



Title	ビスマス(III)錯体型RNA分解誘導剤の開発
Author(s)	花谷, 優太郎
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/93022
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士論文

論文題名：ビスマス(III)錯体型 RNA 分解誘導剤の開発

令和5年8月31日

専攻名 化学専攻

氏名 花谷 優太郎

大阪大学大学院理学研究科

略語表

ASOs	antisense oligonucleotides
Ac	acetyl
AcO	acetate
DCM	dichloromethane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine
HEPES	4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
LSD1	lysine-specific histone demethylase 1
MeCN	acetonitrile
NCD	naphthyridine carbamate dimer
NMR	nuclear magnetic resonance
PINAD	proximity-induced nucleic acid degrader
RBP	RNA binding proteins
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
TEA	triethylamine
THF	tetrahydrofuran
TfO	trifluoromethanesulfonate
UpU	uridyl(3'-5')uridine
bpma	bis(2-pyridylmethyl)amine
eq.	equivalent
mRNA	messenger RNA
<i>o</i> -Ns	2-nitrobenzenesulfonyl
siRNA	small interfering RNA

目次

第1章	序論	1
第1節	低分子創薬研究における課題と新たな創薬標的としての RNA	1
第2節	生命現象を司る RNA	2
第1項	RNA の構造	2
第2項	RNA の分類と機能	3
第3節	RNA 創薬・ケミカルバイオロジー研究の現状	4
第1項	核酸医薬	4
第2項	低分子化合物	6
第3項	RNA 分解を誘導するキメラ化合物	7
第4節	RNA の化学的な分解へ向けたモデル研究	13
第1項	金属イオンによる RNA をはじめとするリン酸エステル類の分解	13
第2項	金属錯体を用いる RNA や RNA モデルの分解	14
第5節	本研究の概要	18
第2章	二核ビスマス(III)錯体型 RNA 分解分子の創製と活性評価	20
第1節	RNA 分解酵素と RNA 分解分子の設計	20
第2節	RNA モデル基質及び DNA モデル基質の設計・合成	23
第3節	金属イオンのスクリーニング	25
第4節	二核ビスマス(III)錯体の設計と合成	27
第5節	RNA/DNA モデル基質を用いた二核ビスマス(III)錯体の活性評価	30
第6節	オリゴ核酸型 RNA/DNA モデル基質を用いた活性評価	32
第7節	二核ビスマス(III)錯体の構造変換による RNA 分解活性への影響	40
第8節	単結晶 X 線構造解析	43
第9節	二核ビスマス錯体による RNA 分解の詳細な解析	44
第3章	結論と今後の展望	48
第4章	参考文献	50
第5章	実験項	62
第6章	謝辞	89

第1章 序論

第1節 低分子創薬研究における課題と新たな創薬標的としてのRNA

現在、低分子創薬研究が抱える課題の一つとして、標的となるタンパク質の枯渇が挙げられる。ヒトゲノムにおけるタンパク質をコードする領域は1.5%ほどしかなく、その中でも医薬品が標的とすることのできるタンパク質はわずか0.15%程度と言われている。現存する医薬品が標的とすることのできるタンパク質はさらに少なく、その数は0.05%にも満たない(Figure 1-1)。¹ 一方、残りのほとんどの領域はタンパク質をコードしないRNAに転写される。このようなタンパク質へ翻訳されないRNAはノンコーディングRNA(ncRNA)と呼ばれており、マイクロRNA(miRNA)や長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)などが含まれる。近年の研究から、ncRNAは遺伝子発現機構の制御や異常を引き起こし、様々な疾患に関わっていることが明らかとなってきている。^{2,3} したがって、ncRNAを含むRNAを標的とできれば、低分子創薬研究で問題視されている標的の枯渇に対する解決につながる可能性がある。また、ncRNAの中には機能が未解明なものも多く、それらの機能を解明するケミカルツールの開発も強く求められていることから、ncRNAを標的とする化合物の創製はncRNAのケミカルバイオロジー研究の発展にもつながる。

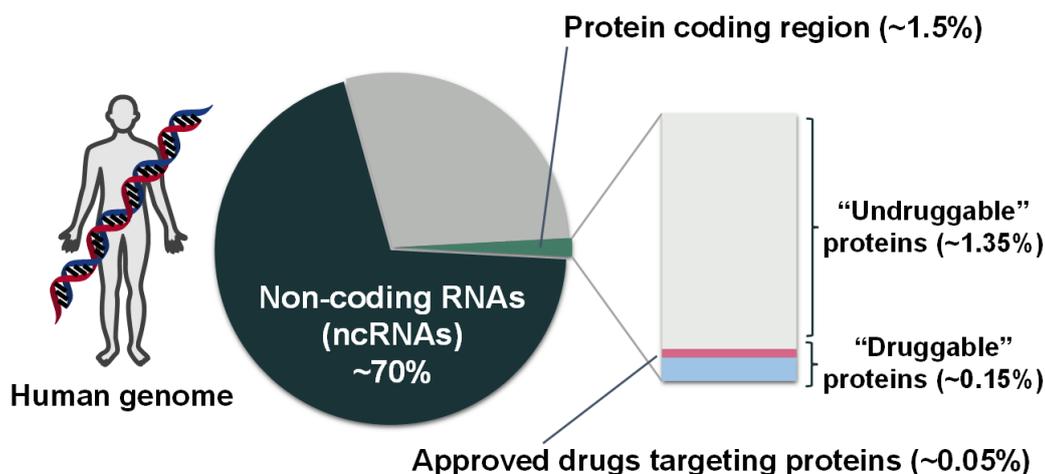


Figure 1-1. RNAs are “Next-generation drug discovery targets”.

第2節 生命現象を司る RNA

第1項 RNA の構造

天然のリボ核酸(ribonucleic acid, RNA)は、リン酸ジエステル結合により連結されたリボースを基本骨格とし、その1'位に塩基(アデニン、ウラシル、グアニン、またはシトシン)を含む(Figure 1-2)。

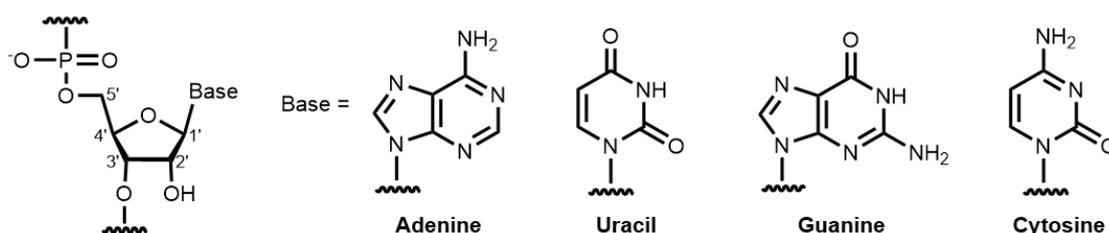


Figure 1-2. Elements of ribonucleic acids.

20種類の天然アミノ酸から構成されるタンパク質と比較して、塩基のみが異なる4種類のリボヌクレオチドによって構成されるRNAは構造の多様性が低いと考えられる。しかし、実際には多くのRNAは、分子内における塩基同士の水素結合により折りたたまれることで二次構造をとる。さらに、転写後のRNAは、メチル化などの様々な修飾を受けるため、二次構造の多様性は拡張される。⁴ 安定な二次構造をとる様々なRNAが、NMRやX線小角散乱(SAXS)などにより決定されてきた。⁵⁻⁸ 特に、最近では塩基配列と、対応する物性値を用いた機械学習によって、二次構造を予測する手法も開発されており、簡便に二次構造を決定することも可能となってきた。⁹ RNA創薬では、RNAの二次構造を標的とする様々なモダリティが提案され、盛んに研究されてきた。RNAの二次構造としては、ヘアピン構造、インターナルループ構造、シュードノット構造やグアニン四重鎖(G4)などが知られており(Figure 1-3)、これらの構造と塩基配列を認識し結合する低分子やペプチド、RNA結合タンパク質(RBPs)などが報告されている。¹⁰

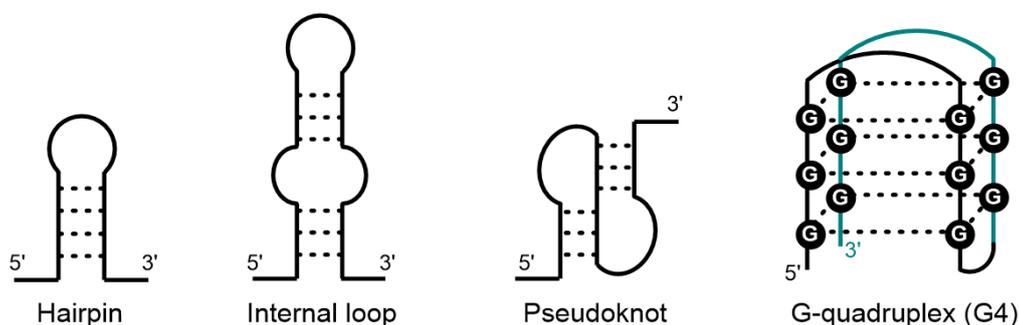


Figure 1-3. Common secondary structures of cellular RNAs.

第2項 RNA の分類と機能

生命の遺伝情報は”DNA からメッセンジャーRNA(mRNA)に転写され、タンパク質へと翻訳されて伝達される”という”セントラルドグマ”の考え方が分子生物学の基本原理としてある。そのため、RNA は生物の遺伝情報を伝える単なる仲介役として考えられていた。しかし、実際は多彩な機能を持ち、生命現象の制御に中心的な役割を担っていると考えられるようになってきた(Figure 1-4)。

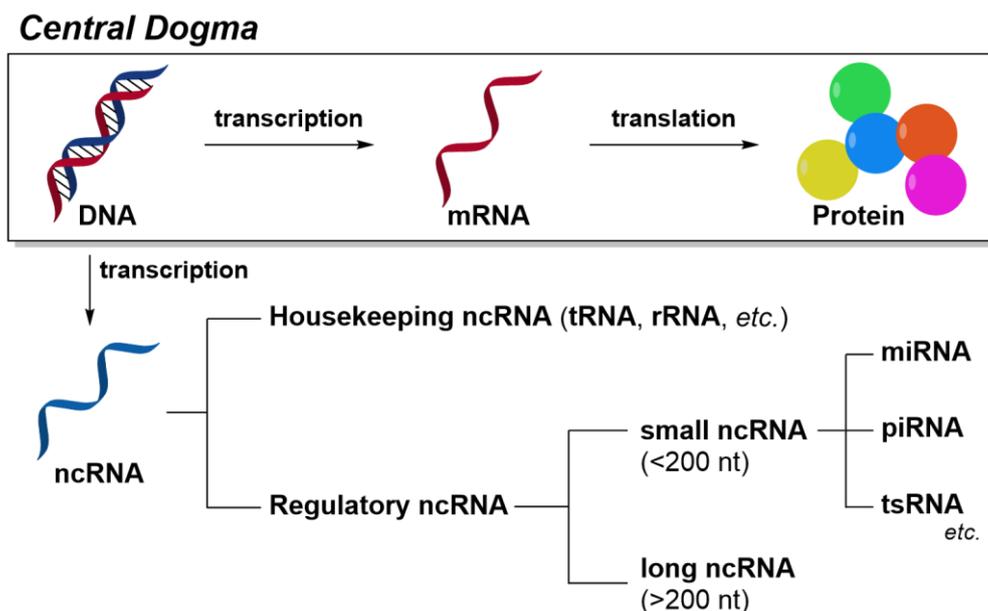


Figure 1-4. Central dogma. The variety and roles of RNAs.

前述したように、ヒトゲノムのほとんどの領域は ncRNA に転写されているが、様々な機能を有する ncRNA が発見されている。その中でも遺伝子発現機構の制御に関わる ncRNA(regulatory RNA)に関する研究は注目を集めている。さらに regulatory RNA は、miRNA などの 200 塩基未満の small ncRNA と 200 塩基以上の long ncRNA(lncRNA)に分類される。Small ncRNA の中でも、miRNA は遺伝子発現機構の制御や異常を引き起こし、がんなどの難治性疾患に関わっているものが存在することが示唆されているため、miRNA の機能に関する研究が精力的に展開されてきた。miRNA のほとんどは、RNA 干渉における miRNA 経路(後述)を介し、標的となる mRNA に結合することで、タンパク質翻訳抑制や mRNA 分解を引き起こすと考えられている。一方、lncRNA は DNA と特異的に結合するプロモーターやエンハンサーといった転写因子や、ヒストン修飾を行う LSD1 などのエピジェネティクス関連タンパク質と結合し、生体分子間のネットワークの構成に寄与することで、遺伝子発現機構に影響を与えていると考えられている。しかし、実際には未解明な点も多く、更なる機能解明が待たれる。^{11,12} このように、ncRNA を含む RNA を標的とするモダリティの創製は、RNA が関与する疾患に対する新たな治療となるだけでなく、生命現象におけるダークマターのような存在である ncRNA の機能解明に向けたケミカルツールの開発へとつながる可能性がある。

第3節 RNA創薬・ケミカルバイオロジー研究の現状

第1項 核酸医薬

RNAを標的とするモダリティの一つとして、核酸医薬が挙げられ、その代表例は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASOs)と siRNA である。ASOs は、標的 RNA に対して相補的な配列を持つようにデザインされた分子であり、標的 RNA の塩基配列特異的にハイブリダイズすることで RNA-DNA 二重鎖を形成し、この二重鎖を認識する RNA 分解酵素の一つである RNase H がリクルートされ、標的 RNA が分解される(Figure 1-5)。これ以外の作用メカニズムとして、RNA-タンパク質間相互作用の阻害も知られている。¹³

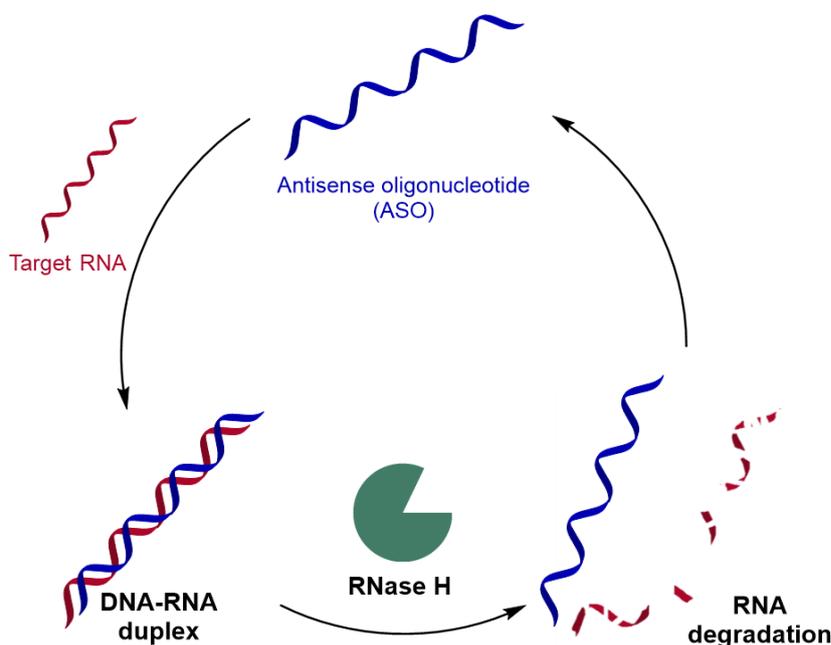


Figure 1-5. Mechanism of ASO-mediated degradation of target RNA.

もう一つの代表的な核酸医薬である siRNA は、生体内 RNA 分解機構である RNA 干渉 (RNAi) を利用している。RNAi は、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるタンパク質複合体が中心として働く、RNA サイレンシング機構で、標的の mRNA を分解する RNAi 経路と、標的の mRNA の翻訳を阻害する miRNA 経路が存在する (Figure 1-6)。¹⁴ 内因性の miRNA 二重鎖は、ゲノムからの転写物である Primary miRNA (pri-miRNA) から核内における Drosha-DGCR8 による切断、続く細胞質での Dicer による切断からなる連続した二段階の切断プロセスを経て生合成される。このような 20~30 塩基長程度の small RNA が、Argonaute (Ago) と呼ばれるタンパク質と相互作用し、続いて一本鎖の RNA (ガイド RNA 鎖) となることで RISC が形成される。その後、標的の mRNA と RISC 内のガイド RNA 鎖の配列がほぼ完全にマッチする時、標的の RNA は切断される (RNAi 経路)。一方、標的 RNA との相補性が低い場合は標的配列に結合し、切断を伴わない翻訳抑制が誘導

される (miRNA 経路)。siRNA 薬は、標的となる mRNA の配列を基に設計された siRNA 二重鎖を用いて、これらの経路を人為的に制御するものである。

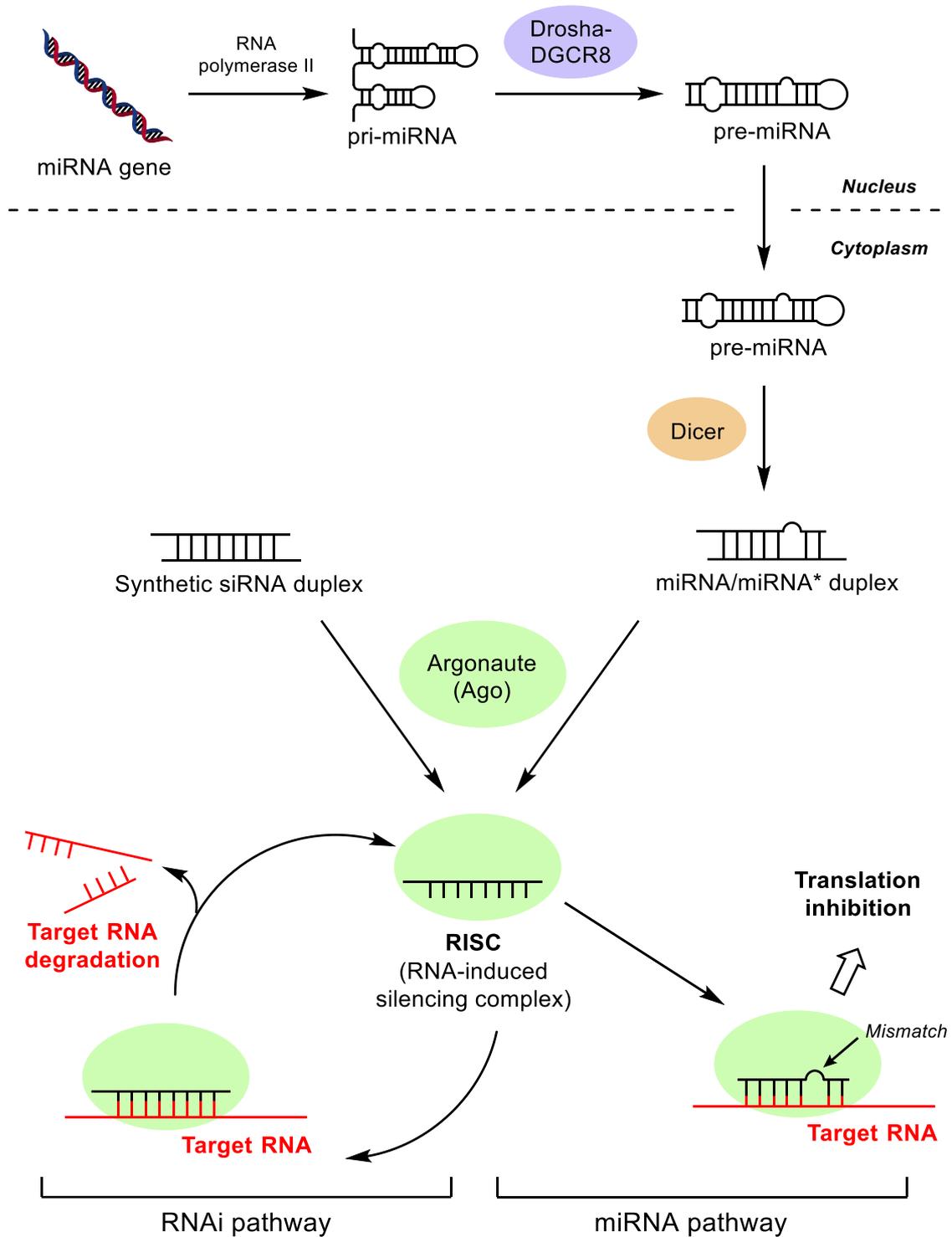


Figure 1-6. Mechanism of RNAi pathway and miRNA pathway mediated by synthetic siRNA or endogenous miRNA.

上述した ASOs や siRNA は有用ではあるが、オフターゲット作用による毒性、ヌクレアーゼに対する安定性や低い細胞膜透過性、適切なドラッグデリバリーの必要性、経口投与が困難であるといった問題点がある。¹⁵ また、オリゴヌクレオチド鎖の阻害活性は標的とする RNA の構造にも影響を受け、ヘアピン構造(Figure 1-3)のような二次構造を有する RNA 配列に対しては阻害活性が低下することが知られている。¹⁶ 最初の核酸医薬であるアンチセンス薬 Vitravene が 1998 年にアメリカで承認され、siRNA を含むいくつかの核酸医薬が既に承認されている。その多くは修飾核酸を配列に組み込む手法や、アシアロ糖タンパク質受容体に特異的に結合する糖 GalNAc とコンジュゲートする手法などを駆使することで達成されている。^{17,18} 以上のように、ASOs や siRNA などの核酸医薬の一部は、既に医薬品として利用され、強力な RNA 創薬モダリティの一つとして注目されているが、様々な課題を抱えていることが現状である。

第 2 項 低分子化合物

一般的に、低分子医薬品は代謝安定性や細胞膜透過性などの薬物動態特性が核酸医薬などの高分子と比較して優れており、経口投与の可能性も高い。¹⁹

RNA を標的とする低分子創薬研究は古くから行われており、アミノグリコシド系抗菌薬で、抗ウイルス薬でもあるネオマイシンや、オキサゾリジノン骨格を有するリネゾリドなどが知られている(Figure 1-7)。これらの化合物はリボソーム RNA に結合し、タンパク質翻訳を阻害すると考えられている。²⁰⁻²²

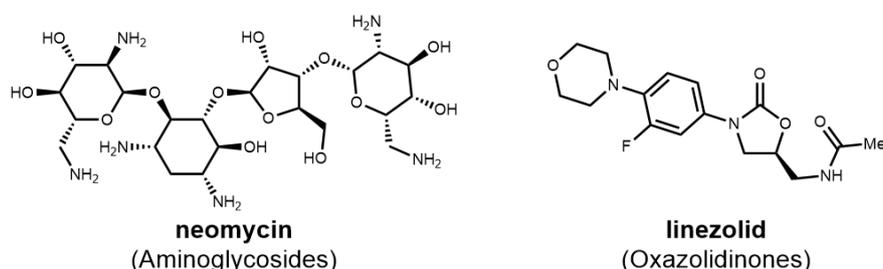


Figure 1-7. Examples of RNA-binding small molecules aminoglycosides and oxazolidinones.

RNA を標的とする低分子治療薬としては、リボスイッチと呼ばれる RNA 配列に結合するリボシル²³ や、SMV mRNA に作用するリスジプラム^{24,25} などが知られている(Figure

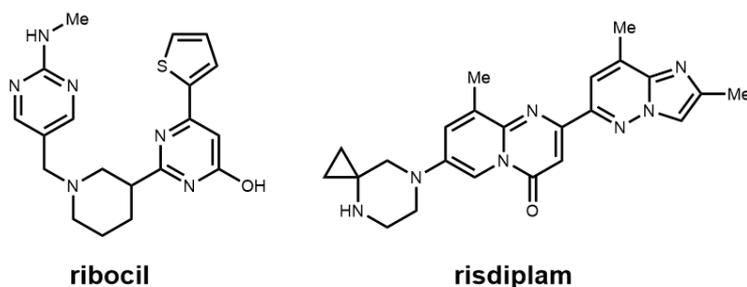


Figure 1-8. Examples of RNA-binding small molecules with drug applications.

1-8)。リスジプラムは脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy: SMA)の進行を抑制する初の経口治療薬であり、2020年にアメリカ食品医薬品局(FDA)により承認されたことで、低分子化合物によるRNA創薬研究が大きく注目される1つのきっかけとなった。

RNAを標的とする低分子化合物の探索は、様々な方法論によって行われている。代表的な手法としては、蛍光置換アッセイ²⁶⁻²⁸やマイクロアレイ法^{29,30}がある。また、Nakataniらは表面プラズモン共鳴(SPR)と合理的な分子設計により見出した核酸のG-Gミスマッチを認識するNCD(RB-1)^{31,32}がUGGAAリピートRNAに結合することで、RNA-タンパク質相互作用やRNA凝集体形成を阻害し、ショウジョウバエモデル系においてリピートRNA毒性を低減することを最近報告し、リピートRNAを標的とするRNA結合低分子創薬の可能性を示した。³³さらに、最近ではコンピューター計算を組み合わせたアプローチも試みられており、DisneyらはInfornaと呼ばれるアルゴリズムを開発し、miRNAに結合するRB-5を見出すことに成功している。³⁴⁻³⁶ごく一部ではあるが、これまでに様々な方法論によって得られたRNA結合低分子化合物の例をFigure 1-9に示した。^{28,37-39}

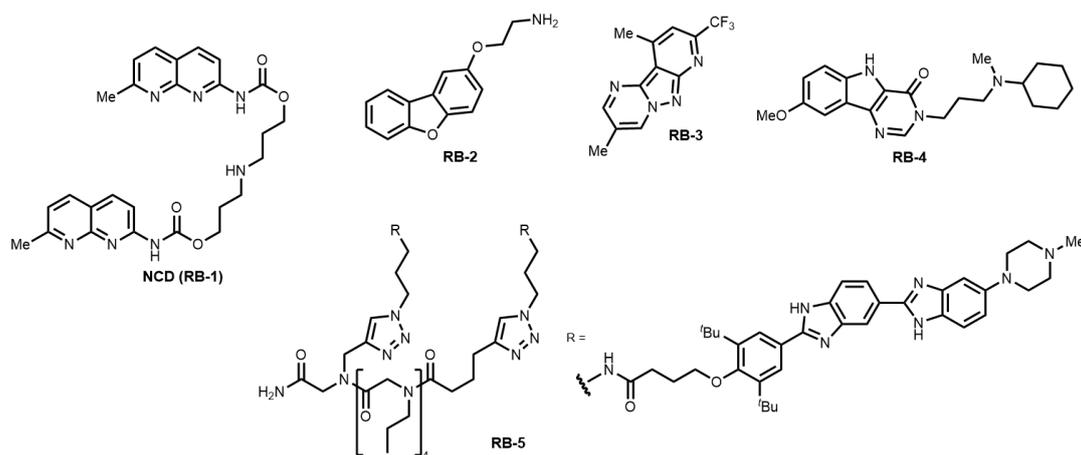


Figure 1-9. Examples of small molecule RNA-binders (RBs) discovered by various approaches.

RNA結合低分子化合物は、核酸医薬と比較して薬物動態やコストの面で優れていると言えるが、標的RNAに対する親和性や選択性において課題があると考えられる。また、標的RNAに対して可逆的に結合するため、標的RNAの総ての機能を完全に停止させることや、投与量を減らすことは難しい。最近では、RNAに対して共有結合する化合物を用いるケミカルバイオロジー研究が展開されている例もあるが、標的RNAを低分子化合物のみによって制御することは未だ困難である。⁴⁰⁻⁴²

第3項 RNA分解を誘導するキメラ化合物

標的とするRNAの分解は、標的に対して可逆的または不可逆的に相互作用する阻害剤よりも多くの利点を有している。前節で述べたRNAを標的とする低分子化合物は、標的RNAに結合し、標的RNAと他のタンパク質などの生体分子との相互作用を阻害することによって効果を示す。しかし、このような薬剤の結合は標的RNAを安定化する可能性もある。加

えて、一つの RNA が複数の生体分子と複合体を形成して機能を示す足場機能を持つ RNA も存在する。⁴³ 例えば、lncRNA の一つである HOTAIR は DNA と結合し、エピジェネティクス関連タンパク質である EZH2 や LSD1 をリクルートし、遺伝子発現機構を制御している。⁴⁴ ただし、単純に RNA に結合する従来の阻害剤のみで、このような RNA の機能を制御することは難しい。そのため、従来の阻害剤とは異なるモダリティの開発も進められている。後述するキメラ化合物による RNA 分解法は、標的 RNA を除去するため、標的 RNA の機能を完全に阻害することが可能であり、従来の RNA 結合阻害剤では標的とすることが困難であった疾患の治療にも適用できると期待されている。さらに、合成キメラ化合物の近接効果による標的の分解は、阻害剤と比較して選択性が向上することが知られている。⁴⁵ 故に、標的の RNA を選択的に分解する分子の創製は、次世代の創薬化学・ケミカルバイオロジー研究における特に重要な課題の一つと言える。

① Ribonuclease targeting chimeras (RIBOTACs)

Disney らは、RNA 結合バインダーと生体内の RNA 分解酵素 RNase L をリクルートする分子を連結させたキメラ化合物(RIBOTAC)を用いる標的 RNA 分解法を報告した(Figure 1-10)。⁴⁶ この RIBOTAC は、標的 RNA と RNA 分解活性を示す RNase L 二量体との三

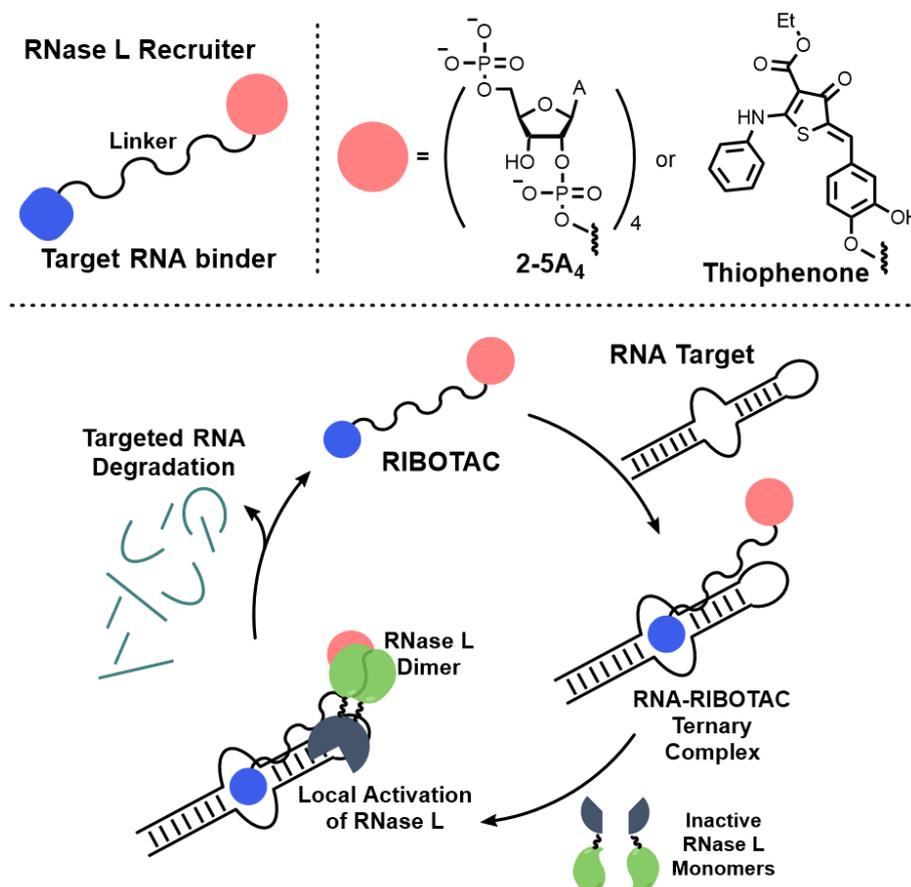


Figure 1-10. Mechanism of targeting RNA degradation via active RNase L dimer recruitment by RIBOTAC.

者複合体形成を促し、標的付近へ活性体 RNase L 二量体を局在化させることで、標的 RNA を触媒的に分解誘導すると考えられている。標的 RNA に結合するバインダー部位を組み替えることで、低酸素がん細胞に過剰発現している pre-miRNA-210 やトリプルネガティブ乳がんに関与する pre-miRNA-21 などの標的に対して適用可能であった。⁴⁷⁻⁴⁹ 本手法は、生体の自然免疫系を司る RNase L の活性化を利用している。したがって、その RNA 分解活性は核酸医薬と同様に細胞内の環境に依存することが問題点として挙げられる。RNase L は細胞質に局在しており、本手法では核内の pri-miR-17-92 のような標的に対しては適用不能であった。⁵⁰ また、RNase L の過剰な活性化は疾患に関与するという指摘もある。⁵¹

② 化学的な RNA 分解を誘導するキメラ化合物

標的 RNA の分解を化学反応によって誘導する合成キメラ化合物は、RNA 分解酵素などの生体分子とは独立して、直接的に標的 RNA を分解できる。その為、核酸医薬や RIBOTAC といった細胞内環境に依存する RNA 分解法とは異なる特色を示せるのではないかと考えられる。このような背景から、標的 RNA 分解誘導を目指したキメラ化合物の開発が現在まで行われてきた。

化学的に RNA 分解を誘導するために、遷移金属錯体や外部刺激応答化合物などによりラジカル種を発生させ、酸化的に標的 RNA を分解する方法が開発されてきた。

1988 年、Chen らは標的 RNA と相補的な配列をもつ DNA オリゴマーに対して、1,10-フェナントロリン-銅錯体をコンジュゲートしたキメラ化合物を用いることで、酸化的に標的 RNA が分解できることを報告した。しかしながら、DNA の酸化的な分解も起こり、RNA/DNA の化学選択性は低かった(Figure 1-11)。⁵²

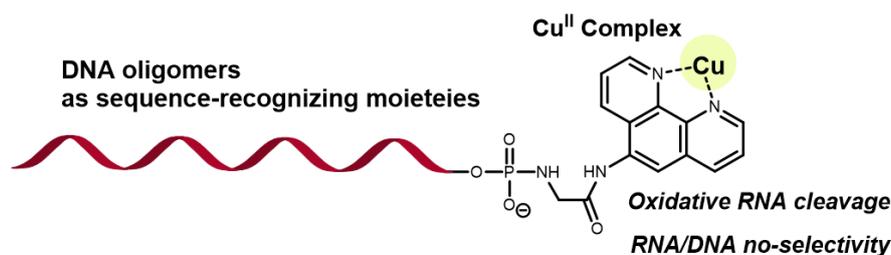


Figure 1-11. Oxidative cleavage of target RNA by Cu(II)-complex conjugated with DNA oligomer.

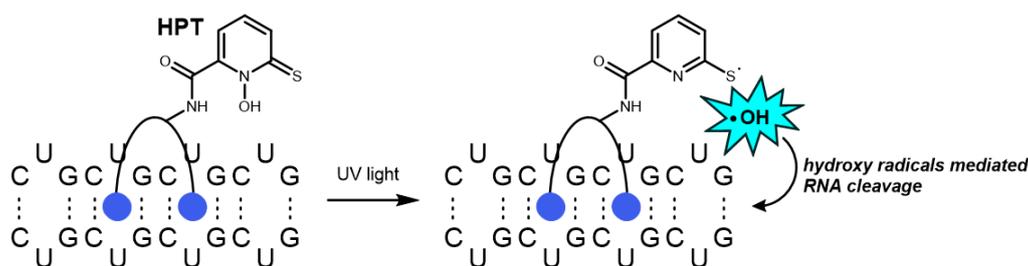


Figure 1-12. Photo-induced formation of hydroxy radical mediated target RNA degradation.

Disney らは、UV 照射下においてヒドロキシルラジカルを発生する分子 HPT を低分子 RNA バインダーに連結させたキメラ化合物による標的 CUG リpeat 配列を有する RNA の分解を報告している。⁵³ 光による外部刺激で RNA の分解が可能であるが、触媒的な作用は示さず、活性は低い (Figure 1-12)。

グリコペプチド系天然物の一つであるブレオマイシン A5 は酸素分子との反応により、ラジカル種を発生させ、DNA や RNA を酸化的に分解することが知られている。⁵⁴ ブレオマイシン A5 は、ラジカル種の発生に関わる Fe(II) を捕捉するキレート部位、膜透過に必要な糖鎖部位、そして核酸結合部位から構成される。Disney らはブレオマイシン A5 の核酸結合部位と低分子 RNA バインダーと連結させたキメラ化合物を用いた標的 RNA の酸化的分解を報告している (Figure 1-13)。^{50,55,56} しかしながら、この手法も非選択的な DNA 分解による副作用の懸念がある。

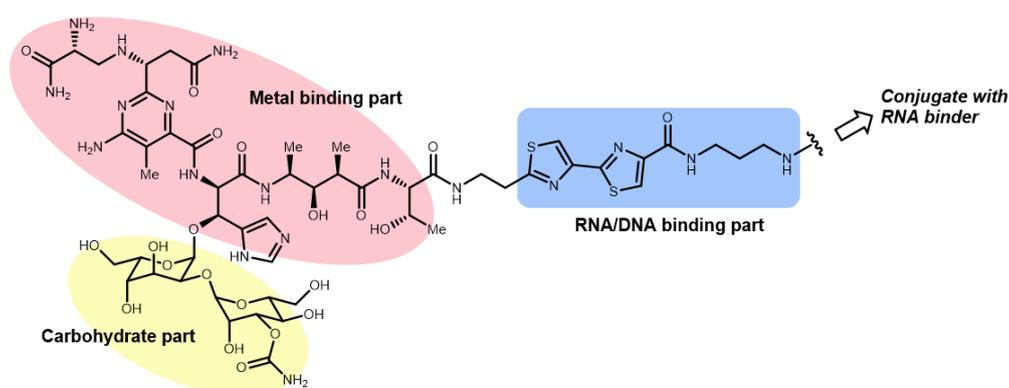


Figure 1-13. Bleomycin A5 conjugated to RNA binder.

一方、Wang らは、フェナントロリン-銅(II)錯体と低分子 RNA バインダーとのキメラ化合物を用いた標的 mRNA の分解を報告しているが、銅の細胞毒性や、酸化的に作用するため RNA/DNA の非選択的な分解が避けられない (Figure 1-14)。⁵⁷

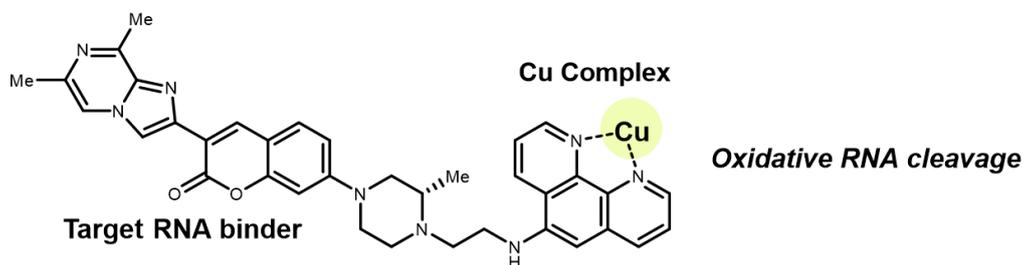


Figure 1-14. Oxidative cleavage of target RNA by Cu(II)-complex conjugated with small molecule RNA binder.

