



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 8-メチルアデノシン及びその関連化合物の合成研究                                                                                                                        |
| Author(s)    | 林, 元吉                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 1978, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32266">https://hdl.handle.net/11094/32266</a>                                                             |
| 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">大阪大学の博士論文について</a>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)    | 林 <small>りん</small> 元 <small>もと</small> 吉 <small>きち</small>            |
| 学 位 の 種 類   | 薬 学 博 士                                                                |
| 学 位 記 番 号   | 第 4 3 5 0 号                                                            |
| 学位授与の日付     | 昭 和 53 年 6 月 26 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 | 8-メチルアデノシン及びその関連化合物の合成研究                                               |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授 池 原 森 男<br>(副査)<br>教 授 枡 井 雅 一 郎 教 授 田 村 恭 光 教 授 佐 々 木 喜 男 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 論

天然に存在する nucleoside 及び nucleotide のコンホメーションについては、X線回析、NMR、CD 等の手段によって広範に解明されており、それ等に共通するところは、sugar 部に対する base の向きは、多くは anti 型であり、そのポリマーは、右巻き helix 構造をとることである。又、S 或は O-anhydro 結合を介してプリン base の 8 位と、sugar 部が連結され、torsion angle が固定された dinucleoside monophosphate についても、上杉等によりそのコンホメーションが広く明らかにされており左巻きに stack する ( $\chi = 120^\circ$ ) ことが、報告されている<sup>1,2)</sup> ところが、8 位に bulky な置換基を持つため、anti 構造をとることがエネルギー的に困難と思われる 8-置換プリン誘導体 (torsion angle が固定されていない dinucleoside monophosphate) のコンホメーションについては、現在迄のところ殆んど明らかにされておらず、わずかに  $\text{br}^8\text{Apbr}^8\text{A}$ <sup>11)</sup>  $\text{br}^8\text{Gpbr}^8\text{G}$  について、そのコンホメーションが論じられているのみである。又、これら化合物の置換基が高い電気陰性度を持つ bromine であるところから、base の電子状態の perturbation も論議の対象となるところである。

そこで筆者等は、8 位に bromine とほぼ同程度の大きさを持つ置換基、即ちメチル基を持つ、8-メチルアデノシン ( $\text{m}^8\text{A}$ ) 及び、これ等の誘導体を合成すればこれ等のコンホメーションを推定できる可能性があることを想定し、以下の研究を行った。ちなみにメチル基は塩基部の perturbation が殆んどなく又、メチル基自身がコンホメーション解析のプロープとなることが期待される。

最初に筆者等は AICA Riboside を出発原料として 8-メチルアデノシンの合成を試み、収率よく得ることに成功した<sup>3)</sup> 又、この  $\text{m}^8\text{A}$  及びその磷酸化体の立体構造を U. V., CD., NMR 及び X 線結晶解析

によって解明した。次に、8-メチルアデノシンとアデノシンから成る6種のhomo-及びheterodimer 即ち (3'→5') m<sup>8</sup>Apm<sup>8</sup>A, (2'→5') m<sup>8</sup>Apm<sup>8</sup>A, (3'→5') Apm<sup>8</sup>A, (2'→5') Apm<sup>8</sup>A, (3'→5') m<sup>8</sup>ApA, (2'→5') m<sup>8</sup>ApA をすべて合成し、これ等のCD及びNMRによるコンホメーションの解析を行い新たな知見を得た。<sup>9)</sup> 又、8-メチルアデノシン5'-二磷酸は他の8置換アデノシン誘導体とは異なり、polynucleotide phosphorylaseにより、高収率でpoly (8-methyladenylic acid) を生成することを見出し、得られたpolymerについてもその物性を調べ若干の知見を得た。<sup>13)</sup>

## 本 論

### 第一章 8-methyladenosine の合成

#### 1) 8-methylinosine (Ⅶ) を経由する8-methyladenosine の合成

8-メチルアデノシンの生成についての報告は、すでに川添等によってなされている<sup>1)</sup> が原料のアデノシンを含む4種のreaction mixtureから、これを単離するには至っていない。筆者は、Fig I に示す方法による8-methyladenosineの合成を先ず検討した。starting materialとして用いた(Ⅰ)は(Ⅰ)より容易に合成できることが山崎等によって示されている<sup>2)</sup>

