

総 説

牧 敬文, 鈴木巳喜男: ステロイド系の抗生物質

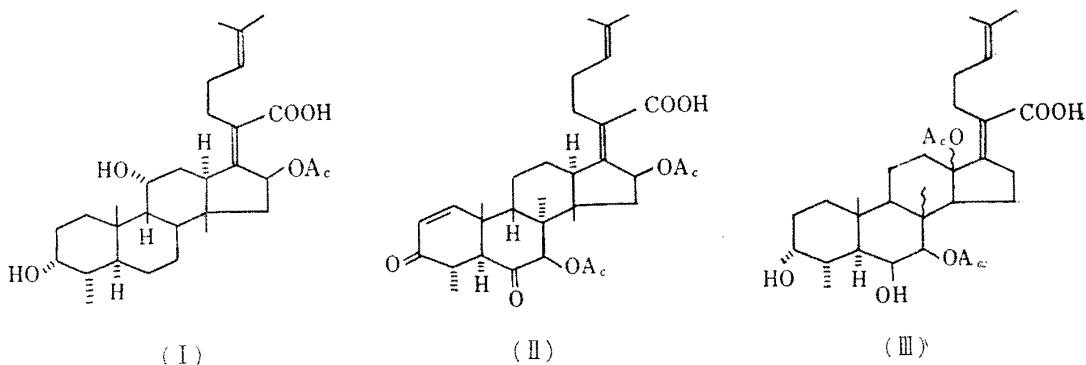
Yoshifumi Maki, Mikio Suzuki: Steroidal Antibiotics

1. Introduction
2. The relationship between antibacterial activity and structure
3. The structure determination of fusidic acid

1. 緒 言

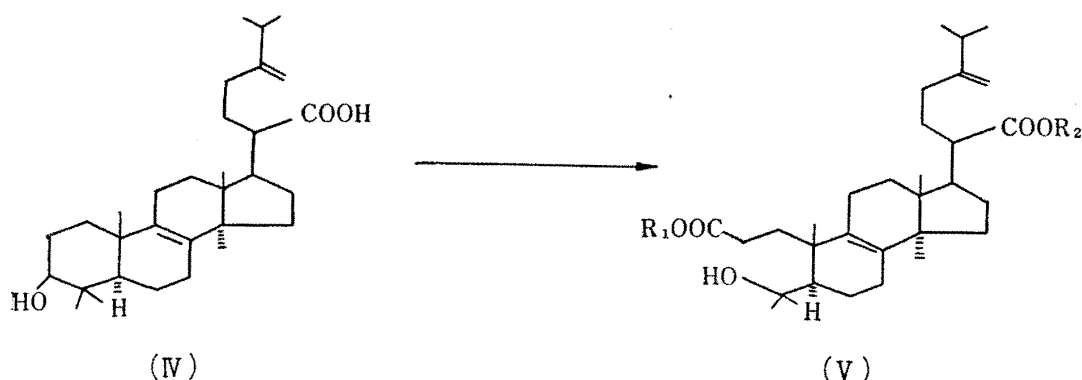
最近カビの生産するステロイド骨格を有する多くの抗生物質が注目されているが、特に著しい抗菌作用を有する fusidic acid (I) (^{1)~5)} (*Fusidium coccineum*, グラム陽性菌), helvolic acid (II) (^{6)~11)} (*Aspergillus fumigatus*, グラム陽性菌), cephalosporin P₁ (III) (⁶⁾¹²⁾¹³⁾ (*Cephalosporium sp.*, グラム陽性菌, mycobacteria; helvolic acid と交叉耐性を示す) については、化学構造の研究が物理的方法を駆使して行われ、それらの全容が明らかになってきた。また、目下化学構造の解明と並行して構造と antibacterial activity との関連性が追求されており、最近著者らもステロイド骨格を有する α -アミノ酸誘導体の合成を行い、¹⁴⁾ 其中のあるものは弱いながら antibacterial activity を有することが判明し、今後より優秀なステロイド系抗菌物質の開発が期待される。

そこで本稿ではステロイド抗生物質に関し、その化学構造と抗菌作用の関連性、更に抗菌性の特にすぐれている fusidic acid (I) の構造が決定されるまでの経過をまとめることにした。



2. Antibacterial activity と構造との関連性

A. I. Laskin¹⁵⁾ は fusidic acid (I) などのステロイド抗生物質と化学構造類似の eburicoic acid (IV) を酵素反応を用いて ring A seco-acid (V; R₁=R₂=H) に導き、これが *Staphylococcus aureus* 209P (以下に述べる抗菌力のデータはこの菌種に対するものである) に対して最少発育阻止濃度 (MIC); 60 γ /ml. を示すことを見出した。これは fusidic acid (I) の抗菌作用 (MIC; 0.02 γ /ml.) に比べその効果はわずかに 1/3000 にすぎないが、これをモノメチルエステル (V; R₁=H, R₂=CH₃) とすると MIC; 2 γ /ml. を示し、抗菌作用の増すことを明らかにした。



