コリスチン関連化合物の研究 (第 8 報¹⁾) α -アシルテトラペ
プタイドの合成と抗菌活性について

栗原藤三郎, 伊藤秀雄

東北薬科大学²⁾

Studies on the Compounds related to Colistin. VIII.¹⁾ Synthesis and
Antibacterial Activity of α -Acyltetrapeptides

TOZABURO KURIHARA and HIDEO ITO

Tohoku College of Pharmacy²⁾

(Received April 16, 1974)

In order to investigate the antibacterial activity of acyltetrapeptides, some compounds similar to the partial structure of lysine-colistin were synthesized. N^{α} -Acyl-L-lysyl- N^{ϵ} -(D-leucyl)-L-lysyl-L-threonine hydrochloride was synthesized by the acylation of tetrapeptide condensed by the stepwise method with dicyclohexylcarbodiimide. Acid chlorides of 6-methyloctanoic acid (a component of colistin) and seven other kinds of acid were employed as acylating agents. It was proved that antibacterial activity of two acyltetrapeptides of these compounds was one-eighth that of colistin sulfate against *Shigella sonnei*, and activities of the others were one-fifteenth to one-thirtieth.

コリスチンはグラム陰性菌に著明な抗菌性を示す抗生物質で、側鎖トリペプチドの N 末端の α,γ -ジアミノ酪酸 (Dab) の α -アミノ基がアシル化された環状アシルデカペプチドである。著者らは先にコリスチンよりも優れた抗生物質を得る目的で、Dab のすべてを近似のリジンで置換したリジン-コリスチンおよびリジン-コリスチンの L-ロイシンと D-ロイシンとの間で開環したアシルデカペプチドを合成し、それらがコリスチン硫酸塩と同程度の抗菌活性を有することを知った。³⁾ そこで著者らはそれらの化合物よりもアミノ酸の数が少ない簡易な

Chart 1

1) 第 7 報: 伊藤秀雄, 薬誌, 94, 1010 (1974).

2) Location: Komatushima, Sendai.

3) 栗原藤三郎, 武田秀雄, 伊藤秀雄, 薬誌, 92, 129 (1972).

アシルペプチドの生物活性に関する知見を得ようとしてこれらの合成を試み、その目的の一環として先にアシルペンタペプチドを合成したが、これらの化合物はコリスチン硫酸の約 1/3—1/6 の抗菌性を示した。^{4,5)} 今回はアミノ酸の数をさらに 1 個少なくし、かつ鎖状で分枝しているアシルテトラペプチドを合成し、若干の知見を得たので報告する。

アシルテトラペプチドの合成法は Chart 1 に示したようにまず前報で得た N^ε-formyl-N^α-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-L-threonine methyl ester をメタノール性塩酸で処理し、formyl 基を脱離した後、formyl-D-leucine⁶⁾ を dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) で縮合し、トリペプチド (II) とし、II をメタノール中で Pd—C の存在下に接触還元によって benzyloxycarbonyl 基を離脱した後、N^ε-formyl-N^α-benzyloxycarbonyl-L-lysine⁷⁾ を DCCD で縮合し、テトラペプチド (IV) を得た。IV をメタノール中で Pd—C の存在下に先と同様にして benzyloxycarbonyl 基を離脱し、ついでそのメチルエステルをアルカリで加水分解して化合物 VI に変じ、VI の α-アミノ基にアシル基を導入した。アシル化はアルカリ存在下に酸塩化物を Schotten-Baumann 法で縮合し、ついでアミノ基を保護した formyl 基をメタノール性塩酸で処理して脱離し、carboxy methyl cellulose (CMC) カラムクロマトグラフィーで精製を行ない、目的とする α-アシルテトラペプチド (XVI—XXIII) を得た。合成した中間生成物および最終生成物の物理恒数を Table I, II に示した。

