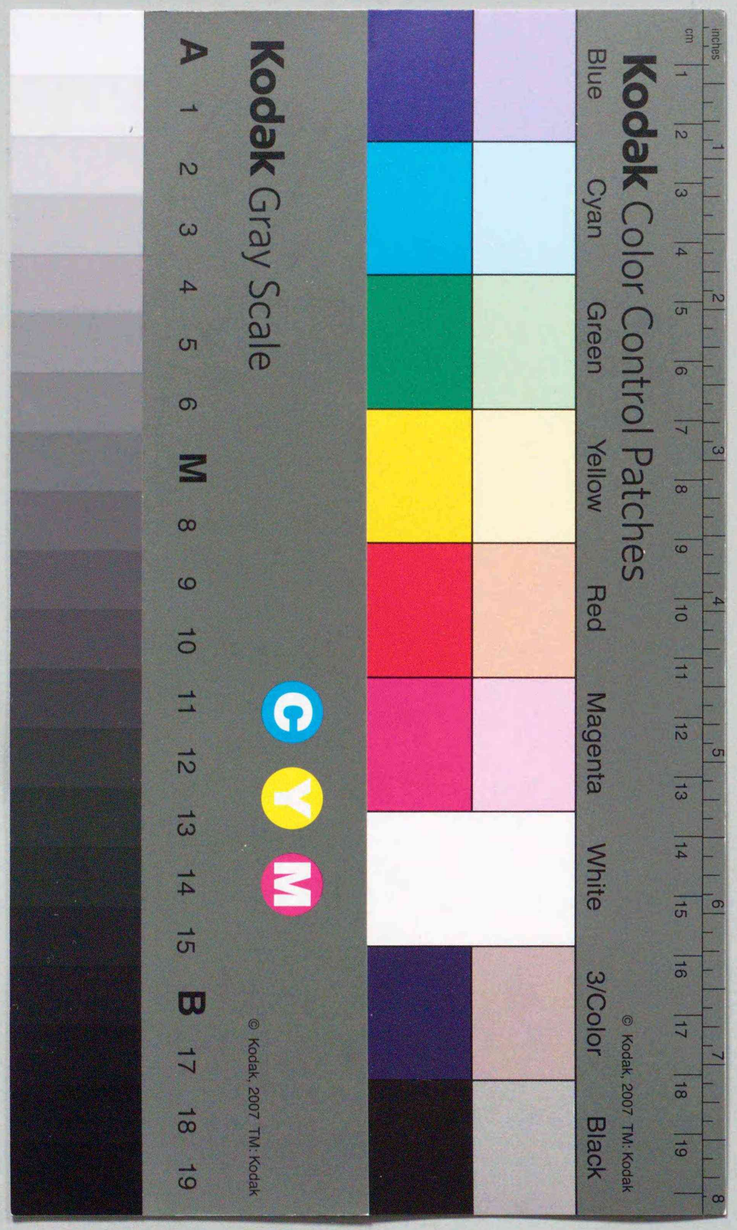
HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	微生物の生産する新規抗ウイルス抗生物質に関する研究
Author(s)	成瀬, 庸彰
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	乙第3889号
Issue Date	1991-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3052860
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49658
Type	doctoral thesis
File Information	000000237999.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP



微生物の生産する

新規抗ウイルス抗生物質に関する研究

成瀬庸彰

微生物の生産する

新規抗ウイルス抗生物質に関する研究

成　瀬　庸　彰

目　次

	頁
緒　言	1
第１章　新規抗ウイルス抗生物質 Lanthiopeptin	7
第１節　Lanthiopeptin の生産菌	9
第２節　Lanthiopeptin の醗酵生産	12
第３節　Lanthiopeptin の抽出、分離及び精製	13
第４節　Lanthiopeptin の物理化学的性状	14
第５節　Lanthiopeptin の生物学的性状	18
第６節　Lanthiopeptin の構造研究	
(1) Lanthiopeptin の構成アミノ酸	21
(2) Lanthiopeptin のアミノ酸配列	26
(3) Lanthiopeptin の構造	30
第７節　考察	33
第２章　新規抗ウイルス抗生物質 Pumilacidins	41
第１節　Pumilacidins の生産菌	43
第２節　Pumilacidins の醗酵生産	44
第３節　Pumilacidins の抽出、分離及び精製	45
第４節　Pumilacidins の物理化学的性状	47
第５節　Pumilacidins の生物学的性状	51
第６節　Pumilacidins の構造研究	
(1) Pumilacidins の構成アミノ酸	54
(2) Pumilacidins の構成脂肪酸	55
(3) Pumilacidins のアミノ酸及び脂肪酸の配列	60
(4) Pumilacidins の構造	64
第７節　考察	66

第３章　新規抗ウイルス抗生物質群 Fluvirucins　69
第１節　Fluvirucins の生産菌
(1) Fluvirucin A 生産菌　73
(2) Fluvirucin B 生産菌　74
(3) Fluvirucin C 生産菌　74
(4) Fluvirucin D_1 生産菌　75
(5) Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の生産菌　75
第２節　Fluvirucins の醗酵生産
(1) Fluvirucin A の醗酵生産　80
(2) Fluvirucin B の醗酵生産　81
(3) Fluvirucin C の醗酵生産　81
(4) Fluvirucin D_1 の醗酵生産　82
(5) Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の醗酵生産　82
第３節　Fluvirucins の抽出、分離及び精製
(1) Fluvirucin A の抽出及び精製　83
(2) Fluvirucin B の抽出及び精製　84
(3) Fluvirucin C の抽出及び精製　84
(4) Fluvirucin D_1 の抽出及び精製　84
(5) Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の抽出、分離及び精製　85
第４節　Fluvirucins の物理化学的性状　87
第５節　Fluvirucins の生物学的性状　96
第６節　Fluvirucins の構造研究
(1) Fluvirucin A アグリコン (fluvirucinine A) の構造　99
(2) Fluvirucin A の構成糖の構造　108
(3) Fluvirucin A の構造　112
(4) Fluvirucin B の構造　119
(5) Fluvirucin C の構造　124
(6) Fluvirucin D_1 の構造　126
(7) Fluvirucin D_2 の構造　131
(8) Fluvirucins D_3 及び D_4 の構造　133
第７節　Fluvirucin A の生合成　135
第８節　考察　141
結　語　147
実験の部　149
引用文献　192
謝　辞　202

緒　言

微生物はその代謝産物として実に多種多様な物質を生産する。その内でも特に抗生物質（antibiotics）は、streptomycin の発見者である Waksman によって「微生物によって作られ、他の微生物の生育を阻止する物質」と定義され、penicillin の発見以来今日に至るまで、数多くが見出され実用化されてきた。その結果、不治の病と考えられていた結核を始めとする細菌感染症の治療が可能となり、人類に多大な貢献をするに至っている。今日では、微生物の代謝産物中に単に抗菌物質にとどまらず、抗腫瘍物質、酵素阻害剤あるいは農薬等、広く生理活性物質を求めて活発な探索研究が続けられており、各々の分野で実用化されているものも少なくない。そのため Waksman により提唱された抗生物質という言葉は、現在ではより広義に用いられ、例えば抗腫瘍活性を有する微生物代謝産物は抗腫瘍抗生物質、抗ウイルス活性を有するものは抗ウイルス抗生物質と称され、抗菌物質とは区別されるようになってきている。

抗菌抗生物質による化学療法が可能になった細菌性疾患に比較し、ウイルス性疾患には有効な薬剤は非常に少なく、特に抗ウイルス抗生物質に限って言えば皆無に等しい。このことは概して次のような理由による。すなわち細菌性疾患に比べ、一般にウイルス性疾患にはインフルエンザ、鼻かぜ、ヘルペスなどの他、はしか、風疹、おたふくかぜ、水ぼうそうなどの小児科領域の疾患に認められるように、身近なものが少なくない。またウイルス性疾患は、エイズのように死亡率の極めて高いものもあるが、概して病気の程度としては軽いものが多い。勿論ワクチンによる予防が効果的なウイルス感染症も少なくない。かつて猛威をふるった天然痘は、Jenner の痘苗の接種によるワクチン法の確立以来、この方法により撲滅されるに至った事実は記憶に新しい。このような終生免疫が獲得される疾患には、ワクチンが絶対的に有効である。このため最近までウイルス性疾患は、癌患者での併発などの一部の例を除いては、抗ウイルス剤の必要性もそれ程高くなかった。しかし今日では、抗菌抗生物質の発達により、細菌性の感染症が強力に抑えられるようになった結果、病原体としてのウイルスを無視できなくなってきているのが現状である。

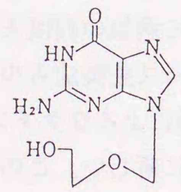
一方、抗菌抗生物質が広汎に開発され実用化されるに至った要因は、病原菌と

の生理的差異を利用し、感染病原菌のみを選択的に攻撃する、いわゆる「選択毒性」という作用機序に基づくものであることは広く知られている。ところがウイルスは細菌と異なり、ウイルス増殖のための自身の代謝系を持たず、宿主細胞の機能に依存するところが大きい。このためウイルス性疾患に対して抗ウイルス剤を使用した場合、一般に宿主細胞に多少なりとも影響を及ぼし、抗菌抗生物質のような選択毒性を有するものが少なかったことも、抗ウイルス剤の開発が遅れていた原因の一つである。

しかし、1977 年に Elion らが[1] 続いて 1978 年に Saeffer らが[2] 発表した抗ウイルス剤の acyclovir (Fig. O-1) は、その治療効果の強さ、作用機序の合理性の両面から高い評価を受けている。Acyclovir は一種の核酸類似物質であり、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼによって特異的にリン酸化された後、ヘルペスウイルスの DNA ポリメラーゼのみを特異的に阻害し、ウイルスの DNA 合成を抑制することが明らかにされた。Acyclovir の発見は、その高い安全性及び特異性において、抗菌抗生物質の penicillin の発見にも匹敵するものと言えよう。

しかし、チミジンキナーゼ産生能のない、薬剤耐性のヘルペスウイルス変異株が出現してきており、acyclovir 以外の薬剤の必要性も増してきている。

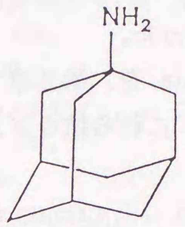
Fig. O-1 Structure of acyclovir



一方、ワクチンによる予防が可能とはいえ、インフルエンザのように実際にはかなりの困難を伴うウイルス性疾患もある。これはウイルス粒子を被う外皮蛋白質の構造を一部変えながら、生体の免疫系をくぐり抜けるためであり、その結果適応する有効なワクチンの選択が難しく、感染を進行させ大流行に至る。このよ

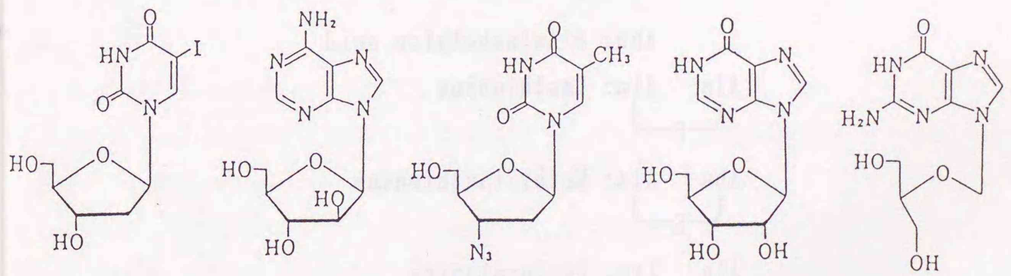
うなインフルエンザにも、効力、選択性共に高い抗ウイルス剤が求められている。しかし実際に臨床で有効な薬剤は、インフルエンザA型ウイルスに対する amantadine (Fig. O-2) があるのみであり、専ら対症療法に頼っているのが現状である。一般にかぜのウイルスに効果を示し、臨床で使用できる薬剤の開発は今後の課題である。

Fig. O-2 Structure of amantadine



これらの観点に加え、現在我国で認可されている acyclovir をも含めた 6 種類の抗ウイルス剤 (Fig. O-3) は、いずれも核酸類似物質であるということから も、新しい化合物、特に新しい構造、骨格を提供するということは重要な意味を持つ。

Fig. O-3 Structures of antiviral agents

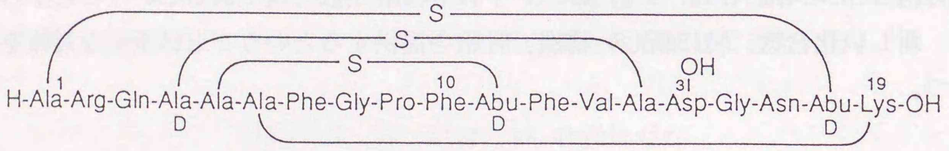


Idoxuridine　Vidarabine (Ara-A)　Zidovudine (Azidothymidine)　Isoprinosine　Ganciclovir

以上述べてきたような背景から、筆者らは多種多様な微生物の代謝産物の中に、新しいタイプの抗ウイルス剤を求めるべく、1984 年に抗ウイルス抗生物質の探索研究を開始した。抗ウイルス抗生物質の標的には、単純ヘルペス 1 型ウイルス及びインフルエンザA型ウイルスを選択した。この探索研究の過程で 1986 年に、単純ヘルペス 1 型ウイルスに活性を示す新規抗ウイルス抗生物質 lanthiopeptin (Fig. 0-4)[3,4,5] 及び pumilacidins (Fig. 0-5)[6] を、1987 年にはインフルエンザA型ウイルスに有効な新規抗ウイルス抗生物質 fluvirucins (Fig. 0-6)[7,8,9] を発見し、それらの生物学的並びに物理化学的諸性状を明らかにすると共に、化学構造を解明するに至った。

本論文では第1章で lanthiopeptin を、第2章で pumilacidins を、更に第3章では fluvirucins を取り上げ、これら抗ウイルス抗生物質に関する研究結果を述べる。

Fig. 0-4 Structure of lanthiopeptin



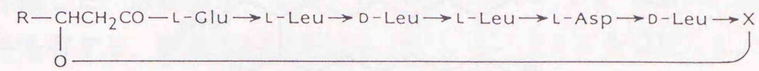
Abu: α-Aminobutylic acid

Ala Ala: Lanthionine

Abu Ala: Methyllanthionine

Ala Lys: Lysinoalanine

Fig. 0-5 Structures of pumilacidins



A R = $CH_3CH(CH_2)_9-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_8-$ (CH_3 branch)
X = L-Ile

B R = $CH_3CH(CH_2)_9-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_8-$ (CH_3 branch)
X = L-Val

C R = $CH_3CH(CH_2)_{11}-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Ile

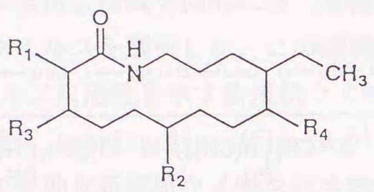
D R = $CH_3CH(CH_2)_{11}-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Val

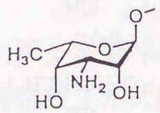
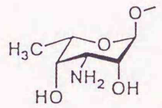
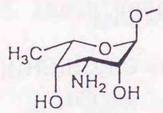
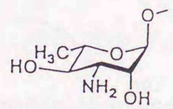
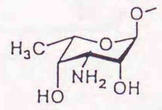
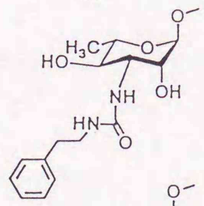
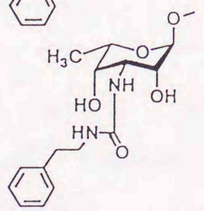
E R = $CH_3CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Ile

F R = $CH_3CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Val

G R = $CH_3(CH_2)_{12}-$
X = L-Val

Fig. 0-6 Structures of fluvirucins



	R1	R2	R3	R4
Fluvirucin A	-CH_3	-CH_3		-H
" B	-CH_2CH_3	"	-H	
" C	-$CHOHCH_3$	"		-H
" D_1	-CH_2CH_3	-CH_2CH_3	-H	
" D_2	"	"	"	
" D_3	"	"	"	
" D_4	"	"	"	

第1章　新規抗ウイルス抗生物質 Lanthiopeptin

抗ウイルス活性を指標とする抗生物質の探索研究の過程で、インドで採取した土壌より分離した一放線菌が、単純ヘルペス 1 型ウイルス（HSV-1）に対し抗ウイルス活性を有する、新規な抗生物質を生産していることを見出した。本菌は L337-2 の菌株番号が与えられたが、その後の詳細な菌学的研究の結果、*Streptoverticillium cinnamoneum* と同定された。本抗生物質はペプチド系抗生物質であり、極めて特異なアミノ酸であるランチオニンを含むことから、lanthiopeptin と命名した。Lanthiopeptin はその培養液より Diaion HP-20 に吸着抽出し、シリカゲル及び逆相系シリカゲルクロマト精製後、メタノールから結晶化し、無色針状晶として単離した。

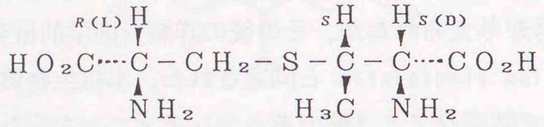
Lanthiopeptin は HSV-1 によるベロ細胞の変性を極めて低い濃度で阻止した。また、枯草菌及びある種の嫌気性細菌に対して顕著な生育阻止作用を示し、更に一部のカビ類に対して弱い生育阻止作用を示した。

Lanthiopeptin はその物理化学的性状から、新規なペプチド系抗生物質であることが明らかになった。[3] Lanthiopeptin の構造決定に際し、先ず酸加水分解により各構成アミノ酸を分離し、各々の構造を決定した。7 種の通常アミノ酸、すなわちアスパラギン酸、グルタミン酸（いずれも分子内ではアスパラギン及びグルタミンとして存在）、グリシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、アルギニンの他に、天然には極めて希なアミノ酸である *erythro*-β-ヒドロキシアスパラギン酸、*meso*-ランチオニン、*threo*-メチルランチオニン、及びリジノアラニンの存在が明らかとなった（Fig. 1-1）。[3] アミノ酸の配列順は、lanthiopeptin 及びその修飾化合物の Edman 法並びに dansyl-Edman 法による解析を、大阪大学との共同研究により行ない決定した。これらの実験結果から、lanthiopeptin の構造を Fig. 0-4 に示すように決定した。[4,5]

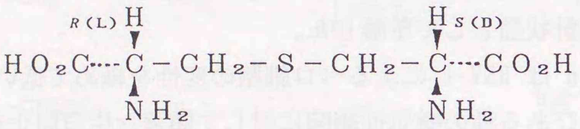
本章では、新規抗ウイルス抗生物質 lanthiopeptin の生産菌、培養、抽出、分離精製及び物理化学的性状、生物学的性状を述べ、更に構造決定に関する研究について述べる。

Fig. 1-1 Structures of *threo*-methyllanthionine, *meso*-lanthionine and lysinoalanine

threo-Methyllanthionine



meso-Lanthionine



Lysinoalanine

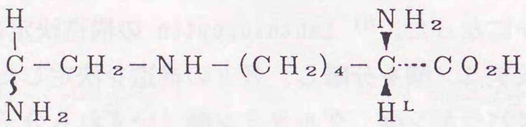
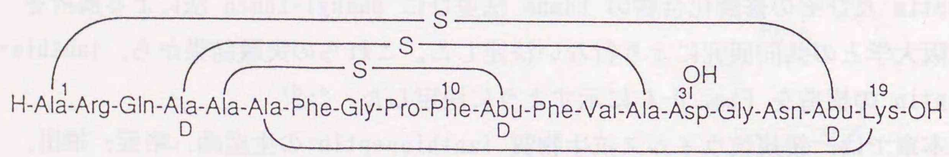


Fig. 0-4 Structure of lanthiopeptin



第1節 Lanthiopeptin の生産菌

Lanthiopeptin 生産菌である L337-2 株は、インド、Gujarat 州、Dohad で採取した土壌より分離した菌株である。本菌株の形態学的特徴は、斜面寒天培地に形成する栄養菌糸及び気菌糸共に良く分岐し、気菌糸は、その双輪生の担胞子体に、桿状の短い胞子鎖を房状に形成している。その輪生体は 1 個の菌糸に有刺鉄線様に規則正しく配置しており、各胞子鎖は 3 から 10 個の胞子から成り、その形態は桿形で表面は平滑である。本菌株はほとんどの培地で良く生育するが、Czapek の庶糖硝酸塩培地では生育は悪い。胞子形成後の気菌糸の色調は、灰色掛かったピンクから褐色掛かったピンクであり赤系列に属する。メラニン様物質あるいはその他の色素は産生しない（Table 1-1)。L337-2 株は Williams ら[10] の記載に従って、Table 1-2 に示すように生理学的に特徴付けることができた。本菌株の細胞の加水分解物の中には、L,L-ジアミノピメリン酸、グルコース、マンノース、及びリボースが認められたので、細胞壁 I_{NC} 型に属し、リン脂質としてホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトールを含むので P-II 型に属する。Baldacci と Locci、[10] Shirling と Gottlieb、[12,13] 及び Williams ら[10] の記載に基づく解析から、L337-2 株は分類学的に *Streptoverticillium griseocarneum*、*S. cinnamoneum*、*S. hachijoense*、*S. lilacinum* 及び *S. kashmirense* に近縁であることが明らかとなったが、これら 5 菌種との直接の比較により *Streptoverticillium cinnamoneum* と同定された。

Table 1-1 Cultural characteristics of strain L337-2

Medium	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Diffusible pigment
Sucrose - nitrate agar (CZAPEK - DOX agar)	Poor	Poor; grayish pink (8)	Colorless	None
Tryptone - yeast extract broth (ISP No. 1)	Poor; not turbid	None	Colorless	None
Yeast extract - malt extract agar (ISP No. 2)	Good	Good, V; grayish yellowish pink (32)	Dark orange yellow (72)	None
Oatmeal agar (ISP No. 3)	Moderate	Moderate, V; grayish pink (8)	Colorless	None
Inorganic salts - starch agar (ISP No. 4)	Moderate	Moderate, C; grayish pink (8)	Light olive brown (94)	None
Glycerol - asparagine agar (ISP No. 5)	Moderate	Moderate, V; grayish yellowish pink (32)	Light yellow (86)	None
Peptone - yeast extract - iron agar (ISP No. 6)	Moderate	None	Moderate olive yellow (71)	None
Tyrosine agar (ISP No. 7)	Good	Good, V; light grayish reddish brown (45)	Moderate yellowish brown (77)	None
Glucose - asparagine agar	Moderate	Moderate, V; brownish pink (33)	Dark olive brown (96)	None
Nutrient agar	Moderate	None	Light yellow (86)	None
BENNETT's agar	Good	Good, V; reddish gray (22)	Dark olive yellow (72)	None

Observation after incubation at 28°C for 3 weeks.
Color name used: ISCC-NBS Color-Name Charts.
V: Velvety, C: cottony.

Table 1-2 Physiological characteristics of strain L337-2

Temperature:	
Growth range	18～45°C
Optimal growth	29～40°C
No growth	13 and 48°C
Tolerance to:	
Lysozyme, 0.01%	+
NaCl, 1～7%	+
8% or more	−
pH 4.5～11.5	+
Production of:	
Gelatinase	+
Amylase	+
Nitrate reductase	−
Tyrosinase	−
Utilization of:[a]	
Glycerol	+
D-Arabinose	−
L-Arabinose	−
D-Xylose	−
D-Ribose	+
L-Rhamnose	−
D-Glucose	−
D-Galactose	−
D-Fructose	−
D-Mannose	+(w)[b]
L-Sorbose	−
Sucrose	−
Lactose	−
Cellobiose	−
Melibiose	−
Trehalose	+
Raffinose	−
D-Melezitose	−
Soluble starch	+
Cellulose	−
Dulcitol	−
Inositol	+
D-Mannitol	−
D-Sorbitol	−
Salicin	−
Production of:	
Melanin	−
Utilization of:	
Coumarin	−
L-Methionine	−
L-Proline	+
Shikimic acid	−
DL-α-Aminobutyric acid	−
Acid from:	
D-Galactose	−
Inositol	+
D-Fructose	−
D-Ribose	+
D-Trehalose	+
Degradation of:	
Aesculin	−
Citrate	+
DNA	+
Hypoxanthine	+
L-Tyrosine	+
Tween 80	+
Production of:	
H_2S	+
Growth with:	
1-Phenolethanol	+(w)[b]
Potassium tellurite	−
Crystal violet	−
Malachite green	−
Resistance to:	
Carbenicillin	+
Cephaloridine	+
Cephalothin	+
Cefamandole	+
Colistin	+
Antibiosis to:	
Aspergillus niger	+
Bacillus subtilis	+
Candida albicans	+

[a] Basal medium: PRIDHAM - GOTTLIEB's inorganic salts medium (ISP No. 9 medium).
[b] (w): Weakly positive.

第２節　Lanthiopeptin の醗酵生産

Lanthiopeptin の生産は、先ず斜面寒天培地上で良く生育した生産菌 L337-2 株を、500mℓ の三角フラスコ中 Table 1-3 に示す組成の培地 100mℓ に接種し、回転振盪機 (200rpm) 上 28℃ で 4 日間培養した。この種培養液の 5mℓ を上記と同じ組成の生産培地 100mℓ を含む 500mℓ の三角フラスコに移し、同一条件で本培養を行なった。Lanthiopeptin の生産力価の検定は、HSV-1 によるベロ細胞の変性効果の阻止活性、並びにペーパーディスク法による枯草菌 (*Bacillus subtilis* PCI219) の生育阻止活性を指標とした。本培養による lanthiopeptin の生産は 6 日後に最高力価に達した。培養は 20ℓ のジャーファーメンターでも行なった。すなわち、種培養液 500mℓ を 12ℓ の生産培地を含むジャーファーメンター中に接種し、通気量 12ℓ/min で除菌空気を導入しながら、28℃、250rpm で撹拌した。この培養での lanthiopeptin の生産は、64 時間後に 150μg/mℓ の最高力価に達した。

Table 1-3　Production medium of lanthiopeptin

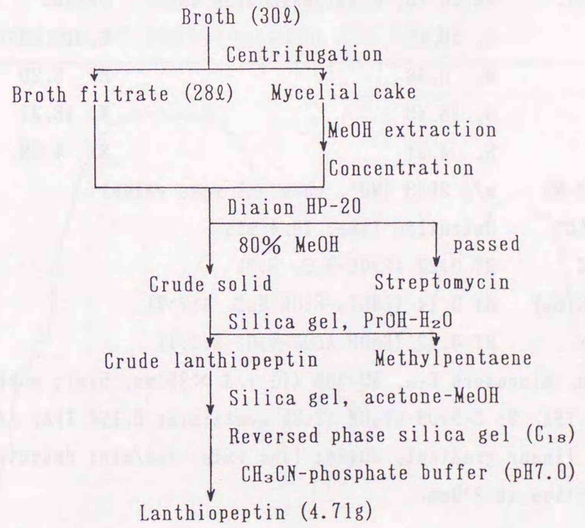
Glucose	3.0%
Soybean meal	2.0%
Distiller's solubles	1.5%
Fish meal	0.2%
$CaCO_3$	0.6%

pH7.0 (before sterilization)

第３節　Lanthiopeptin の抽出、分離及び精製

Lanthiopeptin の抽出及び精製は、Fig. 1-2 に示す方法に従って行なった。すなわち lanthiopeptin の生産が最高力価に達した *Streptoverticillium cinnamoneum* L337-2 株の培養液 30ℓ を、シャープレス遠心機で遠心上清 (28ℓ) と菌体とに分離後、菌体をメタノールで抽出した。メタノール層は減圧下濃縮し、遠心上清に混合した。pH7.0 に調整した混合液に Diaion HP-20 を加え撹拌し、活性物質を吸着抽出した。Diaion HP-20 非吸着部にも抗菌活性が認められたがこの活性成分は streptomycin と同定された。抗ウイルス活性成分は Diaion HP-20 から 80% メタノールで溶出され、凍結乾燥後 21.3g の粗粉末として得られた。この粗粉末のブロパノール－水系のシリカゲルクロマトにより、メチルペンタエン系抗カビ抗生物質を除いた後、抗ウイルス活性の本体である lanthiopeptin の粗粉末 8.3g を得た。この lanthiopeptin の粗粉末をアセトン－メタノール系のシリカゲルクロマト、更にアセトニトリル－リン酸緩衝液 (pH7.0) 系による逆相系シリカゲルクロマトにより順次精製し、純粋な lanthiopeptin の白色粉末 4.71g を得た。 このようにして得られた純粋な白色粉末をメタノールから結晶化し、lanthiopeptin の無色針状晶を得た。

Fig. 1-2　Isolation and purification of lanthiopeptin



第４節　Lanthiopeptin の物理化学的性状

Lanthiopeptin は無色針状晶として単離され、TLC 及び HPLC により単一物質であることが確認された。Lanthiopeptin は含水低級アルコール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド及び酸性水に良く溶解し、水及び低級アルコールに若干溶けるが、ヘキサンには不溶である。呈色反応では、ヨウ素、ニンヒドリン、Sakaguchi 及び Rydon-Smith 試薬に対し陽性であるが、アンスロン、Fehling 及び塩化第二鉄反応には陰性である。Lanthiopeptin は明確な融点を示さず、245℃ 以上で分解した。元素分析値、^{13}C-NMR スペクトル並びに fast atom bombardment マススペクトル (FAB-MS) で m/z 2043 に擬似分子イオン (MH^+) ピークが観測されたことにより、分子式 $C_{89}H_{125}N_{25}O_{25}S_3$ が決定された (Table 1-4)。

Table 1-4　Physico-chemical properties of lanthiopeptin

Nature	Colorless needles	
mp	>245℃ (dec.)	
$[\alpha]_D^{22.5}$	-120° (c 1.0, 50% MeOH)	
Anal.	Calcd for $C_{89}H_{125}N_{25}O_{25}S_3 \cdot 5H_2O$:	Found:
	C, 50.15	C, 49.90
	H, 6.38	H, 6.20
	N, 16.43	N, 16.31
	S, 4.51	S, 4.59
FAB-MS	m/z 2043 (MH^+, chemical mass value)	
HPLC*	Retention time: 19.4 min	
TLC	Rf 0.20 ($PrOH-H_2O$, 7:3)	
(SiO_2)	Rf 0.14 ($CHCl_3$-EtOH-H_2O, 4:7:2)	
	Rf 0.13 (BuOH-AcOH-H_2O, 3:1:1)	

*Column, Microsorb C_{18}, 80-299 (10 i.d.×250mm, 5μm); mobile phase, A: 0.1% TFA, B: 2-PrOH-CH_3CN (7:3) containing 0.1% TFA, A/B 100/0→0/100 linear gradient, 30min; flow rate, 4mℓ/min; detection, UV absorption at 210nm.

Lanthiopeptin は、その IR スペクトル (Fig. 1-3) で 1655 及び 1520cm^{-1} に強いアミドの吸収が認められ、UV スペクトル (Fig. 1-4) では 207nm の強い吸収の他に、フェニル基に特徴的な 252、258、264 及び 268nm の弱い吸収が認められたので、フェニルアラニンを含むペプチドであると推定された。ペプチド構造は、更に ^{1}H-NMR スペクトル (Fig. 1-5) からも支持された。すなわち 7.2 から 10.9ppm の間にアミドプロトンのシグナルが観測され、3.0 から 5.3ppm の間にペプチド結合したアミノ酸の α 位のプロトンのシグナルが認められた。この他に 7ppm 付近には 3 個分のフェニル基由来の芳香環プロトンのシグナル、0.83 (d J=6.8Hz)、0.96 (d J=6.4Hz)、1.17 (d J=7.7Hz) 及び 1.20ppm (d J=7.7Hz) に 4 本の脂肪族のメチル基が明確なシグナルとして観測された。^{13}C-NMR スペクトル (Fig. 1-6) では 167.8 から 177.2ppm の間に 22 本のカルボニル炭素のシグナルが認められ、更に DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer) 法[14] による解析の結果、15 本の芳香族炭素を含む 36 本のメチン炭素、23 本のメチレン炭素及び 4 本のメチル炭素のシグナルが確認された。これらのシグナルの他に更に 137.8、138.0、138.5 (以上芳香族) 及び 157.0ppm (グアニジノ基) の 4 本の 4 級炭素のシグナルが認められ、合わせて 89 個の炭素が lanthiopeptin には存在することが明らかとなった (Table 1-5)。

Fig. 1-3　IR spectrum of lanthiopeptin (in KBr)

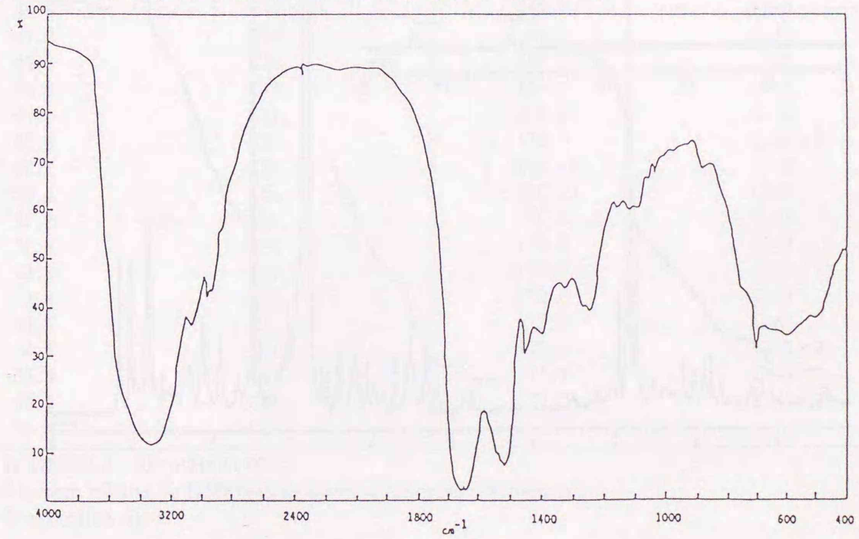


Fig. 1-4 UV spectrum of lanthiopeptin (in 50% MeOH)

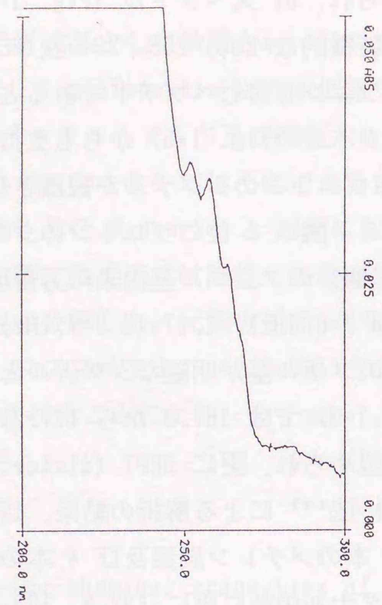


Fig. 1-5 ^{1}H-NMR spectrum of lanthiopeptin (in DMSO-d_6)

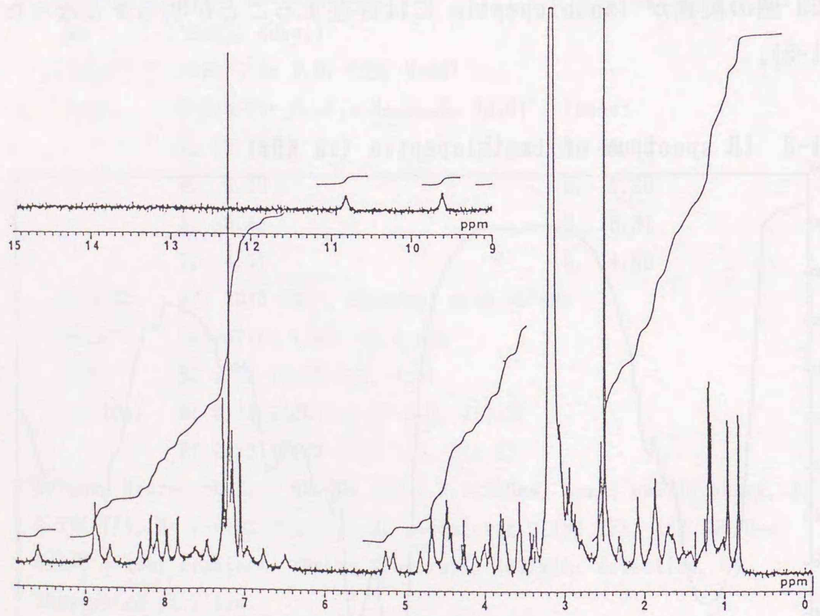


Fig. 1-6 ^{13}C-NMR spectrum of lanthiopeptin (in DMSO-d_6)

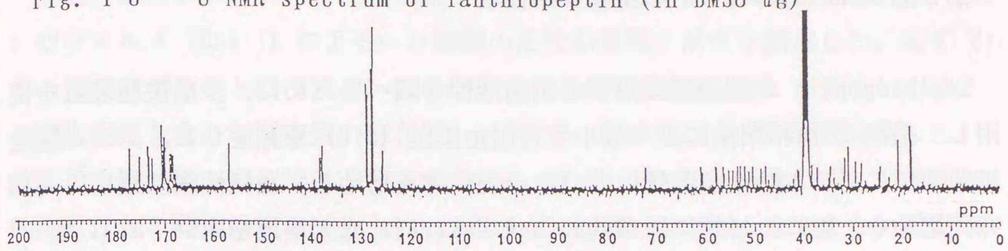


Table 1-5 ^{13}C-NMR data for lanthiopeptin[a]

Chemical shift[b]	Functional groups	Chemical shift[b]	Functional groups
18.1	CH_3	57.8	CH
18.2	CH_3	57.9	CH×2[c]
18.5	CH_3	60.7	CH
20.9	CH_3	61.1	CH
22.7	CH_2	72.3	CH
24.5	CH_2	125.7	CH=C
24.8	CH_2	125.8	CH=C
28.3	CH_2	126.0	CH=C
28.5	CH_2	127.6	CH=C×2[c]
29.5	CH_2	127.8	CH=C×2[c]
31.0	CH_2×2[c]	128.0	CH=C×2[c]
31.7	CH×2[c]	128.2	CH=C×2[c]
32.0	CH_2×2[c]	128.7	CH=C×2[c]
33.9	CH_2	129.1	CH=C×2[c]
34.6	CH_2	137.8	C=C
35.0	CH_2	138.0	C=C
37.2	CH_2	138.5	C=C
38.2	CH_2	157.0	C
39.0	CH_2	167.8	C=O
39.3	CH_2×2[c]	168.3	C=O
40.8	CH_2×2[c]	168.7	C=O
41.2	CH	169.1	C=O
42.0	CH_2	169.7	C=O
46.0	CH_2	169.9	C=O
47.1	CH_2	170.0	C=O
47.8	CH	170.1	C=O×2[c]
48.7	CH	170.19	C=O
50.4	CH	170.23	C=O
51.2	CH	170.4	C=O
51.9	CH	170.6	C=O
52.2	CH	170.7	C=O×2[c]
52.9	CH	172.6	C=O
53.5	CH	173.2	C=O
54.5	CH	173.5	C=O×2[c]
55.3	CH	175.2	C=O
56.2	CH	177.2	C=O×2[c]
56.5	CH		

[a] In DMSO-d_6, 100 MHz at 60°C.
[b] δ in ppm relative to DMSO-d_6 as internal reference (39.50 ppm).
[c] Overlapping signal.

第５節　Lanthiopeptin の生物学的性状

Lanthiopeptin の細菌類に対する抗菌活性を調べるために、多重接種装置を使用し、系列 2 倍希釈法により最小生育阻止濃度（MIC）を測定した。グラム陽性細菌並びにグラム陰性細菌類には Nutrient 寒天培地を、嫌気性細菌類には GAM 寒天培地を、更にカビ類には Sabouraud dextrose 寒天培地を用い、37℃ で一晩培養後活性を判定した。Table 1-6、1-7 及び 1-8 に示すように、lanthiopeptin は、枯草菌並びに嫌気性細菌の *Bacteroides fragilis* 及び *Peptostreptococcus anaerobius* に対し特異的かつ顕著な生育阻止活性を示した。また一部のカビ類に対する弱い生育阻止活性も認められた。

Table 1-6　Antibacterial activity of lanthiopeptin

Test organism	MIC (μg/ml)
Staphylococcus aureus FDA 209P	100
S. aureus Smith	100
S. aureus D136	>100
S. aureus No. 52-34	>100
S. aureus A20239	>100
S. aureus BX1633-2 A9606	>100
S. aureus A15097	>100
S. epidermidis D153	>100
S. epidermidis A22152	>100
Streptococcus faecalis A9612	>100
S. pyogenes A20201	100
Micrococcus luteus No. 1001	100
Bacillus subtilis PCI 219	0.8
Escherichia coli NIHJ	>100
E. coli Juhl A15119	>100
E. coli JR/C600 A20665	>100
E. coli A9624	>100
E. coli TEM A20341-1	>100
Enterobacter cloacae A9659	>100
Klebsiella pneumoniae No. 22-3038 A20680	>100
Pseudomonas aeruginosa A9930	100
P. aeruginosa A9843A	>100
Proteus vulgaris A9436	>100
P. mirabilis A9554	>100
Morganella morganii A9553	>100
Serratia marcescens A20222	>100

Table 1-7　Anti-anaerobic bacterial activity of lanthiopeptin

Test organism	MIC (μg/ml)
Clostridium difficile A21675	>100
C. perfringens A9635	100
Peptostreptococcus anaerobius A21905	3.1
Bacteroides fragilis A22693	6.3
B. fragilis A22035	6.3
B. fragilis A22021	3.1
B. fragilis A21916	3.1
B. fragilis A22534	6.3
B. fragilis A22695	6.3
B. fragilis A22533	3.1
B. fragilis CUH-67	6.3

Table 1-8　Antifungal activity of lanthiopeptin

Test organism	MIC (μg/ml)
Candida albicans IAM 4888	50
C. albicans A9540	100
Cryptococcus neoformans D49	50
C. neoformans IAM 4519	50
Aspergillus fumigatus IAM 2530	>100
A. fumigatus IAM 2034	>100
A. flavus FA 21436 NRRL 484	>100
Piricularia oryzae D91	>100
Trichophyton mentagrophytes D155	100
T. mentagrophytes No. 4329	>100
Blastomyces dermatitidis IFO 8144	>100
Sporothrix schenckii IFO 8158	100
Petriellidium boydii IFO 8078	100

Lanthiopeptin の *in vitro* の抗ウイルス活性を調べるために、単純ヘルペス 1 型ウイルス（HSV-1）によるベロ細胞の変性効果阻止活性を測定した。先ず 24 穴のミクロプレートに 8×10^4 個の細胞を含む細胞懸濁液 1mℓ を分注し、5% 二酸化炭素を含む加湿空気の存在下、37℃ で 48 時間から 72 時間培養した。培養後生育培地を取り除き、種々の濃度の lanthiopeptin を含む新しい培地を加えた。この際、検定のコントロールとして lanthiopeptin を含まない検定液も調製した。次に 2×$TCID_{50}$（50% tissue culture infective dose）の HSV-1 を含む培地 0.1mℓ を分注し、更に 72 時間培養を行なった。細胞変性効果阻止活性は、コントロールに比較し、細胞の変性効果を 50% 阻止する薬剤の濃度、すなわち ID_{50}（50% inhibitory dose）で表示した。同時にウイルスのみを除いたプレートを調製し、薬剤の宿主細胞（ベロ細胞）に対する細胞毒性を測定した。コントロールに比較しベロ細胞の生育を 50% 阻害する薬剤の濃度、TD_{50}（50% toxic dose）を求めた。本検定法には、ヘルペスウイルスによる疾患に対し、実際に臨床で用いられている acyclovir を標準薬剤として使用した。本検定法では、acyclovir は ID_{50}=0.46μg/mℓ、TD_{50}=>100μg/mℓ であった。一方 lanthiopeptin は ID_{50}=0.05μg/mℓ であり、acyclovir より約 10 倍高い活性を示したが、ベロ細胞に対し若干の細胞毒性を示した（Table 1-9）。Lanthiopeptin のインフルエンザＡ型ウイルス（Flu-A）に対する活性は、MDCK（Madin Darby canine kidney）細胞を宿主細胞に用いた細胞変性効果阻止活性の測定により検定したが、活性は認められなかった。

Table 1-9　Antiviral activity of lanthiopeptin

	Activity vs. HSV-1 (ID_{50}, μg/mℓ)	Cytotoxicity vs. vero cells (TD_{50}, μg/mℓ)
Lanthiopeptin	0.05	12.5
Acyclovir	0.46	>100

Lanthiopeptin の各種酵素に対する *in vitro* の阻害活性を測定した結果、豚の胃由来の H^+,K^+-ATPase に対し弱い阻害活性が認められた (Table 1-10)。

Table 1-10 Enzyme inhibitory activity of lanthiopeptin

Enzyme	IC_{50} (μg/mℓ)
Angiotensin I converting enzyme	>100
H^+,K^+-ATPase	36.3
Na^+,K^+-ATPase	>100

Lanthiopeptin のマウスを用いた急性毒性試験では、50mg/kg、i.m. 投与で、毒性症状は認められなかった。

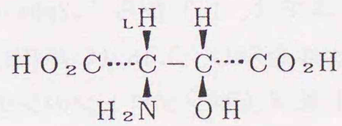
第6節 Lanthiopeptin の構造研究

(1) Lanthiopeptin の構成アミノ酸

Lanthiopeptin (1) の物理化学的性状の考察により、本抗生物質はフェニルアラニン 3 モル、アルギニン 1 モルを含むペプチド系化合物であることが判明した。1 の 6N 塩酸中、110℃、24 時間加熱加水分解後のアミノ酸分析の結果、これらのアミノ酸の他に、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、バリン、プロリンの 5 種類の通常アミノ酸、更に 4 種類の未知成分が確認された。これら未知アミノ酸の同定並びに通常アミノ酸の立体化学を明らかにするために、1.1g の 1 を加水分解し、各アミノ酸の分離を行なった。分離には Dowex 50W×8 (H^+ 型) による陽イオン交換クロマトを用い、塩酸の濃度を順次上げて展開溶出した。分離した 7 種の通常アミノ酸の内、グリシンを除く 6 種類のアミノ酸については、各々の比旋光度の測定結果から、立体化学はすべて L 体と決定した。この内、比旋光度の絶対値が比較的小さいフェニルアラニンについては、更に配位子交換による光学分割カラムを用いた HPLC により、L 体であることを確認した。

Dowex 50W×8 のカラムから 0.2N 塩酸で溶出した未知アミノ酸 **2** は、水から再結晶し無色針状晶として得られた。**2** は ^{1}H-NMR スペクトルで、4.48 並びに 4.62ppm に結合定数 4Hz で互いにスピン結合した 2 個のメチンプロトンの存在を示し、^{13}C-NMR スペクトルでは 169.5 及び 173.9ppm に 2 個のカルボニル炭素、56.9 及び 69.7ppm に 2 個のメチン炭素の存在を示した。元素分析並びにマススペクトル (MS, *m/z* 149, M^+) から、$C_4H_7NO_5$ の分子式が決定され、β-ヒドロキシアスパラギン酸であることが明らかとなったが、TLC の Rf 値が *threo*-β-ヒドロキシ-DL-アスパラギン酸とは異なり、*erythro*-体である。**2** の比旋光度は +43.3° 、融点は 225－245℃ (dec.) であり、文献値[15] との比較か

Fig. 1-7 *erythro*-β-Hydroxy-L-aspartic acid (**2**)



ら **2** を *erythro*-β-ヒドロキシ-L-アスパラギン酸と同定した (Fig. 1-7)。

未知アミノ酸 **3** 及び **4** は、同クロマトにおいて 0.8N 塩酸で、フェニルアラニンの一部と同時に溶出した。先ず、ブタノール－酢酸－水系でのシリカゲルクロマトによりフェニルアラニンを除き、次にセルロースクロマトにより **3** と **4** を完全に分離した。

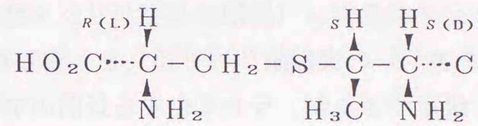
3 は、secondary ion マススペクトル (SIMS) で *m/z* 223 に 擬似分子イオン (MH^+) ピークを示した。**3** の ^{1}H-NMR スペクトルにおいて、1.49 (d *J*=7Hz) と 3.61ppm (dq *J*=6, 7Hz) に 2 級メチル基とその付け根のプロトンのシグナルを、3.22ppm (d *J*=4Hz) にはメチレンプロトンのシグナルを示した。更に 3.97 (d *J*=6Hz) と 4.07ppm (t *J*=4Hz) に 2 個のメチンプロトンのシグナルが認められ、前者はメチル基付け根のプロトンと、後者はメチレンプロトンとそれぞれスピン結合していることが明らかとなった。**3** の ^{13}C-NMR スペクトルでは、これらのプロトンに対応する 5 本の炭素のシグナルの他に、166.5 及び 173.9 ppm に 2 本のカルボニル炭素のシグナルが認められた。これらのデータは *threo*-メチルランチオニンの文献値[16] と一致し、**3** を *threo*-メチルランチオニンと同定した。立体化学については、**3** の ^{1}H-NMR 並びに比旋光度の値が 2*R*,(2*S*,3*S*) 体の文献値[16] と一致したことより、**3** を (2*R*)-*S*-[(2*S*,3*S*)-3-メチルアラニン-3-イル]システインと同定した (Fig. 1-1)。この構造は、次のアミノ酸配列の決定の項で述べるように、**3** のダンシル体とその標品との直接の比較により確認した。

4 は SIMS で *m/z* 209 に擬似分子イオン (MH^+) ピークを示し、^{1}H-NMR スペクトルにおいて *J*=6Hz で互いにスピン結合した、メチンプロトンとメチレンプロトンのシグナルを、各々 4.28 (t) と 3.27ppm (d) に示すのみの単純なスペクトルを与えた。**4** は TLC 並びにアミノ酸分析における挙動が *meso*-ランチオニンの標品と一致し、更に **4** が旋光性を示さないことから、**4** を *meso*-ランチオニンと同定した (Fig. 1-1)。

アミノ酸 **5** は塩基性が強く、4N 塩酸でアルギニンと同時に溶出された。**5** はセルロースクロマトによりアルギニンと分離し、凍結乾燥後粘着性の固体として単離した。^{1}H-NMR スペクトルでは、1.3 から 2.2ppm の間にメチレンプロトン 8 個分の重なり合ったシグナルを示し、3.18 (t *J*=7Hz) と 3.56ppm (d *J*=7Hz) にそれぞれ窒素原子に隣接したメチレンプロトンのシグナルを、更に 4.07 (t

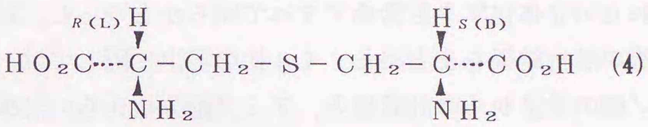
Fig. 1-1 Structures of *threo*-methyllanthionine, *meso*-lanthionine and lysinoalanine

threo-Methyllanthionine



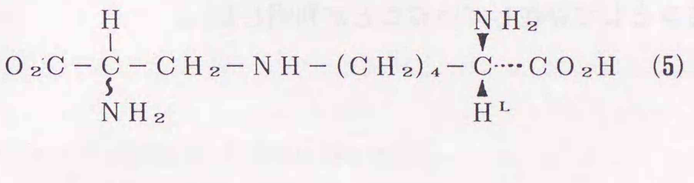
(3)

meso-Lanthionine



(4)

Lysinoalanine



(5)

J=7Hz) と 4.29 ppm (t *J*=7Hz) に 2 個のメチンプロトンのシグナルを示した。3.56ppm のメチレンプロトンは 4.29ppm のメチンプロトンとのみスピン結合していることから、窒素原子をはさんで一方にアラニン残基、もう一方はプロトンの数からリジン残基であると推定されたが、後者はその ^{1}H-NMR スペクトルがリジンのスペクトルと良く一致することから確認された。更に **5** の ^{13}C-NMR スペクトルでは 46.8 と 48.8ppm の、窒素原子に隣接した 2 個のメチレン炭素を含む 5 個のメチレン炭素、50.0 と 53.6 ppm に 2 個のメチン炭素、並びに 170.7 と 172.9ppm に 2 個のカルボニル炭素の存在を示し、^{1}H-NMR スペクトルから予想した **5** の構造を支持した。**5** の構造は文献上、アルカリ処理した牛膵

臓のリボヌクレアーゼAから得られたと報告のあるリジノアラニン[17,18]と一致したので、標品と直接比較し 5 をリジノアラニンと同定した (Fig. 1-1)。

リジノアラニンは通常の酸加水分解の条件では、そのアラニン部分が容易にラセミ化することが報告されているので、[19] 1 から酸加水分解を経て得られた 5 も、そのアラニン部分がラセミ化しているものと考えられた。5 の比旋光度の値は +15.7° であり L-D,L-リジノアラニン（最初の文字がリジン部分、次の文字がアラニン部分の立体化学を表示）の文献値[20] +15° と一致したので、5 のリジン部分の立体化学は L と決定できたが、ラセミ化する以前のアラニン部分の立体化学はこの方法では決定できなかった。

以上のことから、lanthiopeptin (1) を構成するアミノ酸が 5 のアラニン部分を除き、それらの立体化学をも含めてすべて明らかとなった。Table 1-11 にこれらアミノ酸の解析結果をまとめた。モル比の算出に際しては、実際に分離した個々のアミノ酸の重量からの計算値と、アミノ酸分析からの計算値を示してある。先に決定された 1 の分子式 $C_{89}H_{125}N_{25}O_{25}S_3$ から、3 種の酸性アミノ酸残基の内 2 種は ω-アミドの形、すなわち（β-ヒドロキシ）アスパラギン及びグルタミンとして存在していることが判明した。

Table 1-11 Amino acid composition of lanthiopeptin

	Molar ratio		
Amino acid	Isolated amount	Amino acid analyzer	Estimated number of residue
L-HyAsp*1	0.99	1.00	1
L-Asp	1.00	1.02	1
L-Glu	1.11	1.12	1
Gly	2.38	2.00	2
L-Val	1.24	0.82	1
L-Pro	1.13	1.10	1
L-Phe	2.87	2.94	3
MeLan*2	1.91	1.87	2
Lan*3	0.35	1.01*4	1
L-Arg	1.02	1.00	1
LAL*5	0.98	1.00	1

*1 *erythro*-β-Hydroxy-L-aspartic acid.

*2 *threo*-Methyllanthionine.

*3 *meso*-Lanthionine.

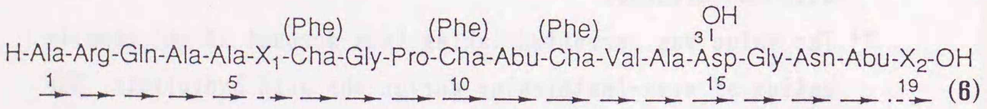
*4 The value was corrected taking into account of an epimerization of *meso*-lanthionine during the acid hydrolysis. The hydrolysis of pure *meso*-lanthionine for 24 hours caused epimerization of 24%.

*5 Lysinoalanine.

(2) Lanthiopeptin のアミノ酸配列

Lanthiopeptin (1) のアミノ酸配列を決定する目的で以下の実験を行なった。最初に 1 の還元的脱硫反応 (H_2/Pd、10kg/cm^2、50℃、4 日間) により生成した修飾ペプチド **6** の Edman 法によるアミノ酸の配列決定を行なった (Fig. 1-8)。本脱硫反応により、1 に存在する *threo*-メチルランチオニン (*threo*-MeLan、**3**) 残基は、**6** ではアラニン及び α-アミノ酪酸 (Abu) 残基に、*meso*-ランチオニン (*meso*-Lan、**4**) 残基は 2 個のアラニン残基に、またフェニルアラニン残基はシクロヘキシルアラニン (Cha) 残基に変換していることが、**6** のアミノ酸分析により確認された。**6** の Edman 分解により、N末端から逐次得られるフェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸は、リジノアラニン残基由来の 6 番目及び 19 番目のアミノ酸を除いてすべてのサイクルで確認できた。このことから Fig. 1-8 に示すように、6 番目及び 19 番目のアミノ酸を除く **6** の全アミノ酸配列が明らかになった。

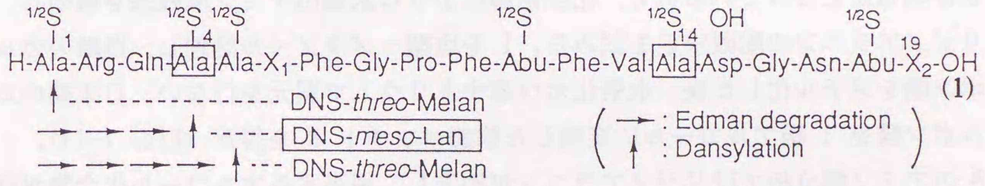
Fig. 1-8 Sequence analysis of desulfurized lanthiopeptin (**6**).
An arrow of a broken line indicates that PTH-amino acid was not detected. Number on an arrow indicates a cycle of the Edman degradation. X_1 and X_2 correspond to lysinoalanine residue.



