

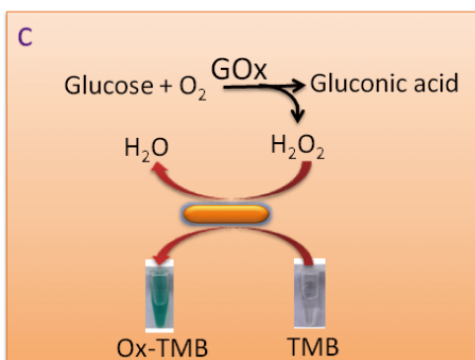
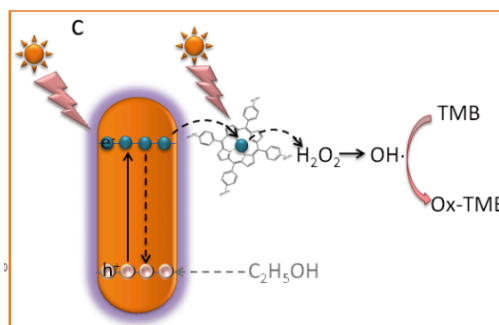
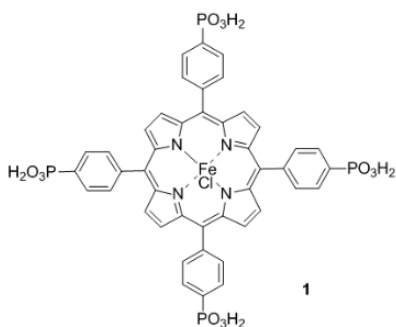
・ RNA の糖鎖内でのリン酸エステル交換の様な反応は生体内で起こるのか？

RNA の加水分解の主な経路としては、RNase による加水分解が挙げられます。この RNase は触媒部位に金属錯体を形成し、金属に結合したヒドロキシイオンが 2'-OH のプロトンを引き抜き、リン酸エステル交換を起こして RNA の切断が行われます。そのため、RNase がある環境では 2'-OH が活性化されるためリン酸エステル交換が起こりますが、RNase に結合していない場合、リン酸エステル交換は起こりにくいと思われます。

・ 酵素模倣の人工触媒の他の例について

Enzyme mimetic 人工触媒の一つに、今回紹介したリン酸ジエステル結合を切断する触媒が知られています。今回のようなルイス酸とリガンドの組み合わせを変えることで、ペプチド結合を切断するペプチダーゼ様の人工触媒も開発されているようです。

下で示すような鉄・ポルフィリン骨格(TPPFe(III))を持ったペルオキシダーゼ様の人工触媒も開発されています。この系では Au<sub>2</sub>S/AuAgS の core-shell gold nanorods と TPPFe(III) が nanocomposite を形成したものが、光励起によってペルオキシダーゼ様の酸化触媒として働くようです。(詳しくは読めていないので詳細は省略させていただきます。)



Y. Yang, F. Tan, X. Xie, et al., J-STAGE, Analytical sciences, (2019), 35, 6, 691-699

DOI: <https://doi.org/10.2116/analsci.19P004>

・ 15 ページのスライドで 4 が最も反応性が高いのはなぜか。

4 の反応性が最も高いというのは、pH 7 での反応性を指しています。将来的に DNA への反応を応用する場合には pH 7 の条件で最も反応性が高いものが望まれるためです。

15 ページで示した図はブレンステッドプロットで、x 軸は各金属錯体に配位する水の酸性度、y 軸は pH に依存しない二次反応速度係数  $k_2$  を表しています。 $k_2$  の計算は後半で示していますが、見かけの二次反応速度係数  $k_2'$  は pH = pKa の時  $k_2' = k_2$  となり反応速度が最大となり、pH が増減するどちらの方向に動いても  $k_2'$  は小さくなります。そのため、プロットされた点を頂点として pH が変化すると釣鐘型の反応性を示します。従って、15 ページで示したもののの中で pH 7 において最も反応性が高いのは 4 という結論が得られます。

そして、なぜ pKa が 7 に近く反応性も高いのかという理由に関しては、その配位の立体構造が反応に適しているからという考察しかされておらず、より深い部分の議論はされていませんでした。