また、J. Fried¹⁶⁾らは多くの ringA seco-acid およびその関連化合物を合成し、抗菌作用と化学構造との関連性を検討し、抗菌作用を示すための条件として次のような結論を得ている。

(1) one anionic site を有すること

前述の如く ringA seco-acid およびそのモノメチルエステルは抗菌作用を示す。しかしながらそのジメチルエステル (V; $R_1=R_2=CH_3$) は MIC; $>100\gamma/ml.$ で作用が弱く、また V の 2 個のカルボキシル基を還元して primary diol に導くと全く作用がなくなるから、一つの anionic site (カルボキシル基) の存在が必要であると推測される。従ってステロイド抗生物質 (I~III) では C_{21} -acidic function が、また ringA seco-acid (V) では C_3 -acidic function が anionic site に相当し、それらが抗菌作用に重要な役割を果していると考えた。

(2) anionic site が酸素官能基 (C=O, OH) に近接していること。

ケト酸 (VI) および対応する 5-deoxo 誘導体 (VII) を合成してその抗菌作用を比較したところ、VI は MIC; $2\gamma/ml.$ を示したが、VII は $100\gamma/ml.$ の濃度で作用を示さなかった。VI はカルボキシル基に対して δ 位にカルボニル基を有し、この酸素官能基が抗菌作用発現に寄与していると考えられる。

(3) anionic site が二重結合の π -電子に近接していること

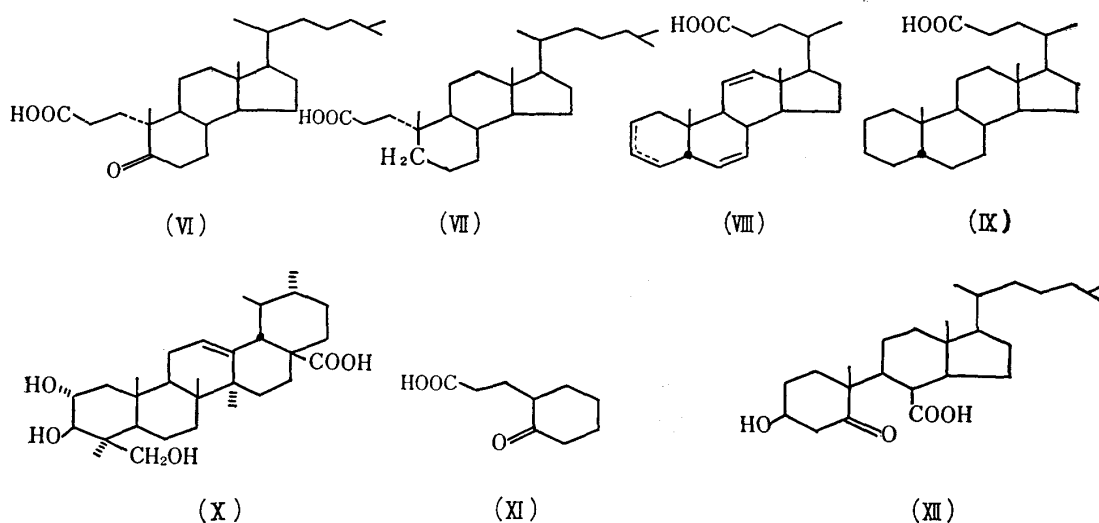
cholatrienic acid (VIII) およびその飽和誘導体である cholanic acid (IX) を比較すると、VIII は MIC; $1\sim 2\gamma/ml.$ を示し、IX は $100\gamma/ml.$ の濃度で作用を示さなかった。VIII はカルボキシル基から離れた位置に二重結合を有しているが、これが作用に何らかの関与をしているものと予想された。そこでカルボキシル基に対し γ 位に二重結合を有する asiatic acid (X) も強い作用を持つことが期待されるが、事実、X は MIC; $14\gamma/ml.$ を示した。従って二重結合の π -電子の存在が抗菌作用発現に何らかの寄与をなすと考えられる。

(4) rigid な分子構造であること

上記抗菌作用と構造に関する知見からそのモデル化合物として、一個のカルボキシル基を有しその δ 位にカルボニル基を持つ cyclohexanone-2-(3-propionic acid) (XI) を合成し、その抗菌作用を検討したところ、結果は予想に反し $100\gamma/ml.$ の濃度でも作用を示さなかった。しかし XI より rigid な骨格を有する ring B seco-acid (XII) について調べたところ MIC; $2\sim 3\gamma/ml.$ を示した。

従ってこのようなステロイド系物質およびその関連物質が抗菌作用を示すためには (1)~(3) の条件が要求されるばかりでなく、更に比較的 rigid な分子構造が抗菌作用発現に有利であると考えられる。

以上 J. Fried らの研究を中心にステロイド性抗生物質の化学構造と抗菌作用の関係を簡単に述べたが、これはあくまでも一つの試みであり仮説的な域を出ない。更に広汎な立体化学を加味した化学構造との関係データ、抗菌作用発現機作に対する生化学的知見が要求されよう。