次に **1** におけるスルフィド架橋の位置決定を行なった。**6** のN末端から 5 番目までに、**3** 及び **4** 由来の 3 個のアラニン残基が存在することが分かっているので、**1** において **6** のこれらのアラニンに相当する残基を dansyl-Edman 法によりダンシル化し、酸加水分解後得られるダンシル (DNS) 誘導体を分析した (Fig. 1-9)。その結果 1 番目と 5 番目のアラニン相当残基のダンシル化では

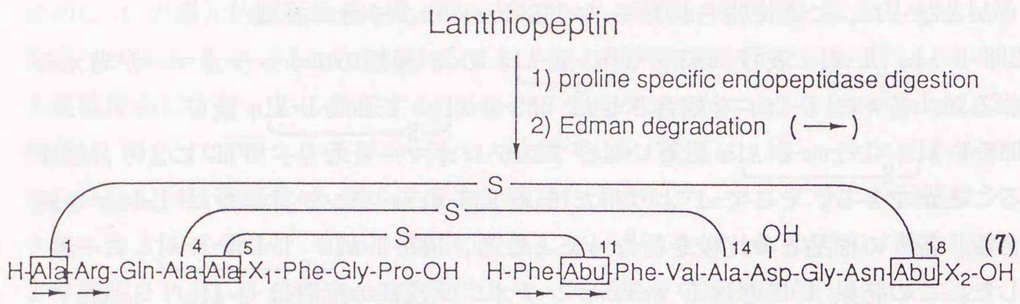
モノ-DNS-*threo*-メチルランチオニンが、4 番目の残基のダンシル化ではモノ-DNS-*meso*-ランチオニンが各々確認されたので、*meso*-ランチオニンはN末端から 4 番目と 14 番目に位置し、この間でスルフィド架橋が形成されていることが明らかとなった。ここで得られたモノ-DNS-*meso*-ランチオニンは、DNS-D-Ala$\underset{S}{\frown}$L-Ala 及び DNS-L-Ala$\underset{S}{\frown}$D-Ala の 2 種類のエナンチオマーが考えられるが、各々に L-Leu を縮合させた DNS-D-Ala$\underset{S}{\frown}$L-Leu-L-Ala 及び DNS-L-Ala$\underset{S}{\frown}$L-Leu-D-Ala は互いにジアステレオマーとなり、HPLC により分離することができる。そこで 1 より得たモノ-DNS-*meso*-ランチオニンに L-Leu を縮合後、各々の標品との比較を行なったところ、DNS-D-Ala$\underset{S}{\frown}$L-Leu-L-Ala に一致した。この結果 1 における *meso*-ランチオニン残基の配置は D-Ala$^4\underset{S}{\frown}$L-Ala^{14} と決定された。

Fig. 1-9 Determination of the position of *meso*-lanthionine



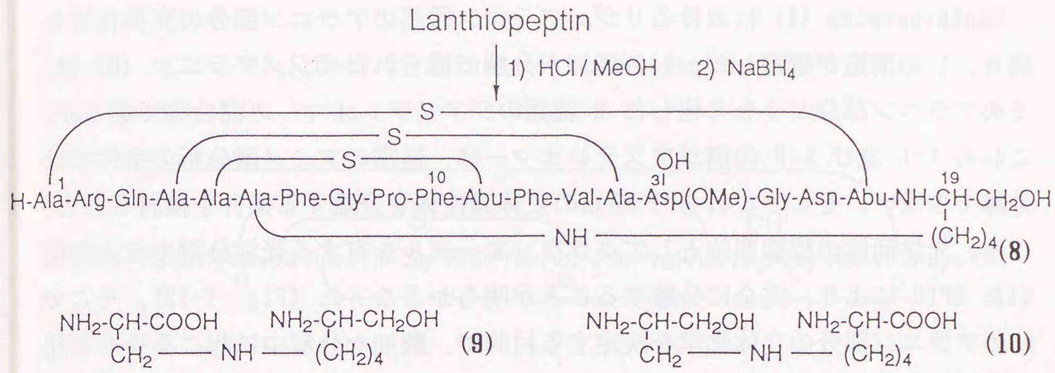
一方 2 個の *threo*-メチルランチオニン残基のスルフィド架橋の位置は、Fig. 1-10 に示す方法により決定した。すなわち **1** をプロリン特異的エンドペプチダーゼ消化し (0.05M リン酸緩衝液 pH7.5、40℃、3 日間)、修飾ペプチド **7** とした後 Edman 消去法によって解析した。1 回目の Edman 分解後に得られるペプチド部分を酸加水分解し、そのアミノ酸組成を分析したところ、メチルランチオニン 1 モル及びフェニルアラニン 1 モルが消失していた。2 回目の Edman 分解後のペプチド部分には、アルギニンに加え更にもう 1 モルのメチルランチオニンが消失していることが確認された。このことにより、Ala^1-$^{1/2}$S は Abu^{18}-$^{1/2}$S と Ala^5-$^{1/2}$S は Abu^{11}-$^{1/2}$S とスルフィド架橋を形成していることが一義的に決定され、2 個の *threo*-メチルランチオニン残基の配置が確定した。

Fig. 1-10 Assignment of sulfide bridge belonging to *threo*-methyllanthionine



1 におけるリジノアラニン残基の配置は、既に述べたように **6** の Edman 法による解析から、N末端から 6 番目と 19 番目（すなわちC末端）に位置することが明らかとなっているので、化学修飾によりC末端のアミノ酸残基を解明し、リジノアラニンの配置決定を試みた。1 を塩酸－メタノール処理し、遊離のカルボン酸をメチル化した後、水素化ホウ素ナトリウムで還元を行ない、C末端のカルボン酸を 1 級アルコールに変換した修飾ペプチド **8** を得た（Fig. 1-11）。**8** のアミノ酸分析ではリジノアラニンが消失し、相当するアルコール化合物が確認されたが、この物質は **10** ではなく **9** であることが各々の標品との比較により判明した。このことから 1 におけるリジノアラニン残基の配置は、そのアラニン部分がN末端から 6 番目に、リジン部分はC末端に位置し、この間で架橋を形成していることが明らかとなった。

Fig. 1-11 Assignment of the position of lysinoalanine



(3) Lanthiopeptin の構造

Lanthiopeptin (1) におけるリジノアラニン残基のアラニン部分の立体化学を除き、1 の構造が確定した。1 の酸加水分解で得られたリジノアラニン (5) は、そのアラニン部分がラセミ化した 2 種類のジアステレオマーの混合物であるが、これら L-L 及び L-D の両ジアステレオマーは、通常のアミノ酸分析の条件では分離できない。そこでこれら 2 種類の立体異性体を分離する条件を検討したところ、光学活性の認識部位としてクラウンエーテルを有する光学分割カラムを用いた HPLC により、完全に分離することが明らかとなった (Fig. 1-12)。そこで 5 のアラニン部分の立体化学を決定する目的で、酸加水分解中に起こるラセミ化を経時的に追跡した。その結果 Table 1-12 に示すように分解時間 4 時間では 5 のジアステレオマーのうち L-L 体が 80% であったが、22 時間後には 56% となりほぼ完全にラセミ化した。この結果 5 は 1 の分子内では L-L 体として存在していることが明らかとなった。

Fig. 1-12 HPLC analysis of two diastereoisomers of lysinoalanine using CROWNPAK CR(+)

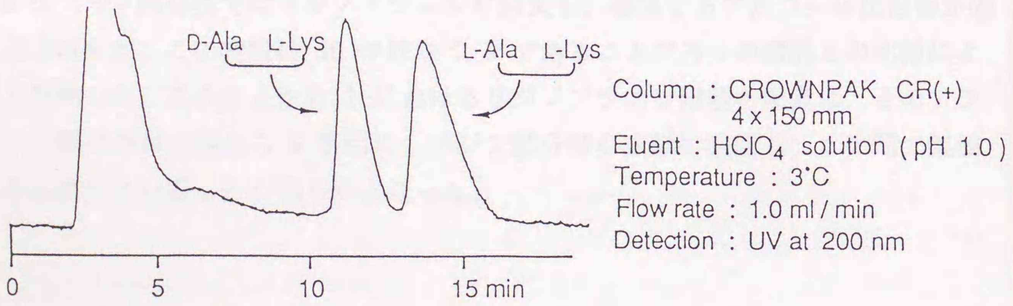
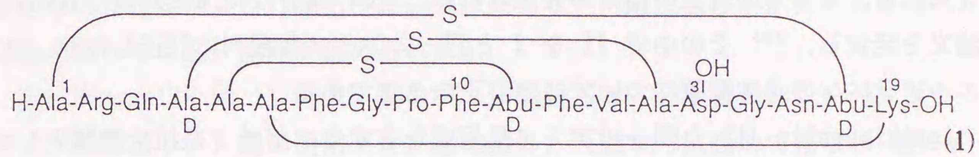


Table 1-12 Ratio of two diastereoisomers of lysinoalanine obtained from lanthiopeptin (1)

Time of hydrolysis	D-Ala L-Lys	L-Ala L-Lys
4 hours	14%	86%
8 hours	18%	82%
22 hours	44%	56%

以上のことから、lanthiopeptin (1) の立体化学をも含めた全構造が明らかとなった (Fig. 0-4)。

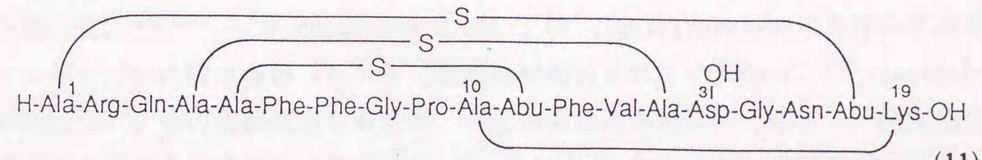
Fig. 0-4 Structure of lanthiopeptin (1)



(1)

以前に Hoffmann-La Roche 社のグループにより、*Streptoverticillium griseoverticillatum* の代謝産物から、免疫賦活作用を有するペプチドとして単離された Ro 09-0198 (11) のアミノ酸組成は、フェニルアラニンが D 体である点以外は lanthiopeptin と同一である。[21] 最近 Kessler らによりその構造が報告されたが (Fig. 1-13)、[22] 彼等の提出した構造式は主として NMR の解析に基づくものであり、その信憑性に疑問が持たれていた。

Fig. 1-13 Structure of Ro 09-0198 (11) proposed by Kessler *et al.*



(11)

1 と 11 との構造式の相違は、1 でN末端から 6 番目に位置するリジノアラニン残基のアラニン部分と、10 番目に位置するフェニルアラニン残基が、11 では互いに入れ換わっている点のみである。そこで 11 の分与を受け、その ^{1}H-NMR スペクトルと HPLC を測定し、1 と比較したところ両者は完全に一致した。更に 11 の脱硫生成物の Edman 分解では、1 と同一の結果が得られ、N末

端の 6 番目から 10 番目のアミノ酸配列は、Fig. 1-13 の構造から予想される Phe[6]-Phe[7]-Gly[8]-Pro[9]-Ala[10] ではなく、1 と同じ配列である Ala[6]-Phe[7]-Gly[8]-Pro[9]-Phe[10] であることが確定し、Fig. 1-13 に示す 11 の構造は誤りで、1 と 11 とは同一物質であると結論付けられた。11 でフェニルアラニンの立体化学を D 体としているのはその比旋光度の絶対値が小さいことに起因しているものと考えられる。筆者らの以上の結果が発表された[4] 後、間もなく Kessler らは訂正論文を発表し、[23] その中で 11 を 1 と同一のアミノ酸配列に訂正したが、フェニルアラニンの立体配置については未訂正のままである。

Lanthiopeptin (1) と同一のアミノ酸組成を有するペプチド系抗生物質として、1952 年に Benedict らによって *Streptomyces cinnamoneus* の培養液より単離されたと報告のある cinnamycin[24] がある。この化合物の構造は未だ決定されてはいないが、1 と同一のアミノ酸組成である[25] ことから、両者は極めて類似の構造を有する、あるいは同一物質である可能性がある。

第7節　考察

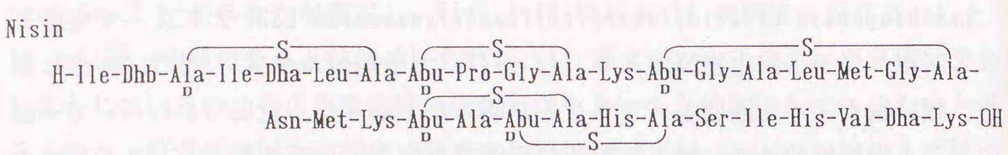
Lanthiopeptin は *Streptoverticillium cinnamoneum* L337-2 によって生産される新規ペプチド抗生物質であり、*in vitro* で単純ヘルペス 1 型ウイルスに対し、強い抗ウイルス活性を有することが明らかとなった。更に *in vitro* で一部のグラム陽性細菌並びに嫌気性細菌類に顕著な生育阻止活性を示し、ある種のカビ類に対しても弱い活性が認められた。

Lanthiopeptin は 11 種 15 個のアミノ酸からなる分子量 2041 のペンタデカペプチドであり、7 種の通常アミノ酸の他に、天然からは極めて希な 4 種のアミノ酸、すなわち *erythro*-β-ヒドロキシアスパラギン酸、*meso*-ランチオニン、*threo*-メチルランチオニン、及びリジノアラニンを含有していることが、構造研究の結果明らかとなった。ランチオニンあるいはメチルランチオニンを含有するペプチド系抗生物質としては、前節第３項で述べたように、lanthiopeptin と同一物質であることが判明した Ro 09-0198 並びに cinnamycin が知られているが、この他には抗細菌性の抗生物質として nisin、[26] subtilin、[27] epidermin、[28,29] gallidermin、[30] Pep5、[31] duramycin[32] 及び actagardine[33] が、また酵素阻害物質として ancovenin[34] がそれぞれ報告されているに過ぎない (Fig. 1-14)。

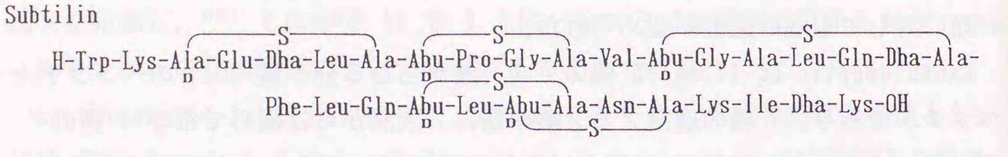
Duramycin 以外の化合物については、それらの全構造が判明しており、これらの内 ancovenin が lanthiopeptin とかなりの相同性を有していることが明らかとなった。[35,36] 一方 duramycin については、lanthiopeptin におけるアルギニンがリジンに置き換わったアミノ酸組成が報告されていたので、[25] lanthiopeptin の 4 個の架橋構造をも含め、両化合物は基本的に同一のアミノ酸配列を有すると推定されていた。最近 Hayashi らにより duramycin の構造が公表されたが、[37] その構造式は lanthiopeptin のN末端から 2 番目のアルギニン残基が、duramycin ではリジン残基に置き換わったものであり、筆者らの推定が正しかったことが裏付けられた。

Fig. 1-14 Structures of lanthionine peptide antibiotics

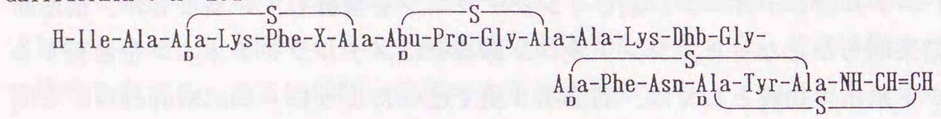
Nisin



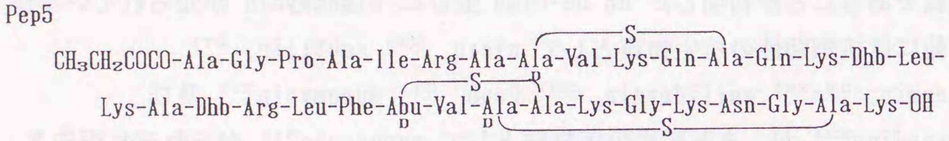
Subtilin



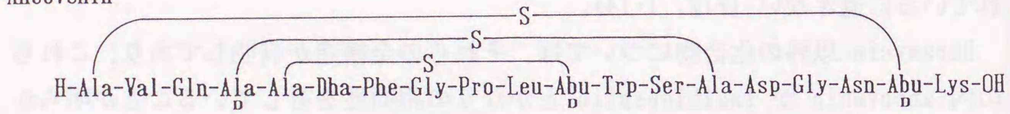
Epidermin : X= Ile
Gallidermin : X= Leu



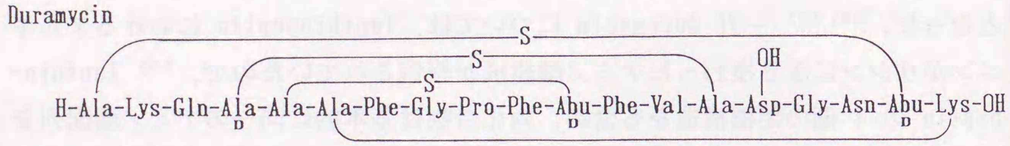
Pep5



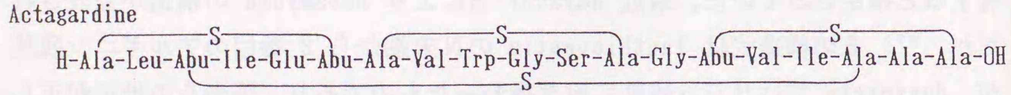
Ancovenin



Duramycin



Actagardine



Dha: Dehydroalanine Dhb: Dehydrobutyline (β-Methyldehydroalanine)

Abu: α-Aminobutylic acid

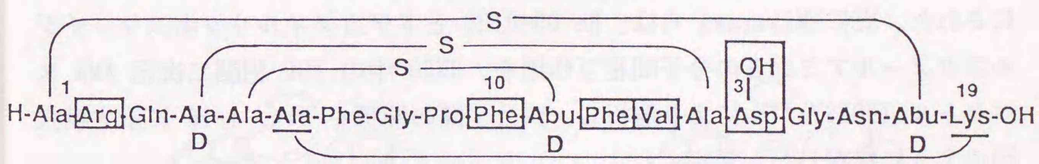
Ala S Ala: Lanthionine Abu S Ala: Methyllanthionine

Ala S H_2N-CH=CH: S-(2-Aminovinyl)cysteine

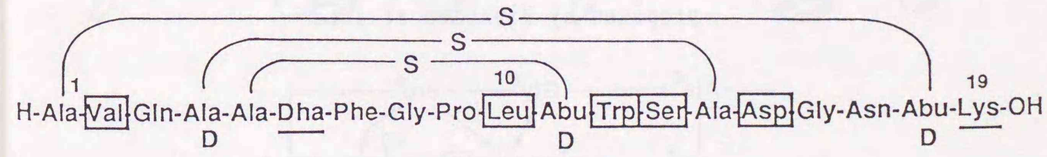
Lanthiopeptin と ancovenin との構造上の相違は、Fig. 1-15 に示すように lanthiopeptin に含まれるリジノアラニン残基が、ancovenin ではリジンとデヒドロアラニン (Dha) 残基とに置き換わり、更にN末端から順に 2、10、12、13 及び 15 番目のアミノ酸残基に相違が認められた。しかし双方共 *meso*-ランチオニン残基 1 モル及び *threo*-メチルランチオニン残基 2 モルで 3 個のスルフィド架橋を形成しており、構造の相同性はかなり高い。Ancovenin はアンジオテンシンⅠ変換酵素の阻害活性を指標としてスクリーニングされ、同酵素に対して強い阻害活性 (IC_{50}=1.7μg/mℓ) を有するが、抗菌活性は全く示さなかったと報告されている。[34] 一方 lanthiopeptin に関しては、第5節で述べたように H^+,K^+-ATPase に対して若干の阻害活性が認められた以外は、アンジオテンシンⅠ変換酵素に対する阻害活性は、筆者らの系では確認できなかった。両者はその構造の類似性にもかかわらず、生物活性に全く類似性が認められないことは非常に興味深い。

Fig. 1-15 Structures of lanthiopeptin and ancovenin

Lanthiopeptin



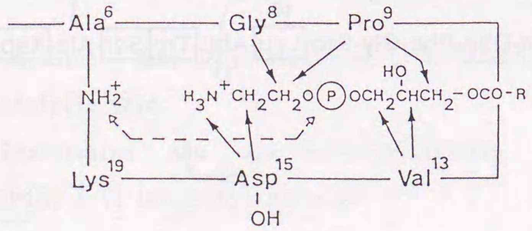
Ancovenin



Duramycin に関しては、上述のように lanthiopeptin とはアミノ酸 1 残基のみの相違である。Duramycin の抗ウイルス活性についての報告は未だ成されていないが、lanthiopeptin との構造の類似性から duramycin にもかなりの活性が期待される。Duramycin のその他の生物活性については、かなり精力的な研究が成されており、抗菌活性の他に塩素イオンの輸送及びプロトンポンプを阻害すること、[38] Na^+,K^+-ATPase の阻害活性を有すること、[39] Ehrlich 固型癌細胞、マウス 3T3 及び 3T6 細胞、並びにヒヨコ繊維芽細胞において低分子物質の細胞透過性を亢進すること[40] 等の作用が確認されている。また duramycin は、ホスファチジルエタノールアミンあるいはモノガラクトシルジグリセリドにより規定される、人工膜の特定のコンホメーションの認識能を有することが明らかにされた。[41]

一方 Choung らは、lanthiopeptin と同一物質であることが明らかになった Ro 09-0198 の抗菌活性並びに免疫増強活性に着目し、これらの作用機序の解明を目的とした研究の過程で、Ro 09-0198 が (リソ)ホスファチジルエタノールアミンを厳密に分子認識する[42] と共に、細胞膜に穴をあける機能を合わせ持つことを見出した。[43] この細胞膜上への特異的結合には、グリセロホスファチジルエタノールアミン分子が必要であり、エタノールアミン部分にメチル基が一つでも置換すると結合能を失うという、かなり厳密な分子認識を行なうことが明らかにされた。更に Miyazawa らは、Ro 09-0198 とドデカノイルリソホスファチジルエタノールアミンとの分子間相互作用を、DMSO 中の NOE 相関二次元 NMR スペクトル (NOESY)[44] により解析し、両分子間の関係を Fig. 1-16 に示す模式図のように提案した。[45]

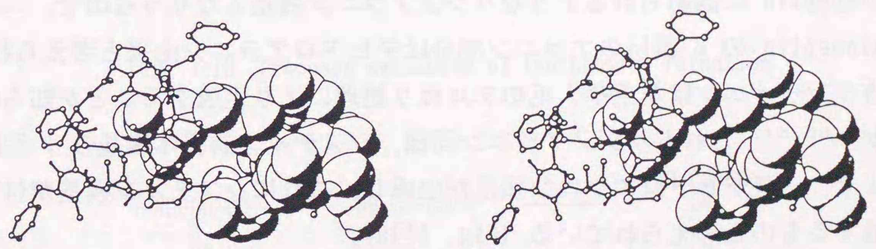
Fig. 1-16 Molecular recognition of Ro 09-0198 proposed by Miyazawa *et al.*



Lanthiopeptin について見出された抗ウイルス活性のメカニズムは未だ解明されてはいないが、lanthiopeptin と同一の Ro 09-0198 には、インターフェロン様物質を誘起する作用のあることが報告されているので、[21] 抗ウイルス活性もこの作用に起因する可能性も考えられるが、詳細は今後の研究に期待したい。

構造研究の結果、その存在が明らかになった *meso*-ランチオニン 1 モル、*threo*-β-メチルランチオニン 2 モル、及びリジノアラニン 1 モルによって、分子内に 4 個の架橋構造を有する lanthiopeptin のコンホメーションを解析することは、その生物活性の発現機構という観点から興味ある課題である。前述の Ro 09-0198 の構造に関する訂正論文の中で、Kessler らは ^{1}H-NMR スペクトルの NOE 実験の結果から、同物質の 重 DMSO 中でのコンホメーションを Fig. 1-17 に示すように提案している。[23] このコンホメーションでは、親水性アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基とが各々分子の反対側に配列したヘリックス構造をとっており、生体膜の表面に親和性を有するとしている。重水中あるいは結晶状態での lanthiopeptin のコンホメーションに関して、今後詳細に検討する必要があると考えられる。

Fig. 1-17 Conformation of Ro 09-0198 proposed by Kessler *et al.*



Lanthiopeptin に存在することが明らかになったリジノアラニンは、当初アルカリ処理による蛋白質中のジスルフィド架橋の変化を研究する途上、Bohak[17] 並びに Patchormik と Sokolovsky によって、[18] アルカリ処理した牛膵臓のリボヌクレアーゼAから各々独立に発見された物質である。アルカリ処理によるリジノアラニンの生成機構は、Fig. 1-18 に示すように蛋白質中のシステイン (R=SH)、シスチン (R=S-Cys)、ホスホリルセリン (R=O-PO_3H_2) あるいはグリコシルセリン (R=O-糖) 残基[46] がアルカリ処理により β 脱離反応を起こし、デヒドロアラニン残基が一旦生成し、これに分子内のリジン残基の ε-アミノ基が付加して生成する機構、あるいは激しいアルカリ処理によりセリン残基の水酸基に直接リジン残基の ε-アミノ基が攻撃し生成する機構[47] が考えられているが、いずれもアラニン部分のラセミ化を伴う。更にセリンの誘導体のアミノ酸残基の置換反応による生成も起こりうるという説があるが、[48] この場合はラセミ化を伴わないといわれている。いずれにしてもこういった過程で得られるリジノアラニンは人工産物である。しかし一方では、ヒトの石灰化した組織の不溶性コラーゲンから得られたという報告があること、[49] 更に微生物代謝産物である lanthiopeptin 及び duramycin に含まれることをも考え合わせ、本アミノ酸を生成する機構が生物には存在することが予想される。

Lanthiopeptin と構造類似の ancovenin には、そのN末端から 6 番目にデヒドロアラニン残基が存在しており、19 番目のリジン残基とで架橋を形成すれば、lanthiopeptin に認められるようなリジノアラニン残基となりうるので、lanthiopeptin の 6 番目のアラニン部分はデヒドロアラニン由来と考えられる。

一方ランチオニンは羊毛や人毛のアルカリ処理により生成することが知られているが、[50,51] これもリジノアラニン同様、システイン誘導体残基の β 脱離反応により、一旦デヒドロアラニン残基が生成し、これにシステイン残基が付加して生成するものと考えられている (Fig. 1-19)。

しかし lanthiopeptin を始め前述の抗生物質群の分子中には、本来このようなスルフィド架橋を有するランチオニン及び β-メチルランチオニンが含まれている。

これら抗生物質群から見出されたランチオニンはいずれも *meso* 体であり、β-メチルランチオニンは *threo* 体の 2*R*,(2*S*,3*S*) の立体配置を有している。また

Fig. 1-18 Proposed mechanism of lysinoalanine formation

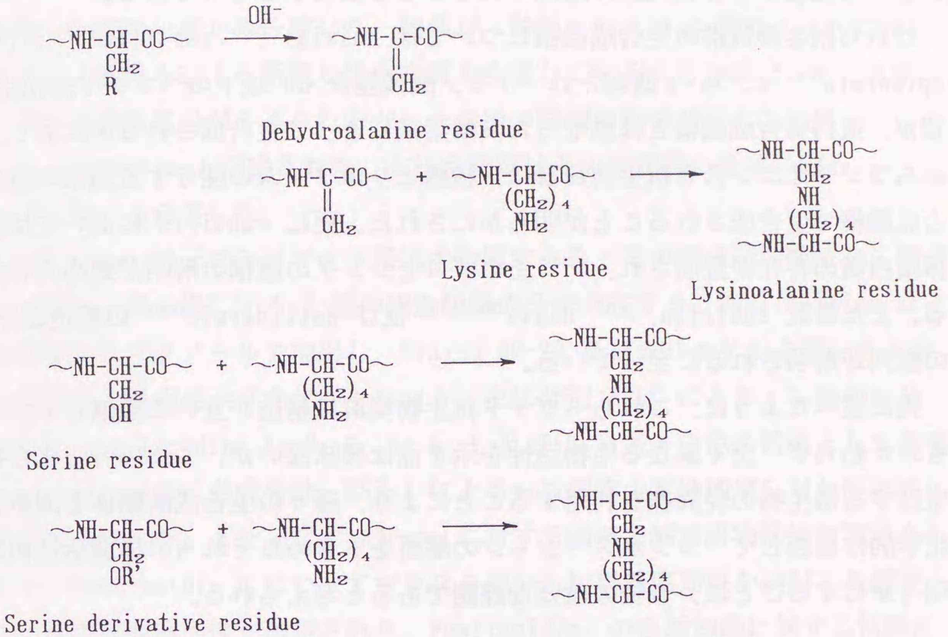
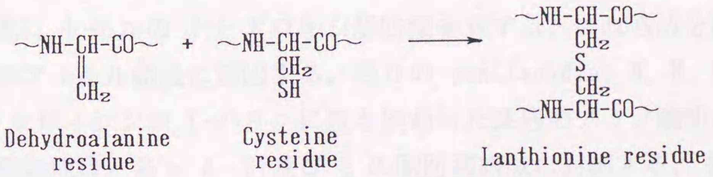


Fig. 1-19 Proposed mechanism of lanthionine formation



lanthiopeptin 分子中でのリジノアラニン残基の立体配置は L-L 体である。このような架橋アミノ酸の一定の立体化学は、ペプチド鎖が形成された後に、酵素によって架橋が立体特異的に形成されることを示唆するものである。

これら抗生物質群の生合成機構については、nisin、[52] subtilin[53] 及び epidermin[54] について研究され、アミノ酸残基が 30 以下のペプチド系抗生物質が、蛋白質合成機構とは異なった多酵素系によって生合成されるのに対し、これらランチオニン含有抗生物質群は、核酸とリボソームの関与する通常の蛋白質合成機構で生合成されることが明らかにされた。更に subtilin においては前駆体蛋白質の存在が証明され、[53] そのプロセシングの機構の解明が進められている。また最近 subtilin、[55] nisin[56,57] 及び gallidermin[58] の構造遺伝子の配列が解明されるに至っている。

先に述べたように、これらペプチド抗生物質群は構造が互いに類似しているにもかかわらず、全く異なる生物活性を示す点は興味深いが、こういった化合物を生産する微生物の変異株を利用することにより、種々の生合成前駆体を調製し、化学的に修飾して、コンホメーションの解析をも含めたそれらの構造活性相関を明らかにすることは、今後の重要な課題であると考えられる。

第２章　新規抗ウイルス抗生物質　Pumilacidins

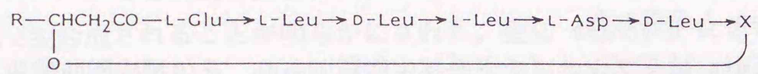
抗ウイルス活性を指標とする抗生物質の探索研究の過程で、山梨県、山中湖畔で採取した苔の一種から分離した一細菌が、単純ヘルペス 1 型ウイルスに対し抗ウイルス活性を有する新規な抗生物質を生産していることを見出した。本菌は M937-B1 の菌株番号が与えられたが、その後の詳細な菌学的研究の結果、*Bacillus pumilus* と同定された。本抗生物質はその生産菌の種名に因み、pumilacidin と命名した。

Pumilacidin はデプシペプチド系抗生物質であり、その構成脂肪酸並びに構成アミノ酸の一部を異にする 7 種の構造類縁成分が存在する。Pumilacidins はその培養液よりブタノールで抽出し、Diaion HP-20 及びシリカゲルを用いたクロマト精製後、逆相系シリカゲルクロマト、更に分取 HPLC により、7 種の成分、すなわち pumilacidins A、B、C、D、E、F 及び G を各々白色の粉末として単離した。Pumilacidin 各成分は、HSV-1 によるベロ細胞の変性効果に対し同程度の阻止活性を示した。また H^+,K^+-ATPase に対する顕著な酵素阻害活性が認められたので、pumilacidin B についてマウスを用いた抗胃潰瘍効果を検討した結果、明らかな抗胃潰瘍活性が確認された。Pumilacidins の各種細菌に対する抗菌活性を調べたが、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、嫌気性細菌及びカビ類、いずれに対しても生育阻止活性は認められなかった。

Pumilacidins はその物理化学的性状から、新規なデプシペプチド系抗生物質であることが明らかとなった。構造研究の結果 pumilacidin 成分の内、A、C 及び E は共通のアミノ酸組成として、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、及び L-イソロイシン各 1 モルの他に、各々 2 モルずつの L-ロイシン及び D-ロイシンから成り、更に 1 モルの β-ヒドロキシ脂肪酸を有する。これら成分間の相違はこの脂肪酸のアルキル鎖長に起因する。残りの pumilacidins B、D、F 及び G は上記の L-イソロイシンが L-バリンに置き換わった共通のアミノ酸組成を有し、G 以外の脂肪酸組成は、各々 A、C 及び E の脂肪酸組成に対応する。また pumilacidins A、B、C 及び D はそれぞれ分離不能な 2 種の化合物から成り、それらは脂肪酸のアルキル鎖の幾何異性体であることが明らかになった（Fig. O-5)。[6]

本章では、新規抗ウイルス抗生物質 pumilacidins の生産菌、醗酵生産、抽出、分離精製及び物理化学的性状、生物学的性状を述べ、更に構造決定に関する研究について述べる。

Fig. 0-5 Structures of pumilacidins



A $R=CH_3CH(CH_2)_9-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_8-$ (CH_3 branch)
X = L-Ile

B $R=CH_3CH(CH_2)_9-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_8-$ (CH_3 branch)
X = L-Val

C $R=CH_3CH(CH_2)_{11}-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Ile

D $R=CH_3CH(CH_2)_{11}-$ or $CH_3CH_2CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Val

E $R=CH_3CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Ile

F $R=CH_3CH(CH_2)_{10}-$ (CH_3 branch)
X = L-Val

G $R=CH_3(CH_2)_{12}-$
X = L-Val

第1節 Pumilacidins の生産菌

Pumilacidins 生産菌である M937-B1 株は、山梨県の山中湖畔の朽木の幹に付着生育していた苔の一種（*Leucobrynum neigherrense*）から分離した菌株である。本菌株はグラム染色陽性の嫌気性細菌であり、胞子形成能を有する長円形の形態を示し、分類学的に *Bacillus* 属に属する。M937-B1 株は Gordon ら[59] 並びに Gibson と Gordon[60] の方法に基づき特徴付けられると共に、Norris らの記載[61] に従ってその分類学上の位置が決定された。すなわち Table 2-1 に示す M937-B1 株の形態学的特徴、生物学的特徴並びにその培養上の特徴から、本菌株は *Bacillus pumilus* Meyer and Gottherl, 1901 に分類されることが明らかになった。

Table 2-1 Taxonomic characteristics of strain M937-B1

Physiological characteristics[b]	Strain M937-B1	*Bacillus subtilis* PCI 219
Morphology:		
Vegetative cells;		
Oblong or short straight rods		
0.6～0.7×1.0～3.1 μm		
Motile, Gram-positive and not acid-fast		
Spores[a];		
Elliptical, 0.6～0.8×1.0～1.2 μm		
Not swollen sporangia		
Central position		
Cultural characteristics:		
Gross colonial morphology;		
Nutrient agar: incubated at 28°C for 3 days		
Circular and umbonate, 2 to 3 mm i.d.,		
entire or somewhat irregular margin,		
opaque density and wrinkled surface		
Scant viscosity, pale yellow color, no swarming		
Production of:		
Acid from glucose	+	+
mannitol	+	−
xylose	+(w)	−
arabinose	+(w)	+
Gas from glucose	−	−
Acetoin (VP-reaction)	+	+
Catalase	+	+
Nitrate reductase	−	+
Hydrolysis of:		
Starch	−	+
Casein	+	+(w)
Growth in:		
Anaerobic agar	−	−
7% NaCl	+	+
50°C	+	+
65°C	−	−
0.001% lysozyme	−	+(w)
pH 6 in V-P medium	+	+

[a] The endospores were not born in Difco nutrient agar but born when $MnSO_4 \cdot H_2O$ was supplemented at 0.0005% (w/v) as described by Norris *et al.*[3]
[b] +: Positive, −: negative, +(w): weakly positive.

第２節　Pumilacidins の醗酵生産

Pumilacidins 生産菌である *Bacillus pumilus* M937-B1 株は、先ず Table 2-2 に示す組成の斜面寒天培地上で 28℃、2 日間培養し生育させた。この充分に生育した M937-B1 株を 500mℓ の三角フラスコ中、Table 2-3 に示す組成の培地 100mℓ に接種し、回転振盪機 (200rpm) 上、28℃で 24 時間培養し、種培養液とした。本培養は Table 2-3 の組成の培地 12ℓ を含む 20ℓ のジャーファーメンターに上記種培養液を移し、通気量 12ℓ/min で除菌空気を導入しながら、28℃、250rpm で 93 時間攪拌した。Pumilacidins の生産力価は HSV-1 のベロ細胞に対する変性効果の阻止活性を簡便なプラーク法にて検定し追跡した。

Table 2-2　Agar slant medium of pumilacidins

Soluble starch	0.5%
Glucose	0.5%
Fish meat extract	0.1%
Yeast extract	0.1%
NZ-case	0.2%
NaCl	0.2%
$CaCO_3$	0.1%
Agar	1.6%
pH7.0 (before sterilization)	

Table 2-3　Vegetative and production medium of pumilacidins

Soybean meal	3.0%
Glucose	3.0%
Pharmamedia	0.5%
Yeast extract	0.1%
$CaCO_3$	0.3%
pH7.0 (before sterilization)	

第３節　Pumilacidins の抽出、分離及び精製

Pumilacidins の抽出及び精製は Fig. 2-1 に示す方法によって行なった。すなわち pumilacidins の生産が最高に達した *Bacillus pumilus* M937-B1 株の培養液 245ℓ を、6N 塩酸で pH4.0 に調製した後、ブタノール 145ℓ で抽出した。シャープレス遠心機で分離したブタノール層を 6ℓ に濃縮後、15ℓ の酢酸エチルに滴下し生成した不溶物を濾別した。濾液を減圧下濃縮し、抗ウイルス活性を有する油状物質約 660g を得た。本油状物質を Diaion HP-20 クロマトの後、種々の展開溶媒系を用いたシリカゲルクロマトを繰り返すことにより精製し、抗ウイルス活性の本体である pumilacidin 複合体 12.5g を、シリカゲル TLC 上単一スポットを示す白色粉末として得た。このようにして得られた pumilacidin 複合体は、逆相系カラムを用いた HPLC 分析により、7 種の成分から成ることが明らかとなった (Fig. 2-2)。

Fig. 2-1　Isolation and purification of pumilacidins

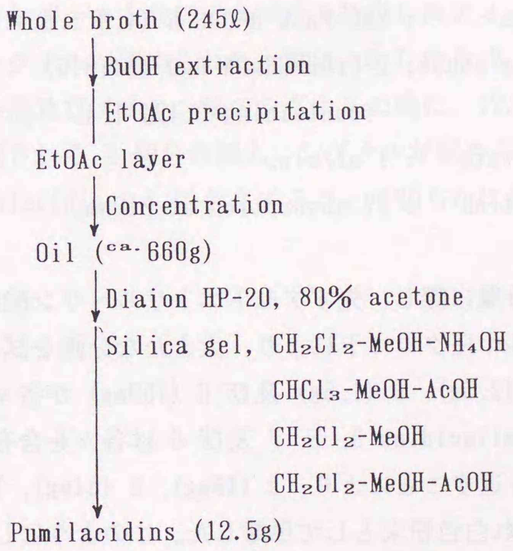
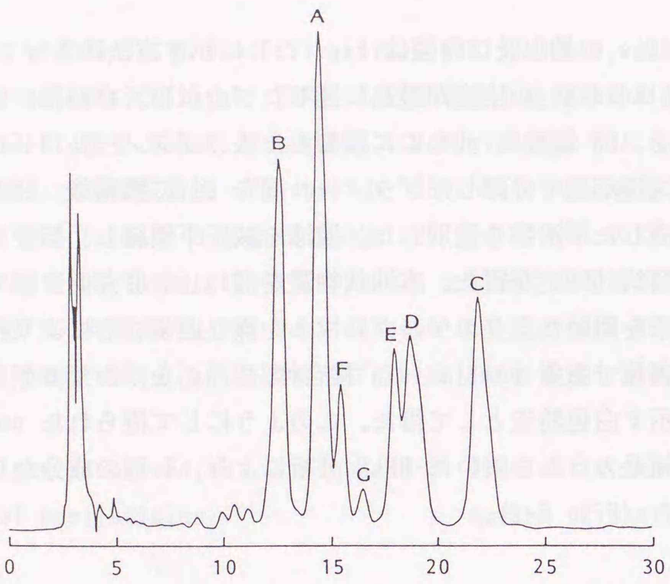


Fig. 2-2 HPLC of pumilacidins



Condition

Column : YMC-Pack R-ODS-5 (4.6 i.d.×250mm, 5μm).

Mobile phase: 2-PrOH-CH_3CN-H_2O (14:6:5)
containing 0.1% TFA.

Flow rate : 1 mℓ/min.

Detection : UV absorption at 210nm.

各々の成分の分離に際し、先ずアセトニトリルーリン酸緩衝液（pH7.0）系の逆相系シリカゲル中圧クロマトにより、大まかな分画を試みた。その結果 pumilacidins A (2.5g)、B (1.5g) 及び C (159mg) が各々単一物質として得られた。残りの pumilacidins D、E、F 及び G は各々を含有するフラクションを分取 HPLC を繰り返すことにより、D (49mg)、E (54mg)、F (27mg) 及び G (20mg) をそれぞれ白色粉末として単離した。このようにして得られた 7 種の pumilacidin 成分の内、pumilacidins A、B、C 及び D は後の構造研究の項で述べるように、いずれも分離不能な 2 種類の化合物から成ることが判明した。

第4節 Pumilacidins の物理化学的性状

Pumilacidins A、B、C、D、E、F 及び G の各成分は、各々白色の粉末として単離され、Table 2-4 に示すようにそれらの物理化学的性状は互いに類似している。これら 7 種の成分はいずれも低級アルコール、クロロホルム、アセトン、酢酸エチル並びにジメチルスルホキシドに良く溶解するが、ヘキサン及び水には不溶である。呈色反応では、ヨウ素及び硫酸に対し陽性であるが、ニンヒドリン及びアンスロン反応には陰性である。各成分の分子式は SIMS 並びに元素分析の結果からTable 2-4 に示すように決定された。Pumilacidin 各成分の UV スペクトルは各々末端吸収を示すのみである。IR スペクトルでは 1655 及び 1540cm^{-1} に強いアミドの吸収が認められ、更に 1730cm^{-1} にエステルカルボニル由来の吸収を示した。Fig. 2-3 及び 2-4 に 7 種の成分を代表して pumilacidins A 及び B の IR スペクトルを掲げる。IR スペクトルによって確認された pumilacidin 各成分のペプチド構造は、各々の ^{1}H-NMR スペクトルによっても裏付けられた。Fig. 2-5 に示す pumilacidin A の ^{1}H-NMR スペクトルでは 7.6 から 8.3ppm の間にアミドプロトンのシグナルが観測され、3.3 から 5.0ppm にはオキシメチンプロトンのシグナルと共に、ペプチド結合したアミノ酸の α 位のプロトンと考えられるシグナルが認められた。更に、0.7 から 2.0ppm の間に観測される脂肪族のメチル基及びメチレン基のシグナルの他に、12.2ppm にはカルボン酸のプロトンに帰属される 2 個分の幅広いシグナルが認められ、遊離のカルボン酸 2 モルが pumilacidin A には存在することが明らかになった。

Table 2-4 Physico-chemical properties of pumilacidins

	A	B	C	D
Nature	White powder	White powder	White powder	White powder
MP (°C)	146～150	160～163	134.5～138	137～142
$[\alpha]_D^{23}$ (MeOH)	−12.2°(*c* 0.5)	−16.9° (*c* 1)	−14.0° (*c* 1)	−16.6° (*c* 0.5)
SI-MS (*m/z*)	1,073 $(M+Na)^+$, 1,089 $(M+K)^+$	1,059 $(M+Na)^+$, 1,075 $(M+K)^+$	1,101 $(M+Na)^+$, 1,117 $(M+K)^+$	1,087 $(M+Na)^+$, 1,103 $(M+K)^+$
Molecular formula	$C_{54}H_{95}N_7O_{13}\cdot H_2O$	$C_{53}H_{93}N_7O_{13}\cdot 3H_2O$	$C_{56}H_{99}N_7O_{13}\cdot H_2O$	$C_{55}H_{97}N_7O_{13}\cdot 2H_2O$
Calcd C	60.71	58.38	61.34	60.03
H	9.15	9.15	9.28	9.25
N	9.18	8.99	8.94	8.91
Found C	60.68	58.34	61.30	60.48
H	9.03	8.67	9.16	9.04
N	9.14	8.79	8.87	8.82
Amino acid composition	L-Asp (1), L-Glu (1), L-Leu (2), D-Leu (2), L-Ile (1)	L-Asp (1), L-Glu (1), L-Leu (2), D-Leu (2), L-Val (1)	L-Asp (1), L-Glu (1), L-Leu (2), D-Leu (2), L-Ile (1)	L-Asp (1), L-Glu (1), L-Leu (2), D-Leu (2), L-Val (1)

	E	F	G
Nature	White powder	White powder	White powder
MP (°C)	137～140.5	139～143	134～138
$[\alpha]_D^{23}$ (MeOH)	−15.2° (*c* 0.5)	−20.1° (*c* 0.38)	−19.5° (*c* 0.3)
SI-MS (*m/z*)	1,087 $(M+Na)^+$, 1,103 $(M+K)^+$	1,073 $(M+Na)^+$, 1,089 $(M+K)^+$	1,073 $(M+Na)^+$, 1,089 $(M+K)^+$
Molecular formula	$C_{55}H_{97}N_7O_{13}\cdot 2H_2O$	$C_{54}H_{95}N_7O_{13}\cdot 2H_2O$	$C_{54}H_{95}N_7O_{13}\cdot H_2O$
Calcd C	60.03	59.70	60.71
H	9.25	9.18	9.15
N	8.91	9.02	9.18
Found C	60.44	59.98	60.65
H	9.04	8.97	9.07
N	8.79	8.85	8.73
Amino acid composition	L-Asp (1), L-Glu (1), L-Leu (2), D-Leu (2), L-Ile (1)	L-Asp (1), L-Glu (1), L-Leu (2), D-Leu (2), L-Val (1)	L-Asp (1), L-Glu (1), L-Leu (2), D-Leu (2), L-Val (1)

Fig. 2-3 IR spectrum of pumilacidin A (in KBr)

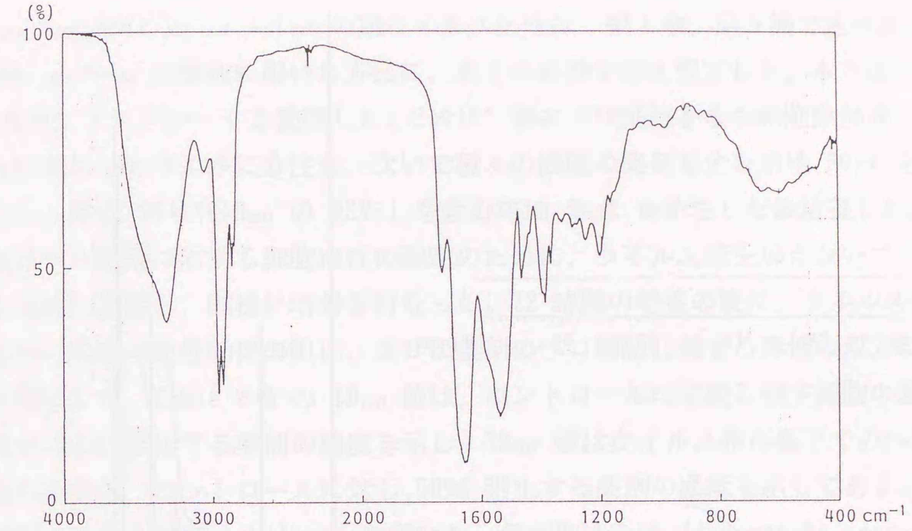


Fig. 2-4 IR spectrum of pumilacidin B (in KBr)

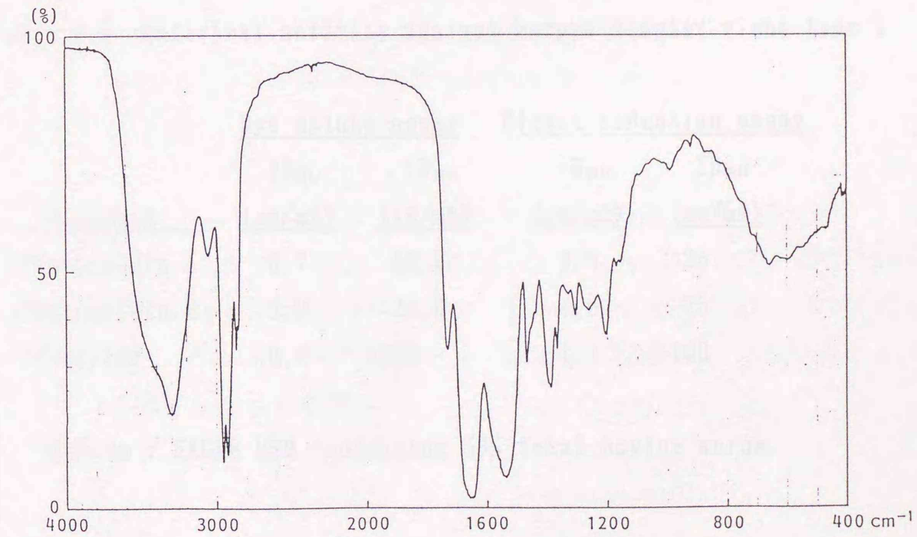
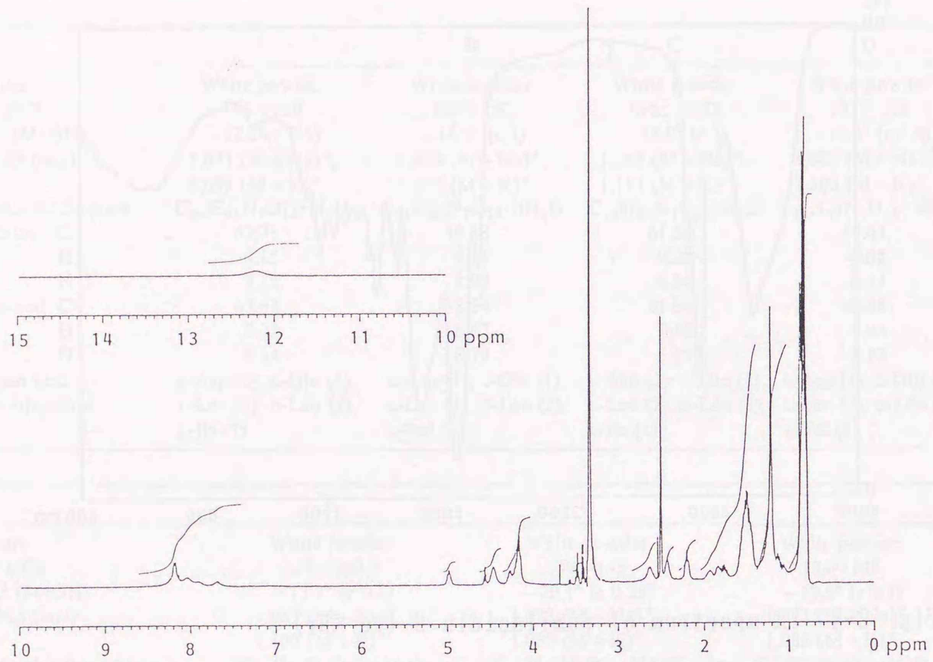


Fig. 2-5 ^{1}H-NMR spectrum of pumilacidin A (in DMSO-d_6)



第５節　Pumilacidins の生物学的性状

Pumilacidins の *in vitro* の抗ウイルス活性は、第１章、第５節で述べた lanthiopeptin の場合に用いた方法に、若干の修飾を加え測定した。本方法では 96 穴のミクロプレートを使用した。2×10^4 個のベロ細胞を含む細胞懸濁液 200μℓ を各々のウエルに分注し、次いで種々の濃度の薬剤を含む培地 50μℓ を分注した。更に 30×$TCID_{50}$ の HSV-1 を含む培地 50μℓ を分注した後培養した。薬剤のベロ細胞に対する細胞毒性の測定のために、ウイルス液を加えないプレートを同時に調製し、同様に培養を行なった。72 時間の培養の後に、ウイルスによるベロ細胞の変性効果の阻止、並びに薬剤のベロ細胞に対する毒性の双方について検定した。Table 2-5 の ID_{50} 値は、コントロールに比較し宿主細胞の変性効果を 50% 阻止する薬剤の濃度を示し、TD_{50} 値はウイルス非存在下でのベロ細胞の生育を、コントロールに対し 50% 阻止する薬剤の濃度を示してある。標準薬剤には先と同様 acyclovir を用いた。色素取込み法 (dye uptake assay)[62] による判定の結果、pumilacidin A は ID_{50}=6.7μg/mℓ、B は ID_{50}=5.2μg/mℓ であり、より簡便なプラーク法では各々 ID_{50}=3.8 及び 4.0μg/mℓ の値を示した。

Table 2-5 Antiviral activity against herpes simplex virus type 1

	Dye uptake assay		Plaque reduction assay	
	ID_{50}	TD_{50}	ID_{50}	TD_{50}
Compound	(μg/mℓ)	(μg/mℓ)	(μg/mℓ)	(μg/mℓ)
Pumilacidin A	6.7	16.5	3.8	25
Pumilacidin B	5.2	17.0	4.0	25
Acyclovir	0.2	>100	1.1	>100

Medium : EAGLE MEM containing 5% fetal bovine serum.

