

配位結合により塩基対を形成する人工  
DNA の合成と機能化

曹 紅花  
総合研究大学院大学  
数物科学研究所  
機能分子科学専攻

## 論文要旨

## 英文要旨

第1章： 序論	1
第2章： 金属配位子を核酸塩基として有するカテコール型人工スクレオシドの合成	7
2-1 緒言	8
2-2 分子設計	10
2-3 カテコール型人工スクレオシドの合成	12
2-4 実験の部	16
2-5 まとめ	19
2-6 引用文献	20
第3章： ボランイオンに誘起される人工スクレオシドの塩基対形成	21
3-1 緒言	22
3-2 カテコール型人工スクレオシドの塩基対形成	23
3-3 実験の部	25
3-4 まとめ	27
3-5 引用文献	28
第4章： カテコール型人工スクレオシドをシークエンス中に導入したオリゴスクレオチドの合成	30
4-1 緒言	31
4-2 フォスフォロアミダイト固相法による合成	32
4-3 リン酸トリエステル液相法による合成	34
4-4 カテコール型人工スクレオシドを導入したオリゴDNA二重鎖形成に及ぼす Cu <sup>2+</sup> イオンの効果	36
4-5 実験の部	38
4-6 まとめ	43
4-7 引用文献	44
第5章： 結論	45
発表論文	
参考論文	
謝辞	

(別紙様式 3)

# 博士論文の要旨

平成 12 年 6 月 7 日

出願者

数物科学研究科 機能分子科学専攻

氏名 曹紅花

(学籍番号 972508)

学位申請論文

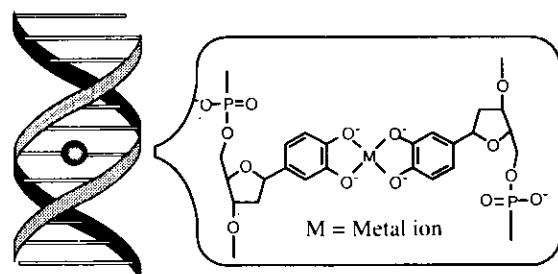
題目 配位結合により塩基対を形成する人工カテコール型スクレオシドの合成と機能化

核酸やタンパク質などの生体高分子は、精密に製御された構造をもつ、最も優れた機能性分子である。これらの分子構造を官能基レベルで変換し、再構築することにより、生体高分子の高い構造性を利用した新しい機能性分子を創製できる可能性がある。

本研究では、新規機能性素子としての応用、生体機能の人為的コントロールへの応用を目的とし、金属イオンと錯体を形成するカテコールを核酸塩基として導入した人工 DNA を合成した。この人工 DNA が水素結合の代わりに配位結合により塩基対を形成することを期待した (Chart 1)。カテコールは金属やホウ素と平面四配位、あるいはテトラヘドラルのような様々な配位構造をとりうるため、カテコール型人工スクレオシドを天然のオリゴマーに導入することにより、配位結合に基づく塩基対が DNA に新たな構造と機能を付与しうると考えられる。

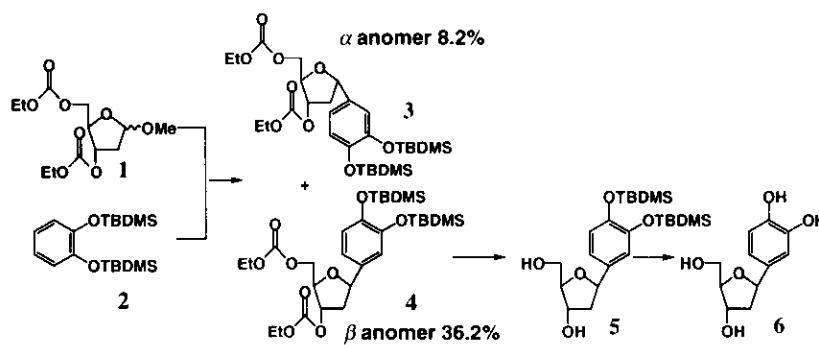
カテコールを塩基として導入した人工 $\beta$ -C-スクレオシド 6 は、デオキシリボ

Chart 1



ース誘導体と水酸基を保護したカテコールを用いて Friedel-Crafts 反応により合成した。目的の  $\beta$ -C-スクレオシドは 36% の収率で選択的に得ることができ、

Scheme 1

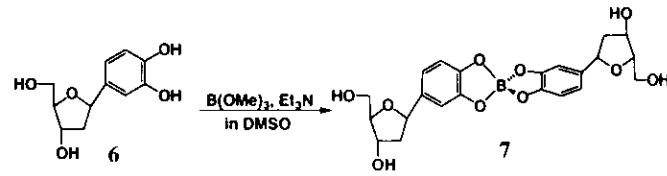


さらに二段階の脱保護反応を経て、目的のスクレオシド **6** を得た (Scheme 1)。スクレオシド **6** は DMSO 中、B<sup>III</sup>イオンとの配位結合反応により、ボランカテコ

レート錯体 **7** を形成すること

Scheme 2

がわかった (Scheme 2)。ESI-TOF (electrospray ionization-time-of-flight) Mass の negative モードによる測定結果は、ボ



ランとカテコール型人工スクレオシド 2:1 錯体の理論的同位体シミュレーションと一致していた。さらに  $^1\text{H}$  NMR の測定結果は、ボランイオンがスクレオシド **6** のカテコールと塩基対

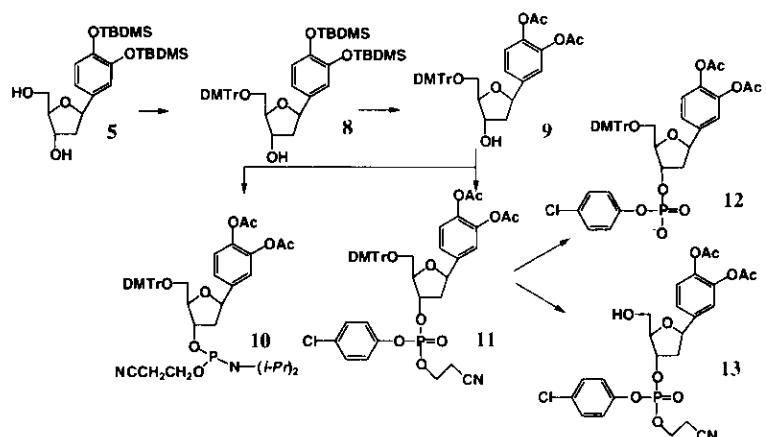
を形成していることを明らかにした。

スクレオシド **6** を DNA オリゴマーサイクエンス中に導入するために、フォスフォロアミダイト固相合成法およびリン酸トリエヌテル液相法を用いるこ

ととした。それぞれの合成方法に用いるための基質 **10**, **12**, **13** を、共通の中間体 **9** より誘導し (Scheme 3)、オリゴスクレオチドの合成を試みた。

DNA の合成方法は確立されており、合成したカテコールを核酸塩基として有する  $\beta$ -C-スクレオシドを DNA シークエンスの目的部位に導入することにより、DNA の二重鎖構造の結合様式を目的に合わせて制御できることが期待される。

Scheme 3



# Synthesis and functionalization of catechol-type nucleoside for alternative base pairing through coordinating bonding

Honghua Cao

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

The Graduate University for Advanced Studies

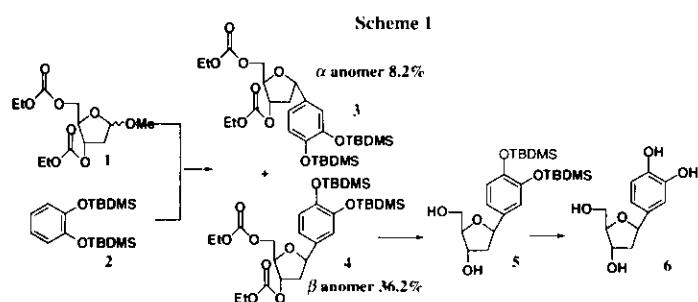
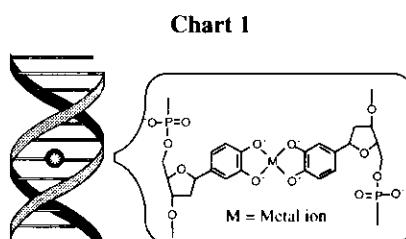
Biomacromolecules such as protein and nucleic acid are excellent functional molecules, which play crucial roles in the vital functions in biological system in an accurate and well-controlled manner. Owing to recent developments in organic synthesis and biotechnology, it has become feasible to chemically modify these molecular structures at the molecular level.

An alternative approach we have used for the reconstruction of DNA is the direct modification of nucleobases by incorporating metal-chelating nucleobases into DNA strands. In this artificial DNA, hydrogen-bonded base pairing is replaced by metal-induced base pairing, thereby creating a novel hybridization motif in double-stranded DNA (Chart 1).

We have synthesized an artificial  $\beta$ -C-nucleoside **6** which have a catechol group as a nucleobase. This novel nucleoside was synthesized from a 2'-deoxyribose derivative **1** and *O*-protected catechol **2** via Friedel-Crafts coupling reaction to selectively afford the desired product  $\beta$ -C-

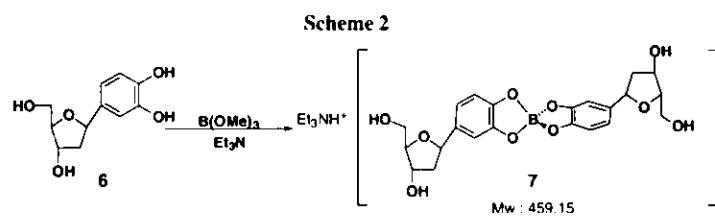
nucleoside **4** in 36% yield.

The following two-step deprotection procedures afforded the target  $\beta$ -C-nucleoside **6** (Scheme 1).



Catechol-bearing  $\beta$ -C-nucleoside **6** was treated with half amount of trimethyl borate and triethylamine in DMSO-*d*<sub>6</sub> at room temperature to obtain 2:1 complex **7** between nucleosides and boron

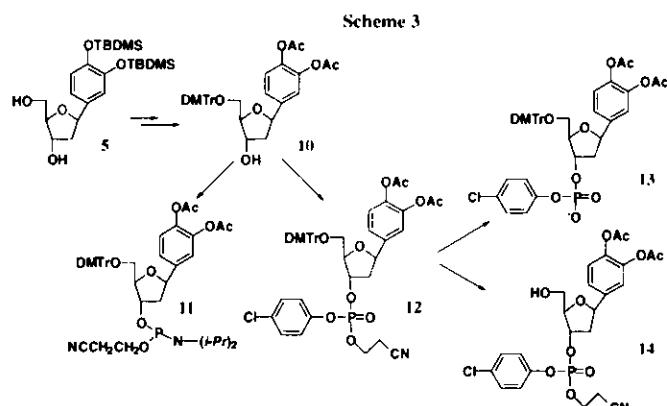
(III) (Scheme 2). The isotopically resolved ESI-TOF mass spectrum of this solution in the negative



mode provided clear evidence for the 2:1 complexation between **6** and boron ion. The signal at  $m/z$  459.15 [ $7\text{-Et}_3\text{NH}^+$ ] gave excellent agreement between the experimental and theoretical isotopic distributions indicating the boron-assisted dimerization of **6**. 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR resonances from aromatic protons of the complex **7** in  $\text{DMSO}-d_6$  were upfield-shifted from those of the nucleoside **6**, and the signals for hydroxy protons on the catechol moiety disappeared upon complexation, whereas those for the ribose moiety still remained. These results indicate that phenoxy groups coordinated to the boron (III) center, in the deprotonated form, that is to say a boron (III) ion promoted base pairing of **6**. Although there are two possible diastereomeric structures for the complex **7**, we only observed one set of proton signals for the complex **7** in the spectrum.

We then tried to incorporate a catechol-type  $\beta$ -C-nucleoside as a “chelator-nucleoside” building block into a DNA strand by means of a phosphotriester or a phosphoramidite approach.

We synthesized phosphoramidite type **11** and phosphotriester-type **13** and **14**, starting from compound **10** (Scheme 3), which can be used to introduce the catechol-type nucleoside into oligo-DNA.



This work demonstrates a novel base pairing mode assisted by borate formation, which would provide an alternative DNA base pair in addition to other metal-assisted base pairs that have been developed in our group so far. This novel base pair at specific site of oligo-DNA would contribute to the development of new structural and functionalized super-biomolecules.

# 第1章

## 序論

**An Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing: Novel-C-Nucleosides with a 2-Aminophenol or a Catechol as the Nucleobase**

Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, and Mitsuhiro Shionoya

*Eur. J. Pharm. Sci.*, in press.

**An Alternative Base-pairing of Catechol-Bearing  
Nucleoside by Borate Formation**

Honghua Cao, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiro Shionoya

*Chem. Pharm. Bull.*, in press.

