The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ペプチド抗生物質ツベラクチノマイシンおよびカプレオマイシンの構造 : 活性相関に関する合成的研究
Author(s)	野本, 信也
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24461
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ペプチド抗生物質ツベラクチノマイシンおよびカプレオマイシンの構造－活性相関に関する合成的研究

野本　信也

目次

第1章　序論　1

第2章　ツベラクチノマイシン群新抗生物質LL-BM547β の構成アミノ酸 N^{β}-メチル-L-β-アルギニンの合成　5

第3章　ツベラクチノマイシンの抗菌作用におけるβ-ウレイドデヒドロアラニン残基の意義　9

3－1　ウレイド交換反応によるウレイド置換ツベラクチノマイシンNの調製　10

3－2　ウレイド置換ツベラクチノマイシンN誘導体の抗菌作用についての考察　17

3－3　ウレイド交換反応による{[^{15}N]ウレイドデヒドロアラニン^{5}}-ツベラクチノマイシンOの調製　18

3－4　{ΔAla^{5}}-ツベラクチノマイシンOの合成の試み　20

第4章　ツベラクチノマイシンの抗菌作用における環状グアニジノ基の意義　25

4－1　{Arg^{6}}-ツベラクチノマイシンOの合成　26

4－2　{Gal^{6}}-ツベラクチノマイシンOの合成　29

4－3　{Arg^{6}}-及び{Gal^{6}}-ツベラクチノマイシンOの抗菌作用についての考察　33

第5章　抗生物質カプレオマイシンの構造決定と全合成並びにカプレオマイシン類似体の合成とその抗菌作用　37

5－1　カプレオマイシンの構造決定　37

5-1-1　カプレオマイシンIAとIBの分離　38

5-1-2　カプレオマイシンの物理化学的性質とアミノ酸組成　38

5-1-3　カプレオマイシンの環状ペンタペプチド部の構造　41

5-1-4　側鎖β-リジンの結合位置――カプレオマイシンの全構造　46

5－2　カプレオマイシンIA及びIBの全合成　50

5-2-1　保護環状ペンタペプチド部分の合成　51

5-2-2　側鎖アミノ酸の導入　53

5－3　カプレオマイシンの構造類似体の合成　61

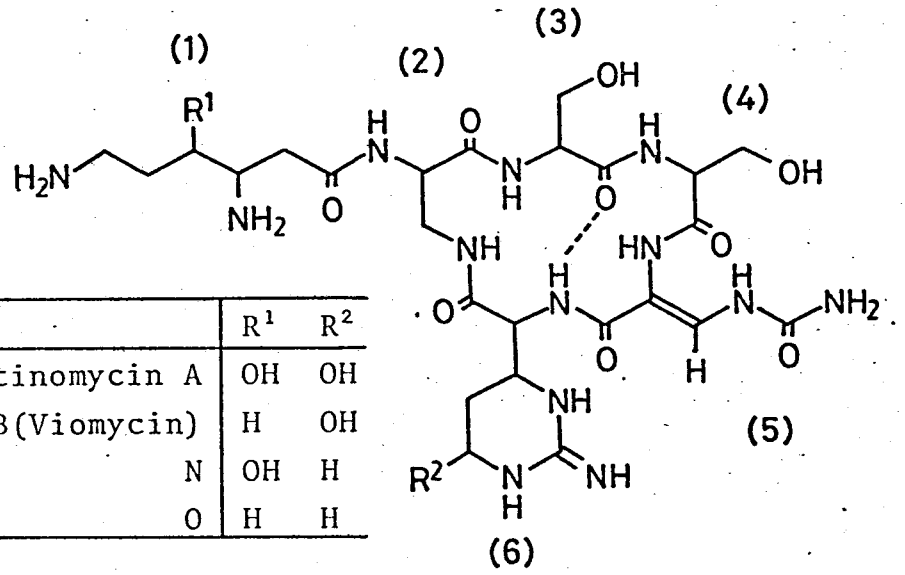
5-3-1　カプレオマイシンIIA及びIIBの合成　62
5-3-2　プソイドカプレオマイシンIBの合成　63
5-3-3　リバースカプレオマイシンIIB及び[Orn⁴]-カプレオマイシンIIBの合成　63
5-3-4　ジ-β-Lys-カプレオマイシンIIBの合成　63
5-4　カプレオマイシン並びにその構造類似体の抗菌作用についての考察　72
第6章　α,β-ジアミノプロピオン酸のHofmann分解を利用するデヒドロアラニンペプチドの新合成法　74
実験の部　80
Abbreviations　98
References　99

第1章　序論

抗結核剤として実用に供されている抗生物質のうちペプチド構造を有するものとしては、カプレオマイシン[1](Capreomycin)、バイオマイシン[2](Viomycin)およびツベラクチノマイシン[3](Tuberactinomycin)の3種類が知られている。これらはいずれも異なる時期に放線菌(Streptomyces)の異なる菌種から見い出された化合物であるが、化学的性質のみならず抗菌活性の点でも極めて類似している。その構造研究は主にバイオマイシンを対象として、古くからいくつかのグループにより進められていたが、1971年芝、若宮らが初めてツベラクチノマイシンOの構造を化学的手法並びにX線解析により決定し続いてこの結果に基づいて、ツベラクチノマイシンの他の同属体A、B、Nの構造式をも提出した[4](Fig.1-1)。このうちツベラクチノマイシンBは、バイオマイシンと同一物質であることが彼らにより明らかにされたが、このバイオマイシンに対する新しい推定構造式はBycroftらが行なったX線解析の結果からも裏づけられた[5]。最後に残されたカプレオマイシンの構造に関しては、後述するように、著者が本研究の一環として、化学分解並びにNMRスペクトルの解析の結果から決定し[6]、さらにカプレオマイシンIA、IBを全合成することにより確立した[7](Fig.1-2)。Fig.1-1と1-2から明らかなように、これら3種の抗生物質は全てに共通の構造すなわち分枝した環状ペンタペプチド骨格を有することから、ひとつの化合物群を構成しているとみなすことができる。

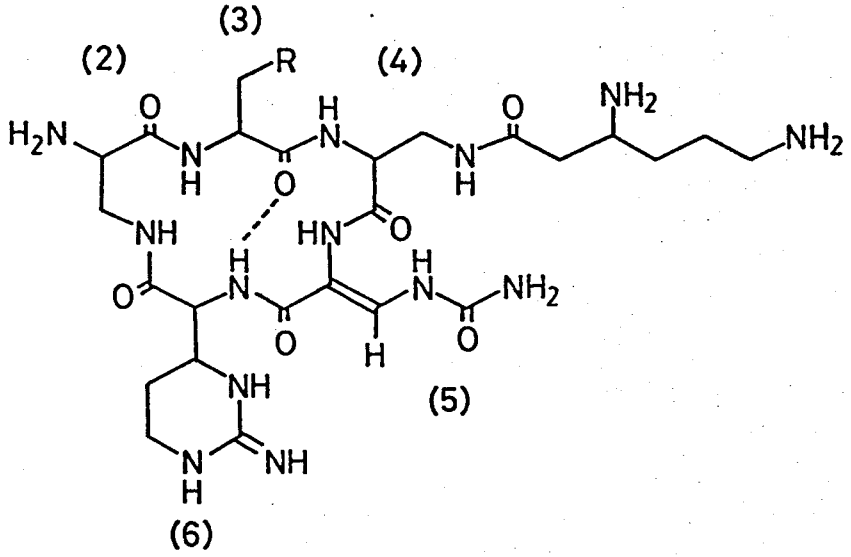
この一群の抗生物質は、通常の抗生物質において一般的に見られるように、多くの異常アミノ酸を構成成分として含んでいる。即ちグアニジノアミノ酸であるツベラクチジン[8]及びカプレオマイシジン[9]、側鎖アミノ酸のβ-リジン[10]及びδ-ヒドロキシ-β-リジン[11]、α,β-ジアミノプロピオン酸そしてα位に二重結合を有するβ-ウレイドデヒドロアラニン[12]がそれである。これらアミノ酸は、ツベラクチジンを除きすべて、主として芝研究室においてすでに合成されている。

さらにこの抗生物質群のうちツベラクチノマイシンOそのものは芝研究室において全合成が完成している[13]。まず若宮らはツベラクチノマイシンNの側鎖アミノ酸δ-ヒドロキシ-β-リジンを選択的に切断除去した後の分枝部を欠く環状ペンタペプチド部分を単離して、これをツベラクチナミンN(Tuberactinamine N)と命名した。さらにその側鎖部分に改めてβ-リジンを導入し、ツ



	R^1	R^2
Tuberactinomycin A	OH	OH
B(Viomycin)	H	OH
N	OH	H
O	H	H

Fig.1-1



	R
Capreomycin IA	OH
IB	H

Fig.1-2

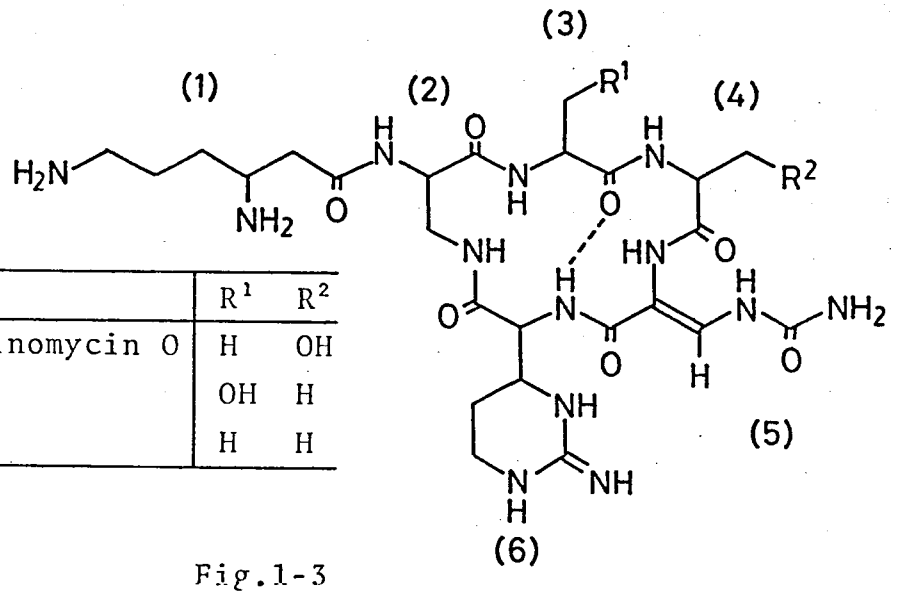
ベラクチノマイシンOへ導いた[14]。即ちこのことによってツベラクチノマイシンNからOへの化学的変換に成功した。この変換反応の発見はツベラクチノマイシンOの全合成の計画にも生かされ、まずツベラクチナミンNを合成し、次いで側鎖β-リジンをこれに縮合してその全合成が完成したのである。

抗生物質のみならず天然由来の生理活性物質は一般に、その活性を最大限に発揮する為に必要かつ十分な化学構造を有しているとは限らないと考えられる。そこでまず活性を発現するに必要な最小構造部分即ち活性部位を究明し、この部分を根拠として元の天然物よりさらに強い生理活性を示す構造類似体の開発を目的とした合成研究が様々な種類の化合物に関して盛んに行なわれている。当研究室においてもツベラクチノマイシンの構造解明と全合成

が終った段階で次に構造と生理活性の相関関係を解明する研究が開始された。

まず豊島、若宮らは分枝部分の構造と抗菌力の関係を明らかにする為、ツベラクチナミンNの側鎖部分に種々の脂肪酸、アミノ酸、ペプチド等を導入する半合成的研究を行なった。[15] この研究で100種近くの半合成ツベラクチノマイシンが調製されたが、それらの抗菌力を比較した結果、強力な抗菌力が発現される為の条件として、側鎖アミノ酸のβ-アミノ基が遊離であること、並びにそれより炭素鎖をへだてた位置に第2のアミノ基が存在することなどが結論された。

次にツベラクチノマイシン分子中の2個のセリン残基の水酸基が活性発現に果す役割を調べる為に[Ala^4]-、[Ala^3]-及び[Ala^3, Ala^4]-ツベラクチノマイシンO（Fig.1-3）が全合成された。[16] このうち前二者及び後者の一部の合成は著者が修士課程において行なったものである。それらはいずれも天然ツベラクチノマイシンOと同程度の抗菌力を示したが、上記の順序で活性がやや低下する傾向が認められた。この結果から、第4番目のセリン残基の水酸基は第3番目のそれに比べて活性を増加させる働きが大きいと結論された。またこれとは別にアミノ配糖体群抗生物質の一部において分子中の水酸基が耐性病原菌体内で修飾を受けることにより元の抗菌作用が消失するという菌の耐性獲得機構が知られているが、ツベラクチノマイシンにおいては、耐性結核菌に対する抗菌作用の点で上記3種の構造類似体は天然ツベラクチノマイシンとの差が全く見い出せずこれら両水酸基は耐性機構に直接関与していないことが明らかにされた。



	R^1	R^2
[Ala^3]-Tuberactinomycin O	H	OH
[Ala^4]-	OH	H
[Ala^3,Ala^4]-	H	H

Fig.1-3

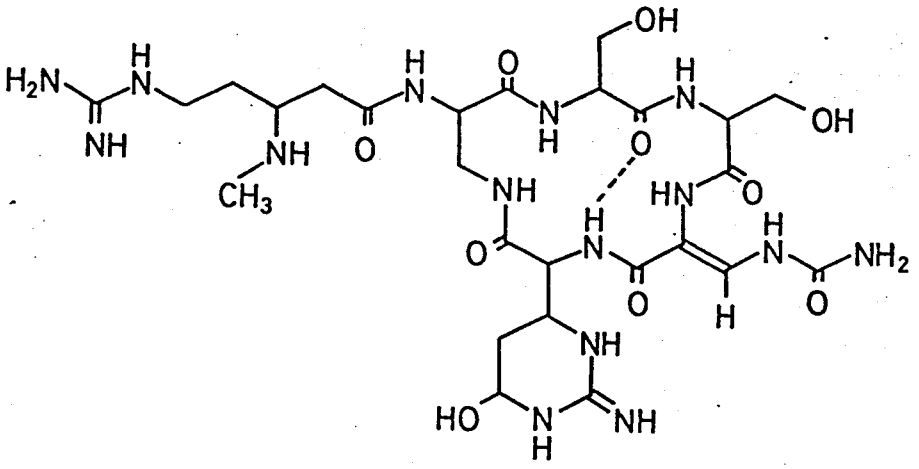
以上のようにツベラクチノマイシンにおけるいくつかの官能基が活性発現において果す役割は部分的に明らかにされていたが、この分子中の最も特異なアミノ酸残基即ちβ-ウレイドデヒドロアラニン並びに環状グアニジノアミノ酸、カプレオマイシジン又はツベラクチジンの存在意義についてはほとんど知られていなかった。そこで著者はこの抗生物質群の構造と生理活性の関係をより深く追求すべく本研究を開始した。

まず第2章では最近発見されたツベラクチノマイシン類似の新抗生物質LL-BM547β[17]の側鎖部分に存在する新アミノ酸N^{β}メチル-L-β-アルギニンの合成について述べる[18]。さらにこの合成法を応用してグアニジノ基を有する天然β-アミノ酸であるブラスチジン酸の合成を行った結果について触れる。次に第3章で前述のβ-ウレイドデヒドロアラニン残基を修飾した構造類似体の合成結果を述べ、第4章では全合成的手法によりグアニジノアミノ酸部を変化させた構造類似体の合成を述べ、これらの結果を基にして、この抗生物質群の活性部位について論じる。なお第3章では同時にβ-ウレイドデヒドロアラニンをデヒドロアラニン(ΔAla)に置き換えた[ΔAla^5]-ツベラクチノマイシンOの全合成も試みた。このものの合成は完成していないが、その研究途上、ジアミノプロピオン酸のHofmann分解を利用するデヒドロアラニンの新合成法を確立することができたので第6章でこの新合成の詳細並びにこの方法を用いた各種のデヒドロアラニンペプチドの合成について述べる。

最後に第5章においてはツベラクチノマイシンに類似する抗生物質カプレオマイシンIA、IBの構造について従来の推定構造の誤りを指摘し、全合成により新構造式を確立した経緯について述べ、さらに数種の構造類似体の合成結果からカプレオマイシンにおける構造－活性相関について論じる。

第2章　ツベラクチノマイシン群新抗生物質LL-BM547βの構成アミノ酸N^{β}-メチル-L-β-アルギニンの合成

McGahrenらは1977年に放線菌の一種から抗結核作用を示すツベラクチノマイシンに類似する新抗生物質を単離し、LL-BM547βと仮称した。彼らはそのアミノ酸組成と^{1}H及び^{13}CNMRスペクトルから、このペプチドの構造としてツベラクチノマイシンA及びBと同一の環状ペンタペプチドに新アミノ酸N^{β}-メチル-L-β-アルギニンが分枝部に結合した推定式(Fig.3-1)を提出した。[17]



LL-BM547β

Fig.2-1

本研究で取り扱っているツベラクチノマイシン及びカプレオマイシン群抗生物質の側鎖部分としてβ-リジン又はそのγ-ヒドロキシ体以外のアミノ酸が見い出されたのはこれが最初の例であったので、著者はその構造を確認する目的でこの新アミノ酸を合成し天然物のデータと比較することを企てた。

このアミノ酸(2-1)の合成に当っては、α,γ-ジアミノ酪酸より出発して、Fig.2-2に示すようにα-アミノ基をトシル化した後メチル化し、次いでArndt-Eistert反応による炭素鎖の延長、最後にω-アミノ基のグアニジノ化を行なう経路が適当であると考えられる。これらの反応を行なう際、その順序には特に注意を要する。即ちArndt-Eistert反応の中間体である混合酸無水物はトシルアミノ基並びにグアニジノ基と反応して副生物を生じることが知られている為、トシルアミノ基のメチル化はArndt-Eistert反応以前に、またグアニジノ化はそれ以後に行なわねばならない。

実際の合成経路をFig.2-3に示した。出発原料であるL-α,γ-ジアミノ酪酸は文献に従いトシル-L-グルタミンのγ-アミドをHofmann転位してアミノ基

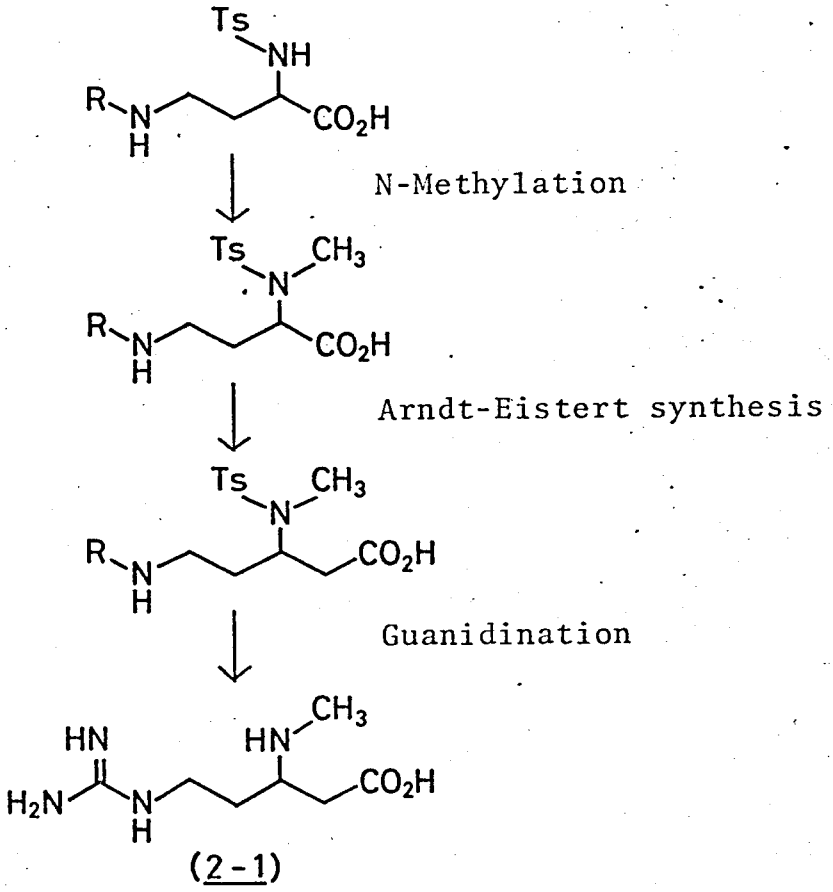


Fig.2-2

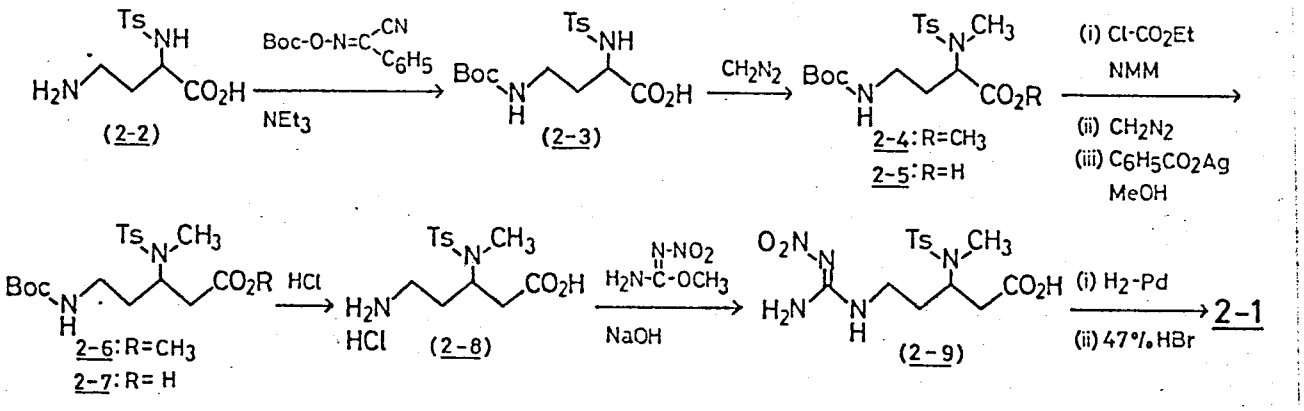


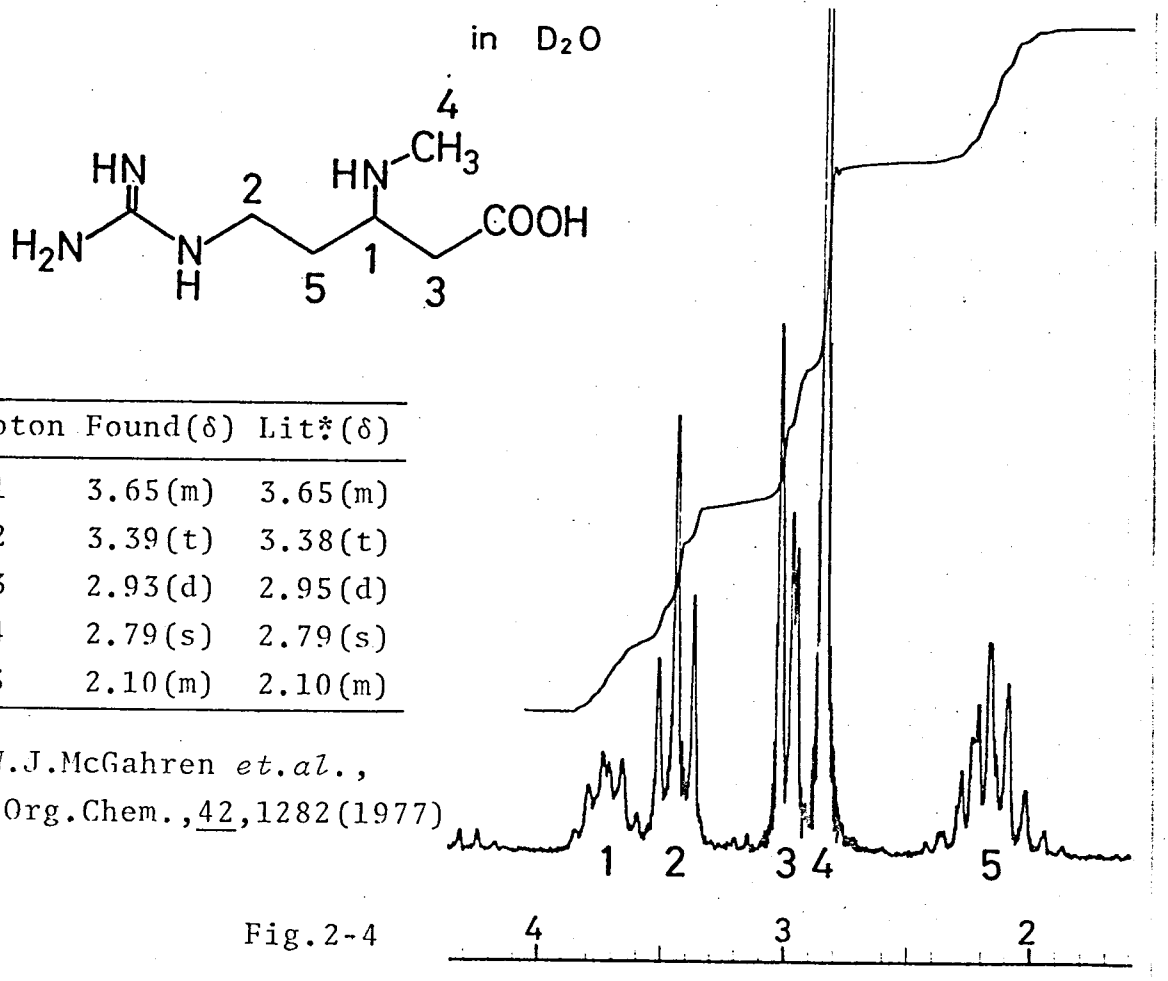
Fig.2-3

に変換して調製した[19]。このγ-アミノ基をもーブトキシカルボニル化してN^{α}とN^{γ}を選択保護してα-トシル-γ-もブトキシカルボニル体2-3とした。次にトシルアミノ基のメチル化に関する従来法は水酸化ナトリウム水溶液中ヨウ化メチルと長時間反応させるもので若干のラセミ化が伴なうことが知られている。著者はこのラセミ化を抑える為により穏和なメチル化法を検討していた。その結果トシルアミノ基は低温でジアゾメタンによりメチル化されることを初めて見い出した。しかしながらこの方法ではβ-炭素に枝分かれのあるアミノ酸及びα-アミノ基以外のアミノ基はメチル化の速度が非常に遅いことが明ら

かになったが従来法よりラセミ化を起こしにくい上に操作が簡便であるので種々のN-メチルアミノ酸の一般的な調製法として利用できると思われる。化合物2-3をジアゾメタンと0℃で一夜反応させα-アミノ基のみを選択的にメチル化して2-4を得た。2-4をケン化した後、混合酸無水物法を用いるArndt-Eistert反応[10]により炭素鎖を延長して化合物2-6へ導いた。次にメチルエステルをケン化により、またブトキシカルボニル基をTHF中塩化水素により切断して化合物2-8とし、末端アミノ基をニトログアニジノ化してNβ-メチル-β-アルギニン骨格を持つ化合物2-9を高収率で得た。

化合物2-9を酢酸中接触還元してニトロ基を除去し、続いて47%臭化水素酸中、3時間煮沸してトシル基を切断した。この粗生成物をAmberlite IRC 120カラムクロマトグラフィーで精製するとTLCで単一のスポットを示す油状物が得られた。このものはN-メチルアミノ酸に特有な弱いニンヒドリン反応及びグアニジノ基に特有な坂口発色をそれぞれ示した。結晶性フラビアン酸塩としての元素分析値もその構造を支持している。

このようにして得られた合成品の塩酸塩は天然物とよく一致する比旋光度及びNMRスペクトル(Fig.2-4)を与えた。従ってこの合成によりMcGahrenの



Proton	Found(δ)	Lit*(δ)
1	3.65(m)	3.65(m)
2	3.39(t)	3.38(t)
3	2.93(d)	2.95(d)
4	2.79(s)	2.79(s)
5	2.10(m)	2.10(m)

* W.J.McGahren *et.al.*, J.Org.Chem., 42, 1282(1977)

Fig.2-4

推定した構造式が確認されたことになる。

さらにここで用いた合成経路は一般性のあるもので、例えばブラスチジン酸[20]又はステンドマイシジン[21]のような他のN-メチル-グアニジノ-β-アミノ酸の合成に応用することも可能である。実際に著者は上に述べた合成経路を応用して天然農薬ブラスチシンS(Blasticidin S)の構成アミノ酸であるブラスチジン酸をFig.2-5に示したように初めて合成した。

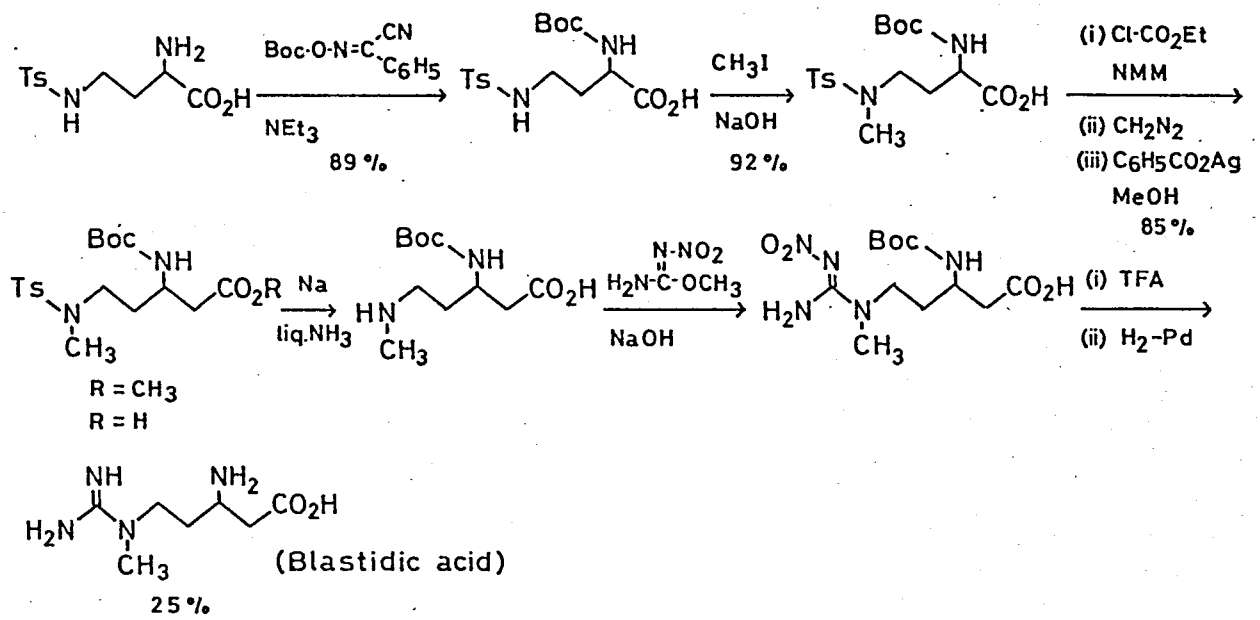


Fig.2-5

第3章　ツベラクチノマイシンの抗菌作用におけるβ-ウレイドデヒドロアラニン残基の意義

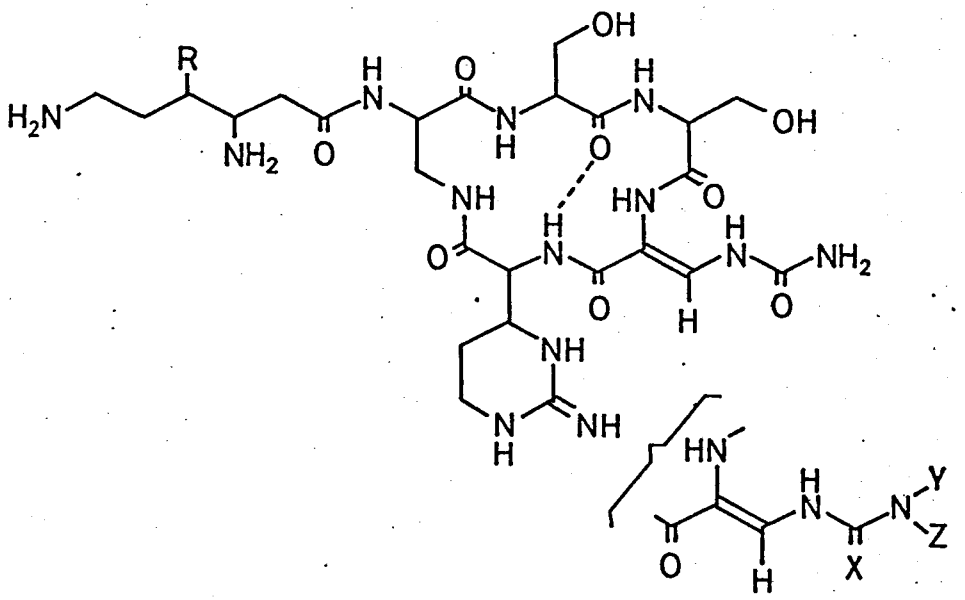
第5番目のアミノ酸残基であるβ-ウレイドデヒドロアラニンは、この抗生物質群にしか見られない特徴的な部分構造である。とりわけ炭素－炭素二重結合がもたらすこのアミノ酸の平面性並びに特異なウレイド基が生理活性の発現においてどのような意義をもつのかということは注目に値する問題である。豊島らはツベラクチノマイシンを還元してβ-ウレイドデヒドロアラニン残基がβ-ウレイドアラニン(Ual)に変化した誘導体及びウレイド基が切断除去されてアラニン残基に変化した誘導体を調製し、その抗菌作用を測定している[15b)](Table 3-1)。この実験結果並びにこれらの誘導体は天然物と異なるコンホメーションを持つという事実を考え合わせると、β-ウレイドデヒドロアラニン残基の炭素－炭素二重結合はツベラクチノマイシンが高活性を示すのに必要なコンホメーションを維持する役割は有しているとはいえ、そのコンホメーションひいてはこの二重結合そのものの存在は活性発現の為の不可欠な要素ではないことが結論される。さらに[Ala^5]体は[Ual^5]体より低いがなお若干の活性を維持していることから、ウレイド基の存在も活性発現の為に必須ではなくただ活性を増大する働きを有するにすぎないと推測することができる。

Table 3-1. Minimum inhibitory concentrations (mcg/ml)[a)] of [Ala^5]- and [Ual^5]-tuberactinomycins

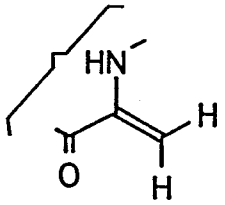
	[Ala^5]-derivative	[Ual^5]-derivative
Tuberactinamine N	>100	25
Tuberactinomycin A	50	50
B	50	50
N	100	12.5
O	100	50

a) Against *Mycobacterium* ATCC 607.

しかし上に述べた両誘導体の抗菌性はかなり低活性であったので、そのような低活性が混在する不純物などの予期せぬ原因に由来する可能性も否定できないと考えられたので、著者は上に述べた結論をさらに確実なものにする為に、β-ウレイドデヒドロアラニン部に関する新たな種類の構造類似体を調製しその抗菌性を調べる計画を立てた。即ちβ-ウレイドデヒドロアラニン残



		X	Y	Z	R
[N'-MethylUda^5]-Tuberactinomycin N	(3-1)	O	Me	H	OH
[N,N'-DimethylUda^5]-	(3-2)	O	Me	Me	OH
[ThioUda^5]-	(3-3)	S	H	H	OH



[ΔAla^5]-Tuberactinomycin O (3-4) (R=H)

Fig.3-1

基の二重結合を残したままウレイド基のみを修飾した誘導体〔N'-メチルウレイドデヒドロアラニン^5〕-(3-1)、〔N',N'-ジメチルウレイドデヒドロアラニン^5〕(3-2)、及び〔チオウレイドデヒドロアラニン^5〕-ツベラクチノマイシンN(3-3)(Fig.3-1)を調製し、これらの置換基が抗菌作用に及ぼす影響を調べた。[22]

さらにウレイド基の存在意義を直接調べる為にβ-ウレイドデヒドロアラニン残基のウレイド基を取り除きデヒドロアラニン(ΔAla)残基とした〔ΔAla^5〕-ツベラクチノマイシンO (3-4) (Fig.3-1)の全合成を試みた。この合成は完成していないが、その研究途上、従来合成の困難であったデヒドロアラニンペプチドの新合成法を確立した。これに関しては第6章で述べる。

3-1 ウレイド交換反応によるウレイド置換ツベラクチノマイシンN誘導体の調製

若宮らはツベラクチノマイシンNを酸処理して側鎖α-ヒドロキシ-β-リジンをα-ラクトンとして選択的に切断除去する際、β-ウレイドデヒドロアラニン残基が著しく分解することを認め、大量の尿素を添加するとこの分解反応を効果的に抑制できることを見い出した。この時尿素はFig.3-2に示した平衡反応を左へずらす働きをすると推定している[14]。もしこのような平衡の存在が事実であるならば、ツベラクチノマイシンを酸性溶液中で尿素誘導体と処理すればこれがもとの尿素構造と置換して導入され、ツベラクチノマイシンの新誘導体が容易に得られると考えた。4種のツベラクチノマイシン同属体のうち実用化され最も大量に入手しやすいツベラクチノマイシンNを用いてこのウレイド交換反応を試みた。

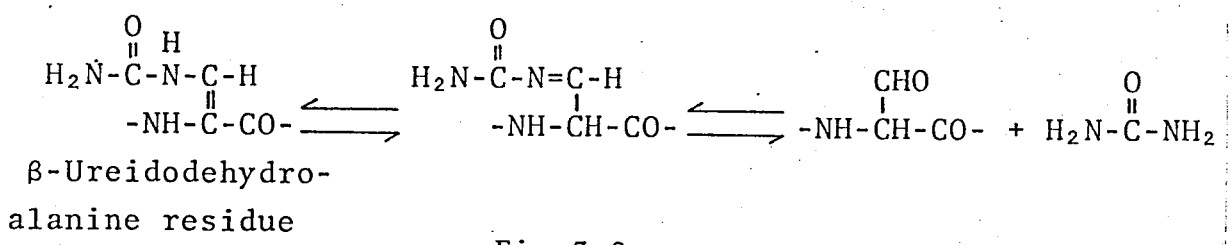


Fig.3-2

まず上で述べた側鎖の切断を起こさず意図するウレイド交換反応を進行させる条件を捜す為の予備実験としてツベラクチノマイシンNをN-メチル尿素の存在下に異なる濃度の塩酸処理を行ない、反応の経過をTLC(フェノール-水-濃アンモニア水、30:10:1)で追跡した。この結果、1N以下の塩酸では原料はほとんど変化せず、また6N以上の濃度ではα-ヒドロキシ-β-リジンラクトンの生成が著しいのに対し、3N塩酸中での反応において約30日後に原料は新たな単一の生成物に変換されたことを認めた。この生成物は後に述べる方法で単離してNMRスペクトルを測定した結果、目的とするN'-メチルウレイドデヒドロアラニン[5]-ツベラクチノマイシンNであることが判明した。

以上の予備実験の結果によってツベラクチノマイシンNのウレイド基は容易に置換ウレイド基に変換し得ることがわかったので、N'-メチルウレイド体(3-1)の他にN',N'-ジメチルウレイド体(3-2)及びチオウレイド体(3-3)を調製した。まずツベラクチノマイシンN·3塩酸塩(1.00g)を3N塩酸(10ml)中尿素誘導体(N-メチル尿素、N,N-ジメチル尿素又はチオ尿素、4.00g)と室温で30日間反応させた。この反応混合物をAmberlite IRC50(NH_4型、酢酸アンモニウム緩衝液溶出)カラムクロマトグラフィーで精製した後、目

目物を含むフラクションをAmberlite IRC50（ピリジン型、1N酢酸溶出）カラムで脱塩して、3種のツベラクチノマイシンN誘導体をそれぞれ純粋に得ることができた（Fig.3-3）。

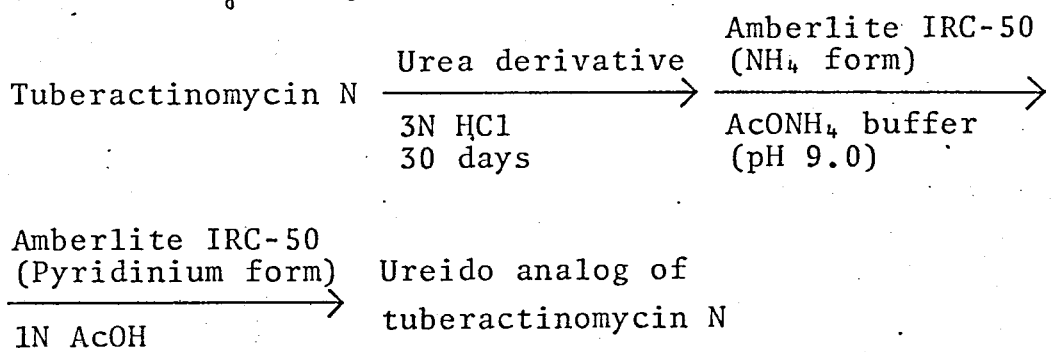


Fig.3-3

Table 3-2. Physicochemical properties of the compounds 3-1, 3-2 and 3-3

	3-1(3HCl)	3-2[a)] (3HCl)	3-3(3AcOH)
Yield(%)	75	64	77
R_f[b)]	0.27	0.36	0.22
R_f[c)]	0.54	0.52, 0.55	0.61
m.p.(dec)	232–235°	220–222°	175–178°
$[\alpha]_D^{29}$(c0.7,H_2O)	-18.7°	-14.0°	-23.2°
Elemental analysis[d)] Found(Calcd) (%) C	38.25(38.59)	36.44(36.27)	40.00(39.78)
H	6.03(5.98)	6.80(6.74)	6.75(6.57)
N	22.43(22.51)	19.28(19.64)	19.36(19.46)
	Cl;13.46(13.15)	Cl;11.63(11.47)	S; 3.35(3.43)
UV (nm) (ε) 0.1N HCl	272(24,900)	275(25,600)	297(21,600) 257(16,700)
H_2O	272(24,800)	275(25,300)	297(22,000) 257(17,100)
0.1N NaOH	288(14,000)	290(16,700)	335(23,200) 264(8,940)

a) A mixture of E- and Z-isomers.

b) TLC (Silica gel, phenol-water-c.NH_4OH, 30:10:1).

c) TLC (Silica gel, 10%$AcONH_4$-acetone-10%NH_4OH, 9:10:1).

d) Calcd. for $C_{26}H_{45}N_{13}O_{10}\cdot 3HCl$ (3-1), $C_{27}H_{47}N_{13}O_{10}\cdot 3HCl\cdot 4H_2O\cdot MeOH$ (3-2) and $C_{25}H_{43}N_{13}O_9S\cdot 3AcOH\cdot 3H_2O$ (3-3).