最近、Bernardes らは SARS-CoV-2 のシュードノット構造に結合する RNA バインダーと、イミダゾール基をリンカーで連結したキメラ化合物(PINAD)により、標的 RNA を分解誘導する手法を報告した。SARS-CoV-2 ウイルスを感染させたマウスモデルに対して、PINADを経鼻投与したところ、肺におけるウイルス量の減少が確認された。しかしながら、RNA 分解機構について未解明な点があり、PINAD の溶解性などの物性に課題があった (Figure 1-15)。⁵⁸ RNA 分解機構としては、レドックス活性のある金属が関与する活性酸素種(ROS)の発生による酸化的な RNA 分解機構の可能性も考えられる。

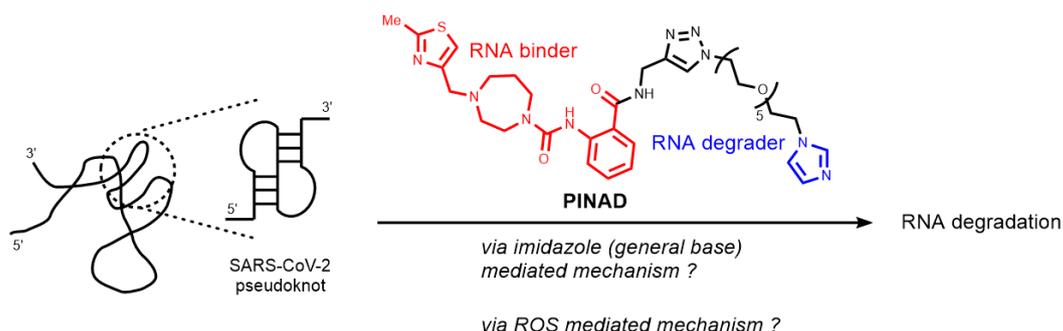


Figure 1-15. Proximity-induced nucleic acid degrader (PINAD) approach to target RNA degradation.

以上のように、標的 RNA を酸化的に分解するキメラ化合物がいくつか報告されており、良好な分解活性を示す例もあった。特に、Figure 1-13 に示したようなブレオマイシン A5 と低分子 RNA バインダーを連結させたキメラ化合物は、核内に局在するような pri-miR-17-92 cluster を選択的かつ直接的に分解した。前述したように、RNase L の活性化に依存する RIBOTAC では pri-miR-17-92 cluster への影響が観測されず、対照的な結果を与えた。⁵⁰ このような細胞内環境に依存することのない化学的な RNA 分解を誘導するキメラ化合物の開発は、RNA 創薬モダリティのさらなる拡充に貢献している。しかしながら、これらのキメラ化合物は酸化的に作用するため、非選択的な DNA の分解や毒性の高い遷移金属錯体を用いる必要がある点などの課題がある。

化学的に RNA を分解するもう一つの方法として、RNA を加水分解する金属錯体の利用が挙げられる。第4節にて後述するが、金属イオンや金属錯体によって RNA が加水分解されることは 1960 年ごろから知られていた。RNA の加水分解ではリボースの 2'位のヒドロキシ基が重要であり、リン酸エステル結合が開裂することで RNA の分解が起こるため、酸化的な RNA 分解では困難であった RNA/DNA の化学選択性を示すことが期待できる。

Komiyama らは、RNA を加水分解する二核亜鉛(II)錯体と DNA オリゴマーとのキメラ化合物を報告している (Figure 1-16)。⁵⁹ このキメラ化合物は、標的 RNA を良好な位置選択性で切断することができたが、過剰量のキメラ化合物を使う必要があり、RNA 分解に対す

る活性の低さが課題であった。また、これらのキメラ化合物は DNA オリゴマーを標的 RNA 認識部位として用いているため、実用化には核酸医薬品と同様の課題がある。この例の他にも、単核ランタノイド錯体や単核銅錯体と DNA オリゴマーとのキメラ化合物が開発されているが、それらの RNA 分解活性は低かった。^{60,61}

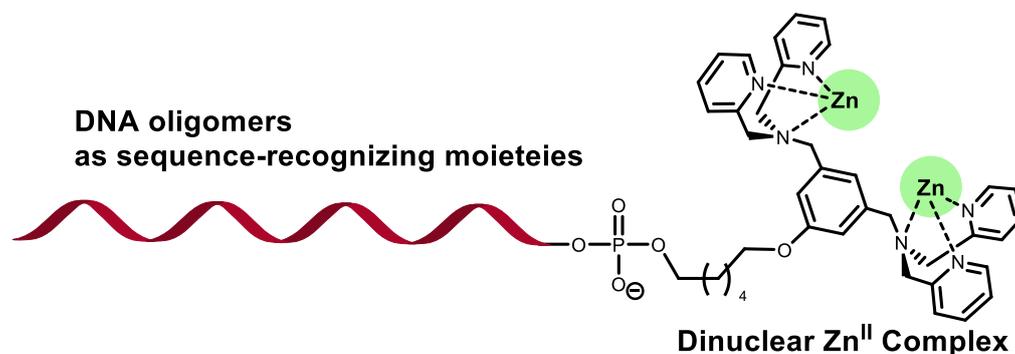


Figure 1-16. Hydrolysis of target RNA by dinuclear Zn(II)-complex conjugated to DNA oligomer.

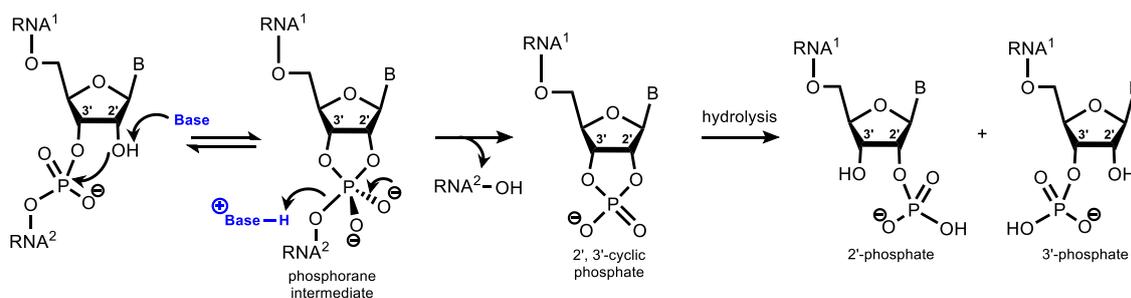
このように、RNA を加水分解する金属錯体の利用は DNA への非選択的な分解を回避できる可能性があり、細胞内環境に依存することなく RNA を分解できることが期待できる。しかし、加水分解型の金属錯体の RNA 分解活性は未だ十分とは言えず、RNA 分解酵素に匹敵するような活性を有する金属錯体型 RNA 分解誘導剤の開発が求められている。また、加水分解型金属錯体の RNA/DNA の化学選択性も十分に示されていないのが現状である。第 4 節では、RNA を加水分解する金属イオンや金属錯体に関する先駆的な研究例や現状について議論する。

第4節 RNAの化学的な分解へ向けたモデル研究

第2節でも述べたようにRNAはヌクレオチドを基本単位とし、それらをリン酸ジエステル結合で連結させた生体高分子である。この生命活動を支える高分子の土台となるリン酸ジエステル結合は強力な結合である。DNAのpH 6.8, 25 °Cにおける半減期は約3000万年⁶²、さらにRNAのpH 6, 25 °Cにおける半減期は約4年⁶³であるように、リン酸ジエステル結合は一定の条件下では特に安定な結合で、化学的な開裂は難しいと予想できる。

化学的なRNAの分解反応は、リボース環の2'-ヒドロキシ基の活性化が鍵である(Scheme 1-1)。例えば、ブレンステッド塩基(Base)によって活性化された2'-ヒドロキシ基がリン原子に求核攻撃することによって、五員環ホスホラン中間体が生成する。この中間体からアルコキシドが脱離し、2',3'-環状リン酸エステルを与える。さらに、この2',3'-環状リン酸エステルは加水分解され、2'-または3'-リン酸エステルが生成する。⁶⁴⁻⁶⁷

Scheme 1-1. Cleavage of RNA via general base-catalyzed intramolecular transesterification and hydrolysis.



第1項 金属イオンによるRNAをはじめとするリン酸エステル類の分解

Cu²⁺、Zn²⁺やPb²⁺などの二価金属イオン⁶⁸⁻⁷⁶やLa³⁺やEu³⁺をはじめとするランタノイドイオン⁷⁷⁻⁷⁹により、RNAなどのリン酸エステル類の加水分解が促進されることはよく知られている。ブレンステッド酸/塩基によるRNAの分解(Scheme 1-1)とは異なり、金属イオンが関与する反応では、金属イオンと基質の複合体形成による活性化が反応促進の鍵となる。活性中心となる金属イオンがルイス酸として機能するだけでなく、その近傍において様々な活性化が相乗的に作用することで、リン酸エステル類の加水分解が加速される。例えば、Figure 1-17のような活性化が働いていることが示唆されている。(I) リン酸エステルの酸素が金属に配位することによって、ホスホリル基の求電子性が向上する。(II) 金属に配位したヒドロキシド種がブレンステッド塩基として働くことで、2'-ヒドロキシ基を活性化する。(III) 脱離するアルコキシ基を活性化する。(IV) 金属に配位した水分子がブレンステッド酸として作用することで、アルコキシ基の脱離を促進する。このように金属イオンとそれに配位した水分子が触媒的に作用することによって、反応の活性化が起こる。その結果、金属イオン非存在下と比較して、高い効率でリン酸エステル類の分解が起こる。^{80,81}

このように RNA を化学的に分解するためには、RNA の相乗的な活性化を可能にする RNA 分解誘導剤の精密な分子設計が必要となる。

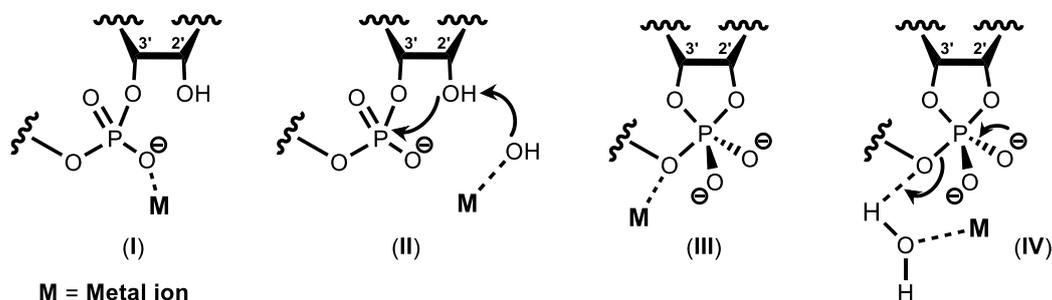
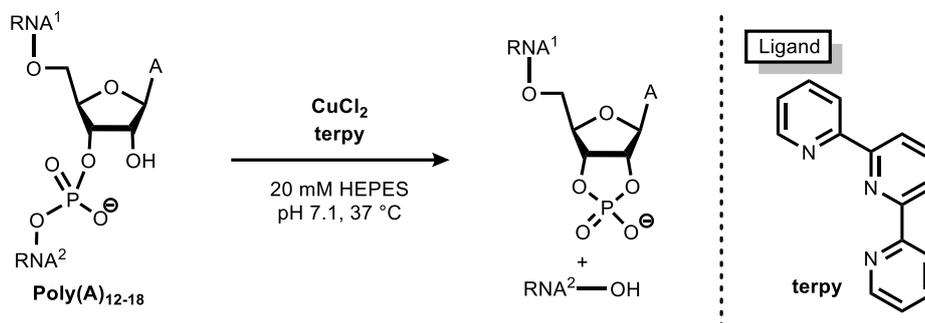


Figure 1-17. Metal ion promoted cleavage of RNA phosphodiester bonds.

第2項 金属錯体を用いる RNA や RNA モデルの分解

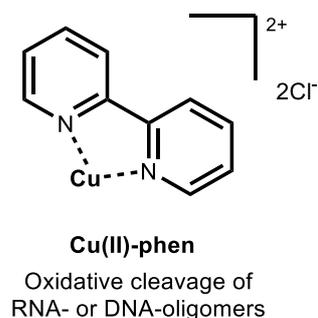
1990 年に Stern らによって、単核錯体による RNA オリゴマー基質の加水分解的な開裂反応が初めて報告された(Scheme 1-2)。⁷⁰

Scheme 1-2. First example of metal complex-catalyzed RNA-oligomer degradation.



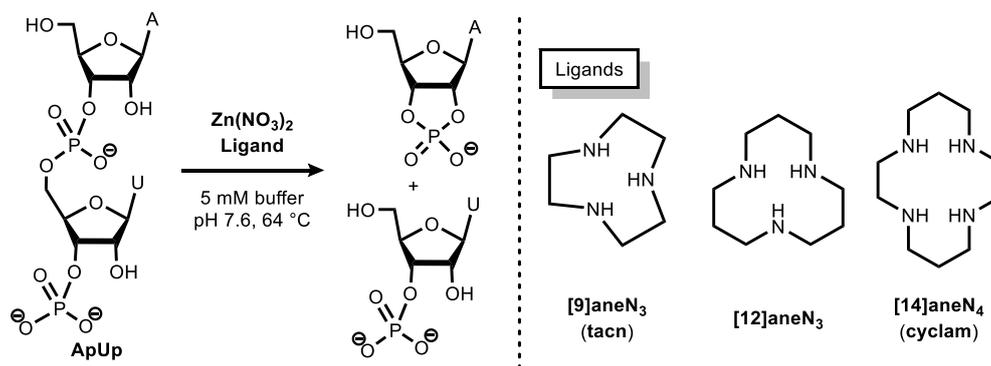
Cu(II)、Ni(II)や Zn(II)の単核錯体を検討したところ、Cu(II)-terpy 錯体が良好な分解活性を示した。また、同様の反応条件下において、DNA オリゴマー基質に対して、Cu(II)-terpy 錯体を作用させても、基質の分解は観測されなかったことから、この錯体は基質を酸化的に分解するのではなく、Figure 1-17 のような活性化を介した加水分解型の機構(Scheme 1-1)で RNA を分解したと考えられる。

一方、右に示したような Cu(II)-phen 錯体やその誘導体は、酸素分子との反応で過酸化物を発生し、Scheme 1-2 と同様の条件下で酸化的に RNA や DNA オリゴマー基質を分解することが報告されている。^{52,82} 即ち、酸化的に作用する金属錯体を用いると RNA と DNA の分解に対する化学選択性を示すのは困難になるといえる。



より単純な構造の RNA モデル化合物を用いた活性評価は、簡便な解析が可能で、さらに RNA 分解の詳細なメカニズムなどを理解する上で有用である。^{83,84} [9]aneN₃ や [12]aneN₃ といった環状ポリアミン系配位子を有する単核亜鉛(II)錯体による RNA モデル化合物 ApUp の分解活性評価が Morrow らによって最初に報告された(Scheme 1-3)。⁸⁵ この条件下においては、配位子を共存させずに金属塩 Zn(NO₃)₂ のみを作用させた方が、配位子 [9]aneN₃ との錯体と比較して、反応初速度が 2 倍ほど大きかった。しかしながら、金属塩のみを作用させると基質 ApUp や、その分解物との錯形成による沈殿物の生成が確認された。このように配位子を共存させずに、金属塩のみを用いると、触媒の失活や再現性といった問題にしばしば直面する。⁶⁶ さらに金属に 4 座配位する配位子 [14]aneN₄ を用いると、[9]aneN₃ などの 3 座配位する配位子との錯体と比較して触媒活性が 10 倍ほど低下した。これは配位数が増加したことによる中心金属のルイス酸性の低下や、RNA のリン酸エステル基と配位可能な部位がアミン配位子によって占められているためと考えられる。このように配位子との錯体形成は、金属触媒の安定性向上と引き換えに、ルイス酸性の低下や金属中心周囲の空間的な要因による触媒活性の低下が起こる。

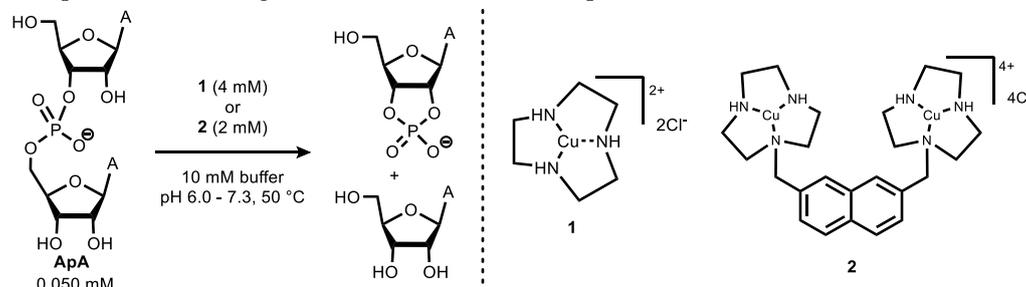
Scheme 1 -3. Examples of Zn(II)-complexes with cyclic-polyamine-type ligands for simple RNA model cleavage.



上述のように、RNA をはじめとするリン酸エステル類の金属錯体による分解は、金属のルイス酸性、基質の認識や、ブレンステッド酸・塩基として働く金属中心に配位した水分子など複数の作用が協奏的に働くことによって促進される。このような活性化を、金属中心を 1 つしか持たない単核錯体で行うのは困難であることが想像できる。一方、多くのホスファターゼなどの加水分解酵素は、活性中心に 2 つもしくは 3 つの金属イオンを有しており、それらが相乗的に働くことで効率的に基質を加水分解する。⁸⁶⁻⁸⁹ 金属錯体による RNA の分解においても、二核錯体などの複核錯体とすることで単核錯体よりも遥かに高い活性を示すことが明らかとなっている。Chin らは、2 つの [9]aneN₃ をナフタレンでつないだ配位子から二核銅(II)錯体 **2** を合成し、RNA モデル化合物 ApA の分解について報告している (Scheme 1-4)。⁹⁰ 二核錯体 **2** の活性は、単核錯体 **1** と比較して約 500 倍も高かった。同様に環状ポリアミンを適切なリンカーでつないだ配位子を用いた複核錯体による RNA や RNA モデル

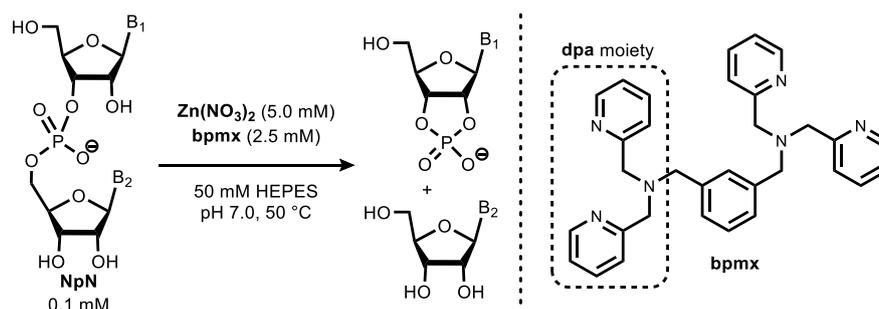
化合物の分解反応が多数報告されている。⁹¹⁻⁹⁸

Scheme 1-4. Comparison of the activities of mononuclear complex **1** and dinuclear complex **2** on the degradation of RNA model ApA.



ピリジン環を有する dipicolylamine (**dpa**)も銅や亜鉛などとよく配位し、さらに合成も容易であるという観点から優れた配位子であると考えている。この **dpa** を基にした配位子との複核錯体による RNA モデル化合物の分解についてもいくつか報告されている。⁹⁹⁻¹⁰⁴

Scheme 1-5. Dinuclear complex with **dpa**-based ligand **bpmx** mediated RNA model cleavage.



Komiyama らは、2つの **dpa** 部位を有する配位子 **bpmx** との二核亜鉛(II)錯体が RNA モデル化合物ジヌクレオチド **NpN** を効率的に分解することを報告している(Scheme 1-5)。⁹⁹ さらに、pH-反応速度解析や電位差滴定分析などの結果から、Figure 1-18 に示すような活性種の関与が示唆された。すなわち、錯体中の2つの亜鉛を架橋する μ -ヒドロキソ種が

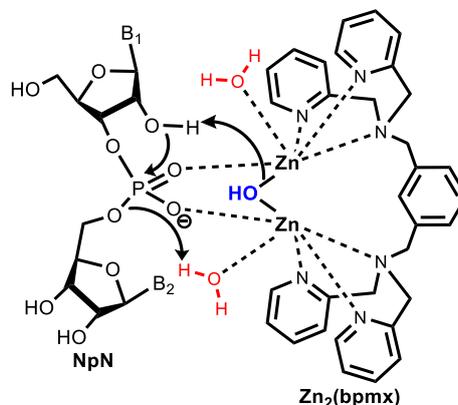
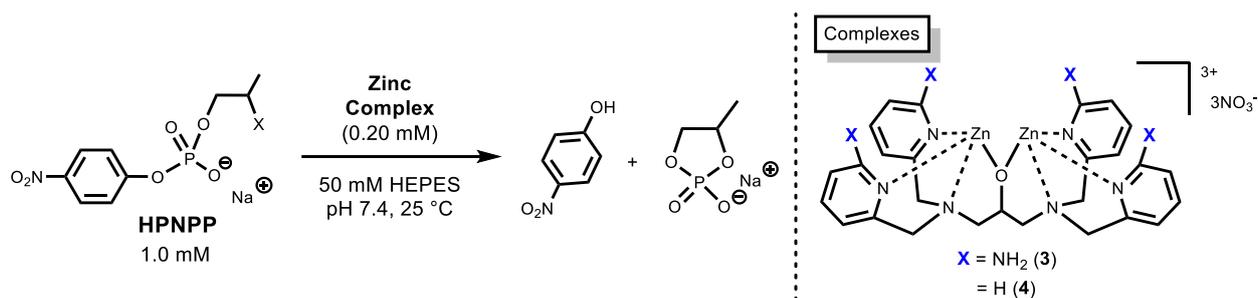


Figure 1-18. Proposed mechanism for cleavage of RNA model **NpN** by **Zn₂(bpmx)**.

ブレンステッド塩基として働き、リボースの2'位のヒドロキシ基を活性化し、ホスホラン中間体の生成を促進する。また、金属に配位した水分子がブレンステッド酸として作用することでアルコキシドの脱離を促進し、RNAの分解を加速させる。このようにRNAを効率的に分解するためには、金属中心近傍にOH種とH₂O種が同時に存在することが必要と考えられる。これは、配位数の小さい金属種からなる単核錯体で制御するのは難しく、良い活性を示すためには錯体の複核化が有効であることが分かる。

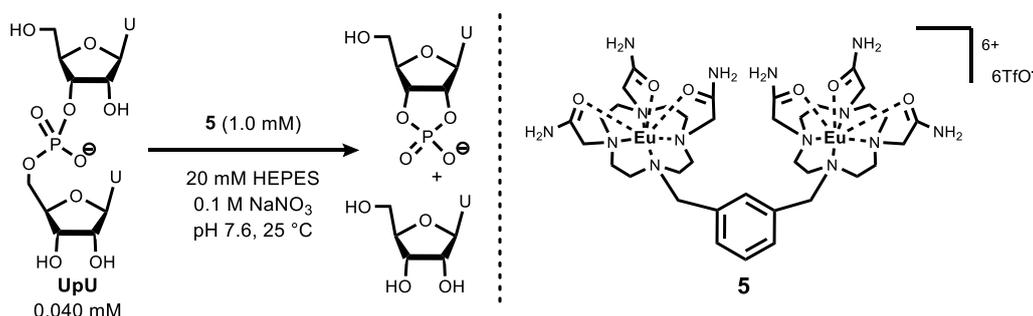
Williamsらは、ピリジン環の6位にアミノ基を導入したdpa型配位子との二核亜鉛(II)錯体によるRNAモデル化合物HPNPPの分解を報告している(Scheme 1-6)。錯体**3**はアミノ基を持たない錯体**4**と比較して、活性が1000倍も高かった。導入したアミノ基が水素結合ドナーとして、基質と相互作用するため活性の向上が見られたと考えられる。^{105,106} 現在までのところ、錯体**3**はRNAモデル化合物を分解する二核金属錯体としては最も活性が高い。さらに、錯体**3**はジヌクレオチドUpUのような基質も効率的に分解できる。^{106,107}

Scheme 1-6. Efficient degradation of RNA model HPNPP by dinuclear Zn(II)-complex with hydrogen bond donor-functionalized dpa-based ligand.



また、同時期に二核ユウロピウム(III)錯体**5**によるジヌクレオチドUpUの効率的な分解もMorrowらによって報告され、錯体**3**と近い活性を示した(Scheme 1-7)。¹⁰⁸

Scheme 1-7. Dinuclear Eu(III)-complex **5** mediated cleavage of RNA model UpU.



これまで、生物無機化学者や錯体化学者が中心となって、金属イオンや金属錯体による化学的なRNAの分解に関する研究が行われてきた。Figure 1-16は、金属錯体を用いた標的RNA分解へ向けた先駆的な試みであるが、RNA分解活性の低さやオリゴ核酸を用いる必要があるといった課題があった。

第5節 本研究の概要

現在までの低分子創薬研究は、タンパク質を標的とするものがほとんどであったが、その標的となるタンパク質は枯渇している。一方で、ヒトゲノムの大部分を占める領域から転写される ncRNA は遺伝子発現機構を制御し、様々な病気に関与することが明らかとなってきた。このような背景から、RNA を標的とする創薬・ケミカルバイオロジー研究は、特に注目されている領域の一つである。核酸医薬は代表的な RNA 創薬モダリティであり、既に医薬品として利用されている例もあるが、生体内での不安定性、低い膜透過性、経口投与の可能性が極めて低いなどの課題が大きな障壁となっている。有機合成化学・スクリーニング法などの発展によって、RNA に結合する低分子化合物も次々と見つかり、2020 年には RNA に結合する経口投与可能な治療薬が承認された。このことを契機に、RNA を標的とする低分子化合物の可能性が開かれ、様々な標的に対する RNA 結合低分子化合物が報告されているが、治療薬として実用化されている例は未だ限られている。現在、RNA 低分子創薬研究は、まだ黎明期の段階にあると考えている。

最近、標的 RNA を選択的に分解する手法の一つである RIBOTACs が報告され、合成分子によって標的 RNA を分解するモダリティが注目を集めている。この手法は標的に対して触媒的に作用するため、従来の RNA 結合低分子化合物と比較して、投与量の低減が期待できる。また、核酸医薬に対して、RIBOTACs は低分子化合物に近い薬物動態を有することが期待されるが、その RNA 分解活性は核酸医薬と同様に細胞内環境に依存することが問題点として挙げられる。

このような背景から、筆者は標的 RNA を化学的に分解する低分子型 RNA 分解誘導剤を新たなモダリティとして提案した(Figure 1-19)。このキメラ分子は、RNA を化学的に分解する RNA 分解部位(RNA degradation inducer)、標的の RNA に対して結合する RNA バインダー部位、そして、それらをつなぐリンカー部位の3つの部位から構成される。本手法の開発には、1つ目のステップとして、RNA 分解部位として有力な候補分子を見出す必要がある。見出した RNA 分解分子候補と、種々の RNA バインダーとを組み合わせることで、様々な標的に対して適用可能であることが期待できる。このように本手法が開発されれば、標的 RNA に分子自身が直接的に作用し、従来の方法論では治療が困難であった疾患に対して、化学的にアプローチできる次世代型医薬品の開発への期待が高まる。したがって、低分子型 RNA 分解誘導剤の開発は、学術・産業の両方において意義がある。

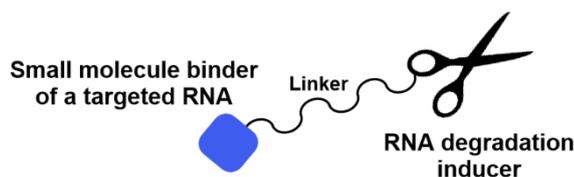
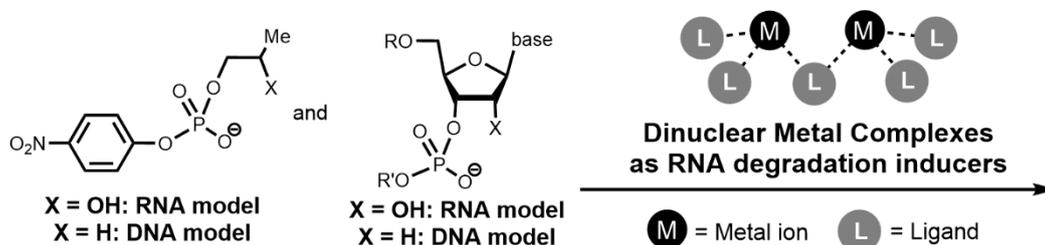


Figure 1-19. RNA degradation-targeting chimeras which consist of an RNA degradation inducer and a small molecule RNA binder.

筆者は、低分子型 RNA 分解誘導剤の開発において、RNA を構成するリン酸ジエステル結合を加水分解する金属錯体に着目した。しかしながら、第 1 章 3, 4 節に示したように既存する金属錯体型の RNA 分解誘導剤は、RNA 分解に対する活性が不十分であること、生理的条件下における錯体としての安定性、毒性のある金属を用いていること、生理的条件下とは程遠いような反応条件を要するといった障壁があり、創薬・ケミカルバイオロジー研究への応用がほとんど試みられていない。

そこで本研究において、既存の金属錯体型 RNA 分解誘導剤とは異なる革新的な分子の開発を目指した。具体的には、生体内における金属依存型の RNA 分解酵素 RNase H や Ribozyme の RNA 分解機構と、金属イオンのルイス酸性などの特性に着目し、二核金属錯体を設計・合成を行った。合成した二核金属錯体の RNA 分解活性について、2 つのタイプの核酸モデル基質を用いた評価を行ったところ、生理的条件下で、高い RNA 分解活性および RNA/DNA 選択性を示す新規二核ビスマス(III)錯体を見出した(Scheme 1-8)。さらに、RNA 分解活性について、ランタノイドや遷移金属イオンと比較したところ、ビスマスイオンの RNA 分解に対する特異性を見出した。また、単結晶 X 線構造解析や速度論解析による二核ビスマス錯体の RNA 分解機構の考察も試みた。

Scheme 1-8. This work: Development of novel dinuclear metal complexes as RNA degradation inducers.



第2章 二核ビスマス(III)錯体型 RNA 分解分子の創製と活性評価

第1節 RNA 分解酵素と RNA 分解分子の設計

第1章4節で述べてきたように、RNA または RNA モデル基質を加水分解する金属錯体が報告されてきた。RNA 分解は単核錯体と比較して二核錯体の方がより高い効率を示した。^{90,98,99,102,104,108,109} これは、RNA 分解に金属によるリン酸ジエステルの活性化、ブレンステッド酸・塩基として作用する水分子を活性中心に近接させる協奏的な作用が必要で、それらの作用が可能な複数の金属中心の存在が重要であるためである (Figure 1-17)。また、Williams らは二核亜鉛錯体の第二配位圏に、リン酸ジエステルを認識するアミノ基を導入することによって、効率的な RNA 分解を達成した (Scheme 1-6)。¹⁰⁶ しかしながら、既存の金属錯体の RNA 分解活性は十分とは言えず、銅などのレドックス活性のある遷移金属や、カドミウム・水銀・鉛などの毒性の高い金属を用いている例もあり、創薬・ケミカルバイオロジー研究への応用・社会実装化の段階にはほど遠い。^{65,66,110-117}

本研究において、筆者は合理的な分子設計に基づいた革新的な RNA 分解分子を開発するために、種々の金属依存 RNA 分解酵素の活性中心における触媒機構に着目し、それらの RNA 分解機構を基に分子設計を行うこととした。生体内の RNA 分解酵素の一つであるリボヌクレアーゼ H (RNase H) は、RNA-DNA ハイブリッド基質中の RNA を加水分解的に切断する。この RNase H には、アスパラギン酸 (D) とグルタミン酸 (E) 残基からなる保存された配列モチーフ (DEDD モチーフ) からなる活性中心が存在し、触媒活性に重要な役割を担うマグネシウムイオンやマンガンイオンといった2価金属イオンと配位している。¹¹⁸⁻¹²⁰ RNase H が触媒する RNA 分解は、実験的および理論的な知見に基づいた次のような機構が広く支持されている。活性中心の2つの2価金属イオンがリン酸ジエステルと相互作用し、リン酸エステルの求電子性の向上および、ヒドロキシドイオンの付加により生じる遷移状態の安定化が起こる。さらに配位したヒドロキシドイオンによるリン酸ジエステルへの求核攻撃および水分子による脱離基の活性化が関与することでリン酸ジエステル結合が切断され、3'-ヒドロキシ基と5'-リン酸残基を残した生成物を与える (Figure 2-1)。¹²¹ 最近

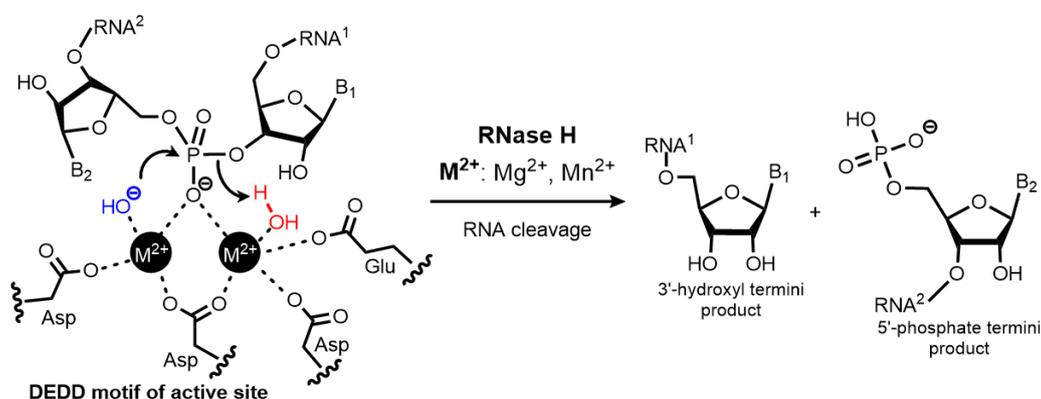


Figure 2-1. Proposed mechanism of RNA cleavage in the active site of RNase H.

の計算化学的な研究によると、活性中心付近のアニオン性アミノ酸残基がブレンステッド酸・塩基として作用し、水分子を介するプロトン移動機構にも関与していることが示唆されている。¹²²

さらに、RNA 触媒であるハンマーヘッド型 Ribozyme¹²³ やピストル Ribozyme¹²⁴ における RNA 分解は、ルイス酸として働く 2つのマグネシウムイオンを中心に、マグネシウムイオンに配位した水分子を介する機構で進行し、2', 3'-環状リン酸生成物と 5'-ヒドロキシ基生成物が生じる。ハンマーヘッド型 Ribozyme とピストル Ribozyme の RNA 分解機構は 2つのマグネシウムイオンと配位した水分子が関与することが共通しているが、5'-ヒドロキシ基生成物が生成するメカニズムが異なる。ハンマーヘッド型 Ribozyme では、水分子を介するプロトン移動ではなく、マグネシウムイオンが直接 5'-OH の酸素原子に配位することで脱離を促進している (Figure 2-2, A)。¹²⁵⁻¹²⁹ 一方、ピストル Ribozyme ではマグネシウムイオンに配位した水分子がブレンステッド酸として作用することで、脱離を加速している (Figure 2-2, B)。^{130,131}

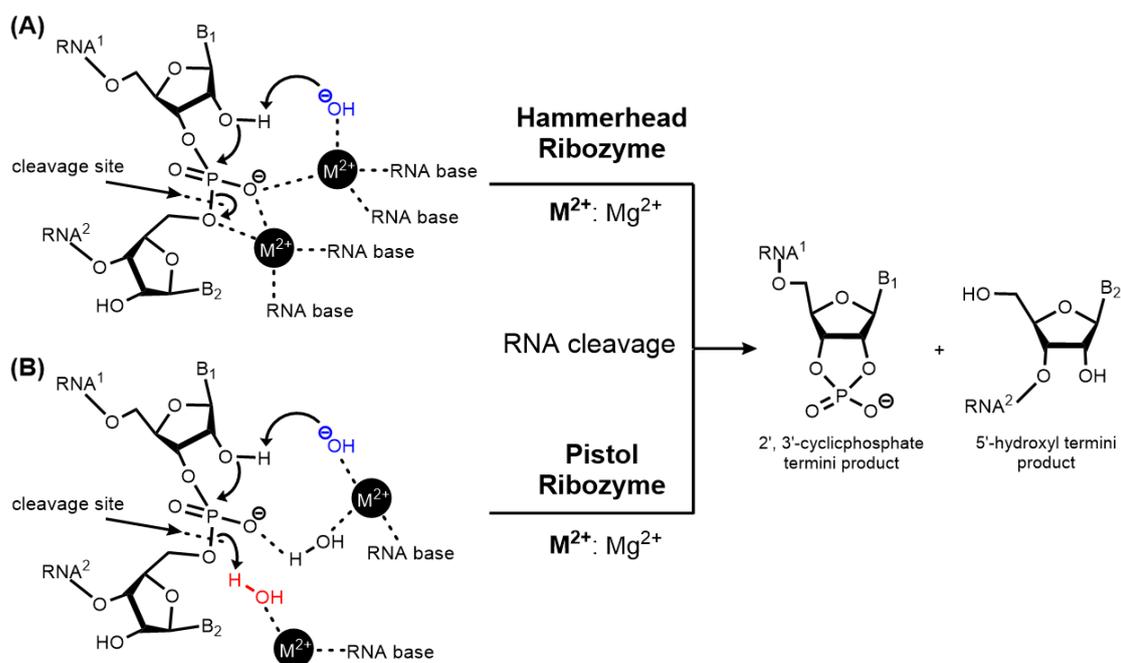


Figure 2-2. (A) Proposed mechanism of RNA cleavage in the active site of hammerhead ribozyme. (B) Proposed mechanism of RNA cleavage in the active site of pistol ribozyme.

上述した RNA 分解酵素は共通して活性中心に 2 価の金属イオンを 2 つ有しており、ルイス酸として作用する金属中心と、金属に配位する水分子が関与している。このような RNA の活性化が重要であることは、金属錯体を用いた基礎的な研究 (第 1 章 4 節) から得られた知見とも一致している。

そこで、RNA 分解酵素の触媒機構から着想を得た二核金属錯体を新たにデザインすることとした (Figure 2-3)。その際、キメラ化合物への応用を考慮し、対称性が高く、2つの金属中心を保持するための架橋部位を導入した配位子が望ましいと考えた。2つの金属を架橋する配位子として、フェノール架橋配位子が挙げられる。この基本骨格となるフェノール架橋配位子のオルト、パラ位は化学変換可能であり、配位子のチューニングも容易に行うことができる。Figure 2-3 の L や X に相当する部位にピリジンなどを導入した配位子はよく知られた配位子であり、錯形成によって二核構造をとると、他の分子と相互作用可能な空間 (open site) ができる。また、金属イオンを強く捕捉することができるカルボキシレート基のようなアニオン性部位を導入も検討した。このようなアニオン性配位子は電子供与による中心金属のカチオン性の低下を引き起こすため、中心金属は高いルイス酸性を有する必要がある。加えて、リン酸ジエステルと複数の水分子を活性化するため、高配位状態がとれ、配位子交換が速いといった特性を有する金属が適しているのではないかと考えられる。実際には、RNA モデル基質を用いた金属スクリーニングにより、金属中心の活性評価を行った (第 2 章 2 節)。

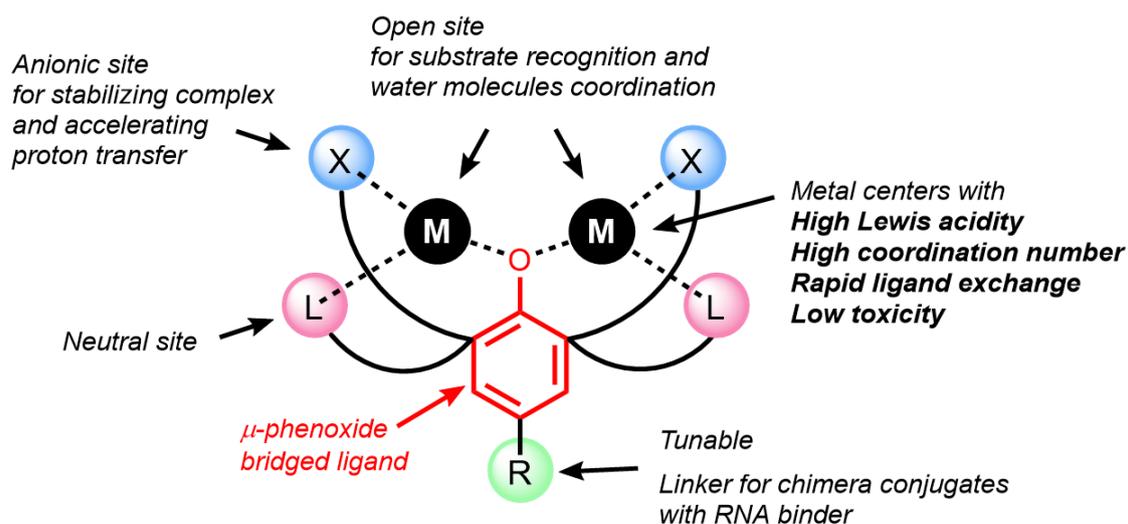


Figure 2-3. Design of dinuclear metal complexes as RNA degradation inducers.

