

核酸塩基として 2-アミノフェノールを  
有する人工DNAの合成と  
金属錯生成による塩基対形成

田坂 基行  
総合研究大学院大学  
数物科学研究科  
機能分子科学専攻

論文目次：	Page
第1章：序論	... 1
第2章：核酸塩基として2-アミノフェノールを有する人工ヌクレオシドの合成	... 20
2-1. 緒言	... 21
2-2. 人工ヌクレオシドのデザイン	... 24
2-3. 人工ヌクレオシドの合成	... 26
2-4. 人工ヌクレオシドの立体構造	... 28
2-4-1. 人工ヌクレオシドのX線結晶解析	
2-4-2. 人工ヌクレオシドの溶液内構造	
2-5. 実験の部	... 31
2-6. まとめ	... 44
Reference and Notes	... 45
第3章：2-アミノフェノール型ヌクレオシドと各種金属イオンとの相互作用	... 49
3-1. 緒言	... 50
3-2. 各種金属イオンを用いる塩基対形成とその評価	... 53
3-2-1. パラジウムイオンを用いる塩基対形成	
3-2-2. 亜鉛イオン、カドミウムイオンを用いる塩基対形成	
3-3. 実験の部	... 58
3-4. まとめ	... 59
Reference and Notes	... 60
第4章：2-アミノフェノール型ヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドの合成と金属イオンとの相互作用	... 64
4-1. 緒言	... 65
4-2. 2-アミノフェノール型ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドのデザインとフォスフォロアミダイト固相法による合成	... 72
4-3. 人工オリゴヌクレオチドの二本鎖形成における金属イオンの効果	... 76
4-4. 実験の部	... 83
4-5. まとめ	... 87
Reference and Notes	... 88
第5章：結論	... 91
発表論文・学会発表	... 94
謝辞	

### Synthesis of an artificial nucleoside with a 2-aminophenol as a nucleobase for alternative base pairing through metal coordination

Motoyuki Tasaka

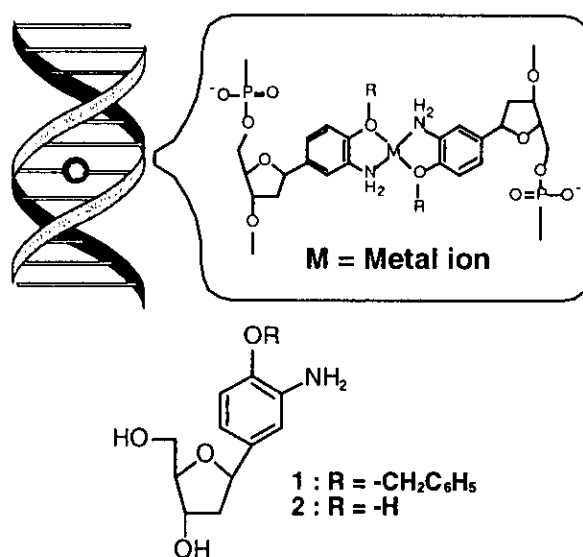
Department of Functional Molecular Science

School of Mathematical and Physical Science

The Graduate University for Advanced Studies

Hydrogen-bonding plays important roles in the DNA base pair identification. Chemical modification of the Watson-Crick base pairing mode will lead to new functional molecular architecture in the fields of biosciences and material sciences. In recent years, a large number of unnatural DNA nucleosides have been synthesized, and most of them are modified with hydrogen bonding patterns for natural base pairing. An alternative approach I have used in this study is the more fundamental conversion of a DNA base itself into a metal-chelating nucleobase. 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. This study reports the syntheses of a metal-chelating artificial  $\beta$ -C-nucleoside possessing a 2-aminophenol moiety as the nucleobase, and its incorporation into oligonucleotides (Chart 1). These artificial nucleosides are directed toward controlling the net charges of

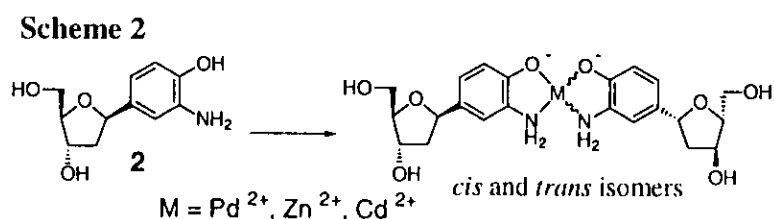
### Chart 1



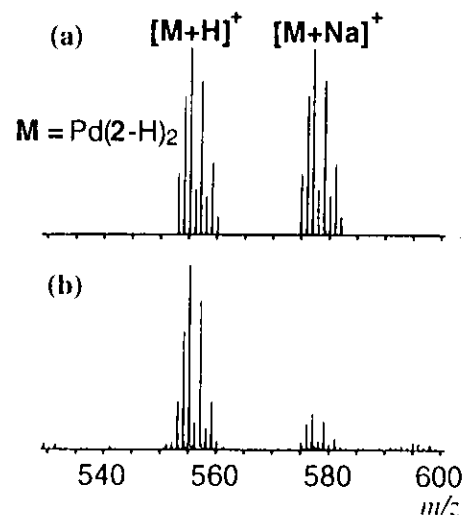
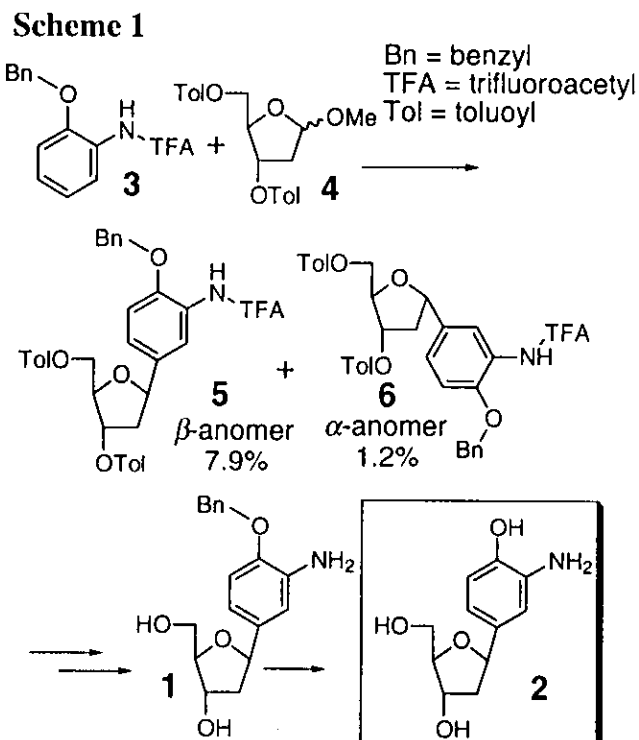
metal-assisted base pairs. These nucleosides **1** and **2** were designed so as to form 2:1 complexes with a divalent metal ion with a charge of +2 and 0, respectively.

The Friedel-Crafts coupling reaction of a 2-aminophenol derivative **3** with a 2-deoxyribose derivative **4** afforded the desired  $\beta$ -C-anomer **5** with high selectivity ( $\beta$ -5 :  $\alpha$ -6 = 7.9% : 1.2%). The artificial nucleoside **2** was finally obtained by 3 steps deprotection reactions

(Scheme 1). The configuration of the  $\beta$ -anomer **5** at C1' position was determined by X-ray analysis and  $^1\text{H}$  NOE differentiation experiments.

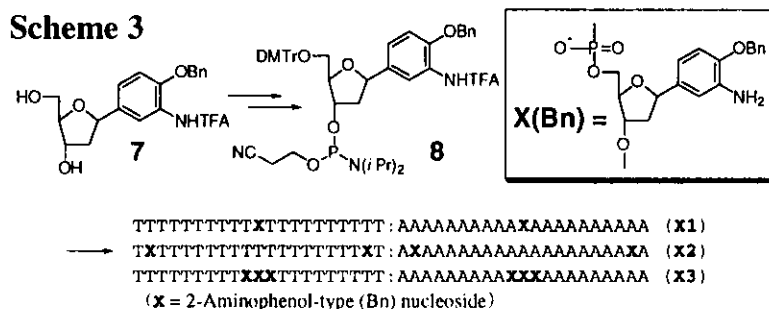


The 2:1 complexation between the nucleoside **2** and a  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , or  $\text{Cd}^{2+}$  ion was confirmed by  $^1\text{H}$  NMR and electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) mass spectroscopies. The ratio of *cis* to *trans* in the case of the  $\text{Pd}^{2+}$  complex was determined to be approximately 1:1 in aqueous solution (Scheme 2, Figure 1).



**Figure 1.** ESI-TOF Mass Spectrum in the Positive Mode for the 1:2  $\text{Pd}^{2+}$  complex with **2** ( $m/z$  530-600); (a) the Theoretical Isotopic Distribution for  $[\text{M} + \text{H}]^+$  and  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  and (b) the Experimental Isotopic Distribution, where  $\text{M} = \text{Pd}(\text{2-H})_2$ .

The resulting artificial nucleoside **1** was introduced into DNA oligomers with the phosphoroamidite solid synthetic method to obtain three kinds of oligomers **X1**, **X2**, and **X3** (Scheme 3). A



double-stranded 21 mer oligonucleotide  $\text{dT}_{21} \cdot \text{dA}_{21}$ , as the standard sequence, was modified by introducing **1** at the central position (**X1**), the second positions from both terminals (**X2**), and the central three positions (**X3**). The effects of metal ions on the thermal stability of these DNA oligomers have been investigated using melting temperature experiments.

In this study, the synthesis of a 2-aminophenol-type artificial nucleoside **1** has been established, and the 2:1 complexation between the nucleoside and a  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , or  $\text{Cd}^{2+}$  ion has been evidenced by  $^1\text{H}$  NMR and ESI-TOF mass spectroscopies. These complexes provide an alternative metal-assisted base pairing motif in addition to natural-type Watson-Crick base pairing. Moreover, this artificial nucleoside was introduced into oligonucleotides, and the effects of metal ions have been clarified on double-strand formation.

# 博士論文の要旨

平成13年6月27日

出願者

数物科学研究科 機能分子科学専攻

氏名 田坂 基行

(学籍番号: 962504)

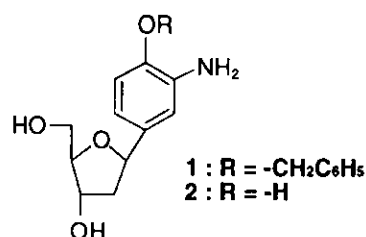
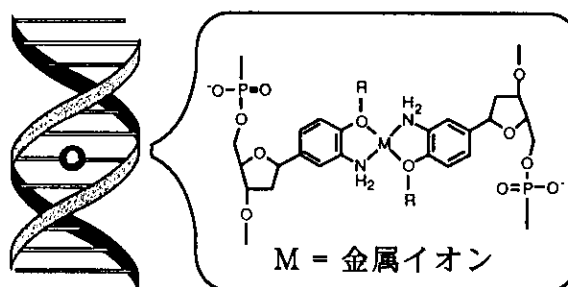
学位申請論文

題目 核酸塩基として2-アミノフェノールを有する人工DNAの合成と  
金属錯生成による塩基対形成

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

2-アミノフェノール誘導体 **3** と2-デオキシリボース誘導体 **4** との Friedel-Crafts カップリング反応により、目的物である  $\beta$ -アノマー **5** を選択的に得 ( $\beta$ -**5**:  $\alpha$ -**6** = 7.9% : 1.2%)、さらに、

Chart 1

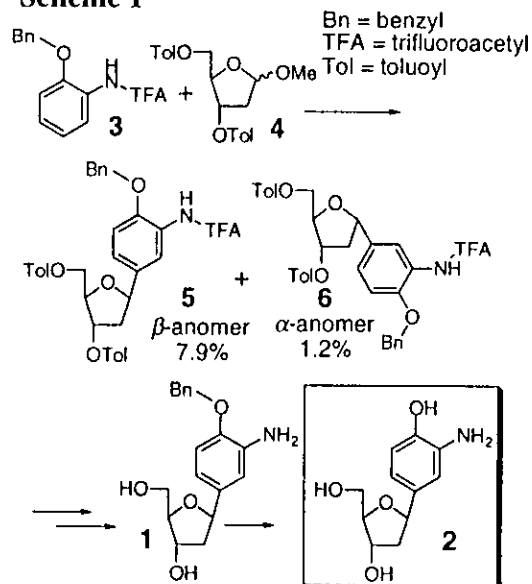


3段階の脱保護反応を行なうことにより人工ヌクレオシド **2** を得た (Scheme 1)。 $\beta$ -アノマー **5** の C1' 位の絶対配置は、X線結晶解析と  $^1\text{H}$  NMR による NOE 差スペクトル法により決定した。

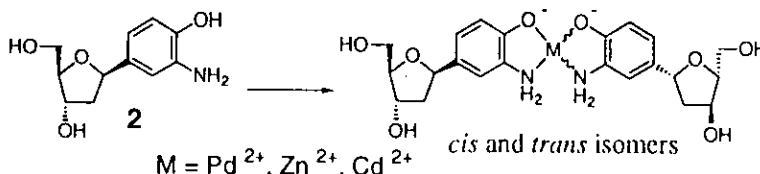
人工ヌクレオシド **1** は、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  と 2 : 1 錯体を形成することを  $^1\text{H}$  NMR 測定及び ESI-TOF マススペクトル測定により確認した。 $\text{Pd}^{2+}$  錯体の場合、水溶液中で *cis* と *trans* の約 1 : 1 混合物であることが明らかにされた (Scheme 2, Figure 1)。

人工ヌクレオシド **1** をフォスフォアミダイト固相合成法を用いて DNA オリゴマーへ導入し、 $\text{dT}_{21}\cdot\text{dA}_{21}$  の中央に一つ導入した **X1**、端から二番目に一つずつ導入した **X2**、また中央に三つ導入した **X3** を得たのち (Scheme 3)、これらの DNA オリゴマーに対する金属イオンの効果を融解実験などにより明らかにした。

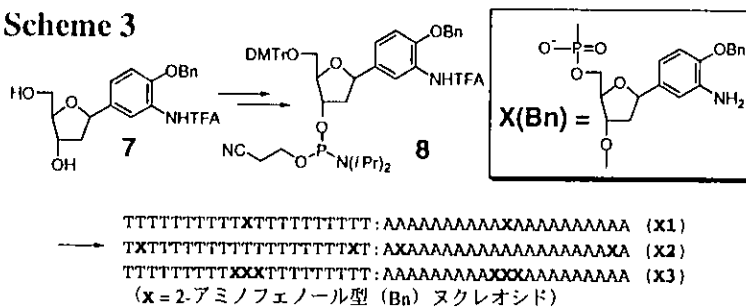
Scheme 1



Scheme 2



Scheme 3



以上、本研究では、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドの合成法を確立し、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  との 2 : 1 錯体形成を明らかにした。これらの錯体は天然型塩基対に代わる新しい金属錯体型塩基対を提供するものである。さらに、本人工ヌクレオシドをオリゴヌクレオチドに導入し、二本鎖形成における金属イオンの効果を明らかにした。

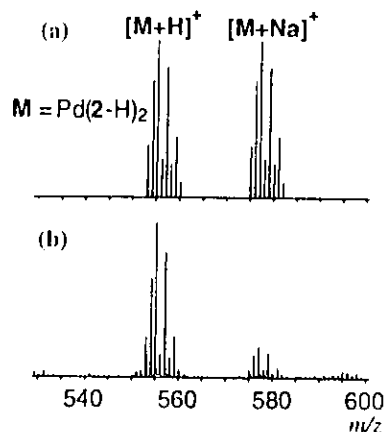


Figure 1. 2- $\text{Pd}^{2+}$  (2 : 1) の、ポジティブモードにおける ESI-TOF マススペクトル、 $m/z$  530-600、(a)  $\text{M}+\text{H}^+$  及び  $\text{M}+\text{Na}^+$  の理論的同位体分布 (b) 実験的同位体分布

# 第 1 章

## 序 論



## 1 序論

金属配位結合により二重らせん構造を形成する人工DNAの創製と機能化

[20 世紀から 21 世紀へ：科学の進歩]

20 世紀は、生物学が飛躍的に発展した世紀であった。遺伝学の誕生は 1900 年のドブリース、コレンス、チエルマックという 3 人の遺伝学者によるメンデルの遺伝法則の再発見にはじまり、ワトソンとクリックのDNA二重らせん構造の発見は 1953 年であった [1]。この、分子レベルにおけるDNA構造の発見が、その後の分子生物学の急速な発展につながり [2]、20 世紀後半には、生命現象を物理学や化学の言葉で語れるようになった [3-5]。さらに生物学が、医学や農学、工学などと連携し、生命を探究する総合科学へと発展した。その結果が、20 世紀最後の年のヒトゲノム全塩基配列の概要決定へと結びついた。21 世紀には植物や動物に対してだけでなく、ヒトの体も分子レベルで理解され、その結果、未来の医療は、生活習慣病を発症前に遺伝子で診断したり、遺伝子の個人差から発病しやすさを調べたり、個人個人の体質に合った副作用のより少ない新薬を開発したりと、個人個人に合ったオーダーメイド医療へと変化してゆくであろうと期待されている [6]。

[生物学と化学の境界領域]

生体内における物質の構成からヒントを得て分子を構築する分野は、この 25 年以上の間に急速に成長してきた、広範囲にわたる学際領域にある。この研究領域では、ナノスケール ( $1\text{ nm} = 10^{-7}\text{ cm} = 10\text{ \AA}$ )、あるいはそれよりも大きなスケールで存在し、機能する、大スケールの生体構造の自己会合の基本的理解を深めること downwards と、小スケール構造の化学合成に関する我々の知識を広げること upwards によって、自然界に存在する基本的な *building block* を制御、あるいは再構築する "*bottom up*" アプローチが追究されている。生物科学

にその基盤をもつ自己組織化と階層構造 (Figure 1.1) という概念は、ナノ構造分子あるいはナノ構造物質への非生物学的アプローチ法に、長い間導入されてきており、多くのエレガントな例が報告されている [7-10]。これらの報告は、有用な知見を提供しているものの、生体物質を構成する複雑な分子構造がどのように組み上がるかについての十分な説明を与えるものではない。

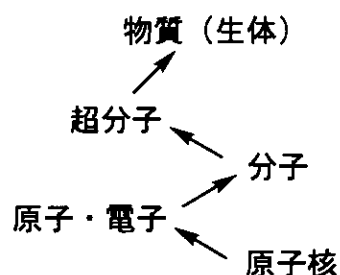


Figure 1.1 物質の組立て (階層構造)

生体は、ヌクレオシド、アミノ酸、脂質、炭化水素のような、ほんの限られた数の基本的な building block しか含まないが、これらの分子は化学的に多様であり、種々の方法で高分子化あるいは集合化され得る。化学合成と生物学における最近の進歩のおかげで、我々は生体分子 building block を結合させたり化学的に修飾したりして、分子構築のための新しい building block を創り出すことができる。特に、金属錯体を生体分子に導入することは生体高分子の機能化に対する重要な設計方針の一つであることは一般に受け入れられている。

### [DNAの構造]

生体内においてDNA、RNA、タンパク質などの生体高分子は、高度に制御されたシステムを構築し、生命活動を維持している。DNA (デオキシリボ核酸: deoxyribonucleic acid) は、核酸塩基を有するデオキシリボースであるヌクレオシドが、リン酸ジエステル結合により結合し、内側に疎水性部分、外側に親水性部分を有し、水中で右巻きの二重らせん構造を形成、維持している生体高分子である (Figure 1.2)。また、ヒト、動物、植物、単細胞生物に至るまで、地球上の全ての生物の細胞核中において遺伝や生命維持活動に関する情報を担っている、生命における最も重要な構成分子でもある [11]。ヌクレオシドは二つの異なるタイプのヘテロ芳香族窒素塩基、ピリミジンとプリン、の N-グ

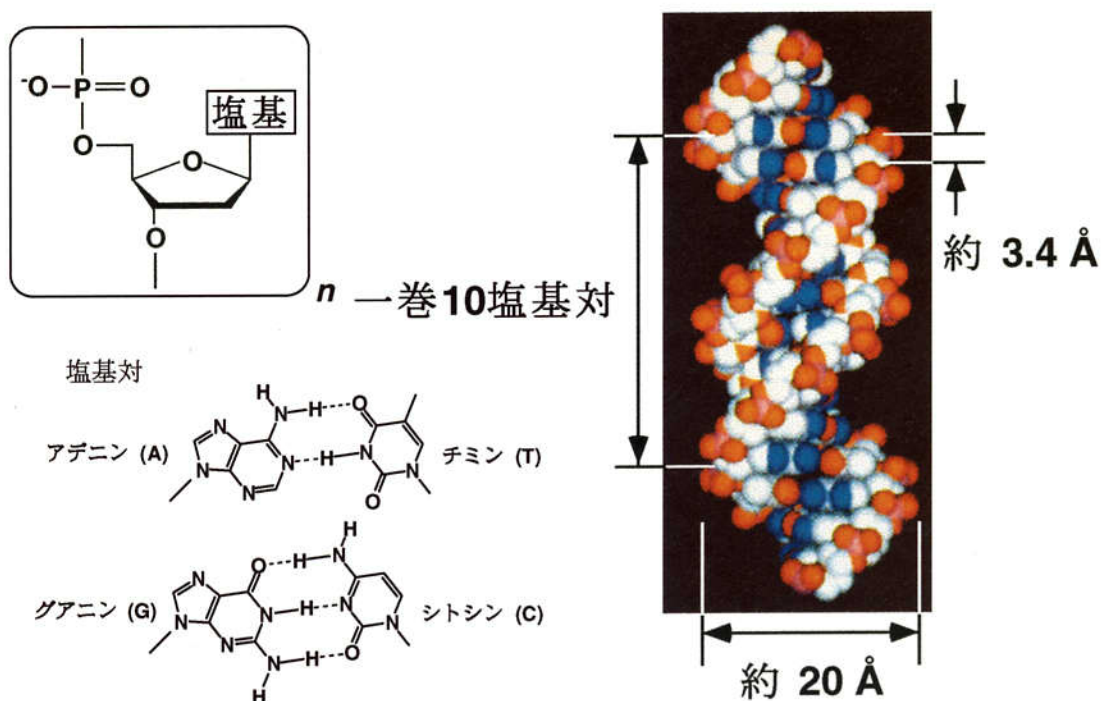


Figure 1.2 DNAの構造

リコシドである。DNAにおけるピリミジン塩基はチミン (T) とシトシン (C)、プリン塩基はアデニン (A) とグアニン (G) である。これらの4文字の暗号の配列そのものがDNAのもつ分子情報であり、このユニークな情報暗号は、全ての細胞プロセスを制御するためにタンパク質に変換される。遺伝暗号は複雑であるが、二つの相補的なDNAあるいはRNA鎖間の塩基対形成プロセスは比較的単純である。ワトソン-クリック塩基対においては相補性に関する二つの本質的なルールがある [1, 12] :

(ルール1) 水素結合相補性 (A と G は、それぞれ T と C と対を形成する。)

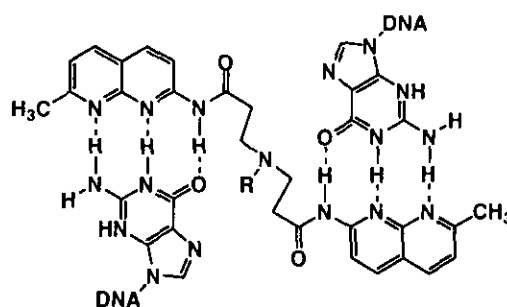
(ルール2) サイズ相補性 (大きなプリンは小さなピリミジンと対をつくる)

DNA二本鎖形成の結合エネルギーは、水中での疎水的核酸塩基の  $\pi$ - $\pi$  スタッキングから生じ、会合の特異性は上記の塩基対形成のルールに基づく。またDNAは、右巻き二重らせん以外にも、左巻きの二重らせん、三重らせん [13]、

グアニン四量体構造 [3] などの多様な構造をとることも知られている。したがって、DNA の分子構造を官能基レベルで変換、再構築することにより、この構造多様性を基盤とする新しい機能を付与できる可能性がある。

#### [核酸塩基を認識する分子の化学療法剤への応用]

核酸塩基を認識する分子を用いる化学療法剤の開発研究の一例として、齋藤らは、人工的に設計、合成した分子が、DNA シークエンス解析に応用できることを示した (Figure 1.3) [14]。この研究で開発されたナフチリジン二量体分子は、相補的な水素結合パターンを利用することによって、G-G ミ



**Figure 1.3** 齋藤らが開発した G-G ミスマッチ認識分子であるナフチリジン二量体

スマッチを特異的に認識する。彼らはまず、二つのグアニンを特異的に認識する目的で、グアニンと相補的な水素結合パターンを有するナフチリジンをリンカーで結合した二量体を設計、合成した。このナフチリジン二量体存在下、G-G ミスマッチを有する DNA オリゴマーが他の塩基対と比較して選択的に安定化されることを、融解実験により示した。さらに、ナフチリジン二量体が、27 塩基対、652 塩基対の DNA サンプル内の G-G ミスマッチを特異的に認識することを、二量体分子をリンカーにより固定化した表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance : SPR) センサーを用いて明らかにした。ヒトゲノムのほぼ全てが解読された現在、ヒトゲノムプロジェクトの新たな目標として、疾患の発症メカニズムの解明に関与する SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms、一塩基多型) 地図をつくることが掲げられているが [15]、齋藤らはこの研究において、人工分子を SNPs 検出に応用できる可能性を示した。

## [人工核酸塩基の開発]

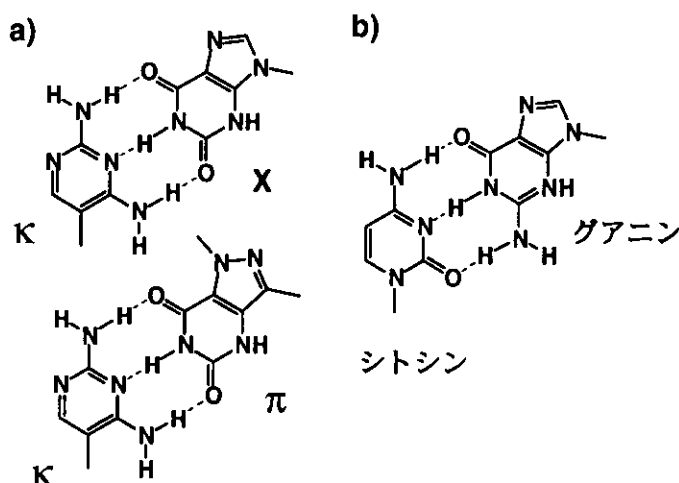
核酸塩基対における水素結合は、DNA 塩基対認識における、高選択的認識において重要な役割を担っている。ワトソン-クリック型を化学的に修飾し、塩基対を増やすことができれば、DNA や RNA 中に蓄積される情報量は飛躍的に増大し、自然により開発された分子プログラミング言語や生命現象の理解だけでなく、生命現象の人為的なコントロールや、物質科学の分野における新しい機能性分子の構築へと展開できる大きな可能性がある。

近年、多くの非天然 DNA ヌクレオシドが合成されている [16]。それらの中で、天然の二つの塩基対にさらにもう一つ新しい塩基対を加えようとする試みが Benner、Schultz、Kool らを中心に、盛んに行なわれている。

## (1) Benner らの水素結合による人工核酸塩基対形成

1990 年以降に、Benner らは非天然型水素結合パターンを介した塩基対、ジアミノピリジン ( $\kappa$ ) - キサントシン (X) 塩基対、および  $\kappa$ -メチルオキソフォルマイシン ( $\pi$ ) 塩基対に関する報告を行なった (Figure 1.4) [17-19]。これらの塩基対では、天然塩基対と水素結合パターンが異なってい

る。しかし、これらの研究においては、互変異性体の制御が難しい、DNA ポリメラーゼによる取り込み、合成が困難である、などの問題点があった。



**Figure 1.4** a) Benner らが開発した、非天然型水素結合パターンを介した人工塩基対  
b) シトシン-グアニン天然塩基対

## (2) Kool らの水素結合を介さない塩基対の開発

ワトソンとクリックによるDNAの構造決定以来、DNA複製においては、塩基対間の相補的な水素結合は必要不可欠であると信じられてきたが、最近の Kool らの発見によってこの定説は覆されつつある。

