



Title	新抗生素質TUBERACTINOMYCINの化学構造に関する研究
Author(s)	若宮, 建昭
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/1447">https://hdl.handle.net/11094/1447</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

新抗生物質 TUBERACTINOMYCIN の  
化学構造に関する研究

若宮 達昭

## 目 次

1 章	序 論	-----	1
2 章	新オキシアミノ酸 $\gamma$ -Hydroxy- $\beta$ -lysine の単離とその構造	-----	7
3 章	ケアニジノアミノ酸の構造	-----	29
4 章	Tuberactinomycin の全構造 についての考察	-----	56
	謝 辞	-----	71

# 1 章 序 論

## ( 1 - 1 ) 新抗生素 Tuberactinomycin の発見まで

抗生素 Tuberactinomycin ( TUM ) は永田ら<sup>1)</sup>により静岡県伊豆大仁町の土壌より分離された放線菌 *Streptomyces griseoverticillatus* var. *tuberacticus* の生産する塩基性ペプチド抗生素で、人型結核菌に対し抗菌作用を示す<sup>2)</sup>。

この TUM が新しい抗生素であることは次のようにして確かめられた。完全なアミノ酸組成がわかるまでは、主として Thin layer chromatography ( TLC ) によって検討された。まず、既知のアミノ酸との同定により  $\alpha, \beta$ -diaminopropionic acid, serine が 1:2 の割合で含まれていることがわかり、その他に未知のアミノ酸として  $\epsilon$ -アニシノアミノ酸および他の塩基性アミノ酸、さらに尿素が含まれていることが明らかになった。そしてこのアミノ酸組成から、既知の抗生素 Capreomycin ( CM ) や Viomycin ( VM ) に類似する構造であることが予想された。

VM と CM について簡単にふれると、まず CM は Lilly 社の E.B.Herr らにより 1960 年に放線菌 *Streptomyces capreolus* の培養液から単離された<sup>3)</sup> 抗結核剤で、構成アミノ酸として  $\beta$ -lysine,  $\alpha, \beta$ -diaminopropionic acid, serine, alanine そして capreomycidine ( 図 1-1-1 ) を有することが明らかにされている。しかし、市販のものを含め一般にこの CM は四成分の混合物であり、純粹な物質の単離が困難なためか、その構造研究は充分に行なわれていない。

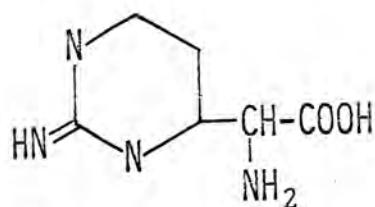
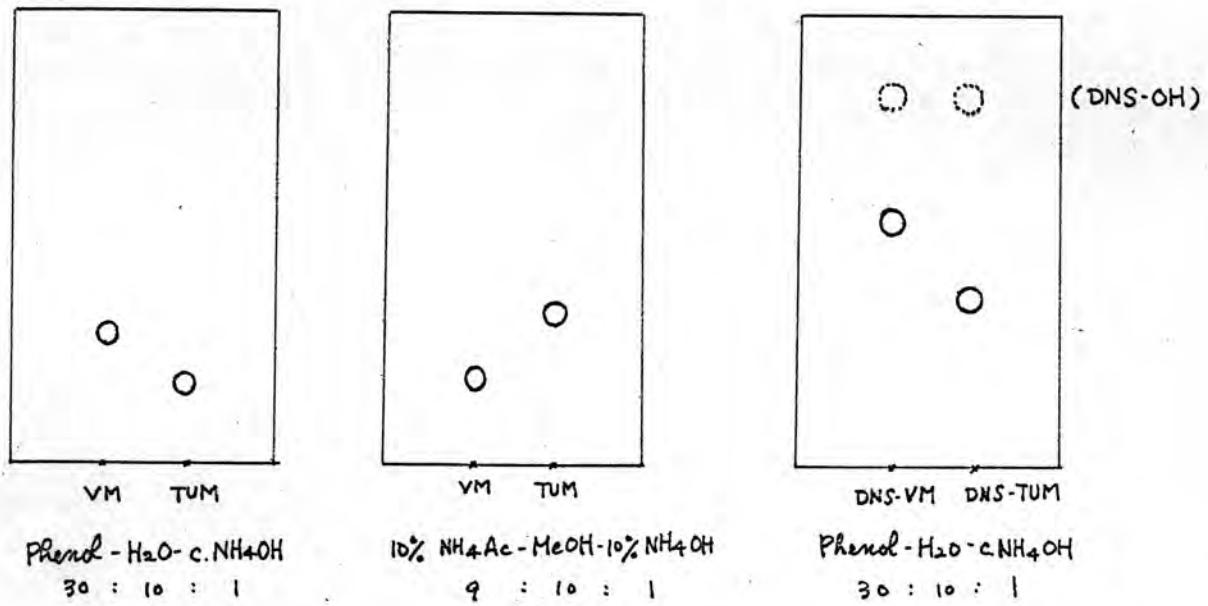


図 1-1-1 capreomycidine

VMは1951年にFinlayらにより放線菌*Streptomyces puniceus*の培養液より単離された抗結核剤で<sup>4)</sup>、そのアミノ酸組成は $\beta$ -lysine,  $\alpha, \beta$ -di-aminopropionic acid, serine, viomycidine<sup>\*</sup>, 3-ureidodehydroalanine<sup>\*\*</sup>を1:1:2:1:1モルの割合で含むことが明らかにされている。<sup>5)</sup>このVMの方はほとんど純粋な物質が単離されており、実際市販のVMも満足し得る程度に純粋である。このVMの構造研究は多くのグループによってなされていて、viomycidineの構造決定(3章)やアミノ酸配列の決定(4章)が試みられている。

著者はアミノ酸組成の点でTUMに最も類似するVMとの比較を行なった。TUMは呈色反応、融点、赤外線吸収スペクトル、溶解度、pKa'値など種々の物理化学的性質がVMと非常によく似ているうえに、口紙電気泳動、TLCなどにおいてもよく似た挙動を示したが、次のような溶媒系のTLCにより両者を明瞭に区別することができた。またTUMとVMを田村らの方法<sup>6)</sup>によってdansyl(diaminomethylnaphthalene-5-sulfonyl)誘導体とし、そのTLCによっても明らかに区別することができた。



\* 3章で述べるように眞の構成成分はviomycidineではなくてTUMの場合と共通のケアニジノアミノ酸tuberactidineeである。

\*\* 未単離、4章で詳述する。

また弱酸性陽イオン交換樹脂による分離においても、TUMとVMは明らかに異なる。さらにTUMの生産菌が全く新種のものであることが確認され後に述べる構成アミノ酸の構造研究よりVMにおける $\beta$ -lysineの代りに、 $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine\*が含まれることが明らかにされたことなどにより、TUMが新しい抗生物質であることが判明したのである。

### (1-2) Tuberactinomycinの性質

TUMは水溶性の塩基性ペプチドで、通常塩酸塩として調製されるが、その物理化学的性状は次の通りである。

分子式 :  $C_{25}H_{43}N_{13}O_{11} \cdot 3HCl$

構成成分 : L-Serine, L- $\alpha$ , $\beta$ -Diaminopropionic acid,  $\gamma$ -Hydroxy-L- $\beta$ -lysine, Tuberactidine, [3-Ureidodehydroalanine]

融点 : 244-264°C(dec.)で明確な融点を示さない。

比旋光度 :  $[\alpha]_D^{25} -31.5^\circ (c\ 1, H_2O)$

紫外吸収 :  $\lambda_{max}$  268m $\mu$  ( $H_2O$ ), 268.5m $\mu$  (0.1N HCl)  
285.5m $\mu$  (0.1N NaOH)

呈色反応 : ニニヒドリン, 坂口, ビュウレット反応陽性

pKa' : 7.2, 10.3, >11

溶解性 : 水に易溶, 热メタノールに可溶であるが他の有機溶媒にはほとんど溶けない。

一般性状 : 白色粉末

赤外線吸収スペクトル : 図1-2-1

(図1-2-1 次ページに別掲)

\* 2章で詳述する。

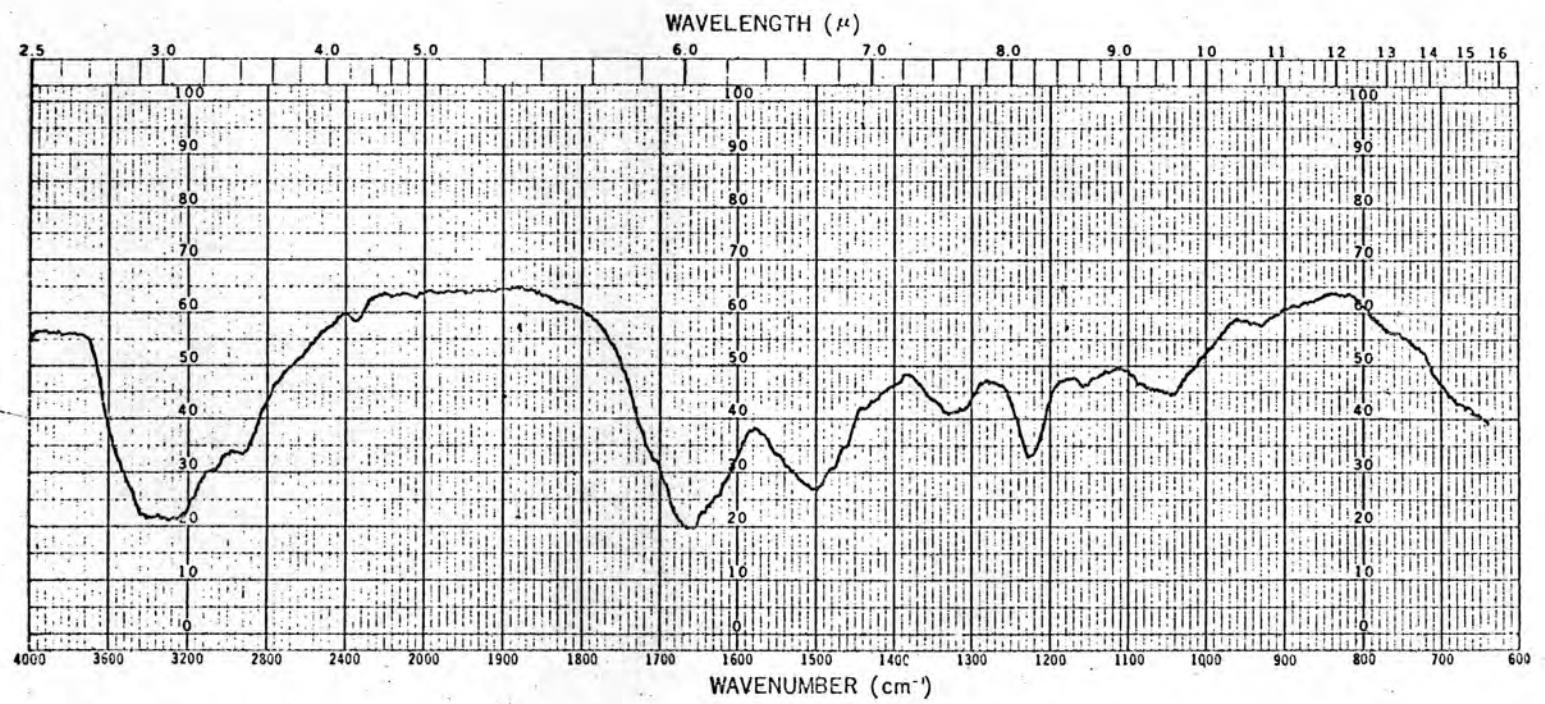


図 1-2-1 Tuberactinomycin 塩酸塩の  
赤外線吸収スペクトル (KBr)

(1-3) Tuberactinomycin の誘導体, Methyltuberactinomycin

VM のアシル誘導体として, DNP 誘導体, アセチル誘導体が得られて  
いる。特にアセチル誘導体は北川らにより succinimide acetate を用い  
て好収率で得られたと報告されているが,<sup>5)</sup> 確かなデータがないので結論  
をつけ難い。著者は TUM に対し同様に DNP 化, アセチル化, ベンゾイル  
化, ベンジルオキシカルボニル化など種々のアシル化を行なってみたが  
いずれも反応中に分解がおこり, 純粹な誘導体を得ることは困難であつ  
た。

一方 VM の結晶性誘導体として Methylviomycin (Me-VM) (構造未知)<sup>6)</sup> があり, 著者もそれに相当する Methyltuberactinomycin (Me-TUM)<sup>7)</sup> の調製を試みた。TUM 塩酸塩 (1g)をメタノール (300ml) にけん引  
した後, 還流下に煮沸を行なうと約3時間で少量の不溶物を残し溶解  
する。この不溶物を一度口別した後, さらに煮沸を続けると徐々にプリ  
ズム晶が析出してくる。12時間煮沸した後, 結晶を口取して 325mg  
の結晶を得た。母液を濃縮すればさらに同一物を得ることができる。こ  
のプリズム晶は TLC で明らかに TUM と異なり, TUM に関する唯一の  
結晶性誘導体が得られた訳である。この新しい結晶性誘導体の諸性質は  
次の通りである。

分子式 :  $C_{26}H_{45}N_{13}O_{11} \cdot 3HCl$

融点 : 275-283°C (dec.)

比旋光度 :  $[\alpha]_D^{22} -7.9^\circ (c 1, NHCl)$

紫外吸收 : TUM と同じ。

呈色反応 : ニンヒドリン, ビュウレット反応陽性, 坂口反応陰性。

pKa' : 7.3, 9.7, 11.2

溶解性 水に易溶, TUM の場合と異なり熱メタノールに難溶,  
一般的の有機溶媒に不溶

この誘導体は VM の場合の例にならって Me-TUM と名づけられたが,

TUM のメチル化を受けた位置は、構成アミノ酸である tuberactidine\*

図 1-3-1) の 4 位の水酸基であると推定される。その根拠は、この結晶の重水中での NMR スペクトルにおいて δ 3.42 ppm に -OCH<sub>3</sub> のシグナルを有し、さらに坂口反応が陰性に変化するからである。このメチル化を受ける水酸基は一種のヘミアセタールであるが、糖類のヘミアセタールの場合にも類似のメチル化が起ることが知られている<sup>9)</sup> (a)。

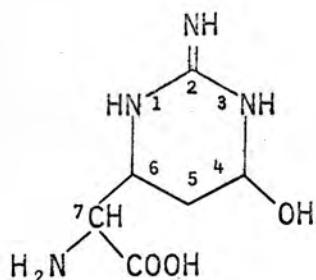
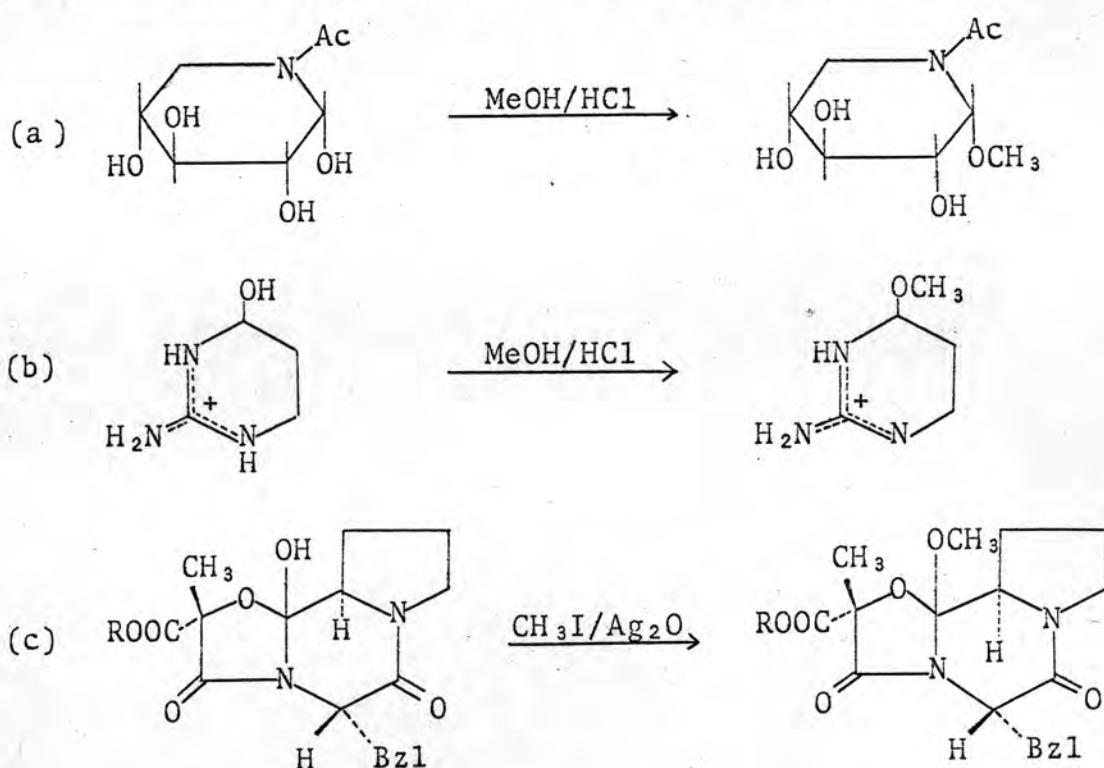


図 1-3-1

さらには 2-amino-4hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (b)<sup>10)</sup> や、エルゴタミンの中心骨格 (c)<sup>11)</sup> の例も参考になる。



著者は、この新しい抗生物質 TUM の構造研究にとりかかり、まず新アミノ酸 γ-hydroxy-β-lysine および tuberactidine の単離と構造決定を行ない、さうにアミノ酸配列すなわち全構造の検討を行なった。その結果現在までに得られた知見をまとめてここに報告する。

\* 3章で詳述

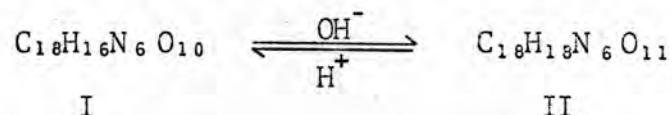
## 2 章 新オキシアミノ酸 $\gamma$ -HYDROXY- $\beta$ -LYSINE の単離とその構造

### (2-1) 新アミノ酸 $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine の単離

Tuberactinomycin (TUM) の構成成分として、新アミノ酸  $\gamma$ -Hydroxy- $\beta$ -lysine が存在することは、次のような思いがけない方向から明らかにすることができた。

著者は、TUM の一次構造を決めるにあたり、まず常法通り N 末端の決定から始めた。すなわち、TUM 塩酸塩を 2,4-dinitrophenyl (DNP) 化して得られた DNP-TUM を塩酸で加水分解すると、黒緑色の塩酸不溶物が得られた。このものは N,N-dimethylformamide (DMF) に可溶であるが、他の有機溶媒および水には不溶で、DMF - エーテルから再結晶すると黄色針状結晶として得ることができた。元素分析、UV\* および質量分析による分子量測定より、このものの分子式として  $C_{18}H_{16}N_6O_{10}$  (I) が与えられた。

I の赤外線吸収スペクトルを測定すると、 $1720\text{ cm}^{-1}$  に五員環ラクトンに由来すると考えられる吸収を示した。そこで、I をアルカリでケン化すると  $3420\text{ cm}^{-1}$  に -OH、 $1720\text{ cm}^{-1}$  に -COOH の吸収を示す化合物 II が得られた。II は酸で処理すると再び I に戻ることから、I は ラクトン構造を有し、II はそのオキシ酸であることが明らかとなった。II は元素分析より、分子式  $C_{18}H_{18}N_6O_{11}$  として間違いないことも確かめられた。



mp 245-6°C(dec.)

mp 161-2°C(sint.)

245°C(dec.)

IR :  $1780\text{ cm}^{-1}$

IR :  $1720\text{ cm}^{-1}, 3420\text{ cm}^{-1}$

紫外吸収スペクトルの分子吸光係数より、このものには DNP 基が 2 個含まれることが明らかとなり、このことからもとのアミノ酸は  $C_6H_{14}N_2O_3$

\* UV による分子量測定については実験の部参照

の分子式を有する塩基性オキシアミノ酸と考えられた。そこでまず同じ分子式をもつ既知の塩基性オキシアミノ酸  $\delta$ -hydroxylysine および  $\gamma$ -hydroxylysine<sup>\*</sup>との比較を行なった。 $\delta$ -hydroxylysine は DNP 誘導体として II と比較し、 $\gamma$ -hydroxylysine はラクトンの DNP 誘導体として I と比較したが、いずれも一致しなかった。

次に、ヨウ化水素-赤リンによる水酸基の還元を目的として、加水分解によって除去できるアシル基をもつたラクトンを得ることを試みた。すなわち TUM 塩酸塩を酸加水分解後、一度濃縮して中和したものにつき通常の方法でベンゾイル化して、遊離してきた油状物を酢酸エチルで抽出処理すると、予想通り IR で  $1780\text{cm}^{-1}$  に  $\gamma$  ラクトンの吸収を示す化合物  $C_{20}H_{20}N_2O_4$  (III) が得られた。このベンゾイル化合物 III を塩酸加水分解後、生成した安息香酸をロ過し、母液をさらに酢酸エチルで充分抽出した後、濃縮して褐色粉末を得た。これを水酸化バリウムでケン化してオキシ酸とし、これをヨウ化水素-赤リンで還元し、還元生成物を DNP 誘導体にみちびき、TLC で確認したところ、大部分は I として得られたが、ごく少量の DNP- $\beta$ -lysine の生成を認めることができた。この結果から、この新塩基性オキシアミノ酸を  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine (図 2-1-1) と予想した。

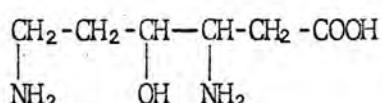


図 2-1-1

上式が正しいとすれば、このものは過ヨウ素酸酸化を受け  $\beta$ -alanine を生成すると考えられる。実際に III の加水分解で得られたラクトンをアルカリケン化後、過ヨウ素酸酸化、つづいて過マンガン酸酸化を行ないロ紙電気泳動および DNP 化生成物の TLC より DNP- $\beta$ -lysine を確認することができた。

また DNP-TUM の酸加水分解により、I の他には DNP 化合物が得られな

\* 九州大学理学部の泉屋信夫博士より恵与された  $\gamma$ -chlorolysine より調製した。

かったので、このオキシアミノ酸が唯一の N 端アミノ酸であることが明らかとなつた。従つて TUM 自身も過ヨウ素酸酸化を受けると考えられ、実際 TUM の過ヨウ素酸酸化テストは陽性であつて、過ヨウ素酸酸化後、過マンガン酸酸化を行なつた生成物中に、やはり  $\beta$ -alanine を確認することができた。

以上の実験結果から、このオキシアミノ酸は  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine であることが明らかとなつた。

## (2-2) I の異性体の草離

一般にオキシアミノ酸を含むペプチドおよびタンパク質の構造研究において、N-O 転位反応がよく利用される。TUM も serine や  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine のようなオキシアミノ酸を含んでいることから、TUM にも N-O 転位反応を試みた。転位反応は岩井らの方法<sup>13)</sup>に従がい、濃硫酸中で行なつた。転位生成物を部分水解後 DNP 化を行ない、DNP 化生成物を酢酸エチルで抽出したところ、IR でやはり  $1780\text{cm}^{-1}$  に ラクトンの吸収を示すが融点、比旋光度、TLC の RF 値、溶解度および IR スペクトルが I とは全く異なる DNP 化合物 IV が得られた。IV の分子式は I と同じ  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_{10}$  であつて、また前述の DNP- $\gamma$ -hydroxylysine lactone とも異なるものであった。

I	IV
mp 245-6°C (dec.)	mp 145°C ご半融後徐々に分解
$[\alpha]_D^{22}$ -63.9° (c0.5, DMF)	$[\alpha]_D^{22}$ -177.8° (c0.5, DMF)

図 2-2-1, I と IV の IR (次ページ列挙)

以上のことから、I と IV は互いに異性体の関係にあるものと推測されこの新しいアミノ酸  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine の構造と立体化学に関する、次の実験を行ない、両異性体の立体構造を決定することができた。

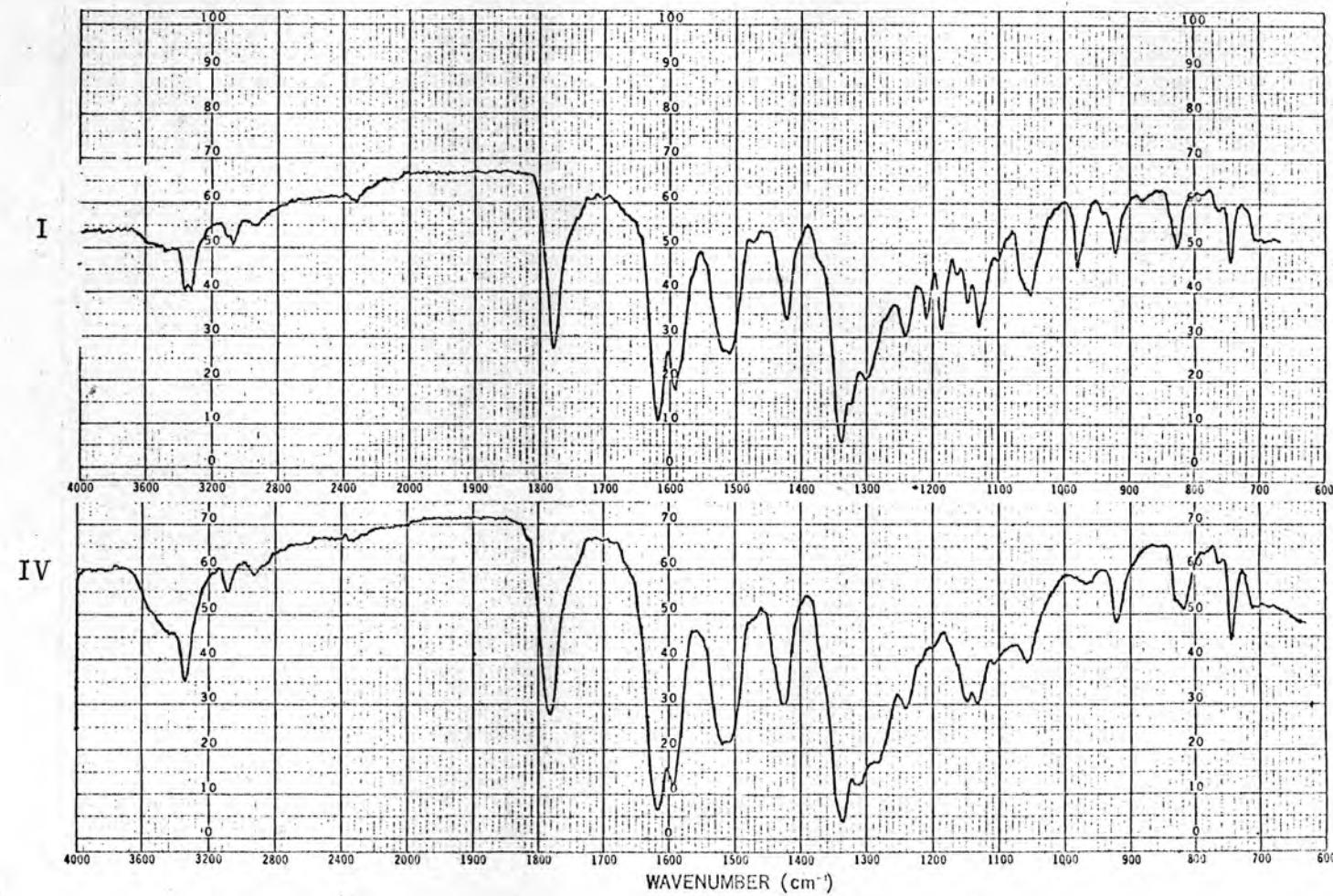


図 2-2-1 I と IV の IR スペクトル ( KBr )

