



Title	ピリンシクロヌクレオサイド燐酸エステルの研究
Author(s)	上杉, 晴一
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27718
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

目 次

緒 言		1
第一章	8,2'-5'-cycloadenosine 5'-monophosphate の合成	5
第一節	Adenine nucleotide の 8 位のブロム化	5
第二節	Adenine nucleotide の特異的 sulfonyl 化	17
第三節	8,2'-5'-cyclonucleotide の合成	23
第二章	8,2'-5'-cycloadenosine を含む dinucleoside monophosphate の合成	29
第三章	8,2'-5'-cycloadenosine 5'-monophosphate の重合反応	34
第四章	8-置換purine nucleoside, 及びその 5'-mo- nophosphate, 5'-pyrophosphate の合成並び に CD による Conformation の研究	39
第五章	8,2'-5'-cycloadenosine を含む Oligonucleotide の構造と性質	49
第一節	Dinucleoside monophosphate A^sA^s の構造と性 質	49
第二節	Oligonucleotide $(pA^s)_n$ の構造と性質	55
結 語		60
謝 辞		61
実験の部		62
第一章, 第一節の実験		65

第一章、第二節及び第三節の実験	73
第二章の実験	83
第三章の実験	88
第四章の実験	93
参考文献	101

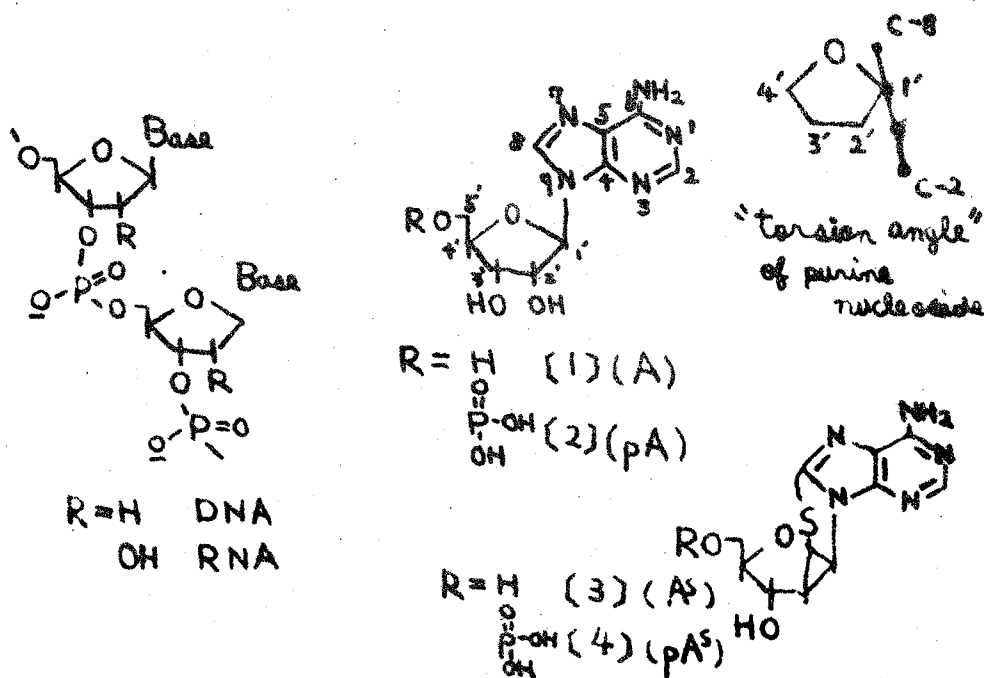
緒 言

遺伝子の本体である核酸は、生体構成成分中、最も重要な物質の一つである。この核酸の構成要素である nucleoside は、purine あるいは pyrimidine base と sugar が glycoside 結合したものであり、これのリン酸エステルを nucleotide という。nucleoside 分子の conformation の可変部は、主に sugar ring の puckering と glycoside bond のまわりの base と sugar とのなす角、いわゆる "Torsion angle" である。

核酸は、このような nucleoside or phosphodiester 結合を介して連った重合体、即ち polynucleotide であり、その機能の発現の爲には、一定の ordered structure を必要とする。polynucleotide の conformation を安定化する要因は、主に base 間の重なり (stacking) と、相補的な base との間の水素結合である。これら 2 つの interaction の様式を決定するのに、monomer unit 中の torsion angle は重要な役割をもつと思われる。従って、torsion angle の固定された sugar と base の間に第 2 の結合をもつ cyclonucleoside のリン酸エステルを monomer unit とする、oligonucleotide を合成し、その性質を研究することにより、polynucleotide の conformation に対する、torsion

angle の影響を解明することができると思われる。

天然の核酸は, sugar の 3' 位と 5' 位が phosphodiester 結合で結ばれているので, base と sugar の 2' 位が 2 の結合で結ばれている cyclonucleosides が, この目的に合う。stacking の強さを考えると adenosine 誘導体で, 化学的安定性から考えると O よりも S で結合した, 8, 2' anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabinofuranosyl) adenine (以下, 8, 2'-S-cycloadenosine あるいは A^S と省略) 誘導体が最も適している。



8, 2'-S-cycloadenosine (3) は池原²⁾等により, adenosine (1) から出発して合成されているが, 本研究には, (3) の 3' 位あるいは 5' 位にリン酸基のついたものが必要なので, adenosine 5'-monophosphate (2).

(以下 5'-AMP あるいは pA と省略) から出発する経路を開発した。

nucleoside level での反応は、普通の有機化合物とはほぼ同様に扱うことができるので、核酸の化学反応の分野で主流を占めてきた。しかし、nucleotide は、解離するリン酸基を有するので、有機溶媒に溶け難く、又、リン酸基は nucleophile としても働くので、有機溶媒中の反応を直接応用することはできない。一般に nucleotide は、nucleoside に比べ結晶性が悪く、一様に水溶性があり、特に水溶性の塩類が共存する場合は、再結晶による分離は不可能で、煩雑なイオン交換クロマトグラフィーを行わなければならない。

従来 nucleotide level の反応は、base 部分の変換が比較的多く報告されているが、³⁾ sugar 部分の反応については、acyl 化⁴⁾、phenyl 化⁵⁾、trityl 化⁵⁾、methanesulfonyl (Ms) 化⁶⁾ とその置換反応⁷⁾、リン酸化⁸⁾ 等が知られているが、8,2'-5'-cycloadenosine 5'-monophosphate [4] の合成のためには、adenine nucleotide の 8 位のハロゲン化及び、sugar 部の 2'OH 基の sulfonyl 化が必要である。adenine 以外の base をもつ nucleoside 誘導体、特に pyrimidine nucleoside のハロゲン化は、古くから行われており、nucleotide⁸⁾ についても報告があった。

8-bromoadenosine の合成は、⁹⁾ 1964 年によって初めてなされたが、この報告を直接 nucleotide に応用することは困難であった。

nucleotide の sulfonyl 化に関しては、5'-位に関しては報告があったが、⁶⁾ 2' あるいは 3' OH 基に関しては全く報告がなかった。

著者は、adenine nucleotide の 8 位の bromin 化及び、2'-OH 基の特異的 toluenesulfonyl (以下 Ts と省略) 化に成功し、主に水溶液中の反応を用いて、adenosine 5'-monophosphate [2] より、3 行程で、8, 2'-S-Cycloadenosine 5'-monophosphate [4] (PA^S) の合成に成功した。

次に、 PA^S [4] を化学的に重合させ、種々の長さの oligonucleotide (PA^S)_n を合成した。一方、nucleoside より出発し、 A^S [3] の dinucleoside monophosphate $A^S A^S$ を合成し、NMR, CD 等により、その構造を明かにした。

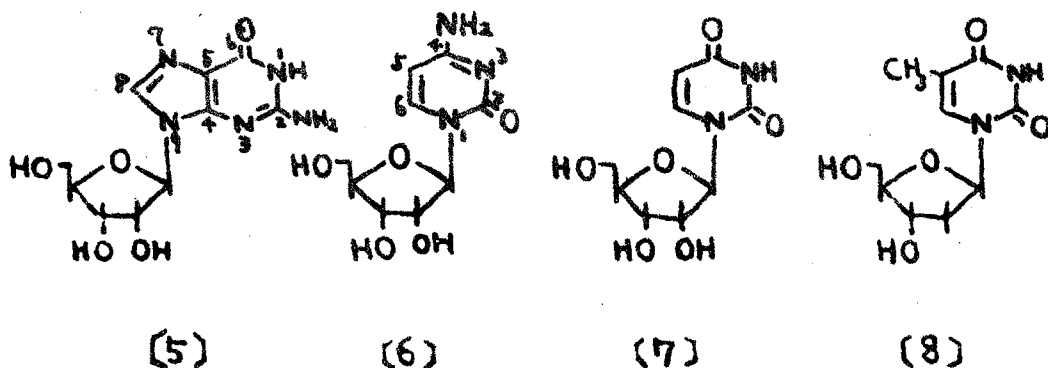
又、種々の 8-置換 nucleoside, nucleotide, dinucleoside pyrophosphate を合成し、 A^S 誘導体との比較により、その溶液中における torsion angle について知見を得た。

第一章 8,2'-5-Cycloadenosine 5'-monophosphate (4), PA^S の合成

第一節 adenine nucleotide の 8 位の ブロム化

リボ核酸(RNA)を構成する4種の nucleoside 誘導体のうち、adenosine 誘導体のみは、ブロム水(以下 Br_2 水と省略)等のブロム化剤により、全く反応しないとされていた。

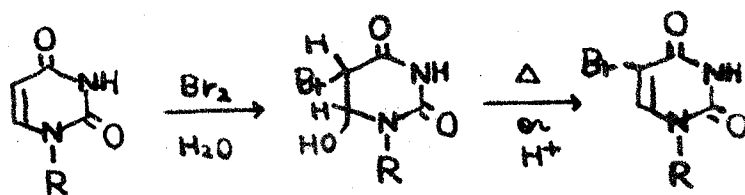
例えば、A.S. Jones⁽¹⁰⁾等は、種々の nucleoside, nucleotide を水あるいは 0.1 N HCl 中に溶し、約 100 当量の飽和 Br_2 水を加えて、10 分間反応させているが、guanosine (5), cytidine (6), uridine (7) 及び thymidine 誘導体では、その 260 m μ 付近の吸収帯が消失するが、adenosine 誘導体のみは始めど吸収に変化はなく、反応していないと報告している。



⁽¹¹⁾
K.W. Bramer は、pH 7 及び pH 9 の buffer 溶液中、1 当量の N-bromosuccinimide あるいは Br₂ を用いて nucleotide のブロム化反応を調べているが、adenine nucleotide のみは、UV 吸収の減少がなく、全く反応しないと報告している。

J. Duvál⁽¹²⁾ 等は、dimethylformamide (DMF) 中 Br₂ の条件で、cytidine [6] 及び uridine [7] の 5-Br 体、guanosine [5] の 8-Br 体を得ているが、adenosine のブロム化 (Br 化と略す) は行かないと報告している。

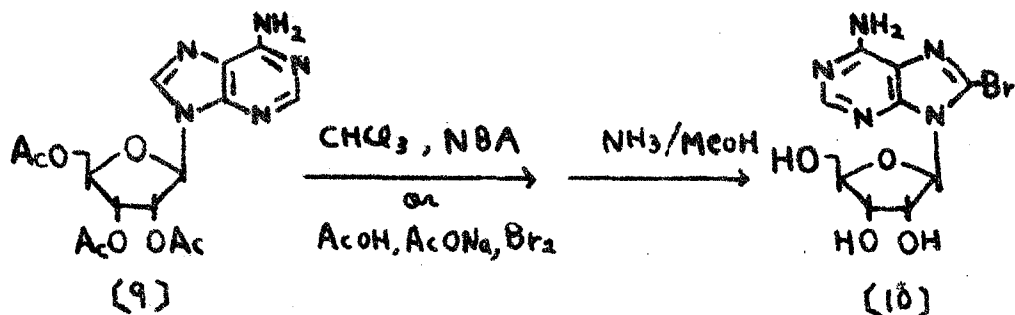
Pyrimidine nucleoside 誘導体の場合は、水のある条件でブロム化すると、260 mμ 付近の UV 吸収が消失し、反応混合物を酸又は熱で処理することにより、5-Br 体を得られており、その反応機構は次のように考えられている。⁽¹³⁾ 即ち、先ず 5,6 の二重結合に付加反応が起り、これの脱水によって 5-Br 体を得られる。



guanosine 誘導体の場合も同じような付加反応が起って、UV 吸収が消失すると思われるが、pH 7 buffer 中では、8-Br 体らしきものがとれるという。現在では、guanosine を飽和 Br₂ 水で数分間扱う

ことにより, 8-bromoguanosine が得られることが判っている。⁽¹⁴⁾

1964年に至り, Holmes, Robins等は, 2', 3', 5'-O-triacyl adenosine [9]を, CHCl_3 中, N-bromoaceta-
mide (NBA)あるいは, 酢酸ナトリウムを含む酢酸中
 Br_2 でブロム化し, NH_3 飽和メタノールで脱保護して,
初めて 8-bromoadenosine [10]を合成した。⁽⁹⁾ しか
し, この方法では, 保護した nucleoside を必要とし
、NBA の不安定性, Br_2 体の glycoside bond は非常に
酸に弱くなるため, 反応温度 (60°), [9] から [10] ま
での収率 48% 等に難点があり, 又, 溶解性の問題から
、nucleotide に直接応用することはできない。^{*}



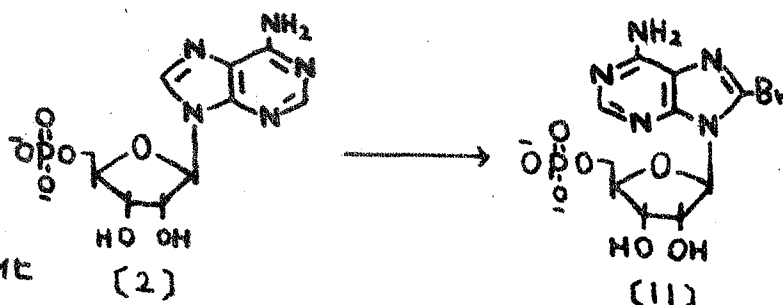
著者は, 種々条件を検討中, 5'-AMP (2) 水溶液に
、 NaOH 存在下, Br_2 水を加えると, 8位にブロム
化が行くことを見出した。⁽¹⁵⁾ small scale (5'-AMP
0.05 mmole, Br_2 0.2 mmole, 全量 1 ml) で反応を

^{*} 著者の予備的実験では, adenosine 3', 5'-cyclic mono-
phosphate の 4-morpholine N,N'-dicyclohexyl carboxamidium
salt で dioxane-DMF 中 NBA を用いて, 約 30% 位, Br_2 体が得られる。

行い、溶媒^{*}Bのペーパークロマトグラフィーで調べると、概ね、3つのspot (R_f 0.31, 0.19, 0.05, 但し、0.19は原料)が観察される。この一番上のspotは、UV吸収から、8-bromoadenosine 5'-monophosphate [(11)] (8-Br-5'-AMP)と推定された。水で抽出し、260 mμの吸収 (A_{260})で定量すると表(1)のようになる。

表(1)

5-AMPのブロム化



Experiment	In NaOH (ml)	Br-H ₂ O (ml)	H ₂ O (ml)	1.5 hr	BrAMP (%)			X ^a (%)
					3	8	24	
1	0.1	0.4	0.5	0	0	0	0	0.5
2	0.2	0.4	0.4	16	18	18	16	5.8
3	0.3	0.4	0.3	53	50	51	51	13
4	0.4	0.4	0.2	38	37	34	35	30

Reaction conditions were as in Experimental.

a) byproduct remaining at the origin of paper chromatography at 24 hrs' reaction

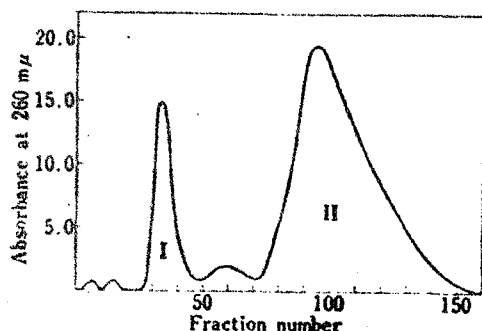
NaOH/Br₂が $\frac{1}{2}$ では、反応は全く行かないが、1以上になると8位にBr化が行っている。 $\frac{3}{2}$ の割合が最高の比率で、もっとNaOHが多くなると、原料付近の byproduct がふえて、Br体の比率は落ちていく。

1 mmole Scale で反応を行ない、Dowex 1X8のカラムにかけ、ギ酸で溶出を行うと、図(1)のような chromatogram を与え、8-Br-5'-AMP [(11)]は原料の後

* 実験の部参照

に溶出され、完全に分けることが出来る。この peak を集め、適当に後処理して、約 50% の収率で (11) を得た。⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ この反応をよく調べると、NaOH と Br₂ 水を予め混ぜた液へ、原料を加えた場合、260 mμ 付近の UV 吸収の消失がかなり起っている。

しかし、単離した、(11) を、NaOH と Br₂ 水の混合液中に放置しても、殆んど UV 吸収の減少をみなかった。アルカリとして、水に難溶性 CaCO₃ を使った場合、Br₂ が 2 当量あれば反応は完全に進行するが、やはり 20% 程度の UV 吸収の減少を伴っている。図 (1) 8-Br-5'-AMP の分離



I: 5'-AMP II: 8-Br-5'-AMP

グラフーによつて調べると表 (2) のようになる。

pH 4 の時に、UV 吸収の減少も殆どなく、(11) の収率を最も良い。これより pH が低くても、高くても収率は減少し、pH 9 では (11) は全く得られなかった。特に、高 pH の場合、UV 吸収の減少が著しい。1 mmole の 5'-AMP を、0.25M-acetate buffer pH 4 中、1.5 当量の Br₂ で Br 化すると、約 70% の

次に、反応条件を詳しく調べるために緩衝液中の反応を検討した。結果をパーパクロマトグラフー又は、イオン交換クロマト

収率で(11)を得ることができた。¹⁶⁾

表(2) buffer 溶液中の 5'-AMP の 7"ロム化

pH	Buffer	TOD ₂₆₀ ^{a)}		Yield (%)			pH after reaction
		Start	End	BrAMP	AMP	X ^{b)}	
3	acetate	737	652	69			3.6
4	acetate	659	625	89			3.8
5	acetate	641	482	66			4.5
6	phosphate	745	401	22	20	12	
7	phosphate	630 ^{c)}	561	24	55		6.4
8	phosphate	630 ^{c)}	540	19	69		6.8
9	borate	630 ^{c)}	400	0 ^{d)}	81		9.1

Reaction conditions were as in Experimental.

a) Optical density units measured at 260 mμ multiplied by volume (ml) of the solution

b) byproduct remaining at the origin of paper chromatography

c) TOD was calculated on the weight basis assuming $\epsilon_{260} = 15000$.

d) By the column chromatography no BrAMP was obtained.

表(3)

3',5'-cyclic AMP (16)
の 7"ロム化

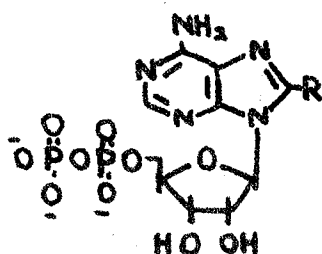
Buffer	TOD ₂₆₀		Yield (%)
	Start	End	
pH 3	741	714	67
4	792	718	100
5	792	607	94

15 お adenosine 3',5'-cyclic phosphate (16) の Br 化に於いても同様の pH の影響がみられている。

この pH 4 の条件により、裸の adenine nucleotide を、緩和な条件下、高収率で、8-Br 化することが可能になった。例えば、酸にもアルカリにも、非常に不安定な adenosine 5'-diphosphate (12) (ADP), adenosine 5'-triphosphate (13) (ATP) の直接的 Br 化も、それぞれ、46%, 66% の収率で行うことができる。この場合も、Dowex 1 のイオン交換で、8-Br 体は、原料の後に溶出される。

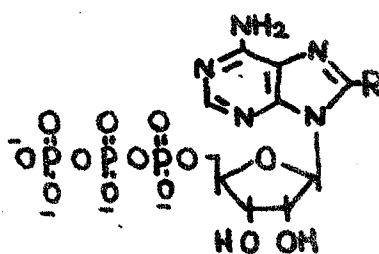
動物ホルモンの作用発現の mediator とされてい

る adenosine 3',5'-cyclic phosphate [16], RNA
 のアルカリあるいは酵素による水解産物である, ad-
 enosine 3'-monophosphate [17] (3'-AMP), adenosine
 2'-phosphate [18] (2'-AMP) の 8-Br 体も合成した。



R=H [12]

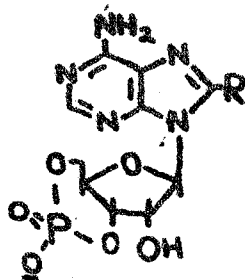
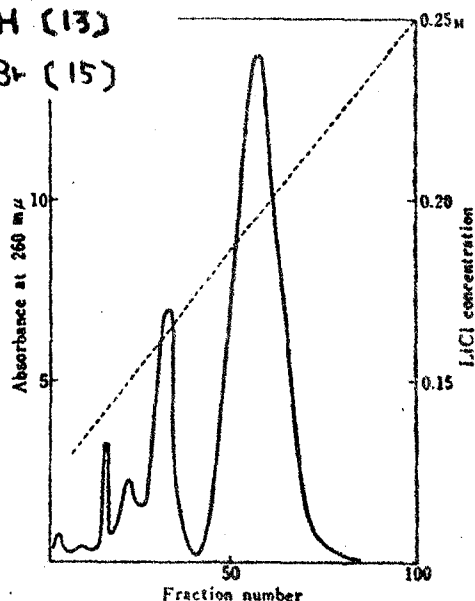
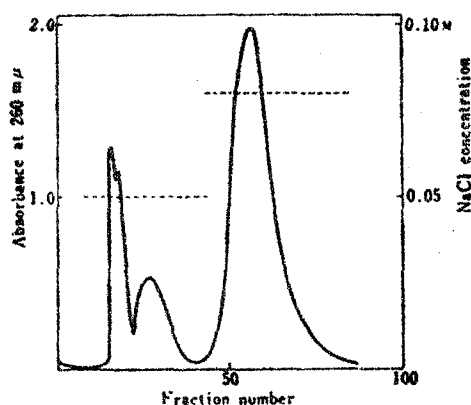
Br [14]



R=H [13]

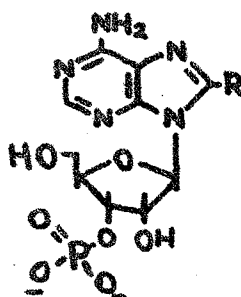
Br [15]

図 (2) 8-Br-ADP [14] (左)
 8-Br-ATP (右) の分離



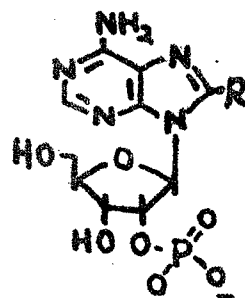
R=H [16]

Br [19]



R=H [17]

Br [20]



R=H [18]

Br [21]