## 1-1 序論

生命現象の中心的役割を果たしている遺伝子は、精密に制御された高次構造をとっており、核酸 (DNA や RNA) 同士の高度な分子認識過程に基いてその機能を発現している。このような精密な分子認識様式は、化学や生化学的手法で新しい化学治療法および遺伝子工学的手法を開発する上で非常に重要な知見を与える。また、タンパク質や核酸は、アミノ酸やヌクレオシドから成る鎖状分子であり、その一次配列によって特性が与えられ、さらにその折り畳み構造により特異的に高い機能を発現している。このような階層構造に注目し、官能基変換等分子レベルで生体分子の構成ユニットを化学修飾することにより、タンパク質や核酸の本来の機能に新しい機能を付加するだけではなく、全く別の機能を持つ分子に応用展開することが可能であると考えられる。

遺伝子本体である核酸は、ヌクレオシドがリン酸ジエステル結合で結ばれている鎖状分子であり、ヌクレオシドは 2'-デオキシリボース (RNA の場合はリボース) と核酸塩基アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T) (RNA の場合はチミンの代わりにウラシル (U))、シトシン (C) から成る。核酸塩基は A-T、G-C というように、水素結合相補的に対を形成し、またこれら核酸塩基対が互いにスタッキングすることにより、DNA は二重らせん構造を形成している。DNA における、核酸塩基間の水素結合は遺伝情報の貯蔵、複製、転写に重要な役割を演じている<sup>1</sup>。例えば、DNA ポリメラーゼによる DNA 鎮の複製において、エラーが起こる確率は  $10^{-9}$  から  $10^{-10}$  と極めて低い。このように、DNA 分子は緻密に制御された分子構造により、高い機能を発現している。

近年、天然分子を人工改変したり、生体からのヒントにより新しい分子を合成することにより、高機能性分子の創成を目指す研究が盛んに行われている。核酸修飾化学は、医薬、生化学、超分子化学、材料化学等の分野において多くの人々の注目を集めている。修飾核酸とは、天然のヌクレオシドの塩基部位、糖部位あるいはリン酸ジエステル部位を、化学的手法を用いて修飾、改変した

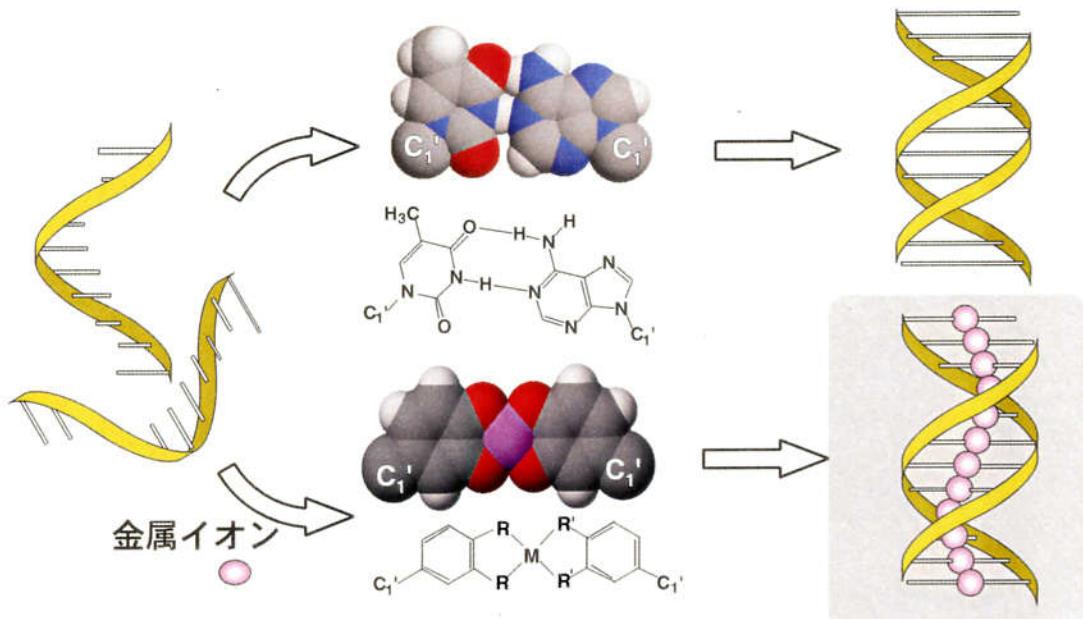
核酸の総称である。核酸塩基部位の改変<sup>2,5</sup>に着目すると、Benner らは、天然の核酸塩基が持たない、様々な水素結合パターンを有する人工ヌクレオシドを化学的に合成し、核酸塩基のアルファベットを拡張しようと試みている<sup>3</sup>。また Kool<sup>4</sup> や Schultz<sup>5</sup> らは、水素結合部位を持たない芳香環を核酸塩基として導入した種々の人工ヌクレオシドを合成することにより、DNA ポリメラーゼによる DNA 複製において、塩基間の相互認識は水素結合のみではなく、塩基の形やスタッキング相互作用が大きく影響するという興味深い説を述べている。

核酸と金属イオンの相互作用に関する研究は、生体内における金属イオンの役割を解明するためのみではなく、核酸の機能化を目指して、近年、大きく発展してきている<sup>6</sup>。DNA 分子を媒介としたエネルギー、電子移動反応、DNA のハイブリダイゼーションプローブおよびセンサー、また DNA 分子の選択的切断試薬などが開発されている。

本研究では、より直接的に金属イオンを DNA へ導入することにより、金属イオンによる DNA の構造、機能変換を目指している。天然の核酸に見られる水素結合による塩基対形成を、金属錯生成を基とした塩基対形成に置き換えることにより、新しい結合様式<sup>7</sup>を DNA 中へ導入し、DNA への高機能の付与を考えた。すなわち、核酸塩基として金属配位子を導入することにより、金属イオンにより塩基対を形成し、二重鎖構造をとる人工 DNA が期待される(Chart 1-1)。本研究室では、o-フェニレンジアミンを核酸塩基として導入した人工ヌクレオシドを合成し、Pd<sup>2+</sup> イオンによる人工ヌクレオシドの塩基対形成を確認した<sup>8</sup>。本論文では、この様な、金属錯体生成により形成した塩基対の電荷や構造を制御するために、カテコール型人工ヌクレオシドを合成し、その塩基対形成能、DNA シークエンス内への導入、金属イオンがプロモートする二重鎖形成について検討することを目的としている。カテコール型人工ヌクレオシドを導入した人工 DNA を合成することにより、DNA の構造や機能を制御する新しい方法論となる可能性があり、また、DNA 二重らせん構造の中心に

金属イオンを並べることなどが期待でき、金属イオン配向集積場としても興味が持たれる。

Chart 1-1



## 引用文献

1. Saenger, W. "Principles of Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag. New York, 1984.
2. (a) Lesser, J.; Kierzek, R.; Turne, D. R.; Kurpiewski, M. R.; Jen-Jacobson, L. *Science*, **250**, 1990, 776. (b) Kornberg, A.; Baker, T. A. *DNA Replication*, 2nd ed, W. H. Freeman: New York, 1992. (c) Smith, S. A.; Rajur, S.B.; McLaughlin, L. W. *Nature Struct. Biol.*, **1**, 1994, 198. (d) Santaluciar, D.H. *Science*, **256**, 1992, 217. (e) Horn, T.; Chang, C.-A.; Collins, M. L. *Nucleosides Nucleotides* **14**, 1995, 1023-1026. (f) Roberts, C.; Bandaru, R.; Swizer, C. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1997, 4640-4649. (g) Roberts, C.; Chaput, J. C.; Swizeer, C. *Chem. Biol.* **4**, 1997, 899-908. (h) Robinson, H.; Gao, Y.-G.; Bauer, C.; Roberts, C.; Swizer, C.; Wang, A. H.-J. *Biochemistry* **37**, 1998, 10897-10905.
3. (a) Piccirilli, J. A.; Krauch, T.; Moroney, S. E.; Benner, S. *Nature* **343**, 1990, 537-539. (b) Bainm, J. D.; Swizer, C.; Chamberline, A. R.; Benner, S. A. *Nature* **356**, 1992, 33-37. (c) Swizer, C.; Moroney, S. E.; Benner, S. A. *Biochem.* **32**, 1993, 10489-10496. (d) Lutz, M. J.; Horlacher, J.; Benner, S. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1998, 499-504. (e) Lutz, M. J.; Horlacher, J.; Benner, S. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1998, 499-504.
4. (a) Schweuzer, B; A.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1995, 1863. (b) Ren, R. X. F.; Chaudhuri, N. C.; Paris, P.L.; Rumney IV, S.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1996, 7671. (c) Kool, E. L. *Chem. Rev.* **97**, 1997, 1473-1478. (d) Morales, J. C.; Kool, E. T. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1998, 950-954. (e) Moran, S.; Ren, R. X.-F.; Kool, E. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1997, 10506-10511. (f) Moran, S.; Ren, R. X.-F.; Rumney, S. I.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1997, 2056-2057. (g) Matray, T. J.; Kool, E. T. *Nature* **399**, 1999, 704-708.
5. (a) McMinn, D. L. ; Ogawa, A. K.; Wu, Y.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1999, 11585-11586. (b) Ogawa, A. K.; Wu, Y.;

- Mcminn, D. L.; Liu, J.; Schultz, P.G. J.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2000, 3274-3280
6. (a) Dreyer, G. R.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1985, 968. (b) Chen, C.-H. B.; Sigman, D. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1988, 6570. (c) Telser, J.; Cruickshank, K. A.; Schanze, K. S.; Netzel, T. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1989, 7221. (d) Bannwarth, W.; Pfleiderer, W.; Müller, F. *Helv. Chim. Acta*, **74**, 1991, 1991 and references therein. (e) Murphy, C. J.; Arkin, M. R.; Jenkins, Y.; Ghatlia, N. D.; Bossmann, S. H.; Turro, N. J.; Barton, J. K. *Science*, **262**, 1993, 1029. (f) Bashkin, J. K.; Frolova, E. I.; Sampath, U. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1994, 5981. (g) Matsumura, K.; Endo, M.; Komiya, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2019. (h) Magd, D.; Miller, R. A.; Sessler, J. L.; Iverson, B. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1994, 7439. (i) Meade, T. J.; Kayyen, J. F. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **34**, 1995, 352. (j) Hall, J.; Hüskens, D.; Haner, R. *Nucleic Acid Res.* **24**, 1996, 3522. (k) Manchanda, R.; Dunham, S. U.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1996, 5144. (l) Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **35**, 1996, 646. (m) Mucic, R. C.; Herrlien, M. K.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Chem. Commun.* **1996**, 555. (n) Dandiliker, P.J.; Holmlin, R. E.; Barton, J. K. *Science*, **275**, 1997, 1465. (o) Meggers, E.; Kusch, D.; Giese, B. *Helv. Chim. Acta.*, **80**, 1997, 640. (p) Ihara, T.; Nakayama, M.; Murata, M.; Nkano, K.; Maeda, M. *Chem. Commun.* **1997**, 1609. (q) Magda, D.; Crofts, S.; Lin, A.; Miles, D.; Wright, M.; Sessler, J. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1997, 2293. (r) Hurley, D. J.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 1998, 2194 and references therein.
7. Kuklenyik, Z.; Marzilli, L. G. *Inorg. Chem.*, **36**, 1996, 5654: Marzilli らは水銀イオンにより、T-Hg-T の形で二つのチミン塩基が架橋され、オリゴ DNA 分子の二本鎖 $\leftrightarrow$ ヘアピン構造の相互変換について報告している。
8. Tanaka, K.; Shionoya, M. *J. Org. Chem.*, **64**, 1999, 5002-5003.

## 第2章

# 金属配位子を核酸塩基として有する カテコール型人工ヌクレオシドの合成

**An Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing: Novel-C-Nucleosides with a 2-Aminophenol or a Catechol as the Nucleobase**

Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, and Mitsuhiko Shionoya

*Eur. J. Pharm. Sci.*, in press.

## 2-1 緒言

修飾ヌクレオシドの中には顕著な生理活性、抗癌性、抗ウイルス性などを有する化合物<sup>1-3</sup>が数多く見い出されており、そのいくつかは医薬品として臨床で使用されている<sup>4,5</sup>。これらの修飾方法は主に、天然のヌクレオシドの核酸塩基部位、リボース部位およびリン酸ジエステル結合部位の化学変換である。ヌクレオシドに導入される官能基の性質により、DNAの構造や機能をコントロールすることが可能である。

一方、合成化学的観点から見た場合、ヌクレオシドは分子内にリボースと複素環化合物を同時に有するため、それを化学修飾するに当たっては精密な立体化学制御が必要とされる。また、このように合成された擬似ヌクレオシドは、酵素の寛容さのために天然DNA中に取り込まれることがあり、抗癌性、抗ウイルス性などの生理活性が期待できることも大きな魅力の一つである。

DNA分子は四つの塩基であるアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の間で、水素結合による高選択的分子認識が行われている。本研究では、水素結合の代わりに金属イオンとの結合により塩基対を形成する人工核酸塩基を合成し、新しいDNAアルファベットをDNAシークエンスに組み込むことを目的としている。金属錯形成能を有する人工ヌクレオシドを天然DNAの特定の位置に導入することにより、金属イオンを活性点としたDNA高次構造の人為的コントロールが可能であると考える。

水素結合の代わりに配位結合により塩基対を形成する人工ヌクレオシドには、金属キレート能を有する核酸塩基を導入する必要がある。当研究室ではこれまでに、フェニレンジアミンを核酸塩基とするヌクレオシド**18**を報告しているが<sup>6</sup>、本研究では、塩基対の電荷や配位構造をコントロールすることを目的とし、アニオン性配位子であるカテコール基を核酸塩基として選んだ。

カテコール型  $\beta$ -C-人工ヌクレオシドの合成において最も重要なステップ

は、核酸塩基とリボース部位のカップリングである。ルイス酸存在下の Friedel-Crafts 反応は、多くの修飾 C-ヌクレオシドの合成に利用されている<sup>6</sup>。水酸基を保護したカテコールとエチルカルボナートで 3', 5'-水酸基を保護したデオキシリボースを Friedel-Crafts 反応によりカップリングし、さらに、二段階の脱保護反応を経て目的のカテコール型人工ヌクレオシドを合成することができたので報告する。

## 2-2 分子設計

天然の DNA 分子は、塩基間の相補的な水素結合による高い認識性<sup>8</sup>と会合力、さらに塩基間のスタッキングにより、二重らせん構造を形成している。それに対し本論文では、水素結合ではなく、金属錯形成により二重鎖を形成する新しい人工 DNA をデザインした (Chart 2-1)。

ヌクレオシドの設計  
指針として、金属イオンとの相互作用において、より安定性をもつ C-ヌクレオシドを合成することにした。また、金属イオンと錯形成により生じた塩基対が天然の塩基対と同様のサイズとジオメトリーになるよ

うに設計した (Chart 2-2)。フェニル基に二つの配位子を有する人工塩基が平面四配位型の金属イオンと 2:1 で錯体<sup>7</sup>を形成することにより、天然の核酸塩基対に近いジオメトリーをとることが分子力場計算により確認された。

