

②

機能性フラビン誘導体の合成と反応に
関する研究

1992

秋山 泰身

目次

理論の部

緒言	1
第1章 著者の研究方針	3
第2章 フラビニウム塩を用いた1電子伝達系の構築	
第1節 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ とフラビニウム塩を用いた電子伝達系	7
第2節 NADHモデル化合物とフラビニウム塩による電子伝達系の構築	11
第3章 5位に水素結合し得る新しいフラビン酵素モデル化合物の合成と性質	
第1節 N(5)位に水素結合し得るフラビン誘導体のデザインと合成	14
第2節 フラビンカルボン酸類のUV-可視光吸収スペクトル	18
第3節 N(5)位に水素結合可能なフラビンのセミキノンラジカルの安定性	23
第4節 フラビン-6-カルボン酸類のセミキノンラジカルのESRスペクトルの解析	31
第5節 フラビン-6-カルボン酸類のセミキノンラジカルのUV-可視光吸収スペクトル	34
第6節 N(5)位に分子内水素結合可能なフラビンによる過酸化水素の活性化	37
第4章 フラビンによるDNA光切断反応	
第1節 DNA切断活性を持つフラビン誘導体のデザインと合成	43
第2節 フラビン誘導体によるDNA光切断の検討	45
第3節 フラビンによるDNA光切断の塩基特異性の検討	47

第5章	フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの合成と性質	
第1節	フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの合成	51
第2節	フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの構造確認	60
第3節	フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの分光学的性質	65
第4節	フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドと相補鎖による ヘリックスの熱的安定性とその構造	71
第5節	フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドによる塩基配列特異的 DNA切断	77
第6章	結語および要約	81
	謝辞	82
	実験の部	
	第2章に関する実験	83
	第3章に関する実験	86
	第4章に関する実験	96
	第5章に関する実験	99
	引用文献	105

理論の部

緒言

フラビン含有酵素は生体内において広く分布し、呼吸鎖¹⁻³あるいは薬物代謝⁴⁻⁵にかかわる酵素として非常に重要な役割を果たしている。これらフラビン含有酵素では、FAD (flavin adenine dinucleotide) やFMN (flavin mononucleotide) (Fig. 1-1) に代表されるフラビン補酵素 (イソアロキサジン類) が主にその機能を担っており、アポタンパク部分は補酵素であるフラビン類 (イソアロキサジン類) の活性化あるいは基質特異性などを発現する役割を果たしている。

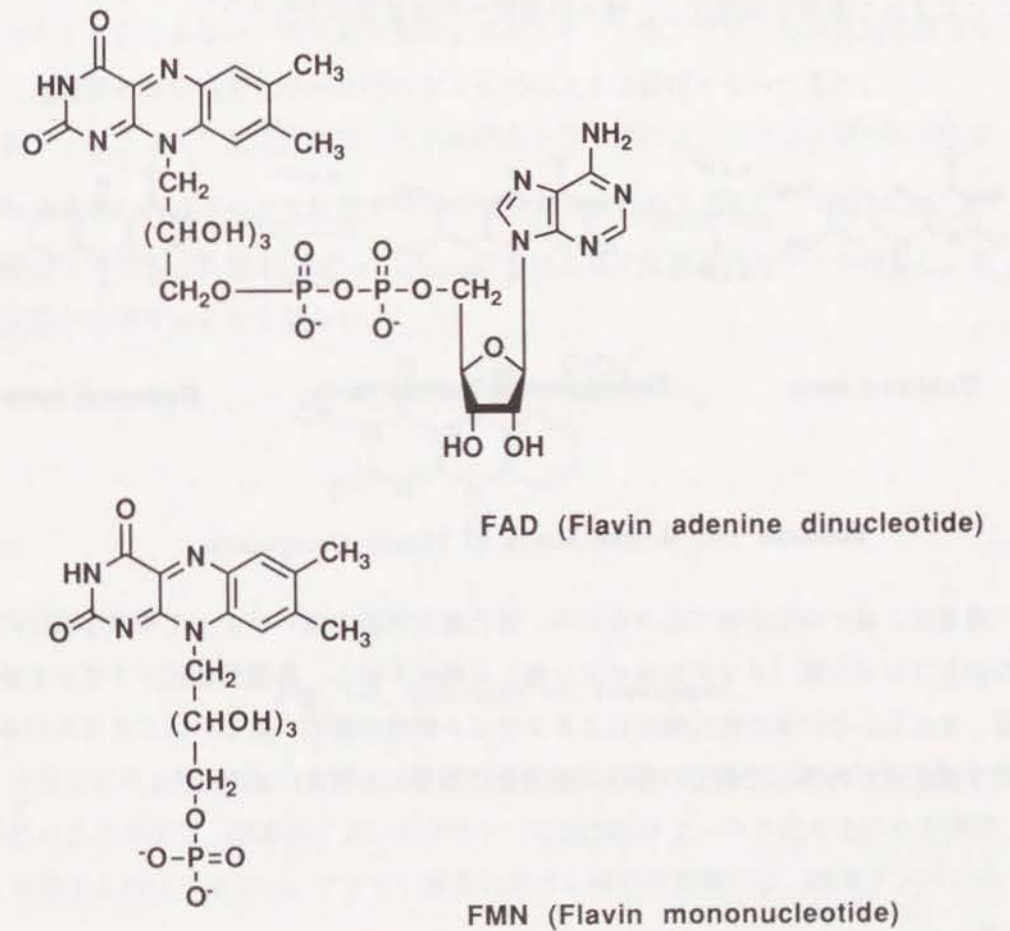


Fig. 1-1. Structures of Flavin Coenzymes

第1章 著者の研究方針

フラビン類は大きく分けて酸化型、セミキノン型、完全還元型の3種類の酸化還元状態をとり得ることが知られている⁶ (Scheme 1-1)。酸化型フラビンはフラビン酵素の反応のなかで、主に脱水素反応を司っている⁷。また特徴的な可視光部の吸収や蛍光を持つとともに高い平面性を持つため、その物理的性質に関して古くから興味を持たれてきた。セミキノン型フラビンはNADH (1,4-dihydronicotine amide dinucleotide) のような2電子酸化還元剤と金属ポルフィリンのような1電子酸化還元剤との間で電子運搬体として機能している⁷。そして完全還元型フラビンは分子状酸素と反応することによって酸素を活性化し、種々の基質への酸素添加を行う^{8,9}。



Scheme 1-1. Redox States of Flavin Compounds.

著者は、単一の化合物でありながら、酸化還元状態の違いによって多様な反応性を示すフラビン類（イソアロキサジン類）に興味を持ち、各種機能性フラビンを設計、合成し、その反応性の検討によるフラビン機能の解明、あるいはフラビンの多彩な機能性を利用した新しい反応の開発を目指して本研究に着手した。

フラビンは酵素に組み込まれた状態と補酵素だけの状態とではその性質が大きく変化する。酵素内において完全還元型フラビンは分子状の酸素を活性化することによりアミン類やスルフィド類の酸素添加反応を行う^{8,9}。一方、ラジカル構造を持つセミキノン型フラビンは生体内2電子酸化還元剤と1電子酸化還元剤との間の橋渡しの役割を担っている⁷。ところが、補酵素のみを取り出した場合、フラビンの完全還元型およびセミキノン型の安定性が大きく損なわれてしまうため、このような反応はほとんど起こらない。完全還元型およびセミキノン型フラビンの不安定性はフラビン補酵素の反応性を化学的に研究する上での大きな妨げとなってきた。

従来、フラビンの反応性に関し化学的研究を行う際には、フラビン環のN(5)位をアルキル化したフラビニウム塩 **1** を用いて研究が行われてきた¹⁰⁻¹⁴ (Fig. 1-2)。まず著者はフラビニウム塩 **1** を用いて *in vitro* における電子伝達系のモデルを構築し、有機反応へ応用することを試みた。

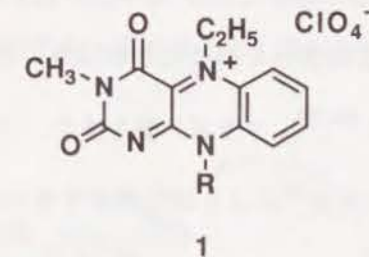


Fig. 1-2. Structure of Flavinium

フラビニウム塩 **1** は、フラビン酵素モデルとして多くの研究に用いられてきたが、当然のことながら、酵素内においてフラビンはN(5)位をアルキル化することで機能を発現するわけではない。フラビン酵素における機能の発現には、酵素タンパクの amino acid 残基によるフラビン補酵素への水素結合が重要であると考えられている¹⁵。フラビニウム塩 **1** の例から考えてもN(5)位への水素結合はフラビンの反応性に大きな影響を及ぼすと考えられる。そこで、著者はフラビンのN(5)位に分子内水素結合しうるようなフラビン **10, 11** を設計・合成し、機能性の変化を調べることによって

タンパクのアミノ酸残基との水素結合がフラビンの反応性に及ぼす影響に関して検討を行った。

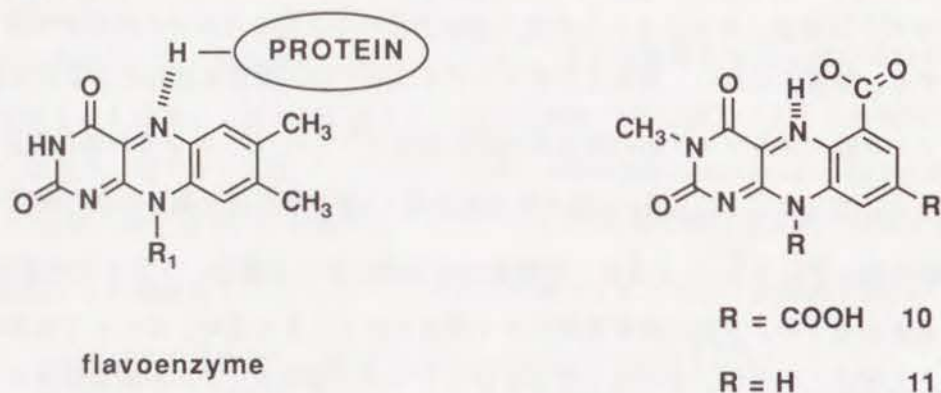


Fig. 1-3. Concept of Flavin-6-carboxylic Acid Derivatives.

最近、数多くの化合物に関し、DNA切断活性が報告されている。DNA切断活性を持つ化合物は、抗ウイルス剤あるいは抗癌剤としての応用はもとより¹⁶⁻¹⁸、人工制限酵素として、あるいはフットプリンティング法などの分子生物学的手法への応用¹⁹⁻²³に広く用いられる。DNA切断活性を持つ化合物は主に活性酸素産生により活性を発現することが知られている²⁴⁻²⁹。フラビン類もまた、フラビン還元体と分子状酸素との反応³⁰あるいは光との反応³¹により活性酸素を生じる。さらにフラビン類には抗マラリア剤としての応用が報告されている^{32,33}。従ってフラビンと生体内成分特にDNA, RNAとの相互作用を調べることは医薬化学の観点から必要不可欠であると思われる。そこで著者はフラビンのDNA切断活性に関して検討した。

また近年DNAやmRNAに対しその相補鎖を用いて転写やタンパク発現を抑制するアンチセンスDNA, RNA法が新しい薬品の形態として脚光を浴びている³⁴⁻³⁵(Fig. 1-4)。その一連の研究において、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドに機能性分子を結合させることにより、相補鎖とのクロスリンク活性や相補鎖切断活性をもたせたり、核酸塩基と相互作用し得るような化合物を用いて、より安定な2本鎖を形成させる試みがなされている^{36,37}。

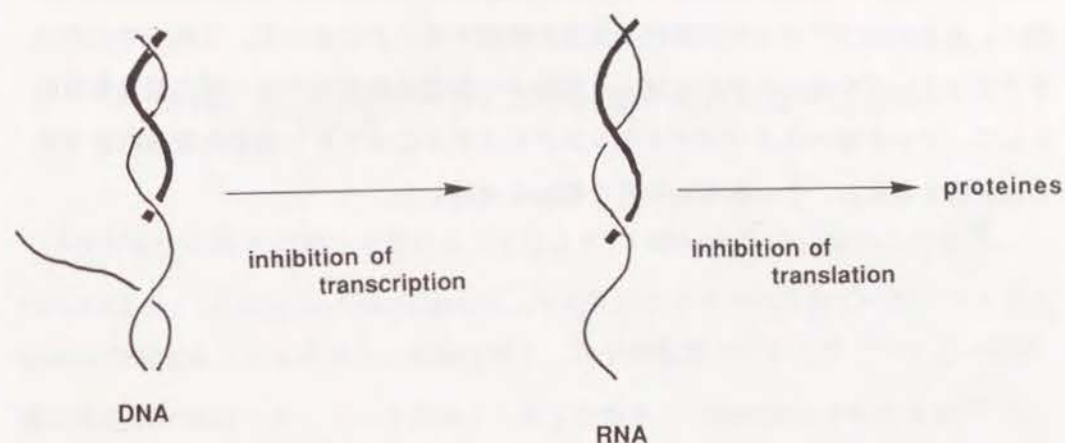


Fig. 1-4. Principle of Antisense DNA and RNA Methods.

一方、酸化型フラビンは、生体内の補酵素形態であるFAD (flavin adenine dinucleotide) において、アデニン環部分と分子内相互作用を行っていることが知られている(Fig. 1-5)^{38,39}。

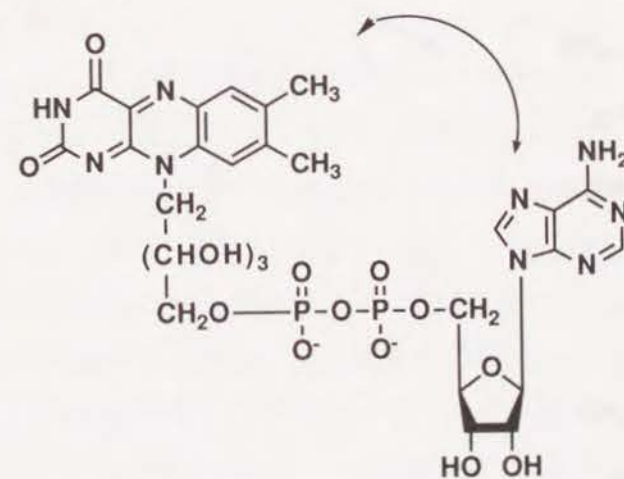


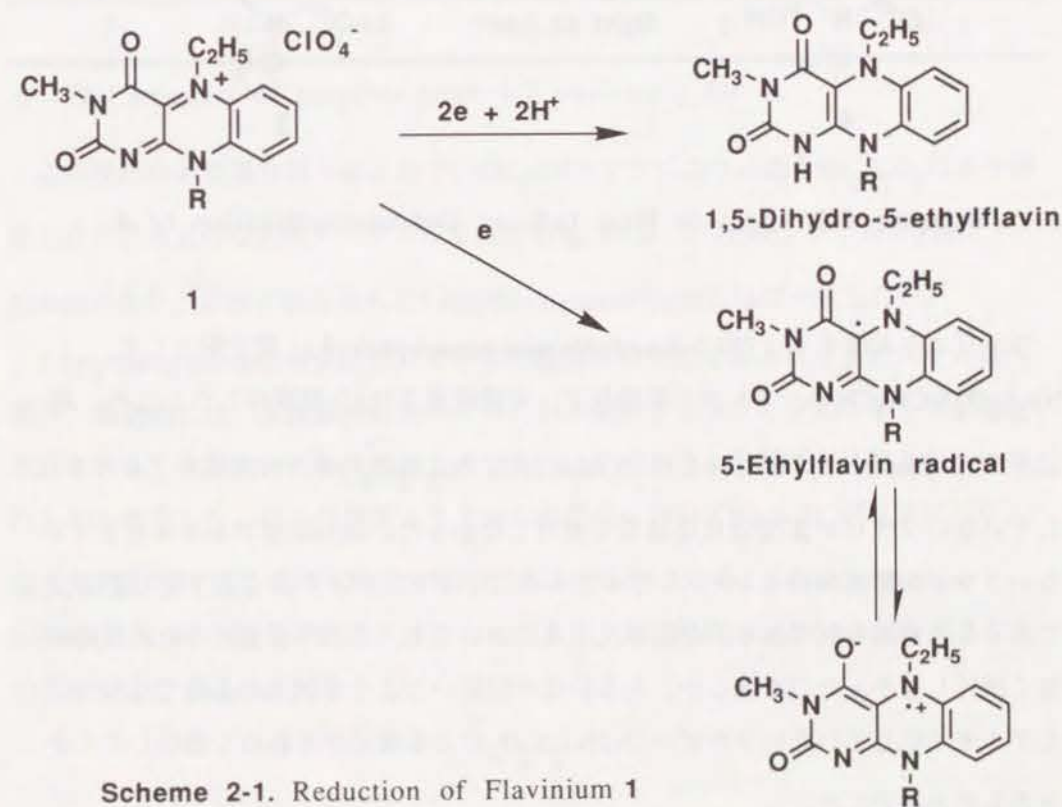
Fig. 1-5. Intramolecular Interaction of FAD

そこで、この相互作用を利用することで、アンチセンスDNAにおける2本鎖安定性の向上、あるいはフラビンの特徴的な蛍光を利用することによって、これまでのラジオアイソトープを使ったプローブより安全かつ安定な蛍光性プローブの開発を目的として、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドにフラビン分子を共有結合させた化合物を合成し、その物理的性質や機能を検討した。

第2章 フラビニウム塩を用いた1電子伝達系の構築

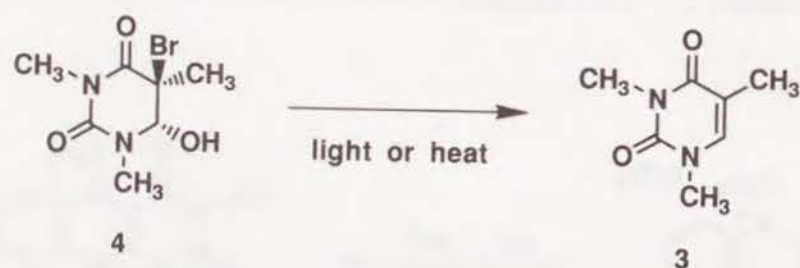
第1節 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ とフラビニウム塩を用いた電子伝達系

フラビニウム塩 **1** は還元を受けることにより1,5-dihydro-5-ethylflavinとなる⁴⁰ (Scheme 2-1)。1,5-Dihydro-5-ethylflavinは、N(5)位がアルキル化されていないフラビン誘導体の還元体よりもはるかに安定であり、分子状酸素の活性化などフラビン補酵素の反応性の検討に適しているため、これまで数多くの研究がなされてきた¹⁰⁻¹⁴。また還元剤の種類によっては5-ethylflavin radicalを与えることも知られている⁴⁰ (Scheme 2-1)。



これまでの研究においては、フラビンの反応性に関する研究はほとんどが2電子酸化還元過程を経るものであった。そこで著者はフラビニウム塩 **1** の1電子酸化還元能に着目した。フラビンの電子運搬体としての性質を考慮すると、1電子酸化還元による電子伝達系の構築は生体内におけるその重要性から考えても興味深い。

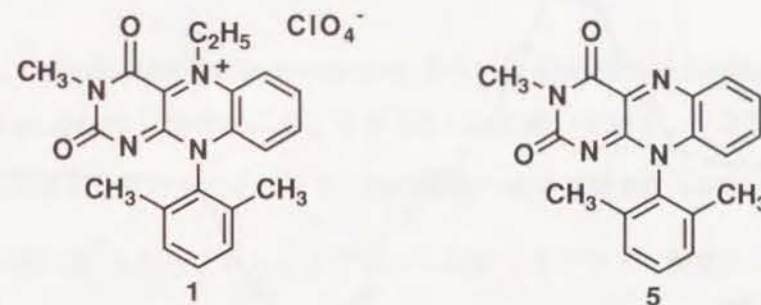
1,3-Dimethylthymine bromohydrin (**4**) は光あるいは熱によるラジカルメカニズムによって、容易に脱bromohydrin化して1,3-dimethylthymine (**3**) となることが当研究室より報告された⁴¹ (Scheme 2-2)。著者はこの1電子還元反応を光や熱を用いずに5-ethylflavin radicalを用いて進行させることを試みた。



Scheme 2-2. Light or Heat Induced Debromohydrination of **4**.

フラビニウム塩 **1** および1,3-dimethylthymine bromohydrin (**4**)、還元剤として $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を CH_3CN 中、アルゴン雰囲気下、室温暗室下で2日間攪拌したところ、高収率で1,3-dimethylthymine (**3**) を得た (Table 2-1)。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ のみやN(5)位をアルキル化していないフラビン **5** では反応は全く進行しなかった。N(5)位をアルキル化していないフラビン誘導体のセミキノンラジカル体はアポタンパクの非存在下では不安定であることが知られており、今回の反応系においても、この不安定性のため反応が全く進行しなかったのであるか、あるいは今回用いたような無水の条件ではN(5)位をアルキル化していないフラビンでは $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ による還元がきわめて進行しにくかったものと推定した。

Table 2-1. The Debromohydrination of **4** by the $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and Flavinium **1** System.



Entry	Reagents ^a	Reaction times	Yields (%)	Recovery(%)
1	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	3 days	0	58.1
2	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + 1	2 days	87.4	0
3	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + 5	3 days	0	90.5

a The amounts of reagents were 1.2 equivalent for **4**.

この反応の活性種を調べる目的で、 CH_3CN 中フラビニウム塩を $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により還元したところ良好なESRスペクトルを得た (Fig. 2-1)。このESRシグナルのg値は2.0040であり、以前に報告された5-ethylflavin radicalのg値とほぼ一致した⁴⁰。

5-Ethylflavin radicalは好氣的には分子状の酸素との反応で徐々にフラビニウム塩へ戻り、嫌氣的には、水酸基の付加とそれに引き続いて分解反応が起こることが報告されている。今回用いた条件は無水系であり、このような分解反応は起こらなかったものと推定した。以上の事実より上述した反応において $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ がフラビニウム塩 **1** を1電子還元し、ここに生成するフラビンラジカルから1,3-dimethylthymine bromohydrin (**4**) へ電子が伝達されることにより、還元的脱bromohydrin化が起きたものと推定した (Scheme 2-3)。

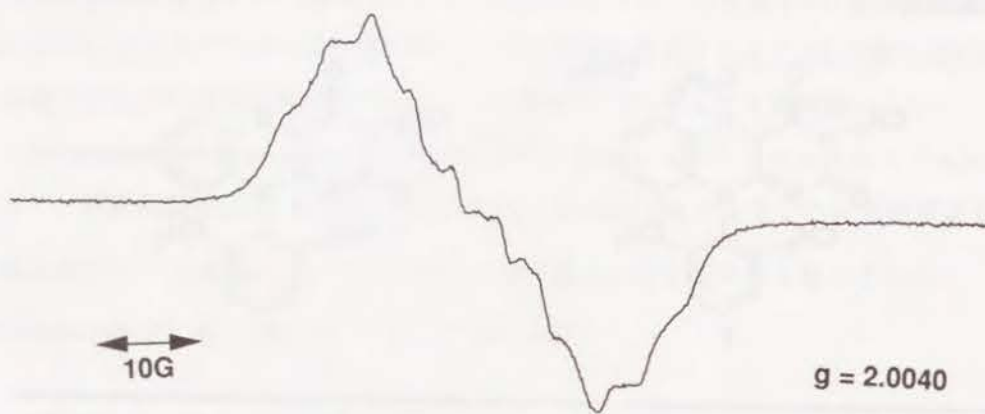
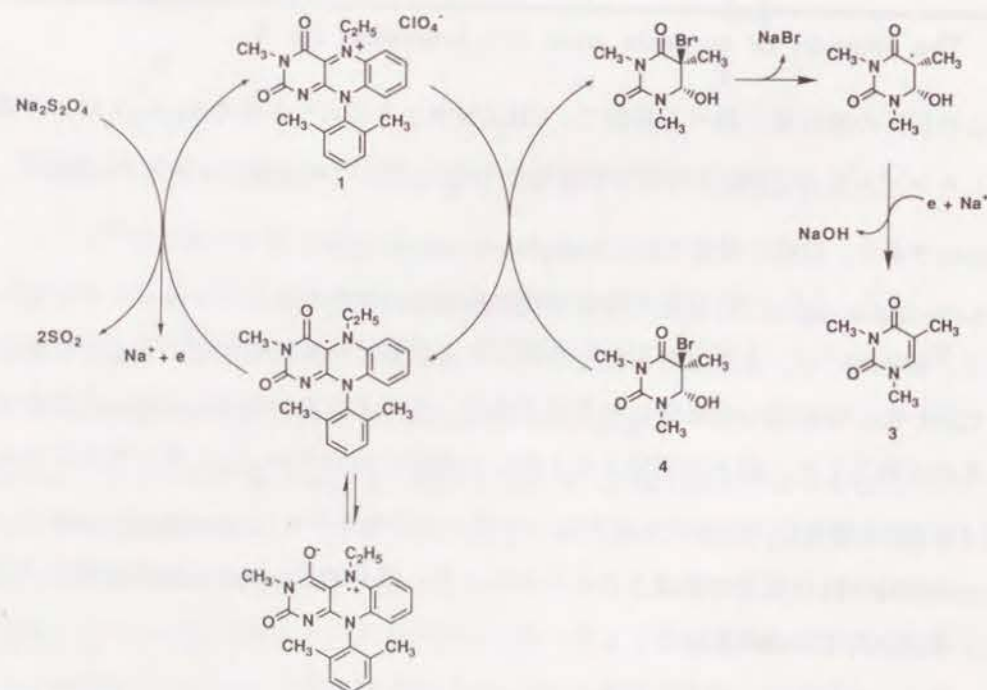


Fig. 2-1. ESR Signal of 5-Ethylflavin Radical.



Scheme 2-3. One-electron Transfer System Consisting of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and Flavinium 1.

第 2 章

第2節 NADHモデル化合物とフラビニウム塩による電子伝達系の構築

NADH (1,4-dihydronicotinamide dinucleotide) あるいはNADPH (1,4-dihydronicotinamide dinucleotide phosphate) は生体内における還元剤として働いている。フラビン酵素はNADHにより還元を受けることにより、他の基質へ電子運搬を行うだけでなく⁹、分子状酸素の活性化⁷も行っている。フラビニウム塩 **1** をフラビン酵素のモデル化合物と考えるならば、NADHあるいはNADPHのモデル化合物により還元され、ついで1電子的に電子を別の基質に渡すことが可能であると思われる。

著者は、NADHのモデル化合物1,5-dihydro-5-deazaflavin **2** を用いて、より生体類似の電子伝達系の構築を試みた。1,5-Dihydro-5-deazaflavin **2** はフラビン環のN(5)位の窒素を炭素に置き換えた化合物であるが、電子状態より考えるとフラビンよりもむしろNADHに近い化合物である⁴²(Fig. 2-2)。

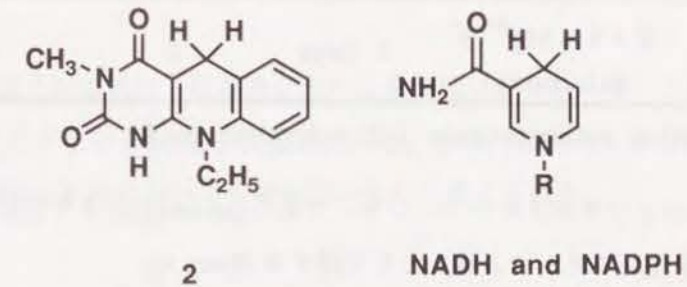
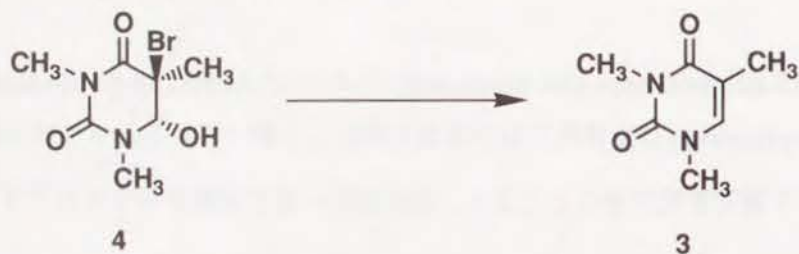


Fig. 2-2. 1,5-Dihydro-5-deazaflavin **2** as NAD(P)H Model.

1,5-Dihydro-5-deazaflavin **2** とフラビニウム塩 **1** の系により、前記した1,3-dimethylthymine bromohydrin (**4**) の脱bromohydrin化を試みた(Table 2-2)。脱bromohydrin化反応は1,5-dihydro-5-deazaflavin **2** とフラビニウム塩 **1** のみでは全く進行しなかったが(Entry 2)、この反応系中に Mg^{++} を共存させることにより、反応は円滑に進行した(Entry 1)。1,3-Dimethylthymine bromohydrin (**4**) は中性条件下では1電子還元しか受けられないことより、この反応は1,5-dihydro-5-deazaflavin **2** がフラビニウム塩 **1** を還元して5-ethylflavin radicalとなり、ついで**4** が1電子還元されたと考えられる。

Table 2-2. The Debromohydration of **4** by the 1,5-Dihydro-5-deazaflavin **2** and Flavinium **1** System.

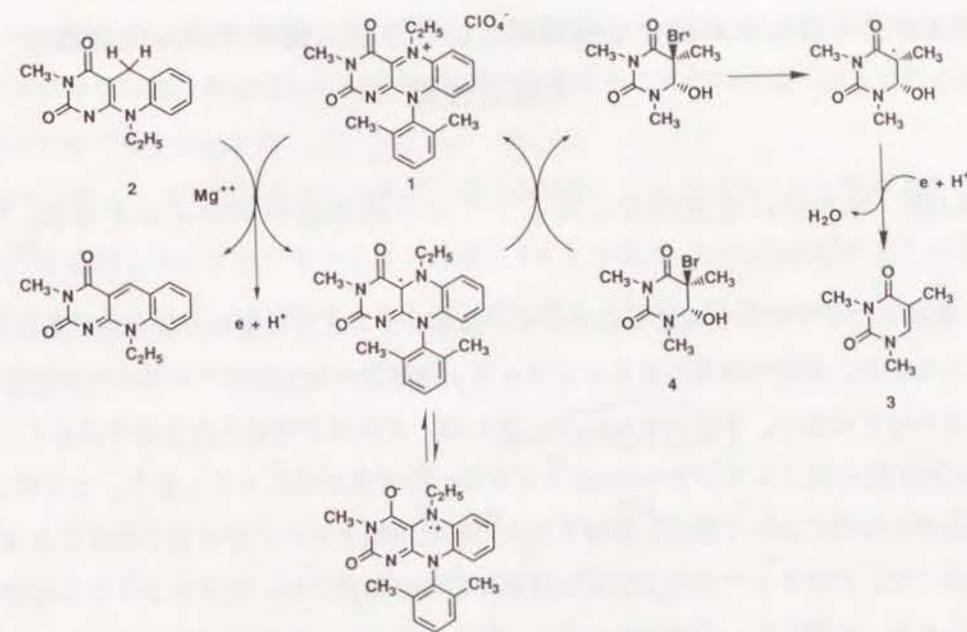


Entry	Reagents ^a	Reaction time	Yield(%)	Recovery(%)
1	2 + 1 + Mg ⁺⁺	3 days	88.7	0
2	2 + 1	3 days	0	69.5
3	2 + Mg ⁺⁺	3 days	0	72.5
4	Na ₂ S ₂ O ₄ + Mg ⁺⁺	3 days	0	41.5
5	2 + 1 + Mg ⁺⁺ + galvinoxyl	3 days	0	58.0

^a The amount of reagents were 1.2 equivalent for **4**.

さらにこの反応がラジカルスカベンジャーであるgalvinoxylにより完全に阻害されたことも1電子還元システムによることを支持する(Entry 5)。

以上の結果をもとにこの電子伝達系のメカニズムを(Scheme 2-4)の様に推定した。NADHモデル化合物において、Mg⁺⁺は電子伝達を円滑に行う際の補助的役割を担っていることがこれまでに報告されている⁴³。今回の反応におけるMg⁺⁺の作用も電子伝達の橋渡しの役割であると考えられる。またNa₂S₂O₄を用いる系に比べて、電子伝達が遅いものとなったことも1,5-dihydro-5-deazaflavin **2** からフラビニウム塩 **1** への電子伝達の段階がこの反応の律速になっていることを示唆している。



Scheme 2-4. One-electron Transfer System Consisting of 1,5-Dihydro-5-deazaflavin **2** and Flavinium **1**.