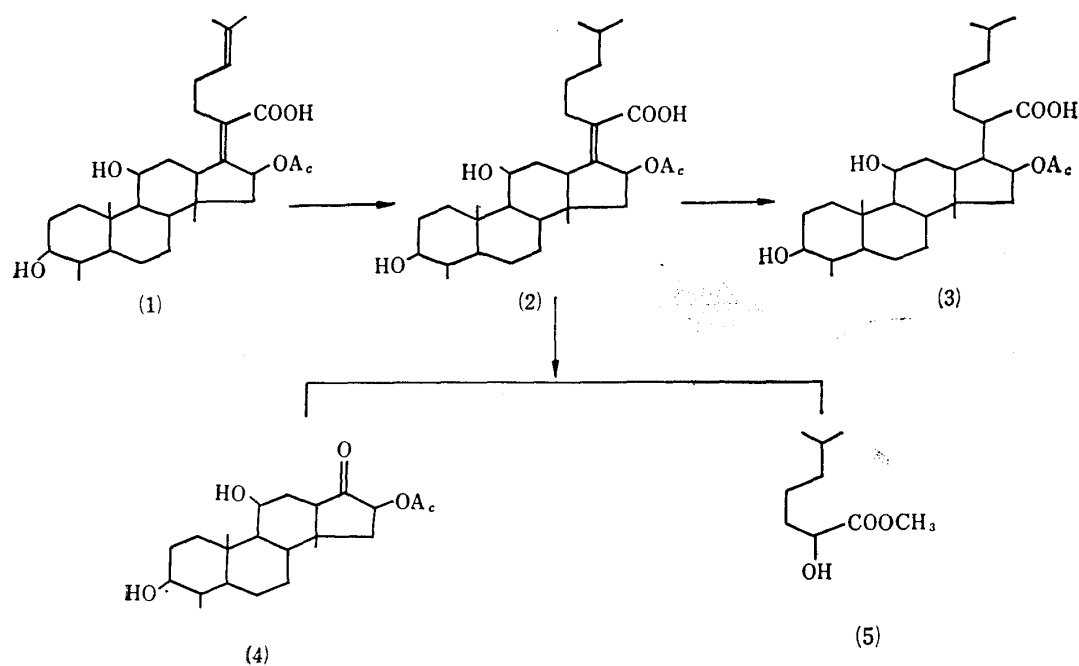
3. Fusidic acid の構造決定

1962年デンマーク・レオ社の W. O. Godtfredsen らは *Fusidium coccineum* K. Tubaki の培養濾液からグラム陽性菌に有効な fusidic acid を分離することに成功した。¹⁾ その後彼等のグループにより引き続き fusidic acid の構造研究が行われ、その途中2, 3の推定構造式が出されたが、現在の構造式⁵⁾ ((I)はその立体構造式を示す)を提出するに至っている。

(1) Fusidic acid の平面構造^{2),3)}

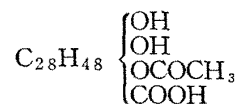
a) 酸素官能基

fusidic acid (1)は分子式 $C_{31}H_{48}O_6$ を有し、その IR スペクトル(KBr) は $3420, 3510cm^{-1}$ (OH); $1697, 1725cm^{-1}$ (C=O); $1260cm^{-1}$ (ester C-O) を示す。(1)はアルカリ加水分解により酢酸を生ずることから、ester band ($1725, 1260cm^{-1}$) はアセトキシ基に帰属された。また(1)はメチルエステルを生成しそれぞれ対応するモノアセタートを与え、両者は IR スペクトルにおいて依然として OH band を示す。即ちアセチル化し難い



水酸基1個が存在している。

以上のことから fusidic acid が有する6個の酸素原子は、右図のように二つの水酸基、カルボキシル基およびアセトキシ基に帰属することができる。



b) 二重結合

(1)をPd-Cで接触還元すると dihydrofusidic acid(2)が得られる。両者のUVスペクトルはそれぞれ(1); 204, 210 m μ (shuolder)(ϵ 9900, 9400), (2); 220m μ (ϵ 8300)である。この(1)および(2)のUVスペクトルの比較から還元されたのはカルボキシル基と共役していない三置換二重結合と考えられ、依然として共役系の存在する(2)のUVスペクトルから、四置換 α, β -不飽和カルボン酸の存在が推定された。更に(2)をPt₂Oで接触還元して得られる tetrahydrofusidic acid(3)は200m μ より長波長領域に特性吸収を示さない。また(3)の分子式より(1)が四環性構造を有することが推測される。

c) 側鎖

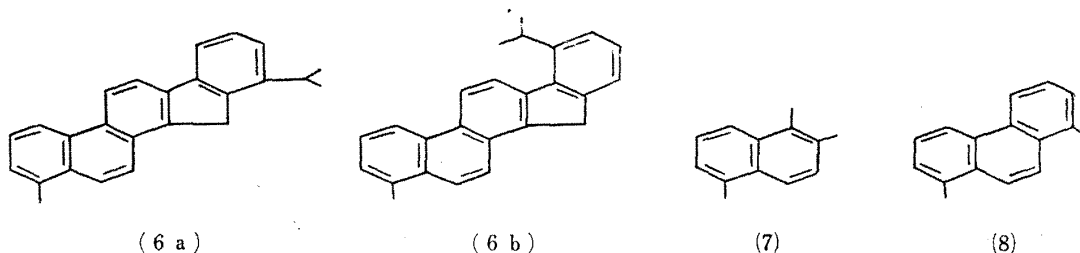
(2)のメチルエステルをオゾン酸化し、次いで亜鉛と酢酸により還元すると、(4)および油状物質である(5)を得る。この(5)は別途に合成した2-hydroxy-6-methylheptanoic acidのメチルエステルとIRにより同定された。

