒸留したものを使用した。

薄層クロマトグラフィーはMerck 60F254及びPOLYGRAMCEL300を用いて行った。陽イオン交換樹脂はDowex50W-X8を用いた。陰イオン交換カラムクロマトグラフィーはBIO-RADエコノシステムを用い、樹脂にDEAE-Sephadex A-25またはQAE-Sephadex A-25を用いた。中圧カラムクロマトグラフィーは[送液ポンプ:FMI RPG-150、UV検出器:日立124、フラクションコレクター:Advantec SF-2120、レコーダー:日立056]をシステムとして、カラムにウルトラパックODS-40を用いて行った。

HPLCは日立638及び日本分光PU880/UV870を使用した。

UV測定は日立3200及び島津UV-1200を使用した。

CDは日本分光J-720/PTC-343を用いて測定した。

^1H NMRはVarian Gemini200, Bruker AMX-500及びJEOL A500 FT NMRを用いて測定した。

^{31}P NMRは日立 R-90H, Bruker AMX-500及びJEOL A500 FT NMRを用いて測定した。

なお、 ^1H NMR及び ^{31}P NMRの一部(Bruker AMX-500を使用)は東京大学工学部工業化学科にて行った。

蛋白質合成阻害アッセイは岩手大学農学部応用生物学科にて行った。

10A 二価金属イオン触媒によるピロリン酸結合形成反応

10A-1 ヌクレオシド-5'-ホスホイミダゾリド(ImpN)の合成

10A-1-1 アデノシン-5'-ホスホイミダゾリド(ImpA)の合成

5'-pA(free acid) 900mg(2.6mmol)を減圧下120°Cで乾燥した後、イミダゾール1360mg(20mmol)を加え、更に減圧乾燥した。窒素雰囲気中でdry-DMF 20ml, dry-トリエチルアミン2ml及びトリ-n-オクチルアミン1mlからなる混合溶媒に溶解後、トリフェニルホスフィン(PPh₃) 1592mg(6.1mmol)及び2',2"-ジピリジルジスルフィド(PySSPy) 1325mg(6.0mmol)を加え室温で2時間攪拌した。反応はセルロースTLC [POLYGAM CEL300, solvent; iPrOH/NH₄OH/H₂O(70:20:10v/v/v)]によって追跡した。反応終了後、dry-アセトン200ml、dry-エーテル100ml、dry-トリエチルアミン10ml及び飽和NaClO₄-アセトン溶液 1mlを含む混合溶媒に反応溶液を注ぎ、ImpAを白色沈澱物とした。生成した沈澱物を窒素ガス気流下G4ガラスフィルターで濾過し、残渣をdry-アセトン次いでdry-エーテルで洗浄後、P₂O₅を乾燥剤として減圧乾燥した。ImpAを白色結晶のImpA·Na 872mg(yield 80%)として得た。

10A-1-2 ImpAを除くヌクレオシド-5'-ホスホイミダゾリドの合成(ImpG, ImpI, ImpC及びImpU)

ImpAの合成法に準じて ImpG, ImpI, ImpC及びImpUを合成した(yield 80-90%)。

10A-1-3 7-メチルグアノシン-5'-ホスホイミダゾリド(Impm⁷G)の合成

(1) 7-メチルグアノシン-5'-モノリン酸(pm⁷G)の合成

5'-pG(free acid) 5012mg(13.8mmol)を減圧下100°Cで乾燥した後窒素雰囲気とし、dry-DMF 150ml, 及びトリ-n-オクチルアミン1mlを加え溶解した。ヨウ化メチル(140mmol)を加え30°Cで30時間攪拌した。反応はHPLCによって追跡した。原料消失を確認後、dry-アセトン500ml、dry-エーテル200ml、及び飽和NaClO₄-アセトン溶液30mlを含む混合溶媒に反応溶液を注ぎ5分間攪拌した後、溶液をG4ガラスフィルターで濾過した。残渣をdry-アセトンで洗浄し、粗製のpm⁷G 3870mg(yield 66%)を得た。この残渣をQAE-Sephadexイオン交換カラムクロマトグラフィー(2.5φ×40cm)によって精製し、最終的にpm⁷G·triethylammonium (yield 36%)を得た。

(2) Impm⁷Gの合成

ImpAの合成法に準じ、pm⁷GとイミダゾールからPPh₃及びPySSPyを縮合剤に用いて合成した。

10A-2 ピロリン酸結合を有する核酸関連生理活性物質の合成

反応条件を設定後ImpN及びp_nXを含む緩衝溶液に金属イオンを加えて反応を開始した。所定時間経過後、使用した金属イオンに対して3倍当量のversenol溶液を加え、金属イオン-ヌクレオチド錯体を金属イオン-versenol錯体とすることで反応を停止した。反応生成物の分析は主としてHPLCを用いて行った。

10A-2-1 AppA合成反応における反応条件の検討

HPLCは次のシステムを用い、また以下に示した条件でAppA合成の検討を行った。

column: RPC-5(4φ×250mm, 粒径3~8μm, Adgen464 3.8ml/100g)

flow rate: 1 ml/min

detection: 260nm

eluent: NaClO₄ 0→10mM(30min) in 2mM Tris-acetate(pH7.5) / 0.1mM EDTA

(1) 金属イオンの検討

13種類の二価金属イオンを検討した。

Table 62 AppA合成スケール(1)

No.	[M ²⁺]	ImpA (mM/μl)	pA (mM/μl)	M ²⁺ (mM/μl)	buffer (μl)	H ₂ O (μl)	total (μl)
1~12	a	56/36	260/23	250/8	20	13	100
13~18	b	200/10	100/20	250/8	20	42	100

a: MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, FeCl₂, CoCl₂, NiCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, CdCl₂, BaCl₂, HgCl₂, none

b: MgCl₂, MnCl₂, CdCl₂, Pb(NO₃)₂, UO₂(NO₃)₂, none

No.1~12; [ImpA]:[pA]:[M²⁺]=1:3:1, No.13~18; [ImpA]:[pA]:[M²⁺]=1:1:1

buffer: 1M N-ethylmorpholine-HCl(or HNO₃), pH7.0; at r.t. for 8d.

(2) 反応時間の検討

反応の進行を室温にて追跡した。

Table 63 AppA合成スケール(2)

No.	ImpA (mM/ μ l)	pA (mM/ μ l)	M ²⁺ (mM/ μ l)	buffer (μ l)	H ₂ O (μ l)	total (μ l)	*Reaction time(d)
1~4	200/10	100/20	250/8	20	42	100	1, 2, 4, 8

[M²⁺]: MgCl₂, MnCl₂, CdCl₂, [ImpA]:[pA]:[M²⁺]=1:1:1
buffer: 1M N-ethylmorpholine-HCl, pH7.0; at r.t.

(3) 反応温度の検討

4°C及び50°Cにて反応を行った。

Table 64 AppA合成スケール(3)

No.	ImpA (mM/ μ l)	pA (mM/ μ l)	M ²⁺ (mM/ μ l)	buffer (μ l)	H ₂ O (μ l)	total (μ l)	*Reaction conditoins
1~14	200/10	100/20	250/8	20	42	100	a, b

[M²⁺]: MnCl₂, none, [ImpA]:[pA]:[M²⁺]=1:1:1, buffer: 1M N-ethylmorpholine-HCl, pH7.0
a: at 4°C for 4d and 10d, b: at 50°C for 2hr, 4hr, 8hr, 1d and 2d.

(4) 金属イオン当量比の検討

ImpA及びpAの濃度を20mMに固定し、金属イオン濃度を変化させた。

Table 65 AppA合成スケール(4)

No.	ImpA (mM/ μ l)	pA (mM/ μ l)	Mn ²⁺ (mM/ μ l)	1M buffer (μ l)	H ₂ O (μ l)	total (μ l)
1~10	110/18	87/23	(0.1~250)/(0~40)	20	0~32	100

[ImpA]/[Mn²⁺]=1, 4, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000 and none.
buffer: N-ethylmorpholine-HCl, pH7.0, at r.t. for 4d.

(5) 反応pHの検討

2種類の緩衝溶液を用いpH5.5~8.0で反応を行った。

Table 66 AppA合成スケール(5)

No.	ImpA (mM/ μ l)	pA (mM/ μ l)	M ²⁺ (mM/ μ l)	buffer (μ l)	H ₂ O (μ l)	total (μ l)	buffer system
1~16	100/20	100/20	250/8	20	32	100	2,6-lutidine-HCl pH=5.5, 6.0, 6.5, 7.0
17~32	100/20	100/20	250/8	20	32	100	N-ethylmorpholine pH=6.5, 7.0, 7.5, 8.0

[M²⁺]: MgCl₂, MnCl₂, CdCl₂, [ImpA]:[pA]:[M²⁺]=1:1:1, at r.t. for 4d.

10A-2-2 核酸塩基の検討(NppNの合成)

ヌクレオチドの核酸塩基の相違が反応に及ぼす影響を各種二価金属イオンを用いて検討した。

Table 67 NppN合成スケール

No.	base	ion	ImpN (mM/ μ l)	pN (mM/ μ l)	M ²⁺ (mM/ μ l)	buffer (μ l)	H ₂ O (μ l)	total (μ l)
1~12	C	a	100/20	200/30	250/8	20	22	100
13~17	U	b	100/20	200/30	250/8	20	22	100
18~21	G	c	100/20	100/20	250/8	20	32	100
22~25	m ⁷ G	c	100/20	100/20	250/8	20	32	100
26~29	I	c	100/20	100/20	250/8	20	32	100
30~33	C	c	100/20	100/20	250/8	20	32	100
34~37	U	c	100/20	100/20	250/8	20	32	100

[M²⁺] a: MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, FeCl₂, CoCl₂, NiCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, CdCl₂, BaCl₂, HgCl₂

b: MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, CdCl₂

c: MgCl₂, MnCl₂, CdCl₂

No.1~17; [ImpN]:[pN]:[M²⁺]=1:3:1, No.18~37; [ImpN]:[pN]:[M²⁺]=1:1:1

buffer: 1M N-ethylmorpholine-HCl(pH7.0), at r.t. for 4d.

10A-2-3 りん酸基供与体の検討 (N_{p_n}Xの合成)

反応条件を次のように設定して行った。

•[M²⁺]: MgCl₂, MnCl₂, CdCl₂, buffer: 1M N-ethylmorpholine-HCl(pH7.0)

at r.t. for 4d or 8d.

