

脱塩基部位認識分子の開発とDNA修復阻害剤への展開

阿部（貞松），由紀子

<https://doi.org/10.15017/4060264>

出版情報：Kyushu University, 2019, 博士（創薬科学），論文博士
バージョン：
権利関係：

脱塩基部位認識分子の開発と DNA 修復阻害剤への展開

2019 年度

九州大学大学院薬学研究院
生物有機合成化学分野

阿部（貞松） 由紀子

目次

第1章 緒論.....	1
第1節 研究概要.....	1
第2節 塩基除去修復機構.....	1
第3節 APサイトの性質.....	4
3-1 APサイトの反応性.....	4
3-2 APサイトがDNA高次構造に与える影響.....	4
第4節 APサイト認識分子.....	6
4-1 APサイトの検出および定量.....	6
4-2 APサイトの認識と切断.....	7
第5節 APサイト修復阻害剤.....	8
第6節 本研究の目的.....	9
6-1 APサイトの化学的性質に基づく特異的認識分子の開発.....	9
6-2 APサイト特異的分子のAPサイトに対する反応性.....	9
6-3 APサイト修復阻害効果を発揮するための新規分子の開発.....	9
第2章 核酸塩基-ポリアミン結合体によるAPサイト特異的認識分子の開発.....	11
第1節 核酸塩基-ポリアミン結合体の設計と合成.....	11
1-1 核酸塩基-ポリアミン結合体の合成.....	11
1-2 THF環を有する人工オリゴヌクレオチド(ODN)鎖の合成.....	12
第2節 APサイトアナログを有するODN2本鎖に対する各リガンドの安定化効果.....	13
2-1 ODN2-1に対する各リガンドの安定化効果(塩濃度100mM).....	13
2-2 ODN2-2に対する各リガンドの安定化効果(塩濃度100mM).....	14
2-3 塩濃度50mMにおけるC-, T-リガンドの安定化効果.....	15
2-4 各リガンドの安定化効果まとめ.....	16
2-5 リガンド核酸塩基部およびポリアミン部単独の安定化効果(コントロール実験).....	17
第3節 円二色性(CD: Circular Dichroism)測定を用いた高次構造変化の確認.....	18
第4節 表面プラズモン共鳴(SPR: Surface Plasmon Resonance)を用いた相互作用解析.....	20
4-1 SPR用ビオチン化ODNの設計と合成.....	21
4-2 ビオチン化ODNのセンサーチップへの固定化.....	21
4-3 各リガンドとAPサイトアナログを有するヘアピン2本鎖との相互作用.....	22
第5節 等温滴定カロリーメトリー(ITC: Isothermal titration calorimetry)を用いた相互作用解析.....	24
5-1 ITC測定に用いるODN2-2配列の透析と各リガンドのNMR定量.....	24
5-2 各リガンドのITC測定による熱力学的パラメーターの算出.....	24
第6節 第2章のまとめ.....	27

第3章 核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイトに対する反応性.....	28
第1節 ヘミアセタール型 AP サイトを組み込む配列の設計.....	28
第2節 ヘミアセタール型 AP サイトを有する ODN の生成.....	28
第3節 各リガンドの AP サイトに対する β -脱離反応効率.....	29
3-1 各リガンドの AP サイトに対する β -脱離反応における塩基選択性.....	29
3-2 プリン塩基を有するリガンドの β -脱離反応の時間変化.....	30
第4節 G-リガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖との β -脱離反応における断片構造確認.....	31
第5節 リガンドの AP サイト修復酵素 (APE1) に与える影響.....	32
第6節 第3章のまとめ.....	34
第4章 チオグアニン-ポリアミン結合体を基にした AP サイト特異的分子の開発.....	35
第1節 チオグアニン-ポリアミン結合体の設計と合成.....	35
1-1 チオグアニン-ポリアミン結合体の合成.....	36
1-2 ^3S -リガンドの UV 吸収確認.....	36
1-3 ^3S -リガンドの光反応に用いる ODN の設計と合成.....	37
第2節 ^3S -リガンドの各 ODN 配列に対する安定化効果.....	37
第3節 ^3S -ligand の AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖に対する光反応.....	38
3-1 光反応における隣接塩基 (X, Y) の影響.....	38
3-2 光反応における相補位置 (Z) の塩基の影響.....	39
3-3 チオカルボニル基および光、DTT の重要性.....	40
3-4 MALDI-TOF MS 測定による新規ピークの構造決定および予想反応メカニズム.....	41
第4節 ^3S -リガンドの AP サイトを有する ODN2 本鎖に対する切断および付加体形成反応.....	42
4-1 ゲル電気泳動を用いた ^3S -リガンドの AP サイトに対する反応性評価.....	42
4-2 ^3S -リガンドと AP サイト β -脱離断片との付加体形成反応予想メカニズム.....	44
4-3 HPLC による ^3S -リガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖との反応解析.....	45
第5節 第4章のまとめ.....	46
第5章 AP サイト修復阻害剤への展開にむけた予備検討.....	47
第1節 CHO 細胞株に対する A-および G-リガンドの細胞毒性効果.....	47
第2節 A549 細胞株に対する A-および G-リガンドの細胞毒性効果.....	48
結論.....	50
謝辞.....	52
実験の部.....	53
機器データ.....	70
参考文献.....	80
発表論文.....	84

第1章 緒論

第1節 研究概要

DNA は紫外線や放射線、食物に由来する変異原、DNA アルキル化剤、更には生体内において発生する活性酸素種等、様々な外的および内的要因により常に損傷を受けており、その損傷もまたそれぞれの損傷に応じた多様な修復機構により常に修復を受ける事で正確な遺伝情報が維持されている。代表的な DNA 修復機構としてミスマッチ修復、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、組み換え修復などが知られている。中でも塩基除去修復は、核酸塩基の酸化およびアルキル化による損傷やミスマッチ塩基、脱塩基部位 (AP サイト) などの修復に関与しており、この修復経路は細胞の生存において必須なものと考えられている。これまでの研究により、塩基除去修復に関わる酵素およびその作用や修復機構など、哺乳動物における概要は明らかになってきたが、現在我々が知りえるのはその一端に過ぎず、本修復系が生命維持に必須である事からもうかがえるように、塩基除去修復においても更に多様な経路が存在しそれぞれがバックアップとして働いているのか、または使い分けがなされているのかなど複雑に発達した修復系の全容は依然として明らかになっていない。これらの学術的興味とともに近年において、複製や転写と共役した塩基除去修復や、修復系の異常と疾患の関わり、更には修復系の阻害による生体への影響などが徐々に明らかになり、特にこれらの修復系とがん疾患との関わりや疾患治療といった臨床応用を目指した研究について改めて注目が集まっている。

本研究では、塩基除去修復において修復中間体であると同時に代表的な DNA 損傷のひとつとして知られる AP サイトについて、その化学的性質に基づく特異的分子を開発し、複雑な塩基除去修復機構に対する理解を深めるとともに、AP サイトの修復機構に与える影響を明らかにする事で、AP サイト修復阻害に基づく新薬シーズとしての可能性を探った。

第2節 塩基除去修復機構¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

塩基除去修復により修復を受ける損傷としては、核酸塩基の酸化反応、脱アミノ化反応、アルキル化反応等の結果生じる酸化塩基⁵⁾、ミスマッチ塩基⁶⁾⁷⁾、アルキル化塩基⁸⁾⁹⁾等が挙げられる。たとえば、代謝により生じた活性酸素はプリン塩基においては 8-オキソグアノシン、ピリミジン塩基においてはチミングリコールなど、それぞれ 1 日 1 細胞当たり約 1000 残基および約 500 残基もの酸化損傷塩基を生じる¹⁰⁾。また、シトシン残基の脱アミノ化の結果生じるウラシル残基、CpG 配列中のシトシン残基のメチル化で生じた 5-メチルシトシン (m⁵C) が続いて脱アミノ化されて生じるチミン残基、これらは結果として U:G および T:G ミスマッチ塩基対を生じる。これらの主に内的要因による DNA 損傷に加え、DNA アルキル化剤などの外的要因により生じる 7-アルキルグアニン¹¹⁾や 3-メチルアデニン¹²⁾などのアルキル化塩基もまた塩基除去修復系により修復を受ける事が報告されている (Fig. 1-1)。生じた損傷塩基は修復過程において酵素的に取り除かれ AP サイトを一時的に生じるが、この AP サイトもまた細胞毒性¹³⁾および変異原性¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾を有する DNA 損傷であり、核酸中の塩基と糖を結ぶ *N*-グリコシド結合は非酵素的かつ自然発生的に 1 日に 1 細胞当たり約 1 万個もの頻度で切断され AP サイトを生じ、同様に塩基除去修復機構により修復を受ける¹⁰⁾¹⁷⁾。

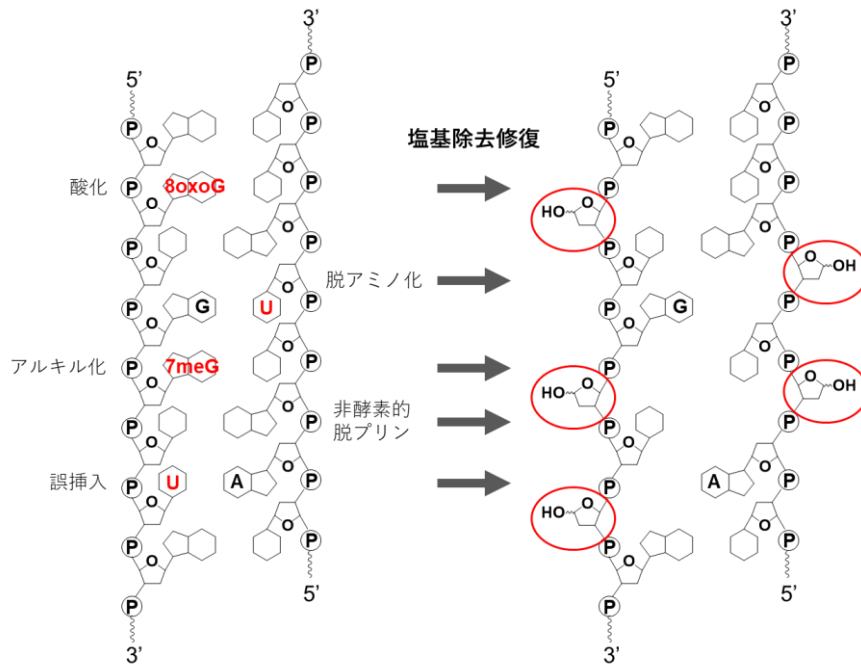


Fig. 1-1 塩基除去修復により修復される損傷塩基

修復には損傷塩基に特異的な多種の DNA グリコシラーゼ¹⁸⁾、DNA ポリメラーゼ^{19,20)}、DNA リガーゼ等が関与し、タンパク質間相互作用を介して修復が円滑に進行する事が明らかとなっている²¹⁾²²⁾²³⁾。一連の修復はまず、損傷塩基やミスマッチ塩基をそれぞれの損傷に特異的な DNA グリコシラーゼにより切除し AP サイトを生じる事から始まる (Fig. 1-2)。DNA グリコシラーゼには DNA グリコシラーゼ活性のみを持つ 1 価性のものと AP リアーゼ活性を併せ持つ 2 価性のものの 2 種類があり、1 価性 DNA グリコシラーゼの場合は、その活性により *N*-グリコシド結合が切断され修復中間体としての AP サイトを生じる。例としてはシトシン残基の脱アミノ化や dUTP の取り込みにより生じた DNA 中のウラシル残基を除去するウラシル DNA グリコシラーゼ (UNG/UDG)、8-オキソグアニンと対合したアデニンを切除するアデニン特異的なミスマッチ DNA グリコシラーゼ (MYH) などが挙げられる。

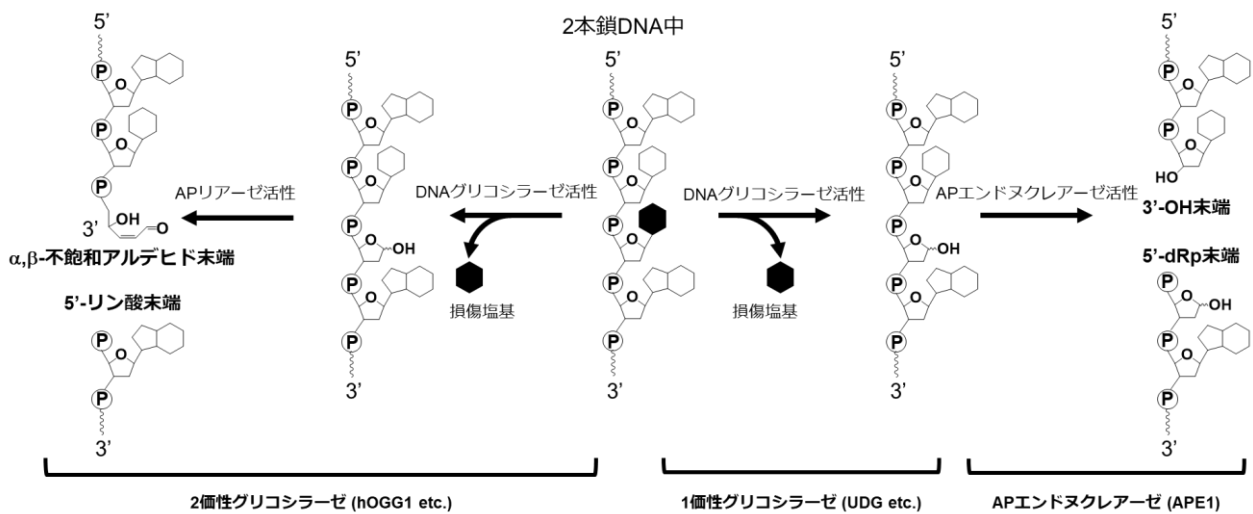


Fig. 1-2 1 価性および 2 価性 DNA グリコシラーゼによる AP サイトの生成

2価性 DNA グリコシラーゼの場合には、DNA グリコシラーゼ活性により損傷塩基が切除され AP サイトを生成した後、AP リアーゼ活性によりその AP サイトの 3' 側でβ-脱離反応による DNA 鎖切断を起こす。この結果 3' 末端にはα,β-不飽和アルデヒドが残り、DNA ポリメラーゼによる正常な塩基の複製を阻害する 3' ブロックを生じる。2価性グリコシラーゼの例としてはシトシンと対合した 8-オキソグアニンを切除する 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ (hOGG1) やチミングリコールの切除を行う NTHL1 などがある。

1価性および2価性グリコシラーゼの作用を受けて生じた AP サイトおよび AP サイトのβ-脱離断片は続いて塩基除去修復において主要な役割を果たす AP エンドヌクレアーゼ (APE1)²⁴⁾ の作用を受ける (Fig. 1-3)。APE1 が持つ AP エンドヌクレアーゼ活性は AP サイトの 5' 側でホスホジエステル結合を加水分解し、3' -OH 末端と 5' -デオキシリボースリン酸 (dRp) 末端を生じる。1価性 DNA グリコシラーゼにより生じた AP サイトはこれにより 3' -OH 末端を生じ、次に DNA ポリメラーゼβ (Polβ)²⁵⁾ の DNA ポリメラーゼ活性による 1ヌクレオチドの合成および dRp リアーゼ活性による 5' -dRp の除去、最後に DNA リガーゼにより断片の連結を受け修復が完了する。一方、2価性 DNA グリコシラーゼの場合では 3' ブロックを生じるため、まずはこれを取り除く必要がある。APE1 は AP エンドヌクレアーゼ活性の他に DNA3' -ホスホジエステラーゼ活性や DNA3' -ホスファターゼ活性を持つ事が知られており、これらの活性により 3' ブロックを取り除き DNA ポリメラーゼによる修復 DNA 合成が始まる。更に塩基除去修復では Polβ に依存しない修復経路 (PCNA 依存性経路) も報告されており、生体内におけるこれらの修復系の使い分けや選択については明確ではないが、塩基除去修復の初期段階ではいずれの場合においても AP サイトを生じており、塩基除去修復機構を理解するうえで AP サイトは重要な構造体といえる。

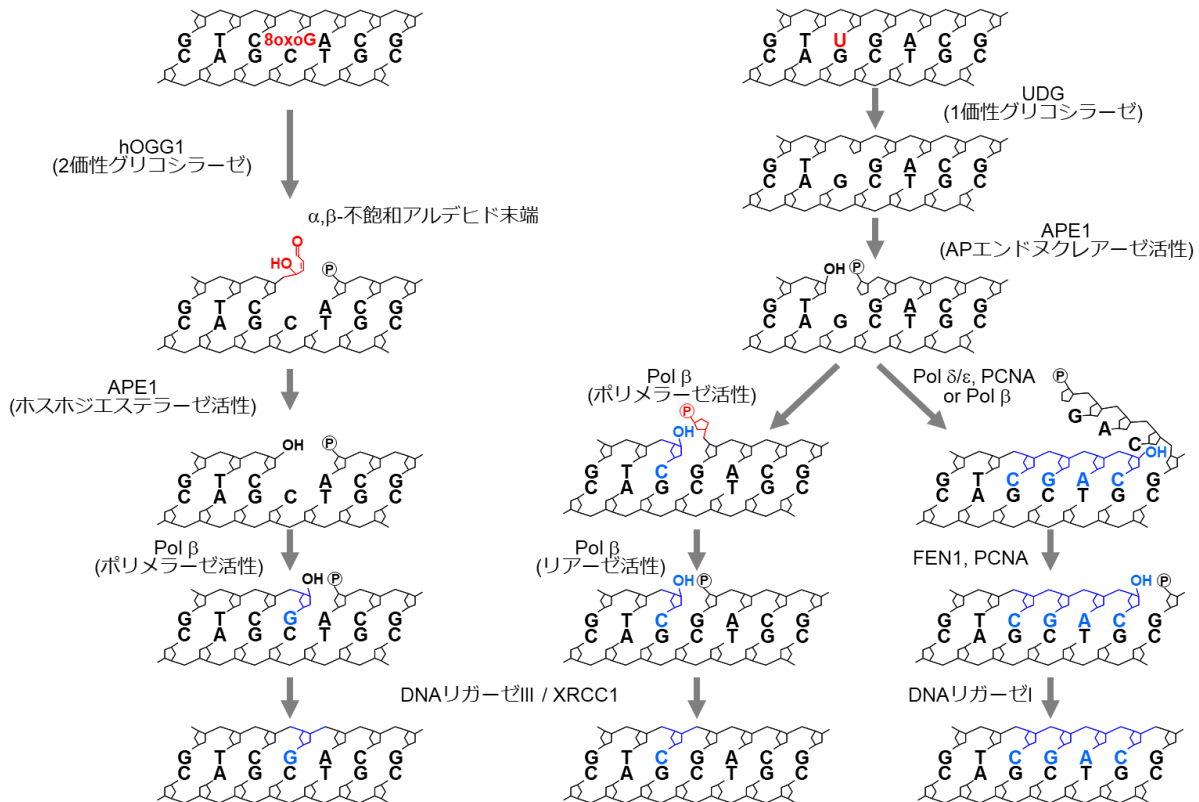


Fig. 1-3 塩基除去修復機構⁴⁾

第3節 APサイトの性質

過去40年に渡りAPサイトの基本的な化学的性質については研究がなされている。本節では主にAPサイトの反応性とAPサイトがDNA高次構造に与える影響について述べる。

3-1 APサイトの反応性

APサイトは生体内において3つの異なる構造（ヘミアセタール型、アルデヒド型、水和物型）の平衡状態で存在する（Fig. 1-4）。NMRスペクトル解析から、溶液中においてはDNA2本鎖中のAPサイトは主に環状のヘミアセタール型で存在しており α -体および β -体がおおよそ1:1で存在する事が報告されている²⁶⁾。3つの平衡状態においてAPサイトの反応性を特徴づけるのはアルデヒド型であり、緩やかなアルカリ条件で β -脱離を起こし α,β -不飽和アルデヒドを形成する事が知られている。3つの平衡状態におけるアルデヒド型の存在比は全体の1%程度に過ぎないものの、この高い反応性のために全体としてAPサイトのアルカリに対する感受性を高めている。また、ポリアミンにより同様の脱離反応が引き起こされる事も広く知られており²⁷⁾、スペルミンにおいては定量的な収率で β -脱離が起こるという報告もある²⁸⁾。強アルカリ条件においては β -脱離に続き δ -脱離反応が起こる事も知られているほか、酵素による切断においても δ -脱離体の存在が示されている。

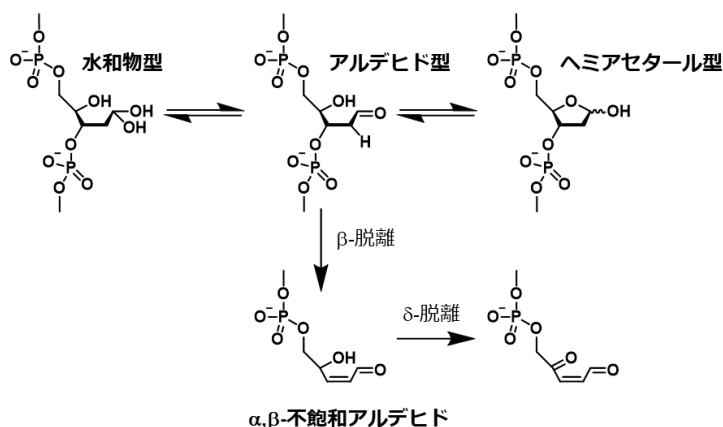


Fig. 1-4 APサイトの異性体および β -、 δ -脱離体

APサイトの β -脱離により生じる α,β -不飽和アルデヒドは前節で述べた通り、APサイトを修復中間体とする塩基除去修復において3'ブロックとなりポリメラーゼによる複製を阻害する事が知られている。APE1の持つDNA3'-ホスホジエステラーゼ活性やDNA3'-ホスファターゼ活性によりこれらの3'ブロックは取り除かれるが、その活性はAPE1のAPエンドヌクレアーゼ活性に比べて低い事が示唆されており²⁹⁾、APサイト修復においてはこの3'ブロックを取り除く過程が律速となる事が示唆されている。これに加え、 α,β -不飽和アルデヒドはその構造ゆえにAPサイトのアルデヒド型と同様に反応性が高く、窒素や硫黄による求核反応を受けることも報告されている³⁰⁾。APサイトの β -脱離断片の反応性については後述する。

3-2 APサイトがDNA高次構造に与える影響

APサイトを有するDNAの高次構造については主にAPサイトの安定アナログとして知られるテト

ラヒドロフラン (THF) 環を導入した人工 DNA 鎖を用いて研究されてきた。AP サイトは前項の通り、アルデヒド型のβ-脱離反応により DNA 鎖切断が起こるが、糖骨格を THF 環に置換する事でβ-脱離反応を防ぐ事ができる。AP サイトを有する DNA の高次構造は塩基の脱離により形成される局所的な疎水空間に由来して様々な構造をとる事が明らかとなっており、それらの高次構造は脱離塩基、相補塩基、隣接塩基対の影響を大きく受ける。ヘミアセタール型 AP サイトを用いた研究についてもいくつか報告があるが、この場合、更にα-体およびβ-体で挙動が異なるなどより多様な構造をとる。AP サイト近傍の核酸塩基によりもたらされるこれらの構造の変化は、DNA2 本鎖に歪みをもたらし、結果として酵素の認識および結合にまで影響を与える³¹⁾。いくつかの場合について下記にまとめる。

3-2-1 ピリミジン塩基の脱離に伴う AP サイト (apyrimidinic サイト) の場合 (Fig. 1-5)

ピリミジン塩基の脱離に伴い、相補塩基を持たないプリン残基が生じる。この場合、THF 環を用いた AP サイトアナログの研究では、THF 環の隣接塩基がどの組み合わせでも THF 環の相補位置にあるプリン残基はヘリックス構造内に残り、スタッキング相互作用に寄与し、THF 環自身もヘリックス構造内に位置する³²⁾。一方、AP サイトのヘミアセタール型を用いた研究では、AP サイトの相補位置にあるプリン残基は THF 環の場合と同様にヘリックス構造内に残りスタッキング相互作用に寄与するが、AP サイト自身はβ-体の場合はヘリックス構造内、α-体の場合はヘリックス構造外に位置する事が報告されている³³⁾。β-体では 1' 位水酸基がヘリックス構造内において相補塩基と水分子を介した水素結合を形成するのに対し、α-体ではこれらの水素結合形成が困難である事が原因だと考えられる。

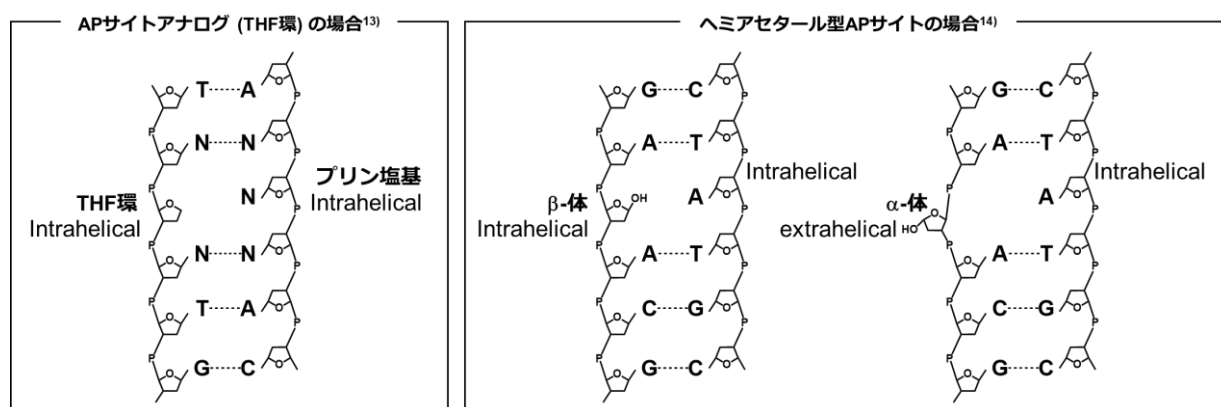


Fig. 1-5 Apyrimidinic サイトを有する DNA の高次構造

3-2-2 プリン塩基の脱離に伴う AP サイト (apurinic サイト) の場合

プリン塩基の脱離に伴い、相補塩基を持たないピリミジン残基が生じる。生体内における非酵素的な脱離はピリミジン塩基よりもプリン塩基で高頻度に関与し、apurinic サイトの場合は隣接塩基の性質に応じて相補位置にあるピリミジン残基の挙動が変わるなど、より複雑な高次構造をとる事が報告されている。

3-2-2-1 Apurinic サイトの隣接塩基がプリン塩基の場合 (Fig. 1-6)

THF 環を用い、かつその隣接塩基にグアニンをを用いた研究では、THF 環の相補位置にあるシトシン残基はヘリックス構造の外側に突き出し、更に THF 環もヘリックス構造外に突き出す事が報告されている³²⁾³⁴⁾。これは、THF 環に隣接するグアニン残基の強いスタッキング相互作用が影響していると考えられ、DNA2 本鎖が圧縮されたような構造を取る事が示唆されている。また、同条件において THF

環の相補位置にある塩基がチミンの場合では、THF 環およびチミン残基はヘリックス構造の内側と外側における配置の平衡状態をとる。AP サイトのヘミアセタール型においては、測定条件により AP サイトの相補位置にあるチミン残基はヘリックス構造の内側と外側における配置の両方を取りうる事が示唆されている³⁵⁾。

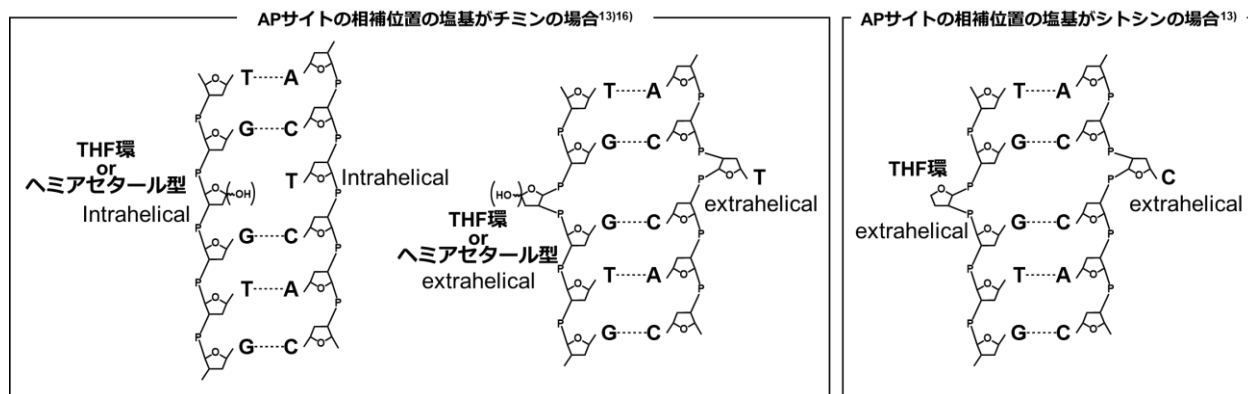


Fig. 1-6 Apurinic サイトを有する DNA の高次構造

3-2-2-2 Apurinic サイトの隣接塩基がピリミジン塩基の場合 (Fig. 1-7)

THF 環の相補塩基がチミン残基の場合において報告例があり、本条件では THF 環の隣接塩基シトシンと AP サイトの相補位置のチミン残基との水素結合形成によりチミン残基がヘリックス内に残る事が示唆されている³⁶⁾。

脱離塩基、相補塩基および隣接塩基の全ての組み合わせを網羅した実験報告はないが、本項で述べたいいくつかの報告例から傾向として、AP サイトによってもたらされる高次構造の変化は主に AP サイトの隣接塩基対間における塩基-塩基スタッキング相互作用により生じていると考えられ、ヘミアセタール型 AP サイトでもその挙動は THF 環の場合と類似する事がうかがえる。これらの NMR による実験結果と合わせて、計算による THF 環を有する DNA の分子力学や動態、熱力学が報告されており、実験結果と一致する情報が得られている³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾。

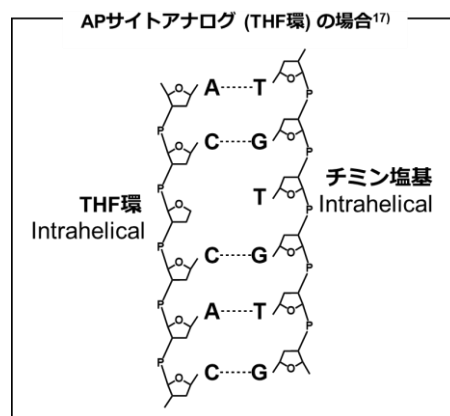


Fig. 1-7 Apurinic サイトを有する DNA の高次構造

第 4 節 AP サイト認識分子

4-1 AP サイトの検出および定量

AP サイトの検出および定量は、様々な内的・外的要因により生じる変異や遺伝子異常に対する DNA 損傷を定量するよい方法となる。これまでに AP サイトの性質を基に様々な認識分子が開発されてきた。9-アミノエリプチシン⁴⁰⁾や 3-アミノカルバゾール、ポリアミンなどのアミノ基を有する化合物は求電子性のアルデヒド型 AP サイトとシッフ塩基形成を経て AP サイトを誘導体化する。これらの化合物の場

合は還元的アミノ化と合わせて2工程を要したが、アルコキシアミンを用いることで安定なオキシムエーテルへと変換し1工程でAPサイトを定量的に誘導体化する事が可能となった。1960年代にはLivingstoneらにより¹⁴Cラベル化されたメトキシアミンを用いて放射活性を計測する事でAPサイトの定量が行われている⁴¹⁾⁴²⁾。より高感度な検出を可能にする分子としてオキシアミンを基本骨格としてビオチン誘導体化した分子(ARP; Aldehyde Reactive Probe)が開発され⁴³⁾⁴⁴⁾、本分子は今日まで様々なAPサイト検出のツールとして研究されている⁴⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾。

また、1990年代からはAPサイトによって形成される局所的な疎水空間に着目した認識分子の報告がある。寺前らにより報告された低分子はAPサイトにはまり込み、APサイト内での相補塩基との水素結合および隣接塩基とのスタッキング相互作用等によりAPサイトを検出する分子である⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾。Torらも蛍光ヌクレオシドアナログを利用する事でAPサイト内の疎水空間に挿入された時に蛍光強度が増加する仕組みを開発し、APサイトの相補塩基によらずAPサイトを検出するツールとして報告している⁵²⁾。低分子によるAPサイトの検出は上記のように主にAPサイトとの特異的結合を利用したものと、APサイトの疎水空間を利用した非特異的結合によるものに大別される。

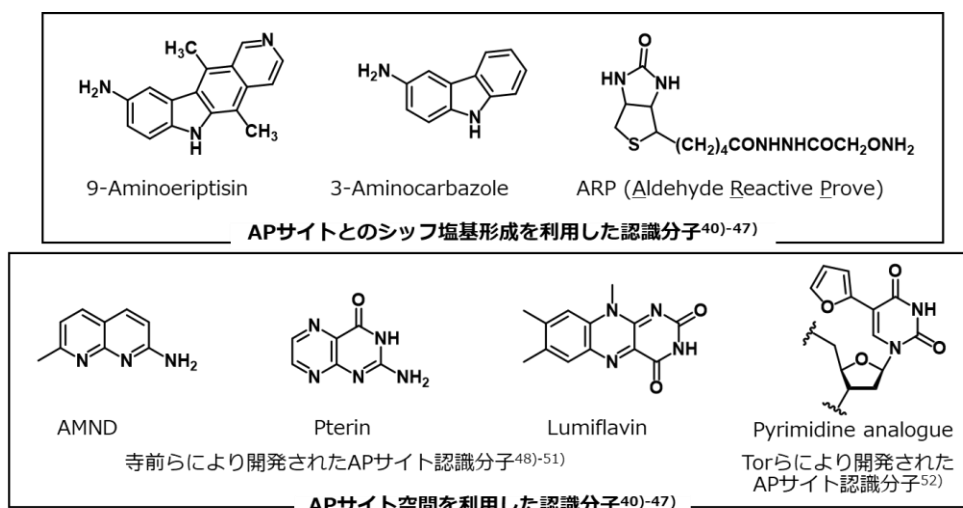


Fig. 1-11 様々なAPサイト検出分子

4-2 APサイトの認識と切断

1980年代にAPサイトを認識し切断する分子としてトリペプチドであるリシン-トリプトファン-リシン(Lys-Trp-Lys)が報告され⁵³⁾、その性質については詳細な研究がなされた⁵⁴⁾⁵⁵⁾。本分子はプロトン化されたリシン残基とDNAリン酸部との間で静電的相互作用による複合体を形成するとともに、トリプトファン残基がAPサイト内に挿入され隣接塩基対とスタッキングする事で2本鎖DNA構造中のapurinicサイトを特異的に認識する。更には本トリペプチドのAPサイトへの特異的結合によりリシン残基のアミノ基がアルデヒド型APサイトに近接し、塩基触媒型のβ-脱離反応を引き起こす⁵⁶⁾。前項で述べた9-アミノエリプチシンや3-アミノカルバゾールもまたこれらの化合物が有するアミノ基とアルデヒド型APサイトとのシッフ塩基形成に続くβ-脱離反応が報告されており⁴⁰⁾⁵⁷⁾、APサイトの認識に続く部位特異的な切断作用を有する分子は、APサイトの検出にとどまらずヌクレアーゼ様の働きをする機能分子として注目された。これらの機能分子はAPサイトが関わる塩基除去修復において、その修復過程に干渉し得ると期待され、これらの報告によりAPサイト認識分子の新薬シーズとしての可能性が示された。

第5節 AP サイト修復阻害剤

DNA アルキル化抗がん剤の細胞毒性効果の一端はアルキル化損傷塩基の修復過程で多量に生じる AP サイトが担っていると言われている。そのため、AP サイトの修復を阻害する事により、DNA アルキル化抗がん剤の細胞毒性効果を増強する事が出来ると考えられ、AP サイト修復阻害剤は既存抗がん剤の作用増強剤としての展開およびそのもの新規抗がん剤としての展開が期待された。AP サイト修復を阻害するためのアプローチとして、AP サイトの認識と切断を触媒する酵素 APE1 への直接阻害⁵⁸⁾⁵⁹⁾ や APE1 の AP サイトへの結合阻害、AP サイトのβ-脱離反応促進による 3' ブロック生成等が挙げられる。

Lhomme らは AP サイト修復に干渉し、修復阻害ひいては細胞毒性を発揮する分子への展開を目指し、核酸塩基とアクリジンをポリアミンで連結した一連の分子を開発した⁶⁰⁾⁶¹⁾ (Fig. 1-10)。本分子は様々な非特異的結合の組み合わせにより AP サイトの認識と切断を達成している。核酸塩基部は AP サイト内での水素結合および隣接塩基対とのスタッキング相互作用による AP サイト認識を担っており、アクリジン部は強力な DNA インターカレーターとして AP サイト近傍の DNA 本鎖中に挿入される。核酸塩基部とアクリジン部を繋ぐポリアミン部は中性溶液中において正電荷を帯びており、溶液中で負電荷を帯びる DNA リン酸部と静電的相互作用する事により DNA への分子の親和性向上に寄与する。更に、生理的条件下において電荷を持たない一部の中性アミンが求核剤となりアルデヒド型 AP サイトのβ-脱離を引き起こす。求核種となるアミンの pKa を変化させる事で、AP サイトに対する結合能のみを有する分子や高い切断能を有する分子を作り分け、中でも高い AP サイト結合能を有する分子は DNA アルキル化剤との併用により、DNA アルキル化剤の細胞毒性効果を増強する事を示した⁶²⁾。Lloyd らにより報告された低分子もシッフ塩基を中間体として AP サイトのβ-脱離による切断を触媒する分子であり、低濃度で AP サイトの切断を引き起こす事を報告し、本分子が Lhomme らと同様に既存の DNA アルキル化抗がん剤の作用を増強させるツールや、APE1 阻害剤となりうる事を示した⁶³⁾。また、AP サイトに結合し APE1 の AP サイトへの結合を阻害する分子については、近年において金属らせん分子⁶⁴⁾ やナフタレン環を用いた大環状分子⁶⁵⁾ などが報告されており、Granzhan らにより報告された一連の大環状分子は、AP サイトのβ-脱離反応促進およびβ-脱離断片との付加体形成についても示唆した⁶⁶⁾ (Fig. 1-11)。

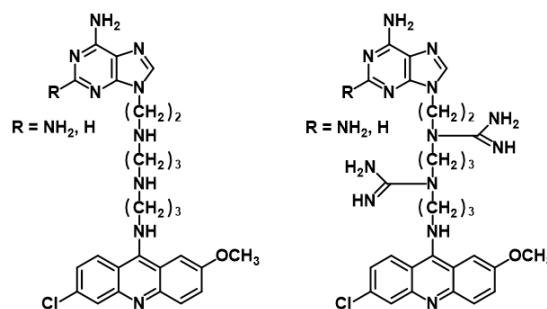


Fig. 1-10 Lhomme らによる AP サイト認識分子⁶⁰⁾⁶¹⁾⁶²⁾

Lloyd らによる AP サイト認識および分子⁶³⁾

Brabec らによる AP サイト認識分子⁶⁴⁾

Granzhan らによる AP サイト認識および切断分子⁶⁵⁾⁶⁶⁾

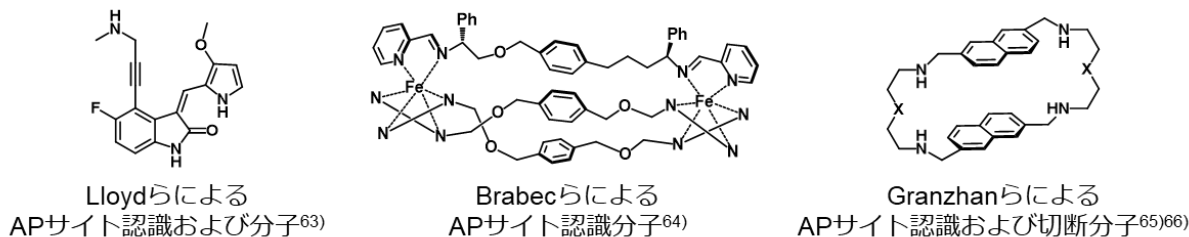


Fig. 1-11 様々な AP サイト特異的分子

第6節 本研究の目的

本研究では、代表的な DNA 損傷のひとつとして知られる AP サイトについて、その化学的性質に基づく特異的分子を開発し、複雑な塩基除去修復機構に対する理解を深めるツールとするとともに、AP サイトの修復機構に干渉する事で細胞毒性を発揮する AP サイト修復阻害剤への展開を目指した。

そこで本研究では、①AP サイトの化学的性質に基づく特異的分子の開発、②AP サイト特異的分子の AP サイトに対する反応性の解析、③AP サイト修復阻害効果を発揮するための新規分子の開発を行い、AP サイト修復阻害剤への展開について検討した。

