The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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'-S-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'-S-cyclonucleotide の合成　23

第二章　8,2'-S-cycloadenosine を含む dinucleoside monophosphate の合成　29

第三章　8,2'-S-cycloadenosine 5'-monophosphate の重合反応　34

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　39

第五章　8,2'-S-cycloadenosine を含む Oligonucleotide の構造と性質　49

第一節　Dinucleoside monophosphate $A^{S}pA^{S}$ 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

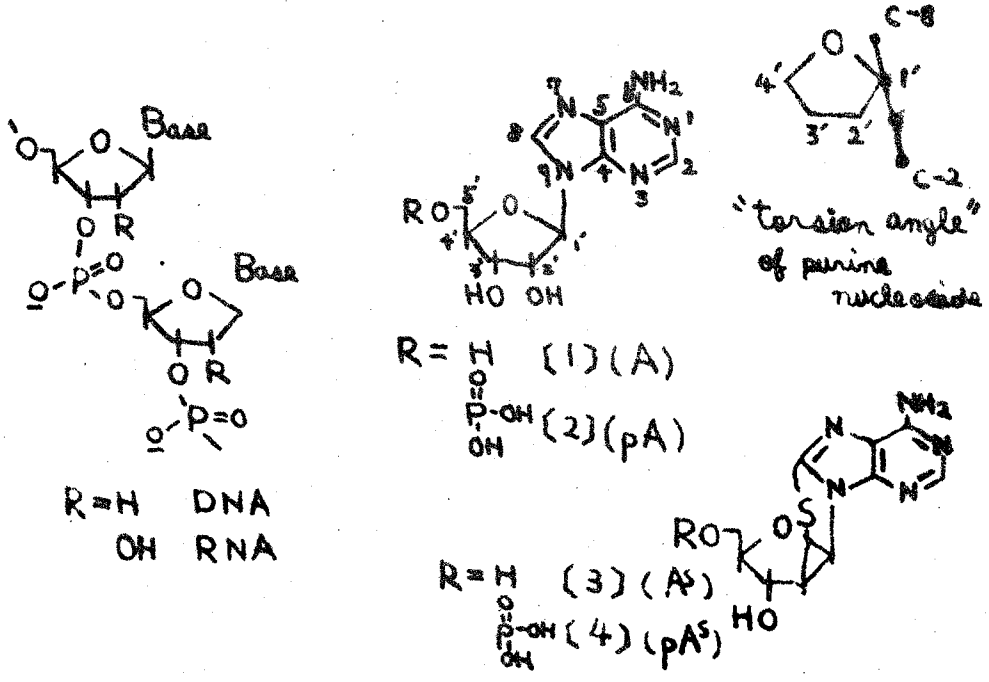
緒　言

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 が phosphodiester 結合を介して連った重合体，即ち polynucleotide であり，その機能の発現の為には，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 ether の結合で結ばれている cyclonucleoside 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-cyclo adenosine あるいは A^S と省略）誘導体が最も適している。



8,2'-S-Cyclo adenosine (3) は池原等[21]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，解離しう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] pyranyl化 [5] trityl化 [5] methanesulfonyl (Ms) 化 [6] とその置換反応，[7] リン酸化 等が知られているが，8,2'-S-cyclo adenosine 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，nucleotide についても報告があった。[8]

8-bromoadenosine の合成は[9]，1964年に至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位のブロム化及び，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-cyclo adenosine 5'-monophosphate〔4〕(pA^S)の合成に成功した。

次いで，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^SpA^S を合成し，NMR，CD 等により，その構造を明かにした。

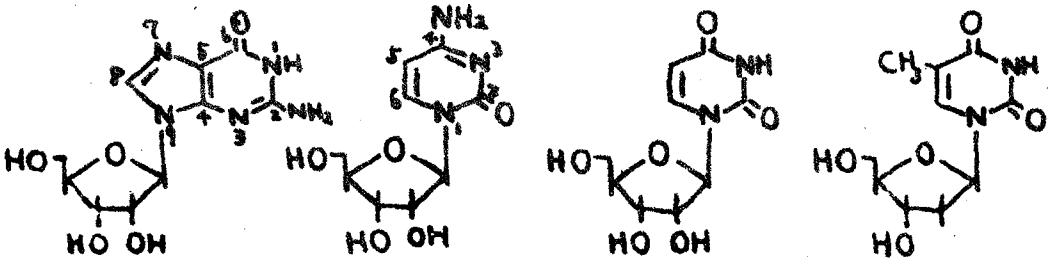
又，種々の 8-置換 nucleoside，nucleotide，dinucleoside pyrophosphate を合成し，A^S誘導体との比較により，その溶液中における torsion angle について知見を得た。

第一章 8,2'-S-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Br₂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0.1N HCl中に溶し、約100当量の飽和Br₂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260mμ付近の吸収帯が消失するが、adenosine誘導体のみは始んど吸収に変化はなく、反応していないと報告している。

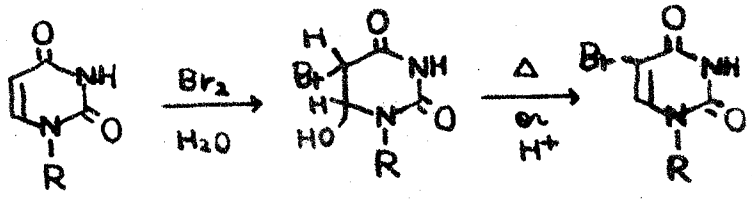


〔5〕 〔6〕 〔7〕 〔8〕

K.W. Bramer[11]は，pH7及びpH9のbuffer溶液中，1当量のN-bromosuccimideあるいはBr_2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. Dural[12]等は，dimethylformamide（DMF）中Br_2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，260mμ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体が得られており，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体が得られる。

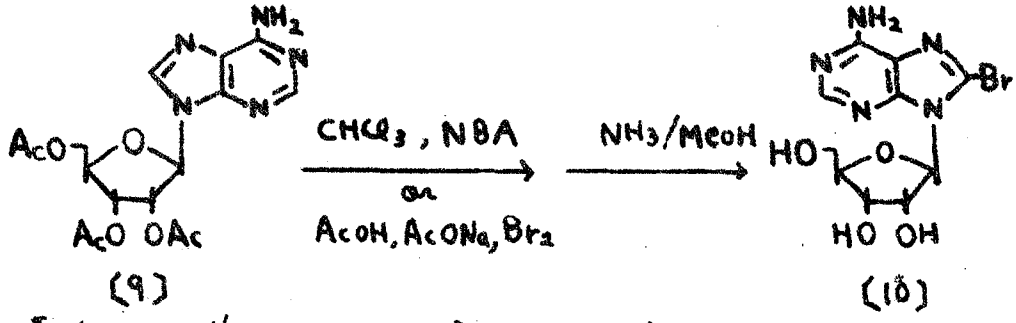


guanosine誘導体の場合も同じような付加反応が起って，UV吸収が消失すると思われるが，pH7 buffer中では，8-Br体らしきものがとれるという。

現在では，guanosineを飽和Br_2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]

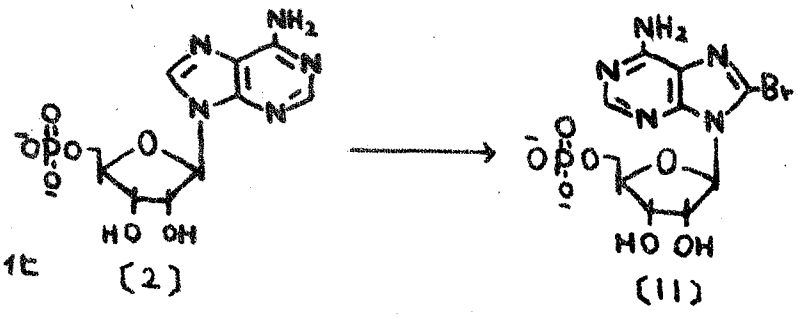
1964年に至り，Holmes，Robins等は，2′,3′,5′-O-triacetyl adenosine〔9〕を，$CHCl_3$中，N-bromoacetamide（NBA）あるいは，酢酸ナトリウムを含む酢酸中Br_2でブロム化し，NH_3飽和メタノールで脱保護して，初めて8-bromoadenosine〔10〕を合成した。[9] しかし，この方法では，保護したnucleosideを必要とし，NBAの不安定性，Br体のglycoside bondは非常に酸に弱くなるため，反応温度（60°），〔9〕から〔10〕までの収率48%等に難点があり，又，溶解性の問題から，nucleotideに直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 monophosphateの4-morpholine N,N′-dicyclohexyl carboxamidium saltでdioxane-DMF中NBAの条件で，約30%位，8-Br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（Rf 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，260mμ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	1N NaOH (ml)	Br-H_2O (ml)	H_2O (ml)	BrAMP (%) 1.5 hr	3	8	24	X[a](%)
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	59	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/Br_2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。$\frac{3}{2}$の時が最高の比率で，もっとNaOHが多くなると，原点付近のbyproductが増えて，Br体の比率は落ちている。

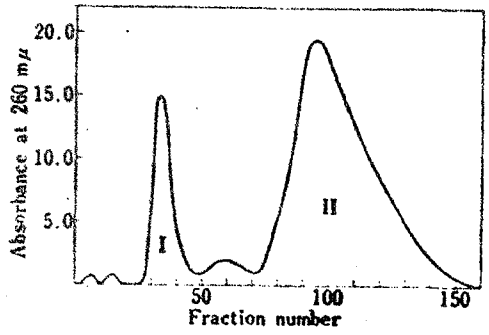
1mmole scaleで反応を行い，Dowex 1×8のカラムにかけ，ギ酸で溶出を行うと，図(1)のようなchromatogramを与え，8-Br-5'-AMP〔11〕は原料の後

※ 実験の部参照

に溶出され，完全に分けることができる。　このpeakを集め，適当に後処理して，約50%の収率で〔11〕を得た。[5][6]　この反応をよく調べると，NaOHとBr₂水を予めまぜた液へ，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，水に難溶な$CaCO_3$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吸収の減少を伴なっている。

図(1) 8-Br-5'-AMPの分離



I：5'-AMP　II：8-Br-5'-AMP

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。結果をペーパークロマトグラフィーまたは，イオン交換クロマトグラフィーによって調べると表(2)のようになる。

pH 4の時に，UV吸収の減少も殆どなく，〔11〕の収率も最も良い。　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

収率で〔11〕を得ることができた。[16]

表(2) buffer溶液中の5'-AMPのブロム化

pH	Buffer	TOD_{260}[a] Start	End	Yield (%) BrAMP	AMP	X[b]	pH after reaction
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 ε_{260}=15000.
d) By the column chromatography no BrAMP was obtained.

表(3)
3',5'-cyclic AMP〔16〕
のブロム化

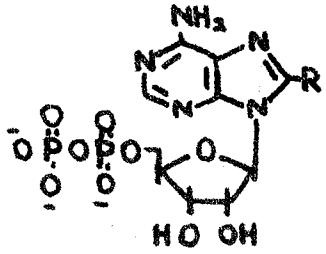
Buffer	TOD_{260} Start	End	Yield(%)
pH 3	741	714	67
4	792	718	100
5	792	607	94

なお adenosine 3',5'-cyclic phosphate〔16〕のBr化に於ても同様のpHの影響がみられている。

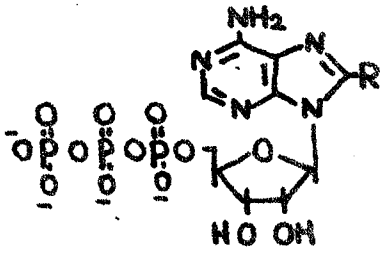
このpH4の条件により，裸のadenine nucleotideを，緩和な条件下，高収率で，8-Br化することが可能になった。例えば，酸にもアルカリにも，非常に不安定なadenosine 5'-diphosphate〔12〕(ADP)，adenosine 5'-triphosphate〔13〕(ATP)の直接的Br化も，それぞれ，46%，66%の収率で行うことができる。この場合も，Dowex 1のイオン交換で，8-Br体は，原料の後に溶出される。

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, adenosine 3'-monophosphate〔17〕(3'-AMP), adenosine 2'-phosphate〔18〕(2'-AMP)の8-Br体も合成した。

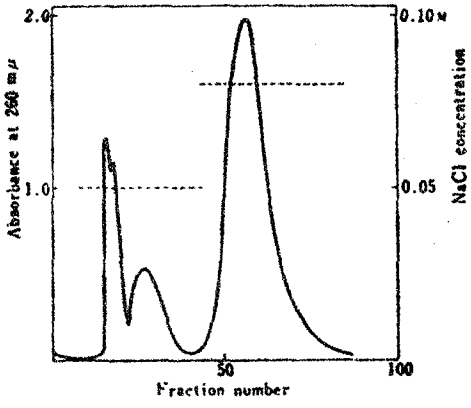


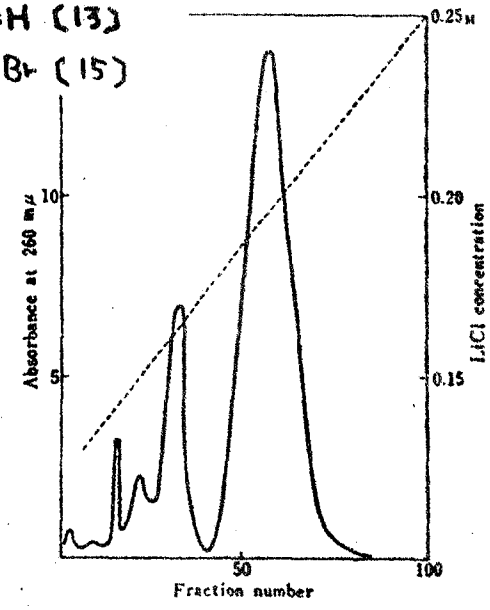
R=H〔12〕
Br〔14〕

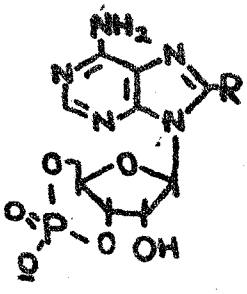


R=H〔13〕
Br〔15〕

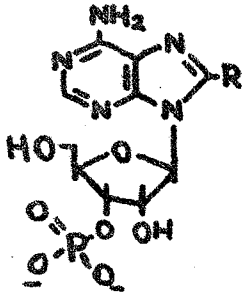
図(2) 8-Br-ADP〔14〕(左) 8-Br-ATP(右)の分離



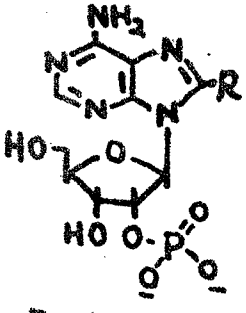




R=H〔16〕
Br〔19〕



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る。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のブロム化