(1) N_{p_n}Nの合成

Table 68 N_{p_n}N合成スケール

No.	Base	p _n X	product	ImpN (mM/μl)	p _n X (mM/μl)	M ²⁺ (mM/μl)	buffer (μl)	H ₂ O (μl)	total (μl)
1~4	A	ppA	Ap ₃ A	200/10	100/20	250/8	20	42	100
5~8	A	ppA	Ap ₃ A	200/30	100/20	250/8	20	22	100
9~12	A	pppA	Ap ₄ A	200/10	100/20	250/8	20	42	100
13~16	A	pppA	Ap ₄ A	200/30	100/20	250/8	20	22	100
17~20	G	ppG	Gp ₃ G	200/10	100/20	250/8	20	42	100
21~24	G	ppG	Gp ₃ G	200/30	100/20	250/8	20	22	100
25~28	G	pppG	Gp ₄ G	200/10	100/20	250/8	20	42	100
29~32	G	pppG	Gp ₄ G	200/30	100/20	250/8	20	22	100

No. 1~4, 9~12, 17~20, 25~28; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=1:1:1

No. 5~8, 13~16, 21~24, 29~32; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=3:1:1

(2) NADの合成

Table 69 NAD合成スケール

No.	Base	p _n X	product	ImpN (mM/μl)	p _n X (mM/μl)	M ²⁺ (mM/μl)	buffer (μl)	H ₂ O (μl)	total (μl)
1~4	A	NMN	NAD	200/10	100/20	250/8	20	42	100
5~8	A	NMN	NAD	200/30	100/20	250/24	20	6	100

No. 1~4; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=1:1:1

No. 5~8; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=3:1:3

(3) ADP/ATPの合成

Table 70 ADP/ATP合成スケール

No.	Base	p _n X	product	ImpA (mM/μl)	p _n X (mM/μl)	M ²⁺ (mM/μl)	buffer (μl)	H ₂ O (μl)	total (μl)
1~4	A	pi	ADP	100/20	100/20	250/8	20	32	100
5~8	A	pi	ADP	100/20	1000/20	250/8	20	32	100
9~12	A	pi	ADP	200/10	1000/20	1000/20	20	20	100
13~16	A	ppi	ATP	100/20	100/20	250/8	20	32	100
17~20	A	ppi	ATP	100/20	1000/20	250/8	20	32	100
21~24	A	ppi	ATP	200/10	1000/20	1000/20	20	20	100

No.1~4, 13~16; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=1:1:1No.5~8, 17~20; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=1:10:1No.9~12, 21~24; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=1:10:10

(4) NppCholiの合成

Table 71 NppCholi合成スケール

No.	Base	p _n X	product	ImpA (mM/μl)	p _n X (mM/μl)	M ²⁺ (mM/μl)	buffer (μl)	H ₂ O (μl)	total (μl)
1~4	A	choli	AppCholi	200/10	100/20	250/8	20	42	100
5~8	A	choli	AppCholi	200/30	100/20	250/8	20	22	100
9~12	C	choli	CppCholi	200/10	100/20	250/8	20	42	100
13~16	C	choli	CppCholi	200/30	100/20	250/8	20	22	100

No.1~4, 9~12; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=1:1:1No.5~8, 13~16; [ImpN]:[p_nX]:[M²⁺]=3:1:1

*"Choli"=phosphocholine

10A-3 A_{p_n}Aの単離精製

A_{p_n}Aの合成を大量スケールで行った(Table 72)。反応終了後、Cd²⁺イオンをchelex100キレート樹脂(16φ×150mm)によって除去した。続いてQAE-SephadexA-25カラムクロマトグラフィー(2.5φcm×40cm)を用いA_{p_n}Aの単離精製を行った。カラム溶出はTEAB緩

衝溶液0.1M(1.01)–0.6M(1.01)のリニアグラジエントによって行った。生成物に対応するUV吸収フラクションを収集後、凍結乾燥して目的物を得た (Ap₃A: fraction No.149~159, yield 189mg (27%); Ap₄A: fraction No.93~103, yield 161mg (23%))。

Table 72 Ap_nA 合成スケール

No.	p _n X	product	ImpA (M/ml)	p _n X (M/ml)	CdCl ₂ (M/ml)	buffer (ml)	H ₂ O (ml)	total (ml)
1	ppA	Ap ₃ A	0.1/6	0.1/6	0.25/2.4	2.4	7.2	24
2	pppA	Ap ₄ A	0.1/6	0.1/6	0.25/2.4	2.4	7.2	24

[ImpA]:[p_nX]:[CdCl₂]=1:1:1, at r.t. for 4d
buffer: 1M N-ethylmorpholine-HCl(pH7.0).

10A-4 Ap_nAの構造解析

10A-4-1 蛇毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)処理

単離精製を行ったAp_nA 0.9~1.7ODに対しSVPD 0.2unitsを含む反応溶液50μlを37°Cで2.5時間インキュベーションした。切断生成物の解析はHPLCを用いて行った。

Table 73 Ap_nAのSVPD処理スケール

compound (μl)	SVPD (μl)	buffer (μl)	MgCl ₂ (0.1M/μl)	total (μl)
Ap ₃ A 38	2	5	5	50
Ap ₄ A 38	2	5	5	50

Ap₃A: 0.9OD, Ap₄A: 1.7OD, SVPD (100units/ml)
buffer:0.1M Tris-Acetate(pH8.8)

10A-4-2 アルカリ加水分解(NaOH)処理

基質0.4~0.9ODを含む0.15M NaOH溶液50μlを室温で1日間反応させた。反応溶液のHPLC解析から分解生成物は確認されなかった。

10A-5 NMR 解析

10A-5-1 ジヌクレオシドポリリン酸($N_{p_n}N$)の 1H NMR解析

各種の $N_{p_n}N$ 単離生成物をDowex 50W-X8陽イオン交換樹脂(Na^+ form)によって処理しNa塩型とした。これらの試料10~100ODを D_2O 400 μ lに溶かしトリメチルシリルプロピオン酸-4ナトリウム(TSP- d_4)を内部標準としてvarian200MHz FT NMR で測定した。

10A-5-2 $A_{p_n}A$ の ^{31}P NMR 解析

以下のスケールで測定溶液を調製後、外部標準プローブとして85% H_3PO_4 (75 ϕ μ m \times 100mm)を加えて日立H-90 FT NMR(36.438MHz)で測定した。

Table 74 ^{31}P NMR 測定用溶液スケール

sample (μ l)	buffer (μ l)	D_2O (μ l)	H_2O (μ l)	total (μ l)
400	320	480	400	1600

sample: ~600OD, buffer: 1M Tris-Acetate(pH7.8)

10A-6 淡色効果(hypochromicity)の算出

$N_{p_n}N$ の淡色効果は各試料をSVPD(10a-4-1参照)によって分解後、0.1M TEAA(pH7.3)緩衝溶液中で吸光度を測定し、処理前($A_{reference}$)と処理後(A_{sample})の260nmにおける吸光度の比から算出した。

$$\text{hypochromicity}(\%) = [(A_{sample} - A_{reference}) / A_{sample}] \times 100 \quad (10.1)$$

$$\text{hyperchromicity} = A_{sample} / A_{reference} \quad (10.2)$$

10B 2',5'-オリゴヌクレオシドチオリン酸の合成及び物性

10B-1 ヌクレオシド-5'-チオホスホイミダゾリドの合成

10B-1-1 イノシン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)I]の合成

イノシン322mg(1.2mmol)を減圧下120°Cで乾燥した後窒素雰囲気とし、dry-りん酸トリエチル4mlを加えた。氷浴した溶液に $PSCl_3$ 150 μ l(1.5mmol)を滴下し氷浴状態で2時間、

続いて室温に戻しながら20時間攪拌した。イノシンが反応の進行に伴い溶解した後再び反応溶液を氷浴して、イミダゾール1008mg(14.8mmol)を溶解したりん酸トリエチル溶液5mlを滴下し20分間攪拌した。反応溶液を窒素ガス気流下でG4フィルターを用いて濾過し、残渣として生成したイミダゾール塩酸塩を除去した。少量のりん酸トリエチルによってG4フィルターを洗浄した後、この濾過液にH₂O 43.2μl(2.4mmol)を含むピリジン溶液15mlを加え室温で30分間攪拌した。攪拌後、dry-アセトン150ml、dry-エーテル75ml及び飽和NaClO₄-アセトン溶液1mlを含む混合溶媒に反応溶液を加えImp(S)Iを白色沈澱物とした。Imp(S)Iを含む溶液を遠心沈澱管に注ぎ遠心分離(3000rpm×3min)によって沈澱を収集後、dry-アセトン10ml×3、次いでdry-エーテル10ml×3で洗浄を繰り返した。最後に遠心分離(3000rpm×3min)によって沈澱を回収し、Imp(S)I·Naを白色粗結晶として得た(532mg, yield 101%)。

10B-1-2 Imp(S)Iの単離精製

粗結晶のImp(S)I 195mgを10mM TEAA(pH7.3)-20% MeOH水溶液に溶解し、逆相系中圧分取カラム(Ultracolumn ODS, 40μm, 30φ×250mm)を用いて精製した。カラムは4mM TEAA(pH7.3)緩衝溶液を含むメタノール水溶液のリニアグラジエント[MeOH; 20%(500ml) - 50%(500ml)]によって溶出した。Imp(S)Iに相当するUV(260nm)吸収フラクションを収集後、凍結乾燥処理を行いImp(S)I・トリエチルアンモニウム塩を得た(36.7mg, yield 14%)。

10B-1-3 アデノシン-5'-チオホスホイミダゾリド[Imp(S)A]の合成

Imp(S)Iの合成法に準じてImp(S)Aの合成を行った。しかしながら飽和NaClO₄溶液を加えて沈殿した結晶の単離は、遠心分離法を用いずに窒素気流下G4ガラスフィルター上に補集することで行った。ガラスフィルター上の結晶はdry-アセトン次いでdry-エーテルで洗浄後、P₂O₅を乾燥剤とするデシケーター中で減圧乾燥した(UV yield 29900 OD, 42%)。

10B-1-4 Imp(S)Aの単離精製

粗結晶のImp(S)A 29900 OD(1.9mmol)を0.3M TEAB(pH7.5)-25% MeOH溶液に溶解しDEAE-TOYOPEARL650Mカラム(30φ×450mm)を用いて精製した。カラムは25%メタノール

ルを含むTEABのリニアグラジエント[0.3M(1.6l)–1.0M(1.6l)]によって溶出した。Imp(S)Aに相当するUV(260nm)吸収フラクションを収集後凍結乾燥しImp(S)A・トリエチルアンモニウム塩を得た(15600 OD, yield 52%)。

10B-1-5 アデノシン-5'-チオホスホベンズイミダゾリド[Bzimp(S)A]及びアデノシン-5'-チオホスホベンズトリアゾリド[Bztriap(S)A]の合成及び単離精製

チオリン酸基の活性基として通常使用するイミダゾールの代わりにベンズイミダゾール(Bzim)を用いてBzimp(S)Aを、またはベンズトリアゾール(Bztria)を用いてBztriap(S)Aを合成した。これらの合成法はImp(S)Aの合成法に準じて行った(yield: Bzimp(S)A 260mg, 53%; Bztriap(S)A 194mg, 80%)。更にこれらの単離精製を10b-1-2に基づいて行った (UV yield: Bzimp(S)A 500 OD (53%) ; Bztriap(S)A 100 OD(trace))。

10B-1-6 Bzimp(S)Aジアステレオマー混合体の分離

Rp-及びSp-チオリン酸基を含むBzimp(S)Aジアステレオマー混合体の分離は、混合体に対してODS-シリカゲルカラム(Wakosil 5C18, 10φ×250mm)を用いたHPLC分取によって行った。分離したジアステレオマー体の光学純度、HPLC R_T及び³¹P NMRケミカルシフトを示す(Table 75)。

Table75 HPLC retention time and ³¹P NMR chemical shift of Bzimp(S)A

BzimpSA configuration[d.e.(%)]	HPLC R _T (min)	³¹ P NMR (ppm)
Rp [92.0]	44.1	61.43
Sp [79.5]	44.8	60.33

HPLC system: column Wakosil5C18(5 μm, 4 φ ×250mm)
eluent MeOH2.4→51.2%(60min) in 10mM TEAA(pH7.3),
linear gradient.

³¹P NMR were masured at 36.44MHz in 100mM TEAA(pH7.3) containing 50%D₂O.