Kool らは、疎水性で、天然塩基のチミンやアデニンに類似した構造を有するフッ化ベンゼン誘導体 **F** 等をデザイン、合成した (Figure 1.5) [20-23]。これらをDNAオリゴマーに導入し、水素結合の有無がDNA二本鎖の塩基対形成に及ぼす影響について検討した結果、安定な二本鎖構造の形成に対して、水素結合が必ずしも必要ではない可能性を示した。

さらに、DNAポリメラーゼを用いたDNA複製においては、活性部位への“立体的な適合”こそがDNA合成の正確さにおいて重要であり、ワトソン-クリック水素結合も、プリン構造とピリミジン構造も、高効率で高選択的な塩基対形成には必要ではないという結果を示した [24]。彼らは Figure 1.6 に示すように、ピレンヌクレオシドと、核酸塩基をもたないヌクレオシドと、核酸塩基をもたないヌクレオシド

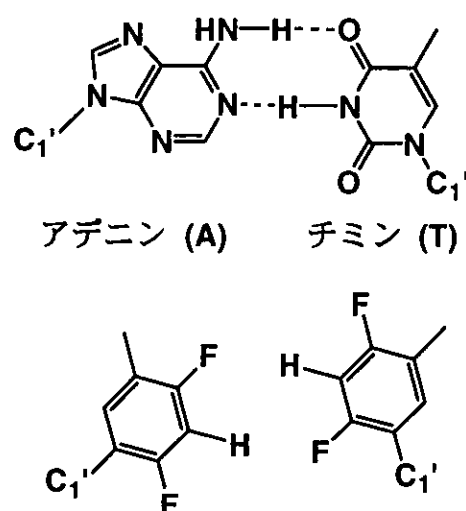


Figure 1.5 上段：アデニン-チミン塩基対  
下段：アデニン-F 塩基対

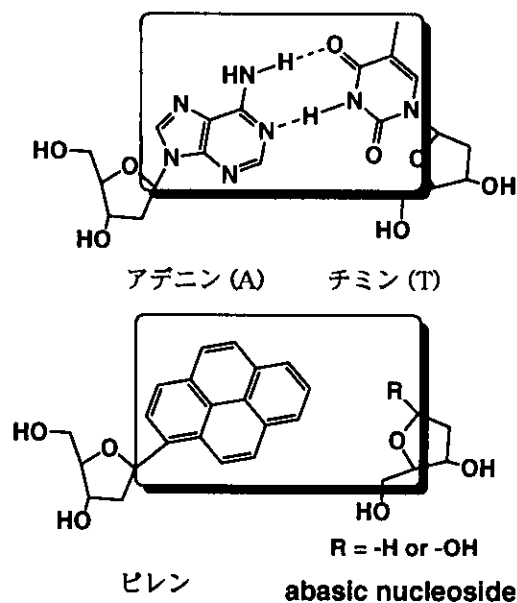


Figure 1.6 上段：アデニン-チミン塩基対  
下段：ピレンと、核酸塩基をもたないデオキシリボースから成る構造

ドからなる構造が、天然のワトソン-クリック塩基対とほぼ同じ大きさであることに着目し、ピレンヌクレオチド三リン酸を用いてDNA複製反応を行なったところ、核酸塩基のない相手に対して、ピレンヌクレオチドが効率的、特異的に導入された。また、これらの性質を応用して、DNA損傷の一般的な形である、核酸塩基が欠如した損傷部位をシーケンスすることに成功した。これらの結果は、人工核酸が天然の核酸合成酵素の基質になりうることを示した点において、人工核酸の有用性を高めたものである。

### (3) Schultz らの非水素結合型核酸塩基対

Schultz らは、ワトソン-クリック水素結合を疎水性相互作用に置き換えた非水素結合型核酸塩基対を開発した

(Figure 1.7) [25, 26]。

種々の非水素結合型核酸塩基が、天然塩基対に匹敵、あるいはより安定に、また選択的に塩基対を形成することを明らかにし [25b, 25c, 25d]、さらにDNAポリメラーゼを用いた酵素的導入において、天然核酸塩基に匹敵する速度で取り込まれることを見い出した。これらの非水素結合型塩基の中で、7-アザインドール (7AI) とイソカルボスチリル (ICS)

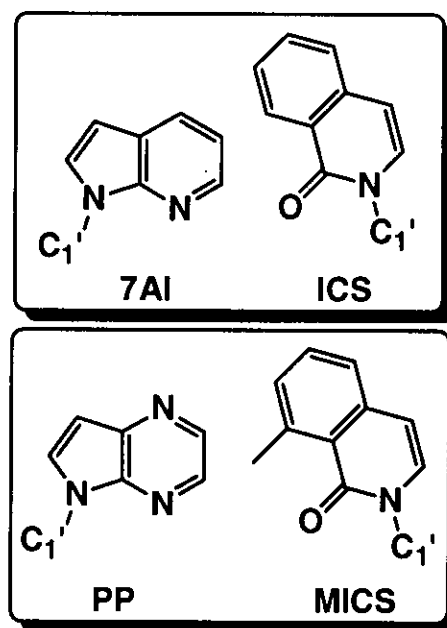


Figure 1.7 Schultz らが開発した非水素結合型塩基対

から形成される塩基対に着目し、7AI と ICS の誘導体である、ピロロピリジン (PP) と C3-メチルイソカルボスチリル (MICS) をそれぞれ設計、合成した。PP に対して MICS、また、MICS に対して PP がそれぞれ特異的に、DNAポリメラーゼにより効率的に導入されることを示し、更に、PP-MICS 塩

基対が天然の A-T、G-C 塩基対に匹敵する程、DNA二本鎖を安定化すること  
も確認した。

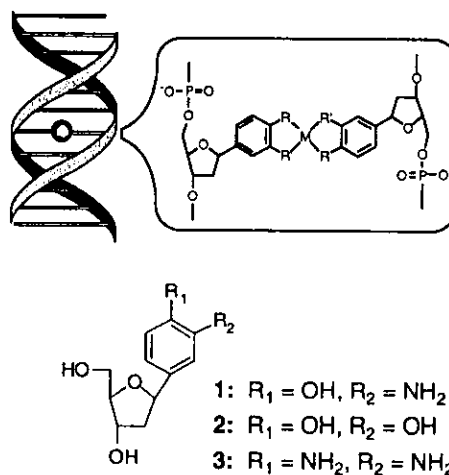
#### [金属錯体の有用性]

DNAへの金属錯体の導入がDNAの機能化における有用な手法であることが一般的に受け入れられている[27]。これまで、光活性な遷移金属錯体 [27a, 27b]、酸化還元活性な遷移金属錯体 [27c, 27d, 27e]、癌研究への利用を指向した遷移金属錯体を含むオリゴヌクレオチド [27f, 27g]、DNAハイブリダイゼーションを利用した部位特異的DNA切断 [27h]、DNAハイブリダイゼーションを利用した部位特異的RNA切断 [27i, 27j, 27k, 27l, 27m, 27n]、DNAを通したエネルギー移動 [27o]、電子移動システム [27p, 27q, 27r] などが報告されている。また、生体内において金属イオンの重要性は周知の通りである [28-30]。

#### [筆者のアプローチ]

DNAへの金属イオンの導入に対して我々が用いたアプローチは、DNA塩基それ自身を金属キレート核酸塩基へ、直接的に修飾することである (Figure 1.8) [31-37]。これらの人工DNAでは、水素結合塩基対は金属により誘起される塩基対に置き換えられており、それによって、二本鎖DNAにおける新しいハイブリダイゼーション様式を創り出している。このアプ

ローチにおいては、オリゴヌクレオチドへの金属錯体の導入のために、DNA塩基それ自身が直接的にキレート部位を含む核酸塩基へ変えられている。当研



**Figure 1.8** 著者らが開発した、金属配位結合を介した人工ヌクレオチド



研究室は、キレート能をもつ  
カテコール **2**、*o*-フェニレ  
ンジアミン **3** を核酸塩基と  
して有する新規人工  $\beta$ -C-  
ヌクレオシドの合成につい  
て世界で最初に報告した。

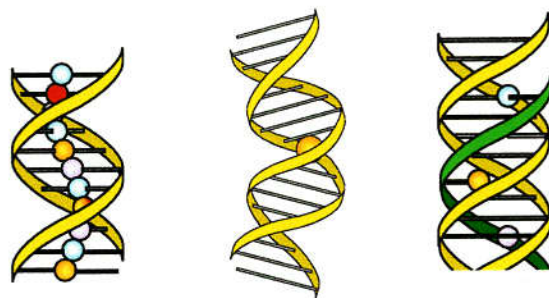
この人工DNAを用いるこ  
とにより、DNAの中心に  
連続的に金属イオンを並べ

たり (Figure 1.9(a))、異なる金属イオンを任意の配列で並べられる可能性がある。金属イオンの酸化状態の変化による配位構造の変化を利用してDNAの高次構造を制御し、さらに転写調節へ応用することにも興味を持たれる (Figure 1.9(b))。金属配位結合を利用した三重らせんの形成も新しい一つの方

向であろう (Figure 1.9(c))。天然の核酸塩基の Hoogsteen 型水素結合の位置に結合できる金属イオンの特性を生かし、安定な三重らせんを形成させることも可能であり

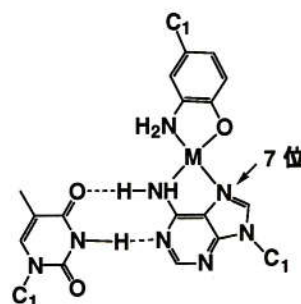
(Figure 1.10)、新しいタイプのアンチ  
ジーンオリゴヌクレオチドの創製が期待

できる。このようなアプローチは、天然の二つの塩基対、AT と GC の他に、第三、第四の塩基対としての遺伝的アルファベットの拡張や、らせん軸に沿って金属を制御して並べるなどの新しいDNA構造あるいは機能へ至ることが期待される。金属配位結合によって二重らせんを形成するDNAの報告例については、当研究室による発表以来 [34]、最近になって Schultz らと Weizman らが以下の報告を行っている。



**Figure 1.9** 金属配位結合を利用した人工DNAの応用

(a) 分子電線 (b) 高次構造変換 (c) 三重らせん



**Figure 1.10** 金属配位結合により三重らせん  
を形成する人工ヌクレオシド

## (1) Schultz らによる、金属イオンを介した塩基対

Schultz らは 三座配位子の pyridine-2,6-dicarboxylate (Dipic) と単座配位子の pyridine (Py) からなる塩基対を DNA オリゴマーに導入し、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下で DNA の二本鎖構造が安定化されることを示した (Figure 1.11) [38]。  $\text{Cu}^{2+}$  が存在しないときには、Dipic と Py をそれぞれ中央に有する 2 本の DN

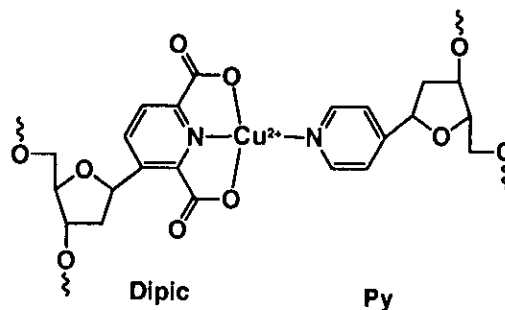


Figure 1.11 金属への錯生成による  
Dipic と Py から成る塩基対

A オリゴマーは、 $\text{Cu}^{2+}$  非存在下では二本鎖の安定性は低下するが、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下では安定な二本鎖を形成することを UV スペクトルを用いた融解実験により示した。また  $\text{Cu}^{2+}$  の濃度が増加するにつれて、二本鎖の安定性が増加することも示した。この DNA 二本鎖の安定化は、 $\text{Ce}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Pt}^{2+}$  存在下では観測されなかった。また、EPR スペクトルにより  $\text{Cu}^{2+}$  が二つの配位子間に存在し、塩基対を形成していることも示した。

## (2) Weizman らによる金属イオンを介した人工塩基対

Weizman らは、核酸塩基を、

(Figure 1.12) [39a, 39b]。このヌクレオシドを DNA オリゴマーに導入して融解実験を行ない、 $\text{Cu}^{2+}$  存在下で DNA 二本鎖が安定化されることを示した。またホスホロアミダイト法によりリン酸ジエステル結合を有する二量体を合成し、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$  との錯体形成を、

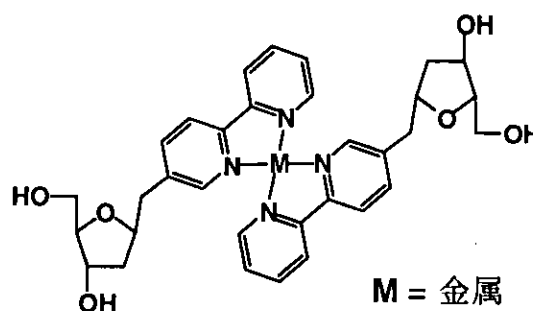
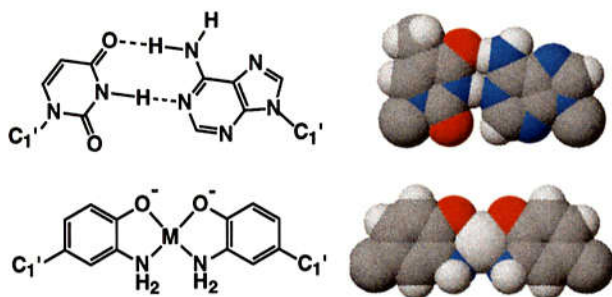


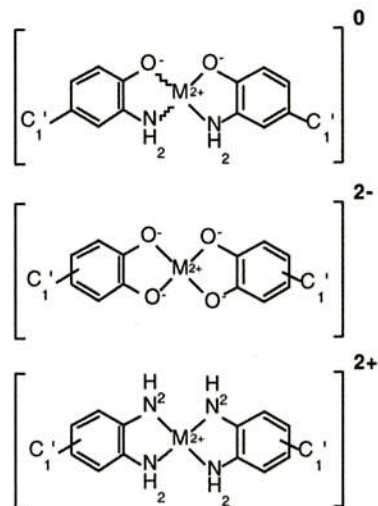
Figure 1.12 Weizman らによる、キレート部位として  
2,2'-ビピリジン有するヌクレオシド

UV 測定とマスペクトルにより示した。

[筆者らが開発した人工塩基対]



**Figure 1.13** AT 塩基対と人工塩基対の  
ジオメトリの比較



**Figure 1.14** 二価の金属イオンにより  
形成した塩基対の電荷

Figure 1.8 に示した 3 つの人工ヌクレオシドは、天然の塩基対と構造的にほぼ同じであり (Figure 1.13)、また、金属を介した塩基対全体の電荷をコントロールすることを指向している (Figure 1.14)。例えば、これらのヌクレオシドが 2 価の金属イオンと 2 : 1 錯体を形成すれば、**1**、**2**、**3** の錯体はそれぞれ 0、-2、+2 価となり、よってオリゴヌクレオチド内で隣の位置と一緒に導入できるだろうと考えた。これらは  $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Pt}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  のような金属イオンと 2 : 1 平面正方形錯体を形成すると予想した。実際には **3** が水溶液中で  $\text{Pd}^{2+}$  と安定な 2 : 1 平面四角型錯体を形成し[34]、また **2** が  $\text{DMSO}-d_6$  中でボランイオン  $\text{B}^{3+}$  と錯体を形成し[37]、そこでは水素結合が塩基対において金属配位結合により置き換えられていることがこれまでに見い出されている。本論文では、この研究の一環として、2-アミノフェノール **1** をもつ人工ヌクレオシドの合成と DNA への導入に着手した。

## [本研究の目的]

本研究は、金属錯形成により二重らせんを形成する人工DNAを合成し、金属の性質を利用することによって、生体機能の人為的コントロールへの応用ならびに、新規機能性素子として応用することを目的とした。DNAを遺伝情報物質としてではなく、機能性分子の素材として着目した研究例は世界的に見ても僅かである [40]。

## [本論文の構成]

本論文は以下の 5 章から構成されている。

**第一章** “緒言” では、生命現象を化学の立場からどうアプローチしてゆくか、ということに関して筆者の考えを示し、また、本研究に関連する研究例を概観、ならびに、本研究の目的について述べた。

**第二章** “核酸塩基として 2-アミノフェノールを有する人工ヌクレオシドの合成” では、人工ヌクレオシドのデザイン、合成、立体構造の決定、などについて述べた。

**第三章** “2-アミノフェノール型ヌクレオシドと各種金属イオンとの相互作用” では、主に  $\text{Pd}^{2+}$  イオン、そして、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  イオンと人工ヌクレオシドとの相互作用について述べた。

**第四章** “2-アミノフェノール型 (Bn) ヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドの合成と金属イオンとの相互作用” では、人工ヌクレオシドの DNA オリゴマーへの導入、また、人工オリゴヌクレオチドの二本鎖形成における金属イオンの効果について述べている。

**第五章** では、第二章から第四章までを総括し、本研究で得られた有用な知見についてまとめるとともに、今後の応用について展望する。

## References and Notes

- 1) Watson, J.D.; Crick, F.H.C. *Nature* **1953**, *171*, 737-738. A structure for deoxyribose nucleic acid.
- 2) 石田寅夫、1998. ノーベル賞からみた遺伝子の分子生物学入門、化学同人.
- 3) 杉本直己、1999. 遺伝子とバイオテクノロジー、丸善株式会社.
- 4) Lippard, S.J.; Berg, J.M., 松本和子 監訳、1997. 生物無機化学、東京化学同人.
- 5) Cowan, J.A., 小林宏、鈴木春男 監訳、1998. 無機生化学、化学同人.
- 6) 大石正道、2001. 入門ビジュアルサイエンス「ヒトゲノムのしくみ」、日本実業出版社.
- 7) Philp, D.; Stoddart, J.F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1154-1196. Self-assembly in natural and unnatural systems.
- 8) Lehn, J.-M. 著、竹内敬人訳、1997. レーン 超分子化学、化学同人.
- 9) 妹尾学、荒木孝二、大月穰、1998. 超分子化学、東京化学同人.
- 10) 日本化学会編、1997. 季刊 化学総説 超分子をめざす化学、No.31、学会出版センター.
- 11) 生田哲、1995. 入門ビジュアルサイエンス「ヒト遺伝子のしくみ」、日本実業出版社.
- 12) Saenger, W., 1987. 核酸構造、シュプリンガー・フェアラーク東京.
- 13) Soyfer, V.N.; Potaman, V.N., 1995. Triple-Helical Nucleic Acids. Springer.
- 14) 齋藤烈、杉山弘、飯田博一、中谷和彦、山東信介、2000. ポストゲノムの生物有機化学：遺伝子をターゲットとするドラッグデザイン、「ヒトゲノム最前線」、化学同人、別冊化学、89-110.
- 15) Collins, F.S.; Patrinos, A.; Jordan, E.; Chakravarti, A.; Gesteland, R.; Walters, L.; and the members of the DOE and NIH planning groups. *Science* **1998**, *282*, 682-689. New Goals for the U.S. Human Genome Project.

- 16) (a) Lesser, D.R.; Kurpiewski, M.R.; Jen-Jacobson, L. *Science* **1990**, *250*, 776-786. The energetic basis of specificity in the Eco RI endonuclease-DNA interaction. (b) Kornberg, A.; Baker, T.A. 1992. DNA Replication, 2nd. ed. W. H. Freeman and company New York. (c) SantaLucia, J. Jr.; Kierzek, R.; Turner, D.H. *Science* **1992**, *256*, 217-219. Context dependence of hydrogen bond free energy revealed by substitutions in an RNA hairpin. (d) Smith, S.A.; Rajur, S.B.; McLaughlin, L.W. *Nature Struct. Biol.* **1994**, *1*, 18-22. Erratum, 198. Specific purine N<sup>7</sup>-nitrogens are critical for high affinity binding by the Trp repressor. (e) Hildbrand, S.; Blaser, A.; Parel, P.; Leumann, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5499-5511. 5-Substituted 2-aminopyridine C-nucleosides as protonated cytidine equivalents: Increasing efficiency and selectivity in DNA triple-helix formation. (f) Simons, C. 2001. Nucleoside Mimetics. Gordon and Breach Science Publishers. (g) Blackburn, G.M.; Gait, M.J. 1996. Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 2nd. ed. OXFORD. Chapter 3.1. Synthesis of nucleosides, 84-98.
- 17) Piccirilli, J.A.; Krauch, T.; Moroney, S.E.; Benner, S.A. *Nature* **1990**, *343*, 33-37. Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet.
- 18) Bain, J.D.; Switzer, C.; Chamberlin, A.R.; Benner, S.A. *Nature* **1992**, *356*, 537-539. Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code.
- 19) Horlacher, J.; Hottiger, M.; Podust, V.; Hübscher, U.; Benner, S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 6329-6333. Recognition by viral and cellular DNA polymerases of nucleosides bearing bases with nonstandard hydrogen bonding patterns.
- 20) Schweizer, B.A.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863-1872. Hydrophobic, non-hydrogen-bonding bases and base pairs in DNA.
- 21) Ren, R.X.-F.; Chaudhuri, N.C.; Paris, P.L.; Rumney IV, S.; Kool, E.T.

- J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678. Naphthalene, phenanthrene, and pyrene as DNA base analogues: synthesis, structure, and fluorescence in DNA.
- 22) Kool, E.T.; Morales, J.C.; Guckian, K.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990-1009. Mimicking the structure and function of DNA: Insights into DNA stability and replication.
- 23) Moran, S.; Ren, R.X.-F.; Rumney IV, S.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2056-2057. Difluorotoluene, a nonpolar isostere for thymine, codes specifically and efficiently for adenine in DNA replication.
- 24) Matray, T.J.; Kool, E.T. *Nature* **1999**, *339*, 704-708. A specific partner for abasic damage in DNA.
- 25) (a) Wu, Y.; Ogawa, A.K.; Berger, M.; McMinn, D.L.; Schultz, G.; Romesberg, R.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7621-7632. Efforts toward expansion of the genetic alphabet: Optimization of interbase hydrophobic interactions. (b) McMinn, D.L.; Ogawa, A.K.; Wu, Y.; Liu, J.; Schultz, P.G.; Romesberg, F.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585-11586. Efforts toward expansion of the genetic alphabet: DNA polymerase recognition of a highly stable, self-pairing hydrophobic Base. (c) Ogawa, A.K.; Wu, Y.; McMinn, D.L.; Liu, J.; Schultz, P.G.; Romesberg, F.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3274-3287. Efforts toward the expansion of the genetic alphabet: Information storage and replication with unnatural hydrophobic base pairs. (d) Berger, M.; Ogawa, A.K.; McMinn, D.L.; Wu, Y., Schultz, P.G.; Romesberg, F.E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2940-2942. Stable and selective hybridization of oligonucleotides with unnatural hydrophobic bases.
- 26) Service, R.F. *Science* **2000**, *289*, 232, 234-235. Creation's seventh day.
- 27) Selected examples: (a) Dandliker, P.J.; Holmlin, R.E.; Barton, J.K. *Science* **1997**, *275*, 1465-1468. Oxidative thymine dimer repair in the DNA helix. (b) Hurley, D.J.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2194-2195. Metal-containing oligonucleotides: Solid-phase synthesis and luminescence properties. (c) Telser,

J.; Cruickshank, K.A.; Schanze, K.S.; Netzel, T.L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7221-7226. DNA oligomers and duplexes containing a covalently attached derivative of tris(2,2'-bipyridine) ruthenium(II): Synthesis and characterization by thermodynamic and optical spectroscopic measurements. (d) Mucic, R.C.; Herrlien, M.K.; Mirkin, C.A.; Letsinger, R.L. *Chem. Commun.* **1996**, 555-557. Synthesis and characterization of DNA with ferrocenyl groups attached to their 5'-termini: Electrochemical characterization of a redox-active nucleotide monolayer. (e) Ihara, T.; Nakayama, M.; Murata, M.; Nakano, K.; Maeda, M. *Chem. Commun.* **1997**, 1609-1610. Gene sensor using ferrocenyl oligonucleotide. (f) Manchanda, R.; Dunham, S.U.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5144-5147. Automated solid-phase synthesis of site-specifically platinated oligodeoxyribonucleotides. (g) Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 646-648. Automated solid phase synthesis of platinated oligonucleotides via nucleoside phosphonates. (h) Dreyer, G.R.; Dervan, P.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 968-972. Sequence-specific cleavage of single-stranded DNA: Oligodeoxynucleotide-EDTA·Fe (II). (i) Chen, C.-H.B.; Sigman, D.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6570-6572. Sequence-specific scission of RNA by 1,10-phenanthroline-copper linked to deoxyoligonucleotides. (j) Bashkin, J.K.; Frolova, E.I.; Sampath, U. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5981-5982. Sequence-specific cleavage of HIV mRNA by a ribozyme mimic. (k) Matsumura, K.; Endo, M.; Komiyama, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2019-2020. Lanthanide complex-oligo-DNA hybrid for sequence-selective hydrolysis of RNA. (l) Magda, D.; Miller, R.A.; Sessler, J.L.; Iverson, B.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7439-7440. Site-specific hydrolysis of RNA by europium(III) texaphyrin conjugated to a synthetic oligodeoxyribonucleotide. (m) Magda, D.; Crofts, S.; Lin, A.; Miles, D.; Wright, M.; Sessler, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2293-2294. Synthesis and kinetic properties of ribozyme analogues prepared using



- phosphoramidite derivatives of dysprosium(III) texaphyrin. (n) Hall, J.; Hüsken, D.; Häner, R. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3522-3526. Towards artificial ribonucleases: the sequence-specific cleavage of RNA in a duplex. (o) Bannwarth, W.; Pfeleiderer, W.; Müller, F. *Helv. Chim. Acta.* **1991**, *74*, 1991-1999. Energy transfer within oligonucleotides from a lumazine (= pteridine-2,4(1*H*,3*H*)-dione) chromophore to bathophenanthroline-ruthenium(II) complexes. (p) Murphy, C.J.; Arkin, M.R.; Jenkins, Y.; Ghatlia, N.D.; Bossmann, S.H.; Turro, N.J.; Barton, J.K. *Science* **1993**, *262*, 1025-1029. Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix. (q) Meade, T.J.; Kayyem, J.F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 352-354. Electron transfer through DNA: Site-specific modification of duplex DNA with ruthenium donors and acceptors. (r) Meggers, E.; Kusch, D.; Giese, B. *Helv. Chim. Acta.* **1997**, *80*, 640-652. An efficient synthesis of enantiomerically pure  $\Delta$ - and  $\Lambda$ -ruthenium(II)-labelled oligonucleotides. and references cited therein.
- 28) 落合栄一郎、1991. 生命と金属、共立出版株式会社.
- 29) 桜井弘、1996. 金属は人体になぜ必要か、講談社.
- 30) 日本化学会編、1995. 季刊 化学総説 微量金属の生体作用 金属イオンの生理機能と薬理作用解明をめざして、No.27、学会出版センター.
- 31) 塩谷光彦、2000. 超分子の未来、2 章DNA型超分子、化学同人、22-35.
- 32) Shionoya, M.; Tanaka, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 1945-1954. Synthetic incorporation of metal complexes into nucleic acids and peptides directed toward functionalized molecules.
- 33) Tanaka, K.; Cao, H.; Shionoya, M. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1998**, *39*, 93-94. Double strands formation of artificial DNAs induced by metal complexation.
- 34) Tanaka, K., Shionoya, M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5002-5003. Synthesis of a novel nucleoside for alternative DNA base pairing through metal complexation.
- 35) Tanaka, K.; Cao, H.; Tasaka, M.; Shionoya, M. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *42*,

- 111-112. Artificial DNAs with metal-assisted base pairs.
- 36) Tanaka, K.; Tasaka, M.; Cao, H.; Shionoya, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 77-83. An approach to metal-assisted DNA base pairing: Novel  $\beta$ -C-nucleosides with a 2-aminophenol or a catechol as the nucleobase.
- 37) Cao, H.; Tanaka, K.; Shionoya, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1745-1748. An alternative base-pairing of catechol-bearing nucleosides by borate formation.
- 38) Meggers, E.; Holland, P.L.; Tolman, W.B.; Romesberg, F.E.; Schultz, P.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714-10715. A novel copper-mediated DNA base pair.
- 39) (a) Weizman, H.; Tor, Y. *Chem. Commun.* **2001**, 453. Oligo-ligandosides: A DNA mimetic approach to helicate formation.  
(b) Weizman, H.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375. 2,2'-Bipyridine ligandoside: A novel building block for modifying DNA with intra-duplex metal complexes.
- 40) Tanaka, K.; Okahata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10679-10683. A DNA-lipid complex in organic media and formation of an aligned cast film.

