



Title	Vlsmeier-ComplexによるNucleoside誘導体の合成並びにその酵素基質としての研究
Author(s)	宇野, 準
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30342
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ・ (本 籍)	宇 野 準
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 2 0 9 5 号
学位授与の日付	昭 和 4 5 年 6 月 2 0 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Vilsmeier-ComplexによるNucleoside誘導体の合成 並びにその酵素基質としての研究
論文審査委員	(主査) 教 授 池 原 森 男 (副査) 教 授 吉 岡 一 郎 教 授 上 原 喜 八 郎 教 授 田 村 恭 光

論 文 内 容 の 要 旨

Purine nucleosideは燐酸エステルとして核酸、又は補酵素の構成要素として、或いはエネルギー伝達の媒体として自然界に重要な役割を果している。又一方Purine nucleosideの構造を有する抗生物質も多く発見されている。従ってPurine nucleosideの合成研究は、(1)核酸関連物質の構造証明、(2)Purine nucleoside、nucleotideの生化学的意義の解明、(3)生物活性を有する新規な化合物の創成等の意義を有している。

筆者は容易に入手しうる天然系のPurine nucleosideを変換して種々のPurine nucleoside誘導体に導く方法について研究し更にそれらを5'-triphosphateに導いて、その酵素基質としての生物活性について研究を行った。

(1) 6-Hydroxy purine nucleosideのchlor化と種々の6置換Purine nucleosideへの変換⁽¹⁾⁽²⁾

現在容易に入手しうるPurine nucleosideのうちInosine及びGuanosineは6位に水酸基を持ち、これをchlor化し、更に求核試薬と反応させることにより種々の6置換 purine nucleoside に導くことができた。

3)

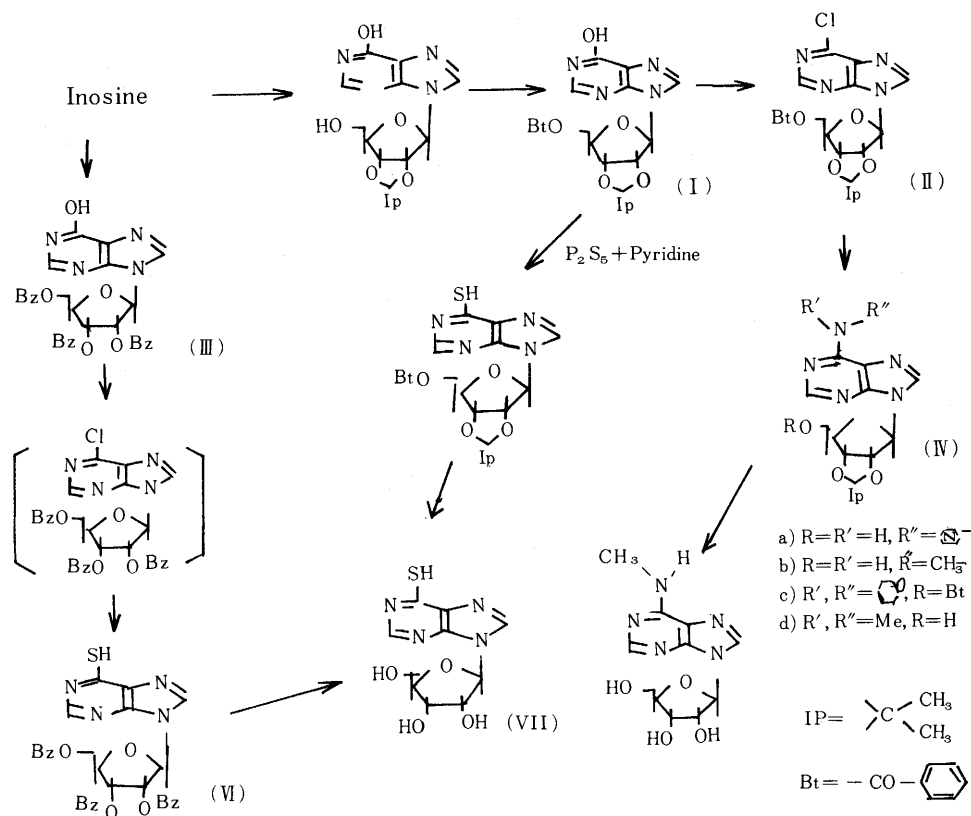
即ち Inosine を Hampton らの方法で2',3'-O-isopropylideneinosine とし、更に benzoyl 化して2',3'-O-isopropylidene-5'-O-benzoyl inosine(I)とする。(I)をCHCl₃中でdimethyl formamideとSOCl₂より調整した Vilsmeier 試薬⁽⁴⁾と反応させたのち、CHCl₃を溜去し氷水中に注ぎCHCl₃で抽出して6-chloro-9-(2',3'-O-isopropylidene-5'-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl) purine(II)m.p.122-4°, λ_{H₂O}^{max} 237, 265 mμを87.4%の収率で得た。(II)をcyclohexylamineと封管中反応させ6-cyclohexylamino-9-(2',3'-O-isopropylidene-β-D-ribofuranosyl) purine(IVa)をガラス状物質として得た。picrateとして精製し構造を確認した。又(II)をmethylamineと反応させガラス状物質として得られた6-methylamino-9-(2',3'-O-isopropylidene-β-D-ribofuranosyl)purine(IVb)はAcOHで処理