結局(2)の側鎖として(CH₃)₂CH-CH₂-CH₂-CH₂-C(=O)OCH₃なる構造が与えられる。また(1)のメチルエステルを重水素還元して dideuteriofusidic acid のメチルエステルとし、次いでオゾン酸化、還元を行うと(4)および重水素化された(5)を得た。これはIRスペクトルでC-D band (2190, 2230cm⁻¹)を示すことより確認された。即ちこの実験から三置換二重結合は側鎖に存在し、(1)の側鎖の構造は(CH₃)₂C=CH-CH₂-CH₂-C-COOHでなければならない。

d) 環系とメチル基の位置

(1)のゼレン脱水素生成物をアルミナクロマトで分離すると3種の物質が得られた。

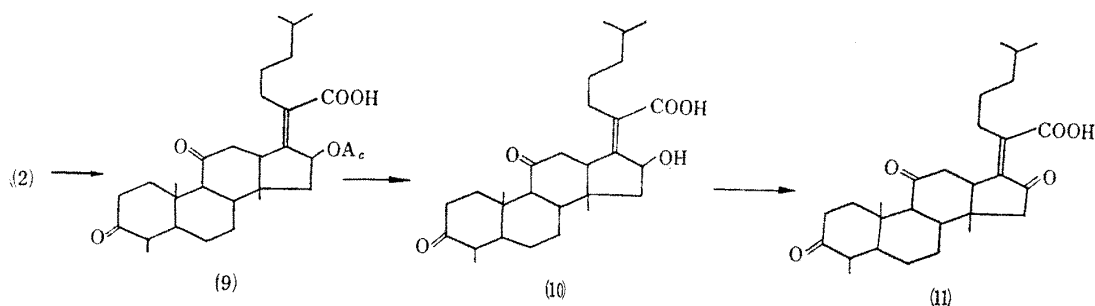
そのうちの1種はUVスペクトルおよびNMRの知見より、11H-naphtho(2,1-a)fluorene環を有する物質であると推定された。当時この物質が(6a), (6b) どちらの構造を有するかは明らかでなかったが、この5環性化合物の生成を説明するには、ゼレン脱水素の過程で側鎖の閉環が起ったものと考えられる。即ち(1)が cyclopentenoperhydrophenanthrene環を有し、側鎖はそのC₁₆あるいはC₁₇位に存在することが推定できる。



他の2物質はそれぞれ1,2,5-trimethylnaphthalene (7), 1,8-dimethylphenanthrene (8)であることが確認された。このことから転位反応が起らない限りC₄, C₁₄, C₈およびC₉にメチル基の存在することが推測される。また(4)のような側鎖を除いた化合物のNMRスペクトルから、母核上のメチル基は3級メチル3個および2級メチル1個であることがわかる。しかし後述の^{49,11}化合物(20)の生成によって、1個の3級メチルはC₉でなくC₁₀に存在することが明らかにされた。即ちゼレン脱水素生成物1,7,5-trimethylnaphthalene (7)の1位メチル基は母核に存在していたC₁₀-CH₃の1,2-シフトによるものと考えればよい。

