UDC 547.457.1-466.2

103. 奥井誠一*, 鈴木茂生**: 糖-アミノ酸結合体の研究 (第1報)

6-O-グリシル-D-グルコースの合成とその性質について

Seiichi Okui and Shigeo Suzuki: Studies on Sugar-Amino Acid Compounds. I. Synthesis of 6-O-Glycyl-D-glucose.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo*, Tohoku College of Pharmacy**)

The present series of work was carried out in order to obtain fundamental knowledge on the compounds formed by peptide bonded to sugar *in vivo*, more specifically the ester-type bonding in which the hydroxyl group of the sugar is bonded to carboxyl in the amino acid. For this purpose, examination was made on the preparation of 6-glycylglucose, the representative compound of the most simple monosaccharide and amino acid, and the object was attained in the following manner:

1,2;3,5-Di-O-benzylidene-D-glucopyranose was reacted with N-benzyloxycarbonylglycine, used as reagent for peptide synthesis, and diethylphosphorous or isovaleric anhydride, and the amorphous 6-O-(N-benzyloxycarbonylglycyl)-1,2;3,5-di-O-benzylidene-D-glucopyranose so obtained was converted to the crystalline 6-O,N-benzyloxycarbonylglycyl-D-glucose. Catalytic reduction of this product finally afforded the objective 6-O-glycylglucose which was extremely labile and turned brown at room temperature to be decomposed rapidly into glucose, glycine, and glycylglycine. It was therefore impossible to obtain this compound in pure state or change it to its various derivatives, such as acetylated compound.

(Received September 29, 1958)

糖類とペプチド類の結合体が生物体内に広く存在している事は衆知の事実であるが現在迄に両者が如何なる様式で結合しているかを明らかにした例は極めて少ない。

天然物中の糖とアミノ酸間の化学的結合様式としては糖のアルデヒド基とペプチドのアミノ基の結合した N-glycoside 型 (1), isoglucosamine 型 (2), Schiff 塩基型 (3), 糖とオキシアミノ酸間の O-glycoside 型 (4), 糖の水酸基とペプチドのカルボキシル基間の ester 型 (5) がその主なものとして考えられる。以上のうち (1), (2), (3) および (4) の結合を有する化合物については若干の報告がなされており, 生体内にその存在が実証されたものもあるが¹⁻⁶⁾, これらといえどもいずれも天然物中の糖アミノ酸間の結合様式を明らかにしたものとはいえない。中でも (5) の結合を有する物質の一つとして, 近年ビタミン B₁₅ の名称でグルクロン酸 (またはグルコン酸)・6-ジメチルグリシンエステルの植物体における存在およびその合成が報告されているが⁶⁾ 未だ極めて不明確である。著者等はこれらの予想される糖とペプチドの結合形式の一つとして (5) のエステル型結合体の性質を検討するための基礎的物質として先ず単糖-アミノ酸エステルの合成を企て, 特に存在の可能性の多い D-グルコースの 6 位の酸素にアミノ酸の結合した化合物についての合成研究を行い, まずグリシン・グルコース結合体 (I) について若干の知見を得たので報告する。

今日迄このようなエステル型結合体合成に関する報告が見出されない主な原因はアミノ酸の高級アルコールエステル, 特に糖類のようなやや複雑な性質を有するアルコールとの確実なエステル形成の一般法が確立されていない事であるが著者等は標題の化合物の合成に当つてエステル結合形成法の検討を行った。

その方法はグリシン誘導体として N-benzyloxycarbonylglycine⁹⁾ (II), (以下 NBG と略称する。また N-

* Motofujicho, Bunkyo-ku, Tokyo.

** Nankozawa, Sendai, Miyagi-ken.

1) F. Micheel, A. Klemmer: Chem. Ber. **84**, 212(1951).2) F. Micheel, A. Klemmer: *Ibid.* **85**, 1083(1952).3) 井上, 小野寺: 農化 **18**, 1112(1942).4) A. Gottshalk: Nature **52**, 455(1952).5) E. L. Richard: Biochem. J. **64**, 639(1956).6) E. T. Krebs, *et al.*: Intern. Record of Med. **168**, 18(1951)(C. A. **46**, 4622 h(1952)).7) M. Bergmann, L. Zervas: Ber. **65**, 1192(1932).8) P. E. Papadakis: J. Am. Chem. Soc. **59**, 841(1937).

benzyloxycarbonyl を N-Bzc と略称する), グルコース誘導体として 1,2;3,5-di-O-benzylidene-D-glucufuranose⁹⁾ (III) (DBG) を適当な方法でエステル化させ 1,2;3,5-di-O-benzylidene-6-N-Bzc-glycyl-D-glucufuranose (IV) とした後接触還元により 2 個の benzylidene 基と N-B₂C 基を除去して目的物 (I) とするものであるが今回は NBG (II) と DBG (III) を既知の方法, 試薬を用いてエステル (IV) を得てついで一旦精製容易な 6-O-(N-Bzc-glycyl-D-glucose (V) を経て目的物に到達しその性質を検討した。