し isopropylidene 基をはずすと 6-methylamino-9- β -D-ribofuranosyl purine, m.p. 130-2° となり、この m.p. 及び紫外吸収は池原ら⁽⁵⁾の報告に一致した。

(I)を CHCl_3 中 Vilsmeier 試薬と反応させたのち、 CHCl_3 を溜去し直ちに morpholine と反応させると 6-morpholino-9-(2', 3'-O-isopropylidene-5'-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl) Purine(IVc)が 62.4%の収率で得られた。m.p. 107-110°, $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 237, 279 $\text{m}\mu$ 。

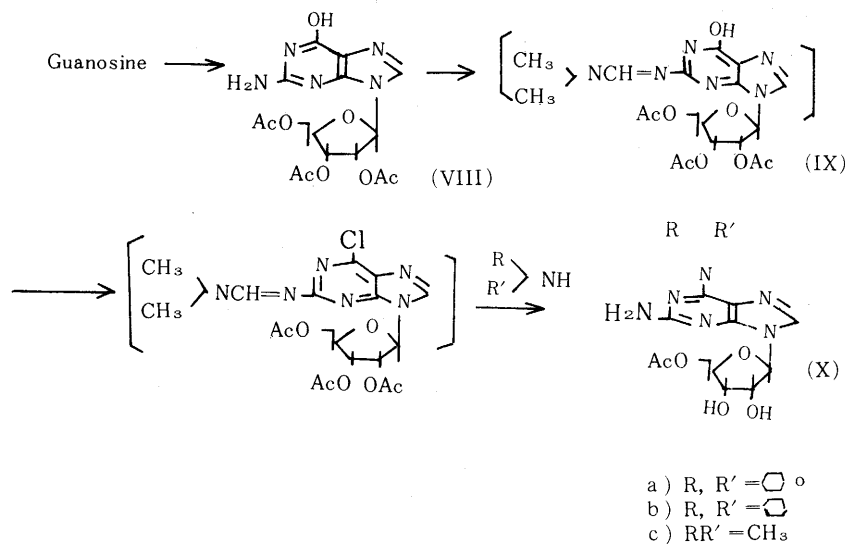
又 dimethylamine と反応させると 52.4%の収率で 6¹-methylamino-9-(2', 3'-O-isopropylidene- β -D-ribofuranosyl) purine (IVa), m.p. 170-3°, $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 273 $\text{m}\mu$ が得られた。(IVa)の m.p. 及び紫外吸収は authentic sample に良く一致した。

