抗生物質 Aminosidin に関する研究 (第 1 報¹⁾) Aminosidin I, II の
分離と Paromomycin I, II との関係について

谷山兵三, 沢田洋介, 橋本敬三, 鍾 栄峰, 北川常広
長崎大学薬学部²⁾

Chemical Studies on Antibiotics Aminosidin. I.¹⁾ Separation of Aminosidin
I and II, and Relation to Paromomycin I and II

HYOZO TANIYAMA, YOSUKE SAWADA, KEIZO HASHIMOTO,
YUNG-HUNG CHUNG and TSUNEHIRO KITAGAWA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University²⁾

(Received July 26, 1971)

Two components of Aminosidin were isolated in the form of N-acetyl derivatives by cellulose chromatography. The acetyl group of the component was hydrolyzed with hydrazine hydrate to produce an active substance. A major component, Aminosidin I, was identified with Paromomycin I, and a minor component, Aminosidin II with Paromomycin II respectively.

Aminosidin (以下 AMD と略称) は 1959 年に Arcamone ら³⁾ によりイタリアの Massa Marittima 付近の土壌から分離された *Streptomyces chrestomyceticus* の培養液からとり出された水溶性塩基性の oligosaccharide 抗生物質で, グラム陽・陰性菌および抗酸性菌らの広範囲にわたり発育阻止作用をもっている。

従来から AMD は Paromomycin⁴⁾ (PM と略称), Hydroxymycin,⁵⁾ Catenulin,⁶⁾ Zygomycin⁷⁾ (ZGM と略称) らと物理化学的性質ならびに生物学的活性がよく似ていて本質的に区別することが困難である。⁸⁾ また AMD は 2 成分に単離されたという報告もなく, このもの自体の化学構造についても最終決定が行なわれていない状態であり, わずかに Schillings ら,^{3b)} Arcamone ら,⁹⁾ Florea ら¹⁰⁾ による分子式の検討があるにすぎなかった。

今回著者らは AMD の 2 成分を単離して, それらの諸性質, PM および ZGM との関係を明らかにし, 結果として AMD-I は PM-I に, AMD-II は PM-II とそれぞれ同定したので報告する。

AMD 硫酸塩はペーパークロマトおよびシリカゲルシンレヤークロマトにおいて, 種々の溶媒系を検討したが鮮明な単一の成分として見なされた。しかし Dutcher ら¹¹⁾ の方法に従い無水メタノール中無水酢酸でアミノ基をアセチル化し, 溶媒系 *n*-BuOH-pyridine-water (6:4:3) で展開すると *R_f* 値 0.54 と 0.44 の 2 つのスポットの存在が認められた。そこで N アセチル (Ac) AMD はセルロースカラムクロマトによって 2 成分を定量的に分離した。*R_f* 値の高い成分を N-Ac-AMD-I, 低いものを N-Ac-AMD-II とした。比較検討するため, PM 硫酸塩から同様の方法で N-Ac-PM-I と II をそれぞれ定量的に分離した。

- 1) 日本薬学会第 91 年会(福岡)発表(1971, April).
- 2) Location: 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi.
- 3) a) F. Arcamone, C. Bertazzoli, M. Ghione, T. Scotti, *Giorn. Microbial.*, **7**, 242, 251 (1959); *ibid.*, **8**, 9 (1960); b) R.T. Shillings, *et al.*, *Antimicro. Agents & Chemoth.*, **1961**, 274 (1962).
- 4) T.H. Haskell, J.C. French, Q.R. Bartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3482 (1959).
- 5) G. Hagemann, G. Nomine, L. Penasse, *Ann. Pharm. Franc.*, **16**, 585 (1958).
- 6) J.W. Davison, I.A. Solomons, T.M. Lees, *Antibiotics & Chemotherapy.*, **2**, 460 (1952).
- 7) S. Horii, H. Hitomi, T. Yamaguchi, M. Imanishi, A. Miyake, *J. Antibiotics*, **14**, 63, 249 (1961); *ibid.*, **15**, 187 (1962).
- 8) H. Umezawa, "Index of Antibiotics from Actinomyceticus," 1967, p. 130.
- 9) F. Arcamone, T. Scotti, C. Bertazzoli, M. Ghione, *Brit.* 880035 Oct. 18, 1961; *C.A.*, **57**, 1385 (1962).
- 10) V. Florea, El. Aiteanu, M. Medianu, *Rev. Chim.*, **15**, 423 (1964); *C.A.*, **62**, 4571 (1965).
- 11) S.C. Pan, J.D. Dutcher, *Anal. Chem.*, **28**, 836 (1956).