### ( 2 - 3 ) $\gamma$ -Hydroxy- $\beta$ -lysine の立体化学

$\gamma$ -Hydroxy- $\beta$ -lysine は  $\gamma$  ラクトン環を形成し易いと若えられ<sup>\*</sup>、実際 DNP 誘導体あるいはベンゾイル誘導体のいずれの場合もラクトンとして単離された。従って、TUM の完全加水分解物を通常の Schotten-Baumann 法でアシル化すれば  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine lactone のアシル誘導体がアルカリ溶液中より遊離してくるので容易に単離することができる。そこで、アシル基の脱離の容易さを考えて、塩化ベンジルオキシカルボニル ( Z-Cl ) を用いてアシル化反応を行なった。

TUM 塩酸塩を酸加水分解し、一段環縮後中和して常法通り Z 化反応を行なったところ、予想通り反応混合物より油状物が遊離してきた。この油状物を酢酸エチルで抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製などにより、目的とする N,N'-dibenzylloxycarbonyl- $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine lactone ( V ) を得ることができた。なお V の他にカルボベンジルオキシアミド ( C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OCONH<sub>2</sub> ) および N,N'-dibenzylloxycarbonyl- $\alpha$ , $\beta$ -di-aminopropion amide が得られた。<sup>\*\*</sup>

一方、濃硫酸中で N-O 転位反応<sup>\*\*\*</sup>を行なった TUM を、部分加水分解後中和し、このものについて Z 化反応を行ない、目的とする V の異性体 VI を単離した。融点は V が 149.5°, VI が 96.5-97.5°C で、両者の IR スペクトル ( 図 2-3-1 ) は明らかに相違し、それぞれ異性体の関係にあることを示している。

( 図 2-3-1 , 次ページに別掲 )

\* ( 2-4 ) 参照

\*\* 実験の部で詳述

\*\*\* ( 2-2 ) の場合もそうだが、正確には N-O 転位反応ではない。このことに関する説明は ( 4-3 ) で説明する。

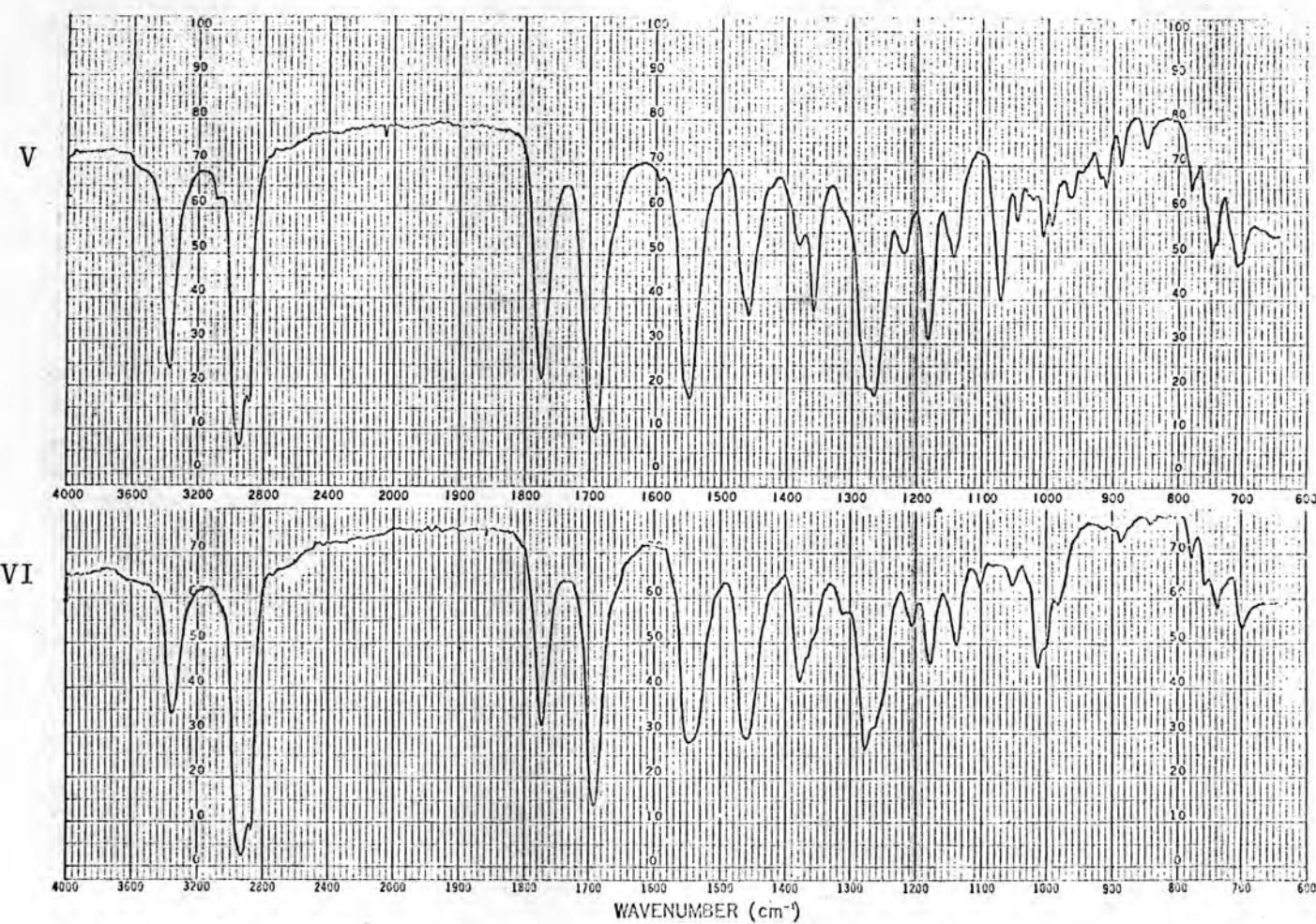


図 2-3-1 V と VI の IR スペクトル (nujol)

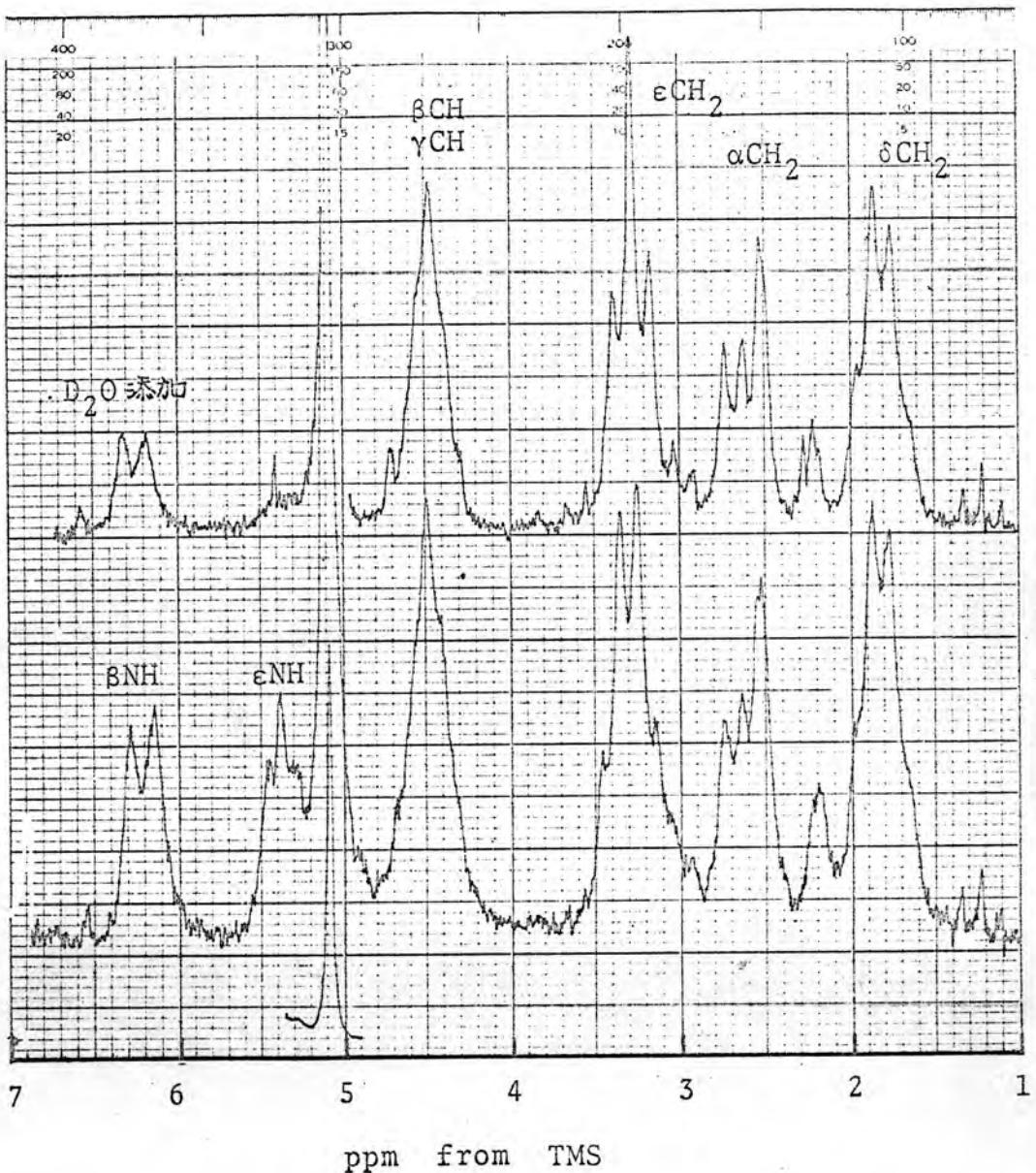
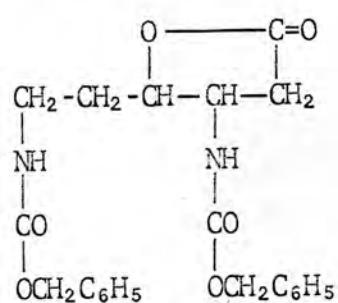


図 2-3-2 V の NMR スペクトル ( in  $\text{CDCl}_3$  )

V の NMR スペクトルは



の構造として、よ

く説明がつき、( 2-1 )での推定構造の正しいことを裏付けた。

次に V および VI を 30% 臭化水素 - 酸酸で脱 Z 化して、それぞれの臭化水素酸塩 VII および VIII を得た。

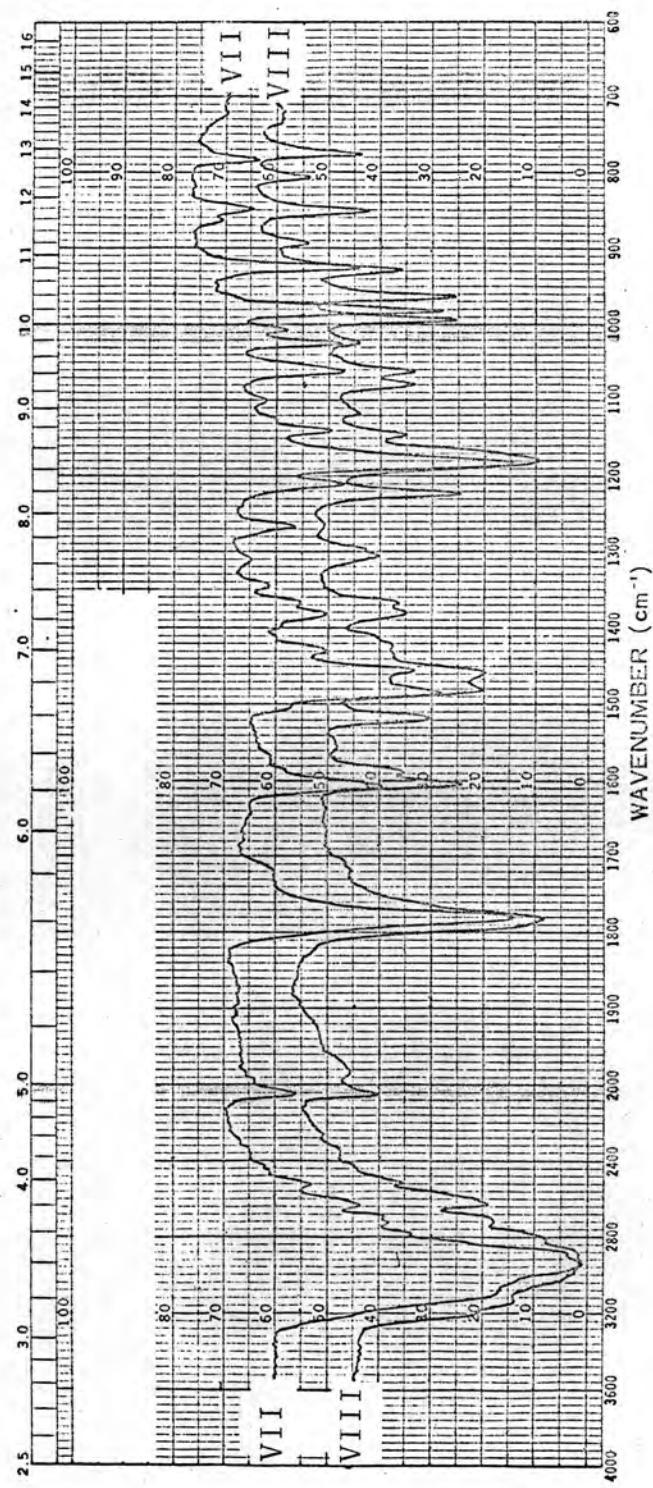
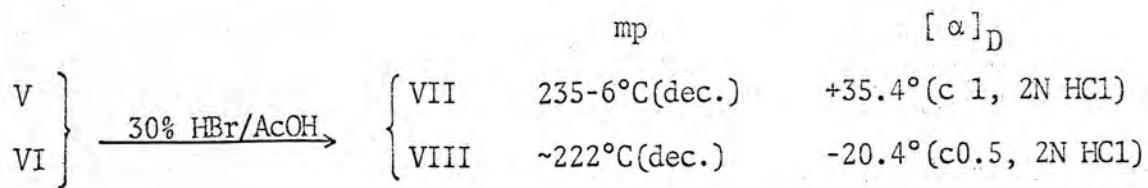
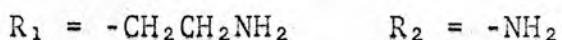
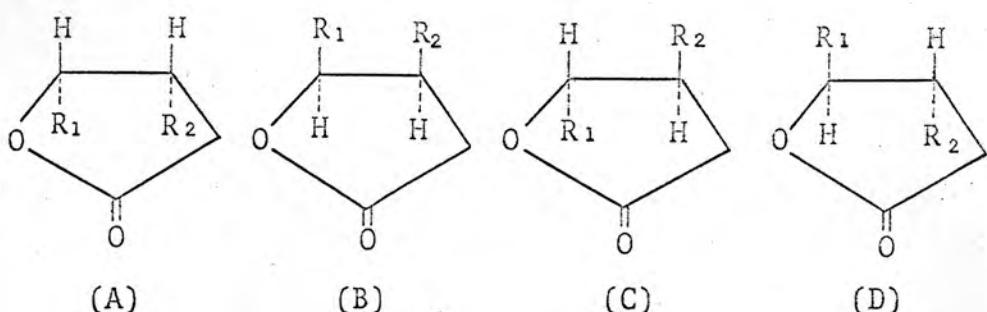


図 2-3-3      VII & VIII の IR 谱 (nujol) (cm⁻¹)

さて  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine lactone には、下図 (A~D) の如く4種の立体異性体が存在するが、TUM から分離されたものがそのいずれに相当するかは、NMR スペクトル、Hudson のラクトン則、および ORD の検討から決定することができた。



まず最初に NMR の検討を行なった。VII と VIII の重水中での NMR スペクトル (図 2-3-4) の化学シフトは、次のように帰属することができる。

図 2-3-4 , 次ページに別掲

	VII		VIII	
	$\delta$ (ppm)	J (cps)	$\delta$ (ppm)	J (cps)
$\alpha$ -CH <sub>2</sub>	3.10	gem=19.0 $\alpha$ - $\beta$ =2.0, 7.5	3.13	gem=16.65 $\alpha$ - $\beta$ =3.96, 7.32
$\beta$ -CH	4.43	$\beta$ - $\gamma$ =4.92	4.19	$\beta$ - $\gamma$ =3.12
$\gamma$ -CH	5.00	$\gamma$ - $\delta$ =4.9, 9.8	4.92	$\gamma$ - $\delta$ =4.68, 7.44
$\delta$ -CH <sub>2</sub>	2.2	multiplet	2.2	multiplet
$\epsilon$ -CH <sub>2</sub>	3.33	$\delta$ - $\epsilon$ =7.5	3.28	$\delta$ - $\epsilon$ =7.14

上表より  $\beta$  水素と  $\gamma$  水素の結合定数を比較すると、VII では  $J_{\beta-\gamma}=4.92$  cps., VIII では  $J_{\beta-\gamma}=3.12$  cps であることから、VII は cis 型、すなわち (A) か (B) であり、VIII は trans 型、すなわち (C) か (D) であると結論した。

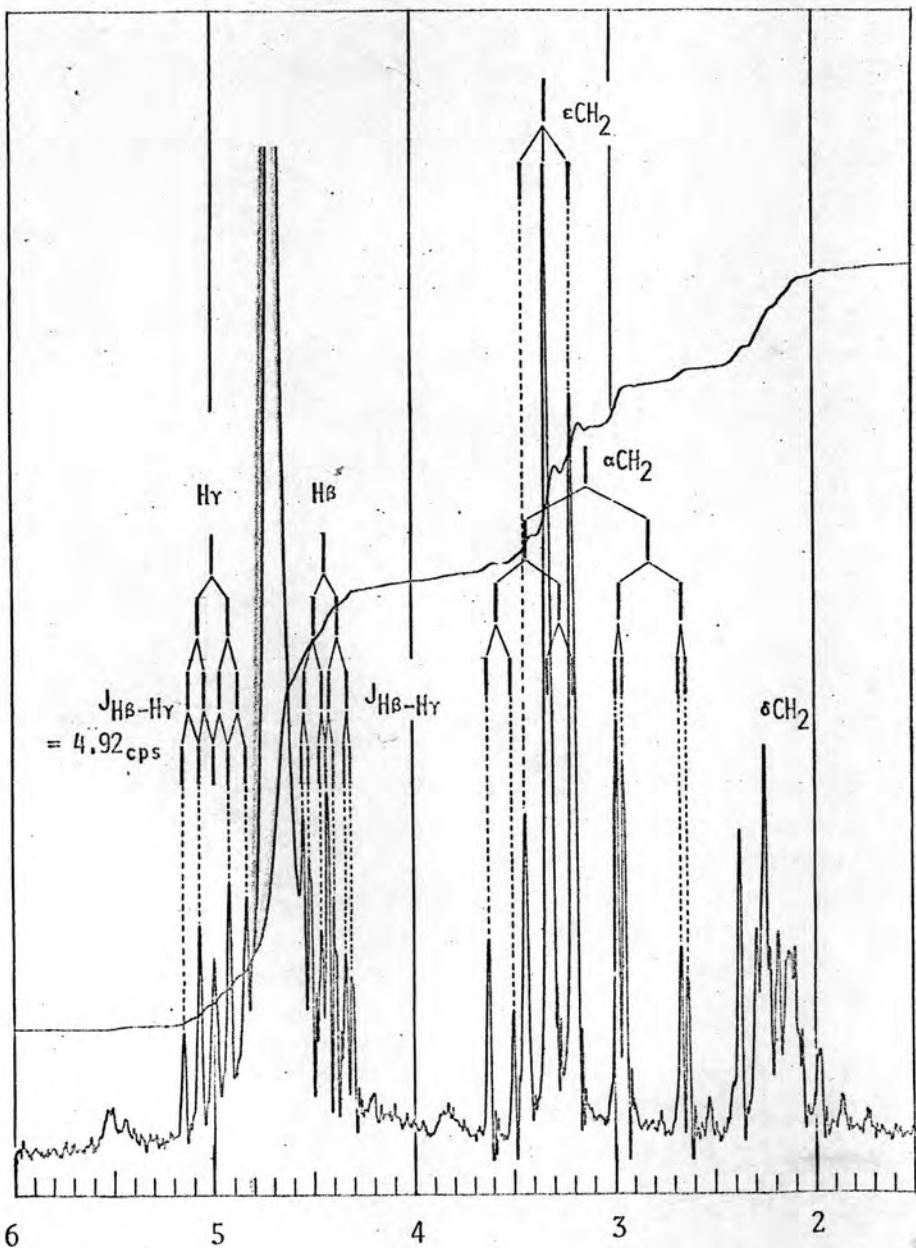


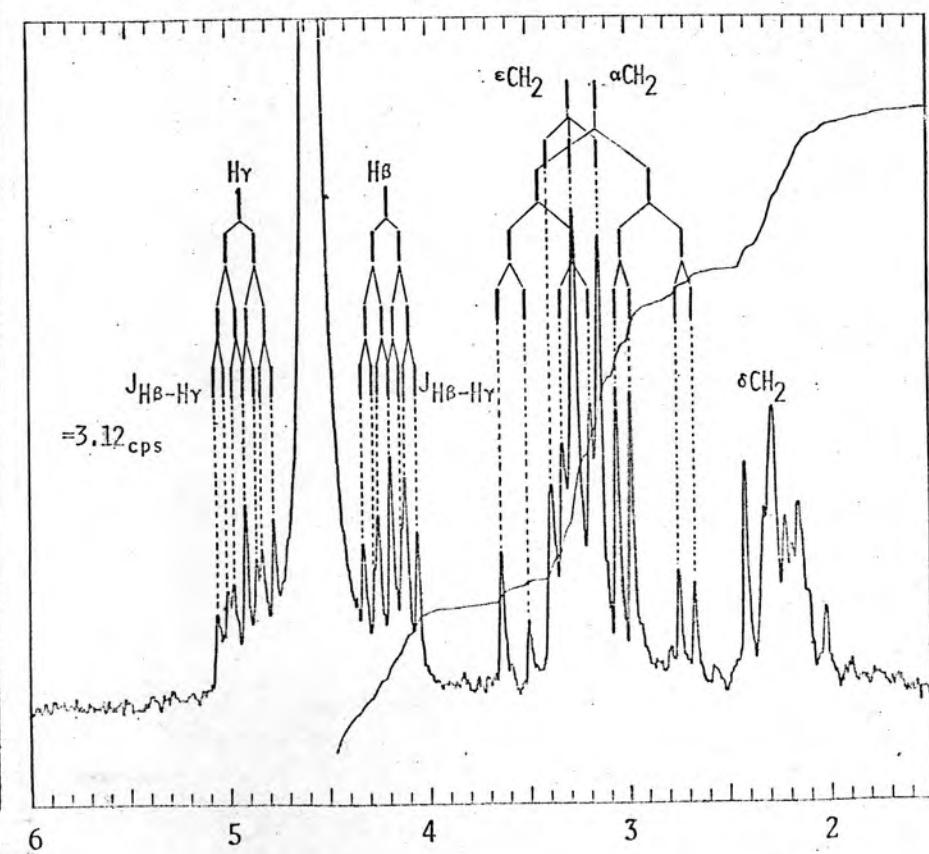
図 2-3-4 VII と VIII の NMR スペクトル

( in  $\text{D}_2\text{O}$  )

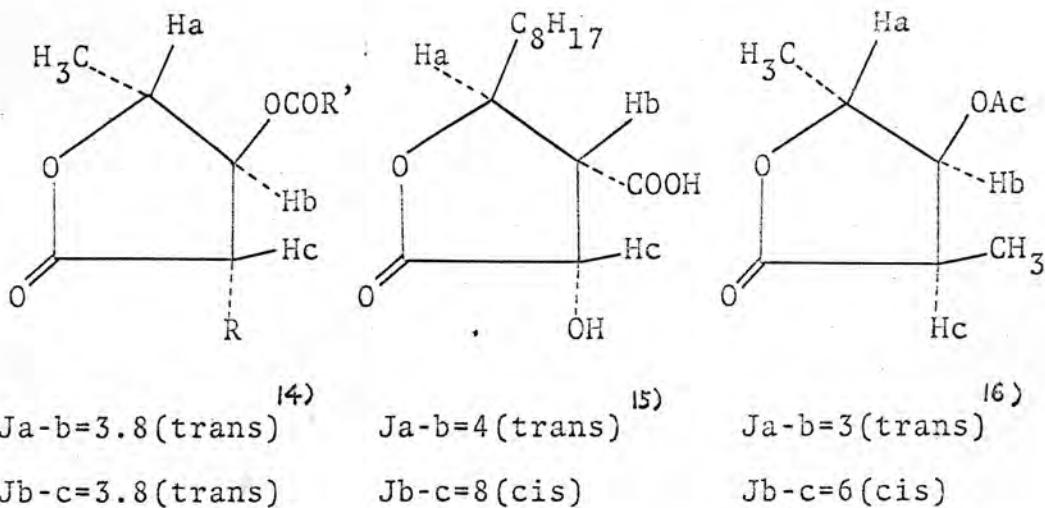
ppm from DSS

← VII

VIII

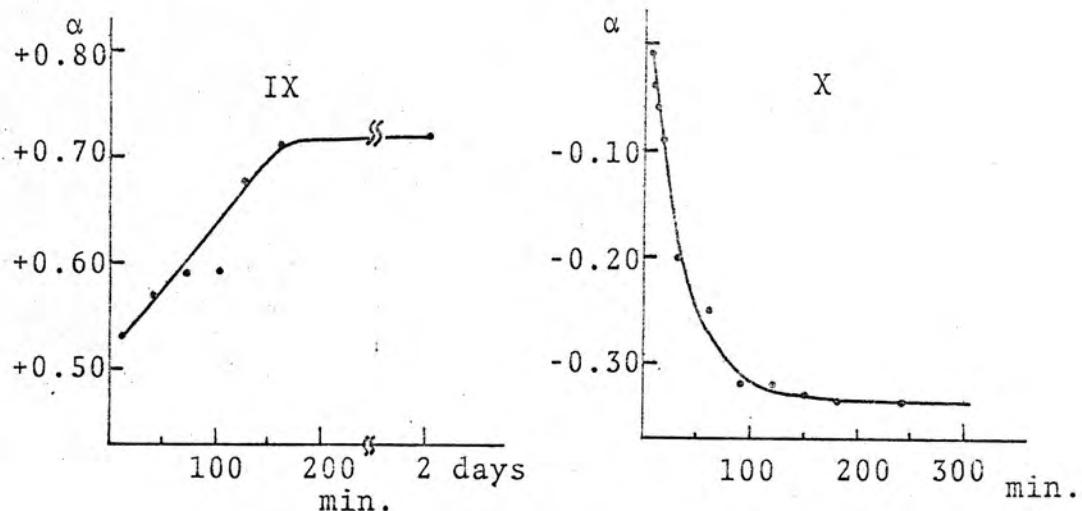


一般に五員環上のプロトン同志の結合定数は Karplus の式にあてはまらないと言われるが、他に環を持たない $\gamma$ -ラクトンでは  $J_{cis} > J_{trans}$  であることが、次のような例から知ることができる。