次に 2', 3', 5'-tri-O-benzoylinosine(III)を CHCl_3 中で Vilsmeier 試薬を反応させたのち、 CHCl_3 を溜去し直ちに thiourea を加え EtOH 中で反応させると、m.p. 210-216° の 6-mercapto-9-(2', 3', 5'-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl) purine (VI)が 77.8%の収率で得られた。(VI)を MeOH 中 MeO Na で脱 benzoyl すると m.p. 209-11° の 6-mercaptapurine-9-ribofuranoside (VII)が得られた。(VII)は(I)を Fox ら⁽⁶⁾の方法で pyridine 中 P_2S_5 で thiation して得られた 6-mercapto-9-(2', 3'-O-isopropylidene-5'-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl) purine を脱 benzoyl 化したのち脱 isopropylidene 化して得られた(VII)に一致した。



続いて Guanosine の Chlor 化を試みた。Guanosine の場合には 2 位の NH_2 基が Vilsmeier と反応することを防ぐため、先ず保護をしておく必要がある。そこで 2', 3', 5'-tri-O-acetyl guanosine (VIII) を Zemlicka ら⁽⁷⁾の方法により dimethylformamide dimethylacetal[®] と反応させて N²-dimethylamino-methylene-2', 3', 5'-tri-O-acetylguanosine (IX) とした。

次いで Inosine の場合と同様に (IX) を CHCl_3 中で Vilsmeier 試薬と反応させたのち、 CHCl_3 を溜去し Chlor 体を単離することなしに直ちに過剰の morpholine と反応すると 6 位の chlor が morpholine に置換されると同時に 2 位の NH_2 及び 2' 位 3' 位の水酸基の保護基のはずれた 2-amino-6-morpholino-9-(5'-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)purine (Xa), m.p. 178° , $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 239, 284 $\text{m}\mu$ が 30.5% の収率で得られた。又 morpholine の代りに piperidine と反応させると 2-amino-6-piperidino-9-(5'-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)purine, m.p. 183.5° , $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 238, 284 $\text{m}\mu$ が 30.8% の収率で得られた。又 dimethylamine 40% 水溶液と反応させると 2-amino-6-dimethylamino-9-(5'-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)purine, m.p. 191.3° , $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 266, 283 (sh) $\text{m}\mu$ が 12% の収率で得られた。

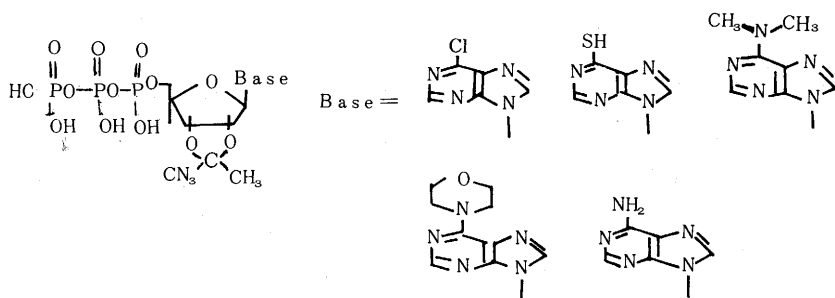


(2) Purine nucleoside 5'-triphosphate の合成⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

Inosine より導いた 6 置換 purine nucleoside 類は筋収縮の基本反応と考えられる Myosin-ATP の反応機構の解明のための基質とする目的で燐酸化して ATP 誘導体に導いた。

即ち 2', 3'-O-isopropylidene nucleoside 類を dioxane 中で P^1 -diphenyl- P^2 -morpholinopyrophosphorochloridate⁽¹¹⁾ (diphenylphosphate 及び morpholinophosphorodichloridate より調製) と反応させて、5'-monophosphoro morpholidate とし次いで bis-tri-n-butyl-ammonium pyrophosphate とピリジン中で反応させて 5'-triphosphate とした。活性炭に nucleotide を吸着させ水洗して diphenyl phosphate 及び phosphate を除いたのち、 NH_3 -EtOH-水で溶出させ、更に Dowex 1×8 (Cl^- form) 又は DEAE-cellulose (HCO_3^- form) のカラムを通して triphosphate を分離した。

