HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	C-シクロピリミジンヌクレオシドの合成と性質に関する研究
Author(s)	吉村, 祐一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	甲第2895号
Issue Date	1991-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3052779
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49718
Type	doctoral thesis
File Information	000000237911.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

C-シクロピリミジンヌクレオシドの合成と性質に関する研究

吉村　祐一

(1)

C-シクロピリミジンヌクレオシドの合成と性質に関する研究

吉村　祐一

§ 目 次

序論 1

第1章 6,3'-メタノヌクレオシドの合成 10
第2章 6,6'-シクロヌクレオシドの合成 15
　第1節 Petersonオレフィン化反応による5位分枝糖の合成 17
　第2節 6,6'-シクロヌクレオシドの合成 22
第3章 2'-デオキシ-6,2'-メタノヌクレオシドの合成 25
　第1節 合成計画 25
　第2節 2'-デオキシ-6,2'-メタノヌクレオシドの合成 27
第4章 Syn型に固定した6,1'-ピリミジンヌクレオシドの合成 32
　第1節 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 32
　第2節 6,1'-プロパノウリジンの合成 33
第5章 C-シクロヌクレオシドのCDスペクトル 40
第6章 C-シクロヌクレオシドとRNase Aの相互作用 50
　第1節 6,6'-シクロヌクレオシド 2',3'-環状リン酸の合成 50
　第2節 RNase Aによる加水分解反応の速度論的解析 51
　第3節 RNase Aと5'-デオキシ-6,6'-シクロ-4-チオウリジン 3'-リン酸の
　　相互作用のCDスペクトルによる解析 55

結語 60

謝辞 61

実験の部 62
　第1章の実験 63
　第2章の実験 69
　第3章の実験 76
　第4章の実験 82
　第6章の実験 93

参考文献 96

略語表

本論文では以下に示す略語を使用した。

AIBN	azobisisobutyronitrile
n-BuLi	n-butyllithium
Bu_4NF	tetrabutylammonium fluoride
Bu_3SnH	tributyltin hydride
CD	circular dichroism
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
Im	imidazole
LDA	lithium diisopropylamide
MsCl	methanesulfonyl chloride
NOE	nuclear Overhauser effect
pmr	proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
Py	pyridine
$SnCl_4$	stannic chloride
TEAB	triethylammonium bicarbonate
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
t.l.c	thin-layer chromatography

また保護基には以下の略号を使用した。

Ac	acetyl
Bz	benzoyl
Ms	methanesulfonyl
TBS	t-butyldimethylsilyl
TIPDS	1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl
TMS	trimethylsilyl

序論

核酸やその構成成分であるヌクレオシドやヌクレオチドがその生理活性を発現する場合、これらがまず酵素蛋白質や受容体に結合することから全てが始まる。一方、制ガン剤や抗ウイルス剤にはヌクレオシド系化合物や核酸塩基の誘導体が数多く知られているが、これらは基質となるヌクレオシドやそのリン酸エステル体の酵素や受容体への結合を拮抗的に阻害することによりその活性を発現する場合が少なくない。これらの認識過程は一般的に極めて立体特異的であり、その詳細を明らかにすることは、新しい阻害剤の分子設計を行う上でも極めて重要である。

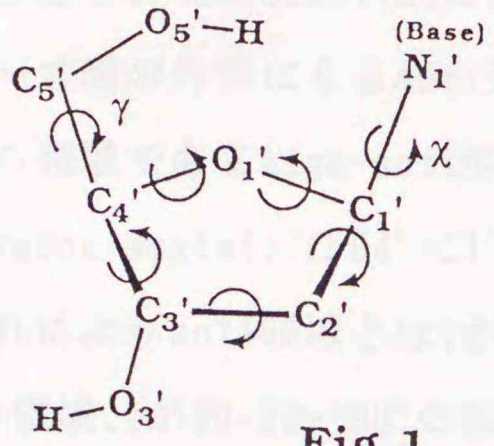
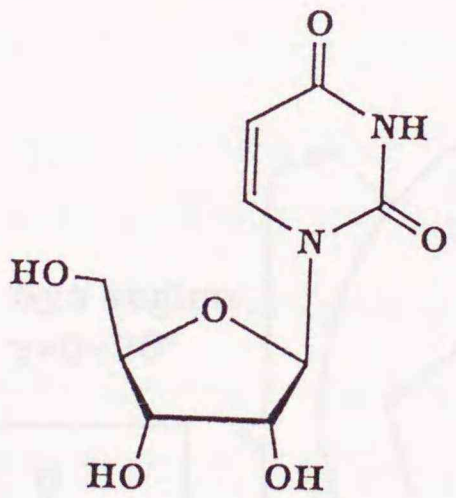


Fig.1

ヌクレオシドの立体構造は主に3つのパラメーター、即ちグリコシル結合回りのconformationであるglycosyl torsion angle(χ)、糖部フラノース環のpuckering、exo-cyclicなC4'-C5'間のねじれ角で規定することができる。中でもグリコシル結合回りのconformation、いわゆるsyn-anti配座の問題は非常に重要であり従来最も関心が持たれている(Fig.1,2)。



anti



syn

Fig.2

一般にヌクレオシドは溶液中でsyn⇄antiの平衡状態にあり、NMR, CDなどの分光学的研究からその変換は非常に迅速に起こることが示されている[2]。特にCDスペクトルに関する研究では、 Milesらによって理論的な計算結果からCDスペクトルのCotton効果とglycosyl torsion angleの関係が示されており[3]、またUlbrichtらによって0-シクロヌクレオシドをモデル化合物として用いた研究からCDのCotton効果とglycosyltorsion angleとの経験則が提唱されている[4]。

注) glycosyl torsion angle(χ)とフラノース環上の塩基部の相対的な位置との関係をウリジンを例としてFig.3に模式的に示した。一般にヌクレオシドの glycosyl結合回りのconformationに関して比較的安定な領域として2位カルボニル基がフラノース環の外側にくるanti型, フラノース環上に位置するsyn型の他に、ほぼこの中間の領域であるhigh-anti型の3つが知られている。IUPACの定義[1]によりglycosyl torsion angle(χ)はO4'-C1'-N1とC1'-N1-C2とのなす2面体角により表現されるので、これによりanti領域とはχが約-90°~180°の領域であり、同様にχが約0~90°の領域をsyn領域、χが約-50~-90°の領域をhigh-anti領域とそれぞれ定義される。

Schematic view of glycosyl torsion angles

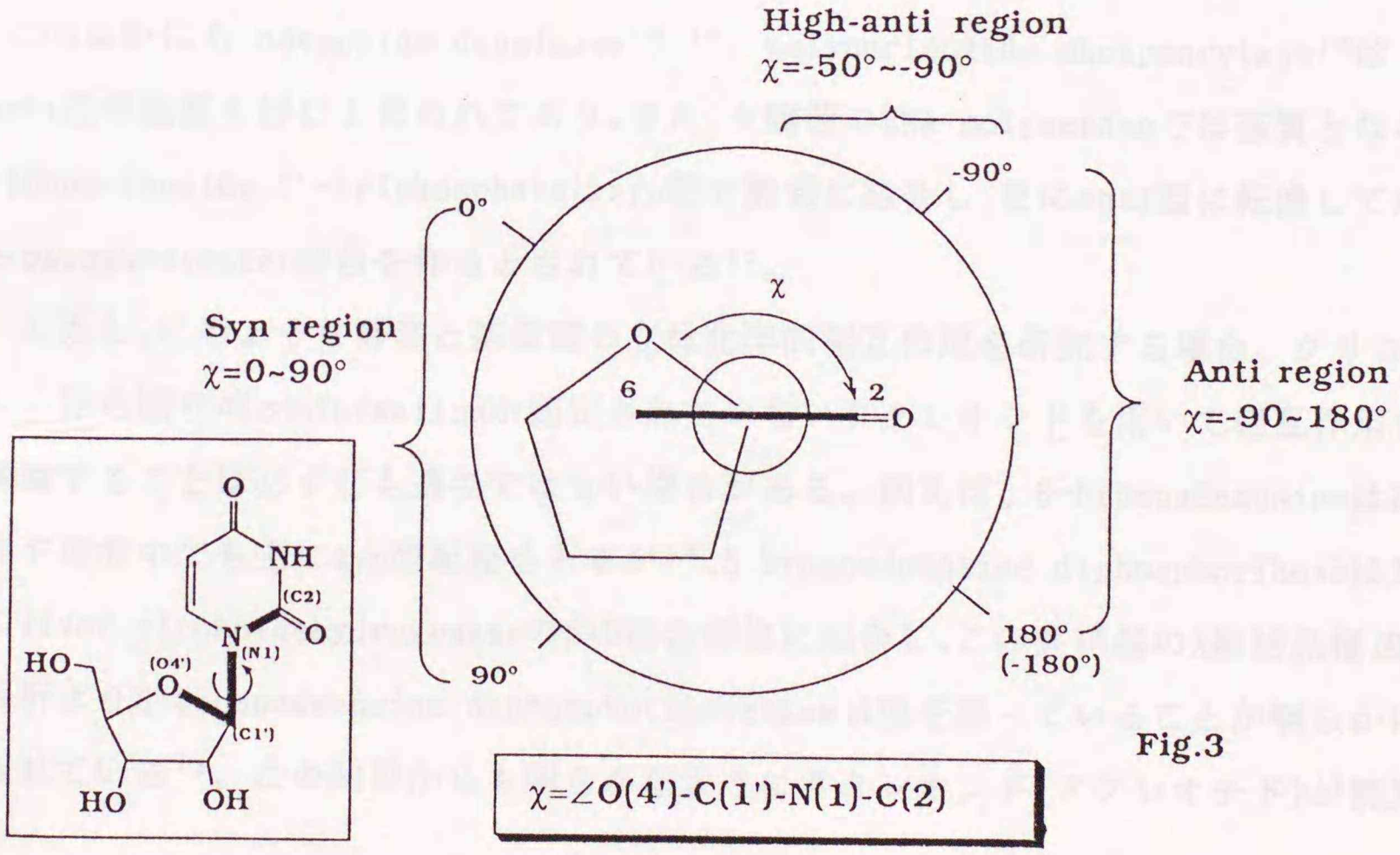


Fig.3

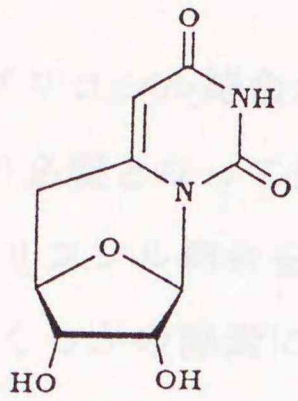
このような分光学的研究からプリンヌクレオシドではsyn, antiのconformerはほぼ等量存在するが、ピリミジンヌクレオシドでは2位カルボニル基の5'位置換基との立体的反発によりsynよりanti conformerの方が多く存在する[2]。また、glycosyl torsion angleは糖部furanose環のpuckeringの影響を受けることも示されている[2]。

ヌクレオシドやヌクレオチドが酵素と結合する際、酵素が基質のsyn型またはanti型のどちらのconformationを優先して認識するかは酵素の種類に依存し変わって来る。例えば、ピリミジン特異的なRNA分解酵素であるRNase Aはanti型の基質を認識すると言われているのに対して[5,6]、同じRNA分解酵素でグアニン特異的なRNase T_1ではスペクトルを用いた研究[7]より基質であるグアニル酸は活性中心においてanti型からsyn型に転換を受けた後、酵素作用をうけると言われており、このことはRNase T_1のinhibitorである2'-GMPとのX線結晶構造解析より2'-GMPがsyn型で結合している[8]との報告などから支持されている 。しかし当研究室の松田はanti型に固定した 8,5'-シクログアノシン 2',3'-環状リン酸がRNase T_1により加水分解を受けることを見出しており[9]、本当に活性中心部においてanti型からsyn型への変換があるのかは疑問である。先のX線結晶構造解析の結果はあくまでもインヒビターである2'-GMPとの結合であり、必ずしも基質-酵素複合体の構造を反映するものではないからである。

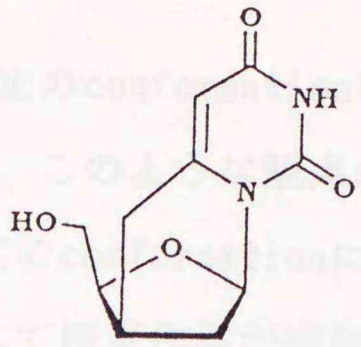
このほかにも adenosine deaminase[10,11], polynucleotide phosphorylase[12]はanti型の基質を好むと言われており、また、大腸菌のRNA polymeraseでは基質となるribonucleoside 5'-triphosphateはsyn型で酵素に結合し、更にanti型に転換してからphosphodiester結合を作るとされている[13]。

しかし、このような酵素と基質間の立体化学的相互作用を研究する場合、グリコシル結合回りのconformationが固定されていないヌクレオシドを用いて相互作用を議論することは必ずしも適当ではない場合がある。例えば、8-bromoadenosineは結晶や溶液中でも主にsyn型配座をとるが[14]、8-bromoadenosine diphosphoriboseは馬のliver alcoholdehydrogenaseのNAD結合部位に結合し、この共結晶のX線結晶構造解析より8-bromoadenosine diphosphoriboseはanti型を取っていることが明らかにされている[15]。この結果からも明らかなようにヌクレオシド(ヌクレオチド)が酵素

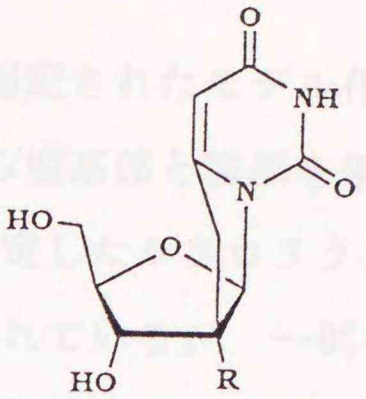
10を塩基で処理しC5-C6間の2重結合を回復し、更に脱保護を行い5'-デオキシ-6,5'-シクロウリジン(1)が合成された。



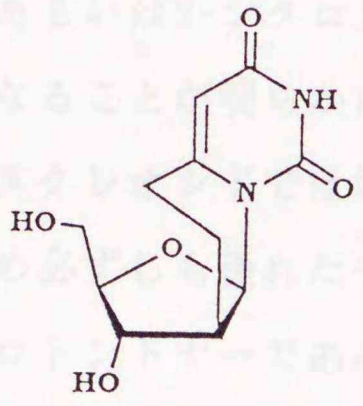
1



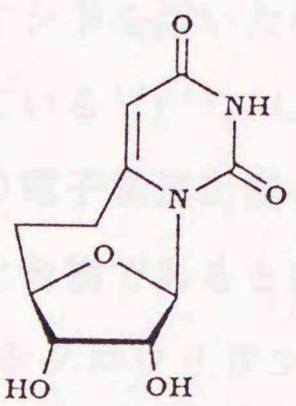
2



R=H ; 3
R=OH ; 4

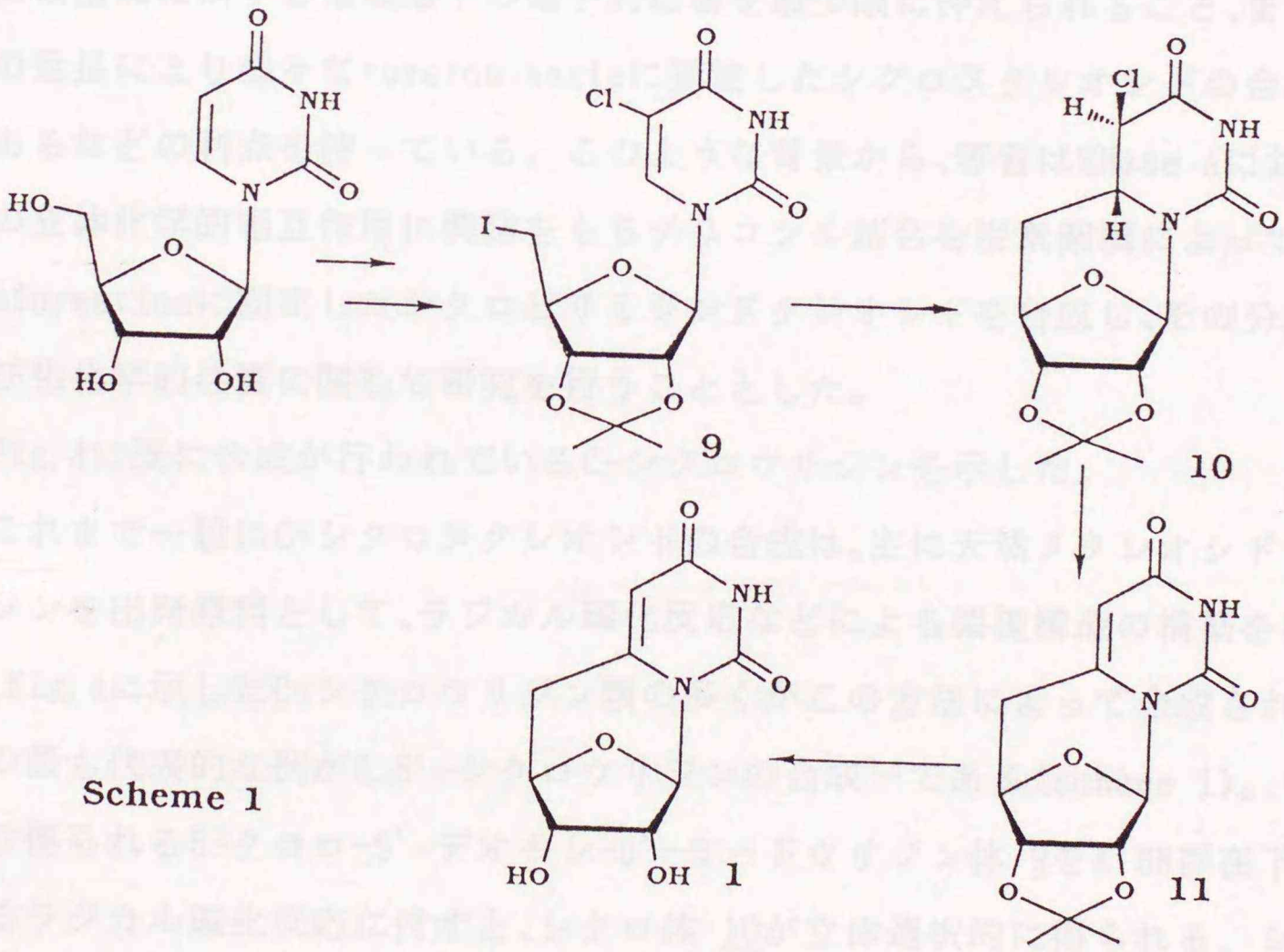


5



6

Fig.4



Scheme 1

に結合する際、強制的にconformationが変換される可能性があり、conformationが固定されていないヌクレオシド自身では必ずしも正しい結論に到達できないことが考えられる。

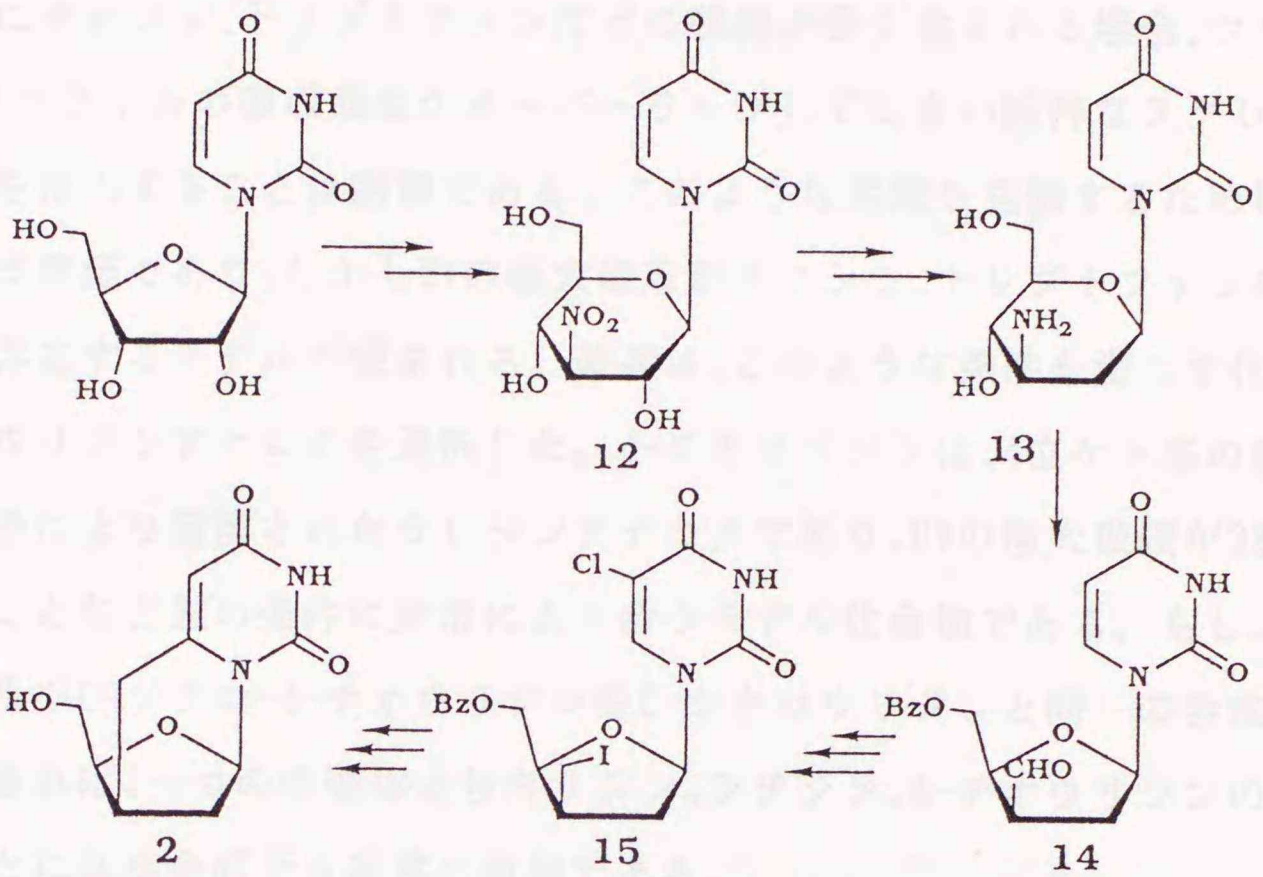
そこでグリコシル結合が特定のconformationに固定されたモデル化合物のデザインと合成が必要となって来る。このような観点から塩基部と糖部を架橋構造により結合し、グリコシル結合を特定のconformationに固定したシクロヌクレオシドが合成され、いくつかの酵素に関して相互作用が議論されている。　一例をあげると、adenosine deaminaseでは酸素またはイオウ原子を架橋構造に持つO-シクロヌクレオシドあるいはS-シクロヌクレオシドを用いた研究よりHigh-anti型の基質が良い基質となることが明らかにされている[10,11]。しかし、ヘテロ原子を架橋構造に持つシクロヌクレオシドでは塩基部の電子構造に変化を起こし、pKaなどの変化の原因となるため必ずしも優れたモデル化合物であるとは言えない(例えばウリジンではN-3位はプロトンドナーであるが、O-シクロウリジンではプロトンアクセプターとなってしまう)。

これに対して炭素架橋によってグリコシル結合を固定したC-シクロヌクレオシドでは塩基部に対する架橋原子の電子的影響を最少限に押えられること、また炭素架橋の延長により様々なtorsion angleに固定したシクロヌクレオシドの合成が可能であるなどの利点を持っている。このような背景から、著者はRNase Aにおける基質との立体化学的相互作用に興味をもちグリコシル結合を炭素架橋によって特定のconformationに固定したシクロピリミジンヌクレオシドを合成し、その分光学的および生化学的性質に関して研究を行うこととした。

Fig. 4に既に合成が行われているC-シクロウリジンを示した。

これまで一般にC-シクロヌクレオシドの合成は、主に天然ヌクレオシドであるウリジンを出発原料として、ラジカル環化反応などによる架橋構造の構築を行っており、Fig. 4に示したC-シクロウリジン類の多くがこの方法によって合成されている。その最も代表的な例が6,5'-シクロウリジンの合成[16]である(scheme 1)。ウリジンより得られる5-クロロ-5'-デオキシ-5'-ヨードウリジン体 9をAIBN存在下Bu_3SnHによるラジカル環化反応に付すと、シクロ体 10が立体選択的に得られる。シクロ体

しかし、5'位以外の他の位置での炭素架橋を形成しようとすると2'または3'位に新たに炭素鎖の導入、即ち分枝糖ヌクレオシドの構築が環化に先立って必要となる。その一例として、scheme 2に周東らによる2',3'-ジデオキシ-6,3'-メタノウリジン(2)の合成[17]の概略を示す。



Scheme 2

ウリジンより数行程を経て得られるアミノピラノシド 13をセミピナコール転位体である3'-ホルミルウリジン 14とし、更に3'-ヨードメチル体 15へと誘導し、15のラジカル環化反応により2を合成している。しかし、この方法は行程が非常に長く、また、このシクロヌクレオシドは、酵素との相互作用を考える上で重要な3'-水酸基が欠落しているなどの問題点が存在する。

そこで著者は今回C-シクロヌクレオシドの合成を行うにあたり、以下の点に着目し標的化合物を選択し、合成を行うこととした。

1) 酵素との立体化学的相互作用を検討する上で、様々なtorsion angleに固定したC-シクロヌクレオシドが望まれる。そこで前述したanti型、syn型そしてhigh-anti型に固定したC-シクロヌクレオシドを合成することとした。

2) 様々なtorsion angleに固定したC-シクロヌクレオシドの合成を行うため、短工

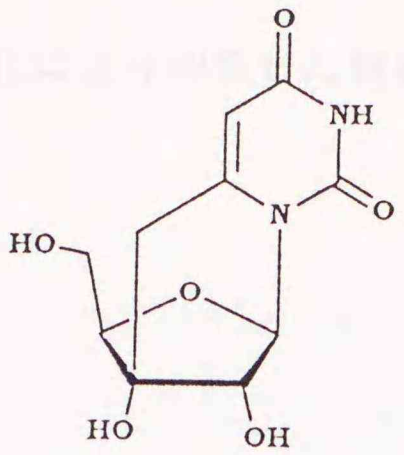
程かつ大量に目的物を得ることのできる合成ルートの開発を行う。

3) 酵素との相互作用の研究に主眼をおいた場合、ウリジン誘導体のみならずシチジン誘導体の合成も必要になってくる。また、タンパク質との相互作用を解析する場合、UV, CDなどのスペクトルが非常に重要となってくる。しかし、タンパク質のアミノ酸残基にチロシン、トリプトファンなどの残基が多く含まれる場合、ウリジン誘導体では、スペクトルの吸収領域がオーバーラップしてしまい純粋なヌクレオシドのみの情報を抽出することは困難である。このような困難を克服するためには、ウリジンとほぼ等価であり、しかもUVの極大吸収がチロシン、トリプトファンのそれより長波長に存在するモデルが望まれる。著者は、このような条件を満たす化合物として4-チオウリジンアナログを選択した。4-チオウリジンは、4位ケト基の酸素原子がイオウ原子により置換されたウリジンアナログであり、UVの極大吸収が330nm付近に存在することなど先の条件に非常によく合うモデル化合物である。もし、C-シクロシチジン及びC-シクロ-4-チオウリジンをC-シクロウリジンと同一の合成中間体から合成できれば、一つの中間体よりウリジン、シチジン、4-チオウリジンの3種を合成できることになり合成上も非常に有用である。

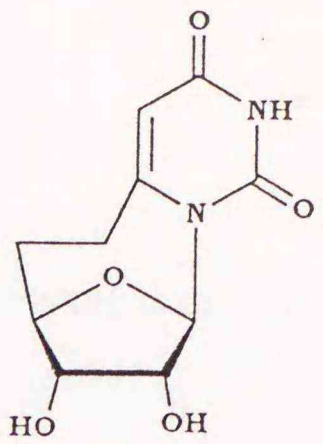
4) これまでanti型に固定したいくつかのC-シクロウリジンが合成され、glycosyl torsion angleとCDスペクトルのCotton効果との相関が認められている。今回この相関関係を更に明確にするため複数のanti型及びhigh-anti型のC-シクロヌクレオシドの合成を行いC-シクロウリジンばかりでなくC-シクロシチジン、C-シクロ-4-チオウリジンにおいても同様の相関関係が成り立つのかを検討する。

5) 4)で述べたようにanti領域におけるCDスペクトルとglycosyl torsion angleの相関に関してはいくつかのデータの蓄積があるが、syn領域に関しては殆ど研究例がないことからsyn領域におけるCDスペクトルの変化に関して明らかにする。

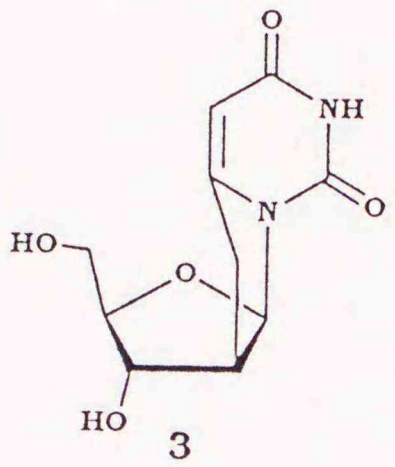
このような観点から今回合成を行ったC-シクロヌクレオシドの構造をFig.5に示した。



7

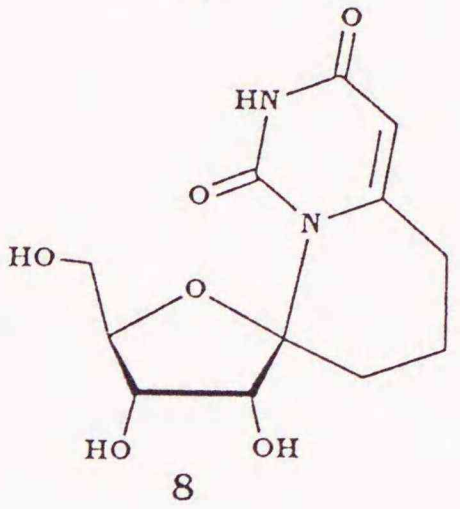


6



3

Fig.5



8

これらC-シクロヌクレオシドのうち6,3'-メタノウリジン (7)及び5'-デオキシ-6,6'-シクロウリジン (6)はanti型に、2'-デオキシ-6,2'-メタノウリジン (3)はhigh-anti型に、更に6,1'-プロパノウリジン (8)はsyn型に固定したモデル化合物に対応する。

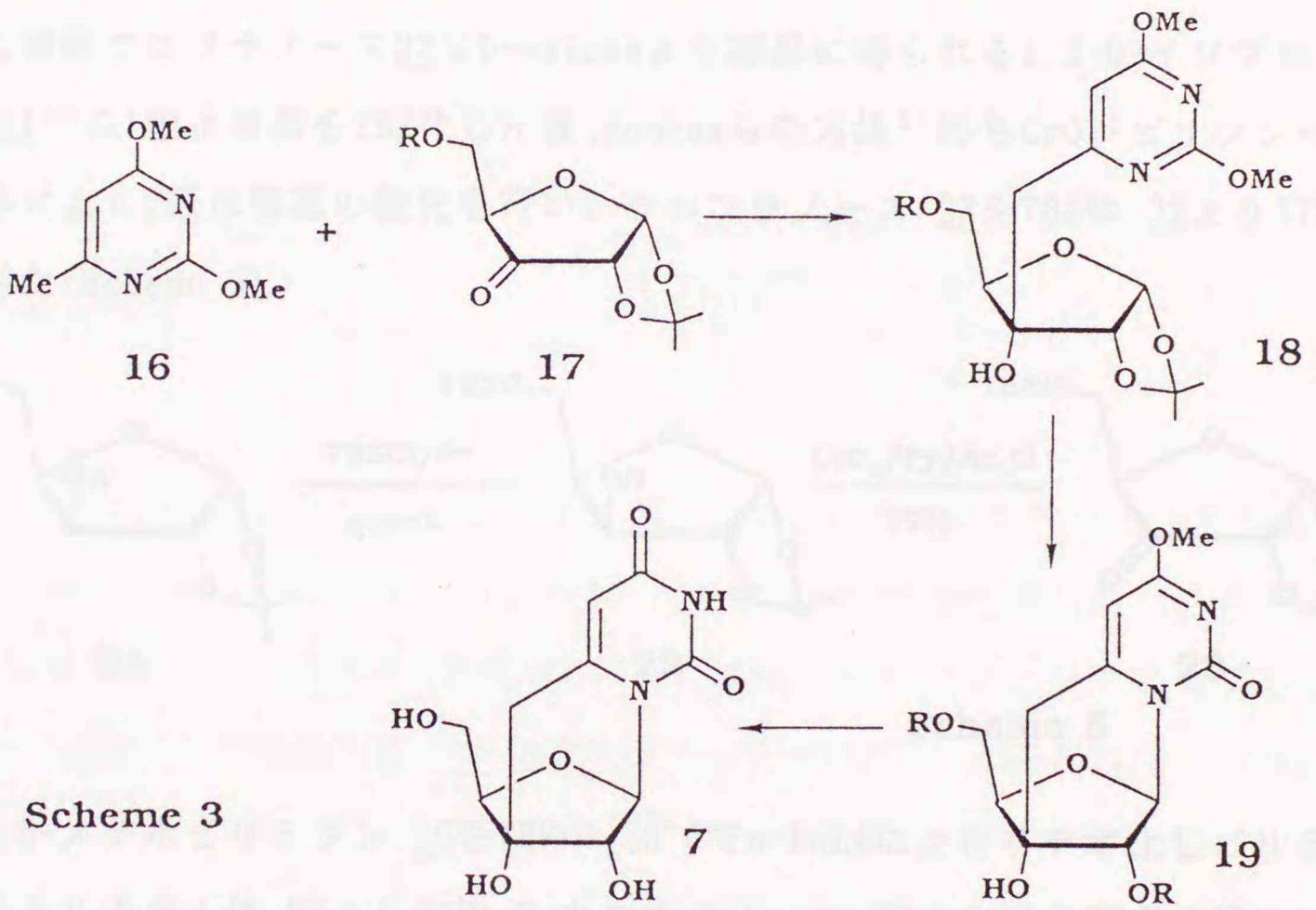
以下著者が今回の研究により得た知見を次の順に述べていくことにする。

第1章では、6,3'-メタノヌクレオシドの合成について、 第2章ではPeterson オレフィン化反応を用いた6,6'-シクロヌクレオシドの合成について述べる。 第3章では第2章で述べた方法論の応用による2'-デオキシ-6,2'-メタノヌクレオシドの合成について記述する。第4章ではスピロ型構造を有するsyn型に固定したC-シクロヌクレオシドである6,1'-プロパノウリジンをデザインし、その合成に関して述べる。第5章においてこれまで得られているCDスペクトルの知見と合わせ、今回合成したシクロヌクレオシド類のCDスペクトルとglycosyl torsion angleの相関関係に関して議論する。 第6章では、 今回合成したシクロヌクレオシドのうち、6,6'-シクロヌクレオシドに関して、それぞれ対応する2',3'-環状リン酸へと導きRNase Aによる水解反応の速度論的解析を行った。更にRNase Aとヌクレオチドとの相互作用をCDスペ

クトル変化により解析した結果も記述する。

第1章 6,3'-メタノヌクレオシドの合成[18]

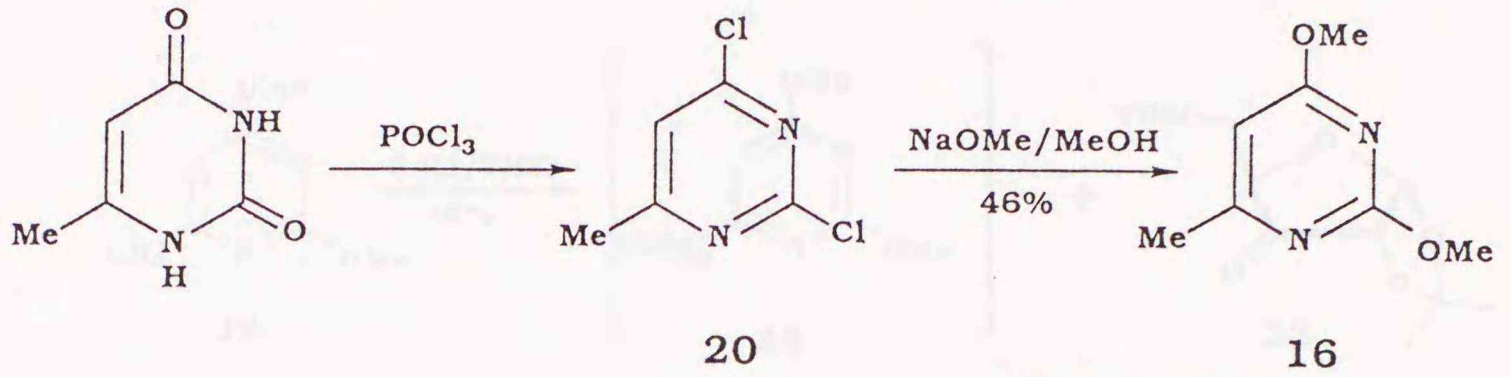
序論でも述べたように6,3'-メタノピリミジンヌクレオシドを合成する場合、天然のピリミジンヌクレオシドを出発原料とすると分枝糖を構築するため多工程を要し実用的ではないと考えられた。更に、2',3'位水酸基が欠落するため酵素との相互作用を見る上でも適当なモデル化合物であるとは言い難い。従って標的化合物の合成を考えた場合、これまでとは全く異なるC-シクロヌクレオシドの合成法の開発が必要となってくる。著者と佐野はこのような条件に合う方法論として分子内グリコシル化反応を応用することを考えた。即ち、6-メチルピリミジン16をシクロヌクレオシド シントンと考え17より対応する分枝糖を合成した後、Hilbert-Johnson法[19]による分子内グリコシル化反応を行うものである(scheme 3)。



Scheme 3

この方法ならばシクロヌクレオシド 19を共通中間体とし、C-シクロウリジン体及びシチジン体の合成が可能となるばかりでなく、4-O-メチル体を4-チオウリジン誘導体へ変換する反応を見出すことにより一つの中間体より3種類のC-シクロピリミジンヌクレオシドの合成が可能となる。

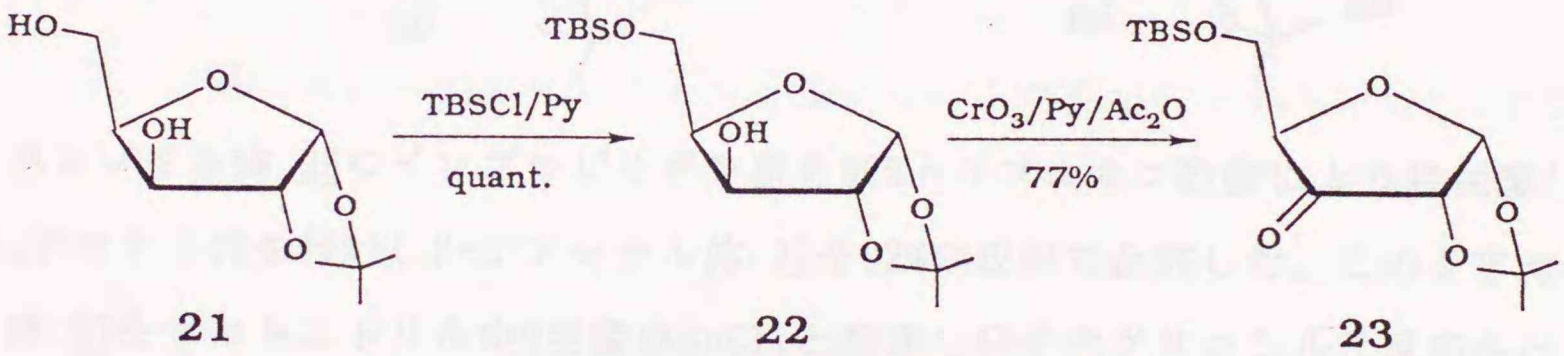
以上のような合成計画により6,3'-メタノピリミジンヌクレオシド 19の合成を行うこととした。 まず塩基部となる6-メチルピリミジン体は市販の6-メチルウラシルを常法により2,4-ジクロル体20に変換した後、このジクロル体をナトリウムメトキシドと処理して2,4-ジメトキシ-6-メチルピリミジン (16)に変換した(scheme 4)。



20　　16

Scheme 4

また糖部ウロフラノース23はD-xyloseより容易に得られる1,2-O-イソプロピリデン体 21[20]の1級水酸基をTBS化した後、Robinsらの方法[21]即ちCrO_3・ピリジン・Ac_2Oの複合体により2級水酸基の酸化を行い3-ウロフラノース 23をTBS体 22より77%の収率で得た(scheme 5)。

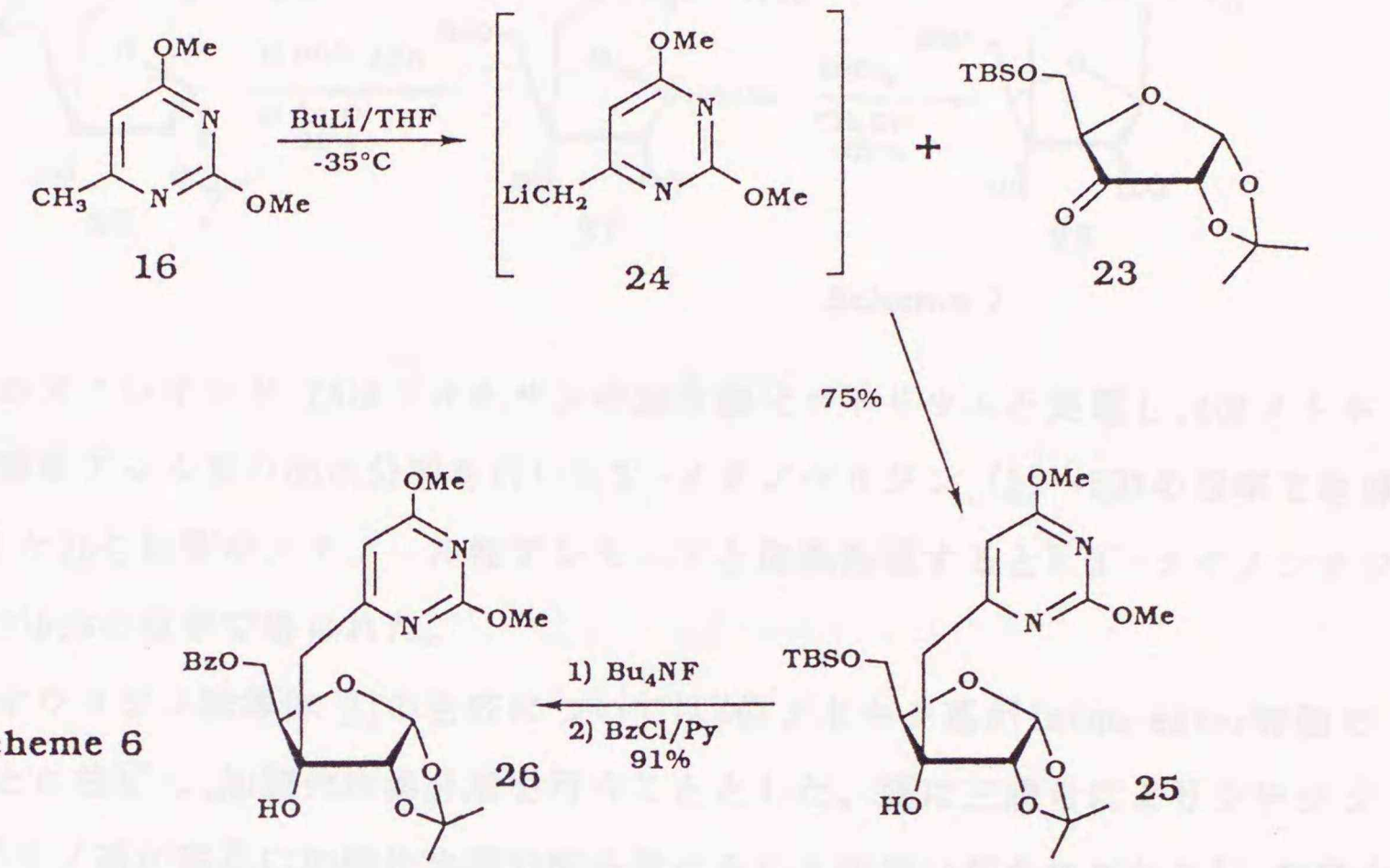


21　　22　　23

Scheme 5

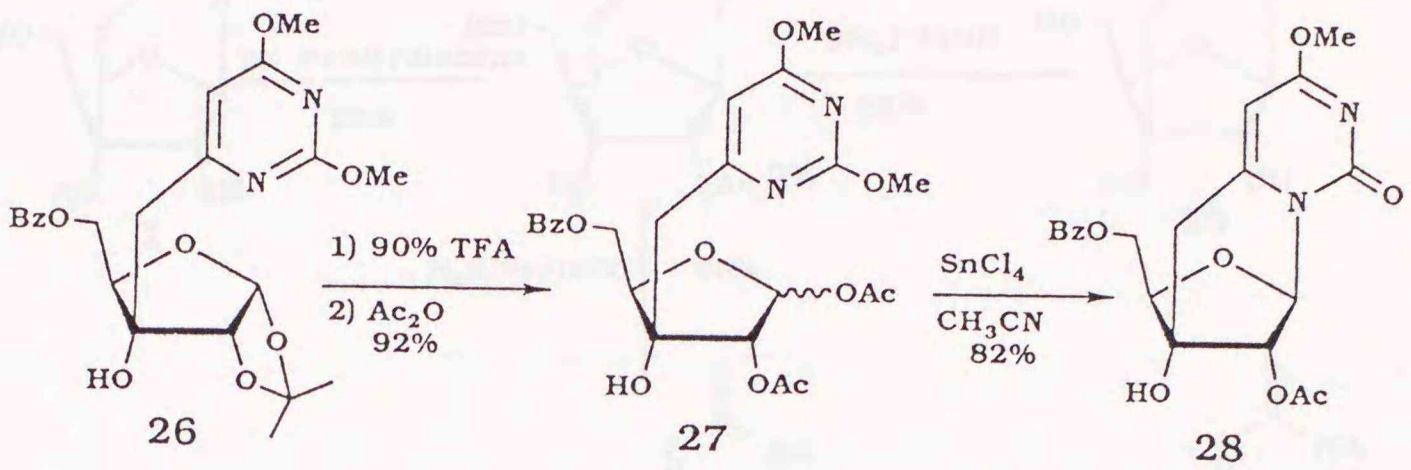
次に6-メチルピリミジン 16をTHF中-35°Cでn-BuLiによりリチオ化しピリミジニルメチルリチウム体 24とした後、3-ウロフラノース 23との縮合反応を行い3-ピリミジニルメチルリボース体 25を75%の収率で合成した。この反応ではt.l.c上単一のスポットのみが認められ、また単離後のpmrの測定からも生成物が単一のジアステレオマーであることから、この反応では1,2-イソプロピリデン基の立体障害により求核攻撃はfuranose環のβ面からのみに限定されCram付加体であるβ-ピリミジニルメチル体 25を与えたものと解釈できる。

