

コンホメーション固定型アナログである炭素環シクロヌクレオシドの合成と応用研究

吉村 祐一

Synthesis and Application of Carbon-bridged Cyclonucleosides as a Conformation-Fixed Analogue

Yuichi YOSHIMURA

(Received November 20, 2008)

はじめに

近年の創薬研究では核酸医薬が大きな注目を集めているが、核酸の構成成分であるヌクレオシドは、以前から、その誘導体が抗がん剤、抗ウイルス剤として臨床で利用されてきた。これらヌクレオシド系医薬品が活性を発現するためには、ターゲットとなる標的タンパク質との相互作用が重要となることは自明であるが、その際、ヌクレオシド自身のコンホメーションが活性の強さを決定する大きな要因となる。ヌクレオシドのコンホメーションは大きく分けて、1) ヌクレオシド糖部であるフラノース環のコンホメーション (puckering), 2) C4'-5'結合回りの

コンホメーション, 3) グリコシル結合回りのコンホメーション, の3つのパラメーターによって規定される。¹⁾ そのいずれもがタンパク質との相互作用を考える上で重要であり、このような立体化学的相互作用を研究するには特定のコンホメーションに固定されたヌクレオシド誘導体が有用な biological probe となる。

ヌクレオシド糖部であるリボースあるいはデオキシリボースはフラノース環を有し、そのコンホメーションは puckering と呼ばれ、シクロペンタンの疑回転 (Pseudorotational cycle) を用い表すことができる (Fig. 1)。^{1,2)}

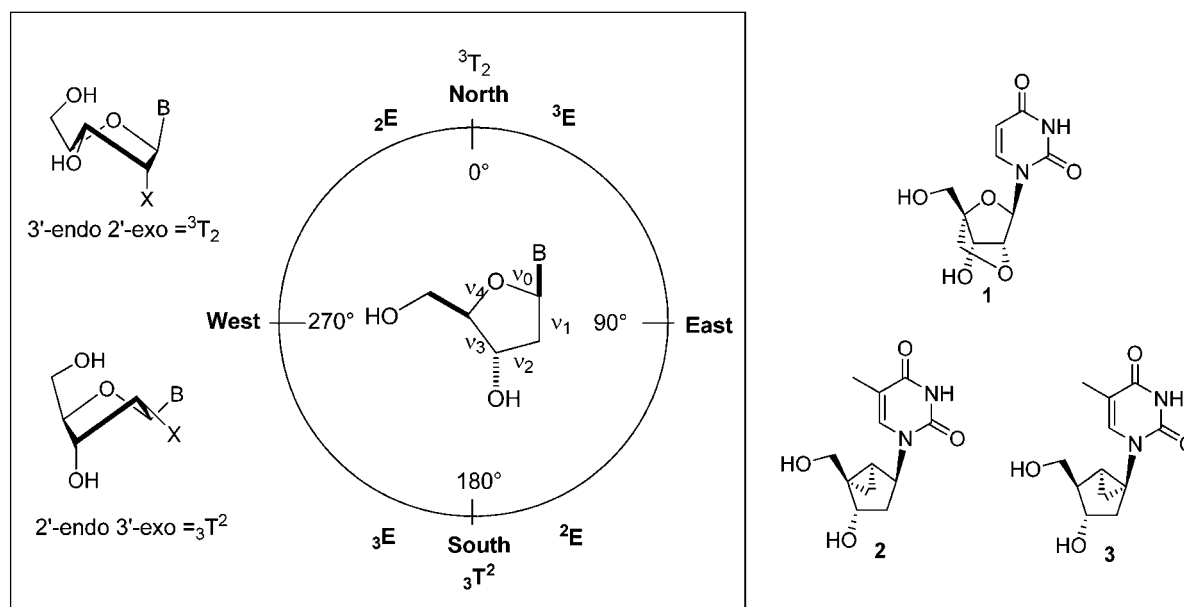


Fig. 1. Conformation of sugar moiety of nucleoside (sugar puckering) and pseudorotational cycle

通常、ヌクレオシド糖部の puckering は疑回転位相角 (Phase angle, P) により表現され、疑回転位相角 P とフラノース骨格中の $\nu_0 \sim \nu_4$ の5つのねじれ角 (torsion angle) との間には式(1) で表わされる関係が成立する。

$$\tan P = \frac{(\nu_4 + \nu_1) - (\nu_3 + \nu_0)}{2\nu_2 \cdot (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)} \dots\dots\text{式(1)}$$

ヌクレオシド糖部の主な puckering 様式としては、C3'-endo(2'-exo) と C2'-endo(3'-exo) の2種類が知られており、前者を N 型 ($P = 0^\circ \pm 36^\circ$)、後者を S 型 ($P = 180^\circ \pm 36^\circ$) とも呼ぶ。これら2つの puckering 様式は熱的に相互変換が可能であり、通常は平衡状態にあるものと考えられている。しかし、DNA や RNA などの高分子中や酵素などのタンパク質と結合した状態では、いずれかの

puckering 様式が優先することになる。糖部 puckering を炭素架橋により固定したヌクレオシド誘導体は、このような立体化学的相互作用を検討する上で有用な biological probe であり、Fig. 1 に示す化合物 **1**,³⁾ **2**,⁴⁾ **3**⁴⁾ などが知られている。特にオキサビシクロ型ヌクレオシド **1** については、**1** を含むオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) が RNA と安定な二本鎖を形成することが明らかとなり、新たな核酸医薬開発の点から注目を集めている。³⁾

糖環外の C4'-5'ヒドロキシメチル基については、水酸基の配向により3つのコンホメーション (+sc, ap, -sc; Fig. 2) が可能であり、その記述には、ねじれ角 ϕ_{oc} ($\gamma = O5'-C5'-C4'-O3'$) が用いられる。これらコンホマーをミミックしたヌクレオシド誘導体として、Paquette らは C4'-5'部にスピロ環を融合したヌクレオシドアナログ **4** のデザインと合成

