



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 酵素的トランスグリコシレーションによるプリンヌクレオシド類の新合成法に関する研究                                                                                                        |
| Author(s)    | 森沢, 弘和                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1981, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33018">https://hdl.handle.net/11094/33018</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)    | 森 沢 弘 和                                                    |
| 学 位 の 種 類   | 薬 学 博 士                                                    |
| 学 位 記 番 号   | 第 5 4 2 0 号                                                |
| 学位授与の日付     | 昭 和 56 年 9 月 24 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 | 酵素的トランスグリコシレーションによるプリンヌクレオシド類の新合成法に関する研究                   |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授 池原 森男<br>(副査)<br>教 授 岩田 宙造 教 授 富田 研一 教 授 田村 恭光 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

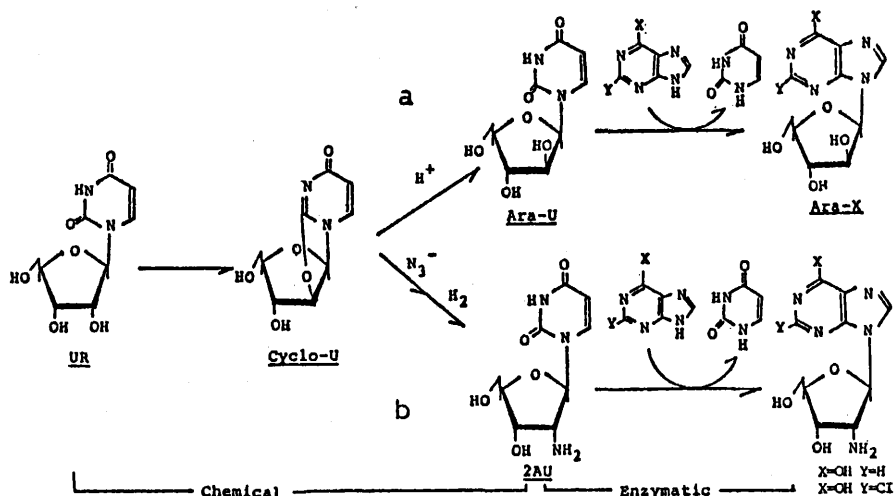
### 序 論

天然ヌクレオシドのリボース、あるいはデオキシリボース部分がアラビノースまたは2-アミノ-2-デオキシリボースになったものを“糖部変換ヌクレオシド”と仮称する。これらは幾通りかの利用が考えられ、一つには抗生物質との関連から生理活性を期待したアナログ合成を含む医薬への応用研究とかそれらの物理化学的あるいは生物化学的諸性質を、天然ヌクレオシドのそれと対比させ明らかにする為のアナログを利用した核酸の機能発現に関する研究があろう<sup>1)</sup>。

糖部変換ヌクレオシドの中で、プリンアラビノシド類は、アデニンアラビノシド (Ara-A) をはじめとして、抗ウイルス、抗ガン活性を示すものが見い出されている<sup>2,3)</sup>。一方それらの合成法も数多く報告されているが<sup>4)</sup>、大量に、かつ簡便に、合成できる方法ではなかった。そこで著者は、Ara-Aの経済性の高い新製造法開発の為、酵素的トランスグリコシレーション法の有用性を勧告し、以下の研究を行った。

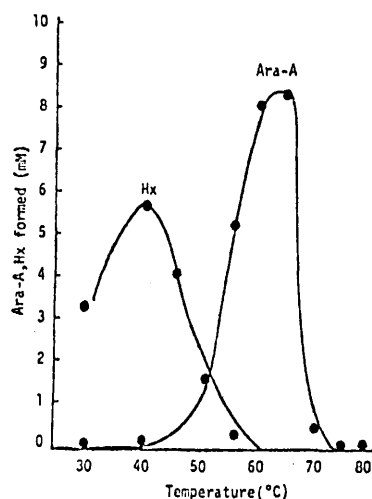
反応の骨子は次のスキームに示す通り、糖部変換が容易なウリジン (UR) をCyclo-U経由でウラシルアラビノシド (Ara-U) とした後に、酵素反応により、プリン塩基類と、反応させ (トランスグリコシレーション) プリンアラビノシド類 (Ara-X) を一挙に得ようというものである。(スキーム a)<sup>5)</sup> アデニンとAra-Uとの反応を検討の結果、第1表に示す通り、本反応は腸内細菌群により触媒されることを見出し、特に活性の高い *Enterobacter aerogenes* を選択した。

この反応は60℃に至適温度があるという特異な条件を有し、その温度領域では、アデニンのヒポキサンチン (Hx) への分解が抑えられ、Ara-A製造には好適であるという新事実を発見した。<sup>6)</sup>



