



生理活性アミノ酸の不斉合成

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 切畑, 光統 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00009389

生理活性アミノ酸の不斉合成^{*}

切 畑 光 統

農学部・農芸化学科・農薬化学研究室

Asymmetric Syntheses of Biologically Active Amino Acids

Mitsunori KIRIHATA

Laboratory of Pesticid Chemistry, Department of Agricultural Chemistry,
College of Agriculture.

(Received October, 31, 1980)

Summary

The asymmetric syntheses of biologically active hydroxy- and α -alkyl-amino acids were achieved by convenient and creative synthetic methods. The various optically active and stereoisomeric amino acids were isolated in high yields, and then the reaction mechanisms were discussed.

An asymmetric synthesis of (4*S*, 3*S*)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid (AHMHA), an amine moiety of pepstatins, from L-leucine has been studied, in chapter 1. The reaction of N-phthalyl-L-leucyl chloride (3) with ethyl *tert*-butyl malonate and (-)-menthyl *tert*-butyl malonate (4) afforded the corresponding condensation products (5*b*) and (5*c*), which were derived to β -ketoesters (7*b*) and (7*c*), respectively, by decarboxylation reaction under mild condition without racemization. Reduction of 7*b* with sodium borohydride gave the mixture of two diastereomers (8*b*₁) and (8*b*₂), which were hydrolyzed with 4*N* hydrochloric acid to afford the corresponding diastereomers (4*S*, 3*S*)-AHMHA and (4*S*, 3*R*)-AHMHA, respectively. These compounds were separated by ion exchange resin chromatography. Similarly, the reaction of hydroxy diesters (6*b*) and (6*c*) to (8*b*) and (8*c*), and subsequent hydrolysis afforded the diastereomeric mixture of 9 and 10. The extent of asymmetric reduction was examined by GLC analysis of the TMS derivatives of 8*b* and 8*c*.

A new approach has been established for the stereoselective synthesis of β -hydroxy- α -amino acids (serine type amino acid) in chapter 2. β -C-Acylamino acid methyl esters (3) were prepared by the acid hydrolysis of oxazole-4-carboxylate derivatives (2), which were easily obtained by the reaction of methyl-2-isocyanoacetate (1) with acyl halides or acid chlorides in the presence of organic bases. The reduction of (2) to β -hydroxy- α -amino acid esters (6) was examined by the following two methods (A and B). Method A :

^{*}本論文は学位論文「アミノ酸の不斉合成とその生理活性- α -アルキルアミノ酸および β -ヒドロキシアミノ酸を中心として」の概要を記したものである。

Hydrogenation of β -C-oxo- α -amino acid esters (3) over PtO_2 or reduction with NaBH_4 , LiBH_4 and $\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$. By the method A, *erythro*- β -hydroxy- α -amino acids were obtained predominately. The relative stereochemistry of the reaction products (*erythro*-(6) and *threo*-(6)) was also discussed. Hydrolysis of (6) with hydrochloric acid afforded β -hydroxy- α -amino acid (7).

In chapter 3, optically active α -methylornithines were synthesized *via* sterically controlled Michael type addition of isocyanoacetic acid (+)- or (-)-menthylesters to acrylonitrile in the presence of sodium hydride. The isocyano group of γ -cyano- α -isocyano- α -methylpropionic acid esters (2) was converted stepwise to amino group of γ -cyano- α -amino- α -methylpropionic acid esters. Subsequently, after the protection of amino group by acetylation, N-acetyl compounds (5) were hydrogenated in acetic anhydride to give di-N-acetylamide derivatives (6). Hydrolysis of 6 with hydrochloric acid gave optically active α -methylornithine (7), which was separated by ion exchange resin chromatography. Asymmetric synthesis of 7 from (+)-menthylester (1a) gave (-)-7 (4.7 % e.e) and from (-)-menthylester (1b) gave (+)-7 (5.8 % e.e).

The syntheses of α -alkylornithines, α -methyl, α -ethyl- and α -benzylornithines were achieved *via* alkylation of carbanion derived from α -isocyanoacetic acid ester (11). α , δ -N-Diacetyl (31), α -N,N-dimethyl (29) and δ -N-formyl-ornithines (33) and other various analogues were also synthesized by usual synthetic methods.

These twelve structural analogues and derivatives of ornithine were evaluated as inhibitors of L-ornithine decarboxylase (ODC) obtained from rat liver, in chapters 3 and 4. From the degree of their inhibition on ODC, it has been possible to delineate some of the fundamental structures of ornithine which are required for inhibiting ODC.

An affinity-gel for the effective purification of ODC has been prepared, in chapter 5; AH-Sepharose 4B was reacted successively with α , δ -N-dinitrophenylsulfenyl- α -methylornithine succinimide ester (40). The nitrophenylsulfenyl group of the gel (41) was removed under mild conditions with aqueous sodium thiosulfate. The enzyme was bound selectively on the affinity-gel and could be eluted with 0.1 ~ 0.5 M NaCl solution. According to this method, ODC could be obtained in high yield.

目 次

緒 言	139
第 1 章 (3s, 4s)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid (AHMHA) の 不斉合成	140
1-1 AHMHA の合成法についての考察	140
1-2 AHMHA の不斉合成 (シリーズ b による合成)	141
1-2-1 ケト酸エステルの還元と生成物ヒドロキシ酸エステルの構造	142
1-2-2 還元生成物中のジアステレオマーの分別定量と不斉収率の決定	143
1-3 重複不斉誘導による AHMHA の合成 (シリーズ C による合成)	143
1-3-1 (-)-Menthyl <i>tert</i> -butyl malonate の合成	143
1-3-2 AHMHA の合成と不斉収率の決定	143
1-4 考察	144
第 2 章 β -ヒドロキシアミノ酸の立体選択的合成	144
2-1 β -ヒドロキシアミノ酸の合成	145
2-2 β -ケトアミノ酸の直接還元による β -ヒドロキシアミノ酸の合成〔A〕法	145
2-2-1 還元生成物のエリスロ型およびスレオ型の存在比の決定	145
2-3 N-アセチル β -ケトアミノ酸の還元による β -ヒドロキシアミノ酸の合成〔B〕法	146
2-4 水素化ホウ素カルシウムおよび水素化ホウ素リチウムによる還元	147
2-5 考察	147
第 3 章 α -メチルオルニチンの不斉合成および α -アルキルオルニチン関連化合物の合成	148
3-1 アラニンを出発物質とする α -メチルオルニチンの不斉合成	148
3-1-1 オルニチン脱炭酸酵素の生理活性とその阻害剤	148
3-1-2 α -メチルオルニチンの合成法についての考察	148
3-1-3 α -メチルオルニチンの不斉合成	149
i) (+) および (-)-Menthyl 2-isocyanopropionate の合成	149
ii) 4 a および 4 b より α -メチルオルニチンの合成	150
3-2 グリシンを出発物質とする α -アルキルオルニチンの合成	150
3-3 オルニチンの α -メチル化による α -メチルオルニチンの合成の試み	151
3-4 α -メチルオルニチン誘導體および構造類似化合物の合成	152
3-4-1 α -メチルオルニチン誘導體の合成	152
3-4-2 α -メチルオルニチンと類似の構造を有する化合物の合成	153

第 4 章 α -アルキルオルニチンおよびその関連化合物のオルニチン脱炭酸酵素に対する阻害活性	154
4-1 オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の調製と阻害活性の測定	154
4-2 阻害剤の化学構造と阻害活性	155
4-2-1 α -アルキルオルニチン類の阻害活性	155
4-2-2 α -メチルオルニチン誘導体および構造類似化合物の阻害活性	
第 5 章 α -メチルオルニチンをリガンドとする ODC の特異的吸着体の調製	157
5-1 特異的吸着体の調製	157
5-2 ODC のアフィニティークロマトグラフィー	158
総 括	168
謝 辞	169

緒 言

近年、種々の生理活性を有する天然型、非天然型のアミノ酸が多数見出されている。これらのアミノ酸は単独で、あるいはペプチドの形で抗生物質や酵素阻害剤などとして知られ、医薬品として利用されているものも多く、生理学的、薬学的に重要である。

このようなアミノ酸の多くは、通常のアミノ酸に特殊な置換基が結合したような構造をしており、分子内に2種類以上の官能基と1個以上の不斉炭素原子が存在し、選択的な官能基の保護と導入、不斉中心を保持したままの構造変換、新たに生成した不斉中心の立体配置の決定、不斉合成など、有機合成化学、立体化学の分野においても興味ある研究対象である。

本研究は、生理活性を有する種々のアミノ酸の中で、特にヒドロキシアミノ酸と α -アルキルアミノ酸に注目し、その不斉合成を目的としたものである。

現在までに知られるヒドロキシアミノ酸は、30種以上におよび、その内の数例をFig. 1に示した。この種のアミノ酸の構造上の特徴は隣接する2つの不斉炭素原子上にそれぞれアミノ基と水酸基を有することであり、これらの抱括的な合成法は未だに行われていない。

また、 α -アルキルアミノ酸は通常のアミノ酸に対する拮抗物質として、主として合成的に得られるものであり、例えば α -メチルドーパのように医薬

品として利用されているものも多く、その不斉合成については未開拓の分野である。

本論文では、第1章において酸性プロテアーゼの阻害剤ペプスタチン、SPIの構成アミノ酸である4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid (AHMHA)をL-ロイシンより不斉合成し、立体化学的検討を加えた。

第2章においては、 β -ヒドロキシアミノ酸の抱括的な立体選択的合成を目的として、4種の β -ヒドロキシアミノ酸を相当するケトアミノ酸の還元により得た。

また第3章においては、オルニチン脱炭酸酵素の阻害剤である α -メチルオルニチンの不斉合成および関連化合物の合成を行い、これらの化合物の構造と阻害活性についても検討した。さらに α -メチルオルニチンの利用として、本アミノ酸をリガンドとするオルニチン脱炭酸酵素の特異的吸着体を調製し酵素の精製に用いた。

第2、第3章において合成した化合物は主としてイソシアノ基の反応性を利用して行ったものでありイソシアノ化合物のアミノ酸合成への利用法を展開したものである。

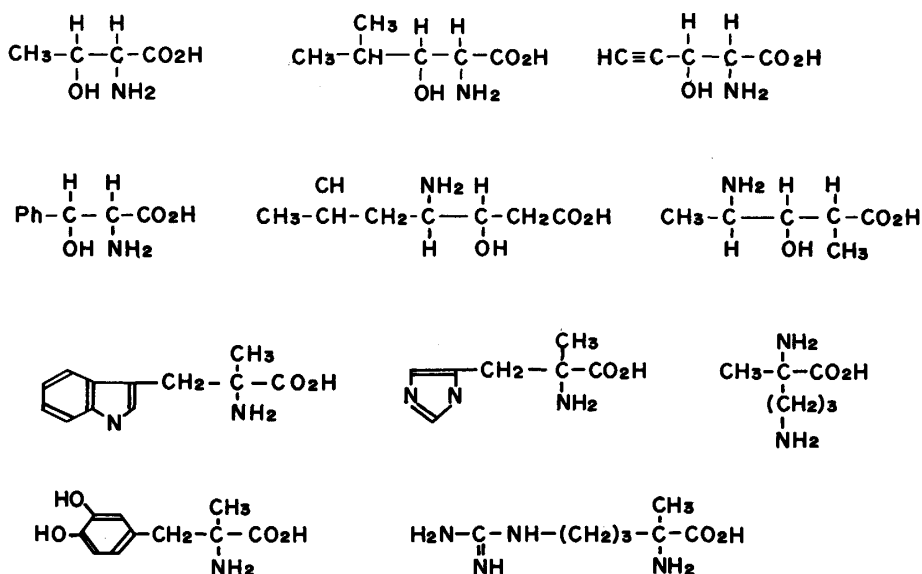
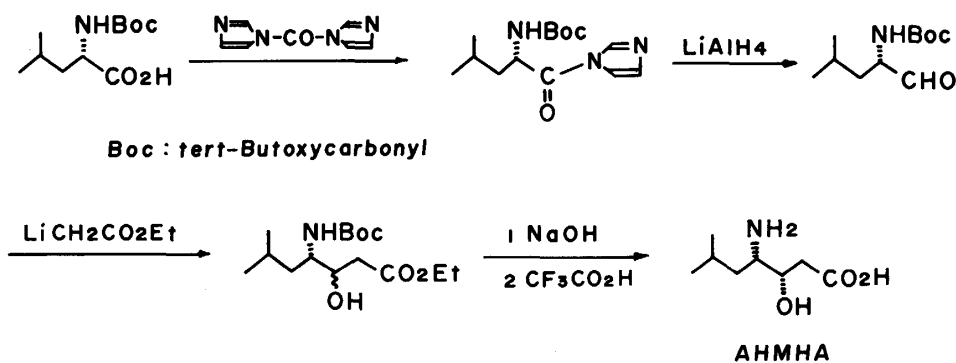
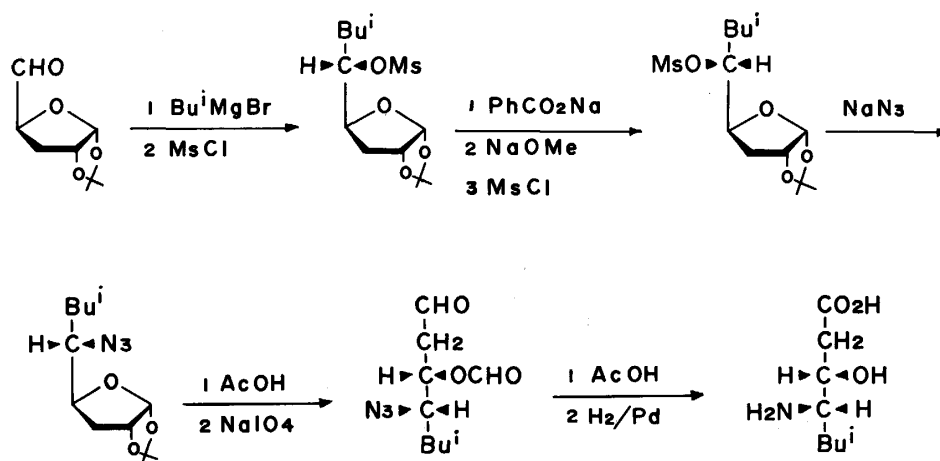


Fig. 1 Examples of hydroxy- and α -methylamino acids



Scheme 1 Synthesis of AHMHA



Scheme 2 Synthesis of (-)-AHMHA

まま、大過剰の NaBH_4 を用いて還元し、低収率で還元生成物を得ている。筆者の追試の結果でも、この還元においては **5 a** のほとんどが **2** と **4 a** に分解してしまい、目的物をごく少量得たにすぎなかった。

そこで本研究においては、マロン酸ジエチル (**4 a**) の代りに、エステルの 1 個を *tert*-ブチルエステルにした (**4 b**) (残りのエステルはエチルエステル), (**4 c**) (残りのエステルはメンチルエステル) を用いた。この理由は、誘導された縮合物 **5 b** および **5 c** が温和な条件でラセミ化することなく脱炭酸して **7 b** および **7 c** を与え、**7 b** および **7 c** は分解することなく還元生成物 **8 b**, **8 c** を与えるであろうと期待したからである。また **4 c** においてメンチルエステルを導入したのは、この不斉中心による不斉誘導効果をねらったものである。

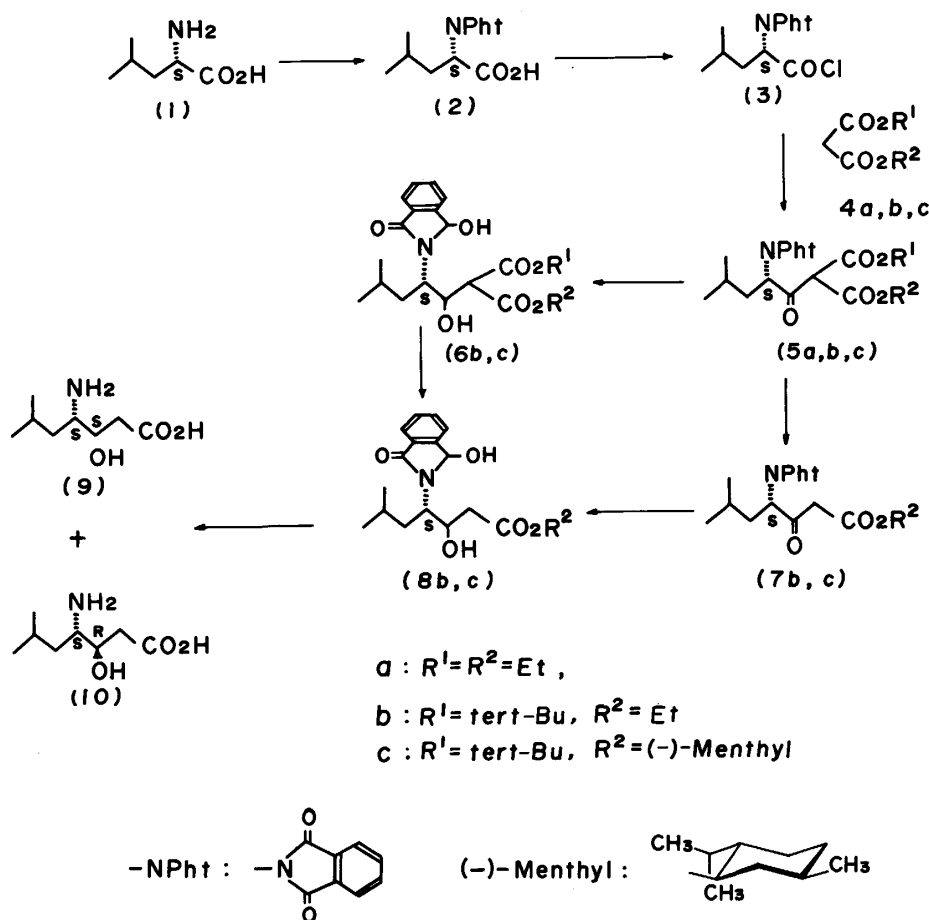
2. **5 a** の C-4 位は、L-ロイシンから保持された S 配置の不斉中心をもっているから、**5 a** の C-3 位はケトン還元する際、当然、C-4 位の立体環境に支配される不斉誘導が起るはずであるが、

