薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (1) 73-79 (1983)

抗菌性ペプチドの研究 (第 16 報^{1,2)}) コリスチン関連 α -デカノイル
ペンタペプチドの合成と抗菌活性 (第 5 報)

栗原藤三郎, 伊藤秀雄,* 土田良雄
東北薬科大学

Studies on Antibacterial Peptide. XVI.^{1,2)} Synthesis and Antibacterial
Activity of α -Decanoylpentapeptides related to Colistin. V

TOZABURO KURIHARA, HIDEO ITO* and YOSHIO TSUTIDA
Tohoku College of Pharmacy, 4-4-1, Komatsushima, Sendai, 983, Japan

(Received June 21, 1982)

In order to investigate the relationship between the chemical structures and the antibacterial activities, three α -decanoylpentapeptides, containing a D-Phe, Leu or Arg were synthesized by the acylation of pentapeptide obtained by the condensation of tripeptide and dipeptide with dicyclohexylcarbodiimide. It was proved that the α -decanoylpentapeptide containing Arg has the strongest antibacterial activities against gram-negative bacteria in synthesized α -decanoylpentapeptides.

Keywords—amino acid; antibiotic; α -decanoylpeptide; α -decanoyl-Lys-Lys-Thr-Lys-D-Phe-OH; α -decanoyl-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-OH; α -decanoyl-Lys-Lys-Thr-Lys-Arg-OH; H-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-OH

著者らはこれまで抗菌活性ペプチドを検索する目的で塩基性アミノ酸を含むアシルペプチド類を合成し、併せてそれらの化合物の抗菌試験を実施し報告した。

ペプチド性抗生物質は一般に D-アミノ酸残基を含むことが知られているが、D-アミノ酸の存在が抗菌活性に与える影響を検討するために今回、先に報告した³⁾ $C_9H_{19}CO-Lys-Lys-Thr-Lys-D-Leu-OH$ (A) 中の D-Leu を他のアミノ酸で置換したアシルペプチド、および α -アミノ基が遊離のペプチド類の合成とそれらの抗菌検定に着手した。なお、D-Leu と置換したアミノ酸として a) D-Phe, b) Leu, c) Arg (NO_2) の 3 種を次の点に着目し使用した。

a) D-Phe——ポリミキシン B が D-Phe を含有していることから、置換した化合物と A との抗菌活性上の差異の検討。

b) Leu——構成アミノ酸残基が全て L 体からなる化合物と A との抗菌活性の検討。

c) Arg——ポリミキシン系化合物が塩基性アミノ酸を多数含有していることに着目し、Arg を導入することにより塩基性を増加させた場合の抗菌活性の検討。

合成は Chart 1 に示した経路で行った。まず For-Lys(Z)-OH⁴⁾ と a) D-Phe, b) Leu, c) Arg (NO_2) のメチルエステルを CH_2Cl_2 中、DCC で縮合後、2N HCl-MeOH 処理により For 基を脱離し、C 端ジペプチド (2a-c) を得た。ついで For-Lys(Z)-Lys(Boc)-Thr-OH⁵⁾ とジペプチドを DMF 中、DCC 法で縮合し (3a-c) とした。この反応においてラセミ体の生成が推定され、沈澱法で精製を行ったが、一部ラセミ体の含有が考えられるが考慮することなく、次の反応を行った。3a-c に矢島ら⁵⁾ の方法に従い、 $NH_2NH_2 \cdot AcOH$ を作用させ For 基を脱離させ、続いて 1N NaOH でエステルの加水分解を施し (5a-c) とし、化合物 5a-c にアシル基の導入を行った。アシル化はデカン酸塩化物をピリジン存在下縮合し、アシル保護ペンタペプチドを得、ついで TFA-anisole を作用し Boc 基の脱離を行い、ついで Z 基を 10% Pd-C を触媒とし接触還元により除去後、Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーを用い精製を行い、目的とするアシルペンタペプチド (8a-c) を得た。

一方対照体としてアシル基をもたないペンタペプチド (10a-c) の合成も併せて行った。10a-c は前述のペンタペプチド 5a-c に、TFA-anisole を作用し脱 Boc 後、Pd 触媒存在下に接触還元し、10a-c を得た。

Fig. 1. Purification of α -C₉H₁₉CO-Lys-Lys-Thr-Lys-D-Phe-OH (8a) on Sephadex G-10

Column : 1.8 × 25 cm.

