

平成 12 年度 博士論文

金属イオンにより誘起される
人工 DNA の自発的集合化

総合研究大学院大学
数物科学研究科
機能分子科学専攻

幡野 明彦

目次

第一章	序論	1
第二章	金属錯形成部位と核酸塩基部位を持った人工核酸モノマーのデザイン	10
2-1	緒言	11
2-2	金属錯形成を介し一本鎖 DNA を認識する人工核酸モノマーのデザイン	13
2-3	各種金属イオンと錯形成部位の錯形成定数と配位子交換速度	17
2-4	結果と考察	18
2-5	参考文献	19
第三章	一本鎖 DNA とグリシンを金属錯形成部位とした人工核酸モノマーの相互作用評価	20
3-1	緒言	21
3-2	結果及び考察	21
3-2-1	UV 淡色効果	21
3-2-2	三重鎖形成の検討	22
3-3	結果と考察	24
3-4	参考文献	25
第四章	エチレンジアミンを金属錯形成部位としたアデニン型人工核酸の金属錯体と一本鎖 DNA との相互作用	26
4-1	緒言	27
4-2	アデニン型人工核酸の金属錯形成の検討	29
4-2-1	各種金属イオンを用いた人工核酸モノマーの錯体合成と X 線結晶構造解析	29
4-2-2	^1H NMR による溶液中での錯形成評価	39
4-3	亜鉛錯体 (B) と一本鎖 DNA (dT) ₇₀ との相互作用の検討	42
4-3-1	UV 淡色効果と緩衝液の効果	42
4-3-2	UV 淡色効果と人工 DNA の濃度の効果	46
4-3-3	融解温度実験と塩強度の効果	48
4-3-4	Job plot 法による複合体形成様式の評価	52
4-3-5	軽水中でのイミノプロトン NMR 測定	55
4-3-6	CD スペクトル測定	60
4-4	アデニン型亜鉛錯体とチミン型亜鉛錯体との構造解析	62
4-5	結果と考察	64
4-6	総括	65
4-7	参考文献	66

第五章	実験方法	68
5-1	General Information	69
5-2	Abbreviations	70
5-3	Syntheses of Artificial DNA monomer	73
5-3-1	Adenine type 8	73
5-3-2	Thymine type 11	78
5-3-3	Guanine type 17	81
5-3-4	Cytosine type 20	84
5-3-5	Synthesis of 32	88
5-4	測定実験操作	92
5-4-1	DNA 合成機によるオリゴ DNA の合成	92
5-4-2	オリゴ DNA の簡易精製	92
5-4-3	オリゴ DNA 濃度決定	98
5-4-4	人工核酸モノマーと金属イオンによる錯形成と結晶化実験	98
5-4-5	UV 吸収スペクトル	99
5-4-6	CD スペクトル測定	103
5-4-7	軽水中でのイミノプロトン NMR 測定 (^1H NMR)	103
5-4-8	内部標準液を用いたサンプル濃度の決定	105
5-4-9	ストック溶液の調製	105
5-5	結果と考察	106
5-6	総括	110
5-7	参考文献	111
第六章	結論	112
	発表論文	115
	学会発表	116
	謝辞	119

博士論文の要旨

数物科学研究科機能分子科学専攻

ふりがな はたの あきひこ

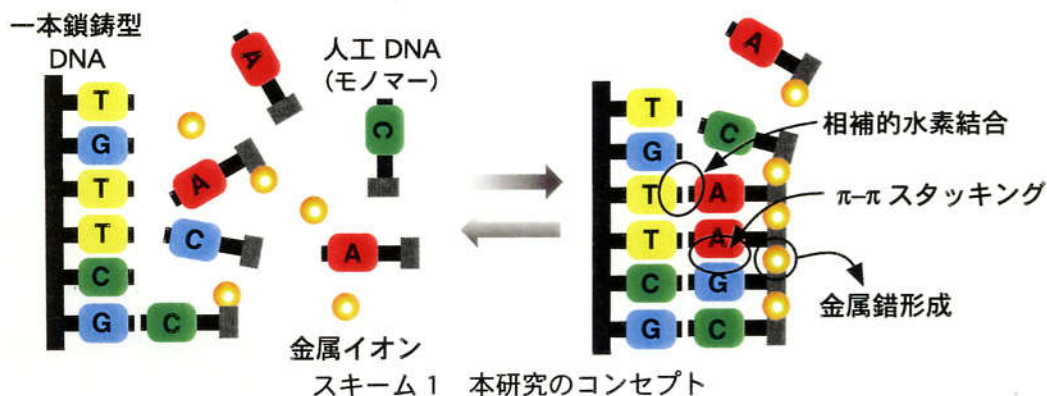
氏名 幡野 明彦

(学籍番号) 972505

学位申請論文

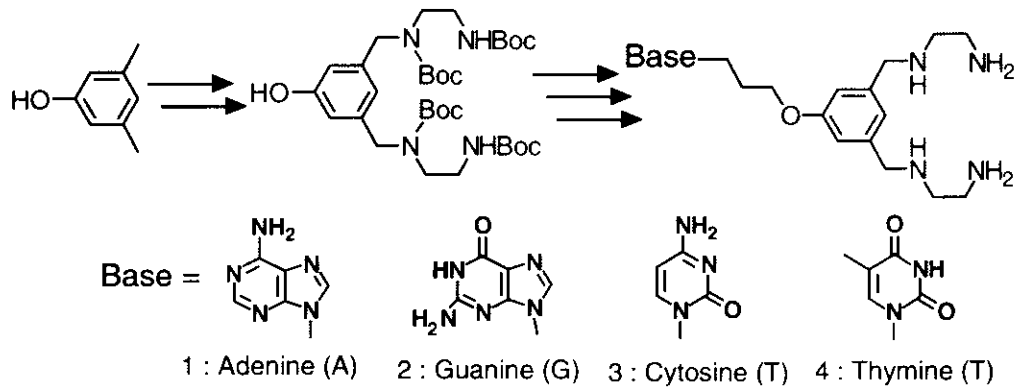
題目 金属イオンにより誘起される人工 DNA の自発的集合化

分子や官能基を任意の分子情報に従って配列化、集積組織化することにより、メモリー材料としての分子素子や医薬など、機能性分子の構築が期待できる。天然の DNA は、アデニンとチミン、グアニンとシトシンという二組の相補的水素結合による塩基対形成、上下の塩基対間でのスタッキングにより、相補的な一本鎖 DNA 同士が二重らせんを形成して生体の遺伝情報を蓄積している。DNA の塩基配列情報を利用して、目的の分子や官能基を思い通りに集積化することが可能になれば、機能性分子を設計する上で非常に有用な手法となりえる。



本研究では、DNA の主鎖を形成するリン酸ジエステル結合の代わりに、金属錯形成により主鎖を形成し、核酸塩基部位による相補的塩基対形成、スタッキングを介して天

然の一本鎖 DNA 上に自発的に集合化する分子システムの構築を目標とした (スキーム 1)。本システムでは、天然の DNA がリン酸ジエステル結合 (共有結合) により主鎖を形成するのに対し、分子間金属錯生成を通して可逆的に主鎖を形成することが期待できる。すなわち、任意の配列を有する一本鎖 DNA 上へ配列特異的に自発集積して二重鎖を形成し、鋳型 DNA の塩基配列情報を写し取ることが期待できる。



スキーム 2 化合物 1-4 の合成法

一本鎖鋳型 DNA に対して相補的に二重鎖を形成する分子として化合物 1-4 をデザイン・合成した (スキーム 2)。化合物 1-4 は、鋳型となる DNA と相互作用する核酸塩基部位 (A, G, C, T)、および二つの金属錯形成部位 (エチレンジアミン) を有する。本化合物 1-4 は、分子内で錯形成すること無く分子間で錯形成することが分子モデル等により予想された。

アデニン塩基をもつ化合物 1 と硝酸亜鉛による金属錯体 (以下 Zn^{II} complex) は、X 線結晶構造解析より、分子間で錯形成した一次元鎖状構造をとっていることがわかった (図 1)。 Zn^{2+} イオンには二分子の化合物 1 のエチレンジアミンユニットが *trans* 位に配位し、さらに軸位へ二つの水分子が配位した六配位八面体型構造を形成していることがわかった。この錯体は一つのユニットあたり二価の正電荷を有し、亜鉛-亜鉛間の距離は 7.718 Å であった。

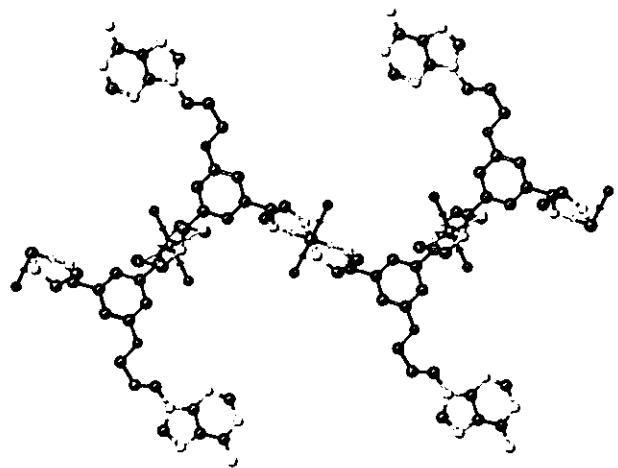


図 1 化合物 1 と硝酸亜鉛より生成した錯体の X 線結晶構造

鋳型 DNA として $(dT)_{70}$ を用い Zn^{II} complex との会合-解離過程を UV 吸収スペクトルの温度依存性により検討した。温度を 0 °C から 80 °C まで変化させたところ、核酸塩基由来の 260 nm の吸収が天然の DNA 同様に濃色効果を示した (約 70%)。この結果は、

低温における $(dT)_{70}$ - Zn^{II} complex 複合体内での塩基対間スタッキングによるものと考えられる。融解温度は $39^{\circ}C$ となり、降温と昇温で可逆性がみられた。

以上の結果より、一本鎖鋳型 DNA 上のモノマー人工核酸である Zn^{II} complex が集積化している可能性が示唆された。人工核酸モノマーが金属錯形成により主鎖を形成して一本鎖鋳型 DNA 上に集積化している可能性が示唆された一方、 Zn^{II} complex は一ユニットあたり

二価の正電荷を有するため、一本鎖 DNA 上に電荷による相互作用で凝集している可能性もある。Job plot 法による複合体の組成比の検討、円二色性スペクトルや NMR スペクトルによる相互作用の評価についても報告する。

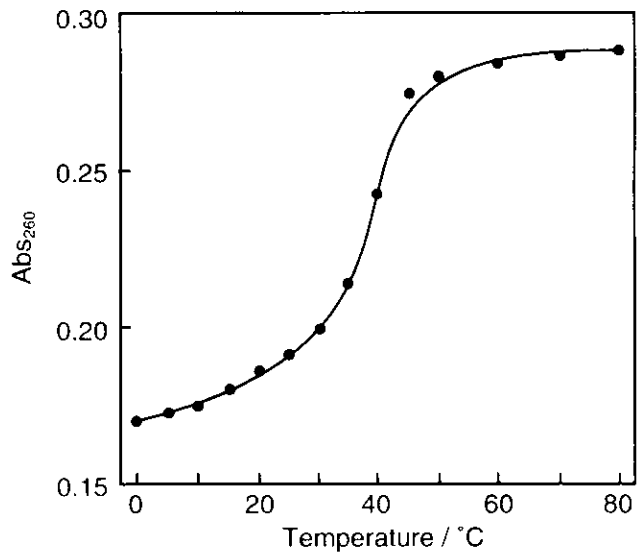


図2 $(dT)_{70}$ と Zn^{II} complex の融解温度曲線

Self-Assembly of Artificial DNA induced by Metal Coordination

Akihiko Hatano

Department of Functional Molecular Science, School of Mathematical and Physical Science

The Graduate University for Advanced Studies

The self-assembly of noncovalently linked molecular clusters of unique building blocks has currently received considerable attention. In particular, “template-directed” approaches are becoming common and have been accepted promising for the construction of the ideally pre-designed assembly. One of the most appealing paradigms of self-assembly in biological system is sequence-specific association between two complementary nucleic acid strands, and such processes play essential roles in most genetic events. DNA oligonucleotides have been intensively used as templates for reaction control on the template such as self-replication of the guest DNA components.

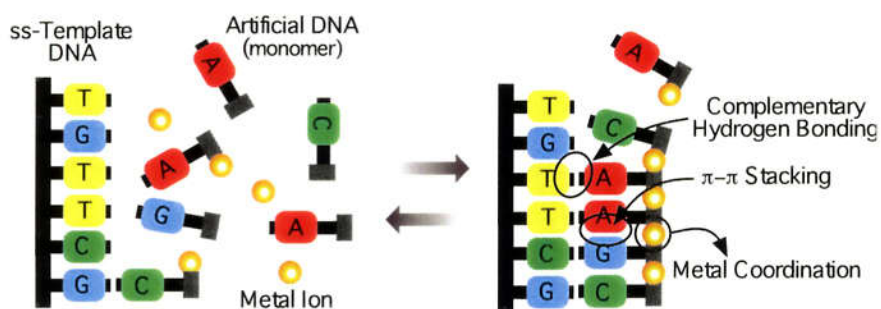
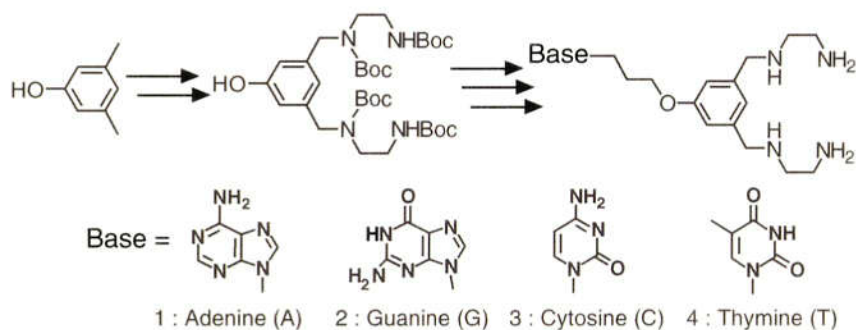


Chart 1. Our research concept.

As an approach to novel metal-assembled systems directed to a single-stranded DNA as the template (**Chart 1**), we have synthesized “chelator-type” nucleic acids mimics **1 - 4** (Scheme 1). Two metal binding sites and one nucleobase moiety were introduced into compound **1 - 4** so that they can undergo strand formation by intermolecular metal coordination thereby possibly interacting with a natural DNA strand through Watson-Crick base pairing.



Scheme 1.

Compound **1** was synthesized from 3,5-dimethylphenol, according to Scheme 1. The phenolic intermediate serves as a common intermediate for the introduction of each nucleobase at the phenolic position. Here we present the experimental data with respect to an adenine mimic **1**. The adenine mimic **1** reacted with $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{NO}_3)_2$ in water to form Zn^{II} complex **2**. The molecular structure of the Zn^{II} complex was characterized by single-crystal X-ray crystallography. Each ethylenediamine moiety binds to Zn^{II} to form a *trans*- N_4 -plane, and two water molecules at the axial positions complete the octahedral structure (Figure 1). Adenine analogues **1** are intermolecularly linked together by Zn^{II} ions that provide the driving force for polymerization by imposing an octahedral coordination geometry at each site. Although the $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-Zn}^{\text{II}}$ distance of 7.718 Å is rather longer than the average distance between adjacent phosphodiester groups in the same chain of B-DNA (*ca.* 6 Å), molecular modeling studies indicated that this complex is structurally flexible enough for complementary binding to a single-stranded natural DNA.

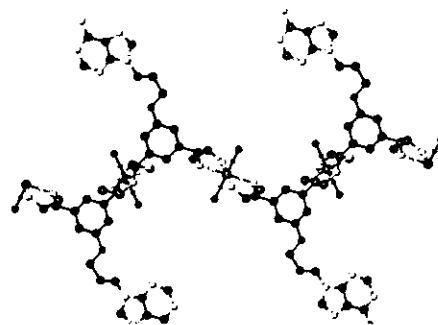


Figure 1. The crystal structure of Zn^{II} complex **2**.

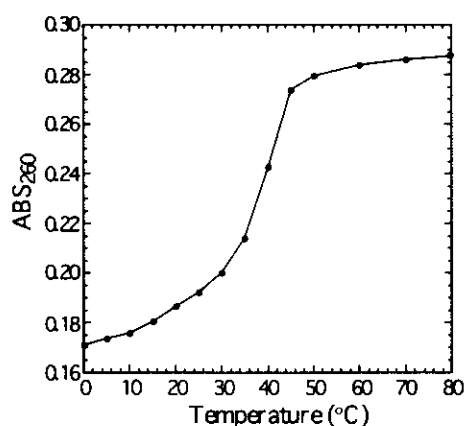


Figure 2. Temperature-dependency of a 1 : 1 mixture of Zn^{II} complex **2**.

We then examined interactions of the Zn^{II} -assembled adenine polymer with oligo $(\text{dT})_{70}$ using UV absorption changes. Figure 2 shows the temperature-dependency of the absorption at 260 nm for a 1 : 1 mixture of Zn^{II} complex and $(\text{dT})_{70}$ ($[\text{Zn}^{\text{II}} \text{ complex}] = [(\text{dT})_{70}] = 15 \mu\text{M}/\text{base}$, 1 mM Mops buffer at pH 7.0) when the solution temperature was elevated from 0 °C to 80 °C. An absorption break was observed at 39 °C, and almost the same curve was obtained even when the temperature was changed downwardly. This behavior is common in the naturally occurring nucleic acids.

The Zn^{II} complex thus preferably associates with a natural DNA oligomer probably through electrostatic and hydrogen bonding interactions accompanied by hydrophobic effects. Such artificially-designed nucleic acid components that can undergo metal-assisted assembly in a reversible fashion would provide novel molecular array systems directed to information-bearing DNA or RNA for applications not only to metallo-antisenses for gene regulation but also to molecular memory devices or molecular wires.

第一章

序論

1 Akihiko Hatano, Hiromasa Morishita, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiko Shionoya

"Metal-Assisted Formation of Artificial Nucleic Acids "

Nucleic Acids Symp. Ser., **39**, 171-172, 1998.

2 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya

"Self-Assembly of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics into a Single-Stranded

Zn^{II} Coordination Polymer "

Chem. Lett., 822-823, 2000.

3 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya, .

"Syntheses of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics: Metal-Assisted Assembly
of Guanine Mimics onto an Oligocytosine "

in preparation.

プログラムされた分子を用いることにより、その情報に従って分子や官能基を配列化したり¹⁾、有機配位子と金属イオンを集積化する自己組織化に関する研究が近年盛んに行われている²⁾。ある閉じた系に、プログラムした情報を与えることにより、無秩序な状態から秩序のある構造を誘起することができ、一次元の配列化から二次元、三次元の構造をもプログラムできる可能性がある^{3,4)}。M. Eigen は、自己組織化について以下のように言っている。「始めランダムな状態しか示さないものが、ランダムな条件が重なり適切な外部条件の下でマクロな機能性組織体に成長する。」このように、外部からの情報に従い分子や官能基を任意の配列、任意の構造に分子レベルで構築することができれば、機能をプログラムした分子の設計合成等に応用できるものと考えられる⁵⁾。

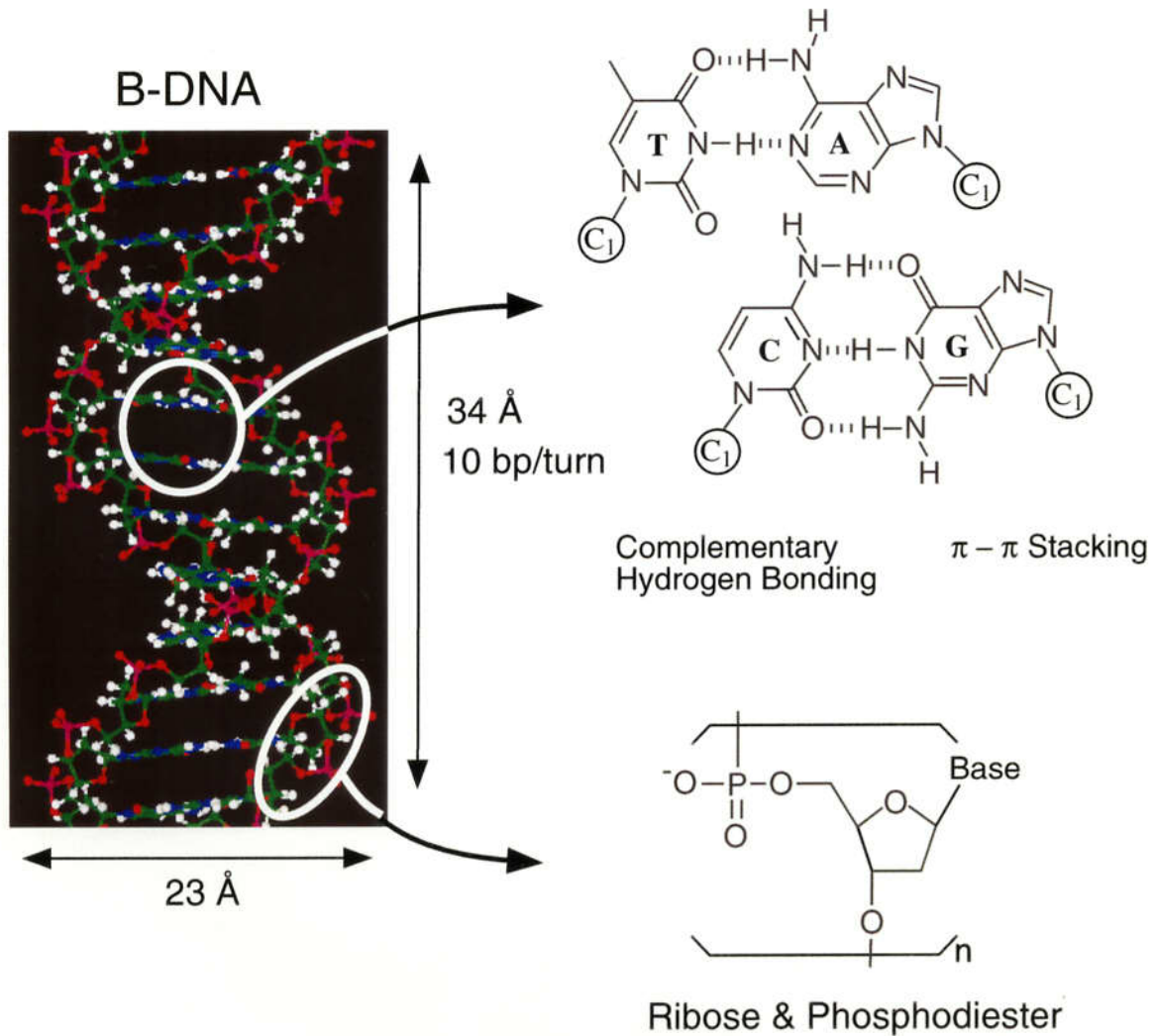
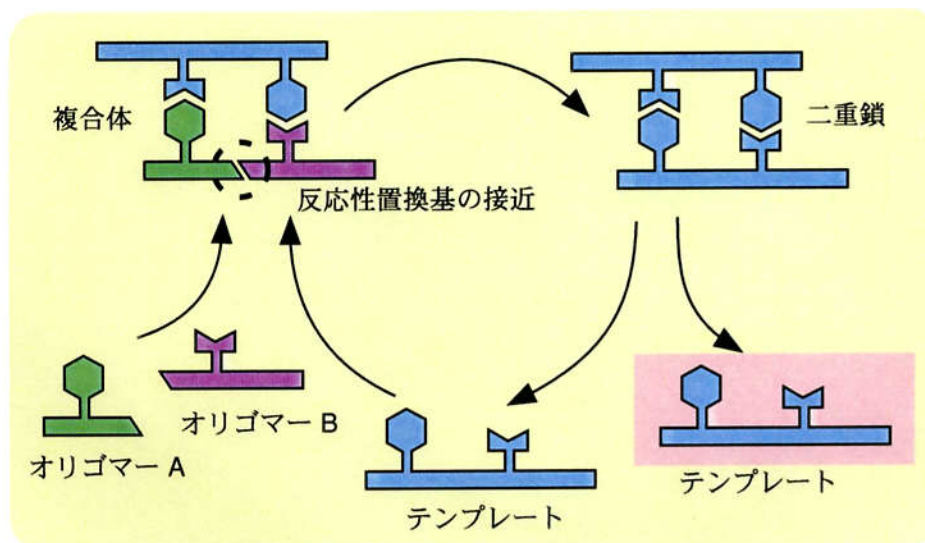


図 1-1 DNA の構造

DNA は生命の遺伝情報を司る生体分子である。リボースが 3', 5'- 位でリン酸ジエステル結合を介して共有結合的につながり、四種類の核酸塩基であるアデニン、チミン、グアニン、シトシンが相補的に水素結合、スタッキングを形成して一本鎖同士が相互作用して二重らせん構造をなしている (図 1-1)。この塩基の配列がタンパク質の一次配列をコードしており、RNA を介してタンパク質の設計図となっている⁷⁾。この DNA の二本鎖らせん構造は、Watson と Crick により 1953 年発表された。当時は X 線繊維回折測定であったため、その構造解析は非常に困難であった。アデニンとチミン、グアニンとシトシンが相補的に水素結合を形成して塩基対を形成して二重らせん構造をとる、という発表はその後の分子生物学の発展の大きな原動力となり、20 世紀最大の発見とも言われている。

DNA が塩基配列の形で情報を蓄積する分子であると見なすと、その塩基配列を利用した様々な機能性分子の構築が可能である。DNA に見られる自己複製は、生命誕生後の生物の進化、及び機能を有した分子情報の蓄積、複製という観点から非常に興味深い。一本鎖 DNA を情報源として、その相補的なオリゴ DNA を非酵素的に合成する試みが Orgel⁸⁻¹¹⁾, von Kiedrowski^{12,13)} らによって行われた。彼らの系では生成したオリゴ DNA



L. E. Orgel et. al.⁸⁻¹¹⁾, G. von Kiedrowski et. al.^{12,13)}

図 1-2 核酸の非酵素的複製

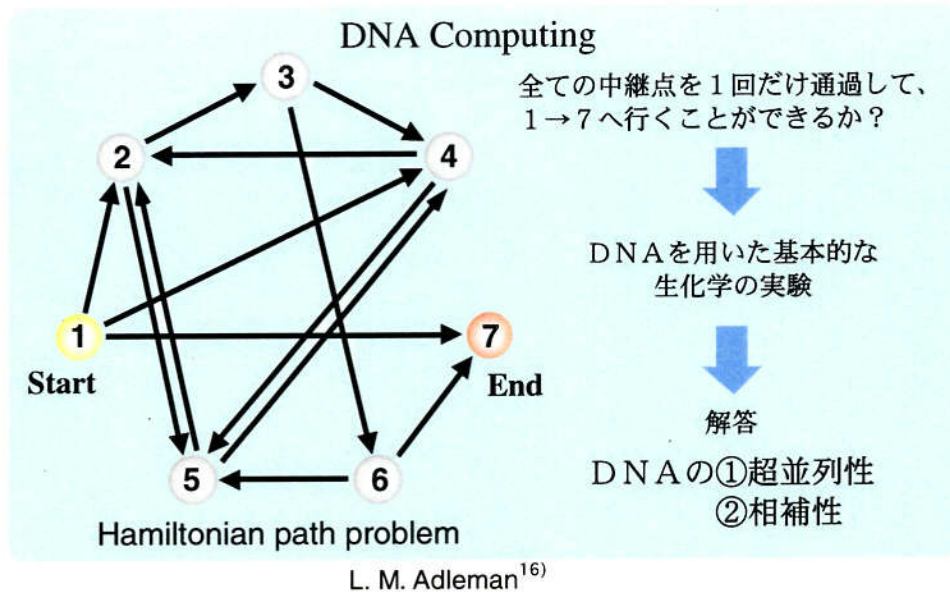


図 1-3 DNA Computing (Hamiltonian 経路問題)

が元の鋳型 DNA と同じ構造になり、鋳型として働く。求核性官能基と脱離基を導入し、縮合剤の存在によって非酵素的に自己複製する系である。また Rebek Jr. らは、自己複製する人工分子を報告している¹⁴⁾。原始地球ではこのような簡単な分子が自己複製の主役であった可能性は充分考えられる。近年タンパク質での系も自己複製の系が報告された¹⁵⁾。

DNA の持つ情報とその高い分子認識能を利用して数学の計算問題を解いたという画期的な研究が Adleman によってなされた。図 1-3 に示すような有効グラフがあるとき、1 からすべての数値を一回ずつ通って 7 に至る経路を解く、Hamiltonian 経路問題を DNA を用いて解くことができたと報告した¹⁶⁾。この研究はいわゆる DNA computing とされるもので、DNA が次世代の演算素子の候補になりうることを実験的に示したものである。

DNA を分子や微粒子を配列化させるための手法として用いた研究もある(図 1-4)^{17,18)}。金微粒子上に金チオールを介して一本鎖オリゴ DNA を結合させハイブリダイゼーションさせることこれにより、金微粒子が図 1-4 のような集合体を形成することを報告した。また温度変化により金集合体の色が変わることも報告した¹⁹⁾。DNA - 金微粒子複合体が温度センサーとして利用できることを示し、機能性分子を構築した例である。

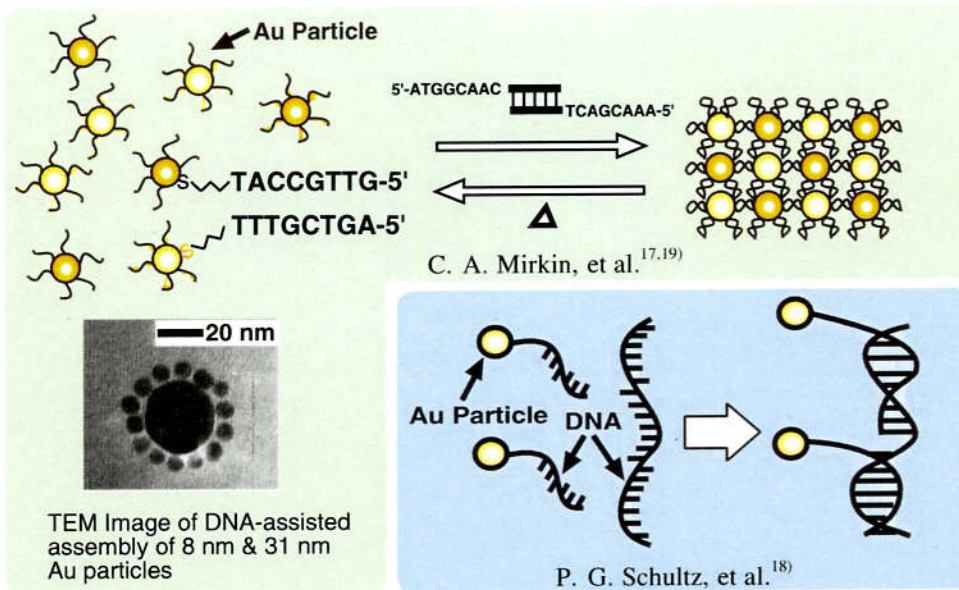


図 1-4 金微粒子の集積化に DNA を利用した例

また DNA の特徴を利用して機能性分子を構築した例がいくつかある。岡畑らは DNA がロッド上のポリアニオン高分子であることに注目し、カチオン性脂質を静電的に作用させ、有機溶媒中に均一に溶解する DNA-Lipid complex を調製することに成功した (図 1-5)²⁰⁾。この研究では複合体を形成させることにより、有機溶媒中でも DNA が二重らせんを形成したことを報告した。また、DNA フィルムを調製して延伸処理することで DNA を配向制御することに成功し、さらに DNA を用いた偏光膜の作製にも展開した。

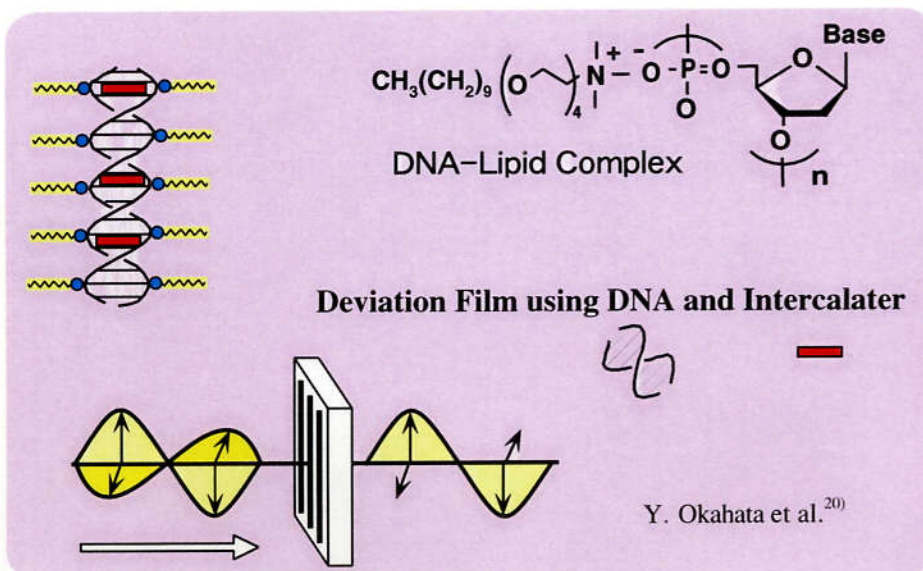


図 1-5 有機溶媒に DNA を可溶化した例

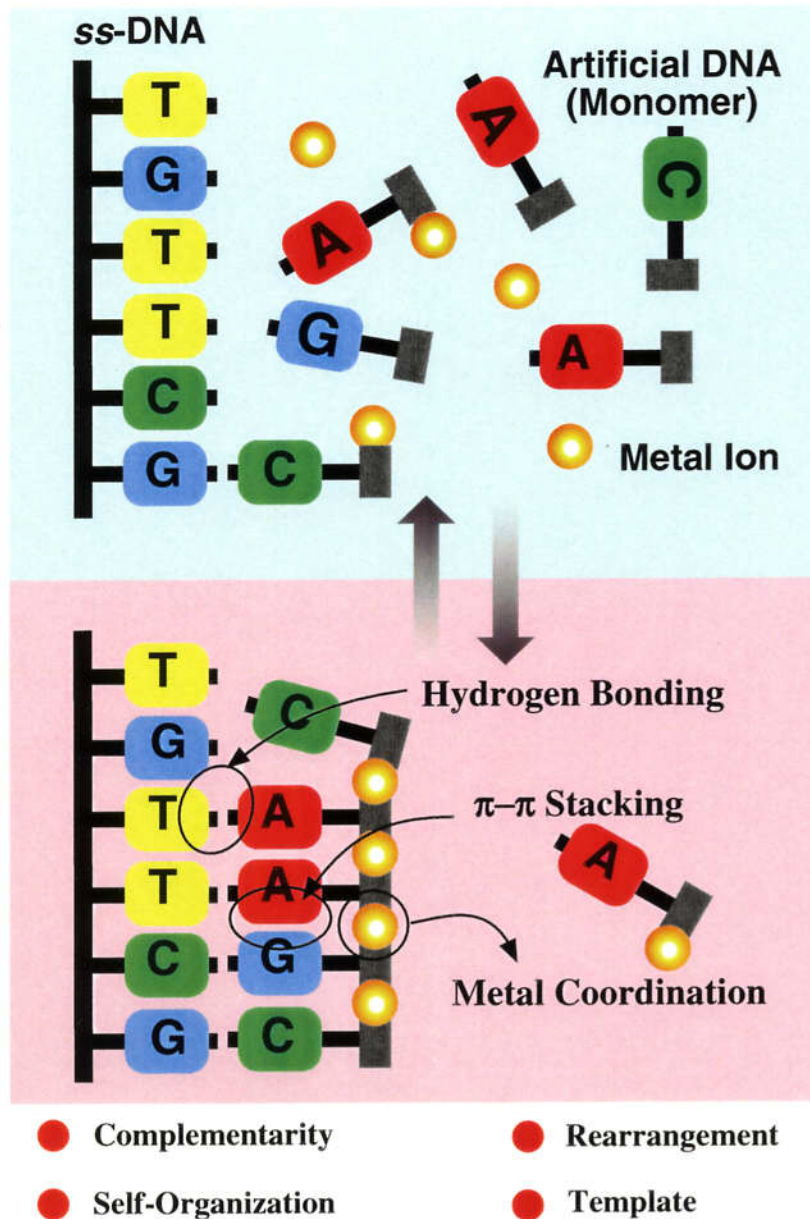


図 1-6 本研究の概念図

このように、生体分子の優れた特徴を利用して自然界には存在しない機能性分子を構築する研究は、生物学的あるいは機能材料科学の観点から非常に興味深く、天然の系を凌駕した機能性分子の構築への道が開かれることが期待される。

本研究では、DNA が持つ塩基配列情報に注目して、その情報(塩基配列)に沿って官能基や分子を配列、集積化するシステムを構築することを目指した(図 1-6)。具体的には、一本鎖 DNA を鋳型にして、核酸塩基を特異的に認識し、上下の塩基対間でスタッキングを形成するような相補的な核酸塩基部位、そして主鎖を形成するための二つの錯

形成部位を持つ分子、すなわち人工 DNA のモノマーの設計・合成に着手した。このモノマー分子は、金属錯形成によって主鎖を形成し、一本鎖鋳型 DNA と相補的な水素結合形成、スタッキングを介すことにより二本鎖形成することが期待された。よって一本鎖鋳型 DNA の配列情報を基にして分子が配列化、集積化するような分子システムが構築できると期待される。適度な配位子交換速度を持つ金属イオンを選ぶことにより可逆的な配列変換が起こり、テンプレートと相補的な熱力学的に安定な配列が形成されるものと考えられた。

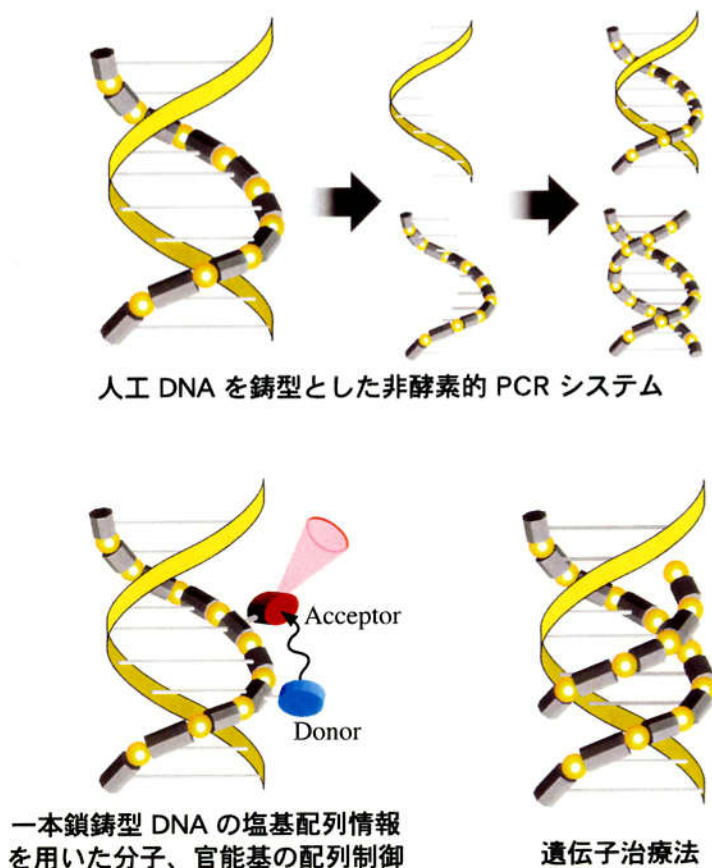


図 1-7 人工 DNA を応用したアプリケーション

本研究を応用すれば、金属錯体により主鎖を形成した人工 DNA による PCR (polymerase chain reaction) システムの構築が期待できる。例えば、テンプレート DNA が存在している溶液中に、四種類の人工核酸モノマーと金属イオンを添加する。アニーリングを行うと一本鎖鋳型 DNA の配列に対応して、人工核酸が金属錯形成を介して主鎖を形成して相補配列で整列する。アニーリングを行い二本鎖を解離後、四種類

のモノマー核酸と金属イオンを再び添加して温度を低下させると、相補配列であった人工 DNA もテンプレートとなり、DNA の配列情報はポリメラーゼを使う必要なく増幅することができると考えられる。

また、ドナー分子とアクセプター分子間の距離を制御する分子システムを構築することにより、エネルギー移動や電子移動のコントロール、あるいはそれらに伴うシグナル発信の制御ができる可能性がある。具体的には、任意の一つの人工 DNA にドナー分子を、また異なる塩基の人工 DNA にアクセプター分子をつけ、一本鎖鋳型 DNA とハイブリダイゼーションを行う。一本鎖鋳型 DNA に目的に合わせた塩基配列を与えることにより、人工 DNA の並び方、すなわちドナーとアクセプターの距離を変化させることができ、それらの間で起こる反応、相互作用の程度をコントロールできる可能性がある。

また、天然の DNA とは異なるためヌクレアーゼ耐性が期待でき、アンチジーン法等の遺伝子治療等にも応用が期待できる (図 1-7)。

本研究では、人工 DNA と天然の一本鎖鋳型 DNA との相互作用が、天然の二本鎖 DNA を形成するための相互作用 (水素結合形成、スタッキング) と同じであることを確認することを目的とした。前述した人工 DNA を設計・合成して、金属イオンとの錯体を形成した。生じた錯体の X線結晶構造解析により、分子構造を確認し、天然の一本鎖 DNA と特異的な相互作用を形成することができるかという基本的な相互作用の確認を各種分光学的な手法を用いて行った。スタッキングによる UV 淡色効果、複合体形成を Job plot、水素結合形成をイミノプロトン NMR によって確認することを行った。

一本鎖鋳型 DNA をテンプレートとしてヌクレオシドを配列特異的に配向化する研究は、Orgel⁸⁻¹¹⁾, von Kiedrowski^{12,13)} らによって研究されている。しかし、どのような一本鎖鋳型 DNA の配列に対しても可逆的に、そして相補的に配向化する分子システムの構築例は未だ報告されていない。本研究では人工 DNA の主鎖が金属錯形成により構築されるため、金属錯形成の特徴である配位子交換により可逆的に相補鎖形成する人工 DNA の構築を目標としたので報告する。

参考文献

- 1) U. Koert, M. M. Harding, and J.-M. Lehn, *Nature*, **346**, 339, 1990.
- 2) M. M. Conn, and J. Rebek, Jr., *Chem. Rev.*, **97**, 1647, 1997.
- 3) S. Hiraoka and M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10239, 1999.
- 4) 妹尾学、荒木孝二、大槻穰、「超分子化学」、東京化学同人、1998.
- 5) M. Eigen, *Naturwissenschaften*, **58**, 465, 1971.
- 6) J. J. Storhoff and C. A. Mirkin, *Chem. Rev.*, **99**, 1849, 1999.
- 7) J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature*, **171**, 737, 1953.
- 8) T. Inoue and L. E. Orgel, *Science*, **219**, 859, 1983.
- 9) W. S. Zielinski and L. E. Orgel, *Nature*, **327**, 346, 1987.
- 10) L. E. Orgel, *Nature*, **358**, 203, 1992.
- 11) L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.*, **28**, 109, 1995.
- 12) G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **25**, 932, 1986.
- 13) B. G. Bag and G. von Kiedrowski, *Pure Appl. Chem.*, **68**, 2145, 1996.
- 14) T. Tjivikua, P. Ballester, and J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1249, 1990.
- 15) K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, and M. R. Ghadiri, *Nature*, **389**, 706, 1997.
- 16) L., M. Adleman, *Science*, **266**, 1021, 1994.
- 17) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff, *Nature*, **382**, 607, 1996.
- 18) A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez Jr., and P. G. Schultz, *Nature*, **382**, 609, 1996.
- 19) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, and C. A. Mirkin, *Science*, **277**, 1078, 1997.
- 20) K. Tanaka and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10679, 1996.