梅沢らの報告にはそのことについては全く記載されていない。本研究では、シリーズ **b** において C-4 位の不斉中心による不斉誘導の効果について検討し **8 b** のジアステレオマーの生成比をガスクロマトグラフィーを用いて算定し、その不斉収率を決定しようとした。

3. シリーズ **c** においては、C-4 位の他にエステルのアルコール部にもキラリティを有する **5 c** または **7 c** の還元を行い、その不斉収率をシリーズ **b** のそれと比較しようとした。この試みは、いわゆる重複不斉誘導 (double asymmetric induction) のモデルであり、2つの不斉部分による不斉誘導の方向が一致すれば、不斉収率の向上と立体化学的に興味ある知見が期待されるからである。

1-2 AHMHA の不斉合成 (シリーズ **b** による合成)

L-ロイシン (**1**) と N-carboethoxyphthalimide より合成した N-Phthal-L-leucine (**2**) をベンゼン中で塩化チオニルと反応させて、N-



Scheme 3 Asymmetric synthesis of AHMHA

Pht-L-leucyl chloride (3) とし、これと ethyl *tert*-butyl malonate (4) をテトラヒドロフラン (THF) 中、水素化ナトリウム (NaH) を塩基として縮合させ 5b を得た。このものは不安定な化合物で、クロマトグラフィーなどの精製操作ですみやかに分解して 2 と 4b になるため、これは単離することなく、直ちにベンゼン中 *p*-トルエンスルホン酸を触媒として室温で約40時間反応させ、 β -ケトエステル (7b) とした。7b はシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した後、NaBH₄ を用いて還元し 8b とした。一方、8b は他の経路として 5b を直接還元し、生成した 6b を精製することなく脱炭酸して得ることもできる。しかしながらこの経路の収率は極端に低かった。つぎに 8b を 4 N-塩酸を用いて還元下に加水分解し、AHMHA (9) およびそのジアステレオマー (10) よりなる生成物を得、これをイオン交換樹脂カラム (Dowex 50×8, H⁺型) により分離精製して、純粋な 9 を得た。9 の物理的性質は文献に示されている天然物のそれと全く一致

した。

1-2-1 ケト酸エステル (5b および 7b) の還元生成物ヒドロキシ酸エステル (8b) の構造

5b および 7b とも室温下ベンゼン中、等モルの NaBH₄ で円滑に還元され 80% 収率でそれぞれ 6b および 8b を与える。これらの還元生成物は C-3 位のカルボニル基とともに、フタルイミド基の一方のカルボニル基も還元された構造をもつことが核磁気共鳴 (NMR) およびガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) のスペクトルを解析して明らかとなった。このような実験例として堀井ら⁸⁾ はフタルイミド誘導体をメタノール中 NaBH₄ で還元すると 3-hydroxyphthalimidine となり、さらに還元がすすむと O-hydroxymethylbenzamide になることを報告している。

他の還元方法として、7b の接触還元および電解還元についても検討したが、いずれの場合も全く還元

されないか、還元されても生成物は目的物と全く異なり、合成に利用することはできなかった。

1-2-2 還元生成物(8b)中のジアステレオマーの分別定量と不斉収率の決定

7bを還元して得た8bを薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した結果、2種のジアステレオマー8b₁(3s, 4s)および8b₂(3R, 4s)に相当する2個のスポット-Rf=0.39およびRf=0.33を得た。また、8bのトリメチルシラン(TMS)誘導体はガスクロマトグラフィー(GLC)分析において2つのピークRt=12min(8b₁)および13.5min(8b₂)を示し、その面積比は67:33であった。この比率は5bを直接還元した6bを脱炭酸して得た8bについてもほぼ同じ値を示した。

TLC上のスポットとGLC上のピークの物質の同定は、TLC上の両スポットを分取、抽出して得た2種の化合物をTMS化した後、GC-MS分析を行い、GLC上のピークと保持時間、分子量およびフラグメンテーションの解析により一致させた。

また個々の化合物の立体配置の決定は8b₁および8b₂をそれぞれ加水分解して既知の9および10と比較同定して行った。

1-3 重複不斉誘導によるAHMHAの合成(シリーズCによる合成)

一般にカルボニル基の不斉還元においては、還元剤の攻撃方向をより厳格に規制すれば不斉収率の向

上が期待できる。

前述した7bを例にとれば、C-3位のカルボニル基に対する還元剤の攻撃方向を規制するのはC-4位の不斉炭素原子に結合する置換基であり、いわゆる不斉誘導(asymmetric induction)が行われる。今この7bにもう一つの不斉部分を導入したようなモデル(すなわち7c)を考えるならば、この2つの不斉部分が規制する還元剤の攻撃方向が一致すればより強力な不斉誘導が起ると考えられる。

1-3-1 (-)-Menthyl *tert*-butyl malonate(4c)の合成

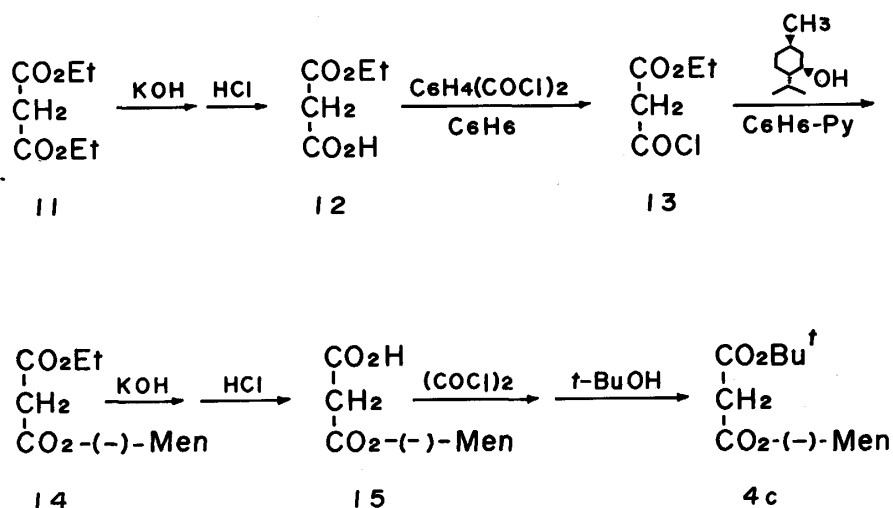
7cの合成中間体であるエステル部分に不斉中心を有する4cをScheme 4に示す経路で合成した。

すなわち、常法により合成したethyl malonyl chloride(13)にベンゼン中ピリジンの存在下(-)-メントールを反応させて(14)とし、つぎにこのエチルエステル部分のみを選択的にケン化して(15)とした後、その塩化物に*t*-ブタノールを作用させて総収率20%で4cを得た。

4cの活性メチレン基は、種々の塩基の存在下でアルキル化、アシル化などの反応を容易に受け、ついで本研究でも行ったように弱酸による加水分解、脱炭酸を順次行えば、種々のメンチルエステル類が合成でき、4cはこの点からも有用性の高い試薬と言える。

1-3-2 AHMHAの合成と不斉収率の決定

このシリーズにおける合成操作およびジアステレ



Scheme 4 Preparation of (-)-menthyl *tert*-butyl malonate

オマーの分別, 不斉収率の決定は, 前節シリーズ **b** の場合に準じて行った。

8 c 中のジアステレオマー **8 c₁** (3 s, 4 s) および **8 c₂** (3 R, 4 s) の GLC (TMS 誘導体として) および TLC はそれぞれ R_t = 13.3 min, R_f = 0.43 および R_t = 14.5 min, R_f = 0.28 であり, その存在比は 58 : 42 であった。

1-4 考察

Cram 則⁹⁾によれば, 不斉中心に隣接するカルボニル基の還元においては, 立体障害の少ない側から還元剤の攻撃をより多く受けると考えられる。本実験にこの経験則を適用すれば **5** および **7** のカルボニル基は Si 面から NaBH₄ の攻撃をより多く受け, その結果, C-3 位の立体構造は S 配置が優先的に生成するものと予測できる。この予測の正当性は, 先の 1-2 および 1-3 における **b**, **c** 両シリーズの不斉収率の比較において (3 s, 4 s) の立体構造を有するジアステレオマーが優先的に生成したという事実によって支持される。

また不斉収率の向上を目的として, エステル部分に (-)-メントールを配した **5 c** および **7 c** の還元は, Prelog ら¹⁰⁾の 1, 4-不斉誘導モデルに類似した 1, 5-不斉誘導モデルと考えることができる。この系において, 前述のようにより高い不斉誘導現象を期待したが, 目的に反して不斉収率の向上は認められず, むしろ, エチルエステルの場合 (シリーズ **b**) に比べても低かった。このことは, 本還元反応においては, 1, 2-不斉誘導の効果が, 1, 5-不斉誘導の効果よりも大きく, かさばりの大きな

メンチル基のために, かえって 1, 2-不斉誘導が弱められたか, (-)-メンチル基の持つ 3 つのキラル部分によって相殺された結果であると考えられる。

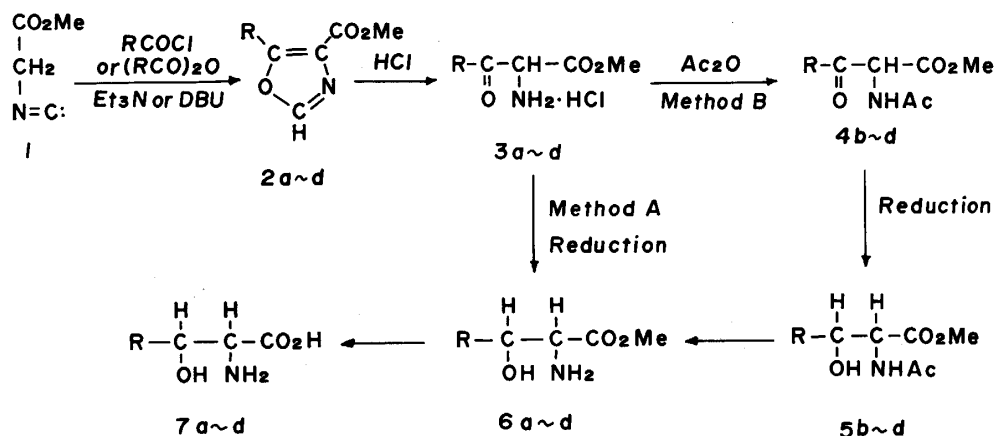
第 2 章 β-ヒドロキシアミノ酸の立体選択的合成

隣接する二つの不斉炭素原子上にアミノ基および水酸基を有するような, ヒドロキシアミノ酸を得る最も一般的な合成法は, 相当するケトアミノ酸を還元して, 水酸基を導入することであるが, ケトアミノ酸自体の合成が困難なために, この方法による合成例は少ない。

近年, Schöllkopf¹²⁾ および松本ら¹³⁾ はイソシアノ基の強い電子吸引性に着目して, イソニトリル化合物に塩基の存在下, 種々のアシル化剤 (例えば酸塩化物, 酸無水物など) を反応させて, オキサゾール中間体を経て, ケトアミノ酸を得る方法を見出しこれをを用いる新しい β-ヒドロキシアミノ酸の合成法を開発した。

本研究は, 上記の方法で得た α-ケトアミノ酸の還元方法に検討を加え, 生理活性を有する β-ヒドロキシアミノ酸の立体選択的な合成法の確立と, 立体化学的知見を得ることを目的としたものである。

本研究で合成したヒドロキシアミノ酸は, いわゆるセリンタイプのアミノ酸で, スレオニン (アロスレオニンを含む) ヒドロキシロイシン, フェニルセリンおよびベンジルセリンの 4 種である¹⁴⁾。これら 4 種のアミノ酸は何れも天然に存在し, 生理活性を有するものとして知られている。



Scheme 5 Stereoselective reduction of β-ketoamino acid

Table 1 Preparation of oxazole compounds (2a~d)

R	Acylation Agent	Base	Oxazole Compounds		
			mp (°C)	bp/mmHg	Yield
a	Ac ₂ O	DBU	46~48	—	73 %
b	(i-PrCO) ₂ O	DBU	52	62/0.27	89
c	PhCOCl	TEA	91~93	—	85
d	PhCH ₂ COCl	TEA	—	142 145/0.2	52

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

TEA: triethylamine

2-1 β-ヒドロキシアミノ酸の合成

ヒドロキシアミノ酸類 (**6**) は松本らの方法¹³⁾に従って Scheme 5 に示した経路で合成した。Ugi の方法¹⁵⁾により N-formylglycine のメチルエステルにホスゲンガスを作用させて得たイソシアノ酢酸メチル (**1**) を THF 中トリエチルアミン (TEA) または DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) の存在下で酸無水物あるいは酸塩化物と縮合させてオキサゾール化合物 (**2**) を得た。使用したアシル化剤のうち、酸塩化物と酸無水物のどちらかが適当であるかは置換基 R によって異なり本実験においては Table 1 に示したように R がメチル (**a**) およびイソプロピル (**b**) の場合には酸無水物を、フェニル (**c**) およびベンジル (**d**) の場合には酸塩化物を用いた時に、いずれも高収率で **2** が得られた。

つぎに精製した **2** を 2N-塩酸で処理して開環し、ケトアミノ酸メチルエステル (**3**) を塩酸塩として単離した。**3** より目的のヒドロキシアミノ酸 **7** を得るためには、つぎの 2 方法が考えられ、それぞれについて検討した。

すなわち、[A] 法として **3** を直接還元してヒドロキシアミノ酸メチルエステル (**6**) とした後、加水分解して **7** を得る経路と、[B] 法としてまず N-アセチル誘導体 (**4**) に導いた後、これを還元して N-アセチルヒドロキシアミノ酸メチルエステル (**5**) とし、脱アセチル化、つづいて加水分解して **7** を得る経路がそれである。

還元方法としては、白金触媒を用いた接触還元法と NaBH₄ による還元について検討した。

2-2 β-ケトアミノ酸の直接還元によるβ-ヒドロキシアミノ酸の合成

[A]法による合成

ケトアミノ酸メチルエステル (**3**) を常法どおり白金触媒存在下に接触水素添加を行うか、あるいは NaBH₄ を用いて還元して、β-ヒドロキシアミノ酸メチルエステル (**6**) を得た。**6** にはエリスロ型およびスレオ型のジアステレオマーが混在するであろうと予想されたので、下記の方法でその存在比を測定した。なお、この段階での異性体組成を変化させるのを避けるため、精製操作を行うことなく、メタノール中水酸化カリウムによりケン化してβ-ヒドロキシアミノ酸 **7** に導いた。

2-2-1 エリスロ型およびスレオ型の存在比の決定

β-ヒドロキシアミノ酸メチルエステル類のエリスロ型およびスレオ型を PMR スペクトルにより分別定量しようとする試みは、既に松本ら¹³⁾が報告している。これはメチルエステルのメチルの化学シフトが、エリスロ型、スレオ型ではそれぞれ異なった磁場に一重線で現れるため、それぞれの積分強度の比より存在比を算定するものである。本実験において得た **6** の PMR スペクトルを測定したところ、還元方法、置換基 R の如何にかかわらずいずれもメチルエステルのシグナルは一本の一重線のピークとして現れた(例えば Fig. 4)。この事実は [A] 法の還元においてエリスロ型かスレオ型のいずれか一方のジアステレオマーのみが立体選択的に生成したことを示す証左である。

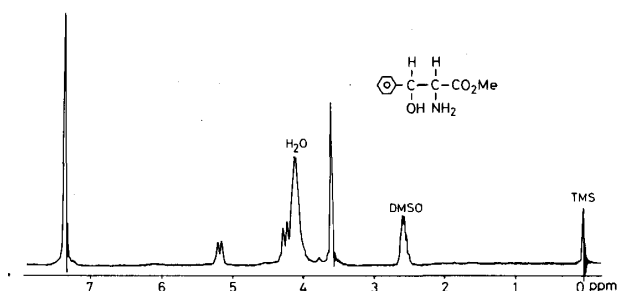


Fig. 4 The PMR spectrum of 6c

一方, Shaw および Fox¹⁶⁾ はペーパークロマトグラフィーによりヒドロキシアミノ酸のステロ型, エリスロ型を識別する方法を報告しており, しばしば利用されている。これに従い 6 をケン化して得た 7 のペーパークロマトグラフィーを Shaw-Fox 溶媒で展開後, ニンヒドリン発色させて Fig 5 の結果を得た。a~d いずれの場合も Rf の小さい方のスポ

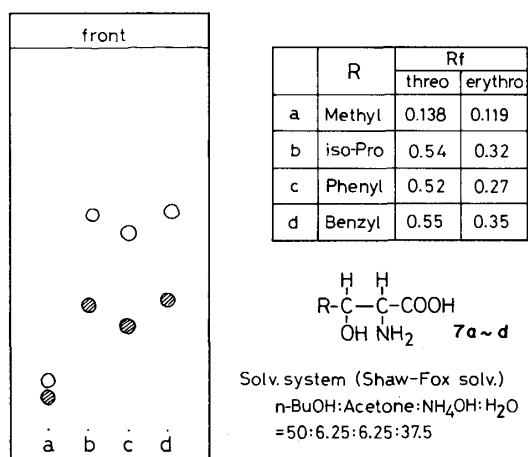


Fig. 5 The paperchromatogram of (7)

ットがエリスロ型であり, それより上部の痕跡程度のスポットはステロ型のものである。この結果と先の PMR スペクトルの知見から [A] 法におけるケトアミノ酸メチルエステル (3) の還元では, 白金触媒による接触水添あるいは NaBH₄ を用いる還元のいずれの場合も, また R の如何にかかわらずほとんどエリスロ型のみが優先的に生成するものと考えられる。

2-3 N-アセチル-β-ケトアミノ酸の還元によるβ-ヒドロキシアミノ酸の合成

(B)法による合成

ケトアミノ酸メチルエステル (3) を塩基性下

(pH 8~9) 無水酢酸と反応させて, N-アセチル誘導体 (4) を得た。これを [A] 法と同じく, 二方法で還元し, N-アセチルβ-ヒドロキシアミノ酸メチルエステル (5) を得た。これを 2N-塩酸により脱アセチル化して (6) とした後, [A] 法と同様にケン化して (7) を得た。4 より 7 までの各段階では再結晶法などの精製操作を行わず 6 の加水分解物をイオン交換樹脂 (Dowex 50×4, H⁺型) カラムに吸着させ, 水洗後 5% アンモニア水で溶出して, ニンヒドリン試薬に陽性の画分を集め, 90% 以上の純度で 7 を得た。

