

## 生体機能性分子を目的としたイミダゾール C-ヌクレオシドの合成研究

荒木理佐, 春沢信哉\*

## Synthetic Studies of Imidazole C-Nucleosides toward Biofunctional Molecules

Lisa ARAKI and Shinya HARUSAWA\*

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received August 7, 2010; Accepted September 2, 2010; Published online September 13, 2010)

Synthetic studies of C4-linked imidazole C-nucleosides toward biofunctional molecules are described, in which the following items are covered. 1) Stereoselective synthesis of imidazole C- and pyrazole C-nucleosides *via* diazafulvene intermediates. 2) Synthesis of tetrahydrofuranylimidazoles using a PhSe group efficiently and its application to the new human histamine H<sub>3</sub> receptor (hH<sub>3</sub>R) agonist, imifuramine, and the first selective human histamine H<sub>4</sub> receptor (hH<sub>4</sub>R) agonist, OUP-16. 3) Synthesis of imidazole ribonucleoside phosphoramidite (Imz-PA) with pivaloyloxymethyl (POM) group for probing the catalytic mechanism of ribozymes. 4) Synthesis of a two-carbon-elongated homologue (Imz-C<sub>2</sub>-PA) with a combination of POM and 2-cyanoethyl groups. 5) Incorporation of C<sub>2</sub>-imidazole nucleoside into position 638 of VS ribozyme using Imz-C<sub>2</sub>-PA and catalytic activities of the thereby generated modified VS ribozyme (G638C<sub>2</sub> Imz).

**Key words**—imidazole; C-nucleoside; H<sub>3</sub> receptor; H<sub>4</sub> receptor; phosphoramidite; ribozyme

## 1. はじめに

核酸の主要構成成分である N-ヌクレオシドは糖の 1 位とヘテロ環上の窒素原子との間でグリコシド結合を形成している。また、天然には C-ヌクレオシドと呼ばれる化合物群があり、ショウドマイシンやピラゾプリンは強い抗腫瘍活性、抗ウイルス活性を示す。<sup>1-3)</sup> これらは糖の 1 位炭素と芳香族ヘテロ環上の炭素原子が C-C 結合したりボヌクレオシドである。そのため C-ヌクレオシドは、N-ヌクレオシドと類似した構造でありながらも化学的、生物学的に安定であるという特徴を持つ。<sup>1-3)</sup>

一方、イミダゾールは生物学的に重要なヘテロ環化合物であり、ヒスチジンやヒスタミンなどの生体内成分として広く分布し、特に酵素中のイミダゾールが金属イオンの配位子として機能するなど、生合成過程に重要な役割を果たしている。<sup>4)</sup> また、イミダゾールは医薬品にも広くみられ、生理活性発現に関与する重要な官能基の 1 つである。しかし、イミダゾールを塩基に持つ C-ヌクレオシドの合成研究はほとんどなく、われわれの研究以前にはわずかに

C-2 置換イミダゾール **1** の合成例<sup>5)</sup> と Bergstrom ら<sup>6)</sup> による C-4 置換イミダゾール-2'-デオキシ体 **2** の合成がみられる程度であった (Fig. 1)。これらはいずれも糖部の 1 位に適当な置換基を導入した後、イミダゾール環を構築していく多段階合成のため、効率的な合成法ではなかった。<sup>2,3)</sup>

われわれは、トリベンジル-D-リボース **3** とイミダゾールのリチウム塩 **4** を直接結合させ、高立体選択的に C-4 置換 β-イミダゾール C-ヌクレオシド **7β** を得る効率的合成法を報告していたが (Scheme 1),<sup>7)</sup> この合成法の一般性、立体選択性の発現機構、及び応用性についてはさらに多くの検討が必要であった。

本総説では、イミダゾール C-ヌクレオシド合成をアラビノース、さらにピラゾール C-ヌクレオシド

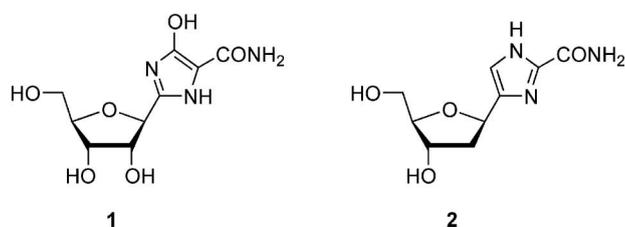
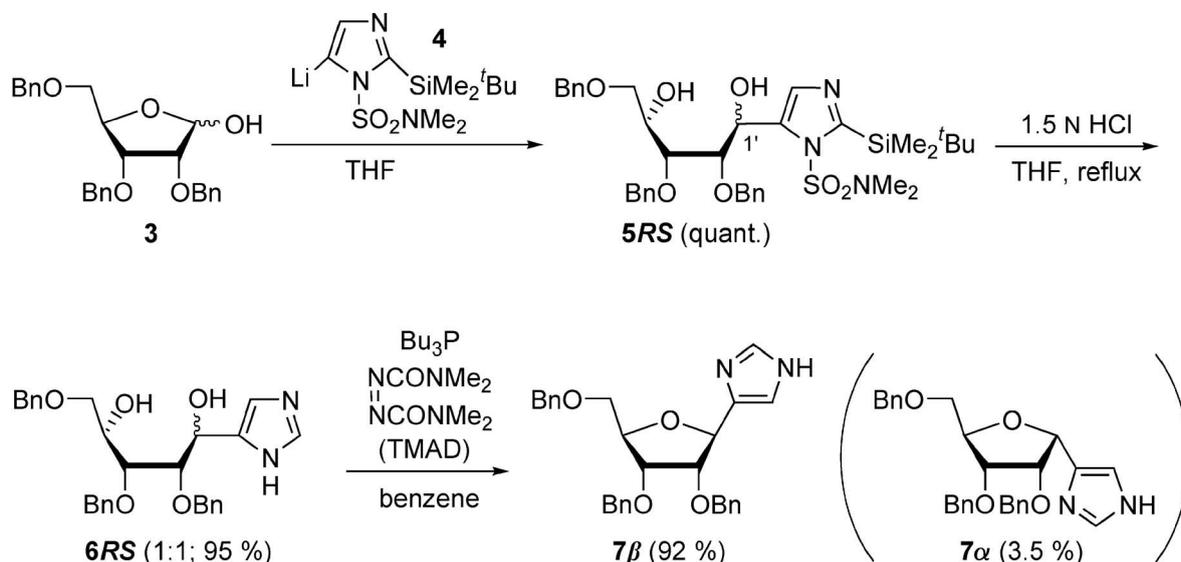


Fig. 1. Previous Imidazole C-Nucleosides



Scheme 1. Stereoselective Synthesis of C4-Linked Imidazole C-Nucleoside

ドに拡張した後、ヒスタミン  $\text{H}_3$  受容体 ( $\text{H}_3\text{R}$ ) 及び  $\text{H}_4$  受容体 ( $\text{H}_4\text{R}$ ) リガンドの創製、続いてリボザイムの反応機構解明のためのイミダゾール C-リボヌクレオシドホスホロアミダイトの合成研究へと展開した経緯を述べる。

## 2. C4 置換イミダゾール C-ヌクレオシドの立体選択的合成法

### 2-1. 立体選択的 $\beta$ -イミダゾール C-ヌクレオシド合成及びその反応機構

トリベンジル D-リボース **3** とイミダゾールのリチウム塩 **4** を結合させた後、得られたジオール体 **5RS** のイミダゾールの保護基を除去して **6RS** ( $\text{6R}/\text{6S}=1/1$ ) とした後、トリブチルホスフィンと  $N,N,N',N'$ -テトラメチルアゾジカルボキシアミド (TMAD) を用いて閉環反応を行うと **6RS** の 1' 位の立体配置の比にかかわらず高立体選択的 C-4 置換  $\beta$ -イミダゾール C-ヌクレオシド **7 $\beta$**  が生成する ( $\text{7}\beta/\text{7}\alpha=26.3/1$ ) (Scheme 1).<sup>7)</sup>

この  $\beta$ -体の高立体選択性の発現については次のように推定している (Scheme 2)。まず、**6R** と **6S** は、反応系中に生成するトリブチルホスフィン-TMAD 付加体が反応し、続いてイミダゾールからの電子の押し出しによりトリブチルホスフィンオキシドが遊離することでイミダゾールと糖の 1' 位の間に二重結合を持つジアザフルベン中間体 **a** 及び **b** が生成する。**a** は、分子内 4'-位第 2 級アルコールの求核反応により閉環し **7 $\beta$**  体を与える。一方、中

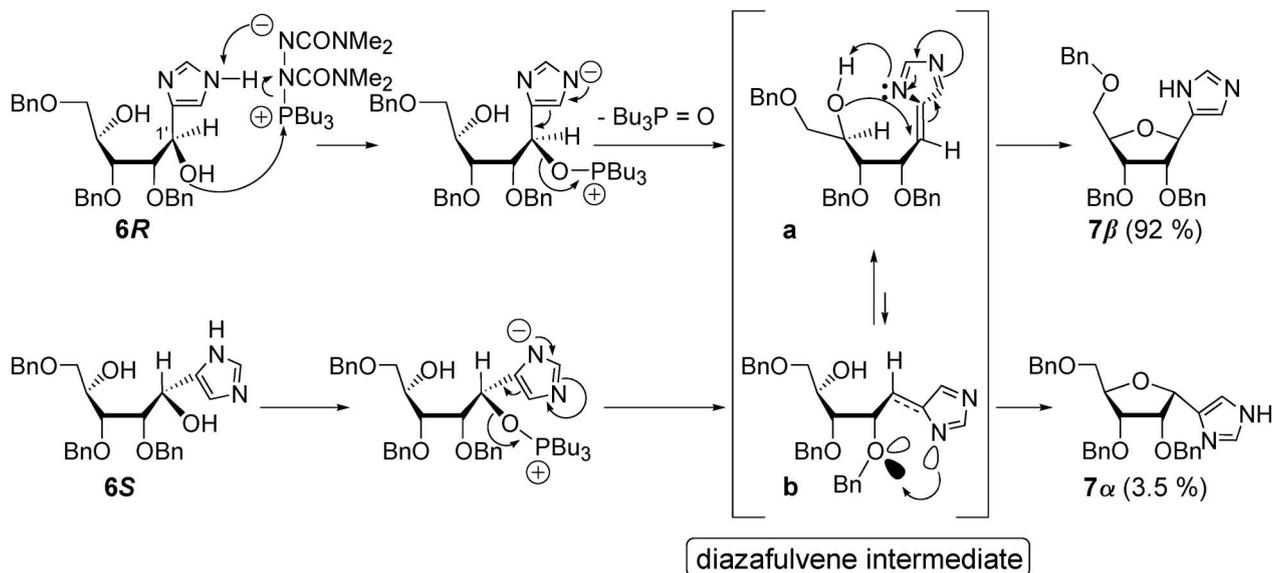
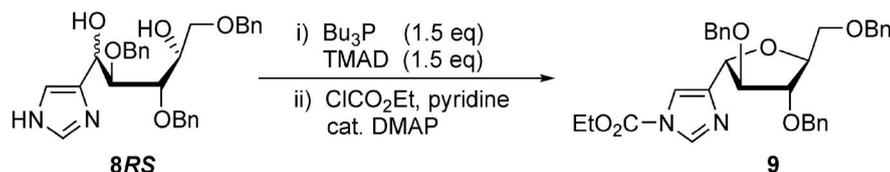
間体 **b** は 2'-OBn 基とイミダゾールの立体電子的反発により、安定な位置異性体 **a** を経て  $\beta$  体が立体選択的に生成したと推定した。そのため糖の 2'-位の置換基がグリコシド結合の立体配置を制御する directing group として働いていると考えた。