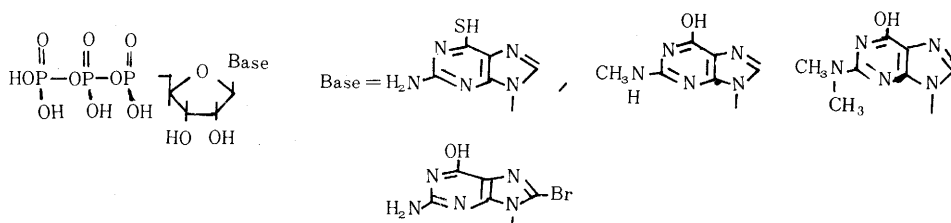
この様にして次の各種の purine nucleoside 5'-triphosphate を合成した。



一方 *E. coli* の ribosome を用いた cell-free での蛋白合成系に及ぼす影響を研究する目的で、Guanosine 誘導体を燐酸化し GTP 誘導体を合成した。この場合には糖部分の水酸基が free の状態でないといけないのでまず Guanosine 誘導体を種々の方法で monophosphate に導いた。

6-mercapto guanosine は 2', 3'-O-isopropylidene 体とし cyanoethylphosphate と DCC により¹² 燐酸化し monophosphate とした。又 N²-methylguanosine 及び N²-dimethylguanosine は POCl₃ (又は POCl₃ + triethyl phosphate) により 2', 3'-O-isopropylidene 体を燐酸化して monophosphate とした。8-bromoguanosine は池原ら¹³の方法により GMP を Acetate buffer 中で brom 化する方法により monophosphate を得た。

これらの GMP 誘導体を Khorana らの方法¹⁴に従って morpholine と DCC で morpholidate とし、次いで bis-tri-n-butylammonium pyrophosphate と反応させ、DEAE-cellulose (HCO₃ form) のカラムを通じ triphosphate を分離した。この様にして合成した化合物は以下に示す 4 種である。



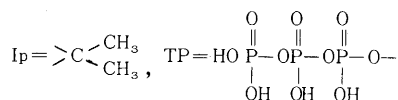
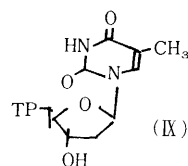
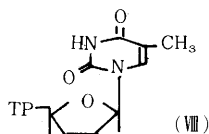
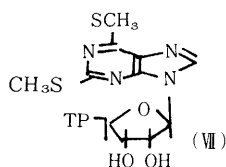
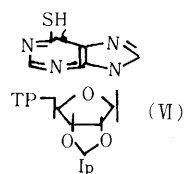
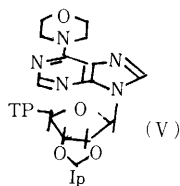
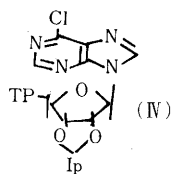
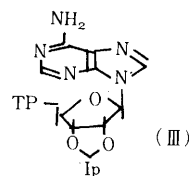
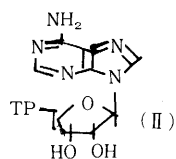
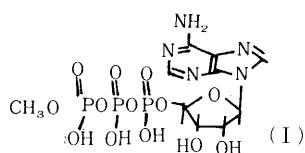
これらの purine nucleoside 5'-triphosphate の構造は紫外吸収、電気泳動、paper chromatography, labile phosphate と total phosphate の定量によって確認した。

(3) ATP 誘導体と Myosin との反応⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

筋収縮の基本的反応は Myosin と ATP との反応、特に Myosin の ATP による conformation の変化、及び燐酸化であろうと考えられている。従って Myosin と ATP の反応機構の解明は筋収縮の機構解明への手がかりとなると考えられる。