Pumilacidins A 及び B の、胃 H^+,K^+-ATPase に対する阻害活性の測定は、以下のようにして行なった。胃 H^+,K^+-ATPase は、豚の胃より Saccomani らの方法[63] に準拠して調製した。ここで得られた H^+,K^+-ATPase は、ATP 同様 *p*-ニトロフェニルホスフェート (*p*NPP) をも加水分解することが知られているので、本実験には *p*NPP を基質として用いた。215μℓ の酵素溶液を分注してある 96 穴のミクロプレートの各ウェルに、2mM の塩化マグネシウム及び 100mM の塩化カリウムを含む薬剤の 50mM トリス塩酸緩衝溶液を加え、37℃ に加温した。3 時間後に 100mM の *p*NPP を 10μℓ 加え酵素反応を開始させ、その 30 分後に 1M リン酸二水素ナトリウム－200mM EDTA 溶液 20μℓ を加え反応を停止させた。酵素反応によって遊離した *p*-ニトロフェノールは、405nm での比色法により定量した。本方法によって測定した pumilacidins A 及び B の IC_{50} 値は、同時に測定した既知のベプチド系抗生物質の値、並びに同酵素に対する阻害剤として知られている omeprazole 及び Sch 28080 の値と共に Table 2-6 に示した。Pumilacidins A 及び B は濃度依存的に同酵素を阻害し、各々の IC_{50} 値は 2.7μg/mℓ 及び 3.2μg/mℓ であった。Pumilacidins A 及び B は、比較に用いたどの化合物よりも低い濃度で酵素阻害活性を示すことが明らかとなった。

Table 2-6 Inhibitory effect of pumilacidins A and B on the hog gastric H^+,K^+-ATPase

Compound	IC_{50} (μg/mℓ)
Pumilacidin A	2.7
Pumilacidin B	3.2
Colistin	>200
Amphomycin	>200
Aspartocin	147
Polypeptin	26.7
Omeprazole	12.3
Sch 28080	11.5

Pumilacidin B の抗胃潰瘍活性を、Shay ラットモデルを用いた *in vivo* 系で検討した。実験前に 24 時間餌を断った約 200g の Wistar 系のオスのラットを、エーテル麻酔下開復し、胃幽門部を結紮した。10 時間後同ラットを屠殺し、その噴門洞を潰瘍形成試験に用いた。結紮直後に pumilacidin B の各濃度の溶液を、体重 100g 当たり 0.1mℓ を s.c. 投与した。潰瘍部を染色するため、屠殺 10 分前に 1% ブリリアントブルー 6B 溶液 1mℓ を i.v. 投与した。形成した潰瘍の数を肉眼判定し、0 から 5 の 6 段階に分類し、コントロールに用いたラットの潰瘍の指数を 5 とした。 Table 2-7 に示すように、pumilacidin B を 100mg/kg 投与した際に、ラットの潰瘍形成阻止率は 68% を示し、pumilacidin B の抗胃潰瘍活性が確認された。

Table 2-7 Protective effect of pumilacidin B on Shay ulcers in rats

Compound	s.c. Dose (mg/kg)	Ulcer index (mean ± S.E.)	% Inhibition
Control	-	5.0 ± 0	-
Pumilacidin B	100	1.6 ± 0.93*	68
"	50	4.4 ± 0.24	12

* $p < 0.01$

Pumilacidins の各種細菌類に対する抗菌活性をペーパーディスク法により検定したが、いずれの成分共に、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、嫌気性細菌並びにカビ類に対する生育阻止活性は、1,000μg/mℓ の濃度でも認められなかった。

一方、pumilacidin A のマウスを用いた急性毒性試験では、200mg/kg、i.m. 投与で毒性症状は認められなかった。

第６節　Pumilacidins の構造研究

(1) Pumilacidins の構成アミノ酸

Pumilacidin 各成分は、その物理化学的性状の考察により、分子内にエステル結合を有するデプシペプチド系化合物であり、更に遊離のカルボン酸 2 個が存在することが明らかとなった。各成分のアミノ酸分析の結果から、各々の成分は 2 つのグループに分類できる。すなわち pumilacidins A (**12**)、C (**14**) 及び E (**16**) 並びに B (**13**)、D (**15**)、F (**17**) 及び G (**18**) の 2 つのグループであり、前者はアスパラギン酸、グルタミン酸及びイソロイシンが各 1 モル、更に 4 モルのロイシンから成るアミノ酸組成を有するのに対し、後者のアミノ酸組成はこの内イソロイシンがバリンに置き換わったものに相当する。Pumilacidins の構造決定に際し、先ずこれらのアミノ酸の立体化学を解明すべく **12** 及び **13** の混合物を酸加水分解し、各アミノ酸の分離を行なった。アミノ酸の分離には Dowex 50W×8 (H^+型) による陽イオン交換クロマトを用い、塩酸の濃度を順次上げて展開溶出した。その結果得られたアスパラギン酸、グルタミン酸及びバリンは、その比旋光度の値からいずれも L 体と決定した。イソロイシンとロイシンは、それらの混合物として得られたが、配位子交換による光学分割カラムを用いた HPLC により、イソロイシンは L 体、ロイシンは L 及び D 体の 1 対 1 の混合物であることを確認した。残りの **14**、**15**、**16**、**17** 及び **18** に関しては、後に述べるパパインを用いた酵素分解により得られたペプチド断片が、**12** あるいは **13** より得られたヘキサペプチドと同一であったことから、各アミノ酸の立体化学が Table 2-4 に示すように決定された。

(2) Pumilacidins の構成脂肪酸

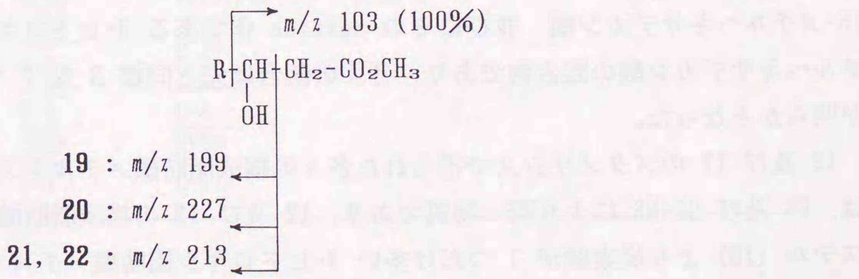
Pumilacidin 各成分の脂肪酸組成を明らかにするために、各々を無水塩酸メタノールにより酸メタノリシスを行ない、その構成脂肪酸をそれぞれのメチルエステルとして単離した。得られた各脂肪酸のメチルエステルは、Silicone OV-17 を用いたガスクロマト (GC) -MS 法 (Table 2-8) 並びに ^{1}H- 及び ^{13}C-NMR スペクトル (Table 2-9～2-12) により解析を行なった。

Table 2-8　Fatty acid methyl esters isolated from pumilacidins

Compound (pumilacidin)	GC* Rt in minutes	GC-MS (m/z)** M^+	Base peak	Diagnostic peaks
19 (A)	12.9	272	103	254, 241, 199, 74
19 (B)	12.9	272	103	254, 241, 199, 74
20 (C)	16.6	300	103	282, 269, 227, 170, 74
20 (D)	16.6	300	103	282, 269, 227, 170, 74
21 (E)	14.5	286	103	268, 213, 74
21 (F)	14.5	286	103	268, 213, 74
22 (G)	15.3	286	103	268, 213, 74

*OV-17, 3%, He, temperature programing 5°C/min from 140°C.

**OV-17, 3%, He, temperature programing 8°C/min from 140°C.



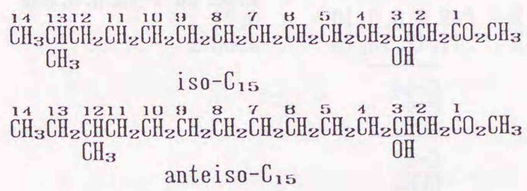
12 及び 13 の構成脂肪酸メチルエステル (19) は、GC によりいずれも 12.9 分の保持時間を示し、GC-MS で m/z 272 に分子イオンピーク、m/z 103 に基準ピーク、その他 m/z 199 等にピークが観測され同一物質である。m/z 103 の基準ピークは、β-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルの β 及び γ 炭素間の結合が開裂して生成する、同化合物に特徴的なフラグメントピークである。一方 m/z 199 のピークは、α 及び β 炭素間の開裂によって生成したアルキル鎖側のフラグメントピークとして説明され、19 は長鎖の β-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルであることが明らかになった。19 の ^{1}H-NMR スペクトルでは、3.99ppm に 3 位すなわち β 位のオキシメチンプロトンの他に、2 位すなわち α 位のメチレンプロトンが 2.41 及び 2.52ppm に各々 dd J=15.0, 9.3Hz 及び dd J=15.0, 3.2Hz として観測され、β-ヒドロキシ体であることが確認された。一方 0.86ppm に約 6 プロトン分に相当するメチル基のシグナルが d J=6.9Hz として観測され、アルキル鎖の末端は iso 型となっていることを示している。しかし 0.84ppm (t J=6.9Hz) にも比較的小さなメチル基のシグナルが認められ、アルキル鎖の幾何異性体が混在することが判明した。19 の ^{13}C-NMR スペクトルを測定し、Table 2-9 に示すようにそのシグナルを丹念に帰属した結果、19 は iso 型と anteiso 型の混合物であり、それらは 19 の ^{1}H-NMR スペクトルにおける 2 種類のメチル基のシグナルの積分値より iso 型 3、anteiso 型 7 の割合であると結論付けられた。以上の結果から、12 及び 13 の構成脂肪酸はいずれも 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸、及びその anteiso 体である 3-ヒドロキシ-12-メチルテトラデカン酸の 3 対 7 の混合物であることが明らかとなった。

14 及び 15 の構成脂肪酸メチルエステル (20) は、GC 及び GC-MS により同一物質であることが確認され、19 と同様 ^{1}H- 及び ^{13}C-NMR スペクトルの詳細な解析の結果から (Table 2-10)、19 より炭素鎖が 2 個多い、3-ヒドロキシ-15-メチルヘキサデカン酸、並びにその anteiso 体である 3-ヒドロキシ-14-メチルヘキサデカン酸の混合物であり、各々の割合は先と同様 3 対 7 であることが明らかとなった。

16 及び 17 のメタノリシスで得られた各々の構成脂肪酸メチルエステル (21) は、GC 及び GC-MS により同一物質であり、12 及び 13 の構成脂肪酸メチルエステル (19) より炭素鎖が 1 つだけ多い β-ヒドロキシ脂肪酸メチルエステルであることが判明した。21 の ^{1}H-NMR スペクトルの解析により、21 は単一物質でありそのアルキル鎖の末端は iso 型である (Table 2-11)。以上のことから、16 及び 17 の構成脂肪酸は 3-ヒドロキシ-14-メチルペンタデカン酸と同定された。

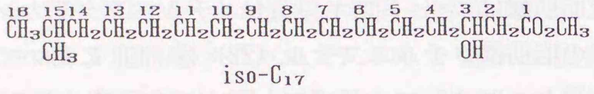
微量成分 18 の脂肪酸メチルエステル (22) は、GC において 20 と 21 の中間の保持時間を示し、GC-MS により 21 と同一の分子量であることが明らかとなった。22 の ^{1}H-NMR スペクトルでは、0.88ppm に 3 プロトン分のメチル基のシグナル (t J=7.0Hz) を示したことにより、そのアルキル鎖は normal 体であることが判明し (Table 2-12)、18 の構成脂肪酸が 3-ヒドロキシヘキサデカン酸と同定された。

Table 2-9 ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of **19**

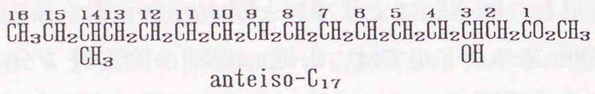


^{13}C-NMR in $CDCl_3$			^{1}H-NMR in $CDCl_3$		
Chemical shift (ppm)	iso-C_{15}	anteiso-C_{15}	Chemical shift (ppm)	iso-C_{15}	anteiso-C_{15}
11.4	———	C-14	0.84 t J=6.9Hz	———	14-H_3
19.2	———	12-CH_3	0.86 d J=6.9Hz	14-H_3	12-CH_3
22.6	C-14, 13-CH_3	———		13-CH_3	
25.5	C-5	C-5	2.41 dd J=15.0, 9.3Hz	2-H	2-H
27.9	C-13	———	2.52 dd J=15.0, 3.2Hz	2-H	2-H
29.5 ~29.7	C-6, 7, 8, 9, 10	C-6, 7, 8, 9, 10, 11, 13	3.71 s	OCH_3	OCH_3
			3.99 m	3-H	3-H
29.9	C-11	———			
34.4	———	C-12			
36.6	C-2	C-2			
39.0	C-12	———			
41.1	C-4	C-4			
51.7	OCH_3	OCH_3			
68.0	C-3	C-3			
173.5	C-1	C-1			

Table 2-10 ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of **20**



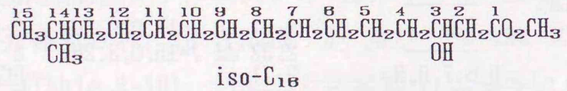
iso-C_{17}



anteiso-C_{17}

^{13}C-NMR in $CDCl_3$			^{1}H-NMR in $CDCl_3$		
Chemical shift (ppm)	iso-C_{17}	anteiso-C_{17}	Chemical shift (ppm)	iso-C_{17}	anteiso-C_{17}
11.4	———	C-16	0.84 t J=6.9Hz	———	16-H_3
19.2	———	14-CH_3	0.86 d J=6.9Hz	16-H_3	14-CH_3
22.6	C-16, 15-CH_3	———		15-CH_3	
25.5	C-5	C-5	2.41 dd J=15.0, 8.9Hz	2-H	2-H
27.9	C-15	———	2.52 dd J=15.0, 3.2Hz	2-H	2-H
29.5	C-6, 7, 8, 9,	C-6, 7, 8, 9, 10	3.71 s	OCH_3	OCH_3
~29.7	10, 11, 12	11, 12, 13, 15	4.00 m	3-H	3-H
30.0	C-13	———			
34.4	———	C-14			
36.5	C-2	C-2			
39.0	C-14	———			
41.1	C-4	C-4			
51.7	OCH_3	OCH_3			
68.0	C-3	C-3			
173.5	C-1	C-1			

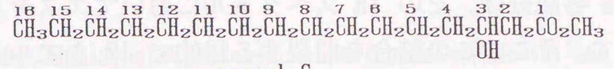
Table 2-11 ^{1}H-NMR spectrum of **21**



iso-C_{16}

^{1}H-NMR in $CDCl_3$	
Chemical shift (ppm)	iso-C_{16}
0.86 d J=6.6Hz	15-H_3, 14-CH_3
2.40 dd J=15.0, 9.2Hz	2-H
2.52 dd J=15.0, 3.2Hz	2-H
3.71 s	OCH_3
3.99 m	3-H

Table 2-12 ^{1}H-NMR spectrum of **22**



normal-C_{16}

^{1}H-NMR in $CDCl_3$	
Chemical shift (ppm)	normal-C_{16}
0.88 d J=7.0Hz	16-CH_3
2.41 dd J=15.0, 9.2Hz	2-H
2.52 dd J=15.0, 2.9Hz	2-H
3.71 s	OCH_3
4.00 m	3-H

(3) Pumilacidins のアミノ酸及び脂肪酸の配列

Pumilacidin 各成分は、その IR スペクトルにおいてエステル（ラクトン）由来の吸収を示す。そこでこの結合を開裂する目的で **12** をアルカリ処理したところ、同結合が加水分解された **23** 並びにその脱水体である **24** が得られた（Fig. 2-6)。UV スペクトルで **23** が 204nm に ε11700 の吸収を示すのに対し、**24** は 207nm に ε32700 の極大吸収を示し、**23** の脱水体である α,β-不飽和構造を示唆している。両生成物は IR スペクトルで、エステル（ラクトン）吸収を示さず、抗ウイルス活性も消失した。一方、エステル結合を非加水分解的に切断することが知られている[64] 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン（DBU）を、無水トルエン中 **12** に作用させた結果、**24** が唯一の生成物として得られた（Fig. 2-6)。[65] **13** も同様な分解反応により、**23** 並びに **24** に対応する生成物 **25** 及び **26** が得られた。これら 4 種の分解生成物について、箱守法による完全メチル化[66] を行ない、完全メチル化体 **27**、**28** 並びに **29**、**30** を各々油状物質として得た。これらをインビーム法による EI-MS（in beam EI-MS）で分析し、そのアミノ酸並びに脂肪酸の配列決定を試みた。Fig. 2-7 に示すように、いずれの誘導体も構成アミノ酸並びに構成脂肪酸の各単位毎に開裂した明確なフラグメントイオンピークを示し、アルカリあるいは DBU 処理によって分子内のラクトン結合のみ開裂したことが確認されると共に、**12** 及び **13** の構成アミノ酸並びに脂肪酸の全配列が一挙に確定した。しかし **12** のイソロイシン残基は、ロイシン残基との区別が不能のため、その位置はこの実験からは明らかにできなかった。

Fig. 2-6 Cleavage of lactone ring

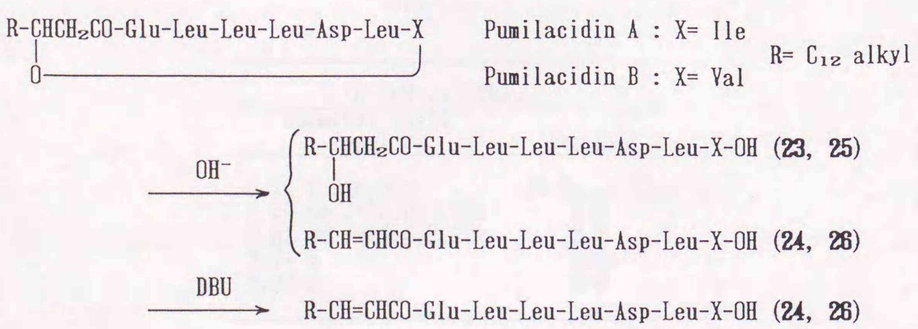
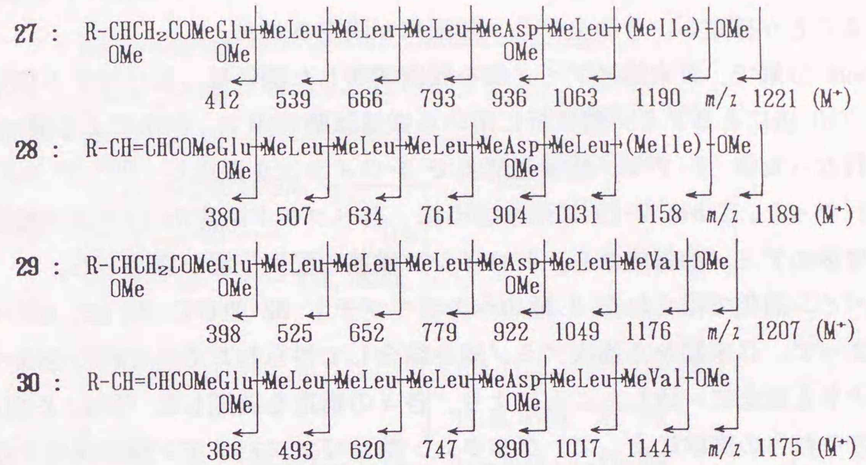
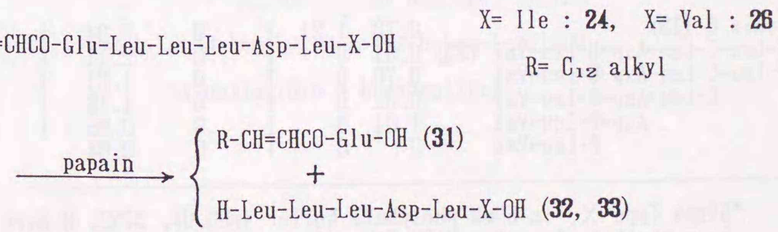


Fig. 2-7 Mass fragmentation of permethylated derivatives



12 のイソロイシン残基の配列位置を決定すること、並びに **12** 及び **13** におけるロイシン残基のエナンチオマー各 2 モルずつの配列位置を決定する目的で、以下の実験を行なった。すなわち **12** 及び **13** の DBU 処理で得られる **24** 及び **26** を、それぞれペプチダーゼの一種であるパパインにより酵素分解を行なった。[67] その結果、グルタミン酸とロイシンとの間のペプチド結合が加水分解を受け、脂肪酸を含むアシルグルタミン酸部分 **31** と、N末端が遊離しニンヒドリン反応に陽性のヘキサペプチド **32** 及び **33** が得られた（Fig. 2-8)。

Fig. 2-8 Papain digestion of α,β-unsaturated acid linear peptide derivatives



32 並びに **33** は、Edman 分解によりＮ末端から順次アミノ酸をはずし、生成した PTH アミノ酸を同定した。その結果、in beam EI-MS によって明らかとなった **13** のアミノ酸配列を確認すると共に、**12** のイソロイシン残基がＣ末端に位置することが確定し、その全アミノ酸配列が決定された。

Edman 分解で、Ｎ末端のアミノ酸を順次切断した際に残ったペプチド部分は、PICO TAG 法によるアミノ酸分析に用いる微量試験管中で、同法による酸加水分解を行なった後、D-アミノ酸酸化酵素で D-ロイシンを消化し、[68] アミノ酸分析を行なった。Table 2-13 に示すように、各ペプチド断片の D-アミノ酸酸化酵素処理後のアミノ酸組成から、D-ロイシン残基の配列位置が確定した。

パパイン消化で得られた 2 種のヘキサペプチド **32** 並びに **33** は、DCC-HOBt 法によって、Ｃ末端から逐次アミノ酸を結合して得られたそれぞれの合成ヘキサペプチドと完全に一致したことにより、各々の構造を確認した (Fig. 2-9)。

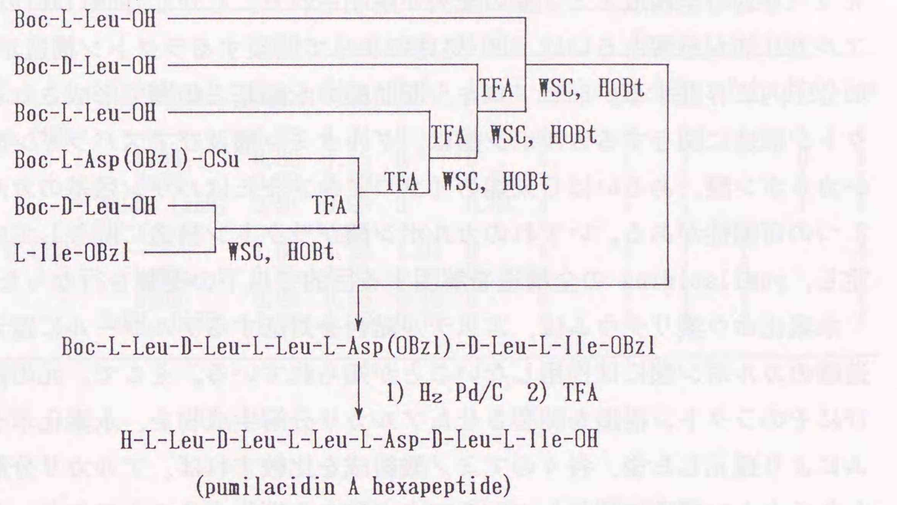
一方これらの実験によって、グルタミン酸及びアスパラギン酸が関与するペプチド結合は、各々パパイン消化を受けること、あるいは Edman 分解を受けることが示され、両アミノ酸共にペプチド結合に関与しているのは、α-カルボン酸であることが同時に証明されたことになる。

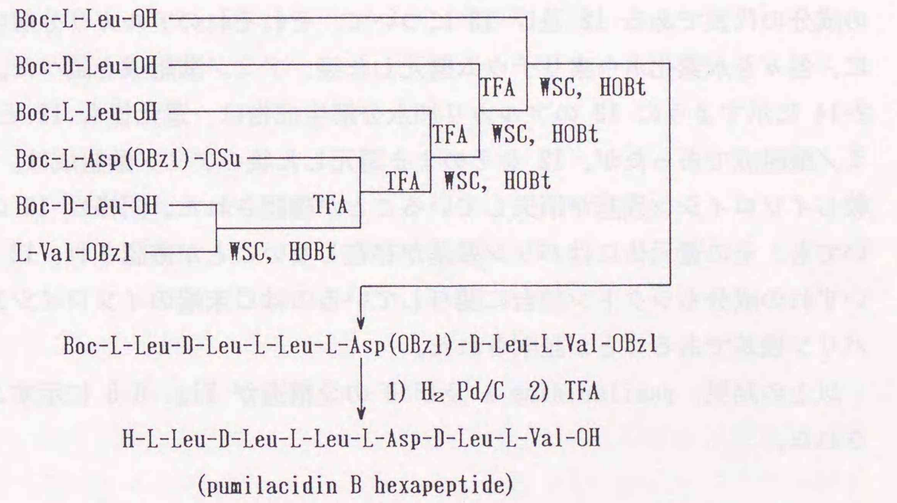
Table 2-13 Amino acid analysis after digestion by D-amino acid oxidase*

Peptides	Analyzed ratio					Theoretical ratio				
	Asp	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Glu	Val	Ile	Leu
Pumilacidin A (**12**)	0.70	1.11	0	1	2.36	1	1		1	2
L-Leu→D-Leu→L-Leu→Asp→D-Leu→Ile (**32**)	0.59	0	0	1	1.94	1			1	2
D-Leu→L-Leu→Asp→D-Leu→Ile	0.72	0	0	1	1.07	1			1	1
L-Leu→Asp→D-Leu→Ile	0.59	0	0	1	1.12	1			1	1
Asp→D-Leu→Ile	0.84	0	0	1	0.13	1			1	0
D-Leu→Ile			N.T.**							
Pumilacidin B (**13**)	0.76	1.21	1	0	2.34	1	1	1		2
L-Leu→D-Leu→L-Leu→Asp→D-Leu→Val (**33**)	0.91	0	1	0	2.11	1		1		2
D-Leu→L-Leu→Asp→D-Leu→Val	0.76	0	1	0	1.21	1		1		1
L-Leu→Asp→D-Leu→Val	0.82	0	1	0	1.16	1		1		1
Asp→D-Leu→Val	1.01	0	1	0	0.05	1		1		0
D-Leu→Val	0	0	1	0	0.04			1		0

*Sigma Type X, in 50mM phosphate buffer (pH8.0), 37°C, 2 days in a reaction tube for PICO TAG amino acid analysis.
**Not tested.

Fig. 2-9 Synthesis of hexapeptide fragments





(4) Pumilacidins の構造

Pumilacidin 各成分の構成脂肪酸、並びにロイシンの 2 モルずつのエナンチオマーを含む全構成アミノ酸の配列が解明された。しかし pumilacidins には、アルカリ加水分解あるいは DBU 処理によって開裂するラクトン構造が、それらの分子内に存在する。β-ヒドロキシ脂肪酸の水酸基との間で形成される、このラクトン構造に関与するカルボン酸は、グルタミン酸及びアスパラギン酸残基のω-カルボン酸、あるいはC末端のイソロイシンまたはバリン残基のカルボン酸の 3 つの可能性がある。いずれのカルボン酸がラクトン構造に関与しているかを決定し、pumilacidins の全構造を解明する目的で以下の実験を行なった。

水素化ホウ素リチウムは、エステル結合を対応するアルコールに還元するが、遊離のカルボン酸には作用しないことが知られている。そこで、元の抗生物質並びにそのラクトン構造を開裂させたアルカリ分解生成物を、水素化ホウ素リチウムにより還元した後、各々のアミノ酸組成を比較すれば、アルカリ分解前に存在したラクトン構造に関与しているアミノ酸のみ消失することになり、そのアミノ酸が特定できる。[69] Pumilacidin 各成分の内、アミノ酸組成の異なる 2 系列の成分の代表である **12** 及び **13** について、それぞれのアルカリ分解生成物と共に、各々を水素化ホウ素リチウム還元した後、アミノ酸組成を調べた。Table 2-14 に示すように **12** のアルカリ加水分解生成物は、還元後も **12** と同一のアミノ酸組成であったが、**12** をそのまま還元した後のアミノ酸組成は、これに比較しイソロイシン残基が消失していることが確認された。同様に **13** の場合についても、その還元体にはバリン残基が存在しないことが確認され、**12** 及び **13** いずれの成分もラクトン結合に関与しているのはC末端のイソロイシンあるいはバリン残基であることが証明された。

以上の結果、pumilacidins A 及び B の全構造が Fig. O-5 に示すように決定された。

Table 2-14 Change in amino acid compositions of pumilacidins A and B after reduction with or without prior alkaline hydrolysis

Compound	Treatment	Analyzed ratio					Theoretical ratio				
		Asp	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Glu	Val	Ile	Leu
Pumilacidin A (**12**)	———	1.27	1.34	0	0.85	4	1	1		1	4
	$LiBH_4$	0.88	1.15	0	0	4	1	1		0	4
	NaOH	0.93	0.99	0	0.72	4	1	1		1	4
	NaOH, $LiBH_4$	0.91	0.93	0	0.64	4	1	1		1	4
Pumilacidin B (**13**)	———	1.07	1.28	1.01	0	4	1	1	1		4
	$LiBH_4$	1.05	1.35	0	0	4	1	1	0		4
	NaOH	0.93	0.98	0.79	0	4	1	1	1		4
	NaOH, $LiBH_4$	1.09	1.09	0.74	0	4	1	1	1		4

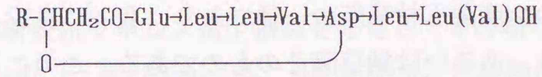
第７節　考察

Pumilacidins は、いずれも構造類似の 7 種類のデプシペプチド系抗生物質であり、各成分はそれらの構成脂肪酸、あるいは構成アミノ酸の一部を異にする。すなわちpumilacidins A、C 及び E は、C末端にイソロイシン残基が配置する共通のアミノ酸配列を有するが、各々に含まれる β-ヒドロキシ脂肪酸のアルキル鎖長が異なる。一方 pumilacidins B、D、F 及び G では、このイソロイシン残基がバリン残基に置き換わったアミノ酸配列であり、pumilacidins B、D 及び F の構成脂肪酸は、各々 A、C 及び E の各成分の脂肪酸に対応する。また各成分ともその β-ヒドロキシ脂肪酸の水酸基とC末端のアミノ酸残基のカルボキシル基との間でラクトン結合した大環状構造を形成している。各成分の分子内には、2 モルずつのロイシンのエナンチオマーが存在し、それぞれの配列順を決定することが、本抗生物質の構造決定に際し最も大きな課題であったが、酵素を利用することにより解決することができた。

Pumilacidins 類似の抗生物質としては (Fig. 2-10)、Ogawa らが *Bacillus mesentericus* の培養液より見出した、抗菌活性を有する esperin が知られている。[70,71] また血液凝固阻害剤のスクリーニングによって、*Bacillus subtilis* の培養液より単離された surfactin も pumilacidins 類似の抗生物質であり、[72,73] pumilacidins のN末端から 4 番目のロイシン残基がバリン残基に置き換わり、C末端のイソロイシンあるいはバリン残基がロイシン残基に置き換わったアミノ酸配列を有している。[69] Surfactin はまた別のグループによって、Ehrlich 固型癌に対する抗腫瘍抗生物質のスクリーニングにより、納豆菌 (*Bacillus natto*) の培養液から見出されたことが報告されている。[74] 更に、サイクリックアデノシン 3',5'-モノリン酸ホスホジエステラーゼ阻害剤として、*Bacillus subtilis* の培養液より単離された APD 抗生物質は、その構成アミノ酸の立体化学は解明されていないものの、それらのアミノ酸配列は surfactin と同一であるとされ、その成分のあるものは、surfactin の成分に一致したと報告されている。[75,76] またこの APD 抗生物質の糸状菌に対する菌糸生育抑制作用も確認されている。[77]

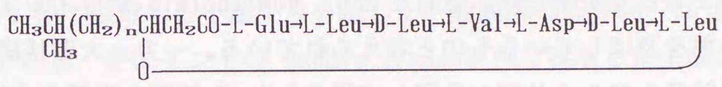
Fig. 2-10　Structures of depsipeptide antibiotics related to pumilacidin

Esperin



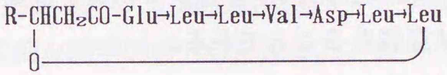
R= $C_{12}H_{25}$ (45%), $C_{11}H_{23}$ (35%), $C_{10}H_{21}$ (20%)

Surfactin



n= 7, 8 and 9

APD



Compound	R
APD-Ⅰ	$CH_3CH(CH_2)_7$- CH_3
APD-Ⅱ	$CH_3CH_2CH(CH_2)_6$- CH_3
APD-Ⅲ	$CH_3(CH_2)_{10}$-
APD-Ⅳ	$CH_3CH(CH_2)_9$- CH_3
APD-Ⅴ	$CH_3CH_2CH(CH_2)_8$- CH_3

Pumilacidins が、HSV-1 に対する抗ウイルス抗生物質のスクリーニングの過程で見出され、更に抗胃潰瘍活性を示すことが明らかになったことを考え合わせると、*Bacillus* 属が生産する pumilacidins 類似のデブシペプチド系抗生物質群が示す生物活性の多種多様性に驚かされる。

いずれの化合物の生産菌も枯草菌の一種であり、我々に身近な納豆菌に分類学上極めて近縁である、あるいは納豆菌そのものである。このことは、こういった化合物を食品である納豆を通し、無意識に摂取している可能性を示唆するものである。

Pumilacidins の HSV-1 に対する抗ウイルス活性は、HSV-1 に対する直接の不活化作用によることが明らかにされており、pumilacidin がウイルス粒子の膜に、何らかの作用を及ぼしているものと考えられている。一方、大環状構造を形成するラクトン結合をアルカリ加水分解して得られた 2 種類の直鎖化合物は、いずれも最早抗ウイルス活性は示さない。このことから pumilacidins の HSV-1 の膜への作用は、単なる界面活性作用ではないと結論付けられる。今までに発見された抗ウイルス剤とは異なる作用機作を有する物質を探索するという観点から、pumilacidins の発見は意義あることである。

第３章　新規抗ウイルス抗生物質群 Fluvirucins

インフルエンザＡ型ウイルス（Flu-A）に対する抗ウイルス活性を指標とした抗生物質の探索研究の過程で、5 種の放線菌の培養液中に互いに類似の構造を有する合計 7 種の新規抗ウイルス抗生物質を発見し、その抗ウイルス活性に因み、各々を fluvirucins A、B、C、D_1、D_2、D_3 及び D_4 と命名した。

イタリアのローマのチベル川河畔で採取した土壌より分離した一放線菌 No. Q464-31 株は fluvirucin A を、フィリピンのネグロス島の La Carlota で採取した土壌からの分離放線菌 No. R359-5 株は fluvirucin B を、インドの Maharashtra 州で採取した土壌より分離した一放線菌 No. R869-90 株は fluvirucin C を、更にインドの Madhya Pradesh 州で採取した土壌より得られた一放線菌 No. L407-5 株は fluvirucin D_1 を、各々単一物質として生産していることを見出した。一方インドの Maharashtra 州で採取した土壌より分離した一放線菌 No. R516-16 株の培養液からは、前述の fluvirucin D_1 と共に、fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の 3 種の新規抗ウイルス抗生物質を見出した。各生産菌は、その後の詳細な菌学的研究の結果から、各々 *Nonomuria tyrrhenii* sp. nov. Q464-31、*Nonomuria* sp. R359-5、*Nocardiopsis mutabilis* R869-90、non-sporogenic maduromycete L407-5 及び non-sporogenic maduromycete R516-16 と同定された。

それぞれの生産菌の培養液からブタノールあるいは Diaion HP-20 で抽出し、シリカゲル及び Sephadex LH-20 を用いた各種クロマト精製を経て単離されたこれら 7 種の類縁化合物は、いずれもアミノ糖及び 14 員環ラクタムから成る配糖体抗生物質であり、各々はラクタム環上のアルキル側鎖、構成アミノ糖の種類、並びにそのアミノ糖のラクタム環上での置換位置により区別される。

各抗生物質共に、Flu-A による MDCK (Madin Darby canine kidney) 細胞の変性効果に対し顕著な阻止活性を示したが、その構成糖のアミノ基に置換基を有する fluvirucins D_3 及び D_4 の抗ウイルス活性は、アミノ基に置換基を持たない他の 5 種の化合物に比較し、かなり低い値であった。

Fluvirucins の各種細菌に対する抗菌活性を調べた結果、各化合物共に嫌気性細菌の内特に *Bacteroides fragilis* に対し強い生育阻止活性を示した。またグ

ラム陽性細菌類、並びに一部のカビ類に対し若干の生育阻止活性を有することが示された。しかし fluvirucins D_3 及び D_4 は、いずれの細菌に対しても生育阻止活性が認められず、抗ウイルス活性同様、その構成糖のアミノ基は遊離の形で存在していることが、その活性の発現に重要であることが明らかになった。[7]

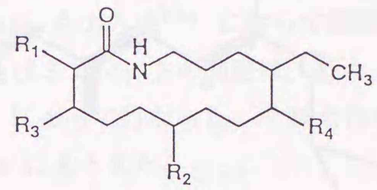
Fluvirucins の構造研究は、先ずこれら類縁化合物群の内、分子量が最も小さくその構造が比較的単純であると考えられた fluvirucin A について行なった。すなわち、種々の化学修飾を含む分解的手法、各種の測定法による NMR スペクトル並びにX線結晶構造解析により、絶対配置を含めた全構造を決定した。その他の各化合物の構造は、各種分解誘導反応生成物を含む各々の構造解析、並びにそれらの物理化学的諸恒数を、fluvirucin A の相当する各化合物の値と比較検討することにより決定した。

Fluvirucin A は、その構成糖として天然には極めて希なアミノ糖である 3,6-ジデオキシ-3-アミノ-L-タロースを有し、そのアグリコン部は 14 員環ラクタム構造の 2,6-ジメチル-10-エチル-3-ヒドロキシ-13-トリデカンラクタムであり、それらが互いにグリコシド結合することにより fluvirucin A を形成している。Fluvirucins B、C 及び D_2 の構成糖は A の構成糖と同一であるが、それらのアグリコンは 2 位及び 6 位のアルキル側鎖が、エチル基あるいはヒドロキシエチル基に置き換わっており、B 及び D_2 では糖の結合位置も異なる。一方、fluvirucin D_1 は D_2 と同一のアグリコンを有するが、その構成糖として L-ミコサミンが存在することが判明した。本アミノ糖は nystatin[78] あるいは amphotericin B[79] に代表されるポリエン抗カビ抗生物質の構成アミノ糖として知られているが、[80] これらのミコサミンの絶対配置はいずれも D 体であり、L 体のミコサミンが天然から得られたのはこれが最初の例である。Fluvirucins D_3 及び D_4 の構造は、各々 D_1 及び D_2 の構成糖の 3'位のアミノ基に、ウレイド結合を介して 2-フェネチルアミンが置換した構造であることが明らかとなり、fluvirucins の全構造が確定した (Fig. O-6)。[8,9]

Fluvirucin A ついて、^{13}C 標識した酢酸並びにプロピオン酸の取り込み実験による生合成の解明を行なった結果、本章、第7節で述べるように、アグリコンの各炭素は、5 分子の酢酸と 2 分子のプロピオン酸に由来することが判明した (Fig. 3-1)。[8]

本章では、新規抗ウイルス抗生物質 fluvirucins A、B、C、D_1、D_2、D_3 並びに D_4 について、各々の生産菌、醗酵生産、抽出、分離精製、及び物理化学的性状について述べた後、更に構造決定に関する研究、並びに生合成研究について述べる。

Fig. O-6 Structures of fluvirucin antibiotics



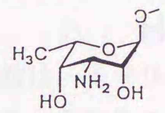
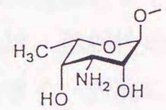
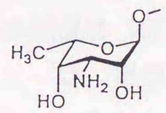
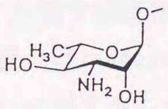
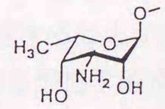
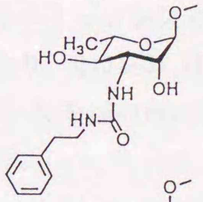
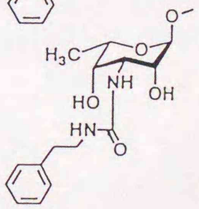
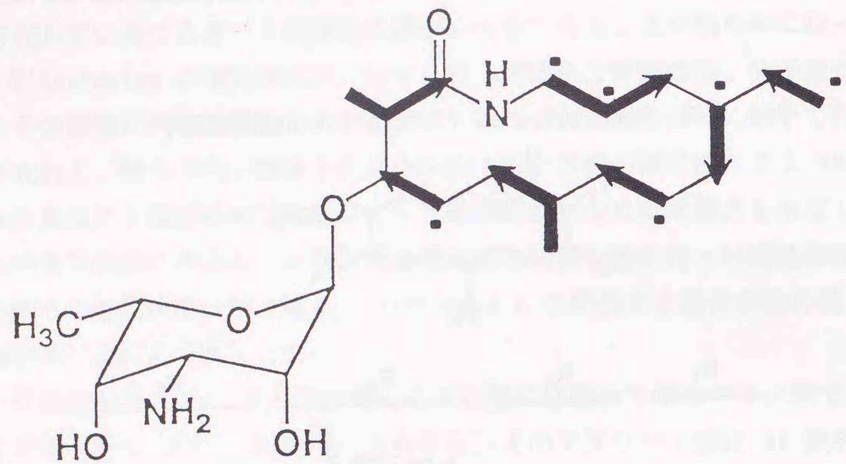
	R_1	R_2	R_3	R_4
Fluvirucin A	$-CH_3$	$-CH_3$		-H
" B	$-CH_2CH_3$	"	-H	
" C	$-CHOHCH_3$	"		-H
" D_1	$-CH_2CH_3$	$-CH_2CH_3$	-H	
" D_2	"	"	"	
" D_3	"	"	"	
" D_4	"	"	"	

Fig. 3-1 Biosynthetic carbon origin of fluvirucin A



第1節 Fluvirucins の生産菌

Fluvirucins の生産菌である 5 種類の放線菌の培養、並びに生理学的特徴の検討は、Shirling と Gottlieb[81] 及び Gordon らの方法[82] に従って行なった。全細胞の加水分解物中に含まれるアミノ酸及び糖類の分析は、Lechevalier の方法[83] によった。リン脂質の分析は、Lechevalier らの方法[84] に従って行なった。メナキノン類は Collins らの方法[85] に従って調製し、MS によって分析した。グリコレート試験、及びミコレートの同定は、各々 Uchida と Aida[86] 及び Minnikin らの方法[87] によって行なった。それぞれの分析結果は、Table 3-1、3-2、3-3 並びに 3-4 にまとめた。

(1) Fluvirucin A 生産菌

Fluvirucin A 生産菌である Q464-31 株は、イタリアのローマのチベル川河畔で採取した土壌から分離した放線菌である。本菌株の形態学的特徴として、以下のことが認められた (Table 3-1)。すなわち気菌糸の先端には、単軸性の鉤状あるいは螺旋状の短い胞子鎖を形成する。その胞子は比較的大きく、表面には垂直方向に隆起が認められた。白色の気菌糸の形成は ISP No. 2、3 及び 4 培地で認められ、ISP No. 2 培地におけるコロニーは、褐色がかった色調で、その形状は堅く、凸状ないしは噴火口状である (Table 3-2)。以上の形態学的観察結果、並びに細胞化学的特徴 (Table 3-3) から、Q464-31 株は最近 *Actinomadura* 属から分離独立させることが提案されている *Nonomuria* 属[88] に属することが判明した。この *Nonomuria* 属には、現在までに 12 の種が存在することが知られているが、Q464-31 株は、その胞子表面に垂直の隆起を有する形態学的特徴、並びにアデニンを分解する、ウレアーゼを有する、及びゼラチナーゼを欠くといった生理学的特徴が (Table 3-4)、これら 12 菌種とは異なり、Q464-31 株はこれらとは別の菌種であると結論付けられた。そこで Q464-31 株を *Nonomuria* 属に属する新菌種 *Nonomuria tyrrhenii* sp. nov. と命名した。

(2) Fluvirucin B 生産菌

Fluvirucin B 生産菌である R359-5 株は、フィリピンのネグロス島の La Carlota で採取した土壌より分離した放線菌である。本菌株は、その形態学的特徴として (Table 3-1)、気菌糸の先端に単軸性の鉤状、あるいは螺旋状の短い胞子鎖を擬似胞子嚢として形成していることが確認された。また胞子の形状は長円形であり、その表面は平滑である。一方栄養菌糸の形状は、非分裂型である。気菌糸の形成は ISP No. 2 及び 3 培地のみで認められ、その色調は白色あるいは黄白色である。ISP No. 2 培地上でのコロニーは、褐色がかった色調の堅い凸状ないし噴火口状の形状を示した (Table 3-2)。以上の形態学的観察結果、並びに細胞化学的特徴から (Table 3-3)、本菌株は Q464-31 株同様 *Nonomuria* 属に属することが判明した。R359-5 株はその形態学的特徴、並びに培養上の特徴から *Nonomuria* 属の 12 菌種の内、*Nonomuria helvata*、*N. pusila* 及び *N. spiralis* に近縁と考えられた。しかしこれら 3 菌種には、カゼイン、ゼラチン及びデンプンの加水分解能が認められず、[89] 生理学的に R359-5 株とは完全に区別される (Table 3-4)。R359-5 株と生理学的に近縁の種としては *N. salmonea* 及び *N. parvosata* があるが、[90] これら 2 菌種の胞子あるいは胞子鎖の形状、並びにピンクないし赤色の色素を産生する点が R359-5 株とは異なる。以上のことから R359-5 株は *Nonomuria* 属の既存のいずれの菌種とも一致しないことが判明した。しかし、新菌種に分類するために更に精査する必要があると判断し、本菌株は *Nonomuria* 属の一菌種と分類するにとどめた。

(3) Fluvirucin C 生産菌

Fluvirucin C 生産菌である R869-90 株は、インドの Maharashtra 州で採取した土壌より分離した放線菌である。気菌糸の形成は ISP No. 2、5 及び 7 の各培地上で、希薄ながら認められた。気菌糸の全部分から、長短様々な直線かつ断片状の胞子鎖が生じており、これらの表面はいずれも平滑である。成熟した胞子はこの断片上で不連続的に形成される (Table 3-1)。一方、栄養菌糸の形状は分裂型である。ISP No. 2 培地上のコロニーは柔軟かつ平滑で、滴状である

(Table 3-2)。メラニン及びその他の色素は産生されない。R869-90 株の形態学的観察結果、細胞化学的特徴 (Table 3-3)、並びに生理学的特徴 (Table 3-4) から、本菌株は *Nocardiopsis mutabilis*[91,92] に分類されることが明らかになった。

(4) Fluvirucin D_1 生産菌

Fluvirucin D_1 生産菌である L407-5 株は、インドの Madhya Pradesh 州で採取した土壌より分離した放線菌である。L407-5 株は、気菌糸あるいは胞子形成が全く認められなかった。一方、その栄養菌糸の形状は非分裂型である (Table 3-1)。ISP No. 2 培地上でのコロニーは、褐色がかった色調を示し、堅く、凸状ないしは噴火口状の形状を示した (Table 3-2)。しかし L407-5 株は、胞子を形成しないという性質から、その分類学上の位置を明らかにすることはできない。えのため、ケモタキソノミーの見地から、本菌株を単に non-sporogenic maduromycete と表示するにとどめた。

(5) Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の生産菌

Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の生産菌である R516-16 株は、R869-90 株同様インドの Maharashtra 州で採取した土壌より分離した放線菌である。R516-16 株は気菌糸あるいは胞子の形成が全く認められなかった。一方、その栄養菌糸の形状は非分裂型である (Table 3-1)。ISP No. 2 培地上でのコロニーは、褐色がかった色調で、その形状は堅く、凸状ないしは噴火口状である (Table 3-2)。メラニン及びその他の識別可能な色素は産生しない。本菌株は L407-5 株同様、最終的に non-sporogenic maduromycete と分類した。R516-16 株は L407-5 株と、培養上の特徴は類似しているが、リン脂質の型において前者がホスファチジルエタノールアミンを欠き、ホスファチジルグリセロールを有する点で後者と区別される (Table 3-3)。生理学的にも両者は明確に区別され (Table 3-4)、各々独立した種である。

Table 3-1 Morphology on five strains of actinomycetes

	Strain Q464-31	Strain R359-5	Strain R869-90	Strain L407-5	Strain R516-16
Aerial mycelium:					
Formation	Moderate(ISP No. 3)	Abundant(ISP No. 2)	None or sparse (ISP Nos.2, 5, 7)	None	None
Spore chain	Short; hook or spiral (5 - 15 spores)	Short; hook or spiral (10 - 30 spores)	Long straight chains of spores with various length.	None	None
Spores	Oval(1.2 x1.6-2.5 μm); surface with vertical ridges	Oval(0.8 x 1.0-2.0 μm); smooth surface	Rod (0.6 x 0.8-3.0 μm); smooth surface	None	None
Special morphology	None	Pseudosporangium (coiled spore chain with pseudo-membrane)	Fascicled thick hyphae, and sclerotic granule	None	None
Substrate mycelium:					
Fragmentation	None	None	Occurred(various degree)	None	None
Special morphology	None	None	None	Dichotomously and repeatedly branched curled hyphae	Dichotomously and repeatedly branched curled hyphae

Table 3-3 Cell chemistry on five strains of actinomycetes

	Strain Q464-31	Strain R359-5	Strain R869-90	Strain L407-5	Strain R516-16
Whole cell hydrolysate:					
Diaminopimelic acid	Meso	Meso	Meso	Meso	Meso
Sugars	Glucose, madurose	Glucose, mannose, madurose, ribose	Galactose, glucose, mannose, ribose, rhamnose	Galactose, glucose, mannose, madurose, ribose	Glucose, mannose, madurose, ribose
Cell wall type	III_B	III_B	III_C	III_B	III_B
Phospholipids*	PIM, GluNU, PI, PE, DPG	PIM, GluNU, PI, PE, DPG	PI, GluNU, two PEs	PIM, GluNU, PI, PE, DPG	PI, GluNU, DPG, PG
Type	P-IV	P-IV	P-IV	P-IV	P- V (tentative)
Major menaquinone	MK-9(H_4)	MK-9(H_4)	MK-9(H_4)	MK-9(H_4)	MK-9(H_4)
Mycolate	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Glycolate test	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

* Abbreviations: PIM phosphatidylinositol mannoside, GluNU unknown glucosamine-containing phospholipids, PI phosphatidylinositol, PE phosphatidylethanolamime, DPG diphosphatidylglycerol, PG phosphatidylglycerol.

Table 3-2 Cultural characteristics of five strains of actinomycetes

		Strain Q464-31	Strain R359-5	Strain R869-90	Strain L407-5	Strain R516-16
Yeast extract-malt extract agar (ISP No.2)	G	Good; deep yellowish brown (75)	Good; strong brown(55)	Good; moderate orange yellow(71)	Good; deep brown (56)	Good; deep brown (56)
	A	Poor; white	Abundant: yellowish white(92)	Very scant; white	None	None
	D	None	None	None	None	None
Oatmeal agar (ISP No.3)	G	Moderate; light yellow(86)	Moderate; light brown(57)	Moderate; pale orange yellow(70)	Good; light yellow(92)	Good; strong yellow(84)
	A	Moderate; white	Moderate; yellowish white(92)	None	None	None
	D	None	None	None	Pale yellow(89)	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No.4)	G	Poor; light olive brown(94)	Poor; moderate yellow(87)	Moderate; light olive brown(94)	Poor; moderate yellow(87)	Poor; pale yellow(89)
	A	Scant; white	None	None	None	None
	D	None	None	None	None	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	G	Moderate; dark yellow(88)	Scant; moderate yellow(87)	Moderate; dark yellow(88)	Poor; moderate yellow(87)	Poor; pale yellow(89)
	A	None	None	Very scant; white	None	None
	D	None	None	None	None	None
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No.6)	G	Moderate; deep yellowish brown (75)	Moderate; light yellowish brown (76)	Good; colorless	Moderate; deep yellowish brown (75)	Moderate; deep yellowish brown (75)
	A	None	None	None	None	None
	D	None	None	None	None	None
Tyrosine agar (ISP No.7)	G	Moderate; dark yellow(88)	Scant; pale yellow(89)	Good; dark orange yellow(72)	Poor; grayish brown(61)	Poor; grayish yellow(90)
	A	None	None	Poor; yellowish white(92)	None	None
	D	None	None	None	None	None

Observation after incubation at 28°C for 3 weeks
Color name, used : ISCC-NBS Color-name Charts
Abbreviations G: growth and reverse color; A: aerial mycelium; D: diffusible pigment

Table 3-4 Physiological characteristics of five strains of actinomycetes

	Strain Q464-31	Strain R359-5	Strain R869-90	Strain L407-5	Strain R516-16
Decomposition of:					
Adenine	+	-	-	-	-
Casein	+	+	+	+	+
Hippuric acid	+	+	+	+	+
Hypoxanthine	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	-	+	-	-
Xanthine	-	-	-	-	-
Decarboxylation of:					
Benzoate	-	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	-	-
Mucate	-	-	-	-	-
Succinate	+	+	+	+	+
Tartrate	-	-	-	+	+w
Production of:					
Amylase	+	+	+	+	+
Esculinase	+	+	+	+	+
Gelatinase	-	+	+	+	+
Nitrate reductase *	-/+	+/+	+/-	-/+	+/+
Tyrosinase	-	-	-	-	-
Urease	+	-	-	+w	+w
Growth in/at:					
Lysozyme, 0.01%	-	-	+	-	-
NaCl, 3%	+	+	+	+	+
5%	-	-	-	+	-
Temperature, 43°C	-	-	+	+	+
46°C	-	-	-	+	-
Acid from:					
Adonitol	+	+	-	-	-
D-Arabinose	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	+	-
D-Glucoose	+	+	+	+	+
Glycerol	-	+	+	+	+
Inositol	+	-	+	+	+
Lactose	-	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	-	+	+
D-Melezitose	-	+	+w	-	+
Melibiose	+	+	+	+	+
Methyl α-glucoside	+w	+	+w	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	+	+w	-	+
Trehalose	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+

* Sucrose-nitrate broth/Peptone-nitrate broth
** +w, weakly positive

第２節　Fluvirucins の醗酵生産

(1) Fluvirucin A の醗酵生産

斜面寒天培地上で充分に生育した fluvirucin A 生産菌 *Nonomuria tyrrhenii* sp. nov. Q464-31 株を 500mℓ の三角フラスコ中 Table 3-5 に示す組成の培地 100mℓ に接種し、回転振盪機 (200rpm) 上 32℃ で 3 日間培養し、種培養液とした。本培養では Table 3-5 の組成の培地 100mℓ を含む 500 mℓ の三角フラスコ中、上記種培養液 5 mℓ を分注し、28℃ で 6 日間回転振盪培養した。Fluvirucin A の生産力価は、Sabouroud dextrose 培地での *Candida albicans* A9540 に対する生育阻止作用を、培養液希釈法により測定し検定した。一方ジャーファンメンターを用いた培養は、以下のようにして行なった。すなわち、フラスコ培養によって得られた Q464-31 株の種培養液 500mℓ を 12ℓ の培地 (Table 3-5) を含む 20ℓ のジャーファーメンター中にし、12ℓ/min で除菌空気を導入しながら 28℃、250rpm で撹拌培養した。ジャーファーメンターにおける fluvirucin A の生産は、113 時間後に最高力価に達した。

Table 3-5　Production medium of fluvirucin A

Soluble starch	2%
Pharmamedia	1%
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.003%
$CaCO_3$	0.4%

pH7.0 (before sterilization)

(2) Fluvirucin B の醗酵生産

斜面寒天培地上で生育した fluvirucin B 生産菌 *Nonomuria* sp. R359-5 株を 500mℓ の三角フラスコ中 Table 3-6 に示す組成の培地 100mℓ に接種し、32℃ で 3 日間回転振盪培養し、種培養液とした。本培養は種培養と同一の培地を用い、上記 fluvirucin A と同様な条件で行なった。Fluvirucin B の生産力価は、培養濾液の Flu-A に対する抗ウイルス活性を測定することにより検定した。本培養における fluvirucin B の生産は、6 日後に最高力価に達した。

Table 3-6　Production medium of fluvirucin B

Mannitol	2%
Fish meal	2%
$CaCO_3$	1%

pH7.0 (before sterilization)

(3) Fluvirucin C の醗酵生産

Fluvirucin C 生産菌 *Nocardiopsis mutabilis* R869-90 株を斜面寒天培地で充分に生育させた後、500mℓ の三角フラスコ中、Table 3-5 に示す組成の培地 100mℓ に接種した。培養並びに生産力価の検定は fluvirucin B の場合と同様にして行なった。

(4) Fluvirucin D_1 の醗酵生産

斜面寒天培地上で充分に生育した fluvirucin D_1 生産菌である non-sporogenic maduromycete L407-5 株を 500mℓの三角フラスコ中 Table 3-7 に示す組成の培地 100mℓ に接種し、32℃ で 3 日間回転振盪培養し、種培養液とした。本培養は種培養と同一の培地を用い、上記 fluvirucin A と同様な条件で行なった。Fluvirucin D_1 の生産力価は、培養濾液の Flu-A に対する抗ウイルス活性を測定することにより検定した。本培養における fluvirucin D_1 の生産は、6 日後に最高力価に達した。

Table 3-7 Production medium of fluvirucin D_1

Glucose	3%
Soybean meal	2%
Distiller's solubles	1.5%
Fish meat extract	0.2%
$CaCO_3$	1%

pH7.0 (before sterilization)

(5) Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の醗酵生産

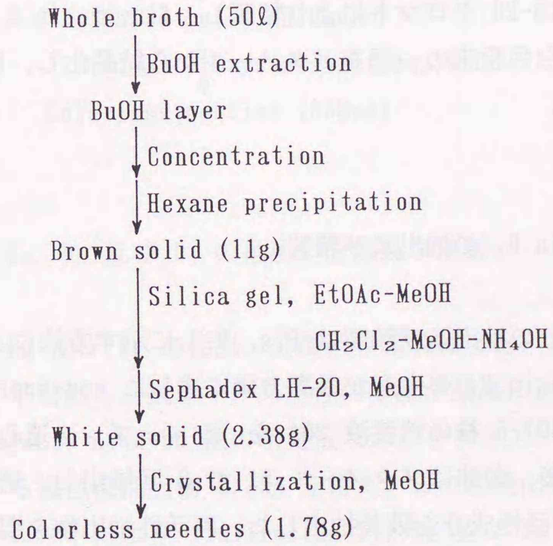
Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の生産菌 non-sporogenic maduromycete R516-16 株を斜面寒天培地で充分に生育させた後、500mℓ の三角フラスコ中、fluvirucin D_1 の場合と同じ Table 3-7 に示す組成の培地 100mℓ に接種した。培養並びに生産力価の検定は fluvirucin D_1 の場合と同様にして行なった。