### 2-2. $\alpha$ -L-アラビノフラノシルイミダゾールの立体選択的合成<sup>8)</sup>

このように、2'-OBn 基が生成物の立体配置を制御する主要因子であるならば、C2'-位水酸基の配置がリボースと逆のアラビノースを用いることにより  $\alpha$ -ヌクレオシドが生成することになる。またこれは後述する  $\text{H}_3\text{R}$  リガンドへの応用を期待したものであった。

まず  $\alpha$ -L-アラビノフラノシルイミダゾールの合成においてトリベンジラルアビノースとリチオイミダゾールのカップリング反応により得られたジオール体 **8RS** の閉環反応について、溶媒や温度を変えて反応条件を検討した。この際、副生するトリブチルホスフィンオキシドとの単離精製が容易なエトキシカルボニル体 **9** に変換した後、 $\alpha/\beta$  比を調べた (Table 1)。

溶媒がベンゼンでは  $\alpha/\beta=9/1$  であったが (Run 2)、溶媒を THF に変えると  $\alpha$  選択性は低下した (Run 1)。しかし、ジクロロメタン、 $0^\circ\text{C}$  では  $\alpha$  選択性は向上し、 $-35^\circ\text{C}$  では  $\alpha/\beta=20/1$  の高い立体選択性を示した (Run 4, 5)。溶媒効果の理由は明らかでないが、本反応のアノマー選択性は 2'-位の置換基による配向性ととも溶媒の種類によって影

Scheme 2. Mechanistic Consideration on  $\beta$ -Stereoselective GlycosidationTable 1. Cyclization of **8RS** via Diazafulvene Intermediate

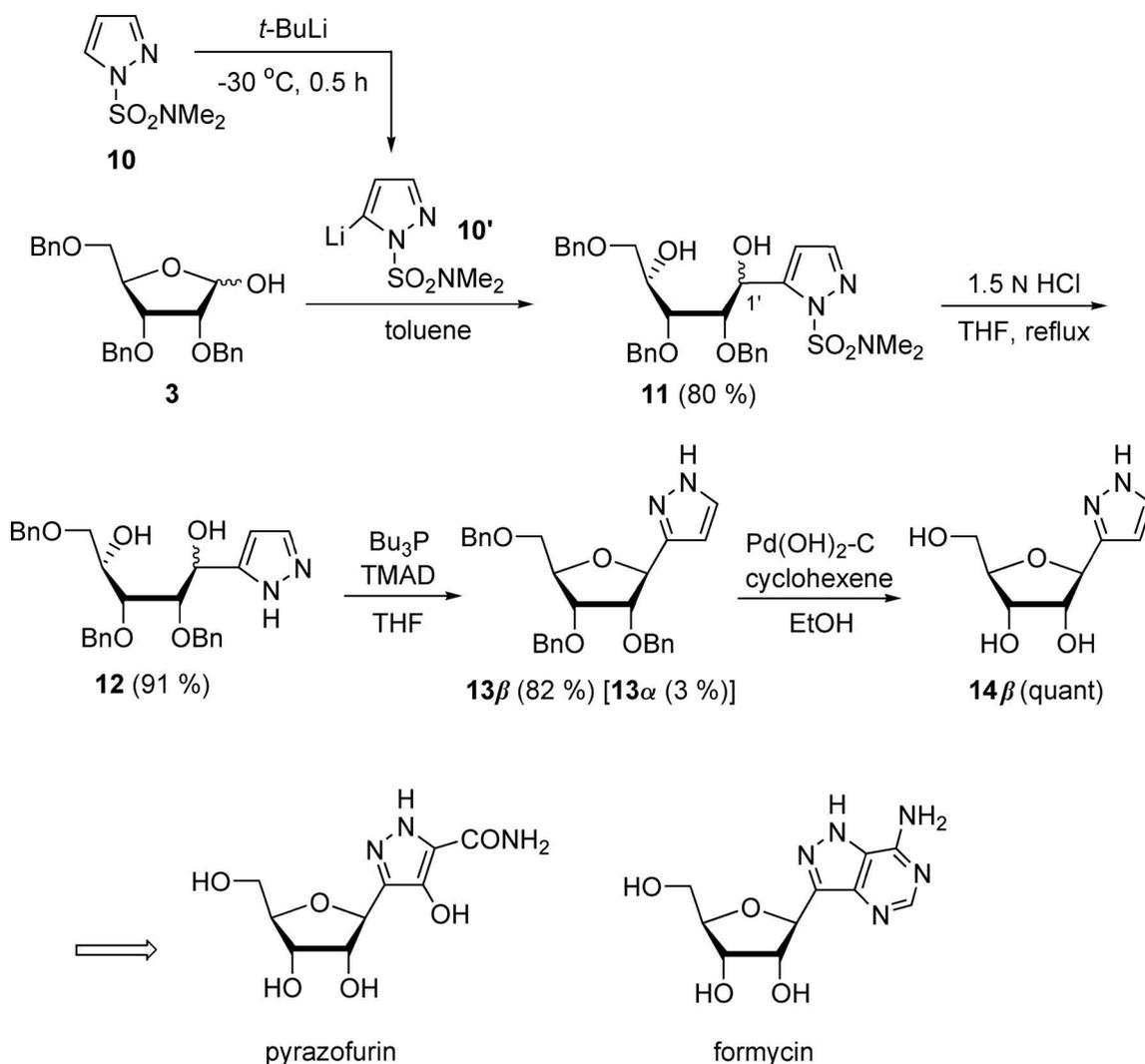
Run	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%)	9 $\alpha$ /9 $\beta$
1	THF	rt	overnight	95	4.5/1
2	benzene	rt	overnight	89	9/1
3	toluene	0	2	82	9.5/1
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	2	64	15/1
5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-35	1.5	95	20/1

響を受けることがわかった。

**2-3. ピラゾール C-ヌクレオシドの合成<sup>9)</sup>** このように C-ヌクレオシド合成の反応条件を種々検討した上で塩基をイミダゾールからピラゾールに変えると、抗生物質ピラゾフリンとホルマイシンの共通合成中間体である  $\beta$ -ピラゾール C-ヌクレオシドの合成が可能である。そこで、次にピラゾール C-ヌクレオシド合成を検討した (Scheme 3)。ピラゾールのリチウム塩 **10'** とトリベンジル体 **3** の付加体 **11** のピラゾールの保護基を除去して得られたジオール体 **12** の閉環反応は、 $\beta/\alpha=27.3/1$  の高い立体選択性で  $\beta$  体を得ることができた。得られたトリベンジル体 **13 $\beta$**  を接触還元により脱ベンジル化することで  $\beta$ -ピラゾール C-ヌクレオシド **14 $\beta$**  が高

収率で得られ、ピラゾフリン、ホルマイシンの形式全合成を達成することができた。<sup>9)</sup> これにより、ジアザフルベン中間体を経由する C-ヌクレオシド合成法が、他のヘテロ環 C-ヌクレオシドの合成にも有用であることが明らかとなった。

われわれが開発した無置換イミダゾールからジアザフルベンを発生させる手法では、1,4-ジオール化合物の 1' 位水酸基が、選択的に活性化されるため、生成物の立体化学の予想が容易であるという利点がある。一方、Benhida らは、この手法を他のアゾール類、ベンゾイミダゾール、インドールに拡張し、いずれも  $\beta$ -ヘテロ環 C-ヌクレオシドの高選択的合成を達成している。<sup>10)</sup> このようにわれわれの開発した C-ヌクレオシド合成は、適用範囲の広い反

Scheme 3.  $\beta$ -Stereoselective Synthesis of Pyrazole C-Nucleosides

応である。

### 3. ヒスタミン $\text{H}_3$ , 及び $\text{H}_4$ 受容体リガンドへの応用

**3-1. ヒスタミン  $\text{H}_3$ , 及び  $\text{H}_4$  受容体** ヒスタミンは、炎症、アレルギー、胃酸分泌、神経伝達といった様々な応答を媒介する生理活性アミンであり、 $\text{H}_1$  アンタゴニストは、抗アレルギー剤として、 $\text{H}_2$  アンタゴニストは、抗潰瘍剤として多大な恩恵をもたらした。さらに、最近になってヒスタミン  $\text{H}_3$  受容体 ( $\text{H}_3\text{R}$ ) と  $\text{H}_4$  受容体 ( $\text{H}_4\text{R}$ ) が発見され、ヒスタミン研究の中心は  $\text{H}_3\text{R}$  と  $\text{H}_4\text{R}$  に移っている。脳内のヒスタミン神経系は、後部視床下部の結節乳頭核から脳のすべての領域に出力している。ヒスタミン神経線維には多数のバリコシティーと呼ばれる軸索瘤があり、ヒスタミン  $\text{H}_3$  受容体 ( $\text{H}_3\text{R}$ ) は神

経終末とバリコシティーの表面に存在し、ヒスタミンの遊離と合成を調節するオートレセプターとして働いている (Fig. 2).<sup>11)</sup> 放出されたヒスタミンが、この  $\text{H}_3\text{R}$  に結合すると、負のフィードバックによりヒスタミンの遊離が抑制される。このため  $\text{H}_3\text{R}$  アゴニストはヒスタミンの遊離を抑制し、反対に  $\text{H}_3\text{R}$  アンタゴニストはヒスタミンの遊離を促進する。<sup>12,13)</sup> また  $\text{H}_3\text{R}$  は、他の神経伝達物質を制御するヘテロレセプターとしても機能している。ヒスタミンは、覚醒や脳の賦活化に関与することから、 $\text{H}_3\text{R}$  アンタゴニストはアルツハイマー病などの認知障害、肥満、睡眠発作、てんかんなどの治療薬として期待され、一方  $\text{H}_3\text{R}$  アゴニストは、不安や不眠症、偏頭痛への有効性に加えて、末梢では気管支喘息の治療薬の標的になっている。