## 第 2 章

### 核酸塩基として 2-アミノフェノールを 有する人工ヌクレオシドの合成

**An Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing: Novel  $\beta$ -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.* **2001**, *13*, 77-83.

### 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、抗ウィルス性などを有する化合物が数多く見い出されており [1, 2, 3]、そのいくつかは医薬品として臨床で使用されている [4, 5, 6]。酵素中の活性中心の寛容さのために、人工的に合成された擬似ヌクレオシドも、天然DNA中に取り込まれることが知られており [7, 8]、望まれないDNA複製反応を停止させ得る疑似ヌクレオシドを設計、合成するという戦略に基づくものが主なものである [4]。また、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。このように、新しい生理活性を期待した、新規な修飾ヌクレオシドの設計、合成に関する研究がこれまで盛んに行われてきた [9, 10]。

一方、合成化学的観点から見た場合、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。ヌクレオシドは、分子内に複数の水酸基を有するリボースと、反応活性な官能基を有する複素環化合物を有し、また糖部位においては不斉炭素が複数存在するため、これを化学修飾するに当たっては、精密な合成設計が必要とされる。

DNAの核酸塩基であるアデニン (A) とチミン (T)、グアニン (G) とシトシン (C) の間では、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シーケ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

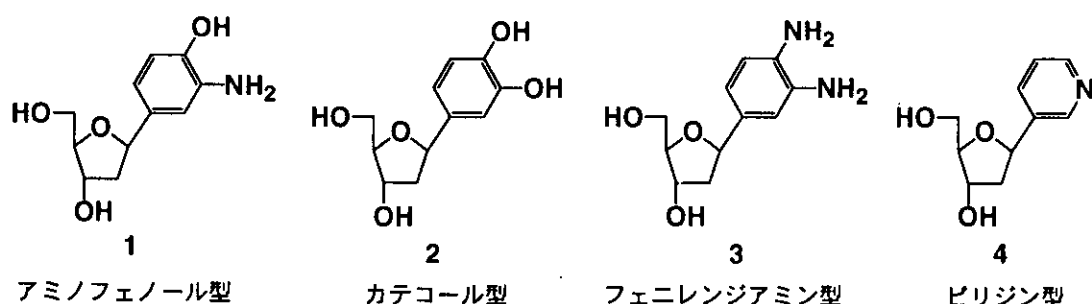
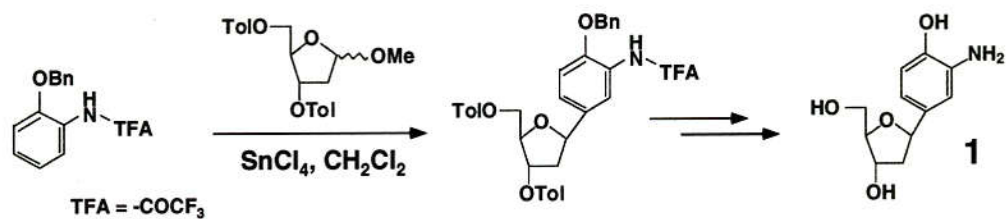


Figure 2.1 金属錯生成により核酸塩基対を形成する人工ヌクレオシド

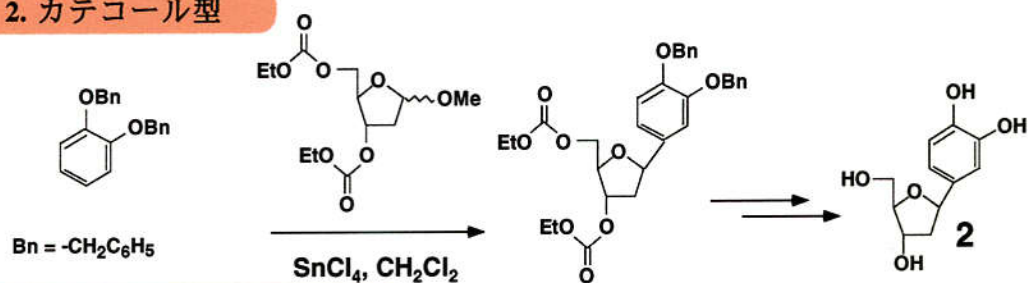
れまでに、フェニレンジアミンを核酸塩基とするヌクレオシド **3**、カテコールを核酸塩基とするヌクレオシド **2** について報告している (Figure 2.1) [11, 12, 13, 14]。また、Eaton らは、ピリジンを核酸塩基とするヌクレオシド **4** について報告している (Figure 2.1) [15]。これらの C-ヌクレオシドの合成法について Figure 2.2 にまとめた。カテコール型ヌクレオシド **2** は、芳香環とリボース部位との鍵反応としてのフリーデル-クラフツ反応を経て 2'-デオキシリボースから直接に合成された。一方、フェニレンジアミン型ヌクレオシド **3** は RNA 型中間体を経て、次に 2'-水酸基を除去する、より長い経路で得られた。また、フェニレンジアミン型ヌクレオシド **4** は、リチオ化したピリジンと D-リボースとのカップリング反応、続いて糖部の閉環反応により得られた。

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 2-アミノフェノール基を核酸塩基として選んだ。2-アミノフェノール型  $\beta$ -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反応である。ルイス酸存在下のフリーデル-クラフツ反応は、多くの修飾 C-ヌクレオシドの合成に利用されている [14, 16, 17]。水酸基とアミノ基を保護した 2-アミノフェノールと、トルオイル基で 3', 5'-水酸基を保護したデオキシリボースをフリーデル-クラフツ反応によりカップリングし、さらに、3 段階の脱保護反応を経て目的の 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **1** を合成することができた。

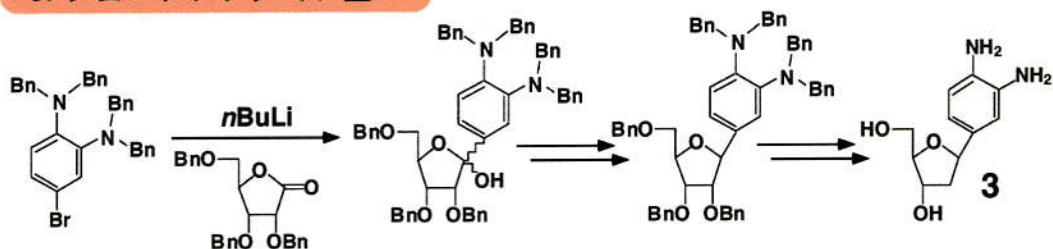
1. アミノフェノール型



2. カテコール型



3. フェニレンジアミン型



4. ピリジン型

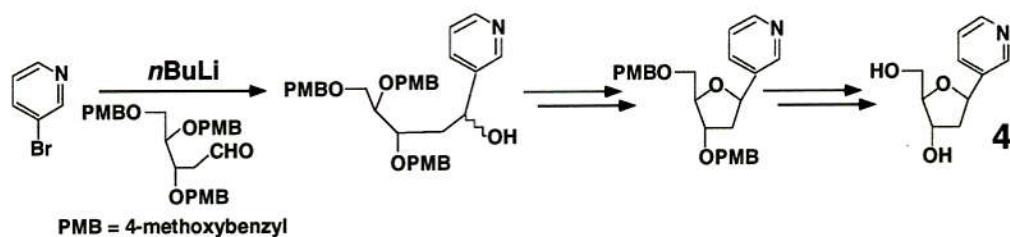
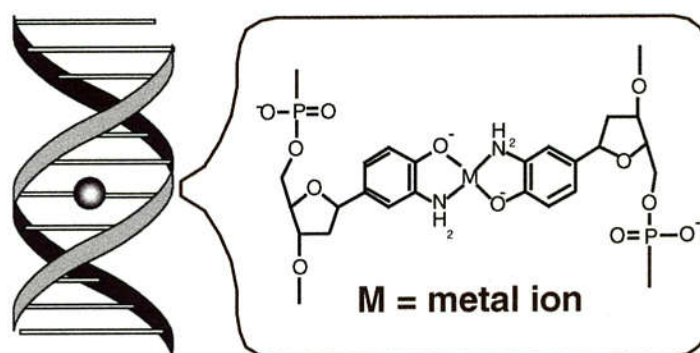


Figure 2.2 金属キレート能を有する $\beta$ -C-ヌクレオシドに対する合成経路

## 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。本論文では、水素結合ではなく、金属錯生成に

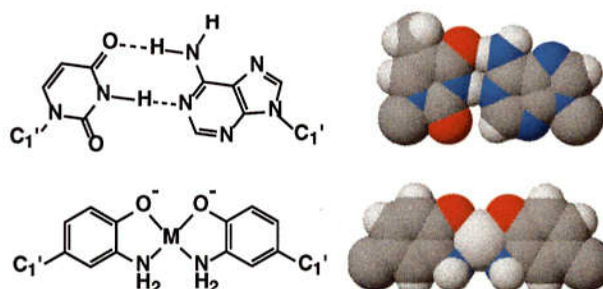
**Figure 2.3** 金属錯生成により塩基対形成する人工 DNA



より二本鎖を形成する新しい人工 DNA をデザインした (Figure 2.3)。

ヌクレオシドの設計指針として、金属イオンと相互作用した場合においても脱塩基が起こらない C-ヌクレオシドを合成することにした。また、金属イオンとの錯生成により生じた塩基対のジオメトリーが天然の塩基対と同じようになるように設計した (Figure 2.4)。フェニル基に二つのドナー性官能基を有する人工塩基が、平面四角型の金属イオンと 2:1 錯体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 **3** [11]、カテコール型ヌクレオシド **2** [14] の合成を行った (Figure 2.5)。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



**Figure 2.4** AT 塩基対と人工塩基対のジオメトリーの比較

## 第 2 章

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  
考えられる。

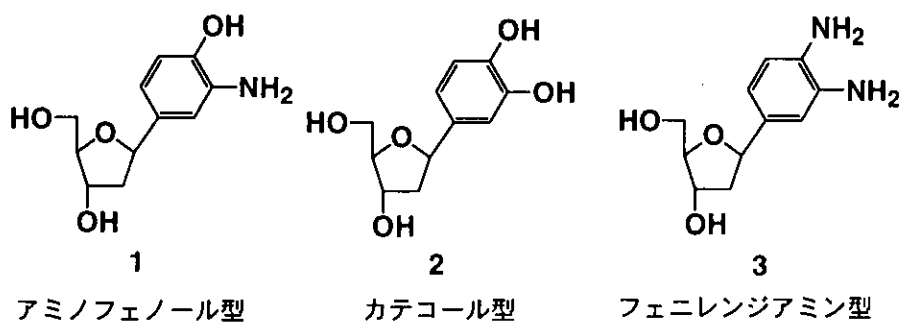


Figure 2.5

例えば、2 価金属イオンとの相互作用により、*o*-フェニレンジアミン型ヌクレオシド **3** では +2 価、カテコール型ヌクレオシド **2** では -2 価になるのに対し、2-アミノフェノール型ヌクレオシド **1** では 0 価になると予想され、更に電荷のバリエーションを増やすことができる (Figure 2.6)。

以上を踏まえ、アミノフェノールの 4 位にデオキシリボースを結合した  $\beta$ -C-ヌクレオシド **1** を合成することにした。

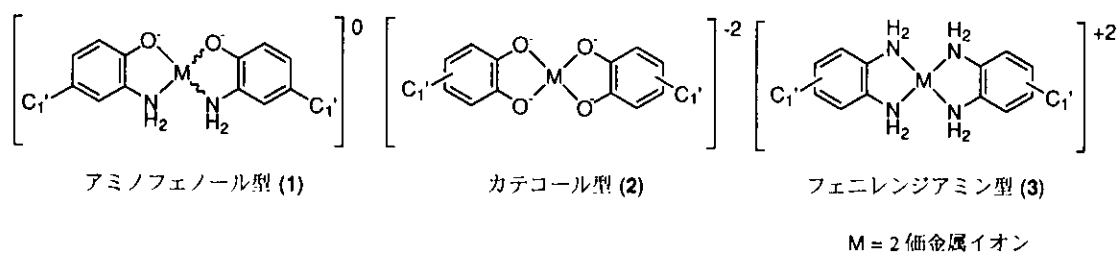


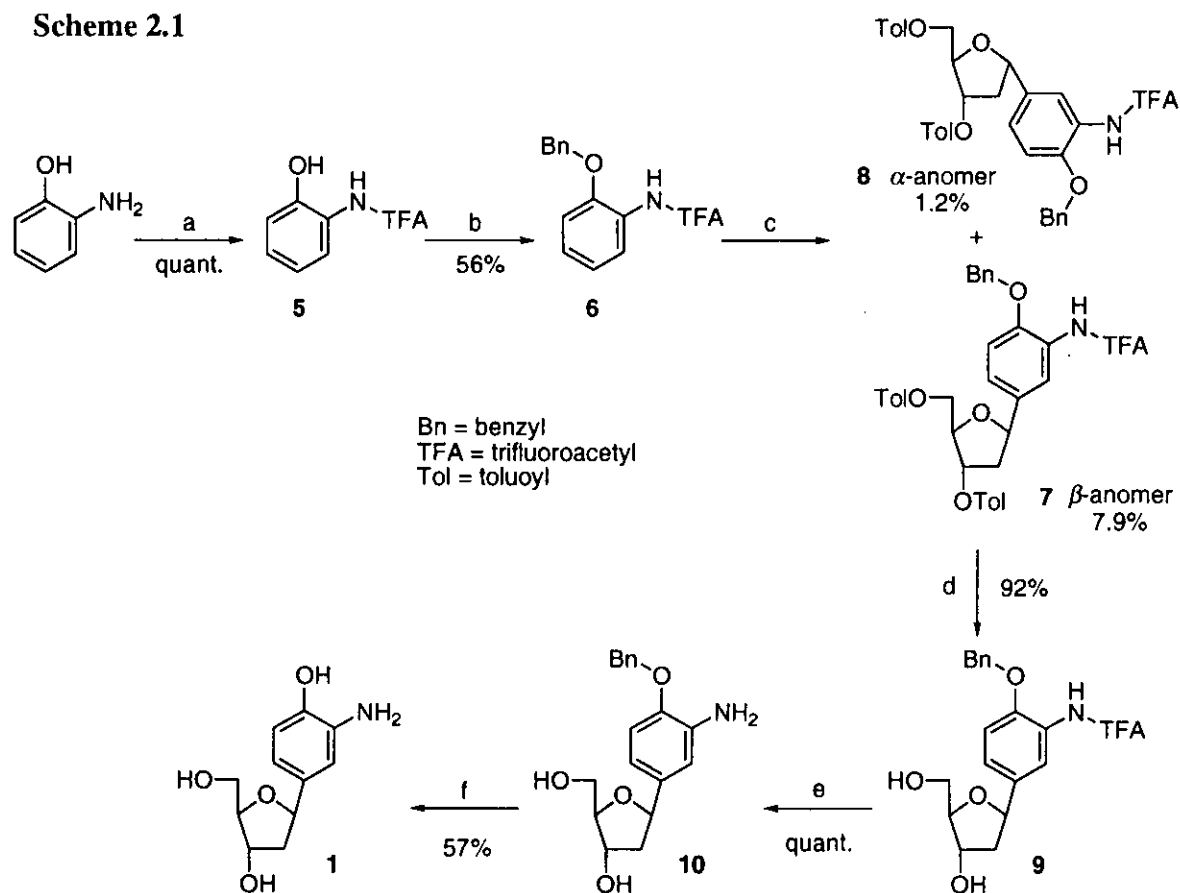
Figure 2.6 2 価の金属イオンにより形成した塩基対の電荷



## 2-3 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドの合成

2-アミノフェノール型  $\beta$ -C-ヌクレオシド **1** の合成経路を Scheme 2.1 に示す。ヌクレオシド **1** は、芳香環とリボース部位との間のフリーデル-クラフツカップリング反応を鍵反応として、効率的に合成された。フェニレンジアミン型  $\beta$ -C-ヌクレオシド **3** の RNA 型中間体を得た後 2'-水酸基を除去する合成経路に比べ、短いルートであり大量合成に適している [11]。アノマー炭素にお

Scheme 2.1



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) trifluoroacetic anhydride, pyridine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , quant.; (b) benzyl chloride,  $i\text{-Pr}_2\text{EtN}$ , 1,2-dichloroethane, reflux, 56%; (c) 1-O-methyl-3,5-O-ditoluoyl-2-deoxy-D-ribofuranose,  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 7.9% ( $\beta$ -anomer), 1.2% ( $\alpha$ -anomer); (d)  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ , rt, 92%; (e)  $\text{MeNH}_2$ ,  $\text{MeOH}$ , rt, quant.; (f)  $\text{H}_2$ , Pd-C,  $\text{MeOH}$ , rt, 57%.

ける炭素-炭素結合形成に対する最も一般的なアプローチは、この親電子中心における求核攻撃を含む合成方法である [16, 17]。ヌクレオシド **1** の炭素骨格を構築するために、親電子的芳香環置換を経て進むフリーデル-クラフツ反応を用いた。芳香族求核剤として、2-アミノフェノールから 2 段階で合成した *O*-benzyl-2-trifluoroacetamidophenol **6** を用いた。はじめに、アノマー位にメトキシ基を有し、3 位と 5 位をシリル基で保護した 2-デオキシ-D-リボフラノースと、**6** の反応をルイス酸触媒である  $\text{SnCl}_4$  存在下、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中、0 °C で行ったところ目的物は得られなかった。そこで、リボフラノース部位の保護基を酸性条件下安定なトルオイル基に変え同様の反応を行ったところ、低収率ではあるが  $\beta$ -C-ヌクレオシド **7** を高選択的に ( $\alpha$ -**8** :  $\beta$ -**7** = 約 1:7) 得た。これらは、シリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーにより、容易に分離精製することができた。更に  $\text{SnCl}_4$  の当量、反応温度を種々検討した結果、-20 °C、2 当量の  $\text{SnCl}_4$  を加え反応を行うことで、 $\beta$ -C-ヌクレオシド **7** を選択的に 16%の最高収率で得た。 $\beta$ -C-ヌクレオシド **7** のトルオイル基をナトリウムメトキシドを用いて脱保護後、トリフルオロアセチル基をメチルアミンを用いて脱保護し、続いてベンジル基を水素添加により脱保護することにより、人工ヌクレオシド **1** を得た。

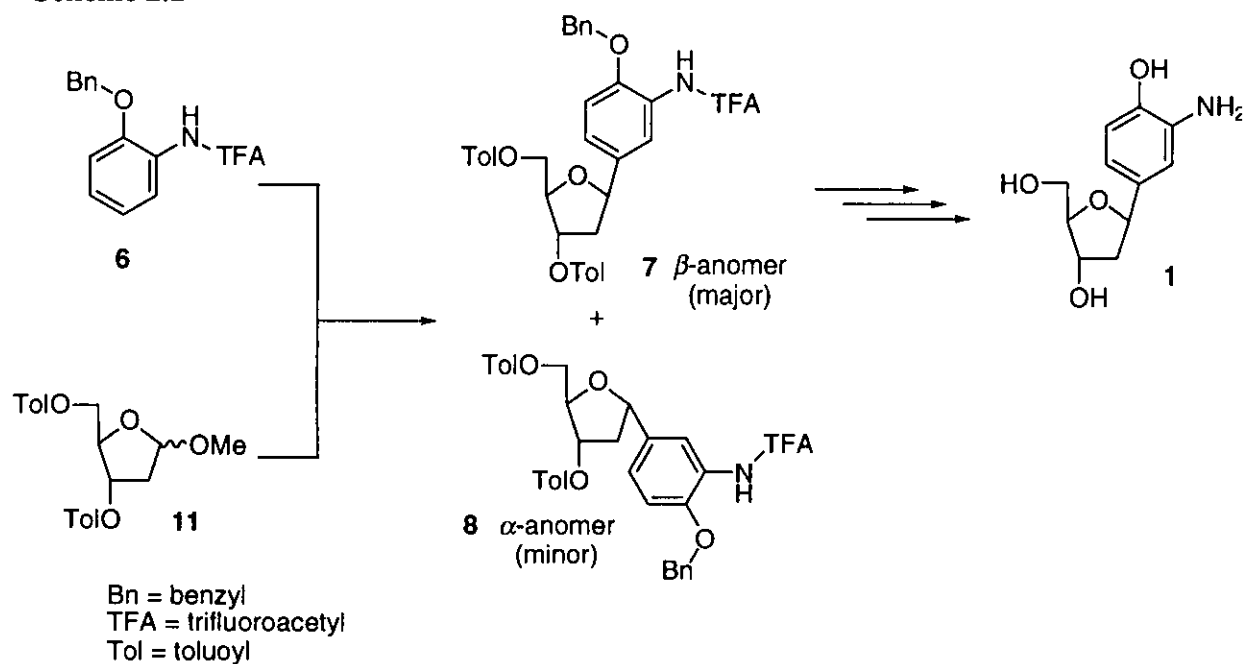
## 2-4 人工ヌクレオシドの立体構造

前章「2-3. 人工ヌクレオシドの合成」で得られた 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドのアノマー部位の立体配置は、X線結晶解析と  $^1\text{H}$  NMR における NOE 差スペクトル実験によって決定した。これらの結果について、次章「2-4-1. 人工ヌクレオシドの X 線結晶解析」と「2-4-2. 人工ヌクレオシドの溶液内構造」において説明する。

## 2-4-1 人工ヌクレオシドのX線結晶解析

核酸塩基として 2-アミノフェノール型  $\beta$ -C-ヌクレオシド **1** に対する合成経路を Scheme 2.2 に示す [14]。

Scheme 2.2



ヌクレオシド **1** の炭素骨格を構築するために、フリーデル-クラフツ反応を用いた。この反応では  $\beta$ -C-ヌクレオシド **7** を高選択的に得ることができた ( $\alpha$ -**8** :  $\beta$ -**7** = 約 1:7)。アノマー異性体 **7** の  $\beta$  立体配置は X 線結晶構造により

明確に確認された (Figure 2.7)。また、2-アミノフェノールの 4 位でデオキシリボースと結合していることも明らかとなった。7 の X 線結晶構造から得られた  $1'\text{-H} - 2'\alpha\text{-H}$  と  $1'\text{-H} - 2'\beta\text{-H}$  に対する二面角はそれぞれ  $36.7^\circ$  と  $158.9^\circ$  であった。 $^1\text{H}$  NMR 測定に関して、ヌクレオシドに対して経験的に調整された Karplus 相関関係 [18] を適用すると、カップリング定数はそれぞれ 5.9 Hz と 9.6 Hz であり、このことは、次に述べる溶液中におけるリボースの環の立体配座と結晶における立体配座が、非常に類似していることを示している。

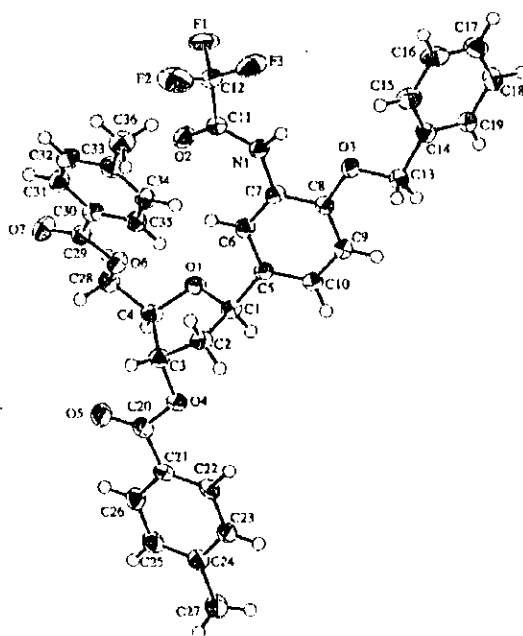


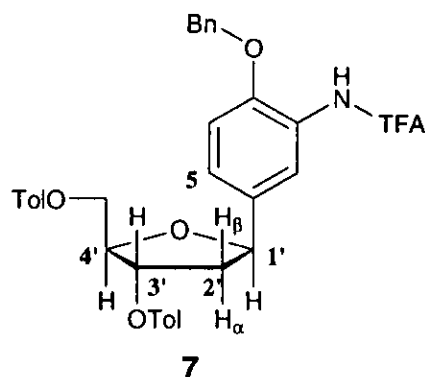
Figure 2.7  $\beta$ -アノマー 7 の X 線結晶構造  
フェノール性水酸基のパラ位に C-C 結合が生成

#### 2-4-2 人工ヌクレオシドの溶液内構造

アノマー異性体 7 が  $\beta$  立体配置であることの決定は、 $^1\text{H}$  NMR における NOE 差スペクトル法を用いた実験と、Kool ら [18c] によって示されたように  $1'$ -プロトンと  $2'$ -プロトンとの間のカップリング定数によっても確認された。

$\beta$ -アノマー異性体において、 $2'\alpha$ -プロトンは、 $1'$ -プロトンと  $3'$ -プロトンのうち、 $1'$ -プロトンのみに近い (Scheme 2.3)。 $1'$ -プロトンと  $2'\alpha$ -プロトンを別々に照射すると、 $2'\alpha$ -プロトンと  $1'$ -プロトンにおいて、それぞれ 4.2% と 10% の

Scheme 2.3



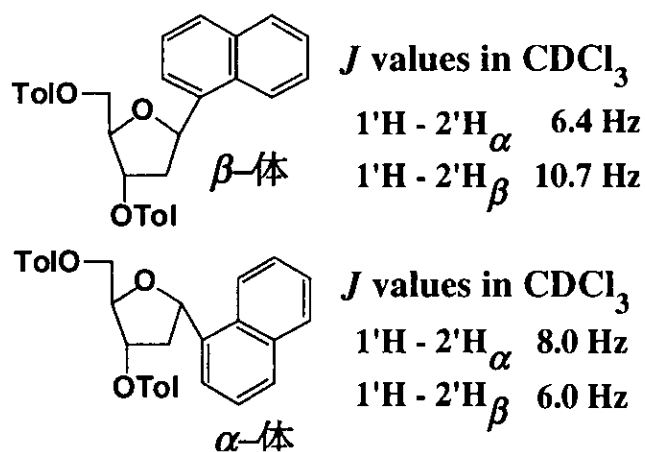
スペクトル線強度の増加が観測された (Table 2.1)。また、1'-プロトンと 4'-プロトンとの間にも相関が見られた。

**Table 2.1** CDCl<sub>3</sub> 中における、芳香族ヌクレオシド **7** の  $\beta$ -アノマー異性体に対するプロトン NOE 差スペクトルデータ

	Irradiation at:					
	H1'	H2' $\alpha$	H2' $\beta$	H3'	H4'	H5
NOE observed:						
H1'	..	<b>10</b>	0	0	<b>2.0</b>	4.1
H2' $\alpha$	<b>4.2</b>	..	..	0	0	0
H2' $\beta$	0	..	..	3.0	0	2.0
H3'	0	0	8.0	..	3.2	0
H4'	<b>2.5</b>	0	0	3.8	..	0
H5	5.1	0	2.9	0	0	..

アノマー異性体 **7** の 1'-プロトンの共鳴シグナルは、ほとんど等間隔の doublet of doublets ( $J = 10.5, 5.0$  Hz) として現れる。この 1'-2' カップリング定数の傾向は、関連する  $\beta$ -C-ヌクレオシドについて報告されたカップリング定数の傾向と一致する (Figure 2.8) [18c, 19, 20, 21]。

これらの結果は芳香族ヌクレオシド **7** が  $\beta$ -アノマー異性体であることを明確に示している。



**Figure 2.8** C-グリコシドのアノマー異性と 1'-2' カップリング定数の傾向 [18c]

### 2-3 実験の部

**General Information.** Unless otherwise noted, all reactions were carried out in oven dried glassware under an argon atmosphere with commercial dehydrated solvents (Wako). 1-*O*-Methyl-3,5-*O*-ditoluoyl-2-deoxy-D-ribofuranose was prepared according to previously reported procedures [22]. 2-Aminophenol and trifluoroacetic anhydride were obtained from TCI. *i*-Pr<sub>2</sub>EtN was dried over KOH. Dowex 50W x 8 (pyridinium) was prepared from its H form. All the other reagents were purchased from Wako and were used without further purification. Column chromatography was performed using Wakogel C-300 silica gel (Wako). NH-DM1020SG silica gel was obtained from Fuji Silysia Chemical LTD. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a JEOL Lambda 500, a JEOL Alpha 500 or a Bruker DRX500 spectrometer (500 MHz for <sup>1</sup>H; 125.77 MHz for <sup>13</sup>C). The spectra are referenced to tetramethylsilane or 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub>-acid sodium salt. Chemical shifts (δ) are reported in ppm; multiplicities are indicated by: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublets of doublets), q (quartet), m (multiplet), and br (broad). Coupling constants, *J*, are reported in Hz. Electron ionization mass spectra were obtained with a Shimadzu QP1000EX spectrometer (low resolution, 70 eV), and fast atom bombardment mass spectroscopies were carried out at the Research Center for Molecular Materials, the Institute for Molecular Science. Elemental analyses were performed on a Yanaco CHN CORDER MT5 at the Elemental Analysis Laboratory, Department of Chemistry, Graduate School of Science, the University of Tokyo. Electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) mass spectra were recorded on a Micromass LCT or a PE SCIEX API-300 spectrosmeter. Melting points were determined with a Yanaco MP-500D instrument.

