

Title	新抗生物質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	https://hdl.handle.net/11094/1447
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

新抗生物質 TUBERACTINOMYCIN の
化学構造に関する研究

若宮 建昭

目 次

1 章	序 論	-----	1
2 章	新オキシアミノ酸 γ -Hydroxy- β -lysine の単離とその構造	-----	7
3 章	グ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) 新抗生物質 Tuberactinomycin の発見まで

抗生物質 Tuberactinomycin (TUM) は永田ら¹⁾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物質で，人型結核菌に対し抗菌作用を示す。²⁾

この TUM が新しい抗生物質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 α, β -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 Guanidino 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，既知の抗生物質 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³⁾ 抗結核剤で，構成アミノ酸として β -lysine, α, β -diaminopropionic acid, serine, alanine として capreomycin (図 1-1-1) を含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，純粋な物質の単離が困難なためか，その構造研究は充分行なわれていない。

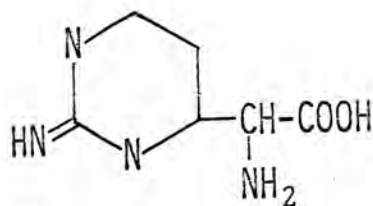
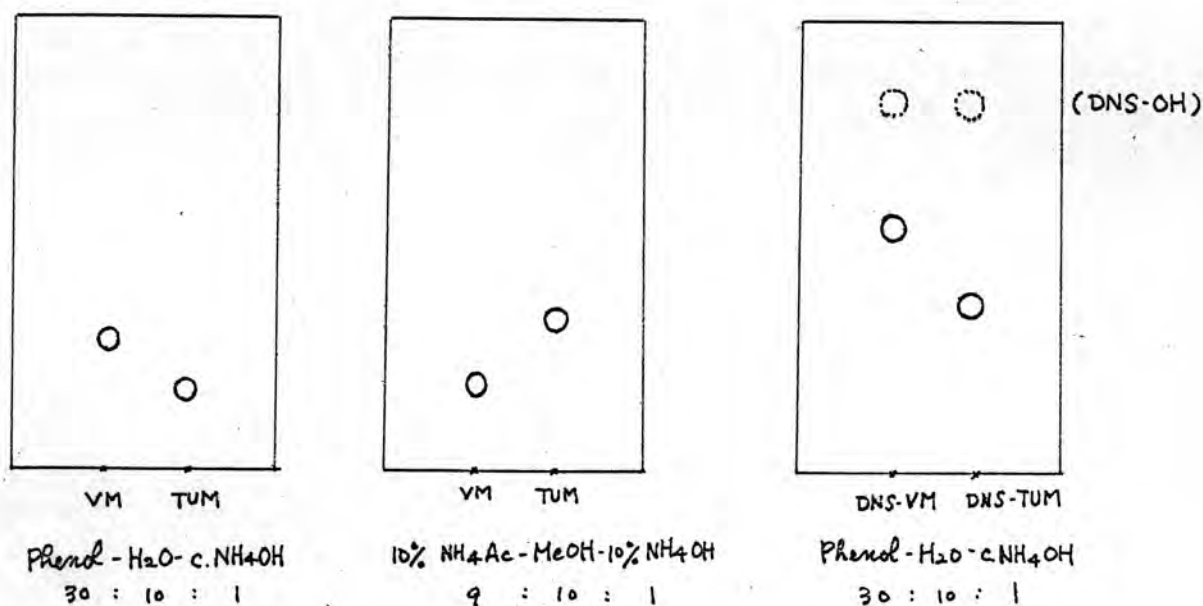


図 1-1-1 capreomycin

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、⁴⁾ そのアミノ酸組成は β -lysine, α, β -diaminopropionic acid, serine, viomycinine*, 3-ureidodehydroalanine** 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。⁵⁾ 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、viomycinine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⁶⁾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章で述べるように真の構成成分は viomycinine ではなくて TUM の場合と共通のデアミノアミノ酸 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た後に述べる構成アミノ酸の構造研究よりVMにおける β -lysineの代りに， γ -hydroxy- β -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- α, β -Diaminopropionic acid, γ -Hydroxy-L- β -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： λ_{max} 268 μ (H_2O)，268.5 μ (0.1N HCl)
285.5 μ (0.1N NaOH)

呈色反応：ニンヒドリン，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，熱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。

-4-

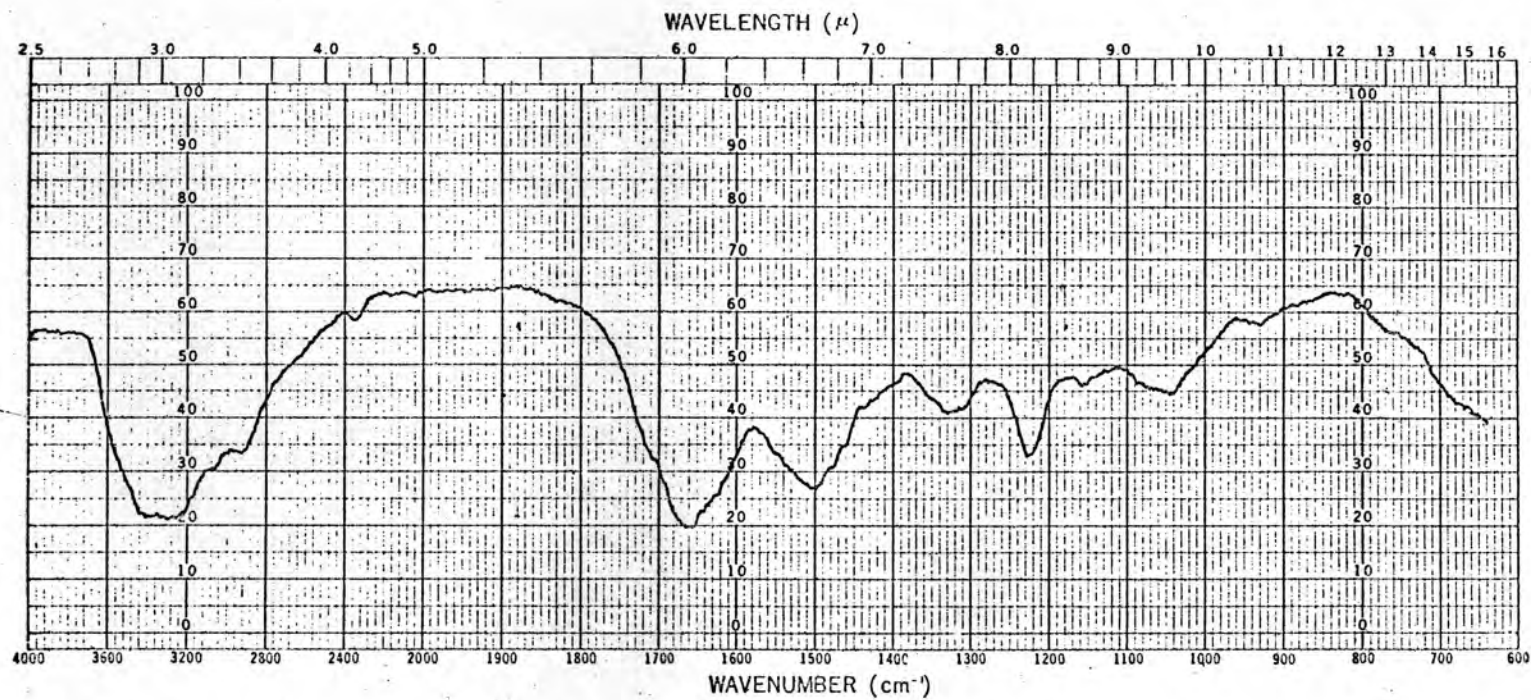


図 1-2-1 Tuberactinomycin 塩酸塩の
赤外線吸収スペクトル (KBr)

(1 - 3) Tuberactinomycin の誘導体 , Methyltuberactinomycin

VM のアシル誘導体として , DNP 誘導体⁵⁾ , 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⁷⁾ , 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 , 純粋な誘導体を得ることは困難であった。

一方 VM の結晶性誘導体として Methylviomycin (Me-VM) (構造未知⁸⁾) があり , 著者もそれに相当する Methyltuberactinomycin (Me-TUM) の調製を試みた。TUM 塩酸塩 (1g) をメタノール (300ml) にけんたぐした後 , 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出来る。このプリズム晶は TLC で明らかに TUM と異なり , TUM に関しては唯一の結晶性誘導体を得られた訳である。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 : $[\alpha]_D^{22} -7.9^\circ (c1, NHCl)$

紫外吸収 : 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

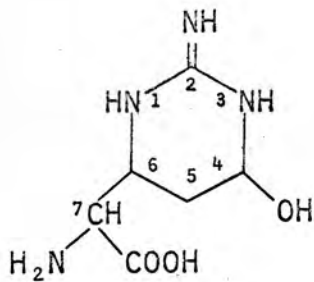
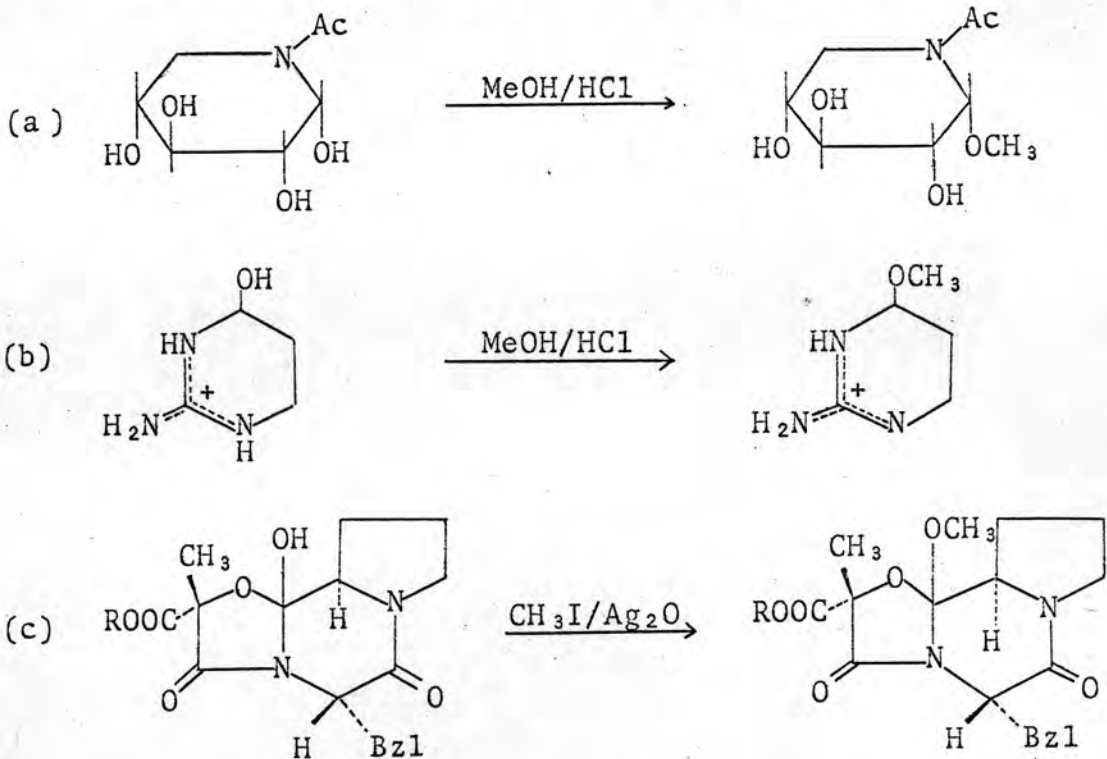


図 1-3-1

晶の重水中での NMR スペクトルにおいて δ
 3.42ppm に $-OCH_3$ 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 (a)⁹⁾。さらに 2-amino-4hydroxy-
 1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (b)¹⁰⁾

や，エルゴタミンの中心骨格 (c)¹¹⁾ 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，さら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。

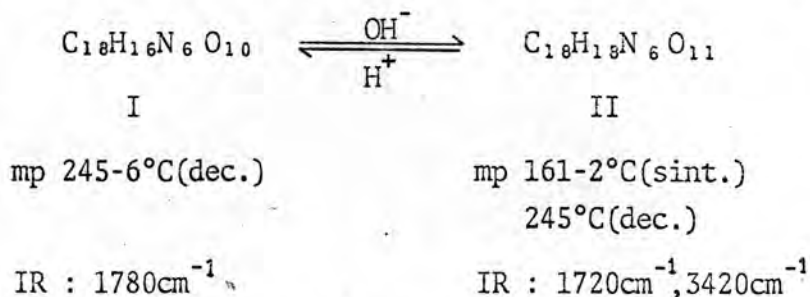
* 3章で詳述

2 章 新オキシアミノ酸 γ -HYDROXY- β -LYSINE の単離とその構造(2-1) 新アミノ酸 γ -hydroxy- β -lysine の単離

Tuberactinomycin (TUM) の構成成分として, 新アミノ酸 γ -Hydroxy- β -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 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 cm^{-1} に -OH, 1720 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。



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 δ -hydroxylysine および γ -hydroxylysine^{*}との比較を行なった。 δ -hydroxylysine は DNP 誘導体として II と比較し、 γ -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っ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 1780cm^{-1} に γ ラクトンの吸収を示す化合物 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ (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口過し、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- β -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 γ -hydroxy- β -lysine (図 2-1-1) と予想した。

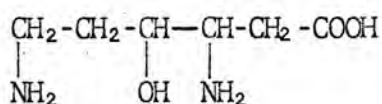


図 2-1-1

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 β -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口紙電気泳動および DNP 化生成物の TLC より DNP- β -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 γ -chloro-lysine⁽¹⁷⁾ 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った。従って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って、過ヨウ素酸酸化後、過マンガン酸酸化を行なった生成物中に、やはりβ-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γ-hydroxy-β-lysineであることが明らかとなった。

(2-2) Iの異性体の単離

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γ-hydroxy-β-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¹³⁾に従い、濃硫酸中で行なった。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 1780cm^{-1} にラク톤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と同じく $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_{10}$ であって、また前述のDNP-γ-hydroxylysine lactoneとも異なるものであった。

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

図 2-2-1, I と IV の IR (次ページ 列掲)

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γ-hydroxy-β-lysineの構造と立体化学に関し、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。

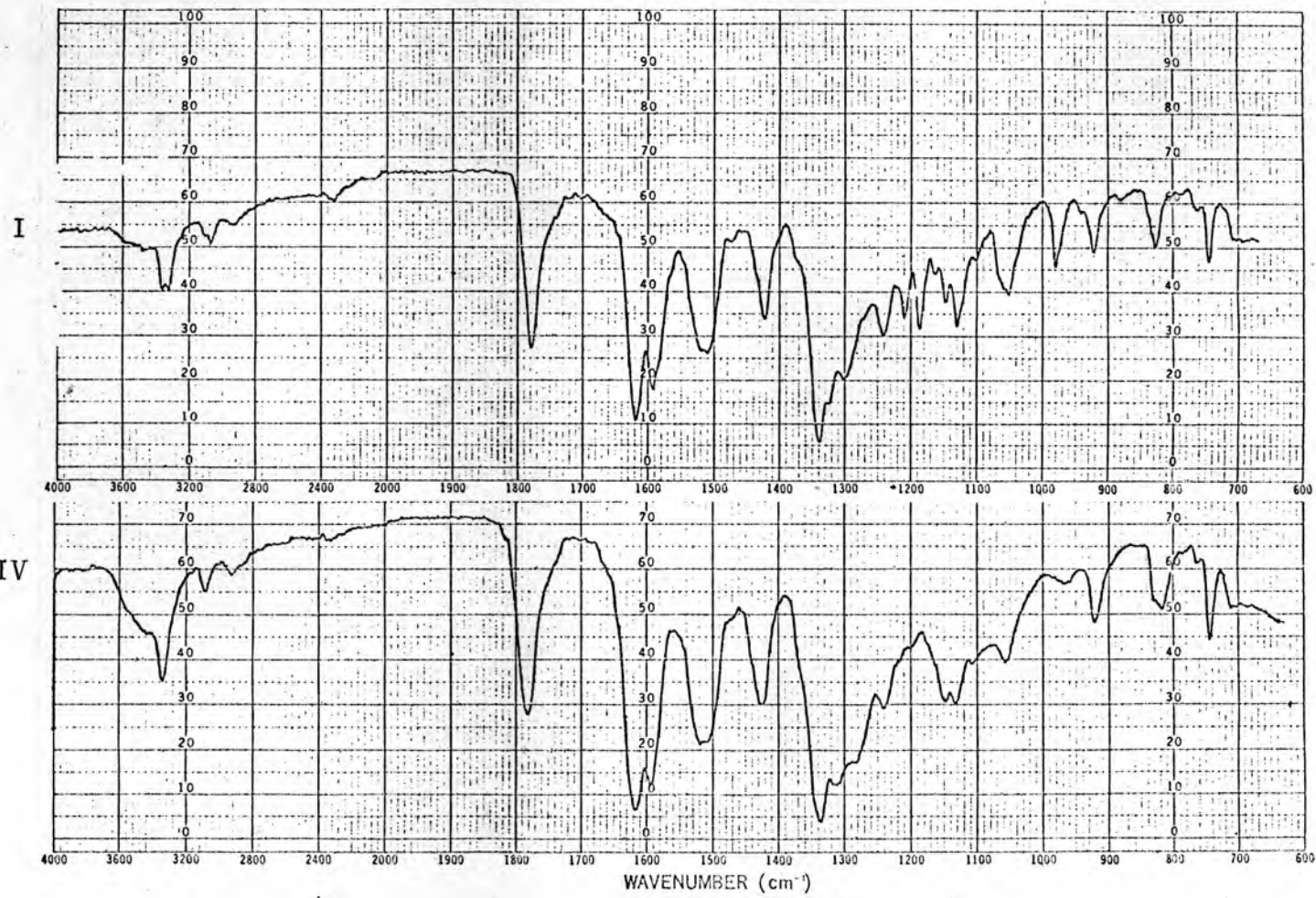


図 2-2-1 I と IV の IR スペクトル (KBr)

(2-3) γ -Hydroxy- β -lysine の立体化学

γ -Hydroxy- β -lysine は γ ラクトン環を形成し易いと考えられ^{*}、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 γ -hydroxy- β -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、一度濃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'-dibenzyloxycarbonyl- γ -hydroxy- β -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 (C₆H₅CH₂OC(=O)NH₂) および N,N'-dibenzyloxycarbonyl- α,β -diaminopropion amide が得られた^{**}。

一方、濃硫酸中で N-O 転位反応^{***}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。このことに関しては (4-3) で説明する。

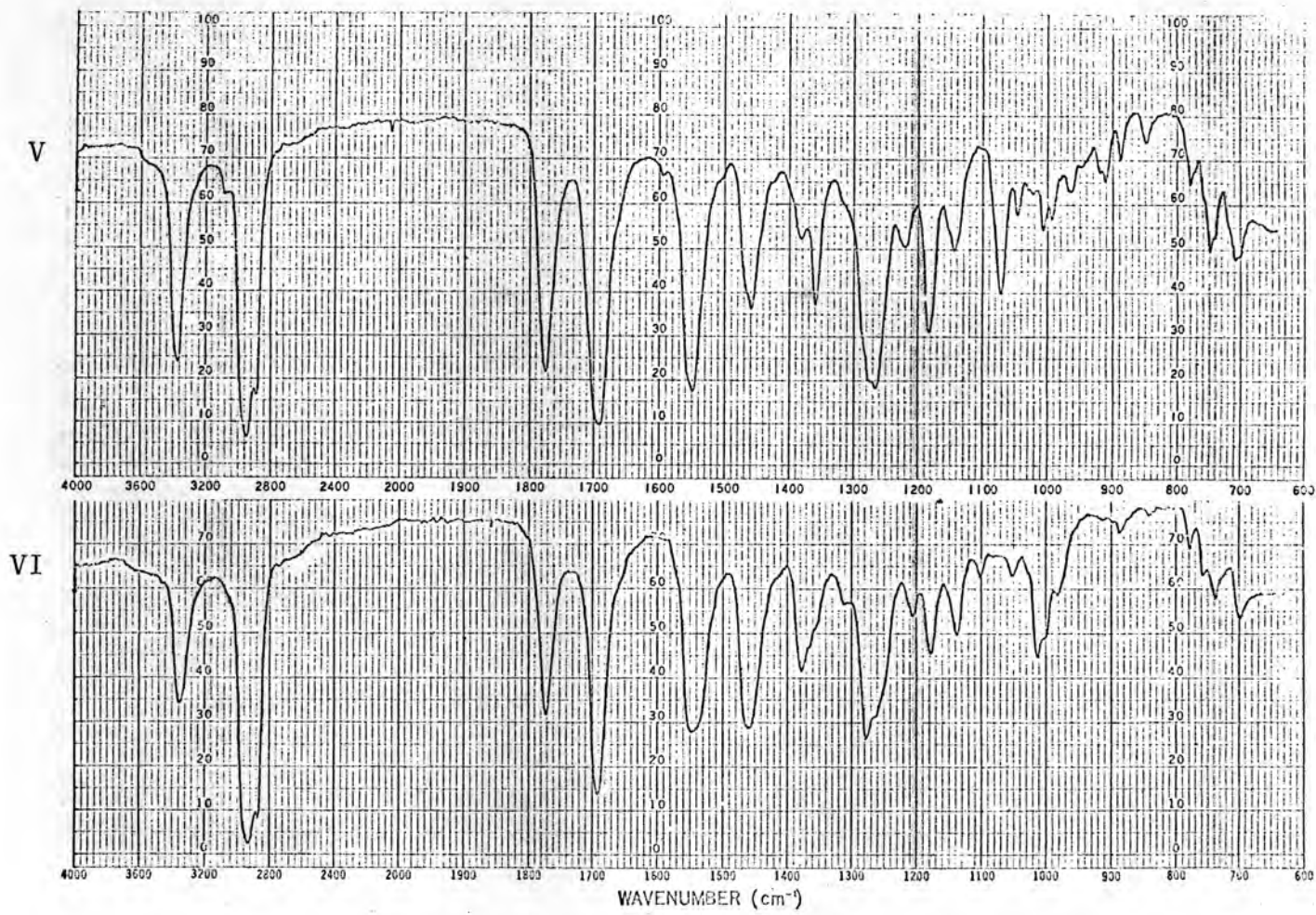


図 2-3-1 V と VI の IR スペクトル (nujol)