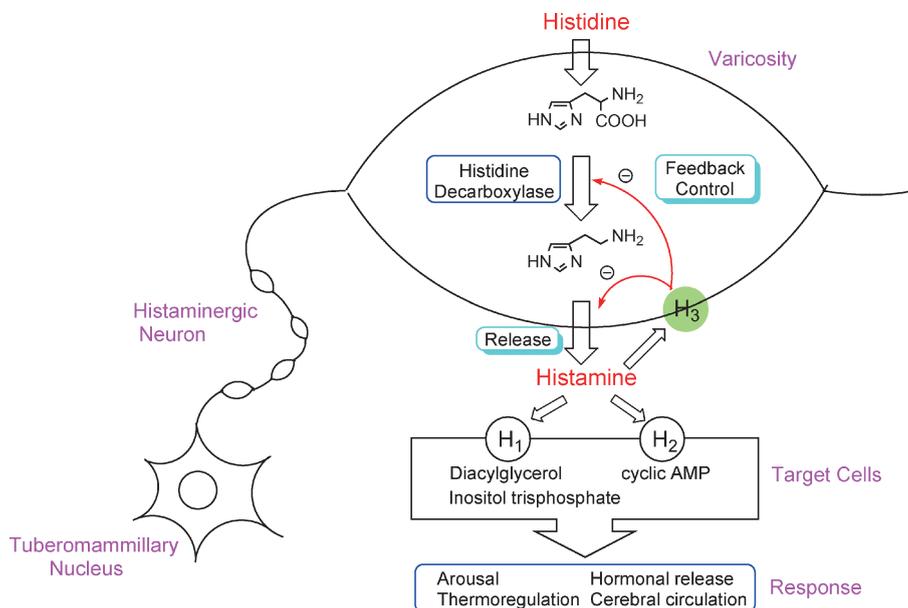


Fig. 2. A Schematic Representation of the Central Histaminergic Neurons

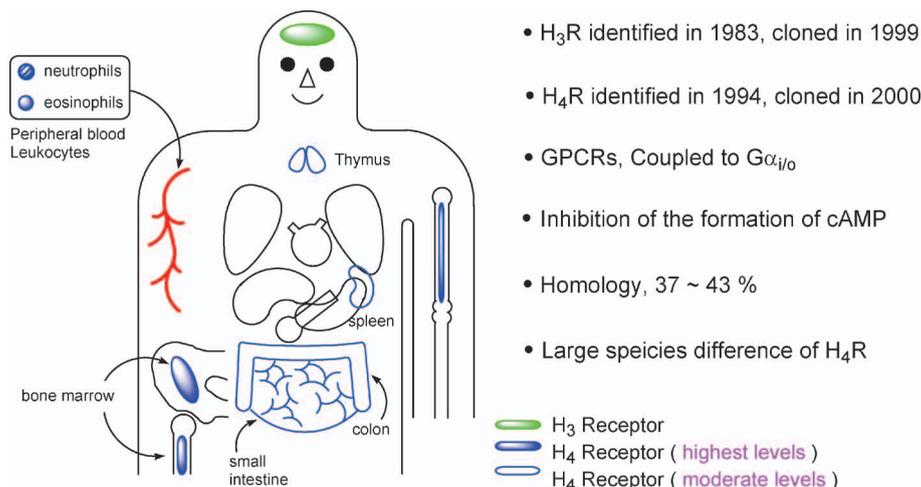


Fig. 3. Comparison between H<sub>3</sub>R and H<sub>4</sub>R

H<sub>3</sub>R は 1983 年に Arrang ら<sup>11)</sup>によって同定され、1999 年に Lovenberg ら<sup>14)</sup>によってクローニングされた。一方、H<sub>4</sub>R は 2000 年にヒトゲノムデータベースに基づき、いくつかのグループがクローニングを報告した。<sup>15)</sup> H<sub>3</sub>R と H<sub>4</sub>R は同じ Gi 結合型 GPCR (G タンパクサブタイプ i 結合型レセプター) であり、そのアミノ酸配列は約 40% の相同性を持っている。また、H<sub>4</sub>R ではその動物間種差が大きいことが特徴である (Fig. 3)。しかし、特に注目すべきはその発現部位で、H<sub>4</sub>R は骨髄、末梢白血球、胸腺、脾臓、小腸、結腸など多岐にわたって

存在しているのに対し、ヒスタミン H<sub>3</sub>R は脳に局限して存在している。

**3-2. テトラヒドロフランイミダゾールの合成研究<sup>16,17)</sup>** われわれが、ヒスタミンリガンドへの応用研究を始めた頃、ヒスタミン及びヒスタミンアゴニストの活性立体配座についてはいくつか報告がなされていた。それらはアミノ基とイミダゾールが分子内水素結合を形成したコンパクトな立体配座 A と、伸びた形 B とする相反する報告であった (Fig. 4)。

1995 年、Timmerman らはヒスタミンの中間鎖を

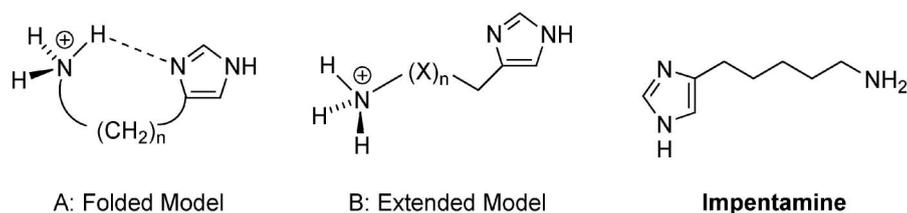


Fig. 4. Two Bioactive Conformations and Impentamine

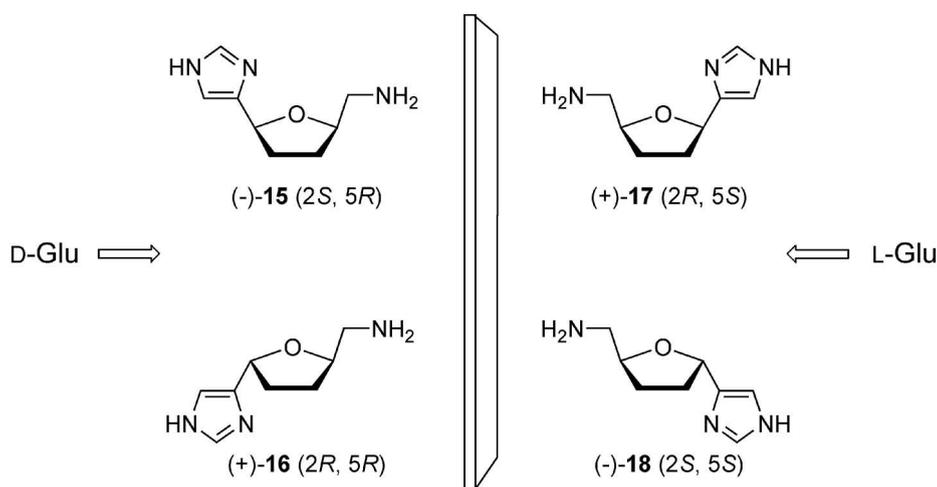


Fig. 5. Four Stereoisomers of 5-(Aminomethyl)tetrahydrofuran-2-ylimidazoles

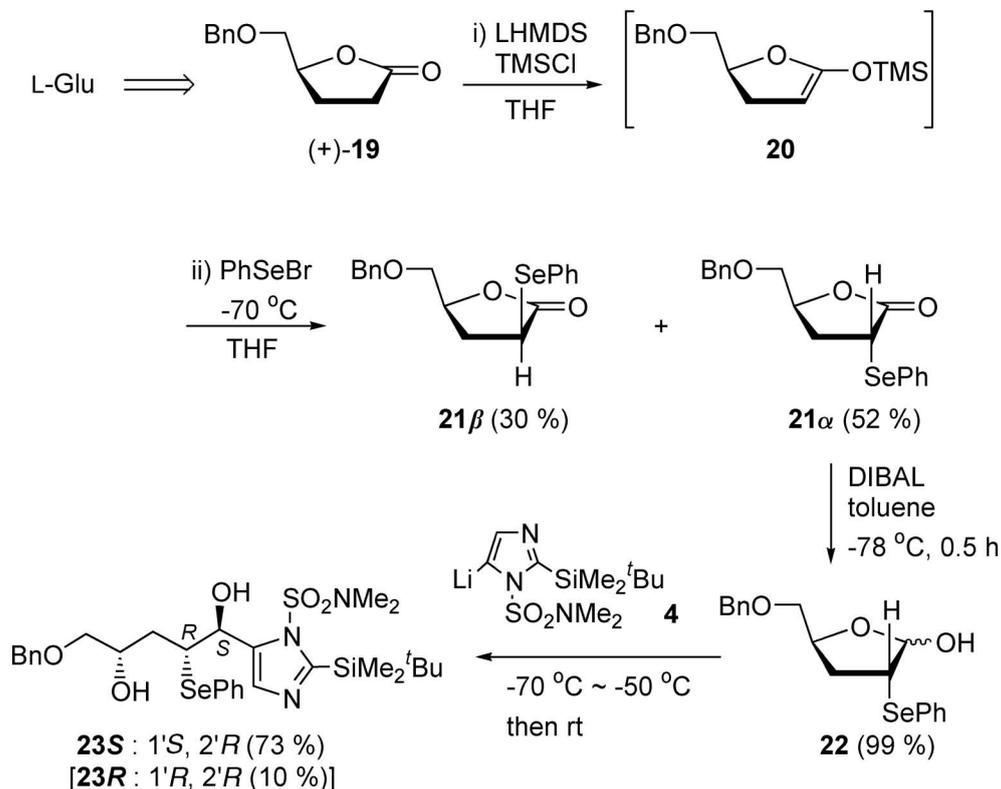
C<sub>2</sub> から C<sub>3</sub> に延長すると強力な H<sub>3</sub>-アンタゴニストになることを見出し、これをイムペンタミンと名づけた (Fig. 4).<sup>18)</sup> のちに、彼らはヒトの H<sub>3</sub>R でイムペンタミンの再評価を行ったところアゴニスト活性を示したと発表している。<sup>19)</sup>

われわれは、この報告からイムペンタミンをテトラヒドロフラン環に組み込むことで H<sub>3</sub>R に対する活性配座を解明することができるのではないかと考えた。そこで最初の標的化合物として、イミダゾール C-ヌクレオシドの 5'-位水酸基をアミノ基に変換し、2', 3'-位の水酸基を除去した 4-(5-アミノメチルテトラヒドロフラン-2-イル) イミダゾールのトランス体とシス体、さらにそれぞれの鏡像体の 4 異性体をデザインした (Fig. 5)。想定した 4 異性体のうち、シス体で H<sub>3</sub>R アゴニスト活性が認められれば、分子内水素結合を持つ A の配座が考えられ、一方、トランス体に活性があれば B であるという仮説を立てた。これらの合成ではシス-トランスの立体選択的合成を避け、1 つの合成スキームの中で両異性体が同じ割合で生成する合成法を目指した。

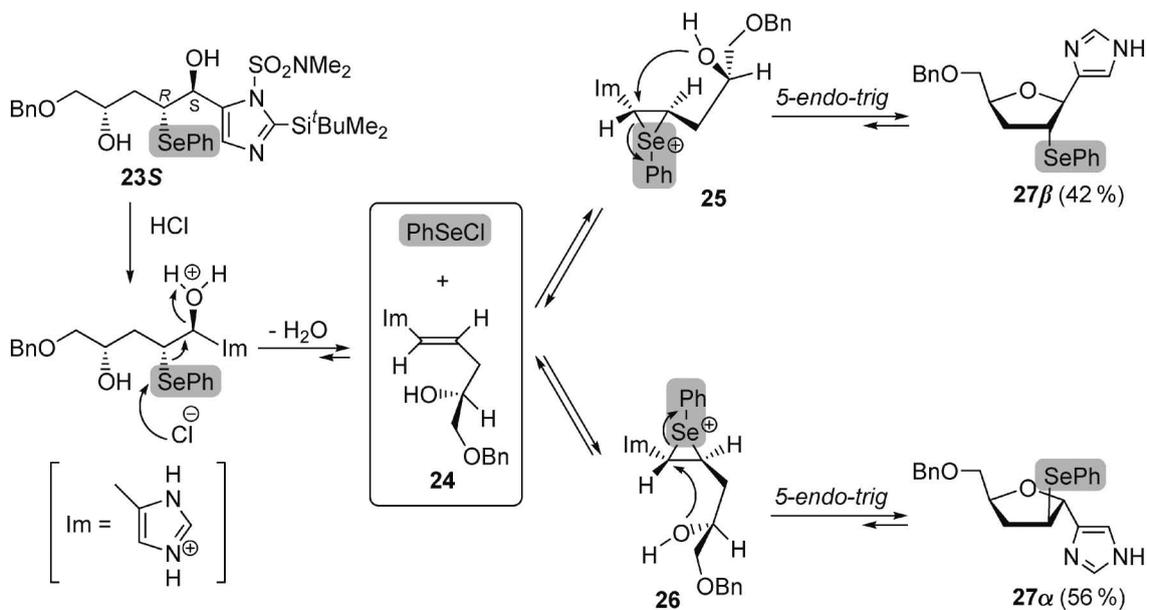
先のイミダゾール C-ヌクレオシドの立体選択的合成では、糖の 2 位の置換基が directing group として働き、アノマー位の立体配置を制御することから、 $\gamma$ -ブチロラクトン **19** の 2 位にあらかじめ directing group として PhSe 基を導入し、それによって生じたシス-トランス生成物から PhSe 基を除去する方法を検討することにした (Scheme 4)。

L-グルタミン酸から得られる  $\gamma$ -ブチロラクトン (+)-**19** にリチウムビストリメチルシリルアミド、トリメチルシリルクロリドを加え、シリルケテンアセタール **20** とした後、PhSeBr を加え、2 種のセレンラクトン **21 $\alpha$** , **21 $\beta$**  を得た。主生成物の  $\alpha$ -セレンラクトン **21 $\alpha$**  を DIBAL 還元してラクツール **22** とした後、リチオイミダゾール **4** を反応させ、1'S, 2'R のアンチ-ジオール **23S** を 73%、1'R, 2'R のシン-ジオール **23R** を 10% で得ることができた (Scheme 4)。

続いて、アンチ-ジオール **23S** のイミダゾールの脱保護を目的として塩酸で還流すると、先のイミダゾール C-ヌクレオシド合成とは異なり、一挙に  $\beta$ -及び  $\alpha$ -配置の C2'-PhSe 基を持つテトラヒドロフラン体 **27 $\beta$**  (42%)、**27 $\alpha$**  (56%) が得られた (Fig.