**2-Trifluoroacetamidophenol (5).** To a solution of 2-aminophenol (25.3 g, 232

mmol) and dry pyridine (20.0 mL, 247 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 mL) was added a solution of trifluoroacetic anhydride (32 mL, 232 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (130 mL) over 35 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 140 min at 0 °C. After the solvent was evaporated, the residue was dissolved in a 1% HCl aqueous solution (360 mL), which was extracted with AcOEt three times. The combined organic layer was washed with brine. The aqueous layer was further extracted with two portions of AcOEt. The combined organic phase was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , followed by concentration. The crude solid was recrystallized from toluene to give 47.1 g (99%) of **5** as colorless thin plates, which were sublimed at 80 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  6.83 (ddd, 1H,  $J_{4,5} = 7.6$  Hz,  $J_{3,4} = 7.6$  Hz,  $J_{4,6} = 1.4$  Hz, H-4), 6.94 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8.1$  Hz,  $J_{4,6} = 1.2$  Hz, H-6), 7.14 (ddd, 1H,  $J_{5,6} = 8.1$  Hz,  $J_{4,5} = 7.5$  Hz,  $J_{3,5} = 1.6$  Hz, H-5), 7.32 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 7.8$  Hz,  $J_{3,5} = 1.5$  Hz, H-3), 9.97 (br, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable), 10.42 (br, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  116.0 (q,  $J_{\text{C-F}} = 288$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 116.0, 118.9, 122.1, 126.3, 127.9, 151.2, 154.9 (q,  $J_{\text{C-F}}^2 = 36.2$  Hz, CO). LRMS (70 eV, EI)  $m/z$  (relative intensity, proposed ion): 205 (71.4,  $\text{M}^+$ ), 136 (100.0,  $\text{M}^+ - \text{CF}_3$ ), 108 (50.4,  $\text{M}^+ - \text{CF}_3\text{CO}$ ).

**O-Benzyl-2-trifluoroacetamidophenol (6).** To a solution of 2-trifluoroacetamidophenol **5** (47.7 g, 233 mmol) and *i*- $\text{Pr}_2\text{EtN}$  (60 mL, 350 mmol) in dry 1,2-dichloroethane (470 mL) was added benzyl chloride (40 mL, 348 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 30 min at 55 °C, and then heated at reflux for 15.5 h. After cooling to room temperature, *i*- $\text{Pr}_2\text{EtN}$  (60 mL) and benzyl chloride (40 mL) were added to the solution. After refluxing for 4 h, the solution was poured into a 2% HCl aqueous solution (1.23 L). The organic layer was separated, and then the aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layer was washed with brine, and then the aqueous layer separated was further extracted with two portions of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic extracts were dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was concentrated. The residue was purified by silica gel column

chromatography (9 $\phi$  x 24 cm) with AcOEt-*n*-hexane (3 : 97), followed by recrystallization to afford 38.8 g (56%) of **6** as colorless needles, mp 76.0-76.5 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5.17 (s, 2H), 7.01 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  = 8.3 Hz,  $J_{4,6}$  = 1.5 Hz, H-6), 7.03 (ddd, 1H,  $J_{3,4}$  = 7.8 Hz,  $J_{4,5}$  = 7.8 Hz,  $J_{4,6}$  = 1.5 Hz, H-4), 7.15 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  = 7.9 Hz,  $J_{5,6}$  = 7.9 Hz,  $J_{3,5}$  = 1.7 Hz, H-5), 7.36-7.43 (m, 5H), 8.32 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  = 8.3 Hz,  $J_{3,5}$  = 1.8 Hz, H-3), 8.64 (br, 1H, D<sub>2</sub>O exchangeable). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  71.3, 112.2, 115.7 (q,  $J_{C,F}$  = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 120.3, 121.7, 125.5, 126.0, 127.3, 128.5, 128.9, 135.8, 147.5, 154.3 (q,  $J^2_{C,F}$  = 37.2 Hz, CO). LRMS (70 eV, EI)  $m/z$  (relative intensity, proposed ion): 295 (100.0, M<sup>+</sup>), 204 (9.7, M<sup>+</sup> - CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 135 (48.4, M<sup>+</sup> - CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> - CF<sub>3</sub>). Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>: C, 61.02; H, 4.10; N, 4.74. Found: C, 61.01; H, 4.18; N, 4.77.

***O*-Benzyl-2-trifluoroacetamide-4-(1,2-dideoxy-3,5-di-*O*-toluoyl- $\beta$ -D-ribofuranos-1-yl)-phenol (7), *O*-Benzyl-2-trifluoroacetamide-4-(1,2-dideoxy-3,5-di-*O*-toluoyl- $\alpha$ -D-ribofuranos-1-yl)-phenol (8).** To a solution of 1-*O*-methyl-3,5-di-*O*-toluoyl-2-deoxy-D-ribofuranose (15.0 g, 39.0 mmol) and *O*-benzyl-2-trifluoroacetamidophenol **6** (11.5 g, 38.9 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL) was added a solution of SnCl<sub>4</sub> (9.0 mL, 77.0 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (97 mL) over 14 min at 0 °C, and the mixture was stirred for 23 min at 0 °C. The reaction mixture was quenched by addition of saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution (300 mL) and the resulting precipitates were removed through a thin pad of Celite. The organic filtrate was washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and then concentrated. The residue was chromatographed (9.0 $\phi$  x 30 cm) on silica gel with AcOEt-*n*-hexane (2 : 8). The resulting solid was recrystallized from MeOH to give 1.99 g (7.9%) of **7** as colorless solid. The resulting solid was recrystallized from CH<sub>3</sub>CN to give 0.29 g (1.2%) of **8** as colorless solid.  $\beta$ -anomer **7**: mp 127.5-128.0 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2.21 (ddd, 1H,  $J_{2,2'}$  = 13.8 Hz,  $J_{1,2'}$  = 11.0 Hz,  $J_{2,3'}$  = 6.3 Hz, H-2'), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.53 (dd, 1H,  $J_{2,2'}$  = 13.9 Hz,  $J_{1,2'}$  = 5.1 Hz,  $J_{2,3'}$  = 0.6 Hz, H-2''), 4.51 (ddd, 1H,  $J_{4,5'}$  = 4.0 Hz,  $J_{4,5''}$  = 4.0 Hz,  $J_{3,4'}$  = 2.0 Hz, H-4'), 4.63 (dd, 1H,  $J_{5,5'}$  = 11.8 Hz,  $J_{4,5'}$  = 3.8 Hz,



H-5'), 4.66 (dd, 1H,  $J_{5,5'} = 12.0$  Hz,  $J_{4,5'} = 4.0$  Hz, H-5''), 5.15 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 5.22 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 10.5$  Hz,  $J_{1,2'} = 5.0$  Hz, H-1'), 5.59 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 5.3$  Hz,  $J_{3,4} = 1.3$  Hz, H-3'), 6.69 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8.5$  Hz, H-6), 7.21 [d, 2H,  $J_{o,m} = 7.5$  Hz, Tol(*m*)], 7.24-7.29 (m, H-5, Tol(*m*), overlapped with residual CHCl<sub>3</sub>), 7.35-7.43 (m, 5H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7.94 [d, 2H,  $J_{o,m} = 8.5$  Hz, Tol(*o*)], 7.98 [d, 2H,  $J_{o,m} = 8.0$  Hz, Tol(*o*)], 8.36 (d, 1H,  $J_{3,5} = 2.0$  Hz, H-3), 8.61 (br, 1H, D<sub>2</sub>O exchangeable). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 21.7, 21.7, 41.6, 65.0, 71.4, 77.1, 80.3, 83.0, 112.4, 115.6 (q,  $J_{C-F} = 288$  Hz, CF<sub>3</sub>), 118.4, 123.2, 125.3, 126.9, 127.1, 127.3, 128.6, 128.9, 129.1, 129.2, 129.8, 134.1, 135.7, 143.7, 144.1, 147.1, 154.3 (q,  $J_{C-F}^2 = 37.2$  Hz, CF<sub>3</sub>CO), 166.1, 166.4. FAB mass (positive): *m/z*, proposed ion: 648, [M+H]<sup>+</sup>. Anal. Calcd for C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub>N: C, 66.76; H, 4.98; N, 2.16. Found: C, 66.65; H, 5.08; N, 2.22. α-anomer **8**: mp 127.0-128.5 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.28 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 13.7$  Hz,  $J_{1,2} = 6.1$  Hz,  $J_{2,3} = 4.3$  Hz, H-2'), 2.39 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.94 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 13.7$  Hz,  $J_{1,2} = 7.2$  Hz,  $J_{2,3} = 7.2$  Hz, H-2''), 4.54 (ddd, 1H,  $J_{5,5'} = 11.8$  Hz,  $J_{4,5'} = 4.5$  Hz, H-5'), 4.58 (ddd, 1H,  $J_{5,5'} = 11.8$  Hz,  $J_{4,5'} = 4.9$  Hz, H-5''), 4.70 (br, 1H, H-4'), 5.16 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 5.31 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 6.9$  Hz,  $J_{1,2'} = 6.9$  Hz, H-1'), 5.59 (ddd, 1H,  $J_{2,3} = 6.5$  Hz,  $J_{2,3'} = 3.7$  Hz,  $J_{3,4} = 3.7$  Hz, H-3'), 6.98 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8.5$  Hz, H-6), 7.17 [d, 2H,  $J_{o,m} = 8.1$  Hz, Tol(*m*)], 7.23-7.24 [m, 3H, Tol(*m*) and H-5], 7.35-7.42 (m, 5H), 7.79 [d, 2H,  $J_{o,m} = 8.1$  Hz, Tol(*o*)], 7.96 [d, 2H,  $J_{o,m} = 8.1$  Hz, Tol(*o*)], 8.42 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, H-3), 8.62 (br, 1H, D<sub>2</sub>O exchangeable). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 21.7 (CH<sub>3</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>), 40.5 (C-2'), 64.6 (C-5'), 71.5 (OCH<sub>2</sub>), 76.4 (C-3'), 80.0 (C-1'), 82.3 (C-4'), 112.1 (C-6), 115.7 (q,  $J_{C-F} = 289$  Hz, CF<sub>3</sub>), 117.9 (H-3), 123.4 (H-5), 125.6, 126.9, 127.2, 127.3, 128.6, 128.9, 129.0, 129.2, 129.8, 135.8, 136.0, 143.8, 143.9, 146.9, 154.3 (q,  $J_{C-F}^2 = 37.4$  Hz, CF<sub>3</sub>CO), 166.1 (CO), 166.4 (CO). ESI mass (CH<sub>3</sub>CN, positive): *m/z*, proposed ion: 670.2, [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. Calcd for C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>7</sub>: C, 66.76; H, 4.98; N, 2.16. Found: C, 66.51; H, 5.16; N, 2.14.

***O*-Benzyl-2-trifluoroacetamide-4-(1,2-dideoxy-β-D-ribofuranos-1-yl)-phenol**

(**9**). To a solution of **7** (1.80 g, 2.78 mmol) in dry MeOH (41 mL) was added in one

portion a solution of 28% NaOMe in MeOH (1.35 mL, 7.00 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 3.5 h at room temperature. After adding Dowex 50W x 8 (pyridinium) (10.5 g), the mixture was further stirred for 5 min. After removing the resin, the filtrates were combined, and then concentrated. The crude oil was purified by silica gel column chromatography (4φ x 9.2 cm) with MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 : 95), followed by recrystallization from toluene to afford 1.05 g (92%) of **9** as colorless solid, mp 126.5 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.76 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 12.6$  Hz,  $J_{1',2'} = 10.6$  Hz,  $J_{2,3'} = 5.7$  Hz, H-2'), 2.04 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 12.5$  Hz,  $J_{1',2'} = 5.4$  Hz,  $J_{2,3'} = 0.6$  Hz, H-2''), 3.42 (ddd, 1H,  $J_{5',5''} = 11.3$  Hz,  $J_{4',5'} = 5.7$  Hz,  $J_{5',5'-OH} = 5.7$  Hz, H-5'), 3.48 (ddd, 1H,  $J_{5',5''} = 11.4$  Hz,  $J_{4',5'} = 5.4$  Hz,  $J_{5',5'-OH} = 5.4$  Hz, H-5''), 3.76 (ddd, 1H,  $J_{4',5'} = 5.2$  Hz,  $J_{4',5''} = 5.2$  Hz,  $J_{3',4'} = 2.0$  Hz, H-4'), 4.17-4.18 (m, 1H, H-3'), 4.74 (dd, 1H,  $J_{5',5'-OH} = 5.6$ ,  $J_{5',5''-OH} = 5.6$  Hz, 5'-OH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 4.95 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 10.4$  Hz,  $J_{1',2''} = 5.3$  Hz, H-1'), 5.04 (d, 1H,  $J_{3',3'-OH} = 3.9$  Hz, 3'-OH, D<sub>2</sub>O exchangeable), 5.15 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 7.12 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8.6$  Hz, H-6), 7.28 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8.6$  Hz,  $J_{3,5} = 2.0$  Hz, H-5), 7.32 [d, 1H,  $J_{o,p} = 7.3$  Hz, Ph(*p*)], 7.35 (d, 1H,  $J_{3,5} = 2.0$  Hz, H-3), 7.37 [d, 2H,  $J_{o,m} = 7.5$  Hz,  $J_{m,p} = 7.5$  Hz, Ph(*m*)], 7.44 [d, 2H,  $J_{m,p} = 7.4$  Hz, Ph(*p*)], 10.74 (br, 1H, D<sub>2</sub>O exchangeable). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 43.4 (C-2'), 62.4 (C-5'), 69.7 (OCH<sub>2</sub>), 72.3 (C-3'), 78.4 (C-1'), 87.7 (C-4'), 113.2 (H-6), 116.0 (q,  $J_{C-F} = 289$  Hz, CF<sub>3</sub>), 123.4, 124.6, 126.2, 126.9, 127.6, 128.2, 135.0, 136.9, 151.6, 155.0 (q,  $J_{C-F}^2 = 35.2$  Hz, CO) .

ESI mass (MeOH, positive): *m/z*, proposed ion: 434.1, [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>: C, 58.39; H, 4.90; N, 3.40. Found: C, 58.65; H, 5.16; N, 3.49.

***O*-Benzyl-2-amino-4-(1,2-dideoxy-β-D-ribofuranos-1-yl)-phenol (10).** A solution of **9** (399 mg, 0.970 mmol) in 40% (w/v) MeNH<sub>2</sub>-MeOH (2.0 mL, 0.80 g, 25.8 mmol) was stirred for 9 h at room temperature. The solvent was evaporated in vacuo to give pale yellow powder, which was then chromatographed on silica gel (17φ x 16 cm) with MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 : 92) to afford 306 mg (100%) of **10** as colorless solid, mp 121.5-123.5 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.72 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 12.6$  Hz,  $J_{1',2'} = 10.6$  Hz,

## 第 2 章

$J_{2,3} = 5.6$  Hz, H-2'); 1.95 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 12.9$  Hz,  $J_{1,2'} = 5.4$  Hz,  $J_{2,3} = 1.4$  Hz, H-2"), 3.46 (ddd, 1H,  $J_{5,5'} = 11.5$  Hz,  $J_{4,5'} = 5.3$  Hz,  $J_{5,5'-OH} = 5.3$  Hz, H-5"), 3.71 (ddd, 1H,  $J = 6.0$  Hz,  $J_{4,5'} = 5.0$  Hz,  $J = 2.0$  Hz, H-4'), 4.13 (m, 1H, H-3'), 4.68 (br, 3H, -NH<sub>2</sub> and 5'-OH), 4.80 (dd, 1H,  $J_{1,2'} = 10.5$  Hz,  $J_{1,2'} = 5.5$  Hz, H-1'), 4.97 (d, 1H,  $J_{3,3'-OH} = 2.5$  Hz, 3'-OH), 5.07 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 6.46 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8.0$  Hz,  $J_{3,5} = 2.0$  Hz, H-5), 6.65 (d, 1H,  $J_{3,5} = 2.2$  Hz, H-3), 6.78 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8.5$  Hz, H-6), 7.31 [tt, 1H,  $J_{m,p} = 7.3$  Hz,  $J_{o,p} = 2.0$  Hz, Ph(*p*)], 7.36-7.39 [m, 2H, Ph(*m*)], 7.47 [d, 2H,  $J_{o,m} = 7.0$  Hz, Ph(*o*)]. <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 43.2 (C-2'), 62.6 (C-5'), 69.4 (OCH<sub>2</sub>), 72.4 (C-3'), 79.1 (C-1'), 87.4 (C-4'), 111.8 (H-6), 112.0 (H-3), 113.9 (H-5), 127.3 [Ph(*m*)], 127.5 [Ph(*p*)], 128.3 [Ph(*o*)], 135.1, 137.5, 144.5. ESI mass (MeOH, positive): *m/z*, proposed ion: 338.1, [M+Na]<sup>+</sup>.

**2-Amino-4-(1,2-dideoxy-β-D-ribofuranos-1-yl)-phenol (1).** To a solution of **10** (284 mg, 0.90 mmol) in dry MeOH (50 mL) was added a suspension of 10% Pd-C (55.0 mg, 51.7 μmol, 5.7% eq.) in dry MeOH (42 mL). The mixture was stirred for 43 min at room temperature under a hydrogen atmosphere. The Pd-C was filtered off and washed with dry MeOH, then dry CH<sub>3</sub>CN repeatedly. The filtrate was evaporated *in vacuo* to give yellow syrup, which was then chromatographed on NH-DM1020SG silica gel (30φ x 11.5 cm) with MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 9) to give 115 mg (57%) of **1** as yellow powder. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O): δ 2.09 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 13.7$  Hz,  $J_{1,2'} = 10.8$  Hz,  $J_{2,3} = 5.9$  Hz, H-2'), 2.20 (ddd, 1H,  $J_{2,2'} = 13.6$  Hz,  $J_{1,2'} = 5.4$  Hz,  $J_{2,3} = 1.4$  Hz, H-2"), 3.69 (dd, 1H,  $J_{5,5'} = 12.1$  Hz,  $J_{4,5'} = 5.8$  Hz, H-5'), 3.73 (dd, 1H,  $J_{5,5'} = 12.1$  Hz,  $J_{4,5'} = 4.8$  Hz, H-5"), 3.99 (ddd, 1H,  $J_{4,5'} = 5.2$  Hz,  $J_{4,5'} = 5.2$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, H-4'), 4.39-4.40 (m, 1H), 5.05 (dd, 1H,  $J_{1,2'} = 10.7$  Hz,  $J_{1,2'} = 5.5$  Hz, H-1'), 6.80 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8.2$  Hz,  $J_{3,5} = 2.0$  Hz, H-5), 6.85 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8.1$  Hz, H-6), 6.91 (d, 1H,  $J_{3,5} = 2.0$  Hz, H-3), mp 119.5-121.0 °C. ESI mass (MeOH, positive): *m/z*, proposed ion: 226.2, [M+H]<sup>+</sup>.

**X-ray Structure Analysis.** The single crystal of compound **7** was obtained from EtOH. The crystallographic data are summarized in Table 2.2. The structural determination was made on a Rigaku RAXIS-RAPID Imaging Plate diffractometer with graphite monochromated Cu-K $\alpha$  radiation at  $-130.0 \pm 1$  °C to a maximum  $2\theta$  value of  $136.5^\circ$ . All calculations were performed using the teXsan [23] crystallographic software package of Molecular Structure Corporation. The structure was solved by direct methods (SIR97) [24] and expanded using Fourier techniques (DIRDIF94) [25]. The non-hydrogen atoms were refined anisotropically.

**Table 2.2 Crystallographic Data for 7.**

Empirical formula	C <sub>36</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>7</sub> F <sub>3</sub>
Formula weight	647.65
Crystal dimensions	0.30 × 0.30 × 0.10 mm
Crystal system	orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (#19)
Unit cell dimensions	<i>a</i> = 16.562(1) Å <i>b</i> = 16.933(1) Å <i>c</i> = 11.205(1) Å
Volume	<i>V</i> = 3142.2(4) Å <sup>3</sup>
<i>Z</i>	4
$\mu$ (CuK $\alpha$ )	8.99 cm <sup>-1</sup>
<i>D<sub>c</sub></i>	1.369 g/cm <sup>3</sup>
Min. and max. transmission	0.72 and 0.91
$2\theta_{max}$	136.5°
<i>R</i> , <i>R<sub>w</sub></i> <sup>a</sup>	0.037, 0.043
No. of Reflections Measured	Total: 35198 Unique: 3205 ( <i>R<sub>int</sub></i> = 0.050)

## 第 2 章

No. Observations ( $I > 2.00 \sigma(I)$ )	2628
No. Variables	425
Goodness of Fit Indicator	1.03
Maximum peak in Final Diff. Map	0.21 e/Å <sup>3</sup>
Minimum peak in Final Diff. Map	-0.18 e/Å <sup>3</sup>

---

<sup>a</sup> Relevant expressions are as follows, where  $F_o$  and  $F_c$  represent respectively the observed and calculated structure factor amplitudes. Function minimized was  $w(|F_o| - |F_c|)^2$ , where  $w = 1/\sigma^2(F_o)$ .  $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ .  $R_w = [(\sum w(|F_o| - |F_c|)^2) / \sum w F_o]^{1/2}$ .

**Table 2.3 Atomic Coordinates and Equivalent Isotropic Temperature Factors.**

atom	x	y	z	B(eq)
F(1)	-0.5752(1)	-0.2372(2)	0.3103(2)	4.87(6)
F(2)	-0.5380(2)	-0.3566(2)	0.3283(3)	7.14(8)
F(3)	-0.4709(1)	-0.2640(2)	0.4119(2)	5.11(6)
O(1)	-0.3469(1)	-0.2779(1)	-0.2432(2)	2.46(4)
O(2)	-0.4965(1)	-0.2886(2)	0.1044(2)	3.18(5)
O(3)	-0.2584(1)	-0.1812(1)	0.2849(2)	2.92(5)
O(4)	-0.2334(1)	-0.3770(1)	-0.4149(2)	2.59(5)
O(5)	-0.3143(2)	-0.4332(2)	-0.5518(2)	3.79(6)
O(6)	-0.4363(1)	-0.4118(1)	-0.1769(2)	2.80(5)
O(7)	-0.5601(1)	-0.4635(1)	-0.2019(2)	3.35(5)
N(1)	-0.3852(2)	-0.2557(2)	0.2158(2)	2.52(6)
C(1)	-0.2672(2)	-0.2893(2)	-0.1921(3)	2.38(6)
C(2)	-0.2515(2)	-0.3774(2)	-0.2047(3)	2.54(6)
C(3)	-0.2922(2)	-0.3971(2)	-0.3229(3)	2.48(6)
C(4)	-0.3640(2)	-0.3404(2)	-0.3266(3)	2.45(6)
C(5)	-0.2655(2)	-0.2568(2)	-0.0669(3)	2.24(6)
C(6)	-0.3299(2)	-0.2695(2)	0.0107(3)	2.37(6)
C(7)	-0.3242(2)	-0.2441(2)	0.1286(2)	2.26(6)
C(8)	-0.2544(2)	-0.2056(2)	0.1681(3)	2.45(6)
C(9)	-0.1906(2)	-0.1943(2)	0.0906(3)	2.90(7)
C(10)	-0.1965(2)	-0.2193(2)	-0.0272(3)	2.83(7)
C(11)	-0.4629(2)	-0.2766(2)	0.1971(3)	2.50(6)
C(12)	-0.5117(2)	-0.2847(2)	0.3133(3)	3.18(7)
C(13)	-0.1842(2)	-0.1572(2)	0.3421(3)	2.84(7)
C(14)	-0.2040(2)	-0.1128(2)	0.4532(3)	2.41(6)
C(15)	-0.2469(2)	-0.1468(2)	0.5476(3)	3.16(7)
C(16)	-0.2641(2)	-0.1041(3)	0.6490(3)	3.68(8)
C(17)	-0.2394(2)	-0.0270(2)	0.6577(3)	3.74(8)
C(18)	-0.1970(2)	0.0080(2)	0.5656(4)	3.80(8)

## 第 2 章

C(19)	-0.1797(2)	-0.0347(2)	0.4637(3)	2.78(7)
C(20)	-0.2516(2)	-0.4008(2)	-0.5269(3)	2.67(7)
C(21)	-0.1853(2)	-0.3835(2)	-0.6111(3)	2.34(6)
C(22)	-0.1095(2)	-0.3599(2)	-0.5731(3)	2.52(7)
C(23)	-0.0479(2)	-0.3476(2)	-0.6551(3)	2.55(6)
C(24)	-0.0612(2)	-0.3595(2)	-0.7767(3)	2.75(7)
C(25)	-0.1377(2)	-0.3817(2)	-0.8140(3)	3.11(7)
C(26)	-0.1995(2)	-0.3935(2)	-0.7339(3)	2.74(7)
C(27)	0.0067(2)	-0.3489(3)	-0.8640(3)	3.91(9)
C(28)	-0.4436(2)	-0.3787(2)	-0.2953(3)	2.83(7)
C(29)	-0.5021(2)	-0.4521(2)	-0.1391(3)	2.47(7)
C(30)	-0.4957(2)	-0.4778(2)	-0.0128(3)	2.44(6)
C(31)	-0.5608(2)	-0.5173(2)	0.0375(3)	2.79(7)
C(32)	-0.5573(2)	-0.5429(2)	0.1544(3)	3.02(7)
C(33)	-0.4893(2)	-0.5299(2)	0.2250(3)	2.93(7)
C(34)	-0.4242(2)	-0.4903(2)	0.1727(3)	2.60(7)
C(35)	-0.4265(2)	-0.4650(2)	0.0554(3)	2.52(6)
C(36)	-0.4859(2)	-0.5560(2)	0.3520(3)	3.59(8)

---

**Table 2.4 Bond Lengths (Å) of 7.**

atom	atom	distance	atom	atom	distance
F(1)	C(12)	1.324(4)	C(9)	C(10)	1.390(5)
F(2)	C(12)	1.304(4)	C(11)	C(12)	1.539(4)
F(3)	C(12)	1.341(4)	C(13)	C(14)	1.491(4)
O(1)	C(1)	1.452(4)	C(14)	C(15)	1.398(5)
O(1)	C(4)	1.440(4)	C(14)	C(19)	1.387(5)
O(2)	C(11)	1.196(4)	C(15)	C(16)	1.377(5)
O(3)	C(8)	1.374(4)	C(16)	C(17)	1.372(6)
O(3)	C(13)	1.444(4)	C(17)	C(18)	1.381(5)
O(4)	C(3)	1.458(4)	C(18)	C(19)	1.381(5)
O(4)	C(20)	1.351(4)	C(20)	C(21)	1.476(5)
O(5)	C(20)	1.207(4)	C(21)	C(22)	1.385(5)
O(6)	C(28)	1.446(4)	C(21)	C(26)	1.406(4)
O(6)	C(29)	1.353(4)	C(22)	C(23)	1.388(4)
O(7)	C(29)	1.208(4)	C(23)	C(24)	1.396(4)
N(1)	C(7)	1.420(4)	C(24)	C(25)	1.386(5)
N(1)	C(11)	1.350(4)	C(24)	C(27)	1.501(5)
C(1)	C(2)	1.521(4)	C(25)	C(26)	1.376(5)
C(1)	C(5)	1.507(4)	C(29)	C(30)	1.484(4)
C(2)	C(3)	1.523(4)	C(30)	C(31)	1.388(5)
C(3)	C(4)	1.528(4)	C(30)	C(35)	1.393(4)
C(4)	C(28)	1.510(5)	C(31)	C(32)	1.381(5)
C(5)	C(6)	1.392(4)	C(32)	C(33)	1.393(5)
C(5)	C(10)	1.381(5)	C(33)	C(34)	1.398(5)
C(6)	C(7)	1.392(4)	C(33)	C(36)	1.491(5)
C(7)	C(8)	1.399(4)	C(34)	C(35)	1.383(4)
C(8)	C(9)	1.381(5)			

Distances are in angstroms. Estimated standard deviations in the least significant figure are given in parentheses.