そこで Myosin ATPase の活性中心と ATP の結合様式を明らかにするために、ATP 誘導体と、Myosin 系との反応を研究し ATP の三つの部分、塩基、リボース、及び triphosphate が果たす役割について考察した。

実験には Actomyosin の主成分である MyosinB を用い、ATP 誘導体と Actomyosin 系との反応は、(1)MyosinB の光散乱強度の変化、(2)ATPase による燐酸の水解、(3)筋原繊維の収縮の三つの効果を調べた。用いた ATP 誘導体は下に示す 9 種である。



実験結果：(1)光散乱の減少率の順は $ATP \geq VI \geq IX > IV > I > V \geq III > VIII$ となる。(2)0.6MKCl, 7mM Ca^{+} 存在下での磷酸の水解率は $ATP \geq VI > II > III \geq IX > IV > VII > VIII > V > I$ となり I は全く水解されない。0.075MKCl, 2mMMg⁺ 存在下での磷酸水解率の順は $II = VI > IV > ATP > III > IX > VIII > V > VII > I$ となり I は全く水解されない。(3)筋原繊維の収縮、0.14mM IX, 0.19mM III は ATP と同様収縮をおこしたが、0.1mM I, V, 及び VI, 0.16mM VIII, 0.19mM VII は収縮をおこさなかった。

ATP 誘導体と MyosinB の反応

化合物	光散乱の減少	水解率		筋原繊維収縮
		0.6MKCl, 7mM Ca^{+}	0.075MKCl, 2mMMg ⁺	
ATP	100	100	100	+
I	72	0	0	—
II		49	270	±
III	71.4	40	53	+
IV	93.5	28	220	+
V	71.5	6	16	—
VI	100	87	270	—
VII		17	5	—
VIII	17.5	7	22	—
IX	99.2	40	40	+

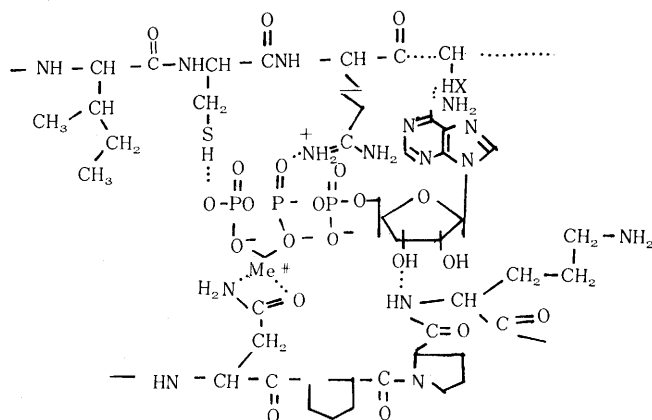
これらの結果と池原、殿村ら⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾の実験結果を比較検討し次の様な結論が導き出された。

(1) Actomyosin と反応し 燐酸が水解され、筋原繊維が強く、収縮されるためには purine 塩基の 6 位の NH_2 、又は OH が Actomyosin のある部分と水素結合をつくる必要がある。

(2) ribose 部分は 2 つの役割を持つ。一つは purine 塩基と triphosphate との距離を一定に保つこと。第二は 3' 位の O が actomyosin と水素結合を形成することである。

(3) triphosphate の γ -phosphate は水解され Myosin を燐酸化するのに用いられる。 α と β の phosphate はおそらく γ -phosphate を Base 又は ribose より一定の距離に保つと共に OH を介して Myosin と水素結合を持つものと考えられる。

これらの結論と Myosin ATPase の活性中心附近のアミノ酸配列の研究結果とから殿村ら⁽¹⁸⁾は Myosin ATPase と ATP の結合様式を次の様に推定している。