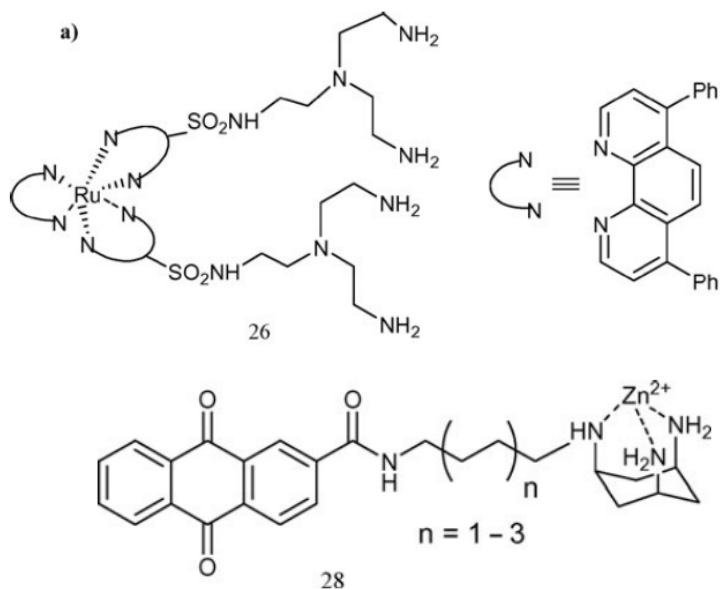
・ 19 ページのバイメタリック錯体のリンカー長について

元の論文を見ると、biphenyl と monophenyl の bimetallic complex の反応性を比べていましたが、HPNP、UpU (RNA) の加水分解のどちらにおいても monophenyl より biphenyl の反応性が高いことが示されていました。Monophenyl の場合は biphenyl とは異なり、14 ページで示したような  $\mu$ -hydroxo bridge が形成されることで反応性が生じ、biphenyl の場合は 19 ページのように分子内での架橋がされていると述べており、その反応性の違いは Zn の活性化モードの違いによるものだろうと考察しています。biphenyl 錯体が架橋する形で HPNP を活性化できるのかに関しては特に追加の実験などは示されていませんでした。Biphenyl 錯体に関して実験事実などはありませんが、僕の考えを回答とさせていただきたいと思います。まず、実際に HPNP は距離的に架橋できるのかについてですが、Zn に配位した三つの N 原子を取り巻く部分は固定されていますが、S 原子から伸びる N までの炭素鎖は柔軟に自由回転できるため HPNP を架橋できる位置をとることは可能だと思います。それでもやはり不利なコンフォメーションではあると思います。ただ、活性化されたアルコキサイドが Zn の配位を離れて P 原子に攻撃するにはむしろ有利に働くのでは無いかと考えます。今回紹介したような錯体触媒の反応性を決める一つのポイントとして、分解されたリン酸種が Zn の配位を離れることも重要とされているので、無理なコンフォメーションはその Zn の配位を離れる部分でも働いているのでは無いかと思います。

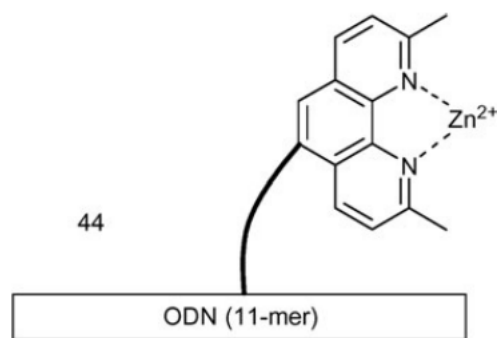
・ DNA や RNA を区別する人工触媒はあるか。

DNA や RNA を区別するために、金属リガンド部位と DNA あるいは RNA 結合サブユニットを繋げたものが開発されています。

DNA 結合サブユニットの例としては、ruthenium や anthraquinone などの DNA の intercalater を結合させるものが研究されています。



RNA 結合サブユニットの例としては、目的とする RNA のアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖 (antisense oligonucleotide (ODN)) を触媒と結合させたものが知られています。RNA は DNA と異なり、二本鎖を形成していないため ODN と二本鎖を形成させることで選択性を実現しようとしています。



・ どうやって遅い反応速度を調べている？

基本的に反応速度解析などは HPLC による p-nitrophenol の産生量の定量によって行われます。1996 年に報告された以下の 1 による BNP の加水分解の速度論的解析は 32 °C, in water, 9 days かけて行なっています。そのため、非常にタイムスケールの大きい研究になっていたようです。p26 の研究においても 180 日後の 31P NMR 測定実験を行なっていました。

