薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (7) 766-770 (1983)

抗菌性ペプチドの研究 (第 19 報^{1,2)}) 塩基性アミノ酸を含む
 α -アシルペンタペプチド類の合成と抗菌活性 (第 8 報)

伊藤秀雄,* 鈴木稠徳, 土田良雄
東北薬科大学

Studies on Antibacterial Peptide. XIX.^{1,2)} Synthesis and
Antibacterial Activity of α -Acylpentapeptides,
containing Basic Amino Acids. VIII

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

(Received February 21, 1983)

Three derivatives of α -acyl-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH including 2,3-diaminopropionic acid (A₂pr) (a component of tuberactinomycin (Tum)) were synthesized to investigate the relationship between the chemical structure and antibacterial activity. These compounds were synthesized as pentapeptide by stepwise elongation method and by liquid phase method with dicyclohexylcarbodiimide and 1-hydroxybenzotriazole, and acylated by (+)-6-methyloctanoyl chloride or two kinds of aliphatic acyl chloride. It was proved that these compounds show very strong antibacterial activity against gram-negative bacteria. Each compound has about one fourth as strong activity as colistin sulfate has.

Keywords—antibiotic; 2,3-diaminopropionic acid; antibacterial activity; stepwise elongation; α -acyl-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH

著者らはこれまでに塩基性アミノ酸を含有し, N 端アミノ酸の α -アミノ基に (+)-6-methyloctanoyl chloride をはじめとする脂肪族および芳香族 acyl chloride によりアシル化を施し, かつアミノ酸残基が 5 個以内の直鎖または環状アシルペプチド類を合成し, 併せて抗菌試験を行い, 抗菌力を有する化合物を数種見出すことができた.^{1,3a-d)} 今回, 抗菌作用の増強および化学構造と抗菌作用との相関関係について知見を得ることを目的し, ヒト型結核菌に著効を示すペプチド性抗生物質 tuberactinomycin (=Tum) 中に, 塩基性アミノ酸である L-2,3-diaminopropionic acid (=A₂pr) が含まれることから今回, 容易に入手できる DL-A₂pr を用いて予試験的に α -アシルペンタペプチド類を合成し, 併せて抗菌試験を実施した結果, かなり強い抗菌性を示す化合物が見出されたので報告する. なお今回, 合成に使用したアミノ酸残基のうち A₂pr は DL 体, Leu は D 体, Thr は L 体を用い, 抗菌試験には指標として硫酸コリスチン (CLS) を使用した.

合成は Chart 1 に従い, stepwise elongation 法により行った. すなわち常法通り H-DL-A₂pr(Z)-OH⁴⁾ を For 化して得られる For-DL-A₂pr(Z)-OH (1) と H-D-Leu-OMe⁵⁾ とを DMF 中, HOBT-DCC⁶⁾ 存在下縮合し, 次に 2N HCl-MeOH により For 基を脱離しジペプチドメチルエステル (3) を得た. さらに 3 に Boc-Thr(Bzl)-OH⁷⁾ を同様の条件下で縮合し, TFA-anisole 処理により Boc 基を脱離後, For-DL-A₂pr(Z)-OH を DMF 中 HOBT-DCC で縮合し脱 For 化後, さらに同様の処理で For-DL-A₂pr(Z)-OH を縮合し, ペンタペプチド (8) を得た. 8 に 1N HCl-MeOH を作用し脱 For 化後, 1N NaOH による加水分解を行い化合物 (10) を得た. 続いてアシル化を施した. アシル化は前報¹⁾ の (+)-6-methyloctanoyl chloride の他, 2 種のカルボン酸塩化物を pyridine 存在下縮合しアシル体 (11a-c) を得た. ついで 11 を 10% Pd-C 触媒存在下接触還元を施し Z 基, Bzl 基を脱離し, 目的とする α -アシルペンタペプチド類 (12a-c) を得た.

