抗生物質 Aminosidin (Paromomycin) に関する研究 (第3報¹⁾)

アミノ酸誘導体とその生物活性

沢田洋介, 奥野 哲, 谷山兵三

長崎大学薬学部²⁾Antibiotics Aminosidin (Paromomycin). III.¹⁾ Some Amino Acid Derivatives and Their Biological Activity

YOSUKE SAWADA, TETSU OKUNO and HYOZO TANIYAMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University²⁾

(Received June 17, 1975)

Amino acid derivatives of Aminosidin (Paromomycin) were prepared. Eight kinds of amino acid were introduced into the amino group in 6-position of the 2,6-dideoxy-D-glucose moiety of Paromomycin by the active esterification method. All the derivatives prepared have an antimicrobial activity but less than that of the original antibiotic. Acute toxicity of the derivatives of glycyl and DL- γ -amino- β -hydroxybutyl Paromomycin was also less than that of the original antibiotic.

抗生物質に対して感受性の低い *Pseudomonas* 属, *Proteus* 属, それに多剤耐性菌などの対策としていろいろの試みが行なわれているが, 土壌菌より新抗生物質を分離するのと同程度に, 既知抗生物質の化学的修飾または微生物変換を行ない目的に合った新抗生物質をつくることは重要な方途である。

アミノ配糖体抗生物質の抗菌作用にはそのアミノ基や水酸基が大きく影響しているものと考えられる。著者ら¹⁾ はグラム陽性菌, グラム陰性菌, それに抗酸性菌に有効な Aminosidin (Paromomycin, PRM と略) 研究の一環として, そのアミノ基の化学的修飾を試み, 特に化学的に反応性に富むアミノ基に注目した。

アミノ基誘導体をつくる時一般に容易なのはアシル化, アルキル化であるが, アミノ配糖体抗生物質のこれら誘導体はいずれも抗菌作用を示さないことが知られている。

著者ら³⁾ は Racemomycin A の β -lysine 部分の ϵ 位アミノ基にアミノ酸を導入することによりもとの抗生物質とはほぼ同程度の抗菌作用を有し, 急性毒性の低い物質をえることができたので, Paromomycin についてもアミノ酸誘導体の合成を計画した。

アミノ酸は中性アミノ酸である glycine, L-alanine, 芳香族アミノ酸である L-phenylalanine, ハイドロキシアミノ酸である DL- γ -amino- β -hydroxybutyric acid (GABOB と略), 塩基性アミノ酸である L-lysine, L-ornithine, L-citrulline, それに L-arginine の8種を選び, Paromomycin と等モルのアミノ酸を結合させ, その修飾体の抗菌活性および毒性を検討することにより Paromomycin の構造と活性相関について若干の知見をえた。

Paromomycin のアミノ酸誘導体

Paromomycin (構造式: Fig. 1) 分子中には1個のアミノメチレン基と4個のアミノメチン基が存在する。

Paromomycin の希薄溶液にアミノ酸の活性エステルを加えるとアミノメチレン部分のアミノ基にほとんど特異的にアミノ酸が導入されることが判明した。

アミノ酸誘導体の合成方法は Chart 1 に示すように, Paromomycin のアルカリ性溶液に benzyloxycarbonyl アミノ酸の活性エステルを加え, Paromomycin とアミノ酸を結合した。反応物をセルロースカラムで分離し, 単一な benzyloxycarbonyl アミノ酸誘導体をえた。Table I にそれら誘導体のペーパークロマトグラフィー (PPC)

1) 第2報: H. Taniyama, Y. Sawada, S. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 21, 609 (1973).

2) Location: Bunkyo-machi, 1-14, Nagasaki.

3) 沢田洋介, 谷山兵三, 薬誌, 94, 858 (1974).

