

Title	Novobiocinの化学構造とその抗菌作用との関係に関する研究
Author(s)	奥村, 健太郎
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28456
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

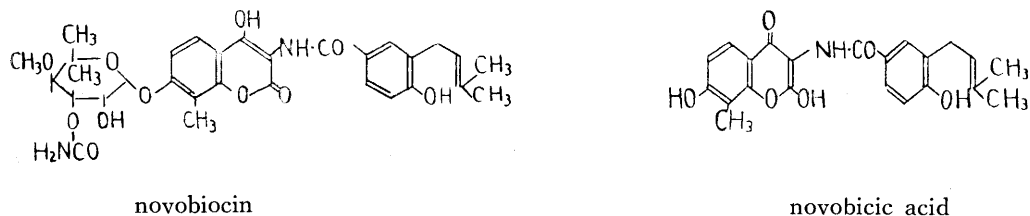
Osaka University

氏名・(本籍)	奥村健太郎 おくむらけんたろう
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 208 号
学位授与の日付	昭和 36 年 4 月 6 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Novobiocin の化学構造とその抗菌作用との関係に関する研究 (主査) (副査)
論文審査委員	教授 堀井 善一 教授 川崎近太郎 教授 吉岡 一郎 教授 犬伏 康夫

論文内容の要旨

novobiocin は主としてグラム陽性菌，特に他の抗生物質に耐性を獲得した黄色葡萄状球菌に抗菌性を示すため，臨床的に注目されている抗生物質である。その化学構造は Hoeksema ら一派，および Folker ら一派によって独立的に構造決定がなされた。その aglycon である novobiocic acid は合成され構造も確定された。

Fig. 1



しかし novobiocin 分解産物の抗菌性，および novobiocin の抗菌性発現の作用機序についてはほとんど解明されていない。novobiocin の構造はその中心骨格 3-acylamino-4-hydroxycoumarin, 置換 benzoic acid, および糖の 3 部分に大別することが出来る。これらの 3 成分と novobiocin の抗菌作用との関係を解明することはまことに興味のあるところである。著者はこれら 3 成分に関連した構造を有する 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体, alkenylhydroxy benzoic acid 誘導体, novobiocin の glucoside 結合に関連した化合物を種々合成し, novobiocin の分解産物を含めて, これらの抗菌試験を実施して novobiocin の構造的特徴と抗菌性との関係を考察した。

第一章 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体の合成とその抗菌作用

novobiocin の主骨格を形成する 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体は文献上合成例が少く，そ

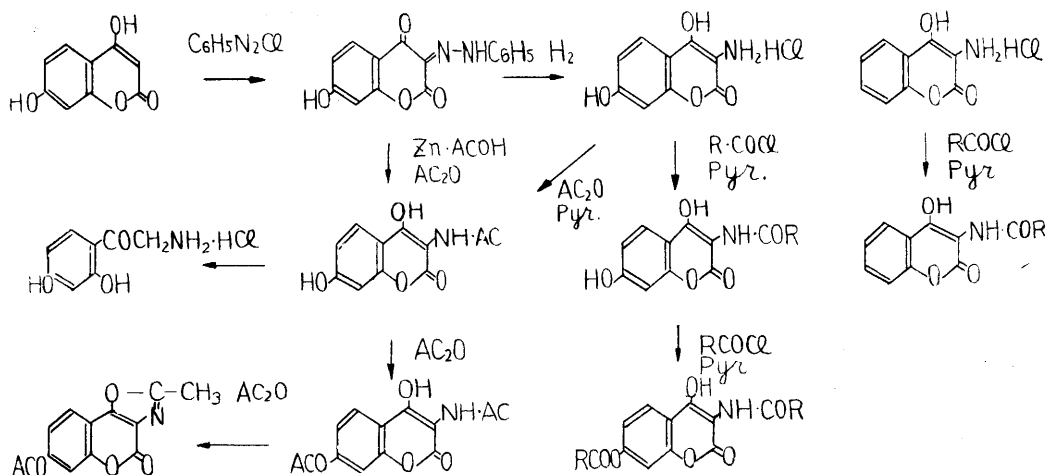
の構造中に含まれる $-\text{CO}-\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{C}}}=\text{C}-$ 基は他の抗菌性物質の構造中にも屢々見られるもので興味がある。