25は分子内グリコシル化反応を行うために1,2-ジアセチル体へと変換しなければならない。しかし酸処理により脱イソプロピリデン化を行う際に、5'位シリル基が脱離することが予想され、糖部フラノース環がピラノース環へ変換を起こし目的とするフラノシドへの変換が困難となることが予想された。そこで25をBu_4NFにより脱保護を行った後、ベンゾイル化を行いベンゾイル体 26へと変換した(scheme 6)。



Scheme 6

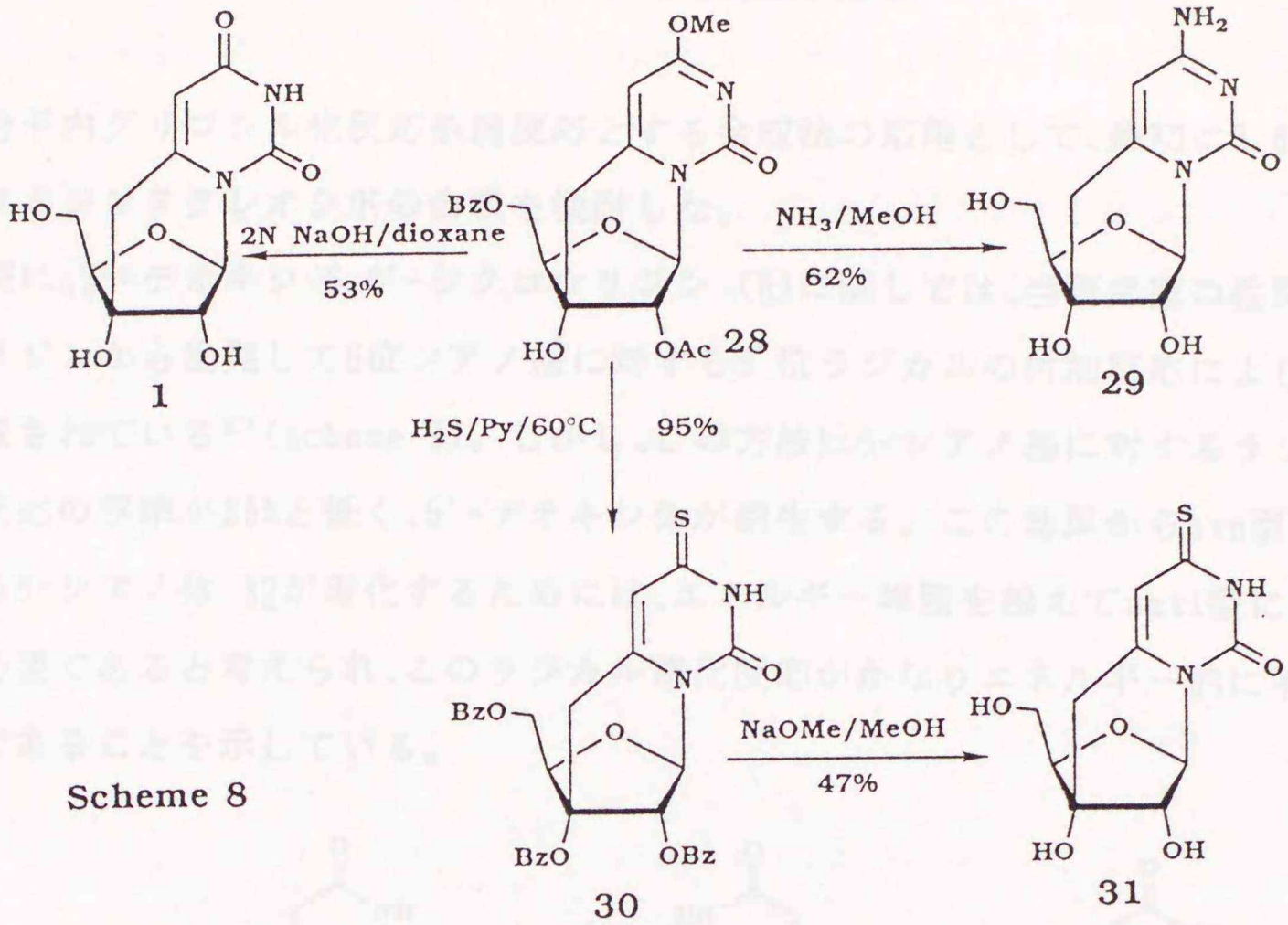
ベンゾイル体 26のイソプロピリデン基を90%トリフルオロ酢酸により脱保護した後、アセチル化を行い1,2-ジアセチル体 27を92%の収率で合成した。このジアセチル体 27をアセトニトリル中2当量の$SnCl_4$と処理し分子内グリコシル化反応を行ったところ、目的とするシクロヌクレオシド 28が82%の収率で得られた。 28はpmrにおいて1'位プロトン及び2'位プロトンがそれぞれ6.50ppm及び5.11ppmにsingletとして観測される。これは分子モデルより28の塩基部と糖部が架橋され糖部puckeringがC3'-endo型に固定され1'位プロトンと2'位プロトンとの二面体角がほぼ90°になったためと考えられる。このことは28がβ-ヌクレオシドであること、また3-ウロースに対する求核試薬の攻撃がβ面から選択的に起こったことを示している(scheme 7)。



Scheme 7

シクロヌクレオシド 28はジオキサン中2N水酸化ナトリウムと処理し、4位メトキシ基と糖部アシル基の加水分解を行い6,3'-メタノウリジン (1)へ53%の収率で誘導した。また28を封管中メタノール性アンモニアと加熱処理すると6,3'-メタノシチジン(29)が62%の収率で得られた。

4-チオウリジン誘導体 31の合成については4位メトキシ基がimino ester等価であることに注目し、加硫化水素分解を行うこととした。既に三浦らによりシチジンの4位アミノ基が容易に加硫化水素分解を受けることが見いだされており[22]、封管中液体硫化水素、ピリジンにより28の加硫化水素分解を行ったところ4-チオウリジン誘導体 30が95%の収率で得られた。30はuvスペクトルで吸収極大が333nmと長波長にシフトしていることなど各種機器データよりその構造を確認した。30は更にナトリウムメトキシドにより糖部アシル基の脱保護を行い6,3'-メタノ-4-チオウリジン(31)を47%の収率で合成した(scheme 8)。なお、28をDMF中Na_2Sで処理しても、糖部アシル基の脱保護が起きるばかりで目的とする30や31は全く得られなかった。



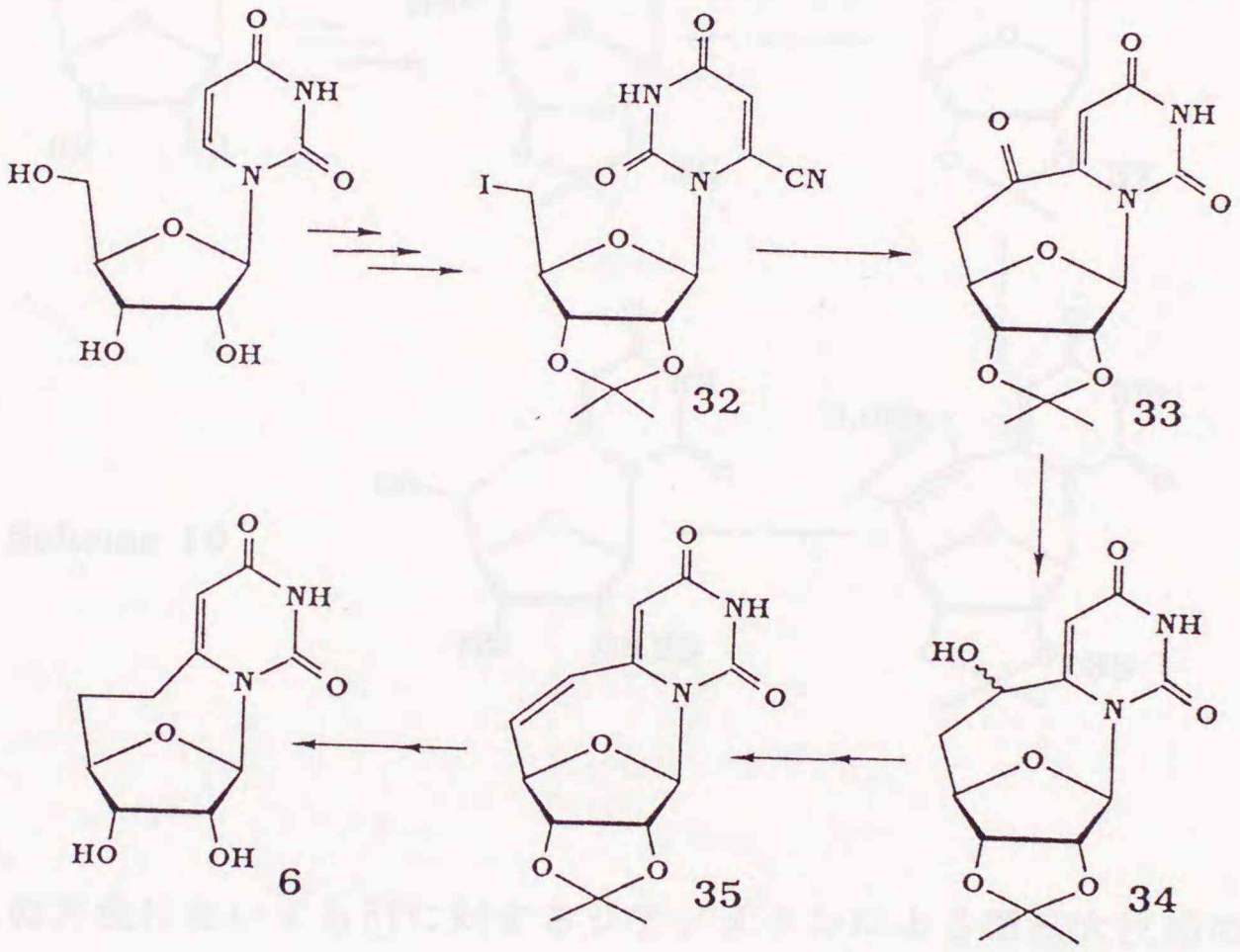
Scheme 8

以上のように6-メチルピリミジン 16をC-シクロヌクレオシド シントンとして6,3'-メタノピリミジンヌクレオシドを短工程で合成することに成功した。またシクロヌクレオシド 28を中間体としC-シクロウリジン、シチジン及び4-チオウリジンの3種類のシクロヌクレオシドを合成することに成功した。

第2章　6,6'-シクロピリミジンヌクレオシドの合成[23]

分子内グリコシル化反応を鍵反応とする合成法の応用として、最初に6,6'-シクロピリミジンヌクレオシドの合成を検討した。

既に、5'-デオキシ-6,6'-シクロウリジン（6）に関しては、当研究室の佐野により、ウリジンから出発して6位シアノ基に対する5'位ラジカルの付加反応により合成が達成されている[24](scheme 9)。しかし、この方法は6-シアノ基に対するラジカル環化反応の収率が35%と低く、5'-デオキシ体が副生する。この結果からsyn型を取っている6-シアノ体 32が環化するためには、エネルギー障壁を越えてanti型になることが必要であると考えられ、このラジカル環化反応がかなりエネルギー的に不利な反応であることを示している。

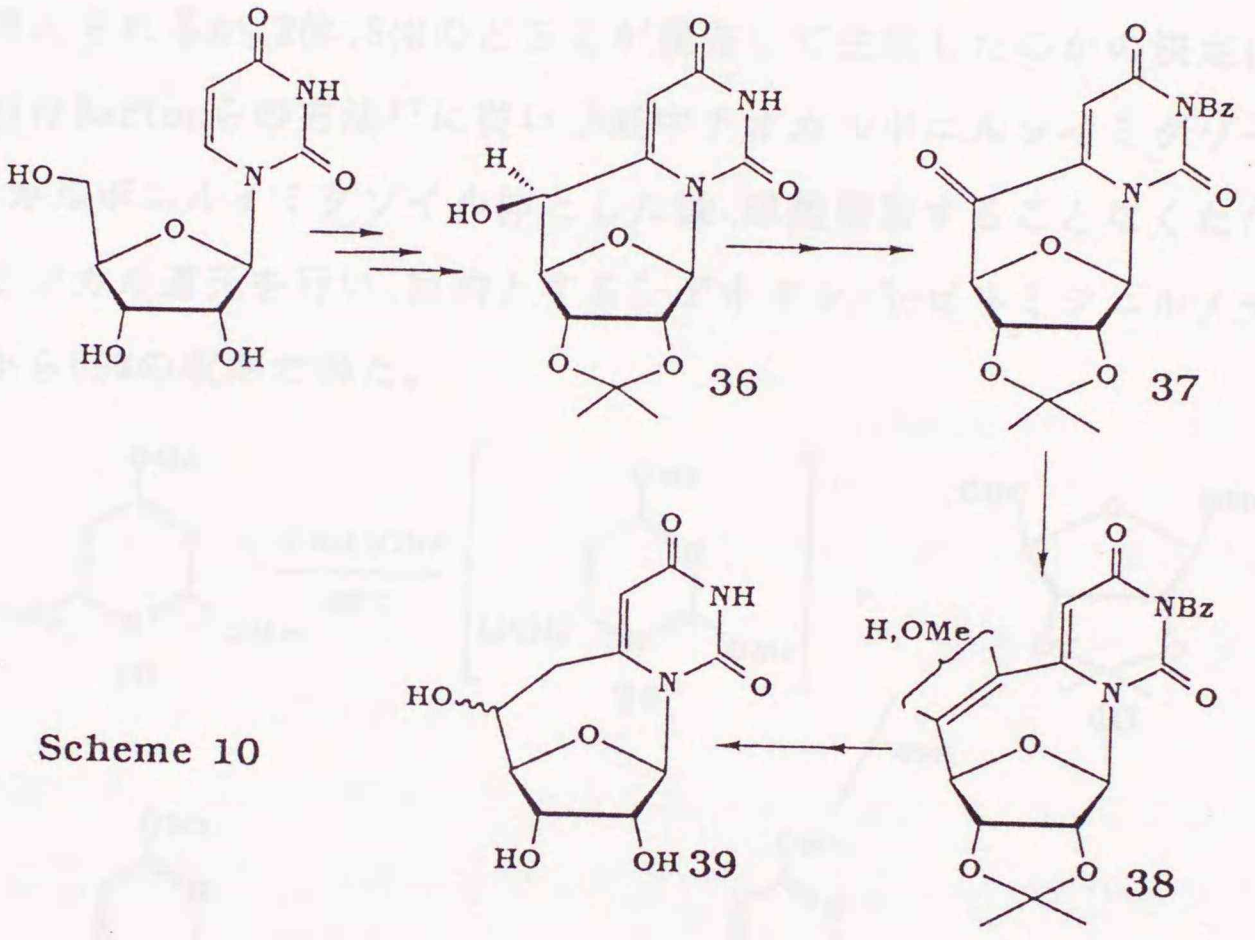


Scheme 9

一方、このシクロウリジン体 6のCDスペクトルは、対応するuv極大吸収の位置にCotton効果を示さないと報告されており[24]CDスペクトルとglycosyl torsion angleの関係を考察する上で非常に興味深い化合物であると言える。

佐野は、合成したこのシクロウリジンの架橋部7員環構造のconformationがendo型であると報告している[24](p.27 Fig.7参照)ことから、著者は、本化合物の合成を全く別途のルートを経た場合、得られたシクロヌクレオシドの架橋部のconformationはendo型となるのか? またendo型であるならば、このシクロヌクレオシドのCDスペクトルは同様に対応するuv領域にCotton効果を示さないのか? この2点に着目し合成を行うこととした。

また、著者が本研究を行っている、ほぼ同時期、Sassonらによって、6,5'-シクロウリジンの環拡大反応による6,6'-シクロウリジン誘導体の合成が報告された[25]。(scheme 10)



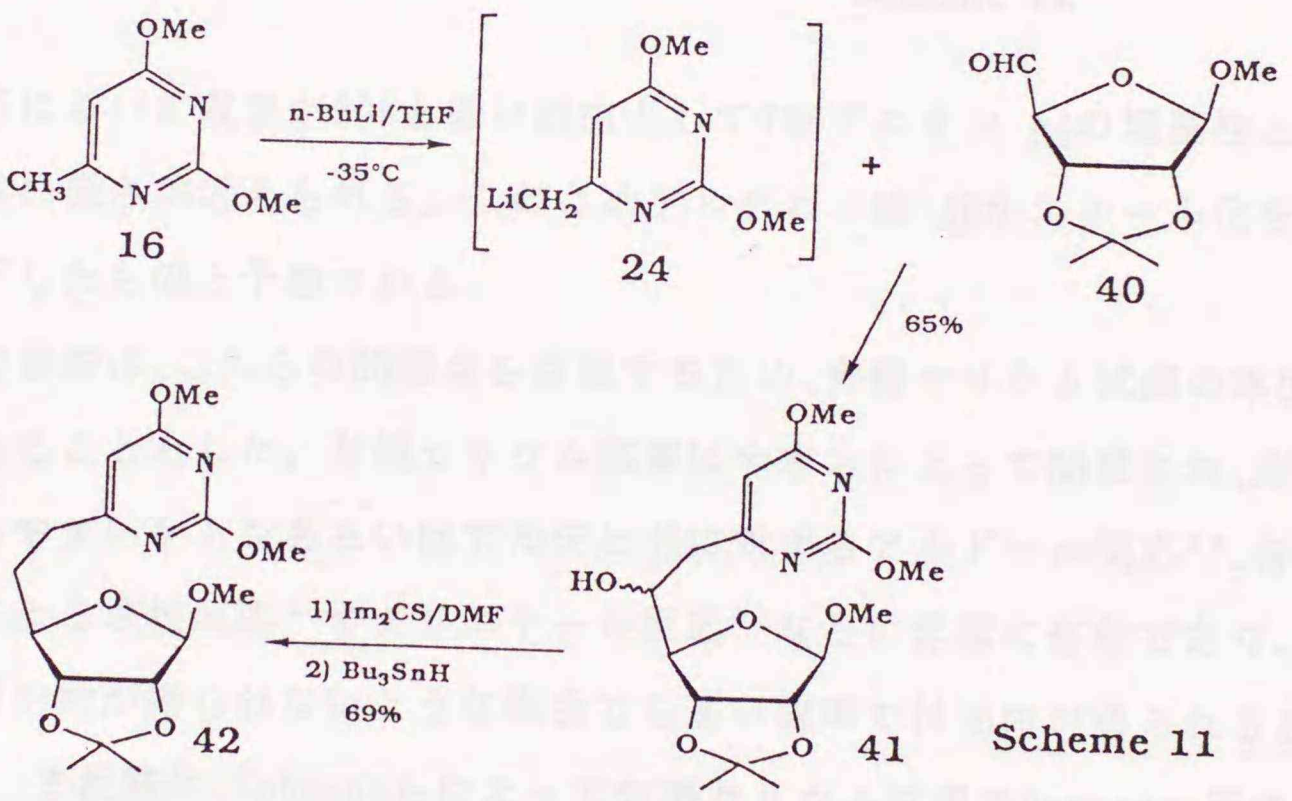
Scheme 10

しかし、この方法においても37に対するジアゾメタンによる環拡大反応の収率が低いなどいくつかの問題点が残されている。

第1節 Petersonオレフィン化反応による5位分枝糖の合成

分子内グリコシル化反応による、6,6'-シクロヌクレオシド合成を考えた場合、その中間体として42が考えられる(scheme 11)。著者は、42を合成するため6,3'-メタノヌクレオシドの合成と全く同様の方法論によりリボース5位での炭素鎖延長を行いその後に遊離の水酸基を還元的に除去することにした。

6-メチルピリミジン 16の6位メチル基をブチルリチウムによりTHF中-35°Cでリチオ化した後、リボース-5-アルデヒド体[26] 40との反応を行うと65%の収率で5-ピリミジニルメチルリボース 41が得られた。41はpmrより約5:1の5位エピマーの混合物であると考えられるが、R体、S体のどちらが優先して生成したのかの決定には至っていない。41はBartonらの方法[27]に従い、DMF中チオカルボニルジイミダゾールと処理し5'-チオカルボニルイミダゾイル体とした後、単離精製することなくただちにBu_3SnHによりラジカル還元を行い、目的とする5-デオキシ-5-ピリミジニルメチルリボース42を41から69%の収率で得た。

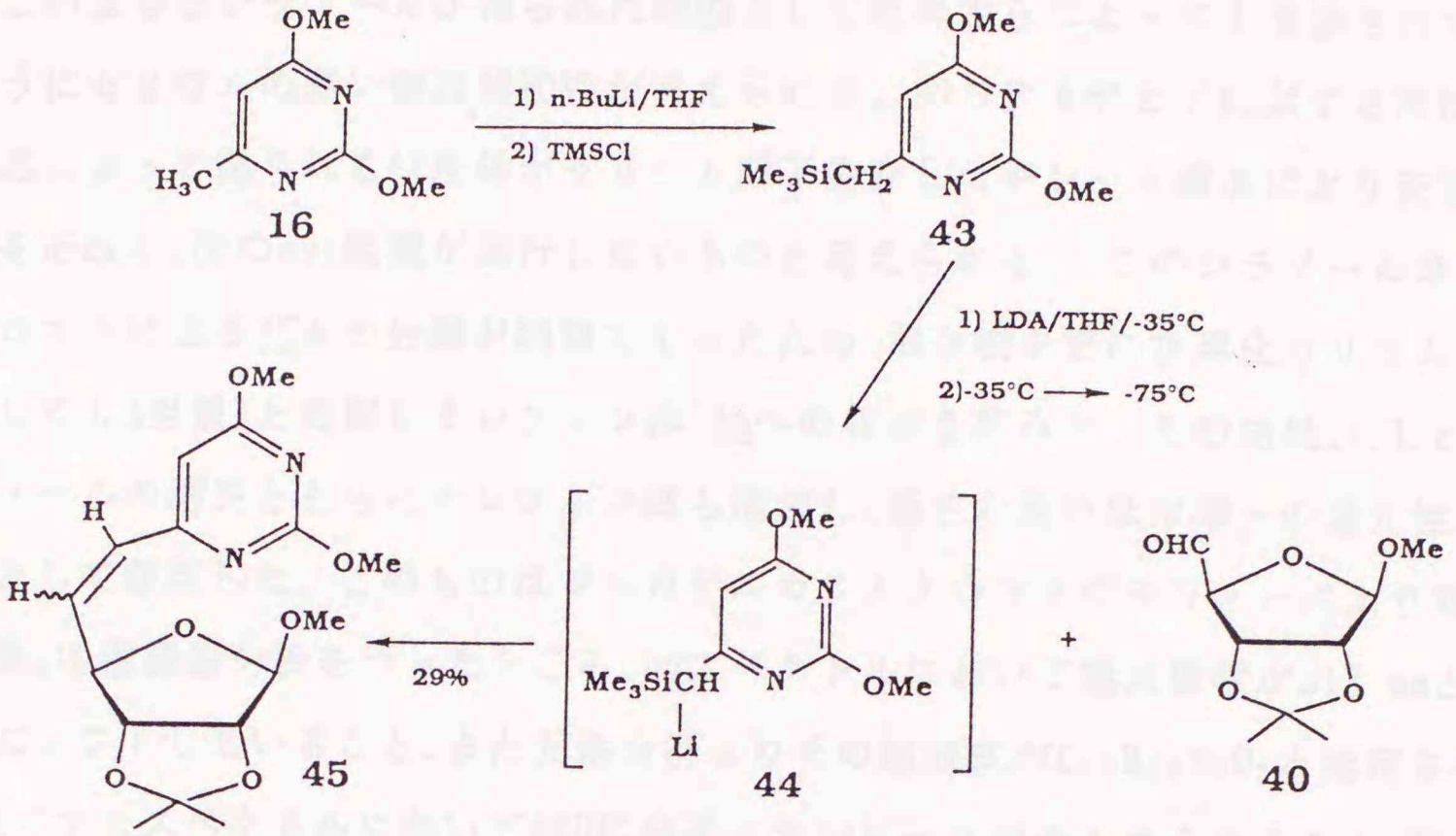


Scheme 11

しかし、この方法では、大量のBu_3SnH(5当量)が必要となり、更に過剰の試薬の除去が困難であるなどの問題点があった。そこでこれらの問題点を解決すべく、次にPetersonオレフィン化反応[28]による5位炭素鎖延長を検討することにした。

6-メチルピリミジン 16をブチルリチウムによりリチオ化した後TMSClを加えTMS

メチル体 43とした。このTMSメチル体 43を再びLDAによりTHF中-35°Cでリチオ化し、このリチオ体 44と5-アルデヒド体 40とのPeterson 反応を行ったところ、45がE体:Z体=約3:2の混合物として29%の収率で得られた(scheme 12)。



Scheme 12

この反応において収率が29%と低い理由としてTMSアニオン 44の塩基性とこのものの求核性の低さが考えられる。このためアルデヒド体 40がエノール化を起こし、収率が低下したものと予想される。

そこで著者は、これらの問題点を克服するため、有機セリウム試薬の本反応への応用を試みることとした。有機セリウム試薬は今本らによって開発され、非常にエノール化しやすいケトンあるいはアルデヒドに対するアルドール反応[29]、有機リチウム試薬による求核反応[30]やグリニヤール反応[31]などに非常に有効であり、通常の方法では目的物が得られないような場合でも高い収率で付加体が得られると報告されている。 また既に、Johnsonらによって有機セリウム試薬のPeterson反応の応用が検討されておりその有効性が確認されている[32]。

著者は、今本らの方法[29,30]に従い先と同様の方法により調製したリチオ体を-70°Cに冷却し、これに無水セリウムクロリドを加えトランスメタル化を行い有機セリウム反応剤 46を調製した。この有機セリウム試薬 46と5-アルデヒド体 40と縮合し

たところ、目的とするオレフィン体 45の他に、syn脱離を起こさずアルデヒドに対する求核付加のみを起こしたビシナルシラノール 47との混合物が得られた。
(scheme 14)

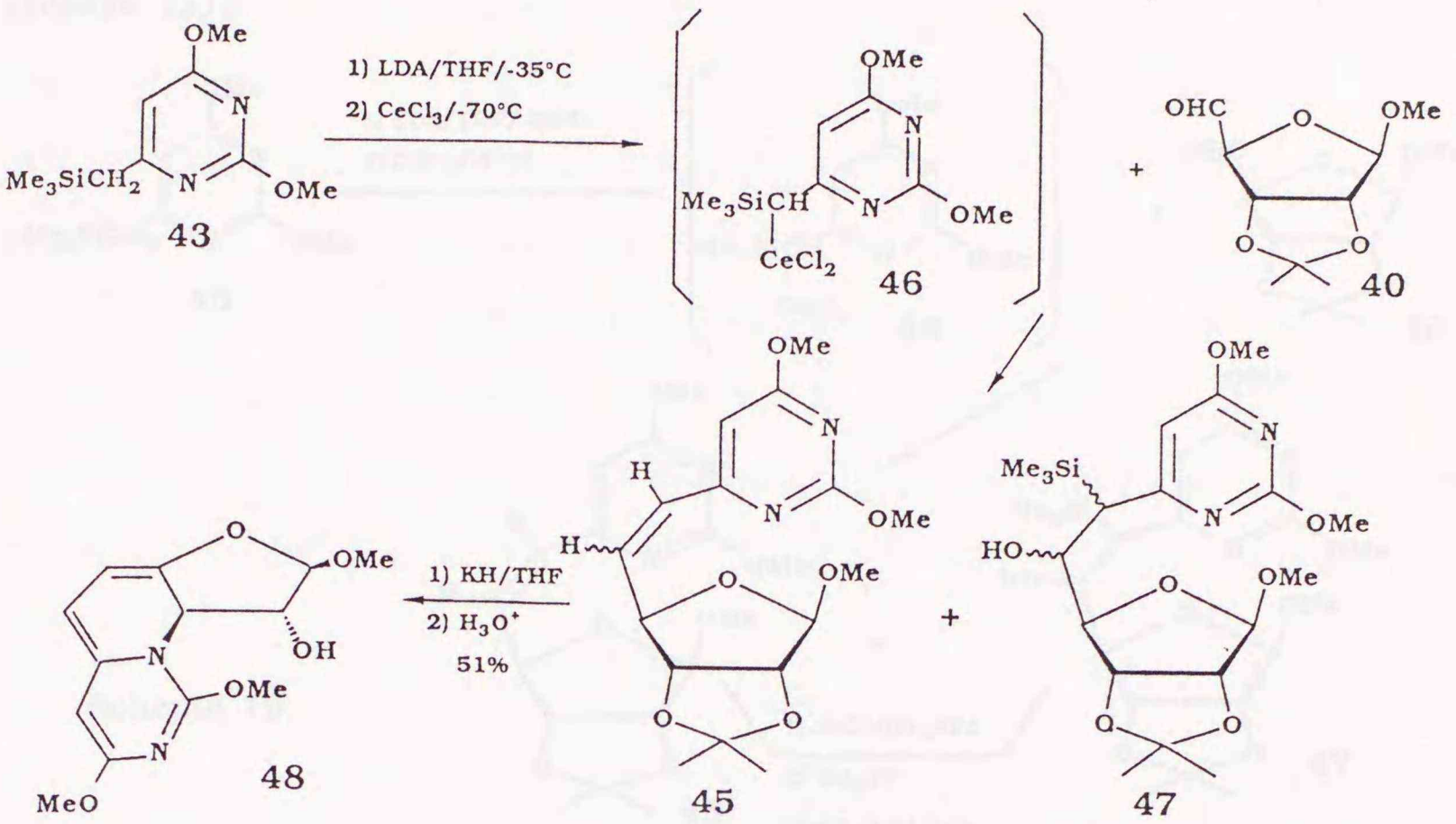
このようなシラノールが得られた理由としては今本らによっても指摘されているようにセリウムの高い酸素親和性が考えられる。即ちアルデヒドに対する求核付加反応によって得られる付加体がセリウム原子を介したキレート構造により安定な錯体を形成し、次のsyn脱離が進行しないものと考えられる。 このシラノール体 47はクロマトによる45との分離が困難であったため、混合物を更に水素化カリウム(43に対して0.4当量)と処理しオレフィン体 45への収束を試みた。その結果、t.l.c上シラノールの消失とともにオレフィン体も消失し、極性の高いほぼ単一の蛍光性スポットとして収束した。このものはシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した後、各種機器分析を行ったところ、uvスペクトルにおいて極大吸収が313 nmと長波長にシフトしていること、また元素分析よりその組成式が$C_{13}H_{16}N_2O_5$と推定された。

更にマススペクトルにおいて280に分子イオンピークがみとめられること、及びpmrスペクトルよりイソプロピリデン基の消失と7.32ppmと6.82ppmにオレフィン由来のダブレットが認められ、4.69ppmに遊離水酸基との結合を示すピークがあるなどの結果から、この化合物の構造を48であると推定した。3位の立体に関しては、nmrスペクトルより2,3位間のカップリングコンスタントが2.9Hzであることから、2,3-trans、即ちβ-置換体であると決定した(scheme 13)。

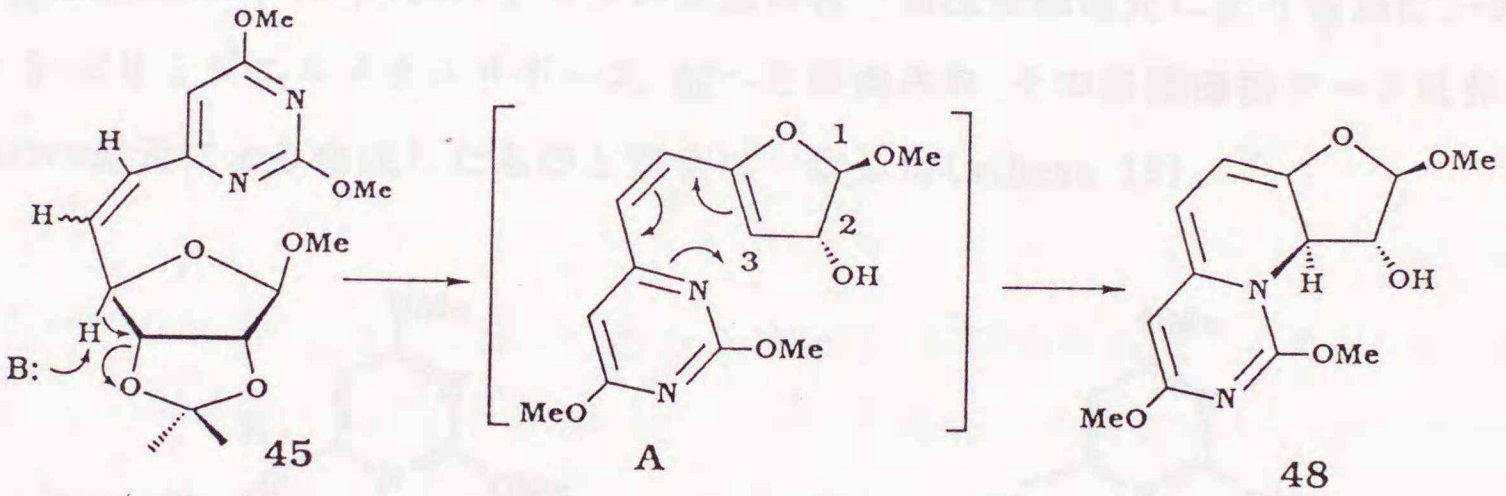
このような化合物の生成のメカニズムに関しては次のように考えている。即ち、水素化カリウムによりシラノール体 47は目的とするオレフィン体45へと変換されるが、このオレフィン体の4位プロトンが過剰の水素化カリウムにより更に引き抜かれイソプロピリデン基が脱離し共役ジエン Aが生成する。ここで、Aのピリミジンの窒素原子上の非共有電子対が3位で分子内マイケル反応を起こせば48が生成するものと考えられる。またAのジエン構造はピリミジン環上のπ電子と共役し共役トリエンとみなすことができる。従ってこの共役トリエン上での電子環状反応が起こったと考えても、先と全く同じように48の生成が説明できる。

本反応で単一の立体配置をもつ48のみが生成していること、また分子内マイケル

反応とみなした場合エノールエーテルと等価な構造をもつ3位に対し求核攻撃を起こすことは非常に考えにくいことから、著者は本反応のメカニズムを共役トリエンにおける逆旋的電子環状反応ではないかと推定している(scheme 14)。



Scheme 13

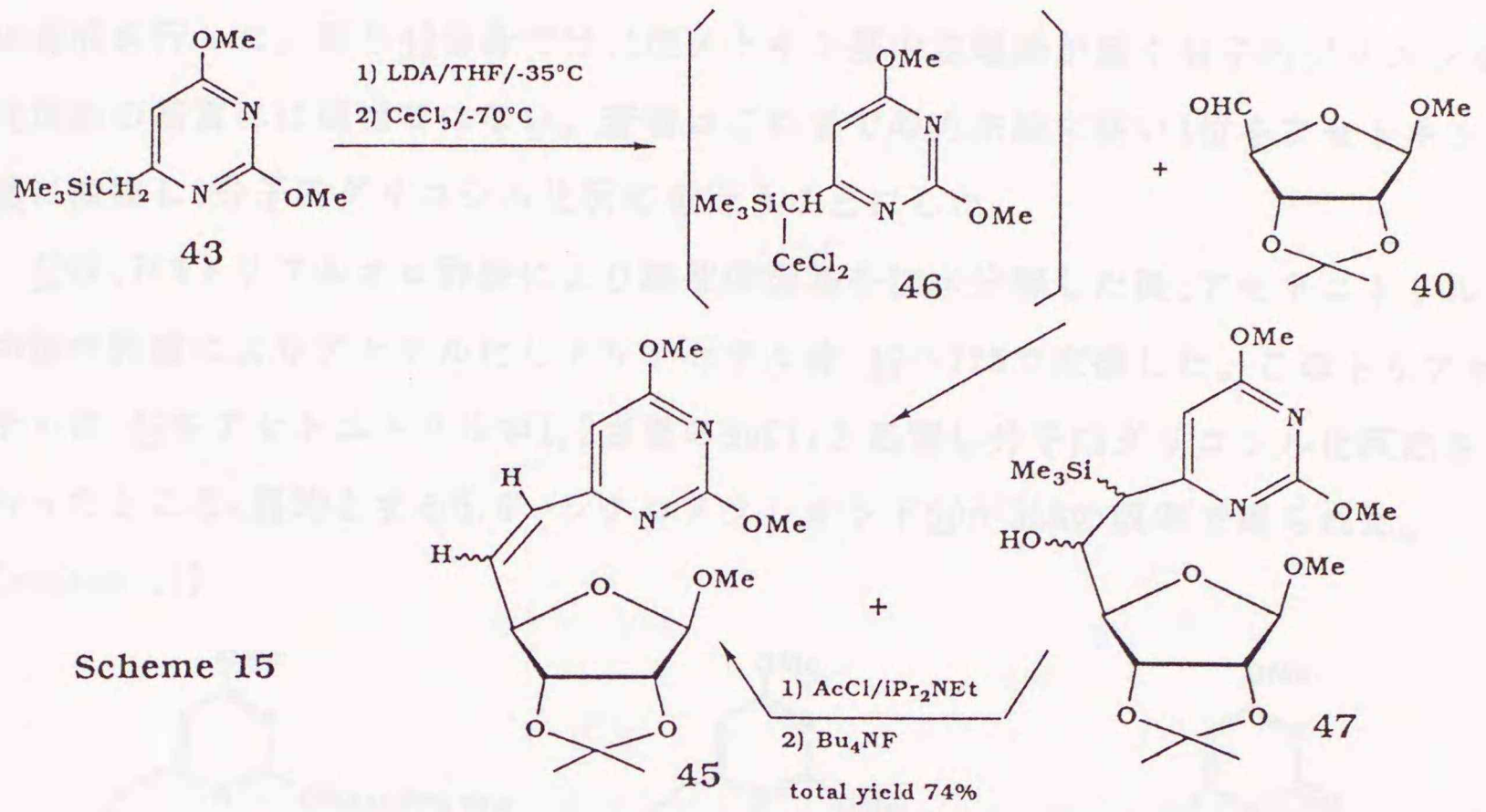


Scheme 14

以上の結果より、塩基によるシラノールのオレフィンへの変換が困難であると考え、次にanti脱離によるオレフィンへの変換を検討することとした。

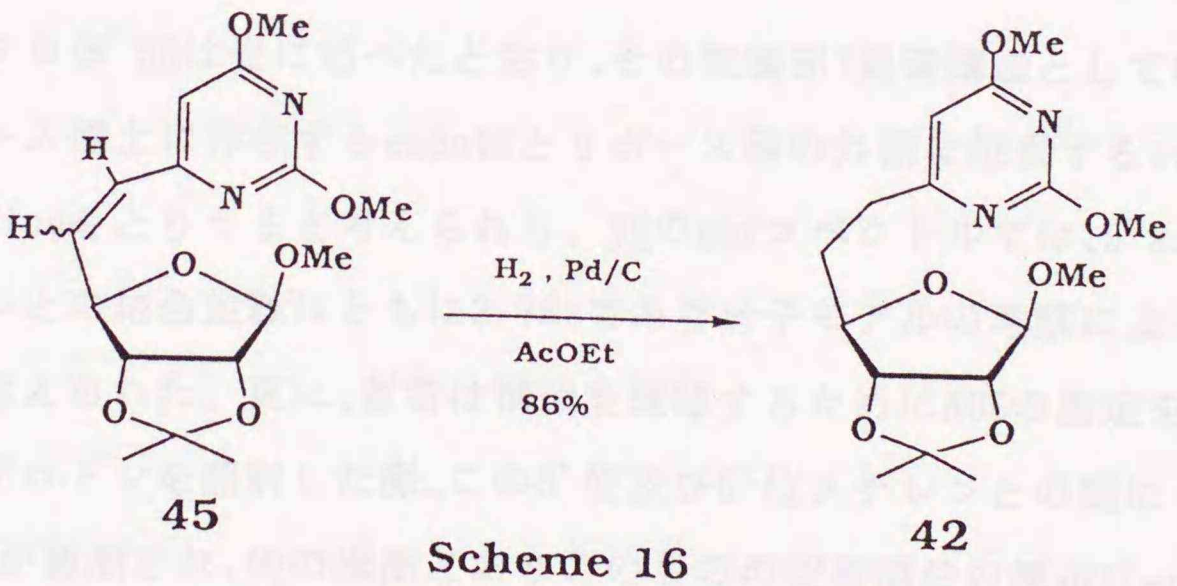
先のオレフィンとシラノールを混合物のままシラノールの水酸基をアセチルクロリドによりアセチル化した後、Bu_4NFによりTMS基を除去しながらanti脱離を行った

ところ目的とするオレフィン体へと収束し、クロマト上分離できない少量の6-メチルピリミジン 16を含む混合物として16よりの通算収率74%で45を得ることができた。45はE体、Z体の混合物であり、その生成比はpmrスペクトルよりE:Z=2.2:1であった(scheme 15)。



Scheme 15

45は、酢酸エチル中10%パラジウム炭素存在下常圧接触還元により容易に5-デオキシ-5-ピリミジニルメチルリボース 42へと変換され、その各種機器データは先にBarton還元により合成したものと完全に一致した(scheme 16)。

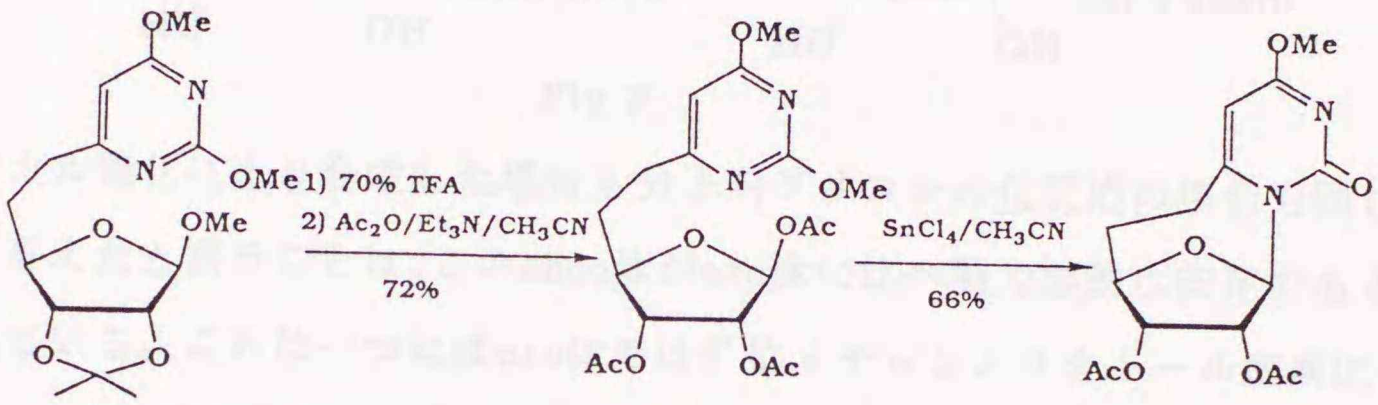


Scheme 16

第2節 6,6'-シクロヌクレオシドの合成

第1節で述べたように5-デオキシ-5-ピリミジニルメチルリボース 42の合成に成功したので、次に分子内グリコシル化反応を検討し目的とするシクロヌクレオシドの合成を行った。即ち42自身では、1位メトキシ基の脱離能が低く分子内グリコシル化反応の基質には適当ではない。著者はこれまでの方法論に従い1位をアセトキシ基に変換し、分子内グリコシル化反応を行うことにした。