NMR spectra of [methylUda^5]-tuberactinomycin N

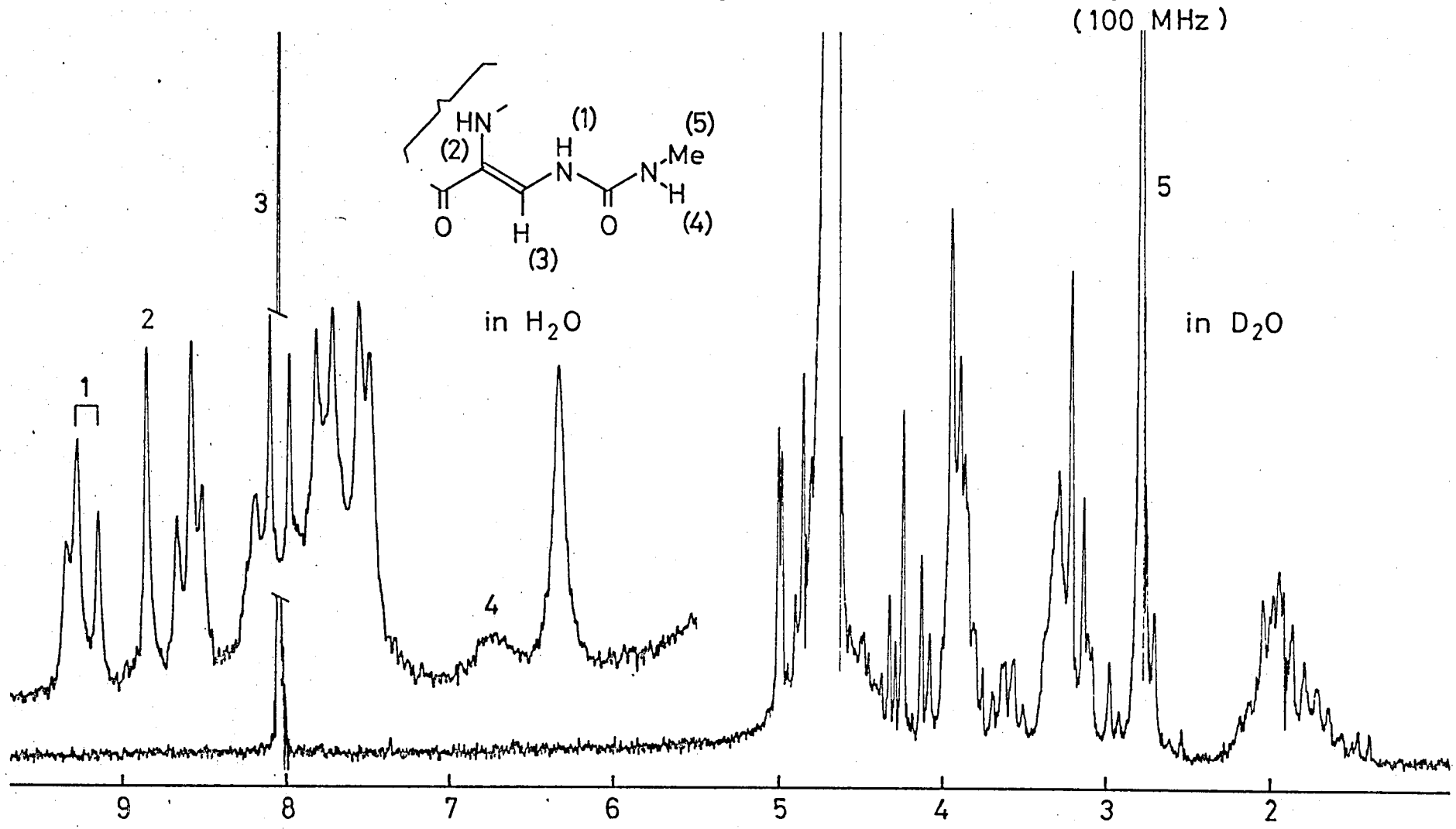
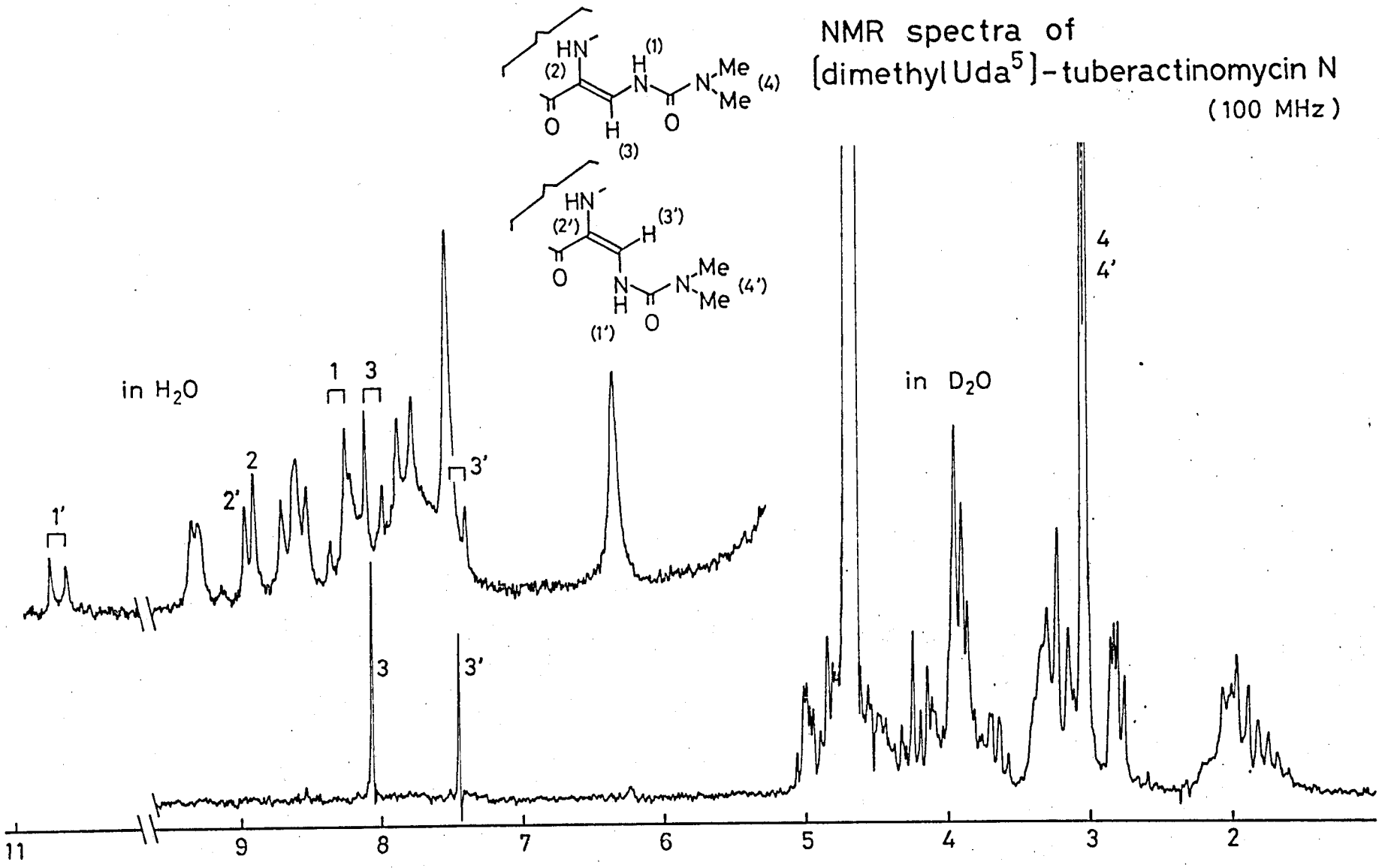


Fig.3-4


NMR spectra of
[dimethyl Uda5]-tuberactinomycin N
(100 MHz)
in H2O
in D2O
1'
2'
2
1
3
3'
3
3'
4
4'
HN
(2)
H
(1)
N
Me
N
Me
(4)
O
H
(3)
O
HN
(2')
H
(3')
O
N
H
N
Me
Me
(4')
(1')
O
11
9
8
7
6
5
4
3
2

Fig, 3-5

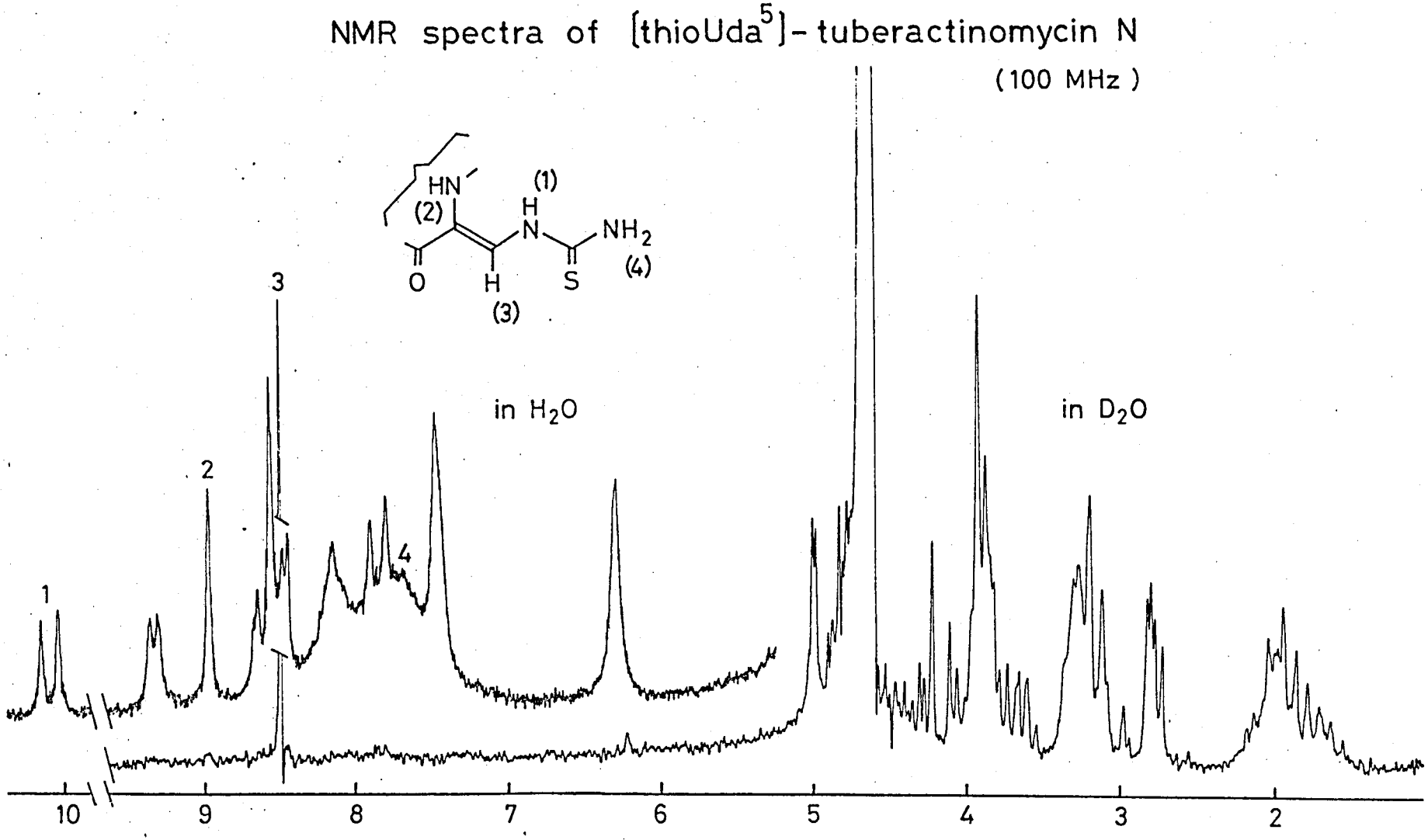

NMR spectra of [thioUda5]-tuberactinomycin N
(100 MHz)
HN
(2)
(1)
H
N
NH2
O
H
S
(4)
(3)
in H2O
in D2O
1
2
3
4
10
9
8
7
6
5
4
3
2

Fig.3-6

Table 3-2 にそれらの物理化学的諸性質を示した。またFig.3-4～3-6のNMRスペクトルにおいて、これらの誘導体はいずれも修飾されたβ-ウレイドデヒドロアラニン残基に由来するシグナル以外はすべて天然ツベラクチノマイシンNのシグナルと一致しており、ここで得た化合物は全て修飾された残基を除く構造がコンホメーションも含めて天然と同じであることが確認できた。

β-ウレイドデヒドロアラニン残基の二重結合に関しては、天然のZ型以外にE型も生じる可能性が考えられるが、NMRスペクトルにおけるオレフィンシグナルを天然物のものと比較した結果メチルウレイド体(3-1)とチオウレイド体(3-3)は天然と同型のZ体であり、ジメチルウレイド体(3-2)はZ体とE体が約3:2の比で混合している混合物であることが明らかとなった。なおチオウレイド体(3-3)のオレフィンシグナルはイオウ原子の影響で天然物のそれより若干低磁場シフトしている。またジメチルウレイド体(3-2)の両異性体はTLCではわずかに分離可能ながら、カラムクロマトグラフィーでは分離することができなかったので、混合物として抗菌作用を測定した。

ジメチルウレイド体(3-2)のNMRスペクトルにおいて注目すべき点は、ウレイド部分のNHシグナルが天然物のそれより大きくシフトしている点である。この事実はFig.3-7における二面角aまたはbが天然型(a=b=180°)からずれた結果として説明することができる。即ちジメチルウレイド基のようなかさ高い原子団を導入すると、二重結合に関する幾何異性のみならず、ウレイド部分のコンホメーションにも変化をもたらすことが明らかになった。

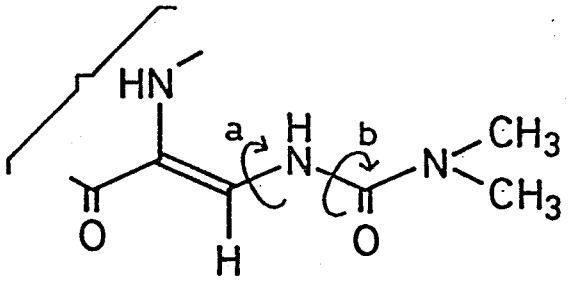


Fig.3-7

ここで確立したウレイド交換反応は保護基や縮合試薬を何ら用いることなく天然ツベラクチノマイシンを修飾できるきわめて簡単な反応であるので、この反応を利用して種々の尿素類を導入できれば、天然物より高活性の誘導体を非常に簡便な操作で創製できる可能性が考えられた。しかしながら先に述べた操作でFig.3-8に示した種々の尿素類のツベラクチノマイシンN分子

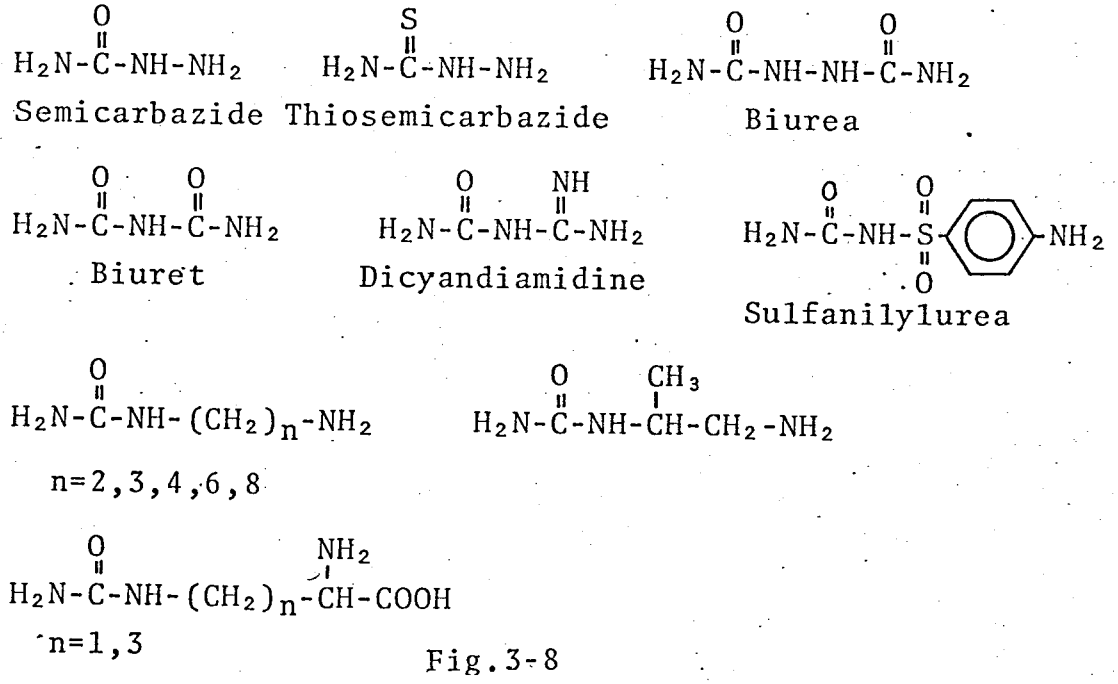


Fig.3-8

への導入を試みたが、これらは全て反応せずツベラクチノマイシンNの分解が起こるのみであった。この結果から考察するとウレイド交換反応はごく限られたpKa値を持つ立体障害の少ない尿素誘導体にしか適用できないと考えられる。

3-2 ウレイド置換ツベラクチノマイシンN誘導体の抗菌作用についての考察

化合物3-1、3-2及び3-3の抗菌スペクトルをTable 3-3に示した。ツベラクチノマイシンは病原菌体内の蛋白合成の場であるリボゾームと結合し、その細菌の蛋白合成を阻害することが確証されている。この薬剤分子とリボゾームとの間に働く結合力としてはイオン間の相互作用、水素結合による相互作用、疎水性相互作用が挙げられるが、荷電を持たずしかも親水性であるウレイド基がリボゾームと相互作用するとすれば、水素結合による可能性が最も高いと考えられる。しかしながらこのウレイド部分にメチル基を導入した化合物3-1及びウレイド基のカルボニルを水素結合性の弱いチオカルボニルに変化させた化合物3-3でもいずれも天然物と全く同程度の抗菌力を示しているのでウレイド部分は、そのような水素結合による相互作用にはほとんど関与していないと推測される。ジメチルウレイド体(3-2)が天然物よりはるかに劣るものの尚若干の活性を残している事実もこの推論をさらに支持するものであると思われる。

Table 3-3. Minimum inhibitory concentrations (mcg/ml) of the compounds 3-1, 3-2 and 3-3[a)]

	3-1	3-2	3-3	Tum N
S. aureus MS353	>100	>100	100	>100
St. agalactiae 1020	>100	50	>100	>100
C. diphtheriae P.W.8	6.3	12.5	3.1	3.1
B. subtilis ATCC 6633	50	100	12.5	25
E. coli B	50	>100	50	50
K. pneumoniae ATCC 10031	25	>100	12.5	25
S. typhosa H 901	50	>100	25	50
Sh. sonnei E33	100	>100	100	100
P. vulgaris OX19	50	>100	50	50
Mycobacterium ATCC 607	12.5	100	12.5	6.3
Mycobacterium 1088	25	>100	25	25

a) Abbreviation; Tum:tuberactinomycin.

次にジメチルウレイド体(3-2)の活性が天然物より低い原因を考察すると、メチルウレイド体(3-1)は天然物と同等の活性を示すにもかかわらず、ジメチルウレイド体(3-2)はそれとはかけ離れて低活性であるのは、ジメチルウレイド構造そのものに基因する可能性も考えられるが、その他にこの化合物のみがZ、E両異性体の混合物であり、しかもそれらのウレイド部分のコンホメーションが非天然型である事実も無視できない。むしろ非天然型であるE体がこの混合物の約半量を占めること、及びZ体が非天然型のコンホメーションをとっていることが、この混合物の低活性の主原因と考えたい。

3-3 ウレイド交換反応による[[^{14}C]ウレイドデヒドロアラニン^{5}]-ツベラクチノマイシンOの調製

著者は、東京大学田中信男教授の依頼を受けて、ツベラクチノマイシンの作用機構の研究に使用する放射性ラベルしたツベラクチノマイシンの調製を上記のウレイド交換反応を利用して行なった[23)]。この反応で放射性尿素を導入する場合、尿素を大過剰に使用する点は不利であるが、[^{14}C]尿素は比較的安価であり、しかも反応後回収して再利用することも可能であるので実際上の問題はなく容易に標識化合物を調製できる。実際にツベラクチノマイシンNでこの反応を行うと、反応中一部トレオニンヒドロキシ-β-リジンの脱離が起る恐れが

あるので、これを避ける為、β-リジン側鎖を持つツベラクチノマイシンOを材料に用いることにした。

まず予備実験として低放射活性の尿素を用いて、特に放射活性物質処理の為に種々の点で反応操作の改善を行った。即ち試験管中でツベラクチノマイシンO(15mg)と尿素(15mg, 0.1mCi)を3N塩酸(0.5ml)と共に室温で30日間反応させた後、反応混合物をSephadex G10カラムで精製した。生成物の単離の為にイオン交換クロマトグラフィーを行なうと煩雑な操作を要し、しかも小規模実験の場合目的物の損失が予想された為である。この結果Fig. 3-9に示したようにツベラクチノマイシンOを過剰の尿素及び塩酸から効果的にかつ簡便に分離できた。このようにして得られた目的物はTLC(フェノール-水-濃アンモニア水、30:10:1)で天然物と一致する単一なスポットを与え、目的とする標識ツベラクチノマイシンOが純粋に得られることが確認された。

次に以上の操作を高活性のラベル化合物の調製に適用して、同じ規模でツベラクチノマイシンOをより高活性の尿素(3.9mCi)と反応させた。この場合、前回と異なり反応中に黒色沈殿が生じた。これは市販の放射活性尿素に含まれていた不純物もしくは高密度の放射線により生じた何らかの不安定分子種の分解産物と考えられたが、Sephadex カラムクロマトグラフィーの段

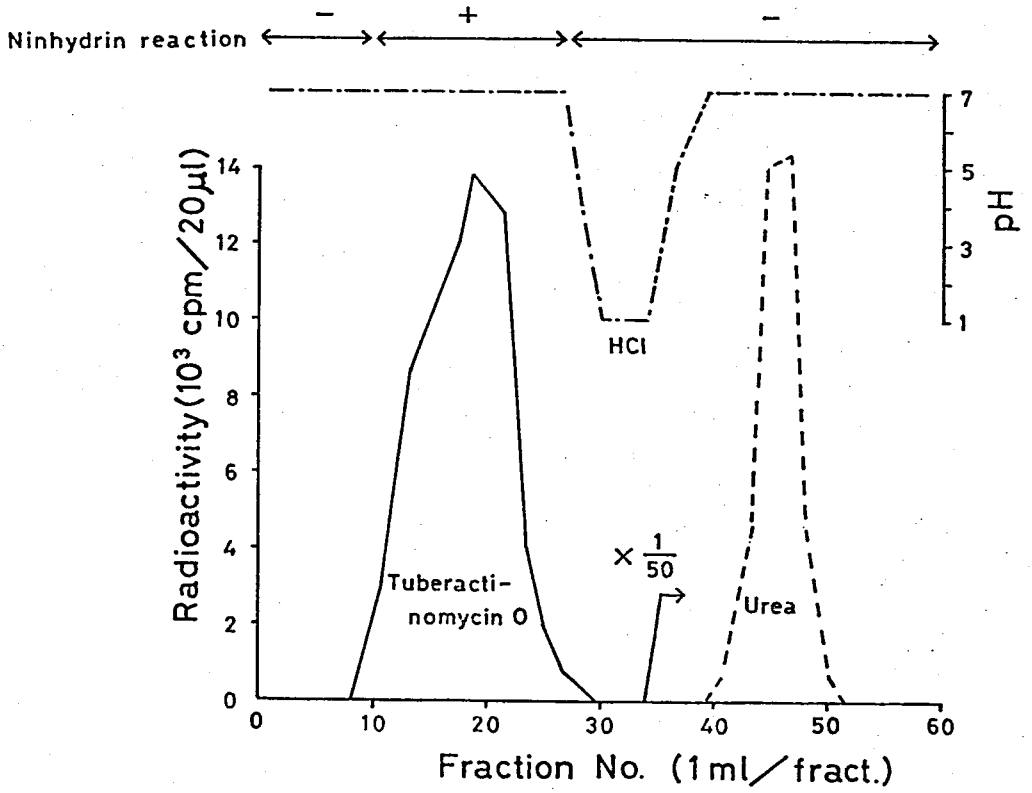


Fig.3-9

階で完全に除くことができた。ニンヒドリン反応陽性のフラクションを集め凍結乾燥すると{[^{14}C]ウレイドデヒドロアラニン^5]-ツベラクチノマイシンO}が白色粉末として約70%の収率で得られた。比放射活性は15.0 mCi/mmolであった。

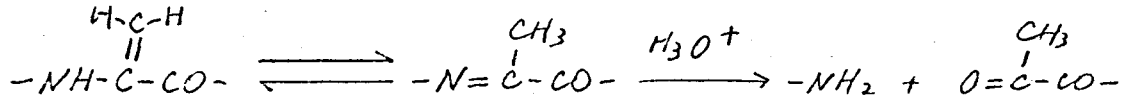
以上の方法によりこの種の化合物を非常に簡便に放射性標識することが可能であり、今後ツベラクチノマイシン類やカプレオマイシン類のラベル化合物が必要とされる場合、このウレイド交換法は有効に利用できると思われる。なおこの実験によって得られた{[^{14}C]ウレイドデヒドロアラニン^5]-ツベラクチノマイシンO}は直ちに田中研究室において大腸菌リボゾームとの結合実験に用いられ、ツベラクチノマイシンOはリボゾームの50Sと30Sのサブユニットに特異的に結合し、そのことがペプチジル-t-RNAのトランスロケーションを阻害する結果となり、このことが大腸菌の蛋白合成を阻害する抗菌作用の本質であることが明らかにされるという貴重な実験結果も生むことになった。[24)]

3-4 {ΔAla^5]-ツベラクチノマイシンOの合成の試み

この化合物を合成する際、最も問題となるのはデヒドロアラニン部分の合成である。デヒドロアラニンは次に述べるような性質をもつ極めて不安定なアミノ酸である。

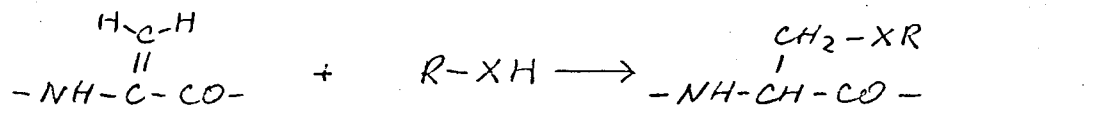
(1) 光又は空気の作用により容易に重合する。この性質は特に低分子量のデヒドロアラニン誘導体において著しい。またシリカゲルは重合を促進する。

(2) 中性もしくは塩基性状態では比較的安定であるが、酸性溶液中ですみやかに水解される。

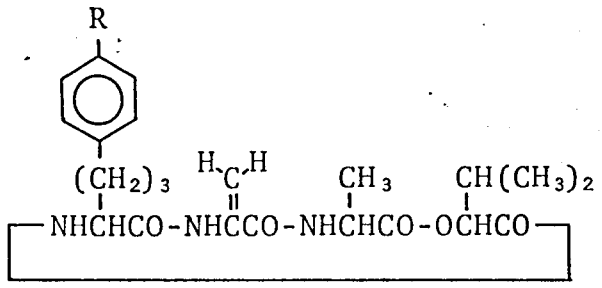


(3) β-ウレイドデヒドロアラニン残基は接触還元に抵抗するのに対し、デヒドロアラニン残基は容易に還元されてアラニンになる。

(4) デヒドロアラニン中の二重結合は種々の求核剤の付加をうける。



これらの諸性質の為にデヒドロアラニンを含むペプチドの精製手段並びに反応条件は大きい制約をうける。従ってデヒドロアラニンペプチドを合成するには、デヒドロアラニン残基の前駆物質を用いてペプチド合成を進めて、これをできるだけ最終に近い段階でしかも効率よくデヒドロアラニンへ変換するという基本方針をとらざるを得ない。事実、トリペプチド以上のデヒドロアラニン含有天然物の唯一の合成例であるリンゴ斑点落葉菌毒素AM-Toxin (Fig.3-10)の合成において、泉屋らはセリンを含む環状テトラデプシペプチドを合成した後、セリンをデヒドロアラニンに変換する経路でのみ成功し、予めデヒドロアラニン残基を導入して反応を進める経路ではことごとく失敗している。[25]



	R
AM-Toxin I	OCH_3
II	H
III	OH

Fig.3-10

デヒドロアラニンの合成に関しては第6章で述べるが、まず従来法のうち原料入手の容易さ及びペプチド合成における前駆物質使用上の利点の点から、セリンのO-トシル化法を検討して、この方法によるツベラクチノマイシン類似体の合成を試みた。

保護環状ペンタペプチド(3-5、Fig.3-11)は常法に従って問題なく合成できた。この化合物の3種のセリン残基の中で、後にデヒドロアラニンに変化させるべき前駆体のセリンと最後までセリン残基として残すべき2個の残基を区別する為に、前者は遊離の状態で、後者はt-ブチル基で保護して導入した。

まず化合物3-5を接触還元して脱ニトロ化した後、セリンのデヒドロアラ

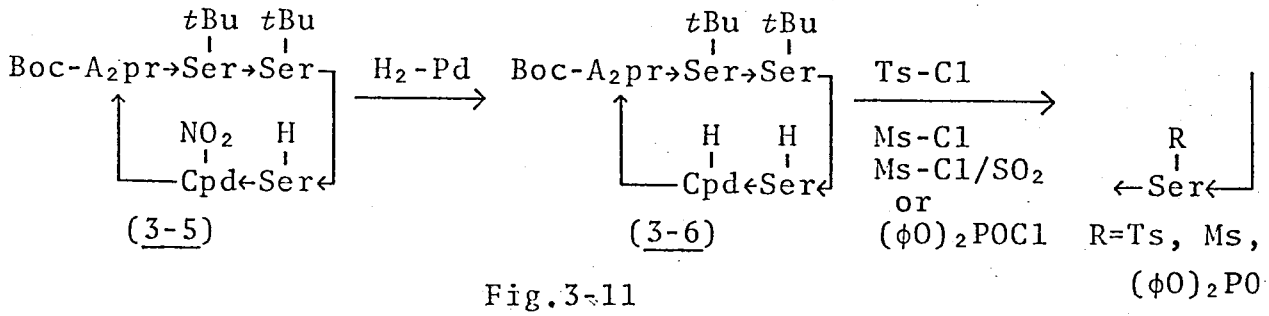


Fig.3-11

ニンへの変換を試みた(Fig.3-11)。セリン残基は水酸基のトシル化次いで塩基処理によるトシルオキシ基のβ脱離を経て、デヒドロアラニン残基に導くことができる。常法に従い化合物3-6をピリジン中塩化トシル処理して、セリンのトシル化を試みたが、いかなる反応条件下でも出発原料はTLCで見る限り全く変化せず、目的物は得られなかった。この反応の不成功の原因を考察すると、水酸基のトシル化の成否は立体障害に左右されやすいことが第1に考えられる。泉屋らもAM-Toxin IIの合成途上でセリンのトシル化が全く進行せず、その原因をセリンに隣接する残基の立体障害の影響と推定している[26]。彼らは塩化トシルより立体的に小さい塩化メタンスルホニルを使用することで低収率ながら目的物を得ている。著者もこれに習い、塩化メタンスルホニル及びさらに活性化された試薬塩化メタンスルホニル/二酸化イオウを試したが、やはり目的物は全く生じなかった。この他に、ジフェニルリン酸クロリドによる水酸基のリン酸エステル化[27]も試みた。この試薬を用いると、化合物3-7及び3-8(Fig.3-12)中のセリン残基から、リン酸エステルを経て塩基処理により、デヒドロアラニン残基に高収率で導くことができた。しかし、環状ペンタペプチド3-6はこの試薬に対しても全く反応しなかった。

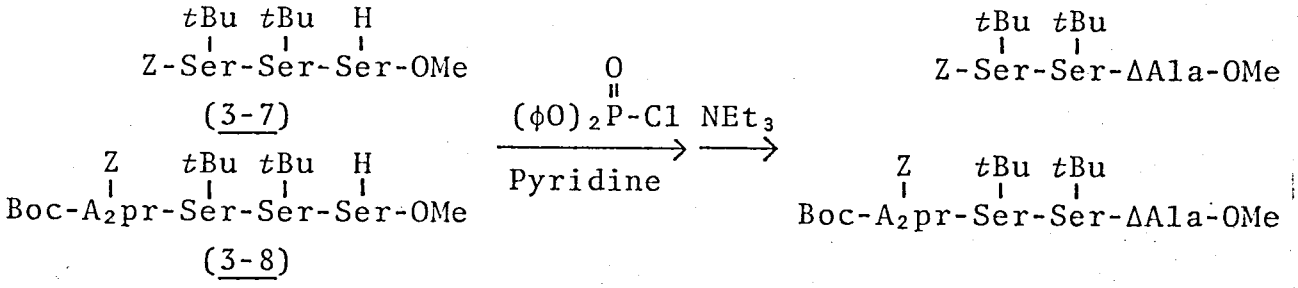


Fig.3-12

化合物3-6はAM-Toxinよりさらにかさ高い原子団を多く有しており、問題のセリン残基はそれらの中に完全に埋もれた形で存在している為に、水酸基の修飾が進行しないのではないかと考えられる。以上の実験結果より、化合物3-6中のセリン残基をデヒドロアラニンに変換することは困難と結論せざるを得ず、この経路による合成を断念した。しかし立体障害がこの失敗の原因であるとすれば、上記の試薬よりも立体的に小さい試薬を使用し得る反応が他に考えられれば、目的を達成する可能性があると推論した。このような考えのもとに、次にS-メチルシステイン法(第6章参照)の検討を行った。

S-メチルシステイン法に対し、予め検討しておくべき問題点は、保護基特にカプレオマイシジンのニトロ基の切断方法並びにその切断とS-メチルシス

テインのデヒドロアラニン化の順序である。即ちFig.3-13に示した化合物3-9を合成中間体と考えると、S-メチルシステインのデヒドロアラニン化をニトロ基の還元後に行なう場合、イオウ原子が触媒毒となり還元を阻害することが考えられ、その逆の順序で行なう場合には、デヒドロアラニン残基の分解を伴なわないニトロ基の切断条件を見い出さねばならない。この2点に関してジペプチド3-10 (Fig.3-14) をモデルペプチドとして予備実験を行った。

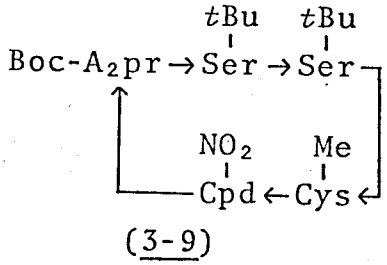


Fig.3-13

まずジペプチド3-10中のS-メチルシステイン残基をデヒドロアラニンに導き3-11とし、この化合物の脱ニトロ化を接触還元又はフッ化水素処理によって試みた。しかし前者ではニトロ基に先立ってデヒドロアラニンが還元され、またフッ化水素処理ではデヒドロアラニン残基は完全に分解した。この結果によって、デヒドロアラニン化した後、ニトロ基を切断する合成経路は否定された。

次に脱ニトロ化後デヒドロアラニン化する経路の可能性を検討した。2価のイオウの存在下での接触還元は大量の触媒を用いるか又はBF3・エーテル錯体を触媒と共に添加した場合成功した例が知られている。しかし化合物3-10のニトロ基の還元は触媒量を多くしても全く進行せず、BF3・エーテル錯体を加えると、還元は進行する反面、この試薬によりブトキシカルボニル基が部

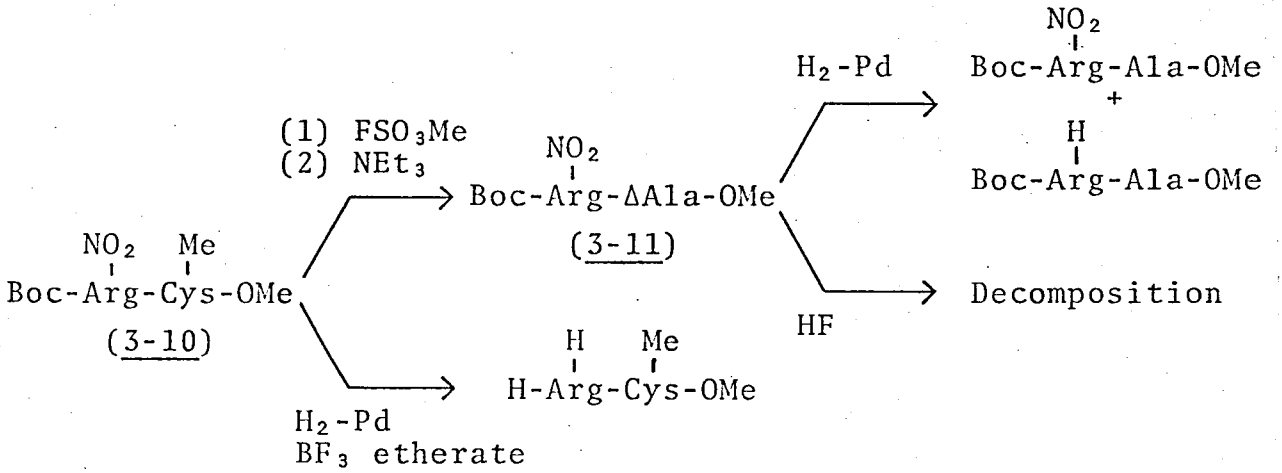


Fig.3-14

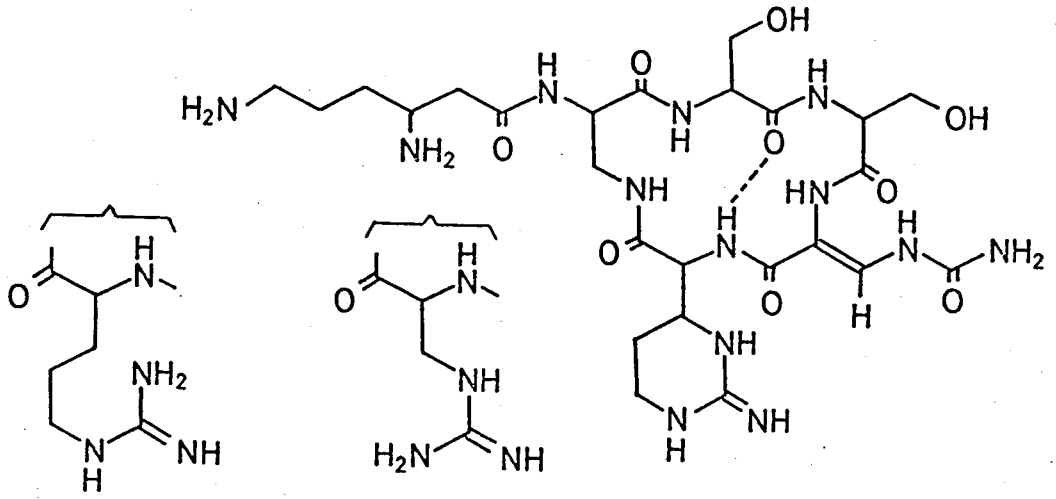
分的に切断された。化合物3-9中のブトキシカルボニル基あるいはt-ブチル基はデヒドロアラニン化の時に必要な保護基であり、これらが脱ニトロ化の段階で切断されたことは、この経路によっても3-9以降の合成が進行できないことを意味するものである。