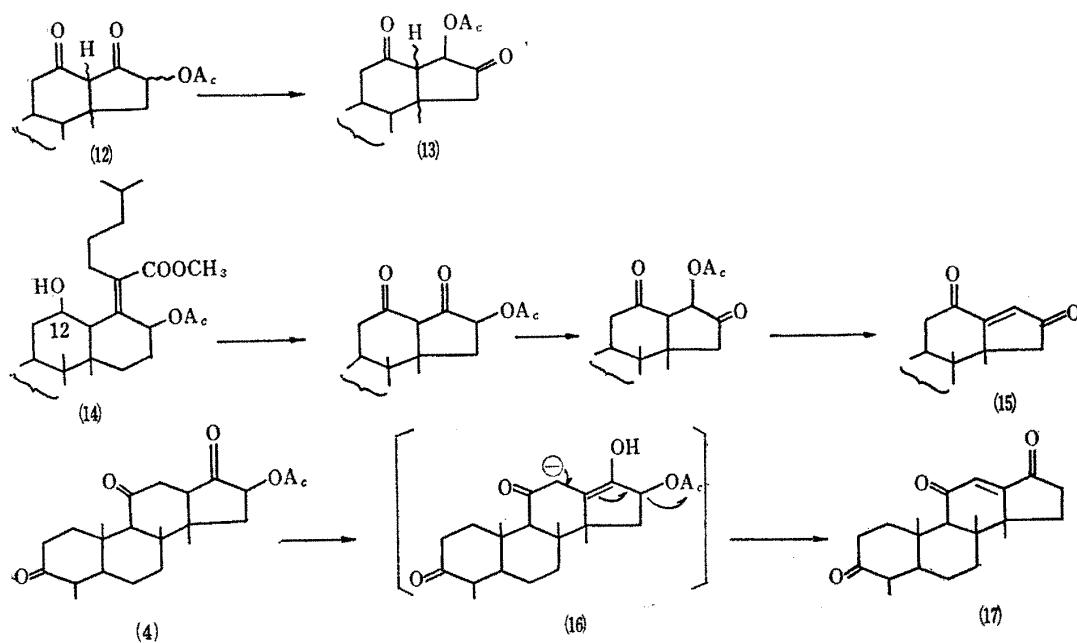
e) 側鎖と官能基の位置

dihydrofusidic acid (2) の CrO_3 酸化により生ずるジケトン酸(9) をアルカリ加水分解すると diketo monohydroxy acid (10) を生成する。(10) の IR スペクトル(KBr) は 1710cm^{-1} に 6 員環ケトンの吸収を示し, 二つの 2 級水酸基が 6 員環に存在することが推定される. 二つの 2 級水酸基のうち一つが $\text{C}_4\text{-CH}_3$ の隣位 (C_3 位) にあることは, (2) のメチルエステルとその CrO_3 酸化生成物ジケトン酸(9) のメチルエステルの NMR における $\text{C}_4\text{-CH}_3$ の化学シフトの比較によって明らかにされた. 即ち $\delta = 0.90 \rightarrow 1.07$ への低磁場シフトが観察された.



また(10)を更に CrO_3 酸化するとトリケトン酸(11)を生じ, その IR スペクトル(KBr) は 1735cm^{-1} に 5 員環ケトンによると思われる吸収を示す. 従ってもとのアセトキシ基は第 2 級で D 環に所在することが明らかにされた. また dihydrofusidic acid (2) のメチルエステル, ジケトン(9)およびトリケトン(11)のメチルエステルの UV スペクトルを比較すると, (2)および(9)のメチルエステルはそれぞれ $222\text{m}\mu$ ($\epsilon 8400$), $220\text{m}\mu$ ($\epsilon 7900$) に吸収を示し, 互いに類似している. しかし(11)のメチルエステルは $247\text{m}\mu$ ($\epsilon 9000$) に UV 吸収を示すので, もとのアセトキシ基は側鎖の二重結合に対して α -位に存在しなければならない.

先に述べた dihydrofusidic acid (2) のオゾン酸化により生ずる結晶性物質(4) の IR スペクトル(KBr) は, 5 員環ケトンの吸収 ($1755, 1770\text{cm}^{-1}$) を示し, 側鎖がステロイドの D 環上に存在することを支持している. 更に(4)を苛性アルカリにより脱酢酸すると, UV スペクトルにおいて ene-dione system ($\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ $261\text{m}\mu$ ($\epsilon 8100$)) を示す物質の生成が認められた.



最初 W. O. Godtfredsen²⁾らは fusidic acid 及びその誘導体の C 環に存在する水酸基が C₁₂にあると考え、J. Fishman¹⁷⁾のアチル転位の例 (12→13) を適用して上の変化を (14→15) により説明した。

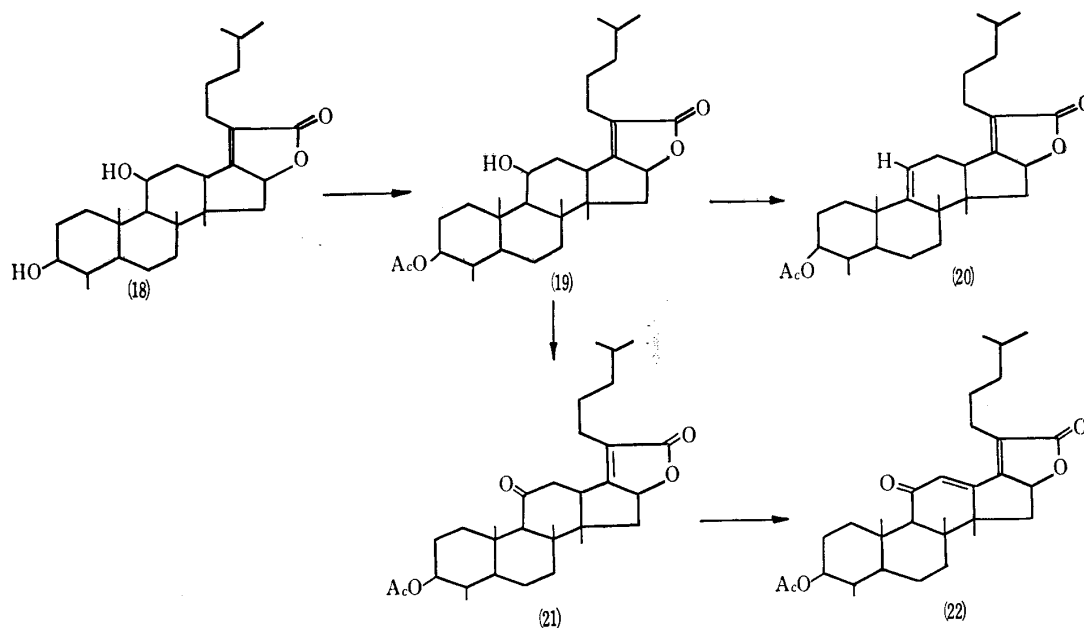
しかしながらその後の研究により、C₁₂-OHは結局 C₁₁に存在することが明らかにされるにおよび、(2)のオゾン酸化生成物(4)の苛性アルカリによる脱酢酸反応は(10)のようなメカニズムを取るとして、ene-dione には(17)式が与えられた。