以上合成した α-アシルテトラペプチド塩酸塩について抗菌力試験を行ない、寒天平板希釈法による各種グラム陽性菌および陰性菌に対する最小発育阻止濃度を検定し、その結果を Table III に示した。なお対照としてはアシル基を導入しないテトラペプチド塩酸塩 (XV) およびコリスチン硫酸塩を用いた。

For-D-Leu
TABLE I. RCO-Lys(For)-Lys-Thr-OH

Compd. No.	RCO-	mp (°C)	[α] _D ²⁵ (in DMF)	Formula	Analysis (%)		
					Calcd. (Found)	C	H N
VI	H	206—207	−31.2 ^{a)}	C ₂₄ H ₄₄ O ₈ N ₆	52.92 (52.78)	8.14 8.01	15.43 15.27
VII	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH(CH ₂) ₄ CO	182—184	−23.3 ^{a)}	C ₃₃ H ₆₀ O ₉ N ₆	57.87 (57.74)	8.83 8.67	12.27 12.16
VIII	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₃ CH(CH ₃)CH ₂ CO	197—199	−24.8 ^{b)}	C ₃₄ H ₆₂ O ₉ N ₆	58.43 (58.28)	8.94 8.83	12.03 11.92
IX	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO	167—169	−20.4 ^{a)}	C ₄₂ H ₇₈ O ₉ N ₆	62.19 (62.08)	9.69 9.62	10.36 10.29
X	CH ₂ =CH(CH ₂) ₈ CO	178—179	−21.7 ^{a)}	C ₃₅ H ₆₂ O ₉ N ₆	59.13 (59.01)	8.79 8.66	11.82 11.74
XI	-CH ₂ CH ₂ SC ₂ H ₄ CH ₂ CO	227—229	−34.2 ^{b)}	C ₃₅ H ₅₆ O ₉ N ₆ S	57.04 (56.89)	7.66 7.53	11.40 11.27
XII	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SC ₂ H ₄ CH ₂ CO	218—220	−28.6 ^{b)}	C ₃₆ H ₅₈ O ₉ N ₆ S	57.58 (57.47)	7.79 7.68	11.19 11.07
XIII	O ₂ N- -CH=CHCO	213—214	−22.8 ^{a)}	C ₃₄ H ₄₉ O ₁₁ N ₇	55.80 (55.63)	6.75 6.63	13.40 13.26
XIV	-CO	194—195	−28.1 ^{b)}	C ₂₉ H ₄₆ O ₉ N ₆ S	53.19 (53.06)	7.08 6.97	12.84 12.76

For=formyl

a) c=1.2

b) c=1.0

4) 栗原藤三郎, 武田秀雄, 伊藤秀雄, 薬誌, 94, 1004 (1974).

5) 伊藤秀雄, 薬誌, 94, 1010 (1974).

6) J.C. Sheehan, D.D.H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1154 (1958).

7) K. Hofmann, E. Stutz, G. Spühler, H. Yajima, E.T. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 3727 (1960).