この方法は nucleoside にも応用することができ、adenosine を用いて、PH の影響を調べると、やはり pH 4 の条件が最も良い。

表(4)
adenosine のブロマイド

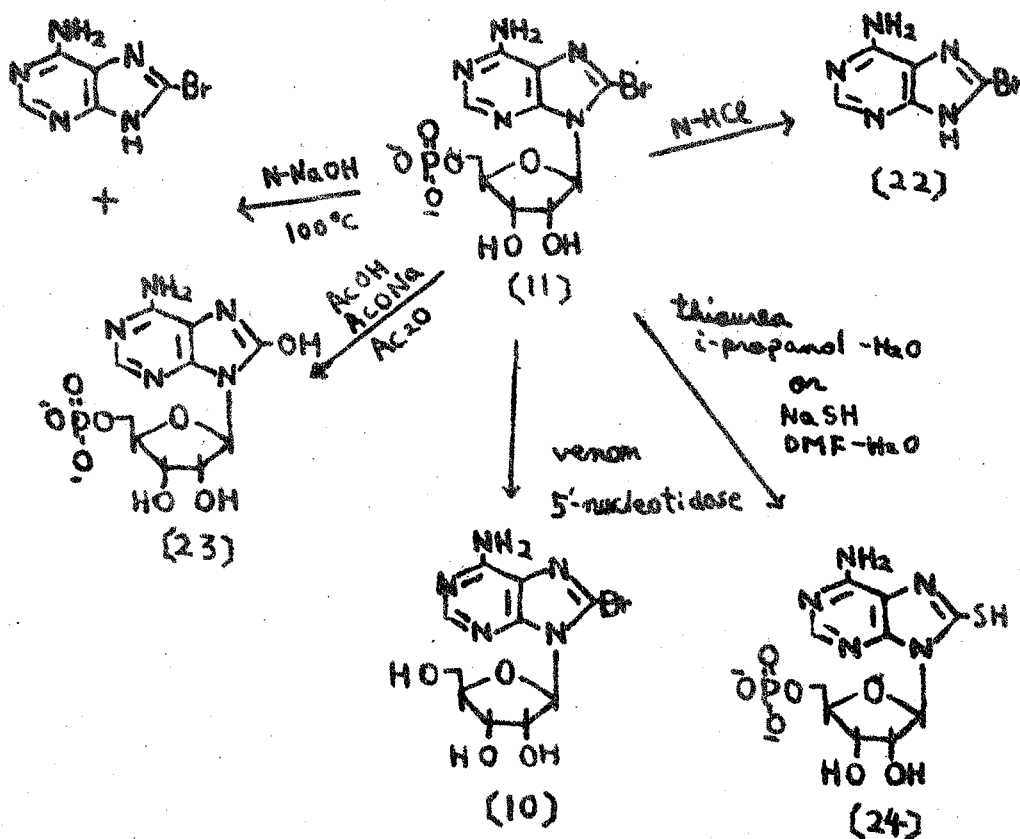
Buffer	TOD ₂₆₀		Yield
	Start	End	
PH 3	843	833	69 %
4	755	754	93
5	910	804	87

現在、8-bromo adenosine [10] の合成法としては、この方法が最もよいと思われる。⁽¹⁷⁾ アルカリあるいは buffer を用いて、2'-deoxyadenosine,⁽¹⁸⁾ xylofuranosyl adenine⁽¹⁹⁾, 2',3'-O-isopropylidene adenosine⁽⁵⁾, 等の 8 位の Br 体も得られている。

上記の如くして得た 8-Br-5'-AMP [11] の同定は UV 吸収, 元素分析, NMR 等によって行った。原料の 5'-AMP とは、酸性溶媒 B のパーパクロマトグラフィー、同じく酸性のイオン交換クロマトで分離できる。AMP の pKa は 3.7 (N-1 の protonation) と報告されているが、⁽²⁰⁾ [11] のそれは 3.6 で、殆ど変わらないので、[11] の場合もやはり N-1 へ protonation が起るのである。[11] は N-HCl 中室温 1 日で約 60 % の glycoside 結合の水解が起り、8-bromo adenine を与える。又、[11] を N-NaOH 中、封管 100° 15 分加熱すると、完全に分解を受け、主な生成物は、8-bromo-

adenine (22) と 8-hydroxyadenosine 5'-monophosphate (23) である。(約 1.4 : 1.0)

(11) を, thiourea あるいは, NaSH で処理すると 8-mercaptoadenosine 5'-monophosphate (24) が得られ, 酢酸-酢酸ナトリウム-無水酢酸²¹⁾ 中で反応させ, 後処理すると (23) が得られる。



(11) は Crude Snake venom 中の 5'-nucleotidase により, 5'-AMP が 100% 脱リン酸される条件下で, 29% 水解され, 8-bromoadenosine (10) を与えた。

8-Bt-ADP (14) 及び 8-Bt-ATP (15) の同定は, UV 吸収, P 分析, 電気泳動, ペーパークロマトグラフィー

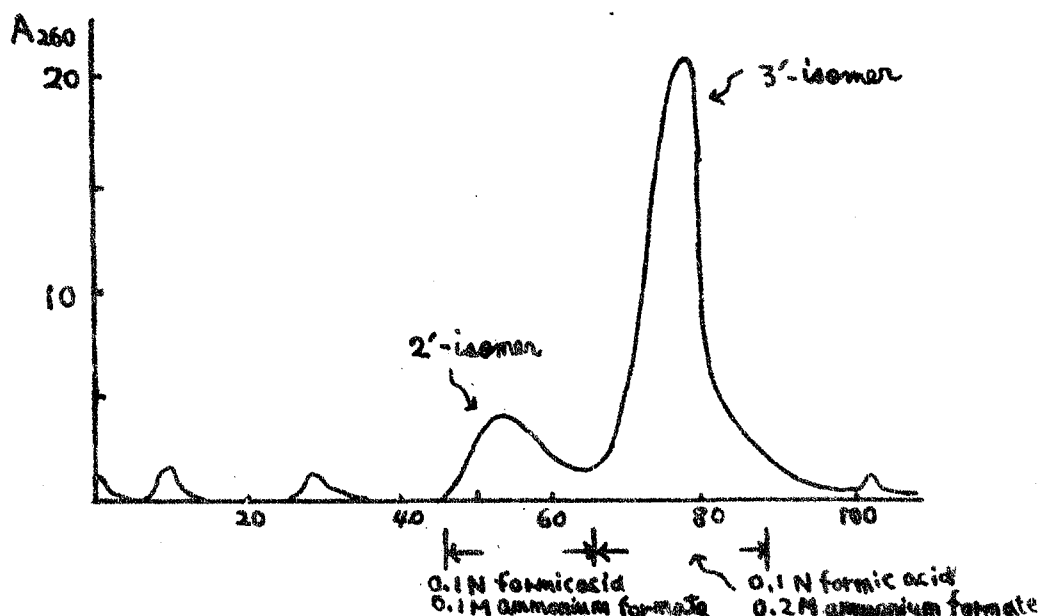
等で行った。これらについては、それぞれ、poly-nucleotide phosphorylase, RNA polymerase による重合反応について調べられている。⁽²⁰⁾⁽²⁴⁾

8-Br-3,5'-cyclic AMP [19] は, Dowex 1 のイオン交換で、やはり原料[16]の後に溶出され、pH 7.5 の弱気泳動で解離が一個、溶媒 A 及び B で原料のすぐ上に来ること、UV 吸収、等で同定した。後述するように、このものから 8,2'-5'-cycloadenosine 3',5'-cyclic phosphate [37] を導くことができる。8-Br-3'-AMP [20] 及び 8-Br-2'-AMP [21] は、3'-AMP [17] と 2'-AMP [18] の混合物(約 4:1)を Br 化し、Dowex 1 のクロマトグラフィーで分離することにより得た。これらの Br 体は原料の溶出する 0.1N 酢酸の条件では溶出されず、これに 0.1M 酢酸アンモニウムを加えると [20] が溶出する。(0.1N 酢酸の条件では、5'-AMP, 2'-AMP, 3'-AMP の順に溶出されることが判っている。)

やはり、5'-AMP, 2'-AMP, 3'-AMP が分離できる溶媒 E のペーパークロマトグラフィーでは、 R_f 0.24 に [20], R_f 0.36 に [21] が検出される。この条件で 3'-AMP 及び 2'-AMP の R_f はそれぞれ、0.48 と 0.52 である。更に [20] 及び [21] を、Potato ⁽⁵⁾ 3'-nucleotidase と扱うと、[20] は 3'-AMP が 90% 脱リノ酸される条件で、30% 水解さ

れるが, [21] は全く水解されない。 NMR でも, [21] の H-2' (5.50 δ) は, [20] のそれ (5.22 δ) よりも低磁場に出ているので, これらのリン酸基の位置は確定された。

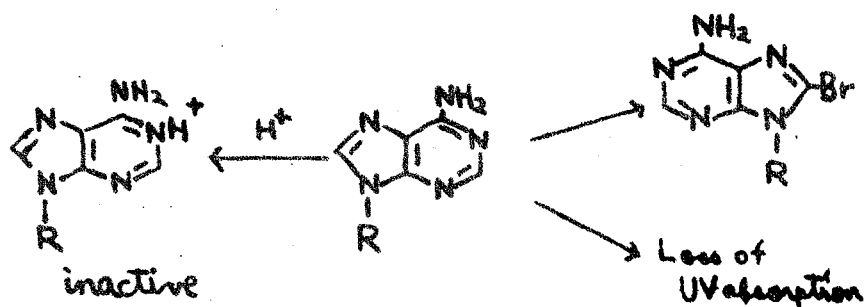
図 (3) 8-Br-2'-AMP (21) と 8-Br-3'-AMP (20) の分離



最後に, adenine nucleoside, nucleotide の Br 化における至適 pH の意味について考察する。

先に述べたように, 5'-AMP の N-1 の pKa は 3.7 付近であり, Br₂ の中性あるいはアルカリ溶液においては, 殆どが, Br-OH のような species になっていると思われる。従って, pH 3 以下の酸性水溶液中では, ブロムはブロム化力のより強い, Br₂ あるいは Br-OH の状態で存在すが, adenine base の protonation により, electrophile に対し, 不

活性な状態になっている。 pH5以上の高 pH では、adenine base の活性は上っているが、ブロムはより弱い BrO^- のような状態になっている。結局この二つの条件の均衡した pH4 の条件で最良の結果を与えるものと思われる。又、高 pH では、UV 吸収の消失（恐らく、2重結合への付加反応によるものであろう。）等の副反応が起り、収率を低下させている。この副反応は、8-Br 体経由ではなく、8-Br 化と平行に起っているものと思われる。



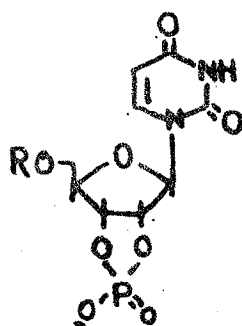
なお、この反応を使い、8-Br-5'-AMP [11] から、補酵素 flavine adenine dinucleotide (FAD) の analog である flavine-8-bromoadenine dinucleotide の合成が報告されている。²⁵⁾

第二節 Adenine nucleotide の特異的 sulfonyl 化

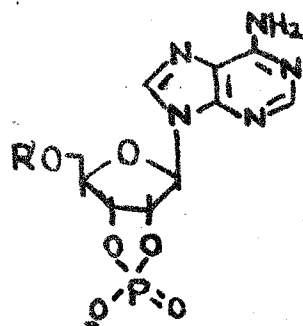
従来, cyclonucleoside の合成に於て, base 部分の nucleophile に於て, sugar 部の sulfonyloxy 基を, 分子内置換反応が用いられており, sulfonyl 基としては, p-toluenesulfonyl 基²⁶⁾, methanesulfonyl 基^{27), 28)}, triisopropyl benzene sulfonyl 基¹⁷⁾, naphthalene sulfonyl 基²⁹⁾等が用いられている。

nucleotide の sulfonyl 化については, A. M. Michelson による, uridine-2', 3'-cyclic phosphate (25) 及び, adenosine-2', 3'-cyclic phosphate (26) の 5'-OH 基の methanesulfonyl (以下 Ms と略す) 化¹⁾, (25) の 5'-OH 基の ethane sulfonyl 化⁷⁾が, 知られているのみである。

これらの反応では, nucleotide の tri-alkyl ammonium 塩を, tri-n-butyl amine 存在下, sulfonyl chloride と反応させている。



R=H (25)
Ms (27)



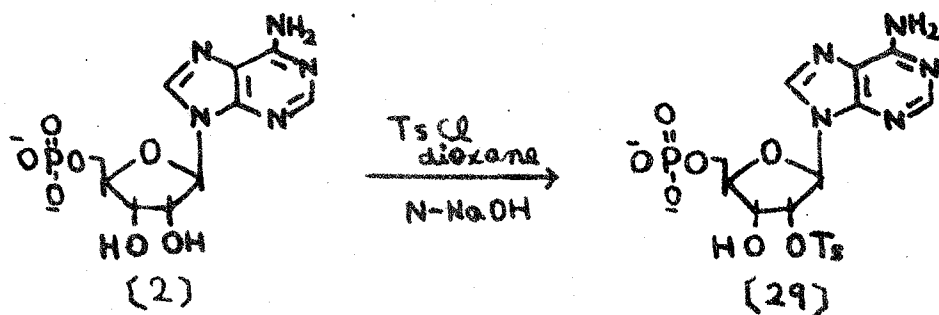
R=H (26)
Ms (28)

著者は, 5'-AMP, 3', 5'-cyclic AMP (16), uridine (7) の 5'-mono-phosphate (5'-uMP) 等を用

12, 先ず有機溶媒中の sulfonyl 化を試みたが, nucleoside で常用される pyridine 中 sulfonyl chloride の条件でも, 満足な結果を得なかった。このように sulfonyl 化が困難なのは, リン酸基と試薬との反応が, 原因の一つと思われる。

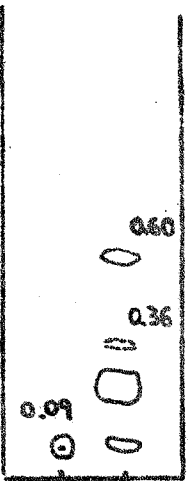
次に, Schotten-Baumann 法で p-toluenesulfonyl (以下 Ts と略す) 化を試み, 初めて nucleoside 5'-monophosphate の Ts 化に成功した。³⁰⁾ しかも後述するように, この際得られる mono Ts 体は, 2'-OTs 体のみであることが判った。

5'-AMP [2] の 2Na salt を 1.5 当量の NaOH 水溶液に溶し, これを, TsCl の含水 dioxane 溶液に, 攪拌下, 約 30 分かけて滴下する。反応液は, 途中からケソ湯液となる。この液は強アルカリ性であり, 液は弱アルカリ性となっている。滴加後, 約 2 時間位攪拌を続けると液は透明となり, 液性は酸性となる。この時点で, N-NaOH を少しづつ加えて中和し, 溶媒 A のペーパークロマトグラフィーで調べると, 図 (4) に示すような pattern を与える。



各スポットを水で抽出して、 $\lambda_{\max}$ における比を出す
すと表(5)のような結果となる。

図(4)海蝶AのPPC 表(5) 5'-AMPのTs化(a)



	Na OH ml.	TsCl mmole	diox- ane ml.	H ₂ O ml.	di- Ts	Rf 0.36	mono- Ts	AMP
N	1.5	3	7.5	0.5	11%	5%	45%	39%
2N	0.95	3	4.5	0.5	20	4	59	17
N	1.5	3.5	7.5	0.5	20	5	61	14
N	1.5	3.5	4.5	0	17	6	54	23
N	1.5	4	7.5	1.0	17	5	56	21
N	1.5	4	4.5	0	22	6	60	11

AMP 原料

原料(Rf 0.10)は中性で260m μ にUV吸収の $\lambda_{\max}$ をもつが、Rf 0.60 R₀ 0.26のspotは、262m μ 付近の吸収極大の他に、230m μ にもう一つ吸収極大が現われ、260m μ の吸収強度に対する230m μ のそれの比 A_{230}/A_{260} は、Rf 0.60が約2. Rf 0.26が約1となっており、前者がdi-Ts体、後者がmono-Ts体と推定される。Rf 0.36のもう一つは、電気泳動で調べると、adenosineと同じ位置にとどまっているので、nucleotideではない。

表(5)の結果をみると、N-NaOHを用いた場合TsClが3eq.では、やや収率が落ちるが、2N-NaOHを用いるか、TsClを多くすると、約60%程度の

monoTs体が得られる。この際、diTs体は約20%副生している。

NaOH 及び TsCl の量を少くしてみると表(6)のような結果を得た。dioxane は 1.5 ml, 水は 0.5 ml 加えた。TsCl が 1 eq. 表(6) 5'-AMP の Ts 化 (b) しかなくとも、反応は行っているが、収率は半分以上に減っている。NaOH を少くすると、diTs体が顕著に減少する。

NaOH ml.	TsCl m-mole	di- Ts	mono- Ts	AMP
1.0	1	8%	22%	67%
1.5	1	13%	27%	56%
1.5	2	18%	43%	34%

ここに得られた Ts 体を pH 4 buffer 中、Br化すると、8-Br-5'-AMP (11) を同様条件で Ts 化したものと同一のものが得られる。これを NaSH で扱って閉環すると、8,2'-S-cydo-5'-AMP のみを得られる。Br化も閉環もペーパークロマトグラフィーで調べると、殆ど完全に進行しているため、原料の monoTs体は殆ど 2'-OTs体のみであると思われる。

次に、単離した 8-Br-5'-AMP の 2Na salt で、表(5)に同様の条件で Ts 化を行い、溶媒 A のペーパークロマトグラフィーで結果を調べると、Rf 0.58 に diTs 体、Rf 0.33 に monoTs 体 (30), Rf 0.11 に原料、原点に副反応物が検出される。TsCl が 3 eq. の時は、diTs 体 2.4%, monoTs 体 56% で、TsCl 4 eq. の

時は, diTs体 4.7%, monoTs体 68%であった。 5'-AMP の Ts化に較べ, diTs体の比率が, かなり小さくなっている。 原料の $\lambda_{\max}$ は, 中性で 265 m μ であるが, monoTs体, diTs体とも 266 m μ 付近に吸収極大があり, 230 m μ に shoulder がみられる。

この場合 も 又 は, A_{230}/A_{260} は, diTs体で 約 2, monoTs体で 約 1 である。 monoTs体 を ペーパークロマトグラフで単離し, DMF-水中 NaSH で扱うと, 殆ど完全に閉環する。

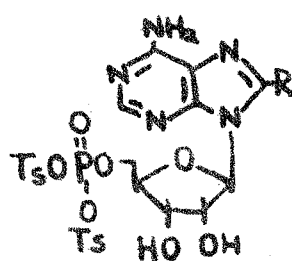
このようにして得られる, monoTs体の同定は, 閉環して得られる cyclonucleotide の分析により行った。

保護基のない nucleoside の sugar の OH基を DMF 中 NaH で解離させて, sulfonyl chloride¹⁹⁾ あるいは benzyl chloride³¹⁾ と反応させた場合, いずれも, 5'-OH基には反応せず, 2' あるいは 3' の OH基に反応が起ると報告されている。 又, nucleoside を NaOH 水溶液中, trimetaphosphate と反応させると, 2' と 3' のみが, リン酸化されるという報告がある。³²⁾ 以上により, 有機溶媒中でも, 水溶液中でも, 2' 及び 3' の OH基が解離しやすいことが判る。

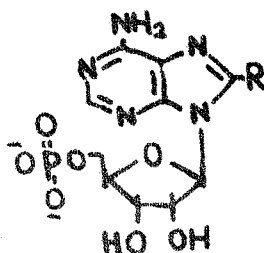
池原, 金子等は¹⁹⁾ 5'位に trityl基のよう is bulky な置換基がある場合, NaH で解離させ, triisopropyl benzene sulfonyl chloride のよう is bulky

な試薬をもってゆくと、2'位が選択的に(70:25) sulfonyl化されると報告している。

従って、上述のような、2'-OH基の特異的Ts化の機構としては、5位へ bulky な置換基のついた(31)のような中間体の生成によるか、あるいは、2'-OH基の優先的な解離によることが考えられる。



(31)



(32)

反応経過をみると、最初からアルカリ性の環境が生じ、それが約2~3時間かかって溶け、液が酸性になる。この液を最終的に中和するまで時間がかかるので、このような条件ではTsClはかなり安定であり、TsClが1eq. しかなくとも選択的な反応が20~30% 行くことを考えると、(32)のような中間体がTsClと反応して mono Ts 体を与える機構の方が、可能性が大きい。

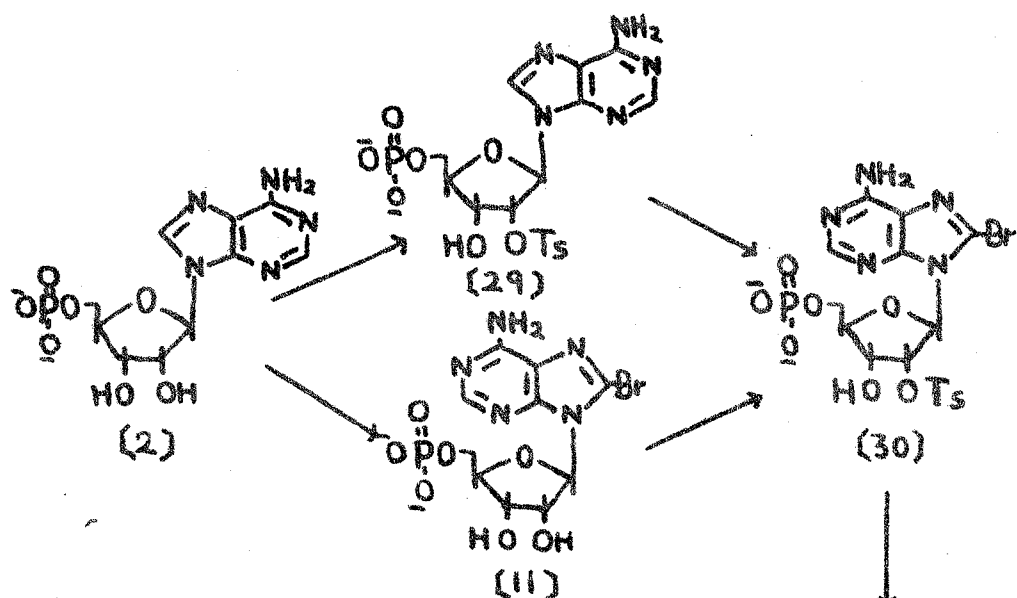
adenosine₃₀₃ の sugar OH基の pKa は、12.35 と報告されており、5'-AMP や 8-Br-5'-AMP 場合

も、 $N-NaOH$ 中では、少なくとも1個は殆ど完全に解離していると思われる。nucleoside 5'-monophosphate の場合既に、リン酸の解離が2個5位にあるので、3'-OH基よりも2'-OH基の解離が容易になることも考えられる。この sugar OH基の解離した nucleotide は、dioxane には難溶で、すぐ沈殿し、 $NaOH$ が薄まるのを防いでいると思われる。

なお、ribonucleoside で、2'-OH基に殆ど特異的に置換が起った例としては、adenosine の 1,2-dimethoxyethane - H_2O 溶液中、diazomethane に5-methyl³⁵⁾化、uridine (7), cytidine (6) の DMF - NaH 系を用いた benzyl^{21) 32)}化などがある。これらの場合未反応の原料がかなり残っており、前者の場合、3'-OMe 体の精査は行われていない。