X: amino acid, X=H: PRM

Fig. 1. Structures of PRM and Its Derivative

示した。元素分析はライネッケ塩をつくり、またライネッケ塩をつくりにくい L-alanine (III), L-phenylalanine (IV), それに DL-GABOB (V) 誘導体は塩酸塩として元素分析を行なった。次に誘導体を塩酸で加水分解し、縮合したアミノ酸および Paromomycin の加水分解産物を PPC および沔紙電気泳動で確認した。Paromomycin のアミノ酸結合位置の決定は Fig. 2 に示すように酢酸水溶液中過剰の亜硝酸ナトリウムを加え脱アミノ化、続いて塩酸で加水分解し、PPC で成分を検出した。その結果、アミノ酸誘導体亜硝酸ナトリウム処理体の加水分解物中のニンヒドリン反応陽性の成分は 6-amino-D-glucone と同定され、Paromomycin の構成成分である 2,

における R_f 値を記載した。これをパラジウム触媒で水素化、脱保護基を行ない、セルロースさらに Sephadex G-10 のカラムクロマトグラフィーで精製、目的物をえた。

このような条件で最も収量の良い glycyI 誘導体 (II) でも収量は約 30% であり、収量をあげる目的で過剰の試薬を加えると Paromomycin 1 分子あたり 2 モルおよびそれ以上のアミノ酸が結合した混合体がえられた。これらの物質はモノアミノ酸誘導体より抗菌力が極めて低下していた。従って、アミノメチレン部分へ選択的に反応を行なう条件では低収量は避けられないものと思われる。

えられた誘導体はいずれも白色粉末であり、それら誘導体の PPC および薄層クロマトグラフィー (TLC) による比較を Table II に

Chart 1. Scheme of the PRM-Derivative Formation

TABLE I. Comparison of PRM and Its Derivatives on PPC

Derivative	R_f
PRM (I)	0.23
Z-Glycyl-PRM	0.55
Z-L-Alanyl-PRM	0.63
Z-L-Phenylalanyl-PRM	0.64
Z-DL-GABOB-PRM	0.67
DiZ-L-Ornithyl-PRM	0.75
DiZ-L-Lysyl-PRM	0.75
Z-NO ₂ (guan.)-L-Arginyl-PRM	0.59
Z-L-Citrullyl-PRM	0.54

PPC: Toyo Roshi No. 51 UH, solvent system I:
n-BuOH-pyridine-HOAc-H₂O-t-BuOH (15:10:3:12:4)
detection: Rydon-Smith reagent
Z: benzyloxycarbonyl group

Fig. 2. Structural Determination of PRM Derivative

TABLE II. Comparison of PRM and Its Derivatives on PPC and TLC

Derivative	<i>R_f</i>	
	PPC	TLC
PRM (I)	0.24	0.18
Glycyl-PRM (II)	0.21	0.16
L-Alanyl-PRM (III)	0.21	0.23
L-Phenylalanyl-PRM (IV)	0.35	0.37
DL-GABOB-PRM (V)	0.26	0.20
L-Ornithyl-PRM (VI)	0.15	0.13
L-Lysyl-PRM (VII)	0.13	0.13
L-Arginyl-PRM (VIII)	0.17	0.18
L-Citrullyl-PRM (IX)	0.17	0.17
Acetyl-PRM (X)	0.32	0.32
Z-PRM (XI)	0.58	0.69

PPC: Toyo Roshi No. 51 UH, solvent system I:

n-BuOH-pyridine-HOAc-H₂O-*t*-BuOH (15:10:3:12:4)TLC: Avicel SF, solvent system II: *n*-PrOH-pyridine-HOAc-H₂O (15:10:3:13)detection: ninhydrin, Rydon-Smith reagents and bioautography on *B. subtilis* PCI-219

6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose, glucosamine, deoxystreptamine は認められなかった (Table III). Kanamycin をアセチル化すると 6-amino-6-deoxy-D-glucose 部分のアミノ基が優先的にアセチル化を受ける報告⁴⁾などを総合して Paromomycin の場合アミノ酸は 2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose 部分の 6 位アミノ基に結合していることが推定される。

4) H. Umezawa, M. Okanishi, R. Utahara, K. Maeda, S. Kondo, *J. Antibiotics*, **20**, 136 (1967).