Scheme 4. Synthesis of 1', 2'-Anti-diol 23S

Fig. 6. Postulated Mechanism of the Formation of 27 $\alpha$  and  $\beta$ 

6). 本反応のメカニズムは、23Sのイミダザールの脱保護と同時に求核性の高い塩素イオンがPhSe基を攻撃し、1,2-トランス脱離によりホモアリルアルコール24とPhSeClが反応系中に発生したと考え

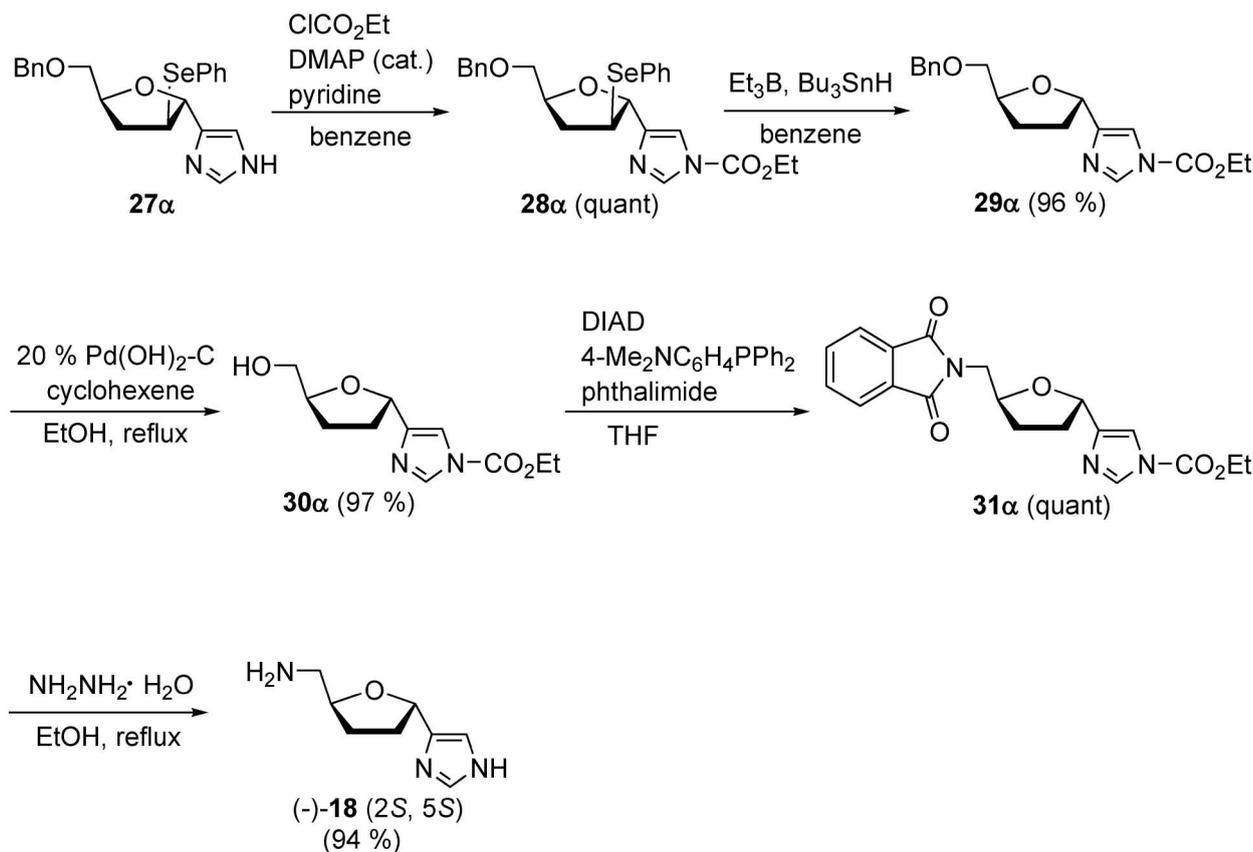
られる。ついでPhSeClが24の二重結合の上面と下面の両面から求電子的に接近し、エピセレンイウムイオン25、26を形成することで4'-位水酸基のセレンエーテル化反応により一挙にテトラヒドロフラン

体 **27 $\beta$** ,  $\alpha$  を与えたと考えられる. 中間体 **24** は, **23S** の加水分解の条件によって生成し, 単離することができる. この **24** と PhSeCl を THF 中で還流すると, 2 種の閉環体 **27 $\alpha$** ,  $\beta$  が **23S** の塩酸処理とほぼ同じ比率で高収率で得られることもこの反応機構を支持した.

このように PhSe 基を持つ C1',2'-アンチジオールから直接 C-ヌクレオシドを合成する手法はこれまでになく, また塩酸で還流するだけで, イミダゾールの脱保護, ホモアリルアルコールの生成, セレノエーテル化によるテトラヒドロフラン環の形成が進行するドミノ型反応でもある. この方法を, 先に副成した  $\beta$ -セレノラクトン **21 $\beta$**  に適用しても, 2 つのテトラヒドロフラン体 **27 $\alpha$** ,  $\beta$  が生成し, その生成比も **21 $\alpha$**  からの場合とほぼ同じであったことから, PhSe 基の立体配置の異なる合成中間体 **21 $\alpha$** ,  $\beta$  のいずれからも無駄なくテトラヒドロフラン体が合成できる効率合成法となった. このようなセレン原子の特性を活かした C-ヌクレオシド合成は今までにない新規合成法である. 得られたテトラヒドロ

フラン体 **27 $\alpha$**  は Scheme 5 に示すように 5 工程で目的のアミノ体 (–)-**18** へと変換できた. また (–)-**18** の合成と同様にして (+)-**17** を合成した. さらにこの方法を D-Glu に適用することでエナンチオマーを含む 4 種のテトラヒドロフランイミダゾールを合成することに成功した.

**3-3. イミフラミン誘導体のマイクロダイアリス法による評価<sup>16)</sup>** 共同研究者の大和谷らは, 合成した 4 つの化合物を用いて, マイクロダイアリス法 (脳微小透析法) により, 生きたラットの脳におけるヒスタミンの遊離への影響を最初に調べたところ, これらの中で (+)-(**2R, 5R**)-**16** (イミフラミン) のみが H<sub>3</sub>R アゴニスト作用を示した (Fig. 7). 人工脳脊髄液にイミフラミンの 10  $\mu$ M 溶液を投与するとヒスタミンの遊離は 30% 近くまで減少した. さらに 1 時間半後に 10  $\mu$ M の既存の H<sub>3</sub>R-アンタゴニスト, クロベンプロピットを同時に灌流させると, ヒスタミンの遊離が 160% まで増加した. このように, クロベンプロピットはイミフラミンの効果に拮抗したことから, イミフラミンの作用発現が



Scheme 5. Synthesis of (–)-5-(Aminomethyl) tetrahydrofuran-2-ylimidazole **18**

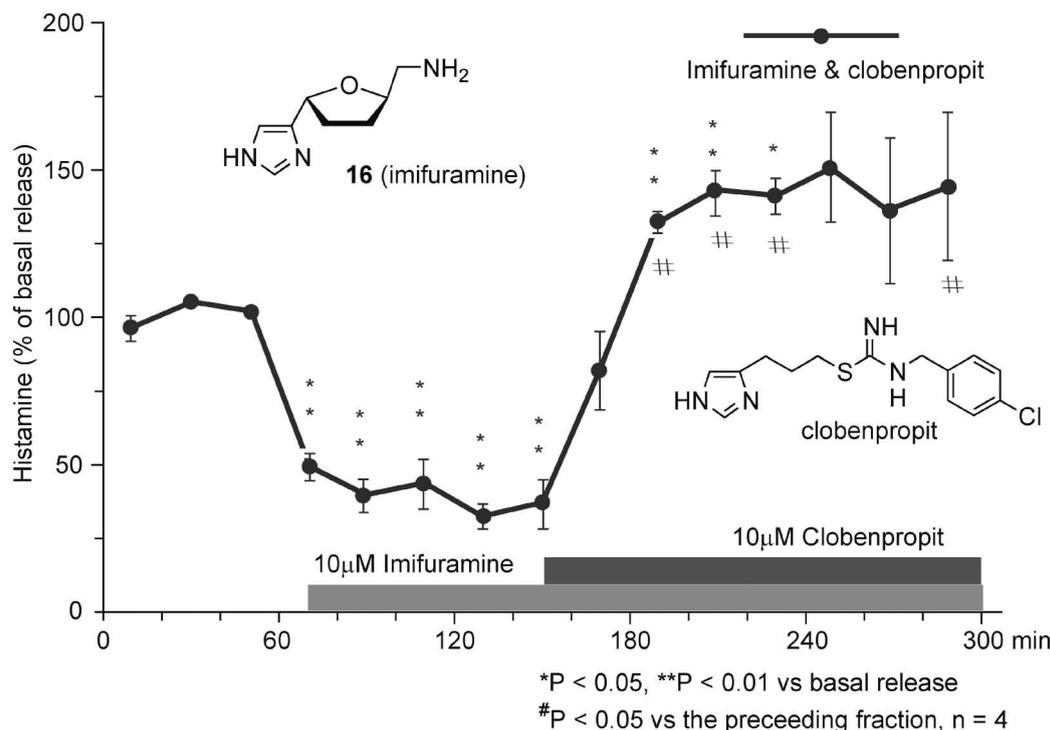


Fig. 7. Effect of Imifuramine and Clobenpropit on the *in vivo* Release of Histamine

脳に局在する  $H_3R$  受容体を介したものであることを支持した (クロベンプロピットとイミフラミンは、末梢に存在する  $H_4R$  に対してはアゴニストとして作用する)。また、その作用は、既存の  $H_3R$  アゴニスト、イメピップに相当する強力なものであった。この結果、 $H_3R$  アゴニストの作用発現に対し、構造上分子内水素結合を取り得ないイミフラミンがアゴニスト活性を示したことで、分子内水素結合が直接アゴニスト作用発現に関与していないことも示唆した。

**3-4. イミフラミン誘導体のヒトの  $H_3R$  及び  $H_4R$  による評価<sup>20)</sup>**  $H_3R$  は  $H_4R$  と相同性が高いため、既存の  $H_3R$  リガンドは  $H_4R$  とも作用する。そのため、 $H_3R$  選択的リガンドは多数みつけれられていたものの、 $H_4R$  に対する特異的リガンドは 2003 年の時点では知られていなかった。そこで、われわれが合成した化合物の中から  $H_3R$  作用の認められるいくつかの化合物について、ヒトの小児がん (SK-N-MC 細胞) に強制発現させたヒト  $H_3R$  ( $hH_3R$ ) 及び  $H_4R$  ( $hH_4R$ ) を用いて評価を行ったところ、 $hH_3R$  と  $hH_4R$  に対して特異性を示す分子を見つけることができた (Fig. 8).<sup>20)</sup> イミフラミンは、 $hH_3R$  に対して最も強いアゴニスト活性 ( $pEC_{50}=7.4$ )