さて C₁₁ に水酸基が存在することは次のようにして証明された。

i) (2)の NMR においてデカップリング操作を行なったところ、二つの 2 級水酸基の根元のプロトン ($\delta = 3.80, 4.40$) と C₁₃-プロトン ($\delta = 3.02$) との間にカップリングが観察されなかった。

ii) (2)を強アルカリ更に酸で処理して得られるラクトン(18)のモノアセタート(19)を、塩化チオニル/ピリジンで脱水すると(20)を生成する。この(20)は NMR で一つのオレフィンプロトン ($\delta = 5.50$) を有すること、および UV スペクトルにより共役系が(19)と変わらないことより確かめられた。

iii) (19)を CrO₃ 酸化し、次いで SeO₂ 脱水素を行なうと、UV スペクトルで 280m μ ($\epsilon 17500$) を示す物質を得る。これを(19)の UV スペクトル 221m μ ($\epsilon 15500$) に比べると、共役系が拡大されていることが判る。即ちこの反応は(19)→(21)→(22)で説明される。



以上述べたデータから fusidic acid の平面構造式として(1)が提出された。

(2) Fusidic acid の立体化学²⁾⁵⁾

a) C₃ 位の水酸基

dihydrofusidic acid (2)を CrO₃ 酸化して得られるジケト酸(9)を NaBH₄ 還元すると、(2)のエピマー体である 3-epidihydrofusidic acid が生成する。このことから、もとの C₃-OH は不安定な axial orientation をとると推定される。

また(2)およびそのエピマー体をそれぞれ対応する 3-アセタートに導き、その分子旋光度の差を求めると、前者では -94、後者で +51 となり、もとの C₃-OH は α -配位をとることが明らかになった。¹⁸⁾

b) C₄ 位のメチル基

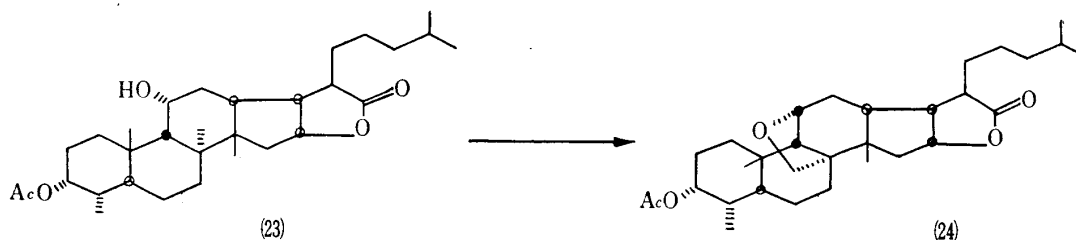
ジケト酸(9)を強アルカリ, 次に酸で処理しても, C₄-CH₃ のエピメリ化を伴わずに対応するジケトラクトンを生成する. 従って, C₄-CH₃ は安定系である equatorial α -configuration を持つことが判る.

c) A/Bring junction

tetrahydrofusidic acid (3) を3-モノケトンに導くと, ORD 曲線は正のコットン効果を示した. 従って, A/Bring junction は trans である.

