

コビンアミドリン酸の合成および ^{31}P -NMRによる分析

明治鍼灸大学 化学教室

小林 和子

要旨: シアノコバラミンを加水分解して得たシアノアクアコビンアミド ((aq)CN-Cbi) を大過剰のオキシ塩化リン中、室温で3日間反応させると、濾紙電気泳動においてpH2.7ではシアノコバラミン(CN-Cbl)と、pH7.0ではCN-Cblモノカルボン酸と同位置に移動するシアノアクアコビンアミドリン酸((aq)CN-Cbi-p)と考えられる新規アナログが約50%の収率で得られた。このアナログは(aq)CN-Cbiと同じ吸収スペクトルを示した。リン酸基が存在するかどうか確認するために、このアナログの ^{31}P -NMRスペクトルを重水中で測定するとピークが観測できなかったが、KCN処理によりジシアノ型に変換して測定すると、+5.24 ppm (85%リン酸基準)に単一ピークが認められた。これは、リン酸基がコリン環のコバルトに配位していて見かけ上リンのピークが認められなかったものと考えられる。

Synthesis of Cobinamide Phosphate and The ^{31}P -NMR Spectrum

KOBAYASHI Kazuko

Department of Chemistry, Meiji College of Oriental Medicine

Summary: When cyanocobinamide ((aq)CN-Cbi) was reacted with a large excess of phosphorus oxychloride at room temperature for 3 days, a 50 % yield cyanocobinamide phosphate ((aq)CN-Cbi-p) was obtained. This new analog showed the same relative mobility in paper electrophoresis as cyanocobalamin (CN-Cbl) at pH 2.7, and cyanocobalamin monocarboxylic acid (CN-Cbl-COOH) at pH 7.0. The optical spectrum of this analog showed absorption similar to that of (aq)CN-Cbi. No peaks of the ^{31}P -NMR spectrum of (aq)CN-Cbi-p could be observed. However, one peak assignable to (CN)CN-Cbi-p was observed at +5.24 ppm when KCN was added to (aq)CN-Cbi-p. This observation indicates that the phosphate group of (aq)CN-Cbi-p coordinates to the Co^+ of corynoid and the peak attributable to CN-Cbi-p seemed to be unobservable because the width of the peak was too great.

Key Words: シアノアクアコビンアミドリン酸 Cyanoaquacobinamide phosphate ((aq)CN-Cbi-p), 合成 Synthesis, ^{31}P -NMRスペクトル ^{31}P -NMR spectrum, Co^+ への配位 Coordination to Co^+

I はじめに

上方配位子にアデノシル基を持つアデノシルコバラミン、即ちビタミン B_{12} 補酵素が補酵素としての機能を発現するためにはコバラミンのどの部分がどのような役割を果たしているかという構造と機能との関係について、コリン環周辺部や上方配位子に関しては詳細に検討されている¹⁾。しかし、下方配位子については、塩基部分の検討はされているが、その本質的な役割はまだよくわかっていない。そこで、下方配位子の役割を調べる第一段階としてシアノアコバリンアミド((aq)CN-Cbi)を出発物質として水酸基の部分を経験的にリン酸化し、シアノアコバリンアミドリリン酸((aq)CN-Cbi-p)を合成し、 ^{31}P -NMRスペクトルや濾紙電気泳動などによって同定した。

II 実験方法

^{31}P -NMRスペクトルはJEOL-FX90Q(観測周波数36.23 MHz)を使用し、85%リン酸を基準(0 ppm)としてスペクトル幅2000Hzで測定した。

(1) (aq)CN-Cbi-pの合成

(aq)CN-Cbi 約35mg (0.03 mmol)にオキシ塩化リン(POCl_3) 300 μl (3.22 mmol)を加え、室温(20°C)で3日間攪拌した。この反応溶液に蒸留水3 mlを冷却しながら少量ずつ加え、加水分解した。20分後にフェノール精製を行い、得られた赤色の水溶液を約5 mlに濃縮した後、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー(acetate form, アニオン交換, 径4.0 cm, 長25.0 cm)に負荷し、蒸留水で展開した。赤色のほぼ等量の2層が分離して流出してきた。先に流出してきた溶液はCbi(電荷 +1), 後から流出してきた溶液はCbi-p(酸性でリン酸モノエステルの第一解離のみおこっている場合は電荷 0, 中性付近で第一, 第二解離ともおこっている場合は電荷 -1)と考えられる。後から流出した溶液を濃縮乾固し(約15 mg), 重水0.3 mlを加えてNMR管(径5 mm)に移し, ^{31}P -NMRスペクトルを測定した。ピークは観測できなかった。このNMR

