亜硫酸塩とピリミジンヌクレオシドの反応について

工 藤 一 郎*・早 津 彦 哉*

The Reactions between Bisulfite and Pyrimidine Nucleosides

Ichiro KUDO* and Hikoya HAYATSU*

Bisulfite ion adds across the 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides to give the 5,6-dihydro-6-sulfonate derivatives. Under mild conditions, cytidine-bisulfite adduct is readily hydrolyzed to the corresponding uridine derivative. On the other hand, free radicals, produced when bisulfite ion is auto-oxidized in the presence of oxygen, react with 4-thiouridine, isopentenyladenosine and some other pyrimidine nucleosides. These reactions and their applications to polynucleotides are reviewed.

1. はじめに

生体の重要な構成成分である核酸を、化学試薬を用いて特異的に修飾しその反応性を明らかにし、ひいては核酸の構造と機能を知らうという試みは従来いくつかなされてきている。その中で、亜硫酸塩は、中性水溶液中、37°Cという緩やかな条件下、種々の核酸成分と比較的に特異的な反応を速やかにすることが明らかにされてきており、優れた核酸の化学修飾の方法とされている。

亜硫酸の反応様式は一般に大きく二つに分けられる。比較的高濃度 ($\geq 1M$) の親核試薬としての亜硫酸イオンの反応と、低濃度領域 ($\leq 10^{-2} M$) で酸素共存下自動酸化される際に生じるフリーラジカルによる反応である。核酸との反応についてもこの二つのタイプの反応性は大別でき、それぞれについて興味ある化学修飾の報告がなされている。亜硫酸による核酸の化学修飾についての研究は、われわれのグループとニューヨーク大学の R. Shapiro らが独立に続けてきており、まだ未完成の分野を多く残している現状である。内容としては、核酸のうちピリミジン塩基の修飾が中心で、具体的に転移 RNA を中心に構造と機能の研究に応用されている。こ

の論文では、われわれのグループの仕事を中心に、亜硫酸とピリミジンヌクレオシドの反応について二つの反応性に分けて要約してみたい。なお、亜硫酸と核酸との反応については早津による総説¹⁾があり、核酸の有機化学反応一般については、Kochetkov と Budowskii によるすぐれた著作²⁾があるので参考にされたい。

2. 高濃度領域におけるイオン反応

ピリミジンヌクレオシドのウラシルおよびシトシン残基の電子密度は C-5 位が高く、C-6 位が低いことが量子力学的に明らかにされている³⁾。事実、ハロゲンやホルムアルデヒドは親電子的にウラシルの C-5 位に付加し、ヒドロキシルアミンやメトキシアミンは親核的に C-6 位に付加する²⁾。

強力な親核試薬である亜硫酸でピリミジンヌクレオシドを処理するとこの反応性に一致し、シトシンおよびウラシル誘導体の 5,6-二重結合の C-6 位に亜硫酸イオンが付加し、5,6-ディヒドロ 6-スルホン酸を可逆的に形成する⁴⁻⁶⁾ (図 1)。これらの付加体はピリミジンによる 260 nm 付近の UV 吸収を失って、エンドアブソープションを示す。シトシン誘導体の付加体では、4 位のアミノ基の反応性が高まり、脱アミノ化反応をおこしウラシル誘導体からの付加体になったり、他のアミノ基との交換反応 (トランスアミネーション)⁷⁻¹⁰⁾ がおこったりする。また、シトシン、ウラシル両方の場合ともに、適当

* 東京大学薬学部衛生化学・裁判化学教室 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo ()

Fig. 1 The reactions of uridine and cytidine with bisulfite

な条件下、重水中で、亜硫酸付加反応、および脱離反応を行うと、5位の水素が重水素に変化する反応（重水素交換反応）¹¹⁻¹³）がおこる。以上の脱アミノ化反応、アミノ基交換反応、重水素交換反応がすべて亜硫酸付加物が反応の中間体となって進行するということが注目すべきである。また、他のピリミジン系の核酸塩基では、チミン、5-メチルシトシン、5-ハロゲン化ウラシル等で付加体形成、脱アミノ化反応など類似な反応が明らかにされている。しかし、プリン塩基（グアニンおよびアデニン誘導体）では、付加体形成反応および脱アミノ化反応はおこらない。なお、このピリミジン環の5,6二重結合への亜硫酸の付加反応は、Bücherer 反応¹⁴）に類似した反応であることがいえる。もっともこの場合には、ウラシル誘導体のアミノ化反応の報告はない。

2.1. ウラシル誘導体との反応 ウラシルを水溶液中亜硫酸ナトリウムで処理すると、5,6-デヒドロウラシル 6-スルホネイト（図1の(2)）を単一の生成物として生成した⁴⁻⁶）。この化合物のナトリウム塩は水にあまり溶けず、酸性側で安定なため、酢酸共存化の水溶液から結晶化された。エンドアブソープションを呈するUV、元素分析、NMR、IR によって構造を決定し、ラマンスペクトルで C-S 結合を確認した。また、この付加体は弱アルカリ性 (pH 9) でウラシルに戻るが、D₂O 中で生成した付加体から戻ったウラシルの5位にDが入っていないことから、5,6-二重結合へトランス付加、トランス脱離すると考えられる。なお、254 nm の UV 照射下で付加体生成反応を行うとイオン反応よりも効率良く反応が進行する¹⁵）。この場合、付加の立体特異性は失なわれる。

