

氏 名 田 坂 基 行

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第549号

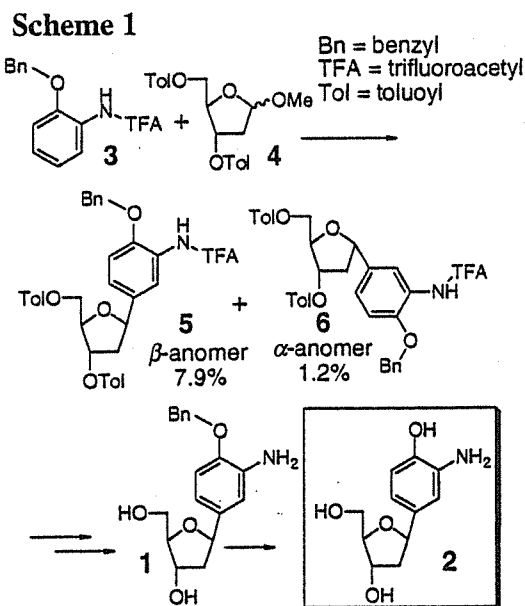
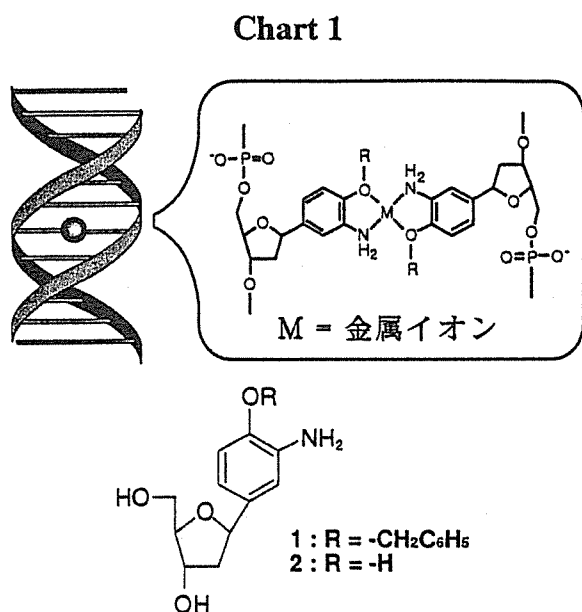
学位授与の日付 平成13年9月28日

学位授与の要件 数物科学研究科 機能分子科学専攻

学位規則第4条第1項該当

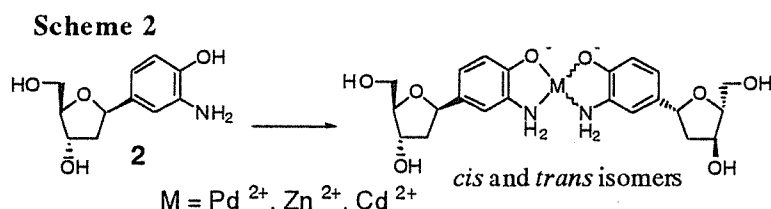
学 位 論 文 題 目 核酸塩基として2-アミノフェノールを有する人工DNAの
合成と金属錯生成による塩基対形成

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 田中 晃二
教授 小林 速男
教授 渡辺 芳人
教授 宇理須 恆雄
教授 塩谷 光彦（東京大学）
グループ リーダー 石田 斉（科学技術振興事業団）



水素結合は、DNA 塩基対認識において重要な役割を担っている。ワトソン-クリック型塩基対を化学的に修飾することによって、生化学や物質科学分野における新しい機能性分子の構築が期待できる。近年、多くの非天然型 DNA ヌクレオシドが合成されているが、ほとんどが天然型塩基対の水素結合パターンを修飾したものである。本研究では、DNA 塩基自体を金属配位子に変換することによって、水素結合を金属配位結合に置き換え、DNA 二本鎖形成における新しい結合様式を創り出すことを目指した。金属配位子である 2-アミノフェノール骨格を核酸塩基として導入した人工β-C-ヌクレオシドを合成し (Chart 1)、これをオリゴヌクレオチドに導入した。人工ヌクレオシド 1、2 では、2 価の金属イオンと 2:1 錯体を形成したときに、生じた塩基対が電荷的にそれぞれ +2 価、0 価になるように設計した。

2-アミノフェノール誘導体 3 と 2-デオキシリボース誘導体 4 との Friedel-Crafts カップリング反応により、目的物である β-アノマー 5 を選択的に得 (β-5 : α-6 = 7.9% : 1.2%)、さらに、3 段階の脱保護反応を行なうことにより人工ヌクレオシド 2 を得た (Scheme 1)。β-アノマー 5 の C1' 位の絶対配置は、X 線結晶解析と ¹H NMR による NOE 差スペクトル法により決定した。



人工ヌクレオシド 2 は、Pd²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺と 2:1 錯体を形成することを ¹H NMR 測定及び ESI-TOF マススペクトル測定により確認した。Pd²⁺錯体の場合、水溶液中で cis と trans の約 1:1 混合物であることが明らかにされた (Scheme 2, Figure 1)。