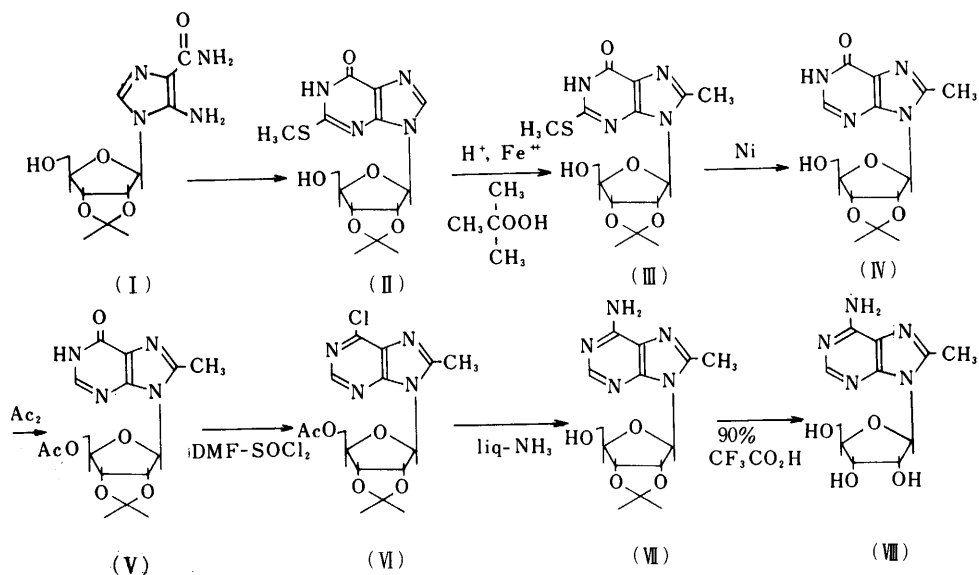


Fig I

(Ⅱ) を川添等の方法に従って硫酸第一鉄存在下、t-butylhydro-peroxide でメチル化することにより、m. p. 234-236°C の(Ⅲ)を、46%の収率で得た。(Ⅲ)の同定は、UV, NMR, 元素分析により行った。次いで(Ⅲ)をRaney nickelで脱硫することにより、m. p. 235°-240°C の(Ⅳ)を87.5%の収率で得た。このものの同定も、UV, NMR, 元素分析により行った。さらに(Ⅴ)を $\text{CHCl}_3$ 中 $\text{SOCl}_2$ -DMFでクロル化し、T. L. C. 上single spotで得られた(Ⅵ)を単離同定することなく、ただちにliquid ammonia中でアミノ化することにより、(Ⅶ)を25%の収率で得た。(Ⅶ)はm. p. 234-236°の白色プリズム晶でUV, NMR, 元素分析値の各データー共にこの構造を支持する。さらに(Ⅶ)を90%

CF<sub>3</sub>COOHでdeprotectすることにより、目的とする8-methyladenosine (Ⅷ) を68%の収率で得た。

(Ⅷ) はm. p. 130-133℃の白色針状晶でUV, NMR, 元素分析値により同定した。

## 2) 2-methylthio-8-methyladenosine (Ⅺ) を経由する8-メチルアデノシンの合成

1) で述べた8-methyladenosineの合成法は、アミノ化の段階の収率が悪く必ずしも満足すべき結果ではない。したがってこの欠点を克服すべくFig IIの経路による合成法を検討した。