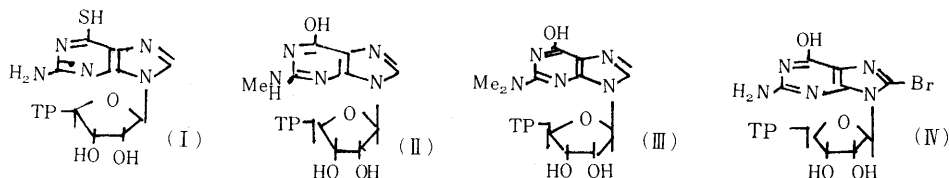


(4) 蛋白合成に対する GTP 誘導体の影響

E.coli の ribosome による cell-free での蛋白合成系に於いて GTP は (1) initiation complex の形成 (2) aminoacyl tRNA の ribosome への結合、(3) peptidyl tRNA の A-site から P-site への転移の 3ヶ所で重要な役割を果しているものと考えられている。⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

そこで GTP の構造とこれらの作用との関連を調べる目的で GTP 誘導体の E.coli-ribosome による cell-free での蛋白合成系の over-all の反応に対する影響について研究を行った。

実験に用いた GTP 誘導体は下に示す 4 種である。



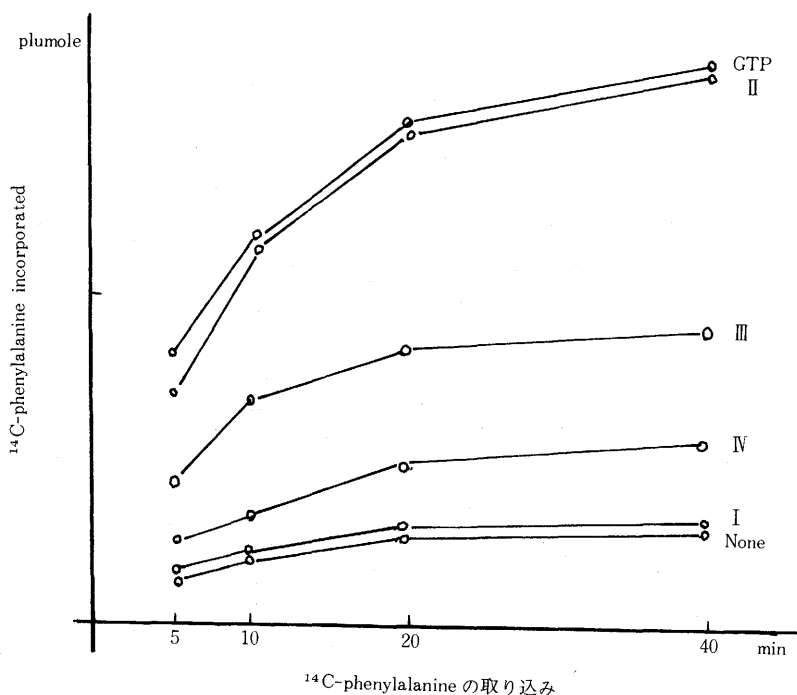
(I)は制癌作用の知られている 6-mercapto gnanosine の triphosphate であり、(II)、(III)は天然には t-RNA の minor component として存在する nucleoside の triphosphate である。又(IV)は 8 位に bulky な基を有し塩基と ribose の立体配置が Guanosine のそれよりややずれていることが知られている。

ribosome 及び上清酵素の調製法及び実験系は Nishizuka ら⁽²¹⁾の方法に準拠した。

実験の結果(I)は殆ど GTP 活性を示さなかったが、(II)は GTP と同程度の、(III)は GTP の 40% の活

性を示した。又(Ⅳ)も弱いながら活性を示した。

この結果より G T P 活性には、(1) Guanine 塩基の 6 位の C=O が不可欠であり C=S に置換できないこと、(2) 2 位の NH₂ も不可欠であるが 2 ケの H のうち 1 ケは CH₃ に置換できること、(3) 7 位の N が結合に関与するか又は ribose と塩基の立体配置が重要な役割を占めると思われる、等の結論が導き出される。