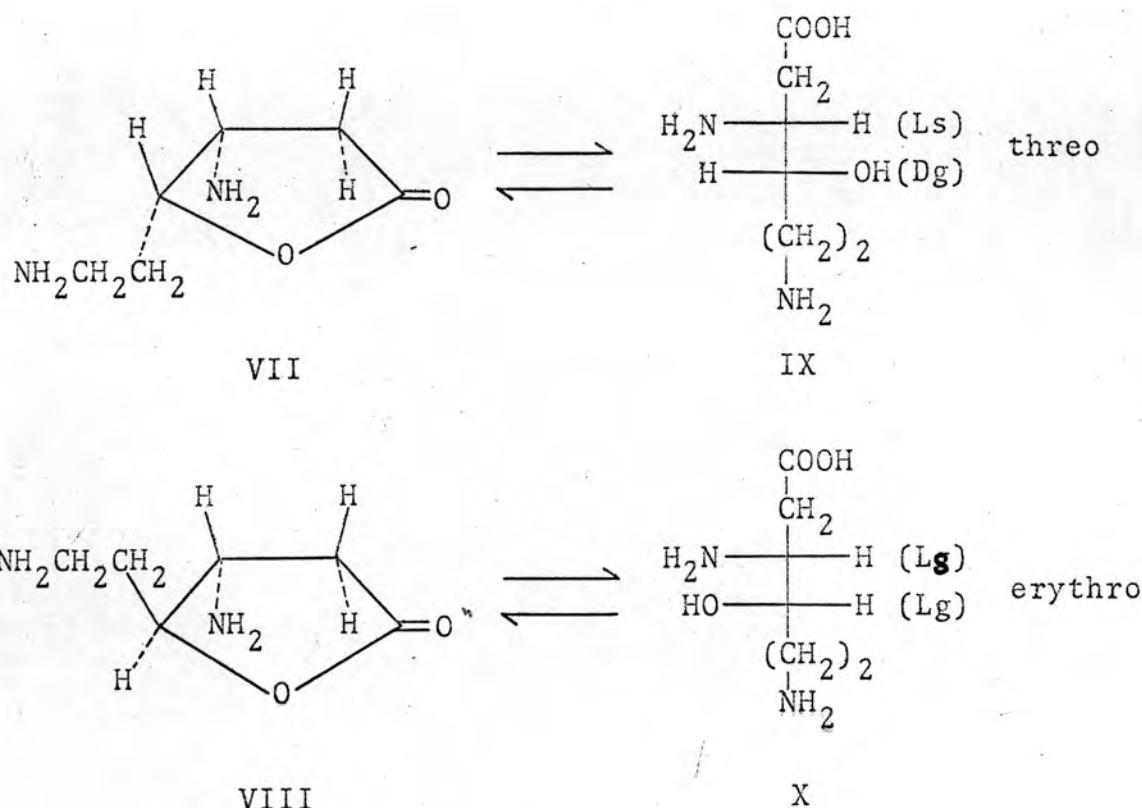
上述のように、VIIとVIIIの相対的な関係がわかったので、 $\beta$ か $\gamma$ 炭素のうちいずれかの立体配置が決まれば、両者の立体構造が決定される。最初に $\beta$ 炭素の配置の決定を試みた。すなわち、 $\gamma$ 位の水酸基を還元して $\beta$ -lysine に導くことを試みたが、これはすでに (2-1) で述べたように成功しなかった。次に、 $\gamma$ 炭素の配置の決定を試みた。これは、泉屋らが $\gamma$ -hydroxylysineの立体化学を論するにあたり、五員環ラクトンにも Hudson のラクトン則が適用し得ることを確かめている。<sup>17)</sup> そこで、この $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysineの場合にも同じように適用し得るものと考へ、以下の実験を行なった。

VII と VIII を酢酸銀でケニ化して、対応するオキシ酸 IX と X に導いた。しかし、このオキシ酸 IX および X は結晶化難く、結晶として取り出すことはできなかった。そこで、ロ紙電気泳動および TLC で純度を確認した油状物を用いて変旋光の測定を行なった。従って比旋光度の算出は不可能であるが、その旋光度  $\alpha$  の経時変化を測定し、変旋光の方向を決定した。



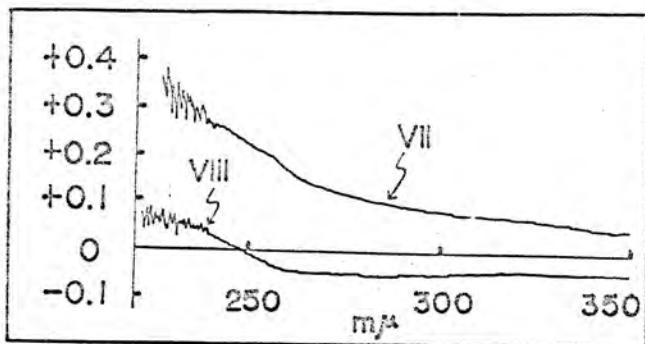
この結果  $\alpha^{\text{VII}} - \alpha^{\text{IX}}$  が正,  $\alpha^{\text{VIII}} - \alpha^{\text{X}}$  が負の相対差を示すことから, VII(IX) の  $\gamma$ 炭素は D<sub>g</sub>, VIII(X)' の  $\gamma$ 炭素は L<sub>g</sub> 配置であることが明らかとなつた。

以上の結果を総合して判断すると, VII, VIII, IX, X は次のよう構造であると結論できた。

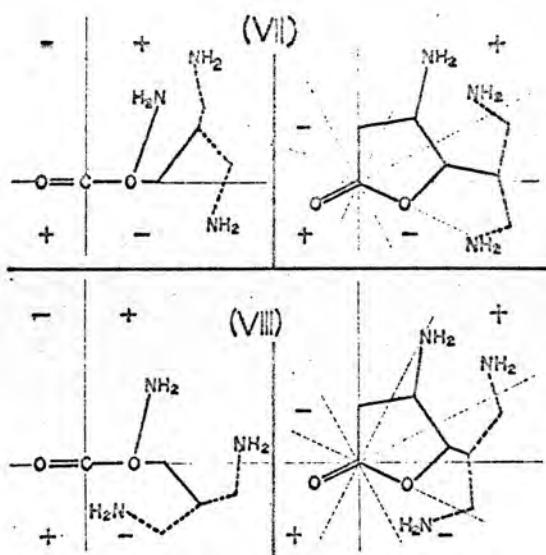


すなわち, IXは threo- $\gamma$ -hydroxy-L- $\beta$ -lysine であり, VIIはそのラクトン, Xは erythro- $\gamma$ - hydroxy-L- $\beta$ -lysine, VIIIはそのラクトンである。

この構造は、VIIおよびVIIIのORDの検討によっても支持された。すなわち、VIIとVIIIのORD曲線は正の單純曲線を与える。



(18)  
Klyne のラクトンセクター則に従えば、次に示すようにVII および VIII はともに正のコットン効果を示すことが期待される。



(点線は自由回転し得ることを意味する)

VIIIの場合 Rの負の寄与があるが、これは  $\beta$  位の  $\text{NH}_2$  の正の寄与よりも弱く、また  $\alpha$  位  $\text{H}$  の自由回転による R の正の寄与を考えれば、VIIよりは小さいがやはり正のコットン効果が期待されてよい。もし VII と VIII の対掌体、すなわち  $\beta$  炭素が D型の分子を考えれば、同じような理由からいすれも負のコットン効果が期待される。ORD 曲線が正の単純曲線を示すということは、正のコットン効果を持つということであると考えてよいので、VII および VIII の ORD 曲線は両者の構造が正しいことを支持するものと考えられる。

## (2-4) ラクトン環の安定性について

*Tuberactinomycin* を完全加水分解して、Dowex 50W×2 のカラムクロマトグラフィーでアミノ酸分離を行なうと、serine,  $\alpha,\beta$ -diaminopropionic acid, tuberactidine (*viomycidine*との混合物として), そして最後に *threo- $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine* が遊離してくる。

*threo- $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine* のフラクションを濃縮し、塩酸酸性とした後もう一度濃縮して得られる油状物を少量の水に溶かし、アルコールを加えて冷蔵庫に放置すると *threo- $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine lactone* の塩酸塩が得られる。従って、加水分解時はラクトンとして存在するが、カラムクロマトグラフィーを行っている間にオキシ酸に開環したものと考えられた。そして、その後実験を進めていくうちに、このラクトン環が意外に開環しやすいことに気付いた。すなわち、VII および VIII のラクトンの開環速度は、濃塩酸中、次いでアルカリ溶液中ではやく、希酸中ではやや遅く、中性ではラクトン環はもっとも安定で開環はかなり遅い。ただし、酸性ではラクトンとオキシ酸との平衡混合物が得られるが、アルカリ溶液中では一方的にオキシ酸が得られる。

DNP 誘導体やベンジルオキシカルボニル誘導体が、希アルカリ溶液中にあってさへラクトン環を形成しやすいのと比べて、意外な結果と言わねばならない。

このようにアミノ基遊離のラクトンが酸性溶液中でオキシ酸との平衡混合物を形成することから、(2-3)での変旋光の測定の結果は、オキシ酸 → (ラクトン + オキシ酸) の変旋光を測定していたことに注意しなければならない。もちろん、相対差を求めた誤りからその結果の解釈に変りはない。

今後、 $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine に関する種々の測定を行なう場合、この開環のしやすさを考慮して、中性溶液中か希酸溶液中にあいて測定しないにはならないと考えている。

## 実験の部

### 1. TUM の 2,4-dinitrophenyl (DNP) 化

TUM 塩酸塩 15g と炭酸水素ナトリウム 15g を、 400cc の水に溶かし、 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) 10g を 400cc のアセトンに溶かして加へ室温で 3 時間器械的にかきませた後、さらに 5g の DNFB を加えて 20 時間かきませを続けた。 TLC で反応を追い、その完結を確認したが、反応完結に長時間を要することがわかった。

反応混合物より一部沈殿してきた生成物をロ過後、ロ液を濃縮してアセトンを除去後、生じた沈殿をロ過して、両沈殿を水、2N 塩酸、水、アルコール最後にエーテルで洗浄した後、ジメチルホルムアミド-エーテルより再沈殿を行なった。 収量 10.2 g.

TLC により極少量の不純物の存在を認めたので、さらに再沈殿、クロマトによる精製を試みたがいずれもうまく行かず、結局そのまま次の実験に用いることにした。

### 2. N,N'-di-2,4-dinitrophenyl-threo- $\gamma$ -hydroxy-L- $\beta$ -lysine lactone (I)

7.0g の DNP-TUM を 350cc の 6N 塩酸にけんかくし、湯浴上で還流下に 24 時間加水分解した。黒緑色の不溶物 2.56g をアセトン、エーテルでよく洗った後、ジメチルホルムアミド-エーテルより再結晶して黄色針状結晶 (I) を得た。 収量 2.2g. 融点 245-6°C (dec.)\*.  $[\alpha]_D^{22} -63.9^\circ$  (c 0.5, DMF). 分子量： MS より  $477 \pm 2$ , UV より  $476^{**}$ .

分析値: C, 45.47 ; H, 3.50 ; N, 17.66 %

$C_{18}H_{16}N_6O_{10}$  としての計算値: C, 45.38 ; H, 3.39 ; N, 17.62 %

\* N,N'-di-DNP-threo- $\gamma$ -hydroxy-L-lysine lactone, 195-7°C (dec.)

\*\* UV 吸収測定による分子量算出

I を DMF 中で UV 吸収測定

$\lambda_{max}$  356m $\mu$ , A : 0.303, c: 0.00424 (mg/cc)

$$\epsilon = \frac{A}{c/M} = X \times \epsilon_0 \quad M: \text{分子量}, \epsilon_0: \text{分子吸光係数}, X: \text{DNPの数}$$

19)

一般に DNP アミノ酸の  $\epsilon_0$  は  $15 \sim 18 \times 10^3$  であるので、これらの値を用いて分子量を算出すると次の表のような結果が得られる。

<del>X</del>	$\epsilon_0$	$15 \times 10^3$	$16 \times 10^3$	$17 \times 10^3$	$18 \times 10^3$
1		210	224	238	252
2		420	448	476	504
3		630	672	714	756

1.  $X=1$  ならば  $N=3$  であり元素分析値より分子式  $C_9H_9N_3O_5$  (219) が与えられる。しかしこれは DNP を除くと  $C_3H_6N_1O_1$  となり酸素の数が不足するので適當でない。
2.  $X=3$  ならば  $N=9$  で分子式は  $C_{27}H_{25}N_9O_{15}$  (715) が与えられる。これは DNP を除くと  $C_9H_{16}N_3O_3$  となり酸素過剰となる。  
 $X=4$  以上についても同様に酸素過剰となる。
3.  $X=2$  ならば  $N=6$  で分子式  $C_{18}H_{16}N_6O_{10}$  (476) が与えられる。DNP を除くと  $C_6H_{10}N_2O_2$  となり、酸素はラクトンのみに由来すると言えられるので、これが正しい分子式と結論した。この時、 $\epsilon_0 = 17 \times 10^3$  を適用して計算すると MW 476 が算出されて、分子式とよい一致を示す。

### 3. N,N'-di-DNP-threo- $\gamma$ -hydroxy-L- $\beta$ -lysine (II)

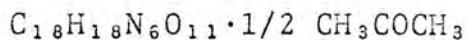
DNP-lactone (I) 600mg を 6cc の 1N 水酸化ナトリウムにけん化くし  $90^\circ\text{C}$  で加熱する（低温ではほとんどケン化されない）。完全に溶け終ったところで直ちに冷却し、6cc の 1N 塩酸を加えて中和する。生成した暗褐色油状物質を酢酸エチルで抽出し、充分水洗後無水硫酸ナトリウム上で乾燥し減圧濃縮した。約 500mg の結晶性残渣をアセトン-エーテルから再結晶し、さらにもう一度メタノールから再結晶してオキシ酸 II を得た。収量 400mg。融点  $161\text{-}2^\circ\text{C}$  で半融、 $245^\circ\text{C}$  で分解

分析値: C, 43.76 ; H, 3.86 ; N, 16.93 %

$C_{18}H_{16}N_6O_{11}$  としての計算値: C, 43.73 ; H, 3.67 ; N, 17.00 %

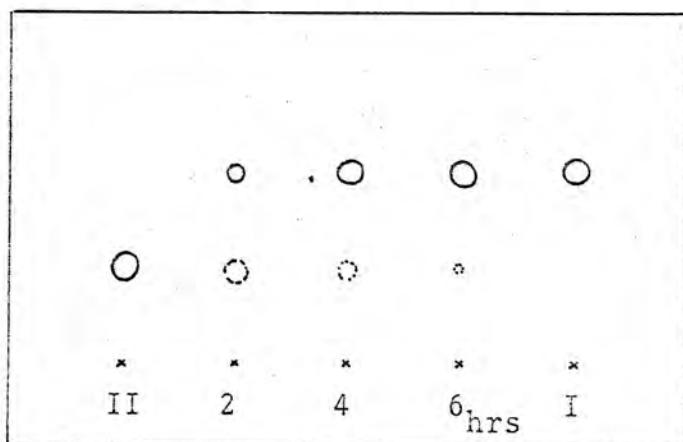
アセトン - 水から再結晶すると  $1/2 \cdot \text{CH}_3\text{COCH}_3$  の結晶溶媒を持つ。

分析値 : C, 44.84 ; H, 4.21 ; N, 16.14 %



としての計算値 : C, 44.74 ; H, 4.04 ; N, 16.06 %

II をアセトンに溶かし、6N 塩酸を加へ、還流下に加熱すると I に変化した。これは TLC(下図) と IR から確認した。



TLC ;  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-AcOH}(38:2:0.4)$

#### 4. $\text{N},\text{N}'\text{-di-DNP-threo-}\gamma\text{-hydroxy-L-lysine lactone}$

erythro- $\gamma$ -chloro-L-lysine\*  $20\text{mg}$  を 1N 水酸化ナトリウム  $2\text{cc}$  に溶かし室温で一夜放置した。放置後、DNFB  $50\text{mg}$  をアセトン  $1\text{cc}$  に溶かして加へ、室温で一夜放置した。次いで、1N 塩酸  $2\text{cc}$  を加へ直ちに酢酸エチルで抽出し、有機層を水でよく洗い、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した後減圧濃縮した。得られた結晶性残渣をエーテルでよく洗い、アセトンとエーテルから再結晶して、黄色フリズム晶を得た。融点  $195\text{-}7^\circ\text{C}(\text{dec.})$  赤外線吸収スペクトルにおいて  $1780\text{cm}^{-1}$  に  $\gamma$ -ラクトンの吸収を示すが、I とは全く異なるスペクトルを示した。

#### 5. $\text{N},\text{N}'\text{-dibenzoyl-}\gamma\text{-hydroxy-}\beta\text{-lysine lactone (III)}$

\* 九州大学理学部 泉屋信夫教授より恵与されたもの。

TUM 塩酸塩 10g を 6N 塩酸 180cc を用い、還流下に 18 時間加水分解し、減圧濃縮後残渣を 100cc の水に溶かし、2N 水酸化ナトリウムで中和したものを、50g の塩化ベンゾイルと 4N 水酸化ナトリウム 100cc を用いて Schotten-Baumann 法によりベンゾイル化した。反応の進行につれ油状物が遊離してきた。一夜攪拌を続けた後、生成油状物を酢酸エチルで抽出し、炭酸水素ナトリウム溶液、水でよく洗い、有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥し減圧濃縮した。得られた油状残渣をエーテルでよく洗って粉末とした。IR スペクトルで  $1780\text{cm}^{-1}$  に  $\gamma$ -ラクトンの吸収を示す。分析試料は、まずクロロホルム-四塩化炭素（活性炭使用）から再結晶後さらにアセトンより再結晶して無色針状結晶を得た。融点 205°C.

分析値 : C, 67.96 ; H, 5.74 ; N, 7.94 %

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$  としての計算値 : C, 68.17 ; H, 5.72 ; N, 7.95 %

#### 6. N,N'-di-DNP-erythro- $\gamma$ -hydroxy-L- $\beta$ -lysine lactone ( IV )

TUM 塩酸塩 1ggを 35cc の特級濃硫酸に溶かし、封管中室温で 24 日間放置した。放置後、ドライアイスで充分冷却したアセトン中に注入し、生じたケル状沈殿をアセトン、エーテルで傾斜洗浄を数回くり返し、最後に吸引口蓋を通して口取りし、直ちに真空デシケーター中、水酸化ナトリウム上で乾燥した。吸湿性の強い粗転位生成物 1.15g が得られた。

転位生成物 500mg を 40cc の 6N 塩酸に溶かし、室温 (15-20°C) で 20 時間放置後、外部を氷水で冷却下に炭酸水素ナトリウムで中和した。中和溶液をさらに炭酸水素ナトリウムで弱アルカリ性とした後、DNFB 1g を 20cc のアセトンに溶かして加へ、DNP 化反応を行なった。反応混合物を 30°C 以下で減圧濃縮してアセトンを除去後、生成した不溶物 (未転位 TUM の DNP 体) を口取りし、口液を酢酸エチルで抽出した。有機層を炭酸ナトリウム溶液、水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、減圧濃縮して約 90mg の粗 DNP 化合物を得た。アセトン-エーテルより再結晶して 70mg の IVを得ることができた。融点 145°C で半融後徐々に分解。

$[\alpha]_D^{22}-177.8^\circ$  (c 0.5, DMF).

分析値 : C, 45.39 ; H, 3.58 ; N, 17.77 %

$C_{18}H_{16}N_6O_{10}$  としての計算値 : C, 45.38 ; H, 3.39 ; N, 17.62 %

### 7. $N,N'$ -dibenzylloxycarbonyl- $\alpha,\beta$ -diaminopropion amide

TUM 塩酸塩 20g を 360cc の 6N 塩酸を用い, 130-135°C で 22 時間加水分解した。加水分解物を一度濃縮後, 残分を約 100cc の水に溶かし, 外部を冷却下に炭酸ナトリウムで中和した。この中和溶液を 100cc の塩化ベンジルオキシカルボニルと 300cc の 2N 水酸化ナトリウムを用い, 通常の方法でベンジルオキシカルボニル化を行なった。室温で一夜攪拌した後, 生成した油状物を酢酸エチルで抽出し, アルカリ, 酸, 水で充分洗い, 無水炭酸ナトリウム上に乾燥した。この乾燥有機層を減圧濃縮して褐色油状物を得た。この油状物をまず石油エーテルでよく洗った後, 約 2l のエーテル, 1l のエーテル-四塩化炭素 (1:1) で洗うと粉末となつた。エーテルおよびエーテル-四塩化炭素溶液を再び濃縮すると, 結晶を含む油状物が得られたので, 少量の酢酸エチルを含むエーテルで油状物を溶かし, 不溶の結晶を口取した<sup>\*</sup>。この結晶を先に得た粉末と一緒に酢酸エチルから再結晶して無色針状結晶を得た。収量 1.3g . 融点 171°C .

分析値 : C, 61.34 ; H, 5.63 ; N, 11.21 %

$C_{19}H_{21}N_3O_5$  としての計算値 : C, 61.44 ; H, 5.70 ; N, 11.32 %

このものは塩酸加水分解すると  $\alpha,\beta$ -diaminopropionic acid を与えることから  $N,N'$ -dibenzylloxycarbonyl- $\alpha,\beta$ -diaminopropion amide ( di-Z-dap amide) であることがわかつた。

しかし, TUM の加水分解物のロ紙電気泳動やアミノ酸分析から dap amide が確認されないが, これはこのアミドのニンヒドリン発色が非常に弱いことと, ロ紙電気泳動では  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine lactone と同じ位置に移動するため確認しにくいものと考えられる。

このアミドの生成は TUM の構造研究上興味深い結果であり, このことに因しては (4-3) で詳しく論ずることにする。

\* 口液は実験 8 で使用。

#### 8. N,N'-dibenzylloxycarbonyl-threo- $\gamma$ -hydroxy-L- $\beta$ -lysine lactone(V)

上記(実験7)の少量の酛酸エチルを含むエーテル溶液を再び濃縮して約6.7gの油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトで精製した。シリカゲルは Merck 社の Kiesel gel (0.05 - 0.20mm mesh) 55gを用い、まず  $\frac{1}{2}$ 量の油状物をクロマトにかけた。カラムの長さは (2.6 × 43) cm であった。カラムはクロロホルムを充分流して安定化させた後、試料を多量のクロロホルムに溶かしカラムに添加した。まずクロロホルムでベンジルアルコールを溶出させた後、クロロホルム-メタノール (100:1) を流し (1300cc), 700mg の無色針状結晶を得た。酛酸エチル-石油エーテルから再結晶して 500mg の純品を得た。融点 89°C。  
IR よりカルボベンジルオキシアミド ( $C_6H_5CH_2OCONH_2$ ) と判明した。

分析値: C, 63.83 ; H, 5.90 ; N, 9.23 %

$C_6H_9NO_2$  としての計算値: C, 63.56 ; H, 6.00 ; N, 9.27 %

さらにクロロホルム-メタノール (100:1) 200cc とクロロホルム-メタノール (100:1.5) 200cc の溶出液を減圧濃縮して、求める N,N'-dibenzylloxycarbonyl-threo- $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine lactone (V) の粗結晶 5.0g が得られた。酛酸エチルから再結晶して 4.1g の針状結晶を得た。融点 149.5°C.

分析値: C, 64.02 ; H, 5.73 ; N, 6.84 %

$C_{22}H_{24}N_2O_6$  としての計算値: C, 64.06 ; H, 5.87 ; N, 6.79 %

最後にクロロホルム-メタノール (100:2, 3, 4) を 400cc, 200cc, 600cc と連続して流すと前述(実験7)の di-Z-dap amide が得られた。酛酸エチルより再結晶して 1.8g の針状結晶を得た。

#### 9. N,N'-dibenzylloxycarbonyl-erythro- $\gamma$ -hydroxy-L- $\beta$ -lysine lactone(VI)

TUM 塩酸塩 5.0g を特級濃硫酸 140cc に溶かし、封管中で五通向装置した後、ドライアイスで冷却したアセトン中に注入し、生じたケル状沈殿をこし分け、アセトン、エーテルで充分洗った後、真空デシケーター中で

乾燥した。一夜乾燥させた転位生成物を 70cc の 6N 塩酸に溶かし、室温で 18 時間放置後、外部を氷水で冷却下に炭酸水素ナトリウムで中和後 25cc の 塩化ベンジルオキシカルボニルを用い、炭酸ナトリウムで pH をアルカリ性に保ちながら ベンジルオキシカルボニル化を行なった。氷水で冷却下に 1 時間、室温で一夜攪拌を続けた後、生成した油状物を 500cc の 酒酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で充分洗った後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥後減圧濃縮し、得られた油状物をまず石油エーテルで充分洗い、次いでエーテルで洗うと粉末となった。この粉末をソックスレーの装置を用いてエーテル抽出を行ない、エーテル溶液ならびに抽出液を減圧濃縮して得られた油状物をエーテルに溶かし石油エーテルを加えると結晶が生じた。この結晶を酢酸エチル-エーテルから再結晶して 500 mg の針状結晶を得た。融点 96.5 ~ 7.5°C.

分析値 : C, 64.07 ; H, 5.87 ; N, 6.81 %

$C_{22}H_{24}N_6O_2$  としての計算値 : C, 64.06 ; H, 5.87 ; N, 6.79 %

#### 10. threo- $\gamma$ -Hydroxy-L- $\beta$ -lysine lactone dihydrobromide (VII)

1.0g の V に 5g の 30% 臭化水素-酢酸を加えると、炭酸ガスを発生しつつすみやかに溶解し、しばらくすると結晶が析出した。一時間後炭酸ガスがもはや発生しないことを確かめ、エーテルを加へ生成した塩を完全に沈殿させた。粗収量 740mg. 融点 233 ~ 4°C (dec.). 94% アルコールより再結晶して美しいプリズム晶を得た。融点 235 ~ 6°C (dec.).  $[\alpha]_D^{10} +35.4^\circ$  (c 1, 2N HCl).

