論文特集「生物活性物質」

(日本化学会誌, 1981, (5), p.845~850)

© 1981 The Chemical Society of Japan

5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=2',3'-環状リン酸
エステルおよび 3'-リン酸エステルの合成と
リボヌクレアーゼ T₁ との相互作用¹⁾²⁾

(1980 年 10 月 22 日 受理)

松 田 彰・上 田 亨*

5'-デオキシ-5'-(フェニルチオ)グアノシン=2',3'-環状リン酸エステルを合成し、光照射を行なうと収率よく 8,5'-環化反応が起こり、5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=2',3'-環状リン酸エステルが得られた。これは、塩基部が *anti* 形に固定されたグアニル酸のモデルである。この化合物はリボヌクレアーゼ T₁ (RNase T₁) で加水分解され 3'-リン酸エステルを与えるが、RNase T₁ と 3'-リン酸エステルの相互作用の分光学的解析を行なった結果、*anti* 形グアニル酸が、RNase T₁ とよく相互作用することが明らかとなり、従来の定説を修正する結果となった。5'-デオキシ-8,5'-シクロアデノシン=2',3'-環状リン酸エステルも同様に合成することができた。

1 緒 言

酵素と基質が相互作用する場合、基質はそのとりうる数多くの配座のうち、ある特定のもののみが立体的に酵素に適合できる。ヌクレオシドやヌクレオチド類においてはその利用酵素との相互作用において、とくにグリコシル結合まわりの配座が重要である。図式 1 にアデノシンを例に 2 種の典型的配座を示した。すなわちアデニン核のピリミジン部がリボース環上に位置する配座を *syn* 形と、また、それがリボース環外にある配座を *anti* 形と呼ぶことにする。

一般に核酸構成ヌクレオシドやヌクレオチドは *anti* 形をとっていることが NMR スペクトル、CD スペクトルや X 線解析などにより知られている³⁾⁴⁾。一方、これらが関連酵素と相互作用する場合には基質の優先配座が異なることがありうる。たとえばアデノシンデアミナーゼ⁵⁾やポリヌクレオチドホスホリラーゼ⁶⁾は *anti* 形の基質を好むが、大腸菌 RNA ポリメラーゼは基質のヌ

Scheme 1

クレオシド 5'-三リン酸の *syn* 形と結合する⁷⁾という。またリボヌクレアーゼ T₁ (RNase T₁) はグアニル酸の *syn* 形と結合して作用すると推測されている⁸⁾。

こうした研究を行なう場合、グリコシル結合における回転が不可能な基質が合成できれば、確実な結論が下せるわけで、著者らはこうした観点から *anti* 形に固定したプリンヌクレオシド類とそれらのリン酸エステルの合成研究を行なってきた。現在までにアデノシンの *anti* 形化合物として 5'-デオキシ-8,5'-シクロアデノシン [1]⁹⁾、8,5'-(*R* および *S*)-シクロアデノシン [2]¹⁰⁾¹¹⁾、5'-ヒドロキシメチル-5'-デオキシ-8,5'-(*R* および *S*)-シクロアデノシン [3]¹²⁾、および 5'-ヒドロキシエチル-5'-デオキシ-8,5'-(*R* および *S*)-シクロアデノシン [4]¹²⁾ などの合成を報告した

北海道大学薬学部, 060 札幌市北 12 条西 6 丁目

1) この報文を“ヌクレオシドとヌクレオチドの研究(第 36 報)”とする。

2) 前報(第 35 報), H. Inoue, S. Takada, S. Tanigawa, T. Ueda, *Heterocycles*, 15, 1049(1981).

3) P. O. P. Ts'o, ed., "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry", Academic Press, New York (1974) Vol. 1, p.417.