今回開発した電子伝達系は、生体系における重要性にかかわらず、これまで見逃されてきたフラビンを介する1電子伝達系である。生体内に実在する系を、モデル化合物を用いて構築した点においても興味深いものと考えられる。

第3章 5位に水素結合し得る新しいフラビン酵素モデル化合物の 合成と性質

第1節 N(5)位に水素結合し得るフラビン誘導体のデザインと合成。

前述したフラビニウム塩**1**はフラビン酵素モデルとして優れた化合物である。しかしながら、実際の酵素内においてフラビン補酵素のN(5)位のアルキル化が起きているわけではない。またフラビニウム塩**1**は、それほど安定な化合物ではなく、容易にN(5)位の脱アルキル化やC(4a)-スピロ体への変換が起こってしまう。フラビン補酵素が生体内において機能を発揮するためにはアポタンパクが必要であることは既に述べた。アポタンパクのフラビン酵素における役割には、以下のようなことが挙げられる。すなわち、①基質取り込みにより、フラビン補酵素と基質を反応しやすい位置関係に置くこと。②フラビン補酵素を活性化状態にして反応性を高めること、あるいはフラビン補酵素をその機能発現に最も適した酸化還元状態を保つこと。③基質を活性化することで、基質の反応性を高めること。④フラビンと基質の反応において不斉な環境をつくることなど。特に①、②、③はフラビンによる反応に際して遷移状態のエネルギーを下げる方向に働く作用である。アポタンパクのいかなる性質が上記した作用を行っているかという問題は、化学合成したフラビンを用いて検討することによって明確になるとと思われる。

フラビン酵素において反応性を高める因子としては数多く考えられるが、著者は特にフラビン補酵素へのタンパクによる水素結合に着目した。フラビニウム塩**1**を考察すると、特にN(5)位の活性化がフラビンの反応性にとって極めて重要であるといえる。N(5)位に水素結合できるフラビンとしては、新海らの合成したフラビン化合物**6**⁴⁶がある。化合物**6**においてはフラビンのN(5)位へフェノール性水酸基が水素結合し得る構造を持っている、さらに彼らの合成した**6**はN(5)位への水素結合によりC(4a)位を活性化することでフラビン誘導体によるチオール類の酸化速度の上昇をもたらした⁴⁶。しかしながら、フェノール性水酸基のpKaは約10.0であり、比較的酸性度が弱い。著者は更に劇的な反応性の変化を期待して、フェノール性水酸基よりさらに酸性度の高いカルボキシル基をN(5)位へ分子内水素結合させることを考

え、C(6)位にカルボキシル基を持つフラビン誘導体**10, 11**をデザインした。C(6)位のカルボキシル基は熱力学的に安定な6員環を形成することでN(5)位への分子内水素結合が可能である(Fig.3-1)。

合成方法は、フラビン-6,8-ジカルボン酸**10**に関しては米田らにより報告された方法⁴⁷を応用した。すなわちフラビン誘導体**14**を合成後、C(6), C(8)位のメチル基を酸化することによって対応するカルボン酸に導くことにした(Scheme 3-1)。

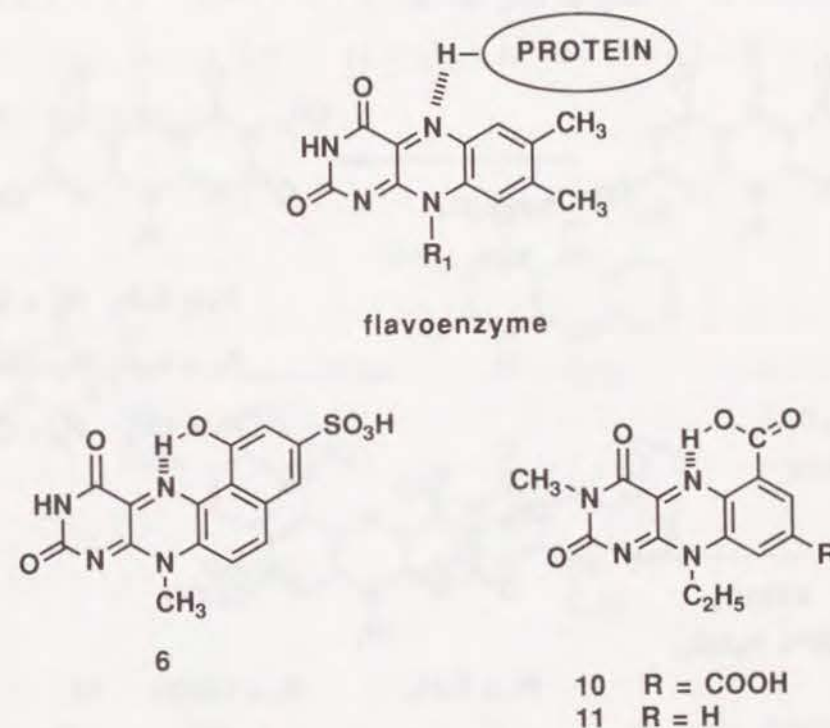
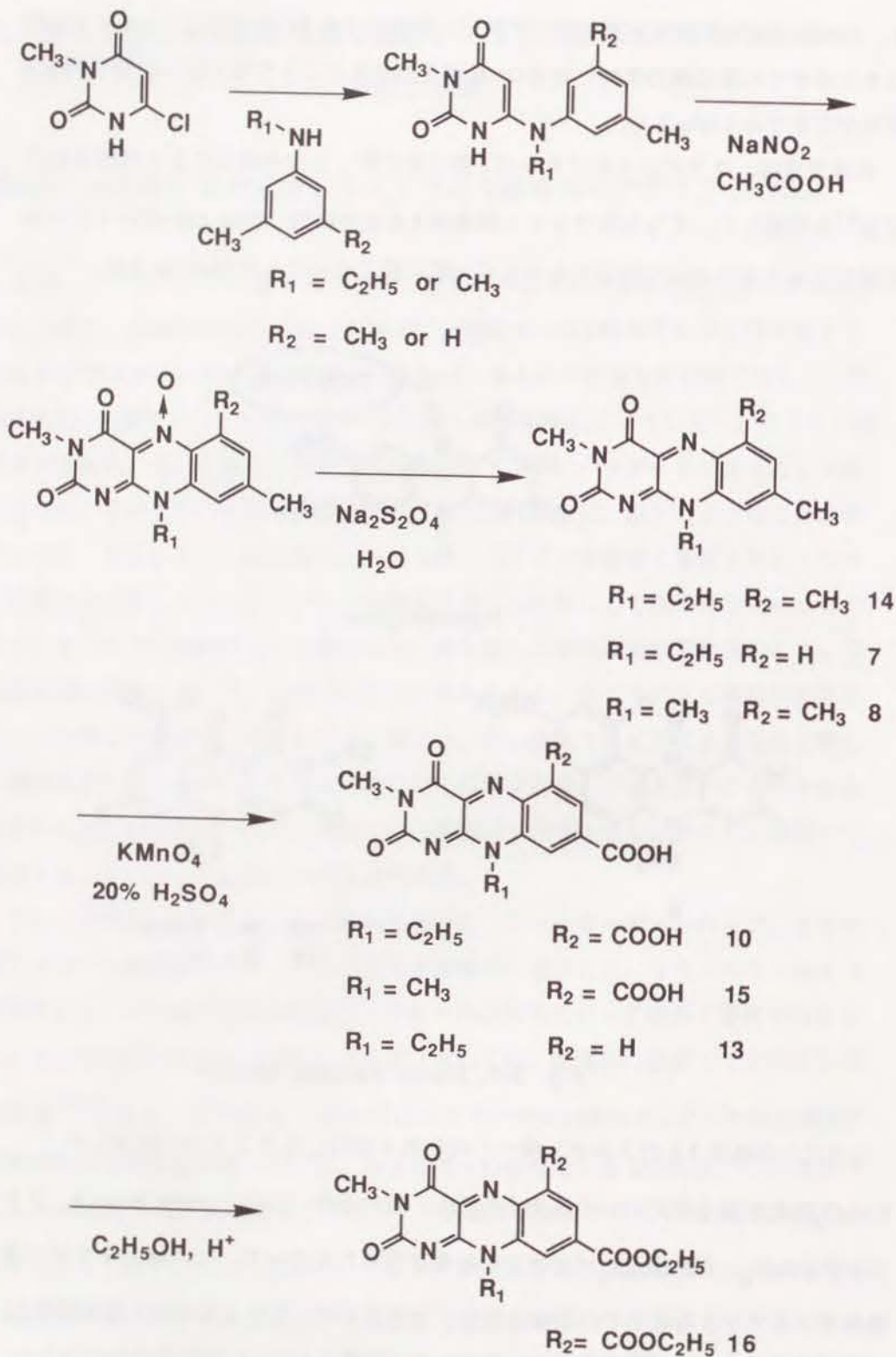


Fig. 3-1. Flavin Enzyme Models.

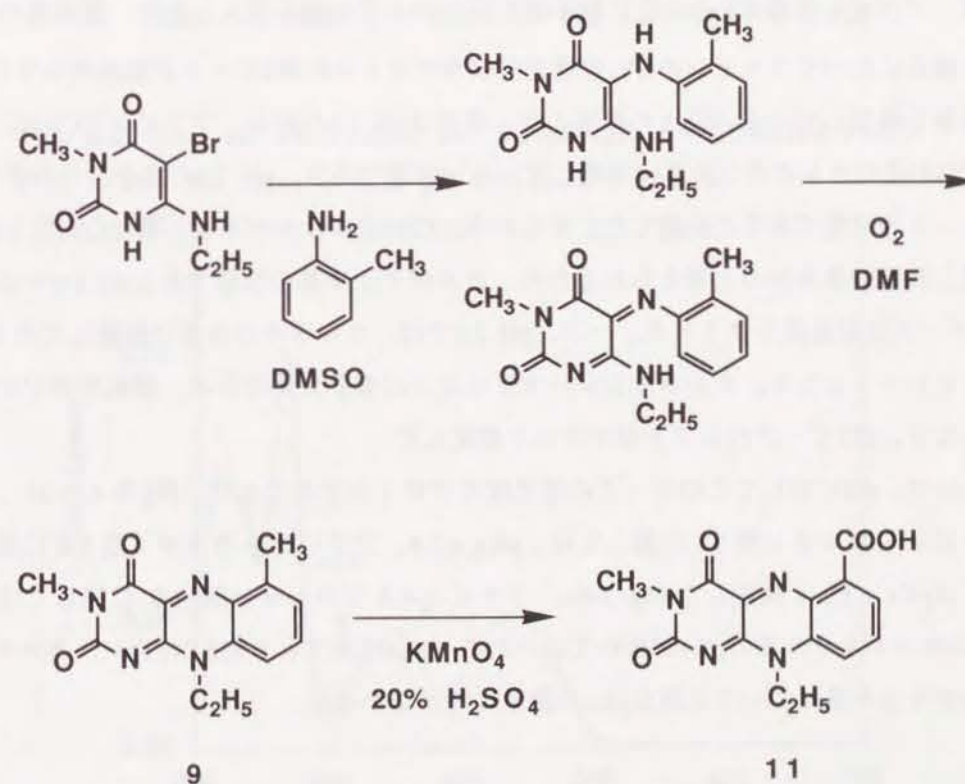
フラビン誘導体**14**のカルボン酸への酸化剤を検討したところ20% H₂SO₄中KMnO₄酸化が最も満足のいく結果を与えた。他の条件(CrO₃、purple benzene、アルカリ性KMnO₄、四酢酸鉛)では十分な結果が得られなかった。これは、フラビン誘導体のアルカリ水溶液中での不安定性や、フラビン環によりメチル基の電子密度が低下していることに起因するものと思われる。同様にして、C(6)位にカルボキシル



Scheme 3-1. Syntheses of Flavin Enzyme Models.

基を持たずC(8)位にのみカルボキシル基を持つ、フラビン-8-カルボン酸 **12** および、**10**のN(10)位の置換基をメチルに変換した**15**も合成した。合成した **10, 12, 15** は元素分析、マスペクトル、 1H -NMRスペクトル等で確認した。

米田らの方法ではフラビン環のC(6)位だけにメチル基あるいはカルボキシル基を導入することは不可能である。そこで、牧らの方法⁴⁸を用いC(6)位にのみカルボキシル基を持つフラビン誘導体を合成した。合成経路はScheme 3-2に示した。この方法で低収率ながらも **9** を得ることができ、引き続き上述の酸化方法でC(6)位にのみカルボキシル基を持つ **11** を得た。**11** は元素分析、マスペクトル、 1H -NMRスペクトル等で確認を行った。



Scheme 3-2. Synthesis of Flavin Enzyme Model.

第3章

第2節 フラビンカルボン酸類のUV-可視光吸収スペクトル

合成した **10**, **11** に関しUV-可視光吸収スペクトルにて、構造に関する詳細な検討を行った。フラビン-6-カルボン酸 **11** および、フラビン-8-カルボン酸 **15** の水溶液中でのUV-可視光吸収スペクトルをFig. 3-2 およびFig. 3-3 に示す。いずれの化合物についてもpH 7.0で370 nm付近に極大吸収を持つフラビンの第2ピークが、pH 1.0においては短波長シフトした。このpH領域においては、通常のフラビン化合物のUV-可視光吸収スペクトルは変化しない。従って、このpH依存的な第2ピークのシフトはフラビンカルボン酸類のカルボキシル基部分に由来すると推定できる。Bruceら⁴⁹は、フラビン誘導体のC(8)位に電子吸引性のニトリル基を導入した際、置換基の無い場合に比べてフラビンのUV-可視光吸収スペクトルの第2ピークが短波長シフトする事を報告している。以上の事実より、著者はpH 1.0の場合、フラビンのC(6)位およびC(8)位のカルボキシル基は解離していない状態であり、pH 7.0の場合、カルボキシレートの状態であると結論した。すなわち、C(6)位のカルボキシル基はC(8)位とはほぼ同じ誘起効果を持つと考えられるため、カルボキシル基の状態であるpH 1.0では、第2ピークは短波長シフトする。一方、pH 7.0では、カルボキシル基は解離してカルボキシレートとなる。カルボキシレートアニオンは電子反発のため、誘起効果が小さくなり、第2ピークのシフトが小さいと推定した。

ついで、pHに対してこのピークの吸光度をプロットすることで (Fig. 3-4, 3-5)、フラビン-6-カルボン酸 **11** に関しては、 $pK_a = 2.8$ 、フラビン-8-カルボン酸 **15** に関しては $pK_a = 3.2$ と決定した(Fig. 3-6)。フラビン-6,8-ジカルボン酸 **10** に関しては、2つのカルボキシル基の pK_a が極めて近いため (pK_a は両方とも約3.0付近)、各々のカルボキシル基について正確な pK_a の決定はできなかった。

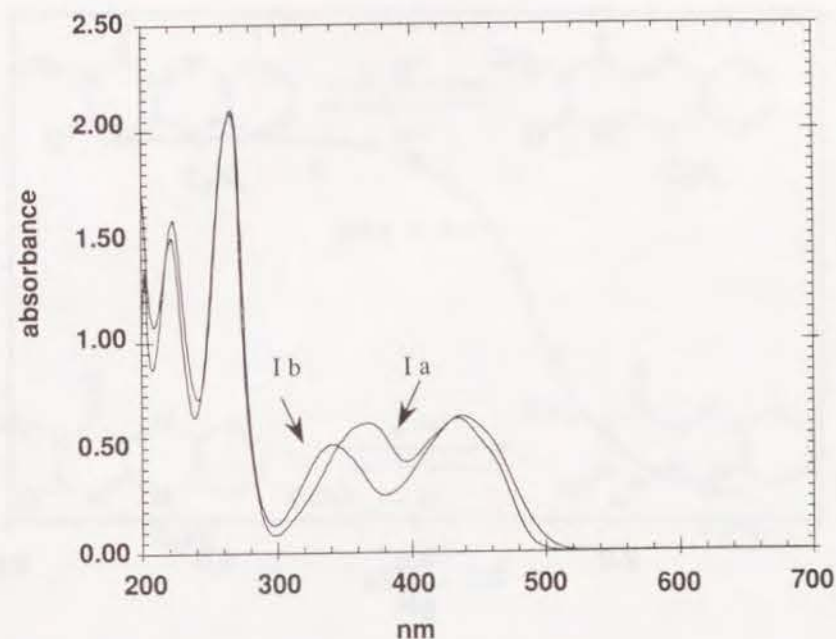


Fig. 3-2. Plots of Absorbance vs. Wavelength for Oxidized Flavin **11** (1.0×10^{-4} M). Plot Ia is at pH 7.0; Ib is at pH 1.0.

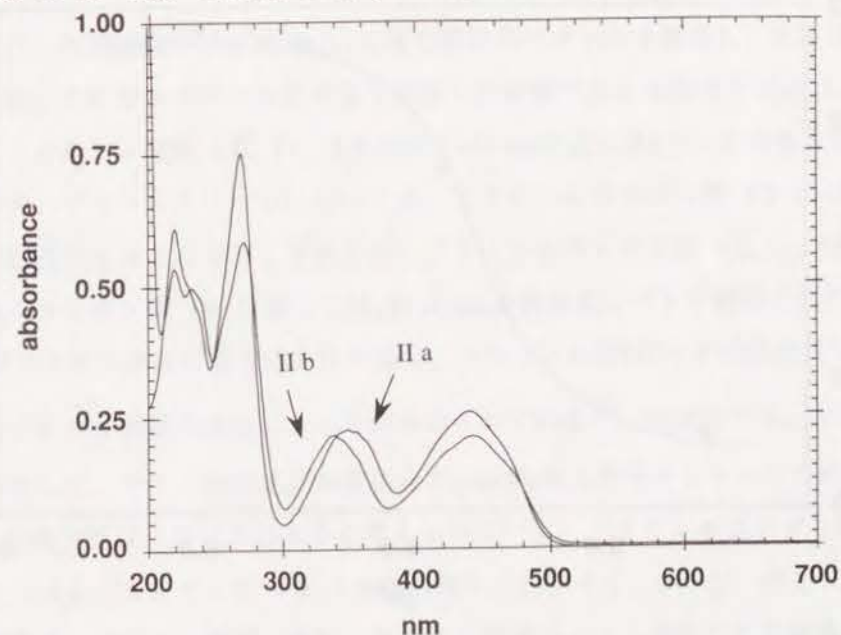


Fig. 3-3. Plots of Absorbance vs. Wavelength for Oxidized Flavin **15** (2.0×10^{-5} M). Plot IIa is at pH 7.0; Ib is at pH 1.0

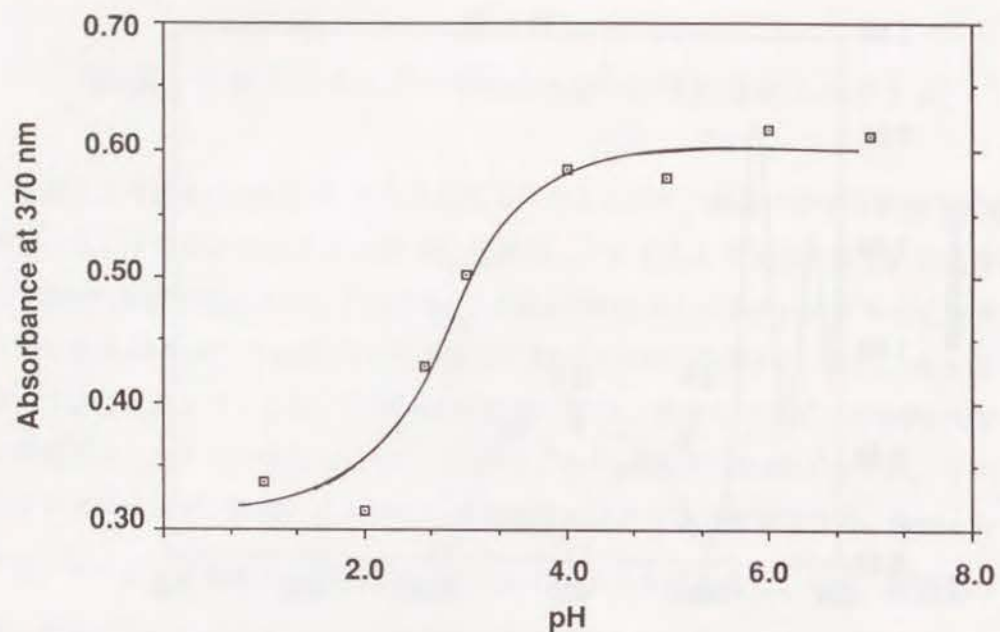


Fig. 3-4. Plot of Absorbance vs. pH for Oxidized Flavin **11** (1.0×10^{-4} M).

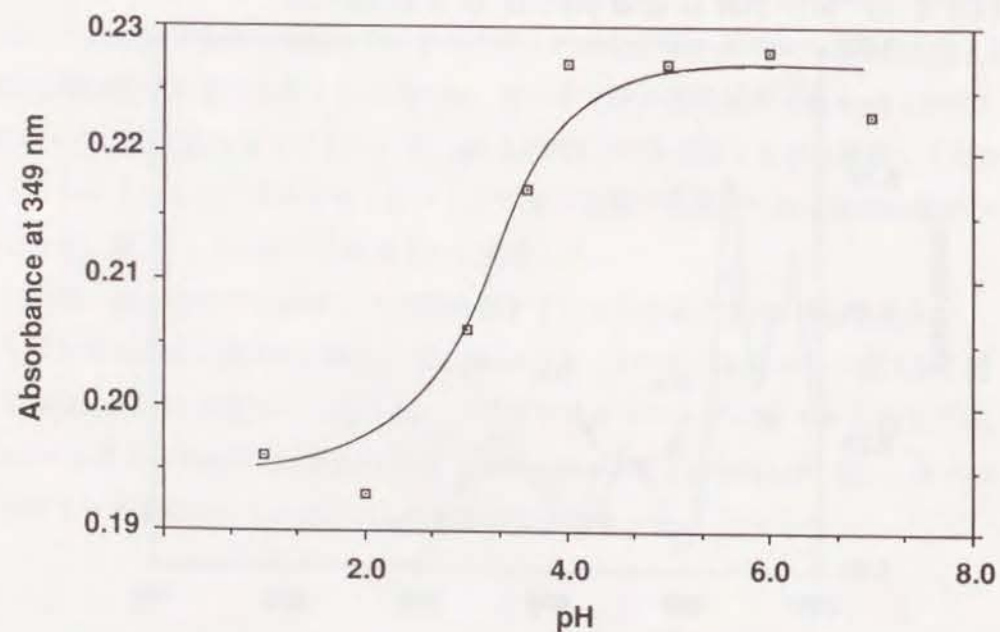


Fig. 3-5. Plot of Absorbance vs. pH for Oxidized Flavin **15** (2.0×10^{-5} M).

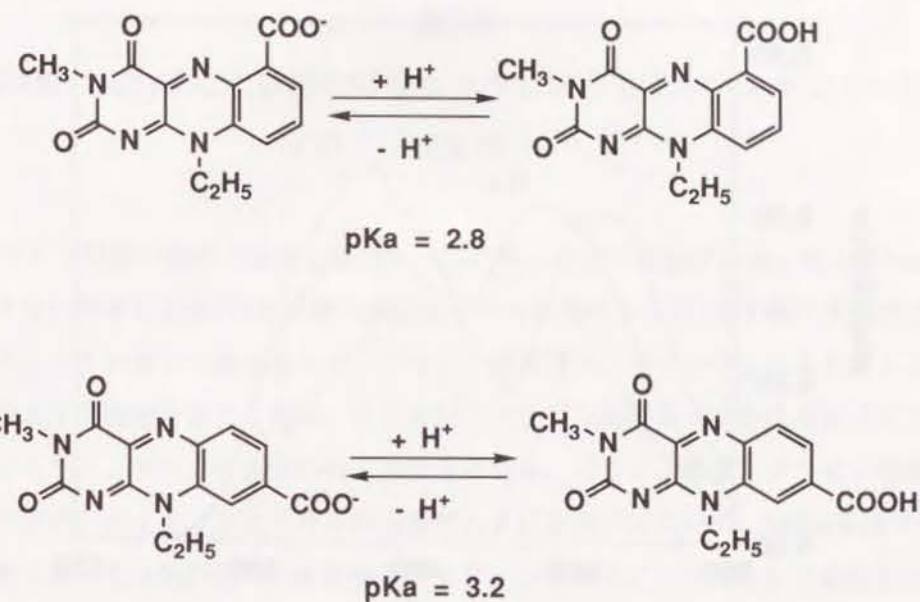


Fig. 3-6. pKa Values of Flavincarboxylic Acids.

さらに、有機溶媒中におけるUV-可視光吸収スペクトルを測定し、水溶液中のものと比較した。カルボキシル基が全て解離した状態である水溶液中 (pH 7.0) では、フラビンカルボン酸類 **10**, **11**, **15** は全て440 nm付近に第1ピークの極大吸収を示す。一方、アセトニトリル中においては、フラビン-8-カルボン酸 **15** は445 nmであり、水溶液中とほとんど同じであるが、フラビン-6-カルボン酸 **10** および、フラビン-6,8-ジカルボン酸 **11** に関しては、約 20 nmの長波長シフトが観察された(Fig. 3-7)。FMNがフラビン酵素に取り込まれた場合、フラビンの第1ピークの長波長シフトが見られることが、再構成実験によって確かめられている⁵⁰。酵素内では、フラビン補酵素に対して、アミノ酸残基が水素結合やstacking相互作用をしているため、この様にUV-可視光吸収に変化が起きると考えられている。フラビン-6-カルボン酸 **11** とフラビン-6,8-ジカルボン酸 **10** は有機溶媒中で解離せず、N(5)位へ容易に水素結合可能なため、フラビン酵素に類似した大きな長波長シフトが生じたと結論した。

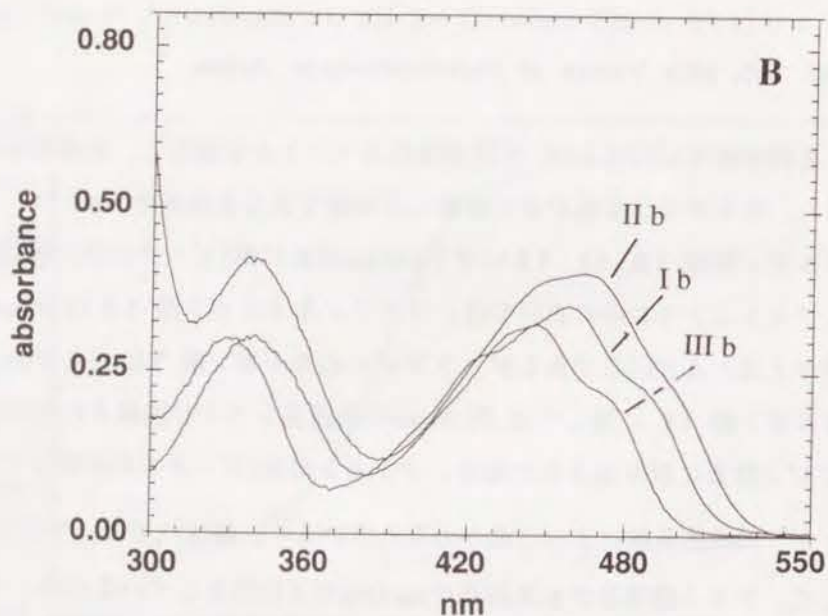
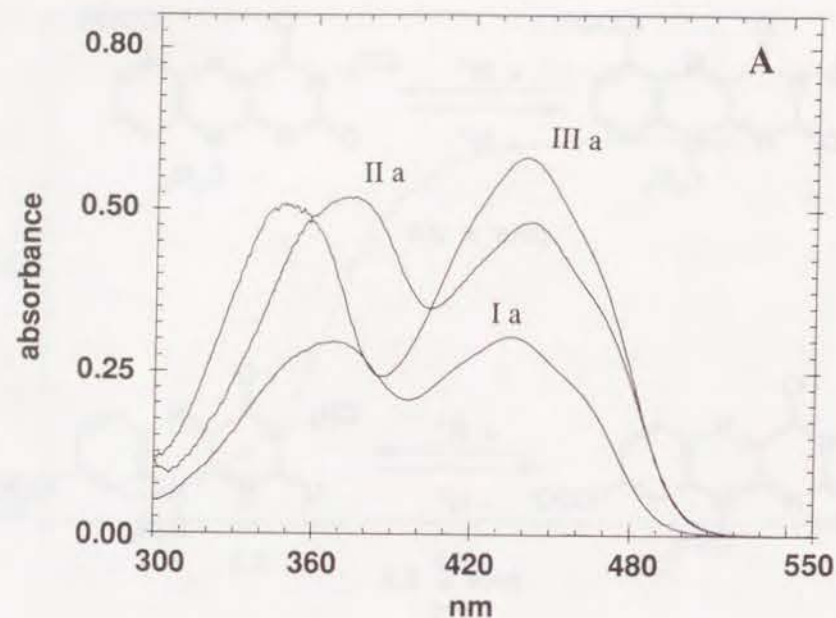


Fig. 3-7. Plots of absorbance vs. wavelength for flavin carboxylic derivatives in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) (A) and in CH_3CN (B).

Plots I : flavin-6-carboxylic acid (11), II: flavin-6,8-dicarboxylic acid (10), III: flavin-8-carboxylic acid (15). 5×10^{-5} M.

第3章

第3節 N(5)位に水素結合可能なフラビンのセミキノンラジカルの安定性

フラビン酵素の極めて重要な機能の一つに電子伝達の役割がある。例えばNADHのようないわゆる生体内2電子酸化還元剤とヘム鉄等のような1電子酸化還元剤との間のスイッチ的電子伝達があるが、フラビン酵素はセミキノンラジカルとなることでこのような機能を果たし得る。ところが、フラビン補酵素だけを取り出すとフラビンセミキノンラジカルはきわめて不安定となる。フラビン酵素とフラビン補酵素とのフラビンセミキノンラジカルの安定性における違いについて、Müllerらはフラビン酵素においてはN(5)位への水素結合がフラビンセミキノンラジカルの安定化に寄与するという仮説を提唱した⁵¹(Fig. 3-8)。

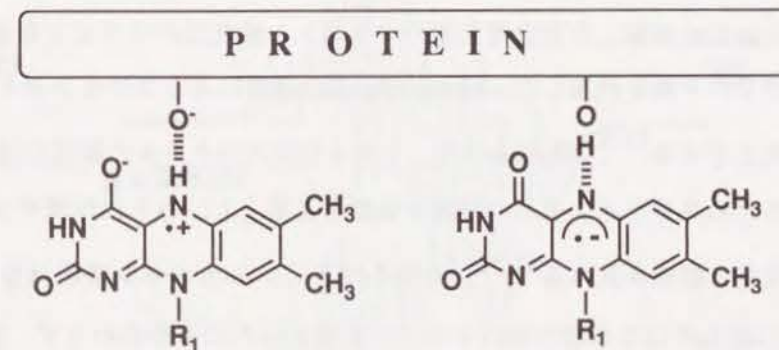
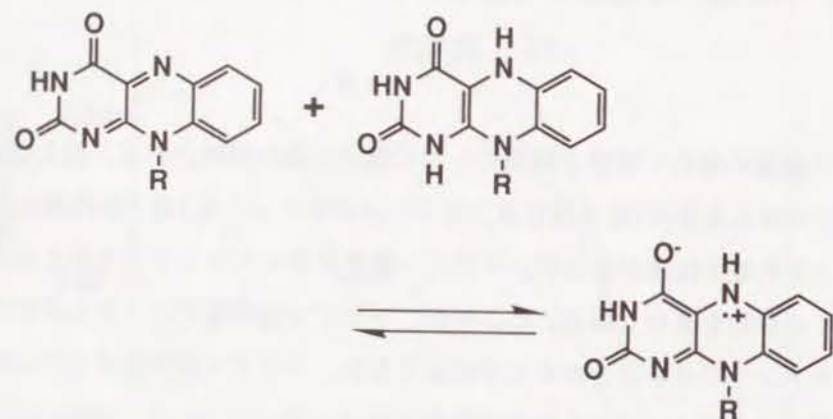


Fig. 3-8. Hypothesis of Intermolecular Hydrogen Bonding.

著者の今回合成したフラビン-6-カルボン酸類 10 および 11 はこの仮説を化学的に証明するに適していると考えた。そこで10, 11 の他に、C(6)位にカルボキシル基を持たないが、電子的にはC(6)位カルボン酸と同等の効果をもたらし得ると考えられるフラビン-8-カルボン酸 15 を加えて、これらのセミキノンラジカルの安定性についてESR (Electron Spin Resonance) スペクトルで比較検討を行った。フラビン 10, 11, 15 (0.01 mmol)を0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.89) (1 mL) 中、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.01 mmol)

により還元を行い生成するセミキノンラジカル類のESRスペクトルを測定した。



Scheme 3-3. Formation of Flavin Semiquinone Radical by Comproportionation.

通常のフラビン誘導体においてセミキノンラジカルのESRスペクトルを観察するためには、あらかじめ調製した完全還元型のフラビンと酸化型のフラビンを当量混合させ、溶液中での平衡を利用したcomproportionation過程によりフラビンセミキノンラジカルを生じさせる⁵¹⁻⁵³ (Scheme 3-3)。しかもESRスペクトルの測定には、嫌気的条件下にするため真空ラインなどの複雑な装置を必要とし、さらに冷凍サンプルにすることで安定な観察を試みる⁵¹⁻⁵³。今回のフラビン-6-カルボン酸類 **10** および **11** の還元に関してはこのような操作を全く行わなかったにもかかわらず、室温で空气中安定なフラビンセミキノンラジカルのESRスペクトルを観察できた (Fig. 3-9)。驚くことにこれらのESRスペクトルはサンプル調製後、1日後においても同様に安定であった。また、観察されたESRシグナルは **10** に関しては16本、**11** に関しては17本の超微細構造を示し、 g 値は **10** が2.0034、**11** が2.0032であった。これは通常のフラビンで観察される g 値とはほぼ一致する⁵⁴。

一方、フラビン誘導体 **15** に関しては微弱なESRスペクトル (Fig. 3-10) が観察されるのみにとどまった。さらにこのESRスペクトルはサンプル調製後、約1時間で完全に消失した。BruceらはフラビンのC(8)位の電子吸引性基はフラビンアニオンラジカ

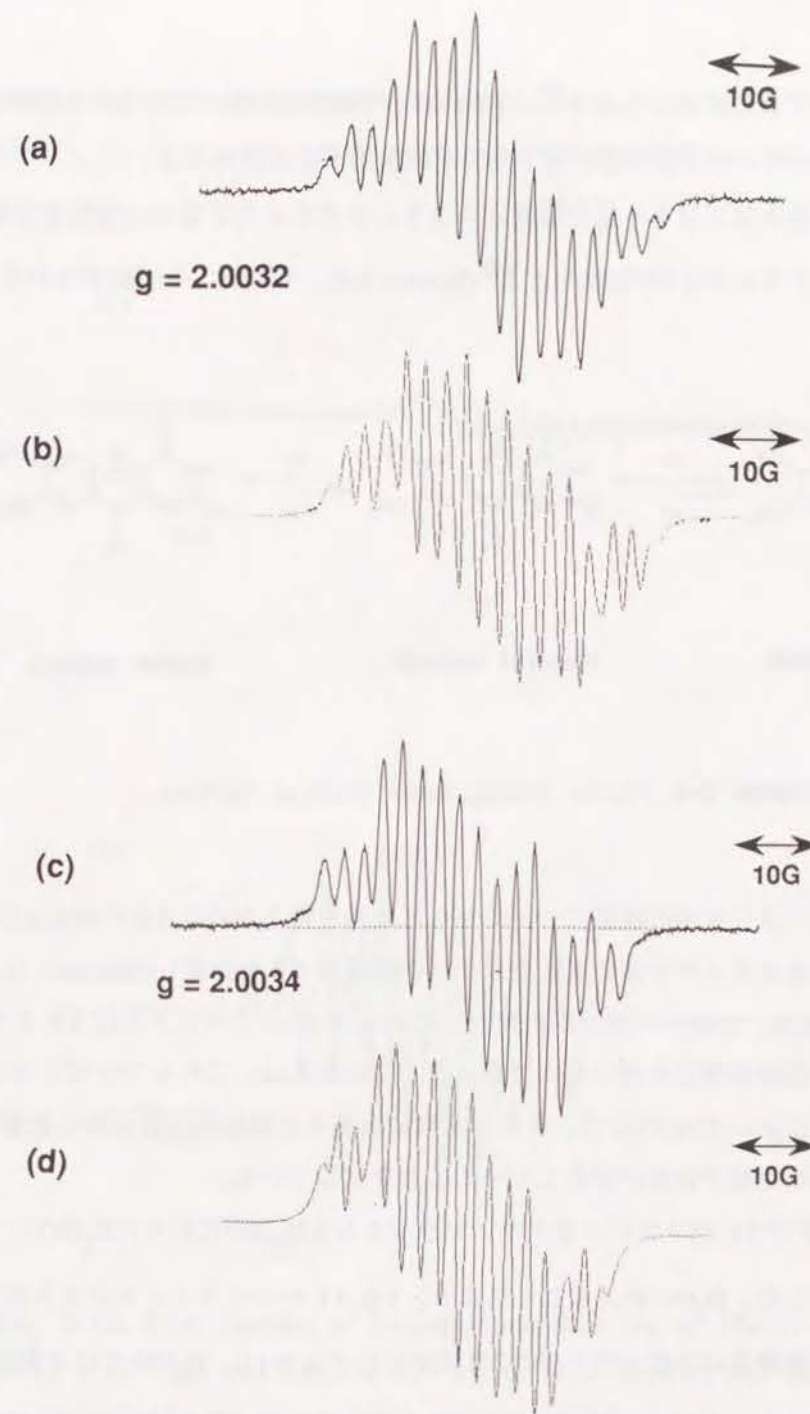
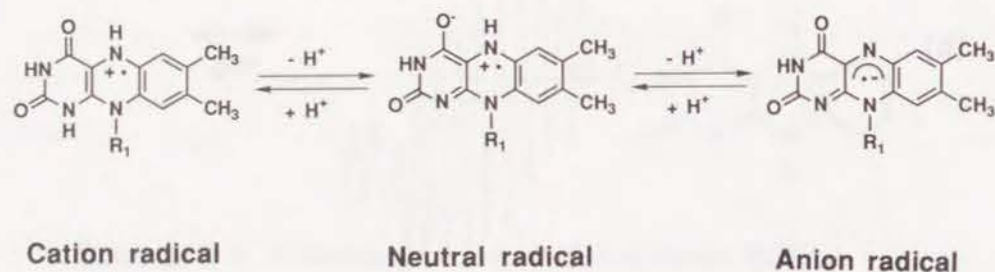


Fig. 3-9. ESR Spectra of Semiquinone Radicals of Flavin Derivatives **11** and **10** (1×10^{-2} M) in H_2O Buffer. (a) observed spectrum of semiquinone radical of **11**; (b) simulated spectrum of semiquinone radical of **11**; (c) observed spectrum of semiquinone radical of **10**; (d) simulated spectrum of semiquinone radical of **10**.