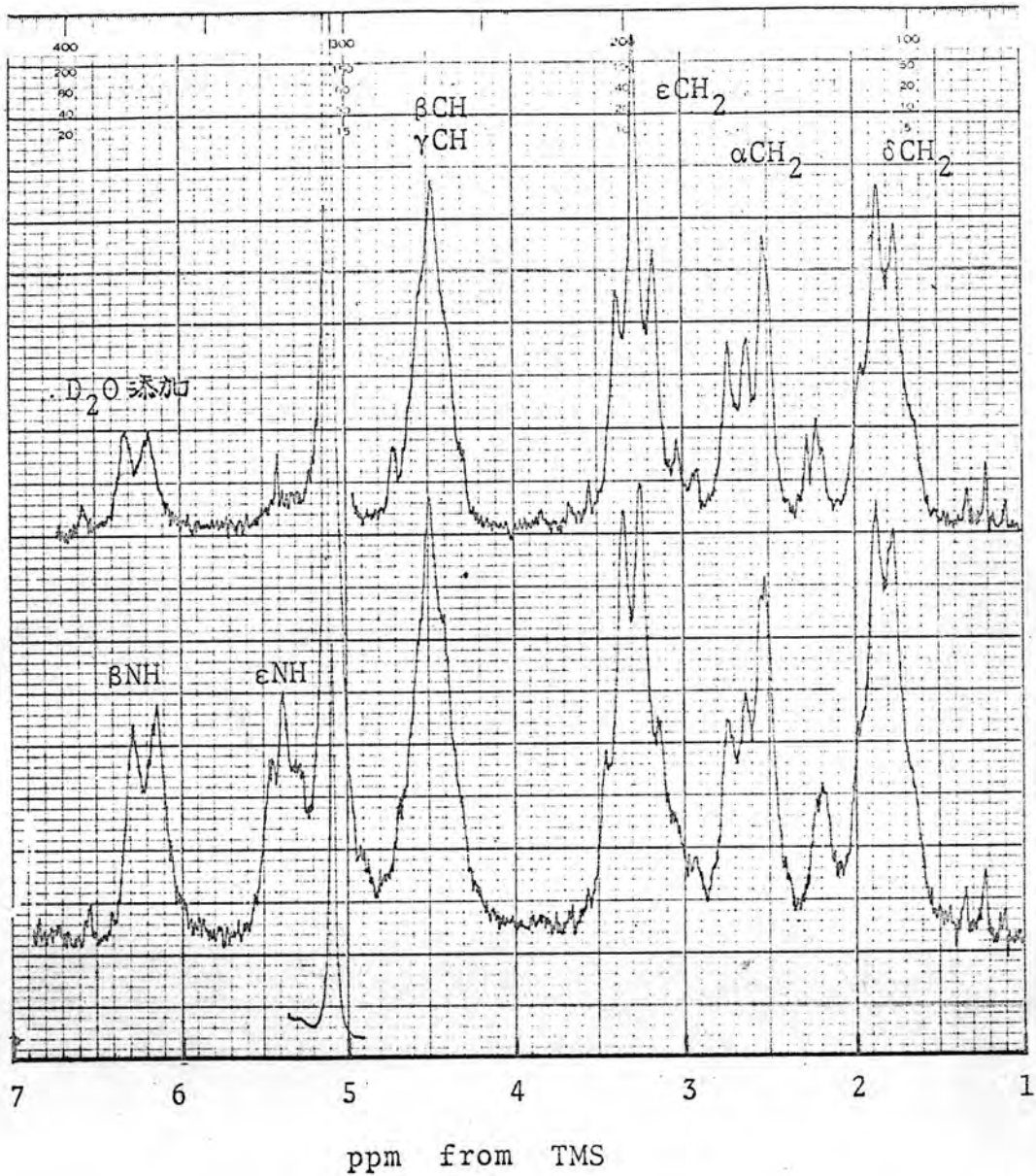
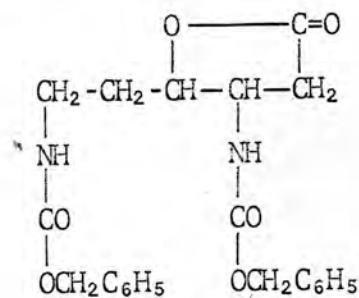


図 2-3-2 V の NMR スペクトル (in CDCl_3)

V の NMR スペクトルは



の構造として、よ

く説明が付き、(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 - 酢酸で脱 Z 化して、それぞれの臭化水素酸塩 VII および VIII を得た。

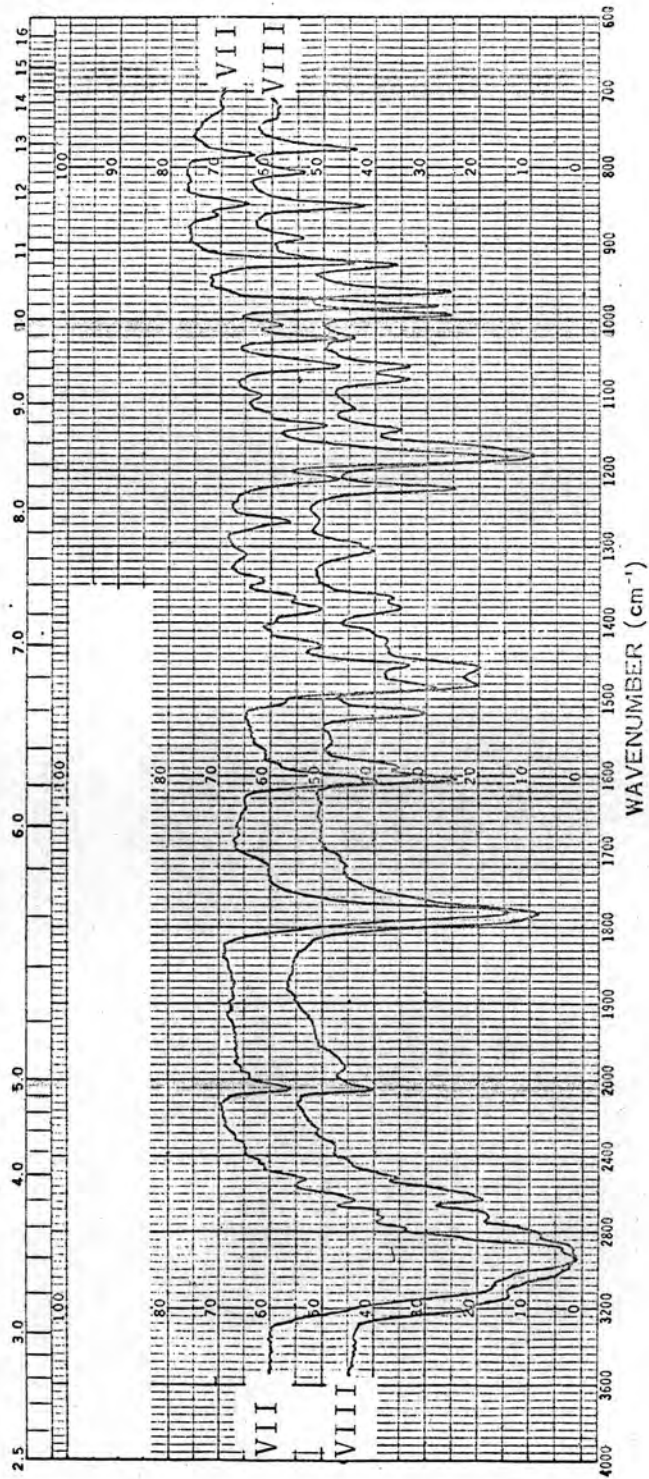
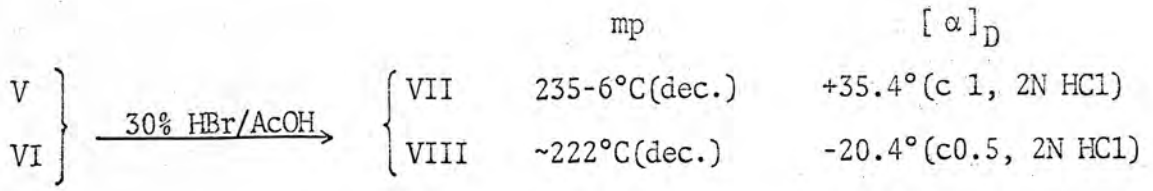
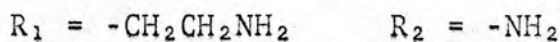
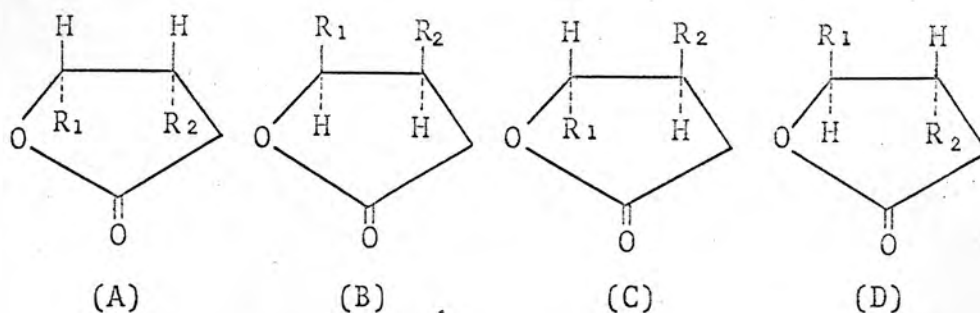


図 2-3-3 VII と VIII の IR スペクトル (nujol)

さて γ -hydroxy- β -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。

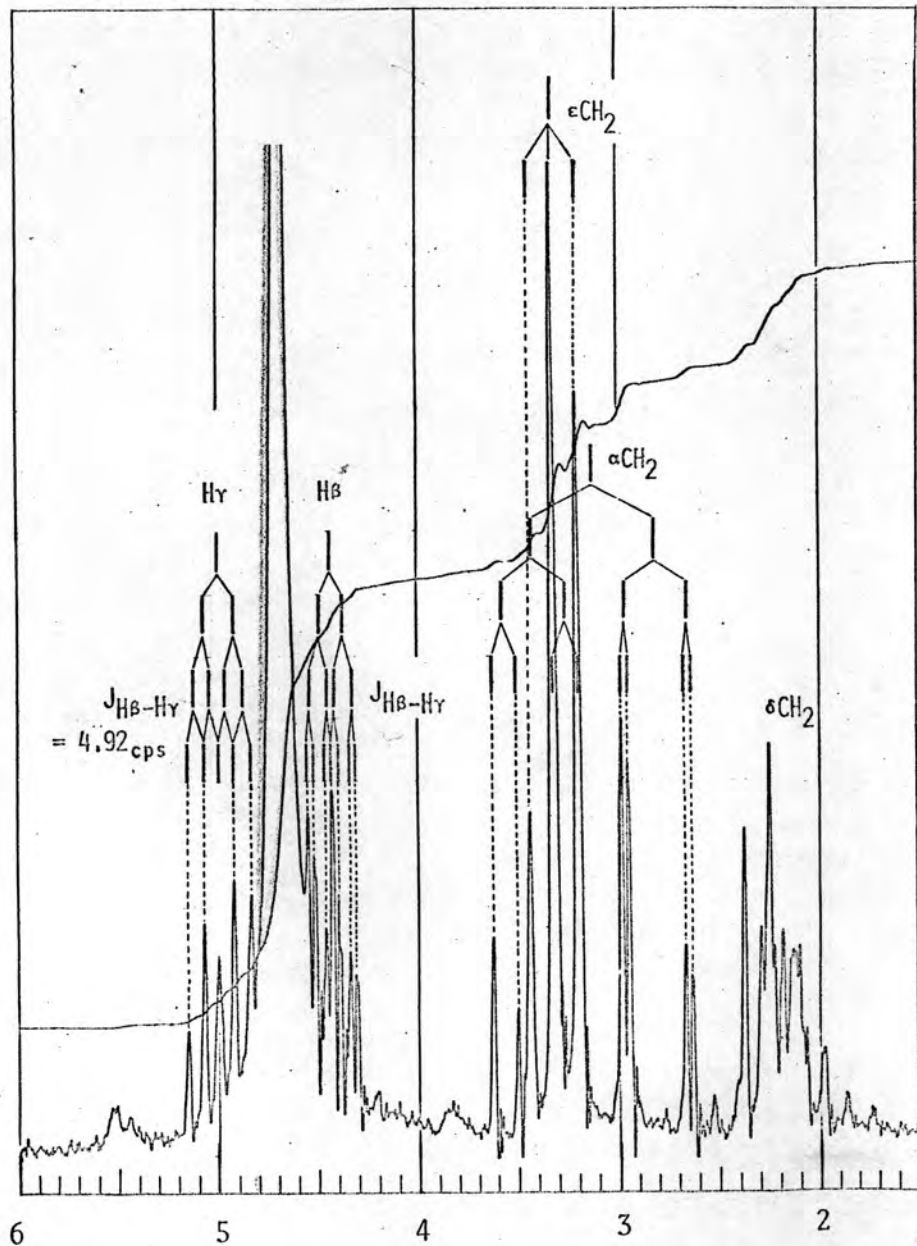


まず最初に NMR の検討を行なった。VII と VIII の重水中心の NMR スペクトル (図 2-3-4) の化学シフトは，次のように帰属することができる。

図 2-3-4 ，次ページに別掲

	VII		VIII	
	δ (ppm)	J (cps)	δ (ppm)	J (cps)
α -CH ₂	3.10	gem=19.0 α - β =2.0, 7.5	3.13	gem=16.65 α - β =3.96, 7.32
β -CH	4.43	β - γ =4.92	4.19	β - γ =3.12
γ -CH	5.00	γ - δ =4.9, 9.8	4.92	γ - δ =4.68, 7.44
δ -CH ₂	2.2	multiplet	2.2	multiplet
ϵ -CH ₂	3.33	δ - ϵ =7.5	3.28	δ - ϵ =7.14

上表より β 水素と γ 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。



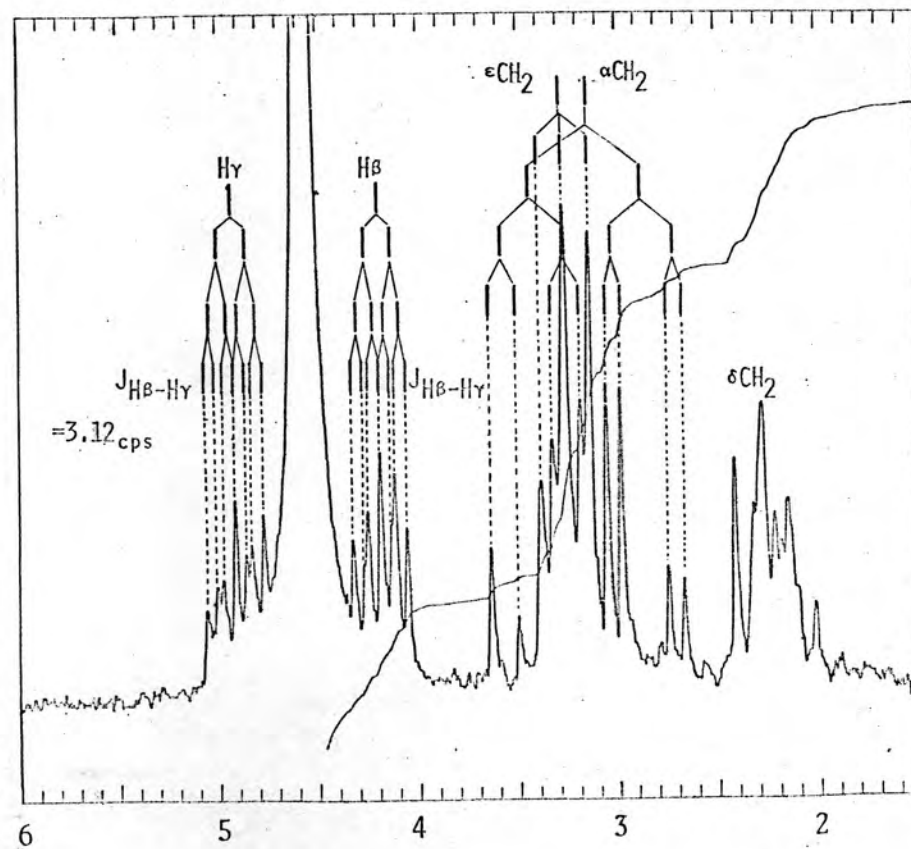
2-3-4 VIIとVIIIのNMRスペクトル

←VII

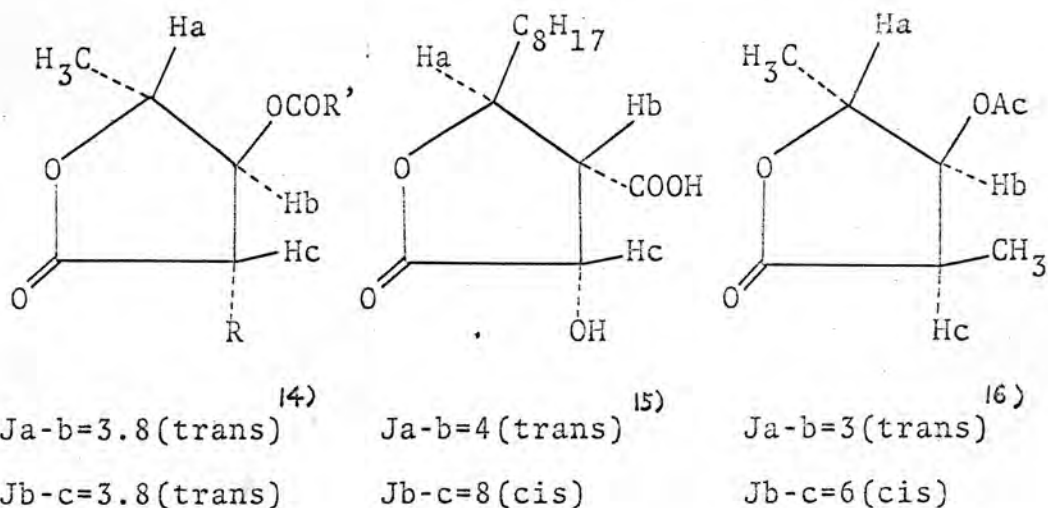
VIII

(in D₂O)

ppm from DSS

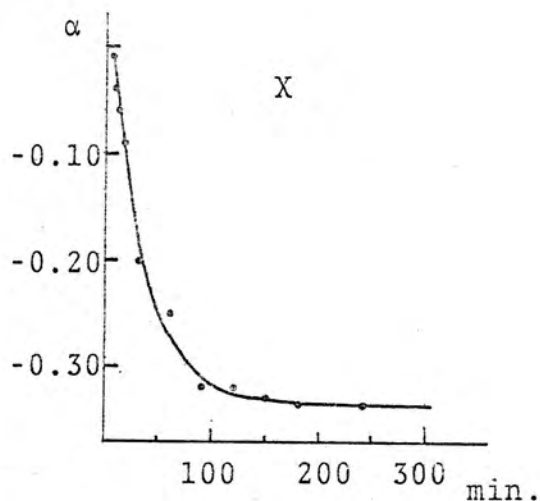
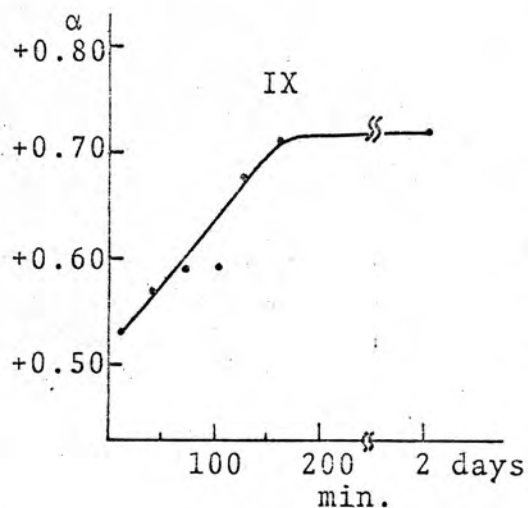


