



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

## [ 5 ]

氏名・(本籍)	林	元	吉
学位の種類	薬学	博士	
学位記番号	第	4350	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) 教授 池原 森男		
	(副査) 教授 枝井雅一郎 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 のコンホー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ー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)</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) のコンホー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 br<sup>8</sup>Apbr<sup>8</sup>A,<sup>11)</sup> br<sup>8</sup>Gpbr<sup>8</sup>G について、そのコンホー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 ( $m^8A$ ) 及び、これ等の誘導体を合成すればこれ等のコンホー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 が殆どなく又、メチル基自身がコンホーメーション解析のプローブ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>2)</sup> 又、この  $m^8A$  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')<sup>m</sup>Apm<sup>8</sup>A, (2'→5')<sup>m</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>4)</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い出し、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>5)</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(II)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>。

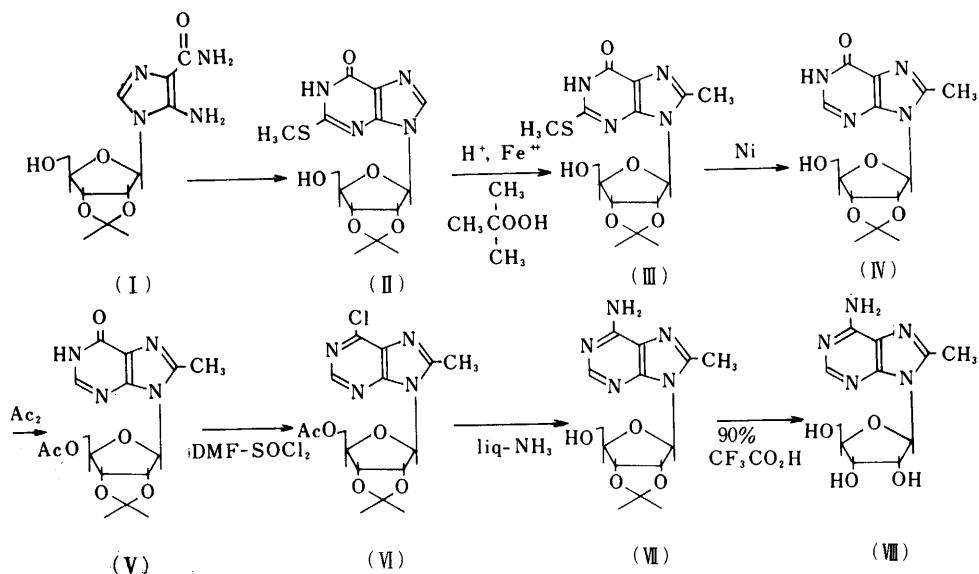


Fig I

(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CHCl<sub>3</sub>中SOCl<sub>2</sub>-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%

$\text{CF}_3\text{COOH}$ でdeprotectすることにより、目的とする8-methyladenosine (VII) を68%の収率で得た。

(VII) はm. p. 130-133°C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) 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。