試料に100 mMイミダゾール緩衝液(pH 7.0)を30 μl 加え, 10 mMイミダゾール緩衝液(pH 7.0)に調整した後, ^{31}P -NMRスペクトルを測定したが, ピークは観測できなかった。上記のイミダゾールを含むCN-Cbi-pと考えられるNMR試料に蒸留水2 mlと K_2HPO_4 を2 mg加えた後, KCNを微量加えると, すぐに紫色に変化した。フェノール抽出した後, 濃縮乾固し, 重水0.2 mlを加えてNMR管に移し, ^{31}P -NMRスペクトルを測定した。また, 新たに合成した(aq)CN-Cbi-pのNMRスペクトルを重水で測定した後(ピークは観測されなかった), K_2HPO_4 を加えないでKCNをNMR管に微量加えてNMRスペクトルを測定した。いずれの場合も+5.24 ppmに単一のピークが認められた。これにより, リン酸基の存在が確認できた。また, (aq)CN-Cbi-p (0.2 μmol)の1.4 ml水溶液に $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を5 mgと1 N NaOH 12.8 μl を加え, KCN 1 mgを加えた後95°Cで1時間加熱した。 $\text{Ce}(\text{OH})_3$ の沈澱が生成した。上澄み溶液を採取しフェノール抽出を行い, 濃縮乾固後, 蒸留水を少量加え, 濾紙電気泳動(0.5 M 酢酸, 800 V, 1.5 時間)を行った。加水分解後の生成物のスポットは(aq)CN-Cbiと同じ位置であった。

(2) (aq)CN-Cbiの生成

シアノコバラミン(CN-Cbl)の加水分解によって得た。

200 mlフラスコにCN-Cblを500 mg採り, 蒸留水を72 ml加え, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液(7.21 g/50 ml)を38.4 ml (5.54 g)加えた。攪拌しながら1 M NaOHを25.6 ml加えた。この混合溶液にKCNを55.2 mg個体のまま加え, 攪拌しながら95°Cで1時間加熱した。冷却後アンモニア水でpH 8.5に調整した。一晚, 冷却保存し, 濾過して $\text{Ce}(\text{OH})_3$ の沈澱を除去した。この濾液をフェノール抽出し, 濃縮した後, コバラミンの側鎖が切断したカルボン酸等のアニオン性の副生成物を除くために, DEAEセルロースカラム(アニオン交換)に負荷し, 蒸留水で展開した。流出液を濃縮

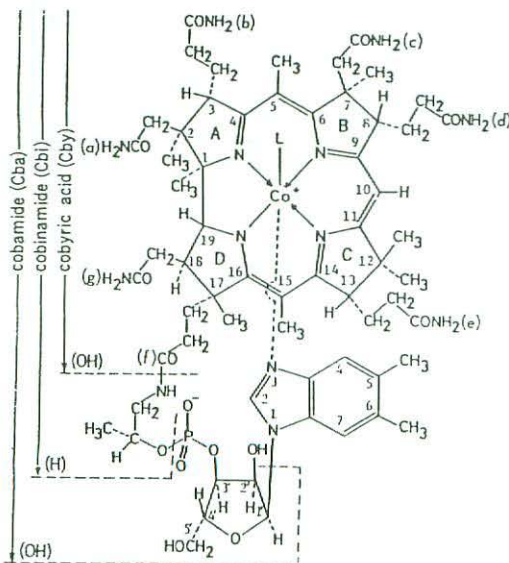
して、粗 (CN)CN-Cbi とリバゾールとを分離するために、疎水性の XAD-2 カラムに負荷した。10% エタノールで展開していくと、(CN)CN-Cbi が徐々に (aq)CN-Cbi に変わって流出してきた。TLC で調べるとリバゾールは流出していないので、(aq)CN-Cbi を 3 日間流出させた。残った少量の (CN)CN-Cbi とリバゾールは 50% エタノールで流出させた。XAD-2 カラムから流出した粗 (aq)CN-Cbi 溶液を濃縮し、P-セル (カチオン交換) に負荷し、未反応の CN-Cbi を水で流出させた後、0.05M NaCl 溶液で純粋な (aq)CN-Cbi を流出させた。