第2節 RNAモデル基質及びDNAモデル基質の設計・合成

RNA分解分子候補のスクリーニングを迅速に行うために、モデル基質を用いた評価系を立ち上げることとした。RNAモデル基質としてよく用いられている2-hydroxypropyl-4-nitrophenyl phosphate (HPNPP)は、RNA分解分子が作用すると分子内環化を経て、リン酸ジエステル結合が開裂し、発色剤である*p*-nitrophenol (PNP)が生成する。この時の紫外-可視光の吸収変化を観測することで、容易に活性評価を行うことができる。¹³²そして、DNAの部分構造を模倣した2位にヒドロキシ基を持たないDNAモデル基質をネガティブコントロールとした(Figure 2-4)。具体的には、96ウェルプレート上で反応を行い、プレートリーダーを用いて、415 nm付近の可視光吸収変化をモニタリングした。尚、HPNPPの合成については既知法を参考に行った。^{132,133} HPNPPとDNAモデル基質は入手容易な出発物質から合成し、それぞれの合成スキームをScheme 2-1に示した。

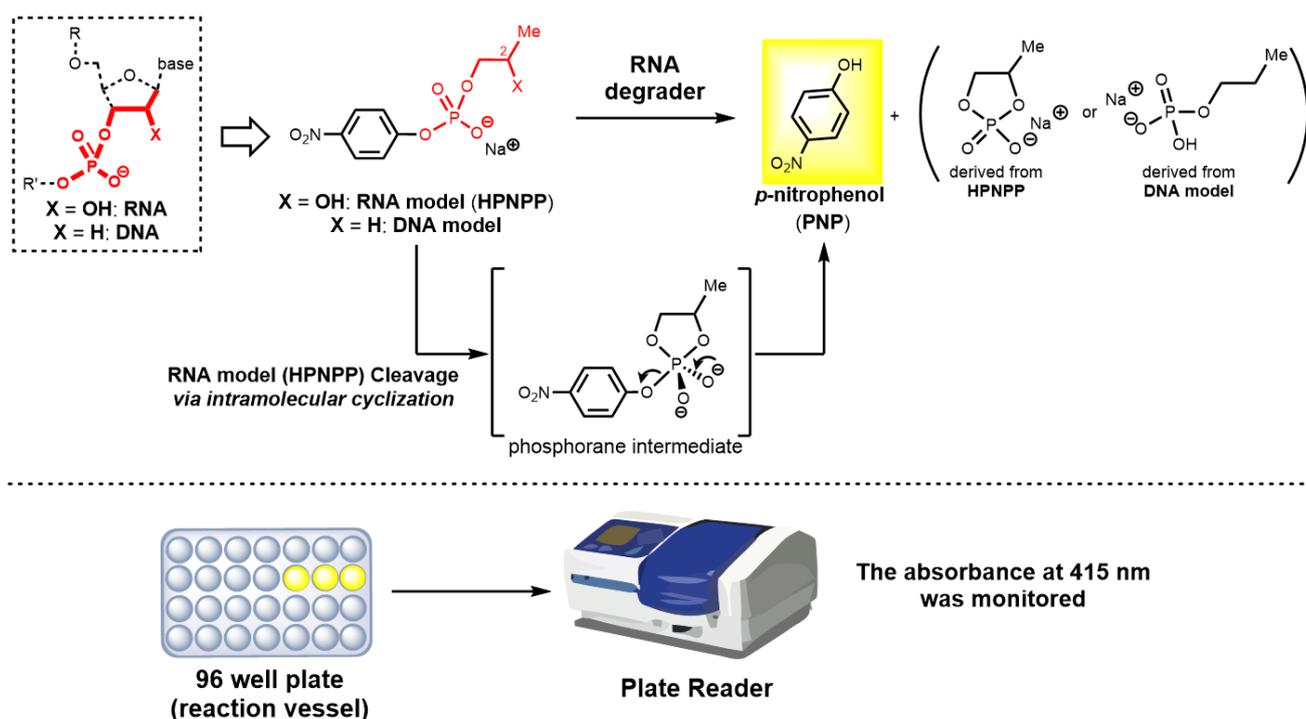
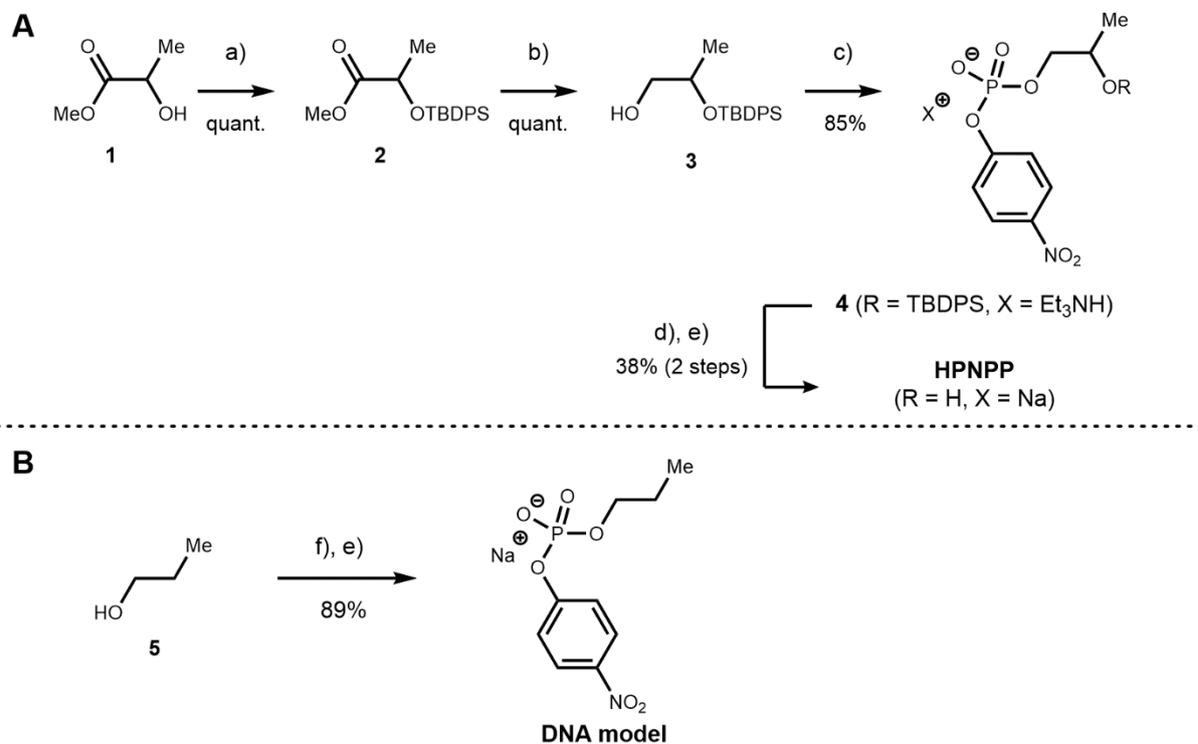


Figure 2-4. Design of the evaluation system on RNA and DNA model degradation.

Scheme 2-1. Synthetic route of RNA model **HPNPP** (A) and **DNA model** (B).

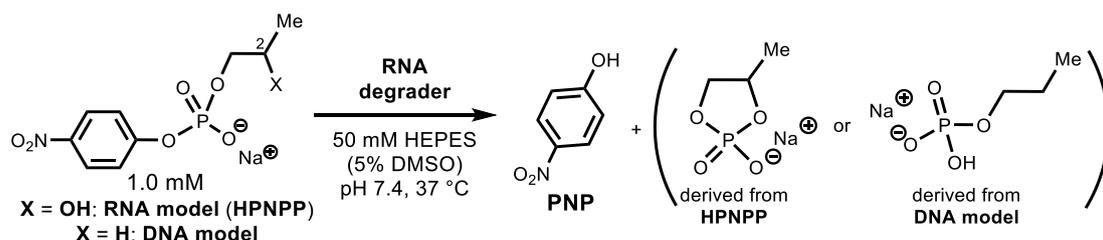


a) TBDPSCI (1.1 eq.), imidazole (1.5 eq.), DCM, 0 °C to r.t.; b) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (2.0 eq.), THF, reflux; c) *p*-nitrophenyl phosphorodichloridate (1.2 eq.), TEA (1.0 eq.), THF, r.t.; d) TEA·3HF (10 eq.), neat, r.t.; e) DOWEX; f) *p*-nitrophenyl phosphorodichloridate (1.0 eq.), pyridine (1.0 eq.), Et_2O , 0 °C, then pyridine (1.0 eq.), H_2O .

第3節 金属イオンのスクリーニング

初期検討として、RNA 分解活性に最も重要である中心金属のスクリーニングを行った。RNA モデル基質 HPNPP に対して、種々の金属イオンを作用させたときの分解速度を評価した。ネガティブコントロールの DNA モデル基質に対しても同様の条件で、評価を行った (Scheme 2-2)。

Scheme 2-2. Screening of metal ions (RNA degraders) by evaluation systems using RNA model HPNPP and DNA model.



RNA モデル基質 HPNPP に対する活性評価の結果を Figure 2-5 に示す。まず、既知の配位子 **L1**¹³⁴ と塩化亜鉛(II)から調製した二核金属錯体 **Zn₂(L1)**を作用させたところ、再現性良く分解活性を示すことが分かった。RNA 分解酵素の一つである RNase H の活性中心にみられるマグネシウム(II)イオンやマンガン(II)イオンを検討したが、マグネシウム(II)イオンのみではほとんど分解活性を示さず、マンガン(II)イオンでも分解活性は低かった。また、銅(II)イオンと比較して、亜鉛(II)イオンは良い分解活性を示した。そこで、強いルイス酸性によるリン酸エステルの活性化が期待できるビスマス(III)イオンを作用させたところ HPNPP の分解が速やかに進行した。ビスマス塩は医薬品への応用例¹³⁵⁻¹³⁸もあり、低コストで、重元素でありながら毒性が低いこと¹³⁹を特徴としており、特に興味深い元素の一つである。

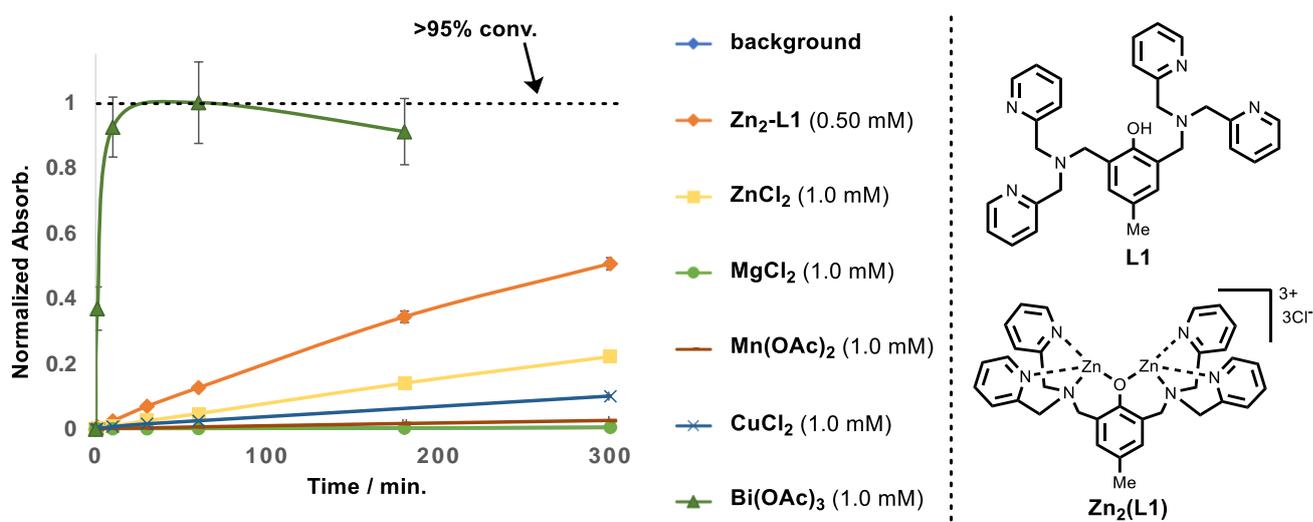


Figure 2-5. Degradation of HPNPP catalyzed by various metal ions or Zn(II)-complex **Zn₂(L1)**.

一方で、DNA モデル基質に対して同様の条件下で金属錯体や金属イオンを作用させても、DNA モデル基質の時間依存的な分解は観測されず、RNA/DNA の化学選択性が示唆された (Figure 2-6)。

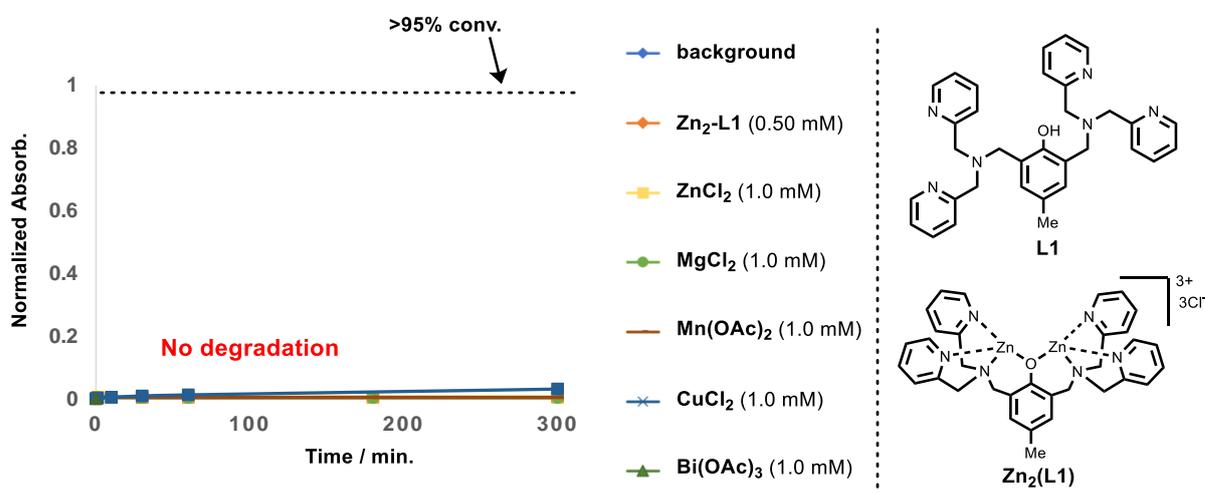


Figure 2-6. No degradation of DNA model in the presence of any RNA degraders.

以上のスクリーニング結果から、ビスマス(III)イオンの有効性が示唆された。ビスマス(III)イオンは、強いルイス酸性によるRNAのリン酸エステルの分極による求電子性の向上、速い配位子交換による触媒反応の高いターンオーバー効率が期待でき、7から10配位のような高い配位数をとれ、さらに配位した水のpKa値を低下させることでRNA分解酵素の活性中心に見られるような金属-ヒドロキソ反応活性種の生成を促したことによりうまく作用したと考えられる。また、ビスマスは、3価のイオンが安定であり、酸化還元反応を受けにくいいため、望まない電子移動に関する副反応を避けることが可能であると期待できる。

140-143

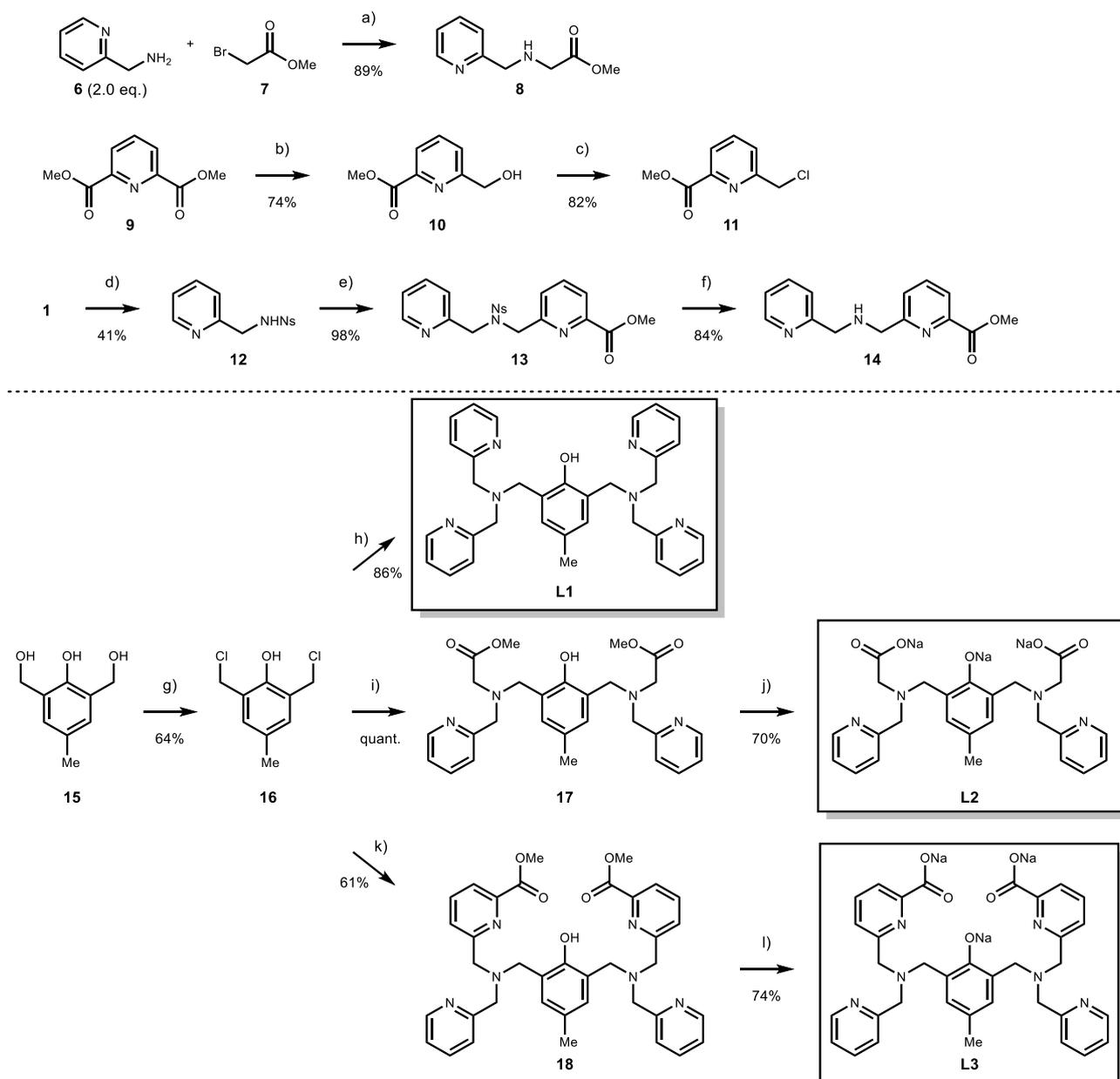
水酸化ビスマス $\text{Bi}(\text{OH})_3$ によるRNAの分解が報告されているが、水酸化ビスマスが水系に対して難溶性であることから過酷な条件 (pH 4, 約 100 °C) を使う必要があり、分解効率も低い。¹⁴⁴ なお、ビスマス(III)イオンによるRNA分解の報告としては、筆者の知る限りこの一例¹⁴⁴のみであった。今回、金属イオンのスクリーニング (Scheme 2-2) で用いた酢酸ビスマス $\text{Bi}(\text{OAc})_3$ は、あらかじめDMSOに溶解させ、対応する濃度のDMSO溶液として反応系へ加えることでうまく反応が進行した。反応後、ビスマス塩由来とみられる難溶性白色沈殿が目視で確認できた。

ビスマス(III)イオンに対して、適切な配位子を用いることによって水系溶媒に対する溶解性及び安定性を保ったまま、RNAの分解に対するビスマス(III)イオンの優れた活性を示すことが可能になるのではないかと期待して、二核ビスマス(III)錯体の検討を行った。

第4節 二核ビスマス(III)錯体の設計と合成

合成の容易性と、キメラ化合物への応用を考慮し、フェノール架橋部位とピコリルアミン部位を基本骨格とする対称性の高い配位子 **L1**, **L2**, および **L3** を合成した(Scheme 2-3)。配位子 **L1**¹⁴⁵ および **L2**¹⁴⁶ は既知法(一部を改変)に従い合成した。なお、配位子 **L2** および **L3** は錯体の安定性のさらなる向上を期待して、複数のカルボキシレート基を導入した。

Scheme 2-3. Preparation of ligands **L1**, **L2**, and **L3**.

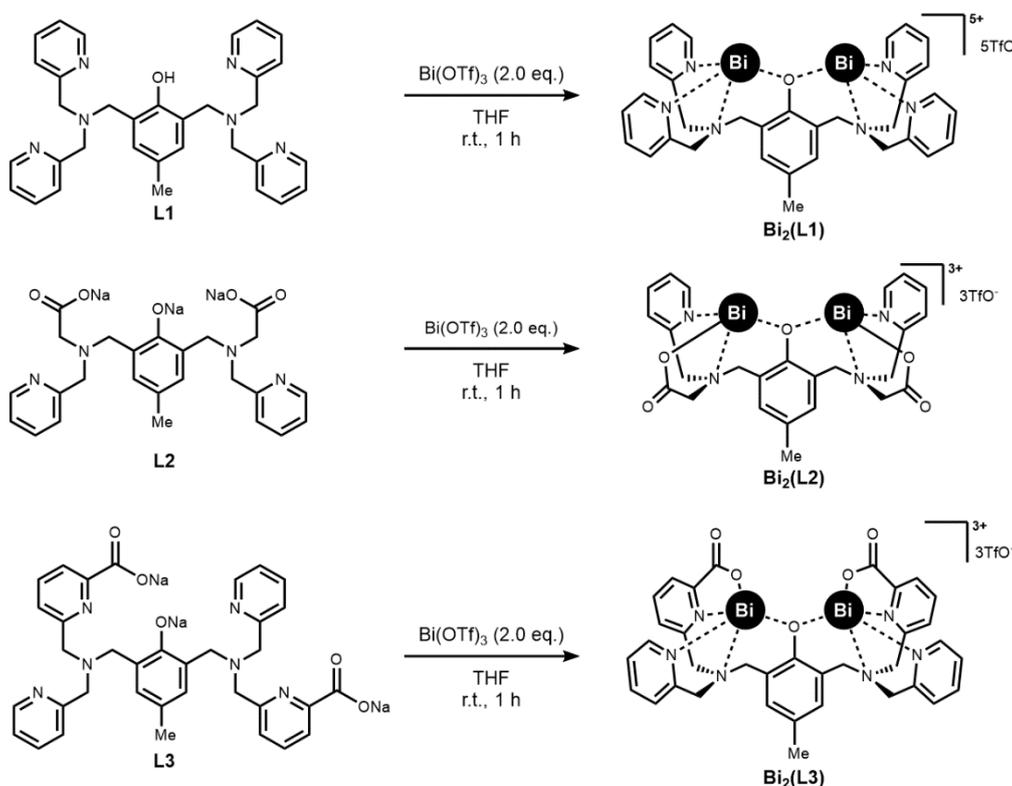


a) DIPEA (3.0 eq.), THF, r.t., 18 h; b) NaBH₄ (1.0 eq.), MeOH/DCM (2/1), 0 °C to r.t., 17 h; c) SOCl₂, r.t., 1 h; d) *o*-NsCl (1.1 eq.), TEA (3.0 eq.), THF, r.t., 3 h; e) **11** (1.0 eq.), K₂CO₃ (3.0 eq.), MeCN, 60 °C, 5 h; f) *p*-mercaptobenzoic acid (2.0 eq.), K₂CO₃ (3.0 eq.), DMF, 60 °C, 12 h; g) conc. HCl, r.t., 12 h; h) bpma (2.0 eq.), TEA (4.0 eq.), THF, r.t., 12 h; i) **8** (2.0 eq.), TEA (4.0 eq.), THF, r.t., 18 h; j) NaOH (3.0 eq.), MeOH/THF(4/1), r.t., 14 h; k) **14** (2.0 eq.), TEA (4.0 eq.), THF, r.t., 18 h; l) NaOH (5.0 eq.), MeOH(2% H₂O), r.t., 17 h.

RNase H の活性中心に存在する 2 つの金属イオンはアスパラギン酸やグルタミン酸残基のアニオン性カルボキシレート基により保持されている。最近の研究によると、これらの金属中心付近のカルボキシレート基はダイナミックな配位子として、RNA 分解機構に重要な水分子を介するプロトン移動を促進することが示唆されている。¹²² 即ち、配位子のカルボキシレート基は金属中心に配位するルイス塩基としての機能と、ブレンステッド酸/塩基としての機能も期待される。

二核ビスマス錯体の合成を検討し、それぞれの配位子を THF 溶媒中で 2 当量のビスマストリフラート $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ と反応させることで、二核ビスマス錯体 $\text{Bi}_2(\text{L1})$, $\text{Bi}_2(\text{L2})$, および $\text{Bi}_2(\text{L3})$ を合成した (Scheme 2-4)。それぞれのビスマス錯体について、重 DMSO 溶媒中で ^1H NMR を測定した (Figure 2-7)。その結果、 $\text{Bi}_2(\text{L1})$ では複雑なピークの分裂とブロード化が観測された (Figure 2-7, A)。配位子 **L1** はビスマスイオンに対して弱く配位していて、溶液中において複数の配位構造が存在していると考えている。また、 $\text{Bi}_2(\text{L2})$ と $\text{Bi}_2(\text{L3})$ では明瞭なピークのシフトや分裂が観測された (Figure 2-7, B-C)。配位子 **L1** と比較して、よりアニオン性の配位子である **L2** および **L3** はビスマスイオンに対して強く配位しており、高い対称性でかつ単一の錯体が生成していると考えられる。

Scheme 2-4. Syntheses of dinuclear bismuth(III) complexes $\text{Bi}_2(\text{L1})$, $\text{Bi}_2(\text{L2})$ and $\text{Bi}_2(\text{L3})$.



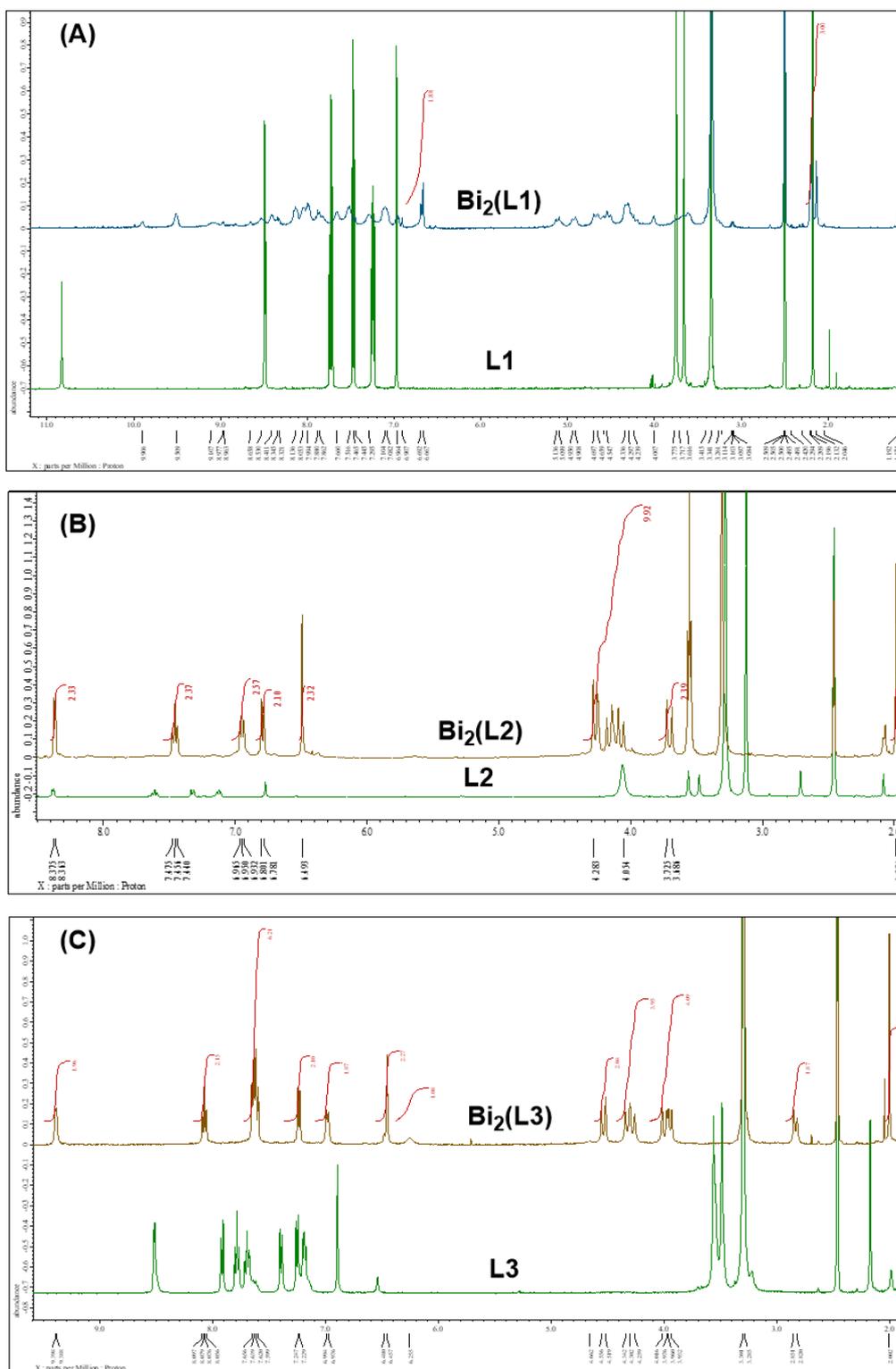


Figure 2-7. ^1H NMR [DMSO-d_6 , 25°C] of (A) Bi-complex $\text{Bi}_2(\text{L1})$ and ligand L1 , (B) Bi-complex $\text{Bi}_2(\text{L2})$ and ligand L2 , (C) Bi-complex $\text{Bi}_2(\text{L3})$ and ligand L3 .

第5節 RNA/DNA モデル基質を用いた二核ビスマス(III)錯体の活性評価

合成した二核ビスマス錯体 **Bi₂(L1)**, **Bi₂(L2)**, **Bi₂(L3)** 及び二核亜鉛錯体 **Zn₂(L1)** について、非環式 RNA モデル基質 HPNPP を用いた活性評価を実施した (Figure 2-8)。その結果、**Zn₂(L1)** と比較して、**Bi₂(L1)**, **Bi₂(L2)** 及び **Bi₂(L3)** とともに良好な触媒活性を示すことが明らかとなった (Figure 2-9, A)。ビスマス錯体 **Bi₂(L1)** が **Bi₂(L2)** や **Bi₂(L3)** と比較して少し活性が劣るようにみえるが、これは錯体の安定性に起因するものと考えている。一方、これらの錯体は類似の DNA モデル基質に対する分解活性は示さなかったことから、合成した錯体の高い RNA 選択性が示唆された (Figure 2-9, B)。さらに、二核亜鉛錯体 **Zn₂(L1)** との反応初速度 ($0.15 \pm 0.02 \mu\text{M}/\text{min}$) を比較したところ、二核ビスマス錯体 **Bi₂(L3)** についての反応初速度は $8.5 \pm 0.6 \mu\text{M}/\text{min}$ であり、**Zn₂(L1)** と比べて約 57 倍の差があった。

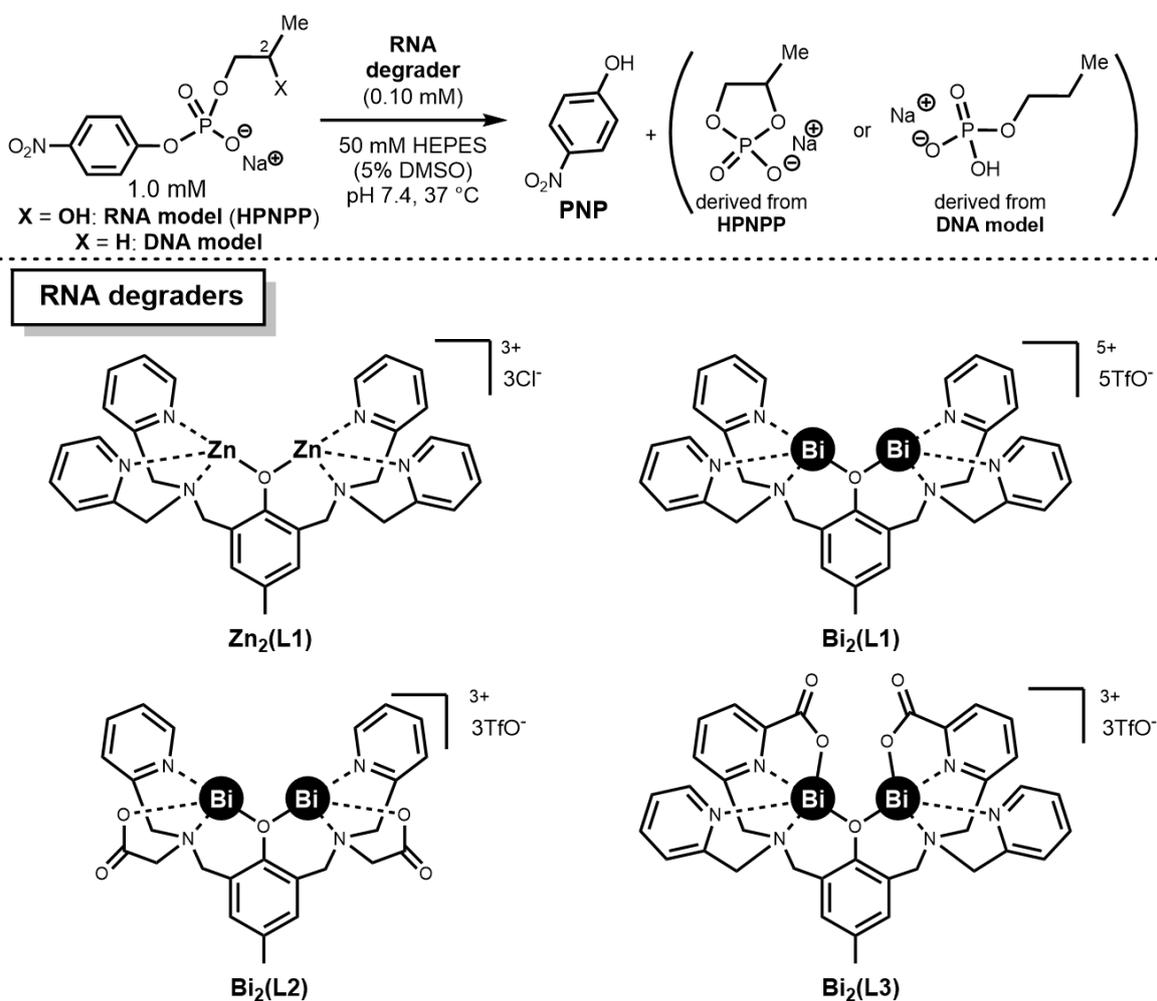


Figure 2-8. RNA model (HPNPP) and DNA model degradation assay for the screening of RNA degraders.

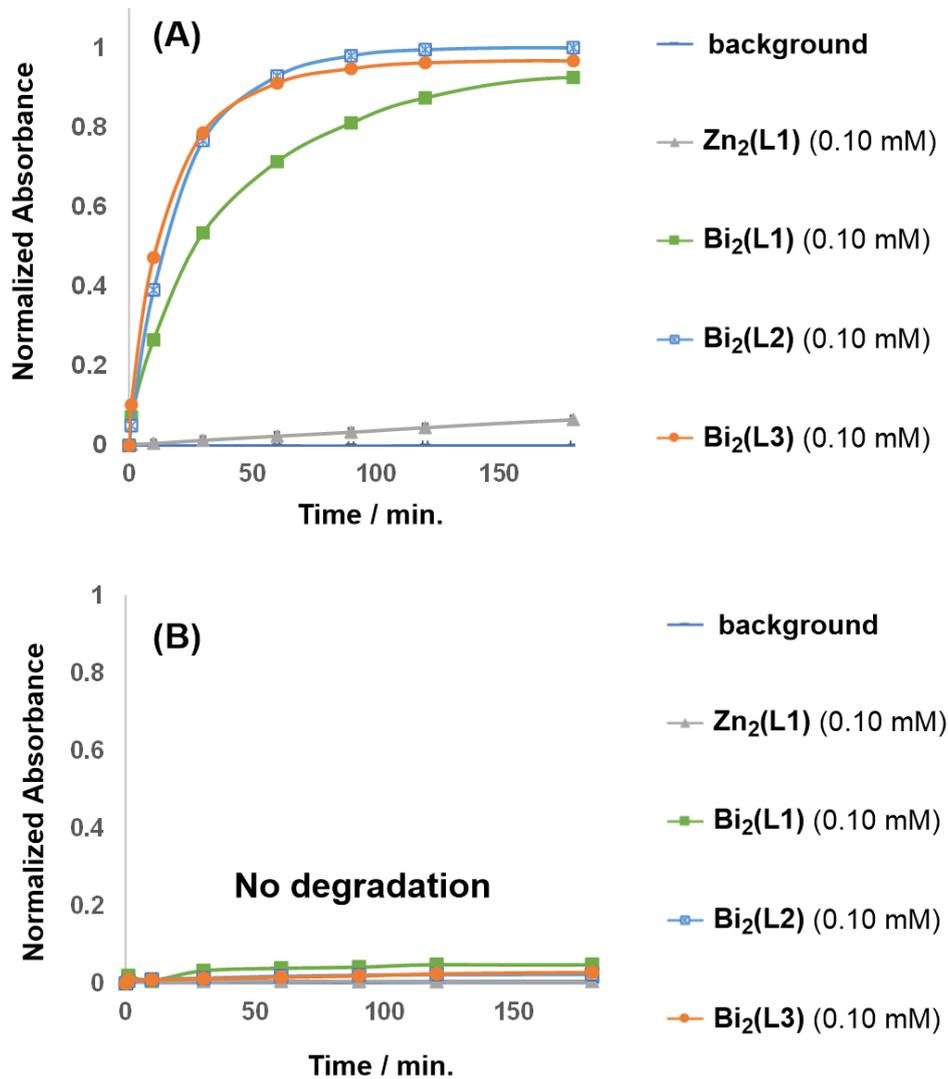


Figure 2-9. Time-course study. (A) HPNPP degradation by RNA degraders. (B) No degradation of DNA model by RNA degraders.