D-Leu
TABLE II. RCO-Lys-Lys-Thr-OH·HCl

Compd. No.	RCO-	mp (°C)	$[\alpha]_D^{25}$ ($c=1.0$, H ₂ O)	PPC R_f^a	Formula	Analysis (%)		
						Calcd. (Found)	C	H N
XV	H	192—193	-22.6°	0.34	C ₂₂ H ₄₆ O ₆ N ₆ Cl ₂	47.05 (46.93)	8.26 8.15	14.97 14.86
XVI	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH(CH ₂) ₄ CO	188—190	-18.3°	0.56	C ₃₁ H ₆₂ O ₇ N ₆ Cl ₂	53.06 (52.87)	8.91 8.73	11.98 11.84
XVII	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₃ CH(CH ₃)CH ₂ CO	167—169	-22.5°	0.45	C ₃₂ H ₆₄ O ₇ N ₆ Cl ₂	53.69 (53.54)	9.01 8.82	11.74 11.61
XVIII	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO	197—199	-28.3°	0.49	C ₄₀ H ₈₀ O ₇ N ₆ Cl ₂	58.02 (57.85)	9.74 9.83	10.15 10.02
XIX	CH ₂ =CH(CH ₂) ₆ CO	178—179	-24.2°	0.38	C ₃₃ H ₆₄ O ₇ N ₆ Cl ₂	54.46 (54.32)	8.86 8.72	11.55 11.41
XX	-CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₂ CO	184—185	-27.8°	0.43	C ₃₃ H ₅₈ O ₇ N ₆ SCl ₂	52.58 (52.45)	7.76 7.64	11.15 11.02
XXI	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₂ CO	195—197	-31.2°	0.46	C ₃₄ H ₆₀ O ₇ N ₆ SCl ₂	53.18 (53.03)	7.88 7.72	10.95 10.78
XXII	O ₂ N- -CH=CHCO	176—178	-25.4°	0.37	C ₃₂ H ₅₁ O ₉ N ₇ Cl ₂	51.33 (51.22)	6.87 6.73	13.10 13.01
XXIII	-CO	183—185	-24.7°	0.35	C ₂₇ H ₄₈ O ₇ N ₆ SCl ₂	48.28 (48.15)	7.20 7.08	12.51 12.37

a) Toyo Roshi No. 51; BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5); ninhydrin

TABLE III. *In Vitro* Antibacterial Activity of α -Acyltetrapeptides against
Bacteria (min. inhib. conc. μ g/ml)

	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	Colistin sulfate
<i>S. paratyphi</i> A	100<	25	12.5	50	50	25	50	50	50	0.8
<i>S. paratyphi</i> B	100<	50	25	50	50	50	25	50	50	0.8
<i>S. typhi</i>	100<	100<	100<	100<	100<	100<	50	100<	100<	1.6
<i>S. enteritidis</i>	100<	100	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	6.3
<i>Sh. flexneri</i> 2a	100<	25	12.5	50	50	50	25	50	50	0.8
<i>Sh. flexneri</i> 3a	100<	25	12.5	25	25	50	12.5	50	25	0.2
<i>Sh. sonnei</i>	100<	25	12.5	25	50	25	12.5	25	50	1.6
<i>E. coli</i>	100<	50	25	100	100<	100	50	100	100	1.6
<i>E. freundii</i>	100<	50	50	100<	100<	100	100	100<	100<	1.6
<i>Arizona</i>	100<	25	25	50	50	25	25	25	25	0.8
<i>Proteus</i> OX19	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<
<i>Ps. pyogenes</i>	100<	50	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	6.3
<i>Klebsiella</i>	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	0.8
<i>St. aureus</i> SH2	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<
<i>St. aureus</i> SH3	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	25

結 論

今回、合成したアシルテトラペプチドの構造と抗菌性については次のように推察される。

1) 全般的にグラム陰性菌に対してコリスチン硫酸塩の 1/8—1/30 の抗菌性が認められるが、グラム陽性菌に対する効力はほとんど認められない。これはコリスチン硫酸塩の抗菌性と同じ傾向を示している。

2) これらの化合物の中で効力の優れているものとしては 3,7-dimethyloctanoyl 基および γ -phenylpropyl thio-propionyl 基を導入したペプチドが挙げられる。これらは *Sh. sonnei* に対してコリスチン硫酸塩の約 1/8 の抗菌性を示している。

3) 直鎖アシル基, 分枝したアシル基および不飽和アシル基を導入した三種のアシルテトラペプチドの抗菌性については有意の差が認められない。

4) アシル基を導入しないテトラペプチド塩酸塩ではグラム陰性菌および陽性菌のいずれに対しても全く抗菌性が認められない。このことからアシル基の導入は抗菌力の発現には必須のものと考えられる。