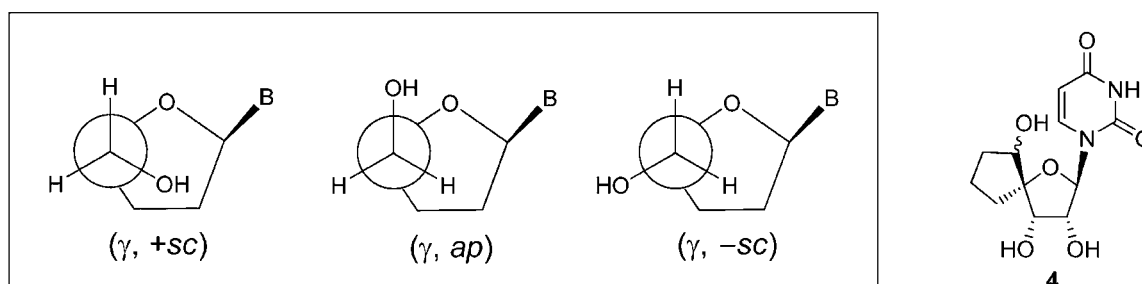


Fig. 2. Conformation around C4'-5' bond

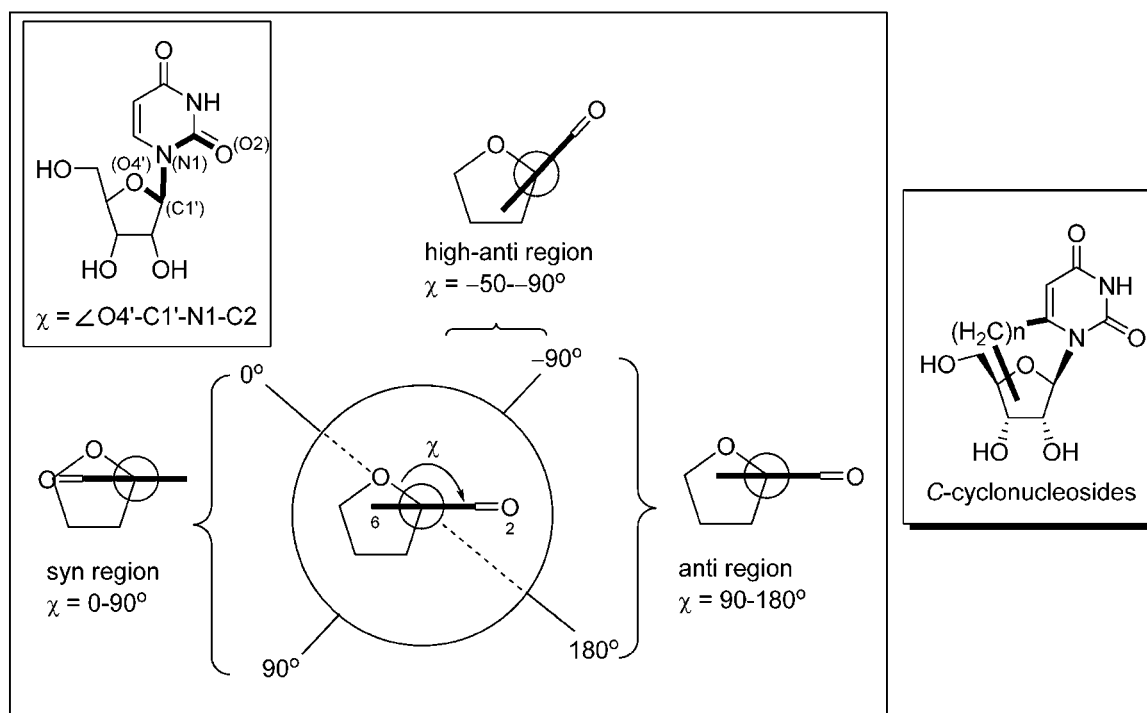


Fig. 3. Conformation around glycoside bond

を報告している。⁵⁾

糖に対する塩基部の配置によって生じるグリコシル結合回りのコンホメーションは、ねじれ角 χ (O4'-C1'-N1-C2) によって表わされ、大きく分けて *syn* 型と *anti* 型がある (Fig. 3). ピリミジンヌクレオシドの場合、2位のカルボニル酸素原子がフラノース環から遠くなるコンホメーションのことを *anti* 型といい、*syn* 型はその反対に2位のカルボニル酸素原子がフラノース環上にくるものを表す. この2つのコンホメーションに加えて、ピリミジン環の6位炭素がフラノース環2'位近傍に位置する *high-anti* 型の存在も知られている.¹⁾ これらグリコシル結合回りにおける特定のコンホメーションを模した誘導体として、塩基部と糖部を炭素架橋により固定した炭素環シクロヌクレオシド (*C*-シクロヌクレオシド) が知られており、著者は、長年その合成研究に従事してきた. 本総説では、著者がこれまで行ってきた *C*-シクロピリミジンヌクレオシドの合成を中心に、その応用を含め論述する.

Anti 型に固定された *C*-シクロヌクレオシドの合成

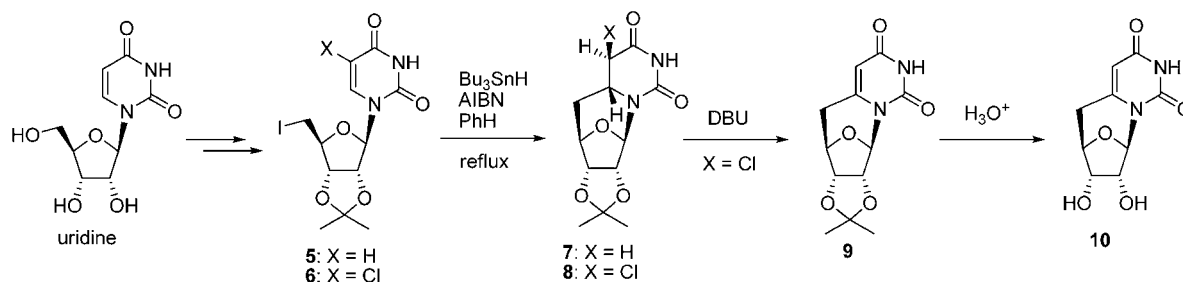
1) 6,5'-*C*-シクロウリジンの合成⁶⁾

最も初期の *C*-シクロヌクレオシドの合成例として、上田らによって報告されたラジカル環化反応による 6,5'-*C*-シクロウリジンの合成がある.⁷⁾ 上田らはウリジンから得られる 5'-ヨード体 **5** のラジ

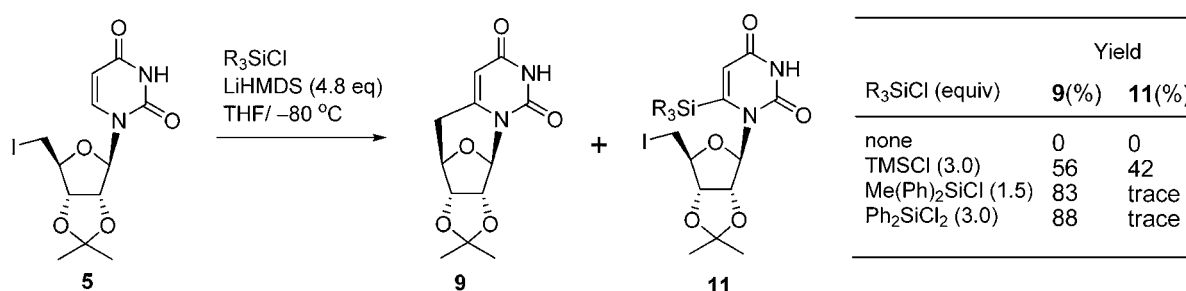
カル還元反応により 5,6-ジヒドロ-6,5'-*C*-シクロウリジン **7** が立体選択的かつ高収率で得られることを見出した. 同反応を 5-クロロ誘導体 **6** に対し行い、DBU 処理による 5,6 位 2 重結合の回復工程を経て 6,5'-*C*-シクロウリジン **10** の合成を達成した (Scheme 1).⁷⁾

近年、著者は、この 6,5'-*C*-シクロウリジンの合成をより簡便に行える新たな合成法の開発に成功した.⁶⁾ 以前からウリジンの 6 位は、LDA などの強塩基によりリチオ化できることが知られていたが、⁸⁾ 5'-ヨード体 **5** を LDA で処理しても複雑な生成物の混合物となり、目的とする *C*-シクロウリジン誘導体 **10** は低収率であった. 使用する塩基を LDA から塩基性の弱い LiHMDS に変更した場合、今度は反応が全く進行せず原料を回収するのみであった. 著者が本研究を行っていた頃、ウリジンの 6 位シリル化反応は、例外的に LiHMDS で進行することが判明していたので、⁹⁾ **5** と LiHMDS との反応にシリル化剤を添加することを考えた.

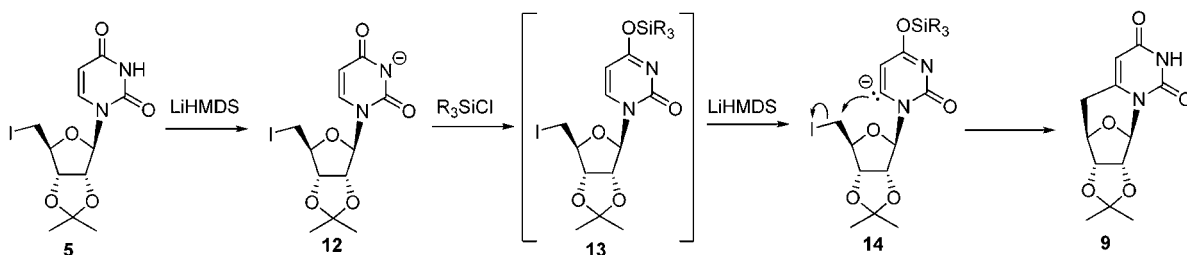
先の反応条件にトリメチルシリルクロリド (TMSCl) を加え反応を行ったところ、6-TMS 体 **11** とともに、目的とする *C*-シクロウリジン誘導体 **10** が 58% の収率で得られることを見出した. その後、添加するシリル化剤の検討を行ったところジフェニルジクロロシラン (Ph₂SiCl₂) を用いた場合、目的とする *C*-シクロウリジン誘導体 **10** が 88% で



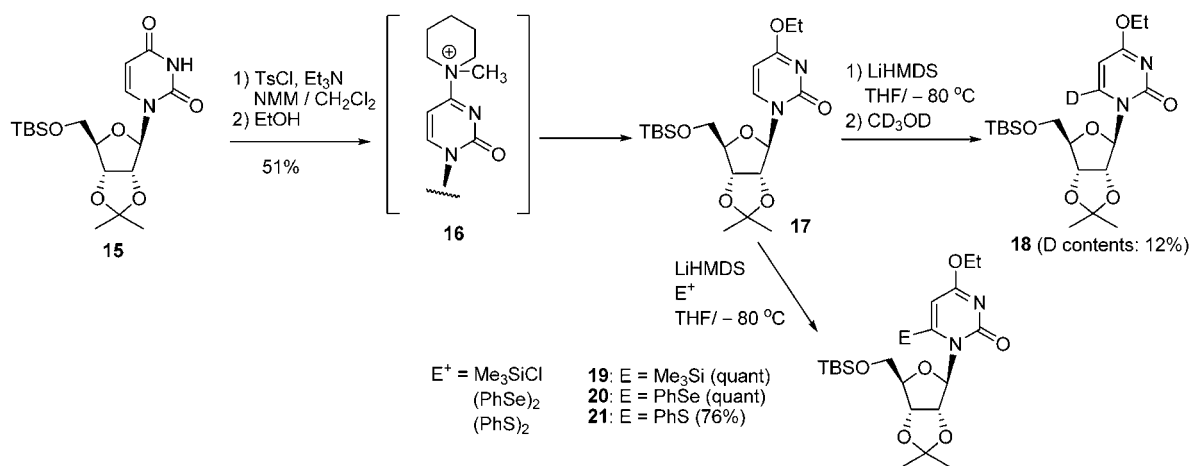
Scheme 1. Synthesis of 6,5'-*C*-cyclouridine