初めにエステル形成の目的で通常用いられる方法, すなわち (III) の 6-O-tosyl 誘導体 (VI) に (II) のカリウム塩 (II'), ナトリウム塩 (II''), (III) の 6-iodo-6-deoxy 体 (VII) に (II) の銀塩 (II''') 等を作用させるいわゆる交換分解法で (IV) を得ようとしたがこれらの反応は全く原料の回収に終つた。

次いで近來ペプチド合成試薬として報告されている N-Bzc-アミノ酸と他の酸の混合無水物の内で比較的副反応を伴わずにアルコール性水酸基と反応し N-Bzc-アミノ酸エステルを与える化合物を選び, これを (III) に作用させて (IV) を得る事を試みた。混合無水物として亜燐酸ジエチルエステルとの無水物: Bzc-NHCH₂CO·OP(OC₂H₅)₂¹⁰⁾ およびイソ吉草酸との無水物: Bzc-NHCH₂COOCOC₄H₉¹¹⁾ を用い, それ等をベンゼン溶液中で (III) に対して 3~4 倍 mol を作用させたところ, いずれも無晶形粉末を得た。これを直ちに 70%酢酸と加熱, アセタールのみを去る操作を行い, 溶液を濃縮放置したところ, いずれもその一部は結晶化した。この結晶体をメタノール・酢酸エチル (1:3) の混液で再結晶して mp 153°, $[\alpha]_D^{25}$: +32.5°, フェーリング液還元性の白色針晶を得, 元素分析の結果は mono-O-(N-Bzc-glycyl)-D-glucose に一致する。また, この結晶体はつぎの種々の反応を示す事より 6-O-(N-Bzc-glycyl)- α -D-glucopyranose (V) である。すなわち 1) 無水酢酸-酢酸ソーダと加熱すれば tetraacetate に一致する mp 130~131° $[\alpha]_D^{25}$: +6.7° の白色針晶を与える。2) 過ヨード酸と反応させればその約 4 mol を消費し, 同時に 4 mol に相当する義酸を検出しこの反応液から過剰の酸化剤を除いた

Fig. 1. Infrared Absorption Spectra of 6-O-(N-Benzyloxycarbonylglycyl)- α -D-glucose (V) (in Nujol)

Fig. 2. Infrared Absorption Spectra of 1,2;3,5-Di-O-benzylidene-6-O-(N-benzyloxycarbonylglycyl)-D-glucufuranose (IV) (in KBr Tablet)

— Esterification of (III)   ---- Rebenzyldienation of (V)

9) G. W. Anderson, R. W. Young: J. Am. Chem. Soc. 74, 5308(1952).

10) J. R. Vaughan, R. L. Osato: Ibid. 73, 5883(1951).

11) S. A. Barkev et al.: J. Chem. Soc. 1954, 171.

室の方々に感謝する。

実 験 の 部

1,2:3,5-Di-O-benzylidene-6-O-tosyl-D-glucofuranose (VI) 3.65 g の (IV) および 2.0 g の tosyl chloride を 10 cc の脱水ピリジンに溶解, 72 時間室温放置, 氷水に注ぎ析出した固形物を濾取, 水洗, 乾燥後ベンゼンより再結, 白色針晶, mp 159~160°, $[\alpha]_D^{25}$: +20.4° (c=1.05, CHCl₃), 収量 3.68 g, 79%. C₂₇H₂₆O₈S₂ 計算値 C 63.52, H 5.09, S 6.26. 実験値 C 63.17, H 4.97, S 6.51.

1,2:3,5-Di-O-benzylidene-6-iodo-6-deoxy-D-glucofuranose (VII) 1.02 g の (IV) および 0.5 g の NaI を 20 cc Me₂CO と耐圧管中 100°, 4 時間加熱, 冷後析出した NaOTs を濾別, Me₂CO で洗い濾液, 洗液を合し, 減圧乾燥後水を加え析出した固形物を濾取, 水洗, 乾燥, MeOH より再結, 白色羽毛状晶, mp 154°. $[\alpha]_D^{25}$: +24.5° (c=1.0, CHCl₃), 収量 600 mg, 72%, C₂₀H₁₈O₅I 計算値 C 51.50, H 4.07. 実験値 C 51.38, H 4.21.

