リン酸チオールエステルの化学と核酸の 化学合成への応用

関根 光雄*・畑 辻 明*

Phosphorothioate Chemistry and Its Application to Chemical Synthesis of Nucleic Acids.

Mitsuo SEKINE* and Tsujiaki HATA*

Synthesis of phosphorothioates and their properties are reviewed from the standpoint of organo-phosphorus chemistry. Inherent synthetic problems in the P-S bond formation are described. Several methods for the synthesis of nucleoside phosphorothioates are introduced and their application to oligonucleotide synthesis is also described from various aspects. Especially, the versatile utility of the bis(phenylthio)phosphoryl group, which can be readily introduced to nucleoside hydroxyls, is shown with several successful examples of the synthesis of DNA and RNA fragments.

1. はじめに

生体内には核酸をはじめリン脂質やリン酸化された糖類など数多くの有機リン化合物が知られている。しかし、これらの天然有機リン化合物は P-C 結合や P-N 結合をもつものを除くと例外なくすべてリン酸エステル誘導体である。カルボン酸誘導体のなかで S-アセチルコエンザイム A のようなカルボン酸のチオールエステル骨格をもつ生理活性物質はいくつか知られているが、リン酸のチオールエステル構造をもつ天然有機化合物は未だに発見されていない。そのためか、リン酸チオールエステルの合成反応と性質については 1960 年代まで Herr¹⁾ や Åkerfeldt²⁾ らの極く限られた範囲の S-アルキルホスホロチオエートに関する研究が知られている程度であった。1965 年 Nussbaum ら^{3a)} はエチルチオ基を 5'-末端のリン酸の保護基として用い、はじめて核酸の化学合成にリン酸チオールエステルの化学を導入した。しかし、当時は Khorana が開発した“リン酸ジエステル法”⁴⁾ と呼ばれる縮合方式を採用していたため、ヌクレオシドのリン酸チオールエステル誘導体の取り扱いにくさもあり、

その後あまり発展をみなかった。

本稿では、リン酸チオールエステルの合成上の問題点やその化学的性質などについて概説しながら、ここ数年求われわれが開発してきた新しい核酸の化学合成法を中心に述べ、リン酸チオールエステルに関連した合成反応などについても併せて紹介したい。

2. リン酸チオールエステルの合成

2.1. リン酸モノエステルへの RS 基の導入反応

一般に、リン酸基のリン原子にアルキルチオ（またはアリールチオ）基 (RS 基) を導入するためには対応するリン酸モノエステル (1) の酸塩化物 (2) とチオールを適当な塩基存在下反応させるか (式 1)、リン酸の水酸基とチオール間で脱水縮合させるか (式 2) の 2 つの方法が考えられる⁵⁾。しかし、前者の方法では酸塩化物 2 が合成可能な単純なリン酸モノエステル誘導体にしか適用できない。このため、核酸等の官能基を多く含む天然有機化合物中のリン酸基に RS 基を導入する場合、後者の方法がごく自然に考えやすい。

しかし、実際にリン酸モノエステル型のヌクレオチド誘導体とエタンチオールをアレンスルホニルクロリドや DCC 等の代表的な縮合剤を用い、脱水縮合させようとしても全く反応が進行しないことが Nussbaum ら^{3e)} により報告されている。一方、われわれもリン酸モノエステルとベンゼンチオールを種々の脱水縮合剤で縮合させ

* 東京工業大学大学院総合理工学研究科 ()

* The Graduate school at Nagatsuta, Tokyo Institute of Technology ()

てもやはり反応が起こらないことを観察しており⁶⁾, このような現象はチオール類に一般的なものであると言える。

1のようなリン酸モノエステルは通常縮合剤によりメタリン酸エステル(4)になることが知られている⁷⁾ので, 最終的にはチオールが4と反応しないものと結論される。アルコール性水酸基に対する1の縮合剤によるホスホリル化反応が容易に進行することと比較するとこのようなチオールに対する4の反応性の乏しさは極めて特異な事実である。このことはPearsonのsoft-hard acid-base principle⁸⁾における分類からもわかるように5価のホスホリル基とアルキルチオ基がそれぞれ典型的なhard acidとsoft baseである本質的な相性の悪さに由来しているようである。

従って, Nussbaumらが研究を開始した当初は5のようなジエステル型のリン酸チオールエステルを合成するためやむなくチオリン酸に臭化エチルを作用させるS-アルキル化反応を利用してあらかじめリン酸基にEtS基を導入した不安定なS-エチルホスホロチオエート(6)を合成し, これとヌクレオシド誘導体(7)と縮合させておこなわなければならなかった^{3a, b)}。

このように一般の縮合剤ではリン酸基に直接RS基を導入することは困難とされていた。しかし, 橋本, 向山ら⁹⁾によりいわゆる酸化還元系の縮合剤¹⁰⁾であるPh₃P-PySSPyを1と反応させるとピリジルチオ基が導入されたジエステル型のチオールエステル(8)を合成できることが報告された。

この縮合系はオリゴヌクレオチド合成にも応用されているが, 無水条件下では2個のピリジルチオ基がリン酸基に導入された(9)が反応中間体と考えられている。この反応機構はモデル化合物としてP-C結合をもつメチルホスホン酸とPh₃P-PySSPyの反応系の³¹P NMR解析から推測されている¹¹⁾。これに対し, Knorreらはオリゴヌクレオチド合成における実際のPh₃P-PySSPyによる縮合系の³¹P NMRによる直接解析の結果詳細は不明であるが, 4のようなメタリン酸エステルを経由していることを報告している^{7c)}。このことについてはより詳細な研究が待れるものである。

一方, この酸化還元系の反応に関連しヌクレオチド(10)にPh₃P-PhSSPhを反応させるとチオールエステル(11)は全く得られず, 対称ピロホスフェート(12)が主生成物となってしまうが, Bu₃P-PhSSPhの複合試薬¹²⁾を用いると11が高収率で合成できる¹³⁾。この反応の選択性はきわめて高く, 2個のPhS基が導入されたトリエステル型のチオールエステルは全く生成しない。この反応は上述した理由からメタリン酸エステルではな