当研究室では、この分子設計に基づき、*o*-フェニレンジアミン型ヌクレオシド<sup>9</sup>、2-アミノフェノール<sup>10</sup>型ヌクレオシドの合成を行った (Chart 2-3)。これらの人工ヌクレオシドが、金属イオンとの配位結合を利用して塩基対を形成することにより、塩基対としての電荷をコントロールすることが可能であると考える。

Chart 2-1 金属錯生成により塩基対形成する人工 DNA

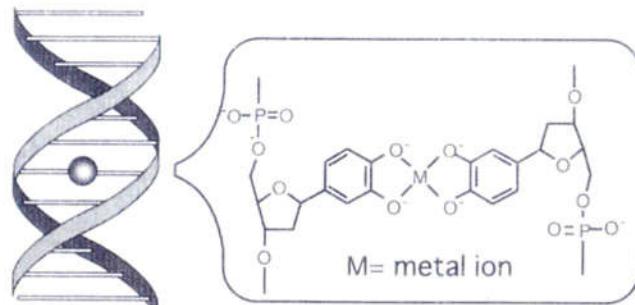
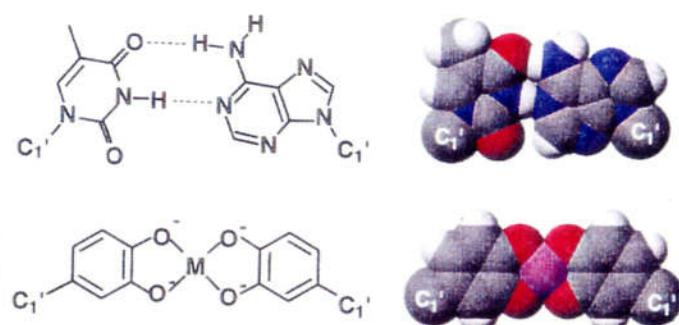


Chart 2-2 AT 塩基対と人工塩基対のジオメトリーの比較



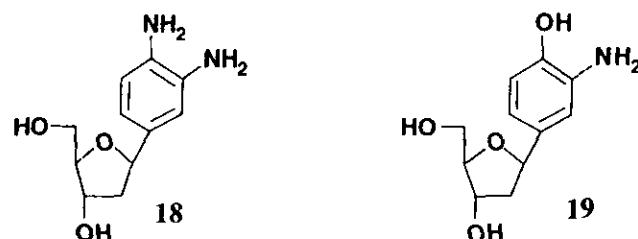
えられる。例えば、

2 値金属イオンと  
の相互作用により、  
*o*-フェニレンジア  
ミンでは +2 値、  
2-アミノフェノー

ルでは 0 値にな

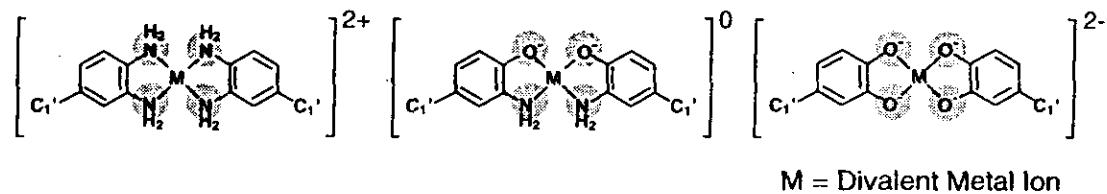
るのに対し、カテコール型ヌクレオシドでは -2 値になると予想される (Chart 2-4)。

Chart 2-3



phenylenediamine-type nucleoside      aminophenol-type nucleoside

Chart 2-4 二価の金属イオンにより形成した塩基対の電荷



M = Divalent Metal Ion

以上を踏まえ、カテコールの 4 位にデオキシリボースを結合した  $\beta$ -C-ヌクレオシドを合成することにした。

## 2-3 カテコール型人工ヌクレオシドの合成

芳香族炭素上へ炭素－炭素結合を形成するには、芳香環炭素上の電子密度の高さによる求核攻撃を利用することが最も一般的な方法である。水酸基をエーテル型に保護したカテコールは芳香族求電子置換反応の良い基質と考えられるため、ヌクレオシド **6** の炭素骨格を形成するために、ルイス酸により活性化されたデオキシリボース誘導体のオキソニウムカチオンを求電子種とした Friedel-Crafts カップリング反応を用いることとした (Scheme 2-1)。

Scheme 2-1

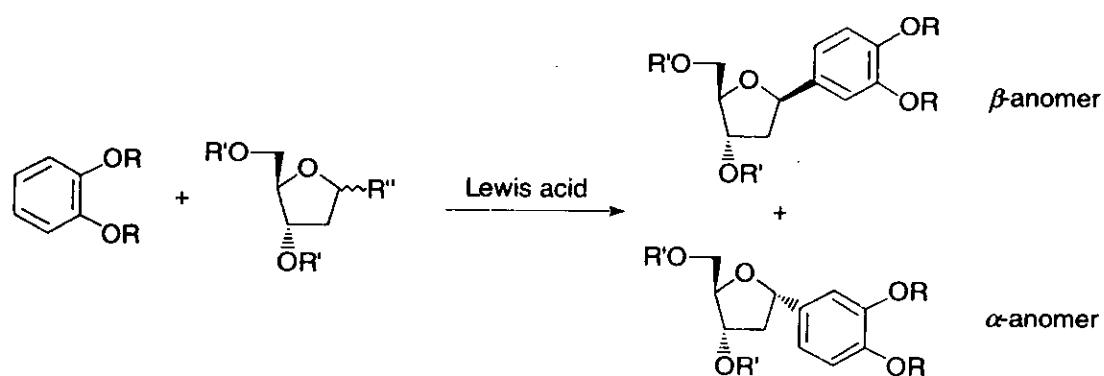


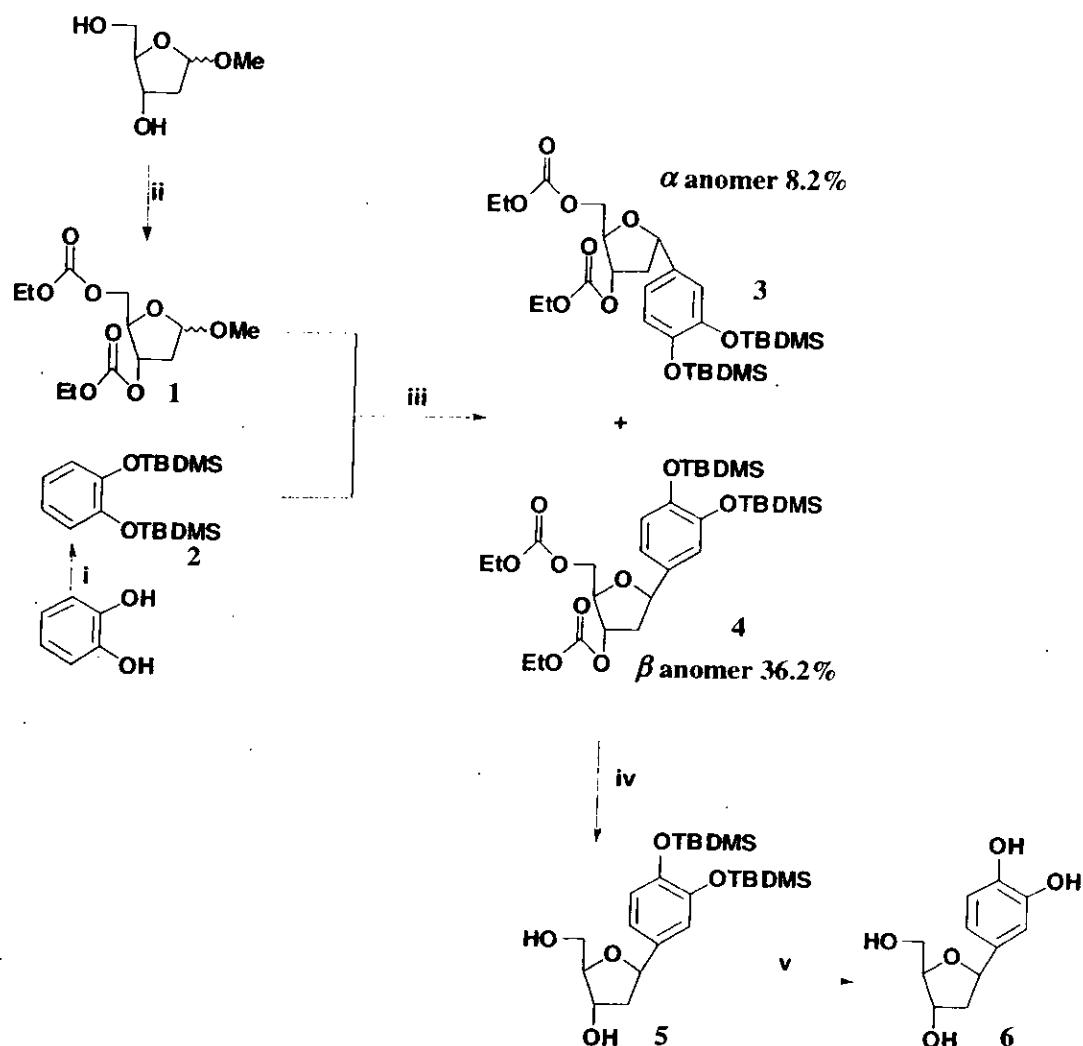
Table 2-1 では、カテコール保護基、デオキシリボース 1'-位脱離基、ルイス酸を種々変化させることにより、反応条件の最適化を行った。デオキシリボース 1-位脱離基として活性なクロライドを用いた場合、カテコール水酸基の保護基として *O*-TBDMS 基、ルイス酸として  $\text{BF}_3\cdot(\text{Et}_2\text{O})$  を用いたときのみ、目的の *C*-ヌクレオシド骨格の生成が確認された。この結果を踏まえ、オキソニウムカチオンの安定性を期待し、デオキシリボース 1-位脱離基としてメトキシ基を用いた結果、目的物の収率は大きく向上した。この場合、反応収率は  $\text{BF}_3\cdot(\text{Et}_2\text{O})$  を用いたときに比べ  $\text{SnCl}_4$  を用いた方が良い結果を与え、立体選択性においても、天然のヌクレオシドと同様な  $\beta$ -ヌクレオシドが選択的に得られることがわかった。また、リボース水酸基の保護基は脱保護反応の容易さから

Table 2-1 Conditions for the Friedel-Crafts coupling reactions

Catechol (R)	R'	R''	Lewis acid	Temp	Yield
OMe	TolO	$\beta$ -Cl	SnCl <sub>4</sub>	0°C	nd
OMe	TolO	$\beta$ -Cl	Ti[OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	0°C	nd
OMe	TolO	$\beta$ -Cl	TiCl <sub>4</sub>	rt	nd
OMe	TolO	$\beta$ -Cl	BF <sub>3</sub> ·(Et <sub>2</sub> O)	rt	nd
OTBDMS	TolO	$\beta$ -Cl	BF <sub>3</sub> ·(Et <sub>2</sub> O)	rt	$\beta$ : 3.8%
OTrt	TolO	$\beta$ -Cl	SnCl <sub>4</sub>	rt	0
OTBDMS	TolO	$\beta$ -Cl	TMS-triflate	0 °C	0
OTBDMS	TolO	$\beta$ -Cl	BF <sub>3</sub> ·(Et <sub>2</sub> O)	-40-0 °C	$\beta$ : 21.3%
OTBDMS	TolO	$\beta$ -Cl	BF <sub>3</sub> ·(Et <sub>2</sub> O)	0 °C	$\beta$ : 9.3% $\alpha$ : 1.4%
OTBDMS	Ethyl carbonate	OMe	SnCl <sub>4</sub>	0 °C	$\beta$ : 36.2% $\alpha$ : 8.2%
OTBDMS	Ethyl carbonate	OMe	BF <sub>3</sub> ·(Et <sub>2</sub> O)	rt	$\beta$ : 14.8% $\alpha$ : 15.4%

エトキシカルボニル基を用いることとした。よって、ヌクレオシド **6** の合成は Scheme 2-2 に示した合成ルートにより行った。Friedel-Crafts カップリング反応の生成物として、 $\beta$ -アノマーが 36%、 $\alpha$ -アノマーが 8.2% 得られた。絶対配置の帰属は、<sup>1</sup>H NMR を用いリボース上の H<sub>1'-H<sub>2'</sub></sub> 及び、H<sub>1'-H<sub>2''</sub></sub> 間のカップリングコンスタントから推定した。Kool らは、種々の芳香環を持つ一連の C-デオキシリボースを合成し、X 線結晶構造と <sup>1</sup>H NMR から、これらのカップリングコンスタントとアノマー位の立体構造の相関性を報告している<sup>6c</sup>。H<sub>1'-H<sub>2'</sub></sub> 及び、H<sub>1'-H<sub>2''</sub></sub> 間のカップリングコンスタントは、 $\beta$ -アノマーの場合、それぞれ 5-7 Hz と 10 Hz 程度の値を示す (1'-位の共鳴シグナルはよく分裂した doublet of doublet のパターンを与える) のに対し、 $\alpha$ -アノマーの場合は両者とも 6 Hz 程度の値を示す (1'-位の共鳴シグナルは pseudo triplet のパターンを与える)。当研究室で合成され結晶構造解析により同定した 2-アミノフェノール型  $\beta$ -C-ヌ

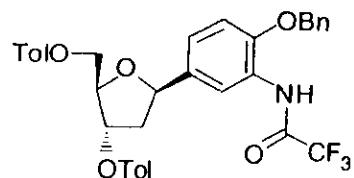
Scheme 2-2<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) TBDMS-Cl, pyridine, 80 °C, 97%; (ii) Ethyl chloroformate, pyridine in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 78%; (iii)  $\text{SnCl}_4$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt; (iv) 1%  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in  $\text{MeOH}$ , rt, 84%; (v)  $n\text{Bu}_4\text{NF}$  in  $\text{THF}$ , rt, 100%.