第二章

金属錯形成部位と核酸塩基部位を持った

人工核酸モノマーのデザイン

- 1 Akihiko Hatano, Hiromasa Morishita, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiko Shionoya

"Metal-Assisted Formation of Artificial Nucleic Acids "

Nucleic Acids Symp. Ser., **39**, 171-172, 1998.

- 2 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya

"Self-Assembly of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics into a Single-Stranded

Zn^{II} Coordination Polymer "

Chem. Lett., 822-823, 2000.

- 3 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya

"Syntheses of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics: Metal-Assisted Assembly

of Guanine Mimics onto an Oligocytosine "

in preparation.

2-1 緒言

DNA は生命の遺伝情報を司る生体分子で、遺伝情報の伝達やタンパク質合成系にとって非常に重要である。4 種類の核酸塩基 (アデニン、チミン、グアニン、シトシン、RNA ではチミンの代わりウラシル) の一次元配列がアミノ酸配列情報を持ち、相補的な塩基同士で水素結合、スタッキングを形成して二重らせん構造を構築している¹⁾。DNA はその特異的な配列を利用し、複製、RNA への転写等、優れた機能を持ち合わせている。このような DNA の構造、機能を利用した機能性分子に関する研究は、近年ますます盛んになってきている。

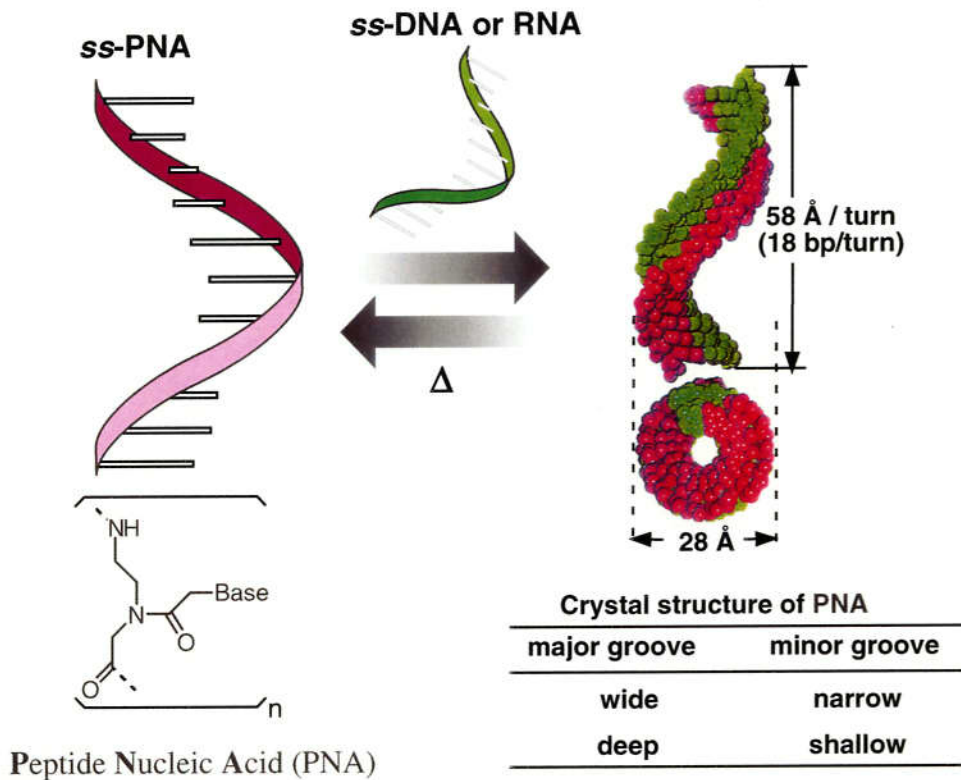


図 2-1 DNA アナログであるペプチド核酸 (PNA) の構造^{2,3)}

天然の DNA と配列特異的に相互作用する分子として、1991 年に Nielsen らによって開発された PNA (ペプチド核酸) が知られている²⁾。PNA は (2-アミノエチル) グリシンを主鎖骨格に持ち、側鎖に核酸塩基を有する核酸類似体である (図 2-1)。その構造は、

18 塩基対で二重らせん構造が一回転し、そのピッチは 58 Å であるという特徴をもっている。天然の B-DNA は 10 base/turn で 34 Å であることから、かなり伸びた構造をしている^{3,4)}。PNA は無電荷であり核酸と相互作用するときの静電的な反発が無く、天然の二本鎖 DNA, RNA 以上の親和性を示すことが知られている。一方、溶解性が悪いという欠点もある。

本研究では、DNA の塩基配列情報をテンプレートとして可逆的、配列特異的に集積化する人工 DNA 分子のデザイン・合成を行った。本人工 DNA は、金属錯形成によって主鎖を形成し、鋳型 DNA と相補的な水素結合形成、スタッキングを介して二本鎖を形成すると期待される。本章ではそのような人工 DNA のデザインについて詳細に述べる。デザインした分子は、核酸塩基部位を有することによりテンプレート DNA と水素結合、スタッキングを介して相補的な塩基対を形成することができ、可逆的に配列変換ができるよう主鎖のリン酸ジエステル結合の代わりに、金属錯形成部位を導入する必要があると考えた。金属錯形成による可逆的な配位子交換により、どのような配列の一本鎖 DNA に対しても相補的に配列化できることが重要であると考えた。このように情報を持つ鋳型に応じて自発的集合化する分子システムを構築することは、人工的な PCR システムの構築や、機能性分子の配列制御、遺伝子治療などの観点からも大変興味深い。

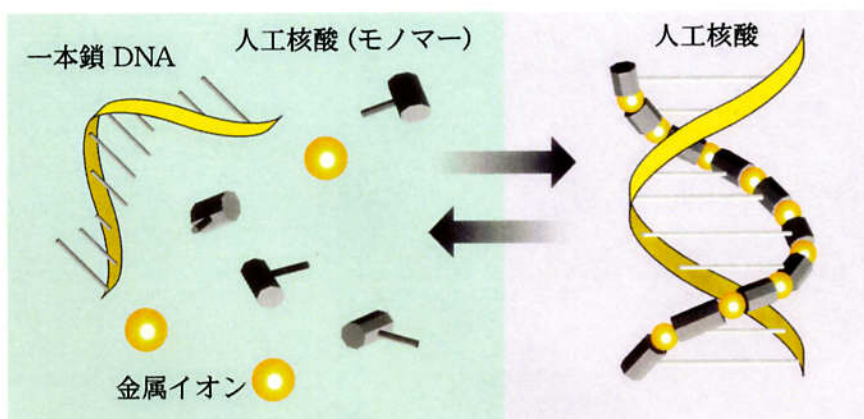


図 2-2 金属錯形成によって誘起される人工 DNA の一本鎖鋳型 DNA 上への集積化

2-2 金属錯形成を介し一本鎖 DNA を認識する人工核酸モノマーのデザイン

テンプレートの一本鎖 DNA の塩基配列に対して自発的に配列、集積化する人工 DNA 分子を設計するにあたり、以下の点について留意した。

- 1 核酸塩基部位を有する
- 2 金属配位部位を二つ持ち、分子間で錯形成する
- 3 柔軟な構造を持つ
- 4 合成が容易である

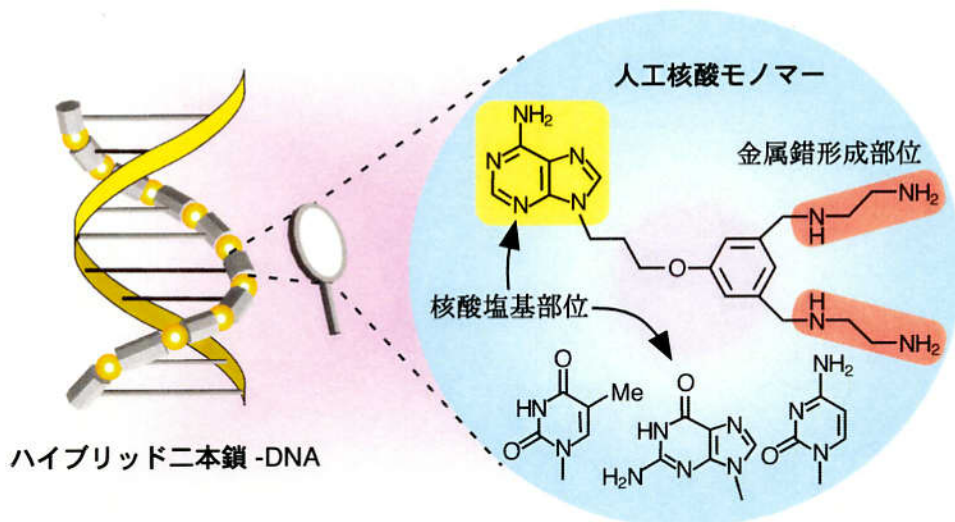


図 2-3 人工核酸のデザイン

以上の点に留意しつつ図 2-4 に示すような化合物を設計し、CPK モデル、Insight II コンピューターモデリングを行い、錯形成したときの主鎖の方向と二本鎖を形成したときの核酸塩基部位の水素結合形成、分子内錯形成が起こるかどうかについて検討を行った。

化合物 (a) は 1,3-diamino-5-hydroxypropane 骨格を有した化合物で、錯形成部位はグリシンである。(b) は、スレイトールを主骨格として、金属錯形成部位としてプロピレンジアミンを用いた化合物である。(c) ~ (e) の化合物は、中心にベンゼン環、トリアジン環を導入することで核酸塩基部位と二つの金属結合部位を三方向に配置した構造

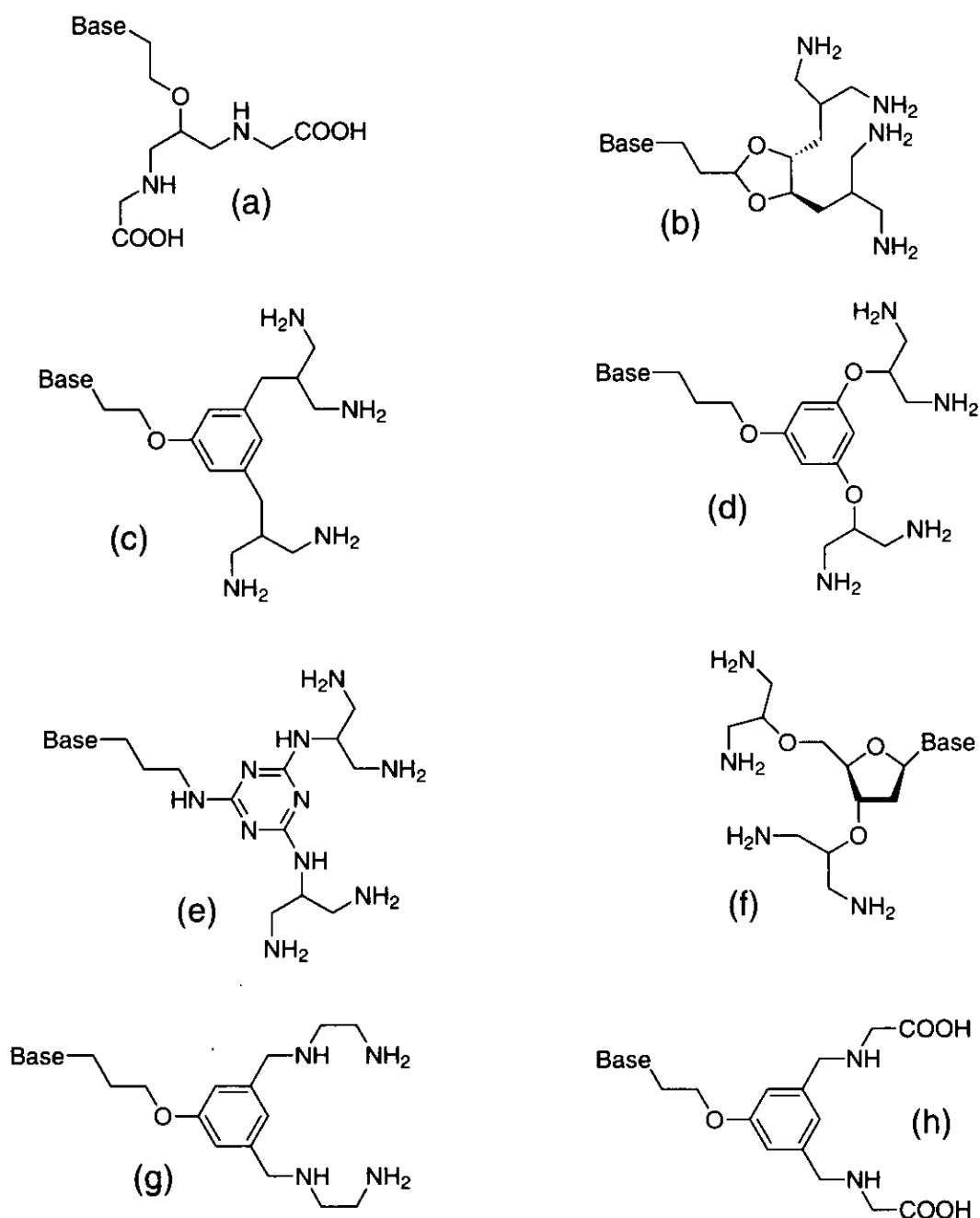


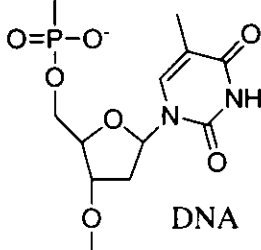
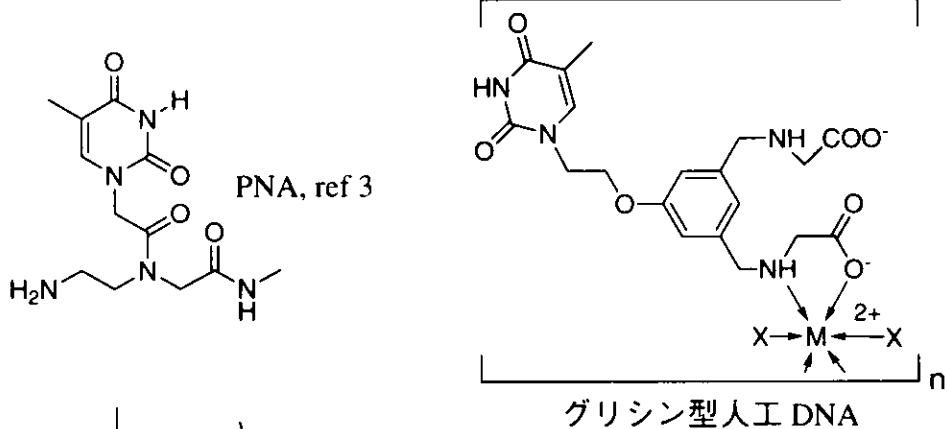
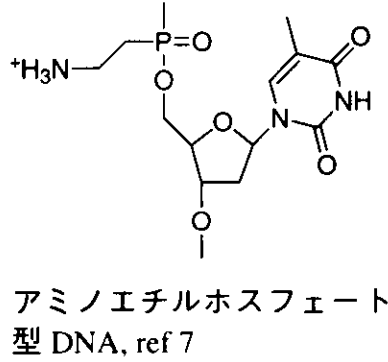
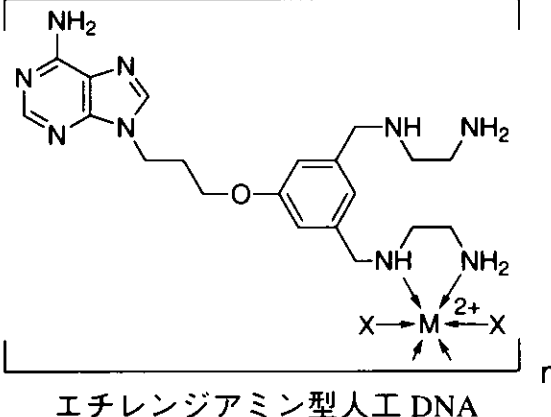
図 2-4 核酸塩基部位と二つの金属錯形成部位を持つ人工核酸のデザイン

を持つ。(f) は天然の DNA の構造により近いものであり、リボース骨格に、3', 5' にプロピレンジアミンを導入したタイプである。化合物 (g) は、二つの金属錯形成部位が分子内で金属イオンを捕捉しないようにフェニル基を中心に持ち、ベンジル位にエチレンジアミンを導入したタイプである。(h) は (g) と同様の骨格を持ち、錯形成部位にグリシン

を用いた。グリシンと金属イオンの錯形成定数はエチレンジアミン等、アミン性官能基と比較すると低い(表 2-2)、錯形成と水素結合、スタッキングが協同的に働くことにより一本鎖 DNA と複合体形成することが期待された。分子モデリングにより分子内錯形成が起こらないことが確認できたのは、化合物 (g), (h) であった。

次に錯体を形成したときの電荷について、化合物 (g), (h) で考えた(表 2-1)。天然の DNA との相互作用を考えると、電荷は非常に重要な因子であり⁵⁾、例えば天然の DNA 同士の本鎖形成の場合、低い塩強度ではリン酸アニオン間の反発により二重鎖は不安定化される。また高い塩強度ではリン酸アニオン同士の反発を抑制する効果があり二重鎖を安定化するが、塩強度が高すぎると DNA の結合水をとってしまい、安定な構造が変わってしまう(例 B 型→A 型)。また PNA は無電荷であり、同じ配列では天然の DNA 二本鎖の場合より高い融解温度(T_m : 温度により二本鎖が一本鎖に解離する中点)を示すことが知られている⁶⁾。塩強度が増加するにつれて、 T_m 値は低下する⁶⁾。Cook らは、主鎖のリン酸ジエステル結合を 2-アミノエチルフォスフォネートに誘導した DNA 誘導体を合成し、中性領域ではアミノ基がプロトン化することを利用して、アニオン性の天然型 DNA と相互作用するときの静電的な効果を検討した(表 2-1)⁷⁾。DNA との複合体は無電荷となり、 T_m 値は上昇した。また塩強度の効果はほとんど見られなかった。グリシン型人工 DNA である (h) は、二価の金属イオンと錯形成したとき電荷は 0 になると考えられた。エチレンジアミン型人工 DNA の場合は、+2 価の電荷を持つので、天然の DNA と 1:1 複合体を形成したときはユニットあたり +1 価となるとが予想される。したがってエントロピー的に不利な条件である二重鎖形成を静電的な相互作用により補助することが期待できる。

表 2-1 天然 DNA と人工 DNA の電荷数との比較

電荷	天然の DNA と人工核酸
-1	 <p>DNA</p>
0	 <p>PNA, ref 3</p> <p>グリシン型人工 DNA</p>
+1	 <p>アミノエチルホスフェート型 DNA, ref 7</p>
+2	 <p>エチレンジアミン型人工 DNA</p>

人工 DNA については、2 価の金属イオンと錯生成したときの電荷数を示す。

2-3 各種金属イオンと錯形成部位の錯形成定数と配位子交換速度

デザインした化合物の金属錯形成部位である、グリシン、エチレンジアミンと金属イオンとの錯形成定数を比較すると、表 2-2 の様になることがわかった。例えばグリシンと亜鉛の ML_2 錯体の結合定数は、 $\log K = 9$ ⁸⁾ であり、エチレンジアミンと亜鉛の ML_2 錯体は $\log K = 11$ ⁹⁾ である。また、パラジウムイオンを除いては、総じてエチレンジアミンの方が各種金属イオンと安定な錯体を形成するということが予想できた。

次に、金属イオンに配位している水分子が、他の水分子と置き変わる交換速度を比較してみると(表 2-3)¹⁰⁾、亜鉛イオン 3×10^7 、銅イオン 5×10^8 、ニッケルイオン 3×10^4 と速い交換速度を示すが、白金イオンやパラジウムイオンでは、非常に遅い交換速度を示すことが分かった。配位子交換反応が起こることによって、鑄型である一本鎖 DNA の配列と相補的になり、熱力学的に安定な構造である相補的な配列を形成するものと予想できた。従って、安定な錯体を形成し、配位子交換速度は速い金属である、亜鉛イオンと銅イオンを用いて錯体を形成することにした。

表 2-2 グリシン・エチレンジアミンと各種金属イオンとの錯形成定数

金属イオン	錯形成定数 ($\log K$, 25 °C)	
	グリシン	エチレンジアミン
Zn ²⁺ (亜鉛)	9.06	10.97
Cu ²⁺ (銅)	14.97	20.82
Ni ²⁺ (ニッケル)	10.50	13.82
Cd ²⁺ (カドミウム)	7.60	10.21
Pb ²⁺ (鉛)	7.70	8.45
Pt ²⁺ (白金)	-	36.50
Pd ²⁺ (パラジウム)	27.50	18.40

表 2-3 各種金属イオンの内圏水和水の交換速度¹⁰⁾

金属イオン	交換速度 (s ⁻¹)
Zn ²⁺ (亜鉛)	3 × 10 ⁷
Cu ²⁺ (銅)	5 × 10 ⁸
Ni ²⁺ (ニッケル)	1 × 10 ⁴
Cd ²⁺ (カドミウム)	3 × 10 ⁸
Pd ²⁺ (パラジウム)	slow

2-4 結果と考察

本研究では、分子内で錯形成せず、分子間で錯形成することにより主鎖を形成した一次元ポリマーあるいはオリゴマー型の人工 DNA を作製し、天然の DNA 鎖と相互作用する人工 DNA モノマー (g), (h) のデザインを行った。核酸塩基部位としては天然の DNA のアデニン・チミン・グアニン・シトシンを利用して相補的な水素結合形成、スタッキングの力が働く様にして、金属錯形成部位としては、エチレンジアミン・グリシンを導入して分子間で錯形成するような分子をデザインした。金属イオンとしては、エチレンジアミン、グリシンと結合定数が高く、配位子交換反応が速い、亜鉛イオン、銅イオンを主として用い、実験を行うことにした。

以下、第三章は化合物 (h)、第四章は化合物 (g) について一本鎖鋳型 DNA との相互作用について述べ、第五章では実験手法、及び人工 DNA の合成について詳細に記した。

2-5 参考文献

- 1) J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature*, **171**, 737, 1953.
- 2) P.E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, and O. Buchardt, *Science*, **254**, 1497, 1991.
- 3) H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, and P. E. Nielsen, *Nature Struct. Biology*, **4**, 98, 1997.
- 4) S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, and D. G. Davis, *Science*, **265**, 777, 1994.
- 5) J. Marmur and P. Doty, *J. Mol. Biol.*, **5**, 109, 1962.
- 6) S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Nordén, and A. Grälund, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5544, 1996.
- 7) R. Fathi, Q. Huang, G. Coppola, W. Delaney, R. Teasdale, A. M. Krieg, and A. F. Cook, *Nucleic Acids, Res.*, **24**, 5416, 1994.
- 8) R. M. Smith and A. E. Martell, *CRITICAL STABILITY CONSTANTS*, **1**: amino acids, Plenum, New York, 1975.
- 9) R. M. Smith and A. E. Martell, *CRITICAL STABILITY CONSTANTS*, **2**: amine, Plenum, New York, 1975.
- 10) H. Diebler, M. Eigen, G. Ilgenfritz, G. Maaß, and R. Winkler, *Pure Appl. Chem.*, **20**, 93, 1969

第三章

一本鎖 DNA とグリシンを金属錯形成部位とした 人工核酸のモノマーの相互作用評価

1 Akihiko Hatano, Hiromasa Morishita, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiro Shionoya

"Metal-Assisted Formation of Artificial Nucleic Acids"

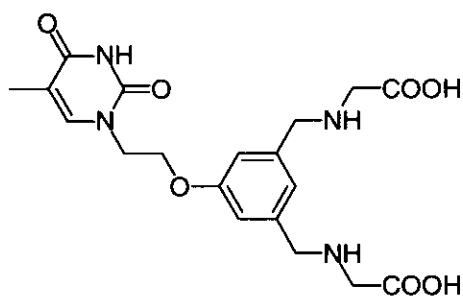
Nucleic Acids Symp. Ser., **39**, 171-172, 1998.

3-1 緒言

一本鎖 DNA の核酸塩基部位と相補的に塩基対を形成し、金属錯形成により主鎖を形成するような人工 DNA として、第二章で述べたように核酸塩基部位としてチミン塩基、金属錯形成部位としてグリシンユニット持つような化合物 (h) を設計合成した。グリシンはエチレンジアミンに比べると金属イオンとの親和性¹⁾は低いものの、塩基対の水素結合形成とスタッキング、主鎖を形成する金属配位結合の三つの相互作用が協同的に働き、一本鎖鋳型 DNA と有効な相互作用することを期待した。

3-2 結果及び考察

3-2-1 UV 淡色効果



グリシン型人工 DNA (チミン) と一本鎖 DNA poly dA との複合体形成の相互作用を、紫外吸収スペクトル測定により評価することにした。一般的に核酸塩基がスタッキングすると吸光度が減少することが知られている。結果を図 3-1 に示した。まず、参照実験として、天然の一本鎖 DNA である poly dA のみを測定したところ、アデニンに由来する 258 nm 付近に極大吸収 ($\epsilon_{260} = 15400$)²⁾ を持つスペクトルが得られた。次に、人工 DNA (チミン) のみを測定してみたところ、チミン塩基に由来する 274 nm 付近に極大吸収 ($\epsilon_{260} = 13000$)²⁾ を持つスペクトルが得られた。また金属イオンを添加することなしに、poly dA と人工 DNA を混合して測定したところ、262 nm 付近に吸収極大をもつスペクトルが得られた。これは分光器の演算を用いて先に測定した poly dA とグリシン型人工 DNA (チミン) の合算のスペクトルと同じになることが確認できた。よって金属イオンが存在しないときは、相互作用しないことがわかった。また、人工 DNA と各種金属イ

オンを加えて淡色効果を調べたが、スペクトルに変化はなかった。

次に poly dA とグリシン型人工 DNA (チミン) を混合した系に、金属イオンを添加した。亜鉛、ニッケル、マンガン、マグネシウム等を添加したが、淡色効果は見られなかった。時間を追って測定したが、UV 淡色効果は観察されず、スタッキングが形成していない可能性が高かった。

3-2-2 三重鎖形成の検討

次に、テンプレートとなる DNA を一本鎖から二本鎖にすることにより、どのような挙動を示すか検討した。本人工 DNA はチミン塩基を持っているので、poly dA-poly dT との三重鎖形成を行うことができると考えられた。鋳型 DNA である poly dA-poly dT が初期状態よりらせん構造をなしているので、らせんを誘起する必要がなく、自発的に二重らせん上に集合化して三重らせん構造を形成することが期待できる。金属としてはマンガンイオンを用いた。結果を図 3-2 に示した。

poly dT : poly dA = 1:1 の融解温度曲線は、融解温度 44.1 °C を示した。次に、参照実験として poly dT : poly dA = 1:1 実験にマンガンイオンを加えて実験を行ったところ、融解温度が 40.2 °C の融解温度曲線が得られた。poly dT : poly dA : 人工 DNA + マンガン = 1:1 :1 の融解温度曲線は、融解温度 39.8 °C を示し、人工 DNA が存在しないときとほぼ同じであった。マンガンとグリシンの結合定数は $\log K$ で約 3 である。X線結晶構造解析より、遷移金属とプリンの N7 位は錯形成することが多数報告されている³⁾。また遷移金属イオンは、DNA の二重らせん構造を不安定化する効果を持つことが報告されている⁴⁾。よってマンガンイオンがアデニンの N7 位に配位して、DNA の立体構造を不安定化して融解温度を低下している可能性が示唆された。

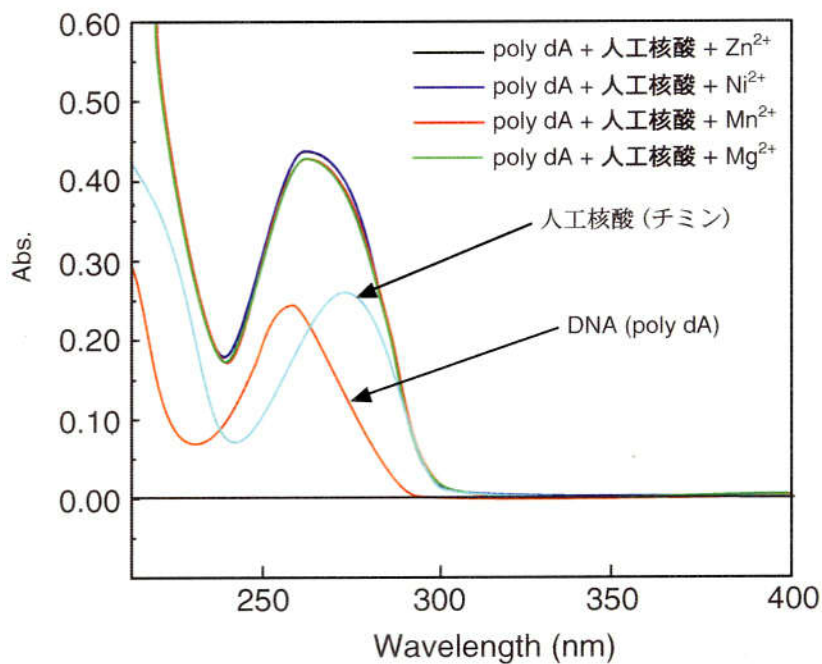


図 3-1 各種金属が及ぼすグリシンを金属錯形成部位とした人工 DNA (チミン) と poly dA の UV 吸収変化

10 mM Pipes, 10 mM NaCl, pH 6.5,
 DNA = poly dA = [DNA] = [チミン型人工 DNA] = 20 μ M/base
 [Metal] = [Zn²⁺] = [Ni²⁺] = [Mn²⁺] = [Mg²⁺] = 2.0 mM

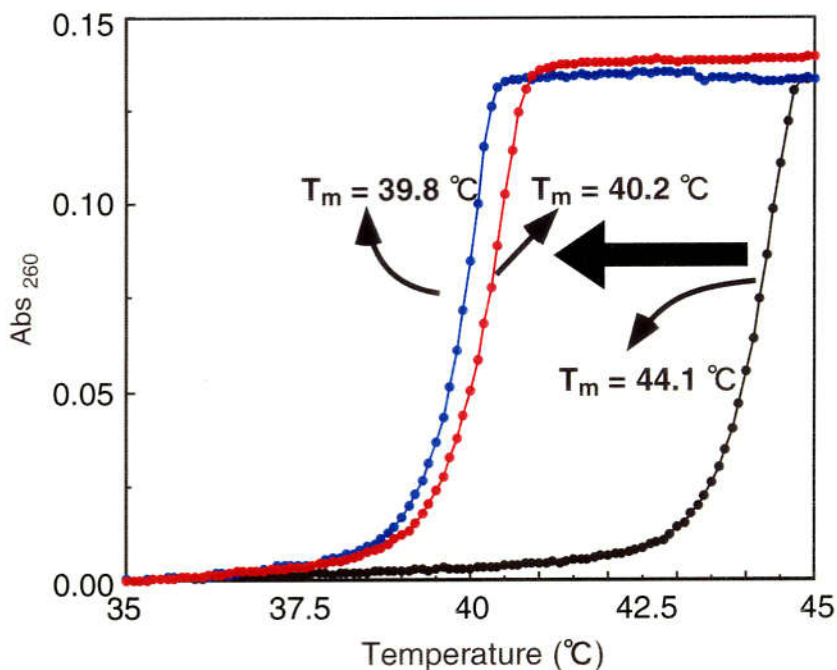


図 3-2 二本鎖 DNA とグリシン型人工 DNA のマンガン (II) イオンによる相互作用

10 mM Pipes, 10 mM NaCl, pH 6.5, [poly dA] = [poly dT] = [チミン型人工 DNA] = 20 μ M/base, [Metal] = [Mn²⁺] = 2.0 mM, 1 °C/min.

● Poly dA-Poly dT ● Poly dA-Poly dT + Mn²⁺
 ● Poly dA-Poly dT + チミン型人工 DNA + Mn²⁺

3-3 結果と考察

グリシンを金属錯形成部位とした人工 DNA と一本鎖 DNA との相互作用を、UV 吸収スペクトルにより検討した。しかし、塩基対のスタッキングに由来する淡色効果は全く示さなかった。また人工 DNA と二本鎖 DNA (polydA-poly dT) との三重鎖形成をマンガンイオン存在下で検討したところ、著しい融解温度の低下が観察された。これは人工 DNA が存在しない場合と同様の結果で、マンガンイオンがアデニンの N7 位に配位して DNA の構造を不安定化している可能性を示した。

金属錯形成による主鎖形成、相補的塩基対形成、スタッキング効果、電荷の力が協同的に働いて人工 DNA と poly dA が有効に相互作用することが期待されたが、残念ながら有意な相互作用は観察されなかった。グリシンより強い錯形成能を有する配位子を導入し、主鎖を確実に形成した後に一本鎖鋳型 DNA との相互作用を確認するべきであると思われた。第四章ではより金属錯形成能が強いエチレンジアミンの人工核酸で実験を行うことにした。

3-5 参考文献

- 1) R. M. Smith and A. E. Martell, *CRITICAL STABILITY CONSTANTS*, **1**: amino acids, Plenum, New York, 1975.
- 2) C. Cantor, M. M. Warshaw, and H. Shapiro, *Biopolymers*, **9**, 1059, 1970.
- 3) R. W. Gellert and R. Bau, In: *Metal Ions in Biological Systems* (H. Siegel, Ed.), Dekker, New York, **VIII**, 1, 1979.
- 4) G. L. Eichhorn and Y. A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7323, 1968.

第四章

エチレンジアミンを金属錯形成部位としたアデニン型人工核酸の金属錯体と一本鎖 DNA との相互作用

- 1 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya
" Self-Assembly of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics into a Single-Stranded
Zn^{II} Coordination Polymer "
Chem. Lett., 822-823, 2000.
- 2 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya
" Syntheses of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics: Metal-Assisted Assembly of
Guanine Mimics onto an Oligocytosine "
in preparation.