同時に抗菌活性を比較検討するために対照体として, アシル基をもたないペプチド (13) を 10 から接触還元により合成した. 12a-c および 13 の精製は Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーを用い pH 6.5 0.05 M

Chart 1. Synthetic Scheme for Acylpentapeptides (12a—c)

HCOONH₄ 緩衝液で溶出後、塩酸塩に導いた。今回の合成過程で生成されると思われるジアステレオマーについては、これらを単離することなく抗菌試験を実施した。抗菌試験は 12a—c および 13 について普通寒天平板希釈法による抗菌試験を施し、グラム陽性菌、陰性菌に対する最小発育阻止濃度 (M.I.C.) で示した。

以上合成した中間体の収率と物理恒数を Table I に、目的物の物理恒数を Table II に示した。また 12a, およ

TABLE I. Yields and Physical Constants of Acyl-DL-A₂pr(Z)-DL-A₂pr(Z)-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OH (11a—c)

Compd. 11	Acyl radical	Yield (%)	mp (°C)	Formula	Analysis (%)		
					Calcd	Found	
					C	H	N
a	(+)-6-Methyloctanoyl	78	190—192	C ₅₉ H ₇₈ N ₈ O ₁₄	63.08 (63.21)	7.00 (7.06)	9.98 (10.01)
b	(±)-3,7-Dimethyloctanoyl	76	185—187	C ₆₀ H ₈₀ N ₈ O ₁₄	63.36 (63.52)	7.09 (7.21)	9.85 (9.97)
c	Decanoyl	88	192—194	C ₆₀ H ₈₀ N ₈ O ₁₄	63.36 (63.47)	7.09 (7.15)	9.85 (9.91)

TABLE II. Yields and Physical Constants of Acyl-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH·3HCl (12a—c)

Compd. 12	Yield (%)	mp (°C)	PPC		Formula	Analysis (%)		
			Rf ^{a)}	Rf ^{b)}		Calcd	Found	
						C	H	N
a	73	193—195	0.54	0.82	C ₂₈ H ₅₇ Cl ₃ N ₈ O ₈	45.44 (45.61)	7.76 (7.84)	15.14 (15.25)
b	68	188—190	0.46	0.71	C ₂₉ H ₅₉ Cl ₃ N ₈ O ₈	46.18 (46.30)	7.89 (7.96)	14.86 (14.91)
c	70	177—178	0.44	0.73	C ₂₉ H ₅₉ Cl ₃ N ₈ O ₈	46.18 (46.27)	7.89 (7.94)	14.86 (14.95)

a) BuOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 5), Toyo Roshi No. 51, Color reagent; Ninhydrin.

b) BuOH-AcOH-pyridine-H₂O (15 : 3 : 10 : 12), Toyo Roshi No. 51, Color reagent; Ninhydrin.

Fig. 1. Purification of (+)-6-Methyloctanoyl-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH (12a) on Sephadex G-10

Column : 1.8 × 25 cm,
Fraction: 5 ml/tube,
Buffer : 0.05 M HCOONH₄, pH 6.5.

Fig. 2. Purification of H-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH (13) on Sephadex G-10

Column : 1.8 × 25 cm,
Fraction: 5 ml/tube,
Buffer : 0.05 M HCOONH₄, pH 6.5.

TABLE III. *In Vitro* Antibacterial Activities of Acyl-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH Hydrochloride (12a—c) and H-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH Hydrochloride (13) against Bacteria (M.I.C., mcg/ml)

Bacteria	12a	12b	12c	13	CLS
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	3, 12	3, 12	3, 12	>100	0, 78
<i>Escherichia coli</i> IID-953	3, 12	3, 12	3, 12	>100	0, 78
<i>Escherichia coli</i> IID-955	6, 25	6, 25	12, 5	>100	1, 56
<i>Escherichia coli</i> IID-958	3, 12	6, 25	6, 25	>100	1, 56
<i>Escherichia coli</i> IID-979	6, 25	6, 25	6, 25	>100	1, 56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3453	12, 5	12, 5	25	>100	6, 25
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	100	100	>100	>100	50
<i>Sarcina lutea</i> ATCC-9341	>100	>100	>100	>100	>100

CLS=colistin sulfate.

び 13 のクロマトグラフィーの溶出曲線を Fig. 1, 2 に, 抗菌試験の結果を Table III に示した.

今回合成したアシルペプチド 3 種, アシル基を有しないペプチド 1 種, 合せて 4 種の化合物に対する抗菌試験の結果は次の通りであった.

1) アシルペプチド類 12a—c は全般に, グラム陰性菌にかなりの抗菌力を示した. しかし, グラム陽性菌に対する抗菌性は認められなかった.

