

Riboflavin 과 Orotic Acid Derivative 와의 分子間 相互作用*

兪炳高 · 李尙鍾 · 鄭曙榮 · 金良培 · 金鍾國

서울대학교 藥學大學

(Received June 3, 1979)

Byung Sul Yu, Sang Jong Lee, Seo Young Jeong, Yang Bae Kim and Chong Kook Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Molecular Interaction of Riboflavin and Orotic Acid Derivatives

Abstract—Biophysical investigation has been carried out for the interaction of riboflavin tetraacetate and an orotic acid derivative to know the binding mechanism between dihydroorotate dehydrogenase and dihydroorotic acid which are concerned with the oxidoreduction *in vivo*. Infrared and nuclear magnetic resonance spectra were measured for the chloroform solution of riboflavin tetraacetate, orotic acid butyl ester and its same mixture. Orotic acid butyl ester has been found to associate with riboflavin tetraacetate. They form a strong complex with each other. The complex is an 1:2 cyclic hydrogen bonded trimer through the imino and 2-C carbonyl groups of the isoalloxazine ring and the imino groups of the orotic acid derivative.

dihydroorotate dehydrogenase 는 生體內의 重要한 酵素로서 orotic acid 의 酸化還元에 作用하고 있으며 構成因子로는 2 mole 의 FAD, 2 mole 의 FMN 및 4g atom 의 금속철분을 含有하고 있음이 알려져 있다. 이들의 生體內에서의 作用機轉^{1~4)}에 orotate 와 結合體를 形成한다는 吸收 spectrum 研究 結果가 報告된 바 있으나 아직 그 作用機轉 및 結合樣式에 대한 具體的인 研究는 알려지지 않고 있다. 또한 orotate 는 生體內에서의 pyrimidine 系 化合物의 前驅物質으로써 각종 誘導體에 대한 合成報告는 많다^{5,6)}.

또 다른 측면에서 本酵素와 관련있는 flavin 含有酵素의 研究 및 FAD, FMN 分子의 舉動을 알아보는 生化學的 研究 또는 藥物分子와 orotic acid 間 結合에 관한 研究도 盛行되고 있는 바이다⁷⁾.

최근 分光學的 器機의 發展으로 生體內 活性分子의 分子水準에서의 舉動에 대한 研究 및 相互作用을 알아보는 研究가 重要視되고 있으며, 生化學的인 面에도 많은 도움을 주고 있다.

이에 著者들은 이제까지 알려진 dihydroorotate dehydrogenase 의 生體內 反應機轉을 보다 具

* 본 論文은 1979年度 文教部 研究助成費에 의한 論文이며 당국에 감사한다.

體的으로 알아 볼 目的으로 이 酵素의 主要 構造化合物인 FAD 또는 FMN의 model 化合物을 合成하고 이와 反應하리라고 推定되는 orotic acid 誘導體를 合成하여 이들 分子間의 結合與否와 그 結合의 樣式을 우선 分子水準에서 赤外吸收 spectrum 또는 核磁氣共鳴 spectrum 과 같은 分光學的인 手段으로 조사하였고, 二次的으로는 이들 生體內 分子와 藥物分子의 作用機轉을 밝히는데 도움이 되고자 함에 그 目的을 두었다.

實 驗

實驗 物質—본 실험에 使用한 物質로는 FAD 또는 FMN의 model 化合物로서 riboflavin 誘導體를 chloroform 과 같은 有機溶媒에 可溶性인 化合物을 얻기 위해 riboflavin 2', 3', 4', 5'-tetraacetate(R)를 合成하여 試料로 使用하였다. 그 合成方法은 이미 알려진 方法⁷⁾으로 간단히 要約하면 다음과 같다.