Scheme 2. Alternative synthesis of 6,5'-*C*-cyclouridine



Scheme 3. Speculated reaction mechanism of the cyclization reaction triggered by temporary silylation of O-4



Scheme 4. Application of C6 lithiation

得られ、6-シリル体の副生は、ほぼ抑制できることが明らかとなった (Scheme 2)。

本反応機構については次のように推定した。LiHMDS と共存するシリル化剤との反応によりウラシル環 4 位酸素原子のシリル化が進行し、中間体 **13** を生じる。LiHMDS 単独では、3 位が解離し負電荷を帯びたウラシル環の 6 位をリチオ化することはできないが、O4 位がシリル化された中間体 **13** については **12** に比べ 6 位の pKa が下がっているため LiHMDS でもリチオ化が進行するものと考えられる。さらに、生じた 6-リチオ体 **14** の分子内 S_N2 反応により目的とする C-シクロウリジン誘導体 **9** が生成したものと推定している (Scheme 3)。

この推定反応機構の検証のため以下のような実験を行った。ウリジンから合成した **15** をトリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド (TPSCl) と N-メチルモルホリン (NMM) と反応させ、¹⁰⁾ 生じた中間体 **16** をさらにエタノールと処理し、4-O-エチル体 **17** を得た。4-O-エチル体 **17** は、先の 4-O-シリル体 **13** と類似の電子構造を有しており、この **17** をモデル化合物として LiHMDS によるリチオ化

実験を行った。その結果、化合物 **17** を LiHMDS で処理した後、重メタノールにより反応をクエンチした場合、約 12% の効率で 6 位に重水素が導入された。一方、化合物 **17** を LiHMDS によりトリメチルシリルクロリド、ジフェニルジスルフィド、ジフェニルジゼレニドと反応させたところ、6-TMS 体 **19**、6-フェニルスルフィド体 **20**、6-フェニルセレニル体 **21** がそれぞれ高収率で得られた。加えて、化合物 **15** と LiHMDS との反応では 6-シリル体を除き、ほとんど対応する生成物が得られないことから、先の一時的 O4 位シリル化が 6-リチオ化の引き金となっていることが示唆された (Scheme 4)。

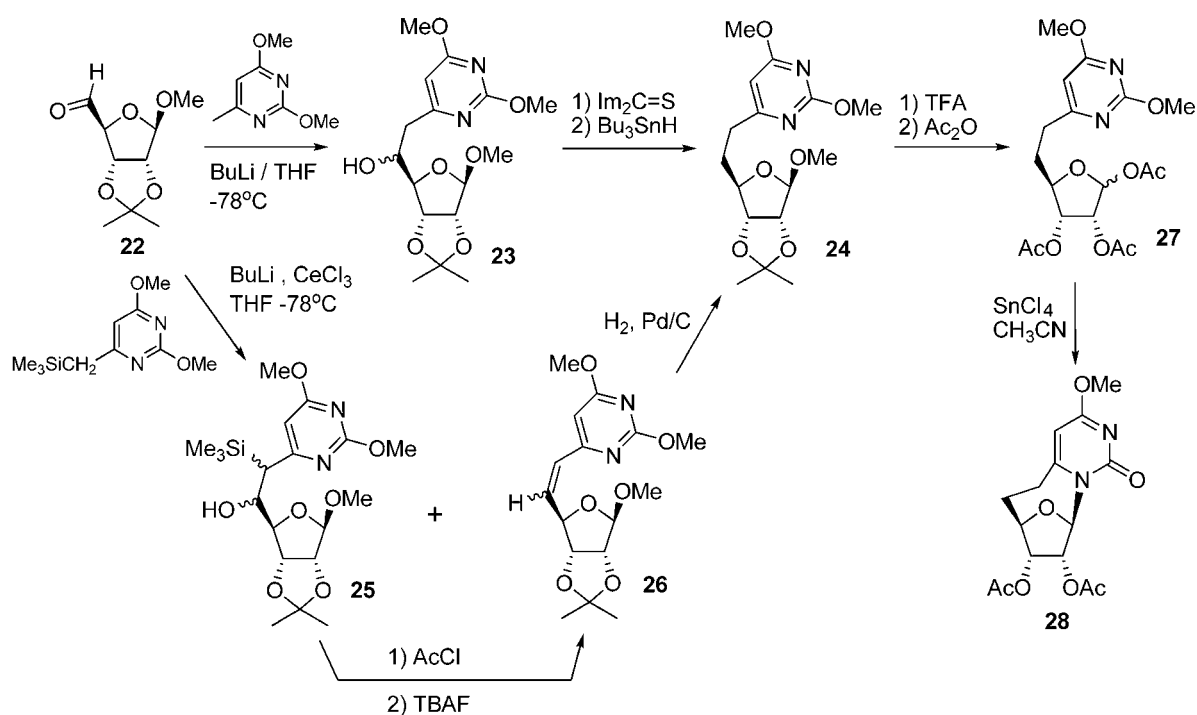
2) 分子内グリコシル化反応による 6,6'-C-シクロウリジンの合成¹¹⁾

上述の 6,5'-C-シクロウリジンの架橋炭素数を 1 個増やした誘導体は 6,6'-C-シクロウリジンと呼ばれ、その合成は、著者が研究を開始する以前に 6-シアノウリジン誘導体に対するラジカル環化反応により達成されていた。¹²⁾ しかし、このラジカル環化反応の収率が低く、biological probe 等への応用を考えた

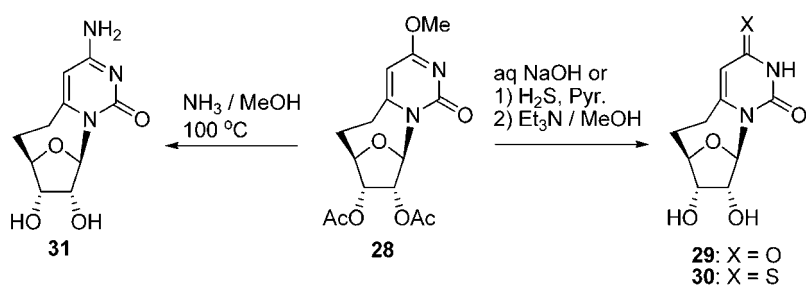
場合、より実用的合成法の開発が必要となっていた。著者は、分子内グリコシル化反応を鍵段階とする新たな C-シクロヌクレオシド合成法の開発に取り組み、6,6'-C-シクロウリジンの合成を検討した。D-リボースから数工程で得られるアルデヒド **22** に対し、2,4-ジメトキシ-6-メチルピリミジンのリチオ体を付加し、付加体 **23** を得た。付加体 **23** は、アルコール部分を Barton 還元により除去し、化合物 **24** とした。また、化合物 **24** の別途合成法として Peterson オレフィン化反応を利用する方法も検討した。2,4-ジメトキシ-6-(TMS メチル) ピリミジンのアルデヒド **22** に対する反応は低収率であったため、2,4-ジメトキシ-6-(TMS メチル) ピリミジンのリチオ体を調整後、有機セリウム試薬¹³⁾ に変換し付加を行ったところ、シラノール **25** とオレフィン **26** の混合物が生成した。**25** と **26** は混合物のまま、塩化

アセチルと引き続く TBAF 処理による anti 脱離を行い、オレフィン **26** を 74% の収率で得た。保護基の変換によりジアセチル体 **27** とした後、四塩化スズを触媒とする分子内 Hilbert-Johnson 反応¹⁴⁾ によるグリコシド結合形成を行い、6,6'-C-シクロヌクレオシド **28** を 66% の収率で得た (Scheme 5)。

6,6'-C-シクロヌクレオシド **28** は水酸化ナトリウム溶液と処理し、目的とする 6,6'-C-シクロウリジン **29** へ導いた。また、6,6'-C-シクロヌクレオシド **28** はウリジン以外の 6,6'-C-シクロピリミジンヌクレオシドを合成する場合においても有用な中間体となる。**28** を封管中メタノール性アンモニアと加熱処理すると 6,6'-C-シクロシチジン **31** が得られ、また、**28** の加硫化水素分解と引き続く脱保護により 6,6'-C-シクロ-4-チオウリジン **30** が良好な収率で得られた (Scheme 6)。



Scheme 5. Alternative synthesis of 6,6'-C-cyclouridine by an intramolecular glycosylation reaction