この亜硫酸付加体の生成は 260 nm の UV 吸収の減少で追跡できるが、十分過剰量の亜硫酸存在下で凝一次反

応をし、平衡に達する。平衡に達するまでの時間は、pH 7, 1M 亜硫酸で 22°C のときは 60 分、37°C のときは 20 分である。pH 8 以下では平衡は付加体側に傾くが、pH 8 以上では平衡は付加体に不利になり、pH 10.2 以上では付加体は 0 となる。ウラシル誘導体について、24°C, pH 7.2 で付加体生成反応の反応速度を比較すると、ウラシル>ウリジン>デオキシウリジン>ウリジン-5'-ホスフェイトの順になる¹⁶）。反応速度定数は pH 7 で最も速く、4 以下では付加体形成は非常に遅い（図2）。この pH 依存性から、非解離型のウラシルと亜硫酸イオン (SO₃²⁻) が反応に関与するものと考えられる¹⁷）。

Fig. 2 The pH dependence of the reaction between uridine and sodium bisulfite (Uridine 10⁻² M, NaHSO₃-Na₂SO₃ buffer 1 M, 30 min. 20°C)

酸イオン (SO₃²⁻) が反応に関与するものと考えられる¹⁷）。

付加体は pH 9 の緩衝液 (1M 塩化アンモニウム-アンモニアの系) 中で、36°C, 2 時間処理すると、完全にウラシルに戻る⁶）。pH 7 でも、36°C, 2 時間で 18% のウラシル再生がみられるが、pH 5 以下では安定である。

ウラシルへの付加体は前述のように立体特異性があるのに対し、重水中で 1M 亜硫酸アンモニウムでウリジンを処理すると、NMR スペクトルで 6 位の水素 (doublet) の中央に新しいスペクトル (singlet) があらわれ¹²）、これは 5 位の水素が部分的に重水素交換されたことを意味する¹⁸）。長時間の反応によりこの反応は 100% 進行する。さらに、この重水素交換反応にはアンモニア以外の種々の有機アミンの添加が有効であることがわかり¹²）、反応は亜硫酸の濃度と添加するアミンの濃度に依存して

進行することが明らかになった。たとえば, dimethylamine, trimethylamine 等を $1M$ 存在させ, pD 8.9, $37^{\circ}C$ で 24 時間, $1M$ 亜硫酸ナトリウムで処理すると 35~37% の重水素交換がおこっており, また pD 8.0 で $1M$ imidazole, $1M$ 亜硫酸ナトリウム 処理で, 62% の交換がおこる。検索した有機アミンのうち他に, methylamine, ethylamine, quinuclidine は有効であったが, triethylamine, guanidine は無効であった。triethylamine (pK_a 10.88) が無効なのに, pK_a がそれとほぼ等しい quinuclidine (pK_a 10.58) が有効なことから, 前者が無効な理由は ethyl 基の立体障害であろうと考えられる。また, pK_a が 13.6 と強塩基である guanidine が無効なのはこの反応条件では, ほとんどの guanidine 分子がカチオン型になっているためと考えられる。さらに, trimethylamine と imidazole の交換反応の至適 pD がそれぞれ pD 8.8, 8.0 であり, pK_a 値が 7.0 と低い imidazole の場合に中性側によることから, この反応には非解離型アミンが関与することが強く示唆された。つまり非解離型アミンの N の不対電子対がピリミジン環 5 位の水素を引抜く反応をすると解釈される。

ここで, ウリジン 5 位がトリチウムのものを用いると重水素への交換の反応速度定数は $6.03 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ で, ウリジン 5 位の水素の重水素交換の場合の $2.69 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ に比べて, 1/4.47 であるという結果を得た。この同位元素効果から, 重水素交換反応では 5 位水素の引抜き反応が律速段階であると考えられる¹¹⁾。なお, アミンの添加はウラシル誘導体の亜硫酸付加体形成反応および脱離反応の両方の速度を早める効果を示すが, 前者の方がより大きい効果を持つため, この平衡反応を付加体側へずらす結果となる^{12, 16, 17)}。

付加体からウラシルへの再生反応のメカニズムについて以下のような考察がなされている。(i) pH 11 付近まで OH^- 濃度が增大するに従って (2)→(1) の脱離反応 (図 1) の速度も直線的に増大するが pH 11 より上ではもはや速度上昇はなくなる。さらに, 3 位の N をメチル基でおさえた 5,6-ディヒドロ-1,3-ジメチルウラシル 6-スルホネイトの場合には pH 11 以上でも速度は直線的に増大する。つまり, 反応には付加体の非解離型が関与する。(ii) 5 位を重水素にした付加体の脱離反応の速度は 1/4 まで減少する。さらに, 先に述べたアミン以

外にも, tris (hydroxymethyl) amine, morpholine, glycine, ethanolamine 等が脱離反応を促進する効果を持ち, アミンが 5 位の重水素を引抜くことが示唆されている。これらのことから中間体とし