4-1 緒言

天然の DNA は、A 型、B 型、Z 型など、外部の状況 (湿度、塩強度、金属イオンの存在、有機溶媒) により種々の高次構造を取ることが知られている (図 4-1)¹⁻³⁾。また、核酸アナログである PNA (peptide nucleic acid) は、天然の DNA では見られない P 型構造をとる⁴⁾。らせん一巻きのピッチを比較すると、A 型 DNA で 24.6 Å、P 型 PNA-PNA ヘキサマー複合体で 58 Å であり、一巻あたりの鎖長が著しく異なる。このことは人工 DNA と天然のものとの間に構造的な差違があっても、天然の DNA の構造的な柔軟性により補完される可能性があることを示している。

本章では、第二章で設計した核酸塩基部位と二つの金属錯形成部位 (エチレンジアミン) を持つ化合物 (人工 DNA) を用いて、一本鎖鋳型 DNA との相互作用を検討した。まず、金属イオンとの錯形成を検討した。本化合物は金属イオンを介して分子間で金属錯形成して主鎖を形成し、DNA と同じように核酸塩基の配列情報を持つことが期待される。金属錯形成は配位子交換反応により熱力学的にもっとも安定な構造、すなわち一本鎖鋳型 DNA に対して相補的な配列を可逆的に形成することが期待される。

人工 DNA が天然の一本鎖 DNA と相互作用することにより、吸収スペクトルにおける淡色効果が期待できる。本効果を詳細に検討することにより、二本鎖の結合解離過程を示す融解温度曲線、Job plot 法による会合体の組成などを求めることができ、天然の DNA の性質と比較評価することができる。また、複合体形成の証明として、円二色性 (CD) スペクトル、¹H NMR や X 線結晶構造解析が有力な方法となる。本章では種々の分光学的手法を用いて人工 DNA の構造、及び天然の DNA との相互作用について詳細に検討した。

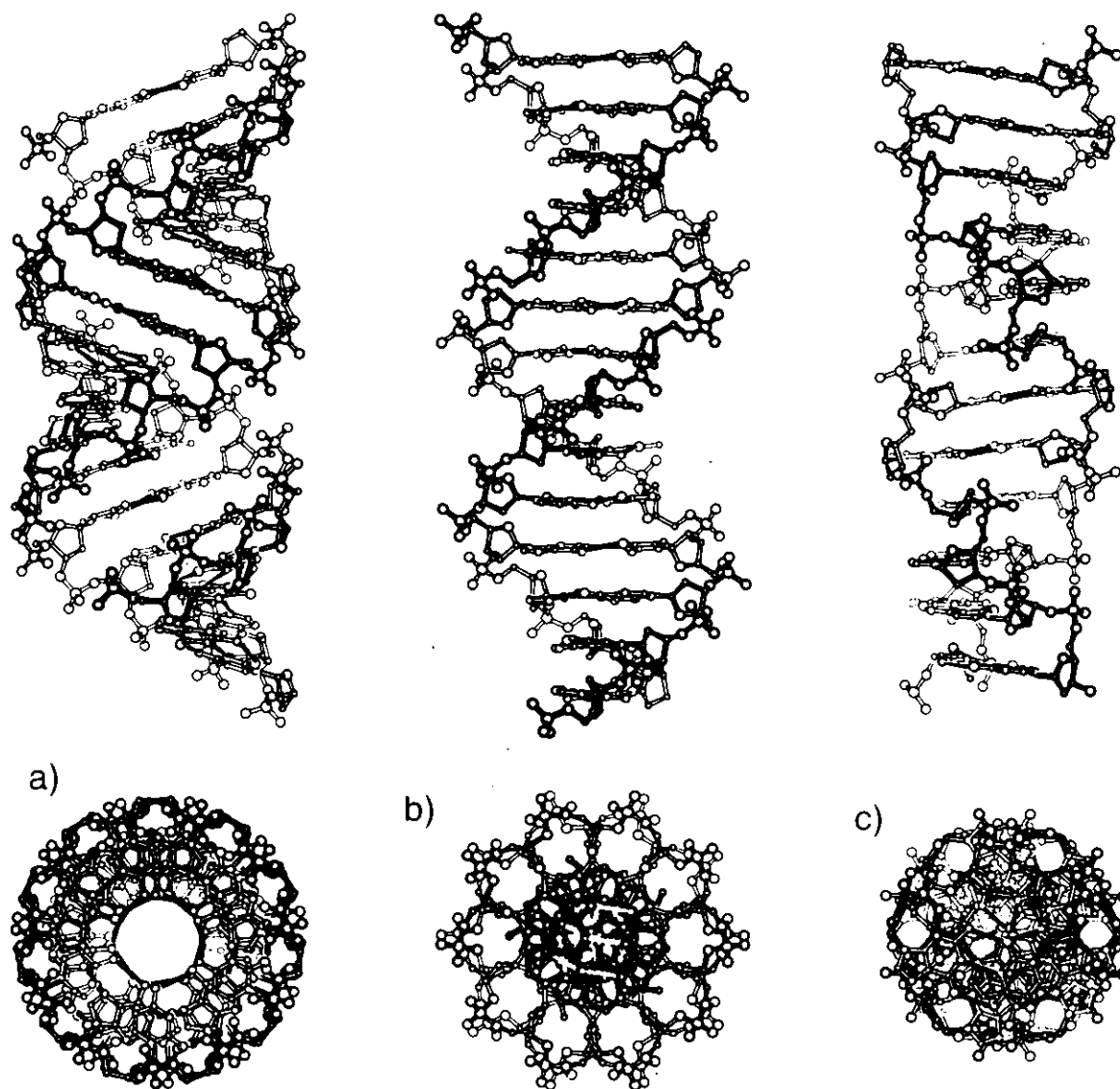


図 4-1 天然の DNA がとりうる代表的な高次立体構造. a) A-DNA¹⁾, b) B-DNA¹⁾, c) Z-DNA²⁾. 上部図は DNA を横から見た図、下部図は上方から見た図。ref 3 より転載。

表 4-1 DNA の高次構造の特徴⁵⁾

	A 型	B 型	Z 型
らせんの巻き方	右 巻	右 巻	左 巻
らせん一巻きのピッチ	24.6 Å	33.2 Å	45.6 Å
らせん一巻きのヌクレオチド数	10.7	10.0	12
塩基対の傾斜	19°	1°	9°
グリコシド結合回りの内部回転角 (χ)	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i> (Pu) <i>anti</i> (Py)

χ はプリンヌクレオシドでは二面角 O1'-C1'-N9-C4, ピリミジンヌクレオシドでは二面角 O1'-C1'-N1-C2。 *anti* は $\chi = 180^\circ \pm 90^\circ$, *syn* は $\chi = 0^\circ \pm 90^\circ$ 。
(PU)は "プリンヌクレオシド"、(Py)は "ピリミジンヌクレオシド" を意味する。

4-2 アデニン型人工 DNA の金属錯形成の検討⁶⁻⁸⁾

4-2-1 各種金属イオンを用いた人工核酸モノマーの錯体合成と X線結晶構造解析

合成したアデニン型人工核酸が分子間で錯形成しうるかどうかを確認するために、種々の金属錯体の結晶化を行い、その X線結晶構造解析を行った。

まず、種々の金属塩 (亜鉛、銅、ニッケル、白金、パラジウム、鉛、カドミウムの過塩素酸塩、塩化物、酢酸塩、硝酸塩、硫酸塩等)、再結晶溶媒を用い、結晶化条件をスクリーニングしたところ、単結晶が得られてものは、以下の二つの条件下であった (表 4-2)。

表 4-2 スクリーニングにより得られた結晶とその作製条件

結晶番号	金属塩	結晶化溶媒	添加物	結晶化温度	結晶
A	酢酸亜鉛	H ₂ O/EtOH	過塩素酸ナトリウム	室温	プリズム
B	硝酸亜鉛	H ₂ O	無し	室温	プリズム

A の結晶は、以下のような方法で得た。エタノール中で酢酸亜鉛とアデニン型人工核酸モノマーを 1:1 の割合で混合し、過塩素酸ナトリウムを一当量加えて白色沈殿を得た。

生じた白色沈殿を水に溶解し、エタノール蒸気拡散法によりプリズム晶を得た。本結晶のサイズは $0.1 \times 0.06 \times 0.03$ mm であり、常温で溶媒中から取り出すとクラックが生じてしまうため、X線結晶構造解析では広角範囲が充分観察できなかった。冷やしすぎてもクラックが大きくなったため、 -50°C で測定を行った。本錯体は、金属イオンとアデニン型モノマーが 1:1 の組成比を有し、無限長ポリマー構造をなしている。二つのエチレンジアミン部位が分子間で亜鉛イオンにシス型で配位し、さらに一分子のアセテートイオンが二座配位し、歪んだ六配位八面体構造を形成していた。金属周りの電荷は +1 であり、対アニオンとして過塩素酸イオンが配位圏外に存在していた。また、アデニン側鎖がポリマーの主鎖に対して同方向を向いた構造であった (図 4-2, 4-3)。しかし、本結晶構造はクラックによる誤差 (R 値) が大きくなり、正確な構造解析を行うことはできなかった。

また B の結晶に関する結果を図 4-4, 5、表 4-3 ~ 4-5 に示す。亜鉛中心には、二分子に由来する二つのエチレンジアミンがトランス型で配位し、さらにアキシャル位に二つの水分子が配位して六配位八面体型構造を形成していた。亜鉛 - 亜鉛間距離は 7.718 \AA で、天然の DNA の隣接するリン原子間の距離約 6.7 \AA より長いことがわかった。また、無限長ポリマー構造をとり、アデニン側鎖はポリマー主鎖に対して交互に逆方向を向いていた。これは、結晶のパッキングによるものと考えられる。溶液中では自由回転できる結合が複数存在するため、結晶 A で示されたような同方向にアデニン側鎖が向く構造をとることは可能であると考えられる。金属周りの電荷は中性 pH では $2+$ となり、対アニオンとして近傍に二つの硝酸イオンが存在した。

また、この結晶を真空乾燥 (0.5 mmHg , 6 h) して元素分析を行ったところ、配位水の 2 分子のみが残り、結晶水の 10 分子は残らないことがわかった。

Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_9\text{Zn}$: C, 37.60; H, 5.52; N, 24.11.

Found: C, 37.48; H, 5.65; N, 23.87.

以下の DNA との相互作用の実験では、過剰な金属イオンが存在しないよう、本錯体の結晶を用いた。

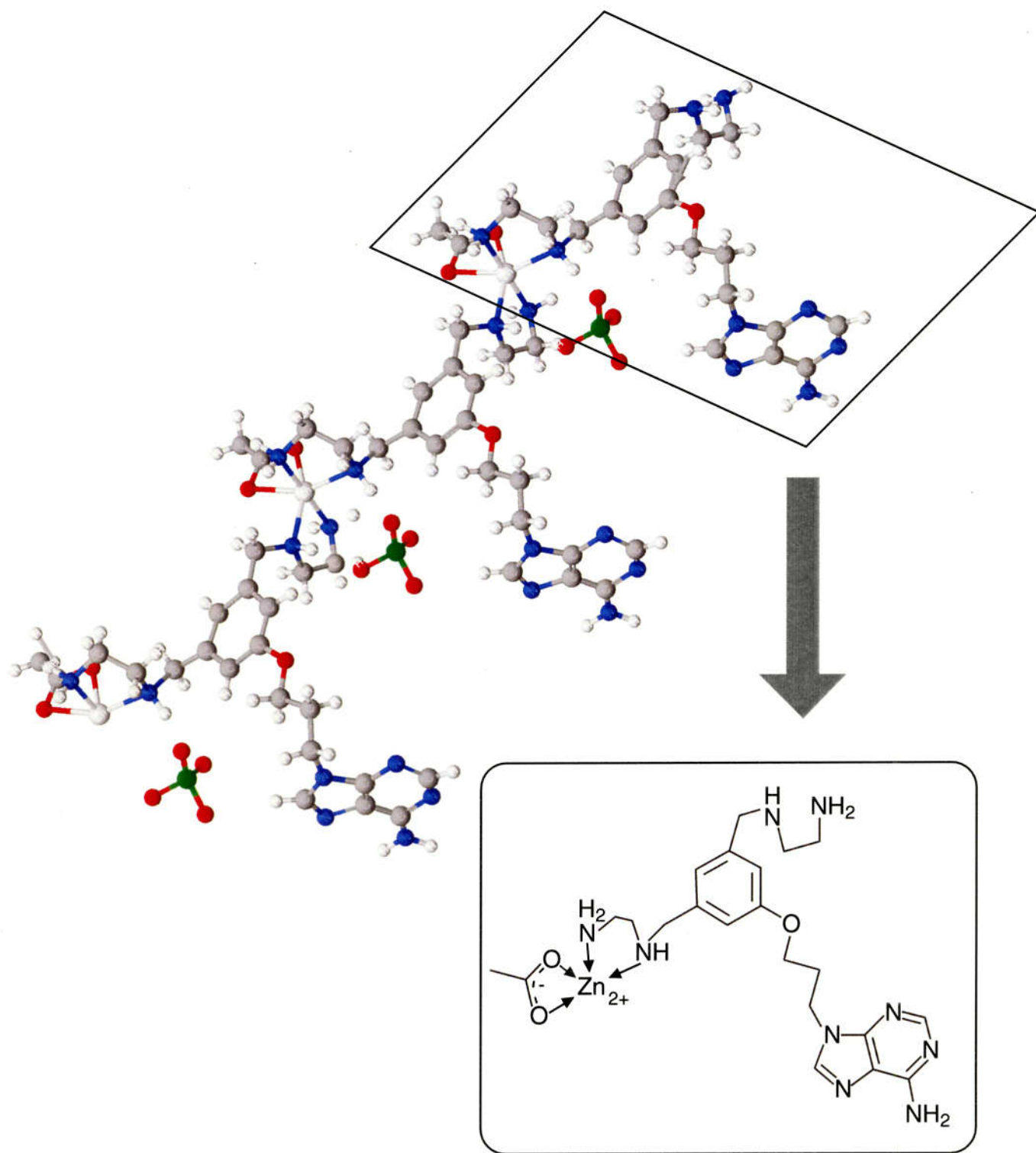


図 4-2 酢酸亜鉛とアデニン型人工核酸より生じた錯体の結晶構造 (A)

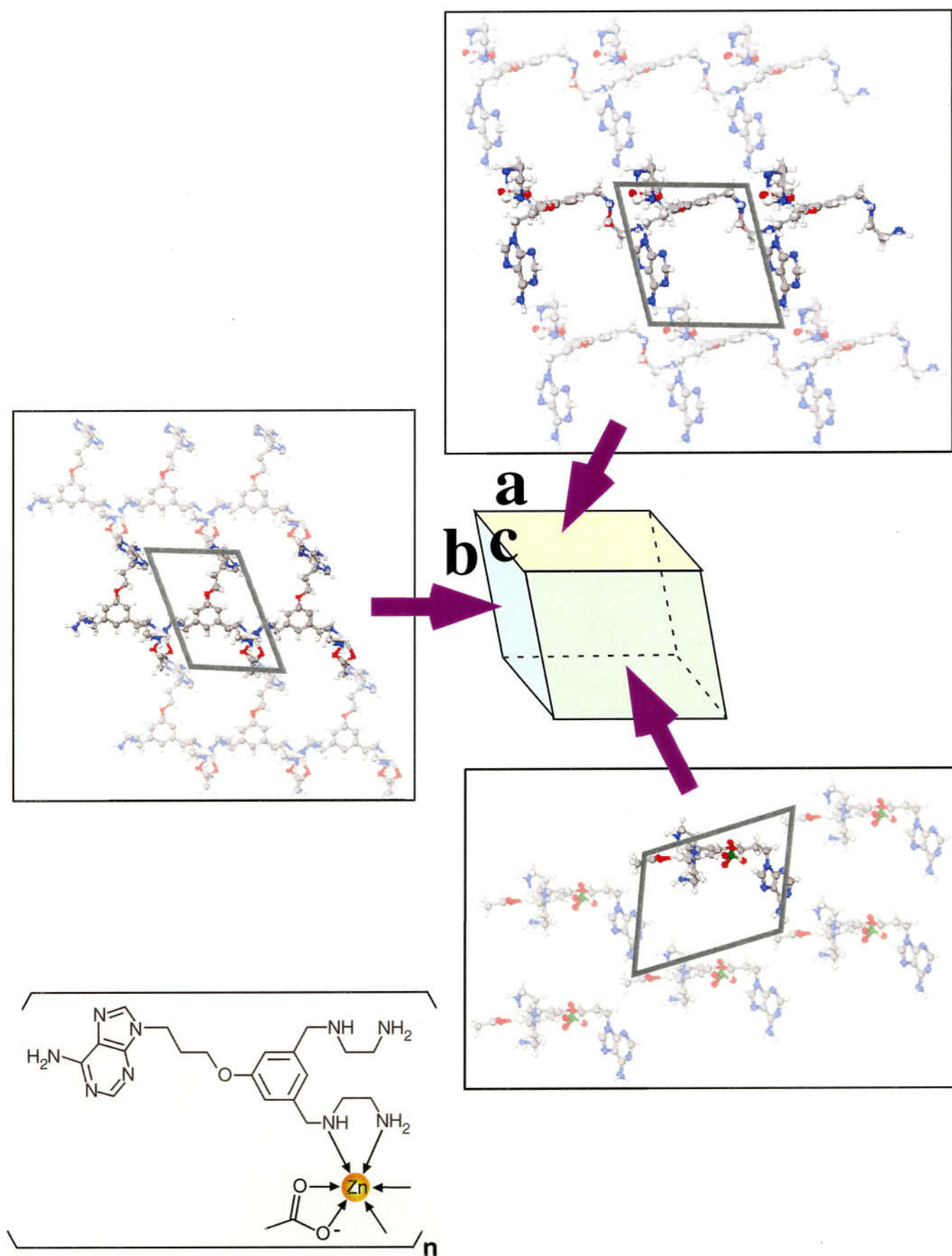
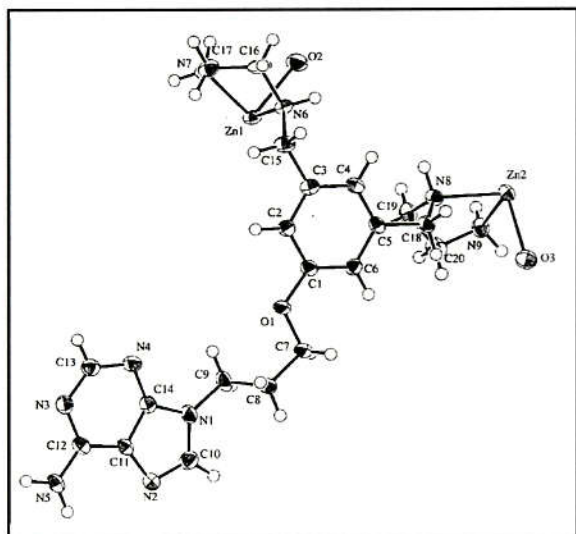
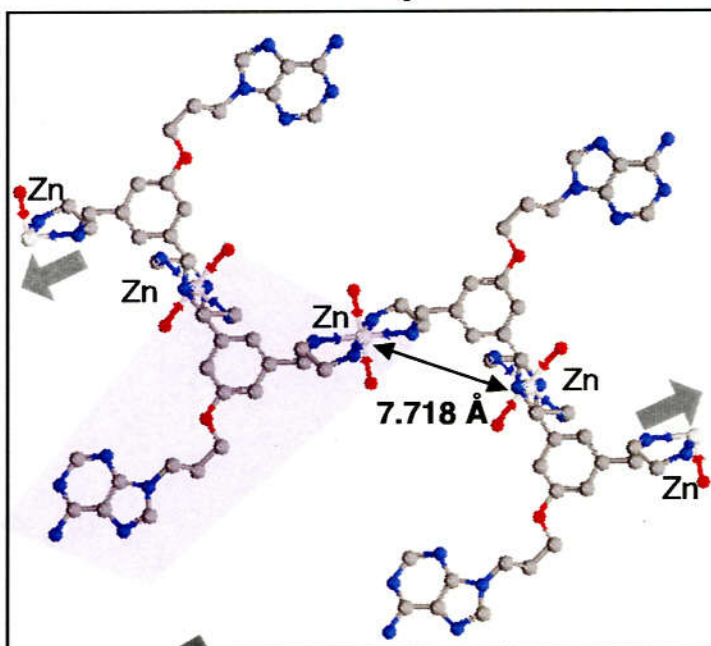


図 4-3 酢酸亜鉛とアデニン型モノマーより生成した錯体の結晶構造 (パッキング図、A)

ORTEP View



One Dimensional Polymeric Structure



$C_{20}H_{55}N_{11}O_{19}Zn$, F. W. 819.10,
Space Group = $P\bar{1}$ (#2)

Crystal Dimension $0.20 \times 0.15 \times 0.08$ mm,

a (Å) = 11.915 (1),
 b (Å) = 15.183 (1),
 c (Å) = 11.3573 (7),
 α (°) = 94.207 (5),
 β (°) = 96.928 (5),
 γ (°) = 71.382 (3)

V (Å³) = 1931.6 (3),

Temperature (°C) = -50.0,

$R^a = 0.063$, $R_w^b = 0.087$

$$^a: R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

$$^b: R_w = \left(\frac{\sum w(|F_o| - |F_c|)^2}{\sum w F_o^2} \right)^{1/2}$$

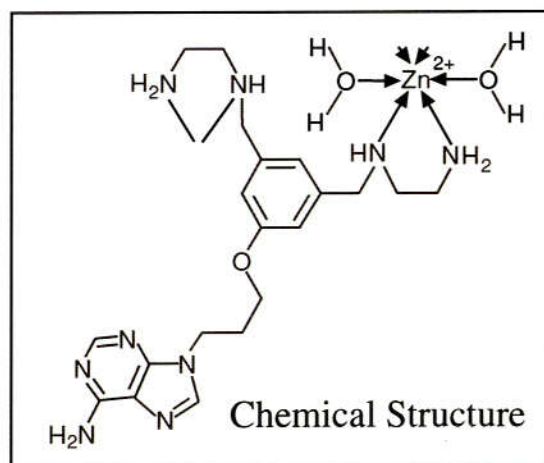


図 4-4 硝酸亜鉛とアデニン型モノマーより生成した錯体の結晶構造 (B)

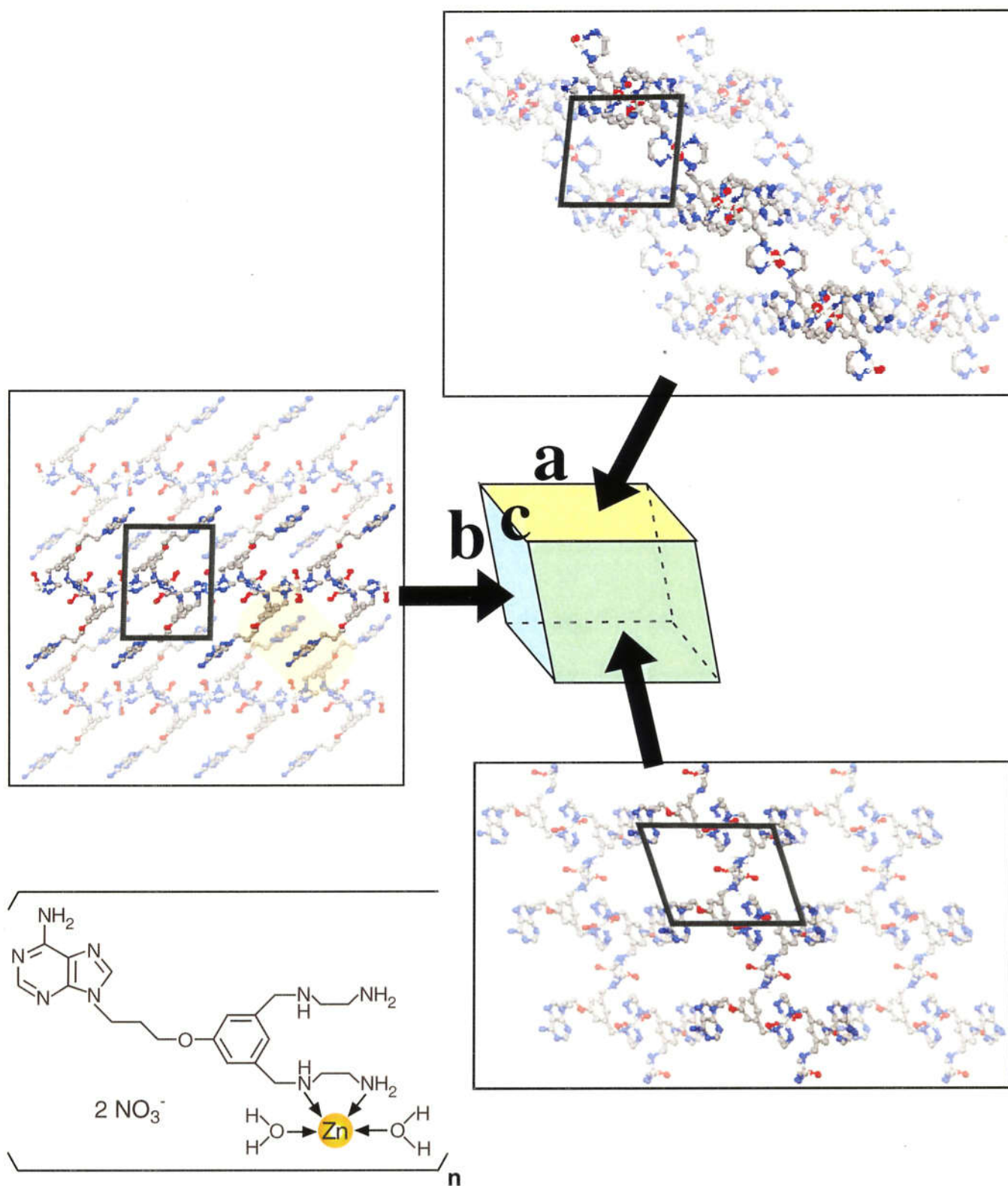


図 4-5 硝酸亜鉛とアデニン型モノマーより生成した錯体の結晶構造 (パッキング図、B)

表 4-3 Crystallographic Data for Zn^{II} Complex (B)

Empirical Formula	C ₂₀ H ₅₅ N ₁₁ O ₁₉ Zn
Formula Weight	819.10
Crystal Color, Habit	colorless, prismatic
Crystal Dimension, mm	0.20 × 0.15 × 0.08
Lattice Type	Primitive
Space Group	<i>P</i> $\bar{1}$ (#2)
<i>a</i> (Å)	11.915(1)
<i>b</i> (Å)	15.182(1)
<i>c</i> (Å)	11.3573(7)
α (°)	94.207(5)
β (°)	96.928(5)
γ (°)	71.382(3)
<i>Z</i>	2
<i>D</i> _{calcd} (g/cm ³)	1.408
Temperature (°C)	-50.0
μ (Mo K α) (cm ⁻¹)	-17.20
<i>F</i> (000)	868.00
<i>R</i> ^a	0.063
<i>R</i> _w ^b	0.087

$$^a R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$$

$$^b R_w = \left[\frac{\sum_w (|F_o| - |F_c|)^2}{\sum_w F_o^2} \right]^{1/2}$$

表 4-4 Selected Bond Lengths for Zn^{II} Complex (B).

Selected Bonds	Lengths (Å)
Zn(1)-O(2)	2.20(5)
Zn(1)-N(6)	2.22(7)
Zn(1)-N(7)	2.08(3)
N(7)-C(17)	1.47(6)
C(17)-C(16)	1.52(4)
C(16)-N(6)	1.47(8)
Zn(2)-O(3)	2.23(5)
Zn(2)-N(9)	2.10(6)
Zn(2)-N(8)	2.19(8)
N(9)-C(20)	1.48(7)
C(19)-C(20)	1.50(4)
C(19)-N(8)	1.46(7)

表 4-5 Selected Bond Angles for Zn^{II} Complex (B).

Selected Bond Angles	Angles (deg)
C(3)-C(15)-(N6)	112.83(9)
C(15)-N(6)-Zn(1)	121.26(7)
C(16)-N(6)-Zn(1)	111.03(0)
N(6)-C(16)-C(17)	110.18(3)
C(16)-C(17)-N(7)	108.71(9)
O(2)-Zn(1)-N(7)	91.83(0)
N(6)-Zn(1)-N(7)	82.81(3)
Zn(1)-N(7)-C(17)	108.31(4)
N(6)-Zn(1)-O(2)	88.40(2)
C(15)-N(6)-C(16)	111.03(0)
C(5)-C(18)-N(8)	114.81(2)
C(18)-N(8)-Zn(2)	115.23(4)
C(18)-N(8)-C(19)	114.48(4)
Zn(2)-N(8)-C(19)	105.17(3)
N(8)-C(19)-C(20)	110.31(0)
C(19)-C(20)-N(9)	109.94(1)
C(20)-N(9)-Zn(2)	107.00(5)
N(8)-Zn(2)-N(9)	82.77(9)
N(8)-Zn(2)-O(3)	93.60(5)
N(9)-Zn(2)-O(3)	89.45(2)

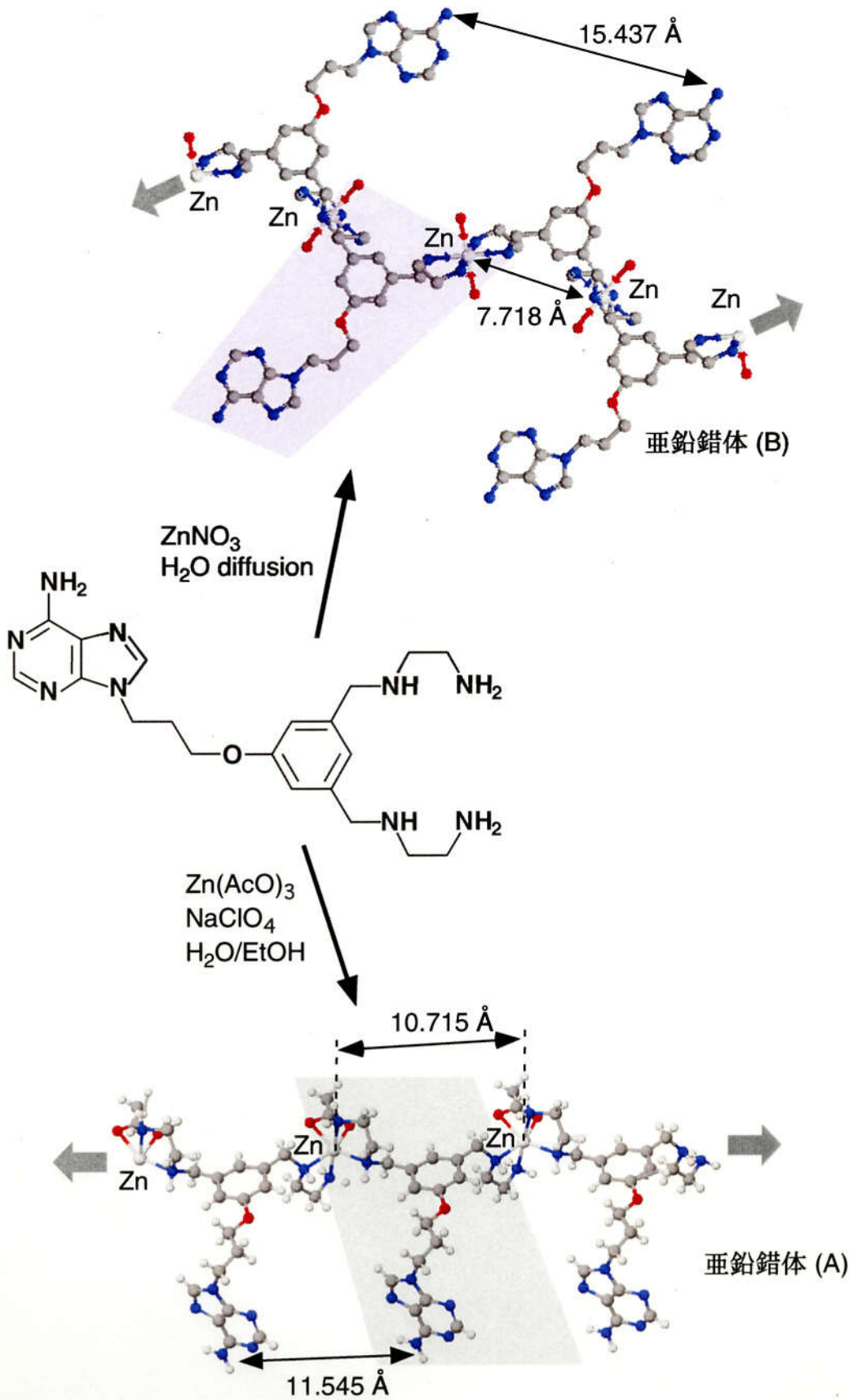


図 4-6 アデニン型亜鉛錯体より生成した錯体の結晶構造と亜鉛間距離とアデニン間距離

4-2-2 ¹H NMR による溶液中での錯形成評価

4-2-1 で得た結晶 A, B を用いて、溶液中で錯形成していることを ¹H NMR により確認した。

結晶 A, B の D₂O 溶液 (15.7 mM) を調製し、内部標準として TSP を用いて測定を行った。結晶 A の結果を図 4-7 に、結晶 B の結果を図 4-8 に示した。また、アデニン型人工核酸モノマー **8** を基準とした差ケミカルシフト値を表 4-6 に示した。

結晶 A では、全体的にピークがブロードニングしていて、エチレンジアミン部位、ベンジル位のプロトンが低磁場シフトしていることがわかった。これは、配位子交換速度が非常に速いこと (亜鉛と水分子では $k_{ex} = 10^7$)、および亜鉛イオンと錯形成することにより電子密度が低下したことを示している。溶液の濃度が低くなると、錯体のポリマー長は短くなることも考えられ、分子量分布が広がる可能性もある。

結晶 B も同様に、すべてのピークの線幅が大きくなった。また、エチレンジアミン部位である b、およびベンジル位 c のケミカルシフトが錯形成することにより低磁場にシフトした (表 4-6)。すなわち、エチレンジアミン部位の電子密度が低下していることより、溶液中 (D₂O) でも錯体を形成していることが示唆された。また、低磁場側にあるアデニン部位のシグナルは、錯形成によるシフトが見られなかったことより、亜鉛イオンがアデニン部位に配位している可能性は無いということを示唆した。

表 4-6 錯形成に伴うケミカルシフトの変化

結晶	差ケミカルシフト (ppm)		
	b1	b2	c
結晶 A	-0.236	-0.247	-0.116
結晶 B	-0.188	-0.231	-0.090

アデニン型人工核酸 **8** のケミカルシフトを基準にとり、各錯体のケミカルシフト値を引いた値を示した。マイナスは低磁場側にシフトしていることを意味する。

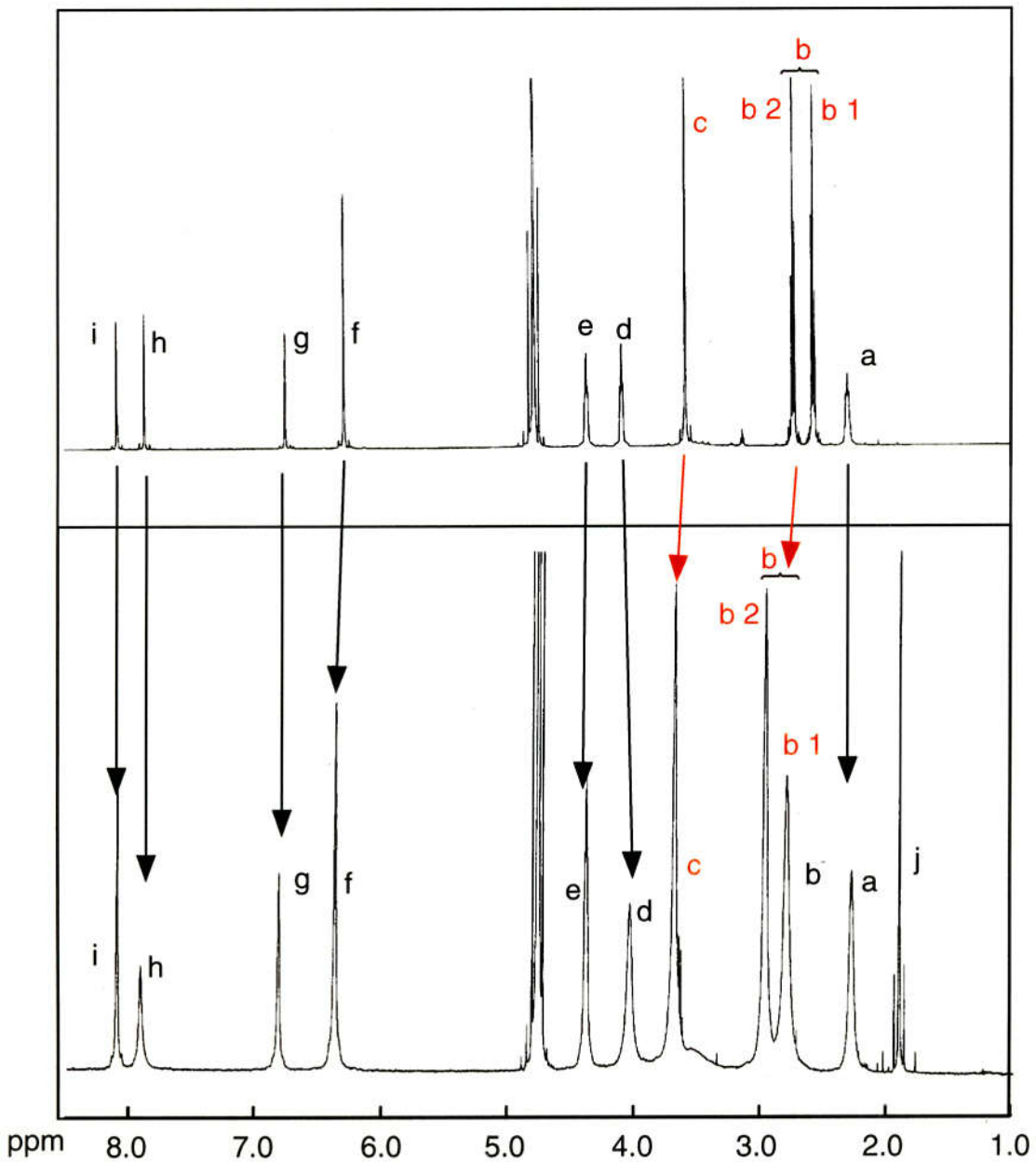
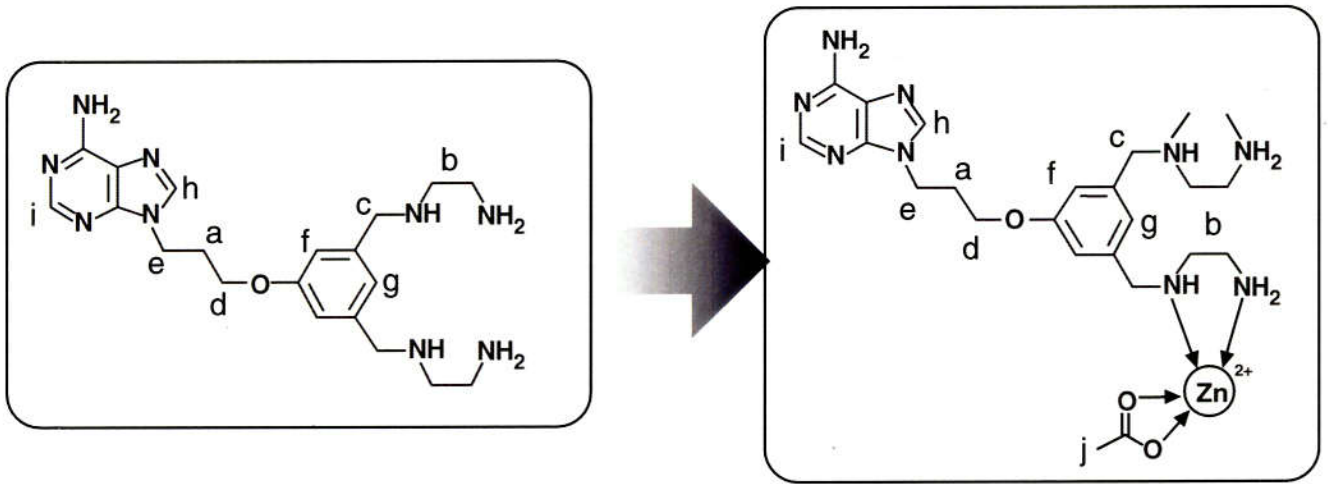


