

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

ペプチド抗生物質ツベラクチマイシン
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	ツベラクチンマイシン群新抗生物質LL-BM547βの構成アミノ酸N ⁶ -メチル-L-β-アルギニンの合成	5
第3章	ツベラクチン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ンマイシンNの調製	10
3-2	ウレイド置換ツベラクチンマイシン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〔 ¹⁴ C〕ウレイドデヒドロアラニンツベラクチンマイシンOの調製	18
3-4	〔ΔAla ⁵ 〕-ツベラクチンマイシンOの合成の試み	20
第4章	ツベラクチンマイシンの抗菌作用における環状ガラニジンの意義	25
4-1	〔Arg ⁶ 〕-ツベラクチンマイシンOの合成	26
4-2	〔Gal ⁶ 〕-ツベラクチンマイシンOの合成	29
4-3	〔Arg ⁶ 〕及び〔Gal ⁶ 〕-ツベラクチンマイシンOの抗菌作用についての考察	33
第5章	抗生物質カプロオマイシンの構造決定と全合成並びにカプロオマイシン類似体の合成とその抗菌作用	37
5-1	カプロオマイシンの構造決定	37
5-1-1	カプロオマイシンIAとIBの分離	38
5-1-2	カプロオマイシンの物理化学的性質とアミノ酸組成	38
5-1-3	カプロオマイシンの環状ペントペプチド部の構造	41
5-1-4	側鎖β-リジンの結合位置——カプロオマイシンの全構造	46
5-2	カプロオマイシンIA及びIBの全合成	50
5-2-1	保護環状ペント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	カプロオマイシンの構造類似体の合成	61

5-3-1	カプロオマイシンIIA及びIBの合成	62
5-3-2	アソイドカプロオマイシンIBの合成	63
5-3-3	リボースカプロオマイシンIIB及び[Orn ⁴]-カプロオマイシンIIBの合成	63
5-3-4	ジ-β-Lys-カプロオマイシンIIBの合成	63
5-4	カプロ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ト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。その構造研究は主として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、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から明らかのように、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トペプト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、通常の抗生物質と比べ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⁾及びカプレオマイジン⁹⁾、側鎖アミノ酸の β -リジン¹⁰⁾及び α -ヒドロキシ- β -リジン¹¹⁾、 α , β -ジアミノプロピオン酸として α 位に二重結合を有する β -ウレイドヒドロアラニン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 α -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分を長く環状ペントペプトド部分を単離して、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

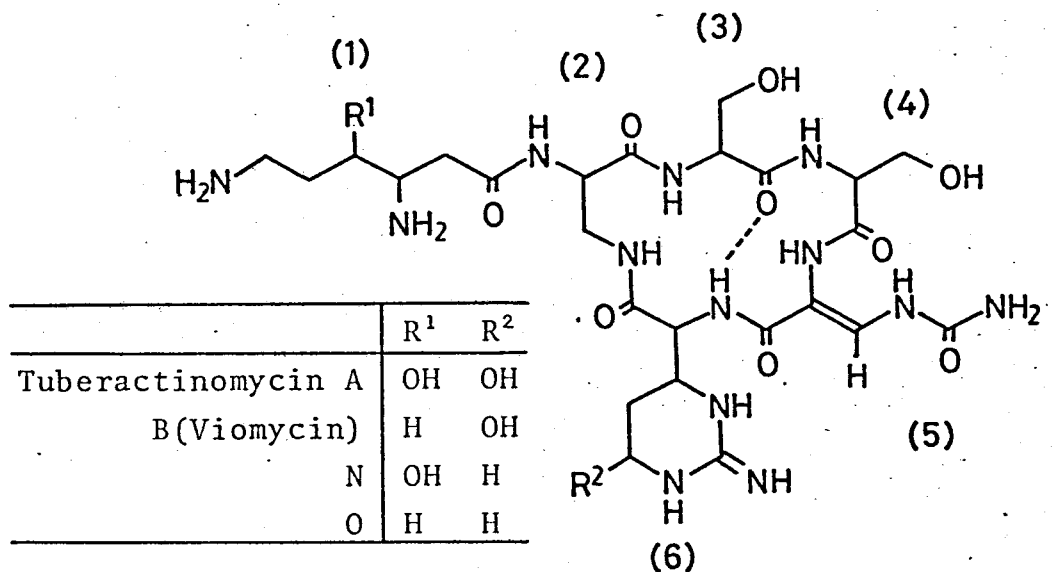


Fig.1-1

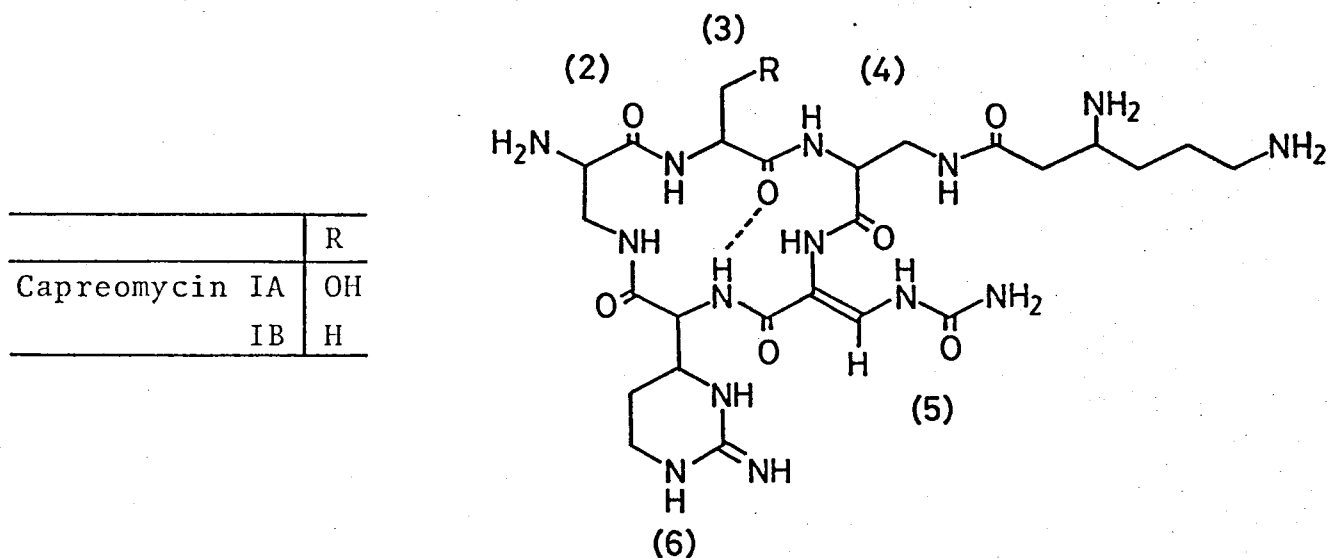


Fig.1-2

ベラクテノマイシンOへ導いた。¹⁴⁾即ちこのことによつてツベラクテノマイシン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テノマイシンOの全合成の計画にも生かされ、まずツベラクテノマイシンNを合成し、次いで側鎖β-リジンとこれを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。本研究室においてもツベラクテ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、ツベラクテノミン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テノマイシンが調製されたが、これらの抗菌力を比較した結果、強か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。

次にツベラクテ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たす役割を調べる為、[Ala⁴]-、[Ala³]-及び[Ala³, Ala⁴]-ツベラクテノマイシンO (Fig. 1-3) が合成された。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テノマイシン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番目のそれと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、ツベラクテ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の種の構造類似体は天然ツベラクテ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。

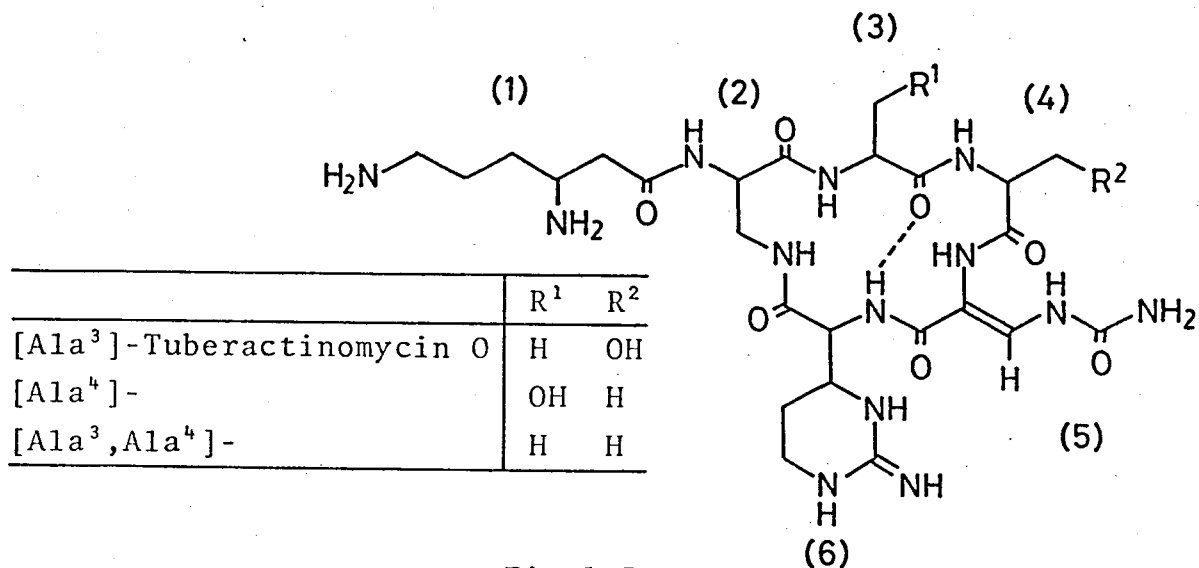


Fig. 1-3

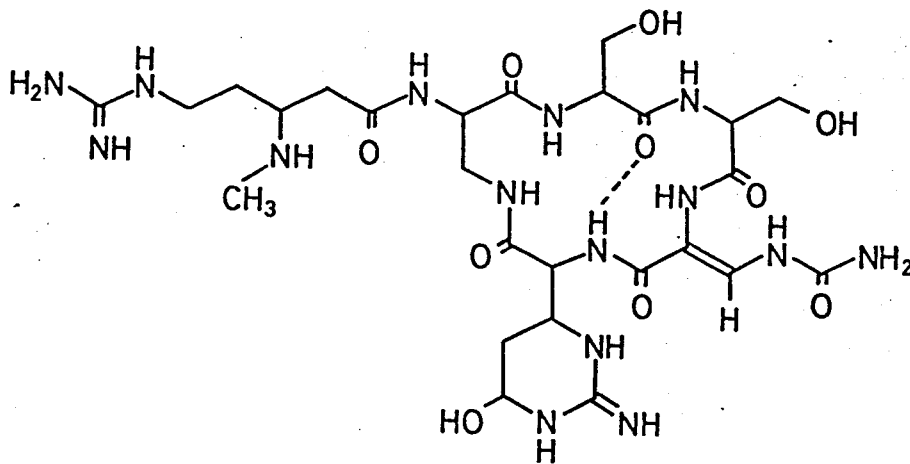
以上のようにツベラクテノマイシンにおけるいくつかの官能基が活性発現において果たす役割は部分的に明らかにされていたが、この分子中の最も特異なアミノ酸残基即ちβ-ウレイドデヒドロアラニン並びに環状グアニジノアミノ酸、カプロオマイシジン又はツベラクテジンの存在意義についてはほとんど知られていなかった。そこで著者はこの抗生物質群の構造と生理活性の関係をより深く追求すべく本研究を開始した。

まず第2章では最近発見されたツベラクテノマイシン類似の新抗生物質、LL-BM547¹⁷⁾の側鎖部分に存在する新アミノ酸N^β-ナテール-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-アミノ酸であるグ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(ΔAla⁵)-ツベラクテノマイシン0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テノマイシンに類似する抗生物質カプロオマイシン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ロ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Nβ-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¹H及び¹³C NMR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Nβ-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ゾ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目指した。

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ってトシル-L-グルタミンのγ-アミドをHofmann転位してアミノ基

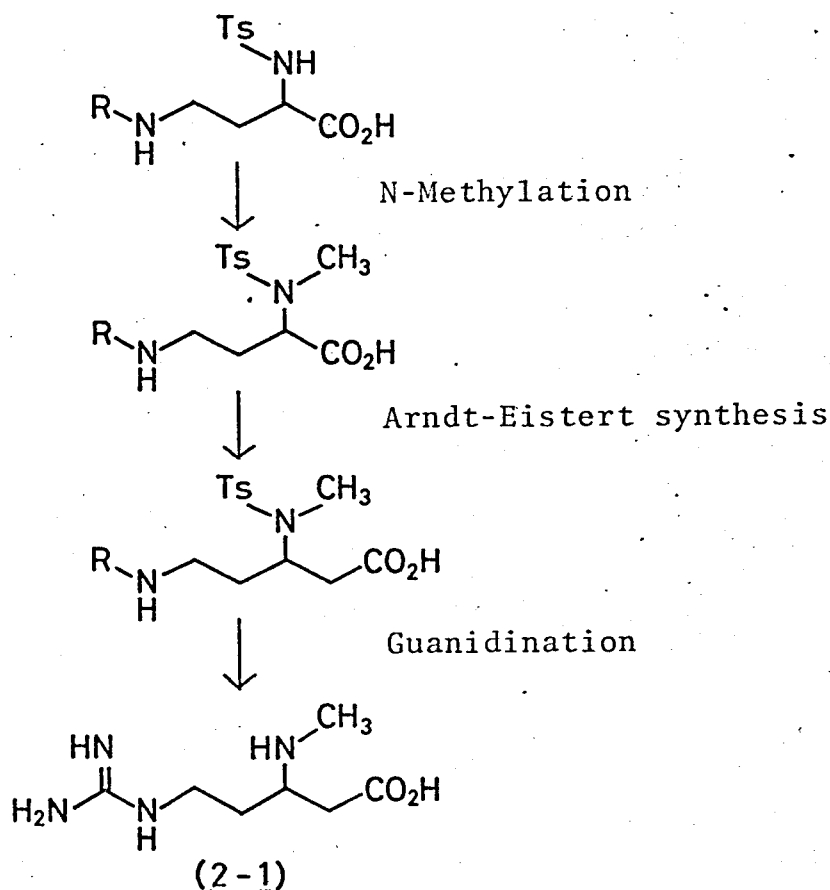


Fig. 2-2

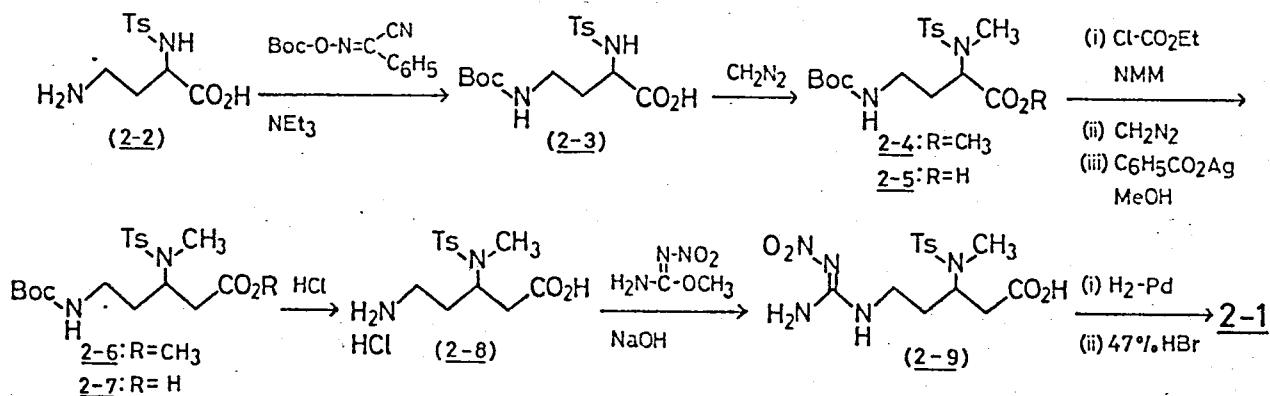


Fig. 2-3

に交換して調製した。¹⁹⁾ このα-アミノ基をセ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-セ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ナトリウムと長時間反応させるもので若干のラセミ化が伴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ブツメタンによりメチル化されることを初めて見出した。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

かになったが従来法よりラセミ化を起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α-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ニ化してNB-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β-グアニジニ基に特有な坂口染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

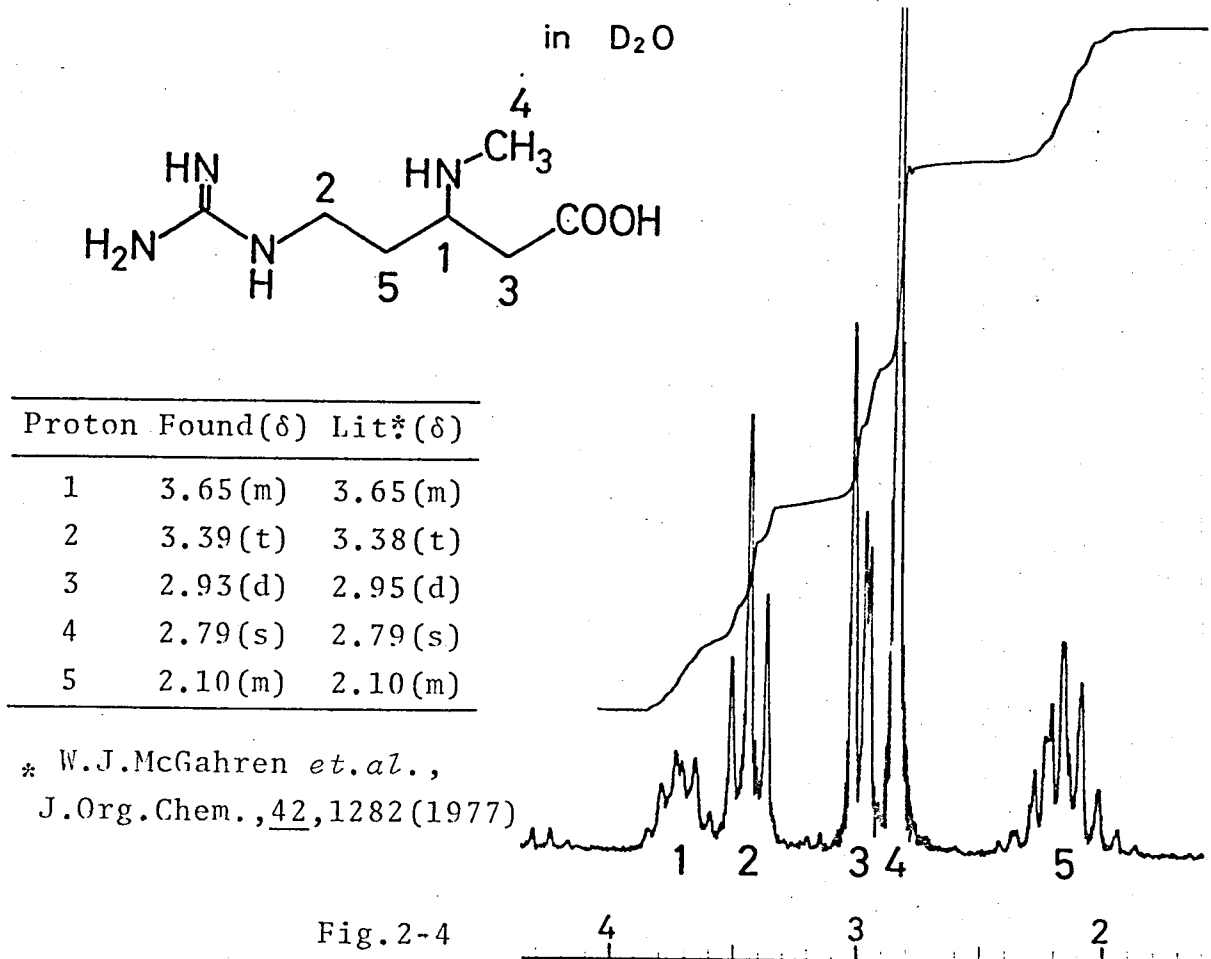


Fig. 2-4

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²⁰⁾酸又はステンドマイシジン²¹⁾のような他のN-トシル-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ジン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。

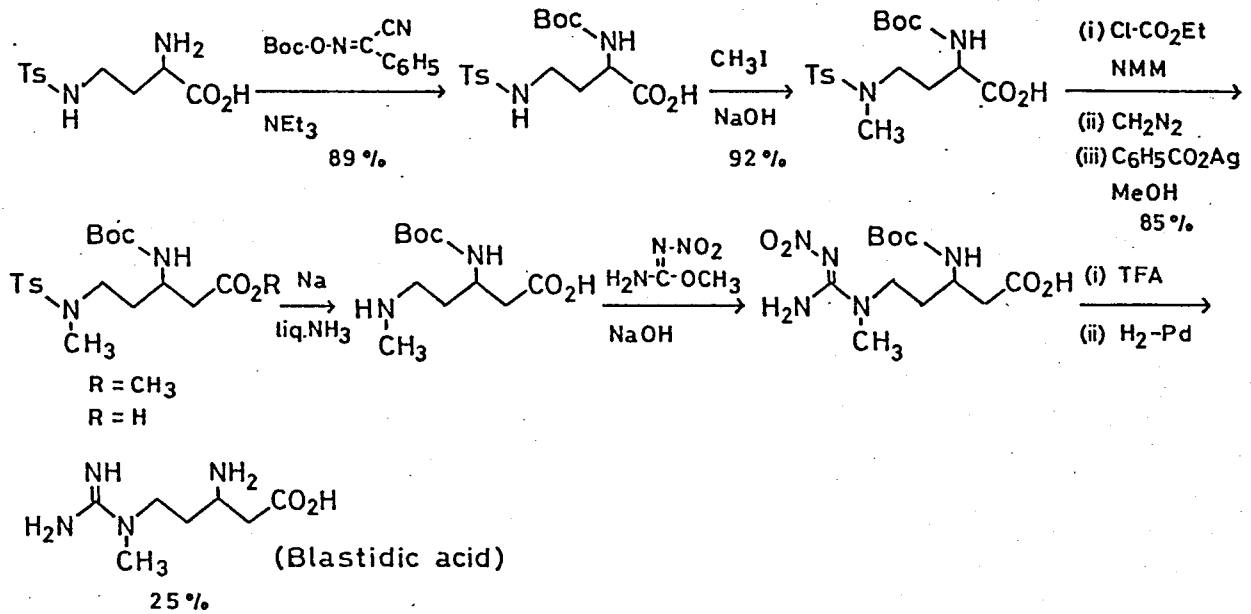


Fig. 2-5

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

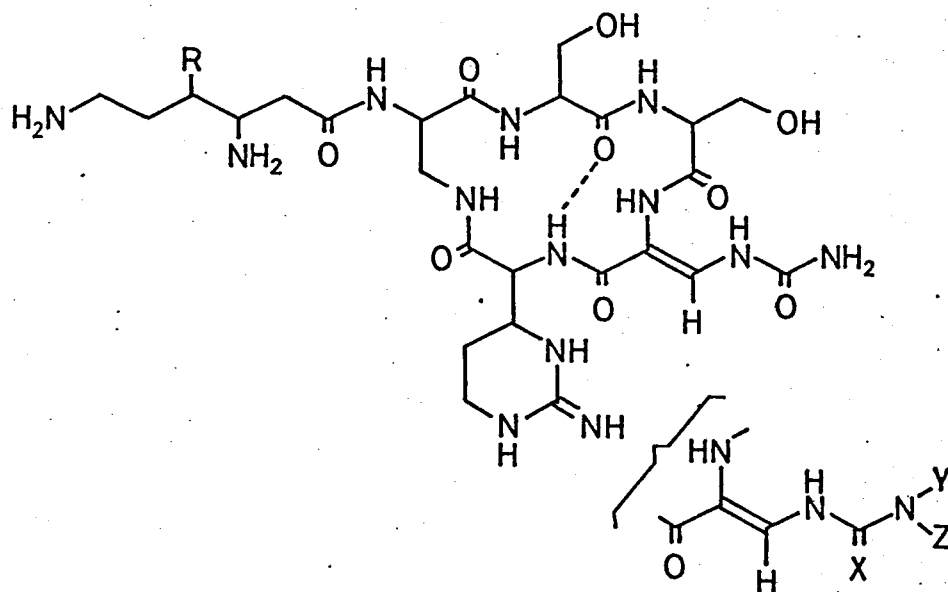
第5番目のアミノ酸残基であるβ-ウレイドデヒドロアラニンは、この抗生物質群にしか見られない特徴的な部分構造である。とりわけ炭素-炭素二重結合がもたらすこのアミノ酸の平面性並びに特異なウレイド基が生理活性の発現においてどのような意義をもつのかということは注目し得る問題である。豊島ら^{15b)}はツベラクチノマイシンを還元してβ-ウレイドデヒドロアラニン残基がβ-ウレイドアラニン(Ual)に変化した誘導体及びウレイド基が切断除去されてアラニン残基に変化した誘導体を調製し、その抗菌作用を測定している^{15b)}(Table 3-1)。この実験結果並びにこれらの誘導体は天然物と異なるイオンホモニーションを持つという事実を考慮合わせると、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イオンホモニーションを維持する役割は有しているといえる。そのイオンホモニーションについてはこの二重結合そのものの存在は活性発現の為に不可欠な要素ではないことが結論される。さらに[Ala⁵]体は[Ual⁵]体より低いながらも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 [Ala⁵]- and [Ual⁵]-tuberactinomycins

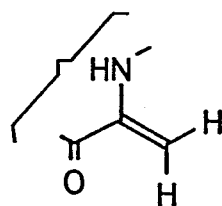
	[Ala ⁵]-derivative	[Ual ⁵]-derivative
Tuberactinamine N	>100	25
Tuberactinomycin A	50	50
B	50	50
N	100	12.5
O	100	50

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、こ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存在しないと考えられたので、着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



[Δ Ala⁵]-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も直接調べる為に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〔ΔAla⁵〕-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はいないが、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も確立した。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を酸処理して側鎖のβ-ヒドロキシ-β-リジンモイ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も認め、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。

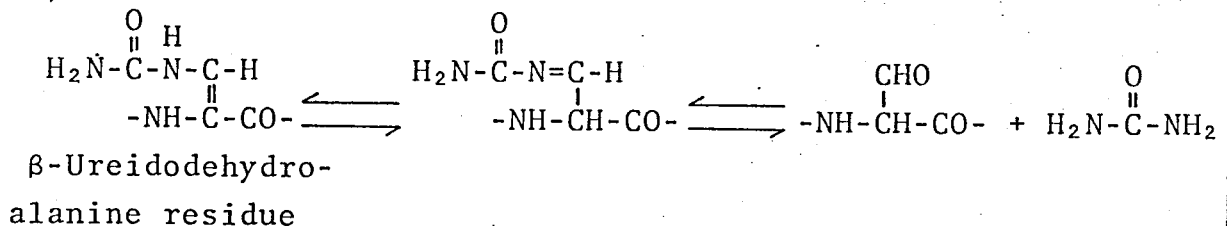


Fig.3-2

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(フェニール水-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β-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を単離して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(NH₄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

的物を含むフラクションを Amberlite IRC-50 (ピリジン型、1N 酢酸溶液) カラムで脱塩して、3種のツバラクテリマイシン N 誘導体もそれぞれ純粋に得ることができた (Fig. 3-3)。

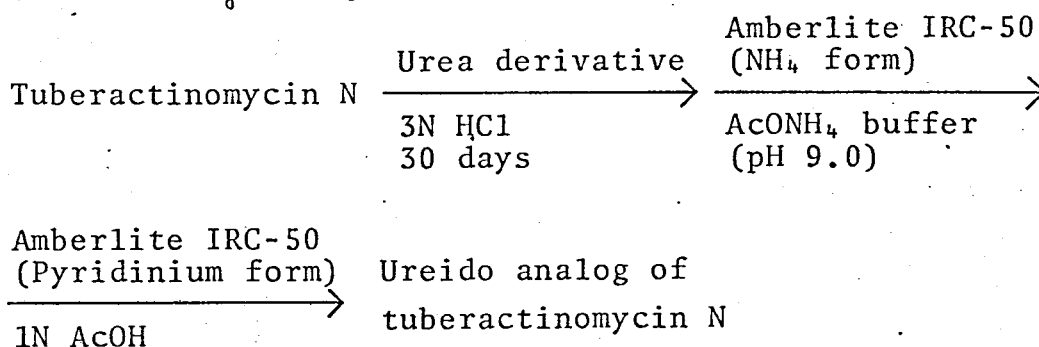


Fig. 3-3

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

	<u>3-1</u> (3HCl)	<u>3-2</u> ^{a)} (3HCl)	<u>3-3</u> (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°
[α] _D ²⁰ (c0.7, H ₂ O)	-18.7°	-14.0°	-23.2°
Elemental analysis ^{d)}			
Found (Calcd)	C 38.25 (38.59)	C 36.44 (36.27)	C 40.00 (39.78)
	H 6.03 (5.98)	H 6.80 (6.74)	H 6.75 (6.57)
	N 22.43 (22.51)	N 19.28 (19.64)	N 19.36 (19.46)
(%)	Cl; 13.46 (13.15)	Cl; 11.63 (11.47)	S; 3.35 (3.43)
UV			
0.1N HCl	272 (24,900)	275 (25,600)	297 (21,600)
(nm)			257 (16,700)
H ₂ O	272 (24,800)	275 (25,300)	297 (22,000)
(ε)			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.NH₄OH, 30:10:1).

c) TLC (Silica gel, 10%AcONH₄-acetone-10%NH₄OH, 9:10:1).

d) Calcd. for C₂₆H₄₅N₁₃O₁₀·3HCl (3-1), C₂₇H₄₇N₁₃O₁₀·3HCl·4H₂O·MeOH (3-2) and C₂₅H₄₃N₁₃O₉S·3AcOH·3H₂O (3-3).