TABLE III. PPC on Hydrolysates of the Deamination Product of PRM Derivative and Aminoglycoside Antibiotics

Compound	<i>R_f</i>				DOS
	2,6-AG	6-AG	3-AG	2-AG	
Neomycin	0.28				0.44
Ribostamycin	0.29				0.45
PRM	0.31			0.55	0.43
Kanamycin		0.60	0.70		0.44
PRM amino acid derivatives after deamination		0.59			

PPC: Methods were described in Tables I and II, and detection was performed by ninhydrin reagent.

Abbreviation:

2,6-AG: Neosamine(2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose)

6-AG: 6-amino-6-deoxy-D-glucose

3-AG: 3-amino-3-deoxy-D-glucose

2-AG: Glucosamine(2-amino-2-deoxy-D-glucose)

DOS: 2-deoxystreptamine

TABLE IV. Antimicrobial Activity of PRM and Its Derivatives *in Vitro*

Compound	MIC (μ g/ml)				
	<i>S. aureus</i> TERA JIMA	<i>E. coli</i> K-12	<i>S. flexneri</i> 2a EW-10	<i>P. aeruginosa</i> TSUCHI JIMA	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ RV
I ^{a)}	0.1	3	1	30	1
II	0.3	10	10	>100	10
III	1	10	10	>100	30
IV	10	100	30	>100	30
V	1	10	10	>100	—
VI	1	10	10	>100	10
VII	1	30	10	>100	10
VIII	0.3	10	10	>100	10
IX	3	100	30	>100	30

All derivatives were used in a form of free base.

a) sulfate

TABLE V. Acute Toxicity of PRM and Its Derivatives in Mice (*i.v.*)

Compound	Dose (mg/kg)	Number of dead mice on day								Body weight (g)		Survival per total	LD ₅₀ (mg/kg)
		0	1	2	3	4	5	6	7	Initial	Terminal		
I	125	3								20.4		0/3	
	62.5	0	0	0	0	0	0	0	0	20.8	23.4	3/3	88.4
II	500	3								21.7		0/3	
	250	2	0	0	0	0	0	0	0	19.9	23.1	1/3	223
	125	0	0	0	0	0	0	0	0	20.3	22.5	3/3	
V	500	0	0	0	0	0	0	0	0	21.4	22.7	3/3	
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	19.1	21.9	3/3	>500

mice: female (ddY-S) weighing 19—21 g

drugs: diluted with distilled water

生物活性

Paromomycin のアミノ酸誘導体は Paromomycin 硫酸塩と比較して系列積法によりブドウ球菌, 大腸菌, 赤痢菌, 緑膿菌, および結核菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた. Table IV に示したようにいずれの誘導体ももとの抗生物質より弱い活性を示した. すなわち, glycine (II), L-arginine (VIII) 誘導体はブドウ球菌, 大腸菌に対し約 1/3 に低下し, L-alanine (III), DL-GABOB (V) 誘導体はブドウ球菌に対し 1/10 に低下, 大腸菌に対し 1/3 に低下した. ブドウ球菌に対し L-phenylalanine (IV) 誘導体は 1/100 に低下, L-citrulline (IX) 誘導体は 1/30 に低下した. 赤痢菌, 結核菌に対しいずれの誘導体も 1/10—1/30 に低下していた. 緑膿菌に対しても同様に低下していた.

比較的多量にえられた glycine (II) および DL-GABOB (V) 誘導体をマウスに静注し, それらの急性毒性を検討した. Table V に示すように glycine 誘導体の LD₅₀ は 223 mg/kg で, Paromomycin の LD₅₀ 88.4 mg/kg の約 1/3 に低下, DL-GABOB 誘導体の LD₅₀ は 500 mg/kg 以上で 1/5 以下に低下していた.

結果と考察

アミノ配糖体抗生物質の化学的修飾はそれら抗生物質の発現する毒性, 主に腎臓毒性の軽減および耐性菌に有効な抗生物質の開発を主目的としている.