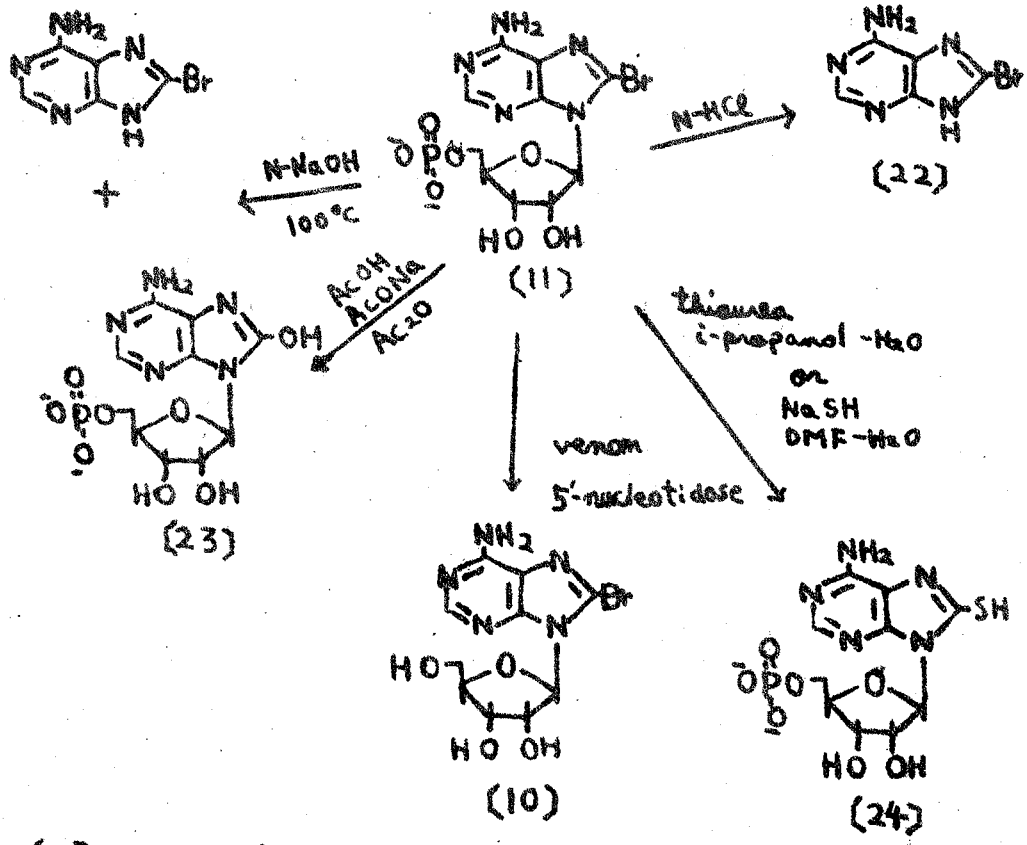
Buffer	TOD260 Start	TOD260 End	Yield
pH 3	843	833	69 %
4	755	754	93
5	910	804	87

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[9]，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のペーパー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，殆ど変らないので，〔11〕の場合も必ずはN-1へprotonationが起るのであろう。〔11〕はN-HCl中室温1日で約60%のglycoside結合の水解が起り，8-bromoadenineを与える。又，〔11〕をN-NaOH中，封管100° 15分加熱すると，完全に分解をうけ，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-mercapto adenosine 5'-monophosphate〔24〕が得られ，酢酸－酢酸ナトリウム－無水酢酸中[21]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で，29% 水解され，8-bromo adenosine〔10〕を与えた。

8-Br-ADP〔14〕及び 8-Br-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

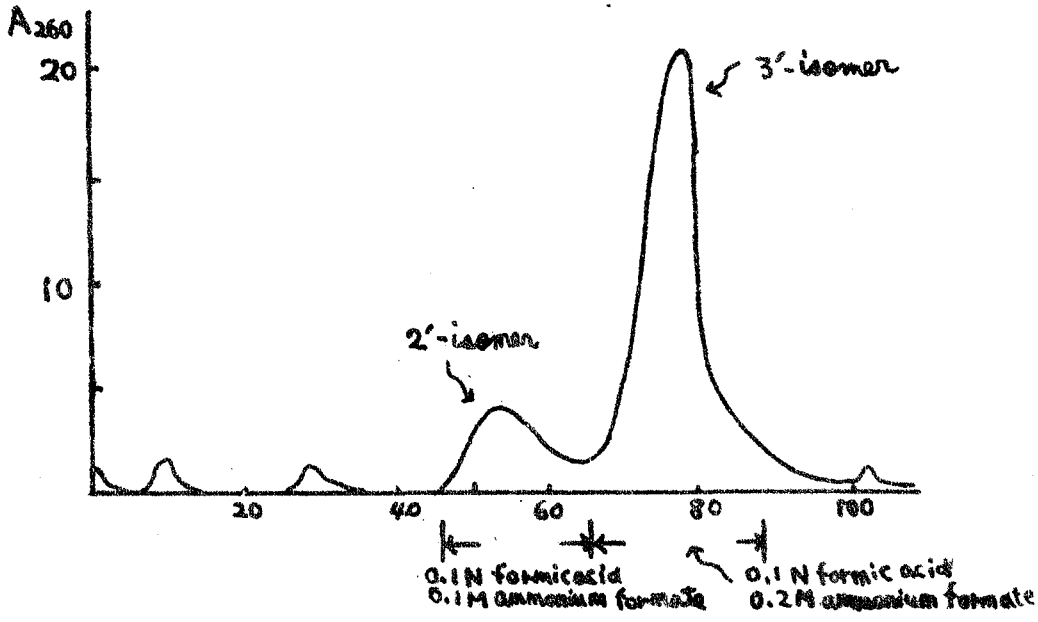
等で行った。これらについては，それぞれ，polynucleotide phosphorylase，RNA polymerase による重合反応について調べられている。[23)24)]

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 の電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'-S-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，Dowex1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 ギ酸の条件では溶出されず，これに 0.1M ギ酸アンモニウムを加えると〔20〕が溶出する。（0.1N ギ酸の条件では，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，Rf 0.24 に〔20〕，Rf 0.36 に〔21〕が検出される。この条件で 3'-AMP 及び 2'-AMP の Rf はそれぞれ，0.48 と 0.57 である。更に〔20〕及び〔21〕を，Potato[13] 3'-nucleotidase と扱うと，〔20〕は 3'-AMP が 90% 脱リン酸される条件で，30% 水解さ

れるが，〔21〕は全く水解されない。 NMRでも，〔21〕のH-2′(5.50δ)は，〔20〕のそれ(5.22δ)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。

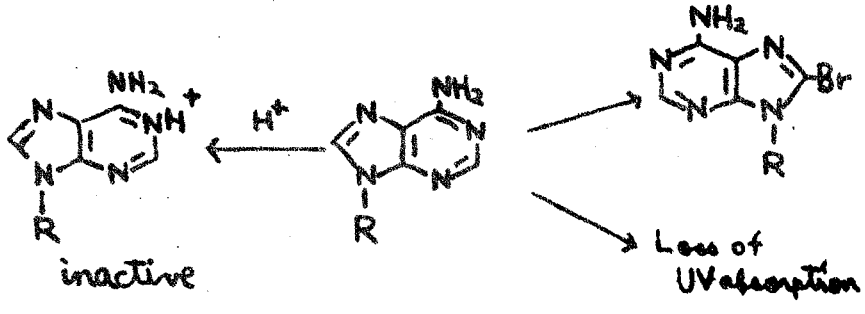
図(3) 8-Br-2′-AMP〔21〕と8-Br-3′-AMP〔20〕の分離



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，Br_2の中性あるいはアルカリ溶液においては，殆どが，^-OBrのようなspeciesになっていると思われる。従って，pH3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，Br_2あるいはBr-OHの状態で存在するが，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2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。



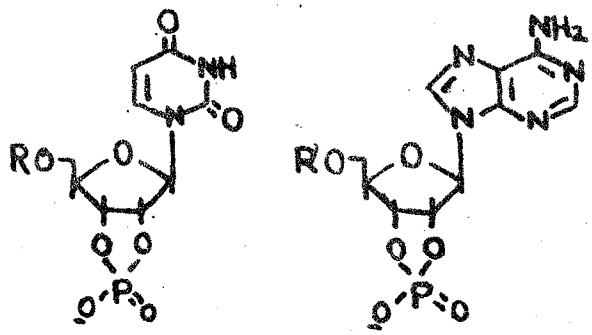
なお，この反応を使い，8-Br-5'-AMP〔11〕から，補酵素flavine adenine dinucleotide（FAD）のanalogであるflavine-8-bromoadenine dinucleotideの合成が報告されている。[25]

第二節 Adenine nucleotide の特異的 sulfonyl 化

従来，cyclonucleoside の合成には，base 部分の nucleophile による，sugar 部の sulfonyloxy 基の，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 benzenesulfonyl 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 trialkyl ammonium 塩を，tri-n-butyl amine 存在下，sulfonyl chloride と反応させている。



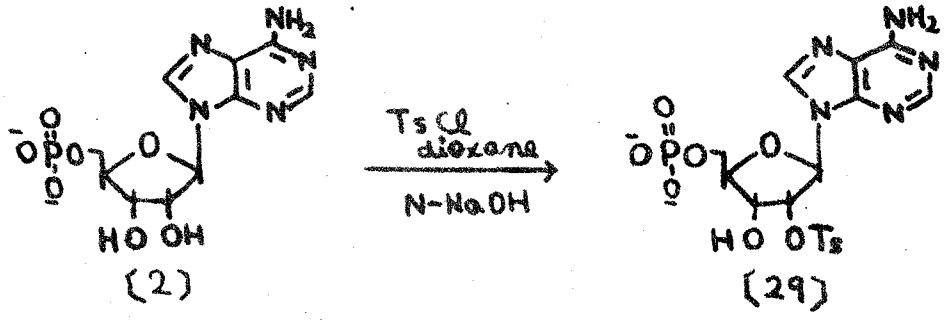
R=H〔25〕　R=H〔26〕
Ms〔27〕　Ms〔28〕

著者は，5'-AMP，3',5'-cyclic AMP〔16〕，uridine〔7〕の 5'-monophosphate（5'-UMP）等を用

いて，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。

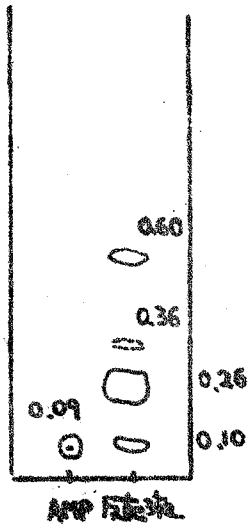
次に，Schotten-Baumann法でp-toluenesulfonyl（以下Tsと略す）化を試み，初めてnucleoside 5'-monophosphateのTs化に成功した。[30] しかも後述するように，この際得られるmono Ts体は，2'-OTs体のみであることが判った。

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，撹拌下，約30分かけて滴下する。反応液は，途中からケン濁液となる。この沈殿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時間位撹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，λmax における比を出すと表（5）のような結果となる。

図(4) 海蟹Aの PPC



表(5) 5'-AMP の Ts 化(a)

NaOH	ml.	TsCl mmole	dioxane ml.	H_2O ml.	di-Ts	Rf 0.36	mono-Ts	AMP
N	1.5	3	7.5	0.5	11 %	5 %	45%	39%
2N	0.75	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

原料（Rf 0.10）は中性で 260 mμ に UV 吸収の λmax をもつが，Rf 0.60 及び 0.26 の spot は，262 mμ 付近の吸収極大の他に，230 mμ にもう一つの吸収極大が現われ，260 mμ の吸収強度に対する 230 mμ 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 のものは，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1.5ml，水は0.5ml加えた。TsClが1eq.しかなくても，反応は行っているが，収率は半分以下に減っている。NaOHを少くすると，diTs体が顕著に減少する。

表(6) 5'-AMPのTs化(b)

N-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で扱って開環すると，8,2'-S-cyclo-5'-AMPのみが得られる。Br化も開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ので，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3eq.の時は，diTs体2.4%，monoTs体56%で，TsCl 4eq.の

時は，diTs体47%，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λmaxは，中性で265mμであるが，monoTs体，diTs体とも266mμ付近に吸収極大があり，230mμにshoulderがみられる。この場合もやはり，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ィーで単離し，DMF－水中NaSHで扱うと，殆ど完全に開環する。

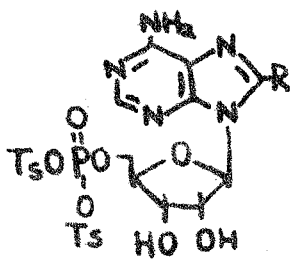
このようにして得られる，monoTs体の同定は，開環して得られるcyclonucleotideの分析により行った。

保護基のないnucleosideのsugarのOH基をDMF中NaHで解離させて，sulfonyl chloride[19]あるいはbenzyl chloride[31]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。[33] 以上により，有機溶媒中でも，水溶液中でも，2'及び3'のOH基が解離し易いことが判る。

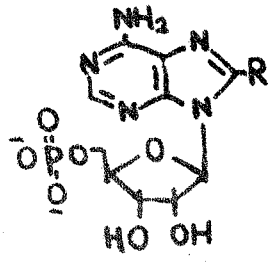
池原，金子等は，[19] 5'位にtritylのようなbulkyな置換基がある場合，NaHで解離させ，triisopropylbenzenesulfonyl chlorideのようなbulky

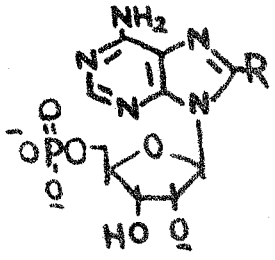
な試薬をもってゆくと，2'位が選択的に(70:25) sulfonyl化されると報告している。

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沈殿が生じ，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.しかなくても選択的な反応が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。

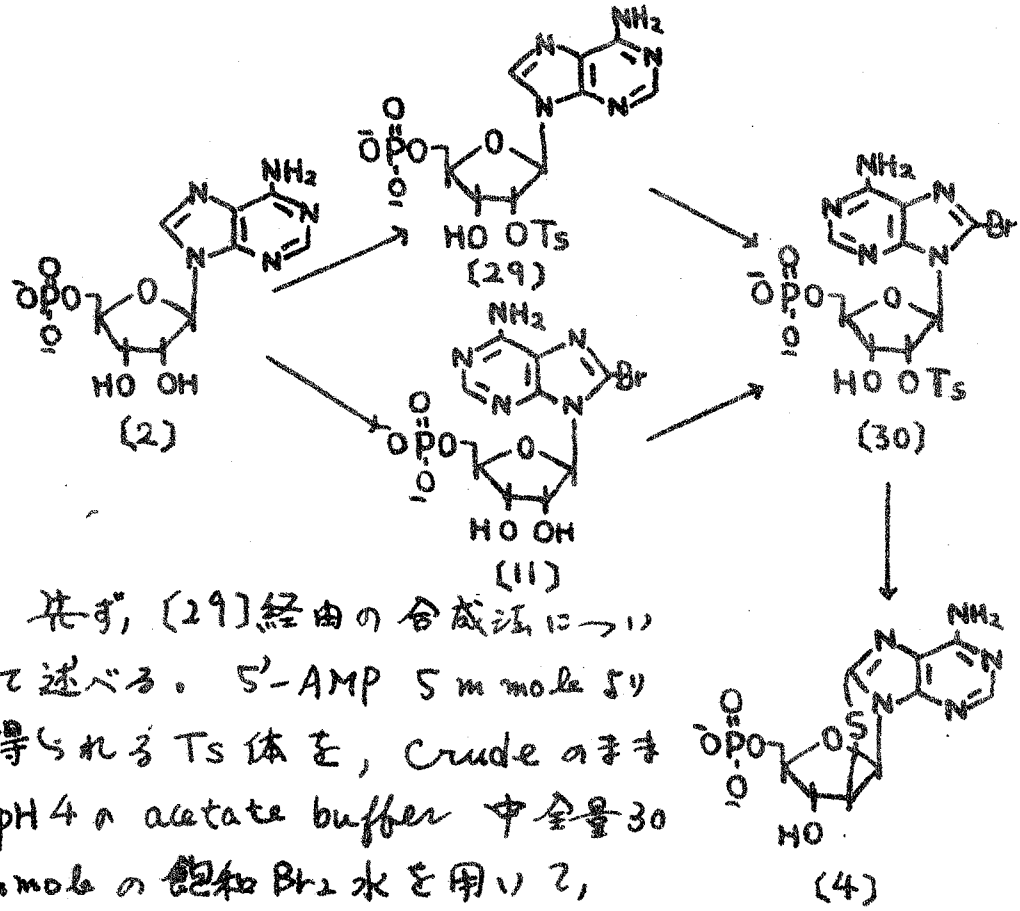
adenosineの[30]sugar OH基のpKaは，12.35と報告されており，5'-AMPや8-Br-5'-AMPの場合

