

生体関連機能に関するモデル系の合成と性質——金属間相互作用
及び核酸塩基-芳香族化合物相互作用のモデル化合物

久留正雄

東京理科大学薬学部, 〒162-0826 新宿区市ケ谷船河原町 12

**Synthesis and Characterization of Model System in Biological Related
Function ——Model Compounds for Investigation of Metal-Metal
Interaction and Nucleobase-Aromatics Interaction**

Masao HISATOME

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo,
12 Ichigaya-Funagawara, Shinjuku-ku, Tokyo 162-0826, Japan*

(Received April 25, 2001)

Several kinds of compounds available as model systems to investigation on metal-metal interaction in metalloproteins and on interaction of aromatics with nucleobases in arene intercalation to DNA were synthesized and characterized by spectrometry. Double and triple layered porphyrinophanes linked with 1,1'- or 1,3-disubstituted ferrocene moieties and their iron and cobalt complexes were prepared. Stabilities of their oxygenation complexes depended on bridging mode, lengths of alkyl linkers, distance between metals, and feature of hydrophobic cavity. Ferrocenophane derivatives in which nucleobase and aromatic hydrocarbon (naphthalene or anthracene) moieties substituted to their cyclopentadienyl rings in a stacking mode between the two chromophores were synthesized, as a model system of intercalation of aromatic condensed-ring hydrocarbons to DNA. Characterization of the ferrocenophanes by spectrometry and molecular modeling suggested that these chromophores interacted due to NH- π hydrogen bonding and π - π charge transfer. A number of porphyrin derivatives covalently connected with a nucleobase or a nucleobase pair in a face-to-face mode between the porphyrin and nucleobase moiety were synthesized. The spectroscopic behavior of the derivatives indicate a greater affinity of the guanine-cytosine pair for porphyrin in comparison with the adenine-thymine pair. These results are compatible with the already reported spectroscopic and kinetic properties of mixing system of DNA and porphyrin derivatives. Moreover, the fluorescence spectra of the nucleobase-porphyrin derivatives gave a piece of evidence to cause DNA cleavage by photosensitizer via "type I" mechanism, in which direct action of singlet or triplet state of photosensitizer excited by laser irradiation brings about damage of cell or DNA.

Key words——nucleobase-porphyrin derivatives; photosensitized DNA cleavage mechanism; ferrocene-porphyrin derivatives; nucleobase-anthracene derivatives

はじめに

筆者は 1965 年に本薬学部にて奉職して以来 90 年位まで、有機金属錯体フェロセンの化学を中心に研究を進めてきたが、それらについてはすでに総合論文^{1,2)}にしてあるので、ここでは 1984 年頃から 10 年ほどの間に手がけた生体機能関連分野の研究をまとめて記述することにしたい。

生体に関係する有機及び無機化学分野では、例えば酵素のような巨大分子の機能研究のために、反応の活性や相互作用が関与する局所的部分を機能的に再現できるモデル系を構築し、低分子化合物にお

けるスペクトルや動力学的研究手法を用いて精密に解析して、その時点では技術的に巨大分子のままでは分からない知見を提供することが行われ、^{3,4)} これらの手法はかなりの成功を収めてきた。特に 1973 年の Collman ら⁵⁾ のピケットフェンス・ポルフィリンは、分子量 1000 程度の低分子量でありながら優れたミオグロビン・モデルとしての機能を持ち、しかも鉄への酸素結合の状態を明らかにすることにも成功し、生体機能関連分野のその後の研究に多大な影響を与えた。

我々はそれまで行ってきた芳香族性金属錯体フェ

ロセン類の研究を通して金属酵素と酸素分子の結合、核酸に対して芳香環や金属が関与する系に興味を持つようになり、フェロセンや種々の芳香環を building block としてそれらの生体機能をモデル化することはできないかと考え、モデル系となりうる化合物の分子設計を行うとともにそれらの合成研究を開始した。

1. 積層型フェロセノポルフィリノファンの合成

フェロセンは低スピン 2 価の鉄を有するが、これをポルフィリン錯体の面上に橋かけ構造によって固定すれば、異種の電子構造を持つ金属が向き合う形の複核錯体となる。また、ポルフィリン平面の両側から橋かけすれば鉄が上下に 3 個配列した三核錯体になる。これらは、金属—金属間相互作用や電子移動のモデル系になるかもしれない。さらに、フェロセンのシクロペンタジエニル環 (以後 Cp 環という) 平面とポルフィリン金属錯体平面が face-to-face となるように橋かけすれば、芳香環を経由した金属—金属間相互作用を調べるためのモデル系となる可能性もある。これらの橋かけ鎖の長さを変えれば活性点の間の様々な距離を持つ錯体が得られる。当時、ヘム酵素の合成モデル系の研究が盛んに行われており、⁶⁻¹⁰⁾ 特に、複数の金属を含む金属酵素 (例えば、シトクローム酸化酵素など) や金属酵素間の電子移動速度と金属間の距離の関係などが問題になっていたので、¹¹⁾ フェロセナーポルフィリン誘導体は、それら金属酵素のモデル化合物として役立つと考えられた。さらには、それら橋かけ化合物はその構造上電導性分子金属¹²⁾ のような新しい材料としての期待も持たれた。

ポルフィリン部としては、5,10,15,20-tetrakis-(2-aminophenyl) porphyrin (**1**; $M=H_2$) の簡便な合成法とアミノ基の方向によるアトロプ異性体の分離及びその構造同定法が確立されていたので、^{5b)} これを利用した。フェロセン部には 1,1'-位及び 1,3-位二置換カルボン酸 (**2** 及び **3**)^{13,14)} を用い、ポルフィリン部の 2 つのアミノ基とアミド結合により橋かけさせることにした。種々のアミド合成法により **1** とフェロセンカルボン酸の反応を検討したが、その中で最も好い成績が得られたのは、*n*-Bu₃N 存在下 2-chloro-1-methylpyridinium iodide による方法¹⁵⁾ であったので、おおむねこれを用いて合成した。**1** のうち 4 個のアミノ基の方向が互い違いになっている

5,10,15,20-tetrakis-($\alpha,\beta,\alpha,\beta$ -2-aminophenyl) porphyrin (**1A**; $M=H_2$) と 1,1'-置換カルボン酸 (**2**) からは二層構造 (**4**) と三層構造 (**5**) を持つ化合物が得られた (Fig. 1).¹⁶⁾ また、**1A** と 1,3-置換カルボン酸 (**3**) では二層構造の化合物 (**6**) は得られたが、**5** に対応する三層構造化合物は単離できなかった。生成物中にクロマトグラフィ不能な難溶部分があり、三層構造体はこの中に入っていると考えられる。

なお、得られたポルフィリン誘導体は、2 つの芳香族化合物を含む一種のファン類なので、それらの命名法¹⁷⁾ に従ってフェロセノポルフィリノファンと呼ぶことにした。

これらの積層化合物のマスマスペクトルでは、通常の EI (electron impact) 法でイオン化しても分子イオンは得られず、FD (field desorption) 法によるイオン化が必要であった。Table 1 に示したように、¹H- 及び ¹³C-NMR スペクトルはその構造の特長をよく表している。すなわち、1,1'-置換の二層化合物 (**4**) ではピロールプロトンが AB 系に分裂して C_{2v} 対称性を示し、Cp 環プロトンは真下にあるポルフィリンの反磁性効果を効果的に受けて、対応するカルボン酸に比べていずれも大きな高磁場シフトをしており、しかも側鎖の短い方がそのシフトは大きい (**4a** で 2.4—2.6 ppm, **4b** で 2.1—2.3 ppm)。側鎖メチレンプロトンも Cp 環に隣接する α 位は β 位に比べていずれも 0.75 ppm 高磁場シフトする。D_{2d} 対称構造の三層構造体 (**5**) ではピロールプロトンはシングレットであらわれ、Cp 環プロトンは二層体とほぼ同様な挙動で、高磁場シフトは対応する **4** よりもわずかながら小さかった。また、1,3-置換二層体の橋かけ鎖が短い方の化合物 (**6a**) では、Cp 環プロトンは 2 位が 3.8 ppm の高磁場シフトするのに対して、4, 5 位の高磁場シフトは 1.1 ppm であり、溶液中では Cp 環が 2 位部分をポルフィリン環に接近するようにして大きく傾いたコンフォメーションをとっていることが明らかとなった。ところが、橋かけ鎖が長くなった化合物 (**6b**) では、Cp 環プロトンは 2 位の高磁場シフトは 1.5 ppm, 4, 5 位の方は 4.0 ppm となって **6a** とは逆の挙動となる。したがって、**6b** の方は Cp 環が 4, 5 位部分を下に向くようにして傾いた配座をとっていることを示した。しかも高磁場シフトは橋かけ鎖が長い方が大きい。これら 1,3 置換体の配座を CPK モデルを

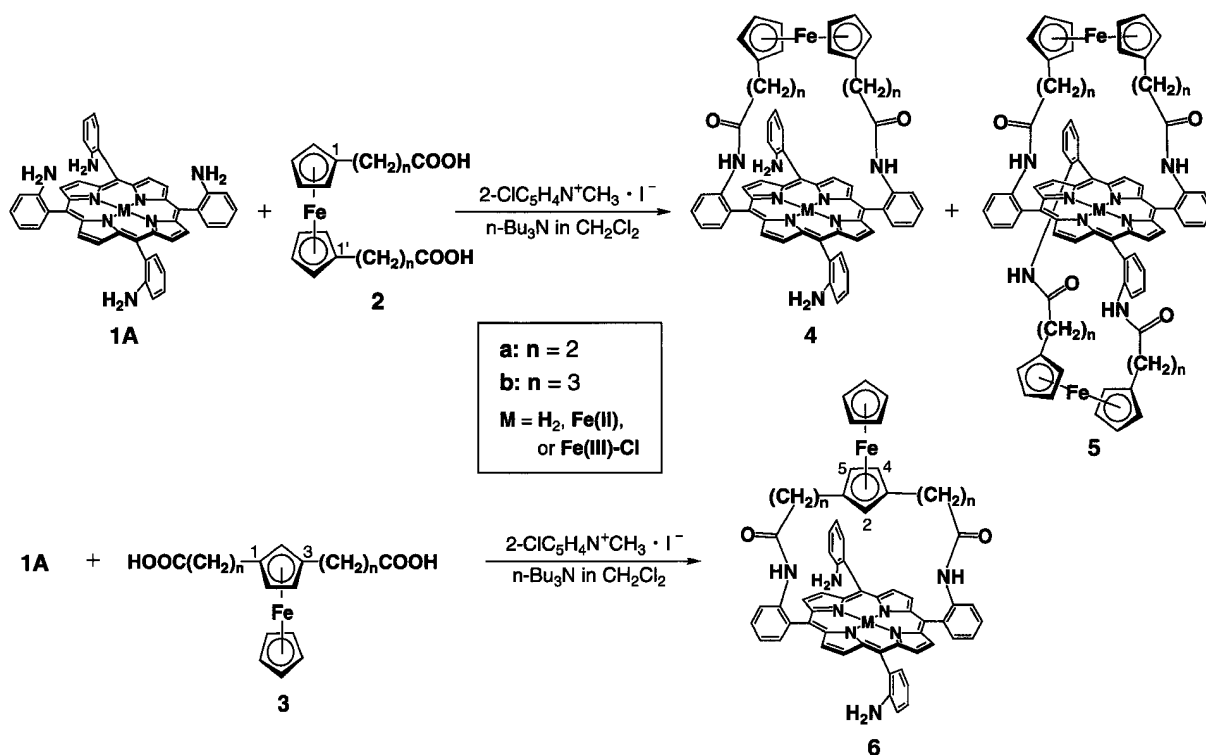


Fig. 1. Synthesis of Ferrocenoporphyrinophanes

使って考察してみると、1,3 置換フェロセンはジメチレン鎖で橋かけしたものはかなりひずみが大きく、トリメチレン鎖による橋かけ体の方が安定で、フェロセンがポルフィリン環に無理なく接近できることが分かった。しかし、なぜフェロセン部の傾きが逆の方向になるかは不明である。