図 4-7 酢酸亜鉛とアデニン型モノマーより生成した錯体 (結晶 A) の ¹H NMR

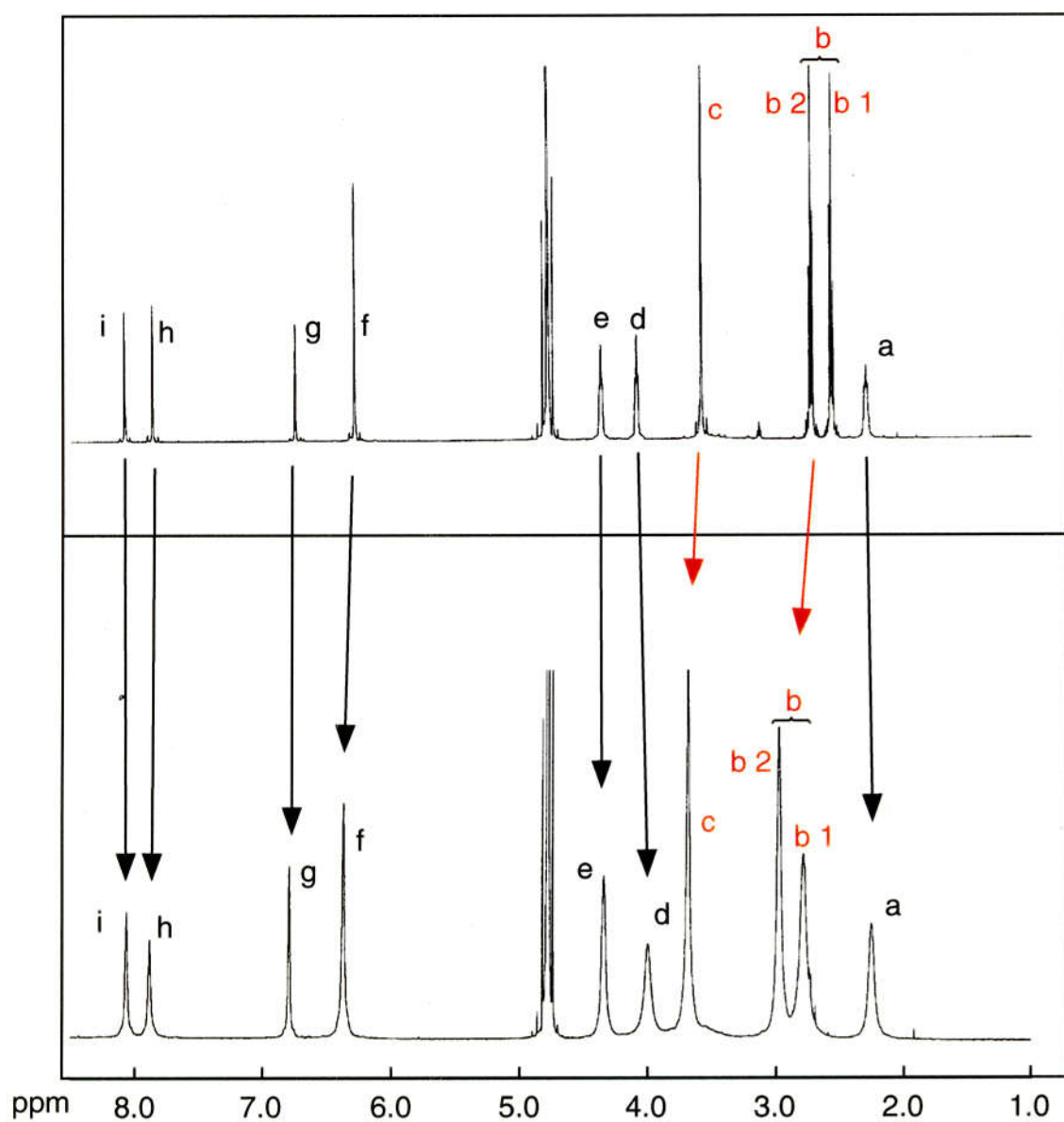
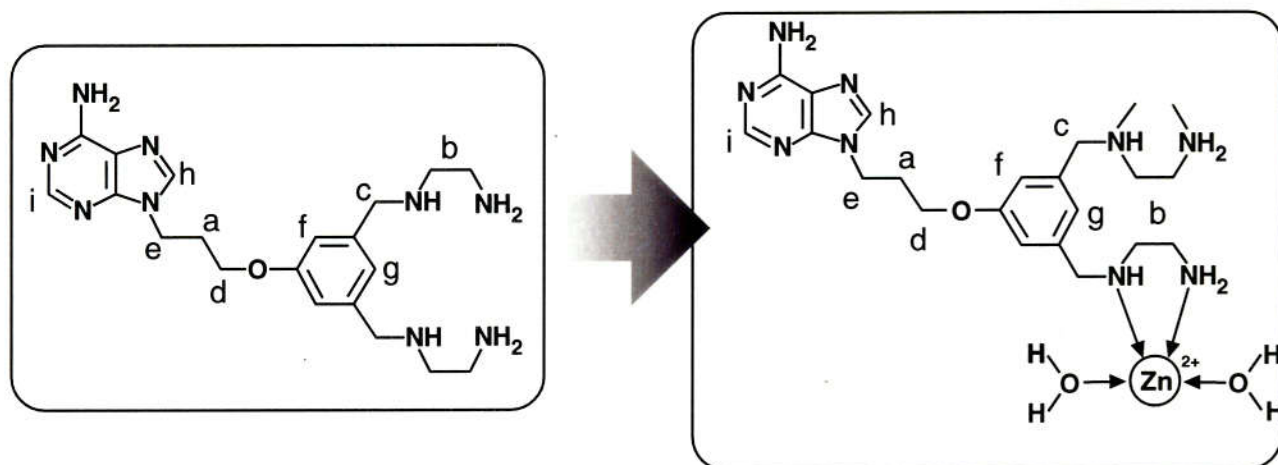


図 4-8 硝酸亜鉛とアデニン型モノマーより生成した錯体 (結晶 B) の ¹H NMR

4-3 亜鉛錯体 (B) と一本鎖 DNA (dT)₇₀ との相互作用の検討

4-3-1 UV 淡色効果と緩衝液の効果

前項で示した亜鉛錯体 (B) が、一本鎖 DNA を認識して二本鎖を形成するかどうかを検討するために、混合時の紫外吸収スペクトル変化の温度依存性を調べた。天然の DNA の場合、高温時は二重らせんがほどけて二つの一本鎖で存在しているが、低温になると水素結合とスタッキングの形成により二重らせん構造を形成し、核酸塩基由来の吸収の強度が、高温時に比べると低下する (淡色効果) ことが知られている⁹⁾。

調製したストック溶液 (第五章参照) を用いて、一本鎖 DNA である (dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (亜鉛錯体 B) の濃度を 30 $\mu\text{M}/\text{base}$ にして、種々の濃度の Pipes, Mops, HEPES 緩衝液中の、UV 吸収スペクトル (220 nm ~ 350 nm) を測定した。一本鎖鎖型 DNA である (dT)₇₀ を選択した理由は、(dT)₅₀, poly dT で同様の実験を行ったところ、(dT)₅₀ では淡色効果が小さくて、融解温度曲線を調べたところ低温での曲線が一定にならないことが分かった。また poly dT は、分子量分布が存在するため使用を控えた。

アデニン型人工 DNA モノマーのモル吸光係数は $\epsilon_{260} = 9500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、アデニン型亜鉛錯体 (B) は $\epsilon_{260} = 12000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ あった。温度を 80 °C から一時間かけて 40 °C に低下させ、20, 10, 0 °C における各緩衝液を用いて測定した吸収スペクトルを図 4-9, 10, 11 表 4-7, 4-8, 4-9 に示した。

(dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) は、0.1 mM ~ 10 mM の濃度範囲の Pipes 緩衝液中で相互作用し (図 4-9, 表 4-7)、淡色効果が観察された。温度を低下していくと、10 °C もしくは 0 °C のとき沈殿が生じ、UV スペクトルでも 290 ~ 350 nm 付近に散乱が生じることがわかった。Pipes 100 mM では、淡色効果は観察されず、温度を低下しても 260 nm の UV 吸収スペクトルの淡色効果は観察できなかった。

Mops 緩衝液を用いたときでは (図 4-10, 表 4-8)、0.1 ~ 100 mM の濃度範囲で淡色効果が観察された。しかし、低温領域ではどの濃度域でも 290 ~ 350 nm 付近に散乱が生じることがわかった。

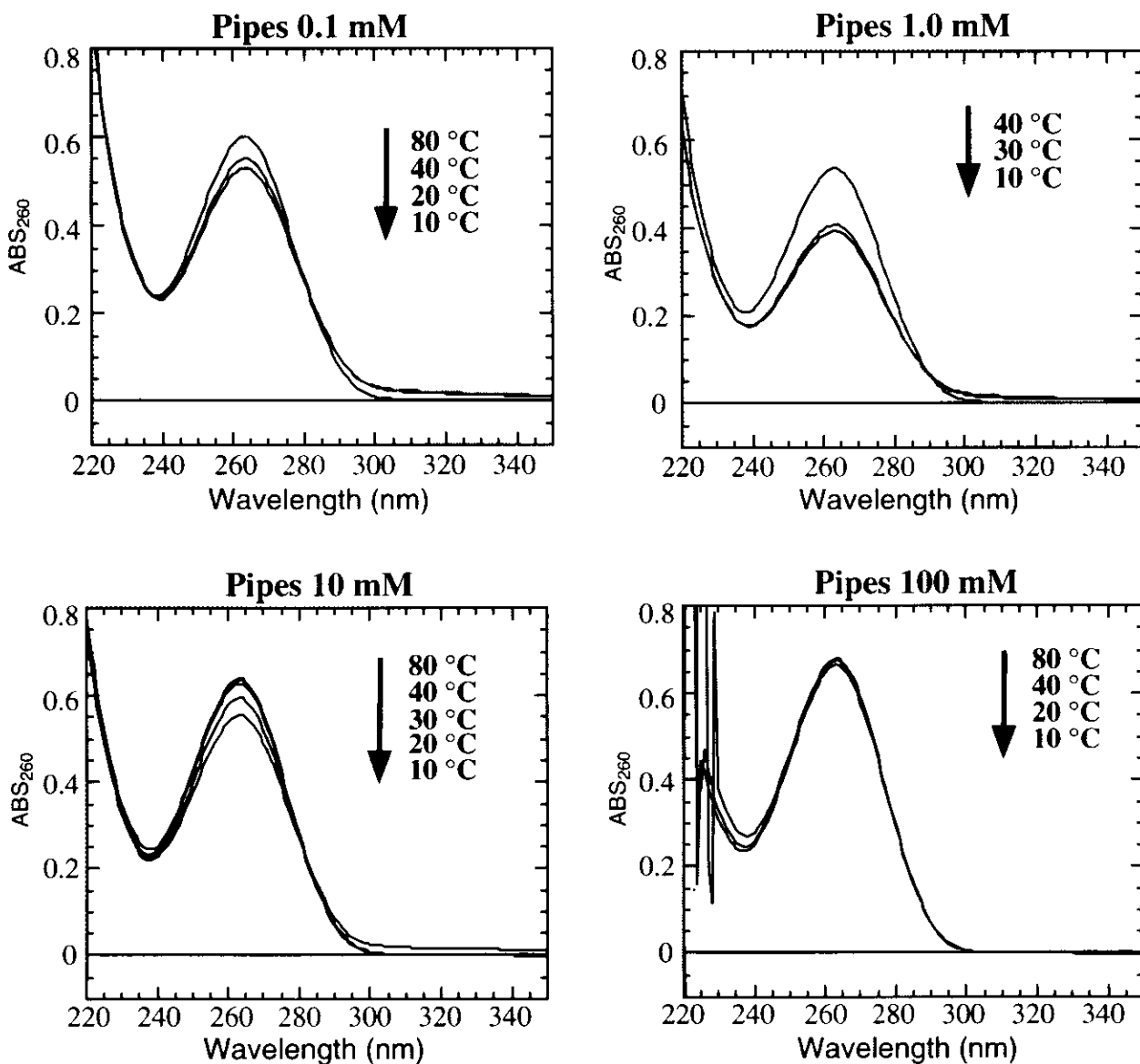


図 4-9 Pipes 緩衝液を用いたときの淡色効果

$[(dT)_{70}] = [Zn^{II} \text{ complex}] = 30 \mu\text{M/base}$

表 4-7 Pipes 緩衝液を用いたときの各温度における沈殿散乱

Pipes (mM)	Temperature (°C)				
	0	10	20	40	80
0.1	○	○	○	○	×
1.0		×	×	×	×
10		×	×	×	×
100	○	×	×	×	×

○ precipitated × not precipitated

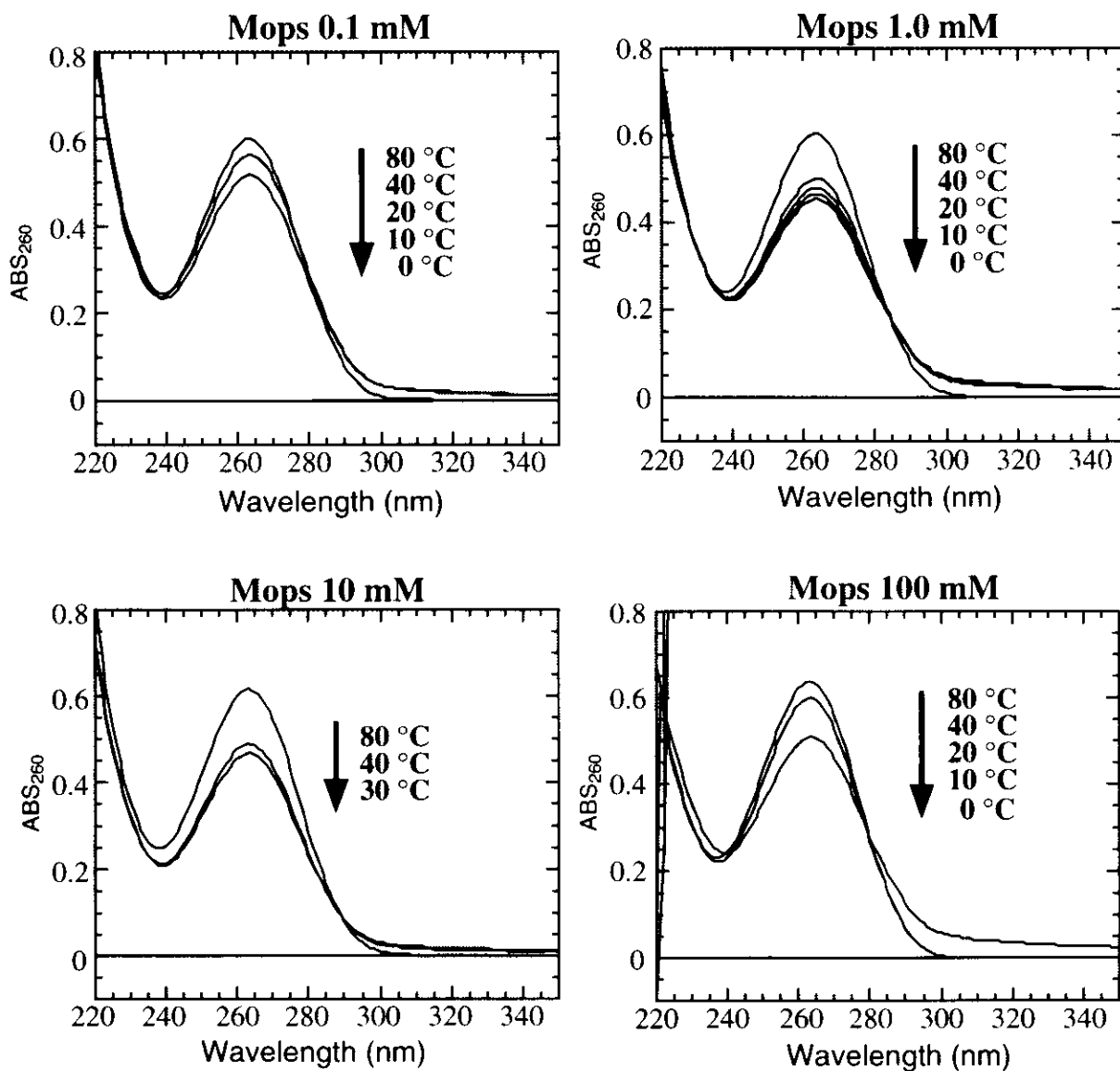


図 4-10 Mops 緩衝液を用いたときの淡色効果

$[(dT)_{70}] = [Zn^{II} \text{ complex}] = 30 \mu\text{M/base}$

表 4-8 Mops 緩衝液を用いたときの
各温度における沈殿散乱

Mops (mM)	Temperature (°C)				
	0	10	20	40	80
0.1	○	○	○	×	×
1.0	○	○	○	○	×
10				○	×
100	○	×	×	×	×

○ precipitated × not precipitated

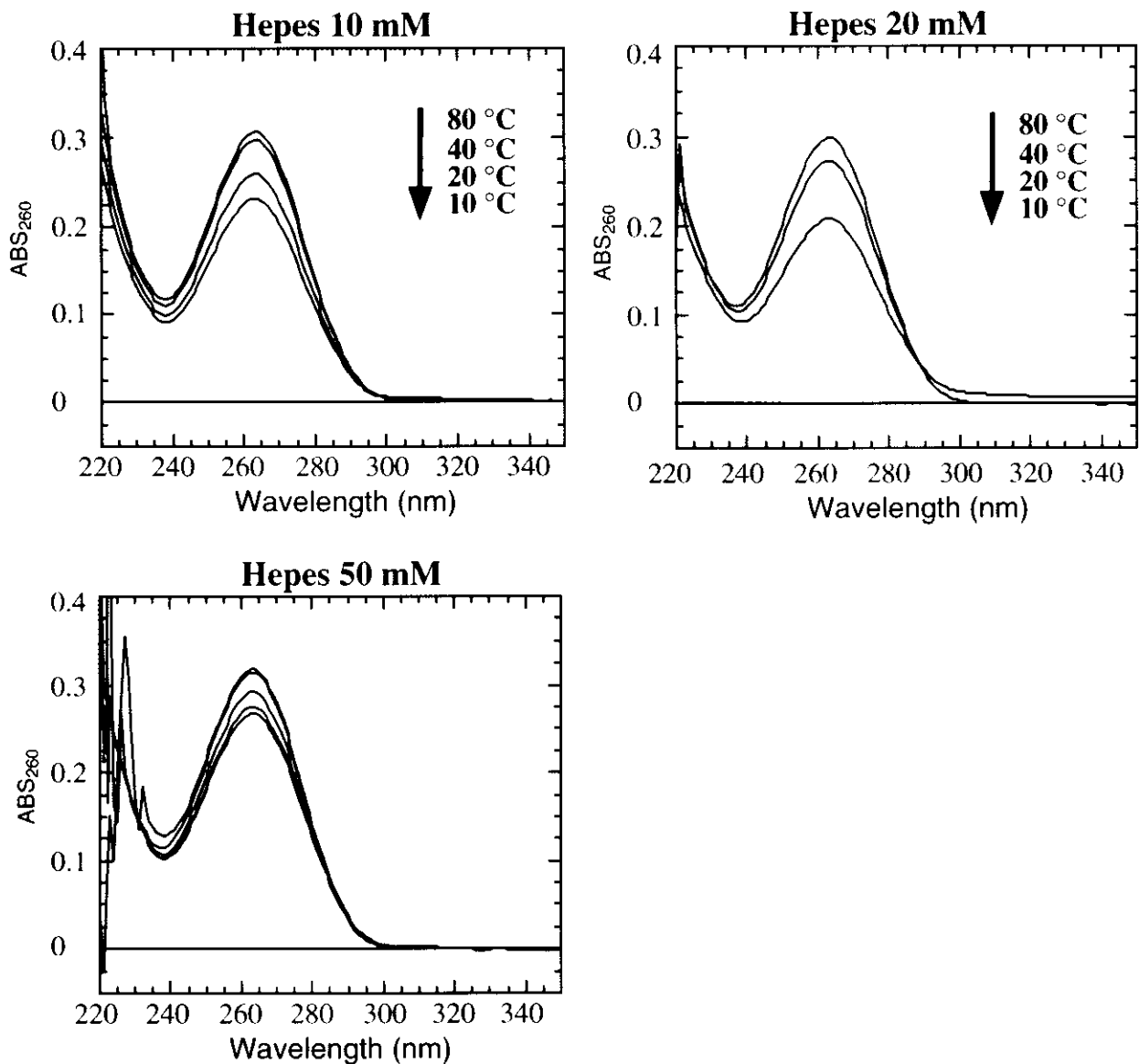


図 4-11 Hepes 緩衝液を用いたときの淡色効果

$[(dT)_{70}] = [Zn^{II} \text{ complex}] = 30 \mu\text{M/base}$

表 4-9 Hepes 緩衝液を用いたときの
各温度における沈殿散乱

Hepes (mM)	Temperature (°C)				
	0	10	20	40	80
10	○	×	×	×	×
20		○	×	×	×
50	○	×	×	×	×

× precipitated ○ not precipitated

また、Hepes 緩衝液を用いたときは (図 4-11, 表 4-9)、10, 20, 50 mM の濃度では淡色効果は観察されたが、10 °C 以下では沈殿が生じた。

4-3-2 UV 淡色効果と DNA 濃度の効果

上記の三種の緩衝液を用いたときには、低温度域で散乱、沈殿が生じた。よって、(dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) の濃度を半分に減らして溶解率を上げることを試みた。(dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) の濃度を 15 μM/base、緩衝液は Pipes 10 mM, Mops 1.0 mM, Hepes 50 mM で実験を行った。結果を図 4-12, 表 4-9 にまとめて記した。

Pipes 緩衝液では 0 °C になると散乱が生じた。また Hepes 緩衝液を用いたときは、散乱は観察されなかったが沈殿が観察された。Mops 緩衝液では散乱、沈殿ともに観察されなかった。また、Mops 緩衝液では淡色効果も観察されたため、以後の実験では Mops 緩衝液を使用することにした。

グッドの緩衝液と各種金属イオンとの錯形成定数は、Pipes $\log K = 6.93$ (H⁺), Hepes $\log K = 5.01$ (H⁺), Mes $\log K = 0.7$ (Mn²⁺) であることがわかった。Mes と Mops の構造は非常に良く似ているため、結合定数も大きく変わらないものと思われる。Mops 緩衝液は、金属イオンとほとんど錯形成しないものと考えられ、測定系に影響を及ぼさないと予想できた。それに対して Pipes、Hepes (1.0 mM) は、金属イオンとの結合定数 $\log K = 5 \sim 7$ と比較的高く、錯体を形成する可能性が充分示唆された。また (dT)₇₀、Zn^{II} complex 濃度 (15 μM/base) より高濃度であるため、測定に影響を及ぼしたものと考えられた。

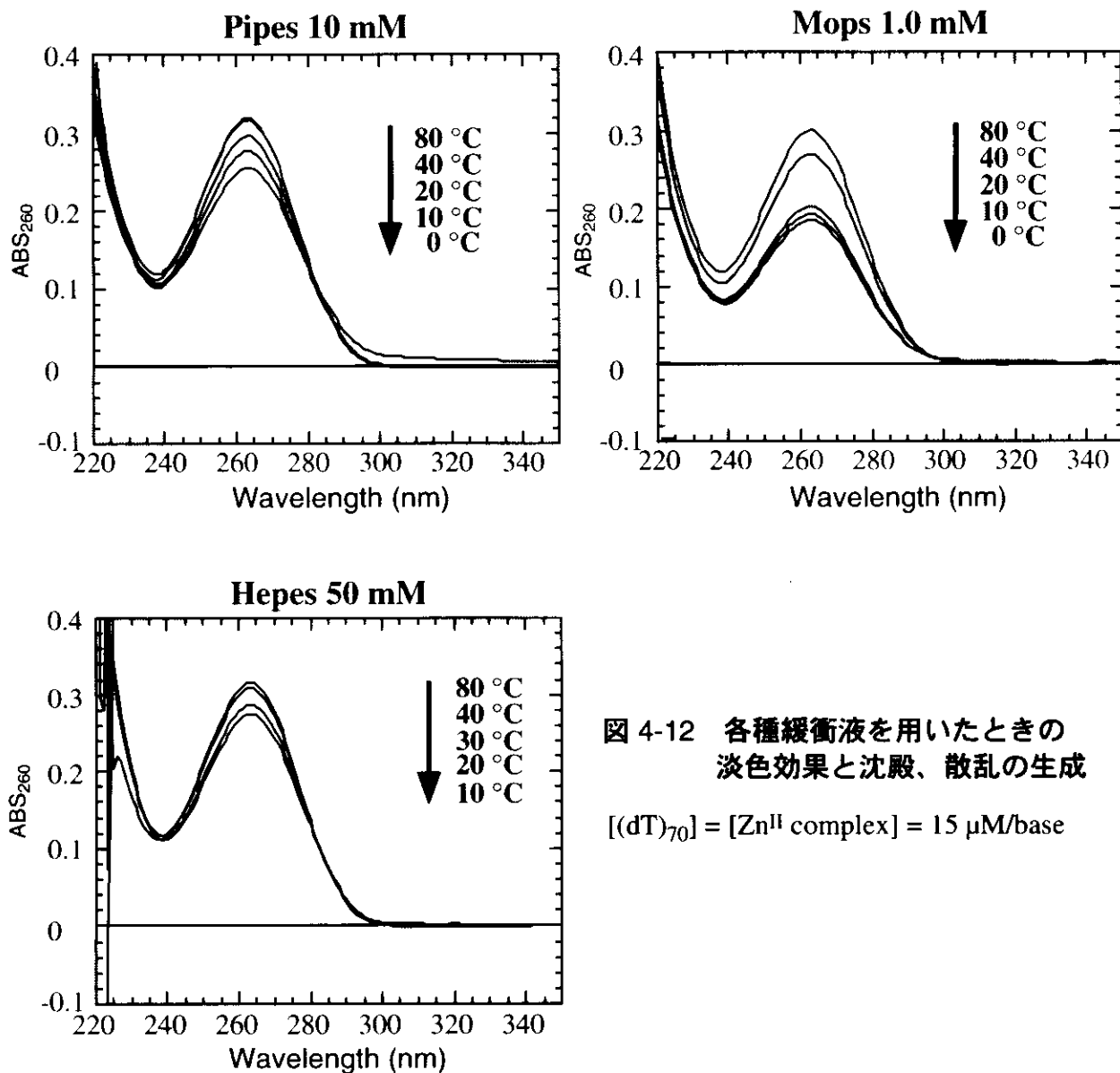


図 4-12 各種緩衝液を用いたときの
淡色効果と沈殿、散乱の生成

[(dT)₇₀] = [Zn^{II} complex] = 15 μM/base

表 4-10 各緩衝液を用いたときの
各温度における沈殿散乱

Buffer (mM)	Temperature (°C)				
	0	10	20	40	80
Pipes (10)	×	○	○	○	○
Mops (1.0)	○	○	○	○	○
Hepes (50)	○	○	○	○	○

○ precipitated × not precipitated

4-3-3 融解温度実験と塩強度の効果

天然の DNA 同様に、塩基に由来する吸収スペクトルに淡色効果が観察されたため、吸光度変化の温度依存性、すなわち融解温度実験を行った。

本実験は、一本鎖鋳型 DNA である (dT)₇₀ を 15 $\mu\text{M}/\text{base}$ 、アデニン型亜鉛錯体 (B) (以後 Zn^{II} complex と表す) を 15 $\mu\text{M}/\text{base}$ に調製し、緩衝液として Mops 1.0 mM (pH 7.0) を用いて行った。260 nm の吸光度を追跡し、各温度において吸光度が一定になるまで、すなわち溶液内が平衡に達することを確認しながら測定を行った。結果を図 4-13 に示した。

(dT)₇₀ - Zn^{II} complex の融解温度実験では、天然の DNA の融解温度曲線と同様の曲線を得ることができた。この結果は、低温における (dT)₇₀ - Zn^{II} complex 複体内での塩基対間のスタッキング形成を示唆した。融解温度は 39 °C となり、降温と昇温で可逆性がみられ、複合体形成および解離過程が温度変化によって可逆的に起こることがわかった。

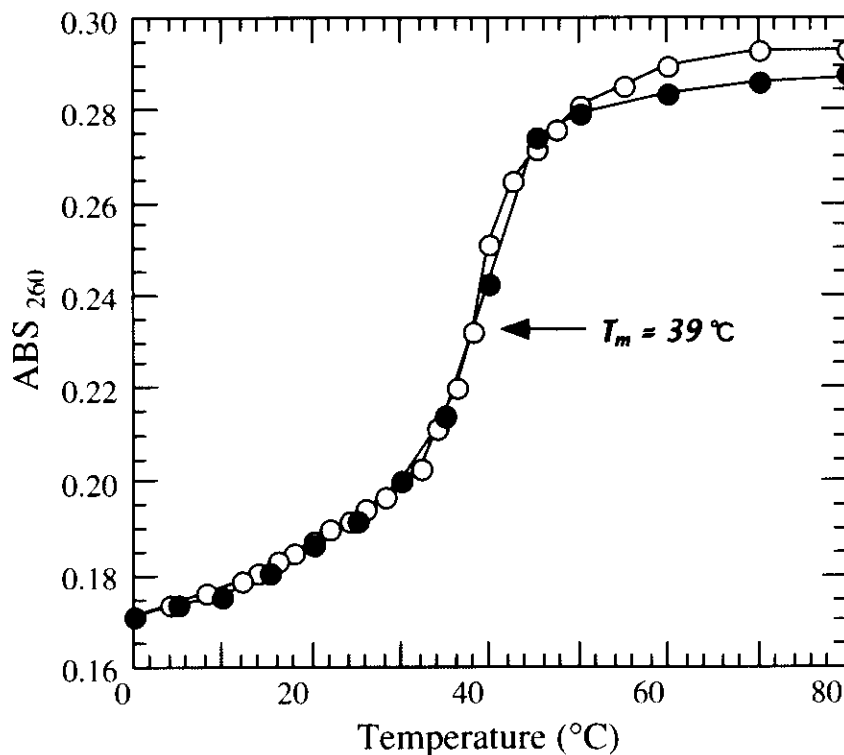


図 4-13 (dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) の 1:1 混合物の吸光度の温度依存性。
Mops buffer (1.0 mM, pH 7.0), [(dT)₇₀] = [(Zn^{II} complex)] = 15 $\mu\text{M}/\text{base}$,
at 260 nm, upward = ●, downward = ○.

天然の DNA では、塩強度が小さいときリン酸のアニオン間の反発が生じて DNA の二重らせん構造が不安定化する。本人工 DNA では一ユニットの電荷が正の二価であるため、一本鎖 DNA の負電荷を一つ中和することができる。しかし、1:1 の複合体を形成したときの電荷は正の一価となり、天然の DNA とは異なる挙動を示す可能性がある。よって、NaCl を用いた塩強度の効果を検討した (図 4-14)。天然の DNA では、塩強度が二重らせん構造の安定性に大きな影響を及ぼす^{10,11)}ことが知られている。一つはリン酸アニオン間の反発、もう一つは DNA の構造を保つための水分子の存在によるものである。B 型 DNA では、マイナーグループに水分子が結合し塩基対間を水素結合で架橋し、さらにその外側にある二層目の水分子も一層目の水分子と水素結合を形成し構造安定化に寄与している (図 4-15 (b))。

DNA の水溶液に KCl を添加して塩強度を増加していくと、水和に必要な水分子が増えるため、DNA の結合水を取ることが知られている (図 4-15 (a))¹⁰⁾。また NaCl などの塩強度の増加は、比較的低い塩濃度の領域ではリン酸ジエステル同士の電荷の反発を緩和する。DNA の二重らせん構造の形成には 100 mM 程度の NaCl が必要である。

天然の DNA と人工 DNA の塩強度の効果を調べるため、NaCl 100 mM の添加による効果を調べてみた。結果を図 4-14 に示した。人工 DNA の NaCl が存在しない系では、天然の DNA のときと非常に似た温度依存性が見られた。NaCl 100 mM の場合は、淡色効果は小さく、温度変化による顕著な吸光度変化は観察されなかった。それに対し (dT)₇₀ と (dA)₇₀ を用いる天然の DNA の系では、NaCl が 0 mM の場合、測定温度範囲内では二重らせんを形成せず融解過程は観察されなかったが、NaCl 濃度を 100 mM にすると融解温度 59 °C の曲線を得ることができた。天然の DNA と人工の DNA の系を比較すると、NaCl の効果が全く逆であることがわかった。人工の DNA の系では、錯体が正の電荷を持つため負の電荷を持つ鋳型 DNA と複合体を形成しうるが、NaCl を添加することにより静電的な相互作用が阻害されて不安定化すると考えられた。

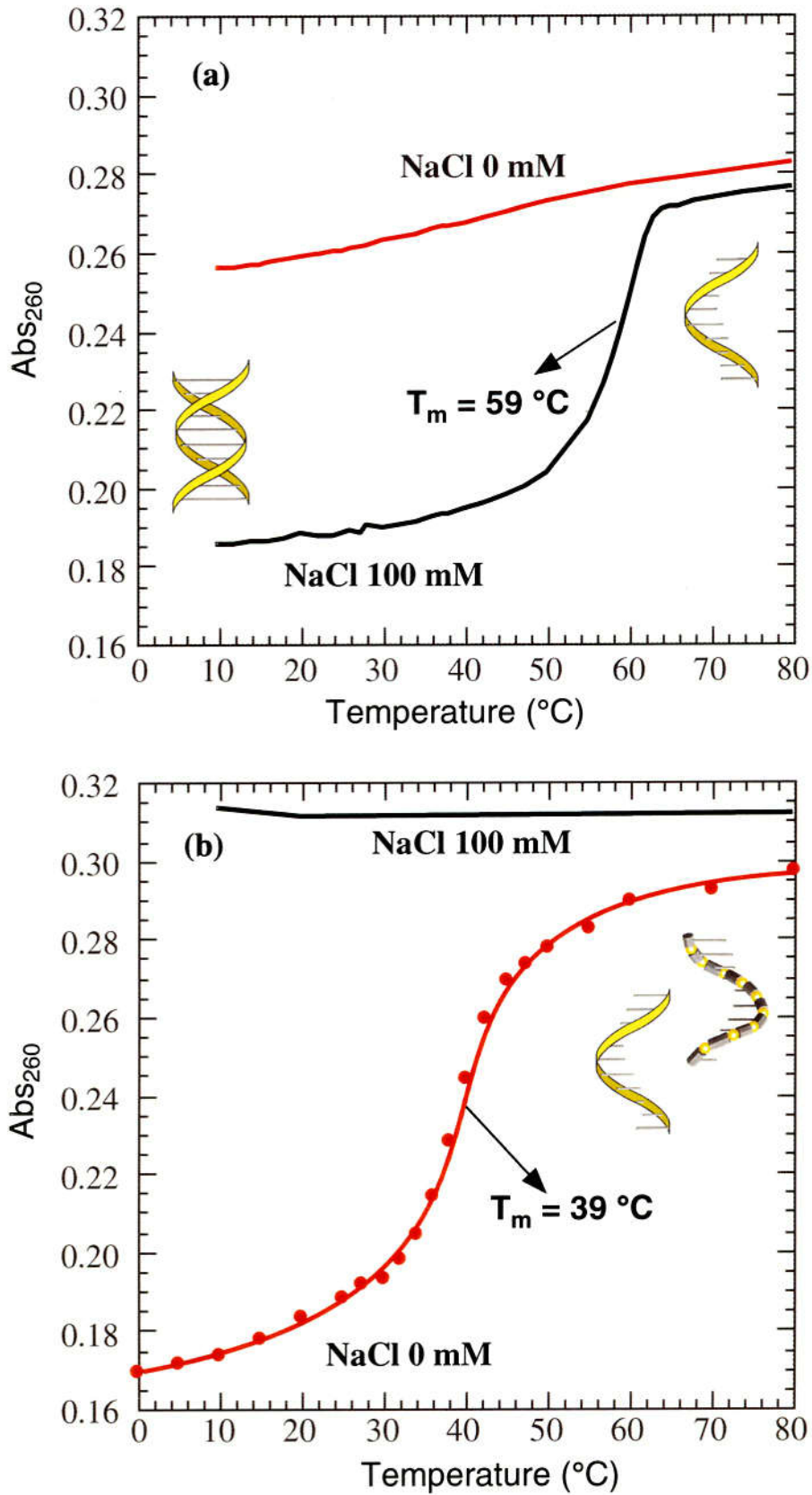


図 4-14 天然の DNA と人工 DNA の融解温度実験に及ぼす塩強度の効果

Mops buffer (1.0 mM, pH 7.0),
 (a): [(dT)₇₀] = [(dA)₇₀] = 15 μM/base,
 (b): [(dT)₇₀] = [(Zn^{II} Complex)] = 15 μM/base.