III 結果と考察

コビンアミド (図1) のリン酸化についてはジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 存在下で β -シアノエチルリン酸化し、その後加水分解して得る方法があるが、反応過程が 2 ステップであり、収率などの再現性にも問題があったので、より簡単なオキシ塩化リンによる 1 ステップのリン酸化法を試みた (図2)。立体障害の大きい

OH 基を持つシアノアクアコビンアミド ((aq)CN-Cbi) を大過剰のオキシ塩化リン中、室温で 3 日間反応させ、分離すると、OH 基がリン酸化されたと考えられる生成物が 50% の収率で得られた。この生成物が、(aq)CN-Cbi-p であるかどうか確認するため、単一に精製後、同定実験を行った。

濾紙電気泳動を pH 2.7 (0.5M 酢酸) の条件で行うと (図3)、生成物はシアノコバラミン (CN-Cbi) と同じく、原点にとどまり、pH 7.0 (0.01M リン酸カリウム緩衝液) の条件では、シアノコバラミンモノカルボン酸 (CN-Cbi-COOH) と同じ位置に移動した。生成物にリン酸基があれば、リン酸の pK_{a1} は 2.12、 pK_{a2} は 7.2 であるから、pH 2.7 では、第一解離のみが起きていると考えられるので、電気的に中性の CN-Cbi と同じ位置にくるはずである。pH 7.0 ではリン酸基は第二解離も起きていると考えられるので、電気的には負電荷 1 個を持った CN-Cbi-COOH ($pK_a=4.2$) と同じ位置にくると思われる。この電気泳動の結果は確かにリン酸基が導入されたことを示して



L	Cobalamin	Cobinamide
CN	CN-Cbi	(CN,aq)-Cbi
H ₂ O	aq-Cbi	(aq) ₂ -Cbi
CH ₃	MeCbi	MeCbi
Ado	AdoCbi	AdoCbi

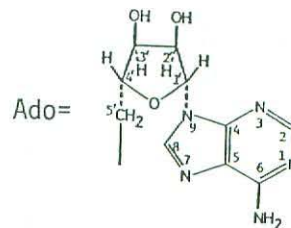


図1 コバラミン及びコビンアミドの構造と略記法

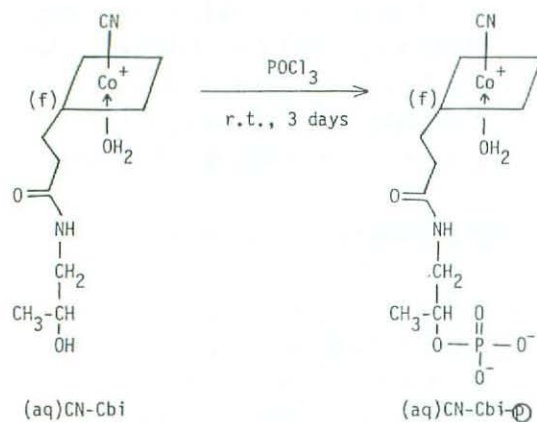


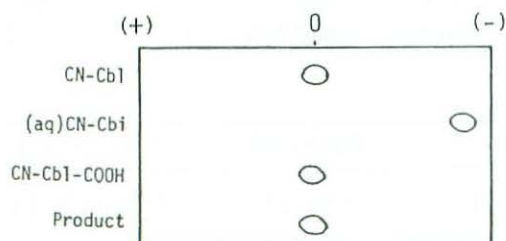
図2 シアノアコバインアミドリリン酸の合成

いる。

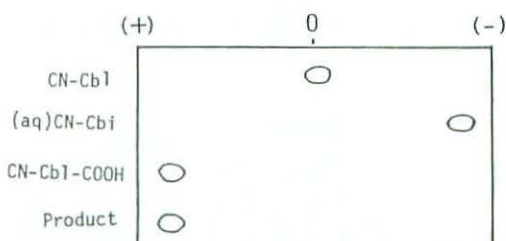
リン酸基がリン酸エステルの形で入っているかどうか確認するために、リン酸エステルを切断する反応として知られている水酸化セリウムで95°C、1時間で処理し、生成物を加水分解すると、リン酸基が切断されてもとの(aq)CN-Cbiが得られた(図3)。従って生成物のリン酸基はコビンアミドの水酸基に結合したリン酸エステルの形で存在していると考えられる。