[B] 法における生成物のエリスロ型/ステロ型の存在比の決定は [A] 法と同じく, 5 の PMR スペクトルにより決定した。すなわち, 5 のメチルエステルのメチルのシグナルはエリスロ型の方がより高磁場側に現れ, Fig. 6 における δ : 3.58 と 3.65 の両シ

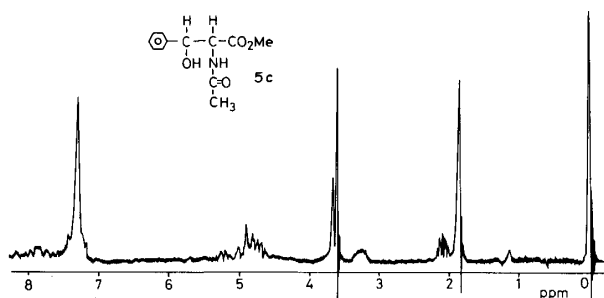


Fig. 6 The PMR spectrum of 5c

グナルの積分強度比から, エリスロ型/ステロ型の比は約 3 : 2 であると算定した。

また 5 の β-位の水酸基を TMS 化して, ガスクロマトグラフィーにより測定したところ, 例えば, Fig. 7 のような結果を得た。Rt=17min. 付近の 2 つのピークは GC-MS スペクトルにより同一分子量 (M⁺: 309) を与え, フラグメントパターンも酷似している。また 6 より誘導した 7 の Shaw-Fox 展開剤を用いたペーパークロマトグラムの解析より,

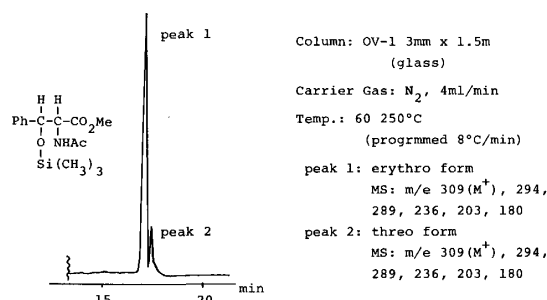


Fig. 7 The gaschromatogram of (5c)

Table 2 Stereoselective reduction of β -keto-N-acetyl amino acid methylesters

R	H_2/Pt		$NaBH_4$	
	ery:threo		ery:threo	
a Me	—		—	
b <i>i</i> -Pr	—		4:1	
c Ph	9:1		3:2	
d $PhCH_2$	9:1		3.5:1	

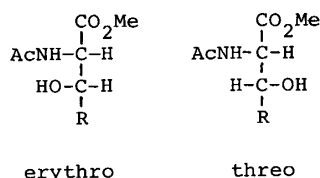


Fig. 7のピーク1はエリスロ型、ピーク2はスレオ型であると決定した。なお両ピークの面積比を算定し、PMRの積分強度から求めたエリスロ型/スレオ型の存在比と比較したところ、ほぼ同じ値であった。

Table 2には〔B〕法で得た還元生成物5中のエリスロ型/スレオ型の存在比を示している。a (R = Me)ではN-アセチル誘導体5が得られず、b (R = *i*-Pr)の場合には常圧下の接触還元によっては還元されず原料を回収した。また $NaBH_4$ による還元では、エリスロ型、スレオ型の存在比は反応溶媒(メタノール、ジオキサン)によって多少の差異が認められ、Tableには最もスレオ型の多い場合を示している。

〔B〕法では、〔A〕法に比べて明らかにスレオ型が増加しており、エリスロ型/スレオ型の比は、還元方法、置換基Rの種類などによって異なるが、 $NaBH_4$ による還元の方がスレオ型の生成が多いのが特徴である。

2-4 水素化ホウ素カルシウム $Ca(BH_4)_2$ および水素化ホウ素リチウム $LiBH_4$ による還元

Pinnes¹⁷⁾は相当するN-アセチルケトアミノ酸エステルを還元して種々の3-aryl-2-methylserineを合成しているが、 $Ca(BH_4)_2$ による還元の場合に最もスレオ型の生成が多いと報告している。

本研究においてもスレオ型のヒドロキシアミノ酸の収率を上げるために、N-アセチルケトアミノ酸メチルエステル(4c)をジオキサン中氷冷下で $Ca(BH_4)_2$ および $LiBH_4$ を用いて還元した。その結果スレオ型の生成率は $Ca(BH_4)_2$ による場合に最も高く、エリスロ型/スレオ型の比は1.3:1であった。

2-5 考 察

Table 2の実験結果より、立体選択性は還元方法や基質であるケトアミノ酸エステルの構造、とくにアミノ基周辺の構造の違いによって明らかに異った。

まず接触水素添加によるケトアミノ酸エステル類の還元機構について考察する。 β -ケトアミノ酸エステル類(3および4)では、分子内のカルボニル基とアミノ基がFig. 8のように白金触媒と結合を構成して、触媒表面に固定されると考えられる。その結果、 C_2-C_3 間の自由回転が防げられた状態で水素の攻撃を受け、水酸基の立体配置が決定されると予想される。

3の場合は4に比べて触媒に対してより強い結合性を示し、著しく C_2-C_3 間の自由回転が防げられた状態で還元されエリスロ型が圧倒的に生成したものと考えられる。これに対して4では、アセチル基による立体障害と、窒素原子上の電子の非局在化のために触媒との結合性が3に比べ弱められ、 C_2-C_3 の自由回転が起っている状態で還元される。こ

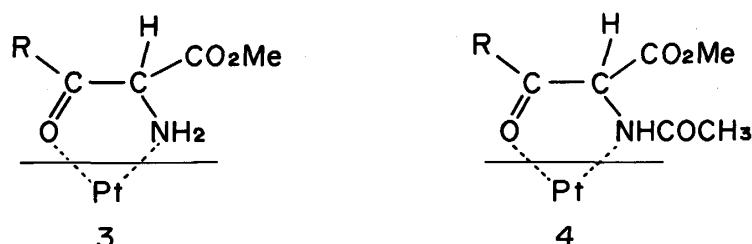


Fig. 8 Mechanism of catalytic hydrogenation

の結果、立体選択性が弱まり、幾分スレオ型が生じたものである。

水素化ホウ素化合物による還元機構については種々の説があるが、本実験の結果を合理的に説明することはできない。

第3章 α -メチルオルニチンの不斉合成および α -アルキルオルニチン関連化合物の合成

3-1 アラニンを出発物質とする α -メチルオルニチンの不斉合成

3-1-1 オルニチン脱炭酸酵素の生理活性とその阻害剤

ポリアミンは細胞の増殖と密接に関係し、その合成はオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) により調節されていると考えられる。

ODCはオルニチンよりプトレッシンが生成する反応を触媒し、特に増殖型細胞、例えば、リンパ球、ガン細胞、ラット再生肝細胞などにおいて、その活性の著しく高いことが知られているが、本酵素はまた生体内における半減期は約10分前後の一過性酵素であって、その性質、構造については今なお不明な点が多い。

従って、ODCの活性を阻害する化合物の研究はODCの構造や機能の解明とともに、ODCの精製に利用される可能性もあり、寄与するところ甚だ大である。また本酵素の阻害剤の多くは、RNAやDNAの生合成を抑制する作用も有することから、ガン細胞などの悪性増殖型細胞に対する抑制効果も期

待され、薬学的見地からも興味を持たれている。

現在までにオルニチンの誘導体でODCに阻害活性を示す化合物はFig. 9に示したように5種類見出されている¹⁹⁾。その中で、 α -メチルオルニチンは

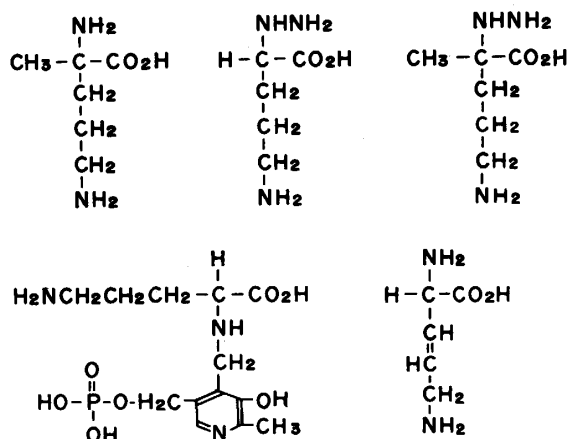
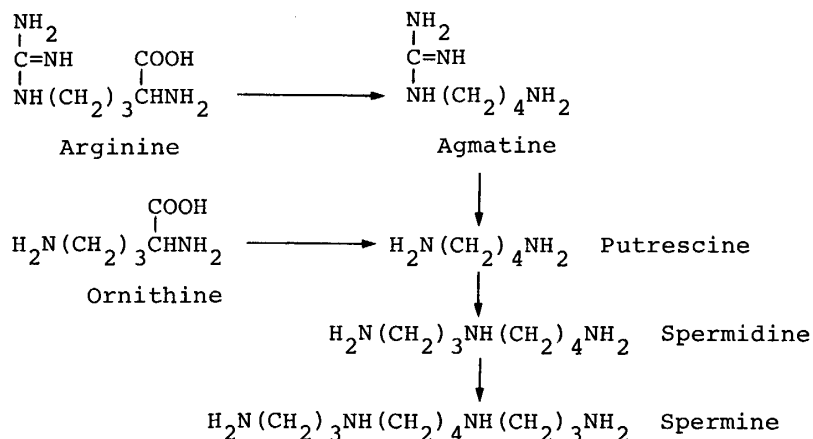


Fig. 9 Inhibitors of ornithine decarboxylase

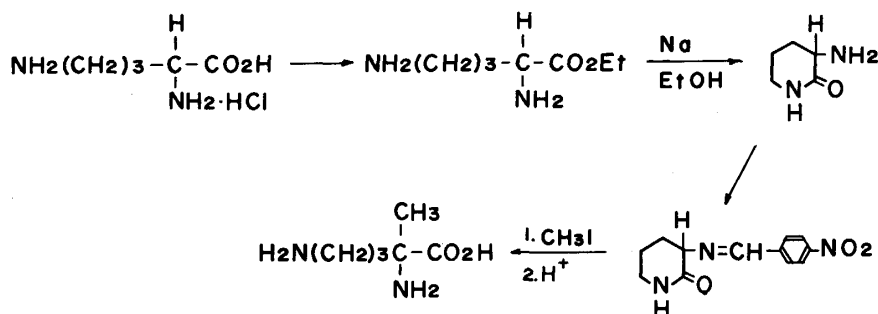
1975年、Abdel Monemら²⁰⁾により最初に報告された非天然型のアルキルアミノ酸で拮抗的にODCを阻害し、またRNAポリメラーゼの生成を抑制するとともに²⁰⁾、ある種の微生物に対してもantimetaboliteとして作用することが報告されている²¹⁾。

3-1-2 α -メチルオルニチンの合成法についての考察

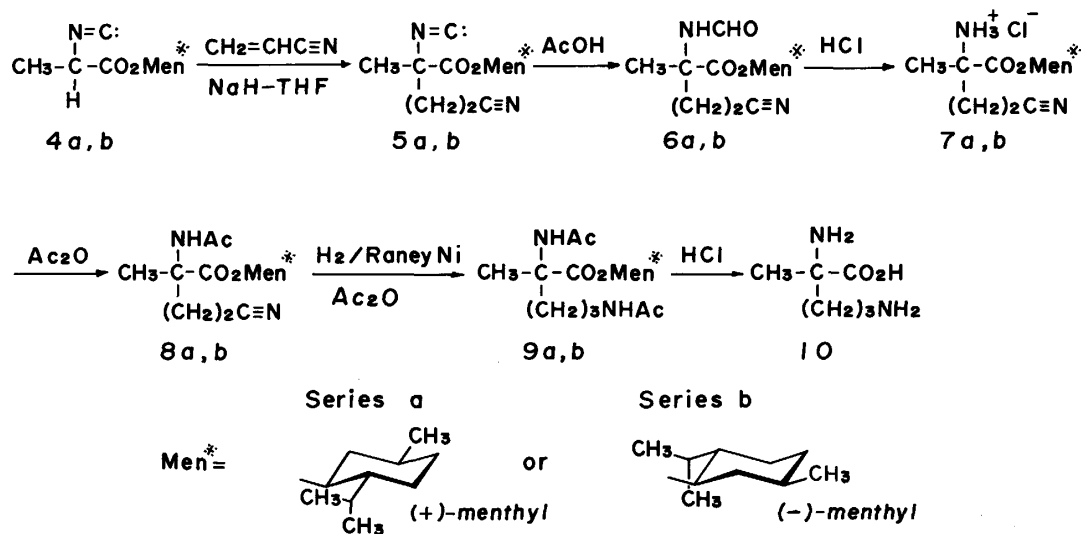
α -メチルオルニチンの合成については、これまでもいくつかの報告がなされている。これらを合成方法で大別すると、①Bucherer-Lieb反応によって得た5-methyl-5-(3-phthalimido-propyl)-hydantoin²²⁾あるいは5-(3-aminopropyl)-5-methylhydantoin^{22, 23)}の加水分解、②5-methyl-5-



Scheme 6 Biosynthetic pathway of polyamines



Scheme 7 Synthesis of (±)-α-methylornithine



Scheme 8 Asymmetric synthesis of α-methylornithine

(3-nitropropyl) hydantoin²⁵⁾あるいは5-(cyanoethyl)-5-methylhydantoin²⁶⁾の接触還元, ③3-imino-(4-nitrobenzyl) piperidine-2-oneをメチル化したのち, 加水分解する方法²⁰⁾ (Scheme 7)などが挙げられる。しかしながらこれらのいずれの方法においても, 得られたα-メチルオルニチンは, ラセミ体であり, このアミノ酸の不斉合成に関する研究は現在までに報告されていない。

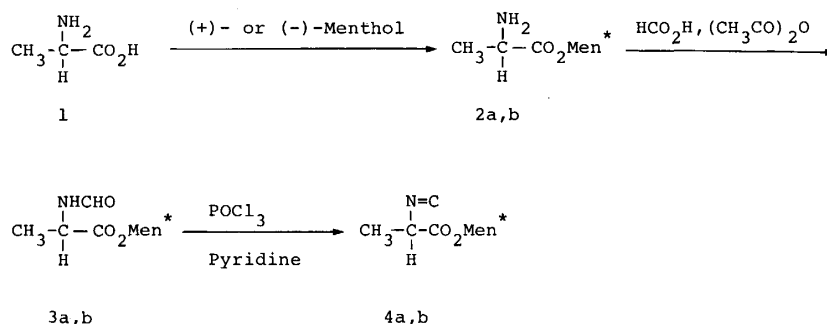
3-1-3 α-メチルオルニチンの不斉合成²⁷⁾

イソシアノ基の強い電子吸引性のために, α位の炭素に結合している水素は塩基によりH⁺として引き抜かれ, 反応性に富むカルバニオンが生成し, これが種々のアシル化剤と反応することはすでに第2章において述べた。このカルバニオンはまた, 種々の活性な二重結合に対してもMichael型の付加反応を起すことが知られている²⁸⁾。

本研究においても, Scheme 8に示したように,

エステルのアルコール部分にキラリティを有するイソシアノエステル(4)をNaHの存在下でアクリロニトリルと不斉Michael型付加反応を行わせ, 付加物(5)に還元, 加水分解などの処理を加えて光学活性なα-メチルオルニチン(10)を得ようとしたものである。

i) (+)および(-)-Menthyl-2-isocyano-propionate (4a)および(4b)の合成
光学活性なイソシアノエステル(4aおよび4b)はScheme 9に示した経路で合成した。すなわち, (±)-アラニン(1)を原田の方法²⁹⁾によって(+)-または(-)-メントールと反応させてアラニンメンチルエステル(2)を高収率で単離した。2をギ酸および無水酢酸で処理してN-ホルミル化合物(3)を得, ついでオキシ塩化リン-ピリジンを作用させてイソシアノエステル(4)を合成した。粗生成物の4をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200)を



Series a: (+)-Menthyl, Series b: (-)-Menthyl.