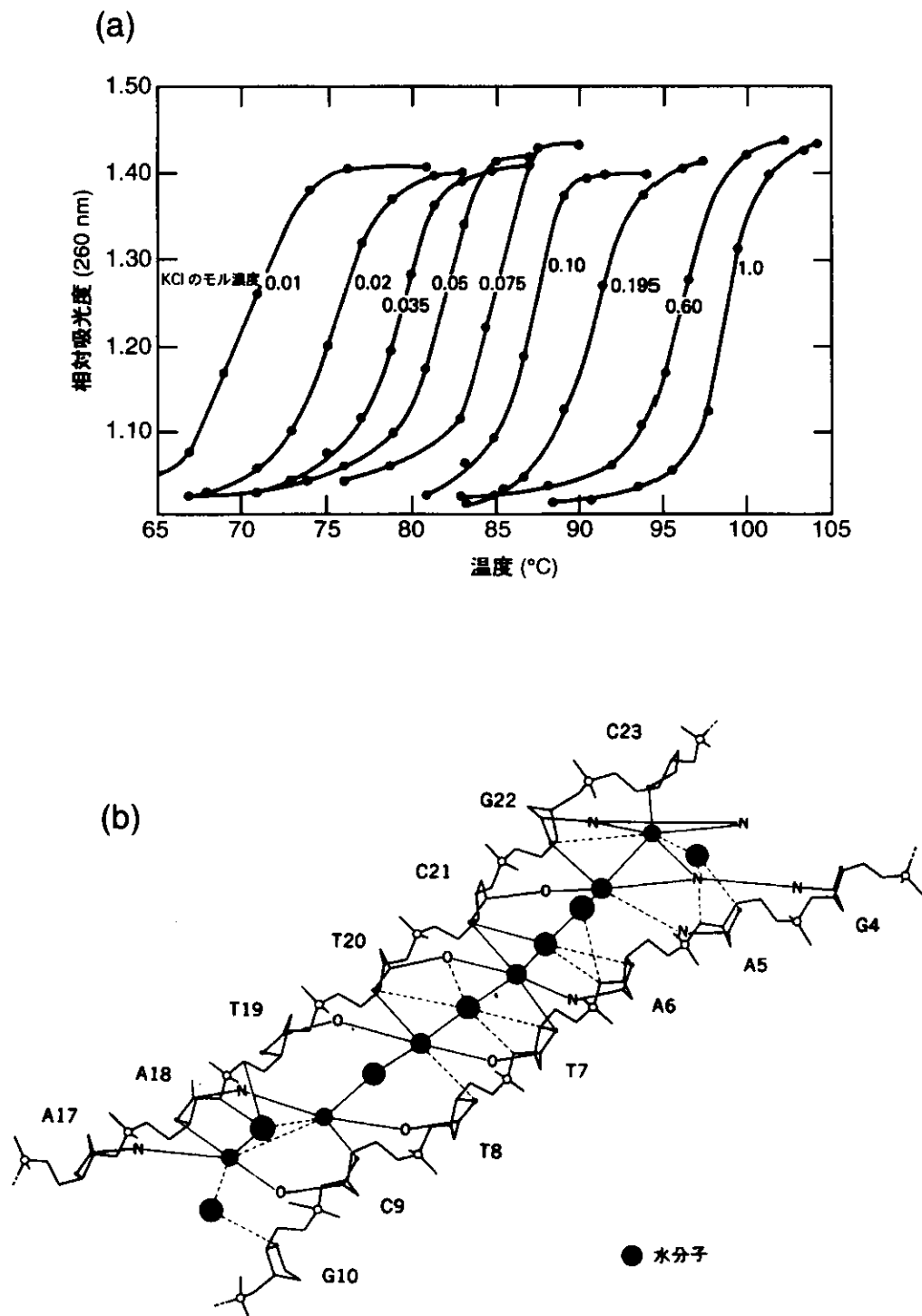


図 4-15 DNA の構造安定化における水分子の効果
 (a): DNA の融解温度の KCl イオン強度依存性¹⁰⁾
 (b): B 型 DNA の構造水³⁾

4-3-4 Job plot 法による複合体形成様式の評価

天然の DNA では、ホモポリマーであるホモポリピリミジンとホモポリプリンが 2:1 の混合比で存在すると三重らせん構造を形成することが知られている¹²⁻¹⁴⁾。また H-DNA や TATA box DNA 等、天然にも三重鎖 DNA が存在することが報告されている^{1,15)}。本アデニン型亜鉛錯体 (B) と (dT)₇₀ の系においても三重らせん構造を形成する可能性があるため、混合比を 2:1 にしたときの融解温度曲線を調べてみた。天然の DNA では、アデニン塩基とチミン塩基の Watson-Crick 塩基対と、もう一つのチミンとアデニンによる Hoogsteen 塩基対による三重鎖を形成する (図 4-16)。

結果を図 4-16 (a) に示した。(dT)₇₀:アデニン型亜鉛錯体 (B) = 2:1 で混合したものは、1:1 のときと同様に温度依存性の吸光度変化が観察され、昇温過程と降温過程で逆性が認められた。0 度での吸光度の減少率は、(dT)₇₀:アデニン型亜鉛錯体 (B) が 2:1 混合比の時の方が大きくなることが分かった。そこで、天然の DNA と同様に三重鎖を形成している可能性が示唆されたので、複合体形成比を調べるべく Job plot を行った。

Job plot は、相互作用している物質の組成比を求める実験方法である¹⁶⁾。Rich らの研究では、poly A, poly U の相互作用様式が塩の添加により変化することを見いだした¹⁷⁾。低塩濃度での Job plot は、poly A:poly U = 1:1 混合比の時もっとも吸光度の減少が大きいが、高濃度存在下では poly A:poly U = 1:2 混合比の時もっとも吸光度の減少が大きかったことから、三重鎖構造の形成を示唆した。一本鎖鋳型 DNA である (dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) の複合体組成比を検討するため、(dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) の全濃度を一定に保ち (30 μM/base)、混合比を種々変化させ、0 °C における吸光度をプロットした。最も大きい UV 淡色効果が観察された混合比では、混合した (dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) の両者が相互作用していることを示唆する。結果を図 4-16 (b) に示した。

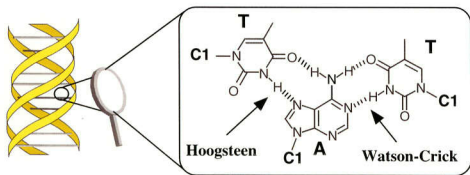
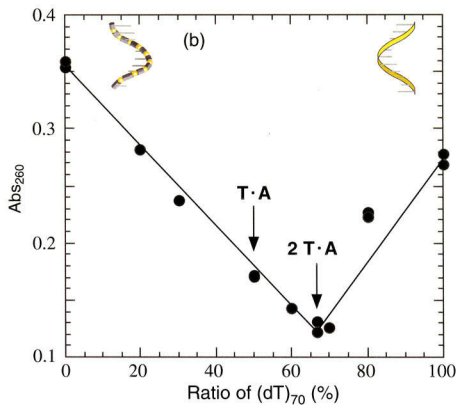
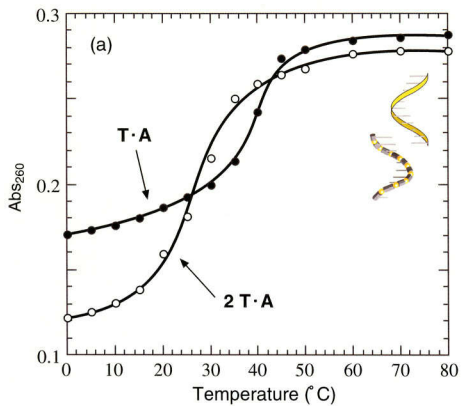


図 4-16 融解温度曲線と 0 °C における Job plotting
 1.0 mM Mops pH 7.0, 260 nm, [Total base] = 30 μ M/base
 (a): T:A = 1:1, T:A = 2:1 のときの融解温度曲線
 T·A ([T] = [A] = 15 μ M/base),
 2 T·A ([T] = 20 μ M/base, [A] = 10 μ M/base),
 (b): Job plotting, 0 °C

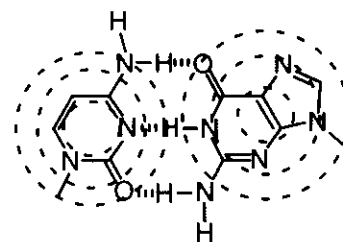
(dT)₇₀:アデニン型亜鉛錯体 (B) が 2:1 のときが最も吸光度の減少が大きかった。すなわち、本 Job plot は、(dT)₇₀:アデニン型亜鉛錯体 (B) が 2:1 の比である複合体が含まれていることを示唆した。天然の三重鎖 DNA の場合、三本鎖から二本鎖、二本鎖から一本鎖への過程を示す二段階の融解温度曲線を示すことが多いが、人工 DNA の系では、一段階の曲線になった。もし、天然の DNA と同じような三本鎖を仮定した場合、三本鎖から二本鎖、二本鎖から一本鎖への解離に必要なエネルギーの差が小さいことを示している。アデニン型亜鉛錯体 (B) のユニットあたりの電荷は正の二価であり、一方鋳型 DNA はリン酸部位はアニオンであるため、ユニットあたりの電荷は負の一価となる。したがって、(dT)₇₀:アデニン型亜鉛錯体 (B) が 2:1 で複合体を形成したとき、ちょうど電荷を打ち消すことになる。静電的な非特異的相互作用で凝集体を形成している可能性も示唆された。

今後、電子顕微鏡により一本鎖鋳型 DNA とアデニン型亜鉛錯体の複合体の観察を行う。本測定により、金属イオンとリン原子がどのような配列順序、距離間隔で並んでいるのかがわかる。また、グアニン型亜鉛錯体を調製して一本鎖鋳型 DNA である (dC)₇₀ との融解温度実験により、融解温度の違いから複合体構造が予測できると期待される。

本人工 DNA の系で特記すべきことは、融解実験において吸光度の値が一定になる、すなわち会合平衡に達するのに非常に長時間を有する (3 - 5 時間) ことである。これは、主鎖の金属錯形成部位の配位子交換反応と一本鎖鋳型 DNA との塩基対形成が同時に起きているからであると考えられた。また、濃度が低いため亜鉛錯体のポリマー (オリゴマー) 長が短く、これらの鋳型上に会合して熱力学的に安定な構造を形成するまでに時間を有することが示唆された。平衡までに達するまでの時間は、金属イオンの配位子交換速度、金属錯体部位の安定度、鋳型の長さなどに依存すると考えられた。

4-3-5 軽水中でのイミノプロトン NMR 測定^{18,19)}

チミンやグアニン塩基のイミノプロトン (T3, G1) は、水素結合を形成すると環電流効果を受けるため、¹H NMR で測定すると特異的に大きく低磁場シフトする。通常 9 - 11 ppm に



現れるこれらのシグナルが、12 - 14 ppm に大きくシフトする。ただし、末端ペアは水素結合がゆらいでいるため、塩基対の生成・解離が非常に速く起こり、シフトが小さいシグナルの線幅が大きくなる。核酸のイミノプロトンを¹H NMR で測定するとき、重水中では交換可能なプロトンが重水素化されてシグナルが消失する。したがって D₂O - H₂O 系での測定が有効である。しかし、大量に存在する水と基質濃度には 1000 - 10000 倍の差があるため、測定に支障が生じないように水ピークを消去する必要がある。

Bruker DRX 500 には溶媒消去パラメーターが組み込まれていて、zgpr, p11 は水のシグナルを強い電磁波 (単一の周波数) で照射して飽和させる方法である。これに対して watergate p3919gs は、水分子と核酸の分子量の違い、すなわち分子運動、拡散速度の差をフィルターとして NMR シグナルを選別する方法である (パルス磁場勾配法)。

今回はこの三つの測定法 (zgpr, p11, watergate p3919gs) を用いてイミノプロトン NMR の測定を行った。まず参照実験として、Dickerson 配列 12 mer (自己相補配列 5'-GCGCAATTGCGC-3'), poly U - poly A, (dT)₇₀ - (dA)₇₀ のイミノプロトン NMR 測定を行った。DNA の濃度は吸光度より決定し、アニーリング後、軽水 NMR 実験マニュアルに従って測定を行った²⁰⁻²²⁾。測定条件は図中に示した。

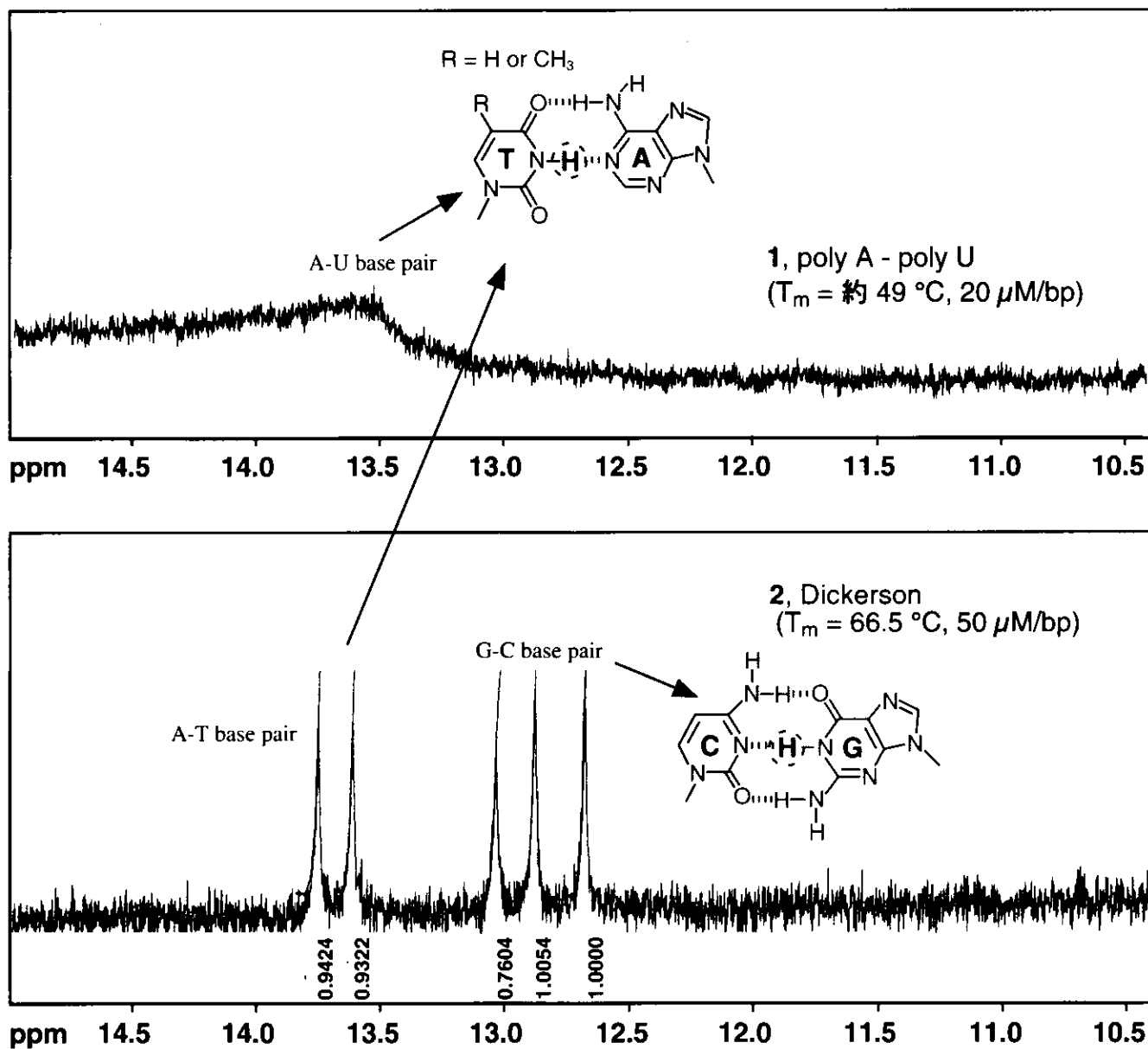


図 4-17 Bruker DRX-500 による DNA のイミノプロトン測定

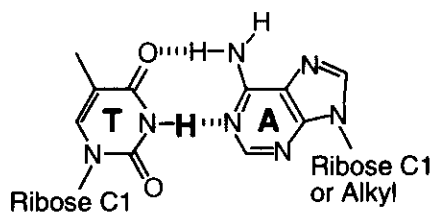
500 MHz, D₂O : H₂O (Mops 10 mM pH 7.0, NaCl 100 mM) = 1 : 10 (total 0.55 ml), TSP at 300 K

1, Dickerson オリゴマー

PulProg : watergate p3919gs, p11 : -4.00 dB, p1 : 7.80 μsec, p16 : 1.0 msec, d16 : 200 μsec
p18 : 8.00 dB, p28 : 31.00 μsec, ns 80, DNA = 2.5 mM/bp

2, poly A - poly U

PulProg : p11, d1 : 1.00 sec, p1 : 6.00 μsec, p11 : -4.00 dB, d19 : 0.0768 μsec, p0 : 6.00 μsec
ns : 800, DNA = 5 mM/bp



3, (dT)₇₀ - (dA)₇₀
(T_m = 61.3 °C, 80 μM/bp)

([DNA] = 0.5 mM/bp, NaCl 100 mM, ns = 11747)

300 K



4, (dT)₇₀ - Zn^{II} complex
(T_m = 39 °C, 15 μM/bp)

([DNA] = 0.5 mM/bp, Mops 1.0 mM, ns = 14775)

300 K



5, (dT)₇₀ - Zn^{II} complex
(T_m = 39 °C, 15 μM/bp)

([DNA] = 0.5 mM/bp, Mops 1.0 mM, ns = 12609)

278 K (5 °C)

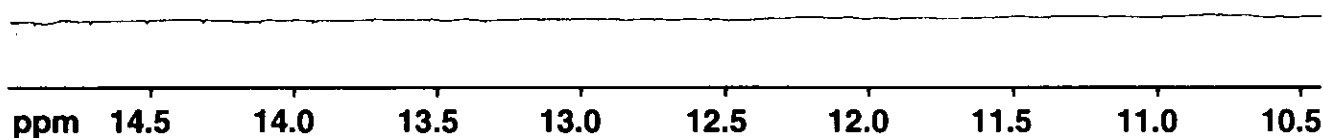
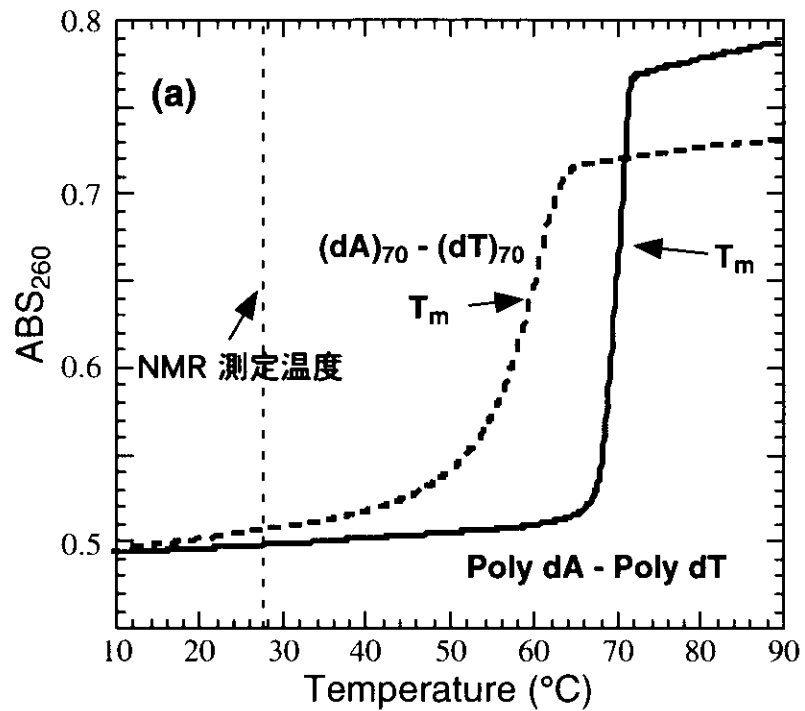


図 4-18 Bruker DRX-500 による天然 DNA オリゴマー、および人工 DNA のイミノプロトン NMR 測定

500 MHz, D₂O : H₂O = 1 : 10 (total 0.55 ml), TSP = 0 ppm, PulProg : watrgate p3919gs, p11 : -4.00 dB, p1 : 7.80 μsec, p16 : 1.0 msec, d16 : 200 μsec, p18 : 8.00 dB, p28 : 31 μsec, p0 : 31

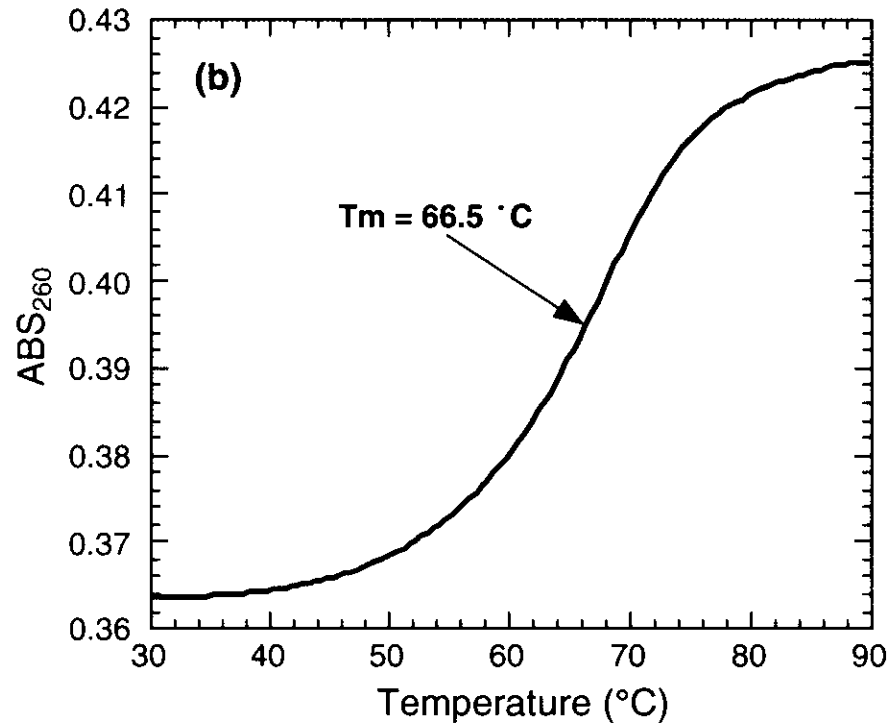
- 1 poly A - poly U (5 mM/bp), Mops 10 mM, pH 7.0 : D₂O = 10:1, NaCl 100 mM, 5 °C
- 2 Dickerson オリゴマー (5 mM/base), [Mops 10 mM, pH 7.0] : [D₂O] = 10:1, NaCl 1.0 M, 5 °C (二本鎖構造を形成する条件、ループ構造はとらない)
- 3 (dA)₇₀ - (dT)₇₀ (0.5 mM/bp), Mops 10 mM, pH 7.0 : D₂O = 10:1, NaCl 100 mM, 5 °C
- 4 (dA)₇₀ - (dT)₇₀ (0.5 mM/bp), NaCl 100 mM (緩衝液無し) : D₂O = 10:1, 5 °C
- 5 (dT)₇₀ - Zn^{II} complex (0.5 mM/bp), H₂O : D₂O = 10:1, 5 °C

1 の poly U - poly A では、5 mM という高濃度でブロードなイミノプロトン由来のシグナルを観察することができた (図 4-17、パルスプログラム p11)。2 の Dickerson 配列を zgpr, watergate p3919gs で測定した。両者ともイミノプロトンのシグナルを観測することができたが、末端 G-C 由来のシグナルは観察されなかった (図 4-17)。次に 3, (dT)₇₀ - (dA)₇₀ を 0.5 mM で測定しところ (パルスプログラム watergate p3919gs)、Mops 由来のプロトンシグナルのためイミノプロトンのシグナルが非常に小さくなり観察できなかった。そこで Mops が存在しない系 4 で測定を行ったところ、14.0 ppm 付近にイミノプロトンと思われるブロードなピークが観察できた (図 4-18、実験 4, NaCl 100 mM, watergate p3919gs)。実験 5 の人工 DNA の系では (図 4-18)、イミノプロトンシグナルが観察できなかった。水素結合の交換が非常に速く NMR のタイムスケールでは測定できない可能性や、人工 DNA の系では静電的な相互作用が優先した構造を取り水素結合が非常に弱くなっている可能性が示唆され、今後条件検討が必要であると思われる。また、より安定な塩基対を形成するグアニン・シトシンの系の検討が重要であると考えられた。



[DNA] = 80 μ M/bp
 Mops 10 mM pH 7.0, NaCl 100mM,
 Temperature change ; 0.5 $^{\circ}$ C/min
 Detection = 260 nm

Line	DNA employed	T_m ($^{\circ}$ C)
—	poly dA - poly dT	70.6
- - - -	(dA) ₇₀ - (dT) ₇₀	61.9



[DNA] = 20 μ M/bp
 Mops 10 mM pH 7.0, NaCl 1.0 M,
 Temperature change ; 0.5 $^{\circ}$ C/min
 Detection = 260 nm

Line	Sequence	T_m ($^{\circ}$ C)
—	Dickerson GCGCAATTGCGC CGCGTTAACGCG	66.5

図4-19 NMR に用いたDNA の融解温度曲線

4-3-6 CD スペクトル測定^{23,24)}

DNA は光学活性物質であるため、直線偏光をあてると円二色性効果 (直線偏光が光学活性物質中を透過した後に楕円偏光になる性質) を示す。(dT)₇₀ の持つ CD スペクトルが、光学不活性である人工 DNA により変化を示せば、両者は相互作用して新しい構造を誘起していることを意味する。CD スペクトル測定の結果を図 4-20 に示した。

(dT)₇₀, 15 μM/base の CD スペクトルは、277 nm 付近に正のコットン効果、250 nm 付近に負のコットン効果を示した。そこに光学不活性なアデニン型亜鉛錯体を加えていくと、三本鎖ができる可能性のある 2.5 μM から 7.5 μM の条件では、等集点 263 nm を通る 277 nm の正のコットン効果の減少が認められた。一方、250 nm の負のコットン効果にはほとんど変化は認められなかった。1:1 の複合体ができる可能性のある 7.5 μM ~ 15 μM の条件下では、異なる等集点 265 nm を通る 250 nm の負のコットン効果が大幅に減少することがわかった。またアデニン型亜鉛錯体 (Zn^{II} complex) が 15 μM 以上存在してもスペクトルに変化はないことが分かった。

以上の結果より、アデニン型亜鉛錯体と (dT)₇₀ は、相互作用していて新しい構造を誘起していることが示唆された。アデニン型亜鉛錯体が 2.5 μM から 7.5 μM の濃度域では、(dT)₇₀ が過剰に存在する領域であり三本鎖の存在が考えられた。7.5 μM ~ 15 μM の領域では (dT)₇₀ : アデニン型亜鉛錯体の存在比が 2:1 ~ 1:1 の条件であり、三本鎖から二本鎖へと移る過程を観察している可能性がある。2:1 ~ 1:1 の条件では三本鎖、二本鎖、一本鎖が混在している可能性が示唆された。

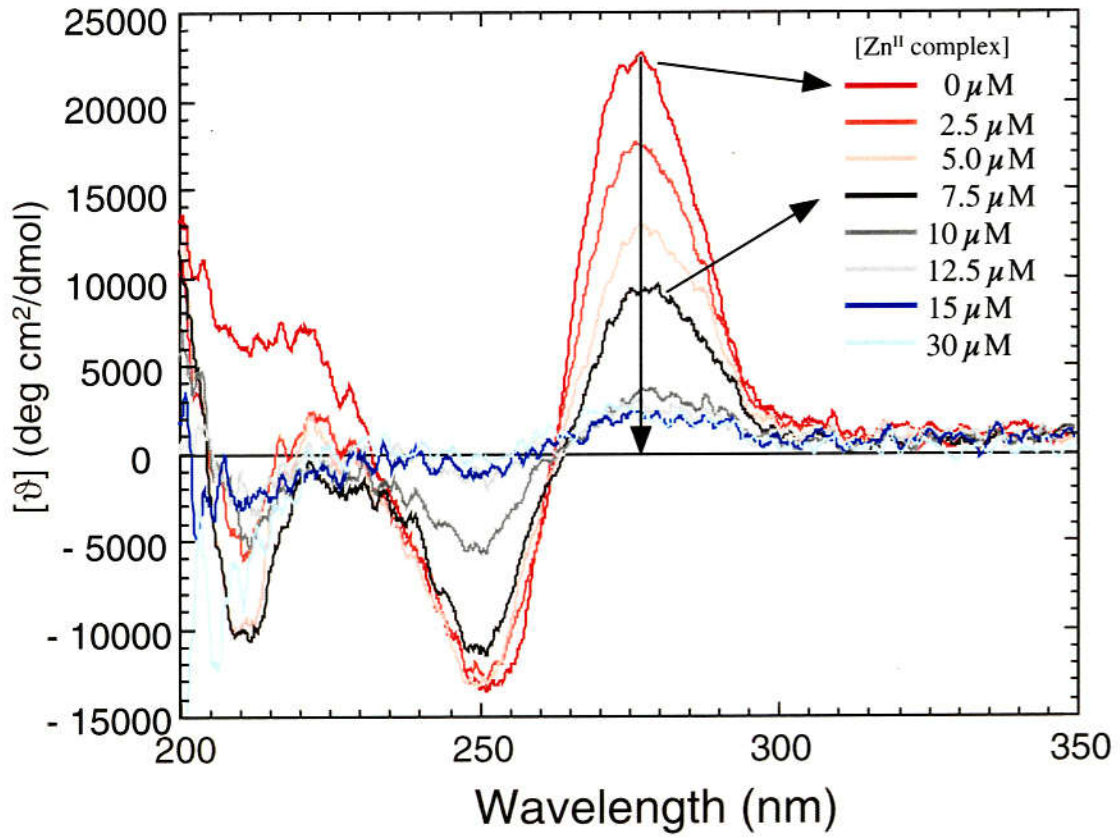


図 4-20 (dT)₇₀ の CD スペクトルに及ぼす (dT)₇₀ と Zn^{II} complex の添加効果 (1.0 mM Mops pH 7.0, 5 °C , [(dT)₇₀] = 15 μM/base)

4-4 アデニン型亜鉛錯体とチミン型亜鉛錯体との構造解析

前項の実験で一本鎖鋳型 DNA と人工核酸である Zn^{II} complex が相互作用していることがわかった。人工核酸同士も二重鎖を形成するかどうかを、X線結晶解析により検討した。

アデニン型亜鉛錯体を蒸留水に溶解し、別の容器にチミン型モノマーと硫酸亜鉛を蒸留水に溶解した。両者を当量になるよう混合し、80 °C でアニーリングしてフィルターろ過し、エタノール蒸気拡散法により結晶化を行った。X線結晶解析の結果を図 4-21 に示した。

本結晶は亜鉛によって錯形成した主鎖同士を、硫酸イオンが架橋している構造をなしていることがわかった。架橋は亜鉛の軸位の水分子が、硫酸イオンの酸素原子に置換されていた。また、核酸塩基部位はお互いに水素結合ではなく、スタッキングしている可能性が示唆された。アデニン-アデニン、アデニン-チミン、チミン-チミンの三つの組み合わせが有り、塩基の特定は困難であった。

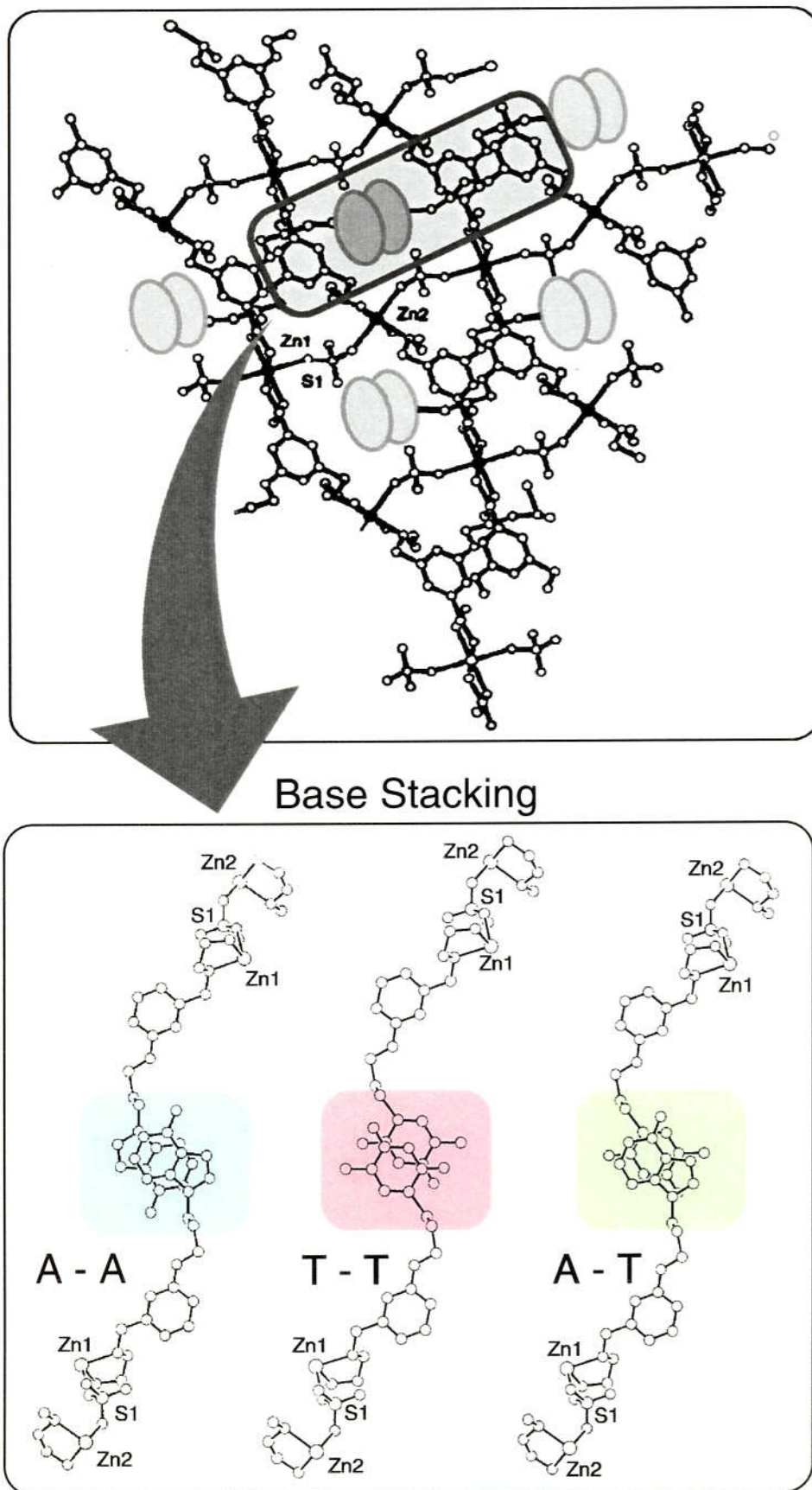


図 4-21 アデニン型モノマーとチミン型モノマーと両垂鉛錯体より生じた結晶のX線結晶解析

4-5 結果と考察

第二章で合成したアデニン型人工 DNA モノマーと硝酸亜鉛の錯体の構造を X 線結晶構造解析より明らかにした。分子内で錯形成することなく分子間の二つのエチレンジアミンが亜鉛イオンにトランス型で錯形成していた。また亜鉛の軸位には、上下に二つの水分子が配位した六配位八面体構造を形成し、無限長ポリマー型であった。亜鉛-亜鉛間の距離は 7.718 Å であり、天然の DNA のリン原子間の距離約 6.7 Å に比べて長いことがわかった²⁵⁾。PNA は DNA と塩基部位が水素結合形成することにより相互作用することが知られているが、非常に伸びた形をしている (一ユニット間の距離は 8.3 Å)⁴⁾。本アデニン型亜鉛錯体 (B) は PNA より距離的には短いため (7.718 Å)、DNA と相互作用する可能性は充分にあると予想された。結晶中ではアデニン側鎖はポリマーの軸に対して交互に向いていたが、溶液中では自由回転等により同方向に向くことは可能である。酢酸亜鉛と人工 DNA モノマーから作成した結晶 (A) も分子間の二つのエチレンジアミンと亜鉛イオンとの錯生成によりポリマーを形成していた。亜鉛周りの配位構造やポリマー軸に対するアデニン側鎖の向きなどが亜鉛錯体 (B) と異なるため、天然の DNA とは違った相互作用をすることが予想された。

一本鎖鋳型 DNA である (dT)₇₀ と人工核酸であるアデニン型亜鉛錯体 (B) の相互作用を検討した。UV 淡色効果より、温度依存的に UV 吸収が変化することがわかり、天然の二本鎖 DNA と同様な挙動を示すことがわかった。また Job plot、CD スペクトルより、(dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体 (B) の 2:1 複合体が形成している可能性が示唆された。CD スペクトルよりアデニン型亜鉛錯体 (B) を添加していくと、新たな円二色性が観察され、構造の変化が起こっていることが示唆された。イミノプロトン NMR 測定により水素結合形成を確認しようと試みたが、観察することができなかった。

以上の結果より、(dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体は相 2:1 あるいは 1:1 複合体の形で相互作用していることがわかった。相補鎖による塩基対間で水素結合を形成しているとい

う直接の証拠はまだ得られていない。イオン間の相互作用によって凝集体を形成している可能性も示唆されたため、電子顕微鏡測定等で複合体形成の様式を詳細に検討中である。

4-6 総括

本章では、エチレンジアミンを金属錯形成部位としたアデニン型人工 DNA の金属錯体と一本鎖鋳型 DNA との相互作用を検討するための実験方法と結果についての評価を記述した。

第二章でデザインした、エチレンジアミンを金属錯形成部位として持ち、アデニンを核酸塩基部位としてもつようなアデニン型人工核酸モノマーは、分子間の二つのエチレンジアミンと硝酸亜鉛が錯形成して無限長ポリマー構造をなしていることがわかった。錯形成は六配位八面体型構造をなし、アキシャル位は水分子がそれぞれ配位していることを X 線結晶構造解析より示した。

各種分光学的な手法を用いて一本鎖鋳型 DNA である (dT)₇₀ とアデニン型錯体の相互作用を検討した。融解温度実験では天然の DNA 二本鎖で見られるような融解温度曲線が得られた。Job plot では (dT)₇₀ とアデニン型亜鉛錯体の混合比が 2:1 のときもっとも淡色効果が大きかった。すなわち 2:1 複合体の生成を支持している。CD スペクトルにより、2:1 と 1:1 複合体が生成していることがわかった。塩基間の相補的水素結合形成をイミノプロトン NMR により直接的に証明するには至らなかったが、今後複合体の X 線結晶構造解析、電子顕微鏡測定などにより明らかにしていく必要がある。

参考文献

- 1) S. Arnott and D. W. L. Hukins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1504, 1972.
- 2) A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, G. van der Marel, J. H. van Boom, and A. Rich, *Science*, **211**, 171, 1981.
- 3) CG でバイオ分子を見る、和田昭允、東京化学同人、103、1988.
- 4) H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, and P. E. Nielsen, *Nature Struct. Biology*, **4**, 98, 1997.
- 5) 生化学辞典第二版、東京化学同人、855、1996.
- 6) 森川耿右、三井幸雄、蛋白質核酸酵素別冊、共立出版、204、1973.
- 7) 森川耿右、生化学実験講座 2、東京化学同人、3、1977.
- 8) 平山令明、結晶解析入門、丸善、1996.
- 9) D. Prörschke, *Biopolymers*, **10**, 1989, 1971.
- 10) J. Marmur and P. Doty, *J. Mol. Biol.*, **5**, 109, 1962.
- 11) M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew, and R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, **163**, 129, 1983.
- 12) A. Rich and D. R. Davies, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3548, 1956.
- 13) R. D. Blake, J. Massoulié, and J. R. Frasco, *J. Mol. Biol.*, **30**, 291, 1967.
- 14) K. Hoogsteen, *Acta Crystallogr.*, **16**, 907, 1963.
- 15) R. D. Wells, D. A. Collier, J. C. Hanvey, M. Shimizu, and F. Wohrab, *FASEB J.*, **2**, 2939, 1988.
- 16) P. Job, *Ann. Chim.*, **9**, 113, 1939.
- 17) G. Felsenfeld and A. Rich, *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 457, 1957.
- 18) 甲斐荘正恒、蛋白質核酸酵素別冊、共立出版、228、1973.
- 19) 曾根達生、京極好正、生化学実験講座 2、東京化学同人、63、1977.

- 20) 日本ブルカー株式会社、NMR-2B 中級者コース、溶媒消去 1-1.
- 21) 王子田彰夫、塩谷研マニュアル「核酸の NMR サンプル調製マニュアル」.
- 22) 幡野明彦、塩谷研マニュアル「Bruker DRX-500 NMR 軽水マニュアル」.
- 23) 今堀和友、渡辺公綱、生化学実験講座、核酸 I、p159、東京化学同人、1977.
- 24) 渡辺公綱、別冊蛋白質核酸酵素、共立出版、172、1973.
- 25) Nucleic Acids in Chemistry and Biology (Eds. G. M. Blackburn, M. J. Gait), IRL Press, Oxford, 1990

第五章

実験方法

- 1 Akihiko Hatano, Hiromasa Morishita, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiko Shionoya
" Metal-Assisted Formation of Artificial Nucleic Acids "
Nucleic Acids Symp. Ser., **39**, 171-172, 1998.

- 2 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya
" Self-Assembly of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics into a Single-Stranded
Zn^{II} Coordination Polymer "
Chem. Lett., 822-823, 2000.

- 3 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya, .
" Syntheses of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics: Metal-Assisted Assembly
of Guanine Mimics onto an Oligocytosine "
in preparation.

5-1 General Information

All solvents and reagents were of reagent-grade quality, and used without further purification. TLC analysis was carried out on silica gel 60 F₂₅₄ 1.05554 (Merck). Column chromatography was performed using Wakogel C-300 (silica gel, Wako) or Silica gel 60 (Merck).

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on either a JEOL Lambda 500 (500 MHz for ¹H; 125.65 MHz for ¹³C) or a Bruker DRX-500 (500 MHz for ¹H, Watergate) spectrometer. The spectra were referenced to TMS in chloroform-*d*₃ or DMSO-*d*₆, and to TSP in D₂O. Chemical shifts (δ) are reported in ppm; multiplicity is indicated by: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quintet), m (multiplet), and br (broad). Coupling constants, *J*, are reported in Hz. FABMS, EIMS, ESIMS were recorded on a Shimadzu KRATOS CONCEPT IS, a Shimadzu QP 1000 EX, and a PE SCIEX API-300 spectrometer, respectively. X-ray analyses were performed on a Rigaku RAXIS-IV Imaging Plate diffractometer with graphite monochromated Mo K α radiation. Melting points were obtained on a Yanaco MP-500D. UV spectra were measured on a Hitachi U-3500 spectrometer in a 1 cm quartz cell. CD spectra were measured on a Jasco J-725 spectropolarimeter in a 1 cm strain-free quartz cell. Structural model studies were performed using a CPK molecular model or a Discover Insight II program and CAChe.