ルを若干安定化すると報告しており⁴⁹、**15**において微弱なESRスペクトルが観察されたのはC(8)位のカルボキシル基の電子吸引性に起因すると思われる。

フラビンラジカルはプロトン化の程度によって、カチオンラジカル、中性ラジカル、アニオンラジカルの3つの形状をとる⁶ (Scheme 3-4)。そこで、今回観察されたフ



Scheme 3-4. Flavin Semiquinone Radical Species.

ラビンセミキノラジカルの構造についてさらに知見を得るために**10**のN(10)位の置換基をエチル基よりメチル基に変えたフラビン誘導体**13**を合成し(Scheme 3-1)、**10**と同様に還元後、ESRスペクトルを測定した(Fig. 3-10)。スペクトルは**10**よりかなり複雑な超微細構造を持つものであった。この結果は、これらフラビンセミキノラジカルにおいてN(10)位に、そのβ水素に由来する超微細結合定数に影響するほどの大きな不対電子密度が存在していることを示している。

また、**10**および**11**のフラビンセミキノラジカルをH₂Oの代わりにD₂Oのバッファ中で測定した。D₂Oに換えることにより、**10**、**11**のセミキノラジカル両方において、超微細構造は本数がそれぞれ2本減少した(Fig. 3-11)。D₂O中では比較的酸性度の高いプロトンがジウムテロンへ交換される。そして、水素の約1/6の磁気モーメントを持つ重水素による置換は、磁気モーメントに比例する結合定数の値を約1/6にすることで、事実上スペクトルからの超微細構造の本数を減少させる。D₂O中で観察された超微細構造の本数の減少は、このセミキノラジカルにおいて不対電

子密度の極めて高い原子へ交換可能なプロトンが結合していることを示唆する。今回検討しているフラビンの構造はN(3)位がメチル基で置換されているため、D₂O中で交換可能なプロトンは中性ラジカルとカチオンラジカルにしか存在しない。すな

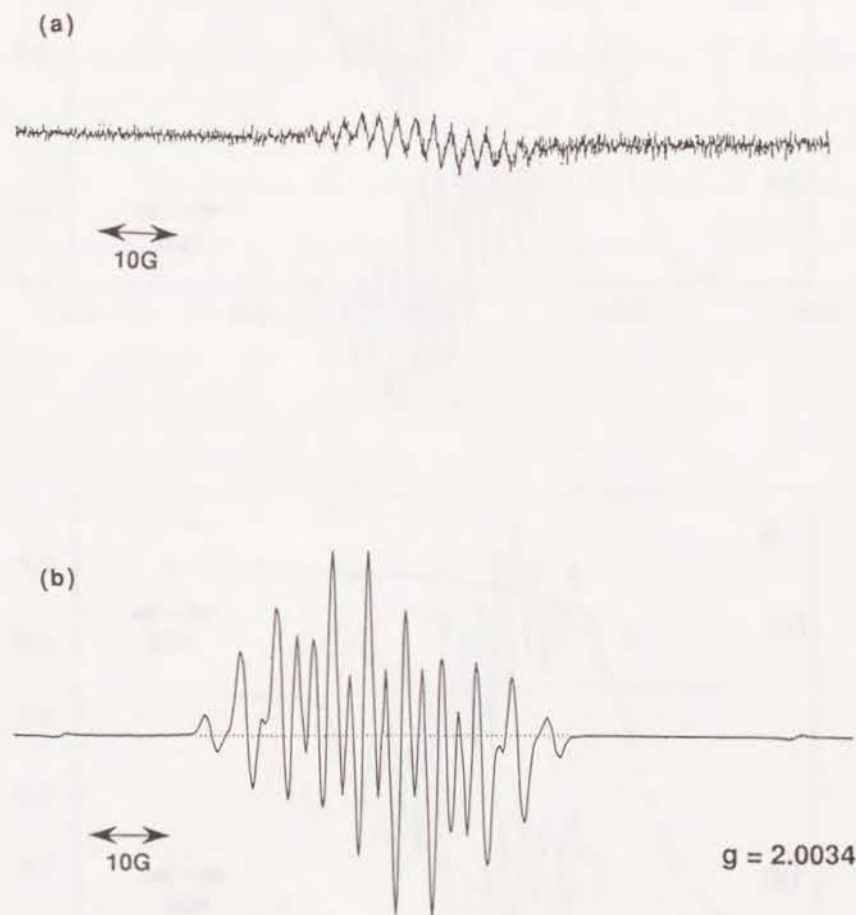


Fig. 3-10. ESR Spectra of Semiquinone Radicals of Flavin Derivatives **15** (1×10^{-2} M) and **13** (1×10^{-2} M) in H₂O Buffer. (a) semiquinone radical of **15**; (b) semiquinone radical of **13**.

わち中性フラビンラジカル構造においてはN(5)位のプロトンが、カチオンラジカルにおいてはN(1)位およびN(5)位のプロトンがD₂O中で交換可能であり、D₂Oバッファ

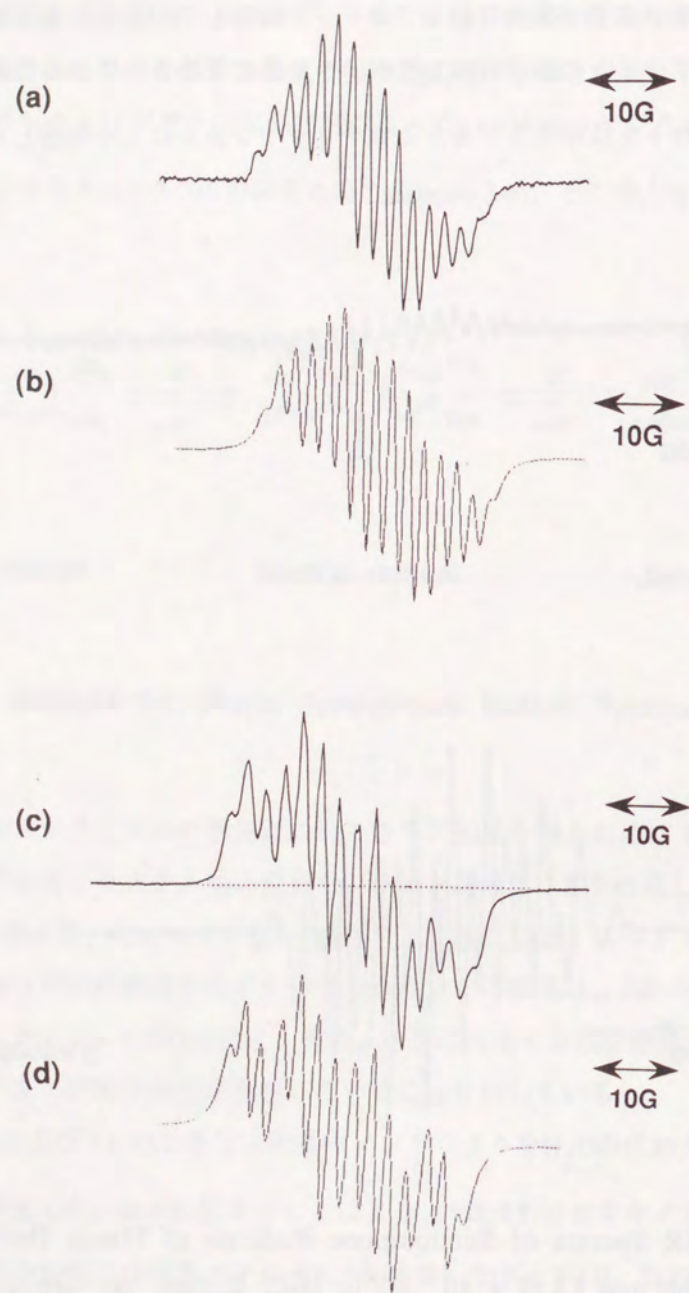


Fig. 3-11. ESR Spectra of Semiquinone Radical of Flavin Derivatives **11** and **10** (1×10^{-2} M) in D_2O Buffer. (a) observed spectrum of semiquinone radical of **11**; (b) simulated spectrum of semiquinone radical of **11**; (c) observed spectrum of semiquinone radical of **10**; (d) simulated spectrum of semiquinone radical of **10**.

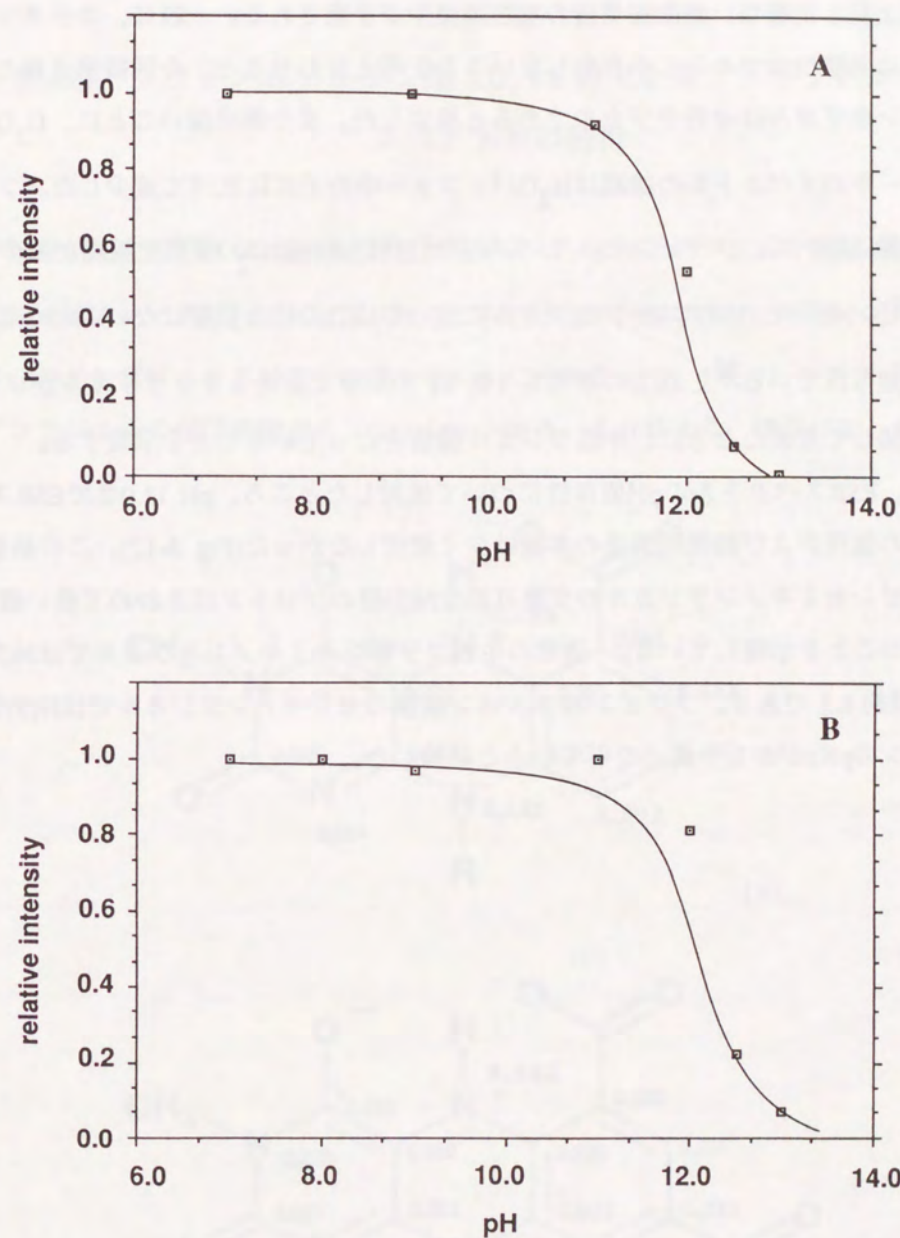


Fig. 3-12. Plots of the Relative Intensities of ESR Signal of Semiquinone Radicals of **11** (A) and **10** (B) vs. pH. The Y axis shows the relative intensities against those obtained at pH 7.0. The flavins **10** and **11** (1×10^{-2} M) were reduced by $Na_2S_2O_4$ (1×10^{-2} M).

一中では上記した様な、超微細構造の本数の減少が予想される。一般に、カチオンラジカルは強酸性中でのみしか存在しないことを考え合わせると、今回観察されたセミキノンラジカルは中性ラジカルであると推定した。また興味深いことに、 D_2O バッファー中のスペクトルの線幅は H_2O バッファー中のそれに比べて減少した。フラビン酵素において、フラビンセミキノンの中性ラジカルは D_2O 置換で線幅が減少し、フラビンセミキノンアニオンラジカルにおいてはこのような影響はないことがこれまでに知られている⁵⁵。以上の事実も **10, 11** のフラビンセミキノラジカルがフラビン環に関して考えたときに、中性ラジカル構造をとっていることを示唆する。

さらに、ESRスペクトルのpH依存性について検討したところ、pH 11.0までESRスペクトルの強度および超微細構造の本数は全く変化しなかった(Fig. 3-12)。この結果は、フラビンセミキノンラジカルの交換可能なN(5)位のプロトンはきわめて低い酸性度を持つことを示唆している。通常の中性フラビンセミキノンラジカルではN(5)位のpKaは約 8.5 であり、フラビン-6-カルボン酸類のセミキノンラジカルではN(5)位のプロトンのpKaがかなり高くなっていると結論した。

第3章

第4節 フラビン-6-カルボン酸 **10, 11** のセミキノンラジカルのESR スペクトルの解析

溶液状態で観察される超微細構造は電子スピンと核とのフェルミ接触相互作用に起因するものであり、これは原子核上に存在する不対電子密度に比例する⁵⁶⁻⁵⁷。量子化学的計算により不対電子密度を明らかにすることで、**10, 11** のフラビンセミキノンラジカルの超微細構造をシュミレートでき、それにより、構造に関して明確な

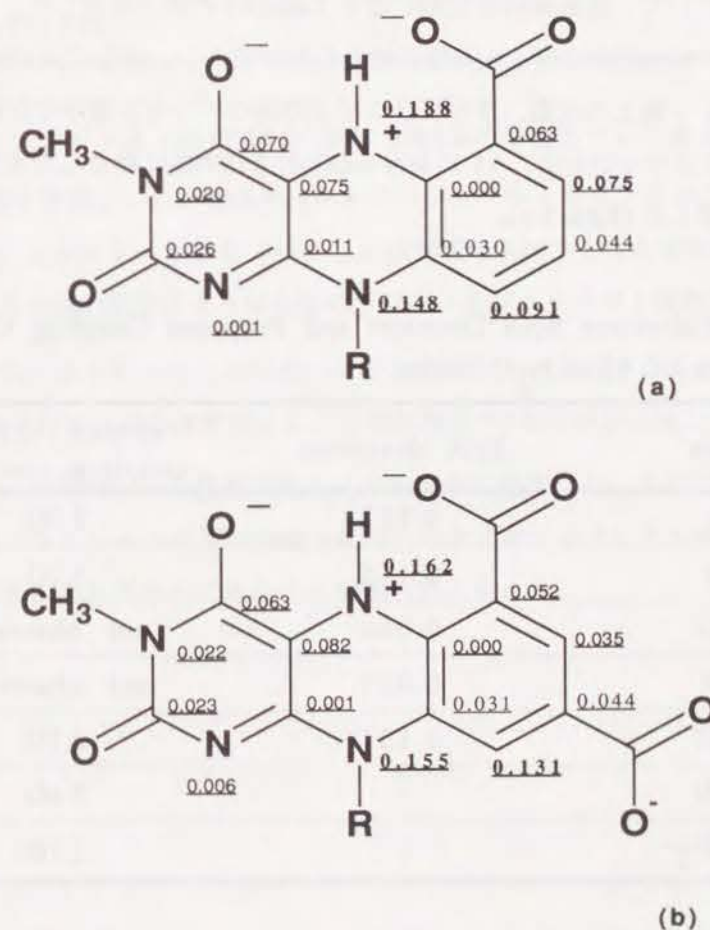


Fig. 3-13. Spin Densities of Flavin Semiquinone Radicals Calculated with Simple HMO Method: (a) spin densities of **11**, (b) spin densities of **10**.

決定ができると考えた。量子化学的計算はMNDO、EHMO、単純HMO法などを試みた。全ての方法において、同様な傾向を示したが、むしろ最も基礎的計算法である単純HMO法⁵⁸がこの超微細結合定数の説明に最も適していた (Fig. 3-13)。

Fig. 3-13より明らかなように、フラビン-6-カルボン酸 **10**, **11** の両方においてN(5)位の不対電子密度が最も高い。また、前節における**10**, **13**のセミキノンラジカルのESRシグナルの比較から予想されたように、N(10)位の置換基の不対電子密度も比較的大きい。通常のフラビンと違う点は、フラビンのベンゼン環部分の不対電子密度が若干高いことであって、これは**10**, **11**が持つカルボキシル基の誘起効果に起因すると考えられる。

この結果に基づいて、超微細結合定数の値を Table 3-1 の様に推定した。ここでは、電子密度の大きいN(5)位および、N(5)位に結合したプロトン、そしてN(10)位とそれに結合したメチレン鎖上の水素、さらにフラビンの持つベンゼン環中で比較的電子密度の高い**10**におけるC(9)位、**11**におけるC(7)位とC(9)位に結合した水素による超微細結合を考慮した (Table 3-1)。

Table 3-1a. Calculated Spin Densities and Proposed Coupling Constants for Semiquinone of **10** in H₂O Buffer.

Position	Spin densities	Proposed hyperfine coupling constants
N(5)	0.162	8.0G
N(10)	0.155	5.2G
C(7)-H	0.044	not observed
C(8)-H	0.035	not observed
C(9)-H	0.131	2.1G
N(5)-H	-	5.6G
N(10)-CH ₂ -	-	2.1G

Table 3-1b. Calculated Spin Densities and Proposed Coupling Constants for Semiquinone of **11** in H₂O Buffer.

Position	Spin densities	Proposed hyperfine coupling constants
N(5)	0.188	8.0G
N(10)	0.148	5.4G
C(7)-H	0.075	2.3G
C(8)-H	0.044	not observed
C(9)-H	0.091	2.3G
N(5)-H	-	6.0G
N(10)-CH ₂ -	-	2.3G

この値と、スピン量子数1を持つ¹⁴Nによる3本の分裂とスピン量子数1/2のHによる2本の分裂を考慮にいれ、ESRスペクトルのシュミレーションをおこなったところ (Fig. 3-9)、シュミレートしたスペクトルは実測のスペクトルと非常によい一致を示した。さらにD₂O置換によりN(5)位のプロトンをジユウテロン置換した場合のESRスペクトルのシュミレーションにおいても、実測のスペクトルとよく一致した (Fig. 3-11)。このようにD₂Oでの置換による超微細構造の2本の減少はN(5)位に結合したプロトンのジユウテロンへの置換であることを完全に確認した。また以上の結果より観測されたフラビン-6-カルボン酸類 **10**, **11** のセミキノンラジカルのESRシグナルは中性ラジカルのシグナルであることが明らかとなった。

第3章

第5節 フラビン-6-カルボン酸類のセミキノンラジカルのUV-可視光吸収スペクトル。

第3節で観察したフラビン-6-カルボン酸類 **10**、**11**の安定なセミキノンラジカルの構造をさらに明確にするためにそのUV-可視光吸収スペクトルを測定した。液性によって変化するカチオンラジカル、中性ラジカル、アニオンラジカルの3つのラジカル状態は各々特徴的なUV-可視光吸収スペクトルを持つため⁶、スペクトルの測定はラジカル構造の推定に非常に有用である。

フラビン-6-カルボン酸 **10** およびフラビン-6,8-ジカルボン酸 **11** (0.005 mmol)を0.1 Mリン酸緩衝液 (100 mL) 中に溶解し、アルゴンガスと超音波により脱気後、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.005 mmol) にて還元を行った後、反応液を一部としてUV-可視光吸収スペクトルを測定した。スペクトルは、フラビン-6-カルボン酸で408 nm、フラビン-6,8-ジカルボン酸で416 nmに極大吸収を示した(Fig. 3-14)。中性フラビンラジカルは約600 nmに極大吸収を持つことが知られている⁶。また、Bruiceらによって電子吸引性基を持つフラビンのアニオンラジカルは402 nmに極大吸収を持つことが報告されており⁴⁹、今回のフラビン-6-カルボン酸 **10**、およびフラビン-6,8-ジカルボン酸 **11**の還元で得られたそれぞれのUV-可視光吸収スペクトルはアニオンラジカルのスペクトルであると考えられる。

UV-可視光吸収スペクトルで得られた結果はESRスペクトルより得られた結果と異なった。すなわち、ESRスペクトルでは、 D_2O 置換実験とシュミレーション実験よりそのセミキノン体が中性ラジカルであると結論したが(前節参照)、UV-可視光吸収スペクトルの結果は明らかにアニオンラジカルを推定させるものであった。

著者はこの異なる2つの結果を説明するものとして、Scheme 3-5に示したメカニズムを提案したい。中性領域においてカルボキシレートとなっているフラビンは、還元を受けることでアニオンラジカルへ変換され、それと同時にプロトンあるいはジュウテロンを緩衝液中より捕獲することで、カルボキシレートとアニオンラジカルの間にプロトンを介在した構造をとる。このプロトンは、カルボキシレートとアニ

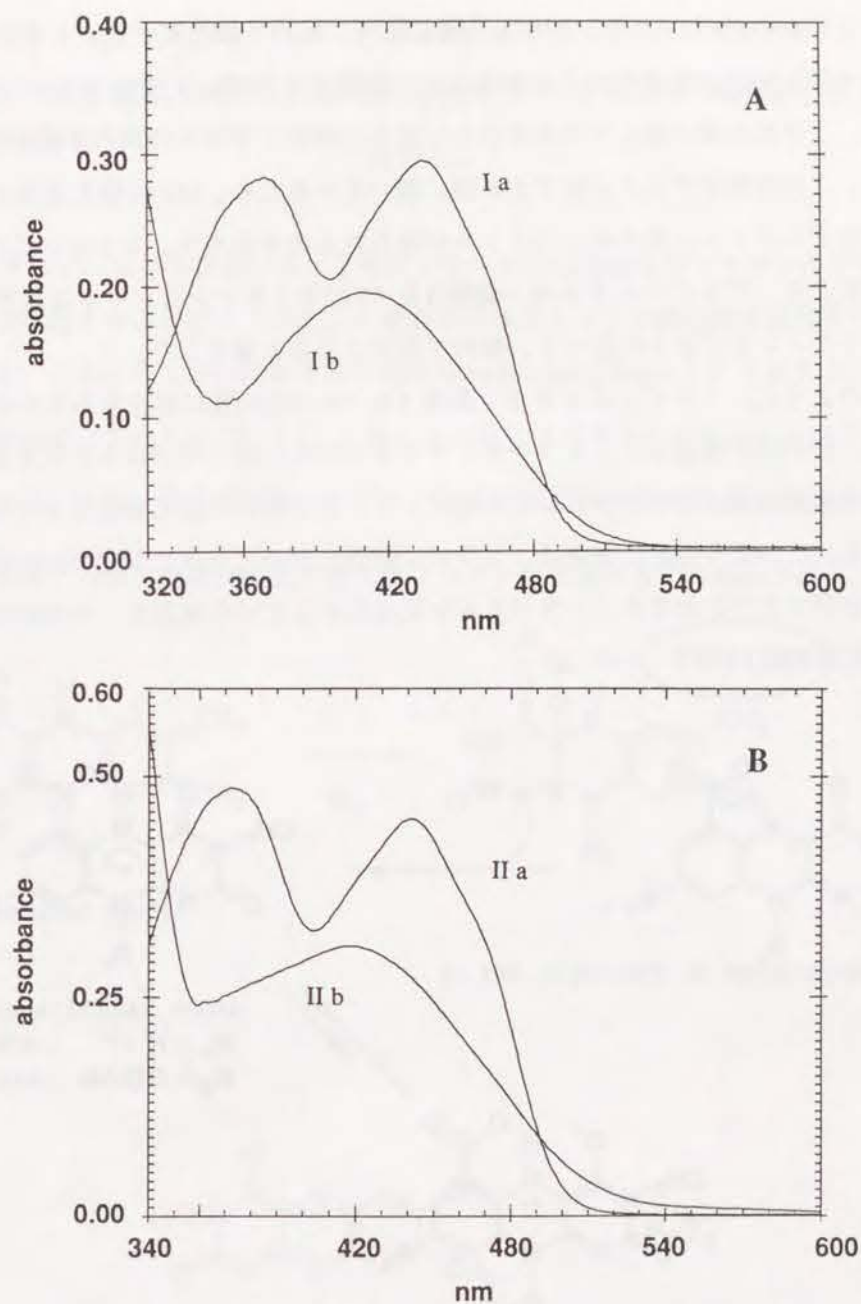
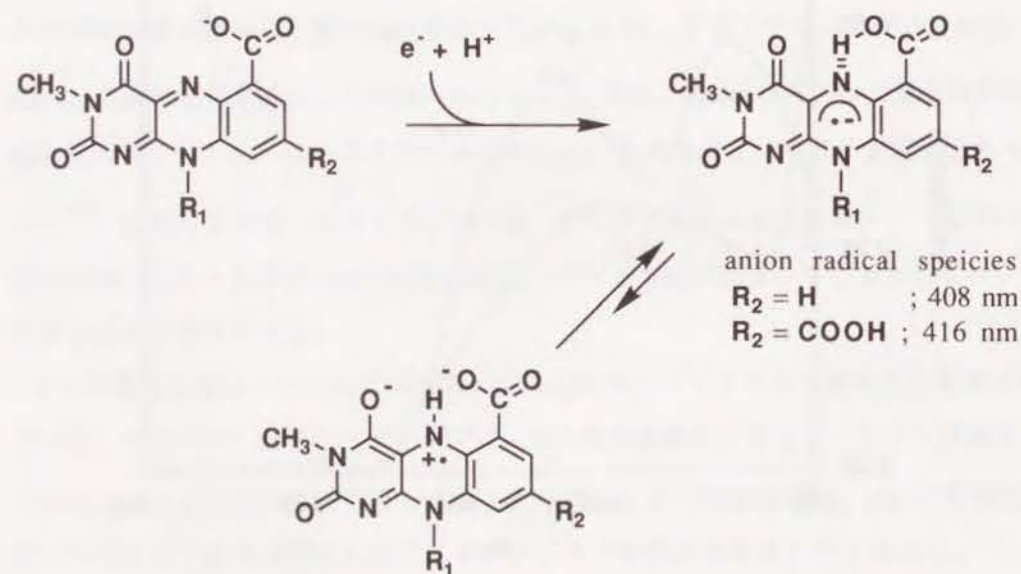


Fig. 3-14. Plots of the Absorbance vs. Wavelength for the Oxidized (Ia, IIa) and Semiquinone (Ib, IIb) Forms of Flavin Compounds **11** (A) and **10** (B).

Flavin-6-carboxylic acids **10** and **11** (5.0×10^{-5} M) were reduced by sodium dithionite (5×10^{-5} M) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.89).

オンラジカルの2つのアニオンの相互作用により、極めて酸性度が低いと考えられ、ESRスペクトルのpH依存性はこの推定をよく説明できる(Fig. 3-12)。さらにこのラジカルは、フラビン環に関してアニオンラジカルと中性ラジカルの間の平衡が存在している。この平衡がアニオンラジカル側に傾いているため、UV-可視光吸収スペクトルではアニオンラジカルのスペクトルが得られるのであろう。さらに、このプロトン化により、フラビン-6-カルボン酸類 **10, 11** のセミキノンラジカルは通常のフラビンセミキノンラジカルに比べて、極めて安定になると推定した。

以上のように、フラビン-6-カルボン酸類 **10, 11** のC(6)位に存在するカルボキシル基は、分子内水素結合によりフラビンラジカルのN(5)位へのプロトン化を容易にし、この相互作用によりフラビンセミキノンラジカルがきわめて安定となったと考えられる。このようにして著者は、フラビン酵素においてフラビン環のN(5)位への水素結合がフラビンセミキノンラジカルを安定化するという仮説を、化学的手法で初めて証明した。

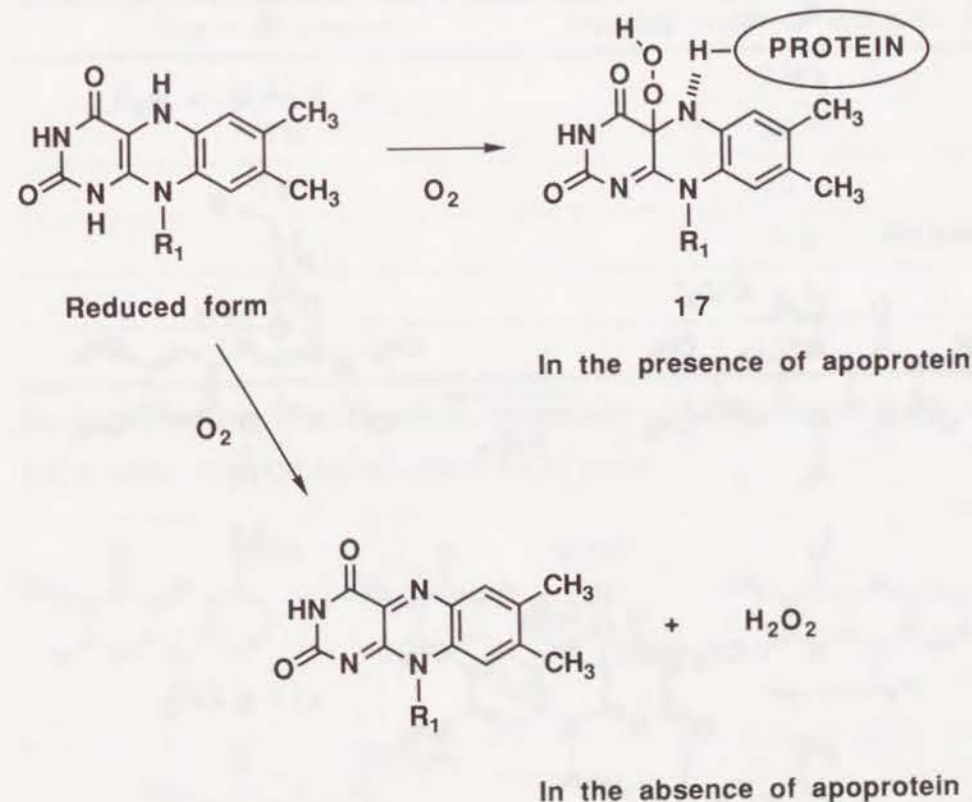


Scheme 3-5. Proposed Structure of Semiquinone Radical of Flavin-6-carboxylic Acid Derivatives.