10B-2 Imp(S)Nの加水分解半減期及びラセミ化速度の算出

10B-2-1 Imp(S)N加水分解半減期の算出(Table 76)

Imp(S)N及び ImpN(N=I,A)の加水分解を0.2M N-ethylmorpholine(pH7.0)緩衝溶液中、0°C及び20°Cまたは25°Cにて行った。加水分解速度定数及び半減期の算出は所定時間毎に反応溶液のHPLC分析を行い、残存しているイミダゾリド体の比率を求めることから行った。

Table 76 Remaining proportion of imdazolid by HPLC analysis

time(hr)	Imp(S)I(20°C)		ImpI(20°C)		Imp(S)A(0°C)		Imp(S)A(25°C)		ImpA(25°C)	
	(%)	log	(%)	log	(%)	log	(%)	log	(%)	log
0	80.2	1.904	97.1	1.987	98.0	1.991	100.0	2.000	80.7	1.907
1	79.4	1.900	90.7	1.958	98.0	1.991	99.0	1.996	79.2	1.899
2					97.9	1.991				
3			87.1	1.940						
4	78.5	1.895					97.0	1.987	72.5	1.860
6	78.2	1.893	79.5	1.900						
8					97.2	1.987			66.0	1.820
12	76.1	1.881	68.1	1.833			94.4	1.975	60.4	1.781
20					96.6	1.985				
24	74.2	1.876	57.6	1.760	95.9	1.982			48.0	1.681
36	72.6	1.861	50.4	1.702						
48	71.1	1.852	41.0	1.613	94.1	1.974				
50							83.5	1.922		
54									30.3	1.481
60	68.6	1.836								
72	67.7	1.831	31.2	1.494	92.6	1.967	78.3	1.894		
96	65.3	1.815	24.9	1.396						
120	60.7	1.783	17.8	1.250						

10B-2-2 Imp(S)Aジアステレオマーのラセミ化速度の算出

R_p-及びS_p-Imp(S)Aジアステレオマーのラセミ化反応を検討した。(R_p+S_p)-Imp(S)Aジアステレオマー混合体をHPLC分取によってR_p-及びS_p-ジアステレオマーそれぞれに分離した。分取溶液を凍結乾燥後、0.2M N-ethylmorpholine(pH7.0)緩衝溶液に溶かし0°C、及び25°Cにて放置した。所定時間経過後、溶液をHPLCにより分析しR_p-及びS_p-Imp(S)Aの比率

を追跡することによってラセミ化速度の算出を行った(Table 77)。

Table 77 Remaining proportion of Imp(S)A diastereomer by HPLC analysis

time(hr)	Rp-Imp(S)A				Sp-Imp(S)A			
	0°C		25°C		0°C		25°C	
	(%)	log	(%)	log	(%)	log	(%)	log
0	68.2	1.834	69.8	1.844	88.9	1.949	75.9	1.880
1	68.1	1.833	69.1	1.840	86.8	1.939	75.4	1.877
2	68.0	1.833	68.5	1.836	86.6	1.938		
4					85.8	1.933	72.6	1.861
8	67.0	1.826					71.6	1.855
12							68.8	1.838
17			57.7	1.761				
20	65.7	1.818						
21					78.4	1.894		
24	65.0	1.813					63.2	1.801
29					73.6	1.867		
33			52.3	1.719				
48	62.4	1.795	45.8	1.661				
49					69.2	1.840		
50							54.9	1.740
72	59.8	1.777	40.3	1.605			49.2	1.692
74					62.4	1.795		
99			36.9	1.567				

10B-3 オリゴチオイノシル酸の合成

10B-3-1 反応条件の検討

金属イオン種、モノマー及び金属イオンの当量比、反応時間及び反応pHを設定後、Imp(S)Iと緩衝溶液を含む水溶液に金属イオンを加えて反応を開始した。所定時間経過後EDTA溶液を加えて反応を停止し、HPLCを用いて分析を行った。

・ HPLC conditions

system(1) column: RPC-5 (2~8 μ m, 6 ml/100g, 4 ϕ × 250mm)

eluent: NaClO₄ 0 → 30mM (30min) in 2mM Tris-acetate(pH7.5)/0.1mM EDTA, linear gradient.

system(2) column: Wakosil 5C18 (5 μ m, 4 ϕ \times 250mm)

eluent: MeOH 2.4 \rightarrow 51.2%(60min) in 10mM TEAA(pH7.3), linear gradient.

Table 78 オリゴチオイノシル酸の合成(1)

No.	Metal ion	[ImpSI] [M ²⁺]	ImpSI (mM/ μ l)	M ²⁺ (mM/ μ l)	buffer (1M/ μ l)	H ₂ O (μ l)
1~8	*	1	100/10	250/4	10	26
9	Pb ²⁺	10	100/10	25/4	10	26
10	UO ₂ ²⁺	10	100/10	25/4	10	26
11	UO ₂ ²⁺	50	100/10	2.5/8	10	22
12	UO ₂ ²⁺	100	100/10	2.5/4	10	26
13	UO ₂ ²⁺	500	100/10	0.25/8	10	22
14	UO ₂ ²⁺	1000	100/10	0.25/4	10	26
15	UO ₂ ²⁺	5000	100/10	0.025/8	10	22
16	none		100/10	0	10	30

Metal*: MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CdCl₂, Pb(NO₃)₂, UO₂(NO₃)₂

Table 79 オリゴチオイノシル酸の合成(2)

No.	[ImpSI] [UO ₂ ²⁺]	ImpSI (mM/ μ l)	UO ₂ (NO ₃) ₂ (mM/ μ l)	buffer (1M/ μ l)	H ₂ O (μ l)
1~6	1	100/10	250/4	10	26
7~12	10	100/10	25/4	10	26
13~18	25	100/10	2.5/16	10	14
19~24	50	100/10	2.5/8	10	22
25~30	none	100/10	0	10	30

in N-ethylmorpholine-HNO₃(or HCl) (pH7.0) at r.t. for 5d.

10B-3-2 2',5'-オリゴイノシル酸の合成

対照実験として2',5'-オリゴイノシル酸の合成を行った。反応条件は10b-3-1と同様に設定して行った。

Table 80 2',5'-オリゴイノシル酸の合成

No.	$\frac{[\text{Impl}]}{[\text{UO}_2^{2+}]}$	Impl (mM/ μl)	$\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ (mM/ μl)	buffer* (1M/ μl)	H_2O (μl)
1	1	100/10	250/4	10	26
2	10	100/10	25/4	10	26
3	50	100/10	2.5/16	10	14
4	100	100/10	2.5/8	10	22
5	500	100/10	0.25/16	10	14
6	1000	100/10	0.25/8	10	22
7	5000	100/10	0.025/16	10	14
8	none	100/10	0	10	30

in N-ethylmorpholine-HNO₃(pH7.0) at r.t. for 5d.

10B-3-3 構造決定用オリゴチオイノシル酸の合成及び単離

オリゴマーの構造を決定するために、次のスケールでImp(S)Iの縮重合反応を行った。生成したオリゴマーの単離精製はHPLC分取によって行った。

・ HPLC conditions; 分取モード

flow rate: 3ml/min

column: Wakosil 5C18 (5 μm , 10 ϕ \times 250mm)

eluent: MeOH 2.4 \rightarrow 32%(45min) in 10mM TEAA(pH7.3), linear gradient.

Table 81 オリゴチオイノシル酸の合成(3)

No.	metal ion	$\frac{[\text{ImpSI}]}{[\text{M}^{2+}]}$	ImpSI (mM/ μl)	M^{2+} (mM/ μl)	buffer (μl)	H_2O (μl)
1	Cd ²⁺	1	80/250	250/80	100	70
2	UO ₂ ²⁺	25	80/250	25/32	200	18
3	UO ₂ ²⁺	25	230/200	25/74	200	26

buffer: No.1; 1M N-ethylmorpholine-HCl (pH7.0)

No.2; 0.5M imidazole-HNO₃ (pH7.0)

No.3; 0.5M N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0), at r.t for 7d.

10B-4 オリゴチオイノシル酸の ^1H NMR 解析

単離精製したオリゴマーは少量であったので(5~20OD)、陽イオン交換処理によってNa塩型とせずそのまま D_2O に溶かし、 $\text{Me}_3\text{SiCD}_2\text{COONa}$ を内部標準としてバリアン200MHz ^1H NMR を用いて測定した。

10B-5 オリゴチオイノシル酸の淡色効果

約1 ODの試料を0.5M NaOH溶液中でアルカリ加水分解後、1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ buffer (pH6.7)を加えて処理前($A_{\text{reference}}$)と処理後(A_{sample})の260nmにおける吸光度の比から(10.1)、(10.2)式によって求めた。

10B-6 2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成

10B-6-1 反応条件の検討

縮重合反応の最適条件を決定するため、ウラニルイオンの当量比及び反応pHを設定後、反応を行った。操作及び分析方法は10b-3-1と同様に行った。

Table 82 2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成(1)

No.	$\frac{[\text{ImpSA}]}{[\text{UO}_2^{2+}]}$	ImpSA (mM/ μl)	$\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ (mM/ μl)	buffer (0.5M/ μl)	H_2O (μl)
1	1	250/20	250/2	20	8
2	10	250/20	25/10	20	0
3	25	250/20	25/4	20	6
3*	25	125/80	25/16	80	32
4	50	250/20	25/2	20	8
5	100	250/20	2.5/10	20	0
6	none	250/20	0	20	10

buffers; (a) Imidazole- HNO_3 (pH6.2 and 7.0)

(b) N-ethylmorpholine- HNO_3 (pH7.0, 7.4 and 7.8)

[ImpSA]=50mM, at 30°C for 5d.

3*: buffer; N-ethylmorpholine- HNO_3 (pH7.0)

at 30°C for 0, 0.5, 4, 8, 24, 72, and 120hr

・ HPLC conditions;

column: RPC-5(2~8 μ m, 6 ml/100g, 4 ϕ \times 250mm)

eluent: NaClO₄ 0 \rightarrow 70mM (60min) in 2mM Tris-acetate(pH7.5)/0.1mM EDTA,
linear gradient.

10B-6-2 Xp(S)Aの縮重合反応

反応機構を検討するため、各種Xp(S)Aを用いた縮重合反応を行った。

Table 83 Xp(S)Aの縮重合反応

XpSA		XpSA	UO ₂ (NO ₃) ₂	buffer	H ₂ O
X	configuratuin[d.e.(%)]	(mM/ μ l)	(mM/ μ l)	(0.5M/ μ l)	(μ l)
Im	Rp+Sp [0]	200/50	25/16	80	54
Bzim	Rp+Sp [0]	125/45	25/9	45	13
Bztria	Rp+Sp [0]	200/50	25/16	80	54
Bzim	Rp [92.0]	125/20	25/4	20	50
Bzim	Sp [79.5]	125/20	25/4	20	50

[XpSA]=50mM, [XpSA] / [UO₂(NO₃)₂]=25

buffer; N-ethylmorpholine-HNO₃ (pH7.0), at 30°C for 0, 1, 2, 3, 4, 7, 9, 12d.

10B-6-3 2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成 (構造及び物性解析用)

オリゴマーの構造及び物性を解析するために、次のようなスケールでImp(S)Aの縮重合反応を行った。

Table 84 2',5'-オリゴチオアデニル酸の合成(2)

0.2M ImpSA	0.025M UO ₂ (NO ₃) ₂	1M buffer	H ₂ O	total
3200 μ l (9750OD)	1024 μ l	2560 μ l	6016 μ l	12.8ml
[50mM]	[2mM]	[200mM]		

buffer; N-ethylmorpholine-HNO₃(pH7.0), at r.t for 10d.

10B-7 2',5'-オリゴチオアデニル酸の単離精製

10B-7-1 イオン交換カラムクロマトグラフィー

まず、反応溶液をChelex100キレート樹脂カラム(16 ϕ \times 150mm, Na⁺ form) に通過させてウラニルイオンを除去した。続いてオリゴマー混合物 (8570OD) はDEAE-Sephadex陰イ

オン交換カラムクロマトグラフィーによって分画した。クロマトグラフィー条件及び分画結果を示す(Table 85)。

・ chromatography conditions

column: DEAE-Sephadex A25(30 ϕ \times 500mm)

flow rate: 1.35 ml/min

detection: 254nm, 0.5 ~ 2.0AUFS

solvent: (A) 0.4M TEAB(pH7.5) in 25% MeOH (2l),

(B and C) 1.2M TEAB(pH7.5) in 25% MeOH(2l)

eluent (1); (A) \rightarrow (B) linear gradient, (2); (B) \rightarrow (C) isocratic.