2) 3 種のアシルペプチド類は, 指標として用いた CLS と比較すると *Escherichia coli* NIHJ をはじめ数種のグラム陰性菌に対し CLS の 1/4 の抗菌性を示したが, アシル基の種類による抗菌力に優位の差はなく, 3 種ともほぼ同程度の抗菌性を示していることから, 炭素数が近似したアシル基は抗菌性に影響を及ぼさないように推察される.

3) アシル基をもたないペプチドは前報¹⁾ 同様, 抗菌力を示さなかった.

グラム陽性菌に対して抗菌性をもつ Tum に存在する A₂pr を含有したアシルペプチド類は, これまで著者が報告してきた化合物,^{1,3a-d)} および polymyxin 系抗生物質と同様にグラム陰性菌に対してはかなりの抗菌力

が認められたが、グラム陽性菌に対しては抗菌性が認められなかった点を検討し、また今回合成したこれらのペプチド類はジアステレオマーの混合体であることから、さらにこれらの混合体を単離し、抗菌性を検定するとともに、現在行っている抗菌試験は抗菌活性のみを追求しているが、今後は毒性試験も併せ静菌性および殺菌性の観点から検討を行う必要があると考える。

実験の部⁸⁾

For-DL-A₂pr(Z)-OH (1) H-DL-A₂pr(Z)-OH 4.7 g (0.02 mol) を HCOOH 200 ml と (CH₃CO)₂O 2 ml との混液に溶解し室温下 24 h 攪拌後、等量の水で希釈、25 ml まで減圧濃縮し EtOAc 200 ml を加え、1 N HCl, H₂O で順次洗浄。無水 Na₂SO₄ で乾燥、減圧濃縮し残渣を EtOAc から再結晶。収量 4.6 g (87%)。mp 97°C. *Anal.* Calcd C₁₂H₁₄N₂O₅: C, 54.13; H, 5.30; N, 10.52. Found: C, 54.31; H, 5.42; N, 10.57.

For-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (2) 1 5.3 g (0.02 mol) と H-D-Leu-OMe 2.9 g (0.02 mol) を DMF 50 ml に溶解、-5°C に冷却攪拌下 DCC 4.5 g (0.02 mol) および HOBT 2.7 g (0.02 mol) を加えた後、1 h 攪拌、ついで氷室に 24 h 放置。AcOH 1 ml を加えて 1 h 攪拌、析出するジクロヘキシル尿素 (DCUrea) を濾去。DMF で洗浄し母液と洗液を合わせて減圧濃縮。残渣を EtOAc に溶解し 10% Na₂CO₃, H₂O, 10% クエン酸, H₂O で順次洗浄。無水 MgSO₄ で乾燥後減圧濃縮。残渣を EtOAc-CH₂Cl₂ から再結晶。収量 7.2 g (92%)。mp 122—124°C. *Anal.* Calcd C₁₉H₂₇N₃O₆: C, 58.00; H, 6.92; N, 11.50. Found: C, 58.34; H, 7.03; N, 11.58.

H-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (3) 2 3.9 g (0.01 mol) を 2 N HCl-MeOH⁹⁾ 50 ml に溶解し、室温で 2 h 攪拌後、減圧濃縮。残渣に H₂O を加え EtOAc 抽出し EtOAc 層を 10% NaHCO₃ でアルカリ性 (pH=9) とし、EtOAc で抽出。EtOAc 層を水洗し無水 MgSO₄ で乾燥、溶媒を減圧濃縮。残渣を EtOAc-ether から再結晶。収量 3.2 g (87%)。mp 153—154°C. *Anal.* Calcd C₁₈H₂₇N₃O₅: C, 59.16; H, 7.45; N, 11.50. Found: C, 59.30; H, 7.56; N, 11.62.

Boc-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (4) 3 3.6 g (0.01 mol), Boc-Thr(Bzl)-OH 2.1 g (0.01 mol) および HOBT 1.4 g (0.01 mol) を DMF 50 ml に溶解し、-10°C に冷却、攪拌下 DCC 2.2 g (0.01 mol) を加えた後、2 と同様に処理。収量 5.2 g (79%)。mp 172—174°C. *Anal.* Calcd C₃₄H₄₈N₄O₉: C, 62.18; H, 7.37; N, 8.53. Found: C, 62.35; H, 7.42; N, 8.62.