く、環状オキシホスホラン型の間mediate (13) を経由する機構で進行するものと考えられている⁶⁾。即ち、環状オキシホスホランの生成に伴うひずみを和らげるため、ヌクレオチド上のホスホリル基が $O=P$ 二重結合よりもむしろ O^--P^+ 双極子結合になりやすくなり、過剰存在する $Bu_3P-PhSSPh$ から生成する PhS^- がリン原子に付加しそのあと $Bu_3P=O$ が脱離する機構である。この

$Bu_3P-PhSSPh$ を用いる反応によりリン酸基に導入された PhS 基はオリゴヌクレオチド合成上の諸条件で安定であることがわかり、これを契機にわれわれの研究がスタートしたものである。

最近、高久ら¹⁴⁾ は縮合剤によって活性化されたヌクレオチドのリン酸ジエステル型の化合物 (14) のリン酸基に $Ph_3P-(Me_2NCS)_2$ の複合試薬を作用させると Me_2NCS 基がリン酸基に導入できることを示した。

上述したいくつかの例からわかるように、一般的には PhS 基を含めてリン酸モノエステルおよびジエステルに安定な RS 基を導入することは非常に難しい部類に入る反応であり、反応機構の面からも今後の研究で明らかにされるべき未開拓の分野と言える。

2.2. 3価のホスファイト中間体を経て RS 基を導入する方法 Pearson⁸⁾ の soft-hard acid-base principle の分類によれば5価のホスホリル基は極端な hard acid であったが、3価のホスファイトは代表的な soft base の一つである。また、 RS 基は典型的な soft acid

である。従って、この分類から予想されるように RS 基はホスファイトとジスルフィドやスルフェニルクロリドのいわゆる Arbusov 反応型の反応によりリン原子上に容易に導入することができる。

しかし、核酸などにこの反応を適用するには対応する核酸のホスファイトが合成しにくい実用的ではない。そこで、ヌクレオシド (15) の糖水酸基をいったん亜リン酸化したのち適当なシリル化剤によりホスホネート→ホスファイト変換¹⁵⁾、シリルホスファイト中間体 (16) を経てジスルフィド等と反応させることによりジエステル型のチオールエステル (17) を得る合成ルートが開発されている¹⁷⁾。

ジスルフィドとして $EtSSPh$ を用いればリン原子上に EtS 基を選択的に導入できる⁶⁾。ジスルフィドのかわりに硫黄やセレンと反応させるとヌクレオシドのチオリン酸¹⁸⁾やセレノリン酸エステル¹⁹⁾が得られる。これらを単離することなくつづけて $EtBr$ と反応させれば EtS 基や $EtSe$ 基もリン酸基に導入できる^{18,19)}。

また、 $PhSe$ 基も PhS 基の場合と同様 $Bu_3P-(PhSe)_2$ の複合試薬によりモノエステル型のヌクレオチドのリン

酸基に直接導入できる¹⁹⁾。しかし、PhSe基はピリジン中でもかなり不安定であるため保護基としては使用できない。EtSe基も保存中ゆっくりと分解するため保護基としては適当と思われないがリン酸、トリリン酸などのようなポリリン酸エステル合成用に一時的な活性基としては十分活用できるものと思われる。

ヌクレオシドホスホネート (18, 19; R=ヌクレオシド残基) の亜リン酸基は酸および酸化剤²⁰⁾や縮合剤²¹⁾等に不安定であることから亜リン酸基のH-P基をエトキシカルボニル基で保護されたエトキシカルボニルホスホネート (20)²²⁾を用い、ヌクレオシドをホスホニル化して得られた生成物 (21) をアルカリ処理したのちシリル化剤を反応させ、脱炭酸を伴いシリルホスファイト (22) を生成させる工夫もなされている^{23, 24)}。

この反応をさらに発展させ、2,2,2-トリクロロエチルカルボニルホスホネート (23) を Me_3SiCl と Zn 処理に

よりシリルホスファイトを一たん生成させ、これと種々の求電子試薬と反応させホスホン酸誘導体²⁵⁾やヌクレオシドチオリン酸エステル²⁶⁾を得る反応に展開されている。

インターヌクレオチド結合のリン酸基がチオリン酸に置き換えられたオリゴヌクレオチドは酵素反応の立体化学を研究する上で有用な基質となることが Eckstein ら²⁷⁾により明らかにされている。このようなチオリン酸誘導体としてジチミジンホスホロチオエート (24) の合成が上述した (式 12) を用いる方法²⁸⁾とベンゾイルホスホネート (25) のアミンによる P-C 結合の開裂^{28, 29)}によって生成した H-P 基を硫化させる方法が報告されている³⁰⁾。

3. オリゴヌクレオチドの合成

DNA や RNA のオリゴヌクレオチドを化学合成する方法は現在までいろいろな工夫がなされ種々の方法が開発されている³¹⁻³⁷⁾。そのなかでもっとも代表的な合成法の一つとして Letsinger ら³⁸⁾の開発した“リン酸トリエステル法”が挙げられる。この方法はリン酸ジエステルとヒドロキシル体を脱水縮合させてリン酸の解離をもたない中性のリン酸トリエステル型生成物を与える縮合形式を経由する合成法である。オリゴヌクレオチドを化学合成する場合、原料としてヌクレオシドを用いるか、すでにリン酸基が 3' あるいは 5' 位に導入されたヌクレオチドから出発するか 2 通りの方法がある。以前、リン酸ジエステル法⁴⁾が全盛の頃は後者の方法が多く採用されたが、今日のリン酸トリエステル法の場合、原料の価格および取り扱い易さの点から前者のヌクレオシドからオリゴヌクレオチド合成に必要なモノマーユニットを構築する方法が一般的にとられている。PhS 基を用いるオリゴヌクレオチド合成においても上述したようにリン酸基に PhS 基を直接導入する方法に限られていることを考え併せると、あらかじめ PhS 基がリン酸基に導入されているようなホスホリル化試薬を用い、ヌクレオシドから