次に、これらのポルフィリンの錯体化を行った。DMF/pyridine 中 FeCl_2 で処理すると、いずれも Fe(III)-Cl 錯体が形成された。鉄が 3 価になるのは空気酸化によるものである。錯体の生成は FD-MS と吸収スペクトルにより確認した (Table 1)。4 をジクロロメタン中 1-methylimidazol (Me-Im) 存在下、アスコルビン酸で還元すると鮮やかな赤色の Fe(II) 錯体溶液となる。三層構造体 5 はポルフィリン環の上下に橋かけがあるので MeIm を配位子とする錯体は形成されないが、かわりにアンモニアを加えると Fe(II) 錯体溶液となった。1,3-置換体の場合はアスコルビン酸では還元されず、 NaBH_4 が必要であった。これら Fe(II) 錯体に、吸収スペクトルをモニターとしてジクロロメタン中 -60°C で酸素ガスを吹き込むと酸素錯体を形成したことを示す吸収が現れた。 Fe(II) 酸素錯体の安定性は $5b \gg$

$6a > 4b > 4a \gg 5a \geq 6b$ である。1,1' 置換系の二層体は橋かけ鎖の長さに応じて安定なのは当然と言えようが、三層体では鎖の長さで安定性が極端に異なり、また 1,3 置換系では鎖が長いほうが不安定となっているのは興味深い。三層体の場合は鎖が短いと第五配位子がうまく収まりきれないために不安定で、1,3 系では非錯体の $^1\text{H-NMR}$ で Cp 環は鎖が長いほうがポルフィリン環に接近するという結果と関係があるものとみられる。これら酸素錯体は 5b を除きやがてフェロセンの鉄が酸化されたことを示す緑色溶液となっていく。しかし、5b の Fe(II) 錯体のみは形成された酸素錯体にアルゴンガスを吹き込むと酸素が外れたもとの Fe(II) 錯体となる。この可逆性は数回のターンオーバーに耐えた。すなわち、この錯体は Collman がつくったピケットフェンス・ポルフィリン⁵⁾と同様にフェロセン橋かけ鎖を酸素分子を収容する疎水性空間として用い、可逆的に酸素を吸脱着する能力があることがわかった。なお、CPK 模型によると 1,1'-系ではフェロセン鉄とポルフィリン鉄との距離は $n=2$ の場合 (a 系列) で約 0.6 nm, $n=3$ (b 系列) で約 0.7 nm である。三層体 5b の酸素錯体が安定なのは、両金属間が 0.7 nm 位

Table 1. NMR and Electronic Absorption Spectral Data of Ferrocenoporphyrinophanes and Their Fe(III)-Cl Complexes, and Formation of Fe(II) Complexes

Compound no.	<i>n</i>	Ferrocenoporphyrinophane (M=H ₂)					Fe(III)-Cl complexes		Fe(II) complexes		
		¹ H-NMR ^{a)}			¹³ C-NMR ^{a)}		Absorption bands ^{c)} (nm)	Reduction agent ^{d)}	Base	Absorption band ^{c,e)} (nm)	
		CH ₂ ^{b)}	Cp-ring	Pyrrole	CH ₂ ^{b)}	Cp-ring					
4a	2	0.80(4H, m)	1.33(4H, m)	8.70 & 8.88 (each 4H, d)	23.83	65.83	418, 513, 586, 654, 682	aa ^{f)}	1-MeIm ^{g)}	533	
		1.55(4H, m)	1.64(4H, m)		38.55	66.86					
4b	3	0.45(4H, m)	1.68(4H, m)	8.76 & 8.88 (each 4H, d)	25.45	66.28	418, 512, 582, 654, 682	aa	1-MeIm	536	
		1.10(4H, m)	1.94(4H, m)		27.24	66.87					
		1.55(4H, m)			37.22	86.01					
5a	2	0.90(4H, m)	1.53(4H, m)	8.76(8H, s)	23.93	66.03	421, 513, 580, 652, 685	aa	NH ₃	534	
		1.55(4H, m)	1.81(4H, m)		38.84	67.00					
5b	3	0.50(4H, m)	1.81(4H, m)	8.80(8H, s)	23.77	66.52	422, 513, 582, 656, 681	aa	1-MeIm	535	
		1.10(4H, m)	2.17(4H, m)		27.47	66.93					
		1.55(4H, m)			37.39	86.24					
6a	2	0.55(4H, m)	0.20(1H, t)	8.75 & 8.90 (each 2H, d)	24.60	65.17	420, 515, 583, 655, 683	NaBH ₄	1-MeIm	543	
		1.25(4H, m)	2.90(2H, d)		38.98	66.75					
			3.35(5H, s)			68.46					
6b	3	0.27(4H, m)	-0.02(2H, d)	8.75 & 8.89 (each 2H, d)	24.42	63.70	418, 510, 580, 652, 680	NaBH ₄	1-MeIm	537	
		1.18(8H, m)	2.46(1H, t)		26.83	66.46					
			2.82(5H, s)		36.40	68.28					
					8.81 & 8.96 (each 2H, d)	36.40					68.28
					85.19						

a) In CDCl₃, δ value. b) Methylene group combined with ferrocene moiety. c) In CH₂Cl₂ d) In CH₂Cl₂/H₂O at room temperature. e) Only characteristic band is shown. f) Ascorbic acid. g) 1-Methylimidazole.

離れると酸素が入ってもフェロセン鉄の酸化が進行しにくいとみられ、これは金属酸化のメカニズムに関する興味深い結果である。二層体が不安定なのは酸素が橋かけの反対側に配位して μ -オキソ二量体が形成されるためではないかと考えている。

次に、ポルフィリン金属上方の疎水性環境を高めた場合に、錯体の安定性に与える影響を調べるために、橋かけ鎖がなく空いている側に疎水性の壁(フェンス)を立てた形の誘導体を合成した (Fig. 2).¹⁸⁾ ポルフィリン部としてすべてのアミノ基が同じ方向を向いた 5,10,15,20-tetrakis-($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -2-aminophenyl)-porphyrin (**1B**) を用いてフェロセン誘導体とカップリング反応を行い、次いで余ったアミノ基にピバロイル基を結合させた。Figure 1 の化合物の結果では 1,3-錯体以外は橋かけ鎖の長い方が安定な錯体を形成するので、**7**, **8** は $n=3$ 及び **4** (**b** 及び **c** 系列) にしてある。また、**8b** 合成のカップリング反応の際に **10** も生成した。

これらの誘導体の構造についての詳細な説明は省略するが、いずれもその対称性を反映した NMR スペクトルを示した。これらを Fe(III)-Cl, Fe(II), Co(III)-Cl 及び Co(II) 錯体に導き、吸収スペクトルによりそれらの挙動を調べた。その結果を要約すると以下ようになる。

- 1) **7b** と **10** の Fe(II) 錯体は酸素分子を可逆的に吸脱着し、相当するフェンスのない錯体に比べかなり安定な酸素錯体を形成する。特に **7b** の Fe(II) 錯体ではわずかな酸素分圧でも酸素分子を取り込む。
- 2) Co(II) 錯体では、**8b** は酸素錯体を形成して酸素分子を吸脱着し、**7b** は酸素錯体を形成するが可逆性はなかった。
- 3) 1,3 置換体 **9** の Fe(II) 錯体は酸素吸脱着を示しフェンスがない場合よりは安定な酸素錯体を形成したが、他のフェンス型錯体よりも不安定であった。この場合、酸素錯体に

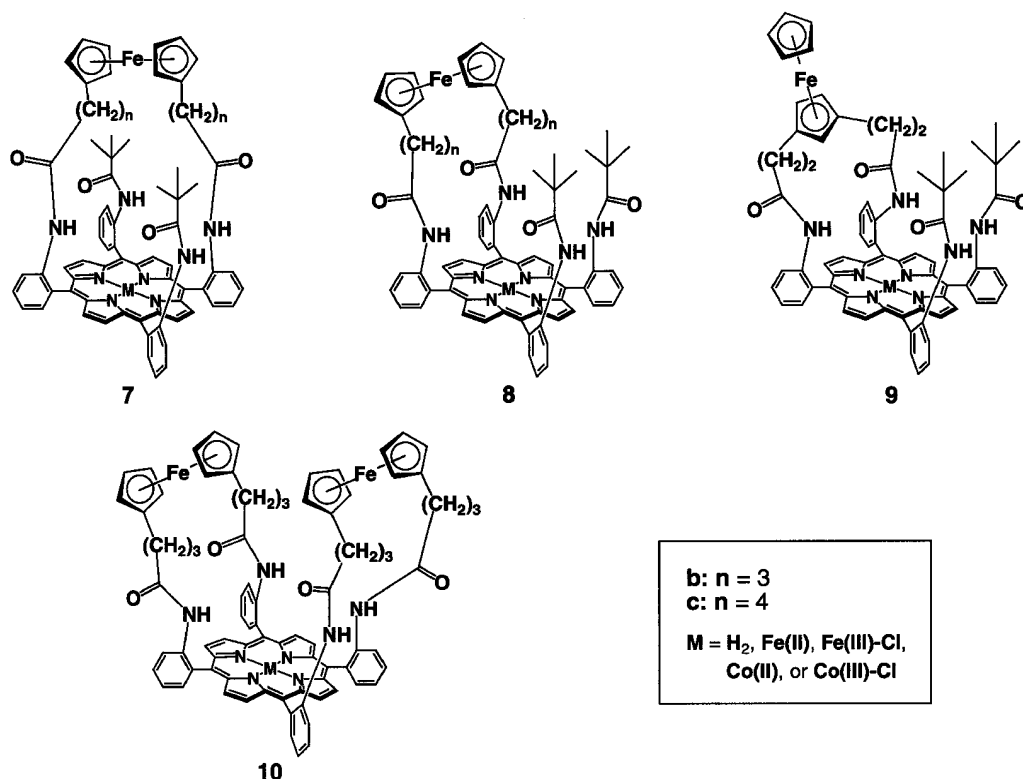


Fig. 2. Ferrocenoporphyriphanes Having Picket-Fences

におけるフェロセン鉄の酸化は Cp 環を経由している可能性がある。

すなわち、ポルフィリン上方の疎水性を高めることにより、錯体の安定性が大きくなることが示された。

これらフェロセノポルフィリノファンは電子移動又は電荷移動のモデル系として役立つつもりであったが、吸収スペクトルではクロモフォアの吸収が重なり合い電荷移動吸収帯の検出はならなかった。また、当初予定していた電気化学的検討は溶液中の安定性に問題があり行っていない。

2. フェロセンを合成部品として用いた核酸塩基—縮合芳香環相互作用に関するモデル化合物の合成

DNA に対するインターカレーションは平面性を有する π 電子系ではかなり一般的で、とくにメチジウム^{19,20}やアクリジン²¹⁻²³などの縮合複素多環式化合物の例は有名である。このような多環縮合系炭化水素でも行われることが示唆されていたが、Kumar ら²⁴はアントラセンのような三環系縮合環のインターカレーションの例を報告した。すなわち、DNA と 9-anthrylmethylamine hydrochloride を混ぜ

て吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定し、アントラセン部位が DNA 二重らせんに挿入し、しかも、アデニン—チミン豊富な部分への特異性があることを推論した。DNA との混合系における現象に基づく推論であるが、その相互作用の本質が明らかになれば DNA 認識能に新たな知見を加えることができ、興味ある展開が期待できるのではないかと思われた。そこで、著者らはこの芳香環挿入部分のモデル化系を低分子量の化合物で合成し、芳香環—核酸塩基との相互作用についての詳細な知見を得ることを考えた。

ところで、フェロセンは 2 つの Cp 環が 0.332 nm の間隔で互いに平行になった構造を有している。常温では 2 つの環が自由回転しているので、各環の置換基の位置関係を空間的に規定することはできないが、Cp 環同士を橋かけしたフェロセノファンでは、Cp 環上の置換基間の関係を三次元的に制御することができるようになり、橋かけの長さや位置を変えることで微調整も可能となる。したがって、フェロセノファンの上下 Cp 環の適切な位置に 2 つのクロモフォアを有する置換基を導入すれば両