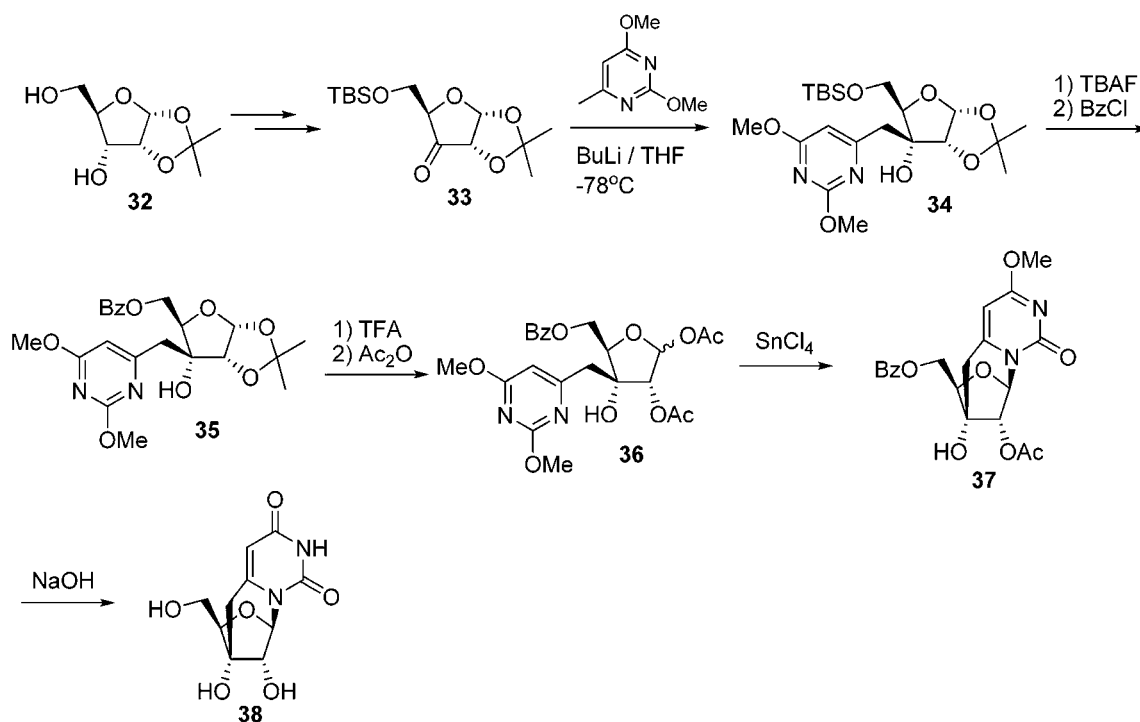


Scheme 6. Synthesis of 6,6'-C-cyclouridine, -cyclocytidine, and -cyclo-4-thiouridine

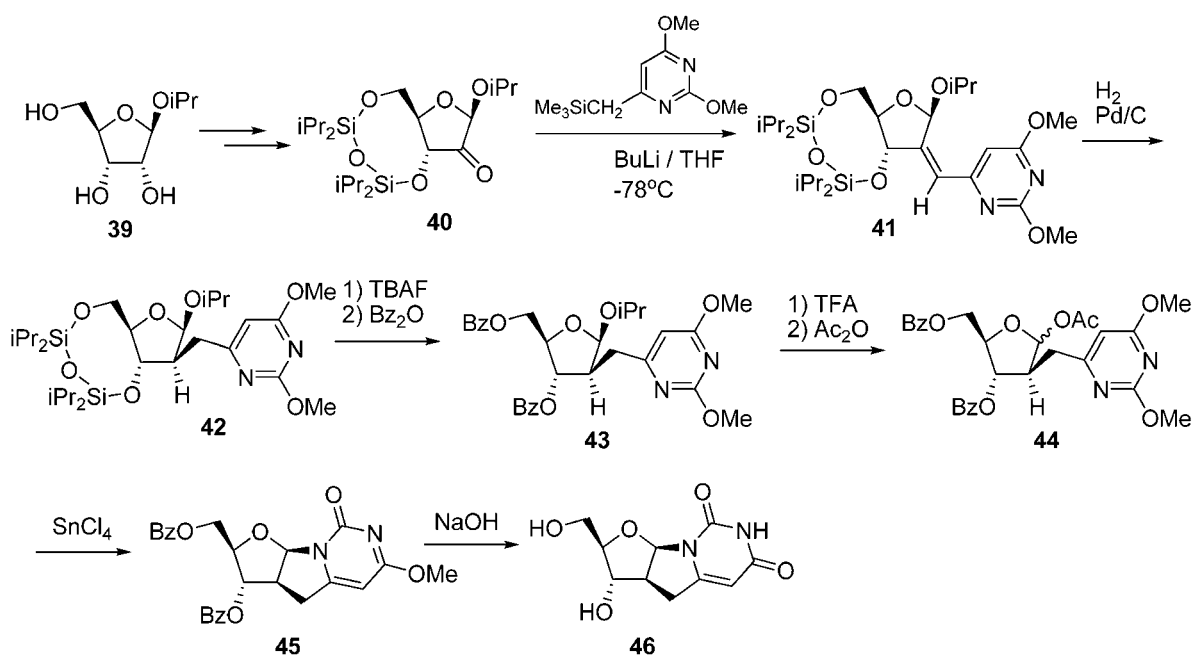
3) 6,3'-メタノウリジンの合成¹⁵⁾

6-メチルピリミジンのD-リボース誘導体への付加と分子内グリコシル化反応による6,6'-C-シクロヌクレオシドの合成は、より簡便かつ一般的な合成法として、他のC-シクロヌクレオシド合成へも応用が可能である。Scheme 7には、同様の方法論による6,3'-メタノウリジンの合成について示した。

D-キシロースより誘導した **32** をさらに数工程を経て3-ウロース **33** へと導いた。2,4-ジメトキシ-6-メチルピリミジンをブチリチウムによりリチオ化した後、ウロース **33** との付加反応を行い、アルコール **34** を75%の収率で単一の成績体として得た。保護基の変換によりジアセチル体 **36** とし、先と同様に分子内グリコシル化反応に付したところ、



Scheme 7. Synthesis of 6,3'-methanouridine



Scheme 8. Synthesis of 2'-deoxy-6,2'-methanouridine

目的とする 6,3'-メタヌクレオシド **37** を収率 82% で得た. 最後に, **37** のアルカリ処理により脱保護を行い, 6,3'-メタノウリジンを合成した (Scheme 7).

High-anti 型に固定された C-シクロヌクレオシドの合成

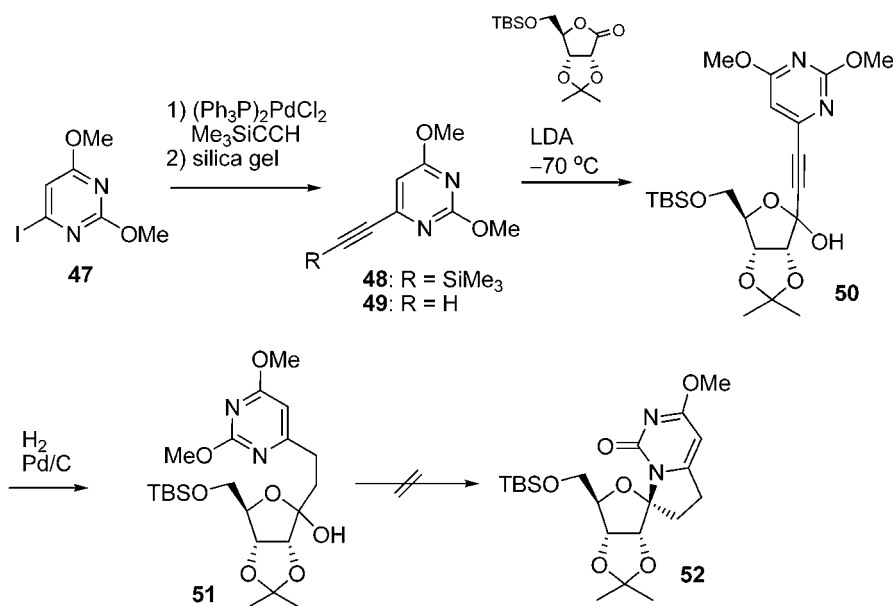
1) 6,2'-メタノウリジンの合成¹⁶⁾

前章で述べた分子内グリコシル化反応を基軸とする C-シクロヌクレオシド合成法は, さらに high-anti 型に固定された C-シクロヌクレオシド誘導体である 6,2'-メタノウリジンの合成へと応用した. 1-O-イソプロピル-D-リボース **39** から 2 工程で得られる 2-ウロース **40** に対し, 6,6'-C-シクロウリジンの際と同様に 2,4-ジメトキシ-6-(TMS メチル) ピリミジンとの Peterson オレフィン化反応を検討した. 2-ウロース **40** との反応では特に有機セリウム試薬¹³⁾ に変換する必要はなく, 対応するリチオ体と **40** との反応により 82% の収率で 2-メチレン体 **41** を与えた. このとき **41** は Z 体のみが優先的に生成した. 2-メチレン体 **41** は接触還元により 2-ピリミジニルメチル体 **42** へ変換した. この接触還元では 1-イソプロピル基の立体障害によりアラビノ配置を有する **42** が選択的に得られた. さらに保護基の変換を行い, 得られたアセチル体 **44** を分子内 Hilbert-Johnson 反応¹⁴⁾ に付したところ, 6,2'-メタヌクレオシド **45** が 78% の収率で得られた. 先の C-シクロウリジンの合成同様, **45** のアルカリ処理により目的とする 6,2'-メタノウリジン **46** の合成を達成した (Scheme 8).