Table 85 2',5'-オリゴチオアデニル酸の単離精製

fraction No.	oligomer	yield (% , ditecton at 260nm)	
		by HPLC	by UV (isolated)
102-123	p(S)A	9.2	7.0 (601 OD)
165-193	Rp-2	31.1	15.5 (1330 OD)
198-220	Sp-2	8.2	4.6 (390 OD)
235-276	RpRp-3	13.1	15.2 (1300 OD)
281-305	3mer mixtures	—	4.9 (420 OD)
310-340	RpRpRp-4mer	3.2	4.9 (421 OD)
341-400	4mer mixtures	—	7.2 (620 OD)

10B-7-2 HPLC分取

10B-7-1によっても単離しきれなかったオリゴマー(RpSp-3mer, SpRp-3mer)は更にHPLC分取を用いて精製した。

・ HPLC conditions;

flow rate: 3 ml/min

ditection: 260nm

column: Wakosil 5C18 (5 μ m , 10 ϕ \times 250mm)

eluent: MeOH 2.4 \rightarrow 32%(45min) in 10mM TEAA(pH7.3), linear gradient.

10B-8 2',5'-オリゴチオアデニル酸のCD測定

10B-8-1 淡色効果の測定

2',5'-オリゴチオアデニル酸の淡色効果の算出は、10b-5で行ったオリゴチオイノシル酸の場合と同様な操作で行った。調製した溶液を37°Cで48時間インキュベーションした後、1.0Mりん酸buffer(pH6.7)500 μ l及びH₂O400 μ lを加えて吸光度の測定(1mm cell, 260nm)を行った。

Table 86 2',5'-オリゴチオアデニル酸のアルカリ加水分解

	oligomer	1M NaOH	H ₂ O	total
sample	36 μ l(1.00 D)	50 μ l	14 μ l	100 μ l
reference	36 μ l(1.00 D)	—	64 μ l	100 μ l

10B-8-2 CD測定

10B-8-2-1 CD測定

各オリゴマーは10b-8-1から求めた淡色効果によって補正を行い、吸光度がモノヌクレオチド残基当たり2.10D/800 μ lになるように調製した。各測定は光路長2mmのセルを用い10mMりん酸buffer(pH6.7)中で3回行い平均化した。測定温度は温度可変装置PTC-343を用い、25°Cまたは温度可変(5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75°C)とした(Table 87~92)。

Table 87 Rp-2量体のCD測定

temp.(°C)	[θ]: 分子楕円率($\times 10^{-4}$)		等吸収点(nm)
	λ max ([θ])nm		
5	269.5 (+2.05)	250.3 (-1.61)	
15	269.7 (+1.77)	250.8 (-1.58)	257.8 (-0.67)
25	269.9 (+1.57)	251.5 (-1.47)	240.4 (-0.49)
35	270.4 (+1.34)	250.9 (-1.40)	215.9 (-0.01)
45	270.5 (+1.14)	250.8 (-1.30)	
55	270.4 (+0.98)	250.8 (-1.18)	
65	270.9 (+0.79)	251.3 (-1.10)	
75	271.7 (+0.65)	251.8 (-0.98)	

Table 88 Sp-2 量体のCD測定

temp.(°C)	[θ]: 分子楕円率($\times 10^{-4}$)		等吸収点(nm)
	λ max([θ])nm		
5	268.7 (+1.04)	249.4 (-0.92)	
15	269.5 (+0.84)	251.2 (-0.94)	256.3 (-0.69)
25	270.2 (+0.68)	251.7 (-0.93)	
35	269.8 (+0.56)	251.6 (-0.88)	
45	270.4 (+0.46)	250.7 (-0.87)	
55	271.6 (+0.36)	251.0 (-0.83)	
65	272.9 (+0.30)	252.3 (-0.78)	
75	271.7 (+0.20)	252.8 (-0.73)	

Table 89 RpRp-3 量体のCD測定

temp.(°C)	[θ]: 分子楕円率($\times 10^{-4}$)		等吸収点(nm)
	λ max([θ])nm		
5	270.0 (+2.26)	250.4 (-2.11)	
15	270.9 (+2.11)	250.6 (-2.09)	257.3 (-0.97)
25	270.2 (+1.94)	250.8 (-2.02)	240.4 (-0.58)
35	270.8 (+1.76)	250.6 (-1.91)	216.3 (+0.22)
45	270.9 (+1.62)	250.4 (-1.79)	
55	271.3 (+1.39)	250.5 (-1.67)	
65	270.9 (+1.25)	251.0 (-1.55)	
75	272.0 (+1.09)	251.0 (-1.45)	

Table 90 RpSp-3 量体のCD測定

temp.(°C)	[θ]: 分子楕円率($\times 10^{-4}$)		等吸収点(nm)
	λ max([θ])nm		
5	270.3 (+2.27)	250.3 (-2.00)	
15	270.5 (+2.09)	250.7 (-1.93)	257.1 (-0.94)
25	270.4 (+1.91)	250.9 (-1.83)	239.0 (-0.40)
35	271.2 (+1.74)	250.4 (-1.76)	222.6 (+0.64)
45	271.2 (+1.55)	250.6 (-1.65)	
55	271.1 (+1.36)	250.2 (-1.53)	
65	271.5 (+1.17)	250.9 (-1.46)	
75	271.6 (+1.01)	251.2 (-1.39)	

Table 91 SpRp- 3 量体のCD測定

temp.(°C)	[θ]: 分子楕円率 ($\times 10^{-4}$)		等吸収点(nm)
	λ max([θ])nm		
5	269.7 (+1.60)	250.3 (-1.83)	
15	270.6 (+1.53)	250.4 (-1.78)	257.1 (-0.93)
25	270.0 (+1.44)	250.4 (-1.70)	240.3 (-0.51)
35	270.9 (+1.31)	250.5 (-1.64)	216.3 (+0.25)
45	271.2 (+1.21)	250.5 (-1.53)	
55	270.8 (+1.07)	250.9 (-1.45)	
65	271.3 (+0.97)	251.0 (-1.43)	
75	271.9 (+0.87)	251.4 (-1.30)	

Table 92 RpRpRp- 4 量体のCD測定

temp.(°C)	[θ]: 分子楕円率 ($\times 10^{-4}$)		等吸収点(nm)
	λ max([θ])nm		
5	269.8 (+2.45)	250.2 (-2.34)	
15	269.9 (+2.30)	250.1 (-2.30)	257.2 (-0.88)
25	270.1 (+2.18)	250.2 (-2.24)	239.3 (-0.37)
35	270.4 (+1.99)	250.3 (-2.09)	216.6 (+0.52)
45	270.9 (+1.82)	250.3 (-1.91)	
55	271.2 (+1.61)	250.2 (-1.70)	
65	271.6 (+1.41)	250.5 (-1.60)	
75	271.7 (+1.26)	250.9 (-1.45)	

10B-8-3 スタッキングエネルギーの算出

1) 5~75°Cの間で測定したCDの θ_t から $\theta_s(0^\circ\text{C})$ 及び $\theta_u(80^\circ\text{C})$ を外挿して求めた (Table 93)。

Table 93 molecular ellipticity of 2-5A analogue at 270nm

temp.(°C)	$\lambda \max([\theta])$								
	pA ₂	Rp-2	Sp-2	pA ₃	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	pA ₄	Rp-4
θ_s	20514	20802	10064	25689	23617	23633	16886	26165	25832
5	20258	20410	10027	25335	22615	22665	15944	25745	24485
15	17841	17692	8359	22908	21009	20866	15276	23453	23036
25	15726	15688	6843	21049	19376	19073	14373	21819	21761
35	13656	13378	5647	18886	17513	17184	12997	19843	19909
45	12716	11401	4551	17546	16027	15296	11936	18324	18079
55	11172	97775	3425	15418	13624	13402	10637	16331	15917
65	9141	7866	2575	13836	12367	11524	9464	14896	13855
75	7532	6268	1796	12751	10502	9826	8282	13737	12325
θ_u	6496	4817	742	11229	9641	8825	7841	12372	11509

2) van't Hoffプロットからスタッキングの熱力学的定数 ΔH° , ΔS° , ΔG° を求めるため、各温度Tにおける平衡定数Kを

$$K = (\theta_s - \theta_t) / (\theta_t - \theta_u)$$

より求め、更に1/TにおけるlogKを算出した(Table 94)。

Table 94 calculation of logK for CD melting thermodynamic data

1/T(K ⁻¹)	log K								
	pA ₂	Rp-2	Sp-2	pA ₃	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	pA ₄	Rp-4
2.96E ⁻³	0.634	0.628	0.611	0.658	0.616	0.652	0.660	0.650	0.708
3.05E ⁻³	0.301	0.347	0.393	0.382	0.400	0.349	0.349	0.395	0.352
3.14E ⁻³	0.098	0.155	0.161	0.110	0.075	0.110	0.082	0.120	0.072
3.25E ⁻³	-0.019	-0.062	-0.045	-0.051	-0.110	-0.113	-0.122	-0.073	-0.152
3.35E ⁻³	-0.285	-0.328	-0.277	-0.326	-0.361	-0.352	-0.415	-0.337	-0.401
3.47E ⁻³	-0.627	-0.616	-0.631	-0.623	-0.639	-0.638	-0.665	-0.611	-0.615

10B-9 オリゴマーの酵素分解アッセイ

SVPD及びRNase T2を用いてオリゴマーの分解を行い、鎖長、結合部位及び立体配置の決定を試みた。

Table 95 オリゴマーの酵素分解反応スケール

enzyme	oligomer	buffer	MgCl ₂	EDTA	H ₂ O	total	
species(0.05U/μl)	(OD)	(μl)	(0.1M/μl)	(0.1M/μl)	(μl)	(μl)	
SVPD	1	0.6	20 ^a	2	—	77	100
RNase T2	1	0.6	25 ^b	—	2	72	100

buffer; ^a0.1M Tris-acetate(pH8.8), ^b0.2M Sodium-acetate(pH4.5)
incubation at 37°C.

オリゴマー(0.6OD)を凍結乾燥した後、上記(Table 95)のようなスケールで反応溶液を調製した。インキュベーション時間はSVPDの場合[0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48hr]であり、RNase T2 では[0, 24, 48hr]行った。所定時間経過毎に反応溶液 8 μlを分取し、これにH₂O 12μlを加えて90°Cで3分間加熱することより、酵素の失活処理を行った。酵素処理後の分解生成物の確認はHPLCを用いて行った。更に、オリゴマーの酵素分解半減期は、HPLCより確認される元のオリゴマーの残存率から算出した(Table 96, Fig. 99)。

・ HPLC condition

column: RPC-5 (6 μ m, 6 ml/100g, 4 φ × 250mm)

eluent: NaClO₄ 0 → 70mM (60min) in 2mM Tris-acetate (pH7.5) / 0.1mM EDTA

Table 96 Remaining proportion of 2-5A analogues with SVPD digestion

time(h)	Rp-2mer		RpRp-3mer		SpRp-3mer		RpRpRp-4mer	
	(%)	log	(%)	log	(%)	log	(%)	log
0	95.3	1.979	97.8	1.990	100.0	2.000	91.0	1.960
0.5	92.4	1.966	85.9	1.934			83.3	1.920
1	90.4	1.956	77.0	1.886	84.6	1.927	78.9	1.897
2	86.7	1.938	63.7	1.804	82.9	1.919	65.8	1.818
4	76.2	1.882	46.3	1.666	60.1	1.779	54.5	1.736
8	51.9	1.715	28.0	1.447	36.2	1.559	45.1	1.624
16	23.1	1.364	12.0	1.079	20.4	1.310		
24	14.8	1.170			6.6	0.820		