第三節 8,2'-S-cyclonucleotide の合成

8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabinofuranosyl) adenine 5'-monophosphate (4) (8,2'-S-cyclo-5'-AMP, PA^S) の合成は、前節で得られた、5'-AMP の monoTs 体 (29) を経由する方法と、8-Bn-5'-AMP を経由する方法の2つの経路で行い、いずれの場合も最終的な 8,2'-S-cyclo-5'-AMP を得ることができた。



先ず, [29] 経由の合成法について述べる。5'-AMP 5 mmole より得られる Ts 体を, Crude のまま pH 4 の acetate buffer 中全量 30 mmole の飽和 Br_2 水を用いて, Br_2 化する。[29] は 5'-AMP に軽べかたりに Br_2 化され難いようである。室温 2 日後, 後処理して, Br_2 を除く。この段階で, 溶媒 A のペーパークロマトで調べると, [30] は 5'-AMP より計算して, 21% 存在する。これを pyridine-H₂O (1:1) 中に溶し, H_2S ガスを通じて, ³⁶⁾ 8 位の Br を SH に置換し, 同時に閉環させる。適当に後処理して, 2 l の水に希釈して, Dowex 1 (formate 型) のカラムにかけ, 酢酸で溶出すると, cyclonucleoside が, 単一 peak として得られる。(図 (5) 参照) この peak

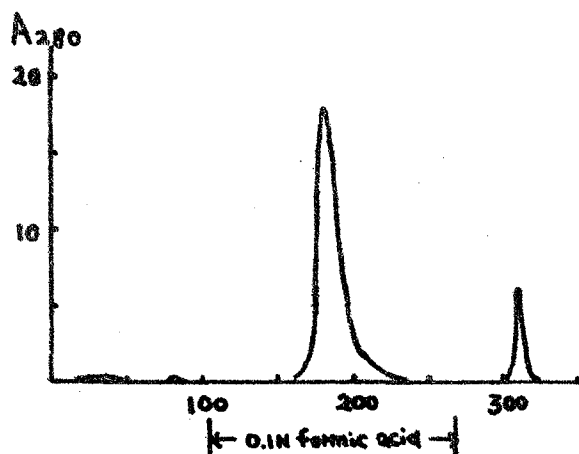
を集めて後処理後、凍結乾燥し、更にエタノール-acetoneで粉にし、5'-AMPより、収率21%で〔4〕の free acid, dihydrateを得る。この収率からも、〔30〕よりの閉環が定量的に行っていることが判る。

8-Bt-5'-AMP 経由の合成は次のように行った。5'-AMP 5 mmole を barium acetate buffer pH 4 中で Bt 化し、エタノールを加えて沈殿させ、Ba salt として単離する。(収率 70~80%) これを少量の酸を加えた水に溶し、硫酸ナトリウムを加えて、Na salt とし、BaSO₄ を遠沈して除く。溶媒を留去してから、N-NaOH に溶し、TsCl の dioxane 溶液に攪拌下、添加する。この際、8-Bt-5'-AMP をアルカリに溶した後、直ちに用いると、反応が起って副生物が多くなる。適当に後処理して得られる Ts 体の混合物を DMF-H₂O (5:3.5) に溶し、40% NaSH 水溶液を加え、室温2日放置すると、完全に閉環が進行する。後処理後、1.5L の水で希釈して、Dowex 1 (formate 型) にかけて、ギ酸で溶出すると、単一の peak として、cyclonucleotide が得られる。これを凍結乾燥すると、結晶が得られる。収率は 5'-AMP より通算して 25% である。

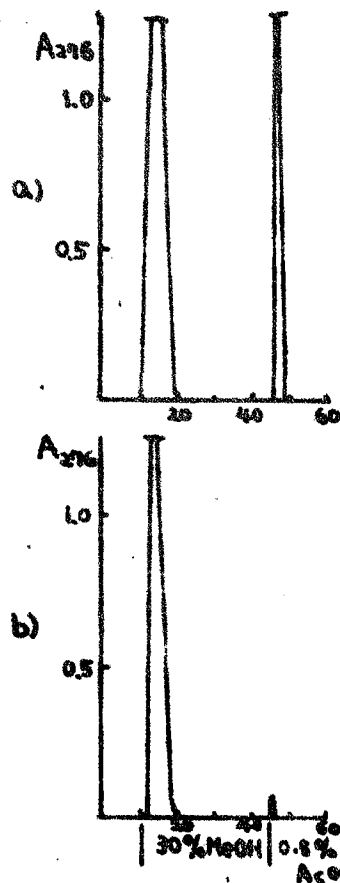
DMF-H₂O 中、NaSH による SH 化は⁽¹⁾ pyridine-H₂O 中 H₂S の条件に較べ、副反応も少く、特に、酸に弱い化合物の場合に適している。

2つの経路より得られた, cyclonucleotideは, UV吸収, 元素分析, NMR, ノーバークロマトグラフィー, 電気泳動等で同定したが, 8,3'-isomerが混在しているかどうかを調べるため, E. coli alkaline phosphatase で処理して, 5位のリン酸基を除き, cyclo-adenosine として, Dowex 1 (OH型) のカラムにかけて分析した。(図(6)参照)

図(5) Dowex 1 による
pA^s の分離



図(6) Dowex 1 (OH⁻) カラムに
よる分析
a) authentic samples b) A^s derived



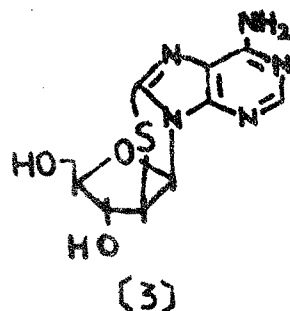
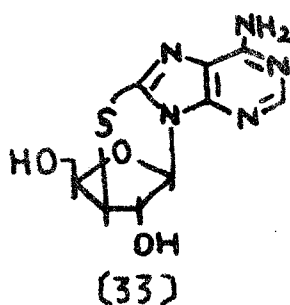
標品の 8,2'-S-cyclo adenosine 及び 8,3'-S-cyclo adenosine の混合物をこのカラムにかけ, 30% x タールで流すと, 8,2'-S-cyclo adenosine が溶出され, 次に 0.5% 酢酸で流すと, 8,3'-S-cyclo adenosine が溶出され両者を完全に分離することが出来る。次に, 8-Br-5'

AMP 経由の Cyclo nucleotide の脱リン体を同じカラム, 同じ条件で分析すると, 殆ど全部30%メタノールで溶出され, 0.5%程度のみ吸収が, 酢酸部に出るが, これをH₂O-バークロマトグラフィーで分け, 精査したが, 8,3'-S-cycloadenosine の吸収 ($\lambda_{max}^{H_2O} 282.5 m\mu$, 8,2'-isomer [3] は, $\lambda_{max}^{H_2O} 275.5 m\mu$) をもつものは検出されなかった。[29] 経由のもも同様に分析したが, 8,3'-体は検出されなかった。

上記の結果により, 前節で得た [29] 及び [30] は, 殆ど 2'-OTS 体のみであることが明かになった。

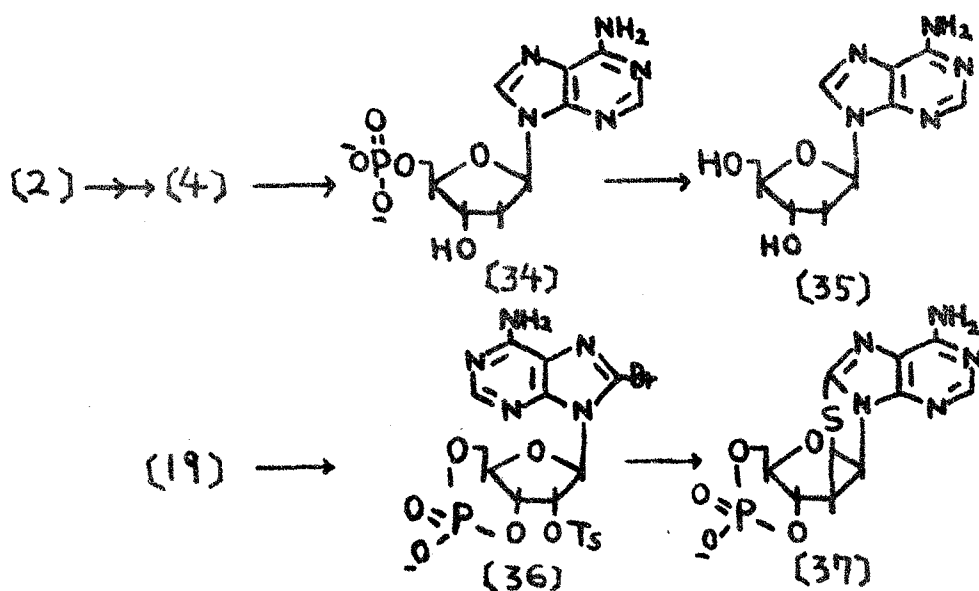
なお, Dowex 1 (OH型) カラムの結果をみると, 8,3'-S-cycloadenosine [33] の sugar OH の解離は, [3] のそれの解離より強いことが判る。UV 吸収をみると [33] の λ_{max} は pH 13 で中性より 2 m μ 長波長側へずれている。 ($\lambda_{max}^{pH 13} 284.5 m\mu$, [3] の $\lambda_{max}^{pH 13} 276 m\mu$)⁽¹⁾ これは [33] の 2'-OH と [3] の 3'-OH の酸性度の差によるものと思われる, adenosine や 5'-AMP の場合にもこのような差が予想される。

8,2'-S-cyclo-AMP [4] を Raney Ni で脱硫すると, 2'-deoxy adenosine 5'-monophosphate [34] を与え, これを Crude snake venom の 5'-nuc-



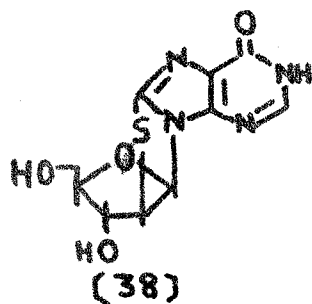
leotidase で脱リン酸すると, 2'-deoxyadenosine [35] を与える。これにより初めて ribonucleotide より, deoxyribonucleotide への変換がなされた。

なお, nucleoside 5'-monophosphate と同様の条件で, 8-Br-3',5'-cyclic AMP [19] も Ts1c でき, H₂S で開環し, Dowex1 (formate 型) カラムで分け, 後処理すると, 46% の収率で, 8,2'-5'-cycloadenosine 3',5'-cyclic monophosphate [37] が得られる。



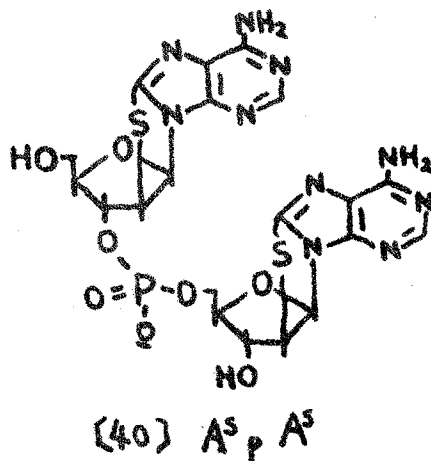
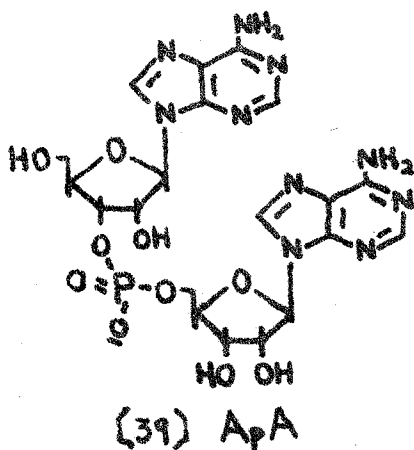
[4] の酵素基質としての活性を調べるに, snake venom の 5'-nucleotidase では, 5'-AMP より非常に遅いが, 酵素量を多くすると殆ど完全に水解される。8-Br-5'-AMP の場合より, むしろ遅いようである。E. coli alkaline phosphatase による脱リン酸は, 5'-AMP と殆ど同じ速度で起る。sheep intestine

mal alkaline phosphatase により, 脱リン酸され,
 , 混在する adenosine deaminase により, adenosine
 が99% 脱アミノされる条件で, 20% 水解をうけて,
 8,2'-S-cycloinosine [38] を与える。



第二章 8,2'-S-cycloadenosine を含む dinucleo- side monophosphate ($A^S p A^S$) の合成.

2つの adenosine 分子が, (3'-5') phosphodiester
 結合で結ばれた, adenylyl (3'-5') adenosine (39)
 ($A p A$) は, RNA の最も単純化された model とし
 て, 多くの研究がなされてきた。これとの比較を行



うため、先ず同様に(3'-5')で結合した、8,2'-5'-cyclic adenosine (A^S)の dinucleoside monophosphate (40) ($CA^S P A^S$)を合成した。⁽⁴¹⁾ 合成は、保護した A^S の 3'-monophosphate と 5'-OH free の保護した A^S [46] との縮合により行った。

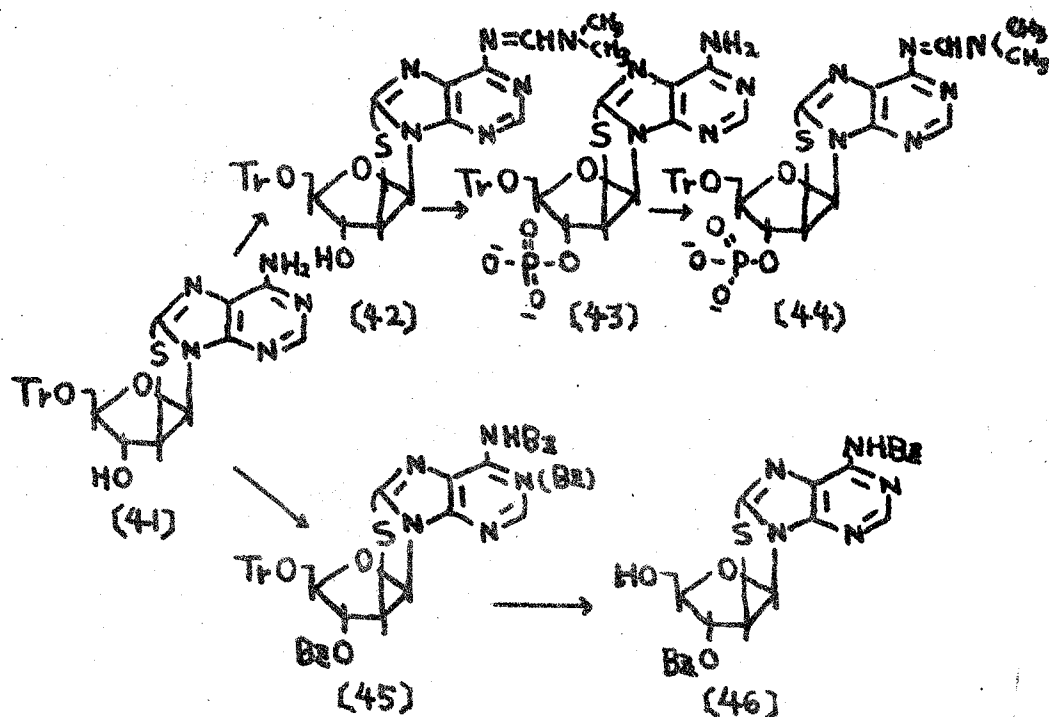
先ず、nucleotide部分の合成について述べる。

池原亨の方法で、 A^S の 5'-OH 体 [41] を合成し、これを、DMF 中、dimethyl formamide dimethyl acetal⁽⁴²⁾ と窒素で処理し、6-NH₂ 基の保護を行った。この保護基は、nucleoside⁽⁴³⁾, nucleotide⁽⁴⁴⁾ の base の NH₂ 基の特異的な保護に使われている。ここに得られた [42] の $\lambda_{max}^{E_{OH}}$ は 320 m μ と、非常に長波長レフトを示し、N⁶-dimethyl aminomethylene 体の特徴を示し、Thin layer クロマトグラフィー (TLC) で原料より R_f が高く、sharp の斑点をもつ。

[42] と 2-cyanoethyl phosphate とを、無水 Pyridine 中、DCC で縮合⁽⁴⁵⁾し、メタロール性 NH₂ で、cyanoethyl 基を脱離すると、NH₂ 基の保護もはずれて [43] を得た。このものは紙電気泳動 (以下 PEP と略す) で、5'-AMP に対する相対移動度 (R_{pA}) が 0.86、T₁ 基の発色、リン酸の発色がある。

[43] をよく乾燥して、DMF 中、DMF dimethyl-acetal を用い、再び 6-NH₂ 基を保護し、[44] を得た。 $\lambda_{max}^{H_2O}$ は 319 m μ にもどり、PEP の R_{pA} = 0.83 で

ある。



次に, nucleoside 部分の合成であるが, (41) を pyridine に溶し, 約 3 eq. の benzoic anhydride を加え, $80 \sim 85^\circ\text{C}$ で 85 時間反応させ, NaHCO_3 水溶液へ注ぎ, CHCl_3 抽出すると (45) が得られる。これは base 部に benzoyl (Bz) 基が 2 個入ったものと, 1 個入ったもののまじりである。両者とも, $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH, H}^+}$ $301 \sim 302 \text{ m}\mu$ を示すので N^6 - Bz 基が, 両方入っていることが判る。

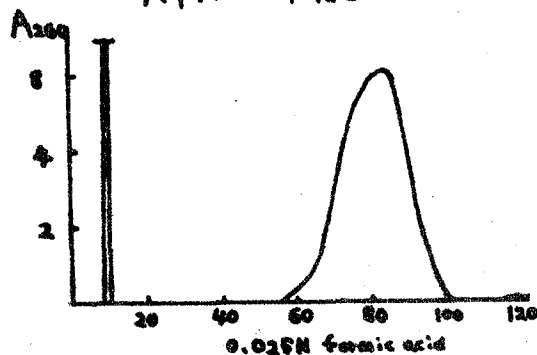
(45) を 80% 酢酸中, 100°C 30 分扱い, 溶媒を留去後, 熱エーテルで triethyl alcohol 等を除き, (46) を得た。UV 吸収より, N^6 - Bz 基の存在が判り, Tr 基の発色マイナス, CHCl_3 - EtOH (3:2:3)

混合物の TLC で one spot である。〔41〕より収率 74% である。

最後に、〔44〕の pyridinium salt と〔46〕を、pyridine で煮沸して無水にし、無水 pyridine^{*} 中、DCC で縮合し、x 9 - ール性 NH₃ で、Bz 基及び dimethylamino-methylene 基をはずし、80% 酢酸で trityl 基をはずす。これを DEAE-cellulose (bicarbonate 型) のカラムにかけ、triethylammonium bicarbonate (TEAB) buffer pH 7.5 の linear gradient で溶出する。約 0.025 M の buffer 濃度で溶出される major peak をハーパークロマトグラフィーで調べると、2 つの spot を与えるので、Dowex 1 (formate 型) のカラムで再クロマトした。0.025 N 酢酸で溶出すると、〔40〕ASpA^S を完全に分離することになった。

〔40〕の UV 吸収は、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} = 271 \text{ m}\mu$ となり、monomer A^S のそれより 5 mμ 程度短波長シフトしているが、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}^+} = 276.5 \text{ m}\mu$ となり、A^S と同じになる。pA 定量をして

図(7) Dowex 1 による A^SpA^S の分離



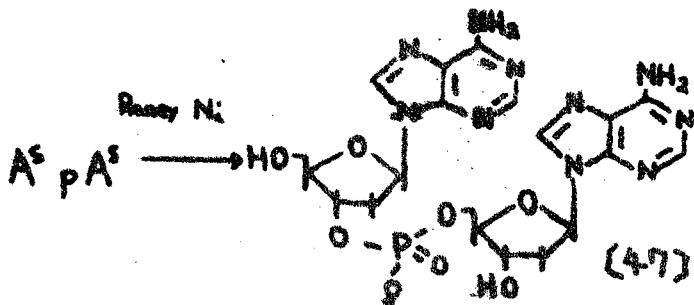
E(P) を出すと、中性で 3.8×10^4 となり、pA^S〔4〕の

* KOH で脱水後、KMnO₄ 処理して蒸留し、次に TSA を入れて蒸留したものを、KOH で脱水し蒸留後、エタノールで上澄液に抽出したものを使用する。

これは、 2.2×10^4 であるので、dimer であることが判
る。NMR をとると、容易に assign できる。H-2
B の H-1 α signal は 2 本ずつ出る。又、CD でも
、dimer 特有の大きな Cotton effect, ϵ pattern を
示す。

ここに得られた Asp^{S} を、 $\text{I}9)-\alpha$ -methyl Cello-
solne 中、Raney Ni で脱硫酸すると、2'-deoxyribose を
sugar 部に含み、2'-deoxyadenyllyl-(3'-5')-2'-deoxy-
adenosine (47) を与える。この化合物は、 β -D-グルコ
マトラフラーで標品⁴⁶⁾と一致した。これにより初めて、
ribonucleoside から出発して、deoxyribodinuclotide
の合成がなされた。

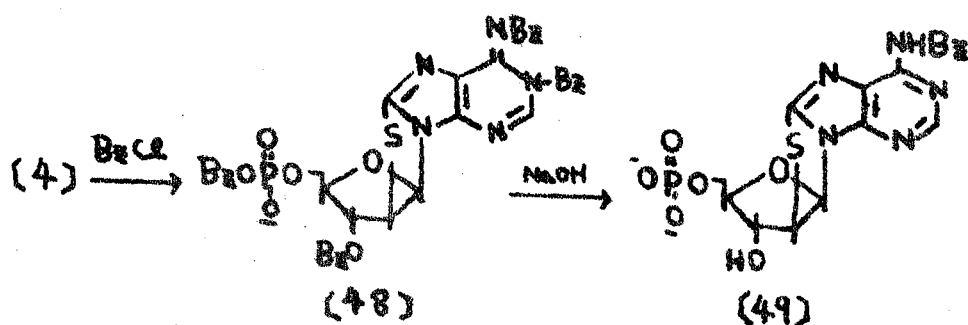
$A^S p A^S$ は, spleen phosphodiesterase と venom phosphodiesterase による水解に, 非常に抵抗するが, venom phosphodiesterase の場合, 酵素量と非常に多くし, 時間を長くかけると, 約 20% 水解される。これ 5' の酵素は deoxyribopolynucleotide を水解する酵素 (5' 3') $A^S p A^S$ の conformation が unfavorable であると思われる。



第三章 8.2'-S-cycloadenosine 5'-mono-phosphate の重合反応

8.2'-S-cycloadenosine 5'-monophosphate (4) (pA^S) の重合は、6-NH₂基のみを保護した、 pA^S 誘導体が必要である。著者は、先ず、第二章に於ける(42)の合成に用いた、DMF dimethyl acetal による保護を試みたが、 pA^S の dimethyl aminomethylene 体は、pyridine 及び DMF への溶解性が悪く、この経路を断念した。次に、Khorana 等⁴⁷⁾の方法で、 pA^S の N^6 -Bz 体を合成し、DMF 中 DCC で重合反応を行った。⁴⁸⁾

pA^S の pyridinium salt を pyridine 中、benzoyl chloride で Bz 化し、水を加えて、CHCl₃ 抽出する。ここで得られるものは(48)のよう「もの2」であると思われる。このものを pyridine-水に溶し氷冷下、NaOH 溶液を加えて、0.25 規定とする。20分後、

