

pyrrolomycin 群 抗生物質 に

関する 研究

江崎 紀夫

目次

序論		-----	1
第1章	pyrrolomycin A~Eの単離		
第1節	pyrrolomycin群抗生物質の発見 と生産菌	-----	5
第2節	pyrrolomycin A~Eの培養と単離	-----	6
第3節	pyrrolomycin A~Eの物理的性状	-----	9
第4節	pyrrolomycin A~Eおよび関連化 合物の生物学的性状	---	16
第2章	pyrrolomycin A~Eの構造決定 と合成		
第1節	pyrrolomycin Aの構造決定と合成		
§ 1	pyrrolomycin Aの骨格の決定	---	21
§ 2	pyrrolomycin Aの構造決定	---	25
第2節	pyrrolomycin Bの構造決定	---	31
第3節	pyrrolomycin CおよびDの構造決 定と合成		
§ 1	スペクトルデータによる構造 解析	---	36
§ 2	pyrrolomycin CおよびDの合成	---	41
§ 3	pyrrolomycin CとBとの関連	---	43
第4節	pyrrolomycin CおよびDの位置異 性体の合成	---	45
§ 1	Friedel-Crafts反応による1-benzene- sulfonylpyrroleのアシル化の配向性の検討	---	47
§ 2	pyrrolomycin C, Dの異性体の合成	---	52
第5節	pyrrolomycin Eの構造決定	---	54

第 3 章	臭素イオンの添加培養で得られる pyrrolomycin F ₁ ~F ₃ について	
第 1 節	ハロゲンイオンの添加培養	----57
第 2 節	pyrrolomycin F ₁ ~F ₃ の単離と物理的性状	----62
第 3 節	pyrrolomycin F ₁ ~F ₃ の構造決定と F ₁ の合成	----68
第 4 節	pyrrolomycin F ₁ ~F ₃ の生物学的性状	----75

結 語 -----78

謝 辞 -----80

実験の部

第 1 章 第 2 節	に 関 する 実験	----83
第 2 章 第 1 節	に 関 する 実験	----85
第 2 章 第 3 節	に 関 する 実験	----89
第 2 章 第 4 節 § 1	に 関 する 実験	----93
第 2 章 第 4 節 § 2	に 関 する 実験	----100
第 2 章 第 5 節	に 関 する 実験	----103
第 3 章	に 関 する 実験	----104

文 献 -----108

序 論

pyrrolomycin (PM) 群抗生物質は Actinosporangium vitaminophilum sp. nov. によって生産される 9 種類の抗生物質, すなわち, pyrrolomycin A, B, C, D, E, F₁, F_{2a}, F_{2b} および F₃ から成る。これらの抗生物質はその構造中にいずれもピロール環を有することに因み「pyrrolomycin」と命名した。

本論文はこれら pyrrolomycin 群抗生物質の単離, 構造決定, 合成および各種ハロゲンイオンの添加培養について述べたものである。

pyrrolomycin の生産菌である Actinosporangium vitaminophilum sp. nov. は長野市を流れる千曲川の川底の土壌から分離された一放線菌である。本菌は, 細胞壁に L, L-diaminopimelic acid を含み, かつ胞子のうを形成するという非常に珍しい菌で, その菌学的特徴に基づいて Actinosporangium 属の新種と同定された。

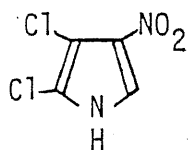
pyrrolomycin A~E を生産する際の本菌の培養は木アト, 大豆油を炭素源とし, 大豆粉, ウィスキーの蒸留カス等を窒素源とし微量の金属イオンを加えた培地で行なった。また, この培地に 0.1% の臭化ソーダを添加して培養すると臭素原子を官能基として含む pyrrolomycin F₁~F₃ が生産される。

pyrrolomycin A~E は菌体と培養液の両者 (whole broth) から酢酸エチルで抽出し, アルミナならびにシリカゲルのカラムクロマトグラフィーによって各成分に単離した。また pyrrolomycin F₁~F₃ は, PM-A~E に準じた方法で単離したが, 相互の性質が非常に類似しているため分離は困難をさめ,

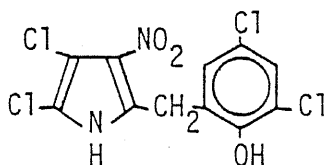
同一の分子式で示される PM-F_{2a} と PM-F_{2b} の分離は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用することによって初めて成功した。

pyrrolomycin 群抗生物質の化学構造は、各種スペクトルデータの解析、構造を推定した化合物の合成、誘導体の合成および X 線解析を適宜組み合わせさせて Chart 1 に示したように決定した。

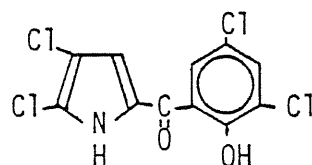
Chart 1



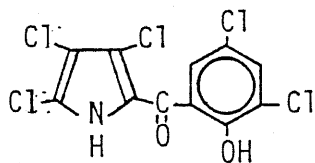
pyrrolomycin A (1)



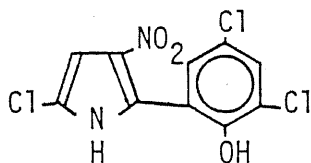
pyrrolomycin B (2)