4) M. Sundaralingam, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 255, 3 (1975).5) K. K. Ogilvie, L. Slotin, P. Rheault, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49, 297(1971); A. Hampton, J. P. Harper, T. Sasaki, *Biochemistry*, 11, 4736(1972).6) M. Ikehara, I. Tagawa, T. Fukui, *Biochemistry*, 8, 736(1969).7) A. M. Kapular, E. Reich, *Biochemistry*, 10, 4050(1971).8) T. Oshima, K. Imahori, *J. Biochem.*, 70, 197(1971).9) A. Matsuda, K. Muneyama, T. Nishida, T. Sato, T. Ueda, *Nucleic Acids Res.*, 3, 3349(1976).10) A. Matsuda, M. Tezuka, T. Ueda, *Tetrahedron*, 34, 2449(1978).11) A. Matsuda, M. Tezuka, K. Niizuma, E. Sugiyama, T. Ueda, *ibid.*, 34, 2633(1978).12) A. Matsuda, K. Niizuma, T. Ueda, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 876(1980).

Scheme 2

(図式2)。今回は 5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=2',3'-環状リン酸エステルとそのアデノシン誘導体の合成と、それらのリボヌクレアーゼ T₁ などとの相互作用を分光学的手段で解析した。

2 実験結果および考察

2.1 5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=2',3'-環状リン酸エステルの合成

著者らはすでに 2',3'-O-イソプロピリデン-5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシンを 5'-フェニルチオ体の光照射による 8,5'-環形成反応によって得ていたが¹¹⁾、この化合物の脱イソプロピリデン化に成功しなかったので別経路による合成を試みた。グアノシン [5] をジフェニルジスルフィドとトリブチルホスフィンと DMF 中処理すると¹²⁾、5'-デオキシ-5'-(フェニルチオ)グアノシン [6] が得られた。[6] を DMF 中ポリリン酸と加熱し¹⁴⁾、生成物を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで精製すると 5'-デオキシ-5'-フェニルチオグアノシン=2',3'-環状リン酸エステル [7] がよい収率で得られた。[7] をアセトニトリル-水中光照射⁹⁾を行ない、生成物をカラムクロマトグラフィーで精

Scheme 3

Scheme 4

製し、5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=2',3'-環状リン酸エステル [8] を高収率で得た (図式3)。

2.2 5'-デオキシ-8,5'-シクロアデノシン=2',3'-環状リン酸エステルの合成

アデノシンから出発し、同様の方法により 5'-デオキシ-5'-(フェニルチオ)アデノシン [9] を得、そのリン酸化により 2',3'-環状リン酸エステル [10] を、光照射により 8,5'-シクロ体 [11] を得ることができた。[11] は [1] をポリリン酸と加熱しても合成することができる (図式4)。なお 5'-フェニルチオ体の光照射による 8,5'-シクロ化反応は糖部 2',3'-ヒドロキシル基がイソプロピリデン化や、環状リン酸エステル化をうけているときのみ良好に進行することが認められた。2',3'-ヒドロキシル基を五員環保護するとリボフラノース環がプリン 8-位と糖部 5'-位とが接近しうる配座をとりやすいためであろう。

2.3 5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=2',3'-環状リン酸エステルの RNase T₁ による加水分解

RNase T₁ [EC 2.7.7.26] は RNA 中のグアニン塩基特異的なリボヌクレアーゼであり、グアノシン=2',3'-環状リン酸エステルをも加水分解してグアノシン 3'-リン酸とする。この塩基特異性が厳密であるため、基質の認識や、加水分解機構について興味をもたれ、種々の研究が行なわれている¹⁵⁾。Oshima, Imahori はその酵素反応の生成物でもあり、競争阻害剤でもあるグアノシン 3'-リン酸と RNase T₁ の相互作用を検討し、差吸収スペクトル法により、複合体中では基質が N-7 プロトン化をうけている¹⁶⁾こと、また差 CD スペクトル法により *anti* 形から *syn* 形に転換して複合体を形成していることを報告している⁹⁾。グアノシンはプロトン化を受けると CD スペクトルの符号が逆転することはすでに知られており、またこの原因を *anti* → *syn* への配座変化によるものと推定がなされている¹⁷⁾¹⁸⁾。

15) たとえば基質特異性については: S. Irie, T. Itoh, T. Ueda, F. Egami, *J. Biochem.*, 68, 163(1970).

16) T. Oshima, K. Imahori, *ibid.*, 69, 987(1971).

17) W. Guschlbauer, Y. Courtois, *FEBS Lett.*, 1, 183 (1968).

18) T.-D. Son, W. Guschlbauer, M. Guéron, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 7903(1972).

13) I. Nakagawa, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, 1975, 1409.

