U.D.C. 577.164.111

133. 川崎 弼：シオール型 Thiamine 誘導体について その 6 Thiamine 磷酸
エステル類の S-アセチル化とその Transacetylation (Vitamin B₁ 及び
諸関係化合物の研究 第 75 報*)

Hazime Kawasaki: Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds. LXXV*.
Thiol-type Thiamine Derivatives. (6). S-Acyl Thiamine Phosphate
and Its Transacetylation.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd**)

Thiamine monophosphate or diphosphate was acetylated with acetic anhydride in alkaline solution and passed through a column of ion exchanger, H-type Amberlite XE-64. By these means, S-acetylthiamine phosphates were obtained as practically pure crystals and their reaction with glutathione effected transacetylation to form S-acetylglutathione.

(Received February 9, 1956)

さきにシオール型 thiamine を acyl 化して合成した 2-methyl-4-amino-5-[N-(3'-acylthio-5'-acyloxy-4'-pentenyl-2')]formamidomethylpyrimidine (O,S-diacetyl thiamine) の S-acyl 基は glutathione, cysteine 等の有する活性の thiol 基へ容易に transacylation することを報告した¹⁾。その際 thiamine の作用機構の一つとして生体内で thiamine pyrophosphate (cocarboxylase, TDP と略称する) が acetyl 化され、生成した S-acetyl TDP が coenzyme A を acetyl 化する可能性を推論した¹⁾が、今回 thiamine 磷酸エステル類の S-acetyl 化を試みさらに上記推論の妥当性を検討した。

まず予試験的に thiamine 磷酸エステル類の中最も安定な thiamine monophosphate (TMP と略称する) を用いてその S-acetyl 化を試みた。TMP をアルカリ溶液中前報²⁾に準じ無水酢酸で acetyl 化し、反応液を paper partition chromatography (PPC と略称する) (酢酸・ブタノール・水=1:4:5) で調べると TMP (R_f=0.07) 以外に R_f=0.35 に Dragendorff 試薬 (D 試薬) で朱色に呈色する未知分別像が検出された。この分別像はブロムシアン試薬 (B 試薬) およびアルカリ試薬 (A 試薬) によるチオクロム反応は陰性であるが、希

Fig. 1.

Fig. 2.

塩酸で加水分解するかまたは cysteine で処理すると陽性となる。このような諸性質はさきに合成した O,S-diacetyl thiamine²⁾ においても認められるところで、R_f=0.35 の分別帯は恐らくシオール型 TMP の SH 基

* 本研究は松川泰三：VitaminB₁ 及び諸関係化合物の研究 (Taizo Matsukawa: Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds) の一部である。その 5：本誌 75, 374(1955)。

** Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) 川崎：本誌 75, 374(1955)。

2) 松川, 川崎：本誌 73, 705(1953)。

が acetyl 化された目的の S-acetyl TMP によるものと想像される。つぎに粗 TDP (TDP 約 50%, TMP 約 40%) を同様な条件で acetyl 化して反応生成物を PPC で調べると TDP ($R_f=0.01$), TMP ($R_f=0.08$) と上記 $R_f=0.35$ の分別帯以外に $R_f=0.15$ に新たに D 試薬で朱色に呈色し, B, A 両試薬でチオクロム反応陰性, 希塩酸または cysteine 処理で陽性の分別帯が検出された。この分別帯は前記と同様の理由から目的とする S-acetyl TDP によるものと推定される。しかしこれらの生成物の分離は従来のような単なる有機溶媒による抽出等だけでは困難なことはその R_f 値から判断されるので, 著者はイオン交換樹脂を用いて生成物の純粋分離を試みた。イオン交換樹脂による thiamine 磷酸エステル類の分離については既に Siliprandi 等の報告³⁾があるが著者は Amberlite XE-64 [H^+ 型]を用いて反応生成物の chromatography を行い, まず水で溶出し各溶出液を fraction collector で 1.5 cc ずつ分画し, その分画液のおのおのについて直接チオクロム反応 (A 法) と希塩酸加水分解後のチオクロム反応 (B 法) を行い, 生成するチオクロム値を Klett の蛍光計で測定して Fig. 1 に示すような結果を得た。すなわち (A) 法による測定では fraction number 18 前後にチオクロム値が最大なる箇所があり, これは標準品との比較から TDP と同定された。(B) 法の測定法では fraction number 12 附近と 27 附近がチオクロム値は最大となり, (B) - (A) の値がいわゆる目的とする S-acetyl 体にもとづくものと考えられる。TMP は水で溶出後 0.5 N 塩酸を用いるとはじめて溶出される。No. 10~14 および 23~24 の間を凍結乾燥してから前と同じ条件で chromatography を 3 回行くと, Fig. 2 に示すように TDP は非常に少くなり, 一方加水分解後はじめて蛍光を発する 2 つの山が明らかに分離され, しかもこの蛍光はブタノールに転溶しない (チオクロム磷酸)。この部分を別々に凍結乾燥して得られる結晶性粉末は, PPC の結果 D 試薬で単一の朱色の呈色像を現わすので, 目的物がほぼ完全に分離できたものと考えられる。これらの R_f 値を Table I に示す。