42は、70%トリフルオロ酢酸により糖部保護基を加水分解した後、アセトニトリル中無水酢酸によりアセチル化しトリアセチル体 49へ72%で変換した。このトリアセチル体 49をアセトニトリル中1.2当量の$SnCl_4$と処理し分子内グリコシル化反応を行ったところ、目的とする6,6'-シクロヌクレオシド50が66%の収率で得られた。(scheme 17)



42　　49　　50

Scheme 17

このシクロ体 50は先に述べたとおり、その架橋部7員環構造として6'-メチレン部分がリボース環上に存在するendo体とリボース環の外側に位置するexo体の2通りのconformationをとりうると考えられる。50のpmrスペクトルでは、5'a,bプロトンと4'プロトンとの結合定数はともに3.7Hzであり分子モデルの考察によりendo体をとっていると考えられた。更に、著者は構造を確認するためにNOEの測定を行った。その結果3'位プロトンを照射した際、この5'位及び6'位メチレンとの間にそれぞれ2.7%, 3.6%のNOEが観測され、先の推測どおりこのものの架橋部分の構造はendo型であると決定した(Fig.6)。

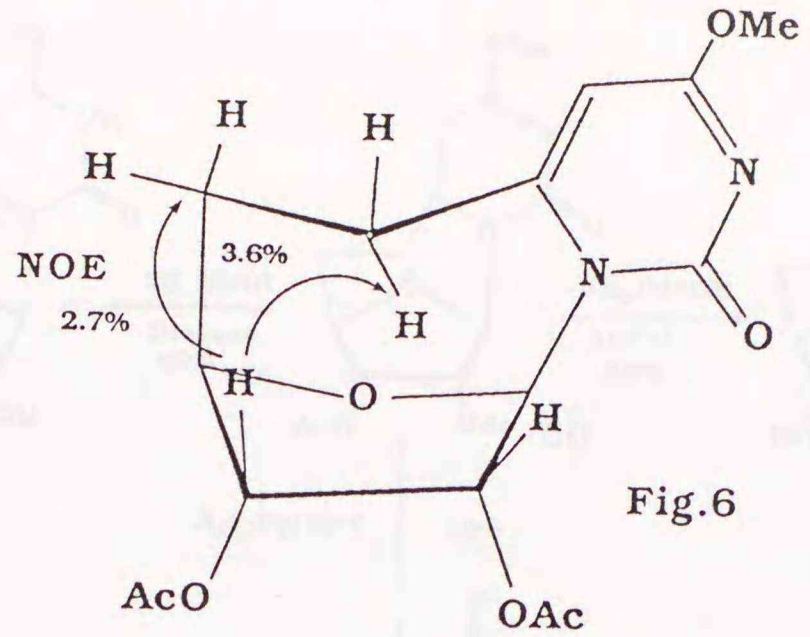


Fig.6

endo-form

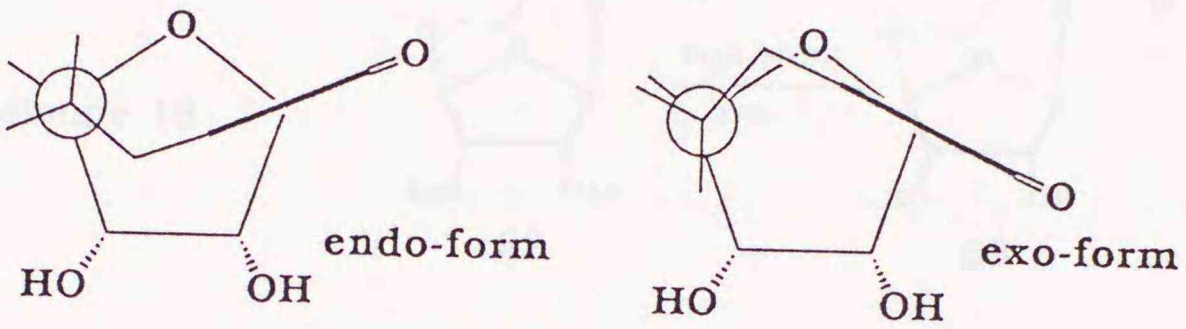
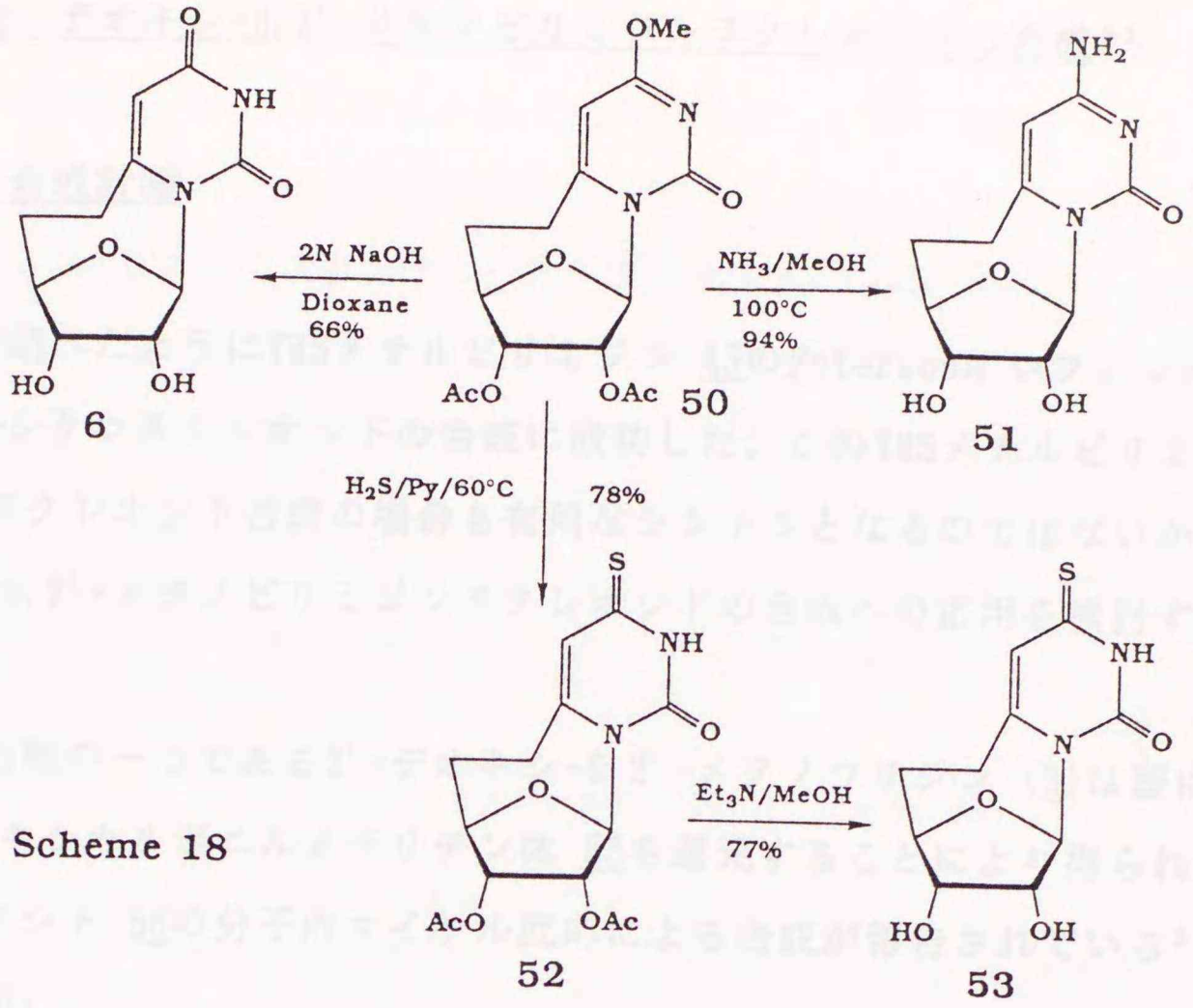


Fig.7

ラジカル環化により合成した場合も分子内グリコシル化反応の場合も同じendo体のみを与えたと言うことは、このendo体がexo体に比べ熱力学的に安定であることを示唆している。これは一つにはexo体では6'位メチレンとラクトール酸素原子のlone pairとの静電的な反発があること、また endo体の場合4'-5'間の立体がgauche-gaucheとなるのに対し、exo体ではeclipsedになりexo体の方が熱力学的に不利になることが最も大きな要因であると思われる(Fig. 7)。

以上のようにして合成した50をジオキサン中アルカリ加水分解を行い目的とする5'-デオキシ-6,6'-シクロウリジン (6)へと誘導した。今回合成した6は先に佐野がラジカル環化により合成したもの[24]と各種機器データが完全に一致した。50を封管中メタノール性アンモニアと100°C22時間処理し5'-デオキシ-6,6'-シクロシチジン(51)を94%の収率で得た。更に50の加硫化水素分解[22]を行い、4-チオウリジン誘導体52を78%の収率で得た。52は更に、Et_3N-MeOH混合溶液により脱アセチル化を行い目的とする 5'-デオキシ-6,6'-シクロ-4-チオウリジン (53) を77%の収率で得た(scheme 18)。



6　50　51

52　53

Scheme 18

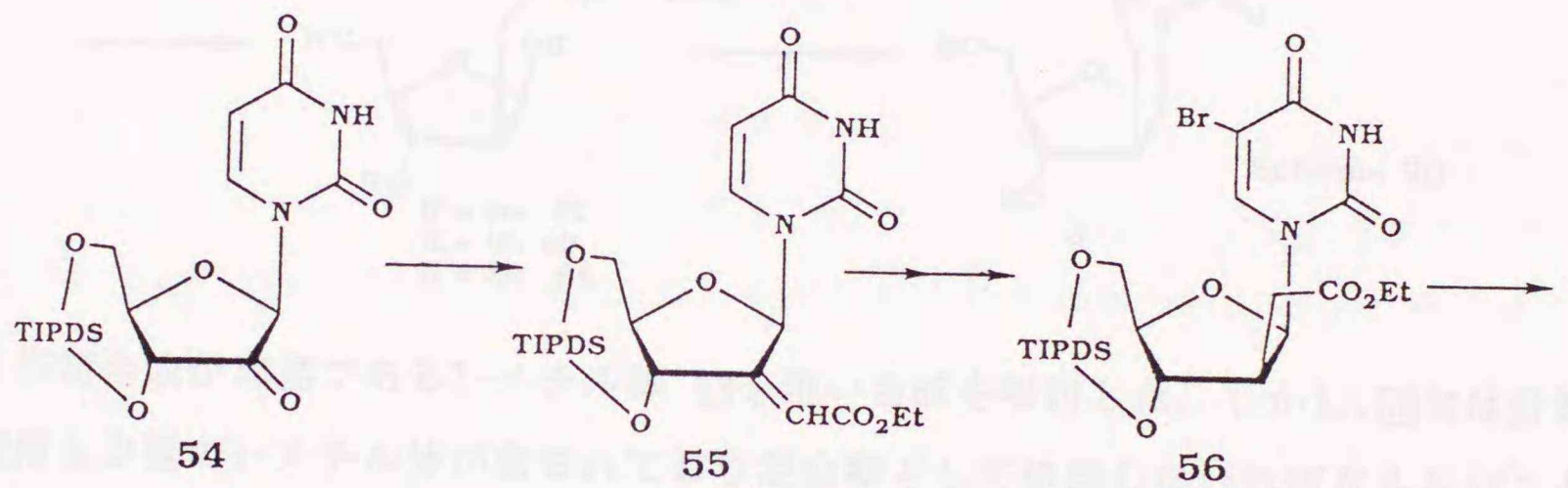
以上、Petersonオレフィン化反応を用い5'位分枝糖を合成し、更に分子内グリコシル化反応によって6,6'-シクロピリミジンヌクレオシドの合成に成功した。今回合成した6,6'-シクロヌクレオシドのCDスペクトルについては、第5章で他のシクロヌクレオシドとともに議論する。

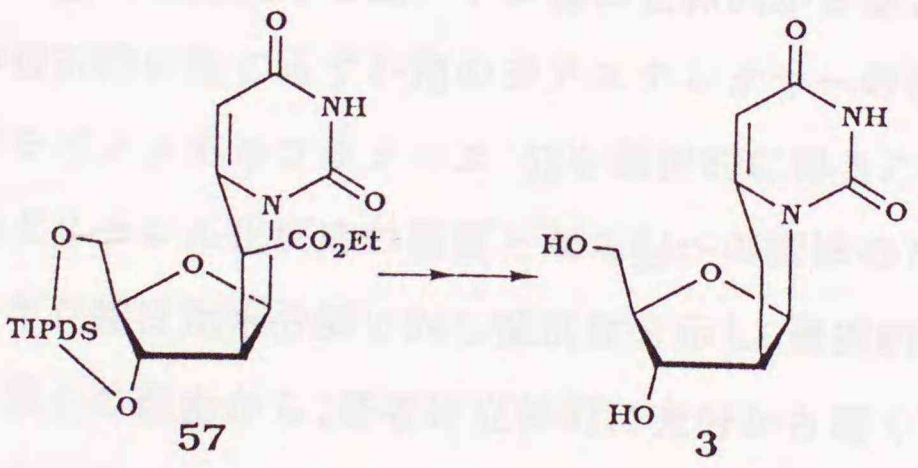
第3章 2'-デオキシ-6,2'-メタノピリミジンヌクレオシドの合成[33]

第1節 合成計画

第2章で述べたようにTMSメチルピリミジン 43のPetersonオレフィン化反応を用いた6,6'-シクロヌクレオシドの合成に成功した。このTMSメチルピリミジン43が他のシクロヌクレオシド合成の場合も有用なシントンとなるのではないかと考え2'-デオキシ-6,2'-メタノピリミジンヌクレオシドの合成への応用を検討することにした。

目的化合物の一つである2'-デオキシ-6,2'-メタノウリジン (3)は既に佐野によって2'-エトキシカルボニルメチリデン体 55を還元することにより得られる2'-分枝糖ヌクレオシド 56の分子内マイケル反応による合成が報告されている[34]。
(scheme 19)



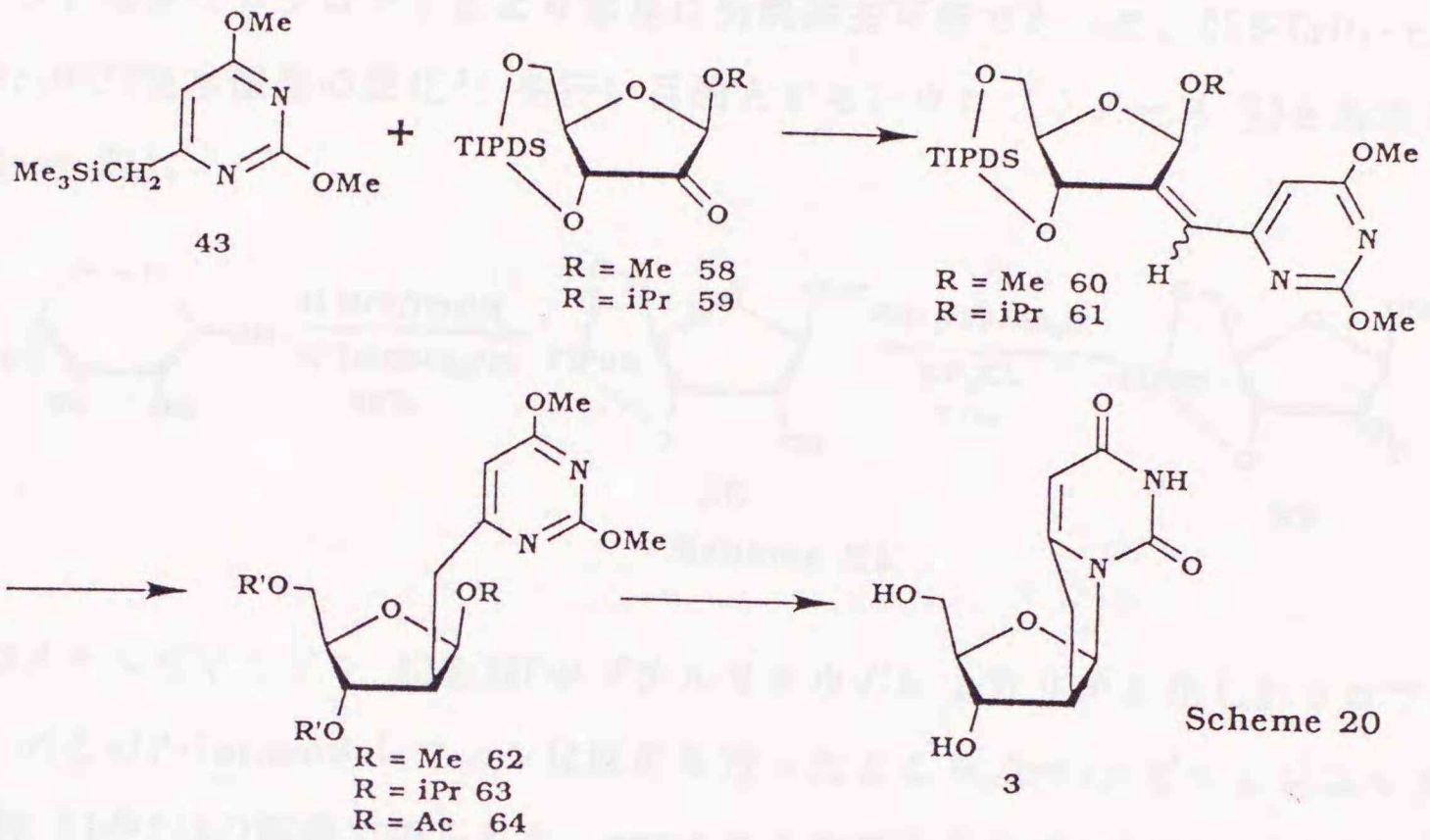


Scheme 19

しかしこの方法では57の脱炭酸の収率が32%と低いという問題点が残されている。またこの方法ではシチジン誘導体あるいは4-チオウリジン誘導体を合成する場合、

最終生成物であるウリジン誘導体 3より変換しなければならず先に述べた4-メトキシ体を共通中間体として変換するほうが有利であると考えられた。

scheme 20に合成計画を示すがTMSメチルピリミジン 43と2-ウロースとのPeterson-sonオレフィン化反応により2-exoメチリデン体を得、この2-exoメチリデン体を立体選択的に還元し2-デオキシピリミジニルメチルアラビノース体を合成し分子内グリコシル化反応で目的とするC-シクロヌクレオシドが得られるものと考えた。



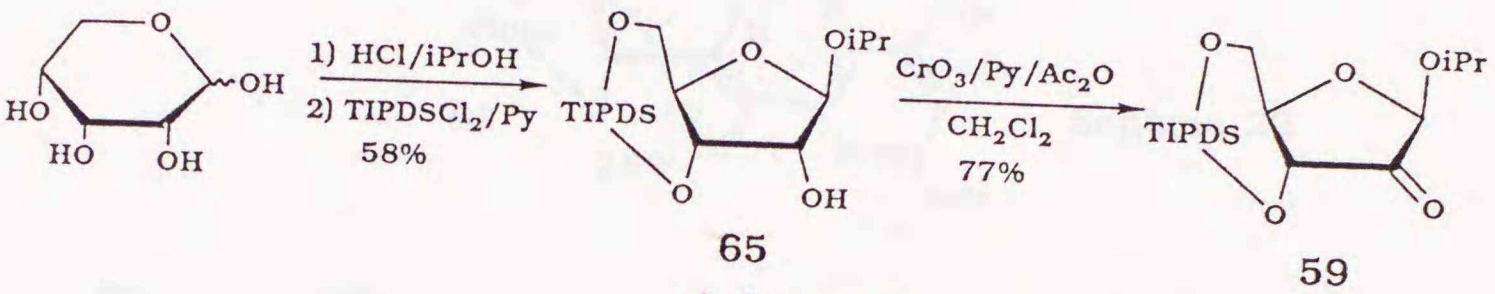
Scheme 20

当初合成が容易である1-メチル体 58を用い合成を検討した。しかし、58には分離困難な少量のα-メチル体が含まれており混合物として処理しなければならないこと、また60の還元反応の際メチル基の立体的かさ高さが十分でないため、水素付加が立体選択的に起こらず4-種のジアステレオマーの混合物となってしまい、目的とするアラビノメチルフラノース 62を選択的に得ることができなかった。更に62は、分子内グリコシル化反応の基質となる64への変換のため1位の脱保護を検討したが1位メトキシ基は加水分解に対し抵抗性を示し、選択的脱保護を行うことはできなかった。

以上の理由から、著者は立体的に充分かさ高くしかも容易に脱保護可能な1位置換基としてイソプロピル基を選択し合成を行うこととした。第2節でその合成に関して述べることにする。

第2節 2'-デオキシ-6,2'-メタノピリミジンヌクレオシドの合成

Petersonオレフィン化反応の基質となる2-ウロフラノース 59はD-リボースより合成することとした。市販のD-リボースを1%塩酸存在下イソプロパノール中室温で2時間処理しβ-イソプロピルリボシドとし、引き続きTIPDS保護を行い3,5-TIPDS-β-イソプロピルリボフラノシド 65を58%の収率で得た。この際少量副生するα-リボフラノシドはカラムクロマトにより容易に分離除去可能であった。65をCrO_3・ピリジン・Ac_2Oで2位水酸基の酸化[21] を行い目的とする2-ウロフラノース 59を合成した(scheme 21)。

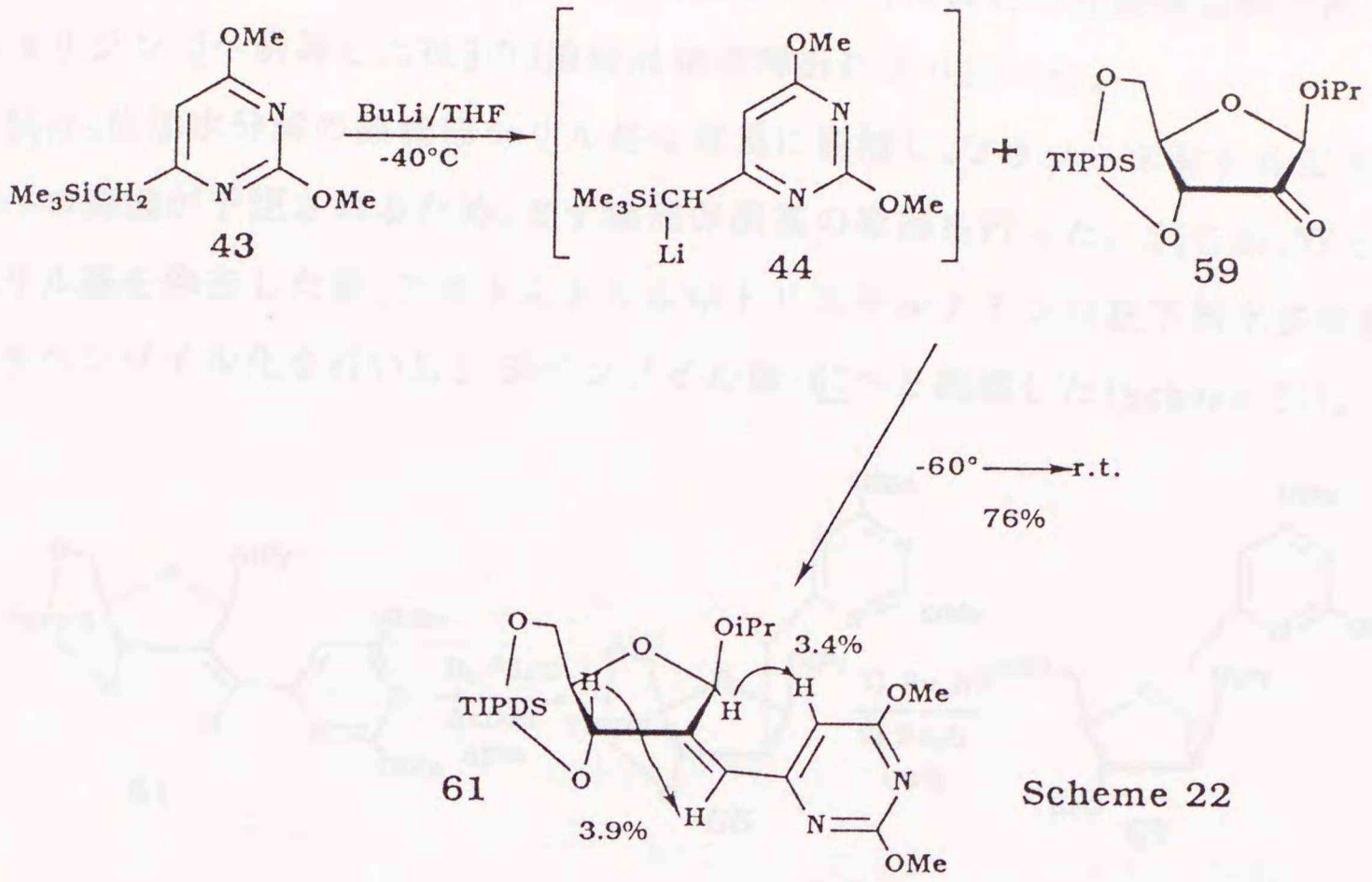


65 59

Scheme 21

TMSメチルピリミジン 43をTHF中ブチルリチウムによりリチオ化し2-ウロフラノース 59とのPetersonオレフィン化反応を行ったところ、2-exo-ピリミジニルメチリデン体 61が76%の収率で得られた。pmrよりこのアルキリデン体が単一の幾何異性体であり、オレフィンプロトンと3位プロトンとの間に3.9%、また1位プロトンとピリミジン環5位プロトンとの間に3.4%とそれぞれNOEが認められたことから61は(Z)-体であると決定した(scheme 22)。

(Z)-体のみが選択的に得られてきたことに関してはつぎのように考えている。即ちこのPetersonオレフィン化反応において考えられる中間体は全部で4通り存在する。このうちカルボニル平面に関しては、求核攻撃が1位のイソプロピル基の立体障害によりα側からの攻撃が優先すると考えられるためFig. 8に示す2つの中間体を経由して反応が進行するものと思われる。これら2つの中間体を比較した場合、threo体ではフラノース環上の3位置換基とピリミジン環との間で立体反発が考えられerythro体の方が有利であると考えられる。従ってerythro体からsyn脱離により得られる(Z)-体のみが優先して生成したものと推定される。



Scheme 22

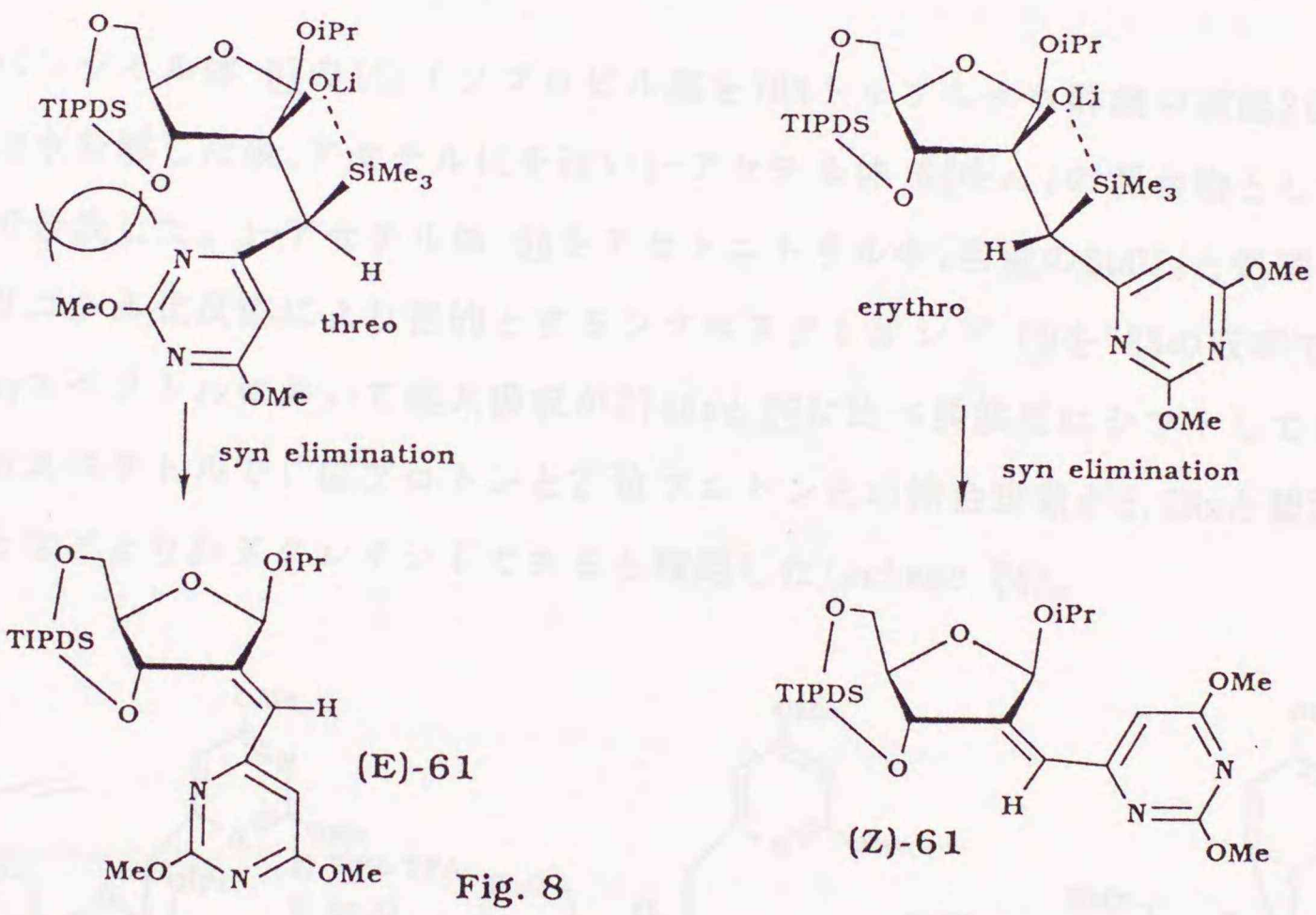
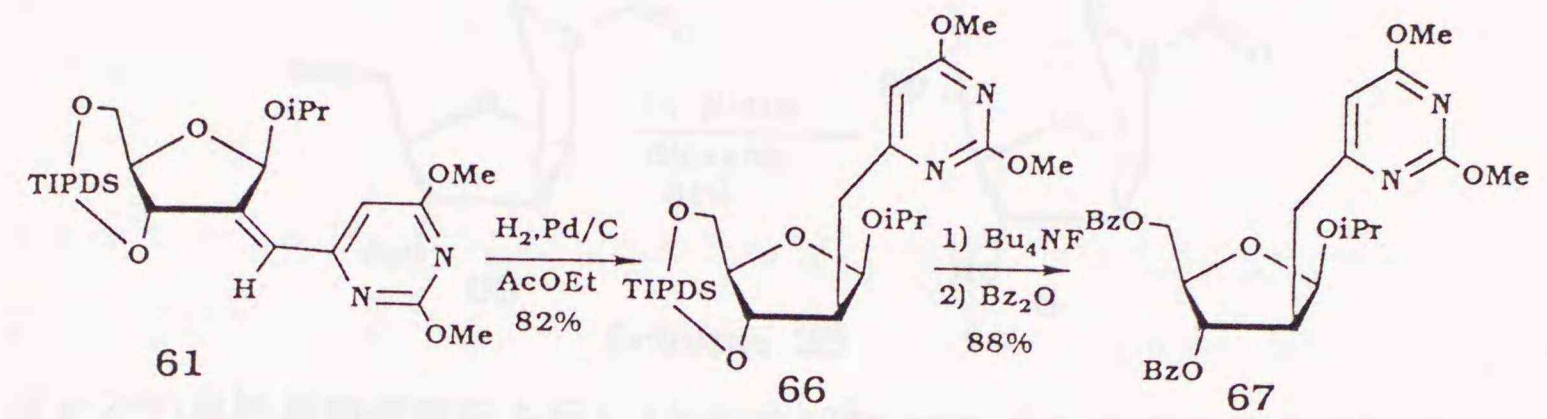


Fig. 8

exo-アルキリデン体 61は、酢酸エチル中パラジウム炭素存在下常圧接触還元を行い2-ピリミジニルメチル体 66へ82%の収率で誘導した。この反応は当初期待したとおり水素付加は1位イソプロピル基の立体障害によりα側から優先的に起こりアラビノ体とリボ体の生成比は約9:1であり、目的とするアラビノ体を主生成物として得る

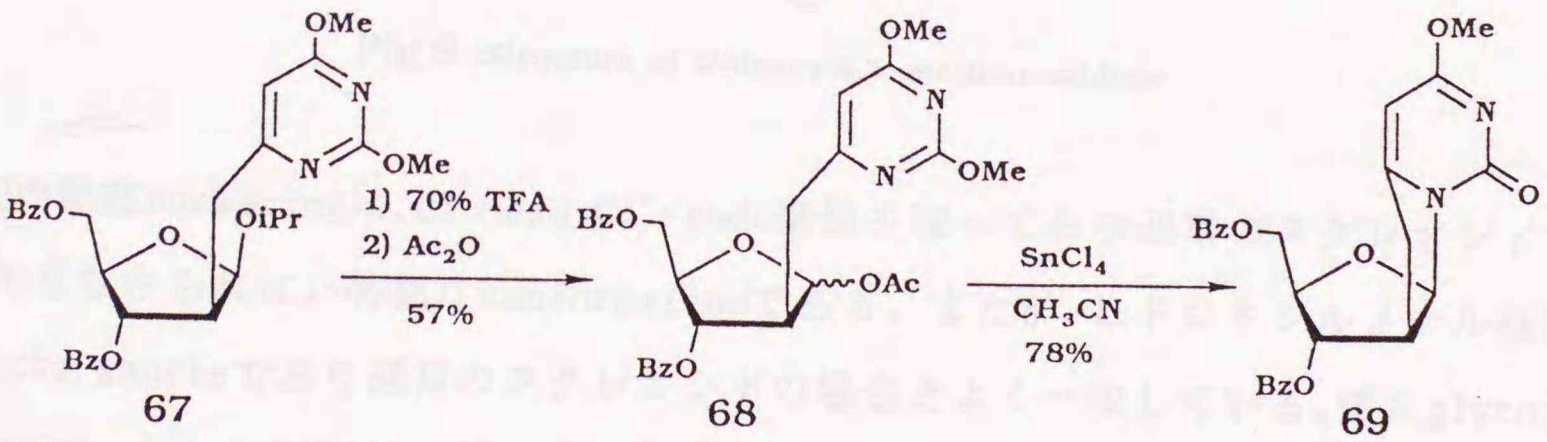
ことができた。なお2位不斉炭素の絶対配置の決定は後述の最終生成物であるシクロウリジン 3へ誘導した後3のX線結晶構造解析により行った。

66は1位加水分解の際糖部シリル基は容易に脱離し、フラノース体からピラノース体への変換が予想されるため、まず糖部保護基の変換を行った。66をBu_4NFと処理しシリル基を除去した後、アセトニトリル中トリエチルアミン存在下無水安息香酸によりベンゾイル化を行い3,5-ジベンゾイル体 67へと誘導した(scheme 23)。



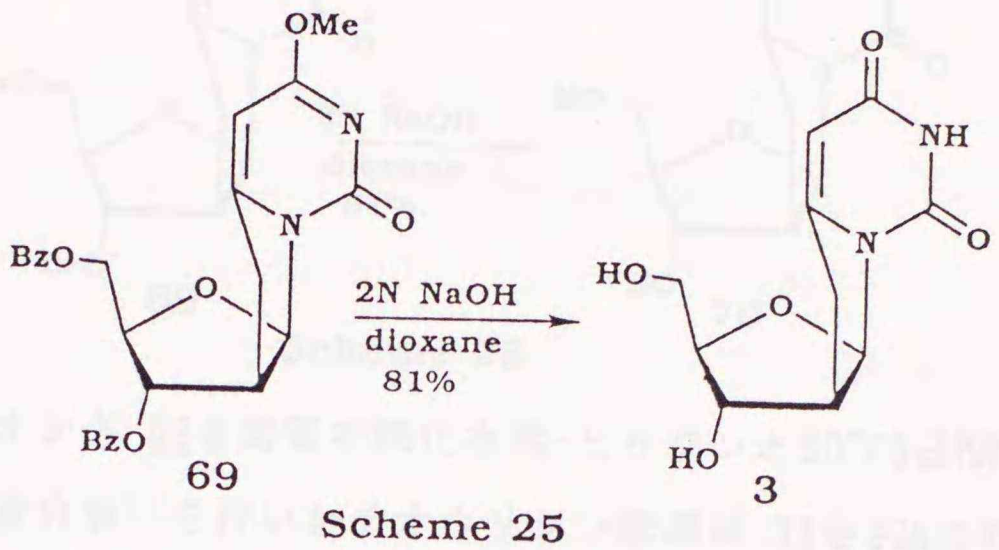
Scheme 23

ジベンゾイル体 67の1位イソプロピル基を70%トリフルオロ酢酸中室温3日間処理して加水分解した後、アセチル化を行い1-アセチル体 68をα,βの混合物として57%の収率で合成した。1-アセチル体 68をアセトニトリル中1当量の$SnCl_4$と処理し分子内グリコシル化反応により目的とするシクロヌクレオシド 69を78%の収率で得た。69はuvスペクトルにおいて極大吸収が274nmと66に比べ長波長にシフトしていること、pmrスペクトルで1'位プロトンと2'位プロトンとの結合定数が6.2Hzと観測されたことなどよりβ-ヌクレオシドであると確認した(scheme 24)。



Scheme 24

シクロヌクレオシド 69をジオキサン中水酸化ナトリウムと処理し、糖部ベンゾイル基と4位メトキシ基の加水分解を行い81%の収率で2'-デオキシ-6,2'-メタノウリジン(3)を得た。このシクロウリジン 3は先に佐野が合成したもの[34]と各種機器データが完全に一致した(scheme 25)。



Scheme 25

また3のX線結晶構造解析を行い3が先に69のpmrスペクトルの結合定数より推定したとおりβ-ヌクレオシドであることを確認した。Fig. 9にX線結晶構造解析の結果を示す。

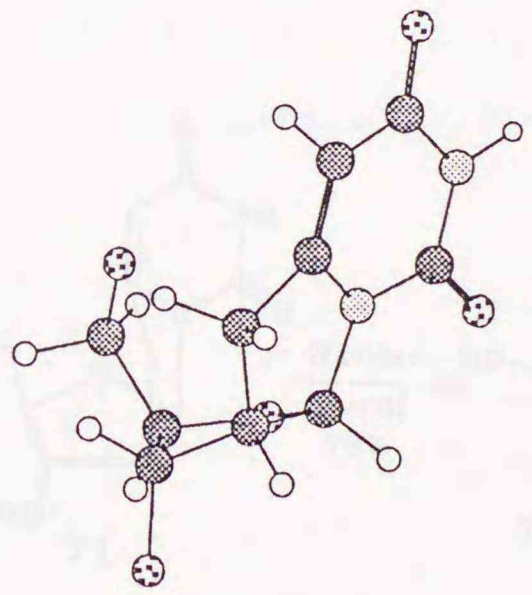
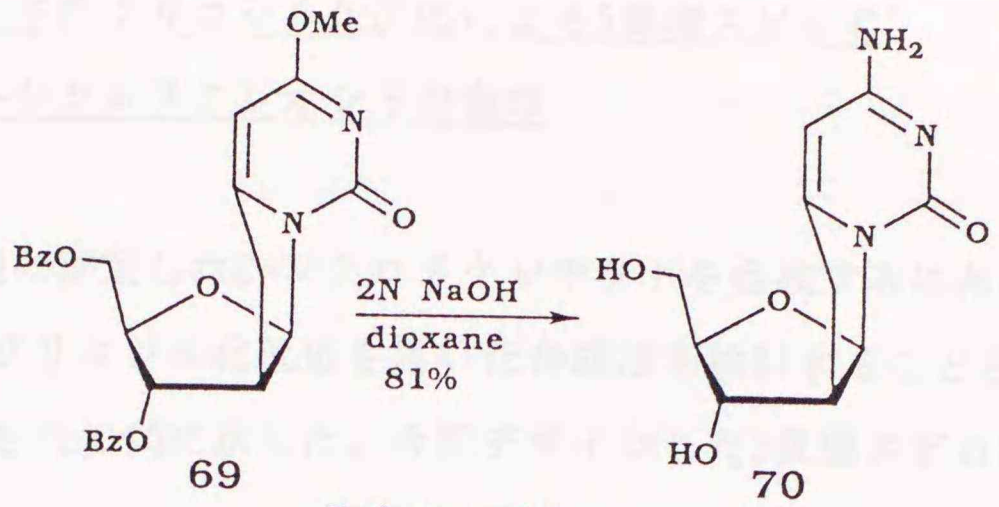


Fig.9 :Structure of 2'-deoxy-6,2'-methanouridine

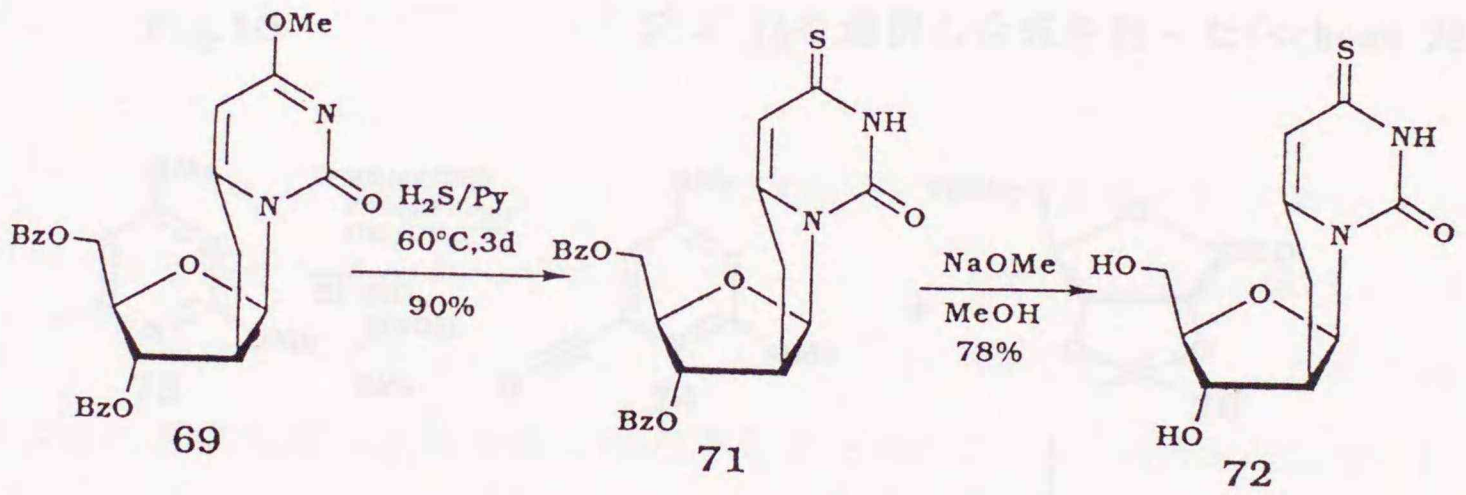
3の糖部puckeringは、C3'-exo-C4'-endo構造を取っており通常のヌクレオシドではあまりみられない特異なconformationである。また5'-ヒドロキシルメチル基はgauche-gaucheであり通常のヌクレオシドの場合とよく一致している。更にglycosyl torsion angle(χ)は111.03°でありこのシクロヌクレオシドはグリコシル結合回りのconformationがhigh-anti領域に固定されたモデル化合物である。

シクロヌクレオシド 69を封管中メタノール性アンモニアと処理し2'-デオキシ-6,2'-メタノシチジン (70)を70%の収率で合成した(scheme 26)。



Scheme 26

シクロヌクレオシド 69を封管中硫化水素-ピリジンと60°C3日間処理し4位メトキシ基の加硫化水素分解[22]を行い4-チオウリジン誘導体 71を90%の収率で得た。71の構造はuvスペクトルにおいて極大吸収が331nmにシフトしていることなど各種機器分析により確認した。71の糖部ベンゾイル基をナトリウムメトキシドにより脱保護し、目的とする2'-デオキシ-6,2'-メタノ-4-チオウリジン72を78%の収率で合成した(scheme 27)。



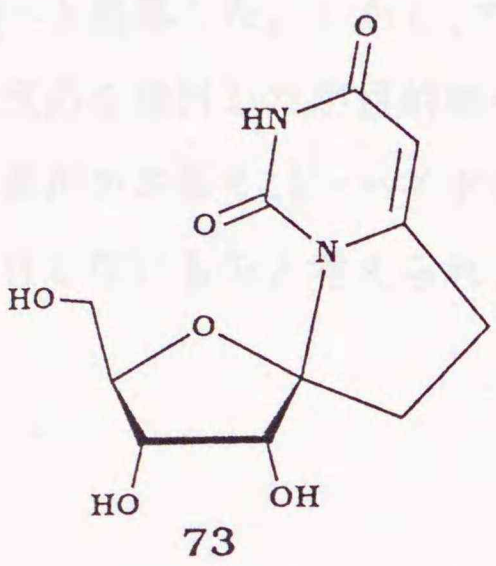
Scheme 27

以上TMSメチルピリミジン 43をシクロヌクレオシド シントンとし、Petersonオレフィン化反応、引き続く還元反応による2'-デオキシ-6,2'-メタノピリミジンヌクレオシドの立体選択的合成に成功した。