Scheme 9 Preparation of (+)- and (-)-menthyl 2-isocyanopropionates

用いて精製し、純品を得た。

ii) **4 a** および **4 b** より α -メチルオルニチン (**10**) の不斉合成

前項で得た光学活性なイソシアノエステル (**4 a** または **4 b**) を水素化ナトリウム (NaH) の存在下 $-30^\circ\text{C} \sim -40^\circ\text{C}$ でアクリロニトリルを反応させ、約 85% の収率で **5** の粗生成物を得た。これをシリカゲラムに吸着させ、ベンゼン溶出面分より **5** の純品を得た。つぎに **5** を 95% 酢酸中、 $40 \sim 50^\circ\text{C}$ に加熱して N-ホルミル化合物 (**6**) を単離し、さらにメタノール-塩酸の混合溶媒中で加水分解して (**7**) の塩酸塩を得た。**5** から **7** の反応の進行は、IR スペクトルにおけるイソシアノ基の吸収 (2150cm^{-1}) の存在とその消失、シアノ基に由来するピーク (2350cm^{-1}) の出現により確認された。

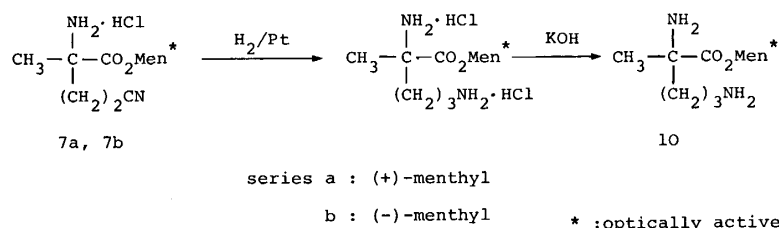
7 から **10** までの経路については、当初、**7** のニトリル基を還元した後、ケン化して **10** を得る下図の経路について検討したが副産物が多く、目的物の単離は困難であった。これはニトリル基の還元中間体であるイミノ化合物が種々の付加反応を起すためであろうと考えられる。そこでまず **7** のアミノ基を塩基性下、無水酢酸と反応させ N-アセチル化合物 (**8**) として保護した後、ニトリル基を無水酢酸中ラネー

ニッケル (R-100) を触媒として、加圧、加熱下で還元して、ジアセチル化合物 (**9**) を 90% 以上の高収率で得た。**9** を 4 N-塩酸により加水分解して脱アセチル、脱メンチル化を同時に行い、イオン交換樹脂クロマトグラフィー (Dowex 50 \times 8, H^+ 型) により精製して純粋な α -メチルオルニチン (**10**) を得た。

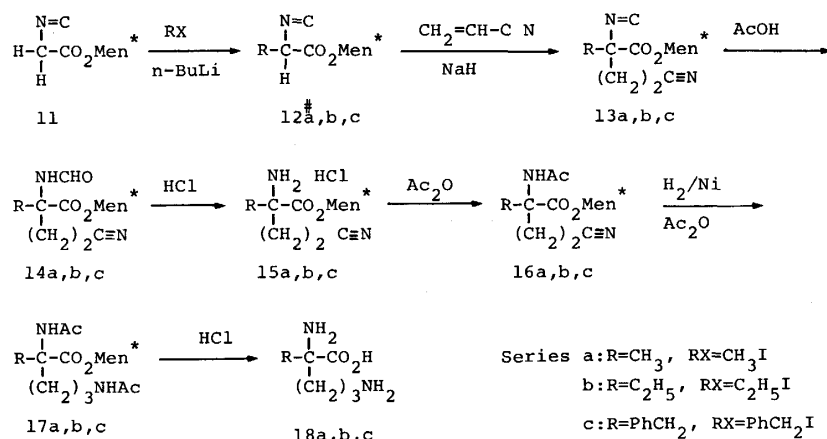
本合成経路において不斉 Michael 型付加反応における不斉収率を求めるために、**5** から **9** までの工程中、再結晶などの精製操作は全く行わず、フラクテーションによる光学異性体比が合成段階で変化することを出来るかぎり避けた。そして得られた純粋な **10** の旋光度より不斉収率を計算した。その結果、(+)-メントールを不斉源に用いたシリーズ **a** では (-)- α -メチルオルニチンを 4.8% e. e で与え、また (-)-メントールを不斉源に用いたシリーズ **b** では、(+)- α -メチルオルニチンを 5.7% e. e で与えた。

3-2 グリシンを出発物質とする α -アルキルオルニチンの合成

アラニンを出発物質とする前節の合成法は α -メチルオルニチンの合成にのみとどまり、他の α -アルキルオルニチンの合成には適用できない。ここでは、Scheme 11 に示したように、グリシンより誘導



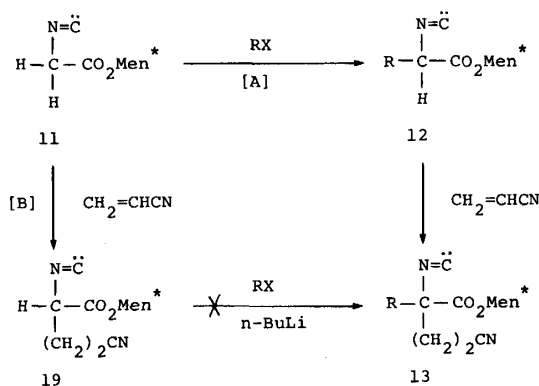
Scheme 10 Preparation of α -methylornithine



#12a=4b (Scheme 8)

Scheme 11 Synthesis of α -alkylornithines

した(-)-Menthyl isocyanoacetate (11) を合成中間体として、その α 位にハロゲン化アルキル類とアクリロニトリルを段階的に反応させ、各種 α -アルキルオルニチンを得る方法を考察し、その有効性について検討した。11から(13)を得るにはScheme 12のように、まず11をハロゲン化アルキルでアルキ



Scheme 12 Methodology of alkylation

ル化して(12)とした後、アクリロニトリルを付加させて13に導く〔A〕法と、先にアクリロニトリルの付加反応を行って(19)とした後にアルキル化する〔B〕法の二つが考えられる。しかしながら〔B〕法においては、19は合成できたが、このアルキル化反応は原料の回収にとどまった。これはおそらく19の反応点周辺における立体障害が大きいためと考えられる。それ故〔A〕法にもとずき、11を無水THF中、*n*-ブチルリチウムの存在下種々のハロゲン化アルキルを用いてアルキル化し、12の粗生成物を得た。この中には約5%のジアルキル化物が含まれており、これをシリカゲルカラムにより分別して、純粋な12を得た。これを前述した条件でアクリロニ

トリルと付加させた後、加水分解、還元を経て17を塩酸により加水分解して、 α -アルキルオルニチン(18)の粗生成物を得た。これをイオン交換樹脂カラムを用い、分離精製して純粋な18とした。得られた18a(α -メチルオルニチン)の光学純度は5.5%e.eであった。

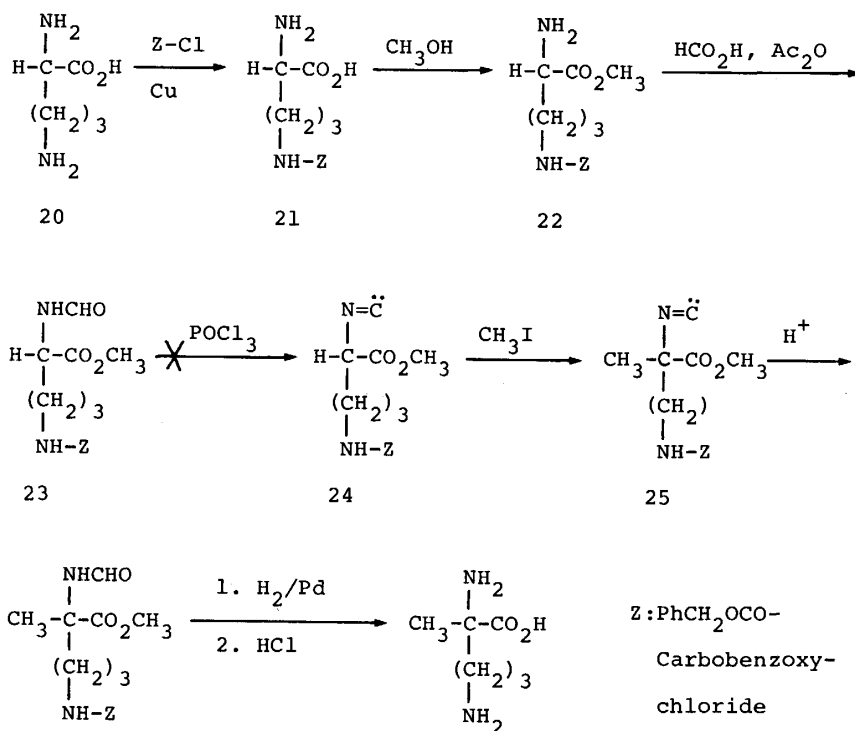
3-3 オルニチンの α -メチル化による α -メチルオルニチン合成の試み

3-1, 3-2においてそれぞれアラニン、グリシンを原料とする α -メチルオルニチンの不斉合成について述べたが、この節ではオルニチンの α -メチル化による α -メチルオルニチンの合成の可能性について検討した。

この合成法の基本的な構想はアミノ酸の α 位の炭素を何らかの方法で活性化し、これをアルキル化しようとする所にある。本実験では、アミノ基をイソシアノ基に変換し、その α 位をアルキル化する試みについて検討した。

もしこの合成法が確立されれば多くの α -アルキルアミノ酸は、それに相当する入手容易な一般のアミノ酸から誘導できることとなり、その意義は大きい。

本合成計画はScheme 13に従って検討した。すなわち、オルニチン(20)を銅イオンの存在下でカルボベンゾキシ化(Z化)して δ 位のアミノ基のみがZ基で保護された(21)を単離した。これを常法どおりメチルエステル化し、つづいてN-ホルミル化して(23)を合成した。23のN-ホルミル基のイソシアノ基への変換については、種々の報告がある

Scheme 13 Synthesis of α -methylornithine by the alkylation of ornithine

が、本実験でまず①トリエチルアミンの存在下、オキシ塩化リンによる方法、②

-トルエンスルホニルクロリド、ピリジンによる方法について試みた。しかしながら①では反応生成物のIRスペクトルに2150cm⁻¹付近のイソシアノ基に由来する吸収が見られず、②では反応が進まず原料を回収した。

現在他のイソシアノ合成法について検討している。

3-4 α -メチルオルニチン誘導体および構造類似化合物の合成

α -メチルオルニチンの構造とODCに対する阻害活性の関係をより明らかにするため、種々の α -メチルオルニチン誘導体および構造類似化合物の合成を行った。

i) α -メチルオルニチン誘導体の合成

この項で合成した誘導体はいずれもFig.10に示す基本骨格を持っており、 α -位のメチル基を固定したのは、本章第2節で合成した3種の α -アルキルオルニチン(R=CH₃, C₂H₅, PhCH₂)の中で、 α -メチルオルニチンがODCに対して最も強い阻害活性を示したからであり(活性の測定法は次章で述

No	R ¹	R ²	R ³
29	CH ₃	CH ₃	H
31	H	COCH ₃	COCH ₃
32	H	H	C(=NH)NH ₂
33	H	H	CHO

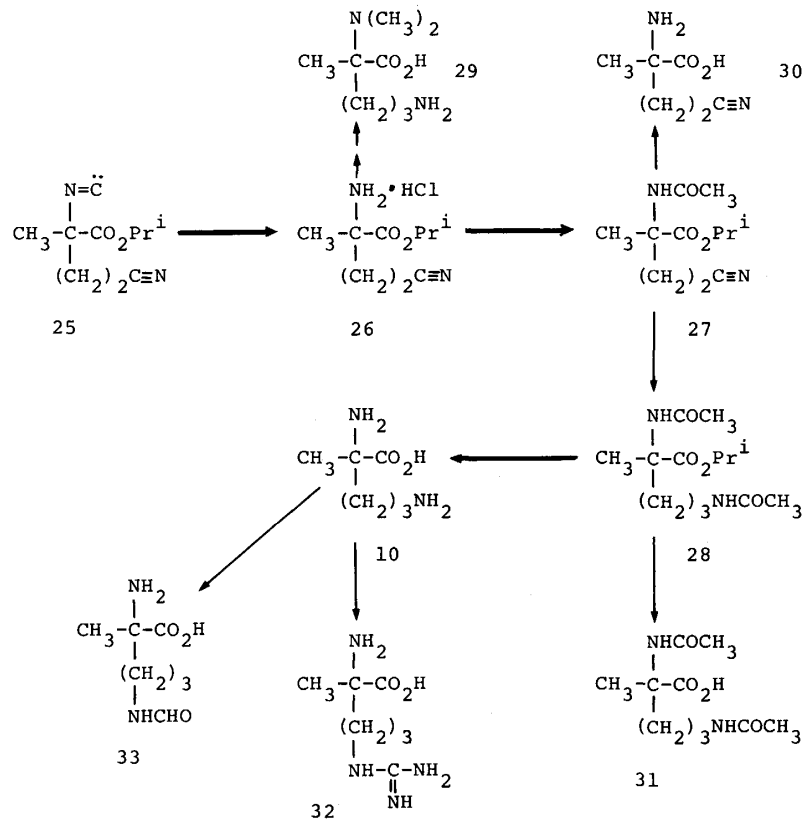
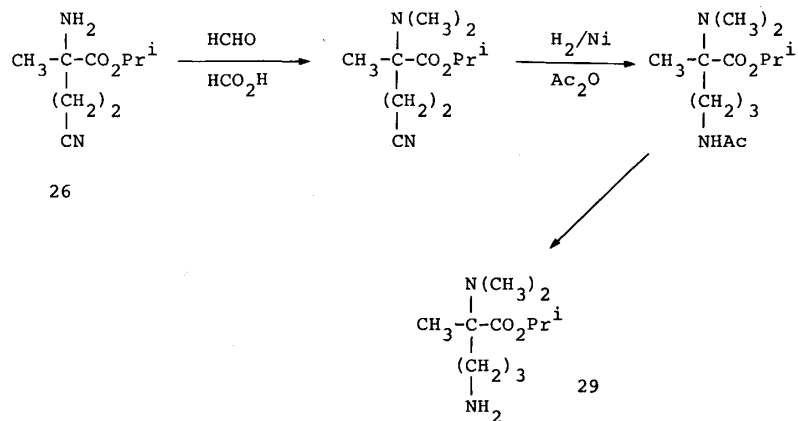
Fig. 10 Structure of (\pm)- α -methylornithine derivatives

べる)、また他のアルキルオルニチンに比べて合成の容易なためである。

本実験では、Scheme14に示したようにisopropyl α -isocyanopropionate (25)を出発物質として各化合物の合成を行った。太線の矢印は(\pm)- α -メチルオルニチンの合成経路を示し、細線の矢印は合成中間体からの種々の誘導体の合成を示している。

(26)から(29)の合成は別にScheme 15に示したようにホルムアルデヒドとギ酸を用いるLeukart反応により、N,N-ジメチル体とした後、常法どおり還元し、ついで塩酸存在下で加水分解して得られた反応生成物をイオン交換樹脂クロマトグラフィーにより精製した。

また(31)は(28)のエステル基のみを水酸化ナトリウムを用いてケン化して得た。

Scheme 14 Syntheses of (+)- α -methylornithine and its derivatives.Scheme 15 Preparation of α -methyl- α -N, N-dimethylornithine

(32) は鮫島らの方法³⁰⁾に従って10とS-メチル尿素をpH10.2のアンモニア水中で反応させることにより得た。

(33) は常法どおり、 α -メチルオルニチンを銅イオンの存在下でホルミル化して得た。

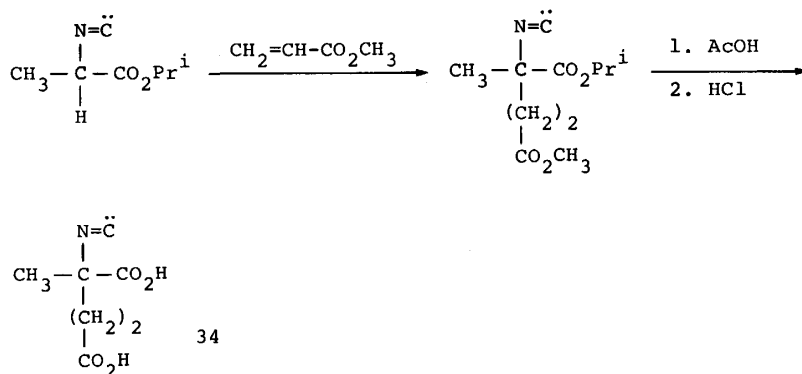
ii) α -メチルオルニチンと類似の構造を有する化合物の合成

本実験ではFig. 9に示した3種の化合物を合成し

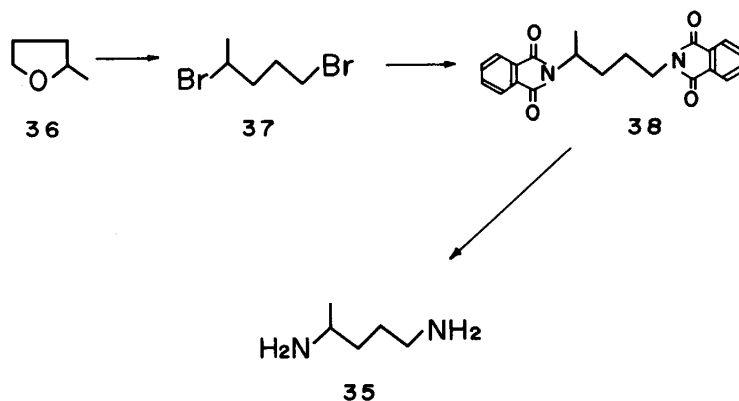
た。

(30) はScheme 16に示したように(27)のエステル基およびN-アセチル基を塩酸で加水分解して得られた。この化合物は(26)からも合成できるが27の段階で精製できるため、前法の方がより純度の高い目的物が得られる。

(34) は α -メチルグルタミン酸であり、Scheme 17に示した経路で合成した。すなわち、イソシアノ化合物に常法どおりアクリル酸メチルを付加し、つ



Scheme 16 Synthesis of (±)-α-methylglutamic acid



Scheme 17 Synthesis of α-methylputrescine

いで酢酸および4 N塩酸で加水分解して全収率45%で得た。

(35)はα-メチルプトレッシンであり、α-メチルオルニチンのカルボキシル基が欠した構造をしている。この化合物はODCのproduct analogueでありその生理活性についても興味を持たれる。合成法はScheme17に示したとおり、2-methyltetrahydrofuran (36)にクロホルム中臭化水素ガスを反応させ、得られた臭化物(37)をジメチルホルムアミド(DMF)中フタルイミドカリウムと反応させて38を得た。これを常法どおりエタノール中ヒドラジンを用いて脱フタルルを行い、目的物を全収率35%で得た。

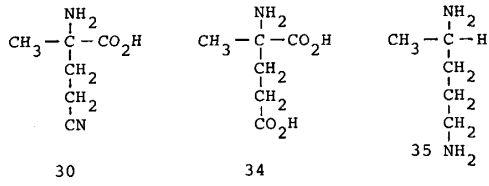
第4章 α-アルキルオルニチンおよびその関連化合物のオルニチン脱炭酸酵素に対する阻害活性

4-1 オルニチン脱炭酸酵素(ODC)の調製と阻害活性の測定

ODCに対する阻害活性は共同研究者である大阪市立大学医学部生化学教室大谷周造助教授、松井勲助手両氏の指導のもとに測定されたものである。

ODCはラット腹腔内にチオアセトアミドを注射して誘導し、2時間後に肝臓をとり出しFig.10に示した方法で粗酵素溶液を調製した。

阻害活性の測定はFig.11に表示した。すなわち、1-¹⁴C-オルニチンを含む基質に上記の粗酵素液、合成した各種阻害剤を加えて、図示したフラスコ(main chamber)に入れ、37°Cで1時間インキュベートした後、50%トリクロル酢酸水溶液0.5mlを注射器で加え、さらに37°Cで1時間インキュベートして、



No	compounds
30	2-(2'-cyanoethyl)alanine
34	α -methylglutamic acid
35	α -methylputrescine

Fig. 11 Analogues of α -methylornithine

発生した $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を含む二酸化炭素ガスを予じめ容器のwell部分に入れておいた吸収剤に完全吸収させた。 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の量はこのwell部分から一定量を計りとり、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。これらの測定結果をDixon plot法により作図して、各種化合物のKi値を求めた。(Fig.14)。