6-1 AP サイトの化学的性質に基づく特異的認識分子の開発

前節までで述べた様に、AP サイト特異的分子はその検出や定量、更には AP サイト修復阻害に基づく新薬シーズの開発を目的として今日まで研究されてきた。主にはアミノ基を有する低分子化合物が AP サイト特異的分子として開発されており、これまでの研究から AP サイト近傍の核酸塩基の種類によりその認識および切断等が制限される事も示されてきた。本研究では、まずは AP サイトの相補位置の核酸塩基に注目し、AP サイト認識分子の開発にあたっては AP サイト空間内における水素結合を基本とした核酸塩基誘導体を開発する事にした。Lhomme らが開発した核酸塩基誘導体⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾は、アデニン骨格とアクリジンをポリアミンで連結した分子であり、その結合様式等については詳細な研究がなされているものの、AP サイトの相補位置の塩基がチミン残基の場合のみに限定されていた。彼らの分子では DNA インターカレーターであるアクリジンが DNA 結合における主要な役割を果たしており、アデニン部は AP サイト認識においては重要であるものの、その塩基選択性については詳細が論じられていなかった。そこで彼らの研究を基に、AP サイト認識分子として種々の核酸塩基とポリアミンの結合体を開発し、AP サイト内における核酸塩基の塩基対形成および塩基選択性について詳細を明らかにする事にした。

6-2 AP サイト特異的分子の AP サイトに対する反応性

核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイト認識は AP サイト内における核酸塩基部の水素結合およびスタッキング相互作用とポリアミン部の DNA リン酸部との静電的相互作用に分けられるが、ポリアミン部はそれだけでなく AP サイト部位特異的な切断能も期待される。ポリアミン部の核酸塩基部に最も近いアミノ基はその pKa がおよそ 7~8 と考えられ、生理的条件において一部が電荷をもたず求核性を維持していると考えられる。このアミノ基が核酸塩基部による AP サイト認識に引き続き、アルデヒド型 AP サイトのβ-脱離を促進すると考えられる。そこで、開発した種々の核酸塩基-ポリアミン結合体の応用研究の第一歩として、実際の AP サイトに対する反応性を明らかにする事にした。核酸塩基-ポリアミン結合体による AP サイトへの結合および切断により、AP サイトの修復過程を阻害または遅延させる事ができれば、AP サイト修復阻害に基づく新薬シーズとしての可能性が示される。

6-3 AP サイト修復阻害効果を発揮するための新規分子の開発

天然核酸塩基とポリアミンの結合体は様々な非共有結合的相互作用により AP サイトを認識するが、本構造は AP サイト認識における最小の構造単位であり、より効果的に AP サイト修復過程に干渉する

にはその結合能および切断能の向上が必要と考えられた。そこで、これまでに明らかにした AP サイトに対する結合および切断能を基に、AP サイト修復阻害を引き起こす新規分子として核酸塩基部にグアニンを有するポリアミン結合体を基本骨格とした分子を開発する事にした。グアニンは4種の核酸塩基中で最も水素結合能およびスタッキング能が高く、ポリアミンとの結合体ではその β -脱離能も高かった。これらに共有結合的な相互作用を加える事でより顕著な AP サイト結合または切断効果が得られると考えた。新規分子の AP サイトに対する結合および切断能の評価から AP サイト修復阻害剤としての可能性を探った。

第2章 核酸塩基-ポリアミン結合体による AP サイト特異的認識分子の開発

第1節 核酸塩基-ポリアミン結合体の設計と合成

核酸塩基とポリアミンの結合体は AP サイト認識における最小構造単位であり、核酸塩基部は脱離した塩基を補う形で AP サイトに挿入され、AP サイト内の局所的な疎水空間において相補位置の核酸塩基と水素結合を形成し、かつ隣接塩基対間でスタッキング相互作用する事で AP サイト内において安定化すると考えられる (Fig. 2-1)。AP サイトの局所的な疎水空間において核酸塩基部は Watson-Crick 型塩基対を形成すると仮定し、Lhomme らにより報告されたアデニンを有する分子の他に、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルを有する分子を設計し、AP サイト内での水素結合に由来する塩基選択性を明らかにする事にした。ポリアミン部は溶液中において正電荷を持つ事で負電荷を帯びた DNA リン酸部と静電的に非特異的相互作用し、疎水性の高い核酸塩基部の AP サイトへの近接を補助するが、AP サイト特異的結合が核酸塩基部に起因する事を明らかにするために、本研究ではスペルミン⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾等の高い親和性を有する生体アミンは利用せず、弱い DNA 結合親和性を有する 3,3'-ジアミノジプロピルアミン (ノルスペルミジン)⁽⁷⁰⁾ を利用する事にした。

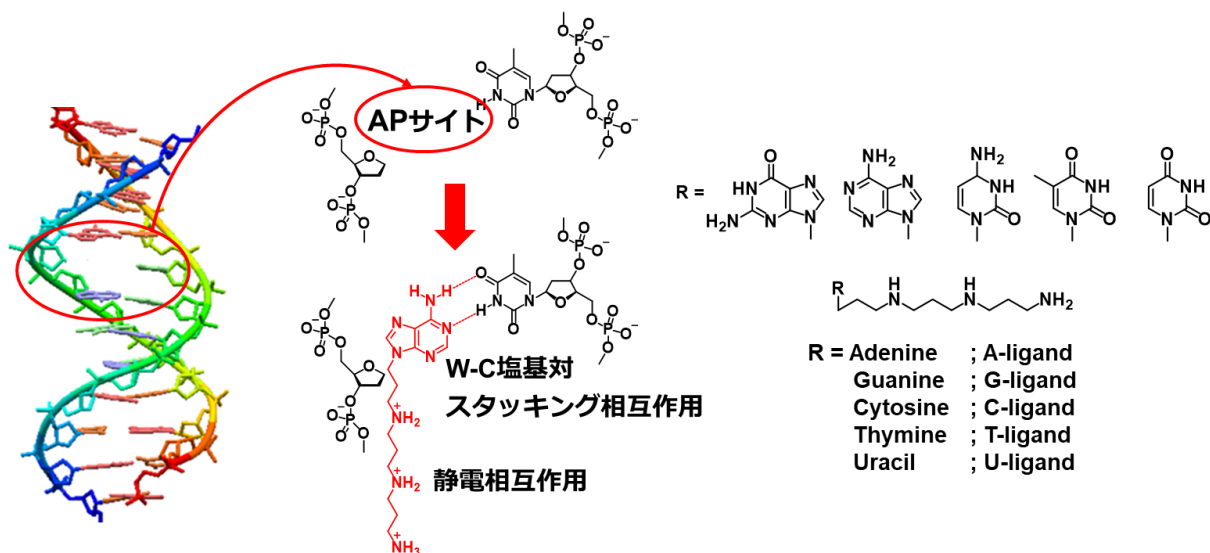
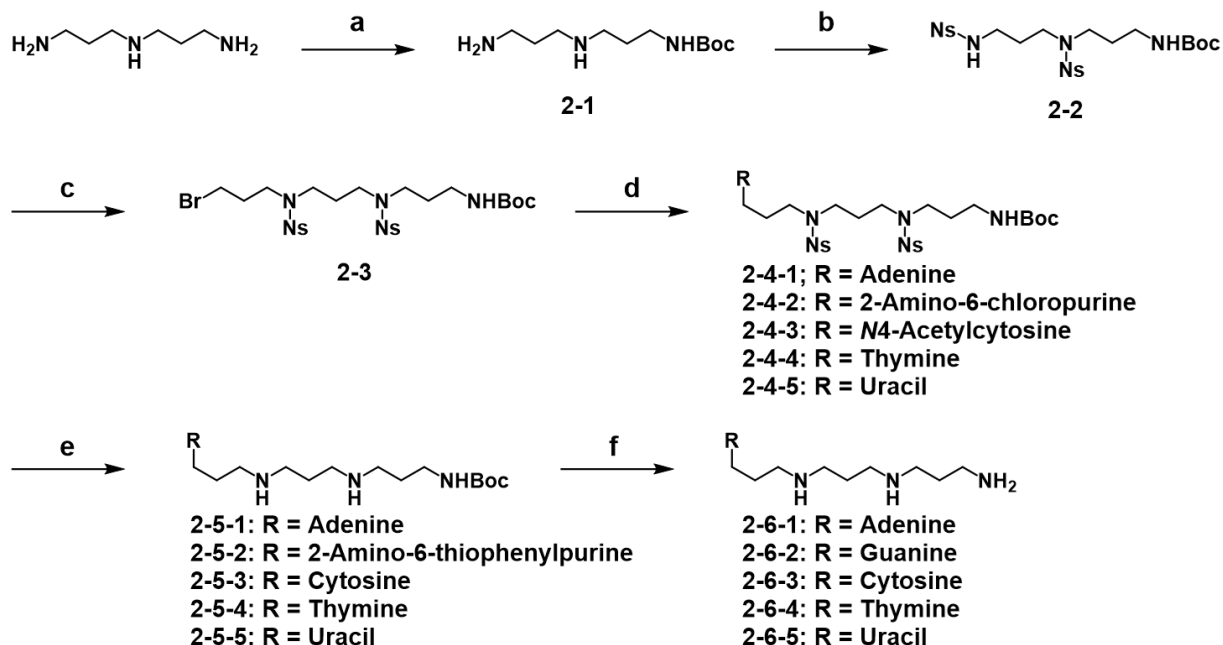


Fig. 2-1 AP サイト特異的認識分子の設計概念

1-1 核酸塩基-ポリアミン結合体の合成

各核酸塩基-ポリアミン結合体を合成するにあたり、効率的に合成するために 3,3'-ジアミノジプロピルアミンを出発原料として、ポリアミン部に各核酸塩基部を結合させる事にした (Scheme 2-1)。まず、ポリアミン末端の 1 級アミンを一方だけ *t*-ブトキシカルボニル (Boc) 基で保護し (2-1)⁽⁷¹⁾⁽⁷²⁾、次に残りの 1 級アミンおよび 2 級アミンを 2-ニトロベンゼンスルホニル (Ns) 基で保護した (2-2)。これに 1,3-ジブロモプロパンを反応させる事でトリアミンブロマイド 2-3 を合成した⁽⁷³⁾。化合物 2-3 に各核酸塩基およびその前駆体や保護体をそれぞれ反応させることでアデニン、2-アミノ-6-クロロプリン、*N*4-アセチルシトシン、チミン、およびウラシルと結合したアミン保護体 (2-4-1 ~ 2-4-5) を得た。これらの結合体においては、プリン骨格ではその 9 位窒素でアミン保護体と結合し、ピリミジン骨格においては 1 位窒素でアミン保護体と結合する化合物が主に得られる。チオフェノールを用いて Ns 基を脱保護し得られる化合物 (2-5-1 ~ 2-5-5) を 0.5M の塩酸メタノール中で攪拌する事で塩酸塩の白色固体とし

て析出させ、目的とする各核酸塩基-ポリアミン結合体を得た。それぞれが有する核酸塩基に応じて A-リガンド (2-6-1)、G-リガンド (2-6-2)、C-リガンド (2-6-3)、T-リガンド (2-6-4)、および U-リガンド (2-6-5) と名付けた。各リガンドは再沈殿による精製の後に、元素分析により A-, G-, および C-リガンドは四塩酸塩であり、T-リガンドは三塩酸塩である事が確かめられた。

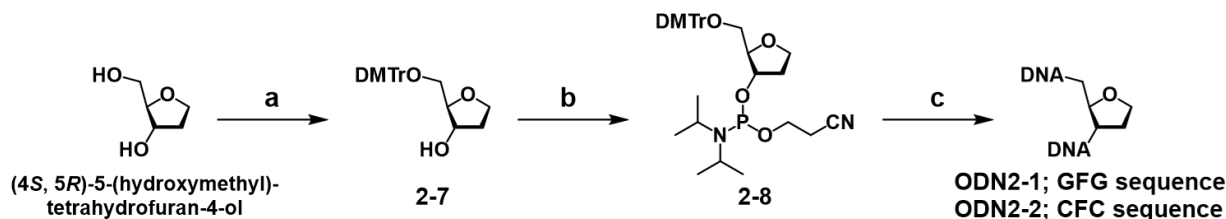


a) (Boc)₂O, dry THF, 0°C, 75%; b) NsCl, Et₃N, dry CH₂Cl₂, 0°C, 94%; c) 1,3-dibromopropane, K₂CO₃, dry DMF, rt, 93%; d) K₂CO₃, dry DMF, 60°C, adenine, 71%, for 2-4-1; 2-amino-6-chloropurine, 67%, for 2-4-2; N4-acetylcytosine, 56% for 2-4-3; N3-benzoylthymine, 68% for 2-4-4; N3-benzoyluracil, 72% for 2-4-5; e) thiophenol, K₂CO₃, dry DMF, rt, 94% for 2-5-1; 88% for 2-5-2; 95% for 2-5-3; 98% for 2-5-4; quant. for 2-5-5; f) 0.5M HCl/MeOH, rt, 73%, for 2-6-1; 66%, for 2-6-2; 71% for 2-6-3; 72% for 2-6-4; 51% for 2-6-5.

Scheme 2-1 核酸塩基-ポリアミン結合体の合成

1-2 THF 環を有する人工オリゴヌクレオチド (ODN) 鎖の合成

合成した各核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイトに対する安定化効果を明らかにするために、AP サイトの安定なアナログである THF 環 (F) を有する ODN を合成した。配列は、AP サイトアナログを有する ODN の熱力学的な性質について、隣接塩基対および相補塩基の影響を報告した Gelfand らの文献³⁹⁾と同じ配列を利用する事にした。



a) DMTrCl, dry pyridine, 0°C, 77%; b) DIPEA, 2-Cyanoethyl N,N-diisopropylchlorophosphoramidite, dry MeCN, 0 °C, 73%; c) i) DNA synthesizer, ii) 28% aq. NH₃, 55°C, iii) HPLC purification, iv) 10% aq. AcOH. ODN2-1; 5'-CGC ATG F GTA CGC-3', ODN2-2; 5'-GCG TAC F CAT GCG-3', F denotes the THF ring part.

Scheme 2-2 THF 環を有する ODN 鎖の合成

(4*S*, 5*R*)-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-4-オール の 5' 位水酸基をジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護したのちに 3' 位水酸基のホスホロアミダイト化を行い、アミダイト前駆体 **2-8** を得た。**2-8** の ODN への導入は、DNA 合成装置を用いて固相ホスホロアミダイト法により行った (**Scheme 2-2**)。合成終了後、固相担体に 28% アンモニア水を加え 55°C で 5 時間加熱する事により合成 ODN の固相担体からの切り出しを行い、HPLC 精製により **ODN2-1** および **ODN2-2** の DMTr 保護体得た。これを更に 10% 酢酸水溶液で処理する事により 5' 末端 DMTr 基の脱保護を行い、目的の **ODN2-1** および **ODN2-2** を得た。また、得られた **ODN2-1** および **ODN2-2** の相補鎖として、THF 環の相補位置にそれぞれアデニン残基、グアニン残基、シトシン残基、チミン残基を有する天然核酸塩基のみからなる 4 種の ODN 鎖についても、DNA 合成装置を用いた固相ホスホロアミダイト法により合成した (**Table 2-1**)。合成した全ての ODN は精製後 MALDI-TOF MS 測定により構造決定し、UV 定量により濃度を算出した。

Table 2-1 ODN 配列

GXG sequence					CYC sequence										
	CGC	ATG	X	GTA	CGC		GCG	TAC	Y	CAT	GCG				
ODN2-1	5'-	CGC	ATG	F	GTA	CGC	-3'	ODN2-2	5'-	GCG	TAC	F	CAT	GCG	-3'
ODN2-3	5'-	CGC	ATG	A	GTA	CGC	-3'	ODN2-4	5'-	GCG	TAC	A	CAT	GCG	-3'
ODN2-5	5'-	CGC	ATG	G	GTA	CGC	-3'	ODN2-6	5'-	GCG	TAC	G	CAT	GCG	-3'
ODN2-7	5'-	CGC	ATG	C	GTA	CGC	-3'	ODN2-8	5'-	GCG	TAC	C	CAT	GCG	-3'
ODN2-9	5'-	CGC	ATG	T	GTA	CGC	-3'	ODN2-10	5'-	GCG	TAC	T	CAT	GCG	-3'

F = tetrahydrofuran ring

第 2 節 AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖に対する各リガンドの安定化効果

各リガンドによる AP サイト認識をまずは THF 環を有する ODN2 本鎖の融解温度変化により調べた。AP サイトの存在により ODN2 本鎖が不安定化しその融解温度は下がるが、各リガンドが AP サイトに挿入されると相補位置の塩基との水素結合、隣接塩基対とのスタッキング相互作用および ODN リン酸部との静電的相互作用により ODN2 本鎖の安定性が回復する、即ち融解温度上昇が確認されると推測された。

融解温度測定にあたり、バッファーや塩濃度等の測定条件を種々検討し、バッファーは希釈や温度による pKa の変化が少ない HEPES を選択し、塩濃度はプリン塩基を有する A-, G-リガンドでは 100mM、ピリミジン塩基を有する C-, T-, および U-リガンドでは 50mM の条件で行った。

2-1 ODN2-1 に対する各リガンドの安定化効果 (塩濃度 100mM)

THF 環の隣接塩基にグアニンを有する **ODN2-1** に対して、THF 環の相補位置にアデニン残基、グアニン残基、シトシン残基、チミン残基を有する 4 種の相補鎖 (**ODN2-4**, **ODN2-6**, **ODN2-8**, **ODN2-10**) をハイブリダイゼーションさせ得られる ODN2 本鎖の融解温度を測定した (**Table 2-2**)。本測定条件では、1 塩基分の欠失に伴う ODN2 本鎖の不安定化により融解温度が 14~20°C 程度低下した³⁹⁾。第 1 章 3 節で述べた様に、THF 環の隣接塩基がグアニン残基の場合、多様な高次構造をとる事が予想され、これらの高次構造変化に伴う ODN2 本鎖の不安定化が本条件においても観察された。これらの AP サイト

トアナログを有する ODN2 本鎖に対し各リガンド 5 等量を添加し 25°C で 2 時間静置後、再度融解温度を測定するとリガンド未添加時よりも融解温度の上昇が観察され、AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖の安定性向上が示された。

Table 2-2 THF 環を有する ODN2 本鎖の各リガンド存在下における融解温度上昇 (°C)

Intact duplexes		ODN2-1 duplexes		+A-ligand	+G-ligand	+C-ligand	+T-ligand
X/Y	T_m	X/Y	T_m	T_m (ΔT_m)			
T/A	58.4	F/A (ODN2-1/2-4)	44.6	46.1 (1.5)	45.6 (1.0)	45.3 (0.7)	46.2 (1.6)
C/G	58.4	F/G (ODN2-1/2-6)	38.3	40.3 (2.0)	43.6 (5.3)	41.3 (3.0)	40.3 (2.0)
G/C	60.1	F/C (ODN2-1/2-8)	42.9	44.1 (1.2)	47.6 (4.7)	43.3 (0.4)	44.3 (1.4)
A/T	57.1	F/T (ODN2-1/2-10)	40.7	48.2 (7.5)	42.8 (2.1)	40.4 (-0.3)	43.3 (2.6)

融解温度測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 4 μ M ODNs, 20 μ M ligands. The sequence is 5'-d(CGC ATG **X** GTA CGC)-3' / 5'-d(GCG TAC **Y** CAT GCG)-3'.

A-リガンドにおいては相補位置の塩基 (Y) が A-リガンドと Watson-Crick 型塩基対を形成しうるチミンの時に顕著な融解温度の上昇 ($\Delta T_m = 7.5^\circ\text{C}$) が観察され、その他のいわゆる mismatches 塩基対となるアデニン、グアニン、シトシン塩基が相補位置にある場合は、顕著な融解温度の上昇は観察されなかった。G-リガンドでは、Watson-Crick 型塩基対を形成するシトシン塩基を相補位置 (Y) に持つ ODN2 本鎖において 4.7°C の融解温度上昇が観察されたものの、同程度の融解温度上昇が相補位置 (Y) にグアニンを持つ配列においても観察された ($\Delta T_m = 5.3^\circ\text{C}$)。グアニン塩基はシトシン塩基とだけでなくグアニン塩基とも高い水素結合能を有する事が知られており⁷⁴⁾、また、G-リガンドと隣接塩基グアニンとの強いスタッキング相互作用の効果も加わり、これらの要因により高い安定化効果が得られたのだと考えられる。一方、ピリミジン塩基を有する C-, T-リガンドでは A-, G-リガンドほどの顕著な安定化効果は得られず、原因として AP サイト内に挿入されたのちのリガンド核酸塩基部のスタッキング相互作用の弱さが挙げられる。

2-2 ODN2-2 に対する各リガンドの安定化効果 (塩濃度 100mM)

THF 環の隣接塩基にシトシンを有する ODN2-2 に対しても同様の条件にて各リガンドの安定化効果を調べた (Table 2-3)。相補位置 (X) にシトシンを有する ODN2-2/2-7 配列はグアニン塩基の欠失に伴い大きく融解温度が低下 ($T_m(\text{C/G}) - T_m(\text{C/F}) = -24^\circ\text{C}$) したが、隣接塩基がシトシン塩基の場合、グアニン塩基の場合と比較して相対的に ODN2 本鎖の安定性が低下する傾向にあり、Gelfand らの報告³⁹⁾と矛盾しない結果である。各リガンドの添加により ODN2-1 配列の場合と同様に融解温度の上昇が観察され、A-リガンドにおいては相補塩基 (X) がチミンの場合にのみ ODN2-2 に対する安定化効果が観察され ($\Delta T_m = 6.7^\circ\text{C}$)、G-リガンドにおいてもシトシン選択的な安定化効果 ($\Delta T_m = 9.6^\circ\text{C}$) が確認された。ODN2-2 は隣接塩基がシトシンであるために、ODN2-1 と比較して AP サイト内に挿入されたリガンドと隣接塩基とのスタッキングによる非特異的相互作用が弱く、結果 AP サイト内での核酸塩基部の水素結合形成に基づく塩基選択性が安定化効果に反映されたと考えられる。

しかし C-, T-リガンドでは、ODN2-1 と比較してよりその融解温度上昇が小さく、顕著な安定化効果は観察されなかった。この原因としてはやはり、C-, T-リガンド自身のスタッキングによる非特異的相

相互作用の弱さが考えられた。そこで、AP サイト内での C, T-リガンドの水素結合様式についての情報を得るために、融解温度測定における塩濃度条件を変更する事した。

Table 2-3 THF 環を有する ODN2 本鎖の各リガンド存在下における融解温度上昇 (°C)

Intact duplexes		ODN2-2 duplexes		+A-ligand	+G-ligand	+C-ligand	+T-ligand
X/Y	T_m	X/Y	T_m	$T_m (\Delta T_m)$			
A/T	57.1	A/F (ODN2-2/2-3)	42.4	42.4 (0.0)	42.5 (0.1)	42.4 (0.0)	43.5 (1.2)
G/C	60.1	G/F (ODN2-2/2-5)	42.6	42.4 (-0.2)	43.5 (0.9)	44.4 (1.8)	43.5 (0.9)
C/G	58.4	C/F (ODN2-2/2-7)	34.4	33.8 (-0.6)	44.0 (9.6)	33.8 (-0.6)	36.2 (1.8)
TA	58.4	T/F (ODN2-2/2-9)	39.7	46.4 (6.7)	42.1 (2.4)	41.4 (0.0)	39.6 (-0.1)

融解温度測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 4 μ M ODNs, 20 μ M ligands. The sequence is 5'-d(CGC ATG X GTA CGC)-3' / 5'-d(GCG TAC Y CAT GCG)-3'.

2-3 塩濃度 50mM における C-, T-リガンドの安定化効果

DNA2 本鎖は緩衝液中の塩との静電的相互作用により安定化されており、これらの塩の存在がリガンドポリアミン部の DNA リン酸部との静電的相互作用による非特異的相互作用の寄与を減弱させていると考えられる。プリン塩基を有するリガンドでは、ポリアミン部による静電的相互作用の寄与が小さくても、AP サイト内に挿入された際の隣接塩基とのスタッキング相互作用の寄与により AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖に対する親和性が保たれるが、一方ピリミジン塩基を有するリガンドではプリン塩基に比べスタッキング相互作用の寄与も小さいため、結果として AP サイト認識における非特異的相互作用の効果が低く顕著な安定化効果が得られなかったと考えられた。そこで、100mM で顕著な安定化効果が観察されなかった C-, T-リガンドに関しては融解温度測定における塩濃度を A-, G-リガンドの半分の濃度 50mM で再度実験を行った (Table2-4)。これにより THF 環を有する ODN2 本鎖の安定性は更に下がるものの、リガンド添加による安定化効果を顕著に確認できると考えた。その結果を塩濃度 100mM における A-, G-リガンドの結果とあわせて Fig. 2-2 にまとめた。

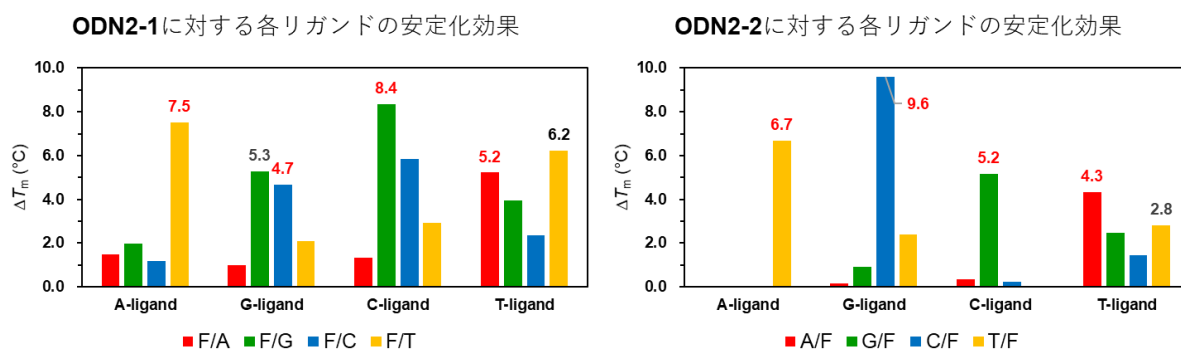
Table 2-4 塩濃度 50mM における融解温度測定 (°C)

Intact duplexes		ODN2-1 duplexes		+C-ligand	+T-ligand	Intact duplexes		ODN2-2 duplexes		+C-ligand	+T-ligand
X/Y	T_m	X/Y	T_m	$T_m (\Delta T_m)$		X/Y	T_m	X/Y	T_m	$T_m (\Delta T_m)$	
T/A	54.3	F/A	40.2	41.5 (1.3)	45.4 (5.2)	A/T	53.0	A/F	34.9	35.2 (0.3)	39.2 (4.2)
C/G	53.2	F/G	32.6	41.0 (8.4)	36.6 (4.0)	G/C	56.2	G/F	35.3	40.5 (5.2)	37.8 (2.5)
G/C	56.2	F/C	38.2	44.1 (5.9)	40.6 (2.4)	C/G	53.2	C/F	32.4	32.6 (0.2)	33.8 (1.4)
A/T	53.0	F/T	35.8	38.7 (2.9)	42.0 (6.2)	T/A	54.3	T/F	32.7	32.4 (-0.3)	35.5 (2.8)

融解温度測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 50mM NaCl, 4 μ M ODNs, 20 μ M ligands. The sequence is 5'-d(CGC ATG X GTA CGC)-3' / 5'-d(GCG TAC Y CAT GCG)-3'.

期待通り塩濃度を 50mM に下げる事で、AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖に対する C-, T-リガンドの安定化効果は顕著に観察された。C-リガンドに関しては、ODN2-1 を用いた場合には塩基選択的な安定化効果は得られなかったものの、相補塩基 (Y) がグアニンの場合に顕著な融解温度上昇 ($\Delta T_m = 8.4^\circ\text{C}$) が観察され、ODN2-2 を用いた場合には高いグアニン選択性 ($\Delta T_m = 5.2^\circ\text{C}$) が観察された。

T-リガンドでは、ODN2-1 および ODN2-2 どちらを用いた場合でも類似した傾向がみられ、相補塩基がアデニンの場合に比較的高い安定化効果が得られたものの相補塩基がグアニンやチミンの場合でも安定化効果が得られ、塩基選択性は観察されなかった。これは、チミンもまた G/T や T/T 塩基対を形成する事が知られており⁷⁴⁾、これらの水素結合形成の寄与により相補塩基にグアニンおよびチミンを有する ODN2 本鎖においても安定化効果が観察されたと考えられる。



融解温度測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0); 100mM NaCl for A-, G-ligand, 50mM NaCl for C-, T-ligand; 4 μ M ODN duplex; 20 μ M ligand. Duplex ODN: 5'-d(CGC ATG X GTA CGC)-3' / 3'-d(GCG TAC Y CAT GCG)-3', where ODN2-1: X = F (tetrahydrofuran ring), Y = A, G, C, T, and ODN2-2: X = A, G, C, T, Y = F.

Fig. 2-2 ODN2-1 および ODN2-2 に対する各リガンドの安定化効果

これまでの結果より、THF 環の隣接塩基がグアニン塩基の場合は、シトシン塩基の場合よりも ODN2 本鎖自身が多様な高次構造を取り、これがリガンドによる AP サイト認識に影響を与えている事が改めて示唆された。AP サイト内における核酸塩基の水素結合および塩基選択性について詳細を明らかにするには THF 環の隣接塩基にシトシンを有する ODN2-2 配列の方が適していると考え、更に、Watson-Crick 型の塩基対形成に基づく選択性が得られなかった T-リガンドに関しては、核酸塩基部としてウラシルを有するリガンド (U-リガンド) を新たに合成し、THF 環の相補塩基にアデニンを有する ODN2 本鎖の選択的認識を試みた。

2-4 各リガンドの安定化効果まとめ

U-リガンドの合成については本章で既に述べた。A-, G-, C-, T-および U-リガンドを用いて再度 ODN2-2 に対する安定化効果を融解温度測定より調べた結果を Fig. 2-3 および Table 2-5 にまとめた。新たに合成した U-リガンドは塩濃度 50mM の条件で実験を行い、安定化効果は他のリガンドに比べて低い ($\Delta T_m = 4.1^\circ\text{C}$) もの、アデニン選択性を維持したまま相補塩基にグアニンおよびチミンを有する ODN2 本鎖に対しては安定化効果が減弱した事で、T-リガンドと比較してアデニン選択性を向上させる事に成功した。

プリン塩基を有する A-, G-リガンドでは、AP サイト内での水素結合に加えそのスタッキング能の高さから AP サイトに挿入されたのちに非特異的な安定化効果をもたらし、ピリミジン塩基を有する C-, T-および U-リガンドと比較して大きな融解温度上昇が観察された。ピリミジン塩基を有するリガンドの中では C-リガンドが $\Delta T_m = 5.3^\circ\text{C}$ と比較的高い安定化効果を示し、T-リガンド ($\Delta T_m = 3.6^\circ\text{C}$) および U-リガンド ($\Delta T_m = 4.1^\circ\text{C}$) は同程度の安定化効果であった。

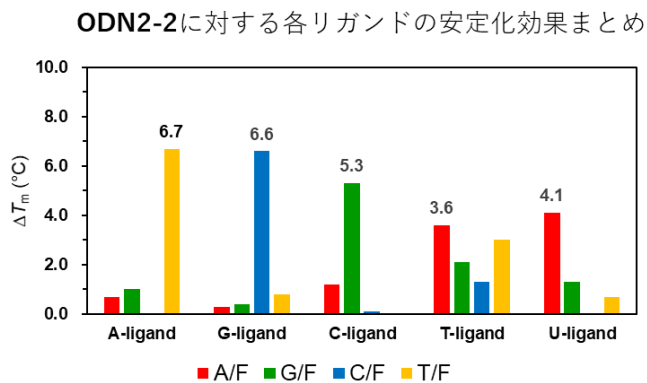


Table 2-5
ODN2-2 に対する各リガンドの ΔT_m 値 (°C)

X/Y	Ligands				
	A-	G-	C-	T-	U-
A/F	+0.7	+0.3	+1.2	+3.6	+4.1
G/F	+1.0	+0.4	+5.3	+2.1	+1.3
C/F	-0.1	+6.6	+0.1	+1.3	± 0.0
T/F	+6.7	+0.8	± 0.0	+3.0	+0.7

融解温度測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0); 100mM NaCl for A-, G-ligands, 50mM NaCl for C-, T-, and U-ligands; 4 μ M ODNs; 20 μ M ligands.

Fig. 2-3 ODN2-2 duplex に対する各リガンドの塩基選択性

ピリミジン塩基におけるこれらの違いは水素結合に起因していると推測され、相補塩基のグアニンと3本の水素結合を形成する C-リガンドの方が、相補塩基のアデニンと2本の水素結合を形成する T-および U-リガンドよりも AP サイトの安定化に対する寄与が大きかったと考えられる。水素結合に関しては、ODN2-1 配列の結果 (Fig. 2-2) も含め Watson-Crick 型のみならず Hoogsteen 型や Wobble 型水素結合の形成が示唆された (Fig. 2-4)。これらは各リガンドの塩基対形成能および AP サイト疎水空間内における自由度が影響していると考えられ、Watson-Crick 型 G/C 塩基対および A/T 塩基対に匹敵するほどの水素結合形成能を有する G/G 塩基対や G/T 塩基対が、通常の ODN2 本鎖に比べ柔軟性を増した ODN2-1 および ODN2-2 の AP サイト空間内で形成されたと考えられる。特にピリミジン塩基を有するリガンドはプリン塩基を有するリガンドに比べ構造が小さく、AP サイト疎水空間内において柔軟に様々な塩基対を形成し AP サイトを有する ODN2 本鎖の安定化に寄与したと考えられる。

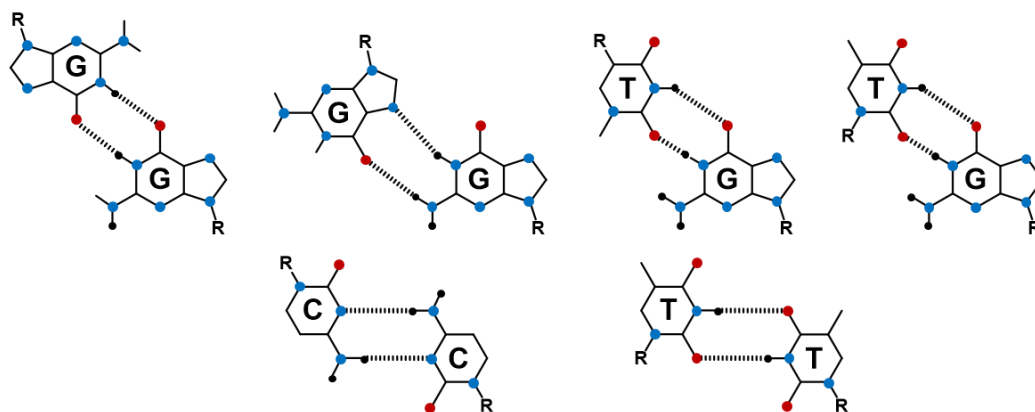


Fig. 2-4 Watson-Crick 型以外の安定な塩基対形成

2-5 リガンド核酸塩基部およびポリアミン部単独の安定化効果 (コントロール実験)

これまでの実験から、各リガンドによる AP サイトを有する ODN2 本鎖の安定化効果が確認され、その安定化には水素結合、スタッキング相互作用、静電的相互作用が寄与する事が示された。そこで、コントロール実験として核酸塩基部のみ、またはポリアミン部のみでの安定化効果を調べ、核酸塩基-ポリアミン結合の重要性を明らかにした。その結果、核酸塩基部のみおよびポリアミン部のみではほとんど安定化効果が得られず、本リガンドによる AP サイト認識には核酸塩基とポリアミンの両者の相互作用

用が必要である事が確かめられた (Fig. 2-5)。核酸塩基部は疎水性が高いために、水溶液中において電荷を帯びた ODN2 本鎖に近接できず、AP サイトへの挿入が難しかったと考えられ、ポリアミン部も ODN2 本鎖との静電的相互作用は塩濃度 50mM の条件においても限定されており、最大で $\Delta T_m = 2^\circ\text{C}$ 程度であった。グアニンに関しては、溶解性が悪く融解温度測定に条件に適さず評価できなかった。

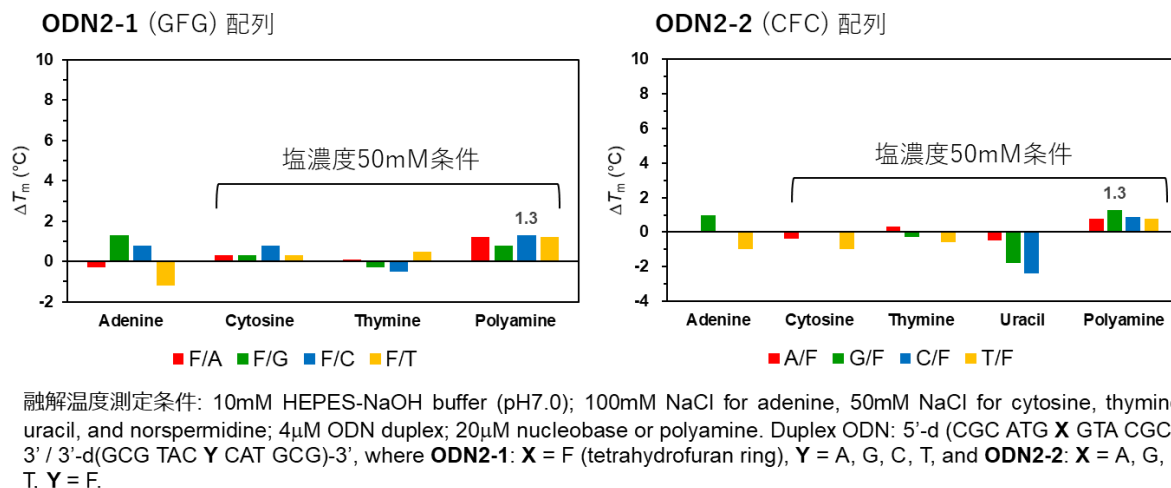


Fig. 2-5 核酸塩基およびポリアミン単独による安定化効果

第3節 円二色性 (CD: Circular Dichroism) 測定を用いた高次構造変化の確認

AP サイトを有する ODN2 本鎖は近傍の塩基の性質により多様な高次構造をとる事が知られているが、いずれの配列においても典型的な B-型 DNA 構造を維持している事も報告されている³⁹⁾。本リガンドにおいてもその高次構造に変化があるのかをリガンド非存在下および存在下における CD 測定を行い確かめた。融解温度測定と同様に、プリン塩基を有するリガンドでは塩濃度を 100mM、ピリミジン塩基を有するリガンドでは 50mM とした。ODN2-1 および ODN2-2 を用いた ODN2 本鎖に対する各リガンドの効果を Fig. 2-6-1 および 2-6-2 にまとめた。

全ての配列において 250 nm 付近の負の極大と 280 nm 付近の正の極大が観察され、その高次構造は典型的な B-型 DNA 構造である事が確かめられた。また、リガンド添加後の CD スペクトルにおいても顕著な変化はなく、リガンドによる AP サイト認識に伴う高次構造変化は顕著ではない事が示された。ノルスペルミジンに関しても塩濃度 50mM の条件で同様に CD スペクトルを測定したが、ODN2-1、ODN2-2 どちらの配列においても高次構造変化は観察されなかった (Fig. 2-7)。一般的にポリアミンは DNA のマイナーグループに結合しその高次構造を安定化する事が知られているが、融解温度測定および CD 測定における濃度 20 μ M ではその効果は限定的であり、そのためポリアミンの効果は観察されなかったと考えられる。以上の結果から、各リガンドにより得られた安定化効果は主に AP サイト内でのリガンド核酸塩基部の水素結合およびスタッキング相互作用によるものであり、ODN2 本鎖の高次構造変化に起因するものではない事が示された。また、各リガンドの AP サイトへの結合による微小な高次構造変化はあるとしても AP サイトを有する ODN2 本鎖の B-型構造を大きく変化させるほどではないと考えられる。

5'-d (CGC ATG **F** GTA CGC)-3'
 3'-d (GCG TAC **Y** CAT GCG)-3'