H-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (5) 4 3.3 g (0.005 mol) を TFA 10 ml に溶解し anisole 0.5 ml を加え 1 h 攪拌後、ether を加え傾斜し、油状部を分取。分取した油状部を冷飽和食塩水に懸濁し、冷却した飽和 K₂CO₃ 水溶液でアルカリ性 (pH=9) とする。生じた油状物を分取、EtOAc に溶解し冷飽和食塩水で洗浄、無水 MgSO₄ で乾燥、溶媒を留去、残渣を EtOAc-acetone から再結晶。収量 2.0 g (73%)。mp 168—170°C. *Anal.* Calcd C₂₉H₄₀N₄O₇: C, 62.57; H, 7.24; N, 10.07. Found: C, 62.69; H, 7.31; N, 10.11.

For-DL-A₂pr(Z)-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (6) 5 2.2 g (0.004 mol), For-DL-A₂pr(Z)-OH 1.1 g (0.004 mol) と HOBT 0.6 g (0.004 mol) を DMF 20 ml に溶解し、-10°C に冷却、攪拌下 DCC 0.9 g (0.004 mol) を加え、1 h 攪拌後、氷室に 24 h 放置、ついで AcOH 0.5 ml を加え室温で 1 h 攪拌、析出する DCUrea を濾去、DMF で洗浄し母液と洗液を合わせて減圧濃縮。残渣を 10% NaHCO₃, H₂O, 10% クエン酸, H₂O で順次洗浄、乾燥後 DMF に溶解し pet. ether を加えて氷室に放置。析出する結晶を濾取、pet. ether で洗浄後、乾燥。収量 2.1 g (68%)。mp 175—177°C. *Anal.* Calcd C₄₁H₅₂N₆O₁₁: C, 61.18; H, 6.51; N, 10.44. Found: C, 61.35; H, 6.62; N, 10.60.

H-DL-A₂pr(Z)-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (7) 6 2.4 g (0.003 mol) を 1 N HCl-MeOH⁹⁾ 50 ml に溶解し、2 h 室温で攪拌後、減圧濃縮。残渣を DMF に溶解、Et₃N で中和し冷飽和食塩水に注入し氷室に放置。析出する結晶を濾取し乾燥後 DMF に溶解、pet. ether を加えて結晶を濾取、pet. ether で洗浄し乾燥。収量 2.1 g (87%)。mp 168—171°C. *Anal.* Calcd C₄₀H₅₂N₆O₁₀: C, 61.84; H, 6.75; N, 10.82. Found: C, 61.91; H, 6.87; N, 10.95.

For-DL-A₂pr(Z)-DL-A₂pr(Z)-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (8) 7 2.3 g (0.003 mol), For-DL-A₂pr(Z)-OH 0.8 g (0.003 mol) および HOBT 0.4 g (0.003 mol) を DMF 20 ml に溶解し冷却、攪拌下に DCC 0.7 g (0.003 mol) を加えた後 6 と同様に処理。収量 2.6 g (85%)。mp 182—184°C. *Anal.* Calcd C₅₂H₆₄N₈O₁₄: C, 60.92; H, 6.29; N, 10.93. Found: C, 61.11; H, 6.42; N, 10.98.

H-DL-A₂pr(Z)-DL-A₂pr(Z)-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OMe (9) 8 2.0 g (0.002 mol) を 1 N HCl-MeOH 20 ml に溶解した後、7 と同様に処理。収量 1.8 g (91%)。mp 173—175°C. *Anal.* Calcd C₅₁H₆₄N₈O₁₃: C, 61.43; H, 6.47; N, 11.24. Found: C, 61.55; H, 6.61; N, 11.31.

H-DL-A₂pr(Z)-DL-A₂pr(Z)-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OH (10) 9 2.0 g (0.002 mol) を dioxane 10 ml に溶解し, 1 N NaOH 2 ml を加え, 室温で 1 h 攪拌後 AcOH 酸性とし減圧濃縮. 残渣を DMF に溶解し不溶物を濾去. 濾液を冷飽和食塩水に注入し析出した結晶を濾取. 乾燥後 DMF に溶解し ether を加えて結晶を濾取. Ether で洗浄し乾燥. 収量 1.7 g (90%). mp 183—185°C. *Anal.* Calcd C₅₀H₆₂N₈O₁₃: C, 61.09; H, 6.36; N, 11.40. Found: C, 61.22; H, 6.51; N, 11.47.