クロモフォア間の相互作用を検討するための良いモデル系になると考えられる。すなわち、フェロセノファンを合成部品 (building block) として核酸塩基と芳香環を結合させれば、両者の相互作用を検討するには格好の形になる (Fig. 3)。

そこで、分子模型を使って詳細に分子設計し (後にモデリングにより確認した)、次のようなモデル化合物を合成することにした。(i) フェロセン部は、Cp 環同士の自由回転を阻害した橋かけ体とし、橋かけの長さを 3C 鎖と 4C 鎖の場合を合成してそれらの違いを明らかにする。対照化合物として非橋かけ体もつくる。(ii) 芳香環としてはモデル反応としてナフタレンを用いて合成し、次にアントラセン誘導体をつくる。ナフタレン誘導体は比較対照化合物としても使える。芳香環とのリンカーは Cp 環と同一平面を保つようにカルボニル基を用いる。(iii) 核酸塩基は Kumar ら²⁴⁾の結果から、とりあえずアデニン及びチミンを選ぶ。(iv) 核酸塩基と Cp 環をつなぐリンカーは、オキソジメチレン鎖とジメチレン鎖の二種類をつくって比較する。ジメチレンを用いるのは核酸塩基と芳香環の両クロモホアが最も無理のない形式で接近して相互作用できる最適の空間的配置を見つけることを意図したものである。

なお、フェロセンを building block とする分子認識能を有する化合物の検討は、2, 3 のグループ²⁵⁻²⁷⁾で行われている。しかし、彼らの発想と我々の考えは独立のものであり、彼らは Cp 環同士の自由回転を利用するが、我々の場合は橋かけにより回転を阻害して、相互作用をより強力にするところにねらいがある。

合成法と得られた化合物を Fig. 4 に要約して示した。合成が達成された化合物はナフタレン系では

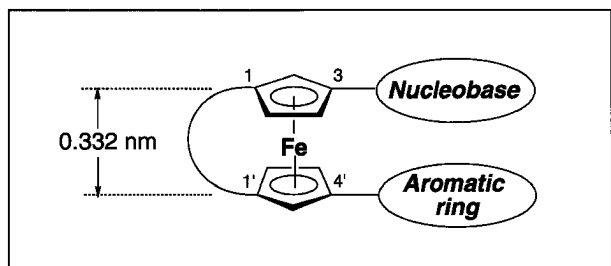


Fig. 3. A Schematic Presentation in Modeling of Ferrocenophane Derivative Combined with Both Nucleobase and Aromatic Ring in a Face-to-Face Mode

13a, 13b, 13c, 14, アントラセン系では **13a, 14** で、いずれもアデニン及びチミン誘導体である。

得られた化合物について ¹H-NMR, 電子吸収スペクトルの測定, 及び分子力学計算 (パーソナル CAChe による MM 計算) を行い、次のような結果を得た。

- 1) オキソジメチレン側鎖のナフタレン誘導体では **13a, 13c, 13b** の順, すなわち Cp 環の自由度が減少するにつれて ¹H-NMR における核酸塩基プロトンの高磁場シフトが大きくなっており, このシフトが芳香環の磁気異方性によることを示すと共に, フェロセン核の構造特異性が塩基と芳香環の空間的配置を規定することを明らかにした。
- 2) ジメチレン側鎖のナフタレン誘導体 (**14**) では, 対応するオキソジメチレン体 비해塩基部プロトンの高磁場シフトが大きい。したがって, ジメチレン側鎖は塩基部の空間的自由度を増大させ, 塩基部を相互作用が最大になる様式で芳香環に接近させているものと考えられる。
- 3) ジメチレン側鎖のチミン-アントラセン誘導体 (**14-T**) の ¹H-NMR と MM 計算の結果は, チミンが芳香環に対し edge-to-face 型の配座をとって安定化していることを示した。これはチミンの 1 位 NH-芳香環 π 電子雲間の水素結合によるものと見られる。
- 4) ジメチレン側鎖のアデニン-アントラセン誘導体 (**14-A**) では, ¹H-NMR と MM 計算の結果からアデニンが芳香環と face-to-face 型の配座で安定化していることを示した。吸収スペクトルではアントラセン由来の吸収帯に顕著な淡色効果 (約 20%) がみられ, クロモフォア間に π - π スタッキングによる電荷移動相互作用が働いているものと推定される。

以上の結果は, Kumar ら²⁴⁾が示したアデニン-チミン対への芳香環の親和性がチミンの NH 水素- π 電子間水素結合, アデニンの π - π 電荷移動相互作用によることを示唆するものであった。

3. 核酸塩基-ポルフィリン誘導体の合成と性質——癌の光学的診断及び治療メカニズム解明のモデル系構築とその応用

ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) を用いた癌の光学的診断法

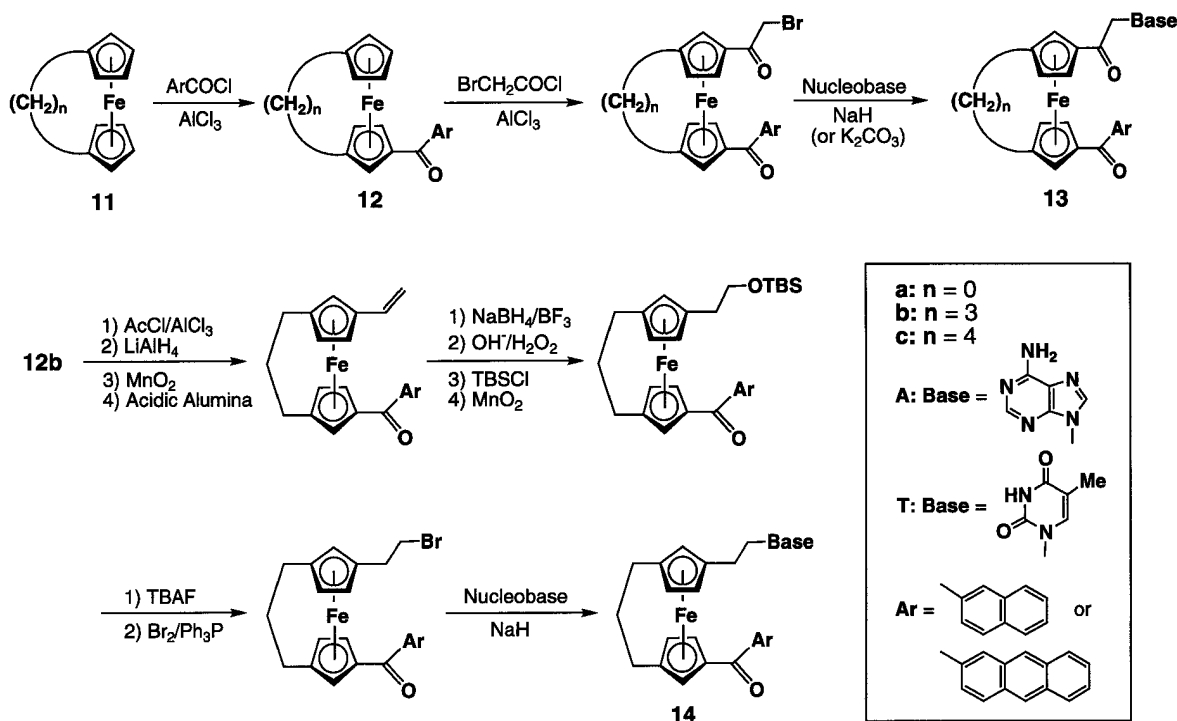


Fig. 4. Synthesis of Nucleobase-Ferrocenophane-Arene Derivatives

(photodynamic diagnosis, PDD) 及び治療法 (photodynamic therapy, PDT)^{28,29}が我が国でも 1994 年に承認され (一般名ポルフィマーナトリウム), 主として表在型初期癌の治療に用いられ良好な成績をおさめている. PDD と PDT が可能なのは, ポルフィリンが蛍光発光し, 光増感作用を有することと共に癌細胞に対し強い親和性を示すことによる. この癌細胞への親和性を, 異常に早い細胞分裂で複製を繰り返す DNA との強い相互作用としてとらえ, この立場で多くの生化学者がポルフィリン誘導体及びその金属錯体と DNA との相互作用をスペクトルや動力的手法を用いて検討し, 両者が強い親和性を有することを明らかにしている.³⁰⁻³⁸ 例えば, Fiel ら²⁹) は, ポルフィリン誘導体に牛胸腺 DNA を加え, 溶液粘度の減少, Soret 帯 (400 nm 付近のポルフィリン特有の強い吸収帯) の吸光係数の減少, CD の誘起などを観測し, Pasternack ら³⁸) は左巻きらせん構造の Z-DNA にポルフィリン誘導体が共存すると右巻きの B-DNA への巻き直しが起こることを見いだしている. また, 一般にポルフィリンのポリヌクレオチドに対する親和性は poly(dA-dT) よりも poly(dG-dC) の方が強いことも示されている (Pasternack ら,³¹) Marizilli ら³⁴) これらの結果か

ら, ポルフィリンが DNA にインターカレーションすることは事実とされ, 特にグアニン-シトシン対リッチな部分に挿入しやすいと推定された.

しかしながら, これらの推論はいずれも DNA 又はポリヌクレオチドと基質の混合物溶液のスペクトルや物性から現象論的に導きだしたもので, 必ずしも挿入部分の状況を分子論的に明らかにしたものはなかった. また, 巨大分子を扱うことに由来する精密さの限界もあって, 相互作用の本質に関わる局所的な視点に欠けることは避けられなかった.

そこで我々は, はじめに述べたような巨大分子の機能を低分子化合物でモデル化する手法を応用し, スペクトル法により精密に解析して相互作用の本質を明らかにすることはできないかと考えた. Pasternack ら^{31,38}) が主張するようにポルフィリンが塩基対間に挟まった状態を仮定し, この挿入部分を模式化すると Fig. 5 の左図のようになる. DNA への基質挿入部分を切り取った状況をできるだけ忠実に再現するとすればポルフィリンと核酸の単単位 (リン酸-糖-塩基) を結合させた化合物となる. しかし, これには合成の難しさもあり, また単純な系の方がむしろ相互作用の本質が明らかになる場合もあることも考慮して, 最初のモデル系には, 核酸

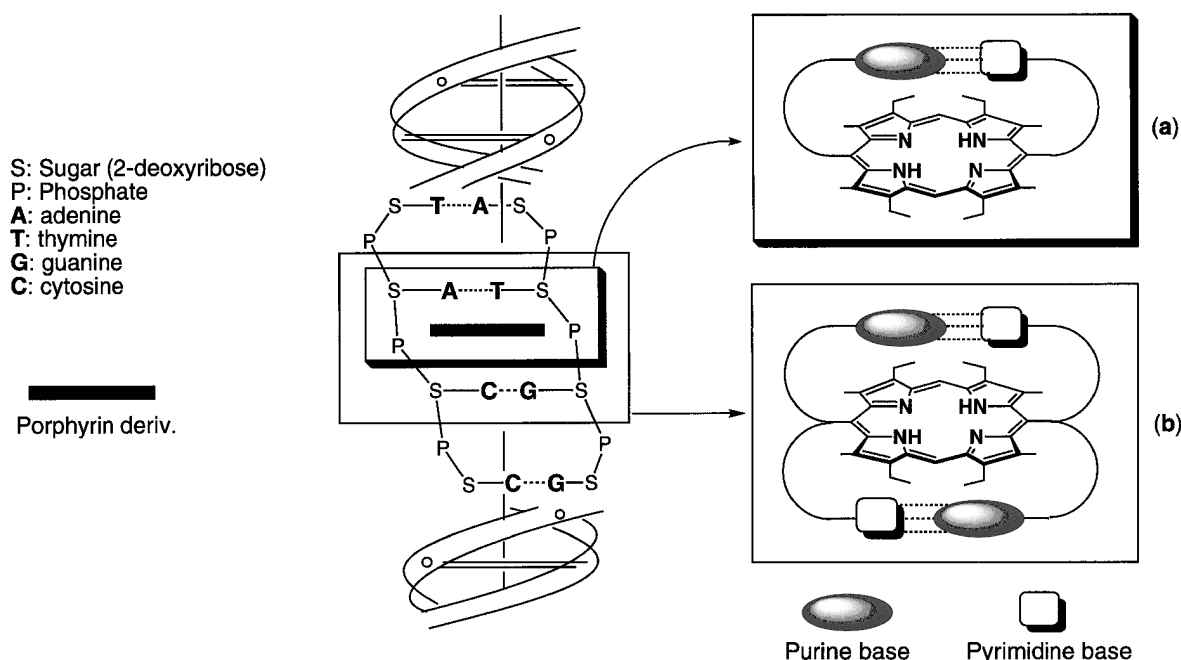


Fig. 5. Intercalation of a Porphyrin Derivative between the Base Pairs of DNA and Schematic Modelings of the Situation in the Intercalation