以上の実験結果より、S-メチルシステイン法もこの合成に利用できないことが判明した。以上の経験を基にして考えると、前駆体にイオウ原子のような触媒毒が含まれず、しかもその前駆体が立体的に小さい試薬でデヒドロアラニンに変換できる合成法があるならば、目的とする[ΔAla]-ツベラクチノマイシンOの合成に効果的に応用できるのではないかという考えに到達した。この考え方に基ずいて著者は最後にこれらの条件を満たすものとして、α,β-ジアミノプロピオン酸のHofmann分解を利用する新しいデヒドロアラニン合成法を見い出すことができた。これに関しては第6章で述べる。

第4章　ツベラクチノマイシンの抗菌作用における環状グアニジノ基の意義

ツベラクチノマイシンやカプレオマイシンは他にはほとんど見られない特異な部分構造のひとつとして、カプレオマイシジン又はツベラクチジン残基の環状グアニジノ基を含んでいる。既に見てきたように、ツベラクチノマイシンに関しては第1残基即ち分枝部アミノ酸の存在、第3、4残基のオキサゾール基の存在、第5残基のウレイド及び二重結合の存在はいずれもその抗菌性発現に決定的な因子でないことが明らかとなった。そうすればツベラクチノマイシンの分子中最も重要な構造部分は残る第6残基即ちグアニジノアミノ酸部分にある可能性が高まってきた。この特異な官能基が生理活性発現において、はたして必須の要素であるかどうかという問題を判定することは、本研究中最も重要でかつ興味のあるところである。

すでに豊島らはこのグアニジノ基をニトロ化した構造の〔Cpd $(NO_2)^6$〕-ツベラクチノマイシンOを合成しそれが全く活性を示さないことから、グアニジノ基の塩基性が抗菌性発現に必要であることを示唆した。しかしこのグアニジノ基が環状構造をとっていることの意義については全く知られていなかったので、これを明確にする目的で環状グアニジノ基を二つの異なる様式で開環した構造に相当する2種のツベラクチノマイシン類似体即ち〔Arg^6〕-ツベラクチノマイシンO（4-1）及び〔Gal^6〕-ツベラクチノマイシンO（4-2）（Gal: β-グアニジノアラニン）（Fig.4-1）をそれぞれ全合成してその抗菌活性を測定した。[22]



[Arg^6]-tuberactinomycin O (4-1)　　[Gal^6]-tuberactinomycin O (4-2)　　Tuberactinomycin O

Fig.4-1

4-1 〔Arg⁶〕-ツベラクチノマイシンOの合成

この化合物の合成経路をFig.4-2に示した。β,β-ジエトキシアラニン残基をC端として、逐次ペプチド鎖を延長して、鎖状ペンタペプチド4-5を得た。これをN-ヒドロキシコハク酸イミド活性エステル法で環化した後、脱保護及びウレイドデヒドロアラニン化を行ない〔Arg⁶〕-ツベラクチナミンN(4-10)へ導いた。これに常法によりβ-リジン残基を導入して最終生成物〔Arg⁶〕-ツベラクチノマイシンO(4-1)を得ることができた。化合物4-10及び4-1のNMR

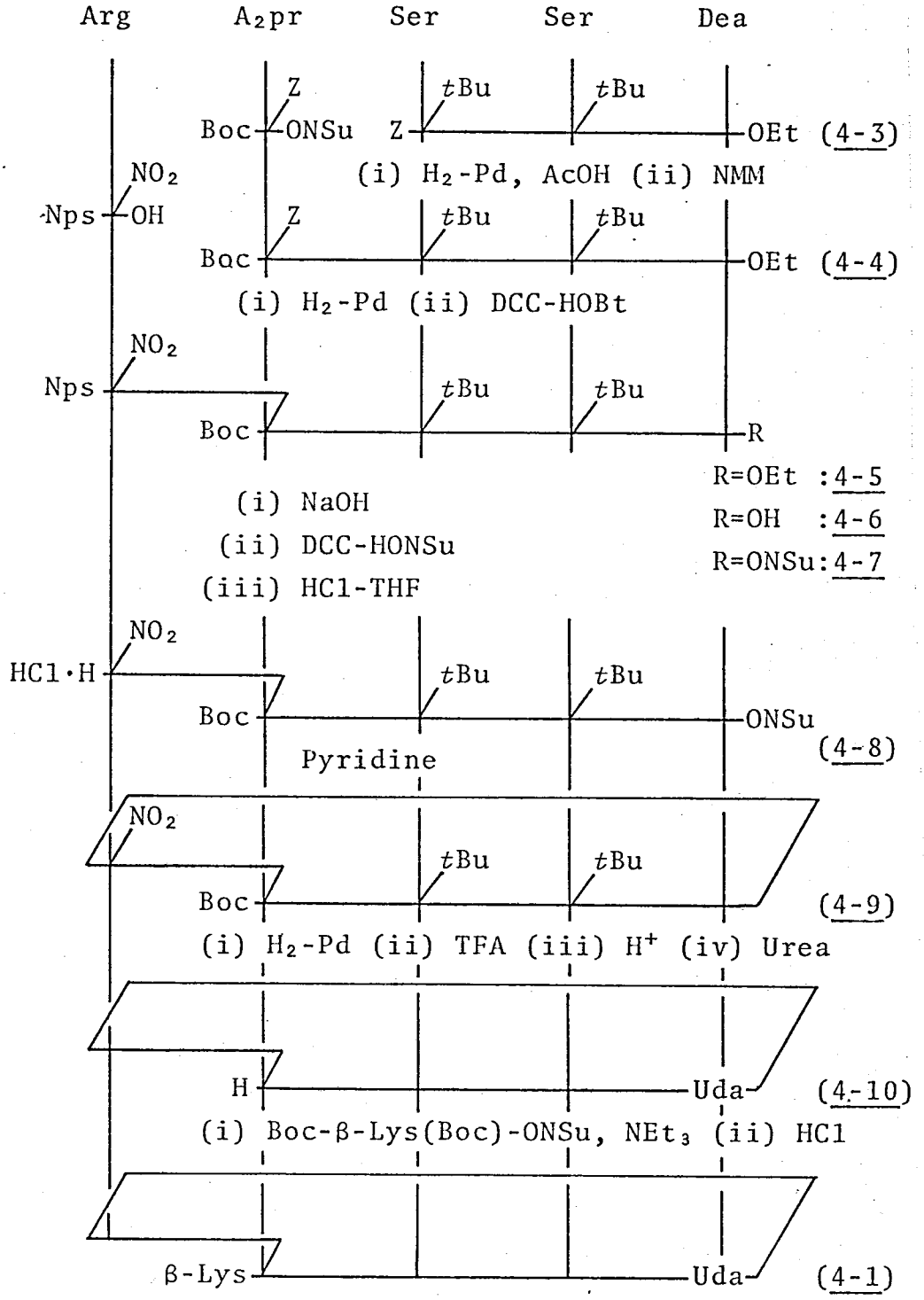


Fig.4-2

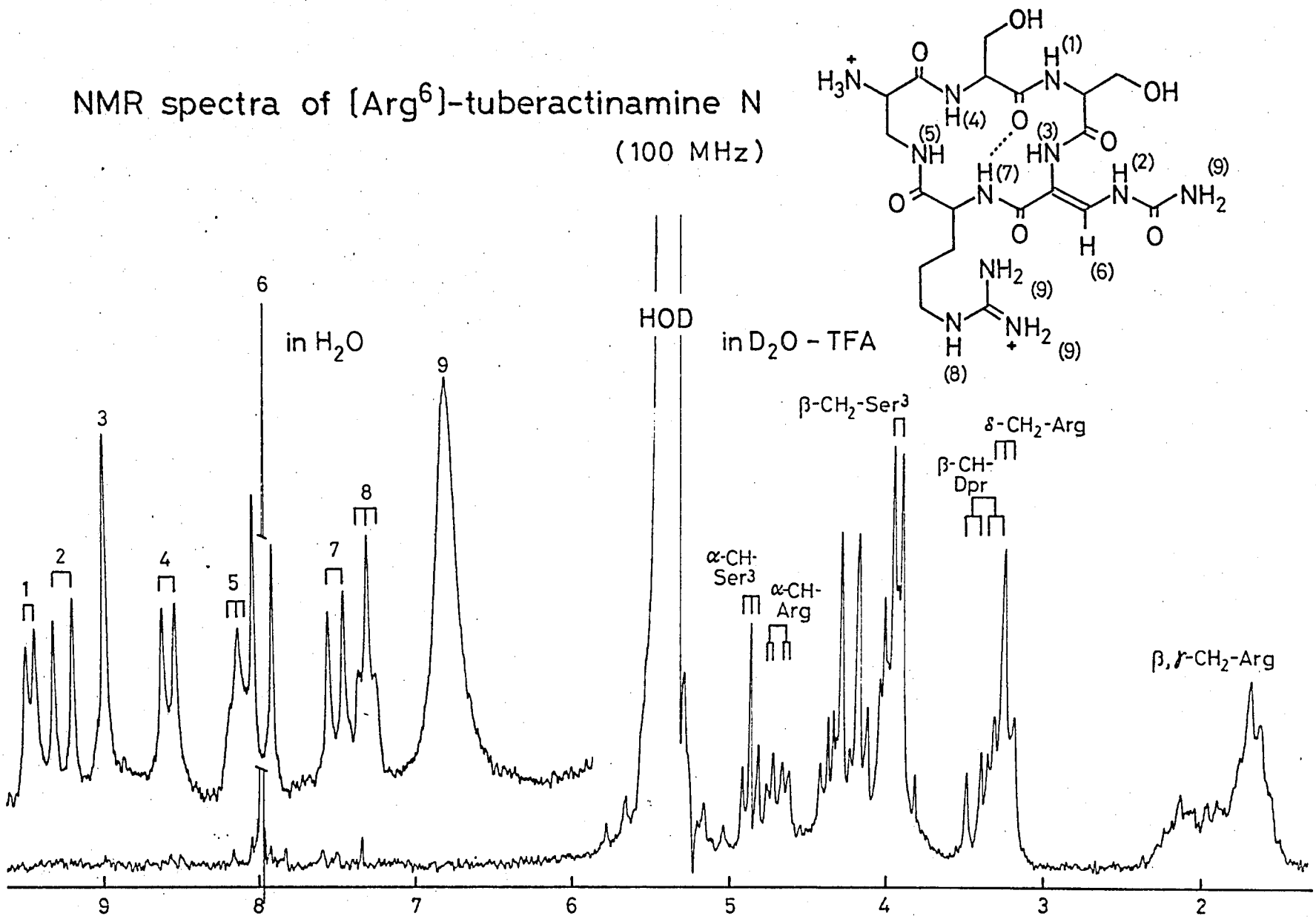

NMR spectra of [Arg6]-tuberactinamine N
(100 MHz)
in H2O
HOD
in D2O - TFA
1
2
3
4
5
6
7
8
9
α-CH-Ser3
α-CH-Arg
β-CH2-Ser3
β-CH-Dpr
δ-CH2-Arg
β,γ-CH2-Arg
9
8
7
6
5
4
3
2

Fig.4-3

NMR spectra of [Arg^6]-tuberactinomycin O

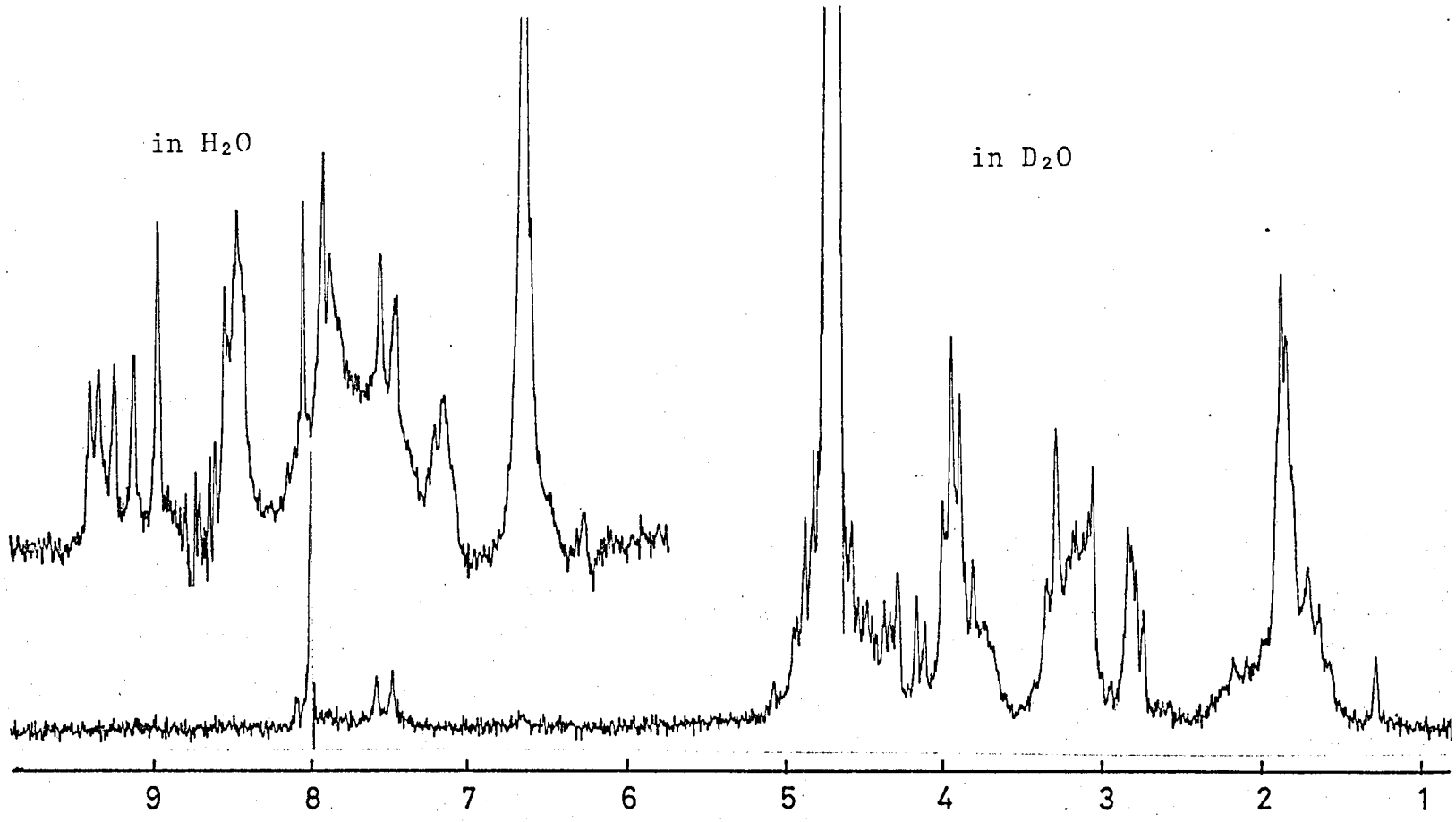


Fig. 4-4

スペクトルをFig.4-3及び4-4に示した。いずれも天然物と類似のパターンを与え、これらの化合物が天然物と同じコンホメーションをとっていることを示している。

4-2 [Gal6]-ツベラクチノマイシンOの合成

この化合物を合成する時、2通りの経路が考えられる。即ちα,β-ジアミノプロピオン酸をペプチド中に組み込んでおき、そのβ-アミノ基を適当な段階でグアニジノ化してβ-グアニジノアラニン残基とする方法と、初めからβ-グアニジノアラニンを用いてペプチド合成を進める方法である。前者の形式はアルギニン含有ペプチドの合成に時として見うけられるが、ペプチド合成を進めてゆく上で問題の多いグアニジノ基を最終段階で導入する点で有利であ

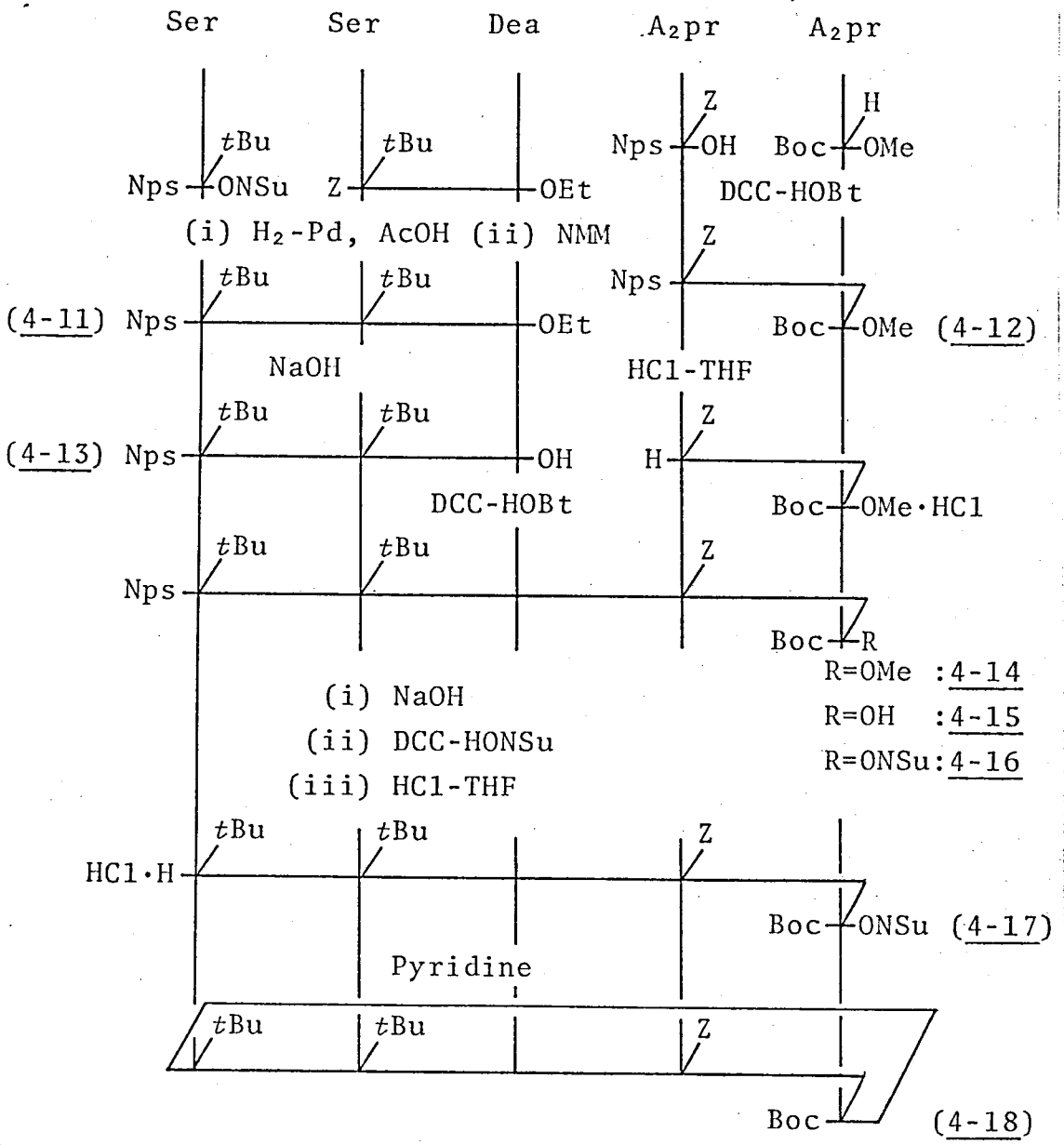


Fig.4-5

る。従ってまずこの方法による合成を試みた。

Fig.4-5 と 4-6 に合成経路を示した。トリペプチド 4-11 及びジペプチド 4-12 の両フラグメントは各々常法により合成した。トリペプチド 4-11 のN端にジペプチド 4-12 を縮合することを考え、4-11 の O-ニトロフェニルスルフェニル基を切断したところ、生じたトリペプチド塩酸塩は油状でしかもその回収率が低い為、ジペプチドはトリペプチドのC端に縮合して鎖状ペンタペプチド 4-14 を得た。これを常法通り環化して環状ペンタペプチド 4-18 へ導いた。

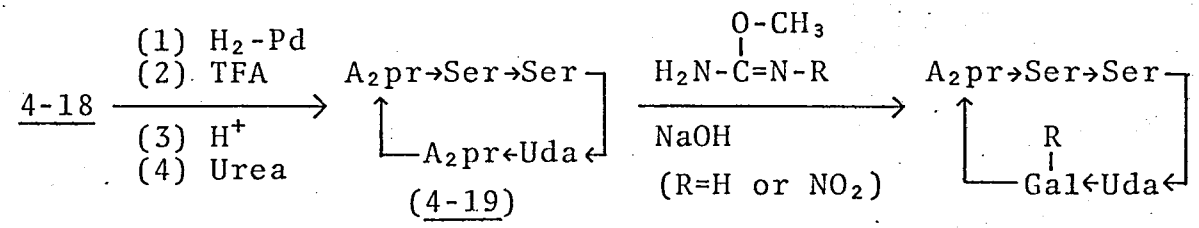


Fig.4-6

次に 4-18 をツベラクチナミンN類似体 4-19 に導いた後、α,β-ジアミノプロピオン酸[6]残基のβ-アミノ基の選択的グアニジノ化を試みた(Fig.4-6)。一般にグアニジノ化反応は立体障害の影響をうけやすく、2級炭素に結合したアミノ基は反応しにくいので、α,β-ジアミノプロピオン酸[6]残基のβ-アミノ基に比べ、α,β-ジアミノプロピオン酸[2]残基のα-アミノ基はグアニジノ化されにくいと考えられる。さらにまたこの第6残基のα-アミド基は分子内水素結合に関与し、固定したβ-Turn 構造の一部を形成しているのでグアニジノ化の際の塩基性条件によるこの残基のN,N-アシル転位は起こりにくいことが期待された。しかし実際に O-メチルイソ尿素を用い水酸化ナトリウム水溶液中でグアニジノ化を試みたところ、TLC上でいくつかのスポットが現れ、目的物を単離するには至らなかった。また O-メチル-N-ニトロイソ尿素を用いた場合も同様な結果を与えた。反応混合物のTLCから判断すると予想を裏切ってやはりα,β-ジアミノプロピオン酸[6]残基のN,N-アシル転位が起こり、さらに何らかの副反応を伴ったことが推測された。従ってこの経路に基ずく合成は断念し、ペプチド合成の最初からβ-グアニジノアラニンを用いる経路に方針をきりかえ以下の検討を行った。

まずペプチド合成に必要なβ-グアニジノアラニン誘導体の調製について述べる(Fig.4-7)。文献記載の方法[19]でトシルアスパラギンから N^{α}-トシル-α,β-ジアミノプロピオン酸を調製し、β-アミノ基をニトログアニジノ化して化合物 4-20 を得た。4-20 の脱トシル化を HBr-AcOH-フェノールで行なうと目的の

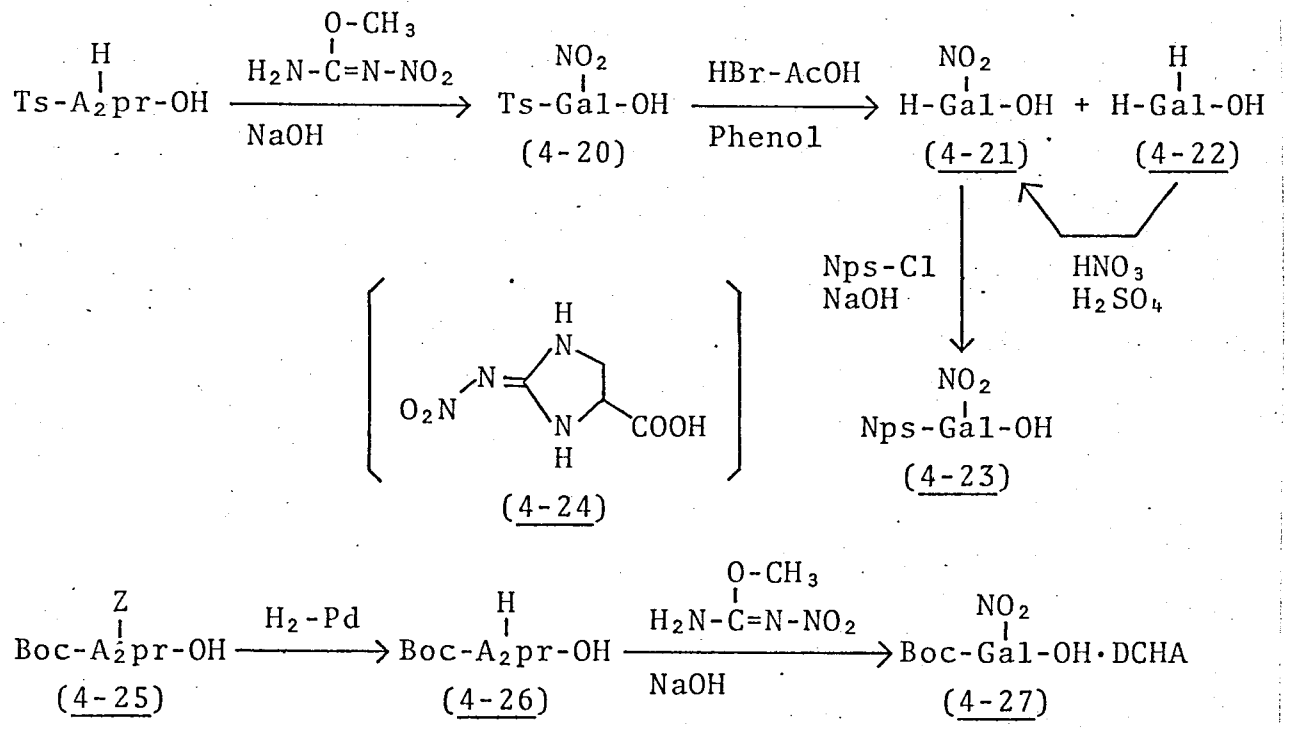


Fig.4-7

Gal(NO2)(4-21)と共に脱ニトロ化された4-22も生じたが、これは再びニトロ化して4-21に導くことができた。次にα-アミノ基のo-ニトロフェニルスルフェニル化を試みたところ、アンモニアが発生するのみで目的物4-23は全く生じなかった。ニトログアニジノ基はアミノ基による求核攻撃をうけやすいことが知られているが、分子内のα-アミノ基とニトログアニジノ基との間の閉環がo-ニトロフェニルスルフェニル化より優先して起こり、化合物4-24が生じたものと考えられる。[28]

そこで始めからペプチド合成に利用できる保護基でα-アミノ基を保護したα,β-ジアミノプロピオン酸誘導体のβ-アミノ基をグアニジノ化する経路を選んだ。即ちBoc-A2pr(Z)-OH(4-25)を脱ベンジルオキシカルボニル化して4-26とした後、β-アミノ基をニトログアニジノ化して目的とする4-27をジシクロヘキシルアミン塩として純粋に得ることができた。

上で得たβ-グアニジノアラニン誘導体を用いたペプチド合成をFig.4-8に示した。4-21と4-28をDCC-HOBt法で縮合してジペプチド4-29を得たが、この単離収率は種々条件を検討したにもかかわらず、30%を上回ることはなかった。この原因としてGal(NO2)残基がアルギニンにも見られるようなラクタム形成(Fig.4-9)を起こしたことが考えられる。続いてジペプチド4-29のブトキシカルボニル基をTHF中の塩化水素で切断した後、N端側トリペプ

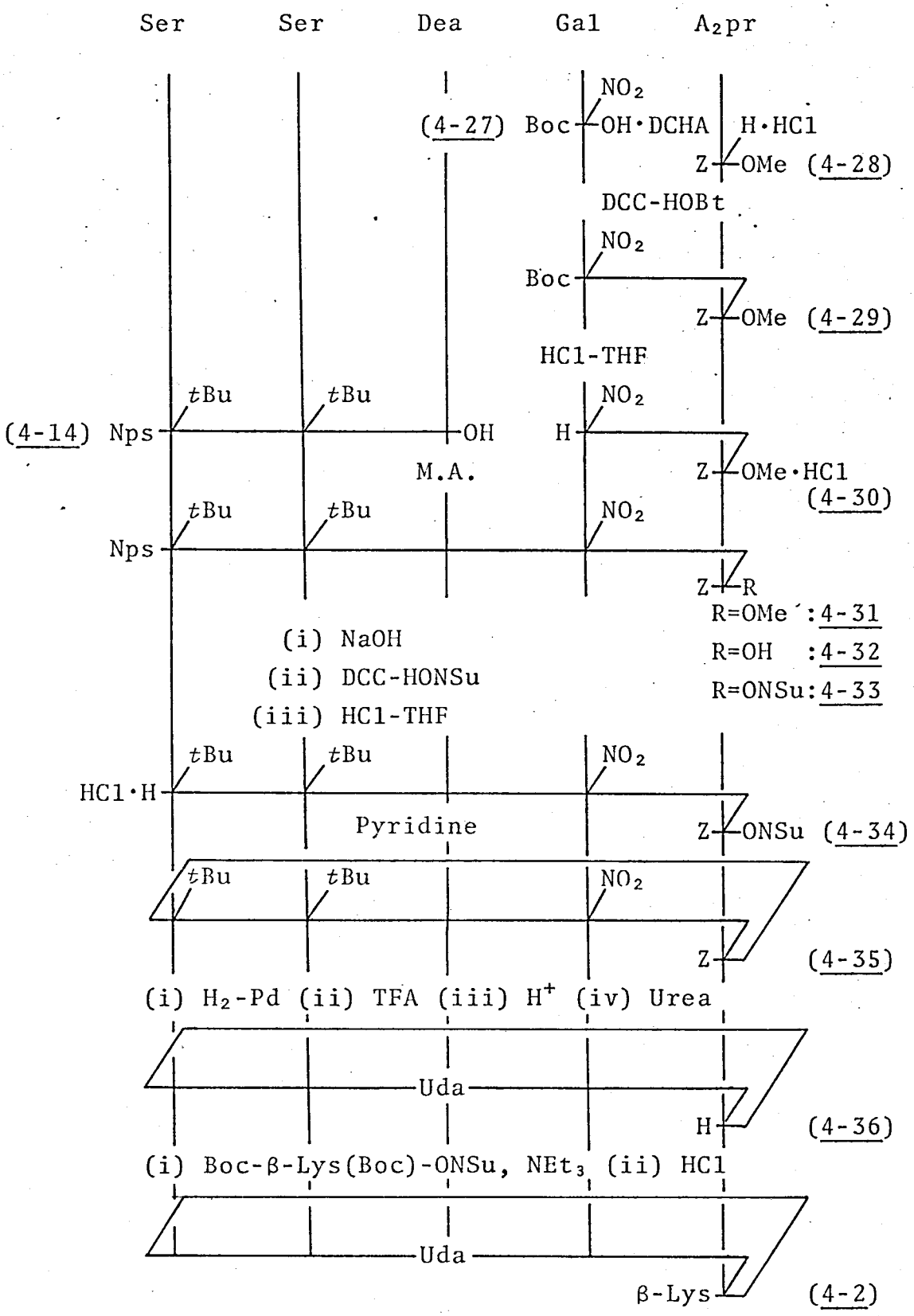

Ser
Ser
Dea
Gal
A2pr
NO2
(4-27) Boc OH·DCHA
H·HCl
Z OMe (4-28)
DCC-HOBt
NO2
Boc
Z OMe (4-29)
HCl-THF
tBu
tBu
NO2
(4-14) Nps
OH
H
M.A.
Z OMe·HCl
(4-30)
tBu
tBu
NO2
Nps
Z R
R=OMe´:4-31
R=OH :4-32
R=ONSu:4-33
(i) NaOH
(ii) DCC-HONSu
(iii) HCl-THF
tBu
tBu
NO2
HCl·H
Pyridine
Z ONSu (4-34)
tBu
tBu
NO2
Z (4-35)
(i) H2-Pd (ii) TFA (iii) H+ (iv) Urea
Uda
H (4-36)
(i) Boc-β-Lys(Boc)-ONSu, NEt3 (ii) HCl
Uda
β-Lys (4-2)

Fig.4-8

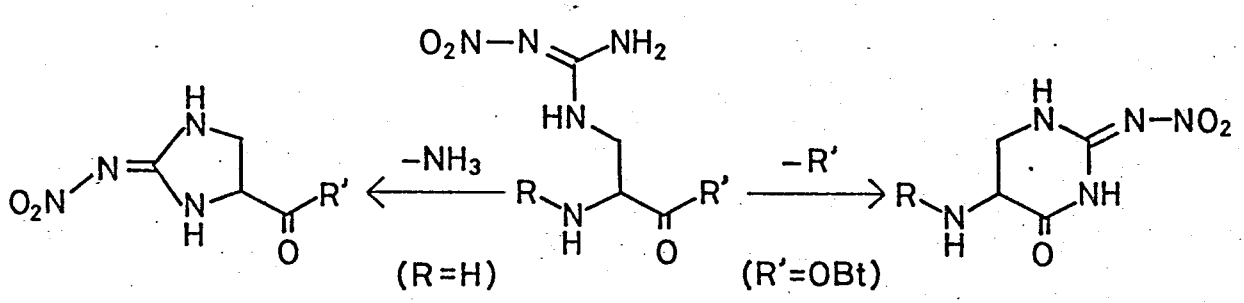


Fig.4-9

テド 4-14 と縮合した。この時先に述べたように Gal(NO2) 残基の開環(Fig.4-9)が縮合より優先することが予想されたが、トリペプチドフラグメントを2当量用い混合酸無水物法でフラグメント縮合を試みたところ、目的とする鎖状ペンタペプチド 4-31 を32%の収率で得ることができた。Gal(NO2) 残基はこのようにN端側へもC端側へも極めて開環しやすい残基であるが、ひとたびペプチド中に組み込まれた後はもはや副反応を起こす傾向は認められなかった。

上記の鎖状ペンタペプチド 4-31 を以下常法通り環化、脱保護等の操作を経て〔Gal⁶〕-ツベラクチナミンN (4-36)とし、これにβ-リジンを導入して〔Gal⁶〕-ツベラクチノマイシンO (4-2) へ導いた。化合物 4-36 と 4-2 のNMRスペクトル(Fig.4-10、4-11)は天然ツベラクチノマイシンOと類似したパターンであり、この化合物も天然物類似のコンホメーションをとっていることを示している。

4-3 〔Arg⁶〕-及び〔Gal⁶〕-ツベラクチノマイシンOの抗菌作用についての考察

Table 4-1にこの両化合物の抗菌スペクトルを示した。〔Arg⁶〕-ツベラクチノマイシンOは全く抗菌力を持たないのに対し、〔Gal⁶〕-ツベラクチノマイシンOは天然物より弱いながら明らかに抗菌活性を示した。この結果から判断すると環状グアニジノ基は、この抗生物質が抗菌力を発現する為の必須の条件ではなく、第6番目のアミノ酸残基のβ-炭素にグアニジノ基が結合していることが重要であると結論された。このことは〔Arg⁶〕-ツベラクチノマイシンOではアルギニン残基の側鎖が伸長した形をとりグアニジノ基とペプチド骨格との位置関係が天然物とは異なるのに対し〔Gal⁶〕-ツベラクチノマイシンOではグアニジノ基の位置が骨格部分に対してほぼ同じ位置を保ち得ることの結果として理解される。

しかし〔Gal⁶〕類似体の活性が天然物のそれに比較してやや弱いことは、グ

NMR spectra of [GuaAla^6]-tuberactinamine N

(100 MHz)

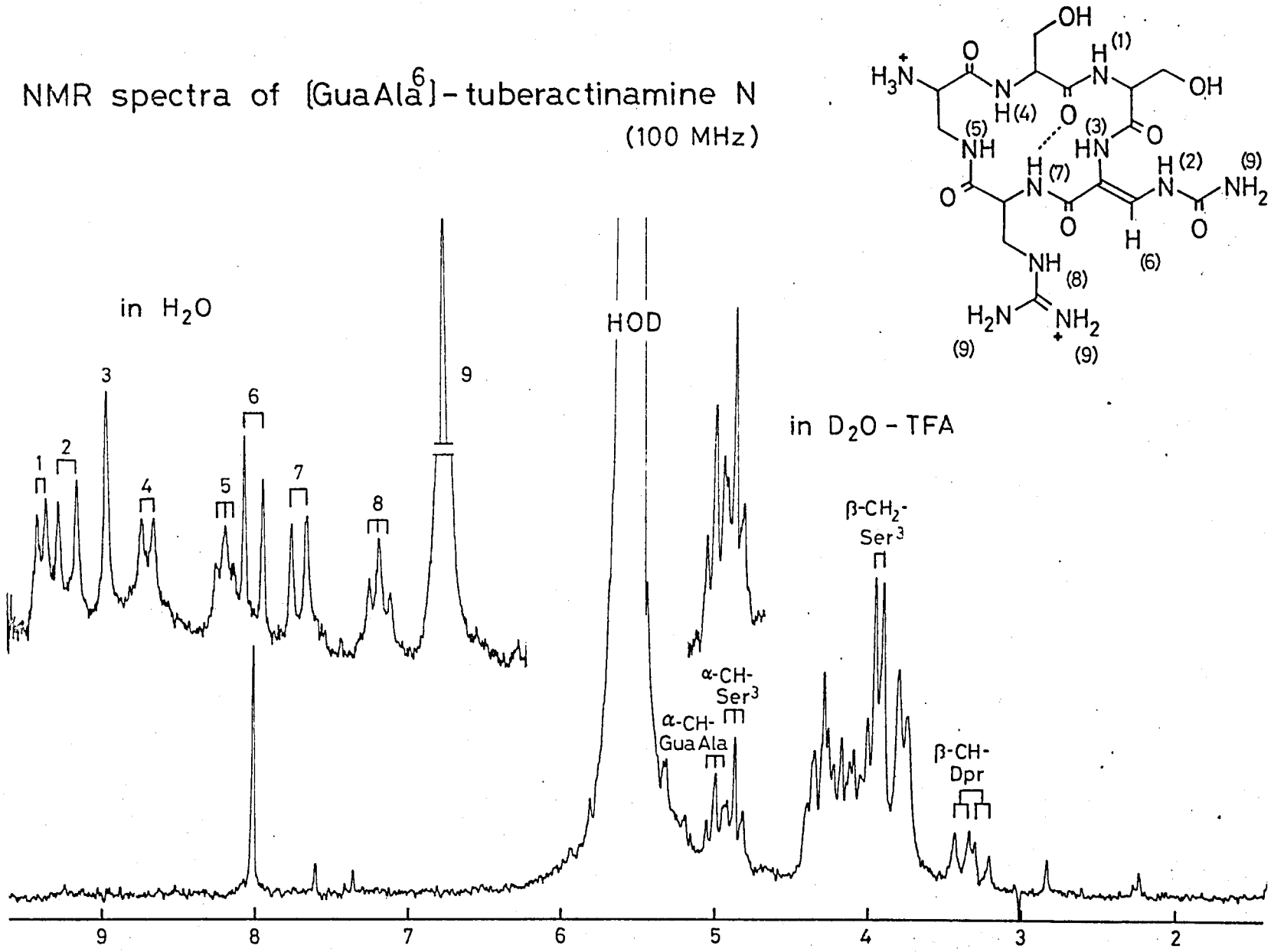


Fig.4-10

NMR spectra of [Gal^6]-tuberactinomycin O

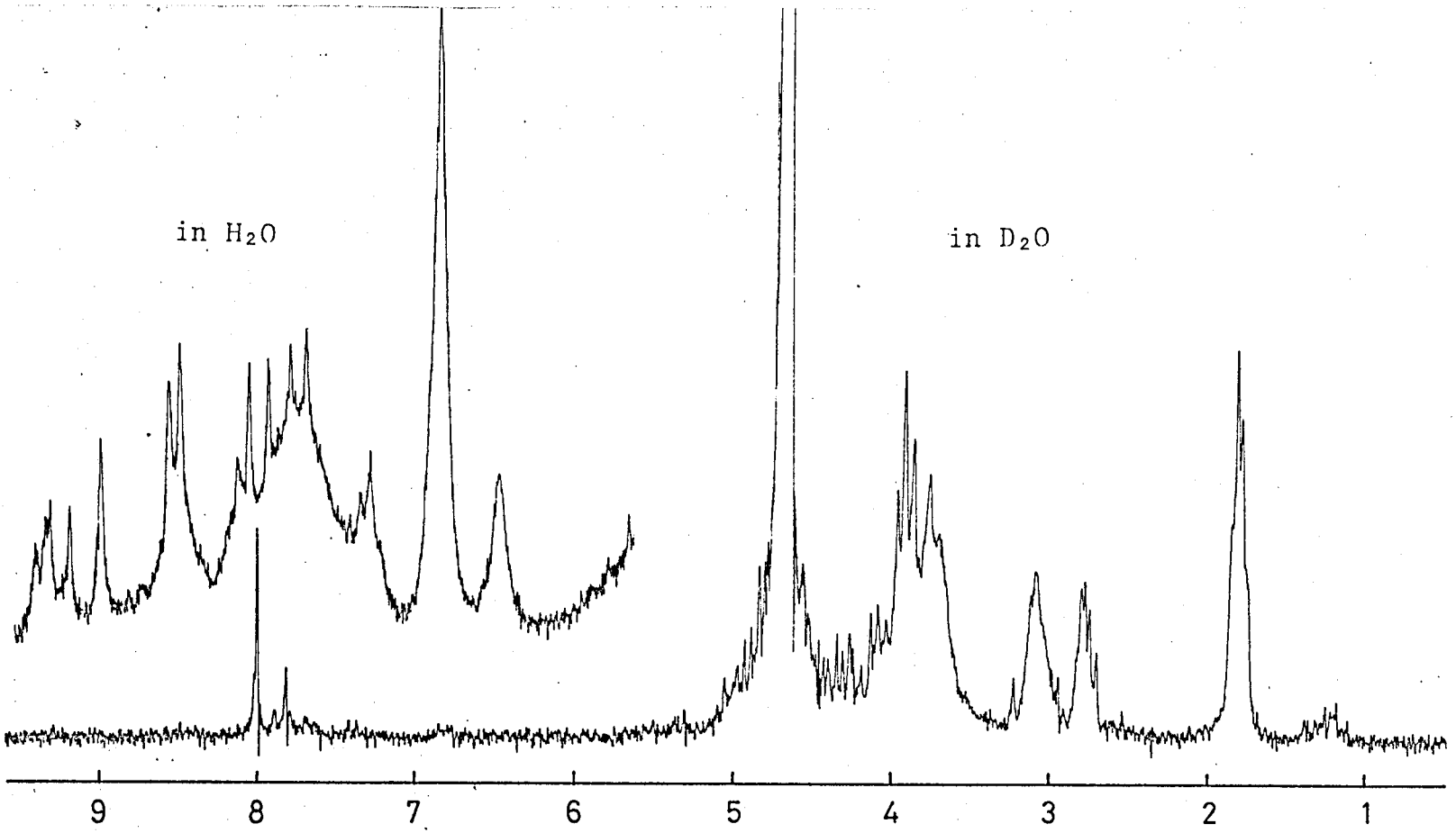


Fig.4-11

Table 4-1. Minimum inhibitory concentrations (mcg/ml) of [Arg^6]- and [Gal^6]-tuberactinomycin O[a)]

Test organism	[Arg^6]-Tum O	[Gal^6]-Tum O	Tum O
S. aureus MS 353	>100	>100	>100
St. pyogenes 1022	>100	>100	>100
St. agalactiae 1020	>100	>100	>100
C. diphtheriae P.W.8	100	25	6.3
B. subtilis ATCC 6633	>100	50	25
E. coli B	>100	>100	50
K. pneumoniae ATCC 10031	>100	>100	25
S. typhosa H 901	>100	>100	25
Sh. sonnei E33	>100	>100	50
P. vulgaris OX19	>100	>100	50
Mycobacterium ATCC 607	>100	25	6.3

a) Abbreviation; Tum:tuberactinomycin, Gal:β-guanidinoalanine.