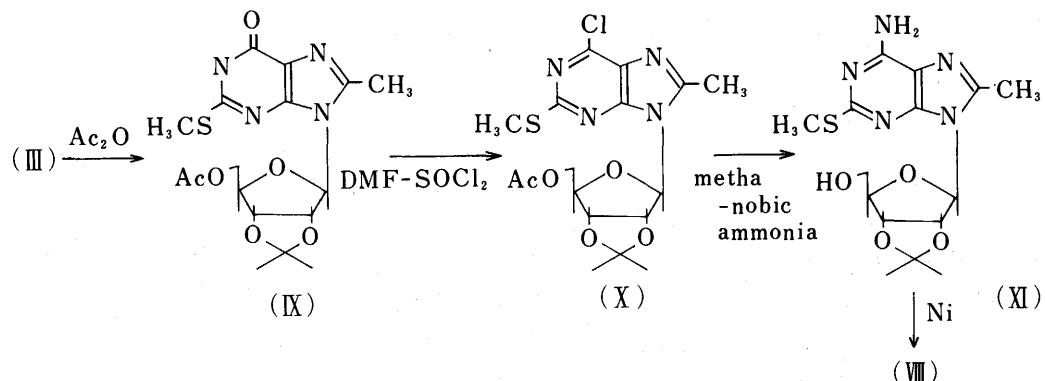


Fig. II

(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  $\text{CHCl}_3$  中、 DMF-SOCl<sub>2</sub> でクロロ化し、 TLC 上、 (IX) とは異なる Rf 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°C, 24 hrs 反応させることにより、 m. p. 214-217°C 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 处理することにより 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 264 nm 附近に 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。

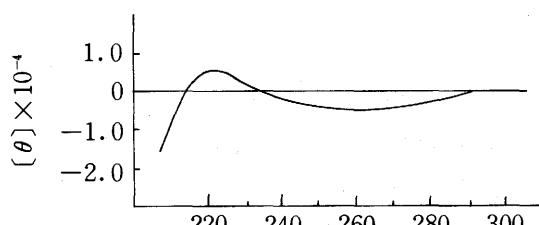


Fig. V

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  $\chi = -140^\circ$  の conformation をとるなら B<sub>2</sub>u の  $[\theta]$  値は -4000 ぐ

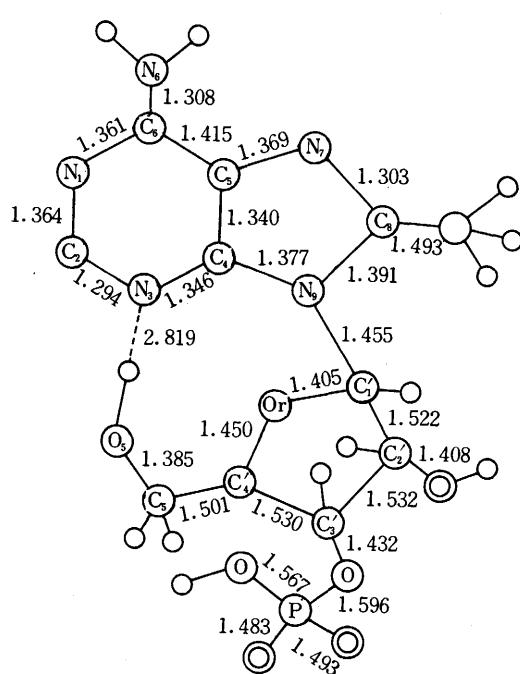
らいであることを報告しており、これは  $m^8A$  の -3800 と良い一致を示す。

## 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。

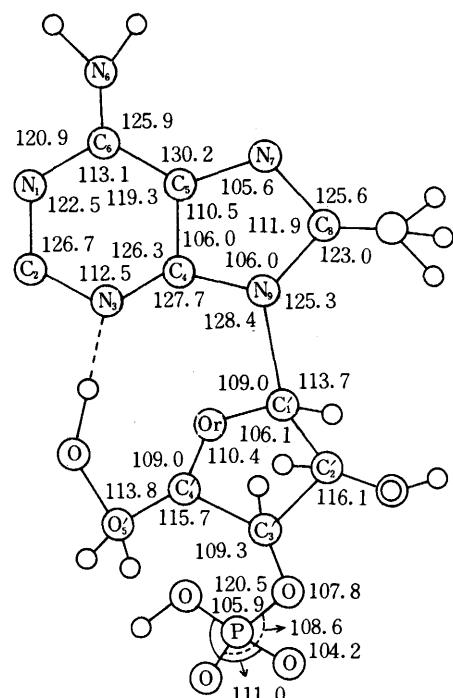
又、5' 水酸基と adenine ring の 3 位の窒素とが水素結合を形成しており、torsion angle  $\chi$  は  $217.2^\circ$  で syn conformation をとっている。

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



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) をオキシ塩化リジンで、磷酸化し、適当に後処理することによって (XIII) を 98% の収率で得た。(XIII) 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 は沪紙電気泳動によって single spot を示し、UV 吸収の極大値は 225, 280 nm 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-