14) T. Ueda, I. Kawai, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 2303(1970).

Fig. 1 Enzymic hydrolysis of 5'-deoxy-8,5'-cycloguanosine 2',3'-cyclic phosphate with RNase T₁

—○— : Formation of [12] with RNase T₁
 ---○--- : Formation of [12] without enzyme

Fig. 2-A Difference spectra of 5'-deoxy-8,5'-cycloguanosine at different the pH

— : [12], Difference between pH 5.6 and pH 0.1
 ---- : [8], Difference between pH 6.0 and pH 0.2

Fig. 2-B Difference spectrum of RNase T₁ and [12] in 0.2 mol/l NaCl at pH 5.4 (25°C)

こうした推測の当否を確かめるには *anti* 形に固定している化合物 [8] が有用と思われる。

塩基特異性を有しない RNase M [EC 2.7.7.17] は [8] (および [11]) に作用し、対応する 3'-リン酸エステル [12] を与えた。一方、RNase T₁ は通常基質であるグアノシン=2',3'-環状リン酸エステルと比較すればきわめて緩慢にはあったが、[8] を加水分解して [12] を与えた (図 1)。酵素非存在下では加水分解はまったく進行しないことから、[8] が基質となったことは明らかである。[8] および [12] の中性型とプロトン型の差吸収スペ

Fig. 3 Circular dichroic spectra of 5'-deoxy-8,5'-cycloguanosine

(a) : [8], (b) : [12]
 — : In 0.2 mol/l NaCl (pH 6.0)
 ---- : In 0.5 N HCl-0.2 mol/l NaCl

クトル (図 2-A) はグアニル酸のそれ¹⁶⁾と酷似している。さらに [12] と RNase T₁ の混合物と各成分との差吸収スペクトル (図 2-B) も、相互作用しているグアニル酸と RNase T₁ が示す差スペクトル¹⁶⁾にはほぼ一致する。

一方、[8] および [12] の中性および酸性溶液中の CD スペクトルを測定すると、[8] の場合には負 → 正への逆転がグアノシンの場合¹⁷⁾と同様に観察された。[12] については中性溶液中で主吸収帯における負のバンドが消失しているが、プロトン化体では [8] やグアノシンと同様の大きな正のバンドを与えた (図 3)。

以上の結果は *anti* 形に固定されているグアニル酸である [8] や [12] が、グアノシンやグアノシン 3'-リン酸と同様の UV, CD スペクトル変化を起こすことを示しており、これらにおけるプロトン化 (N⁷-位) や RNase T₁ との相互作用による *anti* → *syn* 変換の可能性を否定したことになる。もっとも *syn* 形に固定されたグアニル酸のモデルを合成し、同様な検討を行なわなければ RNase T₁ とグアニル酸の相互作用は *anti* 形コンホマーでのみ可能であると最終的に確定することはできず、今後の課題である。

2.4 RNase T₁ と 5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン 3'-リン酸との相互作用の CD スペクトルによる解析

化合物 [12] と RNase T₁ の単独および混合時の CD スペクトルを図 4-a, b に示した。また、その差 CD スペクトルを図 4-c に示した。図 4-c に示された差スペクトルのパターンは Oshima, Imahori⁸⁾ および Sander, Ts'o¹⁹⁾ により報告された RNase T₁ とグアニル酸との相互作用による差 CD スペクトルのパターンと波長領域および強度ともよく一致している。Oshima らはこの差スペクトルをもっぱらグアニル酸の *anti* → *syn* 配座変化によるものとし、一方、Sander らは、もっぱら RNase T₁ におけるチロシンおよびトリプトファンさらには他の側鎖の構造変化に起因するものとしている。

しかし、実際には基質、酵素ともに変化したものと考えの方が合理的であろう。すなわち、280 nm 付近の負の差 CD バンドはおもにポリペプチド中のチロシン、トリプトファン残基の構造変

19) C. Sander, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry*, 10, 1953(1971).