Paromomycin の 2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose 部の 6 位アミノ基をアセチル化 (X) または Z 化 (XI) すると抗菌活性は著しく低下するので Paromomycin が抗菌活性を発現するには 6 位アミノ基は遊離であることが必須であると考えられる. ところが今回著者らの合成した物質はいずれももとの抗生物質よりやや弱いながらも抗菌活性を示した. このことは 6 位アミノ基が必ずしも遊離である必要がなく, 6 位に結合したアミノ酸のアミノ基が遊離であれば抗菌活性を発現しえることを示している.

Racemomycin A のアミノ酸誘導体⁵⁾ では塩基性アミノ酸誘導体がより強い抗菌活性を示したのに対し Paromomycin の場合には同じ結果にならなかった. すなわちアミノ酸の塩基性度と抗菌活性は直接関係ないものと思われる.

また L-phenylalanine を結合した物質 (IV) は特に低い抗菌活性を示した. 一般にアミノ配糖体抗生物質の抗菌活性発現には deoxystreptamine の 2 個のアミノ基のいずれか一方に対し立体障害を受けずに接近する第 3 のアミノ基の存在が必要条件とされている.⁵⁾ Paromomycin のアミノ酸誘導体がもとの抗生物質に比し低い抗菌力を示した理由として, アミノ酸のアミノ基が 2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose の 6 位アミノ基に比し deoxystreptamine のアミノ基から遠距離にあるためか, または rigid conformation をとれないものと考えられ, またアミノ酸誘導体は菌体内への透過性が悪いという可能性もあり, L-phenylalanine 誘導体の抗菌力が低いのは後者の例ではないかと考えられる.

DL-GABOB 誘導体が L-alanine や L-ornithine 誘導体と同程度の抗菌活性を示すことは, アミノ酸は α -アミノ酸である必要がなく, この結果は Racemomycin A の場合と同様である.

アミノ酸誘導体の急性毒性は低下していたが, 同時に抗菌力も低下していたために, Paromomycin において抗菌力を示す部分と毒性を発現する部分は共通性が多いものと考えられる.

Kanamycin A の deoxystreptamine 部分の C₁-アミノ基に L-($-$)- γ -amino- α -hydroxybutyric acid (L-HABA) を結合した物質 Amikacin (BB-K8)^{6,7)} は緑膿菌や各種アミノ配糖体抗生物質耐性菌に有効な半合成抗生物質として知られている. また Naito ら⁸⁾ は Kanamycin A に HABA の isomer を結合させると L 配位が一番抗菌力が強く, また deoxystreptamine 部の C₁-アミノ基以外の 3 つのアミノ基に特異的に L-HABA を導入すると C₁-アミノ基以外の誘導体は抗菌力が低いことを報告している. これらのことより Kanamycin A の C₁-アミノ基の遊離は抗菌活性発現にそれほど影響なく, 他のアミノ基の遊離または代用するアミノ基の存在が必要であり, このことは Paromomycin についても同じであると考えられる.

5) 梅沢純夫, *Chemotherapy*, **11**, 279 (1963).

6) H. Kawaguchi, T. Naito, S. Nakagawa, K. Fujisawa, *J. Antibiotics*, **25**, 695 (1972).

7) K.E. Price, D.R. Chisholm, M. Misiek, F. Leitner, Y.H. Tsai, *J. Antibiotics* **25**, 709 (1972).

8) T. Naito, S. Nakagawa, Y. Abe, S. Toda, K. Fujisawa, T. Miyaki, H. Koshiyama, H. Ohkuma, H. Kawaguchi, *J. Antibiotics*, **26**, 297 (1973).