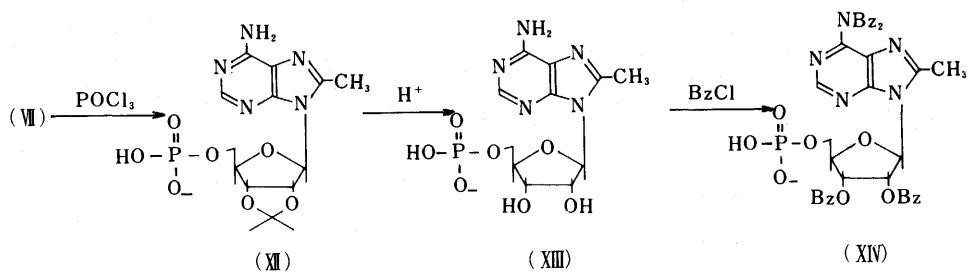


Fig III

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。

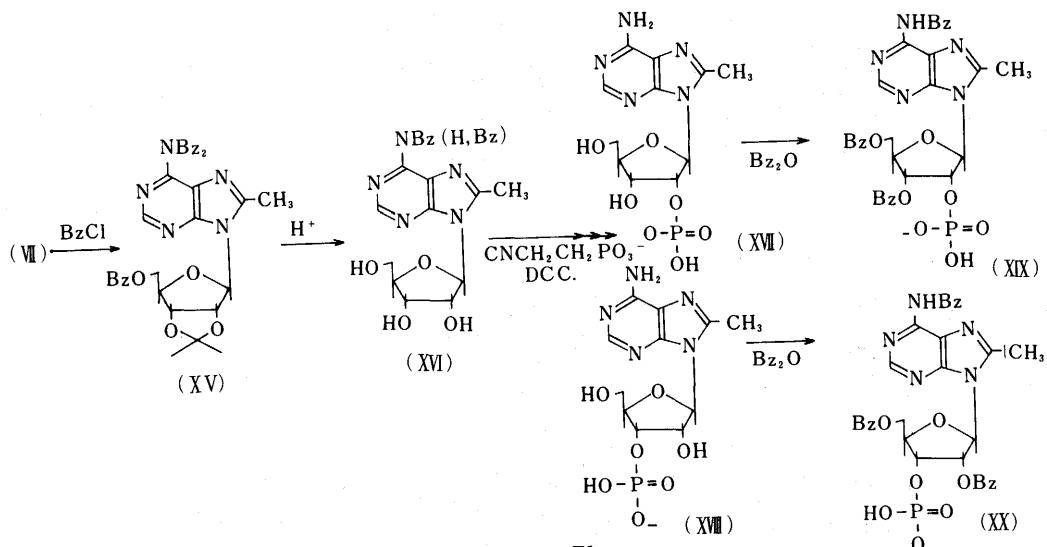


Fig IV

### 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

$\text{N}^6, 2', 5'$ -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

$\text{N}^6, 3', 5'$ -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  $(3' \rightarrow 5')$  isomer も生成することが予想されるが、この isomer は detect できず  $(3' \rightarrow 5')$  体は、反応中  $(2' \rightarrow 5')$  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。 $(2' \rightarrow 5')$  m<sup>8</sup>ApA 及び  $(2' \rightarrow 5')$  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、 $(2' \rightarrow 5')$  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。 $(2' \rightarrow 5')$  Apm<sup>8</sup>A においては、5'-nucleotidyl unit の 8 位の methyl 基の  $\Delta\delta$  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

