ヌクレオシド類と塩化水銀および塩化カドミウムの錯形成能について¹⁾権田金治,^{2a,d)} 古賀正三,^{2a)} 坂口正一, 宮田義久, 小倉治夫,^{2b)} 岡本敏彦^{2c)}東京大学応用微生物研究所,^{2a)} 北里大学薬学部,^{2b)} 東京大学薬学部^{2c)}Complex Formation of Nucleosides with HgCl₂ and CdCl₂KINJI GONDA,^{2a,d)} SHOZO KOGA,^{2a)} MASAKAZU SAKAGUCHI, YOSHIHISA MIYATA,
HARUO OGURA^{2b)} and TOSHIHIKO OKAMOTO^{2c)}*Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo,^{2a)} School of Pharmaceutical
Sciences, Kitasato University,^{2b)} and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, University of Tokyo^{2c)}*

(Received September 16, 1977)

Through the observation of chemical shifts in nuclear magnetic resonance spectra, formation constants of 1:1 metal complexes with nucleosides were found in dimethyl sulfoxide at room temperature. The complex formation constants of CdCl₂-adenine and CdCl₂-benzyladenine are 1.6—1.7 times larger than the values for the HgCl₂ complexes of adenine and benzyladenine. On the other hand, the formation constant of HgCl₂-6-mercaptapurine is larger than the value of CdCl₂-6-mercaptapurine.

6-Methylmercaptapurine did not complex with HgCl₂ or CdCl₂.

In nucleosides, the complex formation constant with HgCl₂ is in the order of 4-thiouridine, cyclocytidine, and cytidine. The complex formation with HgCl₂ or CdCl₂ was not observed with nucleoside analogs prepared from 5,6-diamino-1,3-dimethyluracil with D-glucose or D-galactose.

Keywords—nucleosides; cytidine; cyclocytidine; 4-thiouridine; adenine; 4-mercaptapurine; 4-(methylmercapto)purine; NMR; chemical shift; metal complex

種々の微量金属が生体内で非常に重要な役割を果たしていることはよく知られており、それらの金属のヌクレオシドに対する相互作用についての研究は多い。³⁻⁹⁾

Li⁺,^{5a-c,6)} Jordan^ら,⁷⁾ および Shimokawa^ら⁸⁾ は nuclear magnetic resonance (NMR) スペクトルを用いて alkali metal (Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ および Hg²⁺) と adenosine, guanosine, cytidine および uridine 等との dimethyl sulfoxide (DMSO) 中における complex の formation constant を計算している。それらの結果から金属とヌクレオシドとの錯形成能は金属種によって、あるいはヌクレオシドの種類によって特異性があることがわかる。

我々はヌクレオシド類の置換基の違いが、金属との錯形成能にどのような影響を与えるか、また更に新規に合成した変型ヌクレオシドの場合金属とどのような相互作用を持つかを検討したので報告する。

1) 本報は「C-Glycoside Nucleoside (第 8 報)」および「複素環化合物の研究 (第 20 報)」である。

2) Location: a) Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan; b) Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108, Japan; c) Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan; d) Present address: Department of Chemistry, Tokyo Denki University, Hatoyama-mura, Hiki-gun, Saitama, 350-03, Japan.

3) a) W.E.C. Wacker, B.L. Valee, *J. Biol. Chem.*, **234**, 3257 (1959); b) W.E.C. Wacker, M.P. Gordon, J.W. Huff, *Biochemistry*, **2**, 716 (1963).

4) R.B. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2059 (1964).

5) a) S.M. Wang, N.C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5069 (1968); b) L.S. Kan, N.C. Li, *ibid.*, **92**, 281 (1970); c) L.S. Kan, N.C. Li, *ibid.*, **92**, 4823 (1970).

6) R.M. Izatt, J.J. Christensen, J.H. Rytting, *Chem. Rev.*, **71**, 439 (1971).

7) F. Jordan, B.Y. McFarguhar, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6557 (1972).

8) S. Shimokawa, H. Fukui, J. Sohma, K. Hotta, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1777 (1973).

9) S. Mansy, T.E. Wood, J.C. Spowles, R.S. Tobias, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 1762 (1974).