ホスホリル化反応によりモノマーユニットを合成する方がやはり得策となる。

3.1. ホスホリル化試薬 PSS の合成 ホスホリル化試薬は反応後、中性のトリエステルを与えるようなものが取り扱い上好ましい。そこで、2 個の PhS 基が導入されたシクロヘキシルアンモニウム S,S-ジフェニルホスホロジチオエート (PSS) が合成された^{39,40)}。本試薬ははじめ (式 9) の反応を参考に次亜リン酸を PhSSPh の存在下シリル化することにより合成された。その後、メチルホスホクロリデートを出発物質とする簡便大量合成法が開発されている⁴¹⁾。本試薬は $P(O)Cl_3$ と PhSH からでも得られるように思えるが、反応の選択性も悪くまた複雑な酸化還元副反応を伴うためかえて実用性に欠ける⁴²⁾。PSS は現在市販 (東京化成) されている。対応する PSS の酸塩化物 $(PhS)_2P(O)Cl$ も蒸留中分解するため精製することが困難である。PSS は白色針状結晶であり長期保存が可能である安定な化合物である。ヌクレオシド糖水酸基へのビス (フェニルチオ) ホスホリル (BPTP) 基の導入は PSS と適当な $ArSO_2Cl$ 型の縮合剤の組み合わせを用いておこなうことができる⁴⁰⁾。

その他、ヌクレオシドを亜リン酸化のあと PhSSPh の存在下トシリミダゾールと反応させることによって BPTP 基を導入できるが収率が 50 % 程度であり実用的

でない²¹⁾。

3.2. 5'-末端リン酸の保護基としての PhS 基 チミジン (26) にピリジン中 PSS と塩化 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニル (TPS) を縮合剤として用いると 5' の第一アルコール性水酸基に 65 % の収率で選択的に BPTP 基を導入できる。このようにして得られたホスホリル化生成物 (27) は Neilson 法⁴³⁾ によりトリクロロエチルホスフェートと TPS による 3'-ホスホリル化、チミジンとの選択的縮合反応を 2 回繰り返すことにより 5'-位にリン酸基をもつチミジル酸 3 量体の合成に応用された⁴⁰⁾。

本反応は pGpUpU の RNA トリヌクレオチドの合成にも応用されている⁴⁴⁾。この場合には、後述するように縮合反応の際副生するトリアゾールによる BPTP 基からの PhS 基の脱離を防ぐためビス (4-メトキシフェニル) ホスホリル基が 5'-末端水酸基に導入されている。

3.3. インターヌクレオチド結合のリン酸基の保護基としての PhS 基 リン酸トリエステル法ではインターヌクレオチド結合生成反応において一般にその反応速度はリン酸に導入された保護基に大きく依存し、通常用いることのできる保護基の範囲ではその対応するアルコール (ROH) の pK_a が小さい程速くなる⁴⁵⁾。現在、*o*-クロフェニルオキシ基⁴⁶⁾ が脱保護の容易さと反応速度、安定性を考慮しもっとも汎用されている。*o*-クロ

ロフェノールとベンゼンチオールの pK_a はそれぞれ 8.5⁴⁷⁾ および 8.3⁴⁸⁾ であり若干後者のほうが小さく、また PhS 基は後述するように種々の条件下で容易に脱保護できるため、インターヌクレオチドのリン酸の保護基として適した性質を兼ねそなえている。

インターヌクレオチド結合のリン酸の保護基として PhS 基を用いるため 5'-モノメトキシトリチルチミジン (28) の 3'-水酸基を亜リン酸化したのちシリルホスファイト経由で PhS 基を 3'-リン酸に導入し、更に得られたチオールエステル (29) をチミジンと縮合させチミジル酸 2 量体を合成している⁴⁹⁾。2 量体から 3 量体も同じ方法により合成されている。その際、2 量体および 3 量体レベルでリン酸トリエステルのリン原子の不斉に基づく

くジアステレオマーが単一物質として分離されている。

3.4. 亜リン酸および次亜リン酸による PhS 基の特異的選択的除去法 PhS 基は 5' 末端およびインターヌクレオチド結合のリン酸の保護基として使用できることが明らかにされたため、われわれは 5'-末端にリン酸基をもつオリゴヌクレオチドを合成する目的ですべて PhS 基で保護することにし、27 に式 20 と同様に亜リン酸化を経て 3'-チオールエステル (30) に誘導することを試みた。しかし、亜リン酸化反応で得られた最終生成物は目的物 (31) ではなく 5'-位の BPTP 基から 1 個の PhS 基が脱離してしまった化合物 (32) であることがわかった⁴⁰⁾。

そこで、この原因を詳しく調べたところ 27 と亜リン酸を単独でピリジン中混合した時点ですでに PhS 基が脱離することがわかった。この脱離反応はピリジンで亜リン酸が完全に中和されているにもかかわらずおこるため興味を覚え、さらに次亜リン酸を用いて反応を試みたところ PhS 基の除去は亜リン酸よりも反応速度が著しく向上することを見いだした⁵⁰⁾。

この反応機構は反応後、次亜リン酸が定量的に回収されることおよび H-P 結合をもつものしか反応がおこらないことから、つぎのような遷移状態を経るものと考えられている⁵¹⁾。即ち、次亜リン酸の解離している酸素原子は普通は殆んど求核性がないが分子内に H-P 結合を

もっているため遷移状態においては BPTP 基の $O=P$ 結合の酸素原子上に $H-P$ の水素原子がプロトンとして転位し易くなりその結果、BPTP 基のリン原子を攻撃しやすくなっているものと思われる。