Fraction : 5 ml/tube.

Buffer : 0.05 M HCOONH₄-HCOOH pH 6.5.

Fig. 2. Purification of α -C₉H₁₉CO-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-OH (8b) on Sephadex G-10

Column : 1.8 × 25 cm.

Fraction : 5 ml/tube.

Buffer : 0.05 M HCOONH₄-HCOOH pH 6.5.

Fig. 3. Purification of α -C₉H₁₉CO-Lys-Lys-Thr-Lys-Arg-OH (8c) on Sephadex G-10

Column : 1.8 × 25 cm.

Fraction : 5 ml/tube.

Buffer : 0.05 M HCOONH₄-HCOOH pH 6.5.

以上, 化合物 **8a—c** の精製時における溶出曲線を Fig. 1—3 に, 中間体の収率および物理恒数を Table I—III に, 目的とする **8a—c** および **10a—c** の収率, 分析値を Table IV に表示した. さらに化合物 **8** 類および **10** 類について抗菌力の検定を行った. 抗菌力試験は普通寒天平板希釈法によってグラム陽性菌, 陰性菌に対する最小発育阻止濃度 (M.I.C.) を検定し, その結果を Table V に示した. 今回抗菌試験の結果から構造と抗菌活性の間で次の事項が推察された.

- 1) α -アミノ基がアシル化された **8a—c** はグラム陰性菌に抗菌性を認めているが, グラム陽性菌に対する抗菌

TABLE I. Yields and Physical Constants of Intermediates containing D-Phe Component

Compd. No.	Yield(%)	mp (°C)	[α] _D ²⁰	Formula	Analysis (%)		
					Calcd	(Found)	
					C	H	N
1a	82	96—97	+ 5.2° (<i>c</i> =1.0, CH ₂ Cl ₂)	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₆	63.94 (63.54)	6.60 (6.47)	8.95 (8.82)
2a ^{a)}	93	84—85	+ 7.4° (<i>c</i> =1.0, CH ₂ Cl ₂)	C ₂₄ H ₃₂ ClN ₃ O ₅	60.30 (60.01)	6.75 (6.64)	8.79 (8.72)
3a	61	127—129	-20.2° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₄ H ₇₆ N ₈ O ₁₄	61.11 (61.05)	7.22 (7.16)	10.56 (10.44)
4a	66	152—153	-34.6° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₃ H ₇₆ N ₈ O ₁₃	61.61 (61.38)	7.41 (7.38)	10.85 (10.81)
5a	66	158—160	-26.5° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₂ H ₇₄ N ₈ O ₁₃	61.28 (61.24)	7.32 (7.17)	11.00 (10.87)
6a	76	181—183	-30.8° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₆₂ H ₉₂ N ₈ O ₁₄	63.46 (63.22)	7.90 (7.78)	9.55 (9.52)
7a ^{a)}	89	167—168	-28.2° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₇ H ₈₅ ClN ₈ O ₁₂	61.69 (61.52)	7.72 (7.69)	10.10 (10.02)
9a ^{b)}	79	163—165	-30.1° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₄₇ H ₆₈ Cl ₂ N ₈ O ₁₂	56.00 (55.84)	6.80 (6.73)	11.12 (11.02)

a) HCl salt, b) 2 HCl salt.