Table 2.5 Bond Angles (°) of 7.

atom	atom	atom	angle	atom	atom	atom	angle
C(1)	O(1)	C(4)	109.7(2)	C(5)	C(10)	C(9)	120.3(3)
C(8)	O(3)	C(13)	117.8(3)	O(2)	C(11)	N(1)	128.6(3)
C(3)	O(4)	C(20)	116.0(3)	O(2)	C(11)	C(12)	118.3(3)
C(28)	O(6)	C(29)	114.6(3)	N(1)	C(11)	C(12)	113.1(3)
C(7)	N(1)	C(11)	127.4(3)	F(1)	C(12)	F(2)	107.7(3)
O(1)	C(1)	C(2)	104.4(3)	F(1)	C(12)	F(3)	105.3(3)
O(1)	C(1)	C(5)	109.6(2)	F(1)	C(12)	C(11)	110.0(3)
C(2)	C(1)	C(5)	116.2(3)	F(2)	C(12)	F(3)	107.8(3)
C(1)	C(2)	C(3)	102.7(3)	F(2)	C(12)	C(11)	111.6(3)
O(4)	C(3)	C(2)	105.6(2)	F(3)	C(12)	C(11)	114.1(3)
O(4)	C(3)	C(4)	110.8(2)	O(3)	C(13)	C(14)	109.0(3)
C(2)	C(3)	C(4)	103.4(2)	C(13)	C(14)	C(15)	122.4(3)
O(1)	C(4)	C(3)	106.9(2)	C(13)	C(14)	C(19)	119.2(3)
O(1)	C(4)	C(28)	109.7(2)	C(15)	C(14)	C(19)	118.4(3)
C(3)	C(4)	C(28)	113.8(3)	C(14)	C(15)	C(16)	120.9(3)
C(1)	C(5)	C(6)	120.8(3)	C(15)	C(16)	C(17)	119.8(3)
C(1)	C(5)	C(10)	118.9(3)	C(16)	C(17)	C(18)	120.4(3)
C(6)	C(5)	C(10)	120.2(3)	C(17)	C(18)	C(19)	119.9(3)
C(5)	C(6)	C(7)	119.6(3)	C(14)	C(19)	C(18)	120.6(3)
N(1)	C(7)	C(6)	124.2(3)	O(4)	C(20)	O(5)	122.7(3)
N(1)	C(7)	C(8)	115.8(3)	O(4)	C(20)	C(21)	111.7(3)
C(6)	C(7)	C(8)	120.0(3)	O(5)	C(20)	C(21)	125.6(3)
O(3)	C(8)	C(7)	113.7(3)	C(20)	C(21)	C(22)	122.3(3)
O(3)	C(8)	C(9)	126.5(3)	C(20)	C(21)	C(26)	118.5(3)
C(7)	C(8)	C(9)	119.8(3)	C(22)	C(21)	C(26)	119.1(3)
C(8)	C(9)	C(10)	120.1(3)	C(21)	C(22)	C(23)	120.5(3)
C(22)	C(23)	C(24)	120.5(3)	O(6)	C(29)	C(30)	112.9(3)
C(23)	C(24)	C(25)	118.5(3)	O(7)	C(29)	C(30)	124.4(3)
C(23)	C(24)	C(27)	120.0(3)	C(29)	C(30)	C(31)	118.2(3)
C(25)	C(24)	C(27)	121.4(3)	C(29)	C(30)	C(35)	122.4(3)
C(24)	C(25)	C(26)	121.5(3)	C(31)	C(30)	C(35)	119.4(3)
C(21)	C(26)	C(25)	119.8(3)	C(30)	C(31)	C(32)	120.2(3)
O(6)	C(28)	C(4)	107.8(2)	C(31)	C(32)	C(33)	121.6(3)
O(6)	C(29)	O(7)	122.6(3)	C(32)	C(33)	C(34)	117.4(3)

## 第 2 章

C(32)	C(33)	C(36)	121.7(3)
C(34)	C(33)	C(36)	120.9(3)
C(33)	C(34)	C(35)	121.7(3)
C(30)	C(35)	C(34)	119.7(3)

---

Angles are in degrees. Estimated standard deviations in the least significant figure are given in parentheses.

**NOE difference Measurements.** NOE difference spectra of 24 mM solution of **7** in CDCl<sub>3</sub> were performed on a JEOL Lambda 500 spectrometer.

### 2-6 まとめ

本章では水素結合の代わりに、金属配位結合によって塩基対を形成する人工ヌクレオシドとして 2-アミノフェノールを有する  $\beta$ -C-ヌクレオシド **1** を設計、合成した。

水酸基をベンジル基、アミノ基をトリフルオロアセチル基で保護した 2-アミノフェノールと、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  $\text{SnCl}_4$  を用いたフリーデル-クラフツ反応により、収率 7.9% で目的の  $\beta$ -C-ヌクレオシド **7** を、収率 1.2% で  $\alpha$ -C-ヌクレオシド **8** が得られた。さらにトルオイル基、トリフルオロアセチル基、ベンジル基、の脱保護反応により、2-アミノフェノール型  $\beta$ -C-ヌクレオシド **1** を合成した。2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **1** の炭素骨格構築にフリーデル-クラフツ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 **3** に比べ、より短いステップで目的物を得ることができた。

## References and Notes

- 1) (a) Matsuda, A.; Yasuoka, J.; Ueda, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1659-1661.  
A new method for synthesizing the antineoplastic nucleosides 1-(2-azido-2-deoxy- $\beta$ -D-arabinofuranosyl)cytosine (cytarazid) and 1-(2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-arabinofuranosyl)cytosine (cytaramin) from uridine.  
(b) Matsuda, A.; Yasuoka, J.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 999-1002. Nucleosides and nucleotides. 95. Improved synthesis of 1-(2-azido-2-deoxy- $\beta$ -D-arabinofuranosyl)cytosine (cytarazid) and -thymine. Inhibitory spectrum of cytarazid on the growth of various human tumor cells in vitro.
- 2) Matsuda, A.; Takeduki, K.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 812-819. Nucleosides and nucleotides. 97. Synthesis of new broad spectrum antineoplastic nucleosides, 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine (DMDC) and its derivatives.
- 3) McCarthy, H.J.R.; Matthews, D.P.; Huber, D.M.E.W.; Bey, P.; Sunkara, P.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7439-7440. Stereospecific method to *E* and *Z* terminal fluoro olefins and its application to the synthesis of 2'-deoxy-2'-fluoro-methylene nucleosides as potential inhibitors of ribonucleoside diphosphate reductase.
- 4) 栗村敬、1997. 入門「エイズ学」、11 章 HIV / エイズの化学療法、化学同人.
- 5) Mitsuya, H.; Weihold, K.J.; Furman, P.A.; St. Clair, M.H.; Lehrman, S.N.; Gallo, R.C.; Bolognesi, D.; Barry, D.W.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 7096-7100. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*.
- 6) Mitsuya, H.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 1911-1915.

Inhibition of the *in vitro* infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides.

- 7) Blackburn, G.M.; Gait, M.J. 1996. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2nd. ed. OXFORD. Chapter 4.7. Drug inhibition of nucleic acid biosynthesis, 160-174.
- 8) Kornberg, A.; Baker, T.A. 1992. *DNA Replication*, 2nd. ed. W. H. Freeman and company New York. Chapter 14. Inhibitors of replication, 439-470.
- 9) 市川英子、加藤國基、2001. 糖部修飾ヌクレオシド化合物：最近 10 年の進歩、有機合成協会雑誌、Vol. 59、No.4、331-345.
- 10) Blackburn, G.M.; Gait, M.J. 1996. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2nd. ed. OXFORD. Chapter 3.1. Synthesis of nucleosides, 84-98.
- 11) Tanaka, K.; Shionoya, M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5002-5003. Synthesis of a novel nucleoside for alternative DNA base pairing through metal complexation.
- 12) Tanaka, K.; Cao, H.; Shionoya, M. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1998**, *39*, 93-94. Double strands formation of artificial DNAs induced by metal complexation.
- 13) Tanaka, K.; Cao, H.; Tasaka, M.; Shionoya, M. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *42*, 111-112. Artificial DNAs with metal-assisted base pairs.
- 14) Tanaka, K.; Tasaka, M.; Cao, H.; Shionoya, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 77-83. An approach to metal-assisted DNA base pairing: Novel  $\beta$ -C-nucleosides with a 2-aminophenol or a catechol as the nucleobase.
- 15) Eaton, M.A.W.; Millican, T.A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1988**, *1*, 545. New methodology for C-nucleoside synthesis: Preparation of 1,2-dideoxy-1-(3-pyridyl)-D-ribofuranose.
- 16) For reviews of C-Glycoside synthesis, see
  - (a) Levy, D.E.; Tang, C. 1995. *The chemistry of C-glycosides*. Pergamon, Oxford.
  - (b) Postema, M.H.D. 1995. *C-Glycoside synthesis*. CRC Press, Boca Raton.

- (c) Jaramillo, C.; Knapp, S. *Synthesis* **1994**, 1-20. Synthesis of C-aryl glycosides.
- 17) (a) Allevi, P.; Anastasia, M.; Ciuffreda, P.; Fiechi, A.; Scala, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1245-1246. The first direct method for C-glucopyranosyl derivatization of 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-glucopyranose.
- (b) Chaudhuri, N.C.; Kool, E.T. *Tetrahedron Letter* **1995**, 36, 1795-1798. An efficient method for the synthesis of aromatic C-nucleosides.
- (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. Naphthalene, phenanthrene, and pyrene as DNA base analogues: Synthesis, structure and fluorescence in DNA.
- 18) Davies, D.B. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spect.* **1978**, 12, 135. Conformations of nucleosides and nucleotides.
- 19) Schweuzer, B.A.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1863. Hydrophobic, non-hydrogen-bonding bases and base pairs in DNA.
- 20) Hildbrand, S.; Leumann, C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1968. Enhancing DNA triple helix stability at neutral pH by the use of oligonucleotides containing a more basic deoxycytidine analog.
- 21) Hildbrand, S.; Blaser, A.; Pareln, S.P.; Leumann, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5499. 5-Substituted 2-aminopyridine C-nucleosides as protonated cytidine equivalents: Increasing efficiency and selectivity in DNA triple-helix formation.
- 22) Hoffer, M. *Chem. Ber.* **1960**, 93, 2777-2781.  $\alpha$ -Thymidine.
- 23) teXsan: Crystal Structure Analysis Package, Molecular Structure Corporation (1985 & 1999).
- 24) Altomare, A.; Burla, M.C.; Camalli, M.; Cascarano, G.L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A.G.G.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Cryst.* **1999**, 32, 115. SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement.
- 25) Beurskens, P.T.; Admiraal, G.; Beurskens, G.; Bosman, W. P.; de Gelder, R.; Israel, R.; Smits, J.M.M. (1994). The DIRDIF-94 program system, Technical

## 第 2 章

Report of the Crystallography Laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands.

## 第 3 章

### 2-アミノフェノール型ヌクレオシドと 各種金属イオンとの相互作用

#### **A Palladium-Mediated DNA Base Pair of a $\beta$ -C-Nucleoside Possessing a 2-Aminophenol as the Nucleobase**

Motoyuki Tasaka, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiko Shionoya

*Supramolecular Chemistry*, **2001**, *13*, 671-675.

#### **Toward Nano-Assembly of Metals through Engineered DNAs**

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

*Supramolecular Chemistry*, in press.



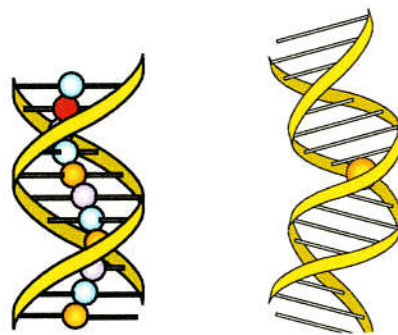
### 3-1 緒言

天然のDNAの水素結合塩基対を他の結合様式に置き換えることは、遺伝的アルファベットの拡張のみならず、らせん軸に沿ってビルディングブロックの配列を制御することによって、新しいDNAの構造や機能へ至ることが期待される。

DNA分子はワトソン-クリック型水素結合と核酸塩基間のスタッキングにより、二重らせん構造を有している。二本鎖形成においては、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が行われている。近年、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 [1]。

本論文では、DNA骨格へ金属イオンを導入することに対する新しいアプローチとして、金属錯形成部位を直接的に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利点は、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が可能なことである。DNA二重鎖中で平面四角型、四面体型、八面体型などの錯体を導入し [2, 3, 4]、DNAの中心に金属を並べることにより、分子電線を構築したり (Figure 3.1 (a))、金属イオンの酸化状態を変えることによりDNA全体の構造変化を誘起できる可能性がある

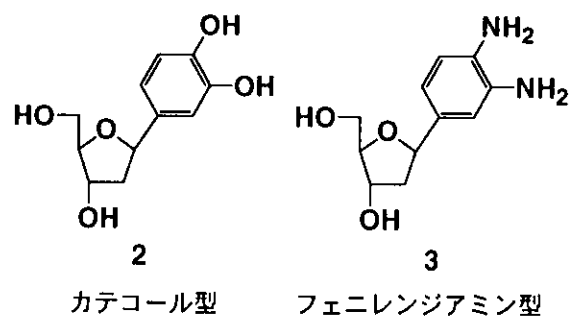


**Figure 3.1** 金属配位結合を利用した人工DNAの応用

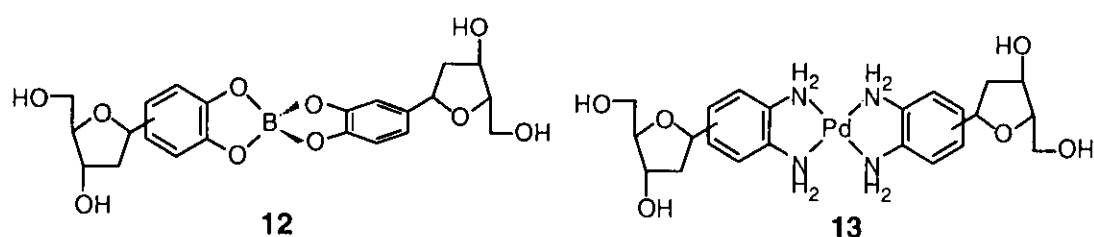
(a) 分子電線 (b) 高次構造変換

(Figure 3.1 (b))。このようなDNA構造の大きな変化 (湾曲、巻き戻し等) は、生化学的な反応の起点となる可能性や、超分子構築の有用な building block となる可能性がある。外部因子としての金属イオンにより、DNA 構造・機能変化を可逆的にコントロールすることに興味を持たれる。

当研究室では最近、核酸塩基部位として金属キレート部位 (それぞれカテコール、*o*-フェニレンジアミン) を有する 2 種類の金属キレートヌクレオシド **2** と **3** を合



**Figure 3.2** 金属錯生成により核酸塩基対を形成する人工ヌクレオシド



**Figure 3.3** ボランイオン、あるいはパラジウムイオンと 2:1 錯体を形成する人工ヌクレオシド

成し (Figure 3.2) [5, 6, 7]、ヌクレオシド **2** と **3** がボランイオン [8] あるいはパラジウムイオン [5] と、それぞれ安定な 2:1 錯体 **12** と **13** を形成することを見い出した (Figure 3.3)。

2-アミノフェノールは各種金属イオンと錯体を形成することが報告されている。銅 (II) イオン [2, 10-14]、マンガン (II) イオン [2, 13, 14]、ニッケル (II) イオン [3, 9-11, 13-15]、コバルト (II) イオン [3, 9-11, 13, 14]、亜鉛 (II) イオン [4, 9, 10, 16, 17]、パラジウム (II) イオン [15]、カドミウム (II) イオン [9, 13, 17]、はそれぞれ 2:1 錯体を形成し、鉄 (III) イオン [2, 4] やバナジウム (III) イオン [4] は 3:1 錯体を形成する。また、鉄 (II) イオンも 2-アミノフェノ

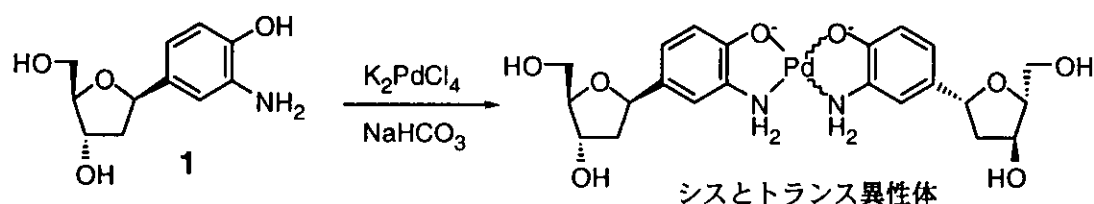
### 第 3 章

ールと相互作用する [13, 14]。タングステン (0) [18] とは 1:1 錯体を、ルテニウム (II) イオン [19] と錯体を形成する。2-アミノフェノールとの金属錯体が触媒として働くという報告例もある [18, 19]。これらのことから、2-アミノフェノール型ヌクレオシドを用いた人工DNAの金属イオンによる構造制御に興味をもたれる。

本章では、第2章で合成した 2-アミノフェノール型  $\beta$ -C-ヌクレオシドの、金属イオンによる塩基対形成を検討した。3-2-1 章ではパラジウムイオンとの相互作用を、3-2-2 章では亜鉛イオンとカドミウムイオンとの相互作用について検討した。これらの結果は、オリゴDNA中に導入された金属配位塩基対の構造を予想する上で、有用な情報を与えるであろう。

## 3-2 各種金属イオンを用いる塩基対形成とその評価

## 3-2-1 パラジウムイオンを用いる塩基対形成

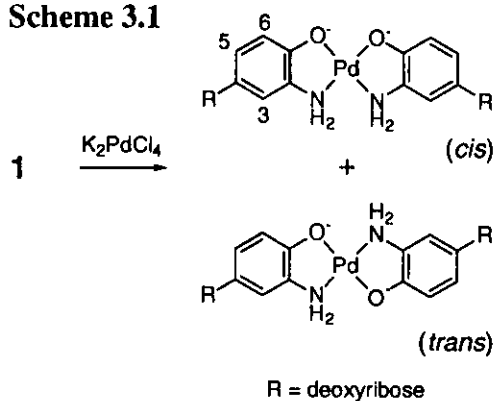


**Figure 3.4** 核酸塩基として 2-アミノフェノールを有する  
β-C-ヌクレオシドの、パラジウムを介する DNA 塩基対

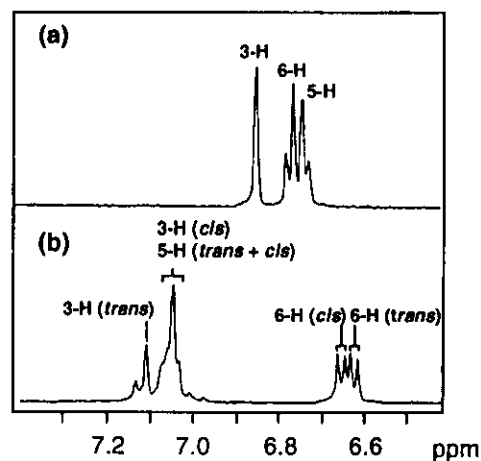
本章では、2-アミノフェノールを核酸塩基として有するヌクレオシド **1** と  $\text{Pd}^{2+}$  との金属錯生成について報告する (Figure 3.4)。

まず、ヌクレオシド **1** と  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$  との錯形成を、等モル量の  $\text{NaHCO}_3$  の存在下、 $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$  (4:1) 中の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにより検討した (Figure 3.5)。共鳴シグナルを、**1** のみの場合と、**1** と  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$  の 2:1 混合物の場合とで比

**Scheme 3.1**



較した結果、 $\text{Pd}^{2+}$  との錯形成による化学シフト値の大きな変化が観測された。3-H と 5-H に帰属される 2 セットのシグナルは、顕著に低磁場側シフトし、積分強度は  $\text{Pd}^{2+}$  濃度の増加に比例して大きくなった。一方、



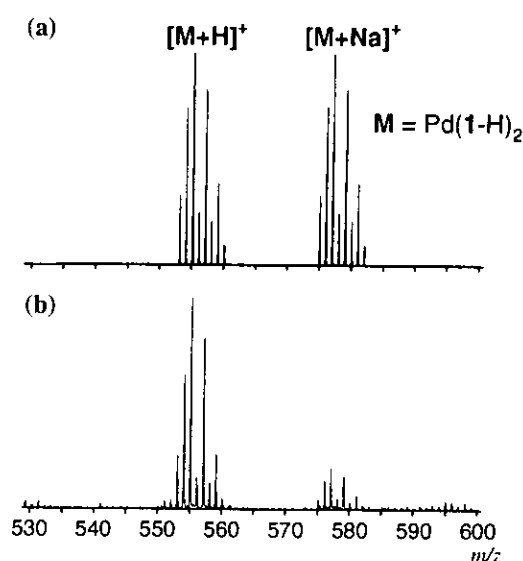
**Figure 3.5**  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$  非存在下と存在下における、ヌクレオシド **1** の 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル;  $[\mathbf{1}] = 2.0 \text{ mM}$ ,  $[\text{Pd}^{2+}] = (\text{a}) 0 \text{ mM}$ ,  $(\text{b}) 1.0 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaHCO}_3] = 2.0 \text{ mM}$ ,  $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$  (4:1) 中、 $27^\circ\text{C}$

6-H に帰属される 2 セットのシグナルは、パラジウム非存在下におけるスクレオシド **1** のシグナルよりも高磁場側に現れる。 $\text{Pd}^{2+}$  の濃度が **1** の濃度のほとんど半分に達したときに錯形成は終了した (Figure 3.5 (b))。それぞれのシグナルは COSY 測定により帰属した。平面四角型である  $\text{Pd}^{2+}$  錯体に対しては、シスとトランスの二つの構造異性体が存在し得る。トランス錯体において、 $\text{Pd}^{2+}$  に結合した二つのフェノレート酸素の間で起こるトランス効果を考慮し、6-H のシグナルの帰属に関しては、高磁場側 (6.62 ppm) の 1 セットのシグナルを、より高い電子密度を有するトランス錯体に帰属した。シス体およびトランス体に帰属される 6-H シグナルの積分値比は、加えるパラジウムの等量を少なくすることにより変化し、シス体が過剰となった (Figure 3.5 (b))。7.11 ppm に見られる 3-H プロトンは 6-H (*trans*) と同様の变化を示したことから 3-H (*trans*) と帰属した。一方、COSY スペクトルにより、5-H (*trans, cis*) および 3-H (*cis*) は 7.02-7.09 ppm のブロードなシグナルに含まれることがわかった。3-H (*trans*) に対し 3-H (*cis*) が高磁場に現れたことよりシス体の 3 位はトランス体のそれに比べ電子密度が高いと考えられる。

シス体の 2-アミノ基が、パラジウムの軌道上への電子供与が大きいフェノキシ基のトランス位であることから、トランス体に比べ 3 位の電子密度が高くなったためと考えられる。

トランス体とシス体の割合は 1:1 であった。

**1** と  $\text{Pd}^{2+}$  との 2:1 錯生成を示す  $^1\text{H}$  NMR 滴定実験の結果に加えて、ポジティブモードにおける、メタノール中の錯体の ESI-TOF マススペクトルは、Figure 3.6 に示すように、



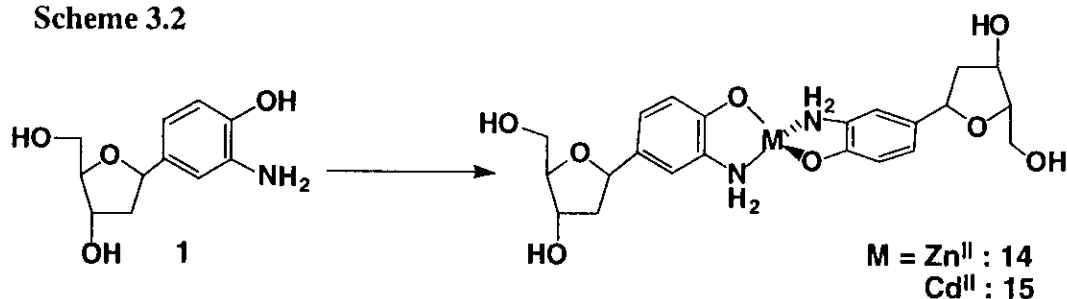
**Figure 3.6** **1** との 1:2  $\text{Pd}^{2+}$  錯体に対する、ポジティブモードにおける ESI-TOF マススペクトル ( $m/z$  530-600); (a)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  と  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  に対する理論的同位体分布、(b) 実験的同位体分布、 $\text{M} = \text{Pd}(\mathbf{1-H})_2$ 。

**1** と  $\text{Pd}^{2+}$  の割合に対して明確な証拠を与えた。 $+1$  電荷を帯びた陽イオン種  $[\text{Pd}(\mathbf{1}\text{-H})_2 + \text{H}]^+$  に対応する、 $m/z$  555.09 に中心をもつシグナル (Figure 3.6 (b)) は理論的同位体分布 (Figure 3.6 (a)) とよく一致した。

これらの結果は、水溶液中において **1** と  $\text{Pd}^{2+}$  の 2:1 錯体が安定であることを示し、“金属配位” 部位として 2-アミノフェノールを含む  $\beta$ -C-ヌクレオシド **1** が、金属イオンを介した新しい DNA 塩基対を与えることを証明した。

## 3-2-2 亜鉛イオン、カドミウムイオンを用いる塩基対形成

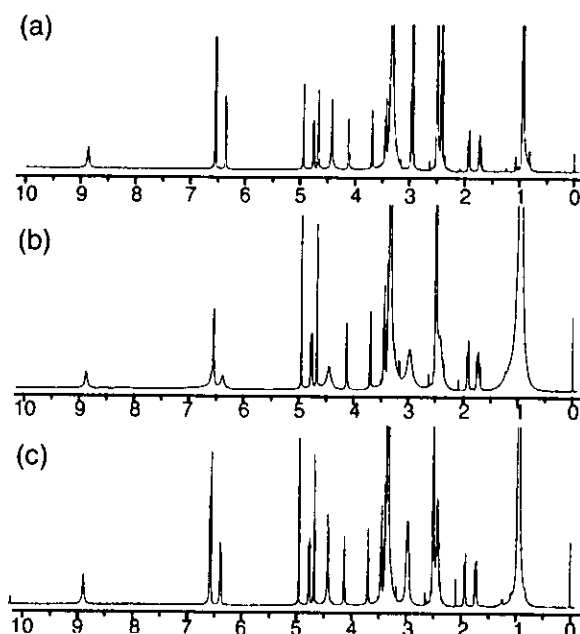
Scheme 3.2



本章では、2-アミノフェノールを核酸塩基として有するヌクレオシド **1** と、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ との金属錯生成について報告する (Scheme 3.2)。

ヌクレオシド **1** の  $\text{DMSO}-d_6$  溶液に、2 当量の diisopropylethylamine、および 0.5 当量の  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  あるいは  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  を加え、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定した (Figure 3.7)。ヌクレオシド **1** のみの場合と (Figure 3.7 (a))、 $\text{Zn}^{2+}$  あるいは  $\text{Cd}^{2+}$  を加えた場合の芳香族領域の共鳴シグナルを比較すると、 $\text{Zn}^{2+}$  の場合にはブロードニングが観察された (Figure 3.7 (b))。このことは、配位子交換の速い金属錯生成過程を示している。 $\text{Zn}^{2+}$  の濃度が増加してもほとんど変化は観察されなかった。一方、 $\text{Cd}^{2+}$  の場合にはシグナルの変化はほとんど観察されなかった (Figure 3.7 (c))。

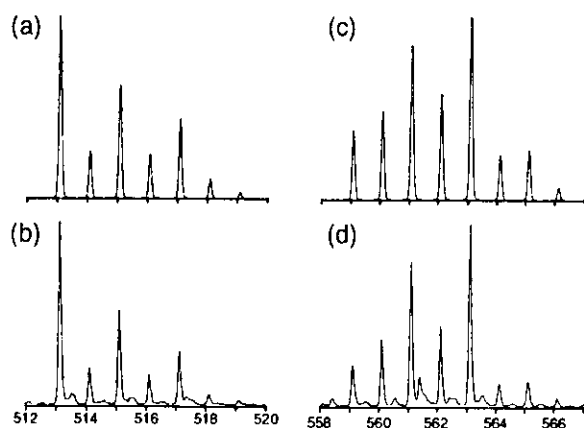
Figure 3.8 には、これらの溶液の、ポジティブモードにおける ESI-TOF マススペクトル測定の同位体分布を示した。 $m/z$  513.11 [**14** +  $\text{H}^+$ ] $^+$  (Figure 3.8 (b)) と  $m/z$  563.10 [**15** +  $\text{H}^+$ ] $^+$  (Figure 3.8 (d)) に



**Figure 3.7** (a) C-ヌクレオシド **1**, (b) **1** と  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , (c) **1** と  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , の 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR スペクトル,  $\text{DMSO}-d_6$  中.  $[\mathbf{1}] = 10 \text{ mM}$ .  $[\text{M}(\text{NO}_3)_2] =$  (a) 0, (b), (c) 5 mM,  $[i\text{Pr}_2\text{EtN}] = 20 \text{ mM}$ .