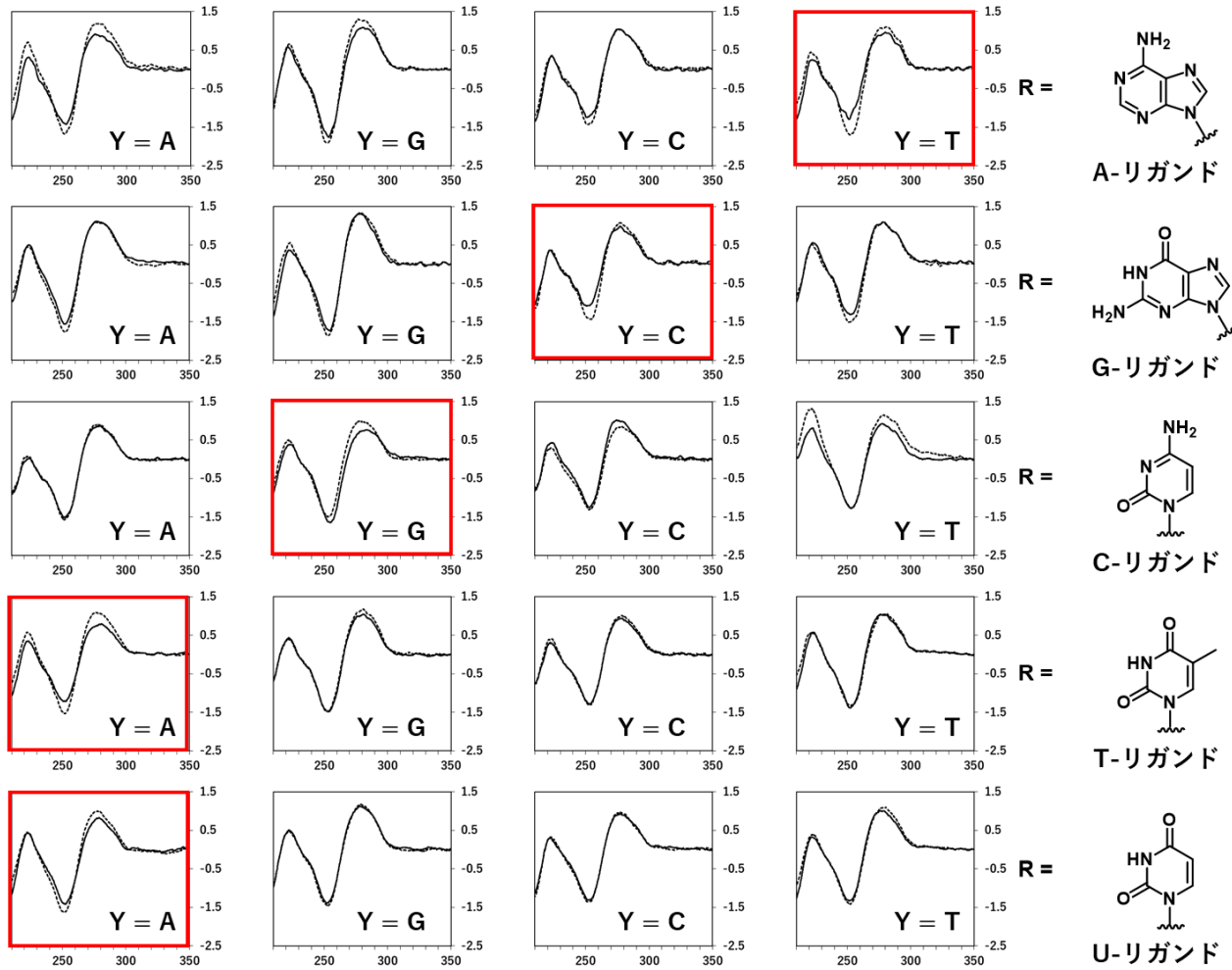


Fig. 2-6 各リガンド非存在下および存在下における ODN2-1 2 本鎖の CD スペクトル

5'-d (CGC ATG **F** GTA CGC)-3'
 3'-d (GCG TAC **Y** CAT GCG)-3'

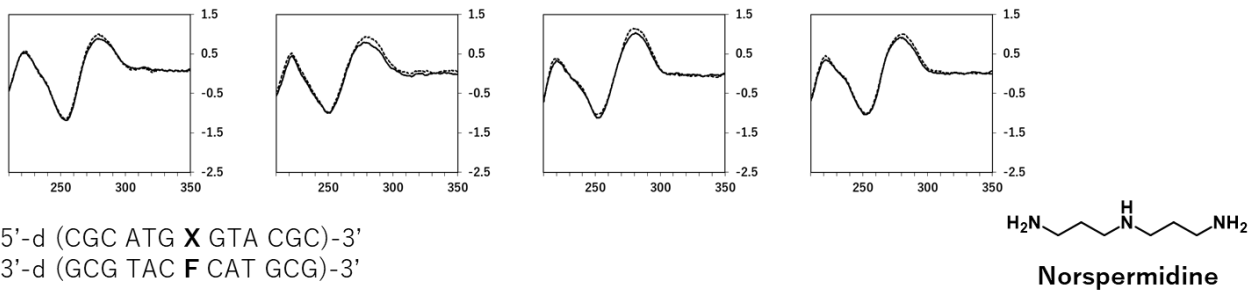


Fig. 2-7 ODN2-1 および ODN2-2 配列に対するポリアミンの CD スペクトル

5'-d (CGC ATG X GTA CGC)-3'
 3'-d (GCG TAC F CAT GCG)-3'

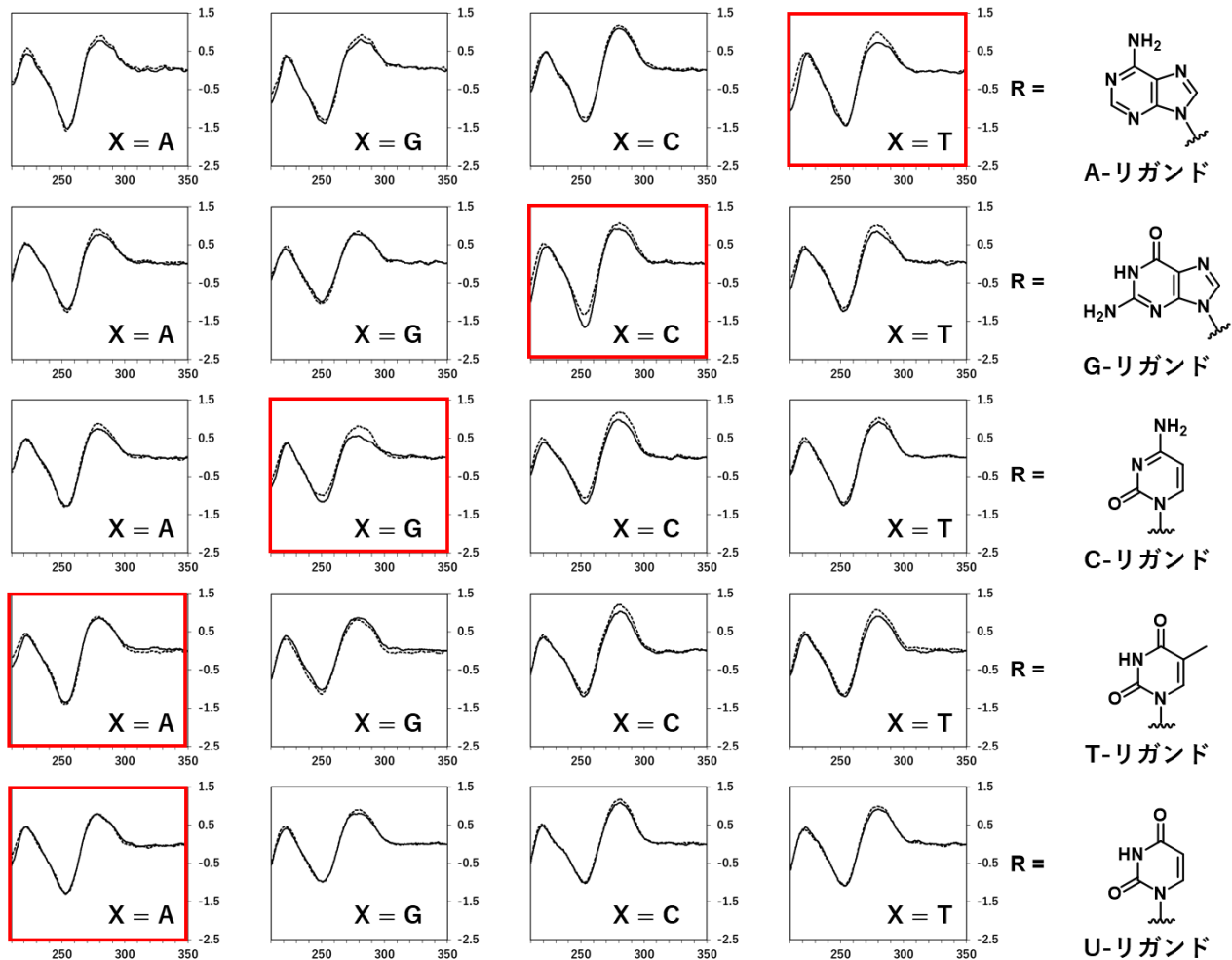


Fig. 2-6 各リガンド非存在下および存在下における ODN2-22 本鎖の CD スペクトル

第 4 節 表面プラズモン共鳴 (SPR: Surface Plasmon Resonance) を用いた相互作用解析

これまでの各リガンドと AP サイトとの相互作用を融解温度の差に基づく安定化効果で議論してきたが、より詳細にその相互作用を知るために速度論的解析を試みた。そこで、各リガンドと AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖との相互作用をより詳細に調べるために SPR を利用した。SPR は 2 分子間の相互作用解析において利用される手法であり、結合の速度論的情報やアフィニティー (2 分子間の複合体の結合の強さ) 情報が得られ、主には DNA と酵素などのタンパク質といった比較的高分子の相互作用解析に用いられる。SPR では、センサーチップ表面上の変化はレゾナンスユニット (RU) というシグナルで示され、センサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を横軸にとったセンサーグラムで表される。このシグナルの変化によりセンサーチップ表面に固定化した物質と相互作用を見たいもう一方の物質の結合を解析する。核酸塩基-ポリアミン結合体は分子量 300 前後の低分子であるものの、SPR を利用する事で各リガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖との結合親和性をより詳細に解析できないかと考え測定を試みた。

4-1 SPR 用ビオチン化 ODN の設計と合成

SPR 測定ではまず、ストレプトアビジンを金薄膜上に結合させたセンサーチップ (Sensor Chip SA) にビオチン化した ODN を固定化する必要がある、そのためのビオチン化 ODN 配列を新しく合成した。相互作用解析において系をシンプルにするために、各リガンドによる塩基選択的な安定化効果が得られていた ODN2-2 配列を基に、AP サイトアナログを有する ODN がヘアピンにより 2 本鎖を形成する配列を設計し、ヘアピンループおよびビオチンと評価配列とのスペーサーを 4 mer のチミン残基とした。ODN の合成は、固相ホスホアミダイト法により本章 1 節 1-2 で述べたアミダイト前駆体 2-8 およびビオチンアミダイト前駆体 (Sigma-Ardrich 社製) を用いて DNA 合成装置により行った。SPR 測定に用いた各配列を Table 2-6 に示す。

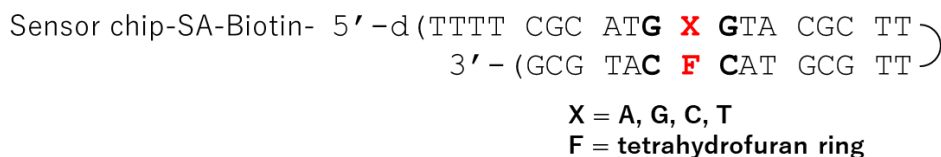


Table 2-6 SPR 用 ODN 配列

ODN2-11	Biotin-	5'-	TTTT CGC ATG A GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'
ODN2-12	Biotin-	5'-	TTTT CGC ATG G GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'
ODN2-13	Biotin-	5'-	TTTT CGC ATG C GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'
ODN2-14	Biotin-	5'-	TTTT CGC ATG T GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'

4-2 ビオチン化 ODN のセンサーチップへの固定化

結合親和性や速度論的情報を得るための最小および最大固定化量は下記の式 (Fig. 2-7) により算出され、結合部位数 (S) を 1、アナライト分子量 を A-, G-, C-, T-および U-リガンドとして計算された至適固定化量はおよそ 6600~35600 RU であったが、ODN の固定化量はいずれの配列においても 1600RU~1900RU の範囲にとどまり、最小固定化量の 1/4 程度となった。これは、ビオチン化した ODN がヘアピン 2 本鎖を形成させるため 34mer と比較的長い分子であり、センサーチップ表面に密集して結合する事が出来なかったためだと考えられる。また、固定化した ODN に各リガンドが最大量結合した時のレスポンスは理論的的最大結合量 (Rmax) として、ODN の固定化量から算出される。



最小固定化量 (RU)	$200 \times 1/S \times (\text{リガンドの分子量}/\text{アナライトの分子量})$
最大固定化量 (RU)	$1000 \times 1/S \times (\text{リガンドの分子量}/\text{アナライトの分子量})$
	S : リガンドの結合部位数
	リガンド : センサーチップ表面に固定化する物質
	アナライト : センサーチップ表面に流すもう一方の物質
アナライトの最大結合レスポンス (理論的的最大結合量: Rmax)	$= \text{アナライトの分子量 (Da)} \times \text{リガンドの固定化量 (RU)} / \text{リガンドの分子量 (Da)} \times S$

Fig. 2-7 SPR 測定に用いたヘアピン ODN 配列および至適固定化量

各リガンドの分子量は 280~320 程度であり、リガンドと評価配列の固定化量から計算される Rmax はおよそ 40~60 RU と算出された。

4-3 各リガンドと AP サイトアナログを有するヘアピン 2 本鎖との相互作用

各 ODN 配列を固定化したセンサーチップを用いて、各リガンドの様々な濃度におけるヘアピン ODN2 本鎖への親和性を調べた結果、各リガンドと相補塩基 (X) の組み合わせが、A-リガンド/T、G-リガンド/C、C-リガンド/G、T-リガンド/A、および U-リガンド/A の場合において他の組み合わせに比べ高いレスポンスが得られ、リガンドと AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖が相補的な組み合わせにおいて特異的結合をしている事が示唆された (Fig. 2-8)。

得られた台形型のセンサーグラムはリガンドと AP サイトとの相互作用が小さい事を示しており、この場合、反応が極めて速く平衡に達し結合領域および解離領域が短く、速度論的な解析が困難になる。SPR における相互作用反応モデルのカイネティクス解析を試みたがフィッティングせず、速度論情報を得る事ができなかったが、アフィニティー解析により各リガンドと AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖の結合定数および解離定数を算出した。アフィニティー解析により得られた各リガンドの結合定数 (Ka) を Table 2-7 にまとめた。アフィニティー解析における結合定数は、測定で得られた Req (リガンドと ODN2 本鎖との相互作用の平衡状態における RU) および Rmax から算出される。

Table 2-7 SPR 測定から算出した各リガンドの結合定数 (Ka)

ODN sequence	Ka (x 10 ⁶ M ⁻¹)					
	X =	A-ligand ^a	G-ligand ^a	C-ligand ^b	T-ligand ^b	U-ligand ^b
A		0.133	0.279	0.169	1.411	0.805
G		0.175	0.266	1.604	0.217	0.142
C		0.241	10.66	0.427	0.253	0.145
T		4.304	0.474	– ^c	0.298	0.292

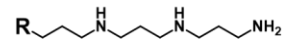
SPR 測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0); ^a 100mM NaCl for A-, G-ligands, ^b 50mM NaCl for C-, T-, and U-ligands; 0.05-6.0μM ligands; temperature: 25°C; flow rate: 20 μl/min

SPR 解析条件: affinity analysis; Ka = 1/Kd = C(Rmax-Req)/Req; C: injected concentration of ligand; Req: RU of steady-state. ^c Not measured.

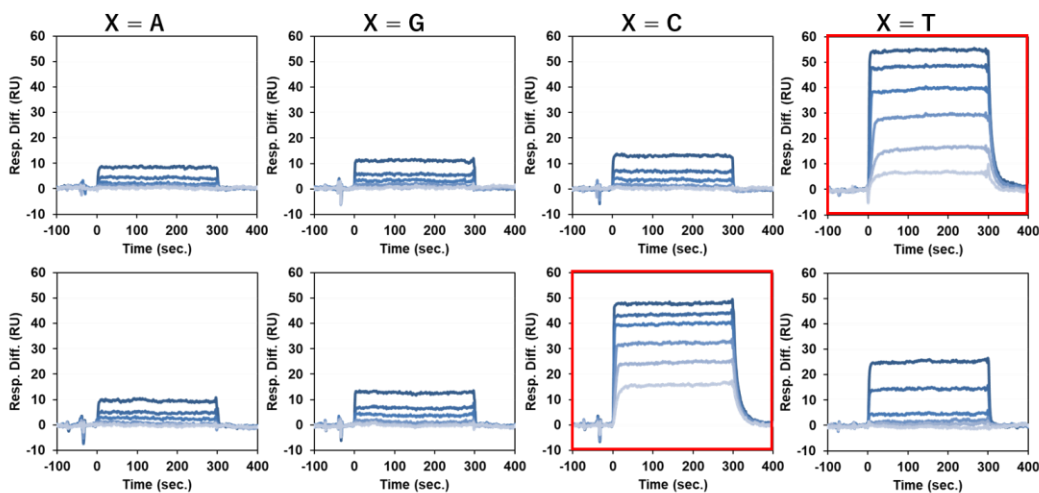
プリン塩基を有するリガンドではシトシン塩基を有するリガンドに比べて高い結合定数が算出され、また、各リガンドの相補的な組み合わせとその他の組み合わせにおける結合定数の差はおよそ 4~40 倍とリガンドにより程度の差はあるものの全てのリガンドにおいて相補塩基との特異的な結合が確認された。その傾向は、融解温度測定において観察された安定化効果と一致しており、水素結合能およびスタッキング能が最も優れている G-リガンドにおいて最も高い親和性が示され、次に A-リガンド、C-リガンド、最後に T-リガンドと U-リガンドが最も低く、同程度であった。T-リガンドに関しては融解温度測定においては顕著な塩基選択性が得られていなかったが、本 SPR 測定からは相補的な組み合わせ (X = A) とその他の組み合わせで 5~6 倍の親和性の差がみられた。その原因は定かではないが、一因に評価系の違いが考えられる。融解温度測定ではリガンド添加時における AP サイトを有する ODN2 本鎖の安定性を観察しているのに対し、SPR 測定では AP サイトを有する ODN2 本鎖とリガンドとの相

相互作用の強さを観測しており、必ずしも融解温度測定から得られた安定化効果と SPR 測定から得られた結合親和性は相関するものではないと考えられる。

Sensor chip-SA-Biotin- 5' -d (TTTT CGC ATG X GTA CGC TT)
3' - (GCG TAC F CAT GCG TT)



塩濃度100mM



塩濃度50mM

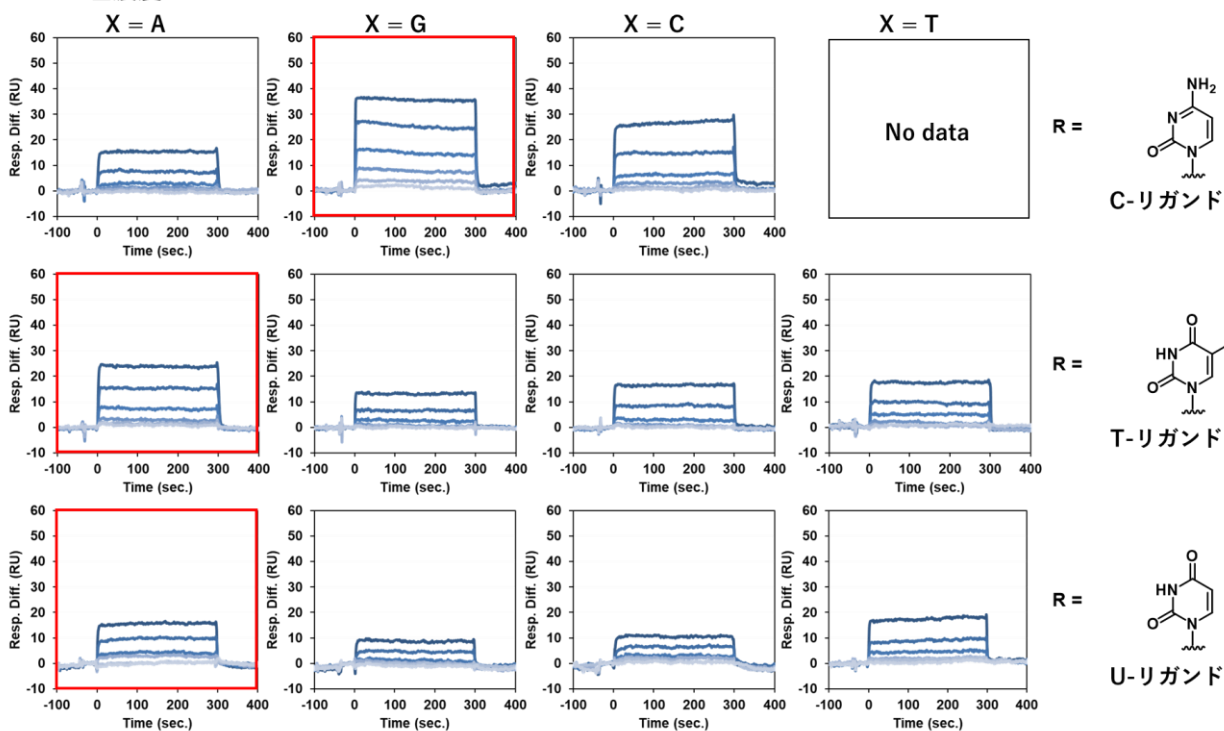


Fig. 2-7 各リガンドのSPRセンサーグラム

第5節 等温滴定カロリメトリー (ITC: Isothermal titration calorimetry) を用いた相互作用解析

これまで行った融解温度測定および SPR 測定から、リガンドの AP サイトに対する特異的結合を明らかにしてきた。そこで、その特異的結合の詳細について更に議論するために ITC による熱力学的パラメーターの算出を行う事にした。

ITC では、相互作用を見たい 2 分子の一方を試料セルに添加し、もう一方をそこに滴下する。この時に試料セル内で起こる発熱および吸熱変化をセルフィードバックネットワークが感知し、参照セルとの温度差 ($\Delta T1$) を 0 に維持するためにセル表面をヒーターにより加熱し $\Delta T1 = 0$ を維持する。そのために消費したヒーターのフィードバック電力を ($DP, \mu\text{cal}/\text{sec}$) を時間 (sec) に対してプロットする事で 2 分子間の相互作用における発熱または吸熱量がわかり、この等温滴定曲線から各種の熱力学パラメーターが算出される。

まず初めに ITC 測定において良好な等温滴定曲線を得るための参考値として C 値を計算した。C 値が 5~250 の範囲では理想的なシグモイド曲線が描けるとされ、測定に用いる ODN2 本鎖の濃度および ODN2 本鎖とリガンドとの結合比、結合定数の積として算出される (実験項参照)。ODN2 本鎖の濃度を $10\mu\text{M}$ とし、結合比を 1、結合定数は SPR 測定により得られた値を代入し計算すると、リガンドの C 値は最大で G-リガンドの 107、最小で U-リガンドの 8 となった。これまでの実験からも明らかであったが、ピリミジン塩基を有するリガンドではその相互作用変化が非常に小さい事が予想された。

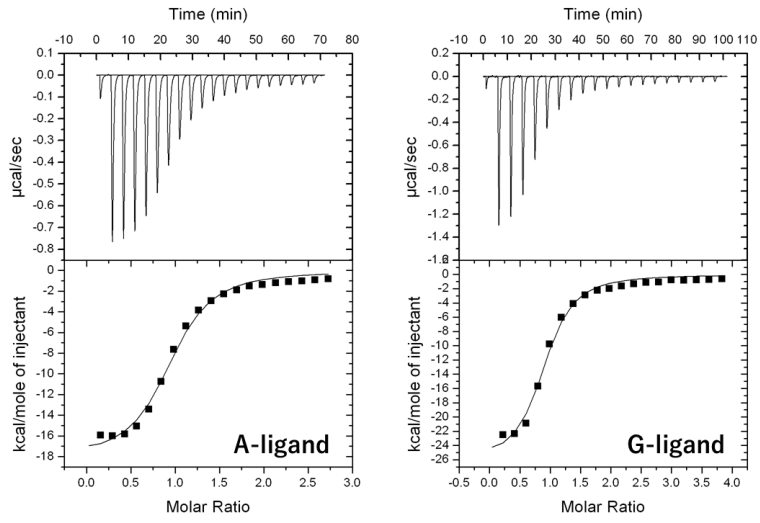
5-1 ITC 測定に用いる ODN2-2 配列の透析と各リガンドの NMR 定量

ITC においては 2 分子間の正確な相互作用を解析するためには、試料となる ODN2 本鎖溶液と滴下する各リガンド溶液の組成を等しくし、溶媒のわずかな組成の違いによる滴定時の熱量変化を避けなければならない。また熱量変化が小さいと予想される場合は、目的とする相互作用以外の反応に伴う熱量変化を極力避けるため、リガンド溶液に関しても夾雑物を除き正確な濃度を求める必要がある。測定に用いた ODN は融解温度測定および SPR 測定と同様に、Watson-Crick 型相補塩基対を形成する組み合わせで特異的結合が示された **ODN2-2** 配列を用いた。また、各リガンドの濃度はこれまで、UV 定量により濃度を算出していたが、ITC 測定において種々条件を検討する過程で、より正確な NMR 定量を行う事にした。標準物質としてマレイン酸を用い、そのアルケンプロトン (2H) と各リガンドの核酸塩基部と直結したリンカー炭素上のメチレンプロトン (2H) を相対定量した。更に、測定に用いる ODN2 本鎖溶液、コントロール溶液、リガンド溶液等は全て同一組成でなければならないため、ODN2 本鎖溶液は半透膜を用いて透析し、コントロール溶液はその透析外液とした。リガンド溶液は NMR 定量されたリガンドストックを透析外液で希釈する事で ODN2 本鎖溶液とその組成を限りなく等しくした。

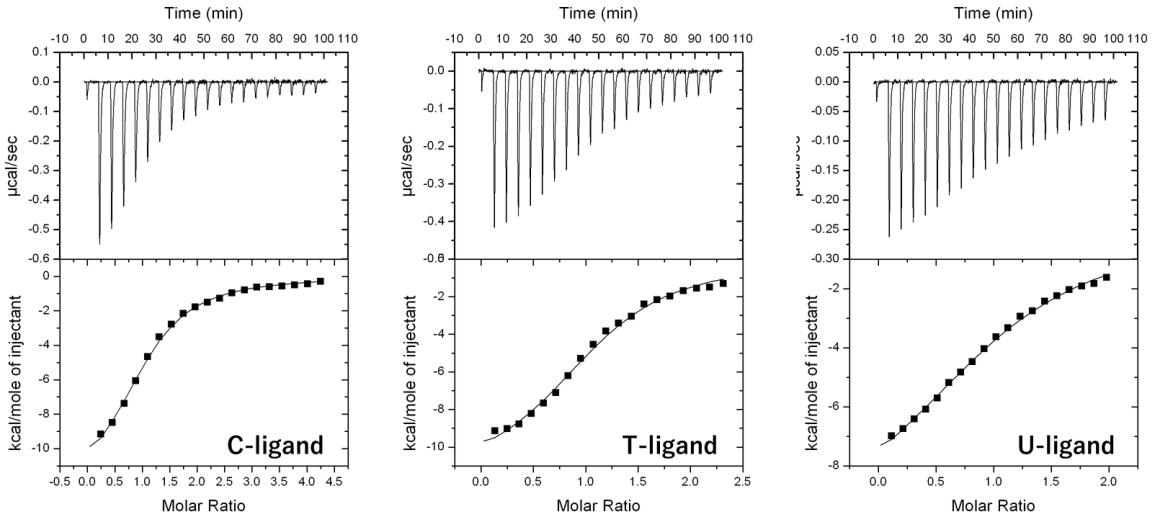
5-2 各リガンドの ITC 測定による熱力学的パラメーターの算出

ITC 測定ではまず、透析外液を用いたコントロール実験を行い、リガンド溶液の拡散に伴う微小の熱量変化を測定し、次に同じバッファー組成の ODN2 本鎖溶液にリガンド溶液を滴下し、得られた熱量変化からコントロールを差し引くことで ODN2 本鎖とリガンドの相互作用に伴う正確な熱量変化を求めた。各リガンドと相補的な組み合わせの配列に関してのみ測定を行い、得られた等温滴定曲線は結合サイトが 1 種類だけの場合のモデル (One Set of Sites) を用いて解析を行った。得られた ITC の等温滴定曲線および熱力学的パラメーターを **Fig. 2-8** と **Table2-8** に示す。

塩濃度100mM



塩濃度50mM



塩濃度100mM

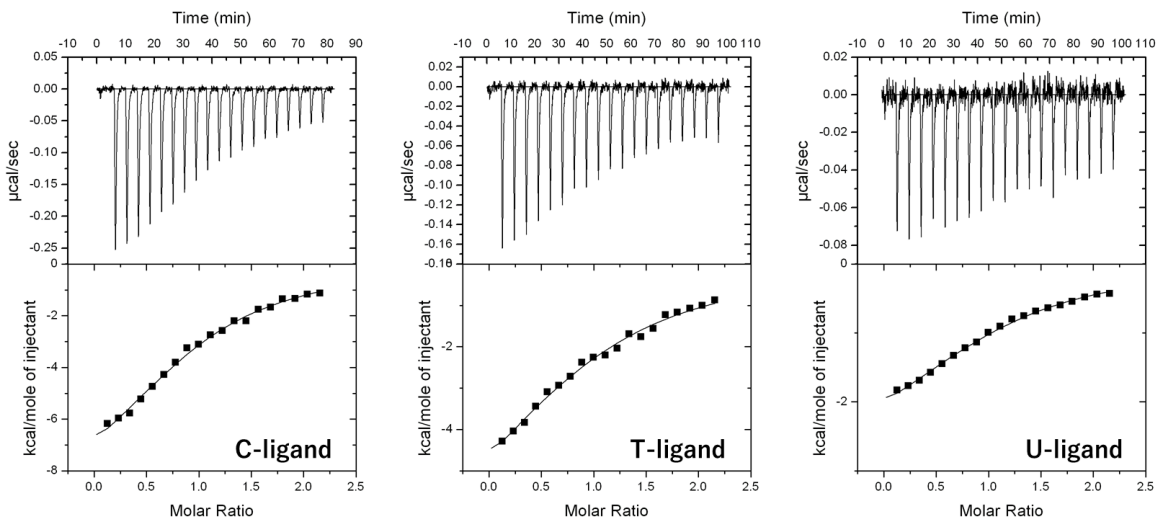


Fig. 2-8 各リガンドのITCの等温滴定曲線

Table 2-8 ITC 測定から算出した各種熱力学的パラメーター

	N	Ka	ΔH	ΔS	$-T\Delta S$	ΔG
		$10^6 M^{-1}$	kcal/mol	cal/mol	kcal/mol	kcal/mol
A-ligand	0.94	1.56	-18.17	-32.6	9.72	-8.45
G-ligand	0.87	1.60	-26.30	-59.8	17.83	-8.47
C-ligand	1.01	0.38 ^a	-12.95 ^a	-17.9 ^a	5.34 ^a	-7.61 ^a
T-ligand	1.07	0.44 ^a	-11.81 ^a	-13.8 ^a	4.11 ^a	-7.70 ^a
U-ligand	1.05	0.21 ^a	-10.62 ^a	-11.2 ^a	3.34 ^a	-7.28 ^a

ITC 測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0); 100mM NaCl for A-, G-ligands, ^a50mM NaCl for C-, T-, and U-ligands; 0.02-2.0 μ M ligands; temperature 25°C. The sequence is 5'-d(CGC ATG X GTA CGC)-3' / 5'-d(GCG TAC F CAT GCG)-3', X = A, G, C, T
 解析条件: One Sites model, $\Delta G = -RT \ln Ka = \Delta H - T\Delta S$

ピリミジン塩基を有するリガンドは、塩濃度 100mM の条件では熱量変化 (ΔH) が非常に小さく熱力学的パラメーターの算出が困難であったため、これまでの実験と同様に塩濃度 50mM の条件で測定を行ったが、得られた熱量変化はやはり小さく特に U-リガンドでは塩濃度 50mM でも明確な等温滴定曲線は描けなかった。しかし、結合が非常に弱く熱量変化も小さかったものの、One Site モデルでのフィッティングの結果、化学量論比 (N) や各熱力学的パラメーターを得る事ができた。その結果全てのリガンドにおいてほぼ N=1 となり、まずはリガンドと AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖との相互作用が 1 : 1 で起こる事が示された。また、ITC 測定における結合定数は等温滴定曲線の傾きから算出されるが、SPR から算出した結合定数と比較するとその値は 1/3~1/6 程小さくなった。化学量論比や結合定数は測定に用いた ODN2 本鎖溶液やリガンド溶液の濃度に影響を受けるため、濃度定量のわずかな誤差がこれらの違いに影響した可能性はある。しかし $10^5 \sim 10^6 M^{-1}$ の範囲であり、SPR と同じく G-リガンド>A-リガンド>C-, T-リガンド>U-リガンドという傾向を示した。更に、得られた熱力学的パラメーター ($\Delta H, \Delta S$) から、全てのリガンドはエンタルピー駆動であり、AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖と各リガンドとの相互作用には水素結合やスタッキング相互作用が寄与している事が示唆された (Fig. 2-9)。

Gelfand らの報告³⁹⁾から、ODN2-2 の 2 本鎖は 1 塩基の欠失に伴いおよそ 8~11 kcal/mol の自由エネルギーおよび 29~46 kcal/mol のエンタルピーが減少する事が明らかとなっている。ギブスエネルギーの式より算出した自由エネルギー差 (ΔG) はどのリガンドでも 7~8 kcal/mol であった事から、1 塩基の欠失に伴う ODN2 本鎖の不安定性を各リガンドが AP サイト内に挿入され結合する事で補っていると考えられる。また、Watson-Crick 型塩基対の相互作用におけるエネルギー変化 (ΔE) は A/T 塩基対で -14.3 kcal/mol、G/C 塩基対で -26.3 kcal/mol であり⁷⁴⁾、本実験により得られた各リガンドにおけるエンタルピー変化が塩基対形成およびスタッキング相互作用によるものである事を示唆する。

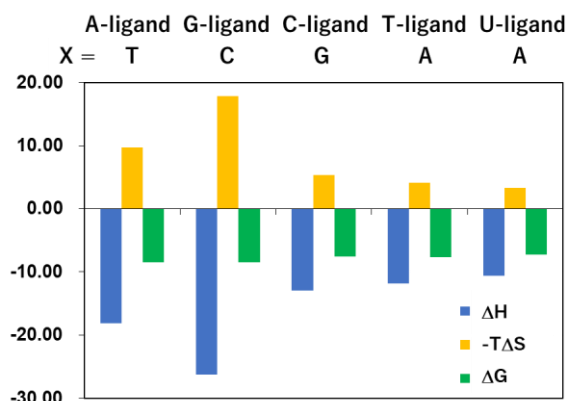


Fig. 2-8 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

エントロピー変化に関しては、AP サイトを有する ODN2 本鎖とリガンドとの 2 分子の結合による系中の分子数の減少がエントロピーロスに表れており、AP サイトとリガンドとの結合において疎水性相互作用はない事が示唆された。またエントロピーロスの一因として、リガンド結合に伴う AP サイト近傍の局所的な高次構造の固定化も考えられる。すなわち、AP サイトの相補位置の塩基に応じて ODN2 本鎖の高次構造は、AP サイト部位も含め相補塩基がヘリックス構造内外の配置を取る事、AP サイトの隣接塩基同士のスタッキングにより ODN2 本鎖が圧縮されたような構造を取る事など、AP サイト近傍において柔軟な構造をとる事を述べたが（第 1 章 3 節 3-2-2 参照）、これにリガンドが添加される事で、AP サイト内での水素結合とスタッキング相互作用およびポリアミン部のマイナーグループでの静電的相互作用により、AP サイト近傍における局所的な高次構造の柔軟性が低下し、これが AP サイト結合におけるエントロピーロスに寄与したと考えられる。

プリン塩基を有するリガンドでは水素結合能やスタッキング能が大きく、同時に先に述べた高次構造の固定化も大きいためエンタルピー変化、エントロピー変化ともに大きく、一方ピリミジン塩基を有するリガンドではプリン塩基を有するリガンドに比べスタッキング能等の効果が小さく、これに伴いエンタルピーやエントロピーの変化量も小さかったが、全てのリガンドで自由エネルギー差 (ΔG) は 7~8 kcal/mol であり、ITC による熱力学的解析から A-, G-, C-, T-および U-リガンドによる AP サイト内での塩基対形成が明確に示された。

第 6 節 第 2 章のまとめ

第 2 章では AP サイト内における核酸塩基の水素結合および塩基選択性について調べるために、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシル塩基を有する核酸塩基-ポリアミン結合体リガンドを設計・合成した。AP サイトを有する ODN2 本鎖に対する安定化効果、リガンド結合時の高次構造変化を融解温度測定、CD 測定から検討し、これらの結果から、リガンドが AP サイトを有する ODN2 本鎖にもたらす安定化効果は AP サイト近傍の配列に依存するものの、AP サイトの隣接塩基がシトシンの配列では Watson-Crick 型水素結合に基づく G/C および A/T 選択性が得られ、また、AP サイトを有する ODN2 本鎖の高次構造を大きく変化させる事なく AP サイトに結合し安定化効果をもたらす事が示された。更に、リガンドによる AP サイトを有する ODN2 本鎖の安定化が AP サイト内での塩基対形成によるものである事を確かめるために SPR, ITC を用いた物理化学的解析を行い、リガンドの AP サイト内における水素結合形成、スタッキング相互作用を示した。リガンドの AP サイトに対する結合定数は 10^5 ~ $10^6 M^{-1}$ 程度に留まり、決して高い結合能を有するわけではないが、核酸塩基-ポリアミン結合体の塩基対形成に基づく AP サイト認識が確立され、本分子設計の有効性が示された。

第3章 核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイトに対する反応性

第1節 ヘミアセタール型 AP サイトを組み込む配列の設計

これまでの研究では、核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイト内での相互作用を明らかにするために、Gelfand らにより報告された配列を用いて様々な化学的性質を評価してきたが、各核酸塩基-ポリアミン結合体の実際の AP サイトへの結合および AP サイトとの反応性を明らかにする上で、新たに K-ras 遺伝子に由来する配列を用いる事にした。K-ras 遺伝子は肺がんや大腸がんに関連する遺伝子であり、K-ras 遺伝子配列における 12 番目のコドン (GGT) の中央のグアニンのアルキル化に伴う様々な変異が報告されている⁷⁵⁾。また、グアニン 7 位窒素のアルキル化により生じるアルキル化グアニンは塩基除去修復により修復される事が報告されており⁸⁾、実際に様々な DNA アルキル化剤において生じる 7 位アルキル化グアニンがその過程で AP サイトを生じる事も報告されている⁷⁶⁾⁷⁷⁾⁷⁸⁾。そこで、グアニンアルキル化に伴い生じた AP サイトのモデルとして K-ras 遺伝子配列に由来する下記の配列 (ODN3-2) を設計し、核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイトに対する結合および反応性、主にはβ-脱離反応による切断能を評価した。

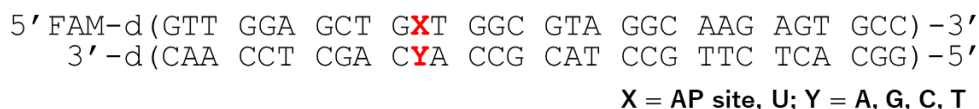


Table 3-1 K-ras 遺伝子配列に由来する ODN 配列およびその相補鎖

ODN3-1	5'-	FAM	GTT	GGA	GCT	GU T	GGC	GTA	GGC	AAG	AGT	GCC	-3'
ODN3-2	5'-	FAM	GTT	GGA	GCT	GAP T	GGC	GTA	GGC	AAG	AGT	GCC	-3'
ODN3-3	3'-		CAA	CCT	CGA	CA A	CCG	CAT	CCG	TTC	TCA	CGG	-5'
ODN3-4	3'-		CAA	CCT	CGA	CA A	CCG	CAT	CCG	TTC	TCA	CGG	-5'
OND3-5	3'-		CAA	CCT	CGA	CA A	CCG	CAT	CCG	TTC	TCA	CGG	-5'
ODN3-6	3'-		CAA	CCT	CGA	CA A	CCG	CAT	CCG	TTC	TCA	CGG	-5'

第2節 ヘミアセタール型 AP サイトを有する ODN の生成

ヘミアセタール型 AP サイトの生成については様々な論文により報告されており、ウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) を用いた方法が最も利用されている。AP サイトを導入したい位置にウラシルを組み込んだ ODN を合成し、これに 1 価性 DNA グリコシラーゼである UDG を反応させると、第1章 2 節で述べた様に、ウラシル残基の N-グリコシド結合が特異的に切断され AP サイトを生じる。

5' 末端を 6-カルボキシフルオレセイン (6-FAM) で標識した 30 mer の ODN 鎖中の 11 番目にウラシルを導入した ODN3-1 と各相補鎖 (ODN3-3~ODN3-6) との 2 本鎖に対して UDG 処理を行い精製する事で、目的とするヘミアセタール型 AP サイトが導入された ODN3-2 を有する各 2 本鎖を得た。AP サイトの生成は、FAM 標識していない ODN3-2 配列を用いた MALDI-TOF MS 測定を行い、計算値と一致する値が得られた (Found 9245.7 (calc. 9245.5 [M-H]⁻) 事から確認した (Fig. 3-1)。