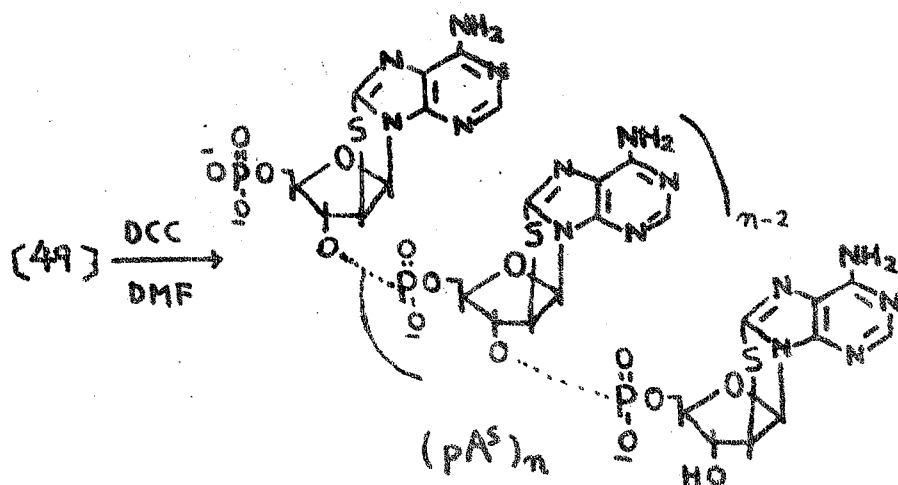


Dowex 50 (pyridine 型) を加えて中和し, 更に Dowex 50 (pyridine 型) のカラムを通し, ether で benzoic acid を抽出し, [49] を得る。 $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 301 m μ を示すので, N⁶ に B₂ 基が入っており, ペーパークロマトグラフィーの R_f 値から mono B₂ 体と推定される。

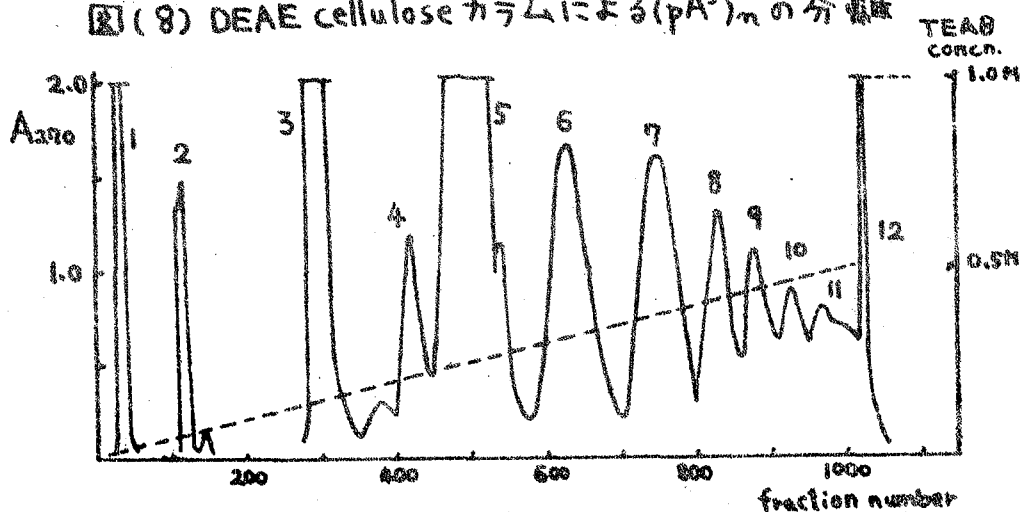
[49] の pyridinium salt は pyridine に難溶であるが, DMF には溶ける。一般に DCC による縮合は, 微量のアミノにより妨害を受けるので, 溶媒としては, DMF は不利であるが Kharana 等は, Dowex 50 (pyridinium 型) resin を共存させることにより, DMF を含む溶媒中でも, nucleotide の重合反応に成功している。⁴⁹⁾ これを応用して, [49] を DMF-pyridine で留去をくり返し, 無水にし, 無水 DMF 中 DCC で重合させた。

室温約 3 週間後, 反応を止め, ピコリン酸縮合を切る無水酢酸-pyridine 処理をした後, 濃 NH₃ 水で B₂ 基をはずし, DEAE-cellulose (bicarbonate 型) のカラムにかけ, 0 ~ 0.25 M 及び 0.25 ~ 0.50 M TEAB buffer pH 7.5 の linear gradient で溶出する。図 (8) に示すようなクロマトグラムが得られ, 表 (7) に示すような成績体となる。各分画を, 水を加えて, 更に, 溶媒 C で 1 ~ 4 日間 ペーパークロマトで乾燥して蒸留した後, BaO で乾燥して蒸留し, エタレフ上, 密栓して貯えたものを用いた。

マトガラスーを行い精製する。



図(8) DEAE celluoseカラムによる(pAs)_nの分離



peak 11及び12は、長鎖の polynucleotide を分離するために考案された、尿素カラムで精製した。

これらの peak は 9個以上の長さのものを含むと思われるが、数十個の長さの天然の polynucleotide を溶出するよう、高濃度の NaCl (0.4 ~ 0.5M) で洗ければ、溶出される。

1M TEAB buffer で peak 12 を溶出した後, 5M B
 り 7M の尿素を含む 1M TEAB buffer で流すと,
 130 00310 ほど溶出されるので, おそらく長鎖の oligo-
 nucleotide まで, できていくと思われる。

N-パーフロロオクタノールで精製した, 直鎖の oligonucleo-
 tide $(pA^S)_n$ と思われるものについて, E. coli alk-
 aline phosphatase で末端の 5' のリン酸基を落し,
 $A^S(pA^S)_{n-1}$ を得, この $(pA^S)_n$ 及び $A^S(pA^S)_{n-1}$ に
 ついて, それぞれ P を定量を行い, 鎖長を調べた。

表(7) $(pA^S)_n$ peak の同定

Peak	Fraction number	TOD ₂₇₀	TOD %	Major component
1	23-42			non-nucleotidic material
2	110-136	362	2.6	unidentified
3	276-335	1620	12	pA^S
4	403-445	459	3.3	$(pA^S)_2$
5	461-570	5190	38	unidentified + $(pA^S)_3$
6	571-700	1590	12	$(pA^S)_4$
7	711-795	1190	8.7	$(pA^S)_5$
8	806-850	665	4.9	$(pA^S)_6$
9	866-900	505	3.7	$(pA^S)_7$
10	901-945	510	3.7	$(pA^S)_8$
11	946-985	451	3.3	$(pA^S)_{27}$
12	986-1060	692	5.1	?

表(8) P 分析

	$(pA^S)_n$	$A^S(pA^S)_{n-1}$
	E(P)	E scaled.
2	1.57	1.88×10^4
3	1.67	173
4	1.62	165
5	1.61	163
6	1.66	164
7	1.61	
8	1.63	

表(8)に示すように, $n=2\sim6$ の $(pA^S)_n$ の $\epsilon(p)^*$ と, $A^S(pA^S)_{n-1}$ の ϵ の計算値 $(\epsilon(p) \times \frac{n-1}{n})$ がよく一致するのど, 鎖長が確認された。 $n=7, 8$ につりては, alkaline phosphatase 処理により ペーパークロマトグラフ上の R_f が大きくなるのど 末端リン酸を有し, $\epsilon(p)$ が $n=4\sim6$ のもの とほぼ等して ペーパークロマトグラフ上 びイオン交換で溶出される位置等から, 鎖長を決めた。 $(pA^S)_n$ 及び $A^S(pA^S)_{n-1}$ の ペーパークロマト (PPC) 及び PEP a data は表(9)に示した。

なお, $(pA^S)_2$ より得られる $A^S_p A^S$ については, 前章で合成した A^S_p 及び, ppc 及び PEP で一致した。

表(9) $(pA^S)_n$ 及び $A^S(pA^S)_{n-1}$ の性質

n	PPC*		PEP**	
	$(pA^S)_n$	$A^S(pA^S)_{n-1}$	$(pA^S)_n$	$A^S(pA^S)_{n-1}$
1	1.00		1.00	0.00
2	0.66	1.10	1.04	0.30
3	0.40	0.77	1.01	0.54
4	0.21	0.42	0.96	0.70
5	0.12	0.30	0.95	0.73
6	0.05	0.12	0.94	0.77
7	0.02	0.055	0.89	0.74
8	0.01	0.03	0.80	0.78

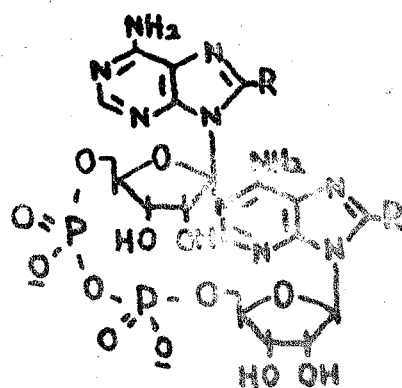
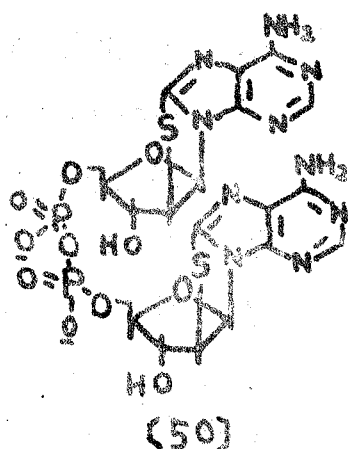
* 濃度 C

** pH 7.5

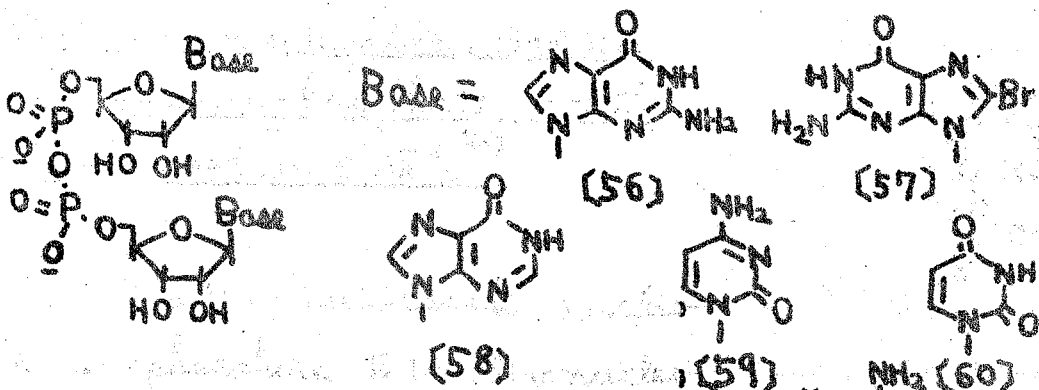
* P 濃度あたりの ϵ .

第四章 8-置換 purine nucleoside, 及びその 5'-monophosphate, 5'-pyrophosphate の合成 並びに CD による Conformation の研究⁵²⁾

前章までで, A⁺[3] を含む, nucleoside, nucleotide, dinucleoside monophosphate 及び oligonucleotide を合成した。更に, 5' のリン酸どうしの間で結合した P₁, P₂-dinucleoside 5'-pyrophosphate (50) を合成した。A.M. Michelson は, このような dinucleoside pyrophosphate が, 大きい hypochromicity を示すと報告している⁵³⁾ので, 分子中の 2 つの base は強く stack していると思われる, その C.D. に興味をもたれる。そこで, 他の 8-置換 purine nucleoside 及び, 天然の nucleoside の pyrophosphate 誘導体も合成した。([51] ~ [61])



R = H (51), -Br (52), -OH (53)
 SH (54), -C(CH₃)₂OH (55)



原料の nucleoside 5'-mono-phosphate は, 8,3'-S-cycloadenosine [33] 誘導体以外は凡て, nucleotide level の反応で合成又は市販のものを用いた。

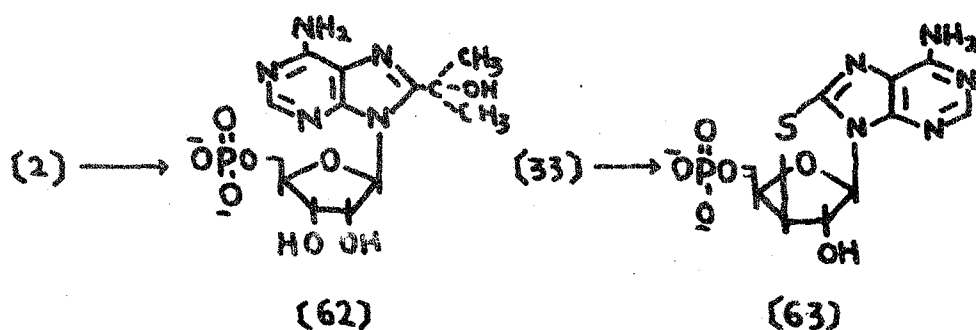
8-mercapto-adenosine 5'-monophosphate [24] は, 8-Br-5'-AMP を, DMF-水中 NaSH と反応させ, 収率 79% で合成した。

8-(2-hydroxypropyl-2-) adenosine 5'-monophosphate [62] は, nucleoside level の反応⁵⁴⁾を応用し, 5'-AMP を, 水-isopropanol-acetone 中で低圧水銀燈で照射し, 収率 22% で合成した。

8,3'-S-cycloadenosine 5'-monophosphate [63] は, 8,3'-S-cycloadenosine を, 5'-OH 基を特異的にリン酸化する吉川野の方法⁵⁵⁾に従い, triethyl phosphate 中 POCl_3 でリン酸化し, 88% の収率で合成した。

8-hydroxy-adenosine 5'-monophosphate [23]

及び、8-Bromoguanosine 5'-monophosphate は、
それぞれ 8-Br-5'-AMP 及び, guanosine 5'-mono-
phosphate (5'-GMP) より合成した。²²⁾



P₁P₂-dinucleoside 5'-pyrophosphate は, nucleo-
side 5'-monophosphate の 4-morpholine-N,N'-
dicyclohexylcarboxamidium salt を, pyridine 中
(難溶な場合は DMF を加える) DCC で縮合して合
成した。⁵⁶⁾ このような強塩基性アミンの存在下⁵⁶⁾ では
、リン酸ゼウルの縮合しか起らない。分離は主にイ
オン交換クロマトグラフィー (DEAE-cellulose)
により行った。上記により得られた化合物の同定は
、UV 吸収, 電気泳動 (PEP), PPC (以上は表
(10) 参照), NMR (表 (11) 参照), CD 等により
行った。

表 (10) dinucleoside pyrophosphate の 性 質

Pyrophosphate	UV λ_{max} (E(P))			PPC $R_pA^*(R_{mp})^{**}$			PEP $R_pA^*(R_{mp})^{**}$
	0.001N HCl	PH7	0.001N NaOH	B	D	A	PH7.5
A [51]	258 (1.32)	261 (1.17)	261 (1.19)	0.36	0.87	1.05	0.87
8,2'-cyclo-A [50]	278.5(2.25)	276.5(2.12)	276.5(2.12)	-	0.48(0.71)	0.82	0.70(0.68)
8,3'-cyclo-A [61]	282.5(2.25)	282 (2.00)	283 (2.00)	0.16(0.14)	0.50(0.68)		0.62(0.62)
8-Br-A [52]	262(1.44)	264.5(1.68)	265(1.48)	0.42(0.36)	1.16(1.00)	1.26	0.85(0.81)
8-(2-hydroxy-propyl-2)-A[55]	260(1.56)	261.5(1.40)	261.5(1.40)	1.17(0.72)			0.68(0.74)
8-SH-A [54]	299(2.17)	297.5(2.21)	295.5(2.65)	0.29(0.35)	0.52(0.77)	0.40	1.07(0.89)
8-OH-A [53]	264 (1.02)	270(1.26)	277(1.49)	0.19(0.18)	0.90(0.92)	0.47	0.92(0.81)
G [56]	256(1.21)	252(1.26)	256.5(1.18)	0.07	0.34	0.74	0.91(0.81)
I [58]	250(1.16)	250(1.15)	254 (1.36)	0.23(0.16)	0.59(0.82)	1.02	0.99(0.86)
8-Br-G [57]	262(1.36)	263(1.40)	267 (1.31)	0.24(0.21)	0.81(0.68)	0.60	0.86(0.82)
U [60]	263(0.98)	263(0.96)	262.5(0.97)	0.38(0.21)	1.24(1.07)	1.06	0.97(0.90)
C [59]	280.5(1.27)	272(0.89)	271(0.91)	0.42(0.24)	0.83(1.00)	1.04	0.93(0.79)

* 測定値の平均値。 ** 原料の 5'-monophosphate に対する相対移動度

表(11) dinucleoside pyrophosphate
 及び 対応する monophosphate の NMR

		8-H	2-H	1'-H	2'-H	5'-H	J_{H_1, H_2}
D ₂ O 溶液, 2M salt 0.1M (51) は 0.27M TMS 外部標準 chemical shift は δ ppm 表示	5'-MP*	8.62	8.25	6.21		4.22	5.0
	A						
	5'-PP** (51)	8.14	7.96	5.94		4.36	4.6
	8-8-A						
	5'-MP		8.27	6.22	5.40	4.26	5.7
	5'-PP (52)		8.14	6.09	5.27	4.38	6.5
	5'-MP		8.21	6.63	5.49	4.26	5.5
	8-5H-A						
	5'-PP (54)		8.07	6.62	5.43	4.40	6.0
	5'-MP		8.27	6.05	5.34	4.27	5.4
* nucleoside 5'-mono- phosphate ** dinucleoside 5'-pyro- phosphate	8-0H-A						
	5'-PP (53)		8.14	6.00	5.32	4.40	5.5
	5'-MP			6.13	5.44	4.26	6.0
	8-8-G						
	5'-PP (57)			6.00	5.43	4.40	6.2

polynucleotide の ORD, CD に関しては, Tinoco 等が理論的な研究を行っているが, base 間の stacking により, monomer のそれとは異なる, 大きな Cotton effect を与え, その pattern 及び magnitude は, base の transition moment のなす角に依存しているといふ⁵⁹⁾。従って, monomer と dimer の CD を比較することにより, dimer 分子中の base 間の stacking の強さが判る。dinucleoside pyrophosphate の CD data を, この観点からまとめると次のようになる。(pyrophosphate を PP と略す。)

(1) 強く stack しているもの

adenosine-PP [51] 8-bromoadenosine-PP [52]
8-(2-hydroxypropanol-2-)-PP [55] 8-mercaptoadenosine-PP [54] 8-bromoguanosine-PP [57]

(2) 中程度に stack しているもの

guanosine-PP [56] inosine-PP [58]
8-hydroxyadenosine-PP [53]

(3) 弱く stack しているもの

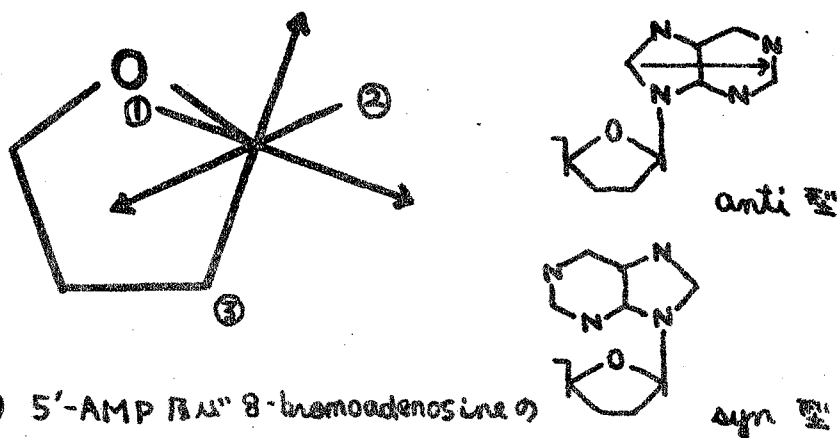
uridine-PP [60], cytidine-PP [59]
8,3'-S-cycloadenosine-PP [61]

(4) 殆ど stack していないもの

8,2'-S-cycloadenosine-PP [50]

次に, nucleoside, nucleotide, pyrophosphate 及び dinucleoside monophosphate の CD を比較す

ることにより, adenosine 及び 8-bromoadenosine 誘導体の torsion angle (2頁参照) について知見を得た。



図(9) 5'-AMP 及び 8-bromoadenosine の torsion angle

結晶の X線解析により, 5'-AMP の torsion angle は, -20° 付近で (base 平面を回のような矢印で表わすと①のような向きになる) であると報告されている。⁵⁸⁾ 8-bromoadenosine の場合は, 約 $+120^\circ$ 付近 (②の位置) であると報告されている。⁵⁹⁾ 5'-AMP の場合のような conformation (図(9) 右上) を anti 型といい, 8-bromoadenosine のそれを syn 型という。一方, 8, 2'-S-cycloadenosine (A^S) の torsion angle は -108° 付近 (③の位置) に固定されている。adenosine 及び 8-bromoadenosine 誘導体が水溶液中でも, このような conformation をとっているかどうかを調べてみた。

図(10)は, adenosine, 8-bromoadenosine 及び

8,2'-5-cycloadenosine の各誘導体の CD をまとめたものである。

先ず, nucleoside と nucleotide を比較すると, anti 型に固定されている A^S では, 両者の CD は殆ど変わらない。同じ anti 型をとっていると思われる adenosine 系でも, 両者の CD は殆ど一致する。

しかし, Sym 型をとっていると思われる 8-Bromoadenosine 系では, 両者にかなり差が見られ, 260m μ 付近の Cotton effect の sign は逆になっている。

pyrophosphate をみると, A^S のそれでは殆ど monomer と変らず, stack していないが, adenosin のそれは, monomer と異り, 非常に大きな Cotton effect を示し, 強い stack していることが判り, その pattern は長波長側に positive, 短波長側に, negative となっている。