第3節 Fluvirucins の抽出、分離及び精製

(1) Fluvirucin A の抽出及び精製

Fluvirucin A の抽出及び精製は Fig. 3-2 に示す方法によって行なった。すなわち、fluvirucin A の生産が最高力価に達した *Nonomuria tyrrhenii* sp. nov. Q464-31 株の培養液 50ℓ をブタノール 20ℓ で抽出した。シャープレス遠心分離機で分離したブタノール層を 0.5ℓ に濃縮後 3ℓ のヘキサンに滴下し、生成した沈澱を遠心分離した。得られた抗ウイルス活性を有する褐色の固体 11g について、同活性並びに TLC を指標として順次精製を行なった。種々の展開溶媒系を用いたシリカゲルクロマト精製の後、更に Sephadex LH-20 クロマトを行ない、抗ウイルス活性の本体である fluvirucin A の純粋な白色固体 2.38g を得た。本白色固体をメタノールから結晶化し、1.78g の fluvirucin A を無色針状晶として単離した。

Fig. 3-2 Extraction and purification of fluvirucin A



(2) Fluvirucin B の抽出及び精製

Fluvirucin B の抽出及び精製は、上記 fluvirucin A の場合と同様な方法により行なった。すなわち、fluvirucin B の生産が最高に達した *Nonomuria* sp. R359-5 株の培養液 2.6ℓ をブタノール抽出し、抗ウイルス活性を有する褐色の固体 1.6g を得た。この粗抽出物を生物活性並びに TLC を指標として、シリカゲル及び Sephadex LH-20 クロマトにより精製し、fluvirucin B の純粋な白色粉末 280mg を単離した。本粉末をメタノールから結晶化し、fluvirucin B の無色針状晶 220mg を得た。

(3) Fluvirucin C の抽出及び精製

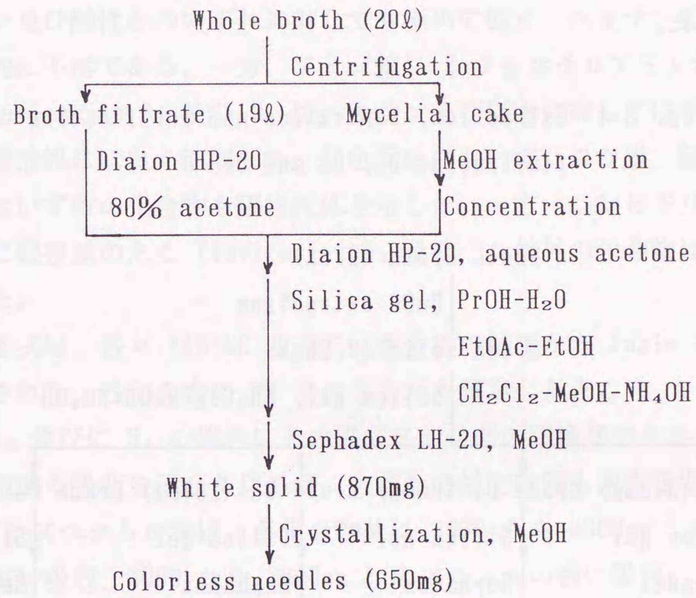
Fluvirucin C の抽出及び精製は、上記 fluvirucin A と同様の方法により行なった。すなわち、fluvirucin C の生産が最高に達した *Nocardiopsis mutabilis* R869-90 株の培養液 2.5ℓ をブタノール抽出し、抗ウイルス活性を有する fluvirucin C の褐色粗抽出物 0.9g を得た。この粗抽出物をシリカゲル並びに Sephadex LH-20 クロマトにより精製し、fluvirucin C の白色粉末 65mg を単離した。本白色粉末の一部をメタノールから結晶化し、fluvirucin C の無色針状晶を得た。

(4) Fluvirucin D_1 の抽出及び精製

Fluvirucin D_1 の抽出及び精製は Fig. 3-3 に示す方法によって行なった。すなわち、fluvirucin D_1 の生産が最高力価に達した non-sporogenic maduromycete L407-5 株の培養液 20ℓ を、シャープレス遠心分離機で菌体と培養濾液とに分離後、菌体はメタノール 5ℓ で 3 回抽出し、培養濾液は 2ℓ の Diaion HP-20 で活性成分を吸着抽出した。両活性抽出物を混合し、Flu-A に対する抗ウイルス活性並びに TLC を指標として精製を行なった。先ず Diaion

HP-20 クロマトを行ない、更に種々の展開溶媒系を用いたシリカゲルクロマトの後、Sephadex LH-20 クロマトにより精製した。以上の操作で得られた fluvirucin D_1 の純粋な白色粉末 870mg をメタノールから結晶化し、650mg を無色針状晶として単離した。

Fig. 3-3 Extraction and purification of fluvirucin D_1

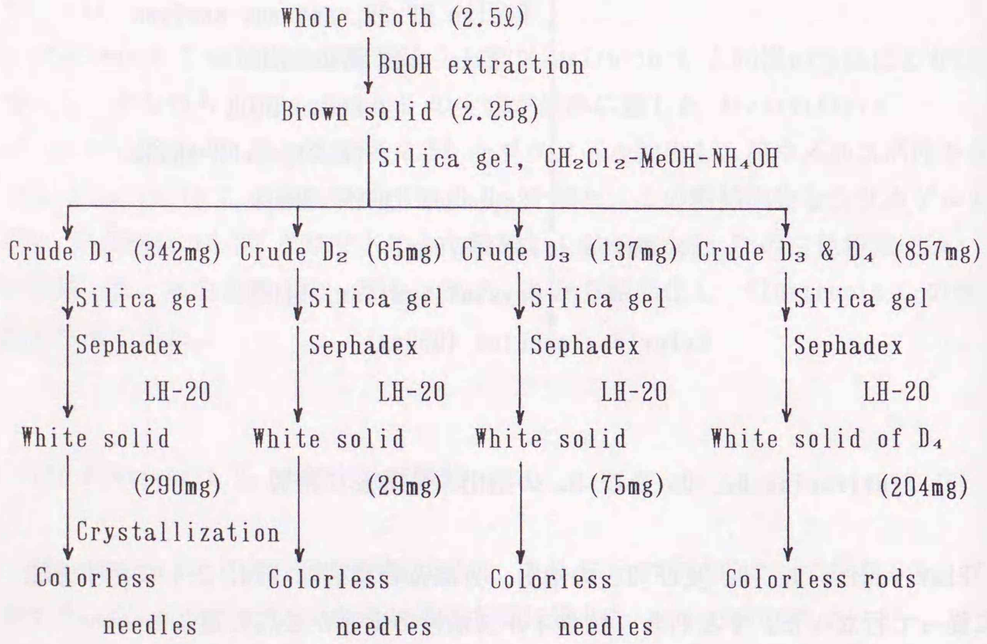


(5) Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の抽出、分離及び精製

Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の抽出、分離及び精製は Fig. 3-4 に示す方法に従って行なった。すなわち、抗ウイルス活性の生産が最高に達した non-sporogenic maduromycete R869-90 株の培養液 2.5ℓ をブタノールで抽出し、抗ウイルス活性を有する褐色粗抽出物 2.25g を得た。この粗抽出物を TLC を指標としたシリカゲルクロマトにより fluvirucins D_1、D_2 及び D_3 を各々単一の成分として含有する 3 つの画分、並びに D_3 及び D_4 の混合物の画分の計 4 つの

画分に分離した。Fluvirucins D_1、D_2 及び D_3 各成分は各々を含有する画分を更にシリカゲル並びに Sephadex LH-20 クロマトにより精製し、fluvirucins D_1、290mg、D_2、29mg 及び D_3、75mg をそれぞれ純粋な白色粉末として単離した。これらの成分は各々メタノールから結晶化し、無色針状晶として得た。fluvirucin D_4 は、D_3 及び D_4 の混合物の画分からシリカゲルクロマトにより D_3 と分離した後、Sephadex LH-20 クロマトにより精製し、D_4 の純粋な白色粉末 204mg を単離した。この白色粉末を更にメタノールから結晶化し fluvirucin D_4 の無色柱状晶を得た。

Fig. 3-4 Extraction, separation and purification of fluvirucins D_2, D_3 and D4



第4節　Fluvirucins の物理化学的性状

Fluvirucins A、B、C、D_1、D_2 及び D_3 はメタノールからの結晶化によりいずれも無色針状晶として得られた。一方 fluvirucin D_4 は、同様の結晶化によって無色柱状晶として単離された。各化合物の溶解性はその構成アミノ糖のアミノ基の置換基の有無により大きく異なり、アミノ基に置換基のない fluvirucins A、B、C、D_1 及び D_2 の溶解度は、低級アルコール、クロロホルム、DMSO、酢酸エチル、ピリジン及び酸性水のいずれに対しても極めて低く、ヘキサン並びに水に対しては実質的に不溶である。一方、アミノ基に 2-フェネチルアミンがウレイド結合した fluvirucins D_3 及び D_4 はヘキサン並びに水に対しては不溶であるが、上記の有機溶媒には良く溶解した。呈色反応において、ヨウ素、硫酸、アンスロン試験ではいずれの化合物も陽性反応を示した。一方、ニンヒドリン試験では、アミノ基に置換基のある fluvirucins D_3 及び D_4 以外の化合物はすべて陽性反応を示した。

各物質の分子式は、各々 FAB-MS 並びに元素分析の結果から Table 3-8 に示すように決定された。各化合物の UV スペクトルを測定したところ、fluvirucins D_3 並びに D_4 の場合にその構成アミノ糖の置換基であるフェニル基に基づく特徴的な吸収を示した以外は、いずれの抗生物質も末端吸収を示すのみであった。IR スペクトルでは、各化合物共に 3600 から 3000cm^{-1} の水酸基等に基づく幅広い吸収、3000 から 2800cm^{-1} のアルキルの強い吸収、1640 及び 1540cm^{-1} 付近にアミドの吸収、更に 980 から1130cm^{-1} に糖由来の吸収を示した。各抗生物質を代表して Fig. 3-5 に fluvirucin D_3 の UV スペクトルを、また Fig. 3-6 及び Fig. 3-7 に fluvirucins A 並びに D_3 の IR スペクトルを掲げる。

重クロロホルム－重メタノールの混合溶媒中で測定した fluvirucins の ^{1}H-NMR スペクトルを Fig. 3-8～3-14 に示す。各化合物共、0.8 から 1.3ppm に 4 個のメチル基のシグナル、1 から 2ppm にはメチレン由来の重なり合ったシグナルを示し、更に 5ppm 前後に糖のアノメリックプロトン、2 から 4ppm には糖のオキシメチンと考えられるプロトンのシグナルを示した。Fluvirucins D_3 及び D_4 の ^{1}H-NMR スペクトルでは、これらのシグナルに加え 7ppm 付近に 5

プロトン分、並びに 2.8 と 3.4ppm 付近に各々 2 プロトン分の、フェネチル基に基づく吸収が認められた (Table 3-13)。

以上の物理化学的性状から fluvirucin A を始めとするこれら 7 種類の抗ウイルス抗生物質は、いずれも類似の構造を有することが想定された。

Fig. 3-5 UV spectrum of fluvirucin D_3 (in MeOH)

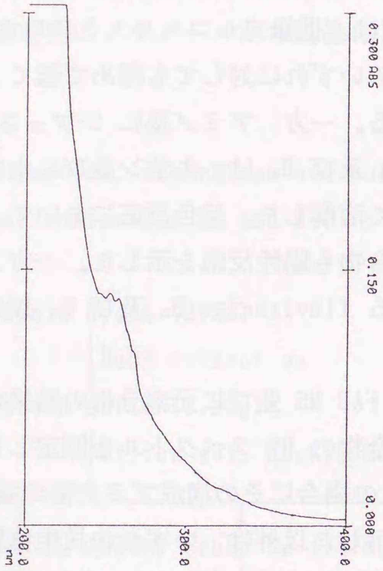


Fig. 3-6 IR spectrum of fluvirucin A (in KBr)

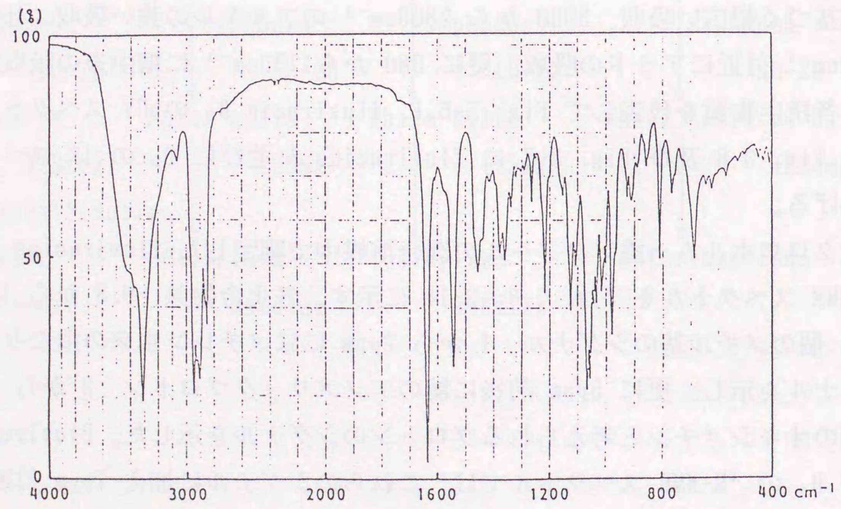


Fig. 3-7 IR spectrum of fluvirucin D_3 (in KBr)

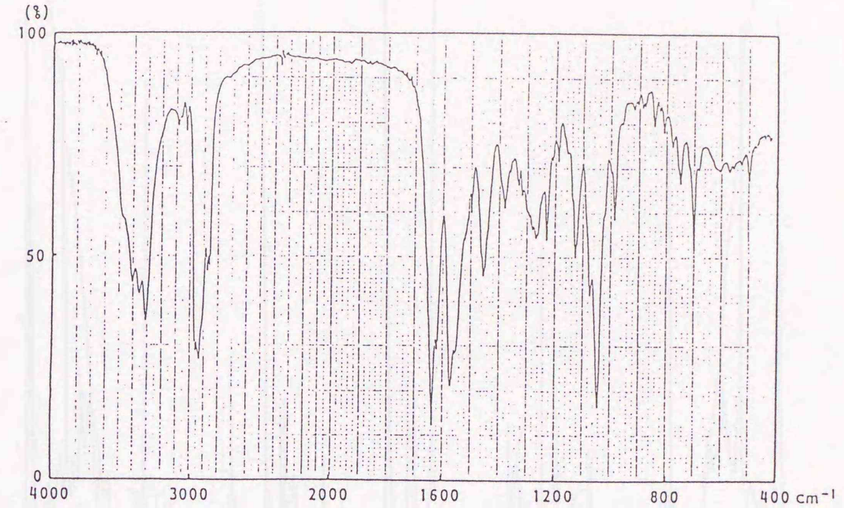


Fig. 3-8 ^{1}H-NMR spectrum of fluvirucin A (in $CDCl_3$-CD_3OD)

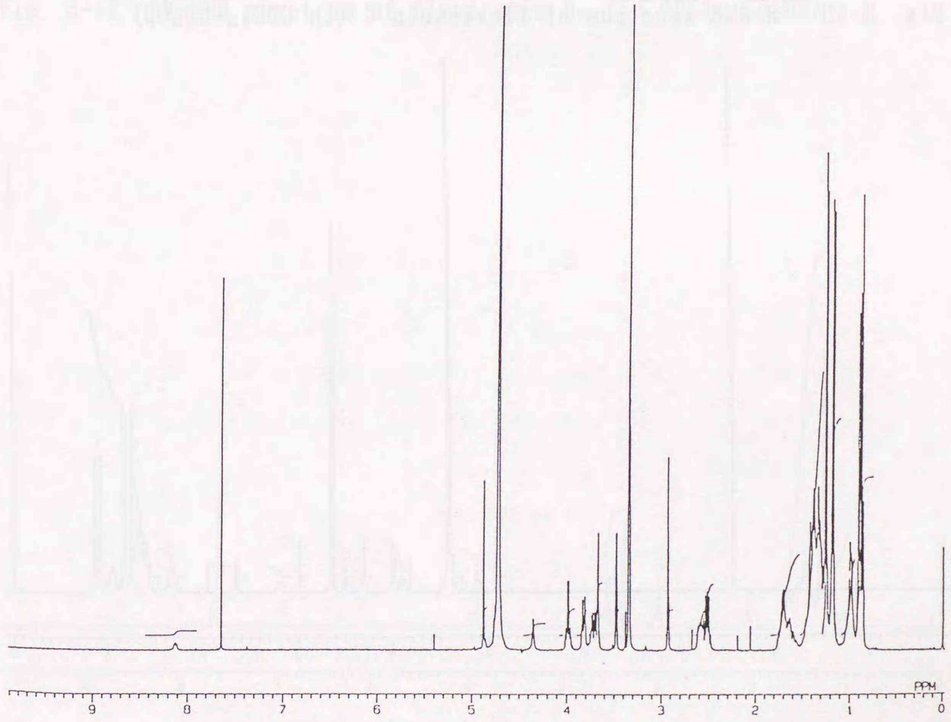


Fig. 3-9 ^{1}H-NMR spectrum of fluvirucin B (in $CDCl_3$-CD_3OD)

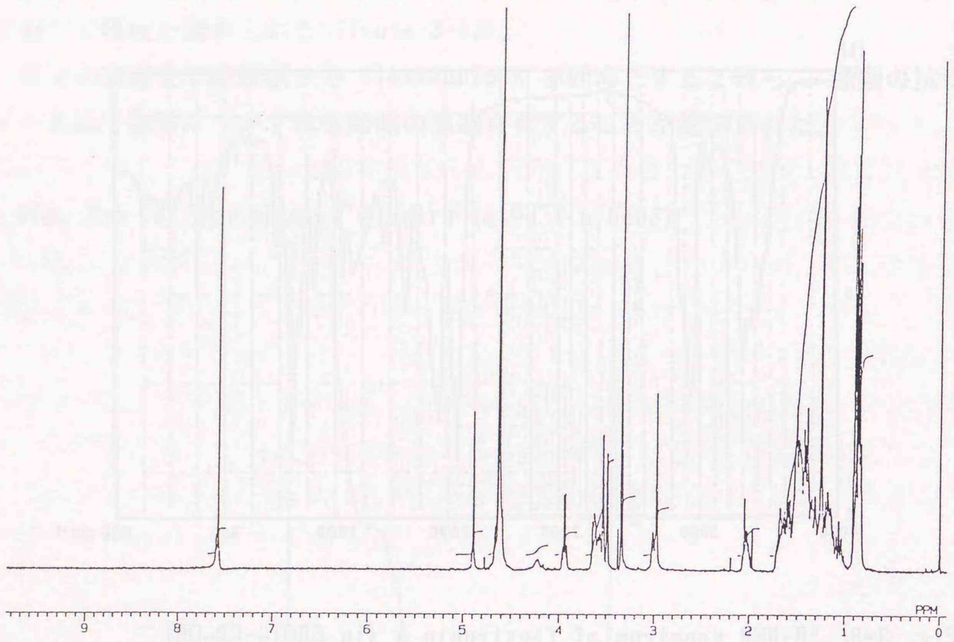


Fig. 3-10 ^{1}H-NMR spectrum of fluvirucin C (in $CDCl_3$-CD_3OD)

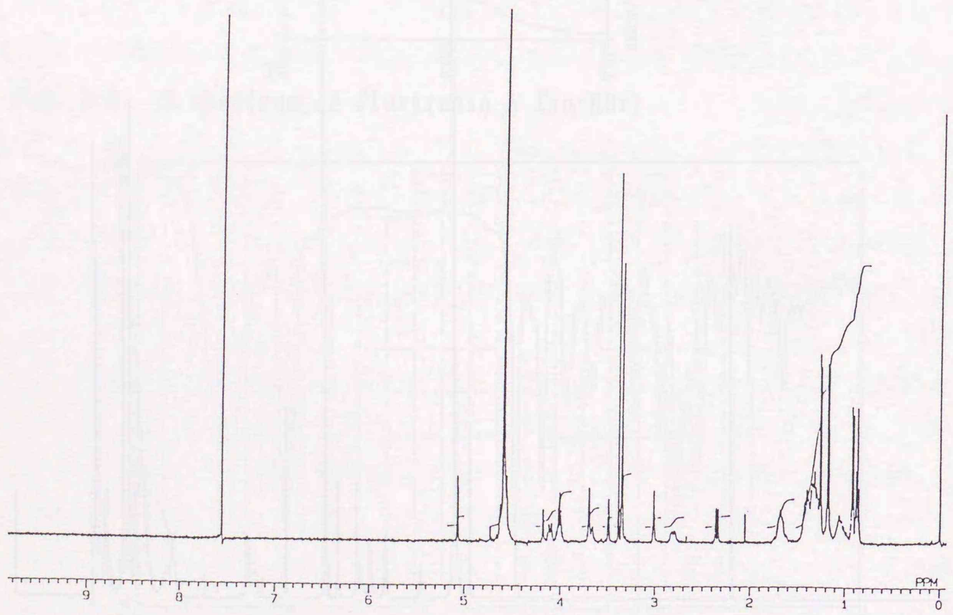


Fig. 3-11 ^{1}H-NMR spectrum of fluvirucin D_1 (in $CDCl_3$-CD_3OD)

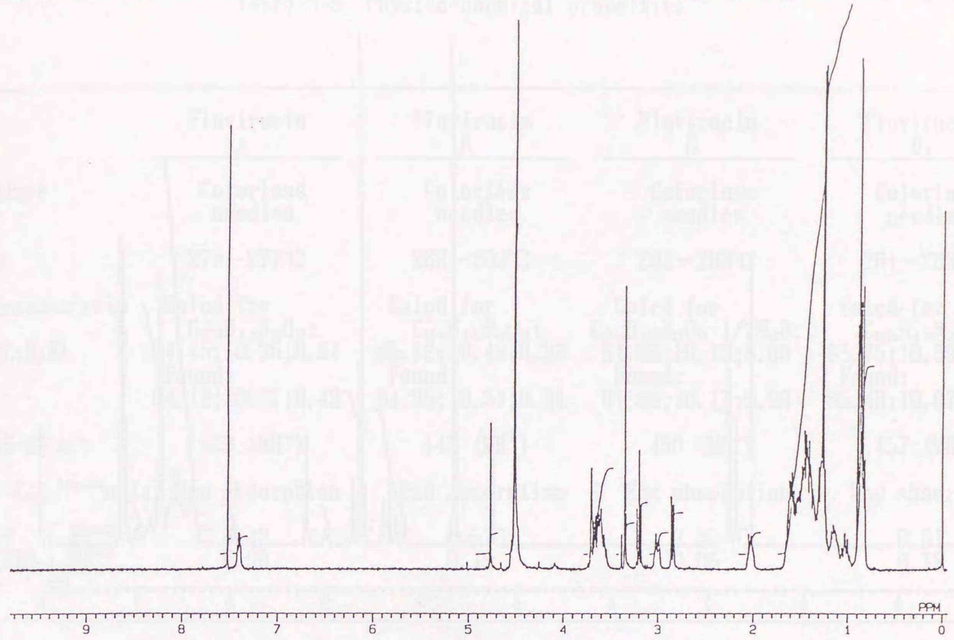


Fig. 3-12 ^{1}H-NMR spectrum of fluvirucin D_2 (in $CDCl_3$-CD_3OD)

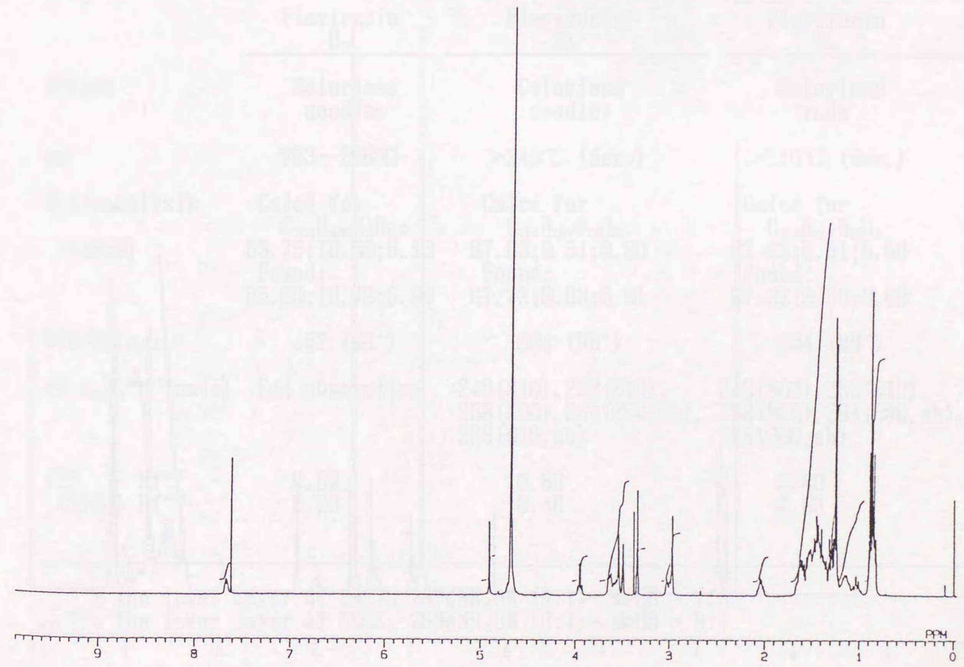


Fig. 3-13 ^{1}H-NMR spectrum of fluvirucin D_3 (in $CDCl_3$-CD_3OD)

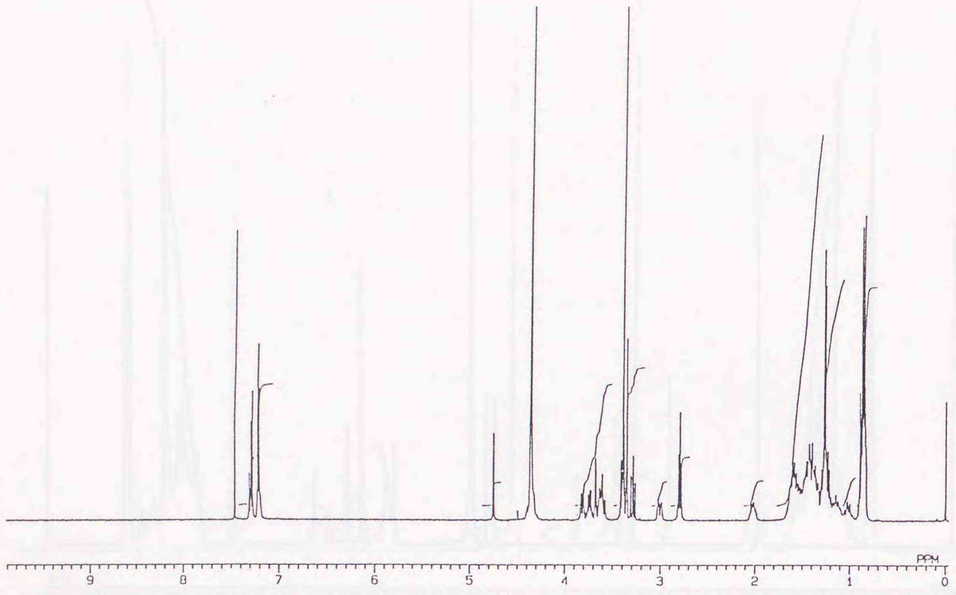


Fig. 3-14 ^{1}H-NMR spectrum of fluvirucin D_4 (in $CDCl_3$-CD_3OD)

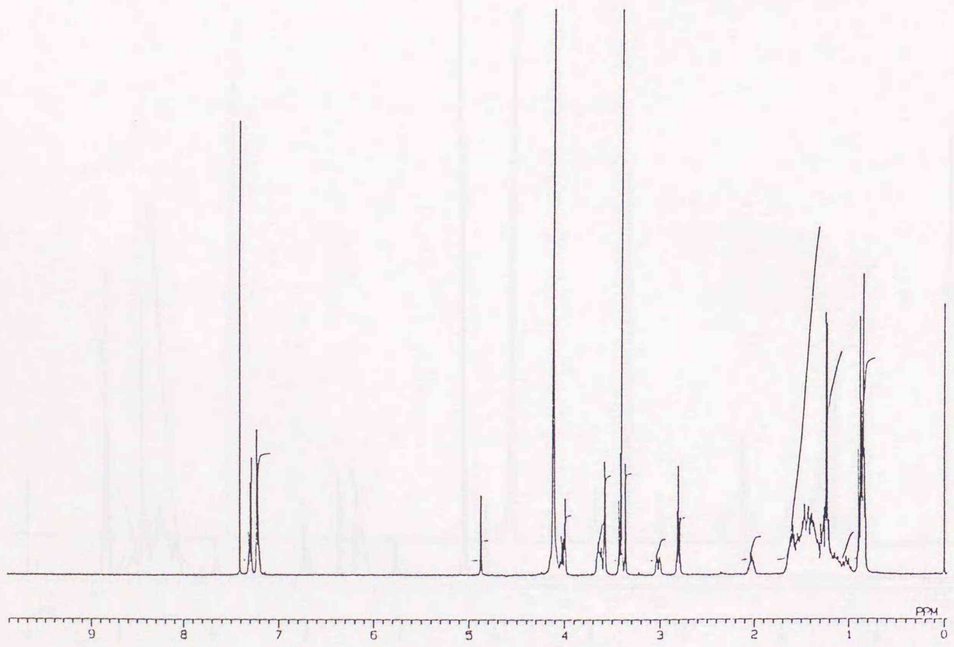


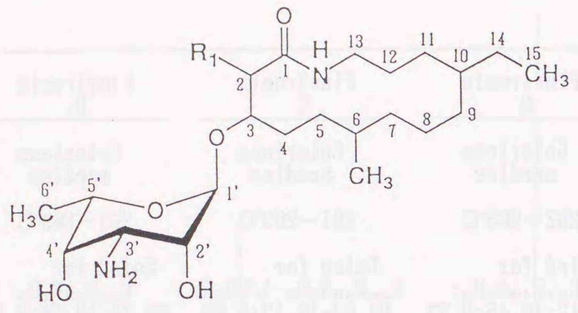
Table 3-8 Physico-chemical properties

	Fluvirucin A	Fluvirucin B	Fluvirucin C	Fluvirucin D_1
Nature	Colorless needles	Colorless needles	Colorless needles	Colorless needles
mp	275－277°C	262－263°C	261－263°C	261－263°C
Microanalysis (C;H;N)	Calcd for $C_{23}H_{44}N_2O_5$: 64.45;10.35;6.54 Found: 64.12;10.37;6.42	Calcd for $C_{24}H_{46}N_2O_5$: 65.12;10.48;6.33 Found: 64.95;10.51;6.54	Calcd for $C_{24}H_{46}N_2O_6 \cdot 1/2H_2O$: 61.60;10.13;5.99 Found: 61.80;10.11;5.93	Calcd for $C_{25}H_{48}N_2O_5$ 65.75;10.59;6.13 Found: 65.49;10.67;6.01
FAB-MS m/z	429 (MH^+)	443 (MH^+)	459 (MH^+)	457 (MH^+)
UV λ_{max}^{MeOH}nm(ε)	End absorption	End absorption	End absorption	End absorption
TLC Rf*1	0.42	0.57	0.30	0.51
(SiO_2) Rf*2	0.08	0.19	0.05	0.12

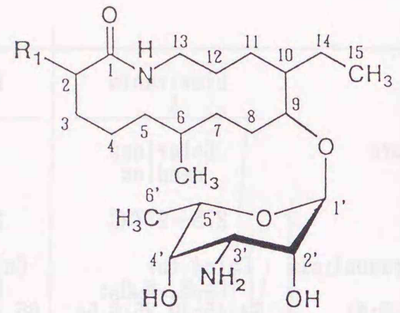
	Fluvirucin D_2	Fluvirucin D_3	Fluvirucin D_4
Nature	Colorless needles	Colorless needles	Colorless rods
mp	263－266°C	>245°C (dec.)	>210°C (dec.)
Microanalysis (C;H;N)	Calcd for $C_{25}H_{48}N_2O_5$: 65.75;10.59;6.13 Found: 65.60;10.72;5.99	Calcd for $C_{34}H_{57}N_3O_6$: 67.63;9.51;6.96 Found: 67.72;9.63;6.91	Calcd for $C_{34}H_{57}N_3O_6$: 67.63;9.51;6.96 Found: 67.33;9.56;6.68
FAB-MS m/z	457 (MH^+)	604 (MH^+)	604 (MH^+)
UV λ_{max}^{MeOH}nm(ε)	End absorption	246(810), 252(810), 258(800), 264(680, sh), 268(610, sh)	246(800), 252(810), 258(800), 264(680, sh), 268(600, sh)
TLC Rf*1	0.59	0.80	0.80
(SiO_2) Rf*2	0.20	0.46	0.53

*1: The lower layer of $CHCl_3$-28%NH_4OH (9:1)- MeOH = 7:3.
*2: The lower layer of $CHCl_3$-28%NH_4OH (9:1)- MeOH = 9:1.

Table 3-13 ^{1}H-NMR data for fluvirucin antibiotics



Fluvirucin A, C

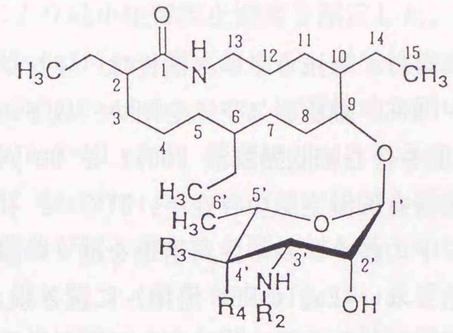


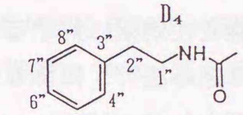
Fluvirucin B

Proton	Fluvirucin A R_1=CH_3	B R_1=CH_2CH_3	C R_1=CH(OH)CH_3
2-R_1	1.18*1 d*2 J=6.8*3	0.88 t J=7.3	1.19 d J=6.4
			4.00 dq J=2.8, 6.4
6-CH_3	0.89 d J=7.3	0.90 d J=7.3	0.92 d J=6.8
15-H_3	0.87 t J=7.5	0.84 t J=7.3	0.87 t J=7.3
2-H	2.52 dq J=10.3, 6.8	2.03 m	2.35 dd J=10.1, 2.8
3- or 9-H*4	3.82 br.dt J=10.3, 3	3.63 m	4.15 m
13-H_2	2.58 m	3.10 m	2.81 m
	3.72 m	3.58 m	3.66 m
1'-H	4.87 d J=1.3	4.89 br.s	5.08 br.s
2'-H	3.67 ddd J=3.0, 1.3, 1.2	3.54 m	3.70 m
3'-H	2.93 t J=3.0	2.98 t J=2.8	3.01 t J=3.0
4'-H	3.48 br.dd J=3, 1.2	3.49 m	3.49 m
5'-H	3.99 q J=6.8	3.95 q J=6.4	4.02 q J=6.4
6'-H_3	1.25 d J=6.8	1.25 d J=6.4	1.27 d J=6.4

*1 Chemical shifts in ppm relative to TMS as internal reference (0.00ppm) in $CDCl_3$-CD_3OD (1:1, v/v).
*2 Multiplicity.
*3 J in Hz.
*4 Fluvirucins A and C (3-H), B (9-H).

Table 3-13 ^{1}H-NMR data for fluvirucin antibiotics (continued)





Proton	Fluvirucin D_1 R_2=H R_3=OH R_4=H	D_2 R_2=H R_3=H R_4=OH	D_3 R_2= R_3=OH R_4=H	D_4 R_3=H R_4=OH
2-$CH_2\underline{CH_3}$	0.88 t J=7.3	0.881 t J=7.3	0.88 t J=7.3	0.88 t J=7.3
6-$CH_2\underline{CH_3}$	0.87 t J=7.3	0.878 t J=7.3	0.86 t J=7.3	0.85 t J=7.3
15-H_3	0.84 t J=7.3	0.84 t J=7.3	0.85 t J=7.3	0.84 t J=7.3
2-H	2.03 m	2.04 m	2.02 m	2.03 m
9-H	3.61 m	3.64 br.dd J=8, 3	3.62 m	3.65 m
13-H_2	3.01 m	3.01 m	3.01 ddd	3.02 ddd
	3.58 m	3.58 ddd J=11.1, 4.4, 2.6	J=13.7, 3.9, 2.6 3.61 m	J=13.7, 4.2, 3.0 3.62 m
1'-H	4.77 d J=0.9	4.91 d J=1.3	4.75 d J=1.7	4.87 br.s
2'-H	3.71 br.dd J=3, 0.9	3.55 br.ddd J=3, 1.3, 1	3.62 dd J=3.0, 1.7	3.57 m
3'-H	2.85 dd J=9.6, 3.0	2.97 t J=3.0	3.82 dd J=9.8, 3.0	3.99 t J=2.8
4'-H	3.20 t J=9.6	3.50 br.dd J=3, 1	3.29 t J=9.8	3.57 m
5'-H	3.67 dq J=9.6, 6.4	3.95 q J=6.4	3.74 dq J=9.8, 6.0	4.02 q J=6.4
6'-H_3	1.26 d J=6.4	1.25 d J=6.4	1.27 d J=6.0	1.24 d J=6.4
1"-H_2			3.40 t J=7.3	3.42 t J=7.1
2"-H_2			2.80 t J=7.3	2.80 t J=7.1
4",8"-H_2			7.22 br.d J=7.3	7.22 br.d J=7.3
5",7"-H_2			7.30 t J=7.3	7.30 t J=7.3
6"-H			7.22 br.d J=7.3	7.22 br.d J=7.3

第５節　Fluvirucins の生物学的性状

Fluvirucins の *in vitro* の抗ウイルス活性は、インフルエンザＡ型ウイルス (Victoria strain) － MDCK 細胞システムを用い、以下の方法によって検定した。2×10^4 個の MDCK 細胞を含む細胞懸濁液 200μℓ を 96 穴のミクロプレートに分注し、5% 二酸化炭素含有加湿空気の存在下、37℃ で 48 時間から 72 時間培養した。ミクロプレートの各ウエルの生育培地を種々の濃度の被験化合物を含む新たな培地（血清を含まない Eagle MEM 培地）に置き換えた後、$10\times TCID_{50}$ のウイルスを含む培地 50μℓ を加えた。更に 72 時間の培養の後、ウイルスが誘導した細胞変性効果に対する各薬剤の阻止活性、並びに薬剤自身による細胞毒性を色素取り込み法[62] により求め、それぞれ ID_{50} 及び TD_{50} 値で表示した。また標準薬剤として ribavirin を対照とした。Table 3-9 に示すように fluvirucins A、B、C、D_1 並びに D_2 は Flu-A に対して、ID_{50} 値 2～10μg/mℓ で抗ウイルス活性を示した。一方 fluvirucins D_3 及び D_4 の抗ウイルス活性は非常に弱く、Flu-A に対する抗ウイルス活性の発現には、構成アミノ糖の遊離のアミノ基が重要であると結論付けられた。

Table 3-9　Anti-influenza A virus activity

	Influenza virus - MDCK cells	
	ID_{50} (μg/mℓ)	TD_{50} (μg/mℓ)
Fluvirucin A	9.9	31.5
B	2.3	17.9
C	4.3	31.6
D_1	4.6	33.1
D_2	4.6	38.6
D_3	19.8	36.4
D_4	>50	>50
Ribavirin	10	>100

Fluvirucins の細菌類に対する抗菌活性を調べるために、多重接種装置を使用し、系列 2 倍希釈法により最小生育阻止濃度を測定した。グラム陽性細菌並びにグラム陰性細菌類には Nutrient 寒天培地を、嫌気性細菌類には GAM 寒天培地を、更にカビ類には Sabouraud dextrose 寒天培地を用い、37℃ で一晩培養後活性を判定した。Table 3-10、3-11 並びに 3-12 に示すように fluvirucins A、B、C、D_1 及び D_2 は *Bacteroides fragilis* に対し顕著な生育阻止活性を示した他、グラム陽性細菌並びに一部のカビ類に対し若干の生育阻止活性を示した。一方、アグリコンの 9 位にアミノ糖を有する B、D_1 及び D_2 の方が、3 位に置換した A 及び C より活性は高い。また糖のアミノ基に置換基を有する D_3 及び D_4 については、いずれの細菌に対しても生育阻止活性が認められず、細菌類に対する生育阻止活性の発現にも抗ウイルス活性同様、遊離のアミノ基が重要であることが判明した。

Table 3-10　Antibacterial activity

	MIC (μg/mℓ)						
	Fluvirucin						
Test organism	A	B	C	D_1	D_2	D_3	D_4
Staphylococcus aureus FDA209P	50	3.1	50	3.1	3.1	>100	>100
S. aureus Smith	100	3.1	100	3.1	3.1	>100	>100
S. aureus D136	100	3.1	100	6.3	3.1	>100	>100
S. aureus No.52-34	100	3.1	100	6.3	6.3	>100	>100
S. aureus A20239	100	3.1	>100	6.3	6.3	>100	>100
S. aureus BX1633-2 A9606	100	3.1	100	6.3	6.3	>100	>100
S. aureus A15097	50	3.1	>100	6.3	6.3	>100	>100
S. epidermidis D153	12.5	0.8	3.1	1.6	0.8	>100	>100
S. epidermidis A22152	6.3	0.8	3.1	1.6	0.8	>100	>100
Streptococcus faecalis A9612	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Micrococcus luteus No.1001	6.3	0.8	3.1	3.1	1.6	>100	>100
Bacillus subtilis PCI219	6.3	0.8	12.5	3.1	3.1	>100	>100
Escherichia coli NIHJ	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
E. coli Juhl A15119	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
E. coli JR/C600 A20665	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
E. coli A9624	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
E. coli TEM A20341-1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Enterobacter croacae A9659	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Klebsiella pneumoniae D11	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
K. pneumoniae No.22-3038 A20680	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Pseudomonas aeruginosa A9930	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
P. aeruginosa A9843A	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Proteus vulgaris A9436	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
P. mirabilis A9554	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Morganella morganii A9553	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Serratia marcescens A20222	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Table 3-11 Anti-anaerobic bacterial activity

Test organism	MIC (μg/mℓ) Fluvirucin A	B	C	D_1	D_2	D_3	D_4
Clostridium difficile A21675	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
C. perfringens A9635	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Propionibacterium acnes A21933	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Peptostreptococcus anaerobius A21905	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100
Bacteroides fragilis A22693	6.3	3.1	6.3	1.6	0.8	>100	>100
B. fragilis A22035	100	0.8	6.3	1.6	0.8	>100	>100
B. fragilis A22021	3.1	0.8	3.1	0.8	0.4	>100	>100
B. fragilis A21916	3.1	0.8	1.6	0.8	0.4	>100	>100
B. fragilis A22534	100	0.8	6.3	0.8	0.8	>100	>100
B. fragilis A22695	25	0.8	12.5	1.6	0.8	>100	>100
B. fragilis A22533	0.8	0.8	1.6	0.8	0.4	>100	>100
B. fragilis CUH-67	3.1	0.8	3.1	0.8	0.4	>100	>100

Table 3-12 Antifungal activity

Test organism	MIC (μg/mℓ) Fluvirucin A	B	C	D_1	D_2	D_3	D_4
Candida albicans IAM4888	>100	1.6	1.6	12.5	>100	>100	>100
C. albicans A9540	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100
C. tropicalis IFO10241	6.3	0.8	1.6	12.5	100	>100	>100
Cryptococcus neoformans D49	25	1.6	1.6	50	100	>100	>100
C. neoformans IAM4519	12.5	1.6	1.6	50	100	>100	>100
Aspergillus fumigatus IAM2530	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
A. fumigatus IAM2034	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
A. flavus FA21436 NRRL484	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Fusarium moniliforme A2284	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Trichophyton mentagrophytes D155	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
T. mentagrophytes No.4329	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Sporothrix schenckii IFO8158	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Petriellidium boydii IFO8078	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

第６節　Fluvirucins の構造研究

(1) Fluvirucin A アグリコン (fluvirucinine A) の構造

Fluvirucin A (**34**) は、分子式 $C_{23}H_{44}N_2O_5$ であり、その物理化学的性状から分子内に糖を有する配糖体抗生物質であると推定された (Table 3-8)。

34 は常法によるアセチル化によりアセテート (**35**) を与えた。**35** の ^{1}H-NMR スペクトルでは 2.16 及び 2.18ppm に 2 個の O-アセチル基、4.81 及び 5.10ppm にそれぞれ低磁場シフトしたオキシメチンプロトン、1.97ppm に N-アセチル基、更に 5.73ppm に新たに生じたアセチルアミノプロトンのシグナルが観測され、**35** は N,O,O-トリアセチル体と判明した (Table 3-14)。**35** の ^{13}C-NMR スペクトルでは DEPT 法による解析も含め、メチル 7、メチレン 9、メチン 9 並びにカルボニル 4 の合わせて 29 個の炭素の存在を示した (Table 3-15)。また **35** の ^{1}H シフト相関二次元 NMR スペクトル (^{1}H-^{1}H COSY)[93,94] の解析の結果、アグリコン部分のアミド結合周辺の部分構造と、3-アミノ-3,6-ジデオキシヒラノースの存在が明らかになった (Fig. 3-15)。一方 **35** の MS では m/z 554 に分子イオンピークを、更に m/z 272 にグリコシド結合の開裂による基準ピークを示した。

Fig. 3-15 ^{1}H-^{1}H COSY spectral data for fluvirucin A acetate (**35**)

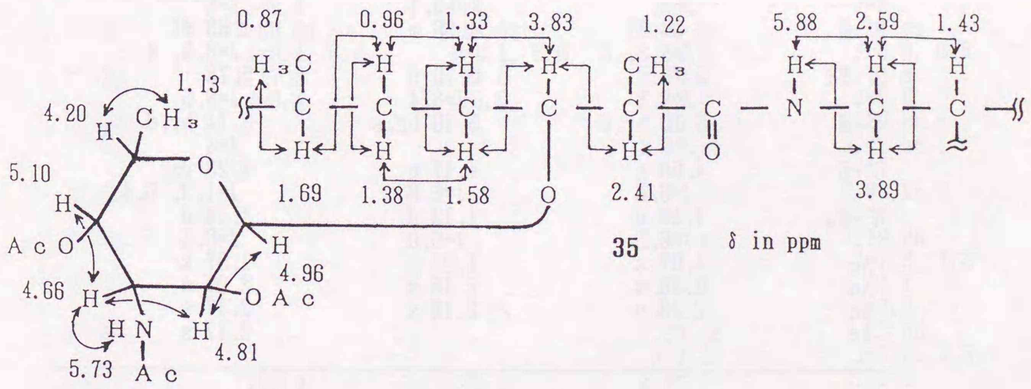
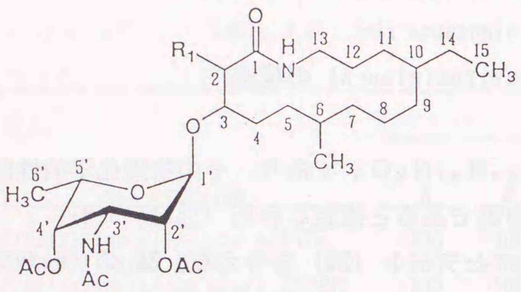
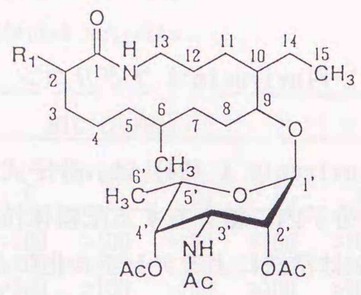


Table 3-14 ^{1}H-NMR data for fluvirucin acetates



Fluvirucin A, C acetates

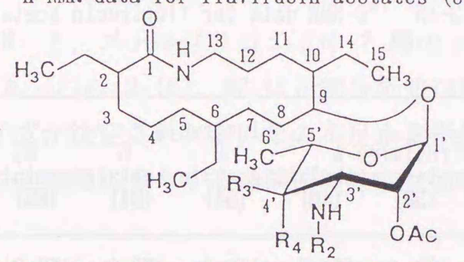


Fluvirucin B acetate

Proton	Fluvirucin A acetate (**35**) R_1=CH_3	B acetate (**54**) R_1=CH_2CH_3	C acetate (**61**) R_1=CH(OAc)CH_3
2-R_1	1.22*1 d J=7.0	0.87 t J=7.0	1.30 d J=6.4 5.18 dq J=3.6, 6.4
6-CH_3	0.87 d J=6.6	0.88 d J=7.0	0.88 d J=6.8
15-H_3	0.85 t J=7.0	0.81 t J=7.0	0.85 t J=6.8
2-H	2.42 br.dq J=9, 7	1.89 m	2.58 dd J=8.9, 3.6
3-H or 9-H*2	3.83 m	3.59 m	3.59 m
13-H_2	2.59 m	3.00 br.d J=13	2.93 ddd J=13.3, 5.9, 5.6
	3.89 m	3.73 br.dd J=13, 9.5	4.01 m
13-NH	5.88 br.dd J=7.3, 3.1	5.57 br.s	5.99 br.t J=6
1'-H	4.96 br.s	4.94 br.s	4.96 br.s
2'-H	4.81 br.d J=3	4.68 d J=3.1	4.74 br.d J=4
3'-H	4.66 dt J=8.8, 3	4.66 m	4.63 dt J=8.5, 4
3'-NH	5.73 d J=8.8	5.70 d J=8.4	5.78 J=8.5
4'-H	5.10 br.d J=3	5.10 br.s	5.14 br.d J=4
5'-H	4.20 q J=6.6	4.17 q J=6.6	4.23 dq J=1.3, 6.4
6'-H_3	1.13 d J=6.6	1.13 d J=6.6	1.14 d J=6.4
Ac	1.97 s	1.97 s	1.97 s
Ac	2.16 s	2.15 s	2.07 s
Ac	2.18 s	2.18 s	2.17 s
Ac			2.17 s

*1 Chemical shifts in ppm relative to $CDCl_3$ as solvent reference (7.26ppm).
*2 Fluvirucin A, C acetates (3-H), B acetate (9-H).