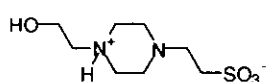
5-2 Abbreviations

Protective groups

Ac	acetyl
Bn	benzyl
Boc	<i>t</i> -butyloxycarbonyl
Bz	benzoyl
Cbz or Z	benzyloxycarbonyl
Pv	pivaroyl
TFA	trifluoroacetyl
TMS	trimethylsilyl
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
Troc	2,2,2-trichloroethoxycarbonyl

Reagents

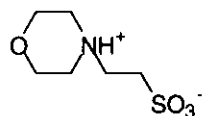
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DMAP	dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethyl formamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid



$$pK_a = 7.55 (20\text{ }^\circ\text{C})$$

$$\text{Log } K = 5.01 (\text{H}^+)$$

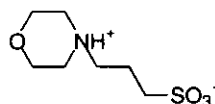
Mes	2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate
-----	---



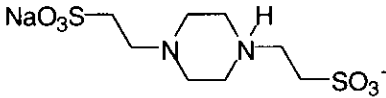
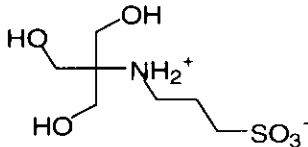
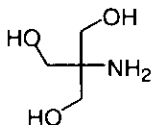
$$pK_a = 6.15 (20\text{ }^\circ\text{C})$$

$$\text{Log } K = 0.7 (\text{Mn}^{2+})$$

Mops	3-morpholinopropanesulfonic acid
------	----------------------------------



$$pK_a = 7.20 (20\text{ }^\circ\text{C})$$

Pipes	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)	
		$pK_a = 6.82 (20\text{ }^\circ\text{C})$ $\text{Log } K = 6.93 (\text{H}^+)$
Taps	<i>N</i> -[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid	
		$pK_a = 8.40 (20\text{ }^\circ\text{C})$
TFA	trifluoroacetic acid	
THF	tetrahydrofuran	
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	
		$pK_a = 6.82 (20\text{ }^\circ\text{C})$ $\text{Log } K = 7.63 (\text{Cu}^{2+})$
TSP	triisopropylbenzenesulfonyl chloride	

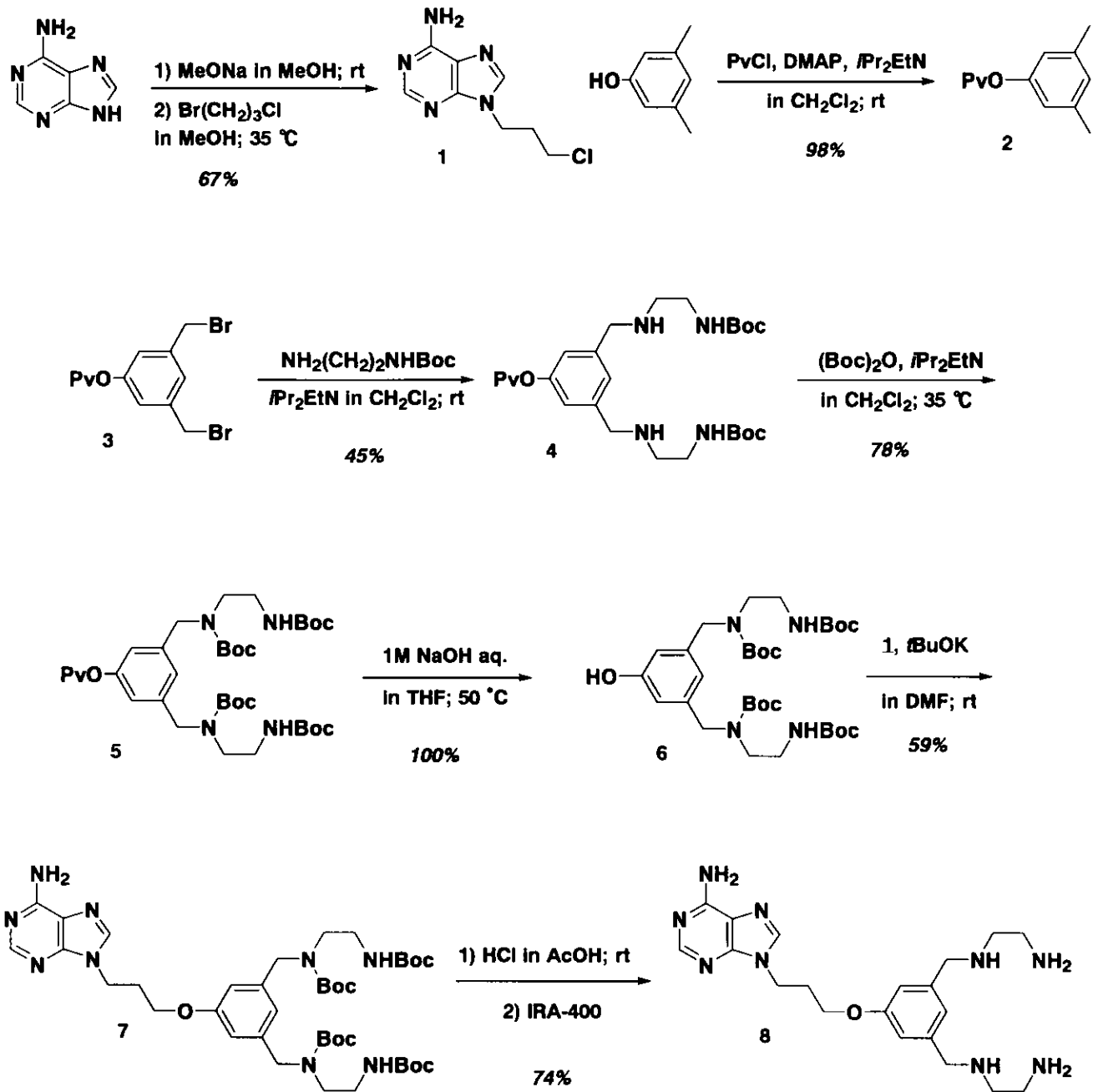
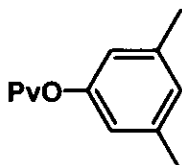


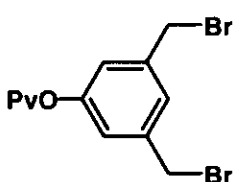
図 5-1 エチレンジアミンを金属錯形成部位として用いたアデニン型核酸モノマーの合成

5-3 Syntheses of Artificial DNA monomers.

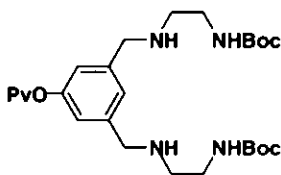
5-3-1 Adenine type 8.



3,5-Dimethylphenylpivaroate (2). To a solution of 3,5-dimethylphenol **1** (25.0 g, 0.21 mol) and DMAP (5.0 g, 0.041 mol), triethylamine (22.3 g, 0.22 mol) in CH_2Cl_2 (40 mL) was added a solution of pivaroyl chloride (26.5 g, 0.22 mol) in CH_2Cl_2 (60 mL) dropwise over 1 h with a nitrogen inlet in an ice-water bath. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature, and then poured into 600 mL CH_2Cl_2 , washed with water (300 mL \times 3), and dried over anhydrous MgSO_4 . After filtration, the solvent was evaporated. Purification of the residue by column chromatography on silica gel with *n*-hexane-ethylether (1:1) gave pure 3,5-bis(bromomethyl)phenyl pivalate (**2**) as a colorless syrup (42.5 g, 98%): ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.34 (9H, s), 2.30 (6H, s), 6.67 (2H, s), 6.84 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 177.3, 151.0, 139.2, 127.3, 119.1, 39.0, 27.2, 21.2; EIMS *m/e* 206 (M^+); HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$ 206.1307, found 206.1315.

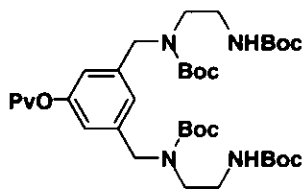


Compound 3. NBS (78.3 g, 0.44 mol) and benzoyl peroxide (0.10 g) were added in 10 equal portions apart during 6 h to a refluxing solution of 3,5-dimethylphenyl pivalate (42.2 g, 0.20 mol) in CCl_4 (412 mL). The reaction mixture was further heated at reflux for 16 h and then resulting precipitate was removed by filtration. The residual oil obtained after evaporation was chromatographed on silica gel (Silica gel 60, Merck) with *n*-hexane-toluene (3.5:1) and then recrystallized from *n*-hexane to afford **3** as pale yellow needles (42.2 g, 58%). mp 44.0-45.0 °C; ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.36 (9H, s), 4.45 (4H, s), 7.06 (2H, s), 7.27 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 176.8, 151.4, 139.7, 126.7, 122.2, 39.2, 32.0, 27.1; EIMS *m/e* 364 (M^+); HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_2$ 363.9498, found 363.9511.

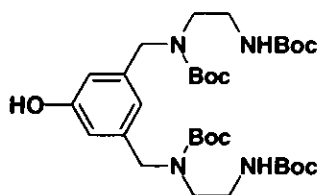


Compound 4. To a solution of *N*-(2-aminoethyl)carbonic acid *t*-butyl ester¹⁾ (17.6 g, 110 mmol) and diisopropylethylamine (1.42 g, 11.0 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) was added dropwise a solution of **3** (2.0 g, 5.49 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) over 1.5 h at room temperature. After 0.5 h, the reaction mixture was poured into CH_2Cl_2 (150 mL), washed with water (120 mL \times 2), dried over anhydrous MgSO_4 , and evaporated. The crude product was chromatographed with CHCl_3 -MeOH (20:1) to obtain **4** as pale yellow foam (1.79 g, 45%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.35 (9H, s), 1.48 (18H, s), 1.57 (2H, br), 2.75 (4H, br), 3.23 (4H, br), 3.71 (4H, s), 4.96 (2H, br), 6.92 (2H, s), 7.13 (1H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 177.2, 156.2, 151.4, 141.9, 129.0, 128.2, 125.3, 125.0, 119.8, 79.2, 53.1, 48.7, 40.2,

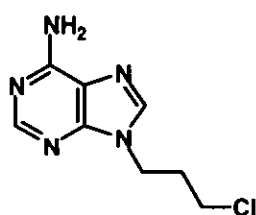
39.1, 28.4, 27.2; FABMS *m/e* 523 (M+H)⁺; HRMS calcd for C₂₇H₄₇N₄O₆ 523.3496, found 523.3482.



Compound 5. To a solution of **4** (2.88 g, 5.51 mmol) and diisopropylethylamine (1.56 g, 12.1 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) was added dropwise a solution of di-*t*-butylbiscarbonate (2.65 g, 12.1 mmol) over 15 min. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature and then washed with water (100 mL × 3), dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-AcOEt (2:1) to obtain **5** as pale yellow foam (3.11 g, 78%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.35 (9H, s), 1.43 (36H, s), 3.26 (8H, br), 4.41 (4H, br), 4.83 (1H, br), 5.02 (1H, br), 6.82 (2H, br), 6.94 (1H, br); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 177.0, 156.1, 155.9, 151.6, 140.3, 123.4, 119.9, 119.2, 80.4, 79.1, 50.6, 50.0, 46.0, 39.1, 39.1, 28.4, 27.1; FABMS *m/e* 724 (M+H)⁺; HRMS calcd for C₃₇H₆₃N₄O₁₀ 723.4544, found 723.4540.

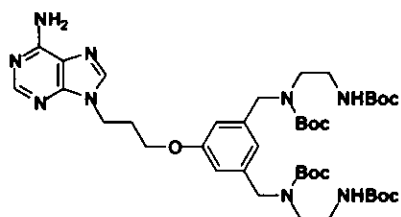


Compound 6. To a solution of **5** (1.94 g, 2.69 mmol) dissolved in THF (20 mL) was added an aqueous 1.0 M NaOH solution (20 mL). The reaction mixture was heated at 60 °C for 6 h. Then the pH of the solution was adjusted to 7 with Dowex 50W-X8 (Muromachi Chem.) in the pyridinium form and stirred for 10 min. The resin was removed by filtration and the filtrate was concentrated on a rotary evaporator. The crude material purified by column chromatography using *n*-hexane-AcOEt (2:1) afforded **6** as pale yellow foam (1.72 g, 100%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.43 (36H, s), 3.32 (8H, br), 4.44 (4H, br), 5.01 (1H, br), 5.16 (1H, br), 6.55 (1H, s), 6.60 (2H, s); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 157.4, 156.6, 156.3, 140.1, 139.8, 113.5, 113.2, 80.4, 79.3, 50.8, 50.1, 45.8, 39.2, 28.4, 27.2; FABMS *m/e* 637 (M-H); HRMS calcd for C₃₂H₅₃N₄O₉ 637.3813, found 637.3800.

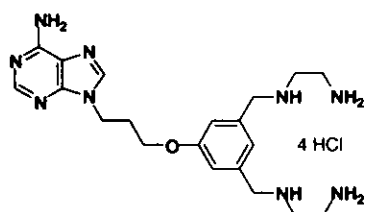


9-(3-Chloropropyl)adenine (1)²¹. To a suspension of adenine (2.5 g, 15.8 mmol) in MeOH (13 mL) was added portionwise MeONa (0.940 g, 17.4 mmol). The reaction mixture was stirred for 5 min at room temperature, to which bromopropyl chloride (2.74 g, 23.7 mmol) was added dropwise over 0.5 h at room temperature. After stirring for additional 15 h, the mixture was poured into iced water (150 mL) and the resulting colorless precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated to remove MeOH. The water layer was extracted with CH₂Cl₂ (100 mL × 3), and the combined organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The crude product was recrystallized from MeOH to afford **1** as colorless plates (2.23 g, 67%). mp 180.0-181.0 °C (dec); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.27 (2H, q, *J* = 6.6 Hz), 3.65 (2H, t, *J* = 6.3

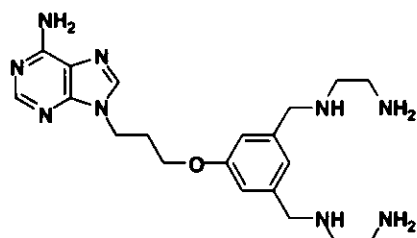
(Hz), 4.29 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 7.23 (2H, s), 8.15 (1H, s), 8.16 (1H, s); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 156.0, 152.4, 149.5, 140.8, 118.8, 42.3, 40.6, 32.0; EIMS m/e 211 (M^+); Anal. Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_5$: C, 45.40; H, 4.76; N, 33.09. Found: C, 45.46; H, 4.67; N, 32.81.



Compound 7. To a solution of **6** (1.63 g, 2.55 mmol) and potassium *t*-butoxide (0.35 g, 3.07 mmol) dissolved in DMF (50 mL) was added compound 9-(3-chloropropyl)adenine (0.48 g, 2.55 mmol) in one portion. The reaction mixture was heated at 50 °C for 10 days and then the solvent was concentrated on a rotary evaporator. The residue was dissolved into 80 mL CH_2Cl_2 and then washed with water twice, dried over anhydrous MgSO_4 , and the solvent was removed on a rotary evaporator. The crude material was purified by silica-gel column chromatography with CHCl_3 -MeOH (25:1) to afford **7** as pale yellow foam (1.08 g, 59%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.43 (36H, s), 2.36 (2H, q, $J = 6.2$ Hz), 3.22 (8H, br), 3.93 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 4.38 (4H, s), 4.42 (2H, s, $J = 6.7$ Hz), 4.94 (1H, br), 5.61 (1H, br), 6.61 (2H, s), 6.69 (1H, s), 7.73 (1H, s), 8.33 (1H, s); FABMS m/e 815 ($\text{M}+\text{H}^+$); HRMS calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{N}_9\text{O}$, 814.4827, found 814.4867.

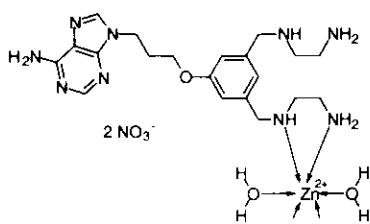


Compound 8 · 4 HCl. Compound **7** (1.01 g, 1.24 mmol) was placed in a flask, to which 1.0 M HCl in AcOH (40 mL) was added. The solution was stirred in an ice-water bath for 1 h. The solvent was removed in vacuo and the resulting colorless solid was recrystallized from H_2O /2-propanol to afford **8 · 4 HCl** as colorless needles (0.569 g, 82%). mp 249.0-250.5 °C; ^1H NMR (D_2O): δ 8.38 (1H, s), 8.36 (2H, s), 7.20 (1H, s), 7.05 (2H, s), 4.57 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 4.34 (4H, s, $J = 5.6$), 4.20 (2H, s), 3.51 (1H, tt, $J = 6.4, 6.8$ Hz), 2.44 (2H, q, $J = 5.9$ Hz); ESIMS m/e 414 (M^+), $m/2e$ 207 (M^+).



Compound 8 The HCl salts of **8** (150 mg, 0.268 mmol) were passed through ion exchange column chromatography (IRA-400, Organo Co. Japan) to obtain the acid-free **8** which was recrystallization from MeCN to afford **8** as colorless prisms (110 mg, 99%). mp 109.5-110.5 °C; ^1H NMR (D_2O): δ 2.13 (2H, q, $J = 5.4$ Hz), 2.61 (4H, t, $J = 6.7$ Hz), 2.83 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.48 (4H, s), 3.93 (2H, t, $J = 5.0$ Hz), 4.18 (2H, t, $J = 5.9$ Hz), 6.13 (2H, s), 6.61 (1H, s), 7.65 (1H, s), 7.91 (1H, s); ^{13}C NMR (D_2O): δ 158.9, 156.5, 153.1, 150.3, 143.9, 141.2, 122.3, 119.7, 114.4, 67.4, 53.1, 47.4, 43.4, 40.0, 29.4; ESIMS m/e 414 (M^+), $m/2e$ 207 (M^+); Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_9\text{O}$:

C, 58.09; H, 7.56; N, 30.48. Found: C, 57.72; H, 7.34; N, 30.07.



Synthesis of Zn^{II} complex (crystal B). To a solution of **8** (22.8 mg, 55.1 μmol) dissolved in distilled water (100 μL) was added 0.5 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ aqueous solution (110 μL). The reaction mixture was filtered and the filtrate was slowly evaporated to obtain Zn^{II} complex as colorless prisms (26.4 mg, 75%). ^1H NMR (D_2O): δ 1.91 (2H, br), 2.77 (4H, br), 2.96 (2H, br), 3.67 (4H, s), 3.99 (2H, br), 4.34 (2H, br), 6.37 (2H, s), 6.79 (1H, s), 7.88 (1H, s), 8.06 (1H, s); Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_6\text{Zn}$: C, 37.60; H, 5.52; N, 24.11. Found: C, 37.48; H, 5.65; N, 23.87.

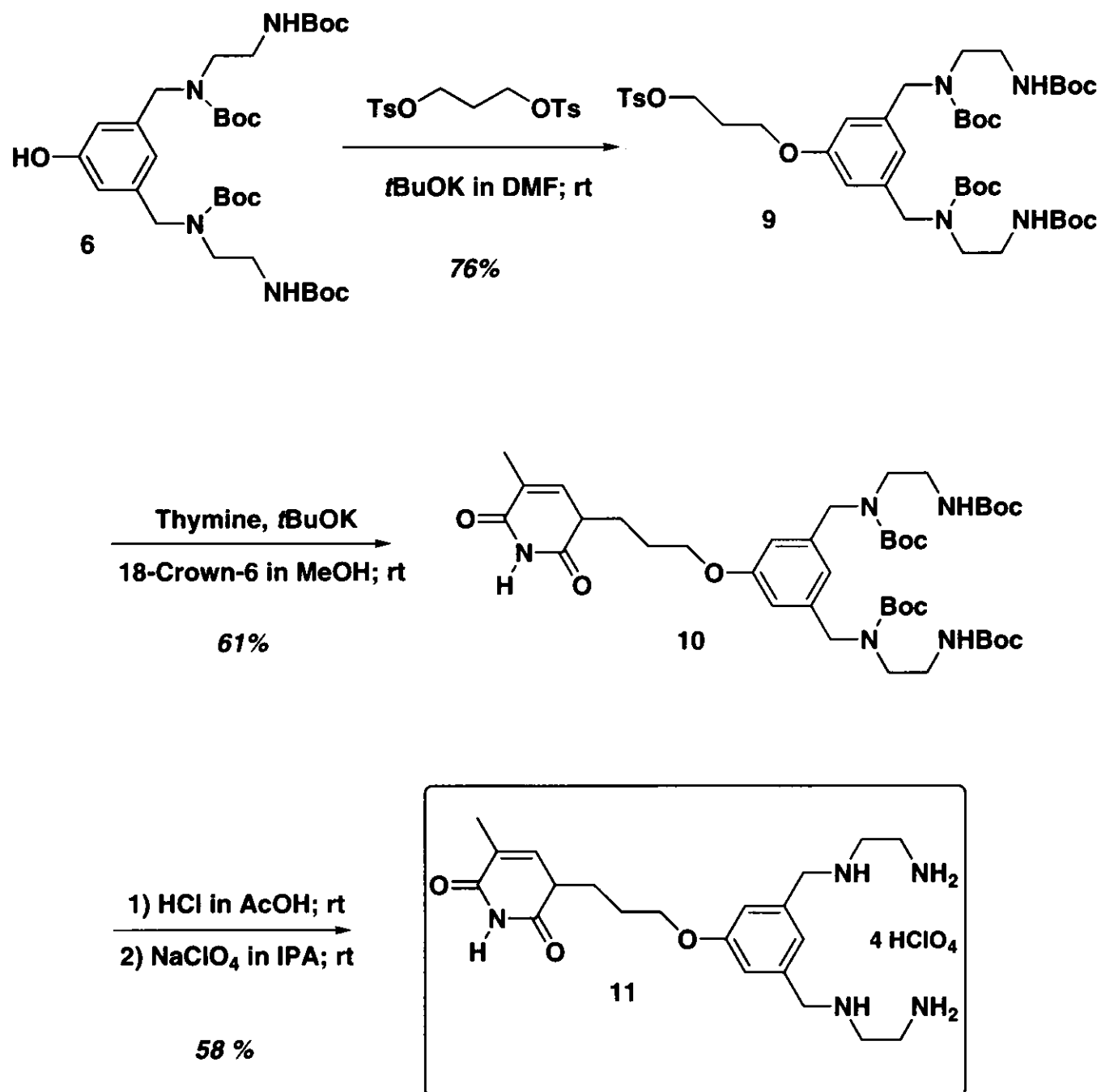
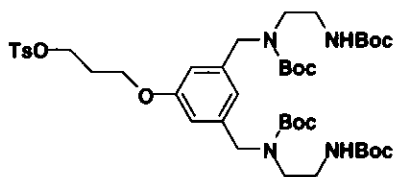
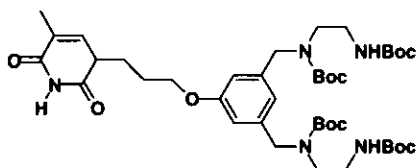


図 5-2 エチレンジアミンを金属錯形成部位として用いたチミン型核酸モノマーの合成

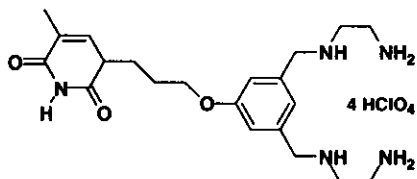
5-3-2 Thymine type 11.



Compound **9**. To a solution of **6** (2.03 g, 3.17 mmol) and potassium *t*-butoxide (0.426 g, 3.80 mmol) dissolved in DMF (6 mL) was added 1,3-di(*p*-toluensulfonyloxy)propane (3.66 g, 5.73 mmol) in one portion for 25 min at room temperature. After 1.5 h the solvent was removed in vacuo. The residue was dissolved into 150 mL CH₂Cl₂ and then washed with water (120 mL × 2), dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was removed on a rotary evaporator. The crude material was purified by silica-gel column chromatography with *n*-hexane-AcOEt (3:1) to afford **9** as pale yellow foam (2.06 g, 76%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.77 (2H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.30 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 6.65 (1H, br), 6.58 (2H, s), 5.00 (1H, br), 4.74 (1H, br), 4.37 (4H, br), 4.23 (2H, t, *J* = 6.1 Hz), 3.94 (2H, br), 3.24 (8H, br), 2.41 (3H, s), 2.10 (2H, br), 1.43 (36H, s); FABMS *m/e* 851 (M)⁺.



Compound **10**. To a solution of thymine (0.355 g, 2.66 mmol), 18-crown-6 (0.767 g, 2.90 mmol) and potassium *t*-butoxide (0.325 g, 0.290 mmol) in dissolved in MeOH (5 mL) was added dropwise a solution of **9** (2.06 g, 2.42 mmol) in MeOH (10 mL) over 5 min with an argon inlet at room temperature. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 23 h. After evaporation of the solvent, the residue was pored into 150 mL CH₂Cl₂, and the solution was washed with water (100 mL × 2), dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated. The crude material was purified by silica-gel column chromatography with *n*-hexane-AcOEt (1:3) to afford **10** as pale yellow foam (1.19 g, 61%); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.67 (1H, br), 7.02 (1H, s), 6.68 (2H, s), 6.63 (1H, s), 5.04 (1H, br), 4.82 (1H, br), 4.39 (4H, br), 3.99 (2H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.91 (2H, t, *J* = 6.7), 3.25 (8H, br), 2.15 (2H, br), 1.87 (3H, s), 1.43 (36H, s); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 164.0, 159.0, 156.2, 155.9, 150.8, 140.9, 140.5, 140.2, 112.7, 112.2, 110.6, 80.3, 79.4, 63.7, 50.8, 50.2, 46.1, 39.1, 29.7, 28.4, 12.3, FABMS *m/e* 806 (M+H)⁺; HRMS calcd for C₄₀H₆₅N₆O₁₁ 805.4711, found 805.4748.



Compound **11**. Compound **10** (0.756 g, 0.939 mmol) was placed in a flask, to which 1.0 M HCl in AcOH (20 mL) was added. The solution was stirred in an ice-water bath for 15 min. The solvent was evaporated in vacuo. The residue was then dissolved into 1.0 M NaClO₄ aqueous solution (7.51 mL), was recrystallized from H₂O/*i*PrOH to afford **11** as colorless needles. ¹H NMR (D₂O): δ 7.39 (1H, s), 7.08 (1H, s), 7.01 (2H, s), 4.22 (4H, s), 4.11

(2H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.88 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 3.35 (8H, m), 2.11 (2H, q, $J = 5.9$ Hz); ^{13}C NMR (D_2O): δ 167.0, 158.9, 152.3, 143.5, 132.8, 123.5, 117.1, 110.6, 66.2, 51.1, 46.6, 43.9, 35.4, 26.9, 11.1; ESIMS m/e 405 (M) $^+$, $m/2e$ 202 (M) $^{2+}$.

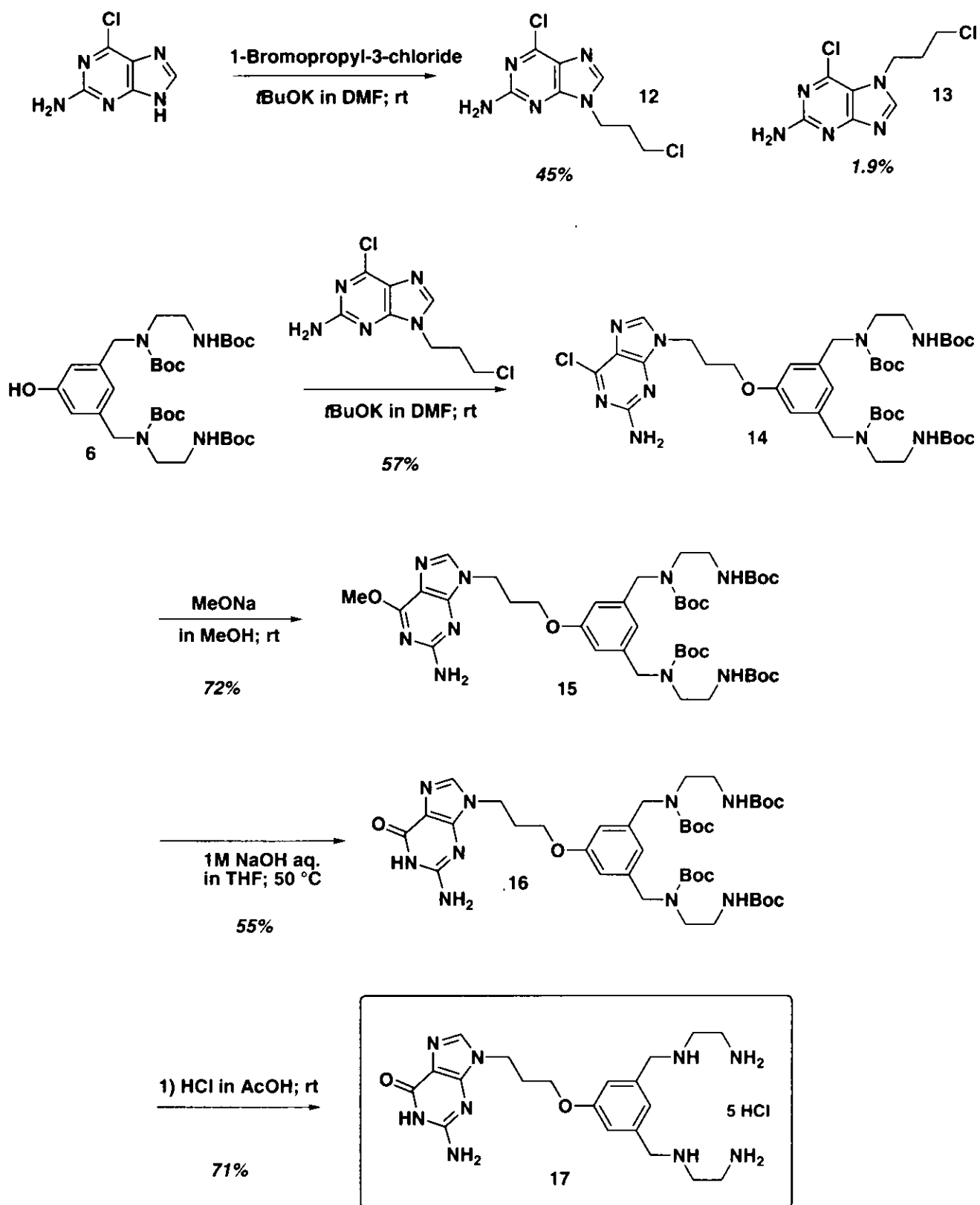
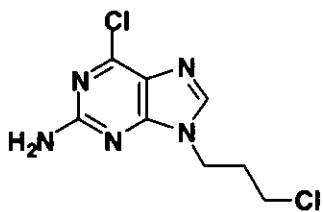


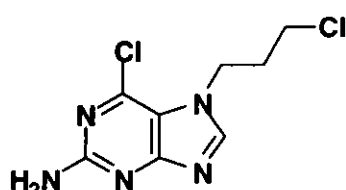
図 5-3 エチレンジアミンを金属錯形成部位として用いたグアニン型核酸モノマーの合成

5-3-3 Guanine type 17.

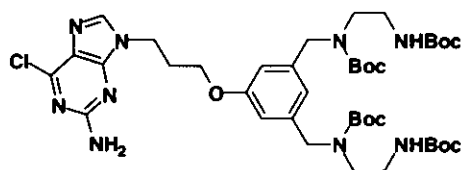


9-(3-Chloropropyl)-6-chloropurine (12). To a suspension of 9-chloropurine (3.4 g, 0.02 mol) in DMF (32 mL) was added portionwise potassium *t*-butoxide (2.5 g, 0.022 mol). The reaction mixture was stirred for 5 min at room temperature, 1-bromo-3-chloropropane (6.3 g, 0.04 mol) was added dropwise over 0.5 h at room temperature.

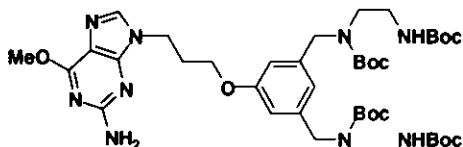
After stirring for 12 h further, the mixture was poured into iced water (200 mL) and the water layer was extracted with AcOEt (80 mL \times 5), and the combined organic phase was dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated. The crude material was purified by silica-gel column chromatography with *n*-hexane-AcOEt (1:2) to afford crude **12** as white powder. The product was recrystallized from 2-propanol to afford **12** as colorless needles (2.5 g, 50%)³⁾. m.p. 153.0-153.5 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.13 (1H, s), 6.91 (2H, s), 4.17 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.65 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 2.27 (2H, q, *J* = 6.7 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 160.2, 154.6, 149.8, 143.6, 124.0, 42.7, 41.9, 31.9; EIMS *m/e* 246 (M)⁺; Anal. Calcd for C₉H₉Cl₂N₅: C, 39.04; H, 3.69; N, 28.46. Found: C, 38.81; H, 3.62; N, 28.18.



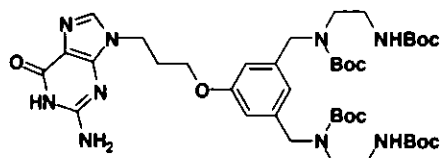
7-(3-Chloropropyl)-6-chloropurine (13) (92 mg, 1.9%); m.p. 178 °C dec; ¹H NMR, (DMSO-*d*₆) δ 8.36 (1H, s), 6.62 (2H, s), 4.43 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.66 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 2.26 (2H, q, *J* = 6.6 Hz), ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 164.7, 160.4, 149.9, 142.6, 115.3, 44.3, 42.5, 33.7.



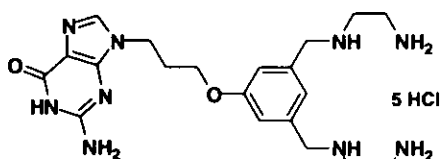
Compound 14. To a solution of **6** (150 mg, 0.24 mmol) and potassium *t*-butoxide (28 mg, 0.25 mmol) dissolved in DMF (2 mL) was added compound **12** (61 mg, 0.25 mmol) in one portion. The reaction mixture was heated at 60 °C for 3 days and then the solvent was concentrated on a rotary evaporator. The residue was dissolved in 80 mL CH₂Cl₂ and then washed with water twice, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was removed on a rotary evaporator. The crude material was purified by silica-gel column chromatography with CHCl₃-MeOH (25:1) to afford **14** as pale yellow foam (1.48 g, 71%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.75 (1H, s), 6.67 (2H, s), 6.60 (1H, s), 5.31 (2H, s), 5.07 (1H, s), 4.85 (1H, s), 4.40 (4H, br), 4.32 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 3.93 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 3.26 (8H, br), 2.31 (2H, br), 1.43 (36H, s).



Compound 15. To a solution of **14** (0.99 g, 1.16 mmol) dissolved in MeOH (5 mL) was added dropwise a solution of 28% sodium methoxide in MeOH (2.4 mL, 11.8 mmol) over 10 min with an argon inlet at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 0.5 h, and then added to 120 mL CH₂Cl₂, washed with brine (120 mL × 3), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The product **15** was obtained as colorless syrup (0.584 g, 87%) and used without further purification: ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.56 (1H, s), 6.67 (2H, s), 6.61 (1H, s), 5.03 (1H, s), 4.88 (2H, s), 4.79 (1H, s), 4.39 (4H, br), 4.29 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 4.08 (3H, s), 3.91 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 3.25 (8H, br), 2.30 (2H, s), 1.43 (36H, s).



Compound 16. To a solution of **15** (0.854 g, 1.01 mmol) dissolved in MeOH (8 mL) was added dropwise a solution of 4.0 M NaOH aqueous solution (8 mL, final concentration 2 M) over 1 min with an argon inlet at 70 °C. The reaction mixture was stirred at 70 °C for 1 week, and then poured into 120 mL CH₂Cl₂, washed with H₂O (120 mL × 3, pH 7), and dried over anhydrous MgSO₄. After evaporation, the crude material was purified by silica-gel column chromatography with CHCl₃-MeOH (25:1) to afford **16** as pale yellow foam (0.461 g, 55%): ¹H NMR (CDCl₃): δ 11.8 (1H, br), 7.58 (1H, s), 6.61 (3H, m), 5.82 (2H, br), 5.11 (1H, br), 4.87 (1H, br), 4.39 (4H, br), 4.23 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 3.94 (2H, t, *J* = 5.3 Hz), 3.23 (8H, br), 2.27 (2H, br), 1.42 (36H, s); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 159.2, 159.0, 156.2, 153.6, 152.0, 140.3, 138.0, 117.3, 80.3, 79.2, 64.4, 50.9, 50.3, 46.2, 40.6, 39.3, 29.6, 28.5.



Compound 17. **16** (0.461 g, 0.56 mmol) was placed in a flask, to which 1.0 M HCl in AcOH (10 mL) was added. The solution was stirred for 30 min at room temperature. The reaction mixture was poured into diethyl ether (10 mL) and the resulting colorless precipitate was collected. The resulting colorless solid was recrystallized from H₂O/EtOH to afford **17** as colorless needles (0.126 g, 37%). ¹H NMR (D₂O): δ 7.71 (1H, s), 6.97 (1H, s), 6.67 (2H, s), 4.18 (2H, t, *J* = 5.8 Hz), 4.14 (4H, s), 4.08 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 3.35 (8H, br), 2.19 (2H, q, *J* = 5.2 Hz); ¹³C NMR (D₂O): δ 158.7, 158.6, 153.5, 151.9, 140.6, 132.8, 123.3, 116.6, 115.8, 66.6, 51.1, 44.0, 42.1, 35.6, 28.0; Anal. Calcd for C₂₀H₃₆Cl₅N₉O₂ · 5 HCl: C, 39.26; H, 5.93; N, 20.60. Found: C, 39.04; H, 5.91; N, 20.40.

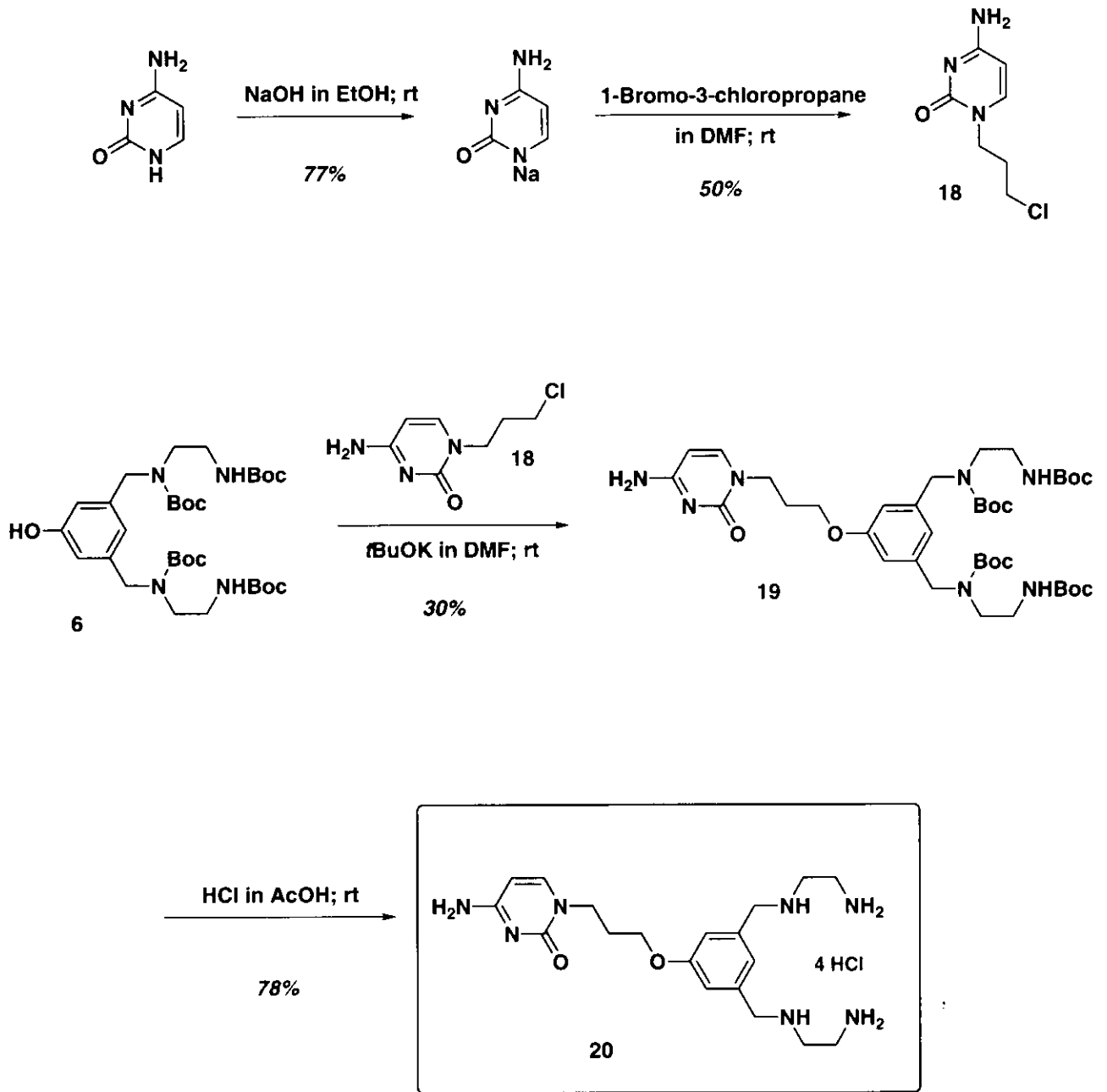
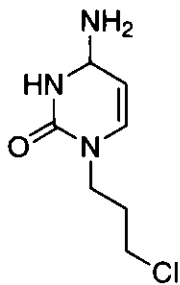
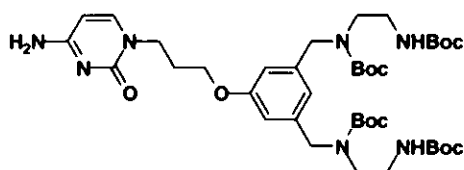


図 5-4 エチレンジアミンを金属錯形成部位として用いたシトシン型核酸モノマーの合成

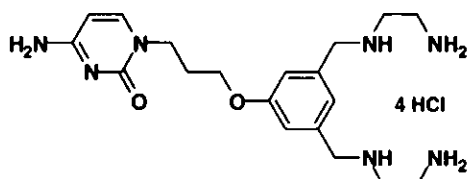
5-3-4 Cytosine type 20.