塩基対と芳香環のみに着目し両クロモフォアの相互作用を明らかにできる系を選んだ。すなわち、Fig. 5の(a)で示したように、Watson-Crick型で会合する一対の相補塩基対がポルフィリン環平面とface-to-faceで重なりあえるように設計された化合物の構築を計画したのである。

それら単純な系を合成してその物性を調べて得られる情報は、インターカレーションそのものを再現することにはならないにしても、挿入の形態と要因を分子論的に解釈するための基礎的なデータを与えるはずである。また、それらモデル系は化合物としてもユニークな興味深い構造を持ち、当初の目的以外にも別な応用に供しうる可能性もある。

そのような観点にたつて、次に示すように、とりあえずはDNAが有する4種の核酸塩基が結合した化合物の合成から開始した。

3-1. アルキルアミド・リンカーによる核酸塩基—ポルフィリン誘導体の合成 ポルフィリン部として5,15-bis(2-aminophenyl) porphyrin (**16**及び**17**)を用いることにした。これにはアミノ基の方向に基づくアンチ、シンのアトロプ異性体があるが、単離と構造同定法はすでにChangら³⁹⁾が確立していた。分子模型の検討からアミド結合側鎖により核酸塩基を結合させると、目的の構造にするにはメチ

レン鎖は $n=3$ 又は4が適当であることがわかった。原料となる核酸塩基カルボン酸誘導体(**15**)はそれまで知られていた核酸塩基の反応^{40–55)}を組み合わせて合成した。

ポルフィリン(**16**)とアデニン酪酸誘導体(**15-A**)の反応では、アミド合成の常法の1つである N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 処理法を用いると少量の核酸塩基—ポルフィリン誘導体(**18**)を与えた。しかし、この反応は $i\text{-Pr}_2\text{NEt}/\text{Py}\cdot\text{HCl}$ を共存⁵⁶⁾させてcarboethoxy chloride (CET-Cl)又はcarbobenzyloxy chloride (CBZ-Cl)を用いて反応すると収率が格段に上がることがわかり、以後基本的にはこの反応剤を用い、改良を加えながら縮合を行った。Figure 6に示したように、4種すべての核酸塩基についてアンチ型のモノ塩基誘導体を合成した。^{57–59)}

また、これらの手法を使ってアデニンとチミンを段階的に結合させ、2つの塩基を有するアンチ体**20**とシン体**21**を合成した(Fig. 7)。シン異性体では、後述するように、アデニンとチミンが塩基対を形成していることが¹H-NMRより明らかにされた。⁵⁹⁾ グアニン—シトシン対を有する誘導体の合成も試みられ、種々の反応を行ったが、アンチ、シン体共にいずれも多数の生成物の混合物となり目的物

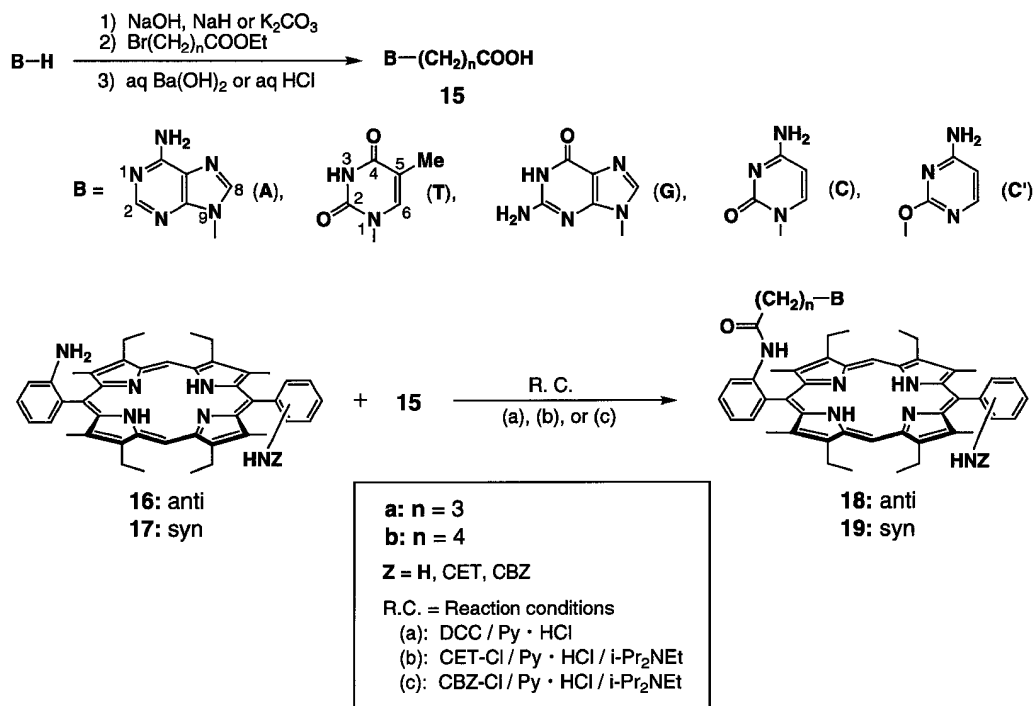


Fig. 6. Synthesis of Mononucleobase-Porphyrin Derivatives in Amide System

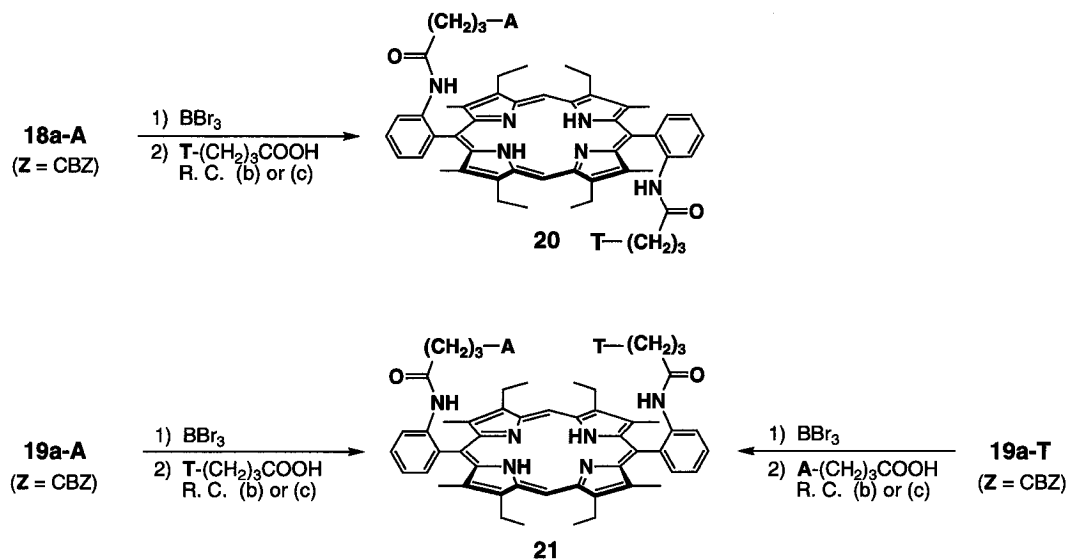


Fig. 7. Synthesis of Bisnucleobase-Porphyrin Derivatives in Amide System

See Fig. 6 for R.C. (Reaction Conditions).

は単離できなかったため、グアニン-シトシン対誘導体の合成は次に述べるエーテル・リンカーによる合成法によって行った。

以上の誘導体のスペクトルは後でまとめて述べる。

3-2. アルキルエーテル・リンカーによる核酸塩基-ポルフィリン誘導体の合成 以上のアミド結合誘導体の場合に2つの問題点が残された。1つは

カルボン酸とアミンの縮合反応がきれいに進まず、副生物がかなり多くなり、したがって収率が全般的に低いことである。モノ体を得るにはさしたる問題はないが、相補塩基を有する誘導体を合成するのは容易でなく、グアニン-シトシン誘導体が得られていないのもそのためである。もう1つの問題点は、核酸塩基とポルフィリンをつなぐ側鎖（リンカー）

の根元にアミド結合があるために、側鎖に回転障害を与えて塩基の向く方向を規制してしまう可能性がある。また、アミドは極性が高く水素結合の相手として働くので核酸塩基と相互作用するかもしれない。これらの因子はいずれも取り除いた方がモデル系として好ましいであろう。

そこで、合成法の改良と共にリンカーとなる側鎖を低極性にするべくエーテル結合鎖で核酸塩基をつなげたベンズアルデヒド (**23**) を用い、ジピリルメタン誘導体 (**22**) と直接ポルフィリン環形成反応を行うことにした。⁶⁰⁻⁶²

23 は、サリチルアルデヒドとジブromoアルカンを炭酸カリウムで反応させ、得られたプロモ体と核酸塩基を NaH 又は炭酸カリウムで処理して得られた。ジピリルメタンとのカップリング反応を、一種類の核酸塩基-ベンズアルデヒドを用い、*p*-TsOH 又はトリクロロ酢酸で処理後 *p*-クロラニルで酸化すると、対応するジ核酸塩基体のアンチ (**25**) とシン (**26**) が同時に得られる。これに非置換のベンズアルデヒドを加えておくと、モノ塩基体 (**24**) も生成する。また、アデニン及びチミンの 2 種類のベンズアルデヒドを共存させてジピリルメタンとカップリング反応を行うと、相補塩基対を有するアンチ体

(**27-AT**) とシン体 (**28-AT**) が得られる (Fig. 8)。グアニン、シトシン系でも同様に **27-GC** と **28-GC** が得られるが、グアニン相当部分を 2-amino-6-chloropurine (以下クロロプリン) にしておいてカップリングさせ、その後塩酸で加水分解してグアニンに誘導した方が収率は良い。2 種の核酸塩基ベンズアルデヒドのカップリング反応で、塩基同士の水素結合によりシン体の生成が優先することを期待したが、実際はシンとアンチはほぼ 1 : 1 で生成した。しかし、同一塩基の誘導体よりも相補塩基対をもつ誘導体の収率の方がかなり上回った。

これにより、必要なすべての組み合わせの核酸塩基-ポルフィリン誘導体を得られ、必要に応じ側鎖の長さの異なる誘導体が自由に得られる合成法を確立することができた。すべてではないがメチレン側鎖の長さが $n=4, 5, 6$ の誘導体を合成し、その長さとはスペクトル挙動の関係を検討した。それらを亜鉛錯体に導きメタル化の効果も調べた。

側鎖の方向によるアトロプ異性体のシン、アンチの帰属は、¹H-NMR における二次元スペクトル NOESY の解析により行った。また、後述の九大佐々木らとの共同研究で、核酸塩基類似体との会合を調べる NMR 実験によりシン体の構造が支持され