著者はその acyl 基を種々かえた化合物を合成し、抗菌性への影響を検討した。

3-amino-4-hydroxycoumarin は文献例に従いニトロ体を還元して合成したが、3-amino-4,7-dihydroxycoumarin は 4,7-dihydroxycoumarin に benzene diazoniumchloride を coupling し、7-hydroxy-2,3,4-trioxochromane-3-phenylhydrazone 体を単離し、10%パラジウム炭で接触還元して 3-amino 体塩酸塩を収率よく得た。

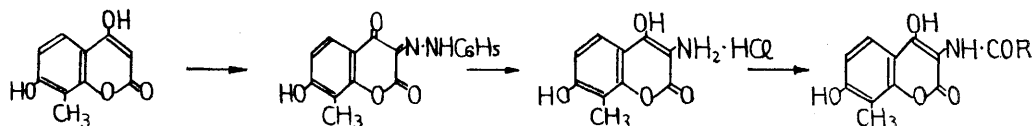
これらの 3-amino 体の塩酸塩を原料として、pyridine 中酸クロリドを作用せしめ、3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体を種々合成した。用いた酸クロリド (R-coCl) は R=alkyl, alkenyl, aralkyl, aralkenyl, aryl 等種々に亘り、3-acylamino-4-hydroxycoumarin 43種、3-acylamino-4,7-dihydroxycoumarin 33種、3-acylamino-7-acyloxy-4-hydroxycoumarin 8種の化合物を合成した。

Fig. 2



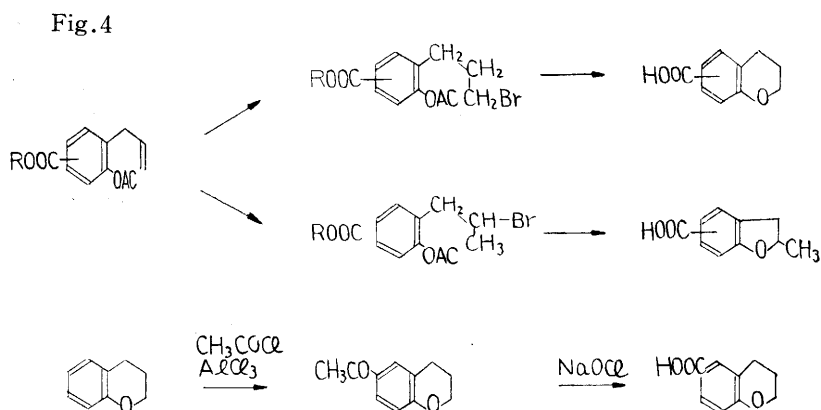
Novobiocic acid cyclonovobioc acid に更に近接した構造を有する 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体を合成する目的で 4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin に前記と同一の方法を用いて 3-amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin 塩酸塩の合成を行い (Fig. 3) これらの 3-amino 体塩酸塩に 3-allyl-4 (or 2)-hydroxy benzoic acid とこれを閉環した Chromanoic acid, 2-methylcoumaranoic acid 類, 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl) benzoic acid とこれを閉環した 2,2-dimethyl-6-chromanoic acid, 2,2-dimethyl-3-methyl-6-coumaranoic acid 類などを縮合させた。