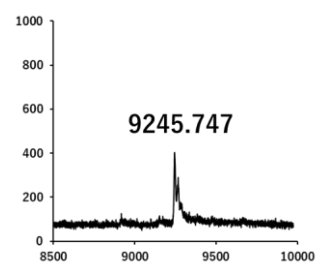


Fig. 3-1 AP サイトを有する ODN の生成確認

第3節 各リガンドの AP サイトに対するβ-脱離反応効率

第1章2節および第1章3節3-1で述べたように、ポリアミン等により引き起こされる塩基触媒型の AP サイト切断では AP サイトのβ-脱離反応により、3′末端にα,β-不飽和アルデヒドを持つ断片を生成し、このβ-脱離断片は Polβの複製を阻害する3′ブロックとなる (Fig. 3-2)。この3′ブロックは APE1 の持つ DNA3′-ホスホジエステラーゼ活性等により取り除かれるが、その活性は AP エンドヌクレアーゼ活性に比べて低い事が示唆されており、AP サイト修復においてはこの3′ブロックを取り除く過程が律速となる事が示唆されている²⁹⁾。また、β-脱離断片末端のα,β-不飽和アルデヒドは更にδ-脱離を受けて3′-リン酸末端を生じ、このδ-脱離断片もまた3′ブロックとなる。そのため、これらの3′ブロックが大量に生じる事は、修復合成を遅延させる事により塩基除去修復過程を妨害すると考えられる。リガンドポリアミン部のアミノ基は同様に塩基として働き AP サイトのβ-脱離反応を引き起こすと考えられ、リガンドによるβ-脱離断片の生成が AP サイト修復系における3′ブロックとなると期待した。そこでまずは各リガンドの実際の AP サイトに対する結合および反応性、主にβ-脱離能を調べる事にした。

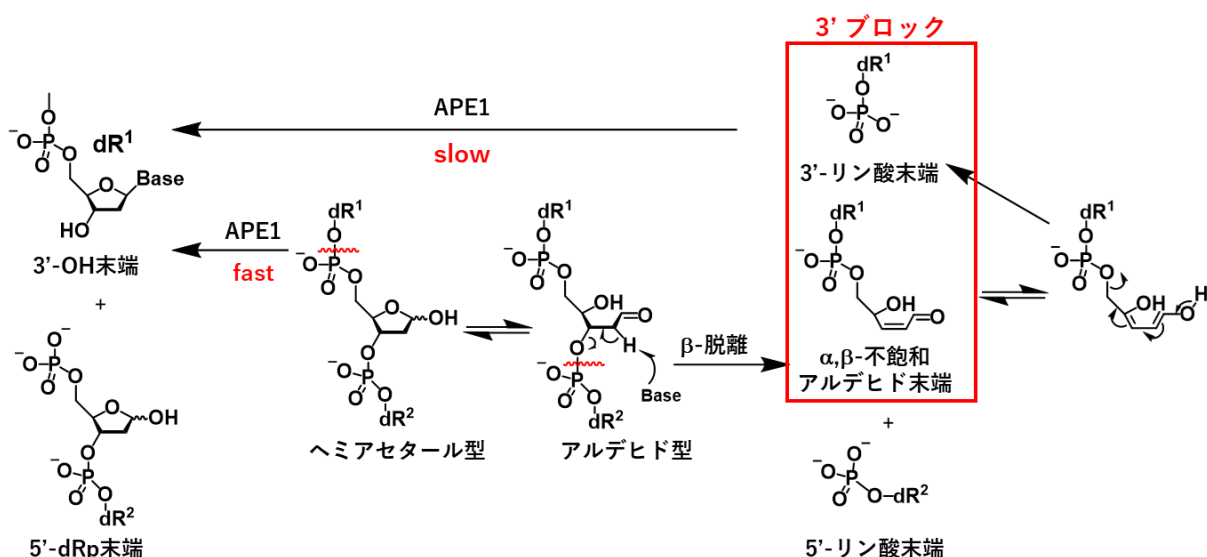


Fig. 3-2 APE1 およびアミンによる AP サイト切断

3-1 各リガンドの AP サイトに対するβ-脱離反応における塩基選択性

まず、各リガンドのβ-脱離反応における塩基選択性を調べる事にした。反応条件をこれまでの実験から得られた条件に基づき、プリン塩基を有するリガンドでは塩濃度 100mM、ピリミジン塩基を有するリガンドでは塩濃度 50mM として 37°C で 30 分間反応させた。高い反応性を示した A-および G-リガンドに関しては、ゲル電気泳動から得られたβ-脱離断片 (ODN3-2-2) の定量も行い、その結果も併せて Fig. 3-3 に示す。

A-リガンドおよび C-リガンドでは相補的な組み合わせであるチミンまたはグアニンに対して選択性が得られた一方、G-リガンド、T-リガンドではβ-脱離反応における明確な塩基選択性は観察されなかった。融解温度測定の実験では G-リガンドおよび C-リガンドに関して、隣接塩基が両方ともグアニンである ODN2-1 配列では塩基選択的な安定化効果は観察されず、隣接塩基が両方ともシトシンである ODN2-2 配列では G-リガンド/C および C-リガンド/G という選択的な安定化効果が観察されていた。

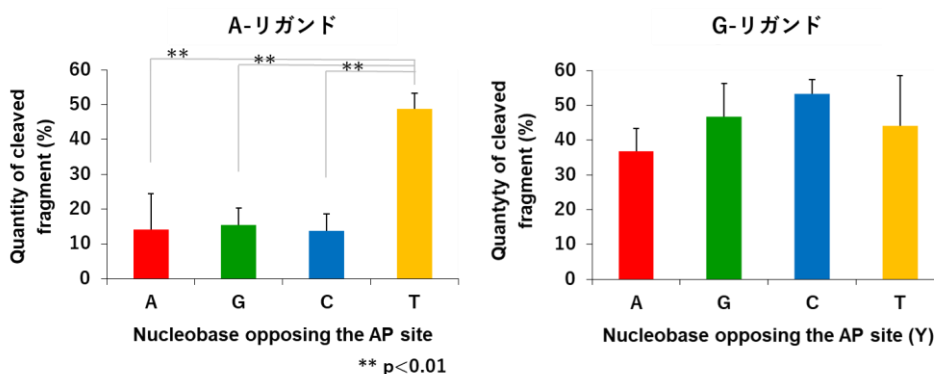
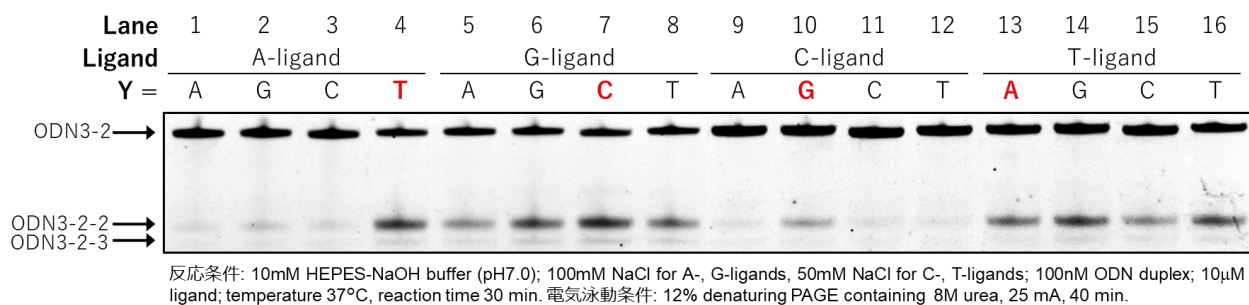


Fig. 3-3 各リガンドの AP サイト β -脱離反応における塩基選択性

これに本実験で用いた、AP サイトの隣接塩基が一方はグアニン、もう一方はチミンである ODN3-2 配列の結果を併せて考えると、G-リガンドでは AP サイトの隣接塩基の一方または両方にグアニンがある場合では、隣接塩基のグアニンと G-リガンドとの強い非特異的相互作用により相補位置の塩基非選択的な ODN2 本鎖の安定化をもたらし、これが続く β -脱離反応における塩基選択性にも影響を及ぼしたと考えられ、一方 C-リガンドでは、隣接塩基の一方でもピリミジン塩基であれば、隣接塩基が両方ともグアニンである場合のような隣接塩基間の強い非特異的相互作用が抑制され、相補塩基と C-リガンドとの塩基対形成に基づく塩基選択的な ODN2 本鎖の安定化と続く β -脱離反応が得られたのではないかと考えられる。T-リガンドに関しては、第 2 章の結果から AP サイト内でのリガンドの柔軟性に起因する様々な塩基対形成が示唆されており、これらの塩基非選択的な AP サイト結合が続く β -脱離反応にも影響したと考えられる。

3-2 プリン塩基を有するリガンドの β -脱離反応の時間変化

第 3 節冒頭で述べた様に、リガンドの AP サイト部位特異的切断により生じる β -脱離断片は AP サイト修復における 3' ブロックとなり、正常な修復過程を遅延させる可能性がある。AP サイトに対する結合能の高さからプリン塩基を有するリガンドにおいてその効果が最も期待され、AP サイト修復阻害によって細胞毒性効果を増強する可能性を秘めている。そこで、プリン塩基を有するリガンドの β -脱離反応についてより詳細に調べる事にした。

β -脱離反応においてチミン選択性を示した A-リガンドと、相補塩基の影響を受けずいずれの配列においても高い反応性を示した G-リガンドについてその経時変化を確認した。ゲル電気泳動により得られた断片のバンドを定量しその比率を時間に対してプロットしたグラフを Fig. 3-4 に示す。本反応では β -脱離断片だけでなく反応開始 1-2 時間程度から δ -脱離断片も確認されており、切断断片として δ -脱離断

片も含め値を算出した。A-リガンドでは AP サイトの相補位置 (Y) にチミンがある場合に、反応開始からおよそ 2-3 時間で完全に AP サイトがβ-脱離により切断され、その他の組み合わせでは反応開始後 5 時間経過してもその切断断片は最大で 40%程度であった。一方 G-リガンドでは、反応開始から 1-2 時間程度まではそのβ-脱離断片の生成量に若干差があるものの、5 時間経過時には相補位置の塩基によらず全ての配列で AP サイトのβ-脱離に伴う切断が完全に進行した (Fig. 3-4)。

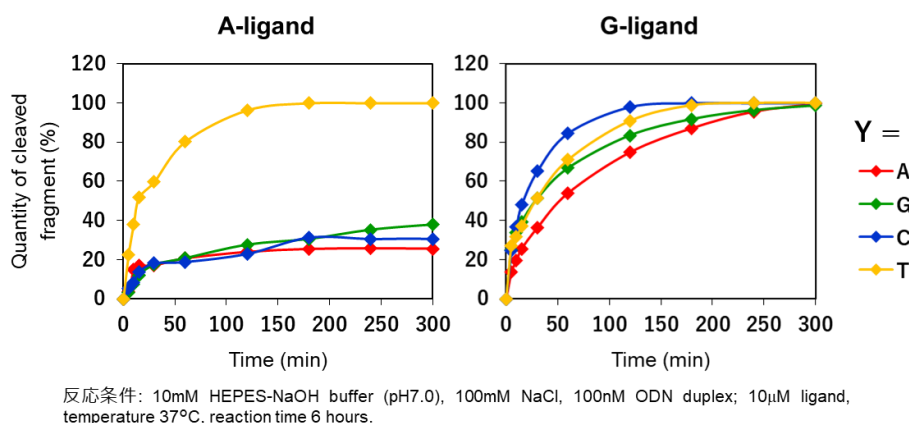
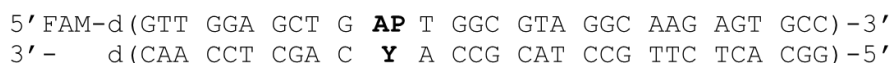


Fig. 3-4 プリン塩基を有するリガンドの AP サイトβ-脱離反応

同じプリン塩基であってもその塩基選択性には顕著な差があり、この要因として隣接塩基の影響が考えられる。第 3 節 3-1 で既に述べたが、隣接塩基のグアニンと G-リガンドとのスタッキング相互作用により強い非特異的相互作用が起こり、このために相補塩基 (Y) によらずに全ての配列で G-リガンドが AP サイト内で安定化し、この隣接塩基とのスタッキング等による AP サイト近傍の高次構造の固定化がポリアミン部アミノ基の AP サイトへの求核攻撃に有利に働き、結果、β-脱離反応が速やかに起こったのではないかと考えられる。第 2 章 5 節において、隣接塩基にシトシンを有する AP サイトアナログを用いた実験ではあるが、算出された熱力学的パラメーターからプリン塩基、特に G-リガンドでは水素結合およびスタッキング相互作用に由来する大きなエンタルピーゲインと高次構造の固定化に由来すると考えられる大きなエントロピーロスが観測されていた。本実験で用いた配列では隣接塩基の一方がグアニンであるため、G-リガンド添加による高次構造の固定化の効果がより大きいと考えられ、これらの効果が G-リガンドの相補塩基 (Y) に依存しない高い反応性をもたらしたと考えられる。

第 4 節 G-リガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖とのβ-脱離反応における断片構造確認

高いβ-脱離反応性を示した G-リガンドと相補位置の塩基シトシンの組み合わせに関して、更に HPLC による反応分析を行った。ゲル電気泳動による分析から得られた情報を基に、G-リガンドの AP サイトを有する ODN2 本鎖に対するβ-脱離反応を 3 時間後まで追跡し、得られた各ピークはそれぞれ単離精製し、MALDI-TOF MS により構造を決定した。反応開始 0 分において観察される 4 つのピークのうち、一番保持時間の長いピーク 4 が AP サイトを有する ODN3-2 であり、ピーク 2 が相補位置 (Y) にシトシンを有する相補鎖 ODN3-5 である (Fig. 3-5)。G-リガンド添加により AP サイトのβ-脱離による切断反応が進行し、ピーク 4 は時間とともに減少し反応開始 2 時間後にはほとんど消失した。これに伴

い切断断片ピーク 1 および 3 が増加し、FAM の蛍光追跡からはピーク 4 の消失に伴うピーク 3 の増加が確認された。反応開始 0 分からわずかに観察されるピーク 1 および 3 は、それぞれ AP サイトの切断後の 3' 側断片 (ODN3-2-4) と末端に α, β -不飽和アルデヒドを有する β -脱離断片 (ODN3-2-2) である事が MALDI-TOF MS から確認された (Table 3-2)。AP サイトの β -脱離断片は末端に α, β -不飽和アルデヒドを持つため、 β -脱離を受けたのちに水の付加が起こり水和物となる事が知られており⁷⁹⁾、本実験で測定した MALDI-TOF MS から β -脱離断片は水和物体として検出された。また、ピーク 3 には単離はできていないものの ODN3-2-2 の δ -脱離断片 (ODN3-2-3) も含まれる事が質量分析より示された。

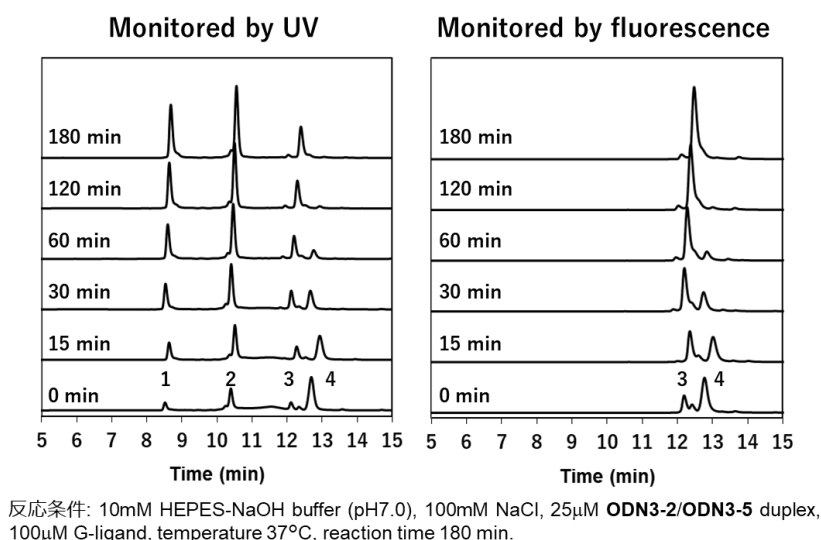


Fig. 3-5 G-リガンドと ODN3-2/3-5 2 本鎖の β -脱離反応

Table 3-2 HPLC から単離精製した各ピークの MALDI-TOF MS

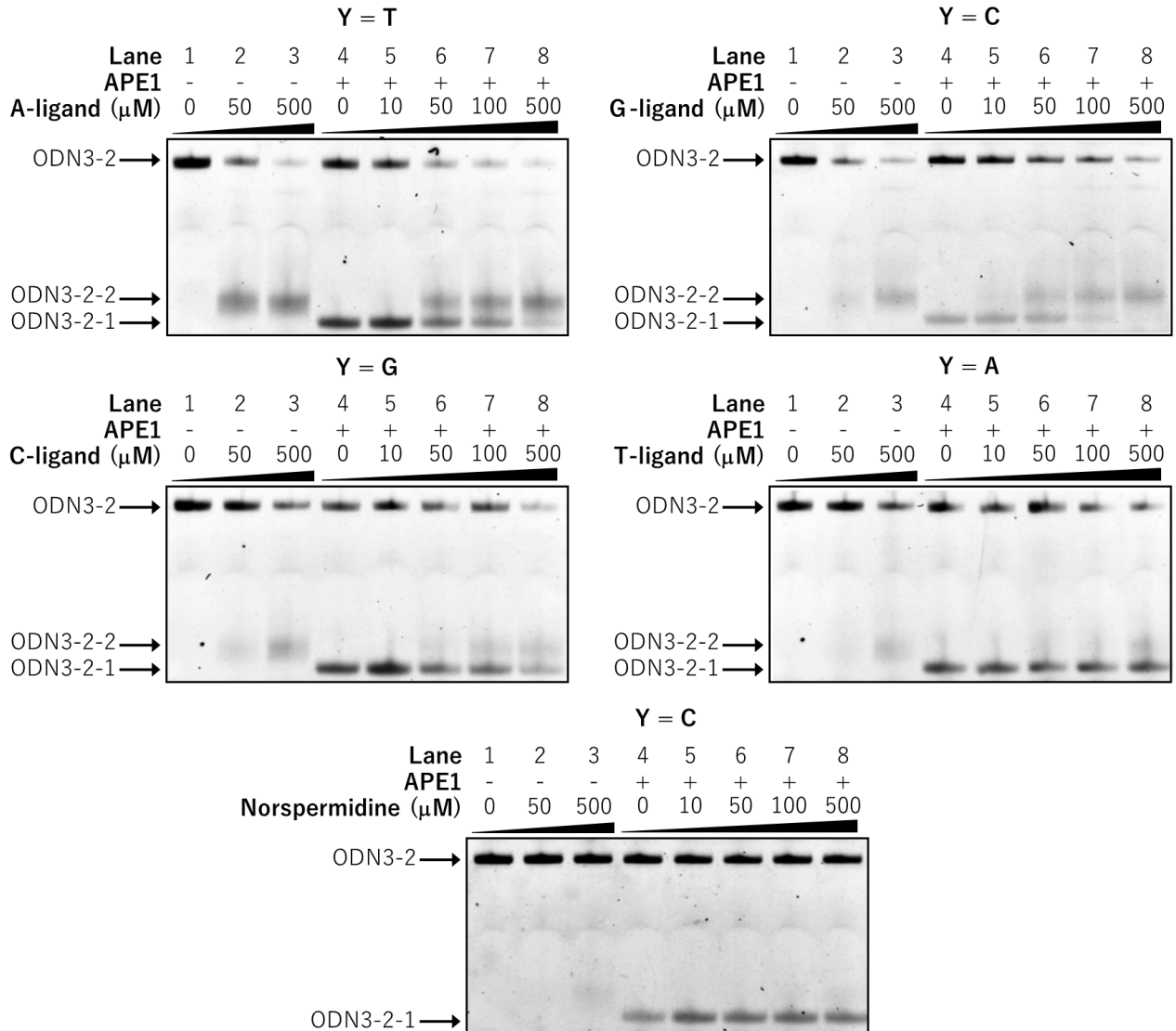
Peak	ODN	Sequence	Found	Calcd. [M-H] ⁻¹
1	3-2-4	5' Phosphate-d(TGGCGTAGGCAAGAGTGCC) -3'	5973.1	5970.0
2	3-5	5' -d(GGCACTCTTGCTACGCCACCAGCTCCAAC) -3'	9026.8	9027.5
3	3-2-2	5' FAM-d(GTTGGAGCTG) - α, β -unsaturated aldehyde 3'	3831.9	3829.7 ^a
	3-2-3	5' FAM-d(GTTGGAGCTG) -hydroxyl 3'	3715.6	3713.6
4	3-2	5' FAM-d(GTTGGAGCTGAPTGGCGTAGGCAAGAGTGCC) -3'	9788.5	9782.7

^aODN3-2-2 was calculated as hydrate.

第 5 節 リガンドの AP サイト修復酵素 (APE1) に与える影響

これまでの結果より、リガンドは実際の AP サイトを有する ODN2 本鎖に対して β -脱離反応による 1 本鎖切断を引き起こし、AP サイト修復における 3' ブロックとなる β -脱離断片を生じる事が示された。そこで次に、APE1 共存下におけるリガンドの β -脱離反応を確かめる事にした。APE1 は塩基除去修復において AP サイトを認識しその 5' 側での加水分解を触媒する酵素であり、AP サイトの β -脱離断片、 δ -脱離断片をポリマーゼの複製起点となる 3' -OH 末端に加水分解する活性も持ち合わせている (本章第 3 節)。APE1 の AP サイト切断反応を種々のリガンド濃度存在下で行い、リガンドによる AP サイトの β -脱離反応が APE1 にどのような影響を与えるかをゲル電気泳動で分析し考察した。

5' FAM-d(GTT GGA GCT G **AP** T GGC GTA GGC AAG AGT GCC) -3'
 3' - d(CAA CCT CGA C **Y** A CCG CAT CCG TTC TCA CGG) -5'



反応条件: 50mM HEPES-NaOH buffer (pH7.4); 100mM NaCl 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 100nM ODN duplex; 0-500μM ligand, 0.01 units/μl APE1, temperature 37°C, reaction time 10 min.
 電気泳動条件: 12% denaturing PAGE containing 8M urea, 25 mA, 70 min.

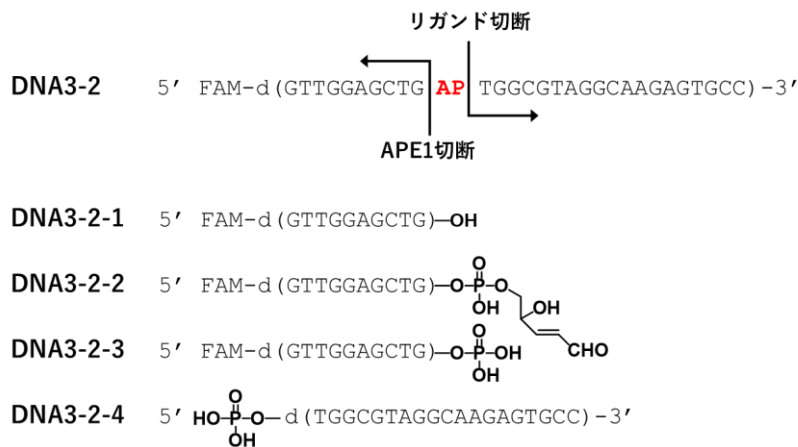


Fig. 3-6 リガンドと APE1 共存条件における AP サイト切断反応

リガンドと AP サイトの相補位置の塩基 (Y) の組み合わせは、これまでの研究から選択性がみられた A-リガンド/T、G-リガンド/C、C-リガンド/G および T-リガンド/A で行う事にし、まずリガンドによる AP サイトのβ-脱離反応を確認した (Fig. 3-6, Lane1-3, ODN3-2-2)。また、Fig. 3-6 の Lane4 においてはリガンド非存在下 37°C で 10 分間の反応を行い APE1 による AP サイトの切断を確認した (Fig. 3-6, ODN3-2-1)。これに対し、各リガンド濃度 10-500μM 存在下での反応では、リガンド 50μM 程度から APE1 による切断断片 (ODN3-2-1) よりもわずかに泳動度の小さい位置にリガンドによるβ-脱離断片 (ODN3-2-2) が確認され、A-および G-リガンドではリガンド濃度 500μM の大過剰条件においては完全にβ-脱離断片のみが観察された(Lane 8)。この事から、A-, G-リガンドは AP サイトの APE1 による切断をβ-脱離反応により阻害する事が示され、リガンドにより生じたβ-脱離断片は AP サイト修復における 3´ブロックとして働く事が示唆された。しかし、ピリミジン塩基を有するリガンドでは、APE1 の存在にかかわらずリガンド大過剰条件においてもほとんどβ-脱離断片の生成が確認されず、本条件では C-, T-リガンドは AP サイトを有する ODN2 本鎖に対して親和性が低い事が示された。すなわち、本実験では APE1 の酵素反応に適した条件で行ったため、塩 (Na⁺および Mg²⁺) の存在がリガンドの AP サイトを有する ODN2 本鎖に対する親和性を減弱させており、特にピリミジン塩基を有するリガンドではその影響を大きく受け、顕著な結果が得られなかったと考えられる。

またノルスペルミジンをを用いて行った実験では大過剰条件においても AP サイトのβ-脱離断片は全く生成されず、APE1 の AP サイト切断を阻害しない事が確認され、AP サイトのβ-脱離反応においても核酸塩基-ポリアミン結合体というリガンド構造の有効性が示された。これらの実験から、APE1 による AP サイトの切断を阻害するには大過剰のリガンドが必要ではあるものの、A-, G-リガンドは AP サイトのβ-脱離反応により 3´ブロックとなるβ-およびδ-脱離断片を生成し、AP サイト修復を遅延または阻害する可能性が示された。

第 6 節 第 3 章のまとめ

第 3 章では核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイトに対する反応性を明らかにするために、ゲル電気泳動および HPLC を用いてそのβ-脱離反応を解析した。その結果、プリン塩基を有するリガンドで高いβ-脱離反応性が示され、A-リガンドでは本研究で用いた配列においてもチミン選択的なβ-脱離反応が確認された。また G-リガンドにおいても高いβ-脱離反応性が示され、アルデヒド型 AP サイトとのβ-脱離反応が AP サイトの相補位置の塩基によらず進行する事が確認された。リガンドによる AP サイト近傍の高次構造の固定化がβ-脱離反応には重要な要素であり、Lhomme らの報告と併せて本実験から、このβ-脱離反応における求核剤は核酸塩基部に最も近いアミノ基であると考えられる。また、AP サイト修復に対する阻害効果を検討するために行った APE1 共存下における実験からは、リガンド高濃度条件ではあるものの APE1 の AP サイト切断に対する阻害効果が観察され、プリン塩基を有するリガンドによるβ-脱離断片の生成、すなわち 3´ブロックの生成が AP サイト修復において APE1 による修復過程を遅延または阻害する可能性がある事が示された。これらの結果によりリガンドそのものの新薬シーズとしての可能性や、既存のアルキル化抗がん剤との併用による抗がん剤の作用増強剤としての可能性が示された。

第4章 チオグアニン-ポリアミン結合体を基にした AP サイト特異的分子の開発

第1節 チオグアニン-ポリアミン結合体の設計と合成

生体内における核酸塩基の非酵素的な脱離や酸化損傷塩基の脱離およびアルキル化損傷塩基の脱離は、その多くがプリン塩基であり、生じる AP サイトの相補位置にはピリミジン塩基が存在する。これらの AP サイトを認識するにはプリン塩基を有するリガンドが適していると考えられる。これまでの研究から、各核酸塩基-ポリアミン結合体の中で G-リガンドが最も良好な AP サイト結合能およびβ-脱離能を有している事が示されてきた。また、G-リガンドはβ-脱離反応において相補塩基の影響を受けずに切断を引き起こす事が示され、これは AP サイト修復阻害剤への展開において有利に働くと考えられる。そこで、これまでに得られた結果を基に G-リガンドを基本骨格とした新規分子を開発する事にした。

これまでのリガンドと AP サイトとの相互作用は、水素結合、スタッキング相互作用、静電的相互作用など、全て非共有結合的な相互作用であり、AP サイト部位特異的結合および切断を達成しているものの、その結合は比較的弱いものであった。第3章3節での APE1 との競合実験からも示唆されたように、AP サイト修復阻害剤への展開においてはリガンドの AP サイトに対する結合能の向上が必要だと考えられた。チオグアニンはグアニンと類似の性質を持ち、シトシンと水素結合を形成する事が知られており⁸⁰⁾、更にチオカルボニル部位は 365 nm の光照射によりピリミジン塩基の 5,6-二重結合と光環化付加体を形成する事が知られている⁸¹⁾⁸²⁾。また同時に、チオールは AP サイトのβ-脱離断片末端のα,β-不飽和アルデヒドと共役付加反応を引き起こす事が報告されており、これらの付加体もまた AP サイト修復における 3' ブロックとなる事が示唆されている³⁰⁾。これらの情報より、共有結合形成可能な新規リガンドとして新たにチオグアニン-ポリアミン結合体を設計し、AP サイトに対する結合および反応性を調べる事にした。チオグアニン部が AP サイトに挿入されたのちに 365 nm の光を照射する事で AP サイト近傍の核酸塩基と付加体を形成する事や AP サイトのβ-脱離断片と反応し付加体を形成する事により、AP サイト修復におけるより強力な阻害効果を示す事を期待した (Fig. 4-1)。

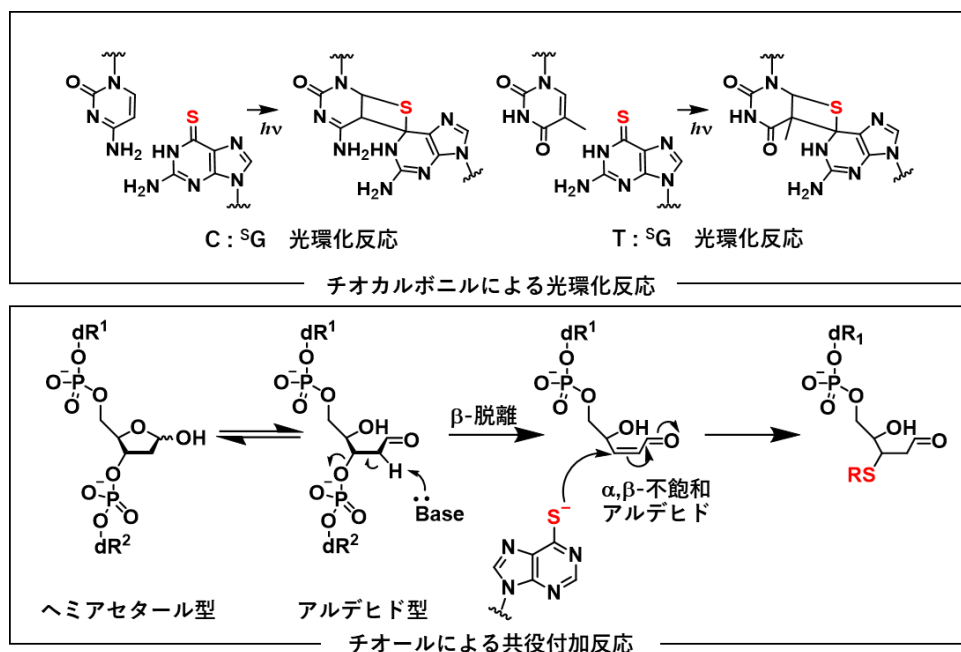
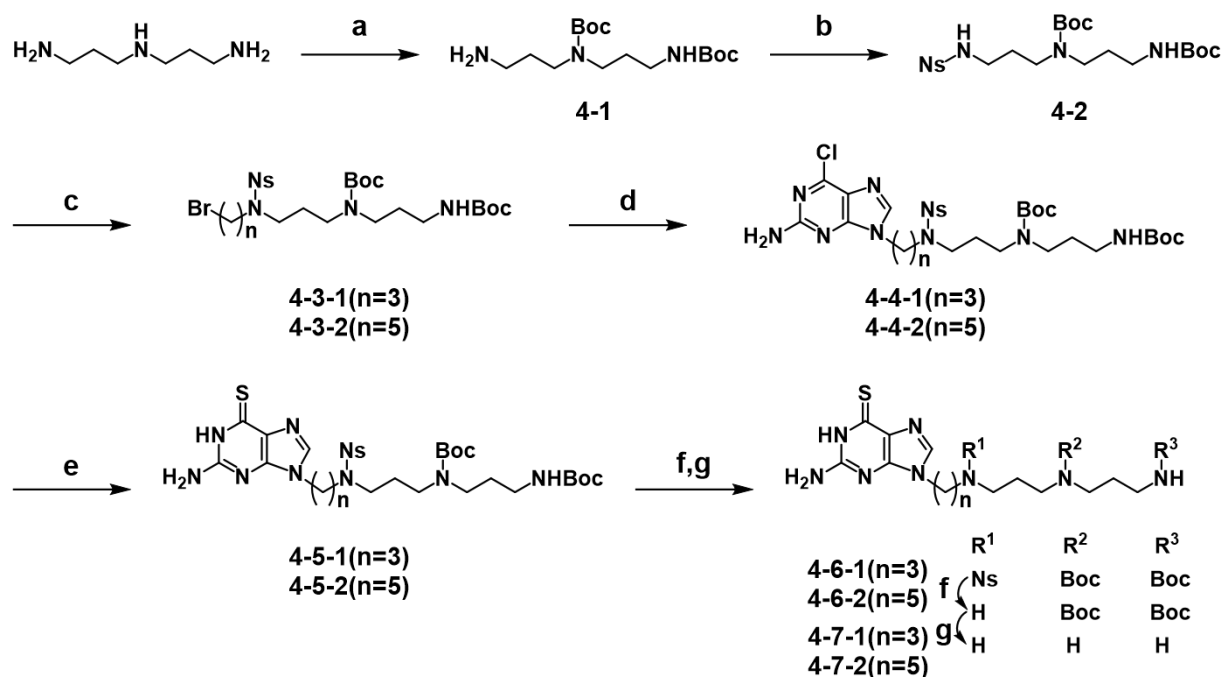


Fig. 4-1 チオグアニンに期待する共有結合形成

1-1 チオグアニン-ポリアミン結合体の合成

チオグアニン-ポリアミン結合体の合成は、第 2 章 1 節で述べた天然核酸塩基を有するリガンドの合成で確立した経路に従い、ノルスペルミジンを出発原料として 7 ステップで目的とする 2 種類のチオグアニンリガンドを合成した (Scheme 4-1)。本研究ではチオカルボニル部位の反応における適切な距離を検討するために、チオグアニンとポリアミンとをつなぐ炭素リンカーの長さが 3 のものと 5 のものを設計・合成し比較評価する事にした。天然核酸塩基を有するリガンド合成では、ノルスペルミジンを 1 つの Boc 基と 2 つの Ns 基で保護していたが、合成終盤において脱保護する際に、Ns 基の脱保護に伴い極性が極端に上昇し精製が困難であった事から、本合成経路ではノルスペルミジンを 2 つの Boc 基と 1 つの Ns 基で保護した化合物 4-2 を合成し、終盤における脱保護および精製を容易にした。化合物 4-2 に 1,3-ジブロモプロパンまたは 1,5-ジブロモペンタンを反応させトリアミンブロマイド (4-3-1, 4-3-2) を合成し、それぞれに 2-アミノ-6-クロロプリンを S_N2 反応により結合させる事で化合物 4-4-1 および 4-4-2 を得た。次に、エタノール中チオウレアを加えて加熱還流する事でチオグアニン骨格を持つアミンの保護体 (4-5-1, 4-5-2) を合成し、最後に Ns 基、Boc 基の順に脱保護する事で目的とするリンカー長の異なるチオグアニン-ポリアミン結合体を塩酸塩として得た。天然核酸塩基を有するリガンドの元素分析の結果から、チオグアニンを有するリガンドでも 4 塩酸塩であると考えられる。それぞれはリンカーの長さに応じて ^sG-n3-リガンド (4-7-1) および ^sG-n5-リガンド (4-7-2) と名付けた。



a) i) CF₃CO₂Et, MeOH, -78°C to 0°C, ii) (Boc)₂O, THF, 0°C to rt, iii) LiOH/H₂O, THF, rt, 58%; b) NsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 83%; c) 1,3-dibromopropane, K₂CO₃, MeCN, 50°C, 67% for 4-3-1; 1,5-dibromopentane, K₂CO₃, DMF, rt, 93% for 4-3-2; d) 2-amino-6-chloropurine, K₂CO₃, DMF, rt, 82% for 4-4-1, 74% for 4-4-2; e) thiourea, EtOH, reflux, 73% for 4-5-1, 80% for 4-5-2; f) thiophenol, K₂CO₃, DMF rt 94% for 4-6-1, 91% for 4-6-2; g) 0.5M HCl/MeOH rt, 94% for 4-7-1, 71% for 4-7-2.

Scheme 4-1 チオグアニン-ポリアミン結合体の合成

1-2 ^sG-リガンドの UV 吸収確認

チオグアニンは 340 nm に特有の UV 吸収を持つ事が知られているため、^sG-リガンドの生成は NMR, ESI-MS の他に UV 吸収測定においても確認した。チオグアニンの 1 位アミノ基プロトンの pK_a はおよ

そ 7.7~8.3 であり、強塩基性条件下においては吸収極大が 320 nm に移動する浅色効果が観察される⁸³⁾。UV 測定から 2 種の ^SG-リガンドでも 340 nm に吸収極大が観察され、主にチオカルボニルで存在している事が確認された。

1-3 ^SG-リガンドの光反応に用いる ODN の設計と合成

^SG-リガンドの光反応性を調べるにあたり、AP サイトに ^SG-リガンドが挿入された際に近傍のピリミジン塩基と光反応すると期待し、Table 4-1 に示す配列を設計した。これらの配列の 2 本鎖においては、THF 環の 5´側、3´側のどちらか、および両方にシトシンが存在し、THF 環の相補位置 (Z) の 5´側、3´側のどちらか、およびその両方にチミンが存在する事になる。^SG-リガンド添加後の照射により THF 環を有する ODN 鎖または相補鎖のどちらかのピリミジン塩基と光反応する事を期待した。相補位置 (Z) の塩基に関しては、チオグアニンがグアニン同様シトシンと水素結合を形成する事を念頭にまずはシトシンを有する配列でのみ評価を行う事にした。合成は第 1 章 1 節 1-2 と同様に、固相ホスホアミダイト法によりアミダイト前駆体 2-8 を用いて DNA 合成装置により行った。

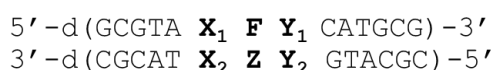


Table 4-1 ^SG-リガンドとの光反応を期待した ODN 配列

ODN	Sequence	ODN	Sequence
2-2	CFC 5'- GCG TAC F CAT GCG -3'	2-7	GCG 3'- CGC ATG C GTA CGC -5'
4-1	AFC 5'- GCG TAA F CAT GCG -3'	4-1-1	TCG 3'- CGC AT T C GTA CGC -5'
4-2	CFA 5'- GCG TAC F AAT GCG -3'	4-2-1	GCT 3'- CGC ATG C T TA CGC -5'
4-3	AFA 5'- GCG TAA F AAT GCG -3'	4-3-1	TCT 3'- CGC AT T C T TA CGC -5'

F = Tetrahydrofuran ring

第 2 節 ^SG-リガンドの各 ODN 配列に対する安定化効果

まず、合成した ^SG-n3-リガンドおよび ^SG-n5-リガンドの AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖に対する安定化効果を確認した (Table 4-2)。その結果、AFC, CFA, AFA の配列において融解温度の上昇が観察され、AP サイトに結合している事が確認された。隣接塩基の違いにより相補塩基が同じシトシンであっても ΔT_m 値に違いがあり、THF 環の 5´側にアデニン、3´側にシトシンを有する AFC 配列に対する安定化効果が最も高く、次に CFA、AFA という傾向がみられた。

Table 4-2 ^SG-リガンド存在下における融解温度上昇 (° C)

Sequence	ODN	T_m	+ ^S G-n3-ligand	+ ^S G-n5-ligand
			ΔT_m	
AFC/C	(ODN4-1/4-1-1)	30.7	+5.4	+4.2
CFA/C	(ODN4-2/4-2-1)	32.0	+3.5	+4.1
AFA/C	(ODN4-3/4-3-1)	29.9	+1.8	+3.3
CFC/C	(ODN2-2/2-7)	34.4	+0.1	+0.1

融解温度測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 2 μ M ODNs; 10 μ M ^SG-ligands.