なお、DNAモデル基質の分解は二核セリウム(IV)錯体¹⁴⁷を用いることで、低い分解効率ではあるものの観測することができた(Figure S7)。さらに、HPNPPの分解による生じる環状リン酸エステル生成物は³¹P NMRを測定することにより観測された(Figure S9)。

以上の結果から、フェノール架橋部位とピリジン部位を基本骨格とする配位子に由来する二核ビスマス錯体がRNAモデル基質の分解に対して良好な触媒活性を示しただけでなく、OH基を持たないDNAモデル基質には作用せず、高いRNA選択性が示唆された。そこで、オリゴ核酸型のモデル基質を用いた更なるスクリーニングを行うこととした。

第6節 オリゴ核酸型 RNA/DNA モデル基質を用いた活性評価

いくつかの RNA 分解分子候補について、非環式 RNA モデル基質 HPNPP を用いた解析により見出すことができた。しかしながら、HPNPP は脱離基の PNP の脱離能が高く、反応性が高い。すなわち、より分解されやすいため、天然の RNA 鎖と比較して反応性が異なる。⁸⁴ そこで、天然の RNA 鎖に近い反応性をもつ基質による評価を行うこととした。実際に、シンプルな配列の RNA と DNA で構成されるオリゴ核酸の両末端に蛍光基と消光基を有するキメラ型の基質をデザインした。基質が分解される前は、ドナー（蛍光基）からアクセプター（消光基）への蛍光エネルギー移動（Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET）が起こるため、蛍光は検出されない。RNA 分解分子によって基質の RNA が分解されると、FRET 効率が低くなり、蛍光を発する。この時の蛍光変化を観測することで活性評価を簡便に行うことができる。各アッセイは 96 ウェルプレート上で行い、プレートリーダーを用いて、495nm の励起光における 520nm 付近の蛍光強度をモニタリングした。なお、DNA のみで構成される基質を DNA モデル基質(ネガティブコントロール)として用いた (Figure 2-10)。類似の RNA モデル基質は、DNAzyme などの活性評価にも用いられている。¹⁴⁸

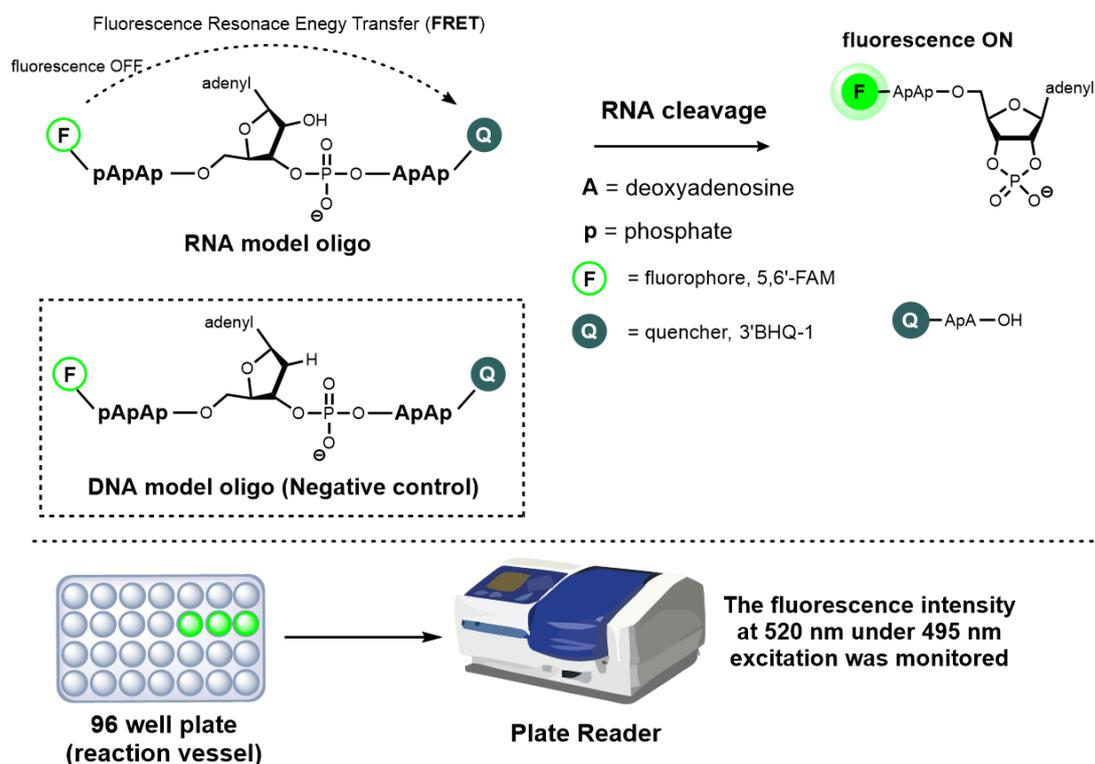


Figure 2-10. Evaluation of RNA degraders using oligonucleotide-type RNA/DNA model with FRET moiety.

オリゴ核酸型 RNA/DNA 基質を用いた活性評価を行ったところ、**Zn₂(L1)**では、オリゴ核酸型 RNA モデル基質の分解がほとんど進行しなかったのに対し、二核ビスマス錯体 **Bi₂(L3)**を用いると良好な RNA 分解活性を示した(Figure 2-11, A, B)。また、**Bi₂(L1)**は中程度の活性を示し、**Bi₂(L2)**については低い活性に留まった。これらの二核金属錯体は、オリゴ核酸型 DNA モデル基質を全く分解せず(Figure 2-11, C, D)、優れた RNA 選択性を有することが示唆された。**Bi₂(L1)**は ¹HNMR の測定結果からも予想できるように、**L1** のピ

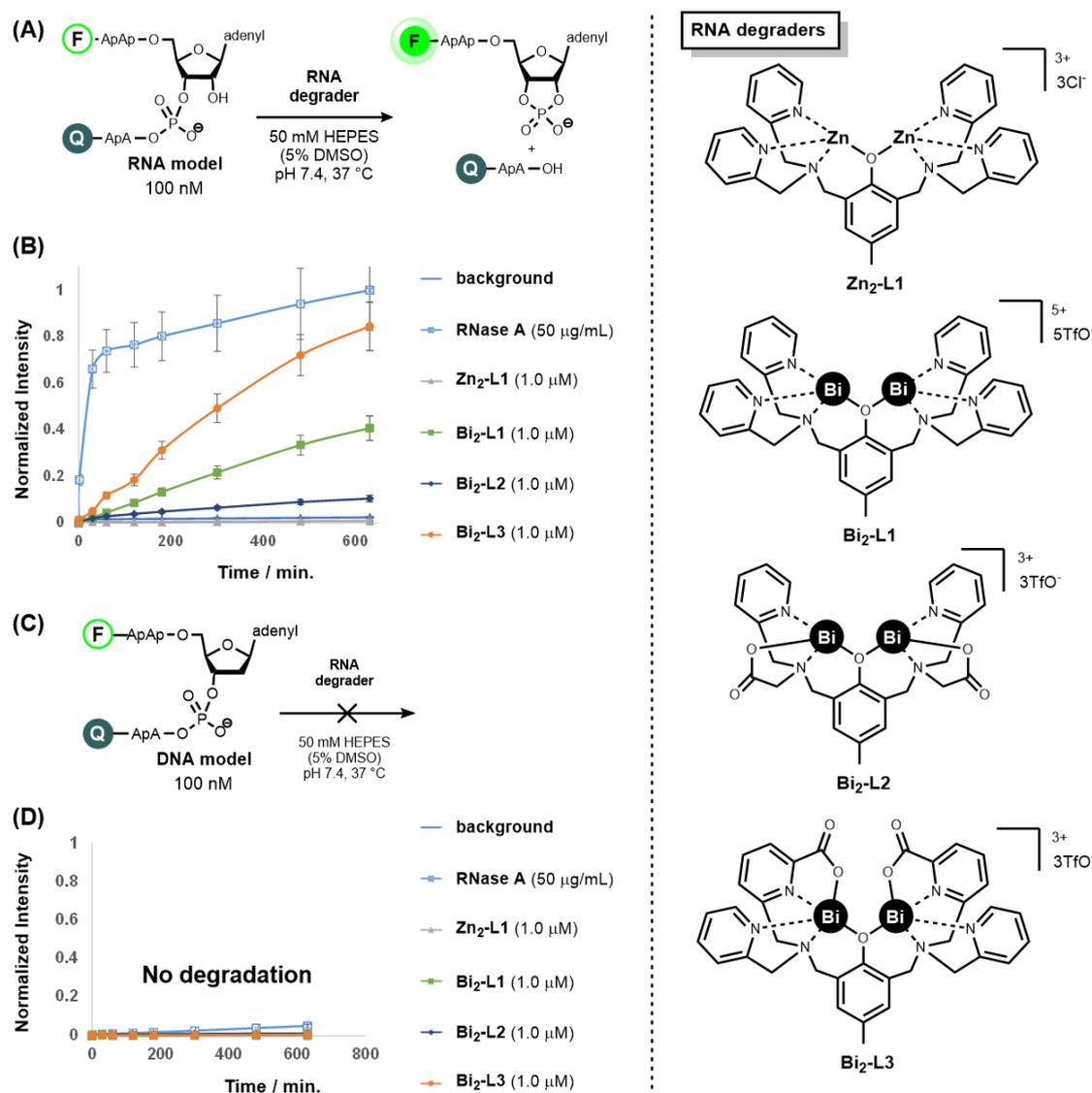


Figure 2-11. Oligonucleotide RNA and DNA model assay. (A) Degradation of RNA model oligo. (B) The time course study for the RNA model oligo degradation. (C) No degradation of DNA model oligo. (D) The time course study for the DNA model oligo degradation.

スマス(III)イオンに対する配位が弱いため、本条件下における錯体の安定性が低く、RNA分解活性の低下につながったのではないかと考えられる。または、推定のような配位構造ではない別の配位構造が生じている可能性も考えられる。なお、後述するがBi(OTf)₃のみを用いるとRNA分解活性の著しい低下が観測された(Figure 2-13, Figure 2-17)。一方で、**Bi₂(L2)**ではRNA分解活性はほとんど示さなかった。これは系中にて、**Bi₂(L2)**が推定の二核構造を保てず、RNA分解に対して不活性な別の配位構造が形成されるためではないかと考えられる。実際に、Scheme 2-4で合成した**Bi₂(L2)**に関して詳細な解析を試みるため、微量の水を混ぜたアセトニトリル溶媒を用いた再結晶による結晶化を行い、単結晶X線結晶解析を行ったところ、Figure S3のような構造の錯体**Bi₂(L2)₂**が得られた。また、**Bi₂(L2)₂**についてESI-MSによる質量分析を行ったところ(Figure S6)、ナトリウムイオンが付加したカチオン性の**Bi₂(L2)₂+Na**: 1363.3137(calcd for C₅₀H₅₀Bi₂N₈NaO₁₀⁺: *m/z* 1363.3150)が検出されたことから、反応系中における**Bi₂(L2)₂**の存在が示唆された。さらに、**Bi₂(L2)₂**について、RNAモデル基質HPNPPを用いた活性評価(Figure S4)を行ったところ、RNA分解活性を全く示さなかったことから、反応系中における**Bi₂(L2)₂**への構造変化が活性低下の原因の一つではないかと考察した。**Bi₂(L3)**では配位子の第二配位圏に存在するアニオン性のカルボキシレート基が錯体の安定性の向上に寄与し、RNA分解活性に重要な二核構造を保つことができた結果、良い分解活性を示したのではないかと考えている。

オリゴ核酸型DNAモデル基質の分解についても、二核セリウム(IV)錯体を用いることで確認できた(Figure S8)。

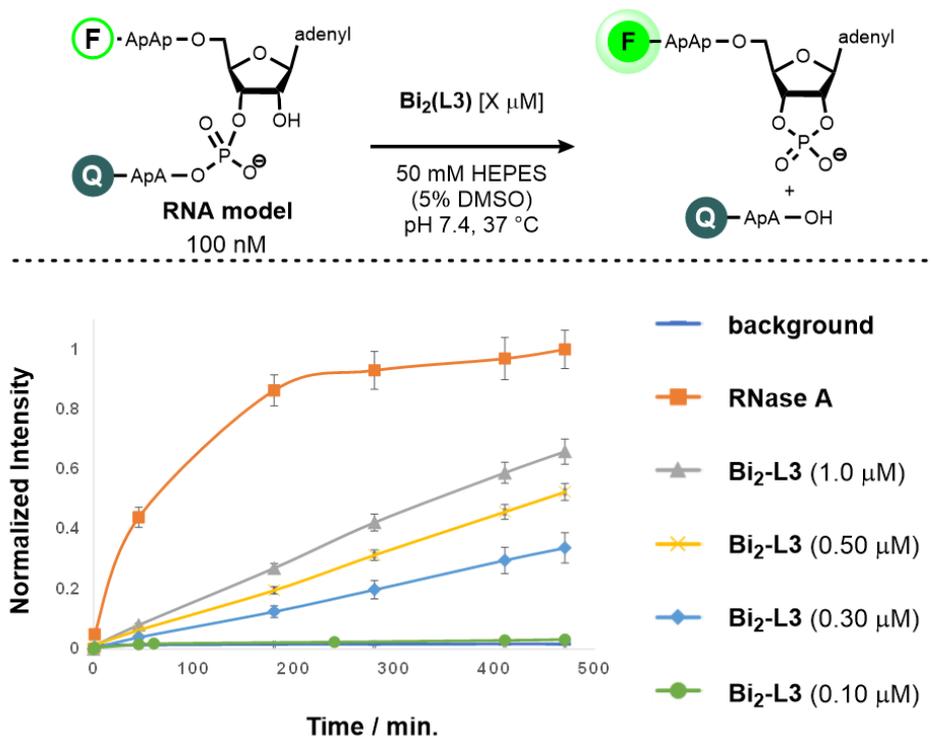


Figure 2-12. Investigation of the amount of Bi-complex $\text{Bi}_2(\text{L3})$.

初期検討では二核ビスマス錯体 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ をオリゴ核酸型モデル基質に対して 10 当量用いた。そこで、より少ない当量数の検討を行った (Figure 2-12)。 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ を 10 当量から 5 当量、3 当量へと減らすにつれて、RNA 分解速度の低下が観測された。さらに 1 当量まで $\text{Bi}_2(\text{L3})$ を減らすと、RNA 分解速度が著しく低下した。本反応が触媒量の $\text{Bi}_2(\text{L3})$ で進行しない理由としては、ルイス塩基として金属イオンと相互作用可能な核酸塩基やリン酸エステル部位による阻害が考えられる。しかしながら、これらが金属錯体の RNA 分解活性に影響を与えることを示すデータは得られなかった (Figure S1, S2)。このように、見出した二核ビスマス錯体 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ は RNA 分解酵素 RNase A と比較してマイルドな活性を示した。しかしながら、Figure 2-12 の条件下において、触媒活性は観測されなかった。現状、RNase A のような酵素と比較して、 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ 単独の RNA 分解活性は低い、将来的には $\text{Bi}_2(\text{L3})$ のような RNA 分解誘導剤と標的 RNA バインダーと連結させることを想定しており (Figure 1-19)、近接効果によって触媒的な標的 RNA 分解が可能になるのではないかと期待している。さらに、 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ のようなマイルドな RNA 分解誘導剤を用いる方が、非選択的な RNA 分解によるオフターゲットの低減も期待できると考えている。なお、10 当量の錯体を用いる条件を標準条件として以降の評価を実施した。

続いて、金属錯体 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ と、金属トリフレート塩 $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ との RNA 分解活性の比較を実施した (Figure 2-13)。その結果、 $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ のみを用いると RNA 分解活性は大きく低下した。 $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ のみでも若干の活性は示すものの、適切な配位子との錯形成により、RNA 分解酵素の活性中心にみられるような二核金属構造による RNA 分解の相乗的な活性化が達成されることが考えられる。

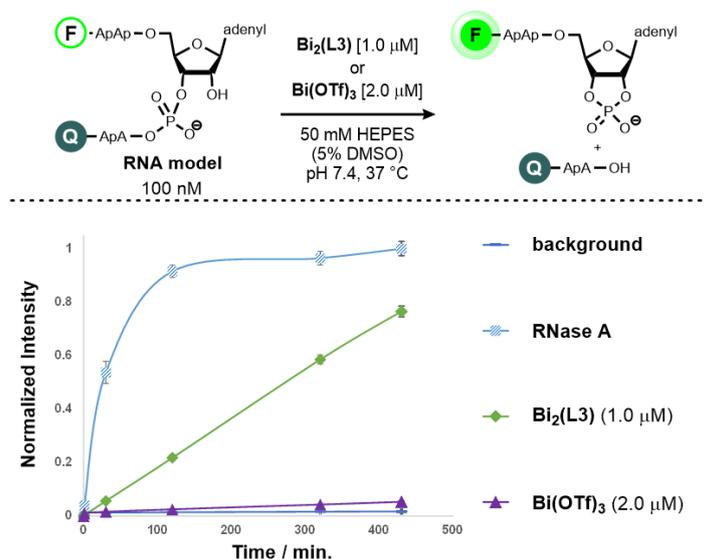


Figure 2-13. Comparison of RNA cleavage activities between complex $\text{Bi}_2(\text{L3})$ and free $\text{Bi}(\text{III})$ ion.

次に、配位子 L3 の濃度を一定 ($1.0 \mu\text{M}$) とし、 $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ の濃度を变化させた時の活性の変化について調査した (Figure 2-14)。その結果、配位子 L3 に対して 2 当量以上の $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ ($2.0 \mu\text{M}$ または $4.0 \mu\text{M}$) を加えると、共に二核ビスマス錯体 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ と同等の良好な RNA 分解活性を示した。一方で、配位子 L3 に対して $0.5 \mu\text{M}$ の $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ 共存下ではほとんど

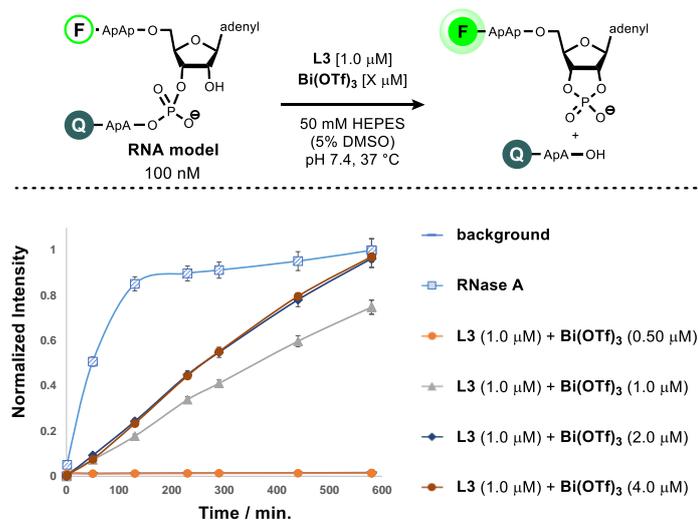


Figure 2-14. The effect of ligand L3 to $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ ratio.

RNA 分解活性は示さなかった。これは、過剰に存在する配位子がビスマス(III)イオンに複数配位し、ビスマス中心のルイス酸性の低下や、基質と相互作用できる空間が配位子によって占められたことに起因していると考えられる。また、配位子 **L3** と $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ の比率が **L3** : $\text{Bi}(\text{OTf})_3 = 1 : 1$ となる条件下においても、**L3** : $\text{Bi}(\text{OTf})_3 = 1 : 2$ または $1 : 4$ の条件にはやや劣るものの、良好な RNA 分解活性を示した。

配位子 **L3** : $\text{Bi}(\text{OTf})_3 = 1 : 1$ の比率においても良好な RNA 分解活性を示した要因を調査するために、配位子 **L3** と $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ を用いた NMR 滴定実験を行った (Figure 2-15)。その結果、**L3** : $\text{Bi}(\text{OTf})_3 = 1 : 1$ となるような条件下において、原料の配位子のピーク(A)は消失したが、複雑なピークを与えた。このことから、推定とは異なる対称性の低い配位構造の錯体や、複数の化学種が存在しているのではないかと考えた (Figure 2-15, B)。さらに、 $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ を添加して、**L3** : $\text{Bi}(\text{OTf})_3 = 1 : 2$ の比率に調節すると、ほとんど単一の対称性の高い生成物に由来するものと見られるピークが見られた (Figure 2-15, C)。この NMR は合成錯体 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ と一致した (Figure 2-16, C)。そして、**L3** : $\text{Bi}(\text{OTf})_3 = 1 : 4$ の比率へと変化させると、 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ に由来するメインのピークの外に、詳細は不明であるが類似の構造の錯体に由来するものと予想されるマイナーピークが現れた (Figure 2-15, D)。このマイナーピークは僅かであるが **L3** : $\text{Bi}(\text{OTf})_3 = 1 : 2$ の比率においても観測された。しかし、このことは RNA 分解活性にはそれほど影響しないと考えられる (Figure 2-14)。

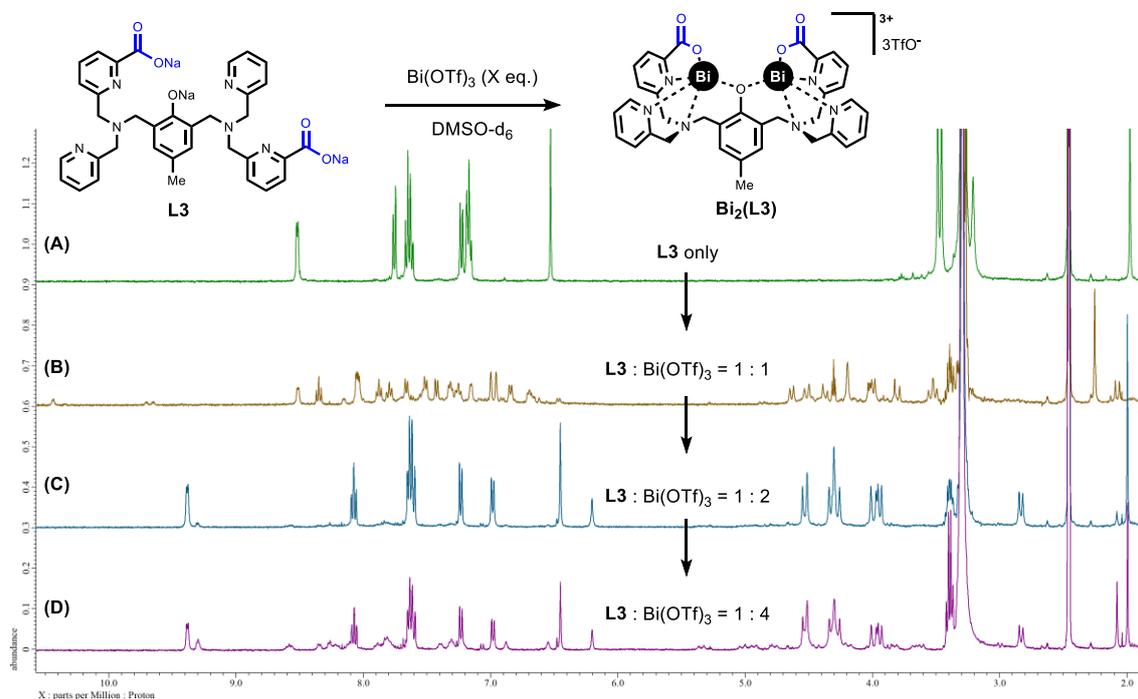


Figure 2-15. ^1H NMR titration of the $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ and **L3** (10 mM) system at 25 °C in DMSO-d_6 . (A) [**L3**] : [$\text{Bi}(\text{OTf})_3$] = 1 : 0 ratio. (B) [**L3**] : [$\text{Bi}(\text{OTf})_3$] = 1 : 1 ratio. (C) [**L3**] : [$\text{Bi}(\text{OTf})_3$] = 1 : 2 ratio. (D) [**L3**] : [$\text{Bi}(\text{OTf})_3$] = 1 : 4 ratio.

第1節の第1項でも述べたように、ランタノイド、特に La^{3+} や Eu^{3+} は RNA モデル基質に対する良い分解活性を示すことが知られている。このことから、ランタノイドを核とする種々の単核錯体や、Scheme 1-7 で示したような複核錯体が開発されている。^{104,108,149-151} このような背景から、良好な分解活性を示した二核ビスマス(III)錯体 **Bi₂(L3)** と、**L3** を配位子とする二核ランタノイド錯体との反応性を比較することとした。具体的には、配位子 **L3** と、 $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ 、 $\text{La}(\text{OTf})_3$ または $\text{Eu}(\text{OTf})_3$ と DMSO 溶液中で混合することで調整した二核錯体によるオリゴ核酸型 RNA モデル基質の分解を調査した。その結果、二核ランタン(III)錯体や二核ユウロピウム(III)錯体では活性が大きく低下した(Figure 2-16)。

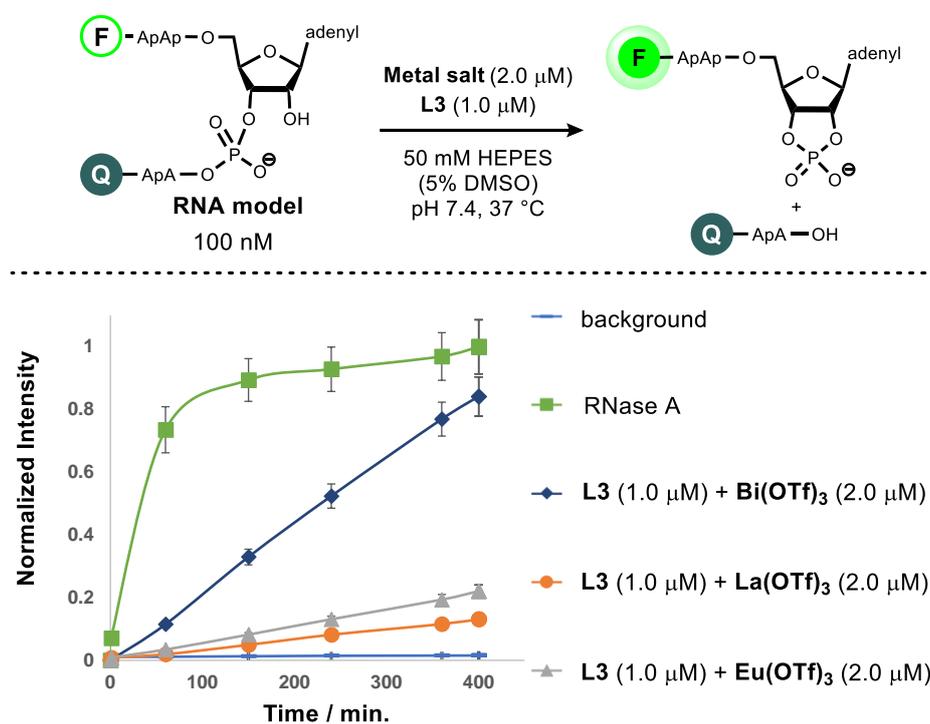


Figure 2-16. Comparison of RNA cleavage activities between Bi(III)-complex and lanthanide(III) complexes.

興味深いことに、それぞれの金属トリフラート塩のみをオリゴ核酸型 RNA モデル基質に作用させると、 $\text{La}(\text{OTf})_3$ や $\text{Eu}(\text{OTf})_3$ のようなランタノイドトリフラート塩の方が、 $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ と比べて高い分解活性を示すことが明らかとなった(Figure 2-17)。即ち、ビスマスは錯体を形成することでより強力な RNA 分解活性を獲得できる金属であり、このような性質が RNA 分解誘導剤の機能制御に有効であると考えられる。将来的に生体内の標的 RNA をビスマス錯体によって分解誘導するということを考える際、このように反応性をコントロールできることは、標的以外の RNA への非選択的な分解(オフターゲット)を回避するための重要な知見であり、他の金属とは逸脱したビスマスの特異性が本研究によって示されたと考えている。

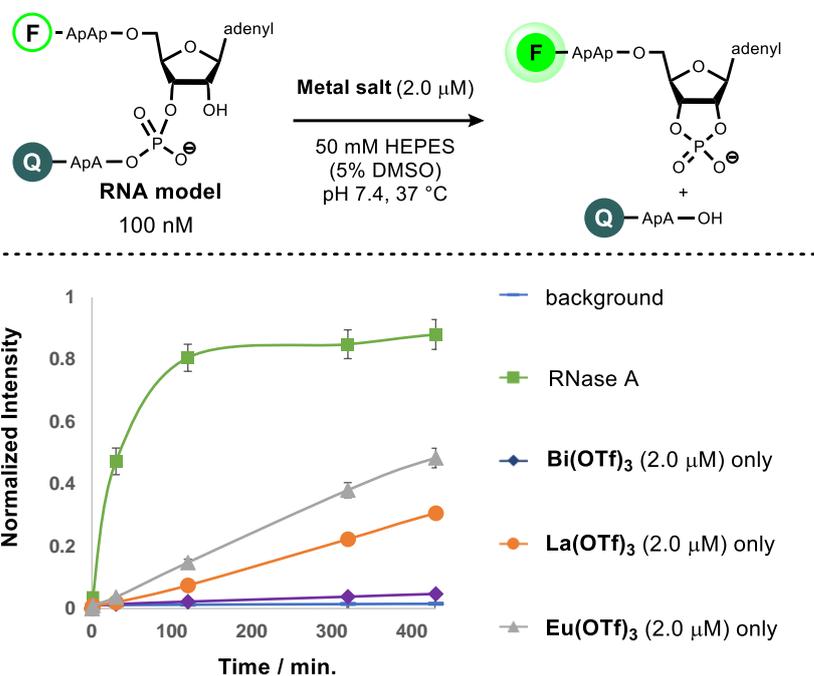
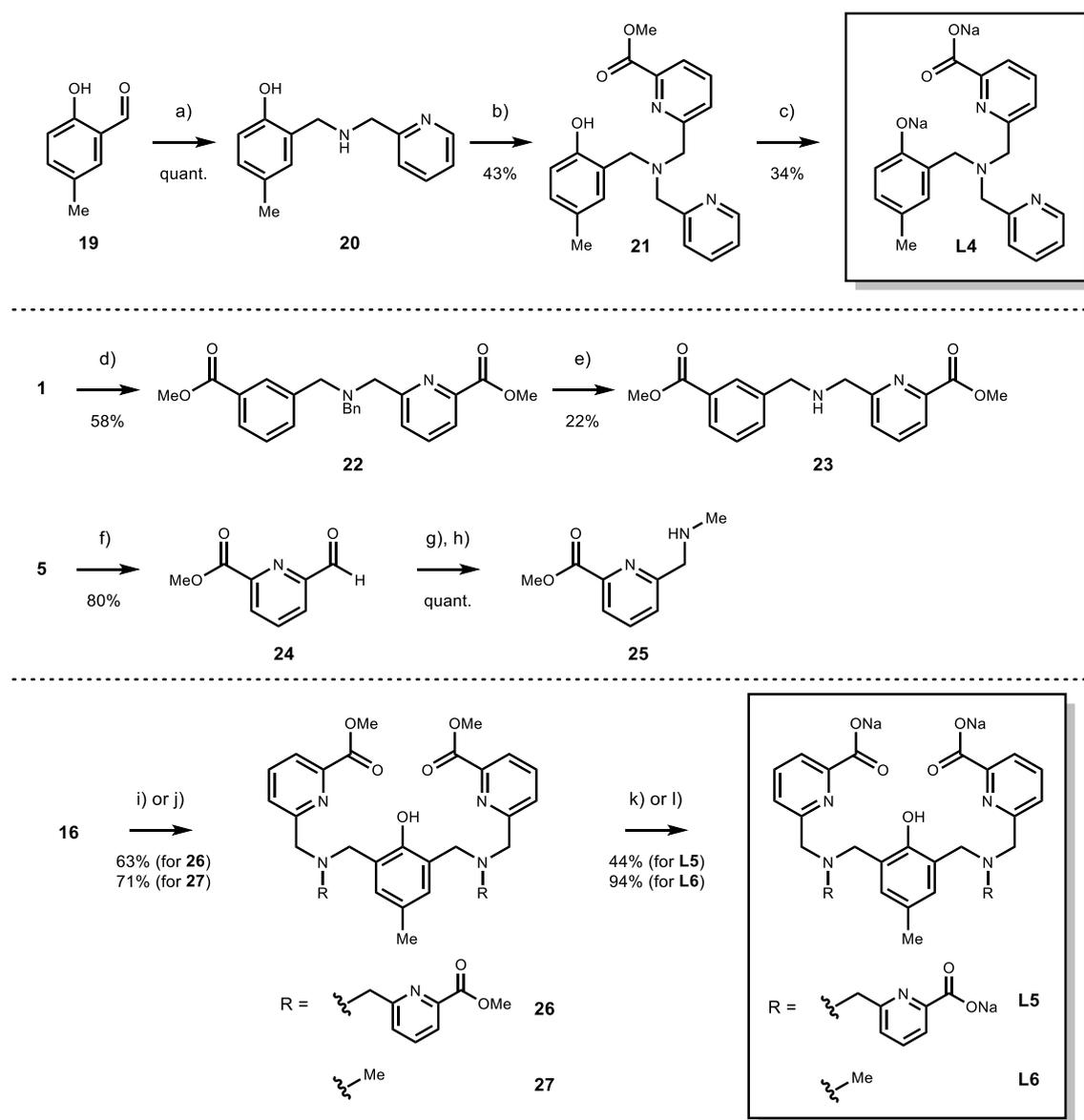


Figure 2-17. Comparison of RNA cleavage activities of $\text{Bi}(\text{OTf})_3$, $\text{La}(\text{OTf})_3$ and $\text{Eu}(\text{OTf})_3$.

第7節 二核ビスマス(III)錯体の構造変換による RNA 分解活性への影響

続いて、配位子 **L3** を軸とした配位子の構造変換による RNA 分解活性への影響を調査した。具体的には、単核錯体の形成が期待され、**L3** の部分構造に相当する配位子 **L4**、4つのカルボキシレート基を有する配位子 **L5**、そして、2つのピリジルメチル基をメチル基へと変換した配位子 **L6** を設計・合成した。配位子 **L4**、**L5**、および **L6** の合成ルートを Scheme 2-5 に示した。

Scheme 2-5. Preparation of ligands **L4**, **L5**, and **L6**.



a) **6** (1.0 eq.), NaBH₄ (1.0 eq.), MeOH, 0 °C, 10 min.; b) **11** (1.0 eq.), NaI (0.50 eq.), K₂CO₃ (2.0 eq.), MeCN, 50 °C, 12 h.; c) NaOH (2.0 eq.), MeOH (2% H₂O), r.t., 14 h.; d) **11** (2.1 eq.), KI (0.50 eq.), K₂CO₃ (3.3 eq.), MeCN, 60 °C, 12 h.; e) 10% Pd on carbon, H₂, EtOH, r.t., 48 h.; f) Dess–Martin periodinane (2.0 eq.) DCM, r.t., 12 h.; g) Na₂SO₄ (5.0 eq.), Methylamine (1.2 eq.), DCM, r.t., 3 h.; h) 10% Pd on carbon, H₂, EtOH, r.t., 12 h.; i) **23** (2.0 eq.), TEA (4.0 eq.), THF, r.t., 12 h.; j) **25** (2.0 eq.), TEA (4.0 eq.), THF, r.t., 12 h.; k) NaOH (5.0 eq.), MeOH (2% H₂O), r.t., 15 h.; l) NaOH (3.0 eq.), MeOH (2% H₂O), r.t., 15 h.

二核錯体 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ と単核錯体 $\text{Bi}(\text{L4})$ の RNA 分解活性を比較したところ、単核錯体 $\text{Bi}(\text{L4})$ ではオリゴ核酸型 RNA モデル基質に対する活性が著しく低下した (Figure 2-18)。RNA 分解の活性化には金属二核構造が必須であり、 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ における 2 つのビスマス中心の相乗的な活性化が働いていることを示唆している。

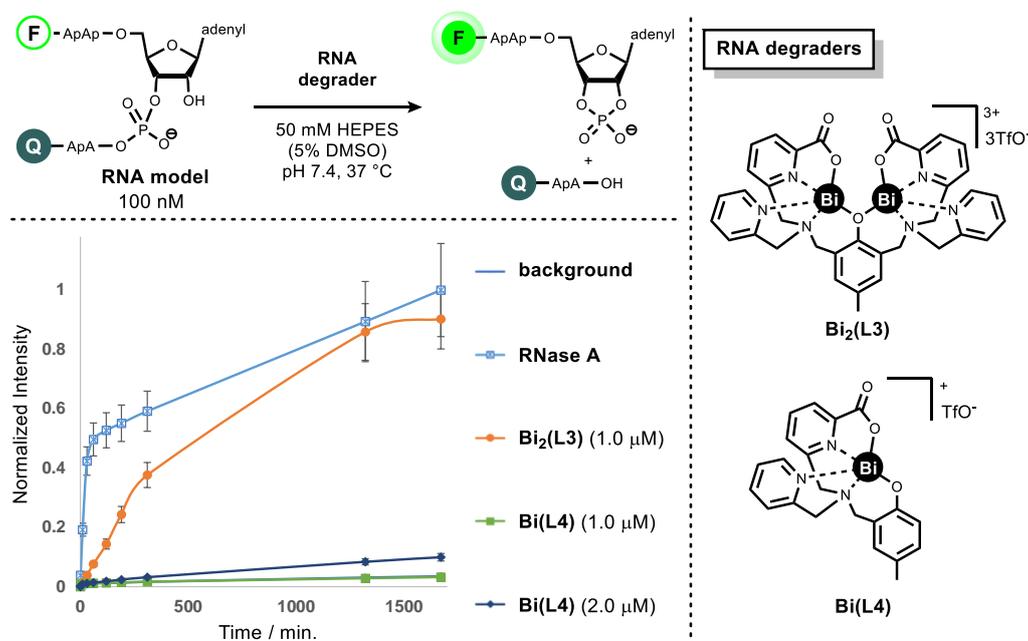


Figure 2-18. Dinuclear complex $\text{Bi}_2(\text{L3})$ vs. mononuclear complex $\text{Bi}(\text{L4})$.