人工ヌクレオシド 1 をフオスフォロアミダイト

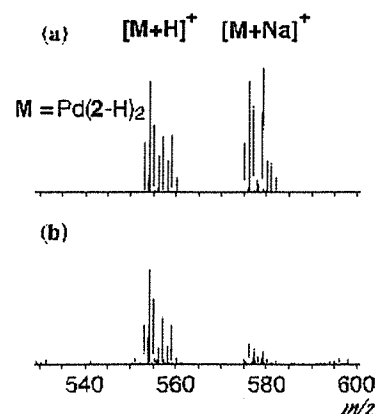
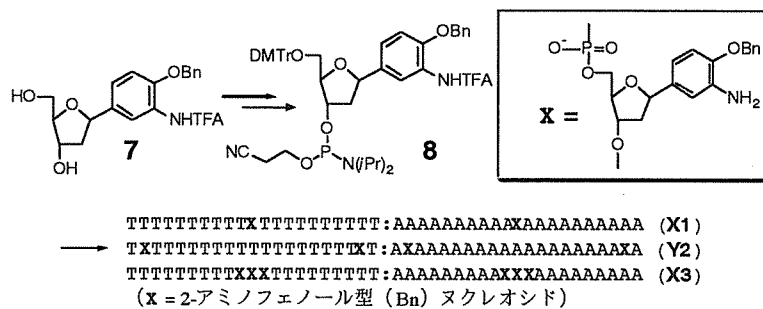


Figure 1 2-Pd²⁺ (2:1) の、ポジティブモードにおける ESI-TOF マススペクトル、m/z 530-600、(a) [M+H]⁺ 及び [M+Na]⁺ の理論的同位体分布 (b) 実験的同位体分布

固相合成法を用いて DNA オリゴマーへ導入し、 $dT_{21}-dA_{21}$ の中央に一つ導入した **X1**、端から二番目に一つずつ導入した **Y2**、また中央に三つ導入した **X3** を得たのち (Scheme 3)、これらの DNA オリゴマーに対する金属イオンの効果を融解実験などにより明らかにした。

Scheme 3



以上、本研究では、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドの合成法を確立し、 Pd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} との 2:1 錯体形成を明らかにした。これらの錯体は天然型塩基対に代わる新しい金属錯体型塩基対を提供するものである。さらに、本人工ヌクレオシドをオリゴヌクレオチドに導入し、二重鎖形成における金属イオンの効果を明らかにした。

論文の審査結果の要旨

本研究は、核酸塩基として 2-アミノフェノールを有する人工 DNA の合成法の確立と金属錯生成による塩基対形成の検討が行われた。水素結合は、DNA 塩基対認識において重要な役割を担っているが、化学的に修飾することによって、生化学や物質科学分野における新しい機能性分子の構築が期待されている。近年、多くの非天然型 DNA スクレオシドが合成されているが、ほとんどが、天然型塩基対の水素結合パターンを修飾したものである。本研究では、DNA 塩基自体を金属配位子に変換することによって、水素結合を金属配位結合に置き換え、DNA 塩基対の新しい結合様式を創り出すことを目指している。

金属配位子である 2-アミノフェノール骨格を核酸塩基として導入した人工 β -C-スクレオシドを合成し、これをオリゴヌクレオチドに導入する方法を行った。2-アミノフェノール誘導体と 2-デオキシリボース誘導体との Friedel-Crafts カップリング反応により、目的物である β -アノマー体を選択的に得 (β -体: α -体 = 6.5:1)、さらに、三段階の脱保護反応を行なうことにより、2-アミノフェノールを核酸塩基とする人工ヌクレオシドを得た。 β -アノマー体の C1'-位の絶対配置は、X 線結晶解析と ^1H NMR による NOE 差スペクトル法により決定した。この人工ヌクレオシドが、 Pd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} と 2:1 錯体を形成することを ^1H NMR 測定及び ESI-TOF マススペクトル測定により確認した。 Pd^{2+} 錯体の場合、水溶液中では *cis* と *trans* 異性体の 1:1 混合物を生成した。次に、本人工ヌクレオシドをフォスフォロアミダイト固相合成法により、 $\text{dT}_{21}\cdot\text{dA}_{21}$ の中央の一つないし三つ、あるいは両端の一つずつ導入した DNA オリゴマーを合成した。ベンジル保護基の除去は成功しなかったが、保護基をつけたままの DNA オリゴマーと各種金属イオンの相互作用を融解実験により評価した。その結果、 $\text{dT}_{21}\cdot\text{dA}_{21}$ の中央の一つの人工ヌクレオシドを導入したオリゴマーに Cu^{2+} イオンを添加した場合、 Cu^{2+} イオンが誘起する塩基対形成により、周囲の塩基対が不安定になり、二重鎖全体の安定性も低下することが明らかになった。一方、同条件下では、通常天然型 DNA の高次構造は安定化された。本結果は、人工塩基対の導入が、それが一つであっても、DNA の構造や安定性に大きな影響を与えることを示した。

本研究は、金属配位能を有する 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドの合成、構造、機能およびその誘導体を含む人工 DNA オリゴマーについて、従来にない人工 DNA 構築法を提供している。

以上の研究成果は、2 報の論文(英文:他に1報投稿準備中)としてまとめられている。本審査委員会では全員一致で、田坂基行氏の提出論文は学位を与えるに相応しいものと判定した。

面接による試験は、出願者に学位論文の内容を約1時間で発表し、その後、人工ヌクレオシドの合成法と機能・構造上の特性、人工ヌクレオシドを含む DNA オリゴマーと金属イオンとの相互作用の詳細を中心に1時間にわたって質疑応答を行い、活発な論議が展開された。多面的な質問に対しほぼ的確に答えるとともに、今後の研究の方向・解決すべき課題に対しても考えを持っていると判断された。

本論文は日本語で書かれているが、本論文の英文要旨および既に発表されている論文(英文)を中心に英語力を審査し、語学力に何等問題はないと判定された。

公開発表会における発表も良く整理されており、合格と認定した。