一般に五員環上のプロトン同志の結合定数はKarplusの式にあてはまらないと言われるが、他に環を持たない γ -ラクトンでは $J_{cis} > J_{trans}$ であることが、次のような例から知ることが出来る。



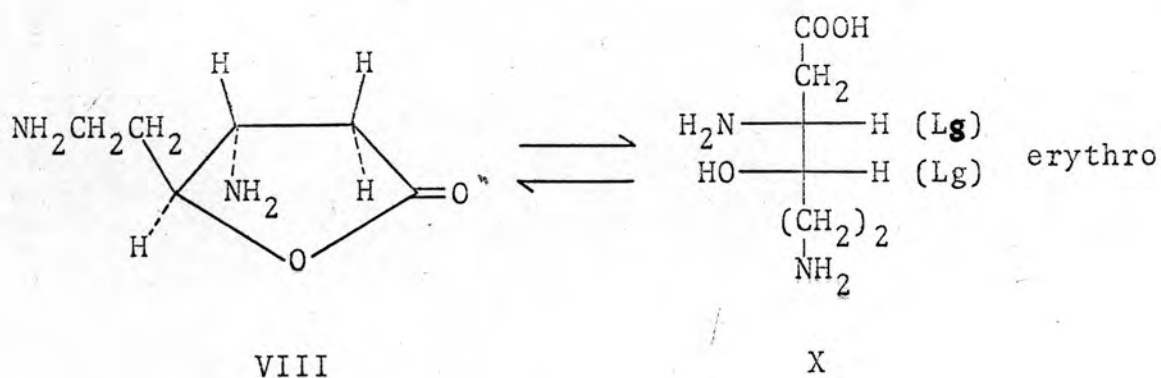
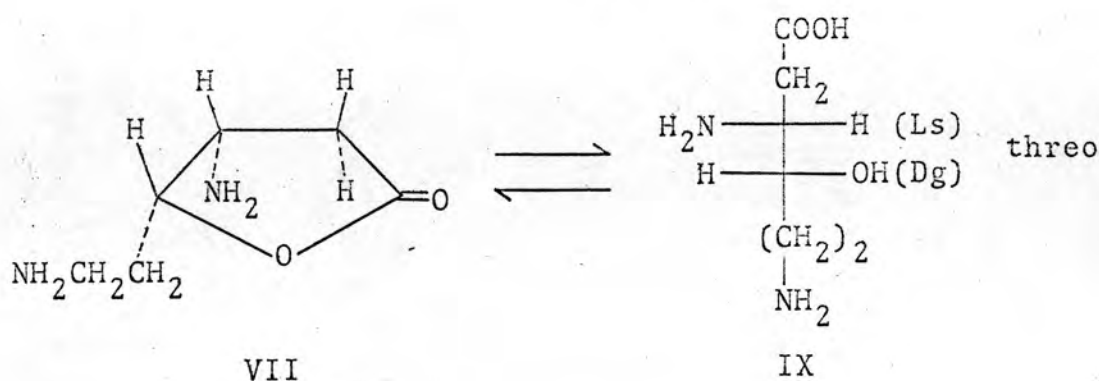
上述のように、VIIとVIIIの相対的な関係がわかったので、 β か γ 炭素のうちいずれかの立体配置が決まれば、両者の立体構造が決定される。最初に β 炭素の配置の決定を試みた。すなわち、 γ 位の水酸基を還元して β -lysineに導くことを試みたが、これはすでに(2-1)で述べたように成功しなかった。次に、 γ 炭素の配置の決定を試みた。これは、泉屋らが γ -hydroxylysineの立体化学を論ずるにあたり、五員環ラクトンにもHudsonのラクトン則が適用し得ることを確かめている¹⁷⁾。そこで、この γ -hydroxy- β -lysineの場合にも同じように適用し得るものと考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

VIIとVIIIを酢酸銀でケン化して、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は結晶化し難く、結晶として取り出すことはできなかった。そこで、口紙電気泳動および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 α の経時変化を測定し、変旋光の方向を決定した。



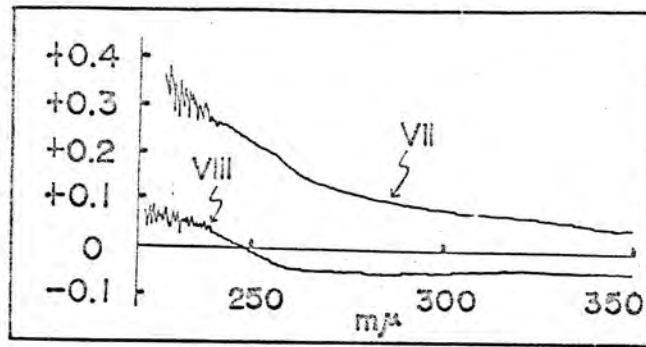
この結果 α^{VII} α^{IX} が正, α^{VIII} α^{X} が負の相対差を示すことから, VII (IX) の γ 炭素は D_g , VIII (X) の γ 炭素は L_g 配置であることが明らかとなった。

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



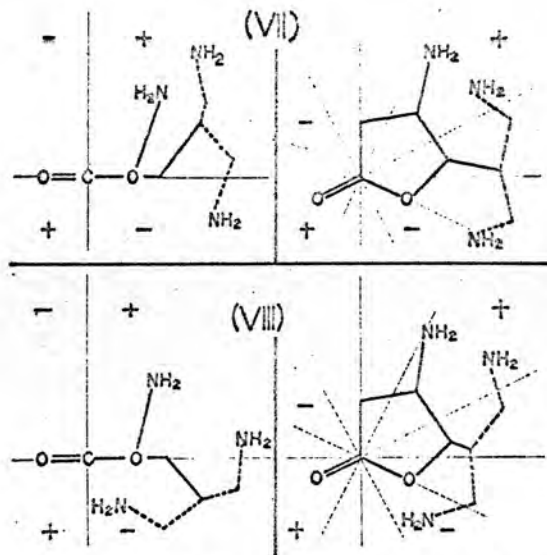
すなわち, IX は threo- γ -hydroxy-L- β -lysine であり, VII はそのラクトン, X は erythro- γ -hydroxy-L- β -lysine であり, VIII はそのラクトンである。

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曲線は正の単純曲線を与える。



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β位のNH₂の正の寄与よりも弱く，またδ位での自由回転による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β炭素がD型の分子を考えれば，同じような理由からいず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るとよいので，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*, α, β -diaminopropionic acid, *tuberactidine* (*viomycin* との混合物として), そして最後に *threo- γ -hydroxy- β -lysine* が遊離してくる。

threo- γ -hydroxy- β -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- γ -hydroxy- β -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閉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閉環しやすいことに気付いた。すなわち, VII および VIII のラクトンの閉環速度は, 濃塩酸中, 次にアルカリ溶液中ではやく, 希酸中ではやや遅く, 中性でラクトン環はもっとも安定で閉環はかなり遅い。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おい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 \rightarrow (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, 相対差を求めた訳からその結果の解釈に変わりはない。

今後, *γ -hydroxy- β -lysine* に関する種々の測定を行なう場合, この閉環のしやすさを考慮して, 中性溶液中か希酸溶液中において測定しなければならぬと考えている。

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時間機械的にかき混ぜた後、さらに5gのDNFBを加えて20時間かき混ぜを続けた。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口過後、口液を濃縮してアセトンを除去後、生じた沈殿を口過して、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 10.2g。

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- γ -hydroxy-L- β -lysine lactone (I)

7.0gのDNP-TUMを350ccの6N塩酸にけんたくし、湯浴上で壺流下に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°(c0.5, 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%

C₁₈H₁₆N₆O₁₀としての計算値：C, 45.38；H, 3.39；N, 17.62%

* N,N'-di-DNP-threo- γ -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

λ_{\max} 356m μ ， A : 0.303， c: 0.00424(mg/cc)

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

一般に DNP アミノ酸の ϵ_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。

X \ ϵ_0	15×10^3	16×10^3	17×10^3	18×10^3
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当でない。
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톤のみに由来すると考えられるので、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- γ -hydroxy-L- β -lysine (II)

DNP-lactone(I) 600mg を 6cc の 1N 水酸化ナトリウムにけんたぐし 90°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 161-2°C で半融、245°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 %

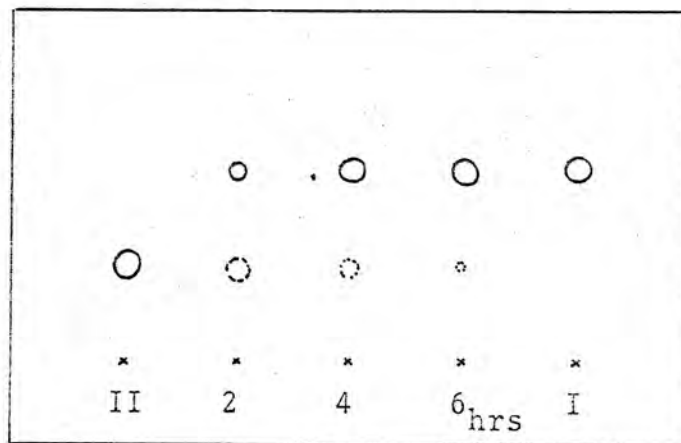
アセトン-水から再結晶すると $1/2 \cdot \text{CH}_3\text{COCH}_3$ の結晶溶媒を持つ。

分析値 : C, 44.84 ; H, 4.21 ; N, 16.14 %

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_{11} \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{COCH}_3$

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 ; CHCl_3 -MeOH-AcOH(38:2:0.4)

4. N,N'-di-DNP-threo- γ -hydroxy-L-lysine lactone

erythro- γ -chloro-L-lysine* 20mg を 1N 水酸化ナトリウム 2cc に溶かし、室温で一晩放置した。放置後, DNFB 50mg をアセトン 1cc に溶かして加へ, 室温で一晩放置した。次いで, 1N 塩酸 2cc 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, 黄色プリズム晶を得た。融点 $195-7^\circ\text{C}(\text{dec.})$ 赤外線吸収スペクトルにおいて 1780cm^{-1} に γ -ラク톤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. N,N'-dibenzoyl- γ -hydroxy- β -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テルで抽出し、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 1780cm^{-1} に γ -ラク톤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- γ -hydroxy-L- β -lysine lactone (IV)

TUM 塩酸塩 1g 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、生じたゲ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、最後に吸引口を通して口取し、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 ($15-20^{\circ}\text{C}$) 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）を口取し、口液を酢酸エテルで抽出した。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。 $[\alpha]_D^{22} -177.8^{\circ}$ ($c0.5$, 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'-dibenzoyloxycarbonyl- α,β -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。室温で一晩攪拌した後、生成した油状物を酢酸エテルで抽出し、アルカリ、酸、水で充分洗い、無水炭酸ナトリウム上で乾燥した。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) で洗うと粉末となった。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、結晶を含む油状物を得られたので、少量の酢酸エテ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*。この結晶を先に得た粉末と一緒に酢酸エテ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 α,β -diaminopropionic acid を与えることから N,N'-dibenzoyloxycarbonyl- α,β -diaminopropion amide (di-Z-dap amide) であることがわかった。

しかし、TUM の加水分解物の口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、口紙電気泳動では γ -hydroxy- β -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、このことに関して (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'-dibenzyloxycarbonyl-threo- γ -hydroxy-L- β -lysine lactone(V)

上記(実験7)の少量の酢酸エチルを含むエーテル溶液を再び濃縮して約67g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。酢酸エチル-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($C_6H_5CH_2OC(=O)NH_2$)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'-dibenzyloxycarbonyl-threo- γ -hydroxy- β -lysine lactone (V) の粗結晶 5.0g が得られた。酢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。酢酸エチルより再結晶して 1.8g の針状結晶を得た。

9. N,N'-dibenzyloxycarbonyl-erythro- γ -hydroxy-L- β -lysine lactone(VI)

TUM 塩酸塩 5.0g を特級濃硫酸 140cc に溶かし、封管中で五通筒放置した後、ドライアイスで冷却したアセトン中に注入し、生じたゲ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。一夜乾燥させた乾位生成物を 70 cc 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 25 cc 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 500 cc の酢酸エチルで抽出し、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上で乾燥した。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、エーテル洗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 $96.5 \sim 7.5^{\circ}\text{C}$ 。

分析値 : C, 64.07 ; H, 5.87 ; N, 6.81 %

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$ としての計算値 : C, 64.06 ; H, 5.87 ; N, 6.79 %

10. threo- γ -Hydroxy-L- β -lysine lactone dihydrobromide (VII)

1.0 g の V に 5 g 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 740 mg。融点 $233 \sim 4^{\circ}\text{C}$ (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 $235 \sim 6^{\circ}\text{C}$ (dec.)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{10} +35.4^{\circ}$ (c 1, 2N HCl)。

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

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HBr}$ としての計算値 : C, 23.54; H, 4.61; N, 9.16; Br, 52.23%

11. erythro- γ -Hydroxy-L- β -lysine lactone dihydrobromide (VIII)

280 mg の VI に 2 g 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 100 mg のプリズム晶を得た。融点 $\sim 222^{\circ}\text{C}$ (dec.)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -20.4^{\circ}$ (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. オキニ酸 IX と X の調製

ラクトンニ臭化水素酸塩 VII 200 mg を 5 cc 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°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°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 ではほぼ単一スポットを手へ、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。

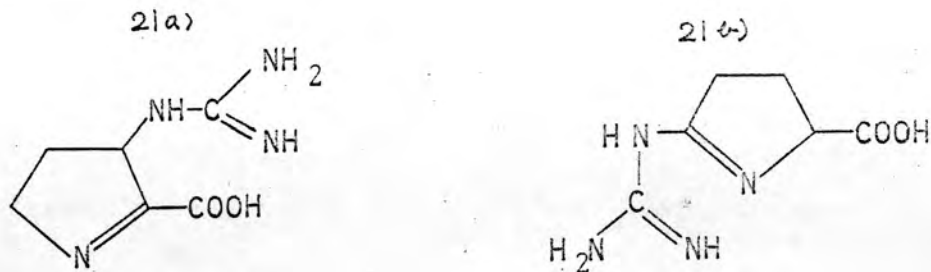
同様に VIII も酢酸銀でケン化したが、やはり結晶としては得られなかった。

3 章 グアニジノアミノ酸の構造

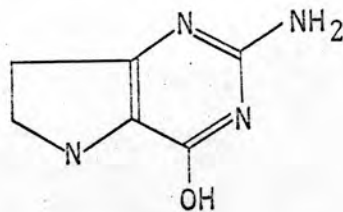
(3-1) 新アミノ酸 tuberactidine の単離と構造決定²⁰⁾

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²¹⁾ および Johnson ら^{5a)} 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。

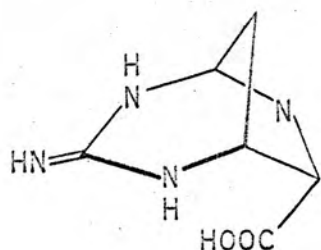
Dyer らの式



Johnson らの式



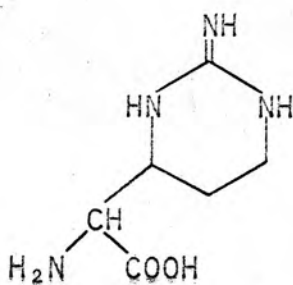
しかし, 1968 年に Dyer らにより, viomycidine 臭化水素酸塩の X 線結晶構造解析により, 従来の推定式とは異なる絶対構造が決定された。²²⁾ (図 3-1-1) その後 菟田らも X 線解析により, 同じ結果を得たと報告している。²³⁾



viomycin
2,4,6-triaza-3-
iminobicyclo[3,2,1]octane-
7-carboxylic acid

図 3-1-1

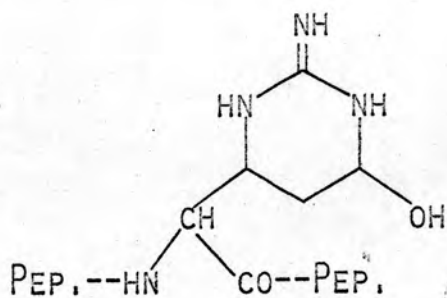
また Capreomycin (CM) は坂口反応陰性の物質で、グアニジノアミノ酸として capreomycinide を有することが Herr らによって明らかにされた。^{5c, 24)}



capreomycin
 α (2-iminohexahydro-4-
pyrimidinyl)glycin

図 3-1-2

この二種のグ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、viomycin がそのままの形で VM 中に存在するとは考えられず 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、²⁵⁾ 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。



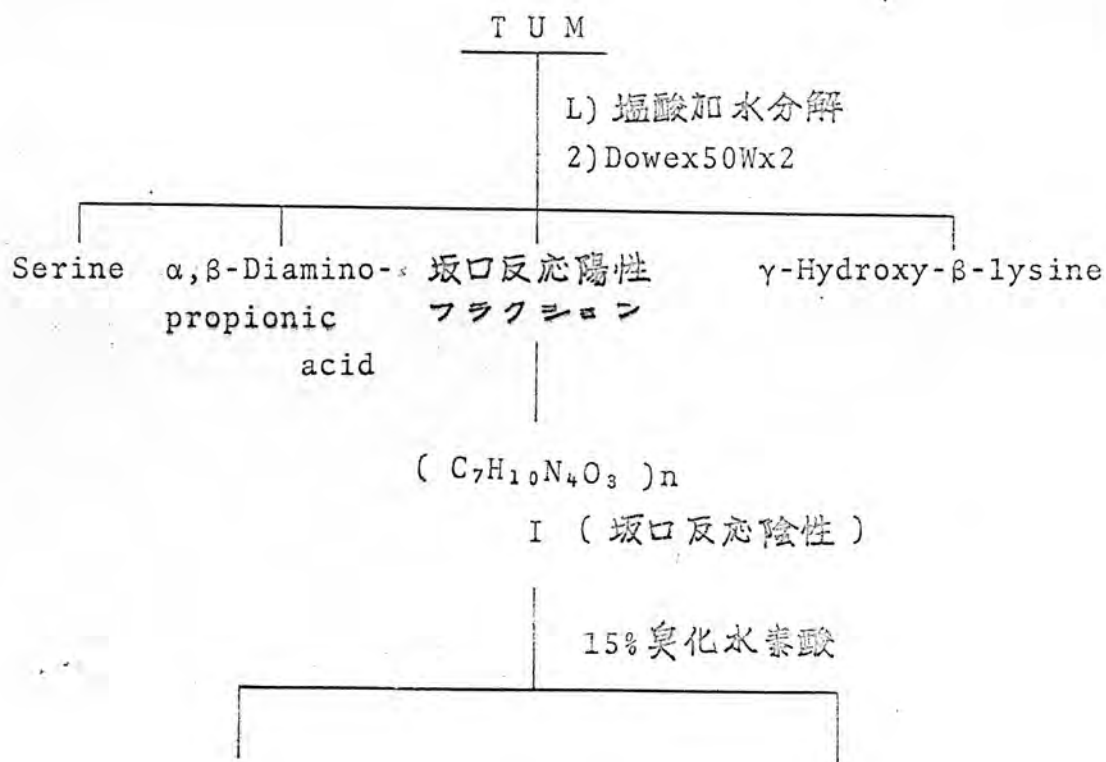
(A)

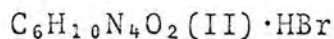
図 3-1-3

しかし、着者は TUM より A に相当するグアニジノアミノ酸 (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 viomycinidine (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ア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 $\sim 245^\circ C$ (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% 臭化水素酸に溶かし、 $50^\circ C$ で処理すると、二種のグアニジノアミノ酸 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。

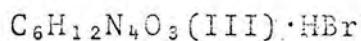




mp 210°C(dec.)