て (5) のような 5 位にアニオンを持つ化合物が想定されている。

2.2. シトシン誘導体との反応 シトシン誘導体を亜硫酸ナトリウムで処理すると, ウラシル誘導体の場合と同様に 5,6 二重結合に亜硫酸が付加した生成物 5,6-ディヒドロシトシン 6-スルホネイト (図 1 の (3)) が可逆的に生成する。この付加体 (C*) は容易に脱アミノ化し, ウラシル亜硫酸付加体 (U*) になる。この U* は弱アルカリでウラシル誘導体まで変換するので, シトシン誘導体がウラシル誘導体まで変ったわけである (図 1 の (4)→(1))。たとえば, シチジンを $2M$ $NaHSO_3$, pH 5, $37^{\circ}C$, 5 時間処理で完全にウラシル付加体にまで変換できる⁹⁾。

脱アミノ化反応の中間体である C 付加体は paper chromatography および電気泳動で検出されるばかりか, 低温で反応を行うと結晶として得られる。これは低温で平衡が付加体側に移り, かつ脱アミノ化反応が遅くなったためである。平衡は非常に速く達成され, 平衡での付加体の割合は $1M$ $NaHSO_3$, pH 6 で, $0^{\circ}C$ の時 90%, $37^{\circ}C$ で 64%, $60^{\circ}C$ で 43% と低温なほど付加体側に動く。また, $37^{\circ}C$, $1M$ $NaHSO_3$ で pH 4 の時 74%, pH 5 で 69%, pH 6 で 64%, pH 7 で 24%, pH 8 で 0% と酸性なほど付加体形成は増す⁹⁾。結晶として得られた付加体は, 0.1 N 塩酸中で安定であるが中性水溶液中で速やかにシチジンに戻る。

シトシン誘導体からウラシル亜硫酸付加体への変換反応 ((4)→(2)) での律速段階は脱アミノ化反応 ((3)→(2)) であって, 亜硫酸が過剰に存在する時は付加体の濃度, つまり原料のシトシン誘導体の濃度に依存する。反応の至適 pH は 5 付近で, 7 以上では脱アミノ化反応はおこらない (図 3)。興味深いことに, 亜硫酸濃度をいろいろ変えて (4)→(3)→(2) の反応を行ってみると, (3)→(2) の step にも亜硫酸イオンが関与することが示唆された^{11, 19, 20)}。図 4 は, (4)→(3) の step にも亜硫酸が関与するとした場合 (点線) と (3)→(2) の step にも関与するとした場合 (実線) を pH 5.0 と pH 5.8 でそれぞれ速度定数の比の亜硫酸濃度依存性を計算すると, 実測値は後者に一致することを示している。また, Shapiro らの綿密な研究により SO_3^{2-} イオンが付加体の protonated form に働くことが明らかにされた²⁰⁾。

Fig. 3 The pH-rate profile of bisulfite-catalyzed deamination of CMP (CMP, $5 \times 10^{-3} \text{M}$, $\text{NaHSO}_3\text{-Na}_2\text{SO}_3$ buffer, 2M, 37°C)

Fig. 4 Relationship between bisulfite concentration and rate of CMP-deamination

D_2O 中, $\text{pD } 7.7$ で CMP を亜硫酸ナトリウムで処理すると 5 位の水素が重水素に交換する反応が観察される¹³⁾。(ウリジンの場合には重水素交換にアミンの添加が必要であったことに注意されたい。) 37°C , 0.96M の亜硫酸処理で, 24 時間で 14.2%, 72 時間で 24.6% と交換反応は進行する。この時脱アミノ化反応は 0.6%, 2.1% とほとんど進行しない。

この重水素交換反応をいろいろな pD で行ってみると $\text{pD } 5.4$ が至適という結果を得¹³⁾, D_2O 中での脱アミノ化反応の pD profile と完全に一致した。これは、二つの反応が共通のメカニズムを含んでいることを強く示唆する。また、どの pD 値でも脱アミノ化反応に重水素交換反応が優先しておこる。さらにこの重水素交換反応には亜硫酸が 1 モル以上関与することがわかっており、亜硫酸イオンが触媒的に働くと考えられている。

シトシン残基の亜硫酸付加体では 4 位のアミノ基の反応性があり加水分解される (脱アミノ化反応) ばかりか各種アミノ基との交換反応が起こる^{7,8)}。aniline, *o*-aminophenol, β -naphthylamine, methylamine, dimethylamine, diethylamine, pyrrolidine, glycine, glycyglycine, polylysine, *o*-methylhydroxyamine が交換することが報告されている。 pH は 7 付近が良いとされているが各反応でそれぞれ至適条件が異なる。たとえば, glycyglycine の場合には亜硫酸濃度が 2M より 0.2M のほうがよいという知見がある⁸⁾。これは、亜硫酸濃度が低い場合には脱アミノ化反応がおこえらるためである。

酸性領域 ($\text{pH } 5$ or 6) では glycyglycine (pK_a 8.25) や methylamine (pK_a 10.66) はアミノ基交換反応をしないが弱いアミンである aniline (pK_a 4.63) は十分反応する。これよりアミンの非解離型が反応に関与することが明らかである。

Imidazole, α -naphthylamine, *p*-phenylazoaniline はアミノ基交換反応をしない。

Budowsky らは CMP を *o*-methylhydroxyamine (強い求核性を持つ) と亜硫酸で処理し、化合物 (6) を得ているがこれは酸やアルカリに安定である³¹⁾。また、このアミン交換反応は非常に速やかに起る。semicarbazide も同じように反応する²¹⁾。

