新型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)类似物的合成及其辅酶活性

侯淑华^{a,b} 刘武军^a 赵宗保^{*,a}^(a) 中国科学院大连化学物理研究所生物技术部 大连 116023)^(b) 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 尝试 4 种形成焦磷酸键的方法合成了 5 种结构新颖的新型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)类似物. 初步考察了类似物的生物活性, 发现苹果酸酶和醇脱氢酶以类似物 **3b** 和 **3d** 为辅酶时, 活性只有以 NAD 为辅酶时的 13%~30%; 而以类似物 **3a**, **3c** 和 **3e** 为辅酶时, 这些酶的活性均极低.

关键词 NAD 类似物; 焦磷酸; 生物活性; 醇脱氢酶

Synthesis of Novel Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Analogs and Their Coenzyme Activities

Hou, Shuhua^{a,b} Liu, Wujun^a Zhao, Zongbao^{*,a}^(a) Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)^(b) Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract Four methods were tested to synthesize nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) analogs, and 5 NAD analogs were prepared. Assays of these NAD analogs indicated that malic enzyme and alcohol dehydrogenase had about 13%~30% enzymatic activity in the presence of analog **3b** or **3d**, whereas significantly lower activities were observed in the presence of analog **3a**, **3c** or **3e**.

Keywords NAD analog; pyrophosphate; bioactivity; alcohol dehydrogenase

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)以及它相应的还原型态(NADH, 图 1),

是生物体内不可缺少的小分子化合物. NAD 依赖型生物大分子在生命活动中具有非常重要的作用, 参与能量传

图 1 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的结构

Figure 1 Structure of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)

* E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

Received June 3, 2011; revised September 22, 2011; accepted October 25, 2011.

递, 物质代谢和信号传导等过程^[1]. NAD/NADH 参与生物体内的氧化还原反应, 保持细胞内氧化还原平衡. NAD 分子中的烟酰胺单核苷酸(NMN)片段起到传递电子和氢的作用, 而腺苷一磷酸(AMP)片段与酶结合, 使 NAD 分子与酶活性中心结合. 通常 NAD 需要与酶形成复合物后才能行使其生物化学功能, 可见功能蛋白质与辅酶间复杂相互作用至关重要. 为了研究 NAD 与 NAD 依赖型酶的相互作用, 化学家们对 NAD 的化学合成和结构改造进行了大量研究, 主要改变 AMP 的衍生物包括腺苷衍生物、嘌呤衍生物及一些杂环结构^[2]. 这些 NAD 类似物与 NAD 依赖型脱氢酶作用, 具有一定生物活性. 但以结构相对简单的脂肪族或芳香族单元替代腺苷部分的 NAD 类似物及其生物活性未见文献报道.

1957 年, Todd 等^[3]在水和吡啶(Py)的混合溶剂中, 将 NMN 和 AMP 通过二环己基碳二亚胺(DCC)偶联首次实现了 NAD 的化学合成. 近年来, 有采用 *N,N*-羰基二咪唑(CDI)^[4], MnCl_2 ^[5,6], 1*H*-四唑^[7,8]活化磷酸单酯合成焦磷酸酯的报道, 本工作尝试用以上方法将 β -NMN 和含有结构相对简单的脂肪族和芳香族磷酸酯偶联, 制备新型 NAD 类似物, 反应收率很低(Scheme 1). 但是, 将近来合成多肽和 DNA 的高活性偶联体系 $\text{PPh}_3/(\text{PyS})_2$ 应

用于制备此类 NAD 类似物^[9,10], 取得了较好的结果(Scheme 2). 本工作合成了 5 种结构相对简单的 NAD 类似物, 并以苹果酸酶(ME)和醇脱氢酶(ADH)为模型检测其生物活性.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

核磁共振谱使用 Bruker 公司 DRX-400 型核磁共振仪测定; 高分辨质谱使用英国曼切斯特 LC/Q-TOF-MS 质谱仪测定.

化合物 **1a**~**1e** 按照文献^[11]方法合成, β -NMN 按照文献^[12]方法由 NAD 经 ZrCl_4 催化水解得到; PPh_3 购自上海锦源精细化工厂; ZrCl_4 购自北京恒业中远化工有限公司; CDI, DCC, $(\text{PyS})_2$ 购自 ABCR. 其余为国产分析纯试剂, 吗啉经过重蒸处理, 其他试剂未做处理直接使用. 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)购自北京鼎国生物技术有限公司; *L*-苹果酸购自上海源聚生物科技有限公司; 焦磷酸钠、 MnCl_2 购自天津市大茂化学试剂厂. 阴离子交换树脂(201X4 型)购自南开大学化工厂, 苹果酸酶的表达纯化参照文献^[13]方法, 醇脱氢酶购自 Sigma, 货号 A3263.