錯形成能はヌクレオシド類の 0.1 M DMSO- d_6 溶液中に種々の濃度の HgCl_2 または CdCl_2 を加え, その濃度および温度による NMR の化学シフトの変化を観測し検討した.

一方溶液内でヌクレオシドの self association が起こらずに,^{10,11)} 金属とヌクレオシドとが 1 対 1 の complex を生成するものとするれば, 溶液内での平衡は (1) 式で示される.

従って平衡定数 K は (2) 式によって決まる.

$$K = \frac{(MB)}{(Mx - (MB))(B_0 - (MB))} \quad (2)$$

(MB); complex の濃度
 Mx ; 金属イオンの濃度
 B_0 ; ヌクレオシドの濃度

一方, この時の化学シフトは, $\Delta\nu = \nu_c - \nu$ とすると (3) 式で示される.

$$\nu_{\text{obs}} = \nu_f + \frac{(MB)}{B_0} \cdot \Delta\nu \quad (3)$$

ν_{obs} ; 実測の化学シフト
 ν_f ; 錯形成していない自由な分子の化学シフト
 ν_c ; 錯形成している分子の化学シフト

ここで金属イオン濃度が溶液中のヌクレオシドの濃度に対して十分低いとき, すなわち $Mx \ll B_0$ の場合には, $Mx(MB) \cong 0$, $(MB)^2 \cong 0$ と近似できる. 従って $\nu x = \nu_{\text{obs}} - \nu_f$, $C = B_0 / \Delta\nu$ とすれば, $Mx \ll B_0$ のときの化学シフトの金属イオン濃度に対する勾配, すなわち $d\nu x / dMx$ は

$$\frac{d\nu x}{dMx} = \frac{1}{(1 + 1/K \cdot B_0) \cdot C} \quad (4)$$

で示される. B_0 はヌクレオシドの濃度, C は実測より求められるので (4) 式より平衡定数 K を求めることができる. この式は $Mx \ll B_0$ の条件でのみ成立する関係式であるが, 他の方法 (最小二乗法) で求めた場合の K 値とよく一致する.

結果および考察

Purine 類

Adenine, benzyladenine, 6-mercaptapurine および 6-(methylthio)purine の各 0.1 M DMSO 溶液に HgCl_2 または CdCl_2 を各種の濃度で加えた際の NMR 化学シフトを plot すると Fig. 1 に示す通りになる. Adenine および benzyladenine の場合 HgCl_2 により 7 位の NH が消失しているが, これは Hg がはじめ 6 位と 7 位の NH に配位した後 (1) プロトンを引き抜いて 2 の様な構造をとるためと思われる. なお Simpson⁴⁾ はメチル水銀が adenosine の NH_2 に配位した後, プロトンを引き抜いている事実を報告している. また 6-mercaptapurine の場合も同様に 3 から 4 の構造をとるものと思われる. 一方 HgCl_2 に対して CdCl_2 の場合は 7 位の NH は消失せずに大きく化学シフトしているがこれは 5 または 6 の様な錯形成が起こりそれ以上は反応が進まないためと思われる. また 6-(methylthio)purine の場合化学シフトは認められなかった.

以上の purine 類の金属イオンに対する平衡定数 K は (4) 式に従って求めた (Table I). なお金属イオンの濃度は $Mx \ll B_0$ の条件を満たす濃度すなわち 0.1 M 以下で K 値を求めたが $\Delta\nu$ を得るため 0.2—0.3 M まで用いて NMR を測定した.

10) R.A. Newmark, C.R. Cantor, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5010 (1968).

11) S.I. Chan, M.P. Schweizer, P.O.P. Ts'ao, G.K. Helmkamp, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4182 (1964).

Fig. 1. Proton Chemical Shifts of Purine Derivatives vs. Varying Concentrations of HgCl_2 and CdCl_2 in DMSO

A) adenine, B) benzyladenine, C) 6-mercaptopurine, D) 6-methylmercaptopurine.