を示したが、 $hH_3R$  と  $hH_4R$  の選択性という意味ではエナンチオマーの **18** (2*S*, 5*S*) 体が 300 倍もの選択性を示した。最も興味深い化合物は、イミフラミンのシアノグアニジン体 OUP-16 とシス-アミンのシアノグアニジン OUP-13 で、これらは  $hH_4R$  に対して特異的アゴニスト活性を示し、またその選択性はそれぞれ 41 倍、46 倍であった。また、ヒスタミンの最大反応を 1 とした最大効果  $\alpha$  は、OUP-16 では、 $hH_3R$  で 0.8 が、 $hH_4R$  で 1.0 に上昇し、OUP-13 では、 $hH_3R$  の 0.4 が、 $hH_4R$  で 1.0 に上昇した ( $\alpha=0.4$  というのは、用量を増加してもヒスタミンに比べ 40% で頭打ちになる部分アゴニストということを意味する)。OUP-13 と OUP-16 は、 $\alpha$  値が 1.0 であることから、 $hH_4R$  の完全アゴニストであることをよく示した。これらは 2000 年に発見された  $hH_4R$  に特異性を示した最初の化合物となった。 $hH_4R$  リガンドは、新しいタイプの抗アレルギー剤の標的として開発が急がれているが、現状ではアンタゴニストとアゴニストのいずれが治療薬となるかは明確でない状況にある。

**4. イミダゾール C-ヌクレオシドホスホロアミダイト合成：リボザイムの反応機構解明への応用**

**4-1. イミダゾールによる触媒活性の回復** 近

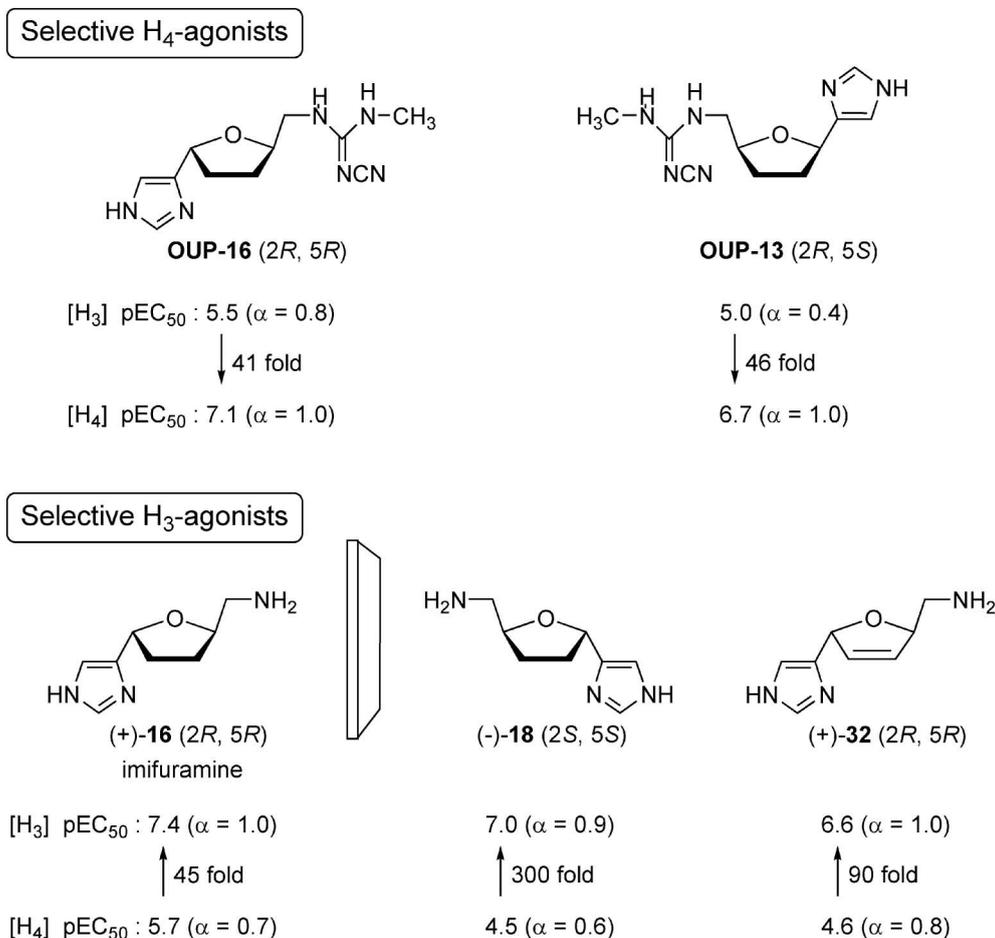


Fig. 8. Selectivity of Imifuramine Derivatives for hH<sub>3</sub>R and hH<sub>4</sub>R Expressed in SK-N-MC Cells

年になって、酵素に匹敵する触媒活性を示す RNA であるリボザイムが発見された。<sup>21)</sup> リボザイムには自己切断活性を持つものと、自己スプライシング活性を持つものがある。そのうち自己切断型にはハンマーヘッド、HDV、ヘアピン、VS、GlmS の 5 種があり、それぞれ RNA の特定の部位のリン酸ジエステル結合の切断-連結反応を触媒している。<sup>22)</sup>

HDV リボザイムの活性中心である 75 位のシトシンは、一般酸-塩基として切断部位の 2'-水酸基を攻撃し、リン酸ジエステル結合を位置特異的に切断することで 2',3'-環状ホスフェートと 5'-末端を与える (Fig. 9)。この反応は可逆的であり、環状ホスフェートと 5'-末端の連結反応も同様に一般酸-塩基反応によって起こると考えられている。

この活性中心のシトシンをウラシルに変異すると不活性化し、自己切断活性は失われるが、Been らはこのウラシル変異体にイミダゾール緩衝液を外部添加するとイミダゾールが一般酸-塩基触媒として

働き、自己切断活性が回復することを見出し、これを imidazole rescue と呼んだ。<sup>23)</sup> HDV リボザイムの X 線結晶構造解析では、活性サイトが外側に向かって開いていることから、溶媒中のイミダゾールが基質に接近し易いためと考えられている。したがって、この現象はいつも起こるとは限らないものである。

一方、VS リボザイムは自己切断型の中で最大のもの (~150 nt) で、結晶構造の知られていない唯一の自己切断型リボザイムある。<sup>22)</sup> そのため、ごく最近まで明確な活性中心の特定がなされておらず、2, 3 のグループにより A730 ループ内の A756 が活性中心として働いている可能性が示唆されていたに過ぎなかった (Fig. 10)。

共同研究者の Lilley らは、この A756 のアデニンをグアニンに変異した VS リボザイムを合成し、イミダゾール緩衝液の添加を行ったが、自己切断活性の回復はみられなかった。<sup>24)</sup> これは VS リボザイム

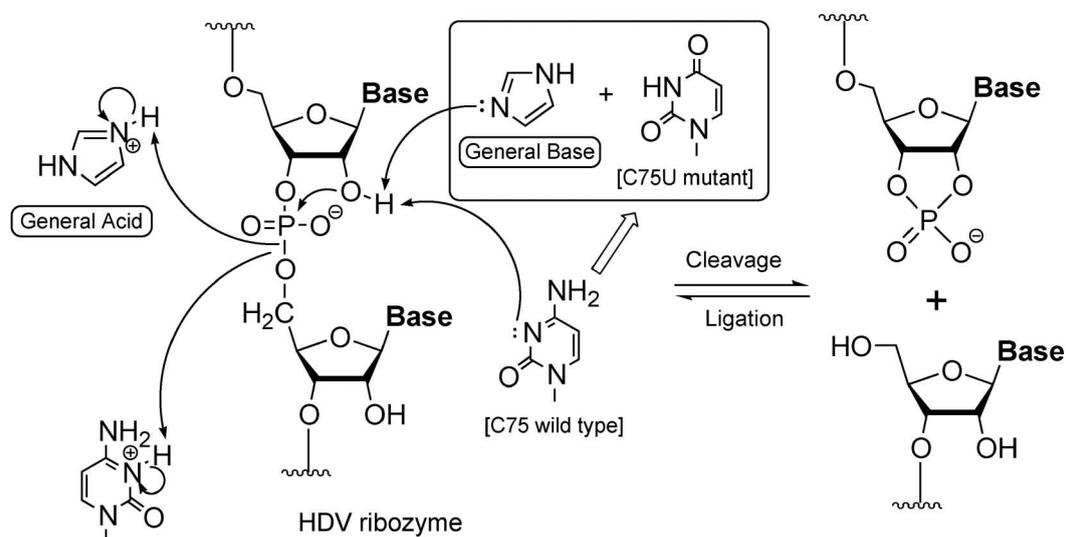


Fig. 9. Imidazole Rescue of C75UHDV Ribozyme

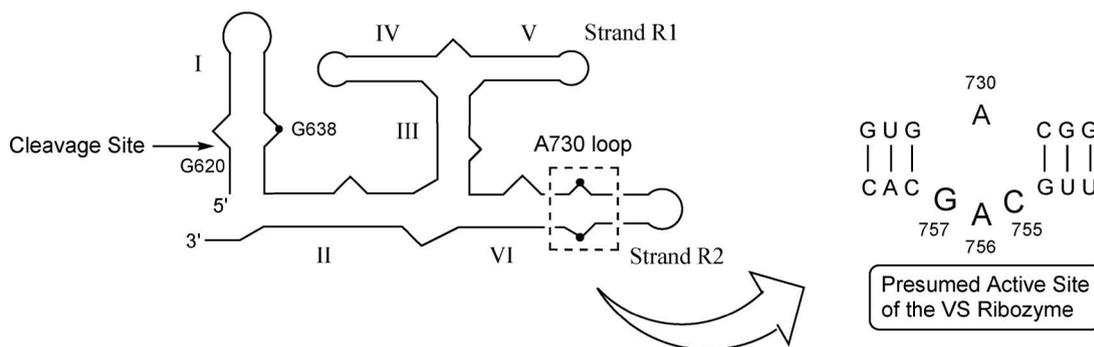


Fig. 10. Schematic of VS Ribozyme

の場合、活性サイトがヘリックス II と VI の内側に折れた溝の中に埋もれているため、イミダゾールが接近することができないと考えられている。これらから、酸-塩基触媒であるイミダゾール ( $pK_a=7.1$ ) を直接リボザイムの重要塩基と置換したイミダゾール置換リボザイムを化学合成し、その触媒活性の回復により、元のリボザイムの塩基が直接触媒反応に関与していることを示す新しい **chemogenetic method** となると考えた。そこでトリベンジル体 **7 $\beta$** <sup>7)</sup> を用いて、イミダゾール置換 VS リボザイムの合成ユニット、新規イミダゾール C-ヌクレオシドホスホロアミダイト (Imz-PA) の合成研究を開始した。

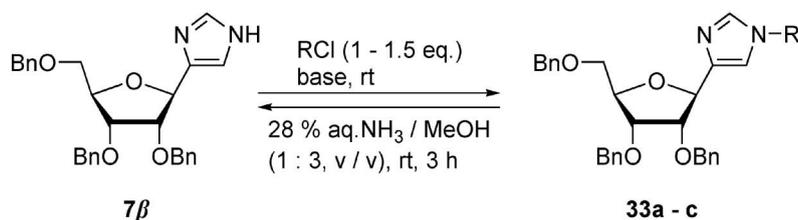
#### 4-2. イミダゾール窒素の保護基の開発<sup>25,26)</sup>

Imz-PA 合成において最初の問題は、RNA 合成のためのイミダゾール窒素の保護基の開発であり、  
i) RNA 自動合成において安定であること、ii) 脱

保護条件(緩やかな塩基性条件下)で除去できること、  
iii) **7 $\beta$**  の脱ベンジル化に対して安定であることを必要とした。そこでこれらの条件を満たす保護基の検討を種々行った。