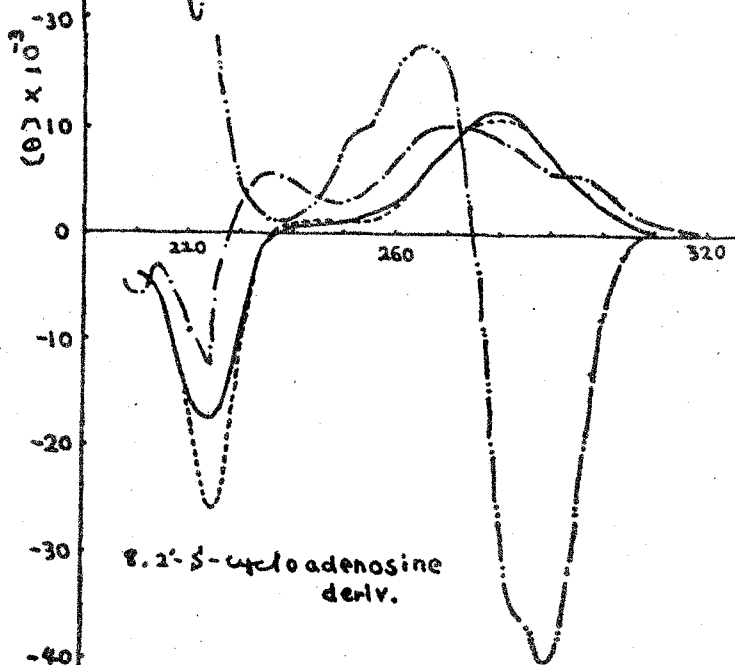
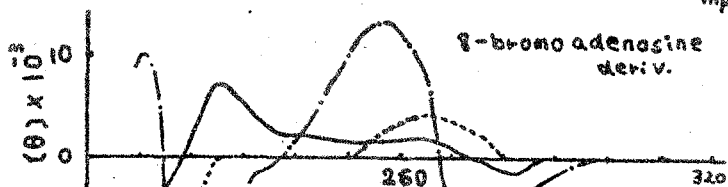
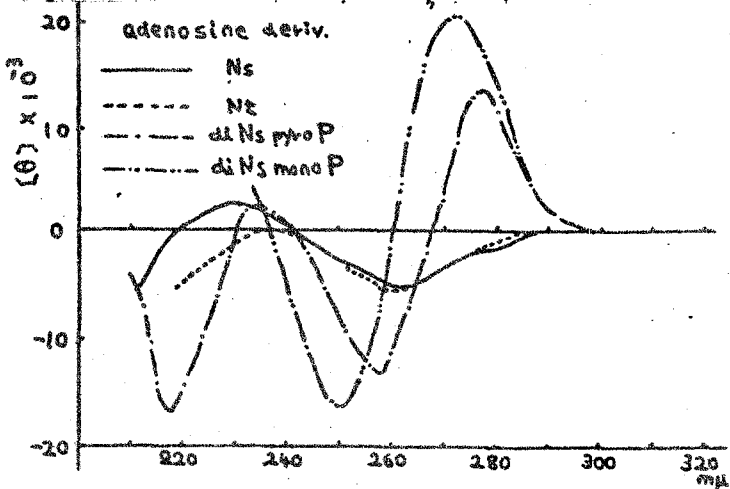
8-bromoadenosine の pyrophosphate も, 大きな Cotton effect を示し, 強く stack しているが, その pattern は, 長波長側に negative, 短波長側に positive と, adenosine の場合とは逆転している。

以上の結果と, CPK^{*} model による検討を統合すると, 表(12)に示したような結論となる。

*. Corey-pauling-koltun 分子模型

図(10) nucleoside, 5'-monophosphate, dinucleoside pyrophosphate, dinucleoside monophosphate の

CD 210°K14



———— nucleoside
 - - - - - nucleoside
 5'-monophosphate
 dinucleoside
 pyrophosphate
 - · - · - · dinucleoside
 monophosphate

表(12) CD測定結果

	torsion angle	difference ^{b)} between monomers	degree of stacking	CD ^{c)} pattern	conformation in aq. solution
A ^S	-108° (anti)	—			anti
A ^S -5'-MP*					
A ^S -5'-PP**			—		
A ^S P A ^S			++	—	
A	-20° ^{a)} (anti)	—			anti (A ^S のtorsion angleとは、 かなり異なる)
A-5'-MP					
A-5'-PP			++	+	
A _P A			++	+	
8-Br-A	+119° ^{a)} (syn)	+			syn
8-Br-A-5'-MP					
8-Br-A-5'-PP			++	—	

a) 結晶中のtorsion angle

b) λ_{max} 付近の、nucleosideとその5'-monophosphateのCDスペクトルの差

c) 長波長側にpositive、短波長側にnegativeのCotton effectが現れるpatternを+とする。

* MP: monophosphate, ** PP: pyrophosphate

第五章 8,2'-S-cycloadenosine を含 む oligonucleotide の構造と性質

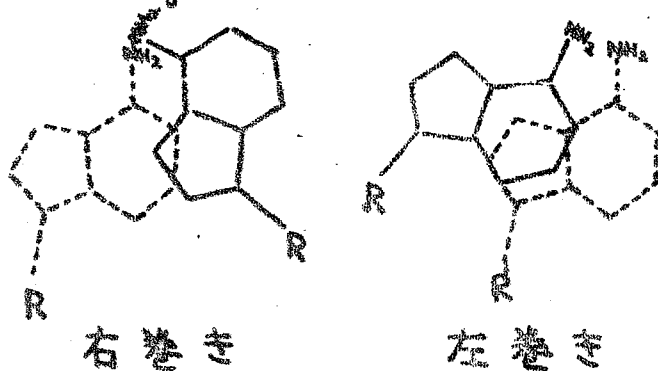
第一節 Dinucleoside monophosphate A^SpA^S の構造と性質

前章で述べたように、A^SpA^S [40] の CD をみると、非常に大きな Cotton effect を示し、分子中の2つの base は強く stack していることが判る。このことは、その UV 吸収からも予想されていた。

(monomer に比べて λ_{max} は約 5 m μ の hypsochromic shift しており、 ϵ_{max} で比較して約10

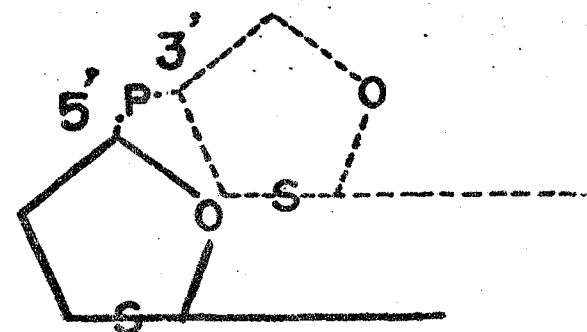
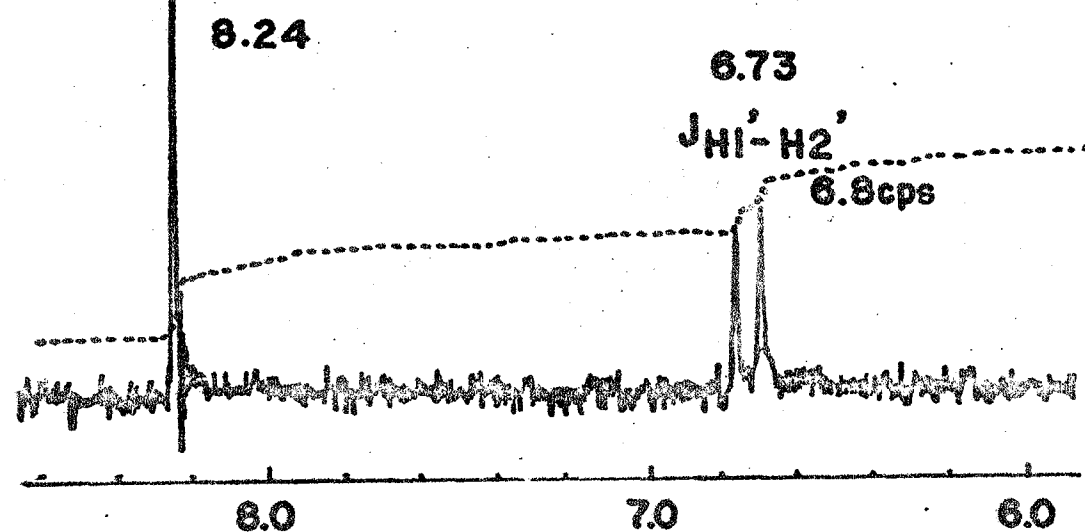
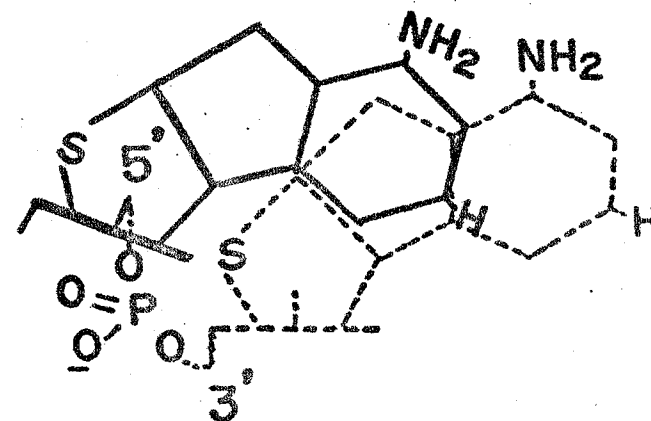
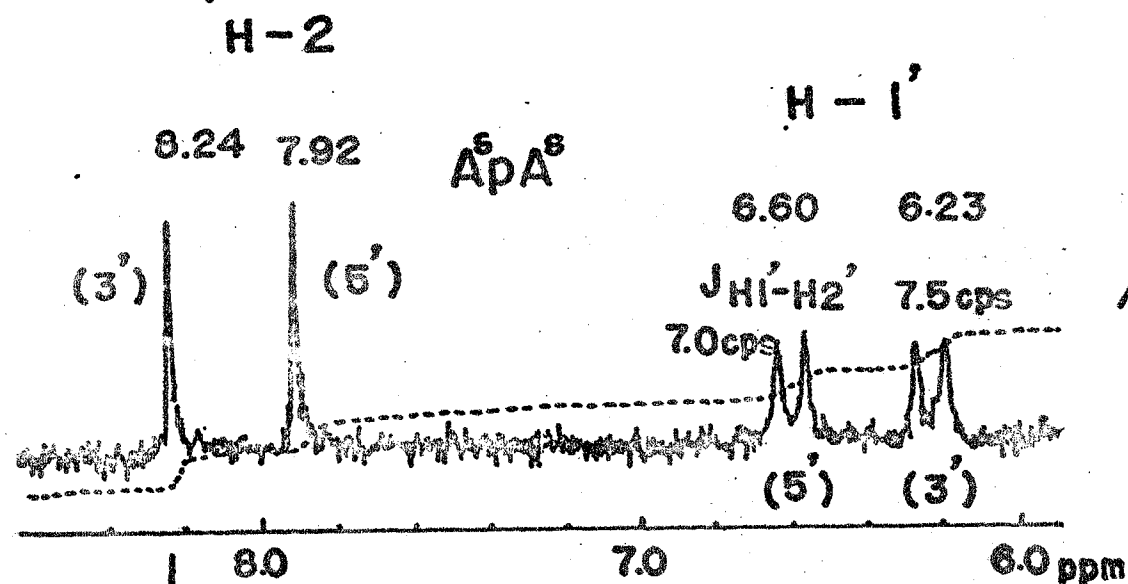
%の hypochromicity がある。) adenosine の
 dinucleoside monophosphate ApA [39] と
 比較すると, Cotton effect の pattern が逆転して
 いるが, これは理論的には, base の stack の仕方
 , ラセン軸に対する まきちが逆になっていることを
 示唆する。天然の polynucleotide は凡て, 右巻
 き の ラセン構造をとっていると言われているが,
 ApA についても, 同様に右巻きの stack をしている
 ことが判っている。⁽²⁸⁾⁽⁴⁰⁾ 従って, A⁵pA⁵ については,
 左巻きの stacking が予想される。

図(11) stacking の仕方



次は NMR により, これを明らかにした。図(12)
 に A⁵pA⁵ B と pA⁵ の NMR スペクトルを示した。最も
 低磁場に出る singlet の signal が H-2 によるもの
 で, その次に現れる doublet が H-1 である。い
 ずれも 2 本ずつ出ており, その 1 本は, pA⁵ の signal
 より 0.3 ~ 0.4 ppm 近く高磁場 shift しており, 強い

図(12) $A^S_p A^S$ 及び PA^S の NMR スペクトル



Schematic representation of $A_p^S A^S$

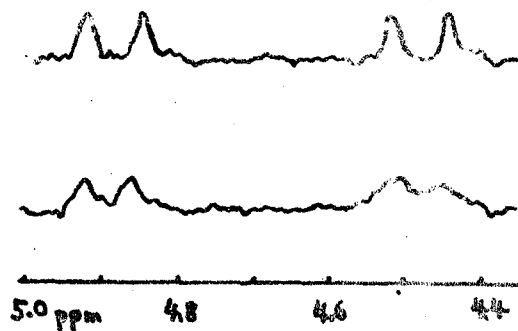
neutral Na salt, 0.1 M in D_2O , external TMS reference

stacking の存在を示している。これ 5 2 組の signal が、 δ の base あるいは sugar に属するかを、Tao 等の方法⁽⁶⁾によって決めた。

nucleotide の NMR は、一般に Na salt でとるが、これを Mn^{2+} salt にかえると、 Mn^{2+} の近く（即ちリン酸基の近く）にある proton の signal は broad になる。図(13)に示したように、上が Mn^{2+} を加えぬ場合の H-1' の signal であるが、 Mn^{2+} を加えると、高磁場側の signal が非常に broad になる。3'-OH 基にリン酸の結合している sugar（以下 3' 側の sugar とする）の H-1' の方が、リン酸基に近いので、この高磁場側の signal は 3' 側のそれであると思われる。

図(13) Mn^{2+} による broadening effect

3' 側の H-1' が ring current anisotropy により high field shift するのを図(12)に示す。



うに、base が左巻きに stack している時である。

この時、H-2 は 5' 側の方が high field shift するはずなので、結局 signal は低磁場側からそれぞれ、H-2(3'), H-2(5'), H-1'(5'), H-1'(3') となる。

以上で, $A^S p A^S$ の 2 つの base は互いに *stack* していることが判ったが, 次に, 熱に対する安定性を調べた。dimer の signal と monomer の signal の chemical shift の差を, dimerization shift $\Delta\delta_D$ と言うが, 表(13)に示したように, これらの値は, H-1'(3') では約 0.6ppm に及び, $A p A$ のそれ($\Delta\delta_D$ が最大の H-2(3') は室温で約 0.2ppm)と比べると, 非常に強い *stacking* をしていることがわかる。又, その温度依存性を見ると, 7°から 60°まであげても, H-1'(3') で 23%, H-2(5') で 15%しか減少していなく, 逆に $A p A$ (H-2(3') で 58%, H-1(3') で 33% 減少している)と比べると非常に熱に安定なことが判る。

表(13)

$\Delta\delta_D$ の温度依存性

$$\Delta\delta_D = \delta_{A^S p A^S} - \delta_{p A^S}$$

(extrapolated to infinite dilution)

		H-1'		H-2	
		3'	5'	5'	3'
7°C	$A^S p A^S$	6.36	6.79	8.08	8.49
	$p A^S$	7.01	7.01	8.48	8.48
	$\Delta\delta_D$	0.65	0.22	0.40	0.01
室温	$A^S p A^S$	6.50	6.92	8.19	8.56
	$p A^S$	7.09	7.09	8.56	8.56
	$\Delta\delta_D$	0.59	0.17	0.37	0.00
60°C	$A^S p A^S$	6.72	7.09	8.36	8.71
	$p A^S$	7.22	7.22	8.70	8.70
	$\Delta\delta_D$	0.50	0.13	0.34	0.01

第二節 Oligonucleotide $(pA^S)_n$ の構造と性質

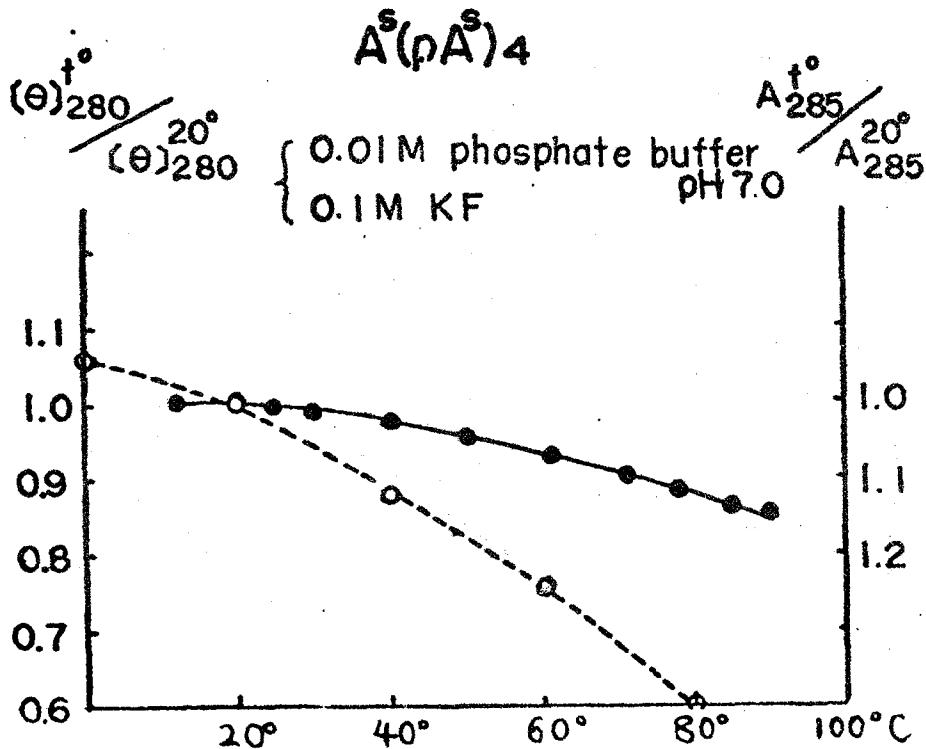
$n=3$ 以上の oligonucleotide においても、その CD pattern は $A^S p A^S$ のそれと殆ど変わらないので、同様に左巻きの stacking をし、左巻キラセン構造を取っているものと思われる。T₂o 等は、 β -L-adenosine の dinucleoside monophosphate が、左巻きの構造をとっている⁽⁴⁾と報告しているが、このような左巻きの構造は、 β -D-nucleotide 系では、初めての例である。

図(15)に、UV 吸収の ϵ 及び CD の $[\theta]$ に對する鎖長の影響を示しても、 ϵ は $n=4$ 位、 $[\theta]$ は $n=6$ 位でほぼ一定値に達している。

図(16)に、pentamer $A^S(pA^S)_4$ の $[\theta]$ 及び UV 吸収の温度依存性を示したが、 $[\theta]$ は 0° から 80° までほぼ直線的に下っている。一方、UV 吸収の方は、ここに示した $285 m\mu$ では、完全に destack すると、1.6 位まで増大するはずであるが、 40° 位までは、ほぼ一定になっており、 90° でも 1.5 位までしか増大しない。NMR の結果と同様に、hypochromicity も殆ど減少せず、base の重なり部分が広く、熱に安定なことが判る。 $[\theta]$ の減少も、酵素で合成した長鎖の polyadenylic acid (poly A) でも、 $0 \sim 74^\circ$ で、

$\frac{1}{2}$ 以下に減少しているが, ApA^S では, $0-80^\circ$ で約 $\frac{1}{2}$ にしか減少しておらず, 熱に対する安定性を示しているが, その温度依存性は, UV吸収のそれより大きくなっている。

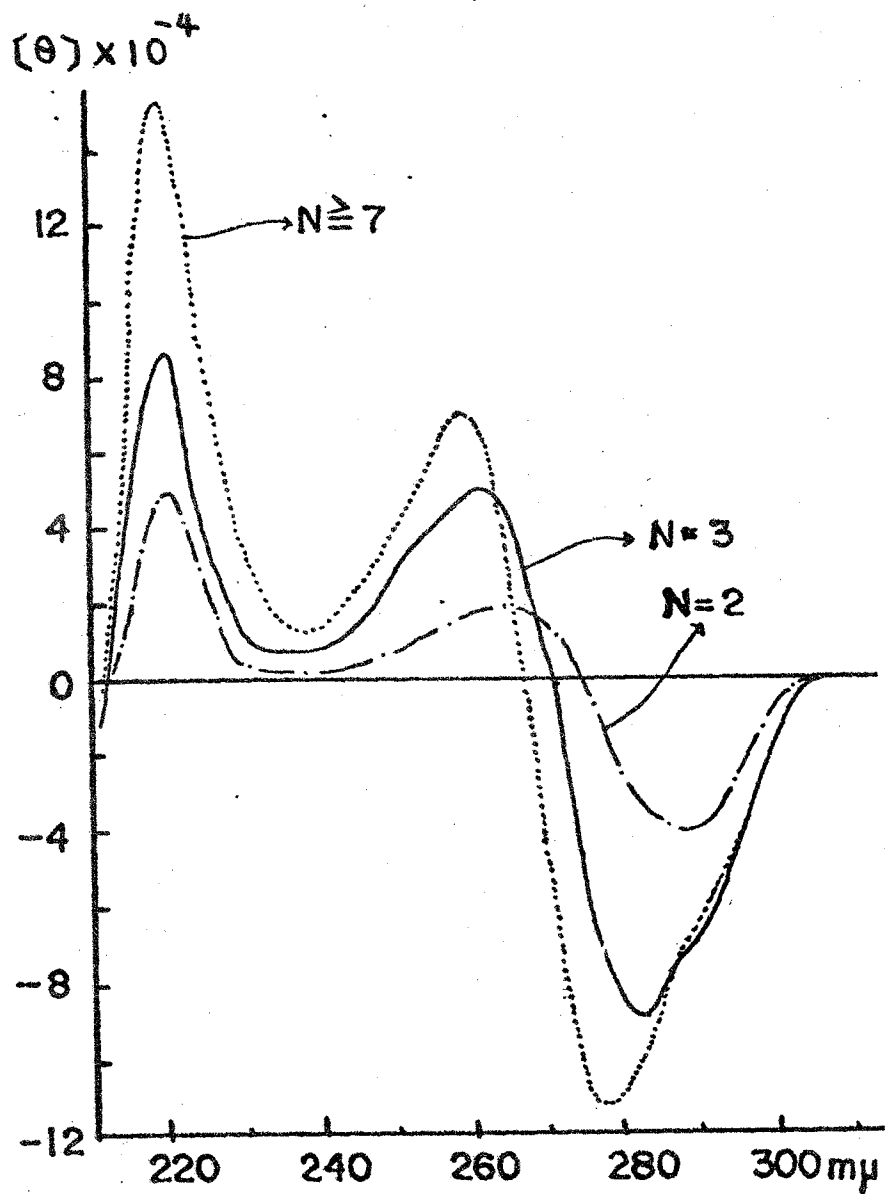
図(16) $\langle \theta \rangle$ 及びUV吸収の温度依存性



Timoco 等により ApA などについて, その con-formation の熱によるくずれ方が調べられている。(6)