Compound 18. To a suspension of cytosine (5.00 g, 0.045 mol) in EtOH (200 mL) was added sodium hydroxyde (2.52 g, 0.063 mol). The reaction mixture was stirred until the mixture became homogeneous. After 1 h the mixture was concentrated and the precipitate appeared was collected. This material was dried under reduced pressure to afford as a white powder (4.60 g 77%). To a suspension of this powder in DMF was added 1-bromo-3-chloropropane (7.10 g, 0.045 mol) in one portion. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 10.5 h and then the solvent was concentrated in vacuo. The residue was poured into iced water (200 mL) and the resulting colorless precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated in vacuo. The water layer was extracted with AcOEt (100 mL × 10), and was dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The crude product was recrystallized from MeOH to afford **18** as colorless plates. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.54 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.04 (1H, s), 6.95 (1H, s), 5.64 (1H, d, *J* = 7.1 Hz), 3.73 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 3.61 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 2.03 (2H, q, *J* = 6.7 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 166.4, 156.2, 146.4, 93.7, 47.0, 43.0, 31.9; Anal. Calcd for C₇H₁₀ClN₃O: C, 44.81; H, 5.37; N, 22.40; Cl, 18.90. Found: C, 44.70; H, 5.22; N, 22.23; Cl, 18.78.



Compound 19. To a solution of **6** (150 mg, 0.24 mmol) and potassium *t*-butoxide (28 mg, 0.25 mmol) dissolved in DMF (2 mL) was added compound **18** (61 mg, 0.25 mmol) in one portion. The reaction mixture was heated at 60 °C for 3 days and then the solvent was concentrated on a rotary evaporator. The residue was dissolved into 80 mL CH₂Cl₂ and then washed with water twice, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was removed on a rotary evaporator. The crude material was purified by silica-gel column chromatography with CHCl₃-MeOH (25:1) to afford **19** as pale yellow foam (55.1 mg, 30%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.20(1H, d, *J* = 6.9 Hz), 6.65 (3H, br), 5.69 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 5.13 (1H, s), 4.88 (1H, s), 4.38 (4H, br), 3.94 (4H, br), 3.22 (8H, br), 2.20 (2H, br), 1.42 (36H, br); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 166.2, 159.1, 156.6, 156.0, 146.2, 140.3, 118.9, 112.4, 93.9, 80.3, 79.2, 64.5, 51.0, 47.7, 46.2, 39.2, 28.6.



Compound 20. To a solution of **19** (55.1 mg, 0.068 mmol) was placed in a flask, to which 1.0 M HCl in AcOH (1 mL) was added. The reaction mixture was stirred in an ice-water bath for 15 min. The reaction mixture was

added to diethyl ether (5 mL) and the resulting colorless precipitate was collected and the filtrate was evaporated in vacuo to afford **20** as white precipitate. (23.1 g, 78%).
 $^1\text{H NMR}$ (D_2O): δ 7.75 (1H, d, $J = 6.7$ Hz), 7.09 (1H, s), 7.05 (2H, s), 6.03 (1H, d, $J = 6.7$ Hz), 4.21 (4H, s), 4.07 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 3.95 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.38 (4H, t, $J = 6.9$ Hz), 3.31 (4H, t, $J = 6.9$ Hz), 2.11 (2H, q, $J = 6.2$ Hz).

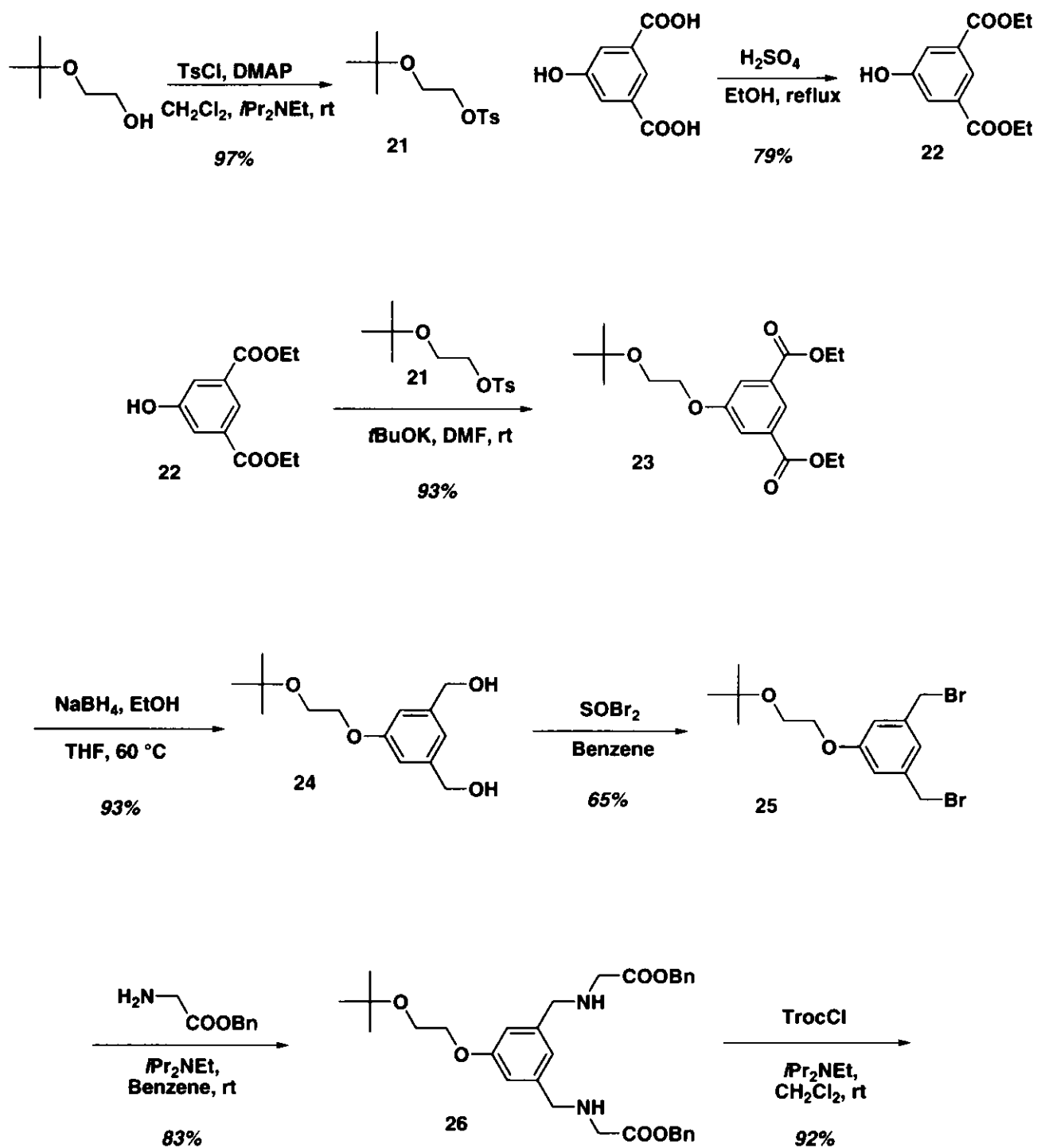


図 5-5 グリシンを金属錯形成部位として用いたチミン型核酸モノマーの合成 (1)

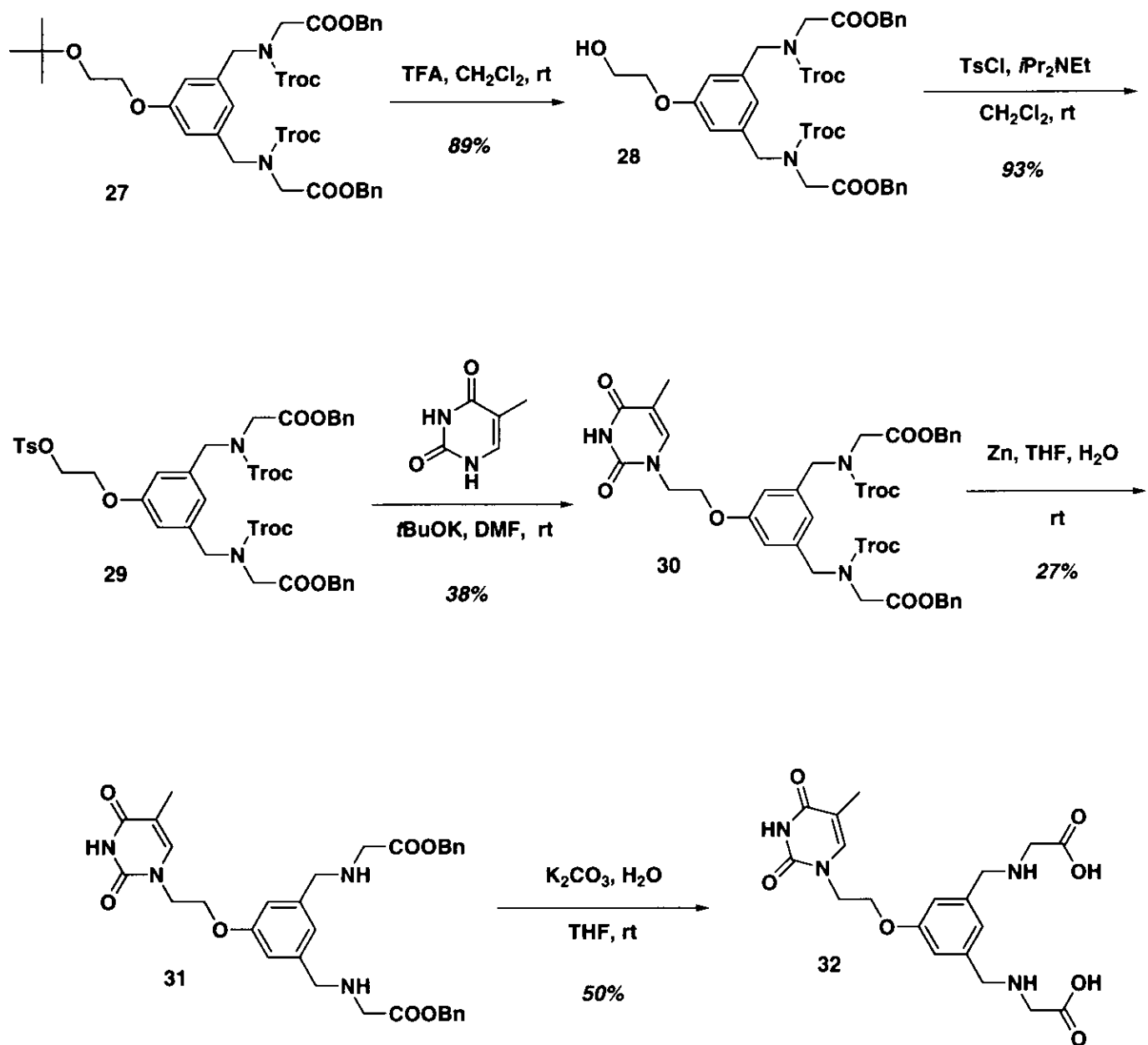
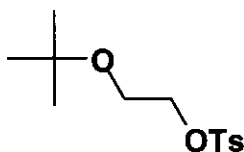
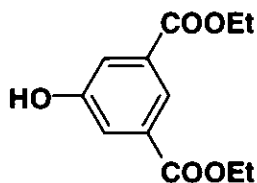


図 5-5 グリシンを金属錯形成部位として用いたチミン型核酸モノマーの合成 (2)

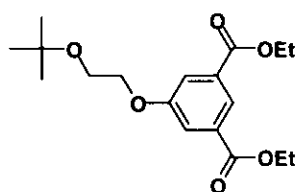
5-3-5 Synthesis of 32.



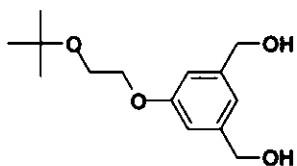
Compound **21**. To a solution of ethyleneglycol mono-*t*-butylther (11.8 g, 0.1 mol) and triethylamine (14.2 mL, 0.1 mol) was dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL) was added dropwise a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (19.1 g, 0.1 mol) in CH_2Cl_2 (50 mL) over 25 min in an ice-water bath. After stirring for 5 h further, the reaction mixture was poured into CH_2Cl_2 (150 mL), washed with water (120 mL \times 3), dried over anhydrous MgSO_4 , and concentrated to obtain **21** as pale yellow oil (27.4 g, 97%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.12 (9H, s), 2.44 (3H, s), 3.54 (2H, t, $J = 5.3$ Hz), 4.11 (2H, t, $J = 5.3$ Hz), 7.33 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.80 (2H, d, $J = 8.5$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 144.5, 133.3, 129.6, 128.0, 73.3, 69.9, 59.5, 53.3, 27.2, 21.4.



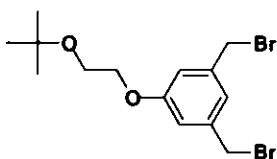
Compound **22**. A solution of 5-hydroxyisophthalic acid (18.3 g, 0.1 mol) and H_2SO_4 (1.5 g) in EtOH (250 mL) was heated at reflux using a Soxhlet system for 12 h. The reaction mixture was poured into iced water and the resulting white precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated in vacuo. The crude product was recrystallized from toluene to afford **22** as colorless prisms (23.3 g, 98%). mp 105.5-106.5 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3): δ 8.25 (2H, t, $J = 1.4$ Hz), 7.79 (2H, d, $J = 1.5$ Hz), 6.11 (1H, s), 4.41 (4H, q, $J = 7.2$ Hz), 1.41 (6H, t, $J = 7.1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 166.3, 156.6, 132.1, 122.7, 121.1, 61.7, 14.3; EIMS *m/e* 238 (M^+); Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$: C, 60.50; H, 5.92; N, 0.00. Found: C, 60.35; H, 5.85; N, 0.00.



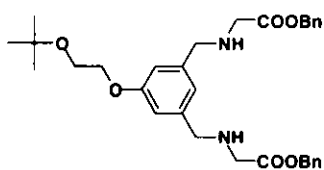
Compound **23**. To a solution of diester compound **22** (29.0 g, 0.12 mol) and *t*BuOK (14.6 g, 0.13 mol) dissolved in DMF (200 mL) was added dropwise a solution of tosylate **21** (29.9 g, 0.11 mol) in CH_2Cl_2 (100 mL) over 45 min in an-ice water bath. The reaction mixture was stirred for 5 h and then poured into CH_2Cl_2 (150 mL), washed with water (200 mL \times 3), dried over anhydrous MgSO_4 , and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-diethyl ether (5:1) to obtain **23** as pale yellow oil (34.5 g, 93%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 8.27 (1H, s), 7.78 (2H, s), 4.39 (4H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.17 (2H, t, $J = 5.3$ Hz), 3.74 (2H, t, $J = 5.3$ Hz), 1.40 (6H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.24 (9H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 165.7, 159.1, 132.0, 122.9, 120.0, 73.7, 68.7, 61.3, 31.5, 27.4, 22.6, 14.3.



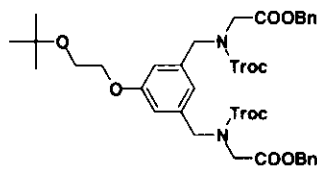
Compound 24. Sodiumborohydride (66.3 g, 1.75 mol) was carefully added a solution of **23** (24.7 g, 87.6 mmol) in THF (100 mL) and ethanol (200 mL) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 4 days and then poured into 4 N HCl aqueous solution (100 mL) and H₂O (350 mL). Then resulting precipitate was removed by filtration and the residual oil was extracted with CH₂Cl₂-THF (3:1, 400 mL × 3), dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-AcOEt (1:2) to obtain **24** as a colorless oil (15.5 g, 70%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 6.79 (1H, s), 6.72 (2H, s), 4.50 (4H, s), 3.98 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 3.67 (2H, t, *J* = 5.3 Hz), 1.23 (9H, s); Anal. Calcd for C₁₄H₂₂O₄: C, 66.12; H, 8.72; N, 0.00. Found: C, 66.10; H, 8.67; N, 0.00.



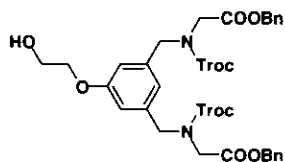
Compound 25. To a solution of **24** (7.90 g, 31.1 mmol) and pyridine (6.3 mL, 77.8 mmol) in benzene (150 mL) was added dropwise a solution of thionyl bromide (14.2 g, 68.4 mmol) in benzene (150 mL) over 10 min in a water bath. The reaction mixture was stirred for 5 h at room temperature, and then poured into EtOH (20 mL) for quenching the reaction. The reaction mixture was washed with water (250 mL × 5), dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-diethyl ether (4:1) to obtain **25** as a colorless oil. The residual oil was recrystallized from *n*-hexane to afford **25** as colorless prisms (8.0 g, 68%). mp 52.5-54.0 °C; ¹H NMR (CDCl₃): δ 6.98 (1H, s), 6.89 (2H, s), 4.42(4H, s), 4.09 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 3.71 (2H, t, *J* = 5.4), 1.23 (9H, s), EIMS *m/e* 380 M⁺; Anal. Calcd for C₁₄H₂₀Br₂O₂: C, 44.24; H, 5.30; N, 0.00; Br, 42.04. Found: C, 44.05; H, 5.13; N, 0.00; Br, 42.24.



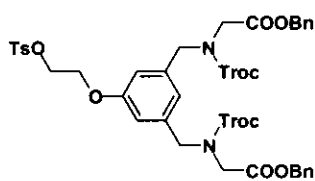
Compound 26. To a solution of benzyloxyglycine tosylate (6.4 g, 40 mmol) and diisopropylethylamine (0.570 g, 4.4 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (30 mL) was added dropwise a solution of **25** (0.753 g, 2.0 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) over 14 h at room temperature. After 3 h, the reaction mixture was poured into CH₂Cl₂ (80 mL), washed with brine (80 mL × 3), dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-diethyl ether-triethylamine (1:2:0.017) to obtain **26** as a colorless oil (0.914 g, 83%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.35 (10H, m), 6.83 (1H, s), 6.79 (2H, s), 5.17 (4H, s), 4.05 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 3.74 (4H, s), 3.69 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 3.44 (4H, s), 1.23 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 167.6, 145.6, 137.8, 135.3, 129.6, 128.4, 128.3, 128.2, 125.6, 126.8, 66.9, 20.8; FABMS *m/e* 549 (M+H)⁺.



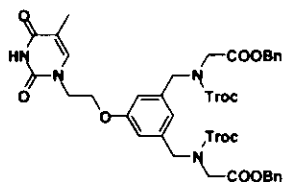
Compound 27. To a solution of **26** (2.43 g, 4.4 mmol) and diisopropylethylamine (1.42 g, 11 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (52 mL) was added dropwise a solution of 2,2,2-trichloroethyl carbonylchloride (2.07 g, 9.75 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) over 15 min at room temperature. After 2 h, the reaction mixture was poured into CH_2Cl_2 (50 mL), washed with brine (150 mL \times 3), dried over anhydrous MgSO_4 , and evaporated. The crude product was chromatographed with CHCl_3 -MeOH (25:1) to obtain **27** as a colorless oil (4.3 g, 99%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.34 (10H, m), 6.81 (1H, s), 6.78 (2H, s), 5.15 (4H, s), 4.04 (2H, t, $J = 5.5$ Hz), 3.74 (4H, s), 3.68 (2H, t, $J = 5.4$ Hz), 3.42 (4H, s), 1.22 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 167.6, 145.6, 137.8, 135.3, 129.6, 128.4, 128.3, 128.2, 125.6, 126.8, 66.9, 20.8; FABMS m/e 549 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.



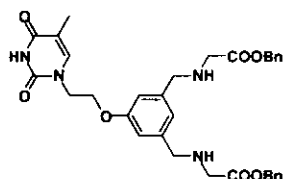
Compound 28. To a solution of **27** (4.0 g, 4.45 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (160 mL) at room temperature. After 1.5 h, the solution was evaporated, and then was poured into THF (75 mL) and H_2O (75 mL). The solution was stirred for 2 days at room temperature. The reaction mixture was poured into CH_2Cl_2 (150 mL). The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (150 mL) 3 times, dried over anhydrous MgSO_4 , and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-AcOEt (1:1) to obtain **28** as a colorless oil (3.33 g, 89%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.34 (10H, m), 6.77 (2H, br), 6.74 (1H, s), 5.16 (2H, s), 5.14 (2H, s), 4.83 (2H, s), 4.74 (2H, s), 4.58 (2H, s), 4.57 (2H, s), 4.02 (2H, d, $J = 3.7$ Hz), 3.97 (2H, d, $J = 3.2$ Hz), 3.95 (2H, br).



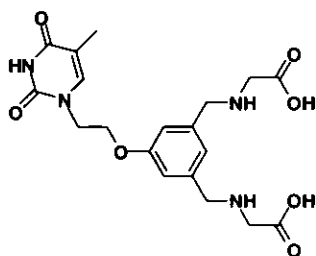
Compound 29. To a solution of **28** (2.0 g, 2.37 mmol) *N*-diisopropylethylamine (0.737 g, 5.7 mmol), and DMAP (0.347 g, 2.84 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (45 mL) was added dropwise a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (1.08 g, 5.86 mmol) in CH_2Cl_2 (45 mL) over 1 h at room temperature. After 14 h, the reaction mixture was poured into CH_2Cl_2 (150 mL), washed with brine (150 mL \times 2), dried over anhydrous MgSO_4 , and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-diethyl ether (3:1) to obtain **29** as a colorless oil (2.17 g, 92%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.81 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.33 (12H, m), 6.74 (1H, s), 6.76 (1H, s), 6.67 (2H, s), 5.14 (2H, s), 5.13 (2H, s), 4.82 (2H, s), 4.74 (2H, s), 4.56 (2H, s), 4.55 (2H, s), 4.32 (2H, t, $J = 4.5$ Hz), 4.09 (2H, br), 4.00 (2H, s), 3.96 (2H, s), 2.45 (3H, s).



Compound 30. To a suspension of thymine (0.339 g, 2.69 mmol) and *t*BuOK (0.311 g, 2.78 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added dropwise a solution of **29** (0.893 g, 0.895 mmol) in DMF (24 mL) over 10 min at room temperature. After 16 h, the reaction mixture was poured into CHCl₃ (200 mL), washed with brine (200 mL × 2), dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated. The crude product was chromatographed with *n*-hexane-AcOEt (2:1) to obtain **30** as a colorless oil (0.326 g, 38%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.27 (1H, s), 7.33 (10H, m), 7.12 (1H, s), 6.77 (1H, s), 6.73 (2H, br), 5.16 (2H, s), 5.14 (2H, s), 4.84 (2H, s), 4.75 (2H, s), 4.57 (2H, s), 4.55 (2H, s), 4.05 (8H, br), 1.61 (3H, s); FABMS *m/e* 951 (M+H)⁺.



Compound 31. To a mixture of **30** (9.4 g, 0.099 mmol) dissolved in THF (2.5 mL) and 1.0 M KH₂PO₄ (0.5 mL) was poured activated Zn dust^{4,5)} (0.553 g, 8.9 mmol) at room temperature. After 10 h, the reaction mixture was added into CHCl₃ (20 mL), and was washed with H₂O (20 mL × 2), dried over anhydrous MgSO₄, and evaporated to obtain **31** as a colorless oil (2.2 mg, 27%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.40 (1H, s), 7.26 (10H, m), 7.08 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 6.79 (1H, s), 6.70 (2H, s), 5.09 (2H, s), 4.11 (2H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.99 (2H, t, *J* = 4.8 Hz), 3.66 (4H, s), 3.37 (4H, s), 1.853 (2H, s); FABMS *m/e* 604 (M+H)⁺.



Compound 32. To a solution of **31** (2.2 mg, 0.0033 mmol) was dissolved in THF (20 μL) and 1.0 M K₂CO₄ (10 μL) was added at room temperature⁶⁾. After 10 h, the reaction mixture was evaporated and the crude product was chromatographed with CHCl₃-MeOH (4:1) to obtain **32** as colorless oil (1.1 mg, 50%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.43 (1H, s), 7.04 (1H, s), 7.03 (2H, s), 4.29 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 4.14 (4H, s), 4.06 (2H, t, *J* = 4.9 Hz), 3.57 (4H, s), 1.73 (3H, s); ESIMS *m/e* 421.2 (M+H)⁺.

5-4 測定実験操作

5-4-1 DNA 合成機によるオリゴ DNA の合成

DNA の断片であるオリゴデオキシヌクレオチドは、従来よりプライマーやプローブとして用いられ、近年では PCR (polymerase chain reaction) 法のプライマーやアンチセンス核酸 (ホスフォロチオエート DNA) など、その用途は広がっている。

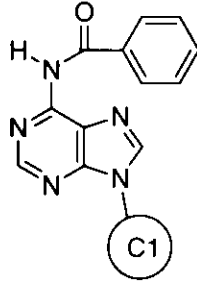
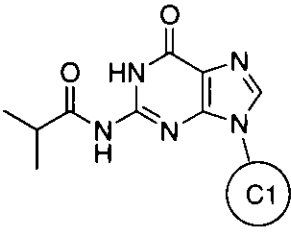
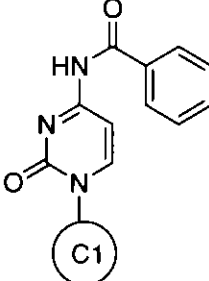
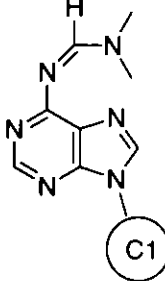
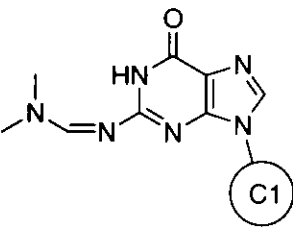
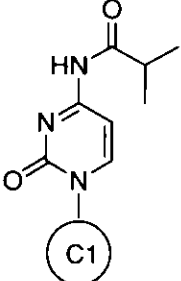
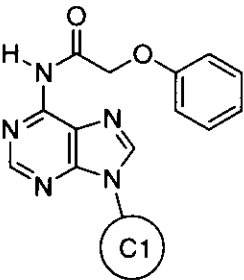
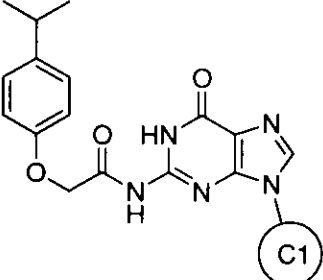
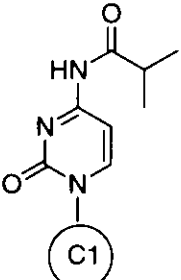
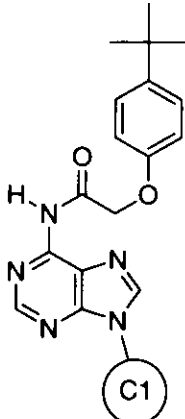
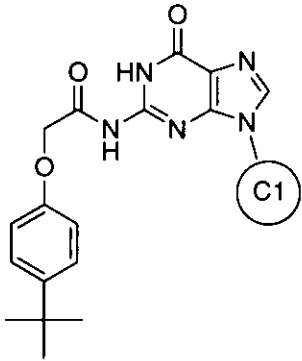
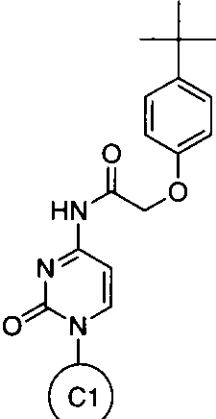
DNA 合成機は、ヌクレオチド鎖を 3' → 5' の方向に伸長させるための反応を自動的に繰り返し、任意の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを固相合成する装置である⁷⁾。

当研究室の PE Biosystems 394 DNA Synthesizer は上記のホスフォロアミダイト法による伸長反応を採用している^{8,9)}。その反応ルートを図 5-6 に示した。合成機の操作方は、PE Biosystems 394 DNA Synthesizer 操作説明書を参考にした。試薬等は PE Biosystems 純正品を使用した。また、本合成機で作成した DNA の精製収率は表 5-3 で述べた。

5-4-2 オリゴ DNA の簡易精製¹⁰⁾

DNA 合成機によって自動化されているのは伸長反応だけであり、その後の脱保護と精製は別途行う。アンモニア処理により CPG ビーズより切りだされたオリゴ DNA には、各種の保護基がついている。PE Biosystem の場合、アデニン (A) とシトシン (C) にはベンゾイル基 (Bz)、グアニン (G) にはイソブチリル (iB) 基がついている。以下に脱保護と OPC カラム (逆相カラム) を用いた簡易精製の実験操作を記載した。本合成はをトリチル on の状態で 5'-ジメトキシトリチル (DMTr) 基をつけたままの状態で行う。

表 5-1 DNA 合成機と塩基の保護基、脱保護の条件

DNA Synthesizer	Deprotection	Adenine	Guanine	Cytosine
PE Biosystems (ABI)	NH ₃ , H ₂ O 55°C, 6 h			
PE Biosystems (Applied)	NH ₃ , H ₂ O 55°C, 1h			
Pharmacia	NH ₃ , H ₂ O 70°C, 1 h			
MilliGen/Bioscience Expedite	NH ₃ , H ₂ O 55°C, 15 min			

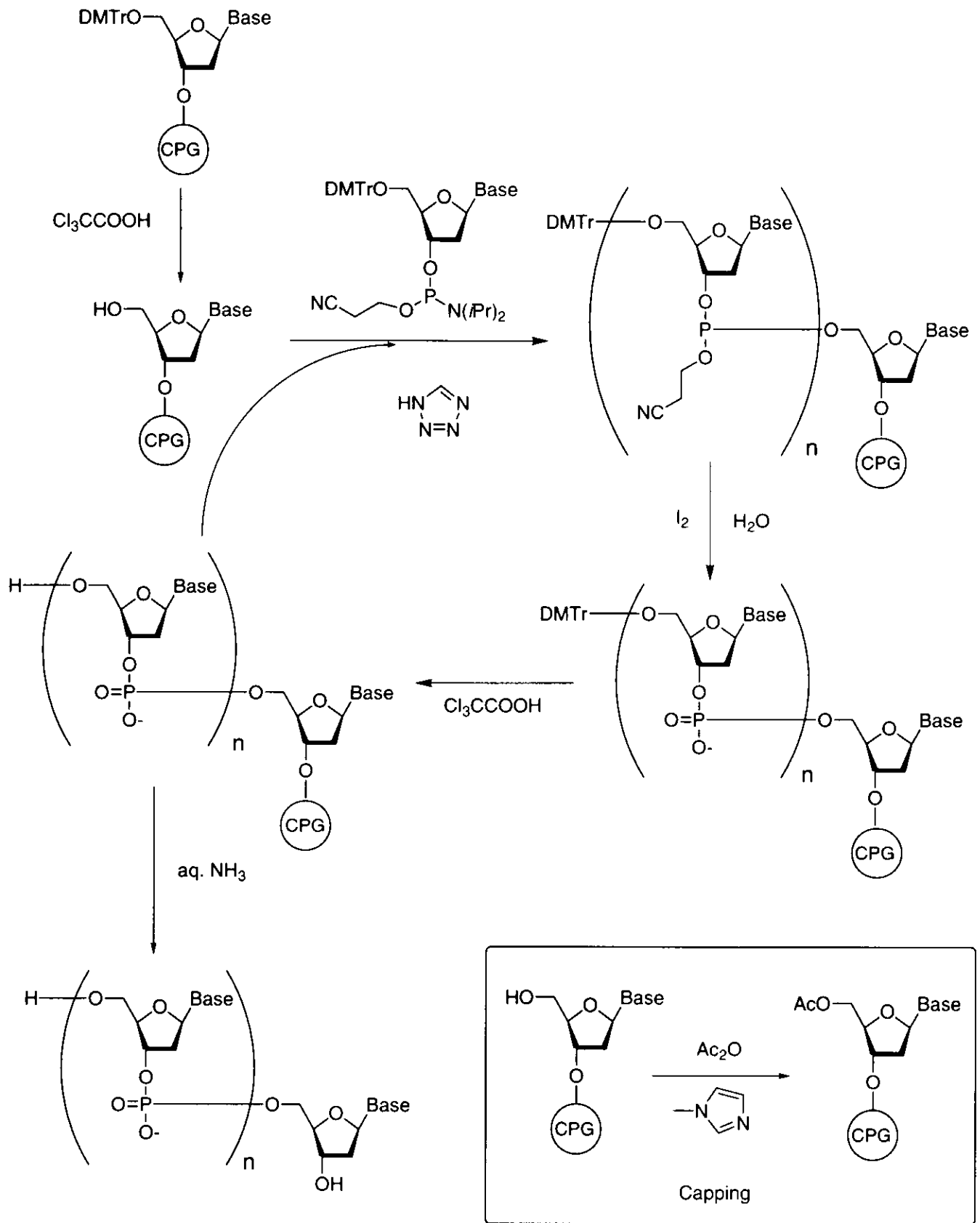


図 5-6 DNA 合成機で行われるオリゴヌクレオチドの化学合成

OPC カラム精製 (図 5-7)

- (a) 55 °C 八時間で脱保護
- (b) 逆相カラムの単担を用いてカラムを作成
- (c) カラムをアセトニトリルで平衡化
- (d) 2 M トリエチルアンモニウムアセテート pH 7.0 で平衡化。
- (e) オリゴヌクレオチド溶液を加える
- (f) 1.5 M アンモニア水 (20 mL) をカラムに通す
- (g) 3 % トリフルオロ酢酸水溶液 (20 mL) を通す
- (h) 20 mL のイオン交換水を通す
- (i) 5 mL の 20 % アセトニトリルで、精製したオリゴヌクレオチドを溶出
- (j) UV 分光器でスペクトル 260 nm の吸光度より収量と収率を求める
- (k) HPLC により精製の程度をチェック
- (l) HPLC のオリゴヌクレオチド溶液は回収し、凍結乾燥

表 5-2 合成オリゴヌクレオチドの精製法

精製法	保護基などの 低分子	不完全長オリゴヌ クレオチド	完全長オリゴヌ クレオチド
エタノール沈殿	△	○	○
ゲルろ過カラム	×	○	○
逆相カラム (トリチル on)	×	×	○

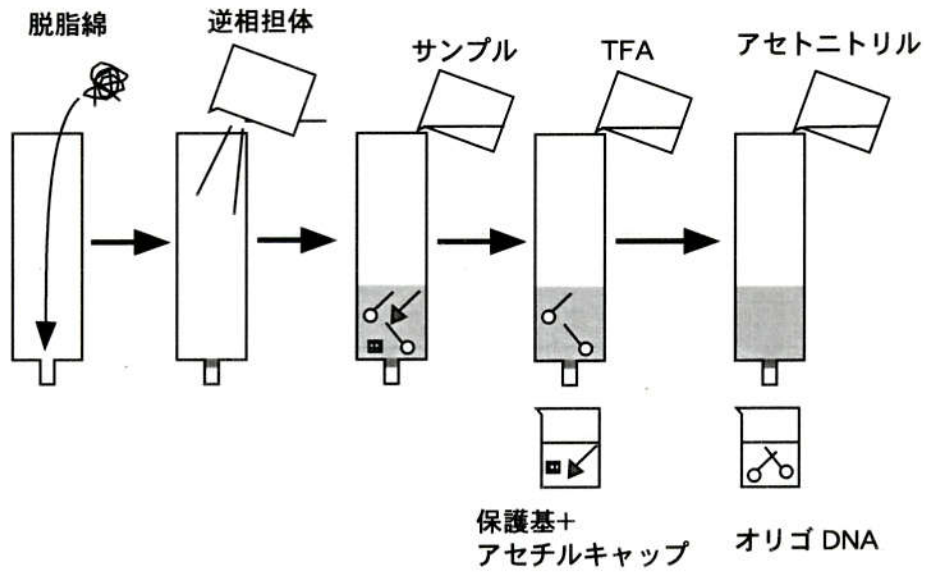


図 5-7 逆相カラムによるオリゴヌクレオチド簡易精製

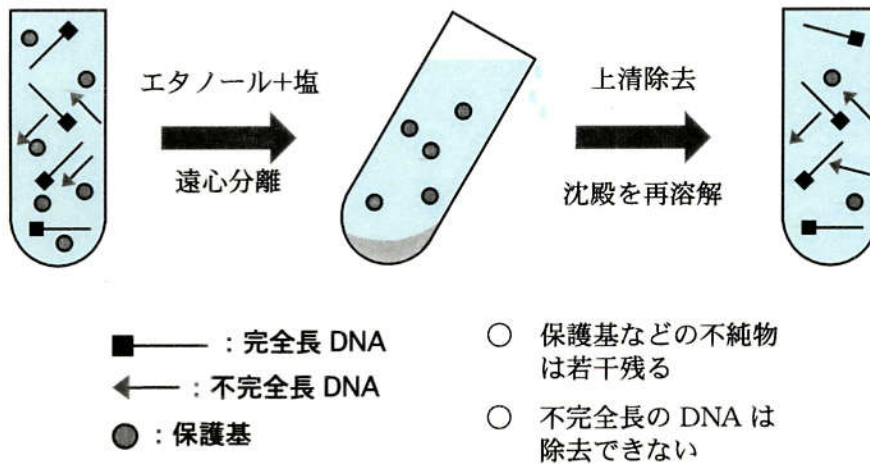


図 5-8 エタノール沈殿による精製

エタノール沈殿法

40 base 以上では (j) の操作でアンモニア水を流すため、DNA のリン酸部分の対カチオンはアンモニウムになる。もし、本 DNA を用いて錯体との相互作用などを実験する場合、アンモニアが錯形成能を有するため配位子と競争する可能性がある。よって、対カチオンをナトリウムイオンに変えるため、エタノール沈殿法を OPC カラム精製に続けて行った (図 5-8)。

- (o) 100 % EtOH, 70 % EtOH/H₂O, 3M AcONa/H₂O (pH7.0) 溶液を調製。
- (m) 100 % EtOH, 70 % EtOH/H₂O 溶液を (p) で調製した冷 EtOH に入れて冷却
- (n) 凍結乾燥した DNA を 100 μ L の蒸留水でよく溶解
- (o) 3 M AcONa 溶液を 150 μ l 加えよく混合
- (p) 750 μ L の冷 100 % EtOH を加えてよく攪拌
- (q) 遠心分離 15000 rpm, 20 min, 4 °C
- (r) 上清を除去
- (s) 70 % 冷 EtOH を加え再び洗浄。遠心分離 15000 rpm, 5 min, 4 °C
- (t) 凍結乾燥