AMD-I=PM-I=ZGM-A₁: R₁=-H,
R₂=-CH₂NH₂
AMD-II=PM-II=ZGM-A₂: R₁=-CH₂NH₂,
R₂=-H

Chart 1. Structural Feature of Paromomycin Antibiotics

AMD-sulfate
↓ amberlite CG-410 (OH⁻)
AMD-free base
↓ N acetylation/MeOH
separation (cellulose column)
↓
N-acetyl-AMD-I, II
↓ hydrazinolysis
purification on Sephadex LH-20 column
↓
AMD-I, II free bases
↓
AMD-I, II HCl and H₂SO₄ salts

Chart 2. Isolation and Purification Route of AMD Components

ここにえられた N アセチル体の融点,¹²⁾ 旋光度,¹³⁾ 元素分析値が Table I および Table II に示された. 赤外線吸収スペクトル (IR) は Fig. 1 に示したが, 互に酷似した吸収である. 重水中における核磁気共鳴スペクトル (NMR) では δ 5.48 (β 配位による), 5.18, 4.97 の 3 つのアノメリック水素を基に N アセチル基は 5 個 (δ 2.01, singlet, 15H) 存在すると定量された. このように N-Ac-AMD-I と II は *R_f* 値と旋光度で明らかに区別されるのみで他のデータでははっきりした差が認められなかった.

精製された N アセチル体はヒドラジンヒドレートによる加水分解方法^{14,15)} によって脱アセチル化を行なった. 反応濃縮物は Sephadex LH-20 のカラムを通過することにより単一とみなされる抗生物質に復すことができた.

TABLE I

N-Acetyl antibiotics	mp (°C)	$[\alpha]_D^{25}$ ($c=1$, H ₂ O)
AMD-I	195—210	+ 68°
AMD-II	210—220	+105°
PM-I	190—215	+ 61°
PM-II	210—225	+100°

TABLE II

Derivatives of antibiotics	Anal. (%)		
	C	H	N
N-Ac-PM·5H ₂ O (as C ₃₃ H ₅₅ O ₁₉ N ₅ ·5H ₂ O)	43.28	7.10	7.65
N-Ac-AMD (Schillings, <i>et al.</i> ^{3b)})	42.66	6.69	7.51
N-Ac-PM (Schillings, <i>et al.</i> ^{3b)})	42.50	7.91	7.39
N-Ac-AMD-I	43.07	6.94	7.34
N-Ac-AMD-II	43.02	7.09	7.47
N-Ac-PM-I	42.98	7.05	7.52
N-Ac-PM-II	43.04	6.93	7.47

12) 融点は自動微量融点測定器で測定した.

13) この値は $\pm 4^\circ$ の誤差を含む.

14) M. Fujinaga, Y. Matsushima, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **37**, 468 (1964).

15) W. Schroeder, B. Bannister, H. Hoeksema, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2448 (1967).