も，N-NaOH中では，少くとも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が導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によるmethyl化，[35] uridine〔7〕，cytidine〔6〕のDMF－NaH系を用いたbenzyl化などがある。[21)32)] 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-Br-5'-AMPを経由する方法の2つの経路で行い，いずれの場合も純粋な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化する。〔29〕は5'-AMPに較べかなり Br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-H_2O (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。直ちに後処理して，2ℓの水に希釈して，Dowex 1 (formate型) のカラムにかけ，ギ酸で溶出すると，cyclonucleotide が，単一peakとして得られる。(図(5)参照) このpeak

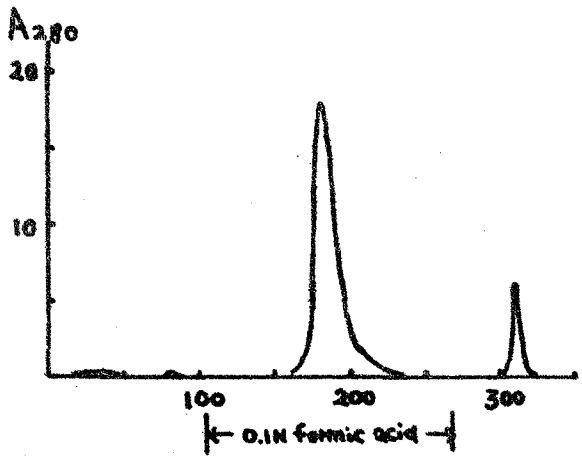
を集めて後処理後，凍結乾燥し，更にメタノール－acetoneで粉にし，5'-AMPより，収率21％で〔4〕のfree acid，dihydrateを得る。この収率からも，〔30〕よりの閉環が定量的に行っていることが判る。

8-Br-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Br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，$BaSO_4$を遠沈して除く。溶媒を留去してから，N-NaOHに溶し，TsClのdioxane溶液に滴下，滴加する。この際，8-Br-5'-AMPをアルカリに溶した後，直ちに用いないと，反応が起って副生物が多くなる。遠心に後処理して得られるTs体の混合物をDMF－H_2O（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，ギ酸で溶出すると，単一な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。

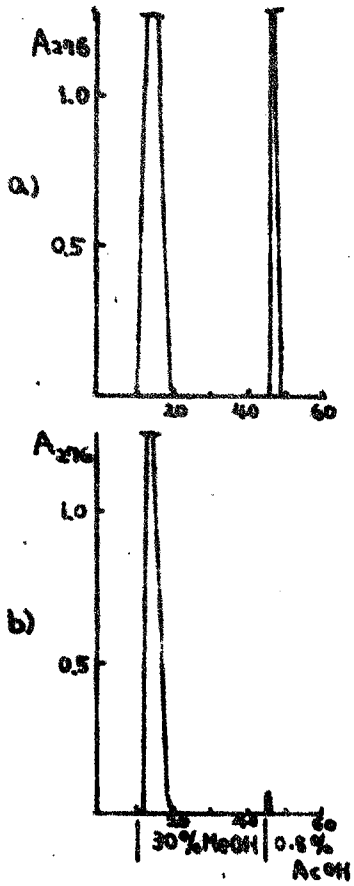
DMF－H_2O中，NaSHによるSH化は[17]，pyridine－H_2O中H_2Sの条件に較べ，副反応も少く，特に，酸に弱い化合物の場合に適している。

2つの経路より得られた，cyclonucleotideは，UV吸収，元素分析，NMR，ペーパ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^5 の分離



図（6）Dowex 1（OH^-）カラムによる分析
a) authentic samples b) A^5 derived



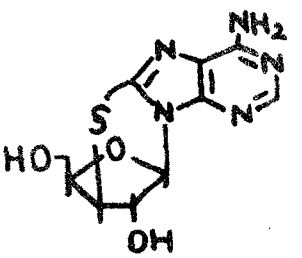
標品の8,2'-S-cyclo adenosine及び8,3'-S-cycloadenosineの混合物をこのカラムにかけ，30%メタノールで流すと，8,2'-S-cycloadenosineが溶出され，次に0.5%酢酸で流すと，8,3'-S-cycloadenosineが溶出され両者を完全に分離することができる。次に，8-Br-5'-

AMP経由のcyclonucleotide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%程度の吸収が，酢酸部に出るが，これをペーパークロマトグラフィーで分け，精査したが，8,3'-S-cyclo adenosineの吸収（$\lambda_{max}^{H_2O}$ 282.5 mμ，[19]）8,2'-isomer〔3〕は，$\lambda_{max}^{H_2O}$ 275.5 mμ）をもつものは検出されなかった。〔29〕経由のものも同様に分析したが，8,3'-体は検出されなかった。

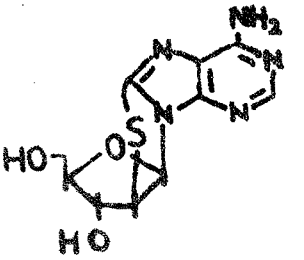
上記の結果により，前節で得た〔29〕及び〔30〕は，殆ど2'-OTs体のみであることが明かになった。

なお，Dowex 1（OH型）カラムの結果をみると，8,3'-S-cyclo adenosine〔33〕のsugar OHの解離は，〔3〕のそれの解離よりも強いことが判る。UV吸収をみると〔33〕のλ_{max}はpH 13で中性より2mμ長波長側へずれている。（λ_{max}^{pH13} 284.5 mμ，〔3〕のλ_{max}^{pH13} 276 mμ）[19] 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，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-



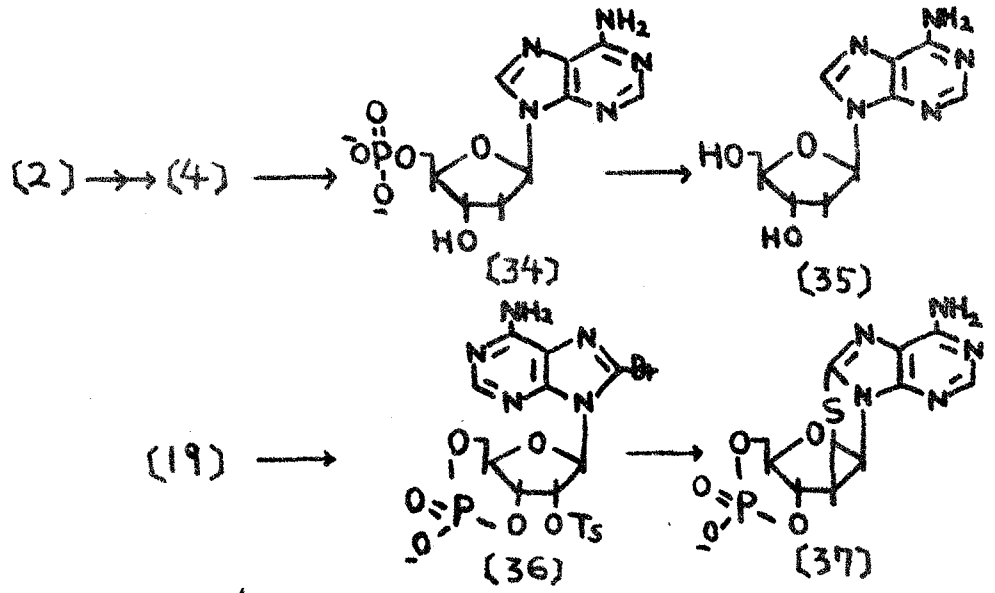
〔33〕



〔3〕

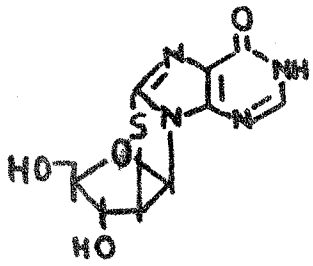
leotidase で脱リン酸すると，2′-deoxyadenosine〔35〕を与える。これにより初めてribonucleotideより，deoxyribonucleotideへの変換がなされた。

なお，nucleoside 5′-monophosphate と同様の条件で，8-Br-3′,5′-cyclic AMP〔19〕もTs化でき，H_2Sで閉環し，Dowex 1（formate型）カラムで分け，後処理すると，46%の収率で，8,2′-S-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と，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の場合よりは，むしろ速いようである。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 intest-

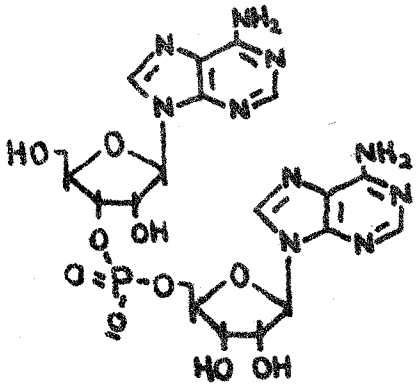
inal alkaline phosphatase により，脱リン酸され，混在する adenosine deaminase により，adenosine が99% 脱アミノされる条件で，20%水解をうけて，8,2'-S-cycloinosine〔38〕を与える。



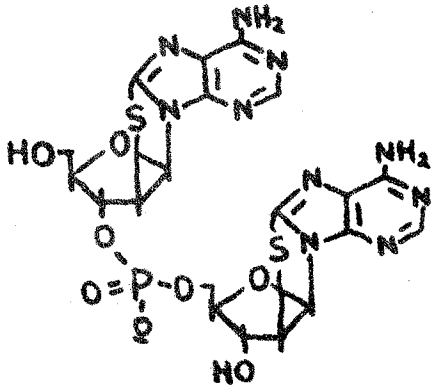
〔38〕

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

2つの adenosine 分子が，(3'-5') phosphodiester 結合で結ばれた，adenyl(3'-5') adenosine〔39〕(ApA) 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



〔39〕 ApA



〔40〕 $A^S{}_pA^S$

うため，先ず同様に(3'-5')で結合した，8,2'-S-cyclo adenosine (A^S)の dinucleoside monophosphate [40] ($A^S pA^S$) 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。

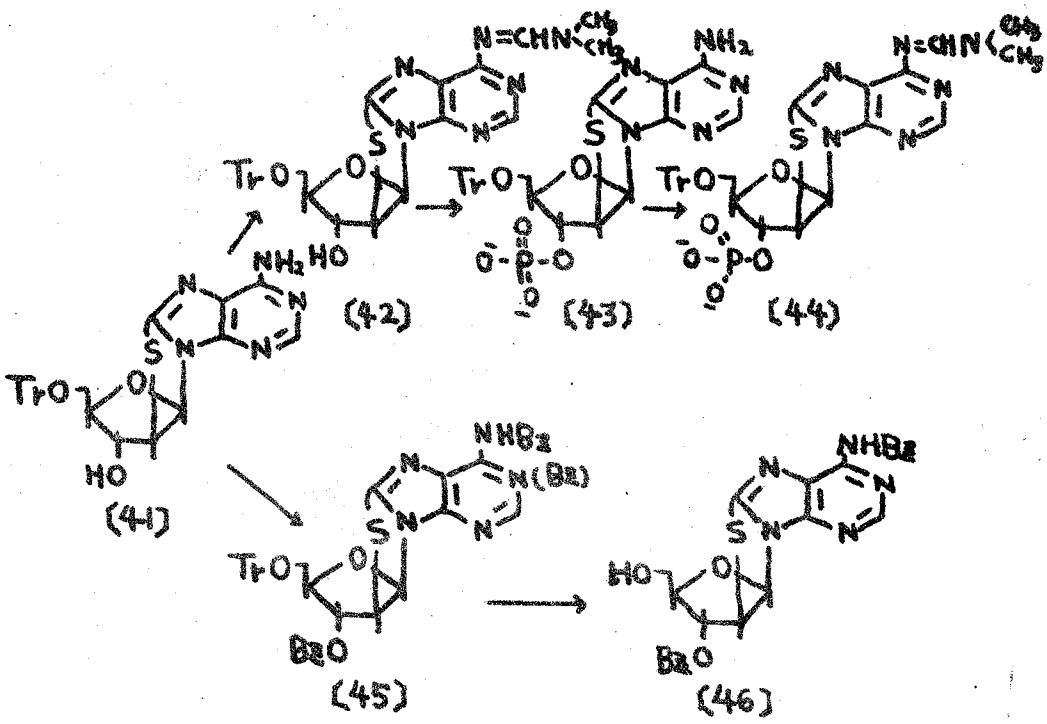
先ず，nucleotide部分の合成について述べる。

泡原等の方法[41]で，A^Sの5'-OTh体[41]を合成し，これを，DMF中，dimethyl formamide dimethyl acetal[42]と室温で処理し，6-NH_2基の保護を行った。この保護基は，nucleoside[43]，nucleotide[44]の base のNH_2基の特異的な保護に使われている。ここに得られた[42]のλ_{max}^{EtOH}は320mμと，非常な長波長シフトを示し，N^6-dimethylaminomethylene体の特徴を示し，Thin layer クロマトグラフィー(TLC)で原料より Rf が高く，sharp な斑点をもつ。

[42]と2-cyanoethylphosphate とを，無水pyridine中，DCCで縮合し[45]，メタノール性NH_3で，cyanoethyl基を脱離すると，NH_2基の保護もはずれて[43]を得た。このものは沪紙電気泳動(以下PEPと略す)で，5'-AMP に対する相対移動度(R_{pA})が 0.86，Th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-NH_2基を保護し，[44]を得た。$\lambda_{max}^{H_2O}$は319mμにもどり，PEPのR_{pA}=0.83で