TABLE II. Yields and Physical Constants of Intermediates containing Leu Component

Compd. No.	Yield(%)	mp (°C)	[α] _D ²⁰	Formula	Analysis (%)		
					Calcd	(Found)	
					C	H	N
1b	80	124—126	-26.3° (<i>c</i> =1.0, CH ₂ Cl ₂)	C ₂₂ H ₃₃ N ₃ O ₆	60.67 (60.52)	7.64 (7.59)	9.65 (9.61)
2b ^{a)}	89	156—157	-52.4° (<i>c</i> =1.0, CH ₂ Cl ₂)	C ₂₁ H ₃₄ ClN ₃ O ₅	56.81 (56.67)	7.72 (7.58)	9.47 (9.44)
3b	64	162—163	-65.0° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₁ H ₇₈ N ₈ O ₁₄	59.63 (59.38)	7.65 (7.56)	10.91 (10.78)
4b	70	187—188	-61.3° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₀ H ₇₈ N ₈ O ₁₃	60.10 (59.98)	7.87 (7.80)	11.22 (11.16)
5b	65	162—163	-56.2° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₄₉ H ₇₆ N ₈ O ₁₃	59.74 (59.59)	7.78 (7.69)	11.38 (11.30)
6b	78	173—174	-42.4° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₉ H ₉₄ N ₈ O ₁₄	62.19 (62.01)	8.32 (8.27)	9.84 (9.67)
7b ^{a)}	78	182—184	-36.6° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₅₄ H ₈₇ ClN ₈ O ₁₂	60.29 (60.08)	8.15 (8.12)	10.42 (10.38)
9b ^{b)}	78	175—177	-36.5° (<i>c</i> =1.0, DMF)	C ₄₄ H ₇₀ Cl ₂ N ₈ O ₁₁	55.16 (55.14)	7.37 (7.19)	11.70 (11.65)

a) HCl salt, b) 2HCl salt.

力は認められなかった. 2) α -アミノ基がアシル化されていない遊離の **10a—c** はグラム陰性菌, 陽性菌, いずれに対しても抗菌力を示さなかった. 3) 化合物 **A** 中の *D*-Leu を *D*-Phe で置換した **8a** は, かなりの抗菌性を示した. 4) Leu を導入した **8b** の化合物は **A** より弱い抗菌性を示した. 5) 塩基性の増大をはかるため Arg を導入した化合物 **8c** は, 一部のグラム陰性菌に対し著効を示した.

以上のことから抗菌力の発現増強には, α -アミノ基がアシル化されていること, また *D*-アミノ酸の導入, および塩基性の増強の必要性が示唆された.

TABLE III. Yields and Physical Constants of Intermediates containing Arg Component

Compd. No.	Yield(%)	mp (°C)	$[\alpha]_D^{20}$ (<i>c</i> = 1.0, DMF)	Formula	Analysis (%)		
					Calcd	Found	
					C	H	N
1c	73	142—144	−12.2°	C ₂₂ H ₃₃ N ₇ O ₈	50.47 (50.40)	6.35 (6.31)	18.73 (18.68)
2c ^{a)}	81	124—126	−20.4°	C ₂₁ H ₃₄ ClN ₇ O ₇	47.41 (47.28)	6.44 (6.39)	18.43 (18.38)
3c	59	156—158	−35.3°	C ₅₁ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₆	54.92 (54.75)	7.05 (6.96)	15.07 (15.04)
4c	61	178—180	−45.9°	C ₆₀ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₅	55.23 (55.08)	7.23 (7.19)	15.46 (15.23)
5c	60	172—173	−32.7°	C ₄₉ H ₇₀ N ₁₂ O ₁₅	54.84 (54.77)	7.14 (7.08)	15.66 (15.60)
6c	70	164—166	−47.8°	C ₅₉ H ₉₄ N ₁₂ O ₁₆	57.73 (57.58)	7.72 (7.64)	13.69 (13.63)
7c ^{a)}	79	154—156	−40.2°	C ₅₄ H ₈₇ ClN ₁₂ O ₁₄	55.73 (55.52)	7.54 (7.38)	14.44 (14.37)
9c ^{b)}	72	163—165	−38.2°	C ₄₄ H ₇₀ Cl ₂ N ₁₂ O ₁₃	50.52 (50.36)	6.75 (6.69)	16.07 (15.98)

a) HCl salt, b) 2HCl salt.