分析値 : C, 23.88; H, 4.53; N, 8.84; Br, 51.80%

$C_6H_{12}N_2O_2 \cdot 2HBr$  としての計算値 : C, 23.54; H, 4.61; N, 9.16; Br, 52.23%

#### 11. erythro- $\gamma$ -Hydroxy-L- $\beta$ -lysine lactone dihydrobromide (VIII)

280mg の VI に 2g の 30% 臭化水素-酢酸を加へ、VII を得たときと同様の処理をして 100mg のプリズム晶を得た。融点 ~ 222°C (dec.).  $[\alpha]_D^7 -20.4^\circ$  (c 0.5, 2N HCl)

分析値： C, 23.92; H, 4.62; N, 8.95 %

$C_6H_{12}N_2O_2 \cdot 2HBr$  としての計算値： C, 23.54; H, 4.61; N, 9.16 %

## 12. 才キニ酸 IX と X の調製

ラクトンニ臭化水素酸塩 VII 200 mg を 5cc の水に溶かし、酢酸銀 1.0 g を加へ、けんたぐした状態で  $90^{\circ}\text{C}$  で 2 時間攪拌した後、生じた臭化銀と未反応の酢酸銀をこし分け、母液を 1N 塩酸で pH 3.5 とし生じた塩化銀をこし分けた後、口液を  $30^{\circ}\text{C}$  以下で減圧濃縮した。得られた油状物をアルコールに溶かし室温で放置すると、容器の壁に針状結晶が析出するものの、完全に結晶化せず結晶として単離することはできなかった。TLC, PEP ではほぼ单一スポットを与へ、ほんのわずかに原料の存在が認められたが、変旋光の測定には影響ない程度でほとんど無視し得ると考えた。

同様に VIII も酢酸銀でケン化したが、やはり結晶としては得られなかった。

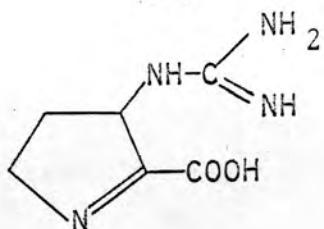
### 3 章 グアニジノアミノ酸の構造

#### (3-1) 新アミノ酸 tuberactidine の単離と構造決定<sup>20)</sup>

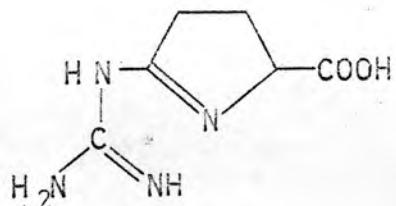
Tuberactinomycin( TUM )は坂口反応陽性の物質であることから, Viomycin( VM )の場合と同様に, TUM 中にモノ置換グアニジノアミノ酸の存在が予想される。すなわち, VM は坂口反応陽性であるところから, モノ置換グアニジノアミノ酸の存在が考えられ, その後このアミノ酸は Dyer ら<sup>21)</sup>およ<sup>5a)</sup>び Johnson ら<sup>22)</sup>によって単離されて viomycidine と名づけられ, その構造研究の結果それぞれ次のような構造式が提出された。

##### Dyer らの式

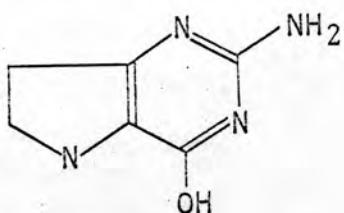
21a)



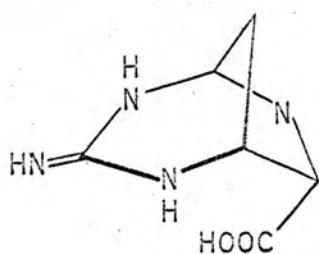
21b)



##### Johnson らの式



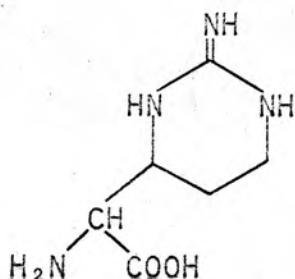
しかし, 1968 年に Dyer らにより, viomycidine 臭化水素酸塩の X 線結晶構造解析により, 従来の推定式とは異なる絶対構造が決定された。<sup>22)</sup> (図 3-1-1) その後堺田らも X 線解析により, 同じ結果を得たと報告している。<sup>23)</sup>



viomycidine  
2,4,6-triaza-3-  
iminobicyclo[3.2.1]octane-  
7-carboxylic acid

図 3-1-1

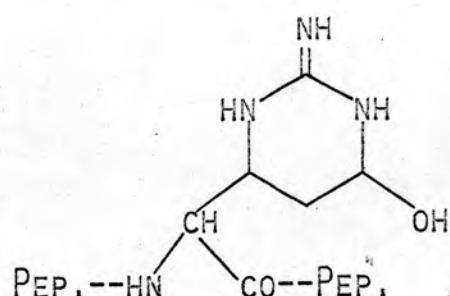
また Capreomycin ( CM ) は坂口反応陰性の物質で、  
ケアニジノアミノ酸として capreomycidine を有することが Herr らによつて明らかに  
された。<sup>5c, 24)</sup>



capreomycidine  
 $\alpha$ (2-iminohexahydro-4-pyrimidyl)glycin

図 3-1-2

この二種のケアニジノアミノ酸はいずれも坂口反応陰性の物質である。  
ところが VM は坂口反応陽性であるから、viomycidine がそのままの形  
で VM 中に存在することは考えられず Johnson らは A ( 図 3-1-3 ) の状態  
で存在するものと仮定しているが<sup>25</sup>、現在までそれに相当するアミノ酸を  
単離したという報告はない。



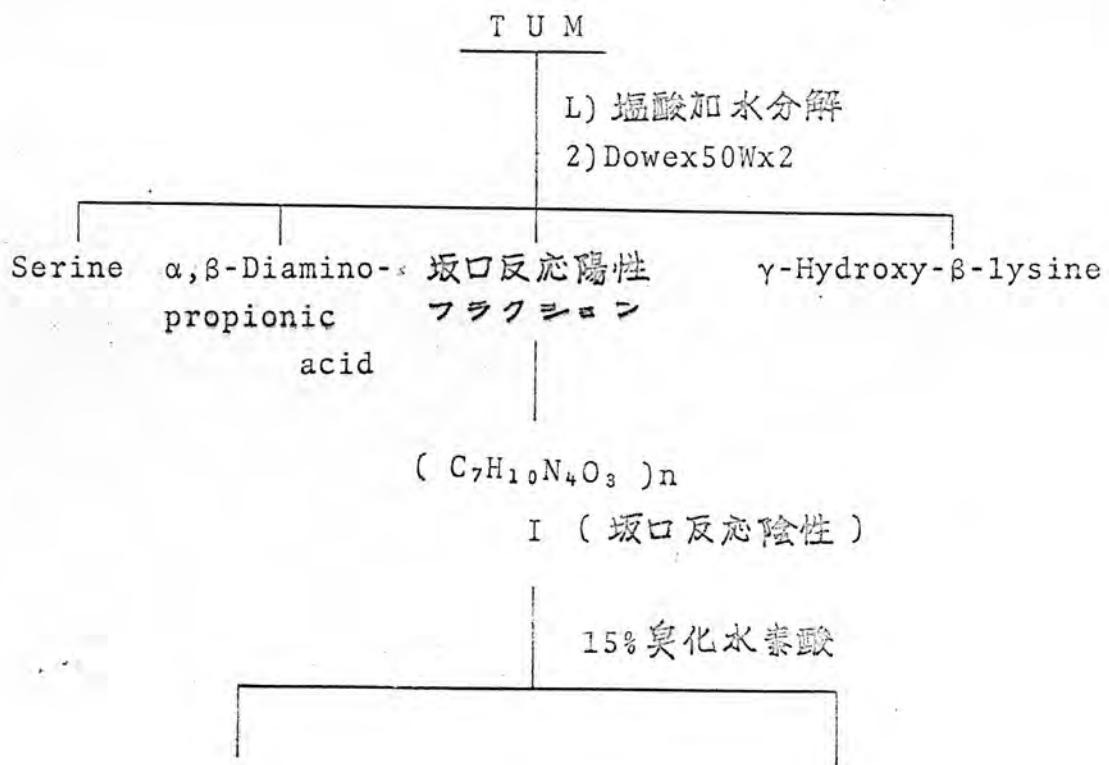
(A)

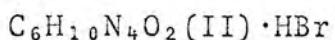
図 3-1-3

しかし、著者は TUM より A に相当するケアニジノアミノ酸 (III) の単離に成功し、その構造を決定することができた。また同時に viomycidine (II) も単離することができた。

TUM を塩酸加水分解後、Dowex50 のカラムクロマトグラフィーを行ない、ヒリジン-キ酸の緩衝液で溶離し、溶出フラクションのうち坂口反応陽性フラクションを集めて濃縮し、さらに水を加えて濃縮をくり返すと水に難溶なプリズム晶が得られた。このものはニンヒドリン反応、坂口反応ともに陰性で、酸に易溶、熱水に可溶であるが、冷水および有機溶媒には不溶である。水から再結晶すると美しい透明な柱状晶として得られ、真空デシケーター中で乾燥すると、結晶水を失なって崩壊し粉末となる。元素分析より  $(C_7H_{10}N_4O_3)_n$  (I) の実験式が与えられた。融点は  $\sim 245^{\circ}\text{C}$  (dec.) で明確な融点を示さない。I の構造については (3-4) で述べることにする。

I を 15% 臭化水素酸に浴かし、 $50^{\circ}\text{C}$  で処理すると、二種のケアニジノアミノ酸 II および III が臭化水素酸塩として得られた。元素分析の結果 II は  $C_6H_{10}N_4O_2$ 、III は  $C_6H_{12}N_4O_3$  なる分子式を有することが明らかとなった。

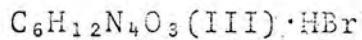




mp 210°C(dec.)

$[\alpha]_D^{13} - 89.1^\circ (\text{c } 0.5, \text{H}_2\text{O})$

ニンヒドリン反応陽性  
坂口反応陰性

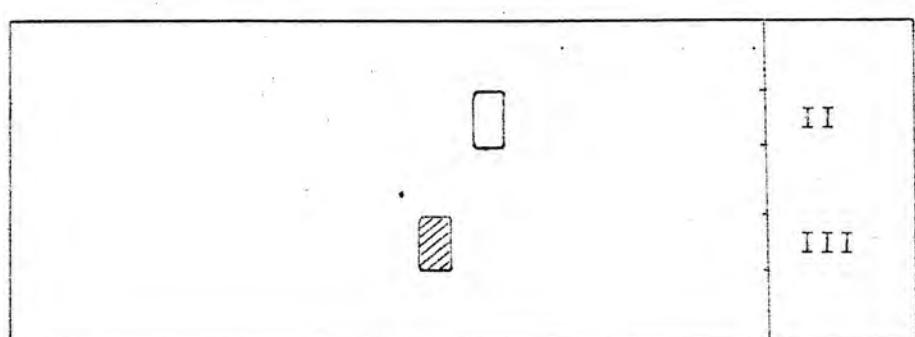


mp 182°C(dec.)

$[\alpha]_D^{15} - 25.8^\circ (\text{c } 0.5, \text{H}_2\text{O})$

ニンヒドリン, 坂口反応  
ともに陽性

### II と III のロ紙電気泳動による比較

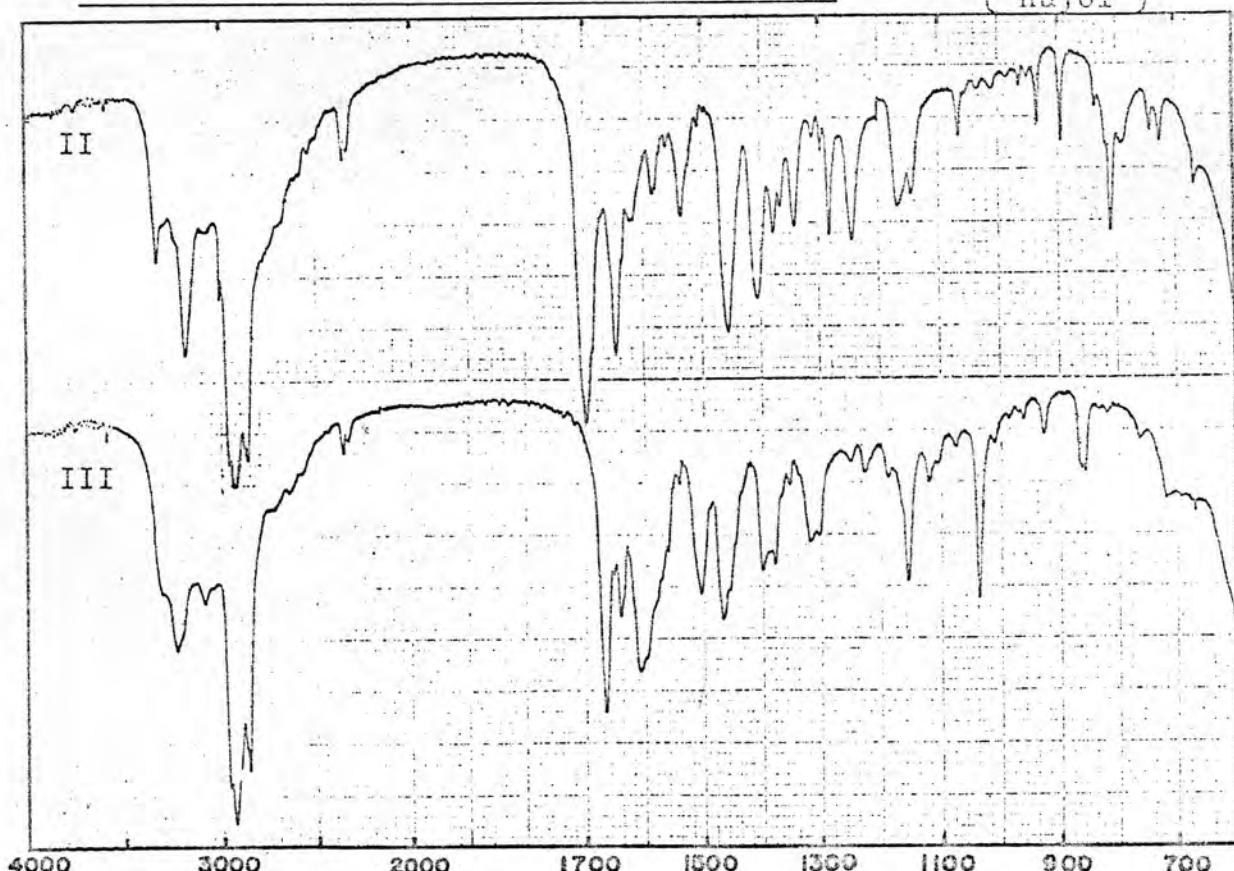


pyridine-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>O(30:4:966), pH 6.35

ニンヒドリンで検出, 斜線は坂口反応陽性を示す。

### II と III の赤外線吸収スペクトルによる比較

(nujol)



## II の構造

II は種々の点で viomycidine と似ているので、両者の性質の比較を行なった。(表3-1-1)

表 3-1-1

		II	viomycidine
塩酸塩として	mp	219°C(dec.)	200-4°C, 200-5°C(dec.) <sup>26), 27)</sup>
	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	-89°(c 0.5, H <sub>2</sub> O) -32°(c 0.5, N HCl)	-74°(c 1, H <sub>2</sub> O) -78°(c 1.78, H <sub>2</sub> O) <sup>21b)</sup> -19°(c 1, 6N HCl) <sup>27)</sup>
	NMR(D <sub>2</sub> O)	2.47( 2H, m ) 4.50( 1H, m ) 5.51( 1H, m )	2.57( 2H, m ) <sup>21b)</sup> 4.62( 2H, m ) 5.63( 1H, m )
	ppm		
	X-ray analysis	210°C(dec.) C222 <sub>1</sub> (orthorhombic) a = 9.37 Å b = 12.49 c = 15.41 Z = 8	202 - 4°C(dec.) <sup>23)</sup> C222 <sub>1</sub> (orthorhombic) <sup>22)</sup> a = 9.36 Å b = 12.47 c = 15.29 Z = 8
	呈色反応		ニンヒドリン反応陽性, 坂口反応陰性

表が示す通り、融点、比旋光度は多少異なるが、塩酸塩の重水中でのNMRスペクトルは文献記載の値とよく一致しており、塩酸塩のIRスペクトルは viomycidine 塩酸塩の標品と完全に一致した。また、臭化水素酸塩のX線解析の結果は、空間群、格子定数はもちろん、絶対構造も両者完全に一致した。(後述)

以上の事実より、II は viomycidine と同一物であることが確定した。

II の臭化水素酸塩のX線回折による絶対構造の決定は、次のようにして行なった。

まず a 軸の振動写真とワイセンベルク写真から、結晶系は斜方晶系

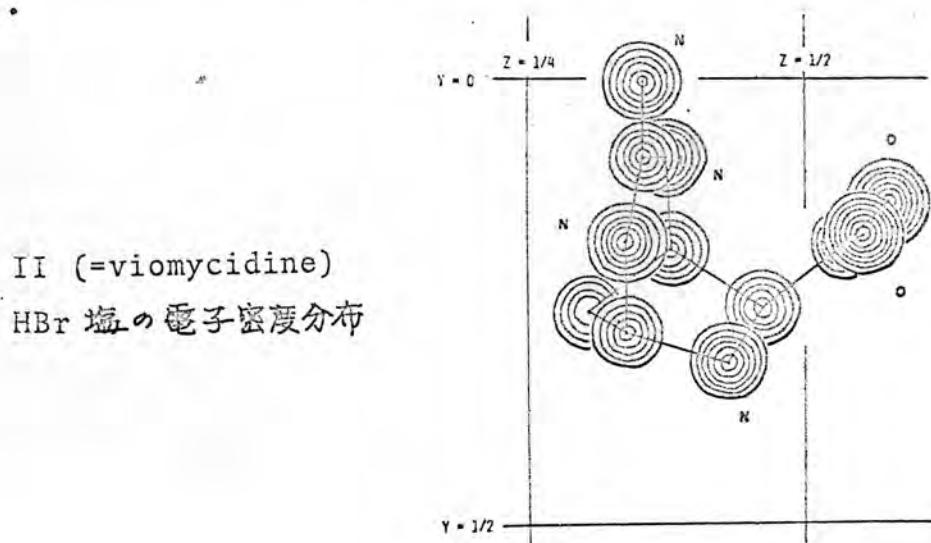
\* 微生物化学研究所の前田謙二博士より恵与された。

に属し、格子定数は  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$  ,  $a=9.37\text{ \AA}$  ,  $b=12.49\text{ \AA}$  ,  $c=15.41\text{ \AA}$  であることが明らかとなつた。そしてワイセンベルグ写真の消滅則より  $C222_1$  の空間群、 $Z=8$  ,  $\rho_c=1.865$  であることが決定された。

次に  $a$  軸の 0 - 6 層線、 $b$  軸の 0 - 2 層線までを、 $\text{CuK}\alpha$  線( $\text{Ni}$  フィルターを用いて  $\text{K}\beta$  線を除いたもの)を用いて、多重フィルム法でワイセンベルグ写真を撮り、目視法(visualy estimated method)により強度測定をした。そして、ローレンツ-ポーラリゼーション( $L_p$ )補正とスポットの補正を行なつた。しかし、試料を充分小さく(0.2-0.5 mm)したので吸収補正は行なわず、撮影時間を等しくして相対スケールを全て 1 とした。

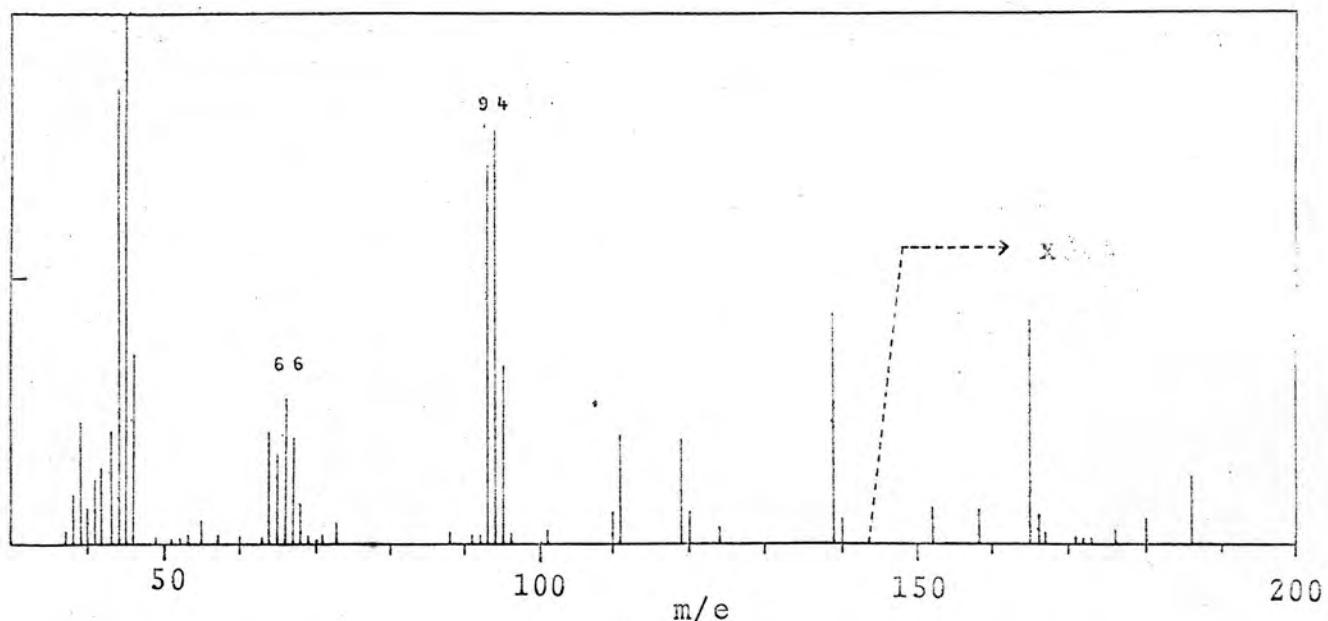
$a$  軸の 0 - 6 層線のデータでパターン合成を行ない、臭素の位置を決め、この位置をもとに  $F(hk\bar{l})$  の計算と同時に  $\alpha(hk\bar{l})$  の計算を行ない、 $F_O$  と  $F_C$  のよく合っている反射だけを使って  $F_O(hk\bar{l})$  と  $\alpha(hk\bar{l})$  から  $\rho(xyz)$  の計算により残りの原子を探した。この操作をくり返して全部の原子をみつけ、最小二乗法で各原子の座標と温度因子、各層線のスケール因子の精密化を行ない、R 因子が 15% になつたところでフーリエ合成を行なつた。

絶対配置は  $\text{MoK}\alpha$  線を使った Diffractometer で  $hkl$  と  $\bar{h}\bar{k}\bar{l}$  の反射強度を測定し、計算値と比較して決定した。これは Vijvoet の方法で異常分散効果を利用したものである。こうして得られた電子密度分布を次に示す。

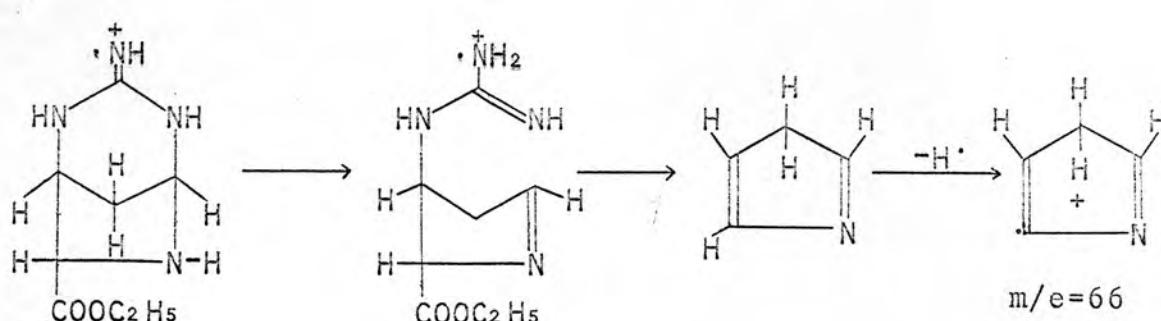
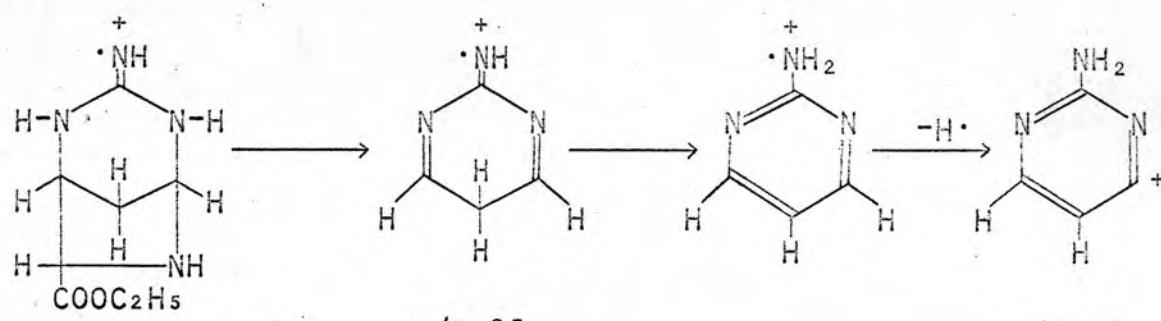


次に常法通り、IIをエチルエステルとして、そのマススペクトルを測定した。

### II のマススペクトル

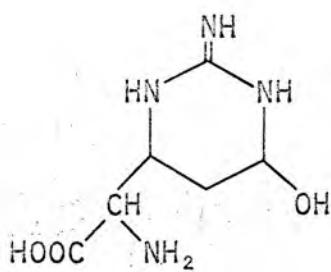


スペクトルにおいて、分子ピークは現われない。注目すべきピークは  $m/e=94$  と  $66$  であり、このイオン生成は次のように考えられる。

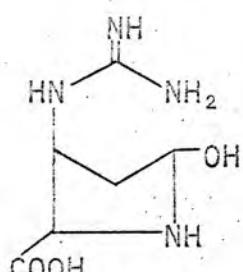


### IIIの構造

IIIは  $C_6H_{12}N_4O_3$  の分子式を有し、ニンヒドリン、坂口反応とともに陽性である。臭化水素酸塩の融点は  $182^{\circ}\text{C}$ (dec.)で  $[\alpha]_D^{13}-25.8^{\circ}$ (c0.5,  $\text{H}_2\text{O}$ )である。NMRスペクトル(後述)より  $\begin{array}{c} \text{H} & \text{H} \\ | & | \\ -\text{C}- & -\text{C}- & \text{H} & \text{H} \\ | & | & | & | \\ \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \end{array}$  の構造単位が考えられ、分子式、呈色反応、IRおよびNMRの化学シフトより、次の二式のいずれかであると推定された。



A



B

しかし NMRスペクトルにおいて、水酸基のついた炭素上の水素の、シケナルの分裂および結合定数は 3-1-4圖のような立体配座の場合に、

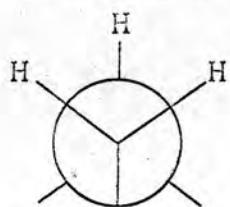
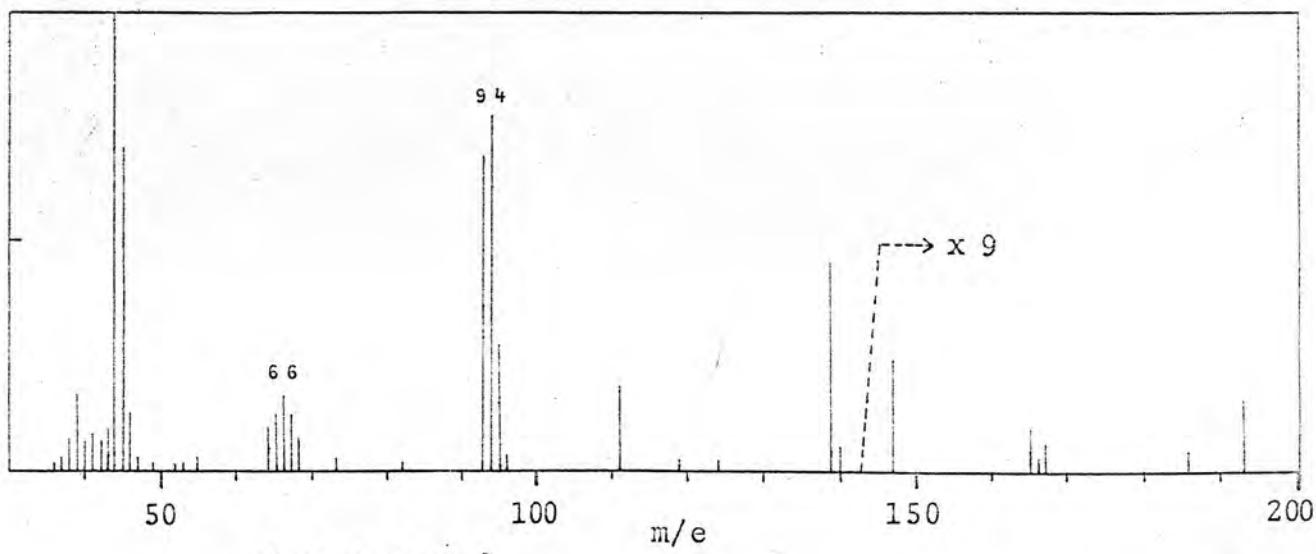