第4章 Syn型に固定した6,1'-プロパノピリミジンヌクレオシドの合成

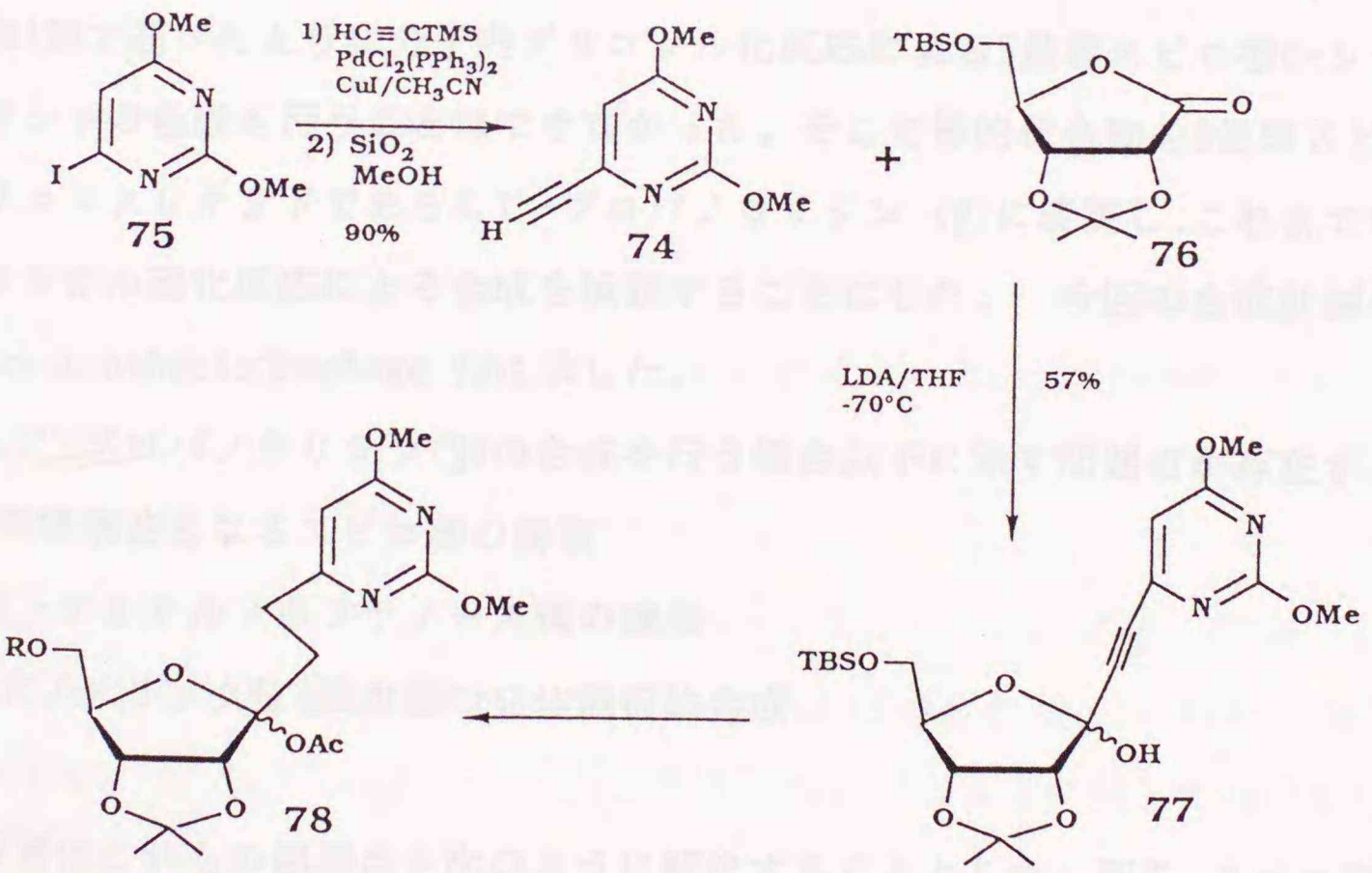
第1節 分子内グリコシル化反応による5員環スピロ型C-シクロヌクレオシドの合成

著者はsyn型に固定したC-シクロヌクレオシドを合成するにあたりこれまでの経緯から分子内グリコシル化反応を用いた合成法を検討することとした。今回選択した標的化合物をFig.10に示した。今回デザインした5員環スピロ構造を有する6,1'-エタノウリジン (73)は架橋構造としてtwo carbon unitを含んでいるため6-メチルピリミジンをシントンとして用いることはできない。そのためピリミジンの6位にtwo carbon unitを有し、かつ末端にcarbanionを発生できる官能基を有するシントンの開発が必要となってくる。著者はこのような条件を満たすシントンとして6-エチニルピリミジン 74を選択し合成を行った(scheme 28)。



73

Fig.10



Scheme 28

文献既知の6-ヨードピリミジン[35] 75をパラジウム触媒存在下TMSアセチレンとのクロスカップリング[36]を行い、更にTMS基を除去し2,4-ジメトキシ-6-エチニルピリミジン（74)を90%の収率で合成した。6-エチニル体 74をTHF中-70°CでLDAと処理しリチオ化を行った後、5-TBS-リボノラクトン[37] 76と縮合しラクトール体 77を57%の収率で合成した。このとき1'位の立体に関しては単一のジアステレオマーのみであることがpmrスペクトルより判明した。おそらく2,3-イソプロピリデン基の立体障害によりβ体であると推定されるが、立体配置の決定には至っていない。ラクトール体77の3重結合部分を接触還元により還元し、更にアセチル化をへて1-アセチル体78へと誘導した。しかし、アセチル体 78の種々のルイス酸による分子内グリコシル化反応を検討したが目的物を得ることはできなかった。これはおそらく2位メトキシ基がかさ高く、5'-ハイドロキシメチル基と立体反発し分子内グリコシル化反応が進行しないものと考えられ、この方法による合成は断念した。

第2節　6,1'-プロパノウリジンの合成

第1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を行うことはできなかった。そこで標的化合物を6員環スピロ型C-シクロヌクレオシドである6,1'-プロパノウリジン（8)に変更し、これまでの例に習いラジカル環化反応による合成を検討することにした。　今回の合成計画をretro-synthesisでscheme 29に示した。

6,1'-プロパノウリジン(8)の合成を行う場合以下に示す問題点が存在する。

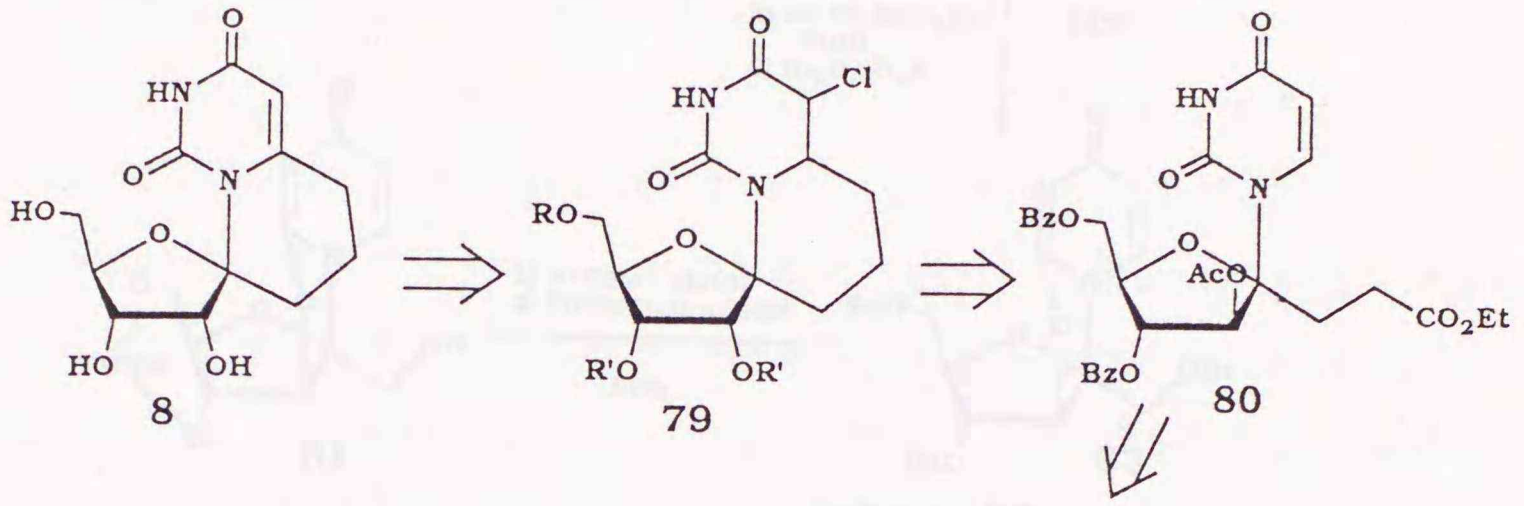
1) 架橋構造となるスピロ環の構築

2) 1'-アルキルリボフラノース環の構築

3) アノメリック位4級炭素の立体選択的合成

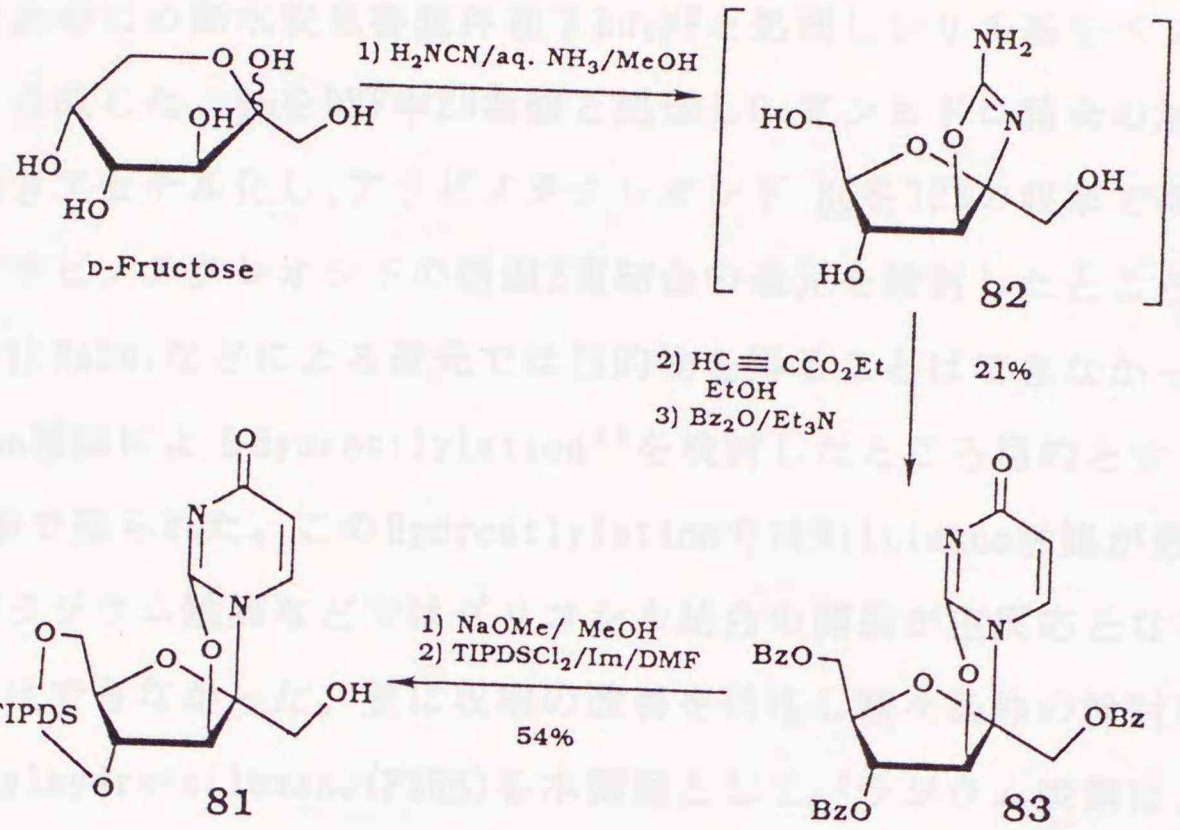
著者はこれらの問題点を次のように解決することとした。即ち、スピロ環の構築

については最後にラジカル環化により行い、糖部1'-アルキル置換リボフラノース体はD-fructoseより誘導し、合成の途中で2'位水酸基の立体の反転、81の1級水酸基の酸化、Wittig反応による炭素鎖の導入により構築することとした。また最後のアノメリック位4級炭素の立体選択的構築であるが、これは既にHolyによって3-deoxy-psicofuranosyluracilの合成の中で解決されており[38]、更に立岡らはこの方法を応用し81の合成を報告している[39]。以上の計画に従い著者は6,1'-プロパノウリジン(8)の合成を行うことにした。



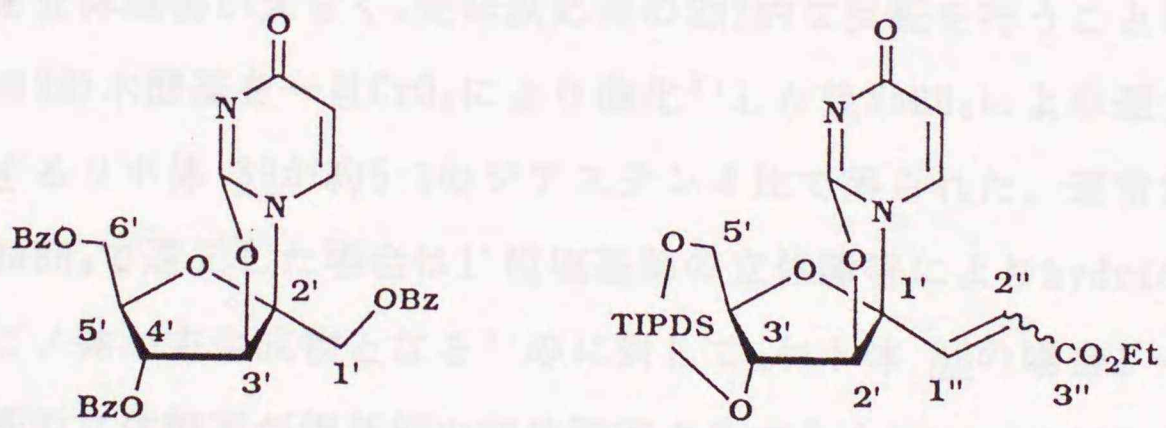
Scheme 29

まず原料となる81の合成はHolyの報告[38]に従い市販のD-fructoseをcyanamideと処理し3位水酸基の立体を利用しアミノオキサゾリン体 82を立体選択的に合成し、82は単離することなく更にEthyl propiolateによる環化、ベンゾイル化を経てO-シクロ体 83に導いた。O-シクロ体 83はナトリウムメトキシドによりベンゾイル基を脱保護した後、立岡らの方法[39]に従いDMF中-30°Cにおいてimidazole存在下1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxaneと処理し4',6'-TIPDS体 81を54%の収率で合成した。しかしこのシリル化反応は残念ながら収率に関しては再現性の乏しいものであった(scheme 30)。



Scheme 30

注）これらヌクレオシドのnumberingは81、84に関しては慣例に従い左下記の通りとし、炭素鎖導入以降はシクロヌクレオシドの例に従い右下記の通りとした。なお塩基部のnumberingに関してはピリミジンヌクレオシドの例と同じである。



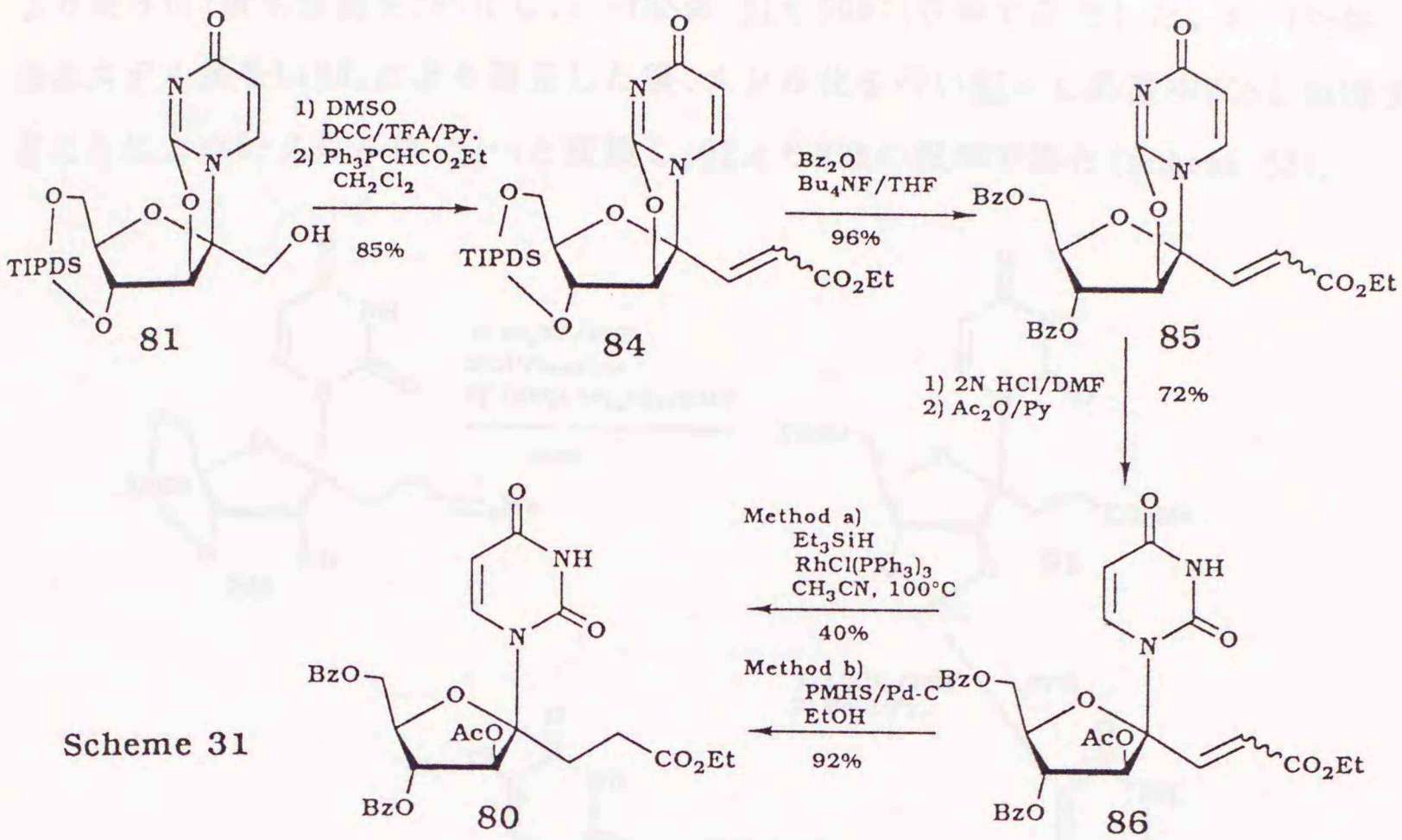
O-アンヒドロ体 81をMoffatt酸化[39,40]に付し1'位水酸基を酸化した後Ethoxy-carbonylmethyltriphenylphosphoraneとのWittig反応により炭素鎖の導入を行いオレフィン体 84をE,Zの混合物として85%の収率で得た。このオレフィン体を次の加水分解反応のため無水安息香酸存在下Bu_4NFと処理しシリル基をベンゾイル基に変換し85を合成した。85をDMF中2N塩酸と処理しO-アンヒドロ結合の加水分解[41]を行い引き続きアセチル化し、アラビノヌクレオシド 86を72%の収率で得た。

このアラビノヌクレオシドの側鎖2重結合の還元を検討したところ、通常の接触還元あるいは$NaBH_4$などによる還元では目的物を得ることはできなかった。 そこでWilkinson触媒によるHydrosilylation[42]を検討したところ目的とする還元体 80が40%の収率で得られた。このHydrosilylationではWilkinson触媒が最も効率が良く、例えばパラジウム触媒などではグリコシル結合の開裂が主反応となり全く目的物を得ることはできなかった。更に収率の改善を目指し種々条件の検討を行ったところpolymethylhydro-siloxane(PMHS)を水素源としてパラジウム炭素による水素転移接触還元[43]により86が容易に還元されることを見いだした。即ち、EtOH中パラジウム炭素触媒存在下PMHSと60°Cで処理し還元体 80に92%の収率で変換することに成功した。この場合水素源としてはPMHSが最も効率が良く、cyclohexeneを用いた場合はグリコシル結合の開裂が副反応として起こり著しく目的物の収率を低下させた。
(scheme 31)

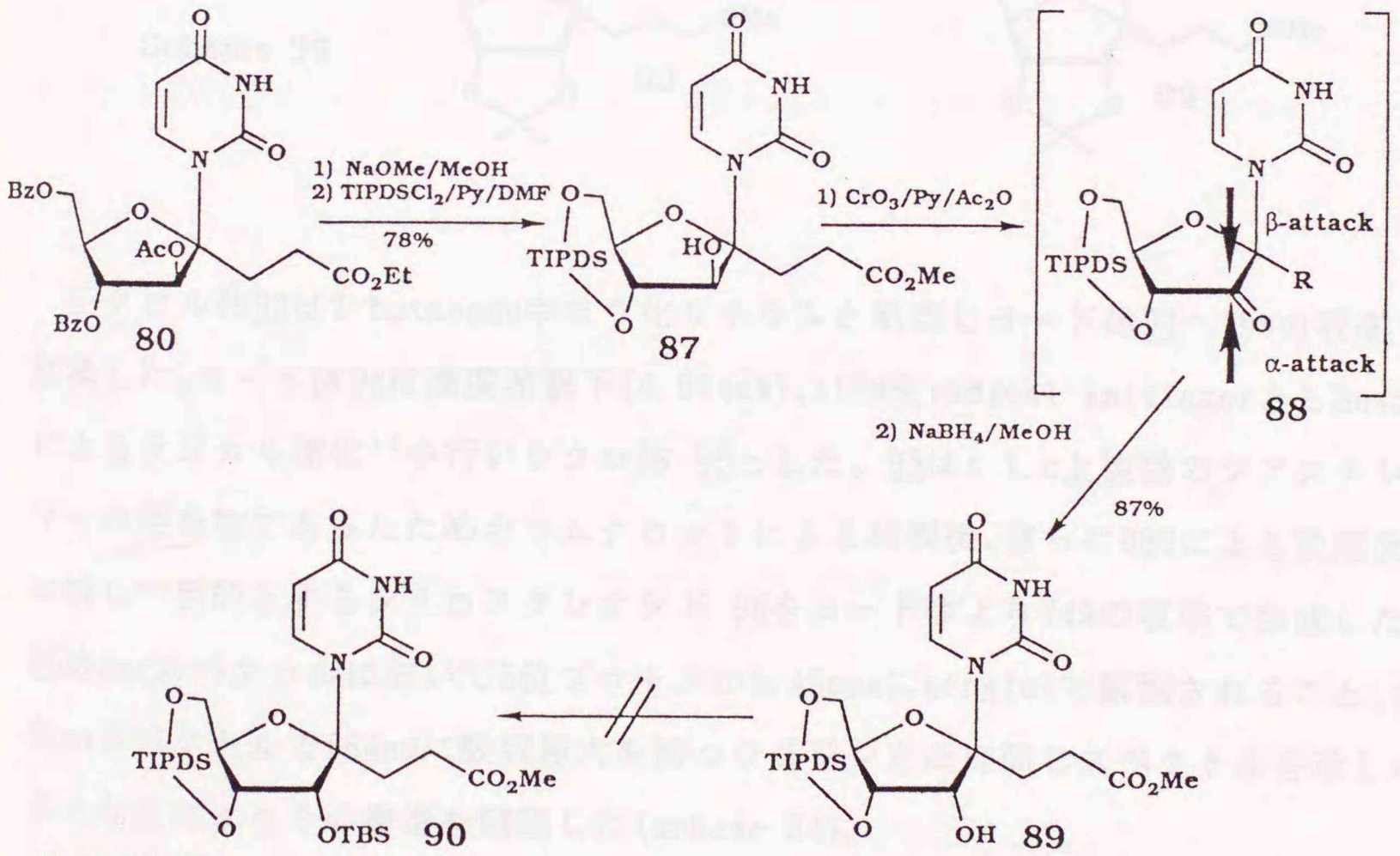
80は次に2'位の立体の反転を行うため、アシル基をナトリウムメトキシドにより脱保護した後再びTIPDS保護を行い、3',5'-TIPDS体 87へ変換した。しかし、87は2'位における立体障害が大きく、光延反応等のSN2的な反転を行うことはできなかった。そこでこの2級水酸基を一旦CrO_3により酸化[21]した後$NaBH_4$により還元を行ったところ目的とするリボ体 89が約5:1のジアステレオ比で得られた。通常2'-ケトヌクレオシドを$NaBH_4$で還元した場合は1'位塩基部の立体障害によりhydrideはα側から攻撃しアラビノ体が主生成物となる[21]のに対して、ケト体 88の場合1'-アルキル基と3'位置換基の立体障害が塩基部の立体障害より大きくβ-attackが主となり目的とするリボ体 89が主生成物になったものと考えられる。

89は次の還元反応のため2'位への保護基の導入が必要である。著者はTBS基で保護

することを試みたが、TBSCl, diisopropylethylamineあるいはTBSOTf, collidineなどの条件においても2'-シリル体を得ることはできなかった(scheme 32)。

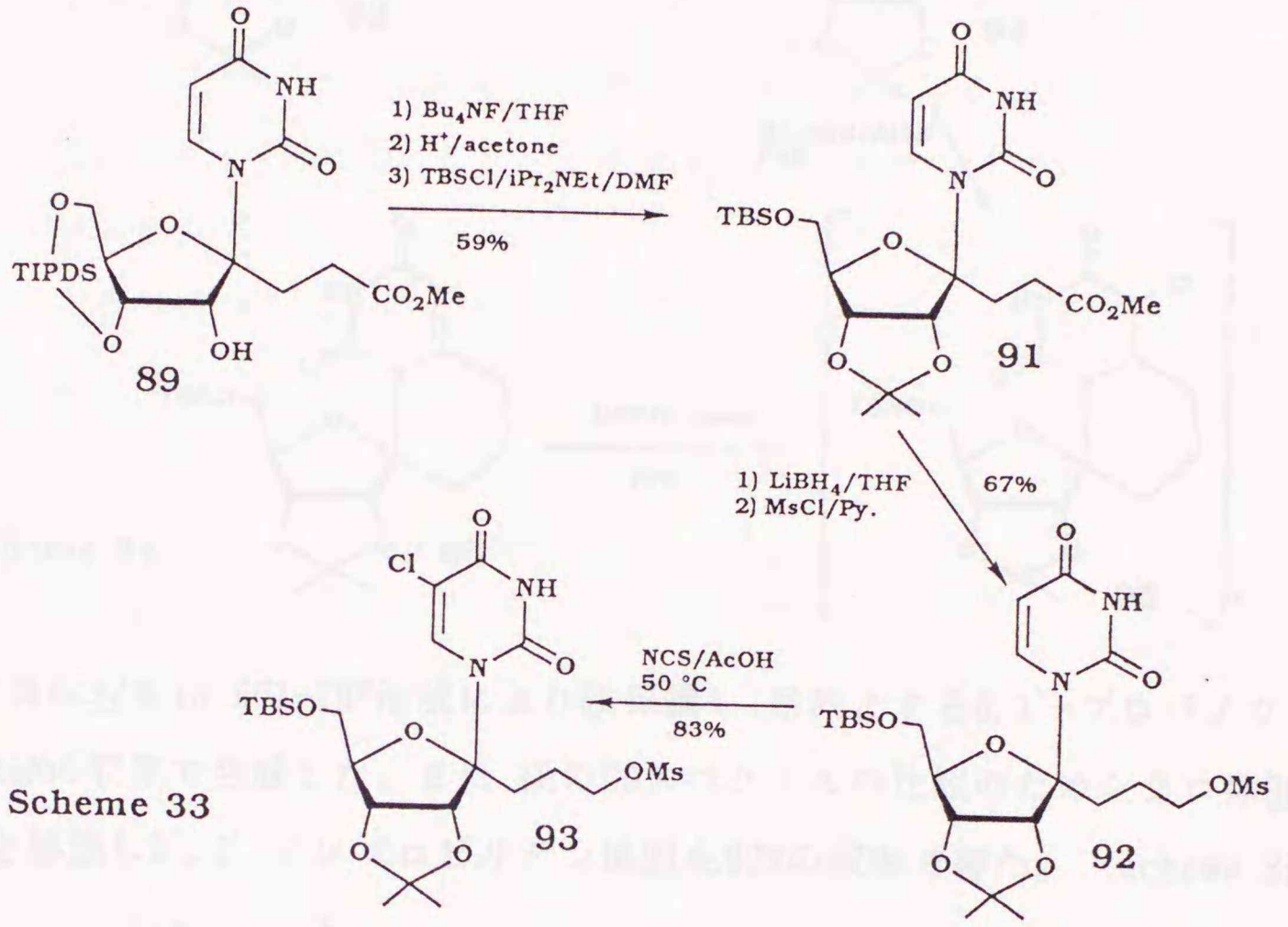


Scheme 31



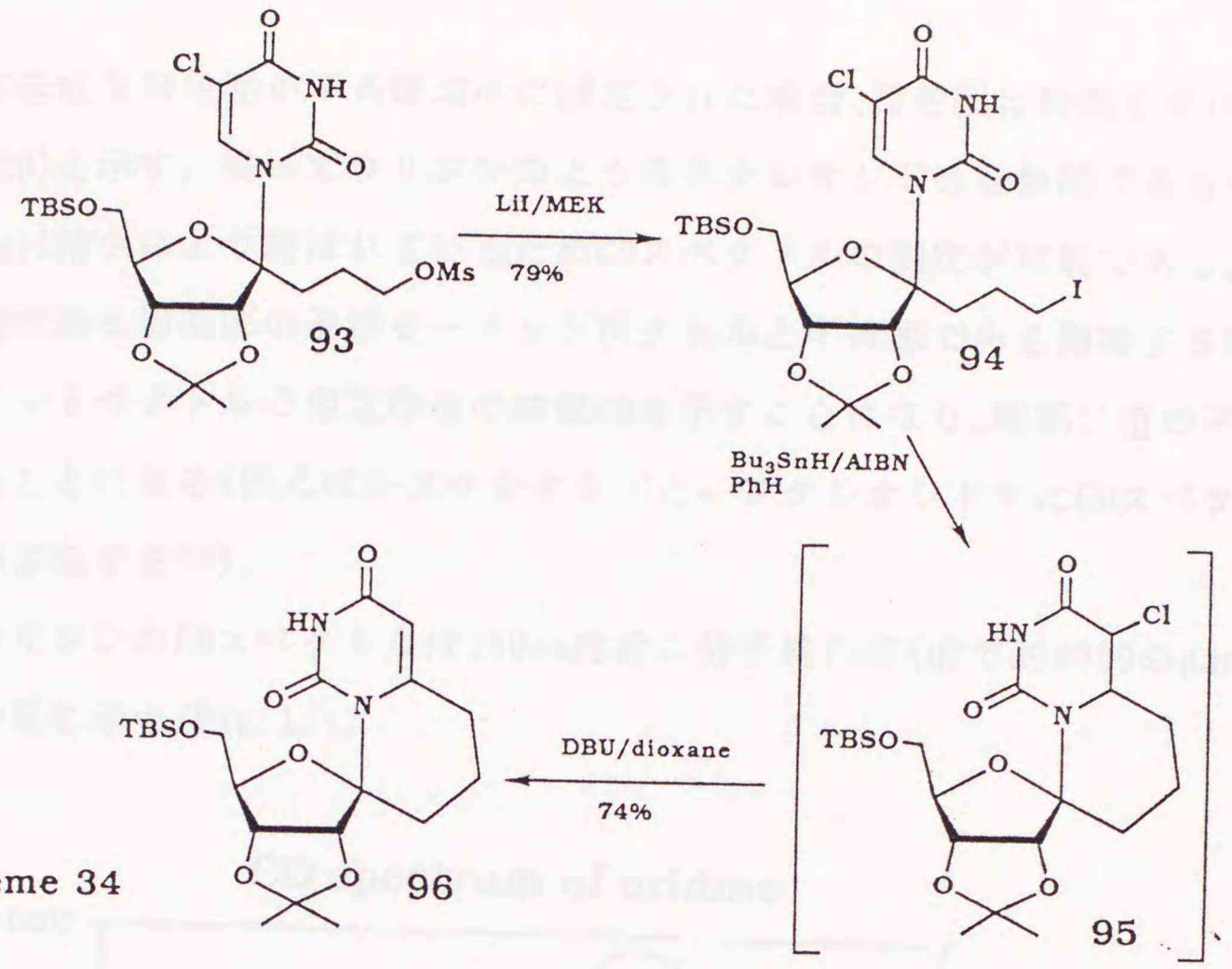
Scheme 32

このため89は一旦Bu_4NFにより脱保護した後、酸触媒存在下アセトンと処理しシスジオール部をイソプロピリデン化し、更に DMF中 diisopropylethylamine, TBSClにより残った1級水酸基をTBS化し、5'-TBS体 91を59%の収率で合成した。5'-TBS体 91のエステル基を$LiBH_4$により還元した後、メシル化を行い92とし酢酸中NCSと処理することにより5-クロル体 93へと変換し、92より83%の収率で得た(scheme 33)。



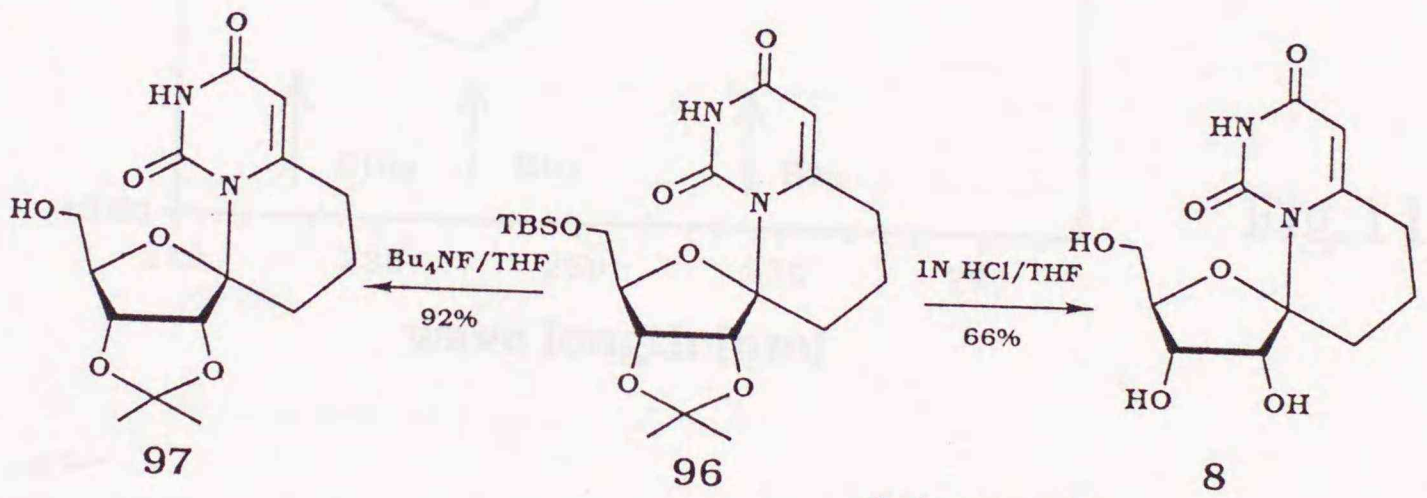
Scheme 33

5-クロル体93は2-butanone中ヨウ化リチウムと処理しヨード体94へ79%の収率で変換した。ヨード体94は高度希釈下(0.004mM)、AIBNをradical initiatorとしBu_3SnHによるラジカル環化[16]を行いシクロ体 95とした。95はt.l.c上複数のジアステレオマーの混合物であったためカラムクロマトによる精製後、直ちにDBUによる脱離反応に付し[44]目的とするシクロヌクレオシド 96をヨード体より74%の収率で合成した。96はpmrスペクトルにおいて5位プロトンが5.45ppmにsingletで観測されること、またuvスペクトルで264nmに吸収極大を持つウリジンとほぼ同じスペクトルを示したことなどによりその構造を確認した(scheme 34)。



Scheme 34

シクロ体96を1N HCl-THF溶液により脱保護し、目的とする6,1'-プロパノウリジン(8)を66%の収率で合成した。また、後のCDスペクトルの比較のためシクロ体96をBu_4NFと処理し2',3'-イソプロピリデン体97を92%の収率で得た。(scheme 35)



Scheme 35

以上これまで用いた分子内グリコシル化反応による6,1'-エタノピリミジンヌクレオシドの合成は行えなかったが、D-fructoseを出発原料としラジカル環化反応を用いる方法によって6,1'-プロパノウリジンの合成に成功した。

第5章　C-シクロピリミジンヌクレオシドのCDスペクトル[45]

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偏光二色性(CD)を示す。従ってウリジンのようなヌクレオシドは発色団である塩基が糖とglycosyl結合により結ばれているためCDスペクトルの測定が可能である。この場合発色団である塩基部の遷移モーメントベクトルと不斉源である隣接する糖部の遷移モーメントベクトルの相互作用の結果CDを示すことになり、糖部1'位の不斉が反映されることになる(例えばβ-ヌクレオシドとα-ヌクレオシドではCDスペクトルのサインが逆転する[46])。

通常ウリジンのCDスペクトルは260nm付近に分子楕円率(θ)で約9000のpositiveのCotton効果を示す(Fig.11)。

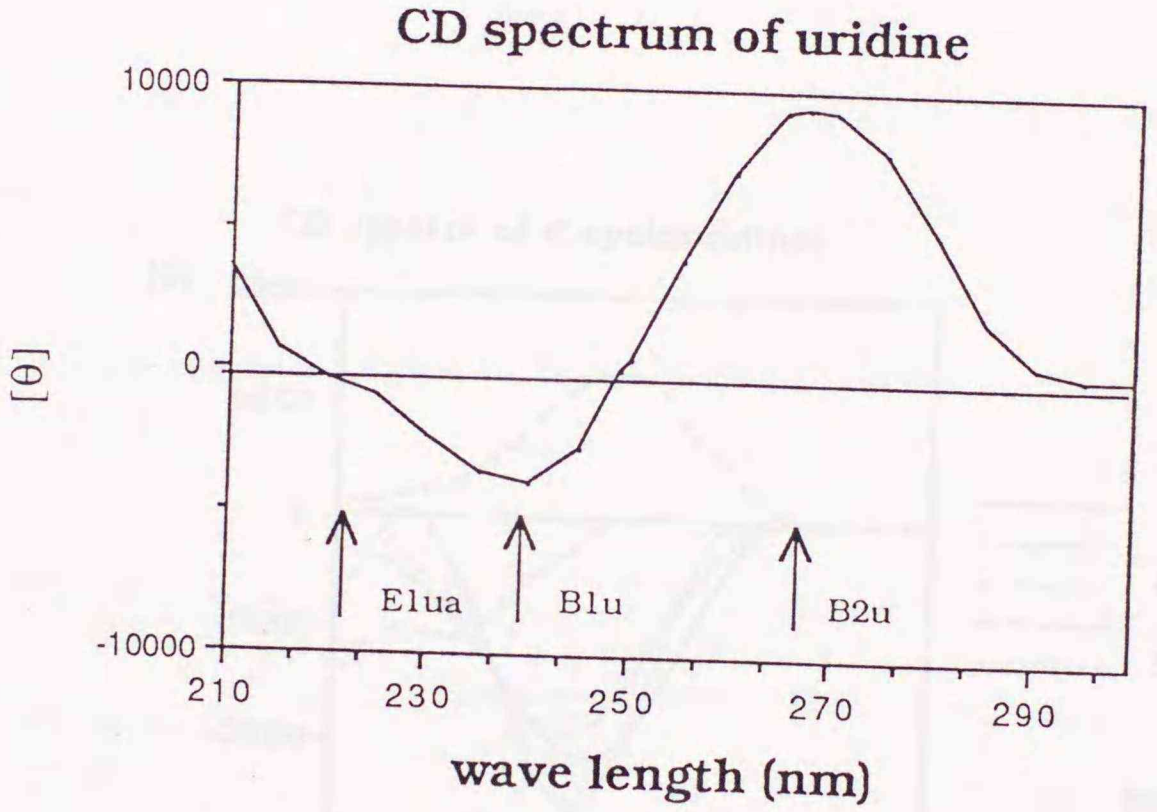


Fig.11

このCotton効果はuv吸収帯でいうB_{2u}吸収帯に由来するものであり、この他に240nm及び220nm付近にそれぞれnegativeのCotton効果を示すが、これはそれぞれB_{1u}吸収帯及びE_{1ua}吸収帯に由来するものである。各吸収帯における遷移モーメントの方向は異なっているため、全ての吸収帯において同じように議論することはできない[47]。以下のCDスペクトルに関して議論を進める場合、ウリジンに関しては全てB_{2u}吸収帯

由来のCotton効果に関するものとする。

ウリジンは発色団である塩基がglycosyl結合によって糖部と結合しているが、glycosyl結合回りのconformationであるglycosyl torsion angleに関しては自由回転が2位カルボニル基と糖部5'置換基との立体障害によりある程度制限を受け、ウリジンは溶液中でanti型をとっていると言われている[2]。しかし、スペクトルに関してはglycosyl結合回りのある程度の自由回転の結果、平均化されたスペクトルがpositiveのCotton効果を示すと解釈されている。

これに対してglycosyl結合を炭素架橋によって固定したC-シクロヌクレオシドでは、そのglycosyl結合回りのconformationに関しては特定のconformationしか取り得ず特徴的なCDスペクトルを示す。Fig.12に今回合成したC-シクロウリジン類と5'-デオキシ-6,5'-シクロウリジン (1)及び2'-デオキシ-6,2'-エタノウリジン (5)のCDスペクトルを、またFig.13に各々の構造を示した。