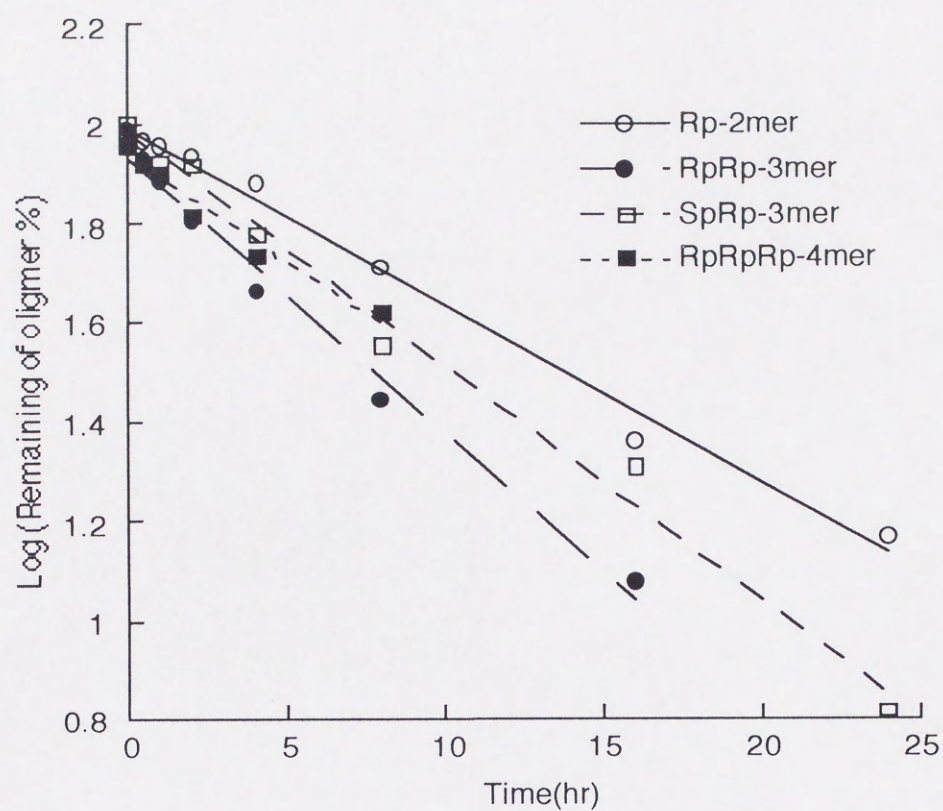


Fig. 100 SVPD digestion of 2',5'-oligothioadenylates

10B-10 オリゴマーの¹H NMR及び³¹P NMR測定

NMR測定に用いたオリゴマーは主としてHPLC分取(Wakosil15C18, 10 φ × 250mm)によって調製した。オリゴマーの分取量及びHPLC純度を示す(Table 97)。

Table 97 Oligomer purity for NMR measurement

oligomer	OD _{unit}	HPLC		
		R _T (min)*	purity	conc.(mM)
Rp-2	51.0	13.4	96.4	4.1
Sp-2	51.0	15.7	83.9	4.1
RpRp-3	70.0	20.2	92.7	3.9
RpSp-3	16.8	21.7	82.2	1.2
SpRp-3	10.0	22.3	81.2	0.7
3mer isomer	32.3	25.0	95.9	2.2
RpRpRp-4	40.0	28.4	71.1	2.2

HPLC retention times on RPC-5 column.

各オリゴマーは、Dowex50W-X8・陽イオン交換樹脂(Na⁺ form)を用いてNa⁺塩に変換後99.9%D₂Oによって重水素化し、最終的に99.96%D₂O 400μlに溶解した。ケミカルシフトにおける内部標準は特に用いず、あらかじめ得られている基準値との比較によってケミカルシフトを求めた(¹H NMR,HDO: δ =4.7814; ³¹P NMR,Pi: δ =0.0000)。測定温度は298.0Kとした。

10B-11 オリゴマー-5'-末端の修飾

オリゴマー-5'-末端の修飾による生物活性への影響を検討するため、りん酸基の付加による5'-二りん酸体の合成、及び5'-チオリン酸基の除去によるコア体の合成を試みた。

10B-11-1 5'-末端の二りん酸化反応

二りん酸化に用いたオリゴマーとして Rp-2mer [p(S)A2'-(Rp)-p(S)5'A]及び RpRp-3mer [p(S)A2'-(Rp)-p(S)5'A-(Rp)-p(S)5'A]を用いた(Table 98)。

Table 98 5'-二りん酸化反応スケール

oligomer species (OD/μmol)	NaH ₂ PO ₄ (mg/μmol)	DPC (μl/μmol)	5-Cl-1-Melm (μl/μmol)
Rp-2 550/21.7	78/220	8.7/43.4	7.6/65.1
RpRp-3 163/4.5	32/90	1.9/9.1	1.6/13.5

DPC: Diphenyl phosphorochloridate

5-Cl-Melm: 5-chloro-1-methylimidazole

(1) tri-n-butylammonium phosphateの調製

NaH₂PO₄·12H₂Oを陽イオン交換樹脂(Dowex50W-X8, 17φ×120mm; pyridinium form)によってpyridinium型へイオン交換した。トリ-n-ブチルアミン(2eq.)を加え留去後、更にdry-ピリジン(1ml×3)で留去を繰り返した。dry-ピリジン(1ml)を加えて溶解したのち(2)の操作に用いた。

(2) 5'-二りん酸化反応

オリゴマーはあらかじめ、陽イオン交換樹脂(Dowex50W-X8, 17φ×120mm; pyridinium form)によってpyridinium型へ変換した。処理したオリゴマーにトリ-n-オクチルアミン

(3eq.)及びdry-メタノール(1.5ml)を加え攪拌後留去した。dry-DMF(1ml×3)で留去を繰り返した後、dry-DMA(0.5ml)、dry-ジオキサン(1ml)、DPC[Diphenyl phosphorochloridate]、5-Cl-1-MeIm[5-chloro-1-methylimidazole]及びトリ-n-ブチルアミン(2eq.)を加え室温で3時間攪拌した。溶媒を留去後、dry-エーテル(3ml)及びヘキサン(5ml)を加え0°Cで10分間静置した。エーテル/ヘキサンをデカンテーション後、dry-ジオキサン(1ml)を加えて留去した。(1)で調製したtri-n-butylammonium phosphate/ピリジン溶液を加え室温で6時間攪拌した。エーテル(5ml)を加え沈澱を生成した後、これを遠心沈澱管に移し遠心分離(3000rpm×5min)を行った。エーテルで洗浄を繰り返した後、再び遠心分離によって沈澱を収集した。この沈澱は一度H₂O(1ml)に溶かして凍結乾燥した後、0.15M NH₄OH(0.5 ml)を加え室温で2時間攪拌した。溶媒を凍結乾燥により除去後、HPLC分取^aによって目的物に相当するピークを単離した。目的物の同定は酵素(alkaline phosphatase)分解アッセイ、³¹P NMR及び¹H NMRを用いて行った。

^aHPLC conditions;

column: Wakosil5C18 (5 μm, 10 φ × 250mm)

flow rate: 3 ml/min

detection: 260nm, 0.32AUFS

eluent: MeOH 14.4 → 34.4% (25min) in 10mM TEAA (pH7.3), linear gradient.

(3) 5'-二リン酸化物の alkaline phosphatase(AP)分解

下記のスケール(Table 99)で反応溶液を調製した後、37°Cで0, 1, 2, 4及び20時間インキュベーションした。所定時間経過後反応溶液を6 μl分取し、これに0.125M EDTA 4 μlを加えHPLC分析を行った。³¹P NMR 分析を含めた結果を示す(Table 100)。

Table 99 alkaline phosphatase(AP)処理スケール

compound	AP(1U/μl)	buffer*	H ₂ O	total
p(pSA) ₂ 0.5 OD	2μl	5μl	43μl	50μl
p(pSA) ₃ 0.5 OD	2μl	5μl	43μl	50μl

dephosphorylation buffer*: 0.5M Tris-HCl(pH8.5)/1mM EDTA

Table 100 5'-末端二りん酸化物のHPLC及び³¹P NMR 分析結果

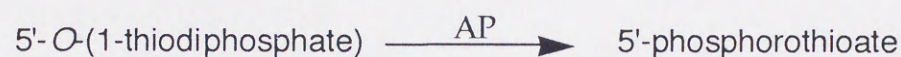
compound	yield (260nm)	HPLC R _T of AP digestion ^a		³¹ P NMR ^b (ppm)
		before(min)	after(min)	
p(pSA) ₂	15.0OD(3%)	10.0	8.2	57.68, 32.21, -10.76
p(pSA) ₃	8.9OD(5%)	13.3	10.5	—

^a) HPLC retention times on PRC-5 column.

^b) p(pSA)₃ は収量が充分ではなく³¹P NMRを測定することができなかった。

反応生成物について

1) RPC-5(アニオン交換樹脂)カラムを用いたHPLC分析でAP処理後にR_Tの短縮が確認された。この結果は5'-末端りん酸基の脱離を示しており、おそらく二りん酸化した生成物の5'-β-りん酸基がAP処理によって脱りん酸化されたことを示唆している。



2) ³¹P NMRにおける-10.76ppmのケミカルシフトは、出発原料の5'-末端が二りん酸化されることによって生じた5'-O-(1-thiophosphate)残基のβ-りん酸基に相当すると思われる。

10B-11-2 5'-末端の脱チオリん酸化反応

alkaline phosphatase(AP)を用いてRp-2mer [p(S)A2'-(Rp)-p(S)5'A]、RpRp-3mer [p(S)A2'-(Rp)-p(S)5'A2'-(Rp)-p(S)5'A]及びRpRpRp-4mer[p(S)A2'-(Rp)-p(S)5'A-(Rp)-p(S)5'A2'-(Rp)-p(S)5'A]の5'-末端の脱チオリん酸化を行った。反応スケールを示す(Table 101)。

Table 101 オリゴマーのAP処理スケール

oligomer	AP	buffer	H ₂ O	total	
(OD/μl)	(U/μl)	(μl)	(μl)	(μl)	
Rp-2	12.6/49.4	488/15.7	50	384.9	500
RpRp-3	18.2/61.5	728/23.4	50	365.1	500
RpRpRp-4	23.2/42.5	928/29.8	50	377.7	500

buffer; 0.5M Tris-HCl(pH8.5)/1mM EDTA.

AP(Calf Intestine由来; 31136U/ml)はオリゴマー 1 OD当たり40Uを使用した。37°Cで72時間インキュベーション後、各反応溶液をゲル濾過カラムクロマトグラフィー(SephadexG25,DNA grade,15φ×220mm)によって処理し、APを除去した。生成物の確認はHPLC及び³¹P NMRを用いて行った(Table 102)。

Table 102 AP処理生成物のHPLC及び³¹P NMR 分析結果

compound	yield (260nm)	HPLC R _T of APdigestion		³¹ P NMR (ppm)
		before(min)	after(min)	
ApSA	14.2OD (113%)	9.1	3.9	57.67
A(pSA) ₂	21.9OD (120%)	15.1	10.6	58.27, 58.07
A(pSA) ₃	13.2OD (57%)	22.5	21.0	—

反応生成物について

1) RPC-5カラムを用いたHPLC分析でAP処理後のR_Tの短縮が確認された。この結果は基質オリゴマーの5'-末端チオりん酸基がAPによって脱りん酸化されたことを示している。



2) ³¹P NMRにおいて4量体は完全な帰属を行うことができなかった。しかしながら、いずれのオリゴマーも5'-末端のチオン酸基に相当する44ppmのピークはAP処理後に消失しているため、これらAP処理生成物の5'-末端チオン酸基は脱りん酸化を受けていると思われる。

10B-12 オリゴマーの生物活性

10B-12-1 ラジオバイディングアッセイ

(1) アッセイ用サンプルの調製

アッセイには次のオリゴマーを使用した。

Rp-2, Sp-2, RpRp-3, RpSp-3, SpRp-3, RpRpRp-4, pA₃(ref.), p₃A₃(ref.), RpRp-3(core),

Rp-p(pSA)₂, RpRp-p(pSA)₃

各オリゴマーは初めに 1.0×10^{-4} (or 2.0×10^{-5})(M)溶液を調製し、続いてこれを順次5倍ずつ希釈していくことによって最終的に 1.28×10^{-9} (M) 溶液を調製した(Table 103)。