Kim A. Deal and Judith N. Burstyn, *Inorg. Chem.* 1996, 35, 10, 2792–279

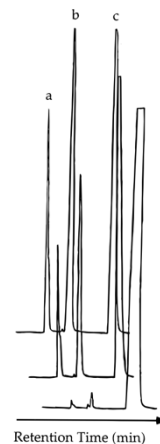
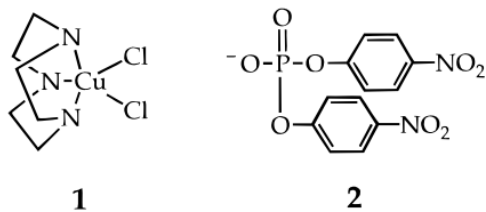


Figure 1. HPLC product separation of (a) 4-nitrophenyl phosphate at 1.4 min, (b) 4-nitrophenolate at 3.5 min, and (c) bis(4-nitrophenyl) phosphate at 4.3 min. Chromatographs were recorded after 1 h, 5 days, and 9 days. The mobile phase contained 1:1 methanol/50 mM phosphate buffer, pH 7.0.

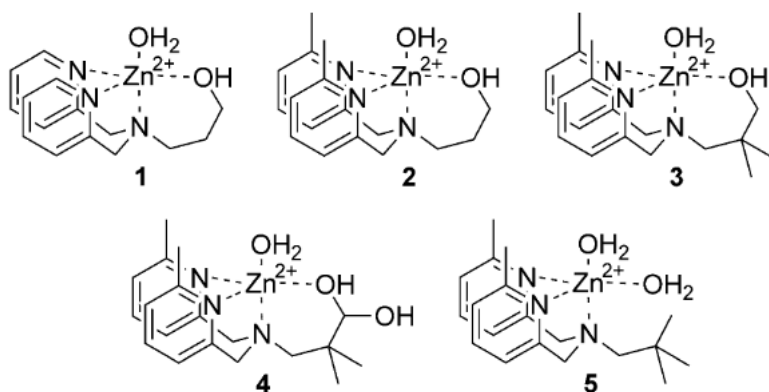
・P. 28 の機構だとリガンドの OH は常にリン酸化されてから反応が進行するか？ そうだとすると、加水分解の反応性が高いのは分子内にリン酸エステルがあるからか？

この系における反応性の高さは二次反応速度  $k_2$  で比較しています。具体的な計算式としては、pH に依存する見かけの二次反応速度  $k'_2$  を①の式を用いて、リン酸ジエステル結合切断 (*p*-nitrophenol の産生量) 5%までの時間から求めます。pH を変化させた場合の  $k'_2$  の値から、 $k_2$  をフィッティングによって導出します。この時得られる値は、*p*-nitrophenol の産生の初速度から求められるので、初速度においては分子内のヒドロキシ基がリン酸ジエステル結合切断を加速することはわかりませんが、生じたリン酸エステルが反応を加速しているかどうかは不明です。

$$\textcircled{1} \quad A = A_{\text{inf}}(1 - e^{-k_p t})$$

$$\textcircled{2} \quad k'_2 = \frac{k_2}{([\text{H}^+]/K_a^1 + 1 + K_a^2/[\text{H}^+] )}$$

発表中には述べませんでした。p24 の研究で分子内にヒドロキシ基を持つリガンドはヒドロキシ基がリン酸化されると活性は落ちると述べられていたので、分子内のリン酸エステルによる加速効果は無いと思われます。リン酸化を受けることで活性が落ちることを改良した研究として、アルデヒドを持たせることでターンオーバーを狙った戦略を用いているものもあります。こちらは 2 や 3 のようなヒドロキシ基単体より 4 の方が活性が高いことが確認されましたが、高々 10 倍程度の加速効果しか見られなかったようです。



- ・ Zn と Cu の 2 価イオンでは d 軌道の個数が異なるがどのように違うのか。
- ・ リンのリガンドが使われていないのはなぜか。

光励起による酸化還元金属触媒などにおいて、金属イオンの d 軌道の電子状態が配位子場安定化エネルギーを決める一つの要因となるため、その d 軌道の電子数は重要な要因となっています。

ただ今回の場合、d 軌道電子の励起よりもルイス酸としての HSAB 則の方が重要となります。今回、Cu<sup>2+</sup>を用いている理由としては、Cu<sup>+</sup>が soft な酸に分類され、Cu<sup>2+</sup>は Cu<sup>+</sup>よりも hard な酸として働きます。リン酸の酸素原子や水のような hard な配位子には、Cu<sup>2+</sup>の方がルイス酸として適した電子状態となっています。そして、ルイス酸の HSAB 則に関してはリガンドの電子供与原子にも関連があります。今回紹介したリガンドの構造では N 原子のみが用いられ、他の配位子としてよく用いられる P 原子は用いられている例はありませんでした。これは、P 原子が比較的 soft な配位子であるため、Zn<sup>2+</sup>や Cu<sup>2+</sup>のような比較的 hard なルイス酸とは結合が弱くなってしまうため用いられていないと思われる。