ある。



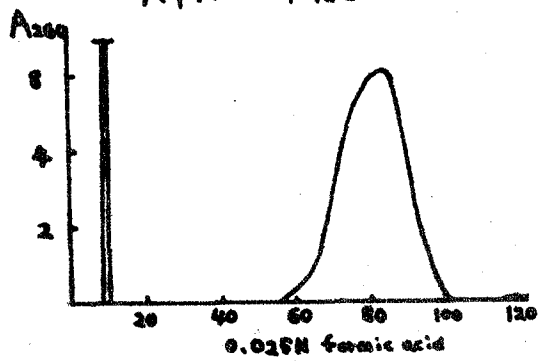
次に，nucleoside 部分の合成であるが，〔41〕を pyridine に溶し，約 3eq. の benzoic anhydride を加え，80～85°C で 35 時間反応させ，$NaHCO_3$ 水溶液へ注ぎ，$CHCl_3$ 抽出すると〔45〕が得られる。これは base 部に benzoyl (Bz) 基が 2 個入ったものと，1 個入ったもののまざりである。両者とも，$\lambda_{max}^{EtOH, H^+}$ 301～302 mμ を示すので N^6 へ Bz 基が，両方入っていることが判る。

〔45〕を 80% 酢酸中，100°C 30 分扱い，溶媒を留去後，熱エーテルで trityl 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 (3:1)

溶媒の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で共沸して無水にし，無水pyridine※中，DCCで縮合し，メタノール性NH_3で，Bz基及びdimethylaminomethylene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0.025Mのbuffer濃度で溶出されるmajor peakをペ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。0.025N ギ酸で溶出すると，〔40〕$A^S pA^S$を完全に分離することができた。

図(7) Dowex 1による$A^S pA^S$の分離



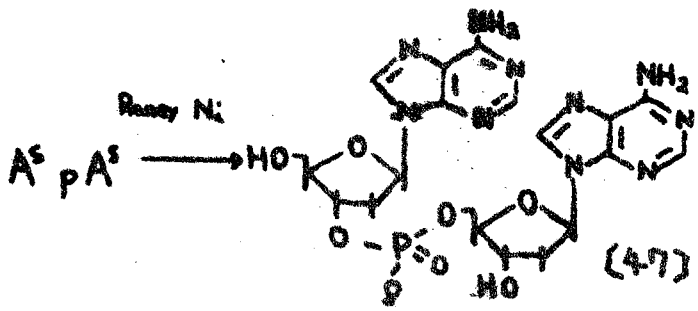
〔40〕のUVの吸収は，$\lambda_{max}^{H_2O}$ = 271mμとなり，monomer A^Sのそれより5mμ程度短波長シフトしているが，$\lambda_{max}^{H^+}$ = 276.5mμとなり，A^Sと同じになる。Pの定量をしてε(P)を出すと，中性で3.8×10^4となり，pA^S〔4〕のそ

※ KOHで脱水後，$KMnO_4$処理して蒸留し，次にTsClを入れて蒸留したものを，KOHで脱水して蒸留後，モレキュラーで上密栓して貯えたものを使用する。

れは，2.2×10⁴ 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 及び H-1′ の signal は 2本づつ出る。又，CD でも，dimer 特有の大きな Cotton effect，と pattern を示す。

ここに得られた $A^{S}pA^{S}$ を，エタノール・methyl cellosolve 中，Raney Ni で脱硫すると，2′-deoxyribose を sugar 部に含む，2′-deoxyadenylyl-(3′-5′)-2′-deoxyadenosine〔47〕を与える。このものは，ペーパークロマトグラフィーで，標品[46]と一致した。これにより初めて，ribonucleoside から出発して，deoxyribodinucleotide の合成がなされた。

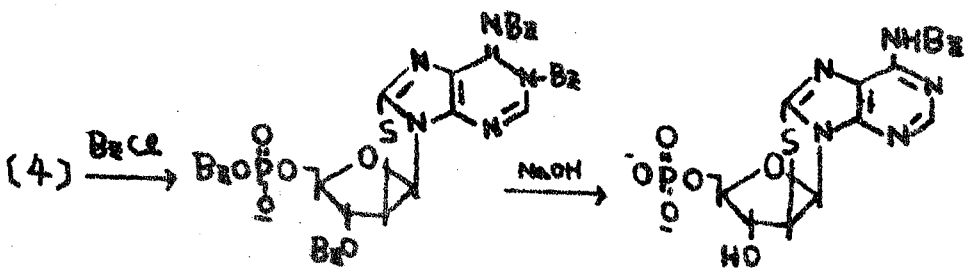
$A^{S}pA^{S}$ は，spleen phosphodiesterase 及び venom phosphodiesterase による水解に，非常に抵抗するが，venom phosphodiesterase の場合，酵素量を非常に多くし，時間を長くかけると，ある程度（約 20 %）水解される。これらの酵素は deoxyribopolynucleotide をも水解する酵素なので，$A^{S}pA^{S}$ の conformation が unfavorable なためと思われる。



第三章　8,2'-S-cycloadenosine 5'-monophosphate の重合反応

8,2'-S-cycloadenosine 5'-monophosphate〔4〕(pA^S)の重合は，6-NH_2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，$CHCl_3$抽出する。ここで得られるものは〔48〕のようなものであると思われる。このものを pyridine 一水に溶し氷冷下，NaOH溶液を加えて，0.25規定とする。20分後，



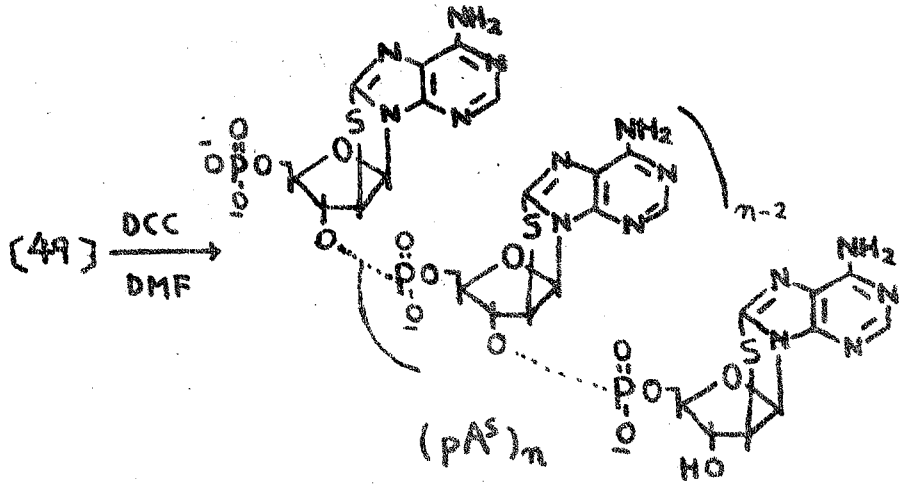
DoweX50(pyridine型)を加えて中和し，更にDoweX50(pyridine型)のカラムを通し，etherでbenzoic acidを抽出し，〔49〕を得る。$\lambda_{max}^{H_2O}$ 301mμを示すので，N^6にBz基が入っており，ペーパークロマトグラフィーのRf値からmono Bz体と推定される。

〔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，微量のアミン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Khorana等は，DoweX50(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，無水にして，無水DMF※中DCCで重合させた。

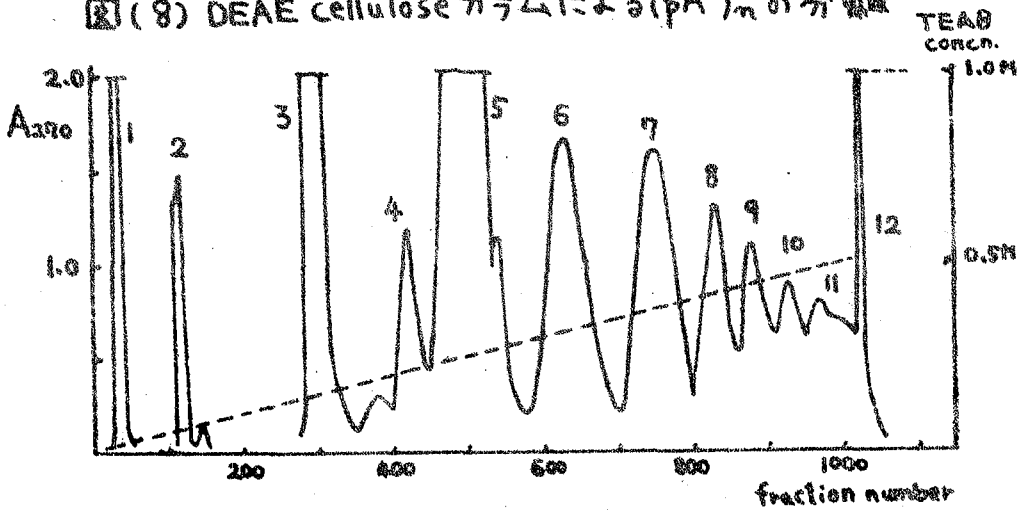
室温約3週間後，反応を止め，ピロリン酸結合を切る無水酢酸-pyridine処理をしてから，濃NH_3水でBz基をはずし，DEAE-cellulose(bicarbonate型)のカラムにかけ，0～0.25M及び0.25～0.50M TEAB buffer pH 7.5のlinear gradientで溶出する。図(8)に示すようなクロマトグラムが得られ，表(7)に示すような成績体となる。各分画を，水を加えて，更に，溶媒Cで1～48時ペーパークロ

※ P_2O_5で乾燥して蒸留した後，BaOで乾燥して蒸留し，モレキュラーブ上，密栓して貯えたものを用いた。

マトグラフィーを行い精製する。



図(8) DEAE cellulose カラムによる$(pA^S)_n$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 を溶出するような、高濃度の NaCl (0.4 ~0.5M) でなければ、溶出されない。

1M TEAB buffer で peak 12 を溶出した後，5M及び7Mの尿素を含む1M TEAB buffer で流すと，130 OD₂₇₀ 程度溶出されるので，かなり長鎖の oligonucleotide まで，できていると思われる。

ペーパークロマトグラフィーで精製した，短鎖の oligonucleotide $(pA^5)_n$ と思われるものについて，E. coli alkaline phosphatase で末端の5′のリン酸基を落し，$A^5(pA^5)_{n-1}$ を得，この $(pA^5)_n$ 及び $A^5(pA^5)_{n-1}$ について，それぞれPの定量を行い，鎖長を調べた。

表(7) $(pA^5)_n$ peak の同定

Peak	Fractions pooled	TOD_{270}	TOD %	Major component
1	23~42			non-nucleotidic material
2	119~136	362	2.6	unidentified
3	276~325	1620	12	pA^5
4	405~445	459	3.3	$(pA^5)_2$
5	461~510	5190	38	unidentified + $(pA^5)_3$
6	599~650	1590	12	$(pA^5)_4$
7	711~795	1190	8.7	$(pA^5)_5$
8	806~850	665	4.7	$(pA^5)_6$
9	866~900	505	3.7	$(pA^5)_7$
10	901~945	510	3.9	$(pA^5)_8$
11	946~985	451	3.3	$(pA^5)_{27}$
12	986~1060	692	5.1	〃

表(8) P分析

n	$(pA^5)_n$ E(P)	$A^5(pA^5)_{n-1}$ E calcd.
2	1.97 [illegible]	1.88 [illegible]
3	1.67	1.73
4	1.62	1.65
5	1.61	1.63
6	1.66	1.64
7	1.61	
8	1.63	

表(8)に示すように，$n=2\sim6$ の $(pA^S)_n$ の $\varepsilon(p)$*と，$A^S(pA^S)_{n-1}$ の ε の計算値（$\varepsilon(p)\times\frac{n-1}{n}$）がよく一致するので，鎖長が確証された。$n=7,8$ については，alkaline phosphatase 処理によりペーパークロマトグラフィーでの R_f が大きくなるので末端リン酸を有し，$\varepsilon(p)$ が $n=4\sim6$ のものとほぼ等しくペーパークロマトグラフィーおよびイオン交換で溶出される位置等から，鎖長を決めた。$(pA^S)_n$ および $A^S(pA^S)_{n-1}$ のペーパークロマト（PPC）および PEP の data は表(9)に示した。

なお，$(pA^S)_2$ より得られる $A^S{}_pA^S$ については，前章で合成した $A^S{}_pA^S$ と，PPC および PEP で一致した。

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

	PPC*		PEP**	
n	$(pA^S)_n$	$A^S(pA^S)_{n-1}$	$(pA^S)_n$	$A^S(pA^S)_{n-1}$
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	0.48	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	0.87	0.74
8	0.01	0.03	0.80	0.78

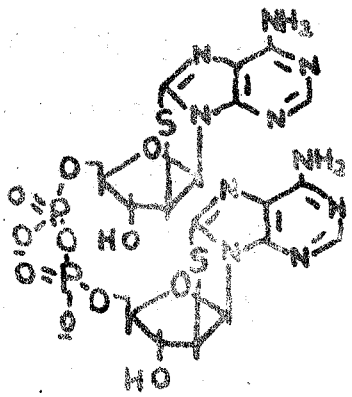
* 温度 C

** pH 7.5

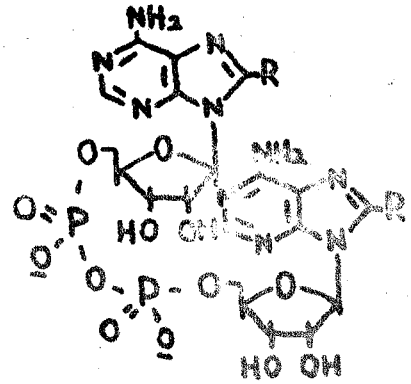
※ P環座あたりの ε.