クレオシド誘導体 **20** も二つのカップリングコンスタンントがそれぞれ、 $\beta$ -アノマーの場合、5.0 Hz と 10.5 Hz、 $\alpha$ -アノマーの場合、6.8 Hz と 6.8 Hz となり同様の傾向が見られた。本章で合成したカテコール型  $\beta$ -C-スクレオシドのカップリングコンスタンントは **4** において 5.4 Hz と 10.0 Hz、**3** にお

Chart 2-5



いて 6.2、6.2 Hz であることからそれぞれ  $\beta$  体と  $\alpha$  体のスクレオシドと帰属した。Friedel-Crafts カップリング後の  $\beta$ -C-スクレオシド **4** は、メタノール溶液中、炭酸カリウムに存在下で、エチルカルボナートの脱保護を行い (**5**)、ついで  $n\text{-Bu}_4\text{NF}$  を用いて TBDMS の脱保護反応を行うことにより、目的のカテーテール型  $\beta$ -C-スクレオシド **6** を得た。

## 2-4 実験の部

### Materials and Methods

**General Information.** Unless otherwise noted, all reactions were carried out in oven dried glasswares under an argon atmosphere with commercial anhydrous solvents (Wako). 1-*O*-Methyl-2-deoxy-D-ribofuranose was prepared according to previously reported procedures.<sup>13</sup> 2-Aminophenol and trifluoroacetic anhydride were purchased from TCI and *tert*-butyldimethylsilyl chloride was purchased from Shin-Etsu. 1 M *n*-Bu<sub>4</sub>NF in THF was purchased from Aldrich. All the other reagents were purchased from Wako and used without further purification. Column chromatography was performed using Wakogel C-300 or C-200 silica gel (Wako). <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a JEOL Lambda 500. The spectra were referenced to tetramethylsilane. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm; multiplicities are indicated by: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), q (quartet), m (multiplet), and br (broad). Coupling constants,  $J$ , are reported in Hz.

***O,O'*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)catechol (1):** To a solution of *tert*-butyldimethylsilyl chloride (9.7 g, 64 mmol) in pyridine (10 mL) was added catechol (3.54 g, 32.2 mmol). After stirring for 2 days at 80 °C, the reaction mixture was poured into ice-cold water (500 mL). The solution was extracted with AcOEt three times, and the combined organic layer was washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography with *n*-hexane-Et<sub>3</sub>N (100 : 1) to give 9.11 g (84%) of 1 as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.81 (m, 4H), 0.99 (s, 18H), 0.19 (s, 12H).

***O,O'*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-[1,2-dideoxy-3,5-*O*-bis(ethoxycarbonyl)- $\alpha$ - and  $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl]catechol (3 :  $\beta$ , 4 :  $\alpha$ ):** To a solution of 1-*O*-methyl-2-deoxy-D-ribofuranose<sup>13</sup> (9.6 g, 65 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added ethyl chloroformate (12.4 mL, 130 mmol) and pyridine (10.5 mL, 130 mmol) at room temperature. After

stirring for 1.5 h, ethyl chloroformate (12.4 mL, 130 mmol) and pyridine (10.5 mL, 129.8 mmol) were added to the reaction mixture, which was further stirred for 40 min at room temperature. The reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) and washed with 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous solution three times and brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography with *n*-hexane-ethyl ether (5 : 2) to afford 16.3 g (78%) of **2** as a colorless oil.

**1- $\alpha,\beta$ -O-methyl-2-deoxy-3,5-O-bis(ethylcarbonyl)-D-ribofuranose 2** (20.0 g, 68.4 mmol) and *O,O'*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)catechol (20.6 g, 60.8 mmol) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 mL), and SnCl<sub>4</sub> (13.7 mL, 127.0 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (130 mL) was added dropwise to the solution within 10 min at 0 °C. After stirring for 15 min at 0 °C, the reaction was quenched by adding saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (1 L), and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> four times. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography with *n*-hexane-ethyl ether (8 : 1) to afford 13.2 g (36%) of **3** ( $\beta$ -anomer) as a pale yellow oil and 3.0 g (8.2%) of **4** ( $\alpha$ -anomer) as a pale yellow oil.  
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\beta$ -anomer:  $\delta$  6.84 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 6.80 (dd, 1H, *J* = 8.2, 1.8 Hz), 6.78 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 5.16-5.18 (m, 1H), 4.98 (dd, 1H, *J* = 11.2, 4.6 Hz), 4.40 (dd, 1H, *J* = 11.5, 4.2 Hz), 4.36 (dd, 1H, *J* = 11.4, 3.8 Hz), 4.18-4.28 (m, 5H), 2.32-2.35 (m, 1H), 2.05 (ddd, 1H, *J* = 14.0, 11.2, 6.1 Hz), 1.34 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.31 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.98 (s, 18H), 0.18 (br, 12H).  $\alpha$ -anomer:  $\delta$  6.85 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 6.81 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.0 Hz), 6.78 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.18 (ddd, 1H, *J* = 7.4, 5.3, 3.8 Hz), 5.04 (dd, 1H, *J* = 7.5, 7.5 Hz), 4.40-4.43 (m, 1H), 4.35 (dd, 1H, *J* = 11.3, 3.7 Hz), 4.32 (dd, 1H, *J* = 11.5, 5.2 Hz), 4.22 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 4.19 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.79 (ddd, 1H, *J* = 13.8, 7.0, 7.0 Hz), 2.10 (ddd, 1H, *J* = 13.5, 8.0, 5.3 Hz), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 0.98 (s, 9H), 0.97 (s, 9H), 0.19 (s, 3H), 0.18 (s, 3H), 0.19 (s, 3H), 0.18 (s, 3H).

***O,O'-Bis(tert-butyldimethylsilyl)-4-(1,2-dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol***

(5): *O,O'-Bis(tert-butyldimethylsilyl)-4-[1,2-dideoxy-3,5-O-bis(ethoxycarbonyl)- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl]catechol* (3) (2.58 g 4.30 mmol) was treated with 1% (w/v) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH (25 mL) for 50 min at room temperature. The mixture was neutralized with aqueous acetic acid solution and then concentrated. The residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) and washed with water, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20 : 1) to afford 1.64 g (84%) of 5 as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 6.82-6.79 (m, 3H), 5.06 (dd, 1H, *J* = 10.3, 5.6 Hz), 4.42-4.43 (br, 1H), 3.99 (ddd, 1H, *J* = 4.5, 4.5, 3.0 Hz), 3.81 (ddd, 1H, *J* = 11.4, 4.8, 4.8 Hz), 3.72 (ddd, 1H, *J* = 11.6, 5.7, 5.7 Hz), 2.20 (ddd, 1H, *J* = 13.4, 5.6, 2.0 Hz), 2.01 (ddd, 1H, *J* = 13.3, 10.3, 6.2 Hz), 1.91 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz), 1.88 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 0.98 (s, 9H), 0.98 (s, 9H), δ 0.18-0.19 (m, 12H).

**4-(1,2-Dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol (6):** *n*-Bu<sub>4</sub>NF in THF (1 M, 1.14 mL, 1.14 mmol) was added dropwise to a solution of *O,O'-bis(tert-butyldimethylsilyl)-4-(1,2-dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol* (5) (0.26 g, 0.57 mmol) in THF (6 mL). After stirring for 10 min, 5% NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (2.6 mL) was added to the reaction mixture, which was then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl<sub>3</sub>-MeOH (4 : 1) to afford 0.13 g (99 %) of 6 as a colorless foam. After recrystallization from acetonitrile, colorless needles were obtained, mp 182.0-184.0 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 6.81 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 6.71 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 6.69 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.7 Hz), 4.96 (dd, 1H, *J* = 10.5, 5.4 Hz), 4.29 (ddd, 1H, *J* = 5.7, 1.8, 1.8 Hz), 3.88 (ddd, 1H, *J* = 5.3, 5.3, 2.3 Hz), 3.65 (dd, 1H, *J* = 11.7, 5.1 Hz), 3.61 (dd, 1H, *J* = 11.7, 5.4 Hz), 2.08 (ddd, 1H, *J* = 13.2, 5.3, 1.5 Hz), 1.93 (ddd, 1H, *J* = 13.2, 10.6, 6.0 Hz).

## 2-5 まとめ

本章では水素結合の代わりに金属配位結合により塩基対を形成する人工ヌクレオシドとしてカテコールを核酸塩基として有する  $\beta$ -C-ヌクレオシド **6** を設計、合成した。

水酸基を TBDMS で保護したカテコールと、1' 位に *O*-メチル基を導入したデオキシリボース誘導体間の  $\text{SnCl}_4$  を用いた Friedel-Crafts 反応により、収率 36% で目的の  $\beta$ -C-ヌクレオシドを、収率 8% で  $\alpha$ -C-ヌクレオシドを合成した。さらにエチルカルボナートと TBDMS の脱保護反応により、カテコール型  $\beta$ -C-ヌクレオシド **6** を合成した。カテコール型人工ヌクレオシド **6** は Friedel-Crafts 反応を用いることができたので、RNA 体を経由する *o*-フェニレンジアミン型ヌクレオシド **18** に比べより短いステップで目的物を得ることができた。

## 引用文献

1. (a) Matsuda, A.; Yasuoka, J.; Ueda, T. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1989, 1659-1661;  
(b) Matsuda, A.; Yasuoka, J.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **34**, 1991, 999-1002.
2. Matsuda, A.; Takeduki, K.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **34**, 1991, 812-819.
3. McCarthy, H. J. R.; Matthews, D. P.; Huber, D. M. E. W.; Bey, P.; Sunkara, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 1991, 7439-7440.
4. Mitsuya, H.; Weihold, K. J.; Furman, P. A.; St. Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Baryy, D. W.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1985, 7096-7100.
5. Mitsuya, H.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1986, 1911-1915.
6. (a) Allevi, P.; Anastasia, M.; Ciuffreda, P.; Fiechi, A.; Scala, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1245-1246. (b) Chaudhuri, N. C.; Kool, E. T. *Tetrahedron Lett.* **36**, No. 11, 1795-1798. (c) Ren, R. X.-F.; Chaudhuri, N.C.; Paris, P. L.; Rumney IV, S.; Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, **118**, 7671-7678. (d) Jaramillo, C.; Knapp, S. *Synthesis*, **1994**, 1-20.
7. 伊藤義広、中原勝巣、近藤幸夫；日本化学雑誌、**92**, 1971, 227-233。
8. Echols, H. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 1991, 477-511.
9. Tanaka, K.; Shionoya, M. *J. Org. Chem.* **64**, 1999, 5002-5003.
10. Tanaka, K.; Tasaka, M.; Cao, H.; Shionoya, M. *Eur. J. Pharm. Sci.*, *in press*.

## 第3章

# ボランイオンに誘起される 人工ヌクレオシドの塩基対形成

An Alternative Base-pairing of Catechol-Bearing  
Nucleoside by Borate Formation

Honghua Cao, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiro Shionoya

*Chem. Pharm. Bull.*, in press.

### 3-1 緒言

DNA 分子は Watson-Crick 型の水素結合と塩基のスタッキングによる、二重らせん構造を有している。二重鎖形成において、アデニンとチミン、グアニンとシトシン核酸塩基間の相補的水素結合により高い選択性をもった認識を行っている<sup>1</sup>。最近、金属錯体を導入することにより、DNA に新しい機能を付与する研究が盛んに行われている<sup>2</sup>。

本論文では新しいアプローチとして金属錯形成部位を直接、核酸塩基として導入することにより、水素結合の代わりに金属錯生成により塩基対を形成する人工 DNA の創成を目的としている。錯形成により金属イオンを DNA 中に導入することによって生体分子 DNA の新しい高次構造、機能が誘起されることが期待できる。

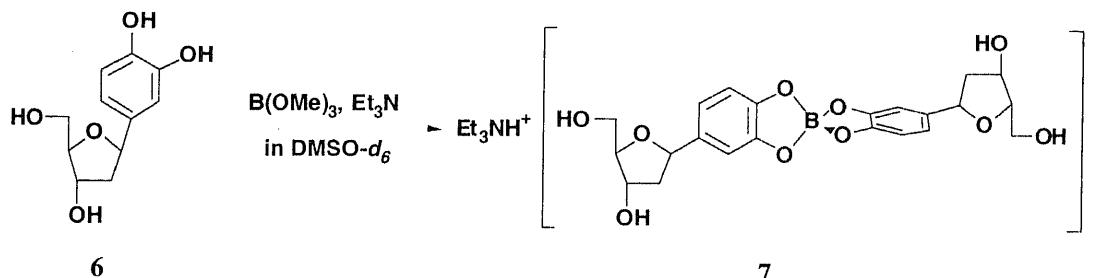
塩基対形成のドライビングフォースとして錯形成を用いることの利点として、電荷のコントロールのみではなく、配位構造を基にした塩基対の立体構造的なコントロールも可能であると考えられる。DNA 二重鎖中で四面体型、八面体型の錯体を形成することにより、周辺の核酸塩基対との効率的なスタッキングが阻害され DNA 全体の構造変化が誘起される可能性がある。このような DNA 構造の大きな変化 (twisting, untwisting, curving, bending 等) は生化学的な反応の起点となる可能性や、超分子化学的な building block としての有用性が期待できる。よって外部因子としての金属イオンにより、DNA 構造変化を可逆的にコントロールすることに興味が持たれる。

ホウ素 (III) イオンは、金属イオンと同様にルイス塩基と錯体を形成する。カテコールと四面体型の 2:1 錯体を可逆的に形成することが知られており<sup>4</sup>、カテコール型ヌクレオシドを用いた人工 DNA のホウ素 (III) イオンによる構造制御に興味がもたれる。よって本章では、第 2 章で合成したカテコール型  $\beta$ -C-ヌクレオシドのホウ素イオンによる塩基対形成を検討した。

### 3-2 カテコール型人工ヌクレオシドの塩基対形成

カテコール型  $\beta$ -C-人工ヌクレオシド **6** と  $B^{3+}$  の錯形成を、DMSO- $d_6$  中、トリエチルアミン存在下、化合物 **6** にトリメチルボレートを作用させることにより検討した (Scheme 3-1)。DMSO- $d_6$  中、 $\beta$ -C-ヌクレオシド **6** (44 mM)、ト