Fig. 3



文献未知の次の acyl 体は Fig.4 の方法で合成した。

3-allyl-4 (or2)-hydroxybenzoic acid のエステルを acetate とし，臭化水素を benzoylperoxide の存在で，又は使用しないで作用せしめ，苛性ソーダで処理して対応する chromanoic acid, 2-methyl coumaranoic acid を合成した。一方 chromane を acetylchloride で acety 化して 6-acetylchromane とし，これを sodium hypochlorite で酸化して 6-chromanoic acid を合成し，閉環法によるものと同一してこれらの構造を決定した。



novobiocin の基本骨格である 4-hydroxycoumarin 誘導体にはその互変異性体 2-hydroxychromone 構造が考えられ，何れか一方の安定構造を有して存在するが，dioxane 中では全て 4-hydroxycoumarin 構造の赤外吸収スペクトルを示すことが判明したので 4-hydroxycoumarin 構造を基本として呼称することとした。

合成した 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体は種々な細菌，酵母，黴を用いて寒天平板希釈培養法によりスクリーニングテストを実施した。

3-acylamino-4-hydroxycoumarin では chlorobenzamido 体が稍有効で Trichophyton 3 株に対して p-chlorobenzamido 体が 50r/ci 以下でその発育を阻止した。その他 benzamido 体 benzylamino, acetoamido, 2-methylcoumaranoylamino 体等が 100r/cc 程度の活性を示すに止まった。

3-acylamino-4,7-dihydroxycoumarin では 3-acylamino-4-hydroxycoumarin では全く活性の認められなかった脂肪酸の amide, hydroxybenzamido 体 allyloxybenzamido 体などが coumarin 核の 7 位に OH が導入されることによって細菌類にも稍活性を示して来る。脂肪酸の amide 類では $\text{C}_{10}\sim\text{C}_{14}$ の脂肪酸 amide 類が比較的活性となる傾向を示した。置換 benzamido 体では para 置換体が最も活性の様に思われる。3-acylamino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin との比較では 8 位 methyl 基の有無による抗菌性への影響は認められないようである。全般的に novobiocin の aglycon, novobiocic acid に近似した構造を有するものに活性が認められたが，しかし novobiocic acid 自身の抗菌性は novobiocin と比較して相当低下した抗菌性を示すに過ぎない。

第二章 alkenylhydroxybenzoic acid 誘導体の合成とその抗菌作用

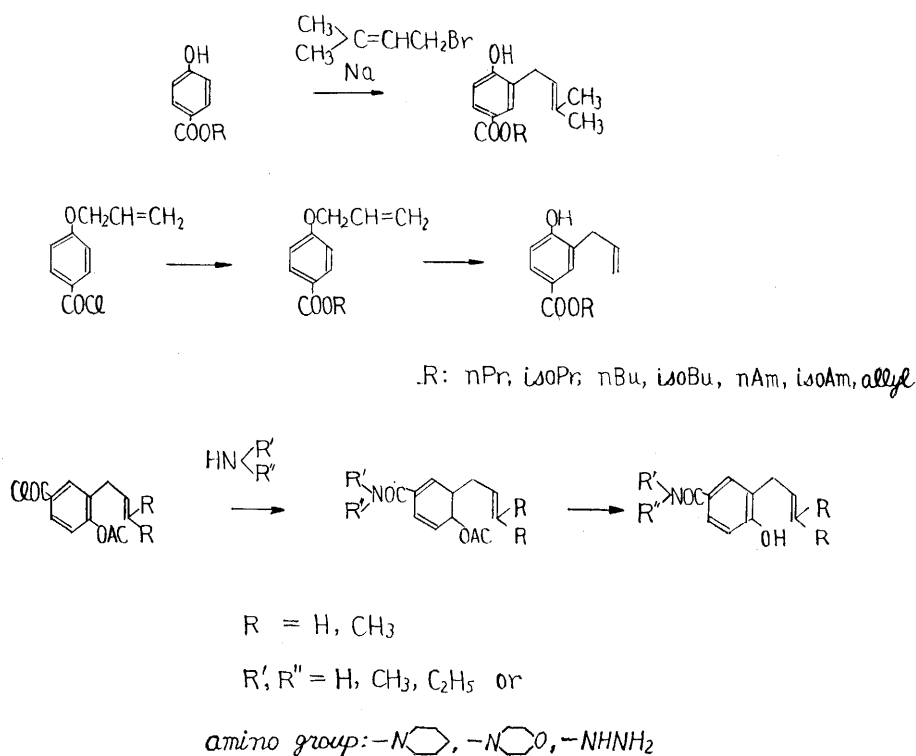
novobiocin の aglycon である novobiocic acid の一部を構成する 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)