Scheme 1

Scheme 2

1.2 合成

1.2.1 以苯乙醇磷酸单酯与 NMN 偶联反应为模型反应的合成路线

方法一：采用 CDI 活化。在 25 mL 烧瓶中，将 β -NMN (146 mg, 0.34 mmol) 溶于 1.5 mL DMF 中(悬浊液)，加入 CDI (319 mg, 2 mmol)，室温下搅拌 1 d，加入 150 μ L 甲醇除去未反应的 CDI，1.5 h 后油泵抽干 DMF 和甲醇，加入苯乙醇磷酸单酯三乙胺盐(100 mg, 0.33 mmol，溶于 2.8 mL DMF)，室温下继续搅拌 3 d。抽干溶剂，加少量水， CH_2Cl_2 萃取洗涤 5~6 次，甲酸调 pH 为 5.0，用 201X4 型阴离子交换树脂(HCO_2^- 型，5 cm $\times$ 3.5 cm)分离，先用水洗脱，再用 5% $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 洗脱，浓缩有紫外吸收部分。粗产物用 NH_4HCO_3 调 pH 约为 7~8， ^1H NMR 表征产物不纯，再过 C8 反相硅胶柱，用水洗脱，紫外跟踪，分管收集，得到 **3a**，产率为 9.5%。 ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 9.25 (s, 1H), 9.12 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 8.76 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.10 (dd, $J=6.2$, 8.1 Hz, 1H), 7.31~7.18 (m, 5H), 6.04 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 4.49~4.38 (m, 2H), 4.29 (dd, $J=2.7$, 4.8 Hz, 1H), 4.23~4.15 (m, 1H), 4.09~4.00 (m, 3H), 2.83 (t, $J=6.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ : 165.6, 146.0, 142.5, 139.9, 138.5, 133.8, 129.1, 128.6, 128.5, 126.5, 99.9, 87.1 (d, $J=8.6$ Hz), 77.5, 70.6, 66.9 (d, $J=5.4$ Hz), 64.7 (d, $J=4.2$ Hz), 36.1 (d, $J=6.6$ Hz); ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) δ : -10.8 (d, $J=19.8$ Hz), -11.3 (d, $J=19.8$ Hz); HRMS (ESI) calcd for $(\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P})^-$ 517.1594, found 517.0777.

方法二：采用路易斯酸 $\text{MnCl}_2/\text{MgSO}_4$ 催化。在 25 mL 两颈瓶中，将 **1a** (54 mg, 0.27 mmol) 溶于 0.34 mL 水、0.34 mL 丁醇和吗啉(95 μ L, 1.1 mmol)中加热至回流温度，再在 1 h 内滴加 DCC (215 mg, 1.12 mmol)，溶入 5

mL 丁醇)溶液，继续搅拌回流 4.5 h，冷却浓缩，过滤除去固体，加入水，用乙醚萃取四次，浓缩冻干，得到中间体 **2**。向中间体 **2** (82 mg, 0.15 mmol) 反应瓶中加入 MnCl_2 (1 mL, 0.2 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 甲酰胺溶液)， β -NMN (57 mg, 0.16 mmol，溶于 0.5 mL 甲酰胺)和 MgSO_4 (35 mg, 0.29 mmol)，室温下搅拌 17 h，反应完毕后加入乙腈，充分搅拌，过滤。滤饼加水溶解后浓缩，按照方法一分离纯化，得到目标化合物 **3a**，产率 12.9%。

方法三：采用 1H-四唑活化。将 **2** (293 mg, 0.41 mmol)和 β -NMN (116 mg, 0.27 mmol)与 2 mL 无水吡啶充分混合，室温下减压干燥，重复用无水吡啶处理 3 次，加入 3 mL 无水吡啶和 1H-四唑(76 mg, 1.1 mmol)，室温下搅拌 4 d。减压除去吡啶后，加水水解，用 CH_2Cl_2 萃取 3 次，水相浓缩，按照方法一分离纯化，得到目标产物 **3a**，产率 5.5%。