잘 乾燥한 pyridin 溶媒中에서 無水醋酸과 乾燥한 riboflavin 를 反應시킨다. 反應 溫度는 室溫으로 約 48時間 계속 교반하여 溶液이 투명해지면 ethanol로 감압증류하여, 최종적으로 chloroform으로 再結晶하여 試料를 얻었다.

orotic acid도 有機溶媒에 可溶性인 化合物로 하기 위해 orotic acid butyl ester를 合成하여 使用하였으며 그 合成方法은 다음과 같다.

orotic acid에 정제한 butyl alcohol을 過量 加하고 (orotic acid 2g에 butyl alcohol 200ml), 여기에 진한 黃酸(98%) 2ml를 加하여 10時間 이상 계속 교반하며 환류시키면 연황색의 透明한 溶液이 된다. 이 溶液을 감압증류하여 진체 부피의 1/3가량 될 때까지 蒸溜시킨다. 蒸溜水로 再結晶한후 여러번 蒸溜水로 洗滌하여 乾燥시켜 板狀結晶의 orotic acid butyl ester(Or)를 얻었다.

赤外吸收 spectrum 과 nmr spectrum 측정용 溶媒인 重 chloroform(CDCl_3)은 독일 Merck Co. 製品으로 乾燥 alumina gel의 column을 通하여 정제한 後 試料를 溶解시켜 측정에 使用하였다.

以下 使用한 試藥은 시판 一級品을 정제없이 使用하였다.

實驗 方法—赤外吸收 spectrum 測定은 Beckman IR 20A 型의 赤外分光光度計를 使用하여 測定하였으며 測定에 使用한 溶液 cell은 3μ 領域($3600\sim 3000\text{cm}^{-1}$) 및 6μ 領域($1800\sim 1400\text{cm}^{-1}$)에서 각각 1.0mm KBr cell을 使用하여 測定하였다.

本 論文에 나타난 모든 赤外吸收 spectrum 圖는 溶媒의 曲線을 基本線으로 하여 透過率을 吸光度로 환산한 것이다.

nmr spectrum 測定은 Perkin-Elmer R32型의 核磁氣共鳴 吸收裝置를 使用하였으며 基準物質로 TMS(intenal)를 使用하였다.

實驗 結果 및 考察

3μ 領域의 赤外吸收 스펙트럼—0.02M 濃度の R 溶液의 赤外吸收 spectrum은 3380cm^{-1} 에서 예민하고 강한 吸收 spectrum이 나타난다(Fig. 1). (R)

이들의 吸收帶는 試料溶液을 重水素化 또는 isoalloxazine의 3位의 N部位の 水素를 methyl 化한 methyl 化合物에서는 볼 수가 없으므로⁷⁾ 이 吸收 spectrum은 riboflavin의 NH基에 기인하는 NH基 伸縮振動의 吸收 spectrum이라고 結論지을 수 있다.

0.02M 濃度の Or 溶液의 赤外吸收 spectrum 역시 같은 位置인 3380cm^{-1} 에서 R 溶液보다 더 예민하고 강한 spectrum이 나타난다(Fig. 1)(Or). 이 吸收 spectrum은 pyrimidine ring의 1,3-

위의 2개의 NH기에 기인하는 흡수 spectrum이라고推定할 수 있다.

다음은 0.02M R溶液과 Or溶液을 같은 비율로 혼합한 混合液 Fig. 1 (R+Or)의 赤外吸收 spectrum에서는 Or 및 R의 본래의 非會合性 吸收 spectrum인 3380cm^{-1} 의 吸收 spectrum의 强度가 크게 減少한 사실을 볼 수 있다. 이것은 두 物質의 分子內에 存在하는 NH基가 會合하였다는 것을 나타내고 있으며 또한 NH基가 會合에 利用되었음을 示唆한다.

6 μ 領域의 赤外吸收 spectrum—다음은 CDCl_3 溶媒中에서 R+Or 會合體의 NH基와 結合된 結合部位를 明確히 할 目的으로 6 μ 領域의 C=O基의 伸縮振動의 變化를 알아보았다.

0.0025M R溶液의 赤外吸收 spectrum은 1745cm^{-1} 부근에서 매우 강한 吸收 spectrum과 $1715, 1695\text{cm}^{-1}$ 에 두 개의 吸收 spectrum이 나타나는 것을 볼 수 있다.