d) C₈ 位のメチル基および C₁₁ 位の水酸基

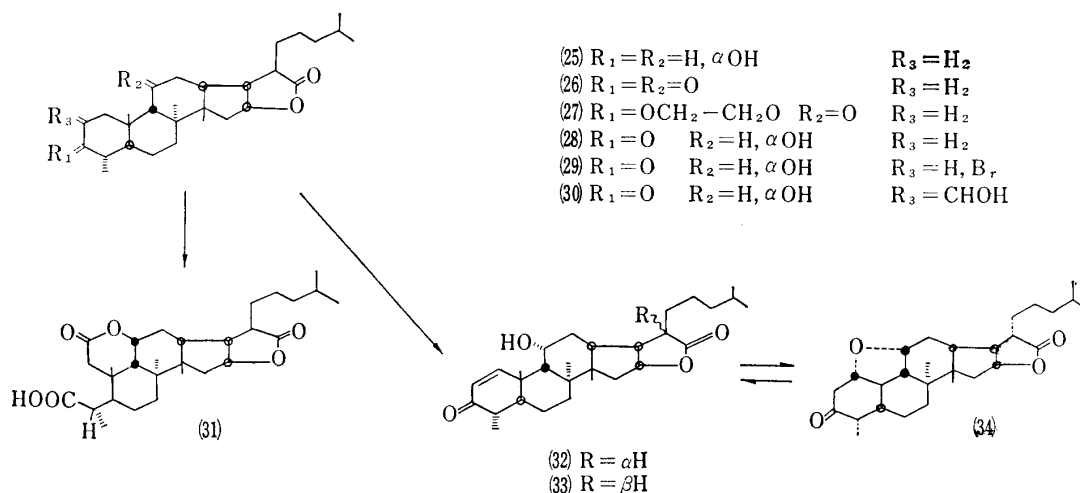
C₈-CH₃ の NMR シグナルは C₁₁-OH により影響を受け, この C₁₁-OH を除くと C₈-CH₃ のシグナルは $\Delta\delta = 0.15$ だけ高磁場シフトする. このことより, C₈-CH₃ と C₁₁-OH とは 1,3-diaxial の関係にあることが判る.



またモノアセタート(23)を四酢酸鉛-ヨードで処理して得たものは, NMR で C₈-メチルに対応するシグナルが消失し, 代って A B 型 ($\delta = 3.68, 3.76$ J=10cps) の quartet が現われた. 即ち $-O-CH_2-\overset{|}{C}-$ なる部分構造を有すると考えられ, その構造としてエーテル(24)が与えられた. このことから C₈-CH₃, C₁₁-OH は共に axial であることが確実となった.

e) C₉ 位の水素原子

テトラヒドロラクトン(25)からモノケトラクトン(27)を経て 2-ヒドロキシメチレン体(30)に導き, (30)をオゾン酸化次いで H₂O₂/酢酸による酸化を行うと δ -ラクトン(31)が生成する.



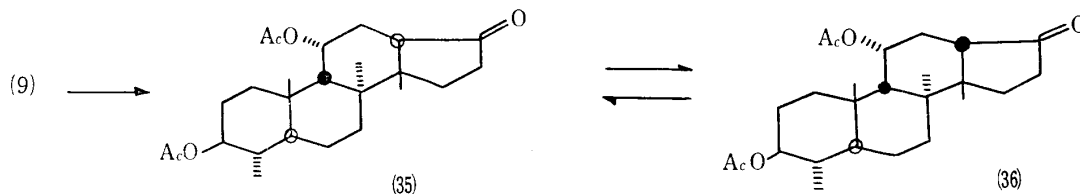
また 2-ブロム体(29)をコリジンで処理し, Δ^1 -不飽和化合物(32)に導き, (32)はアルカリ処理により, 容易に C₂₀-エピマー体(33)に移行する. (33)は 1 α , 11 α -エーテル(34)と平衡関係にある.

A/Bring が trans, C₁₁-OH が axial であることに基づき, (31)および(34)の生成を説明するには C₉-H は β -configuration でなければならない.

f) C/Dring junction

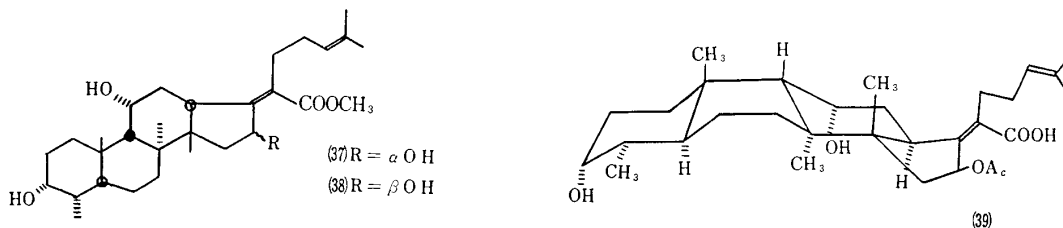
dihydrofusidic acid (2) のジケトン (9) から, C_{13} がエピメリ化しない条件で, 10 工程を経て 17-ケトン (35) に導き, (35) はアルカリ溶液中で C_{13} -エピマー体 (36) と平衡関係にある。

(35) の CD 曲線 ($\Delta\epsilon_{298} = -4.26$, $\Delta\epsilon_{291} = -4.19$) は C/D-trans 17-keto steroid の CD 曲線と対掌関係を示し, 一方 (36) の CD 曲線 ($\Delta\epsilon_{310} = +0.76$, $\Delta\epsilon_{300} = +1.17$, $\Delta\epsilon_{291} = +1.12$) は cis-hydrindan-1-one 及び 3-keto, 5β , A-norsteroid と一致する。従って (35) は $13\alpha, 14\beta$ -configuration を, 又 (36) は $13\beta, 14\beta$ -configuration を有する。故に C/D junction は trans である。

g) C_{16} 位アセトキシ基

C_{16} -deacetylfusidic acid のメチルエステル (37) およびその C_{16} -エピマー体 (38) の NMR を比較すると, 14β - CH_3 は (38) よりも (37) の C_{16} -OH によって大きく deshielding を受けている ($\Delta\delta = 0.18$)。反対に 13α -H は (38) における C_{16} -OH により大きな deshielding を受けている ($\Delta\delta = 0.22$)。