benzoic acid は 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体と比較するために抗菌抗黴試験を行ったところ、そのエステルが相当に強い活性を示した。従ってこれに近似した構造を有する alkenylhydroxybenzoic acid 誘導体はその興味を中心である。

p-(oro-)allyl oxybenzoic acid のエステルから Claisen 反応によって合成した 3-allyl-4(or 2)-hydroxybenzoic acid のエステルと比較するために ethyl m-allyloxy benzoate を同様に Claisen 反応を行ったところ、留分から ethyl 4-allyl-3-hydroxybenzoate, ethyl 2-allyl-3-hydroxybenzoate を単離することが出来た。

これらの抗菌性を比較したところ、p-hydroxy 置換体が最も有効の様に思われた。従来 p-hydroxy benzoic acid のエステル類は抗菌性が強く防腐剤として知られて居り、これらと比較するために alkyl 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl) benzoate, alkyl 3-allyl-4-hydroxybenzoate 類、および novobiocin の構造と抗菌性の関係の一端を知るためにこれらの amide 類の合成を Fig.5 の方法に依って合成した。

Fig. 5



またこれらのエステル類は水に難溶性であるため、これらの水溶性を改善した hydroxyethyl or (2,3-dihydroxypropyl) 3-allyl-4-hydroxybenzoate の合成をも行った。

以上合成された化合物は抗菌抗黴試験を実施した結果その amide 類には全く活性が認められなかったが、4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)benzoic acid, 3-allyl-4-hydroxybenzoic acid のエステル類が相当に強い抗微生物活性を示し、グラム陽性菌のうち Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus に対して、対

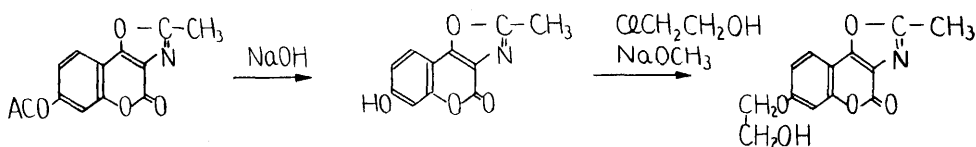
照とした防霉剤 *n*-Butyl *p*-hydroxybenzoate の10~20倍の抗菌力を示し、またこれらのエステルのうち *n*-butyl, allyl ester の抗黴試験成績においても *n*-Butyl *p*-hydroxybenzoate の2~4倍強力な作用を示した。これらのエステル類はマウスを用いた毒性試験の結果 LD₅₀>1.000mg/kg 程度を示し、有効濃度では全く急性毒性がなく実用に供し得るものと思われる。又これらの水溶性を改善した 3-allyl 4-hydroxybenzoic acid の hydroxy ethyl, α -glyceryl ester は残念にもその効力が減退する結果を示した。

第三章 glucoside 関連化合物の合成とその抗菌作用

3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体では novobiocin の aglycon, novobiocic acid の構造に近似したもの程その抗菌性は強まる様に見受けられたが、novobiocic acid 自身の抗菌性は novobiocin と比較して相当低下した値を示すところから、novobiocin の glucoside 結合がその抗菌性に対して重要な意義を有する示唆が得られた。novobiocin はその糖である novobiose の3位に *O*-carbamoyl 結合を有する特異的な glucoside であって、その carbamoyl 基が2位に転移した isonovobiocin では抗菌性が全く失われることが報ぜられている。従ってこの carbamoyl 体が抗菌性とどのような関係を有するかを検討し、有効な 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体を 検索する目的でその carbamoyl glycolide および carbamoyl glyceride の合成を試みた。