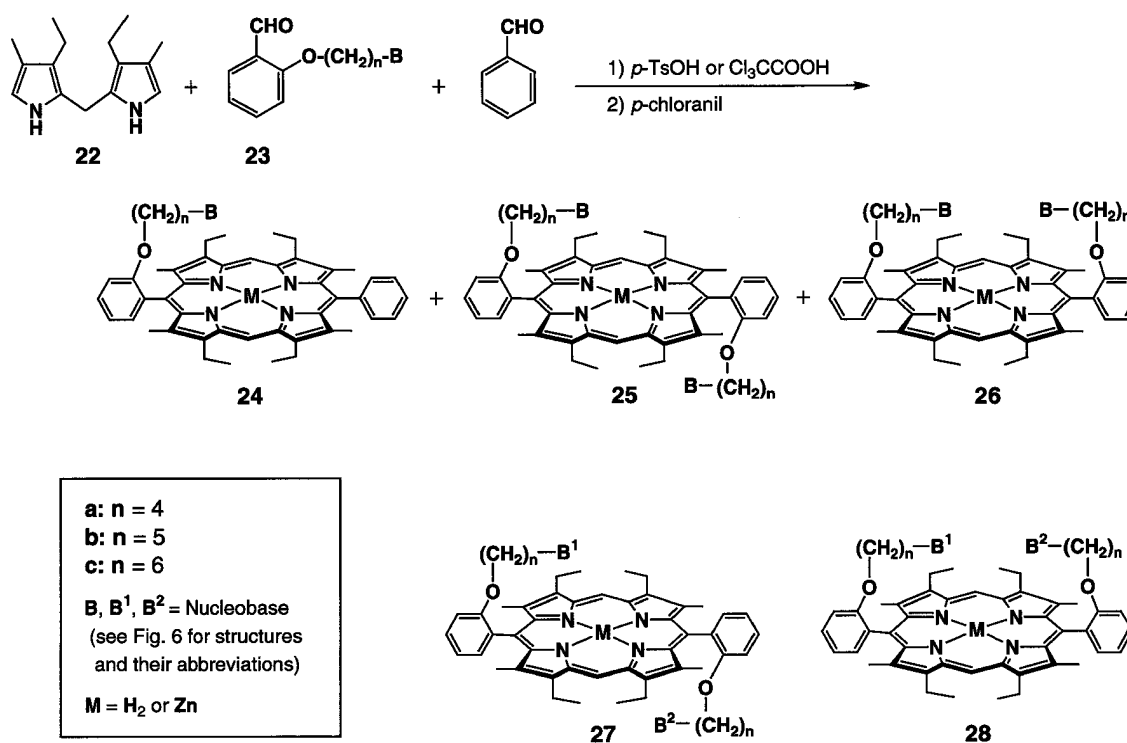


Fig. 8. Synthesis of Mononucleobase- and Bisnucleobase-Porphyrin Derivatives in Ether System

た。さらに、詳細は省略するが、化学的に構造を確定すべく別途ルートによる合成を試み、当初得た誘導体の一部に誤りはあったが、ほとんどの誘導体の構造帰属を支持する結果を得た。⁶³⁾

なお、これらの化合物は分子構造上極めて興味深い化合物なので、X-線結晶解析を行うべく単結晶の作成を試み、考えられる結晶化の方法をすべて行ってみたが薄片ができるのみで、測定可能な単結晶は得られなかった。

このように Fig. 5 の (a) の第一世代ともいふべきモデル化合物の誘導体すべての組み合わせが得られたので、核酸塩基相補塩基対がポルフィリンを上下から挟んだ形の Fig. 5 の (b) に対応する第二世代のモデル系合成も行ってみた。核酸塩基は有機溶媒に対し極めて溶解度が低いので、これが4個結合した場合極端に溶解度が低下するはずである。スペクトル測定に耐えるような溶解度を確保するには、長鎖アルキル基を多数結合しておくのがよい。そこで、*n*-ヘキシル基をポルフィリンのピロール環に4本、フェニル基に2本結合させることにした。なお、第三世代としては水溶性の誘導体を目指していたので、これに応用できることを考え、フェニル基へのアルキル基導入はエーテル結合を介して行うことにした。この方法を確立しておけば、水溶性を高めるポリエーテルをアルキル基のかわりに導入するのは容易になると考えたのである。具体的には Fig.

9 の化合物 **31** を目標とした。

31 の合成がかなり難しいことを予測し、まず試験的にこれまでのモデル系にアルキル鎖を加えた **29** と **30** を合成してみたら、標的化合物に移ることにした。**22** のエチル基をヘキシル基に変えたジピリルメタンと、**23** のパラ位にヘキシロキシ基を導入した核酸塩基ベンズアルデヒド誘導体を合成し、両者をポルフィリン形成反応に付した。その結果、**29** では4種の塩基誘導体、**30** ではアンチ、シン共にグアニン及びシトシン誘導体を合成できた。ベンズアルデヒド部分で $R=OC_6H_{13}$ となる誘導体の合成が難航し最終目的物はできていないが、 $R=H$ のビス核酸塩基-ベンズアルデヒド誘導体は得られたので、これとテトラヘキシルジピリルメタンとのカップリングを行い、**31** ($R=H$) の $B^1=B^2=Cytosine$ 及び $B^1=Cytosine$, $B^2=Chloropurine$ 誘導体は合成することができた。^{64,65)}

3-3. 核酸塩基-ポルフィリン誘導体の分光学的性質 このようにして得られた多種の核酸塩基-ポルフィリン誘導体は極めて興味ある NMR と吸収スペクトルを与えたので、以下にまとめて記述する。

(a) 1H -NMR スペクトル 各誘導体の核酸塩基プロトンの化学シフトを対応する塩基-アルキル誘導体と比較したシフト差を Table 2 と 3 にまとめて示した。モノ塩基誘導体 (**18**, **24**) の 1H -NMR では、いずれの塩基プロトンもポルフィリン環の反

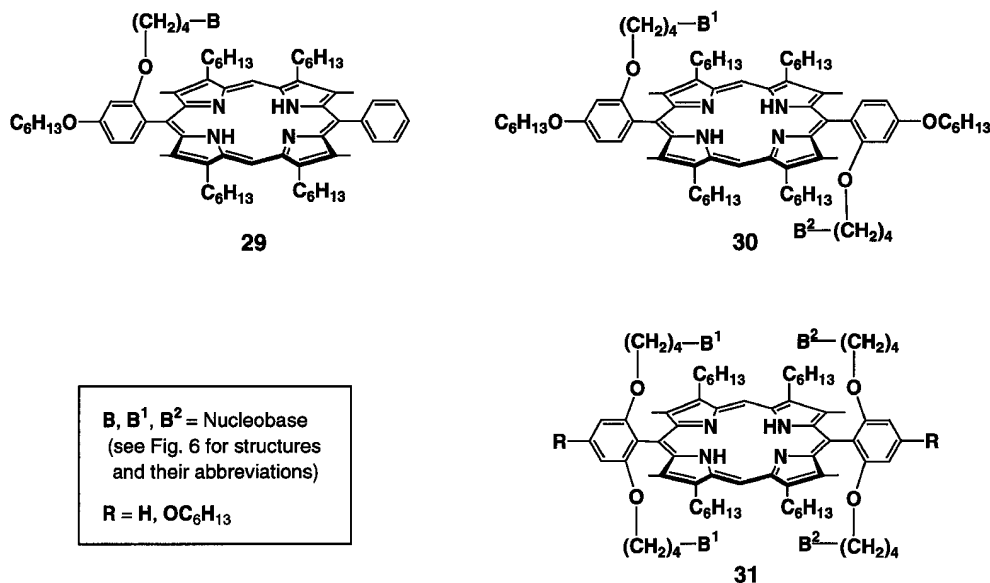


Fig. 9. Polyhexyl Nucleoside-Porphyrin Derivatives and Porphyrins Having Two Nucleobase Pairs

Table 2. Chemical Shift Differences ($\Delta\delta$) of the Base Proton Signals of Nucleobase-Porphyrin Derivatives in Amide System from Those of the Corresponding Reference Compound (Ethyl Ester of Nucleobasebutanoic Acid **15**) in the $^1\text{H-NMR}$ Spectra in $\text{CDCl}_3^{a)}$

Compound			Purine moiety					Pyrimidine moiety					
No.	<i>n</i>	Z	1-NH	2-H	8-H	-NH ₂	9-CH ₂	3-NH	4-NH ₂	5-CH ₃	5-H	6-H	1-CH ₂
18a-A	3	CET		-1.37	-1.65	-1.35	-1.53						
18b-A	4	CET		-0.78	-0.41	-0.38	-0.97						
18a-A	3	CBZ		-1.37	-1.64	-1.33	-1.53						
18b-A	4	CBZ		-0.78	-0.40	-0.38	-0.97						
18a-A	3	H		-1.39	-1.63	-1.36	-1.53						
18b-A	4	H		-0.86	-0.40	-0.32	-1.05						
18a-T	3	CET						-1.72		-0.73		-0.97	-1.08
18b-T	4	CET						-1.05		-0.56		-1.21	-1.06
18a-T	3	CBZ						-1.72		-0.93		-1.19	-1.21
18b-T	4	CBZ						-0.99		-0.58		-1.27	-1.11
20-AT	3	—		-1.35	-1.78	<i>b)</i>	-1.50	<i>b)</i>		-0.66		-0.90	-1.05
18a-G	3	CBZ	-1.30		-3.67	-0.22	<i>b)</i>						
18b-G	4	CBZ	-0.11		-1.22	-0.09	-1.27						
18a-C	3	CBZ							<i>b)</i>		-3.59	-2.17	-0.82
18b-C	4	CBZ							<i>b)</i>		-2.58	-2.27	-1.23
18a-C'	3	CBZ							-1.12		-0.81	-0.69	-0.66

a) The spectra were measured in solutions of ca 0.9×10^{-3} mol m^{-3} . *b)* The chemical shift of the signal in CDCl_3 has not been determined.

Table 3. Chemical Shift Differences ($\Delta\delta$) of the Base Proton Signals of Nucleobase-Porphyrin Derivatives in Ether System from Those of the Corresponding Reference Compound (Nucleobase-Salicylaldehyde **23**) in the $^1\text{H-NMR}$ Spectra in $\text{CDCl}_3^{a)}$

Compound			Purine moiety					Pyrimidine moiety					
No.	<i>n</i>	Z	1-NH	2-H	8-H	NH ₂	9-CH ₂	3-NH	4-NH ₂	5-CH ₃	5-H	6-H	1-CH ₂
24a-A	4			-0.46	-2.23	-0.52	-1.79						
24b-A	5			-0.25	-1.83	-0.36							
24a-T	4							-0.79		-1.94		-3.57	-1.95
24a-G	4	-1.35			-1.11	-0.72	-1.73						
24a-C	4								<i>b)</i>		-6.33	-4.85	-1.73
27-AT	4			-0.08	-1.64	+1.51	-1.14	+4.75		-0.13		-0.92	-1.35
28-AT	4			-0.45	-2.09	-0.57	-1.72	-0.77		-1.97		-3.59	-2.12
27-GC	4	+1.20			-1.45	+0.76	-1.56		<i>b)</i>		-5.86	-5.05	-1.96
28-GC	4	-0.17			-2.66	-0.10	-2.58		-6.49		-9.04	-6.11	-1.62
						+1.18	-2.33		+0.23				-3.17

a) The spectra were measured in solutions of ca 0.9×10^{-3} mol m^{-3} . *b)* The signal was not observed in CDCl_3 , possibly, due to broadening.