Syn 型に固定された C-シクロヌクレオシドの合成

1) 6,1'-エタノウリジンの合成検討¹⁷⁾

著者が前述の C-シクロヌクレオシドの合成研究を行っていたころ, anti 型あるいは high-anti 型に固定された誘導体に関する合成例はいくつか存在していたが,¹⁸⁾ syn 型に固定されたものは, ほとんど存在していなかった.¹⁹⁾ そこで, syn 型に固定された C-シクロヌクレオシドとして, ウリジンの 1'位から炭素鎖を塩基部に架橋したスピロ構造を有する 6,1'-エタノウリジンをデザインし, その合成を検討することとした. さらに, 合成を行うにあたり, 先に著者が開発した分子内グリコシル化反応を基軸とする C-シクロヌクレオシド合成法を適用することとした. 6,1'-エタノウリジンの合成では, 炭素数 2 の側鎖を有するピリミジンシントンが必要となるが, このような条件満たす化合物として 6-エチニルピリミジンを選択した. 既知物質である 6-ヨードピリミジン **47** に対し, Heck 反応によるトリメチルシリルアセチレンとのクロスカップリング反応を行い, さらにトリメチルシリル基を除去し, 6-エチニルピリミジン **49** を合成した. LDA により生じた **49** のリチオ体を, 糖部ユニットとなるリボラクトン誘導体へ付加しアルコール **50** を単一の成績体として得た. アルコール **50** は, 3 重結合部の還元により **51** とし, さらにアセチル化を行った後, 様々なルイス酸触媒による分子内 Hilbert-Johnson 反応¹⁴⁾ を検討したが, 目的とする 6,1'-エタヌクレオシド **52** を得ることはできなかった (Scheme 9).



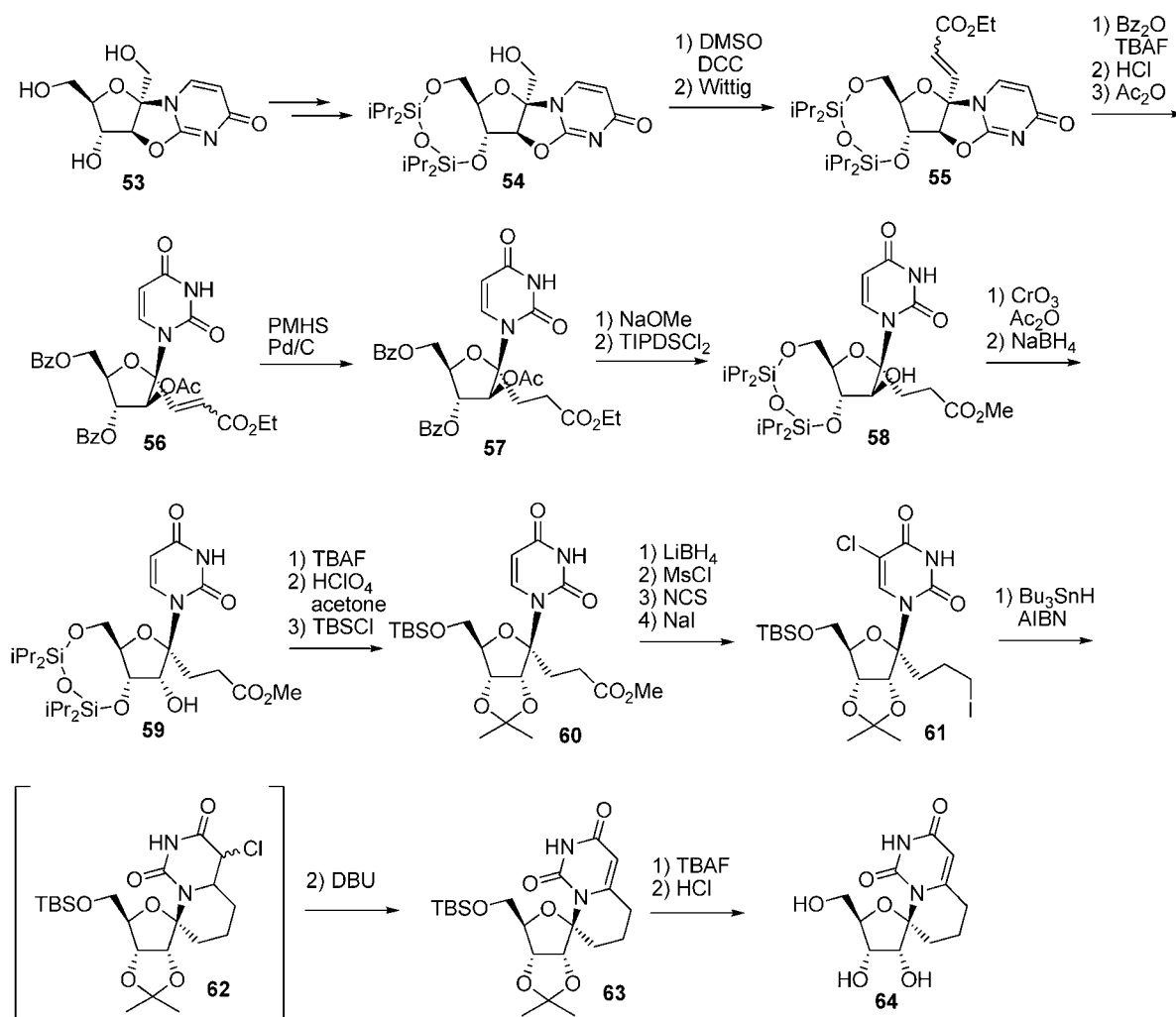
Scheme 9. An attempt to synthesize 6,1'-ethanouridine by an intramolecular glycosylation reaction

2) 6,1'-プロパノウリジンの合成¹⁷⁾

前節で述べたように分子内グリコシル化反応による5員環スピロ型C-シクロヌクレオシドの合成は不調であったことから、標的化合物を、6員環型スピロ構造を有する6,1'-プロパノウリジンに変更し、さらにその合成法についても従来法と同じラジカル環化反応を鍵反応とする方法で検討することとした。Holyらの報告²⁰⁾に従い合成したO-シクロウリジン**53**の3'および5'位水酸基を選択的に保護した後、1'位ヒドロキシメチル基の酸化、Wittig反応を経て不飽和エステル**55**を得た。**55**の2,2'-アンヒドロ結合部を酸処理により開裂し、アセチル化を行い2-アセチル体**56**とした。**56**の2重結合の接触還元では、通常の水素気流下の反応では、N-グリコシル結合の開裂が起こり収率の低下が認められた。条件検討の結果、水素源としてポリメチルヒドロシロキサン (PMHS) を用いる接触水素添加反応²¹⁾により効率よく**56**の還元が行

えることを見出し、化合物**57**を92%の収率で得た。**57**は保護基の変換工程を経てアルコール**58**へと誘導し、2'位水酸基の反転を試みた。4級炭素に隣接するこの水酸基の反転は、求核反応を中心とする検討は立体障害によりいずれも不調であった。唯一、2'位水酸基の酸化と引き続き水素化ホウ素ナトリウムによる還元反応により、所望の立体を有するウリジン誘導体**59**を合成することが可能であった。

59は再度保護基の変換を行い化合物**60**とした後、1'位の側鎖の変換等によりラジカル環化反応の前駆体となるヨード体**61**へ導いた。高度希釈条件のもと、ヨード体**61**をAIBN存在下、ベンゼン中水素化トリブチルスズと処理しラジカル環化反応に付したところ、スピロ体**62**がジアステレオマーの混合物として得られた。**62**は、ただちにDBU処理により脱離反応を行い、目的とするC-シクロヌクレオシド**63**を2工程、74%の収率で得た。最