この脱離反応は実質的に中性条件で進行し、5'-DMTr 基、 N -アシル基、3'- O -アセチル基等は全く安定でありきわめて高度な官能基選択性がある。

このように、リン酸ジチオールエステルの加水分解に $H-P$ 結合をもつリン化合物が強力な試薬となることがわかったため、従来カルボン酸エステル類の加水分解に触媒活性が見いだされているイミダゾール⁵³⁾に対する BPTP 基の安定性についても検討された。その結果、イミダゾールによっても BPTP 基から $PhSH$ が徐々に遊離してくることがわかったが、次亜リン酸の反応性に比べるとはるかに遅い反応である。また、アゾール類の反応性を調べるとイミダゾール>トリアゾール>テトラゾールの順で窒素が多く含まれるにしたがって反応性が低下している⁴⁰⁾。オリゴヌクレオチド合成においてフラグメントどうしの縮合反応にはアレニスルホニルアゾール類や $ArSO_2Cl$ + アゾールの複合試薬が縮合剤として効果的であり、これらの縮合剤を用いるときは縮合反応中存在するアゾールによる BPTP 基からの PhS 基の脱離を考慮する必要がある。

BPTP 基の場合、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール以上の酸性の高いアゾール類を用いたときは縮合時間内では殆んど PhS 基の脱離はみられないが、トリアゾールが縮合反応の進行とともに副生する反応系（例えば式 19）では PhS 基のかわりに 4-メトキシフェニルチオ

基が採用されている。

ここで述べた亜リン酸や次亜リン酸が示す強力な PhS 基の脱離作用は今後の研究課題となろう。なお、亜リン酸に関連して一言付け加えれば、これに関し、ごく最近、瀬戸らは *Streptomyces hygroscopicus* SF-1293 の菌体の代謝産物中に $H-P$ 結合をもつ種々のアミノ酸誘導体⁵³⁾やヒドロキシホスフィン酸⁵⁴⁾が存在することを報

告している。この $H-P$ 基をもつ誘導体は Bialaphos

等の一連の $P-C$ 結合をもつアミノ酸誘導体の生成過程の中間体として存在が確認されているが、その生理作用や化学的性質にも興味がいられる。

Fig. 1

The $H-P$ group-containing organophosphorus compounds recently discovered in biological sources.

3.5. 新しいモノマーユニットを用いるオリゴヌクレオチドの合成 リン酸トリエステル法により 3'-および 5'-方向に任意にオリゴヌクレオチド鎖を伸長させる場合、従来、3'-リン酸基は異なる条件で除去できる 2 種類の保護基で保護されたモノマーユニット（例えば 35）を合成し、必要に応じて 5'-および 3'-リン酸基の 1 つ

の保護基をそれぞれ選択的に除去したのち縮合させる Catlin と Cramer⁶⁰⁾ によって考案された“ユニット合成法”がよく用いられている⁶⁰⁾。

さて、前述のように意外なところから BPTP 基から 1 個の PhS 基が緩やかな条件で除去できることがわかったため 3'-位に BPTP 基を導入したヌクレオチド誘導体 (36) を新しいタイプのオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成ユニットとして用いる合成ルートが開発された^{50, 57)}。

モノマーユニット 36 を次亜リン酸 (PSA) 処理すると *N*-アシルの保護基や 5'-DMTr 基を全くそなわずにジエステル (37) を定量的に与える。一方、36 をトリフルオロ酢酸処理すると 5'-ヒドロキシル体 (38) を与える。この際、BPTP 基は安定である。37 と 38 を縮合剤を用いて縮合すると 2 量体 (39) が得られる。この 2 量体をさらに PSA 処理するとインターヌクレオチド結合の PhS 基は安定で 3'-末端の PhS 基を 1 個だけ選択的に除去することができる。従って、酸あるいは PSA 処理を行ったあと適当に縮合を繰り返すことにより長鎖なオリゴマーブロックが合成できることになる。この PSA による PhS 基の除去法 (以下 PSA 法と呼ぶ) を応用しプロモモザイクウイルス mRNA フィラメント No. 4 の 5'-末端の RNA に相補的な DNA 12 量体が合成された⁵⁷⁾。

Fig. 2 Synthesis of a dodecadeoxyribonucleotide complementary to the 5'-terminal oligonucleotide of bromo mosaic virus mRNA filament No. 4.

3.6. 2 官能性縮合剤 液相法でオリゴヌクレオチドを合成する際 ArSO_2X (X は Cl あるいはアゾール) 系の縮合剤を用いると縮合反応と同時にヒドロキシル体への 5'-*O*-スルホン化が多かれ少なかれ進行し、目的とする縮合生成物と分離が困難となることが報告されている⁵⁸⁾。従って、この副反応をさけるためジエステル体を過剰用いたり、できるだけ小過剰の縮合剤を用いるなど工夫されている。われわれはこの問題を基本的に解

Fig. 3 Comparison of condensing agents.

決する目的で 2 官能性縮合剤を開発してきた。即ち、縮合剤のベンゼン環に 2 個のクロルスルホニル基を導入し、たとえスルホン化がおこっても反応後処理における加水分解により残存するクロルスルホニル基がスルホン酸基に変換されるため極性化合物となり、目的物との分離がきわめて容易となるように工夫している^{50, 57)}。特に、メシチレンスルホニルクロリド (MDS) やイソデュレンスルホニルクロリド (DDS) が反応性および選択性の点ですぐれている。1 官能性縮合剤であるメシチレンスルホニルクロリド (MS)⁵⁹⁾ と較べると MDS は MS より合成し易く、またより安定であり長期保存できる針状結晶の試薬である。

これらの 2 官能性縮合剤を用いる場合 3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール⁶⁰⁾ との複合試薬⁶¹⁾ による組み合わせが反応速度や取り扱い易さから使用されている。2 官能性縮合剤のなかで 4,6-ジメトキシベンゼン-1,3-ジスルホニルクロリド (DMS) とテトラゾールから誘導できる対応する DMS のビススルホニルテトラゾリドは爆発性があることがわかり⁵⁰⁾、危険をさけるため MDS, DDS の場合は 3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール等との複合試薬を用いているが、実際に対応するアゾリドは爆発性があるかどうかまだ確められていない。アゾリドを合成する手間や複合系でも縮合能力に問題なく、またかえってこの方法が 5'-*O*-スルホン化も少なくなる傾向がある⁶¹⁾ ことおよび試薬の安定性等考慮すると、むしろ現在では複合系試薬の方が能率的であると思われる。