第3章

第6節 N(5)位に分子内水素結合可能なフラビンによる過酸化水素の活性化。

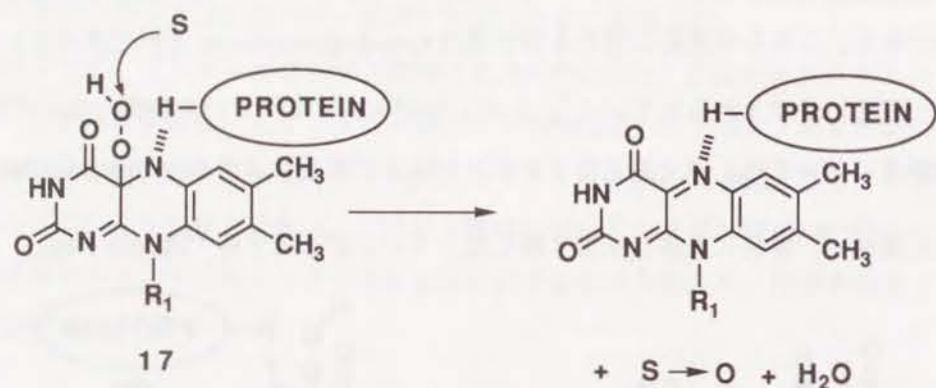
肝ミクロゾームのフラビンモノオキシゲナーゼは完全還元型フラビンが分子状の酸素を活性化することにより、アミン類あるいはスルフィド類に酸素添加を行う酵素である。これらの反応に関わる活性種は4a-hydroperoxyflavin **17** であるという説が一般的に受け入れられている⁹。しかしながら、アポタンパクを持たないフラビン補酵素においては、完全還元型フラビンと O_2 との反応により4a-hydroperoxyflavin **17** は生成せず、容易に過酸化水素と酸化型フラビンが生成する³⁰(Scheme 3-6)。



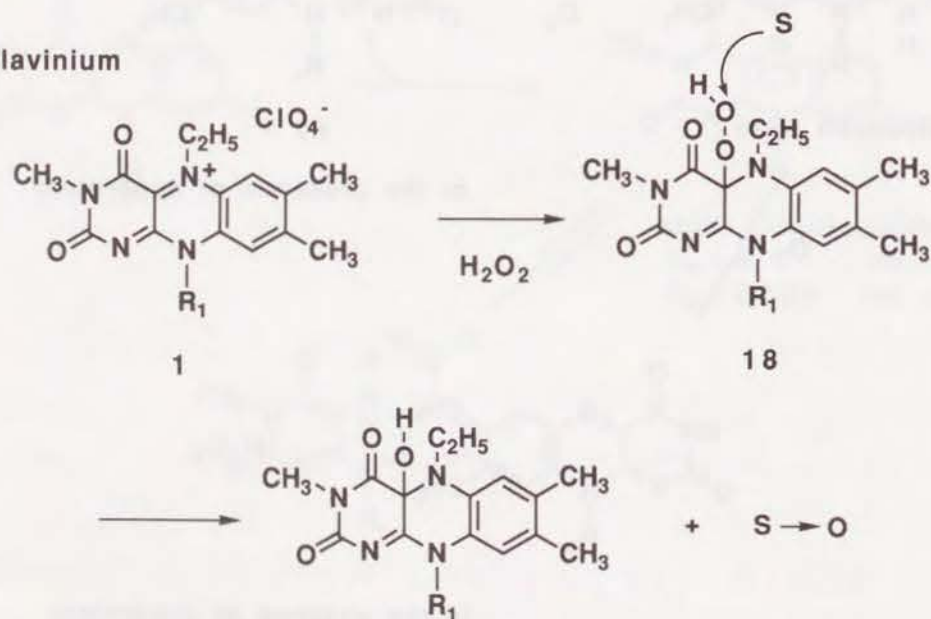
Scheme 3-6. Reactivities of Reduced Form of Flavin Derivatives with O_2 .

4a-Hydroperoxyflavin **17** の反応性を調べるためには、前述してきたフラビニウム塩 **1** がこれまで用いられてきた。フラビニウム塩 **1** は容易に過酸化水素と反応して 5-alkyl-4a-hydroperoxyflavin **18** となり、**18** はアミン類やスルフィド類に酸素添加をおこない得る⁵⁹⁻⁶³ (Scheme 3-7)。そのためフラビニウム塩 **1** はフラビン酵素による

Flavoenzyme



Flavinium



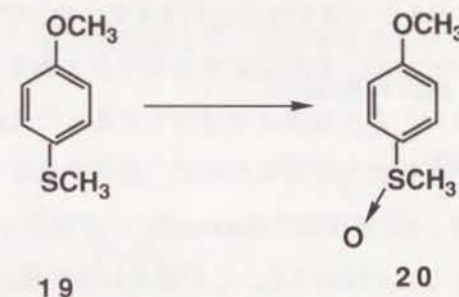
S = amines or sulfides

Scheme 3-7. Enzymatic and Model Reaction of Monooxygenation.

酸素添加反応の化学的解明のために用いられてきたが、**1** の不安定性によりこれらの反応系は複雑になる。

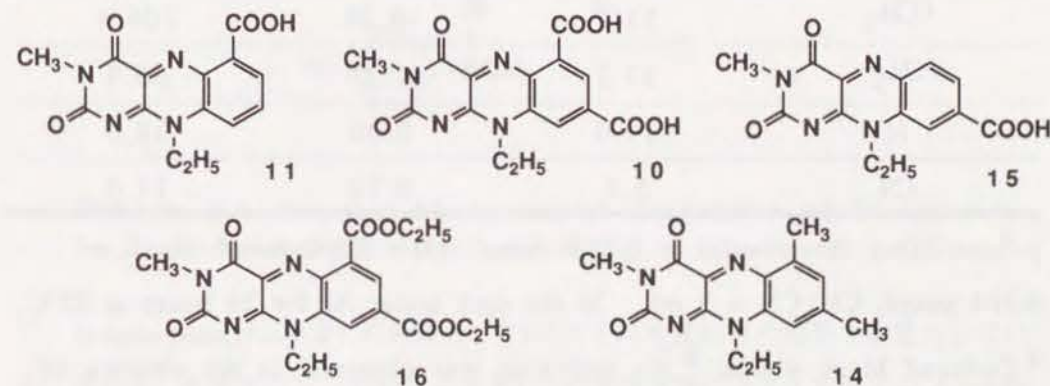
著者がデザイン、合成したフラビン-6-カルボン酸類 **10, 11** はカルボキシル基が

Table 3-2. Oxidation of Thioanisole **19** with Flavin Compounds and H₂O₂ in CH₃CN at 25°C.



Flavin derivatives	Isolated yields of sulfoxide (%)
11	29.1
10	60.6
15*	10.3
14	9.0
16	4.5
none	7.4

Flavin derivatives = 0.162 mmol, thioanisole = 0.324 mmol, H₂O₂ = 0.324 mmol, CH₃CN = 5 mL, *5 = 0.324 mmol.



解離していない条件では、N(5)位への分子内水素結合によりフラビニウム塩 **1** と似た反応を行い得る可能性がある。そこで、水素結合が起きている条件と考えられる CH₃CN 中 (第1節参照) において、フラビン **10**, **11** により過酸化水素の活性化を試みた。

その結果、基質である p-methoxythioanisole (**19**) は対応するスルホキシド **20** へ酸化された (Table 3-2)。カルボキシル基を持たない **14** や、C(8)位にのみカルボキシル基を持つ **15** および、**10** の C(6)位、C(8)位のカルボキシル基をエステル化した **16** はフラビンが全く存在しないとときと収率はほぼ同じであった (Table 3-2)。

さらに、活性種についての知見を得るために、基質であるチオアニソール類の p 置換基効果を調べたところ、p 置換基の Hammett 値 (σ) が増加するに従い、対応するスルホキシドの収率は低下した (Table 3-3)。この結果は活性種によるチオアニソール類への求電子反応を介するメカニズムを示唆している。

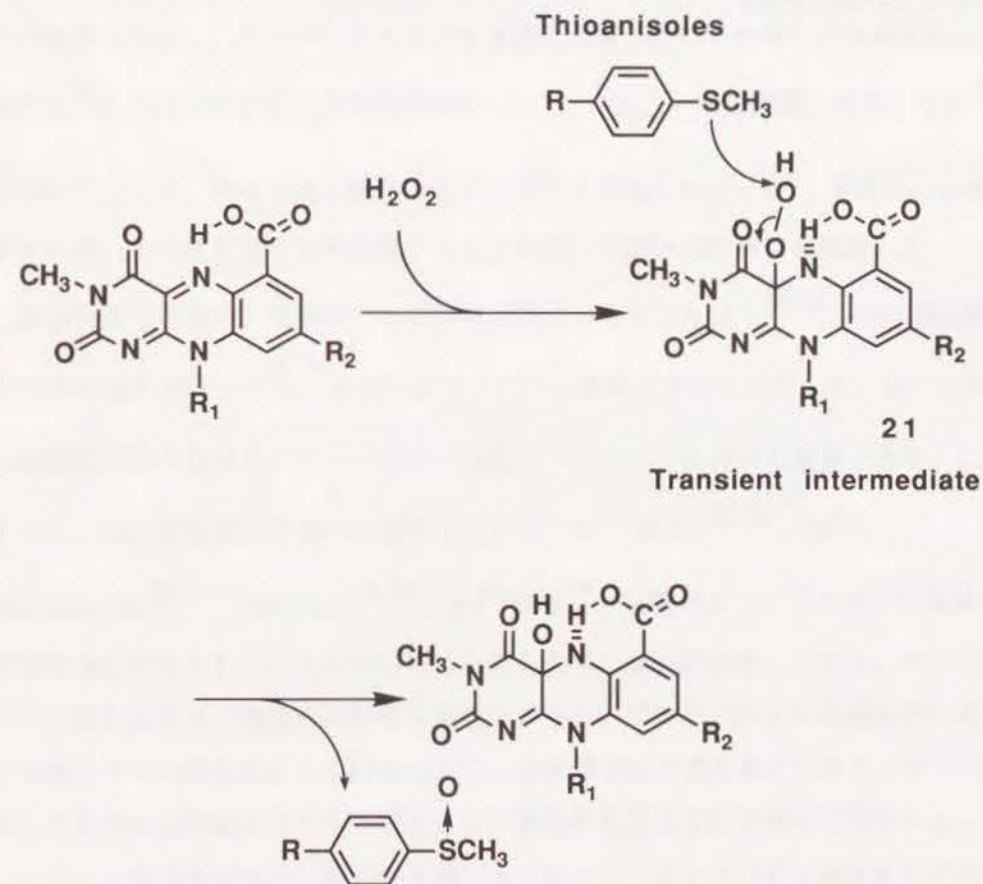
Table 3-3. Oxidation of p-Substituted Thioanisoles with **10** and H₂O₂

R	Isolated yields of sulfoxide (%)	Hammett value	Yield (%) ^c
OCH ₃	53.2	-0.28	106.4
CH ₃	33.2	-0.14	66.4
H	19.0	0.00	38.0
CN	5.5	0.70	11.0

p-Substituted thioanisoles = 0.324 mmol, **10** = 0.162 mmol, H₂O₂ = 0.324 mmol, CH₃CN = 5 mL. In the dark under Ar for 24 hours at 25°C.

^a Deduced blank yields. ^b No sulfoxide was observed in the absence of **10**. ^c On the basis of **10**.

新海らは **6** (p. 15) に関して、チオール類のジスルフィドへの酸化の反応速度の増大を報告している⁴⁶。これは N(5) 位への水素結合を介して C(4a) 位が活性化するためであると彼らは結論した⁴⁶。著者が今回合成したフラビン **10**, **11** も N(5) 位への分子内水素結合が存在し、C(4a) 位が活性化されている可能性が極めて高い。以上のことを考慮して反応のメカニズムを Scheme 3-8 のように推定した。N(5) 位への分子内水素結合により活性化された C(4a) に対して、過酸化水素が求核攻撃を行うことによ



Scheme 3-8. Proposed Mechanism of Oxygenation of Thioanisoles by Flavin-6-carboxylic Acids and H₂O₂.

て、4a-hydroperoxyflavin **21** が生成し、**21** は分子内水素結合の効果で安定化している。次いで、チオアニソール類による **21** への求核攻撃により、チオアニソール類

第4章 フラビン誘導体によるDNA光切断反応

第1節 DNA切断活性を持つフラビン誘導体のデザインと合成。

フラビンの酸化型は、極めて高い平面性を持ち、可視光を含む広い波長の光を吸収する⁶。また、還元型フラビンは、アポタンパクの非存在下ではきわめて容易に分子状酸素と反応し、スーパーオキシドや過酸化水素などのいわゆる活性酸素種を生成する³⁰。さらにフラビンは光増感反応により、 $^1\text{O}_2$ (一重項酸素)を生じたり³¹、光励起によって、極めて高い酸化活性を示すことが知られている⁶。著者はこの様に非常に高い反応性を有する酸化型フラビンを用いてDNA切断活性を検討した。

DNA切断化合物は、抗癌剤としての有用性はいうまでもなく¹⁶⁻¹⁸、DNA構造解析のための化学プローブ^{22,23}あるいはタンパクと結合させることにより、タンパク-DNA相互作用を調べるアフィニティー切断法²¹においても非常に重要である。これまでに、DNA切断活性を持つ化合物としては、 Fe^{++} -EDTA²⁶⁻²⁹、 Cu^{++} -

phenanthroline^{25,65}、bleomycin¹⁶⁻¹⁸、 Ru^{++} 錯体²³、金属ポルフィリン等⁶⁶の金属含有化合物が非常に多い。それに対して金属を含有しない化合物としては、エンジン系の抗生物質など構造的に特殊な化合物が多い。フラビンのような構造的に単純で合成しやすい化合物によるDNA切断は、金属添加の不要な系でもあり、プローブとしてあるいは抗癌抗ウイルス剤としての多様性を大きく広げ得ると思われる。

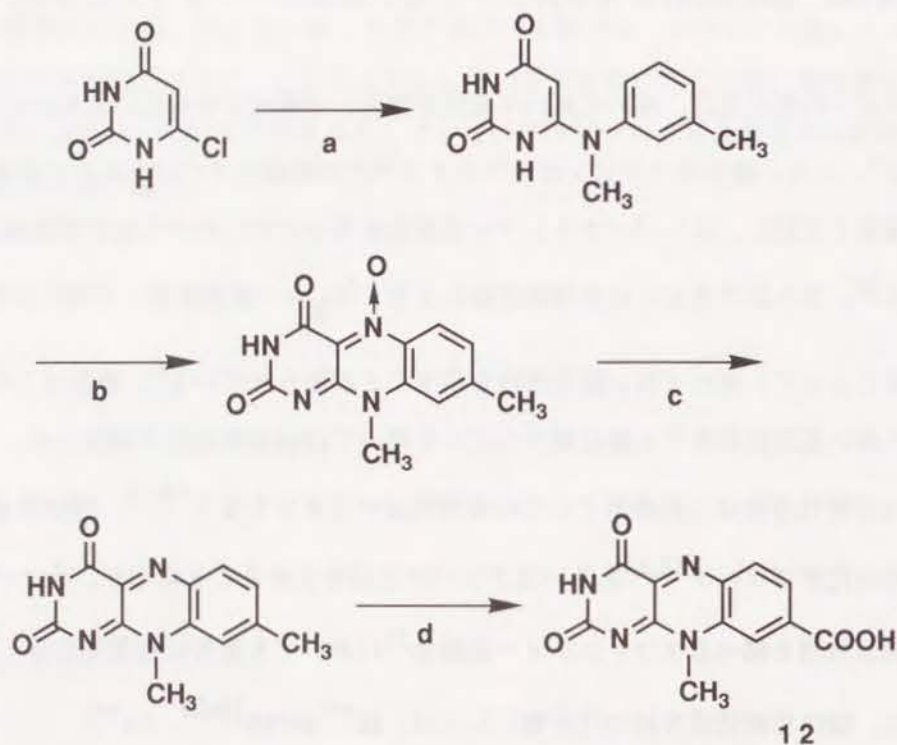
フラビン誘導体のDNA切断活性を調べるためにフラビンカルボン酸**12**をデザインした。**12**はC(8)位にカルボキシル基を持つため、中性領域の緩衝液中に対してよい溶解性を持つと思われる。また、FAD、FMN、riboflavinと異なり、ribose部分の反応性を除外して検討が可能である。さらに、溶解した際には、上記天然フラビン補酵素類と同様にアニオン電荷をもつ。また、C(8)位のカルボキシル基を利用することによって、化学プローブなどとしてのさらなる誘導体化が可能である。

合成は、米田らの方法⁴⁷に準じ、前章と同様な方法を用いた(Scheme 4-1)。得られ

はスルホキシド類へと変換されると考えられる。フラビン-6-カルボン酸に比べてフラビン-6,8-ジカルボン酸**11**において収率が高いのは、**10**の方は2つのカルボキシル基による電子吸引性によりC(4a)位がより活性化されているためと思われる。

この酸化反応では、反応性の高いチオアニソール類では、フラビンに対して100%以上の収率となり、フラビンがリサイクルしている点においても非常に興味深い。また今回の反応はN(5)位をアルキル化していないフラビンによる過酸化水素の活性化の初めての例である。

た **12** は予想通り、10mM リン酸緩衝液 (pH7.0)、および50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) にきわめて高い溶解性を示した。



(a) N-methyl-m-toluidine, 150°C. (b) NaNO₂, CH₃COOH.
(c) Na₂S₂O₄, H₂O. (d) KMnO₄, 20% H₂SO₄.

Scheme 4-1. Synthesis of the Flavin Derivative **12**.

第4章

第2節 フラビン誘導体によるDNA光切断の検討

フラビン誘導体によるDNA切断反応の検討はplasmid DNAを用い、0.9% agarose gel electrophoresis (Ethidium bromide containing)によりおこなった。種々の条件を検討したところ、照射下において、フラビン誘導体によるDNA切断反応を見いだした。Fig.4-1に示すように、フラビン濃度の上昇とともに、ccc (covalently closed circular) DNA (form I)に切断が入ることでoc (open circular) DNA (form II)となり(lane 3)、さらに高濃度である10 mMのフラビン **12** 存在下では、linear DNA (form III)を検出できた(lane 6)。反応がフラビンの濃度に依存しており、この結果より、フラビンがDNA切断に関与していることが明らかとなった。

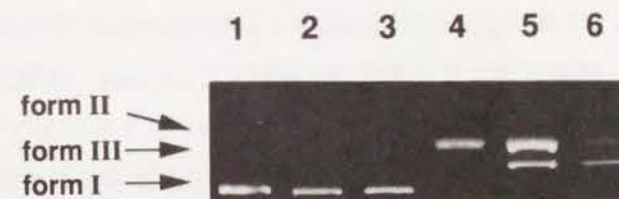


Fig. 4-1. Agarose Gel Electrophoresis Pattern of Plasmid DNA (pIBISV) after the Treatment of Photoirradiation in the Presence of **12**. Lane 1, untreated DNA; lane 2-6, 0, 0.01, 0.1, 1, 10 mM **12**. Reaction mixtures were irradiated with high pressure Hg lamp in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at 20 C° for 1 hour.

また、照射時間依存性を調べたのがFig. 4-2である。照射時間が長くなるにつれてDNA切断が進行している。反応は照射時間2時間においても、飽和はみられなかった。以上の結果より、フラビンによるDNA切断が照射下において起きると結論した。これまでにフラビン類によるDNA切断反応は例がなく、今回の結果はフラビンによるDNA光切断の最初の例である。

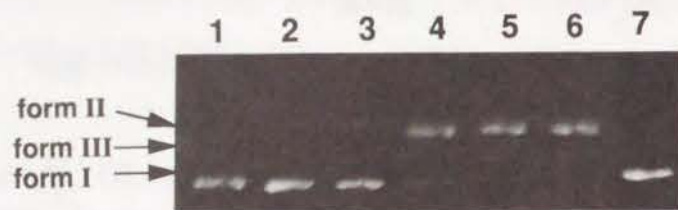


Fig. 4-2. Irradiation Time-dependency of DNA Cleaving with **12** (0.1 mM), lane 1-6, 0, 5, 10, 30, 60, 120 min; lane 7, untreated DNA. Reaction mixtures were irradiated with high pressure Hg lamp in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at 20 C°

第4章

第3節 フラビンによるDNA光切断の塩基特異性の検討

DNA切断化合物のうち、特にDNA切断活性を持つ抗生物質には、切断に塩基配列特異性を持つものが多い^{16,24}。著者は、フラビン**12**によるDNA切断の塩基特異性について検討した。塩基特異性の検討は、フラビンをDNA切断分子としてDNA高次構造のプロブ、あるいはaffinity cleavingに応用する上で重要となる。また、この反応の機構や活性種についてもいくらかの知見が得られると思われる。

常法により、3'末端を³²Pにより標識したDNA fragmentを調製後、フラビン**12**存在下、1時間光照射を行い、10% denaturing polyacrylamide gel電気泳動を用いてMaxam-Gilbert法⁶⁷による切断と比較することにより解析した (Fig. 4-3)。Lanes 1,2は各々Maxam-Gilbert法のpyrimidineおよびpurine特異的反応であり、lane 3はフラビン**12**の存在下での光照射、lane 4はフラビン**12**非存在下での光照射、lane 5はフラビン**12**存在下暗所で反応させたものである。その結果、際だった塩基特異性はみられないが、guanine残基において若干高い反応性を示した。

Guanine残基での若干の高い反応性の理由として、フラビン**12**とguanineとの相互作用の可能性が考えられる。フラビン**12**とDNAとの相互作用を調べる目的でフラビン**12**に対してcalf thymus DNAの添加実験を行った。以前の報告において、フラビンと核酸塩基類との相互作用の存在が、フラビンのUV-可視光吸収スペクトルにおける小さなhypochromicityと若干のred shiftにより示されている^{38,68}。さらにriboflavinとDNAの相互作用が、UVスペクトルにおけるDNAの添加実験によっても確かめられている⁶⁹。しかしながら、**12**に対してcalf thymus DNAを添加しても (molar ratio: flavin **12**/塩基対 = 1/10)、**12**に由来するUV-可視光吸収スペクトルに全く変化が起きなかった。フラビン**12**の持つカルボキシル基のアニオン電荷とDNAのリン酸のアニオン電荷の間の静電的な反発のために**12**と核酸塩基はDNAが2本鎖の状態においては相互作用を持たないか、存在しても極めて小さいと考えられる。従って、guanine残基における小さな高い反応性は、フラビンのDNAへの親和性によるものではなく、活性種の反応性によるものであろう。従来、guanine残基に高い反応性を示

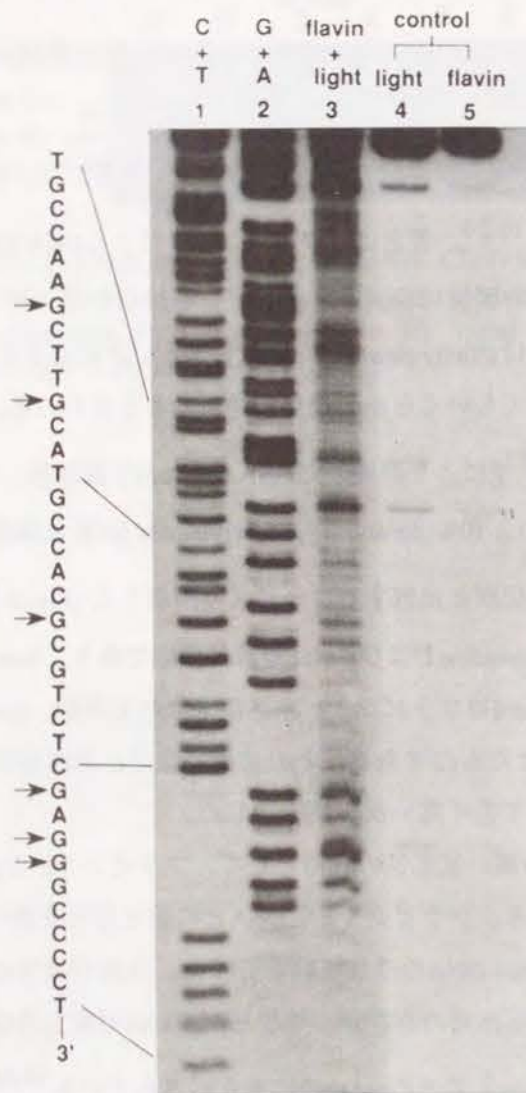
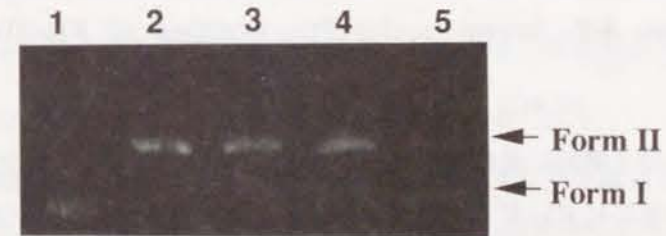


Fig. 4-3. Autoradiogram of 10% Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis. lane 1, Maxam-Gilbert C+T reaction; lane 2, Maxam-Gilbert G+A reaction; lane 3, photocleaving pattern with **12** (1 mM); lane 4, photoirradiation in the absence of **12**; lane 5, without photoirradiation.

すものとして $^1\text{O}_2$ が挙げられる⁷⁰。 $^1\text{O}_2$ はguanine残基に対して反応することで、8-hydroxyguanosineを生成し、続いて起こる脱プリン反応、糖部分の分解によりDNA切断が起きる⁷⁰。

今回検討したフラビンによるDNA切断においても、guanine残基における反応性は $^1\text{O}_2$ の関与を示唆する。そこで、 $^1\text{O}_2$ の阻害剤であるアジ化ナトリウム(NaN_3)⁷¹を反応溶液中に共存させて反応を行った。その結果、フラビンの反応性は NaN_3 が1 mMでは阻害されないが、10 mMの NaN_3 では反応は半分程度阻害された(Fig. 4-4)。この結果より $^1\text{O}_2$ が関与する反応経路が一部存在することは明らかであるが、 $^1\text{O}_2$ が関与しない経路が存在すると推察した。

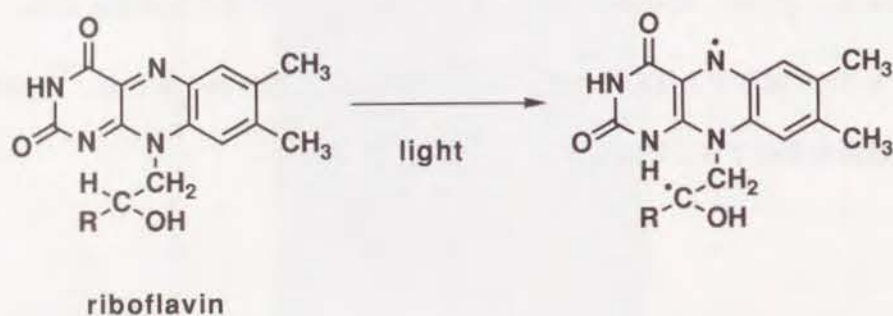


Lane 1: intact DNA Lane 4: 1 mM NaN_3
 Lane 2: no NaN_3 Lane 5: 10 mM NaN_3
 Lane 3: 0.1 mM NaN_3

Fig. 4-4. Inhibition of Flavin Mediated DNA Scission by Sodium Azide.

Flavin (**12**) (1 mM), plasmid DNA (pIBISV) and NaN_3 were irradiated with high pressure Hg lamp for 1 hour in 0.1 M sodium phosphate buffer.

通常、 $^1\text{O}_2$ の反応はguanine残基にかなり高い特異性を持っており、今回のフラビンによるDNA光切断反応における低いguanine残基特異性からも $^1\text{O}_2$ 以外の活性種の存在が裏付けられる。光照射を受けて励起されたフラビンは $^1\text{O}_2$ を発生するだけでなく、riboflavinにおいては自らのribose部分の水素原子をラジカル的に引き抜くことが報告されている^{72,73} (Scheme 4-2)。この種の反応がDNAのribose部分と励起されたフラビ



Scheme 4-2. Intramolecular Photoreaction of Riboflavin.

ン化合物とにより分子間的に進行すると、フラビンによるDNA光切断が起きると考えられる。今回の反応においても、励起フラビンによる直接的なDNAの酸化反応がDNA切断に関わっていると思われる。

第5章 フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの合成と性質

第1節 フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの合成

酸化型フラビンはきわめて高い平面性を持っており、そのため興味深い物理的性質を示す。例えば、可視光部分での特徴的な吸収および蛍光や、補酵素FADにおけるフラビン環とアデニン環の分子内相互作用などが挙げられる。さらに、前章で述べたように酸化型フラビンは光照射によりDNA切断活性を持つ。著者は、このようなフラビンの性質をアンチセンス法あるいは非放射性プローブに応用することを試みた。

アンチセンス法は、Fig. 1-4に示したように、特定遺伝子のDNAやmRNAに対して相補的な配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドにより、遺伝子の転写や翻訳を抑制する方法である³⁴⁻³⁶。アンチセンス法において分子設計上改善すべき点としては、1)安定な2本鎖の形成2)細胞内エンドヌクレアーゼに対する抵抗性3)細胞膜透過性など³⁴が挙げられる。これらの問題点の解決として、リン酸骨格部分を変換した多くの修飾オリゴデオキシヌクレオチドが合成されている³⁴⁻³⁶。

一方で、機能性分子をオリゴデオキシヌクレオチドに共有結合させることによって、付加的な相互作用による2本鎖安定性の向上や、相補鎖切断あるいは、クロスリンクさせることでより効果的なアンチセンス分子を開発する試みがなされている^{34,36}。例えば、2本鎖の安定性の向上を目指したものは、インターカレーターであるアクリジン誘導体³⁷やフェナンスリジウムハライド⁷³を共有結合させたり(Fig. 5-1)、相補鎖切断能を付加するために、 Fe^{++} -EDTA⁷⁴や Cu^{++} -phenanthroline⁷⁵を共有結合させたもの(Fig. 5-1)、またはクロスリンクさせて不可逆的な2本鎖形成を目指したpsoralene結合オリゴデオキシヌクレオチド^{76,77}が挙げられる(Fig. 5-1)。

機能性分子を共有結合させたオリゴデオキシヌクレオチドはアンチセンス分子として用いられるだけでなく、相補鎖切断活性オリゴデオキシヌクレオチドでは affinity cleavingや高次構造プローブとして用いられ、多環性の化合物の蛍光を利

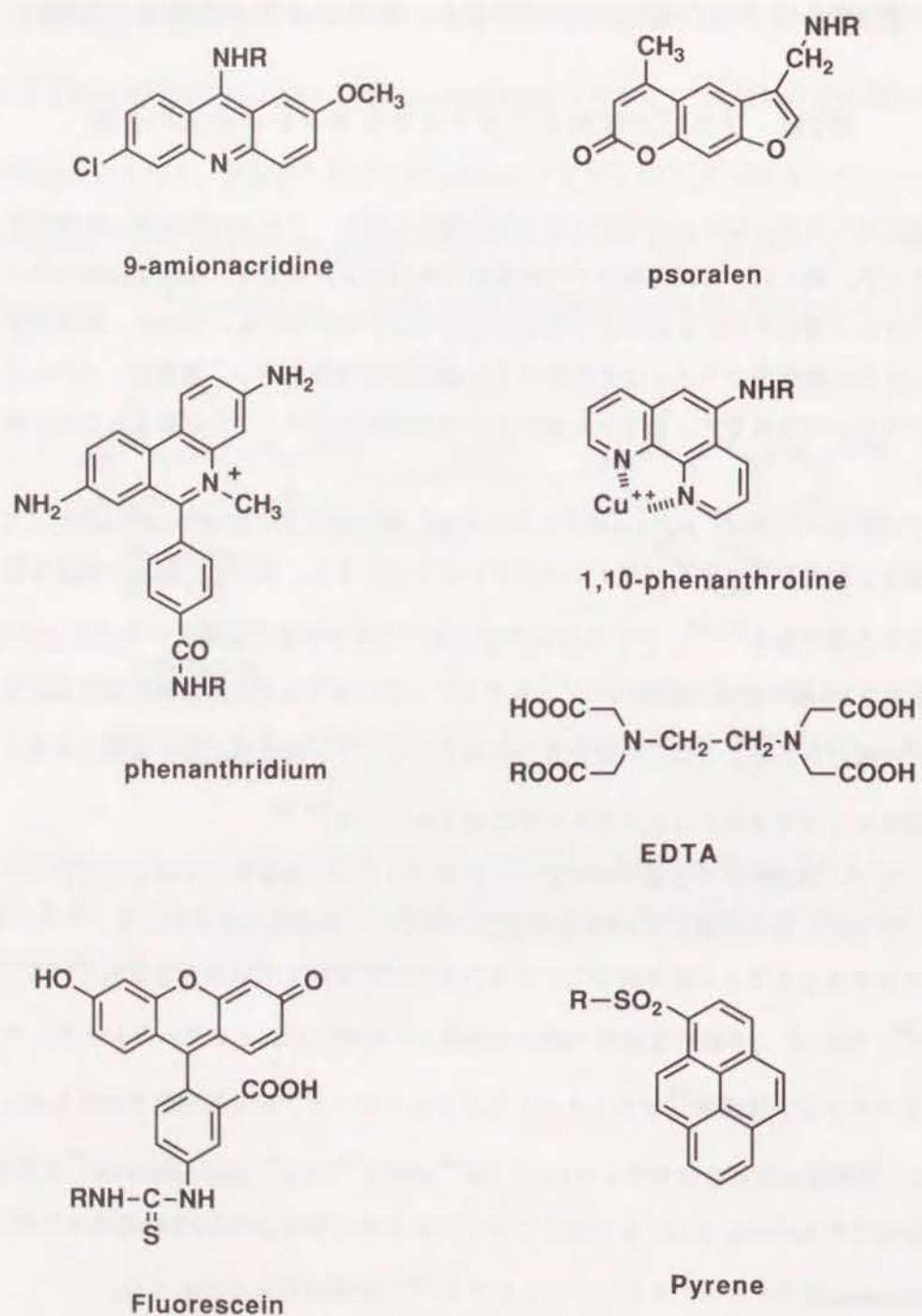


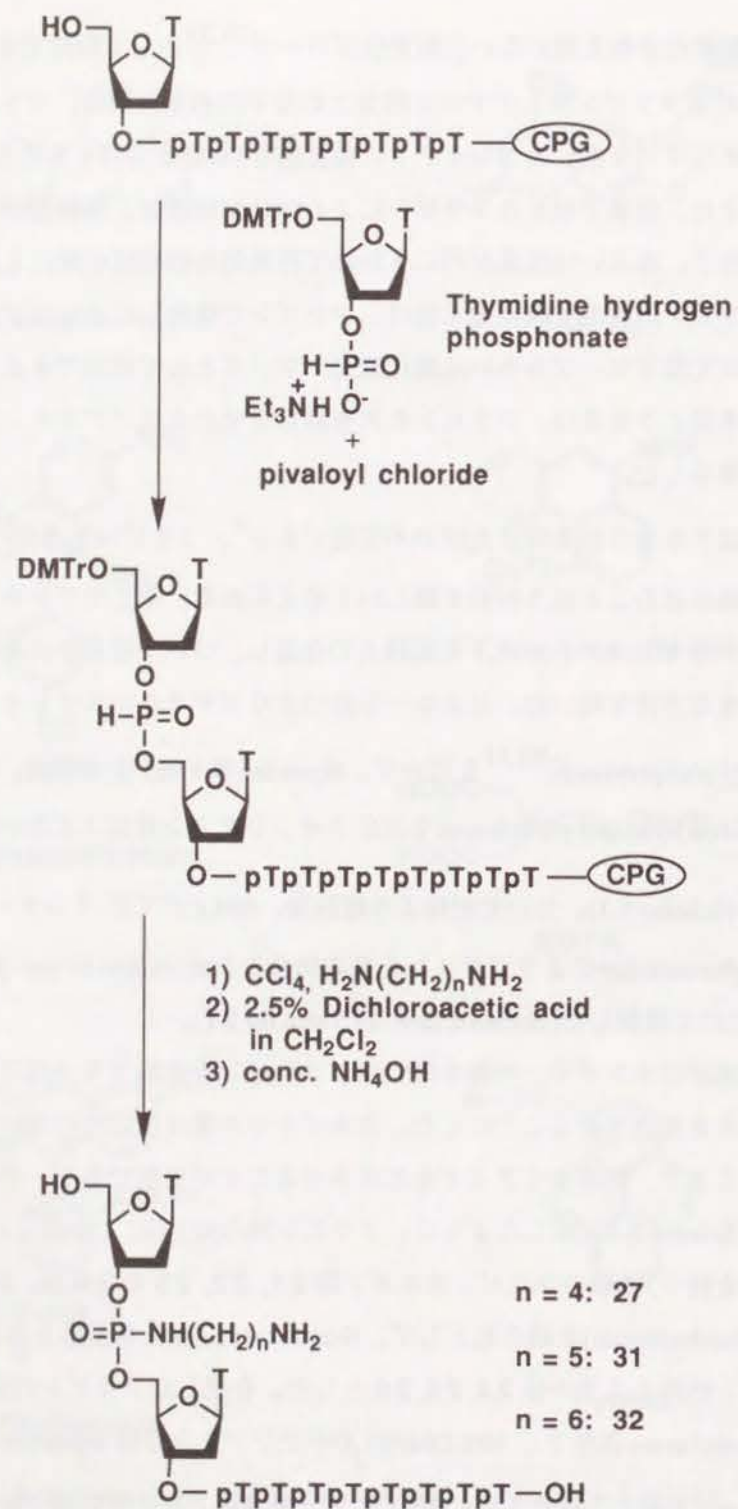
Fig. 5-1. Structures of the Functional Molecules Linking to Oligonucleotides.