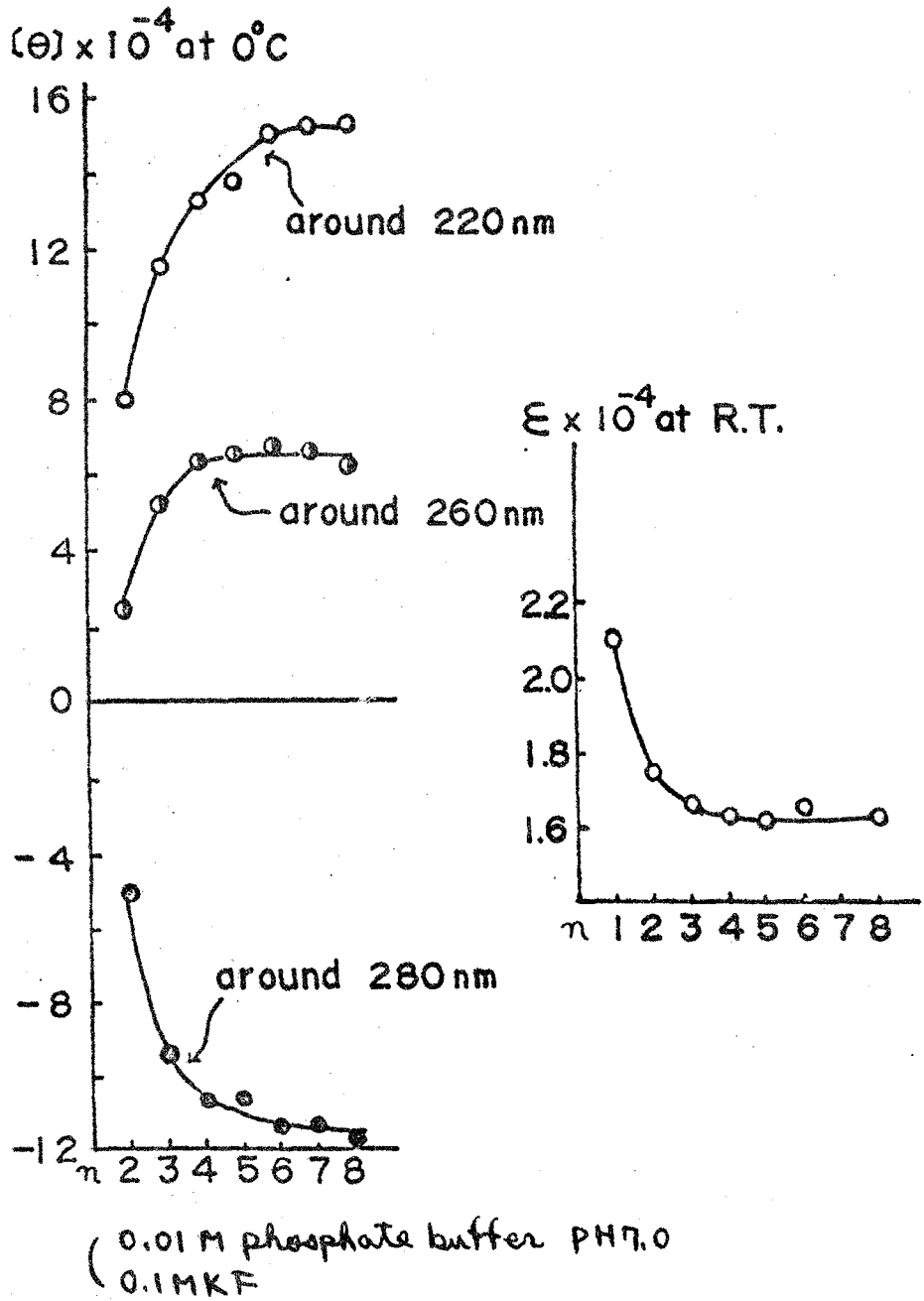
図(17)の(1)のように, base間の距離を一定に保ったまま, 回転軸のまわりに振動する model と, (2)のように, base が完全に stack した状態と, destack した状態との間の平衡を考える model が理論的に調べられている。(1)の model では, $\langle \theta \rangle$ は温度

図(14) $(PA^S)_n$ の CD スペクトル



{ 0.1 M KF
 { 0.01 M Kcacodylate pH 7.0
 20°

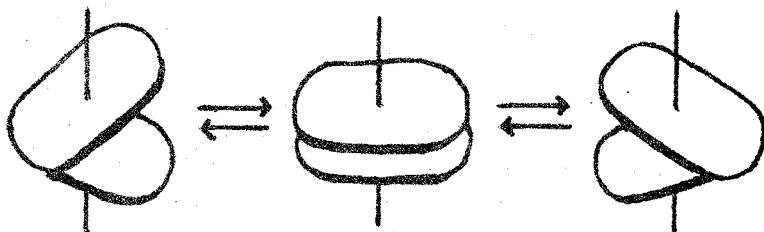
図(15) $[\theta]$ 及び ϵ に対する金膜長の影響



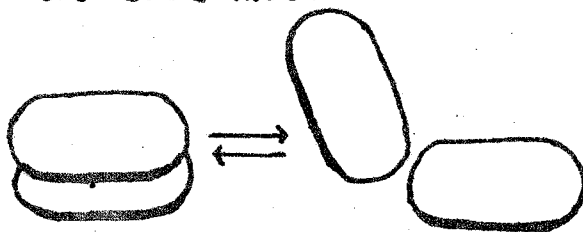
とともに減少するが, hyperchromism は起らない。
 (2) の model では, $[\theta]$ の減少と hyperchromism が同時に起る。ApA では, (2) の model が比較的よく合うとされているが, A^S を含む oligonucleotide では, (2) の過程が起り難く, 室温付近では, (1) の model によく合う結果を与えていると思われる。

図(17) conformation の温度依存性に関する2つのモデル

(1) Torsional oscillator model



(2) Two state model



以上, 中五章の結果から次のことが明らかになった。

- (1) polynucleotide の構造, 特にその helix の巻き方は, sugar 部の D-, L- によらず, monomer unit の torsion angle が重要な役割をもつ。
- (2) base の glycoside bond のまわりの自由回転がなければ, base 間の stacking は非常に安定化する。

結 語

- 1) adenine nucleotide の緩和で、直接的な 8 位のブロム化に成功した。この方法は nucleoside にも応用され、好結果を得ている。
- 2) nucleoside 5'-monophosphate の 2'-OH 基の特異的なトリル化に成功した。
- 3) 以上の反応により、8,2'-S-cycloadenosine 5'-monophosphate を、5'-AMP から容易に合成しうるようになった。
- 4) 8,2'-S-cycloadenosine を含む, oligonucleotide, A^5pA^5 及び $(pA^5)_n$ を合成した。
- 5) 主に nucleotide level の反応を用いて, cycloadenosine, 8-置換 purine nucleoside の 5'-monophosphate 及び dinucleoside 5'-pyrophosphate を合成した。

次いで、これらの CD を測定することにより、その水溶液中における三次構造について知見を得た。

- 6) A^5pA^5 並びに $(pA^5)_n$ の物理化学的性質を調べることにより、その構造を明かにし、polynucleotide の conformation 及びその熱安定性に対する torsion angle の影響について新知見を得た。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭達下さいました、大阪大学薬学部、池原森男教授に感謝いたします。本研究の一部に協力していただいた、安本三治修士、吉田勝美氏、また、研究上の討論に加わり、有益な御助言をいただきました大阪大学薬学部薬化学教室の皆様には感謝いたします。

さらに、 $AspA^S$ の温度可変 NMR を測定していただきました、Johns-Hopkins 大学の Ts'o 博士に感謝いたします。又、potato 3'-nucleotidase を供与してくださった、北海道大学の野村哲士博士に感謝いたします。

実験の部

UV 吸収は, Hitachi Recording Spectrophotometer EPS-3T を, NMR は Varian HA-100 Spectrophotometer (100 Mc) を, CD は JASCO ORD/UV-S Spectropolarimeter を用いて測定した。

NMR Sample は 凡て Na salt を用い, D_2O に溶して 2 回凍結乾燥後, D_2O に溶し, TMS を外部標準として測定した。

CD Sample は, 10mm Cell を用い, 吸収が 1~2 O.D. max/ml となる濃度で測定した。Calibration は d-10-camphor-sulfonic acid を用いて行った。

ペーパークロマトグラフィー (PPC) 及び電気泳動 (PEP) は東洋濾紙 No. 51A を用いて行った。

PPC は下降法で行い, 溶媒は次のようなものを用いた。結果は R_f , R_{pA} は 5'-AMP に対する相対移動度 (R_{pA}) で示した。

A: isopropanol - 濃 NH_3 - 水 (7:1:2)

B: n-butanol 冰酢酸 - 水 (5:2:3)

C: n-propanol - 濃 NH_3 - 水 (55:10:35)

D: ethanol - 1M ammonium acetate (7:3)

E: 飽和硫酸 - 水 - isopropanol (79:19:2)

PEPは、東洋河紙電気泳動器 PE-2 を用い、約 35 V/cm の条件で行い、buffer は次のものを用いた。

PH 7.5 0.05M triethylammonium bicarbonate buffer

PH 3.5 0.05M ammonium formate buffer

結果は、5'-AMP に対する相対移動度 (R_{pA})、あるいは、5'-AMP と adenosine の移動度を、それぞれ、1.0 及び 0.0 とした時の相対移動度 (R_{pA-A}) で表わした。

Thin layer クロマトグラフィー (TLC) は、TLC 用 Kieselgel HF₂₅₄ を用い、展開溶媒としては、CH₂Cl₂ と エタノールの混合溶媒を用いた。

UV 吸収の ϵ 及び、C D の $[\theta]$ は特にことわらぬ限り、base 残基当りの値で示した。

第一章、第一節の実験

8-Brmoadenosine 5'-monophosphate (11)

a) pH 4 acetate buffer 中の反応

adenosine 5'-monophosphate (5'-AMP) 2Na salt
1 mmole を 0.25M-acetate buffer pH 4 40 ml に溶し、
飽和 Br_2 水 7.15 ml を加え、室温 overnight 放置す
る。これに 52 mg の NaHSO_3 を加えて脱色し、溶媒を
エタノールと共沸させてとばす。これを 50 ml の水に
溶し、Dowex 1X8 (formate form) Column (1.5 cm $\times$
15.5 cm) 100~200 mesh, one fraction 50 ml にか
け水洗後 (約 300 ml), 0.1 N 酢酸で溶出する。2 番目の
major peak (fr. 30~50) を集め、1.3 g の活性炭に吸
着させ、50% エタノール-2% 濃 NH_3 で溶出する。(200 ml $\times$ 3)。
最後に少量のメタノール・水混合溶媒に溶し、acetone
を加えて沈澱させる。収量は 332 mg (69%)。

b) CaCO_3 をアルカリとして用いた場合。

5'-AMP $\cdot$ 2Na 1 mmole を dioxane 10 ml と水 40 ml の混合
溶媒に溶し、 CaCO_3 150 mg を加えて攪拌する。これ
に Br_2 水 (1.5 mmole/20 ml) 20 ml を 1 時間かけて滴加
する。そのまま overnight 攪拌し、 NaHSO_3 52 mg を
加えて脱色する。溶媒をとばし、25 ml の水に溶し、
Dowex 1X8 (formate form), 1.5 cm $\times$ 15 cm の column にか
け、水洗後、0.1 N 酢酸で溶出する。major peak

(fr. 21 ~ 41) を集め活性炭処理し、最後に、メタ
ノール・水に溶し、約10倍の acetone を加えて沈澱さ
せる。収量 305 mg (64%) Br_2 の量を2倍にする
と完全に反応進行する。

c) NaOH をアルカリとして用いた場合。

N-NaOH 2ml に、 Br_2 水 (0.3 mmole/ml) 6.6 ml (2当
量) を加える。これに 5'-AMP 2 mmole を加え
よく振って溶す。室温3日後、溶媒をとばし、25
ml の水に溶して、濃 NH_3 1滴を加えてアルカリ性と
し、Dowex 1X8 (formate form) $1.5 \text{ cm} \times 17 \text{ cm}$ の
column にかける。one fraction 12 ml, 流速約 24 ml/hr 。

水洗後、 0.1 N 酸で溶出する。major peak (fr. 74 ~
156) を集め、活性炭処理し、最後に少量の水に溶し
て沈澱し、約10倍の acetone を加えて沈澱をとる。

収量 239 mg (50%)

UV 吸収: H^+
 $\lambda_{\text{max}} 262.5 \text{ m}\mu$ (1.64×10^4), $\lambda_{\text{min}} 231 \text{ m}\mu$
 $\text{H}_2\text{O}, \text{OH}^-$
 $\lambda_{\text{max}} 264.8 \text{ m}\mu$ (1.51×10^4), $\lambda_{\text{min}} 232 \text{ m}\mu$,
 $A_{280}/A_{260} = 0.513 (\text{H}^+)$, $0.454 (\text{H}_2\text{O}, \text{OH}^-)$

PPC: Rf, A (0.11, 5'-AMP に同じ), B (0.31, 5'-AMP 0.19)

PEP: $\text{pH} 3.5$, $\text{pH} 7.5$ で 5'-AMP に同じ。

pK_a : 3.6 ($260 \text{ m}\mu$ で測定)

NMR: D_2O 中 0.1 M 8.29 (singlet H-2), 6.22 (doublet

H-1' $J_{\text{H-1}, \text{H-2}} = 5.7 \text{ cps}$) 5.40 (triplet H-2')

元素分析 ($C_{10}H_{14}N_5NaPO_7Br \cdot H_2O$) 理論値 C: 25.12
H: 4.42, P: 6.48, 分析値 C: 25.23 H: 4.84 P: 6.46

8-Bromoadenosine 5'-diphosphate (14)

adenosine 5'-diphosphate (ADP) 2 Na salt 42 μ mole
を 0.25M-acetate buffer pH 4 2ml 及び水 2.5 ml を加えたものに溶しておき, これに飽和 Br_2 水 0.47 ml を加えて室温に一夜放置する。これに $NaHSO_3$ 5mg を加え脱色し, イタールを加えてとばす。これを 50ml の水に溶かし, Dowex 1X8 (Cl^- form), 0.7cm X 15.5cm のカラムにかけ, 水洗後, 0.05M $NaCl$ + 0.001N HCl で流して目的物を得る。この peak (fr. 48~78) を集めて活性炭処理をする。収量 277 OD₂₆₀ ($\epsilon_{260}^{H_2O} = 1.44 \times 10^4$ として 46%)

UV 吸収: $\lambda_{max}^{H_2O}$ 265 m μ , $\lambda_{max}^{H^+}$ 263 m μ

PPC: B (0.14, 原料 0.07), C (0.51, 原料 0.51)

PEP: pH 7.5, pH 3.5 で ADP に同じ ($R_{pA} = 1.42$)

P 分析: total P: acid labile P: base = 1.96:1.04:1.00

8-Bromoadenosine 5'-triphosphate (15)

0.25M-acetate buffer pH 4, 40ml adenosine 5'-Triphosphate (ATP) 2 Na 1 mmole 飽和 Br_2 水 9.4 ml (2 eq) の順に加え, 室温一夜放置後, $NaHSO_3$ 104mg を加

えて反応を止め、I 9) - ルを加えて溶媒を飛ばし、
 100 ml の水に溶し、Dowex 1X8 (Cl⁻ form) 1.2 cm
 X 20 cm のカラムにかけ、水洗後、0.3 M LiCl +
 0.001 N HCl ~ 0.25 M LiCl + 0.001 N HCl, total 4
 l の linear gradient で溶出する。one fraction
 50 ml, 流速 150 ml/hr. major peak (fr 53 ~ 91)
 を集め、活性炭処理して塩を除去、最後はメタノール・水 (1:1) 約 3 ml に溶し、約 40 ml の acetone
 で沈殿させ、acetone, ether の順に洗って乾燥する。
 母液は濃縮し、同じ操作を行う。クロマトグラフ-収
 率 56% ($T_{OD}^{H^+}_{260} = 9040$), 収量 351 mg ($4Li \cdot 3H_2O$ とす
 ると 53%)

UV 吸収: $\lambda_{max}^{H^+}$ 263 m μ . $\lambda_{max}^{H_2O OH^-}$ 265.5 m μ

PPC: Rf B (0.12, 原料 0.07), C (0.40, 原料 0.38)

PEP: pH 3.5 (RATP 0.97), pH 7.5 (RATP 0.98)

8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (19)

adenosine 3',5'-cyclic monophosphoric acid 104
 mg (0.3 mmole) を、水 6.9 ml に N-NaOH 0.3 ml を
 加えたものに溶す。これに 0.25 M-acetate buffer
 pH 4 10 ml を加え、飽和 Br₂ 水 2.8 ml (2 eq) を加えて
 室温一夜放置する。これに I 9) - ルを加えてと

ばし, 100 mlの水に溶し, Dowex 1X8 (Cl^- form)
1.1 cm X 17 cmのカラムにかける。 1 fraction 50 ml
流速 60 ml/h. 0.02 M LiCl + 0.001 N HCl で原料
を出し, 0.06 M LiCl + 0.001 N HCl で Bl 体を溶出する
。(fr. 34 ~ 51) これを集めて活性炭処理し, ヌ
ール・水に溶し, acetone で沈殿させる。 収量
64 mg ($2\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ とする 51%)

UV 吸収: $\lambda_{\text{max}}^{H^+}$ 263 m μ , $\lambda_{\text{max}}^{H_2O}$ 265 m μ

PPC: Rf A (0.48, 原料 0.38), B (0.39, 原料 0.28)

PEP: pH 7.5 原料と同じ。

8-Bromo adenosine 2'-monophosphate (21)

及び 3'-monophosphate (20)

adenosine 2'(3') monophosphoric acid (2'-AMP
21%, 3'-AMP 79% の混合物) 365 mg (1 mmole)
を, N-KOH 2 ml に溶し, 0.25 M acetate buffer
pH 4, 40 ml を加える。 これに飽和 Br_2 水 9.4 ml
(2 eq) を加えて室温一晩放置し, ヌールを加え
てこぼす。 これを 100 ml の水に溶し, Dowex
1X8 (formate form), 1.2 cm X 19 cm のカラム
にかける。 水洗後, 0.05 M ギ酸 $\text{D} \times \text{E} \times$ +
0.1 M ギ酸 約 1.8 l で洗し, 次は 0.10 M ギ酸 $\text{D} \times \text{E} \times$
+ 0.1 N ギ酸で洗して peak I (fr. 47 ~ 66) を得る。

次に 0.20M 硝酸アンモニウム + 0.1N 硝酸 で流し peak II (fr. 68-92) を得る。以上 2つの peak につき、各々活性炭処理をする。peak I, $T_{OD260}^{H_2O} = 1977$ (14%, 2'-AMP 51 67%), peak II, $T_{OD260}^{H_2O} = 8098$ (56%, 3'-AMP 51 71%)。これを少量のメタール水 (2:1) に溶し、約 10-15 倍の acetone で沈殿させ、acetone, ether の順に洗う。

a) 8-bromoadenosine 2'-monophosphate

peak I より 44 mg の powder が得られる。

UV absorption: $\lambda_{max}^{H^+} 263 m\mu$, $\lambda_{max}^{H_2O, OH^-} 265.5 m\mu$

PPC: Rf. A (0.25, pA 0.16), B (0.45, pA 0.26)

E (0.36, 2'-AMP 0.57, 3'-AMP 0.48)

PEP: pH 7.5: R_{pA} 0.99

NMR: 0.15 M D₂O 溶液, 8.32 δ (singlet, H-2),

6.42 δ (doublet, H-1' J_{H-1'-H-2} = 6.3 cps), 5.50 δ (pseudotriplet, H-2')

b) 8-bromo adenosine 3'-monophosphate

peak II より 210 mg の powder が得られる。

UV absorption: $\lambda_{max}^{H^+} 263.5 m\mu$, $\lambda_{max}^{H_2O} 265.5 m\mu$.

$\lambda_{max}^{OH^-} 266.5 m\mu$.

PPC: Rf. A (0.30, pA 0.16), B (0.45, pA 0.26)

E (0.24, 2'-AMP 0.57, 3'-AMP 0.48)

PEP: pH 7.5. R_{pA} 0.96

NMR: 0.15 M D₂O 溶液, 8.26 δ (singlet H-2)

6.34 δ (doublet, H-1', J_{H-1', H-2'} 6.6 cps)

5.22 δ (pseudo triplet, H-2')

adenine nucleotide の酵素水解

a) crude snake venom⁶⁹⁾ 中の 5'-nucleotidase.

8-Br-5'-AMP 50.0, 1M-(NH₄)₂CO₃ 20 μ l, 0.05M Tris-HCl buffer pH 8 10 μ l, crude snake venom (10 mg/ml) 20 μ l をとり, 全量を 100 μ l とし, 37° 4 時間 incubate する。結果は溶媒 A の P-1-P-70 マトリクスで分析する。8-Br-5'-AMP は, 29% 水解され, 8-Bromoadenosine となる。同条件で, 5'-AMP は 100% 水解され, adenosine となる。

b) potato 3'-nucleotidase*

8-Br-2'-AMP R_w 8-Br-3'-AMP 約 0.5 μ mole, 0.5M Tris-HCl buffer pH 8.1. 50 μ l, 酵素溶液 100 μ l. をとり, 全量を 250 μ l とし, 37°. 1 時間 incubation する。8-Br-3'-AMP は 30% 水解され, 8-bromoadenosine を与えるが, 8-Br-2'-AMP は全く水解されない。同条件で, 3'-AMP は 90% 水解され, adenosine を与える。

Buffer 溶液を用いたブロム化条件の検討

a) 5'-AMP のブロム化

* 北海道大学 野村博士より供与していた。

約 $40 \mu\text{mole}$ の AMP $\cdot 2\text{Na Salt}$ に buffer 溶液, 飽和 BaCl_2 水 0.47ml (約 2.5eq.) を加え, 全量を 5ml とする。pH 3~5, 0.25M -acetate buffer 2ml , pH 6 は 1M -phosphate buffer 2ml , pH 7, 8 は 0.2M phosphate buffer 5ml , pH 9 は 0.04M borate buffer 20ml (従ってこの場合は全量約 20.5ml とする) を加えた。結果の分析は, 室温1日後 pH 3~6 は, 溶媒 B の パーカマトグラフィー, pH 7~9 は Dowex 1×8 (formate form) の カマトグラフィーによって行った。

b) $3', 5'$ -cyclic AMP の グロム化

0.05mmole の $3', 5'$ -cyclic AMP free acid に N-NaOH 0.05ml , 0.25M -acetate buffer pH 3~5, 2ml , 飽和 BaCl_2 水 0.47ml (2eq.), 水 2.5ml を加えて室温1日後, 結果を溶媒 A の パーカマトグラフィーで分析する。

c) adenosine の グロム化

約 $55 \mu\text{mole}$ の adenosine に, 0.25M -acetate buffer pH 3~5, 2ml , 飽和 BaCl_2 水 0.47ml (約 2eq.), 水 2.5ml を加え, 室温1日おき, 結果を溶媒 B の パーカマトグラフィーで分析する。

以上の結果については, 表(2), (3), (4) に示した。

第一章 第二節 B₂ 第三節の実験

2'-O-p-toluenesulfonyl adenosine 5'-mono-phosphate [29]

5'-AMP free acid 1 mmole を N-NaOH 2 ml に溶し、減圧乾固する。これを N-NaOH 1.5 ml に溶し、TsCl 665 mg (3.5 mmole) を dioxane 7.5 ml, 水 0.5 ml に溶かしたものに、攪拌下、30 分かけて滴加する。滴加を始めて数分後に、けん濁液となり始め、最後はかゆ状になる。その後 1.5 時間攪拌を続けると、反応液は透明、液性は酸性になる。これを N-NaOH で中和する。溶媒 A のパークロマトグラスで調べると、mono-tosylate は 61% 生成している。preparative パーパクロマトグラスで単離し、諸性質を調べ、P 分析により ϵ を出した。

UV 吸収: $\lambda_{\max}^{\text{PH } 2} 230 \text{ m}\mu (1.27 \times 10^4)$, $258.5 \text{ m}\mu (1.29 \times 10^4)$, $\lambda_{\min}^{\text{PH } 2} 244.5 \text{ m}\mu$, $\lambda_{\max}^{\text{PH } 7} 231 \text{ m}\mu (1.31 \times 10^4)$, $261.5 \text{ m}\mu (1.26 \times 10^4)$, $\lambda_{\min}^{\text{PH } 7} 245 \text{ m}\mu$, $\lambda_{\max}^{\text{OH}^-} 261.5 \text{ m}\mu$

PPC: R_f, A(0.25, pA 0.07), B(0.55, pA 0.19), D(a39, pA 0.16)

PEP: pH 7.5 (R_{pA-A} 0.95)

2'-O-p-toluenesulfonyl 8-bromoadenosine
5'-monophosphate (30)

8-Br-5'-AMP 2Na Salt 0.5 mmole と N-NaOH 0.75 ml に溶し, TsCl 380 mg (4 eq.) を dioxane 3.75 ml - 水 0.25 ml に溶したものに, 攪拌下 35 分で滴加する。液は赤褐色に着色し, 終始乳濁している。この後, 2 時間攪拌下 徐々に N-NaOH で中和する。溶媒 A のペーパークロマトグラフィーで調べると, mono-tosylate は 68% 生成している。preparative ペーパークロマトグラフィーで単離し, 諸性質を調べ, P 分析により ϵ を求めた。

UV 吸収: $\lambda_{\max}^{PH2}$ 229 m μ (1.27×10^4), 264 m μ (1.61×10^4), $\lambda_{\min}^{PH2}$ 245 m μ , $\lambda_{\max}^{PH7}$ 266 m μ (1.40×10^4)
 $\lambda_{\min}^{PH9}$ 245.5 m μ , $\lambda_{\max}^{OH^-}$ 266 m μ .