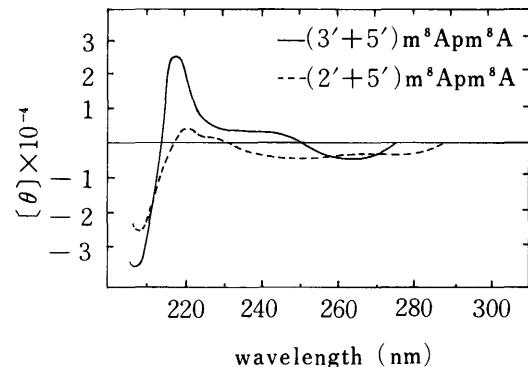


Fig. VI

Table I

8位はprotonの場合と-CH<sub>3</sub>基の場合がある

Molecule		Dimerization Shift $\Delta\delta = \delta(\text{monomer}) - \delta(\text{dimer})$			
		H <sub>8</sub>	g-CH <sub>3</sub> 3H <sub>8</sub>	H <sub>2</sub>	H' <sub>1</sub>
(3'→5')	Ap- -pm <sup>8</sup> A	0.16	—	0.11	0.25
(2'→5')	Ap- -pm <sup>8</sup> A	0.17	—	0.29	0.08
(3'→5')	m <sup>8</sup> Ap- m <sup>8</sup> Apm <sup>8</sup> A- -pm <sup>8</sup> A	—	0.07	0.03	0.31
(2'→5')	m <sup>8</sup> Ap- m <sup>8</sup> Apm <sup>8</sup> A- -pm <sup>8</sup> A	—	0.06	0.13	0.13
(2'→5')	m <sup>8</sup> Ap- 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

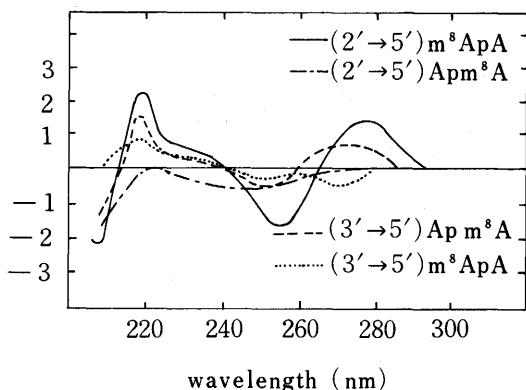
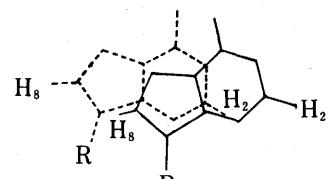


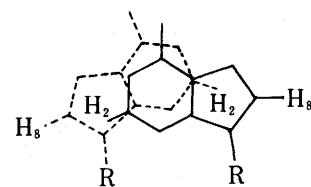
Fig VII

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 VIIより明らかのように、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

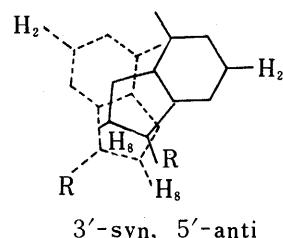
stackしたとすれば、H<sub>2</sub> protonの大きな $\Delta\delta$ は説明できない。一方、前者の様式でstackしたとすれば3'-nucleotidyl unitのH<sub>2</sub>は、ring currentの影響を受ける筈であり、良く説明がつく。故にこの両dimerはanti-anti, right-handed stack構造をとっているものと結論づけられる。これに比し他の4種のdimerは明らかに異ったCD patternを示す。(2'→5') m<sup>8</sup>Apm<sup>8</sup>A, (3'→5') m<sup>8</sup>Apm<sup>8</sup>A, (3'→5') Apm<sup>8</sup>Aについても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。



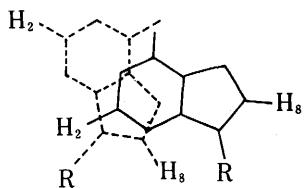
3'-anti, 5'-anti



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 VII

## 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>8), 9)</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した右巻きの二重ラセン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'-磷酸のX線回析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. Ikebara, W. Limn, and T. Fukui, Chem. Pharm. Bull., **25**, 2302 (1977)
- 4) M. Ikebara, 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. Tso 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. Carbohydr. Nucleoside Nucleotide **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'-二磷酸に導き、ポリヌクレオチドフォスフォ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考える。