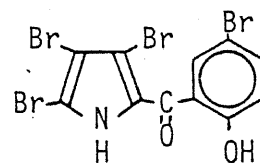
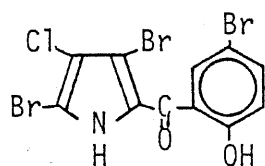
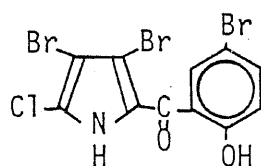
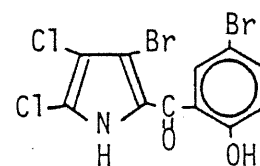
pyrrolomycin C (3)



pyrrolomycin D (4)



pyrrolomycin E (5)

Pyrrolomycin F₁ (6)pyrrolomycin F_{2a} (7)pyrrolomycin F_{2b} (8)pyrrolomycin F₃ (9)

すなわち、PM-A は $C_4H_2Cl_2N_2O_2$ の組成を有し、その各種スペクトルデータならびに合成によりし式と決定した。

PM-B は $C_{11}H_6Cl_4N_2O_3$ の組成であり、スペクトルデータおよび X 線解析によって是式と決定した。

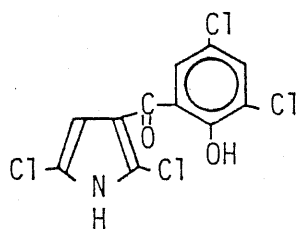
PM-C および D はそれぞれ $C_{11}H_5Cl_4NO_2$, $C_{11}H_4Cl_5NO_2$ の組成を有し非常に類似した化合物である。スペクトルデータの解析, 合成および PM-B の誘導體への関連づけによってそれぞれ Σ , δ 式と決定した。

PM-E は $C_{10}H_5Cl_3N_2O_3$ でありスペクトルデータから構造を推定し, 最終的にはその N, O ジメチル体の X 線解析によって Σ 式と確認した。

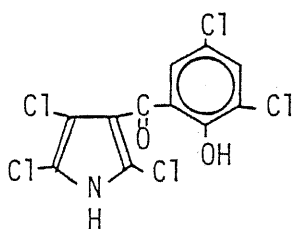
臭素イオンの添加培養によって得られた PM-F₁, F_{2a}, F_{2b} および F₃ は, いずれも PM-C, D に類似した構造で 1 分子中にハロゲンを 4 原子含有し, そのハロゲンが臭素のみのも (PM-F₁) と臭素と塩素が混在しているもの (PM-F_{2a}, F_{2b}, F₃) がある。臭素のみの PM-F₁ はスペクトルデータの解析と合成によってその構造を Σ 式と決定した。PM-F_{2a}, F_{2b}, F₃ は三者それぞれの N, O ジメチル体の X 線解析によって Σ , δ , ϵ 式と決定した。

なお, PM-C, D の構造-活性相関の検討の一環としてピロール環の β 位にベンゾイル誘導體を結合した 2 種類の異性体 Σ , δ (Chart 2 に示す) を合成した。

Chart 2



(10)



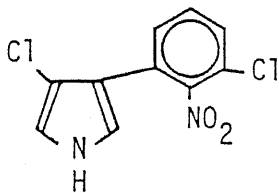
(11)

かくして得られた各化合物の各種微生物に対する最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concent-

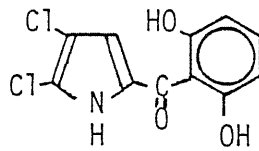
ration, MIC) を測定した結果, それぞれ有効性に特徴があるが, 大まかには PM-D と PM-F₁~F₃ が最も活性が強く, PM-C, E は弱い活性しか示さなかった。合成品¹²は, グラム陰性細菌以外に対しては PM-D とほぼ同等の強い活性を示した。

さて, pyrrolomycin 群抗生物質に類似の既知抗生物質としては pyrrolnitrin (12)²⁾, pyoluteorin (13)³⁾, A-15104Y (14)⁴⁾ および pentabromopseudilin (15)⁵⁾ が挙げられる (chart 3)。

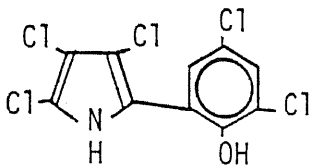
Chart 3



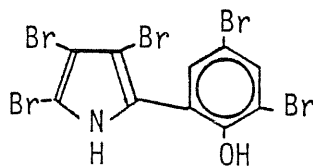
pyrrolnitrin (12)



pyoluteorin (13)



A-15104Y (14)

pentabromopseudilin
(15)

12, 13, 14 はいずれも Pseudomonas 属の細菌によって生産され, 15 は Actinoplanes 属の放線菌によって生産され, 本研究の Actinosporangium 属とは明らかに異なる菌から生産されている。

第1章 pyrrolomycin A~Eの単離

第1節 pyrrolomycin群抗生物質の発見と生産菌

著者は長野市を流れる千曲川の川底から採取した土壌試料より分離された一放線菌, SF-2080株が抗細菌, 抗真菌活性を有する新抗生物質群を生産していることを見出した。これらの抗生物質はその後の研究により, その化学構造中にいずれもピロール環を含むことを確認し「pyrrolomycin」と命名した。