Fig. 4 Circular dichroic difference spectra of RNase T₁ and [12] at 25°C

- (a) : Dichroic spectra of RNase T₁ 1.81×10^{-5} mol/l (—), and [12] 1.27×10^{-4} mol/l (-----) in 0.2 mol/l NaCl at pH 5.4
 (b) : Dichroic spectra of the above mixture (—), and the algebraic sum of the spectra in (a) (-----)
 (c) : Dichroic difference spectra calculated from (b) (—). Dichroic difference spectra of Fig. 3-(b) (-----)

化に起因し、250~260 nm での正の差 CD バンドはグアニル酸または [12] の N⁷-プロトン化体と中性型の差 CD と RNase T₁ の他の側鎖の構造変化の和として現われたものと考えられる。

3 結 論

anti 形に固定したグアニル酸のモデルとして [8] および [12] を合成し、中性型と N⁷-プロトン化型の UV, CD スペクトルを測定すると、グアニル酸と同様の变化を示し、CD スペクトル変化が *anti* → *syn* 形への変換によるものではないことを示した。さらに RNase T₁ との相互作用を検討した結果、グアニル酸と同様の挙動を示した。このことはグアニル酸が RNase T₁ で認識される場合も *anti* 形をとっていることを示している。このように、グルコシル結合まわりの固定コンホマーは、酵素-基質相互作用の立体化学的解明にきわめて有用なモデルとなることが示された。

4 実 験

4.1 使用機器

UV 吸収スペクトルは島津 UV-300 型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-40 型スペクトロポラリメーターを用い 25°C で測定した。NMR スペクトルは日立 R-20 B 型および日本電子 PS-100 型スペクトロメーターを用いた。光化学反応に使用した光源は映光社 PIL-60 型 60W 低圧水銀灯を用い、アルゴンガス気流下行なった。融点測定は柳本 MP-3 型測定器を用いた (未補正)。

4.2 使用試薬など

汙紙電気泳動、汙紙クロマトグラフィーには東洋汙紙 No. 51 A を用いた。薄層クロマトグラフィーは Merck シリカゲル 60 F₂₅₄ を用いた。DEAE セルロースは生化学工業製を用いた。原料スクレオシドおよびスクレオチド類はヤマサ醤油 (株) 製を用いた。RNase T₁ は三共株式会社から購入した。RNase M は入江昌親教授 (星薬科大学) から恵与された。

4.3 シクロプリンスクレオチドの合成

4.3.1 5'-デオキシ-5'-(フェニルチオ)グアノシン [6] : グアノシン 2.83 g を DMF (150 ml) に懸濁し、これにジフェニルジ

スルフィド 8.7 g およびトリブチルホスフィン 10 ml を加え、室温で 4 時間かきまぜたのち 60°C に 19 時間放置した。反応液を減圧下濃縮し、残留物にエーテル 200 ml を加え、析出した沈殿を汙取し、エーテルで十分に洗浄した。沈殿を水-エタノールから再結晶し、mp 219~221°C の白色結晶として [6] を得た。収量 2.33 g (62%)。

UV (H₂O) λ_{max} (nm) : 249.5 (ε=17700), 274 (sh) (ε=8300)

UV (0.5 N HCl) λ_{max} (nm) : 251 (ε=16000), 281 (sh) (ε=7300)

UV (0.5 N NaOH) λ_{max} (nm) : 252.5 (ε=16400), 267 (sh) (ε=12300)

CD (H₂O, nm, [θ]) : 281(+25600), 265(0), 255(-22450), 246(0), 238(+8300)

NMR (DMSO-d₆) δ (ppm) : 7.94 (s, 1, H-8), 7.6~7.1 (m, 5, フェニル), 6.54 (bs, 2, 2-NH₂), 5.74 (d, 1, H-1', J_{1',2'}=6 Hz), 4.63 (dd, 1, H-2', J_{1',2'}=6 Hz, J_{2',3'}=4.5 Hz), 4.4~3.8 (m, 2, H-3', 4'), 3.52 (bs, 2, H-5', J_{4',5'}=6 Hz)