Table 103 アッセイ用サンプルの調製スケール

oligomer	(OD/ μ mol)	mother(M)	dilution of mother liquid
Rp-2	25.2	1.0×10^{-4}	1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625
Sp-2	25.5	1.0×10^{-4}	〃
RpRp-3	36.4	2.0×10^{-5}	〃
RpSp-3	35.4	2.0×10^{-5}	〃
SpRp-3	36.2	2.0×10^{-5}	〃
RpRpRp-4	46.4	2.0×10^{-5}	〃
pA ₃	34.5	2.0×10^{-5}	〃
p ₃ A ₃	34.0	2.0×10^{-5}	〃
RpRp-3(core)	36.4	2.0×10^{-5}	〃
Rp-p(pSA) ₂	25.2	1.0×10^{-4}	〃
RpRp-p(pSA) ₃	36.4	2.0×10^{-5}	〃

(2) アッセイ用緩衝溶液の調製

(2)-1 assay buffer(250ml) は次の成分を含む。

25mM Tris-HCl(pH7.6), 85mM KCl, 5mM Mg(CH₃COO)₂, 1mM ATP,
1mM dithiothreitol(DTT), 5% glycerol

(2)-2 lysis buffer(250ml) は次の成分を含む。

10mM Tris-HCl(pH7.6), 90mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 20mM EDTA, 1mM DTT,
0.5% NiP-40

(3) RNase Lを含む無細胞系溶液の調製

(3)-1 Mouse L929 cell extract(400 μ l)の調製

6×10^7 cellsに lysis buffer(180 μ l)を加え振盪後、遠心分離した(12000rpm \times 5min)。これから上澄み液(200 μ l)を取り、assay buffer(200 μ l)を加えてラジオバインディングアッセイに用いた。

(3)-2 Rabbit reticulocyte lysate(400 μ l)の調製

Rabbit reticulocyte lysate(200 μ l)に assay buffer(200 μ l)を加えてラジオバインディングアッセイに用いた。

(4) アッセイ方法

各濃度のオリゴマー(10 μ l)に、 $[^{125}\text{I}]$ 標識化2-5Aプローブ水溶液 $[^{125}\text{I}]$ 標識化2-5Aプローブを事前に H_2O 1000 μ lに溶解した $[^{125}\text{I}]$ (10 μ l; 0.33KBq)及びMouse L929 cell extract(20 μ l)を加え0°Cで2時間インキュベーションした。インキュベーション後、ニトロセルロースフィルター(Millipore PH0.3 μ m)上に反応溶液を吸引濾過し更に assay buffer(1ml \times 2)によってフィルターを洗浄した。フィルター上に残存した $[^{125}\text{I}]$ 標識化2-5Aプローブの放射能活性は γ 線カウンターを用いて測定した。オリゴマーの代わりに H_2O (10 μ l)を用いた時の γ 線量をcontrol(100%)として各アッセイ溶液における放射能活性を相対化した(Table104, 105)。これから最終的に IC_{50} (プローブとRNase Lとの最大結合量の50%を阻害するのに必要なオリゴマー濃度)を算出した。

Table 104-1 L-cell RNase L に対するプローブの結合量(1)

oligomer concentration(M)	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3	SpRp-3	RpRpRp-4
	CPM/[(sample)/(control) \times 100(%)]					
1.25×10^{-4}	649/30.4					
2.5×10^{-5}		226/10.6				
5×10^{-6}	978/45.9	332/15.6				
1×10^{-6}	950/44.6	1183/55.5	424/19.9	339/15.9		202/9.5
2×10^{-7}	933/43.8		495/23.2		344/16.1	345/16.2
4×10^{-8}	1884/88.4	1444/67.7	349/16.4	274/12.9	315/14.8	398/18.7
8×10^{-9}			482/22.6	408/19.1	352/16.5	403/18.9
1.6×10^{-9}			949/44.5	759/35.6	797/37.4	328/15.4
3.2×10^{-10}			1095/51.4	1022/47.9	817/64.2	817/38.3

Table 104-2 L-cell RNase L に対するプローブの結合量(2)

oligomer conc.(M)	RpRp-3(core)	Rp-p(pSA) ₂	RpRp-p(pSA) ₃	pA ₃	p ₃ A ₃
	CPM/[(sample)/(control) × 100(%)]				
2.5 × 10 ⁻⁵	846/39.7				
5 × 10 ⁻⁶	1115/52.3	1396/65.5			
1 × 10 ⁻⁶	1402/65.8	1846/86.6	673/31.6		
2 × 10 ⁻⁷	1771/83.1	2153/101	710/33.3	446/20.9	170/8.0
4 × 10 ⁻⁸		2140/100		372/17.4	159/7.5
8 × 10 ⁻⁹	2228/104		733/34.4	933/43.8	272/12.8
1.6 × 10 ⁻⁹			859/40.3	1205/56.5	450/21.1
3.2 × 10 ⁻¹⁰			1531/71.8	1703/79.9	1063/49.9

control(avarage)=2132

Table 105-1 reticulocyte RNase L に対するプローブの結合量(1)

oligomer concentration(M)	Rp-2	Sp-2	RpRp-3	RpSp-3
	CPM/[(sample)/(control) × 100(%)]			
1 × 10 ⁻⁶	1200/65.7	1181/64.6	692/37.9	266/14.6
2 × 10 ⁻⁷	1335/73.1	1150/62.9	1090/59.7	619/33.9
4 × 10 ⁻⁸	1538/84.2	1040/56.9	1335/73.1	983/53.8
8 × 10 ⁻⁹	1444/79.0	1167/63.9	1421/77.8	1378/75.4
1.6 × 10 ⁻⁹	1520/83.2	1631/89.3	1438/78.7	1432/78.4
3.2 × 10 ⁻¹⁰	1659/90.8	1669/91.4	1368/74.9	1189/65.1

Table 105-2 reticulocyte RNase L に対するプローブの結合量(2)

oligomer concentration(M)	SpRp-3 CPM/[(sample)/(control) × 100(%)]	RpRpRp-4 CPM/[(sample)/(control) × 100(%)]	pA ₃ CPM/[(sample)/(control) × 100(%)]	p ₃ A ₃ CPM/[(sample)/(control) × 100(%)]
1 × 10 ⁻⁶	543/29.7	210/11.5	404/22.1	336/18.4
2 × 10 ⁻⁷	749/41.0	227/12.4	628/34.4	327/17.9
4 × 10 ⁻⁸	1129/61.8	602/33.0	1221/66.8	426/23.3
8 × 10 ⁻⁹	1200/65.7	1285/70.3		826/45.2
1.6 × 10 ⁻⁹	1306/71.5	1304/71.4	1370/75.0	1018/55.7
3.2 × 10 ⁻¹⁰	1322/72.4	1441/78.9	1327/72.6	1524/83.4

control(average)=1827

10B-1 2-2 蛋白質合成阻害アッセイ

(1) アッセイ用サンプルの調製

本アッセイに用いたオリゴマー及び濃度は以下の通りである。

p₃A₃ (1 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁶, 1 × 10⁻⁷(M))

RpRp-3 (1 × 10⁻⁴, 1 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁶, 1 × 10⁻⁷, 1 × 10⁻⁸(M))

Rp-p(pSA)₂, core-RpRp-3, RpRp-p(pSA)₃, RpSp-3, SpRp-3, RpRpRp-4
(1 × 10⁻⁴, 1 × 10⁻⁵, 1 × 10⁻⁶(M))

(2) 培地の調製

FBS: Fetal Bovine Sera(ウシ胎児血清)

MEM[Minimum Essential Media]; MEM 1, 全ての栄養源を含む。

MEM 5, Methionine(Met) を含まない。

(3) 緩衝溶液の調製

(3)-1 1 × TBS(300 ml)

14mM NaCl, 5mM KCl, 25mM Tris-HCl (pH7.5), 0.78mM CaCl₂, 0.76mM MgCl₂

(3)-2 2 × HBS(300 ml)

50mM HEPES, 280mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM NaH₂PO₄, 12mM Glucose

・ 1M NaOH を用いpH7.12に調整した後、0.22 μ m Millipor filter で濾過した。

(3)-3 TE(100 ml)

1mM Tris-HCl (pH7.5), 0.5mM EDTA

(3)-4 RIPA(100 ml)

10mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100,
1% Deoxycholic Acid-Na salt

(4) Mouse L929細胞の培養

L cells は5% FBS-MEM1 6mlを含む5cm dish上、5% CO₂雰囲気中37°Cでインキュベーションして最終的に3.6 × 10⁵cells/well になるまで培養後、これをアッセイに使用した。

(5) りん酸カルシウムゲルの調製(Table 106)

Table 106 Ca-phosphate gelの調製スケール

	oligomer(μ l)	H ₂ O(μ l)	TE(μ l)	2M CaCl ₂ (μ l)	2×HBS(μ l)	total(μ l)
sample	5	0	16.85	3.15	25	50
control	0	5	16.85	3.15	25	50

オリゴマー(コントロール実験としてH₂O)にTE buffer 及び2M CaCl₂を加え攪拌した後、2 × HBS を加えてゲルを調製した。これをよく攪拌した後 0°Cで5分間放置した。

(6) アッセイ方法

L cell(3.6 × 10⁵cells/well)の古くなった培地を除去し10% FBS-MEM1 0.2mlを加えた。この組織培地から培地(50 μ l)を分取し、(5)で調製したりん酸カルシウムゲルへ加えた(total 100 μ l)。続いてこれを組織培地へ戻して37°Cで4時間インキュベーションした。培地を吸引除去し1×TBSで洗浄後、MEM5 200 μ lを加えて37°Cで15分間インキュベーションした。再び培地を吸引除去し(MEM5+0.1 μ Ci[³⁵S]Met)150 μ lを加えて37°Cで1時間インキュベーションした。

培地を除去後、氷浴上でRIPA buffer(100 μ l)を加え10分間程放置して細胞を溶解した。更にRIPA buffer(100 μ l)を加え共洗いしながらマイクロチューブへ移した。これに10%トリフルオロ酢酸(TCA), 800 μ l)を加えて90-100°Cで10分間加熱し、酸沈澱物を生成した。少量の5% TCAでガラス繊維フィルターを洗浄した後、フィルター上に酸沈澱物を吸引濾過し更に5%TCAで共洗いしながら濾過した。最後にEtOHでフィルターを洗浄し乾燥させた。

バイアルにフィルターを入れ液体シンチレーター(5ml)で満たした後、LCSによってTCA不溶性のポリペプチドに取り込まれた 35 S]Met量を計測した(Table107)。計測より得られたsample及びcontrolの 35 S] Met量を比較してオリゴマーの蛋白質合成阻害能力(IC₅₀)を求めた。

Table 107-1 35 S]-Met の細胞内への取り込み量(1)

oligomer concentration(M)	Rp-p(pSA) ₂	RpRp-3(core)	RpRp-3	RpRp-p(pSA) ₃
	CPM/[(sample)/(contol) × 100(%)]			
2 × 10 ⁻⁵	58073/47.3	120885/98.5	17058/13.9	33082/27.0
2 × 10 ⁻⁶	100246/81.7	123587/100.7	23153/18.9	46283/37.7
2 × 10 ⁻⁷	119281/97.2	117709/95.9	49818/40.6	77587/63.2
2 × 10 ⁻⁸			110803/90.3	
2 × 10 ⁻⁹			122828/100.1	