TABLE IV. Yields and Analytical Data of Synthetic α -Decanoylpentapeptides Hydrochloride (**8a—c**) and Pentapeptides Hydrochloride (**10a—c**)

Compd. No.	Yield (%)	mp (°C)	$[\alpha]_D^{20}$ <i>c</i> = 1.0 H ₂ O	P.P.C.		Amino acid analysis ^{c)}				
				<i>Rf</i> ^{a)}	<i>Rf</i> ^{b)}	Found (Calcd)				
						Lys	Thr	<i>D</i> -Phe	Leu	Arg
8a	49	205—207	−30.2°	0.59	0.72	2.87 (3)	0.94 (1)	0.95 (1)		
8b	57	173—175	−24.7°	0.54	0.47	2.87 (3)	0.92 (1)		0.98 (1)	
8c	57	184—186	−40.3°	0.35	0.64	2.88 (3)	0.93 (1)			0.92 (1)
10a	58	202—204	−28.8°	0.52	0.68	2.84 (3)	0.93 (1)	0.95 (1)		
10b	55	192—194	−27.0°	0.47	0.41	2.85 (3)	0.94 (1)		0.98 (1)	
10c	74	192—194	−46.2°	0.31	0.54	2.84 (3)	0.95 (1)			0.93 (1)

a) BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5)

Color reagent: Ninhydrin.

b) BuOH-AcOH-pyridine-H₂O (15:3:10:12)

Color reagent: Ninhydrin.

c) Acid hydrolysates (6*N* HCl, 108°C, 24 h).

Toyo Roshi No. 51.

Toyo Roshi No. 51.

TABLE V. *In Vitro* Antibacterial Activities of α -Decanoylpentapeptides Hydrochloride (8a—c) and Pentapeptides Hydrochloride (10a—c) against Bacteria (M.I.C., $\mu\text{g/ml}$)

Bacteria	8a	10a	8b	10b	8c	10c
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	1.56	50	50	>100	1.56	>100
<i>Escherichia coli</i> 11 D 953	0.78	50	50	>100	1.56	>100
<i>Shigella flexneri</i> 2a EW 10	0.78	50	50	>100		
<i>Shigella sonnei</i> EW 33	0.39	50	25	>100		
<i>Salmonella typhosa</i> 0901	0.78	50	50	>100		
<i>Salmonella enteritidis</i> G 14	1.56	100	100	>100		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kasuya	1.56	>100	100	>100		
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19 US	>100	>100	>100	>100		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P 1	6.25	>100	>100	>100	3.12	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P 31	0.78	50	100	>100	3.12	>100
<i>Serratia marcescens</i> II D 619	100	>100	>100	>100	9.78	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	50	>100	>100	>100

Chart 1

実 験 の 部⁶⁾

For-Lys(Z)-D-Phe-OMe (1a) For-Lys(Z)-OH 15.4 g (0.05 mol) と H-D-Phe-OMe 9.0 g (0.05 mol) を CH_2Cl_2 50 ml に溶解, -10°C に冷却, 攪拌下 DCC 11.3 g (0.055 mol) を加えた後, 氷室で 24 h 放置, AcOH 2 ml を加え室温で 1 h 攪拌, 析出したジシクロヘキシル尿素 (DC Urea) を濾去, CH_2Cl_2 で洗浄後, 母液と洗液を合わせ 3% クエン酸, H_2O , 5% NaHCO_3 , H_2O で順次洗浄. 無水 Na_2SO_4 で乾燥後, 溶媒留去. CH_2Cl_2 -ether から再結晶. 収量 19.2 g. Table I.

また, H-D-Phe-OMe の代わりに H-Leu-OMe および H-Arg(NO_2)-OMe を用い, 上記と同様の方法により Leu 体 (1b), Arg(NO_2) 体 (1c) を得. Table II, Table III.