Fig. 1. IR Spectra of N-acetyl Antibiotics in KBr

Fig. 2. NMR Spectra of N-Acetyl Antibiotics in D₂O

この sephadex 処理でえられたものはもとの抗生物質に比し少し弱い抗菌活性を示したので 3 回同一精製処理をくり返した。精製された抗生物質の一部はその塩酸塩と硫酸塩にかえた。ヒドラジンヒドレートによる加水分解条件下に AMD の構造に変化が生じないかどうかの検討として、AMD-I および II の遊離塩基を再び無水メタノール中無水酢酸でアセチル化しペーパークロマトを行なったところ N-Ac-AMD-I, N-Ac-AMD-II の *R_f* 値にそれぞれ対応した。従って、本抗生物質類似の構造を有する抗生物質の分離精製においてこのヒドラジンヒドレート分解後の sephadex 処理は抗生物質の化学構造がそのまま保たれ、しかも無機塩の混入をさけることができる点などすぐれた一方法として使われることができる。Table III には AMD 成分塩酸塩の旋光度¹³⁾を示した。これは PM 成分のそれら⁸⁾と良く一致した。また、AMD 成分の遊離塩基、塩酸塩、硫酸塩の元素分析値がそれぞれ Table IV¹²⁾に示され、PM-I, II の構造式に基づく分子式 $C_{23}H_{45}O_{14}N_5$ と良く一致する分子式をえた。

Table V には分離精製した AMD の抗菌力活性を示した。水溶性塩基性抗生物質は培地の pH がややアルカリ側でより強い抗菌活性を示すのであるが、この実験成績でもある菌に対しては pH 7.0 より 8.0 の方が 10 倍近い強い活性を示している結果がえられた。また、遊離塩基、硫酸塩、塩酸塩の順に抗菌力作用が強い傾向を示していた。これらの現象に関しては他の基本的研究を待たねばならない。すでに堀井らにより ZGM-A₁ は PM-I

TABLE III

Antibiotics	$[\alpha]_D^{25} (c=1, H_2O)$	Antibiotics	$[\alpha]_D^{25} (c=1, H_2O)$
AMD-I HCl	+64.6°	AMD-II HCl	+72°

TABLE IV

Antibiotics	mp (°C) (decomp.)	Formula	Analysis (%)					
			Calcd.			Found		
			C	H	N	C	H	N
AMD-I free base	185—192	$C_{23}H_{45}O_{14}N_5 \cdot 2H_2O$	42.40	7.53	10.75	42.71	7.42	10.45
AMD-I hydrochloride	186—196	$C_{23}H_{45}O_{14}N_5 \cdot 5HCl \cdot 2H_2O$	33.11	6.48	8.40	33.56	6.43	8.63
			Cl 21.30			Cl 21.00		
AMD-I sulfate	235—240	$C_{23}H_{45}O_{14}N_5 \cdot 5/2H_2SO_4$	32.09	5.81	8.14	32.46	6.07	7.84
			S 9.30			S 9.02		
AMD-II hydrochloride	220—230	$C_{23}H_{45}O_{14}N_5 \cdot 5HCl \cdot 2H_2O$	33.11	6.48	8.40	33.53	6.35	8.76
			Cl 21.30			Cl 19.86		
AMD-II sulfate	230—	$C_{23}H_{45}O_{14}N_5 \cdot 5/2H_2SO_4$	32.09	5.81	8.14	32.18	6.10	7.88
			S 9.30			S 8.95		
AMD-I reineckate		$C_{23}H_{45}O_{14}N_5 \cdot 5[Cr(NH_3)_2(SCN)_4] \cdot 5H_2O$ (M.W. 2295)	22.48	3.70	21.34	22.74	3.56	21.55
			H ₂ O 3.92			H ₂ O 3.11		