Table 107-2 35 S]-Met の細胞内への取り込み量(2)

oligomer concentration(M)	RpSp-3	SpRp-3	RpRpRp-4	p ₃ A ₃
	CPM/[(sample)/(contol) × 100(%)]			
2 × 10 ⁻⁵	41996/34.2	65290/53.2	28930/23.6	
2 × 10 ⁻⁶	92741/75.6	92131/75.1	36135/29.5	29572/24.1
2 × 10 ⁻⁷	134034/109.2	133521/108.8	59560/48.5	31781/25.9
2 × 10 ⁻⁸			52272/42.6	
2 × 10 ⁻⁹			57180/46.4	

control(avarage)=122704.5

謝辞

本研究を行うに際し始終熱心な御指導をいただきました、群馬大学工学部教授沢井宏明先生に深く感謝いたします。有益な御援助および御助言をいただきました篠塚和夫先生、尾崎広明先生に深く感謝いたします。2-5Aアナログの二次元NMRについて直接御指導、御助言をいただきました東京大学工学部河合剛太先生に深く感謝いたします。2-5Aアナログの生物活性について直接御指導、御助言をいただきました岩手大学農学部平秀晴先生に深く感謝いたします。研究室における様々な面でいつも相談にのっていただきました藤田晴子技官に深く感謝いたします。適切な御指導、御助言をいただきました黒田賢聖さんに深く感謝いたします。また共に学び、かつ御協力をいただきました渋谷貴君、若林治彦君、若井宏倫君、稲葉佳子さん、小鍛冶和己君、伊藤健君、山口宏哉君、戸塚修一君、林尚志君に深く感謝いたします。最後に、研究生活を有意義な時間として与えてくださった群馬大学工学部応用化学科分子反応化学第二研究室の皆様にも心から深く感謝いたします。また、私自身を支えてくれた皆様にも心から深く感謝いたします。

参考文献

- (1) Izatt, R. M.; Christensen, J. J.; Rytting, J. H. (1971) *Chem. Rev.*, 439.
- (2) Lehninger, A. L. (1975) "Biochemistry" Second Ed.; Worth Publishers Inc., part 2.
- (3) Rapaport, E.; Zamecnik, P. C. (1976) *Proc. Nat. Sci. USA* **73**, 3984.
Rapaport, E.; Zamecnik, P. C.; Baril, E. F. (1981) *J. Biol. Chem.* **265**, 12148.
Luthje, J.; Ogilvie, A. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 253.
- (4) Miura, K. (1981) *Adv. Biophysics* **14**, 205.
Sonenberg, N. (1988) *Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 173.
- (5) Spiro, T. G. (1980) "Inorganic Biochemistry" vol. 1 ed. Eichhorn, G. L. Elsevir Pub. Co., Amsterdam, p.578.
Knowles, J. R. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 877.
- (6) Mofatt, J. G.; Khorana, H. G. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 649.
- (7) Michelson, A. M. (1975) "The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides"; Academic Press, London-New York.
- (8) Hoared, D. E.; Ott, D. G. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1785.
Fook, A. F.; Holman, M. J.; Nassbaum, A. L. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1552.
Kamimura, T.; Osaki, Y.; Sekine, M.; Hata, T. (1984) *Tetrahedron Lett.* **25**, 2683.
Worerd, R.; Bakker, C. G.; Schwarz, A. W. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**, 2763.
- (9) Vallee, B. L.; Galdes, A. (1984) *Adv. Enzymol. Related Areas. Mol. Biol.* **56**, 284.
- (10) Mildvan, A. S. (1979) *Adv. Enzymol.* **49**, 103.
- (11) Shabarova, Z. A. (1970) *Progress in Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **10**, 145.
- (12) Sawai, H. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7037.
- (13) Sawai, H.; Kuroda, K.; Hojo, T. (1989) *Bull. Chem. Soc. Jpn* **62**, 2018.
- (14) Sawai, H. (1979) *Abstract Papar ACS/CSJ Chemical Congress* 11.
Sawai, H. (1990) *Bull. Chem. Soc. Jpn* **63**, 692.
- (15) Chu, B. C. F.; Orgel, L. E. (1984) *Biochem. Biophys. Acta.*, **782**, 103.
- (16) Lohrmann, R.; Orgel, L. E. (1978) *Tetrahedron* **34**, 853.
- (17) Jones, J. W.; Robins, R. K. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 193.
- (18) Lienhard, G. E.; Secemski, I. I. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 1121.

- (19) Grummt, F. (1979) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, 649.
Grummt, F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 371.
- (20) Sillero, A.; Ochoa, S. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 548.
- (21) McNaughton, D. R.; Klassen, G. R.; LeJohn, H. B. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 468.
- (22) Sawai, H.; Wakai, H.; Shimazu, M. (1991) *Tetrahedron Lett.* **31**, 6905.
- (23) Ochiai, E. (1987) "General Principles of Biochemistry of the Elements"; Plenum Press, New York and London, pp.184-194.
- (24) Shannon, R. D. (1976) *Acta Crystallogra.* **A32**, 757.
- (25) Frieden, E. (1975) *J. Chem. Educ.* **52**, 754.
- (26) Scheller, K. H.; Hofstetter, F.; Mitchell, P. R.; Sigel, H. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 247.
Sigel, H. (1989) *Biological Trace Element Research* **21**, 49.
- (27) Eckstein, F. (1983) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22**, 423.
Connolly, B. A.; Potter, B. V. L.; Eckstein, F.; Pingound, A.; Grotjahn, L. (1984) *Biochemistry* **23**, 3443.
Mizrahi, V.; Henrie, R. N.; Marlier, J. F.; Johnson, K. A.; Benkovic, S. J. (1985) *Biochemistry* **24**, 4010.
Eckstein, F. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 367.
Eckstein, F.; Gish, G. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 97.
- (28) Noble, S. A.; Fisher, E. F.; Caruthers, M. H. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 3387.
English, U.; Gauss, D. H. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 613.
Suggs, J. W.; Taylor, D. A. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 5461.
Cosstick, R.; Eckstein, F. (1985) *Biochemistry* **24**, 3630.
- (29) Stein, C. A.; Cohen, J. S. (1988) *Cancer Res.* **48**, 2659.
Matsukura, M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Mitsuya, H.; Reitz, M.; Cohen, J. S.; Broder, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7706.
Gao, W.; Stein, C. A.; Cohen, J. S.; Dutschman, G. E.; Cheng, Y. -C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 11521.

- Majumder, C.; Stein, C. A.; Cohen, J. S.; Broder, S.; Wilson, S. H. (1989) *Biochemistry* **28**, 1340.
- (30) Shibahara, S.; Mukai, S.; Morisawa, H.; Nakashima, H.; Kobayashi, S.; Yamamoto, N. (1989) *Nucleic Acid Res.* **17**, 239.
- (31) Kerr, I. M.; Brown, R. E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 256.
- (32) Ball, A. L. (1982) "The Enzymes"(Boyer, P. D.,Ed), pp.281, Academic Press, New York.
Torrence, P. F. (1985) "Biological Response Modifiers"(Torrence, P. F.,Ed), pp.77, Academic Press, New York.
Johnston, M. I.; Torrence, P. F. (1985) "Interferons"(Friedman, R. M.,Ed), Vol.3, p.189, Elsevier, Amsterdam/New York.
Luxembouge, A. (1988) *Bull. Inst. Pasteur* **86**, 373.
- (33) Wells, V.; Mallucci, L. (1985) *Exp. Cell. Res.* **159**, 27.
Wells, V.; Mallucci, L. (1988) *J. Interferon Res.* **8**, 793.
Krause, D.; Silerman, R. H.; Jacobsen, H.; Leisy, S. A.; Dieffenbach, C.; Friedman, R. M. (1985) *Eur.J. Biochem.* **146**, 611.
- (34) Pestka, S. (1981) *Methods Enzymol.* 78 and 79.
Lengyel, P. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 251.
DeMaeyer, E.; DeMaeyer-Guignard, J. (1988) "Interferons and Other Regulatory Cytokines", John Wiley and Sons, Inc., New York.
- (35) Floyd-Smith, G.; Slattery, E.; Lengyel, P. (1981) *Science* **212**, 1030.
Wreschner, D. H.; Silverman, R. H.; James, T. C.; Gilbert, C. S.; Kerr, I. M. (1982) *Eur. J. Biochem.* **124**, 261.
Katze, M. G.; Agy, M. B. (1990) *Enzyme* **44**, 332.
- (36) Williams, B. R. G.; Kerr, I. M.; Gilbert, C. S.; White, C. N.; Ball, L. A. (1978) *Eur.J. Biochem.* **92**, 455.
Minks, M. A.; Bevin, S.; Maroney, P. A.; Baglioni, C. (1979) *Nucleic Acid Res.* **6**, 767.
Knight, M.; Wreschner, D. H.; Silverman, R. H.; Kerr, I. M. (1981) *Methods Enzymol.* **79**, 216.
- (37) Silverman, R. H.; Wreschner, D. H.; Gilbert, C. S.; Kerr, I. M. (1981) *Eur. J. Biochem.*

115, 79.

- (38) Charubala, R.; Pfliederer, W. (1982) *Tetrahedron Lett.* **23**, 4789.
- (39) Jamouille, J. C.; Imai, J.; Lesiak, K.; Torrence, P. F. (1984) *Biochemistry* **23**, 3063.
- (40) Torrence, P. F.; Imai, J.; Lesiak, K.; Jamouille, J. C.; Sawai, H. (1984) *J. Med. Chem.* **27**, 726.
- (41) Imai, J.; Torrence, P. F. (1985) *J. Org. Chem.* **50**, 1418.
- (42) Kanou, M.; Ohomori, H.; Takaku, H.; Yokoyama, S.; Kawai, G.; Suhadolnik, R. J.; Sobol, R. W. (1990) *Nucleic Acid Res.* **18**, 4439.
- (43) Gosselin, G.; Imbach, J. L. (1981) *Tetrahedron Lett.* **22**, 4699.
- (44) Huss, S.; Gosselin, G.; Pompon, A.; Imbach, J. L. (1986) *Nucleosides Nucleotides* **5**, 275.
- (45) Eppstein, D. A.; Marsh, Y. V.; Schryver, B. B.; Larsen, M. A.; Barnett, J. W.; Verheyden, J. P. H.; Prisbe, W. J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13390.
- (46) Kwiatkowski, M.; Gioli, C.; Chattopadhyaya, J. B.; Oberg, B.; Drake, A. F. (1982) *Chem. Scr.* **19**, 49.
- (47) Haugh, M. C.; Cayley, P. J.; Serafinowska, H. T.; Norman, D. G.; Reese, C. B.; Kerr, I. M. (1983) *FEBS Eur. J. Biochem.* **132**, 77.
- (48) Sawai, H.; Lesiak, K.; Imai, J.; Torrence, P. F. (1985) *J. Med. Chem.* **28**, 1376.
- (49) Doetsch, P. W.; Wu, J. M.; Sawada, Y.; Suhadolnik, R. J. (1981) *Nature* **291**, 355.
- (50) Kovacs, T.; Pabuccuoglu, A.; Lesiak, K.; Torrence, P. F. (1993) *Bioorg. Chem.* **21**, 192.
- (51) Nelson, P. S.; Bach, C. T.; Verheyden, J. P. H. (1984) *J. Org. Chem.* **49**, 2314.
- (52) Kariko, K.; Li, S. W.; Sobol, R. W.; Suhadolnik, R. J.; Charubala, R.; Pfliederer, W. (1987) *Biochemistry* **26**, 7136.
- (53) Charubala, R.; Pfliederer, W. (1987) *Nucleosides Nucleotides* **6**, 513.
- (54) Charubala, R.; Pfliederer, W.; Suhadolnik, R. J.; Sobol, R. W. (1991) *Nucleosides Nucleotides* **10**, 383.
- (55) Charubala, R.; Sobol, R. W.; Kon, N.; Suhadolnik, R. J. (1991) *Helv. Chem. Acta* **74**, 892.
- (56) Battistini, C.; Brasca, M. G.; Fustinoni, S. (1992) *Tetrahedron* **48**, 3209.
- (57) Chapekar, M. S.; Glazer, R. I. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 37.