2.3. ハロゲン化ウラシルの反応

5-ハロゲン化ウラシル誘導体は生物学的に重要な化合物である。まず, 5-フロロウラシルはチミジル酸合成酵素の阻害作用を持ち²⁴⁾, 5-ブロモデオキシウリジンはチミンのかわりに DNA に取込まれ突然変異の誘発²⁵⁾や DNA の光感受性の増大をもたらす^{2,26)}。これらの化合物のピリミジン環も 5,6 位へ亜硫酸が付加することが報告されている。

Sander らによると²⁷⁾ $\text{pH } 7.10$, 0.10M 亜硫酸ナトリウムで 5-ヨードウラシルを処理すると 283 nm の UV 吸収が減少し, 259 nm のウラシルの吸収が出現する。引続いてこの吸収も減少し, ウラシル亜硫酸付加体が生

成する。最終的に反応液をアルカリにすることによりウラシルが得られた。

同様の付加体形成反応が 5-ブロモウラシル, 5-フロロウラシル, 5-クロロウラシルでも明らかにされ, $I > Br > F-H > Cl$ の順に付加体形成が速いことが報告されている。このうち, 5-フロロウラシルの場合には脱ハロゲン化反応は起こらないが他の場合にはウラシルを生成する²⁸⁾。

2.4. 5-メチルシトシンおよびチミン誘導体の反応²⁹⁾

シトシン誘導体を亜硫酸ナトリウムで処理すると(2)で述べたように, 6位に亜硫酸が付加することにより5位の水素の立体異性化が起こる。このことより 5-メチルシトシンの亜硫酸による脱アミノ化反応に際して, 中間体として5位の水素と6位のスルホン酸基が *cis* と *trans* に位置する立体異性体が得られることを予想した。事実, 最近のわれわれの実験では 5-メチルシトシンを 3M 亜硫酸, pH 5.5 で処理すると, 5,6-デヒドロチミン 6-スルホネイトの二つの立体異性体(7)と(8)が得られた。

このうち5位の水素と6位のスルホン酸基が *trans* の(7)は中性では比較的安定であるが弱アルカリ性で不安定でチミンに可逆的に変化する。37°Cでのチミンへの変化の速さを付加体(5-D)の減少の半減期でみると, pH 6.9 で13時間, pH 8.9 で70分である。一方, 水素とスルホン酸基が *cis* の(8)は中性, 弱アルカリ性で安定で, 強アルカリ(pH 13.8)でチミンに変化する。付加体(7)はチミンを出発原料として亜硫酸処理した場合にも生成することが NMR で確かめられた。なお, チミンと亜硫酸の付加体は従来中性では非常に不安定であろうと考えられていた。以上, 塩基について得られた情報であるが, スクレオシドについても同様の反応が進行することが期待される。

2.5. プソイドウリジンの反応^{30,31)} 3M NaHSO₃ で pH 6, 60°C, 24時間, プソイドウリジン(9)を処理すると UV 吸収を持つ2つの生成物を生じる。この生成物の構造は未定であるが, anionic であること, ³⁵S ラベルの亜硫酸を用いる実験から S を持つ化合物であることが明らかになっている。また, アルカリ処理に

より未知の物質に変化する。

3. 低濃度領域における亜硫酸イオンラジカルの反応

亜硫酸は, 酸素存在下酸化されて最終的に硫酸になる。この反応は先に述べた亜硫酸イオンの反応と完全に区別され, 自動酸化に伴って生じるフリーラジカルが種々の反応をすることが明らかになっている。この酸化は微量に存在する遷移金属 Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} 等が効率よく触媒する。反応の initiation の機構は³²⁾,

と示されている。こうして始まった亜硫酸の自動酸化は下のような chain reaction を進むと考えられている。

亜硫酸イオンラジカル $\cdot SO_3^-$ は, 水溶液中 $Ce(NO_3)_4 \cdot 2NH_4NO_3$ と $NaHSO_3$ との反応で

という式により生じ, ESR のシグナルとして存在が証明されている³³⁾。また, UV によっても検出されている³⁴⁾。このラジカルは一般に反応性に富み, 古くから, ethylene, styrene, allyl alcohol 等の不飽和結合に付加することが報告されている³⁵⁾。

さらに, ハイドロキノン等のラジカル捕捉剤はこれらの反応を効率良く阻害するとされている。

このようなラジカル生成に至適な条件の水溶液中で, 核酸構成成分を亜硫酸で処理すると, いくつかの反応が起こることが明らかになった。しかし, 亜硫酸イオンラジカルによる核酸の修飾反応は, 先の付加体形成を中心とする親核試薬としての亜硫酸の反応に比べ, 未知の分野を多く残している。各反応は現象の報告にとどまり, 反応機構を論じられる例は少ない。

なお, 核酸と並んで重要な生体構成成分であるアミノ酸と亜硫酸の酸化に伴うフリーラジカルとの反応が研究されており, メチオニンがメチオニンスルホキシドに^{32,36)} ($\cdot O_2^-$ が関与している), トリプトファンがインドール環の崩壊をきたすことが明らかになっている³⁷⁾。

3.1. 4-チオウリジンとの反応

4-チオウリジンは転移 RNA に微量塩基成分として含まれている化合物であるが³⁸⁾, 10 mM 程度の希薄な亜硫酸と反応し, ウリジン 4-スルホン酸 (11) を生じる^{39,40)}。この反応は室温, 中性付近の pH で進行し, 酸素の供給を必要とする。また, フリーラジカル捕捉剤であるハイドロキノン⁴¹⁾の添加で阻害されることより, 亜硫酸の自動酸化に伴うラジカル反応であるとされた。