おけるシグナルの同位体分布は、理論的同位体分布とよく一致した (それぞれ Figure 3.8 (a)、(c))。脱プロトン化された **1** と  $\text{Zn}^{2+}$  あるいは  $\text{Cd}^{2+}$  イオンとの 2:1 錯体に対する明らかな証拠を与えた。

錯体 **14** と **15** については、4 配位四面体構造 (金属中心が  $\bar{\Delta}$  か  $\bar{\Lambda}$ ) あるいは 6 配位正八面体構造 (シスカトランス) であることが考えられるが、質量分析および  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの結果だけでは判断することはできなかった。



**Figure 3.8** ポジティブモードにおける、錯体 **14** と **15** の ESI-TOF マススペクトル [19]: (a, c) 理論的同位体分布, (b, d)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  としての実験的同位体分布, (計算値,  $[\text{14}+\text{H}]^+ = 513.12$  と  $[\text{15}+\text{H}]^+ = 563.10$ ) .



## 第 3 章

### 3-3 実験の部

**General Information.** DMSO- $d_6$  and D<sub>2</sub>O were purchased from EURISO-TOP. Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O and NaHCO<sub>3</sub> were purchased from Wako. K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> was prepared according to previously reported procedures [20]. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker DRX500 spectrometer (500 MHz). The spectra are referenced to 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- $d_4$ -acid sodium salt or trimethylsilane. Electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) mass spectra were recorded on a Micromass LCT spectrometer.

### 3-4 まとめ

本章では、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ イオンにより誘起される 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **1** の塩基対形成について検討を行った。

$\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$  (4:1) 溶液中において、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **1** と  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$  から、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドと  $\text{Pd}^{2+}$ イオンの 2:1 錯体が形成されることが、ESI-TOF マススペクトル測定および、 $^1\text{H-NMR}$  測定により明らかとなった。また、平面四角型 [21] である  $\text{Pd}^{2+}$ 錯体に対しては、シスとトランスの二つの構造異性体が存在し得るが、トランス体とシス体の割合は 1:1 であることが  $^1\text{H-NMR}$  測定により明らかとなった。 $\text{Pd}^{2+}$ イオンによる 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **1** の塩基対は、天然DNAに見られる塩基対形成と同様に、同一平面上で形成されることが推察される(Figure 3.4)。オリゴヌクレオチドに導入されたときの  $\text{Pd}^{2+}$ 錯体のトランス体とシス体の比は、DNAオリゴマーの二本鎖形成の際の速度論的な因子が大きく影響すると予想している。

$\text{DMSO}-d_6$  溶液において、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **1** と、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  あるいは  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  から、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドと  $\text{Zn}^{2+}$ あるいは  $\text{Cd}^{2+}$ イオンの 2:1 錯体が形成されることが ESI-TOF マススペクトル測定により明らかとなった。しかしながら、今回の結果から両錯体の配位構造を決定することはできなかった。

## References and Notes

- 1) (a) Dreyer, G. R.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 968-972. Sequence-specific cleavage of single-stranded DNA: Oligodeoxynucleotide-EDTA-Fe (II). (b) Chen, C.-H.B.; Sigman, D.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6570-6572. Sequence-specific scission of RNA by 1,10-phenanthroline-copper linked to deoxyoligonucleotides. (c) Telser, J.; Cruickshank, K.A.; Schanze, K.S.; Netzel, T.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7221-7226. DNA oligomers and duplexes containing a covalently attached derivative of tris(2,2'-bipyridine) ruthenium(II): Synthesis and characterization by thermodynamic and optical spectroscopic measurements. (d) Bannwarth, W.; Pfeleiderer, W.; Müller, F. *Helv. Chim. Acta.* **1991**, *74*, 1991-1999. Energy transfer within oligonucleotides from a lumazine (= pteridine-2,4(1*H*,3*H*)-dione) chromophore to bathophenanthroline-ruthenium(II) complexes. (e) Murphy, C.J.; Arkin, M.R.; Jenkins, Y.; Ghatlia, N.D.; Bossmann, S.H.; Turro, N.J.; Barton, J.K. *Science* **1993**, *262*, 1025-1029. Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix. (f) Bashkin, J.K.; Frolova, E.I.; Sampath, U. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5981-5982. Sequence-specific cleavage of HIV mRNA by a ribozyme mimic. (g) Matsumura, K.; Endo, M.; Komiyama, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2019-2020. Lanthanide complex-oligo-DNA hybrid for sequence-selective hydrolysis of RNA. (h) Magda, D.; Miller, R.A.; Sessler, J.L.; Iverson, B.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7439-7440. Site-specific hydrolysis of RNA by europium(III) texaphyrin conjugated to a synthetic oligodeoxyribonucleotide. (i) Meade, T.J.; Kayyem, J.F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 352-354. Electron transfer through DNA: Site-specific modification of duplex DNA with ruthenium donors and acceptors. (j) Manchanda, R.; Cunham, S.U.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5144-5147. Automated solid-phase synthesis of site-specifically platinated

- oligodeoxy-ribonucleotides. (k) Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 646-648. Automated solid phase synthesis of platinated oligonucleotides via nucleoside phosphonates. (l) Dandliker, P.J.; Holmlin, R.E.; Barton, J.K. *Science* **1997**, *275*, 1465-1468. Oxidative thymine dimer repair in the DNA helix. (m) Meggers, E.; Kusch, D.; Giese, B. *Helv. Chim. Acta.* **1997**, *80*, 640-652. An efficient synthesis of enantiomerically pure  $\Delta$ - and  $\Lambda$ -ruthenium(II)-labelled oligonucleotides. (n) Ihara, T.; Nkayama, M.; Murata, M.; Nakano, K.; Maeda, M. *Chem. Commun.* **1997**, 1609-1610. Gene sensor using ferrocenyl oligonucleotide. (o) Magda, D.; Crogrs, S.; Lin, A.; Miles, D.; Wright, M.; Sessler, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2293-2294. Synthesis and kinetic properties of ribozyme analogues prepared using phosphoramidite derivatives of dysprosium(III) texaphyrin. (p) Hurley, D.J.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2194-2195. Metal-containing oligonucleotides: Solid-phase synthesis and luminescence properties. (q) Mucic, R.C.; Herrlien, M.K.; Mirkin, C.A.; Letsinger, R.L. *Chem. Commun.*, **1996**, 555-557. Synthesis and characterization of DNA with ferrocenyl groups attached to their 5'-termini: Electrochemical characterization of a redox-active nucleotide monolayer. (r) Hall, J.; Hüsken, D.; Häner, R. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3522-3526. Towards artificial ribonucleases: the sequence-specific cleavage of RNA in a duplex.; and references cited therein.
- 2) Shukla, P.R. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1967**, *29*, 1880-1881. Inorganic co-ordination complexes of *o*-aminophenol with some metals of first transition series – I. Complexes of copper (II), manganese (II), and iron (III).
  - 3) Livingstone, S.E. *J. Chem. Soc.* **1956**, *437*, 1042-1044. Complexes of nickel and cobalt with certain chelate compounds.
  - 4) Shukla, P.R. *Curr. Sci.* **1967**, *36*, 543-544. Inorganic co-ordination complexes of *o*-aminophenol with some metals of 1st transition series. Part III. Complexes of

zinc (II), iron (II), and vanadium (III).

- 5) Tanaka, K.; Shionoya, M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5002-5003. Synthesis of a novel nucleoside for alternative DNA base pairing through metal complexation.
- 6) Tanaka, K.; Tasaka, M.; Cao, H.; Shionoya, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 77-83. An approach to metal-assisted DNA base pairing: Novel  $\beta$ -C-nucleosides with a 2-aminophenol or a catechol as the nucleobase.
- 7) Shionoya, M.; Tanaka, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, *73*, 1945-1954. Synthetic incorporation of metal complexes into nucleic acids and peptides directed toward functionalized molecules.
- 8) Cao, H.; Tanaka, K.; Shionoya, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1745-1748. An alternative base-pairing of catechol-bearing nucleosides by borate formation.
- 9) Hieber, V.W.; Schnackig, A. *Z. Anorg. Allgem. Chem.* **1936**, *226*, 209-221. Zur Kenntnis des komplexchemischen verhaltens von ortho-aminophenol.
- 10) Maslennikova, I.S. *Zh. Fiz. Khim.* **1974**, *48*, 1510-1511. Metallic complexes of *o*-aminophenol.
- 11) Rola-Szustkiewicz, S. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Chim.* **1977**, *25*, 179-183. Electrochemical measurements of stability constants of some metal chelates.
- 12) Bottari, E.; Goretti, G. *Monatsh. Chem.* **1975**, *106*, 1337-1347. *o*-Aminophenol and 8-hydroxyquinoline as ligands of Cu(II) in 1 M-Na(ClO<sub>4</sub>) at 25 °C.
- 13) Sims, P. *J. Chem. Soc.* **1959**, 3648-3649. The stability constants of some metal chelates of ortho-aminophenols.
- 14) Perrin, D.D. *J. Chem. Soc.* **1961**, 2244-2246. Stability constants of some metal complexes of ortho-aminophenols.
- 15) Watt, G.; Knifton, J.F. *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 1443-1446. Deprotonation of *o*-aminophenol and *o*-aminothiophenol complexes of nickel (II) and palladium (II).
- 16) Petrova, I.; Ivanov, S.; Kirilov, M.; Stoyanova, D.; Haupt, E.T.K.; and Diek, H.T. *Phosphorus Sulfur* **1986**, *27*, 285-292. Metal complexes of the tetrahedral ester of

- 4-(2-hydroxyphenylamino)-1,3-butadiene-1,3-diphosphonic acid and the liquid phase oxidation of cumene in their presence.
- 17) Hoppe, H.R.; Andra, K. *Z. Chem.* **1986**, 26, 75-76. Zur spaltung der zink-bzw. Cadmiumkohlenstoffbindung durch bifunktionelle liganden. (Cleavage of zinc- and cadmium-carbon bond by bifunctional ligands.)
- 18) Darensbourg, D.J.; Klausmeyer, K.K.; Reibenspies, J.H. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 1535-1539. Coordinatively and electronically unsaturated tungsten(0) carbonyl complexes stabilized by  $\pi$ -donating amino ligands.
- 19) NMR 測定のための DMSO- $d_6$  溶液を、ESI-TOF マス測定のために MeOH 中で 0.1% AcOH で希釈した。
- 20) G. Brauer (translation editor, R. F. Riley), "Handbook of Preparative Inorganic Chemistry", Academic **1963**, 1584.
- 21) コットンウィルキンソン、中原勝儼 訳、1973. 無機化学 (下)、培風館、30H 章 パラジウムおよび白金、923-937.

## 第 4 章

### 2-アミノフェノール型ヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドの合成と金属イオンとの相互作用

**Toward Nano-Assembly of Metals through Engineered DNAs**

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

*Supramolecular Chemistry*, in press.

## 4-1 緒言

核酸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って、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 [1]。

[DNAの化学合成] [2, 3, 4, 5]

微生物に有用タンパク質を生産させるには、目的とするタンパク質をコードするDNAが必要である。DNAを入手するには2種類の方法がある。一つは酵素的に合成する方法 [6] であり、もう一つは化学的に合成する方法である。DNAの化学合成では、現在では市販のDNA自動合成機で望みのシーケンスのDNAを簡単に得ることができるが、現在のような状況に至るまでには以下のような経緯があった。DNAは、塩基、糖、リン酸を一ユニットとして、多数のユニットが一行列につながったものなので、ユニットとユニットを次々とつないでいけばよいわけであるが (Figure 4.1)、1960 年代においては以下に示

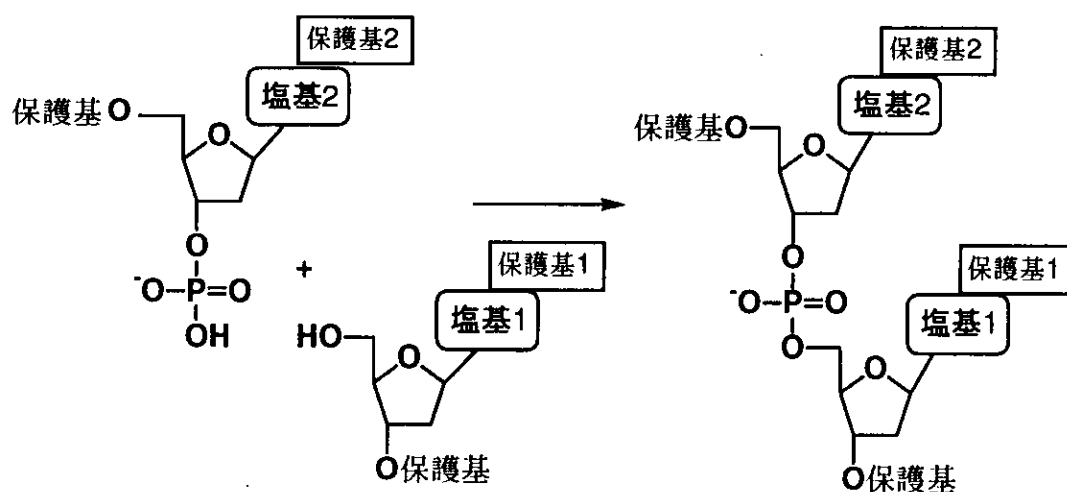


Figure 4.1 1960 年代における DNA 合成法



## 第 4 章

す四つの難点があり、10 ユニットのDNAを作るのに専門家が行なっても約半年もの時間がかかる重労働であった。

(1) 保護基における問題：糖、リン酸、塩基には反応活性な部位が多く、目的部位だけを反応させ、かつ、ユニット結合後に簡単に外せる保護基を開発する必要があった。

(2) カップリングが 100% までは進行しないため副産物が生じる。

(3) 有機溶媒に溶けない。水にだけわずかに溶ける。

(4) 一ステップごとに目的物を分離しなければならない。

しかし、1980 年代になるとこれらの問題は一つずつ解決され軽作業へと移行していった。

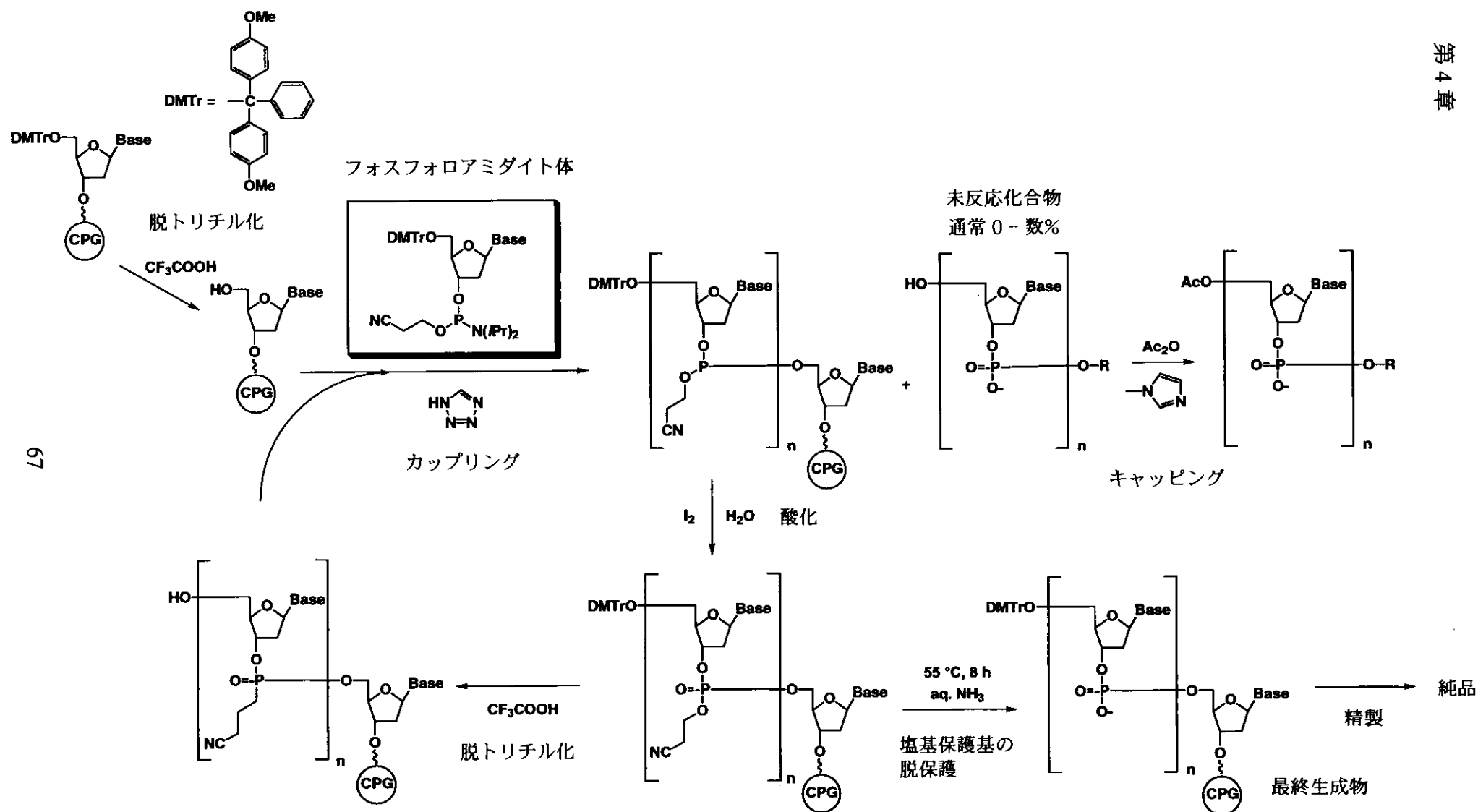
(1) 保護基における問題：自由自在につけたりはずしたりできる適当な保護基が開発された [7]。

(2) カップリングがほとんど 100% の収率で進行する試薬が開発された。

(3) 酸素原子の負電荷がない、より疎水的な結合様式に変えることによって、有機溶媒に容易に溶けるようにした。

(4) 目的物質を樹脂に固定することによって、過剰な試薬を洗い流すだけで分離操作を行えるようになった。

現在ではDNA自動合成機が市販され、たとえ化学の知識が全くななくても、A、G、C、T という文字をタイプできる人なら誰でも自分の望むDNAを簡単に作ることができる。(Scheme 4.1) [8, 9]。



Scheme 4.1 DNA 合成機で行われるオリゴヌクレオチドの化学合成

## 第 4 章

図中のフォスフォロアミダイト体においては、天然のヌクレオチドでなくても、水酸基を二つ有する化合物であれば、一方を DMTr 基で保護し、もう一方をアミダイト基に変換すれば DNA に導入することができる。よって本研究における人工ヌクレオシドにおいても DNA オリゴマーに導入することができるし、DNA を化学的に修飾して DNA に機能をもたせる方法として大変有用である。

### [DNA の性質と融解実験] [10]

DNA は紫外線を吸収し、260 nm 付近に最大吸収波長を有する。また、二本鎖 DNA は温度が上昇すると水素結合が切断され一本鎖に解離（変性）し、下降すると再び二本鎖に戻る性質（復元、アニーリング）をもっている。一本鎖の状態では UV 吸収は、一つ一つのヌクレオチドの吸収の合計に一致するが、二本鎖状態では合計よりも吸収が小さくなる。この効果を淡色効果という。

淡色効果の原因については以下のように考えることができる。淡色効果は隣接する核酸塩基間の  $\pi$ - $\pi$  スタッキングによるエネルギーの安定化により生じる。 $\pi$  電子雲は芳香環上を振動しており、瞬間的に双極子が生じる。上下に平行に  $\pi$  平面が存在すると、双極子同士が相互作用して打ち消し合う。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みなされ、吸収できるエネルギーの量が減り、吸光度が小さくなり、淡色効果が観察される。

一本鎖状態と二本鎖状態における吸光度の違いを利用することによって、DNA の二本鎖構造の安定性を評価することができる。DNA 溶液の温度を 1 分間に 1 度程度の変化率で上昇させ、260 nm の吸収強度を追跡すると二本鎖から一本鎖への解離に伴う吸光度の上昇が見られる。このとき得られる曲線のことを DNA の融解曲線 (Melting Curve) と呼ぶ。二本鎖と一本鎖の DNA の量が等しくなる温度のことを DNA の融点 ( $= T_m$ : Melting temperature) と呼ぶ。 $T_m$  が高い程 DNA は熱的に安定である。こうした背景から DNA の安定性の評価法として融解実験が広く用いられる。

## 第 4 章

本研究においても、人工ヌクレオシドを導入したDNAに対する金属イオンの効果を調べる上で、融解実験は非常に有用であった。

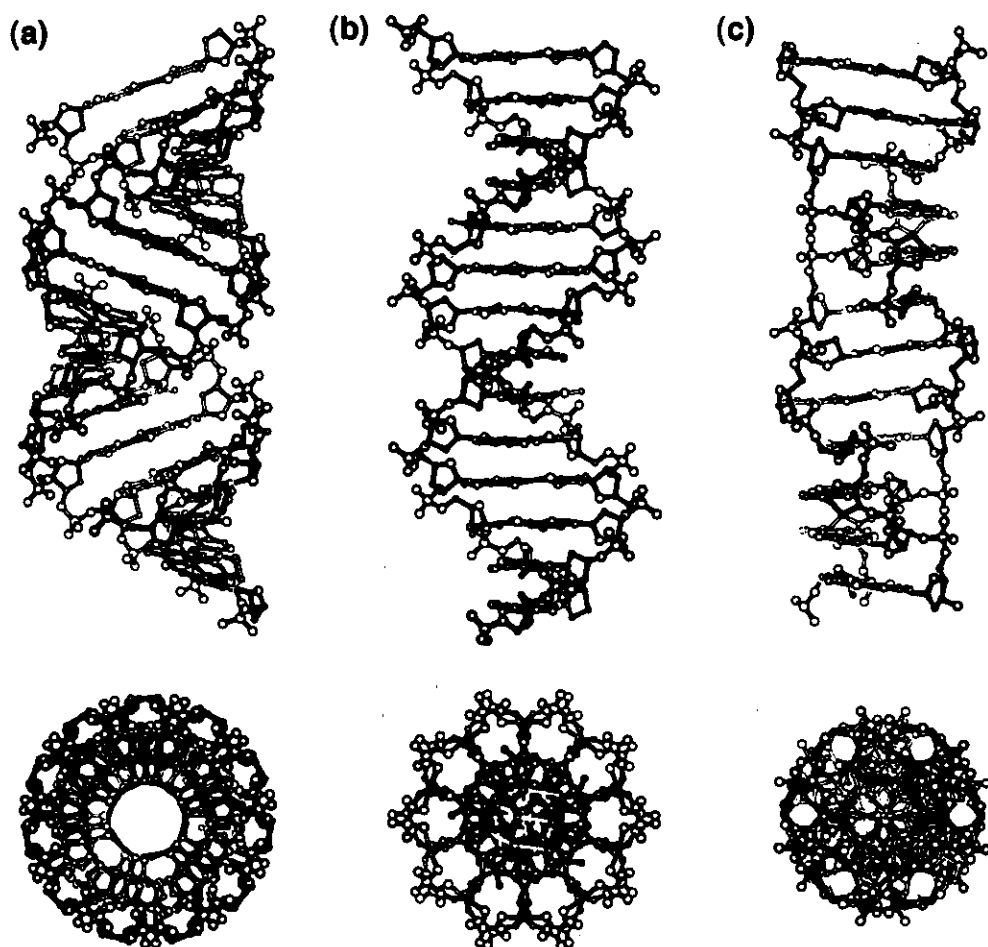
### [DNAの構造]

**Table 4.1** DNAの高次構造 [13]

		A型 右巻	B型 右巻	Z型 左巻
DNAは常温、 中性水溶液中では 二重らせん構造を とる。これは通常 B 型 (B form) とい われている形であ って、らせんの 1 ピッチに 10 塩基対 を含み、塩基対が	らせんの巻き方			
	繰返し単位中の ヌクレオチドの数	1	1	2
	らせん 1 巻きの ピッチ	24.6 Å	33.2 Å	45.6 Å
	らせん 1 巻きに含まれる ヌクレオチドの数	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 $\chi$	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>syn</i> (Pu) <i>anti</i> (Py)
	デオキシリボース 環のしわ	C3' <i>endo</i>	C2' <i>endo</i>	C3' <i>endo</i> (Pu) C2' <i>endo</i> (Py)

らせん軸にほぼ垂直で、これが中央のらせん軸に沿って積み重なったような形をとる (Table 4.1, Figure 4.2) [10, 11, 12]。しかし、DNA繊維を相対湿度 85% よりも低い空気中に保つと A 型 (A form) に変わる。また、ポリ [d(TG)·d(CA)] などのように、プリン-ピリミジン交互の配列をもった DNA 二本鎖が、高塩濃度水溶液中とか、右巻きらせんのねじれをほどく強制力の働く環境下とかに置かれると Z 型 (Z form) と称する左巻二重らせん形になる [14]。このように DNA は、シーケンスや、湿度、塩強度、金属イオンの存在、有機溶媒などの外部の状況に依存して種々の高次構造をとることが知られている。現在までに、どのようなシーケンスをもつ DNA オリゴマーが何型の高次構造であるのかが X 線構造解析によっても多く示されており、直接的な証拠を与えている [15]。

Poly(dA)·poly(dT) は B 型構造であることが既に知られており [12, 16]、本研究において評価を行なった DNA オリゴマーにおいても、通常の B 型構造であることを意識して、**dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** を基本シーケンスとした。そして、人工ヌク



**Figure 4.2** DNAの代表的な高次立体構造：(a) A型DNA [12]、(b) B型DNA [12]、(c) Z型DNA [14]。上部図はDNAを横から見た図、下部図は上方から見た図。Ref 7 より転載。

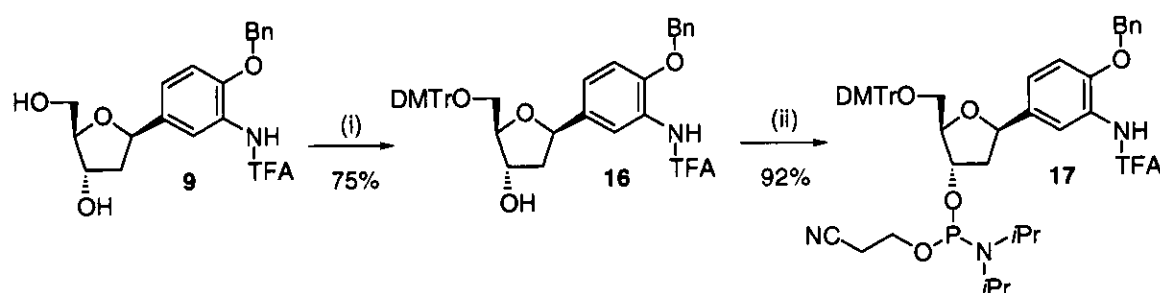
## 第 4 章

レオシドをその真ん中に一つ導入したシーケンス (**X1**)、端から二番目に一つずつ導入したシーケンス (**Y2**)、また中央に三つ導入したシーケンス (**X3**) を DNA 自動合成機によって合成した。ここでは、中央に導入したシーケンスを **X**、端に導入したシーケンスを **Y** として区別した。**dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** シーケンスを選んだ更なる理由としては、**dA<sub>21</sub>**、**dT<sub>21</sub>** はそれぞれ自己相補配列ではなくかつ構造の対称性が高いこと、グアニン (G) においては N-7 位と白金が強く相互作用することが知られているので G を含まないこと、また NMR などで評価する場合、帰属が単純であることなどがある。