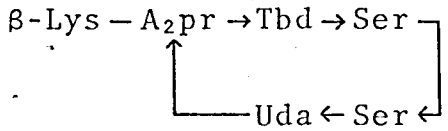
アニジノ基が環状部分に存在することが、抗菌力を増大させる為に何らかの役割を果していることも推定される。ペプチド中のグアニジノアラニン残基とカプレオマイシジン残基を比較した時、前者の側鎖部分がとり得るコンホメーションの自由度は比較的大きいのに対し、後者のそれはかなり限定されている。従ってグアニジノ基が環状構造に組み込まれ、ペプチド中で一定のコンホメーションをとることが抗菌力を増大させる上で大きい要因となることが考えられる。

以上のように本実験によって環状ペンタペプチド骨格とグアニジノ基との間の空間的位置関係がリベラクチノマイシンの抗菌作用発現に最も重要である事実が初めて認識されたのである。

第5章　抗生物質カプレオマイシンの構造決定と全合成並びにカプレオマイシン類似体の合成とその抗菌作用

5-1　カプレオマイシンの構造決定

カプレオマイシンは1960年 Herr ら[1]に発見されて以来、その構造研究は十分には行なわれていなかった。1971年 Bycroft らは彼らの提出した結果的には誤ったバイオマイシンの構造式(Fig.5-1)[29]から類推して、Fig.5-2に示す構造式をカプレオマイシンに与えた。[30] しかしこのバイオマイシンの構造式は後に芝、若宮らによって訂正されたことから、彼らのカプレオマイシンに対する推定式にも疑問がもたれたので、著者はその構造研究の再検討を開始した。

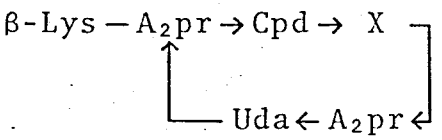


Bycroft's formulus of viomycin

Tbd: tuberactidine

Uda: β-ureidodehydroalanine

Fig.5-1



Bycroft's formula of capreomycin

	X
Capreomycin IA	Ser
IB	Ala

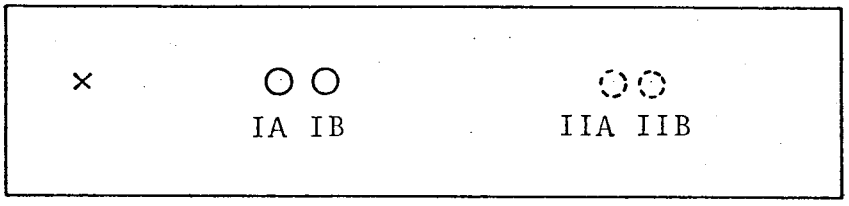
Cpd: capreomycidine

Fig.5-2

Herrらによると、カプレオマイシンには4種の同属体IA、IB、IIA、IIAが存在していて、それぞれのアミノ酸組成はTable 5-1に示す通りである。また永田

Table 5-1. Reported amino acid compositions of capreomycin congeners

	Ser	Ala	A_2pr	Uda	Cpd	β-Lys
Capreomycin IA	1	—	2	1	1	1
IB	—	1	2	1	1	1
IIA	1	—	2	1	1	—
IIB	—	1	2	1	1	—



Silica gel

Phenol-water-c.NH_4OH(30:10:0.6)

Fig.5-3

らはこの全同属体のTLCによる分離同定法を報告している[31](Fig.5-3)。今回著者が用いた試料は市販"Capastat"(カプレオマイシン硫酸塩製剤)であるが、このものはIA.IB及び微量の不純物の混合物であり、IIA.IIBは全く含まれていなかった。その含有比は完全水解物中のセリンとアラニンの比から計算して約3:2(IA:IB)であった。

5-1-1 カプレオマイシンIAとIBの分離

少量の試料を用いる場合はFig.5-3で示した溶媒系で調製TLCを行なって両成分を分離した後、各々をSephadex G10カラムを通して精製した。また大量の試料を分離する場合は、Amberlite IRC50カラムクロマトグラフィーによりFig.5-4に示す過程を経て両成分を単離した。いずれも水-メタノール-エタノールより再沈殿を繰り返すと微粒状晶として得ることができた。

Amberlite IRC-50(NH_4 form) column
(2.5x70cm)
$AcONH_4$ buffer(pH9.0)
Sample: 3.00mg

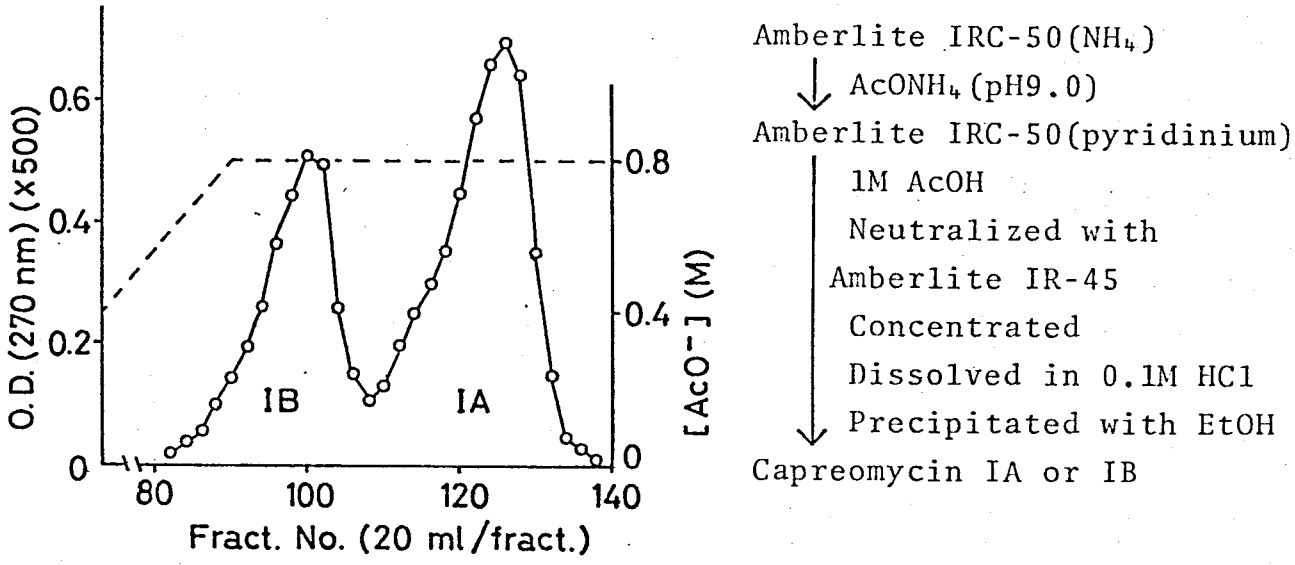


Fig.5-4

5-1-2 カプレオマイシンの物理化学的性質とアミノ酸組成

カプレオマイシンIA及びIBはTable 5-2に挙げた物理化学的性質を示した。両成分のアミノ酸組成に関しては、Table 5-2に示した通りHerrらの値[1]を確認できた。このうちアラニン、セリン、α,β-ジアミノプロピオン酸及びカプレオマイシジンの存在比は、カプレオマイシンを6N塩酸で完全加水分解(110℃, 20時間)した後、アミノ酸分析で決定した。β-リジンはアミノ酸分

Table 5-2. Characterization of capreomycins

		Capreomycin IA		Capreomycin IB	
R_f [a]		0.25		0.29	
m.p. (°C)		246–248(dec)		253–255(dec)	
$[\alpha]_D^{22}$ (c0.5, H_2O)		-21.9°		-44.6°	
UV λ_{max} (nm)(ε)	0.1N HCl	269 (24,000)		268 (22,700)	
	H_2O	268 (23,900)		268 (22,300)	
	0.1N NaOH	289 (15,900)		290 (14,400)	
		Found	Calcd. [b]	Found	Calcd. [b]
Elemental analysis (%)	C	37.11	37.28	37.87	37.60
	H	6.11	6.14	6.38	6.31
	N	23.61	23.41	23.76	23.61
	Cl	17.20	16.93	16.73	17.07
Amino acid composition [c] (molar ratio)		Ser(1), A_2pr(2) Cpd(1), Uda(1) β-Lys(1)		Ala(1), A_2pr(2) Cpd(1), Uda(1) β-Lys(1)	

a) TLC (Silica gel, phenol-water-c.NH_4OH, 30:10:1)

b) Calcd. for $C_{23}H_{48}N_{14}O_8Cl_4 \cdot \frac{1}{2}EtOH$ (IA) and $C_{25}H_{48}N_{14}O_7Cl_4 \cdot \frac{1}{2}EtOH \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (IB).
Presence of ethanol in the sample was shown in NMR spectrum.

c) Abbreviations; A_2pr:α,β-diaminopropionic acid, Cpd: capreomycidine, Uda:β-ureidodehydroalanine, β-Lys:β-lysine.

析ではアンモニアのピークと重なる為、後述するように、カプレオマイシンのNMRスペクトルにより確認した。またβ-ウレイドデヒドロアラニンは酸水解で完全に分解するがカプレオマイシンのUV吸収とNMRスペクトルにおけるオレフィンプロトンの存在から確認できた。

次に各構成アミノ酸の立体配置の決定は、カプレオマイシンの酸水解物のイオン交換クロマトグラフィーにより全アミノ酸を単離し、それらの旋光度を測定する方法で行った。即ち市販カプレオマイシンIA、IB混合物を6N塩酸と共に20時間還流して完全加水分解した後、Amberlite IRC120カラムを通してアミノ酸を分離した。分離パターンをFig.5-5に示す。塩酸で溶出した場合、セリン、アラニン、カプレオマイシジンは単離できたが、α,β-ジアミノプロピオン酸とβ-リジンが重なって溶出した。これに対しピリジン-

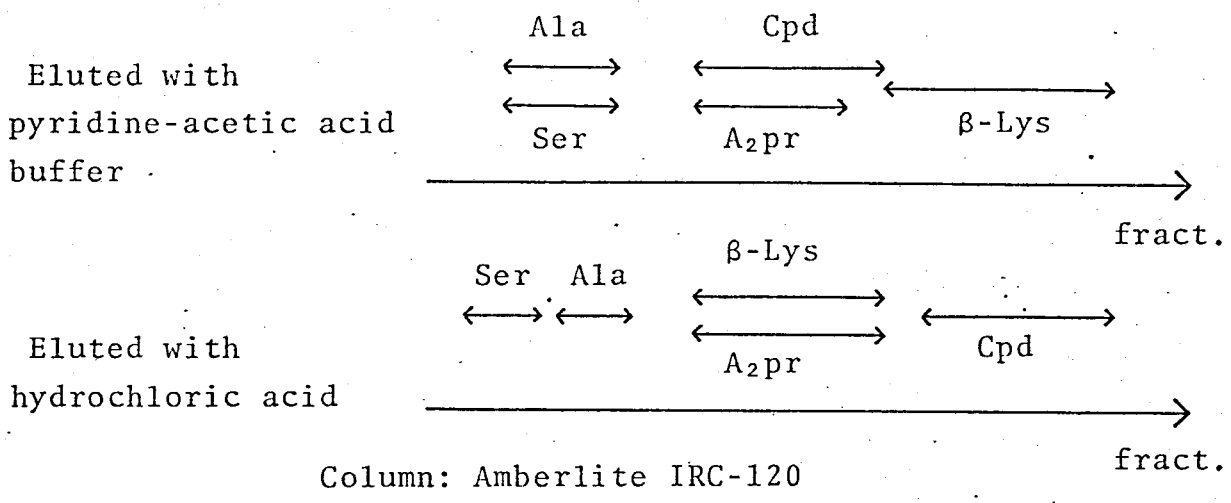


Fig.5-5

酢酸緩衝液による溶出ではセリンとアラニン・カプレオマイシジンとα,β-ジアミノプロピオン酸はそれぞれ重なるがβ-リジンは単離できた。従ってこの2種類のカラムクロマトグラフィーを併用することにより、カプレオマイシンの全構成アミノ酸をそれぞれ純粋に得ることができた。Table 5-3にそれらの比旋光度を示す。

なお上記の操作で得たα,β-ジアミノプロピオン酸は完全にラセミ化したものであった。このアミノ酸が熱によりラセミ化しやすいことは経験的に知られていたので合成標品でその熱によるラセミ化の過程を追跡した(Fig.5-6)。

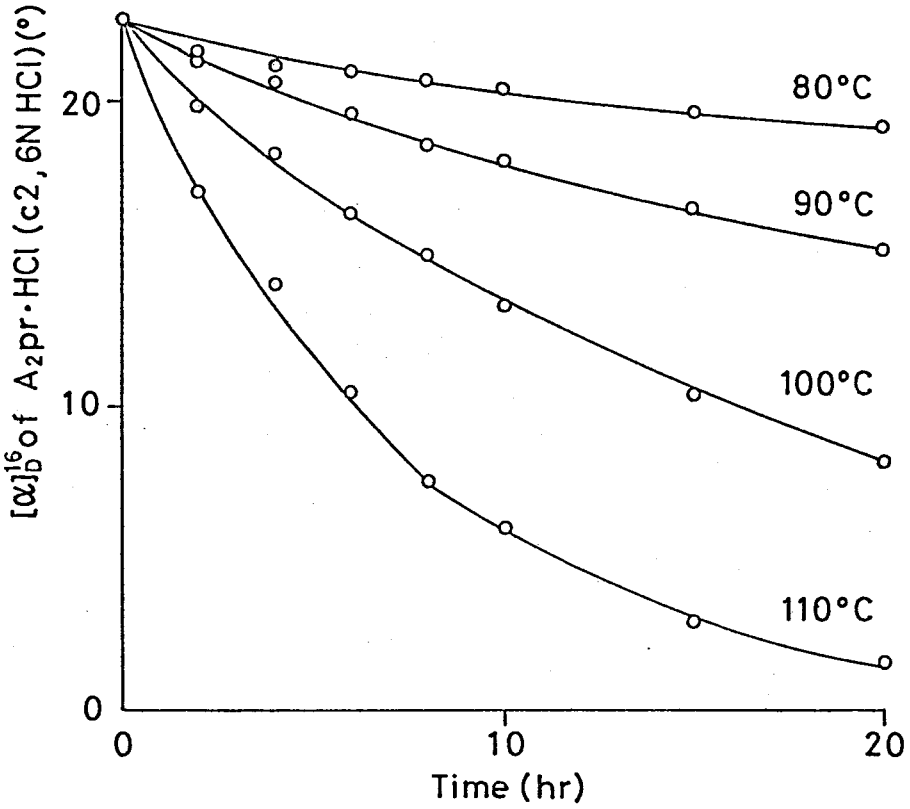


Fig.5-6

この結果、100℃ 5時間程度ではラセミ化の程度が少ないことがわかったので、この条件で改めてカプレオマイシンを水解した後、前述と同じ操作で光学的に純粋なα,β-ジアミノプロピオン酸を単離した。以上の実験結果より、全構成アミノ酸はL型の立体配置を有するという結論を得た。

Table 5-3. Configurations of component amino acids in capreomycin

		Ser	Ala	A_2pr[b]	Cpd[b]	β-Lys[c]
$[\alpha]_D$[a]	Found	+12.7°	+13.3°	+22.1°	+30.0°	+6.3°
	Authentic	+15.1°	+14.7°	+22.3°	+36.1°	+6.4°
Configuration		L	L	L	L	L

a) In hydrochloric acid except for β-Lys (in ethanol).
b) Hydrochloride.
c) HABS salt.

5-1-3 カプレオマイシンの環状ペンタペプチド部の構造

カプレオマイシンのD_2O中でのNMRスペクトルをFig.5-7に、H_2O中でのアミド領域のスペクトルをFig.5-8に示した。

若宮らはツベラクチノマイシンの詳細なNMRの研究により、その全同属体は水溶液中でセリン[3]のC=Oとカプレオマイシジン[6]のα-NHとの間に強い分子内水素結合が存在し、それにより安定な固定したコンホメーションをとっていることを示した。このように構造が類似でしかも一定のコンホメーションをもつ環状ペプチド部の対応するα-CH及びα-NHプロトンの化学シフトは、ほぼ一定の値を示すことが、天然ツベラクチノマイシン同属体のみならずその合成類似体を含めた例から結論されていた。カプレオマイシンはツベラクチノマイシンとアミノ酸組成が類似しているので、カプレオマイシンの全構成アミノ酸のα-CH及びα-NHがツベラクチノマイシンの対応するプロトンシグナルに類似するかどうかをまず検討した。その結果、カプレオマイシンのアミド領域のほとんど全てのシグナル並びにカプレオマイシジン残基及びIAのセリンとIBのアラニン残基におけるα-CHシグナルの化学シフトが、ツベラクチノマイシンのそれらと非常によく対応していることが明らかになった。さらにカプレオマイシジン残基のα-NHシグナルの温度依存性(Fig.5-9)が他のシグナルに比べて小さいことと、その重水交換速度が際立って遅いと

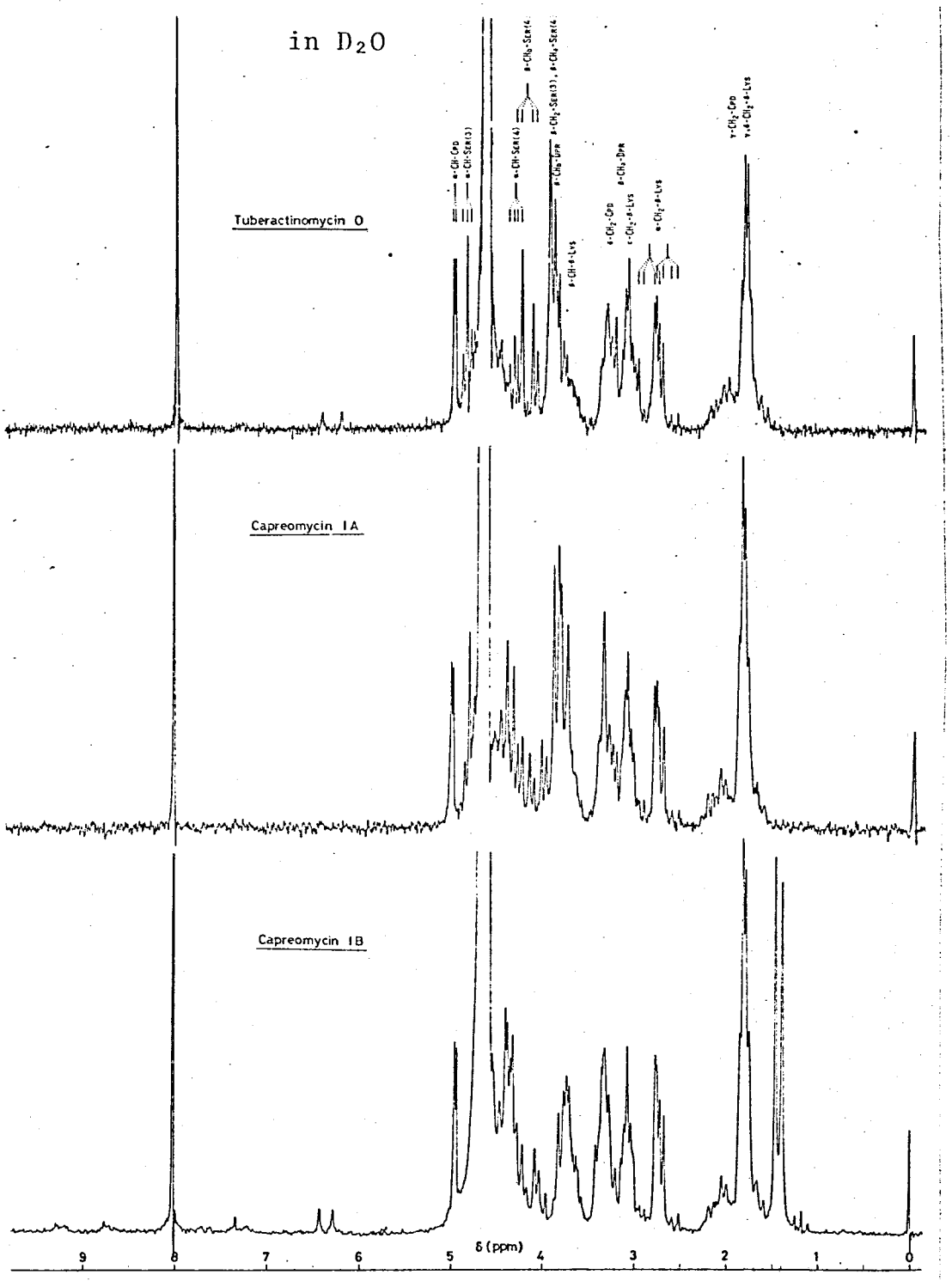


Fig.5-7

いう事実から、カプレオマイシンにおいてもツベラクチノマイシンにおけると同様の分子内水素結合が対応する位置に存在することが明確になった。以上の結果、少くともカプレオマイシンの環状ペプチド部に関しては、Fig.5-1のBycroft式は正しくなく、カプレオマイシンもツベラクチノマイシン同様のアミノ酸配列から成る環状ペンタペプチド骨格を有し、さらに両者は類似のコンホメーションをとっていることが強く示唆された。

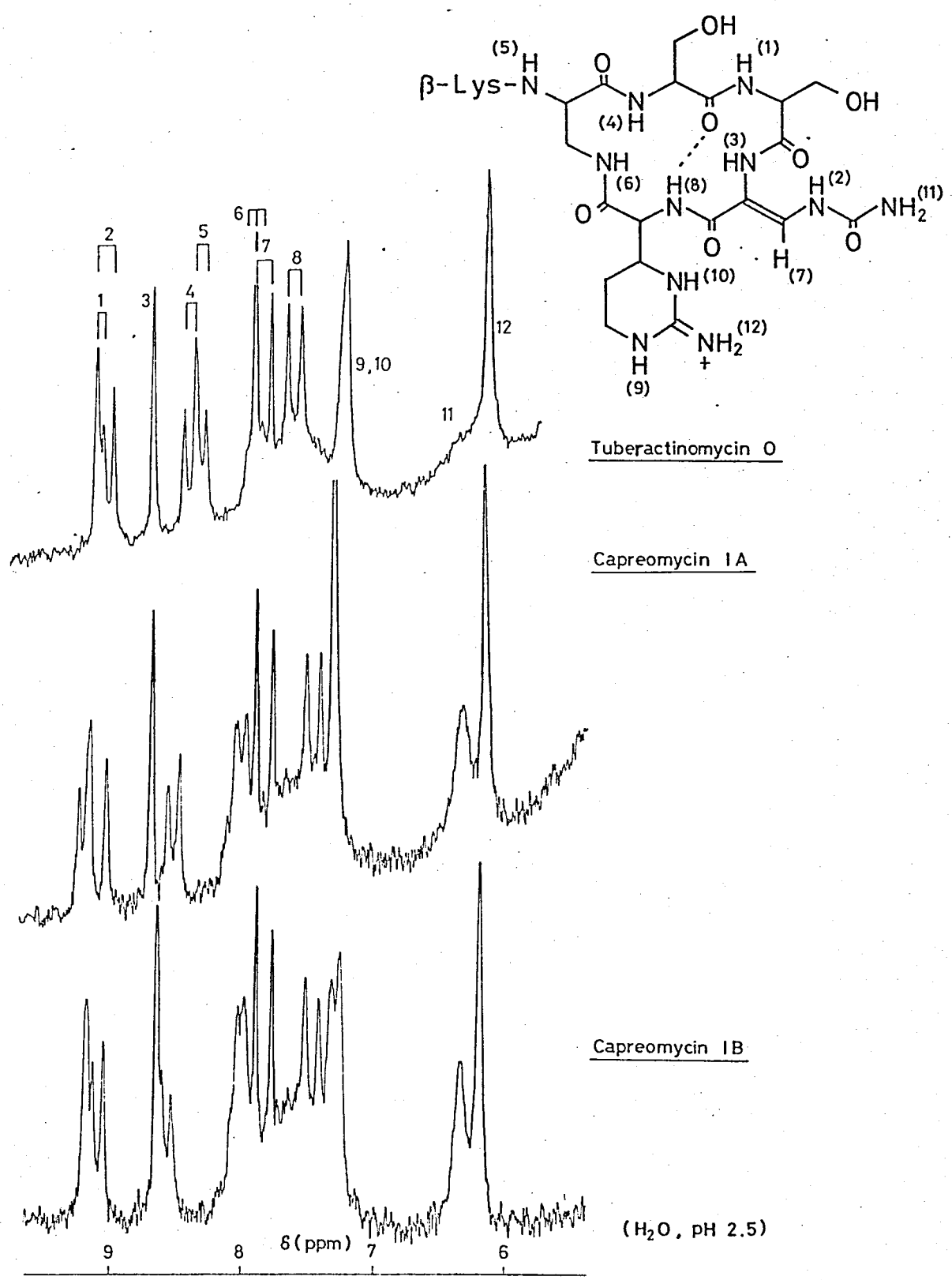


Fig.5-8

これまでの議論及び以下に述べる理由によって、Fig.5-10に示したカプレオマイシン環状部分の構造が推定された。第3及び第4番目のアミノ酸残基の配列に関しては、ツベラクチノマイシンの4種の同属体及び前述の3種の構造類似体のNMRと詳細に比較することにより決定した。即ちこれらの化合

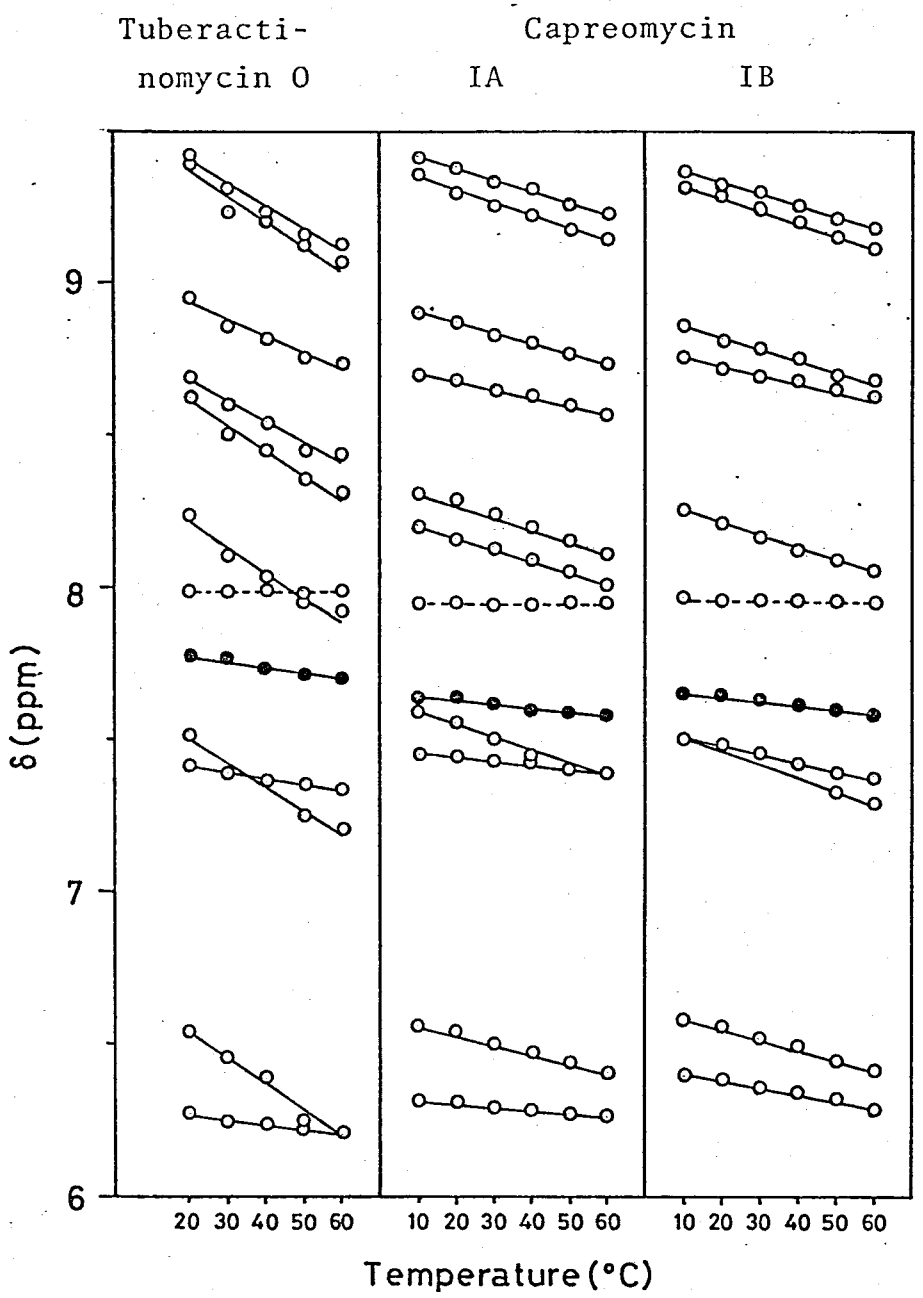
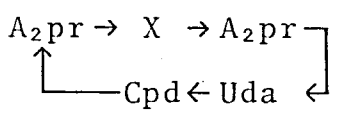


Fig.5-9

物において次の事実が観察されている(Table 5-4)。[16c,32]

(1) セリン^{3}のα-CH はセリン^{4}のそれより低磁場シフトしている。

(2) セリン^{3}のβ-CH_2 は doublet として現われているが、セリン^{4}のそれは2組の double doublet として現われている。



	X
Capreomycin IA	Ser
IB	Ala

The structures of cyclic moieties in capreomycins

Fig.5-10

Table 5-4. Chemical shifts of protons of the third and fourth residues in tuberactinomycins and capreomycins[a)]

Position of amino acid residue	3			4		
	α-CH[b)]	β-CH_2[b)]	α-NH[c)]	α-CH[b)]	β-CH_2[b)]	α-NH[c)]
Tum O	4.85(t)	3.90(d)	8.57(d)	4.30(dd)	3.9 (dd) 4.18(dd)	9.28(d)
Tua N	4.84(t)	3.95(d)	8.70(d)	4.32(dd)	3.90(dd) 4.20(dd)	9.37(d)
[Ala^3,Ala^4]-Tua N	4.55(q)		8.67(d)	4.22(q)		9.17(d)
[Ala^3]-Tua N	4.68(q)		8.78(d)	4.33(m)	3.88(m) 4.20(m)	9.31(d)
[Ala^4]-Tua N	4.79(t)	3.90(d)	8.72(d)	4.28(q)		9.27(d)
Cpm IA	4.86(t)	3.84(d)	8.66(d)	4.3-4.5(m)	3.7-4.3(m)	9.32(d)
Cpm IB	4.58(q)		8.71(d)	4.2-4.5(m)	3.7-4.2(m)	9.27(d)

a) Abbreviations; Tum:tuberactinomycin, Tua:tuberactinamine, Cpm: capreomycin.

b) In D_2O-TFA(4:1).

c) In H_2O(pH2.5).

(3) セリン^{4}のα-NHはセリン^{3}のそれより大きく低磁場シフトしている。この現象を利用してカプレオマイシンの第2、3番目の残基を明確に区別できた。

(1) カプレオマイシンIAにおけるセリンのα-CHとIBにおけるアラニンのα-CHの化学シフトは、それぞれツベラクチノマイシン又はその類似体のセリン^3、アラニン^{3}のそれによく一致する。

(2) カプレオマイシンIAにおけるセリンのβ-CH_2はツベラクチノマイシンのセリン^{3}と同じパターン(doublet)で現われている。一方IA、IBにおいて、ひとつのα,β-ジアミノプロピオン酸のβ-CH_2はツベラクチノマイシン及びその類似体におけるセリン^{4}と同様に磁気的に非等価なmultipletとして現われている。

(3) カプレオマイシンIA、IBにおいて、上記α,β-ジアミノプロピオン酸のα-NHの化学シフトはツベラクチノマイシン及びその類似体のセリン^4

のα-NHによく一致する。またIAのセリンとIBのアラニンのα-NHの化学シフトは、ツベラクチノマイシン類のセリン[3]、アラニン[3]のそれによく一致する。

以上の考察から、結局カプレオマイシンIAはセリン[3]-α,β-ジアミノプロピオン酸[4]、IBはアラニン[3]-α,β-ジアミノプロピオン酸[4]の配列を有すると決定できた。

なお環状ペプチド部分の構造決定において最後に問題になるのは、β-ウレイドデヒドロアラニン残基中の二重結合に関する幾何異性である。3-1節で述べたように、この残基のオレフィンプロトンの化学シフトはE体とZ体で約0.6ppmの差があることが本研究で初めて明らかになった。カプレオマイシンのオレフィンプロトンはほぼδ8に現われており、これはX線解析でZ型と決定されているツベラクチノマイシンのそれとよく一致している。従ってカプレオマイシンのβ-ウレイドデヒドロアラニン残基もZ型と決定された。

5-1-4 側鎖β-リジンの結合位置——カプレオマイシンの全構造

最後に残された問題は、分枝部のβ-リジン残基がツベラクチノマイシン型をとって環状ペプチド部のα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミノ基に結合しているか、あるいはα,β-ジアミノプロピオン酸[4]のβ-アミノ基に結合しているかということである。Bycroftらは、カプレオマイシンIBを2,4-ジニトロフェニル化(DNP化)後、水解するとβ-DNP-α,β-ジアミノプロピオン酸が得られたので、カプレオマイシンの分枝部はα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミノ基に結合したツベラクチノマイシン形を有していると報告しているが[30]、著者は同じ実験を繰り返した結果、Bycroftらの結果と異なり、DNP-カプレオマイシンIA及びIBのいずれの水解物中にもβ-DNP体を認めず、代りにα-DNP-α,β-ジアミノプロピオン酸を沪紙電気泳動並びにアミノ酸分析(Table 5-5)の結果から確認した。従ってカプレオマイシンの全構造はツベラクチノマイシンのそれと様相を異にし、α,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミノ基が遊離であり、α,β-ジアミノプロピオン酸[4]のβ-アミノ基にβ-リジンが結合していると結論せざるを得なかった。

この意外な結論の正否を判定する為に、さらにNMRの解析並びにEdman分解を行なったところ、次のようなこの推論を支持する新たな情報が得られた。

(1) ツベラクチノマイシンのα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-NHは、

Table 5-5. Amino acid analysis and paper electrophoresis of hydrolyzate of DNP-capreomycin

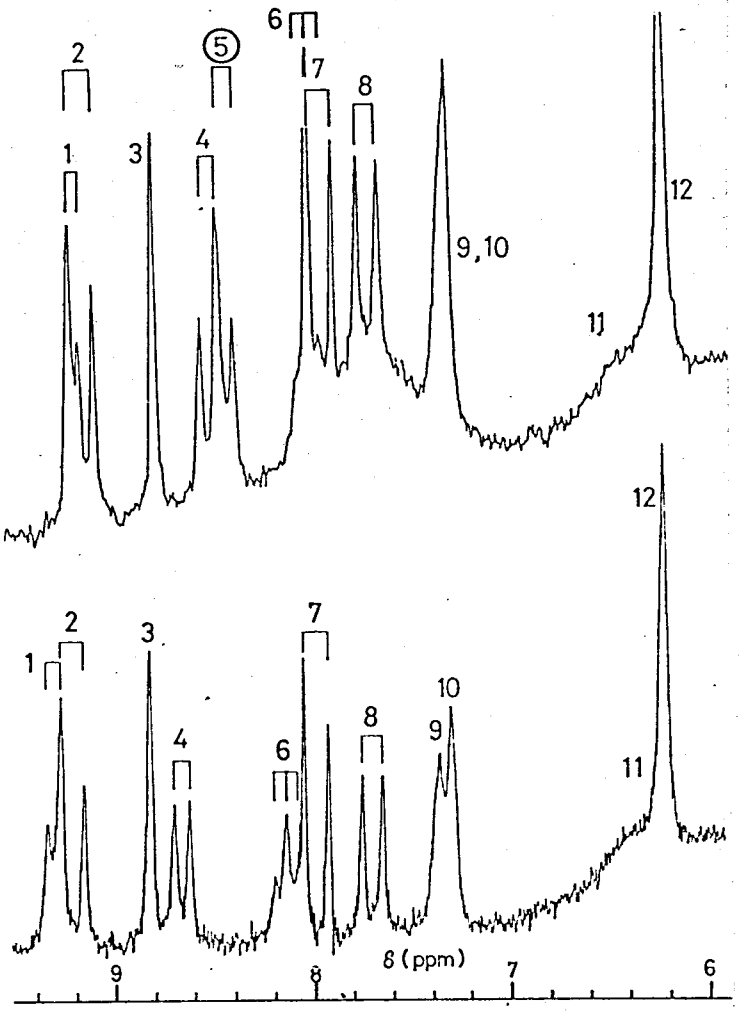
	Amino acid analysis[a] (Retention time, min)	
	Capreomycin IA	Capreomycin IB
Hydrolyzate of DNP-capreomycin	29.0(N^{α}-DNP-A_2pr) 31.5(NH_3) 41.5(A_2pr) 57.0(Cpd)	29.0(N^{α}-DNP-A_2pr) 31.5(NH_3) 41.5(A_2pr) 57.0(Cpd)
N^{α}-DNP-A_2pr	29.0	
N^{β}-DNP-A_2pr	35.0	
	Paper electrophoresis[b] (Migration distance toward cathode, cm)	
	Capreomycin IA	Capreomycin IB
Hydrolyzate of DNP-capreomycin	9.3(N^{α}-DNP-A_2pr) 12.2(Ser) 14.3(Cpd) 15.5(A_2pr)	9.3(N^{α}-DNP-A_2pr) 13.5(Ala) 14.3(Cpd) 15.5(A_2pr)
N^{α}-DNP-A_2pr	9.3	
N^{β}-DNP-A_2pr	8.5	

a) Column of 9x100 mm and 0.35 N sodium citrate buffer were used.

b) A buffer of formic acid-acetic acid-water(50:150:800) was used at 0.80 mA/cm for 130 min.