Scheme 3-1



リメチルボレート (22 mM)、トリエチルアミン (22 mM) を混合し、アセトニトリルで 500 倍希釈した。

この溶液の ESI-Mass スペクトルは、ネガティブモードの測定により、 $m/z$  459.15 の分子イオンピークを示し、 $[7 - \text{Et}_3\text{NH}^+]$  (calcd 459.15) に一致した (Figure 3-1)。さらにピークの同位体シミュレーションの結果 (Figure 3-1(b)) は、測定値 (Figure 3-1(c)) と良い一致を示した。以上より、フェノール性プロトンが解離したカテコール型ヌクレオシド **6** と  $B^{3+}$  が 2:1 の錯体を形成していることがわかった。

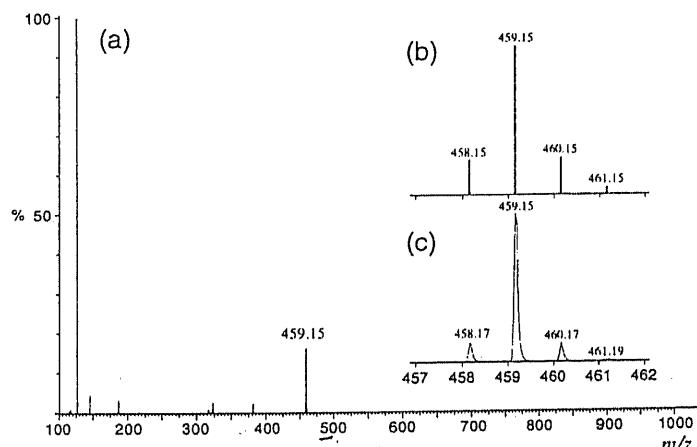


Figure 3-1. 錯体 7 の ESI-TOF mass スペクトル (negative mode): (a)  $m/z$  100-1000, (b) 理論的同位体分布、(c) 実験的同位体分布 ( $m/z$  459.15 ( $[7 - \text{Et}_3\text{NH}^+]$  calcd 459.15))。

Figure 3-2(b) に  
DMSO- $d_6$  中における  
錯体 7 の  $^1\text{H-NMR}$   
スペクトルを示した。  
スクレオシド 6 のカ  
テコール芳香環上の  
プロトンのシグナル  
は (Figure 3-2(a))、錯  
体を形成することに  
より、全て高磁場側  
へシフトした (Figure 3-2(b))。また錯体 7 では、8.75 ppm 付近のフェノール性  
水酸基由来のシグナルが見られること、リボース上の 3'-OH、5'-OH のプロ  
トンがそれぞれ 4.96 ppm と、4.69 ppm に存在することから、 $\text{B}^{3+}$  イオンは脱  
プロトン化したカテコール水酸基と錯形成していると考えられる。よって  $\text{B}^{3+}$   
によるスクレオシド 6 の塩基対形成が誘起されていることが明らかとなった。

錯体 7 は D-リボース骨格および四面体形  $\text{B}^{3+}$  上の不斉に由来するジアステレ  
オメリックな混合物となると考えられるが、Figure 3-2(b) はシャープな 1 セッ  
トのシグナルを与えた。 (i) 錯体 7 の二つのジアステレオマーは 500 MHz  $^1\text{H-NMR}$   
の分解能で分離できない、(ii) DMSO- $d_6$  中で、 $\text{B}^{3+}$  イオン上の速い結合、  
解離平行が起こっている、(iii) D-リボース骨格上の不斉により、 $\text{B}^{3+}$  イオン上  
の錯形成の不斉が誘起された、という可能性が考えられる。

以上より、カテコール型人工スクレオシド 6 は  $\text{B}^{3+}$  により塩基対形成が誘  
起されることから、6 を DNA シークエンスに導入することにより、 $\text{B}^{3+}$  を外  
部因子とした二重鎖形成及び高次構造の制御が期待される。

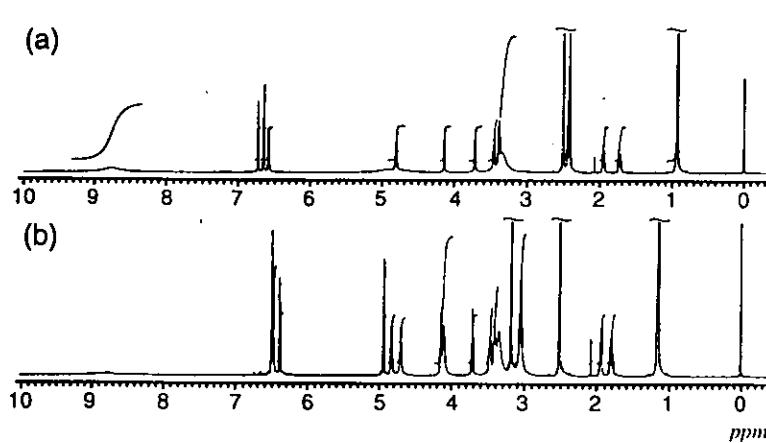


Figure 3-2. 500 MHz  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (DMSO- $d_6$ ) (a) C-nucleoside 6、(b) 3 - borate (2:1) complex, 7: [3] = 44 mM. [ $\text{B}(\text{OMe})_3$ ] = (a) 0 and (b) 22 mM. [ $\text{Et}_3\text{N}$ ] = 22 mM.

### 3-3 実験の部

**General Information.** All reactions were carried out under argon atmosphere. DMSO-*d*<sub>6</sub> was purchased from EURISO-TOP. All other reagents were purchased from Wako and were used without further purification.

<sup>1</sup>H NMR spectra referenced to TMS were recorded on a Bruker DRX500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm; multiplicities are indicated by: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet),ddd (doublet of doublet of doublet), m (multiplet), br (broad). Coupling constants,  $J$ , are reported in Hz. Electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) mass spectra were recorded on a Micromass LCT spectrometer.

**<sup>1</sup>H NMR measurement of 4-(1,2-dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol (3)**

<sup>1</sup>H NMR (4-(1,2-dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol (22  $\mu$ mol) and triethylamine (11  $\mu$ mol) in 0.5 mL DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.76 (2H, br), 6.72 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz), 6.64 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz), 6.57 (1H, dd,  $J$  = 1.8, 8.1 Hz), 4.80 (1H, dd,  $J$  = 5.3, 10.4 Hz), 4.13 (1H, m), 3.71 (1H, ddd,  $J$  = 1.8, 5.5, 5.5 Hz), 3.45 (1H, dd,  $J$  = 5.1, 11.2 Hz), 3.37 (1H, dd,  $J$  = 6.1, 11.2 Hz), 2.42 (5H, q,  $J$  = 7.1 Hz), 1.95 (1H, ddd,  $J$  = 1.2, 5.3, 12.7 Hz), 1.72 (1H, ddd,  $J$  = 5.7, 10.6, 12.7 Hz), 0.93 (7H, t,  $J$  = 7.1 Hz).

**<sup>1</sup>H NMR measurement and mass spectroscopies of 4-(1,2-dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol boron (2:1) complex (7)** <sup>1</sup>H NMR (4-(1,2-dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol (22  $\mu$ mol), trimethyl borate (11  $\mu$ mol) and triethylamine (11  $\mu$ mol) in 0.5 mL DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  6.48 (1H, br), 6.44-6.46 (1H, m), 6.35-6.67 (1H, m), 4.96 (1H, d,  $J$  = 3.8 Hz), 4.82 (1H, dd,  $J$  = 5.2, 10.4 Hz), 4.69 (1H, br), 4.13 (1H, br), 4.09 (1H, br), 3.69 (1H, ddd,  $J$  = 1.9, 5.5, 5.5 Hz), 3.43-3.48 (1H, m), 3.37-3.41 (1H, m), 3.17 (4.6H, s), 3.04 (3.4H, br), 3H, 1.93 (1H, ddd,  $J$  = 1.3, 5.3, 12.8 Hz), 1.78 (1H, ddd,  $J$  = 5.7, 10.5, 12.7 Hz), 1.15 (4.7H, t,  $J$  = 7.2 Hz). Catechol type nucleoside **6** (44 mM), triethylamine (22 mM) and trimethyl borate (22 mM) was dissolved in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

and further diluted with acetonitrile. An ESI-TOF mass spectrum in the negative mode showed  $m/z = 459.15$  as  $[7\text{-Et}_3\text{NH}^+]$  (calcd. 459.15).

### 3-4 まとめ

本章では  $B^{3+}$  イオンにより誘起されるカテコール型人工ヌクレオシド **6** の塩基対形成について検討を行った。

DMSO- $d_6$  溶液中において、カテコール型人工ヌクレオシド **6** と、トリメチルボレートからカテコール型人工ヌクレオシドと  $B^{3+}$  イオンの 2:1 錯体が形成されることが、ESI-MS 測定および、 $^1H$ -NMR 測定により明らかとなった。この結果から、カテコール型人工ヌクレオシドは  $B^{3+}$  により -1 値の電荷を有する四面体型塩基対<sup>4</sup> を形成することがわかった。したがって、上記の塩基対は天然 DNA に見られる同一平面上の塩基対とは異なり、塩基対同士がほぼ直交する形をとることが推察される (Scheme 3-1)。

カテコール型人工ヌクレオシドが  $B^{3+}$  と塩基対を形成していることから、カテコール型人工ヌクレオシドをオリゴマーの DNA に導入した場合、配位結合によるオリゴヌクレオチドの新しい高次構造を誘起することができ、このような高次構造制御による DNA 分子への新しいアプローチが期待できる。またホウ素イオンを DNA 分子の特定の場所に導入することにより、DNA 分子構造及び機能の人为的コントロール、超分子などへの展開が期待される。

## 引用文献

1. Echols, H. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 1991, 477-511.
2. (a) Barton, J. K.; Pyle, A. M. *Prog. Inorg. Chem.*, **38**, 1990, 413. (b) Dreyer, G. R.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1985, 962-972. (c) Chen, C.-H. B.; and Sigman, D. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1988, 6570-6572. (d) Telser, J.; Cruickshank, K. A.; Schanze, K. S.; Netzel, T. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1989, 7221-7226. (e) Bannwarth, W.; Pfleiderer, W.; Müller, F. *Helv. Chim. Acta.*, **74**, 1991, 1991-1999. (f) Murphy, C. J.; Arkin, M. R.; Jenkins, Y.; Ghatlia, N. D.; Bossmann, *Science*, **262**, 1984, 1025-1029. (g) Bashkin, J. K.; Frolova, E. I.; Sampath, U. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1994, 5981-5982. (h) Matsumura, K.; Endo, M.; Komiyama, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2019-2020. (i) Magda, D.; Miller, R. A.; Sessler, J. L.; Iverson, B. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1994, 7439-7440. (j) Meade, T. J.; Kayem, J. F. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.*, **34**, 1995, 352-354. (k) Manchanda, R.; Cunham, S. U.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1996, 5144-5147. (l) Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.*, **35**, 1996, 646-648. (m) Dandliker, P. J.; Holmlin, R. E.; Barton, J. K. *Science*, **275**, 1997, 1465-1468. (n) Meggers, E.; Kusch, D.; Giese, B. *Helv. Chim. Acta*, **80**, 1997, 640-652. (o) Ihara, T.; Nkayama, M.; Murata, M.; Nakano, K.; Maeda, M. *Chem. Commun.*, **1997**, 1609-1610. (p) Magda, D.; Crogrs, S.; Lin, A.; Miles, D.; Wright, M.; Sessler, J. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1997, 2293-2294. (q) Hurley, D. J.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1998, 2194-2195. (r) Mucic, R. C.; Herrlien, M. K.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Chem. Commun.*, **1996**, 555-557.
3. (a) Borgias, R. A.; Cooper, S. R.; Koh, Y.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.*, **23**, 1984, 1009-1016. (b) Tyson, C. A.; Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **90:13**, 1968, 3379-3386. (c) Cooper, S. R.; Koh, Y.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1982, 5092-5102. (d) Barnum, D.W. *Inorg. Chem.*, **19**, No 8, 1970, 1942-1947.
4. (a) Okamoto, Y.; Takei, Y. *Polyhedron*, **6**, No 12, 1987, 2119-2128. (b) Griffith, W.

P.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Polyhedron*, **15**, No 17, 1996, 2835-2839. (c)  
Clegg, W.; Scott, A. J.; Lowlor, F. J.; Norman, N. G.; Marder, T. B.; Dai, C.;  
Nguyen, P. *Acta Cryst.*, **C54**, 1998, 1875-1880. (d) Pizer, R.; Bobcock, L. *Inorg. Chem.*, **16**, No 7, 1977, 1677-1681. (e) Goddard, R.; Niemeyer, C. M.; Reetz, M. T. *Acta Cryst.* **C49**, 1993, 402-404. (f) Graf, E.; Hosseini, M. W.; Cian, A. D.; Fischer, R.; Cian, A. D.; Fischer, J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1505-1506.