$[\alpha]_D^{13} - 89.1^\circ (c0.5, H_2O)$

ニンヒドリン反応陽性
坂口反応陰性

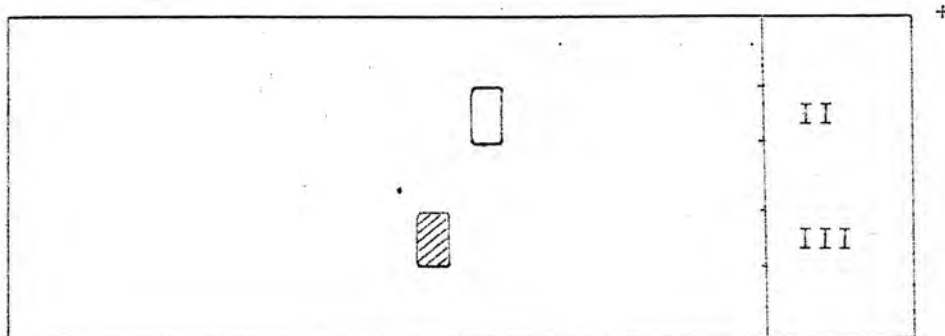


mp 182°C(dec.)

$[\alpha]_D^{15} - 25.8^\circ (c0.5, H_2O)$

ニンヒドリン, 坂口反応
ともに陽性

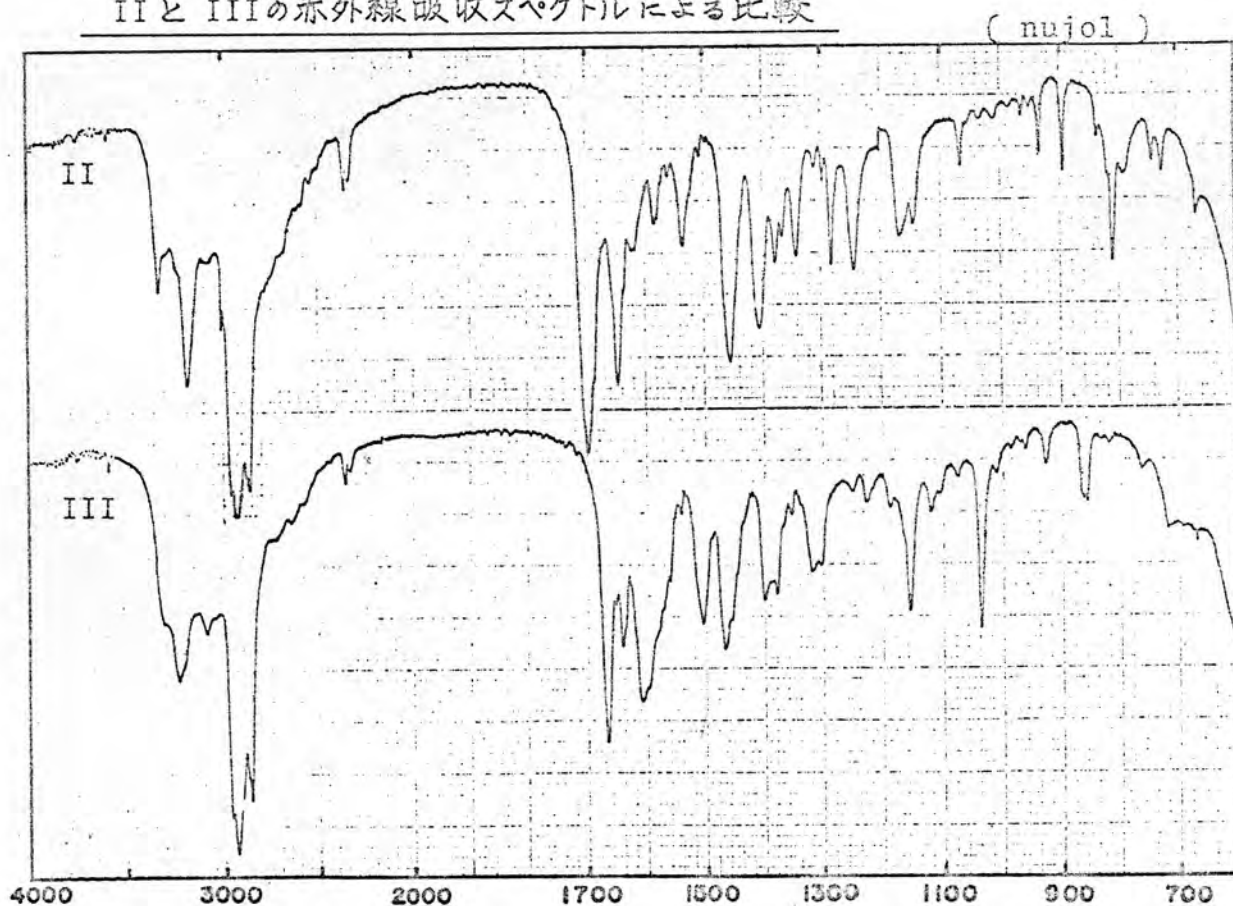
II と III の口紙電気泳動による比較



pyridine- $CH_3COOH-H_2O(30:4:966)$, 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



II の構造

II は種々の点で viomycinine 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	viomycinine
塩酸塩として	mp	219°C(dec.)	200-4°C ²⁶⁾ , 200-5°C(dec.) ²⁷⁾
	[α] _D	-89°(c0.5, H ₂ O) -32°(c0.5, N HCl)	-74°(c 1, H ₂ O) ²⁷⁾ -78°(c1.78, H ₂ O) ^{21b)} -19°(c 1, 6N HCl) ²⁷⁾
	NMR(D ₂ O)	2.47(2H, m)	2.57(2H, m) ^{21b)}
	ppm	4.50(1H, m) 5.51(1H, m)	4.62(2H, m) 5.63(1H, m)
臭化水素酸塩として	mp	210°C(dec.)	202 - 4°C(dec.) ²³
	X-ray analysis	C222 ₁ (orthorhombic) a= 9.37 Å b=12.49 c=15.41 Z=8	C222 ₁ (orthorhombic) ²² 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 viomycinine 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 viomycinine 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ゼンベルグ写真から、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。

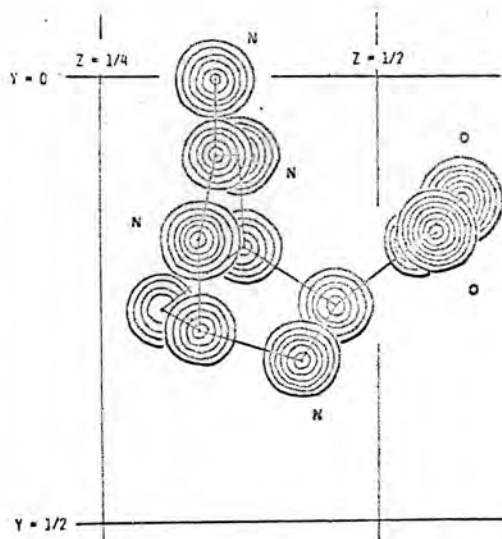
に属し、格子定数は $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $a=9.37\text{\AA}$, $b=12.49\text{\AA}$, $c=15.41\text{\AA}$ であることが明らかとなった。そしてワイゼンベルグ写真の消滅則より $C222_1$ の空間群, $Z=8$, $\rho_c=1.865$ であることが決定された。

次に a 軸の 0-6 層線, b 軸の 0-2 層線までを, $\text{CuK}\alpha$ 線 (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ゼンベルグ写真を撮り, 目視法 (visually 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 (Lp) 補正とスポットの補正を行なった。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ソン合成を行ない, 臭素の位置を決め, この位置をもとに $F(hkl)$ の計算と同時に $\alpha(hkl)$ 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 $F_o(hkl)$ と $\alpha(hkl)$ 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% になったところでフーリエ合成を行なった。

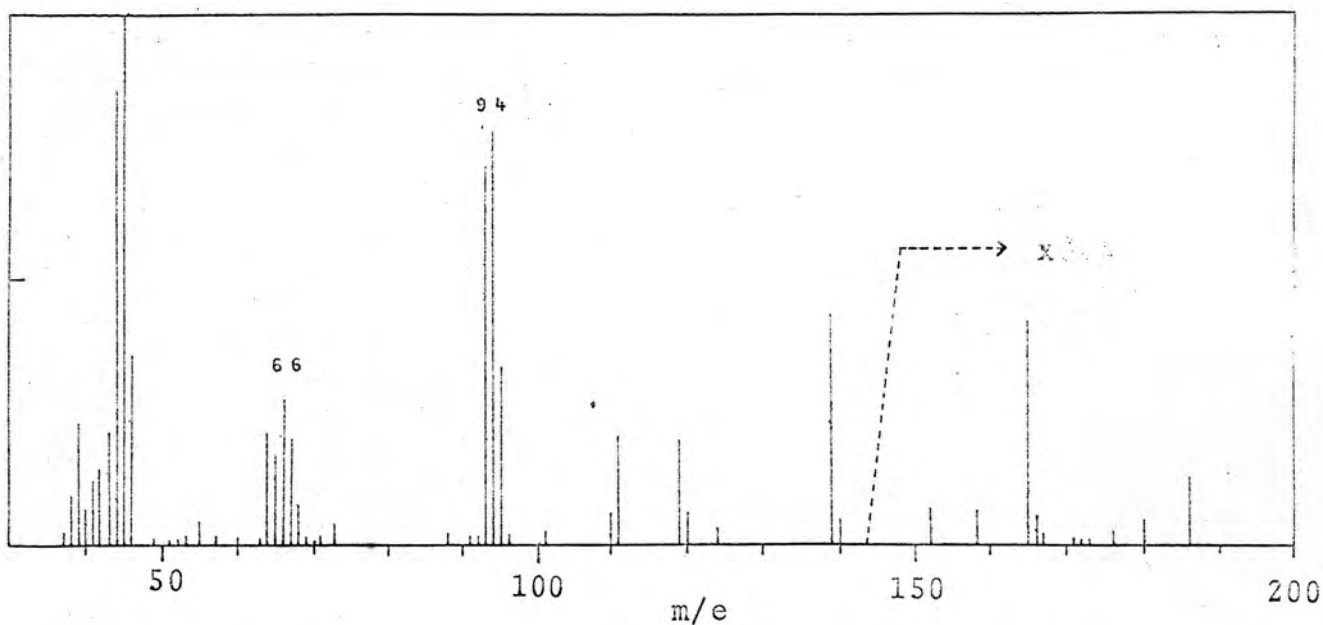
絶対配置は $\text{MoK}\alpha$ 線を使った Diffractometer で hkl と $\bar{h}\bar{k}\bar{l}$ の反射強度を測定し, 計算値と比較して決定した。これは Vijvoet の方法で異常分散効果を利用したものである。こうして得られた電子密度分布を次に示す。

II (=viomycinidene)
HBr 塩の電子密度分布

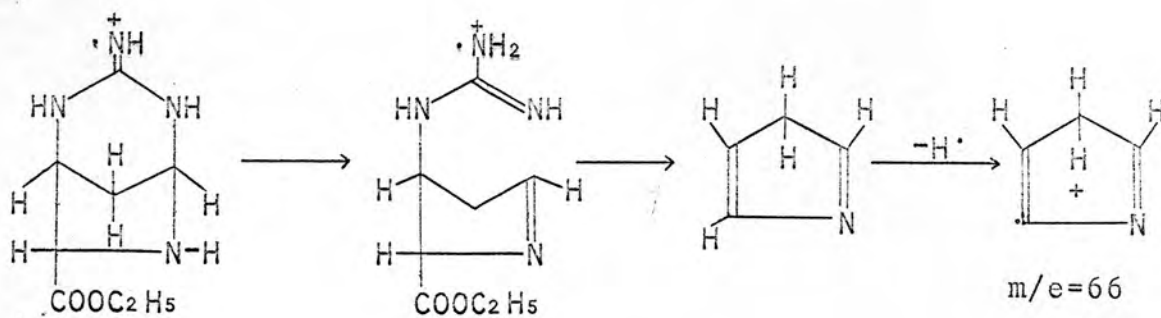
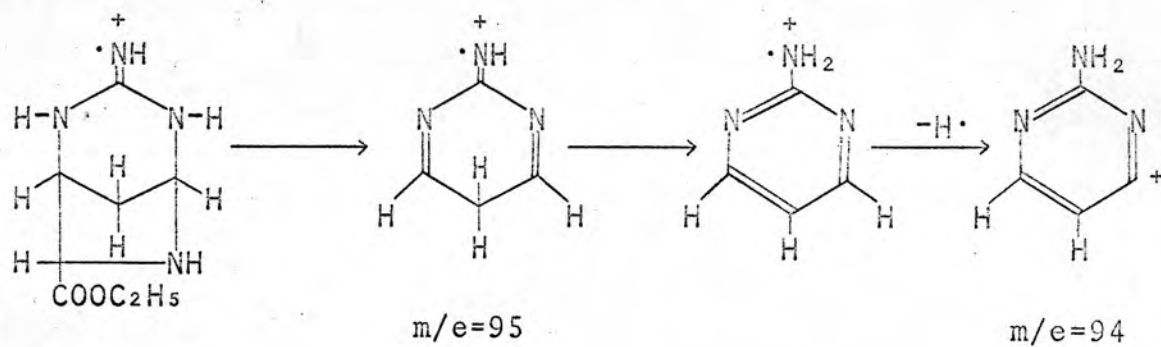


次に常法通り，IIをエチルエステルとして，そのマススペクトルを測定した。

II のマススペクトル

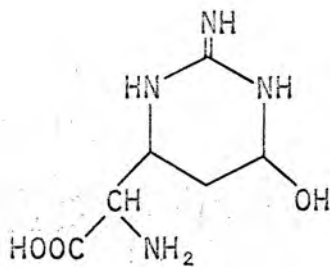


スペクトルにおいて，分子ピークは現われない。注目すべきピークは $m/e=94$ と 66 であり，このイオン生成は次のように考えられる。

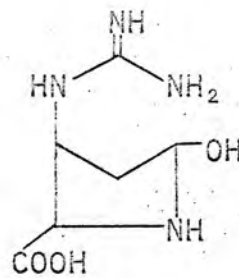


IIIの構造

IIIは $C_6H_{12}N_4O_3$ の分子式を有し、ニンヒドリン、坂口反応ともに陽性である。臭化水素酸塩の融点は $182^\circ C(\text{dec.})$ で $[\alpha]_D^{13} -25.8^\circ (c0.5, H_2O)$ である。NMRスペクトル(後述)より $\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ | & | & | & | \\ \text{---C---} & \text{---C---} & \text{---C---} & \text{---C---} \\ | & | & | & | \\ \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \end{array}$ 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、シグナルの分裂および結合定数は 3-1-4 図のような立体配座の場合に、

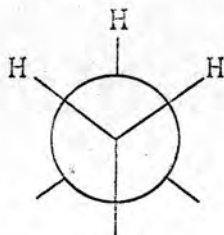
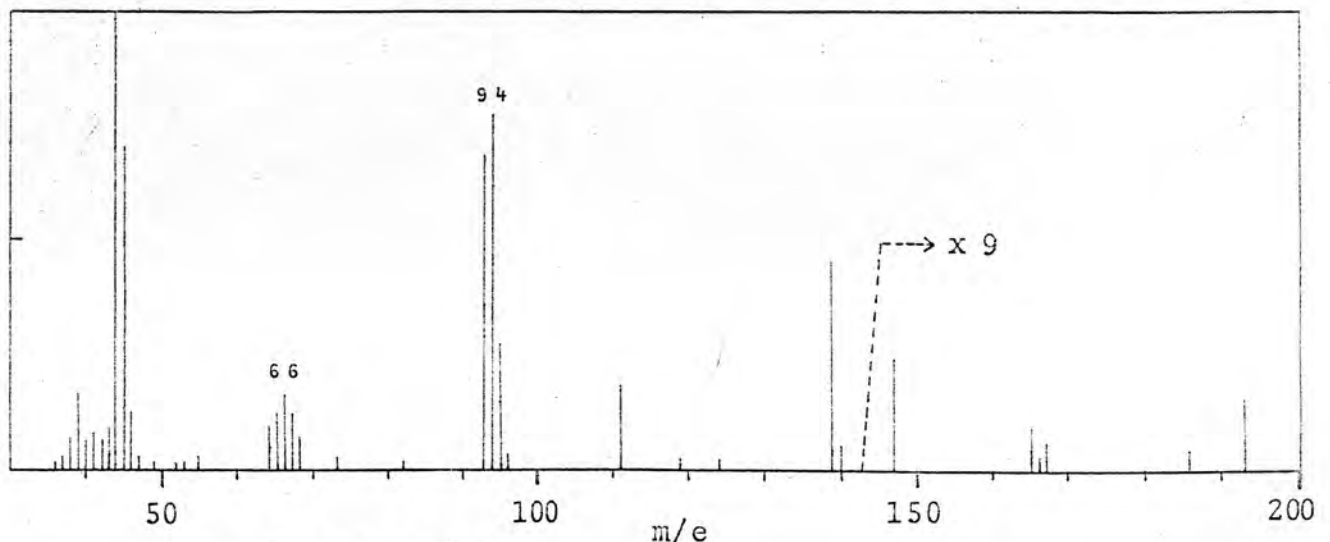


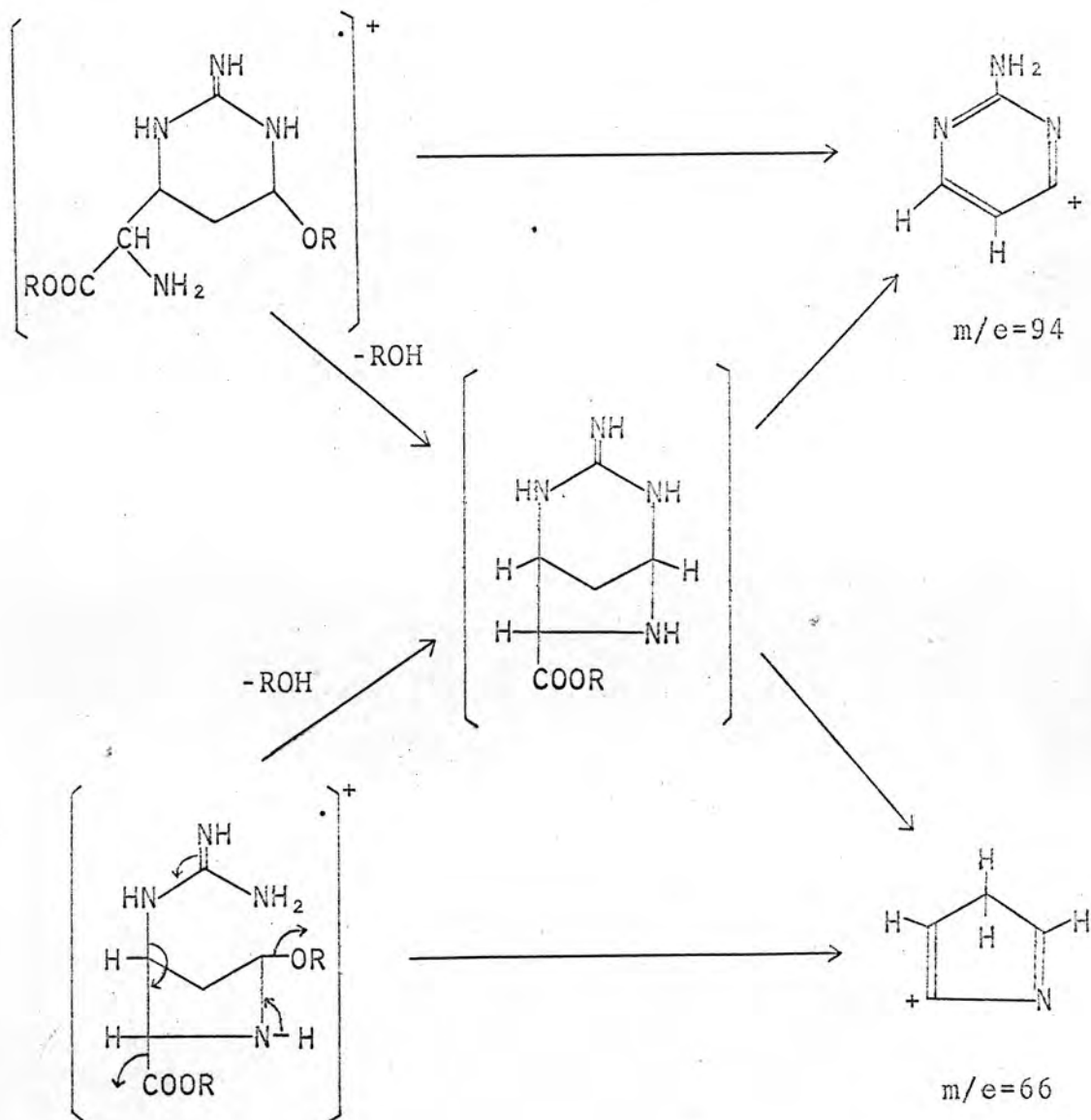
図 3-1-4

最も説明が付きやすいことと、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か(図 3-1-5)、このスペクトルにおいて $m/e=66$ と 94 のピークの比率に注目すると、