配位子 L5 および L6 とのビスマス錯体の活性評価を行ったところ、どちらも活性が大きく低下した (Figure 2-19)。配位子 L3 と比較して、よりアニオン性の高い配位子 L5 は金

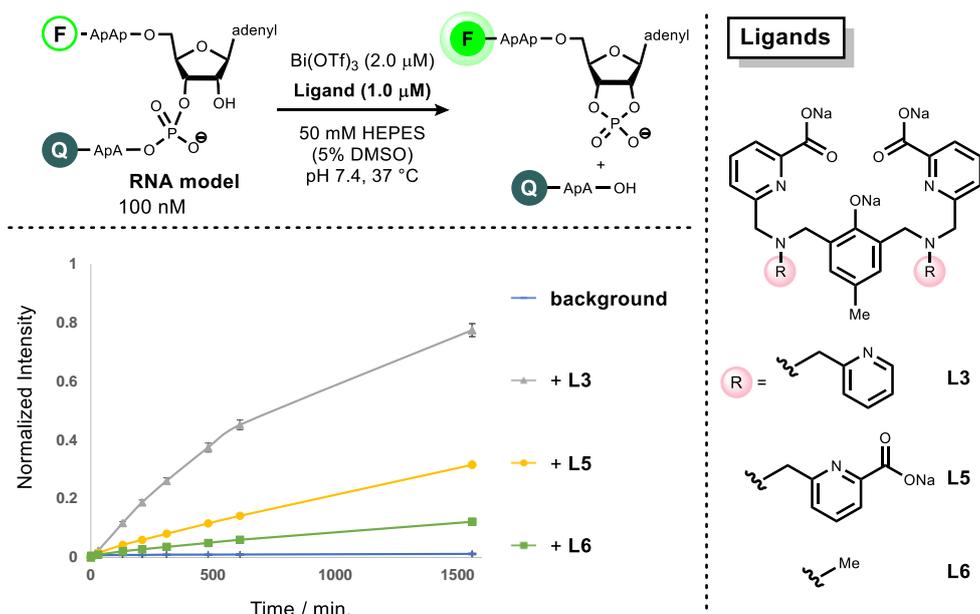


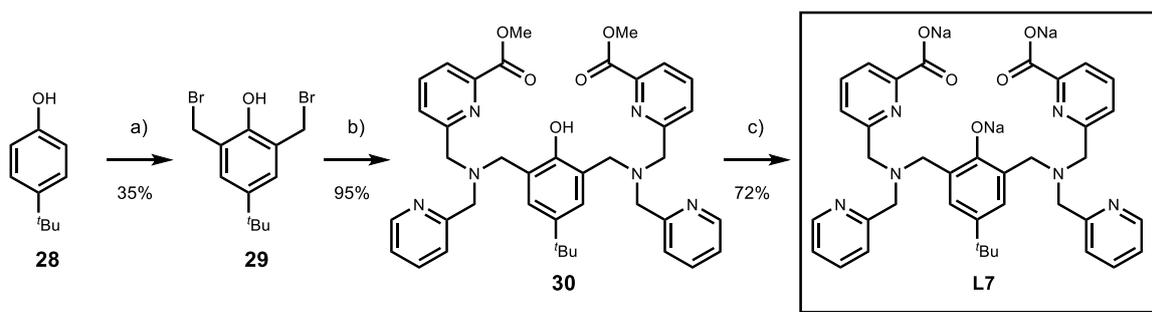
Figure 2-19. Ligand effect on the RNA model degradation.

属捕捉能が高く安定な錯体の形成が期待できるが、同時に中心金属のルイス酸性の低下が生じていることが考えられる。配位子 **L6** の場合、活性はさらに低くなることから、2つのピリジン部位は活性体である二核構造の形成に必須であることが示唆される。このように適度な配位能を有する配位子 **L3** が本研究における最適な配位子の一つであることが明らかとなった。

第 8 節 単結晶 X 線構造解析

錯体 $\text{Bi}_2(\text{L3})$ について、単結晶 X 線構造解析を行うため、再結晶による単結晶の調製を試みたが、錯体の溶解性や結晶性の問題により、結晶化が困難であった。そこで、錯体の結晶性の向上を図るため配位子やカウンターアニオンのチューニングを検討した。

Scheme 2-6. Synthesis of ligand L7.



a) paraformaldehyde (2.5 eq.), HBr-AcOH, 0 °C, 1 h to r.t., 2 h.; b) **14** (2.0 eq.), DIPEA (4.0 eq.), THF, r.t., 12 h; c) NaOH (3.0 eq.), MeOH (2% H₂O), r.t., 24 h.

そこで、配位子の基本骨格であるフェノール部位のパラ位を *tert*-ブチル基へ変換した配位子 **L7** を合成した(Scheme 2-6)。種々の検討の結果、配位子 **L7** およびカウンターアニオンとしてアセテートを有する二核ビスマス錯体 $\text{Bi}_2(\text{L7})\text{-acetate}$ を MeCN に溶解し、ジエチルエーテルを用いた蒸気拡散により単結晶を得ることに成功した。解析結果(Figure 2-20)に示したように1つの配位子に対し、2つのビスマスが μ -アセテートおよび μ -フェノキソ架橋配位子を介して保持されていた。類似の **L3** においても推定の二核ビスマス錯体が形成されていることを支持していると考えている。さらに、それぞれのビスマス中心は 8 配位構造をとっており、アセテートとの配位子交換によって基質のリン酸ジエステルや、ブレンステッド酸・塩基として働く複数の水分子がビスマス中心に配位することで RNA が効率的に分解されると考えられる。

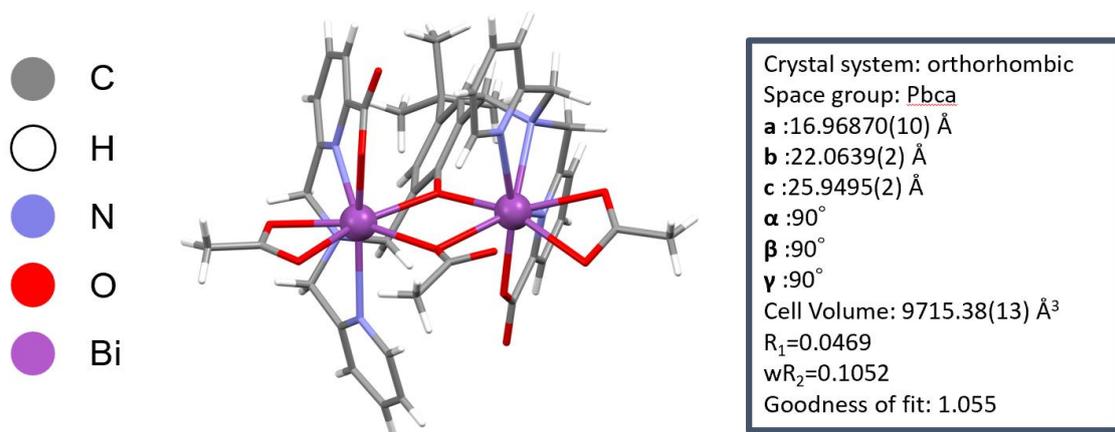


Figure 2-20. X-ray structure of $\text{Bi}_2(\text{L7})\text{-acetate}$.

第9節 二核ビスマス錯体による RNA 分解の詳細な解析

二核ビスマス錯体 $\text{Bi}_2(\text{L}3)$ による RNA 分解について、速度論解析を試みた。RNA モデル基質 HPNPP を用いて、pH と反応初速度の関係をプロットしたところ、反応初速度が pH 7 付近で極大値をとるようなベル型の曲線が得られた (Figure 2-21)。

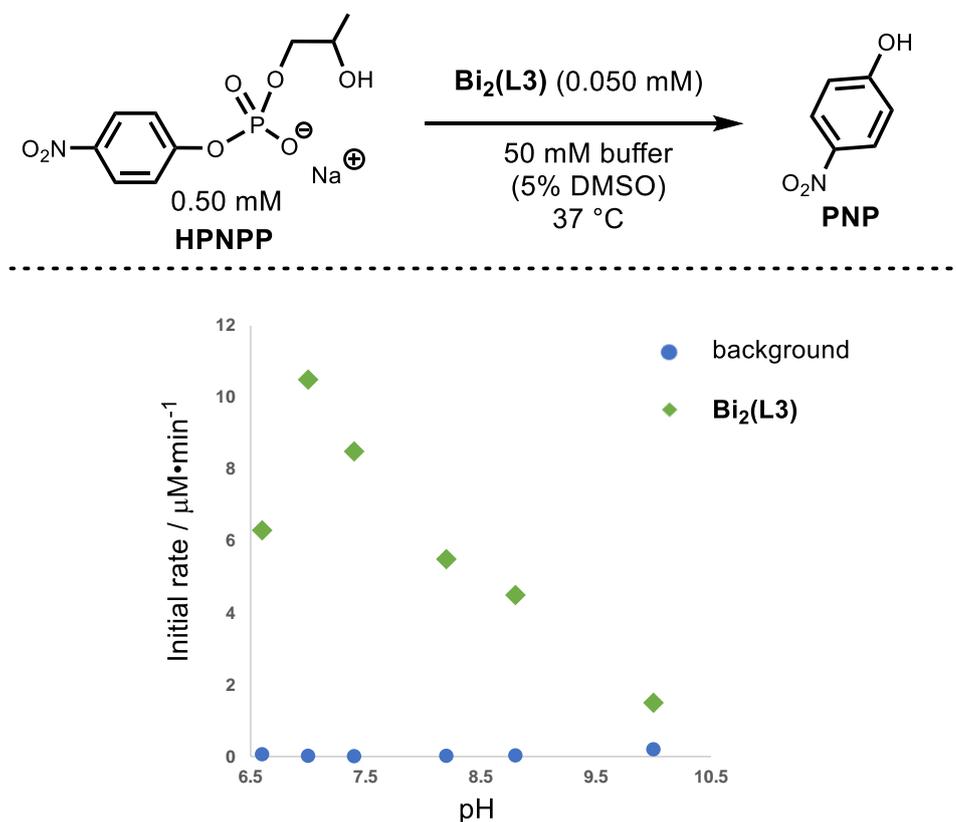


Figure 2-21. pH-initial rate profile for HPNPP cleavage catalyzed by Bi-complex $\text{Bi}_2(\text{L}3)$. pH 6.6-8.2: HEPES; pH 8.8-10: CHES.

配位子 **L7** のモル分率と、オリゴ核酸型 RNA モデル分解における反応初速度の関係を調査したところ、Figure 2-22 のような曲線が得られた。モル分率 $X(\text{L}7) = 0.333\dots$ の時、即ち、配位子 **L7** と $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ との比率が 1 : 2 の時、反応初速度が極大値をとったことから、本反応における活性種は二核ビスマス錯体であることが示唆された。

さらに、キレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加剤とした際の RNA モデル分解への影響を調べた (Figure 2-23)。その結果、二核ビスマス錯体 $\text{Bi}_2(\text{L}3)$ に対して 2 当量の EDTA を加えた条件下においては、 $\text{Bi}_2(\text{L}3)$ の RNA 分解活性がほぼ完全に阻害された。1 当量の EDTA 存在下では、EDTA 非存在下の条件と比べて、少し分解速度が低下した。これは EDTA によって EDTA が錯体のビスマスイオンを捕捉し、金属錯体が不活性化されたと考えられ、RNA の分解には二核錯体の金属中心が必須であることが示唆された。

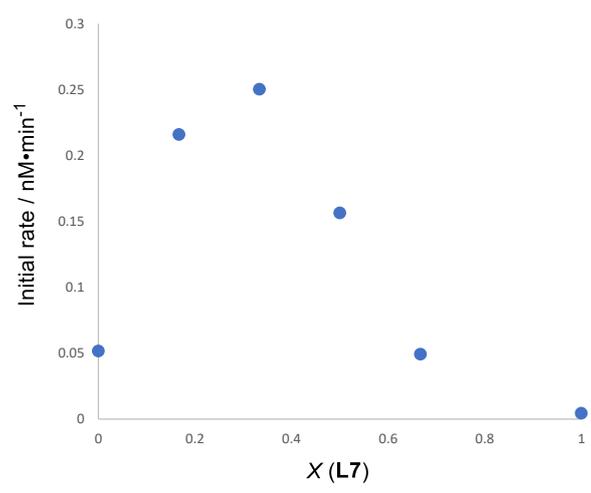
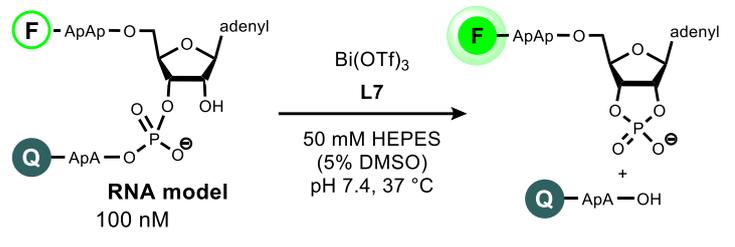


Figure 2-22. Dependence of the initial rate of RNA model cleavage on the mole fraction $X(L7)$. $X(L7) = [L7]/([L7]+[Bi(OTf)_3])$

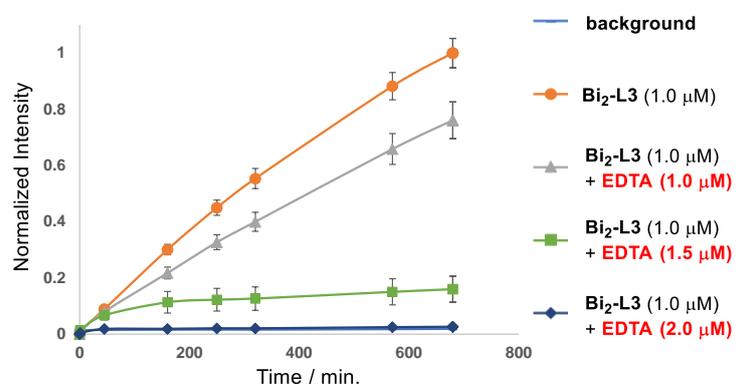
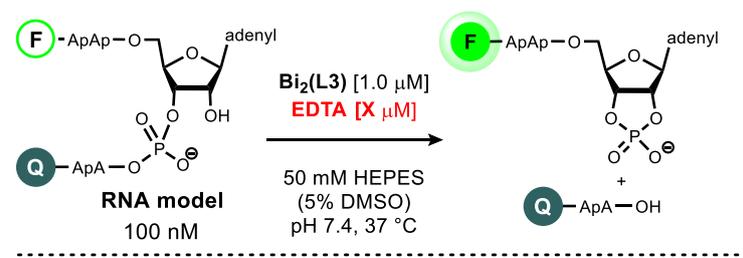


Figure 2-23. The effect of EDTA on RNA cleavage mediated by Bi-complex $Bi_2(L3)$.

二核ビスマス錯体が RNA のリン酸ジエステルと相互作用しているかどうか調査するために、ジメチルリン酸(DMP)を用いた競合阻害実験を試みた。DMP は、DNA や RNA の部分構造に相当する。Williams らは、Scheme 1-6 で示した二核亜鉛錯体による HPNPP 分解について DMP を用いた競合阻害実験を行い、RNA 分解活性が DMP によって濃度依存的に阻害されることを示している。¹⁰⁶ そこで、二核ビスマス(III)錯体 **Bi₂(L3)** による HPNPP 分解について DMP を用いた競合阻害実験を実施した。**Bi₂(L3)** が触媒する HPNPP 分解の DMP(0.10, 0.50, 1.0, 5.0, 10 mM)存在下における反応初速度 v と、DMP 非存在下における反応初速度 v_0 との比率 v/v_0 と DMP 濃度との関係をプロットした(Figure 2-24)。その結果、DMP は **Bi₂(L3)** の HPNPP 分解活性を濃度依存的かつ緩やかに低下させたことから、二核ビスマス錯体とリン酸ジエステルとの間の比較的弱い相互作用が示唆された。即ち、二核ビスマス錯体は RNA のリン酸ジエステルとの親和性が低く、このことが Figure 2-12 において二核ビスマス錯体 **Bi₂(L3)** の当量数の低減に伴う RNA 分解活性の低下に影響したのではないかと考えられる。ただし、このようなリン酸ジエステルに対する親和性の低さは、非選択的な RNA の分解 (オフターゲット) の回避につながることを期待できる。また、二核ビスマス錯体をキメラ化合物(Figure 1-19)へと適用することで標的 RNA への親和性は改善されると期待している。

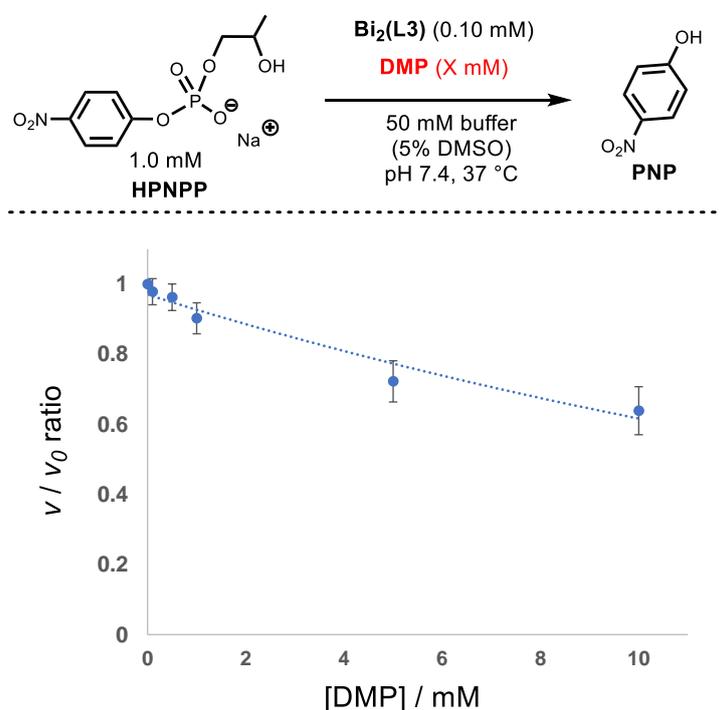


Figure 2-24. Variation in the ratio of the initial rate for HPNPP degradation catalyzed by 0.10 mM **Bi₂(L3)** in the presence of DMP (v) to the initial rate in the absence of DMP (v_0).

これまでの報告や本研究で新たに得られた知見を基に、二核ビスマス(III)錯体による RNA 分解の推定反応機構を以下のように考えた(Figure 2-25)。実験結果から、二核錯体の2つのビスマス中心が反応サイクルに関与し、それらが必須であることが分かっている。ビスマス中心には複数の水分子が配位している可能性が考えられるが、反応サイクルにおいていくつの水分子が関与しているかは現在までのところ定かになっておらず、さらなる検証が必要である。**Bi₂(L7)-acetate** の X 線構造によると 8 配位のビスマス中心が観測され、アセテートとの配位子交換によって複数の水分子が配位可能であることが示唆された。ここでは、それぞれのビスマス中心に水分子が1つずつ配位していると仮定する。まず、2つの水分子が配位した diaqua 種(I)から monohydroxo 種(III)が生成し、それが RNA のリン酸ジエステルと相互作用し、リン酸ジエステルを活性化する(IV)。続いて、ビスマス中心に配位した OH がブレンステッド塩基として作用し、RNA の 2'-OH が脱プロトン化されることで、5 配位環状リン酸エステルの形成を促進する(IV → V)。ビスマス中心に配位している水分子がブレンステッド酸として働くことで、アルコキシドの脱離を加速する(V → VI)。最後に、生成した 2',3'-環状リン酸エステルと水分子が配位子交換することで monohydroxo 種(III)が再生する。pH-プロファイルの結果(Figure 2-21)は、monohydroxo 種(III)が RNA 分解の活性化に重要な化学種であることを示唆している。

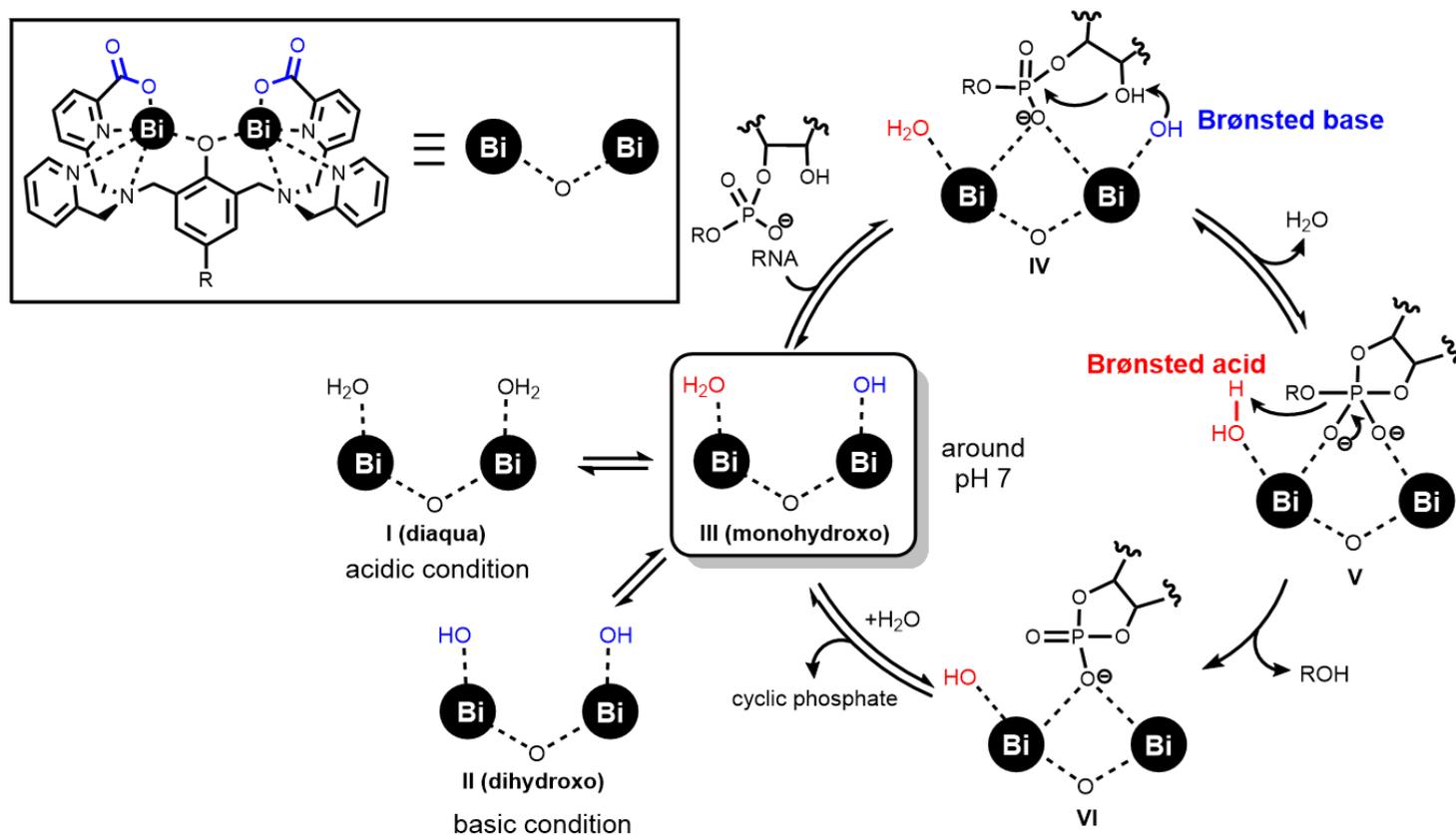


Figure 2-25. Proposed RNA degradation mechanism mediated by dinuclear Bi(III)-complex.

第3章 結論と今後の展望

標的 RNA を化学的に分解する低分子型 RNA 分解誘導剤の開発は、創薬・ケミカルバイオロジー研究において、特に注目されているモダリティの一つである。しかしながら、RNA を化学的に分解誘導する低分子化合物はいくつか報告されているものの、それらの実用化には至っていない。これは、主に既存の RNA 分解誘導剤の RNA 分解活性が十分ではないためと考えられる。そこで、筆者は RNA 創薬・ケミカルバイオロジー研究への応用を志向した革新的な低分子型 RNA 分解誘導剤の開発を目指した。

本研究において筆者は、金属依存型 RNA 分解酵素の触媒機構と金属イオンの特性に着目し、それらに基づいた二核金属錯体を設計・合成し、RNA 分解活性について 2 種類の RNA モデル基質を用いた評価を行った。その結果、生理的条件下で、良好な RNA 分解活性および高い RNA 化学選択性を示す新規二核ビスマス(III)錯体の開発に成功した。その中でも、第二配位圏にカルボキシレート基を導入した配位子から合成した二核ビスマス(III)錯体は安定に存在し、良好な RNA 分解活性を示すことが示唆された(Figure 3-1)。

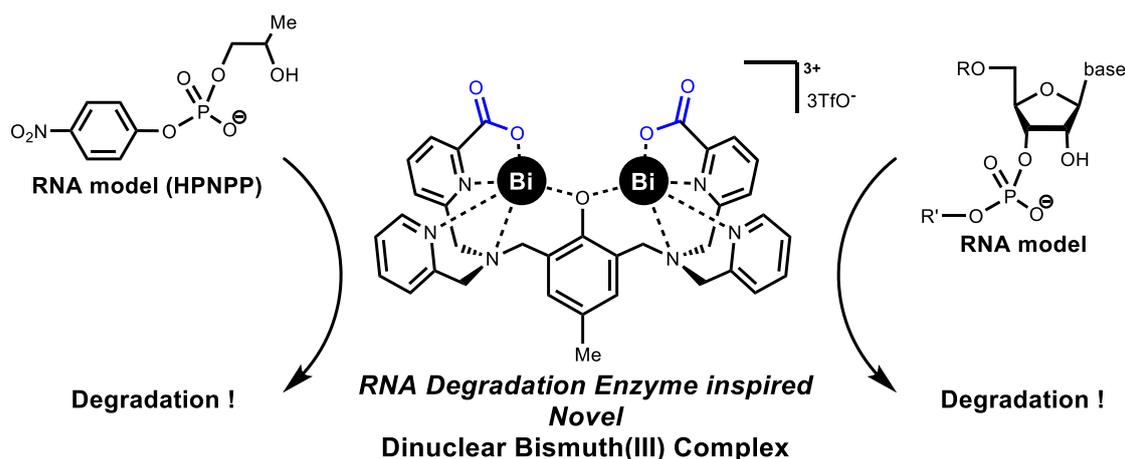


Figure 3-1. Efficient RNA model degradation by novel dinuclear bismuth(III) complexes.

今後は、見出した二核ビスマス(III)錯体を RNA 分解部位として、標的 RNA バインダーと連結させたキメラ化合物を設計・合成し、標的 RNA 分解の *in vitro* での評価を行う(Figure 3-2, A)。その”proof of concept”として、がんなどの疾患に関与することが示唆されている miRNA-210 を標的としたキメラ化合物 **1** などを合成し、*in vitro* における標的 RNA 分解の評価を実施する。さらに、二核ビスマス(III)錯体やキメラ化合物に関して、細胞毒性や細胞膜透過性などの薬物動態を調査し、細胞系への応用を試みる。また、標的 RNA-タンパク質複合体に対する RNA 分解を介したキメラ化合物による阻害も可能になるのではないかと考えている(Figure 3-2, B)。例えば、第1章で述べたように lncRNA の HOTAIR はエピジェネティクス関連タンパク質の一つである LSD1 と相互作用していることが示唆されており、キメラ化合物 **2** を用いることで、LSD1 への結合と標的 RNA の分

解誘導を介した RNA-タンパク質相互作用の阻害が可能になると考えられる。すなわち、RNA-タンパク質の複合体としての機能を阻害できる。このように本研究のさらなる発展によって、低分子化合物による標的 RNA に対して化学的にアプローチする次世代型医薬品の開発への可能性が、今後、大きく開かれる。

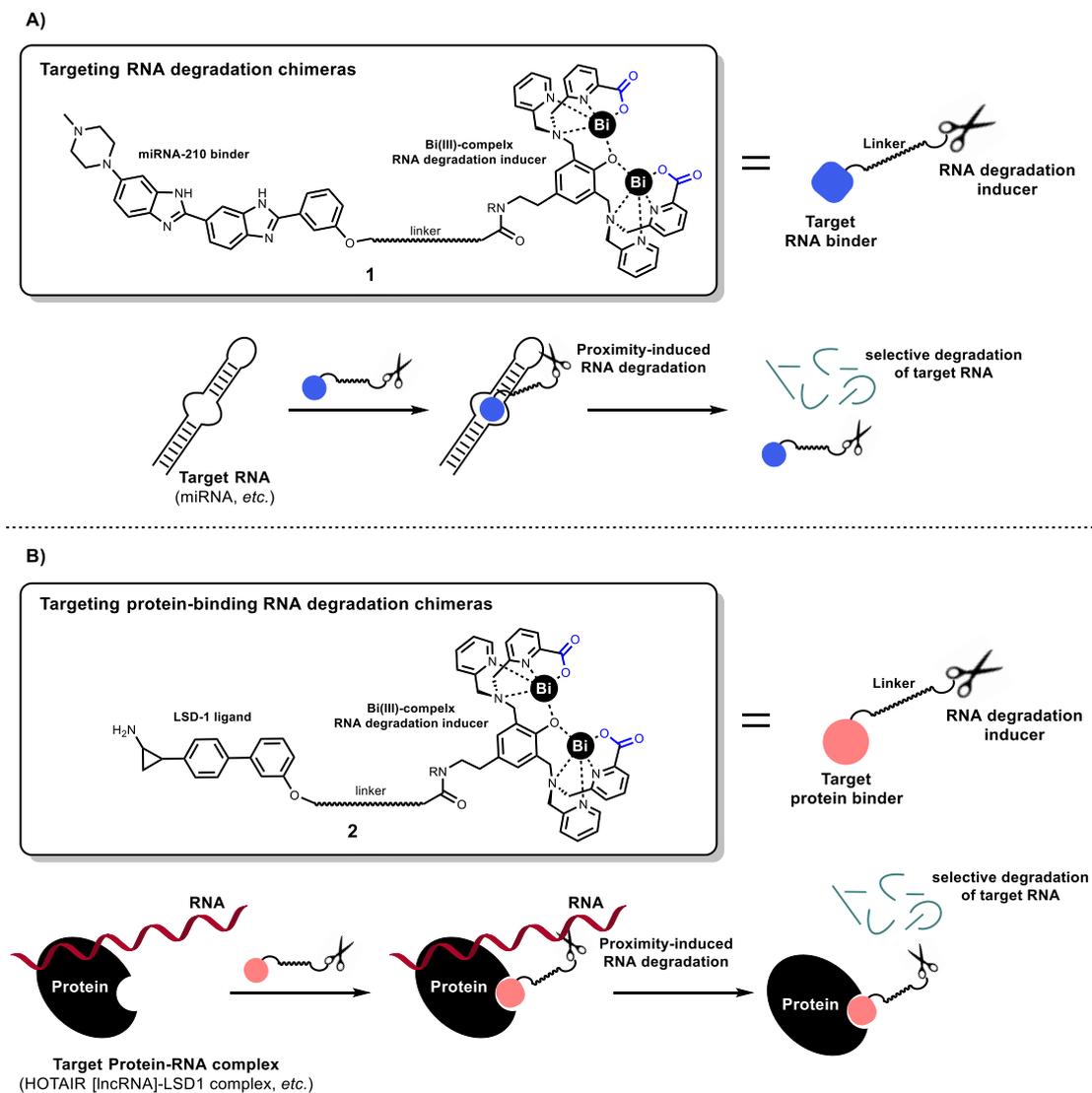


Figure 3-2. Examples of targeting miRNA degradation chimeras (A) and targeting protein-binding RNA degradation chimeras (B).

第4章 参考文献

- (1) Warner, K. D.; Hajdin, C. E.; Weeks, K. M. Principles for Targeting RNA with Drug-like Small Molecules. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2018**, *17*, 547–558.
- (2) Esteller, M. Non-Coding RNAs in Human Disease. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 861–874.
- (3) Singh, I.; Contreras, A.; Cordero, J.; Rubio, K.; Dobersch, S.; Günther, S.; Jeratsch, S.; Mehta, A.; Krüger, M.; Graumann, J.; Seeger, W.; Dobрева, G.; Braun, T.; Barreto, G. MiCEE Is a ncRNA-Protein Complex That Mediates Epigenetic Silencing and Nucleolar Organization. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 990–1001.
- (4) Wiener, D.; Schwartz, S. The Epitranscriptome beyond M6A. *Nat. Rev. Genet.* **2021**, *22*, 119–131.
- (5) Fürtig, B.; Richter, C.; Wöhnert, J.; Schwalbe, H. NMR Spectroscopy of RNA. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 936–962.
- (6) Bermejo, G. A.; Clore, G. M.; Schwieters, C. D. Improving NMR Structures of RNA. *Structure* **2016**, *24*, 806–815.
- (7) Rambo, R. P.; Tainer, J. A. Improving Small-Angle X-Ray Scattering Data for Structural Analyses of the RNA World. *RNA* **2010**, *16*, 638–646.
- (8) Chen, Y.; Pollack, L. SAXS Studies of RNA: Structures, Dynamics, and Interactions with Partners. *WIREs RNA* **2016**, *7*, 512–526.
- (9) Terai, G.; Asai, K. QRNAstruct: A Method for Extracting Secondary Structural Features of RNA via Regression with Biological Activity. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, E130.
- (10) Disney, M. D.; Dwyer, B. G.; Childs-Disney, J. L. Drugging the RNA World. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **2018**, *10*.
- (11) Fu, X. D. Non-Coding RNA: A New Frontier in Regulatory Biology. *Natl. Sci. Rev.* **2014**, *1*, 190–204.
- (12) Meyer, S. M.; Williams, C. C.; Akahori, Y.; Tanaka, T.; Aikawa, H.; Tong, Y.; Childs-Disney, J. L.; Disney, M. D. Small Molecule Recognition of Disease-Relevant RNA Structures. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 7167–7199.
- (13) Rinaldi, C.; Wood, M. J. A. Antisense Oligonucleotides: The next Frontier for Treatment of Neurological Disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 9–22.
- (14) Setten, R. L.; Rossi, J. J.; Han, S. ping. The Current State and Future Directions of RNAi-Based Therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2019**, *18*, 421–446.
- (15) Juliano, R.; Alam, M. R.; Dixit, V.; Kang, H. Mechanisms and Strategies for Effective Delivery of Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4158–4171.
- (16) Vickers, T. A.; Wyatt, J. R.; Freier, S. M. Effects of RNA Secondary Structure on

Cellular Antisense Activity. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1340–1347.

(17) Egli, M.; Manoharan, M. Chemistry, Structure and Function of Approved Oligonucleotide Therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 2529–2573.

(18) Huang, Y. Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *6*, 116–132.

(19) Connelly, C. M.; Moon, M. H.; Schneekloth, J. S. The Emerging Role of RNA as a Therapeutic Target for Small Molecules. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 1077–1090.

(20) Moazed, D.; Noller, H. F. Interaction of Antibiotics with Functional Sites in 16S Ribosomal RNA. *Nature* **1987**, *327*, 389–394.

(21) Mei, H.-Y.; Cui, M.; Heldsinger, A.; Lemrow, S. M.; Loo, J. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Sharmeen, L.; Czarnik, A. W. Inhibitors of Protein-RNA Complexation That Target the RNA: Specific Recognition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAR RNA by Small Organic Molecules. *Biochemistry* **1998**, *37*, 14204–14212.

(22) Bozdogan, B.; Appelbaum, P. C. Oxazolidinones: Activity, Mode of Action, and Mechanism of Resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *23*, 113–119.

(23) Howe, J. A.; Wang, H.; Fischmann, T. O.; Balibar, C. J.; Xiao, L.; Galgoci, A. M.; Malinverni, J. C.; Mayhood, T.; Villafania, A.; Nahvi, A.; Murgolo, N.; Barbieri, C. M.; Mann, P. A.; Carr, D.; Xia, E.; Zuck, P.; Riley, D.; Painter, R. E.; Walker, S. S.; Sherborne, B.; De Jesus, R.; Pan, W.; Plotkin, M. A.; Wu, J.; Rindgen, D.; Cummings, J.; Garlisi, C. G.; Zhang, R.; Sheth, P. R.; Gill, C. J.; Tang, H.; Roemer, T. Selective Small-Molecule Inhibition of an RNA Structural Element. *Nature* **2015**, *526*, 672–677.

(24) Ratni, H.; Ebeling, M.; Baird, J.; Bendels, S.; Bylund, J.; Chen, K. S.; Denk, N.; Feng, Z.; Green, L.; Guerard, M.; Jablonski, P.; Jacobsen, B.; Khwaja, O.; Kletzl, H.; Ko, C. P.; Kustermann, S.; Marquet, A.; Metzger, F.; Mueller, B.; Naryshkin, N. A.; Paushkin, S. V.; Pinard, E.; Poirier, A.; Reutlinger, M.; Weetall, M.; Zeller, A.; Zhao, X.; Mueller, L. Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (SMN2) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6501–6517.

(25) Baranello, G.; Darras, B. T.; Day, J. W.; Deconinck, N.; Klein, A.; Masson, R.; Mercuri, E.; Rose, K.; El-Khairi, M.; Gerber, M.; Gorni, K.; Khwaja, O.; Kletzl, H.; Scalco, R. S.; Seabrook, T.; Fontoura, P.; Servais, L. Risdiplam in Type 1 Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 915–923.

(26) Asare-Okai, P. N.; Chow, C. S. A Modified Fluorescent Intercalator Displacement Assay for RNA Ligand Discovery. *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 269–276.

(27) Tran, T.; Disney, M. D. Identifying the Preferred RNA Motifs and Chemotypes That Interact by Probing Millions of Combinations. *Nat. Commun.* **2012**, *3*.

(28) Murata, A.; Harada, Y.; Fukuzumi, T.; Nakatani, K. Fluorescent Indicator

Displacement Assay of Ligands Targeting 10 MicroRNA Precursors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7101–7106.

(29) Sztuba-Solinska, J.; Shenoy, S. R.; Gareiss, P.; Krumpe, L. R. H.; Le Grice, S. F. J.; O’Keefe, B. R.; Schneekloth, J. S. Identification of Biologically Active, HIV TAR RNA-Binding Small Molecules Using Small Molecule Microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8402–8410.

(30) Connelly, C. M.; Abulwerdi, F. A.; Schneekloth, J. S. Discovery of RNA Binding Small Molecules Using Small Molecule Microarrays. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1518*, 157–175.

(31) Nakatani, K.; Sando, S.; Saito, I. Scanning of Guanine-Guanine Mismatches in DNA by Synthetic Ligands Using Surface Plasmon Resonance. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 51–55.

(32) Peng, T.; Nakatani, K. Binding of Naphthyridine Carbamate Dimer to the (CGG)_n Repeat Results in the Disruption of the G-C Base Pairing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7280–7283.

(33) Shibata, T.; Nagano, K.; Ueyama, M.; Ninomiya, K.; Hirose, T.; Nagai, Y.; Ishikawa, K.; Kawai, G.; Nakatani, K. Small Molecule Targeting r(UGGAA)_n Disrupts RNA Foci and Alleviates Disease Phenotype in Drosophila Model. *Nat. Commun.* **2021**, *12*.

(34) Velagapudi, S. P.; Gallo, S. M.; Disney, M. D. Sequence-Based Design of Bioactive Small Molecules That Target Precursor MicroRNAs. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 291–297.

(35) Disney, M. D.; Winkelsas, A. M.; Velagapudi, S. P.; Southern, M.; Fallahi, M.; Childs-Disney, J. L. Inforna 2.0: A Platform for the Sequence-Based Design of Small Molecules Targeting Structured RNAs. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1720–1728.

(36) Costales, M. G.; Haga, C. L.; Velagapudi, S. P.; Childs-Disney, J. L.; Phinney, D. G.; Disney, M. D. Small Molecule Inhibition of MicroRNA-210 Reprograms an Oncogenic Hypoxic Circuit. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3446–3455.