## 第4章

# カテコール型人工ヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドの合成

**An Alternative Base-paiting of Catechol-Bearing  
Nucleoside by Borate Formation**

Honghua Cao, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiko Shionoya

Submitted to *Chem. Pharm. Bull.*

## 4-1 緒言

核酸分子は生体内で遺伝情報の貯蔵や伝達を担っている。核酸分子は、化学修飾を行うことにより、遺伝子発現制御などの生物学的応用のみならず、新しいアルファベットを用いて情報量や機能を変換することにより、新しい機能性分子、情報素子となりうる<sup>1</sup>。

本章では、カテコール型  $\beta$ -C-ヌクレオシドのオリゴヌクレオチドへの導入を試みた。オリゴヌクレオチドの合成方法は主に、化学合成と酵素合成<sup>2</sup>が挙げられる。これらの合成法を行うためには、ヌクレオシドをそれぞれの原料化合物に導入する必要がある。たとえば、人工ヌクレオシドを DNA 酵素の基質にするためには、まず、5'-水酸基を三リン酸化しなければならない。本章では、化学合成<sup>3</sup>を用いて、オリゴヌクレオチドを合成することにした。化学合成法としては主に、固相合成法としてのフォスフォロアミダイト法と液相法合成法としてのリン酸トリエステル法がある。前者は、DNA 自動合成機で適用されている方法で、固相担体上で迅速に合成できるのが大きな特徴である。しかし、大量合成時には最終生成物の精製に特別なテクニックを要する。一方、液相合成法は、1 ステップずつの縮合反応を繰り返し行うこととなるが、その中間体は有機溶媒に可溶であり、通常の有機合成と同様に大量合成が可能な方法である。天然のヌクレオシドの場合は、すでに保護基の種類などの合成条件が確立されているが<sup>4</sup>、人工ヌクレオシドの場合、研究の目的や合成ルートによってどちらの合成法がよいか選択する必要がある。本章では、カテコール型人工ヌクレオシドを両方の方法に適用できるように誘導を行った。また、フォスフォロアミダイト法で合成したカテコール型ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを用いて、Cu<sup>2+</sup> 存在下の二重鎖形成、融解過程について検討したので報告する。

## 4-2 フォスフォロアミダイト固相法による合成

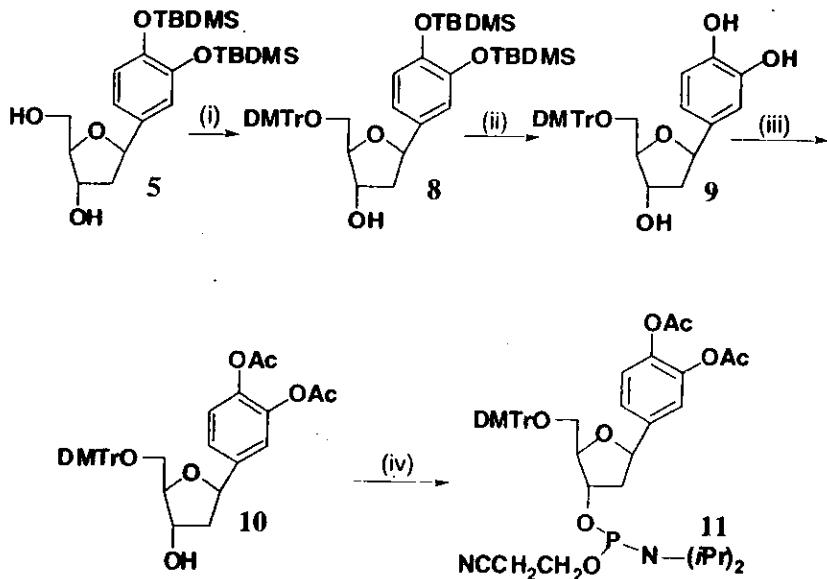
現在、任意の長さとシークエンスを有する DNA オリゴマーは DNA 自動合成機を用いることにより、容易に得られるようになった<sup>5</sup>。多くの場合、DNA 自動合成機による DNA 鎮の合成にはフォスフォロアミダイト法が用いられている<sup>4</sup>。一方、天然のヌクレオシドの以外の化合物もフォスフォロアミダイトに誘導することにより、DNA シークエンスに導入することが可能である<sup>5</sup>。第二章で合成したカテコール型人工ヌクレオシド **6** はホウ素イオンや金属イオンとの錯生成により、塩基対を形成することができるため、DNA オリゴマーシークエンス中の構造及び挙動に興味がもたれる。DNA 合成機を用いてカテコール型ヌクレオシド **6** を DNA シークエンス中に導入するため、反応基質として、フォスフォロアミダイト **11** を合成した。化合物 **5** をピリジン中、ジメトキシトリチルクロライドを用いて 5'-水酸基を DMTr 化し、続いてカテコール水酸

基の保護基をアセ

チル基へ変換し  
た **10** (Scheme 4-  
1) を得た。この  
アセチル基は  
DNA オリゴマ  
ー合成後に濃ア  
ンモニア水によ  
り、容易に脱保  
護されると予想  
される。続いて

3'-OH をフォス  
フォロアミダイ

Scheme 4-1\*



\*Reagents and conditions: (i) DMTr-Cl, pyridine, rt, 73%;  
(ii) TBAF, THF, rt, 92%; (iii) Ac<sub>2</sub>O, *t*-BuOK, THF, rt, 68%;  
(iv) 2-cyanoethyl N, N'-diisopropylchlorophosphorimidite,  
*i*-Pr<sub>2</sub>EtN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 47%.

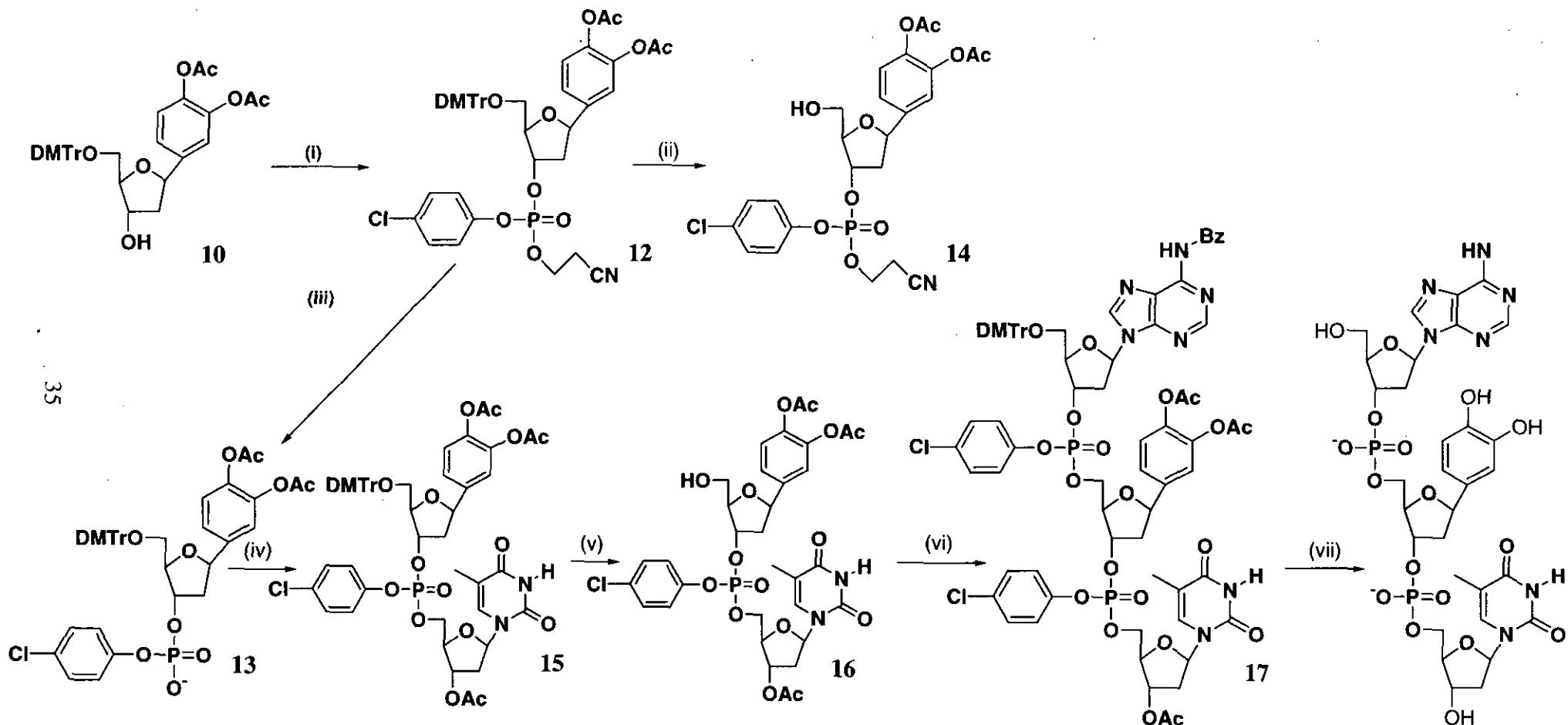
ト化することによりカラム精製後、5 から 21% の収率で **11** を得た。DNA オリゴマーとして自己相補的なシーケンス CGCGAAXTCGCG (X はカテコール型ヌクレオシド)を合成することにした。Applied Biosystems 製 Model 394 DNA/RNA Synthesizer を用い、標準的な方法により、1.0  $\mu\text{M}$  スケールで合成を行った<sup>6</sup>。得られた DNA オリゴマーは DMTr 基を除去せずに固相担体上より切断し、リン酸基上の保護基を 55 °C の濃アンモニア水で 7 時間処理することにより除去した。精製は逆相カラムを用いて行い、カラム内で脱 DMTr 化を行うことにより、目的のシーケンスのみを得ることができた。

### 4-3 リン酸トリエステル液相合成法による合成

十数量体程度でのオリゴデオキシリボヌクレオシドの大量合成のためには、一般にリン酸トリエステル液相法が良く使われる<sup>7</sup>。この方法は通常の有機化学反応を一つ一つ繰り返し、各ステップで合成中間体の単離精製を有機溶媒を用いたカラムクロマトグラフィを用いて行なうことができるという利点がある。

リン酸トリエステル法を利用して、カテコール型人工ヌクレオシド **6** を配列の中心に持つトリマー AXT (**X** = カテコール型ヌクレオシド) の合成を行った (Scheme 4-2)。トリチル体 **10** をリン酸トリエステル体 **12** に誘導した後、ベンゼンスルホン酸によるトリチル基の脱保護反応 (**14**)、あるいはトリエチルアミンによる 2-シアノエチルの脱保護反応 (**13**) を行った。**12** はこれらの反応条件下において安定であった。TPS-Te を縮合剤として **13** の 3'-位へ 2-デオキシチミンユニットを連結し (**15**)、トリチル基を脱保護した後、5'-位へ 2'-デオキシアデノシンユニットを連結することにより、すべての保護基の付いたトリマー **17** を得た。一連の化合物はそれぞれの段階において順相カラムにより精製を行った。リン酸及び核酸塩基の保護基は、濃アンモニア水中で 55 °C、7 時間加熱することにより除去することができた。逆相シリカゲルカラムにより得られたトリマーを精製したが、不純物との分離が困難であり、現在のところ純粋なトリヌクレオチド AXT を得ることに成功していない。

Scheme 4-2<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) *p*-chlorophenyl 2-cyanoethyl chlorophosphate, *N*-methylimidazole, MeCN. -4°C, 90%; (ii) 2% benzenesulfonic acid in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH=7:3, rt, 80%; (iii) acetonitrile:triethylamine= 1:1, rt, *quents*; (iv) TPS-Te in pyridine, rt, 85%; (v) 2% benzenesulfonic acid in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH=7:3, rt, 80%; (vi) TPS-Te in pyridine, rt, 81%; (vii)  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ , 55°C.

#### 4-4 カテコール型人工ヌクレオシドを導入したオリゴ DNA 二重鎖形成に及ぼす Cu<sup>2+</sup>イオンの効果

4-2 で合成したカテコール型ヌクレオチドを導入したオリゴDNA、CGCGAAXTTCG (X = カテコール型ヌクレオチド) の二重鎖形成に及ぼす Cu<sup>2+</sup>イオンの効果を UV 融解温度測定により検討した。Figure

4-2 に、対照シ

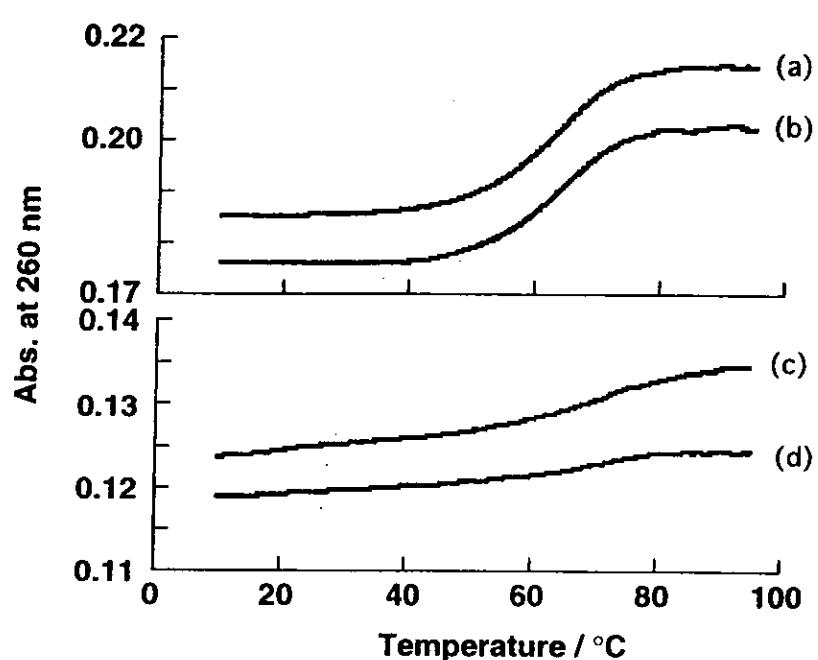


Figure 4-2 カテコール型ヌクレオシドを導入したオリゴDNAの二重鎖融解温度曲線

(a) CGCGAATTCTCGCG, (b) CGCGAATTCTCGCG + 0.42 μM CuSO<sub>4</sub>, (c) CGCGAAXTTCGCG, (d) CGCGAAXTTCGCG + 0.42 μM CuSO<sub>4</sub>; 10 μM / base in 1 mM Mops, 1M NaCl (pH 7.9)

ークエンスとしてカテコール型ヌクレオチドを含まない CGCGAATTCTCGCG の結果と合わせて、UV 吸収変化( $\lambda = 260 \text{ nm}$ )に基づく融解温度曲線を示した。この測定では二重鎖が解離することにより、核酸塩基対間のスタッキング相互作用が弱まり、吸光度が上昇する効果により DNA 二重鎖の解離を検討した。カテコール型ヌクレオチドを含まないシークエンス、CGCGAATTCTCGCG、の場合 (Figure 4-2 (a), (b))、二重鎖の融解温度は 0.42 μM の CuSO<sub>4</sub> (DNA 鎖 1 本に対して 0.5 当量) の存在の有無に関わらず 64 °C となり、二重鎖解離に伴う濃色効果も 1.3~1.5 倍と同様の値を示した。よって、カテコール型ヌクレオ

シドを含まないシークエンスの二重鎖安定性は  $\text{Cu}^{2+}$  イオンに影響されないことがわかった。これに対し、カテコール型スクレオチドを含む CGCGAAXTCGCG の融解曲線 (Figure 4-2 (c)) は、温度上昇に伴い吸光度は上昇するものの明確な二重鎖融解温度を示さなかった。また、 $0.42 \mu\text{M}$  の  $\text{CuSO}_4$  の存在下においても (Figure 4-2 (d))、同様に融解温度を測定することはできなかった。一般に  $\text{Cu}^{2+}$  イオンは、DNA のリン酸ジエステル部位に強く結合することが知られており、今後可視吸収スペクトルや質量分析、EPR などの測定が必要と考えられる。カテコール型スクレオシドを中心にはするオリゴスクレオシドの二重鎖安定性は、カテコールに強く配位しうる金属イオンの存在により増加すると考えられる。よって、金属イオンを外部因子とした DNA 二重鎖安定性の制御に今後、興味が持たれる。

## 4-5 実験の部

**General Information.** All reactions were carried out in oven dried glasswares under argon atmosphere with commercial anhydrous solvents (Wako). Abbreviation TPS-Te (4-*N*-benzoyl-5'-dimethoxytrityl-2'-deoxyadenosine) were prepared according to previously reported procedures <sup>8</sup>. 4,4'-Dimethoxytrityl chloride (DMTr-Cl), 4-chlorophenyl dichlorophosphate, *N*-methylimidazole, and 3-hydroxypropionitrile were purchased from TCI. One molar solution of *n*-Bu<sub>4</sub>NF in THF and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite were purchased from Aldrich. All other reagents were purchased from Wako and were used without further purification. Column chromatography was performed using Wakogel C-300 (Wako).