Ribostamycin⁹⁾ に L-HABA の結合した構造を有する Butirosin¹⁰⁾ が分離されて以来アミノ配糖体抗生物質をアミノ酸特に L-HABA で修飾し、生物活性を検討する実験が広く行なわれているが、Paromomycin についても著者らのこの報告をはじめとして今後他のアミノ基へのアミノ酸導入およびえられた物質の生物活性が期待される。

実 験 の 部

融点は微量融点測定機で測定し、未補正。PPC は東洋汙紙 No. 51 UH 型を用い、溶媒系は主に 1: *n*-BuOH-pyridine-HOAc-H₂O-*t*-BuOH (15: 10: 3: 12: 4) で展開、ニンヒドリン試薬、Rydon-Smith 試薬で発色、それに *B. subtilis* PCI-219 を被検菌とする bioautography で *Rf* 値を求めた。

セルロースカラムクロマトグラフィーはワットマン製汙紙粉末を用いた。

汙紙電気泳動は東洋 C 型装置を用い、pyridine-HOAc-H₂O (9: 1: 240), pH 6.23 を用い、280V, 7.0 mA で 2.5 hr 泳動。

旋光度は Yanagimoto Direct Reading Polarimeter を用いた。

TABLE VI. Optical Rotation of Paromomycin Derivatives

Compounds	$[\alpha]_D^{20}$	<i>c</i> (solvent, H ₂ O)
Glycyl-(II)	+27.3	0.695
L-Alanyl-(III)	+31.2	0.865
L-Phenylalanyl-(IV)	+26.4	0.91
DL-GABOB-(V)	+17.3	1.39
L-Ornithyl-(VI)	+30.0	0.5
L-Lysyl-(VII)	+34.6	0.635
L-Arginyl-(VIII)	+33.9	0.56
L-Citrullyl-(IX)	+19.3	0.725
Acetyl-(X)	+26.7	0.225
Z-(XI)	+32.2	1.18

TABLE VII. Decomposition Temperature and Elemental Analyses of Paromomycin Derivatives

Compounds	Decomp. temp.	Formula	Anal. (%)			
			Calcd. (Found)			
			C	H	N	Cl
II	113° above	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₅ N ₃₆ S ₂₀ Cr ₅ ·5H ₂ O	22.95 (22.74)	3.77 4.04	21.41 21.02	
III	156° above	C ₂₆ H ₅₀ O ₁₅ N ₆ ·5HCl·5H ₂ O	32.56 (32.16)	6.83 7.13	8.76 8.47	18.48 18.79
IV	163° above	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₅ N ₆ ·5HCl·5H ₂ O	37.13 (36.82)	6.72 6.98	8.12 7.86	17.12 17.51
V	obscure	C ₂₇ H ₅₂ O ₁₆ N ₆ ·5HCl·5H ₂ O	32.79 (32.50)	6.83 7.08	8.50 8.23	17.92 18.28
VI	152° above	C ₅₂ H ₉₁ O ₁₅ N ₄₃ S ₂₄ Cr ₆ ·6H ₂ O	22.73 (23.01)	3.78 4.05	21.92 21.57	
VII	121° above	C ₅₃ H ₉₃ O ₁₅ N ₄₃ S ₂₄ Cr ₆ ·6H ₂ O	23.05 (23.26)	3.83 4.15	21.80 21.54	
VIII	122° above	C ₅₃ H ₉₃ O ₁₅ N ₄₅ S ₂₄ Cr ₆ ·6H ₂ O	22.81 (22.51)	3.79 3.98	22.59 22.38	
IX	146° above	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₆ N ₃₈ S ₂₀ Cr ₅ ·5H ₂ O	23.97 (24.13)	3.94 4.25	21.68 21.36	

9) E. Akita, T. Tsuruoka, N. Ezaki, T. Niida, *J. Antibiotics*, **23**, 173 (1970).

10) P.W.K. Woo, H.W. Dion, Q.R. Bartz, *Tetrahedron Letters*, **28**, 2617 (1971).