一方(I)の G T P 活性に対する抑制効果が認められた。又(Ⅲ)も同様に G T P 活性を抑制するが(I)の場合には(I)の濃度と G T P 活性の抑制がほぼ平行するのに対し(Ⅲ)の場合には G T P : (Ⅲ)が 1 : 1 の時急に抑制効果が強くなり両者の間の抑制機構には若干差があるものと思われる。

References

- 1) M. Ikehara, H. Uno, F. Ishikawa; Chem. Pharm. Bull., 12, 267 (1964)
- 2) M. Ikehara, H. Uno; Chem. Pharm. Bull., 13, 221 (1965)
- 3) A. Hampton, D. I. Magrath; J. Am. Chem. Soc., 79, 3250 (1957)
- 4) A. Vilsmeier, E. Haak; Chem. Ber., 60, 119 (1927)
- 5) M. Ikehara, E. Ohtsuka, F. Ishikawa; Chem. Pharm. Bull., 9, 173 (1961)
- 6) J. J. Fox, I. Wempen, A. Hampton, I. L. Doerr; J. Am. Chem. Soc., 80, 1669 (1958)
- 7) J. Zemlicka, S. Chladek, A. Holy, J. Smr t; Coll. Czech. Chem. Comm., 29, 645 (1964)
- 8) Z. Arnold, M. Kornilov; Coll. Czech. Chem. Comm., 29, 645 (1964)
- 9) M. Ikehara, E. Ohtsuka, H. Uno, K. Imamura, Y. Tonomura;

Biochim, Biophys. Acta, 100, 471 (1965)

- 10) Y. Tonomura, K. Imamura, M. Ikehara, H. Uno, F. Harada; J. Biochemistry, 61, 460 (1967)
- 11) M. Ikehara, E. Ohtsuka; Chem. Pharm. Bull., 11, 435, 961 (1963)
- 12) G. M. Tenner; J. Am. Chem. Soc., 83, 156 (1961)
- 13) M. Ikehara, I. Tazawa, T. Fukui; Chem. Pharm. Bull., 17, 1019 (1969)
- 14) J. G. Moffatt, H. G. Khorana; J. Am. Chem. Soc., 83, 649 (1961)
- 15) M. Ikehara, E. Ohtsuka, S. Kitagawa, K. Y. Tonomura; J. Am. Chem. Soc., 83, 2679 (1961)
- 16) N. Azuma, M. Ikehara, E. Ohtsuka, Y. Tonomura; Biochim. Biophys. Acta, 60, 104 (1962)
- 17) M. Ikehara, E. Ohtsuka, S. Kitagawa, Y. Tonomura; Biochim. Biophys. Acta, 82, 74 (1964)
- 18) Y. Tonomura, S. Kubo, K. Imamura; Molecular Biology of Muscular Contraction p.11
- 19) R. W. Erbe, M. M. Nau, P. Leder; J. Mol. Biol., 39, 441 (1969)
- 20) J. W. B. Hershey, K. F. Deweg, R. E. Thach; Nature, 222, 944 (1969)
- 21) Y. Nishizuka, F. Lipmann; Proc. Natl. Acad. Sci., 55, 212 (1966)

論文の審査結果の要旨

本論文はチオニルクロリド及びデメチルフォルムアミドより製せる所謂 Vilsmeier-Complex により、イノシン及びグアノシンの6位のOH基をクロール化することにより、容易且つ、好収率にて各種のヌクレオフィル試薬との反応を行はしめ、アデノシン及びグアノシン誘導体に誘き、それらを化学的にトリリン酸化しATP(I)及びGTPアナログ(II)とし、前者はアクトミオシン系との反応に、又後者は無細胞蛋白質合成系に用いて、その基質としての活性を検したものである。

化学合成の手法を充分に駆使して、新化合物を多数合成し、これらを二種の酵素系に適用し、各酵素系に於ける、此等ヌクレオチドの活性から、これらの基質としての役割を解明した点に意義があり、論文請求に充分なるものと判定する。