NMR spectra of [methylUda⁵]-tuberactinomycin N
(100 MHz)

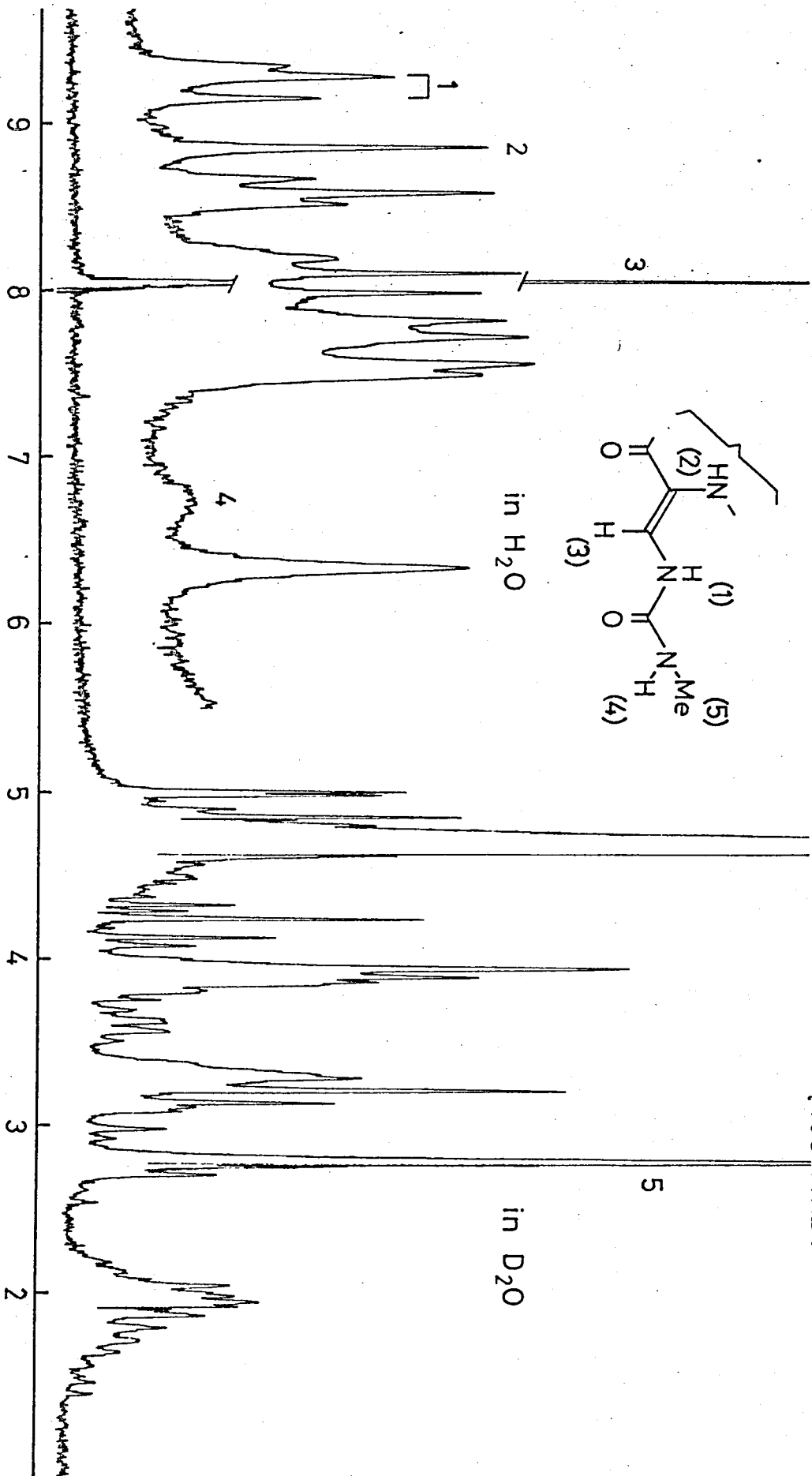


Fig. 3-4

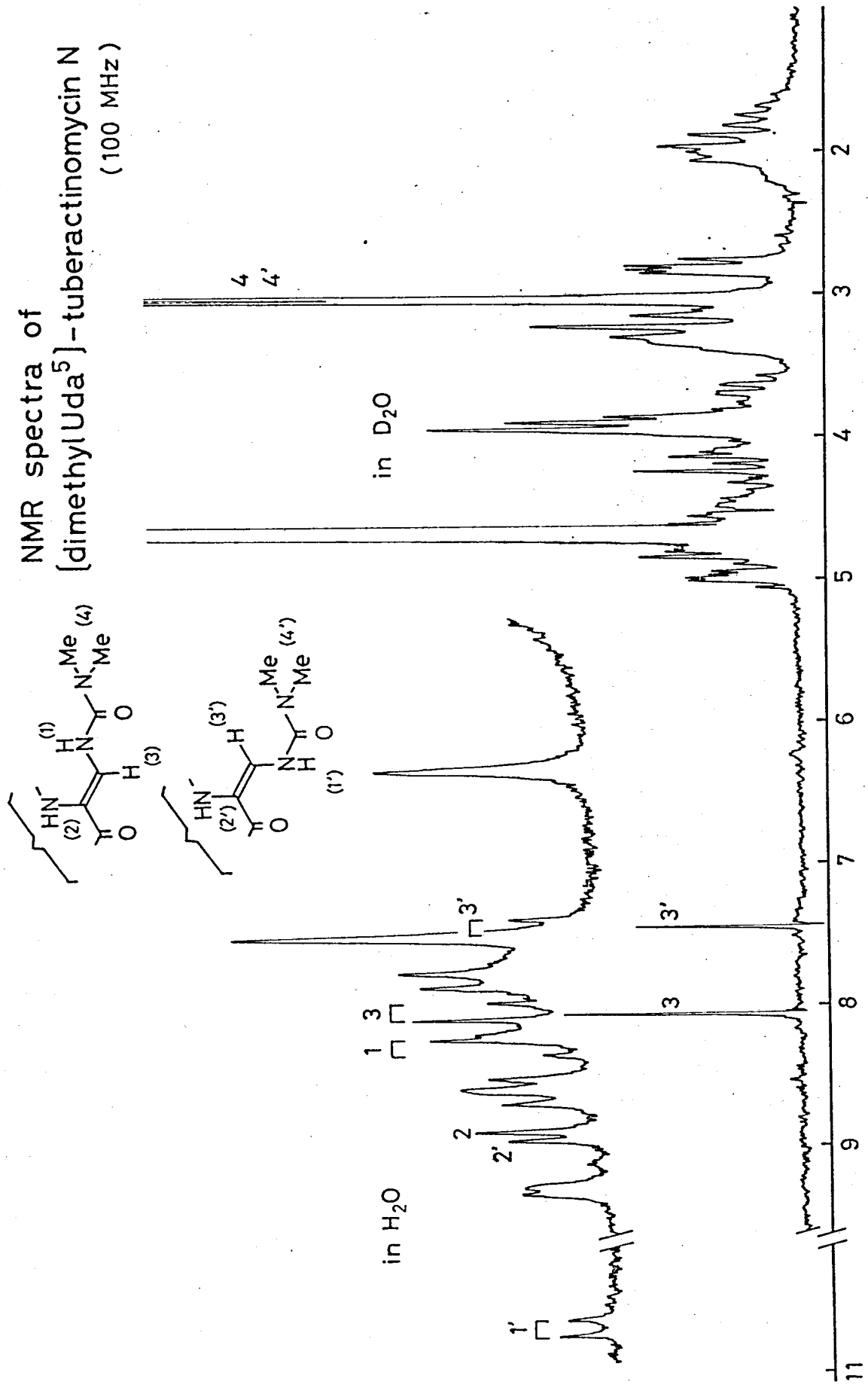


Fig. 3-5

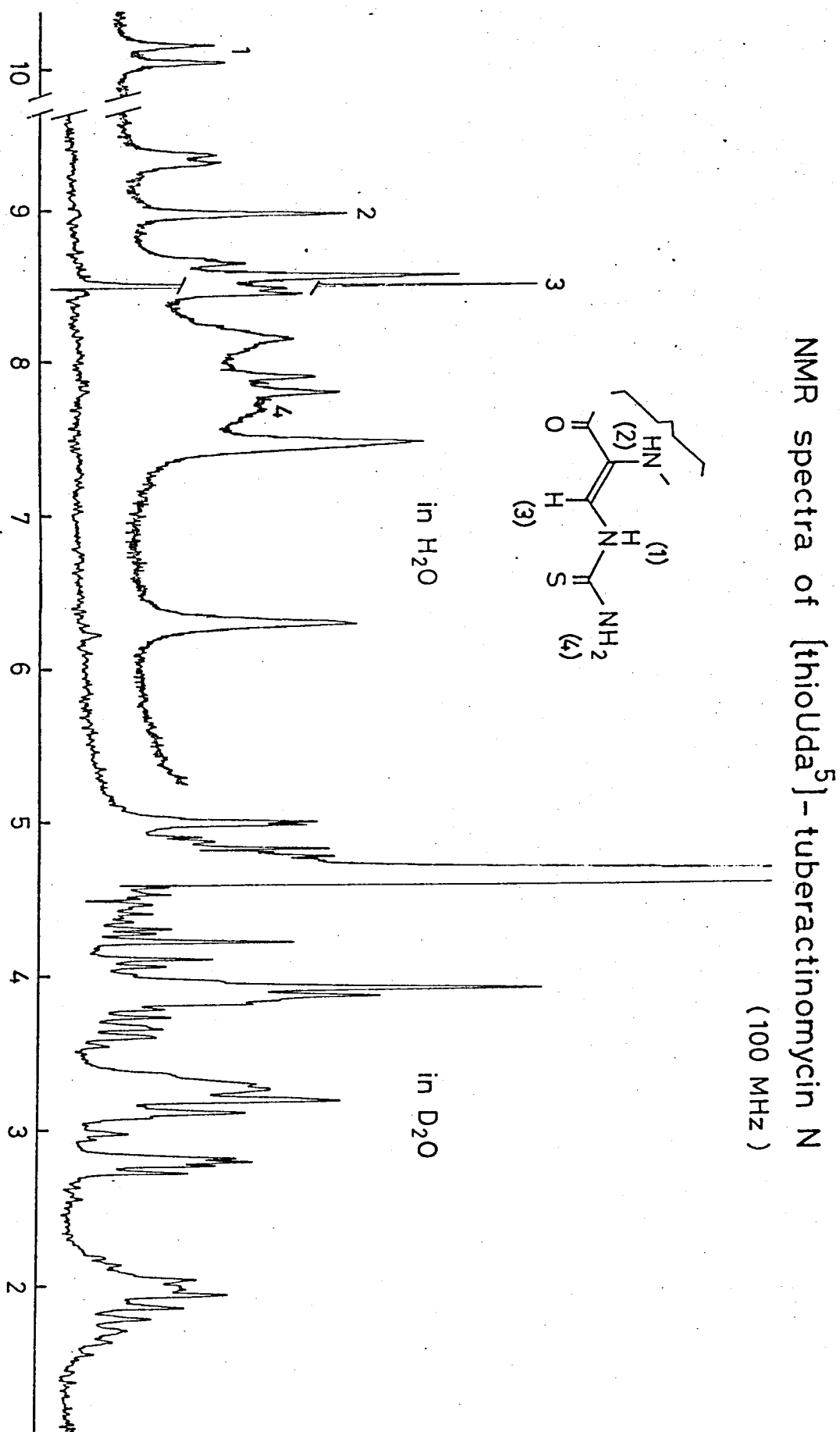


Fig. 3-6

Table 3-2 にこ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、ここから得られ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も天然物のものと比較した結果 ジメチルウレイド体 (3-1) と テオウレイド体 (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。なおテオウレイド体 (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、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ため、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 ($a=b=180^\circ$) からずれた結果として説明することが出来る。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。

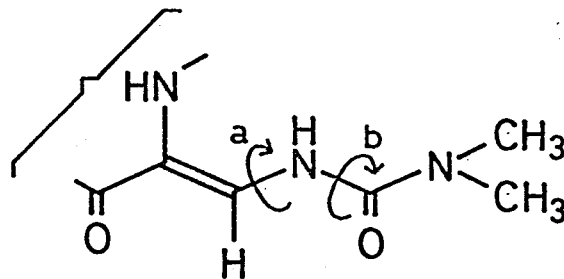


Fig. 3-7

ここに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ため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を 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

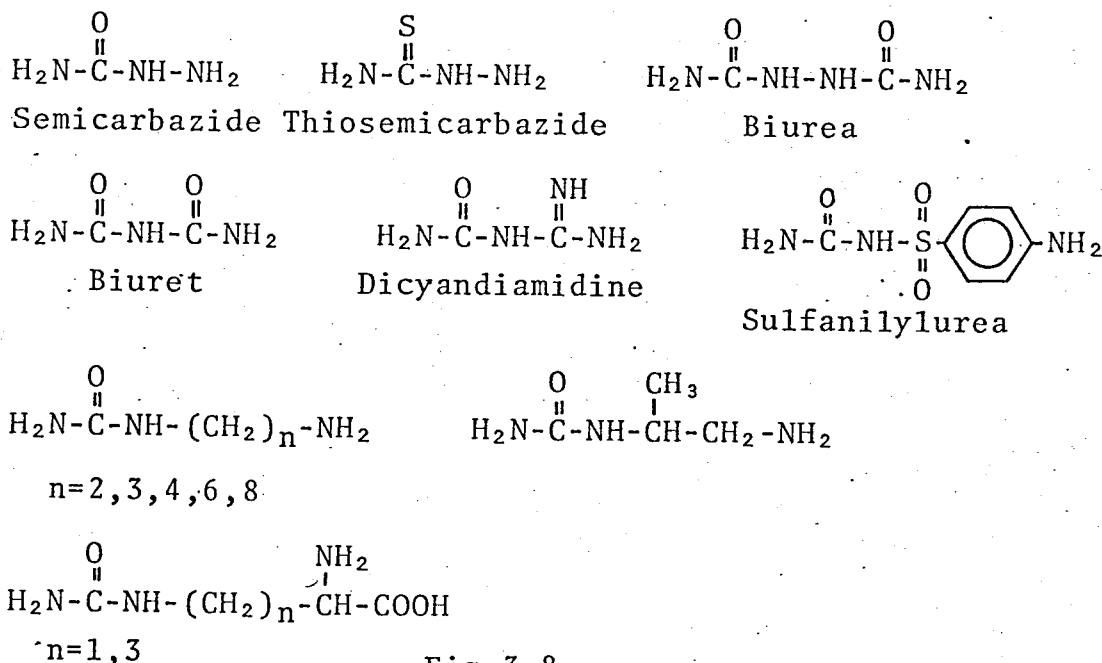


Fig. 3-8

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 の抗菌スペクトルも 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認されている。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 においても天然物と全く同程度の抗菌力を示しているのからウレイド部分は、ど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なお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)}

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

a) Abbreviation; Tum:tuberactinomycin.

次にジナテルウレイド体(3-2)の活性が天然物より低い原因を考察すると、ナテルウレイド体(3-1)は天然物と同等の活性を示すにもかかわらず、ジナテルウレイド体(3-2)はそれとはかけ離れて低活性であるのは、ジナテ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存在、E両異性体の混合物であり、しかもこ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E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[¹⁴C]ウレイドデヒドロアラニン]-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に上記のウレイド交換反応を利用して行った。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、¹⁴C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こと、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α-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に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(フェール-水-濃アンモニア水、30:10:1)で天然物と一致する単一のスポットを与え、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

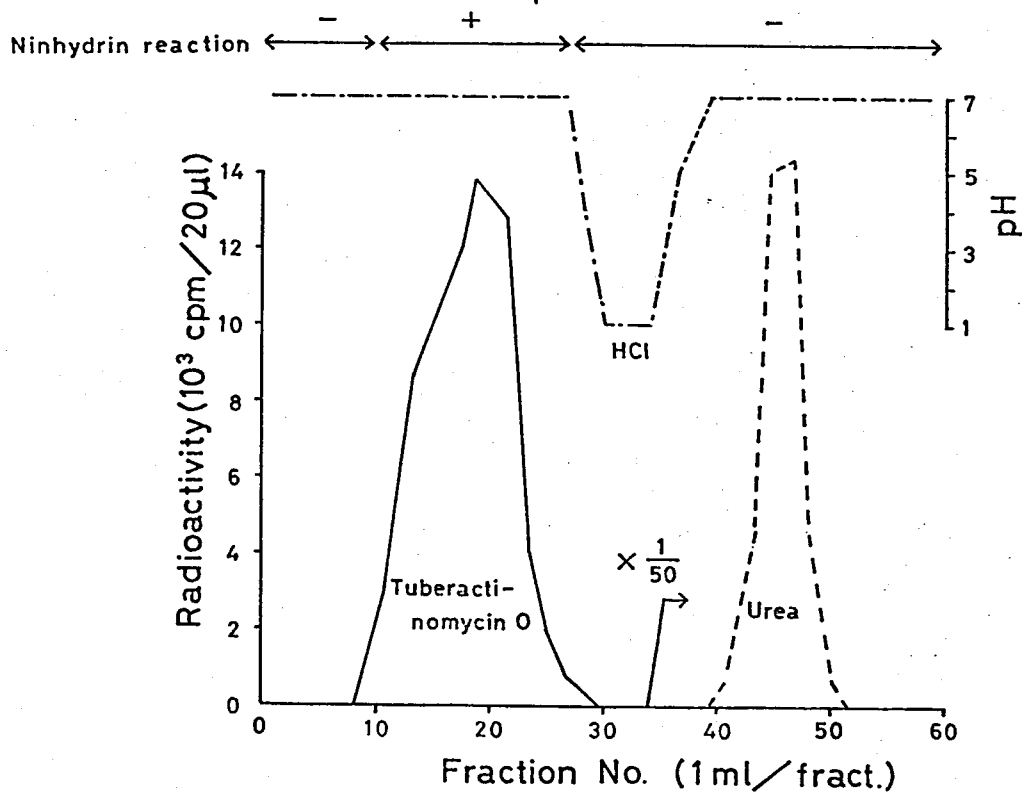


Fig. 3-9

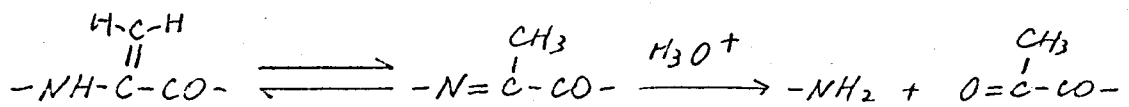
階び完全に除くことができた。ニンヒドリン反応陽性のフラクションを集め凍結乾燥すると〔 ^{14}C 〕ウレイドデヒドロアラニン 5 -ツベラクチノマイシンOが白色粉末として約70%の収率で得られた。比放射活性は 15.0 mCi/mmol であった。

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ロ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。なおこの実験によつて得られた〔 ^{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、そのニヒがペプテジル-tRNA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じた。²⁴⁾

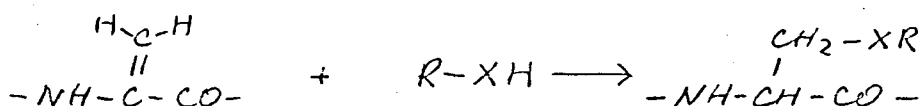
3-4 $[\Delta\text{Ala}^5]$ -ツベラクチノマイシンOの合成の試み

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。

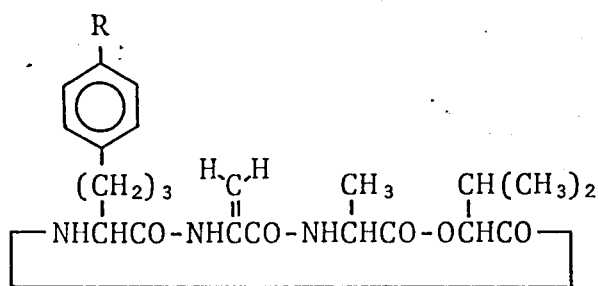
- (1) 光又は空気的作用により容易に重合する。この性質は特に低分子量のデヒドロアラニン誘導体において著しい。またシリカゲルは重合を促進する。
- (2) 中性もしくは塩基性状態では比較的安定であるが、酸性溶液中ですみやかに水解される。



- (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受ける。



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受ける。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、これでも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グ斑点落葉菌毒素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ほとんど失敗している。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ン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、後者はオプテール基で保護して導入した。

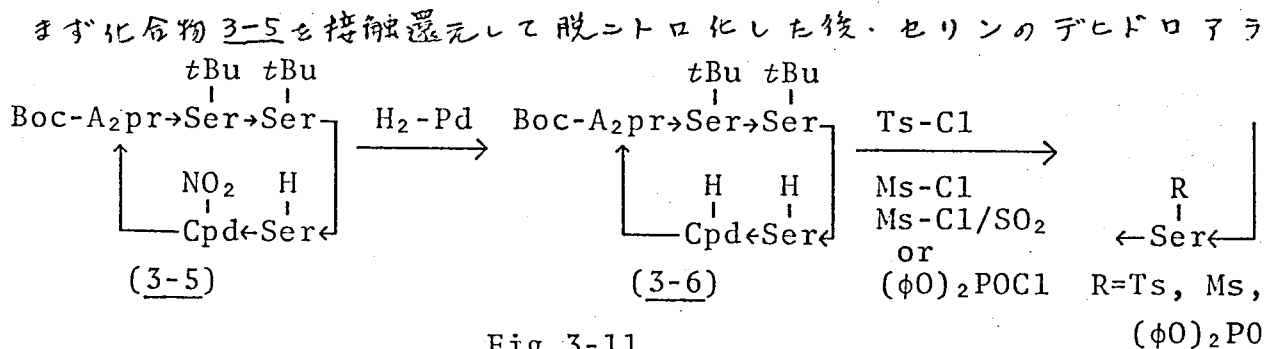


Fig. 3-11

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シルホニルを使用することによって低収率ながら目的物を得ている。著者もこれに習い、塩化メタンシルホニル及びさらに活性化された試薬塩化メタンシルホニル/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。この地は、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⁾を試みた。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、環状ペプタペプチド 3-6 はこの試薬に対しても全く反応しなかった。

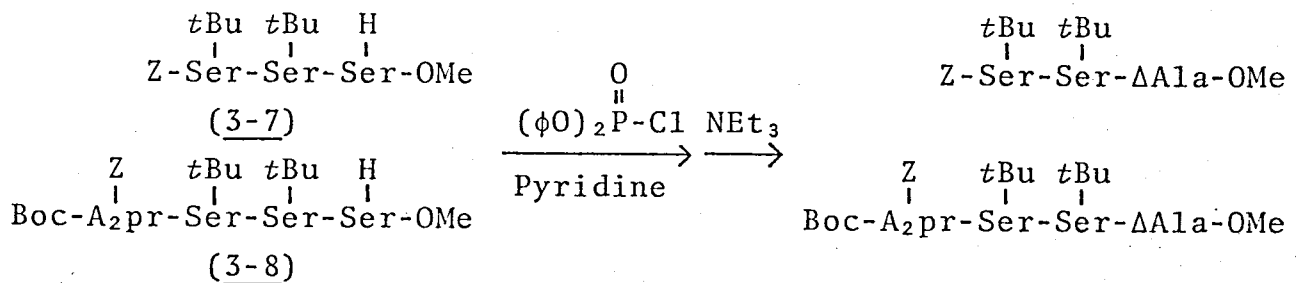


Fig. 3-12

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るれば、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、保護基特にかプロ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-ナ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ゝが考えられ、その逆の順序を行なう場合には、デヒドロアラニン残基の分解を伴わないニトロ基の切断条件を見い出さねばならない。この又点に關してジペプチド 3-10 (Fig. 3-14) をモデルペプチドとして予備実験を行った。

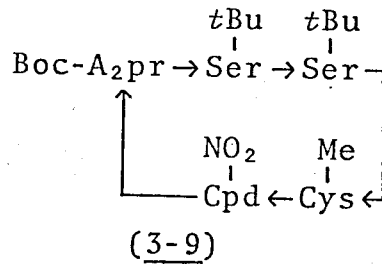


Fig. 3-13

まずジペプチド 3-10 中の S-ナ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は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。又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 BF_3 ・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、 BF_3 ・エーテル錯体を加えると、還元は進行する反面、この試薬によりアトキシカルボニル基が部

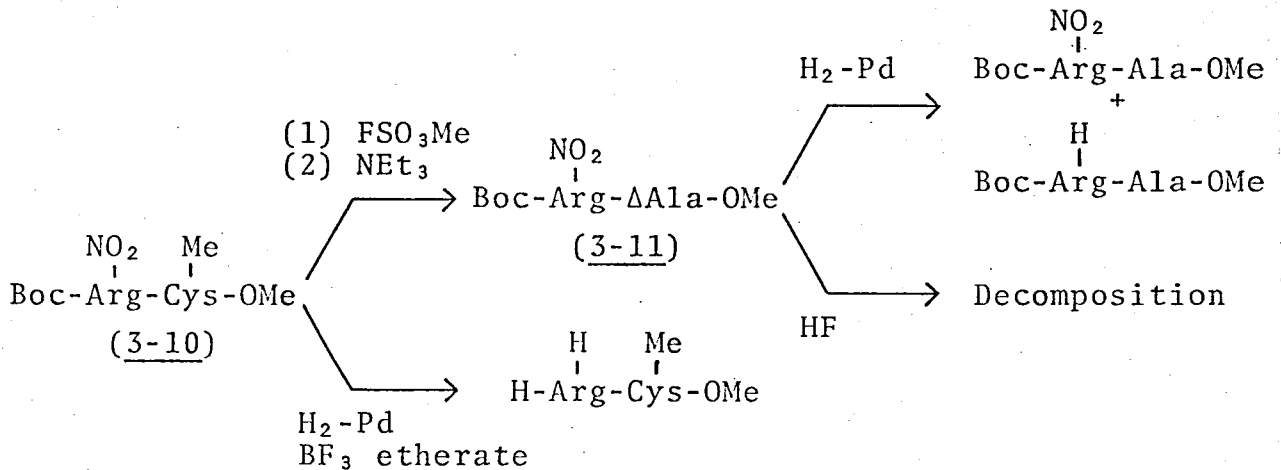


Fig. 3-14

分的に切断された。化合物 3-9 中の アトキシカルボニル基 あるいは カブチル基 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も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基が含まれず、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 $[\Delta\text{Ala}]$ -ツベラクチンマイシン 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。この考え方を基として 蒼蒼 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 合成法を見出すことができた。これに関しては第 6 章を述べる。

第4章 ツベラクテリマイシンの抗菌作用における環状グアニジノ基の意義

ツベラクテリマイシンやカプロ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、カプロオマイシン又はツベラクテリ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、ツベラクテリ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残基の水酸基の存在、第5残基のラ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テリ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、果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 $[Cpd(NO_2)^6]$ -ツベラクテリマイシン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ため、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二種のツベラクテリマイシン類似体即ち $[Arg^6]$ -ツベラクテリマイシンO (4-1) 及び $[Gal^6]$ -ツベラクテリマイシン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判定した²²⁾