濃縮はエバポレーターを用い、40°以下で減圧下行なった。最終段階で粉末をえる場合は凍結乾燥法を用いた。

Glycyl-PRM (II) PRM 硫酸塩 (I) 800 mg (0.93 mmol) を 20 ml の 1/20M Na₂CO₃-1/10M NaHCO₃ (pH 10.3) および 10 ml の MeOH に溶かし、benzyloxycarbonylglycine succinimide ester (Z-gly-OSu),¹¹⁾ mp 110—112°, 350 mg (1.14 mmol) を 5 ml の THF に溶かして滴加、室温で 3 hr 攪拌。反応液を濃縮、濃縮物を溶媒系 I 7 ml に懸濁し、セルロースカラム (2×60 cm) に供し、同一溶媒系で展開。PRM の R_f 0.16 に対し R_f 0.55 の画分を集めエーテル抽出、水層を濃縮、約 400 mg の Z-glycyl-PRM を得。160°より分解, $[\alpha]_D^{20} = +21.1$ ($c=0.76$, H₂O). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2940, 1710, 1560—1550, 1410, 1340, 1250, 1140—1110, 1040, 830, 690, 615. これを 20 ml の 50% AcOH に溶かし 100 mg の Pd 黒を加え水素ガスを通じて還元。反応液より触媒濾取、濾液を濃縮、Sephadex G-10 (2.5×140 cm) に供し H₂O で展開、単一画分を集めて凍結乾燥し、II の白色粉末 325 mg を得。236°より分解、旋光度は Table VI に示した。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3420, 2920, 1690, 1625. 1520, 1140—1130, 715, 615. II の 20 mg を 1 ml の H₂O に溶かし、ライネッケ塩水溶液を加え、生じた沈殿を H₂O で再結。帯紫色粉末を得。分解点および元素分析値は Table VII に示した。

L-Alanyl-PRM (III) I, 800 mg を溶かした溶液に Z-L-ala-OSu (mp 121—122°) 340 mg (1.05 mmol) 加えて反応。II と同様に処理して黄褐色粉末 120 mg を得。131°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2920, 1690, 1560, 1405, 1330, 1260, 1125, 1035, 930, 715, 650, 615. 0.5N HCl に溶かして凍結乾燥し塩酸塩とした。

L-Phenylalanyl-PRM (IV) I, 800 mg を溶かした溶液に Z-L-phe-OSu (mp 140°) 430 mg (1.1 mmol) 加えて反応。II と同様に処理後セルロースカラム (2.3×15 cm) に供し溶媒系 I で展開、黄褐色吸湿性粉末 108 mg を得。144°より分解, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2920, 1690, 1560, 1405, 1335, 1255, 1010, 930, 750, 715, 695, 650, 615. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ nm (ϵ): 264 (6.84×10^3).

DL-GABOB-PRM (V) I, 500 mg (0.58 mmol) を含む溶液に Z-DL-GABOB-OSu (oil) 250 mg (0.71 mmol) 加えて反応。黄褐色粉末 140 mg を得。155°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2930, 1570, 1410, 1340, 1140—1110, 1045—1015, 925, 760, 715, 650, 615.

Z-DL-GABOB-OSu Z-DL-GABOB, 500 mg (2.0 mmol) と N-hydroxysuccinimide 250 mg (2.2 mmol) を THF 20 ml に溶かし、氷冷下攪拌しながら dicyclohexylcarbodiimide 500 mg (2.3 mmol) を THF 5 ml に溶かして滴下、5 hr 後析出した dicyclohexylurea を濾取、濾液を濃縮し Z-GABOB-OSu を得。TLC (Kieselgel G, AcOEt): R_f 0.90, Z-GABOB: R_f 0.10.

L-Ornithyl-PRM (VI) I, 800 mg を含む溶液に diZ-L-orn-OSu (mp 111—113°) 560 mg (1.15 mmol) 加えて反応。黄褐色粉末 90 mg を得。145°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2930, 1570—1550, 1405, 1335, 1125, 1040—1010, 925, 855—835, 760, 715, 650, 615. ライネッケ塩は帯紫色粉末。

L-Lysyl-PRM (VII) I, 800 mg を含む溶液に diZ-L-lys-OSu (mp 111—112°) 590 mg (1.18 mmol) を加えて反応。黄褐色粉末 152 mg を得。134°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2930, 1570—1550, 1405, 1335, 1040—1010, 925, 765, 715, 650, 615. ライネッケ塩は帯紫色粉末。