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，Af〔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縮合した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ので[53]，分子中の2つのbaseは強くstackしていると思われ，そのC.Dに興味がもたれる。そこで，他の8-置換purine nucleosideおよび，天然のnucleosideのpyrophosphate誘導体も合成した。（〔51〕～〔61〕）

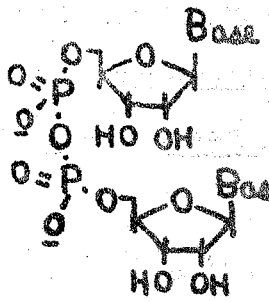


〔50〕

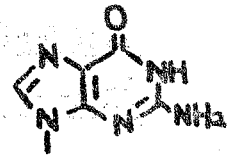


R=H〔51〕，-Br〔52〕，-OH〔53〕

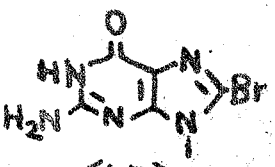
SH〔54〕，-C(CH₃)₂OH〔55〕



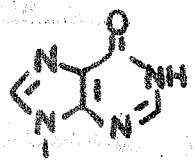
Base =



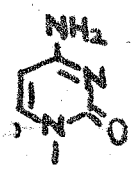
〔56〕



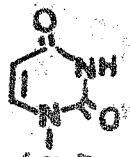
〔57〕



〔58〕

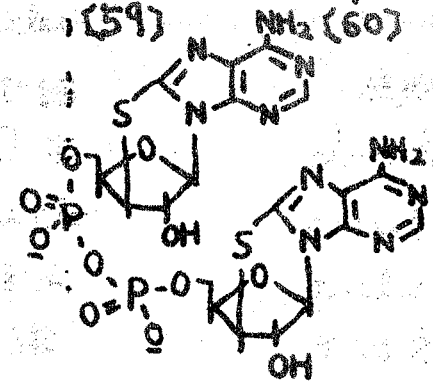


〔59〕



〔60〕

原料の nucleoside 5'-monophosphate 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。



〔61〕

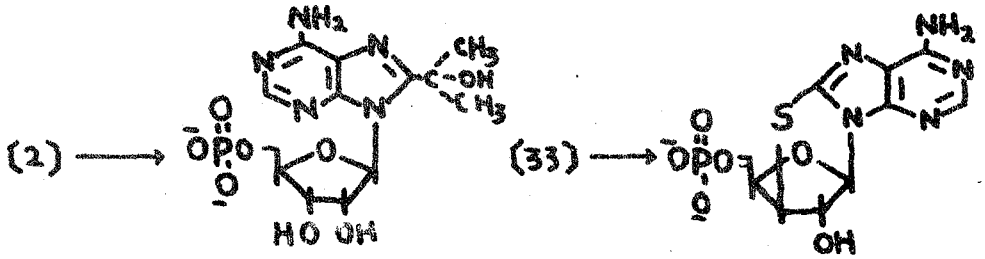
8-mercapto-adenosine 5'-monophosphate〔24〕は，8-Br-5'-AMP を，DMF-水中 NaSH と反応させ，収率79% で合成した。

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等の方法[55]に従い，triethylphosphate 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'-monophosphate (5'-GMP) より合成した。[22]



(62) (63)

P1,P2-dinucleoside 5'-pyrophosphate は，nucleoside 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，リン酸どうし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} (ε(P)) 0.001N HCl	PH7	0.001N NaOH	PPC R_pA^* (R_{mp})** B	D	A	PEP R_pA^* (R_{mp})** 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)

* 実験の部参照。 ** 展開の5'-monophosphateに対する相対移動度

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

			8-H	2-H	1'-H	2'-H	5'-H	$J_{H_{1'}-H_{2'}}$
A	5'-MP*		8.62	8.25	6.21		4.22	5.0
	5'-PP**	(51)	8.14	7.96	5.94		4.36	4.6
8-Br-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
8-SH-A	5'-MP			8.21	6.63	5.49	4.26	5.5
	5'-PP	(54)		8.07	6.62	5.43	4.40	6.0
8-OH-A	5'-MP			8.27	6.05	5.34	4.27	5.4
	5'-PP	(53)		8.14	6.00	5.32	4.40	5.5
8-Br-G	5'-MP				6.13	5.44	4.26	6.0
	5'-PP	(57)			6.00	5.43	4.40	6.2

D_2O 溶液, 2Na salt
0.1M ((51) は 0.27M)
TMS 外部標準
chemical shift は δ で表す

* nucleoside 5'-monophosphate
** dinucleoside 5'-pyrophosphate

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う。[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 の強さが測る。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

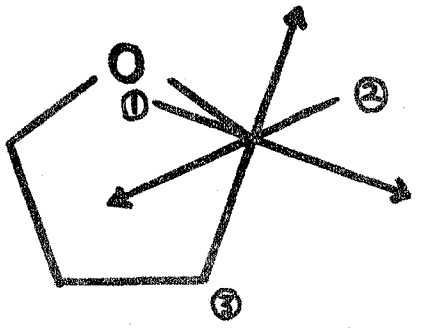
uridine-pp〔60〕, cytidine-pp〔59〕
8,3'-S-cycloadenosine-pp〔61〕

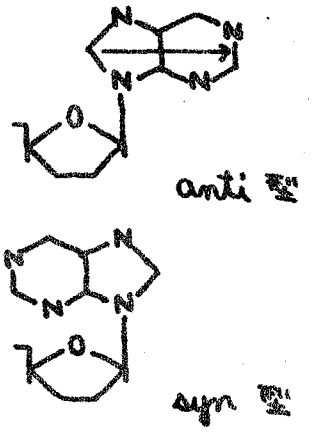
(4) 殆ど stack していないもの

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 平面を図のような矢印で表わすと①のような向きになる）あると報告されている。[58] 8-bromo adenosine の場合は，約 +120°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'-S-cyclo adenosine 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，syn 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，260mμ 付近の Cotton effect の sign は逆になっている。

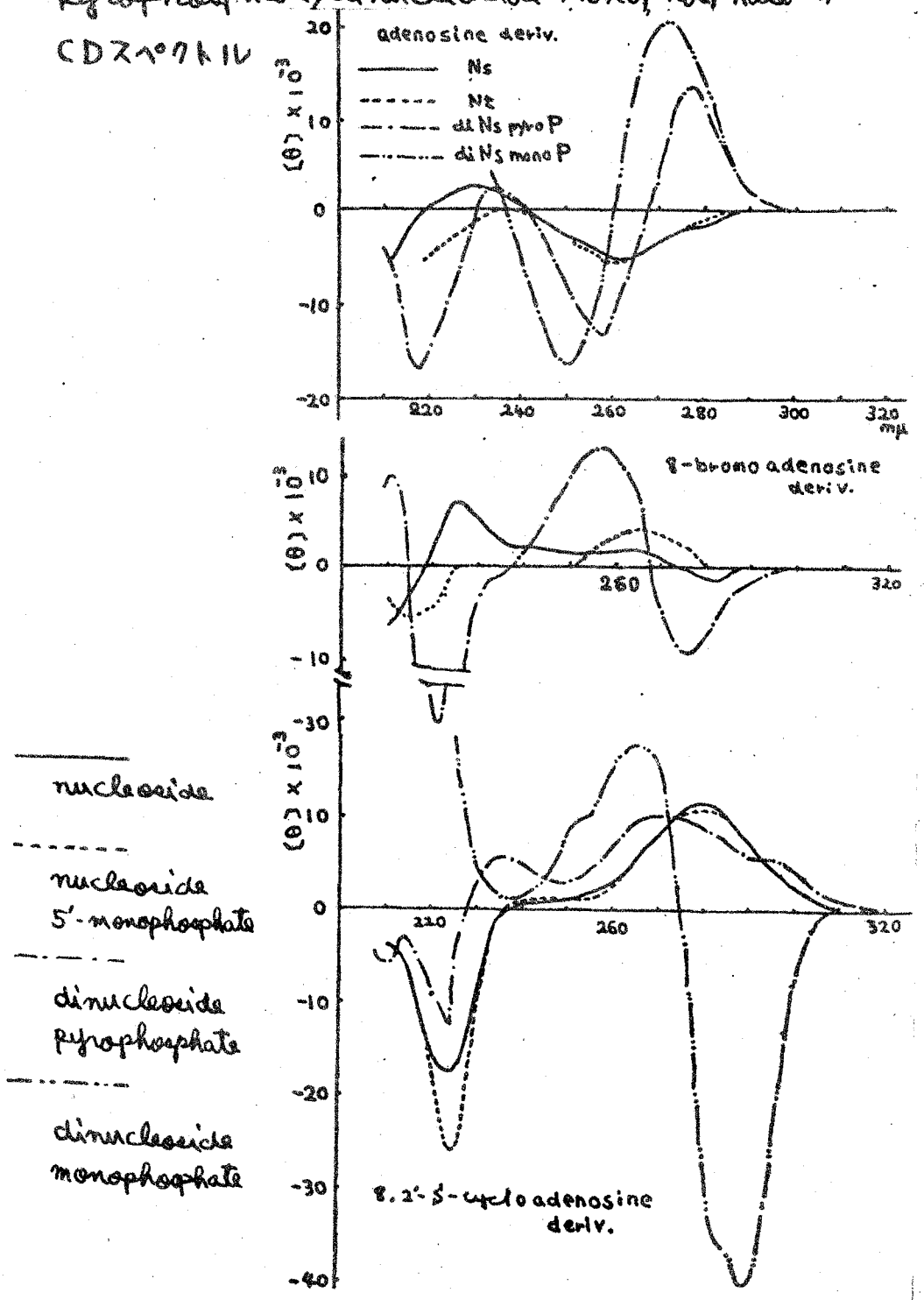
pyrophosphate をみると，A^S のそれでは殆ど monomer と変らず，stack していないが，adenosin のそれは，monomer と異り，非常に大きな Cotton effect を示し，強い stack していることが判り，その pattern は長波長側に positive，短波長側に，negative となっている。

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 による検討を総合すると，表(12) に示したような結論となる。

※ Corey-pauling-Koltun 分子模型

図(10) nucleoside, その5'-monophosphate, dinucleoside pyrophosphate, dinucleoside monophosphate の CDスペクトル



表(12) CD測定結果

	torsion angle	difference between monomers[b]	degree of stacking	CD pattern[c]	conformation in aq. solution
A^s		−			
A^s-5′-MP*	−108° (anti)				anti
A^s-5′-PP**			−		
$A^s{}_pA^s$			++	−	
A		−			anti
A-5′-MP	−20°[a] (anti)				(A^sのtorsion angleとは、かなり異る)
A-5′-PP			++	+	
A_pA			++	+	
8-Br-A	+119°[a] (syn)	+			
8-Br-A-5′-MP					syn
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

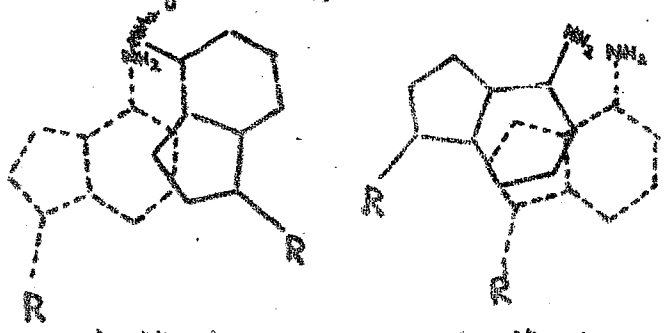
第五章　8,2'-S-cyclo adenosine を含むoligonucleotide の構造と性質

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

前章で述べたように，$A^S pA^S$〔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 mμ の hypsochromic shift しており，ε_{max} で比較して約1.

%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, A^spA^s については, 左巻きの stacking が予想される。

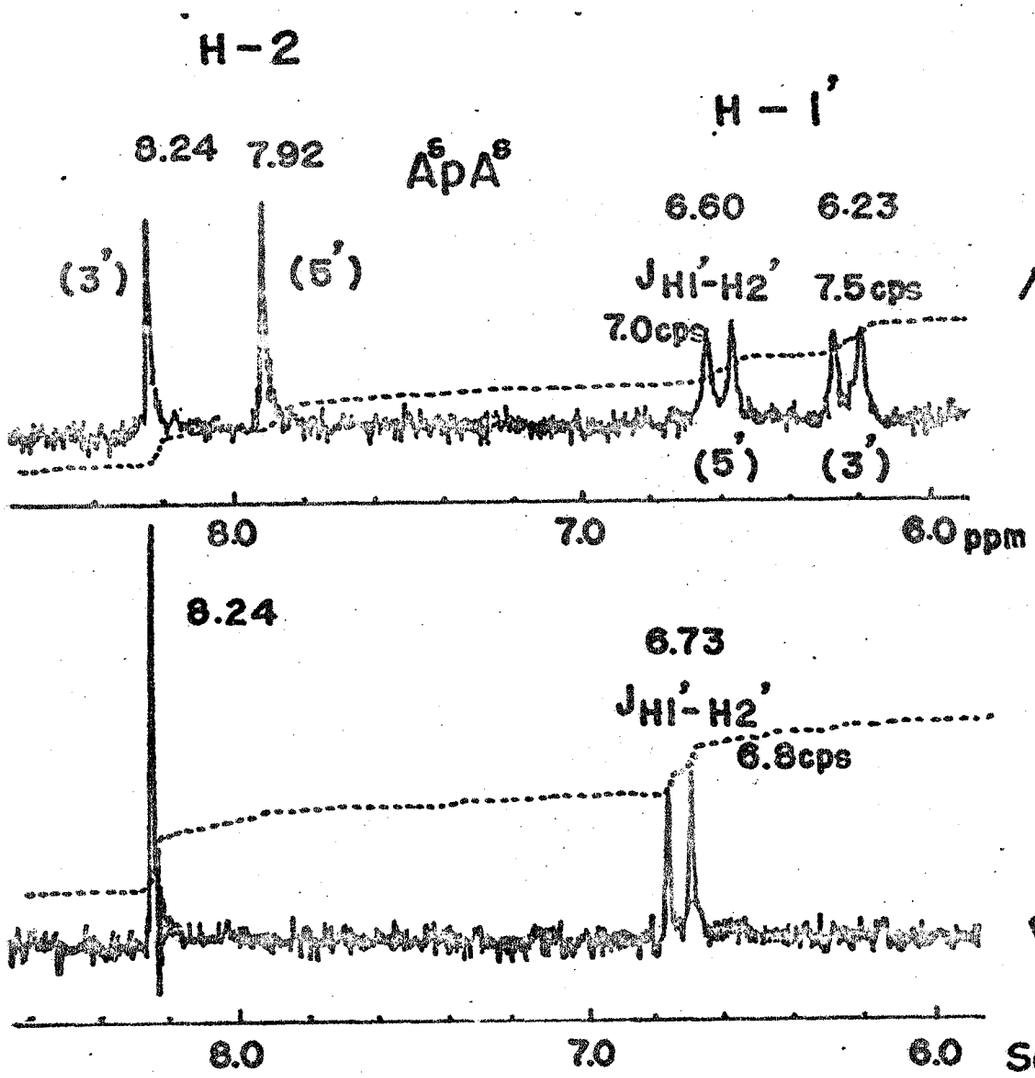
図(11) stacking の仕方

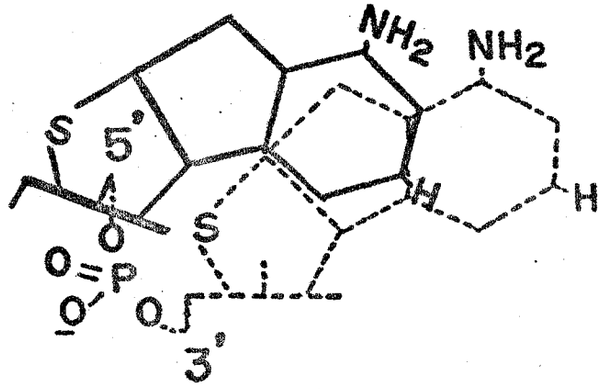


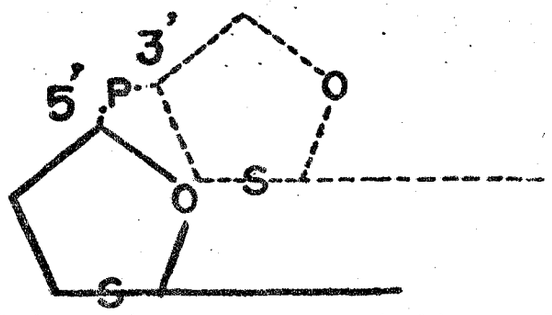
右巻き　　左巻き

次に NMR により, これを明かにした。図(12)に A^spA^s 及び pA^s 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-8 である。いずれも2本づつ出ており, その1本は, pA^s 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







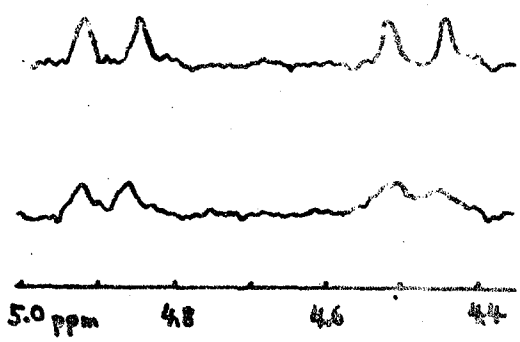
Schematic representation of $A^s p A^s$

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

stackingの存在を示している。これら2組のsignalが，どちらのbaseあるいはsugarに属するかを，Tsáo等の方法[10]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，上からMn^{2+}を加えた場合の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と言う）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'側のものであると思われる。