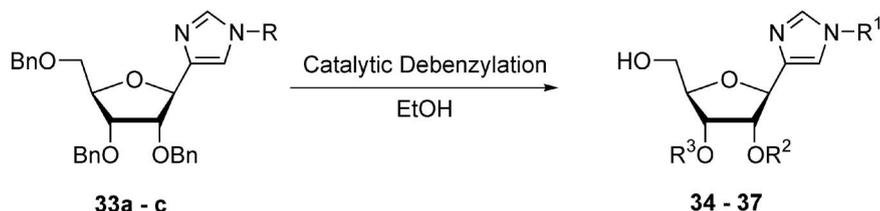
シチジンの保護基としてよく用いられるアニソイル (An) 基、アミノ酸の保護基であるトリクロロエトキシカルボニル (Troc) 基、アルカリ性条件下で除去できるピバロイルオキシメチル (POM) 基に関して調べた。An 基、Troc 基、POM 基はいずれも高収率でイミダゾール窒素に導入することができ、**33a-33c** (74-94%) を与えた (Table 2)。そこでアンモニアによるイミダゾール窒素の置換基の除去について検討したところ、通常の RNA 自動合成における脱保護条件 (アンモニア:メタノール=3:1, 60°C) よりも緩やかな反応条件 (アンモニア:メタノール=1:3, 室温) でこれらの 3 つの保護基は除去でき、中でも POM 基は 92% の高収率であ

Table 2. Preparation of N-Protected Imidazole



Run	Reaction Condition (eq., h)	33 (%)	33 to 7β (%)
1	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COCl (1.1), <sup>t</sup> Pr <sub>2</sub> NEt, pyridine, 1.5	33a, 74	73
2	Cl <sub>3</sub> CCH <sub>2</sub> OCOCl (1.1), DMAP, benzene, 4	33b, 89	89
3	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl (1.5), NaH, THF, 3	33c, 94	92

Table 3. Catalytic Debenzylation of N-Protected Imidazoles



Run	Reaction conditions	Product	Yield (%)
1	33a (An), H <sub>2</sub> /10% Pd-C (3 kg/cm <sup>2</sup> ), 16 h	34, R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> , R <sup>3</sup> =H	quant
2	33b (Troc), H <sub>2</sub> /5% Pd-C (1 kg/cm <sup>2</sup> ), 6 h	34, R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> , R <sup>3</sup> =H	quant
3	33c (POM), H <sub>2</sub> /10% Pd-C (3 kg/cm <sup>2</sup> ), 16 h	35, R <sup>1</sup> =POM, R <sup>2</sup> , R <sup>3</sup> =Bn 36, R <sup>1</sup> =POM, R <sup>2</sup> =Bn, R <sup>3</sup> =H or R <sup>1</sup> =POM, R <sup>2</sup> =H, R <sup>3</sup> =Bn	22 32
4	33c (POM), 20% Pd(OH) <sub>2</sub> -C, cyclohexene, reflux, 3 h	37, R <sup>1</sup> =POM, R <sup>2</sup> , R <sup>3</sup> =H	quant

った。

続いて、これらの化合物 (33a-c) の接触還元による脱ベンジル化の挙動について検討した (Table 3)。An 基及び Troc 基で保護したトリベンジル体は、脱ベンジル化と同時にそれらも除去され無保護のトリオール体 34 を与えたため、イミダゾール窒素の保護基として適用できなかつた (Run 1, 2)。一方、POM 基で保護した 33c は、水素下、10% Pd-C で 16 時間処理すると脱ベンジル化が部分的に進行し、5'-位のみが脱保護された 35 と 2'-位あるいは 3'-位のいずれかが脱保護された 36 をそれぞれ 22%、32% で与えた (Run 3)。このように POM 基が接触還元抵抗したため、触媒に 20% Pd(OH)<sub>2</sub>-C を用い、水素源としてシクロヘキセンを用いてエタノール中、3 時間還流したところ、ベンジル基のみが完全に脱保護された目的の 37 を定量的に得ることに成功した (Run 4)。これらの結

果から、POM 基は脱ベンジル化に安定であり、アンモニアで容易に除去できるという先のイミダゾール窒素の保護基の必要条件 ii) と iii) を満たし、イミダゾール窒素の保護基として POM 基が優れていることが判明した。また POM 基をイミダゾール窒素の保護基として使用した例は今までになく、これが最初の例となった。

得られたトリオール体 37 の 5'-水酸基をジメトキシトリチル基で保護して 38 とした後、2'-水酸基を TBDMSOTf を用いてシリル化した。得られたシリル体は、カラムクロマトグラフィーにより 2'-シリル体 39a と 3'-シリル体 39b に分離してもすぐにマイグレーションしてしまうため、混合物のままアミダイト化に付し、目的の 3'-アミダイト体 41a を市販のトリベンジル D-リボースから総収率 < 5% ながら合成することに成功した (Scheme 6)。<sup>25,26</sup> PA 41a は、天然型 N-ヌクレシド PAs に比べ酸に敏感

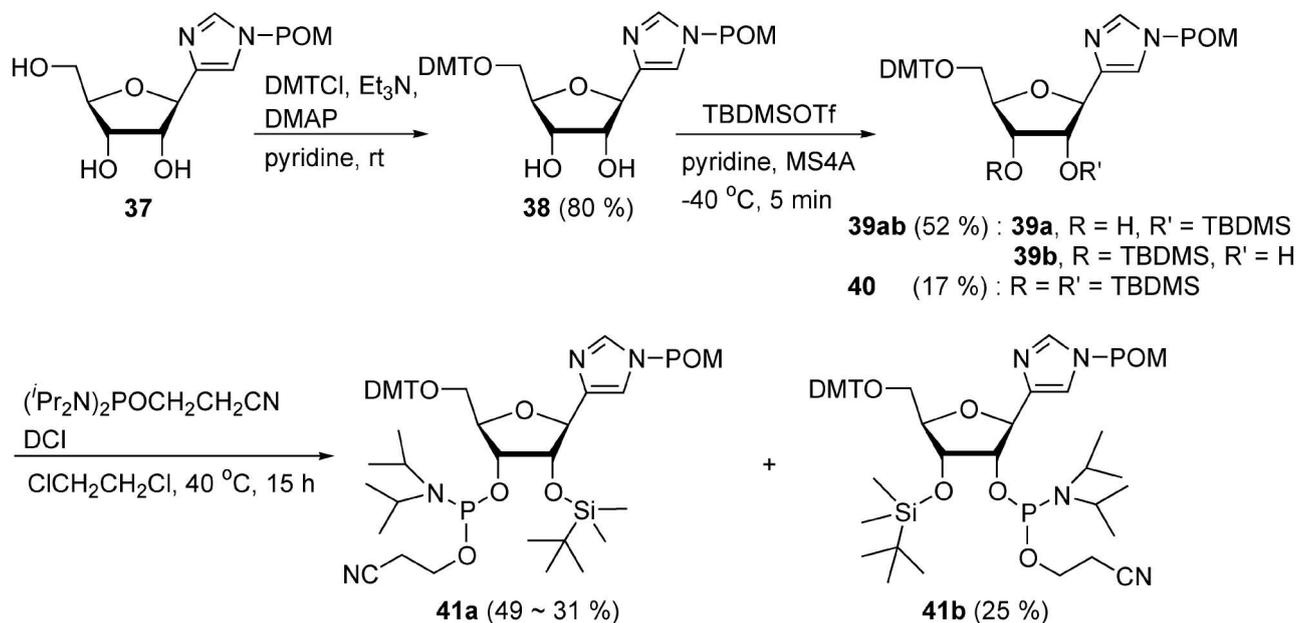
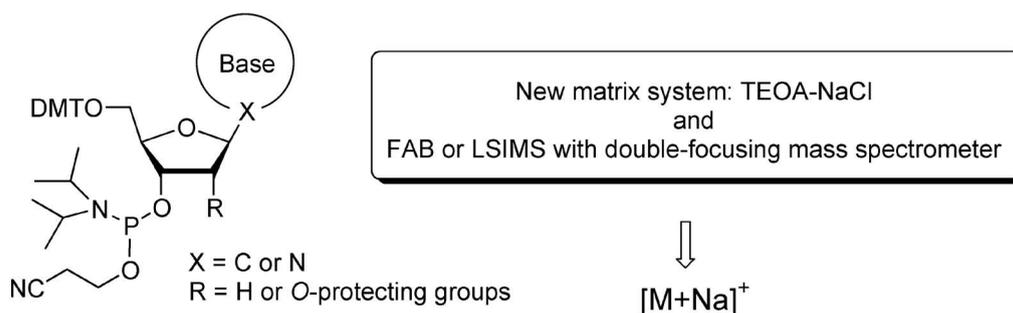
Scheme 6. Synthesis of 2'-O-TBDMS-C<sub>0</sub>-PA

Fig. 11. Accurate Molecular Weight Measurements of PAs

で通常の TLC プレート (Merck 60F<sub>254</sub>) 上でさえ分解してしまう。そのため、**41a** の精製には高修飾塩基性のシリカゲル (pH 10.1) を使用することでようやく単離できた。

**4-3. ヌクレオシドホスホロアミダイトの精密分子量測定法**<sup>27-29)</sup> このようにして得られた PA **41a** は、上述のように不安定な化合物であったため、分子量及び組成決定のためのマススペクトル (MS) 測定は、種々のイオン化法を用いても成功しなかった。われわれは、PA **41a** に対して二重収束質量分析計のイオン源として LSIMS あるいは FAB を用い、様々なマトリックスを用いて **41a** の MS 測定を試みたが成功しなかった。しかし、トリエタノールアミン (TEOA) にある種の金属イオンを添加した場合にのみ付加イオン分子 [M+

metal]<sup>+</sup> が検出できることが分かった。特に **41a** に TEOA-NaCl を使用した場合、安定した相対強度を持つナトリウム付加分子 {**41a**: C<sub>50</sub>H<sub>71</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>PSi, [M+Na]<sup>+</sup>; calculated: 953.4621, observed: 953.4625} を検出することに成功した。さらに、このマトリックスシステム (TEOA-NaCl) の一般性をみるため、様々な官能基を持つ多数のヌクレオシド及び非ヌクレオシド PAs に適応したところ、いずれも平均 mass error が 0.4 ppm 以下という高い精度で [M+Na]<sup>+</sup> の測定に成功し、その実用性を証明することができた (Fig. 11)。

**4-4. Imz-C<sub>2</sub>-PA のデザインと合成**<sup>30)</sup> 共同研究者の Lilley らは、VS リボザイム (trans-acting 型) を用いて、Imz-PA **41a** の RNA 自動合成におけるモノマーユニットとしての有用性を調べた (Fig.

10).<sup>31)</sup> 触媒活性中心とみなされていた A730 ループの A756 の位置へのイミダゾールの挿入は、平均カップリング収率 99% 以上であったことから、**41a** が自動合成に問題なく使用できることが明らかとなった。得られたイミダゾール改変リボザイム (A756ImzVS) は、基質の正しい位置でほぼ完全に切断及び連結反応が起こった。切断速度は天然型に比べて  $10^{-3}$  遅いものの ( $K_{\text{obs}}=0.01 \text{ min}^{-1}$ ), HDV リボザイムにおける imidazole rescue の速度に相当した。この結果は、A756 が VS リボザイムの触媒反応に直接関与することを強く支持したことから、イミダゾールを用いる新しい chemogenetic method を報告することができた。<sup>31)</sup> また、これはイミダゾールが擬核酸塩基として機能することを初めて示したものであった。さらに、**41a** から化学合成されたヘアピンリボザイムの G8 のイミダゾール改変体 (G8Imz) においても切断、連結反応が確かめられた。<sup>32)</sup> この場合、切断効率は、pH に依存し、ベル型のプロファイルを示すことから (至適 pH *ca.* 7.0), ヘアピンリボザイムにおける G8 の一般酸-塩基触媒の役割を強く支持した。

一方、最近になって Lilley らは、VS リボザイムの切断及び連結反応には A756 だけではなく基質ループの G638 が酸-塩基触媒の 2 番目の重要塩基であることを報告した (Fig. 10).<sup>33)</sup> それによると VS リボザイムの切断及び連結反応は A756 と G638 が切断部位のリン酸ジエステル結合に並列して配置し、それらの相互作用により一般酸-塩基触媒として機能する反応機構を提案していた (Fig. 12).