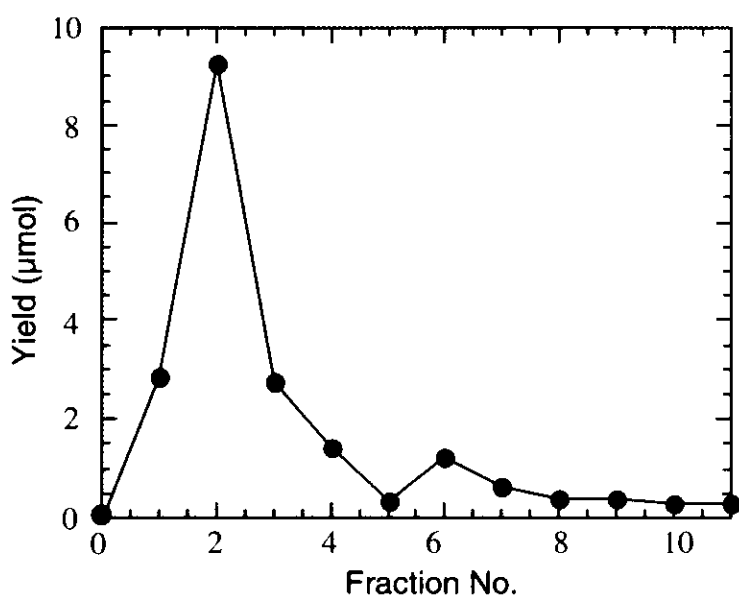


図 5-9 OPC カラム精製とそのフラクション別の収率

5-4-3 オリゴ DNA の濃度決定

蒸留水 50 mL に合成オリゴヌクレオチドを 2 時間かけて溶解した。蒸留水 2.5 mL で希釈し (1/10)、本溶液の 260 nm の塩基に由来する吸光度を 20 °C で測定した。poly dA のモル吸光係数 ϵ_{260} は、15400 である¹¹⁾。ランベルト-ベールの法則より濃度を求め、最終的に 100 $\mu\text{M}/\text{base}$ の溶液に調製した。

また人工 DNA モノマー、アデニン型亜鉛錯体 (B) は、正確に秤量後、蒸留水に溶解して 100 $\mu\text{M}/\text{base}$ の溶液を調整した。20 °C で吸光度を測定し、モル吸光係数を算出した。

本オリゴヌクレオチド溶液、アデニン型亜鉛錯体 (B) はそれぞれ 100 $\mu\text{M}/\text{base}$ のものをストック溶液として以下の実験に用いた。

表 5-3 アデニン型人工 DNA と poly dA のモル吸光係数

DNA、人工 DNA	ϵ_{260} ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
poly dA	15400
人工 DNA	9500
アデニン型亜鉛錯体 (B)	12000

5-4-4 人工核酸モノマーと金属イオンによる錯形成と結晶化実験

合成したアデニン型人工核酸が分子間で錯形成していることを確認するために、溶液中での挙動を $^1\text{H NMR}$ で、構造確認を X 線結晶構造解析により確認した。まずは結晶作製を試みた。

アデニン型人工核酸 (22.8 mg, 55.1 μmol) を秤量して蒸留水 (100 μL) に溶解した。その溶液に 0.5 M 硝酸亜鉛水溶液を 110 μL 添加して良く攪拌してフィルターろ過した。ろ液から水をゆっくり自然蒸発することにより、無色プリズム晶を得た (26.4 mg, 75%)。

$^1\text{H NMR}$ 測定は、本結晶を単離したものを重水に溶解して行った。

5-4-5 UV 吸収スペクトル測定

UV 淡色効果

UV 吸収スペクトルは、Hitachi U-3500 を用いて測定を行った。スキャン波長は 350 nm ~ 220 nm で、260 nm の核酸塩基の淡色効果を調べた。ふた付き 1 cm 石英セルに 3 mL のレファレンス溶液と測定溶液を入れ測定した。濃度は $[(dT)_{70}] = [\text{アデニン型亜鉛錯体}] = 15 \mu\text{M}/\text{base}$ 、Mops 緩衝液 1.0 mM, pH 7.0 で行った。15 °C 以下の時は、セル表面に窒素ガスを吹きつけることにより空気中の水蒸気の結露を防いだ。温度は 80 °C から 40 °C、20 °C、10 °C、0 °C に変化して UV 吸収スペクトルを測定した。

淡色効果は、上下の核酸塩基間でのスタッキングから生ずる分子の安定化を示している。スタッキングは図 5-10 に示したように、芳香環すなわち π 平面が複数存在したとき、集まった状態とランダムに存在しときのエネルギー的安定性は、次のように考えられる。 π 電子は芳香環上を動いており、瞬間的に双極子が生じる。もう一つの π 平面が近傍に存在すると、その双極子同士は互いに相互作用して双極子を打ち消す様に分極する。エネルギーを波の振幅と見なすと、振幅が小さくなったと考えられ、吸収できるエネルギー量も減り吸光度の現象、すなわち淡色効果が観察される。

芳香族環がスタッキングしたときとランダムに存在したとき

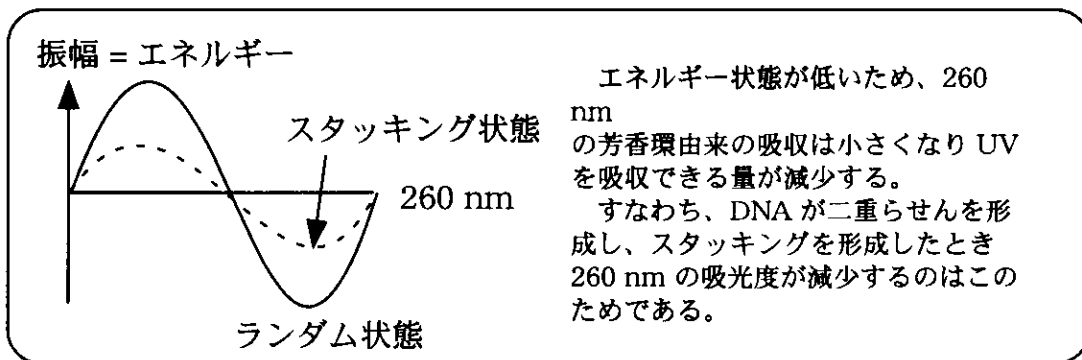
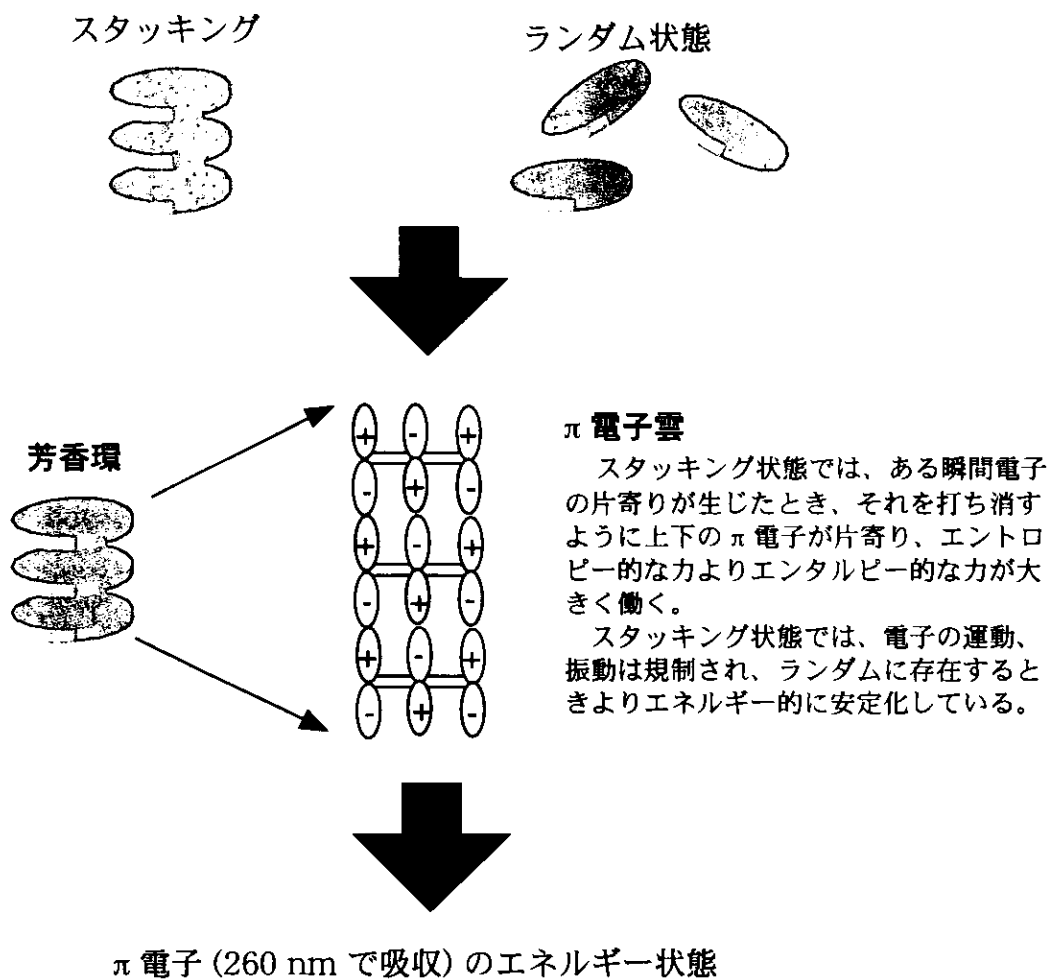


図 5-10 UV 淡色効果が起こる原理

融解温度曲線測定^{12,13)}

時間変化測定画面上で UV 吸収の時間変化の測定を行った。セルに攪拌子を入れ、規定量の蒸留水、 $(dT)_{70}$ 100 $\mu\text{M}/\text{base}$ 溶液、アデニン型人工核酸 (B) 100 μM 溶液、Mops (50 mM, pH 7.0 \rightarrow 最終濃度は 1 mM) を添加して測定を行った。最終濃度は $[(dT)_{70}] = [\text{アデニン型亜鉛錯体 (B)}] = 15 \mu\text{M}/\text{base}$ 、Mops 緩衝液 1.0 mM, pH 7.0 で行った。参照溶液は Mops 緩衝液と脱気した蒸留水を規定量の濃度に調整して測定した (Mops 緩衝液 1.0 mM, pH 7.0)。融解温度曲線を測定中、気泡が生じて正確なデータが得られなくなることがあるため、使用前に脱気を行う。脱気操作は、デシケーターに調製溶液を入れ、フタを緩く閉める。ダイヤフラムポンプで一時間程度吸引することで脱気を行った。測定は温度の変化にともなう吸光度変化が平衡に達するまで待ち、30-60 分程度一定に推移することを確認した。

融解温度を測定するときは、溶液をいっぱい充填したセルに、静かにシリコンパッキングをはめたキャップを取り付けて測定するのが望ましい。高温 (70 $^{\circ}\text{C}$ 以上くらい) の融解曲線を測定するときは、セルに溶液を最上部まで入れ、上部に空間のない状態を作った。70 $^{\circ}\text{C}$ 以上になると水の蒸発が多くなり、空間が存在するとそれぞれの融解曲線の高温部が不均一になる。

得られた融解曲線を一次微分し、この微分曲線の最大値を融解温度と定義した。

Job plot^{14,15)}

表に示すように、 $(dT)_{70}$ とアデニン型亜鉛錯体、Mops 緩衝液のストック溶液を、種々の混合比で調製し (総塩基濃度は 30 $\mu\text{M}/\text{base}$ とした)、80 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 0 $^{\circ}\text{C}$ まで温度をゆっくり変化させ融解温度実験を行った。0 $^{\circ}\text{C}$ の時の 260 nm の吸光度をプロットした (表 5-4)。

表 5-4 Job plot 実験で用いた溶液の調製と濃度

Entry	Ratio (%)		Concentration (μM)		Volume (mL)			
	$(dT)_{70}$	Zn ^{II} complex	$(dT)_{70}$	Zn ^{II} complex	$(dT)_{70}$	Zn ^{II} complex	Mops	H ₂ O
1	0	100	0	30	0	0.900	0.06	2.040
2	20	80	6	24	0.180	0.720	0.06	2.040
3	30	70	9	21	0.27	0.630	0.06	2.040
4	40	60	12	18	0.360	0.540	0.06	2.040
5	50	50	15	15	0.450	0.450	0.06	2.040
6	60	40	18	12	0.540	0.360	0.06	2.004
7	66.7	33.3	20	10	0.600	0.300	0.06	2.040
8	70	30	21	9	0.630	0.270	0.06	2.040
9	80	20	24	6	0.720	0.180	0.06	2.040
10	100	0	30	0	0.900	0	0.06	2.040

Stock solution; $[(dT)_{70}] = [\text{Zn}^{\text{II}} \text{ complex}] = 100 \mu\text{M}/\text{base}$, Mops = 50 mM, pH 7.0.

表 5-5 CD 測定で用いた溶液の調製とストック溶液

Entry	Concentration (μM)			Volume (mL)			
	$(dT)_{70}$	Zn ^{II} complex	Ratio	$(dT)_{70}$	Zn ^{II} complex	Mops	H ₂ O
1	15	0		0.45	0.000	0.06	2.490
2	15	2.5		0.45	0.075	0.06	2.415
3	15	5.0		0.45	0.150	0.06	2.340
4	15	7.5	2:1	0.45	0.225	0.06	2.265
5	15	10.0		0.45	0.300	0.06	2.190
6	15	12.5		0.45	0.375	0.06	2.115
7	15	15.0	1:1	0.45	0.450	0.06	2.040
8	15	20.0		0.45	0.600	0.06	1.890
9	15	30.0		0.45	0.900	0.06	1.590

Stock solution; $[(dT)_{70}] = [\text{Zn}^{\text{II}} \text{ complex}] = 100 \mu\text{M}/\text{base}$, Mops = 50 mM, pH 7.0

5-4-6 CD スペクトル測定¹⁶⁻¹⁸⁾

CD スペクトルの測定は、日本分光社製 J-725 Spectropolarimeter により行った。あらかじめ、Mops 緩衝液 1.0 mM, pH 7.0 を用い、(dT)₇₀ の濃度を 15 μM/base に一定にし、アデニン型亜鉛錯体の最終濃度を 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 30 μM になるように石英セル中で混合した(表 5-5)。90 °C ~ 室温までゆっくりアニーリングした(2 days)。室温から 5 °C までは温度コントローラーで一時間かけて低下させて測定を行った。

5-4-7 軽水中でのイミノプロトン測定 (¹H NMR)^{19,20)}

サンプル調製

(dT)₇₀ と Zn^{II} complex が 0.5 mM/bp の濃度になるように調製する。まず、DNA 合成機で (dT)₇₀ を合成し、5-4-3 で示した方法に従い精製したサンプルを 0.5 mL の蒸留水に溶解した。千分の一に希釈して 260 nm の吸光度を測定した(0.025 mL の (dT)₇₀ 溶液に 2.475 mL の蒸留水を加えて良く混合して測定した。しかし、吸光度が 1 以上を示したため、本溶液を十分の一に再希釈して再び測定した)。A₂₆₀ = 0.3365 であったので、元の溶液濃度を計算すると (ε = 8700)、38.7 μM/base であった。

Zn^{II} complex は、結晶を単離したものを正確に 1.278 mg 秤量し、1 mL の蒸留水に熱しながら溶解して調製した(2 mM Zn^{II} complex 溶液)。

(dT)₇₀ と Zn^{II} complex の濃度を 0.5 mM/bp になるようエッペンチューブに計り取った。(dT)₇₀ を 12.9 μL、Zn^{II} complex を 0.25 mL、蒸留水 0.637 mL 加えて充分混合した。湯浴で 80 °C ~ 室温まで三日間かけてアニーリングし、TSP と重水 0.10 mL を加えて 0.5 mL を NMR チューブに移し取り測定した²¹⁾。

Bruker DRX-500 による溶媒消去法^{22,23)}

Bruker DRX-500 の溶媒消去法の標準プログラムは zgpr と p11, watergatep3919 の三つのパルスプログラムが利用でき、両者の測定の違いと、操作方法を以下に簡単に記す。

zgpr (溶媒飽和法) は、溶媒ピークを飽和させ、目的サンプルの信号強度を上昇させる方法である。ただし、水と交換している -NH, -OH のピークが弱くなったり、消えたりする。p11 (溶媒励起法) は、パルス系列を利用した溶媒消去法である。水ピークを励起せずにスペクトルから水ピークの信号を消去する (Binomonal 法)。zgpr に比べると水消し効果は薄れますが、溶媒飽和法では消えてしまう交換可能プロトンを観察することが可能である。ただし、スペクトル全体の位相を補正することができず、目的ピークの範囲のみを合わせることになる。また正しい積分値も得られない。パルスグラジエント法である p3919gs 溶媒消去法 (watergate 法) は、水ピークを励起せずにスペクトルから消去するため、位相が水の左右で揃う。

以下、三種類のパルスプログラムの代表的な設定値を記した。

a)	zgpr	pl9	60 dB
		d1	2 sec
b)	p11	p1	7.8
		p0	31
c)	p3919	pl1	-4
		p1	7.8
		9l18	8 db
		p28	31
		p0	50 μ sec
		d19	50 μ sec
		GRDPROG	2sin.r
		p16	1 msec
		cnst21 : cnst 22	20 : 20
		d16	200 μ sec

5-4-8 内部標準液を用いたサンプル濃度の決定

チミンを核酸塩基部位に持ち、二つのグリシンを金属錯形成部位として有する化合物を $^1\text{H NMR}$ を用いて濃度決定した。標準液として脱水エタノールと重水から $6.84 \mu\text{M}$ 溶液を調整した (EtOH 10 μL , D_2O 0.49 mL の溶液 (0.343 mM) をさらに 1/50 に正確に希釈した)。化合物が入ったナス型フラスコに本 $6.84 \mu\text{M}$ EtOH/ D_2O 溶液を正確に 0.5 mL 入れて $^1\text{H NMR}$ を測定した。プロトン積分比を比較することによって濃度を決定した。

チミン体の濃度は 4 位のメチル基を用いて測定、計算したところ、 $3.766 \mu\text{mol}$ あることがわかった。溶媒を留去した後、蒸留水で 26.5 mL に調製し、 $100 \mu\text{M}$ ストック溶液として以下の実験に用いた。

5-4-9 ストック溶液の調製

硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 28.8 mg/5 mL)、硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 25.0 mg/5 mL)、硫酸ニッケル ($\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 28.1 mg/5 mL)、硫酸マグネシウム (MgSO_4 , 12.0 mg/5 mL)、塩化コバルト ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 47.6 mg/10 mL)、塩化マンガン ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 39.6 mg/10 mL) の 20 mM 水溶液を調製した。DNA の溶液は、poly dA の $69.1 \mu\text{M}/\text{base}$ 水溶液を使用した。緩衝液は Pipes 緩衝液 100 mM, NaCl 100 mM, pH 6.5 をストック溶液として使用した (表 5-6)。

表 5-6 ストック溶液濃度と測定濃度、測定容量

	ストック溶液濃度	測定溶液濃度	測定添加容量
人工核酸	$100 \mu\text{M}/\text{base}$	$20 \mu\text{M}/\text{base}$	0.868 mL
poly dA	$69.1 \mu\text{M}/\text{base}$	$20 \mu\text{M}/\text{base}$	0.60 mL
Pipes, pH 6.5, NaCl 0.1 M	100 mM	10 mM	0.30 mL
Metal	20 mM	2.0 mM	0.30 mL
H_2O			0.932 mL

5-5 結果と考察

エチレンジアミンを金属錯形成部位とした人工核酸モノマー

アデニン、チミン、グアニン、シトシンを持つ4種類の人工DNAを合成することができた。核酸塩基部位、金属錯形成部位、主骨格の三者を別々に合成し、カップリングさせていく収束型の合成法を行った。

まず、主骨格は3,5-ジメチルフェノールから合成した。水酸基をpivaroyl基で保護し、*N*-bromosuccinimide (NBS)を用いて3,5-位の二つのメチル基をプロモ化した。生成したジプロモ体**3**に*N*-(2-aminoethyl)carbonic acid *t*-butyl esterを反応させ、金属錯形成部位をカップリングした。本カップリングの収率は低かった。原料である*N*-(2-aminoethyl)carbonic acid *t*-butyl esterの一級アミンの求核性より、生成した二級アミンの求核性の方が高いためであると考えられた。カップリングによって生成した二級アミンをBoc基で保護し、pivaroyl基を1 M NaOH、THF中、50 °Cの条件下で脱保護して化合物**6**を得た。フェノール性共通中間体である化合物**6**は、全ての核酸塩基を導入するための中間体である。

核酸塩基部位として導入する、9-(chloropropyl)adenine、9-(chloropropyl)-6-purineは、1-bromo-3-chloropropaneと*t*BuOK存在下でカップリングしてchloropropyl体(化合物**1, 12**)を得た。本反応で得た主生成物は、文献11, ¹H NMR, X線結晶構造解析より9位アルキル基導入体であることがわかった(表5-7, 8, 図5-11)。7位導入体に対して9位導入体は27倍の収率で得ることができた。これは、6-chloropurineの6位に導入したクロル基の電子的な効果と立体的な効果のため、N7位よりN9位に導入されたと考えられた¹¹⁾。

1-(chloropropyl)cytosine体は、シトシンをエタノール中NaOH存在下アニオン体に誘導し、そこに1-bromo-3-chloropropaneを導入して得た。

チミン体は、合成中間体**6**とpropyleneditosylateをカップリングしてアルキルトシル体を得、*t*BuOK存在下チミンとカップリングした。図5-12に示すように、

1-(3-chloropropyl)thymine は、アルカリ性条件下では分子内環化を起こしてしまうことがわかった¹⁰⁾。また 9-(bromopropyl)adenine でも同様に、分子内環化を生じた。アルキルブロマイドなど脱離性の高い官能基を導入した化合物では、分子内環化反応がより促進されてしまうことがわかり、収率との関係上、アルキルクロリド体でカップリングを行うことにした。

グアニン体は 6-chloropurine の 6 位のクロル基をメトキシ基に変換し、加水分解して天然のグアニン体に変換した。最後の Boc 基の脱離反応は、すべての核酸誘導体において 1 M HCl/AcOH で行った。

表 5-7 文献 11 と対比したアルキル 6-クロロプリン の立体予想

	¹ H NMR chemical shift			文献 3
	9 位	7 位	差 (ppm)	
H 8	8.13	8.36	-0.23	9 位高磁場
N-CH ₂	4.17	4.43	-0.26	9 位高磁場
NH ₂	6.91	6.62	0.29	9 位低磁場

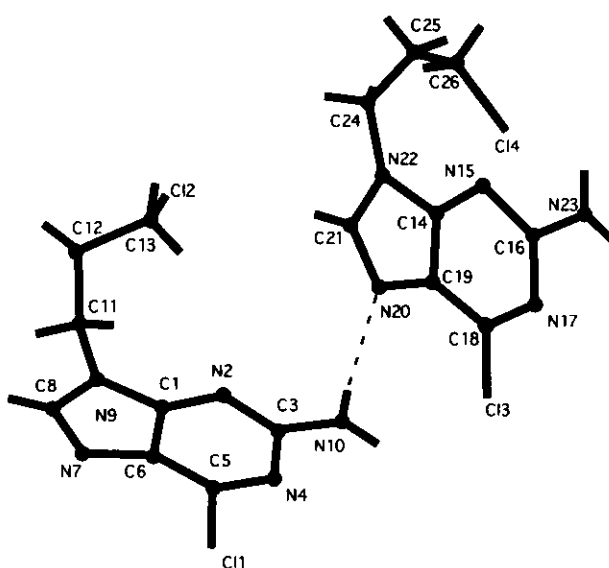


図 5-11 9-(Chloropropyl)-6-chloropurine の X 線結晶解析

表 5-8 Crystallographic data for 9-(chloropropyl)-6-chloropurine

Empirical Formula	$C_8H_9Cl_2N_5$
Formula Weight	246.10
Crystal Color, Habit	colorless, prismatic
Crystal Dimension, mm	$0.50 \times 0.10 \times 0.05$
Lattice Type	A-centered
Space Group	Aba (#41)
a (Å)	23.989(2)
b (Å)	23.607(2)
c (Å)	7.2819(4)
Z	16
D_{calcd} (g/cm ³)	1.585
Temperature (°C)	-150.0
μ (Mo K α) (cm ⁻¹)	-6.01
$F(000)$	2016.00
R^a	0.123
R_w^b	0.133
$R1^c$	0.067

$$^a R = \frac{\sum (F_o^2 - F_c^2)}{\sum F_o^2}$$

$$^b R_w = \left[\frac{\sum_w (F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum_w (F_o^2)^2} \right]^{1/2}$$

$$^c R1 = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|}, \text{ for } I > 2.0\sigma(I)$$

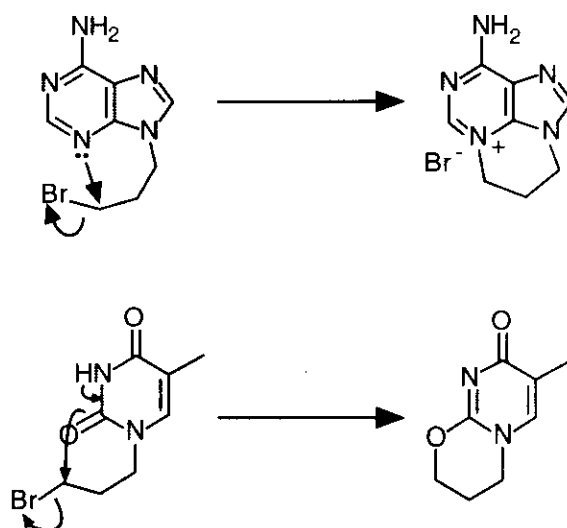
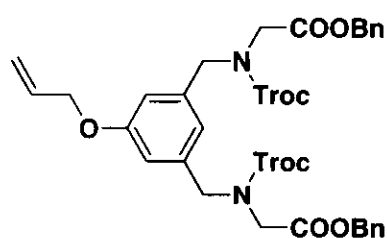


図 5-12 アルキルブロミド核酸誘導体の分子内環化反応

● グリシンを金属錯形成部位とした人工核酸モノマー

本化合物は 5-hydroxyisophthalic acid を出発原料として用い、カルボン酸をエタノール中でエステル化して、フェノール性水酸基と化合物 **21** をカップリングした。化合物 **23** のエステル部位を sodium borohydride で還元してベンジルアルコールタイプに変換した。**24** を thionyl bromide によりプロモ化し、錯形成部位である glycine benzyl ester をカップリングした。生じた二級アミノ基を

2,2,2-trichloromethyloxycarbonyl (Troc) 基で保護し、ベンゼン環の 1 位に導入した *t*-butyl 基を TFA により脱保護してアルキルアルコールタイプに変換した。Tosyl chloride



により末端水酸基を Ts 化し、*t*BuOK 存在下、thymine と 図 5-13 NMR, FAB MS より同定した脱離体の構造

反応させて化合物 **30** を得た。Ts 体 **29** は、非常に脱離性が高く、一日で脱離体である図 5-13 のような化合物が生じた。最終化合物へは、チミン導入体 **30** を Troc 基を酸処理した活性化亜鉛で脱保護し、benzyl 基をアルカリ条件で脱保護して目的とする生成物 **32** を得た。

5-6 総括

本章では、DNA の塩基配列情報をテンプレートとして可逆的、配列特異的に集積化する分子のデザイン・合成について述べた。このような分子としては、テンプレート DNA と相補的な水素結合形成が行えるよう核酸塩基を導入し、可逆的に配列変換するよう主鎖の共有結合であるリン酸ジエステルの代わりに、金属錯形成部位を導入した分子を設計した。

デザインした化合物は (a) ~ (h) までの 8 種類で、金属錯形成部位としてプロピレンジアミン、エチレンジアミン、グリシンの三種類の導入を検討したが、最終段階まで合成が完了したものは、化合物 (g)、(h) であった。(g) についてはアデニン、グアニン、チミン、シトシン体の四種類を合成できた。(h) に関してはチミン体のみを得ることができた。

5-7 参考文献

- 1) D. Nuller, I. Zeltser, G. Bitan, and C. Gilon, *J. Org. Chem.*, **62**, 411, 1997.
- 2) D. T. Browne, J. Eisinger, and N. J. Leonard, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7302, 1968.
- 3) G. R. Geen, T. J. Grinter, P. M. Kinsey, and R. L. Jarvest, *Tetrahedron*, **46**, 6903, 1990.
- 4) G. Just and K. Grozinger, *Synthesis*, 457, 1976.
- 5) *Organic Syntheses*, Wiley: New York, 1995, Collect. Vol III, 410.
- 6) W. F. Huffman, R. F. Hall, J. A. Grant, and K. G. Holden, *J. Med. Chem.*, **21**, 413, 1978.
- 7) 岩井成憲、大塚栄子、別冊蛋白質核酸酵素, **39**, 1788, 1994.
- 8) Applied Biosystems, Model 392 and 394 DNA/RNA Synthesizer 操作説明書、Ver 1.02, 平成5年1月25日改訂版.
- 9) 丹羽峰雄、DNAの化学合成法、廣川書店、1992.
- 10) 田村隆明、遺伝子工学実験ノート、洋土社、12、1998.
- 11) C. Cantor, M. M. Warshaw, and H. Shapiro, *Biopolymers*, **9**, 1059, 1970.
- 12) 王子田 彰夫、「融解温度測定マニュアル」1996.
- 13) 矢吹貞人、和田昭允、別冊蛋白質核酸酵素、共立出版、156、1973.
- 14) P. Job, *Ann. Chim.*, **9**, 113, 1939.
- 15) G. Felsenfeld and A. Rich, *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 457, 1957.
- 16) 今堀和友、渡辺公綱、生化学実験講座、核酸I、p159、東京化学同人、1977.
- 17) 渡辺公綱、別冊蛋白質核酸酵素、共立出版、172、1973.
- 18) 鮫島達也、実験化学講座、核酸の化学修飾および物理化学的性質、p 945.
- 19) 甲斐荘正恒、別冊蛋白質核酸酵素、共立出版、228、1973.
- 20) 曾根達生、京極好正、生化学実験講座2、東京化学同人、63、1977.
- 21) 日本ブルカー株式会社、NMR-2B 中級者コース、溶媒消去 1-1.
- 22) 王子田彰夫、塩谷研マニュアル「核酸のNMR サンプル調製マニュアル」.
- 23) 幡野明彦、塩谷研マニュアル「Bruker DRX-500 NMR 軽水マニュアル」.

第六章

結論

1 Akihiko Hatano, Hiromasa Morishita, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiko Shionoya

" Metal-Assisted Formation of Artificial Nucleic Acids "

Nucleic Acids Symp. Ser., **39**, 171-172, 1998.

2 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya

" Self-Assembly of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics into a Single-Stranded

Zn^{II} Coordination Polymer "

Chem. Lett., 822-823, 2000.

3 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya

" Syntheses of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics: Metal-Assisted Assembly

of Guanine Mimics onto an Oligocytosine "

in preparation.

プログラムされた分子は、それ自身が集合して目的の構造になり機能を発現する。個々ではなんら機能を持たない分子でも、外部からのある刺激より集積化、組織化が起こり機能を持つ集合体になることがある。自然界では、生命体そのものがプログラムされた分子の集まりであると言っても過言ではない。

生体情報分子である DNA は、リボースの 3', 5' -リン酸ジエステル結合によって共有結的にリボースがつながり、二本鎖が四種類の核酸塩基による相補的な水素結合形成、およびスタッキングによりらせん構造をなしている。核酸塩基の配列順序が、生命体の設計図になっており、タンパク質を設計合成するための情報が含まれている。プログラムされた分子である DNA は、タンパク質の設計図としてばかりではなく、その他分子や官能基を配列集積化するための設計図にもなりえるものとする。

本研究では、一本鎖 DNA の塩基配列情報に従って自発的に集積化する分子システムの構築を目指した。DNA のリン酸ジエステル結合の代わりに、二つの金属錯形成部位を有することにより、分子間で金属錯形成して主鎖を形成して一本鎖鋳型 DNA と核酸塩基部位が相補的に水素結合、およびスタッキングを形成することにより二本鎖を形成するような人工 DNA の構築を行った。本分子は金属錯形成を介して主鎖を形成しているため、配位子交換により可逆的な配列変換が可能になると考えられた。

第一章では、本研究の意義とバックグラウンドについて述べた。

第二章では、一本鎖鋳型 DNA と配列特異的に相互作用するような分子をデザインした。デザインとしては金属錯形成部位を二つ持ち、核酸塩基部位を有するような分子である。分子内で錯形成することなく分子間で錯形成するよう、中心にベンゼン間を持ち、3, 5 位から金属錯形成部位としてエチレンジアミンを持つような分子を合成することにした。また、グリシンを錯形成部位として有するものもデザインした。

第三章では、金属錯形成部位にグリシンを有する人工核酸 (チミン) と一本鎖鋳型 DNA である poly dA との相互作用について検討した。UV 吸収スペクトルより、淡色効果は観察されなかった。

第四章では、合成したエチレンジアミンを錯形成部位として有し、アデニン塩基を持

つ人工 DNA の構造決定と、一本鎖鋳型 DNA (dT)₇₀ との相互作用について述べた。硝酸亜鉛とアデニン型人工 DNA の錯体は、X線結晶構造解析より分子間の二つのエチレンジアミンが亜鉛イオンにトランス型で配位し、軸位には二つの水分子が配位した六配位八面体型構造をとることがわかった。本錯体と一本鎖鋳型 DNA との相互作用を UV 吸収スペクトルによる融解温度実験、Job plot、および CD スペクトルより調べたところ、1:1 および 2:1 複合体の形成が含まれることが示唆された。また、軽水中 ¹H NMR を測定したが、イミノプロトンに由来するシグナルの確認はまだできていない。

第五章では、人工 DNA の合成と、一本鎖 DNA との相互作用を調べるための各種分光学的な手法と実験方法について述べた。金属錯形成部位にグリシンを持つような人工 DNA を 10 step で合成した。また、エチレンジアミンを錯形成部位として有する人工 DNA は、3,5-dimethylphenol を出発原料として数段階を経てフェノール性合成中間体を得た。本中間体はアデニン、グアニン、シトシン、チミンの四種類すべてを合成するための合成中間体である。この合成中間体より 2 ~ 4 ステップを経て A, G, C, T すべての核酸塩基を導入したエチレンジアミン型人工 DNA を合成することができた。

本研究では、デザイン・合成した人工 DNA が一本鎖鋳型 DNA と相互作用することを UV 淡色効果、融解温度実験、Job plot、CD スペクトルより示した。Job plot より 1:1 と 2:1 の複合体が形成され、CD スペクトルより一本鋳型 DNA とは異なる DNA の構造を誘起したことがわかった。しかし、より直接的な証明である X線結晶解析、イミノプロトン NMR 測定による水素結合の確認は、未だ確認できていない。今後条件検討が必要であると思われる、また電子顕微鏡測定により、一本鋳型 DNA のリン原子とアデニン型亜鉛錯体の亜鉛等の配列を評価する。また、グアニン型人工核酸を用いて一本鋳型 DNA である (dT)₇₀ との相互作用を検討し、今回の結果と比較する予定である。

[発表論文]

1 Akihiko Hatano, Hiromasa Morishita, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiko Shionoya

「Metal-Assisted Formation of Artificial Nucleic Acids」

Nucleic Acids Symp. Ser., **39**, 171-172, 1998.

2 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya

「Self-Assembly of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics into a Single-Stranded Zn^{II} Coordination Polymer」, *Chem. Lett.*, 822-823, 2000.

3 Akihiko Hatano, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya, .

「Syntheses of Chelator-Type Nucleic Acid Mimics: Metal-Assisted Assembly of Guanine Mimics onto an Oligocytosine」, in preparation.

[学会発表]

1) 幡野 明彦 (総研大博士課程 1 年)、田中 健太郎 (分子研助手)、
塩谷 光彦 (総研大併任分子研教授)

「金属イオンにより誘起される人工 DNA の自発的集合化」

日本化学会第 74 回春季年会 同志社大学 1998 年 3 月

2) 田中 健太郎 (分子研助手)、曹 紅花 (総研大博士課程 1 年)、
幡野 明彦 (総研大博士課程 2 年)、 塩谷 光彦 (総研大併任分子研教授)

「金属配位結合で二重鎖を形成する人工 DNA」

日本化学会第 75 回秋季年会 愛媛大学、松山大学 1998 年 9 月

3) 幡野 明彦 (総研大博士課程 2 年)、森下 泰全 (総研大博士課程 2 年)、
田中 健太郎 (分子研助手)、 塩谷 光彦 (総研大併任分子研教授)

「Metal-Assisted Formation of Artificial Nucleic Acids」

第 25 回核酸化学シンポジウム 甲南大学 1998 年 9 月

4) 塩谷 光彦 (総研大併任分子研教授)、田中 健太郎 (分子研助手)、
曹 紅花 (総研大博士課程 1 年)、幡野 明彦 (総研大博士課程 2 年)

「人工 DNA の合成と機能化」

第 29 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 豊橋科学技術大学 1998 年 9 月

5) 幡野 明彦 (総研大博士課程 3 年)、田中 健太郎 (東大院理助手)、
塩谷 光彦 (東大院理教授)、城 始勇 (理学電機)

「金属錯形成により主鎖を形成する人工 DNA の合成」

第六章

第 49 回錯体化学討論会 北海道大学 1999 年 9 月

6) 幡野 明彦 (総研大博士課程 3 年)、千葉 順哉 (総研大博士課程 1 年)、
今村 恵 (東大理 4 年)、田中 健太郎 (東大院理助手)、塩谷 光彦 (東大院理教授)、
城 始勇 (理学電機)

「一本鎖 DNA をテンプレートとした金属錯体型人工核酸の集積」

日本化学会第 78 回春季年会 日本大学船橋キャンパス 2000 年 3 月

7) 幡野 明彦 (総研大博士課程 3 年)、千葉 順哉 (東大院理博士後期課程 1 年)、
田中 健太郎 (東大院理助手)、城 始勇 (理学電機)、塩谷 光彦 (東大院理教授)

「金属錯形成により主鎖を形成する人工 DNA の合成と

一本鎖 DNA 上への自発的集積化」

第 10 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 東京大学山上会館 2000 年 5 月

8) Mitsuhiko Shionoya, Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, Akihiko Hatano,
Kazuki Shigemori, Sachiko Arie, Jyun-ya Chiba, and Sadayuki Asaoka

「Molecular Design and Functions of Metal-Assisted DNA and Peptide Architectures」

XIth International Symposium on Supramolecular Chemistry ACROS Fukuoka, August, 2000

9) 幡野 明彦 (総研大博士課程 3 年)、千葉 純哉 (東大院理博士後期一年)、田中 健
太郎 (東大院理助手)、塩谷 光彦 (東大院理教授)、城 始勇 (理学電機)

「金属錯生成により主鎖を形成する人工核酸型錯体の合成と DNA との相互作用」

第 50 回錯体化学討論会 立命館大学 2000 年 9 月 発表予定

10) 田中 健太郎 (東大院理助手)、曹 紅花 (総研大博士課程 3 年)、田坂 基行 (総研
大博士課程 3 年)、幡野 明彦 (総研大博士課程 3 年)、千葉 順哉 (東大院理博士後期一

第六章

年)、城 始勇 (理学電機)、塩谷 光彦 (東大院理教授)

「金属配位結合で二重鎖を形成する人工 DNA」

第 50 回錯体化学討論会国際シンポジウム 立命館大学 2000 年 9 月 発表予定

謝辞

本研究を行うにあたり、常に有意なご意見、ご指導いただきました東京大学大学院理学系研究科の塩谷光彦教授に心より感謝いたします。

また、本研究を進めていくにあたり、いつもの確なアドバイスとディスカッションをいただきました東京大学大学院理学系研究科の田中健太郎助手に心より感謝いたします。

本研究は、構造解析が非常に大きなウエイトを持っておりました。X線結晶構造解析で種々のアドバイス、構造解析等でお世話になりました理学電機株式会社X線研究所の城始勇博士に心よりお礼申し上げます。

合成のFAB MS、元素分析では、分子科学研究所物質開発センターの野村幸代技官に多大なる協力をいただきました。御礼申し上げます。

また、本研究を進めていくにあたり測定機器等の使用でお世話になりました方々に心より感謝いたします。

三年半、一緒に研究を進め、互いに励ましあってきた森下泰全氏、茂森一輝氏にもお礼申し上げます。

最後に、社会人から学生に戻ることをわがままを許してくれた両親、並びに妻には感謝の言葉ありません。この場をお借りしまして感謝の意に変えさせていただきたいと思います。ありがとうございました。

本研究は日本学術振興会からのサポートを受けて遂行することができました。ここに感謝の意を示すとともにお礼に変えさせていただきたいと思います。