TABLE V. Antimicrobial Activity of AMD Preparations

Test organisms Antibiotics	pH	MIC (mcg/ml)									
		ECR ₃	SF	PA	SA	EC	BS	PV	SS	ST	KP
AMD S.	7.0	>83	21	>83	0.16	2.6	0.16	2.6	5.2	1.3	0.33
	8.0	>83	21	21	0.082	0.16	0.082	0.65	0.65	0.33	0.16
AMD-I S.	7.0	>83	>83	>83	0.65	5.2	0.33	10.4	10.4	2.6	0.65
	8.0	>83	42	42	0.16	0.65	0.33	1.3	1.3	0.65	0.33
AMD-II S.	7.0	>83	>83	>83	2.6	21	1.3	21	42	10.4	2.6
	8.0	>83	>83	83	0.65	2.6	0.65	5.2	5.2	2.6	1.3
AMD H.	7.0	>83	>83	>83	2.6	21	1.3	21	42	5.2	2.6
	8.0	>83	>83	83	0.65	1.3	1.3	5.2	5.2	2.6	1.3
AMD-I H.	7.0	>83	>83	>83	10.4	83	5.2	83	>83	21	10.4
	8.0	>83	>83	>83	2.6	10.4	2.6	10.4	10.4	5.2	2.6
AMD (free)	7.0	>83	21	>83	0.16	2.6	0.16	2.6	2.6	0.65	0.33
	8.0	>83	21	10.4	<0.04	0.16	0.082	0.33	0.33	0.16	0.082
AMD-I (free)	7.0	>83	>83	>83	0.65	10.4	0.65	10.4	21	2.6	1.3
	8.0	>83	83	42	0.33	1.3	0.33	1.3	2.6	1.3	0.65

ECR₃: *Escherichia coli* R₃ (Resistant to SM, KM, NM, PM, o-TC, CP)SF: *Streptococcus faecalis* ATCC 10541PA: *Pseudomonas aeruginosa* BMH* 1SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538PEC: *Escherichia coli* ATCC 26BS: *Bacillus subtilis* # 10707

Abb.: S: sulfate, H: hydrochloride, (free): free base

PV: *Proteus vulgaris* ATCC 6897SS: *Shigella sonnei* ATCC 9290ST: *Salmonella typhosa* ATCC 9992KP: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

と ZGM-A₂ は PM-II と同定¹⁶⁾ されていることから間接的ではあるが AMD-I と ZGM-A₁, AMD-II と ZGM-A₂ と同一物質であると言える。また, ZGM-A₂ は ZGM-A₁ に比し抗菌活性が低いデータが示されているが, このことは著者らの AMD に関するデータからも明白である。

AMD より 2 成分を分離して, AMD-I, II の諸性質から AMD は PM とほぼ等しい量的関係で 2 成分を含んでおり Chart 1 に示した化学構造を有し, そのうち 6-amino-6-deoxy-L-glucosamine (neosamine) 部分の 5 位のアミノメチレン基が axial に結合した場合 AMD-I, equatorial に結合した場合 AMD-II であることが結論された。

実 験 の 部

AMD 硫酸塩は Farmaceutici Italia 社製品で協和醸酵株式会社より, PM 硫酸塩はパークデビス社製品で三共株式会社より供されたものを使用した。ペーパークロマトグラフィー (PPC) 用の濾紙は東洋濾紙 No. 51 UH 型を使用した。

AMD のアセチル化 抗生物質の硫酸塩は Amberlite CG-410 (OH 型) の約 10 倍容を用いて脱塩し, えられた遊離塩基は凍結乾燥によって白色の粉末をえた。AMD 遊離塩基 1.0 g は 50 ml の無水メタノールにとかし攪拌下無水酢酸 3.2 ml 加えて 3 分間攪拌をつづけるとニンヒドリン反応が完全に消失した。この溶液にエーテル 100 ml 加えて冷所 1 夜放置し生成した沈殿を濾取し乾燥した。このものはさらにメタノール-エーテルより再沈殿を 2 回行ない白色粉末をえた。融点は 225° 以上で分解をとめないとけた。収量は遊離塩基より計算して 80% 以上, $[\alpha]_D^{25} = +47 \pm 4^\circ$ ($c=1$, H₂O), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* に対し 1000 mcg/ml で不活性であった。Anal. Calcd.: C, 45.99; H, 7.30; N, 7.32. IR $\nu_{\max}^{KBr}$ (cm⁻¹): 3500, 3180, 2980, 1640, 1550, 1430, 1380, 1315, 1125, 1075, 1030, 955, 905, 780.