第1表 Incubation mixture containing 5% wet cells, 30mM Ara-U, 10mM adenine and 25mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was adjusted to pH7 with 1N KOH and was incubated at 60°C for 15 hours.

| Strains                         | Ara-A (mg/dl) |
|---------------------------------|---------------|
| <i>Pseudomonas stutzeri</i>     | 11.3          |
| <i>Flavobacterium gasogenes</i> | 11.0          |
| <i>Achromobacter lactium</i>    | 8.5           |
| <i>Salmonella typhimurium</i>   | 11.5          |
| <i>Citrobacter intermedium</i>  | 17.0          |
| <i>Escherichia coli</i>         | 48.0          |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>   | 205.0         |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>     | 84.5          |
| <i>Kluyvera citrophila</i>      | 75.0          |
| <i>Serratia marcescens</i>      | 34.5          |
| <i>Erwinia herbicola</i>        | 31.5          |
| <i>Proteus vulgaris</i>         | 13.5          |
| <i>Xanthomonas citri</i>        | 13.8          |



Ara-U 30mM, adenine 10mM, wet cell 5% K-phosphate buffer 30mM (pH7) 5hr.

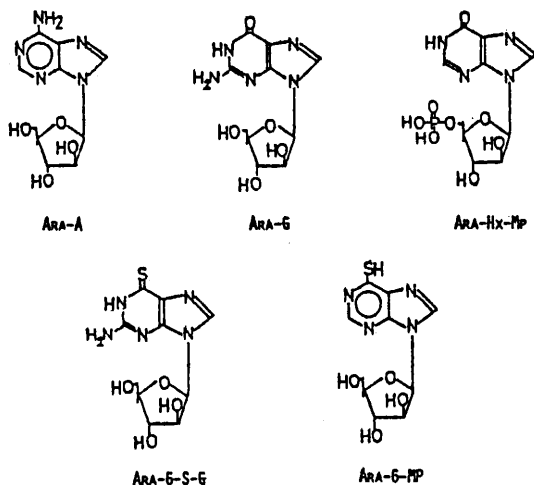
このようにして、Ara-Aの新製造法を確立した後に、この反応を更に拡張する為、化学反応を組み合わせる事による広範囲な塩基部アナログ合成の可能性を検討した。

またプリンアラビノシドのみならず、他の糖部変換ヌクレオシドすなわち、プリン-2'-アミノ-2'-デオキシリボシド類合成への適用を試み、Ara-Uと同様にCyclo-Uから合成できる2'-アミノ-2'-デオキシウリジン (2-AU) とヒポキサンチンとの反応により、2'-アミノ-2'-デオキシイノシン (2頁スキームb, X=OH, Y=H) が生成することが判った<sup>7)</sup>

次に容易にかつ大量に得られるAra-Aの利用として、Ara-Aがデオキシアデノシンの代謝拮抗剤として作用することから、オリゴヌクレオチドレベルでの知見を得る為、Ara-Aを含む、デオキシオリゴマーの合成を行った。

# 第一章 プリンアラビノシド類の合成<sup>8)</sup>

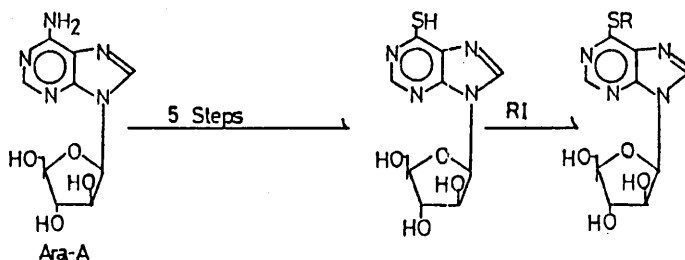
## BIOLOGICALLY ACTIVE PURINE ARABINOSIDES AND ARABINOTIDES



プリンアラビノシド類には、Ara-A<sup>9)</sup>をはじめ、Ara-G<sup>10)</sup> Ara-Hx-MP<sup>11)</sup> Ara-6-S-G<sup>12)</sup> Ara-6-MP<sup>13)</sup> の如く、抗ウイルス、抗ガン活性を有する化合物が知られている。

Ara-Aは大量に、かつ容易に得られることは先に述べたが、そこでAra-Aを出発原料にして、制ガン活性の知られているAra-6-MPへ導き、活性の増強を期待して、新規S-アルキル誘導体 (R=, CH<sub>3</sub>, Et, CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>·COOH, CH<sub>2</sub>-CO-NH<sub>2</sub>, CN) を合成した<sup>14)</sup>