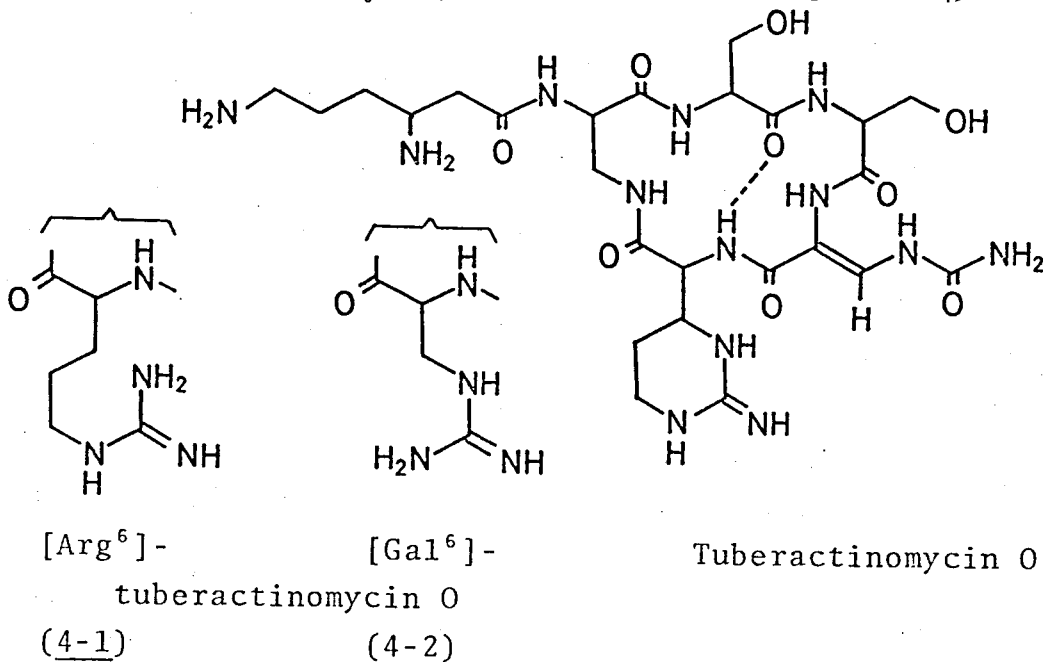


Fig. 4-1

4-1 (Arg⁶-ツバラクチ)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α-アミノ酸鎖を延長して、鎖状ペプチド 4-5 を得た。これをN-ヒドロキシコホル酸イミド活性エステル法で環化した後、脱保護を繰り返してβ-リジン残基を導入して最終生成物 (Arg⁶-ツバラクチ)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

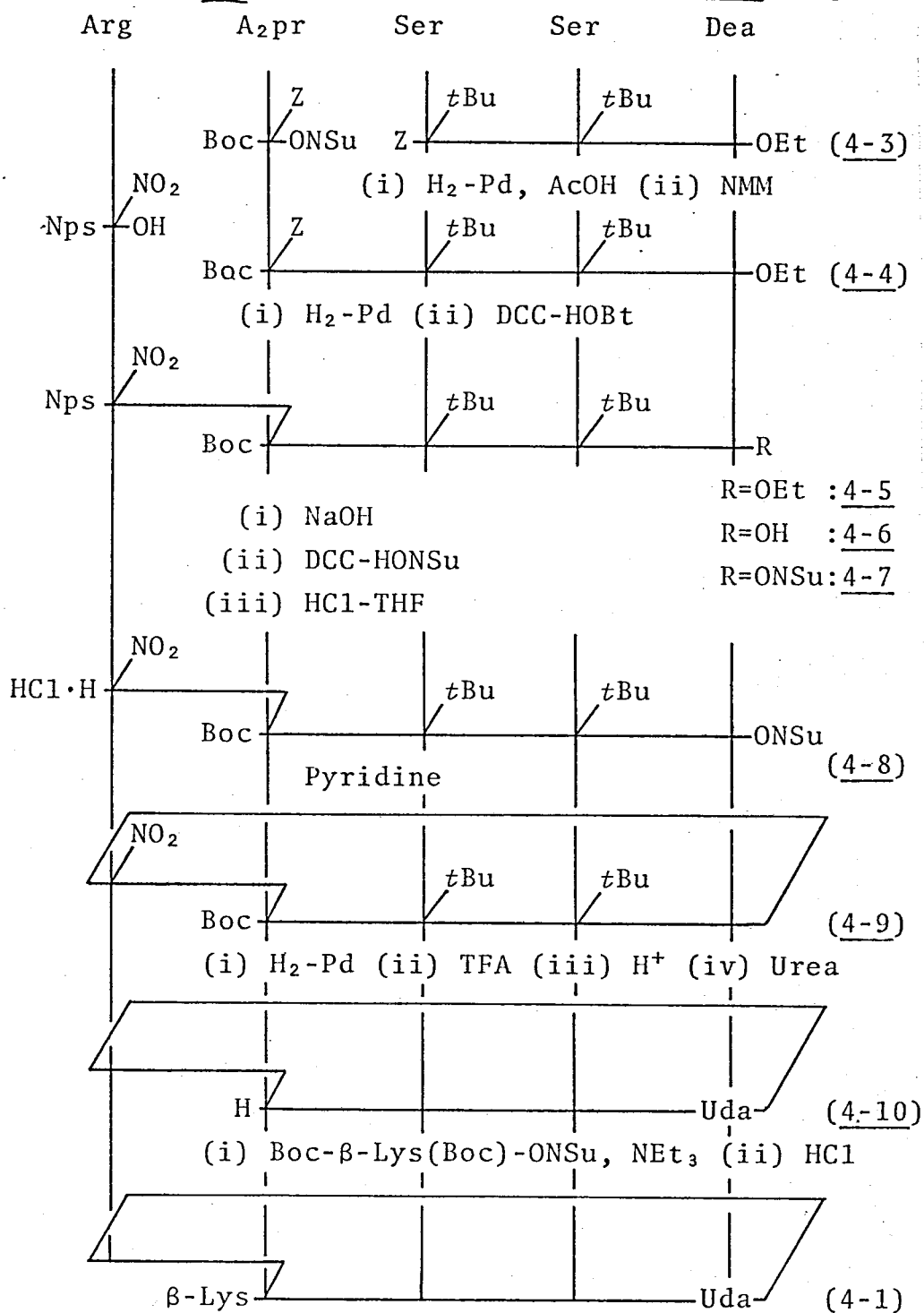


Fig. 4-2

NMR spectra of [Arg⁶]-tuberactinamine N
(100 MHz)

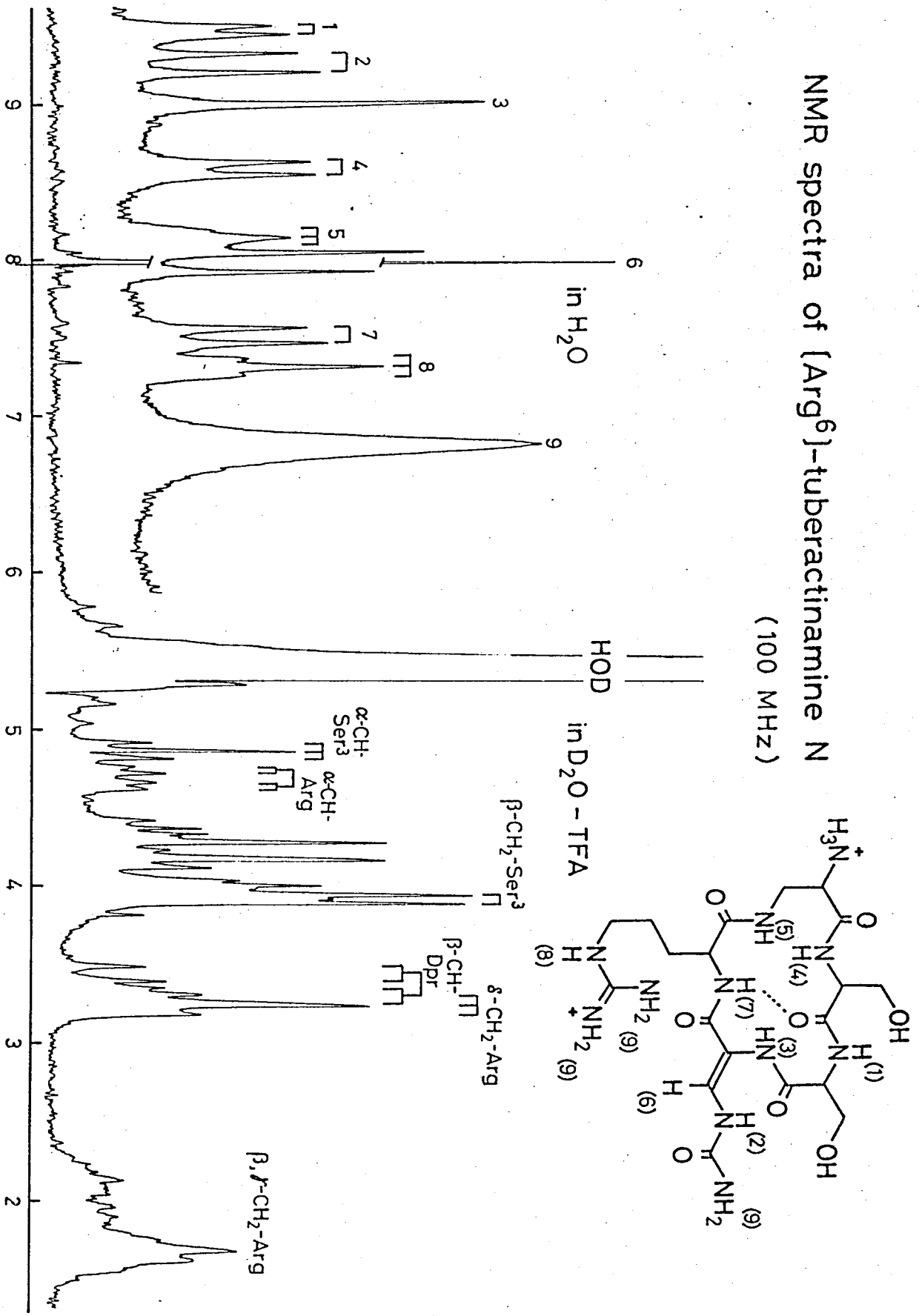


Fig. 4-3

NMR spectra of [Arg⁶]-tuberactinomycin O

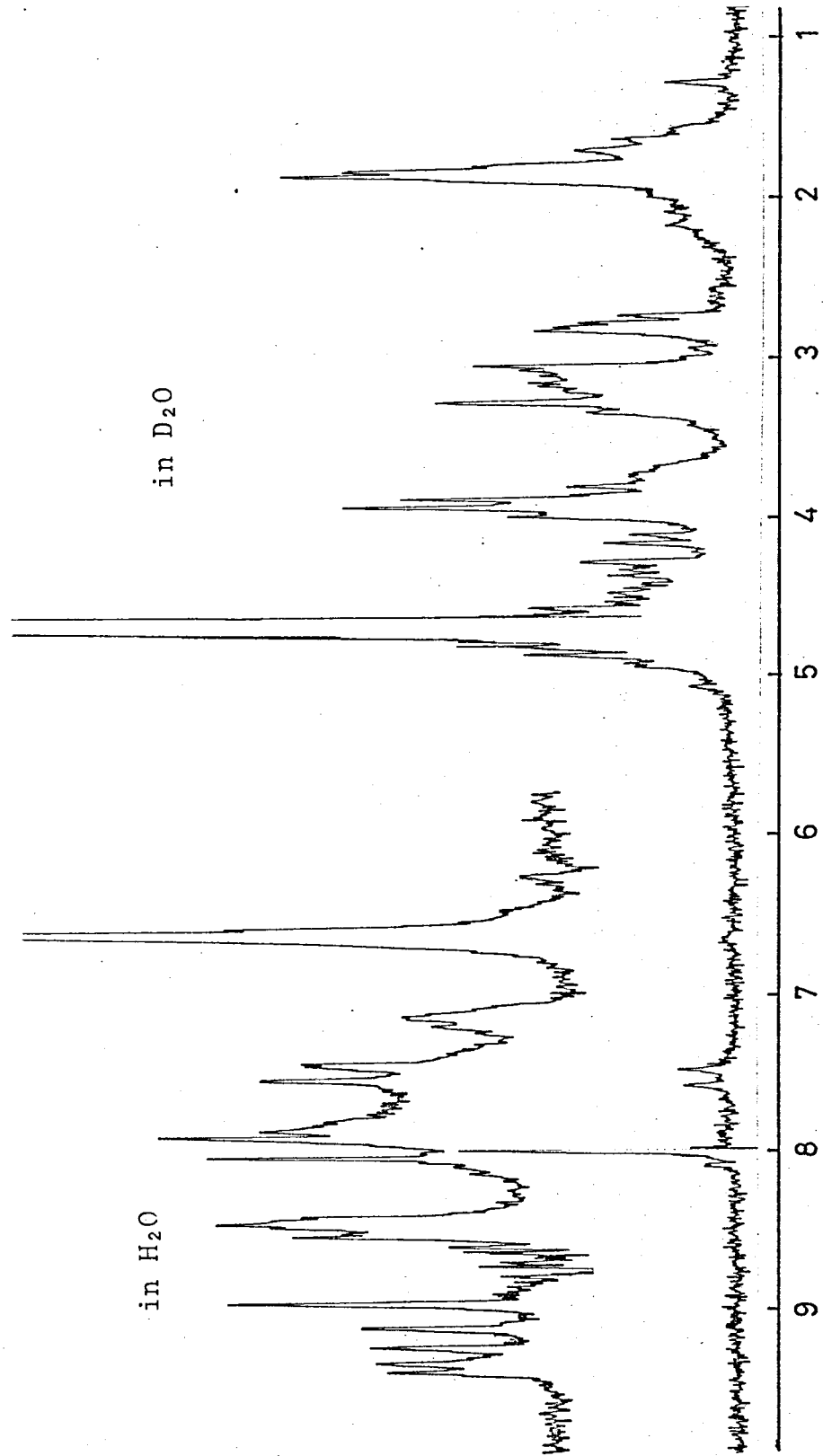


Fig. 4-4

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トーションをとっていることを示している。

4-2 [Gal⁶]-ツバラクチンマイシン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る。

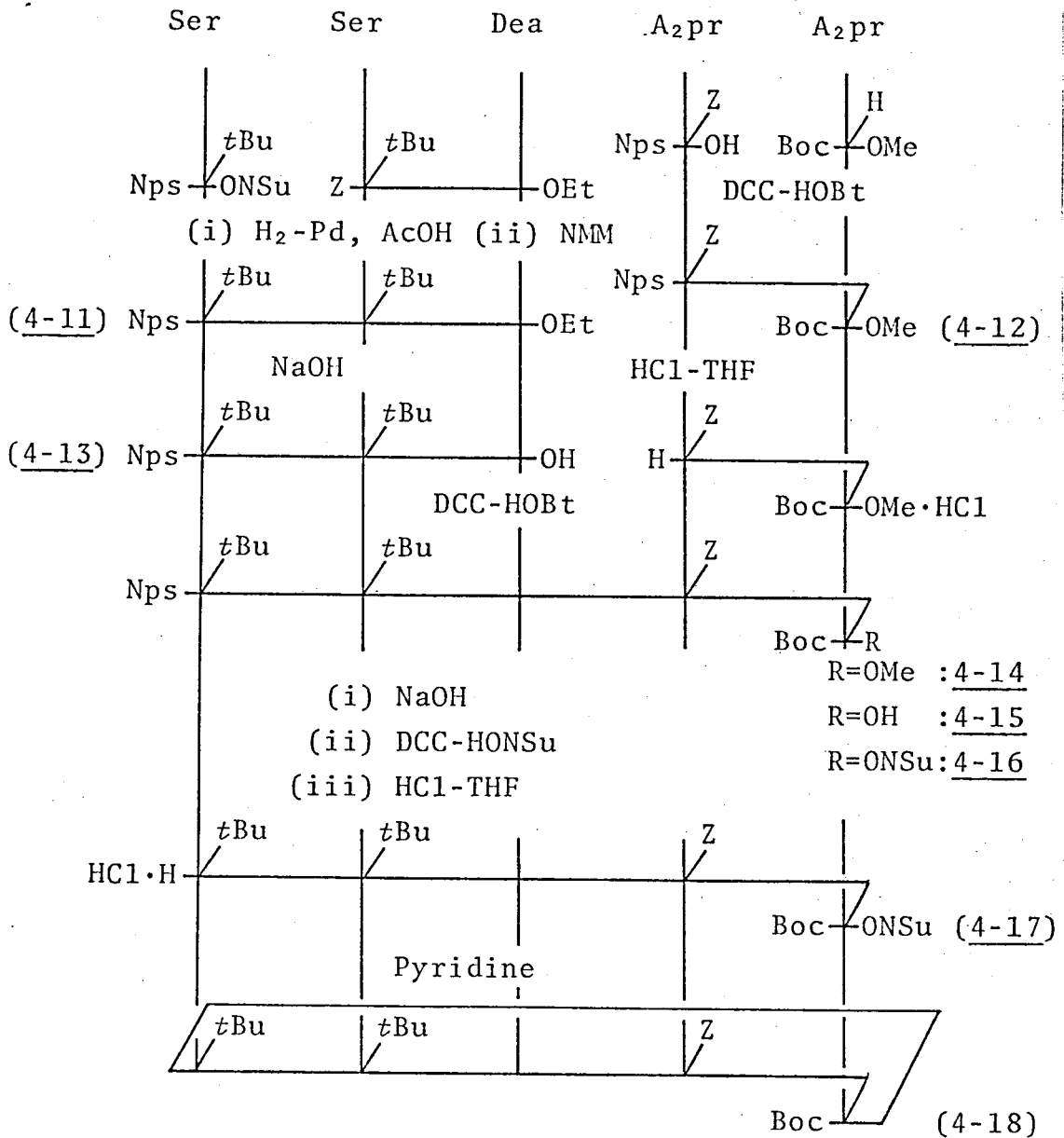


Fig.4-5

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。

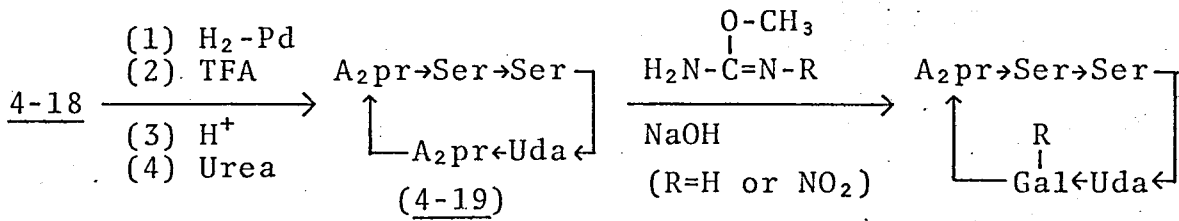


Fig. 4-6

次に 4-18 をツベラフテナミン 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受けやすく、 γ -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び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-ナテリ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われ、目的物を単離するには至らなかった。また O-ナテリ-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づき合成は断念し、ペプチド合成の最初から β -グアニジノアミンを用いる経路に方針を切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 -グアニジノアミ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⁾ トシルアスパラギンから N^ε-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-フェニールで行なうと目的の

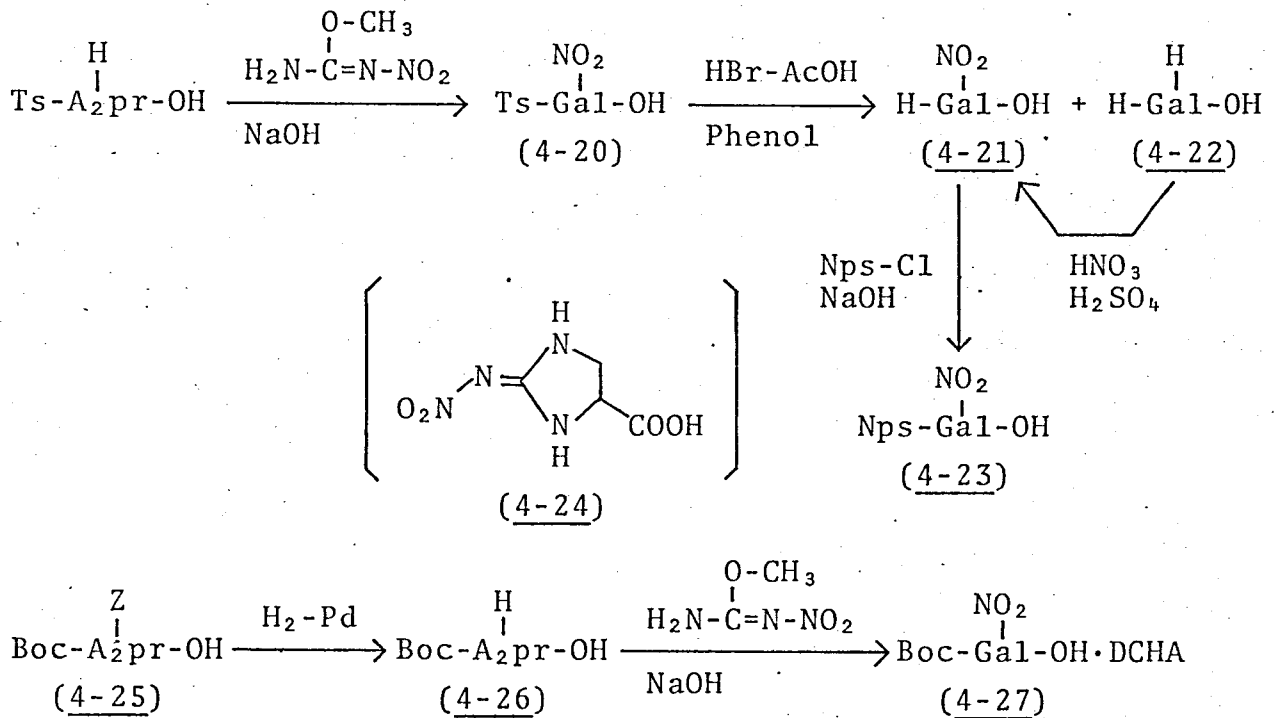


Fig.4-7

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、アミノ基が脱ニトロ化されるのみで目的物4-23は全く生じなかった。ニトロアミノ基はアミノ基による求核攻撃を受けやすいことが知られているが、分子内のαアミノ基とニトロアミ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-ジアミノコピオン誘導体のβアミノ基をジアミ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アミノ基をニトロアミ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。

上記得たβアミ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。4-27と4-28をDCC-HOBT法で縮合してジペプチド4-29を得たがこの単離率は種々の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α-オキシカルボニル基をTHF中の塩化水素で切断した後、N端側トリペプチド

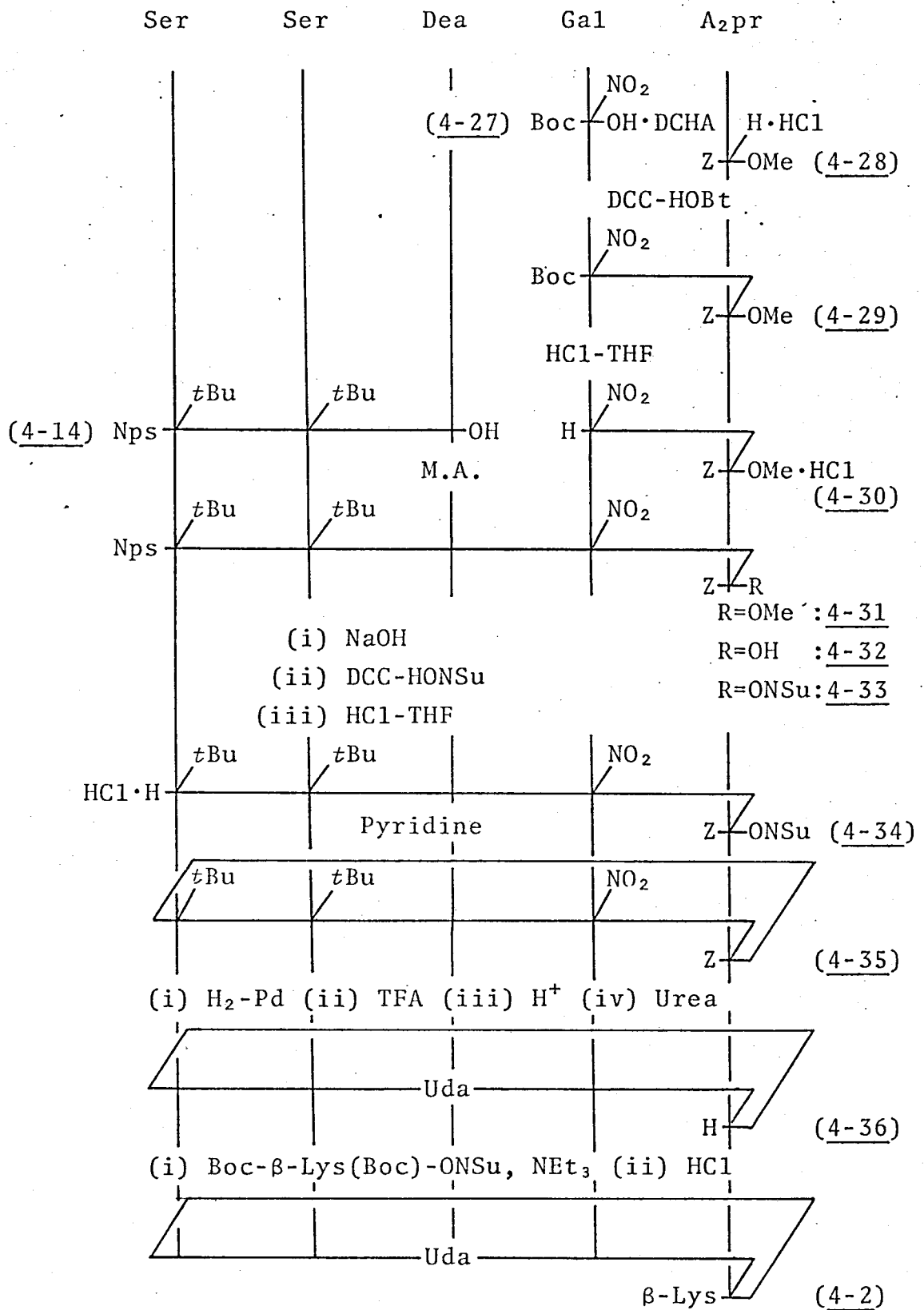


Fig. 4-8

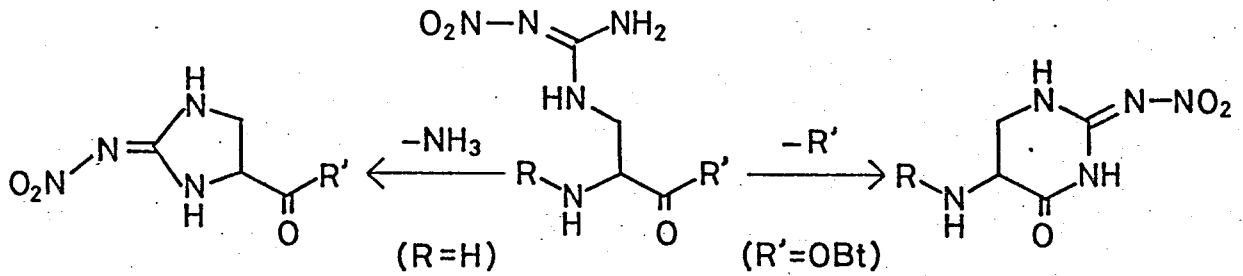


Fig. 4-9

チド 4-14 と縮合した。この時先に述べたように Gal(NO₂) 残基の閉環 (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相当量の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 端側へも極めて閉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やや副反応を起こす傾向は認められなかった。

上記の鎖状ペプチド 4-31 を以下常法通り環化、膜保護等の操作を経て [Gal⁶] ツベラクチナミレン 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 γ-アミノ基は、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 α-アミノ残基の β-炭素に γ-アミ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 γ-アミ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 γ-アミ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と比較してやや弱いことは、γ-

NMR spectra of [GuaAla⁶]-tuberactinamine N
(100 MHz)