PPC: R_f , A (0.33, PA 0.12)

PEP: PH7.5 (R_{PA} -A 0.94)

8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabino-
furanosyl)adenine 5'-monophosphate (4)

a) 2'-OTs-5'-AMP 経由

上記 ϵ を用いて, 5'-AMP 5 mmole より得られる, トシル化の反応混合物 (溶媒 A のペーパークロマトグラフィーより, mono-tosylate 56%, di-tosylate 19% の溶媒をヒバし, これを 100 ml の水に溶す。これに

0.5 M-acetate buffer pH 4, 100 ml, 飽和 Bh_2 水 を 50 ml 加える。約 30 分放置し, 更に飽和 Bh_2 水 50 ml を加える。反応液は赤色となる。室温 2 日放置後, 空気を 1~2 時間通じて Bh_2 を追い出し, 溶媒をとばし, 残渣に水を加えて 2 回とばす。最後に 50 ml の水に溶し, 少量の NaHSO_3 を加えて脱色する。(大量加えると脱 Bh 化をおこなうから注意) この溶液 a 一定量を取り, 溶媒 A のパーパークロマトグラフィーで分け, 水で抽出して定量すると, 2'-OTS-8 β H-5'-AMP は 14700 O.D.266 ある。5'-AMP より 21%。

これに pyridine 50 ml を加え, 室温で H_2S ガスを 7 分間通じる。液は緑色となる。密栓して 2 日間室内放置後, N_2 ガスを吹きこんで, H_2S を除き, 溶媒をとばす。残渣に水を加えてとばす。最後に 2 l の水に溶し, Dowex 1X8 (formate form), 3 cm X 30 cm のカラムにかけ, 水洗後, 0.05 N ギ酸 (fr. 68-104), 0.1 N ギ酸 (fr. 105~265), 0.1 M ギ酸ペンモン + 0.01 N ギ酸 (fr. 266~299) の順に流す。one fraction 50 ml, 流速 100~150 ml/hr. 0.1 N ギ酸で溶出する major peak (fr. 168~217) を集め, 少量にたるとまで溶媒をとばし, 約 200 ml の水を加えて 2 回とばし約 100 ml まで濃縮し, 凍結乾燥する。これに, メタノール 5 ml, acetone 30 ml を加えて粉にし, 遠心後, acetone-ether で洗う。上清は濃縮後,

MeOH に溶し, acetone 30 ml で沈殿させ, 遠心する。
acetone 溶液の順に洗い, P_2O_5 上乾燥する。
収量 421mg (free acid $\cdot 2H_2O$ とし 5'-AMP 57.21%)
元素分析は, ごく少量の水に溶し, EtOH で沈殿させたものについて行う。

元素分析: ($C_{10}H_{12}N_5O_6PS \cdot 2H_2O$) 理論値: C
30.23%, H 4.06%, N 17.63%, 分析値:
C 30.31%, H 4.11%, N 16.65%

b) 8-Br-5'-AMP 経由

5'-AMP-2Na Salt 5 mmole を 0.25M- $Ba(OAc)_2$
buffer pH 4 200 ml に溶し, 飽和 Br_2 水 50 ml を
加えて室温一夜放置し, 溶媒 Ba パーパークロマト
グラフで, one spot になったのを確かめた後, 空気を
吹き込んで Br_2 を大部分除き, 溶媒をとばす。
残渣を水に溶し $NaHSO_3$ 少量を加えて脱色する。溶
媒をとばし, 20 ml の水にケン濁し, 20 ml の EtOH
を加えて遠心する。沈殿を 50% EtOH で 2 回, EtOH
で 2 回洗い, P_2O_5 上減圧乾燥する。収量 2.6~2.9g.
(UV 吸収から定量すると 70~80%)

ここに得られた, 8-Br-5'-AMP の Ba Salt を
250 ml の水にケン濁し, 加温してできるだけ溶し
、冷後 Na_2SO_4 を 20 ml の水に溶したものを加えて、
よく振る。最後は $N-NaOH$ を 0.5 ml 加えて中和し
、溶媒をとばし, 8-Br-5'-AMP の 2Na Salt を得る。

TsCl 3.8 g を dioxane 22.5 ml に溶し、スターラーで撹拌する。これに、上記 Na Salt を 7.5 ml の N-NaOH に溶し、直ちに滴下を始める。約 1 時間かけて滴加し、その溶液が透明になるまで撹拌し、N-NaOH で中和し、溶媒をとばす。

ここに得られた Ts 体 α 混合物を、DMF 5 ml H₂O 3.5 ml に溶し、40% NaSH 水溶液 1.4 ml (10 mmole) を加え、室温 2 日放置後、N-HCl で中和し、溶媒を注意してとばす。これを水に溶してろ過し、約 1 l の水に溶す。この一定量をとり、溶媒 A のパーパークロトグラフィーで分けて、定量すると、8,2'-S-cycloadenosine 5'-monophosphate *rr*, 30500 O.D. 296 存在する。(5'-AMP から 27%)

元素分析:

(1) 凍結乾燥後の結晶 ($C_{10}H_{10}O_6N_5PS \cdot 2H_2O$)
理論値: C 30.23, H 4.06, N 17.63, 分析値: C 30.33
H 4.67, N 17.15

(2) 上の結晶を水から再結して得られる葉状晶を
P₂O₅ 上、減圧、室温で 20 時間で乾燥した。

($C_{10}H_{10}O_6N_5PS \cdot 2.7H_2O$), 分析値: C 28.97,
H 4.45, N 17.37, P 7.58.

UV₂₅₄ λ_{max}^{PHI} 278 (2.15×10^4), λ_{min}^{PHI} 237.5
(2.8×10^3), λ_{max}^{PHI} 220.5 m μ (2.19×10^4) 270 m μ (2.25×10^4)
 λ_{min}^{PHI} 238 (4.2×10^3), λ_{max}^{PHI} 277 m μ (2.28×10^4)

$\lambda_{\min}^{\text{PHB}} 239 (4.4 \times 10^3)$

ppc: A (0.06, pA 0.07) B (0.29, pA 0.24, pA 0.32)^{Br*}

C (0.44, pA 0.48) D (0.12, pA 0.15)

PEP: pH 7.5, R_{pA-A} 0.93

NMR: 0.1M D₂O 溶液, 8.24 δ (singlet, H-2)

6.93 δ (doublet, H-1', J_{H-1', H-2'} 6.8 cps)

8,2'-5'-cycloadenosine 3',5'-cyclic mono-phosphate [37]

8-Br-3',5'-cyclic AMP pyridinium salt 0.2 mmole を 2N-KOH 0.3 ml に溶し, TSC 152 mg (4 eq) を dioxane 1 ml に溶したものに攪拌下約25分で滴加する。初めのうちは, 黒褐色油状のものが析出するが, まもなく homogeneous な溶液となる。液が酸性になるまで攪拌を続け, 2N-KOH で徐々に中和する。ペーパークロマトグラフィーで調べると, 原料は殆どなく残っている。 $\lambda_{\max}^{\text{H}^+} 265 \text{ m}\mu$, $\lambda_{\min}^{\text{H}^+} 261.5 \text{ m}\mu$, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}} 267 \text{ m}\mu$, $\lambda_{\min}^{\text{H}_2\text{O}} 246.5 \text{ m}\mu$ R_f: A (0.73, 原料 0.49), B (0.86, 原料 0.61) のものが, major product である。

溶媒をとばし, 6 ml の水と 6 ml の pyridine を加えて溶し, H₂S を 0° で 10 分間通じる。室温 28 放置後, 溶媒をとばし, 水を加えてとばし, 少量の水を加えて不溶物を浮遊する。Dowex 1X8 (G型),

* 8-bromoadenosine 5'-monophosphate.

1cm x 20cm のカラム にかい, 水洗後 0~0.1 M NaCl + 0.003 N HCl (全量 2l) a linear gradient で 溶出する。 one fraction 10ml 流速 50ml/hr. major peak (fr. 70-111) を集め, 活性炭処理して 単離する。 クロマトグラフ-収量, 1970 OD₂₈₀^{H+} (3',5'-cyclic AMP より 46%)

UV 吸収: $\lambda_{\max}^{H+}$ 279 m μ , $\lambda_{\max}^{H+}$ 246 m μ , $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 278 m μ , $\lambda_{\min}^{H_2O}$ 246 m μ . $\lambda_{\max}^{OH-}$ 278 m μ

PPC: A (0.43, 原料 0.47). B (0.34, 原料 0.29)

PEP: pH 7.5 R_{PI}-A 0.50 (原料 0.53)

2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate [34]

PA^S. free acid 5mg を N-NaOH で中和し, 5ml の 水に 溶す。 (T.O.D. 276 = 270) これに Raney Ni (W-7) をミクロスポーテルに 2杯 ちって 入れ, 浴温 130° で 3 時間 reflux し, 溶媒 D の ペーペー クロマトグラフ で 分離する。 収量 31.800.260 (18%), UV 吸収: $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 260 m μ , $\lambda_{\min}^{H_2O}$ 229 m μ , PPC: D (0.23, 原料 0.16, pA 0.19)

このもの約 50.D. を Crude snake venom と, 37° 5 時間 incubate すると, 98% 脱リノ酸し, 2'-deoxyadenosine を 与える。

PPC: A (0.59. 2'-dA 0.59, A^S 0.48)

Dowex 1 (OH⁻ form) カラムによる PA^S の分析

a) 2'-O-Ts-5'-AMP 経路の PA^S .

free acid 5mg を N-NaOH 2^{ml} 中和し, 水 5ml, 0.5 M NH_4HCO_3 0.5ml, E. coli alkaline phosphatase (0.4 mg/ml) 0.5ml を加え, 37°, 8時間 incubate し, 溶媒をとり出す。これに少量の水を加えると, 花紋状の結晶が析出する。母液及び結晶の洗液を溶媒 C のペーパークロマトグラフィーで分け, R_f 0.57 の AS を水で抽出し, 結晶と合せて 10ml の水に溶し (TOD₂₇₆ = 246), Dowex 1X2 (OH⁻ form), 100~200 mesh, 0.6cm X 2cm のカラムにかける。one fraction 20ml, 流速約 80ml/hr. 水洗で殆ど出てしまう。次に 30% MeOH (fr. 22-29), 及び 1% AcOH (fr. 30~) で洗ったが, 殆ど UV 吸収はなく, 280 mμ 以上に入 max をもつ 8,3'-5'-cycloadenosine は検出されない。これの fr. 4-19 (TOD₂₆₇ = 248) を合せて, 濃縮し, 10ml の水に溶して, 0.6 X 3cm のカラムにかけても同じ結果を得る。ちなみに標品の 8,2'-5'-cycloadenosine 3mg と 8,3'-5'-cycloadenosine 2mg をとり 10ml の水に溶して, 両クロマトグラフィーの時と同じカラム, 同じ条件で洗うと, 完全に両者を分離できる。 AS (fr. 4~35, TOD₂₇₆ = 220), 8,3'-5'-cycloadenosine (fr. 43-92, TOD₂₇₆ = 134)

※ 10% 程度の不純物と trace の汚れ残りがあつた。

b) 8-Bh-5'-AMP 経由の A^S

free acid 8mg を $N-NaOH$ 2" 中和し, 水 4ml, $M-NH_4HCO_3$ 1ml, *E. coli* alkaline phosphatase (0.4mg/ml) 0.15ml を加えて, $37^\circ C$. 15 時間半 incubate する。溶媒をとばし, 更に水を加えてとばすと結晶が析出する。結晶を少量の水で洗い, 洗液を電気泳動で分け。(完全に脱リソ酸されている), $R_{PA-A} = 0$ の nucleoside 部を水で抽出し, これを先々の結晶と合せ, 10ml の水に溶し, Dowex 1X2 (OH^- form), 100-200 mesh, 0.6cm X 4cm のカラムにかける。one fraction 20ml, 流速約 80ml/hr. 水洗 (~fr. 10) 後, 30% MeOH (fr. 11~44) 及び 0.5% AcOH (fr. 45~) で溶出する。

fr. 11~18: $Top_{276} = 421$

peak を集めて, 溶媒をとばすと, 結晶が析出する。

これを集めて, P_{205} 上 乾燥する。このものの UV 吸収, 融点, PPC の R_f は標品の A^S のものと一致した。fr. 46-47: $Top_{276} = 2$

peak を集めて, 溶媒をとばし, 溶媒 A のペーパークロマトで分析したが, 8,3'-S-cycloadenosine は検出されなかった。

次に, 標品の A^S 2mg と, 8,3'-S-cycloadenosine 2mg の混合物を 10ml の水に溶し, 上記と同じカラム, 同じ条件でクロマトグラフィーを行うと, 完全

に分離しうる。(図(6)参照)

8. 2'-5'-Cycloadenosine 誘導体の酵素基質としての特異性

a) Crude snake venom 中の 5'-nucleotidase

約 5 O.D. の基質に, 0.25 M Tris-HCl buffer pH 8.7 20 μ l, 0.1 M MgCl₂ 10 μ l, Crude snake venom (20 mg/ml) 適量を加え, 全量を 100 μ l とし, 37° で incubate する。その結果を pH 7.5 の電気泳動で調べる。pA は酵素 5 μ l, 2 時間で完全に脱リノ酸されるが, pA^S は酵素 10 μ l 及び 30 μ l, 4 時間でそれぞれ 52% 及び 92% 水解される。

b) E. coli alkaline phosphatase*

約 5 O.D. の基質に, M-NH₄HCO₃ 10 μ l, 酵素溶液 (0.4 mg/ml) 5 μ l を加え, 全量を 100 μ l とし, 37° 30 分 incubate する。結果は pH 7.5 の PEP で調べる。

pA は 96%, pA^S は 98% 脱リノ酸される。

c) sheep intestinal alkaline phosphatase**

分画中の adenosine deaminase

約 40 O.D. の基質に, M-NH₄CO₃ 30 μ l, 酵素溶液 (0.5 mg/ml) 60 μ l を加え, 全量を 300 μ l とし, 37° で 4 時間半 incubate する。ろ紙 A. O. P. - P. - 1 ロマトグラフィーで結果を調べる。

* Worthington Biochemical Corp. より購入。

** Boehringer Mannheim Corp. より購入。

pA は 99% inosine まで水解されるが, pA^S は A^S となり, その 20% が脱 P ≡) されて, 8,2'-S-cycloinosine となる。このものは標品との比較により同定した*。
 $\lambda_{\max}^{H^+}$ 266 mμ, $\lambda_{\min}^{H^+}$ 232.5 mμ, $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 265.5 mμ, $\lambda_{\min}^{H_2O}$ 232.5 mμ, $\lambda_{\max}^{OH^-}$ 268-9 mμ, $\lambda_{\min}^{OH^-}$ 235 mμ, PPC: A (0.30, inosine 0.31, A^S 0.49)

第二章の実験

N⁶,O^{3'}-dibenzoyl-8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine (46)

5'-O-trityl-8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine¹¹⁾ 100 mg を pyridine 6ml に溶し, benzoic anhydride 300 mg を加えて, 35 時間, 80°-85°C で加温する。反応液を室温に冷却し, NaHCO₃ 水溶液 (0.4g/40ml) 中に氷冷下, 攪拌して少量づつ注ぎこみ, chloroform 15ml で抽出する。chloroform 層を無水硫酸ソーダで脱水し, CHCl₃ を留去し, 白色の残渣を得る。残渣に 80% 酢酸 30ml を加えて, 100°C 13 分間加温する。酢酸を留去して 167mg の白黄色の粉末を得る。P₂O₅ 上, 25~30°C, 15 分間毎, 3 回 reflux する。エーテルを加え, 粉末の目的物を得る。TLC で one spot, Tr 基の紫色テストはマイナス。収率 74%

* A. Yamazaki, unpublished work.

UV 0B42: $\lambda_{\max}^{70\% \text{ EtOH}}$ 301 m μ , 237 m μ , $\lambda_{\max}^{H^+}$ 301 m μ , 237 m μ , $\lambda_{\max}^{OH^-}$ 315 m μ .

TLC: CHCl₃ - EtOH (37:3) (0.44, 原料 0.13)

5'-O-Trityl-N⁶-dimethylaminomethylene-8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabinofuranosyl)adenosine. (42)

TrA³ 168 mg を DMF 3 ml に溶し, dimethyl formamide dimethyl acetal 0.18 ml を加えて, 無水の状態に 23 時間, 室温放置する。反応液を 80 ml の沸水中に攪拌しながら少量づつ加える。白色の沈殿が析出する。これを 3 時間放置後, 濾取し乾燥する。定量的に目的物が得られる。m.p. 144 ~ 145°C

UV 0B42: $\lambda_{\max}^{H^+}$ 305 m μ , 343 m μ , $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 302 m μ , 251 m μ , $\lambda_{\max}^{OH^-}$ 320 m μ , 251 m μ .

TLC: CHCl₃ - EtOH (7:1) (0.43, 原料 0.34)

5'-O-trityl-N⁶-dimethylaminomethylene-9-(β -D-arabinofuranosyl)adenine-3'-phosphate (44)

上に得た [42] 90 mg と 2-cyanoethyl phosphate (pyridinium salt) を無水 pyridine 10 ml を加えて溶解し, DCC 1.2 g を加え, 45°C で 18 時間放置する。反応液に pyridine-水 (3:1) 80 ml を加え, dicyclohexyl urea を濾過し, 濾液を n-hexane 120 ml

で振り, pyridine 層を分取し, 室温で25時間放置後, 溶媒を留去し残渣に MeOH-濃 NH₃ (1:1) 25ml をかえ, 45°C で10時間放置後, 溶媒を留去し, 残渣に水 30ml を加えて遠心する。沈殿を P₂O₅ 上, 室温10時間乾燥し, DMF 2ml を加えて溶し, dimethyl formamide dimethylacetal 0.2ml を加え, 25°C 20時間放置する。溶媒を留去し, 残渣を 50% pyridine 水に溶し, Dowex 50X2 (pyridinium form) のラムを通す。50% pyridine 水で洗い, 溶出液を 2ml に濃縮し, 50ml のエーテルを加えて沈殿させる。

UV 吸収: $\lambda_{\max}^{H^+}$ 305m μ , 343m μ , $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 319m μ , 241m μ , $\lambda_{\max}^{OH^-}$ 319m μ , 241m μ

PEP: pH 7.5, R_{pA} 0.83.

8, 2'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabino furanosyl) adenine-3'-phosphoryl (3'-5')-8, 2'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabino furanosyl) adenine (A^S_pA)

上に得た, {44} (pyridinium salt) 約 1800 o.d. 319 と {46} 60mg に Dowex 50X2 (pyridinium form) 0.5 ml を加え, pyridine と煮沸する。これに pyridine 2ml と DCC 246mg を加えて, 11日間, 20°C で放置する。反応液に 50% pyridine 水 20ml を加え, 沈殿物を濾去し, 濾液を n-hexane 60ml で振り, pyridine 水層を分取し, 36時間 20°C で放置する。

溶媒を留去し，残渣に， 0°C 飽和 NH_3 -メタノール 30 ml を加え， $30^{\circ}\text{--}33^{\circ}\text{C}$ で 33 時間放置し，溶媒を留去し，残渣に 80% 酢酸 30 ml を加え， 100°C ，12 時間加温し，溶媒を留去する。これを水に溶し，DEAE-cellulose (bicarbonate form)， $2\text{cm} \times 36\text{cm}$ のカラムにかけ，tri-ethyl ammonium bicarbonate buffer $\text{pH } 7.5$ ， $0.001 \sim 0.08\text{ M}$ a linear gradient (全量 3 L) で溶出する。one fraction 16 ml o. major peak (fr. 55~100) を集め，50 ml に減圧濃縮し，凍結乾燥する。収率約 70%。

UV uB42 : $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}^+} 276.5\text{ m}\mu (4.2 \times 10^{-4})$, $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}} 271\text{ m}\mu (3.80 \times 10^{-4})$, $219\text{ m}\mu$ $\lambda_{\text{max}}^{\text{OH}^-} 271.5\text{ m}\mu (3.58 \times 10^{-4})$

PPC: A(0.23, pA 0.12) B(0.27, pA 0.26)
C(0.47, pA 0.45) D(0.27 pA 0.24)

PEP: $\text{pH } 7.5$ RPA-A 0.30.

NMR: D_2O 溶液 (濃度 0.1 以外) 8.56 δ (singlet, H-2(3')) 8.19 δ (singlet, H-2(5')), 4.92 δ (doublet H-1'(5'))
JH-1', H-2' 7.0 cps) 4.50 δ (doublet H-1'(3')) JH-1', H-2' 7.4 cps)

2'-deoxyadenylyl (3'-5')-2'-deoxyadenosine (47)

これに得た AspA^5 約 1mg を EtOH 0.5 ml, methyl-cellulosolve 0.5 ml にケン縮し，Sponge-Nickel ミクロンペーステル 1 杯を加えて， 100°C 7 時間加温する。

遠心して上澄液及び洗液をパーパークロマトグラフィー
* この反応 per residue では 15%。

- 2°分ける。

UV 吸収: $\lambda_{\max}^{H^+}$ 257.5 m μ . $\lambda_{\max}^{H_2O}$ 258 m μ
 $\lambda_{\max}^{OH^-}$ 258 m μ

ppc: B(0.37, 標品 dApdA 0.37) D(0.40, 標品 dApdA 0.41)

$A^S p A^S$ の酵素的水解

a) venom phosphodiesterase*

$A^S p A^S$ 10 O.D.₂₇₁ に, 1M $(NH_4)_2 CO_3$ 40 ml, 酵素溶液 (1 mg/ml) を加え, 全量を 200 μ l とし, 37°C, 14 時間 incubate する。thymidyl(3'-5')thymidine (TpT) は, 酵素 20 μ l, 2 時間で 95% 水解されるが, $A^S p A^S$ は 4 時間 incubate しても全く水解されない。

b) crude snake venom 中の phosphodiesterase

$A^S p A^S$ 約 5 O.D.₂₇₁ に 1M $(NH_4)_2 CO_3$ 40 μ l, 酵素溶液 (20 mg/ml) 100 μ l を加え, 全量を 230 μ l とし 37°C で incubate する。結果を pH 7.5 電気泳動で調べると, 5 時間で 6.4%, 18 時間で 17.6% 水解され, A^S を与えた。

同当量の TpT は, venom 溶液 10 μ l, 25 分で 97% 水解される。

c) spleen phosphodiesterase

$A^S p A^S$ 10 O.D.₂₇₁ に, 1M - ammonium acetate buffer pH 5.7 40 μ l, 酵素溶液 (20 units/ml) 40 μ l を

* Worthington Biochemical Corp. より購入

加え、全量を 200 μ l として、37°C, 14時間 incubate する。

TPT は、酵素溶液 20 μ l, 2時間 で完全に水解される。

第三章の実験

N^6 -benzoyl 8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-~~an~~
bino-furansyl) adenosine 5'-monophosphate (49)

PA^3 free acid 410 mg (1 mmole) を、pyridine 水に溶し、pyridinium salt とする。溶媒を留去し、pyridine で 2 回煮沸して無水にする。これを 20 ml の pyridine に溶し、benzoyl chloride 2.5 ml を加えてよく振る。すぐ溶液となった後、白色沈殿析出する。室温で 1 時間おき、chloroform-水 (50 ml - 50 ml) を加えてよく振り、chloroform 層を分取する。水層を 25 ml の $CHCl_3$ で 2 回抽出する。chloroform 層を集めて留去する。溶媒 D. O. P. - パーカマートグラフィーで one spot ($R_f = 0.76$, 原料 0.15)

これを 50% pyridine 水 200 ml に溶し、これを氷浴で冷しておき、同じく氷で冷した 0.5N-NaOH を 200 ml を加え、0°C で 20 分おく。これに Dowex 50X8 (pyridinium form) を加えて中和し、ろ過してから、同じ resin の 2 cm X 17 cm のカラムを通す。約 250

mlの10% pyridine 及び 約150 mlの水で洗い、溶媒を留去する。溶媒Dのペーパークロマトグラフィーで調べると、 $R_f = 0.40$ (原料 0.13) に青色の蛍光をもつ spot が major である。 $R_f = 0.58$ の蛍光のスポットは、dibenzoyl 体と、思われ約6%存在する。

UV 0B42 : $\lambda_{\max}^{H^+} 237\text{m}\mu$, $309\text{m}\mu$, $\lambda_{\min}^{H^+} 272\text{m}\mu$
 $\lambda_{\max}^{H_2O} 237.5\text{m}\mu$, $302\text{m}\mu$, $\lambda_{\min}^{H_2O} 272\text{m}\mu$, $\lambda_{\max}^{OH^-} 304\text{m}\mu$
 $244\text{m}\mu$ (sh.), $\lambda_{\min}^{OH^-} 273.5\text{m}\mu$.