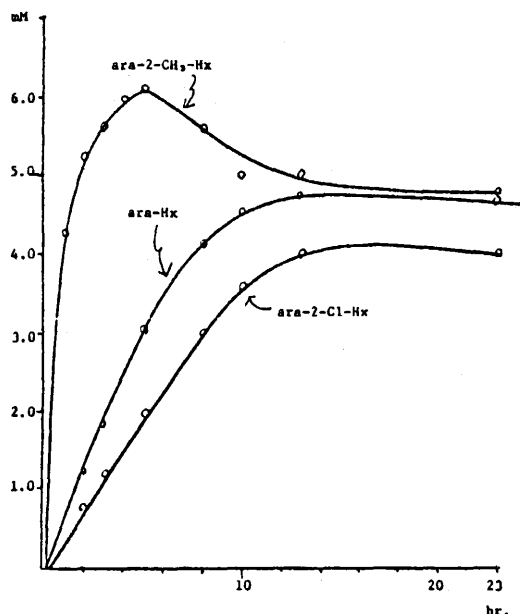
酵素的トランスグリコシレーション (2頁



スキーム a) 於いては、基質特異性などの制約がある。Ara-Gは、抗ウイルス活性を示すことが知られているが、Ara-A程、その検討がなされていない。その原因は、大量合成法がないことに基因すると考え、グアニンの反応を検討したところ、意外にも低収率であった。

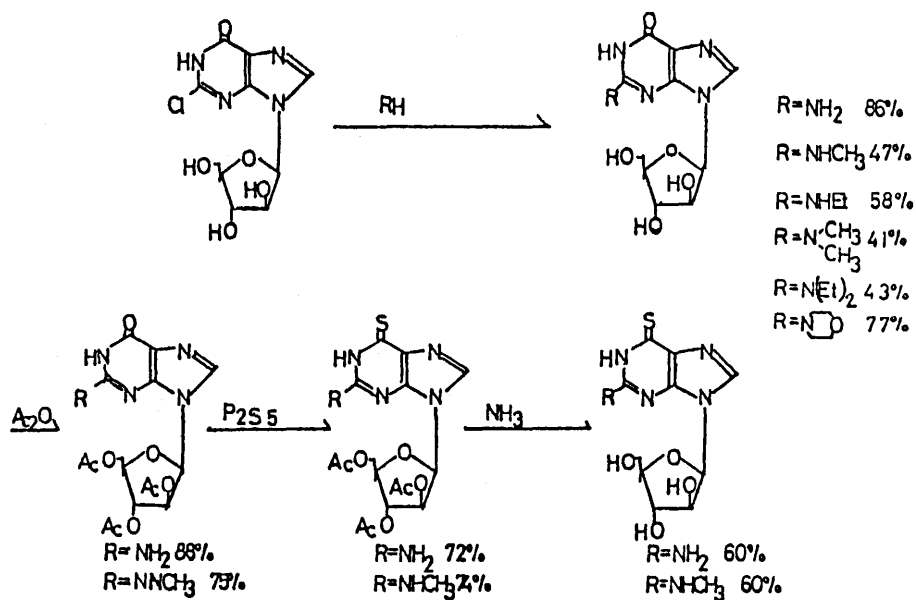
そこで化学変換が容易な2-クロルヒポキサンチン (生成物は、Ara-2-Cl-Hx) との反応を検討したところ、比較的収率良く反応することが判った。また同時に検討した2-メチルヒポキサンチン (生成物はAra-2-CH<sub>3</sub>-Hx) との反応では、20時間程度の反応率は、ヒポキサンチン (生成物はAra-Hx) のそれとさほど変わらないが、非常に速く反応することが見い出され、置換基による差が明らかとなった。得られたAra-2-Cl-Hxは、Ara-Gへの変換のみならず、プリン核2位への置換基導入に有用であり、下記スキームに示す様に、Ara-6-S-Gの他、新規N<sup>2</sup>-置換誘導体合成を行った<sup>15)</sup>

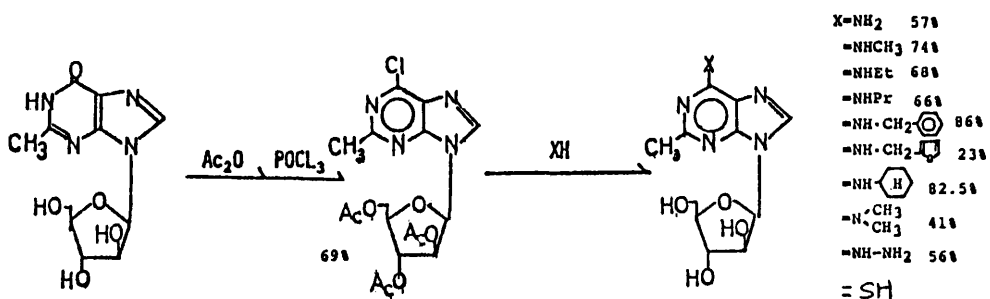
また、Ara-2-CH<sub>3</sub>-Hyも短時間で調製できること、およびアデノシンの2-位置換体はデアミネーションを受けにくいという知見から、6-位をクロル化した後、種々のアミン類と反応させ、Ara-Aの新規誘導体を合成した。同時に、Ara-6-MPからは誘導できない。Ara-2-CH<sub>3</sub>-6-MPも合成することができた。