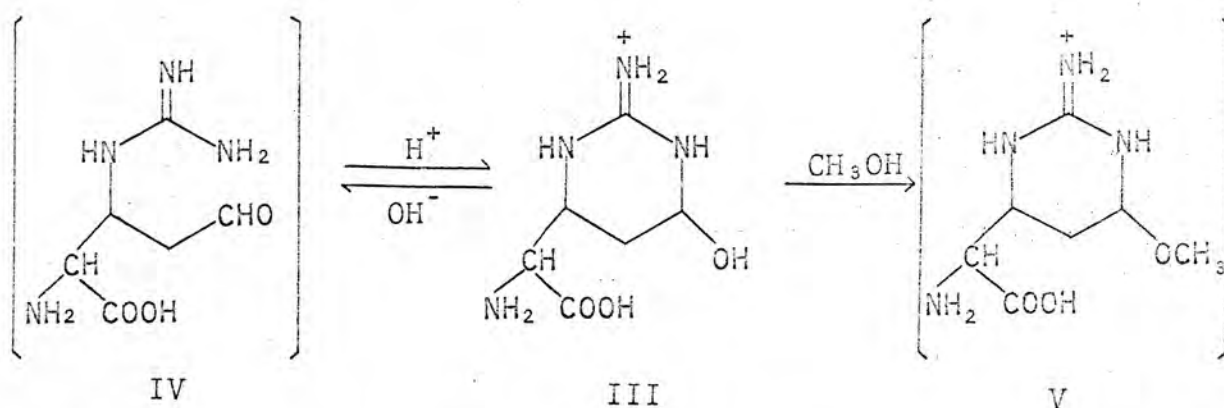


(図 3-1-5)

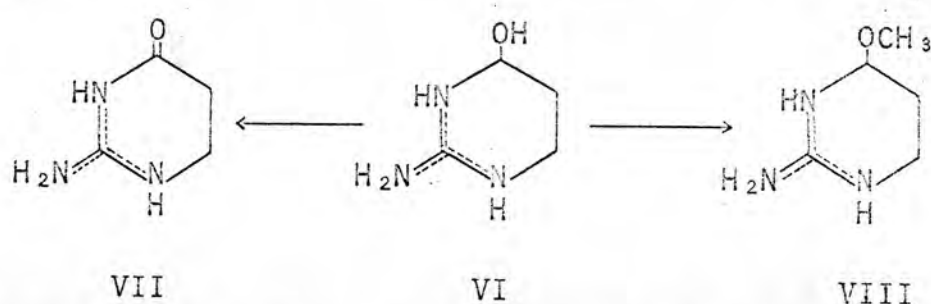
前述の II においては 1:2.7 であったが III においては 1:4.7 となっており, III において $m/e=94$ のピークが相対的に増大している。もし III が五員環構造の B 式であれば, この関係は逆になり $m/e=66$ が相対的に増大してよいはずである。この事実は III に対して A 式の六員環構造を支持するものである。



さらに六員環構造の正しいことは, 簡単な化学的方法によっても確かめられた。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 $-\text{OCH}_3$ 化してこの平衡が進まなくなるようにすれば，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。

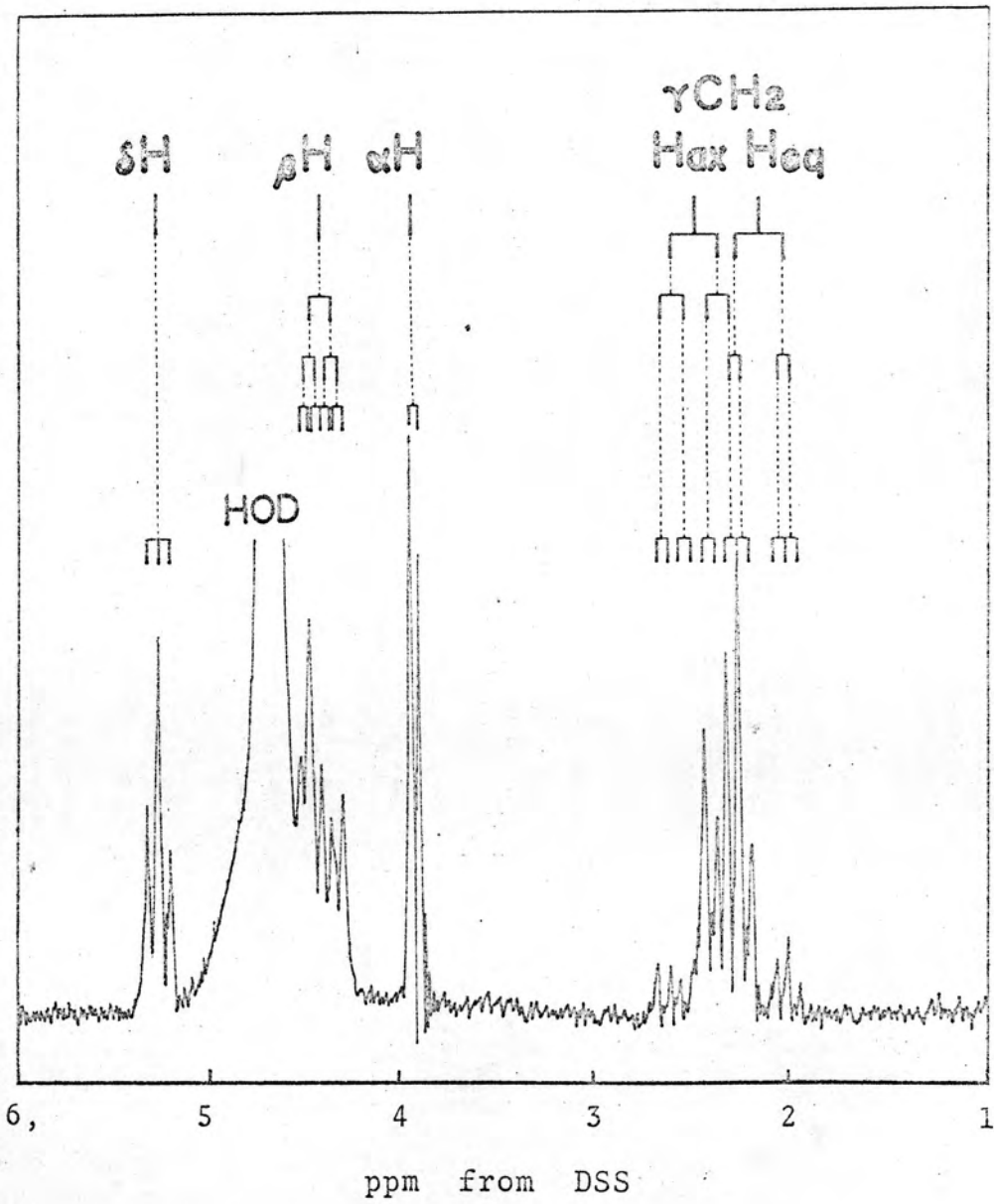


VI は坂口反応陽性であるが，VII，VIII は陰性である。このような関係は五員環構造の B 式では考えられない。

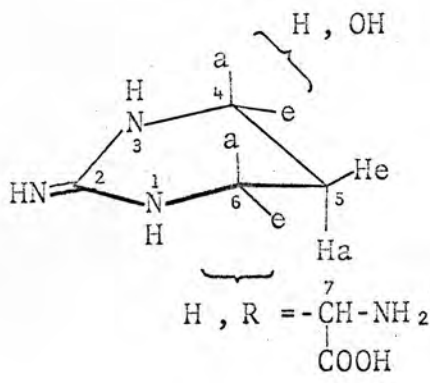
以上のことから III は，六員環構造の A 式が正しいことが明らかとなった。次に，NMR スペクトルを中心に III の立体構造を検討することにした。D₂O 中での NMR スペクトルは，図 3-1-6 の通りである。

図 3-1-6，次ページに別掲

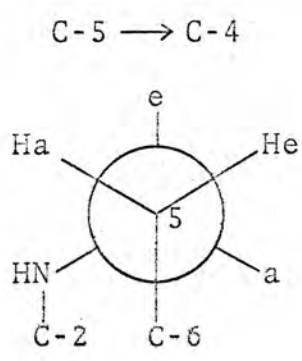
まず α 炭素 (C-7) は ORD 曲線 (後述) が 221m μ に正のコットン効果 ($[\phi] = 807\text{pk}$ in 0.1N HCl) を示すことから，L 配置であることが決定された。六員環に対する 4 位の水酸基と，6 位のアミノカルボキシメチル基の立体配座は，次のようにして決められた。まず可能な構造の一組の組合せを行なってみると，図 3-1-7 および，表 3-1-2 のようになる。



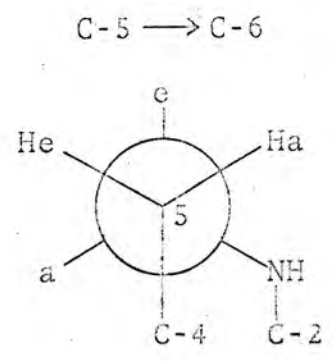
☒ 3-1-6 III の NMR スペクトル (D_2O)



a: axial
e: equatorial



C-4 置換基
(1) H(a), OH(e)
(2) OH(a), H(e)



C-6 置換基
(3) H(e), R(a)
(4) R(e), H(a)

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	C4-He	C6-He	C4-He	C6-Ha
C5	Ha	180°	60°	180°	180°	60°	60°	60°	180°
	He	60°	60°	60°	60°	60°	60°	60°	60°

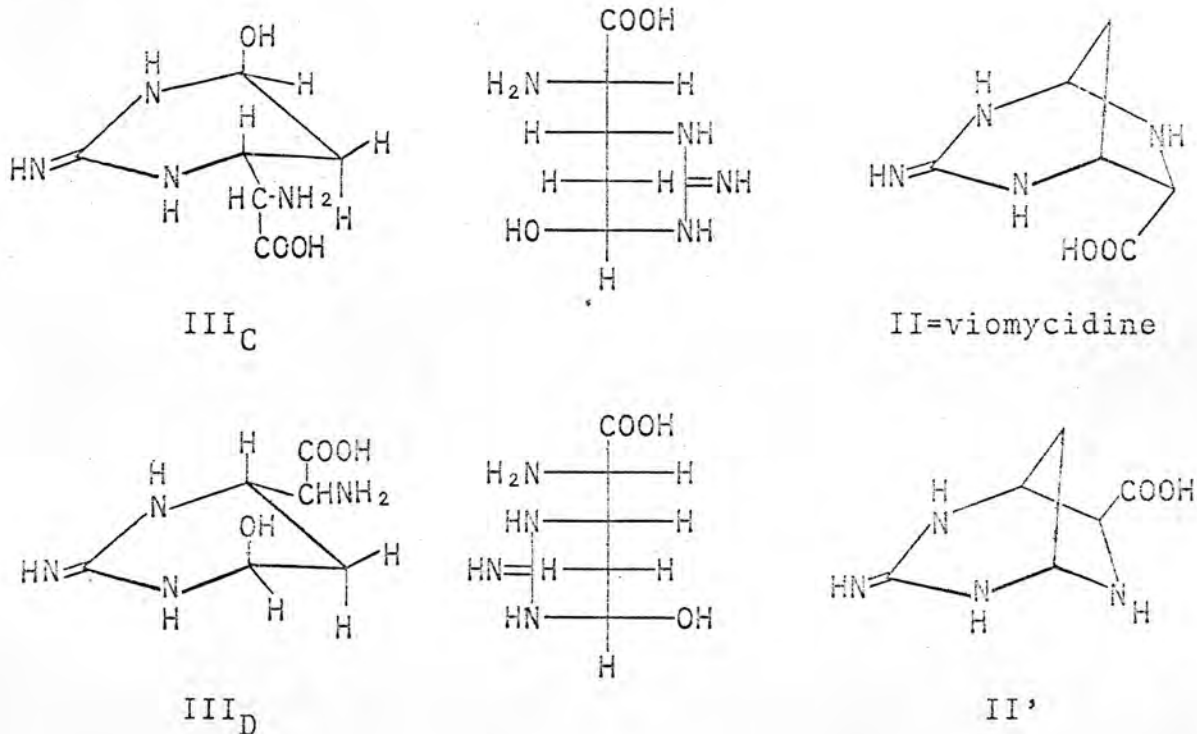
表 3-1-2 C5-H と C4-H および C6-H との二面角の関係

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である。²⁸⁾

	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。²⁹⁾ 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

イプ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_C, III_D 二種の構造が考えられる。



III_Cと III_D 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_C 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 viomycinine 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 viomycinine 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。

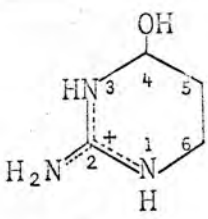
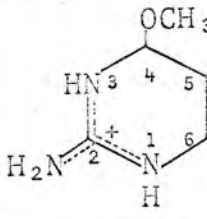
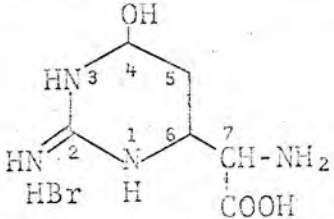
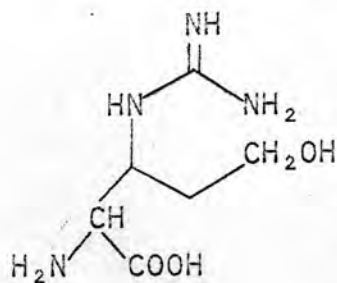
	 VI	 VIII	 III
C-4 1H	5.12(t, J=3)*	4.77(t, J=3.0)	5.26(t, J=3.45)
C-5 2H	1.98(m)	2.02(m)	e 2.12**(J=3.45, 14.7)
C-6 2H	3.42(q, J=5.5, 7.0)	3.34(m)	a 2.45**(J=6.9, 14.7)
C-6 1H			4.40(J=3.0, 3.45, 6.9)

表3-1-3 D₂O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3.91ppmに doublet (J=3.0cps) 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, viomycinide が得られているが, JohnsonらほととのVMが坂口反



IX
dihydro-
viomycinide

応陽性であり, 還元後の加水分解で dihydroviomycinide (IX) が得られ³⁰⁾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²⁵⁾る。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の加水分解物を口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。

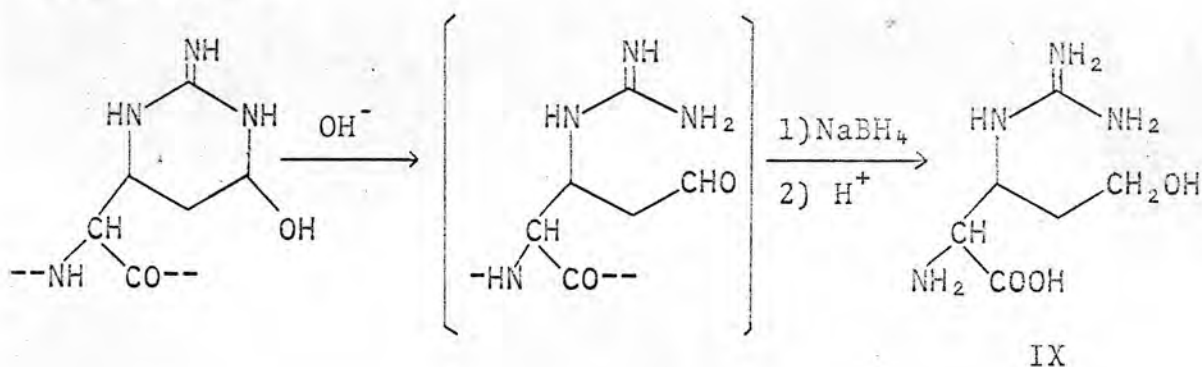
*** (3-2)で詳述

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 (NaBH_4) 還元, dihydroviomycinide* 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 viomycinide 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 のアルカリ溶液中での、アミノ-アルデヒド型への変化を利用し、TUM から 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 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。すでに前回は、VM より同じ方法で還元し dihydroviomycinide 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、 β -guanidino- δ -hydroxy-n-valine である。

表 3-2-1

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

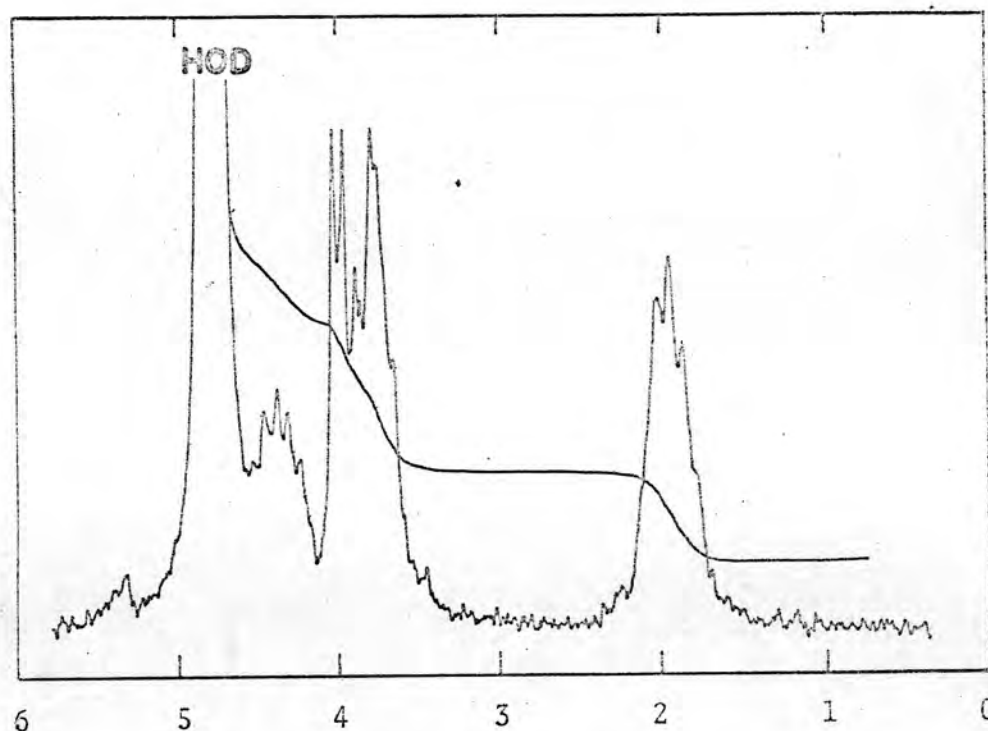
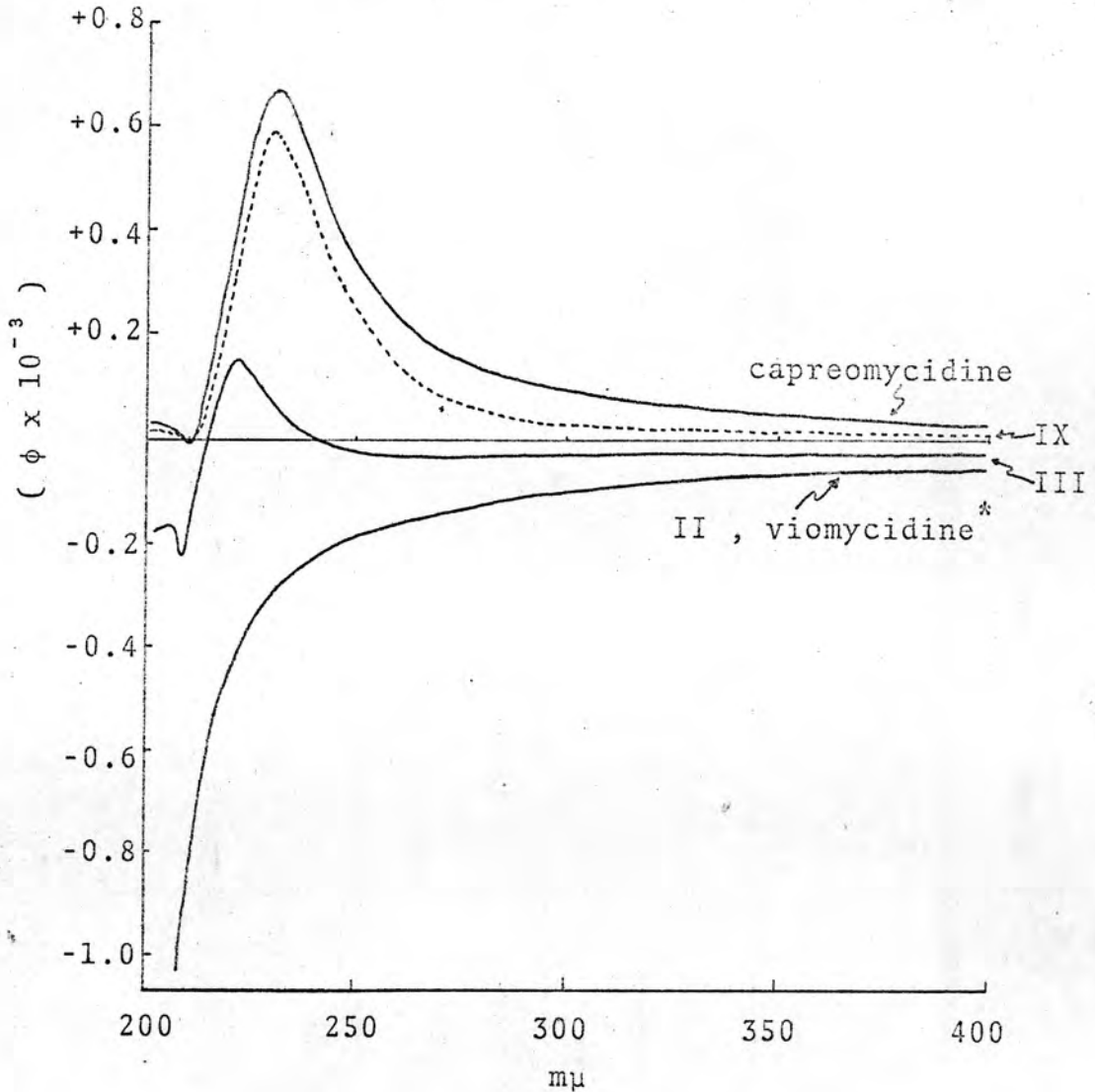