実験の部⁸⁾

N^ε-Benzyloxycarbonyl-L-lysyl-L-threonine Methyl Ester (I) の合成 N^ε-Formyl-N^α-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-L-threonine methyl ester⁵⁾ 27.0 g (65 m mole) を 2N HCl-MeOH 50 ml に溶解し, 室温で 4 hr 放置後, 40° 以下で減圧濃縮し, 残渣を MeOH に溶解して, 再び減圧濃縮して完全に HCl および MeOH を留去し, 残渣を少量の水に溶解し, 濾過後, 濾液を酢エスで抽出, 水層を 1N NH₃ でアルカリ性とし, 酢エスで抽出, 酢エス層を水洗, Na₂SO₄ で乾燥, 溶媒を減圧留去, 残渣を酢エス-アセトンから再結晶。収量 21.1 g (82%)。mp 192—194°, $[\alpha]_D^{25}$ -43.5° ($c=1.0$, MeOH). Anal. Calcd. C₁₉H₂₉O₆N₃: C, 57.70; H, 7.39; N, 10.63. Found: C, 57.58; H, 7.31; N, 10.52.

N^ε-(Formyl-D-leucyl)-N^α-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-L-threonine Methyl Ester (II) の合成 I 19.8 g (50 m mole) と formyl-D-leucine⁶⁾ 8.0 g (50 m mole) を dimethylformamide (DMF) 15 ml に溶解し, 氷-食塩浴で -10° に冷却し, 攪拌下に DCCD 11.3 g (55 m mole) を少量づつ加え, 1 hr 攪拌後, 氷室に 24 hr 放置, ついで AcOH 2 ml を加え, 室温で 1 hr 攪拌し, 析出したジシクロヘキシル尿素を濾去し, DMF で洗い, 洗液と母液を合わせて, 減圧濃縮し, 残渣を CH₂Cl₂ に溶解し, 1N HCl, 水, 1N NaHCO₃, 水の順で洗い, Na₂SO₄ で乾燥後, 溶媒を留去, 残渣を MeOH-アセトンから再結晶。収量 18.2 g (68%)。mp 184—186°, $[\alpha]_D^{25}$ -28.3° ($c=1.0$, DMF). Anal. Calcd. C₂₆H₄₀O₈N₄: C, 58.19; H, 7.51; N, 10.44. Found: C, 58.03; H, 7.42; N, 10.27.

N^ε-(Formyl-D-leucyl)-L-lysyl-L-threonine Methyl Ester (III) の合成 II 17.2 g (32 m mole) を MeOH-ギ酸 (95:5) 40 ml に溶解し, 5% Pd-C を触媒として加え, H₂ を通じる。反応終了後, 触媒を濾去し, MeOH で洗い, 洗液と母液を合わせて, 減圧濃縮し, 残渣を 1N HCl に溶解し, 酢エスで抽出し, 水層を 1N NH₃ でアルカリ性として, 酢エスで抽出し, 酢エス層を水洗, Na₂SO₄ で乾燥後, 溶媒を減圧留去, 残渣を酢エス-アセトンから再結晶。収量 10.6 g (82%)。mp 196—197°, $[\alpha]_D^{25}$ -34.3° ($c=1.0$, MeOH). Anal. Calcd. C₁₈H₃₄O₆N₄: C, 53.71; H, 8.52; N, 13.92. Found: C, 53.58; H, 8.37; N, 13.76.

N^ε-Formyl-N^α-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-N^ε-(formyl-D-leucyl)-L-lysyl-L-threonine Methyl Ester (IV) の合成 III 10.5 g (25 m mole) と N^ε-formyl-N^α-benzyloxycarbonyl-L-lysine⁷⁾ 8.2 g (25 m mole) を DMF 20 ml に溶解し, -10° に冷却し, 攪拌下に DCCD 6.2 g (30 mmole) を少量づつ加え, 1 hr 攪拌後, 氷室に 24 hr 放置, ついで AcOH 2 ml を加えて, 室温で 1 hr 攪拌後, II と同様に処理。MeOH-エーテルから再結晶。収量 11.8 g (68%)。mp 204—206°. $[\alpha]_D^{25}$ -26.4° ($c=1.0$, DMF). Anal. Calcd. C₃₃H₅₂O₁₀N₆: C, 57.21; H, 7.57; N, 12.13. Found: C, 57.06; H, 7.51; N, 12.04.

