



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	NADase関与のTransglycosidation反応における2-フルオロニコチンアミドの反応性
Author(s)	上参郷, 慶一; KAMISANGO, Keichi; 外岡, 秀一 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 39, 29-31
Issue Date	1979-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26521">https://hdl.handle.net/2115/26521</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	39_P29-31.pdf



# NADase 関与の Transglycosidation 反応における

## 2-フルオロニコチンアミドの反応性

上参郷慶一 外岡秀一 関川 勲

(北海道大学免疫科学研究所化学部門)

(昭和53年10月31日受付)

有機フッ素化合物の中には医薬品として利用されているものが多数あり、その代表的なものに制ガン剤として使われている 5-フルオロウラシル誘導体<sup>1)</sup> などがある。

フッ素は水素について小さい原子であり、立体的に見ると水素原子とその大きさにあまり差はない。したがってある分子中の水素をフッ素で置換しても立体的には殆ど変化がないと考えてよく、生体成分であるアミノ酸、核酸などにフッ素原子を導入しても生体はこれを区別できず、正常成分と同様に吸収し、場合によっては代謝系に取込むため、毒性を含めた種々の生理作用を発現する場合が多い<sup>2)</sup>。

さらに、C-F 結合エネルギーは C-H 結合のそれよりも大きく安定であり、生体内で代謝されにくいという特徴がある。このために、フッ素化合物はさきの立体的特徴とも呼応して代謝的拮抗作用を示す場合が少くない<sup>3)</sup>。

ところで、ニコチンアミド誘導体やナイアシン誘導体が興味ある生理活性を示すことはよく知られている。例えば、2-ヒドロキシニコチン酸は脂肪酸合成を阻害し、マウスに経口的に投与すると 2-ヒドロキシニコチン酸リボヌクレオシドとして排泄される<sup>4)</sup>。

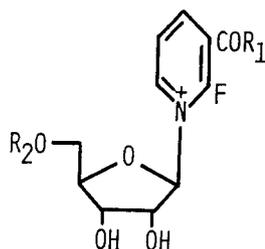
そこで、新しい生理活性物質を見出すことを目的として NAD の先駆物質であるニコチンアミドリボヌクレ

オシド及びニコチン酸リボヌクレオシドに着目して、それらの 2-フルオロ誘導体である (1) 及び (2) (図-1) の合成を企てた。我々はさきに NAD 関連物質の酵素的合成法を報告<sup>5)</sup> しており、その方法を応用して、まず NAD-アナログ (3) の調製を試みるべく、塩基の反応性を検討した。

### 実験材料及び方法

2-フルオロニコチン酸は Minor らの方法<sup>6)</sup> に従って 2-アミノ-3-メチルピリジンより合成した。NAD (Grade III, Sigma 社) は市販品を使用した。NADase は既報の方法<sup>7)</sup> で調製した。薄層クロマトは Silicagel H (Merck 社) に F<sub>254</sub> 蛍光指示薬 (Merck 社) を 3% の割合で混合し 0.25 mm の厚さに塗布したプレートを使用し、アンモニア蒸気を飽和した iso-PrOH-H<sub>2</sub>O (3:2, v/v) 系で展開した。スポット検出はマナスランプ (254 nm) で行った。DEAE-Sephadex (A-25, 3.5 meq/g) カラムクロマトはマイクロカラム (1.0×5 cm) を使用し、LKB-Uvicord II 型 (254 nm) を併用してギ酸アンモニウムの step-wise 溶出 (20 ml/hr) で行った。IR-スペクトル、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルはそれぞれ島津 IR-27G, 日立 R-20B で測定した。