図(13) Mn^{2+}によるbroadening effect



3'側のH-1'がring current anisotropyにより high field shiftするのは図(12)に示すように，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，$A^{S}pA^{S}$ の2つの base は左巻きに 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 にも及び，ApA のそれ（$\Delta\delta_D$ が最大の H-2(3′) は室温で約 0.2ppm）と較べると，非常に強い stacking をしていることがわかる。又，その温度依存性をみると，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，やはり ApA（H-2(3′) で 58%，H-1′(3′) で 33% 減少している）と較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

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

(extrapolated to infinite dilution)

		H-1′ 3′	H-1′ 5′	H-2 5′	H-2 3′
7°C	$A^{S}pA^{S}$	6.36	6.79	8.08	8.49
	pA^{S}	7.01	7.01	8.48	8.48
	$\Delta\delta_D$	0.65	0.22	0.40	0.01
室温	$A^{S}pA^{S}$	6.50	6.92	8.19	8.56
	pA^{S}	7.09	7.09	8.56	8.56
	$\Delta\delta_D$	0.59	0.17	0.37	0.00
60°C	$A^{S}pA^{S}$	6.72	7.09	8.36	8.71
	pA^{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

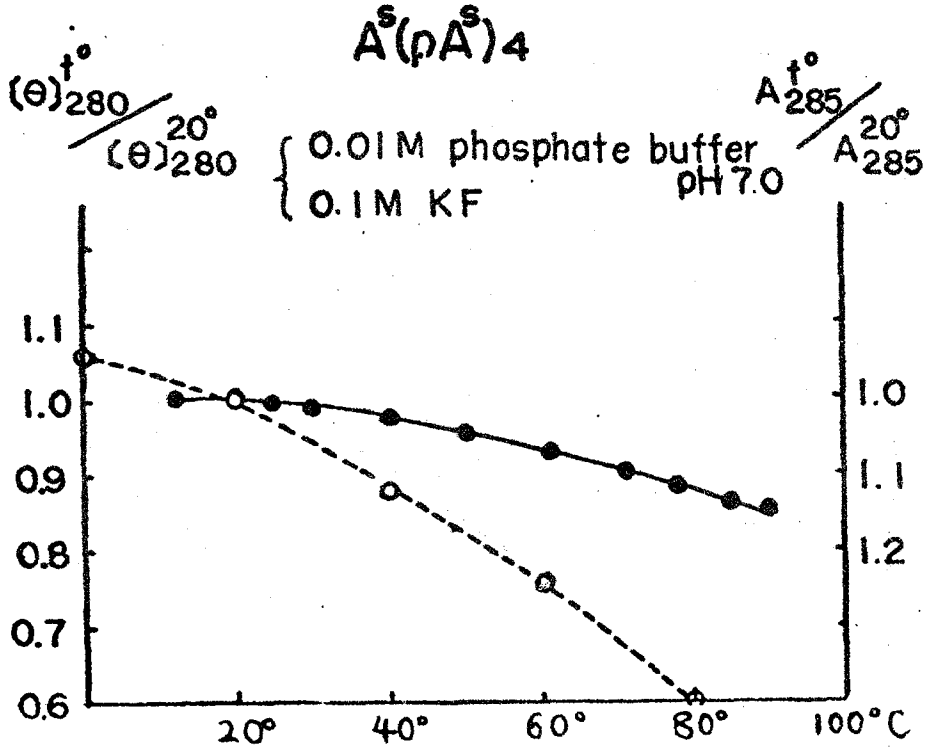
$n=3$ 以上の oligonucleotide においても，その CD pattern は A^SpA^S のそれと殆ど変らないので，同様に左巻きの stacking をし，左巻きラセン構造を取っているものと思われる。Tao 等は，β-L-adenosine の dinucleoside monophosphate が，左巻きの構造をとっていると報告している[4]が，このような左巻きの構造は，β-D-nucleotide 系では，初めての例である。

図(15)に，UV 吸収の ε 及び CD の [θ] に対する鎖長の影響を示したが，ε は $n=4$ 位，[θ] 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 [θ] 及び UV 吸収の温度依存性を示したが，[θ] 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 mμ 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。[θ] の減少も，酵素で合成した長鎖の poly adenylic acid (poly A) でも，0 ～ 74° で，

$\frac{1}{4}$以下に減少しているが，A^SpA^S では，0－80° 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。

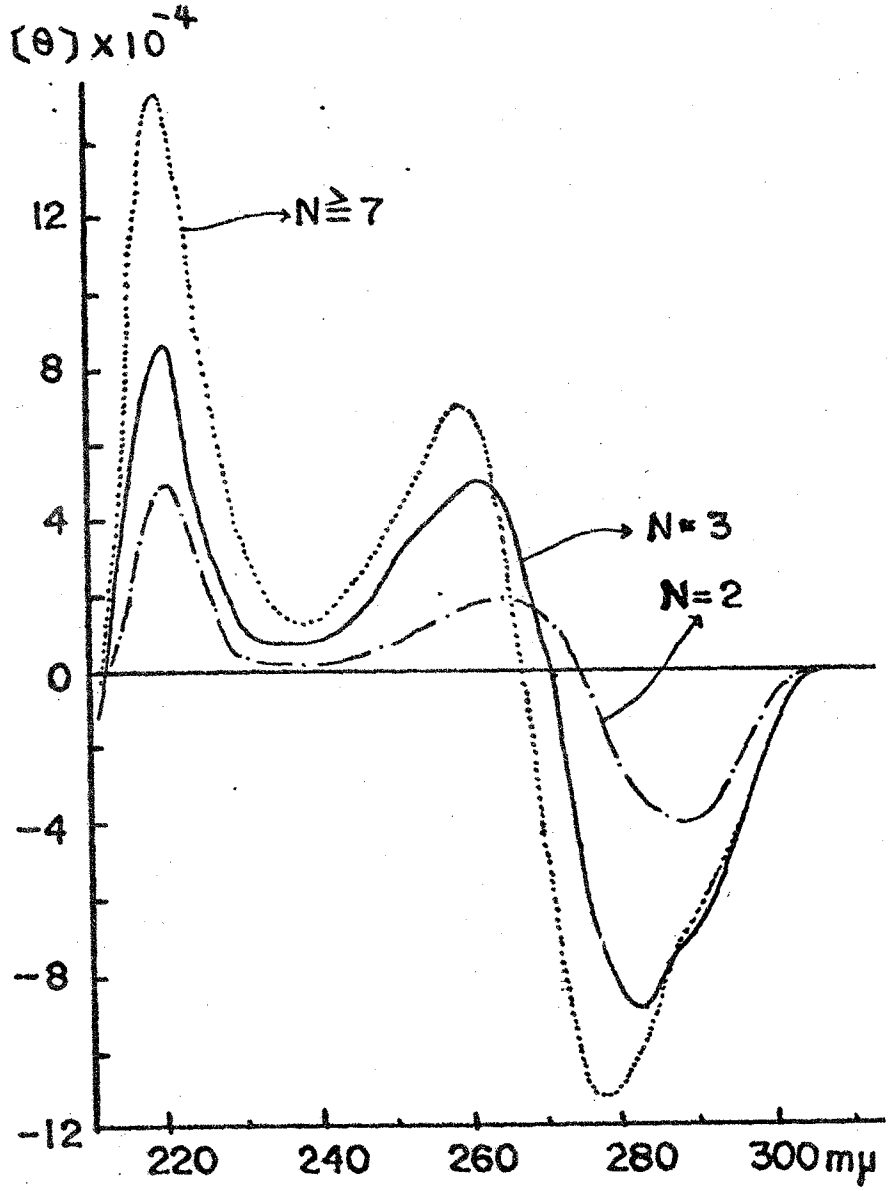
図(16) [θ] 及び UV吸収の温度依存性



Tinoco 等により ApA などについて，その conformation の熱によるくずれ方が調べられている。[63]

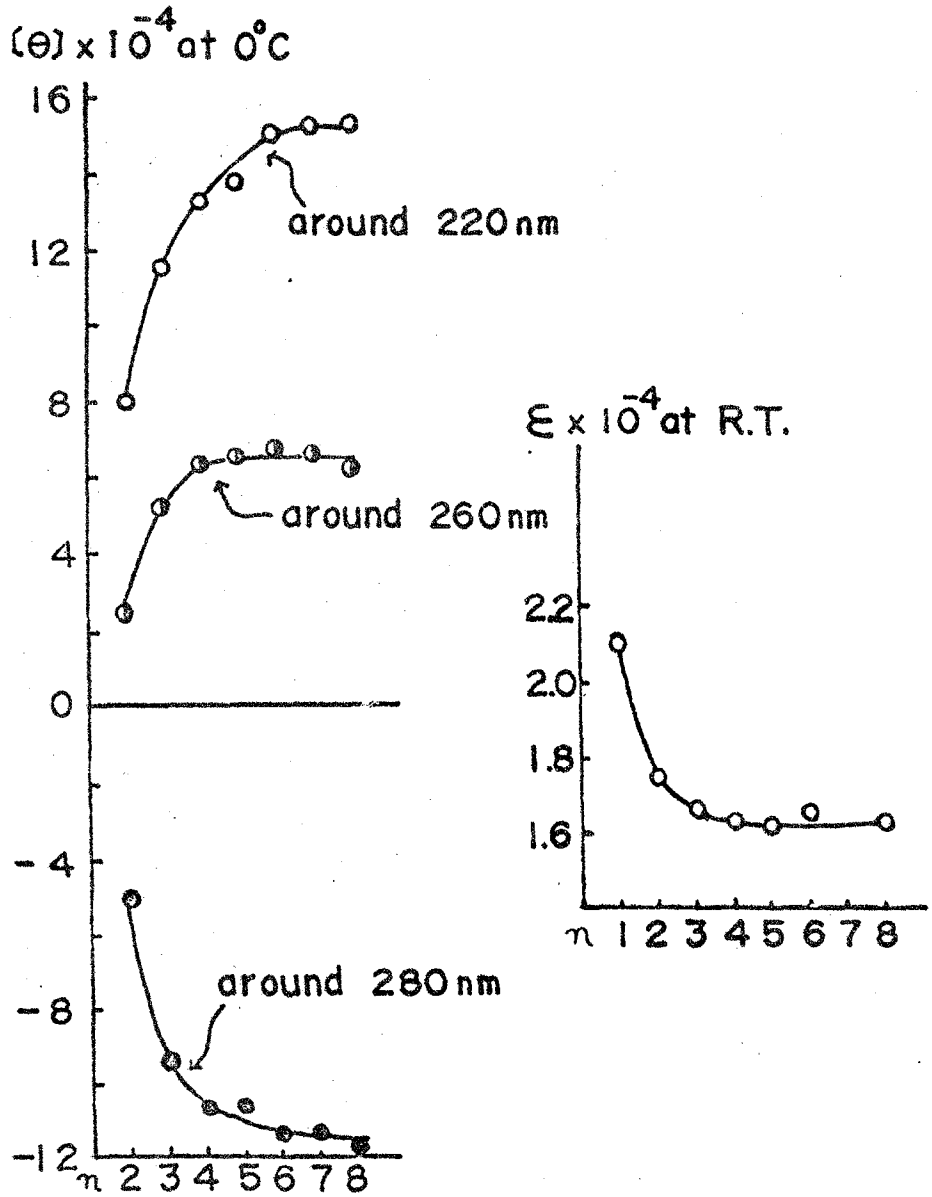
図(17)の(1)のように，base間の距離を一定に保ったまま，回転軸のまわりに振動する model と，(2)のように，base が完全に stack した状態と，destack した状態との間の平衡を考える model が理論的に調べられている。(1)の model では，[θ] は温度

図(14) $(pA^S)_n$ の CD スペクトル



0.1M KF
0.01M Kcacodylate pH 7.0
20°

図(15) [θ] 及び ε に対する鎖長の影響

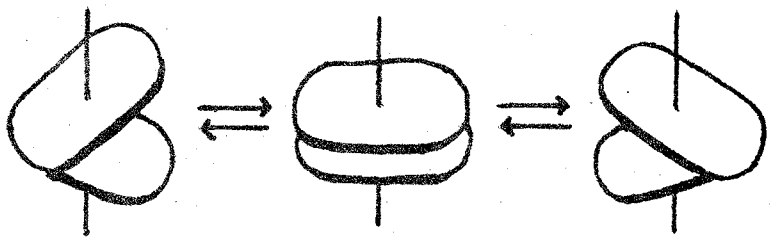


(0.01 M phosphate buffer PH7.0
0.1 M KF

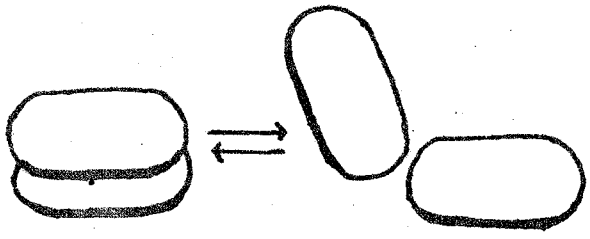
とともに減少するが，hyperchromismは起らない。(2)のmodelでは，〔θ〕の減少とhyperchromismが同時に起る。ApAでは，(2)のmodelが比較的よく合うとされている[63]が，A5を含むOligonucleotideでは，(2)の過程が起り難く，室温付近では，(1)のmodelによく合う結果を与えていると思われる。

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は非常に更定化する。

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 基の特異的なトシル化に成功した。

3) 以上の反応により，8,2'-S-cyclo adenosine 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-cyclo adenosine を含む，oligonucleotide，$A^S pA^S$ 及び $(pA^S)_n$ を合成した。

5) 主に nucleotide level の反応を用いて，cyclo-adenosine，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) $A^S pA^S$ 並びに $(pA^S)_n$ 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，池原森男教授に深謝いたします。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感謝いたします。

さらに，$A^{S}pA^{S}$ の温度可変NMRを測定していただきました，Johns-Hopkins大学の Tso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 Sectrophotometer EPS－3Tを，NMRはVarrian HA－100 Spectrophotometer（100 Mc）を，CDはJASCO ORD/UV－5 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。calikration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）は東洋沪紙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Rf，又は5'-AMPに対する相対移動度（RpA）で示した。

A: isopropanol－濃NH_3－水（7:1:2）

B: n-butanol 氷酢酸－水（5:2:3）

C: n-propanol－濃NH_3－水（55:10:35）

D: ethanol －1M ammonium acetate（7:3）

E: 飽和硫安－水－isopropanol（79:19:2）

PEPは，東洋沪紙電気泳動器 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。

PH7.5 0.05M triethylammonium bicarbonate buffer

PH3.5 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 HF$_{254}$を用い，展開溶媒としては，$CHCl_3$とエタノールの混合溶媒を用いた。

UV吸収のε及び，CD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-Bromoadenosine 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 1×8 (formate form) column (1.5 cm × 15.5 cm) 100～200 mesh, one fraction 50 ml にかけ水洗後（約 300 ml），0.1 N ギ酸で溶出する。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×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·2Na 1 mmole を dioxane 10 ml と水 40 ml の混合溶媒に溶し，$CaCO_3$ 150 mg を加えて撹拌する。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 撹拌し，$NaHSO_3$ 52 mg を加えて脱色する。溶媒をとばし，25 ml の水に溶し，Dowex 1×8 (formate form). 1.5 cm × 15 cm の column にかけ，水洗後，0.1 N ギ酸で溶出する。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) 6.6ml (2当量) を加える。 これに 5'-AMP·2Na 1mmole 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) 1.5cm×17cm の column にかける。one fraction 12ml，流速約24ml/hr.