Time Course of Production of ara-Hx(6),  
ara-2-CH<sub>3</sub>-Hx(7) and ara-2-Cl-Hx(8)

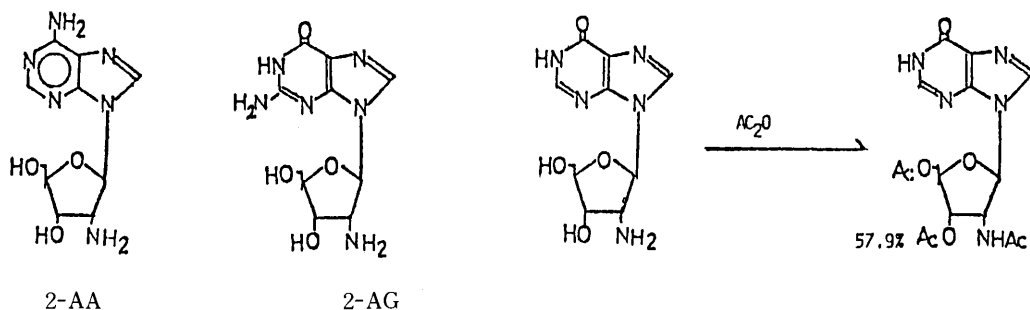
Reaction Condition; Incubation mixture, containing 5% intact *Enterobacter Aerogenes* AJ11125 as wet base, 30mM ara-U, 10mM purine bases (2,3,4) and 25mM potassium phosphate (pH 7.0) was incubated at 60°C.



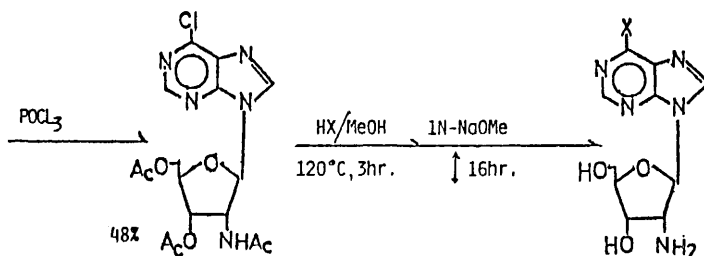


## 第二章 プリン-2'-アミノ-2'-デオキシリボシド類の合成<sup>16,17)</sup>

最近2'-アミノ-2'-デオキシリボースを含む、アデニン (2-AA), 及びグアニン (2-AG) ヌクレオシドが抗生物質として、わが国で発見された<sup>18,19)20)</sup> これらは抗ガン, 抗菌, および抗マイコプラズマ活性を示すことが報告されている。一方これらのアナログは, 数種合成されているにすぎず<sup>21)</sup> 生理活性の面から興味を持たれる。



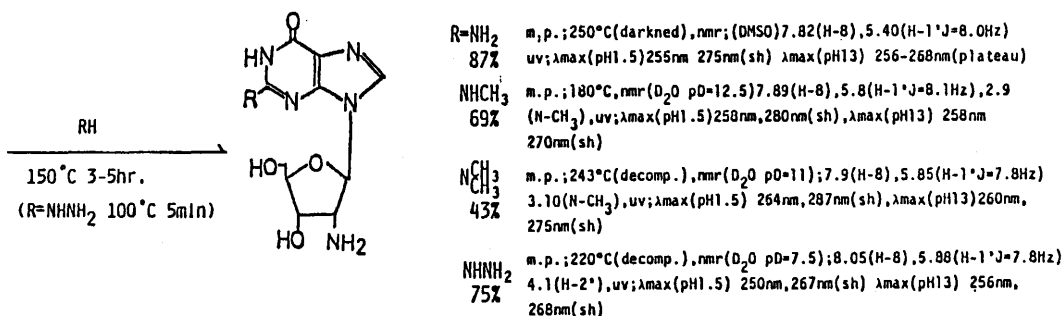
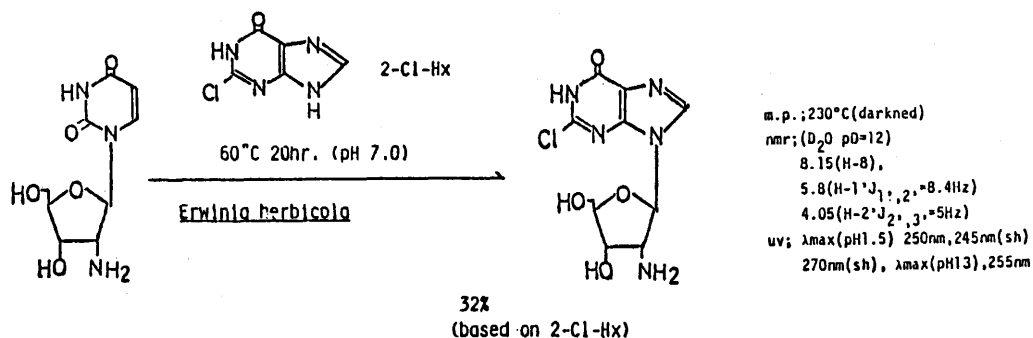
そこで, 酵素的に得られた2'-アミノ-2'-デオキシイノシンの6位をアミノメーションし2-AAおよびそのN-メチル体を合成した (X=NH<sub>2</sub>, NH-CH<sub>3</sub>)。尚この反応では, 6位クロル化及び, 脱N-アセチル化の収率が低く, クロル化には, アミン添加, アミノ基の保護には, トリフルオロアセチル基が適当と思われる。