T. Shomura ら¹⁾によると, SF-2080株は放線菌の同定研究に通常用いられている培地では, 菌の同定に重要な知見を与える胞子が形成されないこと, また菌体の細胞壁を加水分解して得られたdiaminopimelic acid ($\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$) がL,L-型であったことから, 当初, 本菌株は Streptomyces 属に所属するものと考えられた。しかし, その後ビタミンB₁₂を添加した培地において胞子が形成されること, その胞子は胞子のうまたは疑似胞子のうの中につつまれていることが判明した。細胞壁にL,L-diaminopimelic acidを有し, かつ胞子のうまたは疑似胞子のうを有する放線菌として7種類の属が報告されている。本菌株とこれら7種類の属の胞子および胞子のうの形態的な比較の結果, 本菌株は Actinosporangium 属に所属するものと決定された。

第2節 pyrrolomycin A~Eの培養と単離

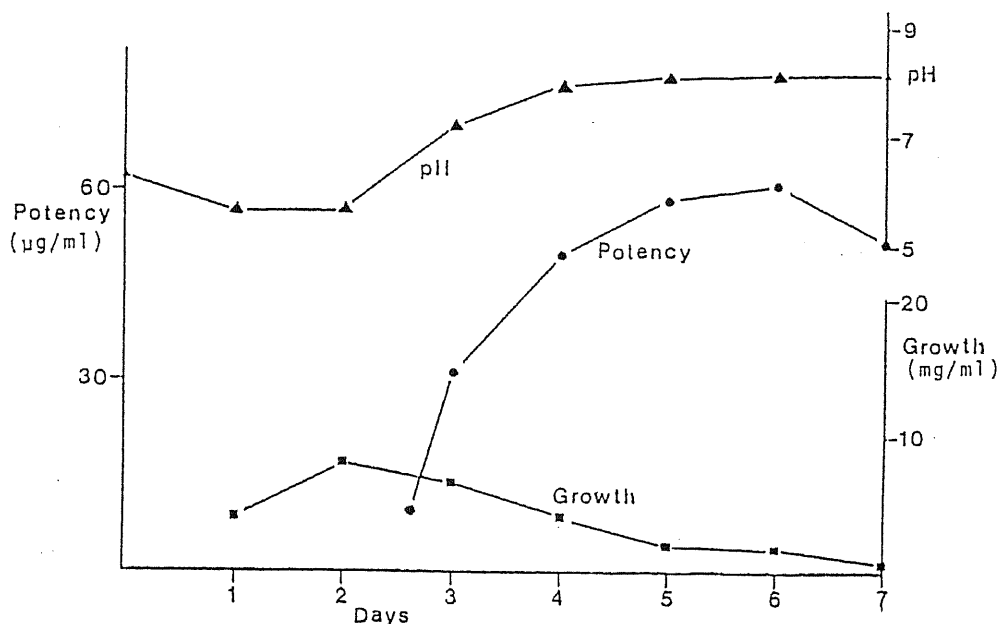
pyrrolomycin A~Eを生産するため生産菌である Actinosporangium vitaminophilum sp. nov. を Table 1 に示した培地を用いて培養した。この

Table 1 Fermentation medium of pyrrolomycin A, B, C, D and E

Seed medium		Production medium	
glucose	2%	maltose syrup.	2%
peptone	0.5	soybean oil	0.15
meat extract	0.2	soybean meal	1
yeast extract	0.3	distiller's solubles	0.25
soybean meal	0.2	Pharmamedia	0.5
CaCO ₃	0.1	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0005
		NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.00005
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00005
		CaCO ₃	0.1

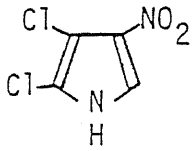
培地の特徴は、生産培地に微量の金属イオンを添加したことである。培養液中の pyrrolomycin A~E の定量は生物検定法で行ない、Bacillus subtilis ATCC 6633 を検定菌として用いたペーパーディスク法によって行なった。本菌株の培養のタイムコースは Fig. 1 に示したとおりである。培養3日目から pH の上昇とともに生産量が上昇し5~6日目で最高に達し PM-A 換算で約 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になった。菌体量は2日目に最高になり3日目からは減少したが、ピークの2日目においても 10 mg/ml に達せず通常の場合の 1/4 程度であった。

Fig. 1 Time course of pyrrolomycin fermentation

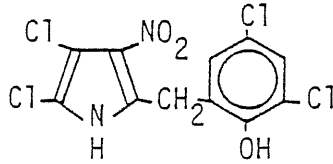


Pyrrolomycin A~E は培養液中のみでなく菌体部分にも蓄積されているので whole broth から抽出した。PM-A~E はいずれも脂溶性物質であるので酢酸エチル, n-ブタノール等の有機溶媒で抽出され、さらに PM-A~E はフェノール性 OH および陰性官能基が置換したピロール性 NH のため弱酸性を示すので酸性側の pH で有機溶媒へ抽出されやすい。有機溶媒へ抽出後は、アルミナあるいはシリカゲルのカラムクロマトグラフィーにより精製することが出来る。その一例として Chart 4 に 500 l の培養液からの抽出工程を示した。whole broth を pH 3 とし酢酸エチルで抽出し、溶媒を留去して得た黒色油状物からトルエンで再抽出した。溶媒を留去後アルミナを用いたカラムクロマトによって PM-A, E, B および C と D の混合物に溶出順に分離した。さらに PM-C と D の混合物はシリカゲルカラムクロマトによってそれぞれに単離した。単離した PM-A~E はベンゼンまたはベンゼン-ヘキ