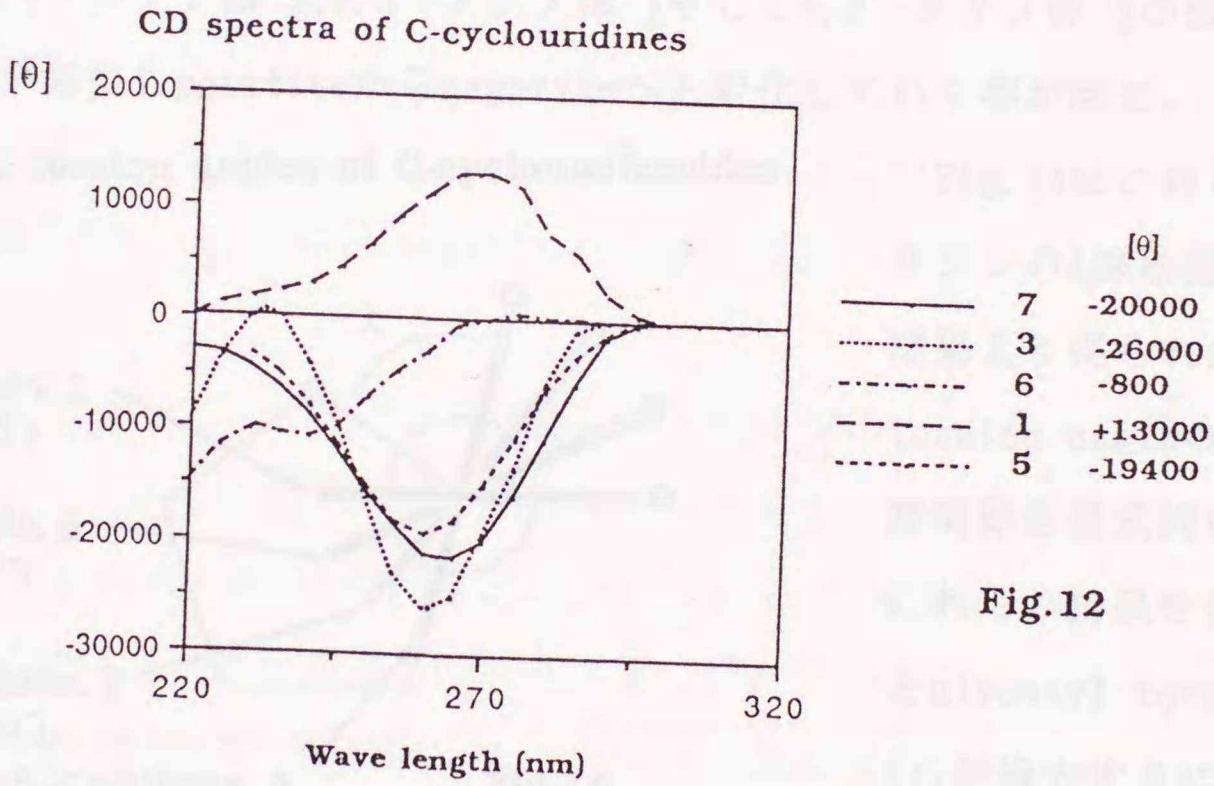
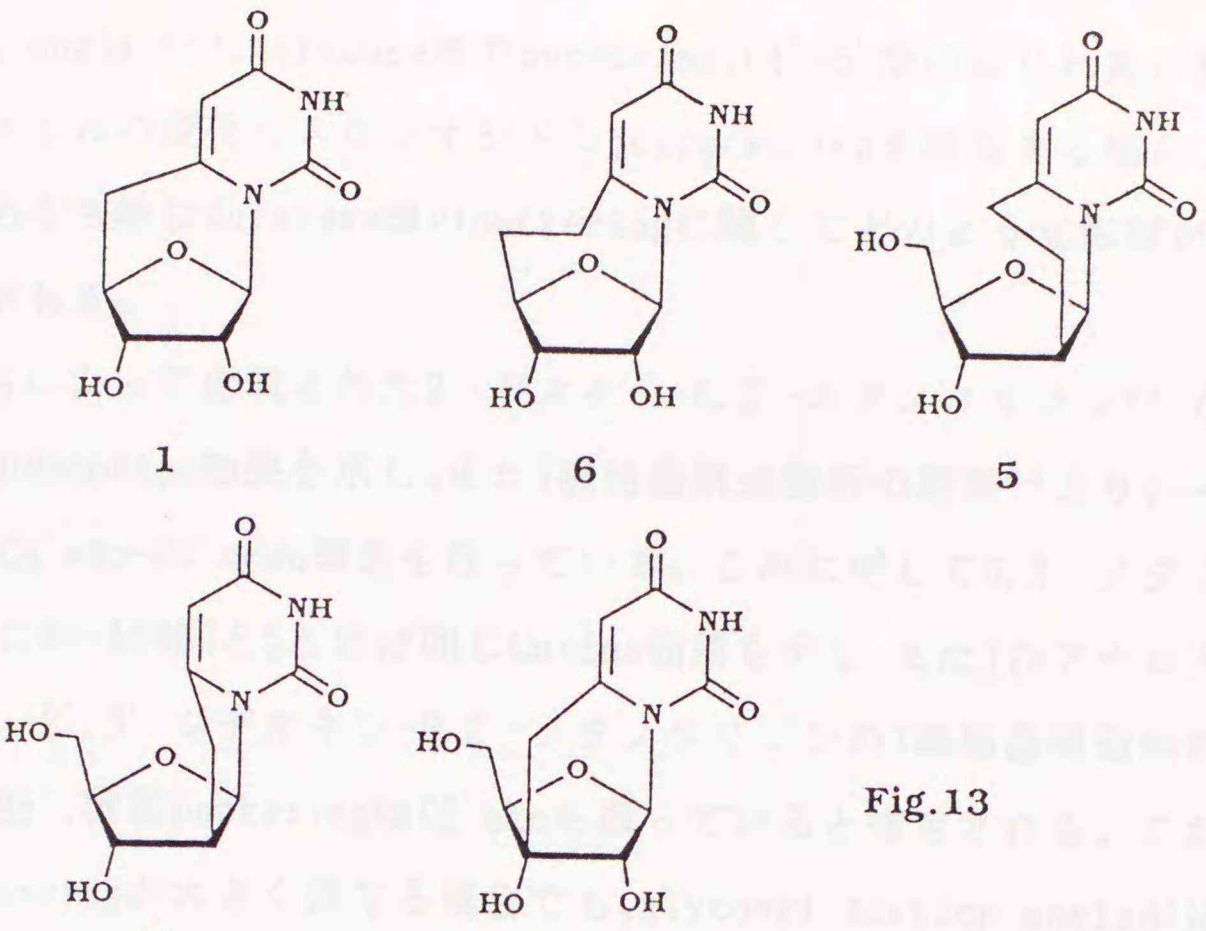


Fig.12



1　　6　　5

3　　7

Fig.13

これらのCDスペクトルより5'-デオキシ-6,5'-シクロ体 1、5'-デオキシ-6,6'-シクロ体 6、6,2'-エタノ体 5、6,3'-メタノ体 7そして6,2'-メタノ体 3の順にCotton効果の強度が減少しpositiveからnegativeへと変化していく事が解る。

Glycosidic torsion angles of C-cyclonucleosides

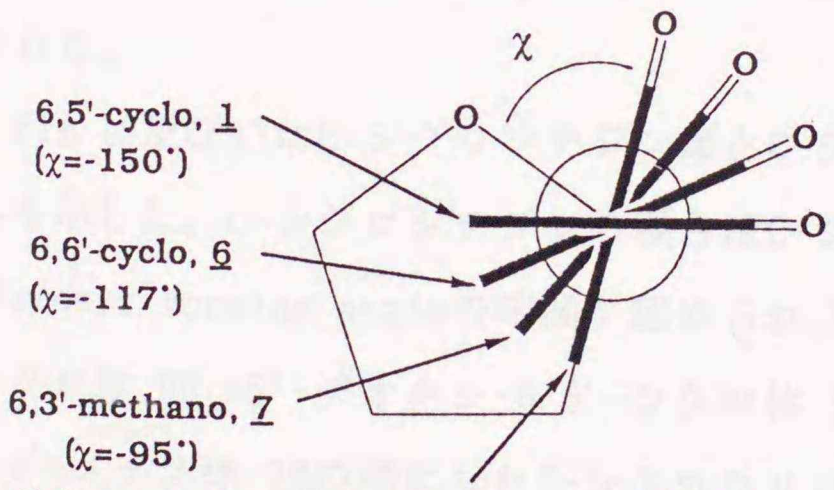


Fig.14

Fig.14にこれらC-シクロウリジンのX線結晶構造解析の結果より得られたglycosyl torsion angleの相対的な位置関係を模式的に示した。これらの結果を併せて考えるとglycosyl torsion angle (χ)が増大するにつれCDのCotton効果がpositiveからnegativeへと変化していると言い換えることができる。このことはCDのCotton効果とglycosyl torsion angleとの間に明らかな相関関係が認められることを示している。

序論でも述べたように、ヌクレオシドのconformationを表現する場合、glycosyl torsion angle (χ), furanose環のpuckering、C4'-5'間のねじれ角が用いられる。CDスペクトルの変化とヌクレオシドのconformationを議論する場合、他の2つのfactorのうち特にfuranose環のpuckeringに関してどのような影響があるのか考える必要がある。

周東らによって合成された2'-デオキシ-6,2'-エタノウリジン[44] (5)は261nmにθ=-20000のCotton効果を示し、またX線結晶構造解析の結果[48]よりχ=-91°、糖部puckeringはC4'exo-O1'endo構造を取っている。これに対して6,3'-メタノウリジン (7)は260nmにθ=-19600と5とほぼ同じCotton効果を示し、また7のアナログである5'-O-アセチル-2',3'-ジデオキシ-6,3'-メタノウリジンのX線結晶構造解析[49]より、7の構造はχ=-95°、糖部puckeringはC2'exoを取っていると推定される。これらの結果より糖部puckeringが大きく異なる場合でも、glycosyl torsion angleがほぼ同じであればCotton効果のサインの方向と強度はほぼ同程度であり、CDスペクトルのCotton効果に対するヌクレオシドのconformationの影響は主にglycosyl結合回りのconformationに依存していると言える。

更に興味深いことに5'-デオキシ-6,6'-シクロウリジン (6)は対応するuvの極大吸収領域に極めて強度の小さなCotton効果しか示さないことからχ=-117°付近にCDのCotton効果がpositiveからnegativeへと変化する境界領域が存在することが示唆された。

Fig.15及び17にC-シクロシチジン類とC-シクロ-4-チオウリジン類のCDスペクトルを示した。C-シクロシチジンの場合はC-シクロウリジンと同様のCotton効果とglycosyl torsion angleの相関が認められ、Cotton効果の強度は5'-デオキシ-6,5'-シクロ体 98 >5'-デオキシ-6,6'-シクロ体 51>6,3'-メタノ体 29>2'-デオキシ-6,2'-メタノ体 70の順になりC-シクロウリジン類の場合同様に5'-デオキシ-6,6'-シクロシチジン (51)の持つglycosyl torsionangle付近でサインがpositiveからnegativeへと変化する角度が存在する。

これに対してC-シクロ-4-チオウリジンの場合、前述の2つの例と若干の相違が認められる。即ち330nm付近におけるCDのCotton効果の強度変化は5'-デオキシ-6,5'-

シクロ体 99>5'-デオキシ-6,6'-シクロ体 53>2'-デオキシ-6,2'-メタノ体 72>6,3'-メタノ体 31の順となっており、先の2つの例でみられた相関がくずれている。

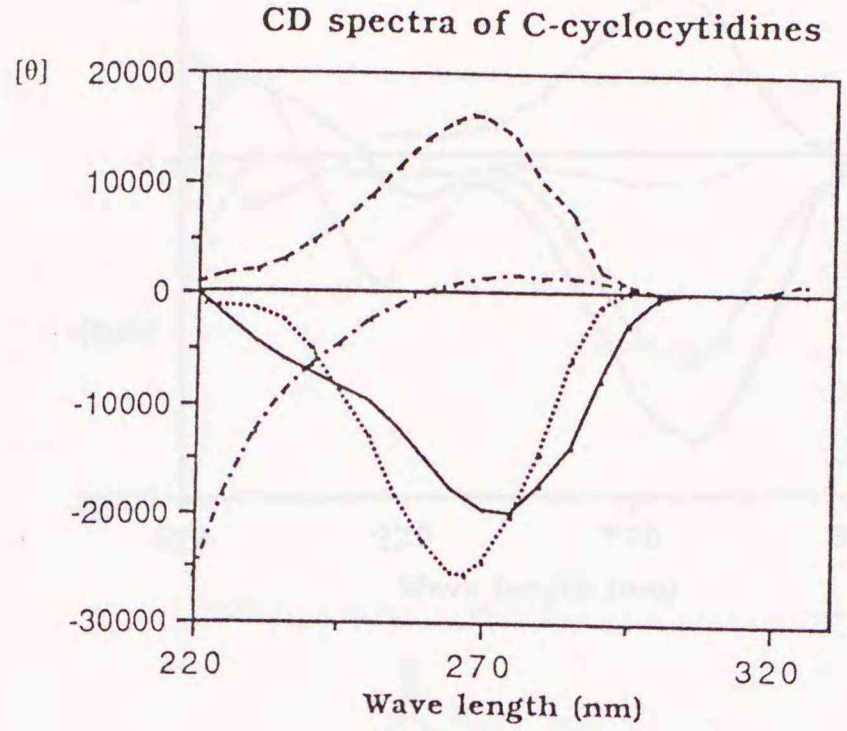
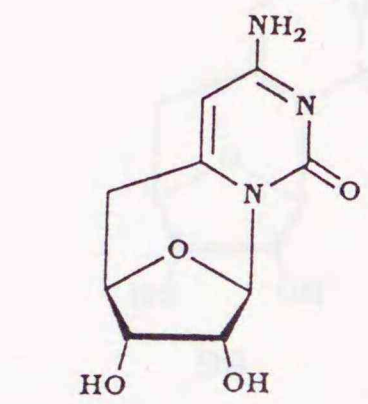
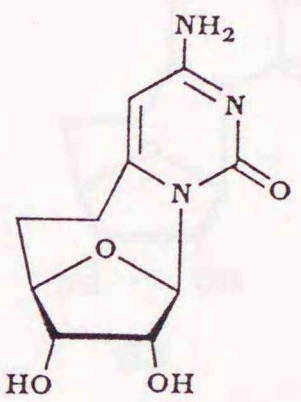


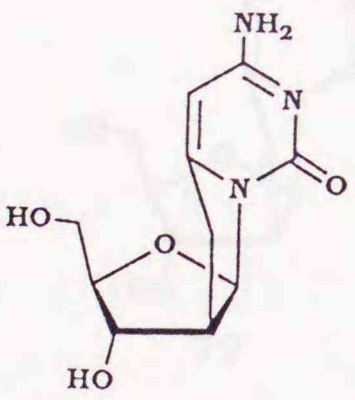
Fig.15



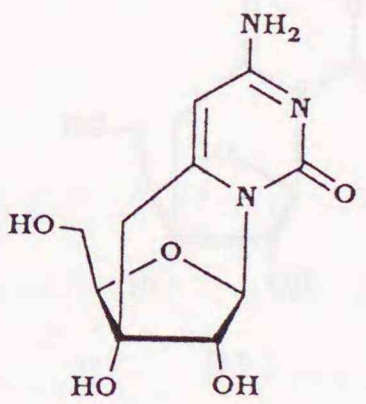
98



51



70



29

Fig.16

しかし、6,6'-シクロ体はC-シクロウリジンの場合同様、ほぼ境界領域に位置している。C-シクロ-4-チオウリジンの場合の差異に関しては発色団の違いからくるものと推定される。発色団が異なる場合、当然それに伴い遷移モーメントの方向も変わってくるため、不斉環境から受ける摂動も等しくない。C-シクロ-4-チオウリジンのCDスペクトルではこれらの影響が現れたものと考えられる。

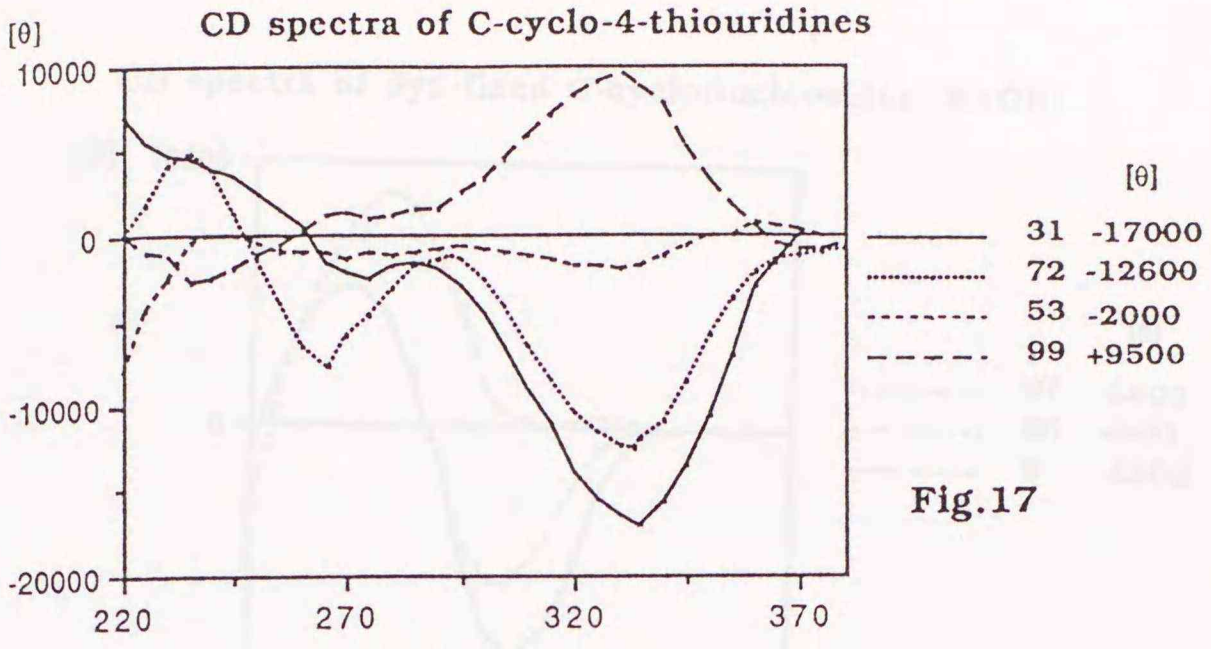


Fig.17

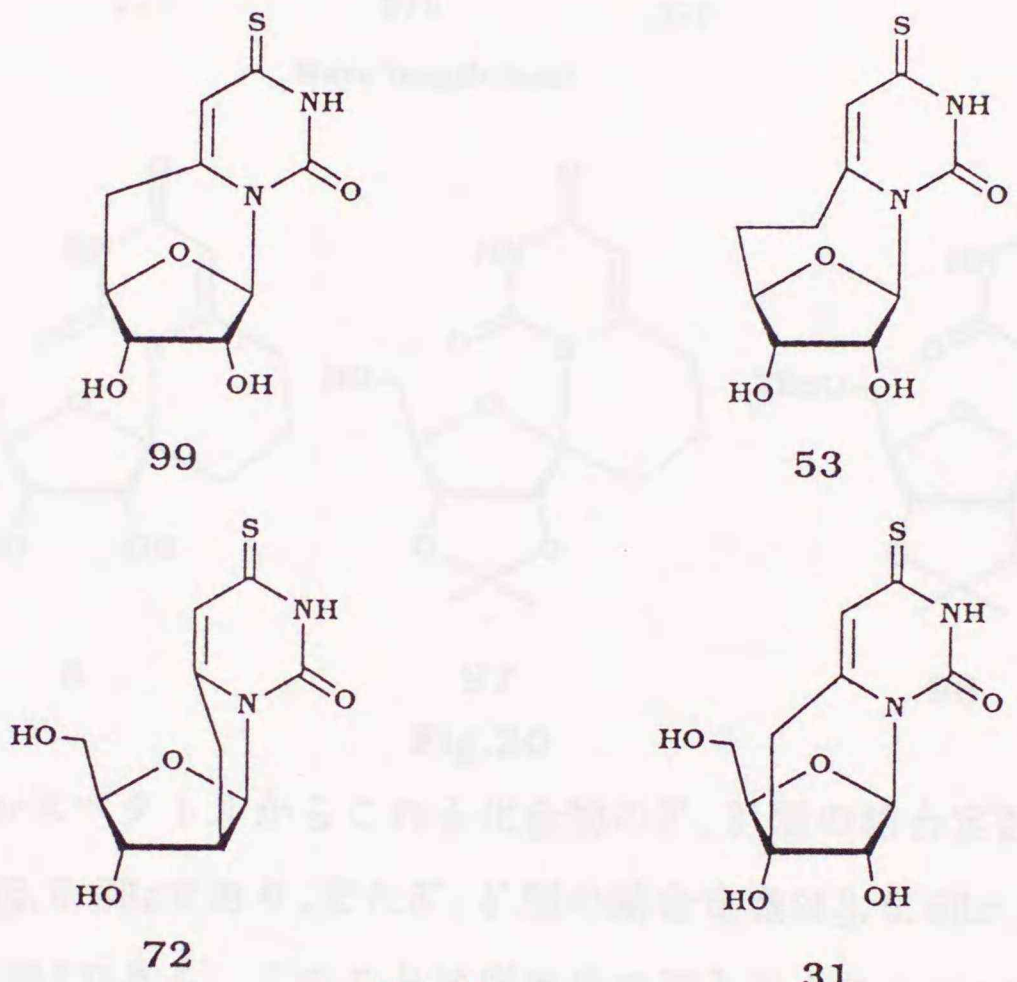


Fig.18

syn型に固定したC-シクロヌクレオシドのCDスペクトルについてはFig.19に示した。6,1'-プロパノウリジン (8)及びその2',3'-イソプロピリデン体 97ではnegativeのCotton効果を示すのに対して、完全に保護した96では対応するuv極大吸収領域に極めて弱い(θ=+900)Cotton効果を示すにすぎない。このことはsyn領域にもanti領域同様Cotton効果がnegativeからpositiveへ変化する境界領域が存在し96がほぼ境界領域に位置することを意味している。

CD spectra of Syn-fixed C-cyclonucleosides (MeOH)

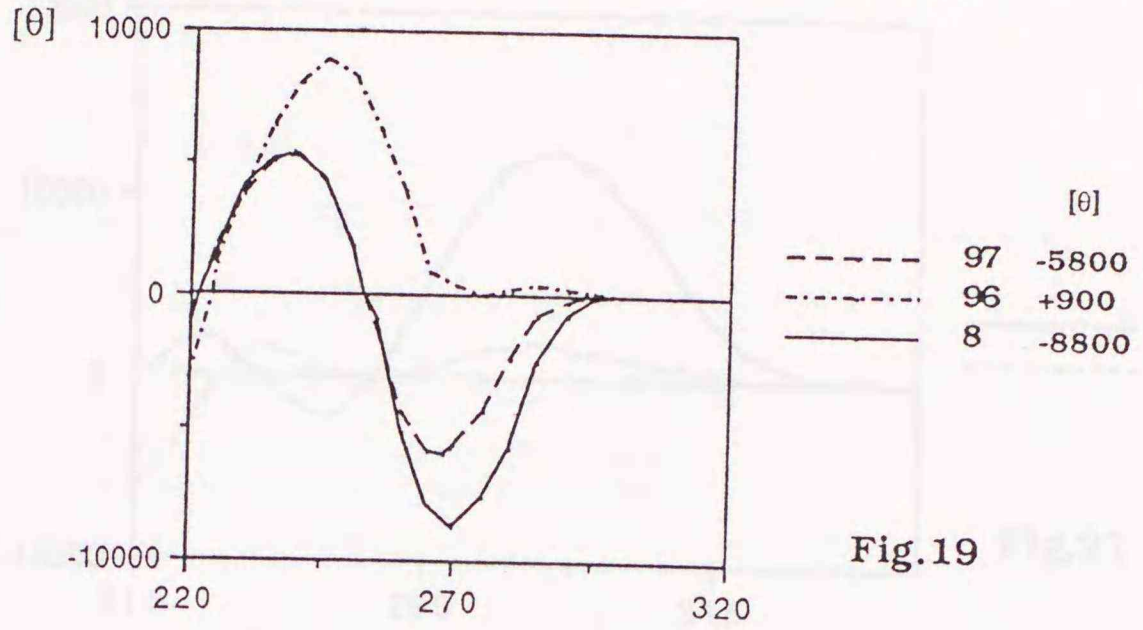
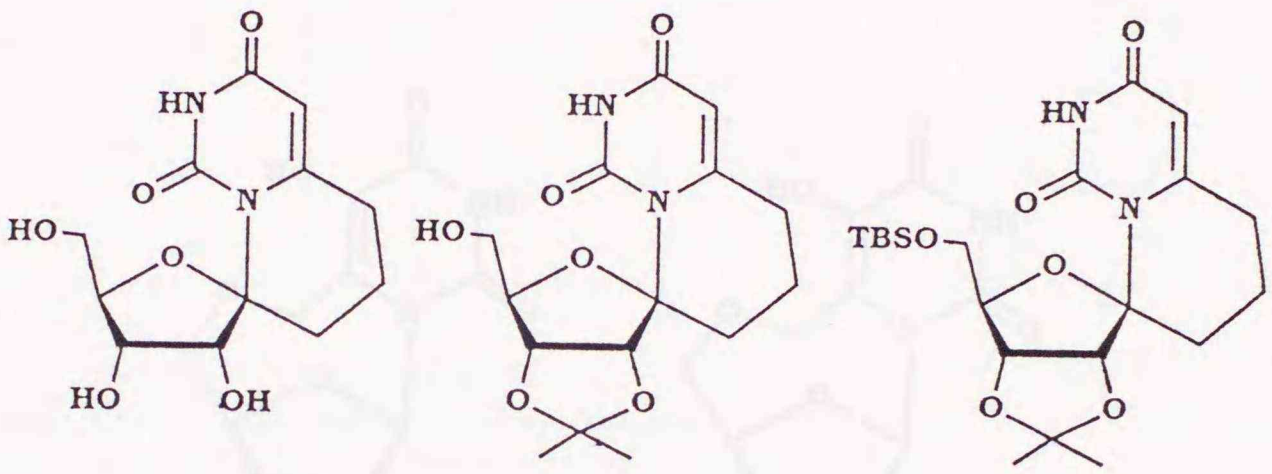


Fig.19



8　　97　　96

Fig.20

8, 97, 96のpmrスペクトルからこれら化合物の2', 3'間の結合定数はそれぞれ8, 7.1 Hz; 97, 7.3Hz; 96, 6.8Hzであり、また3', 4'間の結合定数は8, 6.6Hz; 97, 4.9Hz; 96, 5.1 Hz(実験の部参照)である。このことは保護基の導入によりconformationにわずかな変化が起こっていることをしめしており、これらの変化がglycosyl torsion angleに影響を及ぼしCDスペクトルに変化が現れたものと考えられる。

このような保護基の導入によるわずかな構造の変化によってCDスペクトルに大きな変化が見られることは非常に興味深い。このような現象は著者の例だけでなく、Otterらによって合成されたシクロヌクレオシド100及びそのイソプロピリデン体101のCDスペクトルにおいても認められている[50]。(Fig. 21, 22)

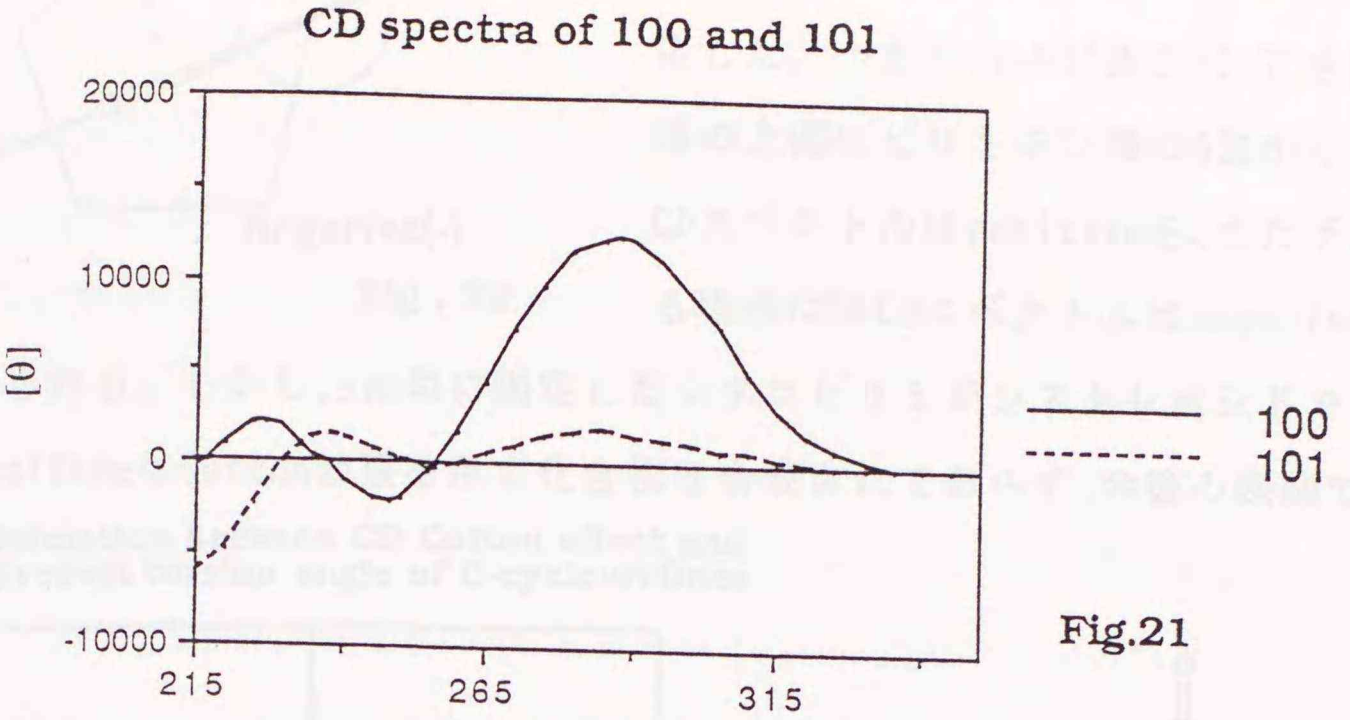
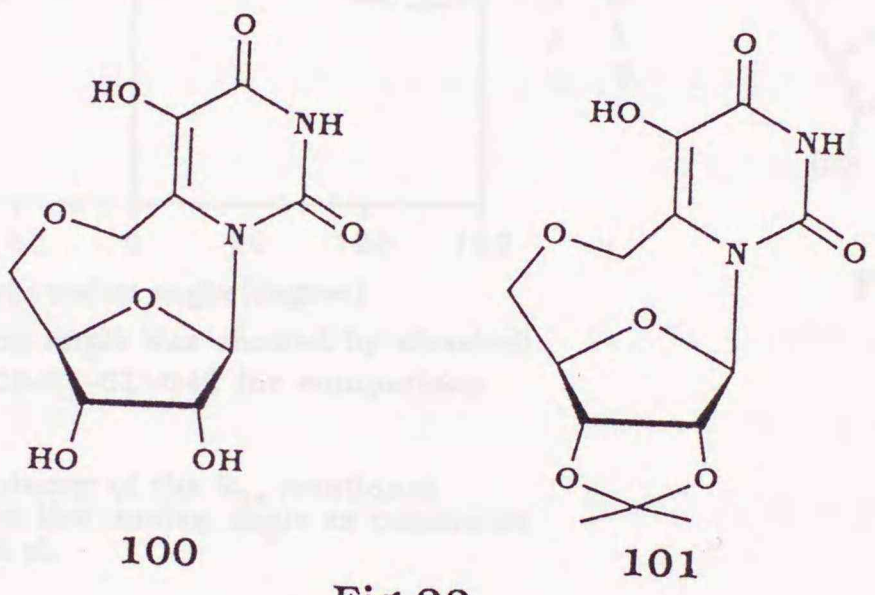


Fig.21



100　　101

Fig.22

シクロヌクレオシド 100は比較的大きなpositiveのCotton効果を示すのに対してそのイソプロピリデン体 101ではほとんどCotton効果を示さない。これらの結果は最初にも述べたようにイソプロピリデン基によってfuranose環が固定されその結果glycosyl torsion angleにわずかな変化が起こり、これらシクロ体がCDのCotton効果が大きく変化する境界領域に位置するため、大きなCDスペクトルの変化となって現れたと解釈することができる。

Fig.23に分子モデルより予想される6,1'-プロパノウリジン(8)のglycosyl torsion angle を模式的に示した。これより著者はsyn領域における境界領域の位置と

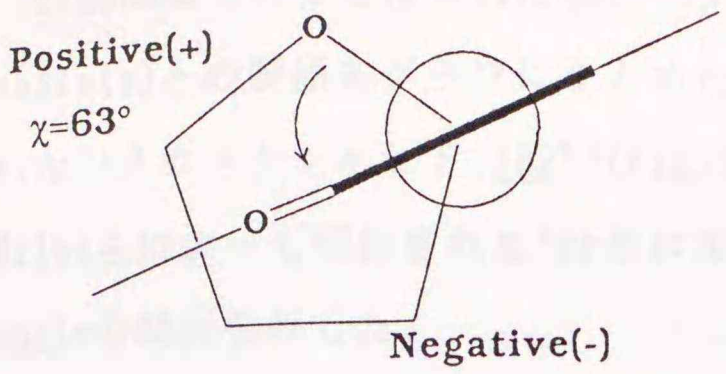
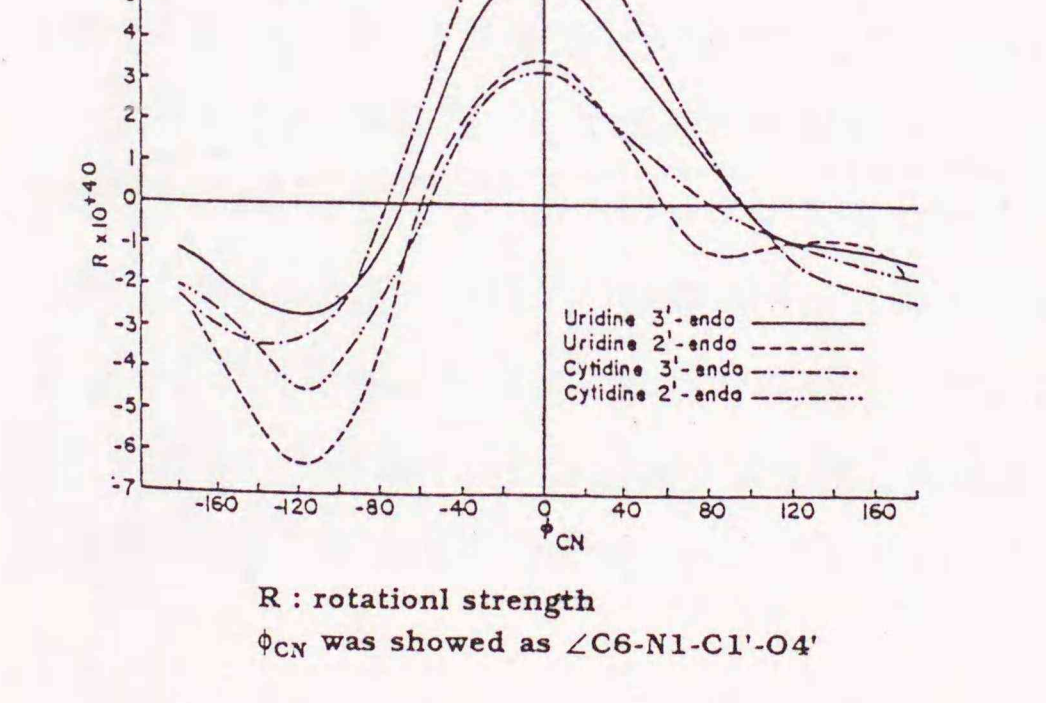


Fig . 23

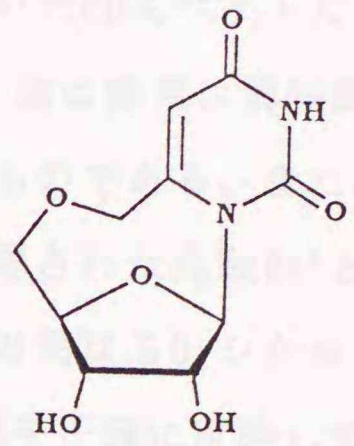
してχ=63°、即ち6,6'-シクロウリジンの存在するほぼ180°対極に位置するものと推定した。つまり、χ=63°及び-117°を結ぶ直線の上部にピリミジン環の6位がくる場合CDスペクトルはpositiveを、また下部に来る場合にはCDスペクトルはnegativeを示すと考えられる。しかし、syn型に固定したシクロピリミジンヌクレオシドで、まだ大きなpositiveなCotton効果を示す化合物は合成されておらず、今後の課題である。

Fig.24 Corelation between CD Cotton effect and glycosyl torsion angle of C-cyclouridines



glycosyl torsion angle was showed by classical defination (∠C6-N1-C1'-O4') for comparison with Fig.26

Fig. 26 The dependency of the B_{2u} rotational strength on the torsion angle as calculated by Miles et al.



102

Fig.25

R : rotationl strength

ϕ_{CN} was showed as ∠C6-N1-C1'-O4'

Fig.24にこれまで得られたCDスペクトルの分子楕円率(θ)とglycosyl torsion angle(χ)との関係をグラフにまとめた。なおグラフ中に近年Otterによって合成されたシクロヌクレオシド 102[50](Fig.25)のデータも加えてある。またFig.26にMilesらによって報告された[3]計算結果より得られた分子楕円率とglycosyl torsion angleの関係を示した。

Milesらは糖部のpuckeringがCDスペクトルに影響するとしてC2'-endo及びC3'-endoそれぞれの場合に関して相関を示している[3]。しかし先に述べた理由から必ずしもこのような条件づけは必要ではないと考えられる。今回得られたC-シクロウリジンの相関関係はMilesらのウリジン C3'-endo体の予想される相関曲線とかなり良い一致をみている。このようにC-シクロヌクレオシドを用いたCDスペクトルとglycosyl torsion angleとの相関でこれまでの報告との良い一致は非常に興味深く、C-シクロヌクレオシドのモデル化合物としての有用性を示すものである。またFig.23に示した境界領域の位置に関してはUlbrichtらによって提唱された経験則[4]と若干のずれが認められる。これはUlbrichtらの経験則が発色団の異なるO-シクロヌクレオシドを用いて導いたものであり、必ずしもウリジンの相関を正確に反映していないためと考えられる。

最後にこれらの結果を併せてウリジンのCDスペクトルに関して考えると、ウリジンは溶液中で境界領域より上部のanti領域に存在し、そのためウリジンのCDスペクトルは平均化されてもpositiveのCotton効果を示すと説明できる。

第6章 C-シクロヌクレオシドとRNase Aの相互作用

ウシすい臓由来RNase A(EC.3.1.27.5)は124個のアミノ酸残基からなるピリミジン特異的なRNA加水分解酵素であり、X線結晶構造解析を含め酵素学的に最も研究の進んでいる酵素の一つである[51]。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。その際12-His、119-Hisと41-Lysがin-line機構で加水分解を触媒することが知られている[51,52]。またRNase Aは溶液中でsyn型をとると考えられている6-メチルウリジン2',3'-環状リン酸を殆ど加水分解しないこと[5]、インヒビターである2'-CMPとの共結晶のX線結晶構造解析の結果2'-CMPがanti型で結合していること[53,54]などから、RNase Aはanti型の基質を認識すると考えられている。著者はこのようなRNase Aと基質との立体化学的相互作用に興味を持ちglycosyl結合を特定のconformationに固定したC-シクロヌクレオシドをモデル化合物として研究を行うことにした。

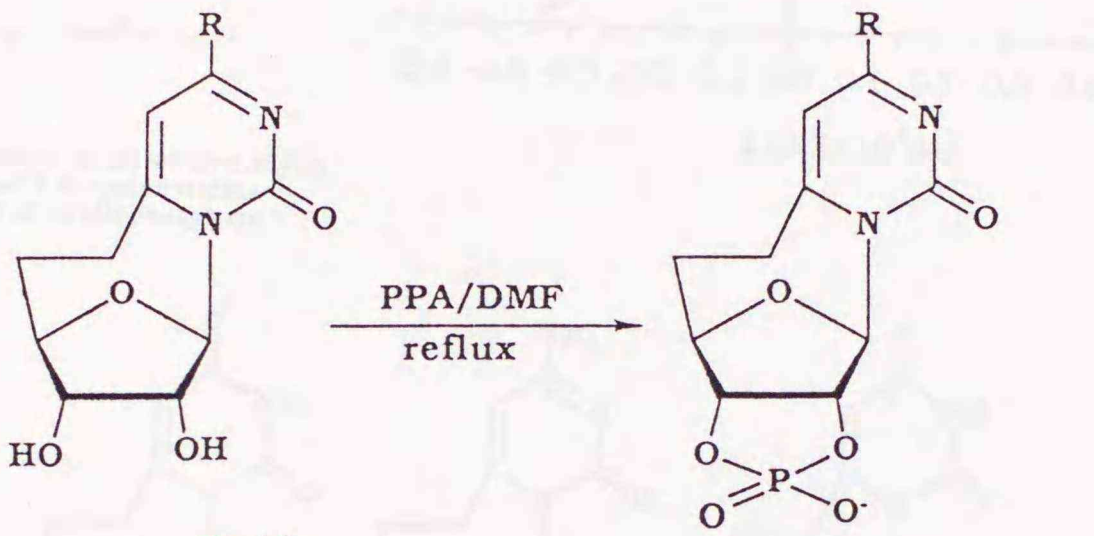
第1節 6,6'-シクロヌクレオシド 2',3'-環状リン酸の合成

当研究室の松田は5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン 2',3'-環状リン酸を合成し、グアニン特異的なRNA分解酵素であるRNase T_1による加水分解反応を検討し、5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン 2',3'-環状リン酸がRNase T_1により非常にゆっくりではあるが加水分解されることを見出している[9]。RNase T_1と3'-guanylic acidとの差CDスペクトルを用いた研究より3'-guanylic acidは酵素活性中心においてanti型からsyn型に転換した後酵素水解を受ける[7]とされていたのに対して、更に松田は5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン 3'-リン酸とRNase T_1との差CDスペクトルが先のguanilic acidとの差CDスペクトルと同様なスペクトルを示したこと[9]から、スペクトルの解釈を含めこれまでの結果に対して疑問を投げかけている。

このようにC-シクロヌクレオシドは酵素との相互作用を探るうえで有用なモデル化合物である。著者は今回合成したC-ピリミジンシクロヌクレオシドのうち5'-デ

オキシ-6,6'-シクロヌクレオシドを対応する2',3'-環状リン酸へと誘導し、ピリミジン特異的なRNA分解酵素であるウシすい臓由来RNase Aによる加水分解反応の速度論的解析及び立体化学的相互作用の解析を行うことにした。

5'-デオキシ-6,6'-シクロピリミジンヌクレオシドをDMF中ポリリン酸と処理し[16]得られた2',3'-環状リン酸体をイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製し、5'-デオキシ-6,6'-シクロウリジン 2',3'-環状リン酸 (103)を66%、5'-デオキシ-6,6'-シクロシチジン 2',3'-環状リン酸 (104)を76%、更に5'-デオキシ-6,6'-シクロ-4-チオウリジン 2',3'-環状リン酸 (105)を27%の収率でそれぞれ得た。なおここで4-チオ誘導体で収率が低いのはこの反応条件で4位チオカルボニル基の加水分解がおこりウラシル誘導体が副生するためである(scheme 36)。



Yield		
6	R = OH	103 : 66%
51	R = NH_2	104 : 76%
53	R = SH	105 : 27%

Scheme 36

第2節 RNase Aによる加水分解反応の速度論的解析

第1節で合成した2',3'-環状リン酸体を酢酸緩衝液中(pH=5.6)RNase Aと処理し、その加水分解率をHPLCにより定量し水解速度を求めLineweaver-Burkプロットによりkm値を算出した。Fig.27に5'-デオキシ-6,6'-シクロシチジン 2',3'-環状リン酸(104)の加水分解のHPLCパターンを、またFig.28に104のRNase Aによる加水分解反応のLineweaver-Burkプロットの結果を、そしてFig.29に得られた103、104、105それぞれのkinetic parameterを示した。

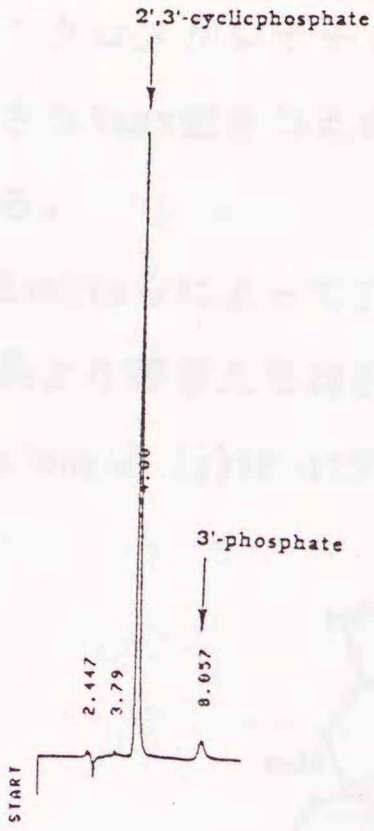
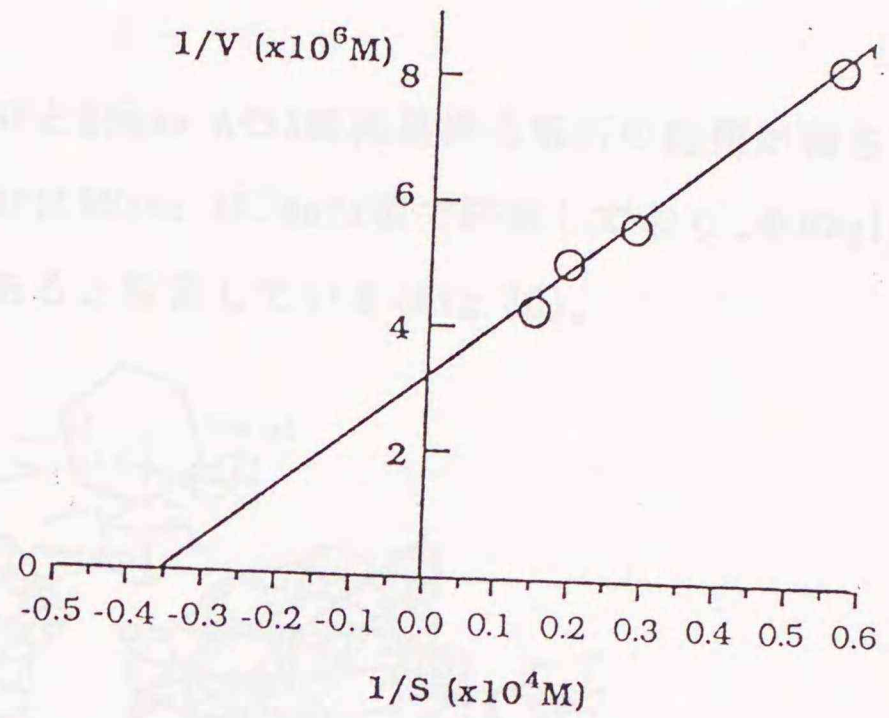
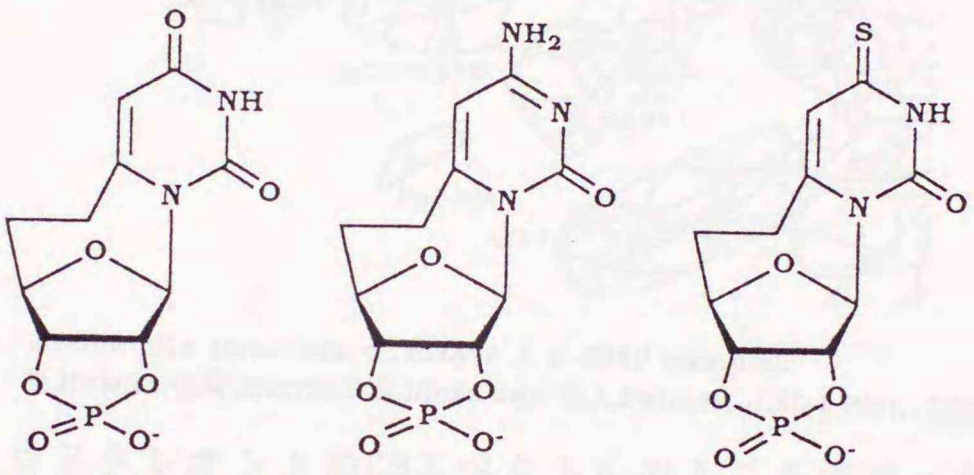


Fig.27 HPLC chart of Hydrolysis of 6,6'-cyclocytidine 2',3'-cyclicphosphate

Fig.28 Lineweaver-Burk plot of Hydrolysis rate of 5'-deoxy-6,6'-cyclocytidine-2',3'-cyclic phosphate by RNase A





Determined kinetic value

				C>P
Km :	0.23 mM	0.29 mM	0.11 mM	0.14mM
rel. Vmax :	0.05	0.1	0.07	100

Fig.29 Enzymatic hydrolysis was performed in 10 mM acetate buffer (pH=5.6). Hydrolysis rates were determined by HPLC analysis. Km values were obtained from their Lineweaver-Burk plot.