次に2-AG合成の為, 第一章で述べた理由から, 2-クロルヒポキサンチンと2-AUとの反応を検討し, 2'-アミノ-2'-デオキシ-2-クロルイノシンを得ることができた。

またアミン類との反応により, 2-AG及びその新規N<sup>2</sup>-置換体を得ることができた<sup>17)</sup>

ここに得られた化合物の内, 2'-アミノ-2'-デオキシ-2-ヒドラジノイノシンはin vitroの系で, Hela cell及び*Commamonasterigera*の増殖阻止作用が認められた興味ある新規誘導体である。



### 第三章 プリンアラビノシド類の生理活性<sup>14)</sup>

第一章で得られた新規アナログを含むプリンアラビノシド類の in vitro 制ガン活性を調べた。方法は二種のガン細胞を用い、培養細胞中への <sup>3</sup>H-dT の取り込み阻害を測定することにより行った。

第2表 PRELIMINARY ANTITUMOR EFFECT OF ARA-GMP AND ITS ANALOGS  
(INHIBITION % OF DNA SYNTHESIS)

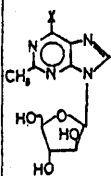
|                                    | Tumor<br>Conc.<br>Sample | P 815     |            | P 388     |             |
|------------------------------------|--------------------------|-----------|------------|-----------|-------------|
|                                    |                          | 5μg/220μl | 25μg/220μl | 5μg/220μl | 25μg/220 μl |
|                                    |                          |           |            |           |             |
| R= H                               |                          | 9         | 23         | 12        | 15          |
| CH <sub>3</sub>                    |                          | 57        | 80         | 41        | 75          |
| Et                                 |                          | 48        | 68         | 71        | 71          |
| CH <sub>2</sub> ⌬                  |                          | 58        | 74         | 77        | 83          |
| CH <sub>2</sub> -COOH              |                          | 5         | -4         | 12        | 8           |
| CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>  |                          | 23        | 47         | 38        | 64          |
| CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub> |                          | 29        | 53         | 52        | 71          |
| CN                                 |                          | 99        | 99         | 97        | —           |

Ara-6-MPのS-アルキル誘導体については、第2表に示す様に、アルキル基がメチル、エチル、ベンジル基の時に、Ara-6-MPに比べて著しい活性増大が見られた。カルボキシメチル基のOH基をアミド、エステルにしたものでは、その親油性が増す程、活性が増大する興味ある傾向が見い出された、CN誘導体は最も高い活性を示した。

これらの化合物は、in vivoの系でL-1210に対する効果を検討したが、CN誘導体は毒性が認められ、他の誘導体についても大きな改善は見い出せなかった。

Ara-2-CH<sub>3</sub>-Hx誘導体については、第3表に示す通り、6位へ種々のアミン類を導入したことに、活性の増大が認められた。これらはAra-Aの誘導体と見ることが出来る為、抗ウイルス活性に興味を持たれる。6位SH体は、Ara-6-MPの2-CH<sub>3</sub>-誘導体であるがプリン核2位へのメチル基導入は全く効力を失うことが判った。