磁性異方性効果を受けて、アルキル体に比べて大きく高磁場シフトし、期待通りに塩基プロトンがポルフィリン環の面上に位置していることを示した。この高磁場シフトは小さいもので 0.5 ppm、大きいものでは 6.3 ppm (エーテル系のシトシン誘導体の 5-H) に達するものもある。しかも、メチレン鎖の短い方が長い鎖の場合に比べ高磁場シフトが大きく、側鎖の長さがポルフィリン環との距離を規定しており、両クロモフォアが層状に重なり合っている

(スタッキング) ことが明らかであった。また、核酸塩基間に対応しているプロトンを比べてみると、プリン塩基ではグアニンの方がアデニンよりも高磁場シフトが大きく、ピリミジン塩基ではシトシンの方がチミンよりもシフトが大きい。そして、互いに相補塩基対を形成する誘導体ではアデニン—チミン対よりもグアニン—シトシン対の方が高磁場シフトが大きくなっており、したがって後者の方がポルフィリン環に接近していることを示している。これは

グアニンとシトシンにあるカルボニル基とポルフィリン環内水素との強い水素結合が関係しているものと推定された。

さらに、エーテル系で得られた相補塩基対を有するアンチ誘導体 (27) では、核酸塩基プロトンのうち、炭素に結合するプロトンが高磁場シフトしてポルフィリン環の異方性効果を受けているのに対し、NH₂とNHプロトンがかなりの低磁場シフトしているのが観測された。これは塩基間の水素結合の存在を示し、アンチ型の構造から考えると分子間水素結合により会合していると推定された (Fig. 10).⁶⁰⁾ 一方、相補塩基を有するシン体 (28) は、G-C, A-T 共にアンチ体よりも高磁場シフトが大きく、2つの塩基が分子内水素結合してポルフィリン環に接近していることを示した。そして、G-C 対化合物は A-T 対よりも明らかに高磁場シフトが大きく、シトシンの 5-H は 9 ppm ものシフトをすることが確認された。

(b) 電子吸収スペクトル 各誘導体の電子吸収スペクトルにおける Soret 帯 (ポルフィリン特有の 410 nm 付近の吸収帯) の吸収を Table 4 に示した。Hypochromicity (淡色効果) は核酸塩基を持たないポルフィリンの吸収強度との比較であり、こ

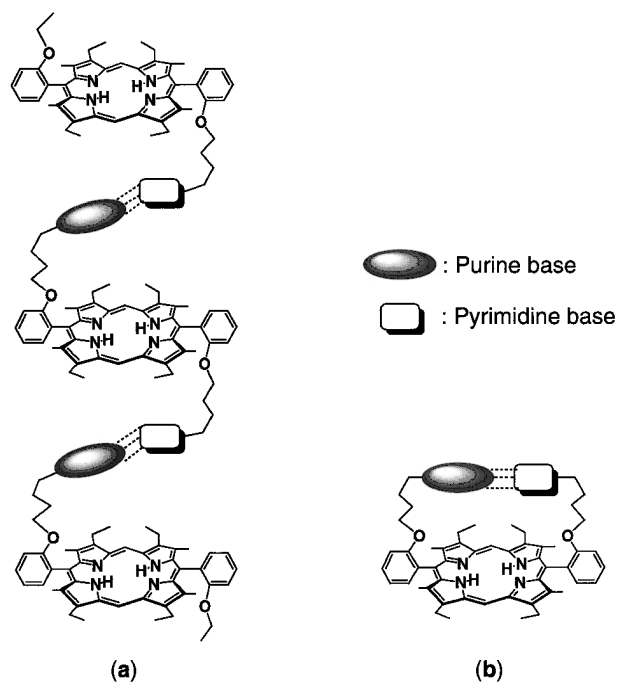


Fig. 10. Inter- and Intramolecular Base Pairing in anti (a) and syn (b) Bisnucleobase-Porphyrin Isomers, respectively

れが大きいほど、すなわち吸収強度の減少が著しいほど両クロモフォアの相互作用が大きいことを意味する。いずれも淡色効果の傾向は ¹H-NMR における高磁場シフトの大きさとほぼ平行であった。すなわち、モノ塩基誘導体 (18, 24) の淡色効果はアデニン、チミンよりもグアニン、シトシンの方が大きく、同じ塩基では側鎖の短い方が大きい。¹H-NMR で異常なシトシンの場合は淡色効果でも同様で、シトシンではスタッキング・モードが独特な形をとっていることを示唆した。また、相補塩基対誘導体ではシン体 (21, 28) の方がアンチ体 (20, 27) より淡色効果が大きくあられ、シン体の方がポルフィリン環と塩基が強く相互作用していることを示し、NMR で推論された塩基間の分子内水素結合による環への接近を支持した (Fig. 10)。また、同様にアンチ体の分子間水素結合しているという推論に

Table 4. Soret Band of the Porphyrin Ring in the Electronic Absorption Spectra of Nucleobase-Porphyrin Derivatives in CH₂Cl₂

Compound		λ_{\max} (nm)	ϵ ($\times 10^5$)	Hypochromicity (%)
No.	n Z			
Amide system Reference compound ^{a)}		408	2.12	0
18a-A	3 CET	410	1.75	17
18b-A	4 CET	410	1.86	12
18a-T	3 CET	408	1.73	18
18b-T	4 CET	408	1.87	12
18a-G	3 CBZ	408	1.18	44
18b-G	4 CBZ	408	1.31	38
18a-C	3 CBZ	408	1.46	31
18b-C	4 CBZ	408	1.37	35
18a-C'	3 CBZ	408	1.63	23
20-AT (anti)	3 —	411	1.65	22
21-AT (syn)	3 —	416	1.27	40
Ether system Reference compound ^{b)}		408	2.13	0
24a-A	4	409	1.84	14
24b-A	5	409	2.02	5
24a-T	4	408	1.99	7
24a-G	4	410	1.18	45
24a-C	4	409	1.90	11
27-AT (anti)	4	410	1.67	22
28-AT (syn)	4	410	1.37	36
27-GC	4	411	1.31	38
28-GC	4	409	1.11	48

a) 5,15-Bis(2-amino)phenyl-2, 8, 12, 18-tetraethyl-3, 7, 13, 17-tetramethylporphyrin.

b) 5,15-Bis(2-propoxy)phenyl-2, 8, 12, 18-tetraethyl-3, 7, 13, 17-tetramethylporphyrin.

も矛盾しない。

長鎖アルキル基を有する **29-31** のスペクトル挙動は他の誘導体と細かい点で多少異なるが、本質的な違いはない。

以上の分光学的挙動は、すでに述べたポルフィリン誘導体は poly(dA-dT) よりも poly(dG-dC) の方に親和性が高いという Pasternack ら³¹⁾ や Marzilli ら³⁴⁾ の報告と全く一致するもので、モデル系によるミクロな分子論的見地からも支持されることが確認された。

各誘導体の亜鉛錯体もスペクトルを測定した。^{66,67)} 優れた規則性は得られなかったが、核酸塩基が亜鉛に配位していて、必ずしも両クロモホアが平行にスタッキングしていないことを示唆する結果を得ている。Pasternack ら³¹⁾ は金属錯体の DNA 相互作用も調べていて、軸配位子が入るような金属 (Zn, Co, Fe など) 錯体では DNA 相互作用の形式が異なるとしているが、上の結果はこれを裏付けるものと考えられる。

以上のように、DNA にインターカレーターが挿入した場合の一部分を切り出し、この形をもとに設計した誘導体が、DNA やポリヌクレオチドを使って得られた分光学的挙動をよく反映し、期待通りに巨大分子の機能発現におけるモデル系として役立つことが示された。

3-4. 核酸塩基-ポルフィリン誘導体の応用

これらの化合物はその構造の特異性のゆえにポルフィリン又は核酸が関係する生体機能関連の研究分野の研究に利用され、重要な知見を提供する可能性を持つ。種々の検討を行ったが、そのうちまとまりのある結果についてのみ記述する。

(a) **核酸塩基認識能** モノ核酸塩基誘導体では、その塩基部分はポルフィリン環の真上にあることが明らかとなったので、もしその溶液に相補塩基を加えると水素結合により会合するであろう。そして、添加物の方もポルフィリンの反磁性異方性効果を受けて高磁場シフトするので、それを検出することにより誘導体の核酸塩基認識能を示すことができる。そこで、モノアデニン誘導体の重クロロホルム溶液にチミンカルボン酸エステルを加えて ¹H-NMR を測定した。⁵⁷⁾ その結果、アデニンのアミノ基及びチミンの NH プロトンの低磁場シフト (各々、+0.52, +2.20 ppm) と共に、チミンの 5-メチ

ル基と 6-H プロトンの高磁場シフト (各々、-0.11, -0.23 ppm) が観測された。すなわち、両塩基の間に強い水素結合が形成され、それによりチミンの方もポルフィリン環上におかれることになって反磁性異方性を受けたものと推定される。また、基質濃度を薄くするか、チミン/アデニンの比を大きくするとシフトは小さくなり、塩基-ポルフィリンをつなぐ鎖が長くなってもシフトが減少する。このように、水素結合形成による会合で相手の塩基を認識していることが明らかとなった。チミン-ポルフィリン誘導体にアデニンカルボン酸エステルを加えても全く同様な挙動が観測された。また、グアニン及びシトシン誘導体でもほぼ同様であったが、シグナルが重なり合っていて帰属が明らかになっていない個所がある。

(b) **核酸塩基対と会合能を有する人工核酸塩基の結合様式を検証** ヒト遺伝子の解明が終わり病原塩基配列が明らかになるとその治療法を確立するためには標的塩基を認識して切断できる方法をデザインする必要がある。この1つの手段として考えられているのは、DNA の標的塩基配列近隣に選択的に巻きついて三重らせん (triplex) を形成するような人工塩基の開発で、これを利用し何らかの処理をすることで望みの部分を切断することができる。そのような研究が Dervan ら^{68,69)} を中心に展開されている。

佐々木らは選択的に塩基対を認識する人工系の化合物を合成する研究を行っており、DNA の G-C 対の major groove 側を選択的に認識して triplex を形成しうる人工核酸塩基 (Fig. 11) をモデリングによりデザインし合成した。この人工塩基が実際に triplex を形成するかどうかを検出するのに、G-C 対の形成が確認されているシトシン誘導体 (**28-GC**) は最適の構造をしている。そこで、彼らが合成した化合物 **32** と **28a-GC** を共に重 DMSO に溶かして ¹H-NMR で NOESY が測定したところ、両者が triplex 複合体を形成すると接近するはずのプロトン同士に明瞭なクロスピークが観測された。⁷⁰⁾ しかし、**32** に A-T 対のシトシン誘導体 **28a-AT** を加えてもこのような相関は見られず、彼らの化合物が確かに G-C 対を選択的に認識して triplex を形成することを確認することができた。また、これらの結果によって、我々の化合物のシン、アンチのアトロプ異性体の構造

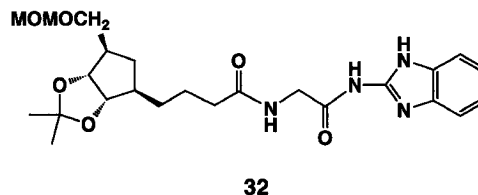
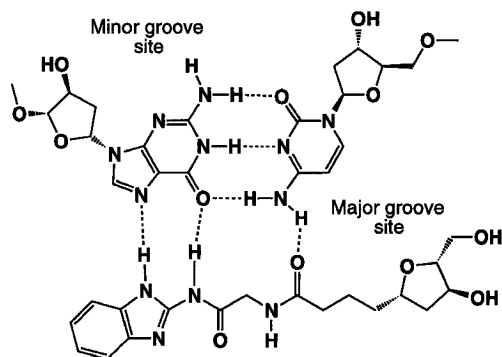


Fig. 11. Design of Artificial Nucleobases to Form a Triple Complex with Guanine-Cytosine Pair and the Designed Compound (32) Employed in NOESY Experiment together with 28a-GC

帰属も支持される結果となった。

(c) 光化学的核酸破壊のメカニズム解明のためのモデル系 この項目の最初にも述べたが、この研究のきっかけは、癌の光学的診断と治療で光増感剤として使われるポルフィリンの役割と癌細胞破壊のメカニズムを解明するためのモデル系構築にあった。現在光増感剤として使われているヘマトポルフィリン誘導体は動物由来のヘムから製造されているが、副作用の低下やレーザー感受性の向上などを実現するために、これに変わる光増感剤の開発が多くの研究者によってなされている。⁷¹⁾ 小林, 小宮山ら⁷²⁾は水溶性と安全性の観点から植物由来のクロロフィル誘導体の1つ Na pheophorbide (Na-Phde) 及び微生物由来の zincphyrin に着目して検討し、優れた抗腫瘍活性を有することを見いだした (Fig. 12)。さらに、それら光増感剤を使って腫瘍細胞破壊のメカニズムの解明も行っていった。

ところで、光増感剤による腫瘍細胞破壊のメカニズムとして2つのタイプが考えられている。⁷³⁾ 簡単に説明すると (Fig. 13)、光増感剤は光を吸収して励起一重項になるが、この一部は系間交差 (intersystem crossing, I.S.C.) によって励起三重項になる。寿命は一重項より三重項の方がはるかに長い。一重項のラジカル又はイオンラジカルが直接 DNA 又は細胞に損傷を与えるというのが Type I のメカニズムであり、三重項から溶存酸素 (三重項酸素, $^3\text{O}_2$) へのエネルギー移動により一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が生成しこれが生体組織と反応して障害を与えるのが Type II の機構である。寿命の関係から多くの場合 Type II で反応が進行するので、HpD でもこの機構が有力とされていた。⁷³⁾ しかし、小林ら⁷²⁾は