(37) Connelly, C. M.; Numata, T.; Boer, R. E.; Moon, M. H.; Sinniah, R. S.; Barchi, J. J.; Ferré-D’Amaré, A. R.; Schneekloth, J. S. Synthetic Ligands for PreQ 1 Riboswitches Provide Structural and Mechanistic Insights into Targeting RNA Tertiary Structure. *Nat. Commun.* **2019**, *10*.

(38) Chen, J. L.; Zhang, P.; Abe, M.; Aikawa, H.; Zhang, L.; Frank, A. J.; Zembryski, T.; Hubbs, C.; Park, H.; Withka, J.; Steppan, C.; Rogers, L.; Cabral, S.; Pettersson, M.; Wager, T. T.; Fountain, M. A.; Rumbaugh, G.; Childs-Disney, J. L.; Disney, M. D. Design, Optimization, and Study of Small Molecules That Target Tau Pre-mRNA and Affect Splicing. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 8706–8727.

(39) Costales, M. G.; Hoch, D. G.; Abegg, D.; Childs-Disney, J. L.; Velagapudi, S. P.; Adibekian, A.; Disney, M. D. A Designed Small Molecule Inhibitor of a Non-Coding RNA Sensitizes HER2 Negative Cancers to Herceptin. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2960–2974.

- (40) Xiao, L.; Habibian, M.; Kool, E. T. Site-Selective RNA Functionalization via DNA-Induced Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 16357–16363.
- (41) Xiao, L.; Jun, Y. W.; Kool, E. T. DNA Tiling Enables Precise Acylation-Based Labeling and Control of mRNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 26798–26805.
- (42) Fang, L.; Xiao, L.; Jun, Y. W.; Onishi, Y.; Kool, E. T. Reversible 2' -OH Acylation Enhances RNA Stability. *Nat. Chem.* **2023**.
- (43) Costales, M. G.; Childs-Disney, J. L.; Haniff, H. S.; Disney, M. D. How We Think about Targeting RNA with Small Molecules. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 8880–8900.
- (44) Ren, Y.; Wang, Y. F.; Zhang, J.; Wang, Q. X.; Han, L.; Mei, M.; Kang, C. S. Targeted Design and Identification of AC1NOD4Q to Block Activity of HOTAIR by Abrogating the Scaffold Interaction with EZH2. *Clin. Epigenetics* **2019**, *11*.
- (45) Ursu, A.; Childs-Disney, J. L.; Angelbello, A. J.; Costales, M. G.; Meyer, S. M.; Disney, M. D. Gini Coefficients as a Single Value Metric to Define Chemical Probe Selectivity. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 2031–2040.
- (46) Costales, M. G.; Matsumoto, Y.; Velagapudi, S. P.; Disney, M. D. Small Molecule Targeted Recruitment of a Nuclease to RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6741–6744.
- (47) Costales, M. G.; Suresh, B.; Vishnu, K.; Disney, M. D. Targeted Degradation of a Hypoxia-Associated Non-Coding RNA Enhances the Selectivity of a Small Molecule Interacting with RNA. *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 1180-1186.
- (48) Haniff, H. S.; Tong, Y.; Liu, X.; Chen, J. L.; Suresh, B. M.; Andrews, R. J.; Peterson, J. M.; O'Leary, C. A.; Benhamou, R. I.; Moss, W. N.; Disney, M. D. Targeting the SARS-COV-2 RNA Genome with Small Molecule Binders and Ribonuclease Targeting Chimera (RiboTAC) Degradable. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1713–1721.
- (49) Zhang, P.; Liu, X.; Abegg, D.; Tanaka, T.; Tong, Y.; Benhamou, R. I.; Baisden, J.; Crynen, G.; Meyer, S. M.; Cameron, M. D.; Chatterjee, A. K.; Adibekian, A.; Childs-Disney, J. L.; Disney, M. D. Reprogramming of Protein-Targeted Small-Molecule Medicines to RNA by Ribonuclease Recruitment. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 13044–13055.
- (50) Liu, X.; Haniff, H. S.; Childs-Disney, J. L.; Shuster, A.; Aikawa, H.; Adibekian, A.; Disney, M. D. Targeted Degradation of the Oncogenic MicroRNA 17-92 Cluster by Structure-Targeting Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 6970–6982.
- (51) Gupta, A.; Rath, P. C. Curcumin, a Natural Antioxidant, Acts as a Noncompetitive Inhibitor of Human RNase L in Presence of Its Cofactor 2-5A in Vitro. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*.
- (52) Chen, C. B.; Sigman, D. S. Sequence-Specific Scission of RNA by 1,10-Phenanthroline-Copper Linked to Deoxyoligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6572–6574.

- (53) Guan, L.; Disney, M. D. Small-Molecule-Mediated Cleavage of RNA in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1462–1465.
- (54) Angelbello, A. J.; Disney, M. D. Bleomycin Can Cleave an Oncogenic Noncoding RNA. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 43–47.
- (55) Benhamou, R. I.; Angelbello, A. J.; Andrews, R. J.; Wang, E. T.; Moss, W. N.; Disney, M. D. Structure-Specific Cleavage of an RNA Repeat Expansion with a Dimeric Small Molecule Is Advantageous over Sequence-Specific Recognition by an Oligonucleotide. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 485–493.
- (56) Li, Y.; Disney, M. D. Precise Small Molecule Degradation of a Noncoding RNA Identifies Cellular Binding Sites and Modulates an Oncogenic Phenotype. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3065–3071.
- (57) Wang, J.; Schultz, P. G.; Johnson, K. A. Mechanistic Studies of a Small-Molecule Modulator of SMN2 Splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, E4604–E4612.
- (58) Mikutis, S.; Rebelo, M.; Yankova, E.; Gu, M.; Tang, C.; Coelho, A. R.; Yang, M.; Hazemi, M. E.; Pires de Miranda, M.; Eleftheriou, M.; Robertson, M.; Vassiliou, G. S.; Adams, D. J.; Simas, J. P.; Corzana, F.; Schneekloth, J. S.; Tzelepis, K.; Bernardes, G. J. L. Proximity-Induced Nucleic Acid Degradation (PINAD) Approach to Targeted RNA Degradation Using Small Molecules. *ACS Cent. Sci.* **2023**.
- (59) Matsuda, S.; Ishikubo, A.; Kuzuya, A.; Yashiro, M.; Komiyama, M. Conjugates of a Dinuclear Zinc(II) Complex and DNA Oligomers as Novel Sequence-Selective Artificial Ribonucleases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3284–3286.
- (60) Magda, D.; Miller, R. A.; Sessler, J. L.; Iverson, B. L. Site-Specific Hydrolysis of RNA by Europium(III) Texaphyrin Conjugated to a Synthetic Oligodeoxyribonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7439–7440.
- (61) Bashkin, J. K.; Frolova, E. I.; Sampath, U. Sequence-Specific Cleavage of HIV MRNA by a Ribozyme Mimic. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5981–5982.
- (62) Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. The Time Required for Water Attack at the Phosphorus Atom of Simple Phosphodiester and of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4052–4055.
- (63) Thompson, J. E.; Kutateladze, T. G.; Schuster, M. C.; Venegas, F. D.; Messmore, J. M.; Raines, R. T. Limits to Catalysis by Ribonuclease A. *Bioorg. Chem.* **1995**, *23*, 471–481.
- (64) Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lönnberg, H. Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the Phosphodiester Bonds of RNA by Brønsted Acids and Bases. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 961–990.
- (65) Lönnberg, H. Cleavage of RNA Phosphodiester Bonds by Small Molecular Entities: A Mechanistic Insight. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1687–1703.

- (66) Desbouis, D.; Troitsky, I. P.; Belousoff, M. J.; Spiccia, L.; Graham, B. Copper(II), Zinc(II) and Nickel(II) Complexes as Nuclease Mimetics. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 897–937.
- (67) Breslow, R.; Labelle, M. Sequential General Base-Acid Catalysis in the Hydrolysis of RNA by Imidazole. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2655–2659.
- (68) Huff, J. W.; Sastry, K. S.; Gordon, M. P.; Wacker, W. E. C. The Action of Metal Ions on Tobacco Mosaic Virus Ribonucleic Acid. *Biochemistry* **1964**, *3*, 501–506.
- (69) Brown, R. S.; Hingerty, B. E.; Dewan, J. C.; Klug, A. Pb(II)-Catalyzed Cleavage of the Sugar-Phosphate Backbone of Yeast tRNA^{-Phe} -Implications for Lead Toxicity and Self-Splicing RNA. *Nature* **1983**, *303*, 543–546.
- (70) Stern, M. K.; Bashkin, J. K.; Sall, E. D. Hydrolysis of RNA by Transition-Metal Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5357–5359.
- (71) Butzow, J. J.; Eichhorn, G. L. Interactions of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. IV. Degradation of Polyribonucleotides by Zinc and Other Divalent Metal Ions. *Biopolymers* **1965**, *3*, 95–107.
- (72) Ikenaga, H.; Inoue, Y. Metal(II) Ion Catalyzed Transphosphorylation of Four Homodinucleotides and Five Pairs of Dinucleotide Sequence Isomers. *Biochemistry* **1974**, *13*, 577–582.
- (73) Farkas, W. R. Depolymerization of Ribonucleic Acid by Plumbous Ion. *Biochim. Biophys. Acta.* **1967**, *155*, 401–409.
- (74) Chatterjee, A.; Zhang, K.; Rao, Y.; Sharma, N.; Giammar, D. E.; Parker, K. M. Metal-Catalyzed Hydrolysis of RNA in Aqueous Environments. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56*, 3564–3574.
- (75) Dange, V.; van Atta, R. B.; Hecht, S. M. A Mn²⁺-Dependent Ribozyme. *Science* **1990**, *248*, 585–588.
- (76) Torres, R. A.; Himo, F.; Bruice, T. C.; Noodleman, L.; Lovell, T. Theoretical Examination of Mg²⁺-Mediated Hydrolysis of a Phosphodiester Linkage as Proposed for the Hammerhead Ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9861–9867.
- (77) Rordorf, B. F.; Kearns, D. R. Effect of Europium(III) on the Thermal Denaturation and Cleavage of Transfer Ribonucleic Acids. *Biopolymers* **1976**, *15*, 1491–1504.
- (78) Komiyama, M.; Takeda, N.; Shigekawa, H. Hydrolysis of DNA and RNA by Lanthanide Ions: Mechanistic Studies Leading to New Applications. *Chem. Commun.* **1999**, 1443–1451.
- (79) Eichhorn, G. L.; Butzow, J. J. Interactions of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. III. Degradation of Polyribonucleotides by Lanthanum Ions. *Biopolymers* **1965**, *3*, 79–94.

- (80) Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Metal Complexes: Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485–493.
- (81) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P. Progress in Artificial Metallonucleases. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5545–5559.
- (82) Graham, D. R.; Marshall, L. E.; Reich, K. A.; Sigman, D. S. Cleavage of DNA by Coordination Complexes. Superoxide Formation in the Oxidation of 1,10-Phenanthroline-Cuprous Complexes by Oxygen-Relevance to DNA-Cleavage Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5421–5423.
- (83) Korhonen, H.; Koivusalo, T.; Toivola, S.; Mikkola, S. There Is No Universal Mechanism for the Cleavage of RNA Model Compounds in the Presence of Metal Ion Catalysts. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8324–8339.
- (84) Mikkola, S.; Lönnberg, T.; Lönnberg, H. Phosphodiester Models for Cleavage of Nucleic Acids. Beilstein *J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 803–837.
- (85) Shelton, V. M.; Morrow, J. R. Catalytic Transesterification and Hydrolysis of RNA by Zinc(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4295–4299.
- (86) Kim, E. E.; Wyckoff, H. W. Reaction Mechanism of Alkaline Phosphatase Based on Crystal Structures Two-Metal Ion Catalysis. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 449–464.
- (87) Klabunde, T.; Sträter, N.; Fröhlich, R.; Witzel, H.; Krebs, B. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 737–748.
- (88) Stec, B.; Hehir, M. J.; Brennan, C.; Nolte, M.; Kantrowitz, E. R. Kinetic and X-Ray Structural Studies of Three Mutant E. Coli Alkaline Phosphatases: Insights into the Catalytic Mechanism Without the Nucleophile Ser102. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 647–662.
- (89) Selleck, C.; Clayton, D.; Gahan, L. R.; Mitić, N.; McGeary, R. P.; Pedroso, M. M.; Guddat, L. W.; Schenk, G. Visualization of the Reaction Trajectory and Transition State in a Hydrolytic Reaction Catalyzed by a Metalloenzyme. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 4778–4781.
- (90) Young, M. J.; Chin, J. Dinuclear Copper(II) Complex That Hydrolyzes RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10577–10578.
- (91) Iranzo, O.; Elmer, T.; Richard, J. P.; Morrow, J. R. Cooperativity between Metal Ions in the Cleavage of Phosphate Diesters and RNA by Dinuclear Zn(II) Catalysts. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7737–7746.
- (92) McCue, K. P.; Morrow, J. R. Hydrolysis of a Model for the 5' -Cap of mRNA by Dinuclear Copper(II) and Zinc(II) Complexes. Rapid Hydrolysis by Four Copper(II) Ions. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6136–6142.
- (93) Rossi, P.; Felluga, F.; Tecilla, P.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Scrimin,

- P. A Bimetallic Helical Heptapeptide as a Transphosphorylation Catalyst in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6948–6949.
- (94) Wang, Q.; Lönnberg, H. Simultaneous Interaction with Base and Phosphate Moieties Modulates the Phosphodiester Cleavage of Dinucleoside 3',5'-Monophosphates by Dinuclear Zn²⁺ complexes of Di(Azacrown) Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10716–10728.
- (95) Scarso, A.; Scheffer, U.; Göbel, M.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Scrimin, P. A Peptide Template as an Allosteric Supramolecular Catalyst for the Cleavage of Phosphate Esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5144–5149.
- (96) Cacciapaglia, R.; Casnati, A.; Mandolini, L.; Peracchi, A.; Reinhoudt, D. N.; Salvio, R.; Sartori, A.; Ungaro, R. Efficient and Selective Cleavage of RNA Oligonucleotides by Calix[4]Arene-Based Synthetic Metallonucleases. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12512–12520.
- (97) Iranzo, O.; Elmer, T.; Richard, J. P.; Morrow, J. R. Cooperativity between Metal Ions in the Cleavage of Phosphate Diesters and RNA by Dinuclear Zn(II) Catalysts. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 7737–7746.
- (98) Iranzo, O.; Kovalevsky, A. Y.; Morrow, J. R.; Richard, J. P. Physical and Kinetic Analysis of the Cooperative Role of Metal Ions in Catalysis of Phosphodiester Cleavage by a Dinuclear Zn(II) Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1988–1993.
- (99) Yashiro, M.; Kaneiwa, H.; Onaka, K.; Komiyama, M. Dinuclear Zn²⁺ Complexes in the Hydrolysis of the Phosphodiester Linkage in a Diribonucleoside Monophosphate Diester. *Journal of the Chemical Society. Dalton Trans.* **2004**, *4*, 605–610.
- (100) Yamada, K.; Takahashi, Y. I.; Yamamura, H.; Araki, S.; Saito, K.; Kawai, M. Phosphodiester Bond Cleavage Mediated by a Cyclic β -Sheet Peptide-Based Dinuclear Zinc(II) Complex. *Chem. Commun.* **2000**, 1315–1316.
- (101) Takebayashi, S.; Ikeda, M.; Takeuchi, M.; Shinkai, S. Metal Ion Induced Allosteric Transition in the Catalytic Activity of an Artificial Phosphodiesterase. *Chem. Commun.* **2004**, 420–421.
- (102) Yashiro, M.; Ishikubo, A.; Komiyama, M. Preparation and Study of Dinuclear Zinc(Ii) Complex for the Efficient Hydrolysis of the Phosphodiester Linkage in a Diribonucleotide. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1793–1794.
- (103) Komiyama, M.; Kina, S.; Matsumura, K.; Sumaoka, J.; Tobey, S.; Lynch, V. M.; Anslyn, E. Trinuclear Copper(II) Complex Showing High Selectivity for the Hydrolysis of 2' -5' over 3' -5' for UpU and 3' -5' over 2' -5' for ApA Ribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13731–13736.
- (104) Yashiro, M.; Ishikubo, A.; Komiyama, M. Dinuclear Lanthanum(III) Complex for Efficient Hydrolysis of RNA. *J. Biochem.* **1996**, *120*, 1067–1069.

- (105) Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. Comparing a Mononuclear Zn(II) Complex with Hydrogen Bond Donors with a Dinuclear Zn(II) Complex for Catalysing Phosphate Ester Cleavage. *Chem. Commun.* **2006**, 1845–1847.
- (106) Feng, G.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. Efficient Phosphodiester Binding and Cleavage by a Zn(II) Complex Combining Hydrogen-Bonding Interactions and Double Lewis Acid Activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7056–7059.
- (107) Linjalahti, H.; Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Mikkola, S.; Williams, N. H. Cleavage and Isomerization of UpU Promoted by Dinuclear Metal Ion Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4232–4233.
- (108) Nwe, K.; Andolina, C. M.; Morrow, J. R. Tethered Dinuclear Europium(III) Macrocyclic Catalysts for the Cleavage of RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14861–14871.
- (109) Mark Wall; Hynes, R. C.; Chin, J. Double Lewis Acid Activation in Phosphate Diester Cleavage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1633–1635.
- (110) Breslow, R.; Huang, D.-L. Effects of Metal Ions, Including Mg²⁺ and Lanthanides, on the Cleavage of Ribonucleotides and RNA Model Compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 4080–4083.
- (111) Morrow, J. R.; Buttrey, L. A.; Berback, K. A. Transesterification of a Phosphate Diester by Divalent and Trivalent Metal Ions. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 16–20.
- (112) Kuusela, S.; Lönnberg, H. Metal Ion-Promoted Hydrolysis of Uridine 2' , 3' - Cyclic Monophosphate: Effect of Metal Chelates and Uncomplexed Aquo Ions. *J. Phys. Org. Chem.* **1992**, *5*, 803–811.
- (113) Irisawa, M.; Takeda, N.; Komiyama, M. Synergetic Catalysis by Two Non-Lanthanide Metal Ions for Hydrolysis of Diribonucleotides. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1221–1222.
- (114) Saleh, L. Y.; Ora, M.; Lönnberg, T. Cleavage of an RNA Model Compound by an Arylmercury Complex. *ChemBioChem* **2021**, *22*, cbic.202000799.
- (115) Ukale, D.; Lönnberg, T. Organomercury Nucleic Acids: Past, Present and Future. *ChemBioChem* **2021**, *22*.
- (116) Trawick, B. N.; Daniher, A. T.; Bashkin, J. K. Inorganic Mimics of Ribonucleases and Ribozymes: From Random Cleavage to Sequence-Specific Chemistry to Catalytic Antisense Drugs. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 939–960.
- (117) Niittymäki, T.; Lönnberg, H. Artificial Ribonucleases. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 15–25.
- (118) Jay, F. D. I.; Zuzana, H.; Zdenek, H.; Steven, R. J.; David, A. M. Crystal Structure of the Ribonuclease H Domain of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Science* **1991**, *252*, 88–95.
- (119) Goedken, E. R.; Marqusee, S. Co-Crystal of Escherichia Coli RNase H with Mn²⁺

- Ions Reveals Two Divalent Metals Bound in the Active Site. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7266–7271.
- (120) Tadokoro, T.; Kanaya, S. Ribonuclease H: Molecular Diversities, Substrate Binding Domains, and Catalytic Mechanism of the Prokaryotic Enzymes. *FEBS J.* **2009**, *276*, 1482–1493.
- (121) De Vivo, M.; Dal Peraro, M.; Klein, M. L. Phosphodiester Cleavage in Ribonuclease H Occurs via an Associative Two-Metal-Aided Catalytic Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10955–10962.
- (122) Durr, S. L.; Bohuszewicz, O.; Berta, D.; Suardiaz, R.; Jambrina, P. G.; Peter, C.; Shao, Y.; Rosta, E. The Role of Conserved Residues in the DEDDh Motif: The Proton-Transfer Mechanism of HIV-1 RNase H. *ACS Catal.* **2021**, *11*, 7915–7927.
- (123) Symons, R. H. Self-Cleavage of RNA in the Replication of Small Pathogens of Plants and Animals. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 445–450.
- (124) Weinberg, Z.; Kim, P. B.; Chen, T. H.; Li, S.; Harris, K. A.; Lünse, C. E.; Breaker, R. R. New Classes of Self-Cleaving Ribozymes Revealed by Comparative Genomics Analysis. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 606–610.
- (125) Uebayasi, M.; Uchimaru, T.; Koguma, T.; Sawata, S.; Shimayama, T.; Kazunari Taira. Theoretical and Experimental Considerations on the Hammerhead Ribozyme Reactions: Divalent Magnesium Ion Mediated Cleavage of Phosphorus-Oxygen Bonds. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7414–7420.
- (126) Sawata, S.; Komiyama, M.; Taira, K. Kinetic Evidence Based on Solvent Isotope Effects for the Nonexistence of a Proton-Transfer Process in Reactions Catalyzed by a Hammerhead Ribozyme: Implication to the Double-Metal-Ion Mechanism of Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2357–2358.
- (127) Takagi, Y.; Sawata, S.; Yoshinari, K.; Taira, K. Molecular Recognition and Mechanism of Action of Hammerhead Ribozyme-Metalloenzyme. *油化学* **1994**, *43*, 975–983.
- (128) Pontius, B. W.; Lott, W. B.; Von Hippel, P. H. Observations on Catalysis by Hammerhead Ribozymes Are Consistent with a Two-Divalent-Metal-Ion Mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 2290–2294.
- (129) Dahm, S. C.; Derrick, W. B.; Uhlenbeck, O. C. Evidence for the Role of Solvated Metal Hydroxide in the Hammerhead Cleavage Mechanism. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13040–13045.
- (130) Teplova, M.; Falschlunger, C.; Krasheninina, O.; Egger, M.; Ren, A.; Patel, D. J.; Micura, R. Crucial Roles of Two Hydrated Mg²⁺ Ions in Reaction Catalysis of the Pistol Ribozyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 2837–2843.
- (131) Joseph, N. N.; Roy, R. N.; Steitz, T. A. Molecular Dynamics Analysis of Mg²⁺-

- Dependent Cleavage of a Pistol Ribozyme Reveals a Fail-Safe Secondary Ion for Catalysis. *J. Comput. Chem.* **2020**, *41*, 1345–1352.
- (132) Pezzato, C.; Chen, J. L. Y.; Galzerano, P.; Salvi, M.; Prins, L. J. Catalytic Signal Amplification for the Discrimination of ATP and ADP Using Functionalised Gold Nanoparticles. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6811–6820.
- (133) Iyer, S.; Hengge, A. C. The Effects of Sulfur Substitution for the Nucleophile and Bridging Oxygen Atoms in Reactions of Hydroxyalkyl Phosphate Esters. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4819–4829.
- (134) Selmeczi, K.; Michel, C.; Milet, A.; Gautier-Luneau, I.; Philouze, C.; Pierre, J. L.; Schnieders, D.; Rompel, A.; Belle, C. Structural, Kinetic, and Theoretical Studies on Models of the Zinc-Containing Phosphodiesterase Active Center: Medium-Dependent Reaction Mechanisms. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9093–9106.
- (135) Briand, G. G.; Burford, N. Bismuth Compounds and Preparations with Biological or Medicinal Relevance. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2601–2658.
- (136) Li, H.; Sun, H. Recent Advances in Bioinorganic Chemistry of Bismuth. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 74–83.
- (137) Keogan, D. M.; Griffith, D. M. Current and Potential Applications of Bismuth-Based Drugs. *Molecules* **2014**, *19*, 15258–15297.
- (138) Griffith, D. M.; Li, H.; Werrett, M. V.; Andrews, P. C.; Sun, H. Medicinal Chemistry and Biomedical Applications of Bismuth-Based Compounds and Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12037–12069.
- (139) Mohan, R. Green Bismuth. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 336.
- (140) Sadler, P. J.; Li, H.; Sun, H. Coordination Chemistry of Metals in Medicine: Target Sites for Bismuth. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185*, 689–709.
- (141) Stavila, V.; Davidovich, R. L.; Gulea, A.; Whitmire, K. H. Bismuth(III) Complexes with Aminopolycarboxylate and Polyaminopolycarboxylate Ligands: Chemistry and Structure. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2782–2810.
- (142) Yang, N.; Sun, H. Biocoordination Chemistry of Bismuth: Recent Advances. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2354–2366.
- (143) Ge, R.; Sun, H. Bioinorganic Chemistry of Bismuth and Antimony: Target Sites of Metallo drugs. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 267–274.
- (144) Dimroth, K.; Witzel, H.; Hulsén, W.; Mirbach, H. Über Die Hydrolyse von Ribonucleinsäuren in Gegenwart von Metallhydroxyden. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1959**, *620*, 94–108.
- (145) Borovik, A. S.; Papaefthymiou, V.; Taylor, -Lucille F; Anderson, O. P.; Que, L. Models for Iron-Oxo Proteins. Structures and Properties of Fe(II)Fe(III), Zn(II)Fe(III), and

- Fe(II)Ga(III) Complexes with (u-Phenoxy)Bis(u-Carboxylato)Dimetal Cores. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6183–6195.
- (146) Jarenmark, M.; Kappen, S.; Haukka, M.; Nordlander, E. Symmetrical and Unsymmetrical Dizinc Complexes as Models for the Active Sites of Hydrolytic Enzymes. *Dalton Trans.* **2008**, 993–996.
- (147) Branum, M. E.; Que, L.; Branum, M.; Que, L. Double-Strand DNA Hydrolysis by Dilanthanide Complexes. *JBIC* **1999**, *4*, 593–600.
- (148) Wang, Q.; Tan, K.; Wang, H.; Shang, J.; Wan, Y.; Liu, X.; Weng, X.; Wang, F. Orthogonal Demethylase-Activated Deoxyribozyme for Intracellular Imaging and Gene Regulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6895–6904.
- (149) Fanning, A. M.; Plush, S. E.; Gunnlaugsson, T. Tuning the Properties of Cyclen Based Lanthanide Complexes for Phosphodiester Hydrolysis; the Role of Basic Cofactors. *Chem. Commun.* **2006**, 3791–3793.
- (150) Fanning, A. M.; Plush, S. E.; Gunnlaugsson, T. Tri- and Tetra-Substituted Cyclen Based Lanthanide(III) Ion Complexes as Ribonuclease Mimics: A Study into the Effect of Log K_a , Hydration and Hydrophobicity on Phosphodiester Hydrolysis of the RNA-Model 2-Hydroxypropyl-4-Nitrophenyl Phosphate (HPNP). *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5804–5816.
- (151) Farquhar, E. R.; Richard, J. P.; Morrow, J. R. Formation and Stability of Mononuclear and Dinuclear Eu(III) Complexes and Their Catalytic Reactivity toward Cleavage of an RNA Analog. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7169–7177.

第5章 実験項

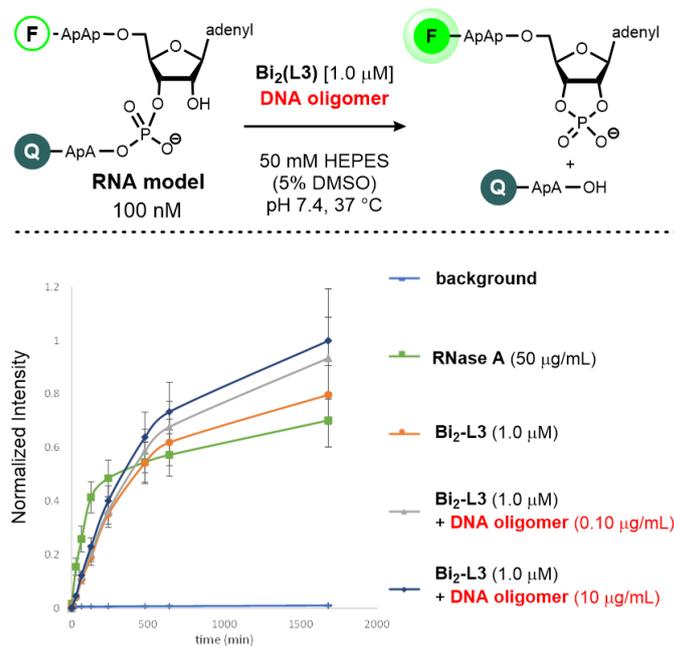


Figure S1. No influence of additive for the RNA-oligo cleavage by Bi-complex. DNA oligomer competitive inhibition assay. DNA oligomer: DNA solution from Calf Thymus, <2000bp, produced by FUJIFILM Wako.

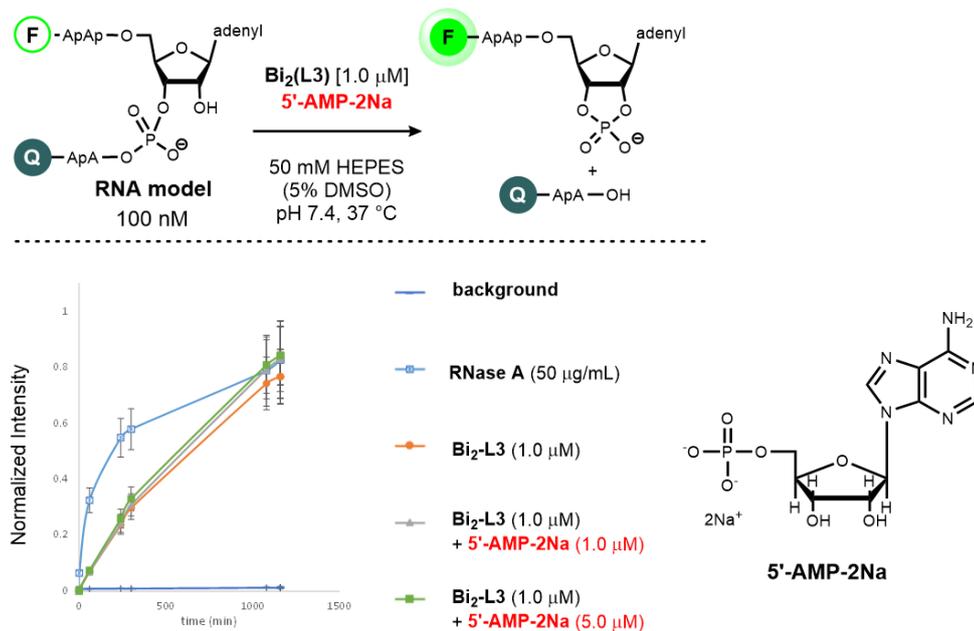


Figure S2. No influence of additive for the RNA-oligo cleavage by Bi-complex. 5'-AMP-2Na competitive inhibition assay.

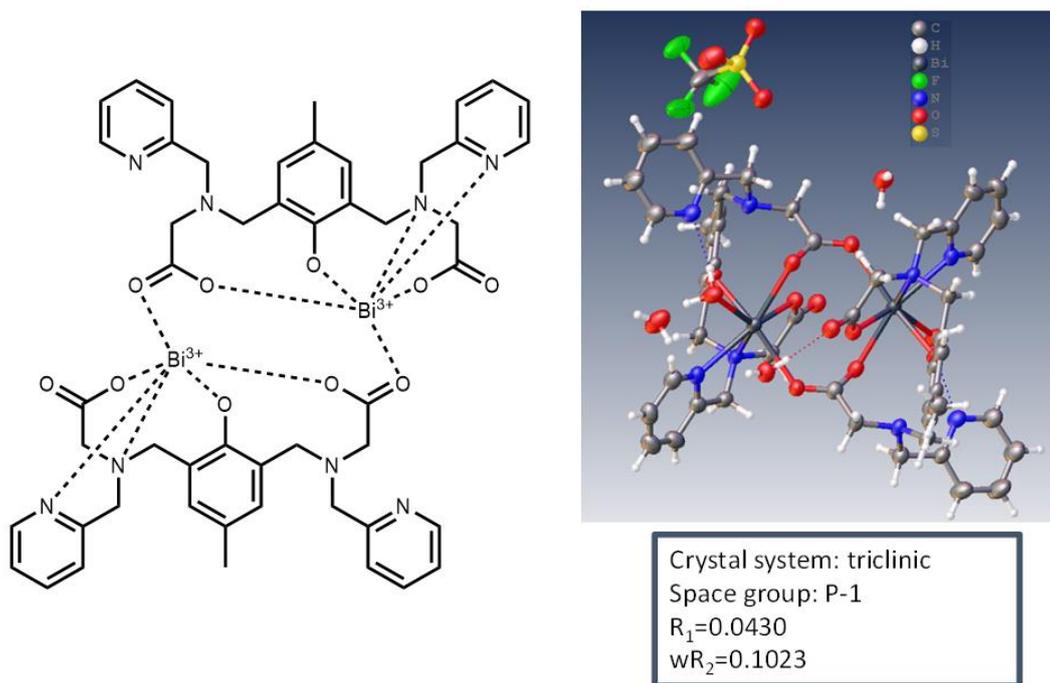


Figure S3. Chemical and crystal structure of $\text{Bi}_2(\text{L2})_2$.

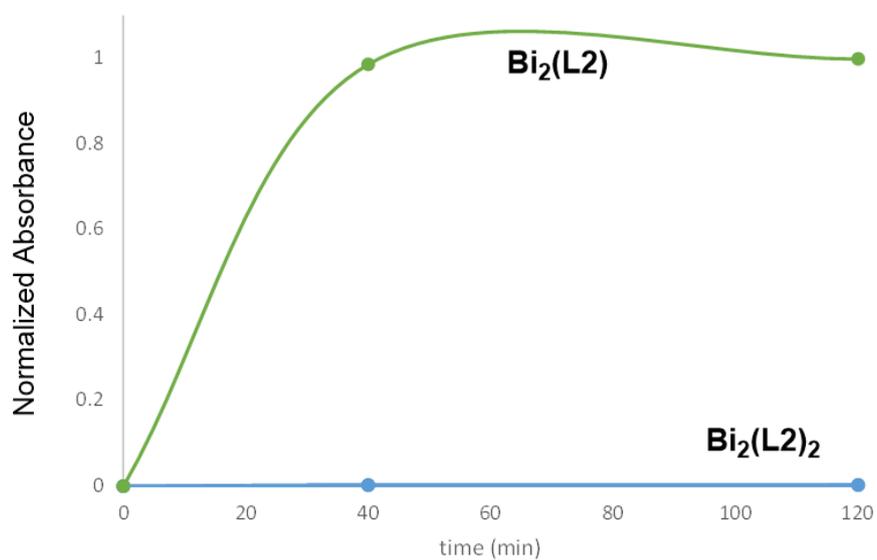


Figure S4. HPNPP (1.0 mM) degradation in the presence of $\text{Bi}_2(\text{L2})$ (0.10 mM) or $\text{Bi}_2(\text{L2})_2$ (0.10 mM) at pH 7.4 (50 mM HEPES, 5% DMSO) and 37 °C.

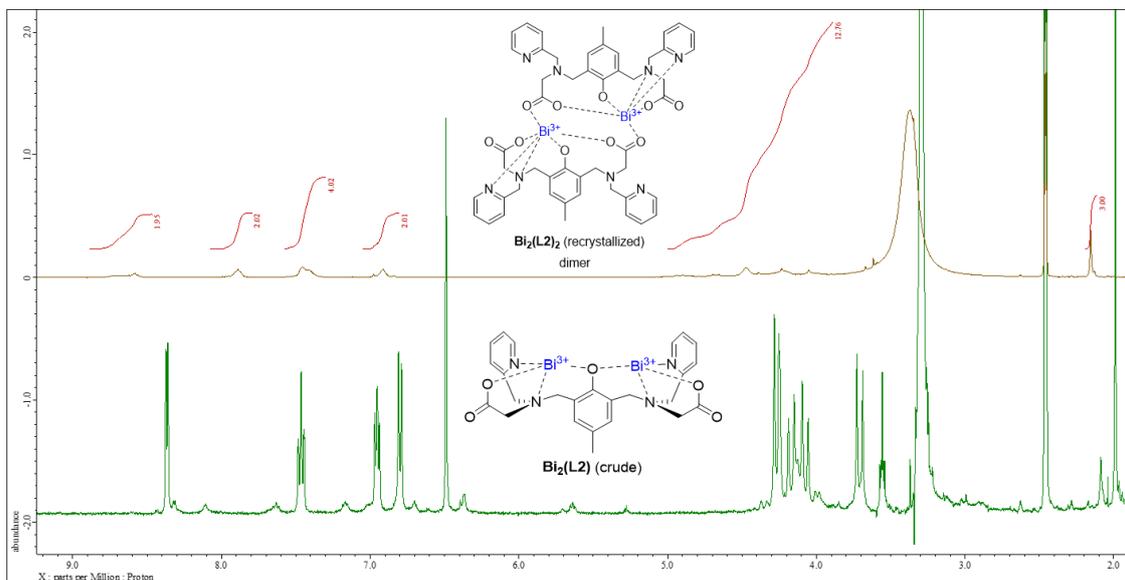


Figure S5. Comparison of ^1H NMR (DMSO-d_6 , $25\text{ }^\circ\text{C}$) spectra between $\text{Bi}_2(\text{L}2)$ and $\text{Bi}_2(\text{L}2)_2$.

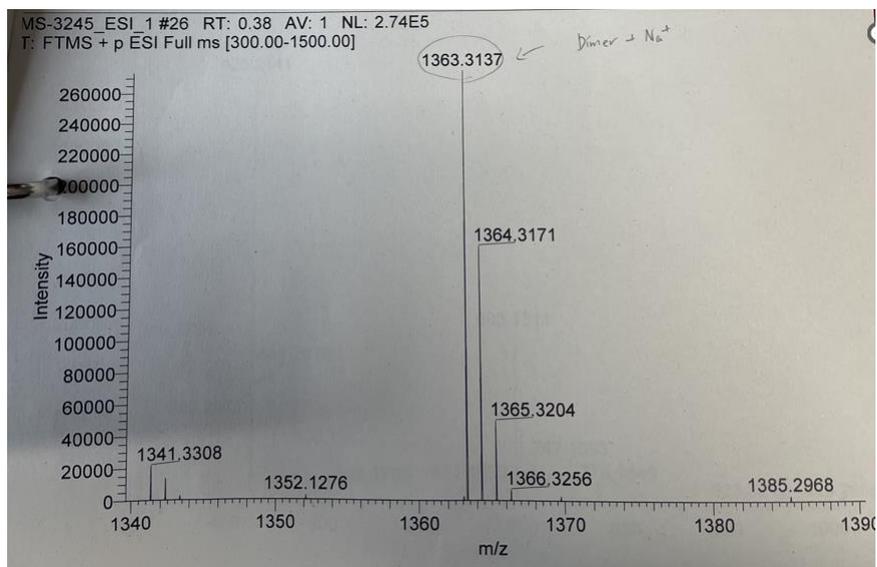


Figure S6. HRMS(ESI) analysis of $\text{Bi}_2(\text{L}2)_2$ solution. (calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{Bi}_2\text{N}_8\text{NaO}_{10}^+$: m/z 1363.3150).