用して、放射性化合物を用いない、蛍光性プローブ^{78,79}として利用できる(Fig. 5-1)。

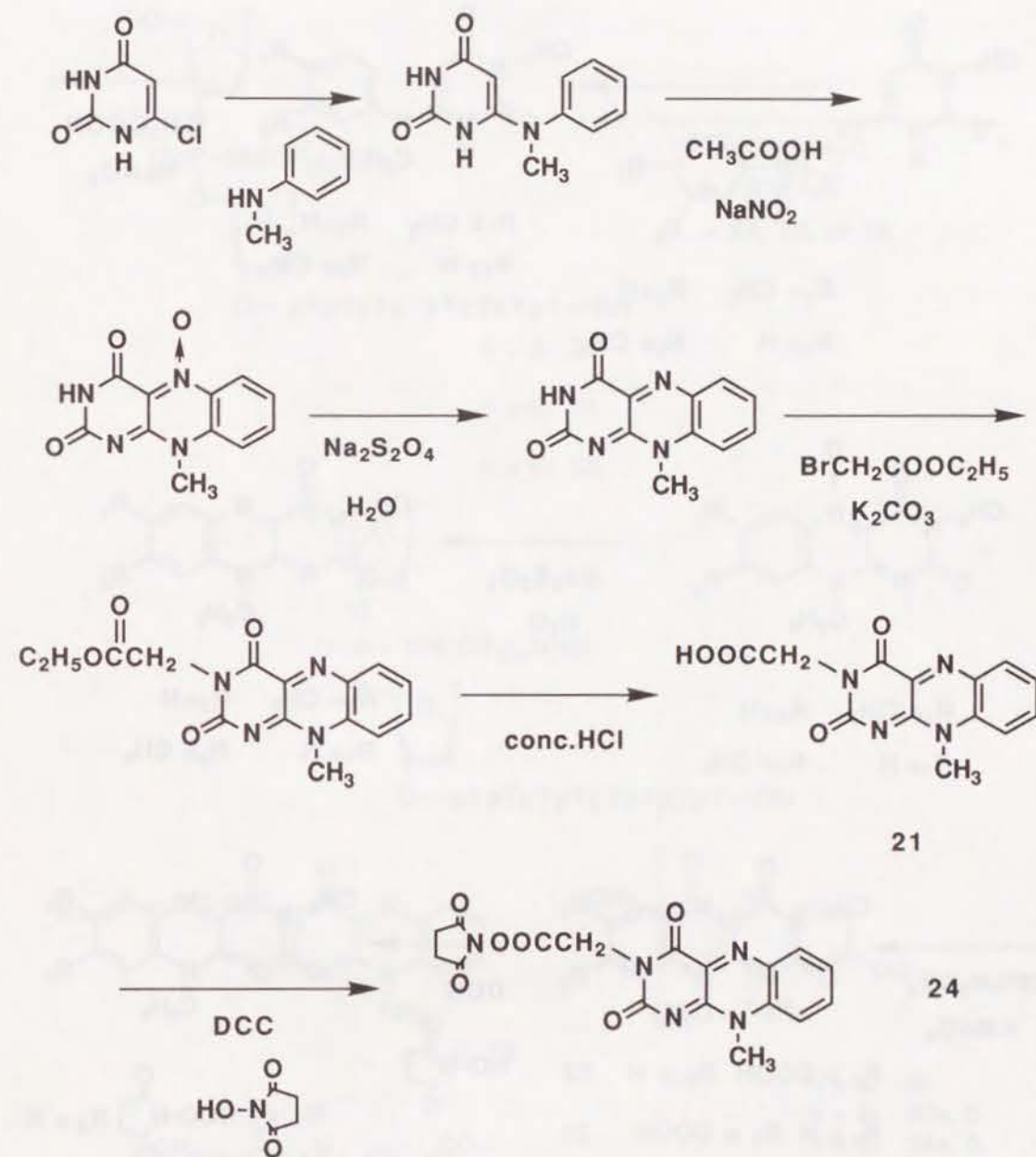
FADにおけるフラビン環とアデニン部分との分子内相互作用は、フラビンを共有結合させたオリゴデオキシヌクレオチドに付加的な2本鎖安定性をもたらす可能性を示唆する。また、前章で示したフラビンによるDNA切断能は、相補鎖切断を持つアンチセンス分子、あるいは塩基配列にきわめて特異的な相補鎖切断にも応用できる。さらに、フラビンの蛍光や酸化還元能は、フラビンで修飾したオリゴデオキシヌクレオチドを蛍光性プローブあるいは酸化還元プローブとして利用できる可能性を示す。以上の考察より著者は、フラビンを共有結合させたオリゴデオキシヌクレオチドの合成に着手した。

フラビンはアルカリ性条件下比較的不安定であり⁶、フラビンを通常のDNA合成の段階に直接組み込むことはきわめて難しいと考えられる。そこでリンカーを結合させたオリゴデオキシヌクレオチドを固相上で合成し、ついで液相中においてフラビンを結合させる方法を用いた。リンカーを持つオリゴデオキシヌクレオチド部分の合成は固相H-phosphonate法^{80,81}を用いて、thymidineの9 merを合成後、同じく固相上にてthymidine hydrogen phosphonateを反応させ、ジアミン存在下においてCCl₄酸化を行った⁸²(Scheme 5-1)。ついで担体より離脱後、HPLCにて5'-インターヌクレオチド間にphosphoramidateによりジアミンを共有結合したthymidine 10 mer **27, 31, 32**を逆相HPLCにて精製した(retention time 21.5 min for **27**)。

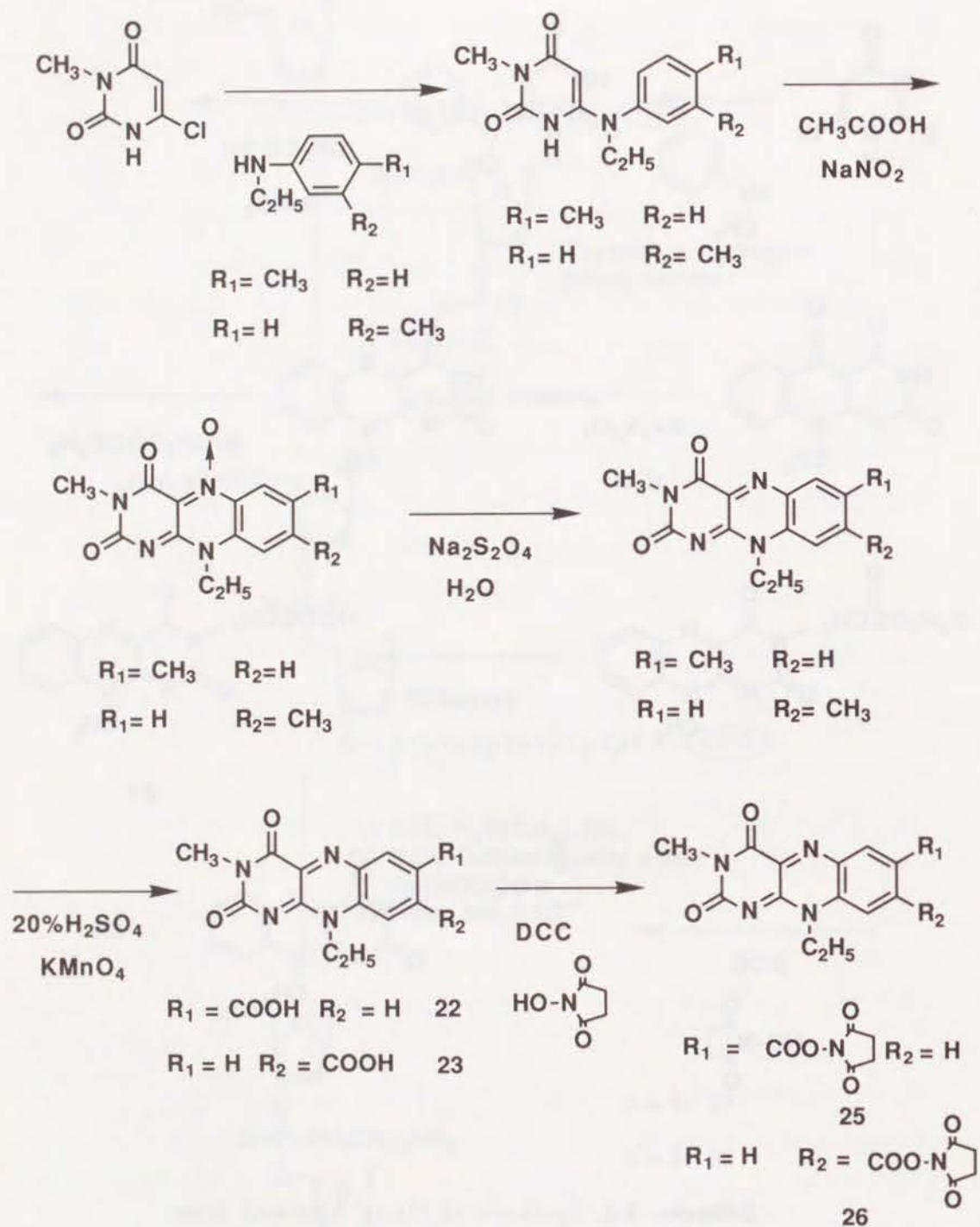
フラビン部分はカルボキシル基を用いて、フラビンを末端アミノ基リンカーにアミド結合で共有結合させることにした。カルボキシル基は反応性の高い活性エステル体とすることで、効率よくアミドを形成させることが可能である。そこで、Scheme 5-2, Scheme 5-3に示したように、フラビン環のN(3)位、C(7)位、C(8)位にカルボキシル基を持つ3種類のフラビンカルボン酸 **21, 22, 23**を合成後、DCC(dicyclohexylcarbodiimide)を縮合剤として、N-hydroxysuccinimideを反応させることにより、フラビン活性エステル体 **24, 25, 26**とした。合成したフラビンの活性エステル体を10% triethylamine存在下、50% DMF/H₂O中でジアミン修飾 thymidine 10 merと反応させ(Scheme 5-4)、これをさらにHPLCにて分離精製した。反応後のHPLC chartの一例をFig. 5-2に示す。オリゴデオキシヌクレオチドに特徴的な260 nmの吸収とフラ



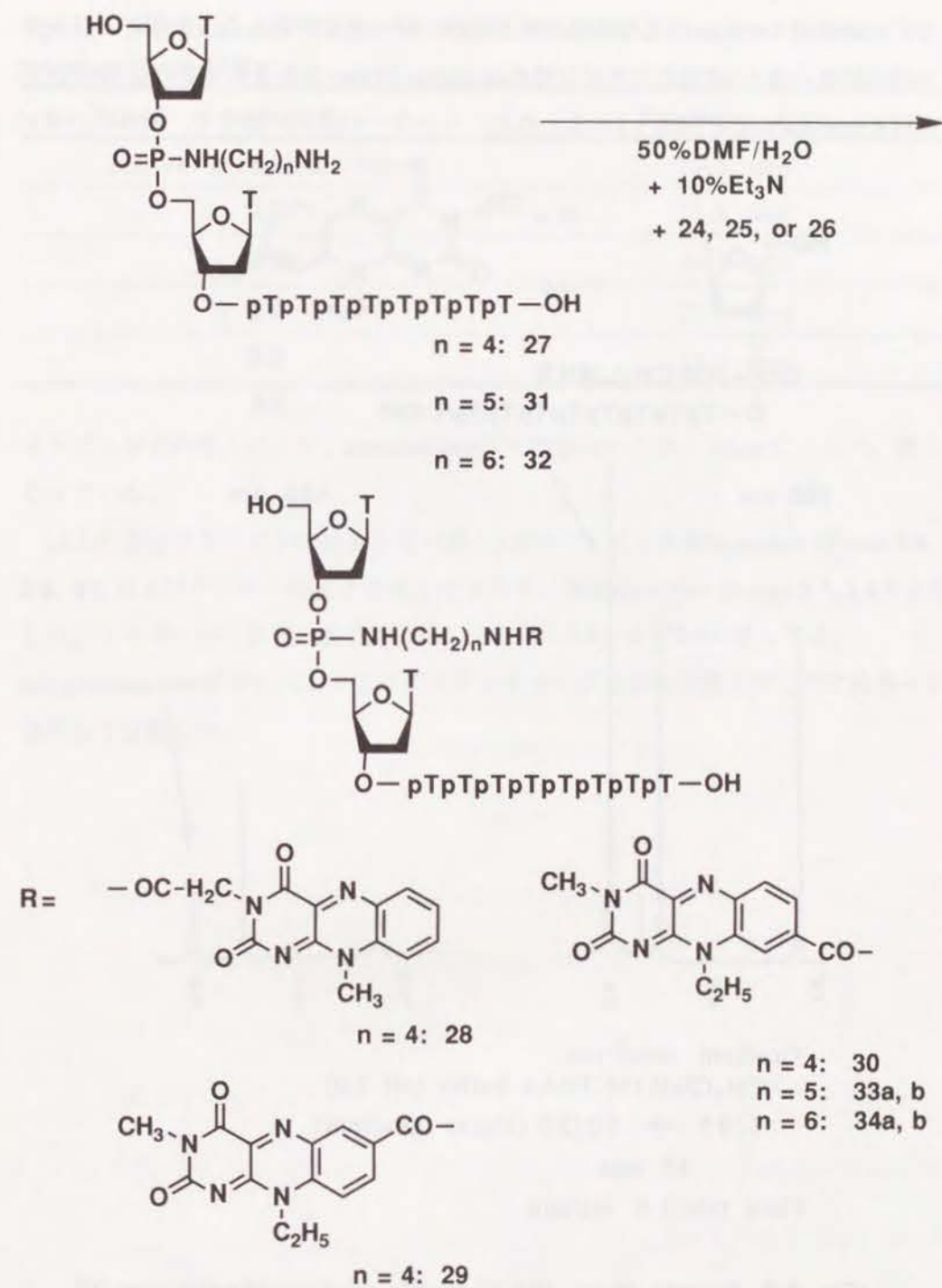
Scheme 5-1. Syntheses of Diamine Modified Thymidine 10 mers.



Scheme 5-2. Synthesis of Flavin Activated Ester.

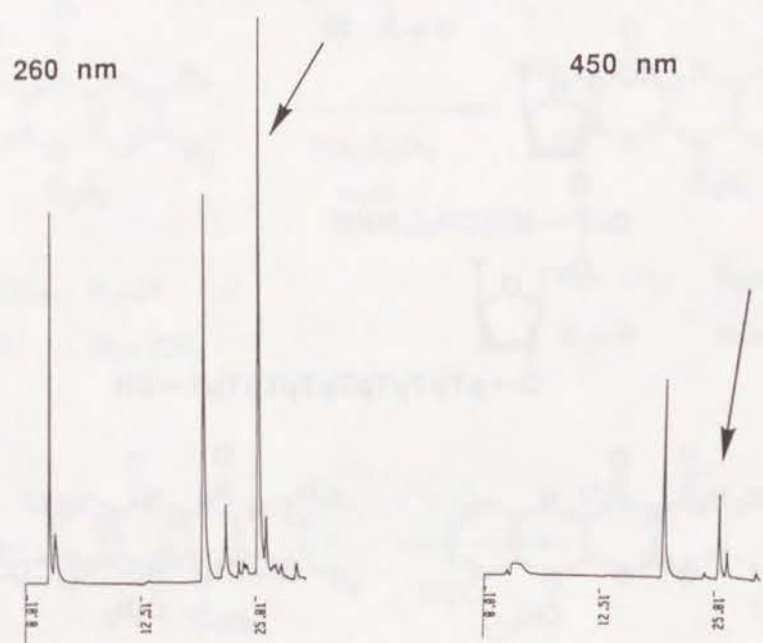
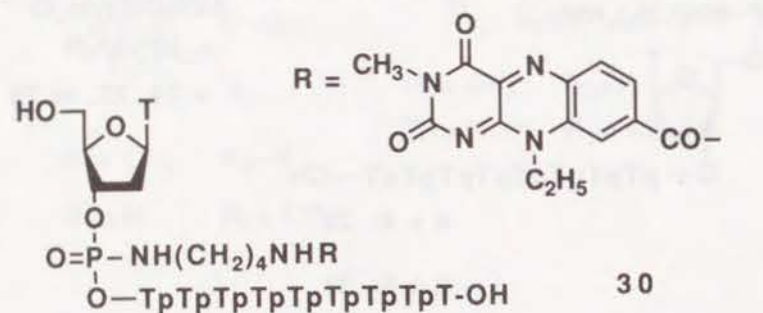


Scheme 5-3. Syntheses of Flavin Activated Esters.



Scheme 5-4. Syntheses of Flavin Modified Thymidine 10 mers.

ピニンに特徴的な450 nm付近の吸収の両方を持つピークを分取した(矢印)。リンカー結合位置の違う3種類のフラビン修飾thymidine 10 mer **28**, **29**, **30** の逆相HPLCにおけるretention timeをTable 5-1にまとめた。リンカーの導入に加えて、脂溶性の高い



Gradient condition;
 CH₃CN/0.1M TEAA buffer (pH 7.0)
 5/95 → 50/50 (linear gradient)
 45 min
 Flow rate; 1.0 ml/min

Fig. 5-2. Reverse Phase HPLC Profile of Thymidine 10 mer **30**.

Table 5-1. Retention Times of Flavin Modified Thymidine 10 mers in Reverse Phase HPLC.

Compound	Retention time
Native thymidine 10mer	19.5 min
27	21.5 min
28	24.2 min
29	25.7 min
30	25.6 min

フラビン分子の導入により、retention timeは天然型のチミジン 10merにくらべ、遅くなっている。

以上の方法でフラビンの結合位置の違う3種のフラビン修飾thymidine 10 mers **28**, **29**, **30** およびリンカーの長さを換えたフラビン修飾thymidine 10 mers **33**, **34**を合成した。リンカーの炭素鎖の長さがn=5, 6である**33**および**34**に関しては phosphoramidate部分に由来するジアステレオマーが良好な分離を示したため各々を区別して分取した。

第5章

第2節 フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの構造確認

第1節で合成したフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの構造について詳細な検討を行った。UV-可視光吸収スペクトルの一例をFig. 5-3に示す。全てのフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドに関して全て同様な結果が得られた。天然型のthymidine 10 merと同様な267 nmにおける大きな吸収とともに、フラビンに特徴的な吸収である360 nm付近と440 nm付近の吸収が観察できた。

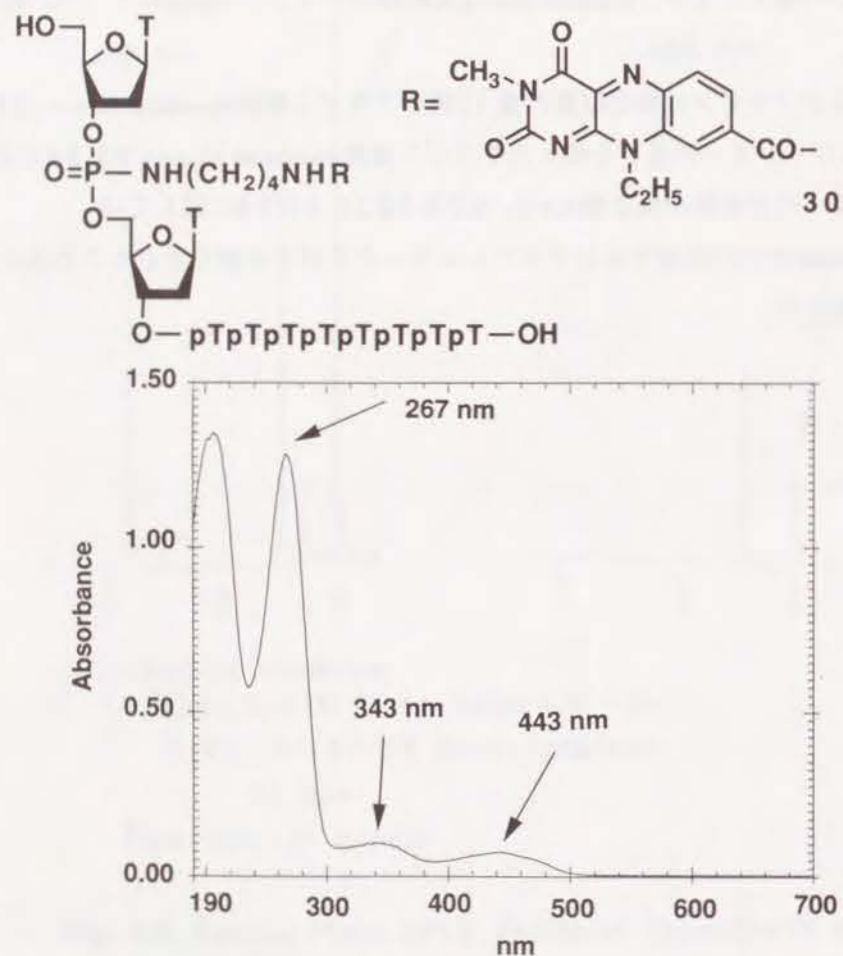


Fig. 5-3. UV Spectrum of Flavin Modified Thymidine 10 mer **30**.

更に、20%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動をFig. 5-4に示す。Lane 1はマー

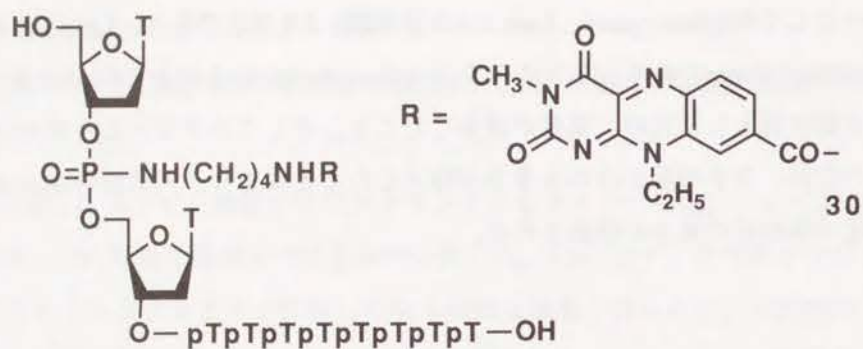
カーとしてのxylene cyanol、Lane 2-4は各々**28**, **29**, **30**であり、Lane 5は天然型のthymidine 10 merである。リンカーをphosphoramidate結合により5'-インターヌクレオチド間に導入したため、電荷が減少したこと、そしてフラビンとリンカーのかさ高さのため、分子の見かけの大きさが増大したことにより、天然型のthymidine 10 merに比べ移動度の減少が観察された。



- Lane 1: Xylene Cyanol
- Lane 2: Flavin modified thymidine decamer **28**
- Lane 3: Flavin modified thymidine decamer **29**
- Lane 4: Flavin modified thymidine decamer **30**
- Lane 5: Native 10 mer

Fig. 5-4. Gel Electrophoresis of Flavin Modified Thymidine Decamers

つぎに、snake venom phosphodiesteraseとalkaline phosphataseによる酵素分解を行った後のHPLCチャートの一例をFig. 5-5に示す。Snake venom phosphodiesteraseは3'方向よりリン酸ジエステル結合を加水分解してモノエステルとし⁸³、alkaline phosphataseはリン酸モノエステルを加水分解する⁸⁴。Retention time 約 10.5 minに出現したピーク



Enzyme;

- 1) snake venom phosphodiesterase
- 2) alkaline phosphatase

Reverse phase HPLC condition

Gradient condition;

CH₃CN/0.1 M TEAA buffer (pH 7.0)
5/95 → 50/50 (linear gradient)
45 min

Flow rate; 0.5 ml/min

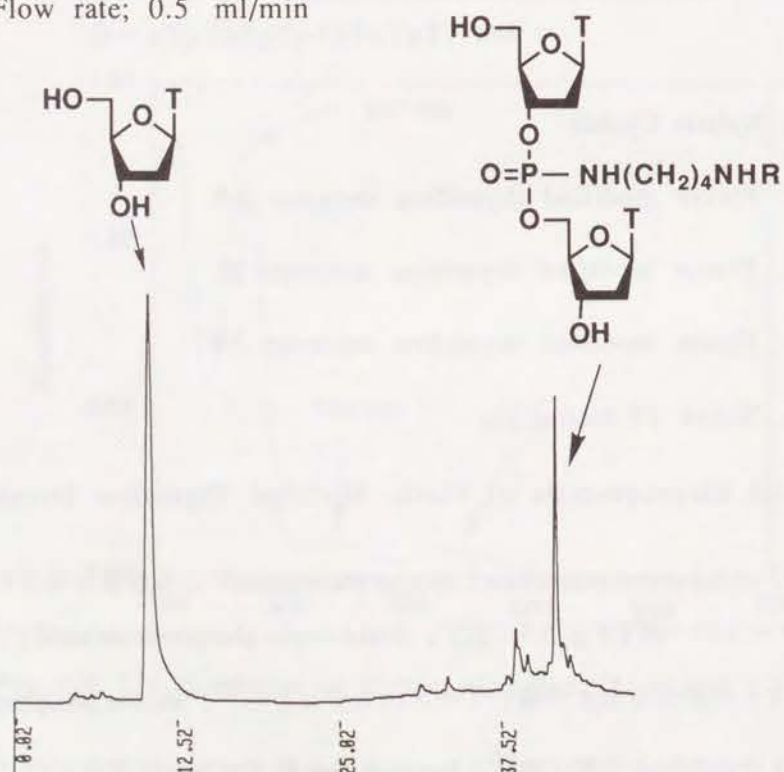


Fig. 5-5. Enzymatic Digestion of Flavin Modified Thymidine 10 mer **30**.

はthymidineと一致し、retention time 約 41.9 minに出現したピークは対応するフラビン修飾thymidine dimerとretention timeが完全に一致した。フラビンと共有結合しているリンカーがphosphoroamidate結合であるため、snake venom phosphodiesteraseによる分解が起きなかったものと思われる。

さらに、phosphoroamidate結合の存在を確認するために³¹P-NMRを測定した(Fig. 5-6)。ケミカルシフトは85% H₃PO₄を外部標準として決定した。リン酸ジエステル由

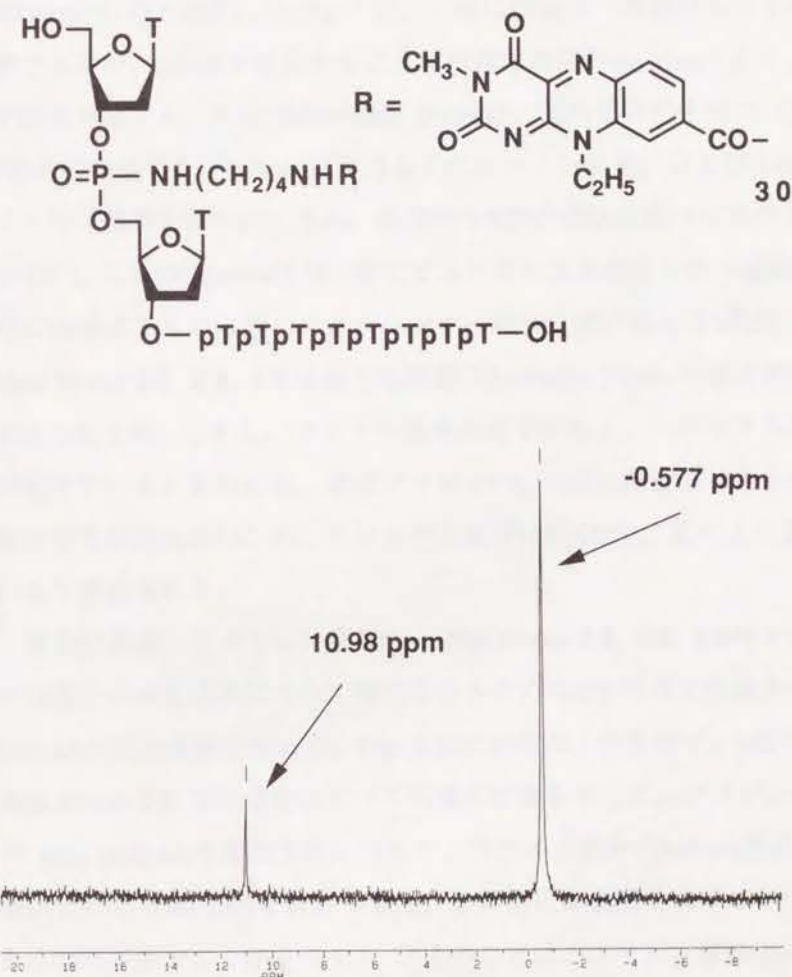


Fig. 5-6. ³¹P-NMR Spectrum of Flavin Modified Thymidine 10 mer **30**.

