窒素配糖体の研究 (第29報) BRIGL's anhydride を用いる窒素配糖体の合成

井上吉之, 小野寺幸之進, 唐沢郁夫 (京都大学農学部農芸化学教室)

昭和 28 年 10 月 23 日 受 理

Studies on N-Glycosides. Part 29. The Synthesis of N-Glucoside with the Use of BRIGL's Anhydride.

By Yoshiyuki INOUE, Kōnosshin ONODERA, and Ikuo KARASAWA

(Biochemistry Laboratory, Dept. Agr. Chem., College of Agriculture, Kyoto Univ.)

窒素配糖体の合成は、普通アルコール或は水を溶媒として行われる⁽¹⁾。アルコールを溶媒として縮合を行う場合には、その中に含有される水分の存在、不存在によって、生成される aldosylamine には、その N-glycosidic linkage に関連して α -或は β -anomer がそれぞれ得られる⁽²⁾。このような現象は始め BUTLER, LALAND, OVEREND 及び STACEY⁽³⁾ によつて、aniline-N-D-riboside について指摘されたが、更に ELLIS 及び HONEYMAN⁽²⁾ によつて *p*-toluidine-N-D-glucoside について詳細に検討されたのである。D-glucose と *p*-toluidine とを無水アルコール中で縮合させると、m. p. 135~136°, $[\alpha]_D^{20} + 209 \rightarrow -43^\circ$ (MeOH) をもつ α -form の結晶が得られ、一方含水アルコール中では m. p. 117~118°, $[\alpha]_D - 101 \rightarrow -52^\circ$ (MeOH) をもつ β -form の結晶が得られる。

以上の他に、例えば *p*-toluidine と D-glucose とを無溶媒の状態では融縮合させると、糖の oxide ring form の変動による異性化が起る。これは AMADORI 転位⁽⁴⁾と呼ばれる現象であつて、この結果 N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine が生成する。このように窒素配糖体は生成条件の差によつて構造上の変化が起るので、更にこの点について知見を得る目的で、われわれが以前に *o*-glycoside の合成に使用して⁽⁵⁾⁽⁶⁾、その反応性について知見を得て来ている BRIGL's anhydride (3,4,6-triacetyl-D-glucose 1,2-anhydride) を用いて窒素配糖体の合成を行つて、縮合条件と生成物との関係をしらべ且つその応用について検討を行つたのである。

BRIGL's anhydride と *p*-toluidine とを 1:1 又は 1:2 モル比で乾燥ベンゼン中で、5~10 mins. 煮沸縮合せしめるか、または室温で 24 hrs. 反応せしめるか、或は溶媒を用いないで 5 mins 加熱熔融して縮合させると、いずれの場合にも生成物として m. p. 133~134°, $[\alpha]_D^{13} - 44.5^\circ$ (*c* 1.6, chloroform) の結晶が得られる。縮合は殆んど定量的に起る。この結晶を更に無水醋酸とピリジンでアセチル化を行うと、m. p. 146°, $[\alpha]_D^{15} - 26.6^\circ$ (*c* 1.5, benzene) の結晶が得られる。次に示す通りである。

最後のアセチル化によつて得られた結晶 (m. p. 146°) は, 別に *N-p*-tolyl- β -D-glucosylamine (m. p. 117~118°) を無水醋酸とピリジンとでアセチル化して得られた *N-p*-tolyl- β -D-glucosylamine 2,3,4,6-tetraacetate (m. p. 146°) との混融試験の結果, 融点の降下がみとめられなかつた。