δ8.5に現われるが、分枝部β-リジンを欠くツベラクチナミンNのα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-NH_2はアミノ基が遊離状態に変化したためにδ6~10の領域に現われない(Fig.5-11)。カプレオマイシンのNMRにおいても、α,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-NHは上記の領域に現われていないので、そのα-アミノ基は遊離であると結論される。

(2) カプレオマイシンのH_2O中でのスペクトルにおいて、δ8.2のdoublet様のシグナルは前述の温度変化の実験の際に実は2組のtripletであることがわかった(Fig.5-12)。このうち片方はα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のβ-アミドであるが、他方のシグナルはtripletであることから、



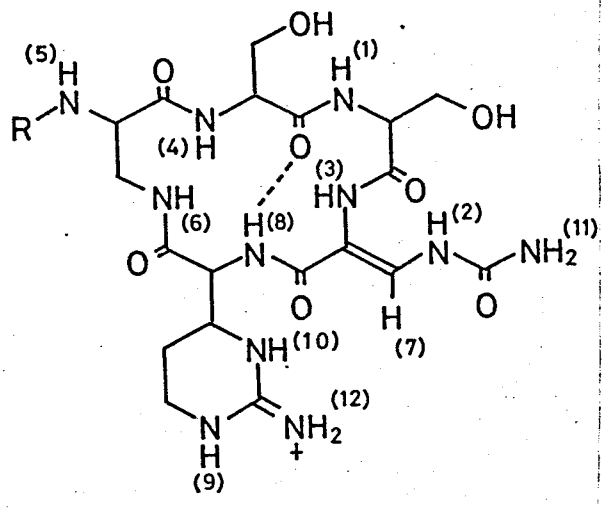


Fig.5-11

α,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミドではなく、α,β-ジアミノプロピオン酸[4]のβ-アミドに帰属できる。即ちα,β-ジアミノプロピオン酸[4]のβ-アミノ基はアシル化されていることを示唆している。

(3) ツベラクチノマイシンとツベラクチナミンNにおけるα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-CHの化学シフトを比較すると、この残基のα-アミノ基がアシル化されている前者の方が遊離形の後者より低磁場シフトしている。カプレオマイシンにおけるα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-CHシグナルは、ツベラクチナミンNのそれとよく一致するので、そのα-アミノ基は遊離であると推論できる(Fig.5-13)。

一方、カプレオマイシンをアセチル化すると、このシグナルはツベラクチノマイシンのそれとよく一致する領域に移動した。また(1)で述べたツベラクチノマイシンのα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-NHシグナルとよく一致する位置にdoubletが現われた(Fig.5-13)。これらの事実もカプレオマイシンのα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミノ基

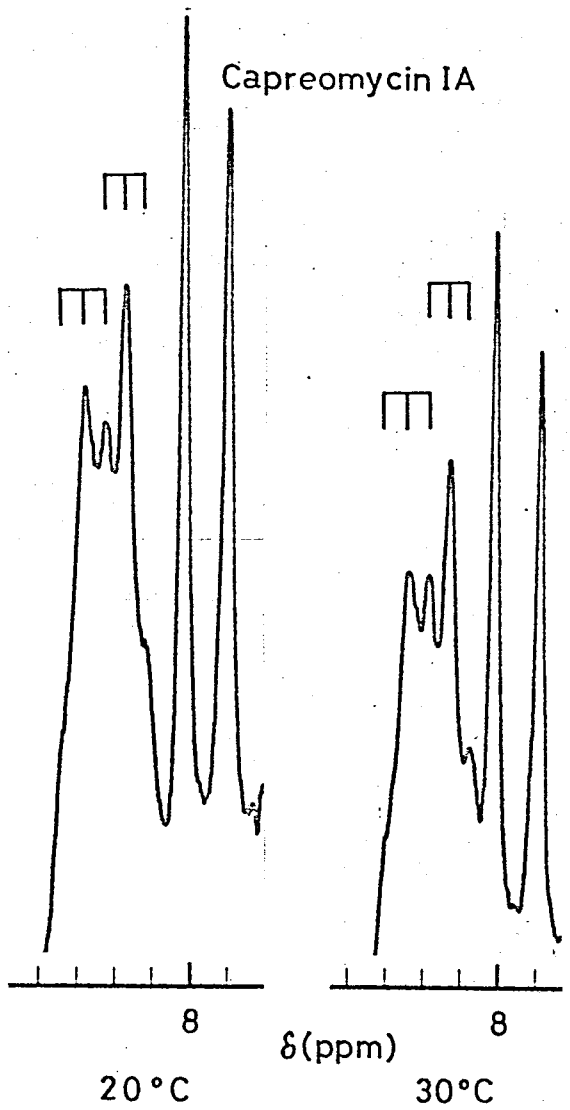


Fig.5-12

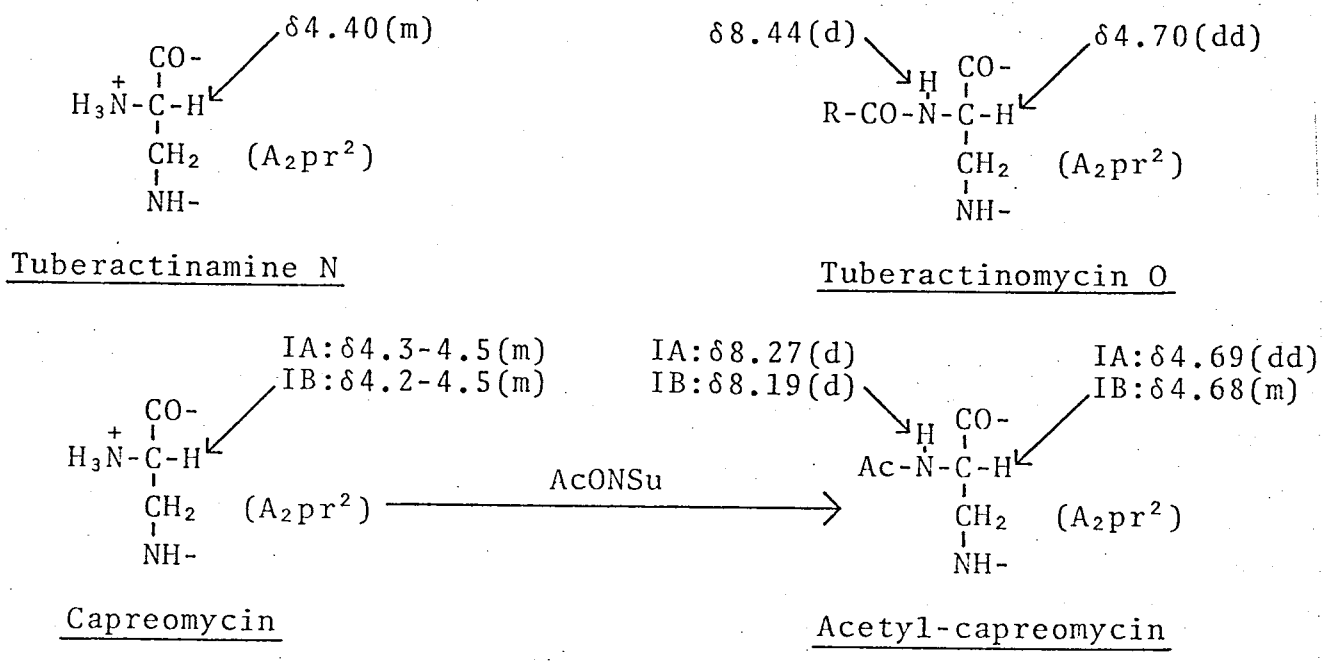
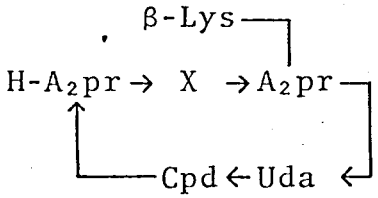


Fig.5-13

が遊離であることを支持する。

(4) カプレオマイシンIAに関して、β-ウレイドデヒドロアラニン残基を酸化白金触媒を用いて酸性溶液中でアラニンにまで還元したものに、Edman分解を1段行なった後、ダンシル(DNS)化して水解するとDNS-セリンが検出されたので、セリンのN端側アミノ酸は遊離のα-アミノ基を有していなければならない。なぜならばもしα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミノ基に分枝部が結合していれば、必然的に遊離のアミノ基はα,β-ジアミノプロピオン酸[4]のβ-アミノ基のみとなり、Edman分解は進行しないはずであり、かりに進行したとしても1段後のDNS-アミノ酸はセリンでなくアラニンでなければならないからである。以上の結果から、α,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミノ基が遊離であることがさらに支持された。

以上の結果をまとめて最終的にカプレオマイシンの全構造をFig.5-14に示したように決定できた。



	X
Capreomycin IA	Ser
IB	Ala

Fig.5-14

5-2 カプレオマイシンIA及びIBの全合成

著者はここに新たに提出したカプレオマイシンの推定式をより確定する為カプレオマイシンIA及びIBの全合成を行なった。ツベラクチノマイシン群ペプチドのうち既にツベラクチノマイシンOの全合成が当研究室において完成している。カプレオマイシンがツベラクチノマイシンと構造的に異なる点はα,β-ジアミノプロピオン酸が2残基含まれ、しかも両者は異なる結合様式で環状ペプチド部に組み込まれている点であって、ペプチドの延長及び側鎖アミノ酸の導入の際に、それらの保護及び脱保護上の新たな問題が生じることが予想された。以上のように構造決定及び合成法開拓の意義の他に、カプレオマイシンの合成経路の確立は、カプレオマイシンの構造と活性の相関関係を解明する為の様々な類似体の合成の基礎という意味でも重要であると考えられた。

5-2-1 保護環状ペンタペプチド部分の合成

カプレオマイシンの保護環状ペンタペプチド部分の合成経路をFig.5-15に示す。β-ウレイドデヒドロアラニン残基の前駆体として用いるβ,β-ジエトキシアラニン(Dea)は、合成の最終段階では立体配置と無関係になるので、ペプチドの環化反応の場合ラセミ化の危険の大きいC端残基として使用した。またこの合成過程で使用したN端側ジペプチド5-6はツベラクチノマイシン

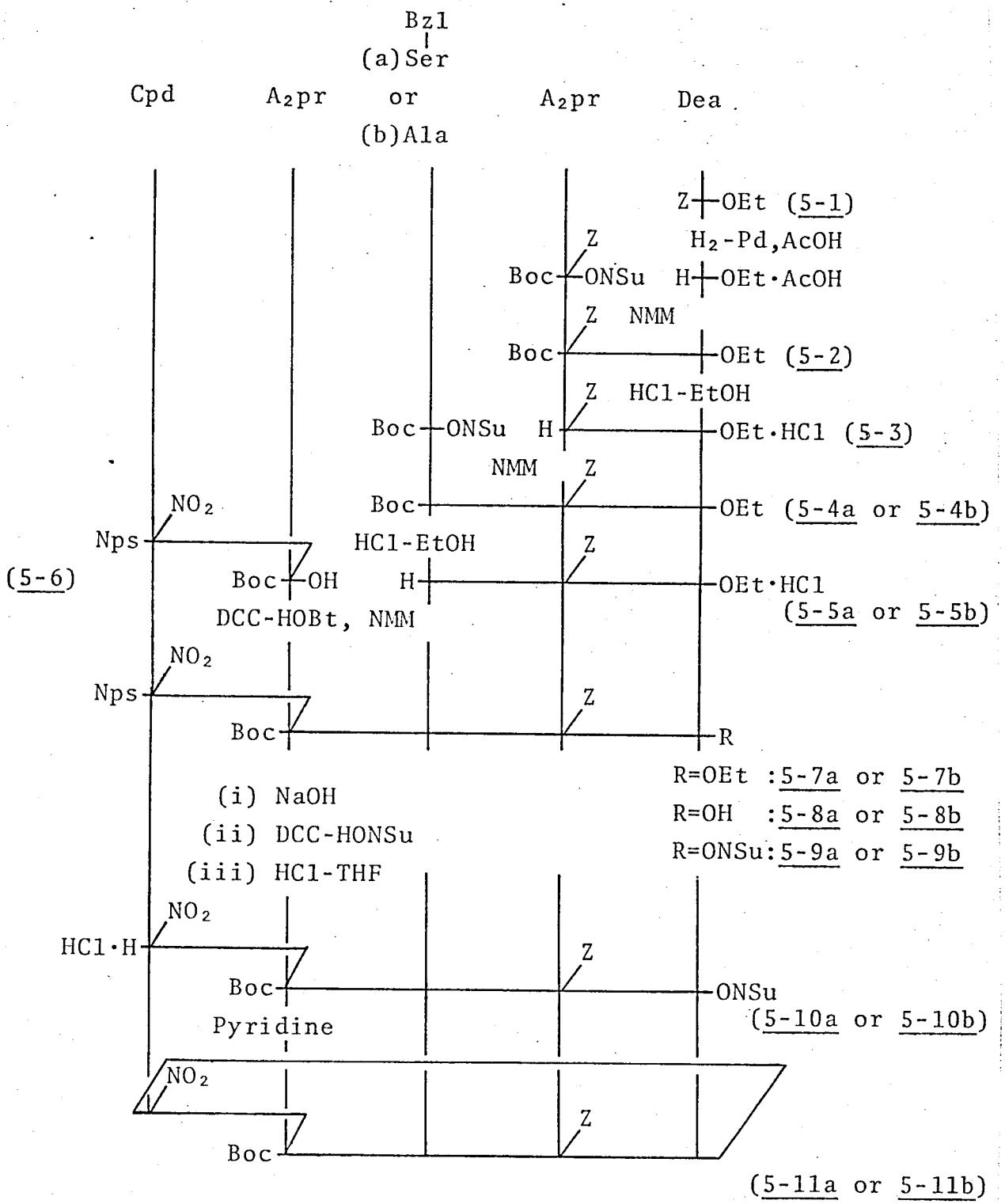


Fig.5-15

0等の全合成中間体に用いたジペプチドと同一物質である。C端側トリペプチド 5-4a 及び 5-4b の合成に際しては、α,β-ジアミノプロピオン酸のβ-アミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護した関係で、そのα-アミノ基の保護基としては、ツベラクチノマイシン合成の場合と異なり、t-ブトキシカルボニル基を用いた。

まずZ-Dea-OEt(5-1)を接触還元により脱ベンジルオキシカルボニル化した後、Boc-A2pr(Z)-ONSu と縮合してジペプチド 5-2 を得た。次にそのブトキシカルボニル基をTFAで切断し、Boc-Ala-ONSu と縮合したところ、TLC上複雑な混合物を与え、これをシリカゲルカラムで分離すると、目的物は50%程度しか得られなかった。Z-Dea-OEtをTFA処理するとTLC上多くのスポットを与えたことから、これはジエトキシアラニン残基のアセタールがTFAで分解することが原因と考えられた。この副反応は酢酸エチル又はTHF中の塩化水素処理でも起こったが、アセタールの生成条件でもあるエタノール中の塩化水素もしくはギ酸のような弱酸でブトキシカルボニル基を切断する場合は、全く起こらないことがわかった(Fig.5-16)。このようにして脱ブトキシカルボニル化したジペプチド 5-3 及びトリペプチド 5-5b は、取り扱い上塩酸塩の方がギ酸塩より良好な性質を示したので2つの脱ブトキシカルボニル化にはエタノール中塩化水素の条件を用いた。この後処理の時、エーテルを加えても目的物は沈殿せず、一方エタノールを留去するとやはり上記の副反応が起こった。脱保護体を得るには、ブトキシカルボニル基切断後、直ちに大量のベンゼンを加え凍結乾燥するのが最も効果的であることがわかった。このようにして得られたジペプチド塩酸塩 5-3 と Boc-Ser(Bzl)-ONSu 又は Boc-Ala-ONSu を縮合して2種のトリペプチド 5-4a と 5-4b を得た。

次にトリペプチド 5-4a 及び 5-4b のブトキシカルボニル基を同上の方法で切断し、N端側ジペプチド 5-6 とDCC-HOBt法で縮合して、ペンタペプチド 5-7a 及び 5-7b とした。それらを環化する為に、まずエステルをケン化

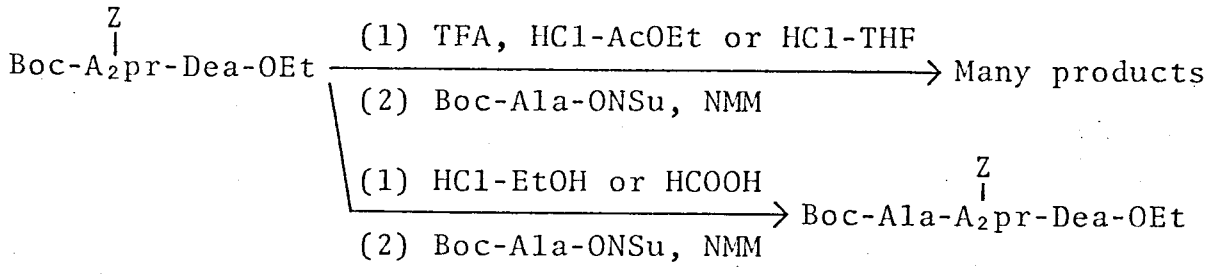


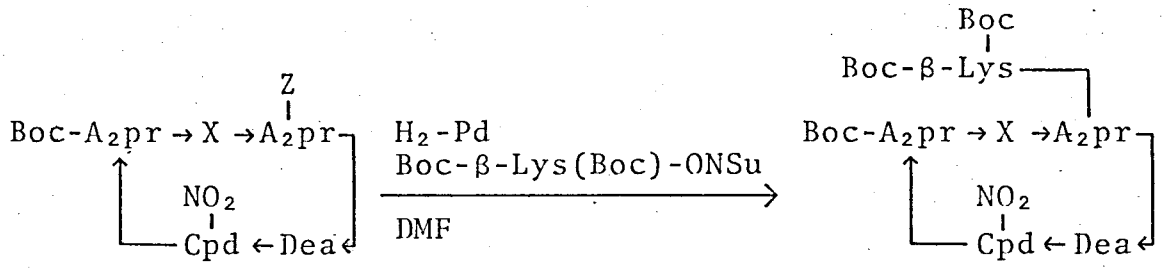
Fig.5-16

して5-8a、5-8bとした後、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル5-9a、5-9bへ導いた。この活性エステルの脱o-ニトロフェニルスルフェニル化においても、ジエトキシアラニンの分解が予想されるが、エタノール中塩化水素又は酢酸を使用すると、それぞれエステル交換又はブトキシカルボニル基の部分的脱離は免れ得ない。そこでやむなくTHF中塩化水素の希薄溶液を用い0°Cで脱o-ニトロフェニルスルフェニル化して、副反応をできる限り防いだ。こうして得られたペンタペプチド活性エステル塩酸塩5-10a、5-10bをDMFに溶解し、大量のピリジン中へ長時間かけて滴下し環化した。反応後、ピリジンを留去して得た残渣は、複雑なTLC上のスポットを与え多量体の生成のみならず上述の副反応が起こったことを示したが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりこれを精製すると、目的物5-11aを粉末として、また5-11bを針状晶として、いずれも25%程度のこの種の環化反応としては好収率で得ることができた。各々、元素分析並びにDMFを溶媒とした蒸気圧浸透法による分子量測定により、環状単量体であることを確認した。

5-2-2 側鎖アミノ酸の導入

ツベラクチノマイシン類の全合成においてはツベラクチナミンNを調製した後、β-リジンが導入されたが、カプレオマイシンの場合はツベラクチナミンNに相当する環状部(カプレオマイシンIIA、IIB)は分子中に2個の遊離アミノ基をもつので、同じ経路でカプレオマイシンIA、IBへ導くことはできない。

α,β-ジアミノプロピオン酸[4]残基のβ-アミノ基へβ-リジンを導入する為、環状ペンタペプチド5-11bの選択的脱ベンジルオキシカルボニル化を試みた。この時もし同時にカプレオマイシジン残基のニトロ基が除去されると、β-リジン残基導入反応に対して不都合である。その為にニトロ基を残してベンジルオキシカルボニル基のみを選択的に除去する条件を検討したにもかかわらず、いずれの場合にもニトロ基の部分的脱離及びα,β-ジアミノプロピオン酸残基におけるN,N-アシル転移と思われる副反応は避けられなかった。しかしながら環状ペプチド5-11bの接触還元の際、Boc-β-Lys(Boc)-ONSuを同時に加えると脱ベンジルオキシカルボニル化と同時にβ-リジン残基の導入が進み結果的には上記の副反応を抑えることができた。即ちこの場合、導入されたBoc-β-Lys(Boc)残基の立体障害の為にニトロ基の脱離反応が妨げられたと考

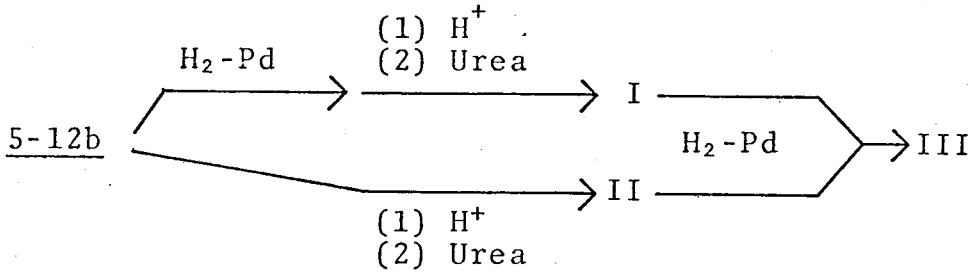


X=Ser(Bzl): 5-11a　　X=Ser(Bzl): 5-12a
X=Ala　　: 5-11b　　X=Ala　　: 5-12b

Fig.5-17

えられる(Fig.5-17)。このように保護基の脱離とアミノ酸の縮合を1段階で行なう反応はペプチド合成の分野では他に例が見られない。この手法は例えばジケトピペラジンを形成しやすいジペプチドの脱保護、ペプチド鎖延長等により一般に応用できる可能性があると考えられる。これと同様な操作をペプチド5-11aにも適用し目的のヘキサペプチド5-12aを得た。この場合はセリンのベンジル基も全く切断されなかった。

次に全合成の最終段階として分枝ヘキサペプチド誘導体の脱保護及びジエトキシアラニン残基のβ-ウレイドデヒドロアラニン残基への変換を行なった。まず化合物5-12bについてニトロ基の切断を試みたが不成功であった(Fig.5-18)。これは上で述べたように分子中の3個のブトキシカルボニル基の立体障害の影響であり、種々の条件で還元を行なったにもかかわらず、TLC上脱



I	×	∘	○
II	×		○
III	×	○	○∘
Capreomycin IB	×	○	
Reduced capreomycin IB	×		○∘

TLC (Silica gel, phenol-water-c.NH_4OH, 30:10:1)

Fig.5-18

ニトロ体と思われるスポットがごくわずかに現われたのみであった。このように脱ニトロ体の生成は低収率であるにせよ、予備実験的にこのものが目的のカプレオマイシンを与えるかどうかを調べる為に、上記の反応混合物を常法に従って酸処理後尿素と反応させることにより、脱保護続いてウレイドデヒドロアラニン化を行なった。この結果、Fig.5-18に示したように、反応混合物中に天然カプレオマイシンIBとTLC上で完全に一致する化合物が存在することがわかった。なおこの混合物中の主成分は、化合物5-12bを還元せず脱ブトキシカルボニル化、ウレイドデヒドロアラニン化した時の生成物と一致することから、N^GニトロカプレオマイシンIBであった。

そこで最終生成物の収率の向上を計って、上記の反応で得られたN^Gニトロカプレオマイシンの脱ニトロ化を試みたところ、目的物も得られるが、β-ウレイドデヒドロアラニン残基の還元された副生成物の生成が認められた。この接触還元を最後に行なう方法は、収率の点で再現性に乏しく、合成カプレオマイシンを得るには満足しうるものではなかった。

以上のように目的物が収率よく得られないのは、カプレオマイシジン残基のニトロ基が効果的に除去できないことが原因であるが、まず化合物5-12b中の3個のブトキシカルボニル基による立体障害を取り除いた後脱ニトロ化を行なえば、この問題は解決できるのではないかと考えた。即ちFig.5-19に示したように、化合物5-12bをまずギ酸処理してブトキシカルボニル基を切断した後、接触還元すると期待通り短時間でニトロ基に基ずくUV吸収が消失した。次にこの生成物を単離することなく、ウレイドデヒドロアラニン化を行なったところ、この場合は副生物を生ずることなく、目的物5-13bへ導くことに成功した。ヘキサペプチド5-12aからも全く同じ経路を経て最終生成物5-13aが高収率で得られた。

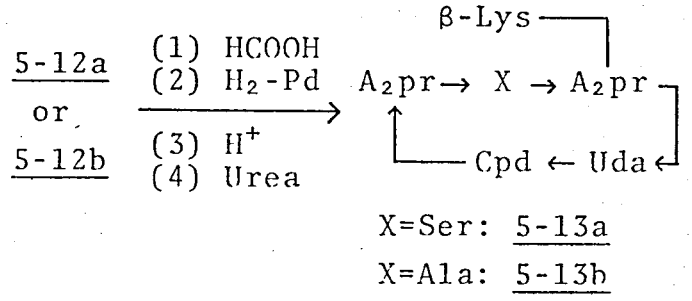


Fig.5-19

このようにして得られた合成カプレオマイシンIA(5-13a) 並びにIB(5-13b)はTable 5-6、5-7及びFig.5-20～5-23に示すように、その物理化学的諸性質と抗菌活性において天然物と完全に一致した。β-ウレイドデヒドロアラニン

Table 5-6. Physicochemical properties of the natural and synthetic capreomycin IA and IB

		Capreomycin IA		Capreomycin IB	
		synthetic	natural	synthetic	natural
R_f a)		0.25	0.25	0.29	0.29
m.p.(dec)		240–245°	246–248°	250–253°	253–255°
$[\alpha]_D^{22}$ (c0.5,H_2O)		-22.0°	-21.9°	-42.5°	-44.6°
UV (nm) (ε)	0.1N HCl	269 (23,400)	269 (24,000)	268 (22,000)	268 (22,700)
	H_2O	268 (23,200)	268 (23,900)	268 (21,900)	268 (22,300)
	0.1N NaOH	288 (15,800)	287 (15,900)	290 (13,100)	290 (14,400)

a) TLC (Silica gel, phenol-water-c.NH_4OH, 30:10:1)

Table 5-7. Minimum inhibitory concentrations (mcg/ml) of the natural and synthetic capreomycin IA and IB

Test organism	Capreomycin IA		Capreomycin IB	
	synthetic	natural	synthetic	natural
S. aureus ATCC 6538P	100	50	100	100
S. epidermidis sp-al-1	50	50	100	50
St. pyogenes N.Y.5	100	100	100	100
S. lutea ATCC 9341	100	100	100	100
M. flavus ATCC 10240	100	100	100	100
B. subtilis ATCC 6633	12.5	12.5	12.5	12.5
E. coli B	50	50	100	100
S. typhosa H 901	25	25	50	50
S. paratyphi PA 41-N-22	100	100	100	100
S. enteritidis Gaertner	100	50	100	100
Sh. sonnei E33	50	50	100	50
Mycobacterium ATCC 607	6.3	12.5	6.3	6.3

残基のオレフィンプロトンの化学シフトも両者は一致しているので、二重結合に関する異性体のうち天然型の立体が選択的に得られたことが確認された。またアミド領域のNMRスペクトルも合成品は天然物と同じパターンを示すことから、両者はアミノ酸配列のみならずコンホメーションにおいても差がないことが示された。

以上のようにして著者の提出したカプレオマイシンの構造式が決定的に証明されたが、その側鎖アミノ酸の結合場所がリベラクチノマイシン形とは全く異なっていたことは、両抗生物質の生合成機構の観点からも、またこれら抗生物質群の構造活性相関を考える上からも興味ある事実である。後者に関

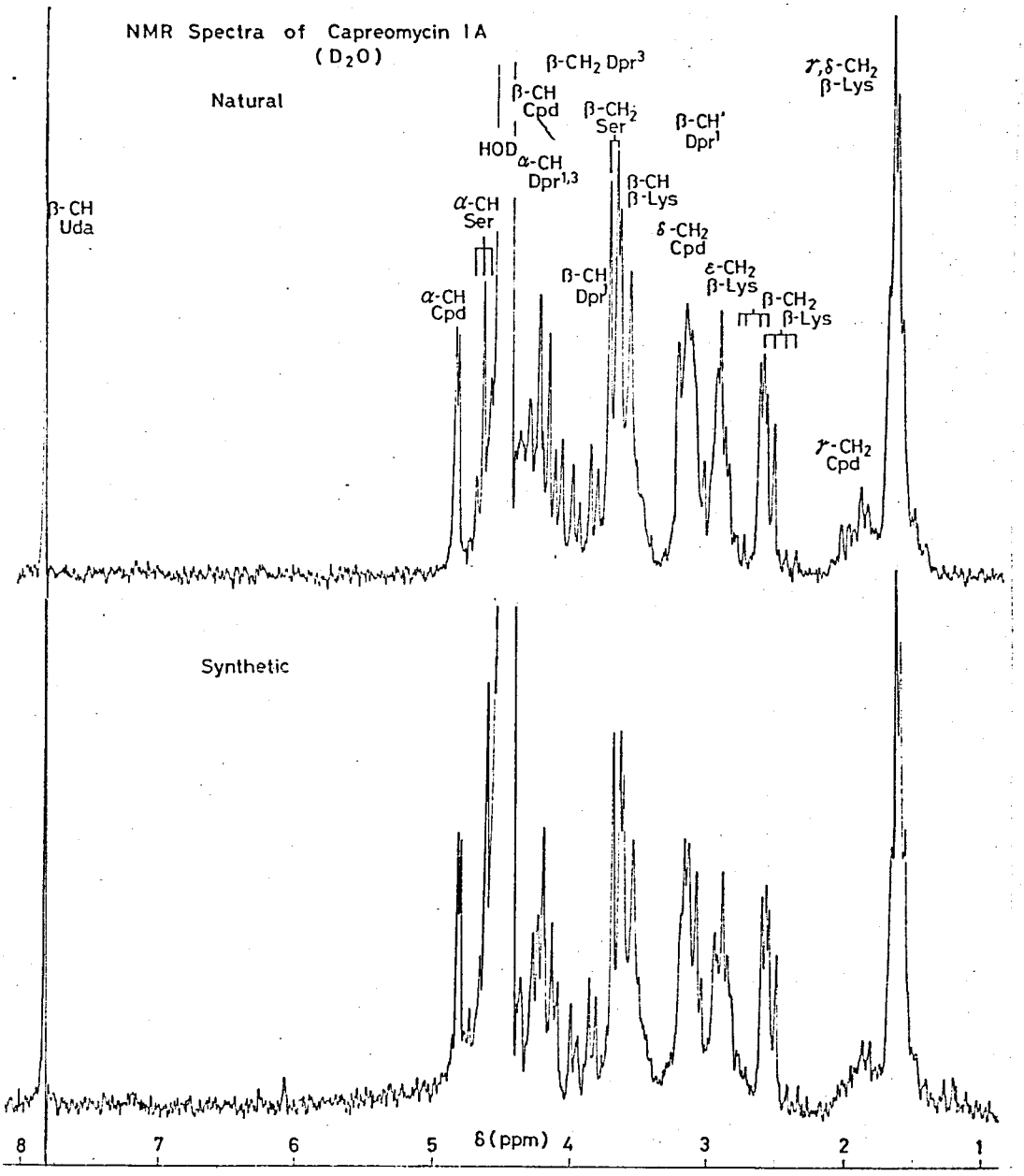


Fig.5-20

する議論は次節のカプレオマイシン類似体の合成の後に述べる。

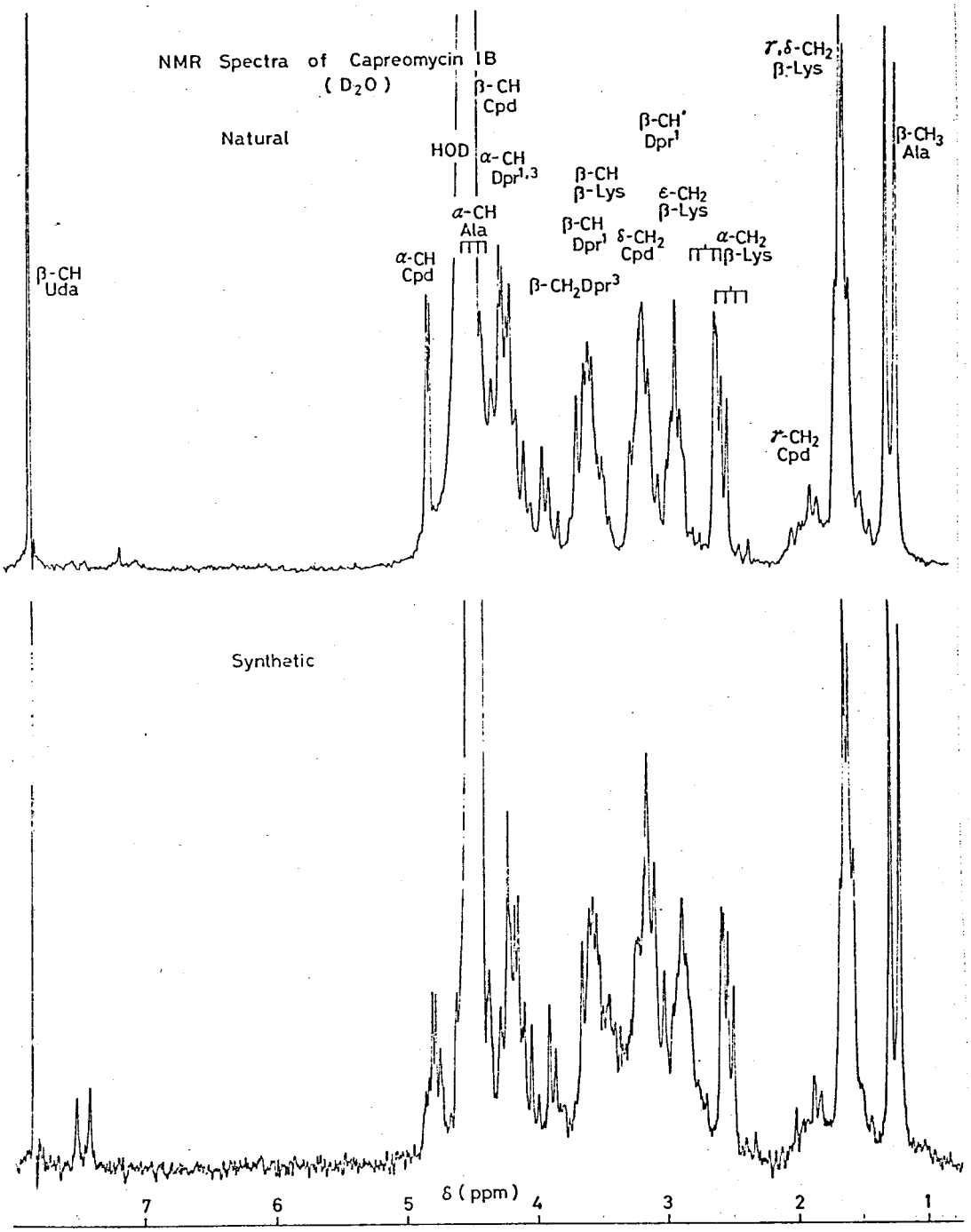


Fig.5-21

NMR Spectra of Capreomycin I A
(H_2O, pH 2.5)

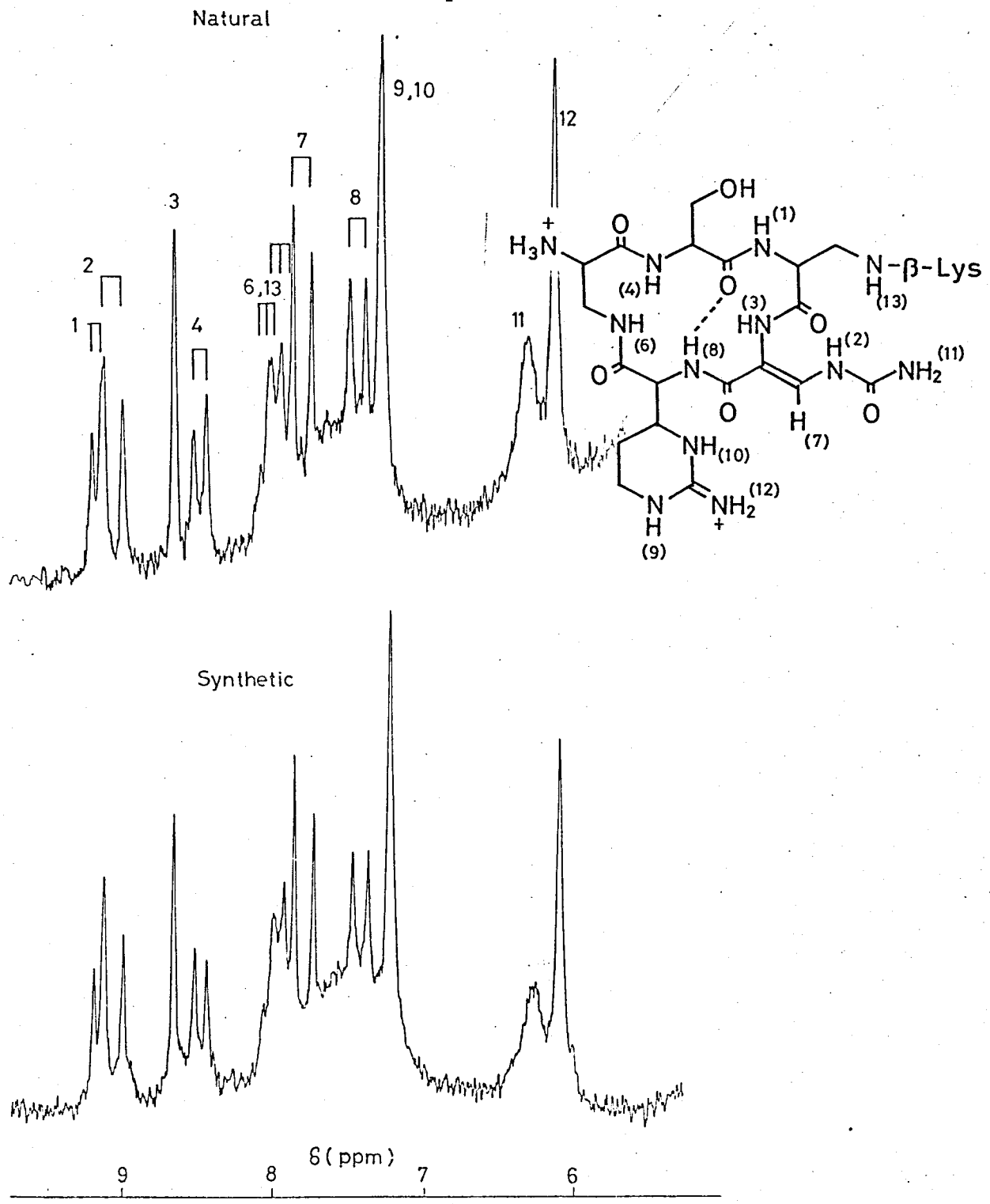


Fig.5-22

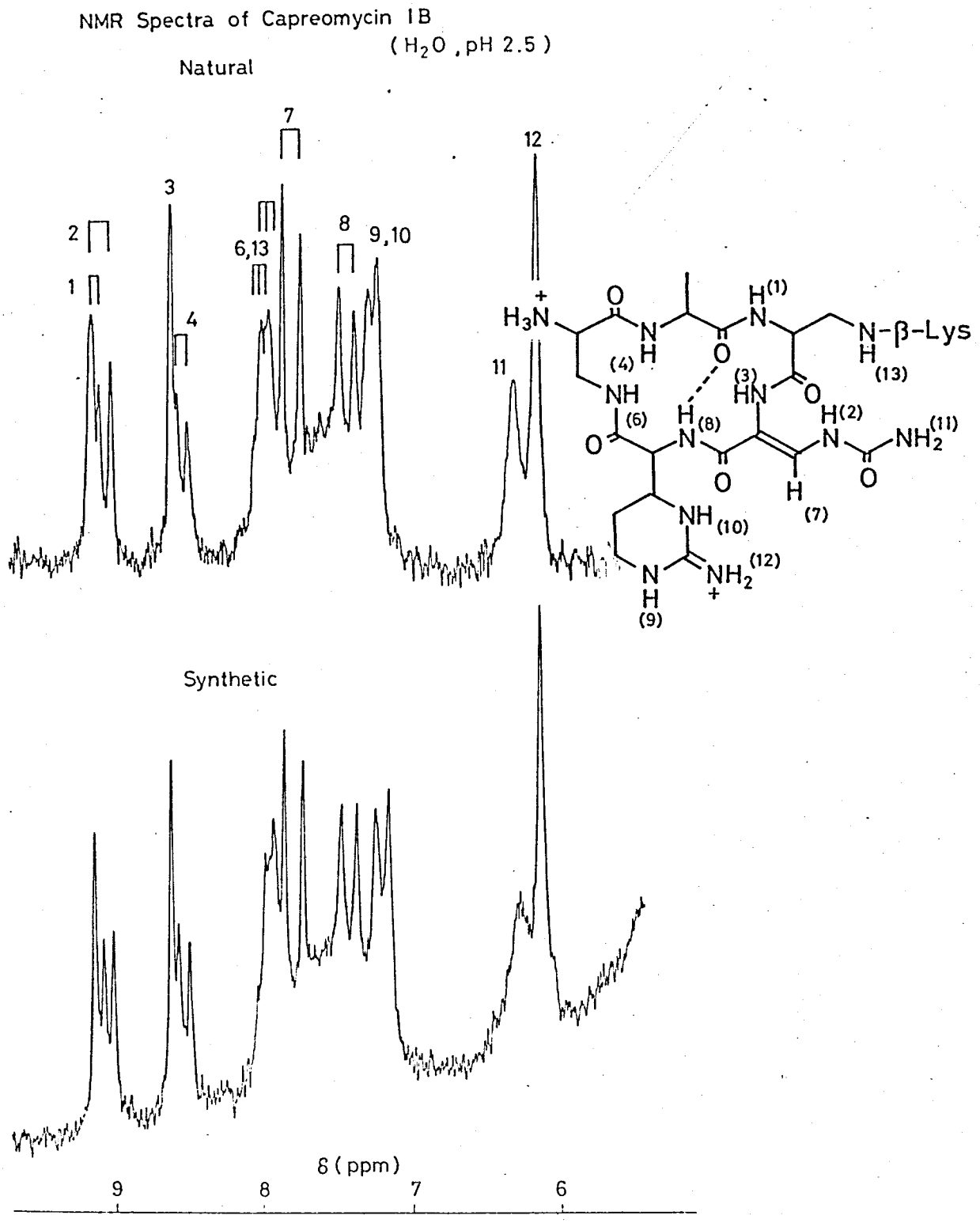

NMR Spectra of Capreomycin IB
(H_2O , pH 2.5)
Natural
Synthetic
1
2
3
4
6,13
7
8
9,10
11
12
δ (ppm)
9
8
7
6
N-β-Lys