分析値 C 50.85%, H 4.54%,

N 18.76%, S 8.65%

C₁₆H₁₇N₅O₄S としたの計算値 C 51.17%, H 4.58%,

N 18.66%, S 8.53%

4.3.2 5'-デオキシ-5'-(フェニルチオ)グアノシン=2',3'-環状リン酸エステル [7] : 五酸化ニリン 500 mg と 85% リン酸 600 mg を混合し 60°C で 1 時間放置する。これに DMF 10 ml とトリブチルアミン 5 ml を加えて溶解し、これに [6] 590 mg を加え 145°C, 3 時間かきまぜながら加熱した。反応液を水 2 l 中にあげ、アンモニア水を加えて pH を 4 に調整し、活性炭 10 g を水溶液に加えて 1 時間かきまぜた。活性炭を汙取し、汙液が中性を示すまで水洗した。この活性炭を水-エタノール溶液 1 l (水:エタノール=1:2, アンモニア水で pH 9 に調整) に加え、2 時間かきまぜた。水層を汙別し、同組成のエタノール水で炭層を洗浄した。汙液と洗液を合わせ、35°C 以下で減圧乾固した。残留物を水 100 ml に溶解し、DEAE セルロースカラム (炭酸水素エステル型, 3.3×25 cm) に吸着させたのち、カラムから水 1.4 l と 0.1 mol/l トリエチルアンモニウム炭酸水素塩 1.4 l の直線濃

Table 1 Paper chromatographic R_f values and paper electrophoretic relative migrations of 5'-deoxy-8,5'-cyclopurine nucleotides

Substance	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	$A > p^c$
R_f value ^{a)}	0.69	0.23	0.76	0.73	0.33	0.01	0.49
Relative mobility ^{b)}	0.69	0.91		0.77	0.88	1.35	1.00

a) Solvent. EtOH: NH₄OAc=5:2, pH 7, ascending.

b) Solvent. 0.05 N Triethylammonium hydrogencarbonate, pH 8, 700 V, 75 min.

c) Adenosine 2',3'-cyclic phosphate.

度勾配で溶出した。1 フラクション 20 ml ずつ分取しフラクション No. 51~120 を集めて減圧濃縮乾固すると [7] のトリエチルアンモニウム塩が全光学密度単位 (249 nm 測定, TOD₂₄₉) で 19000 (68%) 得られた。クロマトグラフィーの結果は表 1 に示した。

UV (H₂O) $\lambda_{\max}$: 249 nm

4.3.3 5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=2',3'-環状リン酸エステル [8]: 化合物 [7] 3000 OD 単位 (249 nm) を水 70 ml に溶解しアセトニトリル 200 ml を加え, アルゴンガス気流下 2 時間光照射した。反応液を減圧下濃縮乾固し, 残留物を水 150 ml に溶解し, DEAE セルロースカラム (炭酸水素エステル型, 1.8×23.5 cm) に吸着させた。カラムを水 500 ml と 0.1 mol/l トリエチルアンモニウム炭酸水素塩 500 ml の直線濃度勾配によって溶出した。溶出液は 10 ml ずつの分画にとり, No. 61~102 分画を集めて減圧下濃縮乾固すると [8] のトリエチルアンモニウム塩が 2115 TOD (254 nm) 得られた (84%)。

UV (H₂O) $\lambda_{\max}$: 254 nm ($\epsilon=14800$)CD (H₂O: nm, $[\theta]$): 252(-5100), 232(0)CD (0.5 N HCl, nm, $[\theta]$): 290(-1000), 276(0), 254(+8400), 223(0), 215(-2800) (図 3-a)UV 吸収から求めた pK_{a1} 値: 2.0

4.3.4 5'-デオキシ-5'-フェニルチオアデノシン [9]: アデノシン 5.34 g を DMF 40 ml に溶解し, ジフェニルジスルフィド 4.8 g とトリブチルホスフィン 5.48 ml を加え, 室温 18 時間放置した。反応液を減圧下濃縮し, 残留物をエーテル 1 l 中にかけまぜながら注いだ。析出した沈殿を濾取し水-メタノールから結晶化して mp 135°C (文献値²⁰⁾ 136~138°C) の [9] を 5.25 g (73%) 得た。

UV (H₂O) $\lambda_{\max}$: 252 nm ($\epsilon=17700$)UV (0.5 N HCl) $\lambda_{\max}$: 251.5 nm ($\epsilon=17900$)UV (0.5 N NaOH) $\lambda_{\max}$: 253 nm ($\epsilon=18700$)CD (H₂O, nm, $[\theta]$): 266(+41000), 252(0), 246(-12600), 234(-3800), 211(-31600)

分析値 C 53.42%, H 4.77%,

N 19.50%, S 8.78%

C₁₆H₁₇N₅O₃S としての計算値 C 53.46%, H 4.78%,20) a) A. C. Koppel, R. K. Robins, *J. Org. Chem.*, 23, 1457 (1958).b) C. V. Z. Smith, R. K. Robins, R. L. Tolman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1973, 1855.c) M. Maeda, K. Nushi, Y. Kawazoe, *Tetrahedron*, 30, 2677(1974).