1745cm^{-1} 부근에 强하게 나타나는 吸收 spectrum은 acetyl 鏈기의 C=O基의 伸縮振動에 의한 것이라고 알려져 있고, $1715, 1695\text{cm}^{-1}$ 에 나타난 2개의 吸收 spectrum은 2,4位的 C=O基의 伸縮振動에 의한 것이라고 알려져 있다.⁷⁾

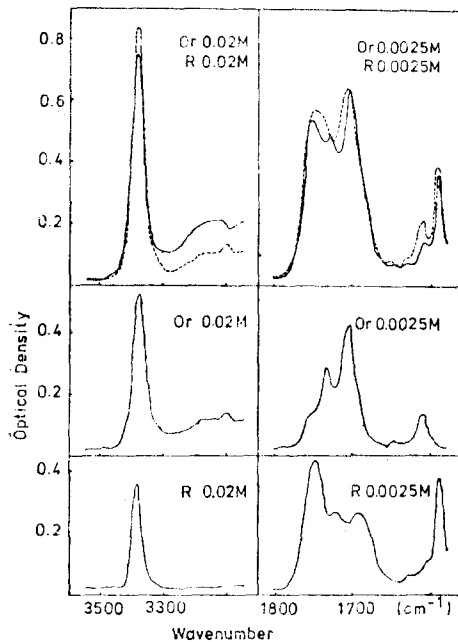


Fig. 1—Infrared spectra of orotic acid butyl ester and riboflavin tetraacetate and equimolar mixture solutions of each compounds in deuteriochloroform. Solid line, observed spectra; dotted line, calculated sum of individual spectrum. The path length is 1mm for the 3μ region and 1mm for the 6μ region.

그리고 1600cm^{-1} 에 매우 弱한 吸收 spectrum이 나타나는때, 이것은 NH基의 變角振動에 기인하는 것이라고 推定된다. 일반적으로 文獻^{8~9)}에 의하면 NH基의 變角振動에 기인하는 吸收 spectrum은 대개 6 μ 領域에 매우 弱한 吸收 spectrum이 나타나는 것으로 本實驗結果의 吸收 spectrum이 NH基임을 쉽게 歸結지을 수 있다.

0.0025M Or 溶液의 赤外吸收 spectrum은 1703cm^{-1} 에 강한 吸收 spectrum과 1730cm^{-1} 에 다른 吸收 spectrum과 1600cm^{-1} 에 弱한 또 하나의 吸收 spectrum을 觀察할 수 있다(Fig. 1).

1703cm^{-1} 에 나타난 吸收 spectrum은 butyl 基로 置換된 C=O基의 伸縮振動에 기인하는 吸收 spectrum이며, 1730cm^{-1} 에 나타난 吸收 spectrum은 pyrimidine ring의 2,4位的 C=O基의 伸縮振動에 기인하는 吸收 spectrum으로 귀결지을 수 있다. 그리고 1600cm^{-1} 에 나타난 弱한 吸收 spectrum은 NH基의 變角振動에 의한 吸收 spectrum일 것으로 推定된다.

R+Or 溶液(0.005M)의 赤外吸收 spectrum 變化를 살펴보면 두 物質의 C=O基에 의한 吸收 spectrum band($1750\sim 1700\text{cm}^{-1}$)가 全體的으로 크게 減少된 것을 볼 수 있다(Fig 1). 이는 C=O基가 어떤 結合에 關與하였음을 시

사해 주는 것이며, 本 實驗의 경우 分子內의 NH基와 水素結合을 形成하는데 利用되었다는 것을 말해주는 것이다.

또한 1600cm^{-1} 의 NH基의 變角振動에 의한 吸收 spectrum 도 크게 減少했음을 觀察할 수 있고 濃度를 4배 (0.01M)로 한 실험에서도 R과 Or의 吸收 spectrum이 減少되어 짐을 再確認할 수 있어 各 分子間의 NH基와 C=O基가 結合에 關係하였음을 알 수 있었다.

Nmr spectrum 測定— CDCl_3 溶媒中에서 R과 Or의 水素結合을 명확히 確認하기 위하여 R, Or 및 R+Or의 nmr spectrum의 NH基의 proton에 의한 signal의 變化를 調査하여 보았다.

R, Or의 各各의 溶液과 R+Or 溶液의 nmr spectrum을 比較하였을 때, 8.72 ppm에 나타난 R의 NH基의 signal이 저자장쪽으로 0.5 ppm 이동했으며, 9.15 ppm에 나타난 Or의 NH基의 signal도 0.3 ppm 저자장쪽으로 이동하였다 (Fig. 2).