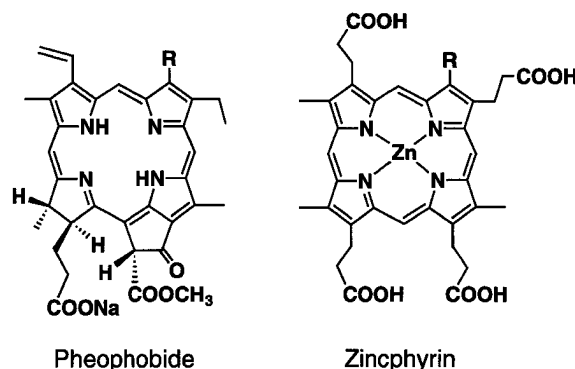


Fig. 12. Novel Sensitizers for Photocleavage of DNA

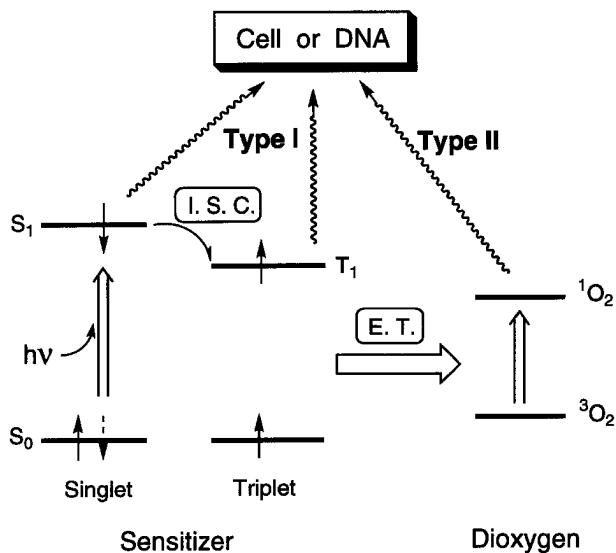


Fig. 13. Proposed Mechanisms for Photodamage of Cell or DNA by Photosensitizer

Na-Phde 及び類縁化合物の亜鉛錯体 (zincphyrin) が嫌気性条件で効率良く DNA 切断を起し、酸素存在下の光照射でも一重項酸素発生は全くないか、あ

ってもわずかであることが確認された。

これらのことから、小林らは Na-Phde と zincphyrin が Type I を経由して DNA 破壊を行っている可能性が高いとして、Na-Phde と 4 種の核酸塩基の酸化電位を測定して比較した (Fig. 14)。その結果、光増感剤の一重項は、ピリミジン塩基 (シトシン, チミン) を直接酸化することはないが、プリン塩基 (グアニン, アデニン) からは極めて効率良く電子を引き抜き得ることが明らかになった。

しかし、これは電気化学的な証拠であって光増感でそれが起る直接的証拠にはならない。核酸塩基とポルフィリンが face-to-face で向き合っている化合物 **24**, **28** を分光学的に検討すればその直接の証拠を与えることができる。そこで、まず 4 種のモノ核酸塩基—ポルフィリン誘導体 (**24a**) 及びその亜鉛錯体の蛍光スペクトルを測定した。⁷⁴⁻⁷⁶ 核酸塩基を持たない対照化合物のスペクトルと共に、1 つのチャートにまとめて Fig. 15 に示してある。これを見ると明らかなように、チミンとシトシン誘導体ではほとんど消光されないが、アデニンとグアニン誘導体には強い消光がみとめられ、しかもその程度はグアニンの方が大きい。亜鉛錯体でもチミン誘導体で消光がやや強まることを除けばほとんど同じであった。消光の程度はすでに述べた吸収スペクトルの淡色効果の大きさと平行であり、酸化電位の挙

動とも全く一致するものであった。

これら一連の結果より次のことが推論される。核酸塩基の近隣に増感剤があり、増感剤が励起されると直ちに酸化電位の低いプリン塩基から一電子移動が起り、したがってプリン塩基はカチオンラジカルとなるが、これが引き金になって連鎖的に DNA の分解反応が起る。すなわち、ポルフィリン系の増感剤による腫瘍細胞破壊は Type I のメカニズムで進行することを強く支持する結果となった。

さらに、これらのことを確かなものとするために、我々の得ているほかの誘導体 (**24a**, **24b**, **27**, **28**) についても蛍光スペクトルを測定した。⁷⁶ スペクトルはあげないが、その結果を要約すると以下のようにまとめられる。

- 1) 核酸塩基とポルフィリンをつなぐ側鎖を長くするほど蛍光の消光は減少し、核酸塩基が消光の要因であることが確認された。
- 2) 相補塩基対を有するシン体ではプリン塩基単独の誘導体より消光は減少し、ピリミジン塩基との対形成により酸化電位は上昇するという予想と一致した。

なお、これらの測定中、核酸塩基—ポルフィリン誘導体の光感受性に関するいくつかの興味ある現象も見つかっている。例えば、蛍光スペクトルは高希釈条件で測定するので溶液はほとんど無色である

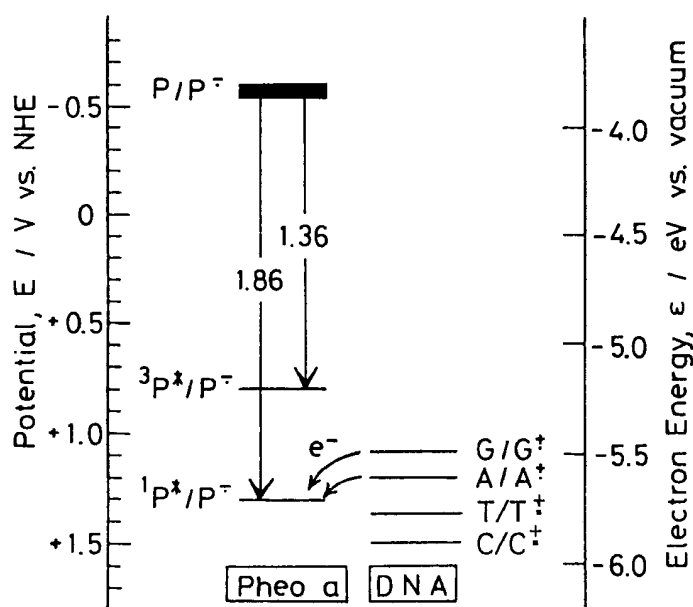


Fig. 14. Ground- and Excited-State Reduction Potentials and the Singlet and Triplet Excitation Energies of Pheophorbide in DMF, and Oxidation Potentials of Adenine (A), Guanine (G), Thymine (T), and Cytosine (C)

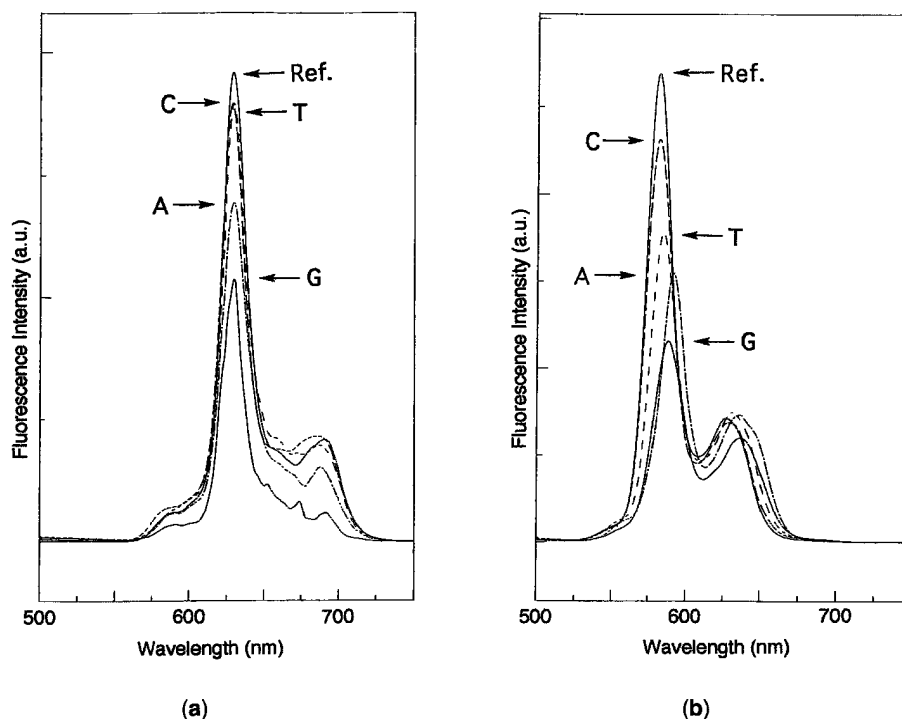


Fig. 15. Fluorescence Spectra of Adenine (A), Guanine (G), Thymine (T), and Cytosine (C) Derivatives of Porphyrin (**24a**, $M=H_2$) (a) and the Corresponding Zinc Complexes (**24a**, $M=Zn$) (b)
Reference compounds (Ref.) in (a) and (b) are 5,15-Bis(2-propoxy) phenyl-2,8,12,18-tetraethyl-3,7,13,17-tetramethylporphyrin and its zinc complex, respectively.

が、クセノンランプの照射により蛍光測定した後は淡黄緑色に変化し、この吸収スペクトルには新たな吸収 (440 nm) が出現する。ところがこれは経時的に退色し、無色となった溶液はもとの吸収スペクトルに戻る。すなわち、これら誘導体は照射により可逆的に変化する。このとき生成する化学種は電荷移動錯体、ラジカルイオン対などの可能性があり、これを解明することで増感剤と核酸塩基の光反応に重要な知見を与える可能性がある。

おわりに

最初にも書いたように、東京理科大学薬学部在職中の前半はサンドイッチ型の独特な構造を有する有機金属錯体フェロセンに魅せられ、種々の誘導体の反応、合成、スペクトル、構造解析などの研究を通して、電子状態や反応に対する金属関与のメカニズムや部分的な構造変化が分子全体の構造と反応性に及ぼす効果の規則性などを明らかにしてきた。^{1,2)} 薬学部においてこれらの錯体化学と構造有機化学的な研究を進めるうち、そこで得られる知見や手法を生体関連の検討に役立てることはできないかと考えて、本論文で記したような研究を開始したのは

1984年頃のことである。以来10年程の間に研究の土台が確立され方向性が明確になり予期以上の成果が現れ始めた。ところが95年になって、本薬学部の研究室構成の再編が行われ、諸事情により著者は情報薬学研究室の立ち上げに参加することになったため、これらの研究は完成をみることなく中止を余儀なくされた。研究全体が、特にはじめに述べた2つの項目が中途半端な形で終わっているのはそのためと理解していただきたい。しかし、物性研究やモデル系としての検討が十分に行われなかったとはいえ、合成されたそれぞれの化合物は大変ユニークな構造を有しており、種々の応用や発展性をもつものと考えられ、そのきっかけにでもなればと考え、この稿を記した次第である。なお、最近5年間の情報薬学研究室における「抗炎症作用を有する薬物及び植物成分の活性と構造の相関に関する研究」はいずれ稿を改めてまとめたいと考えている。

謝辞 本研究ではその性質上、目的は合成そのものではなく得られた化合物のキャラクタリゼーションにある。したがって、合成の記述にはほとんど

紙面を割いていないが、実際には研究の大方の時間は合成に費やしている。そのような多くの困難を伴った実験の担い手として頑張ってくれた共同研究者の高野進一、岡田達典、丸山典昭、岸端就介、池田幸一、宮崎和城、松田尚明、丸山勝(いずれも修士)の諸君に深い感謝の意を表したい。また、項目3-(4)-(b)及び3-(4)-(c)は、それぞれ、九州大学薬学部佐々木茂貴助教授及び東京大学工学部小林正美博士(現筑波大学物質工学系助教授)との共同研究によるものである。これらの研究は我々の化合物の有用性を示すことができたものとして特筆すべきものである。お二人の方々に心より感謝申し上げたい。