- Eppstein, D. A.; Marsh, Y. V.; Schryver, B. B. (1983) *Virology* **131**, 341.
- (58) Imai, J.; Lesiak, K.; Torrence, P. F. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 1390.
Torrence, P. F.; Brozda, D.; Alster, D.; Charubala, R.; Pfliegerer, W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1131.
Jamouille, J. C.; Lesiak, K.; Torrence, P. F. (1986) *Biochemistry* **26**, 376.
Lesiak, K.; Imai, J.; Floyd-Smith, G.; Torrence, P. F. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13082.
- (59) Jager, A.; Engels, J. (1981) *Nucleic Acids Symp. Ser.* **9**, 149.
- (60) Lee, C.; Suhadolnik, R. J. (1985) *Biochemistry* **24**, 551.
- (61) Burgers, P. M. J.; Eckstein, F. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4798.
Bryant, F. R.; Benkovic, S. J. (1979) *Biochemistry* **18**, 2825.
- (62) Suhadolnik, R. J.; Lee, C.; Kariko, K.; Li, S. W. (1987) *Biochemistry* **26**, 7143.
- (63) Charachon, G.; Sobol, R. W.; Bisbal, C.; Salehzada, T.; Silhon, M.; Charubala, R.; Pfliegerer, W.; Lebleu, B.; Suhadolnik, R. J. (1990) *Biochemistry* **29**, 2550.
- (64) Suhadolnik, R. J.; Lebleu, B.; Pfliegerer, W.; Charubala, R.; Montefiori, D. C.; Mitchell, W. M.; Sobol, R. W.; Li, S. W.; Kariko, K.; Reichenbach, N. L. (1989) *Nucleosides Nucleotides* **8**, 987.
- (65) Sobol, R. W.; Wilson, S. H.; Charubala, R.; Pfliegerer, W.; Suhadolnik, R. J. (1990) *J. Interferon Res.* **10**, S66.
Muller, W. E. G.; Weiler, B. E.; Charubala, R.; Pfliegerer, W.; Leserman, L.; Sobol, R. W.; Suhadolnik, R. J.; Schroder, H. C. (1991) *Biochemistry* **30**, 2027.
Montefiori, D. C.; Sobol, R. W.; Li, S. W.; Reichenbach, N. L.; Suhadolnik, R. J.; Charubala, R.; Pfliegerer, W.; Modlizewski, A.; Robinson, W. E.; Mitchell, W. M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7191.
Sobol, R. W.; Fisher, W. L.; Reichenbach, N. L.; Kumar, A.; Beard, W. A.; Wilson, S. H.; Charubala, R.; Pfliegerer, W.; Suhadolnik, R. J. (1993) *Biochemistry* **32**, 12112.
- (66) Minks, M. A.; Benveniste, S.; Maroney, P. A.; Baglioni, C. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5058.
Wells, J. A.; Swyryd, E. A.; Stark, J. R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1363.

- Johnston, M. I.; Friedman, R.; Torrence, P. F. (1981) *Methods Enzymol.* 79, 228.
- (67) Eckstein, F.; Gingl, H.(1967) *Biochem. Biophys. Acta* 149, 35.
- (68) Murray, A. W.; Atkinson, M. R. (1968) *Biochemistry* 7, 4023.
- (69) Connolly, B. A.; Romaniuk, P. J.; Eckstein, F. (1982) *Biochemistry* 21, 1983.
- Eckstein, F. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* 92, 4718
- Eckstein, F.; Goumet, M. (1978) "Nucleic Acid Chemistry part2"(Townsend, L. B.; Tipson, R. S., Ed.), pp.861, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- (70) Kainosho, M.; Takahashi, M. (1983) *Nucleic Acid Symp. Ser.* 12, 181.
- Feldman, I.; Rich, K. E. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* 92, 4559.
- (71) Wandlandt, W. W.; Bryant, J. M. (1956) *Science* 123, 1121.
- Comyns, A. E. (1960) *Chem. Rev.* 60, 115.
- (72) Izatl, R. M.; Hansen, L. D.; Rytting, J. H.; Christensen, J. J. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2760.
- Birnbaum, G. I.; Giziewicz, J.; Huber, C. P.; Shugar, D. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* 98, 4640.
- (73) Buchwald, S. L.; Friedman, J. M.; Knowles, J. R. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 4911.
- Freeman, S.; Friedman, J. M.; Knowles, J. R. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3166.
- Cullis, P. M.; Nicholls, D. (1987) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 783.
- (74) Cullis, P. M.; Iagrossi, A.; Rous, A. J. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7869.
- Cullis, P. M.; Iagrossi (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7870.
- (75) 渡辺公綱 (1973) 核酸実験法・下 (別冊 蛋白質 酵素 核酸),共立出版, pp172.
- Brahams, J.; Michelson, A. M.; VanHolde, K. E. (1966) *J. Mol. Biol.* 15, 467.
- Brahms, J.; Maurizot, J.; Michelson, A. M. (1967) *J. Mol. Biol.* 15, 481.
- Ts'o, P. O. P.; Rapoport, S. A.; Ballum, F. J. (1966) *Biochemistry* 5, 4153.
- (76) 黒田賢聖 (1989) 修士論文, pp31.
- (77) 森浩章 (1990) 修士論文, pp32.
- 平野篤 (1992) 修士論文, pp43 .
- (78) Saenger, W.; Suck, D.; Eckstein, F. (1974) *Eur. J. Biochem.* 46, 559.
- (79) Gopalakrishnan, V.; Ghadage, R. S.; Ganesh, K. N. (1991) *Biochem. Biophys. Res.*

- Comm.* 14, 1251.
- (80) Frey, P. A. in Neuberger, A.; Van Deenen, L. L. M. (1982) "New Comprehensive Biochemistry", vol.3, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp201.
- Frey, P. A. (1982) *Tetrahedron* 38, 1541.
- Eckstein, F.; Romaniuk, P. J.; Connolly, B. A. (1982) *Methods Enzymol.* 87, 197.
- (81) Burgers, P. M. J.; Eckstein, F. (1979) *Biochemistry* 18, 592.
- (82) Romaniuk, P. J.; Eckstein, F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7684.
- Bartlett, P. A.; Eckstein, F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8879.
- Cosstick, R.; Eckstein, F. (1985) *Biochemistry* 24, 3630.
- (83) Davies, D. B. (1978) *Prog. NMR Spectrosc.* 12, 135.
- Danyluk, S. S. (1979) "Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Application", (Walker, R. T.; DeClercq, E.; Eckstein, F. Eds.), Plenum Press, New York, pp15.
- Dhingra, M. M.; Sarma, R. H. (1979) "Stereodynamics of Molecular Systems", (Sarma, R. H. Ed.), Pergamon, New York, pp3.
- (84) Altona, C.; Sundaralingam, M. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 95, 2333.
- (85) Altona, C. (1982) *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* 101, 413.
- Doornbos, J.; den Hartog, J. A. J.; van Boom, J. H.; Altona, C. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 403.
- (86) Knight, M.; Wrenschner, D. H.; Silverman, R. H.; Kerr, I. M. (1981) *Methods Enzymol.* 79, 216.
- Knight, M.; Cailey, P. J.; Silverman, R. H.; Wrenschner, D. H.; Gilbert, C. S.; Brown, R. E.; Kerr, I. M. (1980) *Nature* 288, 189.
- (87) Sawai, H.; Ishibashi, K.; Itoh, M.; Watanabe, S. (1985) *J. Biochem.* 98, 999.
- Sawai, H.; Taira, H.; Ishibashi, K.; Itoh, M. (1987) *J. Biochem.* 101, 339.
- (88) Kitade, Y.; Alster, D. K.; Pabuccuoglu, A.; Torrence, P. F. (1991) *Bioorg. Chem.* 19, 283.
- Kovacs, T.; Pabuccuoglu, A.; Lesiak, K.; Torrence, P. F. (1993) *Bioorg. Chem.* 21, 192.
- (89) Sobol, R. W.; Charubala, R.; Pfleiderer, W.; Suhadolnik, R. J. (1993) *Nucleic Acids Res.*

21, 2437.

- (90) Marin, E. M.; Reisinger, D. M.; Hovanessian, A. G.; Williams, B. R. G. (1981) *Methods Enzymol.* 79, 273.
- (91) Hovanessian, A. G.; Wood, J. N. (1980) *Virology*, 101, 81.
Hovanessian, A. G., Wood, J. N.; Meurs, E.; Montagnier, L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3261.
- (92) Kariko, K.; Sobol, R. W.; Suhadolnik, L.; Li, S. W.; Reichenbach, N. L.; Suhadolnik, R. J.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. (1987) *Biochemistry* 26, 7127.
- (93) Torrence, P. F.; Imai, J.; Johnston, M. I. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5993.
Torrence, P. F.; Imai, J.; Lesiak, K.; Warrinnier, J.; Balzarini, J., De Clerco, E. (1983) *J. Med. Chem.* 26, 1671.
- (94) Stenberg, K.; Oberg, B.; Chattopadhyaya, J. B. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 697, 170.

関連および参考論文

第2章および第3章

1. Facile Synthesis of Nucleotides Containing Polyphosphates by Mn(II) and Cd(II) Ion-Catalyzed Pyrophosphate Bond Formation in Aqueous Solution.
Shimazu, M.; Shinozuka K.; Sawai, H. (1990) *Tetrahedron Lett.* 31, 235-238.
2. Divalent Metal Ion-Catalyzed Pyrophosphate Bond Formation in Aqueous Solution. Synthesis of Nucleotides Containing Polyphosphate, Nucleosides and Nucleotides.
Sawai, H.; Shimazu, M.; Wakai, H.; Wakabayashi H.; Shinozuka, K. (1992) *Nucleosides Nucleotides* 11, 773-785.
3. Facile Synthesis of Cap Portion of Messenger RNA by Mn(II) Ion-Catalyzed Pyrophosphate Formation in Aqueous Solution.
Sawai, H.; Wakai, H.; Shimazu, M. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32, 6905-6906.
4. Mg(II) Ion-Mediated Conversion of Mono- and Oligonucleotides to 5'-Polyphosphates in Aqueous Solution.
Sawai, H.; Inaba, Y.; Hirano, A.; Wakai, H.; Shimazu, M. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 4801-4804.

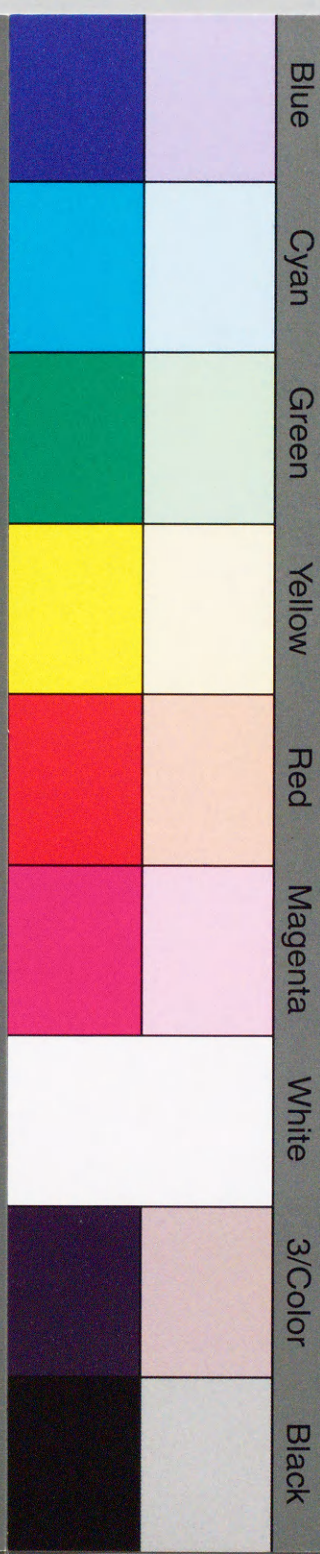
第4章および第5章

1. Facile and Stereoselective Synthesis of 2'-5' Oligothioadenylate by UO_2^{2+} Ion Catalyst.
Shimazu, M.; Shinozuka, K.; Sawai, H. (1992) *Nucleic Acids Symp.* 27, 105-106.
2. UO_2^{2+} -Catalyzed Oligothioadenylate Synthesis with High Regio and Stereoselectivity.
Shimazu, M.; Shinozuka, K.; Sawai, H. (1993) *Angew. Chem. Int. Ed.* 32, 870-872.

inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