L-Arginyl-PRM (VIII) I, 800 mg を含む溶液に Z-, guan.-NO₂-L-arg-OSu (oil) 500 mg (1.09 mmol) を加えて反応。II と同様に処理後さらにセルロースカラム (2×25 cm) で精製、黄褐色粉末 111 mg を得。133°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2925, 1560, 1405, 1335, 1125, 1040—1010, 925, 760, 715, 650, 615. ライネッケ塩は帯紫色粉末。

L-Citrullyl-PRM (IX) I, 800 mg を含む溶液に benzyloxycarbonyl-L-citrulline *p*-nitrophenyl ester (mp 164—166°) 450 mg (1.06 mmol) を加えて反応。黄褐色粉末 134 mg を得。136°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3340, 2840, 1570, 1410, 1335, 1125, 1040—1010, 925, 715, 650, 615. ライネッケ塩は帯紫色粉末。

Acetyl-PRM (X) I, 1 g (1.16 mmol) を含む溶液に N-acetoxysuccinimide (mp 130—132°) 180 mg (1.15 mmol) を加えて反応。反応濃縮物をセルロースカラム (2×50 cm) に供し溶媒系 I で展開。単一画分を集め凍結乾燥、白色粉末 (X) 約 300 mg を得。219°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3420, 2920, 2260, 1630, 1380, 1245, 1190, 1030—1110, 1050, 860, 835, 715, 695, 615.

Z-PRM (XI) I, 6.44 g (7.5 mmol) を 200 ml の pH 10.3 の緩衝液に溶かし、50 ml の DMFA を加え、氷冷下 N-benzyloxycarbonylsuccinimide (mp 78—79°) 2.24 g (9.0 mmol) の DMFA (50 ml) 溶液を滴下、2 hr 攪拌。反応物を濃縮後 (CH₃)₂CO を加えて沈殿させる。沈殿物を濾取、溶媒系 I の 10 ml に溶かしセルロースカラム (4×40 cm) に供し同一溶媒系で分離。単一画分を集めて濃縮。黄褐色粉末 (XI) を得。220°より分解。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 2930, 1700, 1635—1615, 1405, 1335, 1255, 1125, 1040—1025, 930, 745, 715, 695, 650, 615, 585. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ nm (ϵ): 257 (1.49×10^4).

アミノ酸結合位置の決定法 II の 20 mg を 1 ml の H₂O に溶かし、5 ml の AcOH を加え室温攪拌下 30% NaNO₂ の 30 ml を滴加。30 min 後反応溶液に 15 ml の 4N NH₄OH を加え、H₂O を加えて全量 50 ml とする。反応液を濃縮、MeOH で反応物を抽出、抽出液を濃縮後 6N HCl, 120°, 12 hr 加水分解。濃縮、さらに MeOH で抽出。抽出液を濃縮、PPC で検索、その結果は Table III に記載。

11) 略号は IUPAC-IUB Commission on Biochemistry Nomenclature に準じた。Biochemistry, 5, 2485 (1966); 6, 362 (1967); 11, 1726 (1972).

抗菌試験 (*in Vitro*) ブドウ球菌, 大腸菌, 赤痢菌, 緑膿菌については pH 7.0 の普通ブイヨン 1 ml の小試験管に入れ, 薬剤希釈液を定める濃度に加え, 細菌の 1 夜培養液の 10^{-5} 希釈液を 1 滴加え, 37° 48 hr 培養後判定. 結核菌については 0.2% bovine albumin を含む Kirchener 培地 1 ml を小試験管に入れ, 上記同様に処理, 21 日培養後判定.

毒性試験 (静注) 19—21 g の雌性マウス (ddY-S 系) を使用. 薬剤は H_2O で希釈, 静脈より注射後 7 日観察. LD_{50} は Behrens-Kärber 法で計算.

謝辞 本研究において抗菌活性および毒性試験の検討に協力をえた大日本製薬 (株) 総合研究所の方々に感謝の意を表する.