Chart 1

これらの結果から, adenine, benzyladenine の場合 HgCl_2 よりも CdCl_2 の方がその K 値が大きいことからその錯形成能は大きいことがわかる. 一方 Hg^{2+} と非常に結合しやすい SH 基を有している 6-mercaptopurine の場合は, その K 値より CdCl_2 よりも HgCl_2 の方が錯形成能が大きいことがわかる. しかし S に置換基のついた化合物では錯形成能はなくなっている.

TABLE I. Complex Formation Constants of HgCl_2 and CdCl_2 with Purine Derivatives

Adenine				
	HgCl_2		CdCl_2	
	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$
6- NH_2	0.88	1.56	0.28	2.23
2-H	0.20	1.07	0.10	2.40
8-H	0.20	1.07	0.12	1.93
7-HN	—	—	0.30	9.08
Average of K		1.24		2.19
Benzyladenine				
	HgCl_2		CdCl_2	
	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$
6-NH	0.39	1.73	0.07	2.51
2-H	0.15	1.33	0.07	2.51
8-H	0.17	1.43	0.07	2.51
CH_2	0.08	1.51	—	—
Average of K		1.50		2.51
6-Mercaptopurine				
	HgCl_2		CdCl_2	
	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$
2-H	0.44	2.57	0.17	1.87
8-H	0.61	2.43	0.24	1.67
7-NH	—	—	-0.07	—
Average of K		2.50		1.77

ヌクレオシド類

Cytidine, O^2 , 2'-cyclocytidine·HCl, 4-thiouridine および変型ヌクレオシド (pteridine 誘導体および purine 誘導体) の, 0.1M DMSO 溶液に各種濃度の HgCl_2 および CdCl_2 を加えた際の NMR の化学シフトは Fig. 2 に示す通りである. またそれらの K 値は Table II に示す通りである. なお K 値は, purine 類と同様 $Mx \ll B_0$ の条件下で (4) 式より求めたが, $\Delta\nu$ を得るため金属イオンは 0.3—0.4M 濃度まで用いて NMR を測定した.

なお cytidine と HgCl_2 との相互作用について Li ら⁵⁰⁾ の報告があるが, その K 値は我々の求めた値と非常に差がある. 一方 adenosine と HgCl_2 との K 値に於て Li らと Shimokawa ら⁹⁾ で大きな差があることから, 比較のため我々も adenosine について追試したところ, Table III に示す様に Shimokawa らの K 値とほぼ一致していることがわかった.

K 値より cytidine では HgCl_2 の方が CdCl_2 よりも錯形成能が大きいことがわかる. また Fig. 2 の化学シフトをみると cytidine の 4 位の NH_2 が 2 つに割れるがこれについては温度可変装置を用いて 25—83.8° の範囲で NMR の測定を行なった (Fig. 3). この結果温度上昇につれ 2 本のピークは 1 本の幅広いピークになり高磁場側へシフトすることがわかった. このことは金属イオンが室温付近では 8 の様な complex をつくり, この結果 NH_2 が固定されて回転障害をおこすため 2 本の分離したシグナルを与えることを示している. なお温度変化に

Fig. 2. Proton Chemical Shifts of Nucleosides vs. Varying Concentrations of HgCl_2 and CdCl_2 in DMSO

A) cytidine, B) cyclocytidine, C) 4-thiouridine, D) purine derivative, E) pteridine derivative.

TABLE II. Complex Formation Constants of HgCl_2 and CdCl_2 with Nucleosides

Cytidine	HgCl_2		CdCl_2	
	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$
6-H	0.35	1.61	0.18	1.17
5-H	0.40	1.45	0.26	1.24
4- NH_2	1.39	1.42	0.74	1.00
Average of K		1.49		1.14

Cyclocytidine		4-Thiouridine	
HgCl_2		HgCl_2	
$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$	$\Delta\nu$	$K [\text{M}^{-1}]$
4-NH	-0.26	5-H	0.51
6-H	-0.02	6-H	0.58
5-H	-0.20	1-H	-0.04
Average of K	1.96	Average of K	2.31

Chart 2

Fig. 3. Temperature Dependence of NMR Spectra of Cytidine in DMSO

TABLE III. *K* Values of HgCl₂-Nucleosides Complex

	Adenosine	Cytidine
Li	7.2	33.9
Shimokawa	1.04	—
Ogura	1.03	1.49

よる NMR の化学シフトについて Li ら⁵⁰⁾ が cytidine を用いて、また Becker ら¹²⁾ が 1,3-dimethylcytosine-HCl を用いてほぼ同様の結果を得ている。