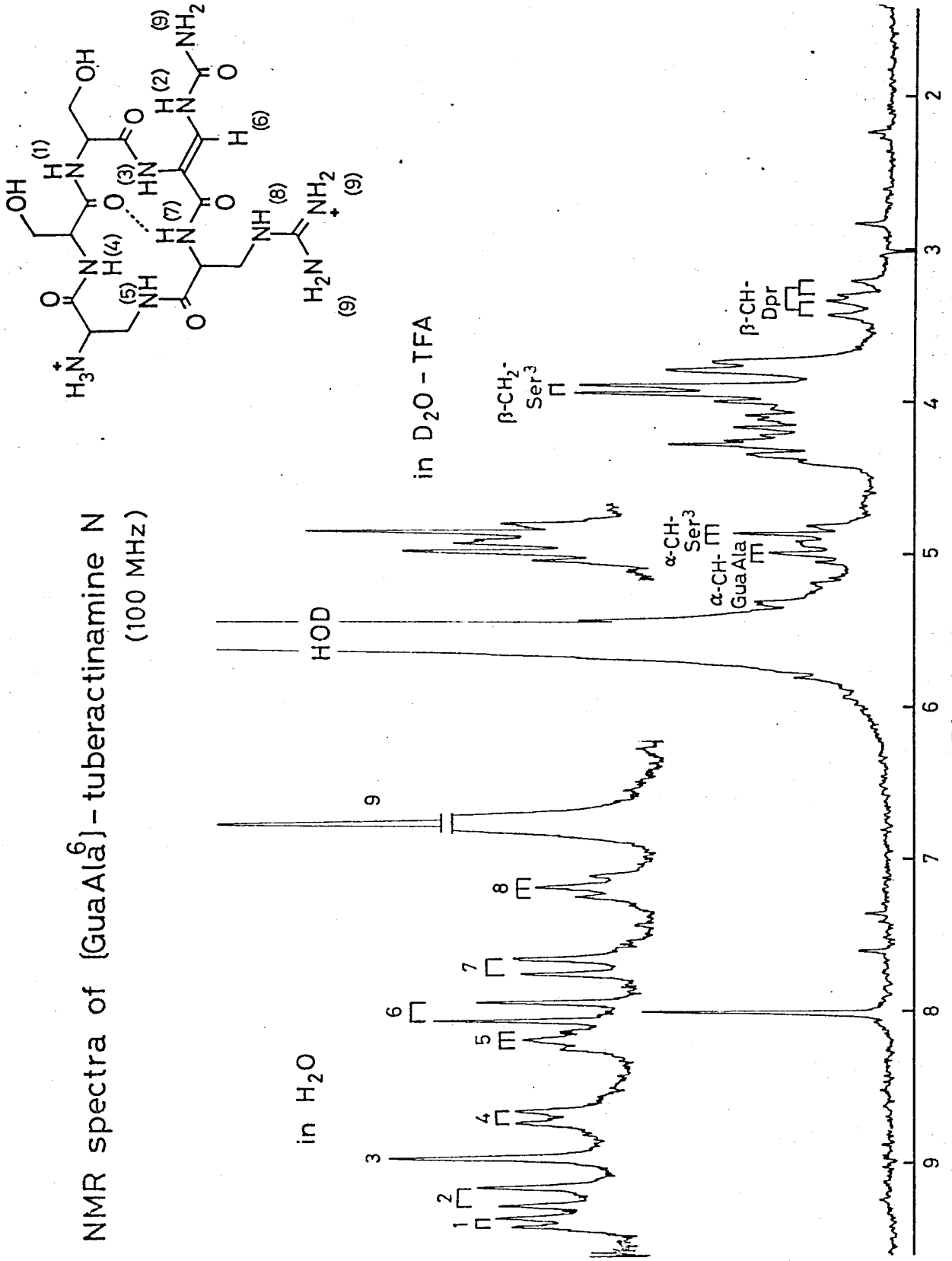


Fig. 4-10

NMR spectra of [Gal⁶]-tuberactinomycin O

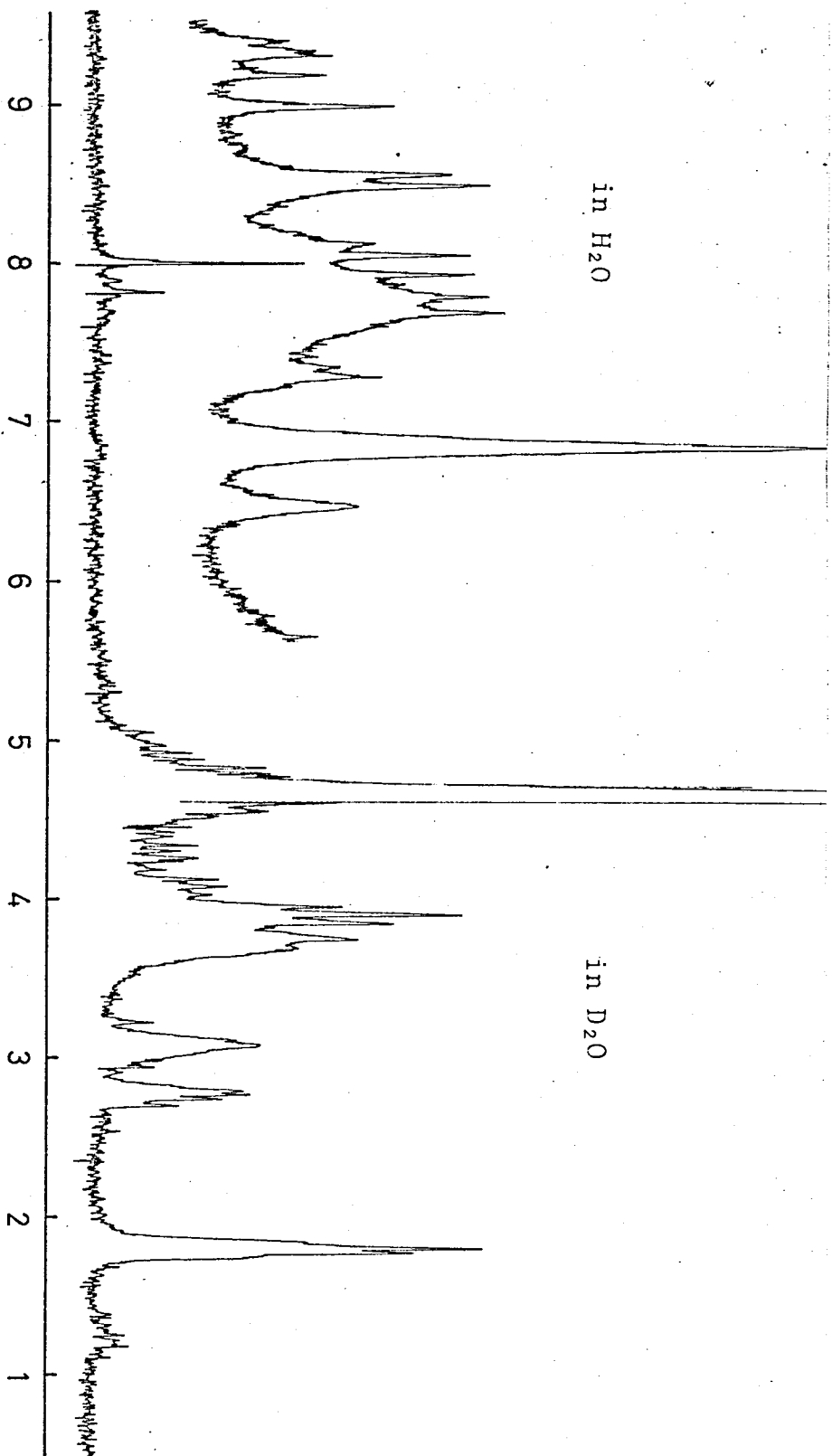


Fig. 4-11

Table 4-1. Minimum inhibitory concentrations (mcg/ml) of [Arg⁶]- and [Gal⁶]-tuberactinomycin O^a

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

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

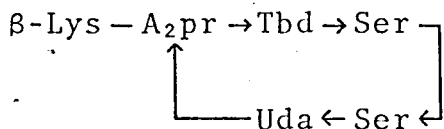
アミノ基が環状部分に存在することが、抗菌力を増大させる為には何らかの役割を果たしていることも推定される。ペプチド中でのアミノアミン残基とカプロオマイシン残基を比較した時、前者の側鎖部分がとり得るコンホメーションの自由度は比較的大きいのに対し、後者のそれはかなり限定されている。従ってアミノ基が環状構造に組み込まれ、ペプチド中で一定のコンホメーションをとることが抗菌力を増大させる上で大きい要因となることが考えられる。

以上のように本実験によって環状ペプチド骨格とアミノ基との間の空間的位置関係がカプロオマイシンの抗菌作用発現に最も重要であることが初めて認識されたのである。

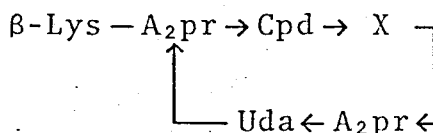
第5章 抗生物質カプレオマイシンの構造決定と全合成並びに
カプレオマイシン類似体の合成とその抗菌作用

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至、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

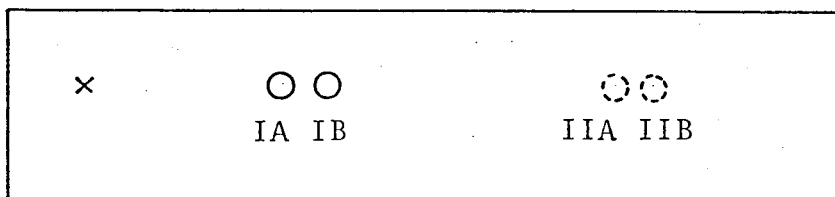
Cpd: capreomycidine

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、IIB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 ₂ pr	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.NH₄OH(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-IIIB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に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(NH₄ form) column
(2.5x70cm)
AcONH₄ buffer(pH9.0)
Sample: 3.00mg

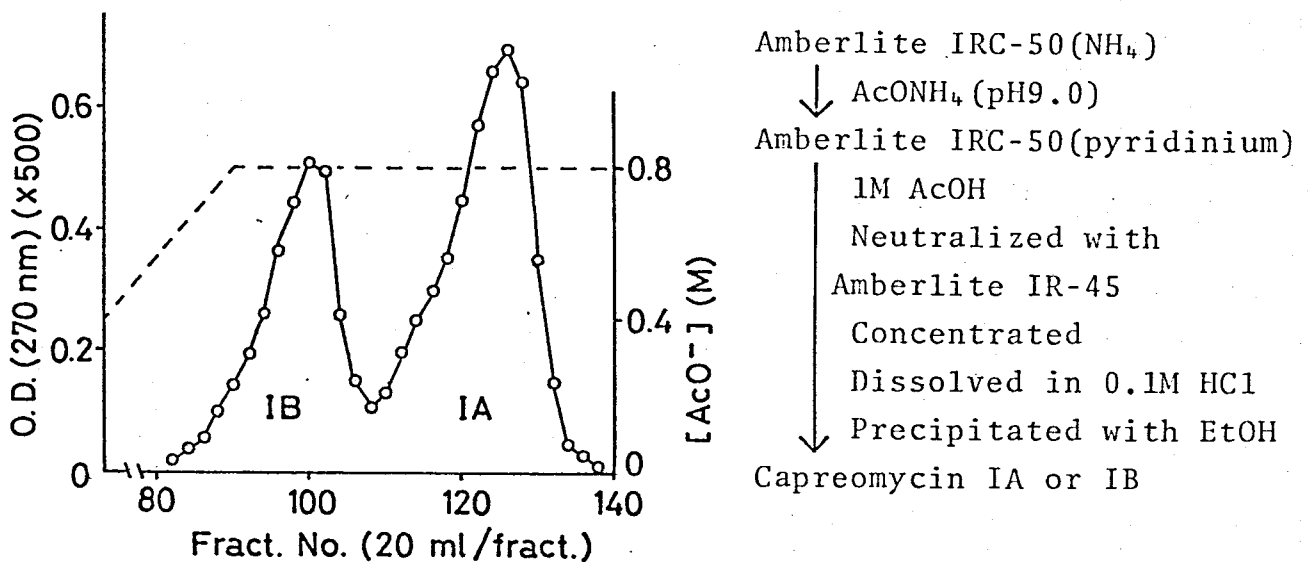


Fig.5-4

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 -ジアラ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°C, 20時間)した後、アミノ酸分析で決定した。 β -リジン¹⁾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 ₂ O)		-21.9°	-44.6°		
UV	0.1N HCl	269 (24,000)	268 (22,700)		
λ_{max}	H ₂ O	268 (23,900)	268 (22,300)		
(nm) (ϵ)	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 ₂ pr(2) Cpd(1), Uda(1) β -Lys(1)		Ala(1), A ₂ pr(2) Cpd(1), Uda(1) β -Lys(1)	

a) TLC (Silica gel, phenol-water-c.NH₄OH, 30:10:1)

b) Calcd. for C₂₃H₄₈N₁₄O₈Cl₄ · $\frac{1}{2}$ EtOH (IA) and
C₂₅H₄₈N₁₄O₇Cl₄ · $\frac{1}{2}$ EtOH · $\frac{1}{2}$ H₂O (IB).

Presence of ethanol in the sample was shown in NMR spectrum.

c) Abbreviations; A₂pr: α, β -diaminopropionic acid, Cpd: capreomycidine, Uda: β -ureidodehydroalanine, β -Lys: β -lysine.

析はアンモニアのピークと重なる為、後述する様に、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 -ウレイドテヒドロアラニン 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。

次に若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を行った。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。塩酸を蒸出した場合、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

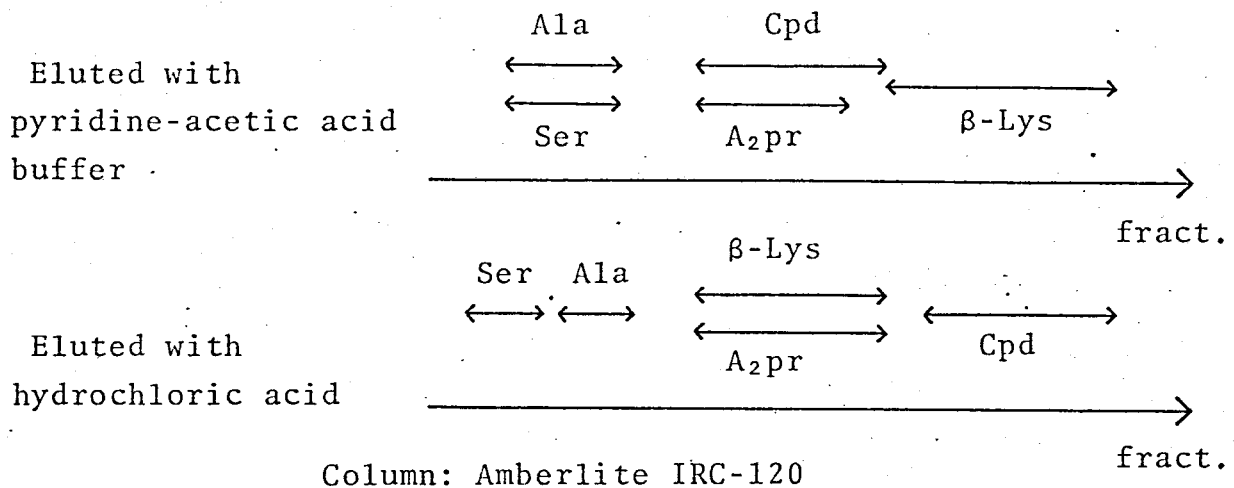


Fig.5-5

酢酸緩衝液による溶出ではセリンとアラニン、カプロオキシジンと 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を併用することにより、カプロオキシジ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にこ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を合成標品をその熱によるラセミ化の過程を追跡した(Fig.5-6)。

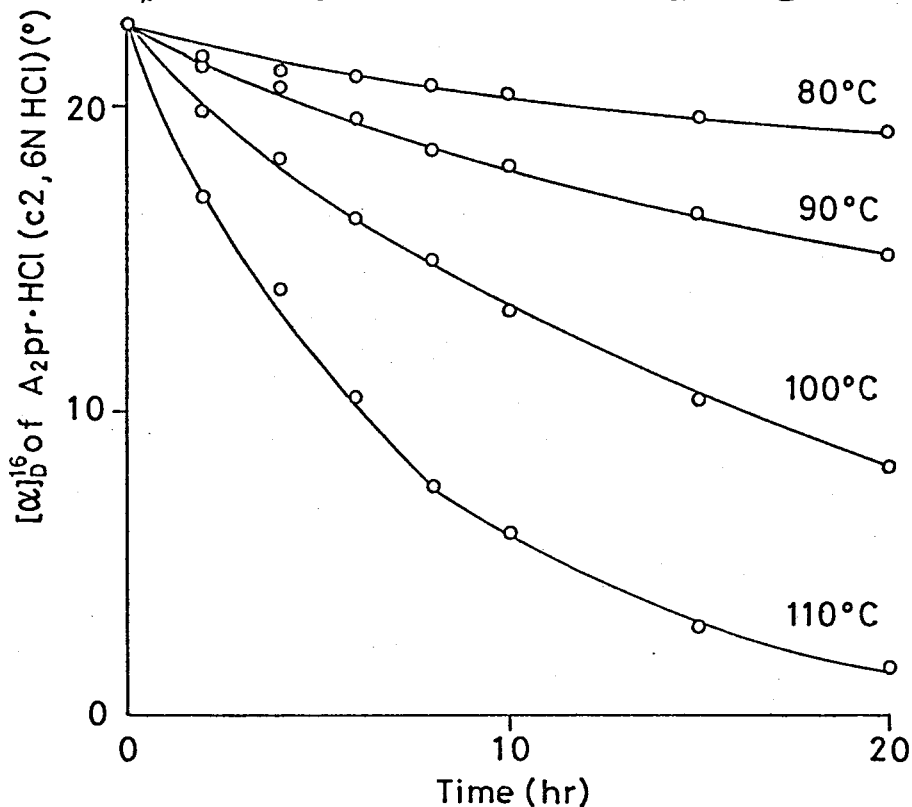


Fig.5-6

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ロ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 ₂ pr ^{b)}	Cpd ^{b)}	β -Lys ^{c)}
[α] _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 カプロオマイシンの環状ペプチド部の構造

カプロオマイシンのD₂O中でのNMRスペクトルをFig.5-7に、H₂O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³⁾はツバラクテリマイシンの詳細な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とカプロオマイシジン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し、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、天然ツバラクテリ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。カプロオマイシンはツバラクテリマイシンとアミノ酸組成が類似しているので、カプロオマイシンの全構成アミノ酸の α -CH及び α -NHがツバラクテリマイシンの対応するプロトンシフトに類似するかどうかをまず検討した。その結果、カプロ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ロオマイシジン残基及びIAのセリンとIBのマラニン残基における α -CHシグナルの化学シフトが、ツバラクテリ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。さらにカプロ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

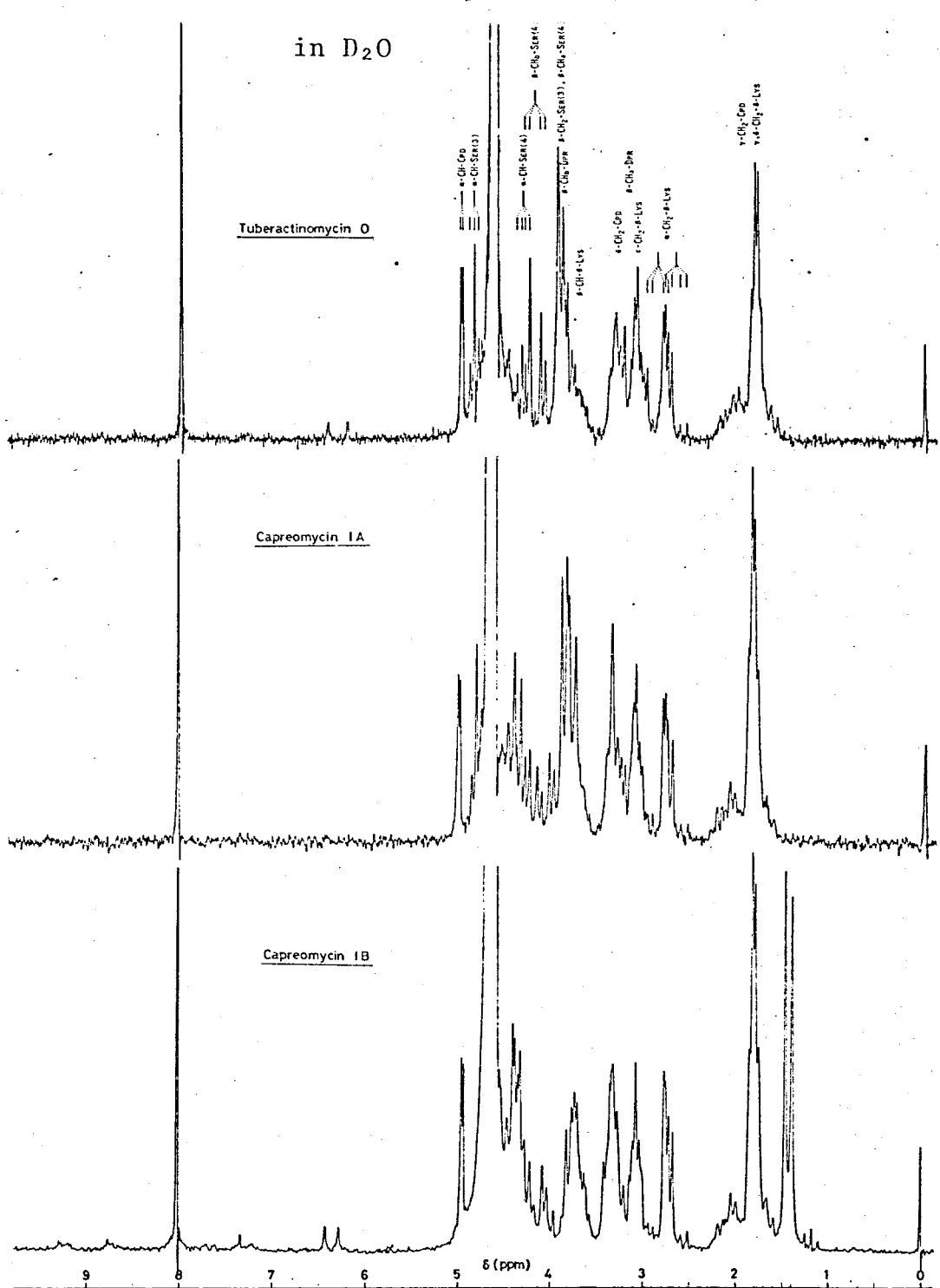


Fig. 5-7

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、少なくともカプレオマイシンの環状ペプチド部に關しては、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
 のアミノ酸配列から成る環状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。

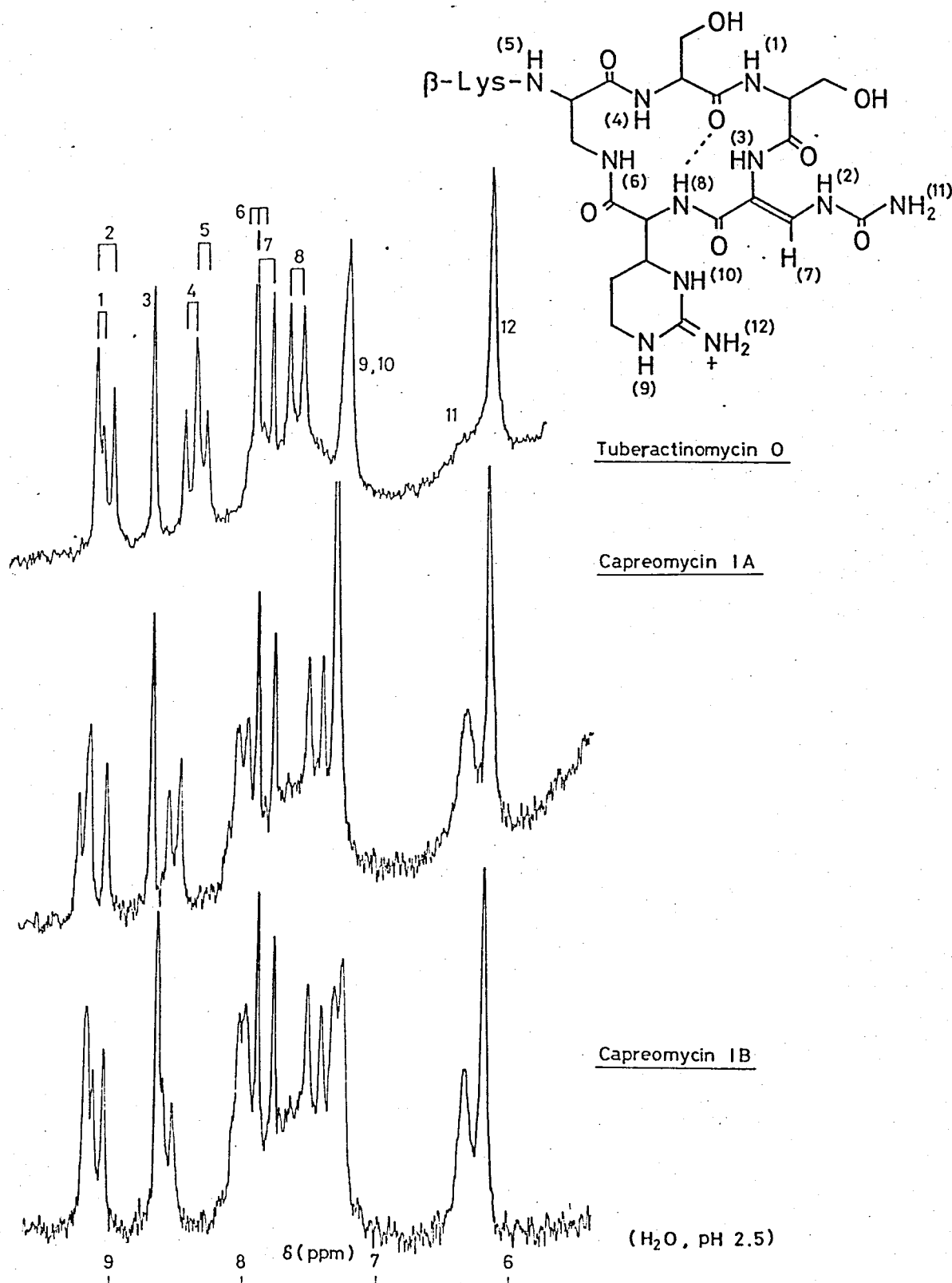


Fig.5-8

これまでの議論及び以下に述べる理由によって、Fig.5-10に示したカプロ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、ツバテクトリマイシンの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

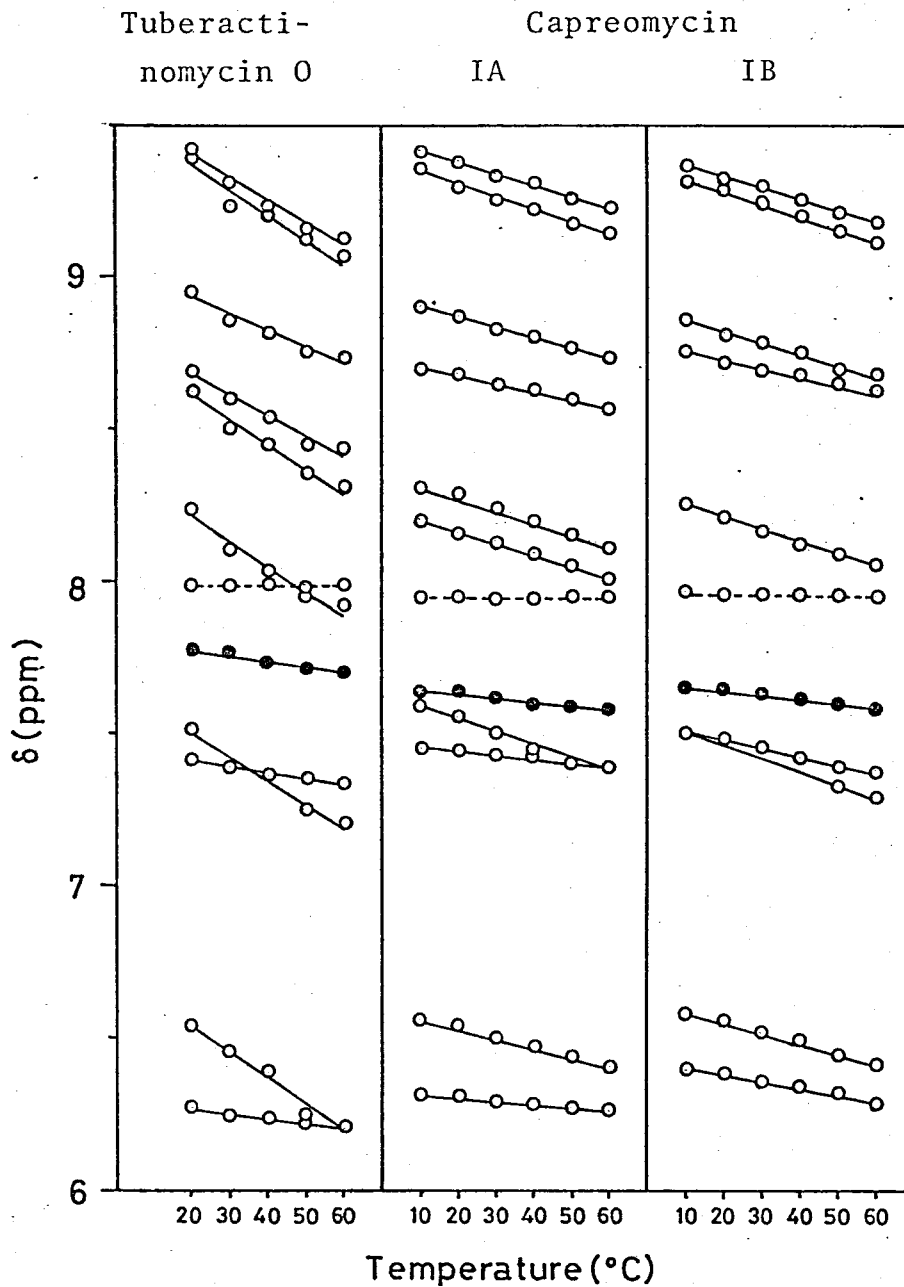
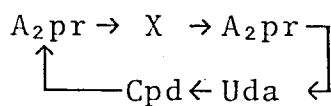