一方、THF 環の隣接塩基が両方ともシトシンである ODN2-2 配列では融解温度の上昇が観察されず、⁵S-G-リガンドが AP サイト内に挿入されていない事が示唆された。チオグアニンはグアニンと比較してスタッキング相互作用および水素結合能は若干低下する⁸⁰⁾⁸⁴⁾ものの、それほど変わらないと言われているが、ODN2-2 配列においては G-リガンドと⁵S-G-リガンドで顕著な差がみられた。THF 環の隣接塩基がシトシンであり、かつ相補位置 (Z) にシトシンを有する ODN2 本鎖 (ODN2-2/2-7) ではこれまでの研究においても相補位置の塩基が異なる他の配列との ODN2 本鎖 (ODN2-2/2-3, ODN2-2/2-5 および ODN2-2/2-19) に比べ融解温度が低く、また明確な融解温度曲線を得る事が困難であった。CD 測定の結果からは他の 2 本鎖と比べて顕著な違いはなく B 型 DNA の高次構造を維持していると考えられるが、AP サイト近傍の局所的な構造が他とは異なり、加熱による不安定化が他の 2 本鎖よりも大きいのかも知れない。本実験で用いた配列の中でも、CFC/C 配列の安定性 (T_m 値) は他と比べて低いわけではないが、明確な融解温度曲線が得られず (Fig. 4-2)、このため CFC 配列は評価に適さないと判断し、AFC, CFA, AFA の 3 つの配列で光反応の検討を行う事にした。

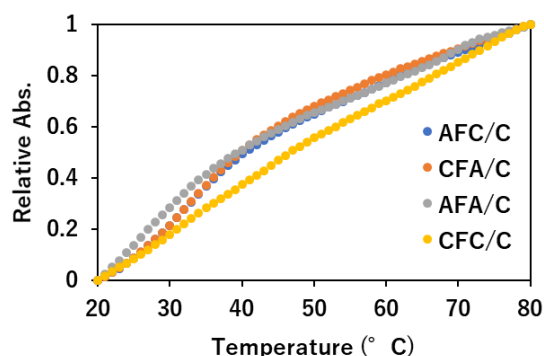


Fig. 4-2 各 ODN2 本鎖の融解曲線

第 3 節 ⁵S-G-ligand の AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖に対する光反応

3-1 光反応における隣接塩基 (X, Y) の影響

⁵S-G-リガンド存在下、AFC/C, CFA/C および AFA/C 配列の ODN2 本鎖に紫外線を照射し、反応液を HPLC により分析した。光反応における光源や添加物等を種々検討した結果、本実験では 4W, 365 nm の紫外線照射を行い、添加物としてジチオスレイトール (DTT) を加えた。光照射によりチオカルボニルは副反応として光酸化を受けスルフィン酸になる事が報告されており⁸⁵⁾⁸⁶⁾、還元剤である DTT を加える事でスルフィン酸をチオカルボニルに戻す事ができる⁸⁷⁾。

まず初めに⁵S-G-n3-リガンドについて光反応を行ったところ、光照射 24 時間後に AFC/C 配列においてのみ AFC 配列の消失とともに新たなピークが検出された (ODN4-1-5, Fig. 4-3)。CFA/C および AFA/C 配列では本章 2 節の結果より、AFC/C 配列と同様に⁵S-G-n3-リガンドが AP サイトに結合していると考えられるが、新たなピークは全く観察されなかった。

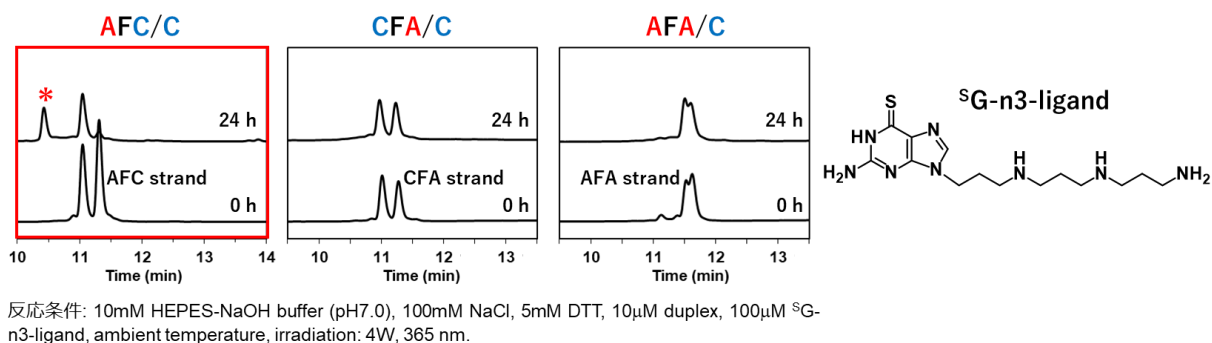


Fig. 4-3 ⁵S-G-n3-リガンドと THF 環の隣接塩基が異なる ODN2 本鎖との光反応

この事から、^SG-リガンドの光反応は相補鎖の塩基とではなく THF 環の隣接塩基と起こっている事が示唆された。チオカルボニル基がピリミジン塩基と光反応したとすると AP サイト 3´側のシトシンと光反応を起こした可能性がある。そこで、^SG-n5-リガンドについても同様に光反応を行ったが、AFC/C 配列において新たなピークが観察されたものの、反応性が悪い事が示された (Fig. 4-4)。^SG-n5-リガンドはリンカーが長く柔軟性が高いため、AP サイトにリガンドが挿入された際の隣接塩基との光反応が効率的に起こらなかったのではないかと考えられる。

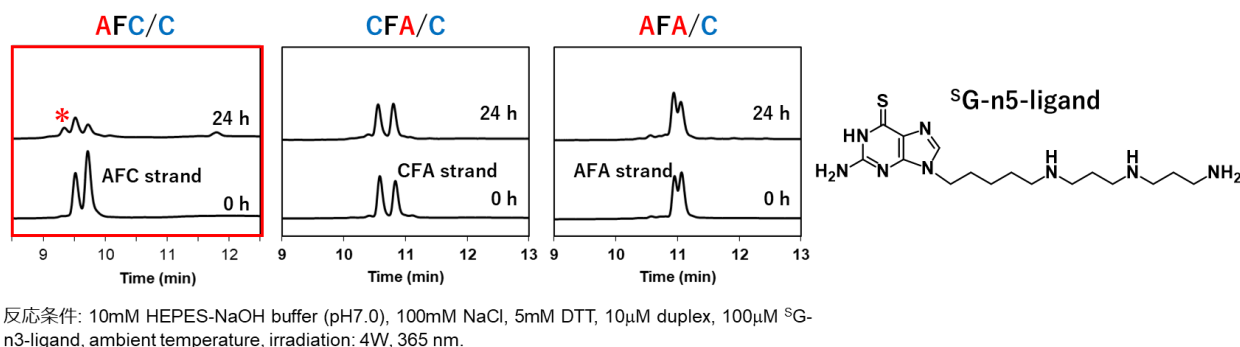


Fig. 4-4 ^SG-n5-リガンドと AP サイトの隣接塩基が異なる ODN2 本鎖との光反応

3-2 光反応における相補位置 (Z) の塩基の影響

THF 環の隣接塩基が異なる 3 つの配列を用いた実験から、^SG-リガンドと AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖との光反応は隣接塩基で起こる事が示唆された。そこで次に、唯一新規ピークが確認された AFC 配列における相補位置 (Z) の塩基の影響を調べる事にした。

3-2-1 ^SG-リガンドの AP サイト安定化効果における塩基選択性

Table 4-3 に示す配列を改めて用意し、まずは融解温度測定から各 ODN2 本鎖に対する ^SG-リガンドの安定化効果を確認した。その結果を Table 4-2 に示した AFC/C 配列の結果と併せて Table 4-4 に示す。

^SG-n3-リガンドでは ^SG/C 塩基対を形成しうる AFC/C 配列で最も高い ΔT_m 値 (+5.4°C) が観察され、塩基選択性が観察された一方、^SG-n5-リガンドでは AFC/C 配列で最も安定化効果が高いものの、他の配列においても中程度の ΔT_m 値の上昇がみられ、塩基選択性は観察されなかった。^SG-n5-リガンドは前項でも述べた様に、^SG-n3-リガンドよりもより柔軟なペンチル

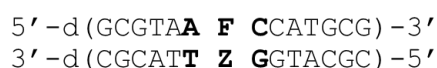


Table 4-3 相補塩基の影響を調べるための ODN 配列

ODN	Sequence
4-1-1	TCG 3'- CGC ATT C GTA CGC -5'
4-1-2	TAG 3'- CGC ATT A GTA CGC -5'
4-1-3	TGG 3'- CGC ATT G GTA CGC -5'
4-1-4	TTG 3'- CGC ATT T GTA CGC -5'

リンカーを持つため、AP サイト内において ^SG/C Watson-Crick 型水素結合だけでなく ^SG/G Hoogsteen 型水素結合や ^SG/T Wobble 型塩基対形成が可能であり、そのため、相補位置 (Z) の塩基によらず安定化効果を示したのではないかと考えられる。しかし、その長いリンカーのために構造の安定化に対する寄与は小さく、相対的に ^SG-n3-リガンドよりも安定化効果が低下したのだと考えられる。

Table 4-4 ^3S -リガンド存在下における融解温度上昇 ($^{\circ}\text{C}$)

Sequence	ODN	T_m	$+^3\text{S}$ -n3-ligand	$+^3\text{S}$ -n5-ligand
			ΔT_m	
AFC/C	(ODN4-1/4-1-1)	30.7	+5.4	+4.2
AFC/A	(ODN4-1/4-1-2)	33.6	+2.3	+2.8
AFC/G	(ODN4-1/4-1-3)	34.4	+1.6	+3.8
AFC/T	(ODN4-1/4-1-4)	33.0	+1.2	+3.1

融解温度測定条件: 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 2 μM ODNs; 10 μM ^3S -ligands.

3-2-2 ^3S -n3-リガンドと AFC 配列 2 本鎖との光反応における塩基選択性

^3S -n3-リガンドについて、THF 環の相補位置 (Z) の塩基にアデニン、グアニンおよびチミンを有する ODN2 本鎖に対する光反応も行った。その結果、相補位置にシトシンがある時のみ光反応が進行し、アデニン、グアニンおよびチミンがある場合には光反応が全く進行しない事が確認された (Fig. 4-5)。これは、融解温度測定の結果からも示されるように、 ^3S -n3-リガンドの AP サイトへの結合が弱いためだと考えられる。

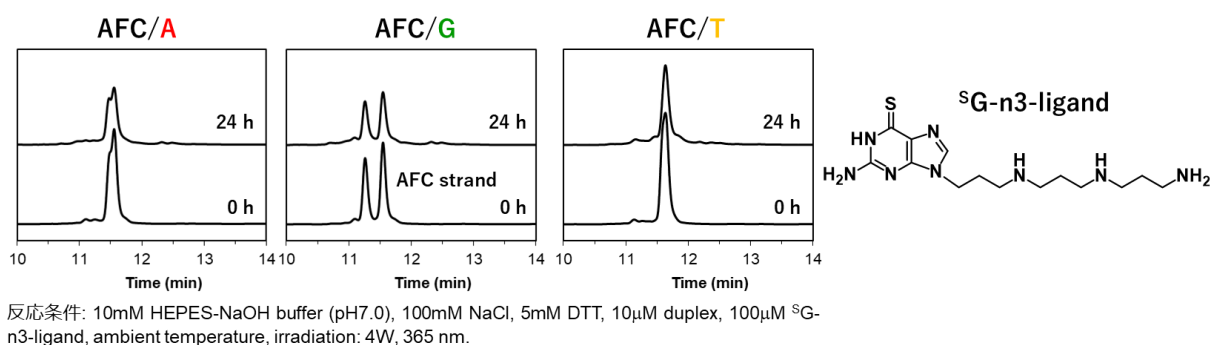


Fig. 4-5 ^3S -n3-リガンドの光反応における相補位置 (Z) の塩基選択性

これまでの結果から、光反応においてはまずはリガンドが AP サイトに結合する事が必要であり、効率的に光反応を起こすにはそのチオカルボニル基が適した位置で固定されている事が重要であると考えられる。本研究では ^3S -n5-リガンドの光反応における相補位置 (Z) の塩基選択性は調べなかったが、 ^3S -n3-リガンドと ^3S -n5-リガンドのこれまでの結果の比較から、 ^3S -n5-リガンドの持つペンチルリンカーでは AP サイト内でのチオグアニン部の自由度が大きく、AP サイトに対する安定化効果はあっても光反応は起こらないまたは反応性が悪いと予想される。

3-3 チオカルボニル基および光、DTT の重要性

更に、対照実験としてチオカルボニルを持たない G-リガンドでも同様の実験を行った。光照射 24 時間後においても新たなピークの出現は確認されず (Fig. 4-6)、この事から、本光反応にはチオカルボニル基が重要である事が示された。

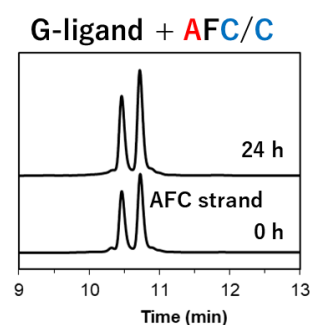


Fig. 4-6 G-リガンドによる光反応

また同様にコントロール実験として、365 nm の照射がない場合および DTT がない場合においても実験を行い、両者の一方でもかけると光反応が進行しない事が示された。この事から、本光反応はリガンドチオカルボニル部位の光反応である事が確かめられた。

3-4 MALDI-TOF MS 測定による新規ピークの構造決定および予想反応メカニズム

³²S-G-n3-リガンドと AFC/C 配列との光反応により得られた新規ピーク (ODN4-1-5) を単離・精製し構造決定を行った。その結果、4156.025 の分子量が得られ、これは AFC 配列に ³²S-G-n3-リガンドの脱硫したユニットが結合した分子量 (calcd. 4151.884 [M-H]⁻¹) と近い値であった (Fig. 4-7)。この事から、本光反応により ³²S-G-n3-リガンドと AP サイトアナログを有する ODN が共有結合に基づく付加体を形成した事が示された。チオウラシルとシトシンによる光環化反応と続く脱硫による付加体形成⁸¹⁾が報告されており、³²S-G-n3-リガンドにおいても同様に隣接シトシンと光環化反応を経て類似の付加体を形成した可能性が示唆される。より詳細な構造決定のために酵素加水分解による付加体の構造決定を試みたが、決定には至らなかった。

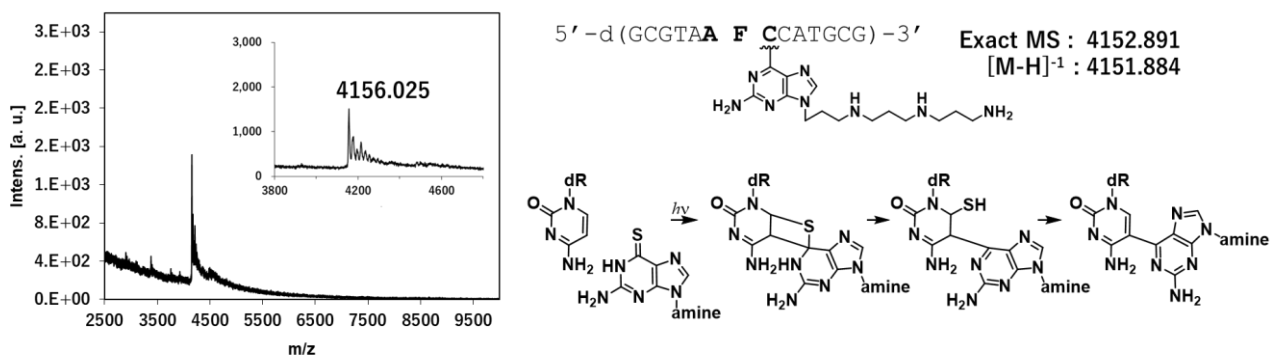


Fig. 4-7 新規ピークの MS スペクトルおよび付加体予想メカニズム

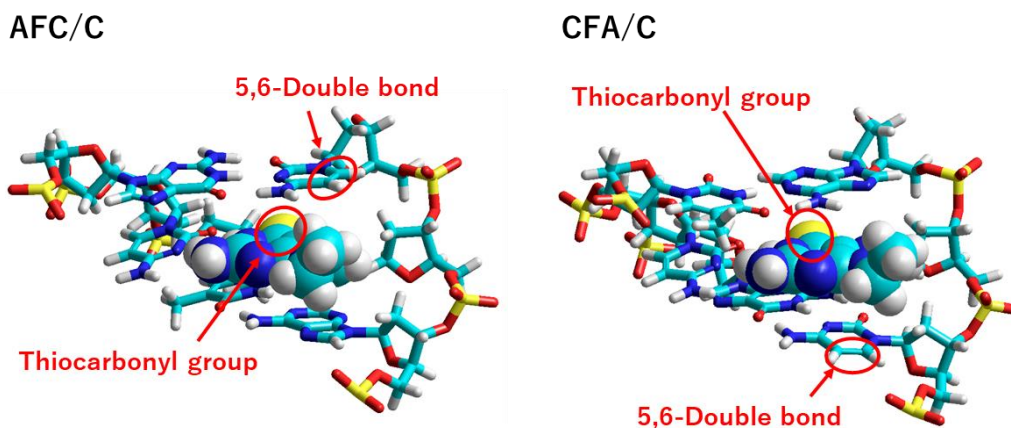


Fig. 4-8 AFC 配列における付加体形成有利の考察

AFC/C 配列に対して ³²S-G-n3-リガンドがメジャーグループ側から接近したとすると、AP サイト 3' 側に存在するシトシンの 5,6-二重結合とリガンドチオカルボニル部位が光反応に有利な位置に近接するのに対し、CFA/C 配列ではチオカルボニル部位が 5' 側シトシンの 5,6-二重結合から離れた場所に位置する。このため、本実験で用いた配列の中では THF 環の 3' 側にシトシンがある AFC 配列においてのみ

光反応が進行したのではないかと考えられる (Fig. 4-8)。これまでの AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖との光反応実験より、³²S-G-リガンドは THF 環の隣接塩基と光反応による共有結合を形成する事が示唆された。しかし、本反応には反応性の高い ³²S-G-n3-リガンドにおいても 24 時間を要し、残念ながら実際の AP サイトでは光反応付加体による AP サイト修復阻害効果は期待できないと考えられた。

第 4 節 ³²S-G-リガンドの AP サイトを有する ODN2 本鎖に対する切断および付加体形成反応

次に、³²S-G-リガンドの反応性について実際の AP サイトを用いてゲル電気泳動により評価した。配列は第 3 章 1 節で紹介した配列と同じものを使用し、第 3 章 2 節で述べた手法により目的とする ODN3-2 を得た。β-脱離反応に関して、天然核酸塩基である G-リガンドでは本配列 ODN2 本鎖における相補位置 (Y) の塩基選択性はみられず、全ての ODN2 本鎖において切断反応が進行した。³²S-G-リガンドにおいては、これらのβ-脱離反応に続く付加体形成反応を期待した。

4-1 ゲル電気泳動を用いた ³²S-G-リガンドの AP サイトに対する反応性評価

³²S-G-リガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖との反応を 5 時間まで追跡し、各時間における反応溶液をゲル電気泳動により分析した。その結果、³²S-G-n3-リガンドおよび ³²S-G-n5-リガンドのどちらにおいても、G-リガンドと同様に相補位置 (Y) の塩基によらず AP サイトの切断反応が起こり (第 3 章 4 節)、反応開始から 5 時間程度でほとんどの AP サイトを有する ODN3-2 が切断された (Fig. 4-9)。

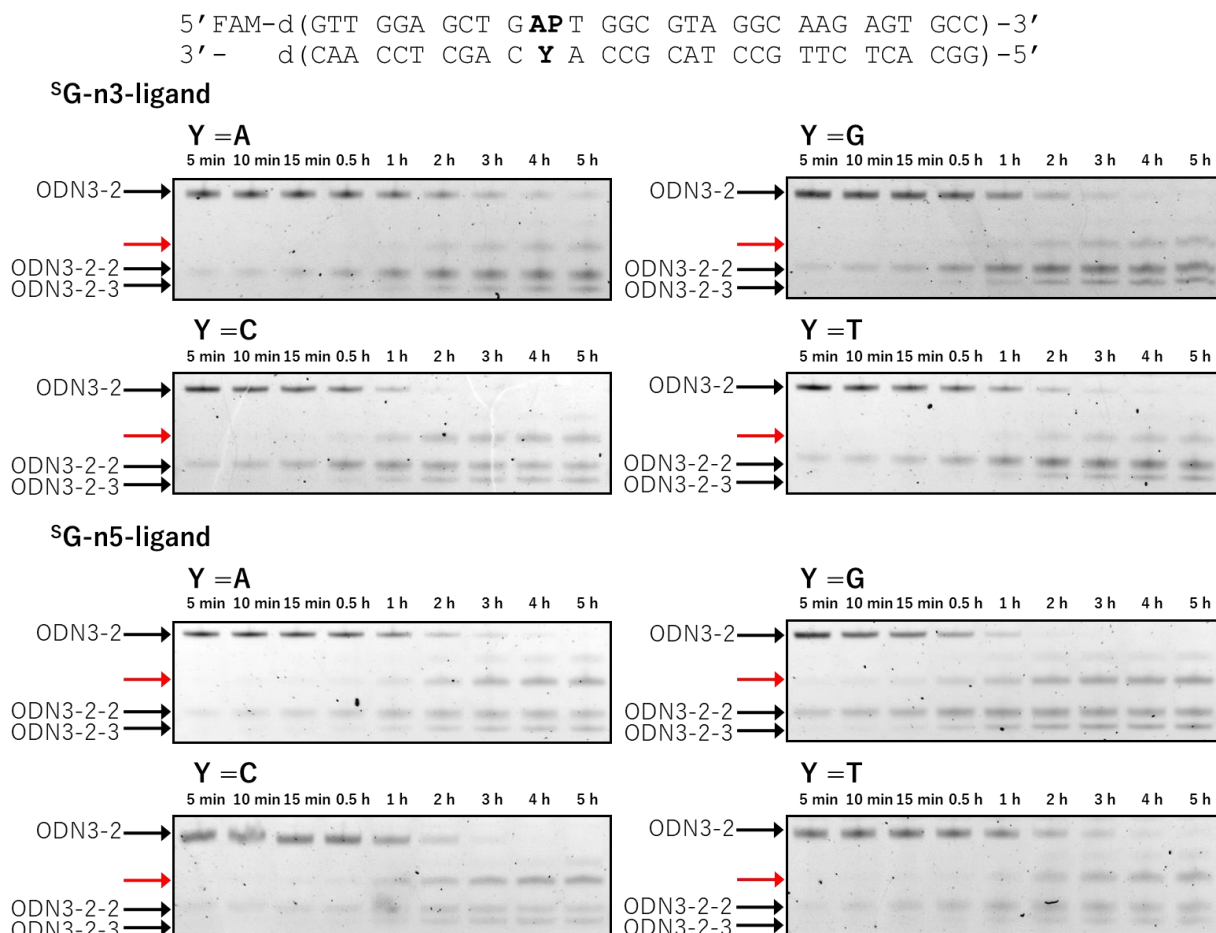


Fig. 4-9 ³²S-G-リガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖との反応

³²P-リガンドと ODN3-2 の反応では、AP サイトにおける切断により 3 つの断片が生じ、反応開始 30 分程度から確認されるバンドが AP サイトのβ-脱離断片 (ODN3-2-2) であり、続いて 1~2 時間後から観察される最も移動度の大きなバンドがδ-脱離断片 (ODN3-2-3) である。更に、δ-脱離断片と同時により移動度の小さなバンドが新たに確認され (赤矢印、Fig. 4-9)、このバンドはチオカルボニル基を持たない G-リガンドでは確認されなかった事から (Fig. 4-10)、これが ³²P-リガンドと AP サイトβ-脱離断片との付加体ではないかと予想された。

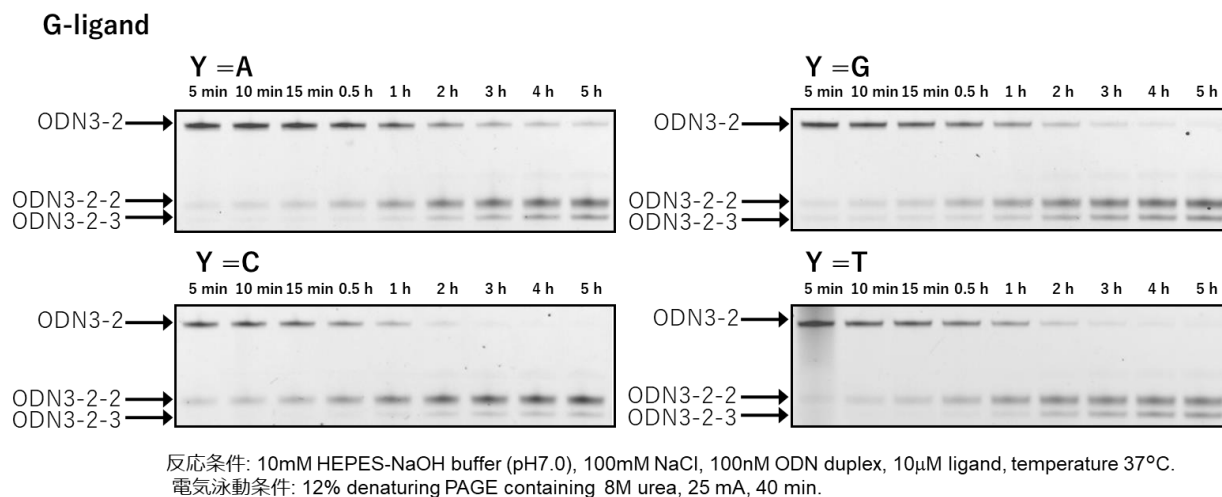


Fig. 4-10 G-リガンドにおける AP サイト切断反応

また、各バンドを定量しその比率をグラフ化した図を Fig. 4-11 および Fig. 4-12 にまとめた。これらのグラフから、新たに確認されたバンドが AP サイトのβ-脱離に続きδ-脱離反応よりも速く起こっている事が示された。³²P-n3-リガンドでは相補位置 (Y) の塩基がシトシン以外では反応後 5 時間においてβ-脱離断片 (ODN3-2-2) が最も多く生成しており、反応 2 時間程度までは増加するがその後の比率はほぼ 50~60%程度で一定となる。相補的な組み合わせである Y = C の場合には付加体と思われるバンドがβ-脱離断片の減少に伴い増加し、反応 5 時間では最も多く生成した。

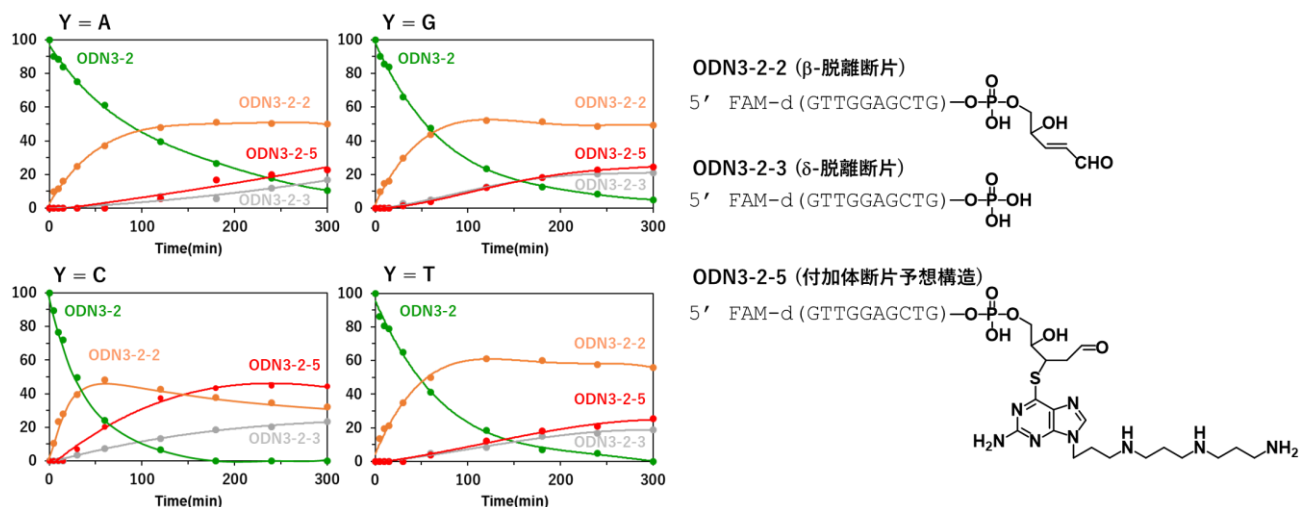


Fig. 4-11 ³²P-n3-リガンドと AP サイトβ-脱離断片との付加体断片生成および予想構造

^3S G-n5-リガンドでは付加体断片と思われるバンドは ^3S G-n3-リガンドよりも顕著に増加し、全ての配列において反応 5 時間後には生成比率が最も多くなった。特に AP サイトの相補位置 (Y) にシトシンがある配列においては β -脱離断片が蓄積する事なく付加体が形成されている事が示唆され、その相対的な比率は 70%と効率的に付加体形成反応が起こっている事が示された (Fig. 4-12)。

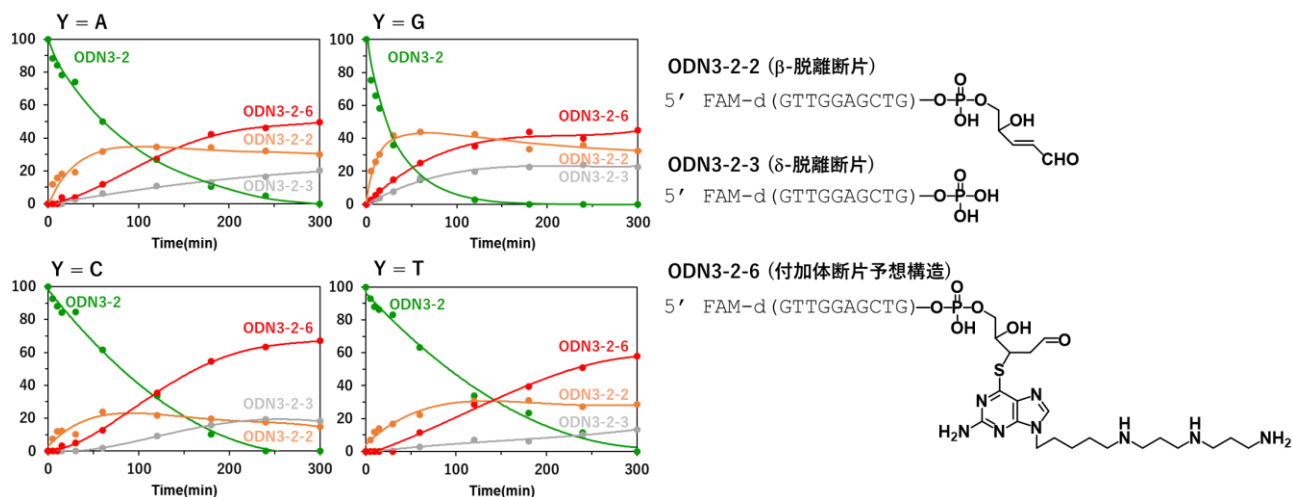


Fig. 4-12 ^3S G-n5-リガンドと AP サイト β -脱離断片との付加体断片生成および予想構造

以上の結果から、AP サイトの β -脱離反応については ^3S G-n3-リガンドと ^3S G-n5-リガンドにおいて顕著な差はないが、続く付加体形成反応においては ^3S G-n5-リガンドの方が効率よく起こっており、これは柔軟なペンチルリンカーをもつ ^3S G-n5-リガンドの方がリガンドチオカルボニル部位と AP サイト切断後の β -脱離断片末端 α,β -不飽和アルデヒドとの反応において ^3S G-n3-リガンドよりも適切な距離をとれるためではないかと考えられる。

4-2 ^3S G-リガンドと AP サイト β -脱離断片との付加体形成反応予想メカニズム

^3S G-リガンドと AP サイト β -脱離断片との付加体形成反応は、チオールと α,β -不飽和アルデヒドの付加体形成が報告されており³⁰⁾、これを基に Chart 4-1 のように起こると考えられる。 ^3S G-リガンドはまず初めに天然核酸塩基を有するリガンドと同様に、AP サイト内に挿入されたのちに核酸塩基部に最も近いアミノ基の攻撃により、AP サイトの β -脱離反応を引き起こして 2 本鎖中の AP サイト 3' 側に切れ目を入れる。次に、AP サイトの切れ目において生じた α,β -不飽和アルデヒドとチオカルボニル部位が共役付加反応を起こし、AP サイト切断断片と付加体を形成する。

^3S G-n5-リガンドは AP サイト切断およびその切断断片との付加体形成を効率的に起こす事がこれまでの実験から明らかとなった。AP サイト切断断片末端での付加体はより強固な 3' ブロックとなり AP サイト修復においてより強い修復阻害効果が期待できる。ゲル電気泳動により観察された付加体と思われるバンドから ODN の抽出と MALDI-TOF MS による構造決定を試みたが、ポリアクリルアミドゲルからの ODN の精製が難しく、MALDI-TOF MS 測定による構造決定には至らなかった。そこで、HPLC 分析により付加体ピークを単離し構造決定する事にした。

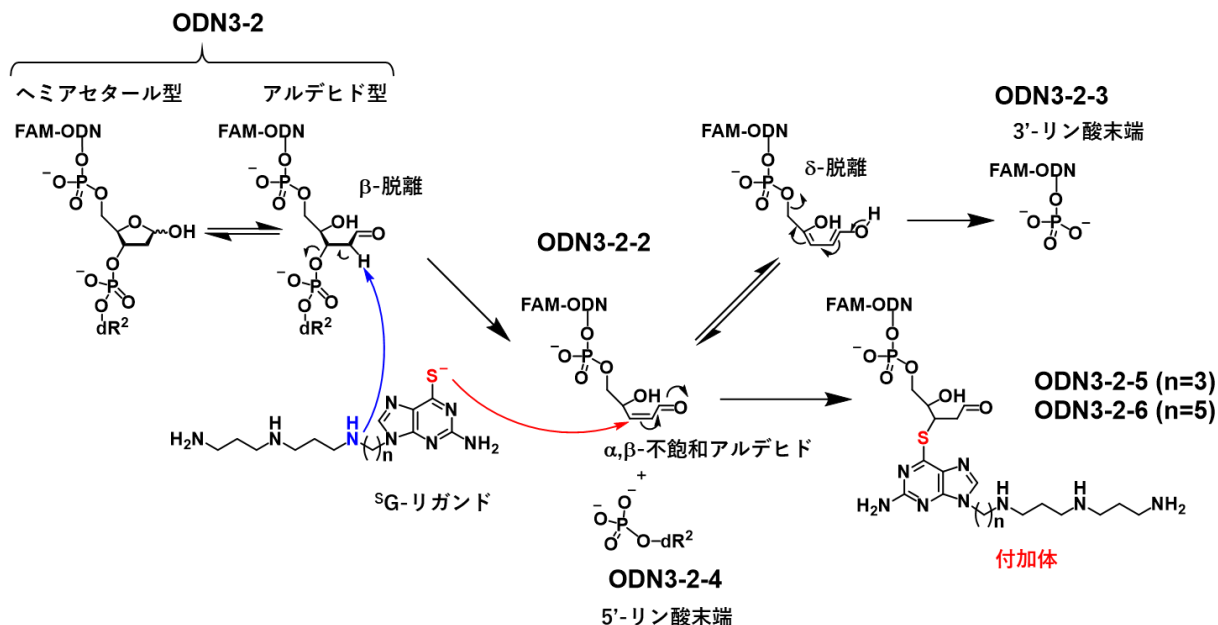


Chart 4-1 ^{35}S -リガンドにおける付加体形成反応予想メカニズム

4-3 HPLCによる ^{35}S -リガンドとAPサイトを有するODN2本鎖との反応解析

^{35}S -リガンドとAPサイトの相補位置 (Y) にシトシンを有するODN2本鎖との反応をHPLCにより追跡し、検出された各ピークを単離・精製後MALDI-TOF MS測定した。 ^{35}S -n3-リガンド、 ^{35}S -n5-リガンドおよび対照実験として行ったG-リガンドのHPLCチャートをFig. 4-13にまとめる。

^{35}S -n3-リガンドでは、反応開始0時間において観察されたODN3-2が時間とともに消失し、反応24時間後には主に3つのピークが検出された。第3章5節と同様に、最も保持時間の短い8分過ぎのピーク1がAPサイトの3'側断片(ODN3-2-4)であり、次に検出される11分前後のピーク2が相補鎖となるODN3-5、13分前後のピーク3がAPサイトの β -脱離断片(ODN3-2-2)および δ -脱離断片(ODN3-2-3)であった。HPLCからは付加体断片に由来するピークを検出できなかったが、MALDI-TOF MS測定の結果から、付加体と一致するMS (found 4150.4 (calcd. $[\text{M}-\text{H}]^{-1}$ 4149.9)) が β -および δ -脱離断片のMSと一緒にピーク3から検出された (Fig. 4-14)。

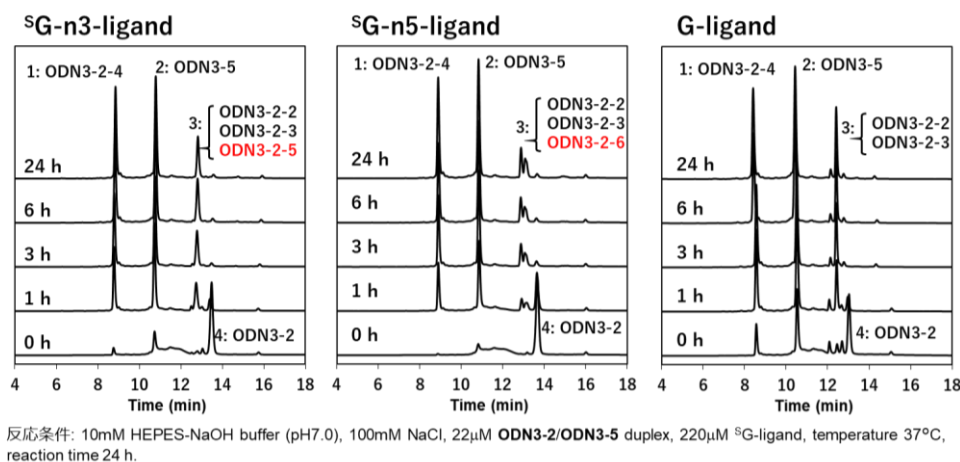


Fig. 4-13 ^{35}S -リガンドの切断反応および付加体形成反応のHPLC追跡

³²S-G-n5-リガンドでは、ピーク **3** に単離はできなかったが鋭いピークと幅広いピークの 2 つが確認された。併せて単離後 MALDI-TOF MS 測定から、³²S-G-n3-リガンドと同様に AP サイトのβ-脱離断片と ³²S-G-n5-リガンドとの付加体と一致する MS (found 4179.1 (calcd. [M-H]⁻ 4177.9)) が検出され、HPLC 分析より付加体形成の証拠を得る事ができた。一方、G-リガンドではピーク **3** の MALDI-TOF MS から AP サイトのβ-脱離断片およびδ-脱離断片の MS しか検出されず、チオカルボニル基の重要性が改めて示された。これらの結果より、ゲル電気泳動で観察された新たなバンドは ³²S-G-リガンドと AP サイトβ-脱離断片との付加体である事が示唆された。

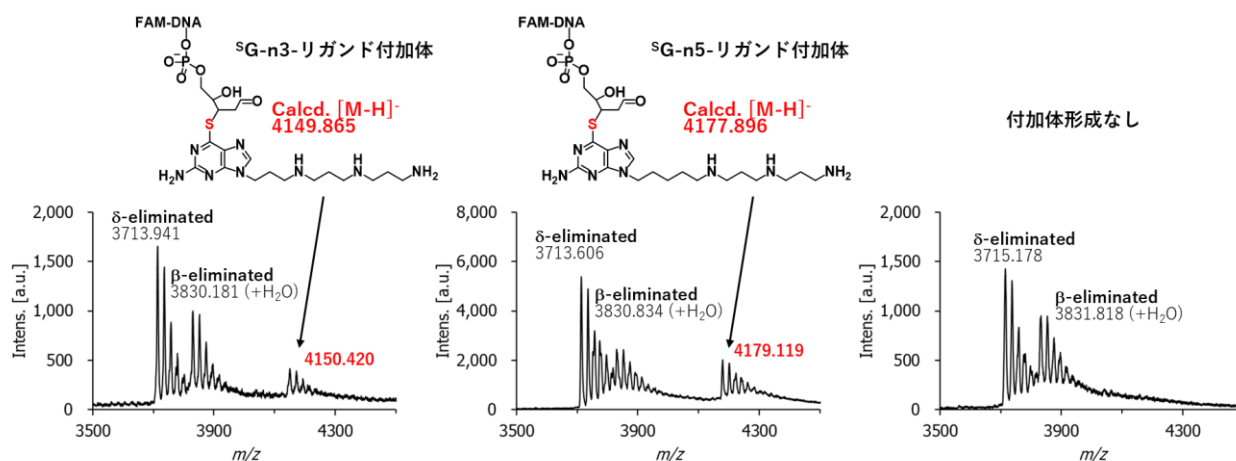


Fig. 4-14 各反応におけるピーク **3** の MS スペクトル

第 5 節 第 4 章のまとめ

第 4 章では AP サイト修復阻害剤への展開を目指し、新たにチオグアニンとポリアミンの結合体 ³²S-G-リガンドを設計・合成した。得られた ³²S-G-リガンドの AP サイトに対する安定化効果、反応性を融解温度測定やゲル電気泳動、HPLC を用いて分析し、光照射条件下ではチオグアニン部と AP サイトアナログに隣接する核酸塩基との光反応による付加体形成が確認された。更に、実際の AP サイトとの反応においても、チオグアニン部と AP サイトβ-脱離断片との付加体形成が確認され、³²S-G-リガンドによる AP サイトの結合と切断、続く共有結合形成反応に成功した。