Cyclocytidine-HCl の場合は他のヌクレオシド類とは逆に 4 位の NH および 5 位の H が高磁場に化学シフトしている。また 4 位の NH は HgCl₂ の濃度が 0.1 M を越すと 2 ピークになっているがこれは cyclocytidine-HCl (9) が 10 の構造をとるためと思われる。

4-Thiouridine は HgCl₂ により 4 位の SH が速かに消失し、5 位および 6 位のプロトンは低磁場に化学シフトする。これは 4-thiouridine が HgCl₂ により 11 の構造をとるためと思われる。

また新規に合成した変型ヌクレオシドである pteridine 誘導体 (12) および purine 誘導体 (13) は HgCl₂ および CdCl₂ を加えても予想に反して NMR の化学シフトは認められなかった。

以上の結果からヌクレオシド類では 4-thiouridine, cyclocytidine, cytidine の順に金属との錯形成能は小さくなり、合成した変型ヌクレオシドでは錯形成能がないことがわかった。

実 験 の 部

IR スペクトルは日本分光 IRA-2 型, Mass スペクトル (MS) は日本電子 JEOL-01S 型, NMR スペクトルは日本電子 JNM-4H-160 型 (100 Hz) で測定し、内部標準として tetramethylsilane (TMS) を用いた。

7-(D-Arabino-teraacetoxybutyl)-1-methylpteridine-2,4-dione (12) D-Glucose 7.2 g (0.04 mol) を 200 ml の酢酸緩衝液 (pH=4.5) に溶かし、これに EtOH 150 ml を加えた後 5,6-diamino-1-methyluracil 6.3 g (0.04 mol) を加え 50—60 時間加熱還流する。次いで反応液を濃縮後減圧乾燥する。これに無水酢酸-ピリジン (1:1) 混合液 200 ml を加え、室温で 12 時間攪拌してアセチル化を行なう。反応液は 1 l の氷水中に注ぎ次いで CHCl₃ で抽出する。CHCl₃ を減圧留去して得た褐色油状物につきカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH) を用いて分離操作を行ない目的の pteridine 誘導体 (12) 1.1 g (5.9%) を得る。水-EtOH より再結晶。mp 173°. Anal. Calcd. C₁₉H₂₂N₄O₁₀: C, 48.92; H, 4.72; N, 12.01. Found: C, 48.64; H, 4.74; N, 11.93. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3250, 1740 (AcO), 1700 (C=O). NMR (DMSO-*d*₆) δ : 11.94 (1H, bs, 3-NH), 8.95 (1H, s, 6-H), 6.15 (1H, d, 1'-H), 5.78—5.68 (1H, dd, 2'-H), 5.40—5.20 (1H, m, 3'-H), 4.30—4.10 (2H, dd, 4'-H), 3.30 (3H, s, NMe), 2.20—1.90 (12H, s $\times$ 4, (COCH₃) $\times$ 4). MS *m/e*: 466 (M⁺).

8-(D-Galacto-pentaacetoxybutyl)-3-methylxanthine (13) D-Galactose 7.2 g (0.04 mol) を 200 ml の酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶かし、上記と同様の反応および処理を行ない xanthine 誘導体 (13) 1.5 g (7.0%) を得る。mp 183°. Anal. Calcd. C₂₁H₂₆N₄O₁₂: C, 47.90; H, 4.94; N, 10.64. Found: C, 47.84; H, 5.13; N, 10.91. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1745 (AcO), 1710 (C=O). NMR (DMSO-*d*₆) δ : 10.98 (1H, bs, 1-NH), 7.90 (1H, bs, 9-NH), 5.50—3.60 (6H, m, sugar-H) 3.25 (3H, s, NMe), 2.15—2.00 (15H, s $\times$ 5, (COCH₃) $\times$ 5). MS *m/e*: 526 (M⁺).

12) E.D. Becker, H.T. Miles, R.B. Bradley, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5575 (1965).