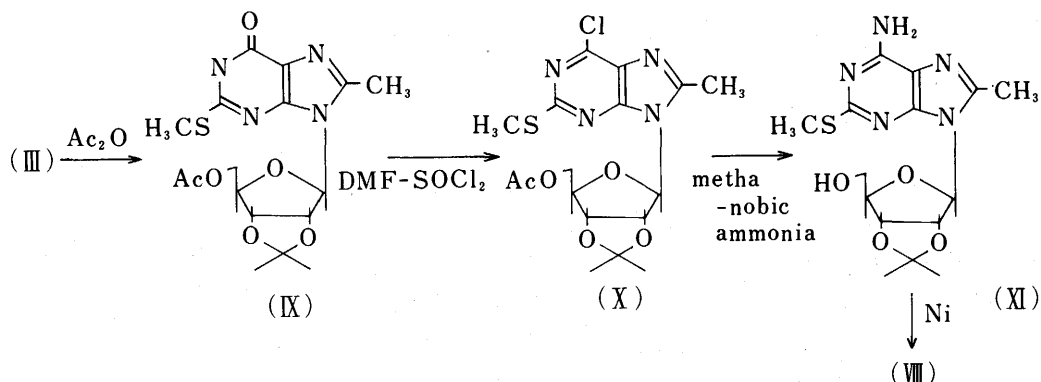


Fig. II

(Ⅲ) をacetyl化することによりTLC上single spotを示すカラメルをほぼ定量的に得た。このものをCHCl<sub>3</sub>中、DMF-SOCl<sub>2</sub>でクロル化し、TLC上、(Ⅸ)とは異なるR<sub>f</sub>値を示す single spot の(Ⅹ)を得た。(Ⅹ)は単離同定することなく直ちにmethanolic ammonia中、80℃、24hrs反応させることにより、m. p. 214-217℃の橙色プリズム晶を(Ⅲ)より、41.7%の収率で得た。なお、このものの構造は、UV, NMR, 元素分析により同定した(Ⅶ)は(Ⅵ)をRaney nickel処理することにより78%の収率で得ることができる。

## 第二章 8-methyladenosine及びその3'-phosphateの立体構造

### 1) 8-methyladenosineの立体構造

8-methyladenosineはFig Vに示すようなCD spectraを与え264nm付近にpositive bandを持つ8-bromoadenosineとは明らかに異なるpatternを示す。

又、<sup>13</sup>C-NMRにおいてC-2'を除くsugar部の全シグナルが高磁場シフトするのに対してC-2'のみが低磁場シフトする。これはbaseのN<sup>3</sup>の影響を受けるsyn typeのnucleosideに観察される現象である。

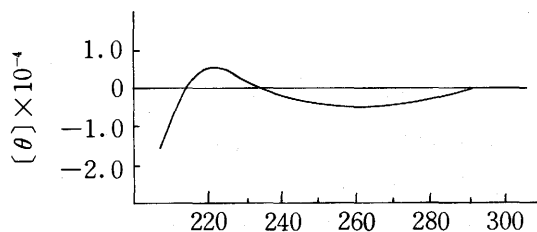


Fig. V

CD spectrumにおいて、m<sup>8</sup>Aがアデノシンと同様のpatternを示すのは、このものの8位のメチル基によって、グリコシド結合の回りの完全な自由回転は抑えられているが,near-anti conformationをとることが許されるためであると解釈される。

ちなみにMiles等はadenosineがχ = -140°のconformationをとるならB<sub>2</sub>uの〔θ〕値は-4000ぐ

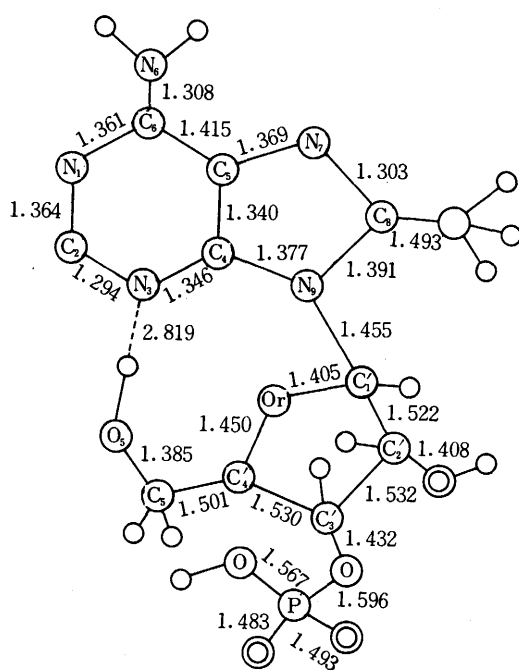
らいであることを報告しており、これは $m^8A$ の $-3800$ と良い一致を示す。

## 2) 8-methyladenosine-3'-phosphateのX線解析

8-methyladenosine-3'-phosphateについてX線解析をFig A及びFig. Bに示す。Fig. Aは結合距離、Fig Bは結合角をあらわしているが、それぞれ妥当な値となっている。