Fig. 5-9

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のそれより後磁場シフトしている。
- (2) セリン³の β -CH₂ 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)	9.28(d) 4.18(dd)
Tua N	4.84(t)	3.95(d)	8.70(d)	4.32(dd)	3.90(dd)	9.37(d) 4.20(dd)
[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)	9.31(d) 4.20(m)
[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-	3.7-	9.32(d)
				4.5(m)	4.3(m)	
Cpm IB	4.58(q)		8.71(d)	4.2-	3.7-	9.27(d)
				4.5(m)	4.2(m)	

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

b) In D₂O-TFA(4:1).

c) In H₂O(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3、4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 -CH₂はツベラクチノマイシンのセリン³と同位パターン(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 -CH₂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と同様に磁氣的に非等価な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、結局カプロオマイシン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。カプロオマイシンのオレフィンプロトンはほぼ δ 8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。従ってカプロオマイシンの 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 — カプロ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り環状ペプチド部の 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、カプロオマイシン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、カプロ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、²⁰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カプロオマイシンIA及びIBのいずれの水解物中にも β -DNP体を認めず、代わりに α -DNP- α , β -ジアミノプロピオン酸と浮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。従ってカプロ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呈し、 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

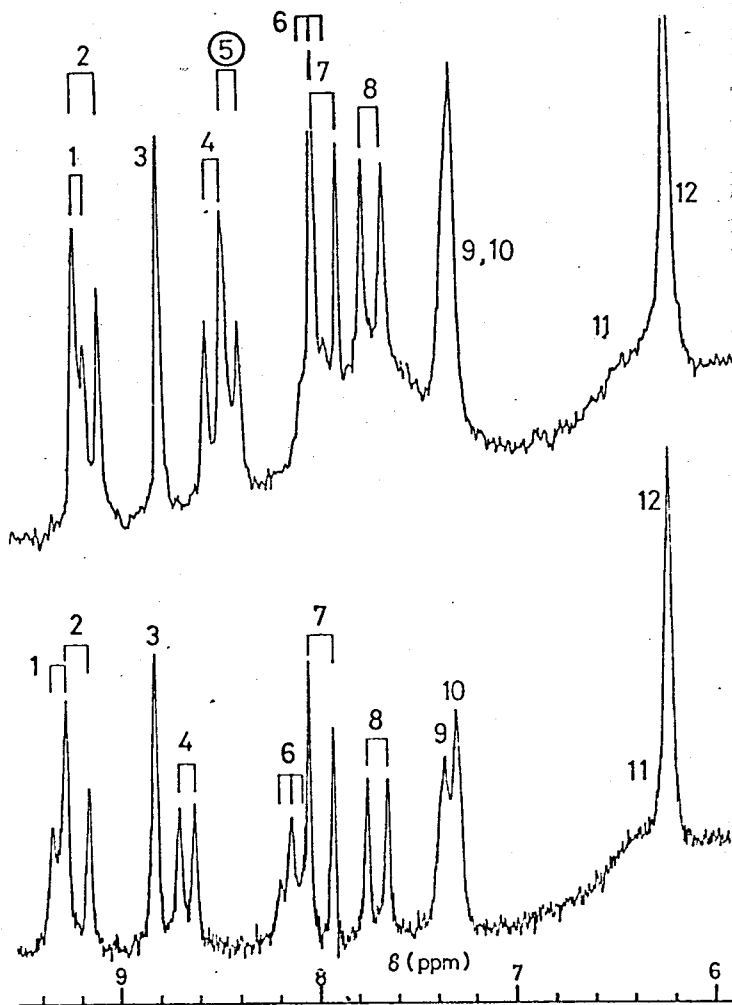
	Amino acid analysis ^{a)} (Retention time, min)	
	Capreomycin IA	Capreomycin IB
Hydrolyzate of DNP-capreomycin	29.0(N ^α -DNP-A ₂ pr)	29.0(N ^α -DNP-A ₂ pr)
	31.5(NH ₃)	31.5(NH ₃)
	41.5(A ₂ pr)	41.5(A ₂ pr)
	57.0(Cpd)	57.0(Cpd)
N ^α -DNP-A ₂ pr	29.0	
N ^β -DNP-A ₂ pr	35.0	
	Paper electrophoresis ^{b)} (Migration distance toward cathode, cm)	
	Capreomycin IA	Capreomycin IB
Hydrolyzate of DNP-capreomycin	9.3(N ^α -DNP-A ₂ pr)	9.3(N ^α -DNP-A ₂ pr)
	12.2(Ser)	13.5(Ala)
	14.3(Cpd)	14.3(Cpd)
	15.5(A ₂ pr)	15.5(A ₂ pr)
N ^α -DNP-A ₂ pr	9.3	
N ^β -DNP-A ₂ pr	8.5	

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

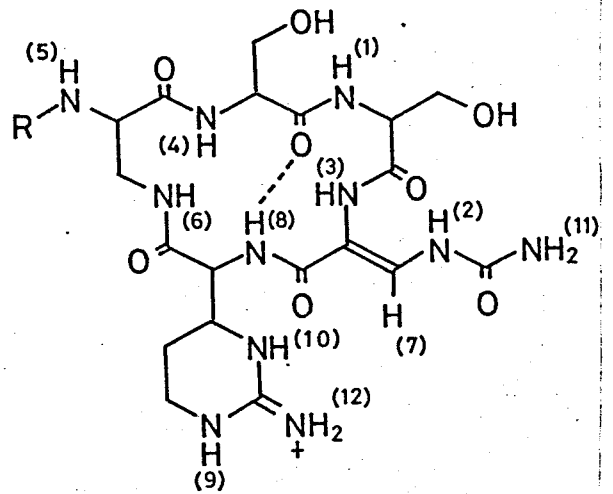
b) A buffer of formic acid-acetic acid-water(50:150:800) was used at 0.80 mA/cm for 130 min.

88.5に現われるが、分枝部β-リジンヒスチジンツペラクテオニンNのα,β-ジアミロプロピオン酸²のα-NH₂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-ジアミロプロピオン酸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H₂O中でのスペクトルにおいて、88.2のdoublet様のシグナルは前述の温度変化の実験の際には実は2組のtripletであることをわかった(Fig.5-12)。このうち片方はα,β-ジアミロプロピオン酸²のβ-アミドであるが、他方のシグナルはtripletであることはわかった。



Tuberactinomycin O
(R=β-Lys)



Tuberactinamine N
(R=H)

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) ツベラクチン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、この 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ン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ンマイシンの 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

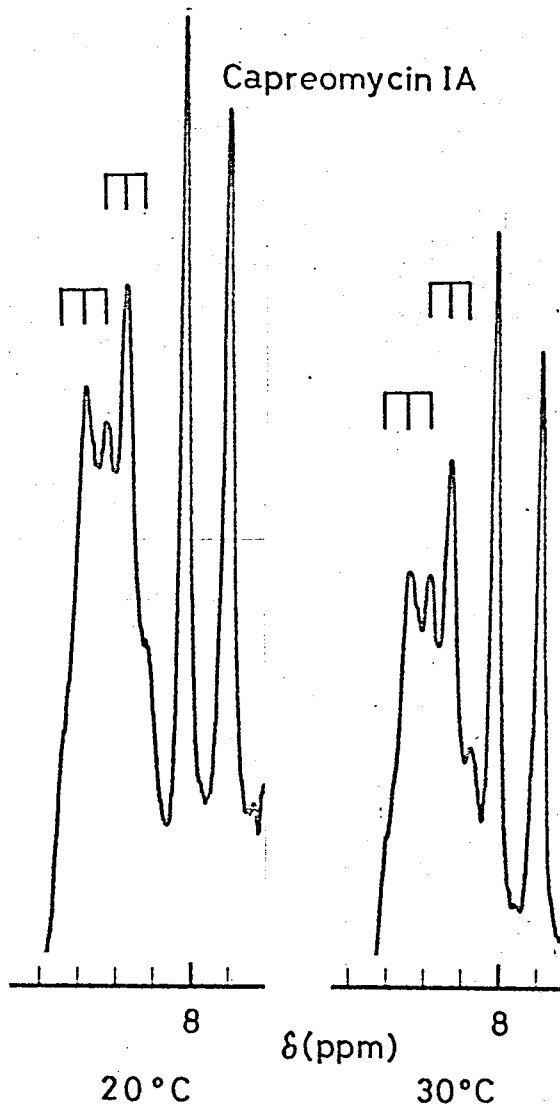


Fig.5-12

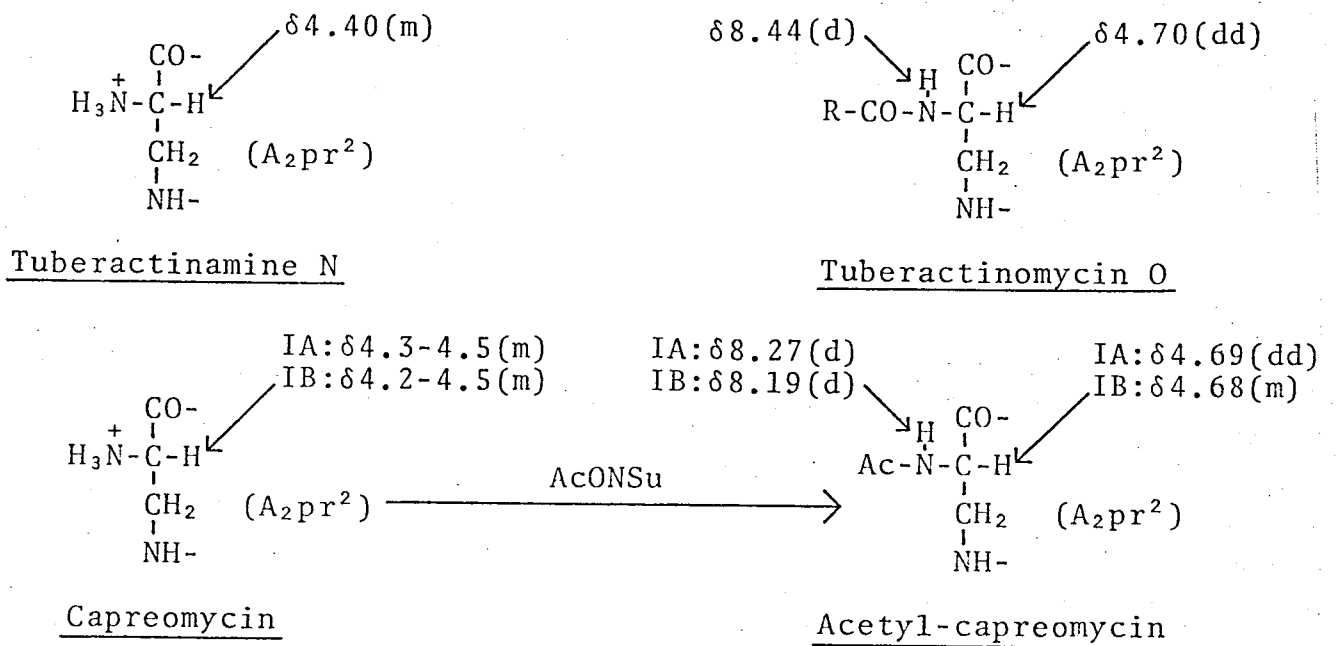


Fig.5-13

が遊離であることを支持する。

- (4) カプロオマイシン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。なせならばもし 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は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をさらに支持された。

以上の結果をまとめて最終的にカプロ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。

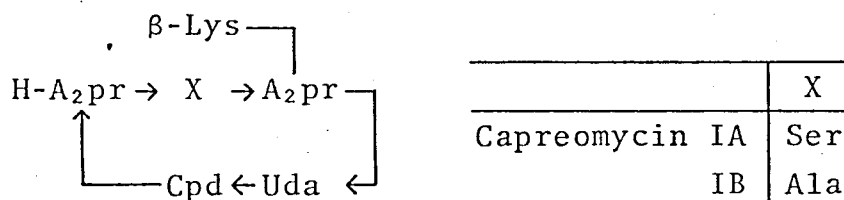


Fig.5-14

5-2 カプロオマイシンIA及びIBの全合成

著者はここに新たに提出したカプロオマイシンの推定式をより確定する為カプロオマイシンIA及びIBの全合成を行なった。ツベラクテリマイシン群ペプチドのうち既にツベラクテリマイシンの全合成が葦研究室において完成している。カプロオマイシンがツベラクテリ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、こ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、カプロオマイシンの合成経路の確立は、カプロ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 保護環状ペプチド部分の合成

カプロオマイシンの保護環状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 はツベラクチンマイシン

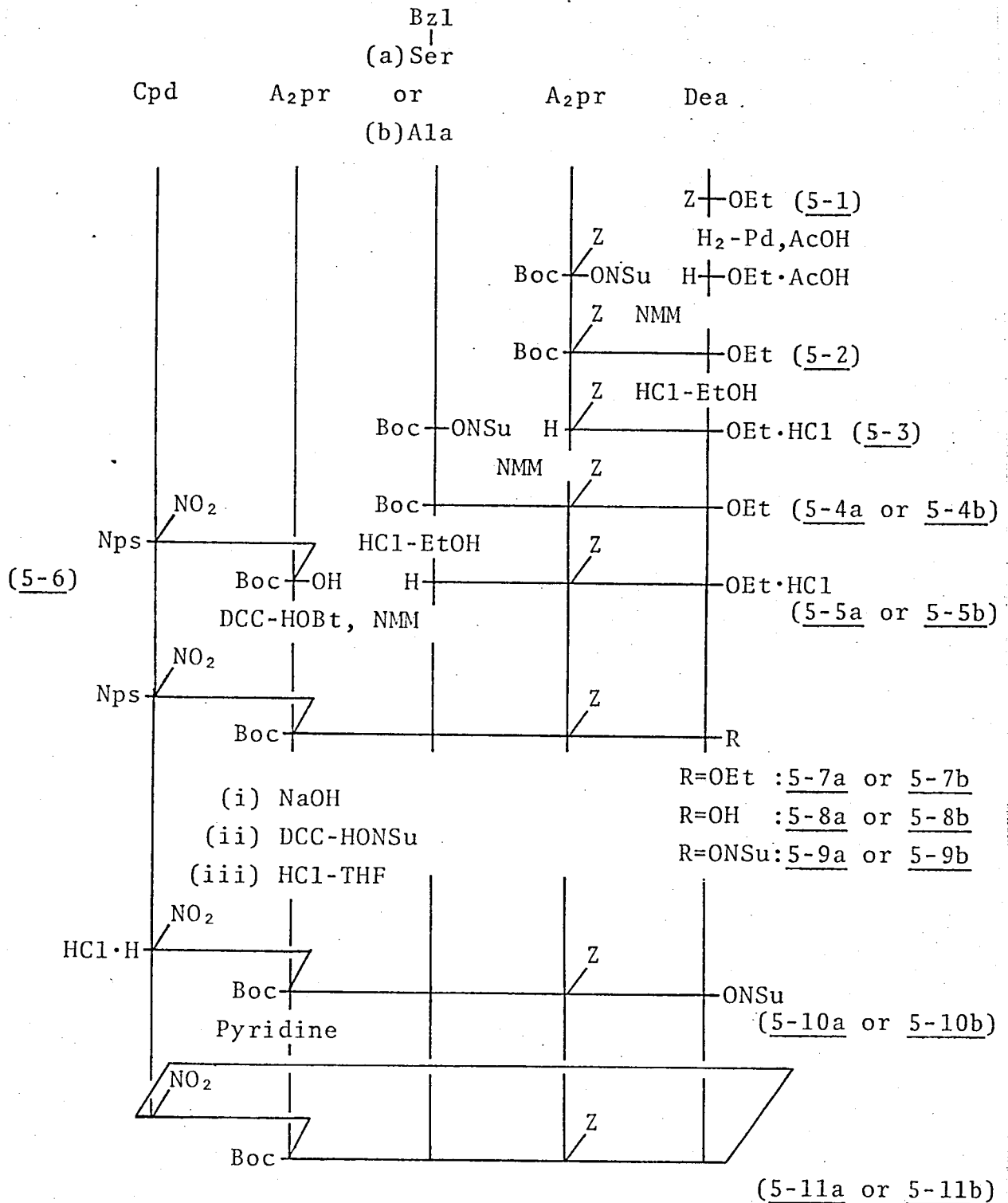


Fig.5-15

0等の全合成中間体に使っ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 -ジマミノプロピオン酸の β -マ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 -マミノ基の保護基としては、ツベラクチン/マイン合成の場合と異なり、カプ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。次にそのカプ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カプ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)。このようにして脱カプ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つの脱カプ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、カプ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 のカプトキシカルボニル基を同じの方法で切断し、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

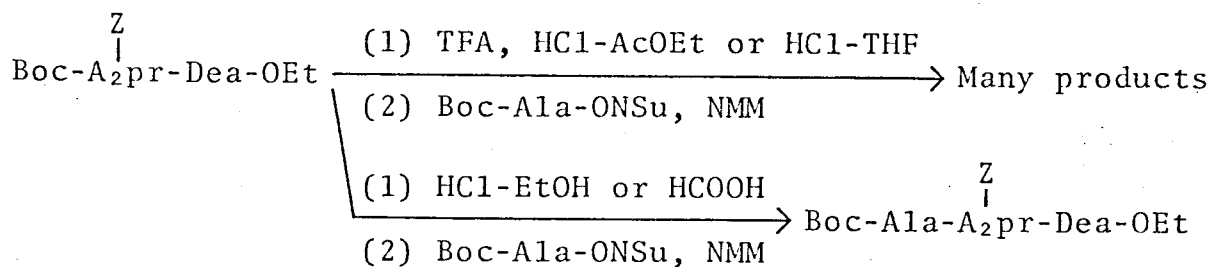


Fig. 5-16

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オニトロフェニルスルフェニル化においても、ジエトキシマ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ギ酸を使用すると、それぞれエステル交換又はア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で脱オニトロフェニルスルフェニル化して、副反応をひきまわり防いだ。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させた。反応後、ピリジンも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を得ることができた。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

ツベラクテリマイシン類の全合成においてはツベラクテリナミンNを調整した後、 β -リジンが導入されたが、カプロオマイシンの場合はツベラクテリナミンNに相当する環状部(カプロオマイシンIIA、IIB)は分子中に2個の遊離アミノ基を有するので、同じ経路でカプロオマイシン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ロ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

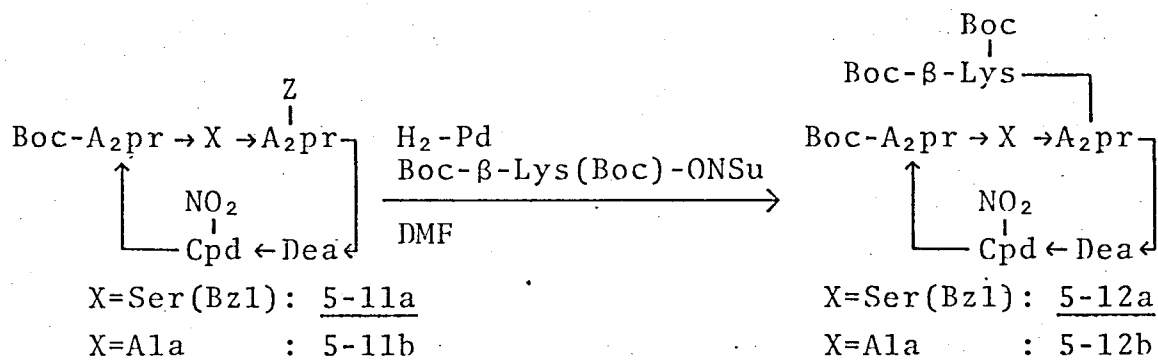
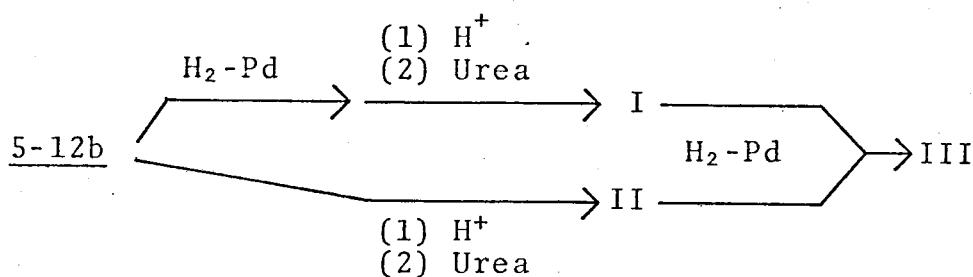


Fig. 5-17

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β-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.NH₄OH, 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ロオマイシンを与えら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ロオマイシン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 を還元せず脱ア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^{ϵ} -ニトロカプロオマイシン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^{ϵ} -ニトロカプロ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、合成カプロ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、カプロ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個のア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 をまず酸処理してア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づく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、この場合は副生成物を生ずることなく、目的物 5-13b へ導くことに成功した。 β -キサペポテド 5-12a から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。

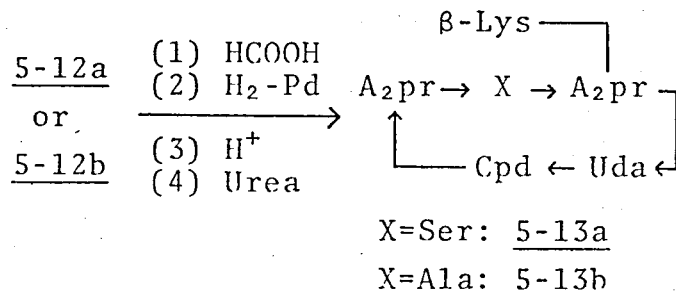


Fig. 5-19

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 ₂ O)	-22.0°	-21.9°	-42.5°	-44.6°	
UV	0.1N HCl	269 (23,400)	269 (24,000)	268 (22,000)	268 (22,700)
(nm)	H ₂ O	268 (23,200)	268 (23,900)	268 (21,900)	268 (22,300)
(ε)	0.1N NaOH	288 (15,800)	287 (15,900)	290 (13,100)	290 (14,400)

a) TLC (Silica gel, phenol-water-c.NH₄OH, 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
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	100	50	100	100
<i>S. epidermidis</i> sp-al-1	50	50	100	50
<i>St. pyogenes</i> N.Y.5	100	100	100	100
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	100	100	100	100
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	100	100	100	100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>E. coli</i> B	50	50	100	100
<i>S. typhosa</i> H 901	25	25	50	50
<i>S. paratyphi</i> PA 41-N-22	100	100	100	100
<i>S. enteritidis</i> Gaertner	100	50	100	100
<i>Sh. sonnei</i> E33	50	50	100	50
<i>Mycobacterium</i> 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互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ツバラクテリ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も考える上からも興味ある事象である。後者に関

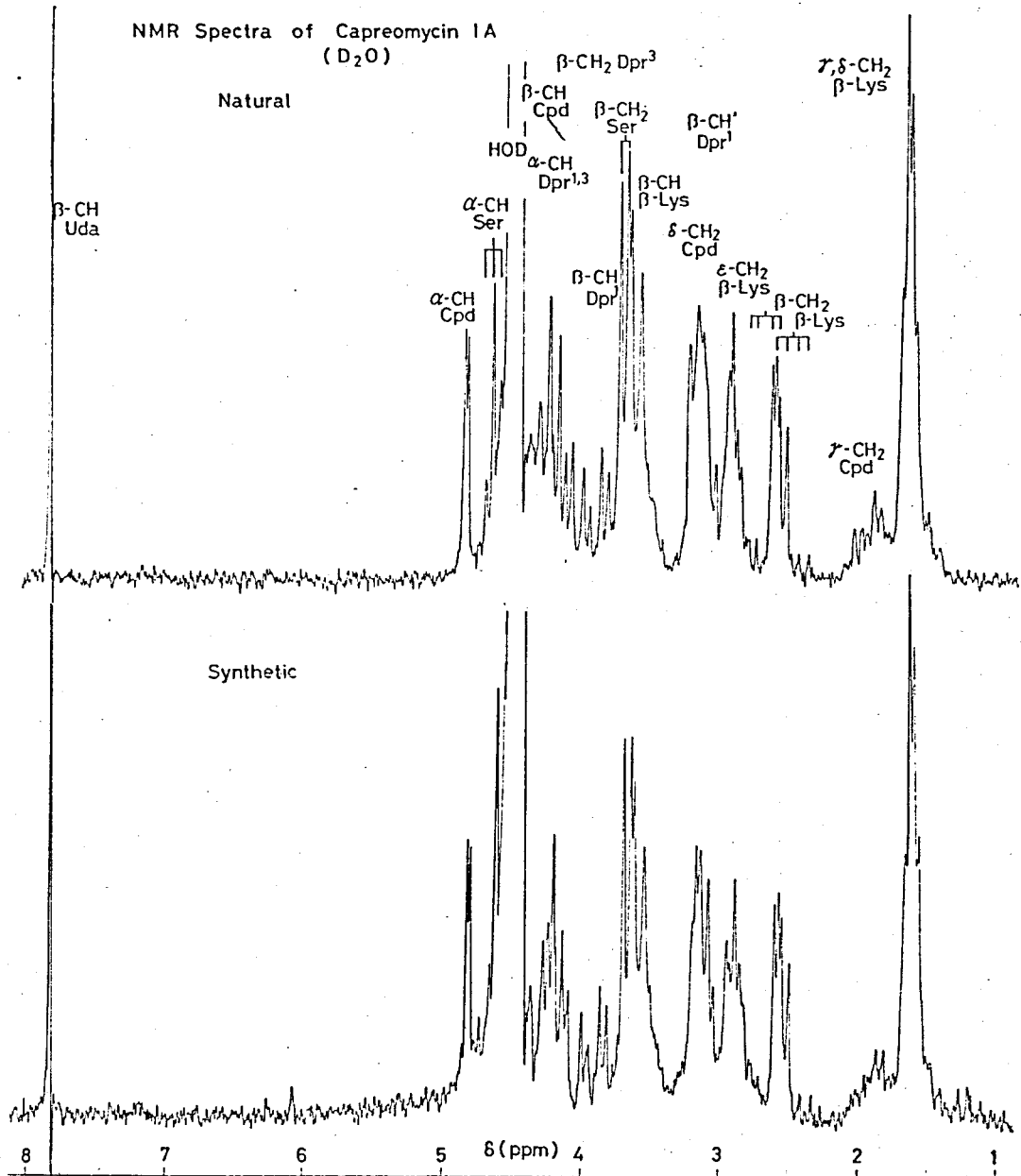


Fig. 5-20

その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。

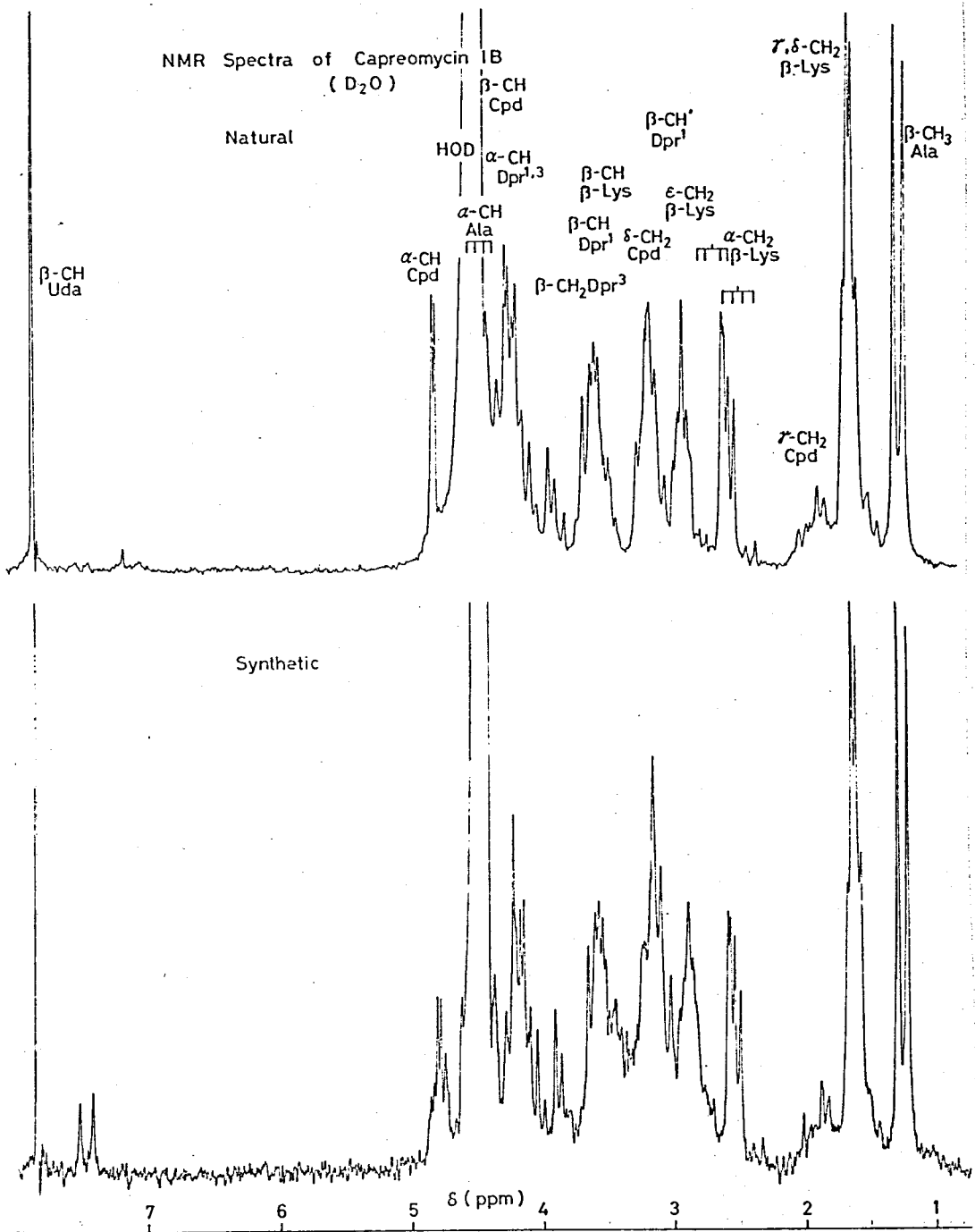


Fig. 5-21

NMR Spectra of Capreomycin 1A
(H₂O, pH 2.5)