K 塩 (II'), Na 塩 (II'') と (VI) の反応 i) K 塩の場合は N KOH, Na 塩の場合は N NaOH で中和溶解. 溶液を減圧濃縮, 乾固, 減圧下 P₂O₅ 上で完全に乾燥.

ii) (VI) と (II') (II'') の反応: 500 mg の (IV) および 170 mg の (II) より調製した (II'), 20 cc EtOH を減圧濃縮, さらに 20 cc の水を加え析出した固形物を濾取, 水洗, 乾燥, Na 熔融で N を検出せず, ベンゼンより再結. mp 159~160° の原料 350~360 mg (約 70%) を回収. (II') と同様に (II'') の反応を行い 350 mg の原料を回収.

Ag 塩 (II''') と (VII) の反応 i) Ag 塩の調製: (II) を N NaOH で中和, これに 2% AgNO₃ 溶液を加え, 析出した沈殿を濾取, 水洗後減圧下 P₂O₅ 上で乾燥.

ii) (VII) と (II''') の反応: (VII) 450 mg および (II''') 500 mg, 20 cc の無水 EtOH を耐圧管中 150°, 2 時間加熱, 冷後 Ag 塩を濾取, 濾液を減圧濃縮, 20 cc 水を加え, 10 cc Et₂O で 2 回抽出, Et₂O 層を取り水洗, 脱水 Na₂SO₄ で乾燥後 Et₂O を減圧留去. 残渣は直ちに結晶する. N を含有しない. MeOH より再結して mp 153~154° を示す. 原料 300~330 mg を回収 (70% 前後).

(III) および (II) と他の酸の混合無水物の反応, (IV) の合成 i) 亜磷酸ジエチル塩化物を使用する方法: (C₂H₅O)₂PCl 3.20 g, (II) 3.20 g を 3 g Et₃N で 20 cc ベンゼン溶媒中で混合酸無水物となし, 一旦減圧濃縮, ベンゼン 20 cc, (III) 3.60 g を加え 5 時間沸騰水浴上に加熱, 冷後水を加えベンゼン層を取り 5% HCl, 5% NaHCO₃ 溶液, 水で洗い, Na₂SO₄ で脱水, 減圧でベンゼンを完全に留去, 淡黄色無晶形粉末 3.40 g を得.

ii) イソ吉草酸塩化物を使用する方法: 8.40 g の (II) および 2.40 g のイソ吉草酸クロリド, トリエチルアミン 3 cc, ベンゼン 20 cc で無水物溶液を調製, 3.60 g の (III) を 5 cc ピリジンに溶解して加え 24 時間放置, i) の場合と同様に後処理を行い淡黄色無晶形粉末 4.10 g を得.

(IV) の精製 上記粗製 (IV) 300 mg を 20 cc のベンゼンに溶解, 100 メッシュ シリカゲルカラム (直径 1 cm 長さ 15 cm) に吸着, 100 cc ベンゼンで洗浄後ベンゼン・AcOEt (2:1) の混液 25 cc で流出し, 減圧で完全に溶媒を去つた後これを後述の (V) のベンジリデン化によつて得た (IV) と赤外部吸収を比較.

(V) の合成 粗製 (IV) 3.0 g を 20 cc 70% AcOH に溶解, 1.5 時間沸騰水浴上に加熱, 700 cc 水を加えて希釈, 不溶物を少量の活性炭を加えて濾去, 濾液を減圧濃縮, P₂O₅ 上で減圧乾燥. 2~3 日後結晶析出. 1 週間放置後素焼板上で粘稠物を去り MeOH・AcOEt (1:3) の混液で再結. 白色針晶, mp 153°, $[\alpha]_D^{25}$: +32.5° (c=1.0, H₂O) 収量 0.6 g, 16%. (亜磷酸法), 1.30 g (31%), (イソ吉草酸法). いずれも (IV) よりの計算. C₁₆H₂₁O₉N 計算値 C 51.75, H 5.65, N 3.77, 実験値 C 51.68, H 5.31, N 3.62.

(V) のアセチル体 (IV) の調製 (V) 50 mg, Ac₂O 2 cc および NaOAc 50 mg の混合物を 100°, 2 時間加熱, 水中に注ぎ 20 cc CHCl₃ で抽出, CHCl₃ 層を水, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い Na₂SO₄ で乾し減圧蒸発, 残渣に 1 cc MeOH を加え放置, 白色針晶析出, 液分を去り, MeOH より再結無水針晶. mp 131°, $[\alpha]_D^{25}$: +6.7° (c=1.0, CHCl₃), 収量 50 mg, 70%, C₂₄H₂₉O₁₃N 計算値 C 53.43, H 5.38, N 2.59, CH₃CO 31.91, 実験値 C 53.13, H 5.39, N 2.55, CH₃CO 32.30.