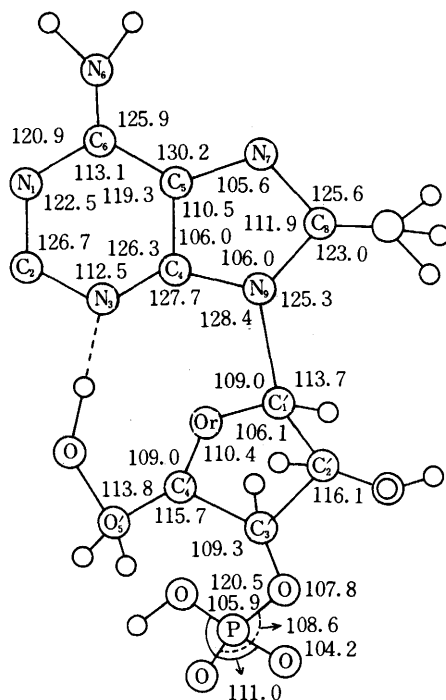
又、5'水酸基とadenine ringの3位の窒素とが水素結合を形成しており、torsion angle  $\chi$ は $217.2^\circ$ でsyn conformationをとっている。

なお、この8-methyladenosine-3'-phosphateのX線解析はsyn型のnucleotideの解析としては初めての例である。



bond lengths

Fig. A



bond angles

Fig. B

## 第三章 8-methyladenosineとadenosineを構成要素とする dinucleoside monophosphateの合成

### 1) dinucleotide monophosphate合成のためのmonomer unitの合成

Fig IIIに示す方法で(XIV)を合成した。(VII)をオキシ塩化リンで、燐酸化し、適当に後処理することによってXIIを98%の収率で得た。(XII)を90%  $CF_3CO_2H$ でdeprotectすることにより、69%の収率で得られた。(XIII)を、ピリジン中benzoyl chlorideでbenzoyl化し(XIV)を98%の収率で得た。XIVは滲紙電気泳動によってsingle spotを示し、UV吸収の極大値は225, 280nmでtetrabenzoyl体であることが確認された。

次にFig IVに示す方法で(XIX)及び(XX)の合成を行った。(VII)をピリジン中benzoyl chlorideでbenzoyl化しXVを得、これを90%  $CF_3CO_2H$ でdeprotectし、(XVI)を得た。(XVI)は、(XV)のN-

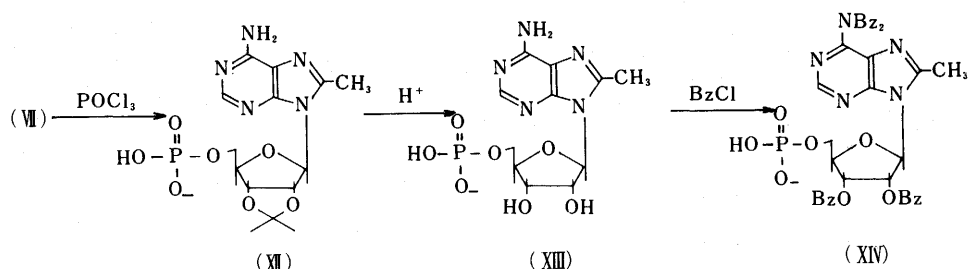


Fig III

benzoyl保護基が一つはずれたものと、2つとも残っているもののmixtureであることがTLC及びUV吸収によって示されたが、これを分離精製することなく、1.5当量のcyanoethylphosphateとDCCによって縮合し、deprotectした後、Dowex 1×2 columnに附すことによって、2'-m<sup>8</sup>AMP (XVII)と3'-m<sup>8</sup>AMP (XVIII)を分離した。(VII)からの2'-m<sup>8</sup>AMPの収率は、11.1%、3'-m<sup>8</sup>AMPの収率は9.6%である。(XVII)、(XVIII)は、tetraethylammonium buffer中、benzoic anhydrideでbenzoyl化し、相当するtribenzoyl体 (XIX)、(XX)を合成した。