図 3-2-1 IX の NMR スペクトル

上表から、著者の得た IX は dihydroviomycin と同一物と決定された。以上の結果を総合して考えると、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 viomycin 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。実際 III から II への変化は容易に起り、たとえば III を TFA に溶かして放置すればすみやかに II へに変化するし、単に III の結晶を室温で長時間放置しておくだけでも、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 OCH₃ 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うりである。



* viomycinidene 標品

これによれば, tuberactidine(III), dihydroviomycinidene(IX), capreomycinidene はいずれも L-α-アミノ酸に特徴的な正の Cotton 効果を示し, viomycinidene(II) は proline, hydroxyproline などの L-α-イミノ酸³¹⁾に特徴的な負の Cotton 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 Cotton 効果を示さねばならないので, このことから 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^0 -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濃縮すると、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った。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

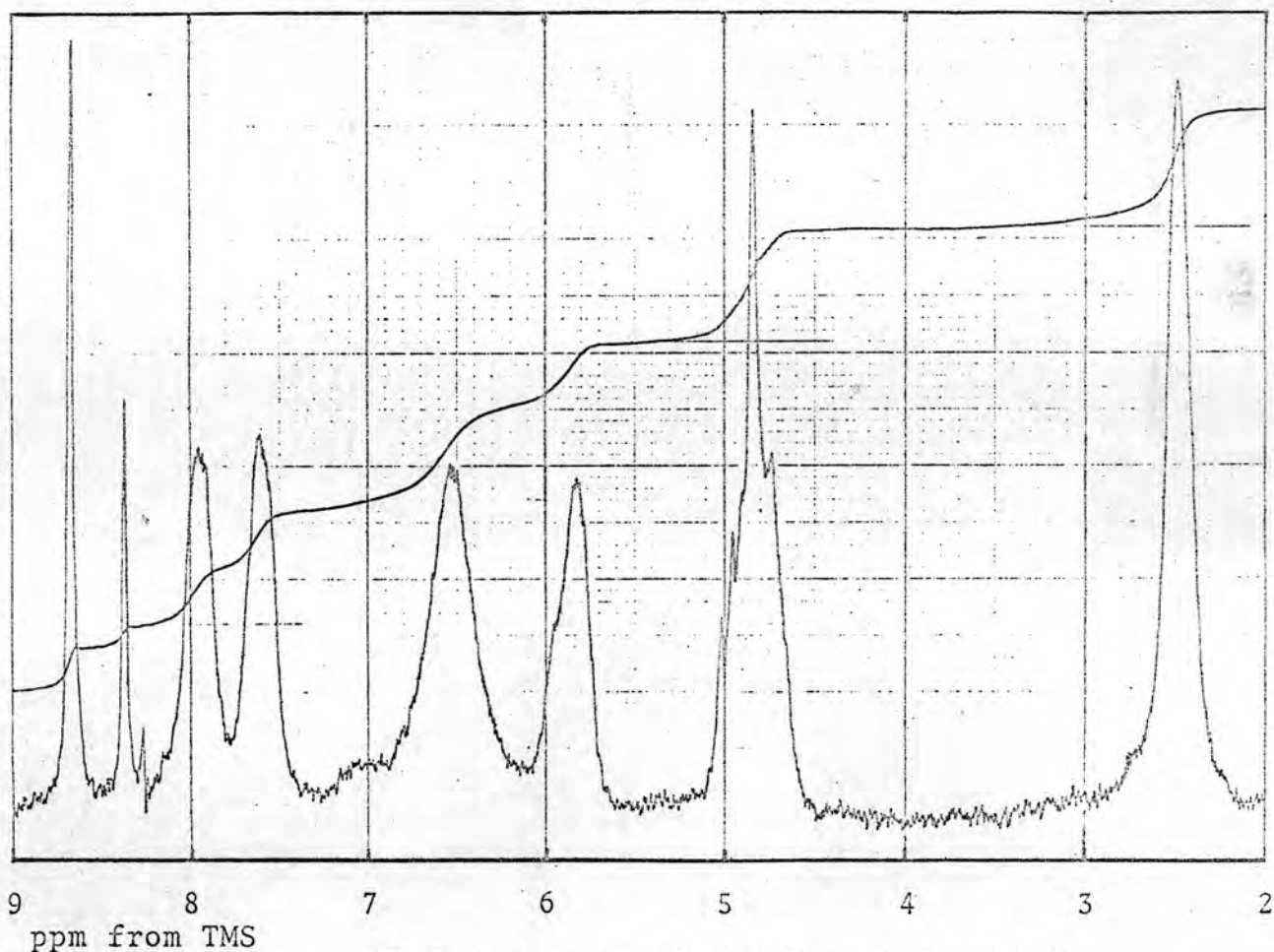


図 3-4-1 I の NMR スペクトル (in TFA)

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 viomycin (II) および tuberactidine (III) が得られることから、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、希酸を用

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ったものと考えれば説明がつく。実際 α, β -diaminopropionic acid(dapa) も一部 β -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 $-\text{COOH}$ が存在しないことから明らかである。IのNMRにおいて HCO^- のシグナルが2本に分裂していることから、二種類の HCO 基が存在すると考えられるので、IはIIまたはIIIの単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をピリジン、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 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_6$ 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はグ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 1750cm^{-1} と 1770cm^{-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ピリジン-ギ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。

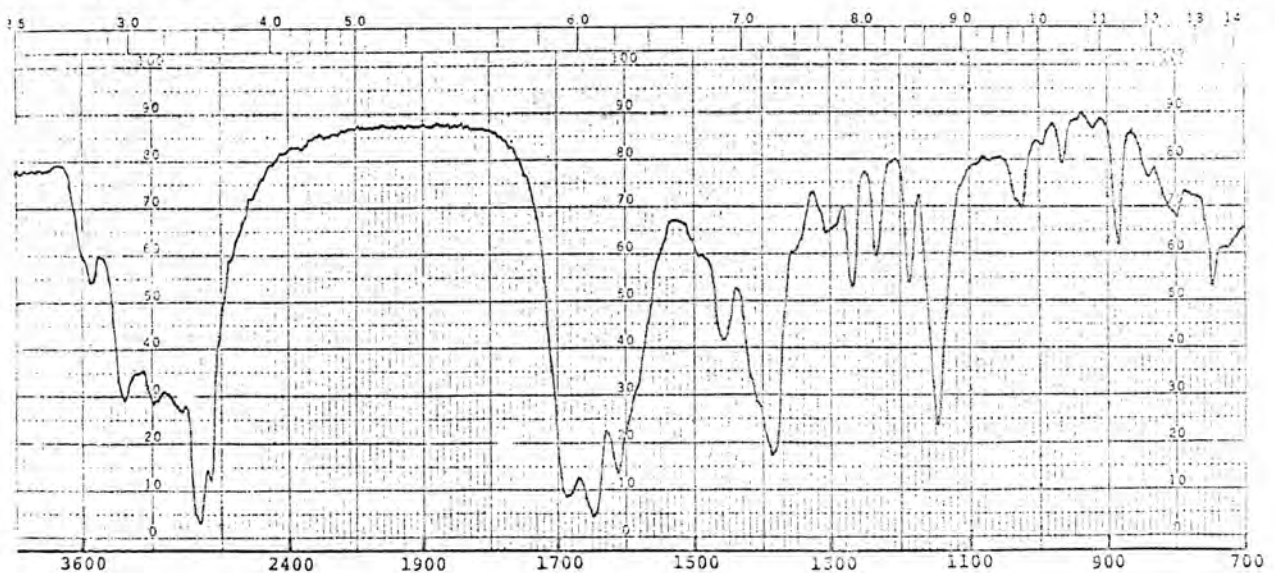


図 3-4-2 IのIRスペクトル (nujol)

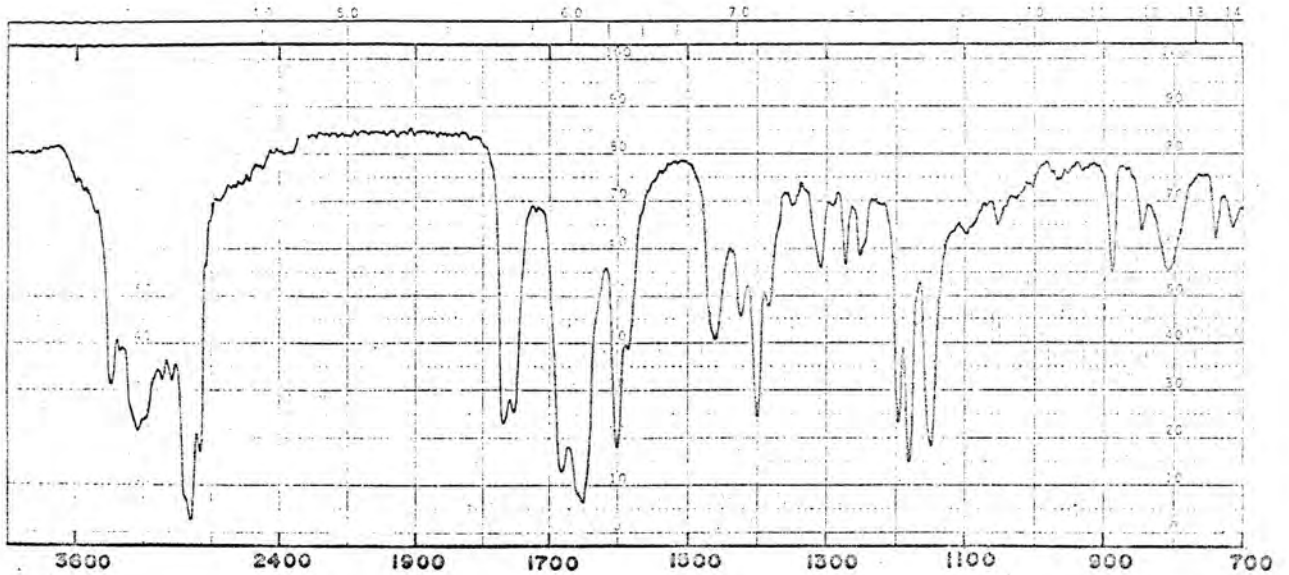
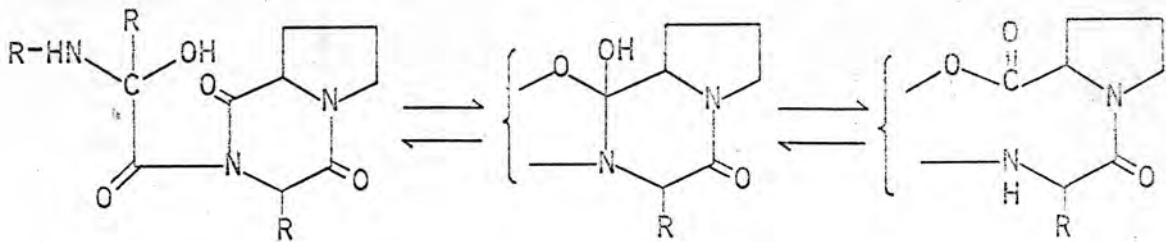
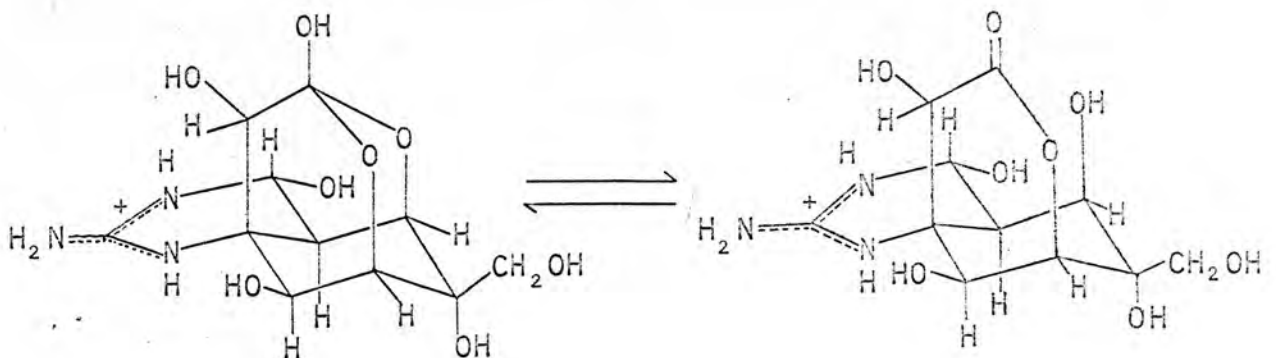


図 3-4-3 I の HBr 塩の IR スペクトル (nujol)

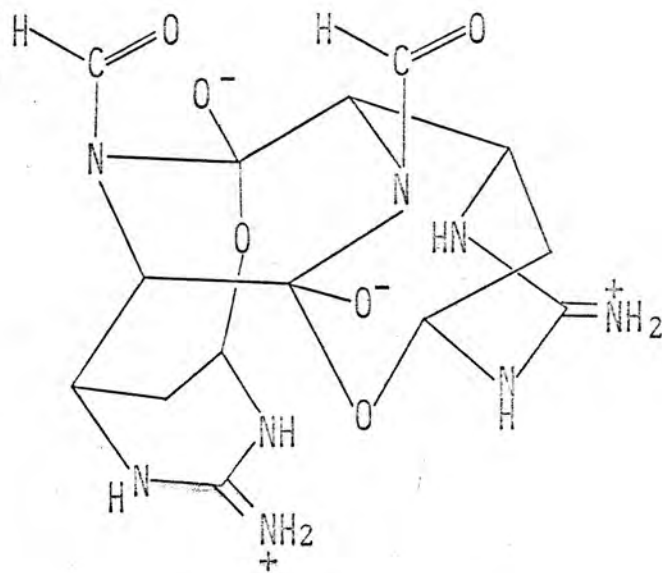
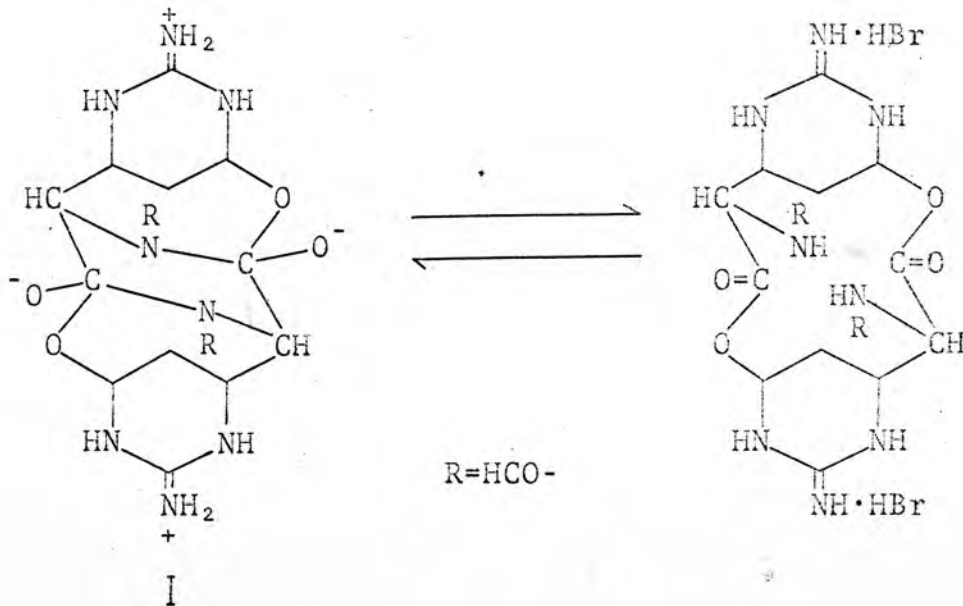
この相互変換の事実は、最近特に注目されるようになった環状ペプチドにおける N→O transannular 効果、エルゴタミンにおけるアミド-ラクトンカルボニル相互作用³²⁾、テトロドトキシシンにおけるラクトン-ラクタール平衡³³⁾などを想起させた。



〔上：エルゴタミン
下：テトロドトキシシン〕

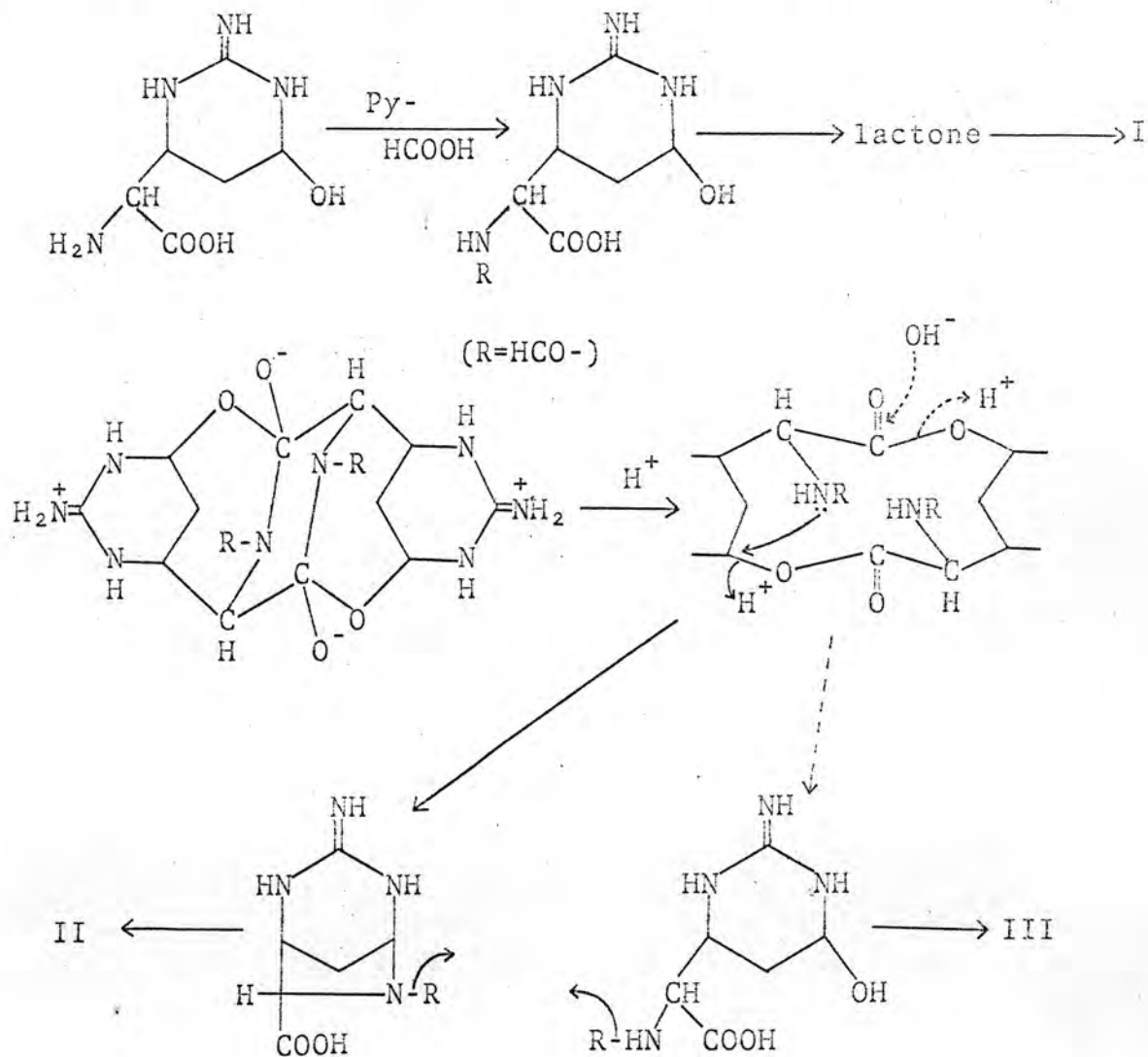


このような考えを，Iとその臭化水素酸塩の相互転換にあてはめると $\text{cyclol} \rightleftharpoons \text{iminolactone}$ の構造変化が推定され，かくして Iの構造として下図が考えられ，臭化水素酸塩はそのラクトン系であると結論された。また分子模形を組んでみると，Iの構造は立体的に大きく規制され，可能と考えられる絶対構造も推定することができた。しかし，正確な絶対構造の解明にはX線解析が必要であることは言うまでもない。

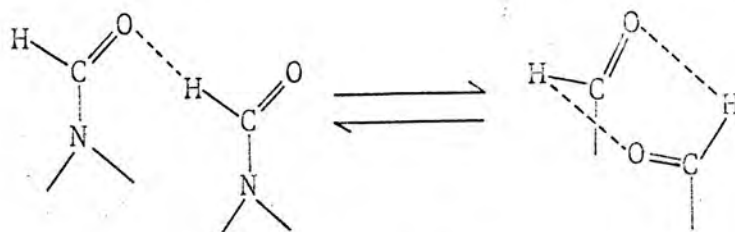


Iの推定絶対構造式

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.