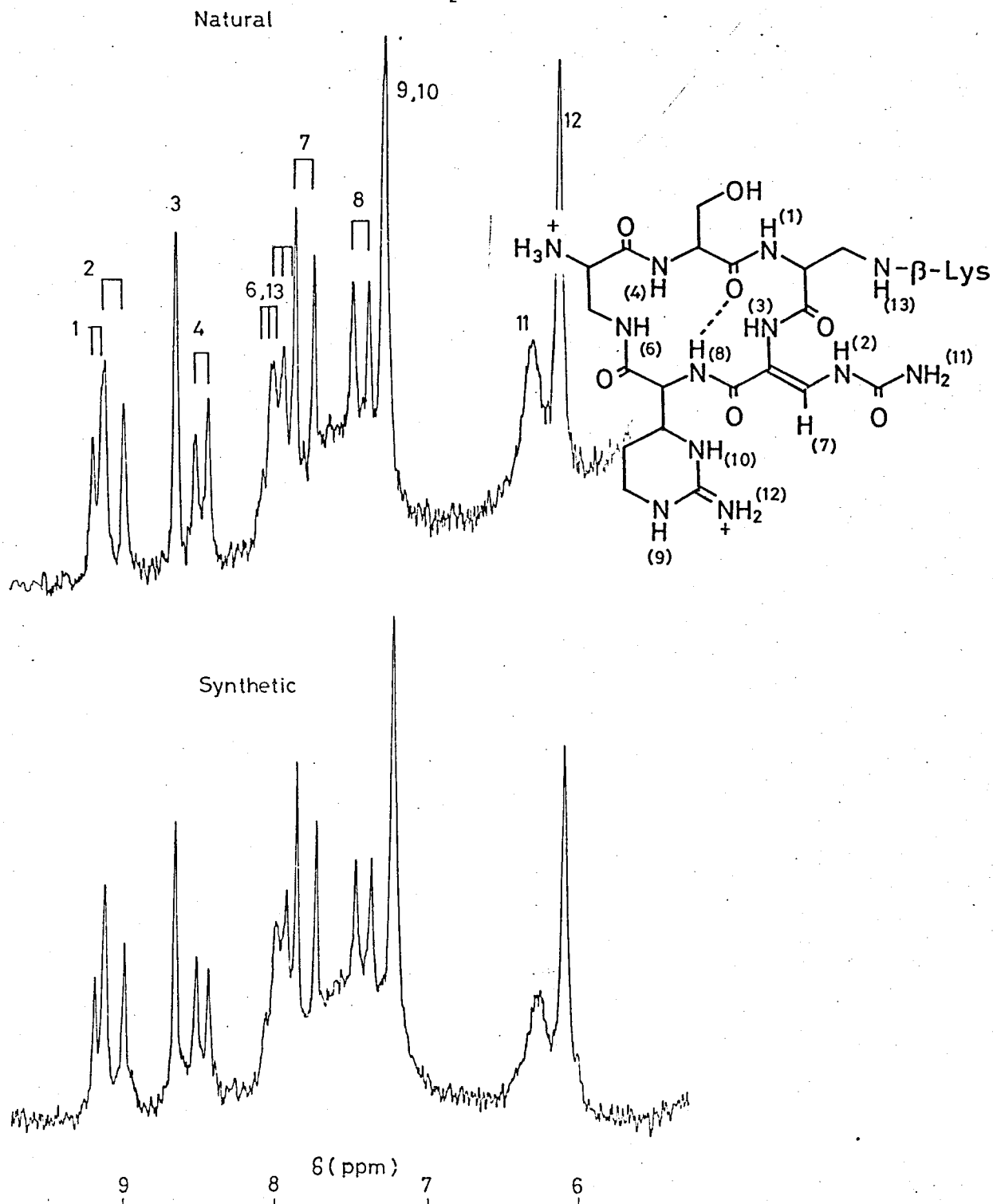


Fig.5-22

NMR Spectra of Capreomycin 1B
(H₂O, pH 2.5)

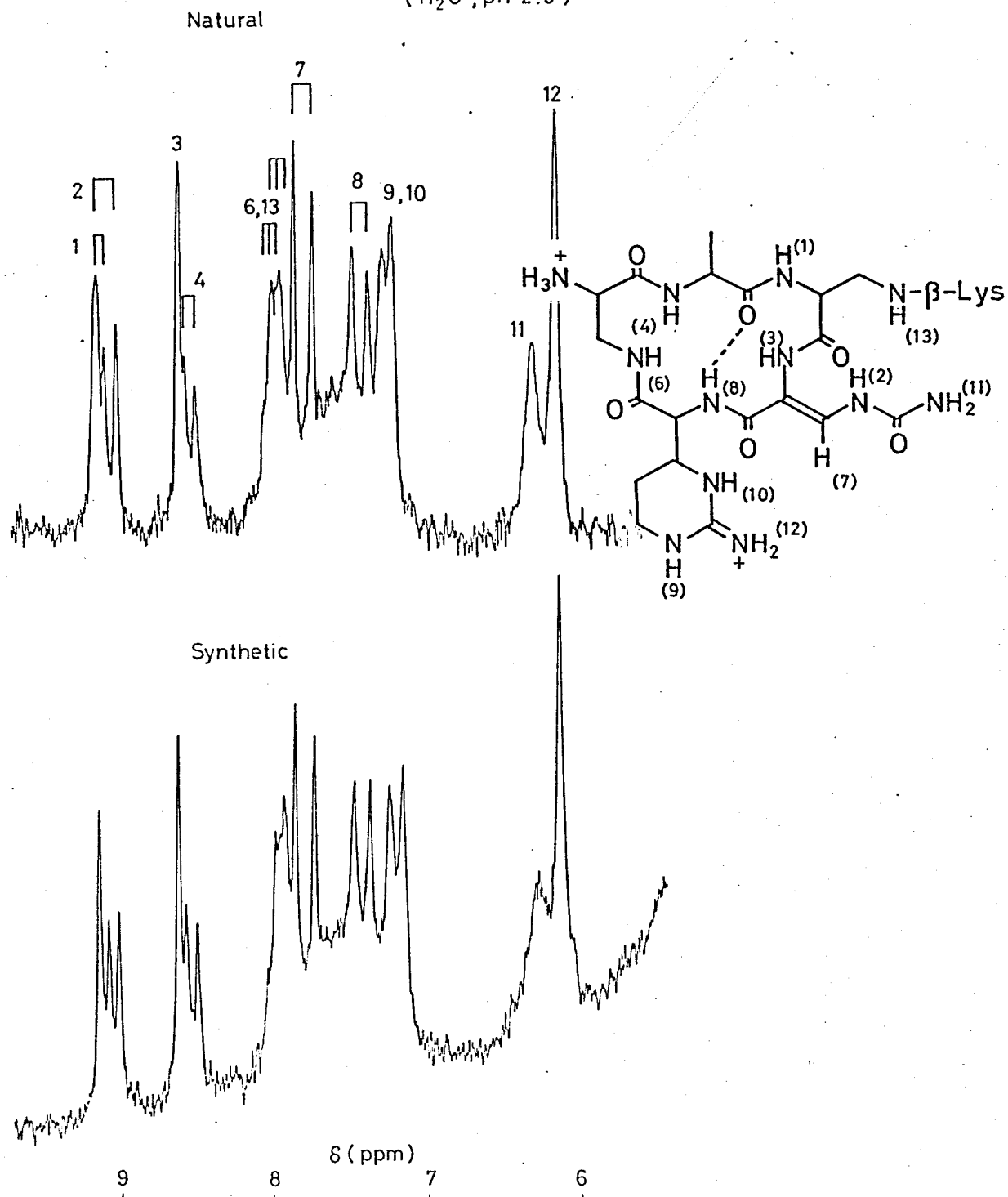


Fig. 5-23

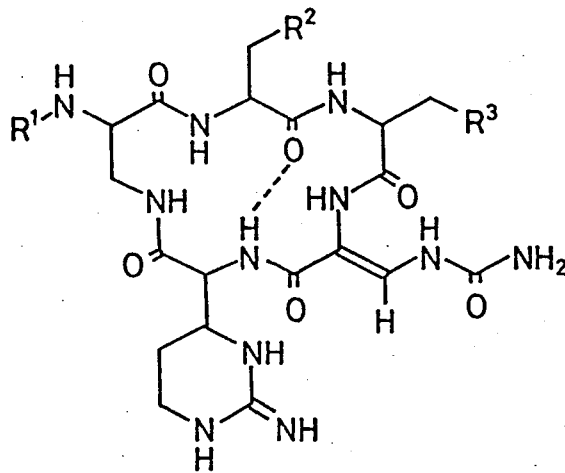
5-3 カプロオマイシンの構造類似体の合成

カプロオマイシンとツベラクテ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) ツベラクテノマイシンの第4番目のセリン残基がカプロオマイシンでは α,β -ジアミノプロピオン酸に置き換わっている。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種のカプロオマイシン類似体を合成した。³³⁾

カプロオマイシンIIA(5-14a)、IIB(5-14b)はカプロ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、ツベラクテ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テノアミンNは元のツベラクテノマイシンより明らかに低い抗菌力を示すのに対し、カプロオマイシン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
[Orn ⁴]-capreomycin IIB (5-16b)	H	H	CH ₂ CH ₂ -NH ₂
Di- β -Lys-capreomycin IIB (5-17)	β -Lys	H	β -Lys-NH
Tuberactinamine N	H	OH	OH

Fig. 5-24

II B はカプロオマイシンIA、IBやツベラクテ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⁾ ツベラクテナミンNとカプロオマイシンIIAと比較すると、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のみ両者は異なっている。カプロオマイシンII B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もツベラクテナミン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、カプロオマイシンIIA、II B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持っていると推論できる。この仮説を確認する為に、カプロオマイシンIIA、II Bを合成しその生理活性をツベラクテナミン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テノマイシン形のフォソイドカプロオマイシン(5-15)の合成を行ない、その活性をツベラクテノマイシン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ベースカプロオマイシンII B(5-16a)並びに第4残基の側鎖にナチレンを2個挿入した形の〔Orn⁴⁾-カプロオマイシンII B(5-16b)を合成して、それぞれの抗菌活性を調べ、カプロ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究した。

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、天然ツベラクテノマイシン、カプロオマイシンIA、IB、及びフォソイドカプロオマイシンII B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。即ちツベラクテナミン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、同じ現象がカプロオマイシンにも現われるならば、カプロオマイシンII B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-カプロオマイシンII B(5-17)を合成した。

5-3-1 カプロオマイシンIIA及びII Bの合成

この2種の化合物はカプロオマイシンIA及びII Bの全合成中間体である保護環状ペプチド 5-11a及び5-11bの脱保護次のウレイドデヒドロアラ

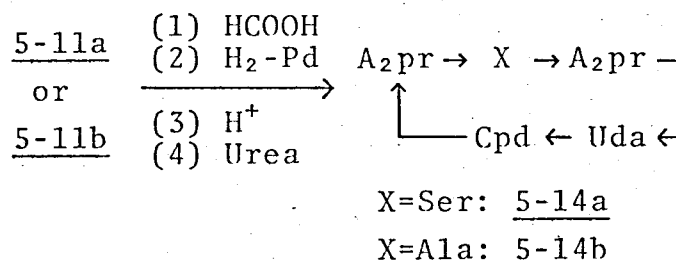


Fig.5-25

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 フォリドカプロオマイシン 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 α-アミノカルボニル基をギ酸で切断し、Boc-β-Lys(Boc)-ONSu と縮合した後、カプロオマイシン IB の場合と同様な操作でフォリドカプロオマイシン IB を導いた。この化合物は Fig.5-29 に示す NMR スペクトルを与えた。

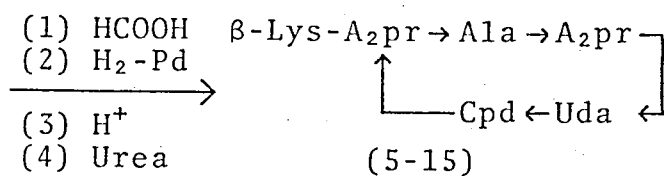
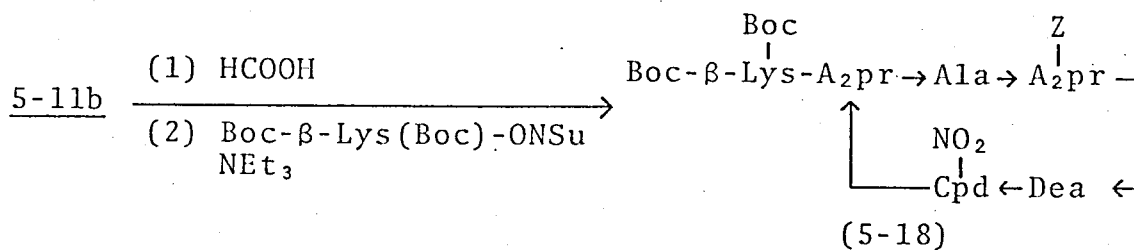


Fig.5-28

5-3-3 リボースカプロオマイシン IB 及び [Orn⁴]-カプロオマイシン IB 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。カプロオマイシン IB 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 ゼ-β-Lys-カプロオマイシン IB 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。

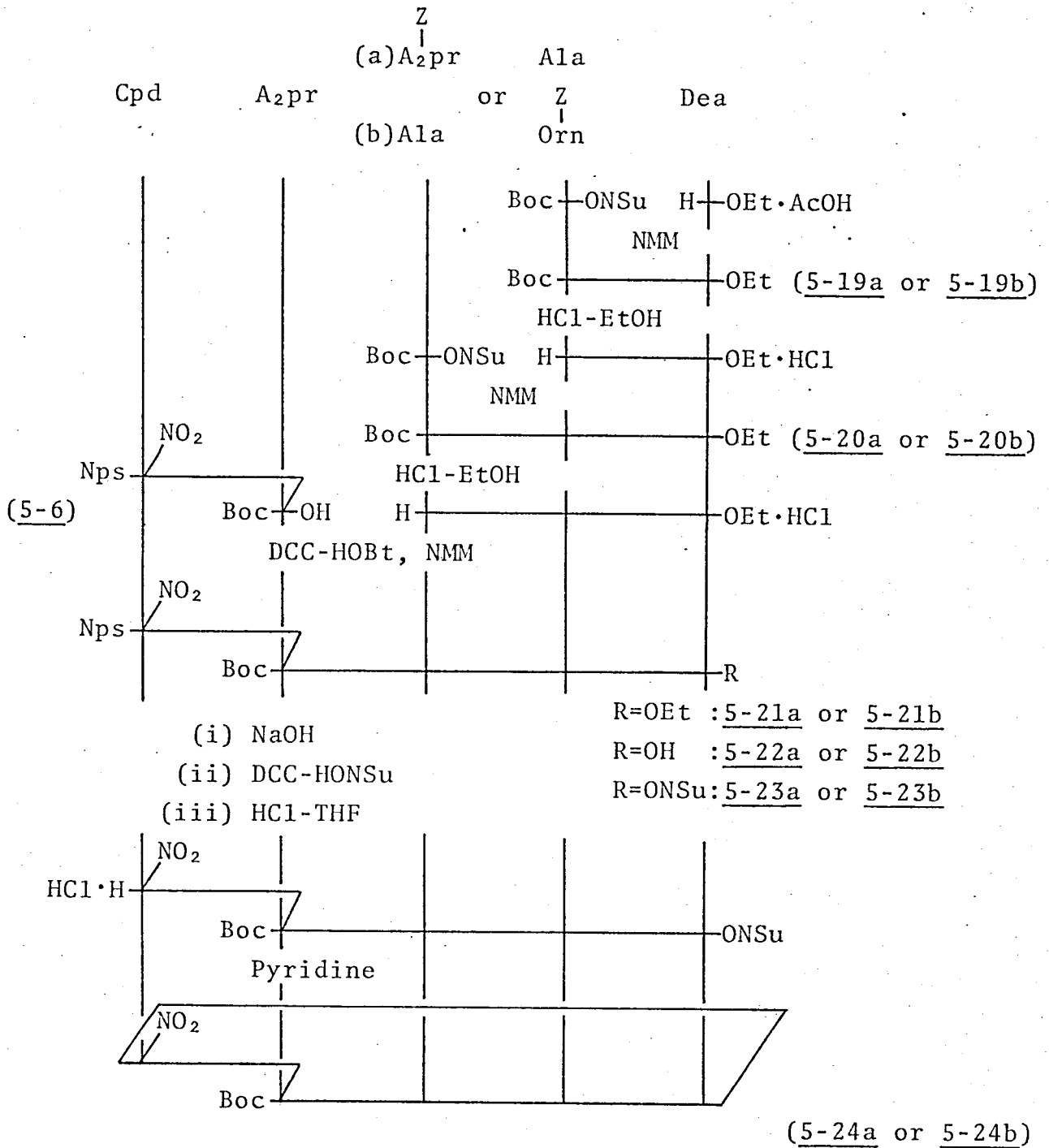


Fig. 5-30

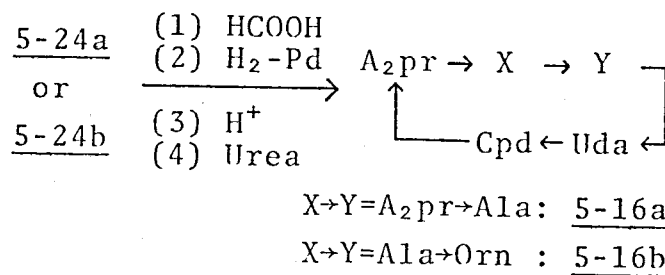


Fig. 5-31

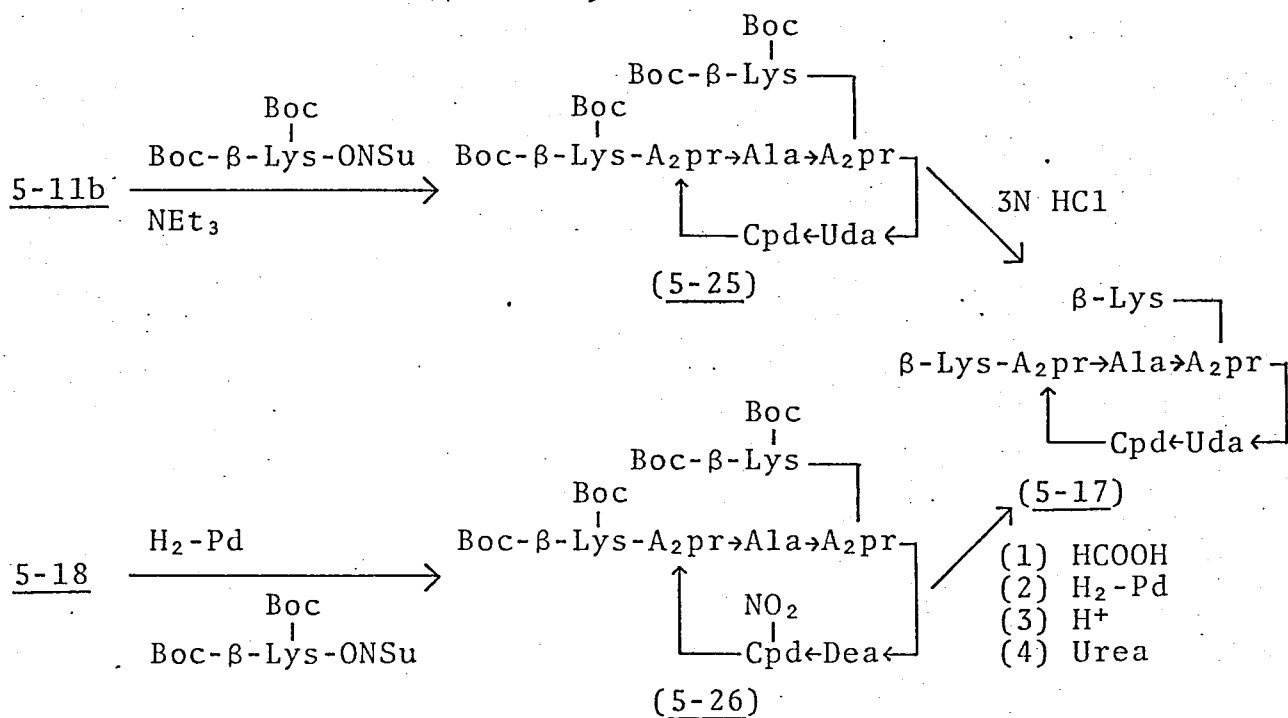


Fig.5-34

- (1) カフォレオマイシン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) フソイドカフォレオマイシンIBの合成中間体5-18とBoc- β -Lys(Boc)-ONSu存在下に接触還元して、保護ヘフタペプチド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