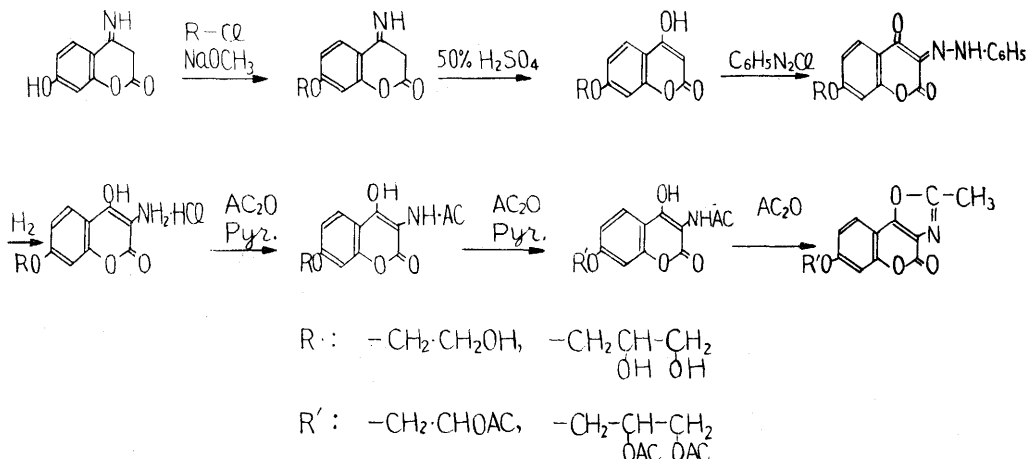
3-acetoamido-4, 7-dihydroxycoumarin に dimethylformamide 中 sodium methylate の存在で ethylenechlorhydrin を作用せしめても原料を回収したが、7-acetoxy-2-methyl-4H-[1] benzopyrano [3.4-d]-4-one を脱 acetyl 化した 7-hydroxy 体を同様に反応せしめると、その glycolide が得られた。

〔Fig 6〕



従って 7-hydroxy-4-imino-2-oxobenzopyrane を原料として 図の方法に従って 3-acetoamido-4, 7-dihydroxycoumarin の 7-hydroxy ethoxy 体、ならびに 7-(2,3-dihydroxypropoxy) 体を合成した。