N 19.49%, S 8.91%

4.3.5 5'-デオキシ-5'-(フェニルチオ)アデノシン=2',3'-環状リン酸エステル [10]: 五酸化ニリン 300 mg と 85% リン酸 360 mg の DMF (10 ml) 溶液を 145°C で 1 時間かきまぜながら加熱した。この溶液に [9] 260 mg とトリブチルアミン 2 ml を加えて 145°C で 3 時間加熱した。反応液を [7] の合成の場合と同様に活性炭吸脱着処理し, DEAE セルロースカラム (炭酸水素エステル型, 3.5×20 cm) に吸着させて水 1 l と 0.1 mol/l トリエチルアンモニウム炭酸水素塩 1 l の直線濃度勾配によって溶出した。溶出液は 20 ml ずつの画分にとり No. 61~104 を集めて減圧下濃縮乾固すると, [10] が 11870 OD 単位 (252 nm) 得られた (93%)。

UV (H₂O) $\lambda_{\max}$: 252 nm

4.3.6 5'-デオキシ-8,5'-シクロアデノシン=2',3'-環状リン酸エステル [11]

(1): [10] 3000 OD 単位 (252 nm) を水 60 ml に溶解し, アセトニトリル 240 ml を加え, アルゴンガス気流下 2 時間光照射した。反応液を減圧下濃縮乾固し, 残留物を水 150 ml に溶解し, DEAE セルロースカラム (炭酸水素エステル型, 1.8×17.5 cm) に吸着させ, 水 500 ml と 0.1 mol/l トリエチルアンモニウム炭酸水素塩 500 ml の直線濃度勾配で溶出した。溶出液は 10 ml ずつの分画で集め No. 33~78 を集めて減圧下濃縮乾固すると [11] が 2490 OD 単位 (263 nm) 得られた (84%)。

UV (H₂O) $\lambda_{\max}$: 263 nmCD (H₂O, nm, $[\theta]$): 262(-6850), 222(0), 210(+6500)

(2) DMF 10 ml にポリリン酸 0.72 ml (五酸化ニリン: 85% リン酸=1:1.2 w/w), トリブチルアミン 2.16 ml および [1]⁹⁾ 156 mg を溶解し, 溶液を 145°C, 2 時間加熱した。(1) と同様の後処理および DEAE セルロースカラム (3.3×24 cm) クロマトグラフィーにより [11] を 8260 OD 単位 (263 nm) で得た (81%)。

4.4 酵素との反応

4.4.1 5'-デオキシ-8,5'-シクログアノシン=3'-リン酸 [12]: 化合物 [8] 5050 OD 単位 (254 nm) を 1.0 mol/l 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) 10 ml および水 30 ml に溶解し, RNase M 0.7 mg を加え 37°C で 26 時間インキュベートした。反応液を水で 400 ml とし 2 N NH₄OH で pH 7 に調整してから DEAE セルロースカラム (炭酸水素エステル型, 1.4×26 cm) に吸着させ, カラムを水 500 ml と 0.15 mol/l トリエチルアンモニウム炭酸水素塩 500 ml の直線濃度勾配で溶出したのち, 0.15 mol/l から 0.2 mol/l のトリエチルアンモニウム炭酸水素塩 (各 200 ml) の直線濃度勾配による溶出を行なった。溶出液は 10 ml ずつの画分にとり, No. 28~62 からは濃縮後 [8] が 655 OD 単位 (254 nm) 回収された。No. 82~114 から [12] のトリエチルアンモニウム塩が 4590 OD 単位 (253 nm) 得られた (90%)。