H-Lys(Z)-D-Phe-OMe·HCl (2a) 1a 18.5 g (0.04 mol) を 2N HCl-MeOH⁷⁾ 20 ml に溶解, 室温で 1 h 攪拌後, 減圧下に HCl および MeOH を留去. 残渣を ether で洗浄し乾燥. 結晶を少量の DMF に溶解, ether を加え氷室に放置. 析出した結晶を濾取, ether で洗浄し乾燥. EtOH-ether から再結晶. 収量 17.5 g.

同様の方法で 2b, 2c を得.

For-Lys (Z)-Lys (Boc)-Thr-Lys (Z)-D-Phe-OMe (3a) 2a 11.9 g (0.02 mol) を DMF 100 ml に溶解, Et₃N 2.8 ml で中和後, -10°C に冷却, 攪拌下, For-Lys (Z)-Lys (Boc)-Thr-OH 15.9 g (0.02 mol) と DCC 5.7 g (0.03 mol) を加え氷室に 24 h 放置. AcOH 2 ml を加え室温で 1 h 攪拌, 析出した結晶を濾過, 少量の DMF で洗浄し, 母液と洗液を合わせ, 減圧濃縮. 残渣を少量の DMF に溶解し濾過, 濾液を冷飽和食塩水に注入し氷室に 2 h 放置, 析出した結晶を濾取, 結晶を 5% クエン酸, H₂O, 5% NaHCO₃, H₂O で順次洗浄, 乾燥. 収量 16.1 g.

同様の方法で 3b, 3c を得.

H-Lys (Z)-Lys (Boc)-Thr-Lys (Z)-D-Phe-OMe (4a) 3a 15.5 g (0.01 mol) を pH 6.0 NH₂NH₂-AcOH-MeOH 混液⁹⁾ 100 ml に溶解, 水浴上 60°C で 12 h 加温後, 減圧濃縮. 残渣を DMF に溶解し濾過. 濾液に ether を加え氷室に一夜放置, 析出した結晶を濾取, ether で洗浄し乾燥後, DMF-ether から再結晶. 収量 10.0 g.

同様の方法で 4b, 4c を得.

H-Lys (Z)-Lys (Boc)-Thr-Lys (Z)-D-Phe-OH (5a) 4a 9.0 g (8.71 mmol) をジオキサン 20 ml に溶解し, 1 N NaOH 8.7 ml を室温攪拌下に滴下, さらに 2 h 攪拌後, AcOH 酸性とし濾過, 濾液を減圧濃縮, 残渣を冷飽和食塩水で洗浄後, DMF に溶解, 不溶物を濾去, 濾液を濃縮, 残液に ether を加え氷室に 2 h 放置, 析出した結晶を濾取, ether で洗浄し乾燥. 収量 5.9 g. 同様の方法で 5b, 5c を得.

C₉H₁₉CO-Lys (Z)-Lys (Boc)-Thr-Lys (Z)-D-Phe-OH (6a) 5a 4.0 g (3.92 mmol) をジオキサン 20 ml に溶解, 室温で攪拌下に decanoyl chloride 0.75 g とピリジン 2 ml を交互に滴下, さらに 12 h 室温で攪拌. ついで AcOH 酸性とし減圧濃縮, 残渣を少量の DMF に溶解し, 不溶物を濾去, 濾液を濃縮, 残渣を水洗後, 再び少量の DMF に溶解し ether を加えて攪拌後, 氷室に一夜放置, 析出した結晶を濾取, ether で洗浄後, 乾燥. 収量 3.5 g.

同方法によって 6b, 6c を得.

C₉H₁₉CO-Lys (Z)-Lys-Thr-Lys (Z)-D-Phe-OH·HCl (7a) 6a 3.3 g (2.81 mmol) に anisole 1.5 ml 存在下, 氷冷しつつ TFA 6 ml を加え溶解, 室温で 1 h 攪拌後, 減圧濃縮. 残渣を少量の DMF に溶解, dry ether を加え氷室に放置, 析出した沈澱を dry ether で洗浄し KOH 粒上で減圧乾燥. 結晶を 1 N HCl-ジオキサン 5 ml に溶解後, 減圧濃縮. 収量 2.78 g.