この結果からこれらC-シクロヌクレオチドは対照としたシチジン 2',3'-環状リン酸(C>P Km=0.14mM)とほぼ同じKm値を持つことが明らかとなり、RNase Aが基質となるヌクレオチドと結合する際anti型の基質を優先して認識するというこれまでの事実[5] [6]とよく一致している。これに対してVmax値はシチジン 2',3'-環状リン酸の

1000分の1であった。これはシクロヌクレオチドが炭素架橋によって固定されているためRNase Aによる加水分解の前後でほとんどconformation変化がないため、加水分解後シクロヌクレオチドは活性中心から速やかに解離せず結合しており、このような小さなVmax値を与えたものと考えられる。このことは後に述べる結果からも支持される。

近年Howlinらによって2'-CMPとRNase AのX線結晶構造解析の結果が報告[54]され、この結果より著者たちは2'-CMPはRNase Aにanti型で結合しており、そのglycosl torsion angle (χ)は-115°であると報告している(Fig.30)。

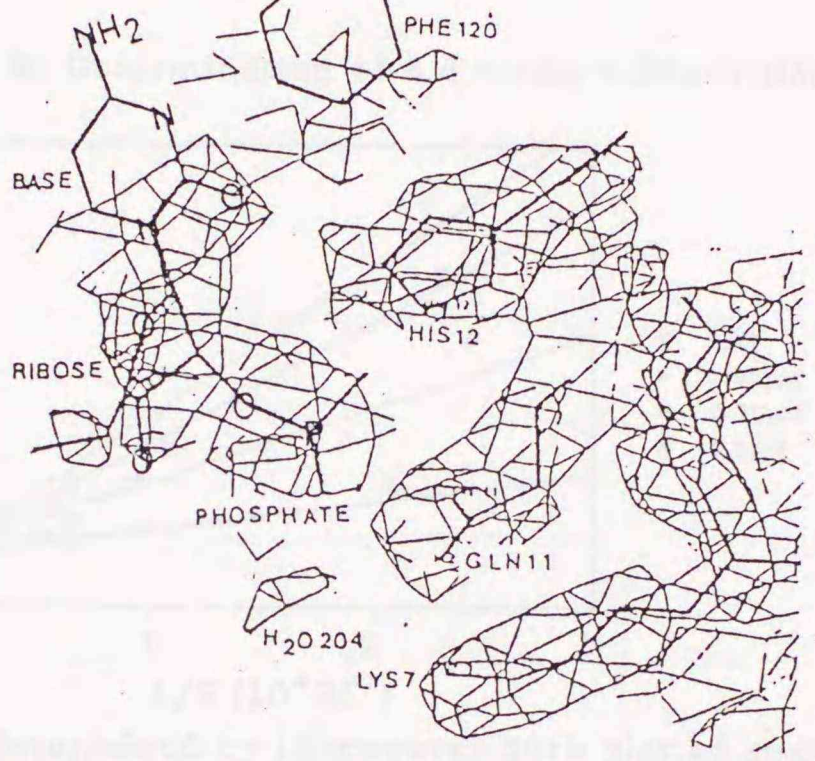
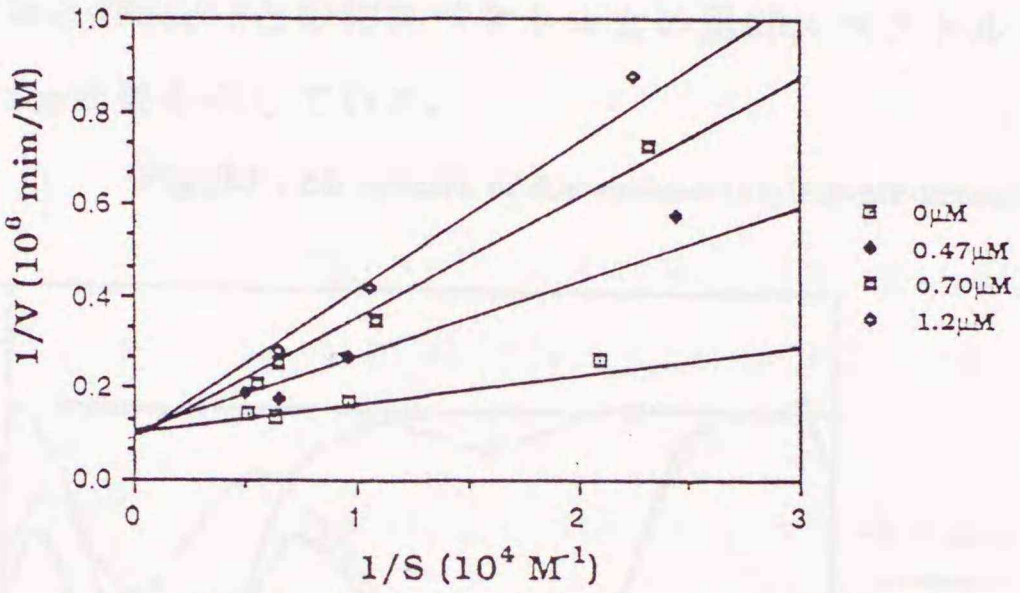


Fig.30 Active site structure of RNase A-2'-CMP complex
B.Howlin,G.W.Harris,D.S.Moss and R.A.Palmer, *J.Mol.Biol.*, 196, 159 (1987)

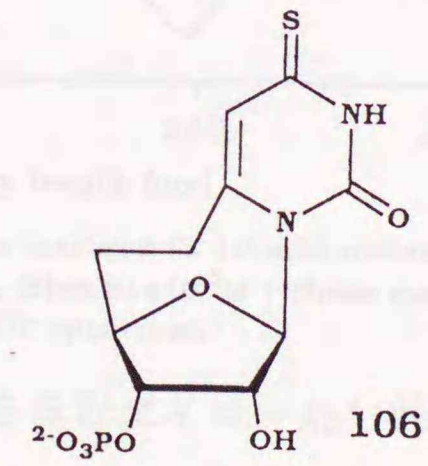
第5章のシクロヌクレオシドのCDスペクトルのところで述べたようにこの6,6'-シクロヌクレオシドはそのglycosyl torsion angleが-117°でありRNase Aに結合した2'-CMPのそれと非常に近い値を取っている。このことからこのシクロヌクレオチドはRNase Aと非常に結合しやすいconformationをとっていると考えられ、先に述べたkinetic parameterを非常に良く説明できる。このように考えるとこのシクロヌクレオシド 2',3'-環状リン酸の酵素水解物である3'-リン酸はRNase Aの強力なインヒビターとなることが予想される。そこで次に5'-デオキシ-6,6'-シクロ-4-チオウリジン 2',3'-環状リン酸 (105)を対応する3'-リン酸体へと導き、阻害実験を行うことにした。

105を酢酸Buffer中RNase T_2と2日間37°Cで保温し加水分解を行いイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製し3'-リン酸誘導体 106を66%の収率で合成した。この3'-リン酸 106をインヒビターとし、シチジン 2',3'-環状リン酸のRNase A水解反応をuv差スペクトル法により解析し、各種インヒビター濃度での見かけ上のKm値を算出し、この結果よりKi値の決定を行った。Fig.31に各種インヒビター濃度におけるLineweaver-Burkプロットの結果を示した。これらの結果よりこの3'-リン酸 106はシチジン 2',3'-環状リン酸に対して競合的に阻害しKi値は2.5×10^{-7}Mであり、106は当初予想したとおりRNase Aの非常に強いインヒビターとなり先の推論を支持する結果となった。

Fig.31 : Ki Determination of 6,6'-cyclo-4-thio-3'-UMP



Ki was determined by Lineweaver-Burk plot of enzymatic hydrolysis rate of cytidine-2',3'-cyclic phosphate with various inhibitor concentration.
Condition : E_0=0.22μM ,10 mM Acetate Buffer(pH=5.6)



106

Ki value: 0.25μM

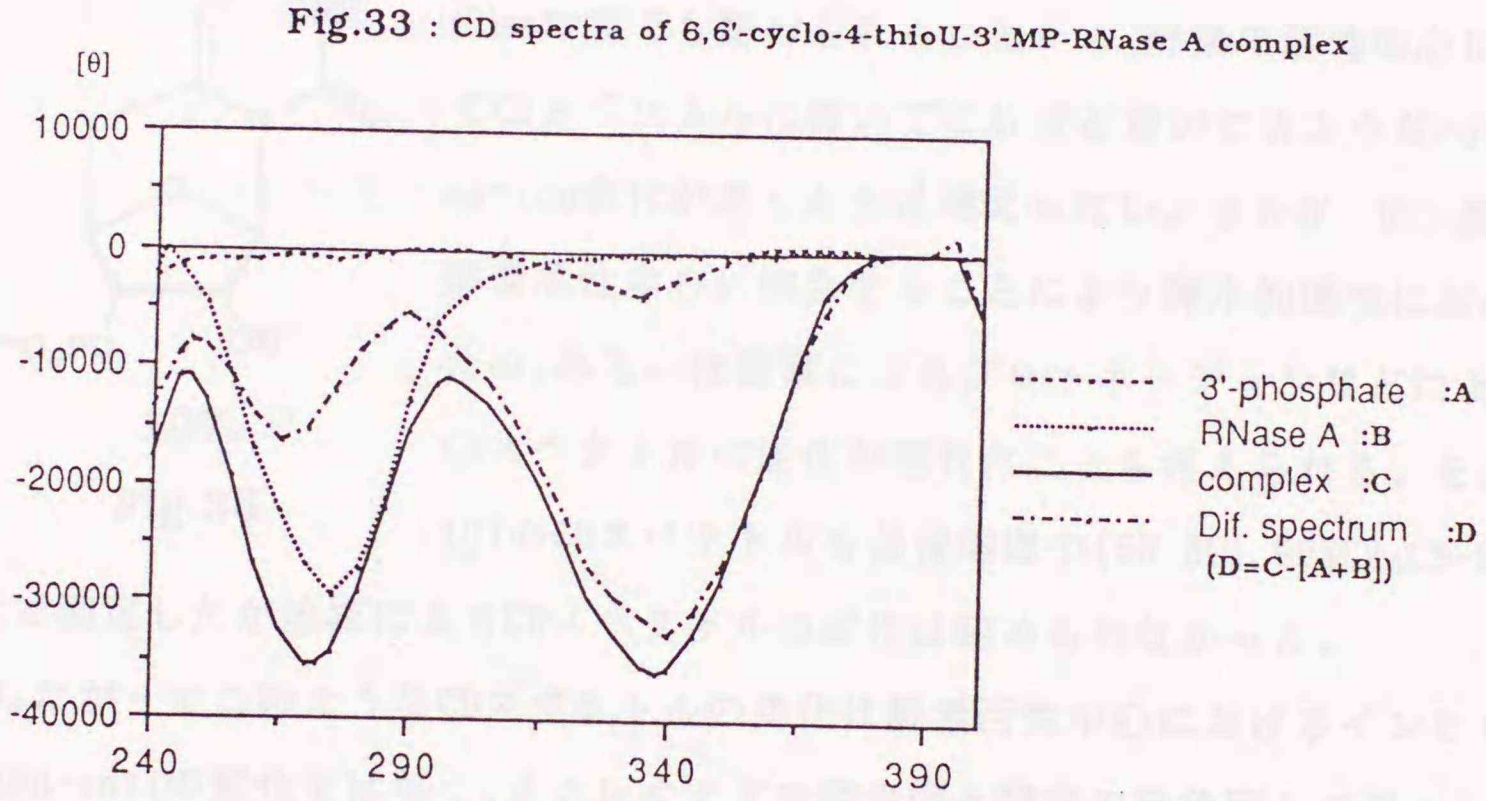
Fig.32 Ki was determined from a Lineweaver-Burk plot of enzymatic hydrolysis rates which were obtained using UV spectrum analysis of cytidine 2',3'-cyclic phosphate with various inhibitor concentration.
Condition : [E]=0.22μM ,10 mM Acetate Buffer (pH=5.6)

第3節 RNase Aと5'-デオキシ-6,6'-シクロ-4-チオウリジン 3'-リン酸の相互作用のCDスペクトルによる解析

更に著者はこの3'-リン酸106とRNase Aとの相互作用を分光学的手法を用いて解析するため、3'-リン酸とRNase Aとの混合物のCDスペクトルの測定を行った。

Fig.33に示したように5'-デオキシ-6,6'-シクロ-4-チオウリジン-3'-リン酸 106はヌクレオシドの場合同様、対応するuvの極大吸収領域にほとんどCotton効果を示さない。またRNase Aは275 nm付近に約30000のnegativeのCotton効果を示す。これに対しRNase Aと106を約1:1に混合しcomplexを形成させた場合は、興味深いことに340nm付近に非常に大きなnegativeのCotton効果を示し、このCDスペクトルと3'-リン酸体とRNase Aとの和スペクトルとの差CDスペクトルも非常に大きなnegativeのCotton効果を示している。

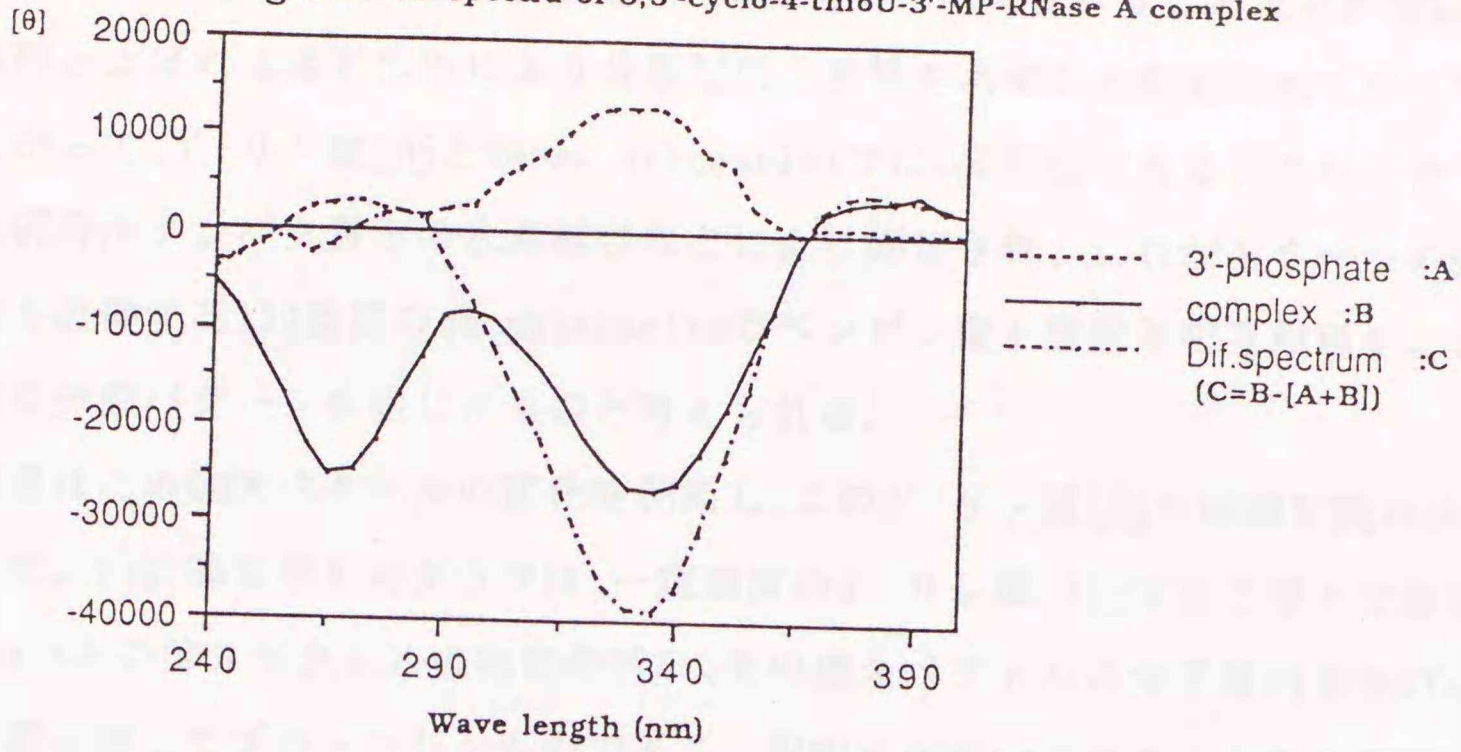
Fig.33 : CD spectra of 6,6'-cyclo-4-thioU-3'-MP-RNase A complex



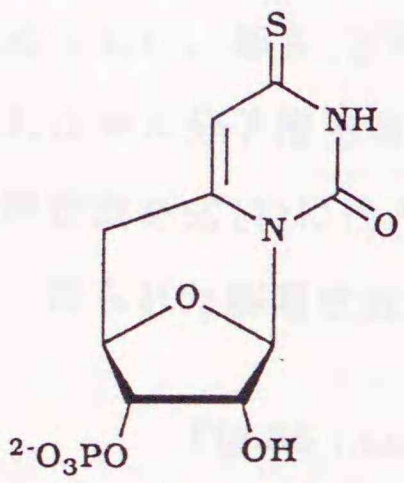
All spectra were mesured in 10 mM acetate buffer (pH=5.6)
[E]=2.74x10^{-5}M, [S]=3.81x10^{-5}M ; These concentrations were determined by UV spectrum.

Whiteらは4-チオウリジンを含むダイマーAp^{4s}UpとRNase AとのCDスペクトルを測定し、330 nmに大きなnegativeのCDスペクトルが現れることを報告[55]しており、この中で著者たちはこのCDスペクトルの変化がanti型からsyn型への転換の結果だと主張している。しかし、Fig.34に示したようにこのようなCDスペクトルの変化は6,5'-シ

Fig.34 : CD spectra of 6,5'-cyclo-4-thioU-3'-MP-RNase A complex



All spectra were mesured in 50 mM acetate buffer (pH=5.5)
[E]=1.0x10^{-4}M, [S]=0.99x10^{-4}M



107

Fig.35

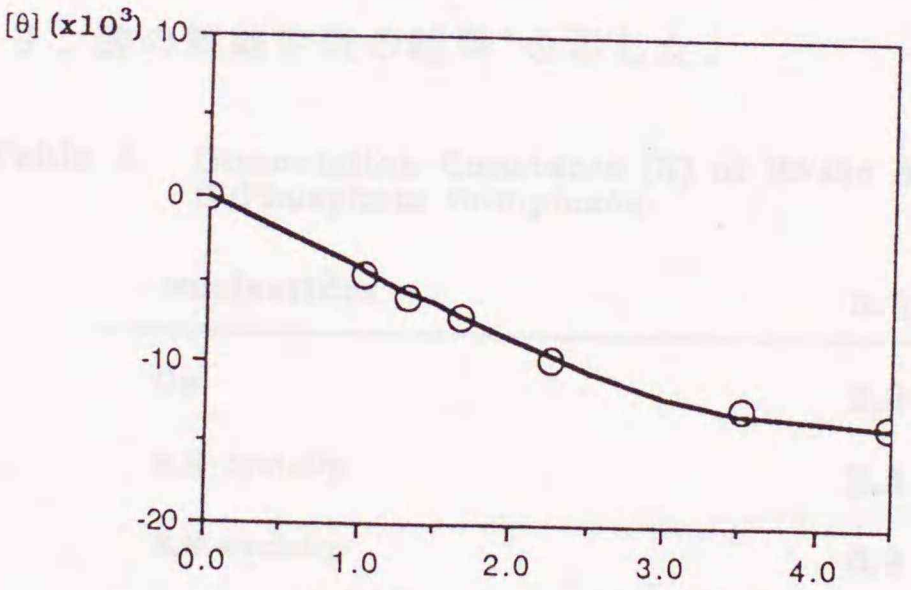
クロ-4-チオウリジン 3'-リン酸 107(Fig.35)[56]とのcomplexの間でも認められることから、酵素の活性中心においてCDスペクトルにおいてこれほど差がでるようなconformation変化があったとは考えらない。また3'-リン酸体が酵素活性中心に結合することにより疎水的環境におかれたため、あるいは酵素によるプロトネーションなどによってCDスペクトルに変化が現れたことも考えられる。そこで107のCDスペクトルを各種溶媒中(6N HCl, 90%CH_3CN-H_2Oなど)で測定したが溶媒によるCDスペクトルの変化は認められなかった。

したがってこのようなCDスペクトルの変化は酵素活性中心におけるインヒビターのsyn-antiの変化ではなく、ヌクレオチドの発色団と酵素の発色団との何らかの光学的相互作用の結果生じたと考えられる。先のHowlinらのX線結晶構造解析の結果[54]より、著者たちは120番目のphenylalanineとシトシン塩基の部分がかなり接近しており, その距離は6.4Åであると報告している。著者はこのX線結晶構造解析の結果よりこのCDスペクトルの変化がこのphenylalanineとの相互作用の結果であると推定した。これまで述べて来たC-シクロヌクレオシドのCDスペクトルは光学不活性な発色団が炭素架橋によって不斉環境中に固定されるため円二色性を示すと解釈される。

これに対し、近接した2つの発色団が不斉環境中に固定されるとお互いが励起子相互作用とよばれる相互作用により分裂型円二色性を示すことが知られている[57]。したがって、3'-リン酸106とRNase Aのcomplexでは、発色団であるヌクレオチドのbase部分がタンパク質との水素結合などにより固定され、これがもう一つの発色団である近接する120番目のphenylalanineのベンゼン環と励起子相互作用をおこし特徴的な分裂パターンを生じたものと考えられる。

著者はこのCDスペクトルの変化を利用し、この3'-リン酸106の解離定数の決定を行った。Fig.36に示したグラフは、一定濃度の3'-リン酸 106存在下様々な濃度のRNase AとのCDスペクトルの測定を行い、その差スペクトルの分子楕円率をRNase Aの濃度に対してプロットしたものである。沢田らが差uvスペクトル法を利用しRNase Aとヌクレオチドの解離定数を決定する際用いた手法[58]を差CDスペクトル法に応用した。即ち、このグラフより極限値であるモル分子楕円率差(Δθ)を算出し、得られたモル分子楕円率をChart 1に示した式(6)に代入し解離定数を決定した。この解離定数を式(7)に代入することにより得られた理論曲線をグラフ中に実線で示した。得られた解離定数は7.2×10^{-7}Mであり、実験結果は理論曲線と良い一致を見てお

Fig.36 : Dissociation constant determination using CD spectra



All spectra were mesured with 3'-phosphate ($[I_0]=3.2\times10^{-5}$) in 10 mM acetate buffer (pH=5.6). Dissociation constant K was determined as 7.2×10^{-7}M.

$$E + I \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} EI \qquad K=\frac{[E][I]}{[EI]} \quad \cdots\cdots\cdots (1)$$

$$[E]=[E_0]-[EI] \quad \cdots\cdots\cdots (2) \qquad [I]=[I_0]-[EI] \quad \cdots\cdots\cdots (3)$$

$$[EI]=\Delta C \quad \cdots\cdots\cdots (4) \qquad \therefore \Delta C=\frac{100\Delta\theta}{\Delta[\theta]} \quad \cdots\cdots\cdots (5)$$

From these equations

$$K=\frac{([E_0]-100\Delta\theta/\Delta[\theta])([I_0]-100\Delta\theta/\Delta[\theta])}{100\Delta\theta/\Delta[\theta]} \quad \cdots\cdots\cdots (6)$$

$$\therefore \Delta\theta=\frac{\Delta[\theta]}{200}\{([E_0]+[I_0]+K)-\sqrt{([[E_0]+[I_0]+K)^2-4[E_0][I_0]}\} \quad \cdots\cdots\cdots (7)$$

($[E_0]$=total concentration of RNase A　　$[I_0]$=total concentration of 106
$[EI]$=cncentration of complex　　ΔC=concentration differnce
$\Delta\theta$=differnce of θ at 340 nm　　$\Delta[\theta]$=molar eliptisity differnce)

Chart 1

り、また、先に阻害実験より得られたKi値2.5×10^{-7}Mともよく一致している。 また、Table 1に当研究室の碓井がfrontal chromatography法により決定した各種ヌクレオシド 3'-リン酸の解離定数の結果[5]を示した。

Table 1　Dissociation Constants (K) of RNase A-Nucleoside 3'-Phosphate Complexes

Nucleotides	K (μM)
Up	2.6
6,5'-cycloUp	2.5
6,6'-cycloUp	0.9
6-Methyl-Up	34.0
S^4Up	1.0
6,5'-cyclo-S^4Up	0.6

この結果を比較すると5'-デオキシ-6,6'-シクロウリジン 3'-リン酸と106はほぼおなじ解離定数を示しており、実験結果の良い一致をみている。またこの値は天然ヌクレオチドであるウリジン 3'-リン酸のそれよりone order 小さい値であり、第2節で推論したように6,6'-シクロヌクレシドはRNase Aと非常に親和性の高い conformationを取っていることが示唆される。

以上の結果よりRNase Aはanti型に固定した5'-デオキシ-6,6'-シクロヌクレオチドを基質として認識し、このことは、従来言われていたRNase Aがanti型の基質を認識すると言う考えを支持するものである。今回用いたC-シクロヌクレオシドは優れたモデル化合物であり、今後様ざまなtorsion angleに固定したC-シクロヌクレオシドを用いることにより、ヌクレオシドあるいはヌクレオチドを基質とする酵素と基質との立体化学的相互作用に関して多くの情報が得られることが期待できる。

結 語

1) 6-メチルピリミジンとD-xyloseを出発原料とし立体選択的に3位分枝糖を合成し引き続く分子内グリコシル化反応により6,3'-メタノピリミジンヌクレオシドを短工程で合成することに成功した。

2) Peterson オレフィン化反応と分子内グリコシル化反応を用い、6,6'-シクロピリミジンヌクレオシドの合成に成功した。またこのPeterson オレフィン化反応により2位分枝糖を合成し、この分枝糖の立体選択的還元続く分子内グリコシル化反応によって2'-デオキシ-6,2'-メタノピリミジンヌクレオシドの合成に成功した。

3) Syn型に固定したスピロ型C-シクロヌクレオシドをデザインし、D-fructoseを出発原料とし1'位での炭素鎖の延長、更にラジカル環化反応によりスピロ環の構築を行い6,1'-プロパノウリジンの合成を達成した。

4) これらシクロヌクレオシドのCDスペクトルでは、glycosyl torsion angle χが大きくなるにつれCotton効果がpositiveからnegativeへと変化していくこと、また、6,6'-シクロピリミジンヌクレオシド及び6,1'-プロパノウリジンがその境界領域に位置することを見いだした。

5) 6,6'-シクロピリミジンヌクレオシドを対応する2',3'-環状リン酸へ誘導し、これらシクロヌクレオチドのRNase Aによる加水分解反応の速度論的解析を行い、これらシクロヌクレオチドが天然ヌクレオチドとほぼ同じKm値を持つことを見いだした。この結果はRNase Aがanti型の基質を優先的に認識するという事実を支持するものである。
また6,6'-シクロ-4-チオウリジン 2',3'-環状リン酸を対応する3'-リン酸に導き、RNase Aとの複合体のCDスペクトルの測定を行い、その結果phenylalanineとの相互作用の可能性が示唆され、これを利用し解離定数の決定を行った。

謝 辞

本研究を行うにあたり、著者の講座配属以来終始御指導下さいました北海道大学 薬学部 故上田 亨教授に心より感謝申し上げるとともに御冥福をお祈り申し上げます。

終始御指導頂きました北海道大学 薬学部 松田 彰 助教授に厚く御礼申し上げます。

研究上 常に討論に加わり有益な御助言を下さいました薬化学教室の皆様に感謝致します。

NMR スペクトル、Mass スペクトル、元素分析の測定をして下さいました北海道大学機器分析センターの皆様に感謝致します。

X線結晶構造解析を行って頂きました吉富製薬株式会社 製剤研究所
丸林 信洋 博士に深謝致します。

1991年 1月　吉村 祐一

§実験の部§

測定機器は以下のものを使用した。

NMRスペクトルは日本電子JNM-FX 100型（100MHz）、日本電子JNM-GX 270型(270MHz)及び日本電子JNM-EX 400型スペクトロメーター（400MHz）を用いて測定した。
(内部標準としてテトラメチルシランを用い、δ値をppmで示し結合定数はJ値(Hz)で示した。)
MASSスペクトルは、日本電子D-300型、日本電子JMS-HX110型及び日本電子JMS-DX303型スペクトロメーターを用い測定した。
UV吸収スペクトルは島津UV-260型及び島津UV-2100S型自記分光光度計を用いて測定した。
CDスペクトルは日本分光J-300A型スペクトロメーターを用いて測定した。
HPLCはポンプ(LC-6A)、システムコントローラー(SCL-6B)、UVモニター(SPD-6A)及びレコーダー(C-R6A,全て島津社製)から構成されるシステムを用いて行った。
融点は、柳本MP-3型微量融点測定器を用いて測定した。
（融点は、すべて未補正）

反応溶媒として使用したTHFは、使用直前にナトリウムベンゾフェノンケチルより蒸留したものを、塩化メチレンは五酸化リンより蒸留したものをDMSOは水素化カルシウムより蒸留したものを用いた。

カラムクロマトグラフィーはYMC-GEL SIL60-230/70を用いて行い、分取薄層クロマトグラフィー(pt.l.c.と略す)はMerck Kieselgel $60F_{254}$,厚さ0.25mm及び2mm(20cm x 20cm)のプレートを使用した。

RNase AはSIGMA社より購入したものを使用した。

2,4-Dimethoxy-6-methylpyrimidine(16)

6-methyluracil 5.00g(39.6mmol)をオキシ塩化リン18mlに懸濁し、3.5時間還流した。過剰のオキシ塩化リンを留去した後、残査を氷水にあけ、エーテルで抽出した。有機層は、$CaCl_2$で乾燥した後溶媒を留去、残査をMeOH 30mlに溶解し2N NaOMe 35 mlを加え10分間還流した。冷却後溶媒を留去し、残査をエーテルに溶かし有機層を水、30% NaOH, 更に水で洗浄後、Na_2SO_4乾燥した。減圧下濃縮乾固し、残査をn-hexaneより結晶化し2.78g (46%)の16を得た。

mp 63-65 ° C

uv:λ_{max} (MeOH) 266nm

pmr:δppm ($CDCl_3$);6.21(s,1H,H-5), 3.97,3.94(s,each 3H,OMe), 2.35(s,3H,6-Me).

Anal. Calcd. for $C_7H_{10}N_2O_2$:C,54.53;H,6.54;N18.17.Found:C,54.34;H,6.49;N,18.06.

5-O-t-Butyldimethylsilyl-1,2-O-isopropylidenexylose(22)

化合物21^{20} 19g(10mmol)をピリジン200mlに溶解し、t-butyldimethylchlorosilane18.1g(12mmol)を加え室温で1.5時間撹拌した。減圧下溶媒を留去し、残査を酢酸エチルに溶解し水で2回分配した後、有機層をNa_2SO_4で乾燥した。ろ過後溶媒を留去し残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ϕ7.5x11cm,0~2~3~5%MeOH in $CHCl_3$で溶出）により精製し、30.5g(100%)の22がsyrupとして得られた。

ms: m/z 304(M^+),289(M^+-Me)

pmr:δppm ($CDCl_3$);5.92(d,1H,H-1,$J_{1,2}$=3.7Hz), 4.46(d,1H,H-2), 4.08(bs,3H,H-4,5), 1.45,1.28(s,each 3H,ipr), 0.86(s,9H,tBu), 0.07(s,6H,Me).

5-O-t-Butyldimethylsilyl-1,2-O-isopropylidene-α-D-erythro-pentofuranose-3-ulose(23)

あらかじめ混合しておいた3当量のCrO_3 complex(CrO_3/pyridine/Ac_2O=15.5g/26ml/15.5ml in CH_2Cl_2 250ml)にCH_2Cl_2 50mlに溶解した15.74g(51.8mmol)の化合物22を加え室温で1.5時間撹拌した。反応液を1ℓの酢酸エチルに徐々に滴

下し、沈殿を吸引ろ過により除いた後溶媒を留去、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（φ6.6x17.5cm 5%AcOEt in n-hexaneにより溶出）により精製し12.1gの23(77%,n-hexaneより結晶化）を白色の結晶として得た。

mp 40~43° C
ms:m/z 287(M^+-Me),245(M^+-tBu)
pmr:δppm ($CDCl_3$);6.13(d,1H,H-1',$J_{1,2}$=4.4Hz), 4.37(m,1H,H-4), 4.28(dd,1H,H-2,$J_{2,4}$=1.1Hz), 3.85(m,2H,H-5), 1.45(s,6H,ipr), 0.86(s,9H,tBu), 0.06,0.03(s,each 3H,Me).
Anal. Calcd. for $C_{14}H_{26}O_5Si$:C,55.59;H,8.67.Found:C,55.55;H,8.69.

3-(R)-5-O-t-Butyldimethylsilyl-1,2-O-isopropylidene-(2,4-dimethoxy pyrimidin-6-yl)-methylribose(25)

化合物16 3.08g(20mmol)をTHF 100mlにサスペンドし,-70° Cに保ち１当量のn-BuLiをゆっくりと滴下した。滴下後温度を-35° Cに上げ、１時間撹拌した。23をTHF20mlに溶かし、この溶液を先の9の懸濁液に30分以上かけ滴下し、更に１時間-35° Cで撹拌した。酢酸を加え中和したのち室温にまでもどし、溶媒を留去残査を酢酸エチルに溶かし2回水洗した。有機層をNa_2SO_4により乾燥した後濃縮乾固し、残査を少量のシリカゲルに吸着させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（φ7.4x15cm,10~20%AcOEt in n-hexaneにより溶出）により精製し、6.87gの25(75%)を得た。また、分析用試料はn-hexaneより結晶化することにより得た。

mp 79~81° C
ms:m/z 456(M^+),441(M^+-Me),399(M^+-tBu)
pmr:δppm ($CDCl_3$);6.33(s,1H,H-5), 5.79(d,1H,H-1',$J_{1',2'}$=3.9Hz), 4.79(s.1H,3'-OH), 4.28(d,1H,H-2'), 4.06-3.84(m,3H,H-4',5'), 3.97(s,6H,OMe), 2.99(d,1H,H-6'a,$J_{6',a,b}$=14.7Hz),2.62(d,1H,H-6'b), 1.58,1.49(s,each 3H,ipr), 0.90(s,9H,tBu), 0.09(s,6H,Me).
Anal. Calcd. for $C_{21}H_{36}N_2O_7Si$:C,55.24;H,7.95;N,6.14. Found: C,55.24;H,7.95,N,6.14.

3-(R)-5-O-Benzoyl-1,2-O-isopropylidene-(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)-methylribose(26)

化合物25　6.25g(13.9mmol)をTHF 50mlに溶解し、14mlの1N Bu_4NFを加え10分間撹拌した。溶媒を留去し残査をピリジン70mlに溶かし、氷冷下ベンゾイルクロリド4ml(excess) を加え一晩撹拌した。減圧下濃縮乾固し、更にトルエンにより3回共沸を行った後残さをクロロホルムに溶解し水で1回、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で3回洗い、有機層をNa_2SO_4により乾燥した。溶媒を留去し残査を少量のシリカゲルに吸着させシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ϕ7.7x16.5cm,20~40% AcOEt in n-hexaneにより溶出）により精製し、5.67g(91%)の26を得た。分析用試料はiPrOHから結晶化することにより得た。

mp 134° C

ms:m/z 446(M^+),431(M^+-Me),388(M^+-58)

pmr:δppm ($CDCl_3$);8.1-8.0(m,2H,oBz), 7.6-7.3(m,3H,Bz), 6.36(s,1H,H-5),5.84(d,1H,H-1',$J_{1',2'}$=3.9Hz),5.18(s,1H,3'-OH), 4.72-4.42(m,2H,H-5'), 4.39(m,1H,H-4'), 4.30(d,1H,H-2'), 3.98(s,6H,OMe), 3.01(d,1H,H-6'a,$J_{6'a,b}$=14.4Hz), 2.68(d,1H,H-6'b), 1.62,1.32(s,each 3H,ipr).

Anal. Calcd. for $C_{22}H_{26}N_2O_8$:C,59.18;H,5.87;N,6.28. Found:C,58.93;H,5.89;N,6.35.

3-(R)-1,2-Di-O-acetyl-5-O-benzoyl-(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)methyl-ribose(27)

化合物26 5.67g(12.7mmol) を90%トリフルオロ酢酸50mlに溶解し室温で1.5時間撹拌した。溶媒を留去し更に、イソプロパノールで3回共沸した後残査を60mlのCH_2Cl_2/Et_3N=5/1の混合溶媒に溶解しAc_2O 5mlを加え2時間撹拌した。MeOHを加え反応をとめた後クロロホルムを加え、水、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で3回分配し、有機層をNa_2SO_4により乾燥した。溶媒を留去し残査を少量のシリカゲルに吸着し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ϕ5.3x24cm,40% AcOEt in n-hexaneにより溶出）により精製し、27 5.71g(92%)をfoamとして得た。

ms:m/z 490(M^+),447(M^+-Ac),431(M^+-AcO)

pmr:δppm ($CDCl_3$);8.15-8.01(m,2H,oBz), 7.53-7.30(m,3H,Bz), 6.43(d,0.3H,H-1',$J_{1',2'}$=5.0Hz), 6.27-6.19(m,1.7H,H-1' and H-5), 5.22,5.04(d,1H,H-2',

$J_{1',2'}$=1.7Hz), 4.65-4.08(m,3H,H-4',5'), 3.97,3.96(s,6H,OMe), 3.09,2.99 (bs,2H,H-6'), 2.13,2.09,2.05,2.04(s,6H,OAc).

2'-O-Acetyl-5'-O-benzoyl-4-O-methyl-6,3'-methanouridine(28)

化合物27 900mg(1.84mmol)をアセトニトリル 15mlに溶解し氷冷下$SnCl_4$ 0.45ml(3.69mmol)を含むアセトニトリル溶液 5mlを加え室温で3時間撹拌した。減圧下濃縮乾固し、残査をクロロホルムに溶かしこれに飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えしばらく撹拌した後、沈殿をセライトろ過した。水層は更にクロロホルムで3回抽出し、有機層を合わせてNa_2SO_4乾燥した。溶媒を留去し残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（φ2.3x23cm,1%MeOH in $CHCl_3$により溶出）により精製し、28 630mg(82%)をアワとして得た。

ms:m/z 416(M^+),373(M^+-Ac)

uv:λ_{max} (MeOH) 281nm

pmr:δppm ($CDCl_3$);8.00-7.90(m,2H,oBz), 7.64-7.28(m,3H,Bz), 6.50(s,1H,H-1'), 5.72(s,1H,H-5), 5.11(s,1H,H-2'), 4.30-4.69(m,3,H-4' and H-5'), 3.88(s,3H,OMe), 3.36(dd,2H,H-6'), 3.65(s,1H,3'-OH), 2.21(s,3H,OAc) .

6,3'-Methanouridine(1)

化合物28 2.0g(4.80mmol)をジオキサン 20mlに溶解しこれに2N NaOH 20mlを加え100°Cに20分間保った。室温に戻した後Dowex 50WX8(H^+form)により中和し、樹脂をろ去し、副生した安息香酸を除くためろ液をエーテルで抽出した。水層を減圧下濃縮し、残査を水から結晶化し660mg(53%)の1を得た。

mp >300°C

uv:λ_{max} (H_2O) 266nm(ε=10900)

CD(H_2O)[θ](nm):-19600(260)

ms:m/z 256(M^+),238

pmr:δppm (DMSO-d_6);11.22(bs,1H,N-3), 5.82(s,1H,H-1'), 5.48(s,1H,H-5), 3.97(dd,1H,H-4',$J_{4',5'}$=2.7,7.1Hz), 3.83(1H,s,H-2'), 3.63(dd,1H,H-5'a,$J_{5'a,b}$=12.0Hz), 3.36(dd,1H,H-5'b), 3.06(d,1H,H-6'a,$J_{6'a,b}$=18.6Hz), 2.83(d,1H,H-6'b).

Anal. Calcd. for $C_{10}H_{12}N_2O_6$:C,46.87;H,4.72;N.10.94. Found:C,46.82;

H, 4.74; N, 10.73.

6,3'-Methanocytidine(29)

化合物28 3.01g(7.23mmol)をメタノール性アンモニア 30mlに溶解し封管中100°Cに20時間保った。室温に冷却し析出した結晶をろ取し1.14g(62%)の29を得た。

mp 310°C

uv: λ_{max} (H_2O) 275nm(ε=9700), λ_{max} (0.1N HCl) 282nm(ε=13600)

CD(H_2O)[θ](nm):-20000(275), (0.1N HCl)[θ](nm):-25000(280)

ms: m/z 255(M^+)

pmr: δppm (DMSO-d_6); 7.07(bs, 2H, NH_2), 5.95(s, 1H, H-1'), 5.80(d, 1H, 2'-OH, J=3.4Hz), 5.50(s, 1H, H-5), 5.45(s, 1H, 3'-OH), 4.74(t, 1H, 5'-OH, J=5.4Hz), 3.95(dd, 1H, H-4'), 3.75(s, 1H, H-2'), 3.55(m, 1H, H-5'a), 3.20(m, 1H, H-5'b), 2.97(d, 1H, H-6'a, J=17.8Hz), 2.85(d, 1H, H-6'b).

Anal. Calcd. for $C_{10}H_{13}N_3O_5 \cdot H_2O$: C, 43.95; H, 5.53; N, 15.38. Found: C, 43.92; H, 5.56; N, 15.65.

2'-O-Acetyl-5'-O-bezoyl-6,3'-methano-4-thiouridine(30)

化合物28 600mg(1.44mmol)をピリジン 4mlに溶解しこの溶液を液体硫化水素(13ml)-ピリジン(5ml)の溶液に加え封管中60°Cに3日間保った。N_2を導入し硫化水素ガスを追い出した後溶媒を留去、残査を少量のクロロホルムに溶かしシリカゲルを加え濃縮した。得られたゲルをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ2.4x7cm)にアプライし50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し574mg(95%)の30を得た。分析用試料はn-hexane-AcOEtより結晶化することにより得た。

mp 171.5-172.3°C

uv: λ_{max} (MeOH) 333nm

ms: m/z 418(M^+), 358, 299

pmr: δppm ($CDCl_3$); 12.69(bs, 1H, N3), 7.94-7.91(m, 2H, o-Bz), 7.69-7.49(m, 3H, Bz), 6.36(s, 1H, H-5), 6.27(bs, 1H, 3'-OH), 6.05(s, 1H, H-1'), 5.22(s, 1H, H-2'), 4.60-4.54(m, 1H, H-4'), 4.35-4.27(m, 2H, H-5'), 3.28(d, 1H, H-6'a, J=18.7Hz), 3.17(d, 1H, H-6'b), 2.16(s, 3H, Ac).

Anal. Calcd. for $C_{19}H_{18}N_2O_7S$:C, 54.57;H, 4.34;N, 6.70;S, 7.67.
Found:C, 54.44;H, 4.29;N, 6.61;S, 7.73

6,3'-Methano-4-thiouridine(31)

化合物30 500mg(1.19mmol)をMeOH 22mlに溶解しこれに1N NaOMe 1.5mlを加え室温で一晩撹拌した。酢酸で中和した後溶媒を留去し残査をEtOH-水より結晶化し155mg(47%)の31を得た。

mp >265°C(decomp.)
uv:λ_{max} (H_2O) 334nm(ε=22100)
CD(H2O)[θ](nm):-17000(334), -2500(274)
pmr:δppm (DMSO-d_6);12.54(bs, 1H, N3), 6.22(s, 1H, H-5), 5.93(bs, 1H, 2'-OH, J=3.6Hz), 5.80(s, 1H, H-1'), 5.61(s, 1H, 3'-OH), 4.80(t, 1H, 5'-OH, J=5.5Hz), 3.97(bd, 1H, H-4'), 3.89(d, 1H, H-2'), 3.64-3.59(m, 1H, H-5'a), 3.44-3.32 (m, 1H, H-5'b), 3.05(d, 1H, H-6'a, J=18.7Hz), 2.84(d, 1H, H-6'a).
Anal. Calcd. for $C_{10}H_{12}N_2O_5S$:C, 44.11;H, 4.44;N, 10.29;S, 11.77.
Found:C, 43.92;H, 4.43;N, 10.12;S, 11.76.