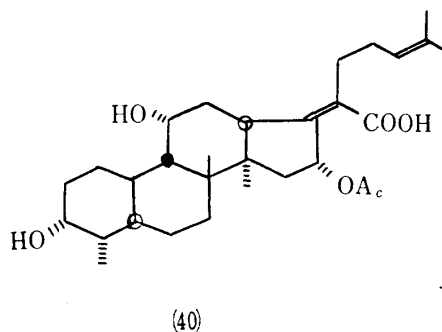
従ってこの NMR データより, もとの C_{16} -OAc は β -配位を持つことが判る。



なお A, B, C 環は tras-syn-trans arrangement であるから, B 環は boat form をとらねばならない。

以上, 構造研究の大略を述べたが, これらを基礎として fusidic acid の全構造は (39) で表わすことができる。

なお R. Bucourt⁴⁾ らは別に fusidic acid の構造研究を行い, B/C, C/D junction 及び C_{16} -OAc の配置の異なる立体構造 (40) を推定している。



文 献

- 1) W. O. Godtfredsen, S. Jahnsen, H. Lorck, K. Roholt, L. Tybring: Nature, Lond., **193**, 987 (1962)
- 2) W. O. Godtfredsen, S. Vangedal: Tetrahedron, **18**, 1029 (1962)
- 3) D. Arigoni, W. von Daehne, W. O. Godtfredsen, Andrée Marquet, A. Melera: Experientia, **19**, 521 (1963)
- 4) R. Bucourt, M. Legrand, M. Vignau, J. Tessier, V. Delaroff: C. R. Acad. Sci., **257**, 2679 (1963)

- 5) D. Arigoni, W. von Daehne, W. O. Godtfredsen, A. Melera, S. Vangedal: *Experientia*, **20**, 344 (1964)
- 6) H. S. Burton, E. P. Abraham, H. M. E. Cardwell: *Biochem. J.*, **62**, 171 (1956)
- 7) J. Cram, N. L. Allinger: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5275 (1956)
- 8) N. L. Allinger: *J. Org. Chem.*, **21**, 1180 (1956)
- 9) N. L. Allinger, J. L. Coke: *J. Org. Chem.*, **26**, 4522 (1961)
- 10) S. Okuda, S. Iwasaki, K. Tsuda, Y. Sano, T. Hata, S. Udagawa, Y. Nakayama, H. Yamaguchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 121 (1964)
- 11) S. Iwasaki, S. Okuda, K. Tsuda: at the Symposium on the Chemistry of Natural Products, Nagoya, Oct. 1964; Abstracts of Papers, p. 192
- 12) B. M. Baird, T. G. Halsall, E. R. H. Jones, G. Lowe: *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 257
- 13) T. G. Halsall, E. R. H. Jones, G. Lowe: *Proc. Chem. Soc.*, **1963**, 16
- 14) Y. Maki, M. Sato, K. Obata: *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 1377 (1965)
- 15) A. I. Laskin, P. Grabowich, C. de Lisle Meyers, J. Fried: *J. Med. Chem.*, **7**, 406 (1964)
- 16) J. Fried, G. W. Krakower, D. Rosenthal, H. Basch: *J. Med. Chem.*, **8**, 279 (1965)
- 17) J. Fishman: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 6143 (1960)
- 18) W. Klyne, W. M. Stoke: *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1979

杉浦 衛, 伊藤万蔵: Nucleodeaminase について

Mamoru Sugiura, Manzo Ito: On Nucleodeaminase

1. Introduction
2. Significance of nucleodeaminase in vivo
3. Distribution of nucleodeaminase in vivo
4. Determination of nucleodeaminase and nucleic base
5. Crystallization and purification of 5'-adenylic acid deaminase
6. Physical and chemical property of 5'-adenylic acid deaminase
7. On industrial application of 5'-adenylic acid deaminase
8. Preparation of industrial nucleodeaminase

1. 緒 言

核酸およびその誘導体のアミノ基を水酸基に置換し、アンモニアを遊離する酵素は、一般に nucleodeaminase (略して deaminase) といわれる。deaminase は 1904年 Jones が胸腺の自家融解中に核酸塩基の脱アミノが起ったことを発見して以来、漸次研究せられてきた。そしてこの中には adenase, adenosine deaminase, 5'-adenylic acid deaminase, 2'-adenylic acid deaminase, 3'-adenylic acid deaminase, guanase, guanosine deaminase, guanylic acid deaminase など種々存在することがあきらかとなった。これらの deaminase のうち、近年、核酸化学の急激な発展にともない工業的に製造されるようになった inosinic acid (5'-IMP) の製造に用いられている