Fig.5-23

5-3 カプレオマイシンの構造類似体の合成

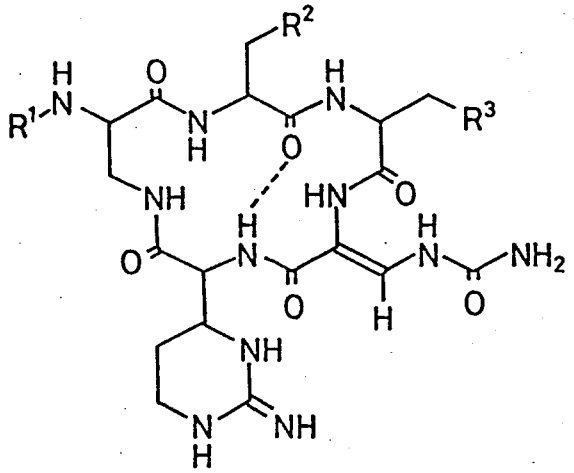
カプレオマイシンとツベラクチノマイシンの構造を比較すると、環状ペプチド部分のアミノ酸配列とコンホメーションは非常に類似しているが、両者は次の二つの点で異なっている。

(1) ツベラクチノマイシンの第4番目のセリン残基がカプレオマイシンでは α,β-ジアミノプロピオン酸に置き換っている。即ち後者は前者よりアミノ基を1個多く有している。

(2) 側鎖アミノ酸の結合場所が両抗生物質で全く異なっている。

この二つの構造上の差異が抗菌力に与える影響を明らかにする目的で Fig. 5-24 に示した6種のカプレオマイシン類似体を合成した。[33]

カプレオマイシンIIA (5-14a)、IIB (5-14b) はカプレオマイシン群の微量成分として天然より得られる同属体であり、それぞれIA、IBのβ-リジン残基を欠く環状ペンタペプチドである。注目すべきことには、ツベラクチノマイシンの側鎖アミノ酸を切断して得られたツベラクチナミンNは元のツベラクチノマイシンより明らかに低い抗菌力を示すのに対し、カプレオマイシンIIA-



	R^1	R^2	R^3
Capreomycin IIA (5-14a)	H	OH	NH_2
IIB (5-14b)	H	H	NH_2
Pseudocapreomycin IB (5-15)	β-Lys	H	NH_2
Reversecapreomycin IIB (5-16a)	H	NH_2	H
[Orn⁴]-capreomycin IIB (5-16b)	H	H	CH_2CH_2-NH_2
Di-β-Lys-capreomycin IIB (5-17)	β-Lys	H	β-Lys-NH
Tuberactinamine N	H	OH	OH

Fig. 5-24

ⅡBはカプレオマイシンⅠA、ⅠBやツベラクチノマイシンとほぼ同程度の活性を示すことが知られている。[34] ツベラクチナミンNとカプレオマイシンⅡAを比較すると、前者の第4番目セリン残基の水酸基が後者ではアミノ基に変わっている点でのみ両者は異なっている。カプレオマイシンⅡBについては、この他に第3番目のアミノ酸残基が水酸基のないアラニンである点でもツベラクチナミンNと差があるが、第1章で述べたように、この水酸基は生理活性にほとんど影響を与えないことがすでに明らかにされている。従ってこのような両環状ペプチドの構造上の比較から、カプレオマイシンⅡA、ⅡBの第4番目アミノ酸残基のβ位アミノ基は特に抗菌活性を増加させる効果を有していると推論できる。この仮説を確認する為に、カプレオマイシンⅡA、ⅡBを合成しその生理活性をツベラクチナミンNと同一条件下に測定し比較した。またこれと同じ目的で分枝部β-リジンがα,β-ジアミノプロピオン酸[2]のα-アミノ基に結合したツベラクチノマイシン形のプソイドカプレオマイシン(5-15)の合成を行ない、その活性をツベラクチノマイシンOと比較した。

さらに問題のα,β-ジアミノプロピオン酸[4]残基上のβ-アミノ基を第3残基に移した形のリバースカプレオマイシンⅡB(5-16a)並びに第4残基の側鎖にメチレンを2個挿入した形のL-Orn[4]-カプレオマイシンⅡB(5-16b)を合成して、それぞれの抗菌活性を調べ、カプレオマイシン構造における遊離アミノ基の位置の重要性を追求した。

分枝部アミノ酸の結合場所の違いが抗菌力に及ぼす影響に関しては、天然ツベラクチノマイシン、カプレオマイシンⅠA、ⅠB、及びプソイドカプレオマイシンⅠBの活性を比較して議論する。またこの問題に関連して、天然抗生物質より強力な活性を示す化合物の創製を試みた。即ちツベラクチナミンNにβ-リジンが結合すると抗菌力が増加することは先に述べたが、同じ現象がカプレオマイシンにも現われるならば、カプレオマイシンⅠBのα,β-ジアミノプロピオン酸[2]残基のα-アミノ基にさらにもう1残基のβ-リジンを導入すればより高活性の化合物が得られることを期待して、ジ-β-Lys-カプレオマイシンⅡB(5-17)を合成した。

5-3-1 カプレオマイシンⅡA及びⅡBの合成

この2種の化合物はカプレオマイシンⅠA及びⅠBの全合成中間体である保護環状ペンタペプチド5-11a及び5-11bの脱保護次いでウレイドデヒドロアラ

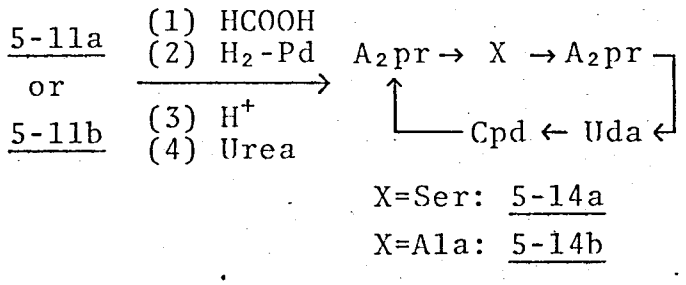


Fig.5-25

ニン化を経て高収率で得ることができた(Fig.5-25)。生成物のNMRスペクトルをFig.5-26、5-27に示した(5-3節で合成した化合物のスペクトルは5-3-4節の後にまとめて示してある。)。

5-3-2 プソイドカプレオマイシンIBの合成

Fig.5-28に示すように、前に合成したペプチド5-11bのブトキシカルボニル基をギ酸で切断し、Boc-β-Lys(Boc)-ONSuと縮合した後、カプレオマイシンIBの場合と同様な操作でプソイドカプレオマイシンIBへ導いた。この化合物はFig.5-29に示すNMRスペクトルを与えた。

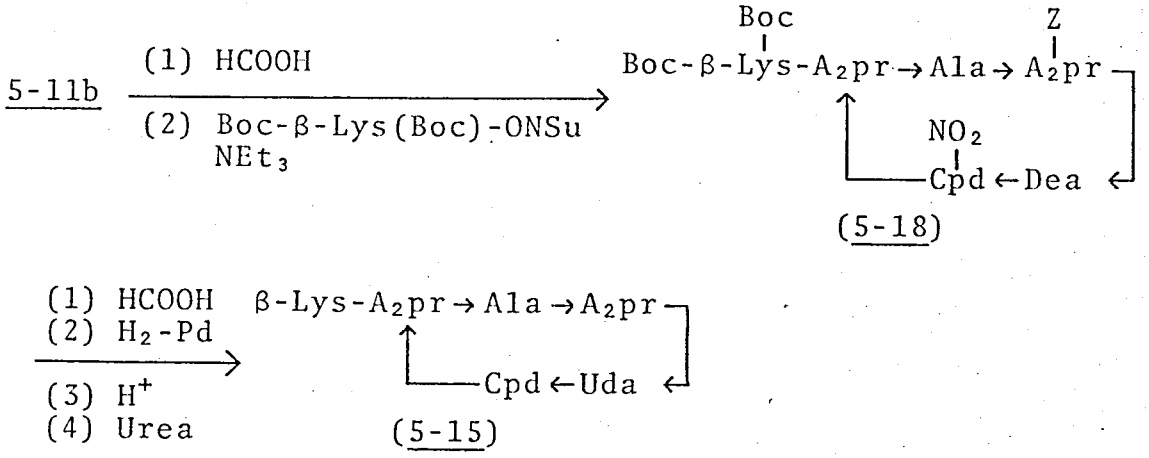


Fig.5-28

5-3-3 リビースカプレオマイシンIIB及び[Orn4]-カプレオマイシンIIBの合成

Fig.5-30、5-31にこの2種の化合物の合成経路を示した。カプレオマイシンIIBの合成と同様にして、保護環状ペンタペプチド5-24a、5-24bを調製し、これらを常法に従い、Fig.5-32、5-33のNMRスペクトルを示す生成物を得た。

5-3-4 ジ-β-Lys-カプレオマイシンIIBの合成

この化合物はFig.5-34に示す二つの経路で合成した。

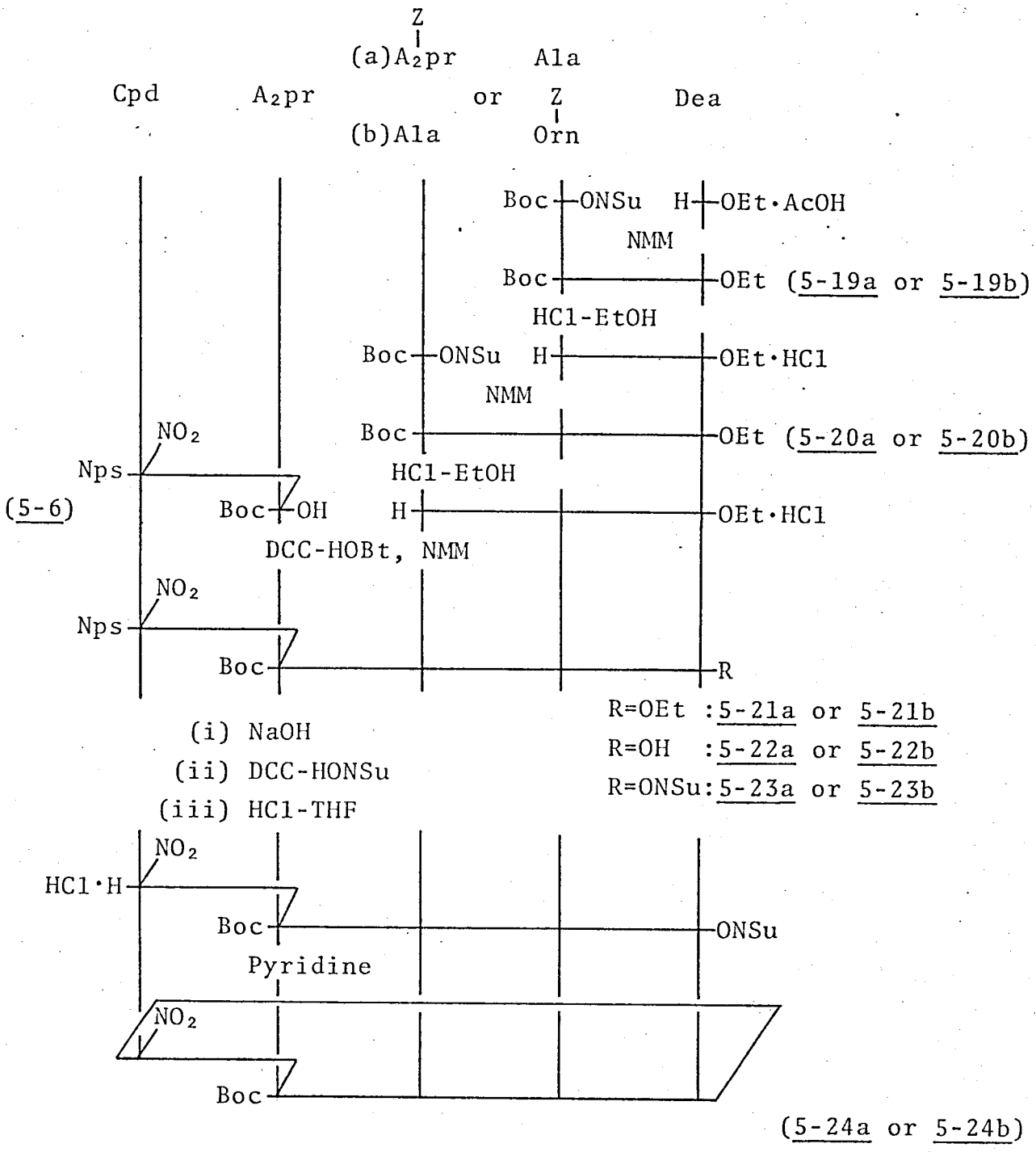
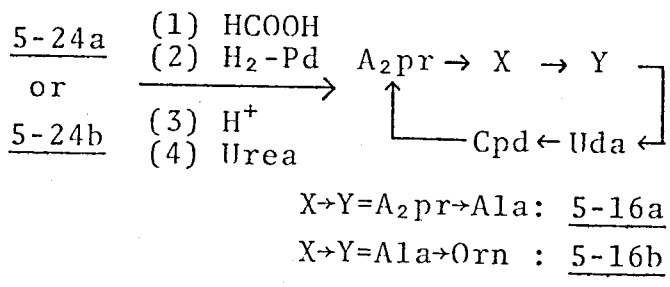


Fig.5-30



X→Y=A2pr→Ala: 5-16a

X→Y=Ala→Orn : 5-16b

Fig.5-31

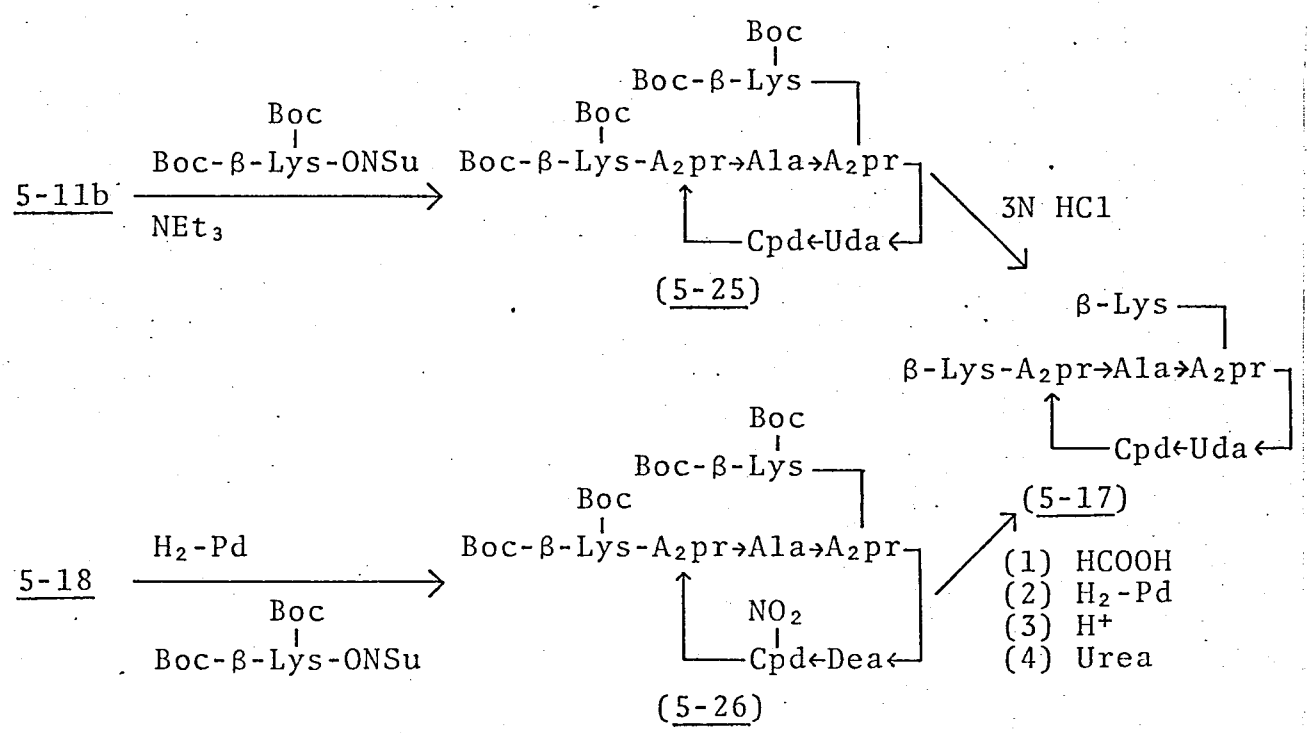


Fig.5-34

(1) カプレオマイシンIB分子中の2個のアミノ基に活性エステル法で、Boc-β-Lys(Boc)残基を導入し、次いで3N塩酸で4個のブトキシカルボニル基を一挙に切断して目的物を高収率で得ることができた。

(2) プソイドカプレオマイシンIBの合成中間体5-18をBoc-β-Lys(Boc)-ONSu存在下に接触還元して、保護ヘプタペプチド5-26を得た。次いで常法により目的物へ導いた。

上記二つの経路による生成物はTLCで完全に一致した。そのNMRスペクトルをFig.5-35に示した。

(1)の経路は反応操作が簡単な点で有利であるが、(2)の経路に従うと二つの分枝部アミノ酸の種類が異なる化合物を合成することも可能である。

NMR spectra of capreomycin IIA

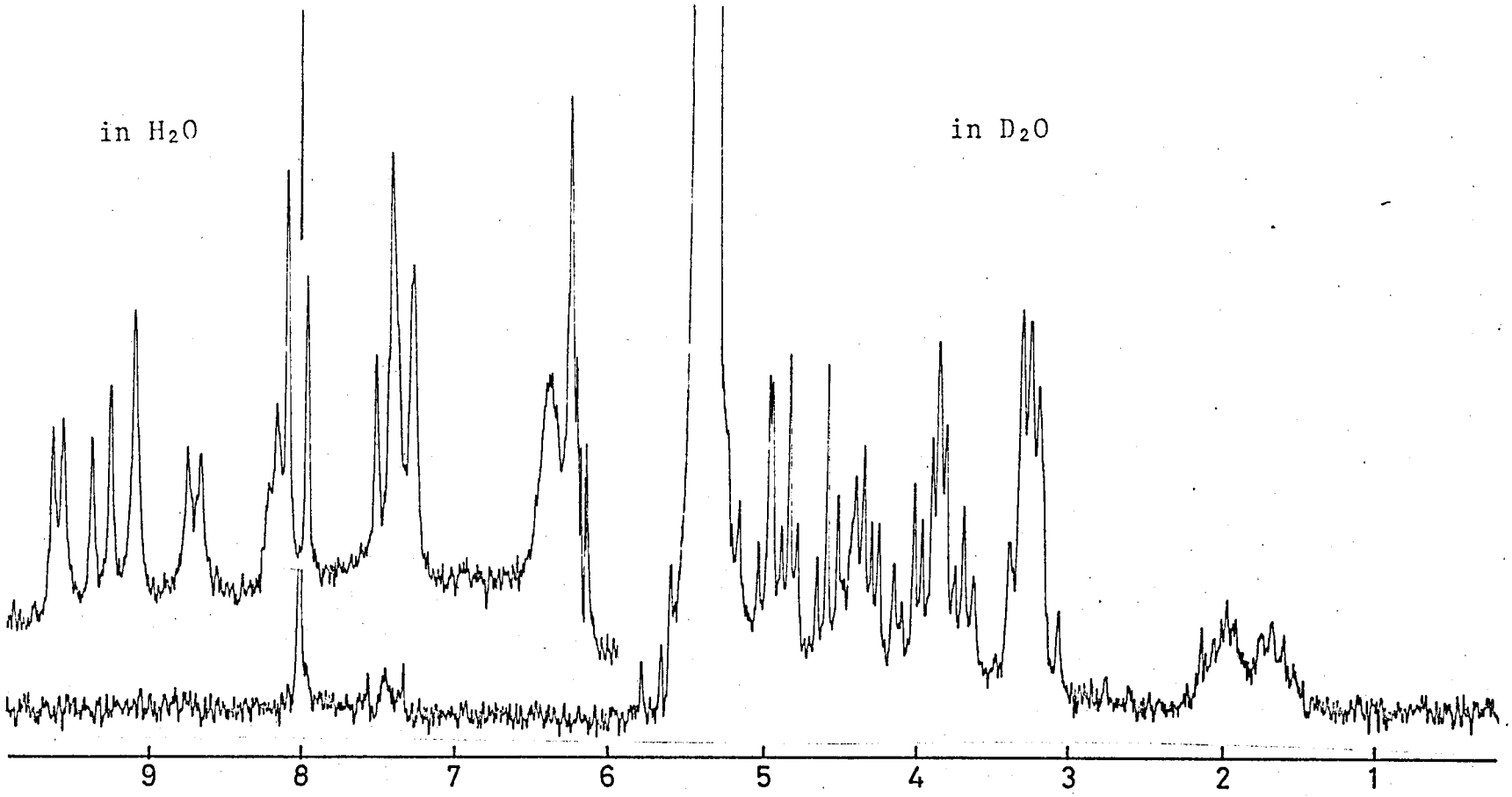


Fig.5-26

NMR spectra of capreomycin IIB

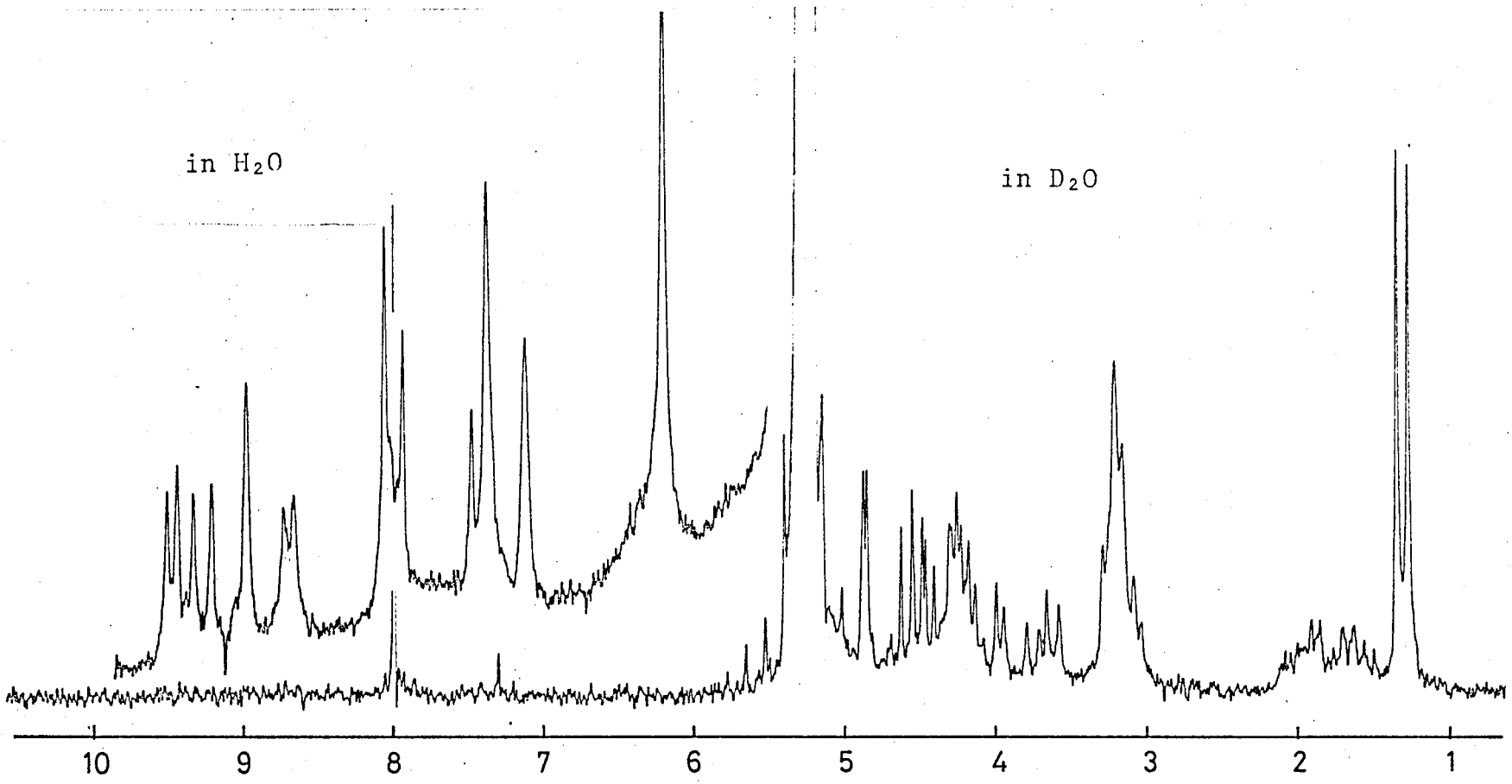


Fig.5-27

NMR spectra of pseudo-capreomycin IB

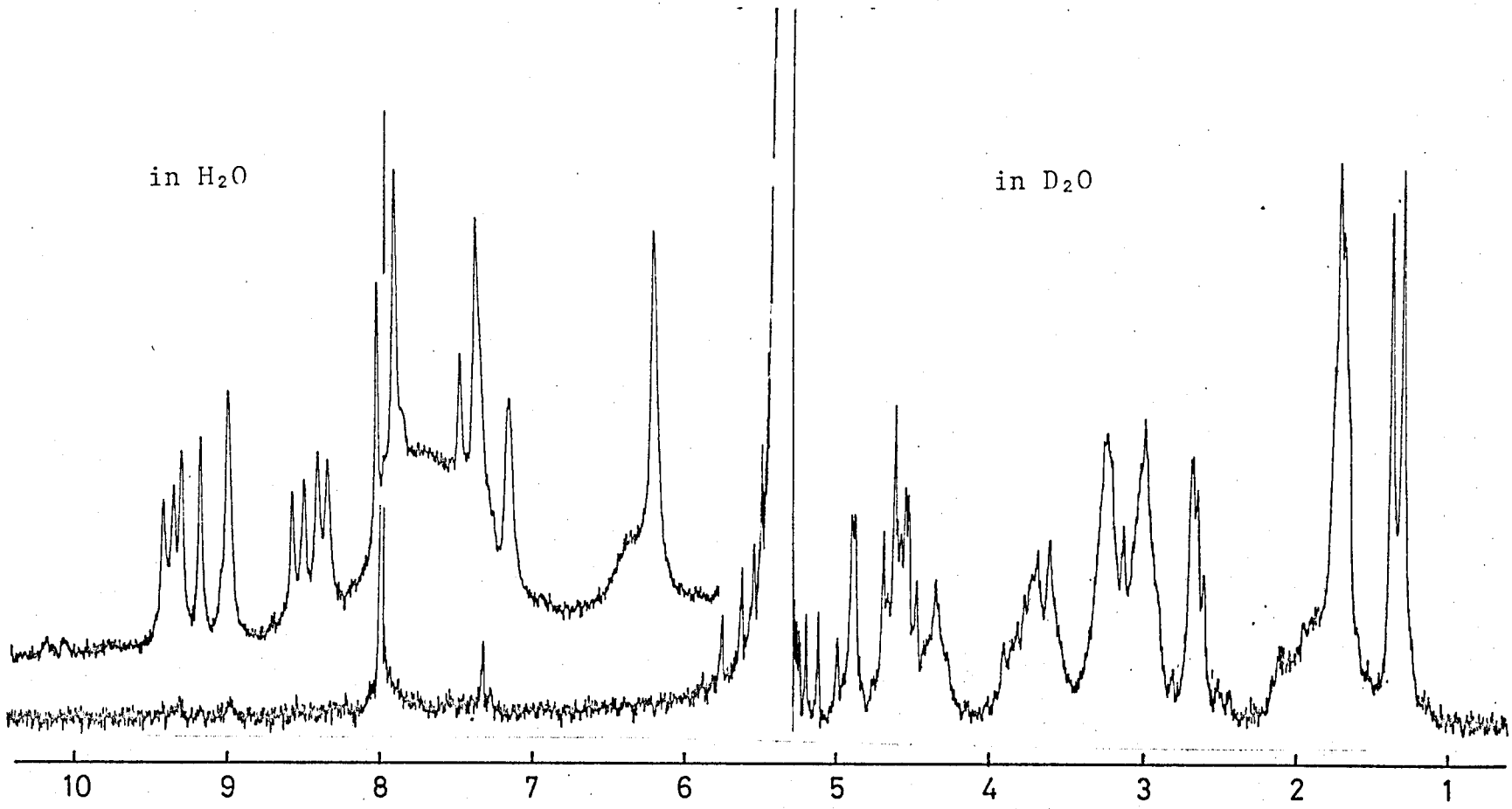


Fig.5-29

NMR spectra of reverse-capreomycin IIB

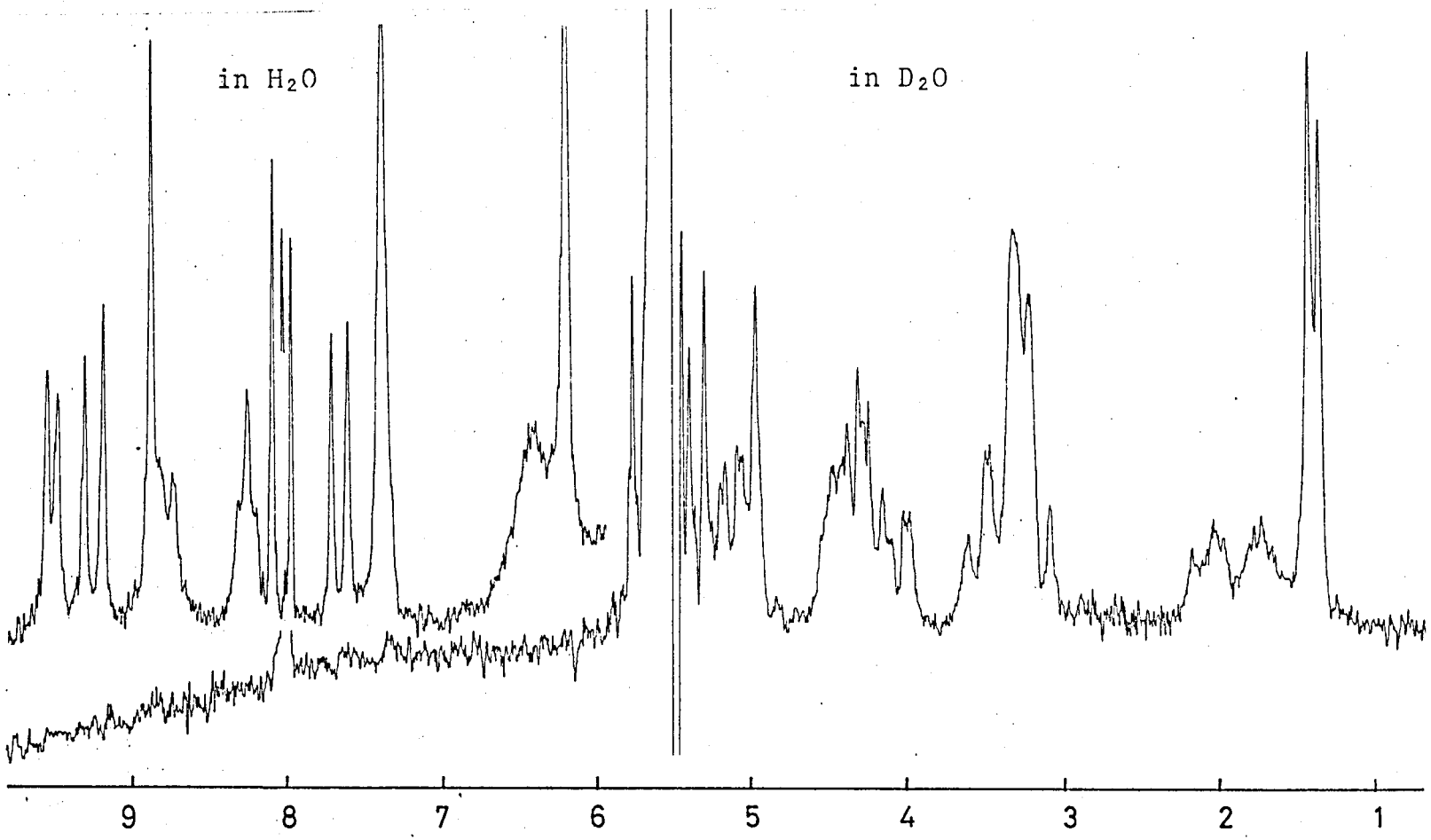


Fig.5-32

NMR spectra of [Orn^4]-capreomycin IIB

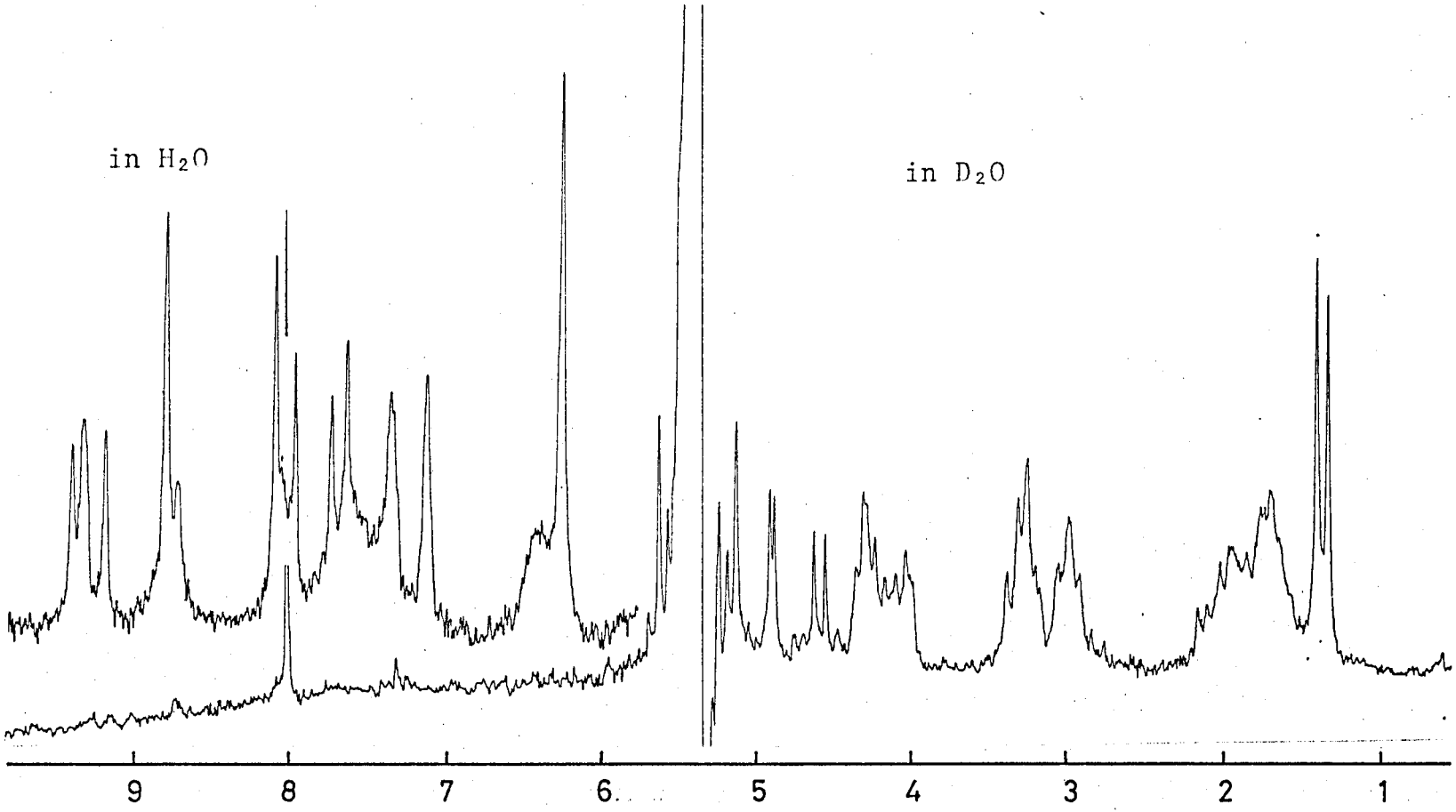


Fig.5-33

NMR spectra of di-β-Lys-capreomycin IIB

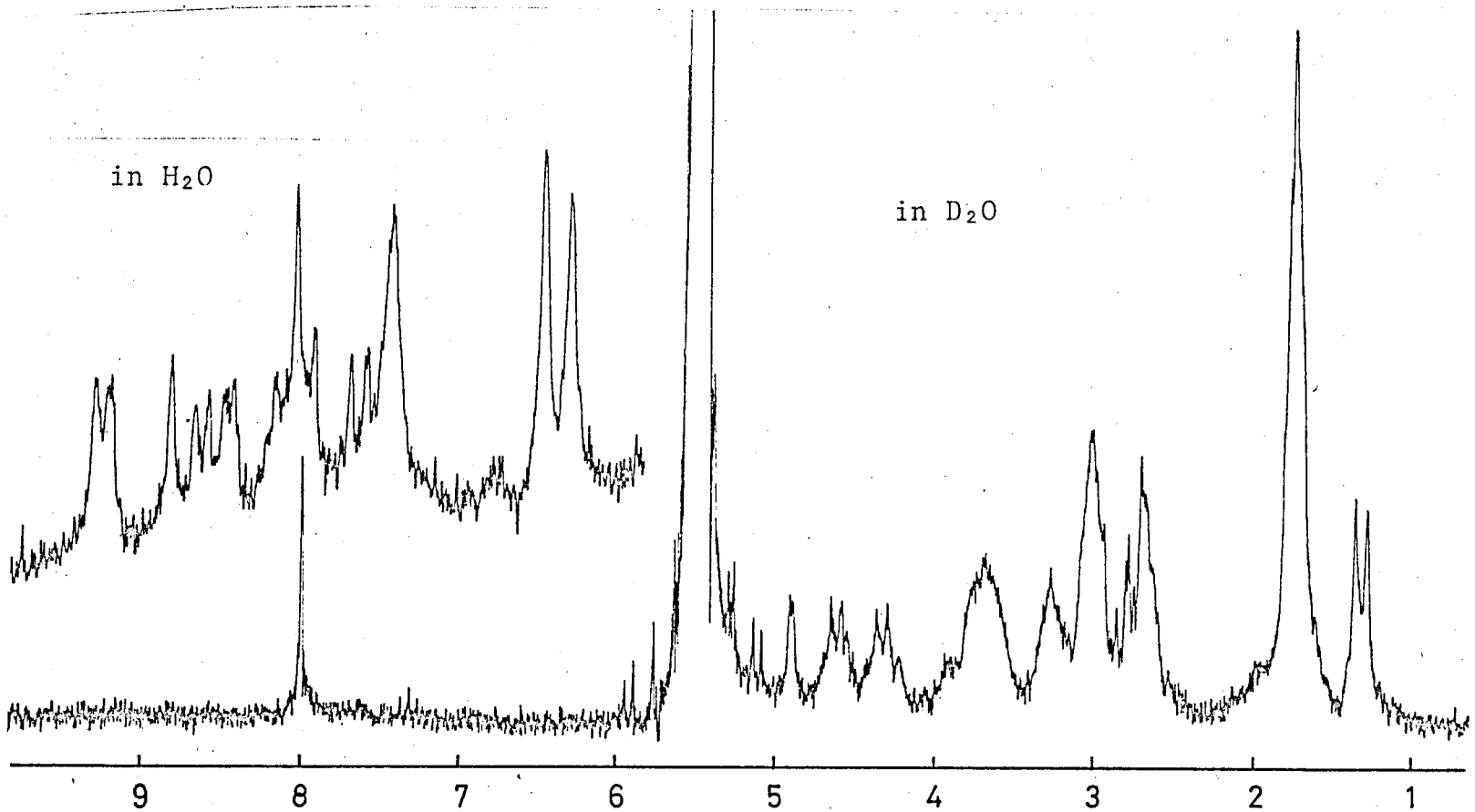


Fig.5-35

5-4 カプレオマイシン並びにその構造類似体の抗菌作用に対する考察

Table 5-8 に示したカプレオマイシン及びその類似体の抗菌スペクトルを比較考察すると、構造と活性の相関関係に関して以下に挙げるような結論を下すことができる。

(1) カプレオマイシンIIA、IIBは、共にツベラクチナミンNより明らかに高い活性を示している。この事実から、第4番目のアミノ酸残基のβ-

Table 5-8. Minimum inhibitory concentrations (mcg/ml) of capreomycin analogs[a)]

Test organism	Cpm IA	Cpm IB	Tum O	Tua N
1) *S. epidermidis* sp-a1-1	100	>100	>100	>100
2) *St. pyogenes* 1022	>100	>100	>100	>100
3) *St. agalactiae* 1020	>100	>100	—	—
4) *C. diphtheriae* P.W.8	3.1	3.1	3.1	50
5) *B. subtilis* ATCC 6633	25	25	50	>100
6) *E. coli* B	50	100	100	>100
7) *K. pneumoniae* ATCC 10031	25	50	25	>100
8) *S. typhosa* H 901	25	50	100	>100
9) *Sh. sonnei* E 33	50	100	50	>100
10) *P. vulgaris* OX 19	50	50	50	>100
11) *Mycobacterium* ATCC 607	6.3	6.3	6.3	50

	Cpm IIA	Cpm IIB	pseudo Cpm IB	reverse Cpm IIB	[Orn^4]-Cpm IIB	di-β-Lys-Cpm IIB
1)	>100	>100	50	>100	>100	50
2)	50	50	50	100	100	>100
3)	50	100	>100	>100	100	>100
4)	6.3	6.3	1.6	100	25	1.6
5)	50	25	6.3	100	50	3.1
6)	50	100	50	>100	>100	100
7)	25	25	25	>100	100	50
8)	50	50	25	>100	>100	50
9)	100	100	100	>100	>100	100
10)	50	100	50	>100	>100	100
11)	25	12.5	12.5	100	25	3.1

a) Abbreviations; Cpm:capreomycin, Tum:tuberactinomycin, Tua: tuberactinamine.