本章では、フォスフォロアミダイト法で合成した 2-アミノフェノ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、金属イオン  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pt}^{2+}$  存在下の二本鎖形成、融解過程について検討したので報告する。

## 4-2 2-アミノフェノール型ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドのデザインとフォスフォロアミダイト固相法による合成

現在、任意の長さとし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。多くの場合、DNA自動合成機によるDNA鎖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 [8, 17]。一方、天然のヌクレオシド以外のジオール化合物もフォスフォロアミダイト体に誘導することにより、DNAシーケンスに導入することが可能である [18]。第二章で合成した 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **9** はパラジウムイオン、亜鉛イオン、カドミウムイオンなどの、種々の金属イオンとの錯生成により塩基対を形成することが可能であるため、DNAオリゴマーシーケンス中での構造及び挙動に興味をもたれる。DNA合成機を用いて 2-アミノフェノール型ヌクレオシド **9** をDNAシーケ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 **17** を合成した (Scheme 4.2)。化合

Scheme 4.2<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) DMTr-Cl, pyridine, rt, 75%; (ii) 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite, *i* Pr<sub>2</sub>EtN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 92%

物 **9** 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 化して **16** を得たのち、3'-OH をフォスフォロアミダイト化することにより **9** から二段階で 92% の収率で **17** を得た。カラム精製後、**17** の <sup>31</sup>P NMR を測定したところ、二つのジアステレオマーに由来する 2 本のピークが観測され

た (Figure 4.3)。これはアミダイト部位におけるリン原子が不斉原子であり、リボース部分が光学活性なので、結果的に二種類のジアステレオマーが生成したことによる。トリフルオロアセチル基は、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たことを MALDI-TOF マススペクトルにより確認した。次に、ベンジル基の脱保護反応を試みた。

Pd/C 存在下、1 atm 水素、  
ギ酸、ギ酸アンモニウムな

どを水素化剤として用い、また反応溶媒として水-メタノール混合溶媒、水、などを用い種々検討したが、当初の目的化合物であった脱ベンジル体を得ることはできなかった。そこで筆者は、ベンジル基を有した化合物でも、目的とする金属イオンを介した塩基対を形成することは可能であろうと考え、ベンジル基のついたDNAオリゴマーを用いて、金属イオンがDNAオリゴマーに及ぼす影響を融解実験によって評価することにした。DNAオリゴマーとしてはデオキシチミジンの 21 量体である **dT<sub>21</sub>** と、デオキシアデノシンの 21 量体である **dA<sub>21</sub>** を基本シーケンスとして選択した (以下、これらの二本鎖を **dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** と記述する)。**dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** シーケンスを選んだ理由は、まず、二本鎖の高次構造が通常の B 型構造であること [12, 16]、さらに、**dA<sub>21</sub>**、**dT<sub>21</sub>** はそれぞれ自己相補配列ではなく、かつ構造の対称性が高いことである。今回は、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドをその中央に一つ導入したシーケンス (**X1**)、端から二番目に一つずつ導入したシーケンス (**Y2**)、また中央に三つ導入したシーケンス (**X3**) をDNA自動合成機によって合成し (Figure 4.4)、金属イオン添加効果を調べた。

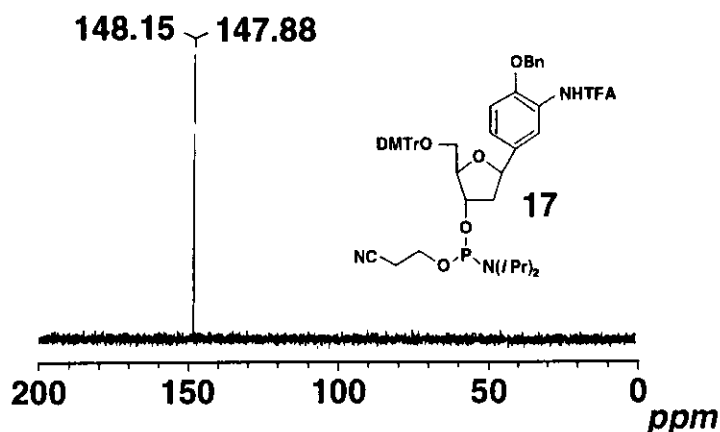


Figure 4.3 化合物 **17** の 202 MHz, <sup>31</sup>P NMR スペクトル D<sub>2</sub>O 中 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を外部標準とし、CDCl<sub>3</sub> 中で測定



TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT : AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA ( $dA_{21}$ - $dT_{21}$ )  
 TTTTTTTTTT**X**TTTTTTTTTTT : AAAAAAAAAA**X**AAAAAAAAA (**X1**)  
 T**X**TTTTTTTTTTTTTTTTTT**X**T : A**X**AAAAAAAAAAAAAAAAA**X**A (**Y2**)  
 TTTTTTTTTT**XXX**TTTTTTTTTTT : AAAAAAAAA**XXX**AAAAAAAAA (**X3**)

(**X** は 2-アミノフェノール型 (Bn) ヌクレオシド)

**Figure 4.4** 2-アミノフェノール型 (Bn) 人工ヌクレオシドを導入した三つのシーケンス

Applied Biosystems 製 Model 394 DNA/RNA Synthesizer を用い、標準的な方法により、1.0  $\mu$ M スケールで合成を行った [19]。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と 2-アミノフェノール型ヌクレオシドのトリフルオロアセチル保護基は 55  $^{\circ}$ C の濃アンモニア水で 8 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。

$T_{10}XT_{10}$  と  $A_{10}XA_{10}$  の MALDI-TOF マススペクトルをそれぞれ Figure 4.5 と Figure 4.6 に示す。ポジティブイオンモード、ネガティブイオンモード、いずれの場合も理論値と実験値はよく一致した。

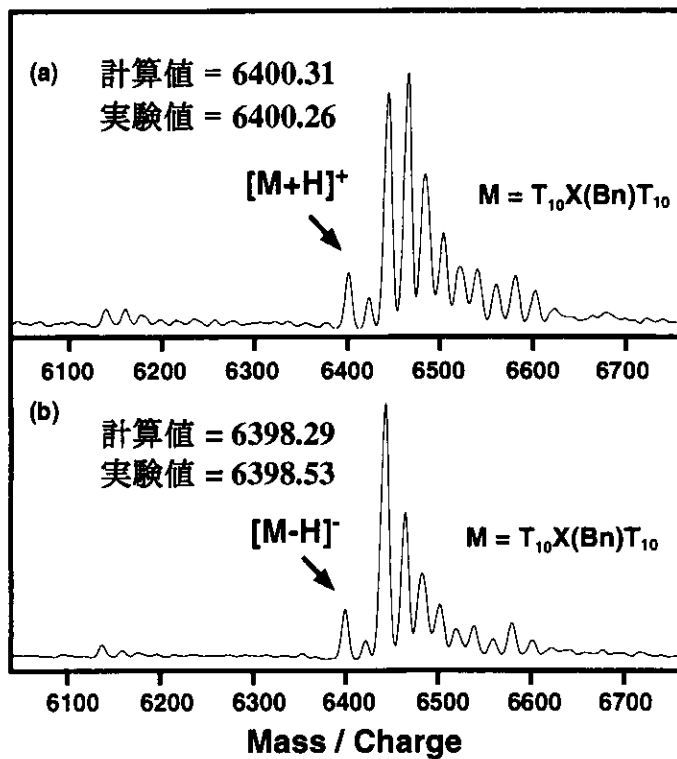


Figure 4.5 T<sub>10</sub>X(Bn)T<sub>10</sub> の MALDI TOF マススペクトル ;  
マトリックスとして 3-hydroxypyridine-2-carboxylic acid  
を用いた ; (a) ポジティブイオン、(b) ネガティブイオン。

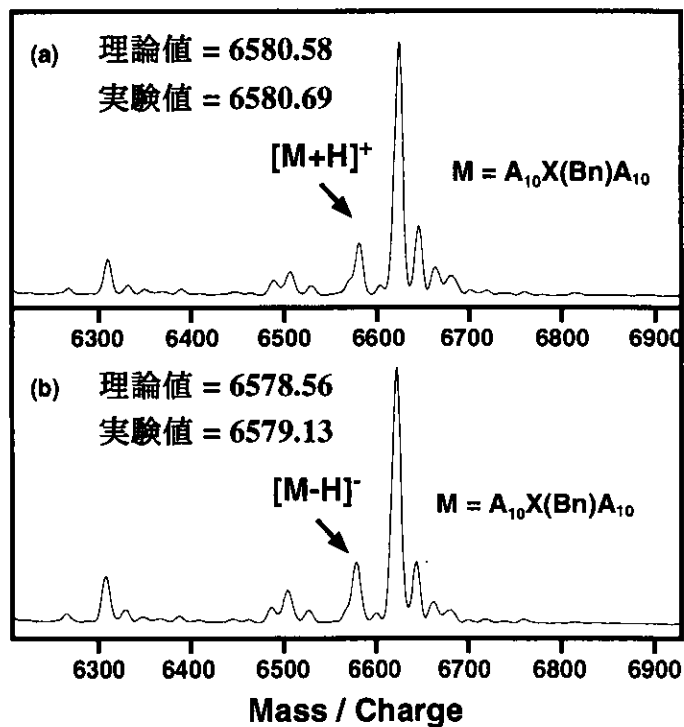


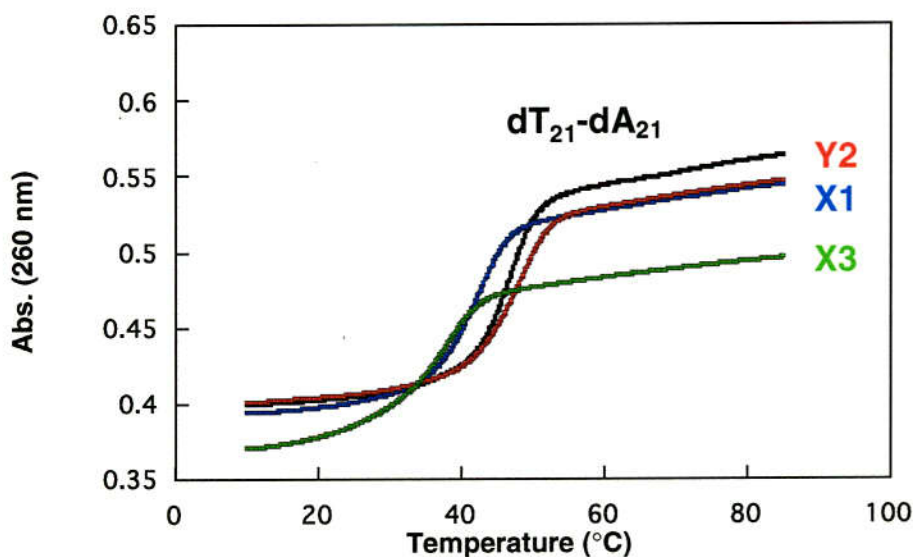
Figure 4.6 A<sub>10</sub>X(Bn)A<sub>10</sub> の MALDI TOF マススペクトル ;  
マトリックスとして 3-hydroxypyridine-2-carboxylic acid  
を用いた ; (a) ポジティブイオン、(b) ネガティブイオン。

### 4-3 人工オリゴヌクレオチドの二本鎖形成における金属イオンの効果

4-2 で合成した 2-アミノフェノール (Bn) 型ヌクレオチドを導入したオリゴ DNA、**X1**、**Y2**、**X3**、の二本鎖形成に及ぼす各種金属イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pt}^{2+}$ ) の効果を UV 融解温度測定により検討した。Figure 4.7 に本研究において用いた DNA オリゴマーのシーケンスを示す。

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT : AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (**dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>**)  
 TTTTTTTTTTT**X**TTTTTTTTTTTTT : AAAAAAAAA**X**AAAAAAAAA (**X1**)  
 T**X**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**X**T : A**X**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**X**A (**Y2**)  
 TTTTTTTTTT**XXX**TTTTTTTTTTTTT : AAAAAAAAA**XXX**AAAAAAAAA (**X3**)  
 (**x** = 2-アミノフェノール (Bn) 型ヌクレオシド)

**Figure 4.7** 本研究で用いた参照シーケンス  
**dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** と、2-アミノフェノール (Bn) 型  
 ヌクレオチドを導入したオリゴ DNA、**X1**、**Y2**、**X3**



**Figure 4.8** 2-アミノフェノール (Bn) 型ヌクレオシドを導入したオリゴ DNA と、**dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** の二本鎖融解温度曲線; [oligonucleotide] = 25  $\mu\text{M}$  / base pair in 10 mM Mops, 0.1 M NaCl (pH 7.0)

Figure 4.8 には、金属非存在下における  $dT_{21}$ - $dA_{21}$ 、**X1**、**Y2**、**X3**、の融解曲線を、

Table 4.2 には、それぞれの曲線における融解温度の比較について示した。波長は核酸塩基の極大吸収波長付近の 260 nm を選択した。参照シーケンス  $dT_{21}$ - $dA_{21}$  の融

点 46.5 °C に対して、**X1** と **X3** の融点はそ

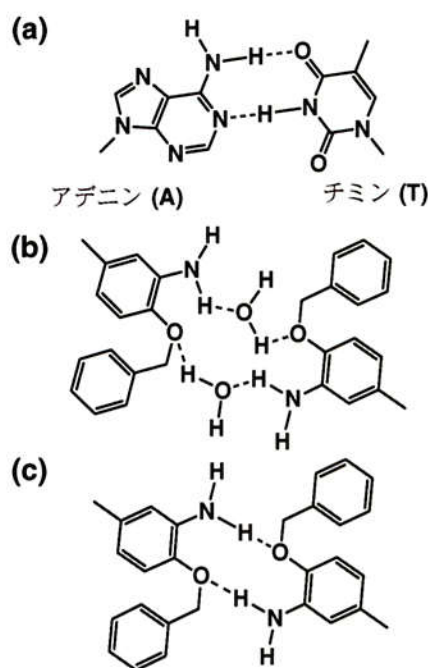
れぞれ 4.0 °C、8.8 °C 低下した。ミスマッチを含む DNA の熱的安定性はパーフェクトマッチの二本鎖 DNA より低いことが知られているので、この結果は金属イオンがないときの 2-アミノフェノール (Bn) 型塩基による対形成はミスマッチであることが推察される。中央に人工ヌクレオシドを三つ導入した **X3** の方が、一つ導入した **X1** よりも融解温度は低いことも、この推察を強く支持している。これに対し、端の方に二

つ導入した **Y2** の融点は 1.3 °C 上昇した。上昇の度合いはわずかではあるが、ミスマッチが DNA を不安定化する、という予想とは異なる結果である。可能性としては、*O*-ベンジルアミノフェノール同士の水素結合などを介した塩基対形成や、芳香環による疎水的会合などが考えられる (Figure 4.9 (b), (c))。では **X1**、**X3** においては通常ミスマッチとして DNA を不安定化することとの

関連についてはどういう解釈ができるだろうか？。DNA 二本鎖においては、末端部位の水素結合は中央部

**Table 4.2** 4 種類のオリゴ DNA の融解温度の比較

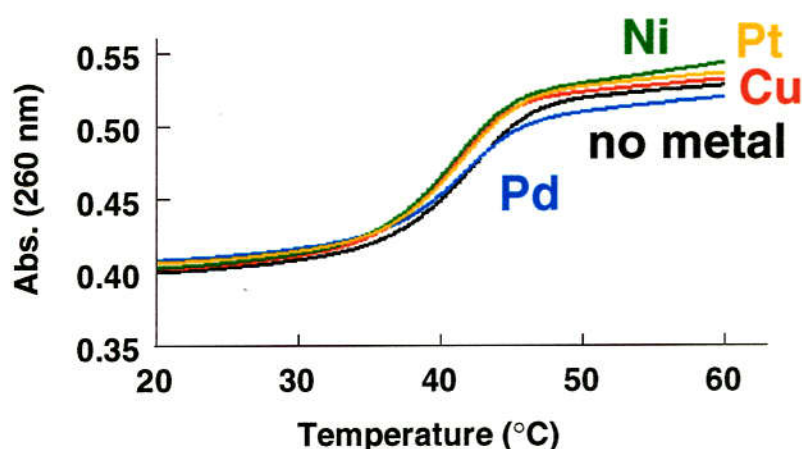
	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
$dT_{21}$ - $dA_{21}$	46.5	
<b>X1</b>	42.5	- 4.0
<b>X3</b>	37.7	- 8.8
<b>Y2</b>	47.8	+ 1.3



**Figure 4.9** 二つの *O*-ベンジルアミノフェノールからなる新塩基対、(a) アデニン-チミン塩基対、(b) 水分子を介する新塩基対、(c) 二本の水素結合による新塩基対

位の水素結合よりも不安定であることがイミノプロトン NMR 測定などによって知られている。よって温度上昇に伴う二本鎖の解離は端から進行すると考えられ、末端部位の二本鎖構造は中央部位よりも柔軟であると考えられる。よって、中央部位に存在する塩基対間では水分子を介する塩基対を形成できないが、末端部位に存在する塩基対間では、水素結合による塩基対を形成し二本鎖が安定化すると考えることもできる。二本鎖の中央部位において、塩基対が形成されることにより周辺の塩基対の高次構造が乱される結果、二本鎖が不安定化される可能性も考えられる。中央部位に非天然型塩基が存在する場合に二本鎖が不安定になる現象は、Kool らの疎水的な水素結合を有しない人工核酸塩基においても見られた現象でもある [20]。O-ベンジルアミノフェノール (Bn) 同士からなる塩基対の存在が確認されれば、本研究の当初の目標である “金属を介した” 塩基対とはならないが、新しい塩基対として展開できる可能性は十分にあると考える。

吸光度が増加する濃色効果については、 $dT_{21}-dA_{21}$  では 1.4 倍、**X1** では 1.4 倍、**Y2** では 1.4 倍、**X3** では 1.3 倍であり、有為な差は観察されなかった。



**Figure 4.10** 中央に一つ 2-アミノフェノール (Bn) 型ヌクレオシドを導入したオリゴDNA **X1** に、2 価の金属イオンを二本鎖当たり 1 当量加えた場合の融解曲線; [DNA duplex] = 1.2  $\mu$ M in 10 mM Mops, 0.1 M NaCl (pH 7.0)



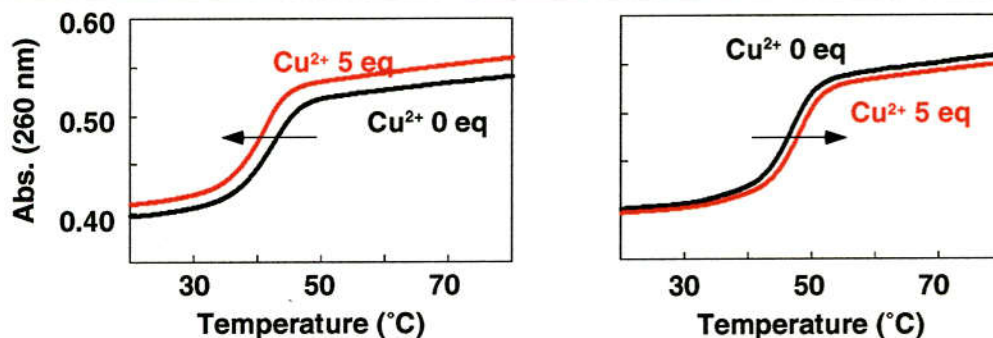
## 第 4 章

次に、人工ヌクレオシドを中央に一つ導入したオリゴDNA **X1** に対する 2 価の金属イオン  $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pt}^{2+}$ それぞれの効果について検討した。Figure 4.10 には、二本鎖当たり金属イオンを 1 当量加えた場合の融解曲線を、Table 4.3 には、それぞれの曲線における融解温度の比較について示した。金属イオンを加えないときの  $T_m$  は  $42.5^\circ\text{C}$  であり、金属イオンを加えることにより、いずれの場合も  $T_m$  は低下した。

**Table 4.3** 人工DNA **X1** の  $T_m$  に対する 2 価金属イオンの効果

	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
no metal	42.5	
<b>Pd</b>	41.5	- 1.0
<b>Cu</b>	40.7	- 1.8
<b>Ni</b>	41.0	- 1.5
<b>Pt</b>	41.3	- 1.2

	<b>X1</b> TTTT TTTT TTTT <b>X</b> TTTT TTTT TTTT AAAAAA AAAAAA <b>X</b> AAAAAA AAAAAA		<b>dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub></b> TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA	
$\text{Cu}^{2+}/\text{eq}$	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
0	42.5		46.5	
5	40.3	- 2.2	47.7	+ 1.2

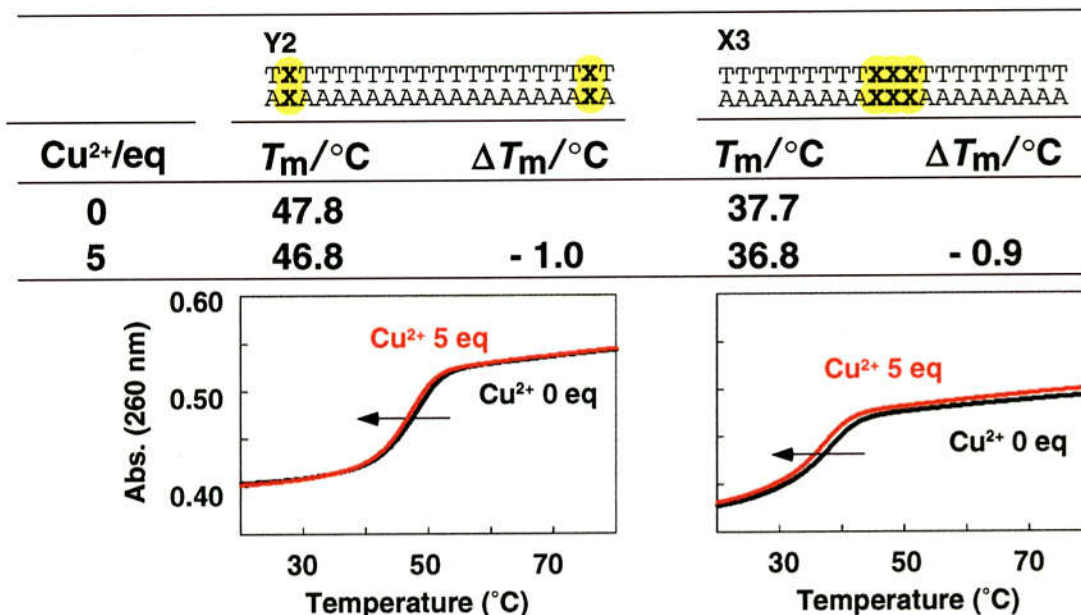


**Figure 4.11** 中央に一つ 2-アミノフェノール (Bn) 型ヌクレオシドを導入したオリゴDNA **X1** と **dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** それぞれに  $\text{Cu}^{2+}$ イオンを二本鎖当たり 5 当量加えた場合の融解曲線; [DNA duplex] =  $1.2\ \mu\text{M}$  in 10 mM Mops, 0.1 M NaCl (pH 7.0)

次に、最も顕著に  $T_m$  が低下した  $\text{Cu}^{2+}$ イオンの効果に関して更に詳しい検討を行なった。Figure 4.11 には **X1** と **dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** のそれぞれに  $\text{Cu}^{2+}$ イオンを二本鎖あたり 5 当量を加えた結果を示した。**X1** では  $\text{Cu}^{2+}$ イオンを加えること

## 第 4 章

により 42.5 °C から 40.3 °C へと  $T_m$  が低下し、対照的に人工ヌクレオシドを含まない dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub> では 46.5 °C から 47.7 °C へと  $T_m$  が上昇した。Y2 と X3 では X1 と同様に  $T_m$  が低下した (Figure 4.12)。



**Figure 4.12** 2-アミノフェノール (Bn) 型ヌクレオシドを導入したオリゴDNA Y2 と X3 それぞれに Cu<sup>2+</sup>イオンを二本鎖当たり 5 当量加えた場合の融解曲線; [DNA duplex] = 1.2 μM in 10 mM Mops, 0.1 M NaCl (pH 7.0)

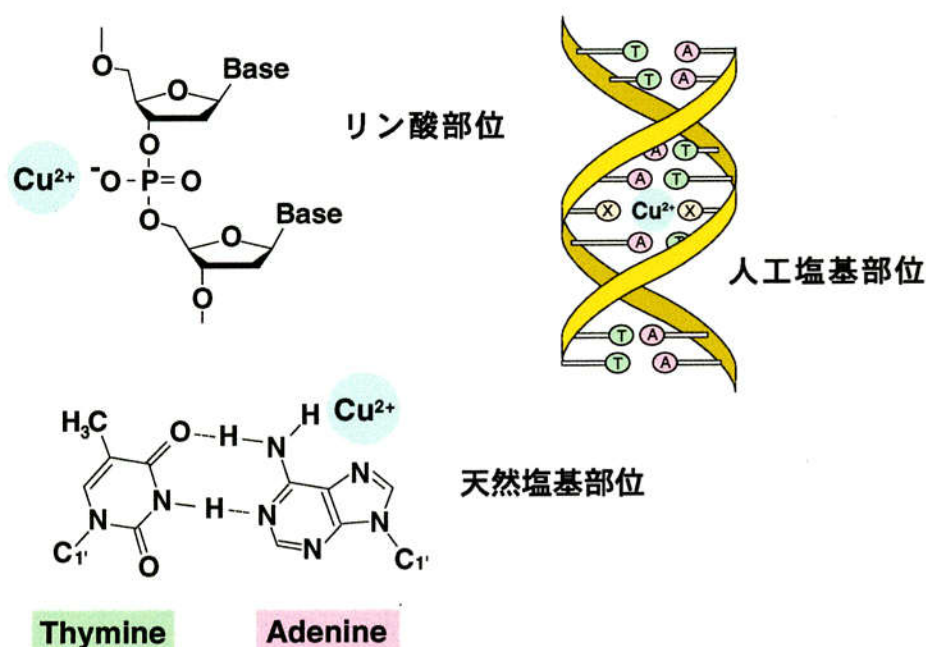
Figure 4.13 に、人工DNAの  $T_m$  に対する Cu<sup>2+</sup>イオンの効果についてまとめた。X1 に加える Cu<sup>2+</sup>イオンの当量が増加するにつれて  $T_m$  は低下した。二本鎖当たり Cu<sup>2+</sup>イオンを 5 当量加えたときの  $T_m$  から、加えていないときの  $T_m$  を差し引くと、人工ヌクレオシドを導入した 3 種類では  $T_m$  が低下し、dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub> では  $T_m$  が上昇した。

これらの Cu<sup>2+</sup>イオンの効果について

	シーケンス	0 eq	1 eq	5 eq	$T_m'' - T_m'$ /°C
		$T_m$ /°C	$T_m'$ /°C	$T_m''$ /°C	
人工ヌクレオシドを導入した 3 種類では $T_m$ が低下し、dT <sub>21</sub> -dA <sub>21</sub> では $T_m$ が上昇した。	X1	42.5	40.7	40.3	- 2.2
	Y2	47.8	-	46.8	- 1.0
	X3	37.7	-	36.8	- 0.9
	dT <sub>21</sub> -dA <sub>21</sub>	46.5	-	47.7	+ 1.2

**Figure 4.13** 人工DNAの  $T_m$  に対する Cu<sup>2+</sup>イオンの効果

考察を行なった (Figure 4.14)。Cu<sup>2+</sup>イオンのDNAへの相互作用部位として、リン酸部位、天然塩基部位、人工塩基部位の 3 つが考えられる。リン酸部位へ Cu<sup>2+</sup>イオンが相互作用すると、アニオン電荷の反発が中和され二本鎖構造が安定化すると考えられる。一方、天然塩基部位と Cu<sup>2+</sup>イオンが相互作用すると、塩基対間の水素結合が弱められ二本鎖が不安定化することが一般に知られている。また本研究においては、人工塩基部位との相互作用が考えられる。本研究での一連の実験では、これらの要因が同時に作用していると考えられる。

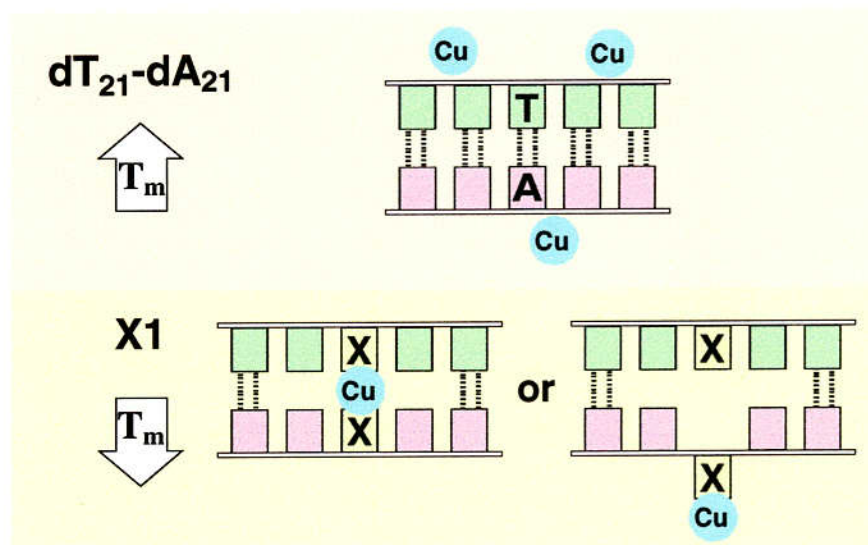


**Figure 4.14** Cu<sup>2+</sup>イオンとDNAが相互作用すると考えられる 3 つの部位

天然DNAである **dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub>** に Cu<sup>2+</sup>イオンを加えると二本鎖が安定化したことから、Cu<sup>2+</sup>イオンは天然塩基部位よりもリン酸部位に優先的に相互作用していると考えられる (Figure 4.15)。また、人工ヌクレオシドを中央に一つ導入した人工DNAである **X1** に Cu<sup>2+</sup>イオンを加えると不安定化したことから、この場合には Cu<sup>2+</sup>イオンとリン酸部位との相互作用による安定化に打ち勝つ不安定化の要因があると考えられ、その要因が人工塩基部位との相互作用であることが一つの可能性として考えられる。他の Pd<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Pt<sup>2+</sup>イオンの存在



により二本鎖が不安定化したことに対しても同様の考察が可能である (Figure 4.10)。



**Figure 4.15** 天然DNA  $\text{dT}_{21}\text{-dA}_{21}$  と、人工DNA **X1** に対する  $\text{Cu}^{2+}$  イオンの相互作用

#### 4-4 実験の部

**General Information.** All reactions were carried out in oven dried glasswares under argon atmosphere with commercial dehydrated solvents (Wako). 4,4'-Dimethoxytrityl chloride (DMTr-Cl) was purchased from TCI. 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite was purchased from Aldrich. *N,N*-Diisopropylethylamine was obtained from Wako, dried over KOH, and distilled at atmospheric pressure. All other reagents were purchased from Wako and were used without further purification. Column chromatography was performed using Wakogel C-300 silica gel (Wako). <sup>1</sup>H NMR spectra referenced to TMS were recorded on a Bruker DRX500 (500 MHz) spectrometer. <sup>31</sup>P NMR spectrum in CDCl<sub>3</sub> 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 (δ) 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. MALDI-TOF mass spectra were recorded on Shimadzu/Kratos laser ionization time of flight mass spectrometer AXIMA-CFR.