Table 3-14 ^{1}H-NMR data for fluvirucin acetates (continued)



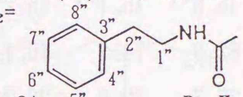
Proton	Fluvirucin D_1 acetate (**65**) R_2=Ac, R_3=OAc, R_4=H	D_2 acetate (**76**) R_2=Ac, R_3=H, R_4=OAc	D_3 acetate (**77**) R_2=  R_3=OAc, R_4=H	D_4 acetate (**78**) R_3=H, R_4=OAc
2-$CH_2\underline{CH_3}$	0.88 t J=7.3	0.88 t J=7.3	0.88 t J=7.3	0.88 t J=7.3
6-$CH_2\underline{CH_3}$	0.84 t J=7.3	0.83 t J=7.3	0.85 t J=7.0	0.84 t J=7.0
15-H_3	0.83 t J=7.3	0.83 t J=7.3	0.83 t J=7.0	0.82 t J=7.7
2-H	1.90 m	1.89 m	1.91 m	1.91 m
9-H	3.58 m	3.58 m	3.59 m	3.58 m
13-H_2	2.99 m	2.99 m	2.99 m	3.00 m
	3.75 ddt J=15.2, 2.2, 9.8	3.73 ddt J=15.8, 2.2, 9.2	3.74 m	3.72 m
13-NH	5.63 br.s	5.52 m	5.65 m	5.64 m
1'-H	4.83 br.s	4.93 br.s	4.84 br.s	4.91 br.s
2'-H	4.83 br.d J=3	4.71 br.d J=4	4.87 br.s	4.74 br.d J=3
3'-H	4.60 dt J=3.0, 9.4	4.66 dt J=8.8, 4	4.46 dt J=2.9, 9.5	4.52 m
3'-NH	5.62 d J=9.4	5.70 d J=8.8	4.41 d J=9.5	4.60 br.s
4'-H	4.79 t J=9.4	5.11 br.d J=4	4.75 t J=9.5	5.13 br.d J=2
5'-H	3.99 dq J=9.4, 6.4	4.18 dq J=1.1, 6.6	3.98 dq J=9.5, 6.2	4.17 dq J=0.9, 6.8
6'-H_3	1.17 d J=6.4	1.13 d J=6.6	1.16 d J=6.2	1.13 d J=6.8
1"-NH			4.29 br.s	4.29 br.s
1"-H_2			3.40 br.t J=7	3.42 br.t J=7
2"-H_2			2.78 br.t J=7	2.80 br.t J=7
4",8"-H_2			7.17 dd J=7.3, 1.5	7.19 dd J=7.3, 1.3
5",7"-H_2			7.30 t J=7.3	7.31 t J=7.3
6"-H			7.23 dd J=7.3, 1.5	7.23 dd J=7.3, 1.3
Ac	1.93 s	1.96 s	2.05 s	2.11 s
Ac	2.07 s	2.15 s	2.12 s	2.15 s
Ac	2.16 s	2.17 s		

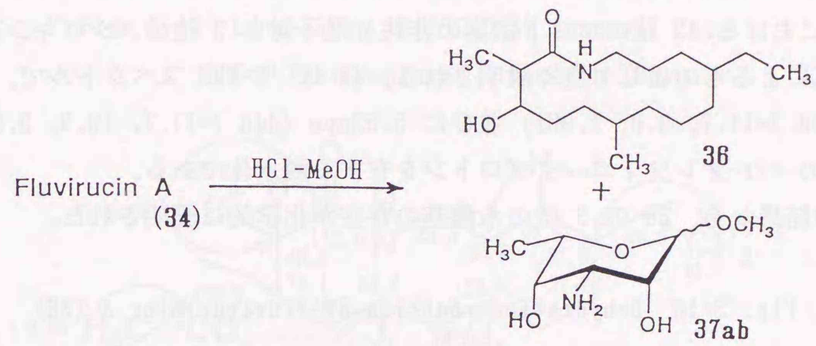
Table 3-15 ^{13}C-NMR data for fluvirucin acetates

Carbon	Fluvirucin A acetate (35)	Fluvirucinine A acetate (36)	Fluvirucinine A methylate (38)	Fluvirucin B acetate (40)	Fluvirucin C acetate (54)	Fluvirucin D_1 acetate (61)	Fluvirucin D_2 acetate (65)	Fluvirucin D_3 acetate (76)	Fluvirucin D_4 acetate (77)	(78)
1	174.1	177.1	173.4	174.5	176.0	170.8	175.9	176.0	176.0	176.1
2	45.0	49.0	46.5	40.3	50.7	54.8	50.5	50.5	50.5	50.5
	15.8*1	15.1*1	15.2*1	14.3*1	26.4*2	68.5*4	26.9*2	27.0*2	27.1*2	27.1*2
					12.2*3	17.8*5	12.1*3	12.2*3	12.2*3	12.2*3
3	82.8	74.1	76.1	83.3	33.4	79.3	31.5	31.6	31.6	31.6
				57.5*6						
4	25.7	32.6	28.2	25.7	24.5	26.4	24.8	24.87	24.7	24.7
5	26.4	31.1	29.4	27.4	34.1	26.9	33.3	33.4	33.4	33.4
6	30.9	31.8	31.0	30.5	30.9	30.9	38.3	38.4	38.5	38.6
	20.5*7	21.4*7	21.0*7	20.2*7	20.8*7	20.8*7	22.8*8	22.9*8	22.8*8	22.8*8
							12.3*9	12.3*9	12.3*9	12.4*9
7	33.9	33.0	32.9	32.5	24.9	33.6	24.8	24.91	25.1	25.1
8	22.9	19.9	20.2	20.6	21.4	21.8	22.3	22.3	23.3	23.3
9	32.0	32.3	31.7	31.7	77.9	31.7	78.4	78.3	78.4	78.6
10	37.9	37.9	37.6	37.5	40.5	37.6	40.6	40.6	41.1	41.1
11	27.01	28.0	27.5	27.1	25.2	27.4	26.3	26.4	26.5	26.5
12	23.5	26.5	25.5	23.3	28.1	23.8	28.1	28.0	28.4	28.2
13	39.2	39.4	39.3	48.0	38.6	39.6	38.5	38.6	38.6	38.7
14	26.95	27.2	26.9	26.3	21.13	27.2	21.3	21.3	21.9	21.9
15	11.8	11.5	11.5	10.9	8.6	11.8	8.6	8.7	9.1	9.1
				36.7*10						
1'	99.0				94.6	98.4	94.0	95.0	94.4	95.4
2'	69.3				70.7	69.9	72.1	70.0	72.6	70.5
3'	44.8				44.9	45.2	48.3	45.0	49.3	45.9
4'	70.1				70.2	70.0	72.9	70.2	73.6	70.9
5'	65.4				65.4	65.8	66.5	65.4	66.8	65.6
6'	16.3				16.4	16.4	17.3	16.3	17.5	16.5
1"									41.6	41.7
2"									36.3	36.2
3"									139.0	139.1
4",8"									128.7	128.9
5",7"									128.5	128.5
6"									126.4	126.3
NHCONH									156.9	156.7
CH_3CO	20.8		21.0		20.3	20.6	20.7	20.7	20.9	20.9
CH_3CO	21.1				21.09	21.1	20.9	21.1	21.0	21.1
CH_3CO	23.2				23.1	21.4	23.1	23.1		
CH_3CO						23.2				
CH_3CO	169.5		170.5		169.5	169.5	169.6	169.5	169.9	170.4
CH_3CO	170.5				170.3	169.6	169.8	170.3	171.6	170.7
CH_3CO	170.7				170.7	170.58	171.4	170.7		
CH_3CO						170.61				

Chemical shifts in ppm relative to $CDCl_3$ as solvent reference (77.00ppm).
48: TMS as internal reference (0.00ppm) in $CDCl_3$-CD_3OD (1:1).
*1 2-CH_3 *3 2-CH_2CH_3 *2 2-CH_2CH_3 *4 2-CH(OAc)CH_3 *5 2-CH(OAc)CH_3
*6 3-OCH_3 *7 6-CH_3 *8 6-CH_2CH_3 *9 6-CH_2CH_3 *10 13-NCH_3

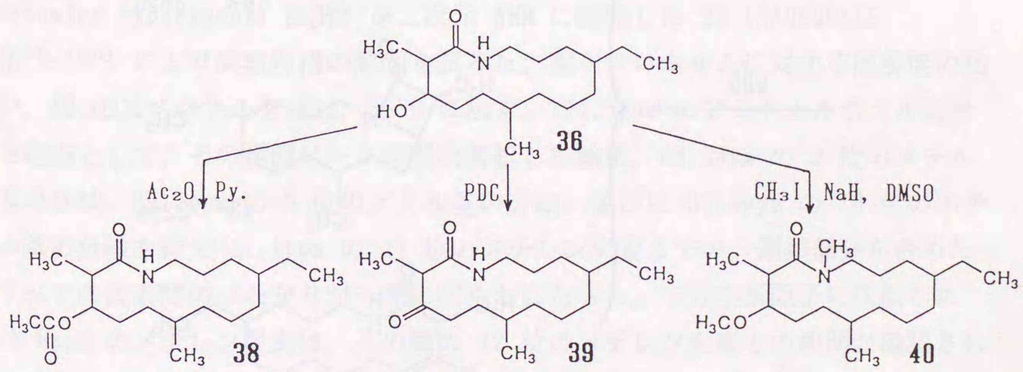
34 は無水塩酸メタノールによるメタノリシスにより、結晶性のアグリコン (fluvirucinine A、**36**) と、メチルグリコシドの 2 種のアノマー混合物 (**37a**、**37b**) を定量的に与えた (Fig. 3-16)。**36** は元素分析並びに MS より $C_{17}H_{33}NO_2$ の分子式が決定されたが、その不足水素指標は 2 であり、アミドカルボニル以外にこの指標に寄与する環構造の存在が示唆された。

Fig. 3-16 Acid methanolysis of fluvirucin A (**34**)



36 は常法によるアセチル化により O-モノアセテート (**38**) を、ジクロム酸ピリジニウム (PDC) によりケト体 (**39**) を、更に箱守法によるメチル化によりジメチル体 (**40**) を与え、水酸基の存在が確認された (Fig. 3-17)。

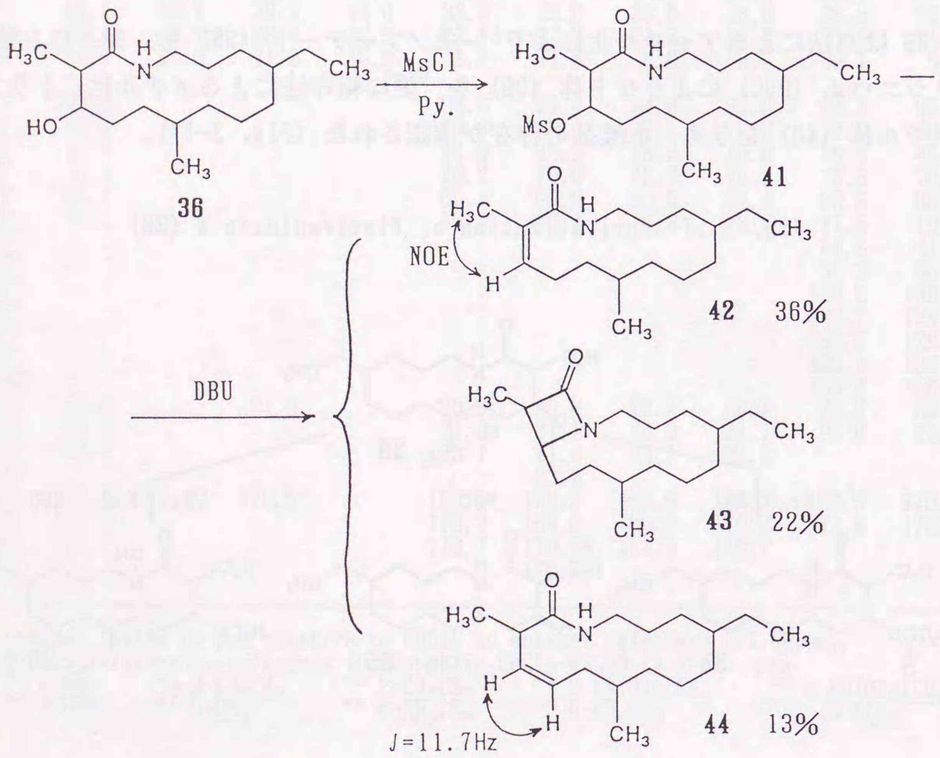
Fig. 3-17 Derivatization of fluvirucinine A (**36**)



一方、**36** の水酸基をメタンスルホニルクロリド (MsCl) によりメシル化し **41** とした後、DBU 処理することにより **42**、**43** 並びに **44** が各々 36%、22% 及び 13% の収率で得られた (Fig. 3-18)。**42** は UV スペクトルで 205nm (ε 11300) に強い吸収を示し、共役エノン構造を有するが、**42** の NOESY で 2 位のメチル基と 3 位のオレフィニックプロトンとの間に強い NOE 相関が観測され、二重結合に関する両者の配置は *cis* である。**43** は IR スペクトルで 1740cm^{-1} に強いカルボニルの吸収を示し、β-ラクタム体であることが示された。**43** の生成機構は、**41** における 13 位のアミド窒素の非共有電子対と 3 位のメシロキシ基間の S_N2 反応によるものとして良く説明される。**44** は ^{1}H-NMR スペクトルで、5.42 (ddd *J*=11.7, 9.0, 1.9Hz) 並びに 5.53ppm (ddd *J*=11.7, 10.3, 3.8Hz) に 2 個の *cis*-オレフィニックプロトンを有する脱水体である。

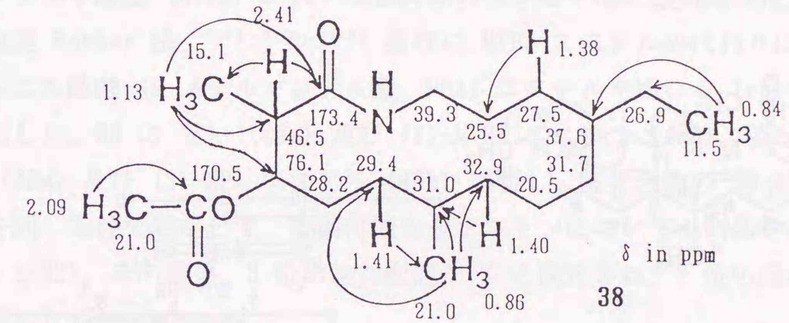
以上の結果から、**36** の 3 位の水酸基の存在が化学的に証明された。

Fig. 3-18 Dehydration reaction of fluvirucinine A (**36**)



36 の構造の残り不明部分の内、メチル 1、メチレン 5 並びにメチン 1 の帰属を目的に、**38** の ^{1}H-^{13}C シフト相関二次元 NMR スペクトル (^{1}H-^{13}C COSY) 並びに long-range ^{1}H-^{13}C COSY[95,96,97] を測定した。その結果、Fig. 3-19 に示す long-range ^{1}H-^{13}C シフト相関からエチル基の存在が示され、残るメチレン 4 個はいずれも環構造に寄与しており、**36** の 14 員環ラクタム構造が確定した。

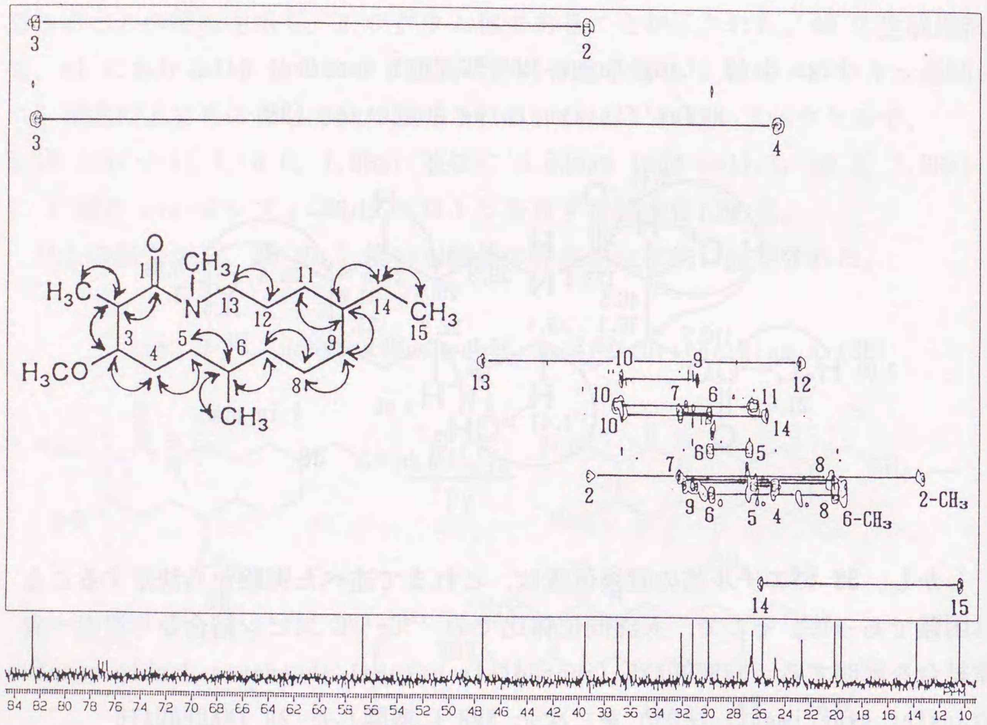
Fig. 3-19 Long-range ^{1}H-^{13}C COSY spectral data for fluvirucinine A acetate (**38**)



しかし、**38** のエチル基の置換位置は、これまで述べた実験から決定することは困難であった。そこで、天然同位体比での ^{13}C-^{13}C スピン結合から炭素－炭素結合を解明する INADEQUATE (incredible natural abundance double quantum transfer experiment) 法[98] を二次元 NMR に展開した 2D INADEQUATE 法[99,100] により炭素骨格の解明を試みた。重クロロホルムに対する溶解度の高い、**40** のスペクトルを Fig. 3-20 に示す。174.5ppm のアミドカルボニル炭素を起点として、その相関ピークを順次解析した結果、40.3ppm の 2 位のメチル基の分岐、30.5ppm の 6 位のメチル基の分岐、並びに 37.5ppm の 10 位のエチル基の分岐を経て 27.1ppm の 11 位のメチレン炭素までの、側鎖部分を含めたすべての炭素間のつながりが一挙に明らかになった。一方窒素原子に隣接した 48.0ppm のメチレン炭素は、その隣の 12 位のメチレン炭素との相関が確認された。11 位と 12 位の両メチレン炭素間の直接の相関は認められなかったものの、

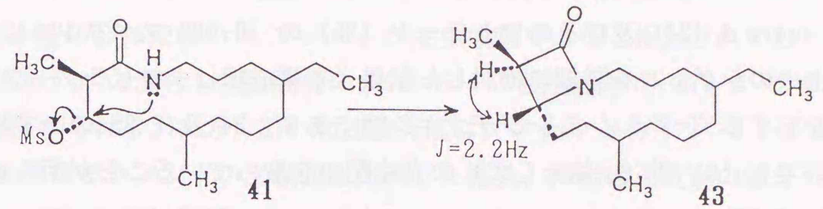
これらが隣り合っていることは明白である。以上のことから **40** のエチル基の置換位置をも含めた 14 員環ラクタム構造が確定し、**36** の平面構造が 2 位と 6 位にメチル基を、10 位にエチル基を有する 14 員環ラクタム、すなわち 2,6-ジメチル-10-エチル-3-ヒドロキシ-13-テトラデカンラクタムと決定された。

Fig. 3-20 2D INADEQUATE spectrum of fluvirucinine A dimethylate (**40**)



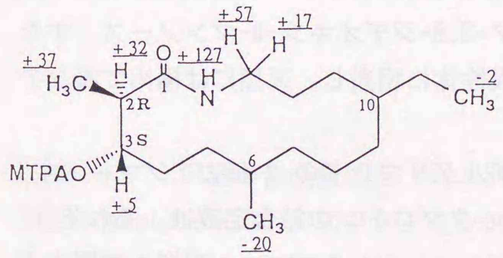
一方、**43** の ^{1}H-NMR スペクトルにおいて、2 位のプロトン (2.70ppm) と 3 位の隔環プロトン (3.10ppm) との結合定数は 2.2Hz であり、両者の配置は *trans* と判明した。前述のように **43** の生成機構は、**41** における 3 位のメシロキシ基と窒素原子の非共有電子対間の S_N2 反応によるものと考えられることから、**36** の 2 位のメチル基と 3 位の水酸基とは *trans* と結論付けられ、一方の絶対配置が決定できれば他方の絶対配置も明らかにすることができる (Fig. 3-21)。

Fig. 3-21 Plausible mechanism of β-lactam derivative (**43**) formation



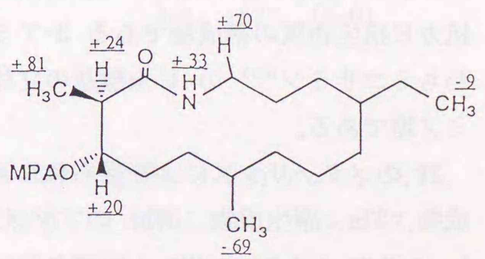
そこで **36** の 2 位の水酸基の絶対配置決定に、α-メトキシ-α-トリフルオロメチルフェニル酢酸 (MTPA) エステル誘導体のベンゼン環の磁気異方性効果を利用した改良 Mosher 法、[101,102,103] 並びに MTPA エステルの代わりに α-メトキシフェニル酢酸 (O-メチルマンデル酸、MPA) エステルを用いる Trost 法[104] を適用した。**36** の (*R*)- (**45a**) 及び (*S*)-MTPA エステル (**45b**)、並びに (*R*)- (**46a**) 及び (*S*)-MPA エステル (**46b**) 調製し、各化合物の ^{1}H-NMR スペクトルを同一条件で測定して、帰属可能な全プロトンについて Δδ 値を求めた (Fig. 3-22)。その結果、3 位の絶対配置が *S* と決定され、2 位の絶対配置が *R* と確定した。

Fig. 3-22 Application of Mosher and Trost methods to fluvirucinine A (**36**)



45a, 45b

(Δδ=$\delta_{S(45b)}-\delta_{R(45a)}$, given in Hz)



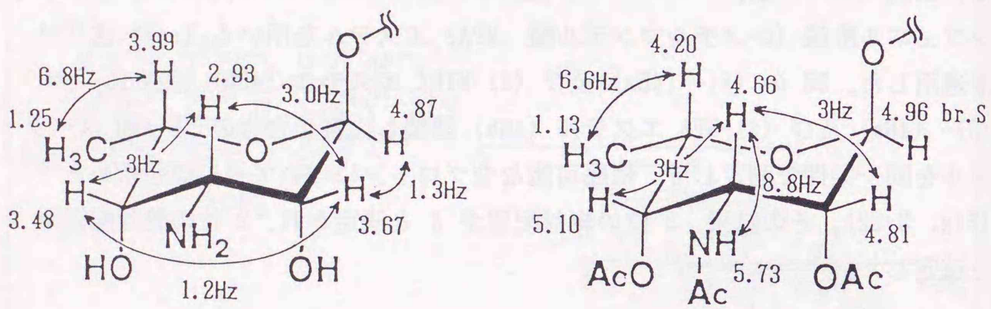
46a, 46b

(Δδ=$\delta_{R(46a)}-\delta_{S(46b)}$, given in Hz)

(2) Fluvirucin A の構成糖の構造

Fluvirucin A (**34**) 及びそのアセテート (**35**) の ^{1}H-NMR スペクトルにおける、構成糖由来のシグナルを詳細に検討した結果、本構成糖はタロピラノース型の相対配置を有する 3-アミノ-3,6-ジデオキシ糖であり、**34** 及び **35** のいずれの場合においても $^1C_4$ 型 (L 体として) の立体配座を取っていることが明らかとなった (Fig. 3-23)。

Fig. 3-23 ^{1}H-^{1}H connectivity of sugar portion of fluvirucin A (**34**) and its acetate (**35**)



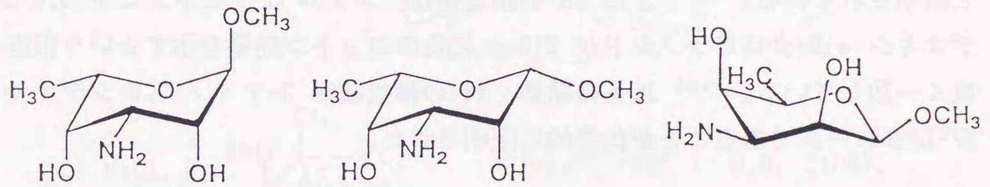
34 δ in ppm **35**

本アミノ糖は nystatin[78] あるいは amphotericin B[79] といったポリエン系抗カビ抗生物質の構成糖である 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-D-マンノース、すなわちミコサミン[80] の 4'水酸基の立体異性体に相当し、天然には極めて希なアミノ糖である。

34 のメタノリシスにより得られたメチルグリコシドの 2 種のアノマー (主生成物、**37a**、副生成物、**37b**) のアノメリックプロトンの結合定数は、それぞれ br.s 及び d $J_{1'-2'}$=1.1Hz と観測され、$^3J_{1'-H-2'-H}$ からアノマー配置を帰属することは困難であった。これは両アノマー共に安定コンホメーションとして $^1C_4$ 型 (L 体として) を取っているために、2'水酸基は *axial* 配置となり、アノメリックプロトンと 2'プロトンとの角度が共に約 60° となるからである。しかし

6-デオキシ-L-タロース、[105] 並びにその 4-アミノ体である 4-アミノ-4,6-ジデオキシ-L-タロース[106] 共に、メタノリシスにより得られるメチルグリコシドは、$^1C_4$ 型の立体配座の α-アノマーが主生成物であると報告されており、fluvirucin A の場合も主生成物の **37a** が α-、副生成物の **37b** が β-アノマーと結論付けられる。一方、**37b** の比旋光度は、メチル 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-β-D-タロピラノシドの文献値と比較した結果、両者は正負逆の値を示したことから、**37b** の絶対配置が L と確定し、fluvirucin A を構成するアミノ糖がその絶対配置をも含め 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロースと決定された (Fig. 3-24)。

Fig. 3-24 Stereochemistry of fluvirucin A methyl glycosides (**37a, 37b**)



37a

$[\alpha]_D^{27}$ -95° (*c* 1.0, H_2O).

37b

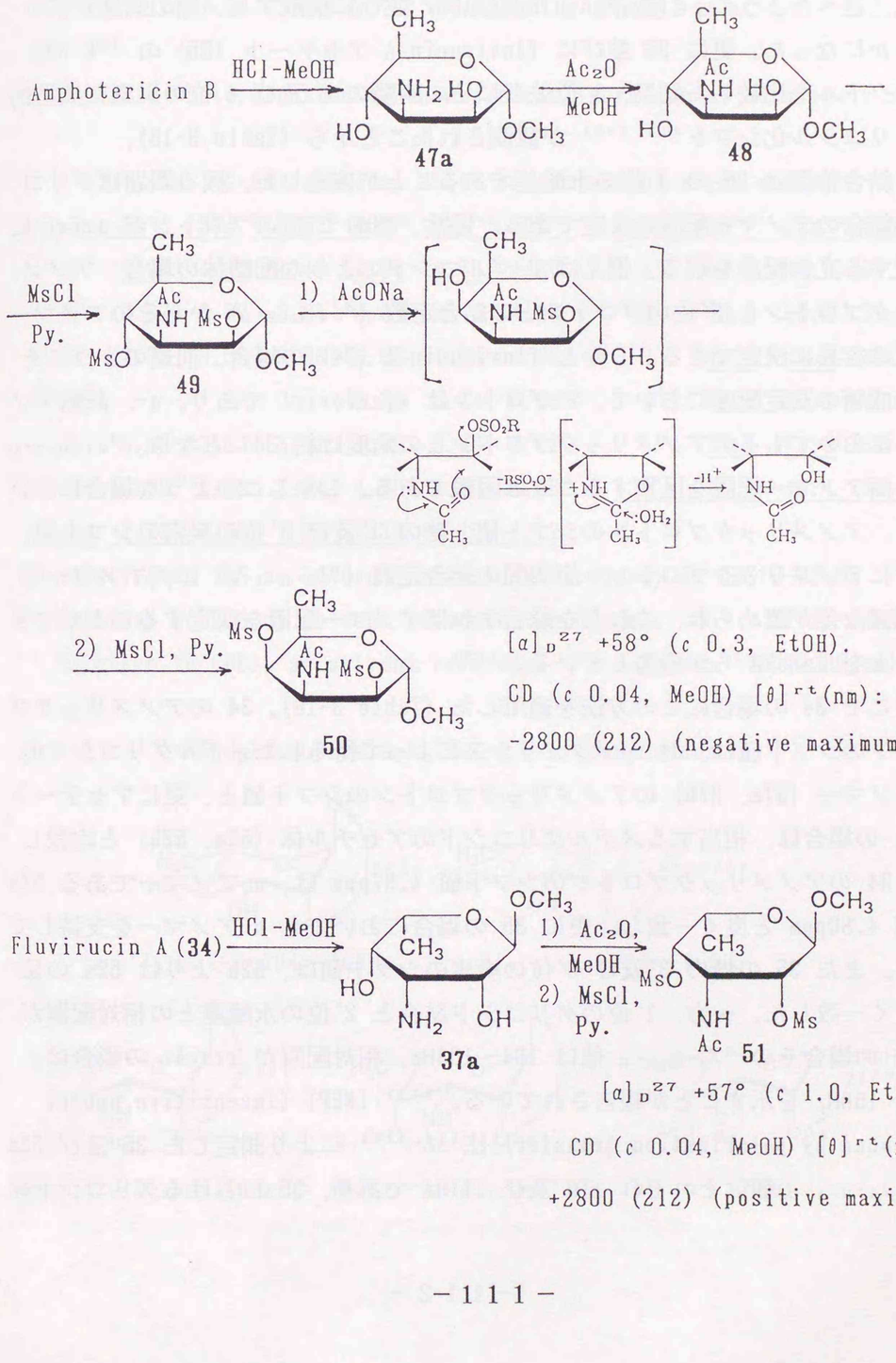
$[\alpha]_D^{25}$ +45° (*c* 0.6, H_2O).

Lit.[107] of methyl 3-amino-3,6-dideoxy-β-D-talopyranoside: $[\alpha]_D$ -52° (H_2O)

次に本アミノ糖の合成証明を Fig. 3-25 に示す経路により行なった。先ず、市販の amphotericin B のメタノリシスにより、ミコサミンのメチル α-グリコシド (**47a**) を得た。続いて **47a** の *N*-アセチル化による *N*-アセテート (**48**) を経て、メシル化により 3-アセトアミド-2,4-ジ-*O*-メシル体 (**49**) とした。更に **49** をメチルセロソルブ中、酢酸ナトリウムと加熱還流することにより、その 4'位の配置が反転したアルコール体に導いた。[108,109] 本反応の機構は、アセト

アミド基と *trans* の配置にあるメシロキシ基の脱離に伴い、中間体としてオキサゾロニウムイオンを経て、*cis*-アセトアミドアルコールが生成すると説明されている (Fig. 3-25)。[109] 本化合物は精製することなくメシル化を行ない、メチル 3-アセトアミド-3,6-ジデオキシ-2,4-ジ-O-メシル-α-D-タロピラノシド (**50**) を **49** からの収率 31% で得た。**50** の相対配置は **34** のメタノリシスによる主生成物 **37a** と同一である。そこで **37a** を 3-アセトアミド-2,4-ジ-O-メシル体 (**51**) とし、両化合物の直接の比較を行なった。その結果、両者の ^{1}H-NMR スペクトル並びに IR スペクトルは完全に一致したが、比旋光度は正負反対の値を示した。更に両化合物の CD スペクトルを測定したところ、**34** より得られた **51** は 212nm に正のコットン効果を示したのに対し、ミコサミン由来の **50** は同一波長に負のコットン効果を示し、**50** と **51** とは互いにエナンチオマーであることが確認された。一方、これらの誘導体の楕円率の絶対値が小さいのは、3'アセトキシ基に対し両隣のメシロキシ基がいずれも同一方向に存在するためであると説明されている。[110] また **50** の測定値は、メチル 3-アセトアミド-3,6-ジデオキシ-α-D-タロピラノシドが 215nm に負のコットン効果を示すという報告と良く一致している。[110] 以上の結果、**34** の構成糖が 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロースであることが化学的に証明された。

Fig. 3-25 Derivatization of mycosamine and fluvirucin A sugar



[α]$_D^{27}$ +58° (*c* 0.3, EtOH).

CD (*c* 0.04, MeOH) [θ]^{rt}(nm):

-2800 (212) (negative maximum).

[α]$_D^{27}$ +57° (*c* 1.0, EtOH).

CD (*c* 0.04, MeOH) [θ]^{rt}(nm):

+2800 (212) (positive maximum).

(3) Fluvirucin A の構造

以上述べたように、fluvirucinine A (**36**) 並びに構成アミノ糖の構造が各々明らかになった。更に **36** 並びに fluvirucin A アセテート (**35**) の ^{13}C-NMR スペクトルを比較した結果、3 位並びにその両隣の 2 及び 4 位の炭素に典型的なグリコシル化シフト[111,112] が観測されたことから (Table 3-15)、糖の結合位置は **36** の 3 位の水酸基であることが確定した。残る問題はグリコシド結合のアノマー配置の決定である。通常、糖の 2'位のプロトンが *axial* に配置する立体配座を取る、例えば D-グルコシドのような配糖体の場合、アノメリックプロトンと 2'位のプロトンとの結合定数 ($^3J_{1'\text{-H-2'-H}}$) からそのアノマー配置は容易に決定できる。しかし fluvirucin A (**34**) の場合、前述のようにその構成糖の安定配座において、2'プロトンは *equatorial* であり、α-、β-両アノマーにおいてもそのアノメリックプロトンとの角度は約 60° となり、$^3J_{1'\text{-H-2'-H}}$ から両アノマー配置を区別することは困難である。しかしこのような場合においても、アノメリックプロトンのシフト値、糖の 3'及び 5'位の炭素のシフト値、並びにアノメリックプロトンー炭素間の結合定数 ($^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$) に両アノマー間で明確な差が認められ、これらを総合すればアノマー配置を決定することができることを Tanaka らが報告している。[113]

そこで **34** の場合にこの方法を適用した (Table 3-16)。**34** のアノメリックプロトンのシフト値は、**34** のメタノリシスによって得られたメチルグリコシドの両アノマー (**37a**、**37b**) のアノメリックプロトンのシフト値と、更にアセテート (**35**) の場合は、相当するメチルグリコシドのアセチル体 (**52a**、**52b**) と比較した。**34** のアノメリックプロトンのシフト値 4.87ppm は、α-アノマーである **37a** の値 4.80ppm と良く一致し、更に **35** の場合においても α-アノマーを支持している。また **35** の糖の 3'及び 5'位の炭素のシフト値は、**52b** よりは **52a** の値に良く一致した。一方、1'位のグリコシド結合と 2'位の水酸基との相対配置が *anti* の場合その $^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$ 値は 164～168Hz、相対配置が *gauche* の場合は 152～158Hz を示すことが報告されている。[113] INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) 法[114,115] により測定した **35** 及び **52a** の $^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$ 値はそれぞれ 170 及び 171Hz であり、**35** におけるグリコシド結合と 2'位の水酸基との相対配置は *anti* の関係、すなわち α-アノマーを良く支持している。

以上のことから **34** におけるアノマー配置が α と決定された。

Table 3-16 Determination of anomeric configuration of fluvirucin A

^{1}H- and ^{13}C-NMR chemical shift comparison of sugar moiety

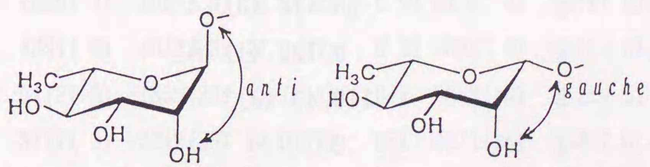
Proton	**34**[*1]	**37a**[*2]	**37b**[*2]	**35**[*3]	**52a**[*3]	**52b**[*3]	Carbon	**35**[*3]	**52a**[*3]	**52b**[*3]
1'-H	4.87	4.80	4.49	4.96	4.73	4.65	1'	99.0	98.2	101.2
2'-H	3.67	3.72	3.81	4.81	4.78	4.93	2'	69.3	69.2	68.7
3'-H	2.93	3.09	2.98	4.66	4.66	4.39	3'	44.8	44.9	46.0
3'-NH				5.73	5.74	6.09	4'	70.1	70.2	72.1
4'-H	3.48	3.63	3.42	5.10	5.09	5.22	5'	65.4	64.8	64.5
5'-H	3.99	4.02	3.74	4.20	4.09	4.06	6'	15.3	16.4	16.4
6'-H_3	1.25	1.26	1.29	1.13	1.15	1.12				

*1 Relative to TMS as internal reference (0.00ppm) in $CDCl_3$-CD_3OD (1:1, v/v).

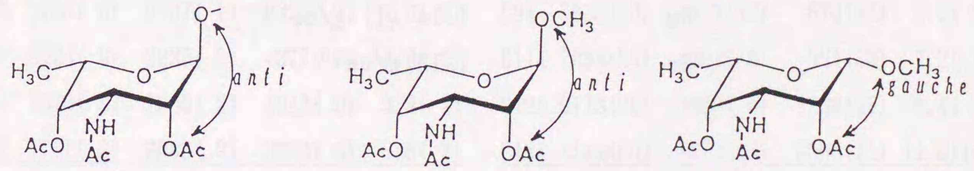
*2 Relative to D_2O as solvent reference (4.80ppm).

*3 Relative to $CDCl_3$ as solvent reference (^{1}H, 7.26ppm; ^{13}C, 77.00ppm).

Coupling constant ($^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$) comparison



$^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$=164～168Hz　　$^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$=152～158Hz



(**35**) $^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$=170Hz　　(**52a**) $^1J_{1'\text{-H-1'-C}}$=171Hz　　(**52b**)

これまで述べてきた化学的並びに分光学的手法による構造解析の結果、アグリコンの 6 位及び 10 位の不斉炭素の絶対配置を除く **34** のすべての構造が明らかになった。最後に残ったこれらの立体化学を決定し、更に結晶状態における fluvirucin A 分子のコンホメーションを解析する目的で、単結晶X線構造解析を行なった。良好な結晶を与える fluvirucin A アセテート (**35**) をアセトンから再結晶し、結晶溶媒として 1 当量のアセトンを含む無色柱状晶を得、解析用試料とした。筑波大学において成された解析により得られた、本結晶の結晶学上の諸数値を Table 3-17 から 3-20 に示す。これらの解析の結果、本結晶における **35** には 0.7 及び 0.3 の割合の、主として 2 種のコンホマーの存在が示された。両者の $-C_{13}-N-C_1-C_2-C_3-$ 部分は本質的に同一のコンホメーションであり、$-C_3-O-$糖 のグリコシド部分は equatorial である。両コンホマーの相違は、3 つの $-CH_2-CH_2-$ 部分すなわち $-C_4-C_5-$、$-C_7-C_8-$ 並びに $-C_{11}-C_{12}-$ に認められた。Fig. 3-26 にはこれらの内の主要なコンホメーションを示した。

Table 3-17 Crystallographic data for **35**

Formula	$C_{29}H_{50}N_2O_8 \cdot C_3H_6O$
FW	612.79
Space group	$P2_1$
a	8.317 (1) Å
b	28.472 (3) Å
c	8.132 (1) Å
β	110.43 (1)°
Z	2
V	1804.5 (46) Å^3
Dm	1.14 (1) g/cm^{-3}
Dc	1.13 g/cm^{-3}

Table 3-18 Final atomic coordinates of the non-hydrogen atoms (×10) and equivalent isotropic temperature factors with esd's in parentheses

Atom	X	Y	Z	BEQ[a]	Atom	X	Y	Z	BEQ[a]
C1	6107(7)	3182	-1047(7)	5.1(3)	O26	1133(4)	3016(1)	2104(4)	4.0(1)
C2	5738(6)	2901(2)	378(7)	4.6(2)	O27	480(5)	2000(2)	1546(5)	4.6(2)
C3	4214(7)	3126(2)	711(7)	5.1(3)	C28	383(10)	1610(3)	593(10)	6.6(4)
C4	4073(10)	3637(3)	1102(11)	4.6(3)	O29	1694(9)	1423(3)	513(12)	12.1(5)
C5	5498(11)	3764(3)	2864(11)	5.4(4)	C30	-1387(11)	1451(3)	-185(12)	7.5(4)
C6	5398(11)	4310(3)	3377(12)	8.0(5)	N31	2203(6)	1787(2)	5055(7)	5.0(2)
C7	5558(16)	4648(4)	1950(18)	7.1(6)	C32	3481(7)	1496(2)	5983(8)	5.0(3)
C8	7235(17)	4598(5)	1603(17)	8.3(7)	O33	4976(5)	1588(2)	6258(8)	7.6(3)
C9	7335(15)	4927(4)	221(15)	10.0(6)	C34	2936(10)	1056(3)	6659(12)	7.5(4)
C10	8839(17)	4803(4)	-136(15)	10.1(7)	O35	-205(4)	2523(2)	4480(4)	3.9(1)
C11	9453(13)	4309(4)	-500(14)	6.5(5)	C36	-763(7)	2448(2)	5827(7)	4.7(2)
C12	8144(14)	4076(4)	-2015(13)	6.2(5)	O37	163(6)	2442(3)	7309(5)	8.0(3)
C13	8398(8)	3511(3)	-1989(8)	6.0(3)	C38	-2646(7)	2369(3)	5222(9)	5.8(3)
N14	7799(6)	3289(2)	-707(6)	5.3(2)	C39	745(8)	3488(2)	4363(9)	5.8(3)
O15	4991(5)	3295(2)	-2398(5)	3.6(2)	C S1	2272(20)	5731(5)	4380(23)	14.3(10)
C16	5417(12)	2406(3)	-195(11)	8.0(4)	C S2	2509(12)	6056(4)	5862(17)	9.9(6)
O17	3826(4)	2829(1)	1980(5)	4.6(2)	C S3	4178(14)	6072(6)	7402(20)	11.9(8)
C18	3948(22)	4391(8)	4042(28)	11.8(11)	O S4	1384(9)	6312(3)	5853(13)	11.6(5)
C19	8866(12)	5172(5)	-1859(29)	15.7(11)	C4A	5332(18)	3513(5)	1882(23)	5.2(4)[b]
C20	10566(31)	5177(9)	-2242(36)	19.9(17)	C5A	4271(18)	3921(5)	2224(26)	5.8(4)[b]
C21	2143(6)	2681(2)	1564(6)	4.0(2)	C7A	6602(29)	4578(11)	2645(35)	7.8(7)[b]
C22	2158(6)	2207(2)	2395(7)	4.0(2)	C8A	5833(23)	4833(12)	870(31)	8.1(6)[b]
C23	2534(6)	2235(2)	4377(6)	4.0(2)	C11A	7898(24)	4351(5)	-991(35)	7.2(6)[b]
C24	1610(6)	2635(2)	4913(6)	3.9(2)	C12A	9176(26)	3990(5)	-1232(35)	6.4(5)[b]
C25	1761(6)	3086(2)	3993(6)	3.8(2)	C18A	4144(60)	4673(15)	3656(71)	11.3(14)[b]

[a] BEQ is the arithmetic mean of the principal axes of the thermal ellipsoid.

[b] Those of the minor conformer are isotropic thermal factor.

Table 3-19 Bond lengths (Å) with esd's in parentheses

Aglycone part (major[a])		Sugar part		Solvent	
C1 -C2	1.523(8)	O17-C21	1.386(7)	C S1-C S2	1.478(21)
C1 -N14	1.370(7)	C21-C22	1.510(8)	C S2-C S3	1.512(14)
C2 -C3	1.526(9)	C21-O26	1.437(7)	C S2-O S4	1.184(14)
C2 -O15	1.209(6)	C22-C23	1.533(7)		
C2 -C16	1.478(10)	C22-O27	1.448(6)		
C3 -C4	1.504(10)	C23-C24	1.522(8)		
C3 -O17	1.453(8)	C23-N31	1.454(8)		
C4 -C5	1.550(11)	C24-C25	1.512(8)		
C5 -C6	1.619(13)	C24-O35	1.461(6)		
C6 -C7	1.550(17)	C25-O36	1.454(5)		
C6 -C18	1.502(25)	C25-C39	1.513(9)		
C7 -C8	1.523(22)	O27-C28	1.340(9)		
C8 -C9	1.488(20)	C28-O29	1.236(12)		
C9 -C10	1.425(20)	C28-C30	1.457(11)		
C10-C11	1.558(16)	N31-C32	1.350(7)		
C10-C19	1.758(25)	C32-O33	1.213(8)		
C11-C12	1.486(13)	C32-C34	1.502(11)		
C12-C13	1.619(13)	O35-C36	1.347(7)		
C13-N14	1.448(9)	C36-O37	1.183(6)		
C19-C20	1.550(37)	C36-C38	1.486(8)		

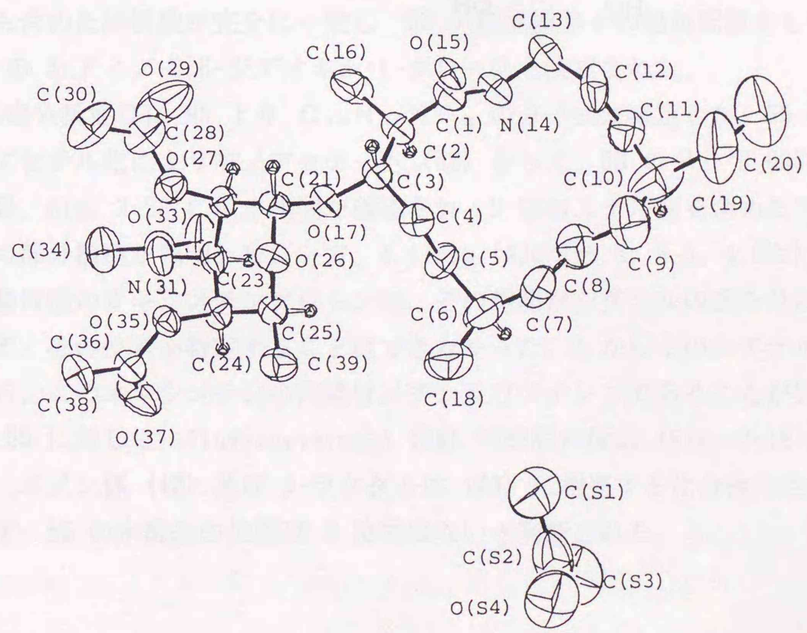
[a] Those among disordered atoms (C4A, C5A, C7A, C8A, C11A, C12A and C18A) were fixed to 1.540Å.

Table 3-20 Tortion angles (°) of lactam and sugar rings

Lactam ring	Major	Minor[a]				Sugar ring	
N14-C1 -C2 -C3	134	134	C7 -C8 -C9 -C10	-173	46	O26-C21-C22-C23	-48
C1 -C2 -C3 -C4	-52	-80	C8 -C9 -C10-C11	48	47	C21-C22-C23-C24	42
C2 -C4 -C4 -C5	-64	166	C9 -C10-C11-C12	57	-165	C22-C23-C24-C25	-48
C3 -C4 -C5 -C6	179	-179	C10-C11-C12-C13	-159	177	C23-C24-C25-O26	55
C4 -C5 -C6 -C7	-59	63	C11-C12-C13-C14	76	-66	C24-C25-O26-C21	-64
C5 -C6 -C7 -C8	-60	57	C12-C13-C14-C15	83	118	C25-O26-C21-C22	59
C6 -C7 -C8 -C9	180	-162	C13-N14-C1 -C2	174	174		

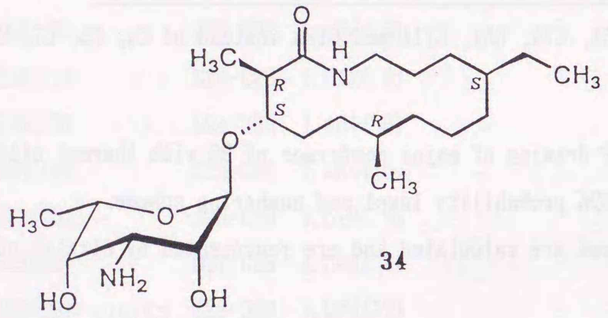
[a] Read as C4A, C5A, C7A, C8A, C11A and C12A instead of C4, C5, C7, C8, C11 and C12.

Fig. 3-26 ORTEP drawing of major conformer of **35** with thermal ellipsoids scaled at 50% probability level and numbering scheme.
H-atoms are calculated and are represented by circles of radius 0.1Å.



35 のX線結晶構造解析の結果、**35** のアグリコン部分の 14 員環ラクタム構造が確定すると共に、ラクタム環上に存在する不斉炭素の絶対配置も、構成糖である 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロピラノースとの比較により 2*R*、3*S*、6*R* 及び 10*S* と決定された。以上のことから、fluvirucin A (**34**) の全構造がその絶対配置をも含め (2*R*,3*S*,6*R*,10*S*)-3-[(3-アミノ-3,6-ジデオキシ-α-L-タロピラノシル)オキシ]-2,6-ジメチル-10-エチル-13-テトラデカンラクタムと決定された (Fig. 3-27)。

Fig. 3-27 Total structure of fluvirucin A (**34**)



34

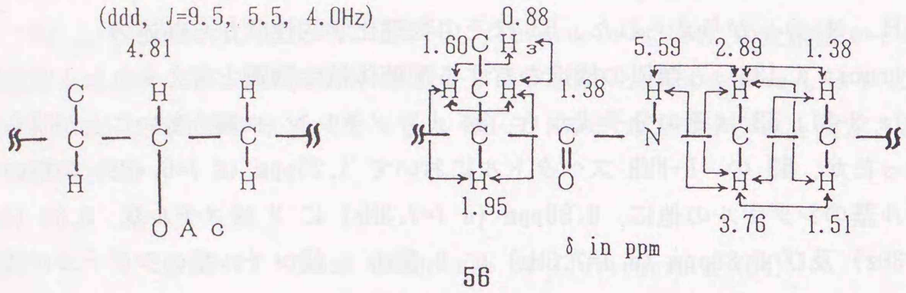
(4) Fluvirucin B の構造

Fluvirucin B (**53**) は元素分析並びに FAB-MS (m/z 443, MH^+) より分子式 $C_{24}H_{46}N_2O_5$ が与えられた。**53** はその物理化学的性状から前述の fluvirucin A (**34**) と類似の構造を有する配糖体抗生物質と考えられた (Table 3-8)。**53** はその分子式から、**34** よりメチレン 1 個分多いことが明らかになったが、**53** の ^{1}H-NMR スペクトルにおいて 1.25ppm (d J=6.4Hz) の糖の 5' メチル基のシグナルの他に、0.90ppm (d J=7.3Hz) に 2 級メチル基、0.84 (d J=7.3Hz) 及び 0.88ppm (d J=7.3Hz) に 2 個の 1 級メチル基のシグナルが観測され (Table 3-13)、**34** の 2 位または 6 位のメチル基の内、一方がエチル基に置き換わった構造が推定された。一方、**53** 及びそのアセチル体 (**54**) の糖部分のシグナルは、**34** 及びそのアセチル体である **35** の場合と各々良く一致しており (Table 3-13、3-14)、**53** を構成する糖は **34** と同一の 3-アミノ-3,6-ジデオキシタロピラノースであり、そのアノマー配置も **34** と同一の α 配置をとることが明らかになった。

53 は酸メタノリシスにより、そのアグリコン (fluvirucinine B、**55**) 並びに 2 種のメチルグリコシドを与えた。後者は **34** より得られた **37a** 及び **37b** と比旋光度をも含めた諸恒数が完全に一致し、**53** の構成糖がその絶対配置をも含め、**34** と同一の 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロースと決定された。

55 は元素分析並びに MS より $C_{18}H_{35}NO_2$ の分子式が確定した。**55** は常法によるアセチル化によりモノアセテート (**56**) を与え、**56** の ^{1}H-^{1}H COSY の解析の結果、Fig. 3-28 に示す相関が確認され、2 位のエチル基を含めたアミド結合周辺の部分構造が判明した。一方、4.81ppm (ddd J=9.5, 5.5, 4.0Hz) のアセトキシ基付根のオキシメチンプロトンは、その相関がシグナルの重なりにより解析できず、その位置を特定することはできなかった。しかしそのシグナルの分裂様式から、このオキシメチンの両隣はメチン及びメチレンであることが判明した。更に **55** に対して、fluvirucinine A (**36**) 同様脱水反応 (Fig. 3-18) を行なったが、エノン体 (**42**) 及び β-ラクタム体 (**43**) に相当する化合物の生成は認められず、**55** の水酸基の位置は 3 位ではないと判断された。

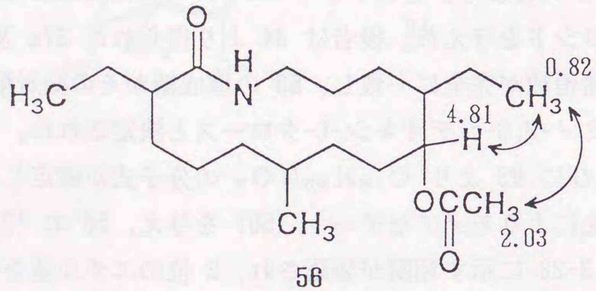
Fig. 3-28 ^1H-^1H COSY spectral data for fluvirucinine B acetate (**56**)



56

一方 **42** の NOESY により、2.03ppm のアセチルメチル基及びその付根のオキシメチンプロトンと 0.82ppm の 1 級メチル基との間に NOE 相関が観測され、**55** の水酸基の位置は、エチル基の隣に存在するものと推定された (Fig. 3-29)。

Fig. 3-29 NOESY spectral data of fluvirucinine B acetate (**56**)



56

55 の水酸基を含めた置換基の位置を決定すべく、先ず **55** を クロロクロム酸ピリジニウム (PCC) で酸化し、ケト体 (**57**) を得た (Fig. 3-30)。**57** の ^1H-NMR スペクトルで、低磁場にシフトしたカルボニルの両隣の 3 個のプロトンのシグナルが観測されたが、この内 2.24ppm のメチンプロトンについては ^1H-^1H COSY により (Fig. 3-31) 1.71 及び 1.62ppm の 11 位のメチレンプロトンとの相関と共に、1.69 及び 1.42ppm のメチレンプロトンを経て 0.85ppm の 1 級メチルへ至る相関が確認され、**55** の水酸基の隣がエチル基と確定した。

Fig. 3-30 Derivatization of fluvirucinine B (**55**)

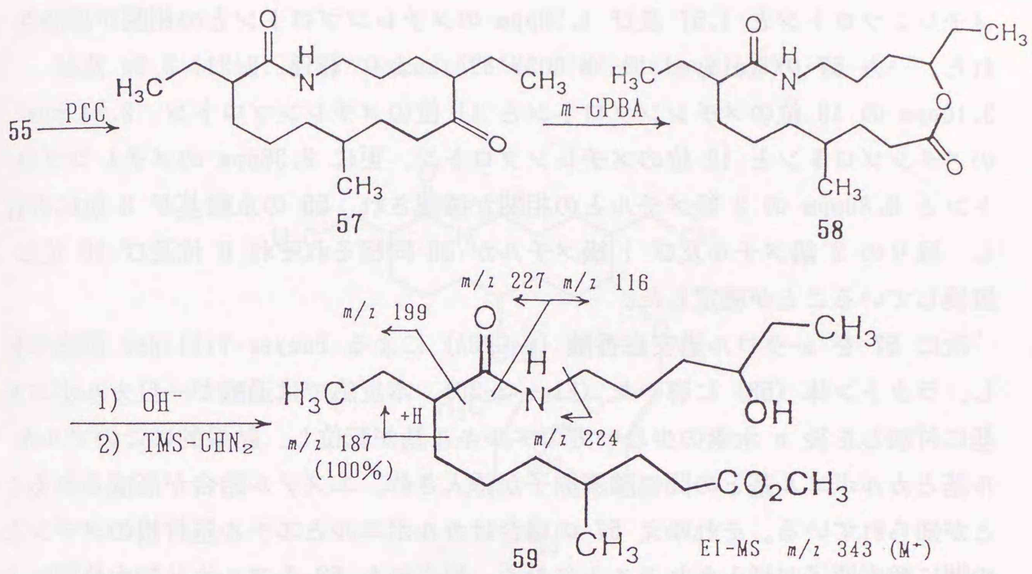
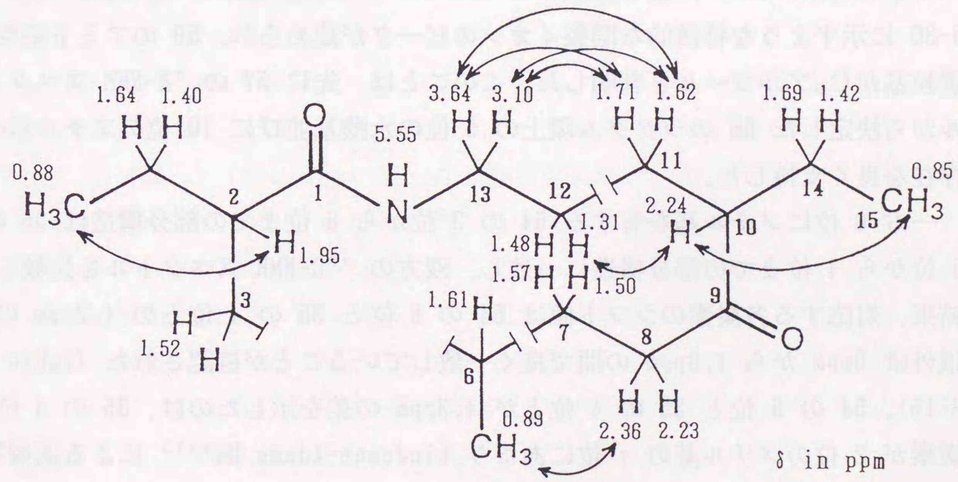


Fig. 3-31 ^1H-^1H COSY and relayed ^1H-^1H COSY spectral data for fluvirucinine B keto-derivative (**57**)



57 ⟷ : Relayed ^1H-^1H correlation

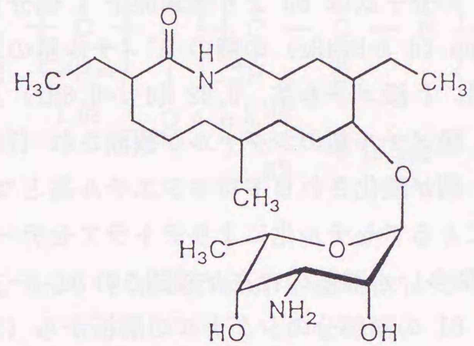
更に 5.55ppm の アミドプロトンから 1.48 及び 1.31ppm の 12 位のメチレンプロトンへの相関、並びにカルボニルのもう一方の隣の 2.36 及び 2.23ppm のメチレンプロトンと 1.57 及び 1.50ppm のメチレンプロトンとの相関が確認された。一方 **57** の relayed ^{1}H-^{1}H COSY[116] により (Fig. 3-31) 3.64 及び 3.10ppm の 13 位のメチレンプロトンと 11 位のメチレンプロトン、2.24 ppm のメチンプロトンと 12 位のメチレンプロトン、更に 2.36ppm のメチレンプロトンと 0.89ppm の 2 級メチルとの相関が確認され、**55** の水酸基が 9 位に存在し、残りの 2 級メチル及び 1 級メチルが **36** 同様それぞれ 6 位及び 10 位に置換していることが確定した。

次に **57** を m-クロル過安息香酸 (m-CPBA) による Baeyer-Villiger 反応に付し、ラクトン体 (**58**) に導いた (Fig. 3-30)。本反応では過酸が一旦カルボニル基に付加した後 α 水素の少ない方のアルキル基が転位し、結果的にこのアルキル基とカルボニル基との間に酸素原子が挿入され、エステル結合が形成されることが知られている。それゆえ **57** の場合はカルボニルとエチル基付根のメチンとの間に酸素原子が挿入されることになる。得られた **58** をアルカリ加水分解により開環した後、生成した遊離のカルボキシル基をトリメチリシリルジアゾメタン ($TMS\text{-}CHN_2$) でメチル化し、直鎖のエステル誘導体 (**59**) とした (Fig. 3-30)。**59** は EI-MS 分析により、m/z 343 の分子イオンピークの他に基準ピークとしてアミドカルボニルの β 位で開裂した m/z 187 のピークを示した。更に Fig. 3-30 に示すような特徴的な開裂イオンのピークが認められ、**59** のアミド窒素の置換基がC_6アルコールと判明した。このことは、先に **57** の ^{1}H-NMR スペクトルから決定した **55** のラクタム環上の 9 位の水酸基並びに 10 位のエチル基の存在を良く支持した。

一方 6 位にメチル基を有する **54** の 3 位から 8 位までの部分構造は **35** の 9 位から 4 位までの部分構造に一致し、双方の ^{13}C-NMR スペクトルを比較した結果、対応する各炭素のシフト値は **54** の 8 位と **35** の 4 位との 4.3ppm の差以外は 0ppm から 1.6ppm の間で良く一致していることが確認された (Table 3-15)。**54** の 8 位と **35** の 4 位とが 4.3ppm の差を示したのは、**35** の 4 位の炭素が 2 位のメチル基の γ 位にあたり Lindeman-Adams 則[117] による低磁場シフトしているものとして良く説明される。

以上のことから **55** の構造が確定し、fluvirucin B (**53**) の構造が Fig. 3-32 に示すように決定された。

Fig. 3-32 Structure of fluvirucin B (**53**)



53

(5) Fluvirucin C の構造

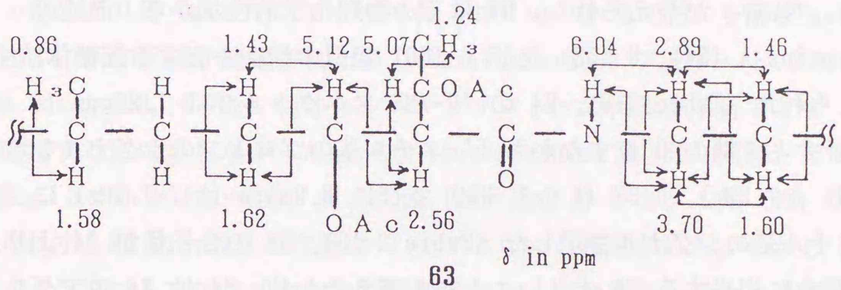
Fluvirucin C (**60**) は元素分析並びに FAB-MS (*m/z* 459, MH^+) より分子式 $C_{24}H_{46}N_2O_6$ が与えられた。**60** はその物理化学的性状から、前述の fluvirucins A (**34**) 及び B (**53**) 類似の構造を有する配糖体抗生物質と考えられた (Table 3-8)。**60** の分子式は **53** より酸素原子 1 個分多く、**60** の ^{1}H-NMR スペクトルでは 1.27ppm (d *J*=6.4Hz) の糖の 5'メチル基のシグナルの他に、0.87ppm (d *J*=7.3Hz) に 1 級メチル基、0.92 (d *J*=6.8Hz) 及び 1.19ppm (d *J*=6.4Hz) に 2 個の 2 級メチル基のシグナルが観測され (Table 3-13)、**53** の 2 個のエチル基の内 1 個が酸化されヒドロキシエチル基となっていることが予想された。**60** は常法によるアセチル化によりテトラアセテート (**61**) を与えたことから、**53** より 1 個多い水酸基の存在が確認された。一方、^{1}H-NMR スペクトルにおける **60** 及び **61** の糖部分のシグナルの解析から (Table 3-13、3-14)、**60** を構成する糖は **34** 並びに **53** の場合と同一の 3-アミノ-3,6-ジデオキシタロピラノースであり、そのアノマー配置もこれらと同一の α 配置をとることが明らかとなった。