来の約 0 ppm 付近の大きなピークに加えて、phosphoramidate 結合由来の約 11 ppm 付近のピークが観察できた⁸⁵。また、phosphoramidate 結合に由来すると思われるピークは、ジアステレオマーに由来する 2 本のピークとして見られた。

以上のようにして、フラビン修飾 thymidine 10 mer が正しく合成できたことを確認した。

第5章

第3節 フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの分光学的性質。

著者の合成したフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドをアンチセンス分子あるいは、プローブとして応用するためには、これらの物理的性質を明らかにする必要がある。そこでまず、フラビン修飾 thymidine 10 mer と poly dA との 2 本鎖形成能を明らかにする目的で、化合物 **28**, **29**, **30** に関し CD スペクトルを測定し、天然型の thymidine 10 mer のものと比較した (Fig. 5-7)。一般に DNA は一本鎖のみにも CD スペクトルが観察できるが、2 本鎖を形成することで核酸塩基間の stacking により、特徴的なコットン効果を生ずる。天然型 thymidine 10 mer は、温度依存性を持つ (言い換えれば 2 本鎖形成に由来する) 265 nm における正のコットン効果、および 245 nm における負のコットン効果を持つ (Fig. 5-8)。典型的な B 型の DNA に比べて正のコットン効果が若干小さい。これは thymine 塩基に関してふたまた水素結合を持つ連続した dA-dT 塩基配列に由来するものと思われる。リンカー結合位置の異なる 3 種類のフラビン修飾 thymidine 10 mer **28**, **29**, **30** は全て天然型の thymidine 10 mer とほぼ同様の挙動を示した (Fig. 5-8, 5-9)。しかし、コットン効果が若干小さく、ヘリックス部分に小さな崩壊が起きていると思われる。特にフラビンの C(7) 位に結合させたものに関してはその崩壊が比較的大きいため、ヘリックス部分は他の 2 つに比べより崩れたものとなっていると推定される。

続いて、著者が合成したフラビン修飾 thymidine 10 mer **28**, **29**, **30** のフラビン部分と相補鎖の塩基との相互作用について検討を行うために UV-可視光吸収スペクトルを用いた poly dA の添加実験を行った。Fig. 5-10 に結果の一例を示す。3 種のフラビン修飾 thymidine 10 mer **28**, **29**, **30** はすべて同様の挙動を示した。フラビン修飾 thymidine 10 mer に poly dA を添加するにつれて、フラビン部分の 440 nm 付近の吸収に hypochromicity と小さな red shift が観察できた。この変化は温度を上げてヘリックスを融解させるにつれて消失した (Fig. 5-11)。以上のことは、フラビン修飾 thymidine 10 mer が poly dA とヘリックスを形成した際に、フラビン環部分と相補鎖のアデニン環との間に相互作用が生じることを示唆する。

続いて蛍光スペクトルを測定した。励起波長には温度変化により UV スペクトルの強度が殆ど変化しない 365 nm の吸収を用いた。Fig. 5-12 に示すようにフラビン化合

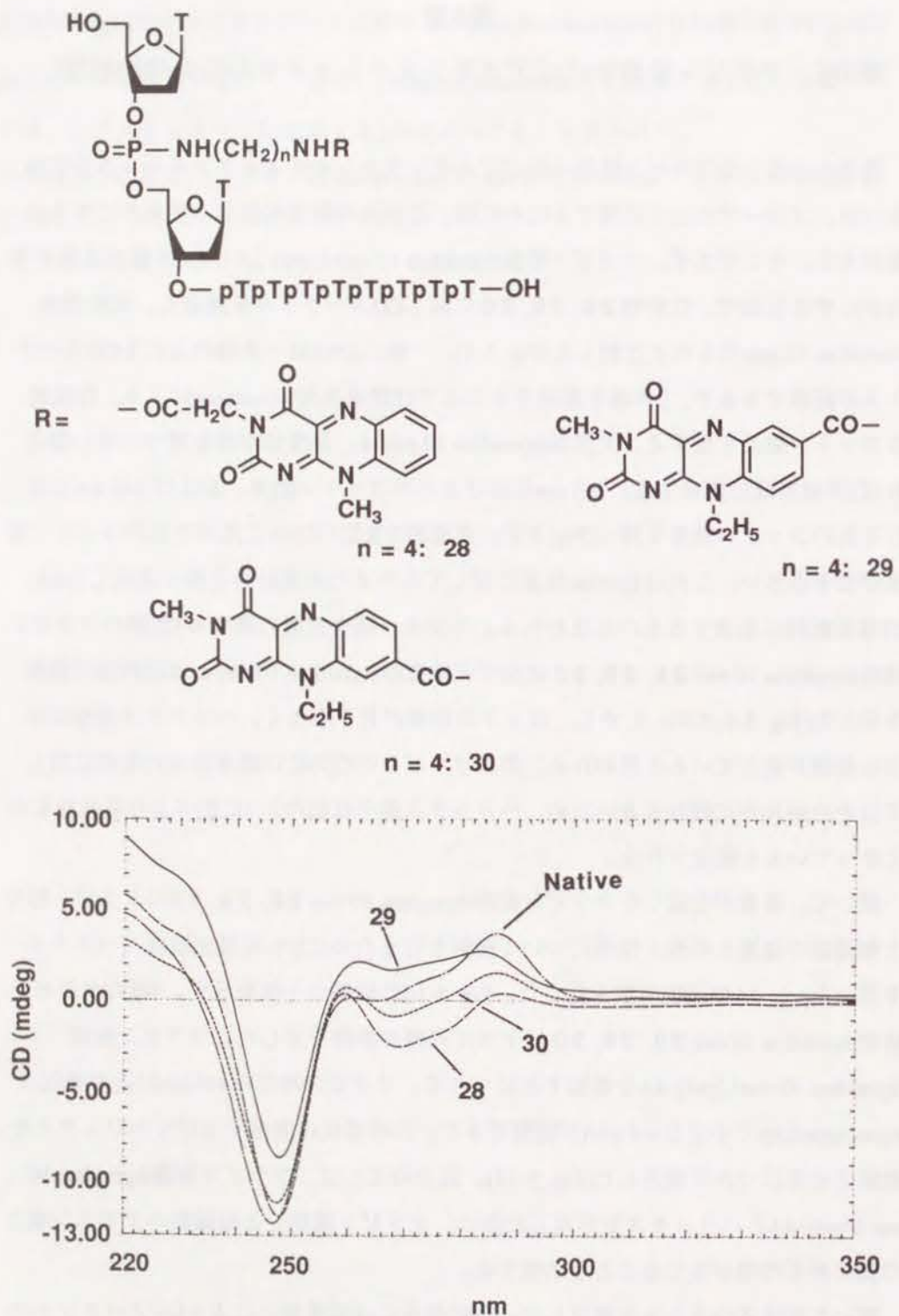


Fig. 5-7. CD Spectra of Flavin Modified Thymidine Decamers with Poly dA.

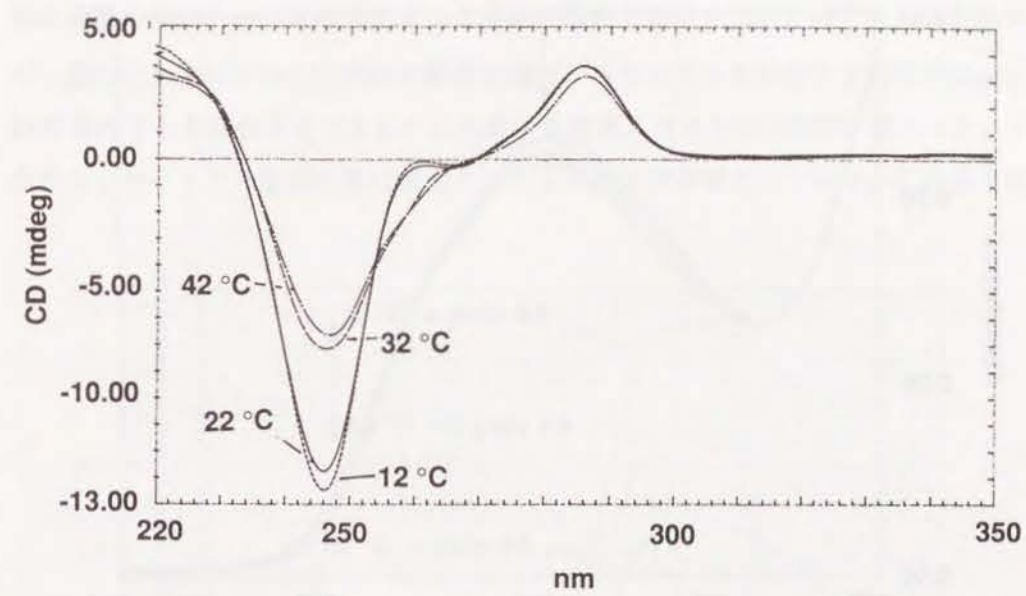


Fig. 5-8. Temperature Dependent CD Spectra of Native Thymidine Decamer with poly dA.

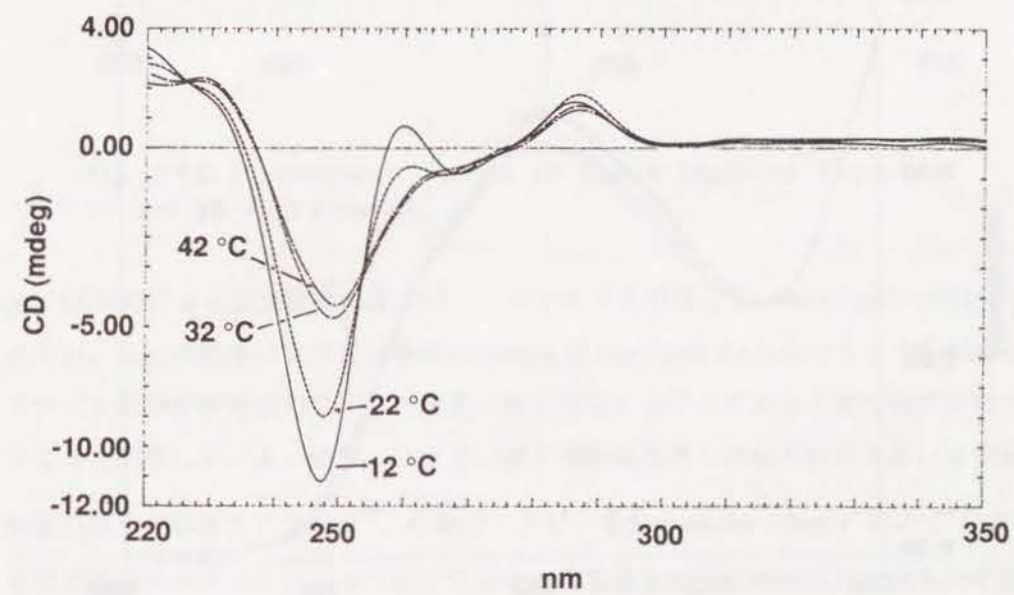


Fig. 5-9. Temperature Dependent CD Spectra of Flavin Modified Thymidine Decamer 30 with poly dA.

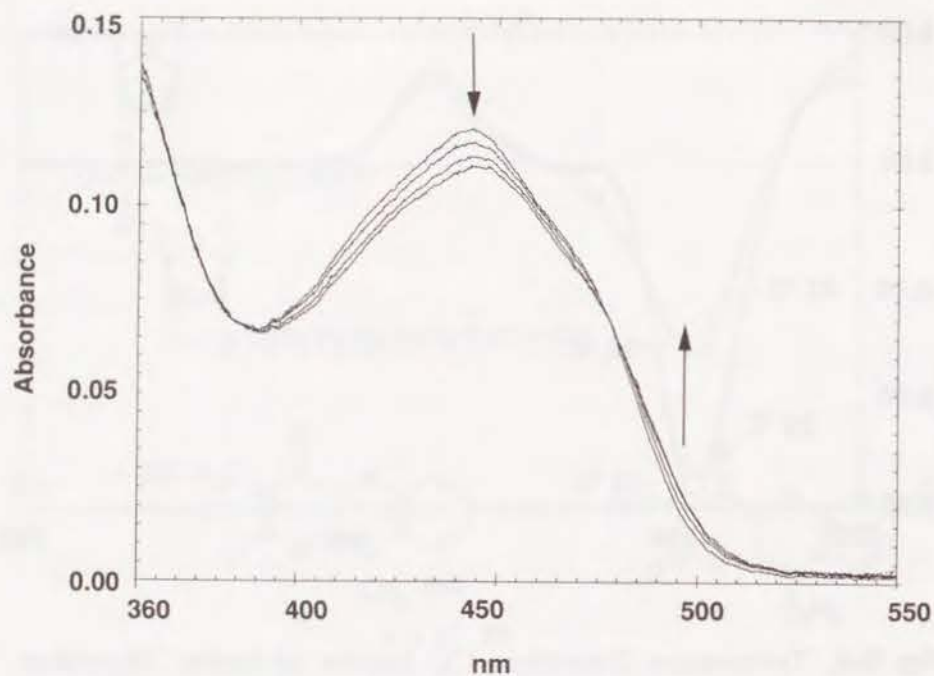


Fig. 5-10. Titration of Flavin Modified Thymidine Decamer 30 with Poly dA.

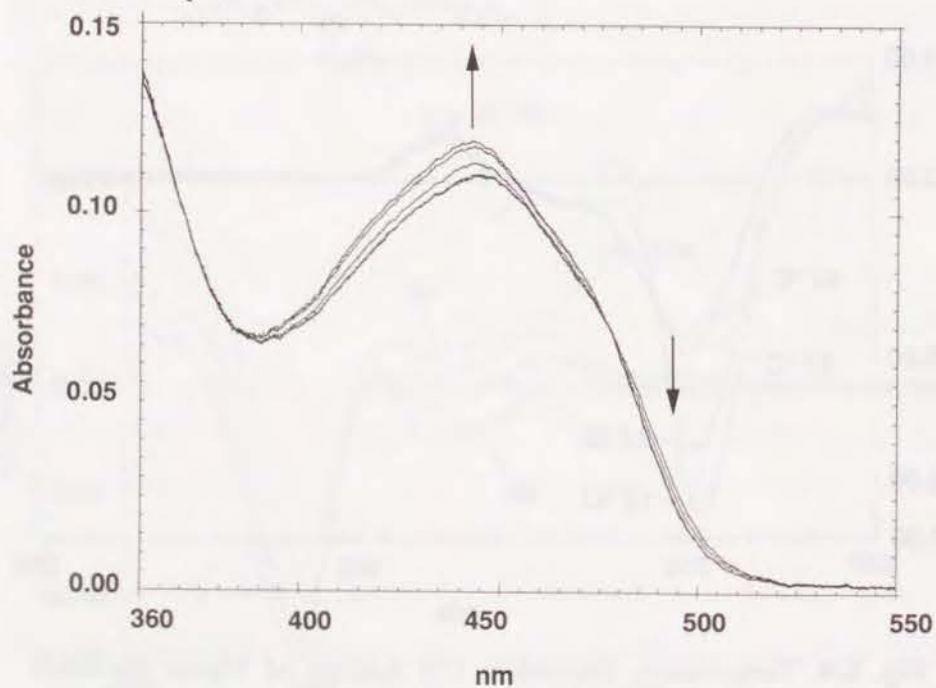


Fig. 5-11. Temperature Dependent Change of Absorption Spectra of Flavin Modified Thymidine Decamer 30 in the Presence of Poly dA.

物に特徴的な530 nm付近の蛍光スペクトルが観察できた。ここではその一例を示すが、他の化合物においても同様の結果を得た。ヘリックスを形成する10°Cではpoly dAの存在下と非存在下でフラビンに由来する蛍光スペクトルの強度が異なった。すなわち、ヘリックス形成の際に蛍光スペクトルの強度が増大している。このような

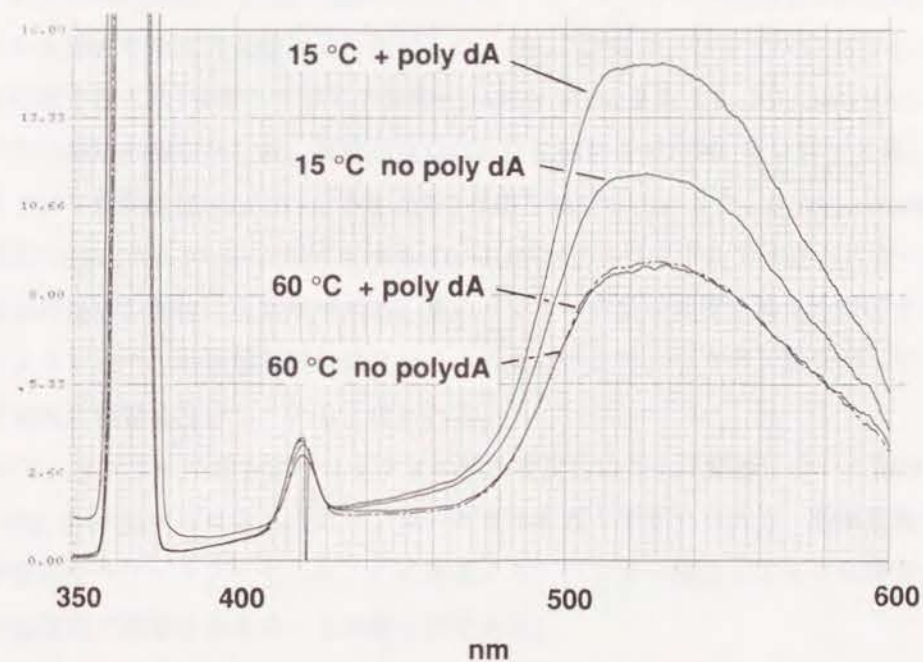


Fig. 5-12. Fluorescence Spectra of Flavin Modified Thymidine 10 mer 30 with Poly dA.

poly dA添加による蛍光強度の増大は、ヘリックスを形成しない60°Cにおいては見られない。以上の結果はフラビン修飾thymidine 10 merがpoly dAとヘリックスを形成し、フラビン部分が相補鎖のアデニン塩基と相互作用することによって蛍光強度が増大すること示唆している。通常、フラビン類と核酸塩基類との相互作用の際には蛍光強度の減少が報告されており⁶、今回のフラビン修飾thymidine 10merにおいてはUV-可視光吸収スペクトルは、フラビン化合物と核酸塩基間とで観察された既知の挙動と一致したが、蛍光スペクトルにおいては逆の結果を得た。蛍光性化合物を共有結合させたオリゴデオキシヌクレオチドの場合、その多くは核酸塩基との相互作用にともなって蛍光強度が減少する。しかしダンシル基においては蛍光強度の増大が報

告されており⁷⁹、これはヘリックス形成にともない疎水性環境に蛍光性化合物が置かれるためと説明されている。著者の合成したフラビン修飾thymidine 10 merにおいても同様の説明が出来るかも知れない。いずれにしても、蛍光性プローブとして用いる場合にはヘリックス形成にともなう蛍光の増大は都合がよく、フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの蛍光プローブとしての応用の可能性を示す結果である。

第5章

第4節 フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドと相補鎖による ヘリックスの熱的安定性とその構造

フラビン修飾thymidine 10 merがpoly dAと形成するヘリックスの熱的安定性をUV吸収スペクトルを用いた熱変性実験により決定した。Fig. 5-13には、フラビンにおけるリンカーの結合位置を換えた3種類のフラビン修飾thymidine 10 mer **28**, **29**, **30**とpoly dAによるヘリックスの融解曲線を示した。融解温度はC(8)位に結合させた**30**では若干上昇したが、他のフラビン修飾thymidine 10 mer **28**, **29**では若干減少した。また、hypochromicityの程度が天然型のthymidine 10 merに比べて小さく、これはCDスペクトルで予想されたヘリックスの部分的崩壊を裏付ける結果である。更にリンカーの結合位置を換えただけでオリゴデオキシヌクレオチドの融解温度に変化がみられることより、フラビン部分がヘリックスの熱的安定性に影響を及ぼしていると思われる。

続いて、リンカーの長さがヘリックスの熱的安定性に与える影響について検討したところ、Fig. 5-14に見られるようにリンカーの長さを長くするにつれて、融解温度は減少し、より不安定なヘリックスとなった。この結果より、リンカー部分による立体障害がヘリックスの安定性に影響を与えることは明らかである。

また $n = 5, 6$ の場合においてHPLCにて分離し精製したオリゴデオキシヌクレオチドに関しリンカーを結合した部分のphosphoroamidateに由来するジアステレオマー間におけるヘリックスの安定性の違いを検討したのがFig. 5-15 a,bである。リン酸部分にchiralityを持つオリゴデオキシヌクレオチドでは、ジアステレオマー間でヘリックスの熱的安定性に大きな差が見られる^{91,92}。この違いはヘリックス形成の際に、一方のジアステレオマーはヘリックスの外の方向に、もう一方は内側の方向に突き出すために生ずると考えられている⁹¹。今回合成したフラビン修飾 thymidine 10 merではジアステレオマー間で融解温度に大きな違いがなかった。さらに、ジアステレオマー間の違いはリンカーの炭素鎖が5個のものより6個のものの方が小さかった。

以上の結果をふまえて、ヘリックスの推定構造をFig. 5-16 に示した。フラビン修飾 thymidine 10 merはヘリックス形成を行うが、フラビンを共有結合しているリンカー部分に置いてヘリックスが崩壊していると思われる。フラビン部分は塩基と相互作用しており、それは、ヘリックス全体の安定性に影響を及ぼしているのであろう。このモデルはリンカ

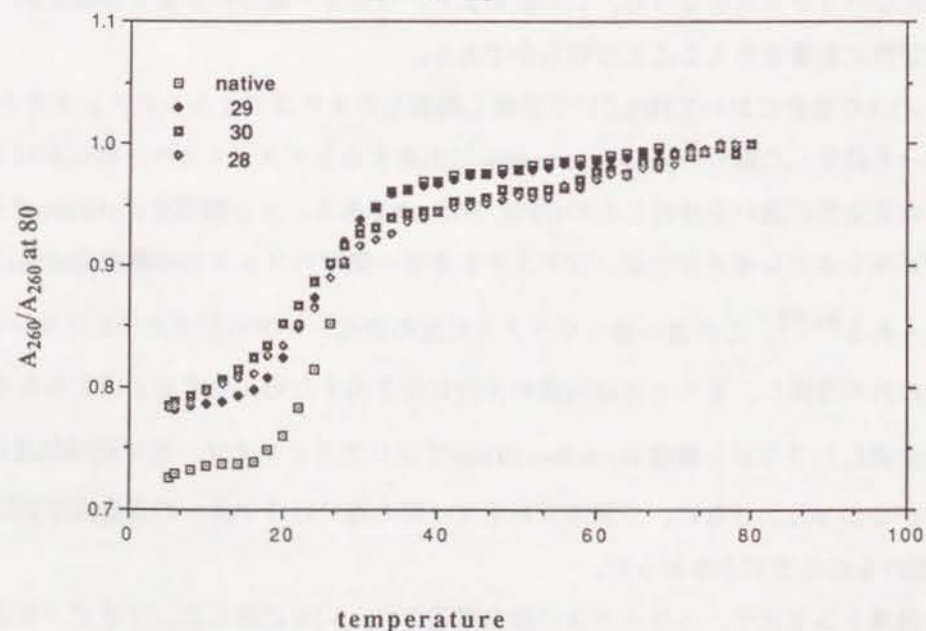
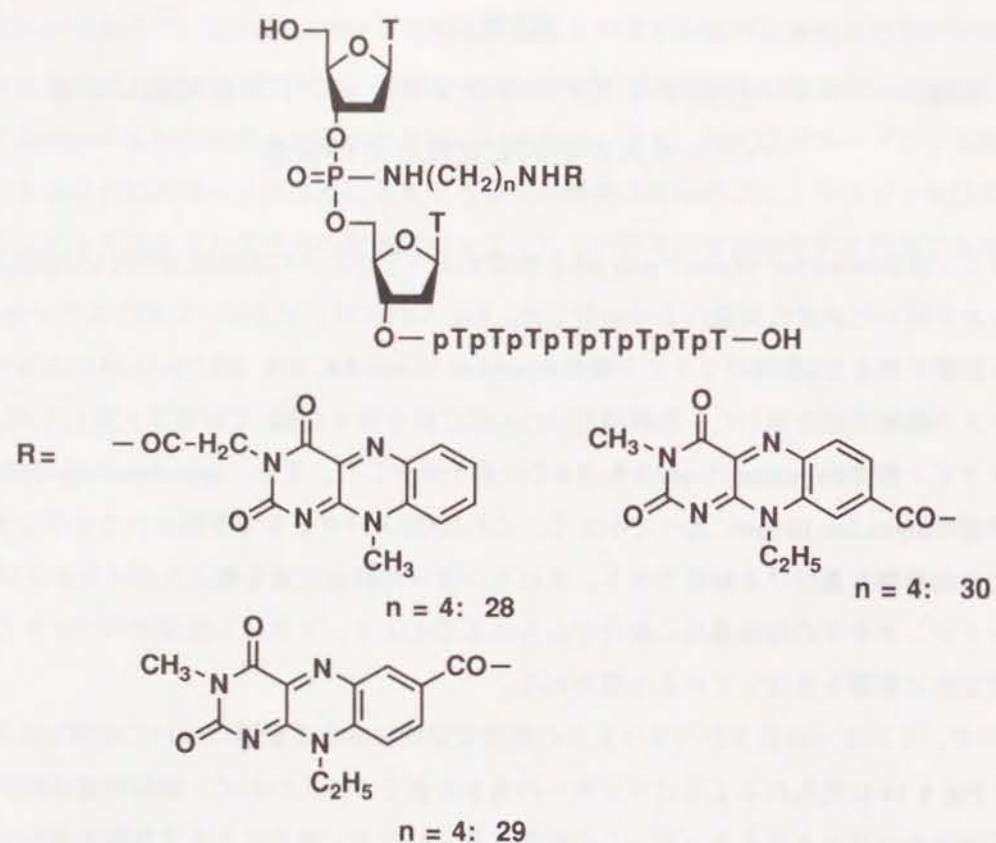


Fig. 5-13. Temperature Melting Profiles of Flavin Modified Thymidine Decamers **28**, **29** and **30** with Poly dA.

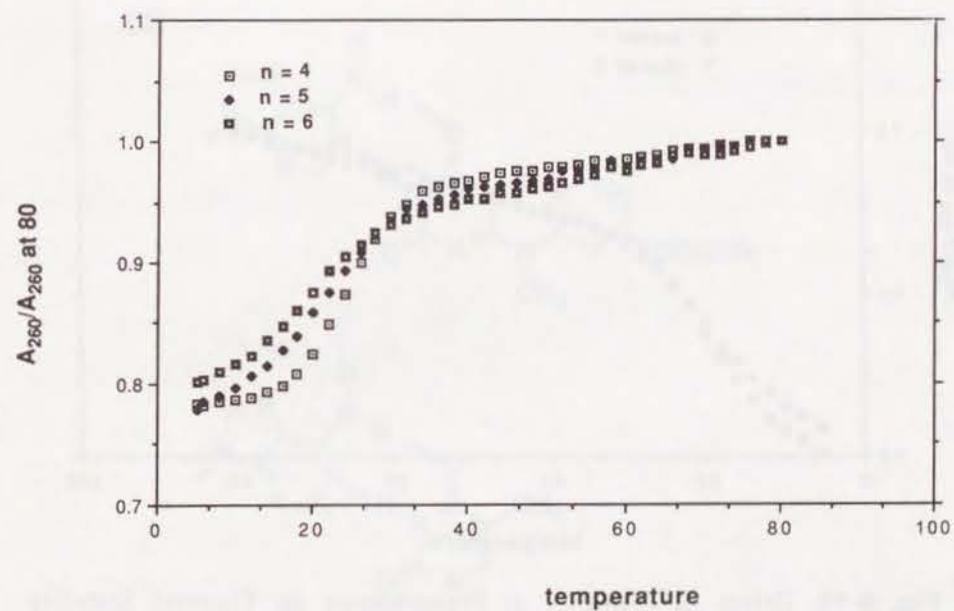
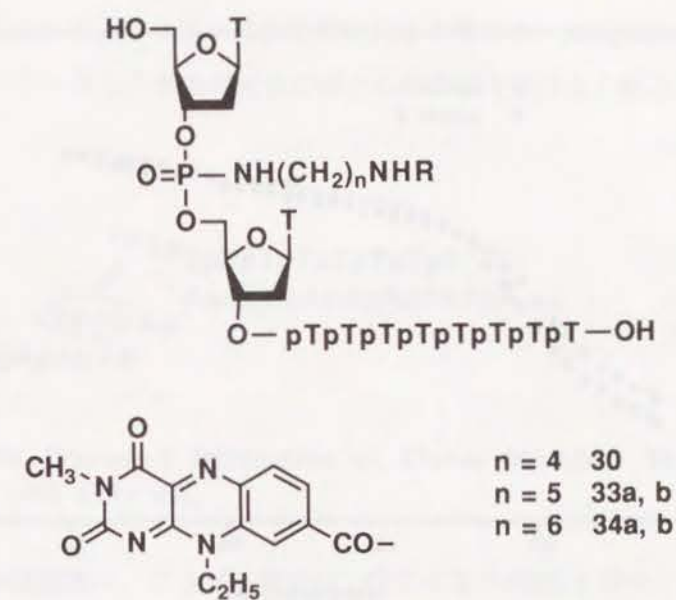


Fig. 5-14. Effect of Linker Length of Linker Arm on Melting Temperature.

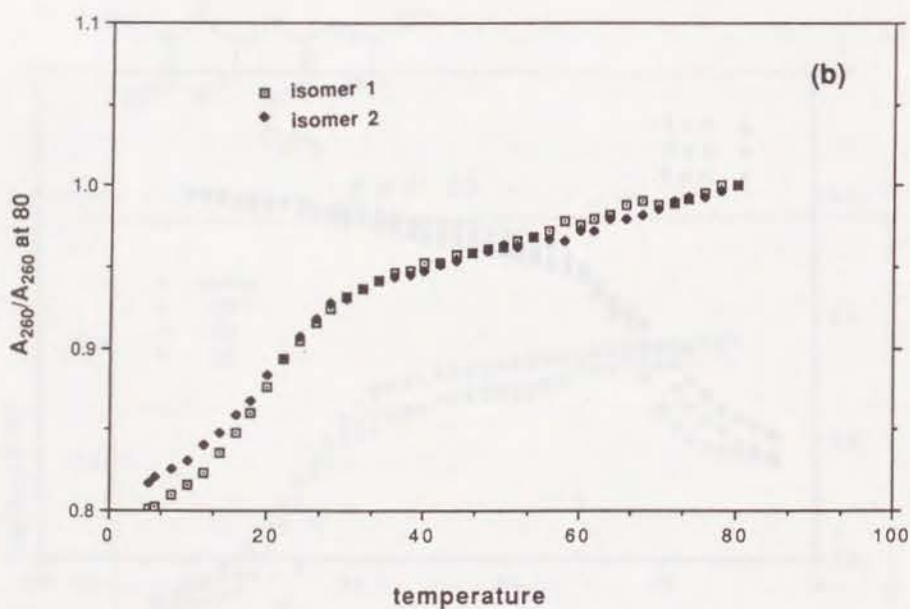
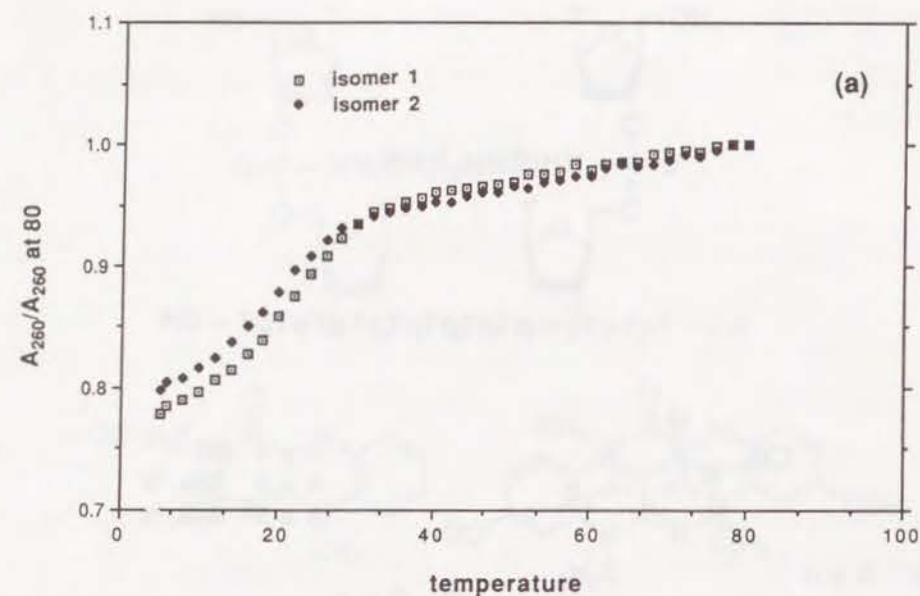


Fig. 5-15. Effect of Chirality at Phosphorous on Thermal Stability of Duplex; (a) cadaverine linker ($n = 5$), (b) hexamethylene diamine linker ($n = 6$).

一の長さの増大につれて、ヘリックスが不安定化する事実や、phosphoroamidate部分の chiralityにより、ヘリックスの熱的安定性がほとんど影響を受けない結果もよく説明できる。

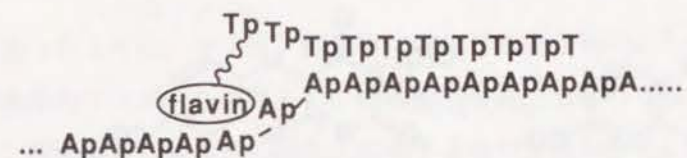


Fig. 5-16. Presumed Interaction of Flavin Modified Thymidine 10 mer with Poly dA.

通常のフラビン補酵素は、フラビン環のN(3)位にイミドのNHを持ち、thymineのイミドNHと非常に類似している(Fig. 5-17)。

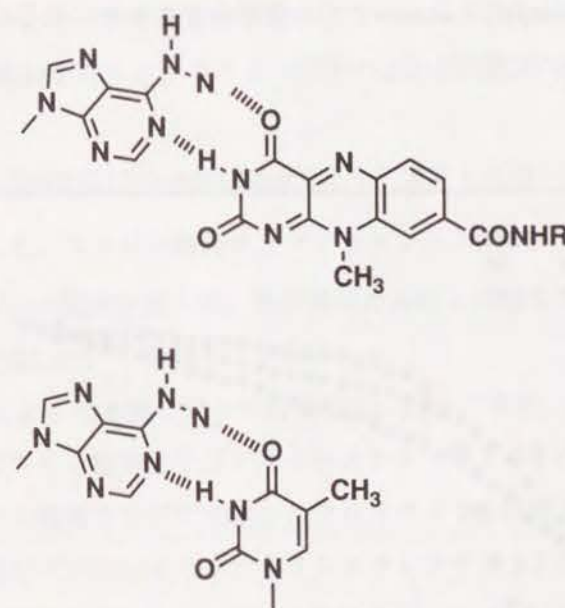


Fig. 5-17. Hydrogen Bonding of Flavin with Adenine.

Thymineはadenineと水素結合をしており、N(3)位にNHを持つフラビンを共有結合させた場合、adenineと水素結合を生じる可能性がある。そこで、N(3)位にNHを持つフラビンを thymidine 10 merに共有結合させた **35** を合成し、相補鎖のpoly dAとのヘリックスの熱的安

定性を調べた(Fig. 5-18)。合成は第1節にて述べたのと同様にして行った。

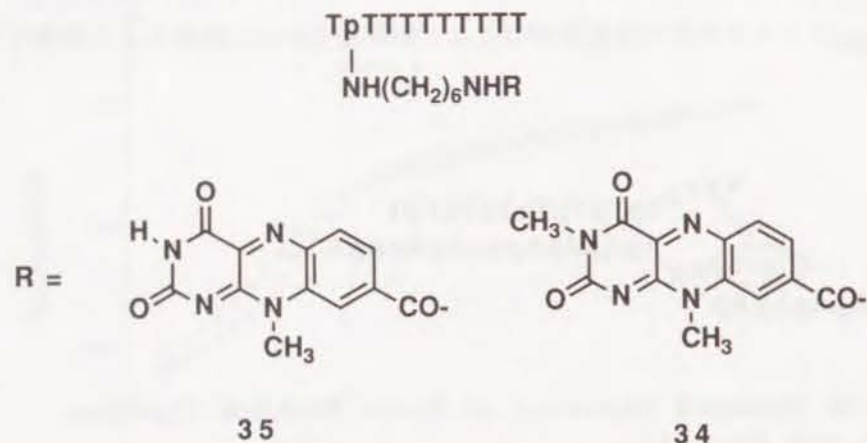


Fig. 5-18. N(3)-Unsubstituted Flavin Modified Thymidine 10 mer.