3.6. オリゴヌクレオチド合成の問題点と解決法

最近、リン酸トリエステル法によるオリゴヌクレオチド合成において縮合剤による塩基部位⁶²⁻⁶⁶⁾ の修飾や DMTr 基の選択的脱保護における酸によるグリコシド結合の開裂⁶⁷⁾ 等の副反応が数多く報告されている。そこで、われわれはこれらの副反応を防ぐため塩基部位のアミノ基やイミド基に新しい保護基を開発してきた (図 4)⁶⁸⁻⁷⁰⁾。

上述した PSA 法はこれらの新しい保護基を全くそなわないことがわかり、副反応を伴わず、従来問題が指摘されていた $\text{d}(\text{G})_8^{68)}$ や $\text{d}(\text{Ap})_3\text{A}^{73)}$, $\text{UpU}^{70)}$ 等が高収率で合成された。DNA 合成の保護基における基本的問題点の解決とともに RNA 合成にも PSA 法が応用さ

Fig. 4 New protecting groups for base residues.

Fig. 5 Synthesis of the 5'-terminal oligonucleotide (GUAUUAUA) of bromo mosaic virus mRNA filament No.4 and an oligonucleotide (GUAUCAUAAUG) in which U at the fifth position from the 5'-terminus was replaced by C. a: B=Ad^{MMTr}, Gu^{MMTr}, Ur; b: B=Ad^{MMTr}, Gu^{DPC-Pro}, Ur^{Am}.

れた⁷⁷⁻⁷⁹⁾。RNA の合成には 2'-糖水酸基の保護基がさらに必要となるが、酸処理により 5'-DMTr 基を選択的に除去できるように比較的安定なテトラヒドロピラニル (THP) 基を採用した。RNA 合成の場合モノマーユニット (40) に導入されている 3'-BPTP 基は DNA モノマーユニット 36 と較べ THP 基による立体障害のため PSA により PhS 基が若干除去しにくくなっている。このため高濃度の PSA を用いる必要がある。しかし、この条件を用いると 5'-DMTr 基が数%脱離してしまうた

めトリエチルアミンを添加し、PSA の一部をトリエチルアンモニウム塩にして DMTr 基の脱離を防いでいる⁷⁹⁾。この例のように、PSA 処理による PhS 基の選択的除去反応は次亜リン酸の対イオンの種類にあまり影響をうけない⁵⁷⁾。この除去条件を用い、ブロモザイクウイルス mRNA の 5'-末端の 9 量体 GUAUUAUA が合成された⁷⁹⁾。

BPTP 基に対し PSA 処理を行うと 1 当量の PhSH が生成するが、トリエステル型のチオールエステルは前述

したように対応するジエステルと PhSH から縮合反応によつては全く合成できない。従つて、この副生成物をつぎの縮合段階で分離することなくインターヌクレオチド結合生成反応を行うことができる。実際に、PhSH 存在下縮合反応をおこなえることは最近 5'-糖水酸基や 2'-糖水酸基に中山試薬⁸⁰⁾ (ベンゾジチオリウムテトラフルオロボレート) を用いて 1,3-ベンゾジチオール-2-イル (BDT) 基を導入したチミジル酸ユニット (41) やウリル酸誘導体 (42 および 43) から適時脱保護、縮合をくり返すことにより (Tp)⁸¹⁾ および UpU⁸²⁾ が合成できることにより示された。

通常の有機化学反応でチオールは非常に求核性が高いというイメージが強いが特異的にリン酸チオールエステルが生成しにくい性質をこの例のように逆用できることは興味深いと思われる。

18SrRNA の 3' 末端部位とより強い塩基対を形成できると思われるプロモモザイクウイルス mRNA の 5'-末端から 5 番目の U を C にかえた RNA 12 量体 GUAUCAUAUAUG も最近化学合成された^{83,84)}。この際、インターヌクレオチド結合のフェニルチオ基が PSA 処理により若干脱離してしまうことがわかり 5'-方向へ 2 量体か 3 量体のブロックを縮合させることにより

その PSA 処理による副反応を最小限におさえることができた。また、塩基部位を先に述べた保護基 (図 4) を用い完全に保護することによりこの 12 量体をきわめて高収率で合成することに成功している。

3.7. PhS 基の除去法 トリエステル型のチオールエステルの PhS 基は導入反応の時の難しさと逆に緩やかな条件下容易に除去することができる。0.1 M 水酸化ナトリウムを用いると BTPT 基から 1 個の PhS 基が選択的に除去される。これに対し、ジエステル型のチオールエステルの PhS 基の除去は高濃度のアルカリ (2 M NaOH) で 100 °C 数時間加熱を要する。しかし、酸性条件下ではジエステル型およびトリエステル型の PhS 基はともにかなり安定である。ジエステル型の PhS 基は Nussbaum らの報告した EtS 基と同様にピリジン水中ヨウ素により容易に除去できる⁴⁰⁾。しかし、トリエステル型の PhS 基はこの条件できわめて安定である。PhS 基のヨウ素による酸化的加水分解反応はメタリン酸エステルが生成しやすいジエステル型のチオールエステルのようにリン酸の解離の存在が必要のようである。また、酢酸銀や塩化第二水銀等の重金属塩によつても PhS 基は除去される^{39,40)}。この場合、ジエステル型でもトリエステル型にかかわらず等しくチオールエステルを加水分

これに対し、3 価の亜リン酸モノアルキルエステルのジチオールエステル (44) はヨウ素-水により酸化を伴い加水分解され、リン酸モノアルキルエステル (45) を与えることが知られている⁸⁵⁾。この場合、リン原子がまず直接酸化される反応機構が提出されているが、上述した理由によりチオールエステルの EtS 基が先に除去されるものと思われる。

Fig. 6 Thiolester types of phosphorylating agents.