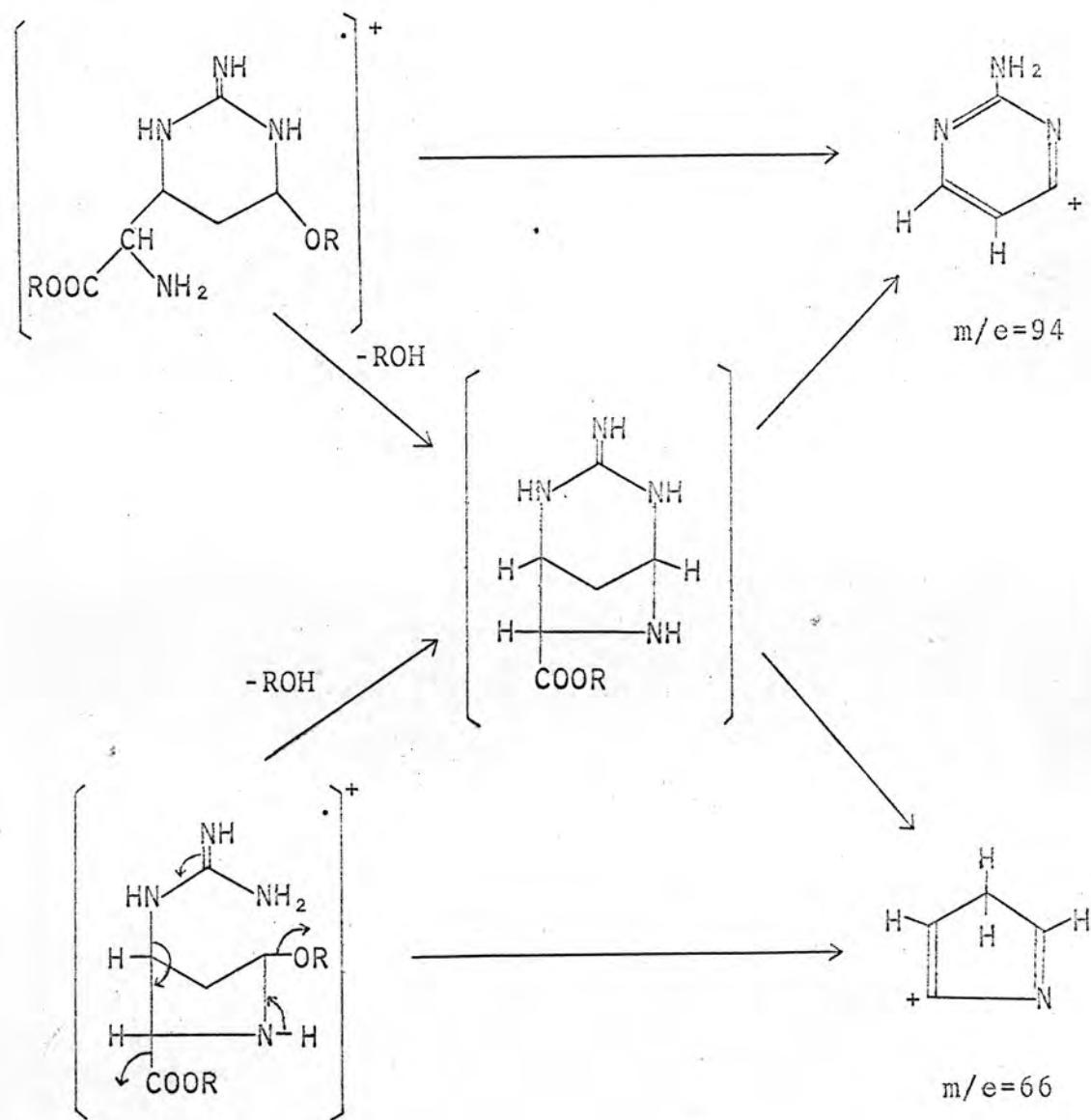
図 3-1-4

最も説明がつきやすいことと、IIIのエチルエステルのマススペクトルの結果より、A式が支持された。すなわち、そのマススペクトルは次に示す通りであるが(図 3-1-5)，このスペクトルにおいて  $m/e=66$  と  $94$  のピーカーの比率に注目すると、

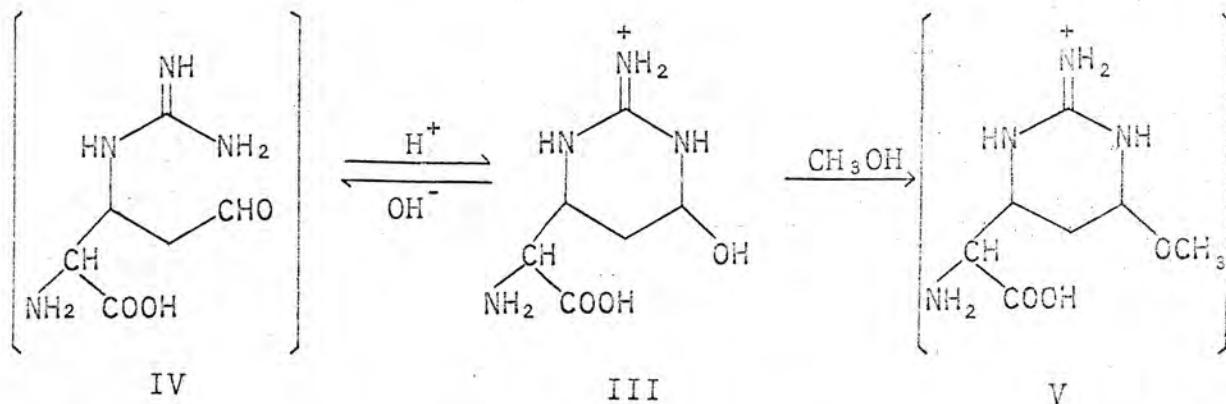


(図 3-1-5)

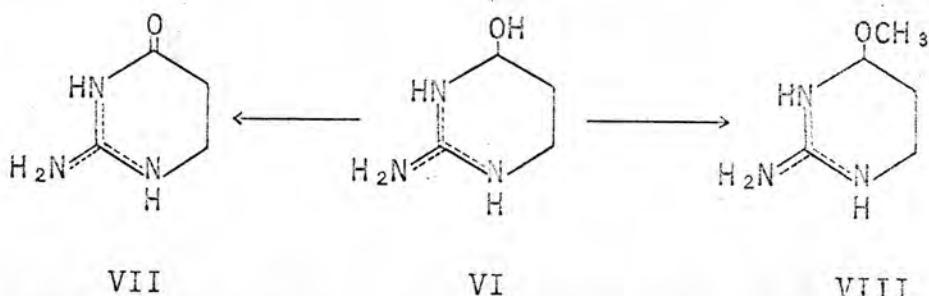
前述の II においては 1:2.7 であったが III においては 1:4.7 となっており、III において  $m/e=94$  のピークが相対的に増大している。もし III が 五員環構造の B 式であれば、この関係は逆になり  $m/e=66$  が相対的に増大してよいはずである。この事実は III に対して A 式の六員環構造を支持するものである。



さらに六員環構造の正しいことは、簡単な化学的な方法によつても確かめられた。すなわち、IIIの臭化水素酸塩をメタノール中で還流下に煮沸すると、坂口反応陰性に変化する。これは次のように説明される。



上図で示したように、IIIが坂口反応陽性であるのは、IVとの平衡関係が成り立つからであり、Vのように-OCH<sub>3</sub>化してこの平衡が進まなくなるようになりますと、坂口反応は陰性となる。これは後藤らによる 2-amino-4-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (VI) の研究からも明らかである。



VIは坂口反応陽性であるが、VII, VIIIは陰性である。このような関係は五員環構造のB式では考えられない。

以上のことからIIIは、六員環構造のA式が正しいことが明らかとなつた。次に、NMRスペクトルを中心にIIIの立体構造を検討することにした。D<sub>2</sub>O中でのNMRスペクトルは、図3-1-6のヒアリである。

図3-1-6, 次ページに別掲

まずα炭素(C-7)はORD曲線(後述)が221μmに正のコットン効果([φ]=807pk in 0.1N HCl)を示すことから、L配置であることが決定された。六員環に対する4位の水酸基と、6位のアミノカルボキシメチル基の立体配座は、次のようにして決められた。まず可能な構造の一组の組合せを行なってみると、図3-1-7および、表3-1-2のようになる。

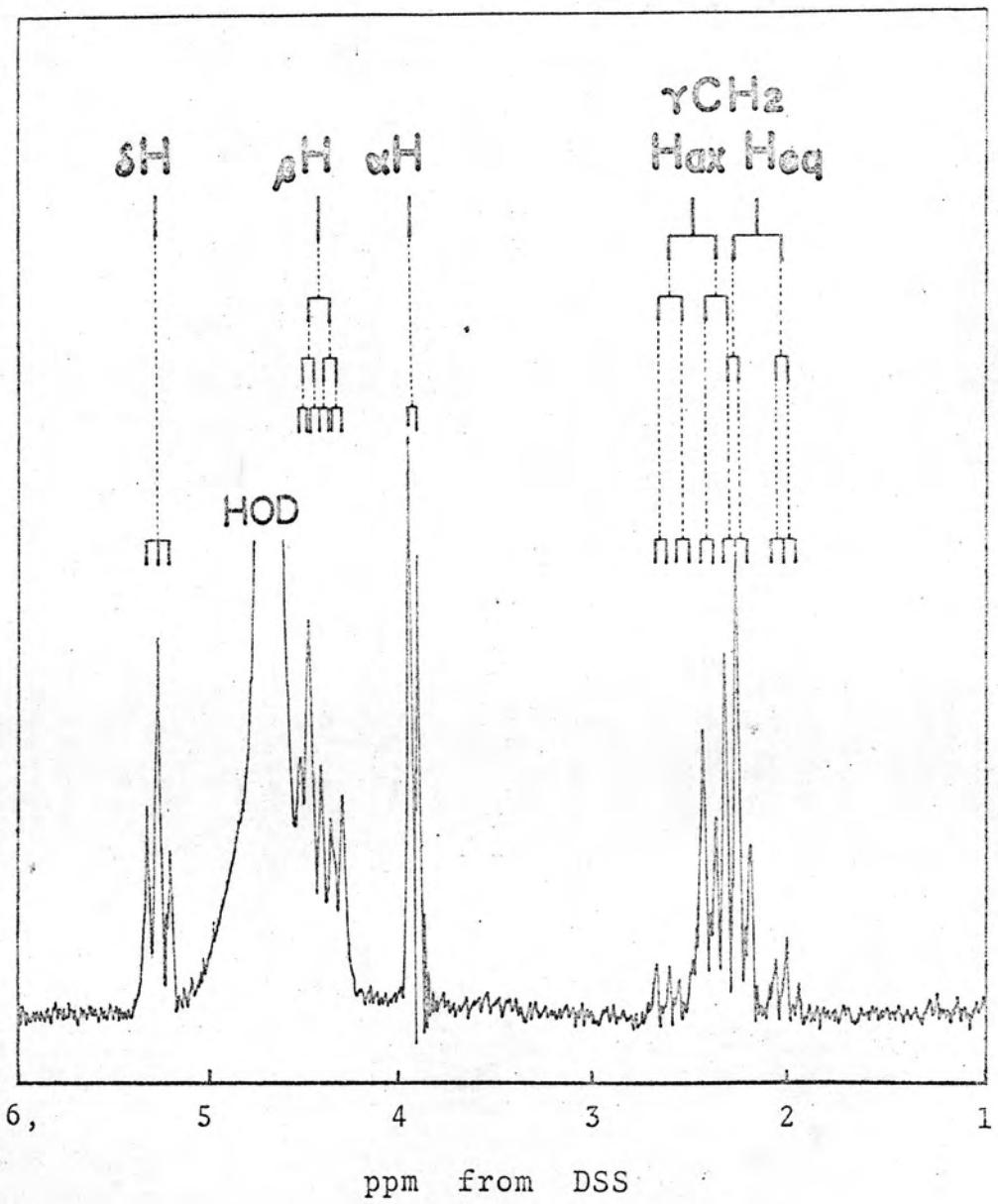


図 3-1-6 III の NMR スペクトル (D<sub>2</sub>O)

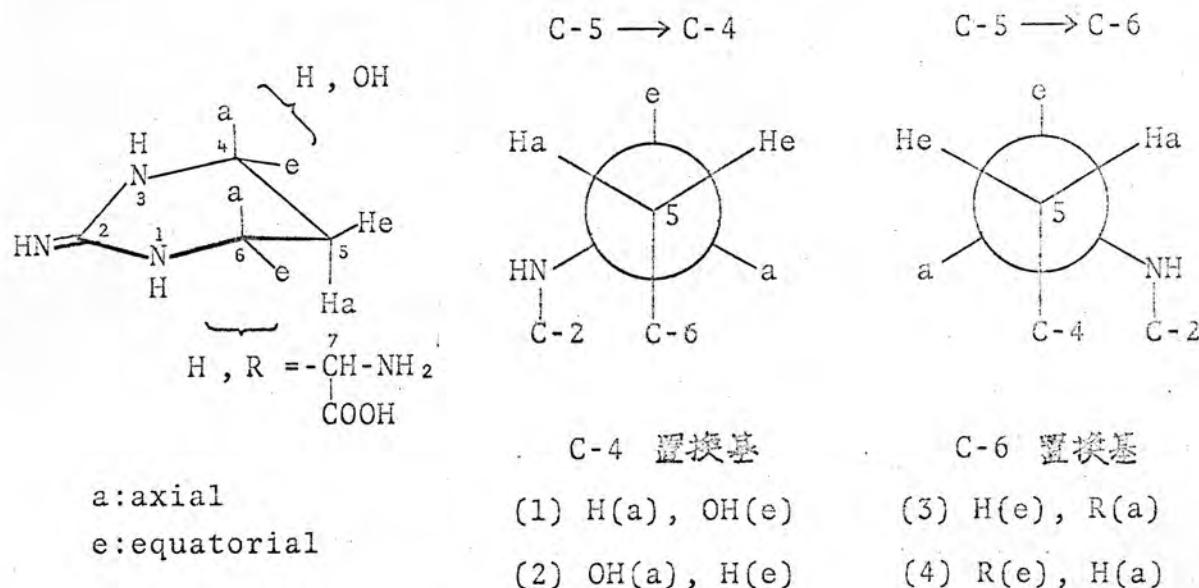


図 3-1-7

		1	2	3	4
組合せ		(1)-(3)	(1)-(4)	(2)-(3)	(2)-(4)
		C4-Ha	C6-He	C4-Ha	C6-Ha
C5	Ha	180°	60°	180°	180°
	He	60°	60°	60°	60°

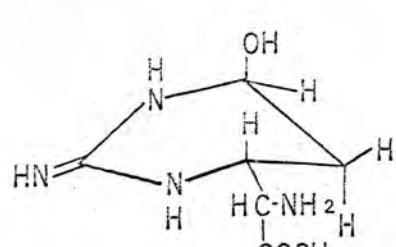
表 3-1-2 C5-H と C4-H および C6-H との二面角の関係

一般にシクロヘキサンでは、axial 水素と equatorial 水素の結合定数は次のようにある。<sup>28)</sup>

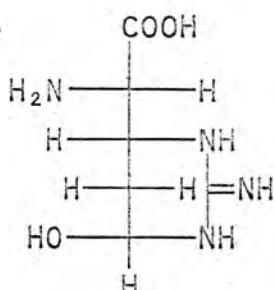
	Calcd. J(cps)	Observed J(cps)
axial-axial	9	8-14 (usually 8-10)
axial-equatorial	1.8	1-7 (usually 2-3)
equatorial-equatorial	1.8	1-7 (usually 2-3)

また、糖ピラノースの研究によれば ax-ax ( $\phi=180^\circ$ ) , eq-eq ( $\phi=60^\circ$ ) , ax-eq ( $\phi=60^\circ$ ) の立体配座をとっている隣接水素原子間の結合定数はそれぞれ、およそ 7, 3, 3 cps であることが明らかにされている。<sup>29)</sup> III の結合定数の実測値は  $J_{C5-C6}=3.45, 3.45$  cps,  $J_{C5-C4}=3.45, 6.9$  cps であることから、III の置換基の位置は、表 3-1-2 における 4 のダ

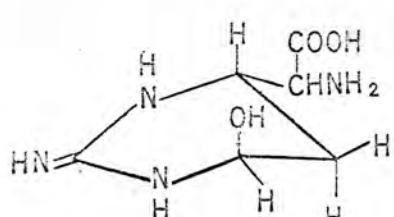
イフであると決定された。すなわち C-4 の水酸基は axial, C-6 のアミノカルボキシメチル基は equatorial に置換していると結論された。さらに 4 のタイプとしては、ジアステレオマーの関係にある III<sub>C</sub>, III<sub>D</sub> 二種の構造が考えられる。



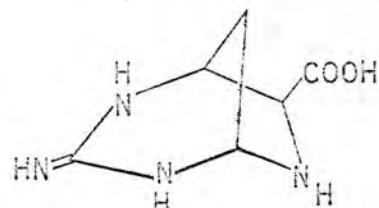
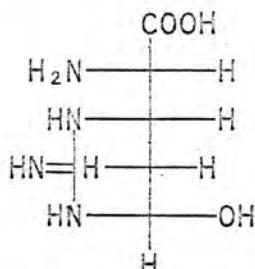
III<sub>C</sub>



II=viomycidine



III<sub>D</sub>



III'

III<sub>C</sub> と III<sub>D</sub> のどちらの構造が正しいかを決定する積極的な証明は困難であるが、I から II と III が同時に生成すること、そして III は脱水反応によって直接容易に II に変化することがわかったので、III は III<sub>C</sub> の絶対構造を持つことが間接的に証明された。

以上の結果より、III は 4-hydroxy-2-iminohexahydro-6-pyrimidinyl-glycine(4S, 6R, 7S) と決定された。そしてこの新しいアミノ酸が TUM の真の構成アミノ酸と考えられ、II すなわち viomycidine はこのアミノ酸から二次的に生成したものであると推定されるので、この新しいアミノ酸を viomycidine と区別するために tuberactidine と命名した。この tuberactidine の NMR スペクトルの帰属の正しいことは、前述の後藤らの 2-amino-4-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine(VI) およびメトオキシ体 VIII の NMR スペクトルとの比較によっても支持される。

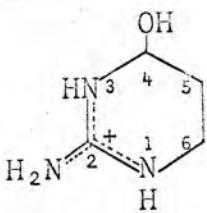
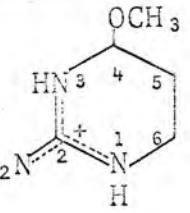
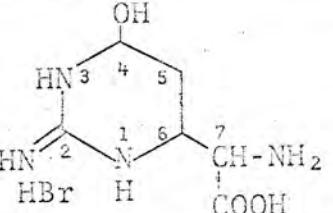
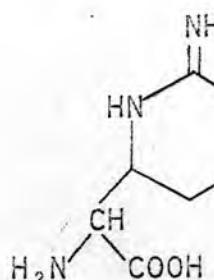
			
	VI	VIII	III
C-4 1H	5.12(t, J=3)*	4.77(t, J=3.0)	5.26(t, J=3.45)
C-5 2H	1.98(m)	2.02(m)	e 2.12** (J=3.45, 14.7)
C-6 2H	3.42(q, J=5.5, 7.0)	3.34(m)	a 2.45** (J=6.9, 14.7)
C-6 1H			4.40(J=3.0, 3.45, 6.9)

表 3-1-3 D<sub>2</sub>O 中における NMR の比較 (\*δ: ppm from DSS, J:cps )

すなわち上の表において VI と III の C-4-H の化学シフトがほぼ一致し VI, VIII, III の C-4-H, C-5-H の結合定数がよく一致することから III の構造が妥当であると言える。なお, III の C-7 プロトンは 3.91 ppm に doublet( J=3.0 cps ) として現われる。

VM の構成成分としてのグアニジノアミノ酸としては多くの研究者により, viomycinidine が得られているが, Johnson らはその VM が坂口反応陽性であり, 還元後の加水分解で dihydroviomycinidine (IX) が得られることから, 著者らの tuberactidine に相当する



物質を本来の構成アミノ酸であろうと予想している。<sup>25)</sup> 著者らはこのことを明らかにするために, VM の加水分解物の再検討を行なった。すなわち VM の加水分解物をロ紙電気泳動で調べると, tuberactidine に相当するスポットが確認できた。さらに

Dowex50 カラムクロマトグラフィーを行ない, TUM の場合と同様の処理をして予想通り I を得る

\*\* C-5 の Ha が He に比較して低磁場側にシグナルを与えるのは, C-6 に結合するアミノ酸残基の影響で deshield されたためでないかと推測される。

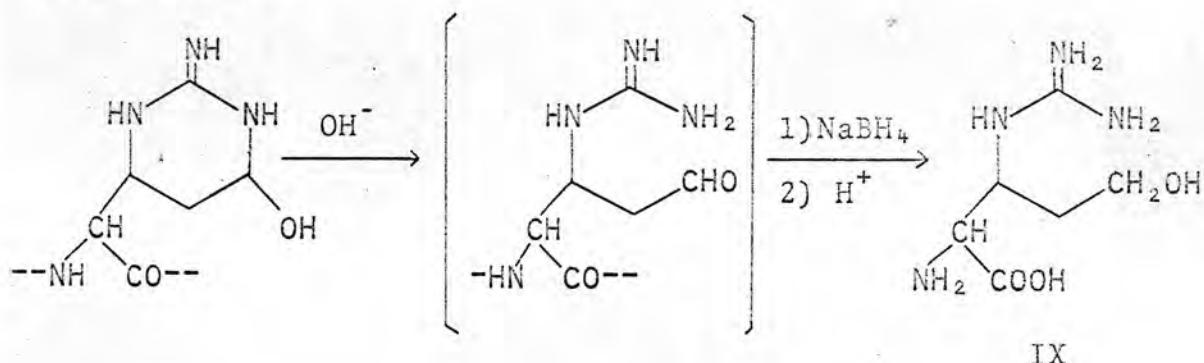
\*\*\* ( 3 - 2 ) で詳述

ことがでてきた。さらに、この I を 15% 臭化水素酸で処理し、直接 tuberactidine の単離を試みたが、少量であったために成功しなかった。しかし TUM および VM から得た I の臭化水素酸処理体の口紙電気泳動、アミノ酸分析は両者完全に一致した。

以上の実験事実より、著者は TUM と VM において tuberactidine が共通のグアニジノアミノ酸であることを、直接明らかにすることができた。

(3-2) Tuberactinomycin の水素化ホウ素ナトリウム ( $\text{NaBH}_4$ )還元、  
dihydroviomycidine\* の単離

(3-1) で述べたように、TUM が坂口反応陽性であることを考慮するとグアニジノアミノ酸としては viomycidine ではなく tuberactidine の形で存在すると考えられる。そこで、化学的にこのことを確かめるために、次に示すように tuberactidine のアルカリ溶液中の、アミノーアルデヒド型への変化を利用し、TUM から  $\text{NaBH}_4$  還元により、アルコール体 IX の単離を試みた。



TUM をアルカリ溶液中で大過剰の  $\text{NaBH}_4$  を用いて還元後、還元体を直ちに加水分解して、Dowex50 カラムクロマトグラフィーを行ない、予想通り目的とする IX を得ることができた。すでに前田らは、VM より同じ方法で還元し dihydroviomycidine を得ているが、このものは著者の得た IX と同一物質であると考へ、両者の塩酸塩の性質を比較した(表3-2-1)。

\* dihydrotuberactidine とすべきであろう。正しくは、 $\beta$ -guanidino- $\delta$ -hydroxy-n-valine である。

表 3-2-1

	IX	dihydroviomycinidine
mp	180°C(dec.)	182°C(dec.)
$[\alpha]_D$	+33°(c0.5, N HCl)	+25°(c0.7, 6N HCl)
NMR in $D_2O$ $\delta$ (ppm)	図 3-2-1	1.91(m, 2H), 3.74(m, 2H) 3.97(d, 1H, J=4.0 cps) 4.38(m, 1H)