融解曲線をFig. 5-19に示す。N(3)位にメチル基を持つ**34**に比べて、融解温度は上昇した。これは、フラビンのN(3)位とadenineとの水素結合が付加的に生じた結果、ヘリックスの熱的安定性が増したものと推定した。

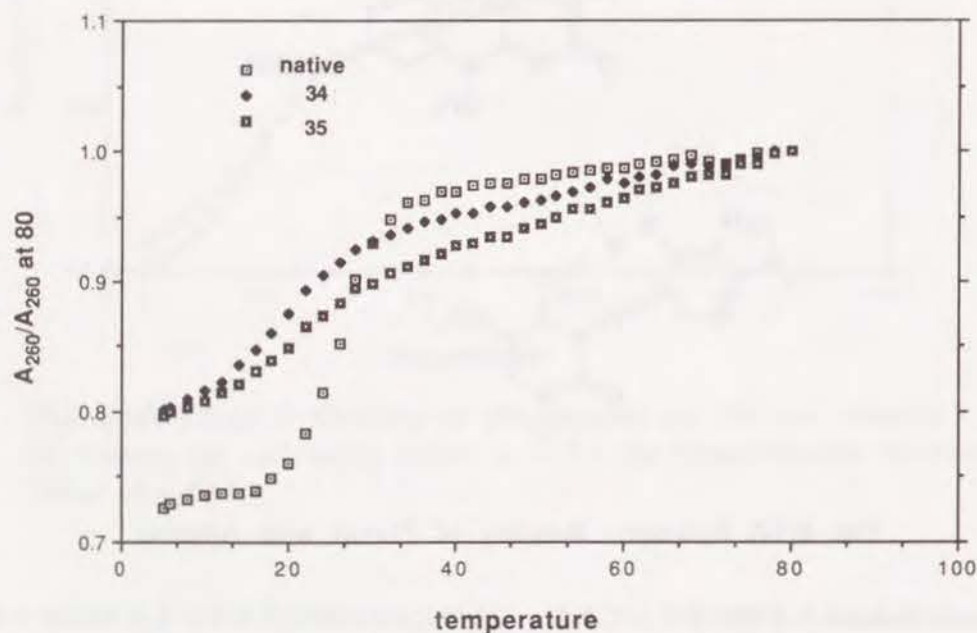


Fig. 5-19. Effect of the Substituent at N(3) Position of Flavin on Thermal Stability.

第5章

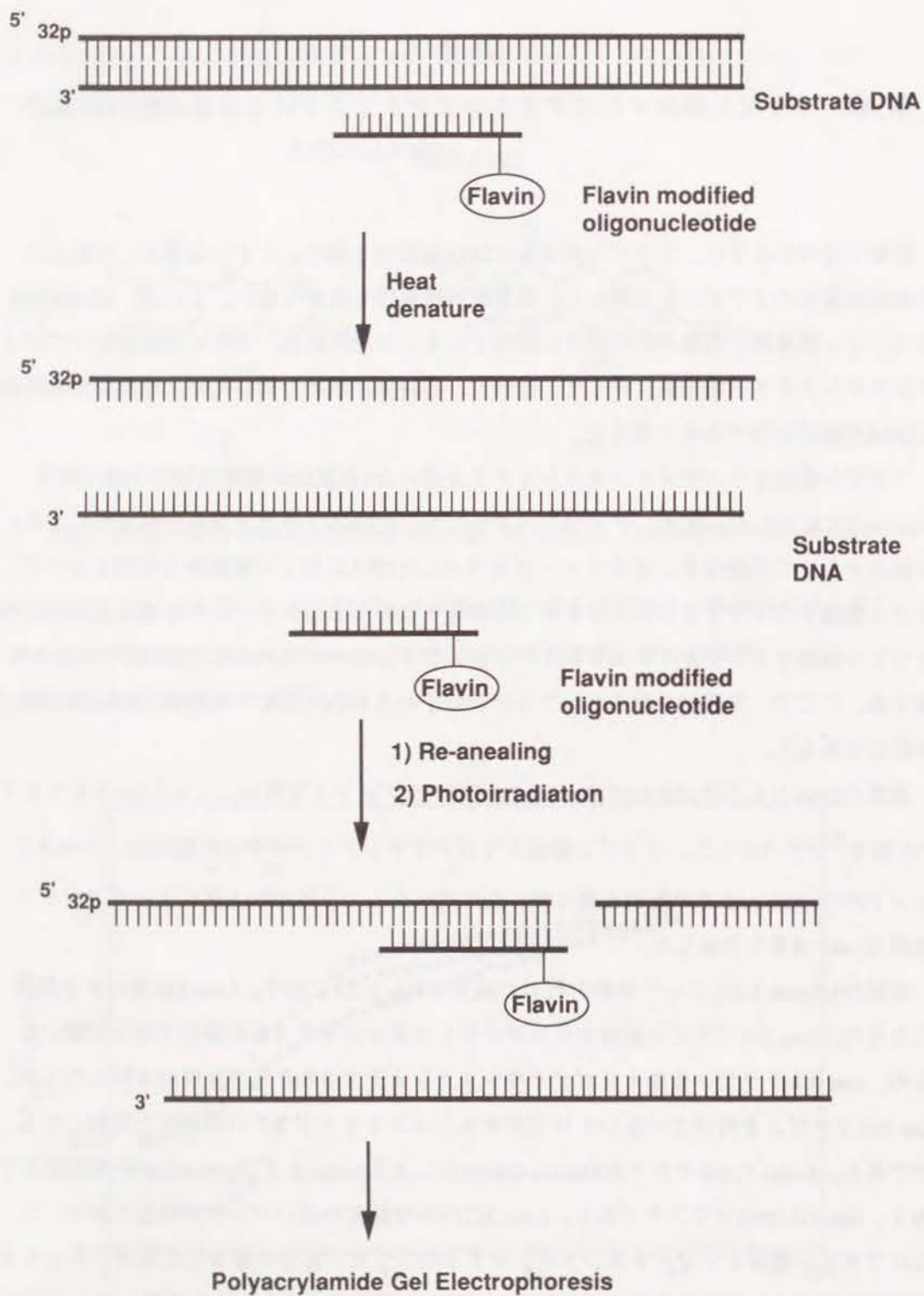
第5節 フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドによる塩基配列特異的DNA切断

前章で述べたように、フラビン誘導体はDNA切断能を持つ。しかしながら、切断には比較的高濃度のフラビンを必要とし、塩基配列特異性も極めて低い。これは、2本鎖DNAとフラビン誘導体との親和性の低さに起因するものと思われる。フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドは相補鎖に対して、親和性、特異性が極めて高いため、塩基配列特異的なDNA切断が可能であると考えた。

フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドを用いた1本鎖DNA切断実験の実験手順をScheme 5-5に示した。まず、アイソトープラベルしたDNAフラグメントを熱変性により1本鎖とする。この操作を、アイソトープラベルしたDNAに対して相補的な配列を持つフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの存在下に行うと、ヘリックスを再形成させた時、フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドは、アイソトープラベルしたDNAと2本鎖を形成する。ここで、光照射を行うと、フラビン分子のきわめて近くで相補鎖のDNAは切断されるであろう。

基質のDNAとしてはpBR322のBamHI-EcoRVフラグメントを用い、これの(+)ストランドの5'側を³²Pラベルした。フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの配列は、このストランドの71-90 b.p.までの配列を選んで、先に述べたものと同様な方法によってフラビン修飾 20 mer **36**を合成した。

前記のScheme 5-5によって実験を行った結果をFig. 5-20に示す。Lane 1は光のみを照射したもの、lane 2はフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチド**36**の存在下暗下に置いたもの、lane 3はフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチド**36**存在下光照射を行ったもの、lane 4はフラビンを付けていないオリゴデオキシヌクレオチド**37**の存在下光照射したものである。Lanes 5, 6はそれぞれMaxam-Gilbert法によるpurineおよびpyrimidine特異的反応であり、lane 7はDNAブランクである。Lane 3にのみ移動度の速いバンドが現れており、これはフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドのフラビン部分が結合した箇所にちょうど相補的なアデニン塩基とそのすぐ3'下流のグアニン塩基であった。ここで用いたオリゴデオキシヌクレオチドの濃度は5 μMでありフラビン単独ではDNA切断が観察されない濃度である。フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドは相補鎖に対して、親和性、特異性が



Scheme 5-5. Procedure for Sequence Specific DNA Photocission by Flavin Modified Oligodeoxynucleotide.

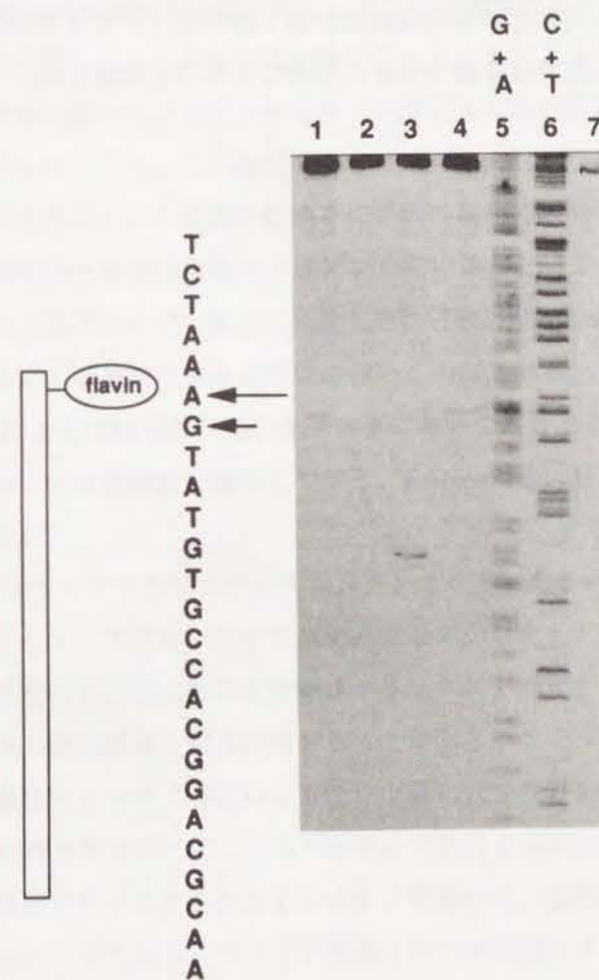
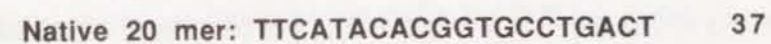
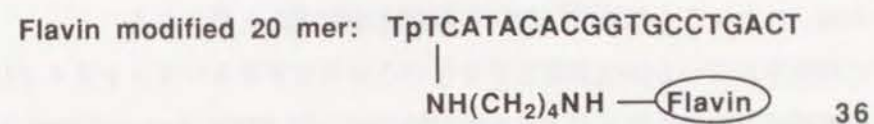


Fig. 5-20. Sequence Specific DNA Photocission by Flavin Modified Oligodeoxynucleotide 36. lane 1, photoirradiation only; lane 2, in the presence of 36 in the dark; lane 3, photoirradiation in the presence of 36; lane 4, photoirradiation in the presence of 37.

極めて高いため、このような低濃度でDNA切断反応が起きたと思われる。

これまでに報告されているDNA切断分子を付けたオリゴデオキシヌクレオチドは距離的に最も近い相補鎖部分である、上下流3-4塩基対付近が広範囲にわたって切断される^{74,75}。著者の用いたフラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドはフラビンの結合部分に対して相補的な塩基部分を切断した。このような特異な位置選択性は、フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドのフラビン部分が相補鎖の塩基部分と相互作用するために生じたと思われる。この相互作用のため他のDNA切断能を持つオリゴデオキシヌクレオチドと比較して、きわめて高い特異性を持つ切断に成功したものと推定した。

第6章 結語および要約

以上、本研究において得られた知見を要約すると以下のようになる、

1) 5-Ethylflavin radicalを用いた1電子伝達系を構築し、これを1,3-dimethylthymine bromohydrinの脱bromohydrin化反応に応用することによって、緩和な条件での反応に成功した。

2) N(5)位に分子内水素結合可能な新しいフラビン補酵素モデルとしてフラビン-6-カルボン酸類を合成した。これらの化合物を用いることによって、従来アポタンパクなしでは不安定であったフラビンセミキノラジカル類の安定化に成功し、同時にその構造を明らかにした。この結果はフラビンのN(5)位への水素結合がフラビンラジカルを安定化するという従来の仮説を化学的に初めて証明したものである。

3) N(5)位に分子内水素結合可能なフラビンを用いることにより、フラビン含有モノオキシゲナーゼ反応のモデル反応に成功した。これはN(5)位が置換されていないフラビン誘導体による過酸化水素活性化の初めての例である。

4) フラビンによるDNA切断反応が光照射下において起こることを見いだした。この反応は部分的に一重項酸素が関与しており、guanine残基に対して、やや高い反応性が観察された。

5) 新しいアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド、あるいは非放射性プローブの開発を目的として、フラビンをオリゴデオキシヌクレオチドに共有結合させた一群の化合物を合成した。これらの化合物はヘリックスを形成することによりフラビン部分が相補鎖の塩基部分と相互作用することが明らかとなった。フラビンに由来する蛍光の強度はヘリックス形成にともない上昇し、フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの蛍光性プローブとしての応用の可能性を示唆した。

6) フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドを用いて、塩基配列特異的DNA光切断反応に成功した。すなわち、フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドによるDNA切断はフラビン単独によるDNA切断に比べ低濃度で起こるだけでなく、高い塩基配列特異性を示した。また他のDNA切断分子を共有結合させたオリゴデオキシヌクレオチド類による切断と比較して、異なった位置選択性を示した。

謝辞

本研究の終わりに臨み、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜った恩師、米田文郎教授に衷心より感謝の意を表します。

また、種々有益なご助言を頂いた京都大学化学研究所田中圭助教授に感謝致します。折りにふれ御激励頂いた岡山大学原山尚教授、京都大学薬学部来海徹太郎、柳田玲子両助手に感謝致します。さらに、実験の一部にご協力頂いた大濃正直学士、中村恵宣学士、示野房江学士、米田賀行学士、並びに種々御討議頂いた有機薬化学教室の方々に感謝致します。

また、DNA切断に関し御指導、御助言頂いた京都大学化学研究所杉浦幸雄教授、桑原淳助手並びに抗癌医薬開発部門Ⅰの方々に深謝致します。さらに、蛍光スペクトル測定に御助言頂いた京都大学薬品物理化学教室の方々に感謝致します。また、ESRスペクトルに関し御助言頂いた武田薬品工業株式会社化学研究所村上守氏に、マススペクトルを測定して頂いた京都大学薬学部秋本直茂助手および元素分析を施行された京都大学元素分析センターの方々に感謝致します。

実験の部

^1H -核磁気共鳴(NMR)スペクトルはJEOL FX-200を使用、テトラメチルシラン(TMS)を内部標準とし測定した。赤外吸収(IR)スペクトルは島津 IR-400を使用し、溶媒は CHCl_3 を用いた。ESR (Electron Spin Resonance)スペクトルはJEOL FE2XGを使用した。Preparative t.l.c.はsilica gel PF254とGF254(E.M.Merck)より製したプレート(20cmx20cm, 厚さ0.25mm)を使用した。UVスペクトルはShimazu UV-2100を用い、セルはShimazu S-260 SPR-8により温度制御を行うとともにセル内溶液の温度をTAKARA D-611により測定した。CD(Circular Dichroism)スペクトルはJASCO J-720を用いて測定し、セルはTAITEC MENDER Jr-100により温度制御を行い、セル内温度をTAKARA D-611により測定した。蛍光スペクトルはShimazu RF-5000を用いて測定した。HPLC (High Performance Liquid Chromatography) はWaters 600SEを用い、カラムはCapcell pack C-18 (SHISEIDO Co. Ltd.)を用いた。検出はWaters 484により260 nmあるいは450nmで行った。溶出は1M TEAA (triethylammonium acetate) buffer中、 CH_3CN 濃度5%から40%への直線グラジエントを35分間おこなった。 ^{31}P -NMR (Nuclear Magnetic Resonance) はBrucker AC-300を用い、室温にて測定し、85% H_3PO_4 を外部標準とした。融点はYANAGIMOTO微量融点測定装置を用いて測定した。融点の補正は行っていない。カラムクロマトグラフィーはWakogel C-200を用いた。

第2章に関する実験

CH₃CNはP₂O₅続いてK₂CO₃で蒸留して用いた。CF₃COOHは蒸留して用いた。10-(2',6'-Dimethylphenyl)-3-methylisoalloxazine (**8**)は米田らの方法⁴⁷にしたがって合成した。10-(2',6'-Dimethylphenyl)-5-ethyl-3-methylisoalloxazine perchlorate (**1**)は以前に報告された方法¹⁴で合成した。10-Ethyl-3-methyl-5-deazaflavin は米田ら⁹³の変法で合成した。すなわち、6-ethylamino-3-methyluracilと2-fluorobenzaldehyde (1.2 eq.)とをDMF中加熱して合成した。1,5-Dihydro-10-ethyl-3-methyl-5-deazaflavin (**2**)は以前に報告された方法⁹⁴に従い合成した。1,3-Dimethylthymine (**3**) および 1,3-dimethylthymine bromohydrin (**4**)は以前に報告された方法^{95,96}に従い合成した。

第2章第1節に関する実験

Na₂S₂O₄とflavinium perchlorate (**1**)の系による1,3-dimethylthymine bromohydrin (**6**)の還元反応

1,3-Dimethylthymine bromohydrin (**4**) (20mg, 0.080mmole), flavinium perchlorate (**1**) (44.1mg, 0.096mmole), Na₂S₂O₄ (16.7mg, 0.096mmole)を2頸フラスコに入れ、アルゴン置換した後、CH₃CN 5mLを加え、室温暗室下で、3日間攪拌した。反応終了後、反応液を、CHCl₃で希釈後、H₂Oで分液した。続いて、CHCl₃層をNa₂SO₄で乾燥後減圧下留去し、残さをpreparative t.l.c (silica gel; 3%CH₃OH/CHCl₃)で分離した。生成物は標品とのNMR, IRの比較検討により同定した。

第2章第2節に関する実験

1,5-Dihydro-5-deazaflavin (**2**)とflavinium perchlorate (**1**)の系による1,3-

dimethylthymine bromohydrin(**6**)の還元反応

1,3-Dimethylthymine bromohydrin (**4**) (20mg, 0.080mmole), flavinium perchlorate (**1**) (44.1mg, 0.096mmole), 10-ethyl-1,5-dihydro-5-deazaflavin (**2**) (0.096 mmol), MgClO₄ (21.4mg, 0.096mmole)を2頸フラスコに入れ、アルゴン置換した後、CH₃CN 5mLを加え、室温暗室下で、3日間攪拌した。反応終了後、反応液を、CHCl₃で希釈後、H₂Oで分液した。続いて、CHCl₃層をNa₂SO₄で乾燥後、減圧下留去し、残さをpreparative t.l.c (silica gel; 3%CH₃OH/CHCl₃)で分離した。生成物は標品とのNMR, IRの比較検討により同定した。

第3章に関する実験

第3章第1節に関する実験

N-Acetyl-3,5-xylidineの合成

3,5-Xylidine 97.2g (0.802 mole)をピリジン 800 mLに加えて、氷上でかくはんしながら塩化アセチル 75.7g (0.964 mole)を滴下。滴下終了後、室温で一晩かくはん。反応液を、減圧下留去し、残さを塩化メチレン3Lに溶かす。塩化メチレン層は、5%塩酸で2回洗浄し、炭酸水素ナトリウム飽和溶液で2回洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下にて留去した。残さをベンゼンより再結晶し、結晶をろ取後、さらにベンゼンにて再々結晶後、目的物を得た。

収量 111.1 g (85%) 白色板状晶、m.p.144-145°C. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 2.14 (s, 3H), 2.28 (s, 6H), 6.74 (s, 1H), 7.12 (s, 2H), 7.26(s,1H)
IR (CHCl_3) 3420, 1680, 1615, 1540, 840 cm^{-1}

N-Ethyl-3,5-xyldineの合成

N-Acetyl-3,5-xylidine 50 g (0.307 mole)をテトラヒドロフラン 1 Lに溶解させ、氷上でかくはんし、冷却する。水素化アルミニウムリチウム 50.2 g (1.53 mole)を少量ずつ加えた後、反応液を室温に戻し、2日間かくはんした。過剰な水素化アルミニウムリチウムを、酢酸エチル、続いて水で分解した後、テトラヒドロフラン層を取り、減圧下留去。残さは茶色い液体状物質。精製はおこなわずに次の反応に使用した。粗収量 44.9 g (98.2%) 茶色い油状物質。

6-(N-Ethyl-3,5-xylidino)-3-methyluracilの合成。

6-Chloro-3-methyluracil 24 g (0.15 mole)と粗N-ethyl-3,5-xyldine 44.8 g (0.3 mole)を混合し、約150度に加熱し溶融する。6-Chloro-3-methyluracilが完全に溶けきった後、室温まで冷却すると、緑がかったガム状物質を得た。これにエタノールとエーテルを加えて結晶化させた。結晶をろ取してエタノールより再結晶した。
収量7.78 g (43.3%) 白色粉末 m.p. 180-182°C

$^1\text{H-NMR}(\text{d}^6\text{-DMSO})$: δ 1.06 (t, $J = 6.90\text{Hz}$, 3H), 2.28 (s, 6H), 3.04 (s, 3H), 3.67 (q, $J = 6.90\text{Hz}$), 4.34 (s, 1H), 6.87 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 10.40 (s, 1H)

High resolution EI-MS: calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ 273.1466, found 273.1477

10-Ethyl-3,6,8-trimethylisalloxazine-5-oxideの合成。

6-(N-Ethyl-3,5-xylidino)-3-methyluracil 7 g (62.3 mmol)を酢酸 150 mLに溶解し、氷上でかくはんしながら、亜硝酸ナトリウム 12.9 g (186.9 mmol)を徐々に加え、室温にて1時間かくはん。反応液中に析出した結晶を濾取後、エタノールで洗浄した。濾取した結晶はエタノールより再結晶。

収量 10.86 g (58.3%)。 橙色針状晶 decomp. 295°C

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.48 (t, $J = 7.08\text{Hz}$, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 4.71 (q, $J = 7.08\text{Hz}$, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.29 (s, 1H)

IR(CHCl_3) ν : 3000, 1710, 1645, 1545 cm^{-1}

High resolution EI-MS: Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ 300.1222, found 300.1225

Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ C, 59.99; H, 5.37; N, 18.74. Found C, 60.00; H, 5.27; N, 18.66

10-Ethyl-3,6,8-trimethylisalloxazine (14) の合成。

10-Ethyl-3,6,8-trimethylisalloxazine-5-oxide 10.9 g (33.6 mmol) に水 200 mL を加え、懸濁させる。懸濁液を攪はんしながら、室温にてハイドロサルファイトナトリウム 11.7 g (6.72 mmol)を加え、2.5時間攪はん。析出した結晶を濾取後、これを塩化メチレンに溶解し、水で洗浄。次いで、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下にて留去。残さをエタノールより再結晶。

収量 9.88 g (95.7%)。黄色針状晶。decomp. 295°C

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.47 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 2.60 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 4.79 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 7.27 (s, 1H), 7.31(s, 1H)

IR(CHCl₃): 3000, 1700, 1650, 1555cm⁻¹

High resolution EI-MS: calcd. for C₁₅H₁₆N₄O₂ 284.1273, found 284.1273

10-Ethyl-3-methylisoalloxazine-6,8-dicarboxylic acid (**10**) の合成。

10-Ethyl-3,6,8-trimethylisoalloxazine (**14**) 9.00 g (34.8 mmol) および KMnO₄ 16.5g (115 mmol) を 20% H₂SO₄ 300 mL に加えて、室温にて2日間攪はん後、エタノール10 mL を加え、続いて炭酸水素ナトリウムを加えて中和した。セライトにより濾過後、濾液を減圧下留去して液量を1/5にした。ついで、濃縮液に濃塩酸を加えることで結晶を析出させた。結晶を濾取して水より再結晶。

収量 3.06 g (28.1%)。橙色針状晶。decomp. 265°C

¹H-NMR(d₆-DMSO): δ 1.35 (t, J = 7.1Hz, 3H), 3.29 (s, 3H), 4.71 (q, J = 7.1Hz, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 4-5 (broad, 2H)

MS m/z 344 (M⁺). Anal. Calcd. for C₁₅H₁₂N₄O₆ · H₂O C, 3.89; H, 49.72; N, 15.46.

Found C, 3.79; H, 49.64; N, 15.50

10-Ethyl-3-methylisoalloxazine-6,8-dicarboxylic acid diethylester(**16**) の合成。

10-Ethyl-3-methylisoalloxazine-6,8-dicarboxylic acid (**10**) 1.5 g (4.36 mmol) をエタノール20 mL に溶かし、濃硫酸 2 mL を加えて、加熱還流する。3時間後、反応液を冷却した炭酸水素ナトリウム飽和水溶液中に注ぐ。ついで塩化メチレンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下留去した。残さをエタノールから再結晶して目的物を得た。

収量 963 mg (55.2%)。黄色針状晶 m.p. 197-199°C.

¹H-NMR(CDCl₃): δ 1.48 (t, J = 7.1Hz, 3H), 1.50 (t, J = 7.1Hz, 3H), 1.52 (t, J = 7.3Hz, 3H), 3.50 (s, 3H), 4.51 (q, J = 7.1Hz, 2H), 4.56 (q, J = 7.1Hz, 2H), 4.83 (q, J = 7.3Hz, 2H), 8.36 (d, J = 1.7Hz, 1H), 8.40 (d, J = 1.7Hz, 1H)

IR(CHCl₃): 2990, 1715, 1660, 1565, 1250cm⁻¹

Anal. Calcd. for C₁₉H₂₀N₄O₆ C, 5.03; H, 57.00; N, 13.99. Found C, 4.88; H, 56.84; N, 13.88

N-Acetyl-N-methyl-3,5-xylidine の合成。

N-Acetyl-3,5-xylidine 30 g (0.18 mole) を蒸留したジメチルスルホキシド 50 mL に溶かし、水酸化カリウム 20.2 g (0.36 mole) を加え、室温にて2時間攪はん後、ヨードメタン 24 mL を加え引続き 10 min 攪はんした。反応液を塩化メチレンと水で抽出し、塩化メチレン層を硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下留去した。残さをエタノールから再結晶した。

収量 22.64 g (69.5%) 無色板状晶。m.p. 69-72°C

¹H-NMR(CDCl₃): δ 1.87 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 6.96 (s, 2H), 7.28 (s, 1H)

N-Methyl-3,5-xylidine の合成。

N-Methyl-N-acetyl-3,5-xylidine にジオキサン 20 mL と 5N 水酸化ナトリウム水溶液 40 mL を加え、120°C で5日間加熱攪はんした。反応液はエーテルで抽出し、硫酸ナトリウムでエーテル層を乾燥後、減圧下留去した。残さは褐色の液体であり、精製せずに次の反応に用いた。

6-(N-Methyl-3,5-xylidino)-3-methyluracil の合成。

6-Chloro-3-methyluracil 2.08 g (13.0 mmol) と N-methyl-3,5-xylidine 3.5 g (25.9 mmol) を混ぜ合わせ、約180-190°C に加熱した。6-Chloro-3-methyluracil が溶けきってから加熱をやめて室温に戻した。続いて、エタノールとエーテルを加えることで結晶化させた。結晶を濾取した後エタノールから再結晶した。収量 1.11 g (32.9%) 無色板状晶 m.p. 195-197°C

¹H-NMR(d₆-DMSO): δ 2.28 (s, 6H), 3.06 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 4.24 (s, 1H), 6.86 (s, 2H), 6.96 (s, 1H), 10.44 (s, 2H)

High resolution EI-MS: Calcd. for C₁₄H₁₇N₃O₂ 259.1321, found 259.1319

3,6,8,10-Tetramethylisoalloxazine-5-oxideの合成。

6-(N-Methyl-3,5-xylydino)-3-methyluracil 1 g (3.66 mmol)を酢酸 10 mLに溶解し、亜硝酸ナトリウム 505 mg (7.32 mmol)を徐々に加えて、室温で攪はんした。5分後析出した綿状物質を濾取し、エタノールより再結晶した。収量 780 mg (74.3%)。 橙色粉末。 decomp. 270-278°C

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$; δ 2.53 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 7.11 (s, 1H), 7.29 (s, 1H)

$\text{IR}(\text{CHCl}_3)$: 3000, 1690, 1650, 1545 cm^{-1}

Anal. Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ C, 4.93; H, 58.72; N, 19.57. Found C, 4.80; H, 58.98; N, 19.60.

3,6,8,10-Tetramethylisoalloxazine (8)の合成。

3,6,8,10-Tetramethylisoalloxazine-5-oxide 750 mg (2.86 mmol)を水 20 mLに懸濁させ、ハイドロサルファイトナトリウム 750 mg (4.31 mmol)を加えて、室温で6時間攪はんした。析出した結晶を濾取してエタノールより再結晶した。収量 527 mg (71.5%) 黄色針状晶。 m.p. 300°C以上。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$; δ 2.59 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 4.11 (s, 3H), 7.27 (s, 1H),

7.31 (s, 1H). $\text{IR}(\text{CHCl}_3)$: 3000, 1700, 1655, 1560 cm^{-1}

Anal. Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ C, 5.22; H, 62.21; N, 20.73. found C, 5.12; H, 62.01; N, 20.80

3,10-Dimethylisoalloxazine-6,8-dicarboxylic acid (15)の合成。

3,6,8,10-Tetramethylisoalloxazine (8) 500 mg (1.85 mmol)を 20% 硫酸 15 mLに溶かし、次いで過マンガン酸カリウム 2.2 g (13.9 mmol)を加えて室温で2日間攪はん。反応液にエタノール10 mLを加えた後、炭酸水素ナトリウムを加え中和する。これをセライト濾過して、濾液を約1/3に濃縮後、濃塩酸を加えて析出した結晶を濾取。水から再結晶。

収量 225mg (41.1%) 橙色針状晶。 decomp. 259°C

$^1\text{H-NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$; δ 3.28 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 8.16 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 4-5 (broad, 2H)

Anal. calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 2/3\text{H}_2\text{O}$ C, 3.34; H, 49.13; N, 16.37. Found C, 3.23; H, 49.14; N, 16.48

5-Bromo-6-N-ethylamino-3-methyluracilの合成。

6-N-Ethylamino-3-methyluracil 6 g (38.7 mmol)を CH_3OH 20 mLにけん濁させ、 Br_2 2 mLを徐々に加える。室温で1時間攪拌後、反応液をろ過して、うすい黄色の結晶を得た。これを、 CH_3OH より再結晶することで、5-bromo-6-N-ethylamino-3-methyluracilを得た。収量 5.90 g (61.5%) 無色針状晶。 m.p. 208-210°C

$^1\text{H-NMR}(\text{d}_6\text{-DMSO})$; δ 1.08 (t, 3H, $J = 7.1\text{Hz}$), 3.13 (s, 3H), 3.35 (m, 2H, $J = 7.1\text{Hz}$), 6.71 (t, 1H)

Anal. Calcd. for $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{Br}$ C, 34.07; H, 3.94; N, 17.13; Br, 32.03 Found C, 33.89; H, 4.06; N, 16.94; Br, 32.21

6-N-Ethylamino-5-N-(o-toluidyl)-3-methyluracilの合成。

5-Bromo-6-N-ethylamino-3-methyluracil 3.97 g (16 mmol)をジメチルスルホキシド 65 mLに溶解し、脱気する。o-Toluidineを加えてアルゴン雰囲気下、7日間室温にて攪拌。反応液を0.05N HClに注ぎ、析出した結晶をろ過。結晶は目的物とデヒドロ体の混合物であり、分離せずにそのまま次の反応に用いた。 収量 1.5 g

3,6-Dimethyl-10-ethylisoalloxazine (9)の合成。

粗6-N-ethylamino-5-N-(o-tolyl)-3-methyluracil 1.50 gをDMF 50 mLに溶解し、酸素気流下 100°Cで加熱して一晚攪拌。反応液を室温で放置後析出した結晶を濾取。結晶は $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{CHCl}_3$ より再結晶。濾液は濃縮後、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ を加えて結晶を析出させる。これを再び $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{CHCl}_3$ より再結晶。

収量 571 mg (38.8%) 黄色針状晶。 m.p. >300°C

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$; δ 1.50 (t, 3H, $J = 7.1\text{Hz}$), 2.89 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 4.80 (q, 2H, $J = 7.1\text{Hz}$), 7.47 (1H, d, $J = 5.6\text{Hz}$), 7.79 (1H, dd, $J = 5.6\text{Hz}$, 4.2Hz). IR(CHCl₃); 3000, 1705, 1650, 1610, 1560, 1475, 1350, 1270, 1180cm^{-1}
Anal. Calcd. for C₁₄H₁₄N₄O₂ C, 62.11; H, 5.22; N, 20.73. Found C, 61.94; H, 5.20; N, 20.61.

10-Ethyl-3-methylisalloxazine-6-carboxylic acid (11) の合成。

3,6-Dimethylisalloxazine (9) 250 mg (0.926 mmol) を 4 mL の 20% H₂SO₄ に溶解する。反応液に KMnO₄ 439 mg (2.78 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下にて 2 日間攪拌。反応液に NaHCO₃ を加えて中和した後セライトろ過する。セライトは水で十分洗浄する。濾液と洗液を合わせ、減圧下約 10 mL まで濃縮後、濃塩酸を加えて中和する。析出した粉末を濾取する。収量 154 mg (55.4%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{d}^6\text{-DMSO})$; δ 1.39 (t, 3H, $J = 8.2\text{Hz}$), 3.33 (s, 3H), 4.76 (q, 2H), 7.7-8.2 (m, 4H)
Anal. Calcd. for C₁₄H₁₂N₄O₄ · 1/2H₂O. C, 54.37; H, 4.24; N, 18.12. Found C, 54.57; H, 4.36; N, 18.07.