いま *N-p*-tolyl-D-glucosylamine tetraacetate について文献に記載されたものをしらべてみると次の通りである。先ず BAKER⁽⁷⁾ は *p*-toluidine と acetobromoglucose とを反応させて m. p. 147° の結晶を得ている。次に KUHN, DANSI⁽⁸⁾ は *p*-toluidine-*N*-D-glucoside のアセチル化によつて m. p. 143~146°, $[\alpha]_D^{20} - 57.5^\circ$ (methylacetate) の結晶を, また *p*-toluidine と 2,3,4,6-tetraacetylglucose とを反応させて m. p. 143~144° の結晶を得ている。更に KUHN, WEYGAND⁽⁹⁾ は *N-p*-tolyl-D-glucosylamine のアセチル化によつて m. p. 143~144° の結晶を得ている。われわれは⁽¹⁰⁾ *N-p*-tolyl-D-glucosylamine のアセチル化, 及び *p*-toluidine と 2,3,4,6-tetraacetylglucose との縮合によつて得られた結晶に対して m. p. 147° を報告した。次に HONEYMAN, TATCHELL⁽¹¹⁾ は *N-p*-tolyl- β -D-glucosylamine (m. p. 117~118°) をアセチル化して得られた acetate に対して, m. p. 145~146°, $[\alpha]_D^{16} - 34.2^\circ$ (*c* 0.5, chloroform) を記載している*。この最後にかかげた文献からみて明かな通り, これまで記載されたものは, すべて *N-p*-tolyl- β -D-glucosylamine 2,3,4,6-tetraacetate であると考えられる。

われわれは更に本報告の実験によつて, 前述の AMADORI 転位に関連して一, 二の知見を得ることができた。AMADORI 転位の機構は既に KUHN, WEYGAND^(8,9) によつて次のように説明されている。

この AMADORI 転位が起るのは arylamine と aldose とを溶媒を用いなくて熔融縮合させた場合に起るとされている**。その著しい例は *p*-toluidine と D-glucose との場合であつて, 生成物は *N-p*-tolyl-D-isoglucosamine と呼ばれる。図に示す通り AMADORI 転位物は糖の oxide ring が C₂-C₆ に移動しているのが見られる。従つて AMADORI 転位が起るためには C₂ の OH が遊離の状態にあることが必要条件であり, また一方, その場合には縮合の条件 (熔融縮合) によつては AMADORI 転位が起ることも期待し得るわけである。

BRIGL's anhydride は C₁-C₂ の間に於て anhydride が形成されていて, これが縮合の起る時に開裂されるのである。従つて C₁-C₅ の oxide ring が C₂-C₆ に移行することに対しては, C₂ の OH が遊離の状態とな

* 尙 ELLIS, HONEYMAN⁽¹²⁾ は, 別の報文では, m. p. 141~142°, $[\alpha]_D^{20} - 32.7^\circ$ (*c* 0.6, chloroform) を記載している。

** 最近 HODGE, RIST⁽¹³⁾ は AMADORI 転位は比較的低温 (25°) でも亦アルコール溶媒中でも起り, 更に arylamine ばかりでなく secondary alkylamines, primary 及び secondary aralkylamines の glycosyl 誘導体に於ても起ることを報告している。

るので、何等支障は考えられない。しかし、われわれの実験に於て BRIGL's anhydride と *p*-toluidine とを熔融縮合させた場合に、その生成物に AMADORI 転位が起つたとは考えられない。この縮合生成物は、溶媒を用いて縮合された場合の生成物と同一の物質であり、更にこの *N-p*-tolyl-*D*-glucosylamine 3, 4, 6-triacetate を無水醋酸とピリジンとでアセチル化して得られる物質は *N-p*-tolyl- β -*D*-glucosylamine 2, 3, 4, 6-tetraacetate であると確認させるからである。このことは、これまで AMADORI 転位物例えば *N-p*-tolyl-*D*-isoglucosamine からアセチル化物が得られた例がないことから逆に考えてもうなずけることである。このように BRIGL's anhydride を窒素配糖体の合成に使用すると縮合が容易に且つ速かに起り、また熔融縮合の場合にも AMADORI 転移が起らぬので、アミノ酸窒素配糖体の合成に使用すれば多くの利点を見出しうるものと思われる。