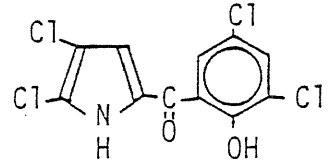
サンから再結晶しいずれも黄色針状晶として得た。
取得量は PM-A: 8.8g, PM-B: 1.5g, PM-C: 1.3g,
PM-D: 1.2g, PM-E: 2.0g であつた。



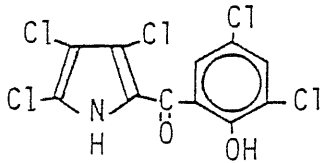
pyrrolomycin A (1)



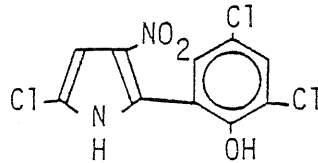
pyrrolomycin B (2)



pyrrolomycin C (3)



pyrrolomycin D (4)



pyrrolomycin E (5)

Chart 4 Isolation of pyrrolomycins A-E

Whole broth(500 liters)

| adjusted pH 3

EtOAc extract(300 liters)

| conc.

Toluene extract(5 liters)

| washed with water(pH 7.5)

| conc.

Alumina column (1.5 kg)

EtOAc

PM-A
8.8g

PM-E
2.0g

EtOAc-MeOH
(10:1)

PM-B
1.5g

EtOAc-conc.HCl
(100:1)

conc.

Silica gel column

hexane-EtOAc-AcOH
(100:20:1)

PM-C
1.3g

PM-D
1.2g

第3節 pyrrolomycin A~Eの物理的性状

pyrrolomycin A~E はいずれも黄色針状晶で、中性ならびに酸性水には不溶であるが、塩基性水およびメタノール、アセトン等の一般的な有機溶媒には可溶である。元素分析値はTable 2にまとめたとおりであるが、その特徴はPM-A~Eいずれも塩素含量が多いことで、35% (PM-E) から49% (PM-D) にも達する。分子量はいずれもマススペクトルによって決定し、元素分析値と併せて決定した分子式もTable 2にまとめて示した。PM-A~Eは全て光学的には不活性であった。UVおよびIRの吸収スペクトルはFig. 2~11に示した。また¹H-NMRおよび¹³C-NMRのデータもTable 2に示した。¹³C-NMRからは、これらPMは主として芳香族炭素より構成されていることが推定された。

Table 2 Physical data of pyrrolomycin A, B, C, D and E

	pyrrolomycin A	pyrrolomycin B	pyrrolomycin C	pyrrolomycin D	pyrrolomycin E
Appearance	Yellow needles	Yellow needles	Yellow needles	Yellow needles	Yellow needles
Melting point	211-213°C	222-225°C	220-221°C	195-198°C	>250°C
Elemental analysis	Calcd. Found	Calcd. Found	Calcd. Found	Calcd. Found	Calcd. Found
	C 26.52 27.03	37.08 36.85	40.66 40.92	36.76 36.41	39.06 39.10
	H 1.10 1.20	1.69 1.68	1.55 1.53	1.12 1.10	1.64 1.61
	N 15.47 14.77	7.87 7.44	4.31 4.24	3.90 3.78	9.11 8.94
	Cl 39.23 38.86	39.89 39.97	43.64 43.26	49.32 49.68	34.59 34.88
Molecular weight (MS)	180	354	323	357	306
Molecular formula	$C_4H_2Cl_2N_2O_2$	$C_{11}H_6Cl_4N_2O_3$	$C_{11}H_5Cl_4NO_2$	$C_{11}H_4Cl_5NO_2$	$C_{10}H_5Cl_3N_2O_3$
UV λ_{max}^{MeOH} nm(ϵ)	268(7400), 318(3100)	277(6500), 330(3700)	220(sh, 21100), 260(sh, 8100), 327(14800), 340(sh, 14600)	220(sh, 26600), 270(sh, 6700), 336(13700), 370(14400)	221(39300), 245(sh, 15600), 300(5600), 340(6200)
1H NMR (δ , acetone- d_6)	7.94(1H, s), 11.30(1H, s, br)	4.42(2H, s), 7.16(1H, d), 7.32(1H, d), 7.5(1H, s, br), 9.9(1H, s, br)	7.09(1H, s), 7.69(1H, d), 7.76(1H, d), 11.1(1H, s, br), 11.8(1H, s, br)	7.61(1H, d), 7.68(1H, d), 10.3(2H, s, br)	6.80(1H, s), 7.42(1H, d), 7.54(1H, d), 10.3(2H, s, br)
^{13}C NMR (δ , acetone- d_6)	105.0(s), 115.9(s), 120.6(d), 133.4(s)	29.6(t)* 105.5(s), 114.1(s), 122.3(s), 125.2(s), 127.5(s), 128.7(d), 130.0(d), 130.5(s), 133.4(s), 150.8(s)	111.8(s), 119.6(d), 123.1(s), 124.0(s), 124.2(s), 125.1(s), 128.8(s), 129.2(d), 133.8(d), 154.5(s), 183.2(s)	118.5(s), 121.1(s), 123.6(s), 124.8(s), 125.9(s), 126.1(s), 129.9(d), 130.1(s), 134.0(d), 153.7(s), 183.0(s)	102.4(d), 114.9(s), 119.6(s), 121.1(s), 122.7(s), 125.5(s), 128.2(d), 128.9(d), 133.0(s), 149.6(s)