4-2 阻害剤の化学構造と阻害活性

i) α -アルキルオルニチン類の阻害活性

前掲の方法で測定したKi値をTable3およびTable

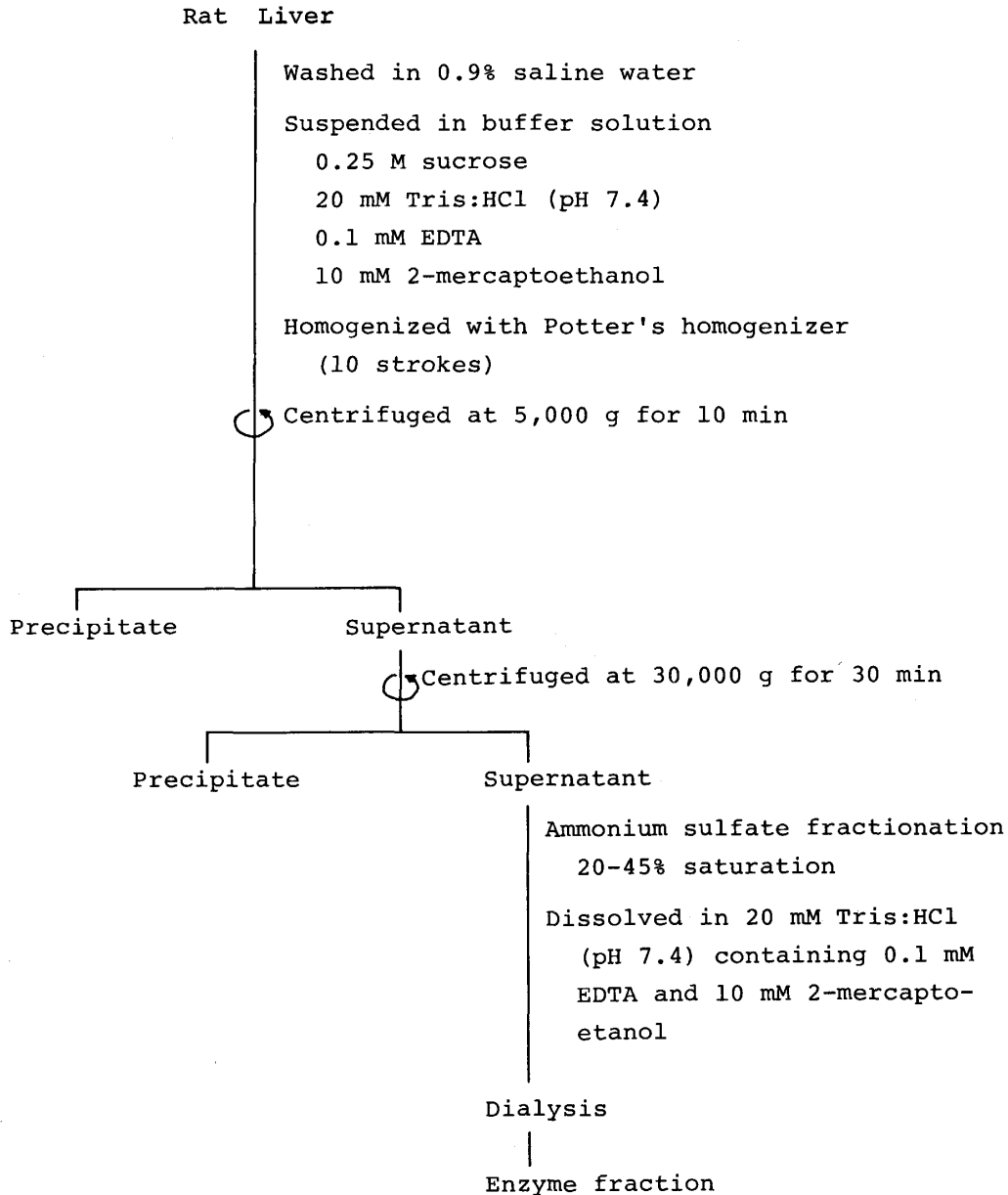
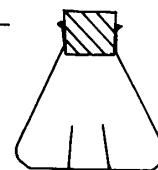


Fig. 12 Preparation of crude ornithine decarboxylase

Reaction Mixture

Main chamber

Tris:HCl (pH 7.4)	50 nmoles
Dithiothreitol	1 nmole
EDTA	1 nmole
Pyridoxal phosphate	50 nmoles
L-Ornithine	80, 400 nmoles
D,L-[1-C ¹⁴]-Ornithine	0.25 μ Ci (2 nmoles)
Enzyme solution	0.1 ml
Inhibitor	

 Total 1 ml


Well

Methyl benzethonium hydroxide 0.3 ml
(1M in methanol)

 Incubation 37°C, 60 min

0.5 ml of 50% Trichloroacetate solution

Incubation 37°C, 60 min

Scintillation liquid

0.4% PPO, 0.01% POPOP in toluene

Packard Tri-Carb liquid scintillation
counting system

Fig. 13 Determination method of ornithin decarboxylase activity

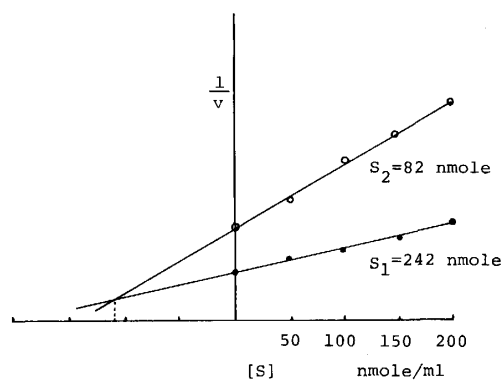


Fig. 14 Dixon plot of the effect of α -methyl(\pm)-ornithine on the rate of L-ornithine decarboxylation by ornithine decarboxylase

4に示した。 α -アルキルオルニチンでは、アルキル基がメチル基の場合に最も強い活性を示した。 α -メチルオルニチンの光学異性体による活性の差については、本実験では光学純度の高い試料が入手できなかったため確認は得られなかったが、若干の差は認められた。

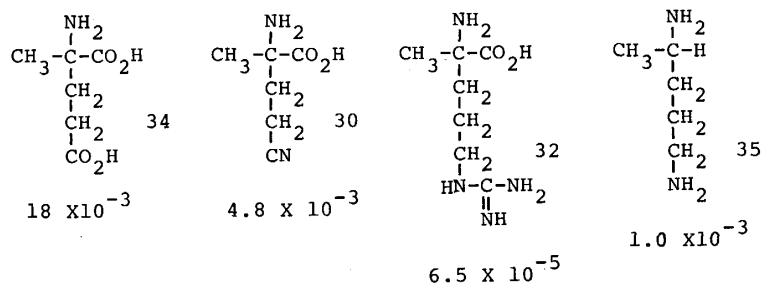
以上の結果からつぎのことが明らかとなった。① α -アルキルオルニチンのアルキル基は、メチル基の時に最も強い阻害活性を示した。② α -メチルオルニチンの δ -位のアミノ基の存在は必須であり、かつ-NH₂の時に最も強い活性を示した。③ α -位のアミノ基がアルキルで置換されたような2級アミノ基であっても、 δ -位のアミノ基が-NH₂の形であれば、阻害活性は高い。

Table 3 Inhibition activity of α -alkylornithins

$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{CO}_2\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Compound			
	No		L:D	Ki
	18a	CH ₃	50:50	1.08 × 10 ⁻⁴
	18a	CH ₃	53:47	0.98 × 10 ⁻⁴
	18a	CH ₃	48:52	1.06 × 10 ⁻⁴
	18b	CH ₃ CH ₂	—	3.50 × 10 ⁻³
	18c	C ₆ H ₅ CH ₂	50:50	1.02 × 10 ⁻³

Table 4 Inhibition activity of ornithine derivatives and analogues

$\begin{array}{c} \text{NR}^1\text{R}^2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CO}_2\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}-\text{R}^3 \end{array}$	Compound				
	No	R ¹	R ²	R ³	Ki
	18a	H	H	H	1.0 × 10 ⁻⁴
	29	CH ₃	CH ₃	H	4.5 × 10 ⁻³
	31	H	COCH ₃	COCH ₃	5.8 × 10 ⁻³
	33	H	H	CHO	5.6 × 10 ⁻³



カルボキシル基の存在の意義についても目下種々のジアミン類を合成して検討している。

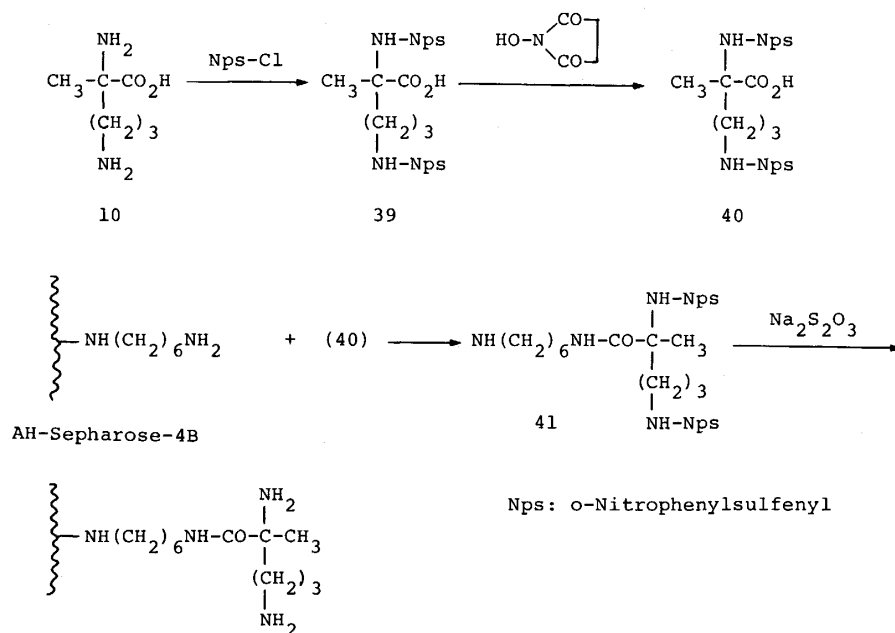
第5章 α -メチルオルニチンをリガンドとするODCの特異的吸着体の調製

5-1 特異的吸着体の調製

近年、阻害剤をリガンドとする種々の吸着体が作られ酵素の精製に広く利用されている。本実験ではScheme 18に示した方法でODCの特異的吸着体を調製した。

すなわち、 α -メチルオルニチン (10) の2つの

アミノ基をNps (*o*-nitrophenylsulfenyl) 基で保護して (39) をジシクロヘキシルアミン塩として単離した。ついで39に常法どおりDCC (dicyclohexyl carbodiimide) の存在下でN-ヒドロキシコハク酸イミドを反応させて (40) に導き、これをホウ酸緩衝液 (pH 8.1) 中、ヘキサメチレンジアミンをスペーサーとする担体 (AH-Sepharose-4 B) に結合させて (41) とした。41は単離することなく、Nps基を酢酸緩衝液 (pH 5.1) 中チオ硫酸ナトリウムを作用させて除去し、目的とする吸着体 (42) を得た。



Scheme 18 Preparation of the affinity column

5-2 特異的吸着体を用いたODCのアフィニティクロマトグラフィー

前掲のようにして調製した吸着体を用いてODCの精製を行った。4-1 Fig.12の方法でラット肝臓から調製したODCの粗酵素液を5 mMリン酸緩衝液(pH 4.6)に希釈し、吸着体を詰めたカラム(φ 1 cm × 7 cm)に通塔してアフィニティクロマトを行い、Fig.15のような結果を得た。フラクションNo 30から食塩水(0.1~0.5M, gradient)で溶出した。ODC活性はNo 40~60の画分に認められ、この吸着体がODCに対して吸着能力を有していることが明らかになった。

現在この吸着体を利用してODCの精製を続行し

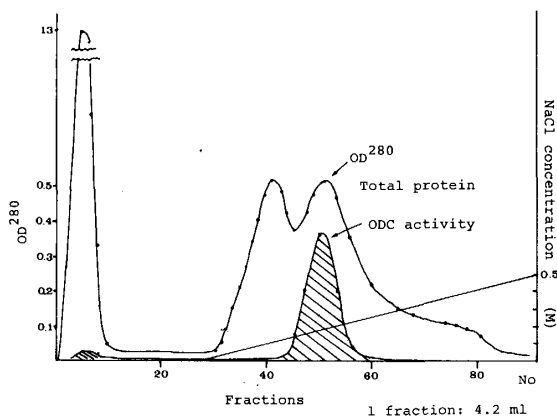


Fig. 15 Pattern of affinity chromatography

ているが比活性は15~20倍に増大する。

実験の部

1 機器分析方法

- 1) ガスクロマトグラフィー (GLC) : 柳本製作所製 GCG 550FP, ガラスカラム 2mm × 1.5m, 10%OV-1 セライト(60~80mesh.)。測定条件はFig. 7に示した。なおトリメチルシリル化はTMS-HT(東京化成製)を用い常法により行った。
- 2) 薄層クロマトグラフィー (TLC) : ワコーゲルB-5, 厚さ0.25mm, 展開溶媒は実験の部にそれぞれ記載した。
- 3) PMRスペクトルは日本電子製MH60-III型を用いて測定した。
- 4) GC-MSの測定は日立質量分析計6MGで行った。ガスクロマトグラフィーの条件は上の1)に準じた。
- 5) IRスペクトルは日本分光製IRA2型用いて測定した。

2 第1章の実験

N-Phthalyl-L-leucine (2)

Nefkens らの方法¹¹⁾に従ってL-ロイシンとN-

carboethoxyphthalimide を反応させて得た。収率75%。mp 120~121°C。IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3450(CO₂H), 1780(Phthal基C=O), 1730(C=O)。

N-Phthalyl-L-leucyl chloride (3)

2 (13g, 50mmol) を100ml の無水ベンゼンに溶解し, 10ml の塩化チオニル (135mmol) を加えて室温で24時間反応させた後さらに1時間還流し, 減圧下でベンゼンを留去して淡黄色液体を得た。IR ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 1810~1780(COCl), 1730(C=O)

Ethyl tert-butyl malonate (4b) および(-)-Menthyl tert-butyl malonate (4c)

4b は Strube の方法¹²⁾ に従って diethyl malonate から合成した。また **4c** は本文中の Scheme 4 の経路によりつぎのような操作で合成した。

塩化フタルル (98g, 0.48mol) を100~110°C に熱し, 攪拌しながら, ethyl hydrogen malonate (**12**) (50g, 0.38mol) を約30分間で滴下した。滴下終了後さらに1時間攪拌を続け, 減圧蒸留して β -ethoxypropionyl chloride (**13**) を得た。bp 71~72°C/15 mmHg, 収率 84%, IR ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 2950, 1800(C=O), 1720(C=O)。

13 (37.5g, 0.25mol) およびピリジン (0.5ml) を無水ベンゼンに溶解し, 還流しながら, (-)-メントール (46g, 0.29mol) の無水ベンゼン溶液を約1時間で滴下した。塩化水素ガスの発生が止むまで還流を続けた後, 反応溶液を分液ロートに移し, 6N 塩酸 1ml を加えてベンゼン層を水洗, 濃縮し, ついで水蒸気蒸留を行い未反応の(-)-メントールを除いた。蒸留残渣をエーテル抽出し, エーテル層を乾燥, 濃縮, 減圧蒸留して無色液体の(-)-menthyl ethyl malonate (**14**) を得た。bp 120~122°C/2mmHg。収率 84%。IR ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 2950, 1760(C=O), 1740(C=O)。

14 (27g, 0.1mol) を無水エタノール (64ml) に溶かし, 別に調製した水酸化カリウム (5.6g, 0.1mol) の無水エタノール溶液 64ml を約30分間で滴下した。室温下で反応液がゼリー状に固化するまで攪拌を続けた後, エタノールを減圧下で留去して, 無色固形物を得た。この固形物を n-ヘキサン ついでエーテルで洗滌して, 氷冷下に 4N 塩酸を加えて溶かし, 溶液の pH を 2 に調製した後, エーテル抽出を行い,

エーテル層を減圧下で蒸発乾固して粗結晶 23g を得た。メタノールおよびエーテル混合溶媒より再結晶を行って無色針状結晶の(-)-menthyl hydrogen malonate (**15**) 17g を得た。mp 56°C, 収率 70%, IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3450(COOH), 2980, 1730(C=O)。

15 (24.2g, 0.1mol) を無水ベンゼン (50ml) に溶解し, 油浴中で還流しながら, 塩化オキザリル (16g, 0.13mol) を約30分間で滴下した後, さらに30分間還流を続けた。ついで減圧下に反応溶液を濃縮して濃縮残渣に無水ベンゼンを加え, ベンゼンを減圧下で留去した。この操作を塩化オキザリルの刺激臭が無くなるまでくり返して, 酸塩化物を淡黄色の液体として得た。この物に無水ベンゼン (50ml) を加え, 還流しながら無水 tert-ブタノール (12g, 0.16mol) を約40分間で滴下した。塩化水素ガスの発生が止むまで還流を続けた後, 溶液を減圧下で濃縮して残渣に飽和重曹水を加えてエーテル抽出した。エーテル層を乾燥, 濃縮してシリカゲルカラム (ワコーゲル C-200) により精製して無色液体の(-)-menthyl tert-butyl malonate **4c** を得た。収率 55%。[α]_D¹⁸ -71.8°C (C=2.0, MeOH)。IR ν_{\max}^{NaCl} cm⁻¹: 2900(CH₂), 1750(C=O), 1730(C=O)。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 0.90 (6H, d, J=7Hz, (CH₃)₂), 1.40 (9H, s, (CH₃)₃), 3.18 (2H, s, -CH₂-), 4.56 (1H, m, メンチル Ci-H)。

Ethyl および (-)-menthyl 2-carboethoxy-3-oxo-4-N-Phthalimido-6-methylheptanoate (5b および 5c)