60 は酸メタノリシスにより、そのアグリコン (fluvirucinine C、**62**) 並びに 2 種のメチルグリコシドを与えた。後者は **34** より得られた **37a** 及び **37b** と比旋光度をも含めた諸恒数が完全に一致し、**60** の構成糖がその絶対配置をも含め **34** と同一の 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロースと決定された。

62 は元素分析並びに MS より $C_{18}H_{35}NO_3$ の分子式が確定した。**62** は常法によるアセチル化によりジアセテート (**63**) を与え、**63** の ^{1}H-^{1}H COSY の解析の結果、Fig. 3-33 に示す相関が確認され、fluvirucinine A (**36**) の 2 位のエチル基が **62** ではヒドロキシエチル基に置き換わっていることが確認された。

更に、**61** の ^{13}C-NMR スペクトルを測定し、fluvirucin A アセテート (**35**) と比較した結果、アルキル側鎖の異なるアグリコンの 2 位及びその近傍にシフト値の相違が認められる以外は、糖部分のシグナルをも含め両化合物のシフト値は良く一致していることが確認された (Table 3-15)。以上のことから fluvirucin C (**60**) の構造が Fig. 3-34 に示すように決定された。

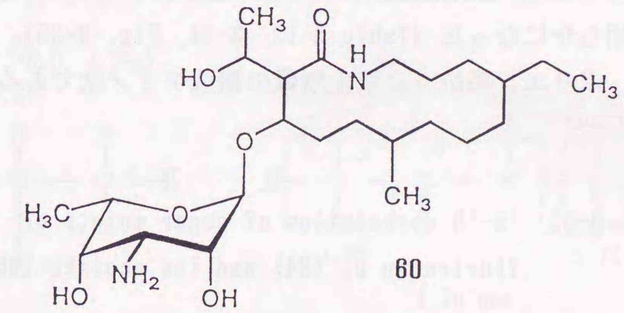
Fig. 3-33 ^{1}H-^{1}H COSY spectral data for fluvirucinine C acetate (**63**)



δ in ppm

63

Fig. 3-34 Structure of fluvirucin C (**60**)



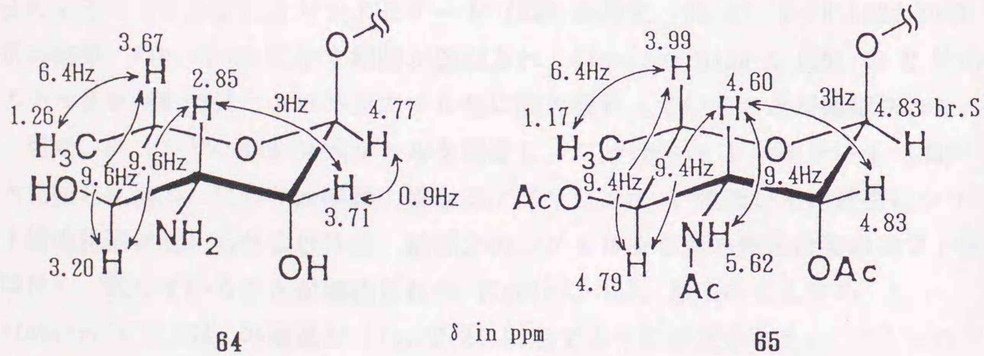
60

(6) Fluvirucin D_1 の構造

Fluvirucin D_1 (**64**) は元素分析並びに FAB-MS (m/z 457, MH^+) より分子式 $C_{25}H_{48}N_2O_5$ が与えられた。**64** はその物理化学的性状から、前述の fluvirucins A (**34**)、B (**53**) 及び C (**60**) 類似の構造を有する配糖体抗生物質と考えられた (Table 3-8)。**64** の ^{1}H-NMR スペクトルでは 1.26ppm (d J=6.4Hz) に 6-デオキシ糖の 6'位すなわち 5'-メチル基のプロトンのシグナルを示す他に、0.84 (t J=7.3Hz)、0.87 (t J=7.3Hz) 並びに 0.88ppm (t J=7.3Hz) に 3 個の 1 級メチル基のシグナルを示した (Table 3-13)。**64** の分子量が **34** よりメチレン 2 個分に相当する 28 大きいことをも考え合わせ、**64** は **34** のアグリコンの 2 位並びに 6 位のメチル基が各々エチル基に置き換わった構造が推定された。

64 は常法によるアセチル化によりトリアセテート (**65**) を与えた。**64** の構成糖は、**64** 並びに **65** の ^{1}H-NMR スペクトルにおける糖由来のシグナルの結合定数を解析することにより、相対配置がマンノース型の 3-アミノ-3,6-ジデオキシ糖であることが明らかになった (Table 3-13、3-14、Fig. 3-35)。本構成アミノ糖の相対配置は、ポリエン系抗カビ抗生物質の構成アミノ糖であるミコサミンに一致する。[78,79,80]

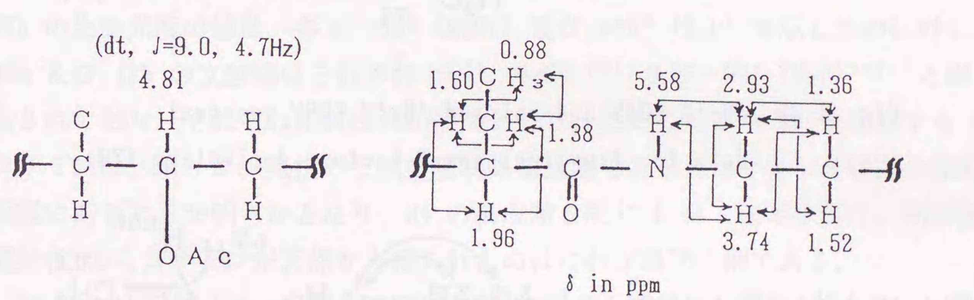
Fig. 3-35 ^{1}H-^{1}H correlation of sugar moiety of fluvirucin D_1 (**64**) and its acetate (**65**)



64 δ in ppm **65**

次に **64** の酸メタノリシスを行ない、そのアグリコン (fluvirucinine D、**66**) 並びにメチルグリコシドの 2 種のアノマー (**67a**、**67b**) をそれぞれ単離した。**66** は元素分析並びに MS により $C_{19}H_{37}NO_2$ が確定した。**66** の常法によるアセチル化により得られたモノアセチル体 (**68**) の ^{1}H-^{1}H COSY を解析した結果、Fig. 3-36 に示す相関が確認されたが、fluvirucinine B アセテート (**56**) 同様 4.81ppm (dt J=9.0, 4.7Hz) のオキシメチンプロトンの相関が解析できず、その位置を確定するには至らなかった。一方 fluvirucinine B (**55**) 同様、その脱水反応 (Fig. 3-18) においても、エノン体 (**42**) 及び β-ラクタム体 (**43**) の生成が認められず、**66** の水酸基の位置は 3 位ではないと判断された。しかし **68** のオキシメチンプロトンのシグナルの開裂様式から、このオキシメチンの両隣はメチン及びメチレンであることが判明した。

Fig. 3-36 ^{1}H-^{1}H COSY spectral data for fluvirucinine D acetate (**68**)



δ in ppm

68

66 の水酸基を含めた置換基の位置を決定すべく、**55** と同様に **66** の各種誘導体を合成し、構造解析を行なった (Fig. 3-37)。先ず **66** を PCC 酸化し、ケト体 (**69**) に導き、更に Baeyer-Villiger 反応によりラクトン体 (**70**) を得た。**70** の ^{1}H-^{1}H COSY により (Fig. 3-38)、5.57ppm のアミドプロトンから 4.90ppm のオキシメチンプロトンを経て 0.87ppm の 1 級メチル基までの相関が明らかになり、**70** のラクトン結合の位置が確定し、**66** の水酸基及び一方のエチル基のラクタム環上での置換位置が、各々 9 位及び 10 位と一挙に決定された。

Fig. 3-37 Derivatization of fluvirucinine D (**66**)

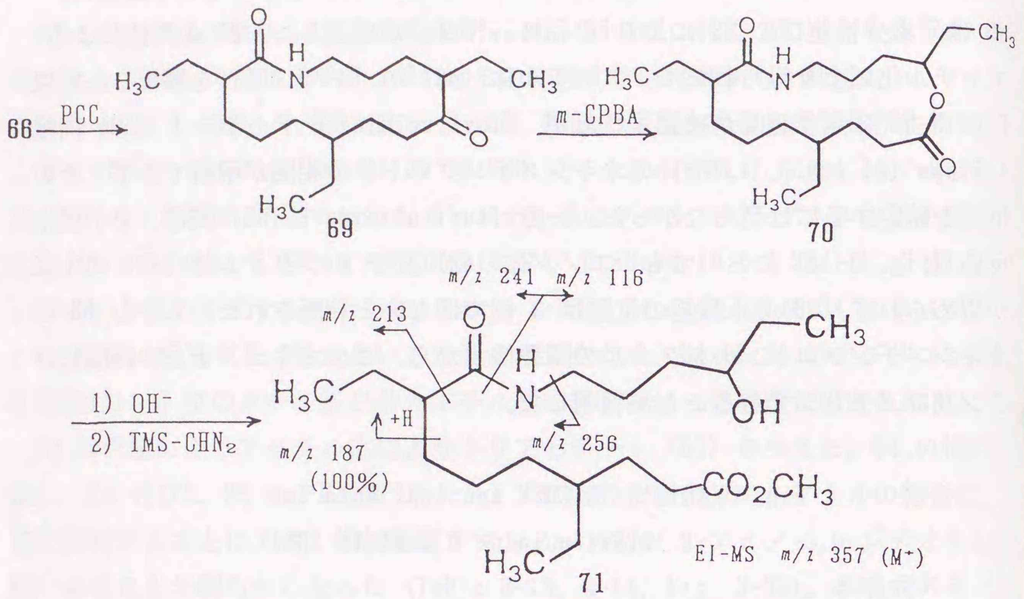
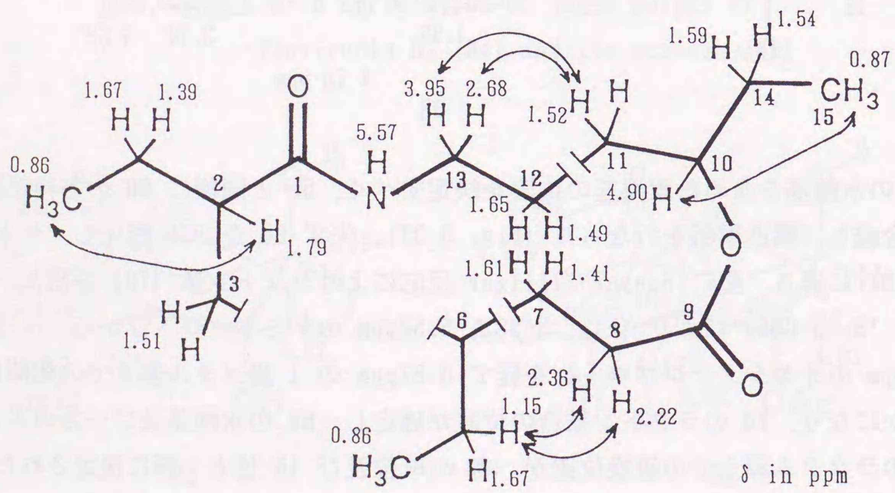


Fig. 3-38 ^{1}H-^{1}H COSY and relayed ^{1}H-^{1}H COSY spectral data for fluvirucinine D lactone derivative (**70**)



⟷ : Relayed ^{1}H-^{1}H correlation

更に **70** をアルカリ加水分解の後、メチル化して得た開環エステル誘導体 (71) の EI-MS 分析により、**59** 同様特徴的な開裂イオンピークが観測され (Fig. 3-37)、上記結論を支持した。**66** の 9 位の水酸基は **36**、**62** とは異なり **55** と一致する。

残ったもう一方のエチル基の置換位置は、**65** の ^{13}C-NMR スペクトルを測定し、**54** の値と比較することにより決定した (Table 3-15)。すなわち、**54** の 6 位のメチル基 (20.8ppm) のシグナルに換わり、**65** では 22.8、12.3ppm にエチル基由来の 2 本のシグナルが新たに観測されると同時に、**54** の 6 位のメチル基付根の炭素が **65** では 7.4ppm 低磁場へシフトしている。しかし糖部分のシグナルを除いたアグリコン部分の他の炭素のシフト値は、両化合物共極めて良く一致しており、**65** のもう 1 個のエチル基が 6 位に位置していることが確認された。

一方、2 種のメチルグリコシド **67a** 及び **67b** は、市販の amphotericin B から得たミコサミンのメチルグリコシドの α- (**47a**、Fig. 3-25) 及び β-アノマー (**47b**) に、それぞれ ^{1}H-NMR スペクトル が完全に一致した。ところが **67a** 及び **67b** の比旋光度の値は、各々 -63° (MeOH) 及び +85° (H_2O) を示したのに対し、**47a** 及び **47b** の文献値はそれぞれ +54° (MeOH)[78] 及び -92° (H_2O)[107] と報告されており、それぞれ正負反対の値であった。このことから **64** を構成するミコサミンは、ポリエン系抗カビ抗生物質の構成糖であるミコサミンとは逆の絶対配置であることが明らかとなり、**34** の構成糖と同じ L 体と決定された。絶対配置が L のミコサミンが天然から得られたのはこれが最初の例である。

64 におけるアノマー配置の決定は、**34** の場合と同様にして行ない、**34** と同一の α と決定した (Table 3-21)。

以上の結果、fluvirucin D_1 (**64**) の構造が Fig. 3-39 に示すように決定された。

Table 3-21 Determination of anomeric configuration of fluvirucin D_1

^1H- and ^{13}C-NMR chemical shift comparison fluvirucin D_1 sugar moiety

Proton	**64**[*1]	**67a**[*2]	**67b**[*2]	**65**[*3]	**72a**[*3]	**72b**[*3]
1'-H	4.77	4.66	4.56	4.83	4.64	4.51
2'-H	3.71	3.88	3.92	4.83	4.92	4.96
3'-H	2.85	2.92	2.77	4.60	4.60	4.32
3'-NH				5.62	5.62	5.37
4'-H	3.20	3.29	3.21	4.79	4.77	4.72
5'-H	3.67	3.67	3.41	3.99	3.91	3.84
6'-H_3	1.26	1.28	1.30	1.17	1.20	1.28

Carbon	**65**[*3]	**72a**[*3]
1'	94.0	97.3
2'	72.1	72.15
3'	48.3	48.3
4'	72.9	72.24
5'	66.5	65.9
6'	17.3	17.5

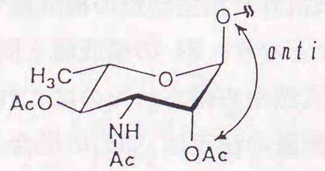
[*1] Relative to TMS as internal reference (0.00ppm) in $CDCl_3$-CD_3OD (1:1, v/v).

[*2] Relative to D_2O as solvent reference (4.80ppm).

[*3] Relative to $CDCl_3$ as solvent reference (^1H,7.26ppm; ^{13}C,77.00ppm).

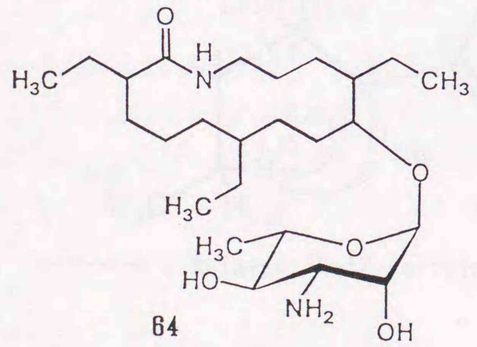
72a, **72b** : Methyl peracetyl glycosides of **64**.

Coupling constant ($^1J_{1'\text{-}H\text{-}1'\text{-}C}$=169Hz)



65

Fig. 3-39 Structure of fluvirucin D_1 (**64**)



64

(7) Fluvirucin D_2 の構造

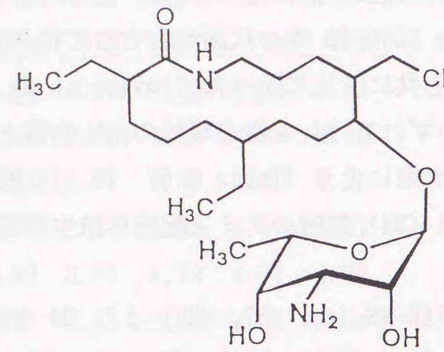
Fluvirucin D_2 (**73**) は、次項で述べる D_3 (**74**) 及び D_4 (**75**) と共に non-sporogenic maduromycete R516-16 株の代謝産物として得られた抗生物質である。本菌株はこれらの化合物と共に、先に述べた fluvirucin D_1 (**64**) を併産しており、**73**、**74** 及び **75** はいずれも **64** と構造類縁の抗生物質と推定された。更に各々の物理化学的性状の考察により (Table 3-8)、**73**、**74** 及び **75** 共に、**64** を含む一連の fluvirucin A (**34**) 類縁のアミノ配糖体抗生物質であることが明らかとなった。

73 は元素分析並びに FAB-MS (m/z 457, MH^+) より **64** と同一の分子式 $C_{25}H_{48}N_2O_5$ が与えられた (Table 3-8)。**73** の ^1H-NMR スペクトルにおいて、そのアグリコン部分は **64** のアグリコン部分と、また糖部分は **34** の糖部分と各々のシグナルが良く一致した (Table 3-13)。一方 **73** のアセチル体 (**76**) の場合にもそれぞれのアセテート (**35**、**65**) との間で同様な一致が認められた (Table 3-14)。一方 **76** の ^{13}C-NMR スペクトルにおいても ^1H-NMR スペクトルの場合と同様、そのアグリコン部分は **65** のアグリコン部分と、糖部分は **35** の糖部分とそれぞれの炭素のシフト値が良く一致していることが確認された (Table 3-15)。このことは、**73** がアグリコンとして fluvirucinine D (**66**) を、糖部分として **34** と同一の 3-アミノ-3,6-ジデオキシタロピラノースから構成されていることを示している。

実際 **73** の酸メタノリシスにより得られたアグリコンは、先に述べた **66** と同一物質であった。一方、同時に得られた 2 種のメチルグリコシドは、**34** のメタノリシスにより得た **37a** 並びに **37b** と、比旋光度の値をも含めそれらの諸恒数が完全に一致し、**73** の構成糖が **34**、fluvirucins B (**53**) 及び C (**60**) と同一の 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロースと同定された。

以上のことから fluvirucin D_2 (**73**) の構造がそのアノマー配置をも含め、Fig. 3-40 に示すように決定された。

Fig. 3-40 Structure of fluvirucin D_2 (**73**)



73

(8) Fluvirucins D_3 及び D_4 の構造

Fluvirucins D_3 (**74**) 及び D_4 (**75**) は元素分析並びに FAB-MS (m/z 604, MH^+) より同一の分子式 $C_{34}H_{57}N_3O_6$ が与えられた (Table 3-8)。**74** 及び **75** 共にその UV スペクトルにおいてフェニル基に特徴的な吸収を示し (Fig. 3-5)、IR スペクトルではアグリコンのアミド結合以外に、更にもう 1 個のアミド結合の存在を示唆した (Fig. 3-7)。一方 **74** 及び **75** の ^{1}H-NMR スペクトルにおいて、UV スペクトルからその存在が予想されたフェニル基のプロトンのシグナルの他に、3.4ppm 付近 (t J=7.1Hz) 並びに 2.80ppm (t J=7.1Hz) に互いにスピン結合した各々 2 プロトン分の積分値を示す、1,2-2 置換エチル基のシグナルが認められ、2-フェネチル基の存在が強く示唆された (Table 3-13)。これら以外のシグナルについては、糖の 3'位のプロトンが約 1ppm の低磁場シフトを示している他は、**74** では fluvirucin D_1 (**64**) と、**75** では D_2 (**73**) と各々良く一致していること、更にいずれの化合物もニンヒドリン呈色反応に陰性であることから、**74** 及び **75** はそれぞれ **64** 及び **73** の 3'位のアミノ基に 2-フェネチル基が置換している構造が推定された。

一方 **74** 及び **75** は常法によるアセチル化により各々 O,O-ジアセテート (**77**、**78**) を与え、3'アミノ基に置換基が存在することが確認された。**77** 及び **78** の ^{1}H-NMR スペクトルでは、アグリコンのアミドプロトン (**77**, 5.65ppm; **78**, 5.64ppm)、糖の 3'アミドプロトン (**77**, 4.41ppm; **78**, 4.60ppm) の他に、もう 1 個のアミドプロトンのシグナル (**77**, **78**, 4.29ppm each) が認められ (Table 3-14)、前述の 1,2-2 置換エチル基のプロトンのシフト値をも考慮することにより、このエチル基は 2-フェネチルアミノ基の一部であることが判明した。**74** (すなわち **75**) の分子式から **64** (すなわち **73**) 並びに 2-フェネチルアミンに相当する分を削除した残りは 炭素 1、酸素 1、すなわちカルボニル 1 個分となる。IR スペクトルから確認されたもう 1 個のアミド結合を考慮し、**74** 及び **75** は各々 **64** 及び **73** の構成糖の 3'アミノ基に、2-フェネチルアミンがウレイド結合を介して置換している構造が推定された。

77 及び **78** の ^{13}C-NMR スペクトルにおいても、2-フェネチルアミノカルボニル基に基づく炭素のシグナル以外は、各々 fluvirucin D_1 アセテート (**65**) 及

び fluvirucin D_2 アセテート (**76**) の値と良く一致し (Table 3-15)、上記の推定を良く支持した。

74 及び **75** の分子内に 2-フェネチルアミノ基が存在することは、**74** の酸加水分解生成物中に 2-フェネチルアミンを検出したことにより確認した。

74 及び **75** の酸メタノリシスにより、**64** 及び **73** と同一のアグリコン **66** の他に、糖としてメチル L-ミコサミド及びメチル 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロピラノシドの各々の 3'-(2-フェネチルアミノカルボニル) 置換体 (**79**、**80**) が得られた (Fig. 3-41)。これらの糖の絶対配置は、併産されている **64** 及び **73** の構成糖がいずれも L 体であること、並びに **79** 及び **80** 共に比旋光度の値が負であることから L 体と決定した。

以上のことから fluvirucin D_3 (**74**) 並びに D_4 (**75**) の構造を Fig. 3-42 に示すように決定した。

Fig. 3-41 Acid methanolysis of fluvirucins D_3 (**74**) and D_4 (**75**)

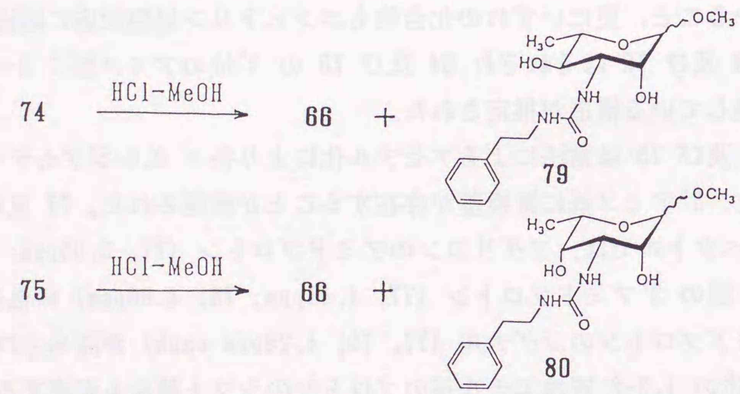
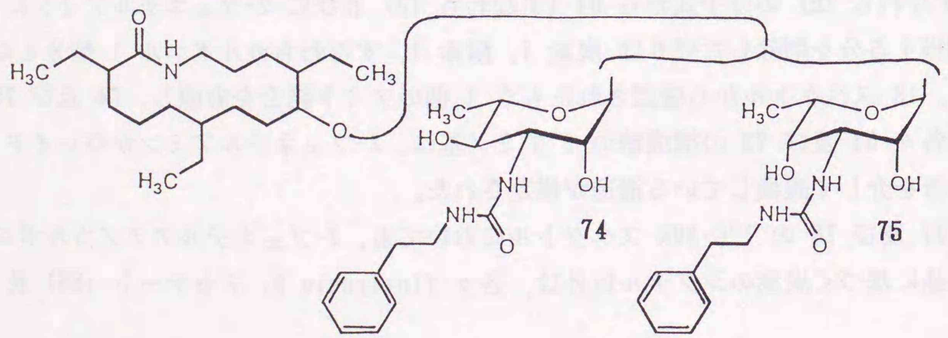


Fig. 3-42 Structures of fluvirucins D_3 (**74**) and D_4 (**75**)



第7節 Fluvirucin A の生合成

Fluvirucin A 分子の各炭素の生合成起源を解明する目的で、炭素原子の安定同位体の取り込み実験を行なった。前駆体として [1-^{13}C]、[2-^{13}C] 及び [1,2-$^{13}C_2$] 標識酢酸ナトリウム、並びに [1-^{13}C] プロピオン酸ナトリウムを各々別途に *Nonomuia tyrrhenii* sp. nov. Q464-31 株の培養液に投与した。生産された fluvirucin A の 4 種の ^{13}C 標識化合物は、各々そのアセテートとして単離した後 ^{13}C-NMR スペクトルを測定し、標識位置並びにその取り込み率を算出した (Table 3-22)。

[1-^{13}C] 標識酢酸の投与実験では、そのアグリコンの 3、7、9、11 及び 14 位の各炭素に高い取り込みが認められた。一方 [2-^{13}C] 標識酢酸の場合には、同じくアグリコン部の 4、8、10、12 及び 15 位の各炭素に取り込みが認められ、両実験から 5 モルの酢酸分子が fluvirucin A のアグリコンに直接に取り込まれていることが判明した。更に [1,2-$^{13}C_2$] 二重標識酢酸の投与実験により、アグリコンの 3-4 位、7-8 位、9-10 位、11-12 位並びに 14-15 位の炭素間に各々スピン結合が観測されたことから、これら 5 モルの酢酸分子の直接の取り込みが証明された (Fig. 3-43)。

一方 [2-^{13}C] 標識酢酸の投与実験において、上述の 5 個の炭素原子以外に 13 位のメチレン炭素にも高い取り込みが認められた。しかもこの 13 位のメチレン炭素と 12 位のメチン炭素は 36.7Hz でスピン結合していることが確認され、12 位と 13 位の炭素は同一の酢酸分子の同一炭素由来であることが明らかになった。このことは fluvirucin A のアグリコンの生合成の過程に、酢酸のメチル基由来の炭素間での結合反応が介在していることを意味するものである。このような酢酸の 2 位の炭素間の結合反応は、TCA 回路において酢酸とオキザロ酢酸との縮合によりクエン酸が生成する場合、更にグリオキシル酸分路において酢酸とグリオキシル酸とが縮合し L-リンゴ酸が生成する場合が良く知られている (Fig. 3-44)。いずれの場合においても、新たに形成された炭素－炭素結合は、コハク酸の 2 位並びに 3 位の炭素間の結合となる。このことから 1 モルの標識酢酸が、TCA 回路 (あるいはグリオキシル酸分路) で 1 回転し、一旦スクシニル Co-A が生成した後、メチルマロン酸－プロピオン酸分路を経て、fluvirucin A

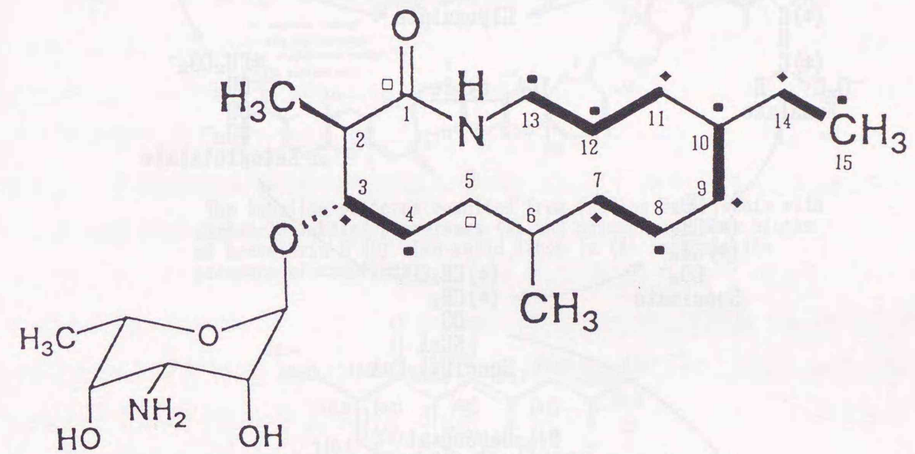
Table 3-22 ^{13}C-NMR data of fluvirucin A acetate derived from [1-^{13}C], [2-^{13}C], and [1,2-$^{13}C_2$]acetates, and [1-^{13}C]propionate

Carbon	δ*1	Enrichment Factor*2			Coupling Constant (Hz)
		[1-^{13}C] acetate	[2-^{13}C] acetate	[1-^{13}C] propionate	[1, 2-$^{13}C_2$] acetate
1	174.1			19	
2	45.0				
2-CH_3	15.8				
3	82.8	48			38.2
4	25.7		74		38.2
5	26.4			23	
6	30.9				
6-CH_3	20.5				
7	33.9	42			33.7
8	22.9		75		33.7
9	32.0	28			33.7
10	37.9		23		33.7
11	27.01	20			36.7
12	23.5		49		36.7*3
13	39.2		36		36.7*3
14	26.95	26			35.2
15	11.8		34		35.2
1'	99.0				
2'	69.3				
3'	44.8				
4'	70.1				
5'	65.4				
6'	16.3				
CH_3CO	20.8				
CH_3CO	21.1				
CH_3CO	23.2				
CH_3CO	169.5	1	1	1	
CH_3CO	170.5				
CH_3CO	170.7				

*1 δ In ppm relative to $CDCl_3$ as solvent reference (77.00ppm).
*2 Ratio of carbon signal intensities for enriched and natural abundance samples measured under identical conditions: for normalization the acetoxy carbon signal at 169.5ppm was used as reference.
*3 This coupling was also observed in the case of [2-^{13}C]acetate enrichment.

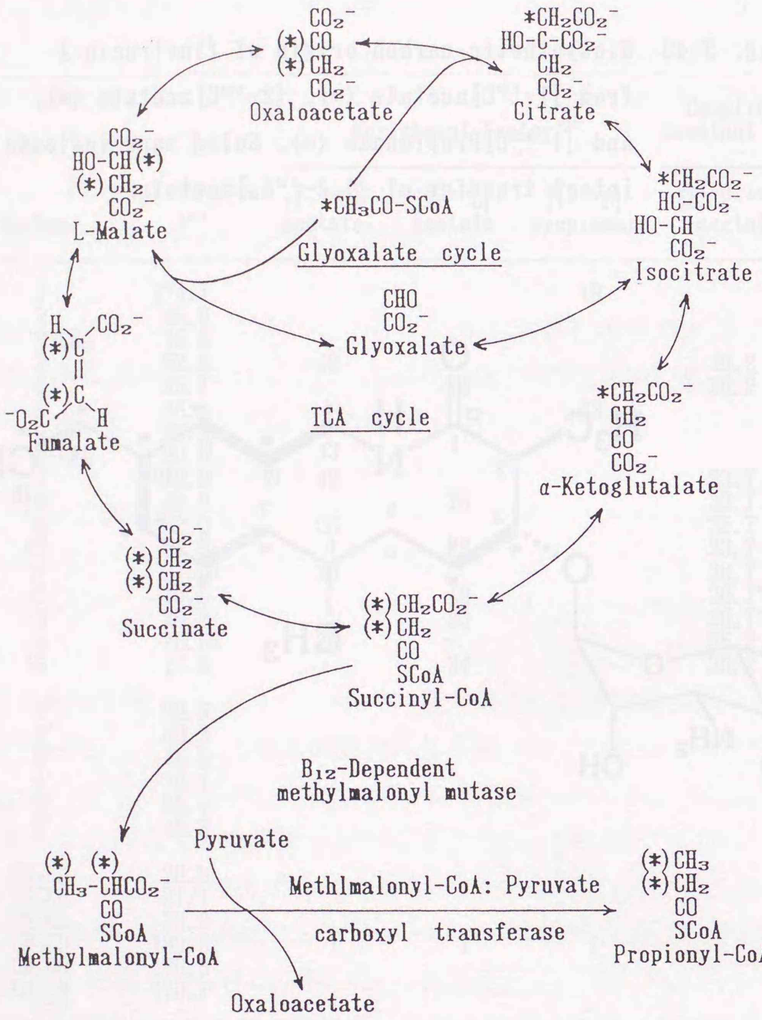
のアグリコン部の 11-12-13 位の C_3 単位に取り込まれたものと考えられる (Fig.3-43)。

Fig. 3-43 Biosynthetic carbon origin of fluvirucin A from [1-^{13}C]acetate (◆), [2-^{13}C]acetate (■), and [1-^{13}C]Propionate (□). Solid bars indicate intact transfer of [1,2-$^{13}C_2$]acetate.



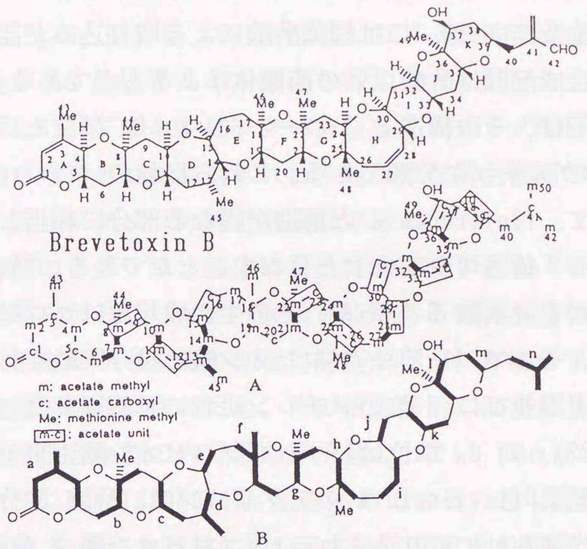
酢酸 1 モルが TCA 回路で 1 回転した後、コハク酸を経由し、C_3 単位として分子内に組み込まれた例としては、赤潮を引き起こす渦鞭毛藻 *Gymnodinium breve* が生産する神経毒である brevetoxin、[118,119] 植物病原菌の *Fusarium martii* が生産する毒素の marticin[120] 更に *Penicillium purpurogenum* の代謝産物である glauconic acid[121] 等が報告されている (Fig. 3-45)。

Fig. 3-44 Pathway for propionate from [2-^{13}C]acetate

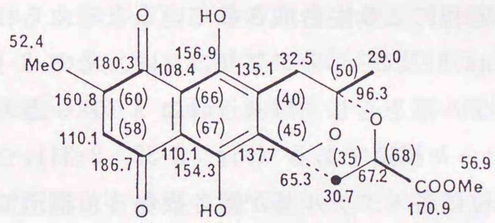


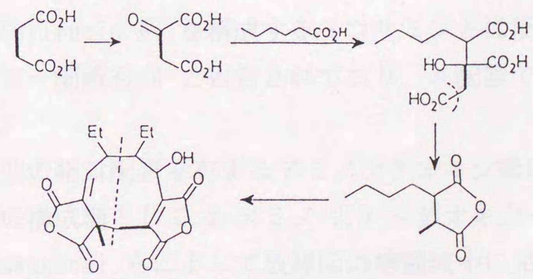
Parenthesized square denote labeling patterns for the first cycle using *CH_3CO_2Na.

Fig. 3-45 Biogenesis of brevetoxin, marticin, and glauconic acid



The labeling patterns resulted from feeding experiments with carbon-13-labeled precursors (A) and assumed building blocks of brevetoxin B (B). The solid lines in (A) indicate the presence of couplings.





Biosynthesis of glauconic acid with heavy bonds to denote ciuplings which arise from the precursor [2,3-^{13}C]-succinate.

以上のことから、fluvirucin A のアグリコンは 5 モルの酢酸分子から生合成されることが明らかになったが、残る 6 個の炭素すなわち 1、2 位及び 2-CH_3 並びに 5、6 位及び 6-CH_3 には標識酢酸による取り込みが認められず、これら炭素原子の生合成起源は酢酸以外の前駆体によるものであることが判明した。これらの炭素原子は、その構造上 1－2－2-CH_3 の C_3 単位と 5－6－6-CH_3 の C_3 単位の 2 つのグループに分類できる。これらは他の fluvirucin 成分の各アグリコンにおいて、fluvirucin A と構造が異なる部分に相当し、これら類縁抗生物質群における「構造可変部分」と見なすことができる。Fluvirucin A の場合これらはいずれも炭素数 3 であり、その生合成起源はプロピオン酸であることが予想された。そこで [1-^{13}C] プロピオン酸の投与実験を行なった結果、1 位のカルボニル炭素並びに 5 位のメチレン炭素に予想通り高い取り込みが認められ (Table 3-22)、両 C_3 単位はいずれもプロピオン酸由来であることが確認された。以上の結果 fluvirucin A のアグリコンは、酢酸 5 分子 (内 1 モルはプロピオン酸に代謝されて取り込まれる)、プロピオン酸 2 分子のポリケチドを経て生合成されることが明らかになった。この場合 11－12－13 位の C_3 単位には外部から投与したプロピオン酸は全く取り込まれておらず、このポリケチドは極めて特異性の高い過程により生合成されていると考えられ興味深い。

一方 fluvirucins B 及び C のアグリコンは、その 2 位にそれぞれエチル基及びヒドロキシエチル基を有し、fluvirucin A の 一方の C_3 単位がいずれも C_4 単位に置き換わった構造である (Fig. 3-32、3-34)。また fluvirucin D_1 では 2 位並びに 6 位に各々エチル基が置き換わった構造であり、これらも C_4 単位ということになる (Fig. 3-39)。これらの C_4 単位の生合成起源が炭素数 3 個のプロピオン酸ではなく、炭素数 4 個の酪酸であろうことは容易に推定される。

第８節　考察

Fluvirucins A、B、C、D_1、D_2、D_3 及び D_4 の 7 種の抗生物質は、アグリコンとして 2、6 及び 10 位にアルキル側鎖を有する 14 員環ラクタムを、また糖として 3-アミノ-3,6-ジデオキシピラノースを有するアミノ配糖体抗生物質であり、それらの構造から今までに発見された多種多様な抗生物質のどのグループにも属さない、全く新しいタイプの抗生物質群である。

これらの化合物群のアグリコン部分は、最終的にいずれも 14 員環ラクタム構造を有することが明らかとなったが、酸素官能基あるいは不飽和結合といった構造解析上、有力な手掛かりとなるような官能基が環上に存在せず、単に飽和炭化水素よりなる比較的単純な構造のため、その構造解析にはかなりの困難を伴った。しかし、これら類縁化合物群の内で最も分子量の小さい fluvirucin A について、種々の化学修飾並びに 2D INADEQUATE 法を始めとする、近年特にその発達が目覚ましい各種の NMR の手法を有効に用いることによりその構造を解明し、更にＸ線結晶構造解析によりその絶対構造を決定した。

一方これらの抗生物質群の構成糖は、その絶対配置がいずれも L 体の 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロース、及びその 4 位水酸基の立体異性体である 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-マンノース、並びにそれらの *N*-(2-フェネチルアミノカルボニル) 置換アミノ糖であり、これら配糖体のアノマー配置はいずれも α であることが明らかになった。

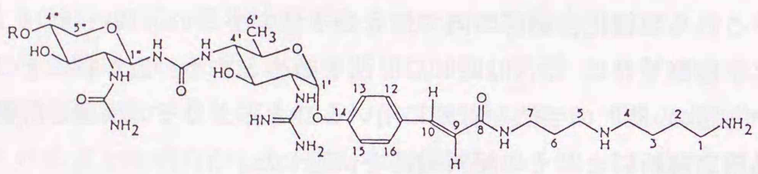
マンノース型の相対配置を有する 3-アミノ-3,6-ジデオキシ糖は nystatin[78] 及び amphotericin B[79] を始めとするポリエン系抗カビ抗生物質群の構成アミノ糖であるミコサミンとして知られている。[80] しかしこれらの場合のミコサミンの絶対配置は fluvirucin D_1 を構成するミコサミンとは反対の D 体であり、またそれらのアノマー配置も β と報告されており、α 配置である fluvirucins との関連性は薄い。

一方、タロース型の絶対配置を有するアミノジデオキシ糖は、*Pneumococcus* type V の多糖類の構成糖として 2-アミノ-2,6-ジデオキシ-L-タロースが、[122] また当研究所の Kawaguchi らによって放線菌の培養液中に見出された、抗腫瘍抗生物質の tallysomycin の構成アミノ糖として 4-アミノ-4,6-ジデオキシ-L-

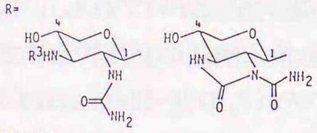
タロースが得られているが、[106,123] 3 位のアミノ体である 3-アミノ-3,6-ジデオキシ-L-タロースが天然から得られたという報告は、抗カビ抗生物質の Sch 38516[124] 以外にはなく、極めて希な糖である。

また、fluvirucins D_3 及び D_4 の構成糖に確認されたウレイド結合を有するアミノ糖を、分子内に有する抗生物質としては、LL-BM123 β、γ_1 及び γ_2、[125] glycocinnasperimicin D、[126] KA-6606 XV 及び XVI、[127] 更に CV-1[128] が知られているが (Fig. 3-46)、フェニチルアミンとのウレイド結合を有するアミノ糖を有する化合物の報告は見当たらない。

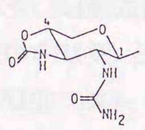
Fig. 3-46 Structures of antibiotics containing ureido bond



LL-BM123 β

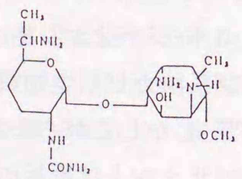


γ_1

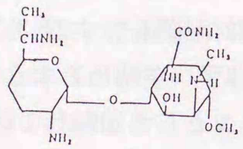


γ_2

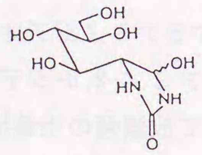
glycocinnasperimicin D



KA-6606 XV



XVI



CV-1

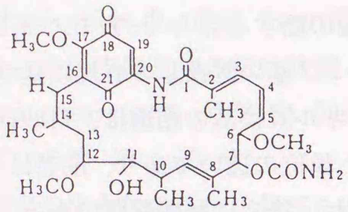
Fluvirucins 各化合物の構造上の相違は、アグリコン部分では 2 位並びに 6 位のアルキル側鎖が、メチル基、エチル基あるいはヒドロキシエチル基となっている点、並びにアミノ糖とのグリコシド結合に関与する水酸基が 3 位あるいは 9 位に存在する点であり、糖部分は 4 種の糖すなわち 3-アミノ-3,6-ジデオキシ糖の 4'位の立体異性並びに 3'位のアミノ基の置換基の有無に基づいている。アグリコン部分の 2 位及び 6 位のアルキル置換基の相違は、fluvirucin A の生合成実験の考察により、C_3 単位と C_4 単位の違いであり、前者はプロピオン酸がその生合成起源であることが証明され、後者は酪酸起源であると考えられている。

分子内にラクタム構造を有する、いわゆるマクロラクタム系抗生物質は、現在までに多くの化合物が見出されており (Fig. 3-47)、そのいずれもが環上に多数の複雑な官能基を有しているのに対し、fluvirucin 抗生物質群のアグリコン部分の環構造は、1 個ないし 2 個の水酸基を有するのみの、比較的単純な構造である。

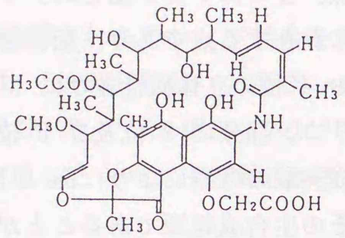
こういった 14 員環マクロラクタム構造を有する抗生物質として、前述の Sch 38516 が極く最近 Schering-Plough 社のグループによって報告された。[124] 本抗生物質は、抗カビ活性を指標としたスクリーニングによって得られ、その構造は *p*-ブロモベンゼンスルホンアミド誘導体のＸ線結晶構造解析により Fig. 3-48 に示すように決定された。Sch 38516 の構造は、fluvirucin B と平面構造は同一であり、記載されている ^{1}H-NMR 及び ^{13}C-NMR スペクトルの値が fluvirucin B と良く類似しており、同一物質の可能性があるが、直接比較するには至っていない。

Fluvirucin 抗生物質群は、Flu-A による MDCK 細胞の変性効果の阻止活性を指標として単離されたが、その構成糖の 3'アミノ基に置換基を有する fluvirucins D_3 及び D_4 の抗ウイルス活性は、置換基のない他の抗生物質に比較し、極めて弱いものであった。一方、遊離の 3'アミノ基を有する化合物でも、そのアミノ基をアセテートで一旦保護すると、抗ウイルス活性は完全に消失する。このことから抗ウイルス活性の発現には、その構成糖の遊離のアミノ基が重要であることが判明した。しかしいずれの抗生物質においても、酸メタノリシスにより得られたそのアグリコン部分には、元の抗生物質の 4 分の 1 から 8 分の 1

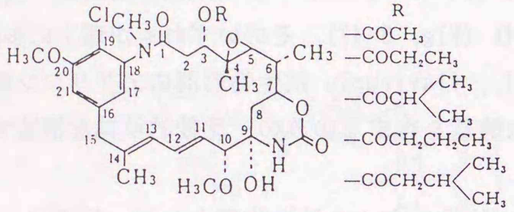
Fig. 3-47 Antibitics containing lactam structure



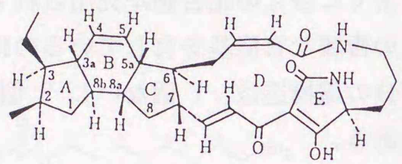
Geldanamycin[129)]



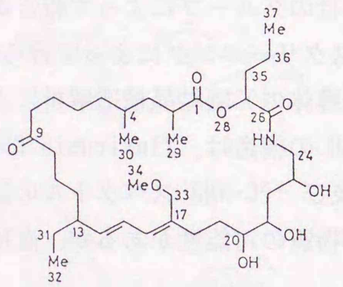
Rifamycin B[130)]



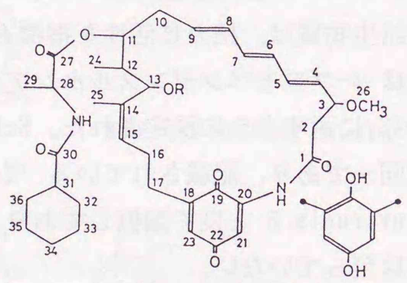
Ansamitocins[131)]



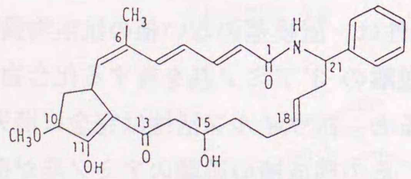
Ikarugamycin[132)]



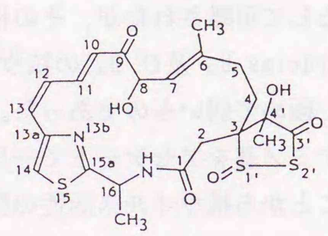
Myxovirescin A[133)]



Mycotrienins[134)]

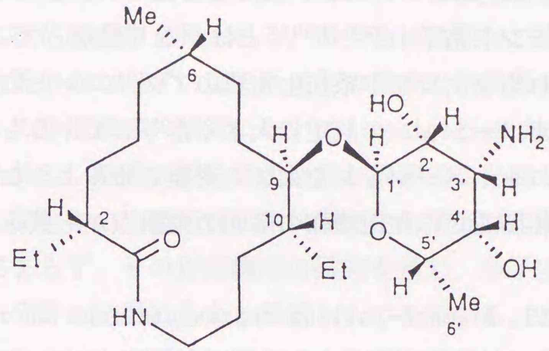


Hitachimycin[135)]



Leinamycin[136)]

Fig. 3-48 Structure of Sch 38516



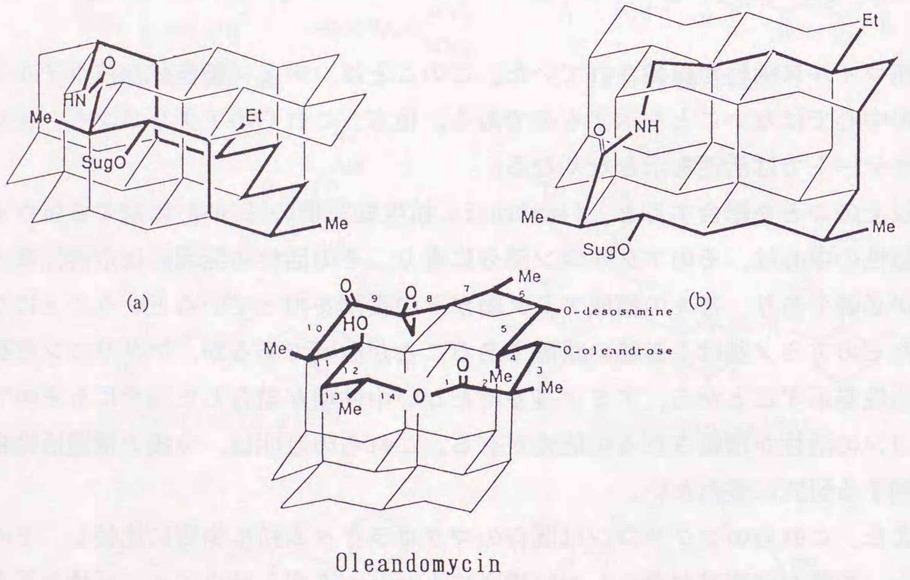
の抗ウイルス活性が保持されていた。このことは、アミノ糖自体が抗ウイルス活性の中心ではないことを示すものである。他方、これらのアグリコンも、各々のアセテートでは活性を示さなくなる。

以上のことを総合すると、fluvirucin 抗生物質群の Flu-A に対する抗ウイルス活性の中心は、そのアグリコン部分に有り、その活性の発現には水溶性基の存在が必要であり、各々の構成アミノ糖がその役割を担っているということになる。またそのアミノ基は、遊離の状態であることが重要であるが、アグリコン自身でも活性を示すことから、アミノ基を持たない中性糖が結合した場合にもそのアグリコンの活性が増幅される可能性が有る。これらの証明は、今後の構造活性相関に関する研究に委ねたい。

また、これらのアグリコンは既存のマクロラクタム抗生物質に比較し、その構造上、複雑な官能基が存在しない構造にもかかわらず、抗ウイルス活性を示すという事実は新しい知見であると共に、その作用機序に興味が持たれる。

第６節で述べたように fluvirucin A アセテートの結晶状態には、主として２種類のコンホマーの存在が示された。しかしいずれのコンホメーションも、oleandomycin 等 14 員環マクロリド系抗生物質のアグリコンに認められる、いわゆる「ダイヤモンド格子」[137,138] とはかなり異なっている (Fig. 3-49)。このことは、これらマクロリド系抗生物質のアグリコン上に認められる多数の官能基がそのコンホメーションの規定に大きく寄与しているものと推察される。Fluvirucins のコンホメーションを大きく変換させるような置換基を導入することは、構造活性相関並びに作用機作の解明の両観点から興味ある課題である。

Fig. 3-49 Diamond-lattice representations of oleandomycin and major (a) and minor (b) conformations of fluvirucin A acetate



結　語

微生物が生産する抗生物質を始めとする代謝産物は、微生物自身の発育機能には必要ではなく、二次代謝産物と称される。微生物は無数の二次代謝産物を作っており、単に抗菌物質のみならず、広く医薬品の重要な供給源である。

また penicillin の作用機序の研究において、penicillin 結合蛋白の生理的意義が解明されると共に、細菌の細胞壁の研究が飛躍的に発展したことにその例が見出せるように、微生物の生理活性二次代謝産物の研究は、単に治療薬の探索といった役割にとどまらず、その作用機序の研究を通じ、分子生物学、更には疾病の生化学といった分野の発展に多大な貢献をしてきている。こういった観点から、微生物の代謝産物中に生理活性物質を求める探索研究は、今後更にその重要性が増してくるものと考えられる。

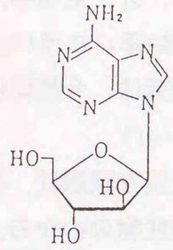
我々、抗生物質の探索研究に従事する薬学研究者の重要な課題は、この医薬品としての無限の可能性を秘めた微生物の無数の二次代謝産物の中から、如何にその目的に合致した物質を選択的に見出すかということに尽きよう。

本研究は、微生物の二次代謝産物中に抗ウイルス抗生物質、その内でも特にヘルペス 1 型ウイルス、並びにインフルエンザＡ型ウイルスに有効な薬剤を求める探索研究の過程で発見された新規な抗生物質、lanthiopeptin、pumilacidins、並びに fluvirucins に関するものである。これらの各化合物は、*in vitro* で既存の抗ウイルス剤に匹敵する、あるいはそれ以上の抗ウイルス活性を示したが、いずれの物質も宿主細胞に対する若干の細胞毒性が認められ、残念ながらこれらをそのまま抗ウイルス剤として開発するには至っていない。しかし、既存の核酸系抗ウイルス剤とは構造の全く異なるこれら新規化合物の発見が、それらの抗ウイルス活性の作用機序の解明、並びに構造活性相関の研究を通じ、今までに得られた物質とは作用機序の全く異なる新規抗ウイルス剤の発見につながるものと確信する。

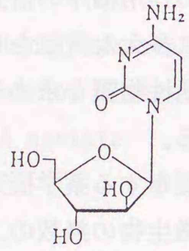
以上述べたこれら新規抗生物質の他に、本探索研究の過程で得られた既知の化合物としては、抗ヘルペス 1 型ウイルス剤のスクリーニング系で vidarabine (ara-A)、cytarabine (ara-C)[139,140] 及び、レトロウイルスの逆転写酵素阻害剤として知られている geldanamycin 類[129,141] (Fig. 0-7) 等が、また抗イン

フルエンザA型ウイルス剤のスクリーニング系では、核酸系抗ウイルス抗生物質である formycin A[142,143,144] (Fig. O-7) 等が単離された。この内 vidarabine は抗ヘルペスウイルス薬として実際に臨床で使用されている。これらの事実は、本研究で用いたスクリーニング系が、医薬品としての抗ウイルス抗生物質発見の、一つの有効な手段であること証明するものである。

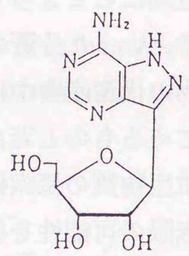
Fig. O-7 Known compounds obtained by our antiviral screening



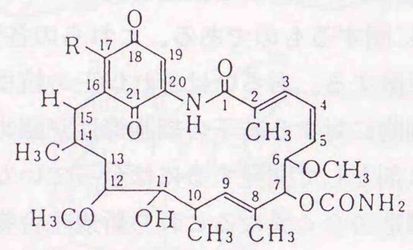
Vidarabine
(Ara-A)



Cytarabine
(Ara-C)



Formycin A



R = —OCH_3 R = —OH

Geldanamycin Des-O-methylgeldanamycin

TLC は、E. Merck 社製 Silica gel 60 プレート No. 5715 及び No. 5744 を使用した。カラムクロマト用シリカゲルは、E. Merck 社製 Silica gel 60 No. 9385 、TLC-Silica gel 60H No. 11695 並びに和光純薬工業社製ワコーゲル C-200 及び C-300 を、逆相系シリカゲルは、E. Merck 社製 LiChroprep RP-18 No.13900 を、更にセルロースは、E. Merck 社製 Cellulose Microcrystalline No.2331 を用いた。中圧クロマトは、Fluid Metering 社製 FMI LAB pump システムにより加圧送液した。HPLC は、分析並びに分取共に Gilson 303 型システムを用いた。IR スペクトルは、JASCO IR-810 により、また UV スペクトルは、JASCO UVIDEC-610 により測定した。^{1}H- 及び ^{13}C-NMR スペクトル は、JEOL JNM-GX400 (^{1}H, 400MHz; ^{13}C, 100MHz) 並びに Varian FT80A (^{1}H, 80MHz) により測定した。マススペクトルの測定は、Hitachi RMU-6MG (in beam EI-MS)、Hitachi M-80B (SIMS) 及び JEOL JMS-AX505H (EI- 及び FAB-MS) により行なった。ガスクロマト及び GC-MS は、各々 Shimadzu GC-4BP-T 及び JEOL JMS-DX300 (EI-MS)により測定した。比旋光度の測定には、JASCO DIP140 を、また CD スペクトルの測定には、JASCO J-500A を用いた。アミノ酸分析は、Hitachi 034-2U アミノ酸分析計、あるいは Waters 社製 PICO TAG 分析システムにより行なった。融点の測定には、柳本社製 Kofler hot stage 型微量融点測定装置 MP-2S を使用し、未補正である。

本論文中以下に示す略号を用いた。

機器分析関係

CD スペクトル: 円二色性スペクトル,
COSY: シフト相関二次元 NMR スペクトル,
DEPT: distortionless enhancement by polarization transfer,
EI-MS: electron impact マススペクトル,
FAB-MS: fast atom bombardment マススペクトル,
GC: ガスクロマトグラフィー,
HPLC: 高速液体クロマトグラフィー,
INADEQUATE: incredible natural abundance double quantum transfer experiment,
INEPT: insensitive nuclei enhanced by polarization transfer,
IR スペクトル: 赤外吸収スペクトル,
mp (dec.): 融点 (分解点),
MS: マススペクトル (M^+: 分子イオン),
NMR スペクトル: 核磁気共鳴スペクトル (d: 二重線, m: 多重線, q: 四重線, s: 一重線, t: 三重線, br.: broad, *J*: 結合定数),
NOE: 核オーバーハウザー効果,
NOESY: NOE 相関二次元 NMR スペクトル,
SIMS: secondary ion マススペクトル,
TLC: 薄層クロマトグラフィー,
UV スペクトル: 紫外吸収スペクトル (sh.: 肩吸収).