位に存在するアミノ基は抗菌力を増加させる作用をすることが明らかになった。

これに対し、プソイドカプレオマイシンIBの場合は、第4残基に遊離アミノ基を有しているにもかかわらず、ツベラクチノマイシンOと比較して、上の例で見られた程度の活性の向上は認められなかった。この事実の解釈として現在次のように考えている。即ちツベラクチノマイシンやカプレオマイシンIA、IBの抗菌活性の強さはこの種の抗生物質の示し得る上限に達しているので、一部の構造変化によりこれ以上の高活性の化合物を得るのは困難ではないかと考えられる。事実、本研究を含めて、現在までに全合成もしくは半合成された100種以上のツベラクチノマイシン類似体の中で、*Corynebacterium diphtheriae* と *Bacillus subtilis* に対してプソイドカプレオマイシンとジ-β-Lys-カプレオマイシンIIBがわずかに天然物より高活性を示したほかは、顕著に天然物の活性にまさる化合物は得られていない。

(2) リバースカプレオマイシンIIBと(Orn$^{\gamma}$)-カプレオマイシンIIBはツベラクチナミンNと同程度かあるいはそれ以下の活性しか示さないので、(1)で問題にされた遊離アミノ基の活性増大作用は、その存在する場所に大きく支配されることが指摘できる。

(3) ツベラクチノマイシンO、カプレオマイシンIA、IB及びプソイドカプレオマイシンIBはいずれもほとんど同程度の活性を示しており、従って分枝部β-リジンの結合位置の差は抗菌力にさほど影響を与えないと考えられる。

またジ-β-Lys-カプレオマイシンIIBとプソイドカプレオマイシンIBが、二・三の菌種に対しわずかに天然カプレオマイシンより高活性を示したことは、この種の誘導体合成により天然物にまさる抗生物質創製に希望をもたせる事実である。

第6章 α,β-ジアミノプロピオン酸のHofmann分解を利用するデヒドロアラニンペプチドの新合成法

この新合成法の研究は第3章で述べた背景の下に生まれたのであるが、以下で述べるように、従来法に比べ応用範囲が広く、一般に種々のデヒドロアラニン含有ペプチドの合成に利用できるものであることが実証された。一般にα位に二重結合を有するデヒドロアミノ酸は、抗生物質や植物毒素等より数多く発見され、それらの生体内での機能、生合成機構等の生化学的見地のみならず、合成化学的興味からも注目されている反面、複雑なデヒドロアミノ酸含有ペプチドの効果的な合成法は十分確立されているとは言えない。現在知られているデヒドロアミノ酸の合成法のうち、デヒドロアラニンペプチドの合成に有用な方法をFig.6-1に挙げた[35]。第3章でも触れたが、これらの方法は立体的にかさ高い試薬、過激な試薬あるいはイオウを含む中間体を使用する点で複雑なペプチドの合成には不利である。

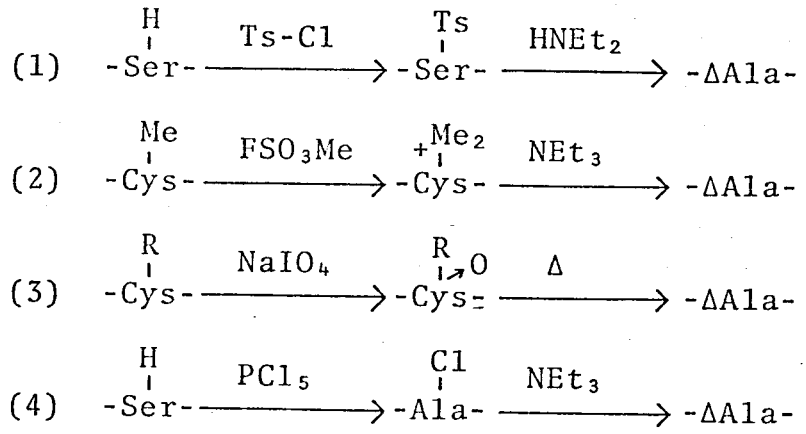


Fig.6-1

著者はこれらの欠点がなく穏和な条件下でデヒドロアラニンペプチドを得る新合成法を見い出した[36]。この方法の原理はFig.6-2に示すように、α,β-ジアミノプロピオン酸(A_2pr)誘導体をデヒドロアラニン残基の合成前駆体として用いてペプチド合成を進め、適当な段階でα,β-ジアミノプロピオン酸のβ-ア

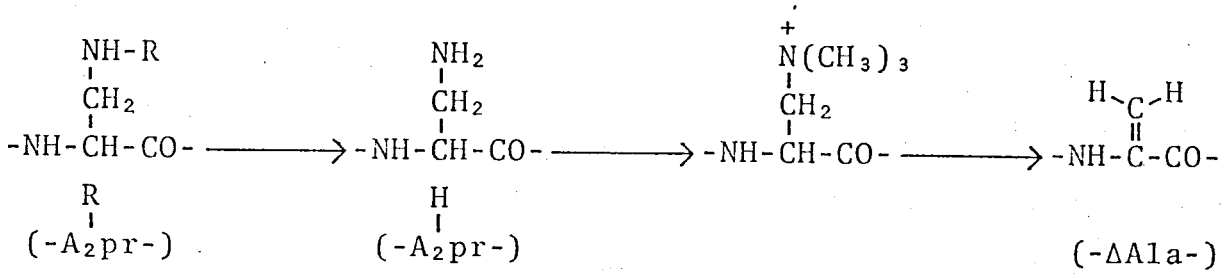


Fig.6-2

ミノ基を脱保護した後、N-トリメチル化してHofmann分解を行ない、これをデヒドロアラニンに変換するものである。

この原理で実際に反応が進行することを確認する為の予備実験として、まずZ-Azpr(H・HCl)-OMe (6-1、Fig.6-3)のHofmann分解を試みた。即ち6-1をChenらの方法[37]に従いアミノ基のトリメチル化条件にさらしたところ、中間に生じるNβ-トリメチルアンモニウム体(6-2)は円滑にβ-脱離を起こし、Z-ΔAla-OMe (6-3)が高収率で得られた。注目すべきことに、反応混合物を酸・アルカリ洗浄して得られた油状粗生成物は極めて純度が高いことがNMRスペクトル(Fig.6-4)及び元素分析により示された。これは既存の方法と異なり、出発原料並びに中間体は全て塩基性物質であり、後処理の段階で完全に除去された為である。

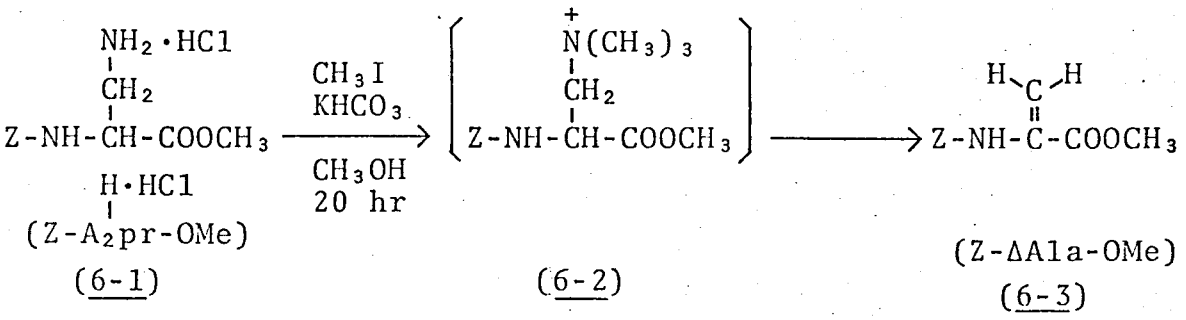


Fig.6-3

次にペプチド中のα,β-ジアミノプロピオン酸残基も本法によりデヒドロアラニンに変換できることを確認した。即ちAzpr(Z)残基を導入したペプチドを調製し、これを還元により脱ベンジルオキシカルボニル化後、Hofmann分解してデヒドロアラニンがペプチドのN端、C端又は中央に存在する3種のペプチド6-4～6-6 (Table 6-1)を得た。生成物の収率並びに純度は十分満足できるものであった。α,β-ジアミノプロピオン酸残基は塩基性条件下にN,N-アシル転位(式1, Fig.6-5)を起こすことが知られているが、転位生成物はメチル化された後もHofmann分解を受けないので、たとえそのような転位生成物が副生してもその塩基性の為に後処理で容易に除去され、目的物に混入することはない。また実際に上記生成物のNMRスペクトルには目的物のシグナルのみが現れており、セリンのO-トシル化法において見られるようなアジリジン形成(式2, Fig.6-5)も全く起こらないことが示された。

続いて本法の有用性を立証する為に、いくつかのより複雑なデヒドロアラ

NMR spectrum of Z-ΔAla-OMe

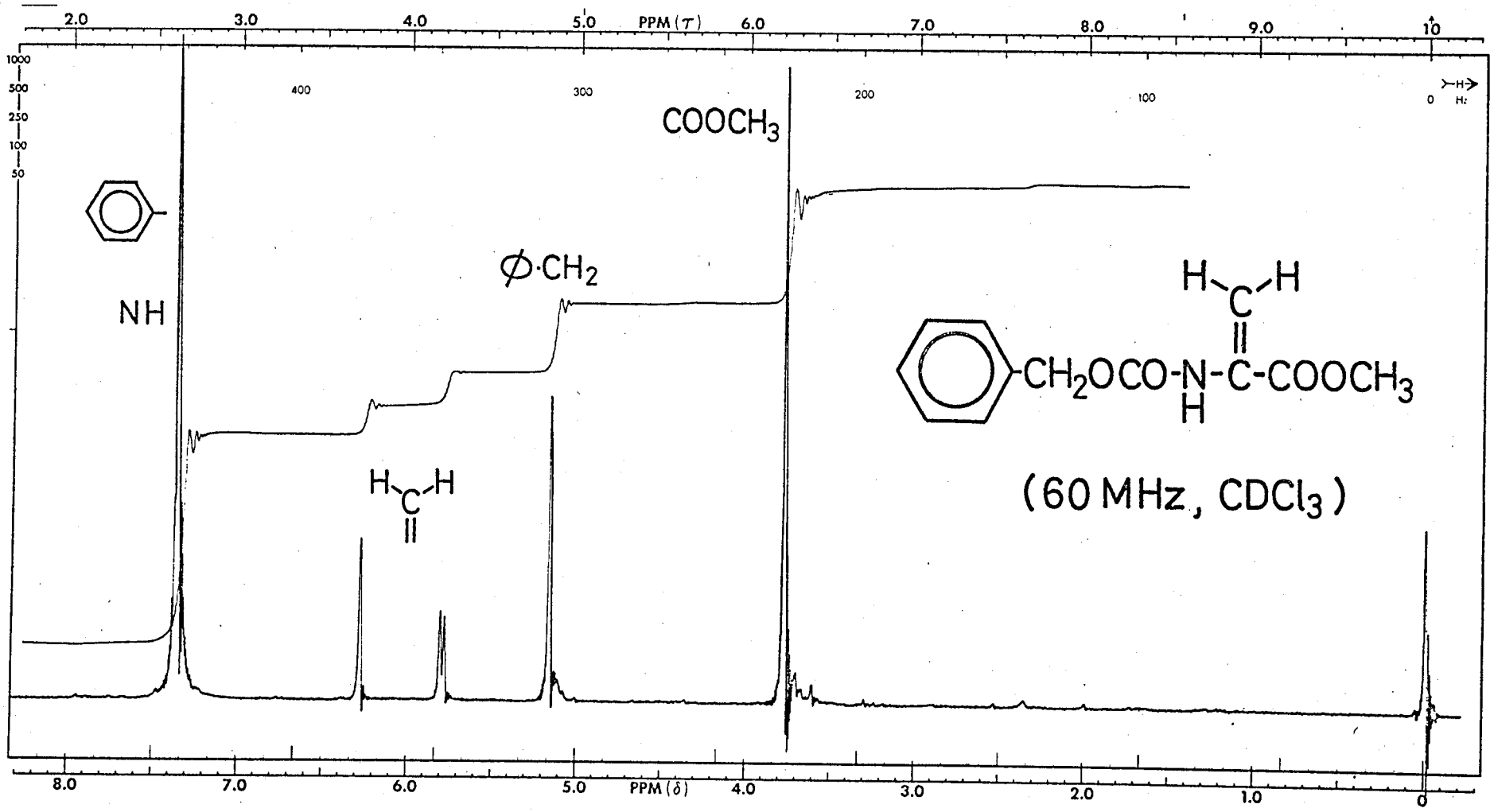


Fig.6-4

Table 6-1. Dehydroalanine peptides synthesized in this study

ΔAla peptides[a]	Yield(%)	NMR(δ, $CDCl_3$)		
			$=CH_2$	NH(ΔAla)
Boc-Ala-ΔAla-OMe (6-4)	68	5.92(d)	6.61(s)	8.57(br.s)
Boc-ΔAla-Ala-OMe (6-5)	82	5.21(t)	6.05(d)	7.30(br.s)
Boc-Ala-ΔAla-Ala-OMe (6-6)	61	5.53(d)	6.47(d)	8.77(br.s)
Boc-ΔAla-Ala-Dea-OEt (6-7)[b]	91	5.21(br.s)	6.02(d)	7.32(br.s)
Boc-Ala-ΔAla-Dea-OEt (6-8)[b]	96	5.40(br.s)	6.51(d)	8.65(br.s)
Boc-ΔAla-Ser(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Dea-OEt (6-9)[b]	88	5.20(br.s)	6.02(t)	7.33(br.s)
Boc-Asn-ΔAla-Ala-OMe (6-10)	77	5.72(d)	6.20(d)	——[c]
Boc-Trp-ΔAla-Ala-OMe (6-11)	74	5.43(br.s)	6.42(d)	8.58(br.s)
Boc-Ser-ΔAla-Ala-OMe (6-12)	76	5.51(br.s)	6.35(t)	9.08(br.s)
Boc-Tyr-ΔAla-OMe (6-13)	83	5.98(s)	6.65(s)	8.32(br.s)

a) These peptides were prepared according to the following scheme. The phenolic hydroxyl group of Tyr residue was protected with benzyl group, which was finally removed simultaneously with Z group of A_2pr residue.

$$\text{Boc---}\overset{\overset{Z}{|}}{A_2}\text{pr---OR} \xrightarrow{H_2\text{-Pd}} \text{Boc---}\overset{\overset{H}{|}}{A_2}\text{pr---OR} \longrightarrow \text{Boc---}\Delta\text{Ala---OR}$$

b) Dea:β,β-diethoxyalanine.

c) In CD_3OD.

ニンペプテド(6-7～6-13)を上記の方法で合成した。本法はメタノールを溶媒としているが、化合物6-7～6-9中のエチルエステルはエステル交換を受けなかった。また立体障害の大きいβ,β-ジエトキシアラニン(Dea)やSer(tBu)残基に隣接するα,β-ジアミノプロピオン酸残基も効率よくデヒドロアラニンに変換された。

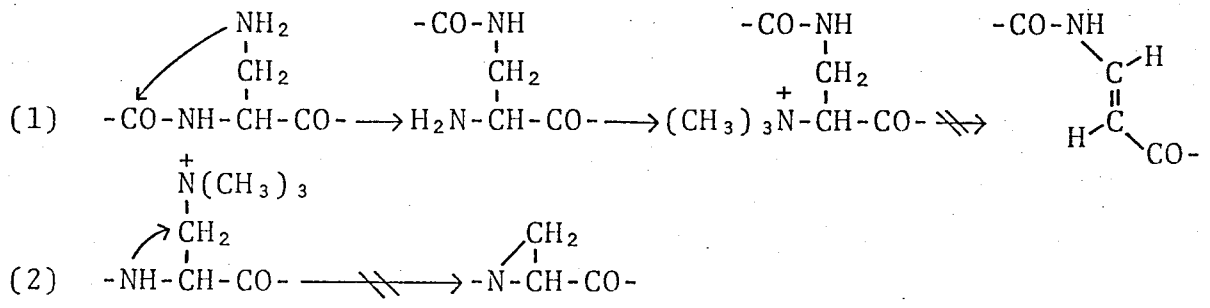
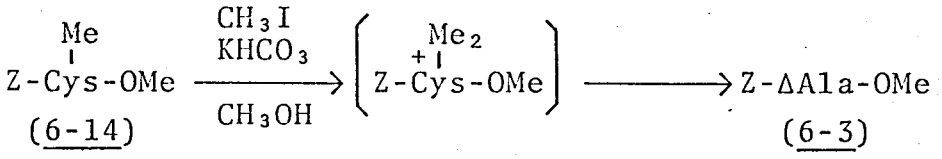


Fig.6-5

前駆物質からデヒドロアラニンへの変換反応中、三官能性アミノ酸残基の側鎖官能基が変化をうけるか否かは、その変換反応の価値を決定する重要な問題である。本反応では化合物 6-10～6-13 (Table 6-1) のNMRスペクトルを測定した結果、アスパラギンの1級アミド、トリプトファンのインドール環、セリン及びチロシンの水酸基は何ら修飾を受けておらず、またアスパラギン残基の転位も起こらなかったことが明らかになった。現在のところ、本法以外にこれらの官能基が遊離の状態でデヒドロアラニンに変換した例は報告されていない。

最後にメチオニン又はS-アルキルシステイン残基中のスルフィド基がこの反応条件に耐えるかどうかを検討した。スルフィド基は通常のアミノ酸に含まれる官能基のうち、最も求核性が強い部類に属し、Hofmann 分解中メチル化をうけることが予想された。まず Z-Cys(Me)-OMe (6-14, Fig. 6-6) をHofmann 分解条件にさらした。この化合物もイオウ原子がメチル化されると、β-脱離を経て Z-ΔAla-OMe (6-3) を与えるが、Z-A2pr(H·HCl)-OMe (6-1) では20時間以内に反応がほぼ終了するのに対し、6-14 は100時間以上を要した。この事実により、スルフィド基のメチル化速度はアミノ基のものに比べ遅いので、S-メチルシステイン残基の共存下でもα,β-ジアミノプロピオン酸をデヒドロアラ



Time (hr)	60	80	100
6-14 (%)	67	76	87
6-3 (%)	18	11	6

Fig.6-6

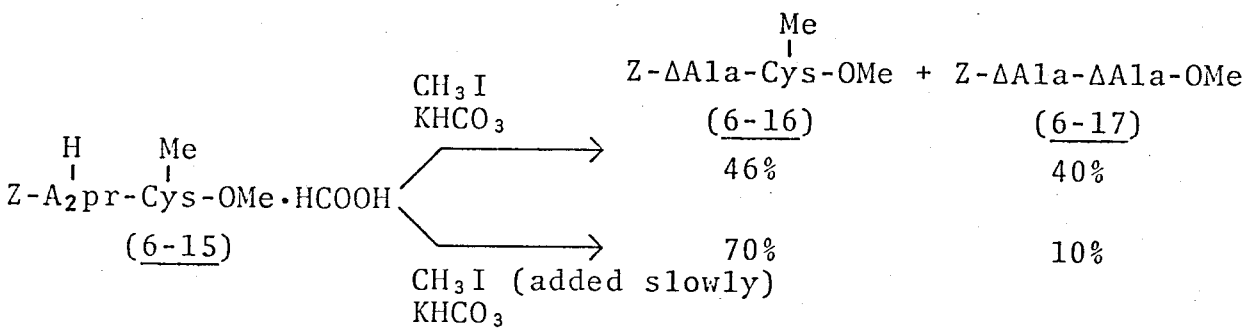


Fig.6-7

ニンに変換できる可能性が示唆された。そこでジペプチド 6-15 (Fig.6-7) 中の α,β-ジアミノプロピオン酸残基のみの選択的変換を試みた。上記の通常の条件でこの反応を行なうと、目的とする 6-16 と Cys(Me) 残基も変換された 6-17 がほぼ等量生じた。しかしこの反応の選択性の向上を期待して、ヨウ化メチルを長時間かけて滴下したところ、目的物 6-16 を主生成物として得ることに成功した。この結果により、メチオニンや S-保護システイン残基共存下でも著者の方法は適用できることが証明された。

デヒドロアラニン残基は非常に重合しやすいことは第3章でも述べたが、本研究においてもジペプチドまでの低分子誘導体はシリカゲルクロマトグラフィー中もしくは油状での放置中、遅いものでも2〜3日のうちに高分子重合体になることを経験した。これに反し、ここで合成した化合物のうち Boc-Tyr-ΔAla-OMe (6-13) のみは全く重合性を持たないことが確認された。一般にフェノール類はラジカル重合の停止剤として古くから使用されていることから、チロシン残基内のオキシフェニル基がこのジペプチドの重合を阻止していると考えられる。これを確認する為、Z-ΔAla-OMe を油状で室温放置し、フェノール添加の効果を調べた。フェノールを加えない場合、一夜のうちに重合反応が進行するが、フェノールをごく微量でも添加すると、3カ月以上全く重合しないことが明らかになった。これまでデヒドロアラニンペプチドは重合性の為、極めて取り扱いにくいものであることが一般に認められながらも、ラジカル重合反応の阻止剤添加による防止法が全く報告されていなかったことは奇妙なことである。

以上の結果、この Hofmann 分解を利用したデヒドロアラニンの合成法は、アミノ酸に含まれる多くの官能基に影響を及ぼすことなく、穏和な条件下にデヒドロアラニンへ変換できる利点を持つことが実証できた。本法は従来合成が困難視されていたフェニルオキシ基を有する AM-Toxin III[25] (Fig.3-10) やスルフィド基を有する抗生物質 Nisin の A 環[33] (Fig.6-8) 等の複雑なデヒドロアラニンペプチドの合成に最も適した方法であると考えられる。このようにここに述べた新合成法の開発と重合阻止法の導入によって、デヒドロアラニン誘導体の合成並びに精製が極めて容易に行なわれ、今後デヒドロアラニンペプチドの化学が飛躍的に発展することが期待される。

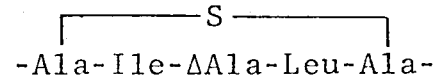


Fig.6-8

実験の部

融点は全て補正していない。

各種の物理化学的性質の測定には以下の機器を使用した。

JASCO Model IR-5 Infrared Spectrophotometer
Hitachi 124 Spectrophotometer
Perkin-Elmer 141 Polarimeter
Knauer Osmometer
Varian A-60 NMR Spectrometer
Varian XL-100-15 NMR Spectrometer
Hitachi KLA-5 Amino Acid Analyzer

薄層クロマトグラフィーはMerckシリカゲルGF254を、またカラムクロマトグラフィーはMerckシリカゲル60 (0.063~0.200mm)を用いて行なった。沪紙電気泳動には東洋沪紙No.51を使用した。

第2章

Ts^{Me}-Dbu(Boc)-OMe (2-3)

化合物2-2 (10.0g, 26.8mmol)の酢酸エチル溶液に大過剰のジアゾメタンのエーテル溶液を加え、0°Cで10時間攪拌した。溶媒を留去して得た油状残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン-酢酸エチル、9:1)で精製して無色油状物(8.91g、82.9%)を得た。$[\alpha]_D^{20}$ -28.0° (c2.0, CH_3OH)。

分析値：C, 53.86; H, 7.02; N, 6.91; S, 8.07%.

$C_{18}H_{28}N_2O_6S$としての計算値：C, 53.98; H, 7.05; N, 7.00; S, 8.01%.

Ts^{Me}-Dbu(Boc)-OH (2-4)

化合物2-3 (8.91g, 22.2mmol)のメタノール溶液(10ml)に0°Cで攪拌しながら2N水酸化ナトリウム(16.7ml)を10分間かけて滴下した。40分間攪拌を続けた後、水で3倍に希釈し濃クエン酸水を加えて酸性にした。生じた油状物を酢酸エチルで抽出し、有機層を水洗して無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去して得た油状残渣をヘキサンで洗うと結晶化した。収量8.43g (89.0%)、mp122~123°C、$[\alpha]_D^{20}$ -1.8° (c2.1, CH_3OH)。

分析値：C, 52.71；H, 6.74；N, 7.23；S, 8.25%.

$C_{17}H_{26}N_2O_6S$としての計算値：C, 53.83；H, 6.78；N, 7.25；S, 8.30%.

Ts^{Me}-β-Orn(Boc)-OMe (2-5)

化合物 2-4 (5.00g, 12.9 mmol) の酢酸エチル溶液(20 ml)に、−15℃で撹拌しながらN-メチルモルホリン(1.44g, 14.2 mmol)、続いてクロルギ酸エチル(1.55g, 14.2 mmol)を加え、30分間撹拌を続けた。沈殿を沪去した後、沪液に約40 mmolのジアゾメタンを含むエーテルを加え、0℃で16時間撹拌した。溶媒を低温で留去して得た残渣をメタノール(100 ml)に溶解し、これに安息香酸銀(0.2g)のトリエチルアミン溶液(3 ml)を加え、10時間撹拌した。溶媒を留去して得た残渣を酢酸エチルに溶かして沪過した後、10%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム次いで水で洗い、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去して得た油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン−酢酸エチル、9:1)で精製して無色油状物(4.39g, 82.1%)を得た。$[\alpha]_D^{20}$ +7.2° (c 2.1, CH_3OH)。

分析値：C, 54.95；H, 7.45；N, 6.45；S, 7.52%.

$C_{19}H_{30}N_2O_6S$としての計算値：C, 55.05；H, 7.30；N, 6.76；S, 7.74%.

Ts^{Me}-β-Orn(Boc)-OH (2-6)

化合物 2-5 (2.90g, 7.00 mmol)より、2-4の場合と同様にして合成した。収量2.44g(87.1%)、mp 125~127℃、$[\alpha]_D^{20}$ +1.5° (c 2.3, CH_3OH)。

分析値：C, 54.01；H, 7.01；N, 6.92；S, 7.92%.

$C_{18}H_{28}N_2O_6S$としての計算値：C, 53.98；H, 7.05；N, 7.00；S, 8.01%.

Ts^{Me}-β-Orn(H·Hcl)-OH (2-7)

化合物 2-6 (0.500g, 1.25 mmol)を4.0N塩化水素THF溶液(6.2 ml)に溶解し2時間撹拌した。エーテルを加えて生じた沈殿を沪取し、エーテルで洗った後、水酸化ナトリウム上減圧乾燥した。収量0.350g(83.1%)、mp 209℃ (dec)、$[\alpha]_D^{20}$ +2.6° (c 2.3, 1N NaOH)。

分析値：C, 45.92；H, 6.34；N, 8.22；S, 9.33；Cl, 10.55%.

$C_{13}H_{21}N_2O_4SCl$としての計算値：C, 46.35；H, 6.28；N, 8.32；S, 9.52；Cl, 10.53%.

Ts-Me-β-Arg(NO2)-OH (Z-8)

化合物 Z-7 (0.400g, 1.19 mmol) の 2N 水酸化ナトリウム溶液 (1.19 ml) に 0°C で撹拌しながら、O-メチル-N-ニトロイソ尿素 (0.198g, 1.66 mmol) を 5 回に分けて 5 分間隔で加えた。0°C で 30 分間撹拌した後、6N 塩酸で酸性にして生じた沈殿 (0.280g) を沪取した。母液を酢酸エチルで抽出するとさらに 0.063g の目的物が得られた。合計収量 0.343g (74.6%)、mp 222~223°C、$[\alpha]_D^{20}$ +0.24° (c 2.1, 1N NaOH)。

分析値：C, 43.34 ; H, 5.47 ; N, 18.11 ; S, 8.04%.

$C_{14}H_{21}N_5O_6S$ としての計算値：C, 43.40 ; H, 5.46 ; N, 18.08 ; S, 8.28%.

Me-β-Arg-OH (Z-9)

化合物 Z-8 (1.50g, 3.87 mmol) を酢酸－水 (9:1) (70 ml) 中パラジウム黒触媒を用いて 16 時間接触還元した。触媒を沪去し溶媒を留去して得た残渣を 47% 臭化水素水 (30 ml) に溶解して 3 時間加熱還流した。反応液を濃縮した後、水を加えて濃縮する操作を 3 回繰り返した。このようにして得た油状物を水に溶かして Amberlite IRC 120 カラム (Type I、100~200 mesh、H^+型、1.8×30 cm) に吸着させた。カラムを水 (200 ml) で洗った後、2N 塩酸でアミノ酸を溶出した。目的物を含むフラクションを集め濃縮した後、水を加えて濃縮する操作を 3 回繰り返した。こうして得た油状物を結晶にする試みは全て失敗に終った。収量 1.14g、$[\alpha]_D^{20}$ +17.5° (c 1.5, H_2O) (lit. +20±2° (c 0.75, H_2O))。

上記生成物を水に溶かし、フラビアン酸 (1.46g, 4.65 mmol) の水溶液を加え、0°C で一夜放置した。生じた黄色結晶状の N^{β}-メチル-β-アルギニン・フラビアン酸塩 (1.57g, 52.8%) を沪取した。mp > 220°C (slowly dec)、$[\alpha]_D^{20}$ +1.51° (c 1.9, 1N NaOH)。

分析値：C, 39.68 ; H, 3.41 ; N, 13.65 ; S, 7.88%.

$C_{27}H_{28}N_8O_8S_2$ としての計算値：C, 39.17 ; H, 3.46 ; N, 13.72 ; S, 7.85%.

第3章

ウレイド交換反応の一般的操作

ツベラクチノマイシン N (1.00g) と尿素誘導体 (4.00g) を 3N 塩酸 (10 ml) に溶解して室温で 30 日間放置した。反応液を濃縮した後エタノールを加えて生じ

た沈殿を沪取した。これを0.4M酢酸アンモニウム緩衝液(pH9.0)に溶解して、AmberLite IRC50 カラム(Type I、100～200mesh、同緩衝液で緩衝化、1.7×30cm)に吸着させた後、同緩衝液で溶出した。目的物を含むフラクションを集め、カプレオマイシンの単離(第5章)の場合と同様な脱塩操作を行ない目的物を得た。

[[^{14}C]ウレイドデヒドロアラニン^{5}]-ツベラクチノマイシンO

ツベラクチノマイシンO(15.0mg)及び放射活性尿素(3.9mCi, The Radiochemical Center Amersham(40～60mCi/mmol))と尿素(11mg)の3N塩酸溶液(0.3ml)を試験管中室温で30日間放置した。反応液をSephadex G10 カラム(1.2×80cm)に充填し水で溶出した。ニンヒドリン反応陽性のフラクションを集め凍結乾燥して、目的物(10.5mg, 69.8%)を白色粉末として得た。

第4章

Boc-Azpr(Z)-Ser(^{t}Bu)-Ser(^{t}Bu)-Dea-OEt(4-4)

化合物4-3(8.40g, 13.4mmol)とBoc-Azpr(Z)-ONSu(5.84g, 13.4mmol)より5-3(第5章に関する実験の部参照)の場合と同様にして合成した。収量9.20g(84.4%)、mp 92～95℃、$[\alpha]_D^{15}$ +9.42°(c 1.7, DMF)。

分析値: C, 57.32; H, 8.07; N, 8.41%.

$C_{39}H_{65}N_5O_{13}$としての計算値: C, 57.68; H, 8.06; N, 8.62%.

Boc-Azpr(Nps-Arg(NO$_2$))-Ser(^{t}Bu)-Ser(^{t}Bu)-Dea-OEt(4-5)

化合物4-4(6.96g, 8.57mmol)をDMF中パラジウム黒触媒を用いて16時間接触還元した。触媒を沪去した後、沪液にNps-Arg(NO$_2$)-OH(4.75g, 8.57mmol)、HOBt(1.62g, 12.0mmol)次いでDCC(2.12g, 10.3mmol)を0℃で撹拌しながら加えた。0℃で2時間、室温で16時間撹拌した後、沪過して溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルに溶解した後、常法通り後処理した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム－メタノール、19:1)で精製して黄色粉末(6.77g, 76.5%)を得た。mp 126～135℃(dec)、$[\alpha]_D^{15}$ +11.7°(c 1.6, DMF)。

分析値: C, 49.48; H, 7.08; N, 14.82; S, 3.06%.

$C_{43}H_{73}N_{11}O_{15}S\cdot H_2O$としての計算値: C, 49.18; H, 7.20; N, 14.67; S, 3.05%.

Cyclo[Boc-Azpr-Ser(^{t}Bu)-Ser(^{t}Bu)-Dea-Arg(NO_2)] (4-9)

化合物4-5 (2.19g, 2.12mmol)から5-11aの場合と同様にケン化、活性エステル化、脱o-ニトロフェニルスルフェニル化続いて環化反応を経て合成した。中間体4-6及び4-7はヘキサンで洗うと固化するが、再結晶の試みは全て失敗した。収量0.236g (13.3%)；mp 235~237°C(dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -39.9°(c1.6, DMF)。

分析値：C, 49.52；H, 7.74；N, 16.17%；分子量, 725.

$C_{35}H_{64}N_{10}O_{13}\cdot H_2O$ としての計算値：C, 49.40；H, 7.82；N, 16.46%；分子量, 851.

[Arg^6]-ツベラクチナミンN (4-10)

化合物4-9 (150mg, 0.180mmol)を少量の酢酸を含むメタノール中パラジウム黒触媒を用いて24時間接触還元した。触媒を沪去した後、沪液を濃縮して得た残渣をTFA (5ml)に溶解して30分間撹拌した。TFAを留去した後、化合物5-13aの場合と同様にして目的物(108mg, 97.3%)を得た。これを水-メタノール-エタノールから再沈殿してTLC上純粋なもの(Rf 0.52、フェノール-水-濃アンモニア水、30:10:1)を71mg (64%)得た。mp 232°C(dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -39.7° (c2.5, H_2O)。

[Arg^6]-ツベラクチノマイシンO (4-1)

化合物4-10 (79mg, 0.13mmol)とBoc-β-Lys(Boc)-ONSu (68mg, 0.15mmol)より5-17の場合と同様にして粗生成物(82mg, 82%)を得た。これを水-メタノール-エタノールから再沈殿してTLC上純粋なもの(Rf 0.31、フェノール-水-濃アンモニア水、30:10:1)を62mg (62%)得た。mp 248°C(dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -39.3°(c1.4, H_2O)。

Nps-Ser(^{t}Bu)-Ser(^{t}Bu)-Dea-OEt (4-12)

Z-Ser(^{t}Bu)-Dea-OEt (4.83g, 10.0mmol)とNps-Ser(^{t}Bu)-ONSu (4.12g, 10.0mmol)より5-2の場合と同様な操作で黄色油状物(6.11g, 94.7%)として得た。

これを常法により結晶性ヒドラジド誘導体に導き、元素分析を行なった。mp 186~187°C、$[\alpha]_D^{15}$ +9.48°(c2.3, DMF)。

分析値：C, 51.51；H, 7.45；N, 13.12；S, 4.96%.

$C_{27}H_{45}N_6O_9S$ としての計算値：C, 51.41；H, 7.35；N, 13.32；S, 5.08%.

Boc-Azpr(Nps-Azpr(Z))-OMe (4-12)

Nps-Azpr(Z)-OH (6.15g, 15.7mmol)とBoc-Azpr(Z)-OMe (5.54g, 15.7mmol)より4-5の場合と同様にして合成した。収量7.09g(76.2%)、mp164-165°C (dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -2.07°(c0.97, DMF)。

分析値：C, 52.96; H, 5.62; N, 11.70; S, 5.40%.

$C_{26}H_{33}N_5O_9S$ としての計算値：C, 52.78; H, 5.62; N, 11.84; S, 5.42%.

Boc-Azpr(Nps-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Dea-Azpr(Z))-OMe (4-14)

化合物4-12 (3.00g, 5.07mmol)のTHF溶液(10ml)に4.6N塩化水素THF溶液(2.8ml)を撹拌しながら滴下した。30分撹拌した後、溶媒を低温で留去して得た残渣を水に溶解し、エーテルで抽出した。水層を炭酸水素ナトリウムで塩基性にした後、酢酸エチルで抽出し有機層を飽和食塩水で洗い乾燥した。溶媒を留去すると淡黄色油状物(2.06g, 4.70mmol)が得られた。

化合物4-11を常法通りケン化して得た油状物4-13 (2.92g, 4.70mmol)と上記生成物のDMF溶液(10ml)に0°Cで撹拌しながら、HOBt (0.888g, 6.58mmol)とDCC (1.16g, 5.64mmol)を加えた。0°Cで2時間、室温で16時間撹拌した後、沪過して沪液を濃縮した。こうして得た残渣を常法通り後処理して目的物(3.78g, 77.3%)を得た。mp170~173°C (dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -12.7°(c0.98, DMF)。

分析値：C, 54.53; H, 7.08; N, 10.69; S, 2.70%.