5-(R,S)-(2,4-Dimethoxypyrimidin-6-yl)methyl-2,3-O-isopropylidene-1-methylribose(41)

化合物16　2.48g (16.1mmol)をanhydrous THF 100mlに溶解し、アルゴン気流下、-48°Cに冷却し、n-BuLi 11.5ml (as 1.54 M, 17.7mmol, 1.1eq)をゆっくりと滴下、-43°Cに昇温した後、30分間撹拌した。30分後、2,3-O-Isopropylidene-1-methyl-ribose-5-aldehyde(40) 3.26g (16.1mmol)をTHF 20mlに溶解し、これを先のリチオ体の溶液にシリンジによりゆっくりと滴下し、-43°Cで2時間撹拌した。酢酸で中和した後、室温に戻し、溶媒を留去、残査を酢酸エチルに溶解し、水で2回分配後、Na_2SO_4で乾燥した。Na_2SO_4を濾過し、溶媒を留去、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ6.6x12cm, eluate;10~20~40%AcOEt in n-hexane)により精製し、3.71g (65%)の41をsyrupとして得た。

uv: λ_{max} (MeOH) 260 nm
ms: m/z 356(M^+), 341, 325, 183, 154
pmr: δppm ($CDCl_3$); 6.29 (s, 1H, H-5), 4.97 (m, 2H, H-1' and H-2'), 4.59 (d, 1H, H-3', $J_{2',3'}$=6.2Hz), 4.11 (d, 1H, H-4', $J_{4',5'}$=6.6Hz), 4.05-3.97 (m, 1H, H-5'), 3.97, 3.96 (s, each 3H, 2 and 4-OMe), 3.29 (s, 1H, 1'-OMe), 2.94 (dd, 1H, H-6'a, $J_{6'a,6'b}$=14.7Hz, $J_{5',6'a}$=3.7Hz), 2.77 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$=7.7Hz), 1.48, 1.33(s, each 3H, ipr).

5-Deoxy-5-(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)methyl-2,3-O-isopropylidene-1-methylribose(42)

Method A) 化合物41 700mg (1.97mmol)をDMF 5mlに溶解し、これに、thiocarbonyldiimidazole 1.17g (5.90 mmol, 3eq)を加え、室温で2日撹拌した。溶媒を留去し、残査を酢酸エチルに溶解し、水で5回以上分配した後、Na_2SO_4乾燥した。溶媒を留去、乾固させた後、残査をトルエン 15mlに溶解し、これにBu_3SnH 2.65ml (9.85 mmol, 5eq)、AIBN 10mg(触媒量)を加え、アルゴン気流下、100°Cで1時間撹拌した。溶媒を留去後、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ2.3x21cm, eluate; 5~10~20% AcOEt in n-hexane)により精製し、464mgの42をsyrupとして得た。

Method B) 化合物45(E,Z mixture) 2.50g (7.40mmol)を酢酸エチル 40mlに溶解し、10% Pd/C 300mgを加え、水素気流下、一晩撹拌した。Pd/Cをセライトによりろ去し、ろ液を濃縮乾固、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ2.8x16cm, eluate;10~20%AcOEt in n-hexane)により精製し、少量混在していた16を分離し、2.17g (86%)の42を得た。

uv: λ_{max} (MeOH) 258 nm

ms: m/z 340(M^+), 325, 251, 193, 154
pmr: δppm ($CDCl_3$); 6.23 (s, 1H, H-5), 4.97 (s, 1H, H-1'), 4.62 (d, 1H, H-2', $J_{2',3'}$=5.9Hz), 4.56 (d, 1H, H-3'), 4.17 (t, 1H, H-4', $J_{4',5'}$=7.7Hz), 3.97, 3.95 (s, each 3H, 2 and 4-OMe), 3.38 (s, 3H, 1'-OMe), 2.75 (ddd, 1H, H-6a', $J_{5',6'a}$= 6.6Hz), 2.70 (ddd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$=6.6Hz, $J_{6'a,6'b}$=13.5Hz), 1.96 (q, 2H, H-5'), 1.48, 1.31 (s, each 3H, ipr).

Pyrimidopyridoxolane derivative(48)

化合物16 770mg (5.00mmol) をTHF 40mlに溶解し、アルゴン気流下、-35°Cにおいてn-BuLi 3.1ml (1.61M, 5.00mmol)をゆっくりと滴下し、滴下後-35°Cで30分間撹拌した後、-80°Cに冷却した。Chlorotrimethylsilane0.67 ml (5.28mmol, 1.05eq)をTHF 10mlに溶解した溶液を-80°Cにおいて10分間以上かけて滴下し、滴下後-80°Cで1時間撹拌した。溶液に 1N NH_4Cl 50mlを加え、室温にまで昇温した後、エーテル 50mlを加え分液、水層を更にエーテル 20mlにより3回抽出し合わせた有機層を飽和食塩水で分配した後、Na_2SO_4乾燥した。ろ液を減圧下濃縮乾固し化合物43を得た。43はそのまま精製せず次の反応へ用いた。

化合物43(as 5.00mmol)をTHF 10mlに溶解し、この溶液を-35°Cにおいて、常法に従い調製したLDA溶液(5.00mmol in 40ml THF)にアルゴン気流下、ゆっくりと滴下した。-35°Cにおいて40分間撹拌した後、-70°Cに冷却し、これに今本らの方法[30]に従い調製した無水$CeCl_3$ (as 1.94g of $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, 5.20mmol)をTHF 15mlに懸濁したものを-70°Cでシリンジにより一気に加え、更に-70°Cで30分間撹拌した。この溶液に化合物40 1.03g (5.00mmol)をTHF10mlに溶解したものをゆっくりと滴下した。混合物を-70°Cにおいて1時間撹拌した後、2時間かけ室温にまでゆっくりと昇温し、このオレンジ色の溶液に飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、激しく約5分間撹拌した。沈殿をセライト濾過により除いた後、エーテルにより水層を4回抽出し、合わせた有機層をNa_2SO_4乾燥した。溶媒を留去後、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ3.7x14 cm, eluate;5~10% AcOEt in n-hexane)により精製し1.42gの45及びシラノール47の混合物を得た。この混合物を30mlのTHFに溶解し、アルゴン気流下、水素化カリウム 80mg (2.00mmol)をTHF 10mlに溶解したものを氷浴上でゆっくりと滴下、1時間氷浴上で撹拌した後、室温で更に1時間撹拌した。1N NH_4Clで中和後、エーテルにより水層を4回抽出し合わせた有機層をNa_2SO_4乾燥し溶媒を留去後、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ5.1x7 cm, eluate;20~40% AcOEt in n-hexane)により精製し、710mg(51%)の48を得た。分析用試料は、n-hexane-EtOHより結晶化することにより得た。

mp 124.0-124.5°C
uv: λ_{max} (MeOH) 313 nm, λ_{max} (H^+) 330 nm
ms: m/z 280(M^+), 262, 220, 191
pmr: δppm ($CDCl_3$); 7.32 (d, 1H, H-5', $J_{5',6'}$=15.4Hz), 6.82 (d, 1H, H-6'), 6.29

(s, 1H, H-5), 5.42 (d, 1H, H-3', $J_{2;3}$=2.9Hz), 5.26 (d, 1H, H-1'), 4.69 (bs, 1H, H-2'), 4.02, 3.97 (s, each 3H, 2 and 4-OMe), 3.55 (s, 3H, 1'-OMe), 1.83 (bd, 1H, 2'-OH).

Anal. Calcd. for $C_{13}H_{16}N_2O_5$: C, 55.71; H, 5.75; N, 10.00. Found: C, 55.81; H, 5.97; 9.78.

5-(E,Z)-5-Deoxy-(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)methylidene-2,3-O-isopropylidene-1-methylribose(45)

Method A) 先と同様の方法により調製した43 (2.00mmol)を同様に-35°Cにおいてアルゴン気流下、LDA (20ml of THF, 2.00mmol)によりリチオ化し、この溶液に40 404mg (2.00mmol)を10mlのTHFに溶解したものをゆっくりと滴下しアルゴン気流下-35°Cにおいて、1時間撹拌した。1時間後、反応液を3時間かけ室温にまで戻した後、水を加え、約5分間激しく撹拌した。水層をエーテルにより3回抽出し、Na_2SO_4乾燥後、溶媒を留去、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ1.7x12.5cm)により精製した。5% AcOEt in n-hexaneにより溶出したところless polar productとして、119mgのZ-45を、more polar productとして77mgのE-45をそれぞれsyrupとして得た。収率は29%であった。

Method B) 同様の方法により調製した43 (as 10mmol)をTHF 7mlに溶解し、アルゴン気流下、-35°CにおいてLDA-THF溶液 (10mmol in 50ml THF)にゆっくりと滴下し-35°Cで40分間撹拌、リチオ化した。-70°Cまで冷却した後、無水 $CeCl_3$(as $CeCl_3 \cdot 7H_2O$, 3.91g, 10.5mmol)をTHF 20mlにサスペンドした溶液を一気に加え、その後、-70°Cで30分間撹拌し、トランスメタル化を行った。40 2.19g (10.8mmol)をTHF 10mlに溶解し、これを、-70°Cにおいてゆっくりと混合物へと滴下し、滴下後、更に2.5時間撹拌した。2時間かけ、ゆっくりと室温にまで戻した後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、激しく撹拌、沈殿をセライトろ去した後、ろ液をエーテル/水で分配、水層を3回エーテル抽出し、合わせた有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後、減圧下溶媒を留去し、残査を塩化メチレン 80mlに溶解、氷冷下、Diisopropylethylamine 2ml (11mmol), アセチルクロライド 0.71 ml (10mmol)を加えた後、室温で一晩撹拌した、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、更に、クロロホルムを加え、分配。水層を3回クロロホルムで抽出し、合わせた有機層をNa_2SO_4乾燥した。溶媒を留去し、得られた残査をTHF 50mlに溶解し、1M Bu_4NF THF溶液 7ml (7mmol)を加え、室温で20分間撹拌した。溶媒を留去後、残査をエーテルに溶かし、水で2回、飽和食塩水で1回分液し、有機層をNa_2SO_4乾燥した。ろ液を濃縮乾固し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ4.9x13.5cm, eluate; 10~20% AcOEt in n-hexane)により精製し、2.50g (74%, E/Z=2.2/1)の45及び分離できない少量の16を含む混合物を得た。

Z-45
uv:λ_{max} (MeOH) 285nm
ms: m/z 338(M^+), 323, 210, 195
Exact ms:Calcd. for $C_{16}H_{22}N_2O_6$:338.14786. Found 338.14837
pmr:δppm ($CDCl_3$);6.29 (s, 1H, H-5), 6.22 (dd, 1H, H-6', $J_{5',6'}$=11.7Hz, $J_{3',6'}$=1.1 Hz), 6.13 (d, 1H, H-4'), 6.04 (dd, 1H, H-5', $J_{4',5'}$=8.1Hz), 5.04 (s, 1H, H-1'), 4.68 (d, 1H, H-3', $J_{2',3'}$=5.9Hz), 4.63 (d, 1H, H-2'), 4.06, 3.96 (s, each 3H, 2 and 4-OMe), 3.41 (s, 3H, 1'-OMe), 1.48, 1.29 (s, each 3H, ipr).

E-45
uv:λ_{max} (MeOH) 286 nm
ms: m/z 338(M^+), 323, 220, 195, 179
Exact ms:Calcd. for $C_{16}H_{22}N_2O_6$:338.14786. Found 338.14286
pmr:δppm ($CDCl_3$);6.98 (dd, 1H, H-5', $J_{5',6'}$=15.6Hz, $J_{4',5'}$=7.7Hz), 6.46 (dd, 1H, H-6', $J_{3',6'}$=1.1Hz), 6.24 (s, 1H, H-5), 5.05 (s, 1H, H-1'), 4.83 (d, 1H, H4'), 4.73 (dd, 1H, H-3', $J_{2',3'}$=5.9Hz), 4.66 (d, 1H, H-2'), 4.00, 3.96 (s, each 3H, 2 and 4-OMe), 3.38 (s, 3H, 1'-OMe), 1.52, 1.33 (s, each 3H, ipr)

5-Deoxy-5-(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)methyl-1,2,3-tri-O-acetylribose (49)

化合物42 1.28g (3.76mmol)を70% トリフルオロ酢酸溶液 10mlに溶解し、室温で4時間撹拌した。減圧下溶媒を留去した後、トルエンで3回共沸し残査をアセトニトリル42 mlに溶解し、この溶液に、氷冷下、トリエチルアミン 12 ml(excess)、無水酢酸 3ml (excess)を加えた後、室温で一晩撹拌した。減圧下濃縮し、残査を、酢酸エチルに溶解し、水で1回、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で3回、水、飽和食塩水で1回ずつそれぞれ分液した後、有機層をNa_2SO_4乾燥した。ろ液を濃縮し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ϕ2.8x16cm, eluate;20~30% AcOEt in n-hexane)により精製し、1.11g (72%)の49をsyrupとして得た。

ms: m/z 412(M^+), 293, 251, 233, 154
pmr:δppm ($CDCl_3$);6.22 (s, 1H, H-5), 6.14 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$=1.0Hz), 5.34 (dd, 1H, H-2', $J_{2',3'}$=4.6Hz), 5.22 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$=11.2Hz), 4.29-4.01 (m, 1H, H-4'), 3.97, 3.95 (s, each 3H, 2, and 4-OMe), 2.82-2.63 (m, 2H, H-5'), 2.29-1.86;2.11, 2.10. 2.04 (m, H-6';s, OAc, total 5H).

2',3'-Di-O-acetyl-6,6'-cyclo-5',6'-dideoxy-1-(β-D-allofuranosyl)-4-O-methyluracil(50)

化合物49 1.11g (2.69mmol)をアセトニトリル 10mlに溶解し、この溶液を$SnCl_4$

0.38ml (3.23mmol, 1.2eq)をアセトニトリル 30mlに溶解した溶液に、氷冷下、一気に加えた後、室温で2.5時間撹拌した。溶媒を留去し、残査をクロロホルムに溶かし、これに飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、約5分間激しく撹拌した。沈殿をセライトろ過により除いた後、有機層を分離、水層をクロロホルムで5回抽出した後、水層を2N HClで中和し、減圧下濃縮乾固し、残査をクロロホルムで抽出し、合わせた有機層をNa_2SO_4乾燥した。ろ液を濃縮し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ2.4x15cm, eluate;$CHCl_3$ 0.5% EtOH in $CHCl_3$)により精製し、600mg(66%)の50を白色のfoamとして得た。

uv:λ_{max} (MeOH) 280 nm
ms: m/z 338(M^+), 279, 166, 140
Exact ms:Calcd. for $C_{15}H_{18}N_2O_7$;338.11144. Found 338.1127
pmr:δppm ($CDCl_3$);7.04 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$=1.8Hz), 5.77 (s, 1H, H-5), 5.49 (dd, 1H, H-2', $J_{2',3'}$=6.2Hz), 5.36 (d, 1H, H-3'), 4.56 (t, 1H, H-4', $J_{4',5'}$=3.7Hz), 3.94 (s, 3H, OMe), 2.89 (ddd, 1H, H-6'a, $J_{6'a,6'b}$=16.1Hz, $J_{5',6'a}$=4.0, 4.8Hz), 2.69 (ddd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$=4.8, 11.4Hz), 2.17-2.01;2.14, 2.13 (m, H-5';s, OAc, total 8H).

6,6'-Cyclo-5',6'-dideoxy-1-(β-D-allofuranosyl)uracil(6)

化合物50 300mg (0.888mmol)をジオキサン 4mlに溶解し、これに2N NaOH 4mlを加え、油浴上、20分間100°Cで還流した。室温にまで冷却した後、Dowex 50W-X8 (H^+ form)で中和し、樹脂を濾過により除去、ろ液を濃縮した。残査をエタノールで3回共沸し、残査をメタノールに溶解、少量のシリカゲルを加え、溶媒を留去した。残ったゲルをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにアプライ、精製し、(φ2.4x8 cm, eluate;30% EtOH in $CHCl_3$) 140mg (66%)の6を得た。

CD in H_2O [θ](nm): 0(270), -10900(240)
pmr:δppm (DMSO-d_6); 11.29 (bs, 1H, N3-H), 6.33 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$=1.7Hz), 5.62 (bs, 1H, H-5), 5.37 (d, 1H, 2'-OH, J=7.2Hz), 5.15 (d, 1H, 3'-OH, J=4.9Hz), 4.52-4.48 (m, 1H, H-2' $J_{2',3'}$=6.0Hz), 4.31 (bs, 1H, H-4'), 4.14-4.10 (m, 1H, H-3'), 2.75-2.53 (m, 2H, H-6'), 1.91-1.70 (m, 2H, H-5').

6,6'-Cyclo-5',6'-dideoxy-1-(β-D-allofuranosyl)cytosine(51)

化合物 50 300mg (0.888mmol) をメタノール 10mlに溶解し、これにメタノール性アンモニア 20 mlを加え、封管中22時間100°Cに保った。開封後、溶媒を留去し、残査を水に溶かし、イオン交換カラムクロマトグラフィー(Dowex 50W-X8, φ1.7x 11.5cm)に吸着し水 400mlで洗った後、1N NH_4OHで溶出した。溶媒を減圧下、留去し、残査をエタノールで3回共沸した後、200mg (94%)の51を得た。
分析用試料は少量を1N HClに溶解し、溶媒を留去、残査をエタノールで3回共沸し

た後、エタノール-水又はメタノールより結晶化することにより塩酸塩として得た。

mp (HCl salt) 210°C(deccomp.)
uv:λ_{max} (H_2O) 276 nm(ε=9700), λ_{max} (0.1N HCl) 283 nm(ε=14000)
CD in H_2O [θ](nm):0(275), -29000(218); in 0.1 N HCl [θ](nm): 3000(275)
ms: m/z 239(M^+), 210, 125
pmr:δppm (DMSO-d_6):7.03 (bd, 2H, 4-NH_2), 6.51 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$=1.5Hz), 5.59 (s, 1H, H-5), 5.27 (bs, 2H, 2'- and 3'-OH), 4.40 (dd, 1H, H-2', $J_{2',3'}$=5.9Hz) 4.27 (t, 1H, H-4', $J_{4',5'}$=2.6Hz), 4.09 (d, 1H, H-3'), 2.61-2.56 (m, 2H, H-6'), 1.87-1.64 (m, 2H, H-5').
Anal. Calcd. for $C_{10}H_{14}N_3O_4Cl$:C, 43.57;H, 5.12;N, 15.24;Cl, 12.86. Found: C, 43.49;H, 5.16;N, 15.16;Cl, 12.73.

2', 3'-Di-O-acetyl-6, 6'-cyclo-5', 6'-dideoxy-1-(β-D-allofuranosyl)-4-thiouracil(52)

化合物50 160 mg(0.473mmol)をピリジン 4mlに溶解し、これにliq.H_2S 13mlとピリジン 5mlを加え、封管中、3日間60°Cに保った。開封後、窒素を通じ、H_2Sを追い出し、溶媒を留去、トルエンで2回共沸した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ϕ1.7x7cm, eluate;30~60% AcOEt in n-hexane)により精製し、126mg (78%)の52を得た。分析用試料は、エタノールより結晶化することにより得た。

mp 200°C (sublimed)
uv:λ_{max} (MeOH) 332 nm
ms: m/z 340(M^+), 298, 209, 167, 142
pmr:δppm ($CDCl_3$);9.24 (bs, 1H, N3-H), 6.73 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$=1.8Hz), 6.35 (s, 1H, H-5), 5.51 (dd, 1H, H-2', $J_{2',3'}$=6.2Hz), 5.37 (d, 1H, H-3'), 4.61 (m, 1H, H-4'), 2.80-2.58 (m, 2H, H-6'), 2.14 (s, 6H, OAc), 2.14-2.05 (m, 2H, H-5').
Anal. Calcd. for $C_{14}H_{16}N_2O_6S$:C, 49.41;H, 4.74;N, 8.23;S, 9.42. Found:C, 49.53; H, 4.67;N, 8.07;S, 9.32.

6, 6'-Cyclo-5', 6'-dideoxy-1-(β-D-allofuranosyl)-4-thiouracil(53)

化合物52 102mg (0.300mmol) をメタノール 10mlに懸濁し、これにトリエチルアミン 0.5 mlを加え室温で18時間撹拌した。溶媒を減圧下留去し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ϕ1.7x5.5cm, eluate; 4~8% MeOH in n-hexane)により精製し、59mg (77%)の52を得た。分析用試料はエタノール-水より結晶化することにより得た。

mp 185.0-186°C
uv:λ_{max} (H_2O) 335nm(ε=23700)
CD in H_2O [θ](nm):-1600(330)
ms: m/z 266(M^+), 167, 142, 124
pmr:δppm (DMSO-d_6);12.65 (bs, 1H, N3-H), 6.38 (s, 1H, H-5), 6.30 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$=1.1Hz), 5.41 (d, 1H, 2'-OH, J=7.7Hz), 5.20 (d, 1H, 3'-OH, J=4.4Hz), 4.58-4.54 (m, 1H, H-2', $J_{2',3'}$=6.0Hz), 4.34 (bs, 1H, H-4'), 4.15-4.11 (m, 1H, H-3'), 2.76-2.53 (m, 2H, H-6'), 1.92-1.68 (m, 2H, H-5').
Anal. Calcd. for $C_{10}H_{12}N_2O_4S$:C, 46.87;H4.72;N, 10.93;S, 12.51. Found C, 46.92;H, 4.76;N, 10.95;S, 12.48.

第3章の実験

Isopropyl 3,5-di-O-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-ribo-pentofuranoside (65)

D-ribose 5.0 g(33.3 mmol)を1% HCl/isoPrOHにサスペンドし、室温で、2.5時間かくはんした。トリエチルアミンを加え中和した後、溶媒を減圧下留去し、更に、ベンゼンで2回、共沸した。残査をピリジン 100mlに溶解し、1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxane 10.5 ml(33.3 mmol,1 eq)を加え、室温で一晩撹拌した。溶媒を留去し、トルエンで2回共沸したのち、残査をAcOEtに溶解し、水で2回洗った。Na_2SO_4乾燥後、濃縮乾固し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ6.4x20 cm,10~20% Et_2O in n-hexanにより溶出)により精製した。溶媒を留去し、65を8.49g(58%)の白色の結晶として得た。

mp:43.5-45℃
ms: m/z 391(M^+-iPr)
pmr: δ ppm($CDCl_3$);5.03(s,1H,H-1), 4.53(bt,1H,H-3,J=5.1,5.5Hz),
4.05-3.79(m,5H,H-2,H-3,H-4 and $(CH_3)_2CHO$), 2.98(bd,1H,2-OH,J=0.7Hz),
1.15-0.99(m,34H,iPr,$(CH_3)_2CHO$).
Anal. Calcd. for $C_{20}H_{46}O_6Si_2$:C,55.26;H,9.74. Found:C,55.14;H,9.74.

Isoprpyl 3,5-di-O-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-erythro-pentofuranosid-3-ulose(59)

化合物65 8.26g(19.0mmol)をRobinsらの方法[21]に従い調製したCrO_3/Pyridine complex[CrO_3 5.7g(57mmol),Pyridine 9.5 ml(117mmol),Ac_2O 5.7ml(60mmol)]のCH_2Cl_2(130 ml)溶液に加え、室温で3時間撹拌した。更に同量の試薬を加え、1時間撹拌した。混合物をn-hexane/AcOEt=1/1,1.5 lの溶液に滴下し、沈殿をセライトろ過により除去し、ろ液を減圧下濃縮した。得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ7.7x11cm 20% Et_2O in n-hexaneにより溶出)により精製し、6.36g(77%)の59をcolorless oilとして得た。

ms:m/z 389(M^+-ipr),347,273
pmr: δ ppm($CDCl_3$);4.83(d,1H,H-1,J=0.7Hz), 4.58(dd,1H,H-3,$J_{3,4}$=8.4Hz),
4.15-4.03(m,2H,H-5), 3.98(q,1H,$(CH_3)_2CHO$,J=6.2Hz), 3.89-3.83(m,1H,H-4),
1.22(dd,6H,$(CH_3)_2CHO$), 1.19-0.96(m,28H,iPr).

Isopropyl (Z)-2-deoxy-2C-[(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)methylene]-3,5-di-O-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-erythro-pentofuranoside(61)

化合物16 2.26g(14.7mmol)より調製した43をTHF 100mlに溶かし、アルゴン気流下、-40℃でn-BuLi 9.5 ml(1.55M, 14.7mmol)を加え、-40℃で30分間撹拌し、リチオ化を行った。-60℃にまで冷却した後、59 6.36g (14.7mmol)をTHF 20mlに溶した溶液をゆっくりと滴下したのち、-60℃で1時間撹拌した。1.5時間かけて室温にまで戻し、水を加えしばらく撹拌した後、Et_2Oで3回抽出し, Na_2SO乾燥した。溶媒を留去し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ5.3x18cm, 5~10% Et_2O in n-hexane により溶出)により精製し、6.35g(76%)の61をsyrupとして得た。

uv: λmax(MeOH) 284nm, 242nm(sh), λmax(H^+) 311nm(sh), 299nm, 290nm(sh)
ms:m/z 568(M^+), 525(M^+-43)
Exact ms:Calcd. for $C_{27}H_{48}O_7N_2Si_2$;568.3001. Found 568.2994
pmr: δ ppm($CDCl_3$);6.42(s, 1H, H-5), 6.38(d, 1H, vinylCH, J=1.5Hz), 6.23(s, 1H, H-1'), 5.06(dd, 1H, H-3' $J_{3',4'}$=6.6Hz), 4.12-3.93(m, 3H, H-5', OCH(CH_3)$_2$), 4.00, 3.97(s, each 3H, OMe), 3.80-3.74(m, 1H, H-4'), 1.23(d, 6H, OCH(CH_3)$_2$, J=6.2Hz), 1.10-1.06(m, 28H, iPr).

Isopropyl 2-deoxy-2C-[(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)methyl]-3,5-di-O-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-arabino-pentofuranoside(66)

化合物61 6.12g(10.8mmol)をAcOEt 150 mlに溶解し、これに10% Pd-C 3gを加え、一晩常圧接触還元を行った。セライトろ過により、Pd-Cを除いた後、溶媒を留去し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ6.3x13.5cm, 10% Et_2O in n-hexaneにより溶出)により精製し、5.04g(82%)の66をcolorless oilとして得た。

uv: λmax(MeOH) 256 nm
ms:m/z 570(M^+), 543(M^+-iPr)
Exact ms: Calcd. for $C_{27}H_{50}N_2O_7Si_2$;570.3158. Found;570.3140
pmr: δ ppm($CDCl_3$);6.24(s, 1H, H-5), 4.90(d, 1H, H-1', J=3.3Hz), 4.32(dd, 1H, H-3', J=5.1, 8.1Hz), 4.02-3.77(m, 3H, H-4', 5'), 3.98, 3.94(s, each 3H, OMe), 3.72(dq, 1H, OCH(CH_3)$_2$, J=6.2Hz), 2.87-2.79(m, 3H, H-2', 6'), 1.12-1.10(m, 31H, iPr, OCH(CH_3)$_2$), 0.91(d, 3H, OCH(CH_3)$_2$).

Isopropyl 2-deoxy-3,5-di-O-benzoyl-2C-[(2,4-dimethoxypyrimidin-6-yl)-methyl]-β-D-arabino-pentofuranoside(67)

化合物66 5.04g(8.83mmol)をTHF 50 mlに溶解し、これにテトラブチルアンモニウムフロライド 17.7 ml(17.7 mmol, 2eq)を加え、室温で10分間撹拌した。減圧下溶媒を留去し、残査をアセトニトリル 50 mlに溶かし、この溶液に無水安息香酸 5.99g(26.5 mmol, 3eq), トリエチルアミン 3.7ml(26.5mmol, 3eq), DMAP 25mg(触媒量)を加え、室温で一晩撹拌した。減圧下濃縮したのち、残査をAcOEtに溶解し、水、

sat $NaHCO_3$×2, sat NaClで洗ったのち、有機層をNa_2SO_4乾燥した。
溶媒を留去し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ6.4x9.5cm, 10~20% AcOEt in n-hexaneにより溶出)により精製し、4.19gの67(88%)を得た。

ms:m/z 536(M), 493(M-iPr)
Exact ms: Calcd. for $C_{29}H_{32}N_2O_8$;536.2159. Found;536.2147
pmr: δ ppm($CDCl_3$);8.04-7.89(m, 4H, o-Bz), 7.58-7.33(m, 6H, Bz), 6.22(s, 1H, H-5), 5.58(dd, 1H, H-3', J=5.5, 9.2Hz), 5.21(d, 1H, H-1', J=5.1Hz), 4.66(dd, 1H, H-5'a, $J_{5'a,b}$=11.4Hz, $J_{4',5'a}$=4.8Hz), 4.54(dd, 1H, C-5'b, $J_{4',5'b}$=7.3Hz), 4.43-4.36(m, 1H, H-4'), 3.93-3.81(m, 1H, OCH(CH_3)$_2$), 3.93, 3.81(s, each 3H, OMe), 3.25-3.16(m, 1H, H-2'), 2.99(dd, 1H, H-6'a, $J_{6'a,b}$=14.3Hz, $J_{2',6'a}$=8.4Hz), 2.87 (dd, 1H, H-6'b, $J_{2',6'b}$=6.6Hz), 1.18, 1.00(d, each 3H, OCH(CH_3)$_2$, J=6.2Hz).

1-O-Acetyl-2-deoxy-3, 5-di-O-benzoyl-2C-[(2, 4-dimethoxypyrimidin-6-yl)-methyl]-α, β-D-arabino-pentofuranose(68)

化合物67 4.07g(7.58mmol)を 70% トリフルオロ酢酸溶液に溶解し、この溶液を室温で65時間撹拌した。減圧下、溶媒を留去したのち、トルエンで3回共沸し、残査を$CHCl_3$に溶かしsat $NaHCO_3$で洗い、更に有機層を$CHCl_3$で3回抽出した。合わせた有機層を、Na_2SO_4乾燥し、溶媒を留去、残査をピリジン 80 mlに溶解し、これに無水酢酸 1.45 ml(15.4mmol)、DMAP 20mg(触媒量)を加え室温で2時間撹拌した。EtOHを加え、quenchしたのち、減圧下濃縮し、残査にトルエンを加え2回共沸し、残査をAcOEtに溶かし水で2回分配し、Na_2SO_4乾燥した。溶媒を留去し、得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ6.4x7 cm, 20~40% AcOEt in n-hexaneにより溶出)により精製し、2.30g(57%)の68をα、βアノマーの混合物として得た。

ms:m/z 536(M^+), 493(M^+-iPr), 477, 154
Exact ms: Calcd. for $C_{28}H_{28}N_2O_9$;536.1795. Found;536.1781
pmr: δ ppm($CDCl_3$);8.09-7.87(m, 4H, o-Bz), 7.63-7.35(m, 6H, Bz), 6.46(d, 0.4H, H-1'β, J=4.8Hz), 6.32(s, 0.6H, H-1'α), 6.19(s, 0.6H, H-5α), 6.17(s, 0.4H, H-5β), 5.68(dd, 0.4H, H-3'β, J=6.2, 9.5Hz), 5.35-5.33(m, 0.6H, H-3'α), 4.75-4.45(m, 3H, H-4', 5'), 3.91, 3.90, 3.89, 3.80(s, total 6H, OMe), 3.39-3.36 (m, 0.4H, H-2'β), 3.13-3.02(m, 0.6H, H-2'α), 2.97-2.90(m, 2H, H-6'), 2.10 (s, 1.8H, OAc-α), 1.99(s, 1.2H, OAc-β).

2'-Deoxy-3', 5'-di-O-benzoyl-4-O-methyl-6, 2'-methanouridine(69)

化合物68 2.30g(4.29mmol)をアセトニトリル 30mlに溶解し、この溶液を氷冷下、スタニッククロライド 0.5ml(4.27mmol)のアセトニトリル溶液(50ml)に滴下し、この混合物を室温で3時間撹拌した。減圧下溶媒を留去したのち、残査を$CHCl_3$に溶

かし、これにsat $NaHCO_3$を加え激しくかくはんした。沈殿をセライトろ過し、水層を$CHCl_3$で4回抽出し、Na_2SO_4乾燥した。溶媒を留去し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ2.8x27cm, $CHCl_3$(ca 0.5% EtOHを安定剤として含む状態)により溶出)により精製し、1.55g(78%)の69をpale orange foamとして得た。

uv: λmax(MeOH) 272nm, 228nm
ms:m/z 462(M^+), 357, 340
Exact ms: Calcd. for $C_{25}H_{22}O_7N_2$;462.1427. Found;462.1410
pmr: δppm($CDCl_3$);8.03-7.92(m, 4H, o-Bz), 7.64-7.36(m, 6H, Bz), 6.47(d, 1H, H-1', J=6.2Hz), 5.74(s, 1H, H-5), 5.29(dd, 1H, H-3', J=2.4, 4.2Hz), 4.73-4.67(m, 1H, H-4'), 4.51(d, 2H, H-5', J=5.1Hz), 3.95(s, 3H, OMe), 3.43-3.39(m, 2H, H-6'), 3.33-3.25 (m, 1H, H-2').

2'-Deoxy-6, 2'-methanouridine(3)

化合物69 100mg(0.216mmol)をジオキサン 2mlに溶解し、これに2N NaOH 2mlを加え、40分間 100℃に保った。室温までさました後、Dowex 50W-X8(H form)で中和した。樹脂をろ去し、樹脂をMeOHでよく洗ったのち、合わせたろ液を減圧下濃縮し、大部分のMeOHを留去した。これに水を加え、etherで2回洗った後、水層を濃縮乾固し、残査をEtOHで3回共沸し、得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ1.7x4.5cm, 4~6~8% MeOH in $CHCl_3$により溶出)により精製し42mg(81%)の3を得た。分析用試料は$MeOH-H_2O$より結晶化することにより得た。

mp 195-198°C
ms:m/z 240(M^+);
CD in H_2O [θ](nm):-26000(261)
pmr: δppm(DMSO-d_6);11.02(bs, 1H, N-3), 6.01(d, 1H, H-1', J=6.1Hz), 5.40(s,, 1H, H-5), 5.38(bd, 1H, 3'-OH), 4.86(bt, 1H, 5'-OH), 3.96(bs, 1H, H-3'), 3.89-3.85(m, 1H, H-4'), 3.36(bd, 2H, H-5', J=4.4Hz), 3.20-3.05(m, 1H, H-6'a), 2.97(m, 2H, H-6'b, H-2').
Anal. Calcd. for $C_{10}H_{12}N_2O_5$:C, 50.00;H, 5.04;N, 11.66. Found:C, 49.85;H, 5.09;N, 11.63.

2'-Deoxy-6, 2'-methanocytidine(70)

化合物69 320mg(0.692mmol)をMeOH 10mlに溶解し、これにメタノール性アンモニア20 mlを加え、封管中、100℃に22時間保った。溶媒を留去した後、残査をエタノールより結晶化し、84mgの70を、また、母液を濃縮し、32mg(total 70%)の70を得た。
また、分析用試料は少量の70を、$EtOH-H_2O$より再結晶することにより得た。

mp >250℃(dec)
uv: λmax(H_2O) 267 nm(ε=9640), λmax(0.1N HCl) 276 nm(ε=13300)
CD in H_2O [θ](nm):-25700 (267), in 0.1N HCl[θ](nm):-23400(275)
FAB-ms:m/z 957($4M^+1$), 718($3M^+1$), 479($2M^+1$), 240(M^+1);
pmr: δ ppm(DMSO-d_6);6.99(bd, 2H, 4-NH_2), 5.98(d, 1H, H-1', J=6.2Hz), 5.49 (s, 1H, H-5), 5.32(d, 1H, 3'-OH, J=4.8Hz), 4.81(t, 1H, 5'-OH, J=5.5, 5.9Hz), 3.94-3.91(m, 1H, H-3'), 3.84-3.79(m, 1H, H-4'), 3.30-3.25(m, 2H, H-5'), 3.14 (dd, 1H, H-6'a, J=9.5, 17.6Hz), 2.93-2.77(m, 2H, H-6'b, -2').
Anal. calcd. for $C_{10}H_{13}N_3O_4 \cdot H_2O$:C, 46.69;H, 5.88;N, 16.34. Found:C, 46.63; H, 5.94;N, 16.22.

2'-Deoxy-3', 5'-di-O-benzoyl-6, 2'-methano-4-thiouridine(71)

化合物69 500mg(1.08 mmol)をピリジン 4 mlに溶解し、これに、ピリジン 5 ml, liq.H_2S 13 mlの混合物を加え、封管中、3日間、60℃に保った。減圧下溶媒を留去し、更に、トルエンで3回共沸し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ2.3x 8.5cm, 25~30~50% AcOEt in n-hexaneにより溶出)により精製し、450mg(90%)の71を得た。また、分析用試料は$CHCl_3$-MeOHより結晶化することにより得た。

mp 115.5-117.3℃
uv: λmax(MeOH) 331 nm
ms:m/z 464(M^+)
pmr: δ ppm($CDCl_3$);9.27(bs, 1H, N3), 8.04-7.94(m, 4H, o-Bz), 7.65-7.41(m, 6H, Bz), 6.36-6.34(m, 1H, H-1'), 6.28(s, 1H, H-5), 5.31(d, 1H, H-3', J=3.7Hz), 4.72(q, 1H, H-4', J=4.4Hz), 4.57(d, 2H, H-5', J=4.8Hz), 3.35-3.25(m, 3H, H-2', H-6').
Anal. Calcd. for $C_{24}H_{20}N_2O_6S \cdot H_2O$:C, 59.74;H, 4.60;N, 5.81;S, 6.64. Found: C, 59.99;H, 4.79;N, 5.90;S, 6.61.

2'-Deoxy-6, 3'-methano-4-thiouridine(72)

化合物71 350mg(0.754 mmol)をMeOH 10mlにサスペンドし、これにNaOMe 1mlを加え室温で13時間撹拌した。得られた溶液を酢酸で中和し、析出した固体を吸引ろ取し、83mgの72を得た。また、ろ液を濃縮し、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ1.7x7.5cm, 4~8% MeOH in $CHCl_3$により溶出)により精製し、68mg(total 78%)の72を得た。また分析用試料はMeOHより結晶化することにより得た。

mp >225℃(decomp.)
uv: λmax(H_2O) 330 nm(ε=23000)
CD in H_2O[θ](nm):-12600(333), -7700(266), +4900(235)

ms:m/z 256(M^+)
pmr: δ ppm(DMSO-d_6);12.40(bs, 1H, 3-NH), 6.20(s, 1H, H-5), 6.06(d, 1H, H-1', J=6.6Hz), 3.99(t, 1H, H-3', J=2.2Hz), 3.93-3.89(m, 1H, H-4'), 3.34(d, 2H, H-5', J=4.4Hz), 4.9-3.8(bs, 2H, 5'-OH and 3'-OH), 3.14(dd, 1H, H-6'a, J=11.5, 19.8Hz), 3.00-2.91(m, 2H, H-6'b and H-2').
Anal. Calcd. for $C_{10}H_{12}N_2O_4S$:C, 46.87;H, 4.72;N, 10.93;S, 12.51. Found: C, 46.87;H, 4.77;N, 10.79;S, 12.42.

第4章の実験

6-Ethynyl-2,4-dimethoxypyrimidine(74)

6-ヨードピリミジン[35] 75 7.40g(27.8mmol)をアセトニトリル 150mlに溶解しこの溶液に$PdCl_2(PPh_3)_2$ 975mg(1.39mmol,5mol%),Et_3N 5.81ml (41.7mmol,1.5eq) ヨウ化銅 795mg(4.17mmol),TMSアセチレン 5.9ml(41.7mmol,1.5eq)を加え室温で1.5時間撹拌した。硫化水素を通じ析出した沈殿をセライトろ過し、ろ液を濃縮した。残査を少量のクロロホルムに溶解しシリカゲルを加え溶媒を留去し得られたゲルをシリカゲルカラム(φ7.7x6.5cm)にアプライし40% AcOEt in n-hexaneにより溶出した。得られたフラクションを濃縮し残査をMeOH 200mlに溶解しこの溶液にシリカゲル 30gを加え室温で2時間撹拌した。溶媒を留去し残ったゲルをシリカゲルカラム(φ6.3x14cm)にアプライし20~40~60%AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し4.10g(90%)の74を得た。

mp 189.5-190.0°C
uv:λ_{max} (MeOH) 291nm
ms:m/z 164(M^+),107
pmr:δppm ($CDCl_3$);6.05(s,1H,H-6), 3.68(s,1H,CH), 3.54,3.34(s,each 3H,OMe).
Anal. Calcd. for $C_8H_8N_2O_2$:C,58.53;H,4.91;N,17.07. Found:C,58.38;4.86;N,16.88.

5-O-t-Butyldimethylsilyl-2,3-O-isopropylidene-1-(2-(2,4-dimethoxy-pyrimidin-6-yl)ethynyl)-D-ribofuranose(77)

化合物74 821mg(5.00mmol)をTHF 5mlに溶解しこの溶液をアルゴン気流下-80°CでLDA溶液(5mmol,THF 10ml)にゆっくりと滴下し、滴下後-70°Cで30分間撹拌した。この溶液にリボノラクトン体[37] 76 1.51g(5.00mmol)のTHF溶液(5ml)をゆっくりと滴下し、滴下後-50°Cに昇温し2時間撹拌した。1N NH_4Clを加えquenchした後、酢酸エチルを加え抽出を行い有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後溶媒を留去し残査を少量のクロロホルムに溶解しシリカゲルを加え濃縮し得られたゲルをシリカゲルカラム(φ5x9.5cm)にアプライし 40-60% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し1.32g(57%)の77を得た。分析用試料はn-hexane-AcOEtより結晶化することにより得た。

mp 153.0-154.0°C
ms:m/z 467(M^+),451,409
uv:λ_{max} (MeOH) 294nm
pmr:δppm ($CDCl_3$);6.06(s,1H,H-6), 5.78(bs,1H,1'-OH), 4.82(d,1H,H-2',J=5.7Hz), 4.62(d,1H,H-3'), 4.45(bs,1H,H-4'), 3.82-3.79(m,2H,H-5'), 3.57,3.34(s,each 3H,OMe), 1.53,1.37(s,each 3H,ipr), 0.94(s,9H,t-Bu),

0.17, 0.16(s, total 6H, Me_2Si).
Anal. Calcd. for $C_{22}H_{34}N_2O_7Si$: C, 56.63; H, 7.34; N, 6.00. Found: C, 56.50; H, 7.40; N, 5.86.

2,3-O-Anhydro-1-(1,4,6-tri-O-benzoyl-β-D-fructofuranosyl)uracil(83)

D-fructose 30g (167mmol), cyanamide 18g (428mmol)をメタノール 120 mlに懸濁し、これに濃アンモニア水 20mlを加え室温で、一晩撹拌した。得られた溶液を減圧下濃縮し、残査をエーテル 300mlで2回洗浄した。エーテルを減圧下留去し、残査をエタノール 160mlに溶解した。この溶液にEthyl propiolate 35mlを加え、7時間還流を行った。室温に戻した後、溶媒を留去、残査をメタノールに溶解し、シリカゲル ca 100gを加え、減圧下濃縮した。残ったゲルをシリカゲルカラム(φ6.4x19(30)cm)にアプライし、20-30% EtOH in $CHCl_3$により溶出し、22.8gのcrude 82を得た。

この82 22.8g(as 88.9mmol)をアセトニトリル 300mlにサスペンドし、氷冷下、無水安息香酸 80.5g(356mmol, 4eq), トリエチルアミン 50ml(356mmol, 4eq)を加え、氷冷下1時間、室温で2時間撹拌した。氷水を加え反応をクエンチした後、減圧下濃縮し、残査をクロロホルムに溶解し、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、更に飽和食塩水で洗った後、有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後、溶媒を留去し、残査をシリカゲルカラムグラフィー(φ7.7x10.5cm, 0-2% EtOH in $CHCl_3$により溶出)により精製し、更に、エタノールより結晶化し、19.7g(21% from D-fructose)の83をwhite powderとして得た。

mp 228.0-228.5°C(lit. 224°C)
ms: m/z 568(M^+), 463, 447
pmr: δppm ($CDCl_3$); 8.06-7.88(m, 1H, o-Bz), 7.68-7.37(m, 6H, Bz), 7.37(d, 1H, H-6, $J_{5,6}$=7.7Hz), 6.07(d, 1H, H-5), 5.84(dd, 1H, H-4', $J_{3',4'}$=1.1Hz, $J_{4',5'}$=2.6Hz), 5.57(d, 1H, H-3'), 4.93(d, 1H, H-1'a, $J_{1'a,b}$=12.5Hz), 4.91-4.86(m, 1H, H-5'), 4.78(d, 1H, H-1'b), 4.51(d, 2H, H-6', J=5.1Hz).
Anal. Calcd. for $C_{31}H_{24}N_2O_9$: C, 65.49; H, 4.25; N, 4.92. Found: C, 65.40; H, 4.13; N, 5.08.