試薬、化合物類

Abu: α-アミノ酪酸, Ac_2O: 無水酢酸, AcOH: 酢酸, AcONa: 酢酸ナトリウム,
ATP: アデノシン 5'-三リン酸, Boc: *tert*-ブトキシカルボニル基,
BuOH: ブタノール, $CDCl_3$: 重クロロホルム, CD_3OD: 重メタノール,
Cha: シクロヘキシルアラニン, Co-A: コエンチーム A,
m-CPBA: *m*-クロロ過安息香酸,
DBU: 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン,
DCC: ジシクロヘキシルカルボジイミド, Dha: デヒドロアラニン,

Dhb: β-メチルデヒドロアラニン, DMF: ジメチルホルムアミド,
DMSO($-d_6$): (重)ジメチルスルホキシド, DNS: ダンシル基, D_2O: 重水,
EDTA: エチレンジアミン四酢酸, EtOAc: 酢酸エチル, EtOH; エタノール,
HOBt: 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール, LAL: リジノアラニン,
Lan: *meso*-ランチオニン, MeLan: *threo*-メチルランチオニン,
MeOH: メタノール, MPA: α-メトキシフェニル酢酸,
MsCl: メタンスルホニルクロリド,
MTPA: α-メトキシ-α-トリフルオロメチルフェニル酢酸,
*p*NPP: *p*-ニトロフェニルホスフェート, OBzl: ベンジルオキシ基,
OSu: サクシミドオキシ基, PCC: クロロクロム酸ピリジニウム,
PDC: ジクロム酸ピリジニウム, PrOH: プロパノール,
PTH: フェニルチオヒダントイン, Py.: ピリジン,
TCA 回路: トリカルボン酸回路, TFA: トリフロオロ酢酸,
TMS: テトラメチルシラン, TMS-CHN_2: トリメチルシリルジアゾメタン,
TsOH: *p*-トルエンスルホン酸,
WSC: 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩.

生物活性関係

Flu-A: インフルエンザA型ウイルス,
HSV-1: ヘルペス 1 型ウイルス,
IC_{50}: 50% inhibitory concentration (50% 阻害濃度),
ID_{50}: 50% inhibitory dose (50% 阻止量),
i.m.: intramuscular injection (筋肉内注射),
i.v.: intravenous injection (静脈内注射),
MDCK 細胞: Madin Darby canine kidney 細胞,
MIC: minimum inhibitory concentration (最小生育阻止濃度),
s.c.: subcutaneous injection (皮下注射),
$TCID_{50}$: 50% tissue culture infective dose,
TD_{50}: 50% toxic dose (50% 毒性量).

第１章の実験

Lanthiopeptin の抽出、分離及び精製

Streptoverticillium cinnamoneum L337-2 株の培養液 30ℓ を、シャープレス遠心機により菌体と培養濾液 28ℓ とに分離した。菌体はメタノール 6ℓ にて抽出し、減圧下 2ℓ に濃縮し濾液に混合した。混合液を 6N 塩酸で pH7.0 に調整後、Diaion HP-20（三菱化成社製）3ℓ を加え 2 時間撹拌した。樹脂を濾取し、カラム（70 i.d.×1000mm）に充填した後、脱イオン水 5ℓ 及び 50% メタノール 5ℓ にて順次洗浄後、80% メタノールにて展開溶出した。溶出液は、*Bacillus subtilis* PCI219 に対する生育阻止活性を指標として分画し、活性画分を減圧下濃縮乾固して、褐色の固体 21.3g を得た。本粗抽出物をシリカゲルカラムクロマト（40 i.d.×350mm）に付し、中圧ポンプにより、プロパノール続いて 90% プロパノールにて洗浄した後、80% プロパノールにより活性成分を溶出した。活性画分を合わせ、濃縮、凍結乾燥の後、黄色の固体 8.3g を得た。本固体を更にシリカゲル中圧クロマト（40 i.d.×240mm）に付し、20、40 及び 70% メタノール含有アセトンにて順次展開溶出した。70% メタノール含有アセトン溶出の活性画分に析出した lanthiopeptin の針状晶を濾取し（750mg）、逆相系シリカゲルカラムクロマト（22 i.d.×700mm）にて精製した。カラムをアセトニトリル－0.01M Sørensen リン酸緩衝液（pH7.0）の 1:4 の混合溶媒にて洗浄後、3:7 系にて展開溶出した。活性画分を減圧下濃縮し、Diaion HP-20 により脱塩し、凍結乾燥後 lanthiopeptin の白色粉末 734mg を得た。結晶濾別後の活性画分は、ブロパノール－水の溶媒系によるシリカゲルカラムクロマトを繰り返し、淡黄色の固体 3.98g とした後、逆相系シリカゲルカラムクロマトにて精製し、lanthiopeptin の白色粉末 3.61g を得た。白色粉末はメタノールから結晶化し、lanthiopeptinの無色針状晶を与えた。

IR スペクトル: Fig. 1-3.

UV スペクトル: Fig. 1-4.

^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 1-5.

^{13}C-NMR スペクトル: Fig. 1-6 及び Table 1-5.

その他の物理化学的性状は、本文中 Table 1-4 に記載した。

Lanthiopeptin (1) の完全酸加水分解、並びに構成アミノ酸の分離

1.1g の **1** を 6N 塩酸 50mℓ に溶解し、封管中 110°C で 24 時間加熱した。反応液を室温に冷却後、脱イオン水 100mℓ を加え、ジエチルエーテル 100mℓ で洗浄した。水層を減圧下濃縮乾固し、残渣に脱イオン水を加え濃縮乾固する操作を繰り返し、塩酸を完全に留去した。残渣を Dowex 50W×8 (H^+型、Dow Chemical 社製）のカラム（20 i.d.×350mm）に付し、脱イオン水で洗浄し、塩酸の濃度を段階的に上げて展開溶出した。分画は TLC 上のニンヒドリン発色を指標として行なった。0.2N 塩酸溶出画分からは、*erythro*-β-ヒドロキシアスパラギン酸（**2**、83mg）、アスパラギン酸（77mg）、グルタミン酸（93mg）、グリシン（136mg）及びバリン（87mg）の順に各々単一物質として溶出された。0.5N 塩酸溶出画分からはプロリン（78mg）が、0.7N 塩酸溶出画分からはフェニルアラニン（264mg）が得られた。0.8N 塩酸溶出画分からは、フェニルアラニン、*threo*-メチルランチオニン（**3**）及び *meso*-ランチオニン（**4**）の混合物（498mg）が、また 4N 塩酸溶出画分からは、アルギニン及びリジノアラニン（**5**）の混合物（279mg）が得られた。0.8N 塩酸溶出の混合物 498mg をシリカゲルカラム（15 i.d.×280mm）に付し、ブタノール－酢酸－水の混合溶媒系で展開溶出した。8:1:1 系によりフェニルアラニン（54mg）を溶出除去した後、4:1:1 系により **3** 及び **4** の混合物（341mg）を得た。本混合物を更に同溶媒系 3:1:1 によるセルロースカラムクロマト（22 i.d.×380mm）により分離し、**3**（181mg）及び **4**（33mg）を単離した。アルギニン及び **5** の混合物は、セルロースカラムクロマト（22 i.d.×380mm）に付し、ブタノール－酢酸－水系（14:3:3、3:1:1 続いて 2:1:1）にて順次展開溶出し、単一のアルギニン（115mg）及び **5**（154mg）を得た。

アスパラギン酸:

$[\alpha]_D^{25}$ +19.5° (*c* 0.85, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ +25.4° (*c* 2, 5N HCl).

グルタミン酸:

$[\alpha]_D^{25}$ +26.3° (*c* 1.37, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ +31.8° (*c* 2, 5N HCl).

バリン:

$[\alpha]_D^{25}$ +20.5° (*c* 1.38, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ +28.3° (*c* 1～2, 5N HCl).

プロリン:

$[\alpha]_D^{25}$ -46.3° (*c* 0.84, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ -60.4° (*c* 1～2, 5N HCl).

フェニルアラニン:

$[\alpha]_D^{25}$ -5.0° (*c* 2.15, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ -4.47° (*c* 1～2, 5N HCl).

HPLC: 保持時間 10.7 min; D-Phe, 6.2min.

カラム: TSKgel Enantio L1, 4.6 i.d.×150mm.

移動相: 1mM $CuSO_4$.

流速: 1mℓ/min.

UV 検出波長: 254nm.

温度: 50°C.

erythro-β-ヒドロキシアスパラギン酸 (**2**):

mp 225－245°C. Lit.[14] mp 225－245°C.

$[\alpha]_D^{25.5}$ +43.3° (*c* 0.60, H_2O). Lit.[14] $[\alpha]_D$ +41.4° (*c* 2.43, H_2O).

TLC (10% 酢酸アンモニウム－メタノール－10% アンモニア水 9:10:1):

Rf 0.41; *threo*-DL-HyAsp, Rf 0.53.

Anal. Calcd for $C_4H_7NO_5$: C, 32.22; H, 4.73; N, 9.39.

Found: C, 31.52; H, 4.77; N, 9.08.

in-beam EI-MS *m/z* 149 (M^+).

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 4.48 (1H, d *J*=4Hz), 4.62 (1H, d *J*=4Hz).

^{13}C-NMR (D_2O) δ: 56.9 (d), 69.7 (d), 169.5 (s), 173.9 (s).

threo-メチルランチオニン (**3**):

$[\alpha]_D^{25.5}$ -31.4° (*c* 0.35, 1N HCl). Lit.[15] $[\alpha]_D^{23}$ -36° (*c* 0.22, 1N HCl).

SIMS *m/z* 223 (MH^+).

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 1.49 (3H, d *J*=7Hz), 3.22 (2H, d *J*=4Hz), 3.61 (1H, dq *J*=6, 7Hz), 3.97 (1H, d *J*=6Hz), 4.07 (1H, t *J*=4Hz).

^{13}C-NMR (D_2O) δ: 19.2 (q), 31.9 (t), 41.4 (d), 53.4 (d), 58.3 (d), 166.5 (s), 170.9 (s).

meso-ランチオニン (**4**):

$[\alpha]_D^{25.5}$ ±0° (*c* 0.29, 1N HCl).

SIMS *m/z* 209 (MH^+).

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 3.27 (2H, d *J*=6Hz), 4.28 (1H, d *J*=6Hz).

リジノアラニン (**5**):

$[\alpha]_D^{25.5}$ +15.7° (*c* 2.09, 2N HCl). Lit.[19] $[\alpha]_D^{25}$ +15° (*c* 2, 2N HCl).

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 1.3～2.2 (6H, m), 3.18 (2H, t *J*=7Hz), 3.56 (2H, d *J*=7Hz), 4.07 (1H, t *J*=7Hz), 4.29 (1H, t *J*=7Hz).

^{13}C-NMR (D_2O) δ: 22.3 (t), 25.7 (t), 30.0 (t), 46.8 (t), 48.8 (t), 50.0 (d), 53.6 (d), 170.7 (s), 172.9 (s).

Pumilacidin 複合体の抽出及び精製

Bacillus pumilus M937-B1 株の培養液 245ℓ を、6N 塩酸で pH4.0 に調整しブタノール 145ℓ で抽出した。シャープレス遠心機により有機溶媒層を分離し、減圧下 6ℓ に濃縮した後、酢酸エチル 15ℓ に滴下した。生成した不溶物を濾別し、溶媒を減圧下濃縮乾固し、黄色油状物質約 660g を得た。本油状物質をバッチ法により Diaion HP-20、3ℓ に吸着し、樹脂をカラム（70 i.d.×1000mm）に充填した。カラムを脱イオン水及び 50% メタノール各々 5ℓ で洗浄した後、80% アセトン 20ℓ で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固し、粘着性油状物質 185g を得た。油状物質の 3 分の 1 量をシリカゲルのカラムクロマト（40 i.d.×250mm）に付し、ジクロロメタン－メタノール－28% アンモニア水の混合溶媒系（90:10:1 続いて 80:20:1）にて展開溶出した。TLC（クロロホルム－メタノール－酢酸 18:2:1、Rf 0.68、硫酸発色）を指標として分画し、凍結乾燥の後、pumilacidins の黄色粗粉末 6.9g を得た。残りの試料も同様に精製し、合わせて 20.7g を得た。本粗粉末の全量をシリカゲルのカラムクロマト（40 i.d.×650mm）に付し、ジクロロメタン 3ℓ で洗浄した後、ジクロロメタン－メタノール 49:1、19:1 続いて 9:1 の混合比率の溶媒系で段階的に展開溶出した。Pumilacidins を含む画分を合わせ、濃縮、凍結乾燥し、pumilacidins の淡黄色粉末 16.8g を得た。この粉末を更にジクロロメタン－メタノール－酢酸（99:1:1 続いて 98:2:1）の混合溶媒系によるシリカゲルカラムクロマト（40 i.d.×300mm）に付し、TLC 上単一のスポットを示す画分を集め、濃縮、凍結乾燥し、pumilacidin 複合体の白色粉末 12.5g を得た。

Pumilacidin 各成分の分離

Pumilacidin 複合体の白色粉末 3.7g を、アセトニトリル－0.01M Sørensen リン酸緩衝液（pH7.0）3:7 の混合溶媒系で調製した逆相系シリカゲル中圧カラムクロマト（22 i.d.×700mm）に付した。カラムを同溶媒系で洗浄した後、2:3 続いて 1:1 の混合比率の系で順次展開溶出した。残りの pumilacidin 複合体も同様に処理し、溶出液を HPLC を指標として分画した。各々の画分を減圧下濃縮

し、Diaion HP-20 により脱塩した。本カラムクロマトにより、pumilacidins B 1.5g、A 及び B の混合物 2.14g、A 2.5g、A 及び F の混合物 84mg、A、F、G、E 及び D の混合物 1.66g、E 及び D の混合物 346mg、E、D 及び C の混合物 2.36g、並びに単一の C 159mg を得た。Pumilacidins D、E、F 及び G の単離は、逆相系カラム（山村化学研究所社製 YMC-Pack D-ODS-5、20 i.d.×250mm）を用いた分取 HPLC（移動相 0.1% トリフルオロ酢酸含有 2-プロパノール－アセトニトリル－蒸留水 14:6:5、流速 12mℓ/min）により行なった。溶出画分を減圧下濃縮乾固し、Sephadex LH-20 カラムクロマト（Pharmacia Fine Chemicals 社製、22 i.d.×700mm、メタノール）により精製した後、凍結乾燥した。Pumilacidins D 及び E の混合物 136mg から D 49mg を、更に A、F、G、E 及び D の混合物 509mg から E 54mg、F 27mg 並びに G 20mg を、各々 HPLC 上単一物質として得た。

Pumilacidin A の IR スペクトル: Fig. 2-3.

Pumilacidin B の IR スペクトル: Fig. 2-4.

Pumilacidin A の ^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 2-5.

Pumilacidin 各成分の物理化学的性状は、本文中の Table 2-4 にまとめた。

Pumilacidins A (**12**) 及び B (**13**) 混合物の完全酸加水分解、並びに構成アミノ酸の分離

12 及び **13** の約 7:5 の混合物 1.24g を 6N 塩酸 60mℓ に懸濁し、封管中 110℃ で 16 時間加熱した。反応液を室温に冷却後、脱イオン水 100mℓ を加えジエチルエーテル 100mℓ で洗浄した後、水層を減圧下濃縮乾固した。残渣に脱イオン水を加え、更に濃縮乾固する操作を繰り返し、塩酸を完全に留去した。残渣を少量の脱イオン水に溶解し、Dowex 50W×8（H^+型）のカラム（20 i.d×560mm）に付した。カラムを水洗後、塩酸の濃度を段階的に上げ溶出展開し、TLC を指標として分画を行なった。0.2N 塩酸溶出画分からは、アスパラギン酸 125mg 及びグルタミン酸 85mg が、0.3N 塩酸溶出画分からは、バリン 61mg が各々単一物質として得られた。0.4N 塩酸溶出画分からは、イソロイシン及びロイシンの混合物 550mg が得られた。

アスパラギン酸:

$[\alpha]_D^{27}$ +20.7° (c 2.2, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ +25.4° (c 2, 5N HCl).

グルタミン酸:

$[\alpha]_D^{27}$ +25.6° (c 1.5, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ +31.8° (c 2, 5N HCl).

バリン:

$[\alpha]_D^{26}$ +24.3° (c 1.15, 5N HCl). Lit.[14] $[\alpha]_D^{25}$ +28.3° (c 2, 5N HCl).

ロイシンとイソロイシンの混合物は、光学分割カラムを用いた HPLC により分析した結果、等量の L-ロイシン (保持時間 6.6min) 及び D-ロイシン (7.0min) の他に、L-イソロイシン (7.1min) の存在を確認した (D-イソロイシン 6.2min)。

Pumilacidin 各成分の構成脂肪酸メチルエステルの調製

Pumilacidin 各成分 5mg を 2.5N 無水塩酸メタノール 1mℓ に溶解し、封管中、90℃ で 16 時間加熱した。アルゴン気流下メタノールを留去し、得られた油状の残渣をジエチルエーテル 2mℓ に溶解し、脱イオン水 1mℓ で洗浄した。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、アルゴン気流により溶媒を留去し、得られた残渣をクロロホルムに溶解し、GC 及び GC-MS を測定した。測定結果は、本文中の Table 2-8 にまとめた。

大量の試料の調製のために、**12** 194mg を 2.5N 無水塩酸メタノール 5mℓ に溶解し、同様にメタノリシスを行なった。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマト (15 i.d.×270mm) に付し、ヘキサン－クロロホルム (1:3) の混合溶媒系で洗浄した後、クロロホルムで展開溶出した。TLC (クロロホルム、Rf 0.15、硫酸発色) を指標として分画し、無色油状の **19**、9mg を得た。

同様の分解により、**14** 100mg から **20** 5mg を、**16** 30mg から **21** 2mg を、更に **18** 10mg から **22** 1mg を得た。

19、**20**、**21** 及び **22** の ^{1}H- 及び ^{13}C-NMR スペクトルデータは、それぞれ本文中の Table 2-9、2-10、2-11 及び 2-12 に示した。

Pumilacidins A (**12**) 及び B (**13**) のラクトン結合の開裂

12 100mg を 0.5N 水酸化ナトリウム 6mℓ 及びメタノール 6mℓ の混合溶媒に溶解し、室温で 18 時間攪拌した。反応液を脱イオン水 100mℓ に注ぎ 1N 塩酸

で中和後、Diaion HP-20 にて脱塩した。80% アセトン溶出液を減圧下濃縮乾固し、シリカゲルのカラムクロマト (20 i.d.×.300mm) に付した。クロロホルム－メタノール－酢酸 (98:2:1 続いて 90:10:1) の混合溶媒系にて展開溶出し、TLC を指標として分画した。各々の画分を濃縮、凍結乾燥し、直鎖ペプチド (**23**) 35mg 及びその脱水体 (**24**) 48mg を白色粉末として単離した。

23:

TLC (クロロホルム－メタノール－酢酸 18:2:1): Rf 0.32.

UV λ_{max}^{MeOH} nm (ε): 204 (11700).

24:

TLC: Rf 0.59.

UV λ_{max}^{MeOH} nm (ε): 207 (32700).

同様の操作により、**13** 200mg から **25** 93mg 及び **26** 97mg を得た。

12 150mg を無水トルエン 15mℓ に溶解し、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン 3mℓ を加え 100℃ で 3 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液に酢酸エチル 100mℓ を加え 1N 塩酸 50mℓ×2 並びに脱イオン水 50mℓ×3 で洗浄した。溶媒を減圧下濃縮乾固し、残渣を上記と同様に精製し、**24** 79mg を得た。また未反応の原料と **24** の混合物 53mg を回収した。

13 140mg も同様に処理し、**26** 73mg を得た。

直鎖ペプチド誘導体 (**23**、**24**、**25** 及び **26**) の箱守法による完全メチル化

50% 油性水素化ナトリウム 100mg を窒素気流下、無水テトラヒドロフランで洗浄し、無水ジメチルスルホキシド 3mℓ を加え、100℃ で水素の発生が止むまで加熱攪拌した。室温に冷却後、窒素気流下 **23** 11mg を加え、ヨウ化メチル 1mℓ を滴下し 1 時間攪拌した。反応液を 50mℓの 氷水中に注ぎ、クロロホルム 50mℓ で抽出した。クロロホルム層を水洗後、減圧下濃縮乾固し、残渣を分取 TLC に付した。クロロホルム－メタノール－酢酸 (18:2:1) の混合溶媒系により展開し、Rf 0.85 の単一バンドを抽出し、**27** を得た。

24、**25** 及び **26** も同様にメチル化を行ない **28**、**29** 及び **30** を得た。

27、**28**、**29** 及び **30** の in beam EI-MS の測定結果は、本文中 Fig. 2-7 に示した。

脱水型直鎖ペプチド誘導体（24 及び 26）の酵素分解

24 75mg をジメチルスルホキシド 1.2mℓ 及び 脱イオン水 33mℓ の混合溶媒に懸濁し、パパイン（Sigma 社製、Type IV、No. P-4762）70mg を加え 37℃ で 9 日間静置した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマト（15 i.d.×250mm）に付し、クロロホルム－メタノール－酢酸の混合溶媒系で展開溶出した。98:2:1 系により、原料及びアシルグルタミン酸 31 の混合物 45mg が、更に 90:10:1 系により、ヘキサペプチド（32）22mg が溶出した。前者は更に 18:2:1 系の分取 TLC により分離し、未反応の原料 18mg 並びに 31 24mg を単離した。

31:

TLC（クロロホルム－メタノール－酢酸 18:2:1）: Rf 0.15.

32:

mp 181.5－184℃.

$[\alpha]_D$ +68°（c 0.5, DMF）.

TLC: Rf 0.32.

HPLC: 保持時間 12.7min.

カラム: YMC-Pack R-ODS-5、4.6 i.d.×250mm.

移動相: A: 0.1% トリフルオロ酢酸、B: 0.1% トリフルオロ酢酸含有 2-プロパノール－アセトニトリル（7:3）. A/B: 1/1→3/7、20min.

流速: 1mℓ/min.

UV 検出波長: 210nm.

高分解能 FAB-MS m/z: Calcd for $C_{34}H_{63}N_6O_9$ (MH^+): 699.4657.

Found: 699.4654.

26 75mg を同様に分解し、未反応の原料 17mg の他に アシルグルタミン酸 31 23mg 及びヘキサペプチド 33 18mg を得た。

33:

mp 187－189℃.

$[\alpha]_D$ +40°（c 0.3, DMF）.

TLC: Rf 0.32.

HPLC: 保持時間 10.6min.

高分解能 FAB-MS m/z: Calcd for $C_{33}H_{61}N_6O_9$ (MH^+): 685.4501.

Found: 685.3517.

ヘキサペプチド（32 及び 33）の Edman 分解及び D-アミノ酸酸化酵素消化

32 10mg をエタノール 1.4mℓ、脱イオン水 0.2mℓ 及びトリエチルアミン 0.2mℓ の混合溶媒に溶解し、イソチアン酸フェニル 0.2mℓ を加え、窒素雰囲気下 45℃ で 1 時間加温した。溶媒を減圧下留去し、脱イオン水 1mℓ を加え、過剰の試薬をベンゼン 1mℓ×3 で抽出除去した。水層を減圧下濃縮乾固し、残渣にトリフルオロ酢酸 0.2mℓ を加え、窒素雰囲気下 40℃ で 40 分間加温した。反応液を減圧下濃縮乾固し、残渣に 0.1N 塩酸 1mℓ を加え、ジエチルエーテル 1mℓ×3 で抽出した。エーテル層を減圧下濃縮乾固し、1N 塩酸 1mℓ を加え 80℃ で 10 分間加熱し、生成した PTH-アミノ酸を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水洗後、減圧下濃縮乾固し HPLC により分析した。エーテル抽出後の水層は凍結乾燥した後、一部を D-アミノ酸酸化酵素消化に、残りを次の Edman 分解に用いた。

PTH-アミノ酸の HPLC 分析:

カラム: YMC-Pack R-ODS-5、4.6 i.d.×250mm.

移動相: 0.02% ラウリル硫酸ナトリウム含有アセトニトリル－0.01M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5（79:121）.

流速: 1mℓ/min.

UV 検出波長: 269nm.

各 PTH-アミノ酸の標品は以下の保持時間を示した。

PTH-Asp, 1.6min; PTH-Glu, 2.1min; PTH-Val, 8.3min; PTH-Ile, 12.9min; PTH-Leu, 14.2min.

少量の 32 を PICO TAG アミノ酸分析用微量試験管に移し、同法による完全酸加水分解を行なった（150℃、1 時間）。残渣に少量のトリエチルアミンを加え撹拌した後、減圧下乾燥し、D-アミノ酸酸化酵素（Sigma 社製、Type X、No. 5418）の 0.05M リン酸緩衝液溶液（pH8.0、5mg/mℓ、10μℓ）を加え、37℃ で 2 日間静置した。消化後のアミノ酸組成は、PICO TAG 法により分析した。分析結果は、本文中 Table 2-13 に示した。

Pumilacidin A ヘキサペプチドの合成

Boc-D-Leu-L-Ile-OBzl:

L-Ile-OBzl·TsOH 2.138g をテトラヒドロフラン 13mℓ 及びクロロホルム 13mℓ の混合溶媒に溶解し、氷冷下トリエチルアミン 0.760mℓ、Boc-D-Leu·H_2O 1.382g、HOBt 751mg 及び WSC 1.096g を加え、室温で 48 時間撹拌した。反応液に酢酸エチル 200mℓ を加え、5% クエン酸、脱イオン水、5% 炭酸水素ナトリウム、脱イオン水の順に各々 100mℓ×2 で洗浄し、有機溶媒層を無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧下濃縮乾固した。残渣を 3 回に分け Sephadex LH-20 のカラムクロマトにより精製し、ジペプチド誘導体の白色固体 2.195g を得た (収率 93%)。本固体の一部をヘキサン－アセトンの混合溶媒により結晶化し、ジペプチド誘導体の無色柱状晶を得た。

mp 55.5－57.5℃.

$[\alpha]_D^{26}$ +15° (c 0.8, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{24}H_{38}N_2O_5$: C, 66.33; H, 8.81; N, 6.45.

Found: C, 66.14; H, 8.82; N, 6.36.

アミノ酸分析: Ile 1, Leu 1.11.

Boc-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Ile-OBzl:

ジペプチド誘導体 2.185g に、トリフルオロ酢酸 6mℓ 及びアニソール 2mℓ を加え、0℃ で 1 時間撹拌した。反応液を減圧下濃縮乾固した後、テトラヒドロフラン 20mℓ を加え溶解した。氷冷下トリエチルアミン 0.701mℓ を加えた後、Boc-L-ASP(OBzl)-OSu 1.825g を加え、室温で 48 時間撹拌した。反応液を上記と同様に処理し、得られた生成物をシリカゲルカラムクロマト (30 i.d.×470mm) に付した。ヘキサン－アセトン 4:1 の混合溶媒系にて展開溶出し、トリペプチド誘導体を含む画分を濃縮、凍結乾燥し、トリペプチド誘導体の白色粉末 2.895g を得た (収率 90%)。本粉末の一部をヘキサン－アセトンの混合溶媒により結晶化し、トリペプチド誘導体の無色針状晶を得た。

mp 107.5－110℃.

$[\alpha]_D^{26}$ 0° (c 1.0, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{35}H_{49}N_3O_8$: C, 65.71; H, 7.72; N, 6.57.

Found: C, 65.46; H, 7.71; N, 6.52.

アミノ酸分析: Asp 0.82, Ile 1, Leu 1.05.

Boc-L-Leu-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Ile-OBzl:

トリペプチド誘導体 2.117g を、トリフルオロ酢酸 6mℓ 及びアニソール 2mℓ で処理した後、テトラヒドロフラン 10mℓ、クロロホルム 8mℓ の混合溶媒中、トリエチルアミン 0.474mℓ、Boc-L-Leu·H_2O 904mg、HOBt 510mg 並びに WSC 718mg によりカップリングを行なった。生成物をシリカゲルカラムクロマト (30 i.d.×500mm、ヘキサン－アセトン 17:3 続いて 4:1)、更に Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製し、テトラペプチド誘導体の白色粉末 2.192g を得た (収率 88%)。本粉末の一部を同様に結晶化し、テトラペプチド誘導体の無色針状晶を得た。

mp 138－139℃.

$[\alpha]_D^{26}$ -16° (c 0.1, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{41}H_{60}N_4O_9$: C, 65.40; H, 8.03; N, 7.44.

Found: C, 65.37; H, 8.06; N, 7.42.

アミノ酸分析: Asp 0.78, Ile 1, Leu 1.93.

Boc-D-Leu-L-Leu-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Ile-OBzl:

テトラペプチド 1.347g を、トリフルオロ酢酸 5mℓ 及びアニソール 1.5mℓ で処理した後、トリエチルアミン 0.255mℓ、Boc-D-Leu·H_2O 510mg、HOBt 270mg 並びに WSC 421mg によりカップリングを行なった。生成物をシリカゲル及び Sephadex LH-20 のカラムクロマトにより精製し、ペンタペプチド誘導体の白色粉末 1.379g を得た (収率 89%)。本粉末を結晶化し、ペンタペプチド誘導体の無色プリズム晶を得た。

mp 149－153℃.

$[\alpha]_D^{26}$ -4° (c 1.0, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{47}H_{71}N_5O_{10}$: C, 65.18; H, 8.26; N, 8.09.

Found: C, 64.88; H, 8.29; N, 8.11.

アミノ酸分析: Asp 0.81, Ile 1, Leu 2.81.

Boc-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Ile-OBzl:

ペンタペプチド誘導体 711mg を、トリフルオロ酢酸 4mℓ 及びアニソール 2mℓ で処理した後、トリエチルアミン 0.120mℓ、Boc-L-Leu·H_2O 273mg、HOBt 191mg

並びに WSC 255mg によりカップリングを行なった。生成物をシリカゲル及び Sephadex LH-20 のカラムクロマトにより精製し、ヘキサペプチド誘導体の白色粉末 683mg を得た（収率 85%）。本粉末を結晶化し、ヘキサペプチド誘導体の無色針状晶を得た。

mp 224－225.5℃.

$[\alpha]_D^{26}$ -7.7° (*c* 0.5, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{53}H_{82}N_6O_{11}$: C, 65.01; H, 8.44; N, 8.58.

Found: C, 64.86; H, 8.45; N, 8.45.

アミノ酸分析: Asp 0.85, Ile 1, Leu 3.90.

L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-Ile:

ヘキサペプチド誘導体 107mg を、エタノール 10mℓ に溶解し、5% パラジウム－炭素 30mg を加え、常圧で水素を添加した。室温で 16 時間撹拌後触媒を濾別し、濾液を減圧下濃縮乾固した。生成物にトリフルオロ酢酸 3mℓ 及びアニソール 1mℓ を加え、0℃ で 1 時間撹拌した後、反応液を減圧下濃縮乾固した。反応生成物をシリカゲルカラムクロマト（15 i.d.×250mm、クロロホルム－メタノール－酢酸 95:5:1 続いて 90:10:1）続いて Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製し、**32** に相当するヘキサペプチドの白色粉末 59mg を得た（収率 78%）。本粉末をメタノールから結晶化し、ヘキサペプチドの無色針状晶を得た。

mp 182－184℃.

32 との混融試験: mp 182－184℃.

$[\alpha]_D^{25}$ +73° (*c* 1.0, DMF).

HPLC: 保持時間 12.7min.

高分解能 FAB-MS *m/z*: Calcd for $C_{34}H_{63}N_6O_9$ (MH^+): 699.4657.

Found: 699.4689.

アミノ酸分析: Asp 0.90, Ile 1, Leu 3.78.

Pumilacidin B ヘキサペプチドの合成

C末端のアミノ酸として L-Val-OBzl·TsOH を用い、pumilacidin A ヘキサペプチドの合成と同様の手順により、pumilacidin B ヘキサペプチドを合成した。以下に合成の中間体、並びにヘキサペプチドの諸恒数を示す。

Boc-D-Leu-L-Val-OBzl（収率 95%、無色柱状晶）:

mp 84－85.5℃.

$[\alpha]_D^{26}$ +12° (*c* 1.0, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{23}H_{36}N_2O_5$: C, 65.69; H, 8.63; N, 6.66.

Found: C, 65.64; H, 8.68; N, 6.61.

アミノ酸分析: Val 1, Leu 1.04.

Boc-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Val-OBzl（収率 91%、無色針状晶）:

mp 114.5－116℃.

$[\alpha]_D^{26}$ 0° (*c* 1.0, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{34}H_{47}N_3O_8$: C, 65.26; H, 7.57; N, 6.72.

Found: C, 65.27; H, 7.60; N, 6.63.

アミノ酸分析: Val 1, Leu 1.89.

Boc-L-Leu-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Val-OBzl（収率 85%、無色針状晶）:

mp 132－133.5℃.

$[\alpha]_D^{26}$ -12° (*c* 1.0, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{40}H_{58}N_4O_9$: C, 65.02; H, 7.91; N, 7.58.

Found: C, 64.89; H, 7.92; N, 7.46.

アミノ酸分析: Asp 0.92, Val 1, Leu 1.92.

Boc-D-Leu-L-Leu-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Val-OBzl（収率 86%、無色プリズム晶）:

mp 157－160℃.

$[\alpha]_D^{26}$ -6° (*c* 1.0, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{46}H_{69}N_5O_{10}$: C, 64.84; H, 8.16; N, 8.22.

Found: C, 64.46; H, 8.10; N, 8.19.

アミノ酸分析: Asp 0.82, Val 1, Leu 2.88.

Boc-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp(OBzl)-D-Leu-L-Val-OBzl（収率 85%、無色板状晶）:

mp 206－210℃.

$[\alpha]_D^{26}$ -13° (*c* 0.5, EtOH).

Anal. Calcd for $C_{52}H_{80}N_6O_{11}$: C, 64.71; H, 8.35; N, 8.71.
Found: C, 64.18; H, 8.11; N, 8.14.

アミノ酸分析: Asp 0.87, Val 1, Leu 3.89.

L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-Val (収率 75%、無色針状晶):

mp 187－189℃.

33 との混融試験: mp 187－189℃.

$[\alpha]_D^{25}$ +41° (*c* 0.3, DMF).

HPLC: 保持時間 10.6min.

高分解能 FAB-MS *m/z*: Calcd for $C_{33}H_{61}N_6O_9$ (MH^+): 685.4501.
Found: 685.4510.

アミノ酸分析: Asp 0.87, Val 1, Leu 3.81.

Pumilacidins A (**12**) 及び B (**13**) のラクトン結合の位置の決定

12 及び **13** 各 10mg を無水 THF 中、水素化ホウ素リチウム 10mg と共に 6 時間加熱還流した。氷冷下、反応液に 60% メタノール 10mℓ を滴下攪拌した後、溶媒を減圧下留去した。残渣に脱イオン水 20mℓ を加え、pH2.0 に調整し、酢酸エチル 20mℓ×2 で抽出した。有機溶媒層を水洗後、濃縮、凍結乾燥して得られた還元生成物の固体に 6N 塩酸 1mℓ を加え、封管中 110℃、16 時間加熱加水分解した。

12 及び **13** のアルカリ分解により得られた各々 2 種類の生成物は、分離することなく同様に還元した後、完全酸加水分解を行なった。

加水分解後の各化合物のアミノ酸組成は、本文中 Table 2-14 に示した。

Fluvirucin A の抽出及び精製

Nonomuria tyrrhenii sp. nov. Q464-31 株の培養液 50ℓ をブタノール 20ℓ で抽出した。シャープレス遠心機により分離したブタノール層を減圧下 0.5ℓ に濃縮した後、ヘキサン 3ℓ に滴下し、生成した褐色固体を濾取した (11g)。本粗抽出物をシリカゲルカラムクロマト (40 i.d.×380mm) に付し、酢酸エチル－メタノール 7:3 の混合溶媒系により洗浄した後、ジクロロメタン－28% アンモニア水 10:1 の下層とメタノール 3:2 の混合溶媒系により展開溶出した。TLC を指標として分画した後、減圧下濃縮乾固し、更にシリカゲルカラムクロマト (40 i.d.×320mm) に付した。カラムをアンモニアアルカリ性ジクロロメタン－メタノール 19:1 の混合溶媒系により洗浄し、9:1 系にて展開溶出した。活性画分に析出した fluvirucin A の無色針状晶を濾取した後 (146mg)、母液並びに残りの活性画分を減圧下濃縮し、メタノール 500mℓ に滴下した。生成した沈澱を濾取し、fluvirucin A の淡黄色の固体 2.24g を得た。本固体の一部をメタノールから結晶化し、fluvirucin A を無色針状晶として単離した。

IR スペクトル: Fig. 3-6.

^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-8 及び Table 3-13.

その他の物理化学的性状は、本文中 Table 3-8 に記載した。

Fluvirucin B の抽出及び精製

Nonomuria sp. R359-5 株の培養液 2.6ℓ をブタノール 1.7ℓ で抽出した。ブタノール層を水洗後減圧下濃縮乾固し、褐色の固体 1.6g を得た。本粗抽出物を TLC を指標として、シリカゲルカラムクロマトにより精製し (最初のカラム: 22 i.d.×540mm、クロロホルム－エタノール－14% アンモニア水 5:7:2、2 番目のカラム: 20 i.d.×450mm、アンモニアアルカリ性ジクロロメタン－メタノール 10:1)、fluvirucin B の淡黄色粉末 317mg を得た。本粉末を 2 回に分け Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製した後、メタノールから結晶化し、fluvirucin B の無色針状晶 86mg を得た。

^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-9 及び Table 3-13.

その他の物理化学的性状は、本文中 Table 3-8 に記載した。

Fluvirucin C の抽出及び精製

Nocardiopsis mutabilis R869-90 株の培養液 2.5ℓ をブタノール 1.5ℓ で抽出した。ブタノール層を水洗後減圧下濃縮乾固し、褐色の固体 0.9g を得た。本粗抽出物をシリカゲルカラムクロマト (30 i.d.×440mm) に付し、アンモニアアルカリ性ジクロロメタン－メタノール 9:1 の混合溶媒にて展開溶出した。TLC 上単一のスポットを示す画分を集め、濃縮、凍結乾燥の後、fluvirucin C の淡黄色粉末 127mg を得た。本粉末を Sephadex LH-20 のカラムクロマトにより精製し、fluvirucin C の白色粉末 65mg を得た。本粉末の一部をメタノールから結晶化し、fluvirucin C の無色針状晶を得た。

^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-10 及び Table 3-13.

その他の物理化学的性状は、本文中 Table 3-8 に記載した。

Fluvirucin D_1 の抽出及び精製

Non-sporogenic maduromycete L407-5 株の培養液 20ℓ を、シャープレス遠心機で菌体と濾液 19ℓ とに分離した。濾液に Diaion HP-20、2ℓ を加え 1 時間撹拌した後、樹脂を濾取し水洗した。バッチ法により 80% アセトン 3ℓ×2 で活性成分を溶出し、減圧下 0.5ℓ に濃縮した。菌体はメタノール 5ℓ×3 で抽出し、減圧下メタノールを留去した後、残った水層を上記濃縮液に混合した。本混合液を Diaion HP-20 のカラムクロマト (55 i.d.×500mm) に付し、50% 及び 80% アセトンで展開溶出した。Flu-A に対する抗ウイルス活性を示した画分を減圧下濃縮乾固し、褐色固体 6.55g を得た。本粗精製物を TLC を指標として、シリカゲルカラムクロマトにより順次精製を行なった (最初のカラム: 55 i.d.×800mm、ブロパノール－水 50:1、2 番目のカラム: 40 i.d.×600mm、酢酸エチル－エタノール 3:2、3 番目のカラム: 20 i.d.×450mm、アンモニアアルカリ性ジクロロメタン－メタノール 19:1)。以上の操作で得られた fluvirucin D_1 の淡黄色の粉末870mg を 4 回に分け、Sephadex LH-20 のカラムクロマト (22 i.d.×720mm、メタノール) により精製し、fluvirucin D_1 の白色粉末 770mg を得た。本白色粉末をメタノールから結晶化し、fluvirucin D_1 の無色針状晶 650mg を得た。

^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-11 及び Table 3-13.

その他の物理化学的性状は、本文中 Table 3-8 に記載した。

Fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の抽出、分離及び精製

Non-sporogenic maduromycete R516-16 株の培養液 2.5ℓ をブタノール 2ℓ で抽出した。ブタノール層を水洗後、減圧下濃縮乾固し、fluvirucins D_2、D_3 及び D_4 の複合体の褐色固体 2.25g を得た。本粗抽出物をシリカゲルカラムクロマト (30 i.d.×420mm) に付し、TLC を指標として分画した。アンモニアアルカリ性ジクロロメタン溶出画分から fluvirucins D_3 及び D_4 の混合物 857mgを、アンモニアアルカリ性ジクロロメタン－メタノール 49:1 系の溶出画分からは D_3 137mg、24:1 系の溶出画分からは D_2 66mg、更に 19:1 系の溶出画分からは D_1 342mg を各々単一成分として得た。D_2 の粗粉末 66mg をシリカゲルカラムクロマト (20i.d.×460mm、97:3 系) 続いて Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製した後、メタノールから結晶化し、D_2 の無色針状晶 29mg を得た。D_3 の粗粉末 137mg をシリカゲルカラムクロマト (20 i.d.×460mm、ベンゼン－メタノール 19:1) 続いて Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製し、D_3 の白色粉末 75mg を単離した。本粉末を更にメタノールから結晶化し、D_3 の無色針状晶 34mg を得た。D_3 及び D_4 の混合物 857mg をシリカゲルカラムクロマト (40 i.d.×700mm、ベンゼン－メタノール 19:1) に付し、TLC を指標として分画し、単一の D_4 204mg、D_3 及び D_4 の混合物 311mg、単一の D_3 210mg の 3 つの画分を得た。D_4 の白色粉末 47mg を Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製した後、メタノールから結晶化し、D_4 の無色針状晶 7mg を得た。

D_2 の ^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-12 及び Table 3-13.

D_3 の UV スペクトル: Fig. 3-5.

D_3 の IR スペクトル: Fig. 3-7.

D_3 の ^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-13 及び Table 3-13.

D_4 の ^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-14 及び Table 3-13.

その他の物理化学的性状は、本文中 Table 3-8 に記載した。

Fluvirucin A (**34**) のアセチル化

34 118mg に無水ピリジン 3mℓ 及び 無水酢酸 2mℓ を加え、室温で 16 時間撹拌した。反応液に酢酸エチル 70mℓ を加え、更に氷水 70mℓ を加えた後 1 時間撹拌した。有機溶媒層を分離し、1M 硫酸銅溶液 50mℓ×2、続いて脱イオン水 50mℓ×3 で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧下濃縮乾固し、得られた反応生成物をシリカゲルカラムクロマト（15 i.d.×270mm）に付した。トルエン－メタノール 19:1 の混合溶媒系にて溶出した画分を TLC（トルエン－メタノール 9:1、Rf 0.16、硫酸発色）を指標として分画し、濃縮、凍結乾燥の後 **35** の白色粉末 149mg を得た。**35** はアセトンから結晶化し、無色柱状晶を与えた。

35:

mp 259－261℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1690, 1520, 1225.

EI-MS *m/z*: 554 (M^+), 539 (M^+-CH_3), 525 ($M^+-CH_2CH_3$), 495 (M^+-OAc), 434, 282, 272 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル: Table 3-14.

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-15.

53、**60**、**64**、**73**、**74** 及び **75** についても同様にアセチル化し、それぞれのアセチル体 **54**、**61**、**65**、**76**、**77** 及び **78** を得た。

54:

mp 213－216℃（無色針状晶）.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1650, 1530, 1230.

EI-MS *m/z*: 568 (M^+), 540, 509 (M^+-OAc), 296, 280 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル: Table 3-14.

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-15.

61:

mp 125－129℃（無色プリズム晶）.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1660, 1530, 1240.

EI-MS *m/z*: 626 (M^+), 567 (M^+-OAc), 506, 354, 338, 278, 272 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル: Table 3-14.

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-15.

65:

mp 238－240℃（無色針状晶）.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1745, 1670, 1540, 1230.

EI-MS *m/z*: 582 (M^+), 567 (M^+-CH_3), 553 ($M^+-CH_2CH_3$), 523 (M^+-OAc), 310, 294, 272 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル: Table 3-14.

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-15.

76:

mp 196－197℃（無色板状晶）.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1650, 1535, 1230.

EI-MS *m/z*: 582 (M^+), 554, 523 (M^+-OAc), 310, 293 (100%), 272.

^{1}H-NMR スペクトル: Table 3-14.

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-15.

77:

mp 226－228℃（無色針状晶）.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1745, 1645, 1555, 1225.

EI-MS *m/z*: 687 (M^+), 659, 628 (M^+-OAc), 596, 394, 377, 368, 294, 236 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル: Table 3-14.

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-15.

78:

mp 196－200℃（無色プリズム晶）.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1640, 1560, 1230.

EI-MS *m/z*: 687 (M^+), 659, 628 (M^+-OAc), 596, 567, 395, 377, 368, 294 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル: Table 3-14.

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-15.

Fluvirucin A (**34**) の酸メタノリシス

34 400mg を 5N 無水塩酸メタノール 70mℓ に懸濁し、封管中 90℃ で 3 時間加熱した。室温に冷却後、反応液中に析出した **36** の無色針状晶を濾取し、充分水洗した後、真空乾燥した (220mg)。

36:

mp 230－240℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1640, 1545.

EI-MS *m/z*: 283 (M^+), 268 (M^+-CH_3), 265 (M^+-H_2O), 254 ($M^+-CH_2CH_3$), 55 (100%).

Anal. Calcd for $C_{17}H_{33}NO_2$: C, 72.04; H, 11.73; N, 4.94.
Found: C, 72.32; H, 11.87; N, 4.93.

濾液と洗液とを合わせ、更に脱イオン水を加え 400mℓ とし、ブタノール 200mℓ で抽出した。水層を減圧下 100mℓ に濃縮し、Amberlite IRA-400 (H^+型、Dow Chemical 社製) で中和後、更に 10mℓ に濃縮した。濃縮液を Amberlite CG-50 のカラム (NH_4^+型、20×270mm) に付し、水洗後 0.2N アンモニア水にて展開溶出した。ニンヒドリン反応陽性画分を集め、濃縮、凍結乾燥し、メチルグリコシドの 2 種のアノマー (**37a**、**37b**) の混合物の白色固体 145mg を得た。このアノマー混合物は、クロロホルム－エタノール－28% アンモニア水 (4:7:2) の混合溶媒系を用いた分取 TLC により分離し、Amberlite CG-50 のカラムクロマトの後、主生成物 **37a** 73mg、及び副生成物 **37b** 14mg を各々白色粉末として単離した。

37a:

mp 140－142.5℃.

$[\alpha]_D^{27}$ -95° (*c* 1.0, H_2O).

TLC (クロロホルム－エタノール－28% アンモニア水、4:7:2): Rf 0.55.

EI-MS *m/z*: 178 (MH^+), 146 (M^+-OCH_3), 128 ($M^+-OCH_3-H_2O$), 127 (M^+-MeOH-H_2O), 97, 86, 69, 59, 40 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル (D_2O) δ: 1.26 (3H, d, *J*=6.6Hz, 6'-H_3), 3.09 (1H, br.dd, *J*=3.3, 1.5Hz, 3'-H), 3.41 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.63 (1H, br.t, *J*=1.5Hz, 4'-H), 3.72 (1H, ddd, *J*=3.3, 1.5, 1.1Hz, 2'-H), 4.02 (1H, q, *J*=6.6Hz, 5'-H), 4.80 (1H, d, *J*=1.1Hz, 1'-H).

Anal. Calcd for $C_7H_{15}NO_4$: C, 47.45; H, 8.53; N, 7.90.
Found: C, 46.97; H, 8.47; N, 7.82.

37b:

mp 117－120℃.

$[\alpha]_D^{25}$ +45° (*c* 0.6, H_2O).

TLC: Rf 0.44.

^{1}H-NMR スペクトル (D_2O) δ: 1.29 (3H, d, *J*=6.6Hz, 6'-H_3), 2.98 (1H, br.t, *J*=3.3Hz, 3'-H), 3.42 (1H, br.d, *J*=3.3Hz, 4'-H), 3.55 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.74 (1H, q, *J*=6.6Hz, 5'-H), 3.81 (1H, br.d, *J*=3.3Hz, 2'-H), 4.49 (1H, d, *J*=1.1Hz, 1'-H).

Anal. Calcd for $C_7H_{15}NO_4 \cdot 1/4H_2O$: C, 46.27; H, 8.60; N, 7.71.
Found: C, 46.49; H, 8.38; N, 7.65.

53、**60**、**64**、**73**、**74** 及び **75** についても同様にメタノリシスを行ない、アグリコンとして **53** から **55** を、**60** から **62** を、更に **64**、**73**、**74** 及び **75** から **66** を単離した。また糖部分として、**53**、**60** 及び **73** から **37a** 及び **37b** を、更に **64** から **67a** 及び **67b** を単離した。**74** 及び **75** の各々の構成糖のメチルグリコシド **79** 及び **80** は、各々の水層を 2N アンモニア水で中和後、分取 TLC (アンモニアアルカリ性クロロホルム－メタノール 9:1、**79**: Rf 0.37、**80**: Rf 0.50) 続いて Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製し、それぞれ白色粉末及び無色シロップとして得た。

55:

mp 235－245℃ (無色針状晶).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1640, 1540.

EI-MS *m/z*: 297 (M^+), 282 (M^+-CH_3), 279 (M^+-H_2O), 268 ($M^+-CH_2CH_3$), 115 (100%).

Anal. Calcd for $C_{18}H_{35}NO_2$: C, 72.68; H, 11.86; N, 4.71.
Found: C, 72.21; H, 11.90; N, 4.68.

62:

mp 184－186℃ (無色針状晶).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1640, 1550.

EI-MS *m/z*: 313 (M^+), 298 (M^+-CH_3), 284 ($M^+-CH_2CH_3$), 268 ($M^+-CHOHCH_3$, 100%), 251, 228, 149.

Anal. Calcd for $C_{18}H_{35}NO_3 \cdot 1/4H_2O$: C, 67.99; H, 11.25; N, 4.40.
Found: C, 67.73; H, 11.15; N, 4.39.

66:

mp 235－245℃ (無色針状晶).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1640, 1545.

EI-MS *m/z*: 311 (M^+), 296 (M^+-CH_3), 293 (M^+-H_2O), 282 ($M^+-CH_2CH_3$), 115 (100%).

Anal. Calcd for $C_{19}H_{37}NO_2$: C, 73.26; H, 11.97; N, 4.50.
Found: C, 72.94; H, 12.05; N, 4.46.

67a:

mp 85－87℃ (白色粘着性固体).

$[\alpha]_D^{27}$ -63° (*c* 0.2, MeOH).

TLC: Rf 0.52.

EI-MS *m/z*: 178 (MH^+), 146 (M^+-OCH_3), 128 ($M^+-OCH_3-H_2O$), 116, 73, 59, 40 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル (D_2O) δ: 1.28 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6'-H_3), 2.92 (1H, dd, *J*=9.8, 3.0Hz, 3'-H), 3.29 (1H, t, *J*=9.8Hz, 4'-H), 3.39 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.67 (1H, dq, *J*=9.8, 6.4Hz, 5'-H), 3.88 (1H, dd, *J*=3.0, 1.3Hz, 2'-H), 4.66 (1H, d. *J*=1.3Hz, 1'-H).

Anal. Calcd for $C_7H_{15}NO_4 \cdot H_2O$: C, 43.07; H, 8.78; N, 7.16.
Found: C, 43.30; H, 8.90; N, 6.82.

67b:

無色シロップ.

$[\alpha]_D^{25}$ +85° (*c* 0.6, H_2O).

TLC: Rf 0.44.

^{1}H-NMR スペクトル (D_2O) δ: 1.30 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6'-H_3), 2.77 (1H, dd, *J*=9.8, 3.0Hz, 3'-H), 3.21 (1H, t, *J*=9.8Hz, 4'-H), 3.41 (1H, dq, *J*=9.8, 6.4Hz, 5'-H), 3.51 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.92 (1H, br.d, *J*=3.0Hz, 2'-H), 4.56 (1H, d. *J*=1.1Hz, 1'-H).

79:

mp 141－146℃ (白色粉末).

$[\alpha]_D^{26}$ -43° (*c* 0.7, EtOH).

EI-MS *m/z*: 324 (M^+), 306 (M^+-H_2O), 293 (M^+-OCH_3), 274, 233, 204, 105 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.29 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6'-H_3), 1.35 (1/4H, d, *J*=6.4Hz, 6'-H_3), 2.79 (2H, t, *J*=7.0Hz, 2"-H_2), 3.27 (1H, t, *J*=9.4Hz, 4'-H), 3.37 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.42 (2H, t, *J*=7.0Hz, 1"-H_2), 3.53 (1/4H, s, 1'-OCH_3), 3.65 (1H, dq, *J*=9.4, 6.4Hz, 5'-H), 3.73 (1H, br.s, 2'-H), 3.83 (1H, br.d, *J*=9.4Hz, 3'-H), 4.39 (1/12H, s, 1'-H), 4.56 (1H, br.s, 1'-H), 4.95, 5.38 (1H each, br.s, NH×2), 7.18 (2H, dd, *J*=7.3, 1.5Hz, 4", 8"-H_2), 7.23 (1H, dd, *J*=7.3, 1.5Hz, 6"-H), 7.30 (2H, t, *J*=7.3Hz, 5", 7"-H_2).

高分解能 EI-MS *m/z*: Calcd for $C_{16}H_{24}N_2O_5$ (M^+): 324.1685.
Found: 324.1686.

80:

無色シロップ.

$[\alpha]_D^{26}$ -75° (*c* 0.2, EtOH).

EI-MS *m/z*: 324 (M^+), 306 (M^+-H_2O), 293 (M^+-OCH_3), 274, 233 (100%), 206, 105.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.24 (3H, d, J=6.4Hz, 6'-H_3), 1.31 (3/10H, d, J=6.4Hz, 6'-H_3), 2.79 (2H, t, J=7.0Hz, 2"-H_2), 3.36 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.41 (2H, t, J=7.0Hz, 1"-H_2), 3.55 (3/10H, s, 1'-OCH_3), 3.61 (1H, br.s, 4'-H), 3.65 (1H, br.s, 2'-H), 3.92 (1H, q, J=6.4Hz, 5'-H), 3.95 (1H, br.s, 3'-H), 4.33 (1/10H, s, 1'-H), 4.66 (1H, br.s, 1'-H), 5.54 (2H, br.s, NH×2), 7.19 (2H, dd, J=7.3, 1.5Hz, 4", 8"-H_2), 7.22 (1H, dd, J=7.3, 1.5Hz, 6"-H), 7.29 (2H, t, J=7.3Hz, 5", 7"-H_2).

高分解能 EI-MS m/z: Calcd for $C_{16}H_{24}N_2O_5$ (M^+): 324.1685.
Found: 324.1693.

Fluvirucinine A (**36**) のアセチル化

36 43mg に無水ピリジン 3mℓ 及び 無水酢酸 1mℓ を加え、室温で 16 時間撹拌した後、前記と同様に処理した。得られた反応生成物をシリカゲルカラムクロマト (15 i.d.×260mm、トルエン－メタノール 49:1) に付した。TLC (トルエン－メタノール 9:1、Rf 0.31、硫酸発色) を指標として分画し、濃縮、凍結乾燥の後、**38** の白色粉末 50mg を得た。本粉末をメタノールから結晶化し、**38** の無色針状晶を得た。

38:

mp 230－235℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1730, 1250.