Scheme 10. Synthesis of 6,1'-propanouridine

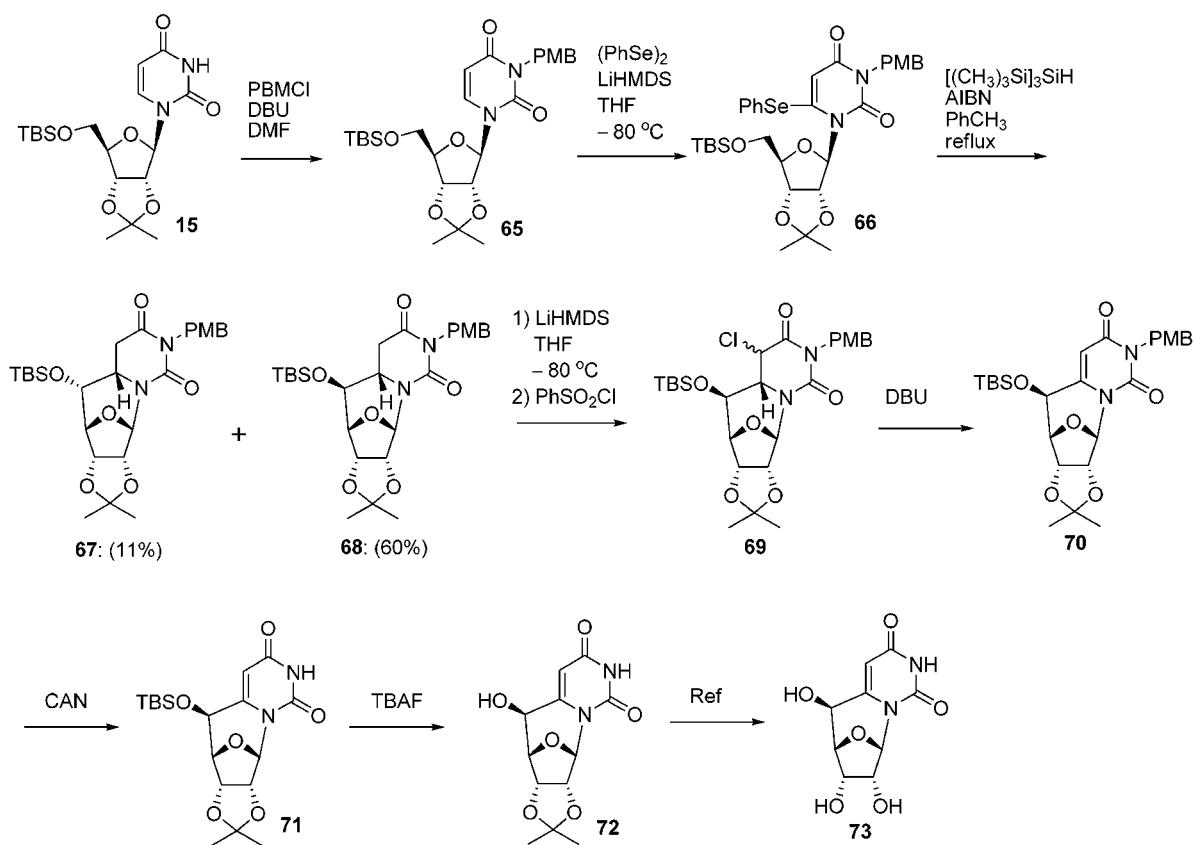
後に、シリル基とアセタールの除去を行い、初の syn 型固定 C-シクロヌクレオシドである 6,1'-プロパノウリジンの合成を達成した (Scheme 10).

その他の C-シクロヌクレオシドの合成

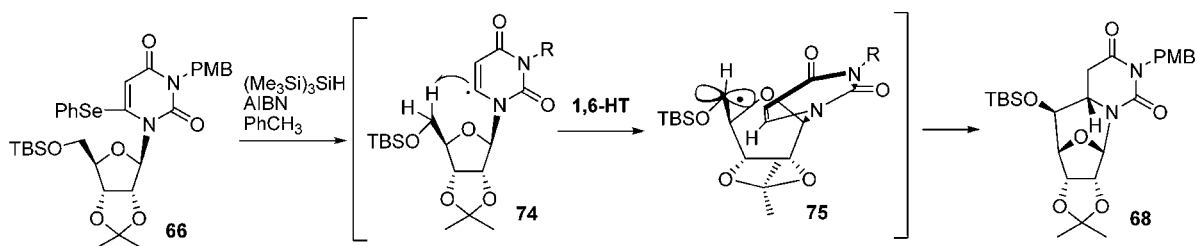
1) 新規水素引き抜き型ラジカル環化反応の開発と 6,5'-C-シクロウリジン誘導体の合成²²⁾

はじめに述べた anti 型固定 C-シクロヌクレオシドのうち、6,5'-C-シクロウリジンや 6,6'-C-シクロウリジンでは、5'位水酸基に相当する部分が欠落しているため、これら誘導体を ODN 中に導入することは不可能である。アンチセンス分子などへの展開を考えた場合、5'位水酸基を保持した誘導体の合

成が必要と考え、既知化合物ではあるが C-シクロヌクレオシド **73** の合成を検討することとした。合成を行うにあたり従来の合成法とは異なる、新しい合成法の開拓を主眼におき、さらにこれまでの著者の研究成果を踏まえ、ピリミジン環 6 位からの炭素鎖伸長を利用した新たな C-シクロヌクレオシドの合成を目指した。既知化合物 **15** のウラシル環 3 位をパラメトキシベンジル (PMB) 基で保護し、PMB 体 **65** を合成した。6,5'-C-シクロウリジンの別途合成の際、見出した LiHMDS による 6 位リチオ化反応については N3 位保護体でも同様に行うことが可能であり、**65** から同反応により 6-フェニルセレニル体 **66** を得た。**66** 分子中への炭素架橋



Scheme 11. Synthesis of 6,5'-C-cyclouridine derivative



Scheme 12. Speculated reaction mechanism of a novel tandem radical 1,6-hydrogen transfer and cyclization

の導入は、6位フェネルセレン基から遊離されるラジカル種を用いた分子内1,6-水素転位を伴うラジカル環化反応により達成できるものと考えた。事実、6-フェネルセレン体 **66** を AIBN 存在下トリリス（トリメチルシリル）シランと処理したところ目的とする環化成績体 **67** および **68** が、それぞれ11%、60%の収率で得られた。

この結果については、反応機構を含め次のように解釈している。同反応条件により生じたウラシル6-ラジカル **74** は、近傍に存在する5'位水素原子のうち1つを引き抜き、結果生成した5'-ラジカル **75** がウラシル環の6位に付加し環化する。このとき分子モデルから予想される5'-ラジカルの安定コンホメーションは Scheme 12 に示したモデル図のとおりであり、このラジカル中間体が優位にラジカル環化反応を行うことで、環化成績体 **68** が主生成物となったものと推定している (Scheme 12)。²³⁾

68 は、再度 LiHMDS と処理し、エノール化経路でジヒドロウラシル環5位をクロル化後、引き続く DBU 処理により2重結合の回復を行い、C-シクロヌクレオシド **70** へ誘導した。**70** の3位 PMB 基を CAN 処理により除去し、さらに5'位シリル基を脱保護し、6,5'-C-シクロウリジン誘導體 **72** を合成した。**72** は、先の6,5'-C-シクロウリジン **73** の最終中間体であり、これにより同化合物の形式合成を達成した (Scheme 11)。

モデル化合物としての C-シクロヌクレオシドの利用

ここまで C-シクロヌクレオシドの合成を中心に述べてきたが、以降では、C-シクロヌクレオシド

をモデル化合物や biological probe として利用した研究例について述べる。

1) C-シクロヌクレオシドの CD スペクトルとグリコシド結合回りのコンホメーション¹⁷⁾

光学不活性な発色団が不斉環境中に固定された場合、発色団は摂動を受け、円二色性 (CD) を示す。ウリジンのようなヌクレオシドの場合、発色団である塩基が糖とグリコシル結合により固定されることで CD スペクトルの測定が可能となり、主に発色団が結合している糖の1'位 (アノマー位) の不斉が反映されることになる。通常、ウリジンの CD スペクトルは紫外スペクトルの極大吸収波長である 260 nm 付近に分子楕円率 (θ) で約 9000 の正の Cotton 効果を示す。

ウリジンのグリコシル結合回りのコンホメーションである glycosyl torsion angle (χ) に関しては、比較的自由度があるが、ウラシル2位のカルボニル基と5'位ヒドロキシメチル基の立体障害により一部制限を受け、溶液中では anti 型が優先すると考えられている。従って、先のウリジンの CD スペクトルは、グリコシル結合の自由回転によって平均化されたものではあるが、その中でも優先的に存在する anti 型コンホメーションを一部反映したものと解釈できる。これに対してグリコシル結合を炭素架橋により固定した C-シクロヌクレオシドでは、そのグリコシル結合回りのコンホメーションについては特定の形しか取り得ず、特徴的な CD スペクトルを示す。Fig. 4 に、著者が合成した C-シクロウリジンの CD スペクトルと X 線結晶