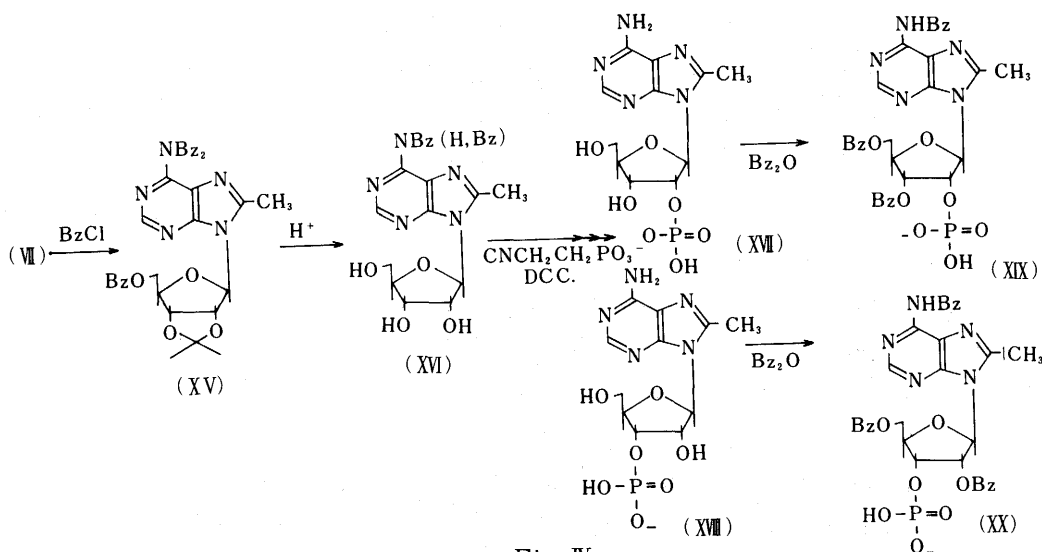


Fig IV

## 2) 8-methyladenylyl-(3'→5')-8-methyladenosineの合成

(XX)と(VII)をピリジン中、DCCで縮合した後、90%CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Hで、脱イソプロピリデン化し、次いでmethanolic ammoniaで脱ベンゾイル化した後、DEAE cellulose columnで分離し、目的物を(XX)より計算して34%の収率で得た。このものの同定はRNase Mで完全に水解され、nucleosideとnucleotideの比が1:1の混合物を与えること、及び後述する(2'→5') isomerとのペーパークロマト上の対比等によって同定した。

## 3) 8-methyladenylyl-(2'→5')-8-methyladenosineの合成

(XIX)と(VII)とをピリジン中DCCを縮合剤として縮合し、2)の場合と同様の後処理によって単離した。このものが、目的とするdimerであることは、RNase Mによる水解には完全に抵抗する

こと、及びVPDaseにより完全に水解され nucleoside と nucleotide の比が1:1のmixtureを与えること、又、2)とのペーパークロマトグラフィー上でのRf値の対比、その他の方法によって同定した。

#### 4) adenylyl-(3'-5')-8-methyladenosineの合成

N<sup>6</sup>, 2', 5'-tribenzoyl-adenosine-3'-phosphateとⅦとを、ピリジン中、DCCと縮合し、脱保護した後、DEAE及びDowex 1×2 column chromatographyにより精製した。同定は2)と同様に行った。

#### 5) adenylyl-(2'-5')-8-methyladenosineの合成

N<sup>6</sup>, 3', 5'-tribenzoyl-adenosine-2'-phosphateと(Ⅶ)とをピリジン中DCCで縮合し、4)に示したのと、同様の方法で、単離同定した。

#### 6) 8-methyladenylyl-(3'-5')-adenosineの合成

(XX)と、2', 3'-O-ethoxymethylidene adenosineとをピリジン中DCCで縮合し、deprotectした後、2)と同様の方法で縮合した。

#### 7) 8-methyladenylyl-(2'-5')-adenosineの合成

(XIV)と(XVI)をピリジン中DCCで縮合し、deprotectした後DEAE cellulose, Dowex 1×2の両columnによって精製した。生成物の同定は、RNase Mによる水解に抵抗すること、及びVPDaseにより完全に水解され、monomerの1:1混合物を与えること、その他の方法により行った。なおこの方法では当然(3'→5') isomerも生成することが予想されるが、このisomerはdetectできず(3'→5')体は、反応中(2'→5')へmigrateするものと思われる。