* This chemical shift was measured in MeOH- d_4

Fig. 2 UV spectra of pyrrolomycin A

11

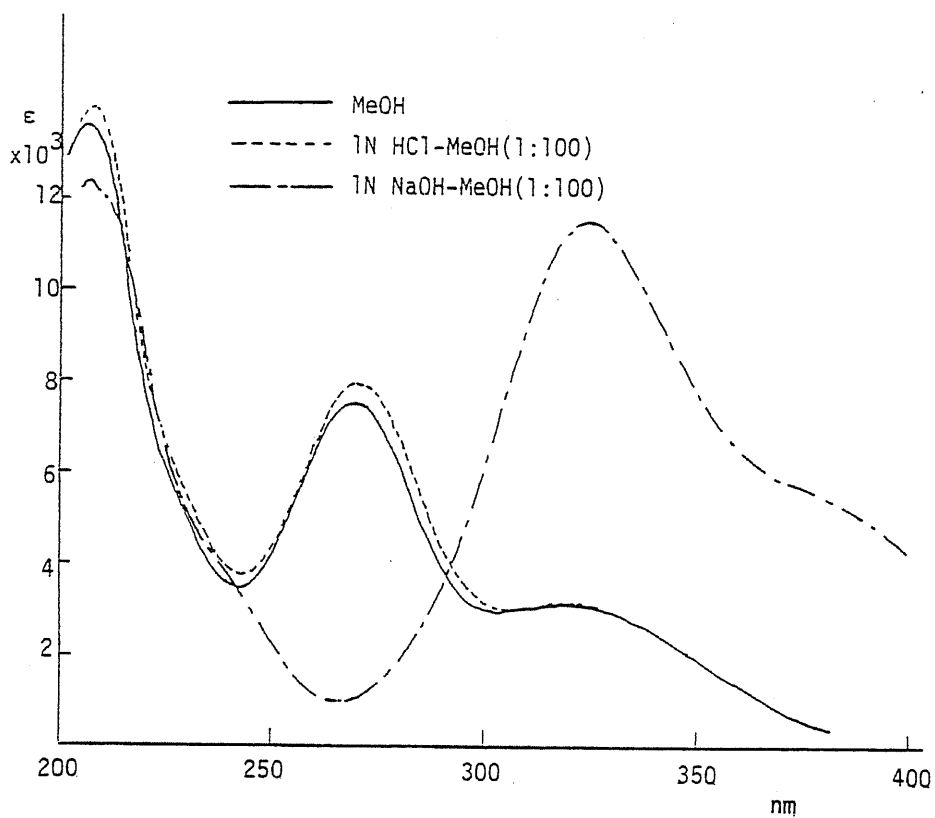
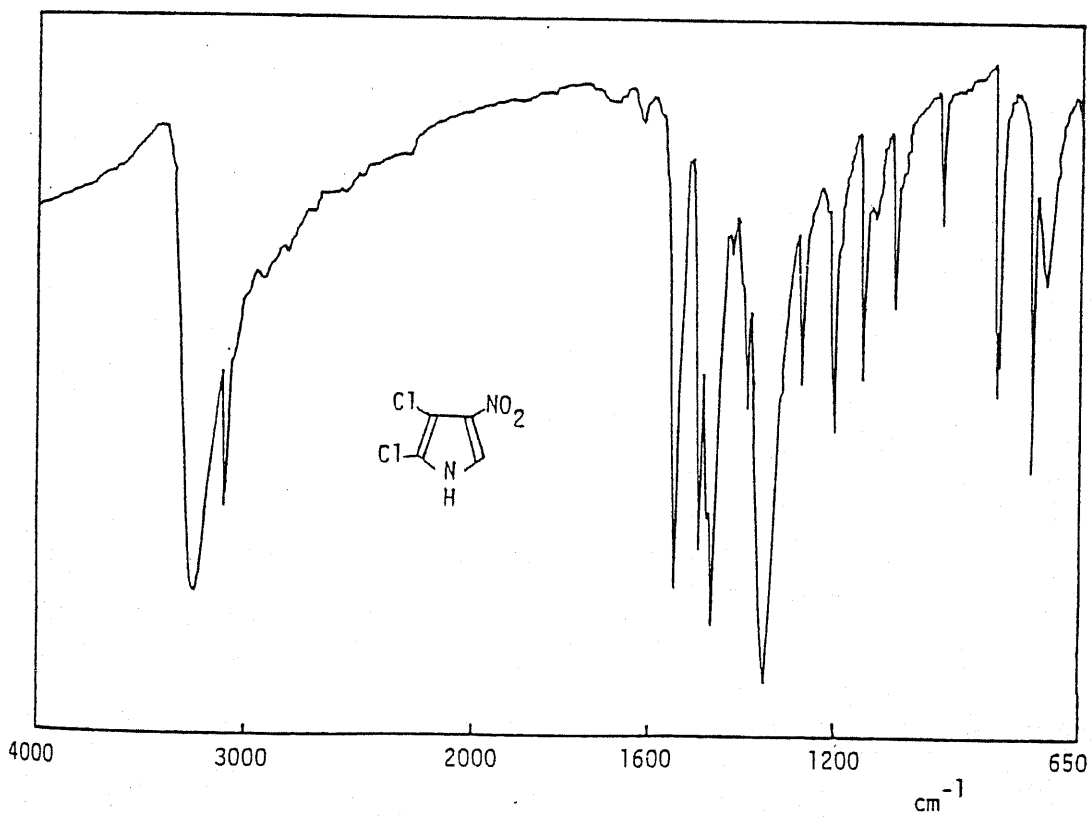