生成物のリン酸基の存在を確認するために ^{31}P -NMRスペクトルを測定した。(aq)CN-Cbi-pと考えられる生成物を重水中で測定すると、ピークが観測されなかったが(図4)、KCNを加えると、直ちに+5.24ppmにシャープな単一吸収が認められ、リン酸基が確認できた。これと比較するため、CN-Cbiと2級炭素に結合したリン酸基

pH 2.7



pH 7.0



After Hydrolysis (7.6 mM $\text{Ce}(\text{OH})_3$, 95°C, 1 hr)

pH 2.7

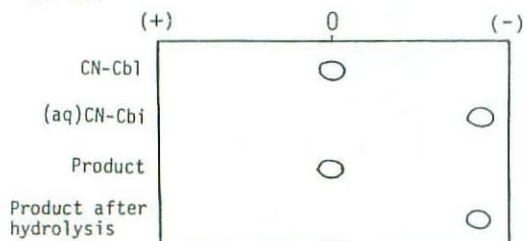


図3 (aq)CN-Cbi-p (product) 及び加水分解後の濾紙電気泳動結果

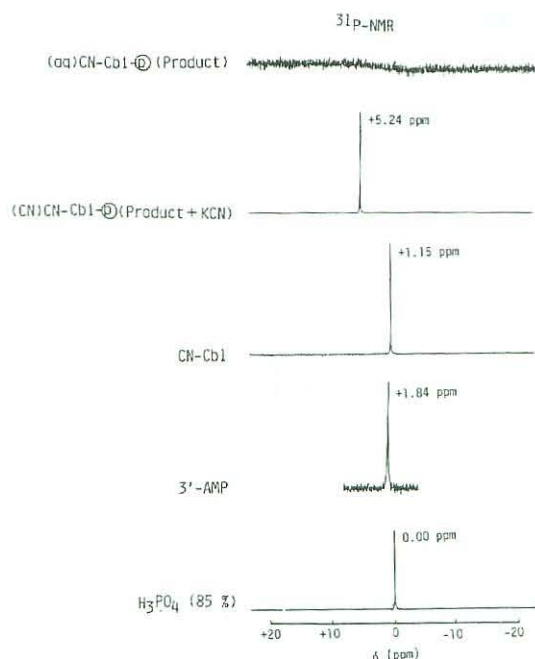


図4 (aq) CN-Cbi-p 及び (CN) CN-Cbi-p の ^{31}P -NMRスペクトル

を持つ3'-アデノシンモノリン酸(3'-AMP)のスペクトルも重水中で測定すると(図4), +1.15ppmと+1.84ppmに各々単一の吸収が認められた。また, 10mMイミダゾール緩衝液中(pH 7.0)でも, ^{31}P -NMRスペクトルを測定したが, 化学シフトはほとんど変わらなかった。通常, リン酸モノエステルの化学シフトはジエステルより低磁場に観測されるので, リン酸ジエステルであるCN-Cbiより(CN)CN-Cbi-pの方が低磁場で吸収が観測される結果は妥当であると考えられる。(aq)CN-Cbiにはリン酸化を受ける水酸基は1個しかないので生成物は(aq)CN-Cbi-pであると考えられる。

(aq)CN-Cbi-pの ^{31}P -NMRスペクトルが観測されなかった理由としては, リン酸エステルに多種類の形があって各々の形の濃度が低く観測できない場合, また, かなり速い平衡が存在してNMRのタイムスケールとの関係で見かけ上観測

できない場合, も考えられるが, この考え方では, KCNを加えて下方配位子を H_2O からCNに変えるとすぐに(CN)CN-Cbi-pに帰属される単一の鋭い吸収が観測される事実を説明することが困難である。従って, この場合は, コバルト(Co^+)のような常磁性の金属イオンが存在すると, リン原子団が Co^+ に配位して ^{31}P -NMRスペクトルの吸収の線幅が広がることが知られているので, (aq)CN-Cbi-pは水溶液中では, コリン環の Co^+ に配位力の弱い H_2O の代わりに, 下方配位子のモノエステル型のリン酸基が配位しており, 吸収の線幅が広がったため見かけ上ピークが観測されなかったと考えることが, 最も妥当であろう(図5)。分子模型を組んでも十分可能である。コバラミンの下方配位子である塩基の5, 6-ジメチルベンズイミダゾールの Co への配位を ^{31}P -NMRスペクトルで考察した報告^{2,3,4)}はあるが, コビンアミドリリン酸のリンの Co への配位は報告されていない。