### 第四章 8-methyladenosineとadenosineを構成要素とする dinucleoside monophosphateの conformation

Fig. VIにhomodimer, Fig. VIIにheterodimerのCD spectraを示す。(2'→5')m<sup>8</sup>ApA及び(2'→5')Apm<sup>8</sup>Aは、hypochromicityも、それぞれ17%, 14.5%と大きく、良くsplitしApAに似たCD spectraを示す。このことから、これ等2種のdimerはanti-anti, right-handed stack構造をとっているものと推測される。これをさらに確かめるため、(2'→5')Apm<sup>8</sup>Aについて<sup>1</sup>H NMRの測定を行った。Table IにNMR測定を行ったdimerのdimerization shift値を示す。このdimerization shift値とstackの様

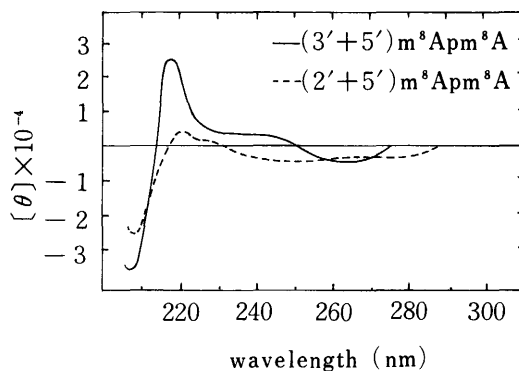


Fig. VI

式との相関関係についての考察はApAにおいてNelson等が行っており、これがstackの方向を決めるパラメーターとして利用できていることが示されている。Fig. VIIIにはbaseのanti, synの関係とstackの様式を示した。(2'→5')Apm<sup>8</sup>Aにおいては、5'-nucleotidyl unitの8位のmethyl基のΔδが0.26と比較的大きな値を示すことよりこのメチル基は、かなりの隣接塩基の環電流shiftを受けていると推定

Table I

| Molecule                                                           |                    | Dimerization Shift<br>$\Delta\delta = \delta(\text{monomer}) - \delta(\text{dimer})$ |                                                               |       |        |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------|--------|
|                                                                    |                    | $H_8$                                                                                | $\begin{smallmatrix} g\text{-CH}_3 \\ 3H_8 \end{smallmatrix}$ | $H_2$ | $H'_1$ |
| (3'→5')<br>Ap-<br>Apm <sup>8</sup> A                               | -pm <sup>8</sup> A | 0.16                                                                                 | —                                                             | 0.11  | 0.25   |
|                                                                    |                    | —                                                                                    | 0.13                                                          | 0.23  | 0.15   |
| (2'→5')<br>Ap-<br>Apm <sup>8</sup> A                               | -pm <sup>8</sup> A | 0.17                                                                                 | —                                                             | 0.29  | 0.08   |
|                                                                    |                    | —                                                                                    | 0.26                                                          | 0.15  | 0.30   |
| (3'→5')<br>m <sup>8</sup> Ap-<br>m <sup>8</sup> Apm <sup>8</sup> A | -pm <sup>8</sup> A | —                                                                                    | 0.07                                                          | 0.03  | 0.31   |
|                                                                    |                    | —                                                                                    | 0.06                                                          | 0.13  | 0.13   |
| (2'→5')<br>m <sup>8</sup> Ap-<br>m <sup>8</sup> Apm <sup>8</sup> A | -pm <sup>8</sup> A | —                                                                                    | 0.08                                                          | -0.13 | -0.05  |
|                                                                    |                    | —                                                                                    | 0.06                                                          | 0.18  | 0.15   |

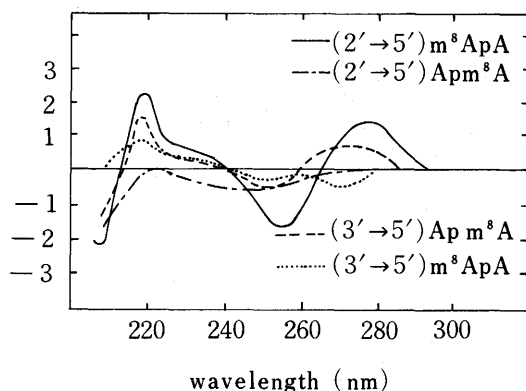
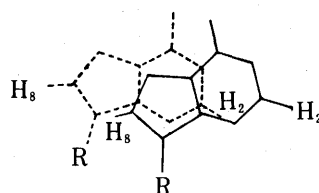