また同様にしてえた N-Ac-PM は 230° 以上で分解をとめないとける白色粉末で, $[\alpha]_D^{25} = +38 \pm 4^\circ$ ($c=1$, H₂O) であった。前記ペーパークロマトグラフィーで展開したのち次の試薬で呈色 (紫色) した。1) 2% Sodium hypochloride aq. soln. 2) 95% aq. EtOH 3) o-Tolidine-KI 液 (o-tolidine 32 mg を酢酸 3 ml にとかし, 水を加えて 50 ml にしたもの, KI 0.2 g を水 50 ml にとかしたのそれぞれ 1:1 容)。

N-Ac-AMD-I, N-Ac-AMD-II の分離 上でえた N-Ac-AMD, 2.0 g はセルロースカラム (2×65 cm) に供し上記溶媒系で溶出した。各試験管 5 g 分取し, フラクション 17 から 20 には R_f 値 0.54, 24 から 28 には R_f 値 0.44 の物質が含まれていた。それぞれの画分を集めてエーテルで抽出し, 水層を凍結乾燥して N-Ac-AMD-I (1.80 g), N-Ac-AMD-II (0.04 g) をえた。

16) S. Horii, H. Hitomi, A. Miyake, *J. Antibiotics*, **16**, 144 (1963).

また、同様に N-Ac-PM 1.0 g をセルロースカラム (2.7×48 cm) にかけて同様の溶媒系で溶出し各フラクション 3 g 分画するとフラクション 29 から 35 に N-Ac-PM-I (*Rf* 0.54), 37 から 41 には N-Ac-PM-II (*Rf* 0.44) がえられた。収量は前者が 0.95 g, 後者が 0.02 g。

抗生物質の再生およびその精製 N-Ac-AMD-I 2.0 g は hydrazine hydrate 50 ml を加えて封管中 110° 24 時間加水分解を行なった。放冷後浮遊物を汙去し、汙液は減圧下濃縮した。この加水分解物に少量の水を加えてとかし、*n*-BuOH-pyridine-acetic acid-*t*-BuOH (15: 10: 4: 17: 10) の液媒系でペーパークロマトを行なうと *Rf* 0.40 (AMD-sulfate: *Rf* 0.38) を示した。*Rf* 0.60 にニンヒドリン反応で黄色を呈するものが認められたが、これはその後の精製操作で分離除去された。N-Ac-AMD-II 0.1 g は 10 ml の hydrazine hydrate により同様加水分解し PPC で確めた。上の加水分解液は黄色油状であったので 3 ml の水を加えて Sephadex LH-20 (2.5×120 cm) のカラムにかけ、水で溶出した。9 g ずつ集めると AMD 遊離塩基はフラクション 26—34 に溶出された。この溶出パターンは AMD-I, II および PM-I, II とともに良く類似していたが、供したサンプルの量が多いと拡散溶出された。その後のフラクションに *Rf* 0.60 の物質が溶出された。PPC にて単一とみられる画分は濃縮し、この操作を 3 回くり返した。AMD-I (約 1.7 g), AMD-II (0.07 g) の収量であった。遊離塩基の一部分は 1*N* HCl にとかして減圧下濃縮し、最後に水にとかして凍結乾燥すると白色粉末の塩酸塩をえた。また一部分は 2*N* H₂SO₄ にとかして (CH₃)₂CO で沈殿させ、再沈殿により粉末様の硫酸塩をそれぞれえた。

Table IV にはそれらの融点と元素分析値が示された。AMD-I および II HCl 塩の IR スペクトル (KBr): 3440, 1620, 1495, 1370, 1320, 1240, 1140, 1030, 860, 760 cm⁻¹。これは PM-I, II の IR スペクトルと一致。

AMD 硫酸塩はライネッケ塩を加えて生ずる沈殿を水から 3 回再結晶。165—175° より変色, 220° より分解をはじめる赤紫色結晶をえた。オスモメトリーで分子量を測定したところ AMD ライネッケ塩は 2214 (*c*=2.9%, THF) であった。

抗菌力テスト Table V の被検菌を使い常法の寒天希釈法で行なった。培地の pH は滅菌前に調整した。

謝辞 本研究に対し種々ご援助を賜った協和醸酵工業株式会社, PM 硫酸塩を提供された三共株式会社に感謝する。