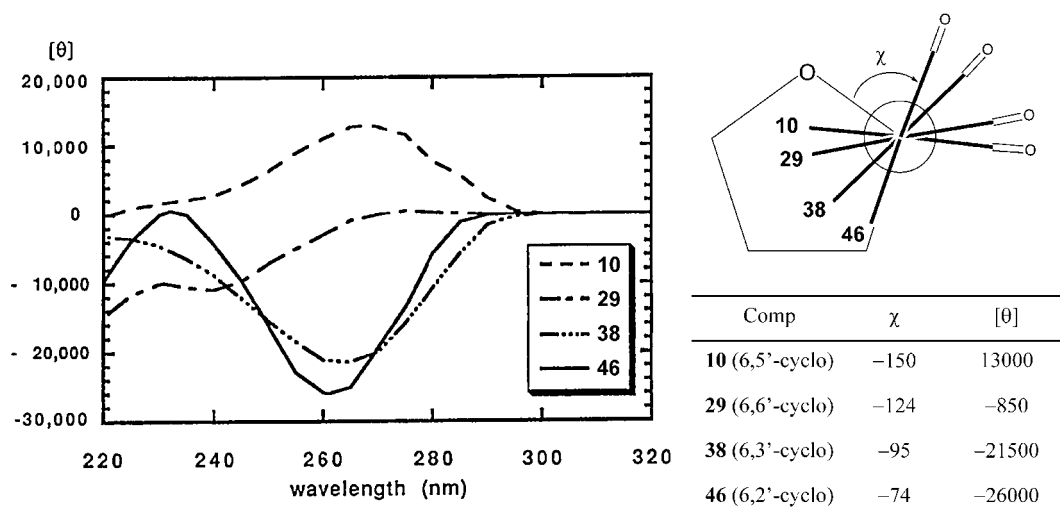


Fig. 4. CD spectra of C-cyclonucleosides fixed in anti-conformation: correlation between Cotton effect and glycosyl torsion angle

構造解析や分子モデルから算出した glycosyl torsion angle (χ) のデータをまとめた。これらの CD スペクトルから 6,5'-*C*-シクロ体 **10**, 6,6'-*C*-シクロ体 **29**, 6,3'-メタノ体 **38**, 6,2'-メタノ体 **46** との順に Cotton 効果の強度が減少し positive から negative へと変化していくことが解る。言い換えれば, Fig. 4 のモデル図と表からも明らかなように, glycosyl torsion angle (χ) が増大するに従い, Cotton 効果が positive から negative へと変化していると言することができる。このような CD スペクトルの Cotton 効果と glycosyl torsion angle との関係については, 著者らの研究以前に, Ulbricht²⁴⁾ や Milles²⁵⁾ らの報告がある。Ulbricht らは *O*-シクロヌクレオシドなどのモデル化合物を用いた研究からの経験則を,²⁴⁾ また, Milles らは Cotton 効果の glycosyl torsion angle 依存性について計算を行い,²⁵⁾ その結果を報告している。著者の研究結果は, Ulbricht や Milles らの結果と矛盾はなく, このことは *C*-シクロヌクレオシドが, このような研究において優れたモデル化合物となることを示している。

2) *C*-シクロウリジンリン酸化物とリボヌクレアーゼ A (RNase A) との相互作用²⁶⁾

ウシ臍臓由来 RNase A (EC.3.1.27.5) はピリミジン特異的な RNA 加水分解酵素であり, 酵素学的にも最も研究の進んでいる酵素のひとつである。

RNase A は RNA を, 2',3'-環状リン酸を経由し 3'-リン酸に加水分解するが, X 線結晶構造解析などから, RNase A と基質となる RNA (2',3'-環状リン酸) が結合する際, グリコシル結合回りのコンホメーションについては anti 型を優先的に認識するものと考えられている。^{27,28)} *C*-シクロヌクレオシドは, このような酵素と基質であるヌクレオシド (ヌクレオチド) との立体化学的相互作用を検討する上で有用な biological probe となる。上田らは, *C*-シクロウリジン類の 2',3'-環状リン酸とそれらの酵素加水分解により対応する 3'-リン酸誘導体 (Fig. 5) を合成し, RNase A との相互作用について検証した。¹⁷⁾

まず, *C*-シクロウリジンを含むウリジン 2',3'-環状リン酸誘導体を用い, RNase A による加水分解反応について検討した結果を Table 1 に示す。

本来の基質であるウリジン 2',3'-環状リン酸 **76** や 4-チオウリジン 2',3'-環状リン酸 **77** がほぼ完全に加水分解を受け, 対応する 3'-リン酸に変換されるのは当然であるが (Entries 1 and 2), 5'-水酸基を欠落している 6,5'-*C*-シクロウリジンや 6,6'-*C*-シクロウリジンの 2',3'-環状リン酸 (**78**, **79**) も RNase A の基質として認識されている (Entries 3 and 4)。これらの結果は, 当初に述べたように RNase A がグリコシル結合回りのコンホメーションとしては anti 型を好んで認識していることが示

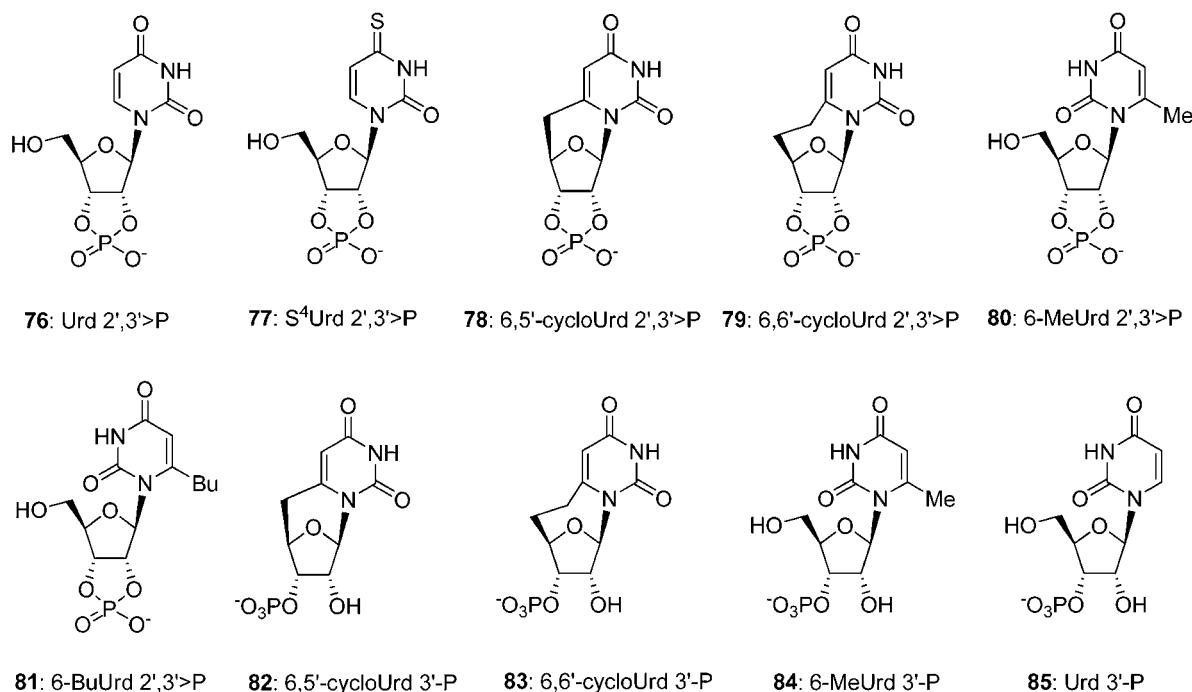


Fig. 5. Structures of nucleoside cyclic phosphates and nucleoside 3'-phosphates

Table 1. Hydrolysis of nucleoside 2',3'-cyclic phosphates with RNase A (37°C, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)-1 mM EDTA, 16 h)

| Entry | Nucleotide | Degree of hydrolysis (%) |
|-------|--|--------------------------|
| 1 | 76 : Urd 2',3'>P | >95 |
| 2 | 77 : S ⁴ Urd 2',3'>P | >95 |
| 3 | 78 : 6,5'-cycloUrd 2',3'>P | 40 |
| 4 | 79 : 6,6'-cycloUrd 2',3'>P | 12 |
| 5 | 80 : 6-MeUrd 2',3'>P | 5 |
| 6 | 81 : 6-BuUrd 2',3'>P | 0 |

Table 2. Inhibition of hydrolysis of 4-thiouridine 2',3'-cyclic phosphate (S⁴Urd 2',3'>P) with RNase A by cyclonucleoside 3'-phosphates (37°C, 1h, 10 mM acetate buffer (pH 5.9), S⁴ Urd 2',3'>P: 8 mM, inhibitor: 10 mM)

| Entry | Inhibitor | Hydrolysis of S ⁴ Urd 2',3'>P (%) |
|-------|--------------------------------|--|
| 1 | none | 96 |
| 2 | 82 : 6,5'-cycloUrd 3'-P | 10 |
| 3 | 83 : 6,6'-cycloUrd 3'-P | 9 |
| 4 | 84 : 6-MeUrd 3'-P | 61 |