EI-MS m/z: 325 (M^+), 296 (M^+-CH_2CH_3), 282 (M^+-Ac), 265(100%, M^+-AcOH), 250, 236.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.84 (3H, t, J=7.1Hz, 15-H_3), 0.86 (3H, d, J=7.0Hz, 6-CH_3), 1.13 (3H, d, J=7.0Hz, 2-CH_3), 2.09 (3H, s, 3-OAc), 2.41 (1H, dq, J=9.4, 7.0Hz, 2-H), 2.96 (1H, m, 13-H), 3.69 (1H, ddt, J=13.6, 1.8, 8.1Hz, 13-H), 5.03 (1H, dt, J=2.9, 9.4Hz, 3-H), 5.72 (1H, br.s, 13-NH).

55、**62** 及び **66** についても同様にアセチル化を行ない、**56** 及び **63** の無色針状晶並びに **68** の白色粉末を得た。

56:

mp 203－205℃ (無色針状晶).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1725, 1250.

EI-MS m/z: 339 (M^+), 311, 296 (M^+-Ac), 279 (100%, M^+-AcOH), 264, 250.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.82 (3H, t, J=7.5Hz, 15-H_3), 0.85 (3H, d, J=7.0Hz, 6-CH_3), 0.88 (3H, t, J=7.3Hz, 2-$CH_2\underline{CH_3}$), 1.95 (1H, m, 2-H), 2.03 (3H, s, 3-OAc), 2.89 (1H, m, 13-H), 3.76 (1H, ddd, J=13.9, 8.1, 2.2Hz, 13-H), 4.81 (1H, ddd, J=9.5, 5.5, 4.0Hz, 9-H), 5.59 (1H, br.s, 13-NH).

63:

mp 186－188℃ (白色粉末).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1255.

EI-MS m/z: 397 (M^+), 368 (M^+-CH_2CH_3), 354 (M^+-Ac), 338 (M^+-OAc), 337 (M^+-AcOH), 310, 294, 277 (100%, M^+-2AcOH), 250.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.85 (3H, t, J=7.7Hz, 15-H_3), 0.86 (3H, d, J=6.8Hz, 6-CH_3), 1.24 (3H, d, J=6.4Hz, 2-CH(OAc)$\underline{CH_3}$), 2.05, 2.09 (3H each, s, 2-CH($\underline{OAc}$)CH_3, 3-OAc), 2.56 (1H, dd, J=10.6, 3.4Hz, 2-H), 2.89 (1H, dddd, J=13.7, 5.7, 5.1, 1.3Hz, 13-H), 3.70 (1H, ddt, J=13.7, 3.0, 5.7Hz, 13-H), 5.07 (1H, dq, J=3.4, 6.4Hz, 2-$\underline{CH}$(OAc)CH_3), 5.10 (1H, dt, J=1.9, 10.6Hz, 3-H), 6.04 (1H, br.t, J=5.7Hz, 13-NH).

Anal. Calcd for $C_{22}H_{39}NO_5$: C, 66.47; H, 9.89; N, 3.52.
Found: C, 66.46; H, 9.90; N, 3.40.

68:

mp 222－224℃ (無色針状晶).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1725, 1250.

EI-MS m/z: 353 (M^+), 325, 310 (M^+-Ac), 293 (100%, M^+-AcOH), 278, 264.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.81 (3H, t, J=7.5Hz, 15-H_3), 0.82 (3H, t, J=7.5Hz, 6-$CH_2\underline{CH_3}$), 0.88 (3H, t, J=7.5Hz, 2-$CH_2\underline{CH_3}$), 1.95 (1H, m, 2-H), 2.03 (3H, s, 3-OAc), 2.93 (1H, m, 13-H), 3.74 (1H, ddt, J=13.7, 2.1, 8.6Hz, 13-H), 4.81 (1H, dt, J=9.0, 4.7Hz, 9-H), 5.58 (1H, br.s, 13-NH).

Fluvirucinine A (**36**) のジクロム酸ピリジニウムによる酸化

36 64.5mg をジクロロメタン 100mℓ に懸濁し、ジクロム酸ピリジニウム 100mg を加え、室温で 32 時間撹拌した。反応液を濾過後、濃縮乾固し、得られた褐色の粗生成物をシリカゲルカラムクロマト (20 i.d.×33mm、トルエン－メタノール 49:1) に付した。TLC (トルエン－メタノール 9:1、Rf 0.37、硫酸発色) を指標として分画し、濃縮、凍結乾燥の後、**39** 32mg (収率 50%) 及び未反応の **36** 16mg (25%) を各々白色粉末として単離した。**39** はメタノールから結晶化し、無色針状晶を得た。

39:

mp 198－200℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1720.

EI-MS *m/z*: 281 (M^+, 100%), 266 (M^+-CH_3), 252 (M^+-CH_2CH_3).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.83 (3H, t, J=7.3Hz, 15-H_3), 0.89 (3H, d, J=6.0Hz, 6-CH_3), 1.33 (3H, d, J=7.3Hz, 2-CH_3), 2.44, 2.63 (1H each, m, 4-H_2), 3.16, 3.34 (1H each, m, 13-H_2), 3.44 (1H, q, J=7.3Hz, 2-H), 5.90 (1H, br.s, 13-NH).

Anal. Calcd for $C_{17}H_{31}NO_2$: C, 72.55; H, 11.10; N, 4.98.

Found: C, 72.77; H, 11.21; N, 4.91.

Fluvirucinine A (**36**) の箱守法によるメチル化

50% 油性水素化ナトリウム 20g 及び無水 DMSO 200mℓ より調製した、ジメチルスルフィニルアニオンのナトリウム塩の溶液中に、アルゴン気流下 **36** 890mg を加えた後、ヨウ化メチル 90mℓ を滴下し、室温で 1 時間撹拌した。反応液を氷水 500mℓ に注いだ後、クロロホルム 300mℓ で抽出した。クロロホルム層を水洗後、濃縮し、得られた黄色油状物質をシリカゲルの中圧カラムクロマト (40 i.d.×360mm) に付した。ヘキサン－アセトン 19:1 の混合溶媒系で展開溶出し、TLC (トルエン－メタノール 9:1、Rf 0.57、硫酸発色) を指標として分画し、濃縮、凍結乾燥の後、**40** の白色固体 727mg を得た (収率 74%)。

40:

mp 51.5－52℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1630, 1190.

EI-MS *m/z*: 311 (M^+), 296 (100%, M^+-CH_3), 282 (M^+-CH_2CH_3), 280 (M^+-OCH_3).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.84 (3H, t, J=7.3Hz, 15-H_3), 0.90 (3H, d, J=6.9Hz, 6-CH_3), 1.21 (3H, d, J=6.9Hz, 2-CH_3), 3.07 (3H, s, 13-NCH_3), 3.41 (3H, s, 3-OCH_3), 2.47 (1H, ddd, J=13.3, 6.9, 1.2Hz, 13-H), 2.82 (1H, dq, J=9.7, 6.9Hz, 2-H), 3.41 (1H, m, 13-H), 4.32 (1H, m, 3-H).

Anal. Calcd for $C_{19}H_{37}NO_2$: C, 73.26; H, 11.97; N, 4.50.

Found: C, 73.86; H, 12.21; N, 4.50.

Fluvirucinine A 脱水誘導体 (**42**、**43** 及び **44**) の調製

36 200mg を無水ピリジン 10mℓ 中、メタンスルホニルクロリド 1mℓ と室温で 16 時間撹拌した。反応液を氷水 100mℓ に注ぎ、酢酸エチル 70mℓ×2 で抽出した。酢酸エチル層を 1N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水、及び脱イオン水の順に、各々 50mℓ×2 で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下濃縮乾固し、淡褐色の固体 220mg を得た。本生成物をクロロホルム－メタノールの混合溶媒から結晶化し、**41** の無色針状晶を得た。

41:

mp 216－217℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1320, 1160.

EI-MS *m/z*: 265 (100%, M^+-Ms), 250 (M^+-Ms-CH_3), 236 (M^+-Ms-CH_2CH_3).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$-CD_3OD) δ: 0.87 (3H, t, J=7.3Hz, 15-H_3), 0.91 (3H, d, J=6.8Hz, 6-CH_3), 1.27 (3H, d, J=6.8Hz, 2-CH_3), 2.69 (1H, dq, J=10.3, 6.8Hz, 2-H), 3.08 (3H, s, 3-OMs), 2.64, 3.71 (1H each, m, 13-H_3), 4.91 (1H, dt, J=10.3, 4.3Hz, 3-H).

Anal. Calcd for $C_{18}H_{35}NO_4S$: C, 59.80; H, 9.76; N, 3.87; S, 8.87.
Found: C, 59.55; H, 9.77; N, 3.74; S, 9.21.

41 184mg をジメチルホルムアミド 10mℓ に懸濁し、1,8-ジアザビシクロ-[5.4.0]-7-ウンデセン 1.5mℓ を加え、100℃ で 4 時間加熱撹拌した。反応液を室温に冷却後、酢酸エチルを加え 150mℓ とし、1N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水、及び脱イオン水の順に各々 100mℓ×2 で洗浄した。有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下濃縮乾固し、淡黄色の反応生成物を得た。本粗生成物をシリカゲルカラムクロマト (20 i.d.×470mm, トルエン－メタノール 49:1)、並びに分取 TLC (トルエン－メタノール 19:1) により分離精製し、**42** 48.5mg、**43** 29.5mg 及び **44** 17.7mg を各々白色粉末として単離した。

42:

mp 163－165℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1660.

EI-MS m/z: 265 (100%, M^+), 250 (M^+-CH_3), 236 (M^+-CH_2CH_3).

UV $\lambda_{max}^{MeOH}nm$ (ε): 205 (11300).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.86 (3H, t, J=7.3Hz, 15-H_3), 0.88 (3H, d, J=6.8Hz, 6-CH_3), 1.89 (3H, s, 2-CH_3), 1.94 (1H, m, 4-H), 2.20 (1H, ddt, J=13.3, 4.7, 9.0Hz, 4-H), 3.26 (1H, m, 13-H), 3.44 (1H, ddt, J=13.3, 2.1, 6.8Hz, 13-H), 5.40 (1H, ddq, J=9.0, 6.4, 1.3Hz, 3-H), 5.62 (1H, br.s, 13-NH).

Anal. Calcd for $C_{17}H_{31}NO$: C, 76.92; H, 11.77; N, 5.28.
Found: C, 76.97; H, 11.95; N, 5.25.

43:

mp 77－78℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740.

EI-MS m/z: 265 (100%, M^+), 250 (M^+-CH_3), 236 (M^+-CH_2CH_3).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.86 (3H, t, J=7.3Hz, 15-H_3), 0.89 (3H, d, J=6.6Hz, 6-CH_3), 1.24 (3H, d, J=7.3Hz, 2-CH_3), 1.99 (1H, m, 4-H), 2.66 (1H, ddd, J=14.3, 7.8, 3.3Hz, 13-H), 2.70 (1H, dq, J=7.3, 2.2Hz, 2-H), 3.10 (1H, dt, J=8.8, 2.2Hz, 3-H), 3.75 (1H, dt, J=14.3, 8.2Hz, 13-H).

Anal. Calcd for $C_{17}H_{31}NO$: C, 76.92; H, 11.77; N, 5.28.
Found: C, 76.77; H, 11.88; N, 5.28.

44:

mp 172－174℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1660.

EI-MS m/z: 265 (100%, M^+), 250 (M^+-CH_3), 236 (M^+-CH_2CH_3).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.84 (3H, t, J=7.3Hz, 15-H_3), 0.93 (3H, d, J=6.8Hz, 6-CH_3), 1.22 (3H, d, J=6.8Hz, 2-CH_3), 1.83 (1H, dt, J=13.7, 10.3Hz, 5-H), 2.16 (1H, ddd, J=13.7, 4.4, 3.8Hz, 5-H), 2.91 (1H, dq, J=9.0, 6.8Hz, 2-H), 2.97, 3.53 (1H each, m, 13-H_2), 5.42 (1H, ddd, J=11.7, 9.0, 1.9Hz, 3-H), 5.53 (1H, ddd, J=11.7, 10.3, 3.8Hz, 4-H), 5.61 (1H, br.s, 13-NH).

Anal. Calcd for $C_{17}H_{31}NO$: C, 76.92; H, 11.77; N, 5.28.
Found: C, 76.82; H, 11.88; N, 5.17.

<u>Fluvirucinine A の MTPA エステル誘導体 (**45a** 及び **45b**) の調製</u>

36 13mg をジクロロメタン 2mℓ 中、*R*-(+)-2-メトキシ-2-(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロリド 150μℓ、トリエチルアミン 1mℓ 及び 4-ジメチルアミノピリジン 10mg と共に室温で 16 時間撹拌した。反応液に酢酸エチル及び氷水を加え 1 時間撹拌し、酢酸エチル層を分離した。有機溶媒層を 1N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水、及び脱イオン水の順に洗浄した後、濃縮乾固し、粗成生物を得た。本生成物を分取 TLC (トルエン－メタノール 17:3 続いてヘキサン－アセトン 9:1) 及び Sephadex LH-20 のカラムクロマト (11 i.d.×450mm, メタノール) にて精製し、**45a** 15mg の白色粉末を得た。**36** の *S*-(-)-2-メトキシ-2-(トリフルオロメチル)フェニル酢酸エステル (**45b**) も、対応する酸クロリ

ドを用い同様に調製した。

45a:

mp 185－187℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1745, 1295, 1250, 1190, 1165, 1120, 1020, 725.

EI-MS *m/z*: 499 (M^+), 485, 470 (M^+-CH_2CH_3), 456, 266 (100%, M^+-OMTPA), 252, 189.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.84 (3H, d, *J*=7.3Hz, 6-CH_3), 0.85 (3H, t, *J*=7.3Hz, 15-H_3), 1.06 (3H, d, *J*=7.3Hz, 2-CH_3), 2.44 (1H, dq, *J*=8.1, 7.3Hz, 2-H), 2.50 (1H, m, 13-H), 3.59 (3H, s, MTPA-OCH_3), 3.75 (1H, ddt, *J*=13.7, 1.7, 8.1Hz, 13-H), 5.26 (1H, dt, *J*=3.4, 8.1Hz, 3-H), 5.45 (1H, dd, *J*=8.1, 4.3Hz, 13-NH), 7.42 (3H, m, MTPA-phenyl), 7.57 (2H, m, MTPA-phenyl).

45b:

mp 184－186℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1275, 1255, 1170, 1120, 1020, 720.

EI-MS *m/z*: 499 (M^+), 485, 470 (M^+-CH_2CH_3), 456, 266 (100%, M^+-OMTPA), 252, 189.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.79 (3H, d, *J*=6.8Hz, 6-CH_3), 0.84 (3H, t, *J*=7.3Hz, 15-H_3), 1.15 (3H, d, *J*=7.3Hz, 2-CH_3), 2.52 (1H, dq, *J*=8.6, 7.3Hz, 2-H), 2.64 (1H, m, 13-H), 3.54 (3H, s, MTPA-OCH_3), 3.79 (1H, ddt, *J*=13.7, 1.7, 8.1Hz, 13-H), 5.27 (1H, dt, *J*=3.4, 8.6Hz, 3-H), 5.76 (1H, dd, *J*=8.1, 4.3Hz, 13-NH), 7.41 (3H, m, MTPA-phenyl), 7.54 (2H, m, MTPA-phenyl).

Fluvirucinine A の MPA エステル誘導体 (**46a** 及び **46b**) の調製

36 14mg をジクロロメタン 5mℓ 中、*R*-(-)-2-メトキシフェニル酢酸 53mg、4-ジメチルアミノピリジン 10mg 及び WSC 37mg と共に室温で 16 時間撹拌した。反応液を減圧下濃縮し、酢酸エチル 40mℓ を加え、5% クエン酸、脱イオン水、5% 炭酸水素ナトリウム及び脱イオン水の順に各々 30mℓ×2 で洗浄した後、減圧下濃縮乾固した。本生成物を分取 TLC (トルエン－メタノール 17:3) 及び

Sephadex LH-20 のカラムクロマト (11 i.d.×450mm, メタノール) にて精製し、**46a** 11.5mg の白色粉末を得た。**36** の *S*-(+)-2-メトキシフェニル酢酸エステル (**46b**) も、対応する酸を用い同様に調製した。

46a:

mp 220－221℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1740, 1220, 1190, 1180, 1120, 1000, 735.

EI-MS *m/z*: 431 (M^+), 387, 372, 282, 266 (M^+-OMPA), 252, 236, 121 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.62 (3H, d, *J*=6.8Hz, 6-CH_3), 0.83 (3H, t, *J*=7.3Hz, 15-H_3), 1.09 (3H, d, *J*=6.8Hz, 2-CH_3), 2.39 (1H, dq, *J*=8.8, 6.8Hz, 2-H), 2.83 (1H, dddd, *J*=13.5, 7.3, 4.7, 2.1Hz, 13-H), 3.43 (3H, s, MPA-OCH_3), 3.63 (1H, m, 13-H), 4.77 (1H, s, MPA-2-H), 5.05 (1H, dt, *J*=2.7, 8.8Hz, 3-H), 5.70 (1H, br.dd, *J*=7.3, 4.7Hz, 13-NH), 7.35 (3H, m, MPA-phenyl), 7.44 (2H, br.d, *J*=7Hz, MPA-phenyl).

46b:

mp 250－252℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1735, 1210, 1200, 1180, 1115, 1000, 730.

EI-MS *m/z*: 431 (M^+), 387, 372, 282, 266 (M^+-OMPA), 252, 236, 121 (100%).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 0.79 (3H, d, *J*=7.3Hz, 6-CH_3), 0.86 (3H, t, *J*=7.3Hz, 15-H_3), 0.88 (3H, d, *J*=6.8Hz, 2-CH_3), 2.33 (1H, quintet, *J*=6.8Hz, 2-H), 2.66 (1H, dddd, *J*=13.3, 8.6, 4.7, 2.1Hz, 13-H), 3.42 (3H, s, MPA-OCH_3), 3.65 (1H, ddt, *J*=13.3, 2.6, 7.3Hz, 13-H), 4.78 (1H, s, MPA-2-H), 5.00 (1H, dt, *J*=2.6, 6.8Hz, 3-H), 5.62 (1H, br.dd, *J*=7.3, 4.7Hz, 13-NH), 7.37 (3H, m, MPA-phenyl), 7.45 (2H, br.d, *J*=7Hz, MPA-phenyl).

Amphotericin B の酸メタノリシスによるメチル α-D-ミコサミニド (**47a**) の調製

Amphotericin B (Makor Chemicals 社製) 1g を 3N 無水塩酸メタノール 25mℓ に溶解し、2 時間加熱還流した。反応液を室温に冷却後、氷水 100mℓ に注ぎ、減圧下 50mℓ に濃縮し、不溶物を遠心分離した。上清を Amberlite IRA-400 (OH^-型) で中和し、Amberlite CG-50 (NH_4^+型) のカラム (20 i.d.×230mm) に付した。脱イオン水で洗浄した後、0.2N アンモニア水で展開溶出し、TLC を指標として分画後、凍結乾燥し、メチル D-ミコサミドのアノマー混合物の粘着性淡黄色固体 133mg を得た。このアノマー混合物を **67** の場合と同様に分離し、主生成物の **47a** 79mg 及び副生成物の **47b** 21mg を各々白色粉末として単離した。

47a:

$[\alpha]_D^{27}$ +61° (*c* 0.5, MeOH). Lit.[68] $[\alpha]_D^{23}$ +54° (*c* 0.5, MeOH).

^{1}H-NMR スペクトル (D_2O) δ: **67a** と一致した.

47b:

^{1}H-NMR スペクトル (D_2O) δ: **67b** と一致した.

メチル 3-アセトアミド-3,6-ジデオキシ-α-D-マンノピラノシド (**48**)

47a 79mg を無水メタノール 2mℓ に溶解し、無水酢酸 0.25mℓ を加え室温で 2 時間撹拌した。反応液を減圧下濃縮乾固し、シロップ状の **48** 97mg を得た (収率 100%)。

48:

$[\alpha]_D^{27}$ +46° (*c* 0.5, EtOH). Lit.[68] $[\alpha]_D^{22}$ +47° (*c* 0.5, EtOH).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1645, 1550.

EI-MS *m/z*: 220 (MH^+), 201 (MH^+-H_2O), 188 (M^+-OCH_3), 169 (M^+-H_2O -MeOH), 142, 128 (100%), 112, 101, 86, 74, 59.

^{1}H-NMR スペクトル (CD_3OD) δ: 1.26 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6-H_3), 1.99 (3H, s, 3-NAc), 3.34 (1H, t, *J*=9.8Hz, 4-H), 3.36 (3H, s, 1-OCH_3), 3.63 (1H, dq, *J*=9.8, 6.4Hz, 5-H), 3.73 (1H, dd, *J*=3.0, 1.7Hz, 2-H), 4.07 (1H, dd, *J*=9.8, 3.0Hz, 3-H), 4.51 (1H, d, *J*=1.7Hz, 1-H).

メチル 3-アセトアミド-3,6-ジデオキシ-2,4-ジメシロキシ-α-D-マンノピラノシド (**49**)

48 61mg を無水ピリジン 2mℓ 中、メタンスルホニルクロリド 0.25mℓ と共に、室温で 16 時間撹拌した。反応液を 50mℓ の氷水に注ぎ、酢酸エチル 50mℓ×2 で抽出した。酢酸エチル層を 1N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水、及び脱イオン水の順に各々 50mℓ×2 で洗浄し、減圧下濃縮乾固し、褐色の固体を得た。本粗生成物を分取 TLC (クロロホルム－メタノール 9:1、Rf 0.41) 更に Sephadex LH-20 カラムクロマト (11 i.d.×450mm、メタノール) により精製し、凍結乾燥後 **49** の白色粉末 67.5mg を得た (収率 68%)。**49** は、アセトン－ヘキサンの混合溶媒から結晶化し、無色針状晶を与えた。

49:

mp 149－150°C.

$[\alpha]_D^{27}$ +18.6° (*c* 0.5, EtOH).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1650, 1545, 1360, 1330, 1180.

EI-MS *m/z*: 344 (M^+-OCH_3), 296 (M^+-Ms), 236 (100%), 221, 206, 194, 179, 149, 140, 117, 98.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.34 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6-H_3), 1.98 (3H, s, 3-NAc), 3.11, 3.20 (3H each, s, 2-, 4-OMs), 3.43 (3H, s, 1-OCH_3), 3.90 (1H, dq, *J*=9.8, 6.4Hz, 5-H), 4.39 (1H, t, *J*=9.8Hz, 4-H), 4.65 (1H, dd, *J*=9.8, 3.0Hz, 3-H), 4.66 (1H, br.s, 1-H), 4.84 (1H, br.s, 2-H), 4.85 (1H, br.s, 3-NH).

Anal. Calcd for $C_{11}H_{21}NO_9S_2$: C, 35.19; H, 5.64; N, 3.73; S, 17.08.
Found: C, 35.68; H, 5.67; N, 3.73; S, 17.09.

メチル 3-アセトアミド-3,6-ジデオキシ-2,4-ジメシロキシ-α-D-タロピラノシド (**50**)

49 56mg をメチルセロソルブ 20mℓ に溶解し、無水酢酸ナトリウム 100mg を加え、3 日間加熱還流した。反応液を室温に冷却後、減圧下濃縮乾固し、残渣を酢酸エチル及び脱イオン水、各々 50mℓ に分配した。有機溶媒層を水洗後、減圧下濃縮乾固し、残渣に無水ピリジン 3mℓ 及びメタンスルホニルクロリド 0.5mℓ

を加え、室温で 40 時間攪拌した。**49** の場合と同様に処理し、**50** の白色粉末 17mg を得た（収率 31%）。

50:

TLC: Rf 0.50.

mp 167－169℃.

$[\alpha]_D^{27}$ +58° (*c* 0.3, EtOH).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1675, 1525, 1340, 1175.

CD (*c* 0.04, MeOH) $[\theta]^{rt}$(nm): -2800 (212) (negative maximum).

EI-MS *m/z*: 344 (M^+-OCH_3), 296 (M^+-Ms), 236 (100%), 221, 206, 194, 179, 149, 140, 117, 98.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.32 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6-H_3), 2.04 (3H, s, 3-NAc), 3.13, 3.14 (3H each, s, 2-, 4-OMs), 3.42 (3H, s, 1-OCH_3), 4.17 (1H, dq, *J*=0.9, 6.4Hz, 5-H), 4.66 (1H, dt, *J*=8.1, 3.2Hz, 3-H), 4.72 (1H, m, 4-H), 4.77 (1H, m, 2-H), 4.87 (1H, d, *J*=1.7Hz, 1-H), 6.58 (1H, br.d, *J*=8.1Hz, 3-NH).

Anal. Calcd for $C_{11}H_{21}NO_9S_2$: C, 35.19; H, 5.64; N, 3.73; S, 17.08.
Found: C, 35.85; H, 5.73; N, 3.72; S, 16.42.

37a の 3-アセチル-2,4-ジメシル誘導体 (**51**) の合成

37a 125mg を無水メタノール 4mℓ 中、無水酢酸 0.5mℓ により N-アセチル化を行なった。反応生成物は、精製することなく **49** の場合と同様にメシル化し、**51** の白色粉末 110mg を得た。

51:

TLC: Rf 0.50.

mp 168－169.5℃.

$[\alpha]_D^{27}$ -57° (*c* 1.0, EtOH).

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: **50** と一致した.

CD (*c* 0.04, MeOH) $[\theta]^{rt}$(nm): +2800 (212) (positive maximum).

EI-MS *m/z*: 344 (M^+-OCH_3), 296 (M^+-Ms), 236 (100%), 221, 206, 194, 179, 149, 140, 117, 98.

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: **50** と一致した.

Anal. Calcd for $C_{11}H_{21}NO_9S_2$: C, 35.19; H, 5.64; N, 3.73; S, 17.08.
Found: C, 35.77; H, 5.72; N, 3.66; S, 16.28.

37a のバーアセチル体 (**52a**) の合成

37a 12mg を無水ピリジン 3mℓ 中、無水酢酸 0.5mℓ と共に室温で 16 時間攪拌した。得られた反応生成物を、分取 TLC（クロロホルム－メタノール、19:1）並びに Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製し、**52a** の白色粉末 13.8mg を得た。同様な操作により **37b**、**67a** 及び **67b** から、各々 **52b**、**72a** 及び **72b** を得た。

52a:

EI-MS *m/z*: 271 (M^+-MeOH), 267, 211 (M^+-MeOH-AcOH), 200 (M^+-Ac_2O-H), 183 (M^+-AcOH×2), 169 (100%, M^+-Ac_2O-MeOH).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.15 (3H, d, *J*=6.8Hz, 6'-H_3), 1.94 (3H, s, 3'-NAc), 2.15, 2.17 (3H each, s, 2'-, 4'-OAc), 3.37 (3H, s, 1'-OCH_3), 4.09 (1H, dq, *J*=0.9, 6.8Hz, 5'-H), 4.66 (1H, dt, *J*=8.5, 3.6Hz, 3'-H), 4.73 (1H, br.s, 1'-H), 4.78 (1H, br.d, *J*=3.6Hz, 2'-H), 5.09 (1H, dd, *J*=3.6, 0.9Hz, 4'-H), 5.74 (1H, br.d, *J*=8.6Hz, 3'-NH).

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-16.

52b:

EI-MS *m/z*: 271 (M^+-MeOH), 267, 211 (M^+-MeOH-AcOH), 200 (M^+-Ac_2O-H), 183 (M^+-AcOH×2), 169 (100%, M^+-Ac_2O-MeOH).

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.12 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6'-H_3), 1.96 (3H, s, 3'-NAc), 2.16, 2.17 (3H each, s, 2'-, 4'-OAc), 3.38 (3H, s, 1'-OCH_3), 4.06 (1H, dq, *J*=1.3, 6.4Hz, 5'-H), 4.39 (1H, dt, *J*=8.6, 3.4Hz, 3'-H), 4.65 (1H, br.s, 1'-H), 4.93 (1H, br.d, *J*=3.4Hz, 2'-H), 5.22 (1H, dd, *J*=3.4, 1.3Hz, 4'-H), 6.09 (1H, br.d, *J*=8.6Hz, 3'-NH).

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-16.

72a:

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.20 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6'-H_3), 1.91 (3H, s, 3'-NAc), 2.06, 2.15 (3H each, s, 2'-, 4'-OAc), 3.37 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.91 (1H, dq, *J*=10.3, 6.4Hz, 5'-H), 4.60 (1H, ddd, *J*=10.3, 9.0, 3.0Hz, 3'-H), 4.64 (1H, d, *J*=1.3Hz, 1'-H), 4.77 (1H, t, *J*=10.3Hz, 4'-H), 4.92 (1H, dd, *J*=3.0, 1.3Hz, 2'-H), 5.62 (1H, br.d, *J*=9.0Hz, 3'-NH).

^{13}C-NMR スペクトル: Table 3-18.

72b:

^{1}H-NMR スペクトル ($CDCl_3$) δ: 1.28 (3H, d, *J*=6.4Hz, 6'-H_3), 1.91 (3H, s, 3'-NAc), 2.06, 2.15 (3H each, s, 2'-, 4'-OAc), 3.37 (3H, s, 1'-OCH_3), 3.84 (1H, dq, *J*=10.3, 6.4Hz, 5'-H), 4.32 (1H, ddd, *J*=10.3, 9.0, 3.0Hz, 3'-H), 4.51 (1H, d, *J*=<1Hz, 1'-H), 4.72 (1H, t, *J*=10.3Hz, 4'-H), 4.96 (1H, dd, *J*=3.0, 0.7Hz, 2'-H), 5.37 (1H, br.d, *J*=9.0Hz, 3'-NH).

Fluvirucinine B (**55**) のクロロクロム酸ピリジニウムによる酸化

55 5mg を ジクロロメタン 1mℓ に溶解し、クロロクロム酸ピリジニウム 5mg を加え、室温で 16 時間撹拌した。反応液を濾過後、濃縮乾固し、得られた褐色の粗生成物を分取 TLC (トルエン－メタノール 9:1) 及び Sephadex LH-20 のカラムクロマト (11 i.d.×450mm, メタノール) にて精製し、**57** の白色粉末 4.7mg を得た。

57:

mp 222－226℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1700.

EI-MS *m/z*: 295 (M^+, 100%), 280 (M^+-CH_3), 267, 252, 238, 224, 210, 185, 169, 128.

^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-31.

66 35mg も同様に反応し、**69** の白色粉末 31mg を得た。

69:

mp 222－226℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1700.

EI-MS *m/z*: 309 (M^+, 100%), 294 (M^+-CH_3), 281, 266, 252, 238, 224, 213, 185, 169, 128.

57 の Baeyer-Villiger 反応によるラクトン体 (**58**) の合成

57 4mg を ジクロロメタン 1mℓ に溶解し、*m*-クロル過安息香酸 10mg を加え、室温で 7 日間撹拌した。反応液にジクロロメタン 10mℓ を加え、1N 水酸化ナトリウム、脱イオン水の順に各々 5mℓ×2 で洗浄した後、減圧下濃縮乾固した。残渣を上記 **57** の場合と同様に分離精製し、2.6mg (66%) の **57** を回収すると共に、**58** の白色粉末 0.7mg を得た (収率 17%)。

58:

mp 166－169℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1720, 1265.

EI-MS *m/z*: 311 (M^+, 100%), 294, 283, 252, 224, 213, 196, 185, 182, 169, 154, 128.

69 35mg も同様に反応し、23mg (66%) の **69** を回収すると共に、**70** の白色粉末 5.1mg を得た (14%)。

70:

mp 186－190℃.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 1720, 1260.

EI-MS *m/z*: 325 (M^+, 100%), 308, 297, 266, 238, 227, 199, 182, 169, 154, 128.

^{1}H-NMR スペクトル: Fig. 3-38.

58 の開環エステル誘導体 (**59**) の合成

58 0.5mg を 0.5N メタノール性水酸化カリウム 0.2mℓ に溶解し、封管中 70℃ で 30 分間加熱した。反応液を室温に冷却後、脱イオン水 5mℓ を加え、1N 塩酸水で pH5.0 に調整し、ブタノールで抽出した。ブタノール層を減圧下濃縮

乾固した後、残渣をメタノール－ベンゼン 1:1 の混合溶媒 0.5mℓ に溶解し、トリメチルシリルジアゾメタンの 10% ヘキサン溶液 0.1mℓ を加え、室温で 30 分間撹拌した。溶媒を減圧下濃縮乾固し、無色油状の **59** 0.4mg を得た。

59:

IR $\nu_{max}^{neat}cm^{-1}$: 1740, 1260, 1170.

EI-MS *m/z*: 343 (M^+), 325 (M^+-H_2O), 314 ($M^+-CH_2CH_3$), 312 (M^+-OCH_3), 294, 284, 270, 242, 227, 224, 199, 187 (100%), 157, 116.

70 2mg も同様に反応し、無色油状の **71** 1.8mg を得た。

71:

IR $\nu_{max}^{neat}cm^{-1}$: 1740, 1260, 1170.

EI-MS *m/z*: 357 (M^+), 339 (M^+-H_2O), 328 ($M^+-CH_2CH_3$), 298 (M^+-OCH_3), 284, 256, 241, 238, 213, 200, 187 (100%), 172, 116.

Fluvirucin D_3 (**74**) の完全酸加水分解

74 55mg を 6N 塩酸 3mℓ、トリフルオロ酢酸 0.5mℓ 及びジオキサン 1.5mℓ の混合液に懸濁し、110℃ で 16 時間加熱した。反応液を室温に冷却後、脱イオン水 50mℓ に注ぎ、ジエチルエーテル 30mℓ×2 で洗浄した。水層を 6N 水酸化ナトリウムで pH 10.0 に調整し、ジエチルエーテル 30mℓ×2 で抽出した。エーテル層を水洗し、1N 塩酸数滴を加えた後、減圧下濃縮乾固した。残渣を Sephadex LH-20 カラムクロマト (11 i.d.×450mm、50% メタノール) にて精製し、2-フェネチルアミン 1mg を得た。

EI-MS *m/z*: 121 (M^+), 104 (100%), 91, 81, 77, 69, 57, 41.

IR $\nu_{max}^{KBr}cm^{-1}$: 3400, 2950, 2780, 2450, 1600, 1455, 1145, 940.

^{1}H-NMR スペクトル (DMSO-d_6) δ: 2.94 (2H, br.s), 3.06 (2H, br.s), 7.27 (5H, br.s), 8.35 (2H, br.s).

^{13}C 標識酢酸及びプロピオン酸添加による fluvirucin A の醗酵生産

Nonomuria tyrrhenii sp. nov. Q464-31 株を Table 3-5 に示す組成の培地を用い、32℃ で 4 日間生育させた後、500mℓ の三角フラスコ中、同一組成の培地 100mℓ に接種し 28℃、180rpm で回転振盪培養した。^{13}C 標識酢酸及びプロピオン酸を蒸留水に溶解し ([1-^{13}C] 及び [2-^{13}C] 標識酢酸並びに [1-^{13}C] 標識プロピオン酸: 1g/6.3mℓ、[1,2-$^{13}C_2$] 標識酢酸: 1g/9.5mℓ)、各々別途に 1mℓ ずつを培養 48 時間、60 時間及び 72 時間経過後に各フラスコに分注した。更に 24 時間培養を継続した後、fluvirucin A の標識体の抽出及び精製を行なった。Fluvirucin A の生産は約 90μg/mℓ であった。

引用文献

1) G.B.Elion, P.A.Furman, J.A.Fyfe, P.de Miranda, L.Beauchamp and H.J. Schaeffer, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **74**, 5716 (1977).
2) H.J.Schaeffer, L.Beauchamp, P.de Miranda, G.B.Elion, D.J.Bauer and P.Collins, *Nature* (London), **272**, 583 (1978).
3) N.Naruse, O.Tenmyo, K.Tomita, M.Konishi, T.Miyaki, H.Kawaguchi, K. Fukase, T.Wakamiya and T.Shiba, *J.Antibiot.*, **42**, 837 (1989).
4) T.Wakamiya, K.Fukase, N.Naruse, M.Konishi and T.Shiba, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4771 (1988).
5) K.Fukase, T.Wakamiya, N.Naruse, M.Konishi and T.Shiba, in Peptide Chemistry *1988*, p.221 (ed.by M.Ueki, Protein Research Foundation, Osaka, 1989).
6) N.Naruse, O.Tenmyo, S.Kobaru, H.Kamei, M.Konishi, T.Miyaki and T. Oki, *J.Antibiot.*, **43**, 267 (1990).
7) N.Naruse, O.Tenmyo, K.Kawano, K.Tomita, N.Ohgusa, T.Miyaki, M. Konishi and T.Oki, *J.Antibiot.*, accepted.
8) N.Naruse, T.Tsuno, Y.Sawada, M.Konishi and T.Oki, *J.Antibiot.*, accepted.
9) N.Naruse, M.Konishi, T.Oki, Y.Inouye and H.Kakisawa, *J.Antibiot.*, accepted.
10) S.T.Williams, R.Locci, J.Vickers, G.M.Schofield, P.H.A.Sneath and A. M.Mortimer, *J.Gen.Microbiol.*, **131**, 1681 (1985).
11) E.Baldacci and R.Locci, in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p.829 (ed.by R.E.Buchanan and N.E.Gibbons, the Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974).
12) E.B.Shirling and D.Gottlieb, *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **18**, 69 (1968).
13) E.B.Shirling and D.Gottlieb, *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **18**, 279 (1968).
14) D.T.Pegg, D.M.Doddrell and M.R.Bendall, *J.Chem.Phys.*, **77**, 2745 (1982).

15) R.M.C.Dawson, D.E.Elliott, W.H.Elliott and K.M.Jones (ed.by), in Data for Biochemical Research, 2nd Ed. (The University Press, Oxford, 1968).
16) T.Wakamiya, Y.Oda, K.Fukase and T.Shiba, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **58**, 536 (1985).
17) Z.Bohak, *J.Biol.Chem.*, **239**, 2878 (1964).
18) A.Patchornic and M.Sokolovsky, *J.Am.Chem.Soc.*, **86**, 1860 (1964).
19) A.C.Tas and R.J.C.Kleipool, *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, **9**, 360 (1976).
20) T.Okuda and H.Zahn, *Chem.Ber.*, **98**, 1164 (1965).
21) 竹本憲司、宮坂裕美子、石塚秀夫、須原康次、丸山博巳 (Hoffmann-La Roche)、公開特許公報、昭 55-157544 (1980).
22) H.Kessler, S.Steuernagel, D.Gillessen and T.Kamiyama, *Helv.Chim. Acta*, **70**, 726 (1987).
23) H.Kessler, S.Steuernagel, M.Will, G.Jung, R.Kellner, D.Gillessen and T.Kamiyama, *Helv.Chim.Acta*, **71**, 1924 (1988).
24) R.G.Benedict, W.Dvonch, O.L.Shotwell, T.G.Pridham and L.A. Lindenfelser, *Antibiot.Chemother.*, **2**, 591 (1952).
25) E.Gross, *Adv.Exp.Med.Biol.*, **86B**, 131 (1977).
26) E.Gross and J.L.Morell, *J.Am.Chem.Soc.*, **93**, 4634 (1971).
27) E.Gross, H.H.Kiltz and E.Nebelin, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, **354**, 810 (1973).
28) H.Allgaier, G.Jung, R.G.Werner, U.Schneider and H.Zähner, *Angew. Chem.Int.Ed.Engl.*, **24**, 1051 (1985).
29) H.Allgaier, G.Jung, R.G.Werner, U.Schneider and H.Zähner, *Eur.J. Biochem.*, **160**, 9 (1986).
30) R.Kellner, G.Jung, T.Hörner, H.Zähner, N.Schnell, K.-D.Entian and F.Götz, *Eur.J.Biochem.*, **177**, 53 (1988).
31) R.Kellner, G.Jung, M.Josten, C.Kaletta, K.-D.Entian and H.-G.Sahl, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **28**, 616 (1989).

32) O.L.Shotwell, F.H.Stodola, W.R.Michael, L.A.Lindenfelser, R.G. Dworschack and T.G.Pridham, *J.Am.Chem.Soc.*, **80**, 3912 (1958).
33) J.K.Kettenring, A.Malabarba, K.Vékey and B.Cavalleri, *J.Antibiot.*, **43**, 1082 (1990).
34) Y.Kido, T.Hamakado, T.Yoshida, M.Anno, Y.Motoki, T.Wakamiya and T. Shiba, *J.Antibiot.*, **36**, 1295 (1983).
35) T.Wakamiya, Y.Ueki, T.Shiba, Y.Kido and Y.Motoki, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 665 (1985).
36) T.Wakamiya, Y.Ueki, T.Shiba, Y.Kido and Y.Motoki, *Bull.Chem.Soc. Jpn.*, **63**, 1032 (1990).
37) F.Hayashi, K.Nagashima, Y.Terui, Y.Kawamura, K.Matsumoto and H. Itazaki *J.Antibiot.*, **43**, 1421 (1990).
38) D.K.Stone, X.-S.Xie and E.Racker, *J.Biol.Chem.*, **259**, 2701 (1984).
39) S.Nakamura and E.Racker, *Biochemistry*, **23**, 385 (1984).
40) E.Racker, C.Riegler and M.Abdel-Ghany, *Cancer Res.*, **44**, 1364 (1984).
41) J.Navarro, J.Chabot, K.Sherrill, R.Aneja, S.A.Zahler and E.Racker, *Biochemistry*, **24**, 4645 (1985).
42) S.-Y.Choung, T.Kobayashi, K.Takemoto, H.Ishitsuka and K.Inoue, *Biochim.Biophys.Acta*, **940**, 180 (1988).
43) S.-Y.Choung, T.Kobayashi, J.Inoue, K.Takemoto, H.Ishitsuka and K. Inoue, *Biochim.Biophys.Acta*, **940**, 171 (1988).
44) S.Macura and R.R.Ernst, *Mol.Phys.*, **41**, 95 (1980).
45) 若松馨、東島勉、宮澤辰雄、丁世栄、小林哲幸、井上圭三、第28回 NMR 討論会プログラム、183 頁 (1989).
46) A.H.Whiting, *Biochim.Biophys.Acta*, **243**, 332 (1971).
47) T.Isohata, K.Abe, S.Homma, M.Fujimaki and S.Arai, *Agric.Biol.Chem.*, **47**, 2633 (1983).
48) M.Friedman, in Protein Crosslinking: Nutritional and Medical Consequences, p.1 (Plenum Press, 1977).

49) D.Fujimoto, M.Hirama and T.Iwashita, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **103**, 1378 (1081).
50) M.J.Horn, D.B.Jones and S.J.Ringel, *J.Biol.Chem.*, **138**, 141 (1941).
51) M.J.Horn, D.B.Jones and S.J.Ringel, *J.Biol.Chem.*, **144**, 87 (1942).
52) L.Ingram, *Biochim.Biophys.Acta*, **224**, 263 (1970).
53) C.Nishio, S.Komura and K.Kurahashi, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **116**, 751 (1983).
54) N.Schnell, K.-D.Entian, U.Schneider, F.Götz, H.Zähner, R.Kellner and G.Jung, *Nature* (London), **333**, 276 (1988).
55) S.Banerjee and J.N.Hansen, *J.Biol.Chem.*, **263**, 9508 (1988).
56) G.W.Buchman, S.Banerjee and J.N.Hansen, *J.Biol.Chem.*, **263**, 16260 (1988).
57) C.Kaletta and K.-D.Entian, *J.Bacteriol.*, **171**, 1597 (1989).
58) N.Schnell, K.-D.Entian, F.Götz, T.Hörner, R.Kellner and G.Jung, *FEMS Microbiol.Lett.* **58**, 263 (1989).
59) R.E.Gordon, W.C.Heynes and C.H.Pang, The genus *Bacillus*. In Agricultural handbook No.427., 1973. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
60) T.Gibson and R.E.Gordon, in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p.529 (ed.by R.E.Buchanan and N.E.Gibbons, the Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974).
61) J.R.Norris, R.C.W.Berkeley, N.A.Logan and A.G.O'Donnell, in the Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, volume II, p.1711 (ed.by M.P.Starr, H.Stolp, H.G. Truper, A.Balows and H.G.Schlegel, Springer-Verlag, Berlin, 1981).
62) C.McLaren, M.N.Ellis and G.A.Hunter, *Antiviral Res.*, **3**, 223 (1983).
63) G.Saccomani, H.B.Stewart, D.Shaw, M.Lewin and G.Sachs, *Biochim. Biophys.Acta*, **465**, 311 (1977).
64) E.D.Parish and D.H.Miles, *J.Org.Chem.*, **38**, 1223 (1973).

65) H.Nakamura, J.Kobayashi, Y.Nakamura, Y.Ohizumi, T.Kondo and Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4319 (1986).
66) S.Hakomori, *J.Biochem.*, **55**, 205 (1964).
67) M.Oka, K.Yaginuma, K.Numata, M.Konishi, T.Oki and H.Kawaguchi, *J. Antibiot.*, **41**, 1338 (1988).
68) A.Kakinuma, M.Hori, M.Isono, G.Tamura and K.Arima, *Agric.Biol.Chem.*, **33**, 971 (1969).
69) A.Kakinuma, M.Hori, H.Sugino, I.Yoshida, M.Isono, G.Tamura and K. Arima, *Agric.Biol.Chem.*, **33**, 1523 (1969).
70) T.Ito and H.Ogawa, *Bull.Agric.Chem.Soc.Jpn.*, **23**, 536 (1959).
71) D.W.Thomas and T.Ito, *Tetrahedron*, **25**, 1985 (1969).
72) A.Kakinuma, G.Tamura and K.Arima, *Experientia*, **24**, 1120 (1968).
73) K.Arima, A.Kakinuma and G.Tamura, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **31**, 488 (1968).
74) Y.Kameda, K.Matsui, H.Kato, T.Yamada and H.Sagai, *Chem.Pharm.Bull.*, **20**, 1551 (1972).
75) K.Hosono and H.Suzuki, *J.Antibiot.*, **36**, 674 (1983).
76) K.Hosono and H.Suzuki, *J.Antibiot.*, **36**, 679 (1983).
77) 細野邦昭、鈴木英雄（工業技術院）、公開特許公報、昭 62-192303 (1987).
78) J.D.Dutcher, D.R.Walters and O.Wintersteiner, *J.Org.Chem.*, **28**, 995 (1963).
79) W.Mechlinski, C.P.Schaffner, P.Ganis and G.Avitabile, *Tetrahedron Lett.*, **11**, 3873 (1970).
80) 田中信男、中村昭四郎著、抗生物質大要　第３版　化学と生物活性、127 頁、東京大学出版会、東京 (1982).
81) E.B.Shirling and D.Gottlieb, *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **16**, 313 (1966).
82) R.E.Gordon, S.K.Mishra and D.A.Barnett, *J.Gen.Microbiol.*, **109**, 69 (1978).
83) M.P.Lechevalier, *J.Lab.Clin.Med.*, **71**, 934 (1968).

84) M.P.Lechevalier, C.D.Bievre and H.Lechevalier, *Biochem.Syst.Ecol.* **5**, 249 (1977).
85) M.D.Collins, T.Pirouz, M.Goodfellow and D.E.Minnikin, *J.Gen. Microbiol.*, **100**, 221 (1977).
86) K.Uchida and K.Aida, *J.Gen.Appl.Microbiol.*, **25**, 169 (1979).
87) D.E.Minnikin, *J.Gen.Microbiol.*, **88**, 200 (1975).
88) M.Goodfellow, E.Stackebrandt and R.M.Kroppenstedt, in Biology of Actinomycetes *1988*, p.233 (ed.by Y.Okami, T.Beppu and H.Ogawara, Japan Scientific Society Press, 1988).
89) J.Meyer, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.4, p.2511 (ed.by S.T.Williams, M.E.Sharpe and J.G.Holt, the Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1989).
90) S.B.Christensen, H.S.Allaudeen, M.R.Burke, S.A.Carr, S.K.Chung, P. DePhillips, J.J.Dingerdissen, M.DiPaolo, A.J.Giovenella, S.L.Heald, L.B.Killmer, B.A.Mico, L.Mueller, C.H.Pan, B.L.Poehland, J.B.Rake, G.D.Roberts, M.C.Shearer, R.D.Sitrin, L.J.Nisbet and P.W.Jeffs, *J. Antibiot.*, **40**, 970 (1987).
91) M.C.Shearer, P.M.Colman and C.H.Nash III, *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **33**, 369 (1983).
92) A.Takahashi, K.Hotta, N.Saito, M.Morioka, Y.Okami and H.Umezawa, *J. Antibiot.*, **39**, 175 (1986).
93) W.P.Aue, E.Bartholdi and R.R.Ernst, *J.Chem.Phys.*, **64**, 2229 (1976).
94) A.Bax and R.Freeman, *J.Magn.Reson.*, **44**, 542 (1981).
95) A.A.Moudsley, A.Kumar and R.R.Ernst, *J.Magn.Reson.*, **28**, 463 (1977).
96) R.Freeman and G.A.Morris, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.*, **1978**, 64.
97) G.Bodenhausen and R.Freeman, *J.Am.Chem.Soc.*, **100**, 320 (1978).
98) A.Bax, R.Freeman and S.P.Kempsell, *J.Am.Chem.Soc.*, **102**, 4849 (1980).
99) T.H.Mareci and R.Freeman, *J.Magn.Reson.*, **48**, 158 (1982).
100) D.L.Turner, *J.Magn.Reson.*, **49**, 175 (1982).
101) J.A.Dale and H.S.Mosher, *J.Am.Chem.Soc.*, **95**, 512 (1973).

102) G.R.Sullivan, J.A.Dale and H.S.Mosher, *J.Org.Chem.*, **38**, 2143 (1973).
103) I.Ohtani, T.Kusumi, M.O.Ishitsuka and H.Kakisawa, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3147 (1989).
104) B.M.Trost, J.L.Belletire, S.Godleski, P.G.McDougal and J.M.Balkovec, *J.Org.Chem.*, **51**, 2370 (1986).
105) N.Okamura, T.Nohara, A.Yagi and I.Nishioka, *Chem.Pharm.Bull.*, **29**, 676 (1981).
106) M.Konishi, K.Saito, K.Numata, T.Tsuno, K.Asama, H.Tsukiura, T.Naito and H.Kawaguchi, *J.Antibiot.*, **30**, 789 (1977).
107) K.čapek, J.Staněk,Jr. and J.Jarý, *Collect.Czech.Chem.Commun.*, **39**, 1462 (1973).
108) A.C.Richardson, *Proc.Chem.Soc.*, **1961**, 255.
109) A.C.Richardson and H.O.L.Fischer, *J.Am.Chem.Soc.*, **83**, 1132 (1961).
110) S.Bystrický, I.Frič, J.Staněk, K.čapek, J.Jarý and K.Bláha, *Collect. Czech.Chem.Commun.*, **44**, 174, (1979).
111) S.Seo, Y.Tomita, K.Tori and Y.Yoshimura, *J.Am.Chem.Soc.*, **100**, 3331 (1978).
112) R.Kasai, M.Suzuo, J.Asakawa and O.Tanaka, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 175.
113) R.Kasai, M.Okihara, J.Asakawa, K.Mizutani and O.Tanaka, *Tetrahedron*, **35**, 1427 (1979).
114) G.A.Morris and R.Freeman, *J.Am.Chem.Soc.*, **101**, 760 (1979).
115) D.M.Doddrell and D.T.Pegg, *J.Am.Chem.Soc.*, **102**, 6388 (1980).
116) G.Eich, G.Bodenhausen and R.R.Ernst, *J.Am.Chem.Soc.*, **104**, 3731 (1982).
117) L.P.Lindeman and J.Q.Adams, *Anal.Chem.*, **43**, 1245 (1971).
118) H.-N.Chou and Y.Shimizu, *J.Am.Chem.Soc.*, **109**, 2184 (1987).
119) M.S.Lee, G.Qin, K.Nakanishi and M.G.Zagorski, *J.Am.Chem.Soc.*, **111**, 6234 (1989).

120) J.E.Holenstein, H.Kern, A.Stoessl and J.B.Stothers, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 4059 (1983).
121) R.E.Cox and J.S.E.Holker, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.*, **1976**, 583.
122) 水野卓、西沢一俊著、図解糖質化学便覧、31 頁、共立出版、東京 (1971).
123) H.Kawaguchi, H.Tsukiura, K.Tomita, M.Konishi, K.Saito, S.Kobaru, K. Numata, K.Fujisawa, T.Miyaki, M.Hatori and H.Koshiyama, *J.Antibiot.*, **30**, 779 (1977).
124) V.R.Hegde, M.G.Patel, V.P.Gullo, A.K.Ganguly, O.Sarre, M.S.Puar and A.T.McPhail, *J.Am.Chem.Soc.*, **112**, 6403 (1990).
125) G.A.Ellestad, D.B.Cosulich, R.W.Broschard, J.H.Martin, M.P. Kustmann, G.O.Morton, J.E.Lancaster, W.Fulmor and F.M.Lovell, *J.Am. Chem.Soc.*, **100**, 2515 (1978).
126) K.Dobashi, K.Nagaoka, Y.Watanabe, M.Nishida, M.Hamada, H.Naganawa, T.Takita, T.Takeuchi and H.Umezawa, *J.Antibiot.*, **38**, 1166 (1985).
127) 岩崎昭夫、出牛武夫、渡辺勇、森俊人 (興和)、公開特許公報、昭 58-29781 (1983).
128) M.Ichimura, T.Koguchi, T.Yasuzawa and F.Tomita, *J.Antibiot.*, **40**, 723 (1987).
129) K.Sasaki, K.L.Rinehart,Jr., G.Slomp, M.F.Grostic and E.C.Olson, *J. Am.Chem.Soc.*, **92**, 7591 (1970).
130) W.Oppolzer and V.Prelog, *Helv.Chim.Acta.*, **56**, 2287 (1973).
131) E.Higashide, M.Asai, K.Ootsu, S.Tanida, Y.Kozai, T.Hasegawa, T. Kishi, Y.Sugino and M.Yoneda, *Nature*, **270**, 721 (1977).
132) S.Ito and Y.Hirata, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **50**, 1813 (1977).
133) W.Trowitzsch, V.Wray, K.Gerth and G.Höfle, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.*, **1982**, 1340.
134) M.Sugita, T.Sasaki, K.Furihata, H.Seto and N.ôtake, *J.Antibiot.*, **35**, 1467 (1982).
135) S.ômura, A.Nakagawa, K.Shibata and H.Sano, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4713 (1982).

136) M.Hara, K.Asano, I.Kawamoto, T.Takiguchi, S.Katsumata, K.Takahashi and H.Nakano, *J.Antibiot.*, **42**, 1768 (1989).

137) H.Ogura, K.Fruhata, Y.Harada and Y.Iitaka, *J.Am.Chem.Soc.*, **100**, 6733 (1978).

138) A.Nakagawa and S.ômura, in Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology, and Practice, p.75 (ed.by S.ômura, Academic Press, Orlando, 1984).

139) E.R.Walwick, W.K.Roberts and C.A.Dekker, *Proc.Chem.Soc.*, **1959**, 84.

140) M.Konishi *et al.*, *J.Antibiot.*, in preparation.

141) 米原弘、大岳望、小野寺一清、瀬川作修、許恵淵、佐々木徹郎（日清製粉、東菱薬品、中国新薬工業有限公司）、特許公報、昭 61-5713 (1986).

142) M.Hori, E.Ito, T.Takita, G.Koyama, T.Takeuchi and H.Umezawa, *J. Antibiot.*, **A17**, 96 (1964).

143) S.Aizawa, T.Hidaka, N.ôtake, H.Yonehara, K.Isono, N.Igarashi and S. Suzuki, *Agric.Biol.Chem.*, **29**, 375 (1965).

144) G.Koyama, K.Maeda, H.Umezawa and Y.Iitaka, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 597.

謝　辞

本論文作成にあたり、暖かい御助言、御助力を賜わりました北海道大学教授 米光宰博士に衷心より感謝の意を表します。また貴重な御助言を賜わりました同教授 小林淳一博士に深く感謝致します。

本研究の発表の機会を与えて下さると同時に、暖かい御助言、激励を賜わりましたブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社副社長兼研究所長 沖俊一博士、同相談役 川口洋博士、並びに同監査役 内藤隆之博士に深く感謝の意を表します。

本研究に対する深い御理解と暖かい御助言、御助力を賜わりましたブリストル・マイヤーズ スクイブ研究所副所長 小西正隆博士に衷心より感謝致します。

X線結晶構造解析をして頂くと同時に、貴重な御助言を賜わりました筑波大学教授 柿沢寛博士、並びに同助教授 井上幸信博士に深謝致します。マススペクトルを測定して頂き、貴重な御助言を賜わりました電機通信大学教授 大橋守博士に深謝致します。

本論文作成に際し、暖かい御助言、御助力を賜わりました恩師、元北海道大学教授 金子光博士に深く感謝致します。

最後に本論文はブリストル・マイヤーズ スクイブ研究所において行なった研究の成果をまとめたものであり、研究の遂行上多大な御協力を賜わりました同研究所の研究員諸氏に厚く御礼申し上げます。