方法四：采用 $\text{PPh}_3/(\text{PyS})_2$ 活化。室温下将 β -NMN (50 mg, 0.14 mmol)溶于 1.5 mL DMSO 和 0.4 mL DMF 中，加入甲基咪唑(225 μ L, 2.8 mmol)， PPh_3 (184 mg, 0.7 mmol，溶于 0.6 mL DMF)和 $(\text{PyS})_2$ (154 mg, 0.7 mmol，溶于 0.6 mL DMF)，搅拌 15 min。向该混合物中加入苯乙醇磷酸单酯三丁胺盐(190 mg, 0.49 mmol，溶于 0.6 mL DMF)，室温下搅拌 20 min。加入丙酮，离心，沉淀物溶入水后再浓缩，按照方法一分离纯化，得到 **3a**，产率为 20.0%。

以上实验表明，方法四明显优于其他合成方法，反应时间短，产率较高。因此，应用方法四还合成了其他 4 种 NAD 类似物。

1.2.2 NAD 类似物 **3b** 的合成

采用方法四合成，分离方法在方法一的基础上有改进，加入丙酮沉淀后，离心，沉淀加少量水， CH_2Cl_2 萃取洗涤 5~6 次，甲酸调 pH 为 5.0，用 201X4 型阴离子

交换树脂(HCO_2^- 型, $5\text{ cm} \times 3.5\text{ cm}$)分离, 先用水洗脱, 后用 5% $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 洗脱, 浓缩有紫外吸收部分, NH_4HCO_3 调 pH 约为 $7 \sim 8$, 然后上 DEAE 柱(HCO_3^- , $32\text{ cm} \times 1\text{ cm}$), $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 洗脱, 浓缩有紫外吸收部分, 冻干得 **3b**, 产率 20.0% . ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 9.29 (s, 1H) , $9.19\text{ (d, } J=5.7\text{ Hz, 1H)}$, $8.83\text{ (d, } J=8.0\text{ Hz, 1H)}$, $8.20\text{ (dd, } J=5.7, 8.0\text{ Hz, 1H)}$, $7.30 \sim 7.09\text{ (m, 5H)}$, $6.07\text{ (d, } J=5.1\text{ Hz, 1H)}$, $4.53 \sim 4.49\text{ (m, 1H)}$, $4.48 \sim 4.45\text{ (m, 1H)}$, $4.39 \sim 4.36\text{ (m, 1H)}$, $4.32 \sim 4.25\text{ (m, 1H)}$, $4.19 \sim 4.12\text{ (m, 1H)}$, $3.91 \sim 3.84\text{ (m, 2H)}$, $2.55 \sim 2.49\text{ (m, 2H)}$, $1.59 \sim 1.50\text{ (m, 4H)}$; ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ : $165.6, 146.1, 142.9, 142.6, 139.8, 133.9, 128.7, 128.6, 128.5, 125.8, 100.0, 87.1\text{ (d, } J=8.5\text{ Hz)}$, $77.6, 70.6, 66.6\text{ (d, } J=5.3\text{ Hz)}$, $64.8\text{ (d, } J=4.2\text{ Hz)}$, $34.5, 29.4\text{ (d, } J=6.9\text{ Hz)}$, 27.0 ; ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) δ : $-10.3\text{ (d, } J=16.9\text{ Hz)}$, $-11.2\text{ (d, } J=16.9\text{ Hz)}$.

1.2.3 NAD 类似物 **3c** 的合成

采用方法四合成及分离方法, 产率为 10.8% . ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 9.47 (s, 1H) , $9.34\text{ (d, } J=6.2\text{ Hz, 1H)}$, $9.01\text{ (d, } J=8.1\text{ Hz, 1H)}$, $8.35\text{ (dd, } J=8.1, 6.2\text{ Hz, 1H)}$, $6.23\text{ (d, } J=5.5\text{ Hz, 1H)}$, $4.65\text{ (dd, } J=5.5, 5.5\text{ Hz, 1H)}$, $4.61\text{ (dd, } J=5.2, 5.5\text{ Hz, 1H)}$, $4.53 \sim 4.48\text{ (m, 1H)}$, $4.45 \sim 4.39\text{ (m, 1H)}$, $4.33 \sim 4.24\text{ (m, 1H)}$, $4.13 \sim 4.06\text{ (m, 2H)}$, $3.85 \sim 3.83\text{ (m, 2H)}$, $3.83 \sim 3.72\text{ (m, 8H)}$; ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ : $165.8, 146.1, 142.6, 139.9, 133.9, 128.7, 99.9, 87.2\text{ (d, } J=8.8\text{ Hz)}$, $77.6, 70.8, 70.0\text{ (d, } J=7.6\text{ Hz)}$, $69.5, 69.4, 65.0\text{ (d, } J=5.6\text{ Hz)}$, $64.8\text{ (d, } J=4.9\text{ Hz)}$, 43.1 ; ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) δ : $-10.7\text{ (d, } J=17.8\text{ Hz)}$, $-11.2\text{ (d, } J=17.8\text{ Hz)}$; HRMS (ESI) calcd for $(\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{ClN}_2\text{O}_{13}\text{P}_2)^-$ 563.0621 , found 563.0599 .