この反応はここに示したように進行する。まず第一のステップは, 4位のS原子への亜硫酸イオンラジカルの攻撃によるチオサルフェイト体の生成で, 第二ステップは亜硫酸イオンのチオサルフェイト基への親核的反応による最終生成体への経路である。中間体であるウリジン 4-チオサルフェイト (10) はモデル化合物として, 1-メチル 4-チオウリジンを用い ³⁵S ラベルの亜硫酸で処理することにより同定された。また, 最終生成体であるウリジン 4-スルホン酸 (11) は反応性に富み, 4位置換体ピリミジンの合成に有用な中間体となる。まず, 酸やアルカリによりウリジンへ戻り, 弱アルカリ性 (pH 8.55) でアンモニアで処理するとシチジンが生成する。さらに, 種々のアルキルアミノグループが4位に置換したピリミジン誘導体に導くことができる⁴¹⁾。

この反応で亜硫酸濃度を 10 mM から 1 M に上げると反応はいきにくくなる。10⁻⁴ M の 4-チオウリジンを処理する時, 10 mM 亜硫酸ナトリウムで 30 分で 85% 反応が進むのに対し, 1 M の場合は 60 分で 10% しか進まない。現在のところ, これは生じたラジカルが過剰に存在する試薬によって不活性化されてしまうためと考えられている。事実, 1 M 亜硫酸で処理する場合に, 4-チオウリジンの濃度を 10⁻⁴ M から 10⁻¹ M へと 1,000 倍に増し, 試薬と原料のモル比を変えてやると, 10 分で 45% まで反応が進行するようになる。この試薬濃度が希薄なほど反応が進行しやすいという現象は亜硫酸イオンラジカルの核酸への attack の際にたびたび見られる。

2-チオウラシルも, 4-チオウリジンに比べて遅い反応ではあるが亜硫酸イオンラジカルと反応し⁴²⁾, ウラシル 2-スルホン酸を形成する。この場合には中間体チオサルフェイト体は検出できない。2-チオウリジンからは同様の処理でウリジンが生成する。これは, ウリジン 2-スルホン酸が速やかに水解されたためと思われる。

なお, 2-チオウラシル^{15,22)} と 4-チオウリジン⁴⁰⁾ の場合には, 先に示した 5,6 二重結合に亜硫酸が付加したディヒドロ体の形成も報告されている。

3.2. イソペンテニルアデノシンとの反応^{43,44,55)}

転移 RNA の微量塩基成分である N⁶(4²-Isopentenyl)-adenosine を亜硫酸で処理すると少くも 4 つの product が生じる。そのうち主な生成物 (50% 以上) は側鎖不飽和

と結合にアンチ-マルコフニコフ付加した化合物 (12) である。他の 3 つについては構造を同定していないが, UV 吸収曲線が原料のそれと大きく違わないため修飾は側鎖部分におこっていると考えられる。

この反応は, ハイドロキノンで完全に阻害されるためラジカル反応によると考えられるが, 他の反応の場合とは異なり, 亜硫酸濃度を高くすると反応は速くなる。これは側鎖のオレフィンの反応性が高く過剰に存在する試薬との競争が無いためと考えられている。

亜硫酸塩による核酸の修飾の中で唯一のプリン塩基の反応例である。

3.3. ウリジン, シチジンの反応⁴⁵⁾

ラジカル生成に最適な条件で亜硫酸塩と主要 RNA モノマーとの反応について調べてみると, ウリジン, シチジンが反応した。反応生成物はそれぞれの base であるウラシル, シトシンであることが同定された。この N-グリコシド結合の崩壊反応 (base liberation) はヌクレオチド (5'-モノリン酸) では反応の進行が遅い。また, プリンヌクレオチドでは起こらず 2'-デオキシシチジンでもおこらないことから, リボピリミジンヌクレオチド誘導体に特有な反応と考えられる。

予想通り, ハイドロキノン添加, N₂ 気流中, Mn²⁺ を系から除く等のラジカル生成に不適と思われる条件は, この反応を著しく阻害する。また, ウリジンの濃度を 1 mM より 20 mM まで濃度を上げていき, 20 mM 亜硫酸で処理すると反応は著しく阻害されるという興味深い現象を呈する。これは, ラジカルが過剰に存在するウリジンにより不活化されるためと思われる。(その際にウリジン自体は変化しない。)

亜硫酸によるこの base liberation の反応機構は現在までのところ明らかにされていない。従来, 過酸化水素およびヒドロキシルアミン-酸素系で同様の反応が報告

されているが、これらの場合、プリンヌクレオシドも反応し^{46,47)}、亜硫酸の場合と明らかに異なることを示唆している。

3.4. チミジンの反応⁴⁸⁾ 5'-dAMP, 5'-dGMP, 5'-dCMP, 5'-TMP について亜硫酸との反応を行ってみると 5'-TMP のみ UV 吸収の減少がおこることが明らかにになった。系から Mn^{2+} を除いたり、ハイドロキノン添加したりすると反応は著しく阻害され、ラジカル反応であることが証明された。