第3表 Antitumor effect of Ara-2-CH<sub>3</sub>-Hx and its Analogs  
( Inhibition % of DNA Synthesis )

|  | Tumor<br>Conc.                                                                                          | P 815      |            | P 388     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----------|------------|
|                                                                                   | Sample                                                                                                  | 5ug/220ul  | 25ug/220ul | 5ug/220ul | 25ug/220ul |
|                                                                                   | X = O                                                                                                   | -2         | 7          | 13        | 11         |
|                                                                                   | NH <sub>2</sub>                                                                                         | -1         | 58         | 31        | 70         |
|                                                                                   | NHCH <sub>3</sub>                                                                                       | 0          | 29         | 20        | 40         |
|                                                                                   | NHEt                                                                                                    | 23         | 56         | 45        | 70         |
|                                                                                   | NHPr                                                                                                    | 36         | 64         | 52        | 75         |
|                                                                                   | NHCH <sub>2</sub> -  | -3         | 62         | 19        | 71         |
|                                                                                   | NH-                  | 44         | 74         | 61        | 84         |
|                                                                                   | NHCH <sub>2</sub> -  | 35         | 66         | 51        | 78         |
|                                                                                   | N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                                                        | 24         | 30         | 24        | 47         |
|                                                                                   | MHNH <sub>2</sub>                                                                                       | -12        | 1          | 10        | 21         |
|                                                                                   | SH (O-Ac)                                                                                               | -7<br>(-5) | -5<br>(14) | 1<br>(10) | 0<br>(20)  |

次にAra-G及び種々の誘導体について検討したところ、今までの傾向とは異なり種々の置換基導入はむしろ、活性の低下をもたらすという知見が得られた(第4表)

#### 第四章 Ara-Aを含むデオキシオリゴマー合成

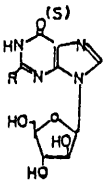
近年遺伝子工学の分野の進歩は著しいものがあり、成長ホルモンやIF合成への応用の他、分子生物学、あるいは、医学分野への利用もめざましいものがある。この進歩に大きく、貢献したものとして、制限酵素の発見とその利用がある。<sup>22)</sup>

これらの酵素は、特定の塩基配列を認識し、特定の部位を選択的に切断するが、塩基部がメチル化されれば作用しないことが知られている。しかし詳細な研究は、あまり行われてなく、糖部の構造変化については全く知見がない。

そこでEco-RI認識塩基配列のdAをAra-Aとした時どの様な変化(認識及び切断反応に於いて)が

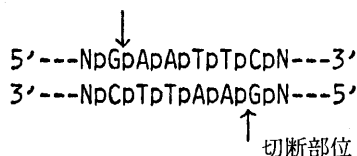


第4表

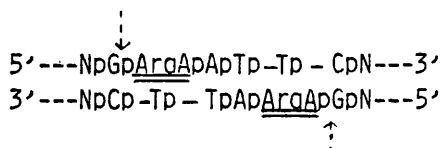
| Tumor<br>Conc.                                                                    | Sample                              | P 815     |            | P 388     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|
|                                                                                   |                                     | 5ug/220ul | 25ug/220ul | 5ug/220ul | 25ug/220ul |
|  | R NH <sub>2</sub>                   | -13       | 25         | 15        | 50         |
|                                                                                   | NHCH <sub>3</sub>                   | -11       | 11         | 5         | 8          |
|                                                                                   | NH <sub>2</sub> t                   | 0         | 0          | 5         | 12         |
|                                                                                   | CH <sub>3</sub><br>NCH <sub>3</sub> | 5         | 0          | 3         | 8          |
|                                                                                   | NEt <sub>2</sub>                    | -4        | 6          | 7         | 14         |
|                                                                                   | N <sub>2</sub> O                    | -5        | -4         | 2         | 19         |
|                                                                                   | NH <sub>2</sub> (OAc)               | -13       | -11        | 5         | 4          |
|                                                                                   | (S)<br>NH <sub>2</sub> (OAc)        | 6         | 16         | 18        | 16         |
|                                                                                   | (S)<br>NHCH <sub>3</sub> (OAc)      | 8         | 38         | 24        | 52         |
|                                                                                   | NH <sub>2</sub> (S)                 | -11       | -9         | 13        | 11         |
|                                                                                   | (S)<br>NHCH <sub>3</sub>            | -7        | -6         | 12        | 7          |

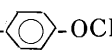
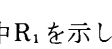
観察されるかを調べることは興味あることと考え、Ara-Aを含むオクターマーを合成した。