1.2.4 NAD 类似物 **3d** 的合成

同类似物 **3b** 的合成及分离方法, 产率为 27.9% . ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 9.26 (s, 1H) , $9.15\text{ (d, } J=6.3\text{ Hz, 1H)}$, $8.81\text{ (d, } J=8.1\text{ Hz, 1H)}$, $8.17\text{ (dd, } J=8.1, 6.3\text{ Hz, 1H)}$, $7.28 \sim 7.19\text{ (m, 2H)}$, $6.93 \sim 6.87\text{ (m, 3H)}$, $6.03\text{ (d, } J=5.6\text{ Hz, 1H)}$, $4.49\text{ (dd, } J=5.6, 5.6\text{ Hz, 1H)}$, $4.35\text{ (dd, } J=2.3, 5.6\text{ Hz, 1H)}$, $4.32 \sim 4.26\text{ (m, 1H)}$, $4.18 \sim 4.11\text{ (m, 1H)}$, $4.10 \sim 4.05\text{ (m, 2H)}$, $3.93 \sim 3.88\text{ (m, 2H)}$, $3.81 \sim 3.75\text{ (m, 2H)}$, $3.66 \sim 3.59\text{ (m, 6H)}$; ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ : $165.5, 157.7, 145.9, 142.4, 139.7, 133.7, 129.8, 128.6, 121.5, 114.6, 99.8, 87.1\text{ (d, } J=8.8\text{ Hz)}$, $77.5, 70.6, 70.0, 69.9, 69.5\text{ (d, } J=3.8\text{ Hz)}$, $69.0, 67.0, 65.0\text{ (d, } J=5.4\text{ Hz)}$, $64.8\text{ (d, } J=3.9\text{ Hz)}$; ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) δ : $-10.6\text{ (d, } J=20.9\text{ Hz)}$, $-11.3\text{ (d, } J=20.9\text{ Hz)}$; HRMS (ESI) calcd for $(\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_2)^-$ 621.1271 , found 621.1251 .

1.2.5 NAD 类似物 **3e** 的合成

同类似物 **3a** 的合成方法, 反应完毕后, 加入丙酮沉淀, 离心, 沉淀加少量水, CH_2Cl_2 萃取洗涤 $5 \sim 6$ 次, 甲酸调 pH 为 5.0 , 用 201X4 型阴离子交换树脂(HCO_2^- 型, $5\text{ cm} \times 3.5\text{ cm}$)分离, 先用水洗脱, 后用 5% HCO_2H 洗脱, 浓缩, NH_4HCO_3 调 pH 约为 $7 \sim 8$, 冻干得 **3e**, 产率为 32.5% . ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 9.34 (s, 1H) , $9.21\text{ (d, } J=6.3\text{ Hz, 1H)}$, $8.88\text{ (d, } J=8.0\text{ Hz, 1H)}$, $8.23\text{ (dd, } J=6.3, 8.0\text{ Hz, 1H)}$, $6.10\text{ (d, } J=5.2\text{ Hz, 1H)}$, $4.53\text{ (dd, } J=5.2, 5.2\text{ Hz, 1H)}$, $4.49\text{ (dd, } J=5.2, 5.2\text{ Hz, 1H)}$, $4.41 \sim 4.37\text{ (m, 1H)}$, $4.33 \sim 4.28\text{ (m, 1H)}$, $4.20 \sim 4.15\text{ (m, 1H)}$, $3.92\text{ (t, } J=6.8, 13.8\text{ Hz, 2H)}$, $2.46\text{ (dd, } J=2.5, 6.8\text{ Hz, 2H)}$, $2.25\text{ (t, } J=2.5\text{ Hz, 1H)}$; ^{13}C NMR (D_2O , 100.6 MHz) δ : $165.8, 146.1, 142.6, 139.9, 133.9, 128.7, 99.9, 87.2\text{ (d, } J=8.6\text{ Hz)}$, $81.8, 77.6, 70.8, 70.5, 64.9\text{ (d, } J=4.7\text{ Hz)}$, $64.3\text{ (d, } J=5.0\text{ Hz)}$, 20.0 ; ^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) δ : $-10.9\text{ (d, } J=20.9\text{ Hz)}$, $-11.3\text{ (d, } J=20.9\text{ Hz)}$; HRMS (ESI) calcd for $(\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}_2)^-$ 465.0447 , found 465.0464 .