水洗後，0.1N 蟻酸で溶出する。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沪過し，約10倍の acetone を加えて沈澱をとる。

収量 239 mg (50%)

UV 吸収：$\lambda_{max}^{H^+}$ 262.5 mμ (1.64×10^4), $\lambda_{min}^{H^+}$ 231 mμ
$\lambda_{max}^{H_2O, OH^-}$ 264.8 mμ (1.51×10^4), $\lambda_{min}^{H_2O, OH^-}$ 232 mμ,
A_{280}/A_{260} = 0.513 (H^+), 0.454 (H_2O, OH^-)

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

PEP: pH3.5, pH7.5 で 5'-AMP に同じ。

pKa: 3.6 (260 mμ で測定)

NMR: D_2O 中 0.1M 8.29 (singlet H-2), 6.22 (doublet H-1' $J_{H-1', H-2'}$ = 5.7 cps) 5.40 (triplet H-2')

元素分析（$C_{10}H_{14}NaPO_7Br \cdot H_2O$）　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）2Na salt 42μmole を0.25M-acetate buffer pH 4 2ml 及び水2.5ml を加えたものに溶しておき，これに飽和 Br_2 水 0.47ml 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，エタノ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 OD_{260}（$\varepsilon_{260}^{H_2O} = 1.44 \times 10^4$ として 46%）

UV吸収；$\lambda_{max}^{H_2O}$ 265mμ，$\lambda_{max}^{H^+}$ 263mμ

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）2Na 1mmole 飽和 Br_2 水 9.4ml（2eq）の順に加え，室温一夜放置後，$NaHSO_3$ 104mg を加

えて反応を止め，エタノールを加えて溶媒をとばし，100 ml の水に溶し，Dowex 1X8 (Cl^- form) 1.2 cm × 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き，最後にメタノール・水 (1:1) 約 3 ml に溶して，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。クロマトグラフィー収率 56% ($T_{OD\,260}^{H^+}$ = 9040)，収量 351 mg (4Li·3H_2O とすると 53%)

UV吸収：$\lambda_{max}^{H^+}$ 263 mμ，$\lambda_{max}^{H_2O\ OH^-}$ 265.5 mμ

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

PEP：pH 3.5 (R_{ATP} 0.97)，pH 7.5 (R_{ATP} 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 0.25M-acetate buffer pH 4 10 ml を加え，飽和 Br_2 水 2.8 ml (2 eq) を加えて室温一夜放置する。これにエタノールを加えて

ばし，100 mlの水に溶し，Dowex 1X8 (Cl^- form) 1.1cm × 17cmのカラムにかける。1 fraction 50ml，流速 60ml/hr.。0.02 M LiCl + 0.001 N HCl で原料を出し，0.06M LiCl + 0.001 N HCl で Br体を溶出する。(fr. 34 ~ 51) これを集めて活性炭処理しメタノール・水に溶し，acetone で沈殿させる。収量 64 mg ($2NH_3 \cdot H_2O$ とすると 51%)

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

PPC：Rf A (0.48，原料 0.38)，B (0.37，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 m mole) 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) を加えて室温一夜放置し，エタノールを加えてとばす。これを 100 ml の水に溶し，Dowex 1X8 (formate form)，1.2 cm × 19 cm のカラムにかける。水洗後，0.05 M ギ酸アンモン + 0.1 M ギ酸 約 1.8 l で流し，次に 0.10 M ギ酸アンモン + 0.1 N ギ酸で流して peak I (fr. 47 ~ 66) を得る。

次に0.20Mギ酸アンモニウム+0.1Nギ酸で流し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，$TOD_{260}^{H_2O}$=1977 (14%，2'-AMPより67%)，peak II，$TOD_{260}^{H_2O}$=8098 (56%，3'-AMPより71%)。これを少量のメタノール水(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吸収；$\lambda_{max}^{H^+}$ 263 mμ，$\lambda_{max}^{H_2O, OH^-}$ 265.5 mμ

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：RpA 0.99

NMR；0.15M D_2O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吸収；$\lambda_{max}^{H^+}$ 263.5 mμ，$\lambda_{max}^{H_2O}$ 265.5 mμ，$\lambda_{max}^{OH^-}$ 266.5 mμ.

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. RpA 0.96

NMR；0.15M D_2O溶液，8.26 δ (singlet H-2)

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

5.22δ (pseudo triplet, H-2')

adenine nucleotide の酵素水解

a) crude snake venom[66]中の 5'-nucleotidase.

8-Br-5'-AMP 5 O.D, 1M-$(NH_4)_2CO_3$ 20μl, 0.05M Tris-HCl buffer pH 8 10μl, crude snake venom (10 mg/ml) 20μl をとり，全量を 100μl とし，37° 4時間 incubate する。結果は濾紙Aのペーパークロマトグラフィーで分析する。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 及び 8-Br-3'-AMP 約 0.5μmole, 0.5M Tris-HCl buffer pH 8.1. 50μl，酵素溶液 100μl, をとり，全量を 250μl 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だいた。

約40μmoleのAMP·2Na Saltにbuffer溶液，飽和Br_2水 0.47ml（約2.5eq.）を加え，全量を5mlとする。pH 3～5，は0.25M-acetate buffer 2ml，pH6は1M-phosphate buffer 2ml，pH7，8は0.2M phosphate buffer 5ml，pH9は0.04M borate buffer 20ml（従ってこの場合は全量約20.5mlとなる）を加えた。結果の分析は，室温1日後pH3～6は，溶媒Bのペーパークロマトグラフィー，pH7～9はDowex 1X8（formate form）のクロマトグラフィーによって行った。

b) 3',5'-cyclic AMPのブロム化

0.05mmoleの3',5'-cyclic AMP free acidにN-NaOH 0.05ml，0.25M-acetate buffer pH 3～5，2ml，飽和Br_2水0.47ml（2eq），水2.5mlを加えて室温1日後，結果を溶媒Aのペーパークロマトグラフィーで分析する。

c) adenosineのブロム化

約55μmoleのadenosineに，0.25M-acetate buffer pH 3～5，2ml，飽和ブロム水0.47ml（約2eq），水2.5mlを加え，室温1日おき，結果を溶媒Bのペーパークロ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 及び 第三節の実験

2'-o-p-toluensulfonyl adenosine 5'-monophosphate〔29〕

5'-AMP. free acid 1mmole を N-NaOH 2ml に溶し，減圧乾固する。これを N-NaOH 1.5ml に溶し，Tscl 665mg (3.5mmole) を dioxane 7.5ml，水 0.5ml に溶かしたものに，撹拌下，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時間撹拌を続けると，反応液は透明，液性は酸性になってくる。これを 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 61% 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eを出した。

UV吸収：λ_{max}^{pH2} 230mμ (1.27×10^4)，258.5mμ (1.29×10^4)，λ_{min}^{pH2} 244.5mμ，λ_{max}^{pH7} 231mμ (1.31×10^4) 261.5mμ (1.26×10^4)，λ_{min}^{pH7} 245mμ，$\lambda_{max}^{OH^-}$ 261.5mμ

PPC：Rf. A (0.25, pA 0.07)，B (0.55, pA 0.19)，D (0.39, 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 を N-NaOH 0.75 ml に溶し，TsCl 380 mg (4 eq.) を dioxane 3.75 ml 一水 0.25 ml に溶したものに，撹拌下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時間撹拌下 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 E を求めた。

UV 吸収：λ_{max}^{pH2} 229 mμ (1.27×10⁴)，264 mμ (1.61×10⁴)，λ_{min}^{pH2} 245 mμ，λ_{max}^{pH7} 266 mμ (1.40×10⁴) λ_{min}^{pH9} 245.5 mμ，$\lambda_{max}^{OH^-}$ 266 mμ.

PPC：Rf，A (0.33，pA 0.12)

PEP：pH7.5 (RpA-A 0.94)

8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine 5'-monophosphate [4]

a) 2'-OTs-5'-AMP 経由

上記の如くして，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，monotosylate 56%，di-tosylate 19% 下の溶媒をとばし，これを 100 ml の水に溶す。 これに

0.5 M-acetate buffer pH 4, 100 ml, 飽和 Br_2 水を 50 ml 加える。約 30 分放置し，更に飽和 Br_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 Br_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 Br 化をおこすから注意）この溶液の一定量をとり，溶媒 A のペ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-Br-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。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 ギ酸アンモン + 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，少量になるまで溶媒をとばし，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，遠沈後，acetone-ether で洗う。上清は濃縮後，

MeOH に溶し，acetone 30 ml で沈殿させ，遠沈する。acetone・ether の順に洗い，P_2O_5 上乾燥する。収量 421mg（free acid・$2H_2O$ として 5'-AMP より 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 Bo ペーパークロマトグラフィーで，one spot になったのを確めた後，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 を加えて遠沈する。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 2.6～2.9 g（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。最後に 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 に溶して，スターラーで撹拌する。これに，上記 Na Salt を 7.5 ml の N-NaOH に溶して，直ちに滴下を始める。約1時間かけて滴加し，その後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 体の混合物を，DMF 5 ml H_2O 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。これを水に溶して沪過し，約1 l の水に溶す。この一定量をとり，溶媒Aのペーパークロマトグラフィーで分けて，定量すると，8,2'-S-cyclo adenosine 5'-monophosphate r*, 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 ($C_{10}H_{12}O_6N_5PS \cdot 2H_2O$)
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薬状晶を P_2O_5 上，減圧，室温で20時間で乾燥したもの。
($C_{10}H_{12}O_6N_5PS \cdot 2.7H_2O$)，分析値：C 28.97 H 4.45 N 17.37 P 7.58

UV吸収：λ_{max}^{PH1} 278 (2.15×10^4)，λ_{min}^{PH1} 237.5 (2.8×10^3)，λ_{max}^{PH7} 220.5 mμ (2.19×10^4) 270 mμ (2.25×10^4) λ_{min}^{PH7} 238 (4.2×10^3)，λ_{max}^{PH13} 277 mμ (2.28×10^4)

λ_{min}^{PH13} 239 (4.4×10^3)

PPC: A (0.06, pA 0.07) B (0.29, pA 0.24, pA^{Br*} 0.32)
C (0.44, pA 0.48) D (0.12, pA 0.15)

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

NMR: 0.1M D_2O 溶液, 8.24 δ (singlet, H-2)
6.93 δ (doublet, H-1', $J_{H-1', H-2'}$ 6.8 cps)

8,2'-S-cycloadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (37)

8-Br-3',5'-cyclic AMP pyridinium salt 0.2 mmole を 2N-KOH 0.3 ml に溶し, TsCl 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, 原料は殆どなくなっている。$\lambda_{max}^{H^+}$ 265 mμ, $\lambda_{min}^{H^+}$ 261.5 mμ $\lambda_{max}^{H_2O}$ 267 mμ, $\lambda_{min}^{H_2O}$ 246.5 mμ Rf. 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, H_2S を 0° で10分間通じる。室温2日放置後, 溶媒をとばし, 水を加えてとばし, 多量の水を加えて不溶物を沪過する。Dowex 1×8 (Cl型),

* 8-bromoadenosine 5'-monophosphate.

1cm × 20cm のカラムにかけ，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。クロマトグラフィー収量，1970 $OD^{H^+}_{280}$（3'5'-cyclic AMP より 46%）

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

PPC：A（0.43，原料 0.47）．B（0.34，原料 0.29）

PEP：pH 7.5 R_{pA-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）をミクロスパーテルに2杯とって入れ，浴温 180° で 3 時間 reflux し，濾紙 D のペーパークロマトグラフィーで分離する。収量 31.8 O.D.260（18%），UV吸収：$\lambda_{max}^{H_2O}$ 260 mμ，$\lambda_{min}^{H_2O}$ 229 mμ，PPC：D（0.23，原料 0.16，pA 0.19）

このもの約 50 O.D. を Crude snake venom と，37° 5時間 incubate すると，98% 遊リン酸し 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 経由の pA^S.

free acid 5mg を N-NaOH で中和し，水 5ml，0.5M NH_4HCO_3 0.5ml，E.Coli alkaline phosphatase (0.4 mg/ml) 0.5ml を加え，37°，8時間 incubate し，溶媒をとばす。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※，Rf 0.57 の A^S を水で抽出し，結晶と合せて 10ml の水に溶し ($T_{OD_{276}}$ = 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～) で流したが，殆どUV吸収はなく，280 mμ 以上に λ max をもつ 8,3'-S'-cycloadenosine は検出されない。これの fr. 4－12 ($T_{OD_{267}}$ = 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'-S-cycloadenosine 3mg と 8,3'-S-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，同じ条件で流すと，完全に両者を分離できる。A^S (fr. 4～35, $T_{OD_{276}}$ = 220)，8,3-S-cycloadenosine (fr. 43－92. $T_{OD_{276}}$ = 134)

※ 10%程度の不純物と trace の硫酸塩がある。

b) 8-Br-5'-AMP 経由の pA^S

free acid 8mg を N-NaOH で中和し，水4ml，M-NH_4HCO_3 1ml，E. coli alkaline phosphatase (0.4mg/ml) 0.15ml を加えて，37°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.（完全に脱リン酸されている），R_{pA-A} = 0 の nucleoside 部を水で抽出し，これを先の結晶と合せ，10ml の水に溶し，DowexX 1X2 (OH^- form)，100－200 mesh，0.6cm × 4cm のカラムにかける。one fraction 20ml，流速約 80ml/hr.。水洗（～fr.10）後，80% MeOH (fr. 11～44) 及び 0.5% AcOH (fr. 45～) で溶出する。

fr. 11～18 : TOD_{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_2O_5 上乾燥する。このものの UV吸収，融点，PPC の Rf は標品の A^S のそれと一致した。 fr. 46－47: TOD_{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'-S-cycloadenosine誘導体の酵素基質としての活性

a) Crude snake venom 中の 5'-nucleotidase

約5 O.D. の基質に, 0.25M Tris-HCl buffer pH 8.7 20μl, 0.1M $MgCl_2$ 10μl, Crude snake venom (20mg/ml) 適量を加え, 全量を100μl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5μl, 2時間で完全に脱リン酸されるが, pA^Sは酵素10μl及び30μl, 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-NH_4HCO_3 10μl, 酵素溶液(0.4mg/ml) 5μlを加え, 全量を100μl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%脱リン酸される。

c) sheep intestinal alkaline phosphatase**

分画中のadenosine deaminase

約40 O.D. の基質に, M-NH_4CO_3 30μl, 酵素溶液(0.5mg/ml) 60μlを加え全量を300μlとし, 37°で4時間半incubateする。溶媒Aのペーパーク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PO₃されて，8,2'-S-cyclo inosine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

N^6,$O^{3'}$-dibenzoyl-8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine〔46〕

5'-O-trityl-8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine(49) 100 mg を pyridine 6 ml 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，$NaHCO_3$ 水溶液（0.4g/40ml）中に氷冷下，撹拌して少量づつ注ぎこみ，chloroform 15 ml で抽出する。chloroform 層を無水硫酸ソーダで脱水し，$CHCl_3$ を留去し，白色の残渣を得る。残渣に80%酢酸30 ml を加えて，100°C 13分間加温する。酢酸を留去して167 mg の白黄色の粉末を得る。P_2O_5 上，25～30°C，15分間宛，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基の発色テストはマイナス。収率74%

* A. Yamazaki, unpublished work.