6-(N-Ethyl-3-toluidino)-3-methyluracil の合成。

6-Chloro-3-methyluracil 3g (8.75 mmol) と N-ethyl-m-toluidine 6.34g (46.9 mmol) を混合し、150°C に加熱。均一系になったところで加熱をやめ、室温まで冷却する。生じた茶色のガム状物質に C₂H₅OH と diethylether を加えて結晶化させる。生じた結晶を濾取して H₂O に懸濁後再び濾取して C₂H₅OH より再結晶。

収量 2.43g (50.0%) 白色板状晶 m.p. 142-145°C

$^1\text{H-NMR}(\text{d}^6\text{-DMSO})$; δ 1.07 (t, 3H, $J = 7.0\text{Hz}$), 2.33 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 3.28 (q, 2H, $J = 7.0\text{Hz}$), 4.34 (s, 1H), 7.04 (d, 1H, $J = 8.8\text{Hz}$), 7.18 (t, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.37 (d, 1H, $J = 8.8\text{Hz}$), 10.46 (s, 1H)
Anal. Calcd. for C₁₄H₁₇N₃O₂ C, 64.85; H, 6.61; N, 16.20. Found C, 64.74; H, 6.59; N,

16.16.

3,8-Dimethyl-10-ethylisalloxazine-5-oxide の合成。

6-(N-Ethyl-m-toluidino)-3-methyluracil 1.29 g (4.98 mmol) に CH₃COOH 10 mL を加えて溶解後、NaNO₂ 687 mg (9.96 mmol) を徐々に加え、ついで室温にて 20 min 攪拌する。生じたオレンジ色の粉末を濾取する。C₂H₅OH/CHCl₃ より再結晶。

収量 936 mg (65.7%)。橙色板状晶 decomp. 214-215°C

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$; δ 1.50 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$), 2.62 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 4.73 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 7.35 (d, 1H, $J = 8.9\text{Hz}$), 7.43 (s, 1H), 8.40 (d, 1H, $J = 8.9\text{Hz}$)
IR(CHCl₃); 3000, 1695, 1650, 1600, 1540, 1500, 1495, 1405, 1275, 1250, 1190, 1150, 1120, 1110cm^{-1}
Anal. Calcd. for C₁₄H₁₄N₄O₃ C, 58.73; H, 4.93; N, 19.57. Found C, 58.80; H, 4.81; N, 19.56.

3,8-Dimethyl-10-ethylisalloxazine (7) の合成。

10-Ethyl-3,8-dimethylisalloxazine-5-oxide 850 mg (2.97 mmol) を H₂O 10 mL に懸濁させ Na₂S₂O₄ 776 mg (4.46 mmol) を加える。室温にて 30 min 攪拌後、析出した結晶を濾取し、C₂H₅OH/CHCl₃ より再結晶する。

収量 800 mg (定量的) 橙色針状晶 decomp. 258°C

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$; δ 1.53 (t, 3H, $J = 7.2\text{Hz}$), 2.66 (3H, s), 3.53 (s, 3H), 4.79 (q, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 7.44 (s, 1H), 7.46 (d, 1H, $J = 7.1\text{Hz}$), 8.22 (d, 1H, $J = 7.1\text{Hz}$)
IR(CHCl₃); 3000, 1705, 1655, 1580, 1550, 1500, 1460, 1440, 1390, 1360, 1315, 1290, 1275, 1240, 1190, 1155, 1130, 1040, 980, 820cm^{-1}
High resolution EI-MS; calcd. for C₁₄H₁₇N₃O₂ 270.1171, found 270.1121
Anal. Calcd. for C₁₄H₁₇N₃O₂ C, 62.21; H, 5.22; N, 20.73. Found C, 62.13; H, 5.26; N,

20.71.

10-Ethyl-3-methylisalloxazine-8-carboxylic acid (**13**) の合成。

3,8-Dimethyl-10-ethylisalloxazine (**7**) 700 mg (2.6 mmol)を10 mLの20% H_2SO_4 に溶解し、 KMnO_4 1.64 g (10.4 mmol)を加え、アルゴン雰囲気下、室温にて一晩攪拌。

NaHCO_3 を加えて中和後、セライトろ過。 H_2O にて十分洗浄後、濾液を約50mLまで濃縮する。これに濃塩酸を加えて析出した結晶を濾取し酢酸から再結晶。

収量 601 mg (77.2%)。黄色粉末 decomp. 280-288°C。

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO); δ 1.40 (t, 3H, $J = 7.3\text{Hz}$), 3.33 (s, 3H), 4.74 (q, 2H, $J = 7.3\text{Hz}$), 8.11 (dd, 1H, $J = 9.3, 1.0\text{Hz}$), 8.24 (s, 1H), 8.34 (d, 1H, $J = 1.0\text{Hz}$).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ C, 52.83; H, 4.43; N, 17.60. Found C, 52.83; H, 4.44; N, 17.41.

第3章第2節に関する実験。

フラビンカルボン酸類のUV-可視光吸収スペクトル。

フラビンカルボン酸類 (0.01 mmol)を1 mLの0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、ストック溶液とした。各々のpHを持つ緩衝液により、100あるいは200倍に希釈して、UV-可視光吸収スペクトルを測定した。

または、フラビンカルボン酸類 (0.01 mmol)を200 mLの CH_3CN に溶解後、溶液の一部をとってUV-可視光吸収スペクトルを測定した。

第3章第3節に関する実験。

フラビンカルボン酸類のセミキノンラジカルのESRスペクトルの測定

フラビン誘導体 (0.01 mmol)を0.1Mリン酸緩衝液 (1 mL)に溶解し、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.01 mmol)を加え、フラビン溶液の一部をキャピラリーに封入後、ESR (electron spin resonance)を測定した。測定は、室温で行った。

あるいはフラビン誘導体(0.01 mmol)を各々のpHを持つ緩衝液 (1 mL)中に溶解し、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.01 mmol)で還元後、同様にしてESRスペクトルを測定した。

第3章第4節に関する実験。

フラビンカルボン酸類のセミキノンラジカルのUV-可視光吸収スペクトルの測定。

フラビン誘導体(0.01 mmol)を0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) (1 mL)に溶解後、アルゴンを吹き込みながら超音波にて1時間脱気した。溶液に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.01 mmol)を加えて、セル内に封入後、UV-可視光吸収スペクトルを測定した。測定は20°Cにて行った。

第3章第5節に関する実験。

Thioanisole類のフラビンと過酸化水素による酸化反応

フラビン誘導体(**10**, **11**, **14**, **16** = 0.162 mmol, **15** = 0.342 mmol)とthioanisole類 (0.342 mmol)をアセトニトリル 5 mLに溶かし、30% H_2O_2 水溶液を73 μl (0.342 mmol)加えて遮光し、アルゴン雰囲気下、25°Cで24時間反応をおこなった。反応終了後、反応液を塩化メチレン100 mLで希釈し、これを炭酸水素ナトリウム飽和水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下にて塩化メチレンを留去した。次いで残さを、シリカゲルプレート (展開溶媒: ① 3% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$, ② ether) で分離することでスルホキシド類を単離した。得られたスルホキシド類はNMRおよびIRにおいて標品と完全に一致した。

第4章に関する実験。

第4章第1節に関する実験

6-(N-Methyl-m-toluidino)uracilの合成。

6-Chlorouracil 2g (13.7 mmol)とN-methyl-m-toluidine 3.3 g (27.3 mmol)を混合し、約190℃まで加熱して均一系とする。室温まで冷却後、エタノールとエーテルを加えて結晶化。水とエタノールで洗浄後、エタノールから再結晶。収量2.02 g (63.9%)。白色粉末。m.p. 269-270℃。

$^1\text{H-NMR}$ (d6-DMSO); δ 2.32 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 4.26 (s, 1H), 7.05 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.13 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.33 (dd, $J = 8.2\text{Hz}$, 7.6Hz, 1H), 10.17 (s, 1H), 10.38 (s, 1H)。

Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ C, 62.33; H, 5.67; N, 18.17. Found C, 62.38; H, 5.62; N, 18.21.

8,10-Dimethylisoalloxazine-5-oxideの合成。

6-(N-Methyl-3-toluidino)uracil 1.5 g (6.49 mmol)を酢酸 (20 mL)に懸濁し、 NaNO_2 1.02 g (14.78 mmol)を徐々に加える。室温にて一晩攪拌。生じたオレンジ色の粉末を濾取する。粉末は酢酸とメタノールにより洗浄。結晶は8,10-dimethylisoalloxazineをわずかに含むため、これ以上精製せずに次の反応に供した。

$^1\text{H-NMR}$ (d6-DMSO); δ 2.55 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 7.42 (dd, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 8.30 (d, $J = 1.0\text{Hz}$, 1H), 8.20 (d, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 11.06 (s, 1H)。

8,10-Dimethylisoalloxazineの合成。

3,10-Dimethylisoalloxazine-5-oxide 1.3 g (5.04 mmol)を H_2O (30 mL)に懸濁させ、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 1.14 g (6.65 mmol)を加え、室温で20分間攪拌。生じた固体を濾取後、エタノールで洗浄。収量1.04 g (83.2%)。酢酸から再結晶。橙色板状晶。m.p. >300℃。 $^1\text{H-NMR}$ (d6-DMSO); δ 2.59 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 7.49 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 11.33 (s, 1H)。

Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$ C, 55.63; H, 4.67; N, 18.53. Found C, 55.62; H, 4.63; N, 18.47.

10-Methylisoalloxazine-8-carboxylic acid (12)の合成。

8,10-Dimethylisoalloxazine 900 mg (3.95 mmol)を20% H_2SO_4 (10 mL)に溶解し、 KMnO_4 1.56 g (9.86 mmol)を徐々に加える。アルゴン雰囲気下、室温で2日間攪拌。反応液に $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ついで NaHCO_3 を加えて中和後、セライトろ過。水で十分洗浄したのち、濾液と洗液を合わせて約20 mLまで濃縮。これに濃塩酸を加えて析出した結晶を濾取。水より再結晶。収量446 mg (43.6%)。橙色粉末 m.p. >300℃。

$^1\text{H-NMR}$ (d6-DMSO); δ 3.97 (s, 3H), 8.08 (d, $J = 10.0\text{Hz}$, 1H), 8.30 (s, 1H), 11.49 (s, 1H)。
Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ C, 46.76; H, 3.92; N, 18.18. Found C, 46.50; H, 3.94; N, 17.88.

第4章第2節に関する実験

フラビン-8-カルボン酸 **12** によるDNA切断のアガロースゲル電気泳動を用いた解析。

10 mMリン酸緩衝液中 (total volume 10 μl) にフラビン-8-カルボン酸 **12** を各濃度およびプラスミド pIBISV (100 μg) を含む反応液を 300W-photoreflexor ランプを用いて、20℃、各時間、光照射を行った。反応液に泳動用緩衝液 (30% glycerol/0.25% xylene cyanol/0.25% bromophenol blue) を加え、エチジウムブロマイド含有アガロースゲルにて泳動した (100V, 2時間)。

第4章第3節に関する実験

アイソトープラベルしたDNAフラグメントの調製。

プラスミド pIBISV の Sal I フラグメントを、DNA polymerase I と [α - ^{32}P] dTTP (3000 Ci/mL) でアイソトープラベルし、Pvu II で再度酵素分解し 131 塩基対を持つフラ

グメントを得た。

フラビンによるDNA切断の塩基配列特異性の検討。

3'-末端をアイソトープラベルした¹³¹I塩基対を持つDNAフラグメント(5000 cpm)、およびフラビン-8-カルボン酸 **12** (1 mM)を含む10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)を300W-photoreflectorランプで光照射した。反応液からエタノール沈澱法によりフラビンを除き、泳動用緩衝液 (0.05 mM NaOH/5M urea/0.05% bromophenol blue/0.05% xylene cyanol)に再溶解、ついで1分間 90℃で加熱後、10% polyacrylamide/7M ureaスラブゲル電気泳動を行った(1800 V, 2時間)。切断箇所はMaxam-Gilbert法による塩基特異的DNA切断反応による分解物と、電気泳動で比較することにより行った。

第5章に関する実験。

フラビン修飾 thymidine 10merの蛍光スペクトルの測定は、 2×10^{-5} Mでおこない、poly dA存在下の蛍光スペクトルは、poly dA 2×10^{-5} Mを用いた。CDスペクトルはフラビン修飾 thymidine 10mer および、poly dAを各々 5×10^{-5} Mずつ用いた。1.0 O.D.はサンプルを1 mLのH₂Oに溶解させ、1 cm光路のセルで測定した際、260 nmの吸光度が1.0 となる量である。

第5章第1節に関する実験。

3-Carboxymethyl-10-methylisoalloxazine-N-hydroxysuccinimide ester (**24**) の合成。

3-Carboxymethyl-10-methylisoalloxazine (**21**) 174 mg (0.699 mmol)をCH₃CN (5 mL)に溶かし、dicyclohexylcarbodiimide 150 mg (0.839 mmol)とN-hydroxysuccinimide 70 mg (0.699 mmol)を加え、アルゴン雰囲気下、室温にて一晩攪拌した。反応液をCH₂Cl₂で希釈ついでH₂Oで洗浄し、CH₂Cl₂層をNa₂SO₄にて乾燥後、減圧下で留去し、残さをエタノールより再結晶した。収量 124 mg (53.2%)。m.p. >300℃。黄色針状晶。

¹H-NMR(d₆-DMSO): δ 2.82 (s, 4H), 4.06 (s, 3H), 5.07 (s, 2H), 7.72 (m, 1H), 8.02 (m, 2H), 8.22 (d, 1H).

High resolution EI-MS; calcd. for C₁₇H₁₃N₅O₆ 383.0865, found 383.0864.

6-(N-Ethyl-4-toluidino)-3-methyluracilの合成。

6-Chloro-3-methyluracil 2g (12.5 mmol) にN-ethyl-p-toluidine 2.54g (18.75 mmol)を加え、約 180℃で均一系になるまで加熱。室温へ冷却後、生じたゴム状物質にEtOH/etherを加え結晶化。生じた粉末をろ取後、水で洗浄し、EtOHより再結晶。無色針状晶。収量1.78 g (54.1%)。m.p.187-189℃.

¹H-NMR(d₆-DMSO): δ 1.06 (t, J = 7.0Hz, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 3.68 (q, J = 7.0, 2H), 4.30 (s, 1H), 7.12 (d, J = 8.2Hz, 2H), 7.27 (d, 2H, 8.2Hz), 10.40 (s, 1H).

Anal. Calcd. for $C_{14}H_{17}N_3O_2$ C, 64.85; H, 6.61; N, 16.20. Found C, 64.83; H, 6.68; N, 16.24.

3,7-Dimethyl-10-ethylisoalloxazine-5-oxideの合成。

6-(N-Ethyl-4-toluidino)-3-methyluracil 1.70 g (6.85 mmol) を CH_3COOH 7 mL に懸濁させ、 $NaNO_2$ 711 mg (10.3 mmol) を徐々に加えた後、室温にて30 min 攪拌。生じた橙色の固体を濾取し、 $CHCl_3$ と C_2H_5OH より再結晶。橙色針状晶。収量 980 mg (48.8%)。m.p. $>300^\circ C$.

1H -NMR($CDCl_3$): δ 1.49 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 2.55 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 4.73 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 7.57 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.32 (s, 1H). IR($CHCl_3$); 3000, 1695, 1650, 1590, 1540, 1440, 1280, 1180cm^{-1} .

Anal. Calcd. for $C_{14}H_{14}N_4O_3$ C, 58.73; H, 4.93; N, 19.57. Found C, 58.73; H, 4.68; N, 19.42.

3,7-Dimethyl-10-ethylisoalloxazineの合成。

3,7-Dimethyl-10-ethylisoalloxazine-5-oxide 980 mg (3.43 mmol) を H_2O に懸濁させ、 $Na_2S_2O_4$ 703 mg (4.11 mmol) を加えて、室温にて、2時間攪拌。黄色の固体を濾取し、 $CHCl_3$ と C_2H_5OH より再結晶。収量 732 mg (79.1%)。黄色針状晶。m.p. $>300^\circ C$.

1H -NMR($CDCl_3$): δ 1.51 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 2.56 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 4.79 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H).

IR($CHCl_3$); 3000, 1705, 1650, 1590, 1550, 1420, 1350, 1185, 1150, 910cm^{-1} .

High resolution EI-MS: Calcd. for $C_{14}H_{14}N_4O_2$ 270.1250, found 270.1121.

10-Ethyl-3-methylisoalloxazine-7-carboxylic acid (22) の合成。

3,7-Dimethyl-10-ethylisoalloxazine 500 mg (1.85 mmol) を 20% H_2SO_4 (4 mL) に溶かし、

$KMnO_4$ 1.17 g を徐々に加える。反応液を、アルゴン雰囲気下、室温で2日間攪拌後、 $NaHCO_3$ を加えてアルカリ性とし、セライトろ過する。 H_2O で十分洗浄後、濾液と洗液を合わせて、減圧下、約10 mL まで濃縮する。これに濃塩酸を加えて、析出した黄色粉末を濾取し、 H_2O より再結晶。収量 210 mg (37.8%)。decomp. $282-288^\circ C$. 1H -NMR (d_6 -DMSO); δ 1.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 3.32 (s, 3H), 4.74 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.79 (d, 1H), 8.4-8.7 (m, 2H).

Anal. Calcd. for $C_{14}H_{12}N_4O_4$ C, 56.00; H, 4.03; N, 18.66. Found C, 55.45; H, 4.13; N, 18.36.

10-Ethyl-3-methylisoalloxazine-7-carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (25) の合成。

10-Ethyl-3-methylisoalloxazine-7-carboxylic acid (22) 100 mg (0.333 mmol) を CH_3CN (5 mL) に溶解し、dicyclohexylcarbodiimide 82.5 mg (0.40 mmol) と N-hydroxysuccinimide 46.0 mg (0.40 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で一晩攪拌。反応液に CH_2Cl_2 を加え、 $NaHCO_3$ 飽和溶液で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後、 CH_2Cl_2 を減圧下留去する。残さをエタノールより再結晶。収量 66 mg (50.0%)。m.p. $>300^\circ C$.

1H -NMR (d_6 -DMSO); δ 1.36 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.93 (s, 4H), 3.30 (s, 3H), 4.68 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 8.20 (d, 9.3 Hz, 1H), 8.47 (dd, $J = 9.3$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.74 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H). High resolution EI-MS: calcd. for $C_{18}H_{15}N_5O_6$ 397.1022 found 397.1027.

10-Methylisoalloxazine-8-carboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (23) の合成。

10-Methylisoalloxazine-8-carboxylic acid (12) 300 mg (1.10 mmol) を CH_3CN に懸濁させ、dicyclohexylcarbodiimide 272 mg (1.32 mmol) および N-hydroxysuccinimide 152 mg (1.32 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温にて、一晩攪拌。 CH_3CN を減圧下で留去し、エタノールから再結晶。収量 207 mg (50.9%)。橙色粉末。m.p. $>300^\circ C$.

1H -NMR(d_6 -DMSO); δ 2.95 (s, 4H), 4.04 (s, 3H), 8.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J =$

8.5Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 11.56 (s, 1H). High resolution EI-MS: Calcd. for $C_{10}H_{11}N_5O_6$ 369.0715, found 369.0717.

10-Ethyl-3-methylisalloxazine-8-carboxylic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester (26) の合成。

10-Ethyl-3-methylisalloxazine-8-carboxylic acid (13) (200 mg, 0.667 mmol) を CH_3CN 5 mL に溶解し、dicyclohexylcarbodiimide 165 mg (0.800 mmol) と N-hydroxysuccinimide 76.8 mg (0.667 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温にて、一晚攪拌。反応液を CH_2Cl_2 で希釈し、 H_2O にて洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥。 CH_2Cl_2 を減圧下留去した後、残さを C_2H_5OH より再結晶。収量 103 mg (38.9%)。黄色粉末。m.p. 288-289°C

1H -NMR(d_6 -DMSO); δ 1.36 (t, 3H, J = 6.5 Hz), 2.94 (s, 4H), 3.31 (s, 3H), 4.73 (q, 2H, J = 6.5 Hz), 8.21 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 8.47 (s, 1H).

High resolution EI-MS; calcd. for $C_{18}H_{15}N_5O_6$ 397.1022, found 397.1025.

Thymidine 10 mer およびジアミン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの合成。

Thymidine 10 mer は通常の固相Hydrogen phosphonate法を用い(1.5 μ mol scale)、シリンジ内にて合成した。ジアミン修飾thymidine 10 mer は、固相上にて9 mer をhydrogen phosphonate法で合成後(1.5 μ mol scale)、同じく固相上でthymidine hydrogen phosphonateを反応させ、引き続いてジアミン存在下 CCl_4 酸化(diamine/ CCl_4 / CH_3CN = 10/45/45)を行うことで、5'-インターヌクレオチド間をphosphoramidateとした。次いで固相より、conc. NH_4OH (室温、2時間) で離脱後、逆相HPLCにて分取精製した。

ジアミン修飾 20 mer も同様に固相hydrogen phosphonate法にて19 mer を合成後、ジアミン存在下 CCl_4 酸化で合成した。固相からの離脱および、塩基部分の脱保護は conc. NH_4OH (50°C, 6時間) でおこなった。

フラビン活性エステルとジアミン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの反応。

ジアミン修飾thymidine 10 merを H_2O (約30 O.D./300 μ l) に溶かし、triethylamineを10% vol.加えて、氷上で冷却した。フラビン活性エステル (2 mg) を300 μ lのDMF (dimethylformamide) に溶解後、この液を上記したジアミン修飾オリゴデオキシヌクレオチド溶液に等volume加えて、4°Cにて30 min反応させた。反応液より、逆相HPLCにて精製する事で、フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドを得た。

第5章第2節に関する実験。

フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動。

フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチド(0.3 O. D.)を30%グリセロール水溶液に溶解し、7M尿素含有ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなった(400 V, 2時間)。マーカーとしてxylene cyanolを用い、バンドの検出はUVshadow法によりおこなった。

フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチドの酵素分解。

蛇毒ホスホジエステラーゼ (1 unit) および、アルカリホスファターゼ (1 unit) を含む100 mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH 7.5) にフラビン修飾オリゴヌクレオチド (1.0 O. D.) を溶解し、37°Cにて1時間、incubateした後、反応液をHPLCにて解析した。

第5章第3節に関する実験。

フラビン修飾 thymidine 10merへのpoly dAへの滴下実験。

フラビン修飾 thymidine 10mer (1.88×10^{-4} mmol/ml) にpoly dAを 5×10^{-5} mmol/ μ l ずつ15°Cにて加え、350 nmから550 nmまでの可視光吸収スペクトルを測定した。滴下終了後、セル内の温度を5°Cずつ上昇させ各温度でのスペクトルを測定した。

第5章第4節に関する実験。

オリゴデオキシヌクレオチドの熱変性実験。

熱変性融解曲線は、UVスペクトルにより、260 nmで記録した。セル内温度は、10-40℃まで1℃/2min、40-80℃は1℃/1minので増加させた。測定は、100 mM NaCl含有10mM Tris-HCl (pH 7.0)で行い、各々のstrandは 5×10^{-5} M用いた。

第5章第5節に関する実験。

アイソトープラベルしたDNAフラグメントの調整。

プラスミドpBR322のBam HIフラグメントをT4 polynucleotide kinaseと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (3000 Ci/mL) でアイソトープラベル後、Eco RVで再度分解し、5% PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) で分離することで、175塩基対を持つフラグメントを得た。

フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチド **36** による塩基配列特異的DNA切断。

5'-末端をアイソトープラベルしたフラグメント(7000 cpm)および、フラビン修飾オリゴデオキシヌクレオチド (5 μ M) を溶解させた50 mM NaCl含有 50 mM Tris HCl (pH 7.0)溶液を、20℃にて1時間光照射した。反応液をエタノール沈澱させて、反応を終了後、泳動用緩衝液 (0.05 mM NaOH/5M urea/0.05% bromophenol blue/0.05% xylene cyanol) に再溶解、ついで1分間 90℃で加熱後、10% polyacrylamide/7M ureaスラブゲル電気泳動を行った(1800 V, 2時間)。切断箇所はMaxam-Gilbert法による塩基特異的DNA切断反応による分解物と、電気泳動で比較することにより行った。

引用文献

- 1) B. Chance and G. R. Williams, *J. Biol. Chem.*, **1955**, 217, 383
- 2) B. Chance and G. R. Williams, *J. Biol. Chem.*, **1955**, 217, 395
- 3) B. Chance and G. R. Williams, *J. Biol. Chem.*, **1955**, 217, 495
- 4) T. Omura, in *Microsomes and Drug Oxidations* (J.R. Glillete, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R.W. Estabrook, J. R. Fouts and G. J. Mannering, eds.), **1969**, pp160-162, Academic Press, New York
- 5) B. S. S. Masters, J. Baron, W. E. Taylor, E. L. Isaacson and J. LoSpalluto, *J. Biol. Chem.*, **1971**, 246, 4143-4150
- 6) 八木国夫、ビタミン学、日本ビタミン学会編、東京化学同人、**1980**、p69 - 129.
- 7) T. C. Bruice, *Acc. Chem. Res.* **1980**, 13, 256-262.
- 8) L. W. Poulsen and D. M. Ziegler, *J. Biol. Chem.* **1979**, 13, 6449-6455.
- 9) C. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **1980**, 13, 148-155.
- 10) A. Miller and T. C. Bruice, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1979**, 896-897.
- 11) S. Murahashi, T. Oda and Y. Masui, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 5002-5003.
- 12) S. Muto and T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7559-7564.
- 13) S. Muto and T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 2284-2290.
- 14) S. Ghisla, U. Hartmann, P. Hemmerich and F. Müller, *Libigs Ann. Chem.* **1973**, 1388-1415.
- 15) V. Massey and P. Hemmerich, *Biochem. Soc. Trans.* **1980**, 8, 246.
- 16) J. Stubbe and J. W. Kozarich, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1107.
- 17) D. Sigman, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 180-186.
- 18) J. Kuwahara and Y. Sugiura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85,

2459-2463.

19) W. Ross, A. Landy, Y. Kikuchi and H. Nash, *Cell* **1978**, 18, 297-307.

20) M. Van Dyke, R. P. Hertzberg and P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 79, 5470-5474.

21) J. P. Sluka, J. H. Griffin, D. P. Mack and P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 113, 6369-6374.

22) T. D. Tullius and J. K. Dombroski, *Biochemistry* **1984**, 23, 3934

23) A. M. Pyle, E. C. Long and J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4520-4522.

24) Y. Sugiura, T. Takita and H. Umezawa, in *Metal Ions in Biological System* (H. Sigel ed.) **1985**, 19, 81-108, Martel Dekker, New York.

25) D. S. Sigman, D. R. Grraham, V. D'Aurora and A. M. Stern, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 12269-12272.

26) J. S. Taylor, P. G. Schultz and P. B. Dervan, *Tetrahedron* **1984**, 40, 457.

27) P. G. Schultz and P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6861.

28) P. G. Schultz and P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7748.

29) P. B. Dervan, *Science (Washington D. C.)* **1986**, 232, 464.

30) V. Massey, G. Palmer and D. Ballow, in "Flavins and Flavoproteins" (H. Kamin ed.) **1986**, University Park Press, Butterworth, p232.

31) M. B. Taylor, G. K. Radda, "Methods in Enzymology", ed. by D. B. McCormik, L. D. Wright, **1971**, vol. 18B, p496, Academic Press, New York.

32) W. B. Cowden, G. A. Butcher, N. H. Hunt, I. A. Clark and F. Yoneda, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1987**, 37, 495.

33) W. B. Cowden, P. K. Halladay, R. B. Cunningham, N. H. Hunt and I. A. Clark, *J. Med. Chem.* **1991**, 37, 1818-1822.

34) E. Uhlmann and A. Peyman, **1990**, *Chem. Rev.* 90, 543-584.

35) D. A. Melton ed., *Antisense DNA and RNA*, **1988**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

36) J. S. Cohen (ed.), *Oligonucleotides "Antisense Inhibition of Gene Expression"*, **1989**, CRC Press, Boca Roton, FL., pp26-51.

37) U. Asseline, M. Delarue, G. Lancelot, F. Toulme, N. T. Thuong, T. Monteray-Garestier and C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 3297-3301.

38) J. E. Wilson *Biochemistry* **1966**, 5, 1351-1359.

39) R. H. Sarma, P. Dannies, and N. O. Kaplan *Biochemistry* **1968**, 7, 4359-4367.

40) E. J. Nanni, Jr., D. T. Sawyer, S. S. Ball, and T. C. Bruice *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2797-2802.

41) T. Harayama, R. Yanada, T. Akiyama, M. Tanaka, and F. Yoneda *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1987**, 148, 995-1000.

42) F. Yoneda, and K. Tanaka *Med. Res. Rev.* **1987**, 7, 477.

43) S. Yasui, and A. Ohno, *Bioorg. Chem.* **1986**, 14, 70-96.

44) C. Kemal, and T. C. Bruice *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3955-3964.

45) M. Iwata, T. C. Bruice, H. L. Carrell, and J. P. Glusker *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5036-5044.

46) S. Shinkai, N. Honoda, Y. Ishikawa, and O. Manabe *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6268-6292.

47) F. Yoneda, Y. Sakuma, M. Ichiba, and K. Shinomura *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 830-835.

48) M. Sako, Y. Kojima, K. Hirota, and Y. Maki. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1691-1692.

49) T. C. Bruice, T. W. Chan, J. Taulane, I. Yokoe, D. L. Elliott, R. F.

- Williams, and M. Navok *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 6713-6720.
- 50) H. Theorell, and Å. Åkeson *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, 65, 439-448.
- 51) F. Müller, P. Hemmerich, A. Ehrenberg, G. Palmer, and V. Massey. *Eur. J. Biochem.* **1970**, 14, 185-196.
- 52) A. Ehrenberg, F. Müller, and P. Hemmerich. *Eur. J. Biochem.* **1967**, 2, 286-293.
- 53) W. H. Walker, and A. Ehrenberg. *FEBS Lett.* **1969**, 3, 315.
- 54) A. Ehrenberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, 105, 453.
- 55) G. Palmer, F. Müller, and V. Massey; in Third International Symposium on Flavins and Flavoproteins (H. Kamin ed.), **1971**, University Park Press, Baltimore, pp123-137.
- 56) 石津和彦編、実用ESR入門、**1981**、講談社サイエンティフィック。
- 57) 大矢博昭、山内淳、電子スピン共鳴、講談社サイエンティフィック。
- 58) 米沢、永田、加藤、今村、諸熊；量子化学入門、1963、化学同人、p62。
- 59) A. E. Miller, J. J. Bischoff, C. Bizub, P. Luminoso, and S. Smiley. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7773-7778.
- 60) C. Kemal, and T. C. Bruice *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 1635-1638.
- 61) S. Ball, and T. C. Bruice *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6498-6503.
- 62) S. Ball, and T. C. Bruice *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4017-4019.
- 63) S. Shinkai, T. Yamaguchi, O. Manabe, and F. Toda. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1399-1401.
- 64) S. Oae, K. Asada, and T. Yoshimura *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 1265-1268.
- 65) C. H. Chen, D. S. Sigman, *Science (Washington D. C.)*, **1987**, 217, 1197-1201.
- 66) D. Praseuth, A. Gaudemer, J. Verhae, I. Kralic, I. Sissoef, and E. Guille.

- Photochem. Photobiol.* **1986**, 44, 717-724.
- 67) A. M. Maxam, and W. Gilbert *Methods. Enzymol.* **1980**, 65, 499-560.
- 68) J. C. M. Tsibris, D. B. McCormick, and L. D. Wright. *Biochemistry*, **1965**, 4, 504-510.
- 69) K. Kuratomi, and Y. Kobayashi. *Biochem. Biophys. Acta.* **1977**, 476, 207-217.
- 70) T. P. A. Devasgayama, S. Steenken, M. S. W. Obendorf, W. A. Schultz, and H. Sites, *Biochemistry*, **1991**, 30, 6238-6289.
- 71) W. M. Moore, and C. Baylor, Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 7170-7178.
- 72) W. M. Moore, J. T. Spence, F. A. Raymond, and S. D. Colson. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3367-3372.
- 73) R. L. Letsinger, and M. E. Schott. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7394-7396.
- 74) G. B. Dreyer, and P. B. Dervan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, 82, 7174.
- 75) C-H. B. Chen, and D. S. Sigman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**, 83, 7174-7151.
- 76) B. L. Lee, A. Murakami, K. R. Blake, S. B. Lin, and P. S. Miller. *Biochemistry*, **1988**, 27, 3197-3203.
- 77) J. Woo, and P. B. Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5457-5459.
- 78) J. Telser, K. M. Cruickshank, L. E. Morrison, and T. L. Netzel. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6966-6976.
- 79) D. Singh, V. Kumar, and K. N. Ganesh. *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 3338-3345.
- 80) B. C. Froehler, P. G. Ng and M. D. Matteucci. *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 5399-5407.

- 81) P. J. Garegg, I. Lindth, T. Regberg, J. Stawinski, and R. Störnberg. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4051-4054.
- 82) B. C. Froehler. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5575.
- 83) E. Sulkowski, and M. Lakkowski. *Biochim. Biophys. Acta.* **1971**, 240, 443.
- 84) T. W. Reid and I. B. Willson, "The Enzymes" (3rd ed.), **1971**, 4, 373.
- 85) D. G. Govenstein, "Phosphorous-31NMR; Principles and Applications", **1984**, Academic Press, Orland.
- 86) V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, and A. I. Poletayev. *Biopolymers* **1973**, 12, 89-100.
- 87) H. C-H. Nelson, J. T. Finch, B. F. Luisi, and A. Klug. *Nature* **1987**, 330, 221-226.
- 88) W. D. Wilson, Y-H. Wang, C. R. Krishnamoorthy, and J. C. Smith. **1985**, 24, 3991-3999.
- 89) J. Telsev, K. A. Cruikshank, L. E. Morrison, and T. L. Netzel. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6966-6976.
- 90) U. Asseline, F. Tolume, N. T. Thoung, M. Delarue, M. G. Therese, and C. Hélène, *EMBO.J.* **1984**, 3, 795-800.
- 91) M. Bower, M. F. Summers, C. Powell, K. Shinozuka, J. B. Regen, G. Zon, W. D. Willson. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 4915.
- 92) L. A. LaPlanche, T. L. James, C. Powell, W. D. Willson, B. Uznanski, W. J. Stec, M. F. Summers, G. Zon. *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 9081.
- 93) T. Nagamatu, Y. Hashiguchi, and F. Yoneda. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **1984**, 561-565.
- 94) F. Yoneda, Y. Sakuma, and P. Hemmerich. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1977**, 825.
- 95) H. S. Ryang and S. Y. Wang, *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 1191.

- 96) O. Baudisch and D. Davidson. *J. Biol. Chem.* **1925**, 64, 233.