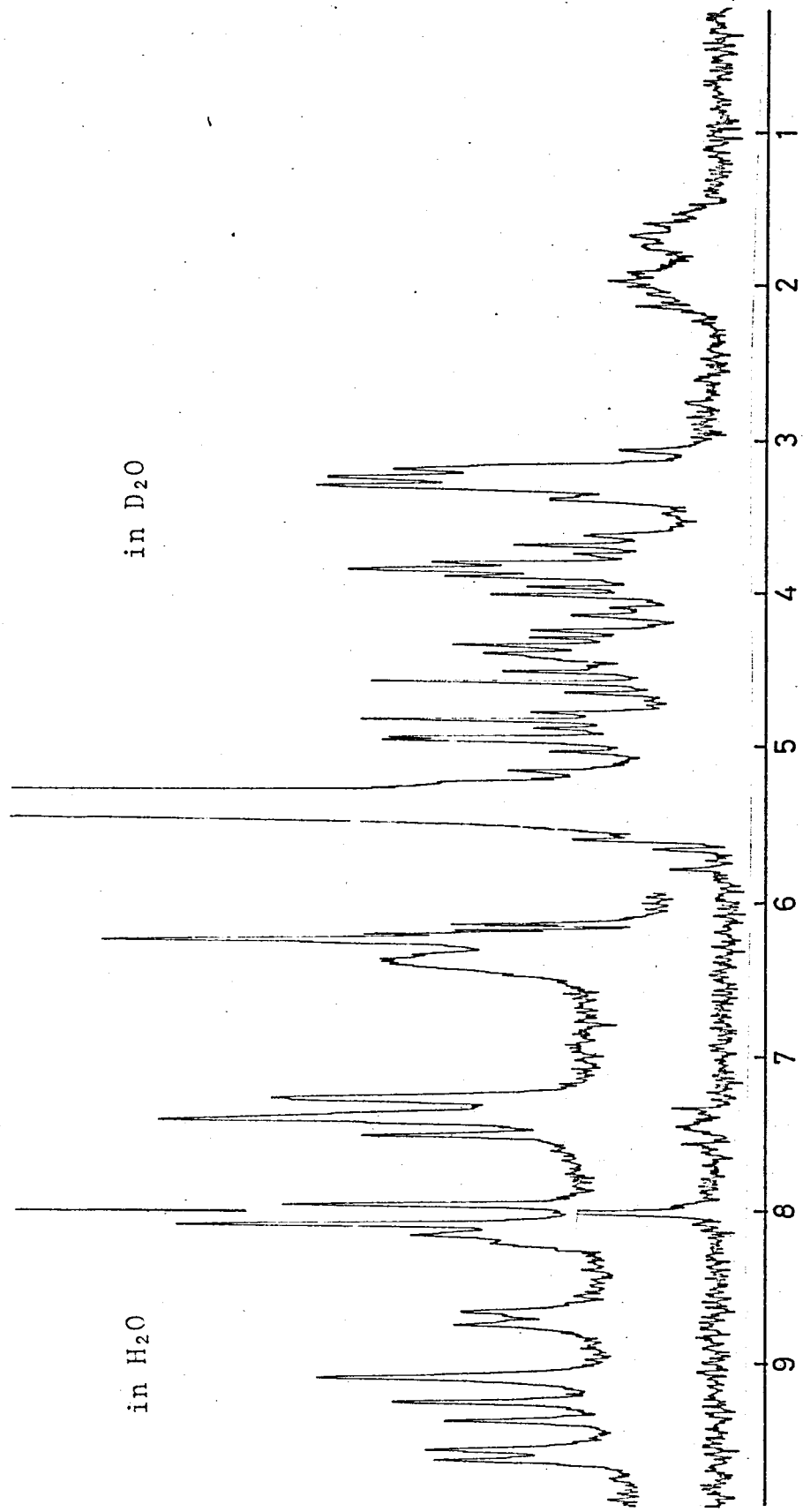


Fig. 5-26

NMR spectra of capreomycin IIB

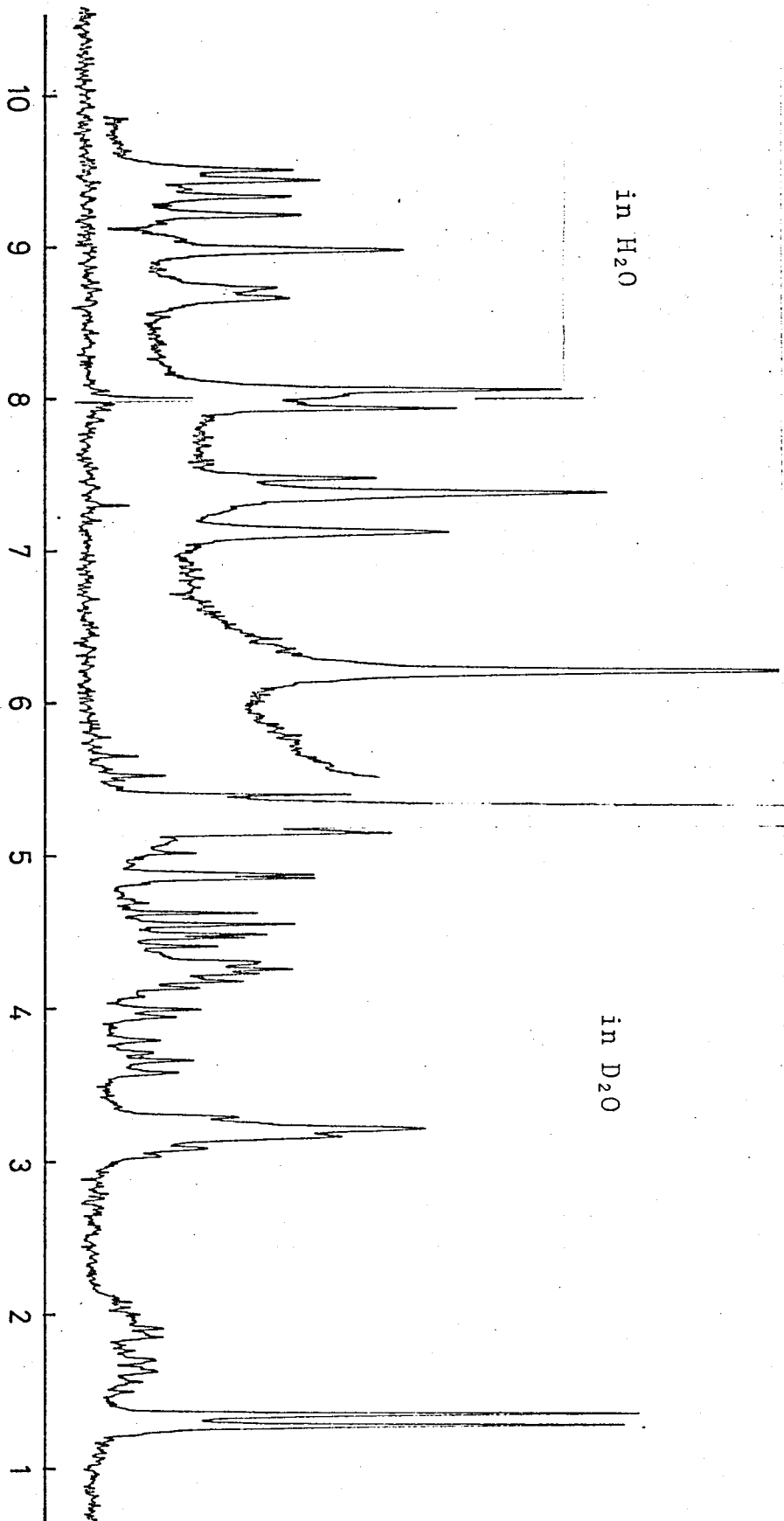


Fig. 5-27

NMR spectra of pseudocapreomycin IB

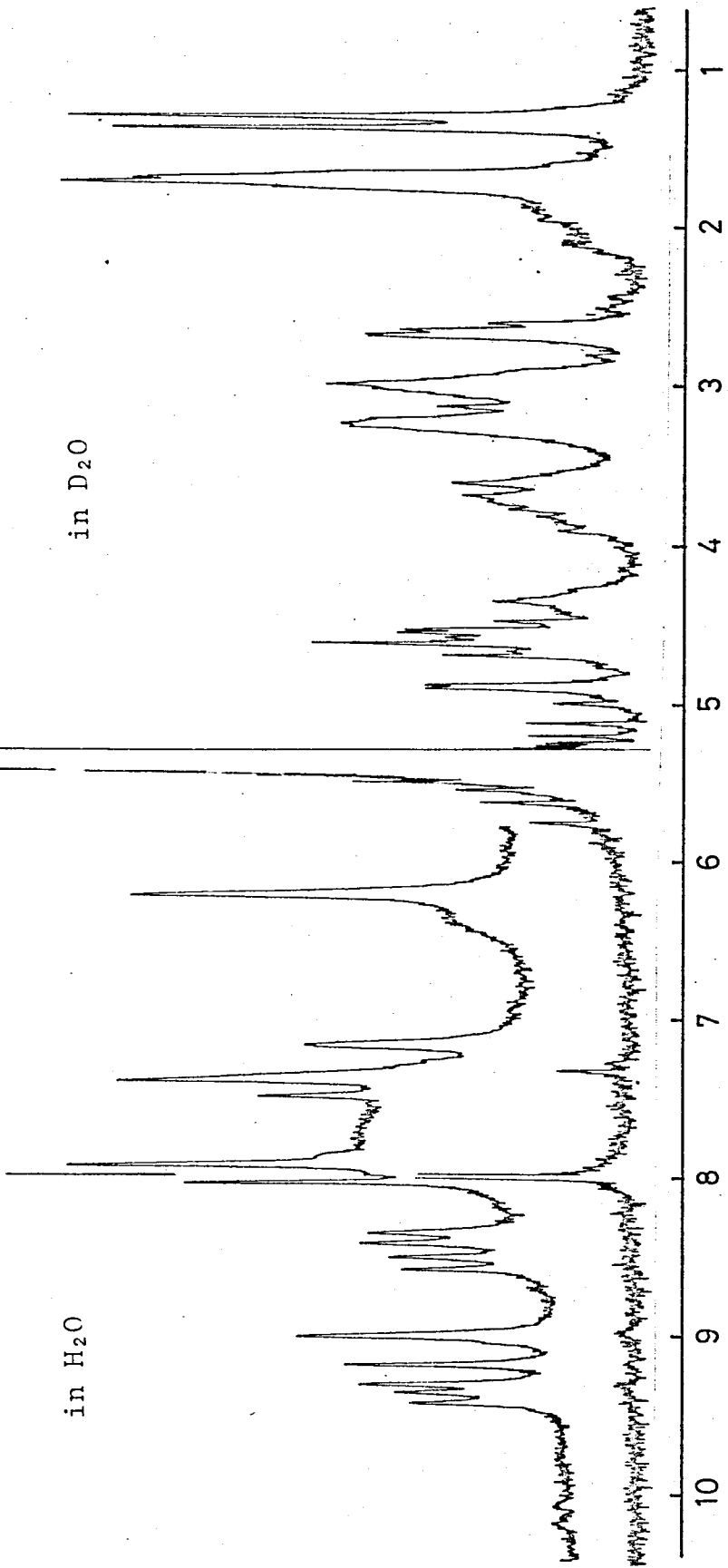


Fig. 5-29

NMR spectra of reverse-capreomycin IIB

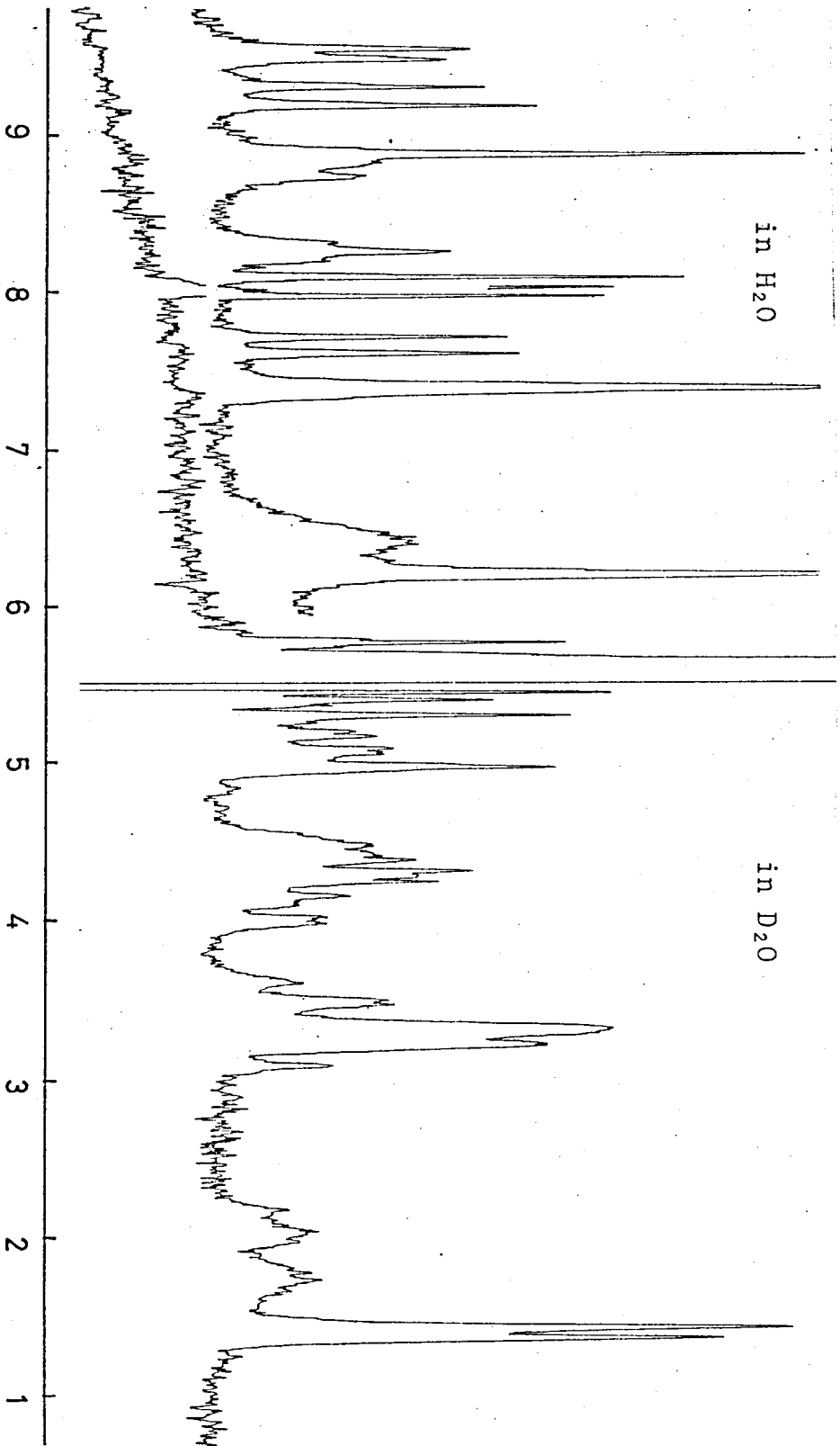


Fig. 5-32

NMR spectra of [Orn⁴]-capreomycin IIB

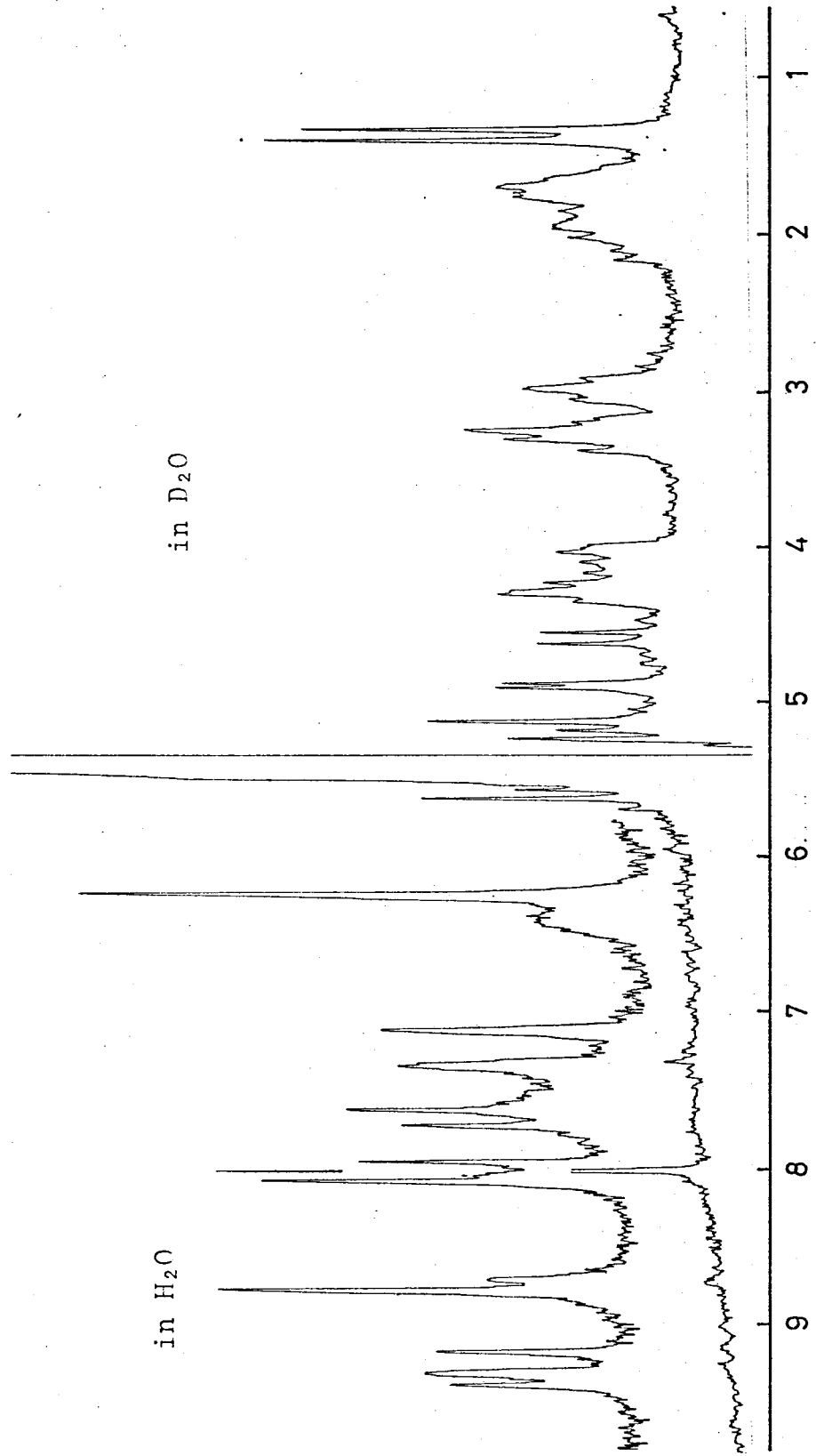


Fig. 5-33

NMR spectra of di- β -Lys-capreomycin IIB

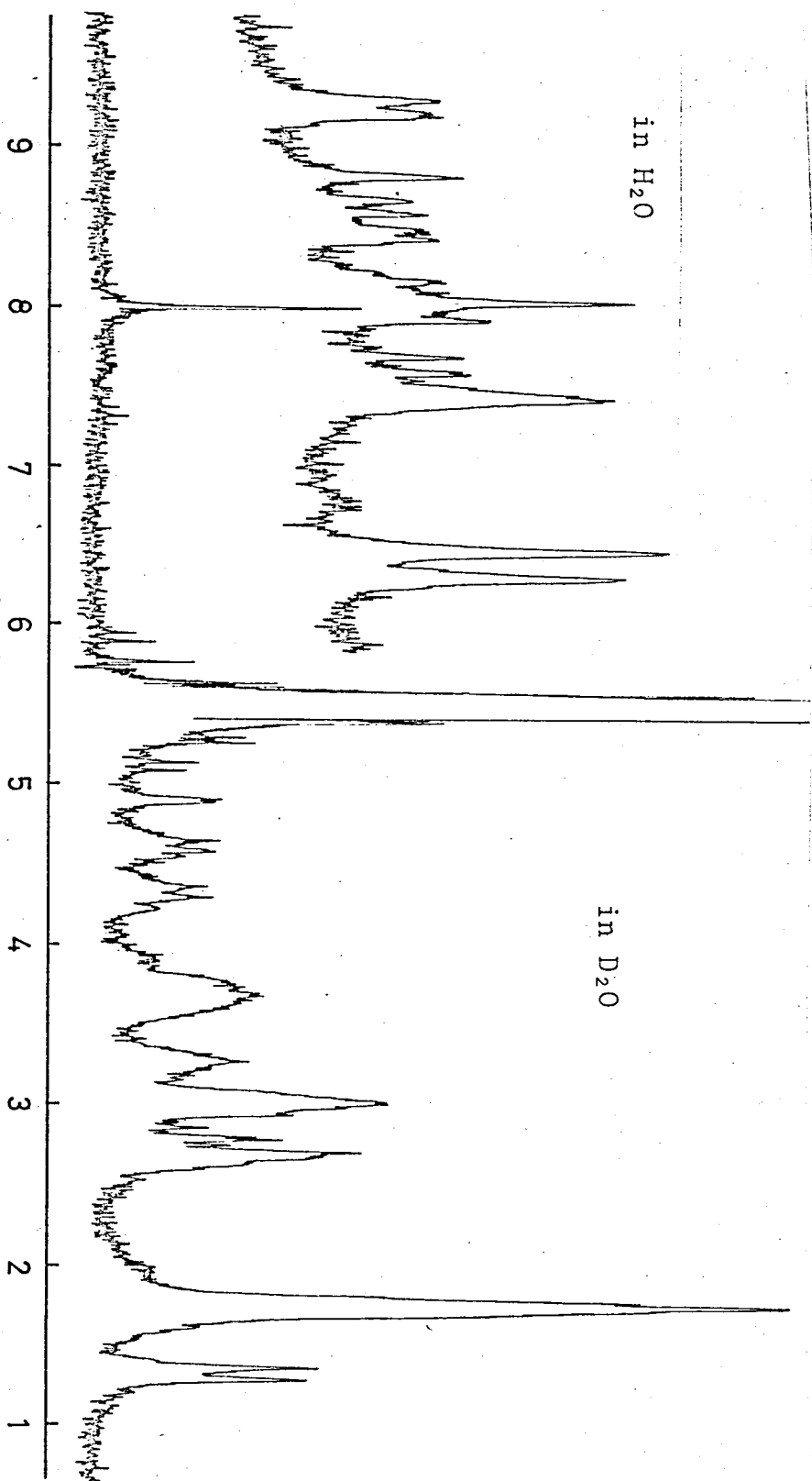


Fig. 5-35

5-4 カプロ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 に示したカプロ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出来る。

- (1) カプロオマイシン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) <i>S. epidermidis</i> sp-a1-1	100	>100	>100	>100
2) <i>St. pyogenes</i> 1022	>100	>100	>100	>100
3) <i>St. agalactiae</i> 1020	>100	>100	—	—
4) <i>C. diphtheriae</i> P.W.8	3.1	3.1	3.1	50
5) <i>B. subtilis</i> ATCC 6633	25	25	50	>100
6) <i>E. coli</i> B	50	100	100	>100
7) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	25	50	25	>100
8) <i>S. typhosa</i> H 901	25	50	100	>100
9) <i>Sh. sonnei</i> E 33	50	100	50	>100
10) <i>P. vulgaris</i> OX 19	50	50	50	>100
11) <i>Mycobacterium</i> 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、フソイドカプロオマイシン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、ツベラクテリマイシン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。即ちツベラクテリマイシンやカプロオマイシン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だから、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種以上のツベラクテリマイシン類似体の中で、*Corynebacterium diphtheriae* と *Bacillus subtilis* に対してフソイドカプロオマイシンとジβ-Lys-カプロオマイシンIBがめづづ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) リバースカプロオマイシンIBと(Orn⁺)-カプロオマイシンIBはツベラクテリナミンNと同程度かあるいはそれ以下の活性しか示さないのだから、(1)の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) ツベラクテリマイシンO、カプロオマイシンIA、IB及びフソイドカプロオマイシン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-カプロオマイシンIBとフソイドカプロオマイシンIBが、二種の菌種に対しめづづかに天然カプロ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 α アミノ酸は、抗生物質や植物毒素等より数多く発見され、こ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 α 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 α 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ンを含む中間体を使用する点が複雑なペプチドの合成には不利である。

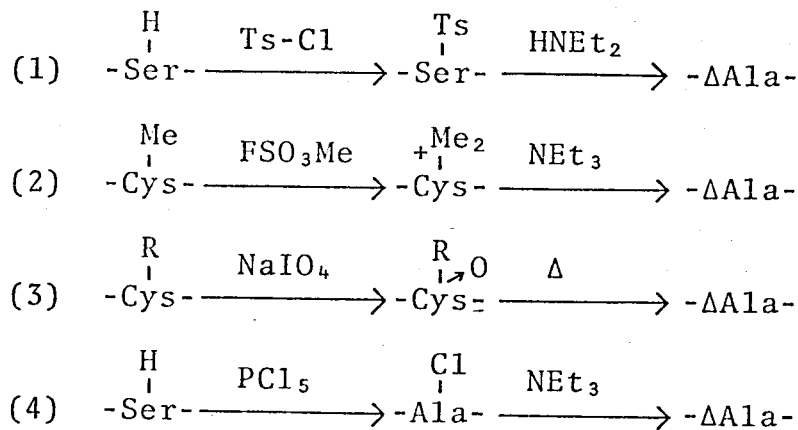


Fig.6-1

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

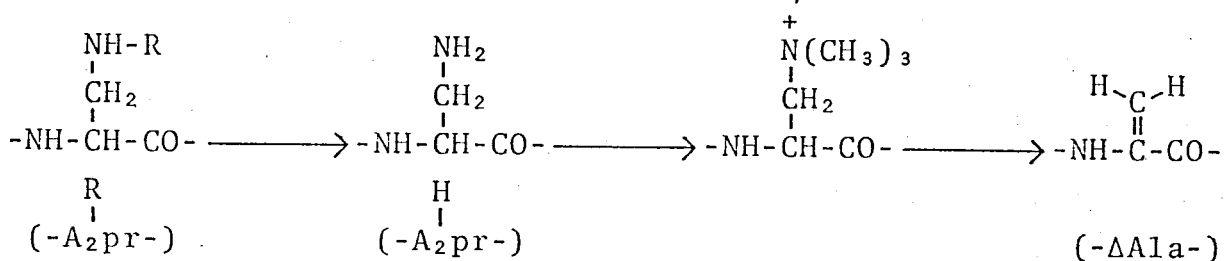


Fig.6-2

ミ) 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。

この原理を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 $Z\text{-Azpr(H}\cdot\text{HCl)-OMe}$ (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、ミ) 基のトリメチル化条件にさらしたところ、中間に生じる $N\beta\text{-トリメチルアンモニウム体}$ (6-2) は所望に $\beta\text{-脱離}$ を起こし、 $Z\text{-}\Delta\text{Ala-OMe}$ (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。

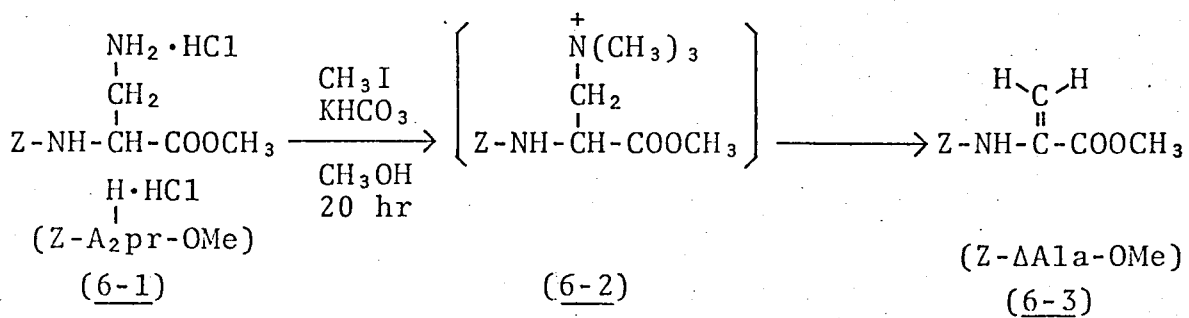


Fig. 6-3

次にペプチド中の $\alpha, \beta\text{-ジ}$ (ミ) フ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分解し、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。 $\alpha, \beta\text{-ジ}$ (ミ) フロピオン酸残基は塩基性条件下に $N, N\text{-}$ 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、たとえどのような転位生成物が副生してもその塩基性の為により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、いくつかのより複雑なデヒドロアラ

NMR spectrum of Z-ΔAla-OMe

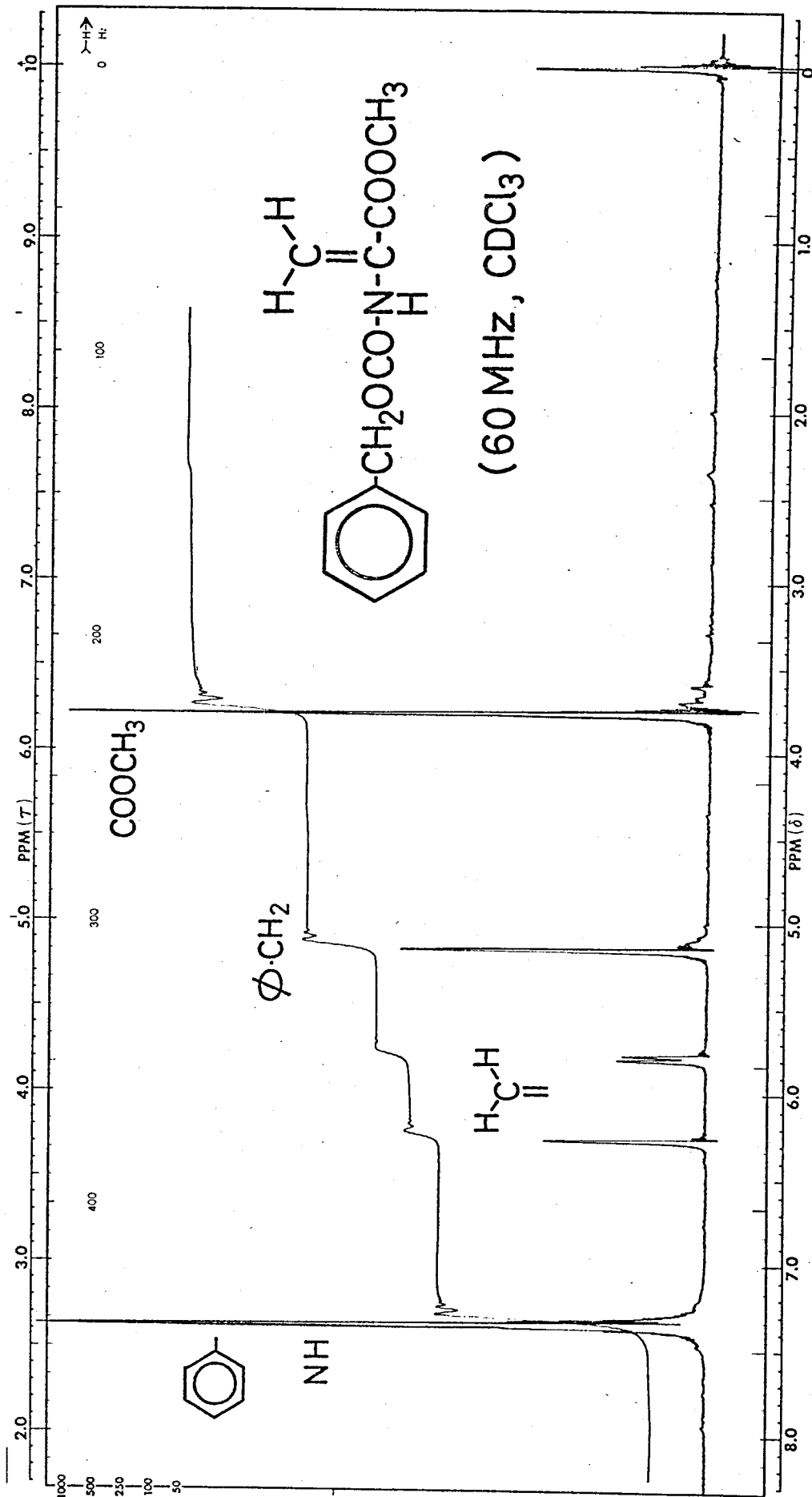
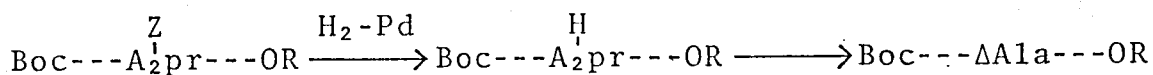


Fig. 6-4

Table 6-1. Dehydroalanine peptides synthesized in this study

Δ Ala peptides ^{a)}	Yield(%)	NMR(δ , CDCl_3)		
		$=\text{CH}_2$	NH(Δ Ala)	
Boc-Ala- Δ Ala-OMe (6-4)	68	5.92(d)	6.61(s)	8.57(br.s)
Boc- Δ Ala-Ala-OMe (6-5)	82	5.21(t)	6.05(d)	7.30(br.s)
Boc-Ala- Δ Ala-Ala-OMe (6-6)	61	5.53(d)	6.47(d)	8.77(br.s)
Boc- Δ Ala-Ala-Dea-OEt (6-7) ^{b)}	91	5.21(br.s)	6.02(d)	7.32(br.s)
Boc-Ala- Δ Ala-Dea-OEt (6-8) ^{b)}	96	5.40(br.s)	6.51(d)	8.65(br.s)
Boc- Δ Ala-Ser(<i>t</i> Bu)- Ser(<i>t</i> Bu)-Dea-OEt (6-9) ^{b)}	88	5.20(br.s)	6.02(t)	7.33(br.s)
Boc-Asn- Δ Ala-Ala-OMe (6-10)	77	5.72(d)	6.20(d)	_____c)
Boc-Trp- Δ Ala-Ala-OMe (6-11)	74	5.43(br.s)	6.42(d)	8.58(br.s)
Boc-Ser- Δ Ala-Ala-OMe (6-12)	76	5.51(br.s)	6.35(t)	9.08(br.s)
Boc-Tyr- Δ Ala-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 A₂pr residue.



b) Dea: β, β -diethoxyalanine.

c) In CD_3OD .