水素化ナトリウム (50% in oil, 2.64g, 55mmol) を無水テトラヒドロフラン (THF, 20ml) に懸濁して, 同量の無水 THF に希釈した **4b** あるいは **4c** (55mmol) を滴下した。ついで無水 THF (30ml) に溶かした **3** (14g, 50mmol) を還流下に30分間で滴下しさらに6時間還流を続けた後, 減圧下で THF を留去して, 残渣に冷水を加えて酢酸エチルで抽出した。有機層を 0.1% 硫酸および水で洗滌し, 乾燥, 濃縮して不純な **5** を得た。本化合物は不安定な化合物であり, 室温下で速やかに分解し, シリカゲルカラムによる **5** の精製を試みたが目的を達せず, 不純なままつぎの反応に供した。

Ethylおよび(-)-menthyl 3-oxo-4-N-phthalimido-6-methylheptanoate (7bおよび7c)

50mmolの**3**より得た**5**を無水ベンゼン(100ml)に溶解し、*p*-トルエンスルホン酸(0.5g, 2.9mmol)を加えて反応溶液を30~40°Cに保ち約70時間反応させた後、溶液を重曹水で洗滌し、乾燥してベンゼンを減圧下で留去して黄色液体を得た。この液体をシリカゲルカラム(ワコーゲル, C-200)に吸着させベンゼンの溶出画分より純粋な**7b**および**7c**を得た。収率は**3**より計算して55%。**7b**: IR $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 2950, 1780, 1750~1680。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 0.81(6H, *d*, *J*=7 Hz, (CH₃)₂C), 1.10(3H, *t*, *J*=7 Hz, エステル-CH₃), 1.45(1H, *m*, C₆位メチンH), 2.0(2H, *m*, CH₂), 3.35(2H, *s*, CH₂CO), 4.0(2H, *q*, *J*=7 Hz, エステルCH₂), 4.85(1H, *d-d*, *J*=5 Hz, C₄位キラルH), 7.65(4H, *s*, aromatic H)。**7c**: IR $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 2950, 1780, 1760~1710; PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 3.30(2H, *s*, CH₂CO), 4.0(1H, *d-d*, *J*=5 Hz, C₄位キラルH), 4.65(1H, *m*, メンチルC₁-H), 7.42(4H, *s*, aromatic H)。

β -ケトエステル(7)の水素化ホウ素ナトリウムによる還元(8bおよび8cの還元)

β -ケトエステル**7**(0.06mol)をベンゼン(200ml)に溶解し、この溶液に水素化ホウ素ナトリウム(0.06mol)および触媒量のメタノールを加えて溶液のpHを3に調節して、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水洗、乾燥して減圧下で濃縮、不純な**8**を得た。機器分析に用いた標品は、いずれもTLC(ワコーゲルB-5, ヘキサン-ベンゼン-酢酸エチル(1:1:1))により分離した純粋な**8**であり、つぎの(9)および(10)の合成には未精製の**8**を用いた。**8b₁**(4*s*, 3*s*): IR $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3420, 3250, 1730, 1670。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 0.92(6H, *d*, *J*=6 Hz, (CH₃)₂C), 1.20(3H, *t*, *J*=7 Hz, エステル-CH₃), 4.08(2H, *q*, *J*=7 Hz, エステルCH₂), 4.85(1H, *broad s*, OH), 5.83(1H, *s*, ジヒドロフタルイミドC₂-H)。MS: *m/e* 335, 290, 260, 218(base peak), 201, 133。**8b₁**のTMS誘導体: MS: *m/e* 479, 464, 332, 290(base peak), 200。**8b₂**(4*s*, 3*R*): IR $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3460, 3320, 1720, 1660。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$:

0.88, 1.18, 2.57, 4.02, 4.04(1H, *broad s*, OH), 4.39(1H, *broad s*, OH), 5.79, 7.45。MS: *m/e* 335, 290, 260, 218(base peak), 201, 133。**8b₂**のTMS誘導体: MS: *m/e* 479, 464, 332, 290(base peak), 200。**8c₁**(4*s*, 3*s*): IR $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3400~3100, 1720, 1680。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 2.60(2H, *d*, *J*=6 Hz, CH₂CO), 4.55(1H, *m*, メンチルC₁-H), 4.90(1H, *broad s*, OH), 5.82(1H, *s*, ジヒドロフタルイミドC₂-H), 6.18(1H, *broad s*, OH), 7.55(4H, *s*, aromatic H)。MS: *m/e* 445, 427, 290, 218(base peak), 201。**8c₁**のTMS誘導体: MS: *m/e* 589, 436, 346, 290(base peak), 200。**8c₂**(4*s*, 3*R*): IR $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3550~3100, 1710, 1680。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 2.60, 4.65(1H, *broad s*, OH), 5.82, 5.85(1H, *s*, OH), 7.50。MS: *m/e* 445, 427, 290, 218(base peak), 201。**8c₂**のTMS誘導体: MS: *m/e* 589, 436, 346, 290(base peak), 200。

ヒドロキシジエステル(6)を経る(8bおよび8c)の合成

50mmolの**3**より調製した**5**を合成後速やかに無水ベンゼン(150ml)に溶解し、水素化ホウ素ナトリウム(19g, 0.5mol)および触媒量のメタノールを加えて、室温下暗所にて約24時間攪拌しながら還元した。反応終了後、希硫酸を加えて未反応の水素化ホウ素ナトリウムを分解し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和重曹水、ついで水で洗滌した後乾燥、濃縮して不純な(6)を黄色液体として得た。この(6)を含む液体を無水ベンゼン(200ml)に溶解し、*p*-トルエンスルホン酸(100mg, 0.6mmol)を加えて還流下約30分間脱炭酸を行った後、炭酸ナトリウム(100mg)を加え、ベンゼン溶液を水洗、減圧下で濃縮して**8**を含む液体を得た。TLC(ワコーゲルB-5, ヘキサン-ベンゼン-酢酸エチル(1:1:1))により分離精製して得た純粋な**8b**および**8c**のPMR, IR, MSの分析データは、先に β -ケトエステル**7**の還元により得た**8b**および**8c**のそれと一致した。また収率は**3**より計算して約5%であった。

(4s, 3s)-および(4s, 3R)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid (9および10)の合成

8を含む反応混合物(20g)にメタノール(100ml)および4N-塩酸(120ml)を加え、油浴上(80~85°C)で約20時間攪拌した後、減圧下でメタノールを留去し、油状物をエーテル抽出により除いた。水層を減圧下で濃縮して、ニンヒドリン試薬に陽性の残渣を得た。この残渣を0.1Mピリジン-酢酸緩衝液(pH4.0, 100ml)に溶かしイオン交換樹脂カラム(Dowex 50×8, H⁺型, 150ml)に吸着させた。このカラムをまずpH4.1の同種の緩衝液(0.1M, 300ml)で溶出し、続いてpHを0.1ずつ上昇させた緩衝液(0.1M, 200ml)でそれぞれ溶出した。溶出液はフラクションコレクターで約5mlごとに分取し、ニンヒドリン試薬に陽性の画分をTLC(ワコーゲルB-5, ブタノール-酢酸-水(4:2:1))で展開して、9および10を確認した。pH4.5よりまずニンヒドリン試薬に対して陰性の副産物が溶出し、これと重複してジアステレオマー10が溶出した。AHMHA 9は、10と重複して溶出しはじめ、pH5.0付近より9のみが溶出した。9のみを含む溶出区分を集め、減圧下で濃縮して、残渣を冷蔵庫中に2日間放置し、析出した無色結晶を得た。またジアステレオマー10は混在する副産物を除けず、純粋に単離できなかった。収率: 9および10を合わせて25~30%。9: mp 200°C. $[\alpha]_D^{18} -18.5^\circ$ (C=0.51, H₂O). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3200, 2950, 1600, 1550. PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{C}_5\text{D}_5\text{N}}$ (90MHz): 1.09 (3H, d, J=6Hz, (CH₃)₂C), 1.76 (2H, q, J=6Hz, -CH₂-), 2.73 (2H, nearly t, J=6Hz, -CH₂-CO₂), 3.52 (1H, q, J=6Hz, C₄位H); irr. (1.76)d(J=6Hz), 4.29(1H, q, J=6Hz, C₃位H)。

3 第2章の実験

Methyl isocyanoacetate (1)

Ugiの方法¹⁵⁾に従って、N-formylglycine methyl-esterをトルエン中、ホスゲンガスを反応させて得た。

Methyl 5-alkyloxazole-4-carboxylate (2 aおよび2 b) (Scheme 5)

イソニトリル化合物1 (3g, 30mmol) およびD

BU (4.5g, 30mmol)をTHF 20mlに溶解し、同量のTHFに溶かした酸無水物(30mmol)を5分間で滴下した。滴下終了後、室温で20時間攪拌した後溶媒を減圧下で留去して、残渣を酢酸エチルに溶解して水洗、有機層を常法どおり処理して目的物を単離した。2a, 2bとも室温下で結晶したので、ベンゼンより再結晶して純品を得た。Table 1に物理恒数、収率を示した。また2a, 2bの純度はガスクロマトグラフィーで確認した。

2a: IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3130(-CH=N-), 1695(C=O), 1600(-C=N-)。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.84 (1H, s, oxazole環H), 3.90(3H, s, CO₂CH₃), 2.65(3H, s, CH₃)。

2b: IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3130, 1695, 1615。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.67(1H, s), 3.87(3H, s), 3.77(1H, m, :CH), 1.15(6H, d-d, J=7Hz, (CH₃)₂C)。

Methyl 5-aryloxazole-4-carboxylate (2 cおよび2 d) (Scheme 5)

酸塩化物である塩化ベンゾイルおよびフェニル酢酸クロリド(40mmol)、イソニトリル化合物1(4.0g, 40mmol)およびトリエチルアミン(12.2g, 0.12mmol)を50mlのTHF中室温で約4日間反応させ、溶媒を留去、濃縮残渣を酢酸エチルに溶解して水洗、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。2cの濃縮残渣は室温に放置すると結晶化したので、メタノールより再結晶して無色針状結晶を得た。2dは減圧蒸留により得た。2c, 2dの物理恒数および収率はTable 1に示した。

2c: IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3100, 1720, 1580。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 8.06~7.83, 7.50~7.20 (5H, m, aromatic H), 7.83(1H, s, oxazole環CH), 3.83(3H, s, CO₂CH₃)。2d: IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3100, 1725, 1580。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.25(5H, s, aromatic H), 6.67(1H, s, oxazole環CH), 3.90(2H, s, CH₂), 3.70(3H, s, CO₂CH₃)。

β-ケトアミノ酸メチル類 (3 a~d)

オキサゾール誘導体(2a~d) (20mmol), 4N塩酸10ml, およびメタノール20mlを混合し、40~50°Cに加熱しながら約3時間攪拌を続けた。反応終了後メタノールを留去し、残留水溶液を酢酸エチル

で抽出した。水層をさらに減圧下で濃縮し、過剰の塩酸を除去するために、残渣にメタノール20mlを加え、メタノールを留去する操作を8~10回くり返し、残渣をメタノール-エーテルの混合溶媒から再結晶して**3 a~d**を得た。

3 a : mp73°C, 収率93%。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3450~2650(NH₂·HCl), 1750(CO₂CH₃), 1730(C=O)。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{D}_6-\text{DMSO}}$: 3.82(3 H, s, CO₂CH₃), 3.80(1 H, s, CH), 2.40(3 H, s, CH₃)。 **3 b** : mp171~174°C, 収率95%。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3300~2650, 1750, 1720。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 3.94(3 H, s), 3.13(1 H, m, CH), 1.17(6 H, d-d, J=7 Hz)。 **3 c** : mp193~194°C, 収率95%。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 3250~2650, 1745, 1690。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 8.25~8.05, 7.75~7.45(5 H, m, aromatic H), 3.67(3 H, s)。 **3 d** : mp195~198°C, 収率93%。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3450, 3300~2650, 1745, 1695。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 7.40(5 H, s, aromatic H), 4.20(2 H, s), 3.65(3 H, s)。

N-アセチル-β-ケト酸メチル類 (**4 b~d**)

3 b~d (10mmol) を10mlの水に溶解し、氷冷下飽和重曹水で溶液のpHを8~9に調節し、激しく攪拌しながら無水酢酸(10mmol)を加え、さらに30分間攪拌を続けた後、酢酸エチルで抽出、抽出液を希塩酸および水で洗滌、乾燥濃縮して**4 b~d**を得た。これらの純度はGLCで確認した。

4 b : 収率87% IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3210(NH), 1745(C=O), 1700および1670(C=O)。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.15(1 H, s, NH), 5.44(1 H, d, J=7 Hz, CH), 3.75(3 H, s, CO₂CH₃), 3.05(1 H, m, CH), 2.07(3 H, s, アセチルCH₃), 1.14(6 H, d-d, J=7 Hz, (CH₃)₂C)。 **4 c** : mp 79~80°C, 収率97%。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3300, 1740, 1660~1640。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 8.25~8.10, 7.80~7.53(5 H, m, aromatic H), 7.40(1 H, s, NH), 6.40(1 H, d, J=7 Hz, CH), 3.77(3 H, s), 2.13(3 H, s)。 **4 d** : 収率92%。IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3320, 1740, 1695, 1670。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.35(5 H, s, aromatic H), 7.25(1 H, s, NH), 5.85(1 H, d, J=8 Hz), 4.30(2 H, s, CH₂), 3.65(3 H, s, CO₂CH₃), 2.12(3 H, s)。

β-ケトアミノ酸メチル (**3 a~d**) およびN-アセチル-β-ケトアミノ酸メチル (**4 a~d**の還元)

1) 接触還元: **3** または **4** をメタノールに溶解し、その重量に対して10%の酸化白金および数滴の酢酸を加え、常圧下で還元した。反応終了後、触媒を濾去し、濾液を減圧下で濃縮、残渣を冷エーテルで洗滌して**3 a~d**から**6 a~b**, **4 c**, **d**から**5 c**, **d**を得た。**4 b**は常圧下では還元されず原料を回収した。

2) NaBH₄による還元: メタノールあるいはジオキサンに**3** または **4** を溶解し、氷冷下で攪拌しながら1.5モル当量のNaBH₄を一度に加え、約1時間同温度で反応させた。反応完結後、2N塩酸を加えて溶液を酸性とし、つぎに重曹でアルカリ性とし、酢酸エチルで抽出した。抽出液を常法により処理して**6 a**, **b**および**5 b~d**を得た。

3) Ca(BH₄)₂およびLiBH₄による還元: Kollonitschの方法¹⁸⁾に従って行った。NaBH₄(10mmol)をジオキサン(15ml)に溶解し、この溶液を-30°Cに冷却しながら塩化カルシウム(5mmol)あるいは塩化リチウム(10mmol)を加えて、Ca(BH₄)₂あるいはLiBH₄のジオキサン溶液を調製した。この溶液に**3 a~d**または**4 b~d**(5mmol)を加え、約30分間攪拌した後、希硫酸を加え、溶媒を減圧下で留去、残渣を塩化メチレンで抽出した。抽出液を乾燥、濃縮し生成物を得た。

5 b : エリスロ型: Rt15.2分, MS (TMS誘導体): m/e 275(M⁺), 260(M⁺-30), 202(M⁺-73), 170。スレオ型; Rt15.9分, MS (TMS誘導体): m/e 275, 260, 245, 202, 170。 **5 c** : Fig. 4 および Fig. 6 に示した。 **5 d** : エリスロ型; Rt21.6分, MS (TMS誘導体): m/e 323(M⁺), 308(M⁺-15), 293(M⁺-30), 250(M⁺-73), 217, 194。スレオ型; Rt22.0分, MS (TMS誘導体): m/e 323, 308, 293, 250, 217, 194。

[A] 法によって得た (**6 a~b**) の機器分析値。

6 a : (塩酸塩) IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3450~2700, 1740, 1630。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{D}_6-\text{DMSO}}$: 4.20~3.90(1 H, m, CH), 3.73(3 H, s, CO₂CH₃), 3.48(1 H, d, J=6 Hz, CH), 1.15(6 H, d-d, J=7 Hz, (CH₃)₂C)。 **6 b** : (塩酸塩) IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3320~2800, 1760, 1600。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{OD}}$:

4.25(1 H, *d*, $J=3$ Hz, CH), 3.83(3 H, *s*, C O₂CH₃), 3.55(1 H, *d-d*, $J=10$ Hz, CH), 1.75(1 H, *m*, :CH), 0.97(6 H, *d*, $J=7$ Hz, (C H₃)₂C). **6 c**: (塩酸塩) IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3350, 3250~2750, 1750, 1600. PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{OD}}$: 7.42(5 H, *s*, aromatic H), 5.22(1 H, *d*, $J=4$ Hz, CH), 4.80(1 H, *d*, $J=4$ Hz, CH), 3.60(3 H, *s*, CO₂CH₃). **6 d**: (塩酸塩) IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300, 3250~2650, 1750, 1595. PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{D}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{OD}}$: 7.40(5 H, *s*, aromatic H), 3.65(3 H, *s*, C O₂CH₃), 3.0(2 H, *t*, $J=6$ Hz, -CH₂-).