Fig. 3 IR spectrum of pyrrolomycin A (KBr)



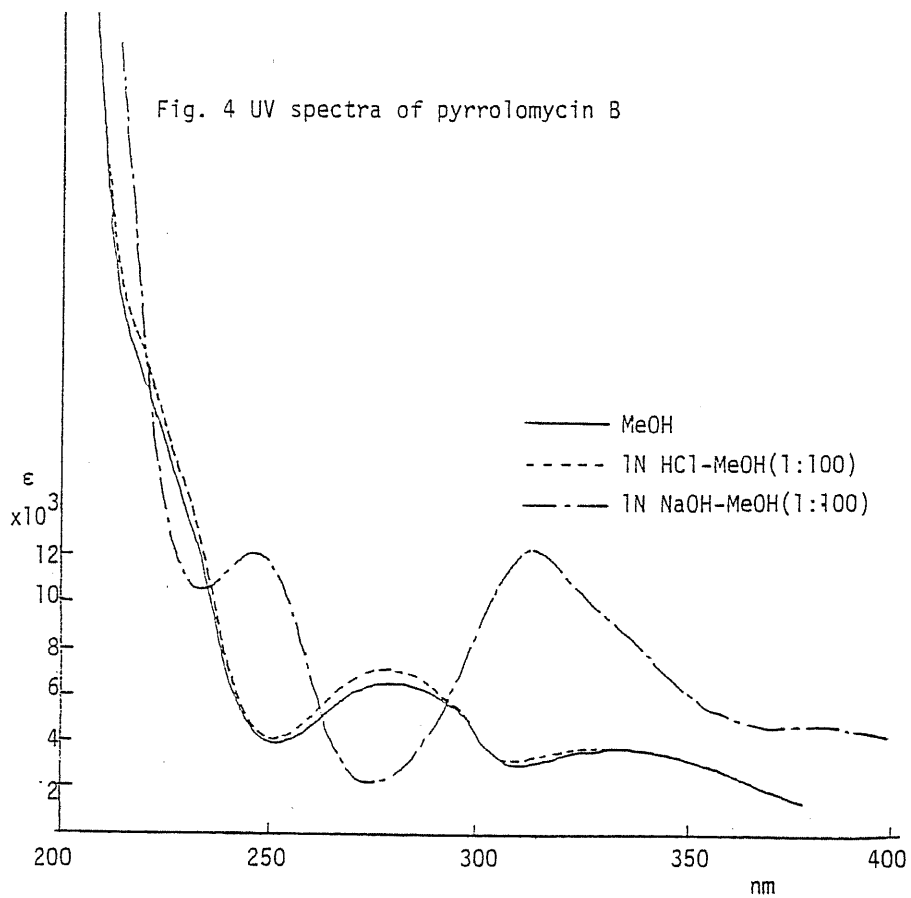
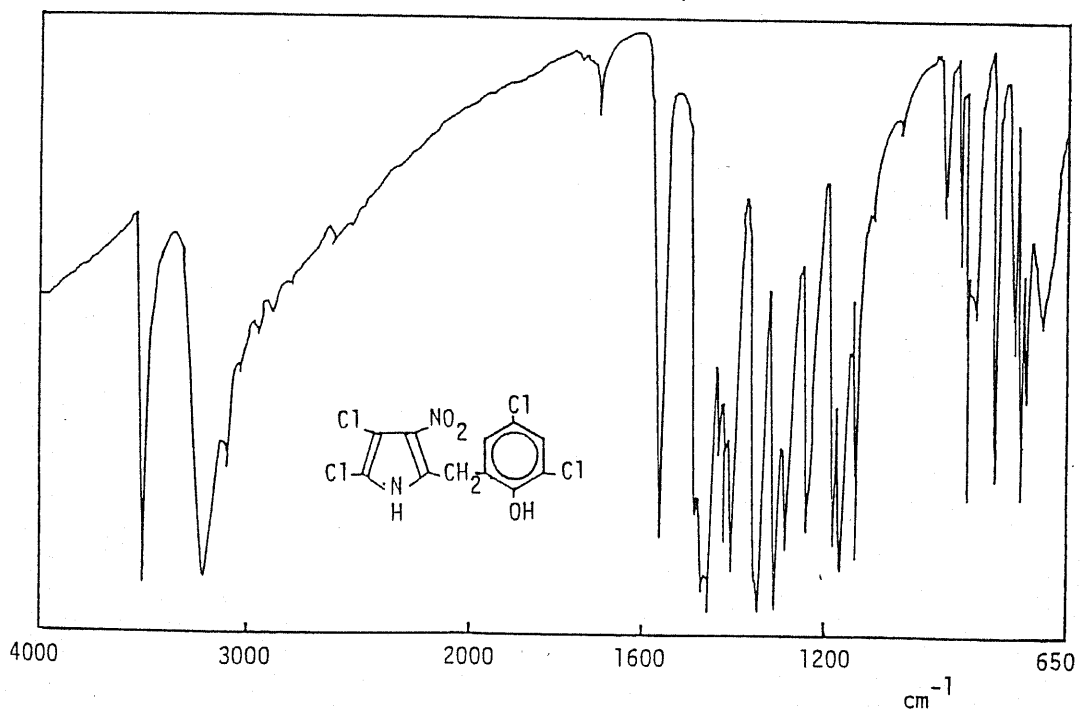