#### Restriction Endonuclease EcoRI-recognized Sequence



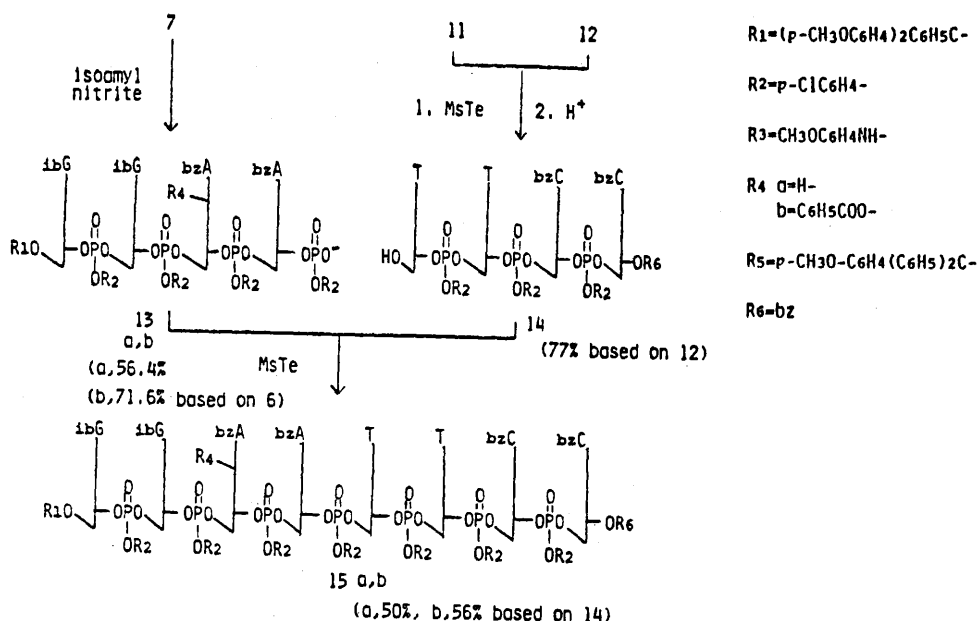
#### Modified Sequence



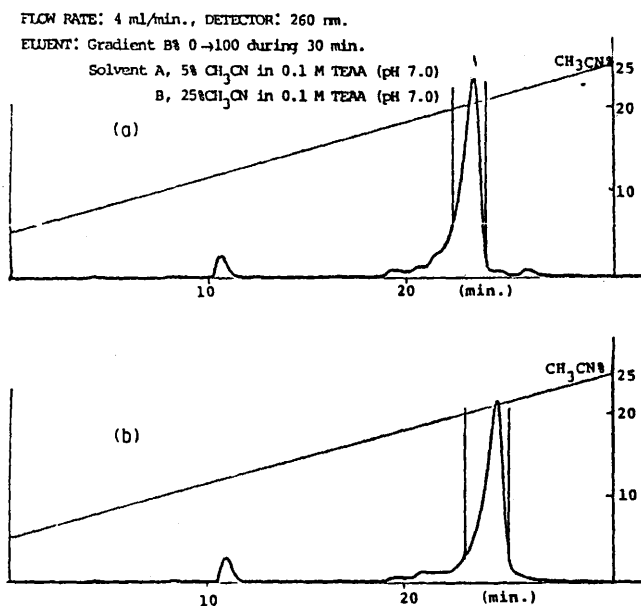
合成法は、リン酸の保護基として、p-クロルフェニル基、及びp-メトキシアニリド基を用いるトリエステル法により、<sup>23)</sup> メシチレンスルホニルテトラゾリド (MSTe)<sup>24)</sup> を縮合剤として、行った。縮合反応のスキームの一部を次頁に示す。スキーム中7はfully protected tetramer, DMTr <sup>Nibu</sup>Gp <sup>Nibu</sup>Gp Ap <sup>NBz</sup>Ap-NH--OCH<sub>3</sub>を示す。また11は、DMTrTp-コンポーネント、12は、HOTp <sup>NBz</sup>Cp <sup>NBz</sup>Cp <sub>O<sub>BZ</sub></sub>を示す。得られた13と14の縮合により、目的とするfully protectedオクターマーを得た。(但し、DMTrはスキーム中R<sub>1</sub>を示し、Pは、スキーム中のP-OR<sub>2</sub>の略であり、PNH--OCH<sub>3</sub>は、 $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{P-OR}_3 \\ \text{OR}_2 \end{matrix}$ の略である)

このようにして得られたfully protectedオクターマーは、一部を酸、アルカリ処理により、保護基を除去した後、H. P. L. Cにより単離精製した。

その構造は二次元ホモクロマトグラフィーにより確認した。<sup>25)</sup>



Preparative high-pressure liquid chromatograms  
of dGGaAATTC (a) and dGGAATTC (b) on  
MEGAPAK SIL C-18, reversed-phase column (0.72 × 250 mm)



## 結 論

1. 酵素的トランスグリコシレーション法による糖部変換ヌクレオシド類の新規合成法を開発した。
2. 有用プリンアラビノシド類, 特にAra-Aの経済的に有利な新製法を確立した。
3. 酵素反応と化学反応を組み合わせることにより, 生理活性が期待され, 入手困難な新規アナログ

の合成を行うことができた。

4. 本法を2'-アミノ-2'-デオキシプリンヌクレオシド類の合成へも拡張し、糖部変換ヌクレオシドの一般的合成法としての可能性を示した。
5. 新規ヌクレオシドを多数合成し、生理活性(制ガン性)に関する知見を得た。
6. Ara-Aを含むEco RI認識配列のデオキシオリゴヌクレオチドをはじめて合成した。