そこで、Imz-PA **41a** を用いて、VS リボザイムの G638 にイミダゾールを挿入したところ、先の A756 位での置換の場合と違い触媒活性はほとんどみられなかった。VS リボザイムの活性発現には G638 のグアニンの 1 位の窒素の重要性が示されていることから、<sup>33)</sup> この場合イミダゾールの 2 つの窒素のいずれもが自由度の小さな基質ループの G638 のグアニンの 1 位を占めることができなかつたためと考えられる。そこで、分子モデリング (Fig. 13) が示すようにイミダゾールと糖との間に 2 炭素増炭することでイミダゾールの窒素とグアニンの 1 位が重なり合う PA **54** (C<sub>2</sub>-Imz PA) を新たにデザインし、その合成研究を行った (Scheme 7).<sup>30)</sup>

新規 Imz-C<sub>2</sub>-PA **54** の合成においては、2'-位水酸

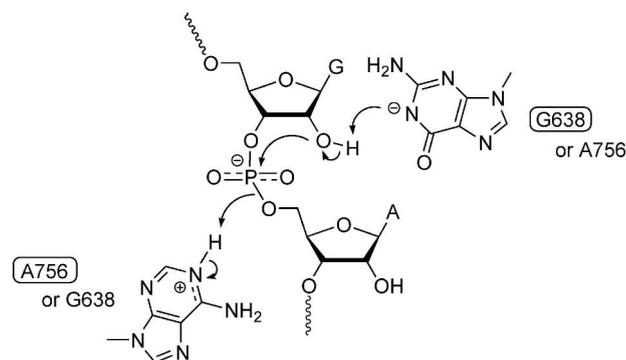


Fig. 12. General Acid-base Catalysis via the Combination of G638 and A756

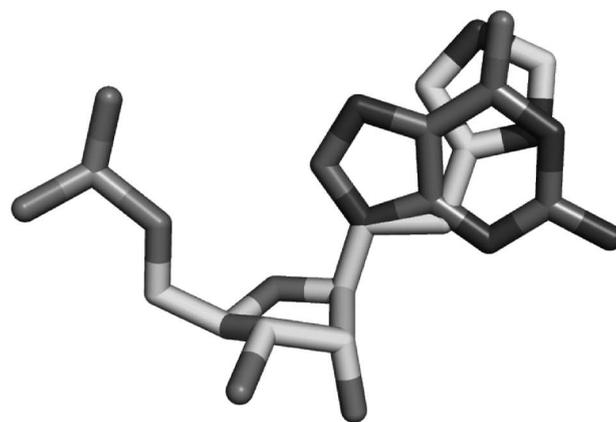
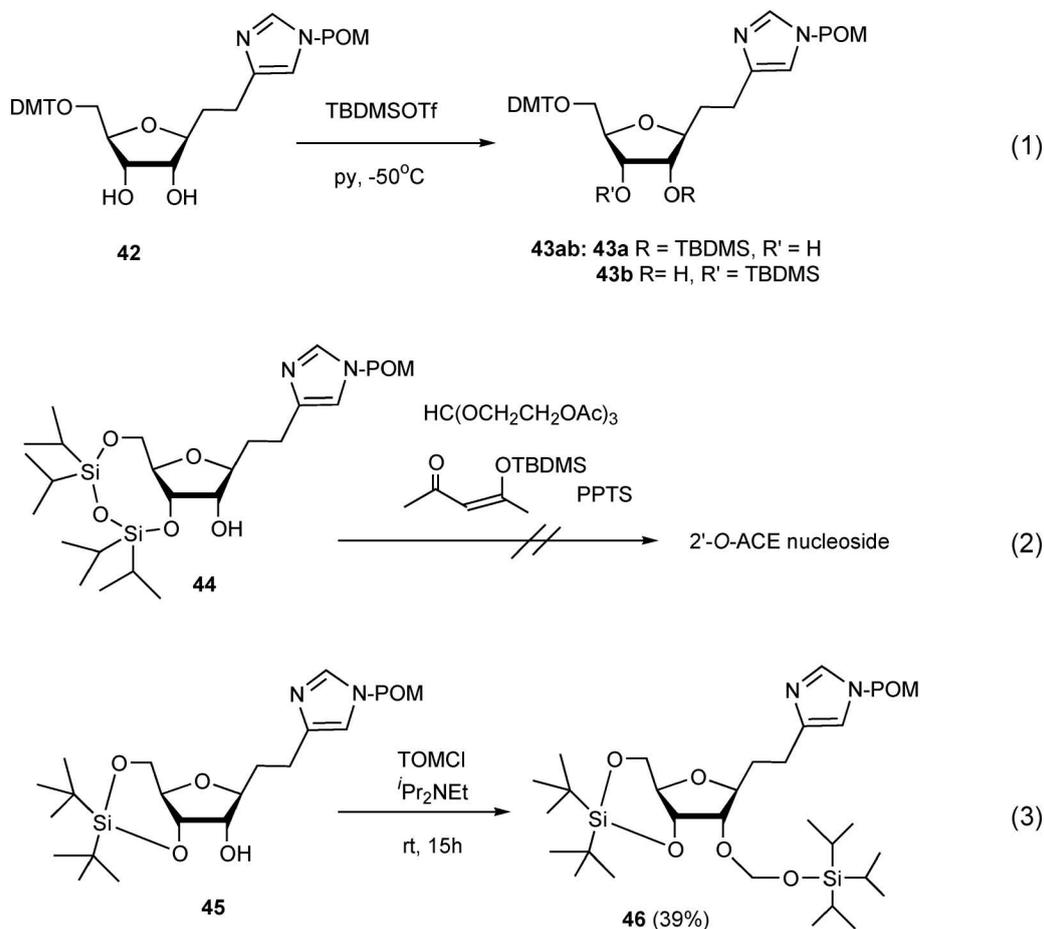


Fig. 13. Superposition of Molecular Graphics Structures of Guanine and C<sub>2</sub>-linked Imidazole Using PyMol

基の保護基の選択が大きな問題となった。先の C<sub>0</sub>-PA **41a** に用いた TBDMS 基は、**54** の合成においても 2', 3'-位間でのマイグレーションが避けられなかった (Scheme 7, Eq. 1)。また、マイグレーションが起こらないとされる ビス (2-アセトキシエトキシ) メチル (ACE) 基は、2'-水酸基への導入ができず (Eq. 2), [(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル (TOM) 基では (Eq. 3), 低収率で合成中間体 **46** を得たにすぎなかった。これらから、一般的な N-ヌクレオシド PAs 合成に用いられる嵩高い保護基は、C-ヌクレオシド PAs には適用困難と思われる。

この合成研究の期間に、関根らは最も小さい 2'-位水酸基の保護基としてシアノエチル (CE) 基を用いるオリゴヌクレオチド合成法を発表した。<sup>34)</sup> そこで CE を用いる Imz-C<sub>2</sub>-PA **54** の合成を検討することとした (Scheme 8)。トリベンジルリボース **3**

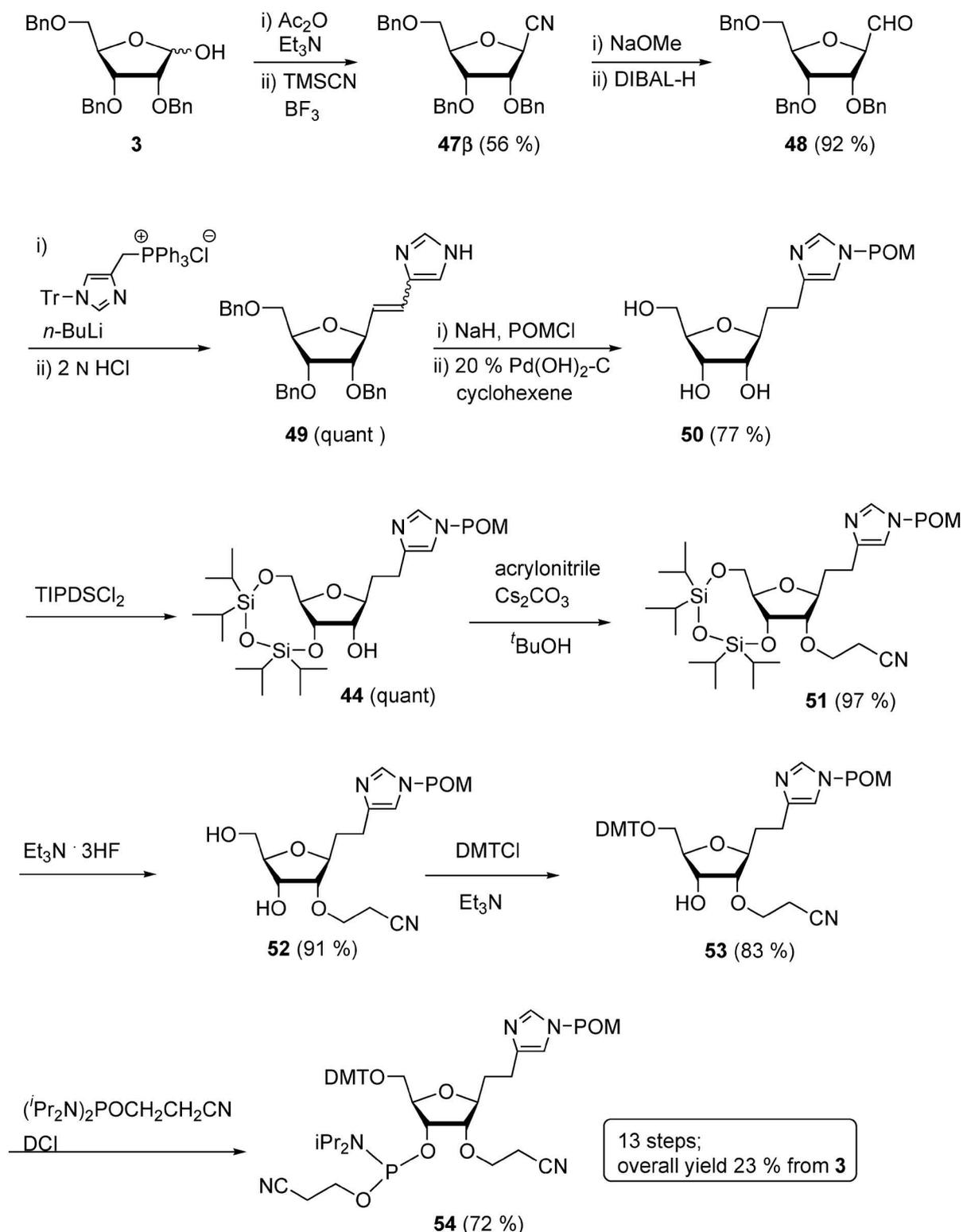
Scheme 7. Studies of 2'-O-Protecting Group for Imz-C<sub>2</sub>-PA

から  $\beta$ -アルデヒド **48** を合成し、Wittig 試薬による C<sub>2</sub> スペーサーを導入した **49** の合成、イミダゾール N の POM 化、続く脱ベンジル化によりエチルイミダゾール **50** を得ることができる。**50** の 3' と 5' 位の水酸基の TIPDS 基による保護により **44** とした後、*tert*-ブタノール中、アクリロニトリルと炭酸セシウムによる CE の導入によりすべての官能基が保護された **51** (97%) を高収率で得ることができた。**51** の TIPDS 基の除去は、Et<sub>3</sub>N · 3HF により **52** (91%) を得た。イミダゾール N の保護基である POM 基は、先に述べたように緩和な塩基性条件下で除去できるが、CE の導入と TIPDS 基の除去の塩基条件には充分耐えることが判明した。このようにして得た **52** の DMT 化、ホスホロアミダイト化は効率よく進行し、出発物質から 13 工程、総収率 23% で目的とする Imz-C<sub>2</sub>-PA **54** (白色アモルフ) を得ることに成功した。また **54** は、重アセトニトリル中、室温で放置後、<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, <sup>31</sup>P-NMR の測定では