なお, (aq)CN-Cbi-p及び常法⁵⁾により変換した

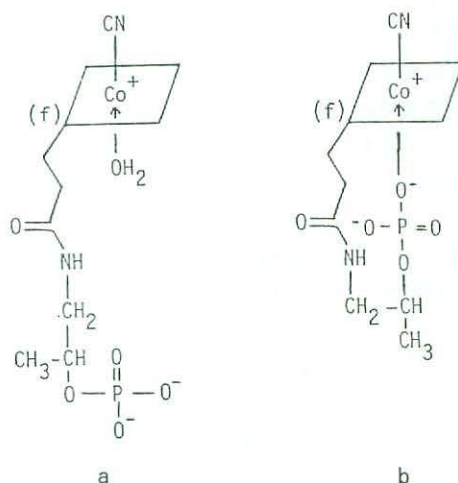


図5 (a) (aq)CN-Cbi-p(下方配位子が H_2O の場合)の構造
(b) ^{31}P -NMRから考えられるリン酸基が Co^+ へ配位した場合の構造

表1 コビンアミドリン酸誘導体のTLC, 濾紙電気泳動, 吸収スペクトル

Chromatographic and Electrophoretic Behaviors of Cobinamide Phosphate Derivatives

Corrinoid	R _f in TLC*		Relative mobility in PEP**	
	Solvent A	Solvent B	pH 2.7	pH 7.0
(aq)CN-Cbi-Ⓟ	0.05	0.03	0	-1
(aq)CN-Cbi	0.11, 0.06	0.05, 0.02	(≡+1)	(≡+1)
(aq)AdoCbi-Ⓟ	0.04	0.05	+0.64	-0.74
(aq)AdoCbi	0.07	0.03		+0.47
CN-Cbl	0.12		(0)	(0)

*Solvent A: H₂O-sat.2-BuOH/AcOH (99:1); Solvent B: H₂O-sat.2-BuOH/(28%)NH₄OH (99:1)

**pH 2.7: 0.5 M AcOH; pH 7.0: 0.01 M Potassium phosphate buffer

Absorption Spectra of Cobinamide Phosphate Derivatives

Corrinoid	λ _{max} (×10 ⁻³) in water
	nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)
(aq)CN-Cbi-Ⓟ	275(10.0), 320(10.1), 355(27.7), 405(4.44), 495(8.20), 525(7.88)
(aq)CN-Cbi	275.5(11.72), 322(11.84), 355(27.3), 404(5.37), 496(8.67), 528(8.13)
(aq)AdoCbi-Ⓟ	265(46.9), 306(26.8), 380(8.69), 460(8.98)
(aq)AdoCbi	262.5(38.2), 304(23.7), 380(8.51), 457.6(9.22)

アデノシルコビンアミドリン酸 ((aq)AdoCbi-p) の薄層クロマトグラフィー (TLC), 濾紙電気泳動における挙動, 吸収スペクトルの結果を表1に示す。電気泳動の結果はシアノ型, アデノシル型ともに予想される移動度を示し, 吸収スペクトルも予測通り相当するコビンアミドと同じスペクトルを示した。

今後これらの補酵素機能や阻害作用など酵素系における挙動について検討する予定である。

謝 辞

本研究は岡山大学工学部生物応用工学科の虎谷哲夫教授が京都大学御在職中に共同研究として行ったものである。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 虎谷哲夫: ビタミンB₁₂補酵素の機能発現の分子的基础, 生化学, 53: 401~426, 1981.

- 2) Brown K L and Hakimi J M: Heteronuclear NMR studies of cobalamins. 4. α-ribazole-3'-phosphate and the nucleotide loop of base-on cobalamins. J Am Chem Soc, 108: 496~503, 1986.
- 3) Brown K L, Hakimi J M and Jacobson D W: Heteronuclear NMR studies of cobalamins. 3. ³¹P-NMR of aquacobalamin and various organocobalamins. J Am Chem Soc, 106: 7894~7899, 1984.
- 4) Brown K L and Hakimi J M: Heteronuclear NMR studies of cobalamins. 2. ¹³C and ³¹P NMR studies of [¹³C]cyanocobalamin. Inorg Chem, 23: 1756~1764, 1984.
- 5) Toraya T, Matsumoto T, Ichikawa M et al: The synthesis of adenine-modified analogs of adenosylcobalamin and their coenzymic function in the reaction catalyzed by diol dehydrase. J Biol Chem, 261: 9289~9293, 1986.