2,3-O-Anhydro-1-((4,6-O-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-fuructofuranosyl)uracil(81)

化合物83 4.25g(7.46mmol)を0.1N NaOMe 60mlに溶解し室温で一晩撹拌した。Dowex 50W-X8(H^+form)を加え中和した後、樹脂をろ去し更に樹脂をhot MeOHで洗浄した後、合わせたろ液を減圧下濃縮乾固し、残査をEtOH, benzene, DMFで共沸した。残査にimidazole 1.12g(16.4mmol, 2.2eq)を加え、DMF 40mlに溶解し、アルゴン気流下-30°Cに冷却した。この溶液に$TIPDSCl_2$ 2.39ml(7.46mmol, 1eq)をゆっくりと

滴下し、-30°C~-20°Cで2時間撹拌し、更に室温で一晩撹拌した。溶媒を留去した後、トルエンで3回共沸を行い、残査を少量のMeOHに溶解しシリカゲルを加え濃縮した。得られたゲルをシリカゲルカラム(φ5.1x15(20.5)cm)にアプライし、2~4~6% MeOH in $CHCl_3$により溶出精製し、2.01g(54%)の81を得た。また分析用試料はn-hexane-AcOEtより結晶化することにより得た。

mp 195.5-197.0°C
ms: m/z 498(M^+), 455, 329
pmr:δppm ($CDCl_3$); 7.32(d, 1H, H-6, $J_{5,6}$=7.3Hz), 5.93(d, 1H, H-5), 5.71(bt, 1H, 1'-OH), 5.40(d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$=4.9Hz), 4.48(dd, 1H, H-4', $J_{4',5'}$=7.8Hz), 4.16 (dd, 1H, H-1'a, $J_{1',OH}$=5.4Hz, $J_{1'a,b}$=13.2Hz), 3.98-3.85(m, 4H, H-5', 6' and 1'b), 1.12-0.96(m, 28H, ipr).
Anal. Calcd. for $C_{22}H_{38}N_2O_7Si_2$: C, 52.98; H7.68; N, 5.62. Found: C, 52.94; H, 7.79; N5.53.

2,2'-Anhydro-1'-(2-ethoxycarbonylvinyl)-3',5'-O-(tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)uridine(84)

benzene 35ml中にDCC 6.55g(31.75mmol), pyridine 0.78ml(9.62mmol), トリフルオロ酢酸 0.37ml(4.81mmol), DMSO 12mlをアルゴン気流下混合し、氷冷下この溶液に化合物81 4.8g(9.62mmol)を加え、室温で17時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 200mlを加えquenchした後酢酸エチルで抽出(200mlx1, 100mlx3)し、有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後溶媒を留去し残査を塩化メチレン 100mlに溶解し、Ethoxycarbonylmethyltriphenylphosphorane 5.02g(14.43mmol, 1.5eq)を加え室温で1時間撹拌した。減圧下溶媒を留去し残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ6.3x18cm, 0~1% EtOH in $CHCl_3$により溶出)により精製し4.66gの84をamorphous solidとして得た。

ms: m/z 566(M^+), 523
Exact ms: Calcd. for $C_{26}H_{42}N_2O_8Si_2$: 566.2480. Found: 566.2478.
pmr:δppm ($CDCl_3$); 7.20(d, 0.35H, H-6Z, $J_{5,6}$=7.8Hz), 7.12(d, 0.65H, H-6E, $J_{5,6}$=7.8Hz), 6.84(d, 0.65H, H-1"E, $J_{1",2"}$=15.6Hz), 6.42(d, 0.65H, H-2E"), 6.30(d, 0.35H, H-1"Z, 12.2Hz), 6.25(d, 0.35H, H-2Z"), 6.09(d, 0.65H, H-5E), 6.02(d, 0.35H, H-5Z), 5.23(d, 0.35H, H-2'Z, $J_{2',3'}$=3.4Hz), 5.11(d, 0.65H, H-2'E, $J_{2',3'}$=3.9Hz), 4.59(dd, 0.65H, H-3'E, $J_{3',4'}$=7.3Hz), 4.56(dd, 0.35H, H-3'Z, $J_{3',4'}$=7.8Hz), 4.28(q, 1.3H, $OC\underline{H}_2CH_3$-E, J=7.1Hz), 4.23-4.14(m, 0.7H, $OC\underline{H}_2CH_3$-Z), 4.13-3.87 (m, 3H, H-4', 5'), 1.34(t, 1.95H, $OCH_2C\underline{H}_3$-E), 1.26(t, 1.05H, $OCH_2C\underline{H}_3$-Z), 1.09-0.96(m, 28H, ipr).

2,2'-Anhydro-3',5'-di-O-benzoyl-1'-(2-ethoxycarbonylvinyl)uridine(85)

化合物84 4.56g(8.04mmol)をTHF 70mlに溶解し無水安息香酸 5.46g(24.1mmol, 3eq), 1M Bu_4NF 16.1ml(16.1mmol, 2eq)を加え室温で一晩撹拌した。溶媒を留去後、残査を酢酸エチル(300ml)に溶解し水(200mlx1)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(200mlx2)、飽和食塩水(200mlx1)でそれぞれ分配した後有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後、溶媒を留去し残査をシリカゲルカラム(φ5.1x20.5cm, 0~1~2% EtOH in $CHCl_3$により溶出)により精製し、4.09g(96%)の85をwhite foamとして得た。

ms:m/z 532(M^+), 503, 459
Exact ms:calcd. for $C_{28}H_{24}N_2O_9$:532.1482. Found:532.1480.
pmr:δppm ($CDCl_3$);8.16-7.97(m, 4H, o-Bz), 7.66-7.44(m, 6H, Bz), 7.17(d, 0.35H, H-6Z, $J_{5,6}$=7.3Hz), 7.16(d, 0.65H, H-6E, $J_{5,6}$=7.3Hz), 6.95(d, 0.65H, H-1"E, $J_{1,2}$=15.1Hz), 6.58(d, 0.65H, H-2"E), 6.49(d, 0.35H, H-1"Z, $J_{1,2}$=12.2Hz), 6.28(d, 0.35H, H-2"Z), 6.10(d, 0.65H, H-5E), 6.04(d, 0.35H, H-5Z), 5.83-5.81(m, 1H, H-3'), 5.54(bs, 0.35H, H-2'Z), 5.33(bs, 0.65H, H-2'E), 4.90-4.85(m, 1H, H-4'), 4.54(dd, 0.65H, H-5'a-E, $J_{5a,b}$=12.2Hz, $J_{4,5a}$=6.3Hz), 4.48(dd, 0.35H, H-5'a-Z, $J_{5a,b}$=12.2Hz, $J_{4,5a}$=6.8Hz), 4.47(dd, 0.65H, H-5'b-E, $J_{4,5b}$=5.4Hz), 4.37(dd, 0.35H, H-5'b-Z, $J_{4,5b}$=5.9Hz), 4.28(q, 1.3H, $OC\underline{H}_2CH_3$-E, J=7.1Hz), 4.18-4.09(m, 0.7H, $OCH_2C\underline{H}_3$-Z), 1.33(t, 1.95H, $OCH_2C\underline{H}_3$-E), 1.23(t, 1.05H, $OCH_2C\underline{H}_3$-Z, J=7.1Hz).

1-(2-O-Acetyl-3,5-di-O-benzoyl-1-(2-ethoxycarbonylvinyl)-β-D-arabino-furanosyl)uracil(86)

化合物85 4.09g(7.68mmol)をDMF 200mlに溶解しこの溶液に2N HCl 80mlを加え室温で2日間撹拌した。2N NaOH溶液により中和した後減圧下濃縮し、残査を酢酸エチル 350ml、水 200mlを加え分配し有機層を更に水(150mlx2)、飽和食塩水(150ml)で分配した後Na_2SO_4乾燥した。濾過後濃縮乾固し、残査をピリジン 80mlに溶解しこの溶液に無水酢酸 1.6ml(excess), DMAP 20mg(触媒量)を加え室温で5時間撹拌した。氷水を加え反応をquenchした後溶媒を留去、トルエンにより共沸(2回)した後残査を酢酸エチル(350ml)に溶かし水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水(各200ml)でそれぞれ分配し、有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後ろ液を約50mlまで濃縮し、少量のシリカゲルを加え溶媒を留去し得られたゲルをシリカゲルカラム(φ4.9x14.5(18.5)cm)にアプライし50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し、3.31g(72%)の86をwhite foamとして得た。

uv:λ_{max} (MeOH) 263nm, 231nm
ms:m/z 592(M^+), 547
Exact ms: Calcd. for $C_{30}H_{28}N_2O_{11}$:592.1693. Found 592.1692.
pmr:δppm ($CDCl_3$);9.23(bs, 1H, N3), 8.08-7.96(m, 4H, o-Bz), 7.85(d, 1H, H-6,

$J_{5',6'}$=8.3Hz), 7.62-7.39(m,7H,Bz and H-1"), 6.34(d,1H,H-2",$J_{1'',2''}$=15.6Hz), 6.04(s,1H,H-2'), 5.74(bd,1H,H-5), 5.39(d,1H,H-3',J=2.2Hz), 4.85(dd,1H,H-5'a,$J_{4',5'a}$=4.2Hz,$J_{5'a,b}$=12.0Hz), 4.69(dd,1H,H-5'b,$J_{4',5'b}$=5.6Hz), 4.61-4.57(m,1H,H-4'), 4.25-4.17(m,2H,$OC\underline{H}_2CH_3$), 1.81(s,3H,OAc), 1.27(t,3H,$OCH_2C\underline{H}_3$,J=7.1Hz).

1-(2-O-Acetyl-3,5-di-O-benzoyl-1-(2-ethoxycarbonylethyl)-β-D-arabino-furanosyl)uracil(80)

Method A) 化合物86 516mg(0.871mmol)をアセトニトリル 10mlに溶解しこの溶液にEt_3SiH 417μl(2.61mmol),$RhCl(PPh_3)_3$ 81mg(0.0871mmol,10mol%)を加え、ガラス封管中アルゴン気流下1時間100°Cに保った。沈殿をセライトろ過した後、ろ液を濃縮し残査を少量のクロロホルムに溶解しこれに少量のシリカゲルを加え溶媒を留去し得られたゲルをシリカゲルカラム(φ2.4x9(13)cm)にアプライし、20~40% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し206mg(40%)の80を得た。

Method B) 化合物86 3.82g(6.45mmol)をEtOH 80mlに溶解しこの溶液に10% Pd/C 800mg,PMHS 2.6mlを加えアルゴン気流下60°Cに2.5時間保った。触媒をセライトろ過により除去しろ液を減圧下濃縮し、残査を少量のクロロホルムに溶解しこれに少量のシリカゲルを加え溶媒を留去し得られたゲルをシリカゲルカラム(φ4.9x19.5(26.5)cm)にアプライし33~50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し3.54g(92%)の80をwhite foamとして得た。

ms:m/z 549,483

pmr:δppm ($CDCl_3$);9.15(bs,1H,N3), 8.10-8.01(m,4H,o-Bz), 7.81(d,1H,H-6,$J_{5,6}$=8.3Hz), 7.65-7.42(m,6H,Bz), 5.83(s,1H,H-2'), 5.70(dd,1H,H-5,$J_{5,N3}$=2.0Hz), 5.35(d,1H,H-3',$J_{3',4'}$=2.9Hz), 4.86(dd,1H,H-5'a,$J_{4',5'a}$=3.4Hz,$J_{5'a,b}$=12.2Hz), 4.67(dd,1H,H-5'b,$J_{4',5'b}$=4.4Hz), 4.51(ddd,1H,H-4'), 4.07(q,2H,$OC\underline{H}_2CH_3$,J=7.1Hz), 2.99(ddd,1H,H-2"a,J=6.8,8.3,14.9Hz), 2.56(ddd,1H,H-2"b,J=6.8,7.8,14.9Hz), 2.40-2.26(m,2H,H-1"), 1.72(s,3H,OAc), 1.20(t,3H,$OCH_2C\underline{H}_3$).

Anal. Calcd. for $C_{30}H_{30}N_2O_{11}$:C,60.06;H,5.09;N,4.71. Found:C,59.83;H,4.97;N,4.61.

1-(1-(2-Methoxycarbonylethyl)-3,5-O-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-arabinofuranosyl)uracil(87)

化合物80 3.54g(5.95mmol)をMeOH 80mlに溶解しこの溶液に1N NaOMe 25mlを加え室温で一晩撹拌した。Dowex50WX8(H^+form)で中和し、樹脂をろ去しろ液を減圧下濃縮乾固し更にEtOH,benzene(x2),ピリジンで共沸した。残査をDMF-ピリジン=1:1

の混合溶液に溶解しこれにTIPDSCl$_2$ 2.81ml(8.93mmol,1.5eq)を加え室温で一晩撹拌した。減圧下溶媒を留去し残査を酢酸エチル(350ml)に溶かし水(x3)、飽和食塩水(各150ml)で分配し有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後溶媒を留去し残査を少量のクロロホルムに溶解しこれに少量のシリカゲルを加え溶媒を留去し得られたゲルをシリカゲルカラム(φ5.1x16(19)cm)にアプライし50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し2.65g(78%)の87をwhite foamとして得た。

ms:m/z 529(M^+-ipr),417
pmr:δppm ($CDCl_3$);9.37(bs,1H,N3), 7.92(d,1H,H-6,$J_{5,6}$=8.3Hz), 5.71(dd,1H,H-5,$J_{5,N3}$=2.0Hz), 4.45(dd,1H,H-2',$J_{2',3'}$=5.9Hz,$J_{2',OH}$=4.4Hz), 4.14(dd,1H,H-3',$J_{3',4'}$=7.3Hz), 4.04-3.96(m,3H,H-5' and 2'-OH), 3.78(ddd,1H,H-4',J=3.4,3.9,7.3Hz), 3.64(s,3H,OMe), 3.16-3.09(m,1H,H-2"a), 2.38-2.19(m,3H,H-1" and H-2"b), 1.10-0.98(m,28H,ipr).
Anal. Calcd. for $C_{25}H_{44}N_2O_9Si_2$:C,52.42;H,7.74;N,4.89. Found: C,52.91;H,7.86;N,4.71.

1-(1-(2-Methoxycarbonylethyl)-3,5-O-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-β-D-ribofuranosyl)uracil(89)

CrO_3 1.73g(17.3mmol),粉末化した4A モレキュラーシーブス 2.5gを塩化メチレン 50mlにサスペンドし、氷冷下ピリジン 2.8ml(34.6mmol)を加えアルゴン気流下0°Cで30分間撹拌した。無水酢酸 1.63ml(17.3mmol)を加え0°Cで30分間撹拌した後化合物87 2.48g(4.33mmol)を少量の塩化メチレンに溶解したものを混合物中に加えアルゴン気流下室温で30分間撹拌した。30分後溶液を酢酸エチル 600mlにあけ、沈殿をシリカゲルろ過しろ液を減圧下濃縮した。残査をトルエン共沸した後酢酸エチル(300ml)に溶解し飽和炭酸水素ナトリウム溶液(150mlx3)で分配し、有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後溶媒を留去し残査をMeOH 50mlに溶解しこの溶液に氷冷下$NaBH_4$ 820mg(21.7mmol)を少量ずつ加え、0°Cで30分間撹拌した。酢酸で中和した後溶媒を留去し残査を酢酸エチル(300ml)に溶かし、水、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水(各150ml)で分配し有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後減圧下濃縮し残査を少量のクロロホルムに溶解し少量のシリカゲルを加え溶媒を留去、得られたゲルをシリカゲルカラム(φ5.2x10(13)cm)にアプライし33~50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し2.15g(87%)の89をwhite foamとして得た。

ms:m/z 529(M^+-ipr),497,417
pmr:δppm ($CDCl_3$);9.49(bs,0.18H,N-3β), 9.24(bs,0.82H,N-3α), 7.97(d,0.82H,H-6α,$J_{5,6}$=8.3Hz), 7.91(d,0.18H,H-6β,$J_{5,6}$=8.3Hz), 5.71(bdd,H-5β), 5.68(bdd,total 1H,H-5α,$J_{5,N3}$=2.0Hz), 4.66(dd,0.82H,H-2'α,$J_{2',3'}$=4.4Hz,$J_{2',OH}$=1.7Hz), 4.46(dd,0.18H,H-2'β,$J_{2',3'}$=5.9Hz,$J_{2',OH}$=3.9Hz), 4.20-4.11(m,2.64H,H-3'α,H-4'α,H-5'aα and H-3'β), 4.01-3.99(m,0.36H,H-5'β), 3.95(dd,0.82H,

H-5'bα, J=2.4, 13.2Hz), 3.89(bd, 0.18H, 2'-OHβ), 3.80-3.77(m, 0.18H, H-4'β), 3.64(s, 0.54H, OMeβ), 3.63(s, 2.46H, OMeα), 3.32(bd, 0.82H, 2'-OHα), 3.13-3.11 (m, 0.18H, H-2"aβ), 2.89(ddd, 0.82H, H-2"aα, J=6.8, 8.3, 15.9Hz), 2.54(ddd, 0.82H, H-2"bα, J=6.4, 8.8, 14.9Hz), 2.35(ddd, H-1"aα, J=6.4, 8.3, 15.9Hz), 2.36-2.22(m, H-2"bβ and H-1"β), 2.20(ddd, total 3H,, H-1"bα, J=6.8, 8.8, 15.6Hz), 1.09-0.98(m, 28H, ipr).
Anal. Calcd. for $C_{25}H_{44}N_2O_9Si_2$:C, 52.42;H, 7.74;N, 4.89. Found: C, 52.17; H, 7.89;N, 4.88.

1-(5-O-t-Butyldimethylsilyl-2, 3-O-isopropylidene-1-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-β-D-ribofuranosyl)uracil(91)

化合物89 2.03g(3.54mmol)をTHF 30mlに溶解しこれに1M Bu_4NF 7.8ml(7.8mmol, 2.2eq)を加え室温で10分間撹拌した。減圧下濃縮乾固した後残査をアセトン 60mlに溶解し、, 2, 2-dimethoxypropane 1.5ml, 70% $HClO_4$ 0.9mlを加え室温で2時間撹拌した。無水炭酸カリウムで中和し過剰の炭酸カリウムをろ去した後、減圧下3分の1程度まで濃縮しシリカゲルを加え溶媒を留去した。得られたゲルをシリカゲルカラム(φ5.1x11(14.5)cm)にアプライし4~8% EtOH in $CHCl_3$により溶出した。目的物のフラクションを濃縮乾固し残査をDMF 25mlに溶解しこれにt-butyldimethylsilylchloride 800mg(5.31mmol), diisopropylethylamine 925μl(5.31mmol)を加えアルゴン気流下室温で一晩撹拌した。溶媒を留去後残査を酢酸エチル(200ml)に溶かし水(150mlx3), 飽和食塩水(150mlx1)で分配し、有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後濃縮し残査を少量のクロロホルムに溶かし更に少量のシリカゲルを加え溶媒を留去した。得られたゲルをシリカゲルカラム(φ5.1x7(9)cm)にアプライし33~50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し1.01g(59%)の91を amorphous solidとして得た。

ms:m/z 469(M^+-Me), 395, 315
pmr:δppm ($CDCl_3$);8.00(bs, 1H, N3), 7.75(d, 1H, H-6, $J_{5,6}$=8.3Hz), 5.61(dd, 1H, H-5, $J_{5,N3}$=2.5Hz), 5.06(d, 1H, H-2', $J_{2',3'}$=6.1Hz), 4.67(dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$=1.5Hz), 4.44(bm, 1H, H-4'), 3.77(dd, 1H, H-5'a, $J_{4',5'a}$=2.4Hz, $J_{5'a,b}$=11.7Hz), 3.67(dd, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$=3.9Hz), 3.62(s, 3H, OMe), 2.78-2.69(m, 1H, H-2"a), 2.42-2.34(m, 1H, H-2"b), 2.25-2.13(m, 2H, H-1"), 1.61, 1.37(s, each 3H, ipr), 0.84(s, 9H, t-Bu), 0.03, 0.01(s, each 3H, Me).
Anal. Calcd. for $C_{22}H_{36}N_2O_8Si$:C, 54.52;H, 7.49;N, 5.78. Found: C, 54.28; H, 7.51;N, 5.86.

1-(5-O-t-Butyldimethylsilyl-2,3-O-isopropylidene-1-(3-methanesulfonyl-oxypropyl)ribofuranosyl)uracil(92)

化合物91 342mg(0.706mmol)をTHF 10mlに溶解し$LiBH_4$ 79mg(3.53mmol,20eq)を加えアルゴン気流下一晩還流した。室温にまで冷却した後1N HClで中和しこの溶液に飽和食塩水を加え、酢酸エチル(15mlx4)で抽出した。有機層をNa_2SO_4乾燥し、濾過後ろ液を濃縮し得られた残査をピリジン 10mlに溶解した。この溶液に氷冷下MsCl 82μl(1.06mmol)を加え室温で2時間撹拌した。溶媒を留去し、トルエン共沸後残査を酢酸エチル(50ml)に溶かし水(30mlx1),飽和食塩水(30mlx1)で分配し、有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後溶媒を留去し、残査を少量のクロロホルムに溶解しシリカゲルを加え更に溶媒を留去した。得られたゲルをシリカゲルカラム(φ2.3x6.5(10)cm)にアプライし50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し253mg(67%)の92を白色固体として得た。分析用試料はn-hexane-AcOEtより結晶化することにより得た。

mp 128.5-129.7°C
ms:m/z 519(M^+-Me),423,365
pmr:δppm ($CDCl_3$);7.99(bs,1H,N3), 7.78(d,1H,H-6,$J_{5,6}$=8.3Hz), 5.63(dd,1H,H-5,$J_{5,N3}$=2.4Hz), 5.05(d,1H,H-2',$J_{2',3'}$=6.2Hz),4.67(dd,1H,H-3',$J_{3',4'}$=1.5Hz), 4.47(bm,1H,H-4'), 4.23-4.16(m,2H,H-3"), 3.79(dd,1H,H-5'a,$J_{4',5'a}$=2.4Hz, $J_{5'a,b}$=11.7Hz), 3.68(dd,1H,H-5'b,$J_{4',5'b}$=3.9Hz), 2.99(s,3H,$MeSO_2$),2.57-2.49 (m,1H,H-2"a), 1.92-1.80(m,2H,H-2"b and H-1"a), 1.59,1.37(s,each 3H,ipr), 1.54-1.41(m,1H,H-1"b), 0.84(s,9H,t-Bu), 0.03,0.02(s,each 3H,,Me_2Si).
Anal. Calcd. for $C_{22}H_{38}N_2O_9SiS$:C,49.42;H,7.16;N,5.24;S,6.00.
Found:C,49.62;H,7.17;N,5.40;S,5.92.

5-Chloro-1-(5-O-t-butyldimethylsilyl-2,3-O-isopropylidene-1-(3-methane-sulfonyloxypropyl)uracil(93)

化合物92 220mg(0.411mmol)を酢酸 10mlに溶解しこれにNCS 165mg(1.23mmol,3eq)を加えアルゴン気流下50°Cに6時間保った。溶媒を留去し、トルエン共沸(2回)した後残査を酢酸エチル(50ml)に溶かし飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水(各50ml)で分配し有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後溶媒を留去し残査を少量のクロロホルムに溶かしシリカゲルを加え濃縮乾固した。得られたゲルをシリカゲルカラム(φ1.7x11(14.5)cm)にアプライし33~50% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し194mg(83%)の93をwhite foamとして得た。

uv:λ_{max} (MeOH) 279nm
FAB-ms:m/z 569(M^+)
Exact ms: Calcd. for $C_{22}H_{37}N_2O_9SiSCl$:569.1756. Found 569.1779
pmr:δppm ($CDCl_3$);8.43(bs,1H,N3), 7.95(s,1H,H-6), 5.02(d,1H,H-2',$J_{2',3'}$=

6.1Hz), 4.69(dd,1H,H-3',$J_{3',4'}$=1.5Hz), 4.52(bs,1H,H-4'), 4.24-4.18(m,2H,H-3"), 3.85(dd,1H,H-5'a,$J_{4',5'a}$=2.0Hz,$J_{5'a,b}$=11.7Hz), 3.72(dd,1H,H-5'b,$J_{4',5'b}$=3.4Hz), 3.00(s,3H,$MeSO_2$), 2.55-2.47(m,1H,H-1"a), 1.92-1.82(m,2H,H-1"b and H-2"a), 1.59,1.37(s,each 3H,ipr), 1.49-1.42(m,1H,H-2"b), 0.84(s,9H,t-Bu), 0.05,0.02(s,each 3H,Me_2Si).

5-Chloro-1-(5-O-t-butyldimethylsilyl-1-(3-iodopropyl)-2,3-O-isopropylidene-ribofuranosyl)uracil(94)

化合物93 405mg(0.712mmol)を2-butanone 15mlに溶解しこれにLiI 238mg(1.79mmol)を加えアルゴン気流下2時間還流した。室温にまで冷却した後溶媒を留去し残査を酢酸エチル(70ml)に溶かし水(50ml)、飽和食塩水(50ml)で分液し有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後溶媒を留去し残査を少量のクロロホルムに溶かしシリカゲルを加え濃縮乾固し得られたゲルをシリカゲルカラム(φ2.1x24(31)cm)にアプライし20~33% AcOEt in n-hexaneにより溶出精製し、337mg(79%)の94をsyrupとして得た。

ms:m/z 585(M^+-Me),487(M^+-TBS+1),455
Exact ms: Calcd. for $C_{15}H_{21}N_2O_6ICl$:487.0133. Found 487.0162
pmr:δppm ($CDCl_3$);8.08(bs,1H,N3), 7.93(s,1H,H-6), 5.01(d,1H,H-2',$J_{2',3'}$=5.9Hz), 4.69(dd,1H,H-3',$J_{3',4'}$=1.5Hz), 4.52(bs,1H,H-4'), 3.84(dd,1H,H-5'a,$J_{4',5'a}$=2.0Hz,$J_{5'a,b}$=11.7Hz), 3.71(dd,1H,H-5'b,$J_{4',5'b}$=3.2Hz), 3.22-3.09(m,2H,H-3"), 2.50-2.44(m,1H,H-1"a), 2.04-1.88(m,2H,H-1"b and H-2"a), 1.62,1.38(s,each 3H,ipr), 1.66-1.50(m,1H,H-2"b), 0.84(s,9H,t-Bu), 0.05,0.02(s,each 3H,Me_2Si).

5'-O-t-Butyldimethylsilyl-2',3'-O-isopropylidene-6,1'-propanouridine(96)

化合物94 320mg(0.532mmol)をbenzene 120mlに溶解しアルゴン気流下還流し、この溶液にBu_3SnH 150μl(0.559mmol,1.05eq), AIBN 20mgのbenzene溶液(15ml)を1.5時間かけゆっくり滴下し、滴下後75分間還流を続けた。室温にまで冷却した後濃縮乾固し残査を少量の酢酸エチルに溶解しシリカゲルを加え溶媒を留去した。得られたゲルをシリカゲルカラム(φ1.7x16.5(19)cm)にアプライし、10~20~33% AcOEt in n-hexaneにより溶出した。得られたフラクションを濃縮し95をジアステレオマーの混合物として得た。95はジオキサン 15mlに溶解しこれにDBU 398μl(2.66mmol)を加えアルゴン気流下60°Cに8時間保った。室温に戻した後1N NH_4Cl(10ml)を加え更に酢酸を加え完全に中和し、酢酸エチル(25mlx4)で抽出を行い有機層をNa_2SO_4乾燥した。濾過後ろ液を濃縮し残査を少量の酢酸エチルに溶かしシリカゲルを加え溶媒を留去した。得られたゲルをシリカゲルカラム(φ1.7x12(16.5)cm)にアプライし、20~33~50% AcOEt in n-hexaneにより溶出しless polar pro-

duct(33% AcOEt in n-hexaneにより溶出)として80mgの95を回収した。またpolar productとして96を147mg(63%)をsyrupとして得た。回収した95は同様の操作により25mgの96を与えた(total yield 74%)。

uv:λ_{max} (MeOH) 264nm
ms:m/z 439(M^++1), 423, 381, 323
Exact ms: Calcd. for $C_{21}H_{34}N_2O_6Si$:438.2186. Found 438.2190.
pmr:δppm ($CDCl_3$);8.22(bs, 1H, N3), 5.45(bs, 1H, H-5), 5.30(d, 1H, H-2', $J_{2',3'}$= 6.8Hz), 4.86(dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$=5.1Hz), 3.98(ddd, 1H, H-4', J=4.9, 5.4, 6.8Hz), 3.85(dd, 1H, H-5'a, J=5.4, 10.5Hz), 3.81(dd, 1H, H-5'b, J=4.9, 10.7Hz), 2.80-2.73(m, 1H, H-3"a), 2.60(dq, 1H, H-3"b, J=1.5, 5.9, 11.7, 17.1Hz), 2.20-2.15 (m, 1H, H-1"a), 2.10(ddd, 1H, H-1"b, J=3.4, 11.7, 14.7Hz), 1.92-1.74(m, 2H, H-2"), 1.52, 1.33(s, each 3H, ipr), 0.88(s, 9H, t-Bu), 0.05, 0.01(s, each 3H, Me_2Si).

2', 3'-O-Isopropylidene-6, 1'-propanouridine(97)

化合物96 25mg(0.0570mmol)をTHF 3mlに溶解しこれに1N Bu_4NF 60μl (0.060mmol)を加え室温で1時間撹拌した。更に1N Bu_4NF 100μl(0.100mmol)を加え室温で一晩撹拌した。溶媒を留去し残査をpt.1.cにより精製($CHCl_3$:EtOH=15:1により展開)し、17mg(92%)の97を得た。分析用試料は$CDCl_3$より結晶化することにより得た。

mp >200°C(sublimed)
ms:m/z 325(M^++1), 309, 235, 199
pmr:δppm ($CDCl_3$);9.25(bs, 1H, N3), 5.49(bs, 1H, H-5), 5.36(d, 1H, H-2', $J_{2',3'}$= 7.3Hz), 5.17(dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$=4.9Hz), 4.06-4.03(m, 1H, H-4'), 3.90(bdd, 1H, H-5'a, $J_{4',5'a}$=2.7Hz, $J_{5'a,b}$=12.0Hz), 3.83(bdd, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$=3.7Hz), 3.08 (bs, 1H, 5'-OH), 2.81-2.74(bm, 1H, H-3"a), 2.63(dq, 1H, H-3"b, J=1.5, 5.4, 10.3 17.1Hz), 2.22(ddd, 1H, H-1"a, J=3.7, 10.9, 14.7Hz), 2.12-2.06(m, 1H, H-1"b), 1.90-1.76(m, 1H, H-2"), 1.54, 1.35(s, each 3H, ipr).
Anal. Calcd. for $C_{15}H_{20}N_2O_6$:C, 55.55;H, 6.22;N, 8.64. Found:C, 55.51;H, 6.23; N, 8.56.

6, 1'-propanouridine(8)

化合物96 (0.310mmol)を1N HCl:THF=3:1 10mlに溶解し室温で3日間撹拌した。濃アンモニア水により中和した後溶媒を留去し、残査をEtOH(x2)により共沸した。残査を少量のMeOHに溶解し、シリカゲルを加え濃縮乾固した。得られたゲルをシリカゲルカラム(ϕ1.7x10.5(15.5)cm)にアプライし4~8% MeOH in $CHCl_3$により溶出し、less polar productとして26mg(26%)の97を、またpolar productとして

58mg(66%)の8を得た。分析用試料はEtOH-水より結晶化することにより得た。

mp 175.5-177.0°C
uv:λ_{max} (H_2O) 267nm(ε=11400)
CD in H_2O [θ](nm):-6100(226),0(251),+4500(239)
ms:m/z 284(M+),266
pmr:δppm (DMSO-d_6);11.10(bs,1H,N3), 5.39(bs,1H,H-5), 5.03(d,1H,2'-OH, J=6.1Hz), 4.92(d,1H,3'-OH,J=6.4Hz), 4.71(dd,1H,H-2',$J_{2',3'}$=7.1Hz), 4.53 (dd,1H,H-3',J=6.6,6.8Hz), 3.63-3.55(m,2H,H-5'a,H-4'), 3.51-3.45(m,1H, H-5'b), 2.75-2.71(bm,1H,H-3"a), 2.60(ddd,1H,H-3"b,J=6.6,9.9,17.5Hz), 2.15(ddd,1H,H-1"a,J=3.7,11.0,14.6Hz), 1.92-1.87(m,1H,H-1"b), 1.67-1.61 (m,2H,H-2").
Anal. Calcd. for $C_{12}H_{16}N_2O_6$:C,50.70;H,5.67;N,9.86. Found:C,50.43;H,5.66; N,10.00.

第6章の実験

5'-Deoxy-6,6'-cyclouridine 2',3'-cyclic phosphate(103)

化合物6 30mg(0.125mmol)をポリリン酸(0.625mmol as H_3PO_4), Bu_3N(0.25mmol)とDMF 13ml中混合し1時間還流した。室温に冷却した後溶媒を留去し残査を1N アンモニア水に(15ml)溶解しエーテル(15mlx2)で分配した後水層を減圧下濃縮した。残査を水 50mlにに溶解しDEAE-celluloseカラム(φ2.9x19.5cm)にアプライし、水150mlで洗浄した後、0-0.1N TEAB bufferのlinear gradient(each 500ml H_2O and 0.1N TEAB buffer)により溶出し、16mlごとにフラクションを分取した。フラクション16-29を集め溶媒を留去し1857 OD units(66%)の103を得た。

Migration on paper electrophoresis(0.05N TEAB buffer, 700V, 1hr):103 +9cm; UMP +13.5cm;6,5'-cycloU>P +10.8cm;6 +4.8cm.

5'-Deoxy-6,6'-cyclocytidine 2',3'-cyclic phosphate(104)

化合物51 60mg(0.25mmol)を用いポリリン酸(1.25mmol as H_3PO_4)と処理し103と同様の方法により104を76%の収率で得た

5'-Deoxy-6,6'-cyclo-4-thiouridine 2',3'-cyclic phosphate(105)

化合物53 34mg(0.134mmol)を用いポリリン酸(0.664mmol as H_3PO_4)と処理し103と同様の方法により105を27%の収率で得た。

2',3'-環状リン酸のRNase Aによる加水分解反応の速度論的解析

2',3'-環状リン酸(0.1~1mMのうち任意の4濃度となるように調製した。)をAcetate buffer中、酵素を加え37°Cでインキュヴェートした(全量を1mlとした)。酵素添加後、10,20,30,40,50分後に反応液の一部をとりHPLCにインジェクトし、ピークの面積比より水解率を求めた。それぞれの時間における水解率より初速度を算出し、2',3'-環状リン酸の濃度と初速度のLineweaver-Burkプロットにより Km値、Vmax値を求めた。

酵素反応は以下に示すbuffer中で行った。また用いた酵素濃度、HPLCの条件は以下に示す通りである。

RNase A concentration:2.92μM for 103;4.39μM for 104 and 105
Buffer: 10mM Na Acetate buffer(pH=5.8)
HPLC condition:column YMC-Pack IES-AX (anion exchange)
elution 0.2M Na phosphate buffer (pH=6.8)
flow 1ml/min

5'-Deoxy-6,6'-cyclo-4-thiouridine 3'-phosphate(106)

化合物 105 422 OD unitsを10mM Na acetate buffer(pH=5.8) 4mlに溶解しこれにRNase T_2 25 unitsを加え2日間37°Cでインキュベートした。水で希釈し全量を50mlとしDEAE toyopal(bicarbonate form, ϕ1.2x4.5cm)にアプライし水 50mlで洗浄した後0-0.16N TEAB buffer(each 200ml H_2O and 0.16N TEAB buffer)、続いて0.16-0.20N TEAB buffer(each 100ml 0.16N and 0.20N TEAB buffer)のlinear gradientにより溶出し、7mlごとにフラクションを分取した。フラクション49~75を集め濃縮し277 OD units(66%)の106を得た。

Migration on paper electrophoresis(0.05N TEAB buffer, 700V, 1hr):
106 +15.5cm; 6,6'-cyclo^{4s}U>P +14cm; 2'(3')-^{4s}UMP +15cm

シクロヌクレオシド 3'-リン酸のRNase Aに対するKi値の測定

シチジン 2',3'-環状リン酸(0.03~0.2mMのうち任意の4濃度となるように調製した。)をuvセル中、Acetate bufferに溶解し更にFig.31に示す濃度となるよう106と酵素を加え37°Cでインキュベートした(全量を1mlとした)。285nmにおける吸光度変化をUV-2100(島津社製)を用い測定し、KINETICS 2100を用いて反応速度を求めた。20~300秒の速度を初速度としLineweaver-Burkプロットよりki値を求めた。

用いたbuffer及び酵素濃度は以下に示す通りである。

buffer: 10mM Na acetate buffer(pH=5.8)
enzyme concentration: 0.22μM

5'-Deoxy-6,6'-cyclo-4-thiouridine 3'-phosphateとRNase AとのcomplexのCDスペクトル

以下に示す組成の溶液を調製し、うち3mlをとりCDスペクトルの測定を行った。また得られたデータを用いdata processorにより和スペクトル及び差スペクトルを算出した。

1) 6,6'-cyclo-4-thio-3'-UMP

6,6'-cyclo-4-thio-3'-UMP (70.8 OD units) in

10mM Na acetate buffer (pH=5.8)	16μl
H_2O	2492μl
20mM Na acetate buffer (pH=5.8)	2494μl
	total 5000μl

uvスペクトルより[I]=3.81x10^{-5}Mと決定した。(ε=23700として計算)

2)RNase A

RNase A (10mg/ml) in	
10mM Na acetate buffer (pH=5.8)	226μl
H_2O	1887μl
20mM Na acetate buffer (pH=5.8)	1887μl
total	4000μl

uvスペクトルより[E]=2.74x10^{-5}Mと決定した。(ε_{277}=10200[58])

3)complex

6,6'-cyclo-4-thio-3'-UMP (70.8 OD units) in	
10mM Na acetate buffer (pH=5.8)	12μl
RNase A (10mg/ml) in	
10mM Na acetate buffer (pH=5.8)	228μl
H_2O	1881μl
10mM Na acetate buffer (pH=5.8)	1881μl
total	4000μl

差CDスペクトルによる解離定数の決定

一定濃度(3.2x10^{-5}M)の106の存在下RNase A(0~5x10^{-5}Mのうち任意の6種類の濃度となるように調整した。)を混合し前述したCDスペクトルの測定条件によりCDスペクトルの測定を行った。また同時に106非存在下でのCDスペクトルの測定を行い、これを用い差スペクトルを測定し、差スペクトルのθ値と濃度をプロットしChart 1に示した式を用い解離定数の決定を行った。

参考文献

1) Eur.J.Biochem., 131, 9 (1983)

2) W.Saenger,"Principles of Nucleic Acids Structure",Springer-Verlag,New York,1984

3) D.W.Miles, W.H.Inskeep, M.J.Robins, M.W.Winkley,R.K.Robins and H.Eyring, J.Am.Chem.Soc., 92, 3872 (1970)

4) G.T.Rogers and T.L.Ulbricht, Bioche.Biophys.Res.Commun., 39, 414 (1970)

5) T.Ueda, Nucleosides and Nucleotides, 4, 67 (1985)

6) Y.Yamagata, K.Tomita, H.Usui, T.Sano and T.Ueda, Chem.Pharm.Bull., 37, 1971 (1989)

7) T.Ohshima and K.Imahori, J.Biochem., 70, 197 (1971)

8) a) S.Sugio, T.Amisaki, H.Ohishi,K.Tomita, U.Heinemann and W.Saenger, FEBS Lett.,181, 132 (1985)

b) S.Sugio, T.Amisaki, H.Ohishi and K.Tomita, J.Biochem., 103, 354 (1988)

9) 松田 彰 博士論文 北海道大学 (1977)

10) K.K.Ogilvie, L.Slotin and P.Rheault, Biochem.Biophys.Res.Commun.,49, 297 (1971)

11) A.Hampton, P.J.Harper and T.Sasaki, Biochemistry, 11, 4763 (1972)

12) a) M.Ikehara, I.Tazawa and T.Fukui, Biochemistry, 8, 736 (1969)

b) A.M.Kapuler, C.Monny and A.M.Michelson, Biochim.Biophys.Acta, 217, 18 (1970)

13) A.M.Kapuler and E.Reich, Biochemistry, 10, 4050 (1971)

14) M.Sundaralingam, "Conformation of Biological Molecules and Polymers", The Israel Academy of Sciences and Humanities 1973, p.417

15) M.A.Abdallah, J.F.Bielmann, B.Nondstrom and C.I.Branden, Eur.J.Biochem., 50, 475 (1975)

16) T.Ueda, H.Usui, S.Shuto and H.Inoue, Chem.Pharm.Bull., 32, 3410 (1984)

17) T.Ueda and S.Shuto, Nucleoside and Nucleotides, 3, 295 (1984)

18) Y.Yoshimura, T.Sano, A.Matsuda and T.Ueda, Chem.Pharm.Bull., 36, 162 (1988)

19) G.E.Hilbert, and T.B.Johnson, J.Am.Chem.Soc., 52, 2001 (1930)

20) B.R.Baker and R.E.Schaub, J.Am.Chem.Soc., 77, 5900 (1955)

21) F.Hansske, D.Madej and M.J.Robins, Tetrahedron, 40, 125 (1984)

22) K.Miura and T.Ueda, Chem.Pharm.Bull., 28, 3415 (1980)

23) Y.Yoshimura, A.Matsuda and T.Ueda, Chem.Pharm.Bull., 37, 660 (1989)

24) T.Sano, H.Inoue and T.Ueda, Chem.Pharm.Bull., 33, 1856 (1985)

25) L.M.Sasson, and B.A.Otter, J.Heterocyclic Chem., 24, 1489 (1987)

26) A.R.Moorman and R.T.Borchart, "Nucleic Acids Chemistry, Part 3", ed. by L.B.Townsend and R.S.Tipson, Wiley Interscience New York, 1986, p.38

27) D.H.R.Barton, R.S.H.Motherwell and W.B.Motherwell, J.Chem.Soc.,Perkin Trans.1, 2263 (1981)

28) a) D.J.Peterson, J.Org.Chem., 33, 781 (1966)
b) J.Ager, Synthesis, 384 (1984)

29) T.Imamoto,T.Kusumoto and M.Yokoyama, Tetrahedron lett., 24, 5233 (1983)

30) T.Imamoto, Y,Sugiura and N.Takiyama, Tetrahedron lett., 25, 4233 (1984)

31) T.Imamoto, N.Takiyama and K.Nakamura, Tetrahedron lett., 26, 4763 (1985)

32) C.R.Johnson and B.D.Tait, J.Org.Chem.,52, 281 (1987)

33) a) T.Ueda, A.Matsuda,Y.Yoshimura and K.Takenuki, Nucleosides and Nucleotides, 8, 743 (1989)
b) Y.Yoshimura, A.Matsuda and T.Ueda, Chem.Pharm.Bull., 38, 389 (1990)

34) T.Sano, H.Inoue and T.Ueda, Chem.Pharm.Bull., 33, 3595 (1985)
35) J.P.Horwitz and A.J.Tomson, J.Org.Chem., 26, 3392 (1961)
36) M.J.Robins and P.J.Barr, J.Org.Chem., 48, 1854 (1983)
37) C.S.Wilcox, G.W.Long and H.Suh, Tetrahedron lett., 25, 395 (1984)
38) A.Holy, Nucleic Acids Res., 1, 289 (1974)
39) T.Tatsuoka, K.Imao and K.Suzuki, Heterocycles, 24, 617 (1986)
40) K.E.Pfitzner and J.G.Moffat, J.Am.Chem.Soc.,85, 3027 (1963)
41) J.F.Codington,R.Fecher and J.J.Fox, J.Am.Chem.Soc., 82, 2794 (1960)
42) E.W.Colvin, "Silicon Reagents in Organic Synthesis" Academic Press San Diego, 1988, p.104
43) J.Lipowitz and S.A.Bowman, J.Org.Chem., 38, 162 (1973)
44) T.Ueda, S.Shuto, M.Satoh and H.Inoue, Nucleosides and Nucleotides, 4, 401 (1985)
45) Y.Yoshimura, A.Matsuda and T.Ueda, Nucleic Acids Res.,Syposium Series, 21, 79 (1989)
46) 池原 森男 "核酸" 朝倉書店 1979 p.277
47) W.Guschlbauer, "核酸の構造と機能" 広川書店 1978 p.20
48) Y.Yamagata, N.Okabe, K.Tomita, S.Shuto, H.Inoue and T.Ueda., Acta Cryst., C41, 1653 (1985)
49) Y.Yamagata, N.Okabe, K.Tomita, S.Shuto and T.Ueda, Acta Cryst., C41, 1656 (1985)
50) B.A.Otter, personal communication
51) F.M.Richards and H.W.Wyckoff, "The Enzymes" vol.4 (3rd. ed.) ed. by P.D.Boyer, p.647
52) R.L.Cambell and G.A.Petsko, Biochemistry, 26, 8579 (1987)
53) N.Borkakoti, Eur.J.Biochem., 132, 89 (1983)
54) B.Howlin, G.W.Harris, D.S.Moss and R.A.Palmer, J.Mol.Biol., 196, 159 (1987)
55) M.D.White,M.Keren-Zur and Y.Lapidot, Nucleic Acids Res., 4, 843 (1977)
56) 碓井 博幸 未発表データ

57) 中西 香爾，原田 宣之，"円二色性スペクトル-有機立体化学への応用"，
東京化学同人，1982
58) 沢田 文夫，市村 幸子，生化学，39，819（1967）

inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19