**2-フルオロニコチンアミド:** Minor らの方法<sup>6)</sup> を改良して調製した。2-フルオロニコチン酸 2.82 g を塩化チオニル 25 ml に加え、3 時間加熱還流する。減圧下で過剰の塩化チオニルを留去しオイル状物質を得る。これを乾燥ベンゼン 20 ml に溶かし、攪拌しつつアンモニアガスを 30 分間通ずる。得られた沈澱から生成物を乾燥アセトンで抽出し、粗生成物 2.08 g を得る。これをカラムクロマト-Silicagel 60 (Merck 社), chloroform-acetone (9:1) で精製し、ベンゼン-メタノールで再結晶すると白色針状晶 1.02 g が得られる。mp. 165°~167°, IR: 3300, 3130, 1660, 1620 cm<sup>-1</sup> (nujol); UV: λ<sub>max</sub><sup>H<sub>2</sub>O</sup> 265 nm; <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD), 8.27 (dd, 1H, J=5.0, 2.0 Hz), 7.78 (dd, 1H, J=7.5, 2.0 Hz), 7.28 (dd, 1H, J=7.5, 5.0 Hz)。



- (1) R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = H
- (2) R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H
- (3) R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = ADENOSINE-DIPHOSPHATE

図-1

**酵素反応の条件:** NAD 6.8 mg (10  $\mu$ mole), 塩基 7.5 mg (50  $\mu$ mole) の水溶液を 0.1 N-NaOH にて中和後, 0.2 M Tris-HCl (pH 7.4) 0.25 ml を加え容量を水で 0.7 ml に調節する。これに NADase (27 U/ml) 0.3 ml を加え, NAD, 塩基, 及び buffer の最終濃度をそれぞれ 10 mM, 50 mM, 0.05 M とした。

### 結果及び考察

NADase の存在下, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) 中, 2-フルオロニコチンアミド及び2-フルオロニコチン酸をそれぞれ NAD と 37° で incubate し, 反応経過を TLC で調べた。反応開始後 90 分で NAD のスポットは完全に消失したが, 生成物はいずれの場合も ADP-ribose に相当するスポットのみで, 目的とする NAD-アナログのものは見出されなかった。さらに, 反応液を DEAE-Sephadex のマイクロカラムにかけアナログ生成の有無を調べ, Uvicord によるクロマトグラムとして表わした (図-2)。両者とも得られた画分は, 2 種類のみで, TLC, UV-吸収からそれぞれ塩基及び ADP-ribose のピークであることが確認され, アナログ相当の画分は見出されなかった。アナログ生成の場合として, 4-メチルニコチンアミドを塩基として用いた例<sup>8)</sup>も対照として示した (図-3)。結局, この酵素反応ではニコチンアミド及びニコチン酸の 2-フルオロ誘導体アナログは得ることができなかった。

transglycosidation 作用の機構については, 図-4 に示すように Kaplan 等が簡単に述べている<sup>9)</sup>。反応の遷

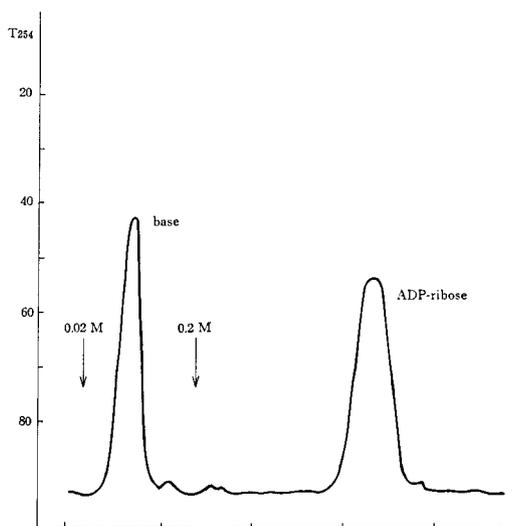


図-2 2-fluoronicotinamide を用いた時のクロマトグラム

移状態では ADP-ribose と酵素の複合体が形成され, それが周囲に存在する nucleophile の攻撃を受けて生成物を与えるというものである。この場合, 水と塩基の競争的反応になるわけであるが, ADP-ribose が不可逆的に生成するのに対して, アナログは平衡反応で生成してくる。従って, アナログ生成のためには塩基濃度ばかりでなく, その nucleophilicity が高いことが要求されるだろう。すなわち, 塩基の pKa の大小及びピリジン窒素近辺の立体的因子がアナログ生成を大きく左右するものと考えられる。2-フルオロ誘導体塩基について考えてみると, はじめにも論じたが, フッ素は水素に比べてその大きさにあまり差がなく立体的な影響は殆どないと見られる。しかしその強い電気陰性度起因してピリジン窒素の pKa 値が極度に小さくなり, nucleophile としての性質に乏しくなる結果, アナログ生成が起こらないものと考えられよう。ちなみに, 或程度立体障害が伴っても pKa 値が高い 6-アミノニコチンアミドの場合はアナログが生成するとの報告<sup>10)</sup>がある。結局, 目的とするヌクレオシドの合成にはこの酵素反応は利用できなかったが, その生理作用には興味を持たれるところであり, 追って化学的合成法を検討している。