<sup>1</sup>H NMR spectra referenced to TMS were recorded on a JEOL Lambda 500 (500MHz) or a Bruker DRX500 (500 MHz) spectrometer. <sup>31</sup>P NMR spectrum was recorded on a JEOL Alpha 500 (202.35 MHz) spectrometer. The spectrum was referenced to external 10 mM phosphoric acid in D<sub>2</sub>O. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm; multiplicities are indicated by: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublets of doublet), m (multiplet), br (broad). Coupling constants,  $J$ , are reported in Hz.

***O,O'*-Bis-(*t*-butyldimethylsilyl)-4-[1,2-dideoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl]catechol (8)** To a solution of *O,O'*-bis-*t*-butyldimethylsilyl-4-(1,2-dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)catechol (0.43 g, 0.95 mmol) in dry pyridine (4 mL) was added DMTr-Cl (0.39 g, 1.15 mmol) in six portions at 0 °C and stirred for 2 h at room temperature. Additional DMTr-Cl (80 mg, 0.24 mmol) was added and the whole was further stirred for 1 h. After the reaction was quenched with methanol (2 mL), the mixture was poured into ice-water (100 mL), and extracted with AcOEt three times. The combined organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The mixture was purified by silica gel column chromatography with *n*-hexane-ethyl ether

(2:1) to obtain 0.53 g (74%) of **8** as a colorless solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.19-7.46 (10.3H, m, including residual  $\text{CHCl}_3$ ), 6.75-6.83 (7H, m), 5.02 (1H, dd,  $J$  = 5.5, 10.1 Hz), 4.41 (1H, ddd,  $J$  = 2.7, 5.6, 5.6 Hz), 4.01 (1H, ddd,  $J$  = 2.5, 4.2, 6.5 Hz), 3.37 (1H, dd,  $J$  = 4.6, 9.8 Hz), 3.20 (1H, dd,  $J$  = 6.4, 9.4 Hz), 2.17 (1H, ddd,  $J$  = 6.1, 10.0, 13.1 Hz), 1.97 (1H, ddd,  $J$  = 6.1, 10.0, 13.1 Hz), 1.84 (1H, d,  $J$  = 3.4 Hz), 0.97 (9H, s), 0.94 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.17 (3H, s), 0.13 (3H, s), 0.13 (3H, s)

**4-[1,2-Dideoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl]catechol (9)**

To a solution of **8** (0.59 g, 0.78 mmol) in 14 mL dry THF was added dropwise 1 M  $n\text{Bu}_4\text{NF}$  in THF (1.59 mL, 1.59 mmol). After 10 min, the reaction was quenched by a 10%  $\text{NaHCO}_3$  aqueous solution (1.3 mL). The mixture was concentrated and purified by silica gel column chromatography with  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  (20:1) to obtain 0.38 g of **9** (92%) as a colorless solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.45-7.47 (2H, m), 7.33-7.37 (4H, m), 7.20-7.30 (7H, m, including residual  $\text{CHCl}_3$ ), 5.05 (1H, dd,  $J$  = 5.6, 10.0 Hz), 4.42 (1H, ddd,  $J$  = 2.5, 2.5, 5.8 Hz), 4.03 (1H, ddd,  $J$  = 2.7, 4.8, 4.8 Hz), 3.35 (1H, dd,  $J$  = 4.4, 9.6 Hz), 3.28 (1H, dd,  $J$  = 5.1, 9.8 Hz), 2.18 (1H, ddd,  $J$  = 2.0, 5.5, 13.2 Hz), 2.03 (1H, ddd,  $J$  = 6.1, 10.0, 13.1 Hz)

**O,O'-Diacetyl-4-[1,2-dideoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl]catechol (10)** To a solution of **9** (0.23 g, 0.44 mmol) in 7 mL THF was added potassium *t*-butoxide (50 mg, 0.45 mmol) and a THF solution (0.4 mL) of acetic anhydride (42  $\mu\text{L}$ , 0.45 mmol). Thirty minutes later, potassium *t*-butoxide (50 mg, 0.45 mmol) and a THF solution (0.4 mL) of acetic anhydride (42  $\mu\text{L}$ , 0.45 mmol) were further added to the reaction mixture and the whole was stirred for 30 min. The solvent was evaporated and the resulting residue was chromatographed on silica gel with  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  (40:1) to obtain 0.18 g (67%) of **10** as a colorless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.44-7.46 (2H, m), 7.31-7.36 (4H, m), 7.19-7.29 (6.4H, m, including residual  $\text{CHCl}_3$ ), 7.12-6.13 (1H, m), 6.81-6.84 (4H, m), 5.15 (1H, dd,  $J$  = 5.6, 10.0 Hz), 4.40 (1H, m), 4.04 (1H, ddd,  $J$  = 2.8, 4.8, 5.0 Hz), 3.33 (1H, dd,  $J$  = 4.3, 9.9 Hz); 3.26 (1H, dd,  $J$  =

5.2, 9.9 Hz,), 2.22-2.27 (1H, m), 2.03 (1H, ddd,  $J$  = 6.1, 10.0, 13.1 Hz), 1.83 (1H, d,  $J$  = 3.2 Hz, D<sub>2</sub>O exchangeable).

***O,O'-Diacetyl-4-[1,2-dideoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranos-1-yl]catechol 3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidite (11)*** To a solution of **10** (0.11 g, 0.18 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (122 μL, 0.70 mmol) in 2 mL dry pyridine was added dropwise 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (78 μL, 0.35 mmol). After 10 min, the reaction was quenched with methanol (0.6 mL), and the mixture was dissolved into AcOEt (100 mL), washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (100 mL x 3) and brine (50 mL x 3), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The mixture was purified by silica gel column chromatography with *n*-hexane-AcOEt (2:1) (including 5% pyridine) to afford 0.13 g (89%) of **11** as a colorless oil consisting of a 1:1 mixture of diastereoisomers. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.45-7.48 (2H, m), 7.33-7.37 (4H, m), 7.25-7.29 (4.6H, m, including residual CHCl<sub>3</sub>), 7.18-7.22 (1H, m), 7.12-7.15 (1H, m), 6.80-6.84 (4H, m), 5.12-5.16 (1H, m), 4.48-4.51 (1H, m), 4.21-4.22 (1H, m), 3.79 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.54-3.77 (2H, m), 3.21-3.33 (2H, m), 2.61 (1H, t,  $J$  = 6.5 Hz), 2.45 (1H, t,  $J$  = 6.5 Hz), 2.40-2.44 (0.5H, m), 2.31-2.34 (0.5H, m), 2.22 (0.5H, s), 2.21 (0.5H, s), 2.00-2.06 (1H, m), 1.18 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz), 1.17 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz), 1.15 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz), 1.07 (3H, d,  $J$  = 6.9 Hz). <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 148.2, 148.0.

***O,O'-Diacetyl-4-[1,2-dideoxy-3-O-[(4-chlorophenoxy)(2-cyanoethoxy)phosphinyl]-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranos-1-yl]catechol (12)*** 4-Chlorophenyl dichlorophosphate (0.31 mL, 1.9 mmol) was dissolved in 0.6 mL dry acetonitrile and *N*-methylimidazole (0.19 mL, 2.4 mmol) was added dropwise to the solution at -37 °C. 3-Hydroxypropionitrile (0.16 mL, 2.3 mmol) in 1 mL dry acetonitrile was then added dropwise to the mixture at -25 °C, and the reaction mixture was stirred for 1.5 h at -9 °C (Solution A).

To a solution of **10** (0.56 g, 0.92 mmol) in dry acetonitrile (2.7 mL) was added

*N*-methylimidazole (0.27 mL, 3.4 mmol) and the reaction mixture was stirred for 30 min at -25 °C. To the reaction mixture was added dropwise the above mentioned Solution A and the whole was stirred for 1 h at -4 °C. Then the mixture was poured into ice water (100 mL), and extracted with AcOEt (100 mL x 3), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl<sub>3</sub> as an eluent to obtain 0.71 g (91%) of **12** as colorless foam consisting of a 1:1 mixture of diastereoisomers. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.41-7.43 (2H, m), 7.20-7.33 (17H, m, including residual CHCl<sub>3</sub>), 7.08-7.16 (3H, m), 6.80-6.83 (4H, m), 5.12-5.15 (1.5H, m), 5.06 (0.5H, dd, *J* = 4.8, 10.9 Hz), 4.24-4.31 (3H, m), 3.78 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.24-3.35 (2H, m), 2.69 (1H, t, *J* = 6.2 Hz), 2.64 (1H, t, *J* = 6.2 Hz), 2.54 (0.5H, ddd, *J* = not detected, 5.0, 13.8 Hz), 2.45 (0.5H, ddd, *J* = not detected, 5.6, 13.9 Hz), 2.28 (3H, m), 2.22 (3H, m), 2.12-2.17 (1H, m).

**Compound (15)** Compound **13** was dissolved in 1 mL acetonitrile/triethylamine (1:1) solution and the whole was stirred for 1 h, at room temperature. The solvent was evaporated and dried in vacuo. The remaining solvent was coevaporated with pyridine three times and dried in vacuo. 3'-*o*-Acetyl-2'-deoxythymidine (83.4 mg, 0.28 mmol) to evaporate with pyridine and was dried in vacuo. The residues was dissolved in 0.5 mL pyridine TPS-Te (22.6 mg, 0.60 mmol) was added, stirred for 1 h at room temperature. The reaction was quenched with 0.2 mL water and then the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography to obtain 0.19 mg (85%) of **15** as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.11 (1H, s), 8.06 (1H, s, s), 7.42-6.80 (26H, m, including residual CHCl<sub>3</sub>), 6.34 (1H, m), 5.18 (3H, m), 4.40 (2.5H, m), 4.16 (1.5H, m), 3.78 (6H, m), 3.30 (2H, m), 2.40 (2H, m), 2.28 (3H, s), 2.22 (3H, m), 1.96 (5H, s), 1.95 (3H, s).

**Compound (16)** To a solution of **15** (0.39 mg, 0.36 mmol) in 1 mL dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added dropwise 1 mL of 2% benzenesulfonic acid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (7:3). The reaction was quenched after 5 min by adding 0.04 mL pyridine and then the solvent was

evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography to obtain 0.24 g of **16** (80 %) as a colorless oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.55 (1H, m), 7.37-7.16 (8H, m, including residual  $\text{CHCl}_3$ ), 6.34 (1H, m), 5.27 (1H, m), 5.10 (2H, m), 4.47 (2H, m), 4.20 (2H, m), 3.74 (2H, m), 2.41 (2H, m), 2.29 (3H, s), 2.17 (1H, m), 2.11 (3H, m), 2.06 (1H, m), 1.87 (3H, s).

**Fully protected trimer A-X-T (X-catechol type nucleoside) (17)** 2-N-Benzoyl-2'-deoxy-3'-O- $\{[O\text{-}(4\text{-chlorophenyl})\text{-}O'\text{-}(2\text{-cyanoethyl})]\text{phosphonyl}\}\text{-}5'\text{-}O\text{-}$ (dimethoxytrityl)adenosine (99.5 mg, 0.11 mmol) was dissolved in 2 mL acetonitrile/triethylamine (1:1) solution and the reaction mixture was stirred for 1 h. After evaporation and coevaporation with pyridine, the residue was dissolved into pyridine and then TPS-Te (111.0 mg, 0.3 mmol) was added to the solution and stirred for 1 h. The reaction was quenched with water and the solvent was concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography with chloroform to afford trimer **16** 0.13 g (81%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.20 (1H, m), 8.69 (1H, m), 8.13 (1H, m), 8.05 (2H, m), 7.53-7.09 (m, including residual  $\text{CHCl}_3$ ), 6.75 (4H, m), 6.44 (1H, m), 6.26 (1H, m), 5.35 (1H, m), 5.24 (1H, m), 5.09 (2H, m), 4.75-4.10 (8H, m), 3.39 (2H, m), 3.09 (1H, m), 2.83-2.60 (1H, m), 2.55-2.34 (2H, m), 2.26 (6H, m), 2.21 (3H, m), 2.08-1.80 (4H, m).