加えて、Irving-Williams series という 3d 系列二価金属イオン M<sup>2+</sup>の錯体の生成定数の序列において、Cu<sup>2+</sup>は最も高い安定性を示します。(生成定数とは、溶媒分子の配位子としての配位力の強さに対する、ある配位子の配位力の相対的な強さを表しています。つまり、溶媒分子と他の配位子分子がどの程度配位子交換して安定に錯体を形成するかという指標のことです。) Irving-Williams series においては配位子の種類に依存しないことが知られています。そのため、Cu<sup>2+</sup>は 3d 系列の M<sup>2+</sup>の中でも配位子交換が早いため、今回の触媒のルイス酸候補の一つとして用いられていると考えられます。

基本的にイオン半径が大きいほど生成定数が大きくなりますが、Cu<sup>2+</sup>は Jahn-Teller effect によって正方ひずみを生じることで、反結合性 e<sub>g</sub> 電子の少ない Ni<sup>2+</sup>やイオン半径の大きい Zn<sup>2+</sup>よりも高い生成定数を持ちます。(Jahn-Teller effect は反結合性軌道が縮退すると d 軌道のエネルギーが安定化される場合に生じます。) 正方ひずみによって Cu<sup>2+</sup>錯体平面に結合するエカトリアル結合は強く結合する一方で、アキシアル方向の結合が弱くなり、Cu<sup>2+</sup>は生成定数が大きくなります。

- ・ 25 ページの反応性の違いについて軌道のずれは関係あるのか？

上記の Jahn-Teller effect によるアキシアル配位子の不安定化がスライド 25 ページの反応性に大きく影響すると思われる。CuL1 はアキシアル配位子がリン酸エステルと配位子交換が早くなります。一方で、CuL2 の場合、アキシアルにはリガンドのヒドロキシ基が配位していますが、キレート効果によって CuL1 に比べて配位子交換が遅くなっているはずです。エカトリアルの水とリン酸エステルが交換しても、リン酸とヒドロキシ基との距離が遠く、リン酸エステル交換は起こりにくいと思われる。そのため、CuL2 はヒドロキシ基が不活性化する方向に働くため、CuL1 より活性が落ちていると考察されていました。CuL3 について、軌道のずれによって反応性が向上しているのではないかという質問をいただき

ましたが、本文中ではヒドロキシ基とリン酸エステルの結合角が小さくなるからとしか記述がありませんでした。確かに、結合角がずれることによって軌道相互作用が弱くなり反応性が向上したという可能性はあると思いますが実際のところはわかりませんでした。

・ **plasmid DNA** の加水分解について、濃度が上がると他のリガンドに比べて **C2** 活性が極端に低下するのはなぜか。

元の論文では特に議論はされていませんでした。以下は、具体的な計算値などはないので厳密なこととは言えませんが僕の個人的な考察になります。リガンドの濃度が上昇すると反応性が低下する理由として、不活性な錯体が DNA に結合することで活性な錯体が結合できなくなるためだと主張していました。これに関して、**C2** の場合は、正電荷を帯びる錯体部位とグアニジル基の距離が負電荷を帯びる DNA の隣り合うリン酸基間の距離と最も合致し、錯体と DNA との結合が他の **C1, C3** より強くなっているためではないかと思います。

・ **P32, 33**: どうやって①～④の構造を決定したのか？また、どのように各種の反応性を調べたのか？

**P32, 33** で示されている構造は、プロトン化状態の平衡と単量体と二量体の平衡を表しています。pH 変化による **UV-vis spectrum** の変化から何種類の化学種がどの程度存在するかを定量解析モデルによって求めます。同様に **UV-vis spectrum** の解析を濃度を変えて行うことで、濃度依存的に変化するものを同定し、これが二量体を形成したものだと決定しています。プロトン化状態は pH 滴定法で同定し、各 **UV-vis spectrum** の各化学種を同定しています。

反応性に関してはモデル基質である **BNP** の pH、濃度毎の反応性を比較しています。条件毎の反応性と上記で同定した化学種との相関からどの化学種が反応活性種であるかを推定しています。