反応系に 1 時間ごとに新鮮な亜硫酸液を添加し、亜硫酸濃度を一定に保つように工夫すると 6 時間の反応で、5'-TMP で 89%, 3'-TMP で 34%, チミジンで 46%, チミンで 0% の UV 267 nm の減少がそれぞれ観察された。また、 ^{14}C ラベルの 5'-TMP を用い、反応液を isotope scanning することにより二つの生成物があることを明らかにしている。反応液はエンドアブソープションを示すが、これを pH 14 にすると 233 nm に極大吸収を持つようになり、この吸収は時間の経過とともに減少する。これらのことから、生成体は 5,6 二重結合が飽和したものであることが予想される。

4. 核酸ポリマーの反応および応用

核酸モノマーに比べ、ポリマーは一般に化学試薬に対する反応性が低い。さらに、ポリマーでも一本鎖と二本鎖では反応性が異なる。また、化学修飾の手法を生物活性を持つ核酸に応用する際には重要な知見であるので、本総説の主旨からははずれるが、亜硫酸と核酸ポリマーの反応およびそれに伴う生物活性への影響について簡単に述べる。

CpA, UpA をそれぞれ pH 6.1, pH 7 で亜硫酸処理すると速やかに定量的に反応は進行し、CpA からは $C(SO_3^-)pA$ を経て $U(SO_3^-)pA$ を、UpA からは $U(SO_3^-)pA$ を生成する。この時リン酸エステル結合の崩壊はおこらない⁴⁹⁾。

合成ポリマー poly(C) と poly(I)・poly(C) および poly(U)・poly(A) を用いることにより亜硫酸の反応は一本鎖に特異的な反応であることが明らかになった^{49,50)}。また、calf thymus DNA の native form と denatured form を用い同様のことが確められた⁵¹⁾。

一本鎖核酸は亜硫酸と確かに反応するがモノマーに比べ反応は遅い⁵⁰⁾。ウリジンと poly(U) の反応性を比べると、0.5M $NaHSO_3$, pH 6.99 で、ウリジンの方が 25°C で 9.3 倍、45°C で 7.8 倍、65°C で 6 倍反応が速い。

重水素交換反応の応用として、 T_2O 中、pH 9 で UpC を亜硫酸アンモニウム処理すると U のみラベルされ、

pH 7.5 で処理すると U と C がラベルされる⁵²⁾。(ここで、pH 7.5 では C 残基は脱アミノ化反応を伴わずラベルされる。) この反応でも二本鎖中の C は反応しない⁵¹⁾。

転移 RNA (tRNA) を亜硫酸イオンで処理すると、予想される通り、クローバーリーフモデルの stem 部分は反応せず、loop 部分と 3' 端の CCA 部分が反応する。得られた知見を以下に述べると (i) anticodon の C が U に変化するとアミノ酸受容能が低下する場合と^{52,53)}、低下しない場合とある⁵⁴⁾。(ii) anticodon loop の構造は tRNA の種によって異なることが示唆される。すなわち、yeast の tyrosine tRNA の anticodon の 5' 端の -CU- は亜硫酸と反応するが^{43,44)}、*E. coli* の formyl-methionine tRNA の anticodon の 5' 端の C は反応しない。(iii) 3' 端の CA_{OH} の C を U に変化させると、tRNA の種によってはアミノ酸受容能の低下をみる^{52,53,55)}。

亜硫酸の付加体形成は下に示すいくつかの酵素系に影響を与える。まず、poly($U(SO_3^-)$) は RNase で $U(SO_3^-)$ に水解できるが⁵⁶⁾、spleen PDase, polynucleotide phosphorylase には抵抗する⁵⁷⁾。また、変性 calf thymus DNA の C 残基の平均 50 個のうち 1 個を $U(SO_3^-)$ にまで変化させると *E. coli* の DNA polymerase I に対する鋳型活性は 1/2 に低下する⁵⁸⁾。これは poly($U(SO_3^-)$) は poly A と水素結合できないという知見⁵⁷⁾ によく一致する。さらに、poly(U) の 2.6% を $U(SO_3^-)$ にすると *in vitro* polyphenylalanine 合成活性は 54% まで低下する^{56,57)}。また、rat liver の DNA methylase は DNA 中の C 残基を $C(SO_3^-)$ にするとメチル化能を失うという報告⁵⁹⁾もある。

以上述べてきた高分子核酸と亜硫酸の反応は試薬濃度が濃い時の反応であったが、もう一方の亜硫酸の反応様式、フリーラジカルに至適な条件で高分子 RNA, DNA を処理した場合には以下の事実が明らかになっている。(i) 合成ポリマー poly(C) および poly(U) の鎖切断を起こす。この時、poly(A) および poly(U)・poly(A) は抵抗する⁴⁵⁾。(ii) 枯草菌の DNA の形質転換活性を低下させる。この反応は pH 7, $10^{-2} M$ 程度の亜硫酸の条件が最適で、1M 亜硫酸ではほとんど起こらない⁶⁰⁾。(iii) T7 phage の DNA を亜硫酸処理したあとアルカリ性ショ糖密度勾配遠心で調べると鎖切断が生じている⁶¹⁾。 λ phage の DNA を用い詳細に検討したところ⁶²⁾ DNA 鎖上の修飾の一部はアルカリ処理によってはじめて鎖切断に導かれることが明らかとなった。この反応は二本鎖 DNA で起こることが特徴である。