〔Fig. 7〕

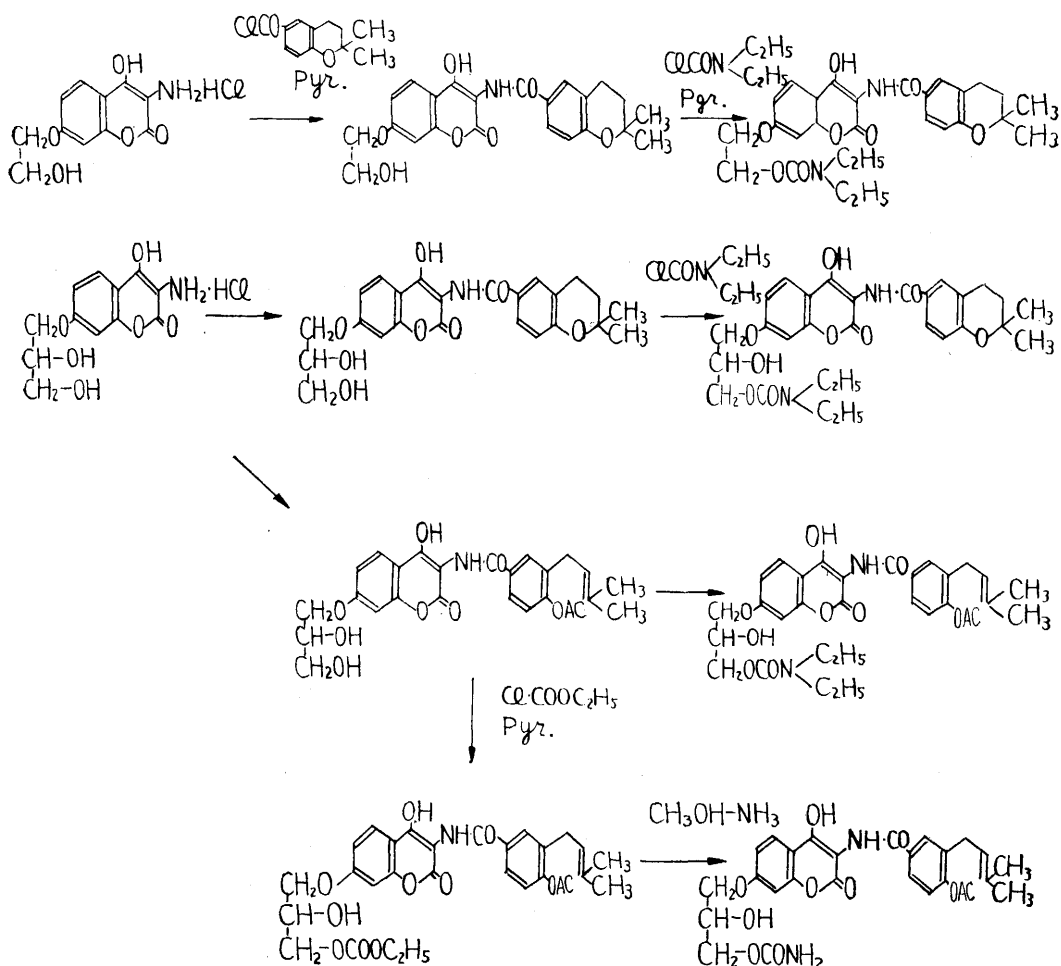


その中間体 3-amino 体の塩酸塩に pyridine 中等 mol の 4-acetoxy-3-(3-methyl-2-butenyl) benzoylchloride, 2,2-dimethyl-6-chromanoylchloride を反応せしめて demethylmonoacetyl novobiocic acid, demethylcyclonovobiocic acid の ethylenglycolide, および glyceride を合成した。

demethylcyclonovobiocic acid の ethyleneglycolide に pyridine 中 diethylcarbamoylchloride と加温して diethylcarbamoyloxyethoxy 体が得られた。

demethylmonoacetylnovobiocic acid, demethylcyclonovobiocic acid の glyceride に pyridine 中 diethylcarbamoyl chloride, ethylchloroformate の過剰と加温して mono 置換体である 3-diethylcarbamoyloxy-2-hydroxypropoxy 体, 3-ethoxycarbonyloxy-2-hydroxypropoxy 体が得られた。同様 carbamoylchloride を作用せしめたが目的物である carbamoylglyceride の合成に失敗したので, 3-ethoxycarbonyloxy-2-hydroxypropoxy 体をアンモニア性 methanol 中に室温に放置して demethylmonoacetyl novobiocic acid の carbamoylglyceride の合成に成功した。

[Fig.8]