REFERENCES

- 1) Hisatome M., Yamakawa K., *J. Synth. Org. Chem. Japan*, **48**, 319–330 (1990).
- 2) Hisatome M., *Rev. Heteroatom Chem.*, **6**, 142–176 (1992).
- 3) Tabushi I., *Tetrahedron*, **40**, 269–292 (1984).
- 4) Dugas H., “Bioorganic Chemistry, A Chemical Approach to Enzyme Action,” Springer-Verlag, New York, 1989.
- 5) a) Collman J. P., Gagne R. R., Halbert T. R., Marchon J.-C., Reed C. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 7868–7870 (1973); b) Collman J. P., Gagne R. R., Reed C. A., Halbert T. R., Lang G., Robinson W. T., *ibid.*, **97**, 1427–1439 (1975).
- 6) Ogoshi H., Sugimoto S., Yoshida Z., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 169–173.
- 7) a) Collman J. P., Denisevich P., Konai Y., Marrocco M., Koval C., Anson F. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6027–6032 (1980); b) Collman J. P., Chong A. O., Jameson G. B., Oakley R. T., Rose E., Schmittou E. R., Ibers J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 516–533 (1981).
- 8) Gunter M. J., Mander L. N., McLaughlin G. M., Murray K. S., Berry K. J., Clark P. E., Buckingham D. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1470–1473 (1980).
- 9) Schauer C. K., Akabori K., Elliott C. M., Anderson O. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1127–1128 (1984).
- 10) Eaton S. S., Eaton G. R., Chang C. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3177–3184 (1985).
- 11) a) McGourty J. L., Blough N. V., Hoffman B. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4470–4472 (1983); b) Peterson-Kennedy S. E., McGourty J. L., Hoffman B. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5010–5012 (1984); c) Baum R. M., *Chem. & Eng. News*, 1984, Dec. 24, pp. 24–27.
- 12) Hoffman B. M., Ibers J. A., *Acc. Chem. Res.*, **16**, 15–21 (1983).
- 13) Graham P. J., Lindsey R. V., Parshall G. W., Peterson M. L., Whiteman G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3416–3420 (1957).
- 14) Hisatome M., Tachikawa O., Sasho M., Yamakawa K., *J. Organomet. Chem.*, **217**, C17–C20 (1981).
- 15) Bald E., Saigo K., Mukaiyama T., *Chem. Lett.*, **1975**, 1163–1167.
- 16) Hisatome M., Takano S., Yamakawa K., *Tetrahedron Lett.*, **26**, 2347–2350 (1985).
- 17) a) Smith R. H., “Bridged Aromatic Compounds,” Academic Press, New York, 1964; b) Keehn P. M., Rosenfeld S. M. (eds.), “Cyclophanes,” Academic Press, New York, 1983.
- 18) a) Hisatome M., Okada T., Kato J., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 107th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Kyoto, April 1987, p. 279; b) Hisatome M., Okada T., Yamakawa K., Abstracts of papers, The 12th International Symposium on Macrocyclic Chemistry, Hiroshima, July 1987, p. 197; c) Hisatome M., Okada T., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 108th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Hiroshima, April 1988, p. 78.
- 19) Herzberg R. P., Dervan P. B., *Biochemistry*, **23**, 3934–3945 (1984).
- 20) Fromherz P., Rieger B., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5361–5362 (1986).
- 21) Bowler B. E., Hollis L. S., Lippard S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6102–6104 (1984).
- 22) Zimmerman S. C., Lamberson C. R., Cory M., Fairley T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6805–6809 (1989).
- 23) Slama-Schwok A., Teulade-Fichou M.-P., Vigneron J.-P., Taillandier E., Lehn J.-M., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6822–6830 (1995).
- 24) a) Kumar C. V., Asuncion E. H., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 470–472; b) Ku-

- mar C. V., Asuncion E. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8547–8553 (1993).
- 25) Medina J. C., Li C., Bott S. G., Atwood J. L., Gokel G. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 366–367 (1991).
- 26) Constable E. C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 407–408 (1993).
- 27) Guthier R., Nieger M., Vogtle F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 601–603 (1993).
- 28) Review: Bonnet R., *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 19–33 (1995), and references cited therein.
- 29) Fiel R. J., Howard J. C., Mark E. H., Datta-Gupta N., *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3093–3118 (1979).
- 30) Review: Marzilli L. G., *New J. Chem.*, **14**, 409–420 (1990), and references cited therein.
- 31) Pasternack R. F., Gibbs E. J., Villafranca J. J., *Biochemistry*, **22**, 2406–2414 (1983).
- 32) Ward B., Skorobogaty A., Dabrowiak J. C., *Biochemistry*, **25**, 7827–7833 (1986).
- 33) Sari M. A., Battioni J. P., Dupre D., Mansuy D., Le Pecq J. B., *Biochemistry*, **29**, 4205–4215 (1990).
- 34) Marzilli L. G., Pettho G., Lin M., Kim M. S., Dixon D. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7575–7577 (1992).
- 35) Pasternack R. F., Bustamante C., Collings P. J., Giannetto A., Gibbs E. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5393–5399 (1993).
- 36) Petho G., Elliott N. B., Kim M. S., Lin M., Dixon D. W., Marzilli L. G., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1547–1548.
- 37) Kuroda R., Tanaka H., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1575–1576.
- 38) McKinnie R. E., Choi J. D., Bell J. W., Gibbs E. J., Pasternack R. F., *J. Inorg. Biochem.*, **32**, 207–224 (1988).
- 39) Young R., Chang C. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 898–909 (1985).
- 40) a) Leonard N. J., Scott T. G., Huang P. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7137–7138 (1967); (b) Browne D. T., Eisinger J., Leonard N. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7302–7323 (1968).
- 41) Kim M., Gokel G. W., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 1686–1688.
- 42) Platzer N., Galons H., Bensald Y., Miocque M., Bram G., *Tetrahedron*, **43**, 2101–2108 (1987).
- 43) Wolfe M. S., Borcharding D. R., Borchardt R. T., *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1453–1456 (1989).
- 44) Huryń D. M., Sluboski B. C., Tam S. Y., Tadaró L. J., Weigle M., *Tetrahedron Lett.*, **30**, 6259–6262 (1989).
- 45) Kim Y. H., Kim J. Y., Lee C. H., *Chem. Lett.*, **1988**, 1045–1048.
- 46) Phadtare S., Zemlicka J., *J. Org. Chem.*, **54**, 3675–3679 (1989).
- 47) Norbeck D. W., Spanton S., Broder S., Mitsuya H., *Tetrahedron Lett.*, **30**, 6263–6266 (1989).
- 48) Uenishi J., Takahashi K., Motoyama M., Akashi H., *Chem. Lett.*, **1993**, 255–256.
- 49) Dezor-Mazur M., Koraniak H., Langer J. J., Golankiewicz K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1989**, 1209–1212.
- 50) Nollet A. J. H., Huting C. M., Pandit U. K., *Tetrahedron*, **25**, 5971–5981 (1969).
- 51) Harnden M. R., Jarvest R. L., *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4265–4268 (1985).
- 52) Kjellberg J., Johansson N. G., *Tetrahedron Lett.*, **27**, 6541–6544 (1986).
- 53) Harnden M. R., Jarvest R. L., Bacon T. H., Boyd M. R., *J. Med. Chem.*, **30**, 1636–1642 (1987).
- 54) Halazy S., Ehrhard A., Danzin C., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 315–317 (1991).
- 55) Lee W. W., Martinez A. P., Goodman L., Henry D. W., *J. Org. Chem.*, **37**, 2923–2927 (1972).
- 56) Wieland T., Faesel J., Faulstich H., *Liebigs Ann. Chem.*, **713**, 201–208 (1968).
- 57) Hisatome M., Maruyama N., Furutera T., Ishikawa T., Yamakawa K., *Chem. Lett.*, **1990**, 2251–2254.
- 58) Hisatome M., Maruyama N., Ikeda K., Yamakawa K., *Heterocycles*, **36**, 441–444 (1993).
- 59) Hisatome M., Maruyama N., Ikeda K., Furutera T., Ishikawa T., Yamakawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1801–1811 (1996).
- 60) Hisatome M., Ikeda K., Kishibata S., Yamakawa K., *Chem. Lett.*, **1993**, 1357–1360.
- 61) Hisatome M., Maruyama M., Ikeda K., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 66th Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Nishinomiya, September 1993, p. 87.
- 62) Hisatome M., Maruyama M., Taguchi S., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 115th

- Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sendai, March 1995, No. 2, p. 102.
- 63) Hisatome M., Abe T., Tatsuta D., Abstracts of papers, the 117th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Machida, March 1997, No. 2, p. 44.
- 64) Hisatome M., Matsuda M., Ikeda K., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 66th Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Nishinomiya, September 1993, p. 87.
- 65) Hisatome M., Matsuda M., Maruyama M., Ikeda K., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 37th Annual Meeting of Kanto Branch, the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, November 1993, p. 95.
- 66) Hisatome M., Maruyama M., Ikeda K., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 114th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March 1994, No. 2, p. 124.
- 67) a) Hisatome M., Maruyama M., Yamakawa K., Abstracts of papers, the 68th Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Nagoya, October 1994, p. 287; b) Hisatome M., Matsuda M., Maruyama M., Yamakawa K., *ibid.*, p. 287.
- 68) a) Griffin L. C., Kiessling L. L., Beal P. A., Gillespie P., Dervan P. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7976–7982 (1992); b) Mrksich M., Dervan P. B., *ibid.*, **115**, 2572–2576 (1993); c) Colocci N., Distefano M. D., Dervan P. B., *ibid.*, **115**, 4468–4473 (1993); d) Mrksich M., Dervan P. B., *ibid.*, **115**, 9892–9899 (1993); e) Dwyer T. J., Geierstanger B. H., Mrksich M., Dervan P. B., Wemmer D. E., *ibid.*, **115**, 9900–9906 (1993); f) Hunziker J., Priestley E. S., Brunar H., Dervan P. B., *ibid.*, **117**, 2661–2662 (1995).
- 69) Zimmerman S.C., Schmitt P., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10769–10770 (1995).
- 70) Sasaki S., Nakashima S., Nagatsugi F., Tanaka Y., Hisatome M., Maeda M., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 9521–9524 (1995).
- 71) Bonnett R., *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 19–33 (1995).
- 72) a) Komiyama M., Kobayashi M., Harada M., *Chem. Lett.*, **1991**, 2123–2126; b) Kobayashi M., Koyama S., Nakazato M., Miyoshi N., Wolff C., Daikuzono N., Tanielian C., Sasaki M., Komiyama M., *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **12**, 133–138 (1994); c) Kobayashi M., Koyama S., Miyoshi N., Yokotsuka D., Watanabe M., Wolff C., Tanielian C., Toriya M., Sasaki M., Komiyama M., *Photomed. Photobiol.*, **16**, 65–69 (1994).
- 73) Praseuth D., Graudemer A., Verlhac J.-B., Kraljic I., Sissoeff I., Guillee E., *Photochem. Photobiol.*, **44**, 717–724 (1986).
- 74) Kobayashi M., Matsuda M., Kise H., Hisatome M., *Photomed. Photobiol.*, **17**, 117–119 (1995).
- 75) Kobayashi M., Kise H., Tanielian C., Wolff C., Toriya M., Nakazato M., Sasaki M., Matsuda M., Hisatome M., “Food Factors for Cancer Prevention,” Springer-Verlag, Tokyo, 1997, pp. 572–576.
- 76) a) Hisatome M., Matsuda M., Yamakawa K., Kobayashi M., Abstracts of papers, the 115th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sendai, March 1995, No. 2, p. 102; b) Hisatome M., Matsuda M., Maruyama M., Kobayashi M., Abstracts of papers, the 10th Symposium on Biofunctional Chemistry, Kyoto, May 1995, pp. 61–63.