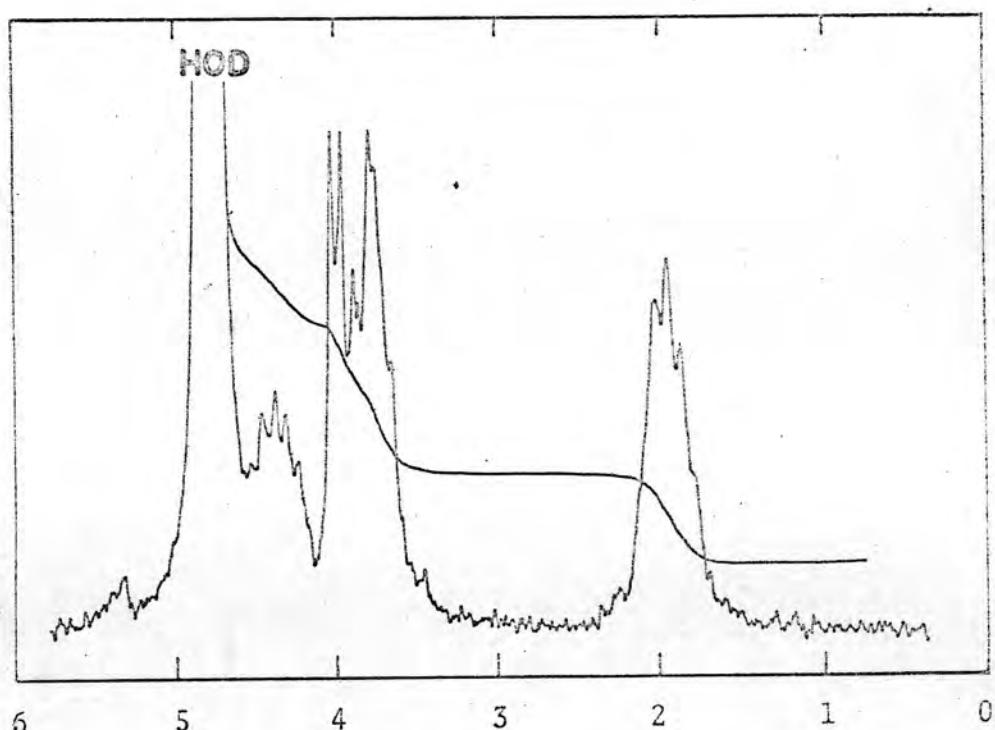
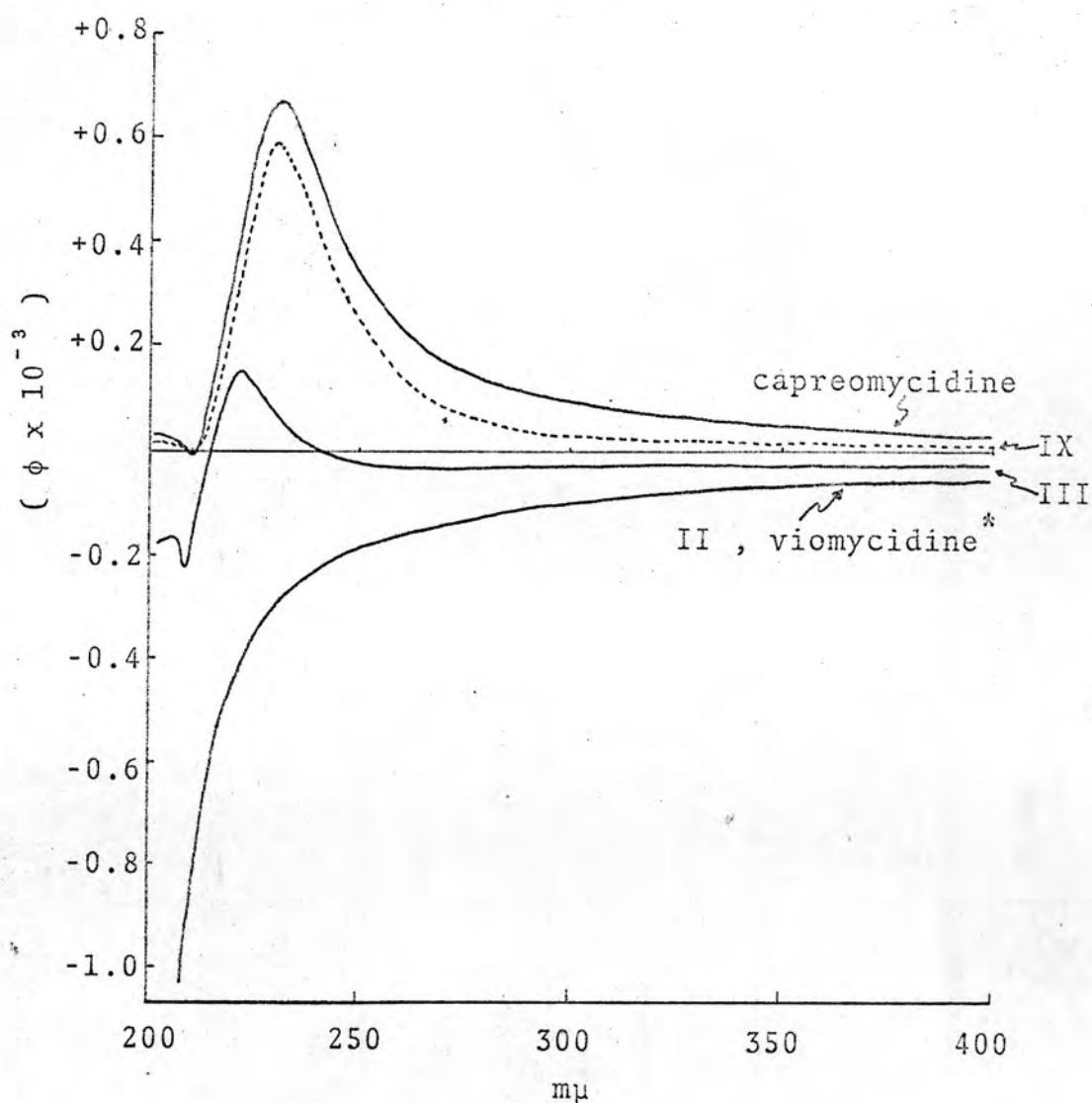


図 3-2-1 IX の NMR スペクトル

上表から、著者の得た IX は dihydroviomycinidine と同一物と決定された。以上の結果を総合して考へると、III すなわち tuberactidine が TUM の真の構成アミノ酸であり、II すなわち viomycinidine は加水分解の処理操作中の変化によって得られた二次的生成物であると結論される。實際 III から II への変化は容易に起り、たとえば III を TFA に密かして放置すればすみやかに II に変化するし、单ヒIIIの結晶を室温で長時間放置してもくだけでも、II への変化がみとめられる。また TUM が坂口反応陽性であり、メタノール中で還流冷却下に煮沸して得たいわゆる methyltuberactinomycin(1章参照) が坂口反応陰性である事実も III の OH が  $OCH_3$  化されることに基づくと考えればよく説明がつく。

(3-3) グアニジノアミノ酸の ORD の検討

一連のグアニジノアミノ酸の ORD 曲線は下図に示すとおりである。



\* viomycinide 標品

これによれば、tuberactidine(III), dihydroviomycinide(IX), capreomycinide はいずれも L- $\alpha$ -アミノ酸に特徴的な正のコットン効果を示し, viomycinide(II) は proline, hydroxyproline などの L- $\alpha$ -イミノ酸に特徴的な負のコットン効果を示す。そして、もし III が五員環構造を有するならば、II と同じく負のコットン効果を示さねばならないので、このことからも III は六員環構造を持つことが確実である。

(3-4) I の構造,  $N^{\alpha}$ -formyltuberactidine dimer

前述の I の構造決定は困難を極めた。(3-1)で述べたように, TUM 加水分解物の Dowex50 カラムクロマトグラフィーにより, 最初坂口反応陽性のフラクションを取り出しこそ縮すると, 得られた結晶は坂口反応陰性, さらにニンヒドリン反応も陰性の物質 I に変化していった。I の水溶液の pH は中性で,  $pK_a$  の測定より  $-NH_2$ ,  $-COOH$  の存在は否定された。また IR にも  $-COOH$  の存在は認められない。I の NMRスペクトルは次に示す通りであるが, 直ちに構造の解明に役立つ情報を与えてくれなかつた。しかし, 8.5ppm付近に  $HCO^-$  基に由来すると考えられるシグナルが

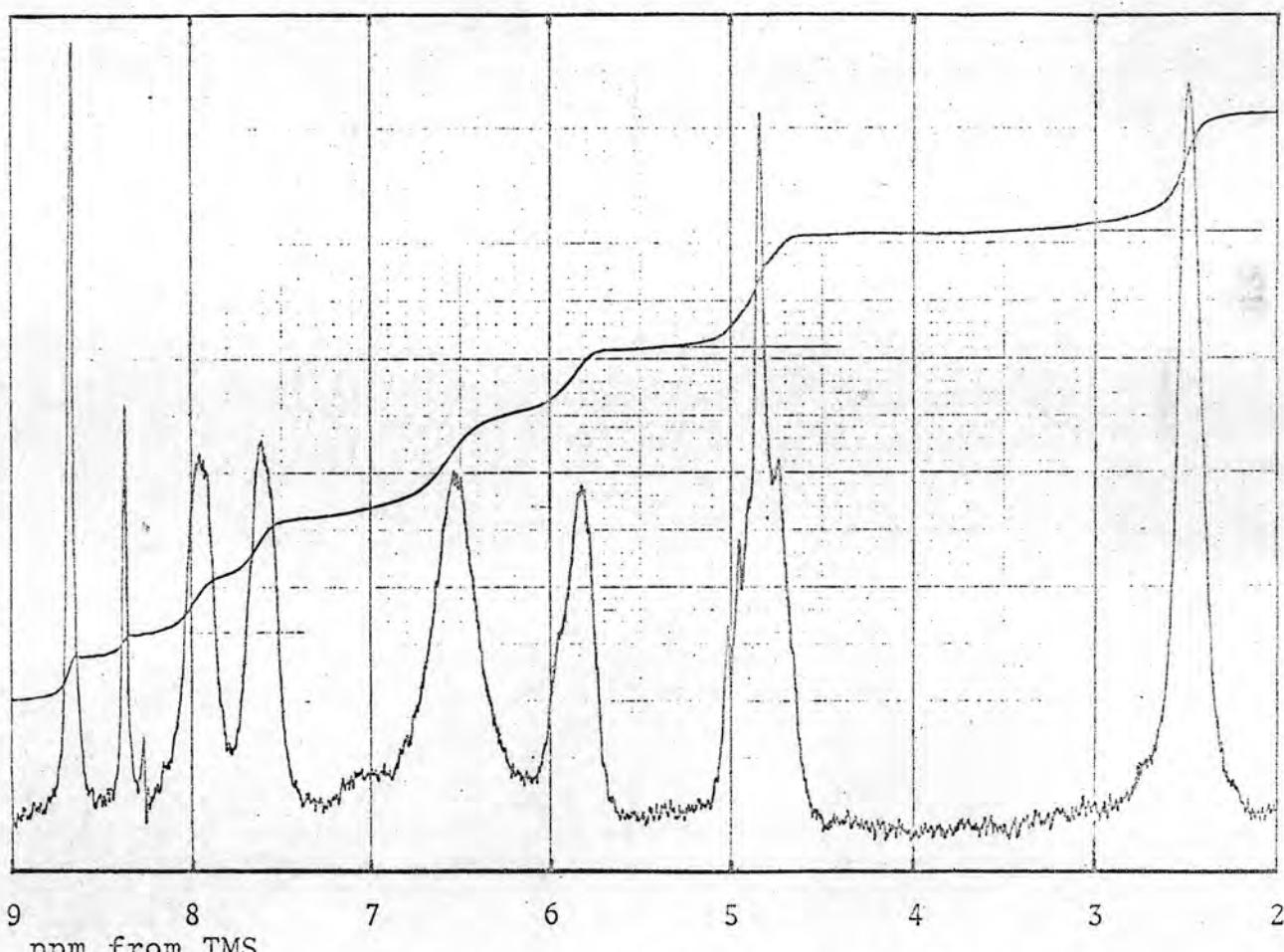


図 3-4-1 I の NMR スペクトル (in TFA)

認められること, および(3-1)で述べたように, I を臭化水素酸で処理すると viomycinine(II) および tuberactidine(III) が得られることがから, I は II もしくは III のホルミル誘導体であろうと推測された。これはカラムクロマトグラフィーの際に溶離剤としてピリジン, 半酸を用

いたため、溶出液の濃縮操作中に二次的にホルミル化が起つたものと考えれば説明がつく。実際  $\alpha, \beta$ -diaminopropionic acid(dapa) も一部  $\beta$ -ホルミル dapa として得られる。しかし単に II あるいは III のホルミル体でないことは、I に -COOH が存在しないことからも明らかである。I の NMR において  $\text{HCO}^-$  のシグナルが 2 本に分裂していることから、二種類の  $\text{HCO}$  基が存在すると考えられるので、I は II または III の草量体の誘導体ではなく、二量体構造をとっているのではないかと推測した。さらに I は元素分析値より  $(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3)_n$  の実験式が与えられ、I をヒリジン、無水酢酸でアセチル化すると  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_8$  (MW 480) は質量分析より決定) のアセチル誘導体 (I') が得られた。この結果より、I は分子式  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_8$  であり、I' はそのジアセチル体であることが明らかとなり、このことより二量体構造が一層有力と考えるに至った。

ところで、I はケアニジノ基を有することから、塩の形成を試みたが塩酸塩の結晶の調製には失敗した。しかし、臭化水素酸塩の調製が成功し、はからずもこの塩の結晶の調製によって I の構造が一気に解決できた。すなわち、I の臭化水素酸塩は、IR スペクトルにおいて  $1750\text{cm}^{-1}$  と  $1770\text{cm}^{-1}$  に、エステルあるいはラクトンに由来すると考えられる吸収を示し、この臭化水素酸塩をセリジン-キ酸で処理することによって、再び I を復活することができた。

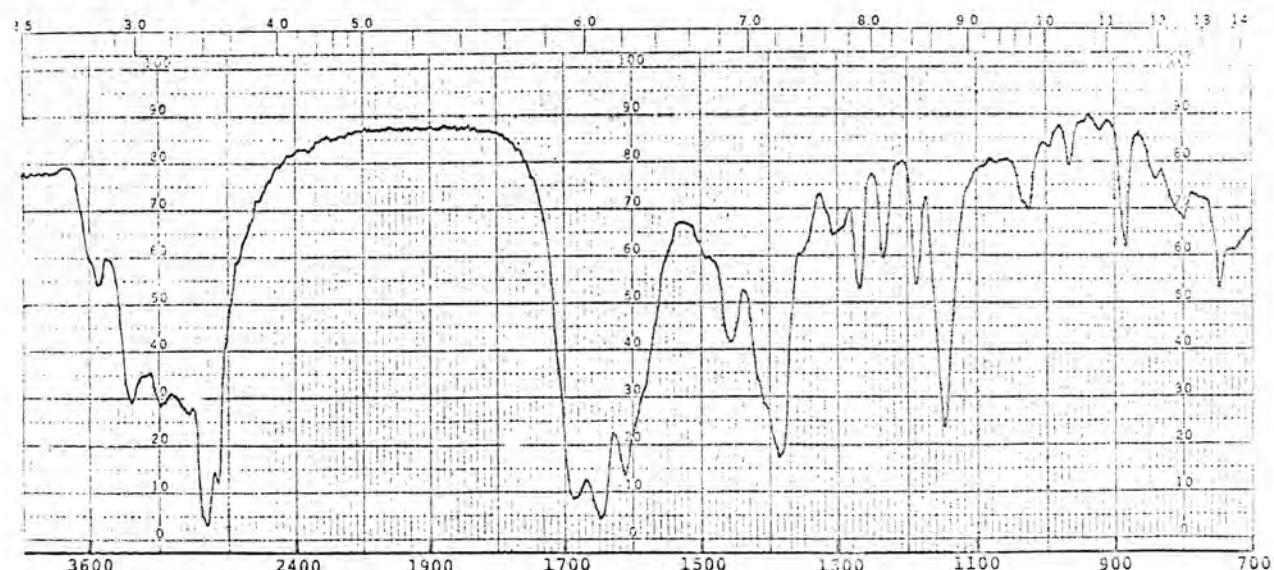


図 3-4-2 I の IR スペクトル (nujol)

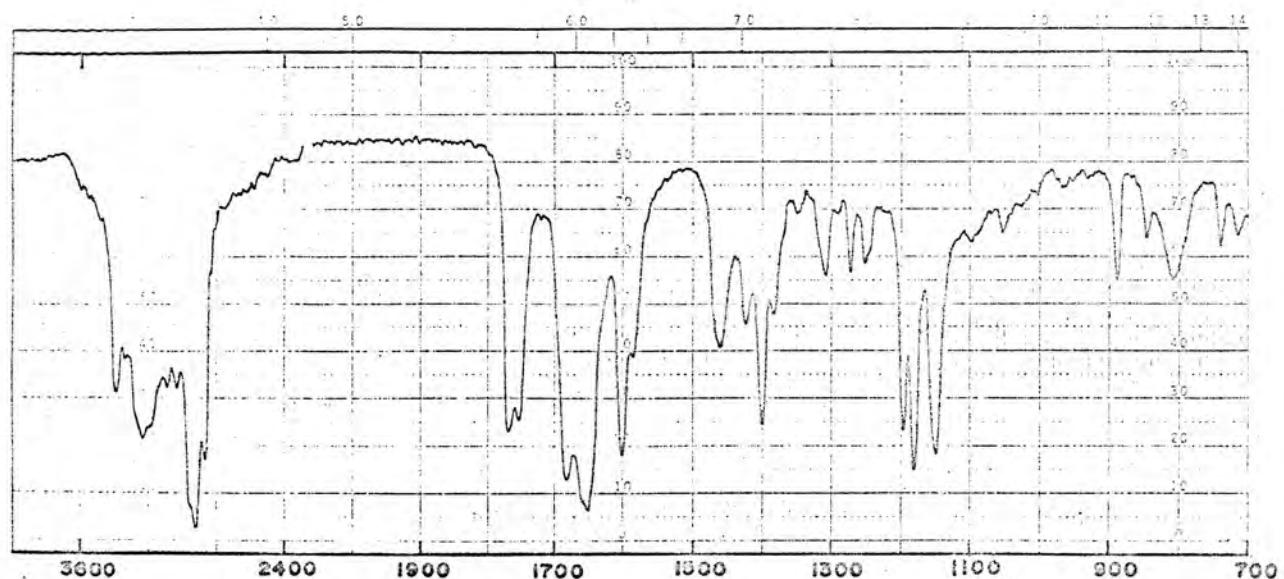
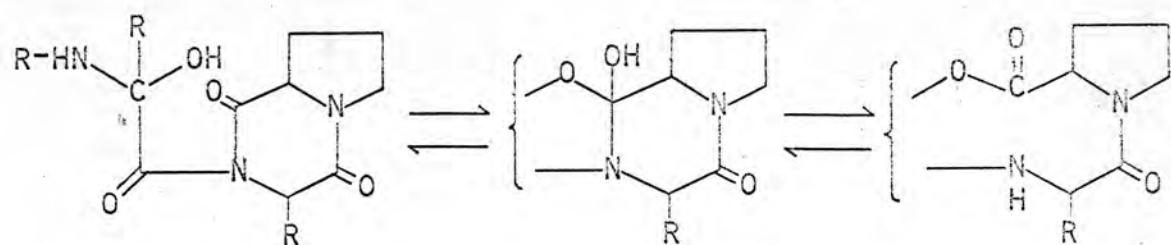
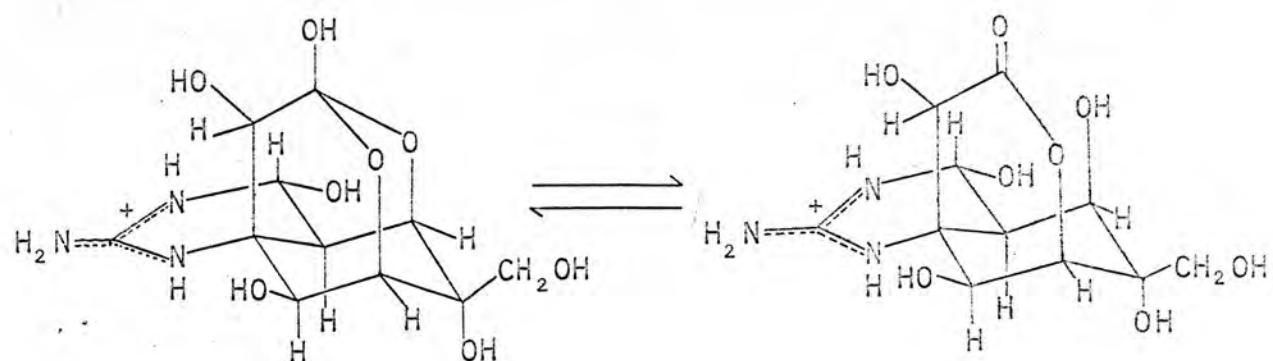


図 3-4-3 I の HBr 塩の IR スペクトル (nujol)

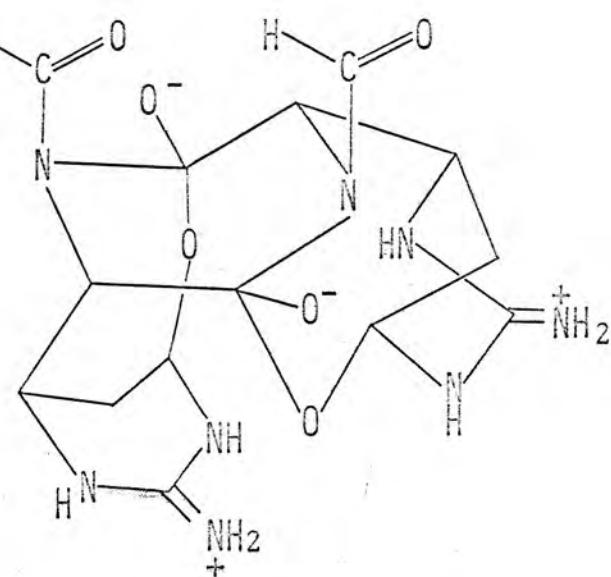
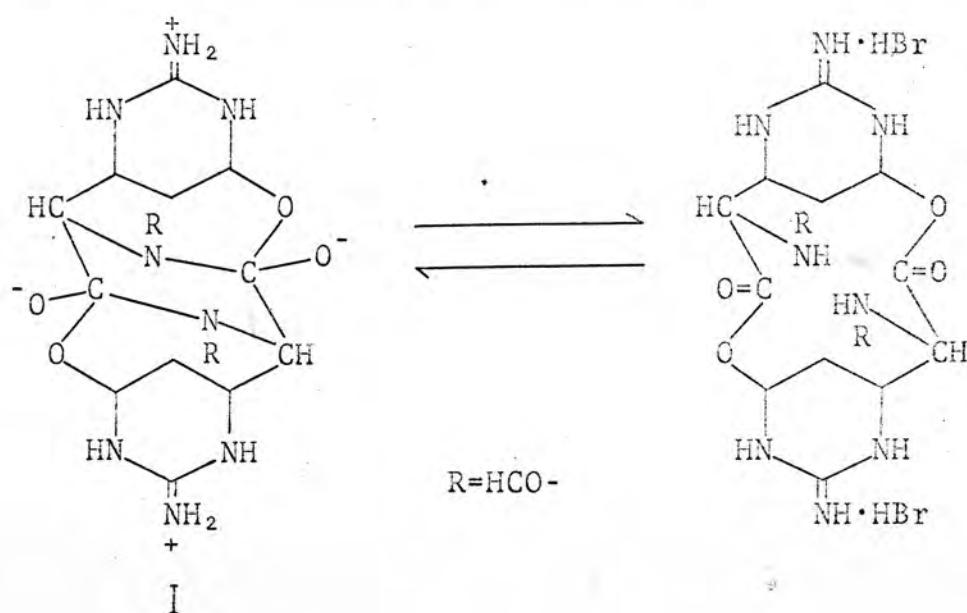
この相互変換の事実は、最近特に注目されるようになった環状ペプチドにあける N $\rightarrow$ O transannular 効果、エルゴタミンにあけるアミドーラクトン<sup>32)</sup>カルボニル相互作用、テトロドトキシンにおけるラクトン-ラクダール平衡<sup>33)</sup>などを想起させた。



[ 上 : エルゴタミン  
下 : テトロドトキシン ]

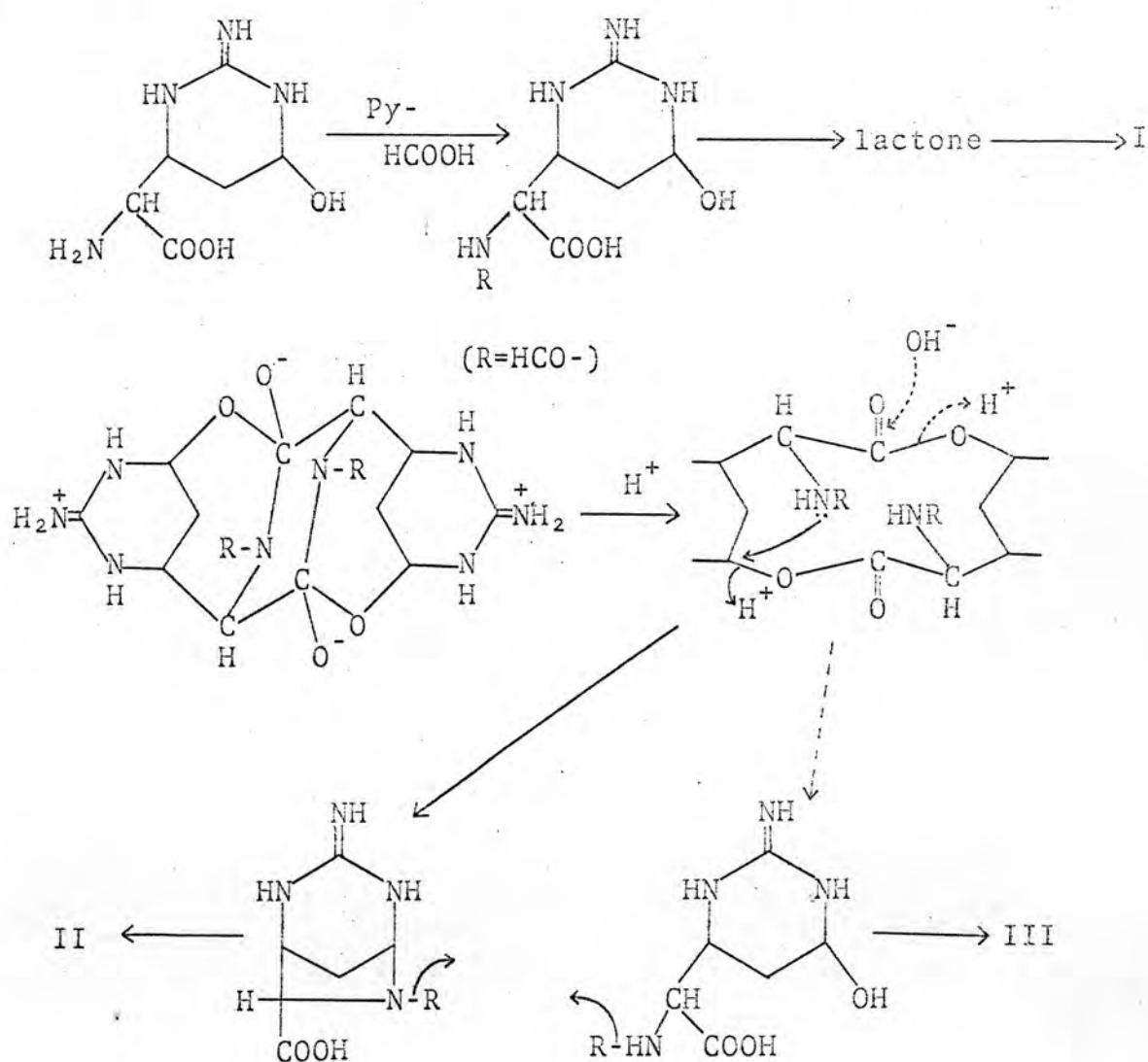


このような考え方を、I とその臭化水素酸塩の相互転換における構造変化が推定され、かくして I の構造として下図が考えられ、臭化水素酸塩はそのラクトン系であると結論された。また分子模型を組んでみると、I の構造は立体的に大きく規制され、可能と考えられる絶対構造も推定することができた。しかし、正確な絶対構造の解明には X 線解析が必要であることは言うまでもない。

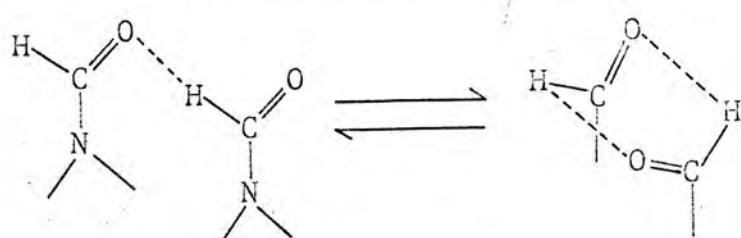


I の推定絶対構造式

I の生成および, II, III への分解機構は次のように推測される。

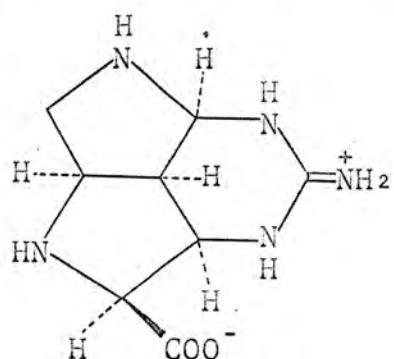


次に I の NMR スペクトルにおいて  $\text{HCO}^-$  のシグナルが二本に分裂する原因是、 $\text{HCO}$  同志の水素結合によるものと考えられる。すなわち高磁場側のシグナルは水素結合をしていない  $\text{HCO}$ 、低磁場側のシグナルは水素結合をした  $\text{HCO}$  プロトンと考えられ、それが約 1:2 あるいはそれ以上の比率で低磁場側のシグナルが強く現われるのは、次のように水素結合に與するプロトンが相対的に多くなっているとすると説明できる。



( 3 - 5 ) viocidic acid

TUM の  $\text{NaBH}_4$  還元の最初の実験ごと、還元剤の量が少なく還元がほとんど進行していなかったものについて、Dowex50 カラムクロマトグラフィーを行なったところ、坂口反応陽性フラクションに続く坂口反応陰性で、ニンヒドリン反応が黄色に発色するフラクションより、新らしい結晶を得ることができた。呈色反応、元素分析、融点などより、この物質は Bycroft らにより、VM の完全加水分解物から単離され、X線解析で構造<sup>26)</sup>決定された viocidic acid に相当するものであることがわかった。



viocidic acid

TUM の完全加水分解物のカラムクロマトグラフィーで単離せらくなっていたと考えられるこの viocidic acid の単離と、VM からも同一物質が得られている\* 事実は、後の TUM の全構造研究に重要な示唆を与えることになる。このことに関しては 4 章で詳しく述べることにする。

---

\* 著者らも VM の加水分解物より viocidic acid を単離している。

## 実験の部

### 1) $N^{\alpha}$ -Formyltuberactidine dimer (I)

Tuberactinomycin 塩酸塩 20g を 6N 塩酸 120cc (1g につき 6cc, 20本の封管中) を用い, 110°C で 24 時間 加水分解した<sup>\*</sup>. 加水分解物を減圧濃縮し, さらに水を加えて濃縮する操作をくり返した後, 真空デシケーター中, 水酸化ナトリウム上で一夜乾燥させた. この加水分解物を Dowex 50Wx2 (200-400 mesh, H<sup>+</sup> form)<sup>\*\*</sup> のカラムクロマトグラフィーによりアミノ酸の分離を行なった. 0.2M ヒリジン, キ酸 pH 3.1 の緩衝液<sup>\*\*\*</sup>を溶出すると serine,  $\alpha, \beta$ -diaminopropionic acid, グアニジノアミノ酸 (tuberactidine と viomycidine の混合物),  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine の順に溶出される.