(52) を与える⁹⁰⁾。核酸レベルにおいてもこのような活性化反応はすでに Nussbaum ら³⁾ により応用されている。特に、最近、スクレオシド-5'-ポリホスフェート合成のため種々のチオールエステル型のアミンホスホリル化剤が開発されている⁹¹⁻⁹⁶⁾。

ジエステル型の PhS 基はヨウ素や銀塩以外にも NCS, NBS, *N*-フェニルチオスクシンイミド, MCPBA, ヨードソトルエン等の試薬によっても活性化できる⁶⁾ が核酸への応用は副反応が伴うため好ましくない。

ジエステル型のチオールエステルをスタンニル化したトリエステル (53) はスズ原子とハロゲンの強い親和性によりヨウ素により容易に活性化できる^{97, 98)}。

銀塩による PhS 基の活性化反応を用いて真核細胞系 mRNA の 5'-末端に共通に存在するキャップ構造^{99, 100)} と呼ばれるトリホスフェート構造を含む $m^7G^5'pppA$ が合成された^{101, 102)}。

カイク多角体ウイルス mRNA の 5'-末端部位の化学合成も *p*-メトキシフェニルチオ基¹⁰³⁾ を活用して合成されている¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾。

ここで示したキャップ化反応は反応系がやや複雑で再現性もあまり良くなく問題であったが、最近、キャップ

化試薬 (54)¹⁰⁷⁾ に適当に保護基を導入しさらにチオールエステルを一たんホスホロイミダゾリド (55) に変換したのちキャップ化反応をすることで収率および再現性を著しく向上させることに成功している¹⁰⁸⁾。

リン酸基が 1 個少ないキャップ構造 $m^7G^5'ppA$ 等も PhS 基のヨウ素による活性化反応により合成されている¹⁰⁹⁾。この合成で用いられた pm^7G のチオールエステル (56) には脂溶性の高い DMTr 基が塩基のアミノ基に導入されており、また中性の分子内塩であるためシリカゲルによるカラムクロマトグラフィーにより容易に精製できる利点がある。本試薬を 5'-末端にジホスフェートをもつ $ppGpU$ 誘導体と同様に反応させることによりプロモモザイクウイルス mRNA フィラメント No.4 の 5'-末端構造である $m^7G^5'pppGpU$ も合成された¹¹⁰⁾。

(34)

(35)

以上述べてきたように PhS 基はリン酸の保護基になるばかりでなく活性化可能な保護基でもあり、核酸誘導体に限らずリン脂質やテルペン誘導体をはじめとする天然有機リン酸化合物の合成にも原理的に応用可能であろう。

おわりに

本稿はわれわれの研究を通してリン酸基の保護基としての PhS 基について紹介したもので、紙面の都合上限定した範囲内で記述を終了したため、他の保護基との比較などが多少不足した感が否めないが、この点については他のすぐれた総説³¹⁻³⁷⁾を参照されたい。また、PhS 基を用いる固相法による核酸の合成も省略したが、これも機会をあらためて紹介したいと思う。

筆者らは、最近糖やステロイド等核酸と異なる分野の研究者からホスホリル化の方法や単離精製法についてよく質問をうける機会が多くなってきたが、一般的有機化学反応としてホスホリル化反応はまだよく普及していないように思われる。本稿が核酸だけでなく他の分野の研究者の一助となれば幸いである。

最後に、本研究中共同研究者として多大な貢献をしていただいた中川 巖、山口和夫、本多伸吉、上村 孝、久米明子、松崎淳一の各博士に感謝致します。また、原稿をまとめるにあたりご協力して下さいました杉村知恵

子技官に深謝致します。

(昭和 60 年 11 月 22 日受理)

文 献

- 1) E. B. Herr, *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 219 (1959)
- 2a) S. Akerfeldt, *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1897 (1962)
- b) S. Akerfeldt, *Scavisk. Kem. Tidskv.*, **75**, 4 (1963)
- 3a) A. L. Nussbaum, R. Tiberi, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2513 (1965)
- b) A. F. Cook, M. J. Holman, A. L. Nussbaum, *ibid.*, **91**, 1522, 6479 (1969)
- c) A. F. Cook, *ibid.*, **92**, 190 (1970)
- d) A. F. Cook, E. P. Heimer, M. J. Holman, D. T. Maichuk, A. L. Nussbaum, *ibid.*, **94**, 1334 (1972)
- e) E. Heimer, M. Ahmad, S. Roy, A. Ramel, A. L. Nussbaum, *ibid.*, **94**, 1707 (1972)
- 4) H. G. Khorana, *Pure Appl. Chem.*, **17**, 349 (1968)
- 5) D. E. Ailman, R. J. Magee, "Organic Phosphorus Compounds", (G. M. Kosolapoff, L. Maier eds.) Vol. 7, Chapter 19 (1973), Wiley, New York
- 6) M. Sekine, Dr. thesis, Tokyo Institute of Technology (1977)
- 7a) D. G. Knorre, V. F. Zarytova, "Abstract of International Conference on "Recent Developments in Oligonucleotide Synthesis and Chemistry of Minor Bases of tRNA" pp 89-124, Poland (1974)
- b) D. G. Knorre, V. F. Zarytova, A. V. Lebedev, L. M. Khalimskaya, E. A. Sheshegova, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1253 (1978)
- c) D. G. Knorre, V. F. Zarytova, "Phosphorus