実 験

1. *N-p*-tolyl-*D*-glucosylamine 3, 4, 6-triacetate

(a) ベンゼン中での縮合 : BRIGL's anhydride は文献⁽¹⁴⁾記載の方法によつた。この結晶 (m. p. 57~58°, $[\alpha]_D^{25} + 106.5^\circ$ (benzene)) 2 g, *p*-toluidine (アルコールから再結) 0.46 g, 或は 0.92 g を乾燥ベンゼン 15 cc に溶解し、室温 (ca. 20°) で一昼夜放置する。または湯煎上で 5~10 mins. 沸騰反応させる。反応後石油エーテルを加えて減圧濃縮し、完全にベンゼンを除去する。残渣を 5 cc の熱無水アルコールに溶解し、氷冷放置すると針状結晶が析出する。これを更に 5 cc の熱アルコールから再結すると m. p. 133~134°, $[\alpha]_D^{13} - 44.5^\circ$ (c 1.6, chloroform) を示す結晶 1.8 g を得た。Anal. Calcd. for $C_{19}H_{25}O_8N$: N, 3.54. Found : N, 3.53, 3.52.

(b) 熔融縮合 : BRIGL's anhydride 1 g, *p*-toluidine 0.23 g を三角フラスコに入れ、上部に塩化カルシウム管を連結した空気冷却器を付けて、50° の湯煎上に加熱熔融させる。約 5 mins. で縮合物が結晶してくる (このとき更に続けて加熱を行うと徐々に分解し、遂には濃褐色の分解物を多量に生ずるに至る)。これを 5 cc の熱無水アルコールに溶解し、氷冷放置すれば結晶が析出する。濾取し、再び 5 cc の無水アルコールから再結すると、m. p. 133~134° の針状結晶 1 g を得た。この結晶と前記の (a) に於て得られた結晶との混融試験は融点の降下がみとめられなかつた。

2. *N-p*-Tolyl- β -*D*-glucosylamine 2, 3, 4, 6-tetraacetate

(a) *N-p*-Tolyl-*D*-glucosylamine 3, 4, 6-triacetate : 1. (a) に於て得られた結晶 1 g を 5 cc のピリジンと 2 cc の無水醋酸に溶解し、一昼夜室温に放置し、これに無水アルコールを添加し、減圧濃縮する。この操作を数回くり返す。結晶の析出するのが見られた。更に 2~3 回くり返した後、析出した結晶を濾取し、無水アルコールから再結すると、m. p. 146°, $[\alpha]_D^{15} - 26.6^\circ$ (c 1.5, benzene) の結晶が得られる。Anal. Calcd. for $C_{21}H_{27}O_9N$: N, 3.20. Found : N, 3.18, 3.19.

(b) *N-p*-Tolyl-*D*-glucosylamine のアセチル化 *D*-glucose 5.4 g, *p*-toluidine 3.2 g を 0.6 cc の水と共に、沸騰湯煎上で約 15 min. 加熱して、反応液が均一の層となつた後、冷却し、100 cc のエーテルを加えて沈澱を析出させる。これを濾取し、アルコール-エーテル (1:1) から再結すると、m. p. 117~118° の結晶 2 g が得られた。この *N-p*-tolyl- β -*D*-glucosylamine 2 g をピリジン 8 cc, 無水醋酸 4 cc に溶解して 24 hrs. 放置する。これを氷水中に注ぎ、数時間放置すると塊状の沈澱物が析出する。これを濾取し、無水アルコールから再結すると m. p. 146° の結晶を得た。収量 1.8 g. 上記 2 (a) によつて得られた結晶との混融試験は融点の降下がみとめられなかつた。

(1) 井上, 小野寺 : 化学の領域, 7, 30 (1953).

(2) G. P. ELLIS, J. HONEYMAN : *J. Chem. Soc.*, 1952, 1490.

(3) K. BUTLER, S. LALAND, G. W. OVEREND, M. STACEY : *J. Chem. Soc.*, 1950, 1433.

(4) R. KUHN, F. WEYGAND : *Ber.*, 70, 769 (1937); R. KUHN, L. BIRKOFER : *Ber.*, 71, 621 (1938).

(5) 井上, 小野寺, 唐沢, 西沢 : 農化, 24, 362

(1951).

(6) 井上, 小野寺, 唐沢, 西沢 : 日本農芸化学会臨時大会にて報告 (於九大, 1951.11.3).

(7) J. W. BAKER : *J. Chem. Soc.*, 1928, 1598.

(8) R. KUHN, A. DANSI : *Ber.*, 69, 1745 (1936).