Fig VII

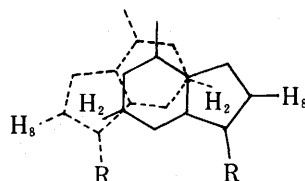
される。このような ring current によるシフトが考えられるのは、Fig VIII より明らかなように、3'-anti, 5'-anti, 又は 3'-syn, 5'-anti, 即ち、5'-nucleotidyl unit が anti の場合のみである。この 2 つの可能性のうち、後者の様式で

stack したとすれば、 $H_2$  proton の大きな  $\Delta\delta$  は説明できない。一方、前者の様式で stack したとすれば 3'-nucleotidyl unit の  $H_2$  は、ring current の影響を受ける筈であり、良く説明がつく。故にこの両 dimer は anti-anti, right-handed stack 構造をとっているものと結論づけられる。これに比し他の 4 種の dimer は明らかに異った CD pattern を示す。(2'→5') m<sup>8</sup>Apm<sup>8</sup>A, (3'→5') m<sup>8</sup>Apm<sup>8</sup>A, (3'→5') Apm<sup>8</sup>A については CD 及び dimerization shift 値よりの考察から anti, syn, (3'→5') m<sup>8</sup>ApA は CD spectrum で同様の pattern を示すことから、類似した stack 様式をとっているものと推察される。

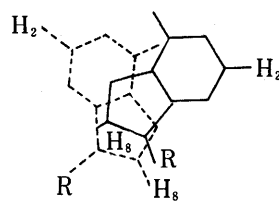
8 位は proton の場合と -CH<sub>3</sub> 基の場合がある



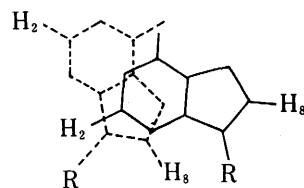
3'-anti, 5'-anti



3'-anti, 5'-syn



3'-syn, 5'-anti



3'-syn, 5'-syn

実線は 5'-nucleotidyl unit, 点線は、3'-nucleotidyl unit を示す。

Fig VIII

## 第五章 Poly (8-methyladenylic-acid) について

従来、8置換アデノシン誘導体は、syn conformationをとるため、polynucleotide phosphorylase による重合は進行しないとされてきた<sup>2)</sup> Todd Miles 等は<sup>8),9)</sup> oligo A, oligo I等のprimerを用いることによって、polynucleotide phosphorylaseによる重合を行った後、RNase T<sub>1</sub>でprimerのみを選択的に除去することによって、この点を克服し、poly(8-bromoadenylic acid)を得、広範にこのpolymerの性状を究明し、N<sub>1</sub>とN<sub>6</sub>の水素結合によってself-associateした右巻きの二重らせん構造をとることを提唱している。又、最近、Forayan等によって8-oxyadenosine diphosphateが、アルブミン存在下、長時間反応を行うことによって、9%という低収率ながら、poly(8-oxyadenylic-acid)を生産し、このものがpoly(U)と1:2 complexを形成するという報告がなされている<sup>10)</sup>

筆者等は、8-methyladenosineが前述したように必ずしもrigidなsyn conformationをとらないという推察をふまえて8-methyladenosine diphosphate (m<sup>8</sup>ADP)の上記酵素による重合を試み、このものが通常の条件下、39%の高収率でpoly(8-methyladenylic-acid)〔poly(m<sup>8</sup>A)と略す〕を生成することを見い出した。

poly(m<sup>8</sup>A)は、poly(brU)、poly(U)の何れともhybridizeせずpH 4.9でみかけのpKaを持ち、このpolymerに特徴的なCD spectraを示す。又、このCD spectraは、温度、pHの変化に応じて大きく変化し、温度62°CでのCD spectrumと、pH 4.9でのCD spectrumは、その形状、[θ]値共によく一致する。これ等のことより、このpolymerはpoly(br<sup>8</sup>A)にみられるようなself associateしたcomplexを形成せず、エネルギー的に安定なhighly ordered single strand構造をとっているものと思われる。