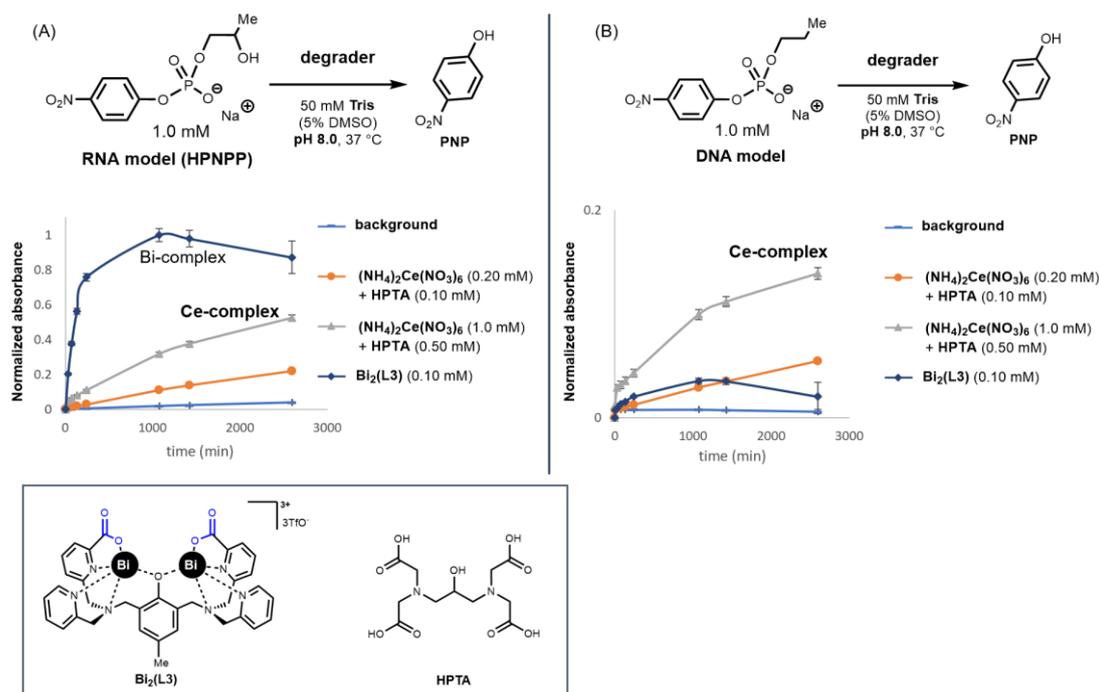


Figure S7. Dinuclear Ce(IV)-complex mediated HPNPP cleavage (A) and DNA model cleavage (B). Ce(IV) source: Cerium(IV) Diammonium Nitrate, CAN. The corresponding Ce(IV) complex was prepared in DMSO solution by mixing of the stock solution of CAN and HPTA.

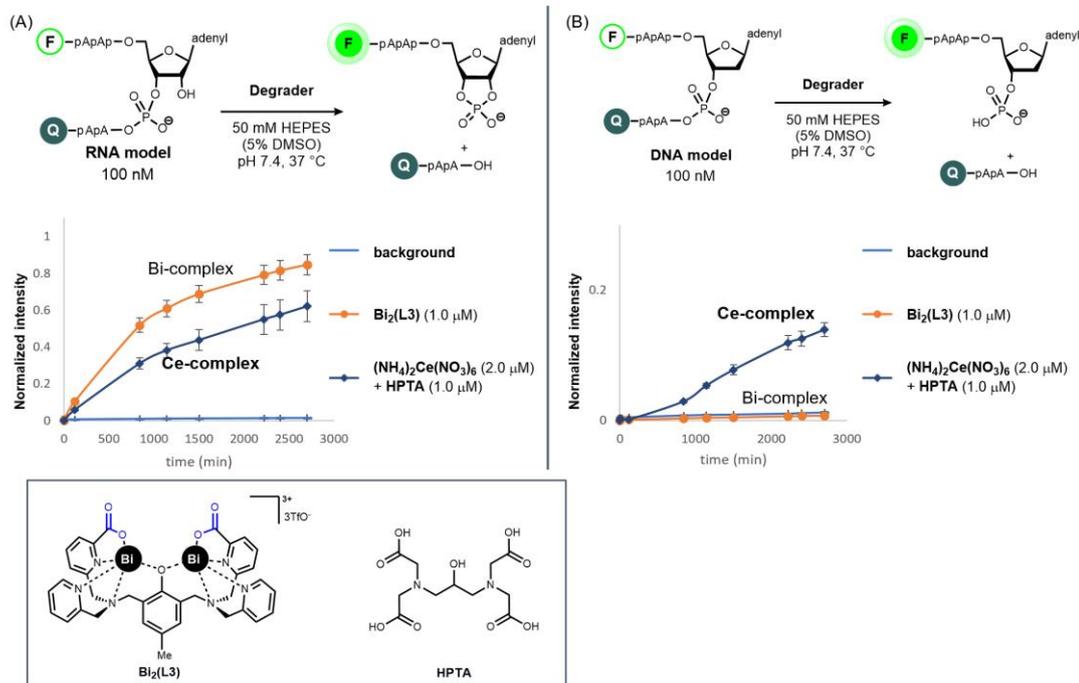


Figure S8. Dinuclear Ce(IV)-complex mediated RNA model oligo cleavage (A) and DNA model oligo cleavage (B). Ce(IV) source: Cerium(IV) Diammonium Nitrate, CAN. The corresponding Ce(IV) complex was prepared in DMSO solution by mixing of the stock solution of CAN and HPTA.

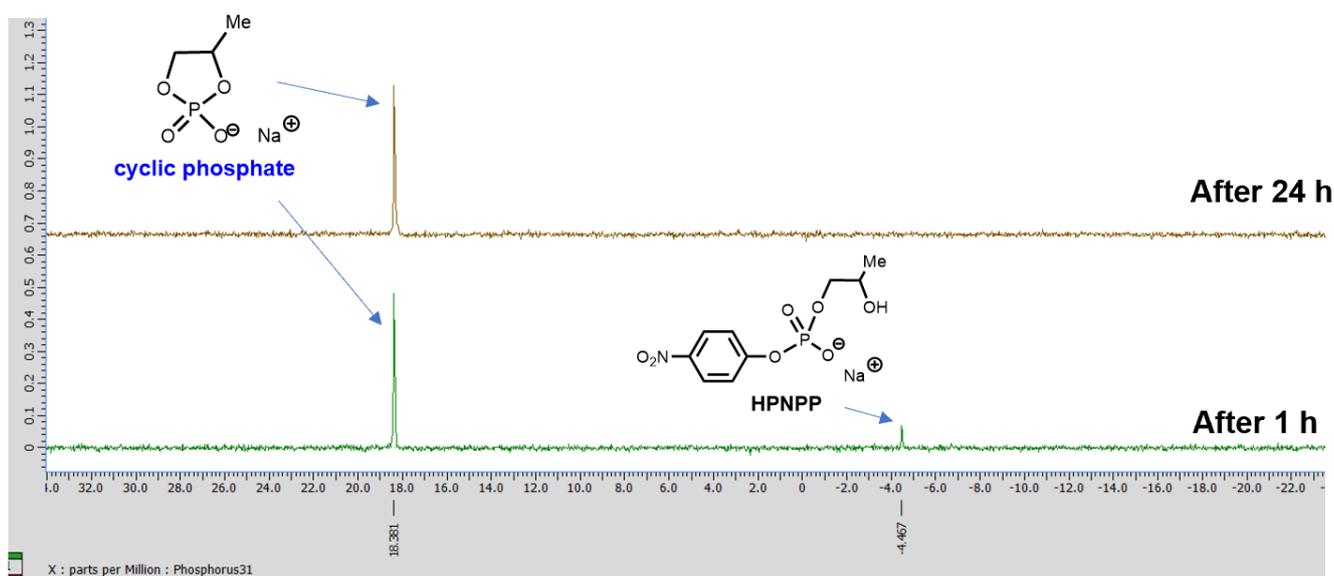


Figure S9. ^1H -decoupled ^{31}P NMR spectra of HPNPP (5.0 mM) in the presence of $\text{Bi}_2(\text{L3})$ (1.0 mM) at pH 7.4 (50 mM HEPES, 5% DMSO) and room temperature. The chemical shift of HPNPP and cyclic phosphate product were similar to the literature (Feng, G.; Mareque-Rivas, J.; Williams, N. *Chem. Commun.* **2006**, 1845-1847).

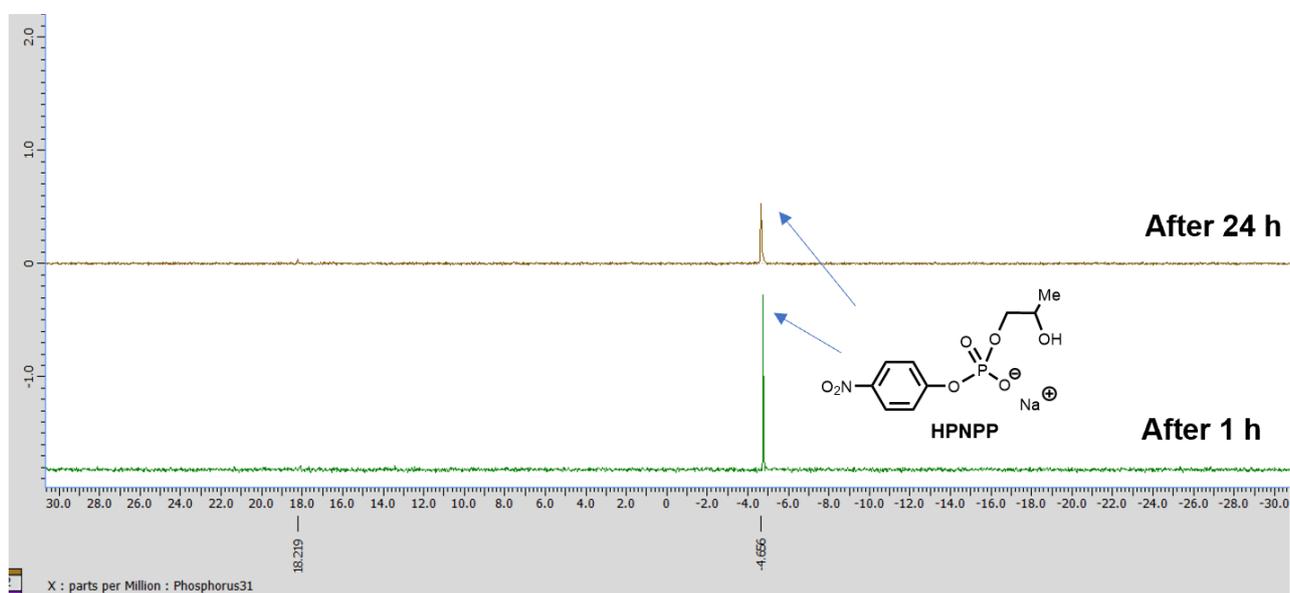
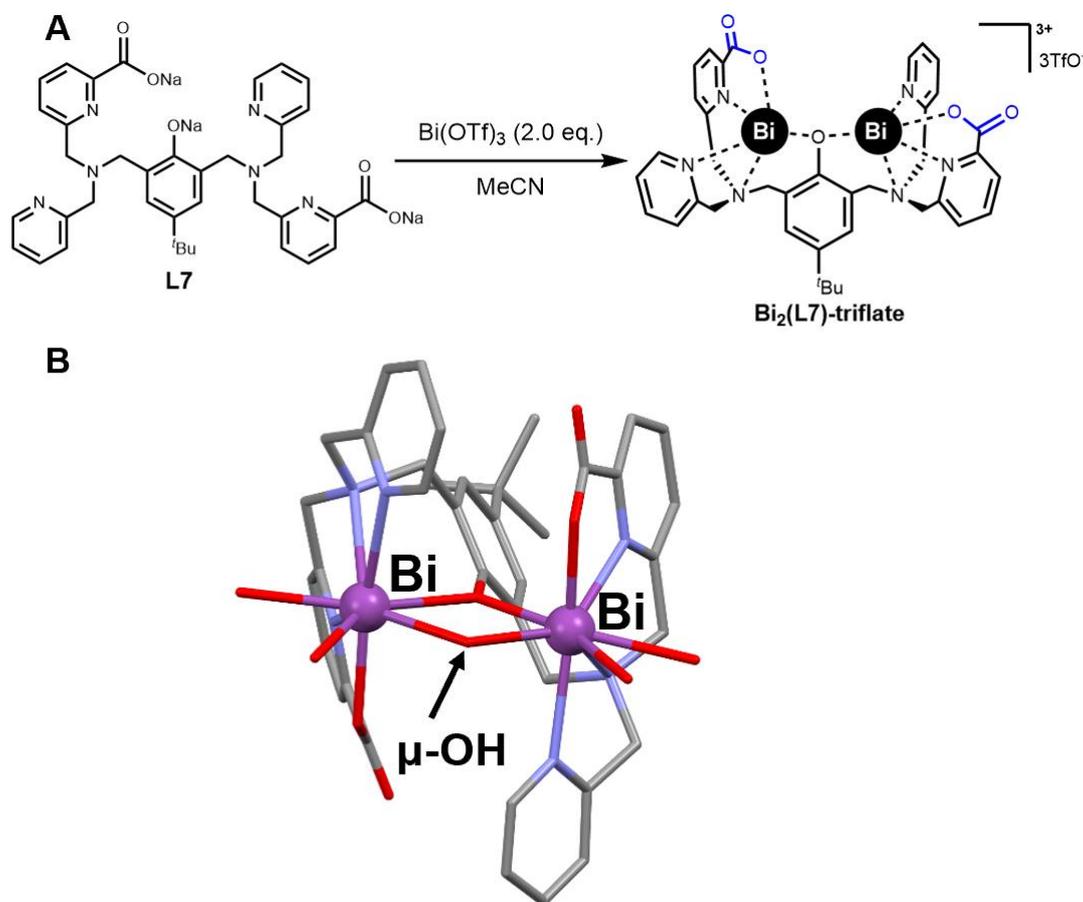


Figure S10. ^1H -decoupled ^{31}P NMR spectra of HPNPP (5.0 mM) at pH 7.4 (50 mM HEPES, 5% DMSO) and room temperature [Background].



Crystal system: triclinic; Space group: $C2/c$
 Cell Lengths: **a** 28.7544(2) **b** 35.8435(3) **c** 40.0051(3);
 Cell Angles: α 90 β 96.900(1) γ 90;
 Cell Volume: 40933
 $R_1=0.0652$; $wR_2=0.2021$; Goodness of fit: 1.065

Figure S11. Preparation of **Bi₂(L7)-triflate** (A) and X-ray structure of **Bi₂(L7)-triflate** (B).

• Experimental section

General Information

^1H -, ^{13}C -, and ^{31}P spectra were recorded with JEOL JMN ECS400 FT NMR, JNM ECA600 FT NMR (^1H -NMR 400 or 600 MHz, ^{13}C -NMR 100 or 151 MHz, ^{31}P -NMR 243 MHz). ^1H -NMR spectra are reported as follows: chemical shift in ppm relative to the chemical shift of tetramethylsilane (TMS) at 0 ppm or relative to the chemical shift of CH_3OH at 3.31 ppm, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ at 2.50 ppm, CH_3CN at 1.94 ppm, H_2O at 4.79 ppm, integration, multiplicities (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet), and coupling constants (Hz). ^{13}C -NMR spectra are reported in ppm relative to the chemical shift of CDCl_3 at 77 ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ at 29.84 ppm, and CD_3OD at 49.00 ppm, CD_3CN at 1.32 ppm. ^{31}P -NMR spectra are reported in ppm relative to the chemical shift of H_3PO_4 (in D_2O) at 0 ppm. ESI-MS spectra were obtained with JMS-T100LC (JEOL). HPLC was performed with a Shimadzu instrument equipped with a COSMOSIL packed column (5C18-AR-II, 4.6 ID \times 150 mm, Nacalai) for analysis and the eluents were water containing 0.1% TFA (A) and MeCN containing 0.1% TFA (B). The conditions for analytical HPLC were as follows; flow rate 1.0 mL/min, detection wavelength 254 nm, gradient A/B 0 to 20 min (90/10 to 10/90), 20 to 30 min (10/90), 30 to 40 min (10/90 to 90/10).

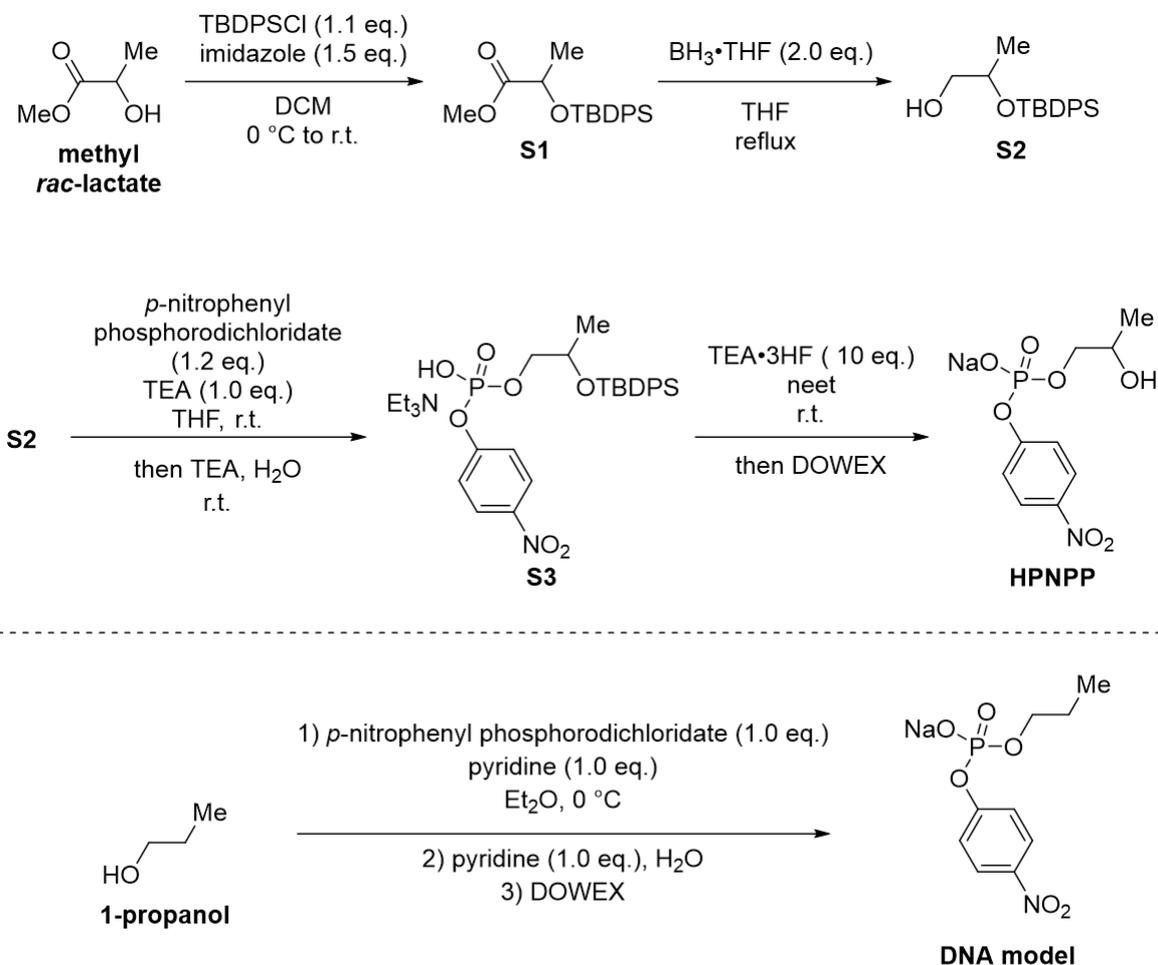
Reagents and solvents were purchased from Aldrich, Tokyo Kasei Kogyo, Kishida Kagaku, Kanto Kagaku, Wako Pure Chemical Industries, Nacalai Tesque or BLD pharm. Commercially available organic and inorganic compounds were used without further purification.

All reactions involving air- or moisture-sensitive reagents or intermediates were performed under an argon atmosphere.

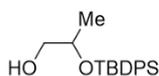
No unexpected or unusually high safety hazards were encountered.

Abbreviations for chemicals used are as follows: DCM, dichloromethane; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMP, Dess-Martin Periodinane; Ns, 2-nitrobenzenesulfonyl; Pd-C, palladium on carbon; TBDPS, *tert*-butyldiphenylsilyl; TEA, triethylamine; THF, tetrahydrofuran; pMBA; 4-mercaptobenzoic acid. Abbreviations for buffers used are as follows: HEPES, *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-ethanesulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

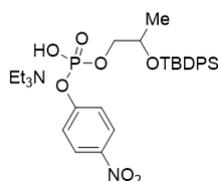
Procedure for preparation of RNA model substrate (HPNPP) and DNA model substrate.



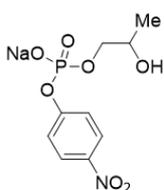
methyl 2-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)propanoate (S1). This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Iyer, S.; Hengge, A. C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4819-4829). To a solution of methyl *rac*-lactate (2.08 g, 20 mmol) in 50 mL of DCM at 0 °C, TBDPSCI (6.05 g, 22 mmol, 1.1 eq.) and imidazole (2.04 g, 30 mmol, 1.5 eq.) were added. After the addition was complete the reaction was stirred at room temperature for 24 h. The reaction was quenched by adding sat. NaHCO₃ aqueous solution. The crude was extracted with DCM, washed with brine. The organic layer was separated, dried over Na₂SO₄ and concentrated in *vacuo* to give the crude. The crude product was purified by silica gel column with hexane and ethyl acetate gradient (0-5% ethyl acetate) to obtain the desired compound **2** (1.57 g, 99%) as a pale-yellow oil. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (t, J = 8.2 Hz, 4H), 7.45-7.35 (m, 6H), 4.28 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 3.56 (s, 3H), 1.37 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.09 (s, 9H).



2-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)propan-1-ol (S2). This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Iyer, S.; Hengge, A. C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4819-4829). To a solution of **S1** (1.71 g, 5.0 mmol) in 30 mL of THF at 0 °C, BH₃-THF complex (11 mL, 10 mmol, 2.0 eq.) was added dropwise. After the addition was complete the reaction was allowed to attain room temperature. The reaction mixture was then refluxed for 2 h. The reaction was cooled and quenched by adding methanol and sat. NaHCO₃ aq. To achieve pH 7. The crude was extracted by DCM, washed with brine. The organic layer was separated, dried over Na₂SO₄ and concentrated in *vacuo* to give the crude. The crude product was purified by silica gel column with hexane and ethyl acetate gradient (0-10% ethyl acetate) to obtain the desired compound **2** (1.57 g, 99%) as a pale-yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (dq, J = 7.9, 1.5 Hz, 4H), 7.46-7.37 (m, 6H), 3.99-3.92 (m, 1H), 3.54-3.40 (m, 2H), 1.93 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 1.07 (t, J = 2.7 Hz, 9H), 1.05 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

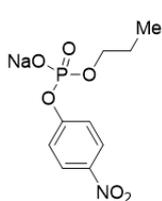


2-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)propyl 4-nitrophenyl phosphate, triethylamine salt (S3). This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Pezzato, C.; Chen, J. L.-Y.; Galzerano, P.; Salvi, M.; Prins, L. *J. Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6811-6820). To a stirred solution of 4-nitrophenyldi-chlorophosphate (614 mg, 2.4 mmol, 1.2 eq.) in anhydrous THF (15 mL) at 0 °C under argon, TEA (280 μL, 2.0 mmol, 1.0 eq.) and a solution of **S2** (629 mg, 2.0 mmol) in anhydrous THF (5.0 mL) was added dropwise. After the complete addition, the mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, TEA/water (2.0 mL/5.0 mL) was added to hydrolyze the intermediate monochloride and the resulting solution was stirred for 30 min. The reaction mixture was extracted with dichloromethane (5% MeOH) and the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column with a chloroform and methanol gradient (0-5% methanol) to obtain the desired compound **3** (1.05 g, 85%) as a pale-yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.96 (s, 1H), 8.08 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.63 (m, 4H), 7.36 (m, 8H), 3.93 (m, 2H), 3.77 (m, 1H), 3.03 (m, 6H), 1.29 (t, J = 7.3 Hz, 9H), 1.06 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 1.01 (s, 9H); HRMS (ESI) calcd for C₃₁HN₄₅NaO₇PSi: *m/z* ([M+Na]⁺) 639.2631, found 639.2613.



2-hydroxypropyl-4-nitrophenyl phosphate, sodium salt (HPNPP). This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Pezzato, C.; Chen, J. L.-Y.; Galzerano, P.; Salvi, M.; Prins, L. *J. Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6811-6820). The mixture of **S3** (616 mg, 1.0 mmol) and TEA-3HF complex (1.6 mL, 10 mmol, 10 eq.) was stirred at room temperature for 48 h. The crude product was purified by triethylamine-treated-silica gel column with a chloroform and methanol

gradient (0-25% methanol) to obtain HPNPP triethylamine salt as a pale-yellow oil. The excess amount of TEA-3HF complex was removed by DIOL column with a chloroform and methanol gradient (0-10% methanol). Then, the triethylamine salt was passed through an ion exchange resin (DOWEX, Na⁺). The water was removed by freeze dryer to afford **HPNPP** (113 mg, 38%) as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.32-8.28 (m, 2H), 7.41-7.38 (m, 2H), 4.08-4.02 (m, 1H), 34.01-3.95 (m, 1H), 3.88-3.82 (m, 1H), 1.18 (d, J = 6.4 Hz, 3H); ³¹P NMR (243 MHz, None) δ -4.66; Anal. Calcd.: C, 36.14; H, 3.71; N, 4.68. Found: C, 35.94; H, 3.98; N, 4.51.

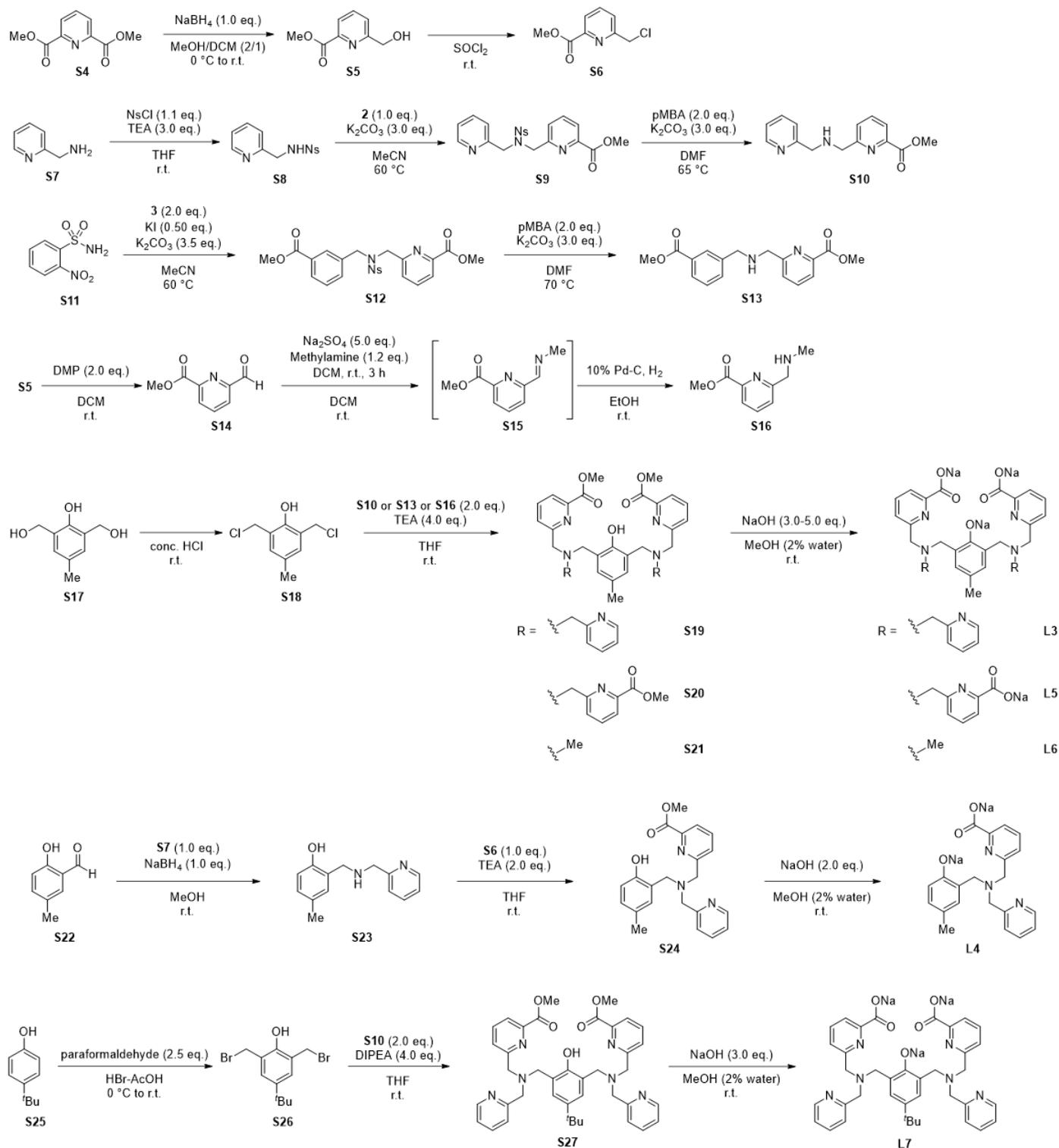


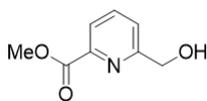
4-nitrophenyl propyl phosphate, sodium salt (DNA model). To a solution of 4-nitrophenyldi-chlorophosphate (512 mg, 2.0 mmol) in diethyl ether (3.0 mL) at 0 °C under argon, a solution of pyridine (160 μL, 2.0 mmol, 1.0 eq.) in diethyl ether (1.0 mL) and a solution of 1-propanol (120 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (1.0 mL) were added dropwise. After the complete addition, the

mixture was stirred for 20 min. Then, a solution of pyridine (160 μL, 2.0 mmol, 1.0 eq.) in water (3.0 mL) was added to hydrolyze the intermediate monochloride and the resulting solution was stirred for 10 min. An excess of 4 M HCl aq. was added to the reaction mixture, which was then extracted with diethyl ether and the organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was passed through an ion exchange resin (DOWEX, Na⁺). The water was removed by freeze dryer to afford the desired product as a white solid (502 mg, 89%). ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 8.13 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 3.82 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 1.51 (td, J = 14.1, 7.1 Hz, 2H), 0.76 (t, J = 7.6 Hz, 3H) ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) 157.5, 143.4, 125.8, 120.4, 68.9, 23.2, 9.48; ³¹P NMR (243 MHz, D₂O) δ -4.58; HRMS (ESI) calcd for C₉H₁₁NNa₂O₆P: *m/z* ([M+Na]⁺) 306.0119, found 306.0111.

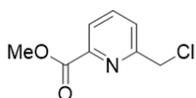
Procedure for preparation of Ligands L3-L7.

Compounds **S4**, **S7**, **S11**, **S17**, **S22** and **S25** were commercially available.

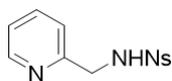




methyl 6-(hydroxymethyl) picolinate (S5): This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Koay, H.; Haskali, M. B.; Roselt, P. D.; White, J. M.; Donnelly, P. S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, *35*, 3378-3386). To **S4** (3.9 g, 20 mmol) in dry methanol (20 mL) and dichloromethane (10 mL) at 0 °C under argon atmosphere, sodium borohydride (0.76 g, 20 mmol, 1.0 eq.) was added slowly. The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. The reaction mixture was cooled to 0 °C, quenched with saturated NH₄Cl aq. The aqueous and organic layers were separated. The aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude was recrystallized with dichloromethane and hexane to obtain the colorless crystal (2.37 g, 72%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.48 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.34 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

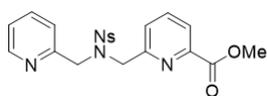


methyl 6-(chloromethyl)picolinate (S6): This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Gracia, S.; Arrachart, G.; Marie, C.; Chapron, S.; Miguirditchian, M.; Pellet-Rostaing, S. *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 5321-5336). **S5** (836 mg, 5.0 mmol) was slowly added to Thionyl chloride (3.0 mL) at 0 °C, under argon and stirred for 1 h. The reaction mixture is concentrated under vacuum. The obtained residue was diluted in toluene and washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution. The combined organic layers were dried on Na₂SO₄, filtered, and concentrated by evaporation in a vacuum. The residue was purified by silica-gel column with hexane and ethyl acetate gradient (ethyl acetate 10-30%) affording the desired product as a colorless solid (873 mg, 94%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.48 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.34 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.27 (s, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).



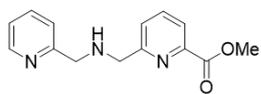
2-nitro-N-(pyridin-2-ylmethyl)benzenesulfonamide (S8): To a solution of **S7** (3.1 mL, 30 mmol) and in THF (30 mL) and water (30 mL), NaHCO₃ (7.6 g, 90 mmol, 3.0 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 30 min at room temperature, then *o*-NsCl (6.6 g, 30 mmol, 1.0 eq.) was added. The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The precipitates were collected by filtration. The crude was purified by amino-silica-gel column with hexane and chloroform gradient (chloroform 50-100%), the obtained solid was washed with MeOH and Hexane. The desired product was afforded as a yellow solid (7.8 g, 86%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 7.6, 2.1 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.70-7.64 (m, 2H), 7.61 (td, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 7.6, 4.1 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.7, 148.8, 147.5, 136.7, 133.9, 133.0, 132.6, 129.6, 124.4, 122.5, 121.5, 47.9; HRMS (ESI) (m/z): calcd for

C₁₂H₁₁N₃O₄S [M+Na]⁺ 316.0362, found 316.0358.



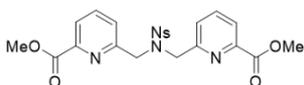
methyl 6-(((2-nitro-N-(pyridin-2-ylmethyl)phenyl)sulfonamido)methyl)picolinate (S9): To a solution of **S6** (8.2 mmol) and **S8** (8.2 mmol, 1.0 eq.) in MeCN (25 mL), KI (0.680

g, 4.1 mmol, 0.50 eq.) and K₂CO₃ (3.46 g, 24.6 mmol, 3.0 eq.) were added. The resulting mixture was stirred for 5 h at 65 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by amino-silica-gel column with hexane and chloroform gradient (chloroform 25-50%) affording the desired product as an orange oil (3.31 g, 91%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.35-8.38 (m, 1H), 8.13 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.74 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64-7.69 (m, 2H), 7.53-7.62 (m, 3H), 7.33 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.08-7.14 (m, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.97 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, Methanol-d₄) δ 166.5, 157.9, 157.1, 149.9, 149.5, 148.4, 139.3, 138.6, 135.3, 134.0, 133.1, 132.1, 127.0, 125.4, 124.9, 124.1, 124.0, 54.7, 54.0, 53.1; HRMS (ESI, positive) (m/z): calcd for C₂₀H₁₈N₄O₆S [M+Na]⁺ 465.0839, found 465.0836.



methyl 6-(((pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)picolinate (S10): To a solution of **S9** (1.06 g, 2.4 mmol) in DMF (15 mL), *p*-mercaptobenzoic acid (0.74 g, 4.8 mmol, 2.0 eq.) and K₂CO₃ (1.33 g, 9.6 mmol, 4.0 eq.) were

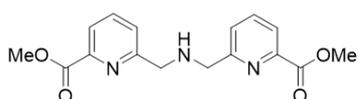
added. The reaction mixture was stirred for 14 h at 70 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature and filtered. The filtrate was washed with sat. NaHCO₃ aq. dried with Na₂SO₄ and filtered. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by amino-silica-gel column with hexane and chloroform gradient (chloroform 20-40%) affording the desired product as an orange oil (436 mg, 84%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.55-8.58 (m, 1H), 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.82 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.63-7.68 (m, 2H), 7.35 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 4.09 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.99 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, Methanol-d₄) δ 166.9, 161.0, 160.0, 149.8, 148.4, 139.4, 138.7, 127.5, 124.8, 124.1, 123.8, 54.8, 54.5, 53.2; HRMS (ESI) (m/z): [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₅N₃NaO₂ 280.1056, found 280.1051.



dimethyl 6,6'-((((4-nitrophenyl)sulfonyl)azanediy)bis(methylene))dipicolinate (S12):

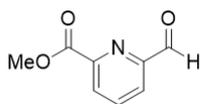
To a solution of **S6** (111 mg, 0.60 mmol, 2.0 eq.) and **S11** (61 mg, 0.30 mmol) in MeCN (3.0 mL), KI (25mg, 0.15 mmol, 0.50 eq.) and K₂CO₃ (152 mg, 1.1 mmol, 3.5 eq.) were added. The resulting mixture was stirred for 19 h at 60 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature and quenched with water. The aqueous and organic layers were separated. The aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with

brine, dried with Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure, affording the desired product as a yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.02-7.98 (m, 2H), 7.85-7.80 (m, 4H), 7.41 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.24 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.99 (s, 6H), 3.94 (s, 4H), 3.70 (s, 2H). The product was used in the next step without further purification.



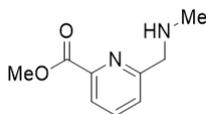
dimethyl 6,6'-(azanediylbis(methylene))dipicolinate (S13):

To a solution of **S12** (150 mg, 0.30 mmol) in DMF (1.2 mL), *p*-mercaptobenzoic acid (92 mg, 0.60 mmol, 2.0 eq.) and K₂CO₃ (166 mg, 1.2 mmol, 4.0 eq.) were added. The reaction mixture was stirred for 16 h at 70 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature and filtered. The filtrates were evaporated under reduced pressure, affording the desired product as a yellow solid (62 mg, 66%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.82 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.09 (s, 4H), 4.00 (s, 6H), 2.20 (s, 2H). The product was used in the next step without further purification.



methyl 6-formylpicolinate (S14):

This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Zhang, L.; Tang, Y.; Han, Z.; Ding, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 4973-4977). To a stirred solution of **S5** (320 mg, 1.9 mmol) in dichloromethane (4.0 mL), Dess–Martin periodinane (1.61 g, 3.8 mmol, 2.0 eq.) was added at 0 °C. The reaction mixture was allowed to reach to room temperature and stirred for 24 h. The mixture of sat. NaHCO₃ aq. and sat. Na₂S₂O₃ aq. (1:1 ratio) was added at 0 °C. The organic phase was separated, and the aqueous phase was extracted twice with dichloromethane. The combined organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica-gel column with hexane and ethyl acetate gradient (ethyl acetate 30-50%) affording a colorless solid (251 mg, 80%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.20 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.37 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 8.17 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 8.07 (td, J = 7.8, 0.9 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H).

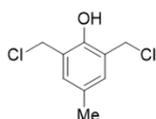


methyl 6-((methylamino)methyl)picolinate (S16):

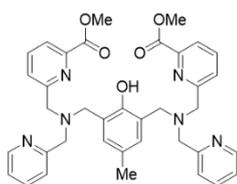
To a solution of **S14** (33 mg, 0.20 mmol) in 2.0 mL of DCM, 2 M of methylamine in methanol (120 μL, 0.24 mmol, 1.2 eq.) and Na₂SO₄ (142 mg, 1.0 mmol, 5.0 eq.) were added. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature, filtered and the filtrate was evaporated to afford imine **S15**, which was used in the next step without purification.

To a solution of **methyl 6-((methylimino)methyl)picolinate, S15** (36 mg, 0.20 mmol) in 2.0 mL of ethanol, 5 mg of palladium on activated carbon (10%) was added. The reaction mixture was stirred for 5 h under hydrogen and then through a Celite pad. The solvent was evaporated to obtain the desired product as a yellow oil (39 mg, 99%, 2 steps). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H),

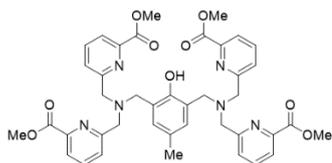
7.82 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.98 (s, 2H), 2.49 (s, 3H). The product was used in the next step without further purification.