- Chemistry Directed Towards Biology", (W.J. Stec, ed.) pp 13-31, (1980), Pergamon Press, New York
- 8) R.G. Pearson, *J. Chem. Educ.*, **45**, 581 (1968)
 - 9) T. Mukaiyama, M. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8528 (1972)
 - 10) T. Mukaiyama, H. Takei, "Topics in Phosphorus Chemistry", Vol. 8, pp 587-645 (E.J. Griffith, M. Grayson, eds), (1976) Wiley, New York
 - 11) M. Hashimoto, M. Ueki, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.*, **1976**, 157
 - 12) T. Endo, S. Ikenaga, T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 2632 (1970)
 - 13) T. Hata, M. Sekine, *Chem. Lett.*, **1974**, 937
 - 14) H. Takaku, M. Kato, S. Ishikawa, *J. Org. Chem.*, **46**, 4062 (1981)
 - 15) 畑 辻明, 関根光雄, 有合化, **39**, 918 (1981)
 - 16) T. Hata, M. Sekine, "Phosphorus Chemistry Directed Towards Biology" (W.J. Stec, ed.) pp 197-212 (1980), Pergamon Press, New York
 - 17) T. Hata, M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7363 (1974)
 - 18) T. Hata, M. Sekine, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 3943
 - 19) M. Sekine, T. Hata, *Chem. Lett.*, **1979**, 801
 - 20) J. A. Schofield, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 2316
 - 21) M. Sekine, H. Mori, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 1145
 - 22) M. Sekine, T. Hata, *Chem. Commun.*, **1978**, 285
 - 23) M. Sekine, H. Mori, H. Yamagata, T. Hata, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **3**, 107 (1977)
 - 24) M. Sekine, H. Mori, T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 239 (1982)
 - 25) M. Sekine, H. Yamagata, T. Hata, *Chem. Commun.*, **1981**, 970
 - 26) M. Fujii, A. Kume, K. Ozaki, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, in press
 - 27) F. Eckstein, *Angew. Chem.*, **22**, 423 (1983)
 - 28) 関根光雄, 有合化, **38**, 244 (1980)
 - 29) M. Sekine, M. Satoh, H. Yamagata, T. Hata, *J. Org. Chem.*, **45**, 4162 (1980)
 - 30) A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, T. Hata, *ibid.*, **49**, 2139 (1984)
 - 31) V. Amarnath, A. D. Broom, *Chem. Rev.*, **77**, 183 (1977)
 - 32) M. Ikehara, E. Ohtsuka, A. F. Markham, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **36**, 135 (1978)
 - 33) C. B. Reese, *Tetrahedron*, **34**, 3143 (1978)
 - 34) E. Ohtsuka, M. Ikehara, D. Söll, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6553 (1982)
 - 35) S. A. Narang, *Tetrahedron*, **39**, 3 (1983)
 - 36) W. Pfeleiderer, *KONTAKTE* (Merck), **3** (1983)
 - 37) 畑 辻明, 松崎淳一, 有合化, **42**, 429 (1984)
 - 38) R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4801 (1967)
 - 39) M. Sekine, K. Hamaoki, T. Hata, *J. Org. Chem.*, **44**, 2325 (1979)
 - 40) M. Sekine, K. Hamaoki, T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 3815 (1981)
 - 41) K. Yamaguchi, S. Honda, I. Nakagawa, T. Hata, *Chem. Lett.*, **1978**, 507
 - 42) M. Sekine et al., unpublished works.
 - 43) T. Neilson, *Chem. Commun.*, **1969**, 1139
 - 44) T. Hata, N. Gokita, N. Sakairi, K. Yamaguchi, M. Sekine, Y. Ishido, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 2949 (1982)
 - 45) A. Kraszewski, J. Stawinski, M. Wiewiorowski, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2301 (1980)
 - 46) J. H. van Boom, P. M. J. Bangers, P. H. van Deursen, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 869
 - 47) C. Schattenkerk, C. T. J. Wreemann, M. J. de Graaf, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *ibid.*, **25**, 5197 (1984)
 - 48) W. H. Fletcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2726 (1946)
 - 49) M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 1711
 - 50) M. Sekine, J. Matsuzaki, T. Hata, *ibid.*, **22**, 3209 (1981)
 - 51) M. Sekine et al., unpublished works
 - 52a) T. C. Bruce, S. Benkovic, "Bioorganic Mechanisms", Chapter 1, (W. A. Benjamin ed.) (1966), New York
 - b) M. L. Bender, "Mechanism of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins" Chapter 6, (1971), Wiley, New York
 - c) W. P. Jencks, "Catalysis in Chemistry and Enzymology", Chapter 2, (1969), McGraw-Hill, New York
 - 53) H. Seto, T. Sakaki, S. Imai, T. Tsuruoka, H. Ogawa, A. Satoh, S. Inoue, T. Niida, N. Ōtake, *J. Antibiotics*, **36**, 96 (1983)
 - 54) S. Imai, H. Seto, T. Sasaki, T. Tsuruoka, H. Ogawa, A. Satoh, S. Inoue, T. Niida, N. Ōtake, *ibid.*, **37**, 1506 (1984)
 - 55) T. Catlin, F. Cramer, *J. Org. Chem.*, **38**, 245 (1973)
 - 56) T. Hirose, R. Crea, K. Itakura, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2449 (1978)
 - 57) M. Sekine, J. Matsuzaki, T. Hata, *Tetrahedron*, **41**, 5279 (1985)
 - 58) H. M. Hsiung, R. Brousseau, J. Michniewicz, S. A. Narang, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1371 (1979)