PPC : D (0.40, 原料 0.13)

PEP : pH 7.5. R_{PA-A} 0.93.

N^b-benzoyl pA^Sの重合反応

上に得た [49]pyridinium salt を pyridine 水に溶し 20ml のコルベシに移し、溶媒を留去する。残渣に pyridine を加えて、これを留去すると、白色固体が析出する。これに DMF 2ml - pyridine 2ml を加えて溶し、これを留去する。同様に、これを3回くり返す。(これ以後の、溶媒の留去は、handy trap を用いて行い)、溶媒は乾燥箱中で加える。

これに DMF 2ml を加えて溶し、無水にした、Dowex 50X8 (pyridinium form) resin 1g を加えて、溶媒を留去する。残渣に pyridine を与えて、2回留去し、最後に DMF 1.5ml に溶し、DCC 550mg を加え、溶媒を0.5ml 位留去してから、密封して室温に放

置する。反応液は数10分で殆ど固化する。

25日後に、50% Pyridine 水 10 ml を加えて、室温 1 時間おき、glass filter で濾過する。残渣を 50% Pyridine 水でよく洗い、濾液と洗液を合せ、石油ベンゼンで 2 回抽出し、水層を留去し、Pyridine 10 ml, triethylamine 0.14 ml, acetic anhydride 2.5 ml を加え時所に 2 日間放置する。

これに水 25 ml を加えて反応を止め、室温に 3 時間おき、*n*-Propanal を加えて発泡を止めながら水で 3 回留去をくり通す。残渣に濃 NH_3 水 40 ml を加えて密栓して 50°C に 3 時間おき、*n*-Propanal を加えて、注意して、アスコレーターで溶媒を留去する。

これを 100 ml の水に溶し、一定量をとり、UV 吸収を測定すると、 $\lambda_{\text{max}}^{H_2O}$ 271 m μ . $\text{Ta}_{280}^{H_2O}/6800$ であった。

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフによる集合体の分離

上記の溶液を、DEAE-cellulose (bicarbonate form), 4 cm X 38 cm のカラムにかけ、水洗後、0 ~ 0.25 M triethylammonium bicarbonate buffer pH 7.5 (全量 10 l) の linear gradient で流す。one fraction 15 ml, 流速約 90 ml/hr. 次に 0.25 ~ 0.5 M buffer の linear gradient で流し、最後に 1 M

bufferで溶出した。クロマトグラフィーは 図(8) 参照。主な peak あるいは分画の TOD. は表7の通りである。尚、この後、更にカラムを、5M尿素有含む 1M buffer 及び、7M urea を含む 1M buffer で流す。約 130 O.D.₂₇₀ の higher oligonucleotide が得られる。各分画の fraction を集めて、濃縮し、水を加えて、数回留去をくり返して、bufferを除き、これを水に溶かして、更に下記のようにして、精製した。

各分画の精製

a) 8個以下の鎖長の oligonucleotide を含む分画、主に溶媒Cのパーパークロマトグラフィーにより精製した。鎖長の長いものについては、下降法で数日間流して分離した。

b) Fr. 946 ~ 992.

fr. 946 - 992 の残渣を 50 ml の水に溶して、0.02 M Tris-HCl buffer pH 7.5 を含む 7M 尿素溶液で洗った。DEAE-cellulose (Cl⁻型) 1 cm X 50 cm にか、尿素溶液で洗った後、7M 尿素溶液中、0.05 M ~ 0.30 M NaCl (全量 1.4 l) の linear gradient で流す。次に、(fr. 345 ~) 同様の条件で 0.30 - 0.50 M NaCl 全量 0.8 l で流す。one fraction 5 ml, 流速約 20 ml/hr. 更に fr. 336 - 426 を同じ尿素カラムで再クロマトグラフィーする。0.30 - 0.50 M

NaCl linear gradient (全量 1 l)。major peak は 0.4 M NaCl 濃度あたりで溶出される。ここに得られた各分画は、水で約 3 倍にうすめて、小さな DEAE-cellulose (bicarbonate 型) のカラムにかけ、十分に水洗して尿素を除き、少量の 1 M-ammonium bicarbonate で溶出し、水を加えて留去をくり返し salt を除く。

C) Fr. 986 以降

50 ml の水に溶して、DEAE-cellulose (Cl⁻ 型)、1 cm X 51 cm の尿素カラムにかけ、水洗後、7 M 尿素 - 0.005 N HCl 中、0.10 ~ 0.50 M NaCl の linear gradient (全量 2 l) で溶出する。one fraction 5 ml, 流速 20 ml/hr. major peak は 0.45 M NaCl 付近で溶出する。

直鎖 oligonucleotide (pA^S)_n 及びその脱塩基体 A^S(pA^S)_{n-1} の P 分析*

溶媒 C a ペーパークロマトグラフィーで分離した直鎖の oligonucleotide と思われる band を水で溶出し、約 50.0 / ml の溶液の 1 ml を各 3 本のキエルダール管にとり、0.5 ml の 60% 過塩素酸を加えて、4 時間加熱し、冷後、0.5 ml のアミドール溶液及びモリブデン酸溶液 0.25 ml を加え、全量を 5 ml とし、15 分後に A₆₇₅ を測定する。

* R. J. L. Allen, Biochem. J., 34, 858 (1940)

次に連鎖の oligonucleotide 約 30 O.D. (NH_4HCO_3 60ml, E. coli alkaline phosphatase (0.4mg/ml) 60 μl を加えて, 全量を 600 μl とし, 37°C で 4 時間 incubate する。これを溶媒 C のパークロマトグラフィーで分け, 脱磷酸体を水で溶出し, その約 5 O.D./ml 溶液 1ml を各 3 本づつのキエルダール管にヒリ, P の分析をする。結果は, 表(8)参照。

第四章 の 実 験

8-mercapto-adenosine 5'-monophosphate(24)

8-Br-5'-AMP ammonium salt 1mmole を DMF-水 (1:1) 7ml に溶し, 40% NaSH 水溶液 0.7ml を加えて密栓して室温 21 時間半放置する。pH 7.5 の電気泳動で, 原料の消失を確かめてから, 0.1N HCl で中和し, 溶媒を留去し, 水を加えて濾過し, 濾液を留去し, 水に溶して, DEAE-Cellulose (bicarbonate 型), 2cm X 50cm にかける。0.01M ~ 0.2M triethylammonium bicarbonate buffer pH 7.5 の linear gradient (全量 6l) で溶出する。one fraction 20ml. fr. 156 ~ fr. 320 を集め, 溶媒を留去し, 水を加えて数回留去をくり返し buffer を除き, 最後に凍結乾燥する。収率 79%。

UV 0B42: $\lambda_{\max}^{\text{PH}2}$ 308 m μ (2.74×10^4), $\lambda_{\min}^{\text{PH}2}$ 261 m μ , $\lambda_{\max}^{\text{PH}7}$ 298 m μ (2.74×10^4), $\lambda_{\min}^{\text{PH}7}$ 254 m μ , $\lambda_{\max}^{\text{PH}11}$ 296 m μ (2.59×10^4) $\lambda_{\min}^{\text{PH}4}$ 251.5 m μ

PPC: R_PA, B(1.34), C(0.61), D(0.66)

PEP: R_PA-A 1.25

NMR: 表(11)参照

8,3'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabinofuranosyl)adenine 5'-monophosphate (63)

8,3'-anhydro-8-mercapto-9-(β -D-arabinofuranosyl)adenine (8,3'-S-cycloadenosine) 0.2 mmole に triethyl phosphate 6.2 ml と POCl₃ 4.8 ml の混合液の 330 μ l を加え, 更に triethyl phosphate 185 μ l を加え, 氷水中で, 容器をよく振っているとき, 約1時間で完全に溶ける。その後, 氷浴中に70時間放置し, これにエーテルを加えて遠心し, 沈澱に水を加えて溶し, 濃アンモニアで弱アルカリとし, Dowex 1X2 (formate型) 1.2 cm X 9 cm のカラムにかけ, 水洗後, 0.2Nギ酸で溶出する。one fraction 15 ml. major peak (fr. 85-140) を集め, 濃縮し水を加えて少量に濃縮し, 凍結乾燥する。

T.O.D.^{HT} 3820 (42率 88%)

UV 0B42: $\lambda_{\max}^{\text{PH}2}$ 282.5 m μ (2.23×10^4), $\lambda_{\min}^{\text{PH}2}$ 242 m μ , $\lambda_{\max}^{\text{PH}7}$ 224 m μ (1.74×10^4) 282 m μ ($2.15 \times$

$\times 10^4$) $\lambda_{\min}^{PH7}$ 244 m μ , $\lambda_{\max}^{PH13}$ 283.5 m μ (2.12×10^4),
 $\lambda_{\min}^{PH13}$ 248.5 m μ .

ppc: R_f, A (0.10, pA 0.12), B (0.30, pA 0.27)
D (0.11, pA 0.14)

PEP: R_{PA}-A 0.93

P₁, P₂-diadenosine 5'-pyrophosphoric acid (51)

5'-AMP-free acid 1 mmole (=, 4-morpholine-N,N'-dicyclohexyl carboxamide 283 mg (1 eq) pyridine 30 ml を加え, これに水を加えて, 溶液とし, 溶媒を留去する。これに無水 pyridine を加えて, 3回留去をくり返す。最後に 150 ml の pyridine を加えて溶し, DCC 496 mg (2.4 eq.) を加え, 60°C で 2 時間半加温する。水を 150 ml 加えて, 室温 1 時間放置し, 濾過して, 濾液を約 100 ml に濃縮する。再度濾過し, 石油エーテル 40 ml で 3 回抽出し, 水層を, Dowex 1X2 (Cl⁻型) 1.4 cm X 29 cm のカラムにかけ, 0.01 N HCl で溶出する。one fraction 50 ml。major peak (fr. 83 ~ 146) を集め, triethylamine で中和し, 約 5 ml に濃縮する。これに 1.2 当量の HCl を含むエタノール 5 ml を加え, 次いで acetone 30 ml を加えて遠沈し, acetone, ether で洗って乾燥する。この粉末を 2 ml の水に一部溶し, エタノールを加えて沈殿させ, 精

製する。 収率 84 %

諸性質については表(10)を参照

P_1, P_2 -di-(8-bromo-adenosine) 5'-pyrophosphate (52)

8-Bn-5'-AMP の 4-morpholine - N, N -dicyclohexyl carboxamidinium salt (1 eq.) との塩 (carboxamidinium salt) 0.5 mmole を pyridine 75 ml に溶し, DCC 1.2 mmole を加え, 60°C で 2 時間半加温する。上記と同様に後処理して, DEAE-cellulose (bicarbonate 型), 2 cm X 40 cm のカラムにかけ, 0.01 M ~ 0.1 M triethyl ammonium bicarbonate buffer pH 9.5 の linear gradient (全量 4 l) で溶出する。one fraction 20 ml。major peak (fr. 125 ~ 168) を集め, 濃縮し, 水を加えて留去をくり返し, 凍結乾燥する。

諸性質は表(10)参照

P_1, P_2 -di-(8-mercaptoadenosine) 5'-pyrophosphate (54)

8-SH-5'-AMP の carboxamidinium salt 0.5 mmole を無水 pyridine 75 ml と DMF 6 ml に溶し, DCC 248 mg (2.4 eq.) を加えて, 60°C , 2 時間後, 更に 0.6 mmole の DCC を加えて, 60°C で 2 時間加温する。適当に後処理し, DEAE-cellulose (bicarbonate 型)

2cm X 40cm のカラム にかい, 0.01M-0.2M triethyl ammonium bicarbonate (TEAB) buffer pH 7.5 の linear gradient (全量 6l) で流した後, 0.2M ~ 0.4M TEAB buffer pH 7.5 の linear gradient, 全量 4l) で溶出する。 major peak (fr. 481 ~ 573). one fraction 18ml を集め, 濃縮, 水で除去をくり返す。後凍結乾燥する。収率 33%
諸性質は, 表(10)参照

P₁P₂-di-(8-oxadenosine) 5'-pyrophosphate. [53]

8-OH-5'-AMP の Carboxamidium salt 0.125mmole を 無水 pyridine 20ml と DMF 3ml に溶し DCC 0.3mmole を加え, 60°C で 2 時間半, 室温一夜反応させ適当に後処理して, DEAE-cellulose (bicarbonate 型) のカラム にかい, 0.01M ~ 0.3M TEAB buffer pH 7 の linear gradient (全量 4l) で溶出する。 one fraction 14ml. major peak (fr. 216 ~ 235) を集め, 後処理して, 凍結乾燥する。収率 67%

諸性質は, 表(10)参照

P₁P₂-diinosine 5'-pyrophosphate [58]
inosine 5'-monophosphate Carboxamidium salt

0.5 mmole を 75ml の無水 pyridine と DMF 6ml に溶し, DCC 1.2 mmole を加え, 60°C で 2 時間半, 室温 - 夜反応させ, 適当に後処理し, DEAE-Cellulose (bicarbonate 型) 2cm x 40cm のカラムにかけ, 0.01 ~ 0.3 M TEAB buffer pH 7.5 の linear gradient (全量 4l) で溶出し, one fraction 18 ml. fr. 151 ~ 183 を集めて, 後処理し凍結乾燥する。収率 81%。諸性質は表(10)参照。

P₁P₂-di-(8-bromo guanosine) 5'-pyrophosphate (57)

8-bromo guanosine 5'-monophosphate carboxanidium salt 0.2 mmole を, pyridine 30ml - DMF 3ml に溶し, DCC 0.48 mmole を加え, 60°C 2 時間半後, 更に DCC 50mg を加え室温で - 夜後, 適当に後処理し, DEAE-Cellulose (bicarbonate 型) 1.7cm x 21cm のカラムにかけ, 0.01 ~ 0.3 M TEAB buffer pH 7.5 の linear gradient (全量 4l) で溶出する。major peak (fr. 101 - 120) を集め, 後処理して凍結乾燥する。収率 60%。諸性質は, 表(10)参照。

8,3'-anhydro-8-mercapto 9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine, 8-(2-hydroxy propyl-2) adenosine cytidine, guanosine, uridine の pyrophosphate は, 対応する 5'-monophosphate か S 同様に反応し, 後

処理して、繊維電気泳動で分離した。
諸性質は、表(10)参照。

参考文献

- 1) J. Donahue and K.N. Trueblood, *J. Mol. Biol.*, 2 363 (1960)
- 2) M. Ikehara and H. Tada, *Chem. Pharm. Bull.*, 15 94 (1967)
- 3) 上田亨, 蛋白質・核酸・酵素, 1968年8月号, 「ヌクレオチドの化学合成」
- 4) P.T. Gilham and H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 6212 (1958)
- 5) M. Smith, D.H. Rammner, I.H. Goldberg and H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 430 (1962)
- 6) A.M. Michelson, *J. Chem. Soc.*, 1371 (1959)
- 7) A.M. Michelson, *ibid.*, 979 (1962)
- 8) A.M. Michelson, *ibid.*, 1957 (1958)
- 9) R.E. Holmes and R.K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 1242 (1964)
- 10) A.S. Jones and D.L. Woodhouse, *Nature*, 183 1603 (1959)
- 11) K.W. Bramer, *Biochim. Biophys. Acta*, 72 217 (1963)
- 12) J. Duvail and J.P. Ebel, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 1059 (1964)
- 13) A.M. Moore and S.M. Anderson, *Canad. J. Chem.*, 37 590 (1959)
- 14) R. Shapiro and S.C. Agarwal, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 401 (1966)
- 15) M. Ikehara, S. Usugi and M. Kaneko, *Chem. Commun.*, 17 (1967)

- 16) M. Ikehara and S. Uesugi, Chem. Pharm. Bull., 17 348 (1969)
- 17) M. Ikehara and M. Kaneko, Tetrahedron, 26 4251 (1970)
- 18) M. Ikehara and M. Kaneko, Chem. Pharm. Bull., 18 2441 (1970)
- 19) M. Ikehara, M. Kaneko and Y. Nakahara, Tetrahedron Letters, 4707 (1968)
- 20) D. O. Tordon, "The Nucleic Acids" 1 459 (1955)
- 21) M. Ikehara and M. Kaneko, Chem. Pharm. Bull., 15 1261 (1967)
- 22) M. Ikehara, I. Tazawa and T. Fukui, Chem. Pharm. Bull., 17 1619 (1969)
- 23) M. Ikehara, I. Tazawa and T. Fukui, Biochemistry, 8 736 (1969)
- 24) 村屋捷利, 大藪新太郎, 大塚栄子, 池原森男, 生化学, 40 (日本生化学会抄録号) 622頁 (1968)
- 25) D. B. McCormick and G. E. Qpar, J. Med. Chem., 12 333 (1969)
- 26) V. M. Clark, A. R. Todd and J. Zussman, J. Chem. Soc. 2952 (1951)
- 27) A. M. Michelson and A. R. Todd, ibid., 816 (1955)
- 28) M. Ikehara, H. Tada and K. Muneyama, Chem. Pharm. Bull., 13 639 (1965)
- 29) S. S. Tang and J. S. Roth, Tetrahedron Letters, 2123 (1968)
- 30) M. Ikehara and S. Uesugi, Tetrahedron Letters, 713 (1970)

- 31) N. Imura, T. Tsuruo and T. Ukita, Chem. Pharm. Bull., 16
1105 (1968)
- 32) K. Kikugawa, F. Sato, T. Tsurumoto, N. Imura and T.
Ukita, Chem. Pharm. Bull., 16 1110 (1968)
- 33) R. Saffhill, J. Org. Chem., 35 2881 (1970)
- 34) R. M. Izatt, L. D. Hansen, T. H. Rytting and J. J. Christensen
J. Am. Chem. Soc., 87 2760 (1965)
- 35) A. D. Broom and R. K. Robins, J. Am. Chem. Soc., 87 1145
(1965)
- 36) M. Ikehara, M. Kanehisa and M. Sagai, Chem. Pharm. Bull.,
16 1151 (1968)
- 37) C. A. Dekker, J. Am. Chem. Soc., 87 4027 (1965)
- 38) M. M. Warshaw, C. A. Bush and I. Timoc Jr., Biochem.
Biophys. Res. Commun., 18 633 (1965)
- 39) J. Brahms, J. Mol. Biol., 11 785 (1965)
- 40) N. S. Kondo, H. M. Holmes, L. M. Stempel and P. O. P. Ts'o
Biochemistry, 9 3479 (1970)
- 41) M. Ikehara, S. Uesugi and M. Yasumoto, J. Am. Chem. Soc.
92 4735 (1970)
- 42) Z. Arnold and M. Kornilov, Coll. Czech. Chem. Comm.,
29 645 (1964)
- 43) J. Žemlička, ibid., 28 1060 (1963)
- 44) A. Holý, S. Chládek and J. Žemlička, ibid., 34
253 (1969)

- 45) G. M. Tener, J. Am. Chem. Soc., 83 159 (1961)
- 46) S. A. Narang, T. M. Jacob and H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 87 2988 (1965)
- 47) R. K. Ralph and H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 83 2926 (1961)
- 48) a) 池原森男, 上杉晴一, 第19回日本薬学会近畿支部総会
b) 池原森男, 上杉晴一, 日本薬学会第91年会発表予定
- 49) R. K. Ralph, W. J. Connors, H. Schaller, H. G. Khorana J. Am. Chem. Soc., 85 1983 (1963)
- 50) H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi and R. K. Ralph, J. Am. Chem. Soc., 84 414 (1962)
- 51) R. V. Tomlinson and G. M. Tener, J. Am. Chem. Soc., 84 2644 (1962)
- 52) 池原森男, 上杉晴一, 第9回日本生物物理学会, 予稿集 74頁 (1970)
- 53) A. M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 55 841 (1962)
- 54) H. Steinmann, I. Rosenthal and D. Elad, J. Am. Chem. Soc., 91 4921 (1969)
- 55) M. Yoshikawa, T. Kato and T. Takenishi, Tetrahedron Letters, 5065 (1967)
- 56) M. Smith, G. I. Drummond and H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 83 693 (1961)
- 57) I. Tinoco Jr., *ibid.*, 86 297 (1964)
- 58) J. Krant and L. H. Jensen, Acta Cryst., 16 79 (1963)

- 59) S. S. Tanabe and H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.*, 48 109 (1970)
- 60) K. N. Fang, N. S. Kondo, P. S. Miller and P. O. P. Ts'o, 160th ACS National Meeting (1970)
- 61) P. O. P. Ts'o, N. S. Kondo, M. P. Schweizer and D. H. Hollis, *Biochemistry*, 8 997 (1969)
- 62) J. Brahms, A. M. Michelson and K. E. Van Holde, *J. Mol. Biol.*, 15 467 (1966)
- 63) D. Glaufiger, D. A. Lloyd and I. Tinoco Jr, *Biopolymers*, 6 409 (1968)
- 64) I. Tazawa, S. Tazawa, L. M. Stempel and P. O. P. Ts'o, *Biochemistry*, 9 3499 (1970)
- 65) A. Nomura and H. Duno, 第20回酵素化学シンポジウム, (1968)
- 66) Y. Mizuno, M. Ikehara, T. Ueda, A. Nomura, E. Ohtsuka, F. Ikehawa and Y. Kanai, *Chem. Pharm. Bull.*, 9 338 (1961)