坂口反応陽性フラクションを集めて濃縮し, さらに水を加えて濃縮をくり返し, 最後に活性炭で脱色後濃縮して得られた残留状物を一夜放置すると結晶化した. アルコールを加へ, 得られた結晶を水とアルコールから再結晶して, 美しいプリズム晶 (I) を得た. I は冷水に難溶で, 酸には可溶である. ニンヒドリン, 坂口反応とともに陰性. 融点は 245°C (dec.) で明確な融点を示さない. 収量は悪く再結晶後で 210mg.

分析値 : C, 42.19; H, 5.41; N, 28.09 %

$C_{14}H_{20}N_8O_6$  としての計算値 : C, 42.42; H, 5.09; N, 28.27 %

### 2) I のラクトン臭化水素酸塩の調製

I の結晶 210mg を 25% 臭化水素酸 1cc に溶かし, ただちにエタノール

\* 6N 塩酸 200cc を用いて, 130°C で 8~24 時間 過流下に煮沸しても同じ結果が得られる。

\*\* あらかじめ緩衝液を流して緩衝化しておく方が分離はやや良好。

\*\*\* 0.2M ヒリジンと酢酸で pH 4.0とした後, キ酸で pH 3.1 にした緩衝液を用いてもほとんど変りはない。

10cc, エーテル 20cc を加えて室温で放置すると、針状結晶が析出する。さうに氷室に一夜放置し、得られた結晶を口取し、アルコール、エーテルでよく洗った。収量 190mg. 融点 227°C(dec.) ニンヒドリン、坂口反応ともに陰性。

分析値: C, 30.10; H, 4.04; N, 19.92; Br, 28.49%

$C_{14}H_{20}N_8O_6 \cdot 2HBr$  としての計算値: C, 30.12; H, 3.97; N, 20.08; Br, 28.63%

この臭化水素酸塩の一部を少量の水に溶かし、ピリジンを加へ、さらにギ酸で中和して、少しがれ加熱すると結晶が析出した。IR より I であることが確認された。

### 3) I のアセチル誘導体

I の結晶 470mg を 25cc のピリジンにけんとくし、無水酢酸 13cc を加えて、室温で器械的に攪拌する。しばらくすると結晶は完全に溶解する。一夜反応後、氷の上に反応混合物を注ぎ、減圧濃縮する。水を加へ、濃縮をくり返した後残留油状物をアルコールに溶かし、一夜放置して結晶を得た。収量 399mg. 分析試料は水および水とアルコールから再結晶して調製したが、水から再結晶すると針状結晶として得られ、水とアルコールから再結晶したものは、美しい柱状もしくは板状プリズム晶として得られた。

分析値: C, 42.07; H, 5.26; N, 22.06 %

$C_{18}H_{24}N_8O_8 \cdot 2H_2O$  としての計算値: C, 41.83; H, 5.46; N, 21.70 %

分析値: C, 44.00; H, 5.68; N, 20.84 %

$C_{18}H_{24}N_8O_8 \cdot H_2O \cdot C_2H_5OH$  計算値: C, 44.11; H, 5.92; N, 20.58 %

マススペクトルより分子量 480 が得られ、分子式と一致した。従ってこれは I のジアセチル誘導体で、NMR より  $\begin{array}{c} -HN \\ | \\ C=N-COCH_3 \\ | \\ -HN' \end{array}$  体と考えられる。

### 4) I の臭化水素酸処理、viomycidine(II) と tuberactidine(III) の単離

#### (4-1) viomycidine(II) の単離

I の結晶 1.1g を 4.5cc の 15% 臭化水素酸に溶かし、50°C 以下で減圧

濃縮をして、さうに水を加えて濃縮をくり返す。残留油状物にエタノールを加へ、冷蔵庫に放置すると結晶化した。この結晶約400mgを水-エタノールから再結晶して350mgのリン片状結晶<sup>\*</sup>(IIの臭化水素酸塩)を得た。融点~210°C(dec.)<sup>\*\*</sup>。

分析値：C, 28.63; H, 4.61; N, 22.24; Br, 31.77 %  
 $C_6H_{10}N_4O_2 \cdot HBr$ としての計算値：C, 28.60; H, 4.42; N, 22.31; Br, 31.83 %

臭化水素酸塩をAmberlite IR45樹脂のカラムを通して溶出してくる塩基性部分を塩酸で酸性とした後、減圧濃縮して塩酸塩を得た。水-エタノールから再結晶して針状結晶を得る。融点~219°C(dec.)<sup>\*\*\*</sup>。

$[\alpha]_D^{13}-89^\circ (c 0.5, H_2O)$ ,  $[\alpha]_D^{16}-32^\circ (c 0.5, N HCl)$ <sup>\*\*\*\*</sup>.

#### (4-2) tuberactidine (III)の草離

IIの結晶を口取れた母液を再濃縮後、エタノールを加えて冷蔵庫に放置するとIIIの結晶が得られた。水-エタノールから再結晶をくり返して約100mgの純品を草離した。無色針状結晶。融点~182°C(dec.)

$[\alpha]_D^{15}-25.8^\circ (c 0.5, H_2O)$ .

分析値：C, 26.98; H, 4.81; N, 20.94; Br, 29.65 %  
 $C_6H_{12}N_4O_3 \cdot HBr$ としての計算値：C, 26.78; H, 4.87; N, 20.82; Br, 29.70 %

#### 5) Dihydroviomycinidine (IX)

TUM 塩酸塩 20gを100ccの0.3N NaOHに溶かし、それに  $NaBH_4$  5gを70ccの0.3N NaOHに溶かして徐々に加えた。43-45°Cの湯浴上で機械的にかきませながら 時間で加え終った。24時間かきませた後、少量の $NaBH_4$ を加えると泡を出して溶けたので、まだ還元が不充分と考へ、さらに 10

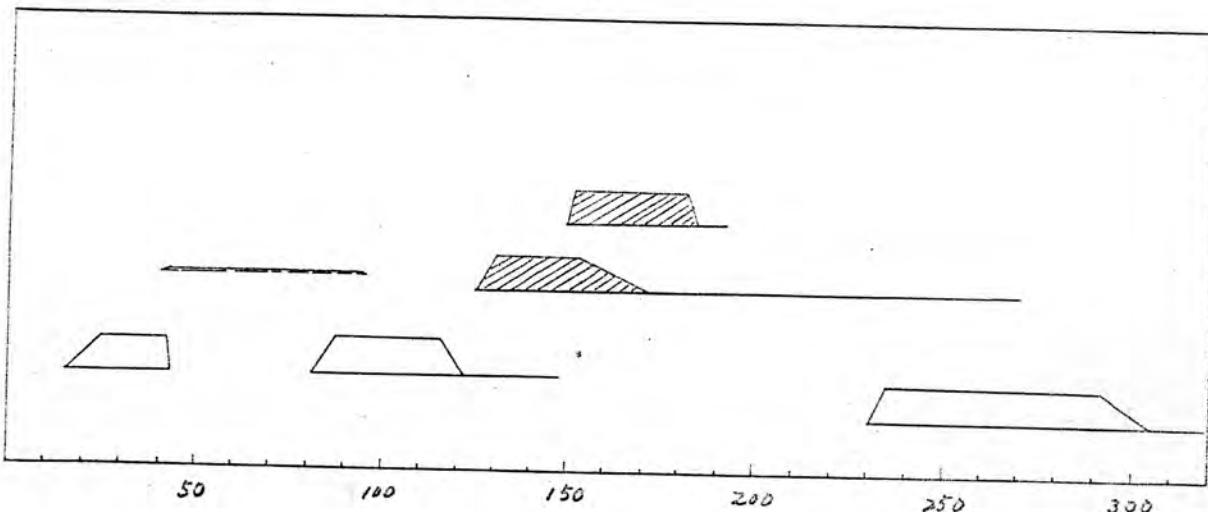
\* 結晶の成長のさせ方により六角板状晶になつたり、柱状晶になつたりする。

\*\* 文献 23 mp 202~4°C (dec.)

\*\*\* 文献 26 mp 200~4°C (dec.) 文献 27 mp 202~5°C (dec.)

\*\*\*\* 文献 27  $[\alpha]_D^{16}-74^\circ (c 1, H_2O)$ , -19°(c 1, 6N HCl)

時間のうちに 5g の  $\text{NaBH}_4$  を加えた。反応混合物を減圧濃縮し、100cc の濃塩酸に溶かし、不溶の無機物をロ過後 100cc の水を加えて還流冷却下に煮沸して 8 時間加水分解した。加水分解物を Dowex 50Wx2 のカラムクロマトグラフィーで分離した。



- Dowex 50Wx2 (200~400 mesh, 500 cc)
- カラム ( $2.5 \times 70$ ) cm, 雙衝液で緩衝化
- 緩衝液 0.2M ヒドリジンと酢酸で pH 4.0 にした後、キ酸で pH 3.1 にしたもの。
- 1 ブラクション 20cc
- 溶出状態は TLC (Phenol -  $\text{H}_2\text{O}$  - c.  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 30 : 10 : 1) 上、ニンヒドリンで検出、坂口反応は別にロ紙にスポットして行った。(■ 坂口反応陽性部)

125 - 147番目のフラクションを集め  $50^\circ\text{C}$  以下で減圧濃縮した。水を加えて数回濃縮をくり返し、残留油状物を一夜放置すると結晶化した。収量 500mg。この粗結晶を少量の希塩酸に溶かし、エタノールとエーテルを加えて冷蔵庫に一夜放置し、無色針状結晶を得た。水アルコールより再結晶して 93mg の純粹な IX の塩酸塩を得た。融点  $180^\circ\text{C}$  (dec.) [文献  $182^\circ\text{C}$  (dec.)].  $[\alpha]_D^{15} +33^\circ$  (c 0.5, N HCl). [文献 +25° (c 0.71, 6N HCl)].

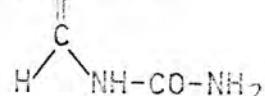
分析値: C, 30.90; H, 7.06; N, 23.59 %

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HCl} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  としての計算値: C, 30.58; H, 6.84; N, 23.77 %

## 4 章 TUBERACTINOMYCIN の全構造についての考察

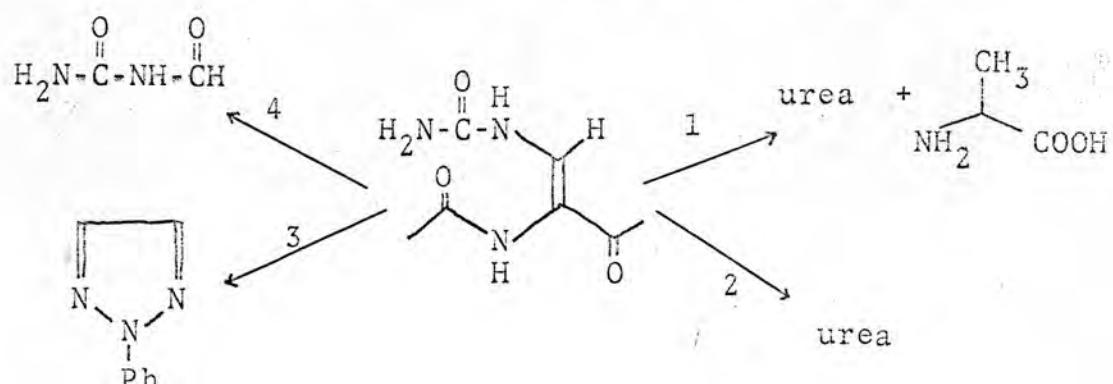
すでに述べてきたように、Tuberactinomycin (TUM) を構成する新アミノ酸の構造および組成を知ることができたので、著者らは現在アミノ酸配列の決定、すなわち全構造の決定を目指して研究を続けている。そしてこれまでに得られた知見と、それをもとにして考えた推定構造式についてもふれ、同時に TUM と Viomycin (VM) の諸性質の類似性から、両者の構造を比較検討したい。

(4-1) 3-Ureidodehydroalanine  $\text{NH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{COOH}$  の存在



TUM は重水中の NMR スペクトルにおいて、 $\delta 8.01 \text{ ppm}$  にシングルレットのシケナルを有し、また紫外吸収スペクトルは  $268 \mu\text{m}(\text{H}_2\text{O})$ ,  $263.5 \mu\text{m}(0.1 \text{N HCl})$ ,  $285.5 \mu\text{m}(0.1 \text{N NaOH})$  において最大吸収を示す。これらのデータは VM の場合と全く同じで、TUM と VM の類似性から考えて、この NMR の  $\delta$  値と UV の吸収極大を示す部分に関しては両者同一の構造を有するものと思われる。

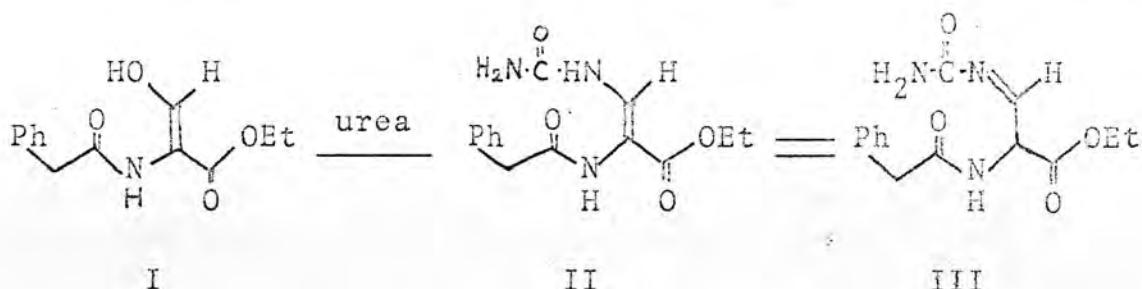
Bycroft らは VM についてこの chromophore の部分構造の詳しい研究を行ない、3-ureidodehydroalanine の存在を予想した。<sup>34)</sup>



- 1) (i)  $\text{H}_2/\text{Pt}$ , (ii)  $6\text{N HCl}$       2)  $\text{KMnO}_4$
- 3) (i)  $\text{I}_2$ , (ii)  $\text{PhHNHNH}_2$ , (iii)  $\text{H}^+$       4)  $0.1\text{N HCl}$

上記の報告は非常に興味ある実験結果であり、特に 1) の反応はこの部分構造を決めるのに決定的な役割を果たしていると考えられるので、TUM にもこの反応を試みた。TUM を 20% 酢酸溶液中、酸化白金で還元したところ、尿素と還元生成物が得られ、この還元生成物は重水中の NMR スペクトルで 8.01 ppm のシグナルが消失し、また UV 吸収も消失した。さらに還元生成物を塩酸加水分解して新たに 1 モル相当の alanine の生成を認めることができた。この結果は全く VM における結果と同じであった。

さらに Bycroft らは、UV 吸収の説明をするために次のようないくつかの研究を行なった。<sup>35)</sup> Ethyl benzyl penicilate (I) を尿素と酸触媒とともに縮合させて ureido 化合物 (II) を合成した。II は III と平衡関係にあり、結晶化の溶解度によりどちらか一方を得ることができるが、一般に II の形で安定である。



II と VM および著者の TUM の NMR, UV スペクトルを比較すると次の通りである。

	II	Viomycin	Tuberactinomycin
UV	a) 中性, 酸性 266 b) アルカリ性 308	267 290	268, 268.5 308
NMR (ppm)	2.2 (CD <sub>3</sub> SOCD <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O)	8.1 (D <sub>2</sub> O)	8.01 (D <sub>2</sub> O)

さらに、この dehydroalanine 認導体の存在を確かめるために、二重結合の酸化を目的として、TUM の臭素酸化反応を試みた。この結果ロ紙電気泳動で明らかに TUM と異なる酸化生成物（構造未定）を得ることができた。これは重水中の NMR スペクトルにおいて 8.01 ppm のシグナルをもたないことから、予想通りこの部分の酸化が行なわれたものと考

えられる。

以上のような事実から、TUM と VM に、ともに 3-ureidodehydroalanine の構造部分が存在することが明らかとなった。この 3-ureidodehydroalanine の TUM (あるいは VM) 中での結合状態については (4-3) で述べることにする。

#### (4-2) 複硫酸、濃塩酸による部分水解

$\beta$ -オキシアミノ酸を含むペプチドの構造決定に、N-O アシル転位反応を利用したペプチド鎖の選択的切断が有効な方法であることが知られている。この転位反応は 1921 年 Bergmann<sup>36)</sup> によって、脂肪族化合物についてみたされ、その後  $\beta$ -オキシアミノ酸を含むペプチドおよびタンパク質に適用され、多くの研究が行なわれてきた。<sup>37)</sup>

転位剤としては、濃塩酸、無水硫酸および濃硫酸などがあがられるが後者を用いた例が多く、転位の結果  $\beta$ -オキシアミノ酸残基のアミノ基側のペプチド結合が切断する。

著者は TUM がオキシアミノ酸に富むことから、このアシル転位反応の適用を試みた。この場合比較のために、常に TUM と VM について同じ反応を行なった。

まず、TUM\*, 酸化 TUM (OTUM\*\*), VM\*\*\*そして酸化 VM (OVM\*\*\*\*) の 4 種について、濃硫酸中の転位反応を試みた。

50mg の試料を 1cc の濃硫酸に溶かし、封管中室温で 10 日間放置して転位させ、転位生成物はエーテルあるいはアセトン中に注入してゲル状沈殿として得るか、あるいは氷水中に注いで約 1 時間に希釈した後、

\* TUM の濃硫酸による転位反応はすでに 2 章で利用している。

\*\* (4-1) 参照

\*\*\* Parke, Davis and Sankey (三共) 社製のものを使用。

\*\*\*\* 酸化 TUM 同じ方法で調製した。

Amberlite IR-45(OH<sup>-</sup> form)カラムで脱塩して得た。この結果、表に示すようにγ-hydroxy-β-lysine と serine の遊離において、それぞれ特徴的な結果が得られた。(表4-2-1)

表 4-2-1

	β-Lys	γ-Hy-β-lys	Ser	
TUM	—	+	-	
OTUM	—	+	+	(+ : 遊離する)
VM	-	—	-	(- : 遊離しない)
OVM	-	—	+	

転位反応により新しく生成するアミノ基の確認は、DNP化法と亜硝酸処理による脱アミノ化法を用いた。DNP化法ではあまりよい結果は得られなかつたが、亜硝酸処理による方法では非常に興味ある結果を得ることができた。すなわち、転位生成物を希硫酸溶液中にあいて亜硝酸ナトリウムで脱アミノ化反応を行ない、窒素ガスの発生が完全に終ったところでAmberlite IR-45カラムを通して過剰の亜硝酸イオンを除去する。塩基性溶出液を塩酸で中和して減圧濃縮後、6規定塩酸を用いて、100°Cで24時間、封管中で加水分解して、アミノ酸組成の変化を調べた。(表4-2-2)

表 4-2-2

	β-Lys	γ-Hy-β-lys	Dapa	Ser	
TUM	—	-	-	+	
OTUM	—	-	-	+	(+: 残存する)
VM	-	—	+	+	(-: 消失する)
OVM	-	—	+	+	

この結果は、N<sub>2</sub>O 転位反応の条件で TUM および OTUM においては γ-hydroxy-β-lysine が遊離するとともに、新たに α,β-diaminopropionic acid のアミノ基が出現し、同じ条件で β-lysine が遊離しない VM, OVM の場合には、α,β-diaminopropionic acid のアミノ基は遊離状態になら

ないことを示している。そして TUM においては  $\gamma$ -hydroxy- $\beta$ -lysine のカルボキシル基に結合するアミノ酸は  $\alpha, \beta$ -diaminopropionic acid であることを強く指示している。

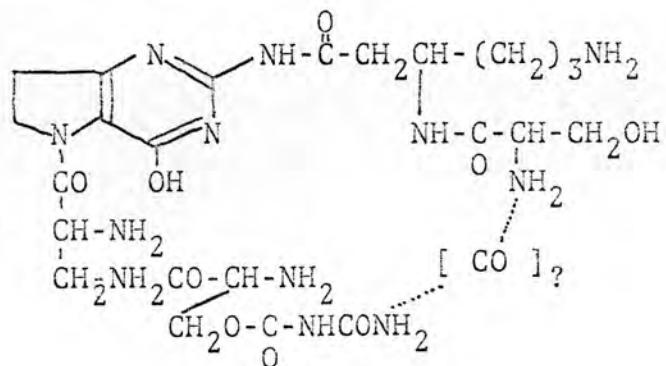
次に、濃塩酸による部分水解を試みた。この結果は濃硫酸による N-O 転位反応の場合と同じであった。

#### (4-3) 推定構造式

著者らは上記の結果と、その他二、三の実験事実より一応考えられる推定構造式を出し、それをもとに今後の研究方向を検討することにした。まず参考のため、すでに多くのグループで研究の行なわれている VM に対し、現在までいろいろな推定構造式が提出されているので、それらを紹介しておこう。

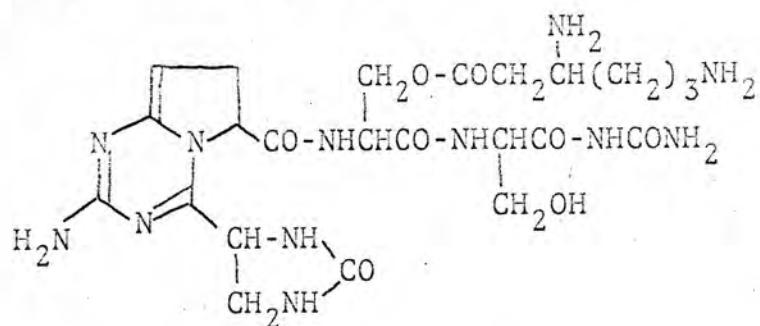
5b)

1) Johnson et al. (1964)

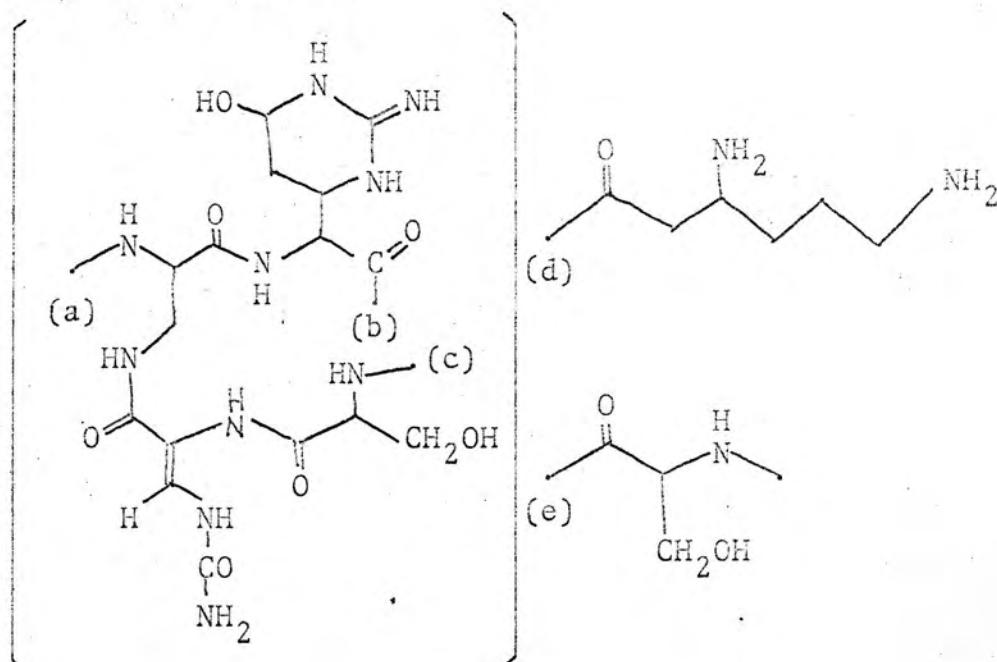


5c)

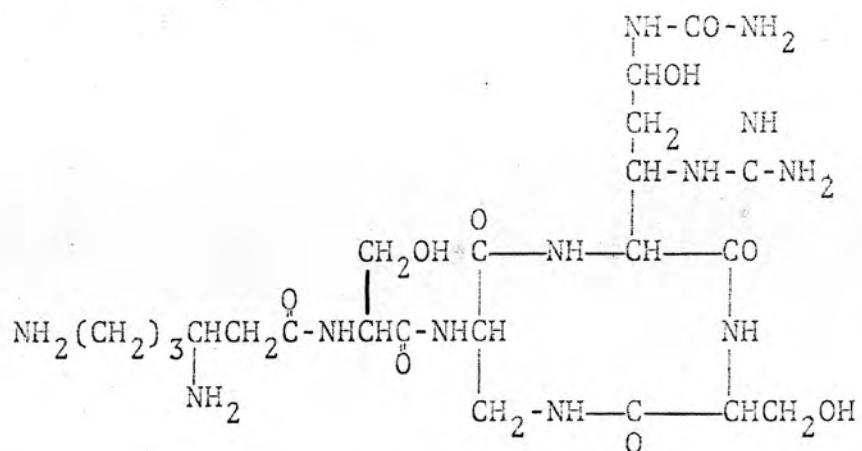
2) Dyer et al. (1965)