Table I.

展 開 溶 媒	TDP	TMP	S-acetyl TDP	S-acetyl TMP
酢酸・ブタノール・水=1:4:5	0.01~0.02	0.05~0.09	0.11~0.16	0.31~0.35
80%エタノール	0.02~0.03	0.13~0.17	0.14~0.18	0.45~0.46

S-acetyl TDP, S-acetyl TMP は O,S-diacetyl thiamine の場合¹⁾と同様 glutathione と反応させた後 PPC で調べると ninhydrin 試薬で S-acetylglutathione が検出され, S-acetyl TDP または S-acetyl TMP の S-acetyl 基が glutathione の活性な SH 基へ transacetylation したことが判る。また cysteine で処理するとチオクロム反応が陽性となることも同じ理由からよく理解される。なお本品は O,S-diacetylthiamine と同様 hydroxamic 反応⁴⁾陽性である。S-acetyl TMP は熱エタノールから再結晶すると mp 166~167° (decomp) の無色柱状晶となるが, 微量のためこれ以上の精製はできなかつた。また S-acetyl TDP は熱エタノールから再結晶を試みたが一部分解をうけるので純結晶を得ることは成功しなかつた。

終りに本研究に際し終始御鞭撻を賜わった所長桑田 智博士に謹謝する。また実験に協力された鈴置氏に感謝する。

実 験 の 部

Paper Partition Chromatography (PPC) の条件 第 37 報⁵⁾, 第 68 報¹⁾ 参照。

TMP の S-acetyl 化 TMP 塩酸塩 0.2 g を水 1 cc に溶かし 10%水酸化ナトリウム 0.8 cc を加え, 冷時無水酢酸 0.2 cc を加えてアルカリ性域で 30 分攪拌。反応液の一部を酢酸酸性にして PPC にかけると $R_f=0.07$ に TMP を, $R_f=0.35$ に D 試薬で朱色に呈色する分別帯を検出した。

粗 TDP の S-acetyl 化とイオン交換クロマトグラフィーによる分離 ionophoresis による分析の結果 TDP 48.7%, TMP 38.8%, で thiamine 0%, inorganic P 0.18%, hydrolyzed P 2.89% の純度のものを使用した。この粗 TDP 2 g を水 5 cc に溶かし 4 N 水酸化ナトリウムを加えて pH 9~10 に調節し無水酢酸 2 cc を攪拌しつつ冷時 (5~10°) 滴下, この間アルカリ溶液を追加して反応液をアルカリ性に保つ。30 分攪拌後 pH 7 で反応液を凍結乾燥し熱エタノール 30 cc で抽出, 抽出液を減圧濃縮, エタノール留去, 残留物を水 3 cc に溶かし放置すると酢酸ナトリウムの結晶が析出。これを濾去しその 1 cc をつぎのイオン交換クロマトグラフィーにかけた。

3) D. Siliprandi, N. Siliprandi: Biochim. et Biophys. Acta 14, 52(1954); 鈴置: ビタミン 7, 1090(1954).

4) 鈴置: ビタミン 7, 333(1954).

5) 松川, 万木: 本誌 72, 1599(1952).