(+)-6-Methyloctanoyl-DL-A₂pr(Z)-DL-A₂pr(Z)-Thr(Bzl)-DL-A₂pr(Z)-D-Leu-OH (11a) 10 0.5 g (0.5 mmol) を THF-DMF (2:1) 混液 5 ml に溶解し pyridine 0.1 ml を加え室温, 攪拌下に (+)-6-methyloctanoyl chloride 0.15 g (0.85 mmol) を滴下, 滴下後 3 h 攪拌, 冷 10% クエン酸溶液 50 ml に注入後氷室に放置. 析出した結晶を濾取, DMF に溶解し ether を加え, 析出した結晶を濾取, 乾燥. 収量 0.47 g. 以下 (±)-3,7-dimethyloctanoyl 体 (11b), decanoyl 体 (11c) も対応する脂肪酸塩化物を同様の方法により縮合し合成した (Table I).

(+)-6-Methyloctanoyl-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH·3HCl (12a) 11a 0.45 g (0.40 mmol) を MeOH 50 ml に溶解し 1 N HCl-MeOH 2 ml および 10% Pd-C を触媒とし H₂ を通ずる. 反応終了後, 触媒を濾去. MeOH で洗浄し母液と洗液を合わせ減圧濃縮. 残渣を 1 N HCl に溶解し, 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 緩衝液で溶出し単一画分を得. この溶出液を凍結乾燥し, 残渣を 0.1 N HCl-MeOH⁹⁾ に溶解し凍結乾燥. 白色粉末を得. 収量 0.22 g. 酸加水分解物のアミノ酸分析¹⁰⁾; Calcd (Found): DL-A₂pr 3 (2.86), Thr 1 (0.92), D-Leu 1 (0.92).

同方法によって, 他のアシル誘導体を 11b, 11c からそれぞれ 12b, 12c を得 (Table II).

H-DL-A₂pr-DL-A₂pr-Thr-DL-A₂pr-D-Leu-OH·4HCl (13) 10 0.5 g (0.5 mmol) を MeOH 50 ml に溶解し, 2a の合成と同様に処理. 収量 0.22 g (69%). mp 164—165°C. *Rf*^{a)} 0.37, *Rf*^{b)} 0.57 (Table II). *Anal.* Calcd C₁₉H₄₂Cl₄N₈O₇: C, 35.86; H, 6.65; N, 17.61. Found: C, 35.95; H, 6.73; N, 17.68.

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 開発部薬理研究センターの諸氏に深謝致します.

引用文献および注

- 1) 第 18 報: 栗原藤三郎, 伊藤秀雄, 土田良雄, *Jpn. J. Antibiotics.*, **36**, 1615 (1983).
- 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. *Biochemistry*, **11**, 1726 (1972). 本研究で用いた保護基および試薬の略号は次の通りである. For=formyl, Boc=*tert*-butoxy-carbonyl, Z=carbobenzyloxy, OMe=methyl ester, Bzl=benzyl ether, DCC=Dicyclohexylcarbodi-imide, HOBT=1-hydroxybenzotriazole, DMF=dimethylformamide, TFA=trifluoroacetic acid, Et₃N=triethylamine, THF=tetrahydrofuran, EtOAc=ethyl acetate, AcOH=acetic acid, MeOH=methyl alcohol.
- 3) a) 栗原藤三郎, 伊藤秀雄, 土田良雄, 薬誌, **101**, 349 (1981); b) *Idem*, 東北薬科大学研究年報, **27**, 93 (1980); c) *Idem*, 薬誌, **103**, 73 (1983); d) *Idem*, *ibid.*, **103**, 80 (1983).
- 4) S. Takagi, H. Tsukatani, K. Hayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **7**, 616 (1959).
- 5) M. Brenner, W. Hüber, *Helv. Chim. Acta*, **36**, 115 (1953).
- 6) W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 788 (1970).
- 7) T. Mizoguchi, G. Levin, D.W. Woolley, J.M. Stewart, *J. Org. Chem.*, **33**, 903 (1968).
- 8) 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: 835 形日立高速アミノ酸分析計, 紫外部 (UV) スペクトル: 島津製 UV-240.
- 9) 2 N HCl-MeOH, 1 N HCl-MeOH, 0.1 N HCl-MeOH: 無水 MeOH に乾燥塩化水素ガスを導入し, 各々 2 N, 1 N, 0.1 N に調整した溶液.
- 10) アミノ酸分析のための試料は, 定沸点 HCl により脱気した封管中 108°C, 24 h 加水分解したものである.