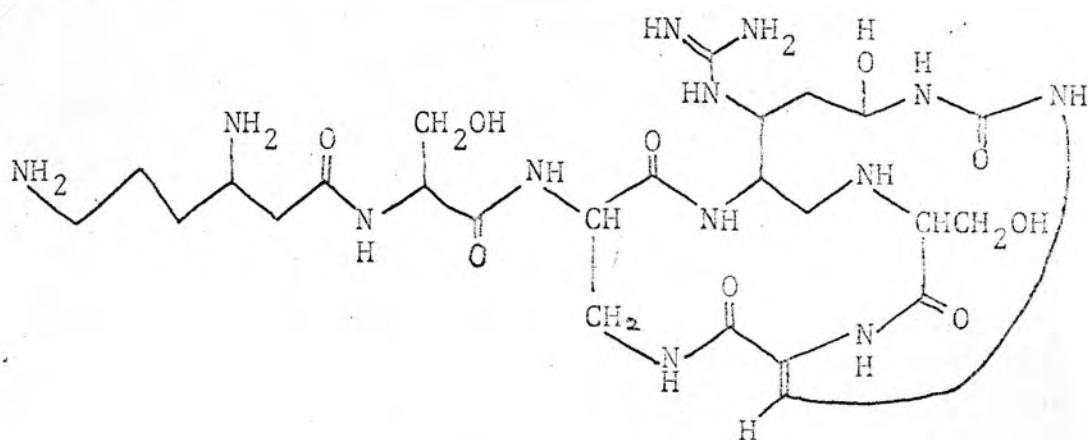
3) Johnson et al. (1968) <sup>34)</sup>



4) Lechowski (1969) <sup>38)</sup>

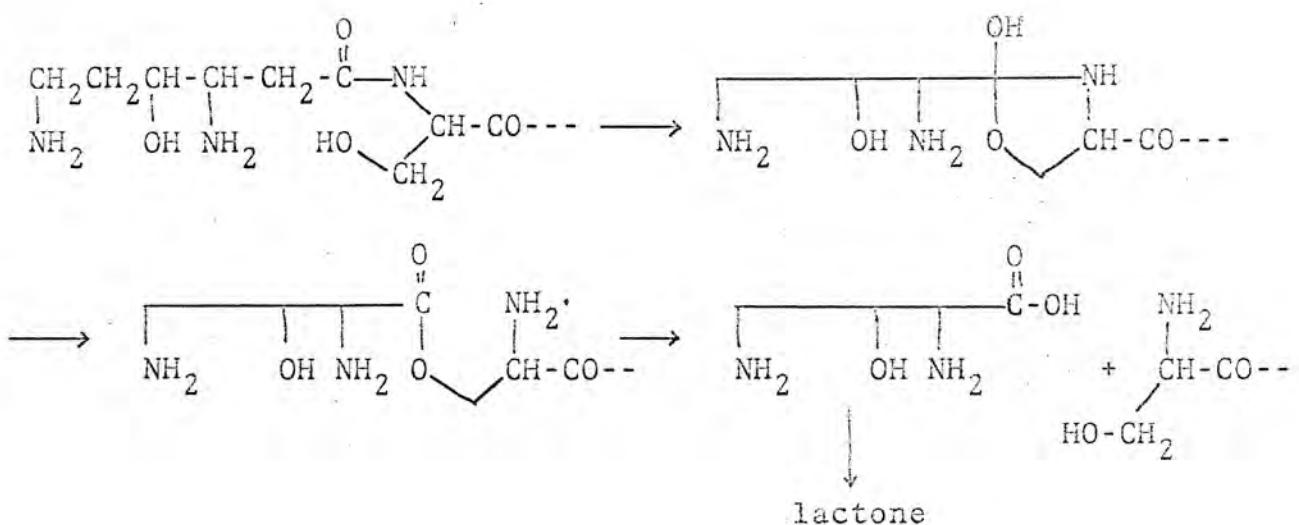


5) Kitagawa et al. (1969) <sup>39)</sup>

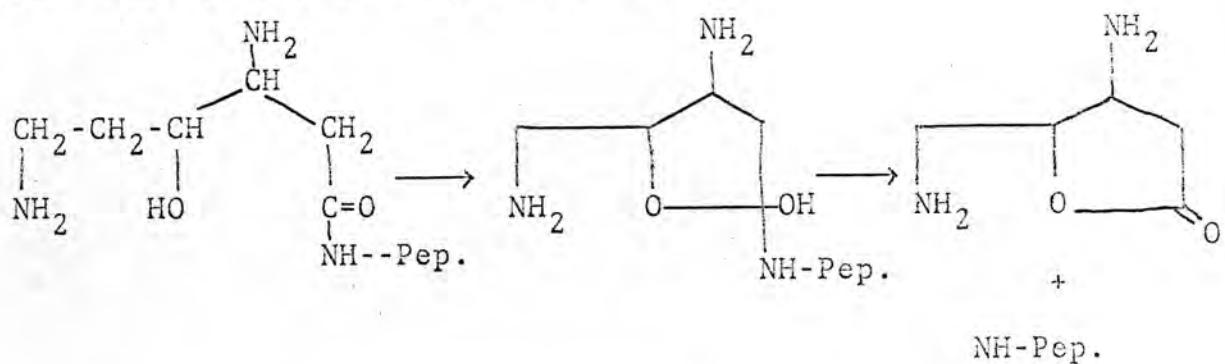


以上のように VM の推定構造式はいろいろ提出されているが、そのなかで 3) と 5) 式が一応実験に忠実に提出された式と考え得る。

著者らは TUM の構造を考えるにあたり、まず (4-2) の結果の説明を最初次のように考えていた。

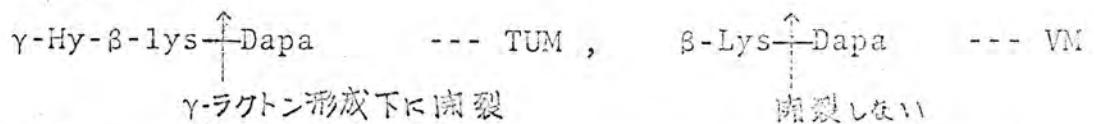


すなわち  $\gamma$ -Hy- $\beta$ -lys の遊離は serine 残基による N $\rightarrow$ O 転位反応の結果起るものと考えていたが、もしそうだとすれば、VM においてもこの条件において  $\beta$ -lysine の遊離が起ってもよいはずである。しかし、そのような事実は認められない。従って、TUM の場合における  $\gamma$ -Hy- $\beta$ -lys の容易な脱離は次のように説明して矛盾がないと考えた。



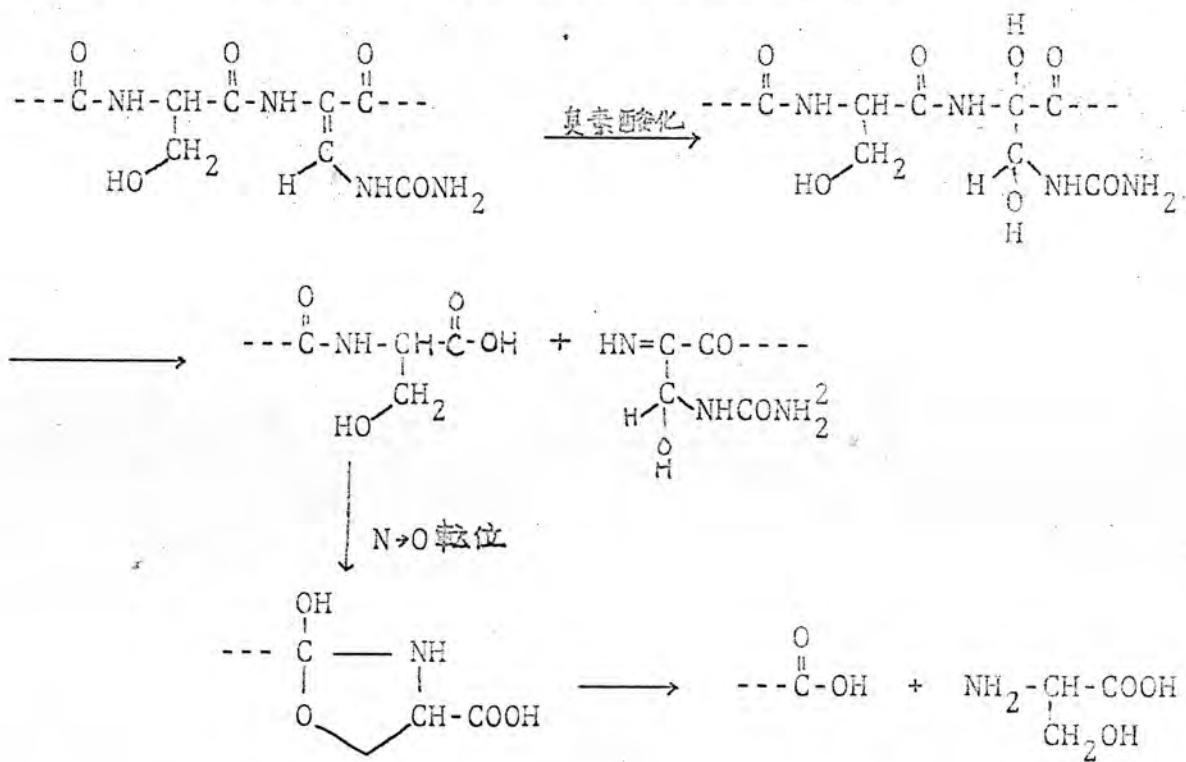
そして TUM と VM との相違が他の諸事実からも、 $\gamma$ -Hy- $\beta$ -lys と  $\beta$ -Lys の相違のみに限られると考えられるので、部分水解あるいは N $\rightarrow$ O 転位条件ごとの反応後の亜硝酸処理の結果の相違すなわち Dapa の消失と残存の差は、 $\gamma$ -Hy- $\beta$ -lys と  $\beta$ -Lys の差に由来すると結論づけると考へた。この

重要な新事実によつて



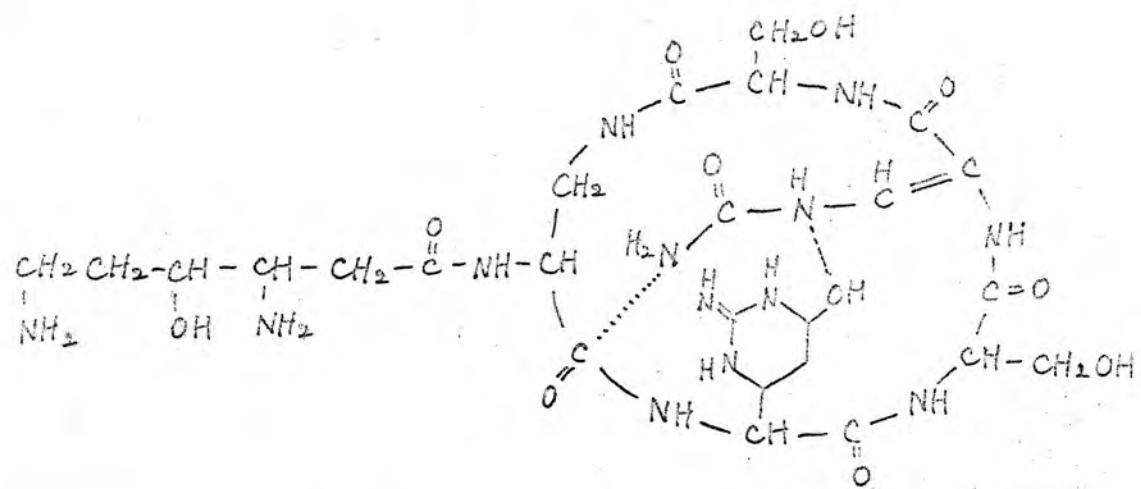
を推定するに至つた。さうに  $\gamma\text{-Hy-}\beta\text{-lys}$  が Dapa の  $\alpha$ -アミノ基に結合しているか、 $\beta$ -アミノ基に結合しているかは、亜硝酸処理後の加水分解物に isoserine\* が存在しているかどうか、および serine のモル数の変化を調べれば決定できる。

次に OTUM および OVM の臭素酸化体の部分水解により、1 モルの serine がすみやかに遊離する事実は下図のように説明できる。

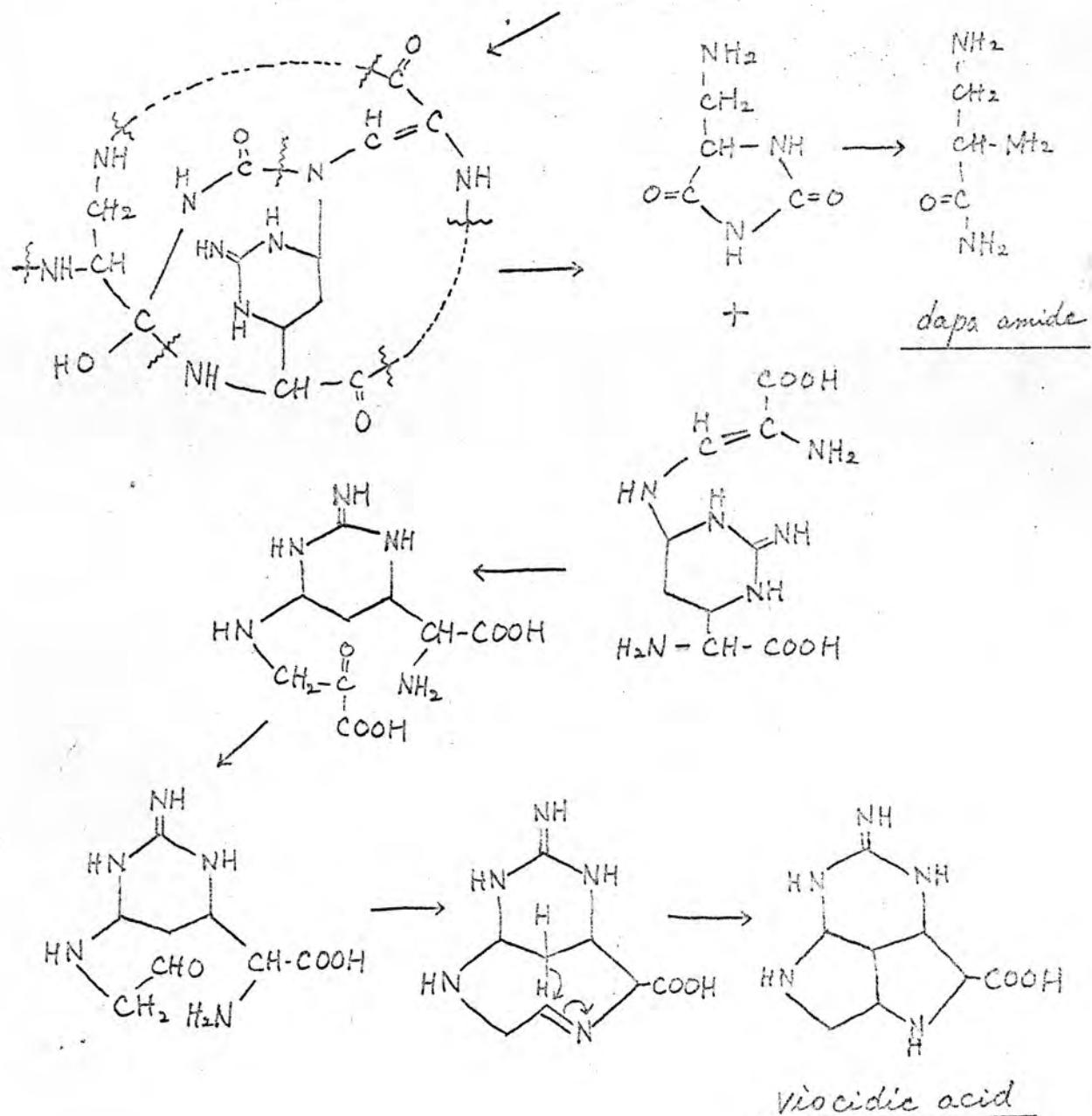


上記のアミノ酸配列に関する新たな実験結果に基づいて、従来全く説明のついていなかつた viocidic acid の生成 (3-5) ならびに Dapa amide の生成 (2-3) をも明快に説明する推定構造式 (A) を提出することができた。

8\*  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-COOH}$



Tuberactinomycin 推定式



Viocidic acid

たが、この推定式において ureido の N<sub>1</sub> 原子が tuberactidine の C<sub>4</sub> 原子に付く水酸基と、單に水素結合により近接した位置を保っているのか、あるいは脱水された形で存在するのかという問題、およびureido の N<sub>5</sub> 原子と Dapa のカルボニル基の間にいわゆる cyclol 構造が実在するのか、それとも加水分解操作の間に同時にこのような cyclol 構造を経て Dapa amide を与える結果になるのかという問題の最終的な解決には、今後再び多くの化学的な裏付けと、X線解析による绝对構造の決定を待たねばならない。そして、これらの研究が、現在著者らによって積極的に進められていることを付記しておく。

#### (4-4) 同系抗生素質群の検討

TUM と VM のアミノ酸組成を検討すると、次のような一連の抗生素質群の存在が予想される。

	$\beta$ -Lys	$\gamma$ -Hy- $\beta$ -Lys	Cpd	Td	
I	+			+	Ser, $C_{25}H_{43}N_{13}O_9$
II	+			+	Dapa, $C_{25}H_{43}N_{13}O_{10}$
III		+	+		3-Ureido -deala $C_{25}H_{43}N_{12}O_{10}$
IV		+		+	$C_{25}H_{43}N_{13}O_{11}$

II は VM であり、IV は TUM であるが 実に興味深いことに、現在すでに東洋醣化研究所において I および III に相当する抗生素質が単離されている。ここで注目すべき点は  $\beta$ -Lys と  $\gamma$ -Hy- $\beta$ -lys, capreomycidine( Cpd ) と tuberactidine( Td ) の相違は、いずれも水酸基の有無である。特に IV の TUM は 4 個のオキシアミノ酸を有することになり、最も酸化型の抗生素質であると言える。このように、この種の抗生素質の構造を酸化段階の差で類別するという考え方に対しては、さらに serine の水酸基を失った alanine を含有する系統の存在が予想される。実際にこの種の抗生素質として Capreomycin が報告されていて Cpd と共に alanine を含有する

ことが知られている。しかしながら CM はまた純粹な形で単離されてい  
ず、従ってその完全な組成は明らかでないが、2 個の serine のうちの 1  
個または両者が alanine に置きかわる系列で、それぞれ上記の VM-TUM  
系の場合と同様な 4 種の類似体が考えられる。CM はこれら 8 種の化  
合物の中の 1 種または複数個の混合物であらうと推定される。

## 参考文献

1. A. Nagata, T. Ando, R. Izumi, H. Sakakibara, T. Take, K. Hayano, and J. Abe, *J. Antibiotics*, 21, 681 (1968)
2. a) 小関勇一, 結核, 43, 55 (1968)  
b) 豊原布一, 結核, 43, 245 (1968)  
c) 永田明徳, 早野和夫, 星野保夫, 結核, 43, 249 (1968)
3. a) E.B. Herr, Jr., M.E. Haney, G.E. Pittenger, and C.E. Higgins, *Proceedings Indiana Academy of Sciences*, 69:134  
b) E.B. Herr, Jr., and M.O. Redstone, *Ann. New York Acad. Scien.*, 135, 940 (1966)
4. a) A.C. Finlay, G.L. Hobby, F.A. Hochstein, T.M. Lees, T.F. Lenart, J.A. Means, S.Y. Pan, P.P. Regna, J.B. Routtein, B.A. Sabin, K.B. Tate, and J.H. Kane, *Ann. Rev. Tubec.*, 63, 1 (1951)  
b) Q.R. Bartz, J. Ehrlich, J.D. Mold, M.A. Penner, and R.M. Smith, *ibid.*, 63, 4 (1951)  
c) C.A. Werner, R. Tompsett, C. Muschenheim, and W. McDermont, *ibid.*, 63, 49 (1951)
5. a) J.H. Bowie, D.A. Cox, A.W. Johnson, and G. Thomas, *Tetrahedron Letters*, 263 (1964)  
b) J.H. Bowie, D.A. Cox, A.W. Johnson, and G. Thomas, *Tetrahedron Letters*, 3305 (1964)  
c) J.R. Dyer, C.K. Kellogg, R.F. Nasser and Wm. E. Streetman, *Tetrahedron Letters*, 585 (1965)

6. a) 田村善蔵, 中島暉躬, 蛋白質・核酸・酵素, 12, 729 (1967)  
b) B.S. Hartley and V. Massey, Biochem. Biophys. Acta, 21,  
58 (1956)  
c) B.S. Hartley and W. Gray, Biochem. J., 82, 379 (1963)  
d) " " ibid, 82, 59P (1963)
7. 北川常弘, 三浦英子, 沢田洋介, 谷山英三, The 7th Symposium  
on Peptide Chemistry, Symposium Papers, 82 (1969)
8. F.A. Hochstein and R.L. Miller, U.S. Pat. 2,920,998 (1960)
9. S. Hanesian, J. Org. Chem., 32, 163 (1967)
10. E. Suzuki, S. Inoue, and T. Goto, Chem. Pharm. Bull.,  
16, 933 (1968)
11. A. Hoffman, H. Ott, R. Griot, P.A. Stadler, and A.J. Frey,  
Helv. Chim. Acta, 46, 2306 (1963)
12. 若宮豊昭, 芝哲夫, 金子武夫, 永田明穂, 田家照生, 郡原秀夫,  
第13回天然有機化合物討論会講演要旨集, 17 (1969)
13. 岩井浩一, 日化誌, 80, 1066 (1959); 81, 1302 (1960); 82,  
1088 (1961); 83, 107, 168 (1962)
14. 竜藤豊成, 米原弘, 第11回天然有機化合物討論会講演要  
旨集, 269 (1967)
15. D. Brookes, B.K. Tidd, and W.B. Turner, J. Chem. Soc.,  
5385 (1963)
16. N. Takahashi, Tetrahedron Letters, 1961 (1967)
17. a) N. Igumiya, Y. Fujita, F. Irreverre, and B. Witkops,  
Biochem. 4, 2501 (1965)

- b) Y. Fujita, J. Kollaritsch, and B. Witkop, *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 2030 (1965)
- c) B. Witkop, *Experientia*, 12, 372 (1956)
18. a) T. P. Jennings, W. Klyne, and P. M. Scopes, *Proc. Chem. Soc.*, 412 (1964)
- b) T. P. Jennings, W. Klyne, and P. M. Scopes, *J. Chem. Soc.*, 7211 (1965)
19. 岩井浩一, 實驗化學講座(日本化学会編), 23, 166 (1967)
20. T. Wakamiya, T. Shiba, T. Kaneko, H. Sakakibara, T. Take, and J. Abe, *Tetrahedron Letters*, 3497 (1970)
21. a) J. R. Dyer, H. B. Hayes, and E. J. Miller, Jr., Paper presented at the Third Interscience Conference for Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D. C. (1963); cf. D. Perlman, *Nature*, 201, 456 (1964)
- b) J. R. Dyer, H. B. Hayes, E. G. Miller, Jr., and R. F. Nassar, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 5363 (1964)
22. J. C. Floyd, J. A. Bertrand, and J. R. Dyer, *Chem. Comm.*, 998 (1968)
23. G. Koyama, H. Nakamura, S. Omoto, T. Takita, K. Maeda, and Y. Gitaka, *J. Antibiotics*, 22, 34 (1969)
24. E. B. Herr, Jr., *Antimicro. Agents and Chemoth.* 1962 : 201 (1963)
25. B. N. Bycroft, D. Cameron, L. R. Croft, A. W. Johnson, T. Webb, and P. Coggon, *Tetrahedron Letters*, 2925 (1968).

26. B.W. Bycroft, L.R. Croft, A.W. Johnson, and T. Webb, *J. Antibiotics*, 22, 133 (1969)
27. T. Takita and K. Maeda, *J. Antibiotics*, 22, 39 (1969)
28. R.M. Silverstein and G.C. Bassler, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, second Edition, p 312 (1967)
29. R.U. Lemieux, R.K. Kulling, H.J. Bernstein, and W.G. Schneider, *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 6098 (1958)
30. T. Takita and K. Maeda, *J. Antibiotics*, 21, 512 (1968)
31. E. Gizuwa and J.T. Yang, *Biochemistry*, 3, 1519 (1964)
32. A. Hoffmann, H. Ott, G. Gridt, P.A. Stadtler und A.J. Frey, *Helv. Chim. Acta*, 46, 2206 (1963)
33. T. Goto, Y. Kishi, S. Takahashi, and Y. Hirata, *Tetrahedron*, 21, 2059 (1965)
34. B.W. Bycroft, D. Cameron, L.R. Croft, A. Hassanali-Walji, A.W. Johnson, and T. Webb, *Tetrahedron Letters*, 5901 (1968)
35. B.W. Bycroft, D. Cameron, A. Hassanali-Walji, and A.W. Johnson, *Tetrahedron Letters*, 2539 (1969)
36. M. Bergmann, E. Brand, F. Dreyer, *Ber.*, 54, 936 (1921)
37. P. Desnuelle and A. Casal, *Biochem. Biophys. Acta*, 2, 64 (1948)
38. L. Lechowski, *Tetrahedron Letters*, 479 (1969)
39. T. Kitagawa, Y. Sawada, T. Miura, T. Osaza, and H. Tanigama, Abstracts papers of 6th International Congress of Chemotherapy and Post-Congress Symposium 1, Tokyo, p 486 (1969)

## 謝　　辞

本研究は大阪大学大学院理学研究科博士課程において、金子武夫教授、芝哲夫助教授の御指導のもとに行なったものであり、終始御懇意な御指導と御援助を賜りました両先生に心より御礼申し上げます。

また、種々の御教示をいただいた大阪大学理学部桂博二助教授はじめ、金子研究室の皆様に御礼申し上げます。

また、元素分析をしていただいた大阪大学理学部元素分析室の奥宮正和、大野かずよの両氏ならびにNMRスペクトル、マススペクトルの測定をしていたいた機器分析室の諸氏に感謝いたします。さらに食品化学研究所の直木秀夫氏には、NMRスペクトル、マススペクトルの測定をしていただき感謝申し上げます。

とくに、本研究のために貴重なTuberactinomycinの試料を御提供いただき、また研究費の一部を御援助賜った東洋醸造株式会社に御礼申し上げるとともに、アミノ酸分析の測定、さらに大学紛争の際には研究室の使用をお許しいただいた同研究所の所長阿部仁之助博士に厚く御礼申し上げます。また、英に研究を進め多くの有意義な御指摘と討論をしていただいた同研究所の田家照生博士、柳原秀夫、野田俊治の諸氏に感謝いたします。

最後に著者の心の支えとなつた多くの友人達の大きな励ましのありましたことを感謝しています。

1970年12月1日