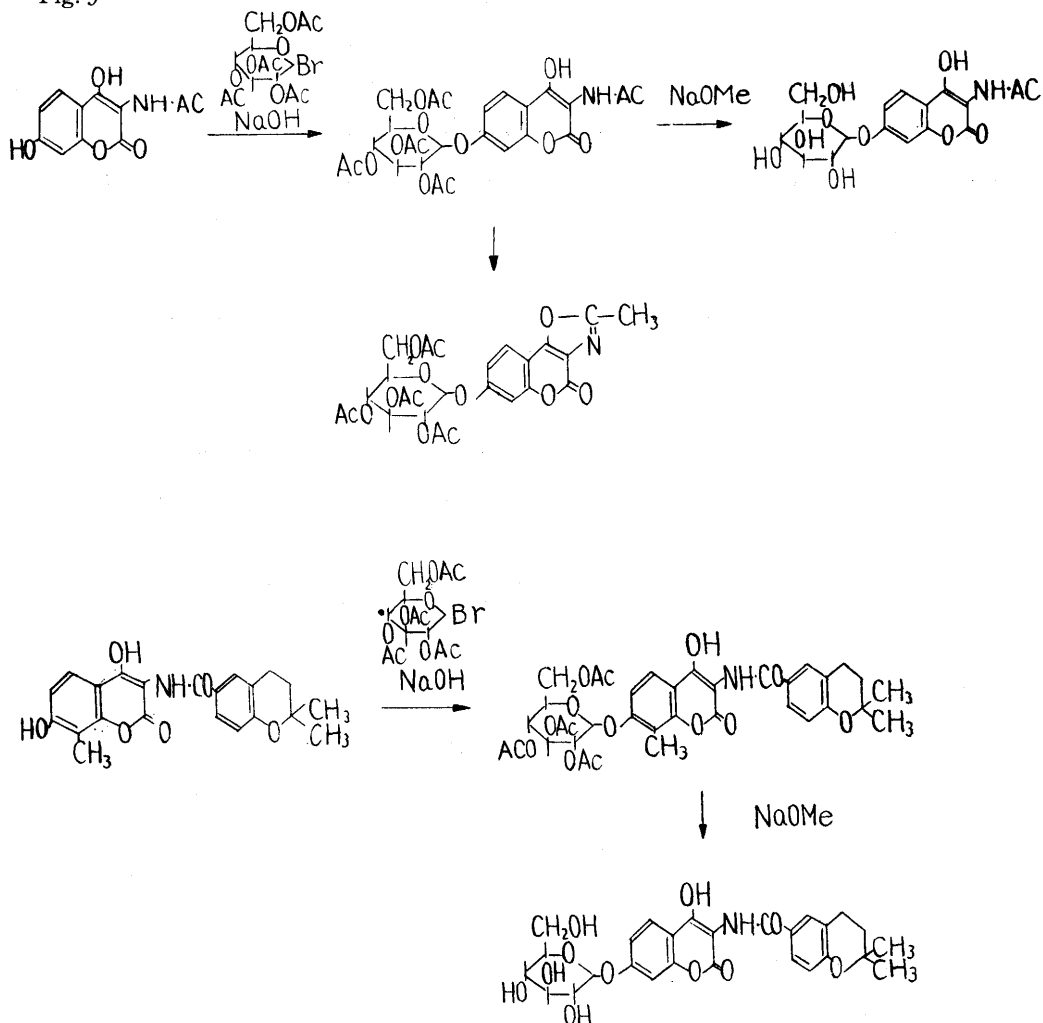
以上合成した化合物の抗菌試験結果は残念にも全く活性が認められなかった。

demethylmonoacetylnovobiocic acid の carbamoylglyceride などの抗菌試験の結果は全く効力が認められなかったため必然的に glucoside の合成を企図した。糖の種類としては最も一般的な D-glucoside の合成を試みた。

先ず 3-acetoamido-4, 7-dihydroxycoumarin を原料として含水 acetone 中 1 規定苛性ソーダを用いて pH を 9 前後に規正しつつ tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromide を作用せしめて tetra-O-acetyl-D-glucopyranoside が得られた。得られた glucoside 結合が coumarin 環の 7 位であることはこれを無水酢酸中に加熱した成績体が 7-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyloxy-2-methyl-4H-(1) benzo-pyrano [3,4-d] oxazol-4-one であることをその紫外部吸収スペクトルから明かにして証明した。3-acetoamido-7-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyloxy-4-hydroxycoumarin は 0.1 規定 sodium methylate と室温に 4 時間放置し、脱 acetyl 化して、3-acetoamido-7-D-glucopyranosyloxy-4-hydroxycoumarin が得られた。