イオン交換クロマトグラフィーの条件：樹脂：Amberlite XE-64 [H⁺型]，カラム 9×300 mm. 溶出：水 100 cc で溶出後，0.5 N HCl 50 cc に切りかえる，2 回目以後は水だけで溶出，流速は毎分 0.2 cc. 分画：溶出液は 1.5 cc ずつを fraction collector で集めた。

TDP, TMP, S-acetyl 体の測定：各 fraction から 0.1 cc ずつを三つの試験管 (a, b, c) にとりそれぞれ盲検，赤血塩酸化，加水分解後の赤血塩酸化を行い，生成するチオクロム値を Klett の蛍光計で測定した。

このイオン交換クロマトグラフィーを 3 回繰返して粗 S-acetyl TDP 15 mg, 粗 S-acetyl TMP 150 mg を得た。粗 S-acetyl TMP を熱エタノールから再結晶すると mp 166~167°(decomp) の無色柱状結晶を得る。C₁₄H₂₁O₆N₄PS 計算値 N 13.85, P 7.69, S 7.92, 実験値 N 12.99, P 6.74, S 8.68.

S-Acetyl TMP, S-acetyl TDP と glutathione との反応 S-acetyl 体微量と glutathione 微量とを水少量に溶かし 60 分放置。後 PPC にかけると原料以外に D 試薬で Rf=0.08 に TMP, または Rf=0.01 に TDP を検出し，ninhydrin 反応で Rf=0.20 に S-acetylglutathione を検出した。

武田薬品工業株式会社研究所

U.D.C. 547.73.1:615.733

134. 中守律夫：Kainic Acid およびその異性体のオゾン酸化成績体に関する研究 (6)

Methyl ketone 体の Monoester 体およびその還元成績体

(海人草有効成分ならびに関連化合物の研究 第 37 報*)

Ritsuo Nakamori: Studies on the Active Components of *Digenea simplex*

Ag. and Related Compounds. XXXVII.

Studies on the Ozone Oxidation Products of Kainic Acid and Its Isomers. (6).

Monoesters of Methyl Ketone Compounds and

Its Reduction Products.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd**.)

As reported previously¹⁾, the lactonic compounds of α -kainic acid series were found to be the δ -lactone between C₃ and C₄ of the pyrrolidine ring and a similar assumptions were made for the structure of the lactonic compounds of α -allo-kainic acid series. Confirmation of this assumption was made in the present series of experiments.

Partial esterification of α -allomethyl ketone compound (α -allo-III) gives the α -allo-C₃-monomethyl ester (α -allo-VII). In the same manner, β -allomethyl ketone compound (β -allo-III) yields β -allo-C₃-monomethyl ester (β -allo-VII). On the other hand, the same reaction course in α - and β -series results in isomerization to form the corresponding α -allo and β -allo series monoester compounds. Partial hydrolysis of the diester of (α -allo-III) gives C₂-monomethyl ester compound (α -allo-IX). By comparing the reduction products of (α -allo-VII) and (α -allo-IX), it was confirmed that the lactonic compounds of α -allokainic acid series were also δ -lactones formed between C₃ and C₄.

(Received February 9, 1956)

著者は前報¹⁾で methyl ketone 体を接触還元した場合 α 系からは容易に安定な lactone が単離でき，この α -lactone 体はその解離定数その他から pyrrolidine 環の C₃ の carboxymethyl 基と C₄ の 1'-hydroxyethyl 基との間に形成された δ -lactone であることを明らかにした。他方 α -allo 系では lactone 化が困難，しかも生成した α -allolactone 体は極めて不安定で酸性溶液中でのみ存在することがわかった。なおこの lactone 体の構造を α 系からの類推により同様に C₃ と C₄ との δ -lactone であろうと一応推定した。その後この α -allo-lactone 体について種々の実験を行いこの推定を立証し得た。

* 本研究は，立岡末雄：海人草有効成分ならびに関連化合物の研究 (Sueo Tatsuoka: Studies on the Active Components of *Digenea simplex* Ag. and Related Compounds) の一部である。

第 36 報：本誌 76, 294 (1956).

** Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) 第 34 報：本誌 76, 287 (1956).