結果적으로 두 物質의 NH基의 proton이

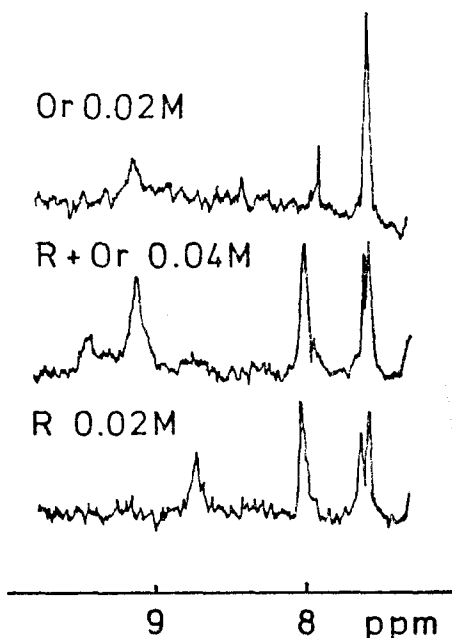


Fig. 2—Nmr spectra of orotic acid butyl ester and riboflavin tetraacetate and their mixtures in deuteriochloroform.

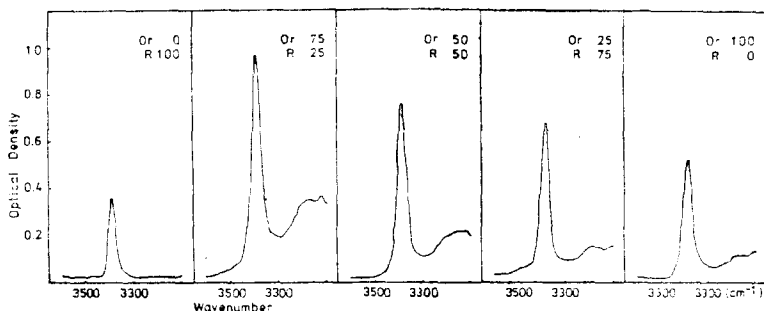


Fig. 3—Infrared spectra of various mixtures of riboflavin tetraacetate and orotic acid butyl ester. The total concentration of the material is 0.04M and the path length is 1 mm.

모두 저자장쪽으로 이동됨을 보아 두 NH기가 水素結合에 관여하였음을 確認할 수 있어 赤外吸收 spectrum의 結果를 잘 뒷받침하여 준다.

連續變化法을 利用한 結合比率 決定—溶液中的 反應物間的 反應이 가성성임을 감안하여 吸光度를 測定하여 生成物の 結合比率를 決定하는 所謂 연속변화법^{10,11)}을 利用하여 R과 Or의 結合比率를 알아보았다.

R과 Or의 各各의 濃도가 0.04M인 溶液을 만들어, 두 溶液의 混合比率를 變化시켜 가며, NH基의 伸縮振動에 의해 나타나는 3380cm^{-1} 부근의 赤外吸收 spectrum의 吸收曲線의 強度 減少를 比較하였다. 이 때 각 比率의 混合液의 3380cm^{-1} 부근의 吸收曲線은 Fig. 3과 같다.

또한 變曲點을 알아보기 위해 graph에 各 混合比率에 있어서의 吸收 spectrum 強度 減少를 graph에 表示했을 때 Fig. 4와 같이 나타났다.

이로보아 變曲點은 R이 0.26M, Or이 0.13M일 때(즉 R:Or=66:33)이므로 R과 Or의 結合比率이 2:1임을 推定할 수 있다.

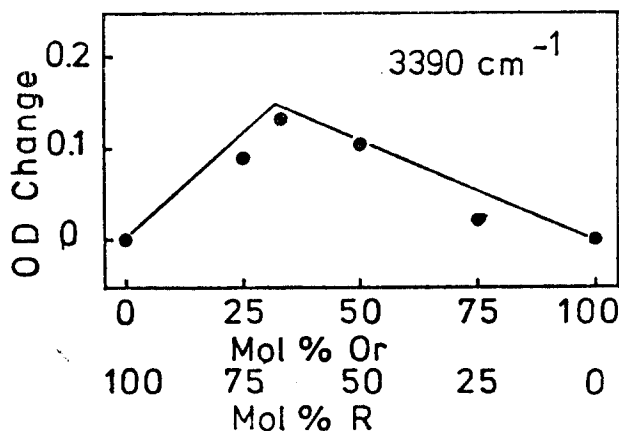


Fig. 4—Change in the optical density of the association bands found at 3380cm^{-1} as a function of the mole ratio of riboflavin tetraacetate and orotic acid butyl ester. The optical density of the pure solution is adjusted to zero.