N-アセチル-β-ヒドロキシアミノ酸メチル (5 b~d) の合成

5 b~d (20mmol) を約20mlのメタノールに溶解し, 4 N塩酸5mlを加え湯浴上 (40~50°C) で約2時間反応させた。反応終了後, 減圧下で濃縮し濃縮残渣に水50mlを加えてイオン交換樹脂(Dowex 50×4, H⁺型)カラムに吸着させ, 水洗したのち4%アンモニア水で溶出した。ニンヒドリン試薬に陽性な画分を集め, 減圧濃縮して〔B〕法による**6 b~d**を得た。この物の純度はペーパークロマトグラフィー(東洋濾紙No51, ブタノール-酢酸-水=4:2:1)で確認し, ほぼ純粋であったので, このままPMR測定に用いた。つぎに**6 b~d**のメチルエステルの化学シフトを示した。測定溶媒にはいずれもD₂Oおよびd₆-DMSOを内部標準にはTMSを用いた。**6 b**: スレオ型3.70, エリスロ型3.65。**6 c**: スレオ型3.66, エリスロ型3.60。**6 d**: スレオ型3.68, エリスロ型3.62。

β-ヒドロキシアミノ酸 (7)

〔A〕および〔B〕法によって得た**6 a~d** (10 mmol) および水酸化ナトリウム (0.5 g) を20mlのメタノールに溶解し, 室温下で1~2時間反応させた。反応液を常法により処理して, イオン交換樹脂(Dowex 50×8, H⁺型)カラムに吸着させ, 水洗後アンモニア水により溶出して目的物を含む画分を集め減圧濃縮した。残渣をヘキサンおよび冷エーテルで洗滌し, **7**の粗生成物を得た。Shaw-Fox 展開溶媒によるペーパークロマトグラフィーには, この粗生成物を用いた。

4 第3章の実験

D, L-Alanine の (+)-および (-)-menthyl-ester hydrochloride (2 a および 2 b)

(Scheme 9)

原田の方法²⁹⁾により *p*-トルエンスルホン酸を触媒として, メントールをアラニンと反応させて合成した。

N-Formylalanine の (+)-および (-)-menthyl-ester (3 a および 3 b) (Scheme 9)

2 (13 g, 50mmol) をギ酸 (9 ml) に溶解し, これにギ酸ナトリウム (4.76 g, 70mmol) を溶解したギ酸溶液 (6.5 ml) を加え1時間放置する。析出した結晶を濾去し, 濾液に無水酢酸 (13.8 ml) を加え湯浴上で70~80°Cに加温した。反応終了後, 反応溶液を放冷し, アセトン (300 ml) を加えて析出する結晶を濾去した後, 濃縮, 蒸留して目的物を得た。**3 a**: b p 150°C/0.3mmHg, **3 b**: b p 145°C/0.5mmHg。

(+)-および (-)-Menthyl 2-isocyanopropionate (4 a および 4 b) (Scheme 9)

3 (51 g; 0.2 mol) を300mlの石油エーテルに溶かし, トリエチルアミン (125.5 g, 1.24mol) を加えて氷冷下に攪拌しながらオキシ塩化リン (18.4 g, 0.12mol) を30分間で滴下し, 滴下終了後10分間還流した。反応溶液に冷水を入れ, 石油エーテル層を分離した。水層を石油エーテルで3回抽出して先の石油エーテル層と合して, 水洗した後, 乾燥, 減圧下で濃縮した。目的物を含む液体をシリカゲルカラム (ワコーゲルC-200, 溶出溶媒ヘキサン) で分離精製して純粋なイソニトリン化合物を得た。

4 a: PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 4.85 (1 H, *m*, メンチル C'1H), 4.38 (1 H, *q*, $J=9$ Hz, CH), 1.6 (3 H, *d*, $J=9$ Hz, CH₃)。

4 b: IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 2150, 1740. PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: **4 a** と同じ。

(+)-および (-)-Menthyl 4-cyano-2-isocyano-2-methylbutanoate (5 a および 5 b) (Scheme 8)

4 (11.9 g, 50mmol) および NaH (純度50%,

2.9 g, 60mmol) を無水THF (20ml) 中に懸濁し反応溶液の温度を -25°C に冷却してアクリロニトリル(3.2 g, 60mmol)のTHF溶液を20分間で滴下した滴下終了後、同温度で2時間攪拌した後、酢酸を加えて溶液を中和し、減圧下でTHFを留去して残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水洗減圧下で濃縮して黄色液体を得た。これをシリカゲルカラムにより精製して目的物を得た。収率66%

5 a : $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}} \text{ cm}^{-1}$: 2950, (CH_2), 2250 ($-\text{C}\equiv\text{N}$), 2140 ($-\text{N}=\text{C}$), 1730 ($\text{C}=\text{O}$)。 $\text{PMR } \delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.68 (3 H, s, CH_3), 2.45 (4 H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) **5 b** : $\text{PMR } \delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.65, 2.48。

(+)—および(—)—Menthyl 4-cyano-2-amino-2-menthylbutanoate hydrochloride (7 a および 7 b) (Scheme 8)

5 (6 g, 21mmol), 15mlの水酢酢, および1mlの水の混合液を $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ に加熱し, 約2時間反応させた後, 減圧下で溶媒を留去して黄色液体(**6**)を得た。これに7mlの3N塩酸および30mlのメタノールを加えて, 湯浴上で $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ に加熱した。約6時間攪拌を続けた後, メタノールを留去した。残留水溶液をエーテル抽出後, 水層を減圧下に濃縮して残渣にメタノールを加えて, 再びメタノールを留去した。この操作を5回くり返し, 無色固体の目的物を得た。 $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: **7 a**; 3450 (NH_2), 2950 (CH_2), 2360 ($-\text{C}\equiv\text{N}$), 1740 ($\text{C}=\text{O}$)。 **7 b**; 3450, 2950, 2360, 1750。

(+)—および(—)—Menthyl 4-cyano-2-N-acetylamino-2-menthylbutanoate (8 a および 8 c) (Scheme 8)

7 (8.4 g, 27mmol) を15mlのTHFおよび40mlの水の混合溶媒に溶かし, 重曹水で溶液のpHを8~9に調節した。反応液を冷却しながら無水酢酸(3.65 g, 35mmol)をゆっくり滴下し, 溶液のpHを常にアルカリ性に保った。反応終了後, THFを減圧下で留去し, 酢酸エチルで抽出した。抽出液を水洗, 乾燥した後, 濃縮してN-アセチル化合物**8**を得た。収率97%。

8 a : $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3350 (NH), 2930 (CH_2), 2350 ($-\text{C}\equiv\text{N}$), 1720 ($\text{C}=\text{O}$), 1660

($\text{C}=\text{O}$) $\text{PMR } \delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.62 (3 H, s, CH_3), 2.04 (3 H, s, COCH_3), 6.50 (1 H, s, NH) **8 b** : $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3350, 2930, 1730, 1630。 $\text{PMR } \delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.57, 2.00, 6.45。

(+)—および(—)—Menthyl 2,4-di-N-acetylamino-2-methylpentanoate (9 a および 9 b) (Scheme 8)

8 (3.3 g, 10mmol) を50mlの無水酢酸に溶解し, 酢酸ナトリウムおよびラネーニッケル触媒 ($\text{R}-100$, 1 g) を加えて, オートクレーブ中, 初気圧 $40\text{kg}/\text{cm}^2$, 温度 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ の条件で還元した。約2時間で反応は完結した。反応溶液をろ過して触媒を除き, 無水酢酸層を減圧下で濃縮して, 濃縮残渣に水を加えて, 酢酸エチルで抽出した。抽出液を水洗, 乾燥, 濃縮して無色固形物である目的物を得た。

9 a : $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3300 (NH), 1720 ($\text{C}=\text{O}$), 1650 ($\text{C}=\text{O}$) $\text{PMR } \delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.58 (3 H, s, CH_3), 1.98 (3 H \times 2, s, COCH_3), 3.18 (2 H, q, $J=7\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{N}$), 5.80 (1 H, broad s, NH), 6.60 (1 H, s, NH) **9 b** : $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3300, 1730, 1650。 $\text{PMR } \delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.56, 1.98, 3.20, 5.90, 6.55。

α -Methylornithine (10) (Scheme 8)

9 (7 g, 19mmol) を10mlの5N塩酸に溶解し, 24時間油浴中で $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ に加熱した。反応終了後, 上層の油状物(メントール)をエーテル抽出して除き, 水層を10mlまで濃縮してイオン交換樹脂カラム(Powex 50 \times 8, H^+ 型)に吸着させ, 水洗後5%アンモニア水で溶出してニンヒドリン試薬に陽性の分画を集めた。これを濃縮して, アンモニアを留去し, 残渣をpH5.1に塩酸で調整し, これにメタノールを加えて冷蔵庫中に放置して析出する結晶を得た。収率90%。

10 (塩酸塩) : $\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3450 (CO_2H) 3200~3100 (NH_2), 2900 (CH_2) $\text{PMR } \delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 1.96 (3 H, s, CH_3), 1.85~2.50 (4 H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.50 (2 H, t, $J=7\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{N}$) $[\alpha]_{\text{D}}^{18} +0.61^{\circ}$ ($\text{C}=2.13$, 5N塩酸) (シリーズaによる合成) $[\alpha]_{\text{D}}^{18} -0.49^{\circ}$ ($\text{C}=1.86$, 5N塩酸) (シリーズbによる合成)

Isocyanoacetic acid(-)-menthylester

(11)のアルキル化 (12の合成)

(Scheme 11)

常法により N-formylglycine(-)-menthyl-ester より調整した11 (4.5 g, 20mmol) を無水 THF (30ml) に溶解し, 窒素気流下ドライアイス-アセトンで-78°Cに冷却し, n-ブチルリチウム (10ml, 15% n-ヘキサン溶液) を約5分間で滴下した。30分間攪拌を続けた後, 無水 THF (20ml) で希釈したヨウ化アルキル (ヨウ化メチル, ヨウ化エチル, ヨウ化ベンジル) (24mmol) を約30分間で滴下した。滴下終了後, さらに3時間反応を続け反応を完結させた。(TLCで確認) つぎに, 反応溶液の温度を-60°Cまで上昇させ, 氷酢酸 (1.4 g, 24mmol) を加えて中和し, 減圧下で溶媒を留去して黄色の液体を得た。この反応生成物を酢酸エチルに溶解し, 水洗, 乾燥, 濃縮した後, シリカゲルカラムにより分離精製して, 混在するジアルキル化合物を除き, 純粋な12を得た。光学的に純粋な12a~cの旋光度が不明なため, 此处で合成した化合物の不斉収率は不明である。

12a: 収率20%。ほぼ同量のジアルキル化合物の生成を認めた。また機器分析値は先に合成した4bのそれと全く一致した。

12b: 収率65%。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2960, 2150 (-N=C), 1745 (C=O)。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$ 4.65 (1H, m, メンチルC'1H), 4.25 (1H, t, J = 8 Hz, CH₂)

12c: 収率15%。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2960, 2160, 1750。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.25 (5H, s, aromatic H), 4.70 (1H, m, メンチルC'1H), 4.43 (1H, t, J = 7 Hz, CH), 3.20 (2H, m, -CH₂-)

Isocyanoester (12) とアクリロニトリルとの Michael 型付加反応 (13の合成)

(Scheme 11)

先に述べた化合物5 (Scheme 11) の合成方法と同じ実験操作を行い目的物を得た。

13a: 収率90%。先の5bと一致した。

13b: 収率88%。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2950, 2350 (-C≡N), 2150 (-N=C), 1740 (C=O)。

13c: 収率80%。PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.35 (5H, s,

aromatic), 4.78 (1H, m, メンチルC'1H), 3.2 (2H, m, -CH₂), 2.4 (4H, m, -CH₂-CH₂-)

 α -Alkylornithine (18) の合成 (Scheme 11)

13にScheme 8の場合と同じ合成方法を行って14~17の合成中間体を得, 17を常法どおり処理して18を得た。中間段階での実験操作, 機器分析値は省略する。

18a (α -methylornithine): Scheme 11シリーズbで得た10と比較検討したが, PMRおよびIRスペクトルは全く一致した。また光学純度は5.7%で(+)- α -methylornithineがより多く生成していた。

18b (α -ethylornithine): 18の塩酸塩を無色固体として得た。この化合物は吸湿性が強く融点, 赤外吸収スペクトルは測定できなかった。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 3.07 (2H, nearly q, -CH₂-), 1.9 (6H m, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.0 (3H, t, J = 7 Hz, -CH₃)

18c (α -benzylornithine): IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} ; c 3350~3400, 1680~1560。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$ 7.3 (5H, s, aromatic H), 3.0 (4H, m, 2 x CH₂), 1.75 (4H, m, 2 x CH₂)

 δ -Carbobenzoxy-L-ornithine (21)

(Scheme 13)

L-オルニチン塩酸塩 (22 g, 0.13mol) を熱水 (320ml) に溶かし, これに炭酸銅 Cu-CO₃·Cu(OH)₂·H₂O (24 g, 0.1 mol) を加え, 約10分間煮沸し, 熱いうちに汙過, 汙液を放冷した。この溶液を氷冷下かきまぜながら, 炭酸水素ナトリウム (17.9 g, 0.19mol) と塩化カルボベンゾキシ (Z-CI) (19.9ml, 0.12mol) とを4分割して, 10分おきに加え, さらに3.5時間かきまぜた。沈澱を汙集, 水およびエタノールで洗滌し固形物を得た。これを水 (450 ml) に懸濁し, 6 N塩酸 (400 ml) を加えて溶かし, 硫化水素ガスを1~2時間通気した。ハイフろスーパーセルを用いて生成した硫化銅を汙去し, これを1 N塩酸で洗滌した。汙液と合して, これに通気して硫化水素を除いた後, 氷冷しながら濃アンモニア水でpH6.5に調整, 冷蔵庫中に一昼夜放置して結晶を汙集, 水, エタノールおよびエーテルで洗滌して粗結晶 (26.7 g, 68%) を得た。

δ -Carbobenzoxy- δ , α -formylornithine methylester (22) (Scheme 13)

21 (6 g, 20mmol) を無水メタノールに溶かし、塩化チオニル (3 g, 25mmol) を約30分間で滴下した。滴下終了後、室温下で20時間攪拌し、さらに還流下で30分間反応させた。減圧下でメタノールおよび過剰の塩化チオニルを留去して粗結晶を塩酸塩として得た。I R $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 3350(-NH), 1750(-C=O), 1690 (C=O₂)

δ -Carbobenzoxy- α -formylornithine methylester (23) (Scheme 13)

遊離の**22** (5.6 g, 20mmol) を98%ギ酸(50ml)に溶かし、氷冷下に攪拌しながら無水酢酸 (14ml) を30分間で加えた。さらに30分間攪拌を続けた後、室温に1時間放置し、ついで水 (100 ml) を加え減圧濃縮し、残留した油状物に少量の水を加え、濃縮を数回くり返した。油状物は結晶化せずこのままつぎの反応に供した。収率90%以上。I R $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3320 (NH), 1760~1660 (C=O₂)

PMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 7.95 (1 H, s, -CHO), 7.10 (5 H, s, aromatic H), 4.95 (2 H, s, -CH₂-Phenyl), 4.55 (1 H, s, NH), 3.60 (3 H, s, CO₂CH₃), 3.07 (2 H, t, 6 Hz, -CH₂-), 1.7 (4 H, m, -CH₂-CH₂-)

δ -Carbobenzoxy- α -isocyanoornithine methylester (24) (Scheme 13)

N-formyl 化合物**23** (3 g, 10mmol) およびトリエチルアミン (5 ml) を無水クロロホルム (30 ml) に溶解し、氷冷下、オキシ塩化リン (0.9 g, 6 mmol) を約10分間で滴下した。反応の進行をTLCで確認したところ、反応は全く進んでいなかったため溶液を室温下で5時間反応させたが、やはり反応は進行しなかった。つぎに還流下に反応させると、N-formyl 化合物**23**に相当するスポットは徐々に消失し、新たに生成物のスポットを確認した。反応液を常法どおり処理して、反応混合物をカラムクロマトにより精製、純粋な反応生成物を得た。本化合物の赤外線吸収スペクトルはイソシア基に特徴的な吸収 (2150 cm^{-1} 付近) を示さず、目的物ではなかった。

オキシ塩化リンの代りに、*p*-toluenesulfon-

yl chloride を用いて合成を行ったが、反応は全く進まず、原料を回収した。

α -N,N-Dimethyl- α -methylornithine (29) (Scheme 14)

90%ギ酸 (2.65 g, 50mmol) を丸底フラスコに採り、冷却下**26 b** (2.8 g, 10mmol) をゆっくり滴下し、ついで40%ホルマリン (2.3 ml, 30mmol) を加えて約8時間油浴上で加熱攪拌した。反応終了後4 N塩酸 (5 ml) を加えて蒸発乾固し、残渣を水 (30 ml) に溶かして水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性とし、析出した油状物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を常法どおり処理して、ジメチルアミノ化合物を得た。収率83%。

I R $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2960 (CH), 2240 (-CN), 1740 (C=O)

このジメチルアミノ化合物を前述の方法で無水酢酸中ラネーニッケルを触媒とし、得られた還元生成物に塩酸を作用させて加水分解して、反応生成物を常法どおりイオン交換樹脂を用いて精製した。収率**26**から計算して48%。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 2.3 (6 H, s, N<CH₃), 1.8 (6 H, m, -(CH₂)₃-), 1.3 (3 H, s, -CH₃)

2-(2-Cyanoethyl)-alanine (30)

(Scheme 14)

2-(2'-cyanoethyl)-alanine(-)-menthylester (**26**) (4 g, 20 mmol) をメタノール (15 ml) に溶かし室温で激しく攪拌しながら水酸化ナトリウム (0.8 g, 20mmol) を加え、2時間反応した。反応終了後、2 N塩酸 (15 ml) を加え溶媒を減圧下で留去、残渣をイオン交換樹脂に吸着させ、水洗したのち、5%アンモニア水で溶出、ニンヒドリン試薬に陽性の画分を集めてた。このものを減圧下で濃縮してアンモニアを留去し、残渣をpH 5.1に調節し、エタノールを加えて結晶化させた。収率80%。PMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 3.5 (2 H, nearly t J = 7 Hz, -CH₂-CN), 2.75 (2 H, t, J = 7 Hz, -CH₂-), 2.0 (3 H, s, CH₃)

δ , α -N,N-Diacetyl- α -methylornithine (31) (Scheme 15)

本化合物も**30**の合成と同様、相当するイソプロピ

ルエステル (**28a**) のケン化により得た。この化合物は結晶化せず、水に易溶な液体であった。収率86%。PMR $\delta_{D_2O}^{DSS}$: 2.25 (2.15 (3 H \times 2, s, acetylH), 1.60 (3 H, s, CH₃))

α -Methylarginine (**32**)

32の合成は鮫島らの合成法³⁰⁾に従って行った。 α -メチルオルニチン**10**の塩酸塩 (3.6 g, 20mmol) を水 (100 ml) に溶解し、この水溶液のpH10.1に調整した。これに S-メチルイソチオ尿素硫酸塩 (6.1 g, 22mmol) を3回に分けて加え、20°Cで20時間反応した。反応完結後、減圧通気して生成したメチルメルカプタンおよびアンモニアを留去し、4 N塩酸を加えてpH 2に調節、つづいてイオン交換樹脂 (Dowex 50 \times 8, H⁺型, 100ml) に吸着させた。樹脂を水洗し、4 Nアンモニア水で溶出し、坂口反応に陽性の溶出区分を集め、減圧濃縮してアンモニアを除去したのち塩酸でpH 4.0に調節、さらにシラップ状になるまで濃縮を行い無色結晶を得た。この化合物のPMRは α -メチルオルニチンと類似していた。PMR $\delta_{D_2O}^{DSS}$: 3.66 (2 H, nearly t, δ -CH₂), 2.22 (4 H, m, -CH₂-CH₂-), 2.0 (3 H, s, CH₃))