UV吸収；$\lambda_{max}^{70\%EtOH}$ 301mμ，237mμ，$\lambda_{max}^{H^+}$ 301mμ，237mμ，$\lambda_{max}^{OH^-}$ 315mμ.

TLC ：$CHCl_3$-EtOH (37:3) (0.44，原料 0.13)

5'-O-Trityl-N^6-dimethylaminomethylene-8,2'-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenosine. (42)

TrA^s 168mg を DMF 3ml に溶し，dimethyl formamide dimethyl acetal 0.18ml を加えて，無水の状態で23時間，室温放置する。反応液を 30ml の氷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，沪取し乾燥する。定量的に目的物が得られる。 m.p. 144～145°C

UV吸収；$\lambda_{max}^{H^+}$ 305mμ，343mμ，$\lambda_{max}^{H_2O}$ 302mμ，251mμ，$\lambda_{max}^{OH^-}$ 320mμ，251mμ.

TLC；$CHCl_3$ - EtOH (7:1) (0.43，原料 0.34)

5'-O-trityl-N^6-dimethylaminomethylene-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine-3'-phosphate (44)

上に得た〔42〕90mg と 2-cyanoethyl phosphate (pyridinium salt) を無水 pyridine 10ml を加えて溶解し，DCC 1.2g を加え，45°C で 18時間放置する。反応液に Pyridine-水 (3:1) 30ml を加え，dicyclohexyl urea を沪過し，沪液を n-hexane 120ml

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 NH_3 (1:1) 25 ml をかえ，45°C で10時間放置後，溶媒を留去し，残渣に水30 ml を加えて遠沈する。沈殿を P_2O_5 上，室温10時間乾燥し，DMF 2 ml を加えて溶し，dimethyl formamide dimethylacetal 0.2 ml 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 50×2 (pyridinium form) のカラムを通す。50% pyridine 水で洗い，溶出液を2 ml に濃縮し，50 ml のエーテルを加えて沈殿さす。

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

PEP：pH 7.5，RpA 0.83.

<u>8, 2'-anhydro-8-mercapto-9 (β-D-arabinofuranosyl) adenine-3'-phosphoryl (3'→5')-8, 2'-anhydro-8-mercapto-9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine ($A^S pA^S$)</u>

上に得た，〔44〕(pyridinium salt) 約1800 o.D. 319 と〔46〕60 mg に Dowex 50×2 (pyridinium form) 0.5 ml を加え，pyridine と共沸する。これに pyridine 2 ml と DCC 246 mg を加えて，11日間，20°C で放置する。反応液に50% pyridine 水 20 ml を加え，沈殿物を沪去し，沪液を n-hexane 60 ml 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°－33°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分間加温し，溶媒を留去する。これを水に溶し，DEAE－Cellulose (bicarbonate form)，2cm × 36cm のカラムにかけ，tri-ethyl ammonium bicarbonate buffer pH 7.5，0.001～0.08 M の linear gradient（全量3L）で溶出する。one fraction 16ml の major peak (fn. 55～100) を集め，50 ml に減圧濃縮し，凍結乾燥する。収率約 70%.

UV 吸収：$\lambda_{max}^{H^+}$ 276.5 mμ (4.2×10^4)*，$\lambda_{max}^{H_2O}$ 271 mμ (3.80×10^4)，219 mμ $\lambda_{max}^{OH^-}$ 271.5 mμ (3.58×10^4)

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：pH 7.5 R_{pA-A} 0.30.

NMR：D_2O 溶液（濃度 0 にタトソウ）8.56 δ (singlet, H-2(3')) 8.19 δ (singlet, H-2(5')), 4.92 δ (doublet H-1'(5') $J_{H-1',H-2'}$ 7.0 cps) 4.50 δ (doublet H-1'(3') $J_{H-1',H-2'}$ 7.4 cps)

<u>2'-deoxyadenylyl (3'-5')-2'-deoxyadenosine</u> (47)

上に得た A^5pA^5 約 1mg を EtOH 0.5 ml，methyl-cellosolve 0.5 ml にケン濁し，Sponge-Nickel ミクロスパーテル1杯を加えて，100°C 7時間加温する。<u>遠沈して上澄液及び洗液をペーパークロマトグラフィ</u>

* このEは pero residue ではない。

一で分ける。

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

PPC：B(0.37, 標品 dApdA 0.37) D(0.40, 標品 dAp dA 0.41)

$A^S pA^S$ の酵素的水解

a) venom phosphodiesterase*

$A^S pA^S$ 10 O.D.271 に, 1M $(NH_4)_2CO_3$ 40 ml, 酵素溶液(1mg/ml)を加え, 全量を 200 μl とし, 37°C, 14時間 incubate する。thymidylyl(3'-5')thymidine (TpT) は, 酵素 20 μl, 2時間で 95% 水解されるが, $A^S pA^S$ は 4時間 incubate しても全く水解されない。

b) crude snake venom 中の phosphodiesterase

$A^S pA^S$ 約 5 O.D.271 に 1M $(NH_4)_2CO_3$ 40 μl, 酵素溶液(20 mg/ml) 100 μl を加え, 全量を 230 μl として 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 μl, 25分で 97% 水解される。

c) spleen phosphodiesterase

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

* Worthington Biochemical Corp. より購入

加え，全量を200μlとして，37°C，14時間incubateする。

TPTは，酵素溶液20μl，2時間で完全に水解される。

第三章の実験

N^6-benzoyl 8,2'-anhydro-8mercapto9-(β-D-arabinofuranosyl) adenine 5'-monophosphate (4.9)

pA^S free acid 410mg (1mmole)を，Pyridine水に溶し，Pyridinium saltとする。溶媒を留去し，Pyridineで2回共沸して無水にする。これを20mlのpyridineに溶し，benzoyl chloride 2.5mlを加えてよく振る。すぐ溶液となった後，白色沈澱析出する。室温で1時間おき，chloroform-水(50ml—50ml)を加えてよく振り，chloroform層を分取する。水層を25mlのCHCl₃で2回抽出する。chloroform層を集めて留去する。溶媒のペーパークロマトグラフィーでone spot (Rf=0.76，原料0.15)

これを50% pyridine水200ml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200mlを加え，0°で20分おく。これにDowex 50×8 (pyridinium form)を加えて中和し，沪過してから，同じresinの2cm×17cm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，Rf=0.40（原料0.13）に青色の蛍光をもつspotがmajorである。Rf=0.58の蛍光のスポットは，dibenzoyl体と思われ約6%存在する。

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

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のコルベンに移し，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 50×8（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，栓して室温に放

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 で沪過する。残渣を50% pyridine 水でよく洗い，沪液と洗液を合せ，石油ベンジンで2回抽出し，水層を留去し，Pyridine 10 ml, triethylamine 0.14 ml, acetic anhydride 2.5 ml を加え暗所に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-Propanol を加えて発泡をとめながら水で3回留去をくり返す。残渣に濃 NH_3 水 40 ml を加え密栓して 50°C に3時間おき，n-Propanol を加え，濃縮して，アスピ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，$\lambda_{max}^{H_2O}$ 271 mμ. $Tab_{240}^{H_2O}$ 6800 であった。

DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによる重合体の分離

上記の溶液を，DEAE-cellulose (bicarbonate form)，4 cm × 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T.O.D.は表(7)の通りである。尚，この後，更にカラムを，5M尿素を含む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，更に下記の如くして，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のペ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) Fn. 946 ～ 992.

fr. 946 − 992の残渣を50mlの水に溶して，0.02M Tris-HCl buffer pH 7.5を含む7M尿素溶液で洗った。DEAE-Cellulose (Cl⁻型) 1cm × 50cmにかけ，尿素溶液で洗った後，7M尿素溶液中，0.05M～0.30 M NaCl (全量1.4l) のlinear gradientで流す。次に，(fn. 345～) 同様の条件で0.30−0.50 M NaCl 全量0.8lで流す。one fraction 5ml，流速約20ml/hr.。更にfn. 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1l）。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，充分に水洗して尿素を除き，少量の 1M-ammonium bicarbonate で溶出し，水を加えて凍結をくり返し salt を除く。

C) Fr. 986 以降

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

<u>直鎖 oligonucleotide $(pA^S)_n$ 及びその脱燐酸誘体 $A^S(pA^S)_{n-1}$ の P 分析※</u>

溶媒Cの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 5 O.D./ml の溶液の 1ml を各3本のキェルダール管にとり，0.5ml の 60% 過塩素酸を加えて，4時間加熱し，冷後，0.5ml のアミドール溶液及びモリブデン酸溶液 0.25ml を加え，全量を 5ml とし，15分後に A_{675} を測定する。

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

次に遠鎖の oligonucleotide 約 30 O.D. に、M-NH_4HCO_3 60ml, E. coli alkaline phosphatase (0.4mg/ml) 60μl を加えて、全量を 600μl として、37°C で4時間 incubate する。これを溶媒Cのペーパークロマトグラフィーで分け、脱燐酸体を水で溶出し、その約 5 O.D./ml 溶液 1ml を各3本づつのキェルダール管にとり、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 1m mole を DMF-水(1:1) 7ml に溶し、40% NaSH 水溶液 0.7 ml 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、原料の消失を確めてから、0.1N HCl で中和し、溶媒を留去し、水を加えて沪過し、沪液を留去し、水に溶して、DEAE-Cellulose (bicarbonate 型)、2cm X 50cm にかけ、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吸収：λ_{max}^{pH2} 308 mμ (2.74×10^4), λ_{min}^{pH2} 261 mμ, λ_{max}^{pH7} 298 mμ (2.74×10^4), λ_{min}^{pH7} 254 mμ, λ_{max}^{pH11} 296 mμ (2.59×10^4) λ_{min}^{pH4} 251.5 mμ

PPC：RpA, B (1.34), C (0.61), D (0.66)

PEP：RpA-A 1.25

NMR：表(7)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 $POCl_3$ 4.8 ml の混合液の 330 μl を加え，更に triethylphosphate 185 μl を加え，氷水中で，容器をよく振っていると，約1時間で完全に溶ける。この後，氷浴中に7日間放置し，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て，Dowex 1X2 (formate型) 1.2 cm × 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。

$T_{O.D.281}^{pH7}$ 3820 (収率 88%)

UV吸収：λ_{max}^{pH2} 282.5 mμ (2.23×10^4), λ_{min}^{pH2} 242 mμ. λ_{max}^{pH7} 224 mμ (1.74×10^4) 282 mμ (2.15×

$\times 10^4$) λ_{min}^{pH7} 244 mμ, λ_{max}^{pH13} 283.5 mμ (2.12×10^4), λ_{min}^{pH13} 248.5 mμ.

PPC: Rf, A (0.10, pA 0.12), B (0.30, pA 0.27)
D (0.11, pA 0.14)

PEP: R_{pA-A} 0.93

<u>P_1, P_2-diadenosine 5'-pyrophospharic acid</u> (51)

5'-AMP·free acid 1 mmole に, 4-morpholine-N, N'-dicyclohexyl carboxamidine 293 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, 沪過して, 沪液を約 100 ml に濃縮する。再度沪過し, 石油エーテル 40 ml で3回抽出し, 水層を, Dowex 1X2 (Cl^-型) 1.4 cm × 29 cm のカラムにかけ, 0.01 N HCl で溶出する。one fraction 50 ml。major peak (fn. 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

P1,P2-di-(8-bromo-adenosine)5'pyrophosphate[52]

8-Br-5'-AMPの4-morpholine-N,N'-dicyclohexyl carboxamidine (1-eq.) との塩(carboxamidium 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 × 40 cm のカラムにかけ, 0.01M ~ 0.1 M の triethyl ammonium bicarbonate buffer pH 9.5 の linear gradient (全量 4l) 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

P1,P2-di-(8-mercaptoadenosine)5'-pyrophosphate [54]

8-SH-5'-AMP の carboxamidium 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° で2時間加温する。 通常に後処理し, DEAE-cellulose (bicarbonate型)

2cm × 40cm のカラムにかけ，0.01M－0.2M triethylammonium 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 (fn. 481～573). one fraction 18 ml を集め，濃縮，水で留去をくり返す。後凍結乾燥する。 収率 33%

諸性質は，表(10)参照

<u>P_1, P_2-di-(8-oxyadenosine) 5'-pyrophosphate</u> [53]

8-OH-5'-AMP の carboxamidium salt 0.125 mmole を無水 pyridine 20 ml と DMF 3 ml に溶し DCC 0.3 mmole 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) のカラムにかけ，0.01M～0.3M TEAB buffer pH 7 の linear gradient (全量 4l) で溶出する。 one fraction 14 ml。 major peak (fn. 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

<u>P_1, P_2-diinosine 5'-pyrophosphate</u> [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，室温一夜反応させ，適当に後処理し，DEAE-Cellulose (bicarbonate 型) 2cm × 40cm のカラムにかけ．0.01 ～ 0.3M TEAB buffer pH 7.5 の linear gradient (全量 4l) で溶出し，one fraction 18ml．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。

<u>P₁,P₂ -di-(8-bromo guanosine) 5'-pyrophosphate</u>(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 を加え室温で一夜後，適当に後処理し，DEAE-Cellulose (bicarbonate 型) 1.7cm × 21cm のカラムにかけ，0.01 ～ 0.3M 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 から 同様に反応し，後

処理して，沪紙電気泳動で分離した。
諸性質は，表(10)参照。

参考文献

1) J. Donohue 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年別冊, 「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. Rammler, 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. Duval 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. Uesugi 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. Jordan, "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. Tozawa and T. Fukui, Biochemistry, 8 736 (1969)

24) 村尾捷利, 大数新太郎, 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. Opar, 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, J.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. Kaneko 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. Tinoco 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. Tsó 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) 三世原森男, 上杉晴一, 第19回日本薬学会近畿支部総会
b) 三世原森男, 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) 三世原森男, 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. Steinmaus, 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. Kraut and L. H. Jensen, Acta Cryst., 16 79 (1963)

59) S. S. Tavale and H. M. Sobell, J. Mol. Biol., 48 109 (1970)

60) K. N. Fang, N. S. Kondo, P. S. Miller and P. O. P. Tsó, 160th ACS National Meeting (1970)

61) P. O. P. Tsó, N. S. Kondo, M. P. Schmeizer 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. Glauflger, D. A. Lloyd and I. Tinoco Jr., Biopolymers, 6 409 (1968)

64) I. Tazawa, S. Tazawa, L. M. Stempel and P. O. P. Tsó, Biochemistry, 9 3499 (1970)

65) A. Nomura and H. Suno, 第20回酵素化学シンポジウム, (1968)

66) Y. Mizuno, M. Ikehara, T. Ueda, A. Nomura, E. Ohtaka, F. Ishikawa and Y. Kanai, Chem. Pharm. Bull., 9 338 (1961)