ニンペプチド(6-7~6-13)を上記の方法で合成した。本法はナター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(*t*Bu)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。

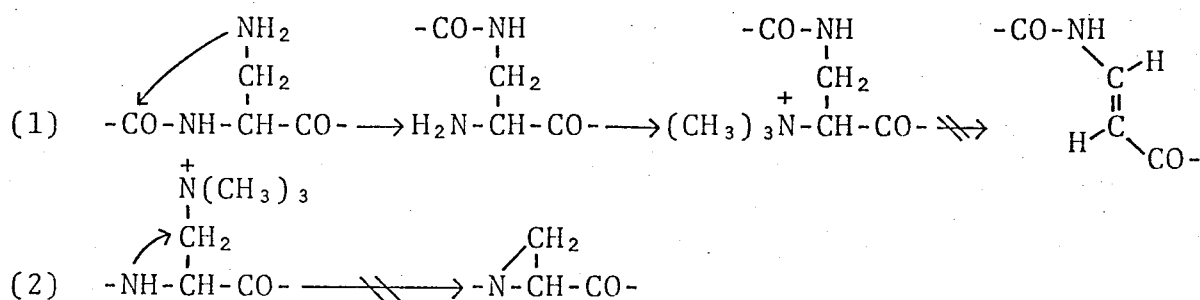
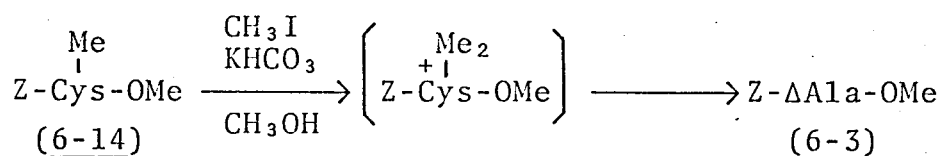


Fig.6-5

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にデヒドロアラニンに変換した例は報告されていない。

最後にナチオニン又は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、最も反応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-Azpr(H·H₂O)-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
<u>6-14</u> (%)	67	76	87
<u>6-3</u> (%)	18	11	6

Fig. 6-6

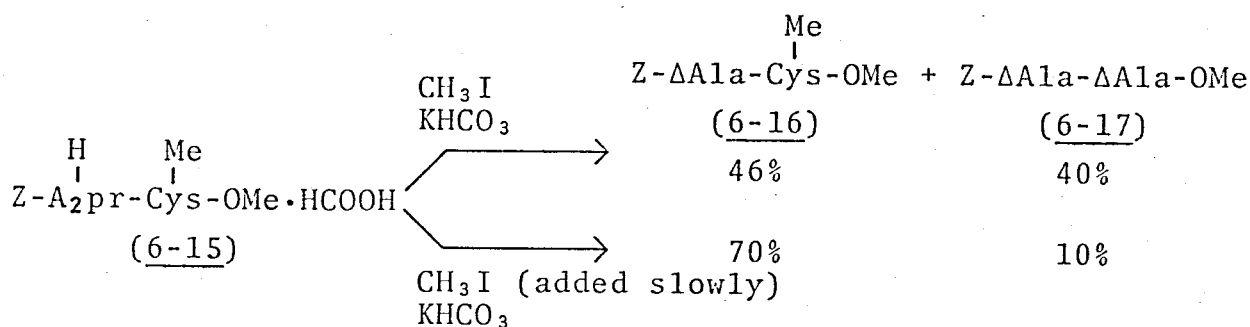


Fig. 6-7

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、ヨウ化ナトリウム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、ナトリウムや β -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イ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- Δ Ala-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- Δ Ala-OMe を油状で室温放置し、フェノール添加の効果調べた。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か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 III²⁵⁾ (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

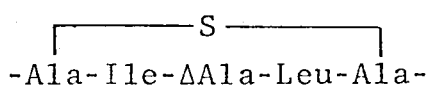


Fig. 6-8

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。

実験の部

融点は全て補正してゐない。

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

第2章

$$\text{Ts}-\overset{\text{Me}}{\text{Dbu}}(\text{Boc})-\text{OMe} \text{ (2-3)}$$

化合物 2-2 (10.0g, 26.8 mmol) の酢酸エチル溶液に大過剰のジアゾタマ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(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。 $[\alpha]_D^{20} -28.0^\circ$ (c 2.0, CH₃OH)。

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

C₁₈H₂₈N₂O₆S としての計算値: C, 53.98; H, 7.05; N, 7.00; S, 8.01%。

$$\text{Ts}-\overset{\text{Me}}{\text{Dbu}}(\text{Boc})-\text{OH} \text{ (2-4)}$$

化合物 2-3 (8.91g, 22.2 mmol) のメタノール溶液 (10 ml) に 0°C で攪拌しながら 2N 水酸化ナトリウム (16.7 ml) を 10 分間かけて滴下した。40 分間攪拌を続けた後、水を 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%)、mp 122~123°C、 $[\alpha]_D^{20} -1.8^\circ$ (c 2.1, CH₃OH)。

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%.

$\text{Ts}-\overset{\text{Me}}{\beta}\text{-Orn(Boc)-OMe (2-5)}$

化合物 2-4 (5.00g, 12.9 mmol) の酢酸エチル溶液 (20 ml) に、 -15°C で攪拌しながら 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分間攪拌を続けた。沈殿を除去した後、溶液に約 40 mmol のジアゾタマンを含むエーテルを加え、 0°C で16時間攪拌した。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時間攪拌した。溶媒を留去して得た残渣を酢酸エチルに溶かしてろ過した後、10% クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗い、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 (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%.

$\text{Ts}-\overset{\text{Me}}{\beta}\text{-Orn(Boc)-OH (2-6)}$

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 $125\sim 127^\circ\text{C}$ 、 $[\alpha]_D^{20} +1.5^\circ$ (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%.

$\text{Ts}-\overset{\text{Me}}{\beta}\text{-Orn(H-HO)-OH (2-7)}$

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時間攪拌した。エーテルを加えて生じた沈殿をろ取し、エーテルで洗った後、水酸にナトリウム上減圧乾燥した。収量 0.350g (83.1%)、mp 209°C (dec)、 $[\alpha]_D^{20} +2.6^\circ$ (c 2.3, 1N NaOH)。

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

$C_{13}H_{21}N_2O_4SO_2$ としての計算値: C, 46.35; H, 6.28; N, 8.32; S, 9.52; O, 10.53%.

Me
Ts- β -Arg(NO₂)-OH (2-8)

化合物 2-7 (0.400g, 1.19 mmol) の 2N 水酸化ナトリウム溶液 (1.19 ml) に 0°C で 攪拌しながら、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 分間攪拌した後、6N 塩酸で酸性にして生じた沈殿 (0.280g) を浮取した。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、 $[\alpha]_D^{20} + 0.24^\circ$ (c2.1, 1N NaOH)。

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

C₁₄H₂₁N₅O₆S としこの計算値: C, 43.40; H, 5.46; N, 18.08; S, 8.28%。

Me- β -Arg-OH (2-9)

化合物 2-8 (1.50g, 3.87 mmol) を酢酸-水 (9:1) (70 ml) 中にラジウム黒触媒を用いて 16 時間接触還元した。触媒を浮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 Amberlite IRC 120 カラム (Type I, 100~200 mesh, H⁺型, 1.8x30cm) 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化する試みは全て失敗に終わった。収量 1.14g、 $[\alpha]_D^{20} + 17.5^\circ$ (c1.5, H₂O) (lit. +20 ± 2° (c0.75, H₂O))。

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 N²-メチル- β -アルギニン-フラビアン酸塩 (1.67g, 52.8%) を浮取した。mp > 220°C (slowly dec)、 $[\alpha]_D^{20} + 1.51^\circ$ (c1.9, 1N NaOH)。

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

C₂₇H₂₈N₈O₈S₂ としこの計算値: C, 39.17; H, 3.46; N, 13.72; S, 7.85%。

第3章

イソド交換反応の一般的操作

ツベラリチ)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

た沈殿を浮取した。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, 100~200 mesh、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、カッポレオマイシンの単離(第5章)の場合と同様な脱塩操作も行ない目的物を得た。

[[¹⁴C]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)及び放射性尿素(3.9mCi, The Radiochemical Center Amersham (40~60 mCi/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(1.2×80 cm)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(tBu)-Ser(tBu)-Dea-OEt (4-4)

化合物4-3 (8.40g, 13.4 mmol)と Boc-Azpr(Z)-ONSu (5.84g, 13.4 mmol) 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°C、 $[\alpha]_D^{15} + 9.42^\circ$ (c 1.7, DMF)。

分析値: C, 57.32; H, 8.07; N, 8.41%。

C₃₇H₆₅N₅O₁₃としての計算値: C, 57.68; H, 8.06; N, 8.62%。

Boc-Azpr(Nps-Arg(NO₂))-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Dea-OEt (4-5)

化合物4-4 (6.96g, 8.57 mmol)をDMF中にラジウム黒触媒を用いて16時間接触還元した。触媒を浮去した後、浮液にNps-Arg(NO₂)-OH (4.75g, 8.57 mmol)、HOBT (1.62g, 12.0 mmol)次いでDCC (2.12g, 10.3 mmol)を0°Cで攪拌しながら加えた。0°Cで2時間、室温で16時間攪拌した後、浮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°C(dec)、 $[\alpha]_D^{15} + 11.17^\circ$ (c 1.6, DMF)。

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

C₄₃H₇₃N₁₁O₁₅S·H₂Oとしての計算値: C, 49.18; H, 7.20; N, 14.67; S, 3.05%。

Cyclo [Boc-Azpr-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Dea-Arg(NO₂)] (4-9)

化合物 4-5 (2.19g, 2.12 mmol) から 5-11a の場合と同様にケン化、活性エステル化、脱オ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), $[\alpha]_D^{15} -39.9^\circ$ (c1.6, DMF)。

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

C₃₅H₆₄N₁₀O₁₃·H₂O としての計算値: C, 49.40; H, 7.82; N, 16.46%; 分子量, 851。

[Arg⁶]-ツペラフチナミン N (4-10)

化合物 4-9 (150mg, 0.180 mmol) を少量の酢酸を含むメタノール中にラジウム黒融媒を用いて 24 時間接触還元した。融媒を除去した後、溶液を濃縮し、得た残渣を TFA (5ml) に溶解して 30 分間攪拌した。TFA を除去した後、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 (R_f 0.52、フェール-水-濃アノモニア水、30:10:1) を 71mg (64%) 得た。mp 232°C(dec), $[\alpha]_D^{15} -39.7^\circ$ (c2.5, H₂O)。

[Arg⁶]-ツペラフチナミン O (4-11)

化合物 4-10 (79mg, 0.13 mmol) と Boc-β-Lys(Boc)-ONSu (68mg, 0.15 mmol) 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 (R_f 0.31、フェール-水-濃アノモニア水、30:10:1) を 62mg (62%) 得た。mp 248°C(dec), $[\alpha]_D^{15} -39.3^\circ$ (c1.4, H₂O)。

Nps-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Dea-OEt (4-12)

Z-Ser(tBu)-Dea-OEt (4.83g, 10.0 mmol) と Nps-Ser(tBu)-ONSu (4.12g, 10.0 mmol) より 5-2 の場合と同様な操作で黄色油状物 (6.11g, 94.7%) を得た。

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

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

(C₂₇H₄₅N₆O₉S) 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%)、mp 164-165°C (dec)、 $[\alpha]_D^{25} -2.07^\circ$ (c0.97, DMF)。

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

C₂₆H₃₃N₅O₉S 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) を攪拌しながら滴下した。30分攪拌した後、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、酢酸エーテ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 で攪拌しながら、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 時間攪拌した後、濾過して濾液を濃縮した。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。mp 170~173°C (dec)、 $[\alpha]_D^{25} -12.7^\circ$ (c0.98, DMF)。

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

C₄₇H₇₂N₈O₁₆S 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 2.307g (12.5%)、mp 725°C。

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

C₄₀H₆₅N₇O₁₃ としての計算値: C, 56.39; H, 7.69; N, 11.51%; 分子量, 852。

{Azpr⁶}-ツペラフチナミン 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)、 $[\alpha]_D^{25} +58.2^\circ$ (c1.0, H₂O)。

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

C₁₆H₂₉N₉O₈Cl₂·4H₂O 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いと固化した。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, 7口口ホルム-メタノール-酢酸, 6:2:1) を与えた。収量 11.7g (72.2%)。mp 145~148°C (dec)。 $[\alpha]_D^{25} +21.3^\circ$ (c 0.9, CH₃OH)。

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7口口ホルム溶液 (30ml) に 0°C で攪拌しながら、HOBT (3.66g, 27.1mmol) 次いでDCC (4.19g, 20.3mmol) を加えた。0°C で2時間、室温で16時間攪拌した後、濾過し濾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- (7口口ホルム-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°C (dec)。 $[\alpha]_D^{25} -12.9^\circ$ (c 1.6, DMF)。

分析値: C, 48.14; H, 6.06; N, 17.89%。

C₂₁H₃₁N₇O₉ · 1/4 CH₃COCH₃ 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°C で攪拌しながら、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分間攪拌した。化合物 4-29 を塩化水素 THF 溶液で脱プロキシル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°C で30分、室温で2時間攪拌した後、N-(2-アミノエチル)ピペラジン (約 0.5ml) を加え、10分間攪拌した。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- (7口口ホルム-メタノール, 29:1) で繰り返して精製した。収量 355mg (31.7%)。mp 172~175°C (dec)。 $[\alpha]_D^{25} -13.1^\circ$ (c 1.9, DMF)。

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

C₄₃H₆₅N₁₁O₆S · 1/2H₂O としての計算値: C, 49.99; H, 6.44; N, 14.91; S, 3.10%。

Cyclo[ε-Azpr-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Dea-Gal(NO₂)] (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、 $[\alpha]_D^{25} -19.4^\circ$ (c 0.35, DMF)。

分析値: C, 51.05; H, 7.04; N, 16.35%; 分子量, 737。

C₃₆H₅₈N₁₀O₁₃ · ½ H₂O としての計算値: C, 50.99; H, 7.01; N, 16.52%; 分子量, 848。

[Gal⁶]-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 (R_f 0.50, フェール-水-濃アミンモニア水, 30:10:1) を示した。収量 40 mg (71%)、mp 225°C (dec)、 $[\alpha]_D^{25} -44.3^\circ$ (c 1.1, H₂O)。

[Gal⁶]-ツベラクチンマイシン 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 (R_f 0.24, フェール-水-濃アミンモニア水, 30:10:1) を示した。収量 26 mg (58%)、mp 249°C (dec)。

第5章

カプロオマイシン IA と IB の単離

市販カプロオマイシン ("Capastat", Eli Lilly) (3.00g) を 0.4 M 酢酸アミンモニア緩衝液 (pH 9.0) に溶解し、この緩衝液を緩衝化した Amberlite IRC50 カラム (Type I, 100~200 mesh, 2.5 × 90 cm) に吸着させた。同緩衝液 (900 ml) と 0.8 M 緩衝液 (pH 9.0) を直線濃度勾配溶出した後、後者 (1200 ml) を溶出した。カプロオマイシン IA または IB を含むフラクションを各々別に集め、3 N 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 × 20 cm) に吸着させた後、1 M 酢酸でカプロ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 3 N 塩酸 (約 5 ml) に溶解した後、エタノール (300 ml) を加えて、カプロオマイシン IA (1.41 g) 及び IB (0.81 g) 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。

カプロオマイシン構成アミノ酸の単離

市販カプロオマイシン(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)を直線濃度勾配溶出して、セリン(0.240g)、アラニン(0.170g)、カプロ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)カラムフロマトグラフィ-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、市販カプロオマイシンを同条件で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。

カプロオマイシンの2,4-ジニトロフェニル(DNP)化とDNPカプロ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

カプロオマイシンIA又は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カプロオマイシンの沈殿を浮取し水、エタノール次のエーテルで十分洗浄し乾燥して、DNPカプロオマイシン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、定沸点塩酸と共に110℃で10時間加熱し水解した。水解物を凍結乾燥した後、水に溶かし酢酸エーテルで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紙電泳法で確認した。

カプロオマイシンのアセチル化

カプロオマイシンIA又は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時間攪拌した。反応液を濾過し濾液を濃縮した後、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フォロマイシン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。

カフォロマイシンIAの還元と還元体のEdman-Dansyl分析

カフォロマイシン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。触媒を濾去した後、濾液を濃縮し残渣にエタノールを加えて $[Ala^5]$ -カフォロマイシンIA(42.9mg)を白色粉末として得た。この生成物を水分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 -ジアラミノピオン酸: カフォロマイシジン: 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マンモニアと一致する測定量できなかった。

この生成物を常法通りEdman-Dansyl分析して、DNS-セリンをTLC(R_f 0.52, n -ブタノール-酢酸-水(4:1:2); R_f 0.68, フェノール-水-濃アモニア水(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 \cdot 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)へ攪拌しながら滴下した。続いてN-アチルモルホリン(2.42g, 24.0mmol)を滴下した後、0°Cで2時間、室温で16時間攪拌した。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°C、 $[\alpha]_D^{25}$ -15.6°(c1.5, DMF)。

分析値: C, 57.04; H, 7.50; N, 8.05%.

C₂₅H₃₉N₃O₉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, 6.00 mmol) 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, 6.00 mmol) の酢酸エチル溶液 (20ml) に 0°C で攪拌しながら N-tert-ブチルモルホリン (0.911g, 9.00 mmol) の酢酸エチル溶液 (10ml) を滴下し、0°C で 2 時間、室温で 16 時間攪拌した。常法通り後処理して白色粉末 (3.38g, 80.1%) を得た。mp 92~108°C, $[\alpha]_D^{25} -10.6^\circ$ (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, 10.0 mmol) と Boc-Ala-ONSu (2.86g, 10.0 mmol) 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, $[\alpha]_D^{20} -18.3^\circ$ (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, 5.39 mmol) を 5-2 の場合と同様に脱アトキシカルボニル化して得た 5-5a と化合物 5-6 (3.00g, 5.39 mmol) の DMF 溶液 (20 ml) に HOBt (1.02g, 7.55 mmol)、N-tert-ブチルモルホリン (0.818g, 8.09 mmol) と DCC (1.33g, 6.47 mmol) を 0°C で加え、0°C で 2 時間、室温で 16 時間攪拌した。冷却した後、溶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), $[\alpha]_D^{25} +37.4^\circ$ (c1.8, DMF)。

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

$C_{50}H_{68}N_{12}O_7S \cdot H_2O$ 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, 4.86 mmol) と 5-6 (2.90g, 4.86 mmol) 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), $[\alpha]_D^{20} +37.8^\circ$ (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 (5 ml) に ZN 水酸化ナトリウム (2.80 ml) を加え 1 時間攪拌した。水を希釈した後、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), $[\alpha]_D^{22} + 33.5^\circ$ (c 0.9, 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), $[\alpha]_D^{22} + 35.3^\circ$ (c 1.7, 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 (10 ml) に HONSu (0.432g, 3.75 mmol) と DCC (0.744g, 3.75 mmol) を加え室温で 4 時間攪拌した。濾過した後、溶媒を留去して得た黄色残渣をエーテルで洗い取った。収量 3.64g (96.3%), mp 121°C (dec), $[\alpha]_D^{22} + 29.9^\circ$ (c 1.8, 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), $[\alpha]_D^{22} + 32.7^\circ$ (c 2.0, DMF).

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

$C_{45}H_{51}N_{13}O_{18}S \cdot \frac{1}{2}H_2O$ 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, 2.17 mmol) の THF 溶液 (3 ml) に 0°C で攪拌しながら、2.0 N 塩化水素 THF 溶液 (3.3 ml) を滴下した。0°C で 30 分攪拌した後、エーテルを加えて 5-10a を沈殿させた。これを濾取乾燥した後、DMF (200 ml) に溶解して、ピリジン (3 l) 中へ攪拌しながら 48 時間かけて滴下した。さらに 16 時間攪拌した後、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 - (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°C、 $[\alpha]_D^{25} - 39.1^\circ$ (c 1.0, DMF)。

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

C₄₂H₅₉N₁₁O₁₄ · H₂O 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, 1.36 mmol) 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°C、 $[\alpha]_D^{25} - 55.1^\circ$ (c 0.8, DMF)。

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

C₃₅H₅₃N₁₁O₁₃ · H₂O 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 (150 mg, 0.159 mmol) を Boc-β-Lys(Boc)-ONSu (97 mg, 0.24 mmol) の存在下にパラジウム黒触媒を用いて DMF (10 ml) 中で接触還元した。16 時間後、触媒を濾去して溶液にクロロホルム (10 ml) とエーテル (5 ml) を加え生じた沈殿を濾取した。収量 150 mg (84.6%)、mp 242~250°C (dec)、 $[\alpha]_D^{25} - 47.0^\circ$ (c 0.4, DMF)。

分析値: C, 51.88; H, 7.16; N, 15.79%.

C₅₀H₈₁N₁₃O₁₇ · H₂O 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 (100 mg, 0.120 mmol) より 5-12a の場合と同様にして合成した。収量 110 mg (89.4%)、mp 245~247°C (dec)、 $[\alpha]_D^{25} - 51.1^\circ$ (c 1.2, DMF)。

分析値: C, 48.75; H, 7.29; N, 17.09%.

C₄₃H₇₅N₁₃O₁₅ · ³/₂ H₂O としての計算値: C, 48.55; H, 7.44; N, 17.22%.

合成カゾレオマイシンIA (5-13a)

化合物 5-12a (120 mg, 0.106 mmol) を 99% ギ酸 (3 ml) で 1 時間処理した後、ギ酸を留去して、ナタール-水 (9:1) 中でソージウム黒触媒を用い 20 時間接触還元した。触媒を留去した後、溶液を濃縮して得た残渣を 1N 塩酸-アセトン (1:1) (5 ml) に溶解して 10 分間加熱還流した。放冷後尿素 (500 mg) を加え 16 時間撹拌した。触媒を留去して得た残渣にエタールを加え、生じた白色沈殿を浮取した。これを水-ナタール-エタールから再沈殿した。収量 69 mg (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%.

合成カゾレオマイシンIB (5-13b)

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

カゾレオマイシンIIA (5-14a)

化合物 5-11a (170 mg, 0.180 mmol) より 5-13a の場合と同様にして合成した。収量 99 mg (84%)、mp 250°C (dec)、 $[\alpha]_D^{25} + 9.3^\circ$ (c 2.8, H_2O)。

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

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

カゾレオマイシンIIB (5-14b)

化合物 5-11b (150 mg, 0.179 mmol) より 5-13a の場合と同様にして合成した。収量 93 mg (81%)、mp 252°C (dec)、 $[\alpha]_D^{25} - 24.9^\circ$ (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-p-Lys(Boc)-Aspr-Ala-Aspr(Z)-Dea-Cpd(NO₂)] (5-18)

化合物 5-11b (300 mg, 0.359 mmol) をギ酸 (5 ml) 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濾取し、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 (191 mg, 0.431 mmol) の DMF 溶液 (3 ml) に トリエチルアミン (54 mg, 0.54 mmol) を加え 40 時間攪拌した。反応液にクロロホルムを加えて生じた塊殻を濾取した。収量 335 mg (87.7%), mp 240°C (dec), $[\alpha]_D^{23} - 43.7^\circ$ (c 0.90, DMF)。

分析値: C, 50.36; H, 6.81; N, 17.13%.

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

70-ノイドカゾレオマイシン IB (5-15)

化合物 5-18 (110 mg, 0.132 mmol) より 5-13a の場合と同様にして合成した。収量 62 mg (74%), mp 245°C (dec), $[\alpha]_D^{23} - 30.7^\circ$ (c 0.61, DMF)。

分析値: C, 37.44; H, 6.09; N, 24.27%.

$C_{25}H_{48}N_{14}O_{10}Cl_4$ としたの計算値: C, 37.60; H, 6.06; N, 24.56%.

リニースカゾレオマイシン IB (5-16a) 及び (Orn⁺)⁺-カゾレオマイシン IB (5-16b)

この二種の化合物は全経路にわたってカゾレオマイシン IB 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。

ϵ - β -Lys-カゾレオマイシン IB (5-17)

経路(1) 化合物 5-11b (45 mg, 0.071 mmol) の DMF 懸濁液 (2 ml) に Boc- β -Lys(Boc)-ONSu (79 mg, 0.18 mmol) と トリエチルアミン (18 mg, 0.18 mmol) を加え 48 時間攪拌した。DMF を留去して得た残渣を 3 N 塩酸 (3 ml) に溶解して 1 時間攪拌した後 4 N 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 × 80 cm) に通し脱塩して目的物 (51 mg, 75%) を得た。mp 245°C (dec), $[\alpha]_D^{23} - 50.5^\circ$ (c 1.3, H₂O)。

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

$C_{31}H_{61}N_{16}O_8Cl_5 \cdot 6H_2O \cdot CH_3OH$ としたの計算値: C, 34.83; H, 7.03; N, 20.31; Cl, 16.07%.

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

Comp.	Yield (%)	mp (°C)	$[\alpha]_D^{23a)}$	Elemental analysis			Found
				C	H	N	Calcd ^{b)} S or Cl
<u>5-19b</u>	84.7	62-63	-5.9°	57.91 57.67	7.96 7.89	7.27 7.47	
<u>5-20a</u>	85.3	70-75	-4.3°	57.49 57.68	7.68 7.74	8.96 8.97	
<u>5-20b</u>	89.5	94-96	-10.7°	56.69 56.36	7.48 7.43	9.45 9.39	
<u>5-21a</u>	88.7	136-140 (dec)	+32.9°	49.19 49.04	6.08 6.13	15.78 15.96	2.96 3.04
<u>5-21b</u>	85.3	155-160 (dec)	+38.0°	50.70 50.84	6.33 6.26	15.40 15.81	3.03 3.02
<u>5-22a</u>	83.9	134-137 (dec)	+42.5°	48.64 49.09	6.05 6.04	15.98 15.98	3.07 3.05
<u>5-22b</u>	90.5	125-130 (dec)	+34.0°	49.94 50.04	6.27 6.25	15.18 15.56	2.79 2.97
<u>5-24a</u> ^{c)}	26.5	>250	-38.1°	49.42 49.23	6.32 6.49	18.21 18.04	
<u>5-24b</u> ^{d)}	20.1	>250	-44.7°	51.04 50.91	6.64 6.70	17.66 17.65	
<u>5-16a</u>	88.6	>250	+29.2°	31.15 31.13	5.99 6.33	22.80 22.93	14.55 14.51
<u>5-16b</u>	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 H₂O (5-16a, 5-16b).

b) Molecular formula: 5-19b, C₂₇H₄₃N₃O₉·¹/₂H₂O; 5-20a, C₃₀H₄₈N₄O₁₀; 5-20b, C₂₈H₄₄N₄O₁₀; 5-21a, C₄₃H₆₂N₁₂O₁₆S·H₂O; 5-21b, C₄₅H₆₆N₁₂O₁₆S; 5-22a, 5-22a, C₄₁H₅₈N₁₂O₁₆S·¹/₂H₂O·¹/₂C₄H₈O; 5-22b, C₄₃H₆₂N₁₂O₁₆S·¹/₂H₂O·¹/₂C₄H₈O; 5-24a, C₃₅H₅₃N₁₁O₁₃·H₂O; 5-24b, C₃₇H₅₇N₁₁O₁₃·¹/₂H₂O; 5-16a, C₁₉H₃₅N₁₂O₆Cl₃·5.5H₂O; 5-16b, C₂₁H₃₉N₁₂O₆Cl₃·5.5H₂O.

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

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

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

分析値: C, 50.07; H, 7.52; N, 16.61%。

C₅₄H₉₅N₁₅O₁₉·2H₂O 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(1)による生成物と TLC 上完全に一致した (R_f 0.22, フェ) - ル - 水 - 濃アミン水, 30:10:1)。

第6章

ε-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時間攪拌した。濾過した後、溶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に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, 60.56; H, 5.63; N, 6.10%.

$C_{12}H_{13}NO_4 \cdot \frac{1}{5} H_2O$ 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、ピ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、触媒を濾去し、溶液にヨウ化メチル (2ml) と炭酸水素カリウム (1.5g) を加え、20時間攪拌した。化合物 6-3 の場合と同様の後処理をして目的物を得た。

ε-Cys(Me)-OMe (6-14) の ε-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, 83.76; 6-3, 83.82) の積分比より求めた。

ε-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, 83.78;

6-17, 83.88)

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

Abbreviations

Z	benzyloxycarbonyl
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
Nps	<i>o</i> -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 ₂ pr	α,β -diaminopropionic acid

References

- 1) E.B.Herr, M.E.Haney, G.E.Pittenger, and C.E.Higgins, 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.Higgins, 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.Izumiyu, 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もあり、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は感謝します。

本研究に使用したツバラクテ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は感謝します。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は感謝いたします。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は感謝いたします。