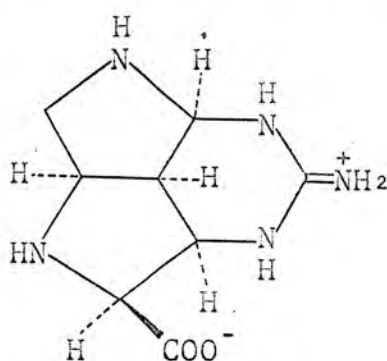


次に I の NMR スペクトルにおいて HCO⁻ のシグナルが二本に分裂するのは, HCO 同志の水素結合によるものと考えられる。すなわち高磁場側のシグナルは水素結合をしていない HCO, 低磁場側のシグナルは水素結合をした HCO プロトンと考えられ, それが約 1:2 あるいはそれ以上の比率で低磁場側のシグナルが強く現われるのは, 次のように水素結合に関与するプロトンが相対的に多くなっていると考えると説明できる。



(3 - 5) viocidic acid

TUM の NaBH_4 還元の実験で、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²⁶⁾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しこなっていたと考えられるこの viocidic acid の単離と、VM から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^α-Formyltuberactidine dimer (I)

Tuberactinomycin 塩酸塩 20g を 6N 塩酸 120 cc (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*。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⁺ form) 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 ヒロジン, キ酸 pH 3.1 の緩衝液で溶出すると serine, α,β-diaminopropionic acid, グアニジノアミノ酸 (tuberactidine と viomycin の混合物), γ-hydroxy-β-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物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 210 mg。

分析値 : C, 42.19; H, 5.41; N, 28.09 %

C₁₄H₂₀N₈O₆ 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 210 mg を 25% 臭化水素酸 1 cc に溶かし, ただちにエタノール

* 6N 塩酸 200 cc を用いて, 130°C で 8 ~ 24 時間還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 ヒロジンと酢酸で 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。さら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%

$C_{14}H_{20}N_3O_6 \cdot 2HBr$ 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。

5) I のアセチル誘導体

I の結晶 470mg を 25cc のピリジンにけんたしくし , 無水酢酸 13cc を加えて , 室温で機械的に攪拌する。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 %

$C_{18}H_{24}N_3O_8 \cdot 2H_2O$ 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 %

$C_{18}H_{24}N_3O_8 \cdot H_2O \cdot C_2H_5OH$ 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 $\begin{matrix} -HN \\ | \\ C=N-COCH_3 \\ | \\ -HN \end{matrix}$ 体と考えられる。

6) I の臭化水素酸処理 , viomycinine(II) と tuberactidine(III) の単離

(4-1) viomycinine(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，さら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* (IIの臭化水素酸塩) を得た。融点 $\sim 210^{\circ}\text{C}(\text{dec.})^{**}$ 。

分析値：C, 28.63; H, 4.61; N, 22.24; Br, 31.77 %

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HBr}$ 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，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 $\sim 219^{\circ}\text{C}(\text{dec.})^{***}$ 。

$[\alpha]_{\text{D}}^{13} - 89^{\circ} (c 0.5, \text{H}_2\text{O})$, $[\alpha]_{\text{D}}^{16} - 32^{\circ} (c 0.5, \text{N HCl})^{****}$ 。

(4-2) tuberactidine (III) の単離

II の結晶を口取した母液を再濃縮後，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 の純品を単離した。無色針状結晶。融点 $\sim 182^{\circ}\text{C}(\text{dec.})$

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

分析値：C, 26.98; H, 4.81; N, 20.94; Br, 29.65 %

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HBr}$ としての計算値：C, 26.78; H, 4.87; N, 20.82; Br, 29.70 %

5) Dihydroviomycin (IX)

TUM 塩酸塩 20g を100ccの0.3N NaOHに溶かし，それに NaBH_4 5g を70 ccの0.3N NaOH に溶かして徐々に加えた。43-45 $^{\circ}\text{C}$ の湯浴上で機械的にかき混ぜながら 暗向で加え終った。24 時間かき混ぜた後，少量の NaBH_4 を加えると泡を出して溶けたので，また還元が不十分と考へ，さらに 10

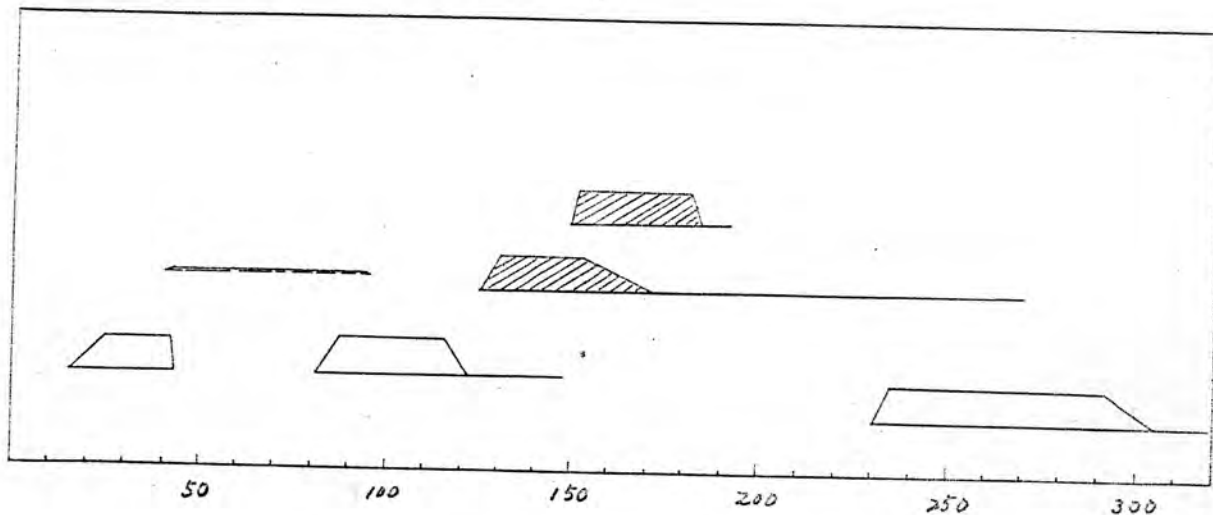
* 結晶の成長のさせ方により六角板状晶になったり，柱状晶になったりする。

** 文献 23 mp 202 \sim 4 $^{\circ}\text{C}$ (dec.)

*** 文献 26 mp 200 \sim 4 $^{\circ}\text{C}$ (dec.) 文献 27 mp 202 \sim 5 $^{\circ}\text{C}$ (dec.)

**** 文献 27 $[\alpha]_{\text{D}}^{16} - 74^{\circ} (c 1, \text{H}_2\text{O})$, $-19^{\circ} (c 1, 6\text{N HCl})$

時間のうちに 5g の 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、不溶の無機物を口過後 100cc の水を加えて逐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 x 70) cm, 緩衝液で緩衝化
- 緩衝液 0.2M ホリジンを酢酸で pH 4.0 にした後、ギ酸で pH 3.1 にしたもの。
- 1 フラクション 20 cc
- 溶出状態は TLC (Phenol - H₂O - c.NH₄OH = 30 : 10 : 1) 上, ニンヒトリンで検出, 坂口反応は別に口紙にスポットして行なった。(▨ 坂口反応陽性部)

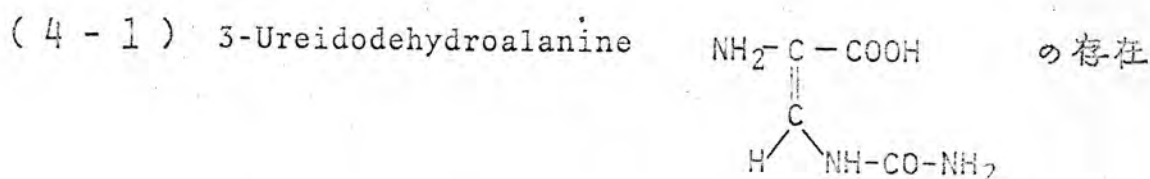
125 - 147 番目のフラクションを蒸め 50°C 以下で減圧濃縮をした。水を加えて数回濃縮をくり返し、残留油状物を一夜放置すると結晶化した。収量 500mg。この粗結晶を少量の希塩酸に溶かし、エタノールとエーテルを加えて冷蔵庫に一夜放置し、無色針状結晶を得た。水 アルコールより再結晶して 93mg の純粋な IX の塩酸塩を得た。融点 180°C (dec.) [文献 182°C (dec.)]。 $[\alpha]_D^{15} + 33^\circ$ (c0.5, N HCl)。 [文献 +25° (c0.71, 6N HCl)]。

分析値: C, 30.90; H, 7.06; N, 23.59 %

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

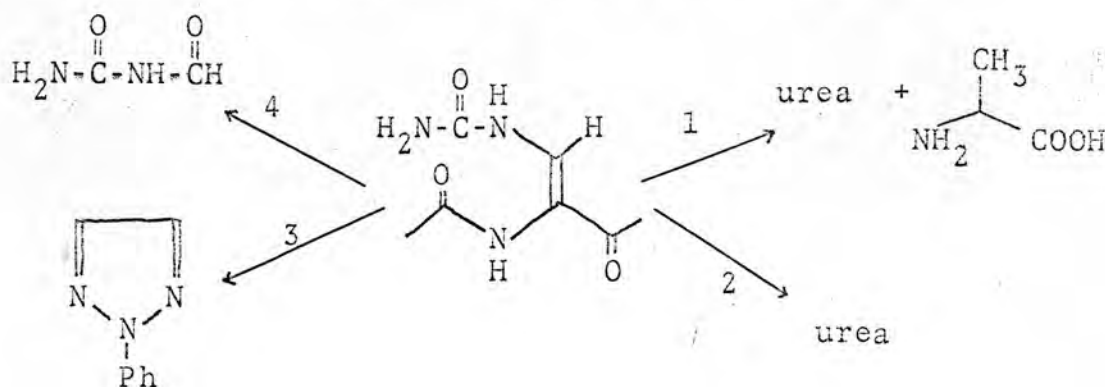
4 章 TUBERACTINOMYCIN の全構造についての考察

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。



TUMは重水中のNMRスペクトルにおいて， $\delta 8.01$ ppmにシングレットのシグナルを有し，また紫外吸収スペクトルは $268\text{m}\mu$ (H₂O)， $268.5\text{m}\mu$ (0.1N HCl)， $285.5\text{m}\mu$ (0.1N 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 δ 値とUVの吸収極大を示す部分に関しても両者同一の構造を有するものと思われる。

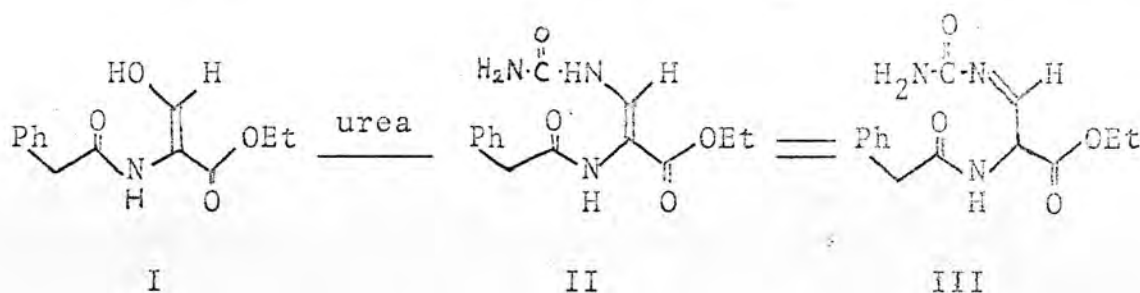
BycroftらはVMについてこのchromophoreの部分構造の詳しい研究を行ない，3-ureidodehydroalanineの存在を予想した。³⁴⁾



- 1) (i) H₂/Pt, (ii) 6N HCl 2) KMnO₄
 3) (i) I₂, (ii) PhNHNH₂, (iii) H⁺ 4) 0.1N 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 8.01ppm 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研究を行った³⁵⁾。Ethyl benzyl penaldiate (I) を尿素と酸触媒のもとに縮合させて ureido 化合物 (II) を合成した。II は III と平衡関係にあり、結晶化の溶媒の相違によりどちらか一方を得ることが出来るが、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	268, 268.5
	b) アルカリ性	308	308
NMR (ppm)	2.2 (CD ₃ SOCD ₃ /D ₂ O)	8.1 (D ₂ O)	8.01 (D ₂ O)

さらに、この dehydroalanine 誘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。この結果口紙電気泳動で明らかに TUM と異なる酸化生成物(構造未知)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 8.01ppm 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) 濃硫酸、濃塩酸による部分水解

β -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 Bergmann³⁶⁾らによって、脂肪族化合物についてみいだされ、その後 β -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³⁷⁾、多くの研究が行なわれてきた。

転位剤としては、濃塩酸、無水硫酸および濃硫酸などがあげられるが後者を用いた例が多く、転位の結果 β -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^{**}をして酸化VM(OVM^{***})の4種について、濃硫酸中で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規定に希釈した後、

* 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と同じ方法で調製した。

Amberlite IR-45(OH⁻ 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ったが、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、転位生成物を希酢酸溶液中にお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わったところで 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+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

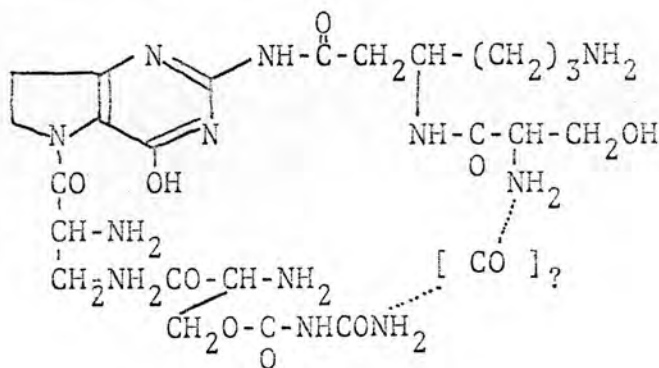
ないことを示している。そしてTUMにおいては γ -hydroxy- β -lysineのカルボキシル基に結合するアミノ酸は α, β -diaminopropionic acidであることを強く指示している。

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。

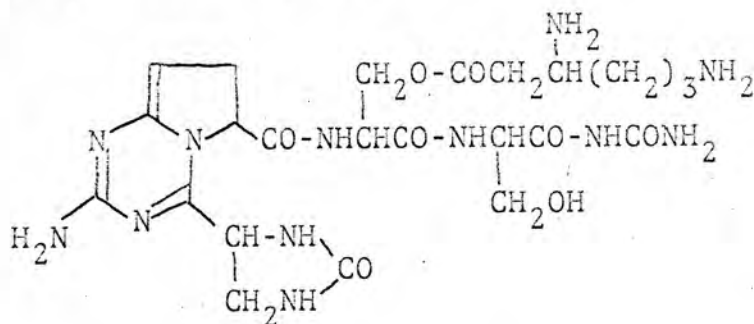
(4-3) 推定構造式

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が行なわれている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。

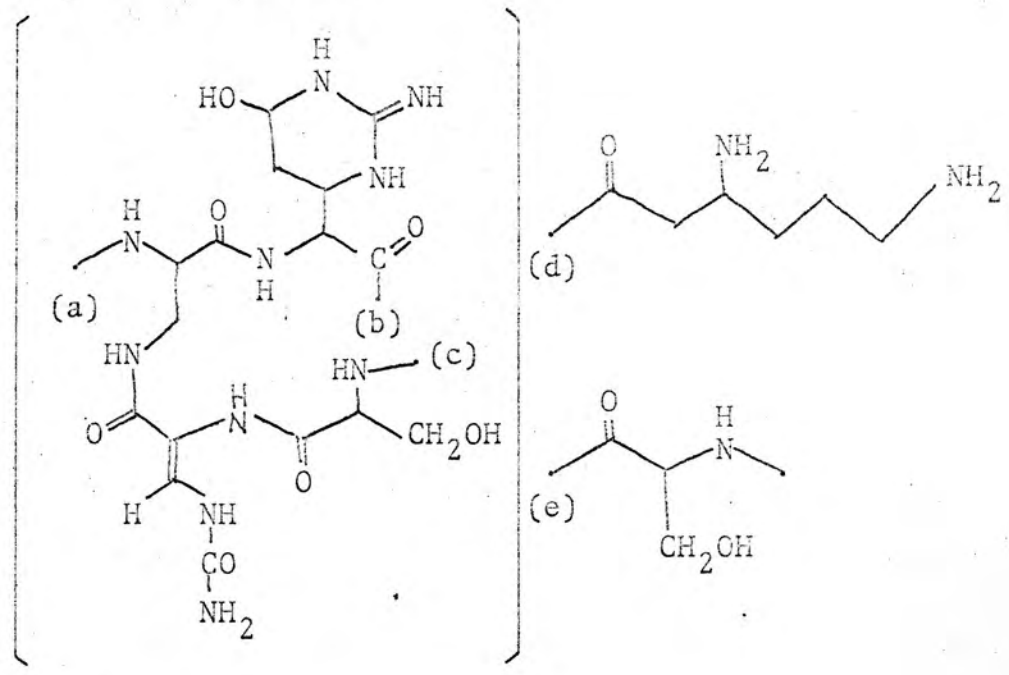
5b)
1) Johnson et al. (1964)