チオグアニン部とポリアミン部を繋ぐ炭素リンカーの長さの検討から、AP サイトアナログの隣接塩基との光反応では炭素鎖が 3 つの ³²S-G-n3-リガンドの方が有利であり、AP サイト内でチオグアニン部が光反応に適した位置に固定される事が重要である事が示された。また、実際の AP サイトを用いた実験では AP サイト結合および切断に関しては炭素鎖リンカーの長さの違いによるリガンド間の差はほとんど観察されなかったが、AP サイトβ-脱離断片との反応性においては炭素数が 5 つの ³²S-G-n5-リガンドの方が有利である事が示された。これは、リガンドポリアミン部による AP サイト切断後、そのチオカルボニル部位が AP サイト切断断片末端のα,β-不飽和アルデヒドに対して攻撃しやすい構造を柔軟に取れるためだと考えられる。HPLC 分析から得られた各ピークの MALDI-TOF MS 測定より、期待した付加体構造が形成されている事が示され、AP サイトβ-脱離断片との付加体形成は、β-およびδ-脱離断片よりも強力は 3' ブロックとなると考えられ、実際の AP サイトに対して、結合、切断、付加体形成を起こす ³²S-G-リガンドの AP サイト修復阻害効果が期待された。

第5章 AP サイト修復阻害剤への展開にむけた予備検討

これまでの研究により、核酸塩基-ポリアミン結合体による AP サイトの認識と切断および付加体形成が明らかとなった。そこで次に、培養細胞を用いた細胞毒性効果の評価を行う事にした。

第1節 CHO 細胞株に対する A-および G-リガンドの細胞毒性効果

スペルミンやスペルミジン等の生体アミンは細胞の増殖因子として働き、これらのアミンを優先的に細胞内に取り込むポリアミントランスポーターの存在が報告されている⁸⁸⁾。特に活発に細胞増殖を繰り返すがん細胞では多く発現している事が示唆されており、ポリアミンの構造の違いによる取り込み効率の変化などが報告されている⁸⁹⁾⁹⁰⁾⁹¹⁾。またこれらの知見を基に、既存薬剤などに生体アミンを結合する事でがん細胞への取り込みを増加させるといった、がん細胞への薬剤の送達にポリアミントランスポーターを利用する研究も行われている⁹²⁾。これらの報告は主に CHO 細胞を用いており、実験的にポリアミントランスポーターをノックアウトした変異株などの存在も知られている。そこで、これらの報告を基に、A-および G-リガンドの細胞毒性効果をまず CHO 細胞で調べる事にした。更に、これらのリガンドの既存薬剤に対する相乗効果についても検討するために、DNA アルキル化剤との共存条件における細胞毒性効果についても調べる事にした。

CHO 培養細胞を 96 穴プレートに分注し RPMI1640 培地にて 1 晩培養した後に、RPMI1640 培地で希釈した A-および G-リガンドを終濃度が 0 から 1mM となるよう添加し、37°C で 48 時間培養した。これを MTS アッセイする事で細胞の生存率を確認し、IC₅₀ 値を算出した (Fig. 5-1)。また同様に、DNA アルキル化剤であるメチルメタンサルホン酸 (MMS) についても CHO 細胞に対する IC₅₀ 値を算出した。

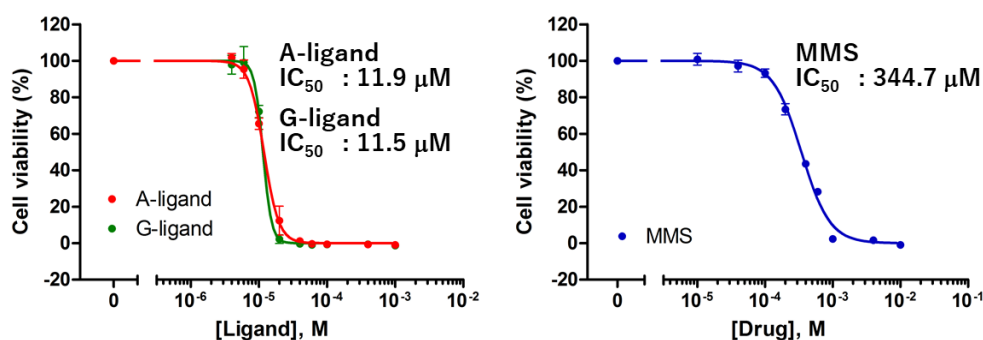


Fig. 5-1 CHO 細胞株に対する A-, G-リガンドおよび MMS の細胞毒性効果

その結果、A-および G-リガンドは CHO 細胞に対し、IC₅₀ 値が 12μM 程度であり、MMS は 345μM 程度であった。この結果と Lhomme らの報告⁶²⁾を参考に、1 μM, 5 μM および 10μM のリガンド存在下における MMS の細胞毒性効果を更に検討したところ、リガンド 1μM 存在下においてはその IC₅₀ 値に変化はなかったが、リガンド 5μM および 10μM 存在下では IC₅₀ 値がわずかに低下した (Fig. 5-2)。MMS 200μM における細胞毒性効果とリガンド 5μM, 10μM における細胞毒性効果および併用時の細胞毒性効果を比較すると、A-リガンド 5μM では顕著な相乗効果は観察されなかったものの、A-リガンド 10μM、G-リガンド 5μM, 10μM 条件では併用時の細胞毒性効果はそれぞれの単独時における細胞毒性効果の単なる足し合わせではなく、わずかながら相乗効果が観察された。

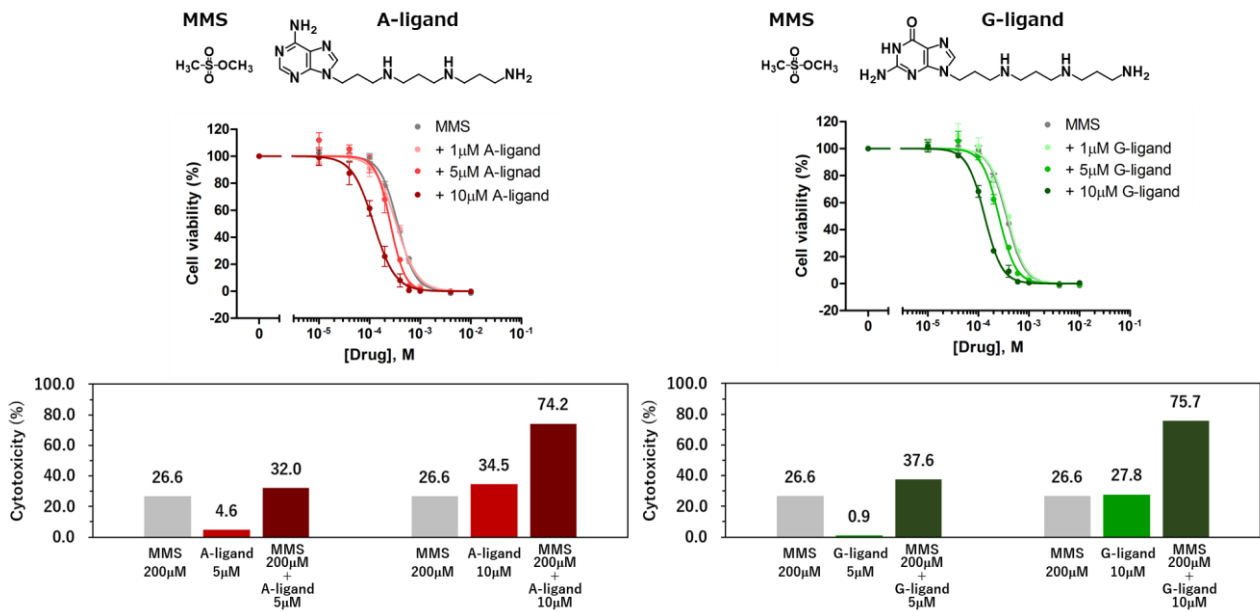


Fig. 5-2 CHO 細胞株に対する A-, G-リガンドと MMS の相乗効果

DNA アルキル化剤である MMS はアデニンやグアニンのアルキル化により AP サイトを生成する事が報告されているが⁹³⁾、AP サイトの生成とリガンドの AP サイト認識および切断等の効果についてはより詳細な検討が必要であり、今回の実験からは相乗効果はわずかに得られたものの、AP サイトとの関連性は明らかではない。

第 2 節 A549 細胞株に対する A-および G-リガンドの細胞毒性効果

CHO 細胞株の結果を受け、同様の実験を A549 細胞においても行った。A549 細胞はヒト肺がん細胞由来であり、ポリアミントランスポーターの存在も示唆されているが明確ではない。まず、A549 細胞に対する A-, G-リガンドおよび MMS の細胞毒性効果をそれぞれ MTS アッセイより IC₅₀ 値として算出した。その結果、A549 細胞では CHO 細胞に比べ毒性効果が低く、A-リガンドおよび G-リガンドの IC₅₀ 値はそれぞれ 163μM、117.9μM となり、MMS は 413.3μM となった (Fig. 5-3)。

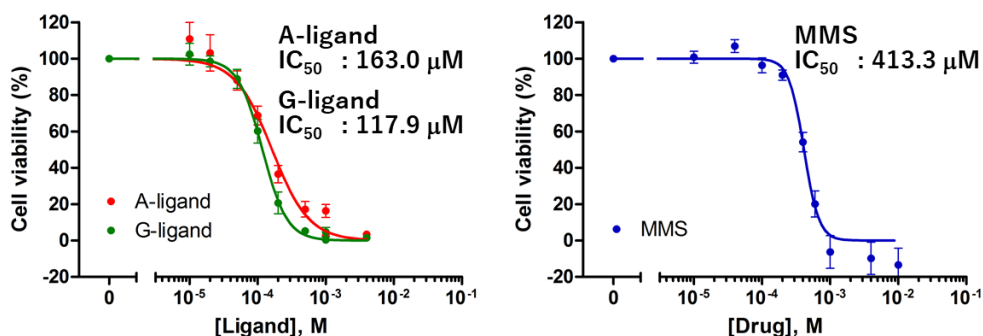


Fig. 5-3 A549 細胞株に対する A-, G-リガンドおよび MMS の細胞毒性効果

この結果を基に、A549 細胞では各リガンドの濃度を 10μM、50μM および 100μM として MMS との併用における細胞毒性効果を検討し、MMS の細胞毒性効果が CHO 細胞と同様に 25%程度となる MMS

400 μ Mにおいてリガンド濃度が10 μ M, 50 μ Mの時にわずかな相乗効果とともに細胞毒性効果の増強が観察された (Fig. 5-4)。しかし、A549細胞では値のばらつきが大きく、リガンド濃度が100 μ Mとなると、細胞毒性効果が50 μ Mよりも低下するなど、良好な結果が得られなかった。

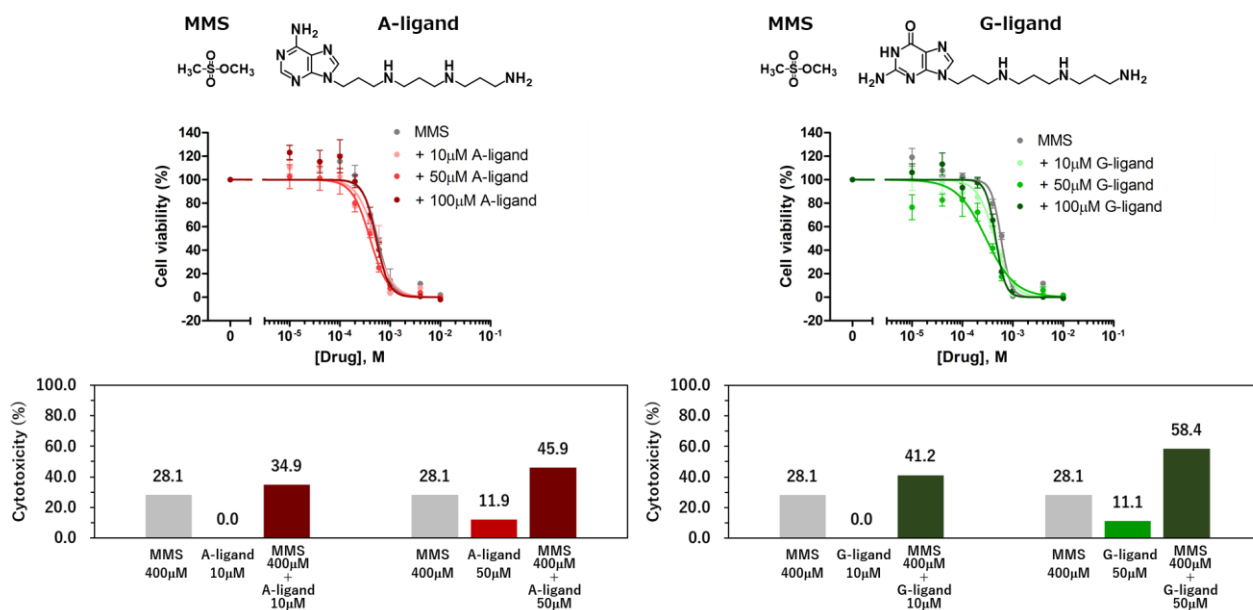


Fig. 5-3 A549細胞株に対するA-, G-リガンドおよびMMSの細胞毒性効果

以上の結果から、A-およびG-リガンドはA549細胞に対しては顕著な細胞毒性効果を示さなかったが、CHO細胞と同様にわずかな相乗効果が観察され、リガンドによる細胞毒性効果増強について基礎となる知見が得られた。CHO細胞におけるIC₅₀値はA549細胞と比較して10倍程度高い値であったが、これにポリアミントランスポーターが関与しているかはより詳細な検討が必要になる。

結論

本研究では、代表的な DNA 損傷のひとつとして知られる AP サイトについて、その化学的性質に基づく特異的分子を開発し、複雑な塩基除去修復機構に対する理解を深めるツールとするとともに、AP サイトの修復機構に干渉する事で細胞毒性を発揮する AP サイト修復阻害剤への展開を目指した。

1. 種々の核酸塩基-ポリアミン結合体リガンドを合成し、これらを用いて AP サイト認識における相補塩基および隣接塩基の影響を明らかにした。AP サイトは隣接塩基の影響により局所的に多様な高次構造をとり、隣接塩基にプリン塩基、特にグアニン塩基が存在する場合は、AP サイト内でのリガンドと相補塩基との水素結合による認識に非特異的なスタッキング相互作用が加わり、AP サイトを有する ODN2 本鎖の安定化効果における各リガンドの塩基選択性は顕著ではなかった。しかし、AP サイトの隣接塩基が両方ともシトシンである配列を用いる事で各リガンド核酸塩基部の水素結合による AP サイト認識の効果を確かめる事ができた。AP サイトの隣接塩基が両方ともシトシンである配列は最も高次構造に対する隣接塩基の影響が少ないと考えられ、これらの配列を用いて更に種々の測定をする事で、リガンド核酸塩基部と AP サイトの相補位置の塩基との相互作用を解析する事ができた。これにより、相対的にプリン塩基を有するリガンドの方がピリミジン塩基を有するリガンドよりも AP サイトに対する結合が強く、更に、G/C 塩基対を形成する組み合わせの方が A/T 塩基対を形成する組み合わせよりも結合が強いという結果が得られ、AP サイト内における各リガンドの水素結合様式は一般的な Watson-Crick 型に基づいている事が示された。
2. また CD 測定の結果から、AP サイトを有する ODN2 本鎖の高次構造は B 型構造を維持しており、リガンドは高次構造を大きく変化させる事なく AP サイトに結合する事が示された。しかし、AP サイト近傍での局所的な高次構造は隣接塩基および相補塩基の影響により変化していると考えられ、各リガンドは AP サイト内での自由度が異なると考えられた。ピリミジン塩基を有するリガンドではその自由度が大きく、このため Watson-Crick 型のみならず Hoogsteen 型や Wobble 型などの様々な塩基対形成が可能であり、配列によって AP サイト認識における塩基選択性が変化する事が示された。
3. 更に、SPR, ITC により親和性および熱力学パラメーターを算出し、各リガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖との相互作用をより詳細に調べた。その結果、各リガンドと AP サイトの結合には、水素結合、スタッキング相互作用等による熱的安定性の増加、および AP サイトを有する ODN2 本鎖にリガンドが結合した事に伴う高次構造の固定化、すなわち柔軟性の低下が寄与している事が示された。各リガンドと AP サイトの結合に伴う自由エネルギー差は 7~8 kcal/mol であり、リガンド核酸塩基部により欠失した 1 塩基のエネルギーが補われたと考えられる。しかし、その親和性は $10^5 \sim 10^6 \text{M}^{-1}$ 程度であり、今後の展開においては結合親和性の向上が課題と考えられた。
4. これまでの AP サイトアナログを用いた研究成果を基に、各リガンドの実際の AP サイトに対する反応性をゲル電気泳動および HPLC 分析から明らかにした。AP サイトは 3 つの平衡状態で存在しており、なかでもアルデヒド型 AP サイトはポリアミンにより β -脱離反応を受ける事が知られている。各リガンドにおいても核酸塩基部の AP サイトへの挿入とともに塩基選択的な β -脱離反応による AP サイト切断が起こると考えた。その結果、プリン塩基を有するリガンドで高い β -脱離反応性が示され、A-リガンドでは期待通り AP サイトの相補位置の塩基がチミンの時にのみ β -脱離反応が顕著に進行し、G-リガ

ンドでは AP サイトの相補位置の塩基がアデニン、グアニン、シトシン、チミンのいずれにおいても高い β -脱離反応性を示した。これはグアニンのもつ高い水素結合能およびスタッキング相互作用に起因すると考えられる。一方、ピリミジン塩基を有するリガンドでは AP サイトに対する β -脱離反応性が低く、核酸塩基部の AP サイトへの結合が弱いためにポリアミン部のアミノ基が AP サイトに近接できず求核反応が効率的に起こらなかったと考えられた。これらの結果から、核酸塩基-ポリアミン結合体による β -脱離反応性には AP サイトへの結合親和性だけでなく結合後の AP サイト近傍の高次構造の固定化が重要である事が示された。

5. 各リガンドの β -脱離反応が APE1 の AP サイト切断に与える影響についても検討したが、どのリガンドにおいても APE1 の AP サイト切断に対する阻害効果は低く、高い β -脱離反応性を示していたプリン塩基を有するリガンドにおいても過剰量のリガンド存在下でないと競合阻害効果は示されなかった。しかし、プリン塩基を有するリガンド、特に G-リガンドでは高い結合性と β -脱離反応性が示されており、生じる β -脱離断片は 3´ブロックとなる事から、グアニン-ポリアミン結合体の基本構造は AP サイト修復においてその修復過程を遅延または阻害する可能性がある事が示された。そこで予備検討として 2 種の培養細胞を用いて A-および G-リガンドの細胞毒性効果を明らかにした。残念ながら顕著な細胞毒性効果は得られなかったが、今後の研究において基礎となる結果が得られた。

6. ここまでの研究成果として、核酸塩基-ポリアミン結合体の AP サイトに対する結合および切断の詳細を明らかにする事で、AP サイト修復阻害剤への展開において重要となる親和性および反応性向上を目的とした構造最適化における知見を得る事ができた。これを基にグアニン-ポリアミン結合体を基本骨格とした新たな分子を開発するに至った。チオグアニンとポリアミンの結合体である S G-リガンドはチオカルボニル部位における光反応および共役付加反応により AP サイトとの共有結合形成可能なりガンドとして設計し、その反応性を調べた結果、光反応および共役付加反応のどちらにおいても共有結合形成すなわち S G-リガンドと AP サイトを有する ODN との付加体形成が確認された。光反応による付加体形成では、反応に長時間を要するため、AP サイトの修復阻害剤への展開においては更なる構造の最適化が必要だと考えられるが、チオカルボニル部位における共役付加反応はチオグアニン骨格による AP サイト認識、ポリアミン部による β -脱離反応に引き続き効率よく起こる事が示され、AP サイト修復阻害剤への展開において期待が持たれた。

以上、本研究では AP サイト認識における最もシンプルな構造として、核酸塩基-ポリアミン結合体を設計し、AP サイト疎水空間における一般的な塩基対形成が成り立つ事を示し、水素結合やスタッキング相互作用の重要性および塩基選択性について詳細を明らかにした。また、その AP サイトに対する反応性についても詳細を明らかにし、これらの研究から、核酸塩基誘導体を基にした AP サイト修復阻害剤への展開において基礎となる知見が得られた。得られた情報を基に新たに設計した S G-リガンドでは AP サイト結合と切断に続く付加体形成が示され、この付加体は AP サイト修復における強力な 3´ブロックとなる事が期待される。

近年 AP サイト修復系とがん疾患との関わりや AP サイト修復阻害に基づく抗がん剤の開発などが改めて注目を集めており、本研究により得られた AP サイト認識における基礎的な化学的性質および反応性とそれに基づく展開が核酸研究および新薬開発分野に貢献する事を期待する。

謝辞

本研究の遂行に際して、御指導と御助言を賜りました、九州大学大学院薬学研究院 生物有機合成化学分野 佐々木 茂貴教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究に際して数々の御助言を頂きました九州大学大学院薬学研究院 生物有機化学分野 谷口 陽祐准教授および麻生 真理子准教授に深く感謝いたします。

本研究に際して御助力頂いた大阪大学大学院薬学研究科 中川 治特任講師、九州大学大学院薬学府 山口 莉慧修士に心より感謝致します。

本研究に際して所有する SPR を利用させて頂いた九州大学医学研究院 教育支援センターに深く感謝致します。

本研究に際して所有する ITC を利用させて頂いた九州大学生体防御医学研究所 構造生物学分野 神田 大輔教授に深く感謝致します。同様に ITC を利用させて頂いた東京工業大学 生命理工学研究科 丸山 厚教授に深く感謝いたします。

NMR スペクトル測定においてご助力頂いた九州大学大学院薬学研究院 測定機器室の関 多恵美氏に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、経済的援助を頂いた独立行政法人 日本学術振興会に深く感謝致します。

更に、御助言と御助力を頂いた九州大学大学院薬学府 生物有機化学分野の卒業生、在学生の皆様に深く感謝致します。

最後に、研究生生活を理解し支えて下さった家族に心より深く感謝致します。

実験の部

融点は Stuart Scientific MELTING POINT APPARATUS SMP3 にて測定し、未補正である。IR スペクトルは PerkinElmer SpectrromOne フーリエ変換赤外分光分析装置にて測定した。¹H-NMR スペクトルは Varian Unity 400 (400 MHz)、Bruker Ascend 500 (500 MHz) 核磁気共鳴装置にて、各種溶媒のピークを基準に測定した。¹³C-NMR スペクトルは Varian Inova 500 (125 MHz)、Bruker Ascend 500 (125 MHz) 核磁気共鳴装置にて、各種溶媒のピークおよび外部標準として DSS を基準に測定した。³¹P-NMR スペクトルは 10%リン酸重水溶液 (0.00 ppm) を外部標準とし、Varian Unity 400 (161 MHz)、Bruker Ascend 500 (202 MHz) 核磁気共鳴装置にて測定した。低分解能 ESI-MS、高分解能 ESI-MS は Applied Biosystems Mariner Biospectrometry Workstation 質量分析計にて測定した。高分解能 ESI-MS では内部標準物質として、Physalaemin、Neurotensin、Angiotensin I、Bradykinin および Nicotinic acid のうち二種類を選んで用いた。MALDI-TOF MS は BRUKER DALTONICS microflex-KS Linear 質量分析計にて測定した。マトリックスには 3-ヒドロキシピコリン酸の水/アセトニトリル = 1/1 溶液に 10%クエン酸水素二アンモニウム水溶液を 10 : 1 の比率で加えたものを用いた。UV/VIS スペクトルは BECKMAN COULTER DU800 にて測定した。CD スペクトルは JASCO Spectrolarimeter J-720W にて測定した。溶液の pH は METTLER TOLETO MP220 にて測定した。反応の追跡は MERCK TLC プレート ⁶⁰F₂₅₄ にて行い、カラムクロマトグラフィーは関東化学 Silicagel 60N または富士ゲル FL-60D を充填剤として使用した。フラッシュカラムクロマトグラフィーには YAMAZEN AI0580S を用い、精製カートリッジとして Biotage ZIP™ (10g, 30g, 45g, 120g) を使用した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、JASCO LC-2000PLUS シリーズ (4 溶媒低圧グラジェントポンプ: PU-2089Plus、紫外可視検出器: UV-2075Plus、カラムオープン: CO-2065Plus) を主に使用した。蛍光検出には FP-920 を使用した。カラムは Waters X Bridge C18 3.5 μm (4.6×150 mm)、SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MG (4.6×250 mm) を分析用に、nacalai tesque COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (10×250 mm) を精製用にそれぞれ用いた。DNA/RNA 自動合成装置は Applied Biosystems 394 DNA/RNA Syntesizer および NTS H-Series DNA/RNA Synthesizer を使用した。ODN の透析には半透膜 Funakoshi 製 SelluSep H1 (MWCO: 1000) を用いた。光反応は FUNAKOSHI 4W ハンディ型 UV ランプ UVGL-25 の LONG WAVE (365 nm) にて行った。電気泳動装置は BIO CRAFT Real Power Model BP-3 を使用し、バンドのイメージングには FUJIFILM luminoimage analyzer LAS-4000 を用いた。反応の温度コントロールには、EYELA MG-2200 またはサーマルサイクラー Gene Atras を使用した。SPR 測定は GE Biacore 3000 にて行った。ITC 測定は MicroCal VP-ITC microcalorimeter を使用した。実験に用いた一部のオリゴ DNA は日本バイオサービス、ジーンネットから購入し、酵素は NEW ENGLAND BioLabs から購入した。

略語表

AP: Alkaline Phosphatase
APE1: Apurinic/aprimidinic Endonuclease 1
BAP: Bacterial Alkaline Phosphatase
Boc: tert-Butoxycarbonyl
BPB: Bromo Phenol Blue
CD: Circular Dichroism
CHO: Chinese Hamster Ovary
¹³C-NMR: ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance
CPG: Controlled Pore Glass
DIPEA: Diisopropylethylamine
DMF: *N,N*-dimethylformamide
DMSO: Dimethyl Sulfoxide
DMTr: Dimethoxytrityl
DTT: Dithiothreitol
ECACC: European Collection of Cell Cultures
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI: Electrospray Ionization
FAM: Carboxyfluorescein
HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
¹H-NMR: ¹H-Nuclear Magnetic Resonance
IR: Infrared Spectroscopy
ITC: Isothermal Titration Calorimetry
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
mp: melting point
Ns: 2-Nitrobenzenesulfonyl
ODN: Oligodeoxynucleotide
SPR: Surface Plasmon Resonance
TEAA: Triethylammonium acetate
THF: Tetrahydrofuran
T_m: Thermal melting point
TOF MS: Time of Flight Mass Spectrometer
UV: Ultraviolet
VPDE: Snake Venom Phosphodiesterase
XC: Xylene Cyanol

化合物の合成

tert-butyl 3-((3-aminopropyl)amino)propyl carbamate (2-1)

アルゴン気流下、0°Cにて、3,3'-ジアミノジプロピルアミン (12.1 ml, 86 mmol) の無水 THF (90 ml) 溶液にジ-*tert*-ブチルジカルボナート (4.60 ml, 20 mmol) の無水 THF (60 ml) 溶液を2時間以上かけて滴下し、0°Cで一晩攪拌した。過剰の THF 溶液を減圧下留去後、残渣に10%炭酸ナトリウム水溶液 (50 ml) を加え、ジクロロメタン (80 ml×3) で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (10.7 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, ジクロロメタン : メタノール : 28%アンモニア水 = 40 : 8 : 1 → 10 : 4 : 1) にて精製し、**2-1** (3.45 g, 14.9 mmol, 75%) を淡黄色のカラメル状物質として得た。

tert-butyl 3-((4-nitro-*N*-(3-((4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)phenyl)sulfonamido)propyl)-carbamate (2-2)

アルゴン気流下、0°Cにて、無水アセトニトリル (5 ml×3) で共沸した **2-1** (3.40 g, 14.7 mmol) の無水ジクロロメタン (25 ml) 溶液にトリエチルアミン (10.2 ml, 73.5 mmol) と2-ニトロベンゼンスルホンクロリド (6.80 g, 30.9 mmol) を加え0°Cで攪拌した。1時間後、反応溶液をジクロロメタン (80 ml) で希釈し、1M 硫酸水素カリウム水溶液 (80 ml)、飽和炭酸水素ナトリウム (80 ml)、飽和食塩水 (60 ml) で洗浄した。合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール = 80 : 1 → 50 : 1) にて精製し、**2-2** (8.32 g, 13.8 mmol, 94%) を淡黄色の泡状物質として得た。

tert-butyl 3-((*N*-(3-((*N*-(3-bromopropyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)-4-nitrophenyl)-sulfonamido)propyl)carbamate (2-3)

アルゴン気流下、0°Cにて、無水アセトニトリル (5 ml×3) で共沸した **2-2** (8.30 g, 13.8 mmol) の無水 DMF (25 ml) 溶液に炭酸カリウム (9.53 g, 69 mmol) と1,3-ジブロモプロパン (7.0 ml, 69 mmol) を加え室温で攪拌した。2時間半後、反応溶液に水 (100 ml) を加え、エーテル (200 ml×2) で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (18.3 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : 酢酸エチル = 20 : 1 → 15 : 1 → 10 : 1) にて精製し、**2-3** (9.23 g, 12.8 mmol, 93%) を淡黄色のカラメル状物質として得た。

tert-butyl 3-((*N*-(3-((*N*-(3-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)propyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (2-4-1)

アルゴン気流下、0°Cにて、無水アセトニトリル (4 ml×3) で共沸した **2-3** (4.49 g, 6.22 mmol) の無水 DMF (6.5 ml) 溶液に炭酸カリウム (2.15 g, 15.5 mmol) とアデニン (700 mg, 5.18 mmol) を加え50~60°Cに昇温し攪拌した。3時間半後、反応溶液に水 (100 ml) を加え、クロロホルム (50 ml×3) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (60 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (5.97 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (富士シリシア FL-60D,

クロロホルム：メタノール = 60 : 1 → 20 : 1) にて精製し、**2-4-1** (2.84 g, 3.65 mmol, 71%) を白色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(3-((*N*-(3-(2-amino-6-chloro-9*H*-purin-9-yl)propyl)-4-nitrophenyl)-sulfonamido)propyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (2-4-2)**

アルゴン気流下、0°C にて、無水アセトニトリル (4 ml×3) で共沸した **2-3** (4.09 g, 5.66 mmol) の無水 DMF (5.9 ml) 溶液に炭酸カリウム (1.96 g, 14.2 mmol) と 2-アミノ-6-クロロプリン (800 mg, 4.72 mmol) を加え 50~60°C に昇温し攪拌した。1 時間半後、反応溶液に水 (120 ml) を加え、クロロホルム (70 ml×3) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (60 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (4.67 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (富士シリシア FL-60D, クロロホルム：メタノール = 60 : 1) にて精製し、**2-4-2** (2.57 g, 3.17 mmol, 67%) を白色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(3-((*N*-(3-(4-acetamido-2-oxopyrimidin-1(2*H*)-yl)propyl)-4-nitrophenyl)-sulfonamido)propyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (2-4-3)**

アルゴン気流下、0°C にて、無水アセトニトリル (1.5 ml×3) で共沸した **2-3** (1.30 g, 1.80 mmol) の無水 DMF (2.5 ml) 溶液に炭酸カリウム (588 mg, 4.25 mmol) と *N*4-アセチルシトシン (636 mg, 4.14 mmol) を加え 50~60°C に昇温し攪拌した。6 日後、反応溶液に水 (50 ml) を加え、クロロホルム (30 ml×3) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (30 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (2.22 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60D, クロロホルム：メタノール = 40 : 1 → 20 : 1) にて精製し、**2-4-3** (806 mg, 1.01 mmol, 56%) を白色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(3-((*N*-(3-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)propyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (2-4-4)**

アルゴン気流下、0°C にて、無水アセトニトリル (1.5 ml×3) で共沸した **2-3** (1.04 g, 1.43 mmol) の無水 DMF (1.5 ml) 溶液に炭酸カリウム (792 mg, 5.73 mmol) と *N*3-ベンゾイルチミン (495 mg, 2.15 mmol) を加え 50~60°C に昇温し攪拌した。6 日後、反応溶液に水 (50 ml) を加え、クロロホルム (30 ml×3) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (30 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (1.55 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60D, クロロホルム：メタノール = 60 : 1 → 40 : 1) にて精製し、**2-4-4** (748 mg, 0.97 mmol, 68%) を淡黄色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(3-((*N*-(3-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)propyl)-4-nitrophenyl)-sulfonamido)propyl)-4-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)carbamate (2-4-5)**

アルゴン気流下、0°C にて、無水アセトニトリル (1.5 ml×3) で共沸した **2-3** (1.02 g, 1.41 mmol) の無水 DMF (5 ml) 溶液に炭酸カリウム (763 mg, 5.52 mmol) と *N*3-ベンゾイルウラシル (448 mg, 2.07 mmol) を加え 80°C に昇温し攪拌した。4 日後、反応溶液に水 (50 ml) を加え、クロロホルム (50 ml

×3) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (1.75 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60D, クロロホルム : メタノール = 100 : 1 → 40 : 1) にて精製し、**2-4-4** (769 mg, 1.02 mmol, 73%) を淡黄色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((3-((3-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)propyl)amino)propyl)amino)propyl)carbamate (2-5-1)**

アルゴン気流下、室温にて、無水アセトニトリル (4 ml) で共沸した **2-4-1** (2.83 g, 3.64 mmol) の無水 DMF (5.0 ml) 溶液に炭酸カリウム (1.51 g, 10.9 mmol) とチオフェノール (822 μ l, 8.01 mmol) を加え 40°C で攪拌した。3 時間後、反応溶液をクロロホルム (50 ml) で希釈し、10%炭酸ナトリウム水溶液 (50ml)、飽和食塩水 (60 ml) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (8.60 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 90 : 10 : 1 → 20 : 8 : 1) にて精製し、**2-5-1** (1.40 g, 3.43 mmol, 94%) を無色のカラメル状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((3-((3-(2-amino-6-(phenylthio)-9*H*-purin-9-yl)propyl)amino)propyl)amino)propyl)carbamate (2-5-2)**

アルゴン気流下、室温にて、無水アセトニトリル (4 ml) で共沸した **2-4-2** (2.56 g, 3.16 mmol) の無水 DMF (5.0 ml) 溶液に炭酸カリウム (1.31 g, 9.46 mmol) とチオフェノール (713 μ l, 6.94 mmol) を加え 40°C で攪拌した。3 時間後、反応溶液をクロロホルム (70 ml) で希釈し、10%炭酸ナトリウム水溶液 (60ml)、飽和食塩水 (80 ml) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (8.24 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 90 : 10 : 1 → 20 : 8 : 1) にて精製し、**2-5-2** (1.43 g, 2.78 mmol, 88%) を無色のカラメル状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((3-((3-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2*H*)-yl)propyl)amino)propyl)amino)propyl)carbamate (2-5-3)**

アルゴン気流下、室温にて、無水アセトニトリル (1 ml×3) で共沸した **2-4-3** (800 mg, 1.01 mmol) の無水 DMF (1.5 ml) 溶液に炭酸カリウム (695 mg, 5.03 mmol) とチオフェノール (227 μ l, 2.21 mmol) を加え室温で攪拌した。3 時間半後、反応溶液にメタノールを加えガラスフィルターで濾過後、ろ液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒留去し粗生成物 (1.27 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (富士シリシア FL-60D, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 20 : 8 : 1 → 10 : 4 : 1) にて精製し、**2-5-3** (364 mg, 0.952 mmol, 95%) を無色のカラメル状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((3-((3-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)propyl)amino)propyl)amino)propyl)carbamate (2-5-4)**

アルゴン気流下、室温にて、無水アセトニトリル (1.5 ml×3) で共沸した **2-4-4** (738 mg, 0.96 mmol) の無水 DMF (1.5 ml) 溶液に炭酸カリウム (664 mg, 4.80 mmol) とチオフェノール (217 μ l, 2.11

mmol) を加え室温で攪拌した。11 時間半後、反応溶液にメタノールを加えガラスフィルターで濾過後、ろ液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒留去し粗生成物 (1.71 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール = 2 : 1 → 1 : 1 → クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 20 : 8 : 1) にて精製し、**2-5-4** (376 mg, 0.945 mmol, 98%) を無色のカラメル状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((3-((3-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)propyl)amino)propyl)amino)propyl)-carbamate (2-5-5)**

アルゴン気流下、室温にて、無水アセトニトリル (1 ml×3) で共沸した **2-4-5** (240 mg, 0.32 mmol) の無水 DMF (700 μl) 溶液に炭酸カリウム (177 mg, 1.28 mmol) とチオフェノール (70 μl, 0.70 mmol) を加え室温で攪拌した。4 時間後、反応溶液にメタノールを加えガラスフィルターで濾過後、ろ液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒留去し粗生成物 (523 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (富士シリシア FL-60D, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 40 : 8 : 1) にて精製し、**2-5-5** (128 mg, quant.) を無色のカラメル状物質として得た。

***N*1-(3-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)propyl)-*N*3-(3-aminopropyl)propane-1,3-diamine (2-6-1)**

2-5-1 (1.75 g, <3.64 mmol) に 0.5M 塩酸メタノール溶液を加え、室温で攪拌した。6 日後、生じた白色の沈殿物を冷塩酸メタノールで洗浄し、粗生成物を得た。これを水 (3 ml) に溶解し、-78°C に冷却したエタノール (45 ml) へ 0.45 μm フィルターを通して滴下した。得られた沈殿を 10 分間遠心 (1500 rpm) しデカントで回収後、真空乾燥にて **2-6-1** (1.12 g, 2.47 mmol, 68%) を白色固体の 4 塩酸塩として得た。

2-amino-9-(3-((3-((3-aminopropyl)amino)propyl)amino)propyl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one (2-6-2)

2-5-2 (1.43 g, <2.88 mmol) に 0.5M 塩酸メタノール溶液 (9 ml) を加え、室温で攪拌した。3 日後、35% 塩酸水溶液 (1.3 ml) を加え、50°C に昇温後更に 3 日間攪拌した。生じた白色の沈殿物を冷塩酸メタノールとクロロホルムで洗浄し、粗生成物 (1.06 g) を得た。これを水 (2 ml) に溶解し、-78°C に冷却したエタノール (40 ml) へ 0.45 μm フィルターを通して滴下した。得られた沈殿を 10 分間遠心 (1500 rpm) しデカントで回収後、真空乾燥にて **2-6-2** (1.02 g, 2.18 mmol, 76%) を白色固体の 4 塩酸塩として得た。

4-amino-1-(3-((3-((3-aminopropyl)amino)propyl)amino)propyl)pyrimidin-2(1*H*)-one (2-6-3)

2-5-3 (364 mg, 0.952 mmol) に 0.5M 塩酸メタノール溶液 (30 ml) を加え、室温で攪拌した。2 日後、反応溶液をリービッヒ冷却器で除去し、粗生成物 (362 mg) を得た。これを水 (1.5 ml) に溶解し、-78°C に冷却したエタノール (40 ml) へ 0.45 μm フィルターを通して滴下した。得られた沈殿を 10 分間遠心 (1500 rpm) しデカントで回収後、真空乾燥を行った。再沈殿操作を 2 回行い、**2-6-3** (291 mg, 0.680 mmol, 71%) を白色固体の 4 塩酸塩として得た。

1-(3-((3-((3-aminopropyl)amino)propyl)amino)propyl)-5-methylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (2-6-4)
2-5-4 (376 mg, 0.945 mmol) に 0.5M 塩酸メタノール溶液 (28 ml) を加え、室温で攪拌した。1 日後、反応溶液をリービッヒ冷却器で除去し、粗生成物 (361 mg) を得た。これを水 (3 ml) に溶解し、-78°C に冷却したエタノール (40 ml) へ 0.45 μm フィルターを通して滴下した。得られた沈殿を 10 分間遠心 (1500 rpm) シデカントで回収後、真空乾燥を行った。再沈殿操作を 2 回行い、**2-6-4** (276 mg, 0.678 mmol, 72%) を白色固体の 3 塩酸塩として得た。

1-(3-((3-((3-aminopropyl)amino)propyl)amino)propyl)pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (2-6-5)
2-5-5 (140 mg, 0.365 mmol) に 0.5M 塩酸メタノール溶液 (1 ml) を加え、室温で攪拌した。3 日後、反応溶液をリービッヒ冷却器で除去し、粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (富士シリシア FL-60D, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 40 : 8 : 1) にて精製し、得られた **2-6-5** に再度 0.5M 塩酸メタノールを加え、溶媒留去することにより **2-6-5** (72.7 mg, 0.185 mmol, 51%) を白色固体の 3 塩酸塩として得た。