1.3 NAD 类似物生物活性初步测定

1.3.1 NAD 类似物与苹果酸酶相互作用

苹果酸酶利用 NAD 为辅酶, 催化 *L*-苹果酸的氧化脱羧反应, 同时生成 NADH (Eq. 1). 由于 NADH 及其类似物在 340 nm 处有吸收, 可用于评价酶反应活性.

在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下向酶活性分析体系 ($5.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ *L*-malate, $5.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 , $2.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD 或 NAD 类似物, $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.2) 中加入一定量的苹果酸酶, 快速混匀后, 置于分光光度计中, 连续监测 340 nm 吸收值, 使 1 min 内吸收值变化呈直线状态. 实验中以 NAD 为辅酶时, 酶浓度为 $2.8\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 以类似物 **3a**, **3c** 和 **3e** 为辅酶时, 酶浓度为 $2.6\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 以类似物 **3b** 和 **3d** 为辅酶时, 酶浓度为 $14\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.3.2 NAD 类似物与醇脱氢酶相互作用

测定 ADH 对乙醇的氧化反应 (Eq. 2). 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下向酶活性分析体系 ($0.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇, $2.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD 或 NAD 类似物, $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 8.8) 中加入一定量的醇脱氢酶, 快速混匀后, 置于分光光度计中, 连续监测 340 nm 吸收值, 使 1 min 内吸收值变化呈直线状态. 实验中以 NAD 为辅酶时, 酶浓度为 $0.73\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 以类似物 **3a**, **3c** 和 **3e** 为辅酶时, 酶浓度为 $2.2\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 以类似物 **3b** 和 **3d** 为辅酶时, 酶浓度为 $3.7\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.3.3 NAD 类似物活性计算

NAD 及其类似物的活性按照 Eq. 3 计算.

$$\text{Specific activity (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times V_t \times \text{df}}{6.22 \times 1.0 \times V_s \times C} \quad (3)$$

V_t : 总体积(mL); V_s : 样品体积(mL); 6.22: 在测定条件下 NADH 的毫摩尔消光系数($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); 1.0: 光程(cm); df: 稀释因子; C: 酶浓度.

2 结果与讨论

NMN 由于带有正电荷, 易溶于极性溶剂如水, 不溶于大部分有机溶剂, 导致活化困难, 若作为亲核试剂, 具有较差的亲核性, 产率较低. 合成方法二和方法三采用活化脂肪族磷酸酯的策略, 首先由 DCC 催化脂肪族磷酸酯和吗啉反应, 分离纯化后得到吗啉中间体. 该中间体进一步通过 1*H*-四唑或路易斯酸 $\text{MnCl}_2/\text{MgSO}_4$ 催化, 与 β -NMN 偶联形成焦磷酸键. 方法一和方法四采用活化 β -NMN 的策略, 中间体无需纯化分离, 可直接与脂肪族磷酸酯偶联合成 NAD 类似物. 由于脂肪族磷酸酯较带有正电荷的 β -NMN 亲核性更强, 反应产率较高. 但是, 以 CDI 为缩合试剂时, 反应时间比较长, 一般需要 2~3 d^[14,15]. 当用催化活性更高的 $\text{PPh}_3/(\text{PyS})_2$ 体系时, 35 min 内就可以完成反应, 反应更加高效.

NAD 类似物 **3c** 含有氯原子, 可以与一些亲核基团发生取代反应, 生成新的 NAD 类似物; NAD 类似物 **3e** 含有端炔结构, 可用于进行 1,3-偶极环加成反应. 1,3-偶极环加成反应是“点击化学”的一种^[16], 具有反应条件温和、可靠、高效、快速的特点. 利用类似物 **3e** 和含有叠氮的化合物反应可生成其他 NAD 类似物, 有利于快速增加 NAD 类似物的库容量.