この方法を cyclonovobiocic acid に応用して、その D-glucopyranoside を合応した。

Fig. 9



かくして合成した cyclonovobioc acid の D-glucopyranoside にも全く抗菌性は認められなかった。

第四章 novobiocin 関連化合物の抗菌作用

novobiocin の構成成分 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)benzoic acid とこれに近似した構造を有する 3-allgl-4-hydroxybenzoic acid を acyl 体とした 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体には 100~200r/cc 程度の微生物活性を示すものがあり、全般的に novobiocin に近接する構造を有するものが作用は弱いがいづらか活性が認められる。しかし 3-acylamino-4-hydroxycoumarin 誘導体以外の amide 類には全く活性が認められない。

これに反してこれらの酸のエステル類は相当に強い活性を示し、防腐剤 n-Butyl p-hydroxybenzoate を凌駕する抗菌抗黴性を示した。

また ethyl 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)benzoate を水素添加した ethyl 4-hydroxy-3-isopentylbenzoate は効力が低下しない結果を示し、novobiocin を水素添加した dihydronovobiocin が novobiocin と比較してその効力が低下しないことと考え併せ興味深い。

novobiocin の分解産物である novobiocic acid, methyl 3-O-carbamoylnovobioside ではその活性が甚だしく低下するところから novobiocin の分子内の glucoside 結合が活性発現のための不可欠な因子であることは明白である。又一方合成 D-glucopyranoside が抗菌性を示さず、carbamoylglyceride も活性が認められないので novobiocin の 3-O-carbamoylnovobioside が重要な役割を果すものと解釈される。

Hoeksema らは novobiocin の 3-位に結合した carbamoyl 基が 2-位に転移した novobiocin の isomer である isonovobiocin では抗菌性が全く失われることを認めて居り、novobiocin の活性発現は novobiocic acid に novobioside の結合、および carbamoyl 基の存在と結合位置の総合した構造様式に依っているものと思われる。

結論として novobiocin の化学構造と抗菌力の関係を追求検討して 3-(3-alkenyl-4-hydroxybenzamido)-4-hydroxycoumarin 骨格の 7 位に 3-O-carbamoylnovobioside 結合の必要性を確認し、また、novobiocin を構成する 3-alkenyl-4-hydroxybenzoic acid の エステル類に強力に抗菌抗黴作用のあることを発見した。

論文の審査結果の要旨

本論文は抗生物質ノボヴィオシンの化学構造とその抗菌作用との関係に関する研究である。即ちノボヴィオシンを構成するオキシ安息香酸誘導体部、クマリン誘導体部、糖部に分ちその各部とその誘導体を多数合成しついで各部を順次結合させて最終的にはノボヴィオシンにほとんど近い化合物を合成し、各誘導体について抗菌作用、抗バイ作用を検査した。その結果化学構造がノボヴィオシンに近づく程その抗菌作用が増大することを認めた。この研究において合成したパラオキシメタアルリル安息香酸-n-ブチルエステルが従来のニパギン類、デヒドロ酢酸に比べて数倍の抗菌、抗バイ作用があり且つ毒性が非常に弱いので医薬品、食品の防バイ剤として実用価値があることを発見した。又、クマリンとクロモンとの化学

構造を決定する手段として赤外線吸収スペクトルによる方法を多数の実験例を挙げて確立することが出来た。

これを要するに本論文は、参考論文も考慮に入れてノボヴィオシンの化学と互変異性体の化学に貢献し、且つ実用価値のある防バイ剤を発見したことは学術上大きな価値があり博士論文としての価値を確認した。