(2*R*,3*R*)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)tetrahydrofuran-3-ol (2-7)
アルゴン気流下、0°C にて、無水ピリジン (3 ml×3) で共沸した(4*S*,5*R*)-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-4-オール (1.00 g, 8.46 mmol) の無水ピリジン (20 ml) 溶液にジメトキシトリチルクロライド (3.44 g, 10.2 mmol) を加え、室温で攪拌した。3 時間後、反応溶液に炭酸水素ナトリウム (20 ml) を加え溶媒を留去後、水 (20 ml) を加え酢酸エチル (60 ml×2) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (40 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (4.75 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1 → 1 : 1) にて精製し、**2-7** (2.75 g, 6.54 mmol, 77%) を黄色のカaramel状物質として得た。

(2*R*,3*R*)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite (2-8)
アルゴン気流下、0°C にて、無水アセトニトリル (3 ml×3) で共沸した **2-7** (400 mg, 0.951 mmol) の無水アセトニトリル (3 ml) 溶液にジイソプロピルエチルアミン (198 μl, 1.14 mmol) を加え、0°C で攪拌した。45 分後、反応溶液に 2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (318 μl, 1.42 mmol) を加え更に 30 分間攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム (20 ml) を加え酢酸エチル (20 ml×2) で抽出した。合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (895 mg) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (富士シリシア FL-60D, ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1, 1%トリエチルアミン) にて精製し、**2-8** (433 mg, 0.698 mmol, 73%) を無色のカaramel状物質として得た。

***tert*-butyl (3-aminopropyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)carbamate (4-1)**
アルゴン気流下、-78°C にて、3,3'-ジアミノジプロピルアミン (10.0 ml, 70.9 mmol) のメタノール (120 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸エチル (8.40 ml, 70.9 mmol) のメタノール (50 ml) 溶液を 3 時間以上かけて滴下し、-78°C で攪拌した。30 分後 0°C に昇温し、ジ-*tert*-ブチルジカルボナート (57.0 ml, 248

mmol) のメタノール (40 ml) を反応溶液に滴下し、室温に戻し 4 時間攪拌した。メタノール溶液を減圧下留去後、残渣に THF (60 ml) および水酸化リチウム水溶液 (17 g/120 ml) を加え、室温で一晩攪拌した。反応溶液を中性にしたのちに、クロロホルム (200 ml×2) で抽出し、合わせた有機層を水 (120 ml) および飽和食塩水 (200 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (33.6 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 180 : 20 : 1 → 90 : 10 : 1) にて精製し、**4-1** (13.4 g, 40.6 mmol, 57%) を淡黄色のカaramel状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-propyl)(3-((2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)-carbamate (4-2)**

アルゴン気流下、0°C にて、無水アセトニトリル (20 ml×3) で共沸した **4-1** (12.4 g, 37.3 mmol) の無水ジクロロメタン (65.3 ml) 溶液にトリエチルアミン (26.0 ml, 186 mmol) と 2-ニトロベンゼンスルホンクロリド (9.10 g, 41.0 mmol) を加え、0°C で攪拌した。1 時間後、反応溶液をジクロロメタン (90 ml) で希釈し、1M 硫酸水素カリウム水溶液 (100 ml)、飽和炭酸水素ナトリウム (100 ml)、飽和食塩水 (100 ml) で洗浄した。合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (18.3 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : 酢酸エチル = 5 : 1 → 3 : 1) にて精製し、**4-2** (14.5 g, 28.0 mmol, 75%) を淡黄色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(3-bromopropyl)-2-nitro-phenyl)sulfonamido)propyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)propyl)carbamate (4-3-1)**

アルゴン気流下、0°C にて、無水アセトニトリル (20 ml) で共沸した **4-2** (11.0 g, 21.3 mmol) の無水アセトニトリル (39 ml) 溶液に炭酸カリウム (14.7 g, 107 mmol) と 1,3-ジブロモプロパン (10.9 ml, 107 mmol) を加え 50°C に昇温し一晩攪拌した。反応溶液を濾過した後に減圧下溶媒留去し、残渣をクロロホルム (100 ml) に溶解した。これを水 (50 ml) および飽和食塩水 (50 ml) で洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (25.0 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : 酢酸エチル = 10 : 1 → 6 : 1) にて精製し、**4-3-1** (9.10 g, 14.3 mmol, 67%) を淡黄色のカaramel状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(5-bromopentyl)-2-nitro-phenyl)sulfonamido)propyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)propyl)carbamate (4-3-2)**

アルゴン気流下、0°C にて、**4-2** (2.70 g, 5.23 mmol) の無水 DMF (6 ml) 溶液と炭酸カリウム (2.17 g, 15.7 mmol) を 1,5-ジブロモプロパン (3.60 ml, 26.1 mmol) に加え室温で一晩攪拌した。反応溶液に水 (60 ml) を加え、ジエチルエーテル (40 ml×2) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (50 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (8.19 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : 酢酸エチル = 10 : 1) にて精製し、**4-3-2** (3.20 g, 4.85 mmol, 93%) を淡黄色のカaramel状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(3-(2-amino-6-chloro-9*H*-purin-9-yl)propyl)-2-nitrophenyl)sulfonamide)propyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)carbamate (4-4-1)**

アルゴン気流下、0°Cにて、無水アセトニトリル (20 ml) で共沸した **4-3-1** (9.00 g, 14.1 mmol) の無水 DMF (15 ml) 溶液に炭酸カリウム (3.54 g, 25.6 mmol) と 2-アミノ-6-クロロプリン (2.20 g, 12.8 mmol) を加え室温で一晩攪拌した。反応溶液に水 (100 ml) を加え、クロロホルム (150 ml) で抽出した。有機層を飽和食塩水 (100 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (15.7 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール = 60 : 1 → 20 : 1) にて精製し、**4-4-1** (7.60 g, 10.5 mmol, 82%) を淡黄色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(5-(2-amino-6-chloro-9*H*-purin-9-yl)pentyl)-2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)carbamate (4-4-2)**

アルゴン気流下、0°Cにて、無水アセトニトリル (3 ml×2) で共沸した **4-3-2** (3.20 g, 4.81 mmol) の無水 DMF (5.1 ml) 溶液に炭酸カリウム (1.80 g, 13.1 mmol) と 2-アミノ-6-クロロプリン (741 mg, 4.37 mmol) を加え室温で一晩攪拌した。反応溶液に水 (80 ml) を加え、クロロホルム (100 ml×2) で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (80 ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (5.66 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール = 60 : 1 → 20 : 1) にて精製し、**4-4-2** (2.50 g, 3.25 mmol, 74%) を淡黄色のカラメル状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(3-(2-amino-6-thioxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)propyl)-2-nitrophenyl)-sulfonamido)propyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)carbamate (4-5-1)**

アルゴン気流下、室温にて、**4-4-1** (2.50 g, 3.44 mmol) のエタノール (46 ml) 溶液にチオウレア (786 mg, 10.3 mmol) を加え、加熱還流した。2時間後、反応溶液を減圧下溶媒留去し、残渣に酢酸エチル (100 ml×3) を加え、水 (150 ml) で洗浄した。合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (2.30 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール = 40 : 1 → 10 : 1) にて精製し、**4-5-1** (1.81 g, 2.50 mmol, 73%) を黄色固体として得た。

***tert*-butyl (3-((*N*-(5-(2-amino-6-thioxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)pentyl)-2-nitrophenyl)-sulfonamido)propyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)propyl)carbamate (4-5-2)**

アルゴン気流下、室温にて、**4-4-2** (2.50 g, 3.45 mmol) のエタノール (43 ml) 溶液にチオウレア (742 mg, 9.74 mmol) を加え、加熱還流した。2時間後、反応溶液を減圧下溶媒留去し、残渣に酢酸エチル (100 ml×2) を加え、水 (80 ml) および飽和食塩水 (150 ml) で洗浄した。合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒留去し粗生成物 (2.07 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール = 40 : 1 → 20 : 1) にて精製し、**4-5-2** (1.94 g, 2.58 mmol, 80%) を黄色の泡状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((3-((3-(2-amino-6-thioxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)propyl)amino)propyl)amino)propyl)carbamate (4-6-1)**

アルゴン気流下、0°Cにて、**2-5-1** (1.80 g, 2.49 mmol) の無水 DMF (4.3 ml) 溶液に炭酸カリウム (1.03 g, 7.47 mmol) とチオフェノール (281 μ l, 2.74 mmol) を加え室温で攪拌した。3時間後、反応溶液を減圧下溶媒留去し粗生成物 (3.70 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 90 : 10 : 1 \rightarrow 40 : 8 : 1) にて精製し、**4-6-1** (1.26 g, 2.35 mmol, 94%) を黄色のカaramel状物質として得た。

***tert*-butyl (3-((5-(2-amino-6-thioxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)pentyl)amino)propyl)(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)carbamate (4-6-2)**

アルゴン気流下、0°Cにて、**2-5-2** (1.89 g, 2.52 mmol) の無水 DMF (5 ml) 溶液に炭酸カリウム (1.04 g, 7.55 mmol) とチオフェノール (284 μ l, 2.77 mmol) を加え室温で攪拌した。3時間後、反応溶液を酢酸エチル (150 ml \times 2) で希釈し、水 (50 ml) および飽和食塩水 (80 ml) で洗浄した。合わせた有機層を減圧下溶媒留去し粗生成物 (3.13 g) を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 silicagel 60N, クロロホルム : メタノール : 28%アンモニア水 = 90 : 10 : 1 \rightarrow 40 : 8 : 1) にて精製し、**4-6-2** (1.29 g, 2.28 mmol, 91%) を白色の泡状物質として得た。

2-amino-9-(3-((3-((3-aminopropyl)amino)-propyl)amino)propyl)-1,9-dihydro-6*H*-purine-6-thione (2-7-1)

4-6-1 (1.25 g, 2.32 mmol) に 0.5M 塩酸メタノール溶液 (46 ml, 23.2 mmol) を加え、室温で攪拌した。6日後、生じた白色の沈殿物を冷塩酸メタノールで洗浄し、粗生成物 (1.05 g) を得た。これを水 (2.2 ml) に溶解し、-78°Cに冷却したエタノール (40 ml) \rightarrow 0.45 μ m フィルターを通して滴下した。得られた沈殿を 10 分間遠心 (1500 rpm) しデカントで回収後、真空乾燥にて **4-7-1** (1.01 g, 2.09 mmol, 90%) を淡黄色固体の 4 塩酸塩として得た。

2-amino-9-(5-((3-((3-aminopropyl)amino)-propyl)amino)pentyl)-1,9-dihydro-6*H*-purine-6-thione (2-7-2)

4-6-2 (1.28 g, 2.26 mmol) に 0.5M 塩酸メタノール溶液 (45.2 ml, 22.6 mmol) を加え、室温で攪拌した。6日後、生じた白色の沈殿物を冷塩酸メタノールで洗浄し、粗生成物 (972 mg) を得た。これを水 (2.3 ml) に溶解し、-78°Cに冷却したエタノール (45 ml) \rightarrow 0.45 μ m フィルターを通して滴下した。得られた沈殿を 10 分間遠心 (1500 rpm) しデカントで回収後、真空乾燥にて **4-7-1** (899 mg, 1.75 mmol, 78%) を淡黄色固体の 4 塩酸塩として得た。

ODN の合成

テトラヒドロフラン環導入 ODN および天然型 ODN の合成と精製

ODN の合成は DNA 合成装置を用いて、固相ホスホロアミダイト法により 1 μmol スケールで行った。5' 末端のジメトキシトリチル基を脱保護せずに合成を終了し、28%アンモニア水溶液中にて 55°C で 5 時間加熱する事で、固相担体からの切り出しと同時に核酸塩基部の保護基の脱保護を行った。溶液中の不溶物を 0.45 μm のメンブレンフィルターにて取り除いた後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC conditions 1 または 2) にて分取し、凍結乾燥を行う事で精製した。続いて 10%酢酸水溶液にて 5' 末端の DMTr 基を脱保護し、ジエチルエーテルによる分液操作を行う事で保護基の残骸を除去し、得られた水溶液を凍結乾燥する事で目的とする ODN を得た。

HPLC conditions 1:

Column: Waters X Bridge Prep C18 5 μm , column oven: 35°C, UV monitor: 254 nm, flow rate: 4 ml/min, solvent: A)0.1M TEAA buffer (pH7.0), B) MeCN, B conc.: 10-50%/20min, linear gradient.

HPLC conditions 2:

Column: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 10 \times 250 mm, column oven: 35°C, UV monitor: 254 nm, flow rate: 3 ml/min, solvent: A)0.1M TEAA buffer (pH7.0), B) MeCN, B conc.: 10-50%/20min, linear gradient.

ODN およびリガンドの濃度測定

ODN およびリガンドの濃度は 260 nm の吸光度を測定する事により算出した。核酸塩基および FAM のモル吸光係数を右記の表に従い計算し、チオグアニン誘導体は 340 nm におけるモル吸光係数を 21000 として濃度を算出した。オリゴマーのモル吸光係数は構成塩基のモル吸光係数の合計値に補正值として 0.9 をかけた値を用い、測定は 25°C で行った。

	モル吸光係数 (ϵ)
Adenine	15300
Guanine	11800
Cytosine	7400
Thymine	9300
Uracil	10000
Thioguanine	21000 ^a
FAM	20960

^a340 nm におけるモル吸光係数

種々の測定・評価

2 本鎖融解温度 (T_m) の測定 (第 2 章 2 節および第 4 章 2 節)

第 2 章 2 節の実験では終濃度が ODN2 本鎖 4 μM となるよう 10mM HEPE-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaCl または 50mM NaCl 溶液に溶解したサンプルを、まずはリガンド非存在下 20°C から 80°C まで 1°C/min の速度で昇温し、1°C 毎に 260 nm における吸光度を測定した。折り返し 1°C/min の速度で 20°C まで冷却してアニーリング操作を行ったのちに、リガンド終濃度が 20 μM (ODN2 本鎖に対して 5 等量) となるよう添加し、20°C で 2 時間静置後、再び 20°C から 80°C まで測定を行った。測定は二面透過型の 325 μM マイクロ T_m セル (光路長 1 cm) を用いて行った。 T_m 値は、得られた融解曲線の 1 次微分または非線形カーブフィッティングにより算出全ての ODN2 本鎖サンプルは測定前日に 80°C で 5 分間加熱後、徐々に放冷する事でアニーリング操作を行い、 $\Delta T_m = T_m (+\text{ligand}) - T_m (\text{duplex})$ とした。

また、第4章2節の実験では、ODN2本鎖濃度を終濃度2 μ Mおよびリガンド濃度を10 μ Mとして測定を行った (T_m conditions 2)。

T_m conditions 1: (in final concentration)

4 μ M ODN duplex; 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0); 100mM NaCl for A-, G-ligand, 50mM NaCl for C-, T-, and U-ligand; 20 μ M ligand.

T_m conditions 2: (in final concentration)

2 μ M ODN duplex, 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 10 μ M ligand.

CD スペクトルの測定 (第2章3節)

終濃度がODN2本鎖4 μ Mとなるよう10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaClまたは50mM NaCl溶液に溶解したサンプルを、Jasco社製300 μ l円形セル(光路長0.1cm)を用いてリガンド非存在下350nmから210nmまで測定した。次に、ODN2本鎖溶液サンプルにリガンド終濃度が20 μ M (ODN2本鎖に対して5等量)となるよう添加し、環境温度で2時間静置後、再び同範囲で測定を行った。また、全てのODN2本鎖サンプルは予め80 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後、徐々に放冷する事でアニーリング操作を行った。

CD conditions: (in final concentration)

4 μ M ODN duplex; 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0); 100mM NaCl for A-, G-ligand, 50mM NaCl for C-, T-, and U-ligand; 20 μ M ligand.

SPR 測定 (第2章4節)

九州大学医学研究院教育支援センター所有のBiacore 3000を用いて測定を行った。ビオチン化ODN1本鎖が1~10 μ g/mlとなるようHBS-N buffer (10mM HEPES buffer (pH 7.4)、150mM NaCl)で希釈しこれを、ストレプトアビジンを金薄膜上に結合させたセンサーチップ(センサーチップSA)上に25 $^{\circ}$ Cにおいて100 μ l~120 μ lずつ

	固定化量 (RU)
ODN2-11	1567.7
ODN2-12	1601.5
ODN2-13	1551.9
ODN2-14	1943.0

4~7回、10 μ l/minの速度で流し固定化した。固定化したビオチン化ODNのうち、ODN2-14は合成し、ODN2-11、ODN2-12およびODN2-13は日本バイオサービスより購入した。各ODNの固定化量は右表に示す。これらのセンサーチップ上に、各リガンドの終濃度が0.05 μ M~6.0 μ Mとなるよう10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaClまたは50mM NaCl溶液で希釈したサンプルを、25 $^{\circ}$ Cにおいて100 μ lを20 μ l/minの速度で流し、添加時間300秒、解離時間120秒とした。得られたセンサーグラムをアフィニティー解析のOne-Siteモデルでフィッティングし、結合定数(K_a)を算出した。 $K_a = C(R_{max} - R_{eq}) / R_{eq}$ であり、Cはリガンド濃度、 R_{max} は理論的的最大結合量、 R_{eq} はリガンドとODNへアピン2本鎖との相互作用の平衡状態におけるRUである。

NMR 定量 (第2章5節)

各リガンドのNMRによる定量は、標準物質としてマレイン酸を用い、そのアルケンプロトン(2H)と各リガンドの核酸塩基部と直結したリンカー炭素上のメチレンプロトン(2H)を相対定量した。3.5mMのマレイン酸重水溶液にUV定量により算出したリガンドの終濃度が同程度になるよう各リガ

ンドを加え、NMR 測定した。得られた NMR チャートの積分値から各リガンドのストック溶液濃度を算出した。

ITC 測定 (第 2 章 5 節)

九州大学生体防御医学研究所構造生物学分野所有または九州大学先導物質科学研究所所有の VP-ITC を用いて行った。ODN2 本鎖 10 μ M となるよう 100mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaCl または 50mM NaCl 溶液に溶解した ODN2 本鎖サンプルのアニーリング操作 (80°C, 5 min) を行ったのちに半透膜に封入し、これを 400 ml の透析外液 (100mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaCl または 50mM NaCl) 中で攪拌した。1 時間毎に新しい透析外液に交換し、これを 3 回繰り返す事で、半透膜中の ODN2 本鎖 10 μ M 溶液と透析外液のバッファー組成を同一にした。また、最後の透析外液で終濃度が 150 μ M となるようリガンド溶液を希釈し、ODN2 本鎖溶液とリガンド溶液の組成も限りなく等しくなるようにした。まずコントロールとして最後の透析外液にリガンド溶液を滴下し得られる熱量変化を測定し、次に ODN2 本鎖溶液にリガンド溶液を滴下し得られる熱量変化を測定した。機器における測定の設定は下記に示す通り (ITC Setting up Run Parameters) であり、解析は 1 回目の滴下 (滴下量 2 μ l) を除いた 19 回 (滴下量 10 μ l) の値を用いて One Site モデルで行った。得られたエンタルピー変化およびエントロピー変化よりギブスエネルギー変化 ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) を算出した。

また、C 値は相互作用する 2 分子の結合定数、結合比、セル内の分子の濃度の積で表され、本実験ではセル内に ODN2 本鎖溶液を充填しリガンド溶液を滴下するため、セル内分子の濃度を ODN2 本鎖濃度 10 μ M とし、結合比は 1 と仮定した。結合定数は先に測定した SPR より算出した値を代入して計算した。

ITC Setting up Run Parameters:

Cell Temperature: 25°C, Reference Power: 10 μ Cal/sec, Initial Delay: 60 sec, Stirring Speed: 310, Feedback Mode/Gain: High, ITC Equilibration Options: Fast Equil, Initial Cell Volume: 1426 μ l, Syringe Concentration: 0.15mM, Cell Concentration: 0.01mM, Total# Injections: 20 times, Volume 1st Injection: 2 μ l, Duration 1st Injection: 4 sec, Volume after 1st Injection: 10 μ l, Duration after 1st Injection: 20 sec, Injection Spacing: 210 sec, Filter Period: 2 sec.

UDG による AP サイト生成反応 (第 3 章 2 節、3 節および 5 節)

はじめに、FAM で標識していない ODN3-1 配列を用いて UDG による AP サイトの生成と確認を行った。終濃度が 2 μ M となるように UDG buffer に溶解し、これに UDG を終濃度 0.1 units/ μ l となるよう加え 37°C で 1 時間インキュベーションした。反応溶液に適量の milliQ を加え容量を 500 μ l にし、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール = 25/24/1 を加えて攪拌後、13,000 rpm で 10 分間遠心した。デカントで上層を回収し、再度上層にクロロホルム (450 μ l) を加え攪拌後遠心する事で抽出操作を行い、最後にイソプロパノール沈殿を行う事で ODN の精製を行った。これを MALDI-TOF-MS 測定し、AP サイトの精製 (found 9245.7 (calcd. 9245.5[M-H]⁻¹))を確認した。

実験に際しては、ODN3-1 の終濃度が 2 μ M となるよう UDG buffer に溶解し、これに UDG を加え 37°C で 5 分間インキュベーションした (UDG conditions 1)。氷浴にて反応停止後マイクロバイオスピ

ン® P-30 カラム (BIO-RAD 社製) により精製し、**ODN3-2** を得た。これに関しても MALDI-TOF MS 測定し、AP サイトの生成を確認した。

また、APE1 との競合実験においては **ODN3-1** と相補鎖 (**ODN3-3, ODN3-4, ODN3-5** および **ODN3-6**) との 2 本鎖を予め 70°C で 5 分加熱後、徐々に放冷する事でアニーリングし、2 本鎖の状態での UDG 処理 (UDG conditions 2) を行った。精製は 50mM HEPES-NaOH buffer (pH7.4) で予め置換したマイクロバイオスピン® P-30 カラムで行い、**ODN3-2** 配列の 2 本鎖を得た。これをアルカリ処理後、ゲル電気泳動によりβ-脱離断片を確認する事で、AP サイトの生成を確認した。

更に、プリン塩基を有するリガンドと AP サイトを有する ODN2 本鎖とのβ-脱離反応を HPLC で追跡した実験では、UDG conditions 3 の条件で行った。

UDG conditions 1: (in final concentration)

2μM ODN, 20mM Tris-HCl buffer (pH8.0), 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 units/μl UDG, 37°C, 5min.

UDG conditions 2: (in final concentration)

1μM ODN duplex, 50mM HEPES-NaOH buffer (pH7.4), 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 units/μl UDG 37°C, 15min.

UDG conditions 3: (in final concentration)

35μM ODN duplex, 50mM HEPES-NaOH buffer (pH7.4), 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.2 units/μl UDG 37°C, 15min.

各リガンドと APE1 との競合実験 (第 3 章 3 節)

APE1 との競合実験では、予め調製した **ODN3-2** の 2 本鎖溶液 (50mM HEPES-NaOH buffer (pH7.4)) に終濃度が 10μM から 500μM となるようリガンドを添加し、37°C で 15 分間プレインキュベーションした。その後、氷浴にて APE1 を各サンプルに添加し、37°C で 10 分間インキュベーションし、ローディングバッファーを加える事で反応を停止した。得られた各サンプルを 12%変性ポリアクリルアミドゲルにアプライし、25 mA で 70 分泳動した。得られた各バンドは FAM の蛍光を LAS-4000 で測定する事で可視化した。

Reaction conditions 1: (in final concentration)

100nM ODN duplex, 50mM HEPES-NaOH buffer (pH7.4), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.01 units/μl APE1, 37°C, 10 min.

Loading buffer and gel conditions 1: (in final concentration)

3M urea, 10mM EDTA, TBE buffer, 0.025 w/v% BPB, 0.025 w/v% XC, 20 v/v% formamide. 12% denaturing PAGE (25 ml) containing 8M urea, 25mM, 70 min.

各リガンドの AP サイトに対するβ-脱離反応 (第 3 章 4 節)

UDG conditions 2 の条件で調製した **ODN3-2** の 2 本鎖溶液をマイクロバイオスピン® P-30 カラムを用いて 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0) に置換し、終濃度が 100nM となるよう 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaCl または 50mM NaCl 溶液に溶解し、再度アニーリング操作 (70°C, 5min) を行った。その後、氷浴にて各リガンド濃度が 10μM (ODN2 本鎖に対して 100 等量) となるよう添加し、37°C で 30 分間インキュベーションした。各サンプルはローディングバッファーにより反応

停止し、12%変性ポリアクリルアミドゲルにアプライ後、25 mM で 40 分泳動した。得られた各バンドは FAM の蛍光を LAS-4000 で測定する事で可視化した。また、A-および G-リガンドに関しては、実験を 3 回行い、得られたデータの標準偏差の算出および t-検定を行った。

A-および G-リガンドの AP サイト β -脱離反応の反応追跡では reaction condition 2 に従い、反応開始 5, 10, 15, 30 分、1, 2, 3, 4, 5 時間毎に反応液を回収し、Loading buffer and gel conditions 2 に従いゲル電気泳動を行った。

Reaction conditions 2: (in final concentration)

100nM ODN duplex, 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0); 100mM NaCl for A-, G-ligand, 50mM NaCl for C-, T-ligand; 10 μ M ligand; 37°C, 30 min.

Loading buffer and gel conditions 2: (in final concentration)

5M urea, 10mM EDTA, TBE buffer, 0.025 w/v% XC. 12% denaturing PAGE (25 ml) containing 8M urea, 25mM, 40 min.

A-および G-リガンドによる AP サイト β -脱離反応の HPLC 反応追跡 (第 3 章 5 節)

ODN3-1 と相補鎖 (ODN3-3~ODN3-6) を 70°C で 5 分加熱後、徐々に放冷しアニーリングを行った後、UDG conditions 3 の条件で AP サイトを有する ODN3-2 の 2 本鎖溶液を調製した。これをマイクロバイオスピン® P-30 カラムを用いて 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0) に置換し、本溶液に終濃度が 100mM となるよう NaCl 溶液を加え、再度アニーリング操作を行った (ODN2 本鎖の終濃度 25 μ M)。 β -脱離反応は、氷浴にてリガンドを 100 μ M (ODN2 本鎖に対して 4 等量) となるよう添加し、37°C で 3 時間まで追跡した (Reaction conditions 3)。反応停止はローディングバッファー (Loading buffer and gel conditions 2 と同じ組成) にて行い、得られた各時間 (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) のサンプルを HPLC にて分析した (HPLC conditions 3)。HPLC により検出された各ピークは分取後 NAP-10 カラムで簡易精製し、MALDI-TOF MS 測定により構造決定した。

Reaction conditions 3: (in final concentration)

25 μ M ODN duplex, 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 100 μ M ligand; 37°C.

HPLC conditions 3:

Column: Waters X Bridge C18 3.5 μ m 4.6 \times 150 mm, column oven: 50°C, UV monitor: 254 nm, fluorescence: Ex. 494 nm, Em. 518 nm, flow rate: 1 ml/min, solvent: A)0.1M TEAA buffer (pH7.0), B) MeCN, B conc.: 5-18%/20min, linear gradient.

³⁵S-G-ligand の AP サイトアナログを有する ODN2 本鎖に対する光反応 (第 4 章 3 節)

光反応では、終濃度が ODN2 本鎖 10 μ M となるよう 10mM HEPE-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaCl 溶液に溶解したサンプルを測定前日に 80°C で 5 分間加熱後、徐々に放冷する事でアニーリング操作を行った。これに ³⁵S-G-リガンドと DTT の終濃度がそれぞれ 100 μ M、5mM となるよう加え、環境温度で 4W, 365 nm の光を 24 時間照射した (Reaction conditions 4)。反応開始 0, 1, 3, 6 および 24 時間後のサンプルを回収し HPLC により分析する事で、光反応の時間経過を確認した (HPLC conditions 4)。光反応が確認された組み合わせにおいては各ピークを分取し、MALDI-TOF MS 測定により構造決定を行った。

Reaction conditions 4: (in final concentration)

10 μ M ODN duplex, 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 5mM DTT, 100 μ M ligand; irradiation 365 nm (4W) at ambient temperature

HPLC conditions 4:

Column: Waters X Bridge C18 3.5 μ m 4.6 \times 150 mm, column oven: 50°C, UV monitor: 254 nm, flow rate: 1 ml/min, solvent: A)0.1M TEAA buffer (pH7.0), B) MeCN, B conc.: 4-14%/15min, linear gradient.

光付加体ピークの酵素加水分解反応

光反応で得られた新規ピークを HPLC conditions 4 により回収し、BAP, VPDE, Nuclease P1 による酵素加水分解を行った (Reaction conditions 5)。また得られた加水分解産物は HPLC conditions 5 により分析を行った。

Reaction conditions 5: (in final concentration)

20 μ M 以下の AFC 配列と ³²P-5'-リン酸化 ODN の付加体, BAP buffer (50mM Tris-HCl (pH9.0), 1mM MgCl₂), 0.05 units/ μ l BAP, 0.01 units/ μ l VPDE, 0.08 units/ μ l Nuclease P1, 37°C, 24 hours.

HPLC conditions 5:

Column: SHISEIDO C18 5 μ m 4.6 \times 250 mm, column oven: 35°C, UV monitor: 254 nm, flow rate: 1 ml/min, solvent: A) 50mM HCOONH₄, B) MeCN, B conc.: 7-55%/25min, linear gradient.

³²P-リガンドの AP サイトを有する ODN2 本鎖に対する切断および付加体形成反応 (第 4 章 4 節)

UDG conditions 2 の条件で調製した ODN3-2 の 2 本鎖溶液をマイクロバイオスピ[®] P-30 カラムを用いて 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0) に置換し、終濃度が 100nM となるよう 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0)、100mM NaCl 溶液に溶解し、再度アニーリング操作 (70°C, 5min) を行った。その後、氷浴にてリガンド濃度が 10 μ M (ODN2 本鎖に対して 100 等量) となるよう添加し、37°C で 5 時間インキュベーションした。反応開始 5, 10, 15, 30 分、1, 2, 3, 4, 5 時間毎に反応液を回収し、Loading buffer and gel conditions 2 に従いゲル電気泳動を行った。得られた各バンドは FAM の蛍光を LAS-4000 で測定する事で可視化した。

³²P-リガンドによる AP サイト β -脱離反応の HPLC 反応追跡 (第 4 章 4 節)

HPLC による反応追跡は、基本は第 3 章 5 節の方法に従ったが、³²P-リガンドの終濃度を ODN2 本鎖に対して 10 等量に変更した (Reaction conditions 6)。HPLC による分析は同じく HPLC conditions 3 で行った。また、HPLC から回収したピークは NAP-10 カラムによる簡易精製を行わずに MALDI-TOF MS を測定した。

Reaction conditions 6:

25 μ M ODN duplex, 10mM HEPES-NaOH buffer (pH7.0), 100mM NaCl, 250 μ M ligand; 37°C.

A-, G-リガンドおよび MMS を用いた MTS アッセイ (第 5 章)

CHO 細胞は九州大学医学部医化学分野より分けて頂き、ECACC を参考に培養を行った。RPMI1640 培地にて培養した CHO 細胞をトリプシン処理により 1000 \times 10⁴ cell/ml の細胞懸濁液にし、これを 96

穴プレートに 100 μ l ずつ分注し一晩 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。培地交換後、RPMI1640 培地で希釈した各リガンドを終濃度が 4, 6, 10, 20, 40, 60, 100, 400 μ M および 1mM となるよう添加し、48 時間 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養した。細胞生存率を MTS アッセイにより比色定量する事で算出し、解析は GraphPad Prism4 で行い IC₅₀ 値を算出した。また MMS においては、終濃度を 10 μ M~10mM とした。

A549 細胞を用いた実験では、同様の操作を DMEM 培地を用いて行い、各リガンドおよび MMS の終濃度を 10 μ M~10mM の範囲で実験を行った。

CHO 培養 conditions:

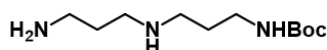
PRMI1640 培地、10%FBS (仔ウシ血清)、100 units/100 μ g/ml penicillin-streptomycin

A549 培養 conditions:

DMEM 培地、10%FBS (仔ウシ血清)、100 units/100 μ g/ml penicillin-streptomycin

A-, G-リガンドと MMS との併用実験では、CHO 細胞および A549 細胞を上記の条件で 96 穴プレートにて培養した後、各濃度の MMS とリガンド (CHO 細胞では 1, 5 または 10 μ M、A549 細胞では 10, 50 または 100 μ M) と同時に添加し、48 時間培養後 MTS アッセイを行った。

機器データ



2-1
C₁₁H₂₅N₃O₂ (MW 231.34)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

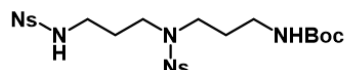
δ ppm: 5.17 (1H, bs), 3.22-3.15 (2H, m), 2.82 (2H, t, *J* = 7 Hz),
2.74-2.67 (4H, m), 1.70-1.65 (4H, m), 1.40 (9H, s)

ESI-MS

m/z: 232.2 [M+H]⁺ (calcd. 232.2020)

IR

cm⁻¹: 1692.8, 1365.1, 1276.9, 1251.9, 1171.1



2-2
C₂₃H₃₁N₅O₁₀S₂ (MW 601.65)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

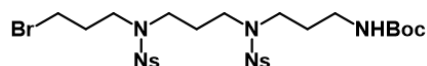
δ ppm: 8.10-8.08 (1H, m), 7.99-7.97 (1H, m), 7.85-7.83 (1H, m),
7.75-7.67 (4H, m), 7.62-7.60 (1H, m), 5.63 (1H, t, *J* = 6
Hz), 4.74 (1H, bs), 3.36 (2H, t, *J* = 7 Hz), 3.31 (2H, t, *J* =
7 Hz), 3.16-3.09 (4H, m), 1.83 (1H, quint., *J* = 7 Hz), 1.70
(1H, quint., *J* = 7 Hz), 1.41 (9H, s)

ESI-MS

m/z: 602.2 [M+H]⁺ (calcd. 602.1585)

IR

cm⁻¹: 1694, 1542, 1367, 1344, 1164



2-3
C₂₆H₃₆N₅O₁₀S₂Br (MW 722.63)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

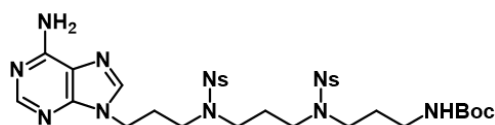
δ ppm: 8.03-7.97 (2H, m), 7.71-7.66 (4H, m), 7.62-7.59 (2H, m),
3.40 (2H, t, *J* = 7 Hz), 3.36-3.25 (8H, m), 3.13-3.08 (2H,
m), 2.06 (2H, quint., *J* = 7 Hz), 1.86 (2H, quint., *J* = 7
Hz), 1.71 (2H, quint., *J* = 7 Hz), 1.42 (9H, s).