Table 3. Dissociation constants (Kd) of RNase A-nucleoside 3'-phosphate complexes

| Entry | Nucleotides | Kd (μ M) |
|-------|--------------------------------|---------------|
| 1 | 85 : Urd 3'-P | 2.6 |
| 2 | 82 : 6,5'-cycloUrd 3'-P | 2.5 |
| 3 | 83 : 6,6'-cycloUrd 3'-P | 0.9 |
| 4 | 84 : 6-MeUrd 3'-P | 34 |

唆される。一方、溶液中では syn 型を取ると考えられている 6-メチルウリジン 2',3'-環状リン酸 **80** と 6-ブチルウリジン 2',3'-環状リン酸 **81** が、RNase A によってほとんど加水分解を受けないことも先の推論を支持するものである (Entries 5 and 6)。

Anti 型固定の C-シクロヌクレオチドである 6,5'-C-シクロウリジン 2',3'-環状リン酸や 6,6'-C-シクロウリジン 2',3'-環状リン酸の加水分解効率率は、天然の基質であるウリジン 2',3'-環状リン酸に比べ極端に加水分解速度が遅い。その理由のひとつとして、生成物である C-シクロウリジン 3'-リン酸が RNase A に対して product inhibition を起こすことが考えられ、これら 3'-リン酸体の RNase A 加水分解反応に対する阻害効果について検討している (Table 2)。

期待どおり、6,5'-C-シクロウリジン 3'-リン酸 **82** および 6,6'-C-シクロウリジン 3'-リン酸 **83** はいずれも、RNase A による 4-チオウリジン 2',3'-環状リ

ン酸の加水分解を阻害する一方 (Entries 2 and 3), 6-メチルウリジン誘導体 **84** に関しては、その阻害作用はごく弱いものであった (Entry 4)。C-シクロウリジン 3'-リン酸の RNase A への結合の強さについて、上田らは、RNase A を固定化したカラムを用いた前端クロマトグラフ法²⁹⁾による評価を行い、解離定数 (Kd) の決定も行っている (Table 3)。

ウリジン 3'-リン酸 **85** が product inhibition を起こすことは既に知られており、**85** は 2.6 μ M の解離定数を示した (Entry 1)。6,5'-C-シクロウリジン 3'-リン酸 **82** は、**85** とほぼ同程度の解離定数であったのに加え、6,6'-C-シクロウリジン 3'-リン酸 **83** は、これらの化合物よりも RNase A に対してさらに高い親和性を示した (Entries 2 and 3)。一方、6-メチルウリジン 3'-リン酸 **84** の解離定数は、34 μ M とかなり大きな値を示し (Entry 4)、これらの結果は、先の阻害実験の結果と良く一致している。

おわりに

著者のこれまでの研究を中心に C-シクロウリジンの合成とその応用研究について述べた。ウリジン以外についても、様々な C-シクロヌクレオシドの合成が報告されているが、誌面の関係で割愛した。この点については他の総説³⁰⁾を参考にさせていただきたい。また、その応用研究から C-シクロヌクレオシドがヌクレオシドと酵素との相互作用を調べる上で有用な conformational probe となることを紹介した。さらに RNase A について、C-シクロヌクレオシドリン酸体が新規阻害剤となる可能性が示唆されるなど、今後の展開に期待が持たれる。

謝辞 本総説の中で紹介した著者の研究を行うにあたり、著者がこれまで在籍した北海道大学大学院薬学研究院 松田彰教授、昭和大学薬学部田中博道教授、東北薬科大学薬学部高畑廣紀教授よりご指導、ご助言を頂戴した。ここに記して感謝申し上げます。また、一部の研究費については、文部科学省 科学研究費補助金より財政的支援を頂いた。合わせて深謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) W. ゼンガー 著, 西村義文 訳, 核酸構造 (上), シュプリンガー・フェアクラーク東京, 1987.
- 2) Marquez V. E., Lim B. B., Barchi, Jr. J. J., Nicklaus, M. C. Conformational Studies and Anti-HIV Activity of Mono- and Difluorodideoxy Nucleosides in "Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents" Chu C. K. and Baker D. C. eds., Plenum Press, 1993, pp. 265-284.
- 3) a) Obika S., Nanbu D., Hari Y., Morio K, In, Y., Ishida T., Imanishi T. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8735-8738 (1997); b) Singh S. K., Nielsen P., Koshkin A. A., Wengel J., *Chem. Commun.*, 455-456 (1998).
- 4) Marquez V. E., Ben-Kasus T., Barchi, Jr. J. J., Green K. M., Nicklaus M. C., Agbaria R., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 543-549 (2004).
- 5) Paquette L. A., Owen D. R., Bibart R. T. Seekamp C. K., Kahane A. L., *Org. Lett.*, **3**, 4043-4045 (2001).
- 6) Yoshimura Y., Kumamoto H., Baba, A., Tanaka, H., *Org. Lett.*, **6**, 1793-1795 (2004).
- 7) Ueda T., Usui H., Shuto S., Inoue H., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3410-3416 (1984).
- 8) Tanaka H., Hayakawa H., Miyasaka T., *Tetrahedron*, **38**, 2635-2642 (1982).
- 9) Ogamino J., Kumamoto H., Mizunuma H., Takeda S., Tanaka H., *Nucleic Acids Res., Suppl. 1*, 3-4 (2001).
- 10) Tsuchiya K., Komatsu H., *Nucleic Acids Res., Suppl. 2*, 135-136 (2002).
- 11) Yoshimura Y., Matsuda A., Ueda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 660-664 (1989).
- 12) Sano T, Inoue H., Ueda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1856-1860 (1985).
- 13) Inamoto T., Takiyama N., Nakamura K., *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4763-4766 (1985).
- 14) Hilbert G. E., Johnson T. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **30**, 4489-4494 (1930).
- 15) Yoshimura Y., Sano T., Matsuda A., Ueda, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 162-167 (1988).
- 16) Yoshimura Y., Matsuda A., Ueda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 389-392 (1990).
- 17) a) Yoshimura Y., Ueda, T., Matsuda A., *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4542-4549 (1991). b) Yoshimura Y., Otter B. A., Ueda, T., Matsuda A., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1761-1769 (1992).
- 18) a) Otter B. A., Falco E. A., Fox, J. J., *J. Org. Chem.*, **41**, 3133-3137 (1976). b) Sasson I. M., Otter B. A., *J. Heterocyclic Chem.*, **24**, 1439-1444 (1983).
- 19) 一部 O-シクロヌクレオシドについて報告例があるのみであった: Brown D. M., Todd A. R., Varadarajan S., *J. Chem. Soc.*, 868-872 (1957).
- 20) Holý A, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 289-298 (1974).
- 21) Lipowitz J., Bowman S. A., *J. Org. Chem.*, **38**, 162-165 (1973).
- 22) Yoshimura Y., Yamazaki Y., Wachi, K., Satoh S., Takahata H., *Synlett*, 111-114 (2007).
- 23) 同様な水素引き抜き型ラジカル反応による C-シクロアデノシンの合成が報告されている: a) Mastuda A., Tezuka M., Ueda T., *Tetrahedron*, **34**, 2449-2452 (1978); b) Gani D., Johnson A. W., Lappert M. F., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3065-3569 (1981); c) Flyunt R., Bazzanini R., Chatgialiloglu C., Mulazzani Q. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4225-4226 (2000); d) Chatgialiloglu C., Guerra M., Mulazzani Q. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3839-3848 (2003); e) Chatgialiloglu C., Duca M., Ferreri C., Guerra M., Ioele M., Mulazzani Q. C., Strittmatter H., Giese B., *Chem. Eur. J.*, **10**, 1249-1255 (2004); f) Navacchia

- M. L., Chatgialloglu C., Montecvecchi P. C., *J. Org. Chem.*, **71**, 4445-4452 (2006).
- 24) Rogers G. T., Ulbricht T. L. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 414-418 (1970).
- 25) Miles D. W., Inskip W. H., Robins M. J., Winkley M. W., Robins R. K., Eyring H., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3872-3881 (1970).
- 26) Ueda T., *Nucleosides Nucleotides*, **4**, 67-75 (1985).
- 27) Borkakoti N., *Eur. J. Biochem.*, **132**, 89-94 (1983).
- 28) Howlin B., Harris G. W., Moss D. S., Palmer R. A., *J. Mol. Biol.*, **196**, 159-164 (1987).
- 29) Kasai K, Ishii S., *J. Biochem.*, **84**, 1061-1069 (1978).
- 30) Len C., Mondon M., Lebreton J., *Tetrahedron*, **64**, 7453-7475 (2008).