分解はみられず RNA 自動合成に用いるアセトニトリル中での安定性をよく示した。

このようにして得られた **54** は、95% 以上のカップリング収率で VS リボザイムの G638 に導入することができ、C<sub>2</sub> スペーサーを持つ G638C<sub>2</sub>Imz を得た。G638 イミダゾール改変体の切断活性を調べたところ、G638C<sub>2</sub>Imz は G638C<sub>0</sub>Imz に比べ速度定数が約 15 倍上昇した (Table 4).<sup>30)</sup> この結果、リボースとイミダゾール間に C<sub>2</sub>-リンカーを加えることによって切断活性が著しく伸びることが判明した。このことは ribose-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Imz タイプの PAs は、X 線結晶構造解析のない VS リボザイムの活性サイトの環境を系統立てて調べるのできるシリーズ化合物となると期待できる。

**4-5. 2'-CE-Imz-C<sub>0</sub>-PA の合成**<sup>35)</sup> この Imz-C<sub>2</sub>-PA の合成研究で明らかとなったイミダゾール窒素の保護基を POM、2'-位水酸基の保護を CE とする組み合わせは、ribose-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Imz タイプの PAs の

Scheme 8. Synthesis of Imz-C<sub>2</sub>-PA 54

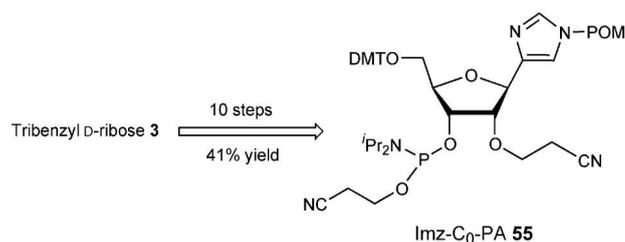
一般的合成法となると期待できる。この保護基の組み合わせを用いて不安定な 2'-TBDMS を持つ C<sub>0</sub>-PA 41a に代わって 2'-CE を持つ 2'-CE-Imz-C<sub>0</sub>-PA 55 を合成したところ、トリベンジル D-リボース 3

から、10 工程、総収率 42% の効率合成に成功した (Fig. 14)。この 55 は、室温やアセトニリル中での安定性は先の Imz-C<sub>2</sub>-PA 54 と同程度であった。

合成したこれら PAs は、RNA の任意の位置にイ

Table 4. Comparison of Cleavage Rates between G638C<sub>2</sub>Imz and G638C<sub>0</sub>Imz

	rates/min <sup>-1</sup> natural	G638C <sub>2</sub> Imz	G638C <sub>0</sub> Imz	C <sub>2</sub> Imz/ C <sub>0</sub> Imz
10 mM Mg <sup>2+</sup> pH 8				
-Rz		6 × 10 <sup>-5</sup>	5 × 10 <sup>-5</sup>	
+1 μM Rz	0.61	0.001	7 × 10 <sup>-5</sup>	14
200 mM Mg <sup>2+</sup> pH 6.5				
-Rz		1 × 10 <sup>-5</sup>	2 × 10 <sup>-5</sup>	
+1 μM Rz	6.2	0.008	5 × 10 <sup>-4</sup>	15

Fig. 14. Synthesis of Imz-C<sub>0</sub>-PA

ミダゾールを挿入できるため、リボザイムの反応機構の研究のみならず RNA の様々な機能を解明する実用的プローブとして応用できるものと期待している。

### 5. おわりに

われわれは、ほとんど合成例のなかったイミダゾール C-ヌクレオシドの効率的かつ立体選択的合成法について詳細に検討し、その一般性及び立体選択性の発現機構について研究した。さらにイミダゾール C-ヌクレオシドの応用性、特に生体機能性分子の創製に向けて努力を続けた。幸いにも、その中で現在臨床開発が世界的に進められている hH<sub>3</sub>R 及び hH<sub>4</sub>R リガンドのいくつかを開発することができた。特に OUP-16 は、世界初の選択的 hH<sub>4</sub>R リガンドであった。また、RNA 自動合成のために独自に開発した POM と CE 基の保護基の組み合わせを用いて合成した Imz-C<sub>n</sub>-PAs によって、リボザイムの反応機構を解明する chemogenetic method に応用した。今後、Imz-C<sub>n</sub>-PAs を key building block として RNA の機能解明に広く活用されることを期待している。PAs の MS 測定のための新しいマトリックスシステムの開発は、大阪薬科大学 MS 室の藤嶽美穂代氏との共同研究として進めたものである。

最後にこの小文が今後の有機化学、生化学分野の

研究に少しでも役立つことを願う次第である。

**謝辞** 本研究に対しては、大阪薬科大学、栗原拓史名誉教授に全面的な御支援、御協力を賜り深謝いたします。さらに本研究に際し、ヒスタミン H<sub>3</sub>R 及び H<sub>4</sub>R リガンド開発の共同研究者の大阪大学医学部、大和谷 厚教授に心より感謝申し上げます。また、Imz-C<sub>n</sub>-PA の合成研究とリボザイムへの応用研究は、Dundee 大学 David M. J. Lilley 教授、Birmingham 大学 Zheng-yun Zhao 博士との共同研究として行ったもので両氏に御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり御協力を頂きました大阪薬科大学薬品製造学教室、薬品合成化学研究室出身の方々に厚く御礼申し上げます。最後に機会ある毎に暖かく励まして頂いた名古屋市立大学、塩入孝之名誉教授に深謝いたします。

### REFERENCES

- 1) Levy D. E., Tang C., "The Chemistry of C-Glycosides," Pergamon Press, Oxford, 1995.
- 2) Wu Q., Simons C., *Synthesis*, 1533-1553 (2004).
- 3) Štambaský J., Hocek M., Kočovský P., *Chem. Rev.*, **109**, 6729-6764 (2009).
- 4) Grimmett M. R., "Imidazoles, Comprehensive Heterocyclic Chemistry II," Vol. 3, eds. by Katritzky A. R., Rees C. W., Scriven E. F., Pergamon Press, Oxford, 1996.
- 5) Poonian M. S., Nowoswiat E. F., *J. Org. Chem.*, **45**, 203-208 (1980).
- 6) Bergstrom D. E., Zhang P., Zhou J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3029-3034 (1994).
- 7) Harusawa S., Murai Y., Moriyama H., Imazu T., Ohishi H., Yoneda H., Kurihara T., *J. Org. Chem.*, **61**, 4405-4411 (1996).
- 8) Araki L., Harusawa S., Suzuki H., Kurihara T., *Heterocycles*, **53**, 1957-1973 (2000).
- 9) Harusawa S., Matsuda C., Araki L., Kurihara T., *Synthesis*, 793-798 (2006).
- 10) Guianvarc'h D., Fourrey J.-L., Dau M. T. H., Guérineau V., Benhida R., *J. Org. Chem.*, **67**, 3724-3732 (2002).
- 11) Arrang J.-M., Garbarg M., Schwartz J.-C., *Nature*, **302**, 832-837 (1983).
- 12) Arrang J.-M., Garbarg M., Lancelot J.-C.,

- Lecomte J.-M., Pollard H., Robba M., Schunack W., Schwartz J.-C., *Nature*, **327**, 117–123 (1987).
- 13) Morisset S., Rouleau A., Ligneau X., Gbahou F., Tardivel-Lacombe J., Stark H., Schunack W., Ganellin C. R., Schwartz J.-C., Arrang J.-M., *Nature*, **408**, 860–864 (2000).
- 14) Lovenberg T. W., Roland B. L., Wilson S. J., Jiang X., Pyati J., Huvar A., Jackson M. R., Erlander M. G., *Mol. Pharmacol.*, **55**, 1101–1107 (1999).
- 15) Smits R. A., Leurs R., de Esch I. J. P., *Drug Discov. Today*, **14**, 745–753 (2009).
- 16) Harusawa S., Imazu T., Takashima S., Araki L., Ohishi H., Kurihara T., Yamamoto Y., Yamatodani A., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2561–2564 (1999).
- 17) Harusawa S., Imazu T., Takashima S., Araki L., Ohishi H., Kurihara T., Sakamoto Y., Yamamoto Y., Yamatodani A., *J. Org. Chem.*, **64**, 8608–8615 (1999).
- 18) Vollinga R. C., Menge W. M. P. B., Leurs R., Timmerman H., *J. Med. Chem.*, **38**, 266–271 (1995).
- 19) Wieland K., Bongers G., Yamamoto Y., Hashimoto T., Yamatodani A., Menge W. M. B. P., Timmerman H., Lovenberg T. W., Leurs R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 908–914 (2001).
- 20) Hashimoto T., Harusawa S., Araki L., Zuiderveld O. P., Smit M. J., Imazu T., Takashima S., Yamamoto Y., Sakamoto Y., Kurihara T., Leurs R., Bakker R. A., Yamatodani A., *J. Med. Chem.*, **46**, 3162–3165 (2003).
- 21) Saville B. J., Collins R. A., *Cell*, **61**, 685–696 (1990).
- 22) “Ribozymes and RNA Catalysis,” eds. by Lilley D. M. J., Eckstein F., RSC Publishing, Cambridge, 2008.
- 23) Perrotta A. T., Shih I., Been M. D., *Science*, **286**, 123–126 (1999).
- 24) Lafontaine D. A., Wilson T. J., Zhao Z., Lilley D. M. J., *J. Mol. Biol.*, **323**, 23–34 (2002).
- 25) Araki L., Harusawa S., Yamaguchi M., Yonezawa S., Taniguchi N., Lilley D. M. J., Zhao Z., Kurihara T., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2657–2661 (2004).
- 26) Araki L., Harusawa S., Yamaguchi M., Yonezawa S., Taniguchi N., Lilley D. M. J., Zhao Z., Kurihara T., *Tetrahedron*, **61**, 11976–11985 (2005).
- 27) Fujitake M., Harusawa S., Araki L., Yamaguchi M., Lilley D. M. J., Zhao Z., Kurihara T., *Tetrahedron*, **61**, 4689–4699 (2005).
- 28) Fujitake M., Harusawa S., Zhao Z., Kurihara T., *Bull. Osaka Univ. Pharm. Sci.*, **1**, 107–112 (2007).
- 29) Harusawa S., Fujitake M., Kurihara T., Zhao Z., Lilley D. M. J., “Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,” eds. by Beaucage S. L., Bergstrom D. E., Herdewijn P., Matsuda A., John Wiley & Sons, New York, 2006, pp. 10.11.1–10.11.15.
- 30) Araki L., Morita K., Yamaguchi M., Zhao Z., Willson T. J., Lilley D. M. J., Harusawa S., *J. Org. Chem.*, **74**, 2350–2356 (2009).
- 31) Zhao Z., McLeod A., Harusawa S., Araki L., Yamaguchi M., Kurihara T., Lilley D. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5026–5027 (2005).
- 32) Willson T. J., Ouellet J., Zhao Z., Harusawa S., Araki L., Kurihara T., Lilley D. M. J., *RNA*, **12**, 980–987 (2006).
- 33) Willson T. J., McLeod A. C., Lilley D. M. J., *EMBO*, **26**, 2489–2500 (2007).
- 34) Saneyoshi H., Seio K., Sekine M., *J. Org. Chem.*, **70**, 10453–10460 (2005).
- 35) Araki L., Zhao Z., Lilley D. M. J., Harusawa S., *Heterocycles*, **81**, 1861–1869 (2010).