**Synthesis of *O*-benzyl-2-trifluoroacetamide-4-[1,2-dideoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranos-1-yl]-phenol (16)** [21]. **9** (247 mg, 0.600 mmol) was coevaporated with pyridine (1 mL) twice. To a solution of **9** in dry pyridine (0.95 mL) was added DMTr-Cl (434 mg, 1.28 mmol) dividing into 2 portions over 30 min at 0 °C, and stirred for 45 min at room temperature. Only when DMTr-Cl was added, the solution was kept at 0 °C. The solution was poured into AcOEt (60 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (20 mL). The organic extract was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and the solvent was concentrated. The residue was purified by silica gel column

chromatography (4φ x 9.5 cm) with MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99) to afford 322 mg (75%) of **16** as colorless solid, mp 61.5-62.5 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.76 (br, 1H, D<sub>2</sub>O exchangeable), 2.02 (ddd, 1H,  $J_{2,3} = 6.2$  Hz,  $J_{1,2} = 10.0$  Hz,  $J_{2,2'} = 13.1$  Hz, H-2'), 2.24 (ddd, 1H,  $J_{1,2} = 2.1$  Hz,  $J_{2,3} = 5.7$  Hz,  $J_{2,2'} = 13.1$  Hz, H-2''), 3.26 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 5.9$  Hz,  $J_{5,5'} = 9.8$  Hz, H-5'), 3.38 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 4.6$  Hz,  $J_{5,5'} = 9.7$  Hz, H-5''), 3.79 (s, 6H, OMe), 4.01-4.04 (br, 1H, H-4'), 4.41 (ddd, 1H,  $J_{3,4} = 2.9$  Hz,  $J_{2,3} = 5.6$  Hz,  $J_{2,3'} = 5.8$  Hz, H-3'), 5.13 (dd, 1H,  $J_{1,2} = 2.8$  Hz,  $J_{1,2'} = 9.9$  Hz, H-1'), 5.15 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.82 (d, 4H,  $J = 8.8$  Hz, MeOCCH=CH or MeOCCH=CH), 6.94 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8.4$  Hz, H-6), 7.18-7.23 (m, 2H), 7.25-7.28 (m, 6H, including residual CHCl<sub>3</sub>), 7.33-7.47 (m, 11H), 8.2<sup>8</sup> (d, 1H,  $J_{3,5} = 1.9$  Hz, H-3), 8.59 (br, 1H, D<sub>2</sub>O exchangeable). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 43.5 (C-2'), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 64.5 (C-5'), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 74.7 (C-3'), 79.4 (C-1'), 86.2 (C-4'), 86.3, 112.2 (C-6), 113.2 (MeOCCH=CH or MeOCCH=CH), 115.67 (q,  $J_{C-F} = 289$  Hz, CF<sub>3</sub>), 118.3 (C-3), 123.5, 125.4, 126.8, 127.3, 127.8, 128.2, 128.6, 128.9, 130.1, 135.5, 135.9, 136.1, 144.9, 147.0, 154.3 (q,  $J^2_{C-F} = 36.5$  Hz, CO), 158.6 (C=O). ESI MS (CH<sub>3</sub>CN, positive):  $m/z$ , proposed ion: 736.2, [M+Na]<sup>+</sup>.

**Synthesis of *O*-benzyl-2-trifluoroacetamide-4-[1,2-dideoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranos-1-yl] phenol-3'-*O*-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)phosphoramidite (**17**).** **16** (257 mg, 0.36 mmol) was coevaporated with pyridine-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:9) (5 ml) twice. To the solution of **16** in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.3 mL) was added *N,N*-diisopropylethylamine (250 μL, 1.46 mmol) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (250 μmol, 1.12 mmol), and stirred for 90 min at room temperature. After the reaction was quenched with methanol (0.50 mL, 12.3 mmol), the solution was poured into aq. NaHCO<sub>3</sub> (4.21 mM, 200 mL), and extracted with Et<sub>2</sub>O (160 mL). The organic phase was washed with aq. NaHCO<sub>3</sub> (4.21 mM, 200 mL) and brine (80 mL) twice, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residual oil was purified by column chromatography (3φ x 11.5 cm) with Et<sub>2</sub>O-*n*-

## 第 4 章

hexane (2:1) (including 5% triethylamine), and coevaporated with toluene to afford 302 mg (92%) of **17** as pale yellow powder, mp 44.5-46.5 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.08 (d, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 1.15-1.19 (m, 8H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 1.95-2.03 (m, 0.9H, H-2'), 2.30-2.42 (m, 0.7H, H-2''), 2.44-2.47 (m, 0.6H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.62 (t, 1.0H,  $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2} = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.23-3.33 (m, 1.9H, H-5' and H-5''), 3.54-3.64 (m, 1.6H,  $\text{CH}_3\text{CHCH}_3$ ), 3.66-3.73 (m, 0.5H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.79 (s, 3H, OMe), 3.80-3.88 (m, 0.4H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 4.21 (br, 0.9H, H-4'), 4.49 (br, 1H, H-3'), 5.12 (dd, 1H,  $J_{1,2'} = 10.0$  Hz,  $J_{1,2''} = 5.0$  Hz, H-1'), 5.16 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ), 6.79-6.83 (m, 3.9H,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 9.0$  Hz,  $\text{MeOCCH=CH}$  and  $\text{MeOCCH=CH}$ ), 6.95-6.97 (m, 1.0H,  $J_{5,6} = 8.5$  Hz,  $J_{5,6} = 8.5$  Hz, H-6), 7.17-7.19 (m, 0.8H), 7.20-7.25 (m, 6.5H, including residual  $\text{CHCl}_3$ ), 7.29-7.42 (m, 7.9H), 7.45-7.47 (m, 1.6H), 8.29-8.30 (m, 1.0H, H-3), 8.61 (br, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exchangeable).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 24.9 ( $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 25.0 ( $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 25.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 25.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 30.2 ( $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 43.6, 43.6, 43.7, 43.7 ( $\text{CH}_3\text{CH}$ , C-2'), 55.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 58.7 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 58.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 64.5 (C-5'), 64.6 (C-5'), 71.8 ( $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ), 76.2 (C-3'), 76.3 (C-3'), 76.6, 76.7, 80.2 (C-1'), 80.2 (C-1'), 86.2, 86.2, 86.5, 86.6, 112.7 (C-6), 113.6 ( $\text{MeOCCH=CH}$  and  $\text{MeOCCH=CH}$ ), 116.1 (q,  $J_{\text{C-F}} = 287$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 118.0, 118.1, 118.9, 118.9 (C-3), 123.9, 125.7, 125.7, 127.2, 127.2, 127.8, 128.2, 128.7, 128.8, 129.0, 129.4, 130.6, 130.7, 135.8, 136.3, 136.6, 145.4, 147.4, 154.7 (q,  $J_{\text{C-F}}^2 = 36.2$  Hz, CO), 158.9 (C=O).  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  148.15, 147.88. ESI MS ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , positive):  $m/z$ , proposed ion: 936.4,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Oligonucleotide Syntheses** [22, 23]. The oligonucleotides were synthesized by using Applied Biosystems 394 DNA / RNA synthesizer in 1.0  $\mu\text{M}$  scale (trytyl on mode), according to the User's Manual [24]. After chain assembly and cleavage from solid support, the oligomers were deprotected by treatment with concentrated  $\text{NH}_3$  (55° C, 8 h), and purified with reversed phase column chromatography as standard procedures [25, 26]. Purity of the obtained oligonucleotides were checked by using

RP-HPLC (TSK gel ODS-80Ts).

**UV Melting Experiments.** UV melting experiments were performed on a Hitachi U-3000 UV/vis Spectrometer. Melting curves ( $\lambda = 260$  nm) were recorded for a consecutive heating (10-85 °C) cooling-heating protocol with a linear gradient of 1.0 °C / min. All measurement were conducted in buffer solution (10 mM Mops, 0.1M NaCl (pH 7.0)). Concentration of oligonucleotides were determined by UV absorbance at 260 nm [27, 28]. Molar coefficient of *O*-benzyl-2-aminophenol was used in substitution for that of the artificial nucleotide without regard for nearest neighbor effect.

### 4-5 まとめ

現在では、広く市販されているDNA自動合成機により、フォスフォロアミダイト固相法に必要なフォスフォロアミダイト体さえ合成できれば、設計の通りの長さや配列をもったオリゴヌクレオチドが合成できる。したがって、目的に応じて、任意の位置に任意の数の金属錯体型塩基対をDNAに導入することが可能になる。

筆者は最初に、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドをオリゴヌクレオチドに導入する試みを種々行ったが、残念ながら、最後の脱保護反応が進行しなかった。そこで次に、フェノール性水酸基をベンジル基で保護した 2-アミノフェノール (Bn) 型人工ヌクレオシドのフォスフォロアミダイトを合成し、dT<sub>21</sub>-dA<sub>21</sub> の両方の鎖の中央に一つ、両端に二つ、中央に三つ導入した 21 量体DNAオリゴマー **X1**、**X2**、**X3** をそれぞれ合成した。オリゴヌクレオチドに導入された 2-アミノフェノール (Bn) 型人工ヌクレオシドの塩基部位と金属イオンとの相互作用を、二本鎖構造の熱力学的安定性により評価した。2 価の金属イオン、Cu<sup>2+</sup>、Pd<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Pt<sup>2+</sup> をオリゴDNAの溶液に加え、二本鎖DNAの融解過程に対する金属イオンの効果について検討を行ったところ、いずれの場合もわずかなではあるが融点降下が見られた。また、銅イオンを加えた場合、天然DNAでは融点が上昇し二本鎖が安定化したが、対照的に、人工DNAでは融点が低下し二本鎖が不安定化した。この不安定化の要因として、銅イオンと人工塩基との相互作用が一つの可能性として考えられる。

## References and Notes

- 1) (a) Asseline, U.; Delarve, M.; Lancelot, G.; Toulme, F.; Thoung, N.T.; Montenary-Garestier, T.; Helene, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3297-3301. Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: Intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides.  
(b) Thoung, N.T.; Chassignol, M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5905-5908. Solid phase synthesis of oligo- $\alpha$ - and oligo- $\beta$ -deoxynucleotides covalently linked to an acridine.  
(c) Letsinger, R.L.; Zhang, G.; Sun, D.K.; Ikenchi, T.; Sarin, P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6553-6556. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: Synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture.  
(d) Chu, B.C.F.; Oragel, L.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 963-967. Nonenzymatic sequence-specific cleavage of single-stranded DNA.  
(e) Dreyer, G.R.; Dervan, P.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 968-972. Sequence-specific cleavage of single-stranded DNA: Oligodeoxynucleotide-EDTA-Fe (II).
- 2) 生田哲、1998. 「遺伝子技術とクローン」入門ビジュアルサイエンス、日本実業出版社.
- 3) Blackburn, G.M.; Gait, M.J. 1996. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2nd. ed. OXFORD. Chapter 3 Chemical Synthesis, 84-98.
- 4) 広瀬忠明 タンパク質 核酸 酵素 **1980**、Vol.25、No.3、225-336. 遺伝子の合成法.
- 5) Reese, C. B. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3143-3179. The chemical synthesis of oligo- and poly-nucleotides by the phosphotriester approach.
- 6) Kornberg, A.; Baker, T.A. 1992. *DNA Replication*, 2nd. ed. W. H. Freeman and

company New York.

- 7) 大塚栄子 有機合成化学協会誌 **1978**, Vol.36, No.9, 723-731. 核酸合成における保護基.
- 8) 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.
- 9) 岩井成憲、大塚栄子 蛋白質 核酸 酵素 **199**, 39, No.11, 1788-1799. DNA/RNA 合成機.
- 10) 生田哲、1995. 「ヒト遺伝子のしくみ」入門ビジュアルサイエンス、日本実業出版社.
- 11) 和田允、1988. CG でバイオ分子を見る、東京化学同人、103.
- 12) Arnott, S.; Hukins, D.W.L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, 47, 1504-1510. Optimised parameters for A-DNA and B-DNA.
- 13) 生化学辞典第二版、1996. 855.
- 14) Wang, A.H.-J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; van der Marel, G.; van Boom, J.H.; Rich, A. *Science* **1981**, 211, 171-176. Left-handed double helical DNA: Variations in the backbone conformation.
- 15) 竹中章郎、松本治、1995. 蛋白質 核酸 酵素 7月号増刊号、核酸化学の新展開 新しい機能性分子を求めて、共立出版、1527. 核酸分子の相互作用における構造モチーフ.
- 16) Saenger, W., 1987. 核酸構造、シュプリンガー・フェアラーク東京.
- 17) Caruthers, M.H. *Science* **1985**, 230, 281-285. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses.
- 18) (a) Piccirilli, J.A.; Krauch, T.; Moroney, S.E.; Benner, S.A. *Nature* **1990**, 343, 33-37. Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet.  
(b) Matray, T.J.; Kool, E.T. *Nature* **1999**, 339, 704-708. A specific partner for abasic damage in DNA.



- (c) Horlacher, J.; Hottiger, M.; Podust, V.; Hübscher, U.; Benner, S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 6329-6333. Recognition by viral and cellular DNA polymerases of nucleosides bearing bases with nonstandard hydrogen bonding patterns.
- (d) Griffin, L.C.; Kiessling, L.L.; Beal, P.A.; Gillespie, P.; Dervan, P.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7976-7982. Recognition of all four base pairs of double-helical DNA by triple-helix formation: Design of nonnatural deoxyribonucleosides for pyrimidine·purine base pair binding.
- (e) Durland, R.H.; Rao, T.S.; Seth, D.M.; Jayaraman, K.; Revankar, G.R. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 647-653. Azole substituted oligonucleotides promote antiparallel triplex formation at non-homopurine duplex targets.
- 19) Models 392 and 394 DNA/RNA Synthesizers, User's Manual, Section 2, Operation.
- 20) Schweizer, B.A.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863-1872. Hydrophobic, non-hydrogen-bonding bases and base pairs in DNA.
- 21) Gait, M.J. Eds. *Oligonucleotide synthesis*, IRL PRESS. 1984. Chapter 2, Preparation of protected deoxyribonucleosides.
- 21) 中山広樹、西片敬人 1995. バイオ実験イラストレイテッド、(1) 分子生物学実験の基礎. 秀潤社.
- 23) 田村隆明 1997. 遺伝子工学実験ノート、(上) DNA取扱いの基本とサブクローニング. 羊土社. Chapter 2 DNA取扱いの基本、20-37.
- 24) Applied Biosystems 製 Model 394 DNA / RNA Synthesizer の使用説明書。
- 25) Models 392 and 394 DNA/RNA Synthesizers, User's Manual, Section 6, Chemistry for Automated DNA/RNA Synthesis.
- 26) Evaluating and Isolating Synthetic Oligonucleotides. Applied Biosystems.
- 27) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. 589-595. Optical properties of nucleic acids, absorption, and circular dichroism spectra.
- 28) The Schepartz Lab Biopolymer Calculator, <http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>.

## 第 5 章

## 結 論

### **An Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing: Novel $\beta$ -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.* **2001**, *13*, 77-83.

### **A Palladium-Mediated DNA Base Pair of a $\beta$ -C-Nucleoside Possessing a 2-Aminophenol as the Nucleobase**

Motoyuki Tasaka, Kentaro Tanaka, and Mitsuhiro Shionoya  
*Supramolecular Chemistry*, **2001**, *13*, 671-675.

### **Toward Nano-Assembly of Metals through Engineered DNAs**

Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, and Mitsuhiro Shionoya  
*Supramolecular Chemistry*, in press.

## 5 結論

DNAは遺伝や生命維持活動に関する情報を担う生体高分子である。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保持している。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最も重要な役割を果たしている。このようなDNA分子を化学合成的手法を駆使して官能基レベルで修飾、変換し、新しい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。

本研究では、DNA分子の核酸塩基間の相補的水素結合を金属配位結合に置き換えることを目的とした。このような金属配位結合を塩基対の相互認識様式として導入することにより、塩基対間の、ひいてはDNA鎖間の結合の強さ、可逆性、構造などを制御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 2-アミノフェノ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。2-アミノフェノール型  $\beta$ -C-ヌクレオシドは、フリーデル-クラフツ反応と三段階の脱保護反応を経て合成することができた。

第三章では  $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  と 2-アミノフェノール型人工ヌクレオシド **g** との錯形成による塩基対形成について検討した。ESI-TOF マススペクトル測定と  $^1\text{H}$  NMR 測定により、2-アミノフェノール型人工ヌクレオシドがそれぞれ  $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  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。

第四章では、フォスフォロアミダイト固相合成法により、ベンジルアミノフェノール型人工ヌクレオシドを含む 21 量体DNAオリゴマー 3 種を合成した。 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pt}^{2+}$  イオン存在下における二本鎖融解実験を行った結果、融点降下が見られ高次構造変化が示唆された。

天然の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 2-アミノフェノ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。2-アミノフェノールは様々の遷移金属イオンと平面四角型、四面体型、八面体

型などの錯体構造をとり得るため、2-アミノフェノールを核酸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、2-アミノフェノ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ことが考えられる。残念ながら、オリゴヌクレオチドの脱保護反応は成功しなかったが、保護基のついたアミノエーテル型のオリゴヌクレオチドにおいても、 $\text{Cu}^{2+}$ イオンと特異な相互作用をすることが見出された。

金属イオンに誘起されるDNA二本鎖の直接的な証拠を得ること、DNAオリゴマーにおけるベンジル基の脱保護反応を検討すること、脱保護したアミノフェノール型人工DNAと金属イオンとの相互作用を検討することなどが、今後の課題である。

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は、配位子のシーケンスを設計することにより様々な金属イオン配列を提供することが期待される。配位子型核酸塩基と金属イオンの組み合わせは数限りなくあり、将来的には、金属イオンの一次元配列構造の分子電線、光学的異方性素子などの機能性分子の構築や、金属イオンを活性点としたDNA構造変換の誘起、転写調節などの生命化学分野への展開も可能であると期待される。また、第3、第4のアルファベットとして、DNAコンピュータの素子に用いることも一つの新しい方向であろう。本研究の結果は、いまだ端緒にすぎないが、これらの方向に一步近づいたものとする。

## 発表論文

## 原著論文

- 1) Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, and Mitsuhiko 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.*, **2001**, *13*, 77-83.
- 2) Motoyuki Tasaka, Kentaro Tanaka, Motoo Shiro, and Mitsuhiko Shionoya  
**A Palladium-Mediated DNA Base Pair of a  $\beta$ -C-nucleoside Possessing a 2-Aminophenol as the Nucleobase**  
*Supramol. Chem.*, **2001**, *13*, 671-675.
- 3) Kentaro Tanaka, Motoyuki Tasaka, Honghua Cao, and Mitsuhiko Shionoya  
**Toward Nano-Assembly of Metals through Engineered DNAs**  
*Supramol. Chem.*, in press.

## 参考論文

- 1) Motoyuki Tasaka, Masakazu Hirotsu, Masaaki Kojima, Syunji Utsuno, and Yuzo Yoshikawa  
**Syntheses, Characterization, and Molecular Mechanics Calculations of Optically Active Silatrane Derivatives**  
*Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 6981-6986.

## Proceeding

- 1) Mitsuhiko Shionoya, Akio Ojida, Michito Shiotsuka, Motoyuki Tasaka, Kentaro Tanaka  
**Metal Complexes Targeting AT-cluster Domains of Double-stranded DNA**  
*J. Inorg. Biochem.*, **1997**, *67*, 346.
- 2) Kentaro Tanaka, Honghua Cao, Motoyuki Tasaka, and Mitsuhiko Shionoya  
**Artificial DNAs with Metal-assisted Base Pairs**  
*Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1999**, *42*, 111-112.

## 学会発表

- 1) 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、広島大学、  
1998年11月.

- 2) 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.
- 3) K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
**Artificial DNAs with Metal-Assisted Base Pairing**  
 The 62nd Okazaki Conference, Okazaki, Japan, January, 1999.
- 4) 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、北海道大学、1999年9月.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
**Artificial DNAs with Metal-Assisted Base Pairs**  
 26th Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Gunma, Japan, November, 1999.
- 8) 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、大阪大学、2000年1月.
- 9) 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、日本大学、2000年3月.
- 10) K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, and M. Shionoya  
**An Alternative Base-pairing of Artificial DNA by Means of Metal Coordination**  
 XIth International Symposium on Supramolecular Chemistry (ISSC XI), Fukuoka,  
 Japan, July, 2000.
- 11) 曹紅花、田坂基行、田中健太郎、塩谷光彦  
**金属配位子を核酸塩基として導入した人工DNA**  
 第50回錯体化学討論会、立命館大学、2000年9月.
- 12) K. Tanaka, H. Cao, M. Tasaka, A. Hatano, J. Chiba, M. Shiro, and M. Shionoya

**DNAs Forming Double Strands by Metal Complexation**

錯体化学討論会第50回記念国際シンポジウム、立命館大学、2000年9月.

- 13) 田中健太郎、曹紅花、田坂基行、幡野明彦、千葉順哉、城始勇、塩谷光彦  
**金属錯生成を基にした人工DNAの二重鎖形成**  
第15回生体機能関連化学シンポジウム、奈良女子大学、2000年9月.
- 14) K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, A. Hatano, J. Chiba, M. Shiro, S. Furusho, and M. Shionoya  
**A Novel Approach to Metal-Assisted DNA Base Pairing:  $\beta$ -C-Nucleosides with a 2-Aminophenol, a Catechol, or an *o*-Phenylenediamine as the Nucleobases**  
2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, December, 2000.
- 15) 田中健太郎、田坂基行、曹紅花、山田泰之、幡野明彦、千葉順哉、城始勇、塩谷光彦  
**金属錯体で人工DNAを作る**  
第3回生命化学研究会シンポジウム、甲南大学、2001年1月.
- 16) 塩谷光彦、田中健太郎、田坂基行、曹紅花、幡野明彦、山田泰之、明谷早映子、千葉順哉、井原裕一郎、天花寺厚、平田香織、山田智之  
**金属錯体によるDNAの再構築**  
金属の関与する生体関連反応シンポジウム、岡山国際交流センター、2001年3月.
- 17) K. Tanaka, M. Tasaka, Y. Yamada, S. Aketani, A. Tengeiji, K. Hirata, S. Miyagawa, S. Hiraoka, and M. Shionoya  
**Metal-mediated DNA base pairing**  
The 26th ISMC - Satellite-Symposium Dreaming Supramolecular Chemistry for New Millennium, Hiroshima, July, 2001
- 18) 田中健太郎、田坂基行、平田香織、塩谷光彦  
**2-アミノフェノールを核酸塩基として有する人工ヌクレオチドを導入したDNAオリゴマーの合成**  
日本化学会第80秋季年会、千葉大学、2001年9月

## 謝辞

博士課程 5 年半の間に、様々な方々にお世話になりました。

東京大学 塩谷光彦教授には、5 年半の長きにわたって、研究指導のみならず、あらゆる面で多大なバックアップをしていただきました。

助手の田中さんには、私がキチンと研究を進めることができるようになるために、絶えず有益な示唆を与えていただきました。

分子科学研究所 小林速男教授には、東京大学に研究生として離れている間、指導教官としてお世話になりました。

理学電機（株）城始勇博士には、X 線結晶解析を行なっていただきました。

中央大学 芳賀正明教授、橋本祐樹様、ジャスコインタナショナル（株）古庄早苗博士には、ESI-TOF マススペクトル測定、島津製作所（株）富永晃生博士には、MALDI-TOF マススペクトル測定でお世話になりました。

塩谷研究室の方々には、博士課程後半ということもあり、博士論文作成中、大変、気を使っただきました。本論文の 4 章における仕事が大幅に進んだのは、4 年生の仕事として一緒に合成をしていただきました平田香織さんのお陰です。助手の平岡さんには、特に博士論文審査公聴会でいい発表ができるようにと大変援助していただきました。曹紅花さんには大変お世話になりました。

南開大学 Bu 先生には、大変助けていただきました。

トロント大学 Jik Chin 先生には、卒業後は一緒に仕事をしようということで、大変励ましていただきました。

大学院担当の、広岡さん、浅井さん、永井さん、永田さんには、総合研究大学院大学在学中、ならびに博士論文提出に関しまして大変お世話になりました。

里美姉、敏之兄、タカラ叔母には、絶えず精神的に支えていただきました。

武田薬品工業（株）王子田彰夫さんには、合成に関する事から何かと相談事までいろいろお世話になりました。



岡山大学理学部化学科 吉川雄三教授には、私が今に至るチャンスを与えていただきました。山本啓司先生、川本平山先生、小島正明先生、黒田泰重先生にはこれまで大変励ましていただきました。

博士論文予備審査において、十分なプレゼンテーションの準備ができていなかった私に、本審査での信用挽回のチャンスを与えていただきました、田中晃二教授をはじめとする審査員の先生方、ならびに、分子科学研究所にて 5 年 2 ヶ月を過ごしたこともあり、分子科学研究所出身者として応援していただいております、山口ゆみ子さん、神谷躬知余さん、小江誠司さんを初めとする分子科学研究所の方々や、同じく、鈴木和治君、高橋保先生、柘植清志さん、福田豊先生、藤原隆司さん、西原康師さん、を初めとする分子科学研究所出身者の方々に感謝申し上げます。

他にも多くの方々に励ましていただいております。

深く感謝申し上げますと共に、今後もその御恩に報いるべく精進してゆく所存でおります。