UV (H₂O) $\lambda_{\max}$: 255 nm ($\epsilon=14900$)CD (H₂O, nm, $[\theta]$): 285(+700), 260(+100), 210(+8400)CD (0.5 N HCl, nm, $[\theta]$): 254(+8200), 226(+1300), 219(0), 212(-2900) (図 3-b)UV 吸収から求めた pK_{a1} 値: 2.25

4.4.2 RNase T₁ による [8] の加水分解: 化合物 [8] 0.64 mg と RNase T₁ 13 μ g をリン酸-水素ナトリウム-クエン酸緩

衡液 (0.2 mol/l Na_2HPO_4 -0.1 mol/l クエン酸, pH 7.25) 100 μl に溶解し, 37°C でインキュベートし, 一定時間ごとに少量を濾紙クロマトグラフィー (エタノール: 酢酸アンモニウム=5:2, pH 7) で分離し, 対応するスポットを切り抜き 0.01 N HCl で抽出し, その UV スペクトルで [8] と [12] の定量を行なった。酵素を含まない溶液を同様にインキュベートし, 対照とした。結果を図 1 に示す。

4.4.3 [8], [12] および RNase T_1 の差 UV スペクトルの測定: 0.2 mol/l 塩化ナトリウム溶液中および 1 mol/l HCl-0.2 mol/l 塩化ナトリウム溶液中約 2 吸光度の [8] を溶解し, それぞれ対照セル, サンプルセル (10 mm) に入れて差スペクトルを測定した。一方, [12] は酸性側は 0.5 mol/l HCl-0.2 mol/l 塩化ナトリウム溶液に溶解して同様に差スペクトルを測定した (図 2-A)。RNase T_1 と [12] を 0.2 mol/l 塩化ナトリウム溶液 (pH 5.4) にそれぞれ 2.38×10^{-5} mol/l および 1.91×10^{-4} mol/l になるように溶解し, 各 UV 吸収スペクトルを測定した。一方, 同塩

化ナトリウム溶液に各成分が同濃度になるように混合溶解したものの UV スペクトルを測定し, 両者の差スペクトルを計算で求め図 2-B に示した。

4.4.4 [12] および RNase T_1 の差 CD スペクトルの測定: まず 0.2 mol/l 塩化ナトリウム水溶液 (pH 5.4) 中で RNase T_1 (1.81×10^{-5} mol/l) の CD スペクトルおよび [12] (1.27×10^{-4} mol/l) の CD スペクトルをそれぞれ測定した (図 4-a)。つぎに RNase T_1 (1.81×10^{-5} mol/l) と [12] (1.27×10^{-4} mol/l) を混合した溶液の CD スペクトルを測定し (図 4-b), その差を計算してスペクトルを作成した (図 4-c)。測定温度はすべて 25°C である。

(1976 年 9 月, 米国化学会 100 年会 (サンフランシスコ)(一部発表²¹⁾)

21) "Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides", R. E. Harmon, R. K. Robins, L. B. Townsend, Eds. Academic Press, N. Y., p.397 (1978)

Special Articles on Biologically Active Substances

Synthesis of 5'-Deoxy-8, 5'-cycloguanosine 2', 3'-Cyclic Phosphate and 3'-Phosphate, and Their Interaction with Ribonuclease T_1 [†]

Akira MATSUDA and Tohru UEDA*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University;
Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo-shi 060 Japan

Photo-cyclization of 5'-deoxy-5'-(phenylthio)guanosine 2', 3'-cyclic phosphate furnished 5'-deoxy-8, 5'-cycloguanosine 2', 3'-cyclic phosphate, a fixed model of the *anti*-form of guanosine 2', 3'-cyclic phosphate. The UV and CD spectral behaviors of this cycloguanine nucleotide are essentially identical with those of guanylic acid. The cyclic phosphate was digestible with RNase T_1 to give 3'-phosphate. The spectral analysis of the interaction of RNase T_1 and the 8, 5'-cycloguanosine 3'-phosphate revealed that it behaved exactly like 3'-guanylate. The previous assumption of interaction between RNase T_1 and guanosine 3'-phosphate of *syn*-form has now been revised, since the cycloguanine nucleotide should possess the *anti*-form. The corresponding adenine nucleotide was also synthesized.

[†] Nucleosides and Nucleotides. XXXVI.