ESI-MS

m/z: 722.5, 724.5 [M+H]⁺ (calcd. 722.1160, 724.1139)

IR

cm⁻¹: 1705, 1543, 1368, 1346, 1161



2-4-1
C₃₁H₄₀N₁₀O₁₀S₂ (MW 776.84)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

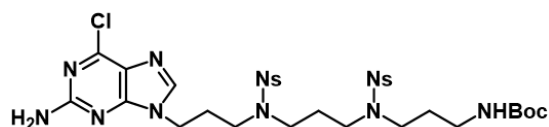
δ ppm: 8.29 (1H, s), 7.93 (1H, s), 7.96-7.88 (2H, m), 7.70-7.58
(6H, m), 4.25 (2H, t, *J* = 7 Hz), 3.33 (2H, t, *J* = 7 Hz),
3.30-3.22 (6H, m), 3.09 (2H, q, *J* = 6 Hz), 2.19 (2H,
quint., *J* = 7 Hz), 1.85-1.77 (2H, m), 1.67 (2H, quint., *J* =
7 Hz), 1.41 (9H, s)

ESI-MS

m/z: 777.4 [M+H]⁺ (calcd. 777.2443)

IR

cm⁻¹: 1704, 1543, 1367, 1347, 1162



2-4-2
C₃₁H₃₉N₁₀O₁₀S₂Cl (MW 811.29)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

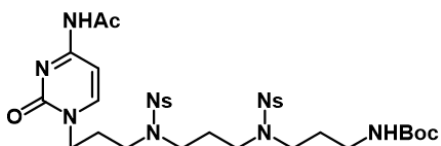
δ ppm: 7.95-7.92 (2H, m), 7.69-7.67 (4H, m), 7.68 (1H, s), 7.61-
7.57 (2H, m), 4.31-4.26 (2H, m), 3.43-3.39 (2H, m), 3.34-
3.26 (6H, m), 3.07 (2H, t, *J* = 6 Hz), 2.28-2.21 (2H, m),
1.90-1.83 (2H, m), 1.72-1.65 (2H, m), 1.39 (9H, s)

ESI-MS

m/z: 810.8 [M+H]⁺ (calcd. 811.2053)

IR

cm⁻¹: 1698.1, 1615.0, 1542.6, 1368.4, 1162.2



2-4-3
 $C_{32}H_{42}N_8O_{12}S_2$ (MW 795.86)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

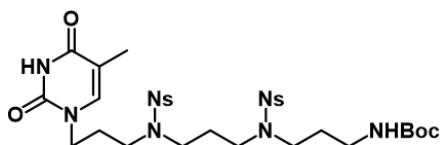
δ ppm: 7.97-7.93 (2H, m), 7.72-7.66 (4H, m), 7.62-7.56 (2H, m), 7.40 (1H, d, $J = 7$ Hz), 3.95-3.86 (2H, m), 3.36 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.32-3.23 (6H, m), 3.16-3.08 (2H, m), 2.07 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.88 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.42 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 794.9 $[M+H]^+$ (calcd. 795.2436)

IR

cm^{-1} : 1708, 1544, 1370, 1347, 1162



2-4-3
 $C_{31}H_{41}N_7O_{12}S_2$ (MW 767.83)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

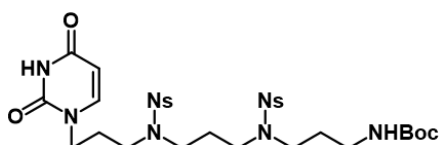
δ ppm: 7.97-7.95 (2H, m), 7.73-7.66 (4H, m), 7.62-7.59 (2H, m), 7.04 (1H, bs), 3.72 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.36 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.32-3.24 (6H, m), 3.11 (2H, q, $J = 6$ Hz), 1.97 (4H, quint., $J = 7$ Hz), 1.90 (3H, s), 1.71 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.44 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 768.1 $[M+H]^+$ (calcd. 768.2327)

IR

cm^{-1} : 1684, 1543, 1368, 1347, 1162



2-4-4
 $C_{30}H_{39}N_7O_{12}S_2$ (MW 753.80)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

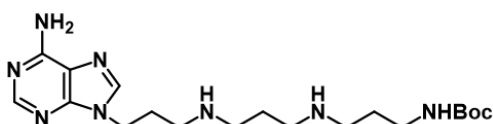
δ ppm: 7.91-7.88 (2H, m), 7.79-7.70 (6H, m), 7.29 (1H, d, $J = 8$ Hz), 5.53 (1H, d, $J = 8$ Hz), 3.64 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.31-3.22 (8H, m), 2.80 (2H, q, $J = 6$ Hz), 1.85 (4H, m), 1.67-1.60 (2H, m), 1.39 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 754.1 $[M+H]^+$ (calcd. 754.2171)

IR

cm^{-1} : 1682, 1543, 1369, 1346, 1162



2-5-1
 $C_{19}H_{34}N_8O_2$ (MW 406.54)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD)

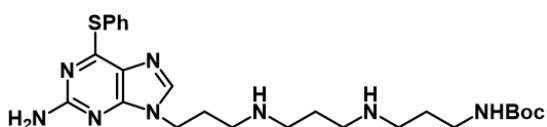
δ ppm: 8.20 (1H, s), 8.12 (1H, s), 4.30 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.08 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.69-2.61 (6H, m), 2.58 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.07 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.69 (4H, sept., $J = 7$ Hz), 1.41 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 407.5 $[M+H]^+$ (calcd. 407.2877)

IR

cm^{-1} : 1691.0, 1648.2, 1599.8, 1477.6, 1416.2, 1365.0, 1247.1, 1171.3



2-5-2
 $C_{25}H_{38}N_8O_{12}S$ (MW 514.69)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD)

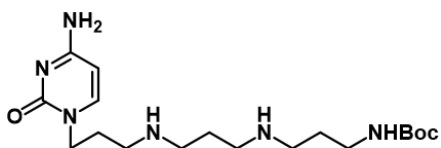
δ ppm: 7.96 (1H, m), 7.61-7.59 (2H, m), 7.45-7.43 (3H, m), 4.18 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.07 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.63-2.58 (6H, m), 2.55 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.04 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.72-1.61 (4H, m), 1.41 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 515.5 $[M+H]^+$ (calcd. 515.2911)

IR

cm^{-1} :



2-5-3
 $C_{18}H_{34}N_6O_3$ (MW 382.51)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD)

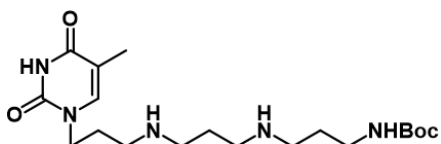
δ ppm: 7.56 (1H, d, $J = 7$ Hz), 5.86 (1H, d, $J = 7$ Hz), 3.84 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.11 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.82 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.75 (2H, dt, $J = 2, 7$ Hz), 2.65 (2H, t, $J = 7$ Hz), 1.91 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.78 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.72 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.42 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 383.2 $[M+H]^+$ (calcd. 383.2765)

IR

cm^{-1} : 1649.2, 1495.0, 1390.1, 1366.3, 1170.4



2-5-4
 $C_{19}H_{35}N_5O_4$ (MW 397.52)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD)

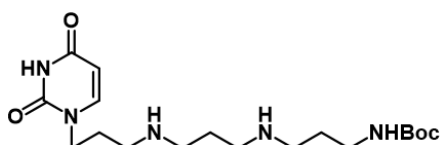
δ ppm: 7.46 (1H, s), 3.77 (1H, t, $J = 7$ Hz), 3.08 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.63-2.57 (8H, m), 1.86 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.86 (3H, s), 1.70 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.65 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.42 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 398.1 $[M+H]^+$ (calcd. 398.2762)

IR

cm^{-1} : 1689.7, 1468.2, 1365.2, 1171.7



2-5-5
 $C_{18}H_{33}N_5O_4$ (MW 383.49)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD)

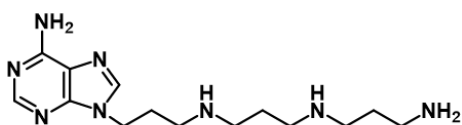
δ ppm: 7.53 (1H, d, $J = 8$ Hz), 5.60 (1H, d, $J = 8$ Hz), 3.76 (1H, t, $J = 7$ Hz), 3.05 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.69-2.56 (8H, m), 1.83 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.73-1.61 (4H, m), 1.38 (9H, s)

ESI-MS

m/z : 384.2 $[M+H]^+$ (calcd. 398.2762)

IR

cm^{-1} : 1673.7, 1513.5



2-6-1
 $C_{14}H_{26}N_8$ (MW 306.42)
 Tetrahydrochloride (MW452.25)

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

δ ppm: 8.36 (1H, s), 8.28 (1H, s), 4.38 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.13-3.02 (10H, m), 2.28 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 2.10-2.00 (4H, m)

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

δ ppm: 152.9, 151.2, 147.7, 147.1, 120.8, 47.5, 47.3, 47.2, 44.0, 39.2, 28.7, 26.3, 25.3

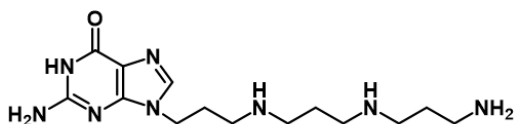
HR ESI-MS

m/z : 307.2366 $[M+H]^+$ (calcd. 307.2353)

IR

cm^{-1} : 2954, 2756, 1699, 1595, 1416

mp 270-271°C



2-6-2
 $C_{14}H_{26}N_8O$ (MW 322.42)
 Tetrahydrochloride (MW468.25)

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

δ ppm: 8.08 (1H, s), 4.19 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.17-3.05 (10H, m), 2.23 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 2.14-2.03 (4H, m)

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

δ ppm: 160.2, 157.0, 153.8, 141.9, 115.9, 47.4, 47.4, 47.3, 47.2, 43.9, 39.3, 28.5, 26.4, 25.3

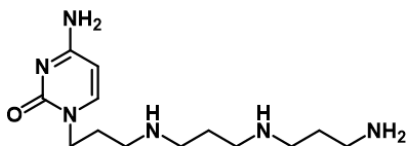
HR ESI-MS

m/z : 323.2319 $[M+H]^+$ (calcd. 323.2302)

IR

cm^{-1} : 2959, 2756, 1716, 1644, 1607, 1137, 1108

mp 210-213°C



2-6-3
 $C_{13}H_{26}N_6O$ (MW 282.39)
 Tetrahydrochloride (MW 428.22)

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

δ ppm: 7.77 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6.12 (1H, d, $J = 8$ Hz), 3.91 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.16-3.04 (10H, m), 2.13-2.01 (6H, m)

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

δ ppm: 162.7, 152.6, 151.8, 97.6, 49.4, 47.4, 47.3, 47.2, 47.2, 39.2, 27.6, 26.3, 25.2

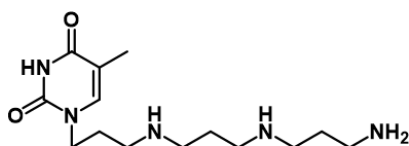
HR ESI-MS

m/z : 283.2266 $[M+H]^+$ (calcd. 283.2241)

IR

cm^{-1} : 2959, 2752, 1707, 1682

mp 248-249°C



2-6-4
 $C_{14}H_{27}N_5O_2$ (MW 297.40)
 Trihydrochloride (MW 406.78)

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

δ ppm: 7.42 (1H, s), 3.81 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.14-3.03 (10H, m), 2.10-2.00 (6H, m), 1.82 (3H, s)

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

δ ppm: 169.5, 155.1, 145.2, 113.9, 48.0, 47.4, 47.3, 47.2, 47.1, 39.2, 27.8, 26.3, 25.2, 13.9

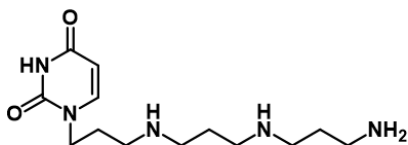
HR ESI-MS

m/z : 298.2266 $[M+H]^+$ (calcd. 298.2238)

IR

cm^{-1} : 2952, 2756, 1699, 1664

mp 243-244°C



2-6-5
 $C_{13}H_{25}N_5O_2$ (MW 283.38)
 Trihydrochloride (MW 392.75)

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

δ ppm: 7.59 (1H, d, $J = 8$ Hz), 5.79 (1H, d, $J = 8$ Hz), 3.85 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.16-3.04 (10H, m), 2.12-2.01 (6H, m)

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

δ ppm: 169.3, 155.1, 149.5, 104.6, 48.3, 47.4, 47.3, 47.2, 47.1, 39.1, 27.7, 26.3, 25.2

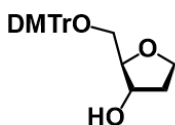
HR ESI-MS

m/z : 284.2077 $[M+H]^+$ (calcd. 284.2081)

IR

cm^{-1} : 3405, 1544, 1368, 1164

m.p. 260-261°C



2-7
 $C_{26}H_{28}N_5$ (MW 420.51)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

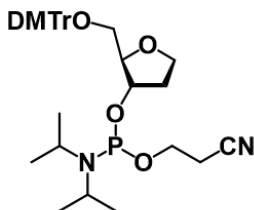
δ ppm: 7.41-7.16 (9H, m), 6.80 (4H, d, $J = 9$ Hz), 4.28-4.25 (1H, m), 3.95 (2H, dd, $J = 6, 8$ Hz), 3.87-3.83 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.22 (1H, dd, $J = 5, 9$ Hz), 3.05 (1H, dd, $J = 5, 9$ Hz), 2.17-2.08 (1H, m), 1.89-1.83 (1H, m)

ESI-MS

m/z : 443.4 $[M+Na]^+$ (calcd. 443.1829)

IR

cm^{-1} : 1607.5, 1508.3, 1249.5, 1176.4, 1033.7



2-8
 $C_{35}H_{45}N_2O_6P$ (MW 620.73)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ ppm: 7.42 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.31 (4H, dd, $J = 2, 9$ Hz), 7.25 (2H, t, $J = 7$ Hz), 7.18 (1H, t, $J = 7$ Hz), 6.80 (4H, d, $J = 9$ Hz), 4.41-4.36 (1H, m), 4.02-3.98 (2H, m), 3.96-3.90 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.68-3.61 (2H, m), 3.60-3.51 (2H, m), 3.14 (1H, dd, $J = 5, 10$ Hz), 3.09 (1H, dd, $J = 5, 10$ Hz), 2.42 (2H, dt, $J = 2, 6$ Hz), 2.12-2.05 (1H, m), 1.97-1.92 (1H, m), 1.15 (6H, d, $J = 7$ Hz), 1.12 (6H, d, $J = 7$ Hz)

^{31}P -NMR (161 MHz, $CDCl_3$)

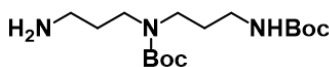
δ ppm: 148.05

ESI-MS

m/z : 621.5 $[M+H]^+$ (calcd. 621.3088)

IR

cm^{-1} : 1607.8, 1508.6, 1250.0, 1178.7, 1034.5



4-1
 $C_{16}H_{33}N_3O_4$ (MW 331.46)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

δ ppm: 5.27 (1H, bs), 3.28-3.17 (4H, m), 3.12-3.07 (2H, m), 2.68 (2H, t, $J = 7$ Hz), 1.68-1.61 (4H, m), 1.45 (9H, s), 1.42 (9H, s)

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

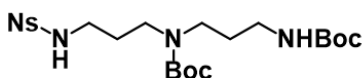
δ ppm: 156.2, 79.8, 79.1, 44.5, 43.8, 39.5, 37.6, 32.7, 31.8, 28.6

HR ESI-MS

m/z : 332.259 $[M+H]^+$ (calcd. 332.2544)

IR

cm^{-1} : 1676, 1481, 1421, 1366, 1251, 1167



4-2
 $C_{22}H_{36}N_4O_8S$ (MW 516.61)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 8.05 (1H, bs), 8.01-7.95 (2H, m), 7.88-7.84 (2H, m), 6.72 (1H, bs), 3.08 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.03 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.88-2.84 (4H, m), 1.60 (2H, bs), 1.52-1.49 (2H, m), 1.37 (9H, s), 1.34 (9H, s)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

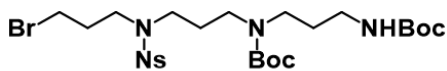
δ ppm: 155.5, 154.6, 147.8, 134.0, 132.6, 129.4, 124.4, 78.5, 77.5, 44.2, 40.6, 37.6, 28.6, 28.2, 28.0

HR ESI-MS

m/z : 517.231 $[M+H]^+$ (calcd. 517.2327)

IR

cm^{-1} : 1681, 1542, 1420, 1366, 1251, 1166



4-3-1
 $C_{25}H_{41}BrN_4O_8S$ (MW 637.59)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

δ ppm: 8.03 (1H, d, $J = 7$ Hz), 7.73-7.67 (2H, m), 7.63 (1H, d, $J = 7$ Hz), 3.44 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.38 (2H, t, $J = 6$ Hz), 3.31 (2H, t, $J = 8$ Hz), 3.21 (2H, t, $J = 6$ Hz), 3.15 (2H, bs), 3.07 (2H, bs), 2.11 (2H, quint., $J = 6$ Hz), 1.80 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.63 (2H, bs), 1.45 (9H, s), 1.43 (9H, s)

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

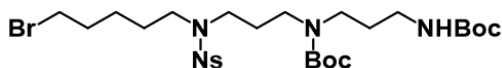
δ ppm: 156.2, 148.2, 133.9, 133.2, 131.9, 131.2, 124.4, 79.1, 45.9, 44.5, 37.5, 31.4, 30.0, 28.6, 27.4

HR ESI-MS

m/z : 637.190, 639.188 $[M+H]^+$ (calcd. 637.1901, 639.1881)

IR

cm^{-1} : 2975, 1686, 1545, 1418, 1366, 1160



4-3-2

$C_{27}H_{45}BrN_4O_8S$ (MW 665.64)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

δ ppm: 8.00 (1H, bs), 7.71-7.66 (2H, m), 7.62 (1H, d, $J = 8$ Hz), 3.35 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.31-3.27 (4H, m), 3.20 (2H, t, $J = 6$ Hz), 3.13 (2H, bs), 3.07 (2H, bs), 1.85-1.77 (4H, m), 1.62-1.52 (4H, m), 1.45 (9H, s), 1.43 (9H, s), 1.41-1.39 (2H, m)

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

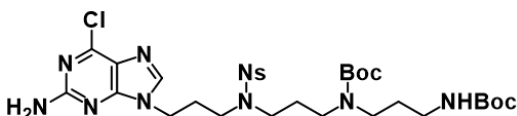
δ ppm: 156.1, 148.2, 133.7, 133.6, 131.8, 130.9, 124.3, 80.1, 79.2, 47.2, 45.2, 44.5, 44.1, 37.6, 33.5, 32.2, 28.6, 27.4, 25.2

HR ESI-MS

m/z : 687.207, 689.205 $[M+Na]^+$ (calcd. 687.2034, 689.2013)

IR

cm^{-1} : 2932, 1683, 1545, 1366, 1160



4-4-1

$C_{30}H_{44}ClN_9O_8S$ (MW 726.25)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 8.11 (1H, s), 7.96 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.91 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.87 (1H, t, $J = 8$ Hz), 7.79 (2H, t, $J = 8$ Hz), 6.88 (2H, s), 6.72 (1H, bs), 4.04 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.33 (2H, t, $J = 8$ Hz), 3.03 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.85 (2H, q, $J = 7$ Hz), 2.05 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.50-1.49 (2H, m), 1.36 (9H, s), 1.33 (9H, bs)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

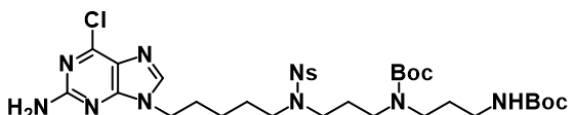
δ ppm: 160.2, 156.0, 154.5, 149.8, 148.0, 143.5, 135.1, 132.9, 131.9, 130.1, 124.9, 123.9, 79.0, 77.9, 45.7, 45.3, 44.5, 41.0, 38.1, 28.7, 28.4, 28.2

HR ESI-MS

m/z : 726.283 $[M+H]^+$ (calcd. 726.2795)

IR

cm^{-1} : 1678, 1613, 1545, 1367, 1161



4-4-2

$C_{32}H_{48}ClN_9O_8S$ (MW 754.30)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 8.10 (1H, s), 7.98-7.94 (2H, m), 7.87 (1H, dt, $J = 2, 8$ Hz), 7.82 (2H, t, $J = 2, 8$ Hz), 6.87 (2H, s), 6.72 (1H, bs), 4.00 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.24 (2H, t, $J = 8$ Hz), 3.19 (2H, t, $J = 8$ Hz), 3.05-3.02 (4H, m), 2.86 (2H, q, $J = 6$ Hz), 1.75 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.64-1.62 (2H, m), 1.52-1.50 (4H, m), 1.36 (9H, s), 1.33 (9H, s), 1.23-1.14 (2H, m)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

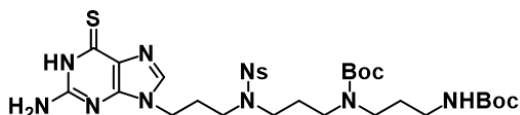
δ ppm: 159.7, 155.5, 154.5, 154.0, 149.3, 147.5, 143.1, 134.4, 132.4, 131.8, 129.6, 124.3, 123.3, 78.5, 77.4, 47.1, 45.0, 44.1, 42.8, 37.6, 28.5, 28.2, 28.0, 27.4, 23.0

HR ESI-MS

m/z : 754.312 $[M+H]^+$ (calcd. 754.3108)

IR

cm^{-1} : 1673, 1615, 1545, 1367, 1161



4-5-1

$C_{30}H_{45}N_9O_8S_2$ (MW 723.87)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 11.86 (1H, s), 7.96 (1H, dd, $J = 1, 8$ Hz), 7.89-7.85 (2H, m), 7.86 (1H, s), 7.79 (1H, dt, $J = 1, 8$ Hz), 6.75 (3H, bs), 3.95 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.31 (2H, t, $J = 8$ Hz), 3.23 (2H, t, $J = 8$ Hz), 3.05-3.02 (4H, m), 2.86 (2H, q, $J = 6$ Hz), 1.99 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.63 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.50-1.49 (2H, m), 1.36 (9H, s), 1.35 (9H, bs)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

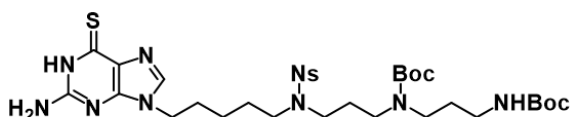
δ ppm: 174.9, 155.5, 154.6, 152.9, 147.8, 147.5, 140.3, 134.6, 132.4, 131.5, 129.6, 128.3, 124.4, 78.5, 77.5, 45.2, 44.8, 44.0, 40.3, 37.6, 28.8, 28.3, 28.0, 27.1

HR ESI-MS

m/z : 724.288 $[M+H]^+$ (calcd. 724.2905)

IR

cm^{-1} : 1676, 1632, 1579, 1542, 1367, 1161



4-5-1

$C_{32}H_{49}N_9O_8S_2$ (MW 751.92)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 11.85 (1H, bs), 7.98-7.94 (2H, m), 7.88-7.80 (2H, m), 7.85 (1H, s), 6.75 (2H, bs), 6.73 (1H, bs), 3.91 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.25-3.16 (4H, m), 3.06-3.03 (4H, m), 2.86 (2H, q, $J = 6$ Hz), 1.70 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.63 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.53-1.47 (4H, m), 1.34 (9H, s), 1.33 (9H, s), 1.16 (2H, quint., $J = 8$ Hz)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

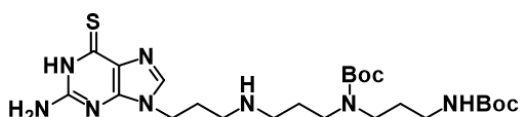
δ ppm: 174.8, 155.5, 154.6, 152.9, 147.8, 147.5, 140.5, 134.4, 132.4, 131.8, 129.6, 128.3, 124.3, 78.5, 77.5, 47.1, 45.0, 44.1, 42.6, 37.6, 28.7, 28.2, 28.0, 27.4, 23.0

HR ESI-MS

m/z : 752.320 $[M+H]^+$ (calcd. 752.3218)

IR

cm^{-1} : 1682, 1635, 1580, 1543, 1367, 1161



4-6-1

$C_{24}H_{42}N_8O_4S$ (MW 538.71)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 7.85 (1H, s), 6.75 (3H, bs), 3.99 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 3.13-3.07 (4H, m), 2.88 (2H, q, $J = 6$ Hz), 1.83 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.57-1.54 (4H, m), 1.37 (9H, s), 1.36 (9H, s)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

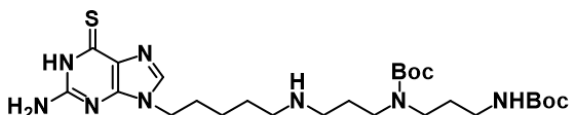
δ ppm: 174.9, 155.6, 154.7, 152.9, 147.8, 140.6, 128.3, 78.3, 77.5, 46.7, 46.0, 44.4, 44.2, 40.9, 37.6, 29.4, 28.8, 28.3, 28.1

HR ESI-MS

m/z : 539.309 $[M+H]^+$ (calcd. 539.3122)

IR

cm^{-1} : 1678, 1578, 1421, 1391, 1366, 1251, 1171



4-6-1

$C_{26}H_{46}N_8O_4S$ (MW 566.77)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 7.88 (1H, s), 6.77 (2H, bs), 6.75 (1H, bs), 3.93 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.14-3.07 (4H, m), 2.88 (2H, q, $J = 6$ Hz), 2.48-2.44 (4H, m), 1.72 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.60-1.56 (4H, m), 1.41 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.37 (9H, s), 1.36 (9H, s), 1.23 (2H, quint., $J = 8$ Hz)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

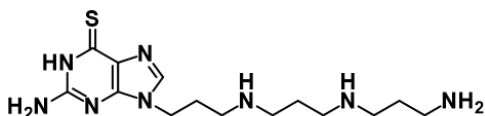
δ ppm: 174.9, 155.6, 154.7, 152.9, 147.8, 140.6, 128.3, 78.3, 77.5, 48.9, 46.5, 44.3, 42.7, 37.6, 29.1, 28.5, 28.2, 28.1, 27.7, 23.8

HR ESI-MS

m/z : 567.348 $[M+H]^+$ (calcd. 567.3435)

IR

cm^{-1} : 1682, 1576, 1391, 1366, 1251, 1167



4-7-1

$C_{14}H_{26}N_8S$ (MW 338.48)

Tetrahydrochloride (MW484.31)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 12.70 (1H, s), 9.44-9.40 (4H, m), 9.00 (1H, s), 8.22 (3H, bs), 7.47 (2H, bs), 4.23 (2H, t, $J = 6$ Hz), 3.01-2.97 (6H, m), 2.92-2.91 (4H, m), 2.22 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 2.09 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 2.01 (2H, quint., $J = 7$ Hz)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

δ ppm: 173.4, 154.4, 146.5, 140.2, 122.2, 44.0, 43.9, 43.8, 41.5, 36.1, 25.2, 23.6, 22.2

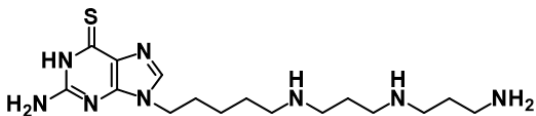
HR ESI-MS

m/z : 339.212 $[M+H]^+$ (calcd. 339.2074)

IR

cm^{-1} : 2972, 2767, 1645, 1618, 1594

mp 279-283°C



4-7-2

$C_{16}H_{30}N_8S$ (MW 366.53)

Tetrahydrochloride (MW512.36)

1H -NMR (500 MHz, DMSO)

δ ppm: 12.48 (1H, s), 9.31 (2H, bs), 9.17 (2H, bs), 8.69 (1H, s), 8.15 (3H, bs), 7.29 (2H, bs), 4.04 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.05-2.95 (6H, m), 2.93 (2H, q, $J = 6$ Hz), 2.90-2.81 (2H, m), 2.07 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 2.00 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.80 (2H, quint., $J = 7$ Hz), 1.69 (2H, quint., $J = 8$ Hz), 1.30 (2H, quint., $J = 8$ Hz)

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO)

δ ppm: 173.4, 154.1, 146.8, 140.4, 123.5, 46.5, 44.1, 44.0, 43.9, 43.5, 36.2, 28.2, 24.8, 23.7, 22.9, 22.2

HR ESI-MS

m/z : 367.238 $[M+H]^+$ (calcd. 367.2387)

IR

cm^{-1} : 2975, 1645, 1588, 1453, 1198, 1172

mp 265-268°C

MALDI-TOF MS データ

ODN No.		Sequence	Found	Calcd. [M-H] ⁻¹	
ODN2-1	5'-	CGC ATG F GTA CGC	-3'	3823.4	3823.7
ODN2-2	5'-	GCG TAC F CAT GCG	-3'	3823.5	3823.7
ODN2-3	5'-	CGC ATG A GTA CGC	-3'	3957.2	3956.7
ODN2-4	5'-	GCG TAC A CAT GCG	-3'	3957.1	3956.7
ODN2-5	5'-	CGC ATG G GTA CGC	-3'	3973.2	3972.7
ODN2-6	5'-	GCG TAC G CAT GCG	-3'	3972.5	3972.7
ODN2-7	5'-	CGC ATG C GTA CGC	-3'	3933.5	3932.7
ODN2-8	5'-	GCG TAC C CAT GCG	-3'	3932.8	3932.7
ODN2-9	5'-	CGC ATG T GTA CGC	-3'	3948.6	3947.7
ODN2-10	5'-	GCG TAC T CAT GCG	-3'	3947.6	3947.7
ODN2-11	Biotin 5'-	TTTT CGC ATG A GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'	10687.8	10689.0 ^a
ODN2-12	Biotin 5'-	TTTT CGC ATG G GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'	10704.2	10705.0 ^a
ODN2-13	Biotin 5'-	TTTT CGC ATG C GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'	10665.0	10665.0 ^a
ODN2-14	Biotin 5'-	TTTT CGC ATG T GTA CGC TTTT GCG TAC F CAT GCG	-3'	10598.6	10743.8
ODN3-1	FAM 5'-	GTT GGA GCT G UT GGC GTA GGC AAG AGT GCC	-3'	9877.9	9876.7 ^a
ODN3-2	FAM 5'-	GTT GGA GCT G APT GGC GTA GGC AAG AGT GCC	-3'	9788.5	9782.7
ODN3-3	3'-	CAA CCT CGA C AA CCG CAT CCG TTC TCA CGG	-5'	9051.9	9051.5 ^a
ODN3-4	3'-	CAA CCT CGA C GA CCG CAT CCG TTC TCA CGG	-5'	9067.4	9067.5 ^a
ODN3-5	3'-	CAA CCT CGA C CA CCG CAT CCG TTC TCA CGG	-5'	9027.4	9027.5 ^a
ODN3-6	3'-	CAA CCT CGA C TA CCG CAT CCG TTC TCA CGG	-5'	9042.5	9042.5 ^a
ODN3-2-2	FAM 5'-	GTT GGA GCT G- α,β -unsaturated aldehyde	-3'	3831.9	3829.7 ^b
ODN3-2-3	FAM 5'-	GTT GGA GCT G-hydroxyl	-3'	3713.9	3713.6
ODN3-2-4	5'-	Phosphate-T GGC GTA GGC AAG AGT GCC	-3'	5973.1	5970.0
ODN3-2-5	FAM 5'-	GTT GGA GCT G + SG-n3-ligand	-3'	4150.4	4149.9
ODN3-2-6	FAM 5'-	GTT GGA GCT G + SG-n5-ligand	-3'	4179.1	4177.9
ODN4-1	5'-	GCG TAA F C AT GCG	-3'	3847.6	3847.7
ODN4-2	5'-	GCG TAC F A AT GCG	-3'	3847.7	3847.7
ODN4-3	5'-	GCG TAA F A AT GCG	-3'	3871.7	3871.7
ODN4-1-1	3'-	CGC ATT T C GTA CGC	-5'	3907.6	3907.7
OND4-2-1	3'-	CGC ATG C T TA CGC	-5'	3907.5	3907.7
ODN4-3-1	3'-	CGC ATT C T TA CGC	-5'	3882.5	3882.7
ODN4-1-2	3'-	CGC ATT A GTA CGC	-5'	3932.4	3931.7 ^a
ODN4-1-3	3'-	CGC ATT G GTA CGC	-5'	3947.9	3947.7 ^a
ODN4-1-4	3'-	CGC ATT T GTA CGC	-5'	3926.6	3922.7 ^a
ODN4-1-5	3'-	CGC ATT T C GTA CGC + SG-n3-ligand	-5'	4156	4151.9

^a日本バイオサービスおよびジーンネットより購入。^b水和物として検出。

元素分析結果

	含有率 (%)			灰分 (mg)
	H	C	N	
A-ligand	6.59	36.02	23.97	1.5
Tetrahydrochloride (calcd.)	6.69	37.18	24.78	
G-ligand	4.51	22.22	15.04	85.5
Tetrahydrochloride (calcd.)	6.46	35.91	23.93	
C-ligand	6.76	35.93	19.4	1.5
Tetrahydrochloride (calcd.)	7.06	36.46	19.63	
T-ligand	7.3	40.97	16.96	—
Trihydrochloride (calcd.)	7.43	41.34	17.22	

理学研究院中央元素分析所に測定を依頼した。

参考文献

- ¹ Lindahl, T.; Karran, P.; Wood, R. D. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, *7*, 158-169.
- ² 池田 正五, 関 周司, 蛋白質 核酸 酵素, **2001**, *46*, 916-923.
- ³ Boiteux, S.; Guillet, M. *DNA Repair*, **2004**, *3*, 1-12.
- ⁴ Klungland, A.; Lindahl, Höss, M.; Gunz, D.; Constantinou, A.; Clarkson, S. G.; Doetsch, P. W.; Bolton, P. H.; Wood, R. D.; Lindhal, T. *Mol. Cell*, **1999**, *3*, 33-42.
- ⁵ Barnett, R. N.; Cleveland, C. L.; Landman, U. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 280-287.
- ⁶ Takao, M.; Zhang, Q.-M.; Yonei, S.; Yasui, A. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3638-3644.
- ⁷ Hendrich, B.; Hardeland, U.; Ng, H.-H.; Jiricny, J.; Bird, A. *Nature*, **1999**, *401*, 301-304.
- ⁸ Drabros, F.; Feyzi, E.; Aas, P. A.; Vaagbø, C. B.; Kavli, B.; Bratlie, M. S.; Peña-Diaz, J.; Otterlei, M.; Slupphaug, G.; Krokan, H. E. *DNA repair* **2004**, *3*, 1389-1407.
- ⁹ Fronza, G.; Gold, B. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *91*, 250-257.
- ¹⁰ Kunkel, T. A. *Trends in Genetics* **1999**, *15*, 93-94.
- ¹¹ Viswesh, V.; Gates, K.; Sun, D. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 99-107.
- ¹² Parrish, J. P.; Kastrinsky, D. B.; Wolkenberg, S. E.; Ogarashi, Y.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10971-10976.
- ¹³ Zerbe, L. K.; Goodman, M. F.; Efrati, E.; Kuchta, R. D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12908-12914.
- ¹⁴ Sagher, D.; Strauss, B. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4518-4526.
- ¹⁵ Kunkel, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 1494-1498.
- ¹⁶ Obeid, S.; Blatter, N.; Kranaster, R.; Schnur, A.; Diederichs, K.; Welte, W.; Marx, A. *EMBO Journal* **2010**, *29*, 1738-1747.
- ¹⁷ Lindahl, T.; Nyberg, B. *Biochemistry* **1972**, *11*, 3610-3618.
- ¹⁸ Friedman, J. I.; Stivers, J. T. *Biochemistry* **2010**, *49*, 4957-4967.
- ¹⁹ Blanca, G.; Villani, G.; Shevelev, I.; Ramadan, K.; Spadari, S.; Hübschere, U.; Maga, G. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11605-11615.
- ²⁰ Maga, G.; van Loon, B.; Crespan, E.; Villani, G.; Hübscher, U. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14267-14275.
- ²¹ Strauss, P. R.; Beard, W. A.; Patterson, T. A.; Wilson, S. H. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1302-1307.
- ²² Carey, D. C.; Strauss, P. R. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16553-16560.
- ²³ Baldwin, M. R.; O'Brien, P. J. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7879-7891.
- ²⁴ Mol, C. D.; Izumi, T.; Mitra, S.; Tainer, J. A. *Nature*, **2000**, *403*, 451-456.
- ²⁵ Mullen, G. P.; Wilson, S. H. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4713-4717.
- ²⁶ Wilde, J. A.; Bolton, P. H.; Mazumder, A.; Manoharan, M.; Gerlt, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1894-1896.
- ²⁷ McHugh, P. J.; Knowland, J. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1664-1670.
- ²⁸ Bailly, V.; Verly, W. G. *Biochem. J.* **1988**, *253*, 553-559.
- ²⁹ Izumi, T.; Hazra, T.; Boldogh, I.; Tomkinson, A. E.; Park, M. S.; Ikeda, S.; Mitra S. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 1329-1334.

- ³⁰ Bailly, V.; Verly, W. G. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9489-9496.
- ³¹ Kingma, P. S.; Corbett, A. H.; Burcham, P. C.; Marnett, L. J.; Osheroff, N. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21441-21444.
- ³² Cuniasse, Ph.; Fazakerley, G. V.; Guschlbauer, W. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 303-314.
- ³³ Goljer, I.; Kumar, S.; Bolton, P. H. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22980-22987.
- ³⁴ Cline, S. D.; Jones, W. R.; Stone, M. P.; Osheroff, N. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15500-15507.
- ³⁵ Singh, M. P.; Hill, G. C.; Péoc'h, D.; Rayner, B.; Imbach, J. L.; Lown, J. W. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10271-10285.
- ³⁶ Coppel, Y.; Berthet, N.; Coulombeau, C.; Coulombeau, C.; Garcia, J.; Lhomme, J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4817-4830.
- ³⁷ Cognet, J. A.; Gabarro-Arpa, J.; Cuniasse, P.; Fazakerley, G. V.; Le Bret, M. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1990**, *7*, 1095-1115.
- ³⁸ Ayadi, L.; Jourdan, M.; Coulombeau, C.; Garcia, J.; Lavery, R. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1999**, *17*, 245-257.
- ³⁹ Gelfand, C. A.; Plum, G. E.; Grollman, A. P.; Johnson, F.; Breslauer, K. J. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7321-7327.
- ⁴⁰ Bertrand, J.-R.; Malvy, C.; Paoletti, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *143*, 768-774.
- ⁴¹ Livingstone, D. C. *Biochem. Biophys. Acta* **1964**, *87*, 538-540.
- ⁴² Fortini, P.; Calcagnile, A.; Vrieling, H.; Van Zeeland, A. A.; Bignami, M.; Dogliotti, E. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1149-1155.
- ⁴³ Chen, B. X.; Kubo, K.; Ide, H.; Erlanger, B. F.; Wallace, S. S.; Kow, Y. W. *Mutat. Res.* **1992**, *273*, 253-261.
- ⁴⁴ Nakamura, J.; Swenberg, J. A. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2522-2526.
- ⁴⁵ Sato, K. Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2806-2807.
- ⁴⁶ Xue, L.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7010-7011.
- ⁴⁷ Dhar, S.; Kodama, T.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8702-8703.
- ⁴⁸ Yoshimoto, K.; Nishizawa, S.; Minagawa, M.; Teramae, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8982-8983.
- ⁴⁹ Yoshimoto, K.; Xu, C.-Y.; Nishizawa, S.; Haga, T.; Satake, H.; Teramae, N. *Chem. Commun.* **2003**, 2960-2961.
- ⁵⁰ Sankaran, N. B.; Sato, Y.; Sato, F.; Rajendar, B.; Morita, K.; Seino, T.; Nishizawa, S.; Teramae, N. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1522-1529.
- ⁵¹ Rajendran, A.; Zhao, C.; Rajendar, B.; Thiagarajan, V.; Sato, Y.; Nishizawa, S.; Teramae, N. *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, *1800*, 599-610.
- ⁵² Greco, N. J.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10784-10785.
- ⁵³ Behmoaras, T.; Toulme, J.-J.; Helene, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 926-930.
- ⁵⁴ Behmoaras, T.; Toulme, J.-J.; Helene, C. *Nature* **1981**, *292*, 858-859.
- ⁵⁵ Duker, N. J.; Hart, D. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *105*, 1433-1439.

- ⁵⁶ Mazumder, A.; Gerlt, J. A.; Absalon, M. J.; Stubbe, J.; Cunningham, R. P.; Withka, J.; Bolton, P. H. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 1119-1126.
- ⁵⁷ Malvy, C.; Prévost, P.; Gansser, C.; Viel, C.; Paoletti, C. *Chem. Biol. Interactions* **1986**, *57*, 41-53.
- ⁵⁸ Zawahir, Z.; Dayam, R.; Deng, J.; Pereira, C.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 20-32.
- ⁵⁹ Poletto, M.; Malfatti, C.; Dorjsuren, D.; Scognamiglio, P. L.; Marasco, D.; Vascotto, C.; Jadhav, A.; Maloney, D.; Wilson III, D. M.; Simeonov, A.; Tell, G. *Molecular Carcinogenesis* **2016**, *55*, 688-704.
- ⁶⁰ Berthet, N.; Boudali, A.; Constant, J. F.; Decout, J. L.; Demeunynck, M.; Fkyerat, A.; Garcia, J.; Laayoun, A; Michon, P.; Lhomme, J. *J. Mol. Recognit.* **1994**, *7*, 99-107.
- ⁶¹ Fkyerat, A.; Demeunynck, M.; Constant, J.-F.; Michon, P.; Lhomme, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9952-9959.
- ⁶² Belmont, P.; Jourdan, M.; Demeunynck, M.; Constant, J.-F.; Garcia, J.; Lhomme, J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5153-5159.
- ⁶³ Minko, I. G.; Jacobs, A. C.; de Leon, A. R.; Gruppi, F.; Donley, N.; Harris, T. M.; Rizzo, C. J.; McCullough, A. K.; Lloyd, R. S. *Scientific Reports*, **2016**, *6*:28894.
- ⁶⁴ Malina, J.; Scott, P.; Bravec, V. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 5297-5306.
- ⁶⁵ Kotera, N.; Poyer, F.; Granzhan, A.; Teulade-Fichou, M.-P. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15948-15951.
- ⁶⁶ Caron, C.; Duong, X. N. T.; Guillot, R.; Bombard, S.; Granzhan, A. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 1949-1962.
- ⁶⁷ Tabor, H. *Biochemistry* **1962**, *1*, 496-501.
- ⁶⁸ Mandel, M. *J. Mol. Biol.* **1962**, *5*, 435-441.
- ⁶⁹ Hirschman, S. Z.; Leng, M.; Felsenfeld, G. *Biopolymers* **1967**, *5*, 227-233.
- ⁷⁰ Yamamoto, S.; Shinoda, S.; Makita, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *87*, 1102-1108.
- ⁷¹ Karapcho, A. P.; Kuell, C. S. *Synth. Commun.*, **1990**, *20*, 2559-2564.
- ⁷² Fixon-Owoo, S.; Levasseur, F.; Williams, K.; Sabado, T. N.; Lowe, M.; Klose, M.; Mercier, A. J.; Fields, P.; Atkinson, J. *Phytochemistry*, **2003**, *63*, 315-334.
- ⁷³ Hidai, Y.; Kan, T.; Fukuyama, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, *48*, 1570-1576.
- ⁷⁴ Šponer, J.; Leszczynski, J.; Hobza, P. *Biopolymers* **2002**, *61*, 3-31.
- .
- ⁷⁵ Ziegel, R.; Shallop, A.; Jones, R.; Tretyakova, N. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 541-550.
- ⁷⁶ Zang, H.; Gates, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1539-1546.
- ⁷⁷ Nooner, T. Dutta, S. Gates, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 942-949.
- ⁷⁸ Kumar, G. S.; Musser, S. M.; Cummings, J.; Tomasz, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9209-9217.
- ⁷⁹ Sugiyama, H.; Fujiwara, T.; Ura, A.; Tashiro, T.; Yamamoto, K.; Kawanishi, S., Saito, I. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 673-683.
- ⁸⁰ Somerville, L.; Krynetski, E. Y.; Krynetskaia, N. F.; Beger, R. D.; Zhang, W.; Marhefka, C. A.; Evans, W. E.; Kriwacki, R. W. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1005-1011.
- ⁸¹ Favre, A.; Saintomé, C.; Fourrey, J.-J.; Clivio, P.; Laugâa, P. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1998**, *42*, 109-124.

- ⁸² Brem, R.; Karran, P. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 5-13.
- ⁸³ Fox, J. J.; Wempen, I.; Hampton, A.; Doerr, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1669-1675.
- ⁸⁴ Šponer, J.; Leszczynski, J.; Hobza, P. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 9489-9895.
- ⁸⁵ Ren, X.; Li, F.; Jeffs, G.; Zhang, X.; Xu, Y.-Z.; Karran, P. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1832-1840.
- ⁸⁶ Zou, X.; Zhao, H.; Yu, Y.; Su, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4509-4515.
- ⁸⁷ Nishioka, T.; Oshiro, K.; Onizuka, K.; Taniguchi, Y.; Sasaki, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1315-1320.
- ⁸⁸ Seiler, N.; Delcros, J. G.; Moulinoux, J. P. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **1996**, *28*, 843-861.
- ⁸⁹ Phanstiel IV, O.; Kaur, N.; Delcros, J.-G. *Amino Acids*, **2007**, *33*, 305-313.
- ⁹⁰ Delcros, J.-G.; Tomasi, S.; Carrington, S.; Martin, B.; Renault, J.; Blagbrough, I. S.; Uriac, P. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5098-5111.
- ⁹¹ Wang, C.; Delcros, J.-G.; Biggerstaff, J.; Phanstiel, IV, O. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2663-2671.
- ⁹² Barret, J.-M.; Kruczynski, A.; Vispé, S.; Annereau, J.-P.; Brel, V.; Guminski, Y.; Delcros, J.-G.; Lansiaux, A.; Guilbaud, N.; Imbert, T.; Bailly, C. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9845-9853.
- ⁹³ Asaeda, A.; Ide, H.; Terato, H.; Takamori, Y.; Kubo, K. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *365*, 35-41.

発表論文

Yukiko Abe, Osamu Nakagawa, Rie Yamaguchi, Shigeki Sasaki

Synthesis and binding properties of new selective ligands for the nucleobase opposite the AP site

Bioorganic & Medicinal Chemistry **2012**, *20*, 3470-3479.

Yukiko S. Abe, Shigeki Sasaki

DNA cleavage at the AP site via β -elimination mediated by the AP site-binding ligands

Bioorganic & Medicinal Chemistry **2016**, *24*, 910-914.

Yukiko S. Abe, Shigeki Sasaki

The adduct formation between the thioguanine-polyamine ligands and DNA with the AP site under UVA irradiated and non-irradiated conditions

Bioorganic & Medicinal Chemistry **2019**, *27*, 115160.