### 結 論

- 1) AICARを原料とする2つのルートによる8-methyladenosineの合成を検討し始めてこのものの単離同定に成功した。
- 2) 8-methyladenosineのUV, CD, NMR (<sup>1</sup>H及び<sup>13</sup>C) 及びその3'-リン酸のX線回折よりその立体構造を解明した。
- 3) 8-methyladenosineとadenosineを構成要素とする6種のdinucleoside monophosphateを合成し、これらのstackの様式を推察した。
- 4) 8-methyladenosine diphosphateが、polynucleotide phosphorylaseによる重合を容易に受け、poly(m<sup>8</sup>A)を生成することを見い出し、このものの物性について調べた。

### 引用文献

- 1) M. Mazuda, K. Nushi, and Y. Kawazoe, Tetrahedron, **30**, 2677 (1974)
- 2) A. Yamazaki, I. Kumashiro, and T. Takenishi, J. Org. Chem., **32**, 3032 (1967)
- 3) M. Ikehara, W. Limn, and T. Fukui, Chem. Pharm. Bull., **25**, 2302 (1977)
- 4) M. Ikehara, W. Limn, S. Uesugi, J. Carbohyd-Nucleosides Nucleotides, **5**, 163 (1978)
- 5) D. N. Miles, S. J. Hahn, R. K. Robins, M. J. Robins, and H. Eyring, J. Phys. Chem., **72**, 1483 (1968)

- 7) M. Ikehara, I. Tazawa and T. Fukui, *Biochemistry*, **8**, 736 (1969)
- 8) F. B. Howard, J. Frazier and H. Todd Miles, *J. B. C.*, **250**, 2951 (1975)
- 9) G. Govil, C. Fisk, F. B. Howard and H. Todd Miles, *Nucleic Acids Research* **4**, 2573 (1975)
- 10) J. O. Forayan and D. W. Hutchinson, *Biochim. Biophys. Acta* **474**, 329 (1973)
- 11) M. Ikehara, S. Uesugi and M. Kobayashi *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 2394 (1972)
- 12) S. Uesugi, M. Yasumoto, M. Ikehara, K. N. Fang, P. O. P. T'so *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5480 (1972)
- 13) 日本薬学会第98年会 (岡山, 1978年4月)
- 14) M. Yasuniwa, R. Tokuoka, K. Ogawa, Y. Yamagata, S. Fujii, K. Tomita, W. Limn and M. Ikehara, *Biochim. Biophys. Acta*, **561**, 240 (1979)

#### 論文目録

- 1) Studies of Nucleosides and Nucleotides. LXXI. Synthesis and Characterization of 8-Methyladenosine.  
Morio Ikehara, Wongil Limn, and Toshikazu Fukui *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2707 (1977)
- 2) Polynucleotides. L. Synthesis and Properties of Dinucleoside Monophosphates Derived from Syn Type Nucleoside.  
Morio Ikehara, Wongil Limn, and Seiichi Uesugi *J. Carbohyd. Nucleoside Nucl. otide* **5** 163 (1978)
- 3) Polynucleotides. LIII. Conformation of Dinucleoside Monophosphates Containing 8-Methyladenosine Residue as Studied by Proton Magnetic Resonance Factors Governing Syn-Anti Conformations in a Dinucleoside Monophosphate.  
Morio Ikehara, Wongil Limn, Seiichi Uesugi, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3732 (1978)
- 4) Polynucleotides. LV. Synthesis and Properties of Poly (8-methyladenylic acid).  
Wongil Limn, H. Todd Miles and Morio Ikehara (in preparation)

#### 論文の審査結果の要旨

当研究者は、8-メチルアデノシンの合成法を確立し、初めてその立体構造を明らかにした。更に8-メチルアデノシンとアデノシンを含むデヌクレオシドモノフォスフェート6種を合成し、その立体構造を、CD, UV, NMR等によって明らかにし、8-メチルアデノシンがsyn型のみでなく、anti型構造としても存在し得ることを見出した。

更に研究者は8-メチルアデノシンを5'-二リン酸に導き、ポリヌクレオチドフォスホリラーゼにより重合し、ポリ(8-メチルアデニル酸)を合成し、このものの性質をUV, CD, 融点測定等により明

らかにした。

この研究は8-メチルアデノシン及びその誘導体の性質を明かにしたものであり、博士号請求に値するものとする。