**Oligonucleotide CGCGAAXYYCGCG (X = catechol type nucleoside)** The oligonucleotide was synthesized by using Model 394 DNA / RNA synthesizer in 1  $\mu\text{M}$  scale, according to the manufacturer's protocol. Deprotection and purification of the synthesized DNA oligomer was performed according to standard procedure<sup>7</sup>. Purity of the obtained oligonucleotide was estimated by RP-HPLC (TSK gel ODS-80Ts 21.5 mm I. D x 30 cm). UV melting experiments were performed on a Hitachi U-3000 UV/vis Spectrometer. Melting curves ( $\lambda = 260$  nm) were recorded for a consecutive heating (10-95 °C) cooling-heating protocol with a linear gradient of 0.5 °C / min. All measurement were conducted in buffer solution (1 mM Mops, 1M NaCl (pH 7.9)).

## 4-6 まとめ

DNA 合成法は確立されており、液相合成法および固相合成法を用いることにより、長さおよびシークエンスを設計の通りに合成できることから、目的に応じて人工 DNA の任意の位置に錯体型人工ヌクレオチドを導入することができると考えられる。

よって、我々はホスフォロアミダイト固相合成法はによりカテコール型人工ヌクレオシドを Diskerson sequence の中央に導入し、ODS 逆相カラムの HPLC により生成を行った。さらに  $\text{Cu}^{2+}$  がカテコールと平面四配位の錯形成構造をとっていることから、 $\text{Cu}^{2+}$  とオリゴヌクレオチドに導入されたカテコール型人工ヌクレオシドの塩基部位が相互作用し、DNA 二重鎖の会合をより安定化することが期待された。 $\text{Cu}^{2+}$  イオンをカテコール型人工ヌクレオシドが導入されたオリゴヌクレオチドの溶液に加えることによってその二重鎖 DNA の融解過程について検討を行った。今のところ  $\text{Cu}^{2+}$  の効果ははっきりしないが、今後、結合様式を明らかにするための分光学的な実験が必要であると思われる。

また、リン酸トリエステル液相法により、デオキシアデノシンとデオキシリミジンの中にカテコール型人工ヌクレオシドを挿入したトリマーのヌクレオチドを合成することができた。しかし、残念ながら、精製過程にはいくつかの問題点が残された。

## 引用文献

1. (a) Asseline, U.; Delarve, M.; Lancelot, G.; Toulme, F.; Thoung, N. T.; Montenay-Garestier, T.; Helene, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1984, 3297.  
(b) Helene, C.; Montenay-garestier, T.; Saison, T.; Takasugi, M.; Toulme, J. J.; Asseline, U.; Lancelot, G.; Maourizot, J. C.; Tolume, F; Thoung N. T. *Biochémie*, **67**, 1985, 777. (c) Thoung, N. T.; Chassignol, M. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1988, 5905. (d) Yamana, K.; Letsinger, R. L. *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, **16**, 1985, 169. (e) Letsinger, R. L.; Zhang, G.; Sun, D.K.; Ikenchi, T.; Sarin, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1989, 6553. (f) Mertes, M. P.; Coates, E. A. *J. Med. Chem.*, **12**, 1969, 154. (g) Dreyer, G. B.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1985, 968. (h) Chu, B. C. F.; Oragel, L. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1985, 963. (j) Lin, S. -B.; Blake, K. R.; Miller, P. S.; Ts' O, P. O. P. *Biochemistry*, **28**, 1989, 1054.
2. Kornberg, A.; Baker, T. A. "DNA Replication", 2nd edition, W. H. Freeman and company New York, 1992.
1. 丹羽峰雄、「DNA の化学合成法」、化学と生物 実験ライン 22、廣川書店, 1992.
4. Caruthers, M. H. *Science*, **230**, 1985, 81.
5. (a) Piccirilli, J. A.; Krauch, T.; Moroney, S. E.; Benner, S. A. *Nature*, **343**, 1990, 33. (b) Matray, T. J.; Kool, E. T. *Nature*, **399**, 1999, 704. (c) Horlacher, J.; Hottiger, M.; Podust, V. D.; Hübscher, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1995, 6329. (d) Griffin, L. C.; Kiessling, L. L.; Beal, P. A.; Gillespie, P.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1992, 7976. (e) Durland, R. H.; Rao, T.S.; Seth, D. M.; Jayaraman, K.; Revankar, G. R. *Nucl. Acid. Res.*, **23**, No 4, 1995, 647.
1. Applied Biosystems 製 Model 394 DNA / RNA Synthesizer の使用説明書。
7. (a) 大塚栄子、有合化、**36**, 1978, 723. (b) Reese, C. B. *Tetrahedron*, **34**, 1978, 3143.

8. 広瀬忠明、タンパク質 核酸 酵素、25、No 3、1980、225-336.

## 第 5 章

### 結論

**An Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing: Novel-C-Nucleosides with a 2-Aminophenol or a Catechol as the Nucleobase**

Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, and Mitsuhiro Shionoya

*Eur. J. Pharm. Sci.*, in press.

**An Alternative Base-pairing of Catechol-Bearing  
Nucleoside by Borate Formation**

Honghua Cao, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiro Shionoya

*Chem. Pharm. Bull.*, in press.

## 5-1 結論

DNA は遺伝情報を司る生体高分子である。核酸塩基対間の相補的な水素結合とスタッキングにより二重らせん構造をとっている。特に、塩基対形成における相補性は、DNA が関わる遺伝子発現においてもっとも重要な役割を果たしている。このような DNA 分子を化学的手法を駆使して官能基レベルで修飾、変換し、優れた構造と機能をもつ人工分子を開発することにより、様々な研究分野に波及効果をもたらすことが期待される。

本研究は、DNA 分子の核酸塩基間の相補的水素結合を配位結合に置き換えることを目的とした。このような配位結合を塩基対の相互認識様式に導入することにより、塩基対間の結合力、可逆性、ジオメトリーなどをコントロールすることができると考えられる。

**第二章**では、金属イオンなどに配位結合が可能なカテコールを核酸塩基として有する人工ヌクレオシドを設計・合成した。カテコール型 C-ヌクレオシドは、Friedel-Crafts 反応と二段階の脱保護反応を経ることにより、選択的に目的の  $\beta$  体 **6** を合成することができた。

**第三章**では  $B^{3+}$  とカテコール型人工ヌクレオシド **6** の錯生成による、配位結合による人工核酸塩基対形成について検討を行った。ESI-MS 測定と  $^1H$  NMR 測定によりカテコール型人工ヌクレオシドが  $B^{3+}$  イオンと 2:1 の塩基対を形成することが明らかになった。カテコールと  $B^{3+}$  イオンは正四面体型の 2:1 錯体を可逆的に生成することが知られており、カテコール型ヌクレオシドをシークエンス中に導入した DNA の可逆的構造制御に興味が持たれる。

**第四章**では、ホスフォロアミダイト固相合成法とリン酸トリエステル液相法により、カテコール型人工ヌクレオシドを DNA シークエンス中に導入することができた。ホスフォロアミダイト固相合成法を用いて合成した、13 mer オリゴヌクレオチドの自己相補的シークエンスの中心にカテコール型人工ヌクレオシドを導入し、 $Cu^{2+}$  イオン存在下での二重鎖融解測定を行った。 $Cu^{2+}$  イオ

ンとカテコールの金属配位結合は水素結合に比べ熱的安定性が高いため、人工 DNA の二重鎖が融解する温度は天然の DNA 二重鎖に比べて高いことが期待されたが、残念ながらその効果が明らかにできていない。

天然 DNA は水素結合により相互認識しているのに対し、我々が設計したカテコール型人工ヌクレオシドは、配位結合により塩基対を形成する。カテコールは  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  などの金属イオン、あるいは  $\text{B}^{3+}$ 、 $\text{Si}^{4+}$  などの非金属イオンと平面四配位型、正四面体型、正八面体型などの様々な錯体構造をとりうることから、カテコールを塩基とした人工ヌクレオシドをオリゴ DNA に導入した場合、カテコールによる配位結合により DNA の新しい超分子構造が誘起されると考えられる。このような超分子構造により、DNA 分子の新しい機能、さらには DNA 分子をただの遺伝分子だけではなく材料分子としての利用も可能になるであろう。

水素結合の代わりに金属錯形成により塩基対を形成する人工 DNA は、配位子のシークエンスを設計することにより様々な金属イオンを任意の配列で並べることが可能であると考えられる。このようにして作成した金属イオンの一次元配列構造の分子電線、光学的異方性素子としての応用が期待できる。また、このようなカテコール型人工ヌクレオシドを DNA 分子に組み込むことにより、金属イオンを活性点とした DNA 構造変換の誘起、転写調節なども興味を持たれ、分子生物学や医薬への応用も期待される。

## 発表論文

1. Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, and Mitsuhiro Shionoya  
An Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing: Novel  $\beta$ -C-nucleosides with a 2-Aminophenol or a Catechol as the Nucleobase  
*Eur. J. Pharm. Sci.*, in press.
2. Kentaro Tanaka, Honghua Cao, and Mitsuhiro Shionoya  
An Alternative Base Pairing of Catechol-Bearing Nucleosides by Borate Formation  
*Chemical and Pharmaceutical Bulletin.*, in press.

## 参考論文

1. Kentaro Tanaka, Honghua Cao, and Mitsuhiro Shionoya  
Double Strands Formation of Artificial DNAs Induced by Metal Complexation  
*Nucleic Acid Symp. Ser.*, **1998**, 39, 93-94.
2. Kentaro Tanaka, Honghua Cao, Motoyuki Tasaka, Mitsuhiro Shionoya  
Artificial DNAs with Metal-Assisted Base Pairs  
*Nucleic Acid Symp. Ser.*, **1999**, 42, 111-112.

## 学会発表

1. 田中健太郎、曹紅花、塩谷光彦  
金属配位子を核酸塩基として有する人工DNAの合成とその機能  
第9回金属の関与する生体関連反応シンポジウム（熊本）、1998年5月
2. K. Tanaka, H. Cao, and M. Shionoya  
Supramolecular Structures of DNAs  
XXIII International Symposium on Macroyclic Chemistry, Hawaii, June 1998
3. 曹紅花、田中健太郎、塩谷光彦  
金属錯生成により二重鎖を形成する人工DNAの合成  
第13回生体機能関連化学シンポジウム（愛媛大）、1998年9月
4. 田中健太郎、曹紅花、塩谷光彦  
金属配結合で二重鎖を形成する人工DNA  
第75回日本化学会秋季年会（愛媛大）、1998年9月
5. 田中健太郎、曹紅花、塩谷光彦  
金属錯生成により二重鎖を形成する人工DNA

- 第25回核酸化学シンポジウム（甲南大）、1998年9月
6. 田中健太郎、曹紅花、塩谷光彦  
錯体型人工DNAの合成と機能  
第48回錯体化学討論会（高知大）、1998年9月
7. 塩谷光彦、田中健太郎、曹紅花、幡野明彦  
人工DNAの合成と機能  
第29回中部化学関係協会支部連合秋季大会（豊橋技術科学大学）、1998年10月
8. K. Tanaka, K. Shigemori, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
*Synthesis and Structures of Artificial Metallo-Biomolecules*  
文部省科学研究費重点領域研究公開シンポジウム 生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学（広島大）、1998年11月
9. 田中健太郎、曹紅花、田坂基行、塩谷光彦  
金属錯生成により塩基対を形成する人工DNA  
第1回生命化学研究会シンポジウム（岡崎コンファレンスセンター）、1999年1月
10. K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
*Artificial DNAs with Metal-Assisted Base Pairing*  
The 62nd Okazaki Conference (Okazaki, Japan), January, 1999
11. 田坂基行、曹紅花、田中健太郎、塩谷光彦  
核酸塩基として2-アミノフェノールを有する人工DNA  
第14回生体機能関連化学シンポジウム（北海道大）、1999年9月
12. K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
*Alternative DNA Base-Pairing with Metal Complexation*  
文部省科学研究費重点領域研究公開シンポジウム 生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学（岡崎コンファレンスセンター）、1999年11月
13. K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
*Artificial DNAs with metal-assisted base pairs*  
International Symposium, Molecular Design and Functionalities of Assembled Metal Complexes (Kyoto, Japan), November, 1999
14. K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya

Artificial DNAs with metal-assisted base pairs

第26回核酸化学シンポジウム（群馬）、1999年11月

15. 田中健太郎、田坂基行、曹紅花、幡野明彦、森下泰全、千葉順哉、塩谷光彦  
金属錯体を使って人工DNAをつくる  
生命化学研究会シンポジウム（大阪大）、2000年1月
16. 田中健太郎、曹紅花、田坂基行、塩谷光彦  
核酸塩基として金属配位子を導入した人工DNAの合成と構造  
日本化学会第78春季年会（日本大）、2000年3月
17. M. Shionoya, K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, A. Hatano, K. Shigemori, S. Arie, J. Chiba, and S. Asaoka  
Molecular Design and Functions of Metal-Assisted DNA and Peptide Architectures  
XIth International Symposium on Supramolecular Chemistry (ISSC XI) July 30 – August 4, 2000, ACROS FUKUOKA, Fukuoka, Japan
18. K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
An Alternative Base-Pairing of Artificial DNA by Metal Coordination  
XIth International Symposium on Supramolecular Chemistry (ISSC XI) July 30 – August 4, 2000, ACROS FUKUOKA, Fukuoka, Japan

## 謝辞

本研究を行うにあたり、親切なご指導と暖かいご支援をいただきました東京大学理学系研究科化学専攻・塩谷 光彦教授に深くお礼を申し上げます。

研究から博士論文作成まで、親身なご支援、ご助言をいただきました東京大学理学研究科化学専攻助手・田中 健太郎博士に心から感謝をいたします。

ESI-TOF マス・スペクトル測定につきまして、中央大学理工学部・芳賀 正明教授に厚くお礼を申しあげます。また、実験を進める上で、多くのご協力をいただきました塩谷研究室の田坂 基行氏、森下 泰全氏、幡野 明彦氏などの皆様にお礼を申し上げます。

三年間の日本での留学生活を塩谷研で過ごせたことを幸せだと思います。塩谷先生、田中助手及び塩谷研の皆様と色々ないい思い出を作ることができました。研究から生活までご支援下さいましてありがとうございました。

最後に、いつも見守ってくれた両親、兄に感謝いたします。