先のモノマーの反応性を考えると (i) の反応は C と U

の base liberation と密接な関係があることが予想されるが詳細には検討されていない。また, (ii), (iii) については DNA 上にもたらされた同種の修飾体が原因で起こる現象と思われるが, 先に述べたチミジンの反応物との関連が興味ある課題として残されている。

さらに, 亜硫酸と核酸の反応の研究の結果から亜硫酸の突然変異誘起能が報告されている。現在までのところ λ phage⁶³⁾, T4 phage⁶⁴⁾, *E. coli*⁶⁵⁾, Yeast⁶⁶⁾ で報告があり, このうち, T4, *E. coli* では CG→TA への突然変異のみ誘起することが明らかにされており核酸モノマーの反応と突然変異とが直接結びついたよい例である。

5. おわりに

亜硫酸による核酸の化学修飾は上に示した通り詳細に整理されている。そして, CからUへの変換反応および同位元素置換反応等は生物活性を有する高分子核酸の構造を知る目的に具体的に应用されている。また, シトシン残基におけるアミノ基交換反応, たとえばグリシルグリシンとシトシンとの結合反応は生体内での核酸とタンパク質の結合の一つの可能なモデルを呈示している。

一方, 含硫 nucleophile によるピリミジン6位への付加反応は他にもシステインメチルエステル⁶⁷⁾等で報告されており, 5位の水素の交換反応を導くことが明らかになっている。ここで, *in vitro* でチミジル酸合成酵素を働かせる際に T_2O 中で反応を行うと, 基質であるウリジル酸の5位にTが入ったものが得られる⁶⁸⁾という報告があり, ピリミジン環の生体内代謝の one step に化学反応でみられたと同様の交換が含まれる可能性を示唆している。化学試薬を用いた生体成分の反応性を研究し, その結果から生体内の反応機構が示唆されるということは有機化学が生物の理解に役立つ一例であるといえよう。

亜硫酸の反応は濃度によってイオン反応とラジカル反応に大別されるが, ヒドロキシルアミンを用いた核酸の化学修飾の際にも同様の傾向がある。高濃度では, pH6で主に CMP と, pH10ではUMPとそれぞれ反応し^{69,70)}, 低濃度では酸素共存下 base liberation の反応をする⁴⁹⁾。

低濃度亜硫酸によるラジカル反応は, 安定なラジカルによる核酸への攻撃という点からも興味ある問題ではあるが, 環境に大気汚染物質や食品添加物として存在する亜硫酸の生体への毒性を考える上にも重要な反応であると考ええる。

(昭和50年10月3日受理)

文 献

- 1) H. Hayatsu, in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology" Vol. 16, p. 75 (W.E. Cohn, ed.) Academic Press, New York, 1976
- 2) N.K. Kochetkov, E.I. Budowskii, "Organic Chemistry of Nucleic Acids" Plenum Press, London, 1972
- 3) B. Pullman, A. Pullman, in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology" Vol. 9, p. 327 (J.N. Davidson and W.E. Cohn, eds.) Academic Press, New York, 1969
- 4) R. Shapiro, R.E. Servis, M. Welcher, *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 422 (1970)
- 5) H. Hayatsu, Y. Wataya, K. Kai, *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 724 (1970)
- 6) H. Hayatsu, Y. Wataya, K. Kai, S. Iida, *Biochemistry* **9** 2858 (1970)
- 7) R. Shapiro, J.M. Weisgras, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40** 839 (1970)
- 8) I.V. Boni, E.I. Budowsky, *J. Biochem. (Tokyo)* **73** 821 (1973)
- 9) M.F. Turchinsky, K.S. Kusova, E.I. Budowsky, *FEBS Lett.* **38** 304 (1974)
- 10) R. Shapiro, D.C.F. Law, J.M. Weisgras, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49** 358 (1972)
- 11) M. Sono, Y. Wataya, H. Hayatsu, *J. Amer. Chem. Soc.* **95** 4745 (1973)
- 12) Y. Wataya, H. Hayatsu, *Biochemistry* **11** 3583 (1972)
- 13) K. Kai, Y. Wataya, H. Hayatsu, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 2089 (1971)
- 14) H. Seeboth, *Angew. Chem. Internat. Edit.* **6** 307 (1967)
- 15) W.A. Summers, C. Enwall, J.G. Burr, R.L. Letsinger, *Photochem. Photobiol.* **17** 295 (1973)
- 16) R.W. Erickson, E.G. Sander, *J. Amer. Chem. Soc.* **94** 2086 (1972)
- 17) G.S. Rork, I.H. Pitman, *J. Amer. Chem. Soc.* **96** 4654 (1974)
- 18) S.R. Heller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32** 998 (1968)
- 19) H. Hayatsu, M. Sono, *J. Chem. Soc. (D)* 1178 (1971)
- 20) R. Shapiro, V. DiFate, M. Welcher, *J. Amer. Chem. Soc.* **96** 906 (1974)
- 21) H. Hayatsu, *Biochemistry* in press (1976)
- 22) K. Isono, S. Suzuki, M. Tanaka, T. Nanbata, K. Shibuya, *Tetrahedron Lett.* **1970** 425
- 23) K. Kai, H. Hayatsu, unpublished results.
- 24) S.S. Cohen, J.G. Flaks, H.D. Barner, M.R. Loeb, J. Lichtenstein, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **44** 1004 (1958)
- 25) 化学物質の突然変異性検出法 田島弥太郎, 吉田俊秀, 賀田恒夫編 p. 176 (1973) 講談社