- 59) T. M. Jacob, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1630 (1964)
- 60a) C. B. Reese, R. C. Titmas, L. Yau, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 2727
- b) J. F. M. de Rooij, G. Wille-Hazeleger, P. H. van Deursen, J. Serdijn, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **98**, 537 (1979)
- 61) A. K. Seth, E. Jay, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5445 (1980)
- 62) P. K. Bridson, W. Markiewicz, C. B. Reese, *Chem. Commun.*, **1977**, 447; *idem*, *ibid.*, **1977**, 791
- 63) C. B. Reese, A. Ubasawa, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **7**, 5 (1980)
- 64) P. H. Daskalov, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3899 (1980)
- 65) P. H. Daskalov, M. Sekine, T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 3076 (1981)
- 66) S. D. Bernardini, F. Walsmeier, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta*, **64**, 2142 (1981)
- 67) J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl, R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 353 (1977)
- 68) M. Sekine, J. Matsuzaki, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 5287 (1982)
- 69) T. Kamimura, M. Tsuchiya, K. Koura, M. Sekine, T. Hata, *ibid.*, **24**, 2775 (1983)
- 70) T. Kamimura, T. Masegi, K. Urakami, S. Honda, M. Sekine, T. Hata, *Chem. Lett.*, **1983**, 1051
- 71) J. Matsuzaki, H. Hotoda, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 4019 (1984)
- 72) J. Matsuzaki, H. Hotoda, M. Sekine, T. Hata, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **15**, 93 (1984)
- 73) A. Kume, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4365 (1982)
- 74) A. Kume, M. Sekine, T. Hata, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **11**, 25 (1982)
- 75) A. Kume, M. Sekine, T. Hata, *Chem. Lett.*, **1983**, 1597
- 76) A. Kume, R. Iwase, M. Sekine, T. Hata, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8525 (1984)
- 77) S. Honda, K. Urakami, K. Koura, J. Matsuzaki, T. Kamimura, T. Masegi, M. Sekine, T. Hata, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **10**, 183 (1981)
- 78) S. Honda, K. Terada, T. Satoh, M. Sekine, T. Hata, *Chem. Lett.*, **1982**, 15
- 79) S. Honda, K. Urakami, K. Koura, K. Terada, Y. Sato, K. Kohno, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron*, **40**, 153 (1983)
- 80a) J. Nakayama, K. Fujiwara, M. Hoshino, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 3567 (1976)
- b) 中山重蔵, 星野正松, 有合化, **37**, 655 (1979)
- 81) M. Sekine, T. Hata, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 2044 (1983)
- 82) M. Sekine, T. Hata, *J. Org. Chem.*, **48**, 3112 (1983)
- 83) T. Kamimura, T. Masegi, K. Urakami, M. Tsuchiya, K. Koura, J. Matsuzaki, K. Shinozaki, M. Sekine, K. Miura, T. Hata, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **12**, 63 (1983)
- 84) T. Kamimura, M. Tsuchiya, K. Urakami, K. Koura, M. Sekine, T. Hata, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4552 (1984)
- 85) H. Takaku, Y. Shimada, *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 411
- 86) M. Sekine, H. Tanimura, T. Hata, *ibid.*, **26**, 4621 (1985)
- 87) M. Sekine, T. Hata, *ibid.*, **24**, 5741 (1983)
- 88) E. Ohtsuka, H. Ubasawa, M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5507 (1970)
- 89) M. Nishizawa, T. Kurihara, T. Hata, *Chem. Lett.*, **1984**, 175
- 90) M. Sekine, unpublished works
- 91) M. Eto, M. Sasaki, M. Iio, M. Eto, H. Ohkawa, *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 4263
- 92) M. Eto, M. Iio, H. Omura, M. Eto, *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 2081 (1974)
- 93) M. Eto, M. Iio, H. Omura, M. Eto, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **2**, 65 (1976)
- 94) C. B. Reese, L. Yau, *Chem. Commun.*, **1978**, 1050
- 95) S. S. Jones, C. B. Reese, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7399 (1979)
- 96) U. Asseline, N. T. Thuong, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 847 (1981)
- 97) T. Kamimura, S. Honda, K. Terada, Y. Osaki, M. Sekine, T. Hata, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **8**, 87 (1980)
- 98) T. Kamimura, M. Sekine, T. Hata, *Chem. Lett.*, **1983**, 951
- 99) Y. Furuichi, K. Miura, *Nature*, **253**, 374 (1975)
- 100) K. Miura, *Adv. Biophys.*, **14**, 205 (1981)
- 101) I. Nakagawa, S. Konya, S. Ohtani, T. Hata, *Synthesis*, **1980**, 556
- 102) T. Hata, M. Sekine, S. Honda, T. Kamimura, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **7**, 151 (1980)
- 103) N. Gokita, S. Ohtani, S. Nakamura, K. Yamaguchi, M. Sekine, T. Hata, N. Sakairi, Y. Ishido, K. Miura, *ibid.*, **5**, 267 (1978)
- 104) K. Yamaguchi, I. Nakagawa, T. Hata, K. Shimotohno, M. Hiruta, K. Miura, *ibid.*, **2**, 151 (1976)
- 105) K. Yamaguchi, I. Nakagawa, M. Sekine, T. Hata, K. Shimotohno, M. Hiruta, K. Miura, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2939 (1984)

- 106) T. Hata, M. Sekine, I. Nakagawa, K. Yamaguchi, S. Honda, T. Kamimura, K. Yamaguchi, K. Miura, *Am. Chem. Soc., Symposium Series*, No. 171 "Phosphorus Chemistry", 17 (1981)
- 107) T. Kamimura, Y. Osaki, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2683 (1983)
- 108) M. Sekine, S. Nishiyama, T. Kamimura, Y. Osaki, T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 850 (1985)
- 109) M. Sekine, T. Kamimura, T. Hata, *J. Chem. Soc., Perkin I*, in press
- 110) M. Sekine, unpublished works

会員名簿 (昭和 58 年版) の頒布について

本会会員名簿は昭和 58 年 5 月、協会創立 40 周年記念事業の一環として発行いたしました。会員の皆様へは引き続き特別価格で頒布いたしますので、ご購入の上会員相互の間の情報源としてご利用いただきたくご案内申し上げます。

主 な 内 容

名誉会員、歴代会長、正会員（永年会員、終身正会員を含む）、学生会員、海外在住会員、維持会員、団体会員、定款および細則、有機合成化学協会沿革、報文投稿規定

頒 価 本 会 会 員 1,000 円/冊 (送料共)

非 会 員 5,000 円/冊 (送料共)

◎ ご希望冊数に代金を添え現金書留でお申し込み下さい。

申 込 先 106 東京都港区麻布台 2-2-12 三貴ビル内
有機合成化学協会 会員名簿係
Tel. 03-582-4293