(9) R. KUHN, F. WEYGAND : *Ber.* 72, 1663 (1939).

(10) 井上, 小野寺 : 農化, 22, 120 (1945).

- (11) J. HONEYMAN, A. R. TATCHELL : *J. Chem. Soc.*, 1950, 967. (13) J. E. HODGE, C. E. RIST : *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 316 (1953).
 (12) G. P. ELLIS, J. HONEYMAN : *J. Chem. Soc.*, 1952, 2053. (14) P. BRIGL : *Z. physiol. Chem.*, 116, 20 (1921); 122, 245 (1922).

Summary

A method for the synthesis of N-glycosides through the condensation of *p*-toluidine with BRIGL's anhydride (3,4,6-triacetyl-D-glucose 1,2-anhydride) is presented. The reaction mixture of *p*-toluidine with the anhydride in benzene solution was boiled for 5 minutes or allowed to stand for 24 hours at room temperature to produce a crystal which had the melting point of 133~134° and the $[\alpha]_D^{13}$ of -44.5° (*c* 1.6, chloroform). This was proved to be N-*p*-tolyl-D-glucosylamine 3,4,6-triacetate, and by acetylation to yield N-*p*-tolyl-β-D-glucosylamine 2,3,4,6-tetraacetate, which was shown to be identical with the specimen prepared by the acetylation of N-*p*-tolyl-β-D-glucosylamine.

On the other hand it was found that condensation by melting both reactants without solvent gave the same reaction product as that of the condensation in benzene. Concerning the result of the present experiment, the mechanism of the AMADORI rearrangement was discussed, and the possibility for the rearrangement of the reaction product obtained when BRIGL's anhydride was melted with *p*-toluidine was also discussed and taken into consideration. The reaction condition of melting might be expected to have the possibility of the AMADORI rearrangement, but it was found that no intramolecular rearrangement occurred. The advantage of applying this method for further synthesis of N-glycosides is mentioned.

Penicillium chrysogenum Q-176 による Phenylacetic Acid

の酸化的代謝に関する研究 (第5報) *Pen. chrysogenum*

Q-176 の1変異種による Homogentisic Acid の生成につ

いて (その1) Homogentisic Acid の分離及び確認

磯 野 正 雄 (武田薬品工業株式会社大阪工場)

昭和28年10月24日受理

Oxidative Metabolism of Phenylacetic Acid by *Penicillium chrysogenum* Q-176. Part 5.

The Production of Homogentisic Acid by a Mutant Strain Induced from *Pen. chrysogenum* Q-176. (1) Isolation and Identification of Homogentisic Acid.

By Masao ISONO (Osaka Factory, Takeda Pharmaceutical Industries Ltd.)

Pen. chrysogenum. Q-176 による phenylacetic acid (PAA) の芳香核がその開裂様式に於て哺乳動物の homogentisic acid (2,5-dihydroxyphenylacetic acid) (HGA) の開裂様式と異なる事実については既に報告⁽¹⁾したが、2-hydroxyphenylacetic acid が PAA 代謝中間物質として生成される点から考えて更に -OH 基の導入によつて HGA へ移行する可能性を棄てることは出来ない。この考えにもとづいて著者は各種培養条件に於ける HGA の生成を検討したが、全くその生成を認めることが出来なかつた。即ちこの種の代謝中間物質はたとえこれが存在するとしても、菌による turnover が非常に早いため normal strain を使用する限りこれを分離確認することが不可能であると考えに至つた。

Gene-blocked mutant は BEADLE をはじめ諸学者により growth factor の生合成経路の解明⁽²⁾に広く利用されている。PAA 代謝系に於てもその系の一部が害された mutant が得られれば、代謝中間物質の確認は可能である。著者は紫外線照射による mutant の分離を試み、その結果 PAA を添加して培養する時のみ多量の HGA を生成集積する mutant の分離に成功し、HGA が *Pen. chrysogenum* Q-176 による PAA 代謝中間物質であることを確認し得た。

本報は mutant の分離条件並びに本菌の PAA 添加培養により生成される HGA の分離、確認について報告する。