$C_{47}H_{72}N_8O_{16}S$ としての計算値：C, 54.43; H, 7.00; N, 10.80; S, 3.09%.

Cyclo[Boc-Azpr-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Dea-Azpr(Z)] (4-18)

化合物4-14 (3.00g, 2.88mmol)より5-11aの場合と同様にして合成した。収量0.307g(12.5%)、mp>250°C、

分析値：C, 56.28; H, 7.73; N, 11.43%; 分子量, 748.

$C_{40}H_{65}N_7O_{13}$ としての計算値：C, 56.39; H, 7.69; N, 11.51%; 分子量, 852.

[Azpr6]-ツベラクチナミンN (4-19)

化合物4-18 (150mg, 0.176mmol)より4-10の場合と同様にして合成した。収量75mg(78%)、mp>220°C (slowly dec)、$[\alpha]_D^{15}$ +58.2°(c1.0, H_2O)。

分析値：C, 31.24; H, 5.75; N, 20.43; Cl, 11.46%.

$C_{16}H_{29}N_9O_8Cl_2 \cdot 4H_2O$ としての計算値：C, 31.07; H, 6.03; N, 20.38; Cl, 11.47%.

Boc-Gal(NO2)-OH・DCHA (4-27)

化合物 4-26 (7.00g, 34.3mmol) より 2-8 の場合と同様にして Boc-Gal(NO2)-OH を油状物として得た。これを酢酸エチルに溶解して、DCHA (8.70g, 48.0mmol) を加えた。溶媒を留去して得た残渣をヘキサンで洗うと固化した。再結晶の試みは全て失敗した。このDCHA塩はTLC上単一のスポット (Rf 0.85, クロロホルム－メタノール－酢酸, 6:2:1) を与えた。収量 11.7g (72.2%)、mp 145～148℃ (dec)、$[\alpha]_D^{15}$ +21.3° (c 0.9, CH_3OH)。

Z-Azpr (Boc-Gal(NO2))-OMe (4-29)

化合物 4-27 (8.00g, 16.9mmol) と 4-28 (4.89g, 16.9mmol) のクロロホルム溶液 (30ml) に 0℃ で撹拌しながら、HOBt (3.66g, 27.1mmol) 次いで DCC (4.19g, 20.3mmol) を加えた。0℃ で2時間、室温で16時間撹拌した後、沪過し沪液を常法通り後処理した。こうして得た生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム－メタノール, 20:1) で精製した後、アセトン－エーテルから再結晶して目的物 (2.40g, 27.0%) を得た。mp 114～115℃ (dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -12.9° (c 1.6, DMF)。

分析値：C, 48.14; H, 6.06; N, 17.89%.

$C_{21}H_{31}N_7O_9 \cdot 1/4\ CH_3COCH_3$ としての計算値：C, 48.37; H, 6.07; N, 18.16%.

Z-Azpr (Nps-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Dea-Gal(NO2))-OMe (4-31)

化合物 4-14 (1.34g, 2.17mmol) の DMF 溶液 (2ml) に -15℃ で撹拌しながら、N-メチルモルホリン (230mg, 2.27mmol) 次いでクロルギ酸エチル (287mg, 2.27mmol) を加え 15分間撹拌した。化合物 4-29 を塩化水素 THF 溶液で脱ブトキシカルボニル化して得た 4-30 (500mg, 1.08mmol) の DMF 溶液 (2ml) を上記反応物へ加え、直ちに N-メチルモルホリン (121mg, 1.19mmol) を加えた。-20℃ で30分、室温で2時間撹拌した後、N-(2-アミノエチル)ピペラジン (約 0.5ml) を加え、10分間撹拌した。溶媒を留去して得た残渣を酢酸エチルに溶解して常法通り後処理した。こうして得た生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム－メタノール、29:1) を繰り返して精製した。収量 355mg (31.7%)、mp 172～175℃ (dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -13.1° (c 1.9, DMF)。

分析値：C, 50.39; H, 6.43; N, 14.70; S, 3.03%.

$C_{43}H_{65}N_{11}O_{16}S \cdot 1/2H_2O$ としての計算値：C, 49.99; H, 6.44; N, 14.91; S, 3.10%.

Cyclo[Z-Azpr-Ser(^{t}Bu)-Ser(^{t}Bu)-Dea-Gal(NO$_2$)] (4-35)

化合物 4-31 (2.50g, 2.44 mmol) より 5-11a の場合と同様にして合成した。収量 2.88 mg (14.1%)、mp > 250°C、$[\alpha]_D^{15}$ -19.4° (c 0.35, DMF)。

分析値：C, 51.05 ; H, 7.04 ; N, 16.85% ; 分子量, 737.

$C_{36}H_{58}N_{10}O_{13}\cdot 1/2\,H_2O$ としての計算値：C, 50.99 ; H, 7.01 ; N, 16.52% ; 分子量, 848.

[Gal^6]-ツベラクチナミンN (4-36)

化合物 4-35 (80mg, 0.095 mmol) より 4-10 の場合と同様にして合成した。この生成物はTLC上単一のスポット (Rf 0.50, フェノール-水-濃アンモニア水, 30:10:1) を示した。収量 40mg (71%)、mp 225°C (dec)、$[\alpha]_D^{15}$ -44.3° (c 1.1, H_2O)。

[Gal^6]-ツベラクチノマイシンO (4-2)

化合物 4-36 (30mg, 0.051 mmol) と Boc-β-Lys(Boc)-ONSu (25mg, 0.056 mmol) より 4-1 の場合と同様にして合成した。この生成物はTLC上単一のスポット (Rf 0.24, フェノール-水-濃アンモニア水, 30:10:1) を示した。収量 26mg (58%)、mp 249°C (dec).

第5章

カプレオマイシンIA とIBの単離

市販カプレオマイシン("Capastat", Eli Lilly) (3.00g) を0.4M酢酸アンモニウム緩衝液 (pH9.0) に溶解し、この緩衝液で緩衝化したAmberlite IRC50カラム (Type I、100~200 mesh、2.5×70cm) に吸着させた。同緩衝液 (900ml) と0.8M緩衝液 (pH9.0) で直線濃度勾配溶出した後、後者 (1200ml) で溶出した。カプレオマイシンIA又はIBを含むフラクションを各々別に集め、3N塩酸で中和した後、水で3倍に希釈した。各々をAmberlite IRC50カラム (Type I、100~200 mesh、ピリジン型、1.8×20cm) に吸着させた後、1M酢酸でカプレオマイシンを溶出した。ニンヒドリン反応陽性のフラクションを集め、ピリジンで中和して減圧濃縮した。油状残渣を3N塩酸 (約5ml) に溶解した後、エタノール (300ml) を加えて、カプレオマイシンIA (1.41g) 及びIB (0.81g) を各々塩酸塩として得た。これを水-メタノール-エタノールより再沈殿して元素分

析用試料とした。NMR測定にはこれをさらに水から凍結乾燥して用いた。

カプレオマイシン構成アミノ酸の単離

市販カプレオマイシン(5.00g)を6N塩酸(50ml)中で20時間加熱還流して、完全水解した。濃縮した後、水を加え再濃縮する操作を3回繰り返して得た油状残渣を水に溶かし、AmberLite IRC120カラム(Type I. 100~200 mesh. H^+型、1.8×30cm)に充填した。水(500ml)と4N塩酸(500ml)で直線濃度勾配溶出して、セリン(0.240g)、アラニン(0.170g)、カプレオマイシジン塩酸塩(1.09g)をそれぞれ純粋に得た。α,β-ジアミノプロピオン酸とβ-リジンは混合物として得られたので、これを0.2Mピリジン-酢酸緩衝液(pH3.1)に溶かし、AmberLite IRC120(Type I、100~200 mesh、同緩衝液で緩衝化、1.2×40cm)カラムクロマトグラフィーで精製した。同緩衝液(400ml)と2M緩衝液(400ml)で直線濃度勾配溶出して、両アミノ酸をそれぞれ純粋に得た。α,β-ジアミノプロピオン酸は塩酸塩に変換して1.26g、β-リジンは油状酢酸塩として0.720g得られた。

このようにして得たα,β-ジアミノプロピオン酸は完全にラセミ化していたが、市販カプレオマイシンを同上条件で5時間水解した後、同様な単離操作を経て光学的に純粋なものを得た。

カプレオマイシンの2,4-ジニトロフェニル(DNP)化とDNPカプレオマイシン水解物中のDNP-α,β-ジアミノプロピオン酸の検出

カプレオマイシンIAまたはIB(10mg)の水溶液(10ml)に炭酸水素ナトリウム(200mg)と2,4-ジニトロフルオロベンゼン(0.2ml)のエタノール溶液(20ml)を加え暗所で5時間撹拌した。生じたDNPカプレオマイシンの沈殿を沪取し水、エタノール次いでエーテルで十分洗浄し乾燥して、DNP-カプレオマイシンIA(12mg)とIB(9mg)をそれぞれ得た。

上記生成物を各々、減圧封管中、定沸点塩酸とともに110℃で10時間加熱し水解した。水解物を凍結乾燥した後、水に溶かし酢酸エチルで3回抽出した。水層中のDNP-α,β-ジアミノプロピオン酸をアミノ酸分析及び沪紙電気泳動で確認した。

カプレオマイシンのアセチル化

カプレオマイシンIAまたはIB(200mg)をDMFに懸濁しAcONSu(177mg)及びト

リエチルアミン(114mg)と共に24時間撹拌した。反応液を沪過し沪液を濃縮した後、残渣にエタノールを加え生じた沈殿を遠心分離した。このようにして得たアセチルカプレオマイシンIA(119mg)とIB(92mg)をDMF－エタノールから再沈殿してNMR測定用試料とした。

カプレオマイシンIAの還元と還元体のEdman－Dansyl分析

カプレオマイシンIA(50mg)を1N塩酸中酸化白金触媒(15mg)を用いて48時間接触還元した。触媒を沪去した後、沪液を濃縮し残渣にエタノールを加えて{Ala[5]}-カプレオマイシンIA(42.9mg)を白色粉末として得た。この生成物を水解してアミノ酸分析にかけると次のアミノ酸が検出された。α,β-ジアミノプロピオン酸：カプレオマイシジン：セリン：アラニン(1.87：1.12：1.00：0.93，モル比)。β-リジンはその保持時間がアンモニアと一致する為定量できなかった。

この生成物を常法通りEdman－Dansyl分析して、DNS-セリンをTLC(Rf 0.52，n-ブタノール－酢酸－水(4：1：2)；Rf 0.68，フェノール－水－濃アンモニア水(30：10：1))で検出した。

Boc-Azpr(Z)-Dea-OEt(5-2)

Z-Dea-OEt(5-1)(8.15g，24.0mmol)を酢酸(2.17g，36.0mmol)存在下にパラジウム黒触媒を使用してエタノール中で接触還元して、H-Dea-OEt・AcOHを油状物として得た。

上記生成物の酢酸エチル溶液(20ml)を氷冷したBoc-Azpr(Z)-ONSu(9.5g，21.8mmol)の酢酸エチル溶液(50ml)へ撹拌しながら滴下した。続いてN-メチルモルホリン(2.42g，24.0mmol)を滴下した後、0℃で2時間、室温で16時間撹拌した。反応混合物を10%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液次いで水で洗い、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去すると白色粉末(9.49g，82.7%)が得られた。酢酸エチル－ヘキサンより再結晶して得た針状晶を元素分析した。mp 38～45℃、$[\alpha]_D^{15}$ -15.6°(c1.5，DMF)。

分析値：C，57.04；H，7.50；N，8.05%.

$C_{25}H_{39}N_3O_9$としての計算値：C，57.13；H，7.48；N，8.00%.

Boc-Ser(Bzl)-Azpr(Z)-Dea-OEt(5-4a)

化合物 5-2 (3.15g, 6.00mmol) を4.5N塩化水素エタノール溶液(20ml)で1.5時間処理した。ベンゼン(300ml)を加え凍結乾燥する操作を3回繰り返した後、得た白色粉末を水酸化ナトリウム上減圧乾燥した。

上記生成物と Boc-Ser(Bzl)-ONSu (2.35g, 6.00mmol)の酢酸エチル溶液(20ml)へ0°Cで撹拌しながらN-メチルモルホリン(0.911g, 9.00mmol)の酢酸エチル溶液(10ml)を滴下し、0°Cで2時間、室温で16時間撹拌した。常法通り後処理して白色粉末(3.38g, 80.1%)を得た。mp 92~108°C、$[\alpha]_D^{22}$ −10.6° (c2.1, DMF)。

分析値: C, 59.79; H, 7.17; N, 7.85%.

$C_{35}H_{50}N_4O_{11}$ としての計算値: C, 59.81; H, 7.17; N, 7.97%.

Boc-Ala-Azpr(Z)-Dea-OEt (5-4b)

化合物 5-2 (5.26g, 10.0mmol)と Boc-Ala-ONSu (2.86g, 10.0mmol)から 5-4a の場合と同様にして合成した。収量5.04g(84.4%)、mp 83~87°C、$[\alpha]_D^{20}$ −18.3° (c2.0, DMF)。

分析値: C, 56.13; H, 7.14; N, 9.28%.

$C_{28}H_{44}N_4O_{10}$ としての計算値: C, 56.36; H, 7.43; N, 9.39%.

Boc-Azpr(Nps-Cpd(NO2))-Ser(Bzl)-Azpr(Z)-Dea-OEt (5-7a)

化合物 5-4a (3.77g, 5.39mmol) を 5-2 の場合と同様に脱ブトキシカルボニル化して得た 5-5a と化合物 5-6 (3.00g, 5.39mmol) のDMF溶液(20ml)に HOBt (1.02g, 7.55mmol)、N-メチルモルホリン(0.818g, 8.09mmol)とDCC (1.33g, 6.47mmol)を0°Cで加え、0°Cで2時間、室温で16時間撹拌した。沪過した後、沪液を減圧濃縮し酢酸エチルに溶解して常法通り後処理した。収量5.47g(88.9%)、mp 160~170°C (dec)、$[\alpha]_D^{22}$ +37.4° (c1.8, DMF)。

分析値: C, 52.04; H, 5.98; N, 14.57; S, 2.71%.

$C_{50}H_{68}N_{12}O_{17}S \cdot H_2O$ としての計算値: C, 51.80; H, 6.09; N, 14.50; S, 2.77%.

Boc-Azpr(Nps-Cpd(NO2))-Ala-Azpr(Z)-Dea-OEt (5-7b)

化合物 5-4b (2.70g, 4.86mmol) と 5-6 (2.90g, 4.86mmol) より 5-7a の場合と同様にして合成した。収量4.54g(90.3%)、mp 134~163°C (dec)、$[\alpha]_D^{20}$ +37.8° (c2.1, DMF)。

分析値：C, 49.37 ; H, 6.11 ; N, 15.69 ; S, 2.97%.

$C_{43}H_{62}N_{12}O_{16}S \cdot H_2O$ としての計算値：C, 49.04 ; H, 6.13 ; N, 15.96 ; S, 3.04%.

Boc-Azpr(Nps-Cpd(NO2))-Ser(Bzl)-Azpr(Z)-Dea-OH (5-8a)

化合物 5-7a (4.20g, 3.68 mmol) のエタノール懸濁液 (5ml) に 2N 水酸化ナトリウム (2.80 ml) を加え 1 時間撹拌した。水で希釈した後、10% クエン酸水溶液で酸性にし、生じた油状物を酢酸エチルで抽出した。有機層を水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去して黄色粉末 (3.39g, 82.7%) を得た。mp 132°C (dec)、$[\alpha]_D^{22}$ +33.5° (c0.9, DMF)。

分析値：C, 51.43 ; H, 5.89 ; N, 14.88 ; S, 2.65%.

$C_{48}H_{64}N_{12}O_{17}S \cdot H_2O$ としての計算値：C, 50.97 ; H, 5.88 ; N, 14.86 ; S, 2.83%.

Boc-Azpr(Nps-Cpd(NO2))-Ala-Azpr(Z)-Dea-OH (5-8b)

化合物 5-7b (2.97g, 2.87 mmol) より 5-8a の場合と同様にして合成した。収量 2.62g (90.7%)、mp 140～148°C (dec)、$[\alpha]_D^{22}$ +35.3° (c1.7, DMF)。

分析値：C, 48.14 ; H, 5.79 ; N, 16.37 ; S, 2.90%.

$C_{41}H_{58}N_{12}O_{16}S \cdot H_2O$ としての計算値：C, 48.04 ; H, 5.90 ; N, 16.40 ; S, 3.13%.

Boc-Azpr(Nps-Cpd(NO2))-Ser(Bzl)-Azpr(Z)-Dea-ONSu (5-9a)

化合物 5-8a (3.48g, 3.13 mmol) の THF 溶液 (10ml) に HONSu (0.432g, 3.75 mmol) と DCC (0.744g, 3.75 mmol) を加え室温で 4 時間撹拌した。沪過した後、溶媒を留去して得た黄色残渣をエーテルで洗い沪取した。収量 3.64g (96.3%)、mp 121°C (dec)、$[\alpha]_D^{22}$ +29.9° (c1.8, DMF)。

分析値：C, 51.01 ; H, 5.52 ; N, 14.92 ; S, 2.44%.

$C_{52}H_{67}N_{13}O_{19}S \cdot H_2O$ としての計算値：C, 50.85 ; H, 5.66 ; N, 14.83 ; S, 2.61%.

Boc-Azpr(Nps-Cpd(NO2))-Ala-Azpr(Z)-Dea-ONSu (5-9b)

化合物 5-8b (2.62g, 2.60 mmol) より 5-9a の場合と同様にして合成した。収量 2.69g (93.7%)、mp 137°C (dec)、$[\alpha]_D^{22}$ +32.7° (c2.0, DMF)。

分析値：C, 48.97 ; H, 5.80 ; N, 16.06 ; S, 2.62%.

$C_{45}H_{61}N_{13}O_{18}S \cdot 1/2\,H_2O$ としての計算値：C, 48.55 ; H, 5.61 ; N, 16.36 ; S, 2.88%.

Cyclo[Boc-Azpr-Ser(Bzl)-Azpr(Z)-Dea-Cpd(NO2)] (5-11a)

化合物5-9a (3.17g, 2.17mmol)のTHF溶液(3ml)に0℃で撹拌しながら、2.0N塩化水素THF溶液(3.3ml)を滴下した。0℃で30分撹拌した後、エーテルを加えて5-10aを沈殿させた。これを沪取乾燥した後、DMF(200ml)に溶解して、ピリジン(3l)中へ撹拌しながら48時間かけて滴下した。さらに16時間撹拌した後、ピリジンを留去して得た残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム－メタノール、19:1)にかけて目的物を単離した。収量0.486g(23.8%)、mp>250℃、$[\alpha]_D^{17}$ −39.1°(c1.0, DMF)。

分析値：C, 52.68; H, 6.24; N, 16.11%; 分子量, 880.

$C_{42}H_{59}N_{11}O_{14}\cdot H_2O$としての計算値：C, 52.55; H, 6.40; N, 16.05%; 分子量, 960.

Cyclo[Boc-Azpr-Ala-Azpr(Z)-Dea-Cpd(NO2)] (5-11b)

化合物5-9b (1.50g, 1.36mmol)より5-11aの場合と同様にして合成した。収量0.293g(26.6%)、mp>250℃、$[\alpha]_D^{22}$ −55.1°(c0.8, DMF)。

分析値：C, 49.34; H, 6.41; N, 17.85%; 分子量, 920.

$C_{35}H_{53}N_{11}O_{13}\cdot H_2O$としての計算値：C, 49.23; H, 6.49; N, 18.04%; 分子量, 854.

Cyclo[Boc-Azpr-Ser(Bzl)-Azpr(Boc-β-Lys(Boc))-Dea-Cpd(NO2)] (5-12a)

化合物5-11a (150mg, 0.159mmol)をBoc-β-Lys(Boc)-ONSu (92mg, 0.24mmol)の存在下にパラジウム黒触媒を用いてDMF(10ml)中で接触還元した。16時間後、触媒を沪去して沪液にクロロホルム(10ml)とエーテル(5ml)を加え生じた沈殿を沪取した。収量150mg(84.6%)、mp242~250℃(dec)、$[\alpha]_D^{17}$ −47.0° (c0.4, DMF)。

分析値：C, 51.88; H, 7.16; N, 15.79%.

$C_{50}H_{81}N_{13}O_{17}\cdot H_2O$としての計算値：C, 52.03; H, 7.25; N, 15.78%.

Cyclo[Boc-Azpr-Ala-Azpr(Boc-β-Lys(Boc))-Dea-Cpd(NO2)] (5-12b)

化合物5-11b (100mg, 0.120mmol)より5-12aの場合と同様にして合成した。収量110mg(89.4%)、mp245~247℃(dec)、$[\alpha]_D^{17}$ −51.1°(c1.2, DMF)。

分析値：C, 48.75; H, 7.29; N, 17.09%.

$C_{43}H_{75}N_{13}O_{15}\cdot 3/2\,H_2O$としての計算値：C, 48.55; H, 7.44; N, 17.22%.

合成カプレオマイシンIA (5-13a)

化合物 5-12a (120mg, 0.106mmol) を 99%ギ酸(3ml) で1時間処理した後ギ酸を留去して、メタノール-水(9:1)中でパラジウム黒触媒を用い20時間接触還元した。触媒を沪去した後、沪液を濃縮して得た残渣を1N 塩酸-アセトン(1:1)(5ml)に溶解して10分間加熱還流した。放冷後尿素(500mg)を加え16時間撹拌した。溶媒を留去して得た残渣にエタノールを加え、生じた白色沈殿を沪取した。これを水-メタノール-エタノールから再沈殿した。収量69mg(80%)、物理化学的データは本文中に記載した。

分析値: C, 36.00; H, 6.07; N, 23.54; Cl, 17.41%.

$C_{25}H_{48}N_{14}O_8Cl_4 \cdot H_2O$ としての計算値: C, 36.06; H, 6.05; N, 23.55; Cl, 17.03%.

合成カプレオマイシンIB (5-13b)

化合物 5-12b (105mg, 0.102mmol) より 5-13a の場合と同様にして合成した。収量 69mg (85%).

分析値: C, 36.90; H, 6.20; N, 24.05; Cl, 17.74%.

$C_{25}H_{48}N_{14}O_7Cl_4 \cdot H_2O$ としての計算値: C, 36.77; H, 6.17; N, 24.02; Cl, 17.37%.

カプレオマイシンIIA (5-14a)

化合物 5-11a (170mg, 0.180mmol) より 5-13a の場合と同様にして合成した。収量 99mg (84%)、mp 250°C (dec)、$[\alpha]_D^{23}$ +9.3° (c 2.8, H_2O)。

分析値: C, 34.77; H, 5.60; N, 25.13; Cl, 15.35%.

$C_{19}H_{35}N_{12}O_7Cl_3 \cdot 1/2\,H_2O \cdot 1/2\,CH_3OH$ としての計算値: C, 34.70; H, 5.67; N, 24.90; Cl, 15.76%.

カプレオマイシンIIB (5-14b)

化合物 5-11b (150mg, 0.179mmol) より 5-13a の場合と同様にして合成した。収量 93mg (81%)、mp 252°C (dec)、$[\alpha]_D^{23}$ -24.9° (c 0.57, H_2O).

分析値: C, 31.99; H, 6.15; N, 23.82; Cl, 15.24%.

$C_{19}H_{35}N_{12}O_6Cl_3 \cdot 4H_2O$ としての計算値: C, 32.32; H, 6.14; N, 23.81; Cl, 15.07%.

Cyclo[Boc-β-Lys(Boc)-Azpr-Ala-Azpr(Z)-Dea-Cpd(NO_2)] (5-18)

化合物 5-11b (300mg, 0.359mmol) をギ酸(5ml) に溶かして2時間撹拌した。

ギ酸を留去して得た残渣をエーテルで洗って沪取し、水酸化ナトリウム上減圧乾燥した。

上記生成物とBoc-β-Lys(Boc)-ONSu(191mg, 0.431mmol)のDMF溶液(3ml)にトリエチルアミン(54mg, 0.54mmol)を加え40時間撹拌した。反応液にクロロホルムを加えて生じた沈殿を沪取した。収量335mg(87.7%)、mp240℃(dec)、$[\alpha]_D^{23}$ -43.7°(c0.90, DMF)。

分析値: C, 50.36; H, 6.81; N, 17.13%.

$C_{46}H_{73}N_{13}O_{16}\cdot 3/2\,H_2O$ としての計算値: C, 50.63; H, 7.02; N, 16.69%.

プソイドカプレオマイシンIB(5-15)

化合物5-18(110mg, 0.132mmol)より5-13aの場合と同様にして合成した。収量62mg(74%)、mp245℃(dec)、$[\alpha]_D^{23}$ -30.7°(c0.61, DMF)。

分析値: C, 37.44; H, 6.09; N, 24.27%.

$C_{25}H_{48}N_{14}O_7Cl_4$ としての計算値: C, 37.60; H, 6.06; N, 24.56%.

リビースカプレオマイシンIIB(5-16a)及び[Orn⁴]-カプレオマイシンIIB(5-16b)

この2種の化合物は全経路にわたってカプレオマイシンIIBの場合と同様な操作で合成した。合成中間体並びに最終生成物の収率と物理化学的性質を次表に示す。

ジ-β-Lys-カプレオマイシンIIB(5-17)

経路(1) 化合物5-11b(45mg, 0.071mmol)のDMF懸濁液(2ml)にBoc-β-Lys(Boc)-ONSu(79mg, 0.18mmol)とトリエチルアミン(18mg, 0.18mmol)を加え48時間撹拌した。DMFを留去して得た残渣を3N塩酸(3ml)に溶解して1時間撹拌した後4N水酸化ナトリウムで中和した。この溶液をSephadex G10カラム(2.5×80cm)に通し脱塩して目的物(51mg, 75%)を得た。mp245℃(dec)、$[\alpha]_D^{23}$ -50.5°(c1.3, H_2O)。

分析値: C, 35.01; H, 6.89; N, 20.23; Cl, 16.44%.

$C_{31}H_{61}N_{13}O_8Cl_5\cdot 6H_2O\cdot CH_3OH$ としての計算値: C, 34.83; H, 7.03; N, 20.31; Cl, 16.07%.

経路(2) 化合物5-18(150mg, 0.141mmol)とBoc-β-Lys(Boc)-ONSu(94mg, 0.21mmol)より5-12aの場合と同様にして化合物5-26(147mg, 83.1%)を得

Comp.	Yield (%)	mp(°C)	$[\alpha]_D^{23}$ a)	Elemental analysis Found / Calcd b) C	H	N	S or Cl
5-19b	84.7	62-63	-5.9°	57.91 57.67	7.96 7.89	7.27 7.47	
5-20a	85.3	70-75	-4.3°	57.49 57.68	7.68 7.74	8.96 8.97	
5-20b	89.5	94-96	-10.7°	56.69 56.36	7.48 7.43	9.45 9.39	
5-21a	88.7	136-140 (dec)	+32.9°	49.19 49.04	6.08 6.13	15.78 15.96	2.96 3.04
5-21b	85.3	155-160 (dec)	+38.0°	50.70 50.84	6.33 6.26	15.40 15.81	3.03 3.02
5-22a	83.9	134-137 (dec)	+42.5°	48.64 49.09	6.05 6.04	15.98 15.98	3.07 3.05
5-22b	90.5	125-130 (dec)	+34.0°	49.94 50.04	6.27 6.25	15.18 15.56	2.79 2.97
5-24a c)	26.5	>250	-38.1°	49.42 49.23	6.32 6.49	18.21 18.04	
5-24b d)	20.1	>250	-44.7°	51.04 50.91	6.64 6.70	17.66 17.65	
5-16a	88.6	>250	+29.2°	31.15 31.13	5.99 6.33	22.80 22.93	14.55 14.51
5-16b	93.0	245-248 (dec)	-51.5°	33.02 33.14	6.24 6.62	22.07 22.09	14.14 13.98

a) c1.0-2.0 in DMF (5-19b-5-24b) or in H_2O (5-16a, 5-16b).

b) Molecular formula: 5-19b, $C_{27}H_{43}N_3O_9 \cdot {}^1/_2H_2O$; 5-20a, $C_{30}H_{48}N_4O_{10}$; 5-20b, $C_{28}H_{44}N_4O_{10}$; 5-21a, $C_{43}H_{62}N_{12}O_{16}S \cdot H_2O$; 5-21b, $C_{45}H_{66}N_{12}O_{16}S$; 5-22a, 5-22a, $C_{41}H_{58}N_{12}O_{16}S \cdot {}^1/_2H_2O \cdot {}^1/_2C_4H_8O$; 5-22b, $C_{43}H_{62}N_{12}O_{16}S \cdot {}^1/_2H_2O \cdot {}^1/_2C_4H_8O$; 5-24a, $C_{35}H_{53}N_{11}O_{13} \cdot H_2O$; 5-24b, $C_{37}H_{57}N_{11}O_{13} \cdot {}^1/_2H_2O$; 5-16a, $C_{19}H_{35}N_{12}O_6Cl_3 \cdot 5.5H_2O$; 5-16b, $C_{21}H_{39}N_{12}O_6Cl_3 \cdot 5.5H_2O$.

c) Molecular weight: found, 781; calcd., 854.

d) Molecular weight: found, 743; calcd., 873.

た。mp >250°C、$[\alpha]_D^{23}$ −43.1° (c0.42, DMF)。

分析値：C, 50.07 ; H, 7.52 ; N, 16.61 %.

$C_{54}H_{95}N_{15}O_{19} \cdot 2H_2O$ としての計算値：C, 50.10; H, 7.71 ; N, 16.23 %.

上記生成物 5-26 (66mg, 0.052 mmol) より 5-13a の場合と同様にして目的物 5-17 (39mg, 78%) を得た。この生成物は経路(i)による生成物とTLC上完全に一致した (Rf 0.22、フェノール－水－濃アンモニア水、30:10:1)。

第6章

Z-ΔAla-OMe (6-3)

化合物 6-1 (600mg, 2.08mmol) のメタノール溶液 (40ml) にヨウ化メチル (4ml) と炭酸水素カリウム (3.00g) を加え、20時間撹拌した。沪過した後、沪液を濃縮して得た残渣に酢酸エチルと水を加え激しく振とうした。有機層を10%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液次いで飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去すると無色油状の 6-3 (421mg, 86.1%) を得た。このまま元素分析を行ない次の結果を得た。

分析値：C, 60.66 ; H, 5.63 ; N, 6.10%.

$C_{12}H_{13}NO_4 \cdot 1/5\ H_2O$ としての計算値：C, 60.34 ; H, 5.66 ; N, 5.86%.

ペプチド中の Azpr(Z) 残基の ΔAla への変換反応に対する一般的操作

Azpr(Z) 残基を含むペプチド (1mmol) をメタノール (25ml) 中、パラジウム黒触媒を用いて接触還元した。この時 Azpr(Z) 残基がペプチドのN端以外にある場合は、Azpr残基の N,N- アシル転位を防ぐ為酢酸 (2mmol) を添加した。

還元終了後、触媒を沪去し、沪液にヨウ化メチル (2ml) と炭酸水素カリウム (1.5g) を加え、20 時間撹拌した。化合物 6-3 の場合と同様の後処理をして目的物を得た。

Z-Cys(Me)-OMe (6-14) の Z-ΔAla-OMe (6-3) への変換

化合物 6-14 (283mg, 1.00mmol) を 6-3 の場合と同一の条件にさらし、一定時間後に上と同様の後処理を行ない油状生成物 (6-14 と 6-3 の混合物) を得た。両者の混合比は混合物のNMRスペクトルにおけるエステル部のメチルシグナル ($CDCl_3$中の化学シフト：6-14, δ3.76 ; 6-3, δ3.82) の積分比より求めた。

Z-Azpr(H·HCOOH)-Cys(Me)-OMe (6-15) 中の Azpr残基の ΔAla への変換

化合物 6-15 (415mg, 1.00mmol) を 6-3 の場合と同様にして 6-16 と 6-17 の混合物 (276mg) を無色油状物として得た。両者の混合比は 6-14 の場合と同様にして求めた。(エステル部のメチルシグナルの化学シフト ($CDCl_3$)：6-16, δ3.78;

6-17, δ3.88)

次にヨウ化メチルのメタノール溶液(20ml)を10時間で滴下して同じ反応を行なうことにより同上の混合物(335mg)を得た。

Abbreviations

Z	benzyloxycarbonyl
Boc	*t*-butoxycarbonyl
Nps	*o*-nitrophenylsulfenyl
HONSu	N-hydroxysuccinimide
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
TFA	trifluoroacetic acid
DMF	dimethylformamide
THF	tetrahydrofuran
Tua	tuberactinamine
Tum	tuberactinomycin
Cpm	capreomycin
Tbd	tuberactidine
Cpd	capreomycidine
Uda	β-ureidodehydroalanine
A_2pr	α,β-diaminopropionic acid

References

1) E.B.Herr, M.E.Haney, G.E.Pittenger, and C.E.Higgens, Proc. Indiana Acad. Sci., 69, 134 (1960).

2) A.C.Finlay, G.L.Hobby, F.Hochstein, T.M.Lees, F.F.Lenert, J.A. Means, S.Y.Pan, P.P.Regma, J.B.Rontier, B.A.Sobin, K.B.Tate, J. H.Kane, Amer. Rev. Tuberac., 63, 1 (1951).

3) A.Nagata, T.Ando, R.Izumi, H.Sakakibara, T.Take, K.Hayano, and J.Abe, J. Antibiot., 21, 681 (1968).

4) H.Yoshioka, T.Aoki, H.Goko, K.Nakatsu, T.Noda, H.Sakakibara, T.Take, A.Nagata, J.Abe, T.Wakamiya, T.Shiba, and T.Kaneko, Tetrahedron Lett., 1971, 2043.

5) B.W.Bycroft, Chem. Commun., 1972, 660.

6) a) S.Nomoto, T.Teshima, T.Wakamiya, and T.Shiba, "20th Symposium on the Chemistry of Natural Product (Sendai, 1976)," Symposium Papers, p.32.

b) T.Shiba, S.Nomoto, and T.Wakamiya, Experientia, 32, 1109 (1976).

c) S.Nomoto, T.Teshima, T.Wakamiya, and T.Shiba, J. Antibiot., 30, 955 (1977).

7) a) S.Nomoto, T.Teshima, T.Wakamiya, and T.Shiba, "Proceedings of the 14th Symposium on Peptide Chemistry," ed. by T.Nakajima Hiroshima (1976) p.109.

b) T.Shiba, S.Nomoto, T.Teshima, and T.Wakamiya, Tetrahedron Lett., 1976, 3907.

c) S.Nomoto, T.Teshima, T.Wakamiya, and T.Shiba, Tetrahedron, 34, 921 (1978).

8) T.Wakamiya, T.Shiba, T.Kaneko, H.Sakakibara, T.Noda, and T.Take, Bull. Chem. Soc. Jpn., 46, 949 (1973).

9) T.Shiba, T.Ukita, K.Mizuno, T.Teshima, and T.Wakamiya, Tetrahedron Lett., 1977, 2681.

10) T.Wakamiya, H.Uratani, T.Teshima, and T.Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn., 48, 2401 (1975).

11) T.Wakamiya, T.Teshima, I.Kubota, T.Shiba, and T.Kaneko, 47, 2292 (1974).

12) B.W.Bycroft, D.Cameron, L.R.Croft, A.Hassanali-Walji, A.W. Johnson, and T.Webb, J. Chem. Soc., Perkin I, 1972, 827.

13) a) T.Teshima, S.Nomoto, T.Wakamiya, and T.Shiba, "Proceedings of the 34th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan," Kanagawa (1976) p.699.

b) T.Teshima, S.Nomoto, T.Wakamiya, and T.Shiba, Tetrahedron

Lett., 1976, 2343.
c) T.Teshima, S.Nomoto, T.Wakamiya, and T.Shiba, J.Antibiot., 30, 1073 (1977).
14) T.Wakamiya and T.Shiba, J.Antibiot., 28, 292 (1975).
15) T.Wakamiya, T.Teshima, H.Sakakibara, K.Fukukawa, and T.Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn., 50, 1984 (1977).
16) a) T.Teshima, S.Nomoto, T.Wakamiya, and T.Shiba, "Proceedings of the 13th Symposium on Peptide Chemistry," ed. by S.Yamada, Tokyo (1975) p.106.
b) T.Shiba, T.Wakamiya, T.Teshima, and S.Nomoto, "Proceedings of the 14th Symposium on Peptide Chemistry," ed. by T.Nakajima, Hiroshima (1976) p.127.
c) T.Teshima, S.Nomoto, T.Wakamiya, and T.Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn., 50, 3372 (1977).
17) W.J.McGahren, G.O.Morton, M.P.Kunstman, and G.A.Ellestad, J. Org. Chem., 42, 1282 (1977).
18) a) S.Nomoto and T.Shiba, "Proceedings of the 36th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan," Kanagawa (1978) p.1119.
b) S.Nomoto and T.Shiba, Chem. Lett., 1978, 589.
19) J.Rudinger, K.Poduska, and M.Zaoral, Collect. Czech. Chem. Commun., 25, 2022 (1960).
20) N.Otake, S.Takeuchi, T.Endo, and H.Yonehara, Tetrahedron Lett., 1965, 1411.
21) M.Bodanszky, G.Marconi, and A.Bodanszky, J.Antibiot., 22, 40 (1969).
22) S.Nomoto, T.Teshima, and T.Shiba, "Proceedings of the 15th Symposium on Peptide Chemistry," ed. by T.Shiba, Osaka (1977) p.139.
23) S.Nomoto, T.Teshima, and T.Shiba, J.Antibiot., 31, 792 (1978).
24) M.Misumi, N.Tanaka, and T.Shiba, Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 971 (1978).
25) S.Lee, H.Aoyagi, Y.Shimohigashi, N.Izumiya, T.Ueno, and H.Fukami, Tetrahedron Lett., 1976, 843.
26) Y.Shimohigashi, S.Lee, T.Kato, N.Izumiya, T.Ueno, and H.Fukami, Chem. Lett., 1977, 1411.
27) G.Riley, J.H.Turnbull, and W.Wilson, J. Chem. Soc., 1957, 1373.
28) F.Brtnik and M.Zaoral, Collect. Czech. Chem. Commun., 41, 2969 (1976).
29) B.W.Bycroft, D.Cameron, L.R.Croft, A.Hassanali-Walji, A.W.

Johnson, and T.Webb, Experientia, 27, 501 (1971).
30) B.W.Bycroft, D.Cameron, L.R.Croft, A.Hassanali-Walji, A.W. Johnson, and T.Webb, Nature, 231, 301 (1971).
31) R.Izumi, T.Noda, T.Ando, T.Take, and A.Nagata, J. Antibiot., 25, 201 (1972).
32) T.Wakamiya and T.Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn., 48, 2502 (1975).
33) a) S.Nomoto, T.Teshima, and T.Shiba, "Proceedings of the 36th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan", Kanagawa (1978) p.1122.
b) S.Nomoto and T.Shiba, submitted to Bull. Chem. Soc. Jpn.
34) W.M.Stark, C.E.Higgens, R.N.Wolfe, M.M.Hoehn, and J.W.McGuire, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1962, p.596.
35) a) Y.Nakagawa, T.Tsuno, K.Nakajima, M.Iwai, H.Kawai, and K.Okawa, Bull. Chem. Soc. Jpn., 45, 1162 (1972).
b) D.H.Rich and J.P.Tam, Tetrahedron Lett., 1975, 211.
c) A.Srinivasan, R.W.Stephenson, and R.K.Olsen, J. Org. Chem., 42, 2252 (1977).
d) D.H.Rich and J.P.Tam, J.Org. Chem., 42, 3815 (1977).
36) a) S.Nomoto, A.Sano, and T.Shiba, "Proceedings of the 16th Symposium on Peptide Chemistry", ed. by N.Izumiya, Fukuoka (1978) in press.
b) S.Nomoto, A.Sano, and T.Shiba, Tetrahedron Lett., in press.
37) F.C.M.Chen and N.L.Benoiton, Can. J. Chem., 54, 3310 (1976).
38) E.Gross and J.L.Morell, J. Amer. Chem. Soc., 93, 4634 (1971).

謝辞

本研究は大阪大学理学部芝研究室において行なわれたものであり、終始暖かい御指導を賜わりました芝哲夫教授に心から御礼申し上げます。

また実験上の問題などについて御指導、御助言をいただき、有意義な討論をしていただきました若宮建昭助手並びに豊島正助手に御礼申し上げます。本研究を行なうにあたり御助言をいただき御協力していただきました広津順弘助教授、楠本正一助教授をはじめとする芝研究室の皆様に感謝します。

本研究に使用したツベラクチノマイシンを御提供いただき、また抗菌力を測定していただきました東洋醸造株式会社研究所の皆様に感謝します。分子量測定にあたり御便宜をはかっていただきました大川乾次教授とその御研究室の皆様に感謝いたします。また比旋光度の測定にあたり御便宜をはかっていただきました乾利成教授に感謝いたします。