Fig. 5 IR spectrum of pyrrolomycin B (KBr)



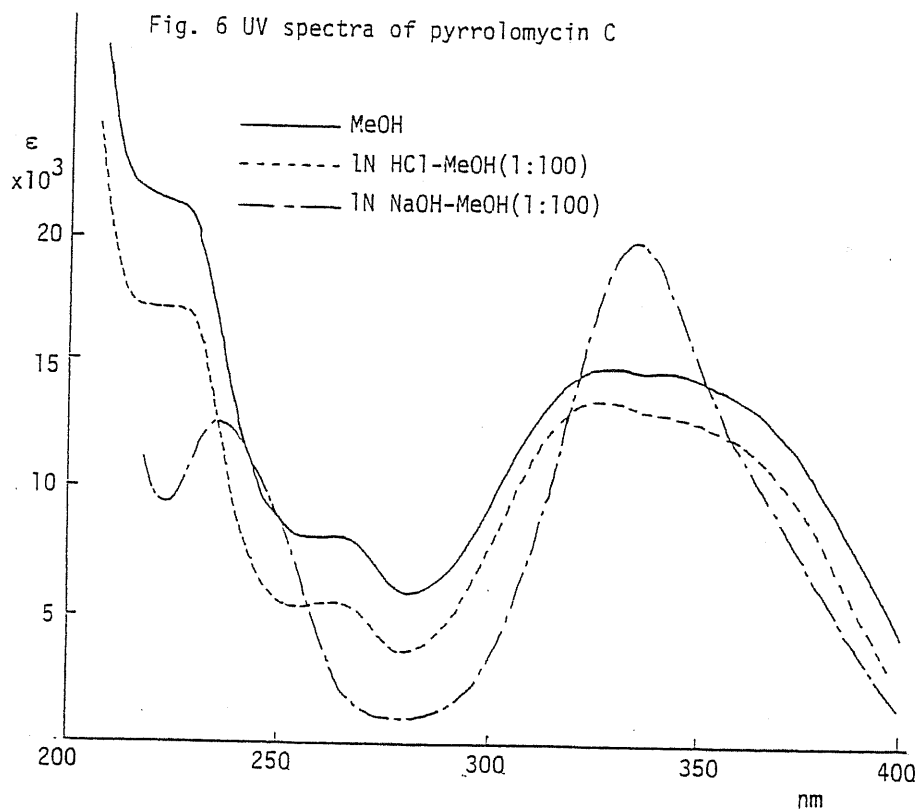


Fig. 7 IR spectrum of pyrrolomycin C (KBr)