室温下将 NAD 类似物 **3a**、*L*-苹果酸和苹果酸酶的混合物孵育, UV-vis 全波长扫描发现在 340 nm 有明显的吸收峰. 该吸收峰的特征和还原型 NADH 相同, 说明类似物 **3a** 在该条件下被转化为还原型, 即 **3a** 具有辅酶活性. 类似地, 发现其他类似物也具有一定的辅酶活性(表 1). 类似物 **3a**, **3c** 和 **3e** 对苹果酸酶和醇脱氢酶的活性都比较低, 与 NAD 相比低于 2%. 但是, 类似物 **3b** 和 **3d** 具有较高辅酶活性. 以 **3b** 和 **3d** 为辅酶时, 苹果酸酶的比酶活分别为 67.6 和 40.0 U/mg, 约为以 NAD 为辅酶

的 30% 和 20%. 以 **3b** 和 **3d** 为辅酶时, 醇脱氢酶的比酶活分别为 58.2 和 99.6 U/mg, 约为以 NAD 为辅酶的 13% 和 22%. 类似物 **3d** 比类似物 **3b** 增加了醚键和链长, 对苹果酸酶活性降低, 对醇脱氢酶活性升高. 类似物 **3b** 仅比 **3a** 多 2 个 CH_2 , 但苹果酸酶和醇脱氢酶利用 **3b** 表现出的比酶活比利用 **3a** 时分别高 600 倍和 1300 倍, 说明 NAD 的结合空腔更适宜结合分子结构较长的类似物. 类似物 **3d** 比 **3c** 仅多 1 个苯环, 但苹果酸酶和醇脱氢酶利用 **3d** 表现出的比酶活比利用 **3c** 时分别高 167 倍和 1660 倍, 说明 NAD 的结合空腔中与 AMP 相互作用的部分空间较大, 需要结合具有较大体积的基团.

表 1 苹果酸酶和醇脱氢酶利用 NAD 类似物的活性(U/mg)

Table 1 Enzymatic activity data of ME and ADH in the presence of NAD analogs (U/mg)

Cofactor	Specific activity of ME	Specific activity of ADH
NAD	212.8 ± 17.8	443.4 ± 9.9
3a	0.11 ± 0.01	0.04 ± 0.00
3b	67.6 ± 2.3	58.2 ± 0.09
3c	0.24 ± 0.00	0.06 ± 0.00
3d	40.0 ± 0.48	99.6 ± 2.9
3e	0.09 ± 0.00	0.17 ± 0.00

References

- [1] Lin, S. J.; Guarente, L. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 241.
- [2] Woenckhaus, C.; Jeck, R. In *Coenzymes and Cofactors, Pyridine Nucleotide Coenzyme*, John Wiley & Sons, New York, **1987**, pp. 450~568.
- [3] Hughes, N. H.; Kenner, G. W.; Todd, A. C. *J. Chem. Soc.* **1957**, 3733.
- [4] Dowden, J.; Moreau, C.; Brown, R. S.; Berridge, G.; Galione, A.; Potter, B. V. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4637.
- [5] Lee, J.; Churchil, H.; Choi, W. B.; Lynch, J. E.; Roberts, F. E.; Volante, R. P.; Reider, P. J. *Chem. Commun.* **1999**, 729.
- [6] Kennedy, K. J.; Bressi, J. C.; Gelb, M. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 95.
- [7] Wittmann, V.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144.
- [8] Zhao, Z.; Liu, H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6810.
- [9] Mukaiyama, T. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Related Elem.* **1976**, *1*, 371.
- [10] Abramova, T. V.; Vasileva, S. V.; Serpukrylova, I. Y.; Kless, H.; Silnikov, V. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6549.
- [11] Sakakura, A.; Katsukawa, M.; Ishihara, K. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1999.
- [12] Liu, R.; Visscher, J. *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 1215.
- [13] Wang, J.; Tan, H.; Zhao, Z. *Protein Expr. Purif.* **2007**, *53*, 97.
- [14] Franchetti, P.; Cappellacci, L.; Pasqualini, M.; Petrelli, R.; Jayaprakasan, V.; Jayaram, H. N.; Boyd, D. B.; Jain, M. D.; Grifantini, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2045.
- [15] Wahler, D.; Reymond, J.-L. *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 665.
- [16] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.

(Zhao, C.; Lu, Z.)