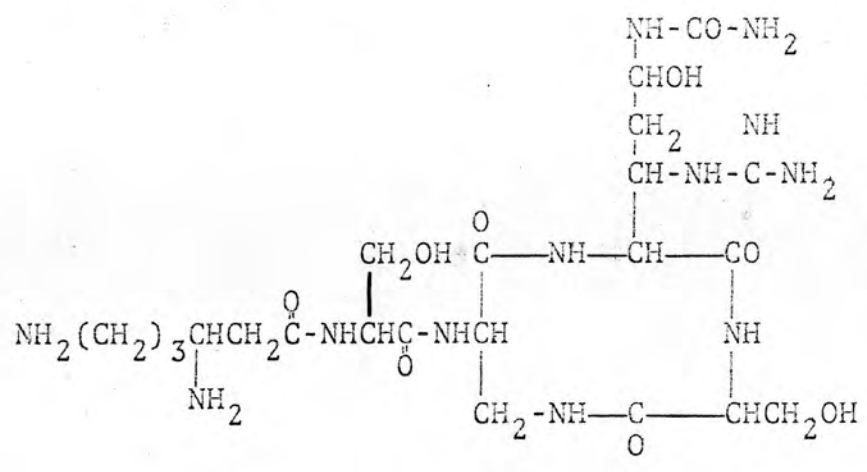
5c)
2) Dyer et al. (1965)



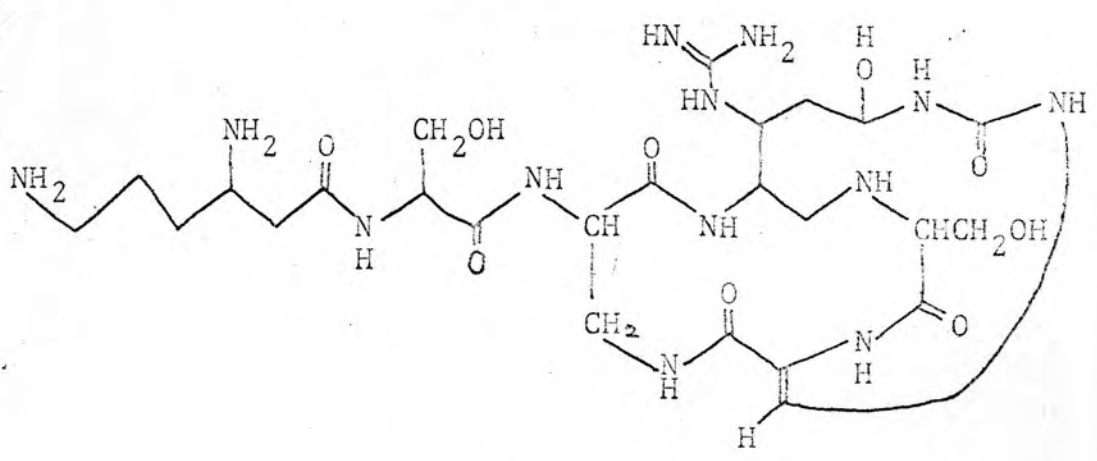
3) Johnson et al. (1968)³⁴⁾



4) Lechowski (1969)³⁸⁾

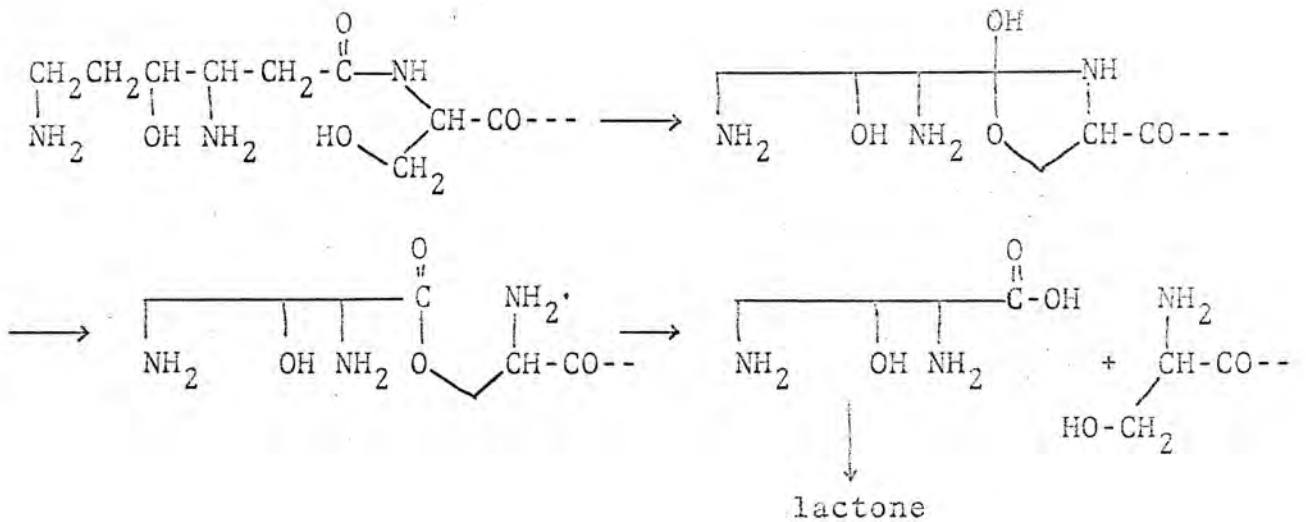


5) Kitagawa et al. (1969)³⁹⁾

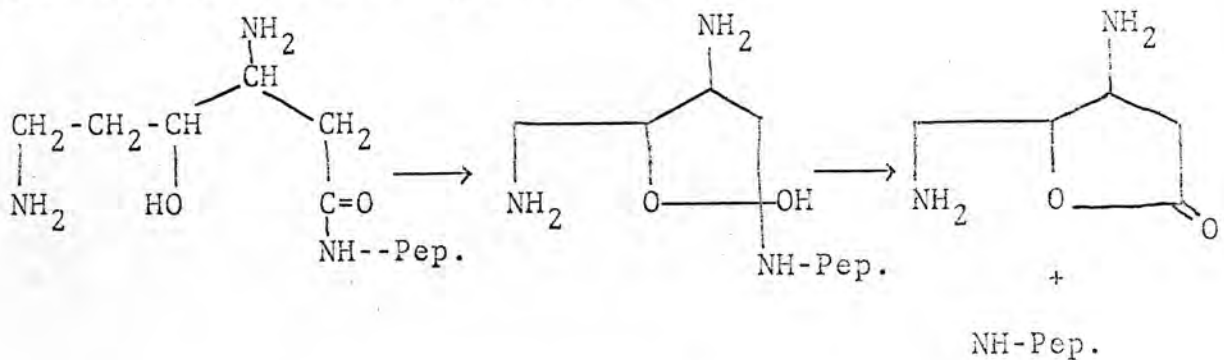


以上のように VM の推定構造式はいろいろ提出されているが、そのなかで 3) と 5) 式が一応実験に忠実に提出された式と考え得る。

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。

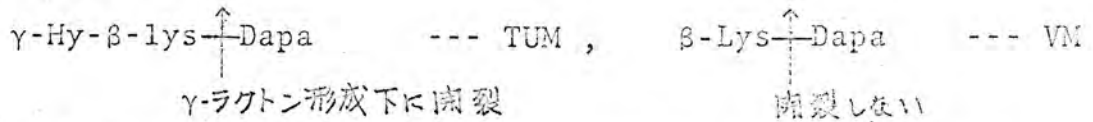


すなわち $\gamma\text{-Hy-}\beta\text{-lys}$ の遊離は serine 残基による N→O 転位反応の結果起るものと考えていたが、もしそうだとすれば、VM においてもこの条件において $\beta\text{-lysine}$ の遊離が起ってもよいはずである。しかし、そのような事実は認められない。従って、TUM の場合における $\gamma\text{-Hy-}\beta\text{-lys}$ の容易な脱離は次のように説明して矛盾がないと考えた。



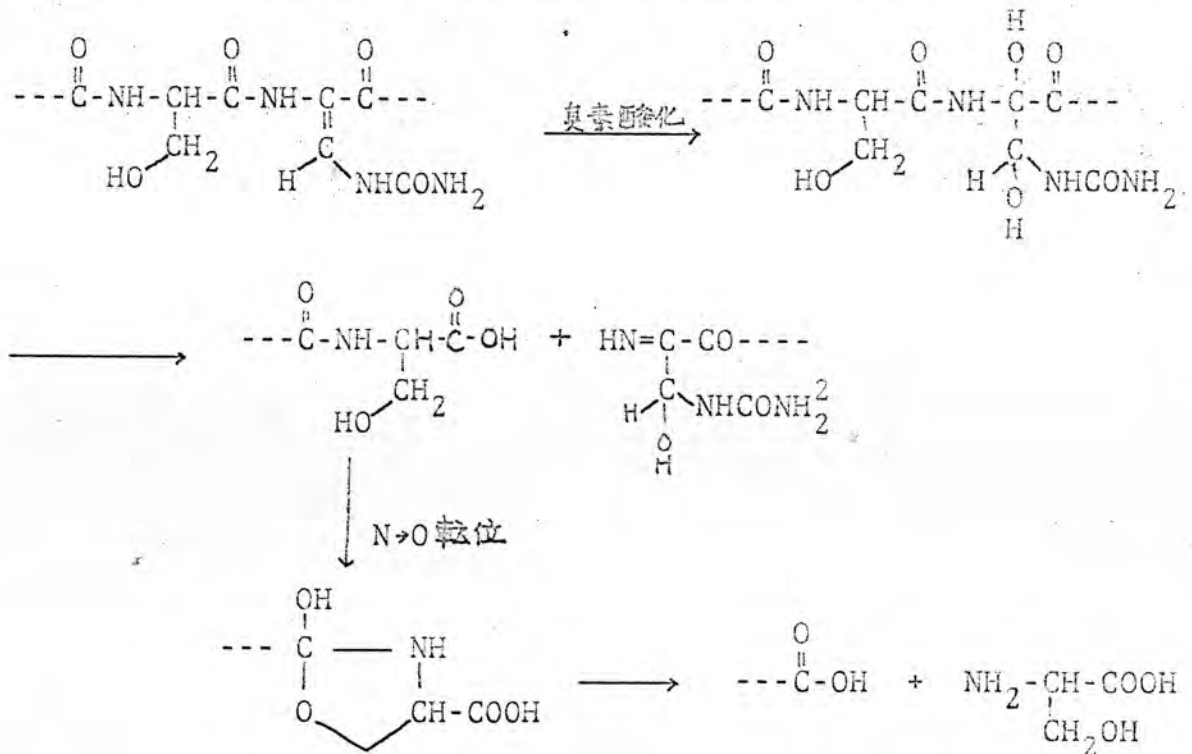
そして TUM と VM との相違が他の諸事実からも、 $\gamma\text{-Hy-}\beta\text{-lys}$ と $\beta\text{-Lys}$ の相違のみに限られると考えられるので、部分水解あるいは N→O 転位条件での反応後の亜硝酸処理の結果の相違、すなわち Dapa の消失と残存の差は、 $\gamma\text{-Hy-}\beta\text{-lys}$ と $\beta\text{-Lys}$ の差に由来すると結論できると考えた。この

重要な新事実によって



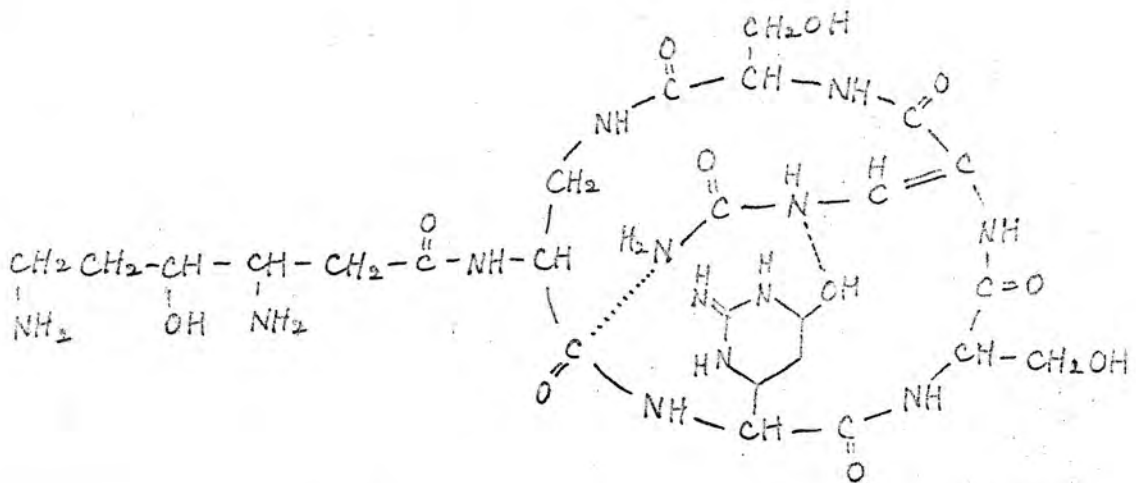
を推定するに至った。さらに $\gamma\text{-Hy-}\beta\text{-lys}$ が Dapa の α -アミノ基に結合しているか、 β -アミノ基に結合しているかは、亜硝酸処理後の加水分解物に isoserine* が存在しているかどうか、および serine のモル数の変化を調べれば決定できる。

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。

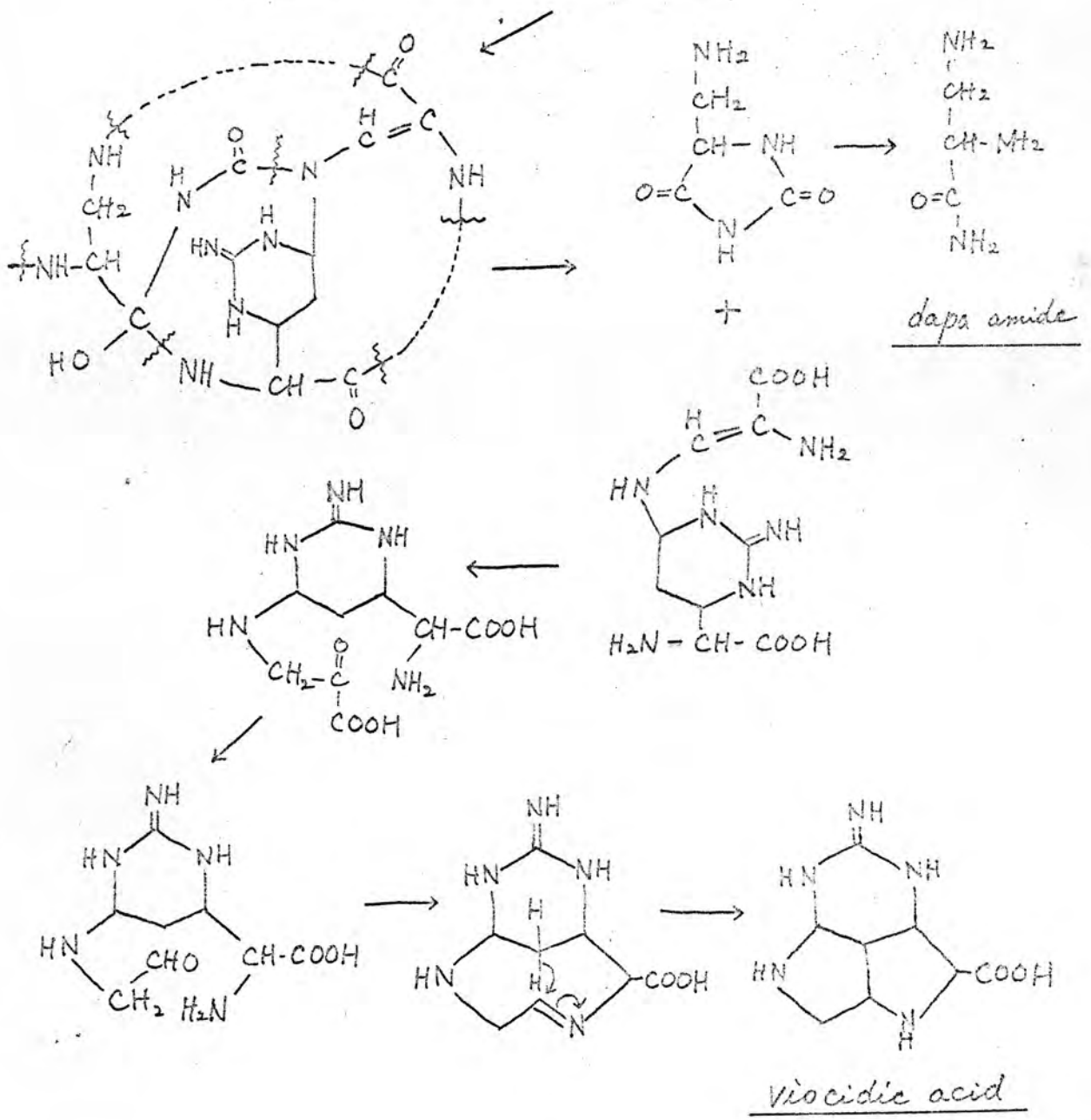


上記のアミノ酸配列に関する新たな実験結果に基づいて、従来全く説明のついていなかった viocidic acid の生成 (3-5) ならびに Dapa amide の生成 (2-3) をも明快に説明する推定構造式 (A) を提出することができた。

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



Tubercidinomycin 推定式



ただ、この推定式において ureido の N_1 原子が tuberactidine の C_4 原子に付く水酸基と、単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_5 原子と Dapa のカルボニル基の間にいわゆる cyclol 構造が存在するのか、それとも加水分解操作の間に中間にこのような 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、今後更に多くの化学的な裏付けと、X線解析による絶対構造の決定を待たねばならない。そして、これらの研究が、現在若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) 同系抗生物質群の検討

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物質群の存在が予想される。

	β -Lys	γ -Hy- β -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	$C_{25}H_{43}N_{13}O_{10}$
IV		+		+		$C_{25}H_{43}N_{13}O_{11}$

IIはVMであり、IVはTUMであるが更に興味深いことに、現在すでに東洋醸造研究所においてIおよびIIIに相当する抗生物質が単離されている。ここで注目すべき点は β -Lys と γ -Hy- β -lys, capreomycin (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、最も酸化型の抗生物質であると言える。このように、この種の抗生物質の構造を酸化段階の差で分類するという考え方に立てば、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物質として 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 はまた純粋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 に置きかわった系列で、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体であろうと推定される。

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) 豊原希一, 結核, 43, 245 (1968)
c) 永田明穂, 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. Scienc.*, 135, 940 (1966)
4. a) A. C. Finlay, G. L. Hobby, F. A. Hochstein, T. M. Lees, T. F. Lenert, J. A. Means, S. Y. Pan, P. P. Regna, J. B. Routin, B. A. Sobin, K. B. Tate, and J. H. Kane, *Ann. Rev. Tuberc.*, 63, 1 (1951)
b) A. 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. Kellog, R. F. Nasser and Wm. E. Streetman, *Tetrahedron Letters*, 585 (1965)

6. a) 田村善哉, 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, 599 (1963)
7. 北川常弘, 三浦孝子, 沢田洋介, 谷山英三, *The 7th Symposium on Peptide Chemistry, Symposium Papers*, 82 (1967)
8. F.A. Hochstein and R.L. Miller, *U.S. Pat.* 2,920,998 (1960)
9. S. Hanessian, *J. Org. Chem.*, 32, 163 (1967)
10. E. Suzuki, S. Imoue, and T. Goto, *Chem. Pharm. Bull.*, 16, 933 (1968)
11. A. Hoffman, H. Ott, R. Grist, P.A. Stadler, and A.J. Frey, *Helv. Chim. Acta*, 46, 2306 (1963)
12. 若宮達昭, 芝 哲夫, 金子武夫, 永田明穂, 田家照生, 柳原秀夫, 才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. 遠藤豊成, 米原 弘, 才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. Izumiya, Y. Fujita, F. Invererre, and B. Witkop, *Biochem.* 4, 2501 (1965)

- b) Y. Fujita, J. Kollonitsk, and B. Witkop, *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 2030 (1965)
- c) B. Witkop, *Experientia*, 12, 372 (1956)
18. a) J. P. Jennings, W. Klyne, and P. M. Scopes, *Proc. Chem. Soc.*, 412 (1964)
- b) J. P. Jennings, W. Klyne, and P. M. Scopes, *J. Chem. Soc.*, 7211 (1965)
19. 岩井浩一, 実験化学講座 (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. J. 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. Iitaka, *J. Antibiotics*, 22, 34 (1969)
24. E. B. Herr, Jr., *Antimicro. Agents and Chemoth.* 1962: 201 (1963)
25. B. W. 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. Silberstein 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. Izuka and J.T. Yang, *Biochemistry*, 3, 1519 (1964)
32. A. Hoffmann, H. Ott, G. Grist, P.A. Stadler 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. Lechowiski, *Tetrahedron Letters*, 479 (1969)
39. T. Kitagawa, Y. Sawada, T. Miura, T. Oaza, and H. Taniyama, 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、終始御懇篤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をはじめ、金子研究室の皆様にも御礼申し上げます。

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だ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も御礼申し上げますとともに、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、共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っ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