α -Methylglutamic acid (**34**) Scheme 16)

常法どおり isopropyl α -isocyanopropionate を低温下 (-30~-40°C) でNaHを塩基としてアクリル酸メチルと縮合させ、生成物をシリカゲルカラムにより精製して isopropyl 4-carbomethoxy-2-methyl-2-isocyanobutanote を得た。この化合物のイソシアノ基を酢酸によりN-ホルミル基とし、4 N塩酸で加水分解して**34**を得た。収率45%。mp 176°C IR ν_{max}^{KBr} $c m^{-1}$: 3360 (CO₂H) 1690 (C=O), 1540。PMR $\delta_{TMS}^{D_2O}$: 2.5 (4 H, m, -CH₂CH₂-), 1.6 (3 H, s, CH₃))

α -Methylputrescine (**35**) (Scheme 17)

2-methyltetrahydrofuran (**36**)に常法どおり臭化水素を反応させて1.4-dibromopentane (**37**)を得た。収率45%。bp 82~88°C/16mmHg。

37 (12.5 g, 50mmol), フタイルドミカリウム (22.2 g, 0.12mol) および 18-crown-6 (100mg) をDMF (150 ml) に溶解し油浴中で攪拌しながら

約10時間反応させた。反応終了後、反応溶液を水に注ぎ、クロロホルムで抽出した。抽出液を水、飽和重曹水、ついで水で洗滌した後、乾燥、濃縮して無色固形物を得た。クロロホルムより再結して純粋な (**38**) を収率 90%以上で得た。mp 143°C。

IR ν_{max}^{KBr} $c m^{-1}$: 2900, 1770, 1730~1680, 1620。

38 (3.6 g, 10mmol) および抱水ヒドラジン NH₂-NH₂·H₂O (0.5 g, 10mmol) を85%含水エタノール (50ml) 中で加熱攪拌した。反応は約2時間で終了したので、減圧濃縮し、濃縮残渣に塩酸を加えてpH 4~5に調整すると沈澱が生じた。これはフタリルヒドラジンと考えられるので汙去し、汙液をイオン交換樹脂カラムにより常法どおり処理して**35**を得た。この物の塩酸塩は吸湿性が強く、室温下で徐々に分解する。PMR $\delta_{TMS}^{CDCl_3 + D_2O}$: 4.08 (1 H, m, CH), 3.37 (2 H, nearly t, J = 7 Hz, δ -CH₂), 2.05 (4 H, m, -CH₂CH₂-), 1.70 (3 H, d, J = 6 Hz, CH₃))

5 第5章の実験

δ, α -bi-N-o-Nitrophenylsulfenyl- α -methylornithine (**39**) (Scheme 17)

Zervasの方法³²⁾に従って α -メチルオルニチン (**10**) と ortho-nitrophenylsulfenyl chloride (NPS-CI) の反応によって得た。 α -メチルオルニチン (3.65 g, 20mmol) を2 N水酸化カリウム溶液 (10ml) およびジオキサン (25ml) の混合溶媒に溶かし、これに Nps-CI (8.3 g, 44 mol), および2 N水酸化カリウム (24ml) をそれぞれ10分割して、激しく攪拌しながら15分毎に加えた。反応終了後、希硫酸を加えて中性とし、汙過後酢酸エチルで抽出した。抽出液を水洗、乾燥、濃縮して、氷冷下にジシクロヘキシルアミン (4 ml) を加え、冷蔵庫中に一昼夜放置した後、析出する結晶を汙別して、目的物をジシクロヘキシルアミン塩として得た。mp 145~152°C。PMR $\delta_{TMS}^{CDCl_3 + D_2O}$: 8.15~7.90 (4 H \times 2, m, aromatic H), 3.00 (2 H, t, J = 6 Hz, -CH₂N), 1.80 (4 H, m, -CH₂CH₂-), 1.37 (3 H, s, -CH₃))

$\delta^1\alpha$ -di-N-O-Nitrophenylsulfenyl- α -methylornithine-N-hydroxysuccinimideester (40)
(Scheme 17)

39 (4.5 g, 10mmol), N-hydroxysuccinimide (1.4 g, 12mmol) および Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (2.0 g, 10mmol) を30mlの酢酸エチルに溶解し室温下約20時間反応させた後, 生じた尿素誘導体を濾去し, 酢酸エチル層を水洗, 乾燥, 減圧濃縮して, 40の粗生成物を得た。この化合物はこれ以上精製することなく次の反応に用いた。

AH-Sephrose-4 Bと(40)のカップリングおよびNps基の除去(42の調製)

(Scheme 17)

AH-Sephrose-4 B (10 g, スペーサー残基 0.24~0.40mmol) を0.2M ほう酸緩衝液 (pH8.1 30ml) に懸濁し, 30~32°C に加温しながら, 40 (0.32 g, 0.8 mmol) をDMF (5 ml) に溶解して一時に加えた。同温度で2時間反応させた後, 濾過, 氷水で充分洗滌して(41)を得た。

41を0.2M 酢酸緩衝液 (pH5.1, 50ml) に懸濁し, チオ硫酸ナトリウム (10 g, 60mmol) を加えて 30~32°C で2.5時間振盪した後, 濾過, 水ついでメタノール, 再び水で洗い, さらにDMF水溶液(50%) および水で洗滌して42を得た。

総括

本論文では, 生理活性アミノ酸の中で, 医薬品としての用途が期待されるヒドロキシアミノ酸類および α -メチルオルニチンとその関連化合物の不斉合成を試み, さらに後者の系列については, 生理活性と化学構造の関係にも検討を加えたものである。

本研究において得られた新知見, 成果は概説, 要約するとつぎのとおりである。

1) 第1章のAHMHAの不斉合成については, L-ロイシンの酸塩化物をマロン酸ジエチルと縮合させ, 還元後脱炭酸して目的物を得る梅沢らの方法に改良を加えた。すなわち, マロン酸ジエチルの代わりにエチルtert-ブチルエステルを使用した。これにより, 脱炭酸を容易ならしめるとともに, ラセミ化を防止し, 得られたモノエステルを還元して前例に見られたジエステルの分解を回避して収率を格段

に向上させ得た。この結果, 容易に天然と同じ絶対構造を持つAHMHAの合成方法が確立でき, またL-ロイシンの不斉中心による不斉誘導効果をはじめて正確に評価し得た。さらに, マロン酸の(-)-メンチルエステルを用いて, 2つのキラル部分にはさまれたカルボニル基を還元するいわゆる重複不斉誘導を試みた。この結果は, 両方のキラル部分の立体効果が逆方向に働き, 相殺されたために, 不斉収率はかえって低下したが, (-)-メントールを(+)-メントールに代えることにより好結果が期待されることを示唆した。

2) 第2章は, 最近開発されたイソニトリル化合物を用いるアミノ酸合成法を応用して, イソニトリル化合物と酸誘導体から β -ケトアミノ酸を合成し, これを選択的に還元して β -ヒドロキシアミノ酸の立体選択的合成法を見出そうとしたものである。その結果, エリスロ型をほぼ定量的に得る還元方法と, エリスロ型, スレオ型の混合物を得る方法を見出した。後者については, 還元方法, 還元剤の種類を変えて実験を行い, ジアステレオマーの生成比を測定し, また反応機構を推定した。 β -ヒドロキシアミノ酸は, その種類によってエリスロ型かスレオ型のいずれか一方のみが生理活性を示す場合が多く, この還元方法に関する知見は実用的な意義を有する。

3) 第3章においては, 悪性増殖型細胞を抑制する目的でオルニチン脱炭酸酵素(ODC)の阻害剤である α -メチルオルニチンの不斉合成について検討した。(±)-アラニンの光学活性メンチルエステルから誘導したキラルなイソニトリル化合物を, アクリロニトリルに不斉付加させ, 加水分解, 還元することにより目的とする光学活性な α -メチルオルニチンを合成した。この不斉収率は低かったが, α -メチルオルニチンの最も有効な合成法を確立した。

4) ついで, この合成法をさらに拡大してグリシンのイソニトリル化合物に任意のハロゲン化アルキルとアクリロニトリルを段階的に付加させ, 各種 α -アルキルオルニチンを合成した。後述する酵素実験の結果, α -メチル体が最もODCに対する阻害活性が高いことが判明したので, 10種以上の α -メチルオルニチン類縁化合物を合成した。

5) 第4章においては, 合成したすべての化合物について, ラット肝臓より調製したODCに対する阻害活性を測定し, 阻害度より活性発現のための必

須化学構造を提案した。この結果は、ODC阻害度を指標とする制ガン剤開発のための有力な指針となろう。

6) 第5章においては、本研究の実用的な利用法の1つとして、 α -メチルオルニチンのカルボキシル基をヘキサメチレンジアミンをスペーサーとするセファロースに結合させ、ODCの特異的吸着体を調製し、これを用いるアフィニティクロマトにより、ODCの精製に成功した。この精製法は、本酵素の性質ならびにポリアミン生成機構の解明に有効であろうと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり終始ご指導戴いた本学教授上田博夫先生、AHMHAの合成についてご教示戴いた同、村尾沢夫先生、また本論文をまとめるについてご助言戴いた同、北岡正三郎先生に衷心より感謝申し上げます。

研究の全般に渡り適切なご教示とご指導を戴いた田辺製薬応用生化学研、松本和男博士、酵素活性を測定して戴いた大阪市大医学部、大谷周造博士に深甚なるお礼を申し上げます。

常時、ご支援して戴き、討論に時を費して戴いた農薬化学研究室内の諸先生、院生、学生の皆さん、卒業生の徳森等、滑川和也、佐々暢雄、三原生、小西順一、野中実の諸氏に赤心から謝意を申し上げます。

文 献

- MORISHIMA, H., TAKITA, T., AOYAGI, T., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H. (1970). Structure of pepstatin. *J. Antibiot.*, **23**, 263-265. MIYANO, T., TOMIYASU, M., IISUKA, H., TOMISAKA, S., TAKITA, T., AOYAGI, T. and UMEZAWA, H. (1972). New pepstatins, pepstatins B and C, and pepstanone A, produced by *Streptomyces*. *J. Antibiot.*, **25**, 489-491.
- MURAO, S. and SATOI, S. (1971). New pepsin inhibitors (SPI) from *Streptomyces* EF-44-201. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1477-1481.
- MORISHIMA, M., TAKITA, T. and UMEZAWA, H. (1973). Synthesis of 4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid, imine component of pepstatin. *J. Antibiot.*, **26**, 115-116.
- STEULMANN, R. and KLOSTERMYER, H. (1975). Synthesis of (3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid and some of its derivatives. *Justus Liebig's Ann. Chem.*, **48**, 2245-2250.
- KINOSHITA, M., HAGIWARA, A. and ABURAKI, S. (1975). Synthesis of (3S, 4S)- and (3S, 4R)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid and their N-(acetyl-L-Val-L-Valyl) derivatives. *Bull. Chem. Soc., Japan*, **48**, 570-575.
- 切畑光統, 徳森等, 櫛本五男, 上田博夫(1978). (4S, 3S)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid (AHMHA) の不斉合成に関する研究. 日本農芸化学会誌. 52巻, 135-141.
- HORII, I., IWATA, C. and TAMURA, Y. (1961). Reduction of phthalimides with sodium borohydride. *J. Org. Chem.*, **26**, 2273-76.
- CRAM, D. J. and ABD ELHAFAER, F. A. (1952). Studies in stereochemistry. X The rule of "Steric control of asymmetric induction in the syntheses of a cyclic systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5828-5835.
- PLELOG, V. (1953). Untersuchungen über asymmetrische Synthesen I. Über den sterischen Verlauf der Reaktion von α -Ketosäure-estern optisch aktiver Alkohole mit Grignard'schen Verbindungen. *Helv. Chim. Acta.*, **36**, 308-319.
- NEFKENS, G. H. L., TESSER, G. I. and NIVARD, R. J. F. (1960). Simple preparation of phthaloyl amino acid via mild phthaloylation. *Rec. Trav. Chim.*, **79**, 688-689.
- BRESLOW, D. S., BAUMGARTEN, F. and HAUZER, C. R. (1944). A new synthesis of β -ketoesters of the type $\text{RCOCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1286-1288.
- SCHOLLKOPF, U. and SCHROUDER, R.

- (1971). Hôhere Aminosâure durch Alkyl-
ieren von β -metallierten Isocyanessig- oder
propionsâureestern. *Angew. Chem.*, **83**, 358-
359.
- 13) SUZUKI, M., IWASAKI, T., MIYOSHI, M.,
OKUMURA, K. and MATSUMOTO, K.
(1973). New convenient syntheses of α -C-
acylamino acids and α -aminoketones. *J.*
Org. Chem., **38**, 3571-3575.
- 14) 切畑光統, 徳森等, 櫛本五男, 上田博夫(1978).
 β -ケトアミノ酸の還元. 日本農芸化学誌, 25
巻, 271-276.
- 15) UGI, I. (1968). *Newer Methods of Prepar-*
ative Organic Chemistry. Vol. 4, Academic
Press Inc., New York, 37-66.
- 16) SHAW, K. H. F. and FOX, S. W. (1953).
Stereochemistry of the α -phenylserines:
Improved preparation of *allo*-phenylserine.
J. Am. Chem. Soc., **75**, 3421-3424.
URABE, Y., MATSUMOTO, K., OZAKI, Y.,
IWASAKI, T. and MIYOSHI, M. (1975).
Stereoselective synthesis of *threo*-4.4.4-
trichlorothreonine. *Agr. Biol. Chem.*, **39**,
1869-1873.
- 17) PINES, S. H., KARADY, S. S. and SLETZINGER,
M. (1968). 3-Aryl-2-methylserines, I. A new
synthesis. *J. Org. Chem.*, **33**, 1758-1761.
- 18) KOLLONITSCH, J., FUCHS, O. and GABOR,
V. (1954). New and known complex boro-
hydrides and some of their applications in
organic synthesis. *Nature*, **173**, 125-126.
- 19) a) HELLER, J. S., CANELLAKIS, E. S.,
DONALD, L., BUSSOLOTTI, L. and CORWARD,
J. K. (1975). Stable multisubstrate adducts
as enzyme inhibitors. Potent inhibition of
ornithine decarboxylase by N(5'-phosphopy-
ridoxyl)-ornithine. *Biochem. Biophys. Acta*,
403, 197-207.
b) RWLYEA, N. and RANDO, R. R. (1975).
Potent inhibition of ornithine decarboxylase
by β,γ -unsaturated substrate analogues.
Biochem. Biophys. Rec. Comm., **67**, 392-402.
c) BEY, P., DANZIN, C., VAN DORSSELAER,
V., MAMMONT, P., JUNG, J. and TARKIF,
C. (1978). Analogues of ornithine as inhib-
itors of ornithine decarboxylase. New ded-
uctions concerning the topography of enzy-
me's active site. *J. Med. Chem.*, **21**, 50-55.
d) 井上秀夫, 竹田義郎, 大工原恭 (1977). 生
化学実験講座, 11巻, 東京化学同人。
e) 竹田美文, 五十嵐一衛 (1976). ポリアミン
の基礎, 薬根出版
- 20) a) ABDE-MONEM, M. M., NEWTON, N. E.
and WEEKS, C. E. (1974). Inhibitors of
polyamine biosynthesis 1. *J. Med. Chem.*,
17, 447-451.
b) RUSSELL, D. H. (1973). *Polyamines in*
Normal Neoplastic Growth, Raven Press,
New York.
c) NEWTON, N. E. and ABDEL-m MONEM,
M. M. (1977). Inhibitors of polyamine bios-
ynthesis 4. Effects of α -methyl-(\pm)-ornithine
and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) on
growth and polyamide content L-1210
leukemic cells of mice. *J. Med. Chem.* **20**,
249-253.
- 21) MAER, H., YARMCHUK, L., PRUESS, D. L.,
KELLET, M. and POLLERONI, N. J. (1976).
Antimetabolites producing by microorg-
anisms XIV. 2-Methylarginine, a new amino
acids with antibiotic properties. *J. Antibiot.*,
29, 213-215.
- 22) ABDEL-MONEM, M. M., NEWTON, N. E.,
HO, B. B. and WEEKS, C. E. (1975). Poten-
tial inhibitors of polyamin biosynthesis. *J.*
Med. Chem., **18**, 600-604.
- 23) NISHIMURA, N. and SHIMOKAWA, N.
(1974). α -Methylornithine and its acid addi-
tion salts. *Japan kokai*, 74, 29, 018.
- 24) KIKUMOTO, R. and SATO, S. (1974).
Ornithines. *Japan kokai*, 31, 31, 614.
- 25) ELLINGTON, J. J. and HONIGBERG, I. L.
(1974). The synthesis of 2-methylproline
and 2-methylornithine. *J. Org. Chem.*, **39**,
104-106.
- 26) SAKURABA, M., IWASHITA, Y. and NINA-
GAWA, S. (1974). 5-Methyl-5-(β -cyanoethyl)-
hydantoin. *Japan kokai*, 55, 666.

- 27) KIRIHATA, M. MIHARA, S., ICHIMOTO, I. and UEDA, H. (1978). Asymmetric synthesis of α -methylornithine. *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 185-186.
- 28) SCHÖLLKOPF, U. and HANTKE, K. (1973). α -Isocyanglutarsäure-diäthylester, Glutaminsäure-Derivate und Pyrrolincarbonsäure-äthylester aus α -metallierten Isocyanessigsäure oder -propionsäure-äthylester und Acrylsäureestern. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **45**, 1571-1582.
- 29) HARADA, K. and HAYAKAWA, T. (1964). Synthesis of α -amino acid methylesters. *Bull. Chem., Soc. Japan*, **37**, 191-194.
- 30) 鮫島弘年. (1964) 光学活性 α -アミノ- ω -グアニジンカルボン酸の製造法, 特許公報, 21,232.
- 31) 大饗茂 (1956). 実験化学講座, ハロゲン化物の合成, 235-236.
- 32) ZERVAS, L., BOROVAS, D. and GAZIS, E. (1963). New methods in peptide synthesis, I. Trityl sulfonyl and *o*-nitrophenylsulfonyl groups as N-protecting groups. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3660-3666.