- 26) M.B. Lion, *Biochim. Biophys. Acta* **155** 505 (1968)
- 27) E.G. Sander, C.A. Deyrup, *Arch. Biochem. Biophys.* **150** 600 (1972)
- 28) F.A. Sedor, D.G. Jacobson, E.G. Sander, *Bioorg. Chem.* **3** 221 (1974)
- 29) M. Shiragami, I. Kudo, S. Iida, H. Hayatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **23** 3027 (1975)
- 30) R.P. Singhal, *Biochemistry* **13** 2924 (1974)
- 31) E.D. Sverdlov, G.S. Monastyrskaya, L.I. Guskova, T.L. Levitan, V.I. Sheichenko, E.I. Budowsky, *Biochim. Biophys. Acta* **340** 153 (1974)
- 32) S.F. Yang, *Biochemistry* **9** 5008 (1970)
- 33) T. Ozawa, M. Setaka, T. Kwan, *Bull. Chem. Soc. Japan* **44** 3473 (1971)
- 34) E. Hayan, A. Treinin, J. Wilf, *J. Amer. Chem. Soc.* **94** 47 (1972)
- 35) M.S. Kharasch, E.M. May, F.R. Mayo, *J. Org. Chem.* **3** 175 (1938)
- 36) M. Inoue, H. Hayatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **19** 1286 (1971)
- 37) S.F. Yang, *Environmental Research* **6** 395 (1973)
- 38) S. Nishimura, in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology" Vol. 12, p. 49 (1972)
- 39) H. Hayatsu, *J. Amer. Chem. Soc.* **91** 5693 (1969)
- 40) H. Hayatsu, M. Inoue, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 2301 (1971)
- 41) M. Yano, H. Hayatsu, *Biochim. Biophys. Acta* **199** 303 (1970)
- 42) M. Sono, H. Hayatsu, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **21** 995 (1973)
- 43) Y. Furuichi, Y. Wataya, H. Hayatsu, T. Ukita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41** 1185 (1970)
- 44) H. Hayatsu, Y. Wataya, Y. Furuichi, Y. Kawazoe, *Chemosphere* **1** 75 (1972)
- 45) N. Kitamura, H. Hayatsu, *Nucleic Acids Res.* **1** 75 (1974)
- 46) H. Rhaese, E. Freese, *Biochim. Biophys. Acta* **155** 476 (1968)
- 47) H. Rhaese, E. Freese, M.S. Melzer, *Biochim. Biophys. Acta* **155** 491 (1968)
- 48) N. Kitamura, H. Hayatsu, unpublished results.
- 49) J.P. Goddard, L.H. Schulman, *J. Biol. Chem.* **247** 3864 (1972)
- 50) R. Shapiro, B. Braverman, J.B. Louis, R.E. Servis, *J. Biol. Chem.* **248** 4060 (1973)
- 51) S. Iida, Y. Wataya, I. Kudo, K. Kai, H. Hayatsu, *FEBS Lett.* **39** 263 (1974)
- 52) L.H. Schulman, J.P. Goddard, *J. Biol. Chem.* **248** 1341 (1973)
- 53) R.W. Chambers, S. Aoyagi, Y. Furukawa, H. Zawadzka, O.S. Bhanot, *J. Biol. Chem.* **248** 5549 (1973)
- 54) H.G. Zachau, *Angew. Chem. Internat. Edit.* **8** 711 (1968)
- 55) Z. Kučan, K.A. Freude, I. Kučan, R.W. Chambers, *Nature New Biol.* **232** 177 (1971)
- 56) R. Shapiro, B. Braverman, W. Szer, *Molecular Biology Reports* **1** 123 (1973)
- 57) R. Shapiro, B. Braverman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47** 544 (1972)
- 58) K. Kai, T. Tsuruo, H. Hayatsu, *Nucleic Acids Res.* **1** 889 (1974)
- 59) D. Drahovsky, N.R. Morris, *Biochim. Biophys. Acta* **277** 245 (1972)
- 60) M. Inoue, H. Hayatsu, H. Tanooka, *Chem. Biol. Interactions* **5** 85 (1972)
- 61) H. Hayatsu, R.C. Miller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46** 120 (1972)
- 62) I. Kudo, H. Hayatsu, unpublished results.
- 63) H. Hayatsu, A. Miura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39** 156 (1970)
- 64) G.A. Summers, J.W. Drake, *Genetics* **68** 603 (1971)
- 65) F. Mukai, I. Hawryluk, R. Shapiro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39** 983 (1970)
- 66) J.L. Dorange, P. Dupuy, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D* **274** 2798 (1972)
- 67) Y. Wataya, S. Iida, I. Kudo, Z. Ohashi, S. Nishimura, K. Suga, H. Takagi, T. Yokoshima, H. Hayatsu, *Eur. J. Biochem.* in press (1976)
- 68) M.I.S. Lomax, G.R. Greenberg, *J. Biol. Chem.* **242** 1302 (1967)
- 69) D.W. Verwoerd, H. Kohlhaage, W. Zillig, *Nature* **192** 1038 (1961)
- 70) D.W. Verwoerd, W. Zillig, H. Kohlhaage, Z. *Physiol. Chem.* **332** 184 (1963)