N^ε-Formyl-L-lysyl-N^ε-(formyl-D-leucyl)-L-lysyl-L-threonine Methyl Ester (V) の合成 IV 10.4 g (15 m mole) を MeOH-ギ酸 (95:5) 30 ml に溶解し, 5% Pd-C を触媒として加え, H₂ を通じる。反応終了後, III と同様に処理。MeOH-エーテルから再結晶。収量 4.6 g (54%)。mp 206—207°, $[\alpha]_D^{25}$ -31.2° ($c=1.0$, MeOH). Anal. Calcd. C₂₅H₄₆O₈N₆: C, 52.92; H, 8.14; N, 15.04. Found: C, 52.74; H, 8.02; N, 14.97.

N^ε-Formyl-L-lysyl-N^ε-(formyl-D-leucyl)-L-lysyl-L-threonine (VI) の合成 V 8.4 g (15 m mole) を dioxane 20 ml に溶解し, 室温で攪拌下に 1N NaOH 17 ml を滴下, 滴下後 4 hr 攪拌し, 濾過後, 濾液に AcOH を加えて微酸性とし, 減圧濃縮, 残渣を 1N HCl に溶解し, 酢エスで抽出し, 水層を 1N NH₃ で pH 9 に調整して, 酢エス 30 ml づつ 2 回抽出, 酢エス層を合わせて, 水洗, Na₂SO₄ で乾燥後, 溶媒を減圧下に留去, 残渣を DMF-MeOH から再結晶。収量 5.8 g (72%)。Table I.

N^α-Acyl-N^ε-formyl-L-lysyl-N^ε-(formyl-D-leucyl)-L-lysyl-L-threonine (VII—XIV) の合成 VI 0.8 g (1.5 m mole) を 0.5N NaOH 8 ml に溶解し, 室温で攪拌下に対応する酸塩化物 2.0 m mole と 0.2N NaOH 11 ml とを数回に分けて, 30 min を要して滴下, 滴下後 2 hr 攪拌し, ついで塩酸酸性として, エーテル 5 ml づつ 2 回抽出し, 水層を CH₂Cl₂ 15 ml づつ 2 回抽出し, CH₂Cl₂ 層を合わせて, 水洗, Na₂SO₄ で乾燥後, 溶媒を留去, 残渣を CH₂Cl₂-エーテルから再結晶。Table I.

N^α-Acyl-L-lysyl-N^ε-(D-leucyl)-L-lysyl-L-threonine Hydrochloride (XVI—XXIII) の合成 VII—XIV 0.5 g を 2N HCl-MeOH 5 ml に溶解し, 室温で 1 hr 放置後, 40° 以下で減圧濃縮する。この操作を 2 回繰返した後, 残

8) 融点はすべて未補正。

渣を MeOH 10 ml に溶解し、減圧下に MeOH および HCl を完全に除去し、残渣を少量の水に溶解し、汙過、汙液を CMC カラムクロマトグラフィーに付し、pH 6.5 の 0.05M ギ酸アンモニウム緩衝液で溶出し単一画分を得る。この溶出液を減圧濃縮し、残渣にメタノール性塩酸を加えて、汉過、汉液を減圧濃縮し、白色粉末を得る。VI から同様に処理して XV を得る。Table II.

謝辞 本研究に際し、終始御鞭撻を賜わった本学 武田秀雄博士、また元素分析を実施された本学 榊原房夫氏ならびに抗菌力試験を実施していただいた科薬抗生物質研究所の方々に深謝致します。