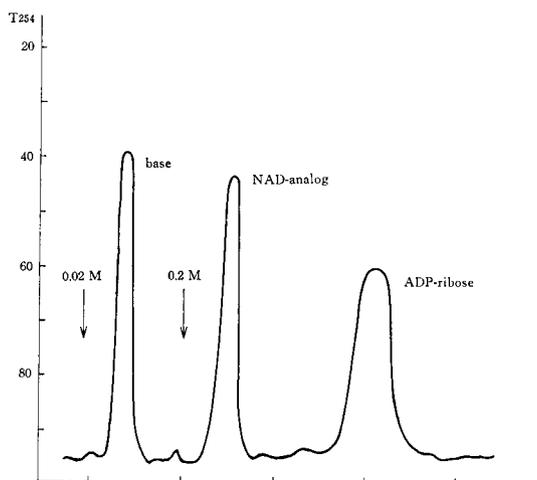


図-3 4-methylnicotinamide を用いた時のクロマトグラム

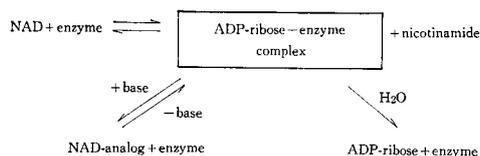


図-4

## 結 論

2-フルオロニコチンアミドリボヌクレオシドをNAD-アナログを経て酵素的に合成する目的で、まず NADase 関与の transglycosidation 反応を試みた。その結果、目的とするアナログは得ることができず、フッ素の強い電気陰性度に起因するピリジン塩基の nucleophilicity の著しい減少があらためて確認された。

## 文 献

- 1) Heidelberger, C.: A Ciba Foundation Symposium, "Carbon-Fluorine Compounds", p. 126, 1972, Elsevier, Amsterdam.
- 2) Goldman, P.: Science, **164**, 1123, 1969.
- 3) Santi, D. V. and Sakai, T. T.: Biochemistry **10**, 3598, 1971.
- 4) Schwartz, M. A., Kolis, S. J., Williams, T. H., Gabriel, T. F. and Toome, V.: Drug Metab. Dispos., **1**, 447, 1973.
- 5) Tono-oka, S., Sasaki, A., Shirahama, H., Matsu-moto, T. and Kakimoto, S.: Chemistry Lett., **1449**, 1977.
- 6) Minor, J. T. and Hawkins, G. F.: J. Am. Chem. Soc., **71**, 1125, 1949.
- 7) 外岡秀一, 柿本七郎: 北大免疫研紀要, **37**, 17, 1977.
- 8) Tono-oka, S., Sasahara, Y. and Sekikawa, I.: unpublished results.
- 9) Zatman, L. J., Kaplan, N. O., Colowick, S. P. and Ciotti, M. M.: J. Biol. Chem., **209**, 453, 1954.
- 10) Dietrich, L. S., Friedland, I. M. and Kaplan, L. A.: J. Biol. Chem., **233**, 964, 1958.

## Reactivity of 2-Fluoronicotinamide in NADase-Catalyzed Transglycosidation Reaction

Keichi KAMISANGO, Shuichi TONO-OKA  
and Isao SEKIKAWA

The synthesis of 2-fluoro-NAD, has been attempted utilizing the NADase-catalyzed reaction of NAD with 2-fluoronicotinamide. However, no detectable amounts of the expected NAD-analog could be observed. This result has revealed the remarkable decrease in nucleophilicity of the base, due to the strong electronegativity of the fluorine atom.