2,6-bis(chloromethyl)-4-methylphenol (S18): This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Lee, B. L.; Kaerkaes, M. D.; Johnston, E. V.; Inge, A. K.; Tran, L. H.; Xu, Y.; Hansson, O.; Zou, X.; Aakermark, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 5462-5470). To a solution of concentrated hydrochloric acid (40 mL), **S17** (1.68 g, 10 mmol) was added slowly. The reaction mixture was stirred for 15 h at room temperature. The crude was extracted with dichloromethane, the organic layers were combined and washed with brine, dried with Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude was recrystallized with petroleum ether to obtain a yellow solid (1.31 g, 64%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (s, 2H), 5.54 (s, 1H), 4.66 (s, 4H), 2.27 (s, 3H).

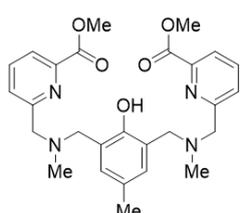


dimethyl 6,6'-((((2-hydroxy-5-methyl-1,3-phenylene)bis(methylene))bis((pyridin-2-ylmethyl)azanediyl))bis(methylene))dipicolinate (S19): To a solution of **S10** (162 mg, 0.63 mmol, 2.0 eq.) in tetrahydrofuran (3.0 mL) at 0 °C, triethylamine (180 μL, 1.3 mmol, 4.0 eq.) and a solution of compound **S18** (0.32 mmol) in tetrahydrofuran (3.0 mL) were added. The resulting mixture was stirred for 3 h at room temperature. After stirring, the suspended mixture was filtered off, the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by amino-silica-gel column with hexane and chloroform gradient (chloroform 30-50%) affording the desired product as colorless oil (183 mg, 88%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.67 (s, 1H), 8.56-8.53 (m, 2H), 7.92 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.72 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.61 (dt, J = 7.6, 1.7 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.16-7.13 (m, 2H), 6.95 (s, 2H), 3.96 (s, 6H), 3.95 (s, 4H), 3.85 (s, 4H), 3.76 (s, 4H), 2.20 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.7, 160.4, 158.7, 153.5, 148.9, 146.9, 137.4, 136.5, 130.0, 127.2, 126.1, 123.5, 123.4, 122.7, 122.0, 59.5, 59.5, 54.7, 52.7, 20.5; HRMS (ESI) (m/z): calcd for C₃₇H₃₈N₆O₅ [M+Na]⁺ 669.2796, found 669.2793.



tetramethyl 6,6',6'',6'''-((((2-hydroxy-5-methyl-1,3-phenylene)bis(methylene))bis(azanetriyl))tetrakis(methylene))tetrapicolinate (S20): To a solution of **S13** (62 mg, 0.19 mmol, 2.0 eq.) in tetrahydrofuran (2.0 mL) at 0 °C, triethylamine (53 μL, 0.38 mmol, 4.0 eq.) and **S18** (19 mg, 0.095 mmol) were added. The resulting mixture was stirred for 4 h at room temperature. After stirring, the suspended mixture was filtered off, the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by amino-silica-gel column with chloroform and methanol gradient (methanol 0-1%) affording the desired product as a yellow oil (66 mg, 92%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.99 (s,

1H), 7.98 (d, J = 6.9 Hz, 4H), 7.81-7.74 (m, 8H), 6.95 (s, 2H), 3.98 (s, 12H), 3.96 (s, 8H), 3.79 (s, 4H), 2.22 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.9, 159.7, 153.6, 147.5, 137.6, 130.1, 128.1, 126.5, 123.8, 123.3, 59.8, 55.2, 53.0, 20.7; HRMS (ESI, positive) (m/z): calcd for C₄₁H₄₂N₆O₉ [M+Na]⁺ 785.2905, found 785.2894.; HPLC *t*_R = 12.1 min, purity 99.9%.



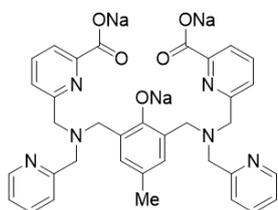
Dimethyl

6,6'-((((2-hydroxy-5-methyl-1,3-

phenylene)bis(methylene))bis(methylazanediyl))bis(methylene))dipicolinate

(**S21**): To a solution of **S16** (36 mg, 0.20 mmol, 2.0 eq.) in tetrahydrofuran (1.0 mL) at 0 °C, triethylamine (55 μL, 0.40 mmol, 4.0 eq.) and a solution of compound **S18** (20 mg, 0.10 mmol) in tetrahydrofuran (1.0 mL) were added. The resulting

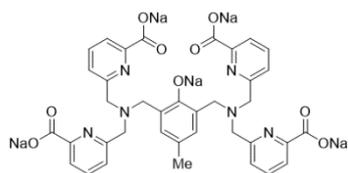
mixture was stirred for 12 h at room temperature. After stirring, the suspended mixture was filtered off, the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by amino-silica-gel column with hexane and chloroform gradient (chloroform 20-40%) affording the colorless oil (35 mg, 71%, 3 steps from compound **S14**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.83 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 6.93 (s, 2H), 4.00 (s, 6H), 3.88 (s, 4H), 3.72 (s, 4H), 2.30 (s, 6H), 2.25 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.9, 159.8, 153.8, 147.4, 137.7, 129.6, 127.9, 126.4, 123.9, 123.1, 63.1, 58.6, 53.0, 42.3, 20.6; HRMS (ESI) (m/z): calcd for C₂₇H₃₂N₄O₅ [M+H]⁺ 493.2445, found 493.2433.



sodium 6,6'-((((5-methyl-2-oxido-1,3-phenylene)bis(methylene))bis((pyridin-2-ylmethyl)azanediyl))bis(methylene))dipicolinate (**L3**):

To a solution of **S19** (133 mg, 0.21 mmol) in methanol (5.0 mL) and water (100 μL) at 0 °C, a solution of NaOH in methanol (1.3 M, 480 μL, 0.62 mmol, 3.0 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 12 h at room temperature. After stirring, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was washed with diethylether

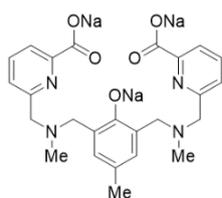
affording the desired product as pale-yellow powder (115 mg, 80%). ¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.53 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.64 (dt, J = 7.8, 1.8 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.18 (dd, J = 7.3, 5.0 Hz, 2H), 6.77 (s, 2H), 3.74 (s, 4H), 3.69 (s, 4H), 3.60 (s, 4H), 2.12 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, Methanol-d₄) δ 173.0, 160.5, 158.9, 155.3, 150.8, 150.8, 138.8, 138.4, 138.4, 133.6, 126.0, 125.4, 125.3, 123.5, 123.4, 61.1, 60.8, 59.0, 20.4; HRMS (ESI) (m/z): calcd for C₃₅H₃₁N₆Na₃O₅ [M+Na]⁺ 685.2122, found 685.2110; HPLC *t*_R = 9.45 min, purity 95.8%.



sodium **6,6',6'',6'''-(((5-methyl-2-oxido-1,3-phenylene)bis(methylene))bis(azanetriyl))tetrakis(methylene)tetrapicolinate**

(L5): To a solution of **S20** (66 mg, 0.087 mmol) in methanol (2.5 mL) and water (150 μ L) at 0 $^{\circ}$ C, a solution of 1.3 M NaOH in methanol (340 μ L, 0.44 mmol, 5.0 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 14 h at room temperature.

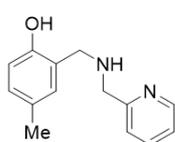
After stirring, the solvent was evaporated, and the residue was washed with ether and methanol, affording the desired product as a pale-yellow powder (51 mg, 72%). ^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ 7.91 (dd, $J = 7.6, 2.1$ Hz, 4H), 7.74 (td, $J = 7.6, 2.1$ Hz, 4H), 7.25 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H), 6.58 (s, 2H), 3.81 (d, $J = 6.2$ Hz, 8H), 3.56 (s, 4H), 2.06 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 171.5, 157.7, 157.3, 153.7, 137.5, 131.4, 124.9, 123.9, 122.2, 59.2, 57.0, 19.1; HRMS (ESI, positive) (m/z): calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{Na}_5\text{O}_9$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 817.1557, found 817.1550. The product was used for the formation of metal complex without further purification.



sodium **6,6'-(((5-methyl-2-oxido-1,3-phenylene)bis(methylene))bis(methylazanediyl))bis(methylene)dipicolinate**

(L6): To a solution of **S21** (30 mg, 0.061 mmol) in methanol (900 μ L) and water (60 μ L) at 0 $^{\circ}$ C, a solution of 1.3 M NaOH in methanol (140 μ L, 0.18 mmol, 3.0 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 14 h at room temperature.

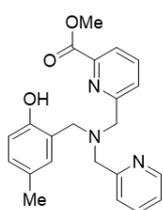
After stirring, the solvent was evaporated under reduced pressure, affording the desired product as pale-yellow powder (30 mg, 94%). ^1H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ 7.96 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 15.6$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.79 (s, 2H), 3.75 (s, 4H), 3.59 (s, 4H), 2.16 (s, 3H), 2.13 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ 172.6, 158.6, 155.7, 138.8, 133.0, 132.9, 126.3, 125.6, 125.6, 123.8, 64.2, 61.3, 42.0, 20.5; HRMS (ESI) (m/z): calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 531.1591, found 531.1572; HPLC $t_R = 7.40$ min, purity 96.0%.



4-methyl-2-(((pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)phenol (S23):

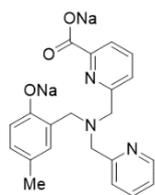
This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Peralta, R. A.; Bortoluzzi, A. J.; De Souza, B.; Jovito, R.; Xavier, F. R.; Couto, R. A. A.; Casellato, A.; Nome, F.; Dick, A.; Gahan, L. R.; Schenk, G.; Hanson, G. R.; De Paula, F. C. S.; Pereira-Maia, E. C.; De P. Machado, S.; Severino, P. C.; Pich, C.; Bortolotto, T.; Terenzi, H.; Castellano, E. E.; Neves, A.; Riley, M. J. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 11421-11438). To a solution of **S22** (272 mg, 2.0 mmol) in MeOH (6.0 mL) at room temperature, **S7** (202 μ L, 2.0 mmol, 1.0 eq.) was added. The resulting solution was stirred at room temperature for 1h. Then NaBH_4 (76 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq.) was added slowly at 0 $^{\circ}$ C. The reaction mixture was stirred for 10 min. at 0 $^{\circ}$ C. After stirring, 4 M HCl aq. was added to adjust pH 6 to 7 at 0 $^{\circ}$ C. The crude was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with sat. NaHCO_3 aq. (3 times), dried

with Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure to obtain the desired product as a pale-yellow oil (1.39 g, 99%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.59 (dd, J = 5.5, 1.8 Hz, 1H), 7.67 (td, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.23-7.20 (m, 2H), 6.98 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 6.79-6.75 (m, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.24 (s, 3H). The product was used in the next step without further purification.



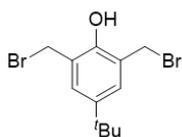
methyl 6-(((2-hydroxy-5-methylbenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)picolinate (S24): To a solution of **S23** (114 mg, 0.50 mmol) in tetrahydrofuran (2.5 mL) at room temperature, triethylamine (140 μL, 1.0 mmol, 2.0 eq.) was added, then a solution of **S6** (93 mg, 0.50 mmol) in tetrahydrofuran (2.5 mL) was added. The resulting mixture was stirred for 3 h at

room temperature. After stirring, water (5.0 mL) was added. The crude was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by amino-silica-gel column with hexane and ethyl acetate gradient (ethyl acetate 5-50%) affording the desired product as a pale-yellow solid (82 mg, 43%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.70 (s, 1H), 8.65-8.63 (m, 1H), 7.96 (dd, J = 6.6, 2.1 Hz, 1H), 7.77-7.71 (m, 2H), 7.67-7.62 (m, 1H), 7.25-7.19 (m, 2H), 6.97 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.97 (s, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.77 (s, 2H), 2.23 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.9, 159.8, 157.7, 155.2, 149.2, 147.2, 137.8, 137.0, 130.9, 129.7, 128.1, 126.7, 123.8, 123.3, 122.5, 122.4, 116.4, 59.3, 59.0, 57.2, 53.0, 20.5; HRMS (ESI) (m/z): calcd for C₂₂H₂₃N₃O₃ [M+H]⁺ 378.1812, found 378.1810; HPLC *t_R* = 12.0 min, purity 99.2%.

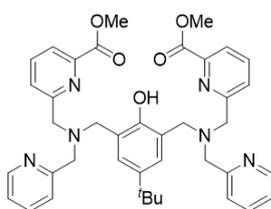


sodium 6-(((5-methyl-2-oxidobenzyl)(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)picolinate (L4): To a solution of **S24** (276 mg, 0.73 mmol) in methanol (4.0 mL) and water (100 μL) at 0 °C, a solution of 1.3 M NaOH in methanol (1.1 mL, 1.5 mmol, 2.0 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 14 h at room temperature. After stirring, the solvent was evaporated under

reduced pressure, affording the desired product as a pale-yellow powder (101 mg, 34%). ¹H NMR (600 MHz, Methanol-d₄) δ 8.49 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 7.88 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.75 (td, J = 7.6, 2.7 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 7.6, 2.1 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.81 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.66-6.63 (m, 1H), 3.82 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 2.18 (s, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, Methanol-d₄) δ 172.9, 159.9, 159.3, 156.8, 155.3, 150.6, 138.7, 138.1, 133.2, 130.4, 128.3, 125.4, 125.0, 124.8, 123.4, 123.2, 117.0, 61.3, 61.0, 58.4, 20.4; HRMS (ESI) (m/z): calcd for C₂₁H₁₉N₃Na₂O₃ [M+Na]⁺ 430.1114, found 430.1110; HPLC *t_R* = 12.5 min, purity 99.5%.



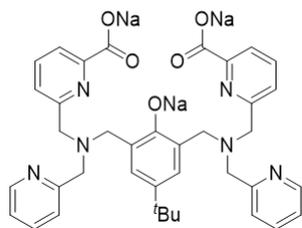
2,6-bis(bromomethyl)-4-(tert-butyl)phenol (S26): This compound was prepared by the similar procedure as that described in literature (Baker, M. V.; Bosnich, M. J.; Brown, D. H.; Byrne, L. T.; Hesler, V. J.; Skelton, B. W.; White, A. H.; Williams, C. C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7640-7652). To a n ice-cold solution of paraformaldehyde (150 mg, 5.0 mmol, 2.5 eq.) in hydrobromic acid in acetic acid (25% w/v), **S25** (300 mg, 2.0 mmol) was added portionwise. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C and then 2 h at room temperature. The solution was poured onto ice. The crude was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude was recrystallized with petroleum ether to obtain a colorless solid (354 mg, 53%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (s, 2H), 5.49 (s, 1H), 4.56 (s, 4H), 1.28 (s, 9H).



dimethyl

6,6'-((((5-(tert-butyl)-2-hydroxy-1,3-phenylene)bis(methylene))bis((pyridin-2-ylmethyl)azanediyl))bis(methylene))dipicolinate (S27):

To a solution of **S10** (322 mg, 1.25 mmol, 2.0 eq.) in tetrahydrofuran (5.0 mL) at 0 °C, *N,N*-diisopropylethylamine (450 μL, 2.60 mmol, 4.0 eq.) and a solution of **S26** (222 mg, 0.66 mmol) in tetrahydrofuran (5.0 mL) were added. The resulting mixture was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was quenched by adding water. The aqueous and organic layers were separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried with Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by amino-silica-gel column with hexane and 2-propanol gradient (2-propanol 3-10%) affording the pale-yellow oil (327 mg, 76%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.70 (s, br, 1H), 8.56 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.73 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.62 (td, J = 7.3, 1.8 Hz, 2H), 7.43 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.17-7.13 (m, 4H), 3.99 (s, 4H), 3.97 (s, 6H), 3.89 (s, 4H), 3.82 (s, 4H), 1.24 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, Methanol-d₄) δ 166.6, 161.4, 160.0, 154.5, 149.5, 148.0, 142.3, 138.9, 138.4, 127.7, 127.7, 124.7, 124.5, 124.2, 123.6, 60.9, 60.3, 56.4, 53.1, 34.7, 32.0; HRMS (ESI) (m/z): calcd for C₄₀H₄₄N₆O₅ [M+Na]⁺ 711.3265, found 711.3256.



sodium

6,6'-((((5-(tert-butyl)-2-oxido-1,3-phenylene)bis(methylene))bis((pyridin-2-ylmethyl)azanediyl))bis(methylene))dipicolinate (L7):

To a solution of **S27** (209 mg, 0.30 mmol) in methanol (7.0 mL) and water (0.30 mL) at 0 °C, a solution of NaOH in methanol (1.3 M, 700 μL, 0.90 mmol) was added. The resulting mixture was stirred for 3 h at room temperature. After stirring, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was

washed with diethylether affording the desired product as pale-yellow powder (177 mg, 81%). ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.43-8.39 (m, 2H), 7.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.71 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.64-7.59 (m, 2H), 7.30-7.24 (m, 4H), 7.16-7.10 (m, 2H), 6.95 (s, 2H), 3.73 (s, 4H), 3.66 (s, 4H), 3.59 (s, 4H), 1.21 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, Methanol- d_4) δ 171.5, 158.3, 157.3, 154.2, 149.2, 137.4, 137.0, 127.6, 124.4, 123.9, 123.1, 122.3, 122.2, 60.0, 59.3, 57.2, 33.3, 30.7.; HRMS (ESI) (m/z): calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{Na}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ 743.2331, found 743.2237; HPLC $t_R = 11.1$ min, purity 95.7%.

Preparation of Zn(II)-complex $\text{Zn}_2(\text{L1})$.

$\text{Zn}_2(\text{L1})$: **L1** (53 mg, 0.10 mmol) was dissolved in MeCN (4.0 mL). Then, triethylamine (14 μL , 0.10 mmol, 1.0 eq.) and ZnCl_2 (27 mg, 0.20 mmol, 2.0 eq.) were added, and the resulting mixture was stirred for 16 h. The reaction mixture was poured into excess amount of Et_2O . The precipitates were collected and washed with Et_2O . The crude was purified by recrystallization with MeCN and Et_2O at -20 $^\circ\text{C}$, affording the desired zinc complex as pale-brown solid (31 mg, 40%). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.89 (br, 4H), 7.96 (br, 4H), 7.49 (br, 4H), 7.39 (br, 4H), 6.51 (s, 2H), 4.14 (br, 8H), 3.68 (br, 4H), 1.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 159.3, 155.3, 148.3, 140.3, 131.0, 124.9, 124.2, 123.8, 123.1, 59.0, 58.7, 19.7.

Preparation of dinuclear or mononuclear Bi(III)-complexes.

$\text{Bi}_2(\text{L1})$: $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ (131 mg, 0.20 mmol, 2.0 eq.) was dissolved in THF (10 mL). Then, **L1** (53 mg, 0.10 mmol) was added, and the mixture was stirred during 1 h. The precipitates were collected, and the crude was washed with THF and ether, dried under vacuo to afford the corresponding Bi-complex as a yellow-orange powder (143 mg, 97%).

$\text{Bi}_2(\text{L2})$: $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ (131 mg, 0.20 mmol, 2.0 eq.) was dissolved in THF (10 mL). Then, **L2** (53 mg, 0.10 mmol) was added, and the mixture was stirred during 1 h. The precipitates were collected, and the crude was washed with THF and ether, dried under vacuo to afford the corresponding Bi-complex as a pale-yellow powder (108 mg, 81%). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.41 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 7.50 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.99 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.53 (s, 2H), 4.34-5.27 (m, 4H), 4.22-4.10 (m, 6H), 3.75 (d, $J = 15.1$ Hz, 2H), 2.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 174.2, 157.9, 154.1, 147.0, 138.1, 131.9, 129.0, 126.0, 122.6, 122.3, 120.1, 63.0, 60.6, 58.4, 19.8.

$\text{Bi}_2(\text{L3})$: $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ (66 mg, 0.10 mmol, 2.0 eq.) was dissolved in THF (5.0 mL). Then, **L3** (34 mg, 0.050 mmol) was added, and the mixture was stirred during 1 h. The precipitates were collected, and the crude was washed with THF and ether, dried under vacuo to afford the corresponding Bi-complex

as a pale-yellow powder (59 mg, 80%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.43 (d, J = 4.6 Hz, 2H), 8.14-8.10 (m, 2H), 7.71-7.63 (m, 6H), 7.28 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 6.50 (s, 2H), 4.58 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 4.36 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 4.32 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 4.04 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 3.99 (d, J = 11.0 Hz, 2H), 2.88 (d, J = 11.0 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 167.8, 155.0, 154.9, 151.1, 148.5, 140.4, 140.1, 132.2, 126.9, 124.6, 124.1, 124.0, 123.7, 122.3, 120.1, 63.8, 61.0, 56.5, 19.7.

Bi(L4): Bi(OTf) $_3$ (33 mg, 0.050 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in THF (3.0 mL). Then, L4 (20 mg, 0.050 mmol) was added, and the mixture was stirred for 21 h. The precipitates were collected, and the crude was washed with THF and ether, dried under vacuo to afford the corresponding Bi-complex. ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 9.06 (s, 1H), 7.97-7.38 (m, 9H), 6.63 (s, 1H), 6.55 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.59-4.39 (m, 3H), 2.09 (s, 3H).

Bi $_2$ (L7)-acetate: To a solution of L7 (145 mg, 0.20 mmol) in water (3.0 mL), a solution of Bi(NO $_3$) $_3$ ·5H $_2$ O (194 mg, 0.40 mmol, 2.0 eq.) in 2 M HNO $_3$ aq. (2.0 mL) was added dropwise. The resulting mixture was stirred for 24 h at room temperature. The precipitates were collected, and washed with water and ether, dried under vacuo to afford the Bi-complex with nitrate anion as white-yellow powder (215 mg, 85%). The obtained complex with nitrate anion (38 mg, 0.030 mmol) was suspended in water (3.0 mL). Then, KOAc (73 mg, 0.75 mmol, 25 eq.) was added, and the mixture was stirred for 12 h. The solvent was evaporated. The crude was dissolved in MeCN, filtered to remove the insoluble salts. The filtrate was evaporated, and the residue was dried under vacuo to afford the corresponding Bi-complex with acetate as counter anion (24 mg, 63%). The single crystal was grown by the vapor diffusion method (MeCN-ether, -20 °C, 7 days). ^1H NMR (600 MHz, Acetonitrile- d_3) δ 9.05 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 7.98 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.57 (t, J = 7.6 Hz, 5H), 7.51 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.61 (s, 2H), 4.81 (d, J = 14.4 Hz, 2H), 4.48 (m, 4H, two protons overlapped), 4.09 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 4.03 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 2.80 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 1.09 (s, 9H); HRMS (ESI) (m/z): calcd for C $_{44}$ H $_{46}$ Bi $_2$ N $_6$ O $_{11}$ [M-OAc] $^+$ 1193.2694, found 1193.2689, [M-2OAc] $^{2+}$ 567.1278, found 567.1271.

HPNPP and DNA model Assay

The assay was performed in standard 100 μL of reaction mixture (50 mM HEPES buffer, 5% DMSO, pH 7.4) containing an RNA degrader, 1.0 mM model substrate. The reaction was monitored by the changes in UV/Vis absorbance at 400 nm using EnSightTM with a 96 clear well plate. Reactions were initiated by the addition of small volume (10 μL) of a stock solution (50% DMSO-buffer) of the catalyst to 90 μL of buffer solution containing model substrate. Time-dependent absorbance changes

were recorded at a fixed wavelength of 410 nm.

HPNPP kinetic Assay (Initial rate)

The HPNPP assay was performed in standard 100 μL of reaction mixture (50 mM buffer, 5% DMSO) containing an RNA degrader, 0.50 mM HPNPP. The reaction was monitored by the changes in UV/Vis absorbance at 400 nm using EnSight™ with a 96 clear well plate. Reactions were initiated by the addition of 10 μL of a stock solution of HPNPP to 85 μL of buffer and 5 μL of DMSO mixed solution containing RNA degrader. Time-dependent absorbance changes were recorded at a fixed wavelength of 400 nm.

Oligonucleotide model Assay

The assay was performed in standard 100 μL of reaction mixture (50 mM HEPES buffer, 5% DMSO, pH 7.4) containing an RNA degrader, 100 nM model substrate. The reaction was monitored by the fluorescence changes at 520 nm under the 495 nm excitation using EnSight™ with a 96 black half-well plate. Reactions were initiated by the addition of small volume (10 μL) of a stock solution (50% DMSO-buffer) of the catalyst to 90 μL of buffer solution containing model substrate. The time-dependent fluorescence changes were recorded at 520 nm under the 495 nm excitation.

X-ray Crystal Structure Determination

The crystal was immersed in Fluorolube®, mounted in a MicroMount, and measured at 103(2) K. The X-ray diffraction data were collected with a XtaLAB PRO diffractometer (Rigaku) using Cu (40 kV, 30 mA) X-ray source. The structure was solved and refined by ShelXT program. All hydrogens were placed in idealized positions and constrained to ride on their parent atom.

checkCIF/PLATON report

Structure factors have been supplied for datablock(s) exp_323

THIS REPORT IS FOR GUIDANCE ONLY. IF USED AS PART OF A REVIEW PROCEDURE FOR PUBLICATION, IT SHOULD NOT REPLACE THE EXPERTISE OF AN EXPERIENCED CRYSTALLOGRAPHIC REFEREE.

No syntax errors found. CIF dictionary Interpreting this report

Datablock: exp_323

Bond precision: C-C = 0.0114 A Wavelength=1.54184

Cell: a=16.9687 (1) b=22.0639 (2) c=25.9495 (2)
 alpha=90 beta=90 gamma=90

Temperature: 103 K

	Calculated	Reported
Volume	9715.38 (13)	9715.38 (13)
Space group	P b c a	P b c a
Hall group	-P 2ac 2ab	-P 2ac 2ab
Moiety formula	C44 H46 Bi2 N6 O11, H2 O [+ solvent]	0.889(C44 H46 Bi2 N6 O11), 0.889(H2 O)
Sum formula	C44 H48 Bi2 N6 O12 [+ solvent]	C44 H46 Bi2 N6 O11
Mr	1270.85	1252.83
Dx, g cm ⁻³	1.738	1.927
Z	8	9
Mu (mm ⁻¹)	14.597	16.394
F000	4928.0	5454.0
F000'	4877.38	
h, k, lmax	21, 27, 32	21, 27, 32
Nref	10153	10102
Tmin, Tmax	0.156, 0.380	0.155, 0.584
Tmin'	0.043	

Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.155 Tmax=0.584
AbsCorr = GAUSSIAN

Data completeness= 0.995

Theta (max) = 76.167

R(reflections)= 0.0469(9539)

wR2(reflections)=
0.1052(10102)

S = 1.055

Npar= 590

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format

test-name_ALERT_alert-type_alert-level.

Click on the hyperlinks for more details of the test.

Alert level B

PLAT241_ALERT_2_B	High	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	001E	Check
PLAT242_ALERT_2_B	Low	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	C00Z	Check
PLAT242_ALERT_2_B	Low	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	C016	Check
PLAT420_ALERT_2_B	D-H Bond Without Acceptor	O1	--H1A	.	Please Check
PLAT971_ALERT_2_B	Check	Calcd Resid. Dens.	0.72Ang From Bi02	2.88	eA-3
PLAT972_ALERT_2_B	Check	Calcd Resid. Dens.	0.82Ang From Bi02	-2.64	eA-3
PLAT972_ALERT_2_B	Check	Calcd Resid. Dens.	0.76Ang From Bi02	-2.60	eA-3

Alert level C

PLAT213_ALERT_2_C	Atom	O01E	has ADP max/min Ratio	3.1	prolat
PLAT213_ALERT_2_C	Atom	C01S	has ADP max/min Ratio	3.4	prolat
PLAT213_ALERT_2_C	Atom	C01T	has ADP max/min Ratio	3.4	prolat
PLAT220_ALERT_2_C	NonSolvent	Resd 1	C	Ueq(max)/Ueq(min) Range	5.5	Ratio
PLAT220_ALERT_2_C	NonSolvent	Resd 1	O	Ueq(max)/Ueq(min) Range	4.8	Ratio
PLAT222_ALERT_3_C	NonSolvent	Resd 1	H	Uiso(max)/Uiso(min) Range	6.0	Ratio
PLAT234_ALERT_4_C	Large Hirshfeld Difference	O008	--C01M	.	0.17	Ang.
PLAT234_ALERT_4_C	Large Hirshfeld Difference	O01E	--C00Z	.	0.17	Ang.
PLAT234_ALERT_4_C	Large Hirshfeld Difference	C9	--C016	.	0.19	Ang.
PLAT234_ALERT_4_C	Large Hirshfeld Difference	C01C	--C01Q	.	0.19	Ang.
PLAT241_ALERT_2_C	High	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	000A	Check	
PLAT241_ALERT_2_C	High	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	000C	Check	
PLAT241_ALERT_2_C	High	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	000M	Check	
PLAT241_ALERT_2_C	High	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	C01Q	Check	
PLAT242_ALERT_2_C	Low	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	Bi02	Check	
PLAT242_ALERT_2_C	Low	'MainMol'	Ueq as Compared to Neighbors of	C01M	Check	
PLAT260_ALERT_2_C	Large Average Ueq of Residue Including	O1		0.126	Check	
PLAT342_ALERT_3_C	Low Bond Precision on	C-C Bonds	0.01135	Ang.	
PLAT369_ALERT_2_C	Long	C(sp2)-C(sp2) Bond	C00T - C018	.	1.53	Ang.
PLAT906_ALERT_3_C	Large K Value in the Analysis of Variance		3.418	Check	
PLAT971_ALERT_2_C	Check	Calcd Resid. Dens.	0.76Ang From Bi02	2.30	eA-3	
PLAT976_ALERT_2_C	Check	Calcd Resid. Dens.	1.06Ang From O003	-0.53	eA-3	

Alert level G

FORMU01_ALERT_1_G There is a discrepancy between the atom counts in the
_chemical_formula_sum and _chemical_formula_moiety. This is
usually due to the moiety formula being in the wrong format.
Atom count from _chemical_formula_sum: C44 H46 Bi2 N6 O11
Atom count from _chemical_formula_moiety:C39.11600 H42.67200 Bi1.778 N

FORMU01_ALERT_2_G There is a discrepancy between the atom counts in the
_chemical_formula_sum and the formula from the _atom_site* data.
Atom count from _chemical_formula_sum:C44 H46 Bi2 N6 O11
Atom count from the _atom_site data: C39.11111 H42.66666 Bi1.777777 N

CELLZ01_ALERT_1_G Difference between formula and atom_site contents detected.

CELLZ01_ALERT_1_G ALERT: Large difference may be due to a
 symmetry error - see SYMMG tests
 From the CIF: _cell_formula_units_Z 9
 From the CIF: _chemical_formula_sum C44 H46 Bi2 N6 O11
 TEST: Compare cell contents of formula and atom_site data

atom	Z*formula	cif sites	diff
C	396.00	352.00	44.00
H	414.00	384.00	30.00
Bi	18.00	16.00	2.00
N	54.00	48.00	6.00
O	99.00	96.00	3.00

PLAT002_ALERT_2_G	Number of Distance or Angle Restraints on AtSite	2	Note
PLAT007_ALERT_5_G	Number of Unrefined Donor-H Atoms	2	Report
PLAT041_ALERT_1_G	Calc. and Reported SumFormula Strings Differ		Please Check
PLAT045_ALERT_1_G	Calculated and Reported Z Differ by a Factor ...	0.889	Check
PLAT051_ALERT_1_G	Mu(calc) and Mu(CIF) Ratio Differs from 1.0 by .	10.96	%
PLAT083_ALERT_2_G	SHELXL Second Parameter in WGHT Unusually Large	79.42	Why ?
PLAT142_ALERT_4_G	s.u. on b - Axis Small or Missing	0.00020	Ang.
PLAT143_ALERT_4_G	s.u. on c - Axis Small or Missing	0.00020	Ang.
PLAT171_ALERT_4_G	The CIF-Embedded .res File Contains EADP Records	1	Report
PLAT172_ALERT_4_G	The CIF-Embedded .res File Contains DFIX Records	1	Report
PLAT232_ALERT_2_G	Hirshfeld Test Diff (M-X) Bi02 --N00N .	8.2	s.u.
PLAT232_ALERT_2_G	Hirshfeld Test Diff (M-X) Bi --O008 .	5.3	s.u.
PLAT301_ALERT_3_G	Main Residue Disorder(Resd 1)	2%	Note
PLAT605_ALERT_4_G	Largest Solvent Accessible VOID in the Structure	279	A**3
PLAT720_ALERT_4_G	Number of Unusual/Non-Standard Labels	104	Note
PLAT794_ALERT_5_G	Tentative Bond Valency for Bi02 (III) .	2.47	Info
PLAT860_ALERT_3_G	Number of Least-Squares Restraints	1	Note
PLAT868_ALERT_4_G	ALERTS Due to the Use of _smtbx_masks Suppressed	!	Info
PLAT912_ALERT_4_G	Missing # of FCF Reflections Above STh/L= 0.600	51	Note
PLAT978_ALERT_2_G	Number C-C Bonds with Positive Residual Density.	0	Info

-
- 0 **ALERT level A** = Most likely a serious problem - resolve or explain
 7 **ALERT level B** = A potentially serious problem, consider carefully
 22 **ALERT level C** = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight
 24 **ALERT level G** = General information/check it is not something unexpected
- 6 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data
 28 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient
 5 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low
 12 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
 2 ALERT type 5 Informative message, check
-

It is advisable to attempt to resolve as many as possible of the alerts in all categories. Often the minor alerts point to easily fixed oversights, errors and omissions in your CIF or refinement strategy, so attention to these fine details can be worthwhile. In order to resolve some of the more serious problems it may be necessary to carry out additional measurements or structure refinements. However, the purpose of your study may justify the reported deviations and the more serious of these should normally be commented upon in the discussion or experimental section of a paper or in the "special_details" fields of the CIF. checkCIF was carefully designed to identify outliers and unusual parameters, but every test has its limitations and alerts that are not important in a particular case may appear. Conversely, the absence of alerts does not guarantee there are no aspects of the results needing attention. It is up to the individual to critically assess their own results and, if necessary, seek expert advice.

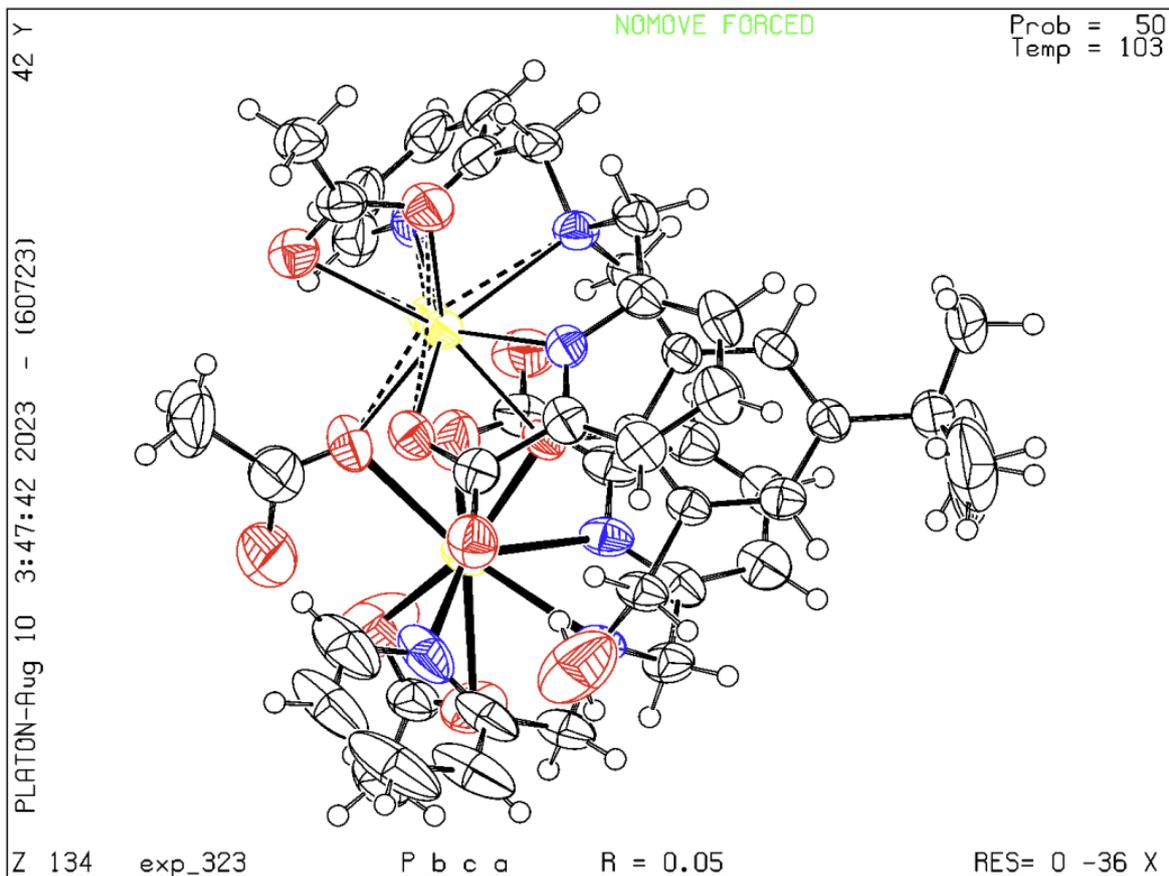
Publication of your CIF in IUCr journals

A basic structural check has been run on your CIF. These basic checks will be run on all CIFs submitted for publication in IUCr journals (*Acta Crystallographica*, *Journal of Applied Crystallography*, *Journal of Synchrotron Radiation*); however, if you intend to submit to *Acta Crystallographica Section C* or *E* or *IUCrData*, you should make sure that full publication checks are run on the final version of your CIF prior to submission.

Publication of your CIF in other journals

Please refer to the *Notes for Authors* of the relevant journal for any special instructions relating to CIF submission.

PLATON version of 06/07/2023; check.def file version of 30/06/2023



第6章 謝辞

本研究を行うにあたり終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、大阪大学産業科学研究所・複合分子化学研究室 鈴木孝禎 教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を通じて直接御指導をいただきました、大阪大学産業科学研究所・複合分子化学研究室 伊藤幸裕 准教授、黒原崇 博士、山下泰信 助教に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり有益な御助言・御指導をいただきました、大阪大学産業科学研究所・複合分子化学研究室 高田悠里 助教、秋山敏毅 特任助教、大阪大学産業科学研究所・総合解析センター 鈴木健之 准教授に深く感謝いたします。

実験や普段の生活面でお世話になり、充実した研究生活を過ごさせて下さった大阪大学産業科学研究所・複合分子化学研究室の学生・研究員・技術補佐員の皆様に深く感謝いたします。

日常の事務や雑務等においてお世話して下さいました、本多綾香さん、吉野香弥さんに御礼申し上げます。

機器分析にあたりご協力いただきました、大阪大学産業科学研究所・総合解析センターの皆様に感謝いたします。

最後に、様々なかたちで支えて下さった友人・知人、長い学生生活を支えてくれた家族に深く感謝いたします。

令和5年
花谷 優太郎