結 論

以上の 實驗 結果로써 riboflavin 誘導體와 orotic acid 誘導體間的 結合樣式은 다음에 제시되는 R:Or=2:1의 環狀水素結合體임을 推定할 수 있으며 結合比率에도 모순이 없다(Fig. 5).

그러나, 이것이 實際 生體內에서 일어나는 dihydroorotate dehydrogenase와 orotic acid間에 이루어지는 結合樣式이라고는 斷定할 수는 없는 것으로 酵素中 存在하는 FAD 또는 FMN의 電子分布狀態에 따라 結合狀의 差異가 있을 것으로 생각되나, 본실험과 같은 酸化型의 riboflavin을 대상으로 할 때는 orotic acid와의 反應은 以上에서 提案한 結合樣式이 가장 妥當性이 있음을 알 수 있으며 向後 還元型과의 反應 또는 보다 더 生體內에 가까운 實驗을 通하여 確實한 反應機轉이 밝혀지리라 믿으며 우리들의 研究課題로 삼고자 하는 바이다.

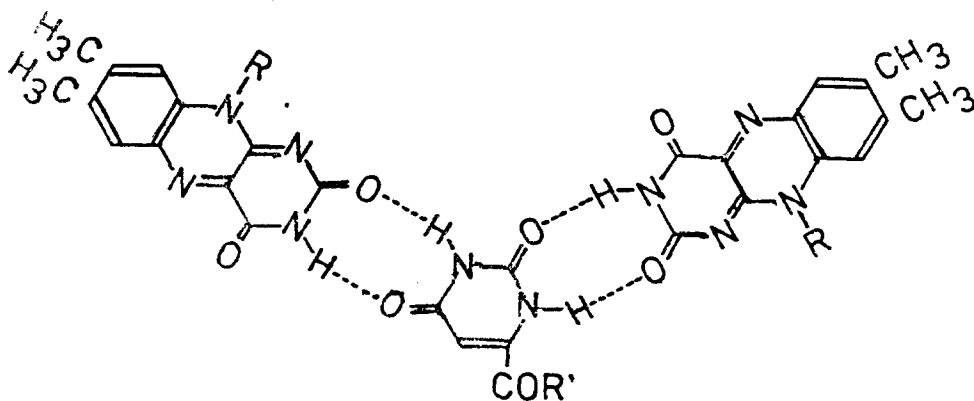


Fig. 5—Proposed interaction of riboflavin and orotic acid derivative in deuteriochloroform solution.

文 獻

1. V. Aleman and P. Handler, *J. Biol. Chem.*, **242**, 4087(1967).
2. H. C. Friendman and B. Vennessland, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1519(1960).
3. A. L. Lehninger, *Biochemistry*, 2nd, Worth Publishers, Inc., New York, 486, 735(1975).
4. H. A. Harper, V. W. Rodwell and P. A. Mates, *Review of Physiological Chemistry*, 16th, Lange Medical Publications, California, 402(1975).
5. 邊溫星, 蔡東圭, *藥學會誌*, **8**, 45(1964).
6. B. Pullman and A. Pullman, *Quantum Biochemistry*, John Willy & Sons, Inc., New York, 747(1963).
7. 俞炳高, *韓國生化學會誌*, **3**, 61(1970).
8. J. W. Robinson, *Undergraduate Instrumental Analysis*, 2nd, Marcel Dekker Inc., New York, 106(1970).
9. R. M. Silverstein, *et al.*, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 3rd ed, John Wiley & Sons, Inc., New York, 104(1974).
10. 高木誠司, *定量分析의 實驗과 計算* 第3卷, 共立出版株式會社, 東京, 32, 1961.
11. A. N. Martin, J. Swarbrick and A. Cammarata, *Physical Pharmacy*, 2nd ed., Lea & Febiger, Inc., Philadelphia, 336, 1969.