(V) の過ヨード酸々化 (V) 42.0 mg を 50 cc メスフラスコ中で 10 cc の水に溶解, これに 600 mg の NaIO₄ を 50 cc の水に溶解した酸化液 25 cc を加え, さらに水で全量を 50 cc とする. 別に酸化液 25 cc と水 25 cc で盲検液を調製. 2 時間後その 25 cc ずつを取り, それぞれ硼砂-硼酸緩衝液 10 cc, KI 2 g を加え, 析出した I₂ を 0.1N-As₂O₃, F=1.010 で滴定. 検液滴定数 11.10 cc および盲検液滴定数 15.70 cc を得. 故に過ヨード酸の消費 mol 数は次式により

$$\frac{0.8 \text{ mg} \times 1.01 \times 4.60 \times 2}{1.878 \text{ mg}} = 3.95(\text{mol})$$

残余の酸化液, 盲検液, 各 20 cc を取りそれぞれ 0.5 cc のエチレングリコールを加えて 1 夜放置後 N/30 NaOH, F=1.18 で滴定, 検液 4.56 cc, 盲検液 0.16 cc の値を得. 故に義酸生成 mol 数は

$$\frac{1.533 \times (4.56 - 0.16) \times 1.18 \times 2.5}{5.207} = 3.82(\text{mol}).$$

2-(N-Benzoyloxycarbonylglycyl)glycolaldehyde *p*-nitrophenylhydrazone (VIII) の分離 (V) 100 g を水 2 cc に溶解, これに 250 mg の NaIO_4 を水 10 cc に溶解した酸化液を加え 5 時間放置飽和 $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ 水溶液を加えて析出した沈殿を遠心沈殿, その上澄をとり, 50 mg *p*-nitrophenylhydrazine を 10% AcOH 10 cc に溶解して加える. 反応液は直に黄変, 黄色の油を析出, これを AcOEt で抽出, AcOEt 層を水洗, Na_2SO_4 で脱水乾燥, 減圧で溶媒を留去, 1 cc MeOH を加え放置. 間もなく内容固結, 無水 EtOH より再結, 黄色板晶. mp 146° , (100° 附近より軟化) $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_4$, 計算値 C 55.95, H 4.66, N 14.50, 実験値 C 55.83, H 4.50, N 14.62.

(V) の水溶液における接触還元 (V) 60 mg を水 10 cc に溶解, 0.5 g の 20% Pd-C と常温, 常圧で接触還元, 2 時間後触媒を濾去, 濾液を室温減圧濃縮, P_2O_5 上で乾燥. 無色結状物質 30 mg を得, ニンヒドリン, AHP 反応陽性. 43 時間後に著しく褐変する. 一部をとり濾紙クロマトグラフィーにかける (濾紙: 東洋濾紙 No. 51, 溶媒: $\text{BuOH} \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2:1:1), 発色試薬: ニンヒドリン, AHP) AHP 陽性スポット Rf 0.51, グルコースに一致. ニンヒドリン発色スポット Rf 0.36, グリシンに一致.

(V) の MeOH 溶液における接触還元 60 mg (V) を 5 cc MeOH に溶解, 20% Pd-C 触媒で水溶液における場合と同様に還元, 濾紙クロマトグラフィーを行い同一 Rf 値でグルコース, グリシンを検出, 他にニンヒドリン陽性スポット Rf 0.28, 黄色はグリシルグリシンに一致.

(V) の Ac_2O 溶液における接触還元 (V) 100 mg を Ac_2O 5 cc と混合, 0.5 g の 20% Pd-C で前述のように還元, 2 時間後触媒を濾去, 濾液に 100 mg 無水 AcONa を加え 2 時間沸騰水浴上で加熱, Ac_2O の大部分を減圧留去, 残渣に水 20 cc を加え, 暫時後不溶性の油状物を 10 cc CHCl_3 で抽出, CHCl_3 層を 5% NaHCO_3 溶液, 水で洗い, 脱水 Na_2SO_4 で乾燥, CHCl_3 を減圧留去, 黄色油状物を得る. 少量の EtOH を加えて一夜放置, 120 mg の白色針晶が析出するが N を含有しない.

(V) の NH_3 分解 (V) 50 mg を室温 NH_3 飽和 MeOH 10 cc に溶解, 室温に 5 日間放置, 減圧で NH_3 , 溶媒を去り 1 cc 水を加える. 結晶性沈殿析出, 濾取, MeOH より再結, 白色板晶. mp 135.7° , 別途合成した (X) と混融して融点降下しない.

(V) のベンジリデン化による (IV) の生成 (V) 180 mg, ベンズアルデヒド 1 cc および ZnCl_2 500 mg を混合, 振盪すれば (V) は間もなく溶解する. さらに 50° に 24 時間放置, 水 10 cc を加え, 油状物を AcOEt 10 cc で抽出, 溶媒層を減圧濃縮, 少量の石油エーテルを加え, 石油エーテル不溶の油をとる. さらに 2 回石油エーテルで洗い減圧乾固後 (IV) の精製の項と同様に精製, 赤外部吸収を測定.

東京大学薬学部, 東北薬科大学