同方法によって 7b, 7c を得.

C₉H₁₉CO-Lys-Lys-Thr-Lys-D-Phe-OH·3HCl (8a) 7a 2.3 g (2.07 mmol) を MeOH-AcOH 混液 (10 : 1) 50 ml に溶解, 10% Pd-C を触媒として H₂ を通じる. 反応終了後, 触媒を濾去, MeOH で洗浄し, 洗液と母液を合わせ, 減圧濃縮. 残渣を 1 N HCl に溶解, 濾過, 濾液を Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーに付し, pH 6.5, 0.05 M HCOONH₄-HCOOH で溶出し単一画分を得. この溶出液を凍結乾燥, 残渣を 0.5 N HCl-MeOH⁷⁾ に溶解, 不溶物を濾去, 濾液を凍結乾燥. 収量 0.94 g.

同方法によって 8b, 8c を得. 本品の分析値などを Table IV に示した.

H-Lys (Z)-Lys-Thr-Lys (Z)-D-Phe-OH·2HCl (9a) 5a 1.5 g (1.47 mmol) に anisole 1 ml 存在下, 氷冷下 TFA 4 ml を加えて溶解, 7a の合成と同様に処理. 収量 1.17 g.

同方法によって 9b, 9c を得.

H-Lys-Lys-Thr-Lys-D-Phe-OH·4HCl (10a) 9a 1.0 g (0.99 mmol) を MeOH-AcOH 混液 (10 : 1) 25 ml に溶解, 8a の合成と同様に処理. 収量 0.46 g.

同方法によって 10b, 10c を得. 本品の分析値などを Table IV に示した.

謝辞 本研究に際し, 元素分析を実施して頂きました本学 榊原房夫氏, アミノ酸分析を担当して頂きました本学 佐々木有亮氏ならびに抗菌試験を実施して頂きました科薬抗生物質研究所の諸氏に深謝致します.

引用文献および注

- 1) 第 15 報 : 栗原藤三郎, 伊藤秀雄, 土田良雄, 東北薬科大学研究年報, 27, 93 (1980).
- 2) アミノ酸, ペプチドおよび保護基などの略号は IUPAC-IUB の規定に従った. *Biochim. Biophys. Acta*, 263, 205 (1972). 本研究で用いたアミノ酸は, Phe を除いてすべて L 型である. その他の保護基および試薬の略号は次の通りである.: DMF=dimethylformamide, DCC=dicyclohexylcarbodiimide, TFA=trifluoroacetic acid, Et₃N=triethylamine, Z=benzyloxycarbonyl, Boc=*tert*-butoxycarbonyl, For=for-

myl, OMe=methyl ester.

- 3) 栗原藤三郎, 伊藤秀雄, 土田良雄, 薬誌, **101**, 349 (1981).
- 4) D.E. Wole, J. Valiant, R.L. Peck, K. Folkess, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2002 (1952).
- 5) H. Yajima, Y. Okada, Y. Kinomura, N. Mizokami, H. Kawatani, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1237 (1969).
- 6) 各 physical constants は次の装置を用いて測定した. 融点: 柳本微量融点測定装置 (未補正), 旋光度: アタゴ偏光計ポーラックス, アミノ酸分析: 日立 KLA-3 B 型アミノ酸分析計.
- 7) 2 N HCl-MeOH : 0.5 N HCl-MeOH : 無水 MeOH に乾燥塩化水素ガスを導入し各々 2 N, 0.5 N に調整した溶液.
- 8) $\text{NH}_2\text{NH}_2\text{-AcOH-MeOH}$ 混液= $\text{NH}_2\text{NH}_2\text{-MeOH}$ (10 : 1) に AcOH を加え pH 6.0 に調整した溶液.