#### 引用文献

- 1) 池原森男, 福井寿一, 有合化, **37**, 948 (1979).
- 2) G. B. Elion, J. L. Rideout, P. Collins and D. J. Bauer, *Ann. N. Y. Sci.*, **255**, 468 (1975)
- 3) S. S. Cohen, *Medical Biology*, **54**, 299 (1976)
- 4) 金子正勝, 清水文治, 有合化, **37**, 40 (1979)
- 5) 森沢弘和, 宇多川隆, 山崎皓弘, 有合化, **39**, 205 (1981)
- 6) T. Utagawa, H. Morisawa, T. Miyoshi, F. Yoshinaga, A. Yamazaki and K. Mitsugi, *FEBS Lett.*, **109**, 261, (1980)
- 7) T. Utagawa, H. Morisawa, T. Nakamatsu, A. Yamazaki, and S. Yamanaka, *FEBS Lett.*, **119**, 101 (1980)
- 8) H. Morisawa, T. Utagawa, T. Miyoshi, N. Kashima, T. Nakamatsu, S. Yamanaka and A. Yamazaki, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **6**, 25 (1979)
- 9) F. M. Schabel, Jr., J. A. Montgomery, "Chemotherapy of Virus Diseases," Vol. I, D. J. Bauer ED., Pergamon Press, Oxford, p231—364, (1972)
- 10) E. J. Reist and L. Goodman, *Biochemistry*, **3**, 15 (1964)
- 11) W. W. Lee, A. P. Martinez, R. W. Blackfor, U. J. Bartuska, E. J. Reist and L. Goodman, *J. Med. Chem.* **14**, 819 (1971)
- 12) A. P. Kimball, B. Bowman, P. S. Bush, J. Herrion, and A. LePage, *Cancer Res.*, **26**, 1337 (1966)
- 13) G. R. Revankar, J. H. Huffman, L. B. Allen, R. W. Sidwell, R. K. Robins and R. L. Tolman, *J. Med. Chem.*, **18**, 721 (1975)
- 14) H. Morisawa, T. Utagawa, T. Miyoshi, S. Yamanaka, and A. Yamazaki, in preparation.
- 15) H. Morisawa, T. Utagawa, T. Miyoshi, F. Yoshinaga, A. Yamazaki and K. Mitsugi, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 479 (1980)
- 16) H. Morisawa, T. Utagawa, T. Nakamatsu, S. Yamanaka, and A. Yamazaki, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **8**, 11 (1980)
- 17) H. Morisawa, T. Utagawa, S. Yamanaka and A. Yamazaki, *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
- 18) T. Nakanishi, F. Tomita and T. Suzuki) *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2465 (1974)
- 19) Y. Iwai, A. Nakagawa, A. Nagai, K. Matsuyama, Y. Takahashi, M. Matsushita, A. H

- Hirano and S. Omura, J. Antibiot., **32**, 1367 (1979)
- 20) N. Okawa, H. Nakayama, K. Ikeda, K. Furihata, A. Shimazu, N. Otake and Y. Yonehara, Agric. Biol. Chem., **44**, 1671 (1980)
- 21) M. Ikehara and Y. Takatsuka, Chem. Pharm. Bull., **26**, 985 (1978)
- 22) H. O. Smith, Science, **205**, 445 (1979)
- 23) E. Otsuka, S. Shibahara, T. Ono, T. Fukui, and M. Ikehara, HETEROCYCLES, **15**, 395 (1981)
- 24) J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl and R. Wu, Nucleic Acids Res., **4**, 353 (1977)
- 25) E. Otsuka, H. Morisawa and M. Ikehara, in preparation.

### 論文の審査結果の要旨

森沢君は先ずアラビノシルウラシルよりグアニン及びアデニンへのトランスグリコシテーションが *Enterobacter aerogenes* の存在下60°の高温下で非常に好収率で進むことを発見し、この方法を用いて大量に合成したアラビノシルプリンから、種々の6-チオ、及びアルキルチオヒポキサンチン、2-置換グアニン、チオグアニン及び2-メチル-6-置換プリン等を合成した。

更に2'-アミノ-2'-デオキシリボフラノースを転位する菌体をも発見し、それを用いて、ヒポキサンチン、グアニンの2'-アミノ-2'-デオキシヌクレオシド多数を合成した。

これらの多くのヌクレオシド、アナログの抗癌活性を調べた結果その中の数種に顕著な活性を見出した。

更に同君は制限酵素Eco RIの認識部位GAATTCのAをアラビノシルAにかえたデオキシヘキサマーを合成した。

これらの成果は博士号請求に価するものと認める。