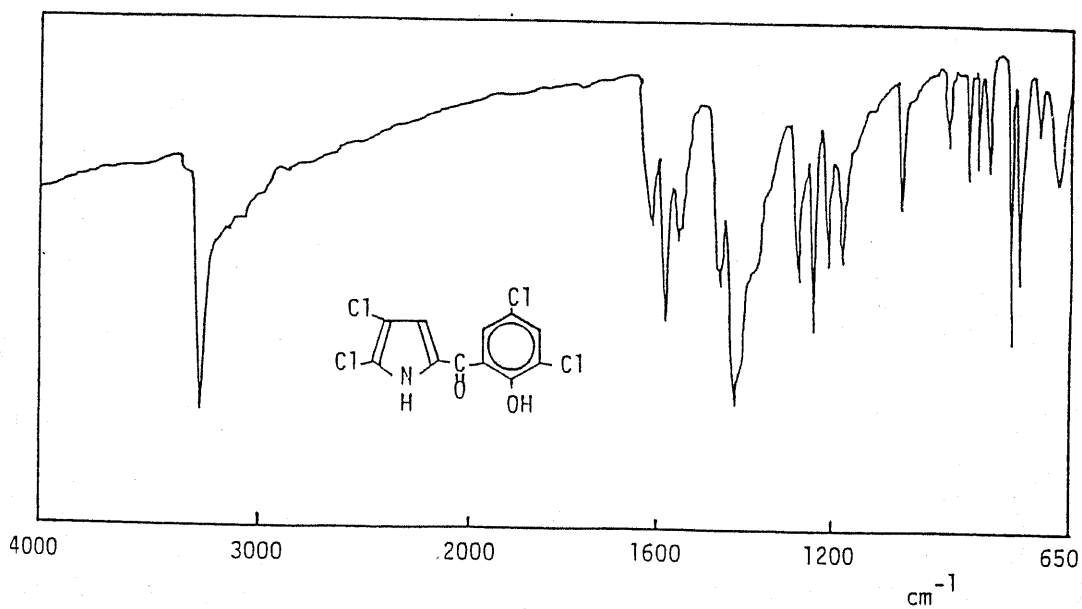


Fig. 8 UV spectra of pyrrolomycin D

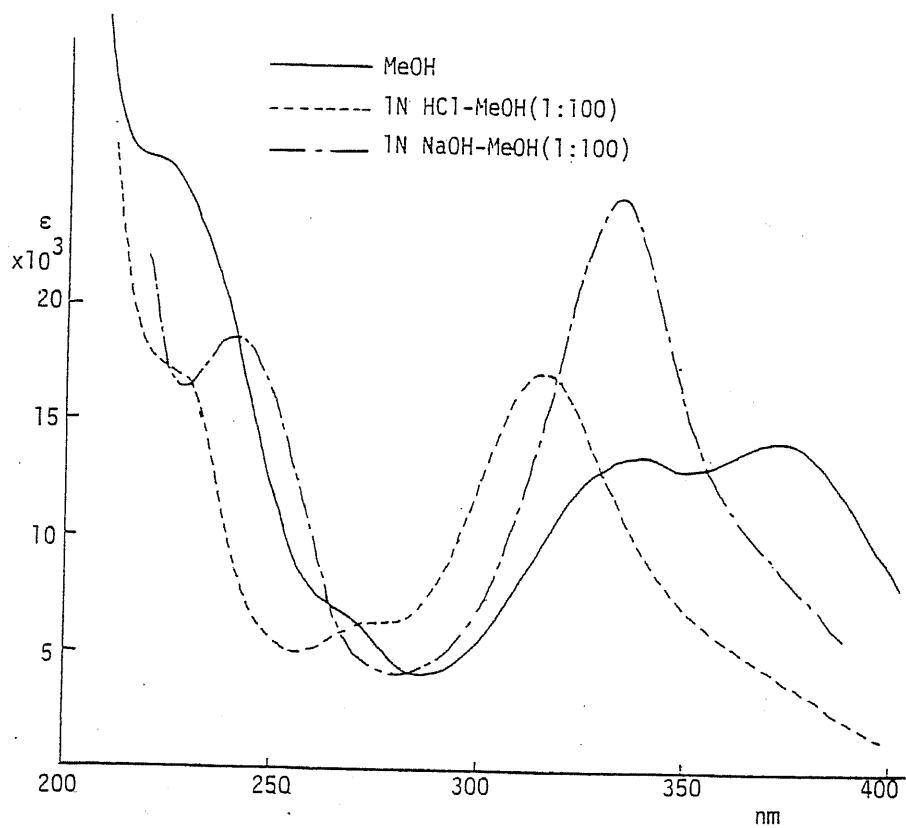
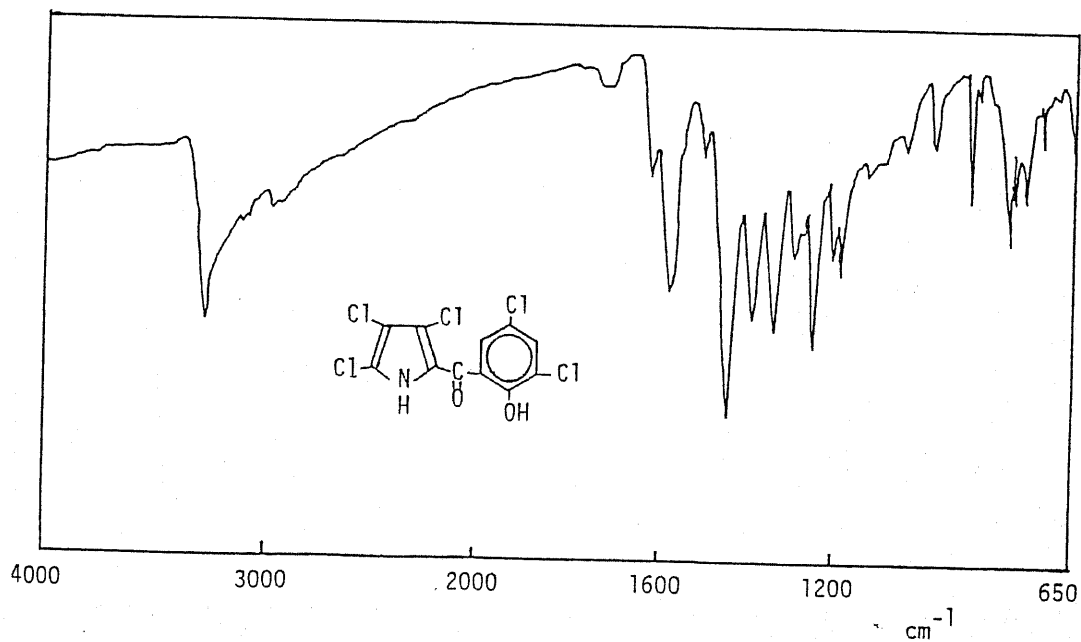


Fig. 9 IR spectrum of pyrrolomycin D (KBr)



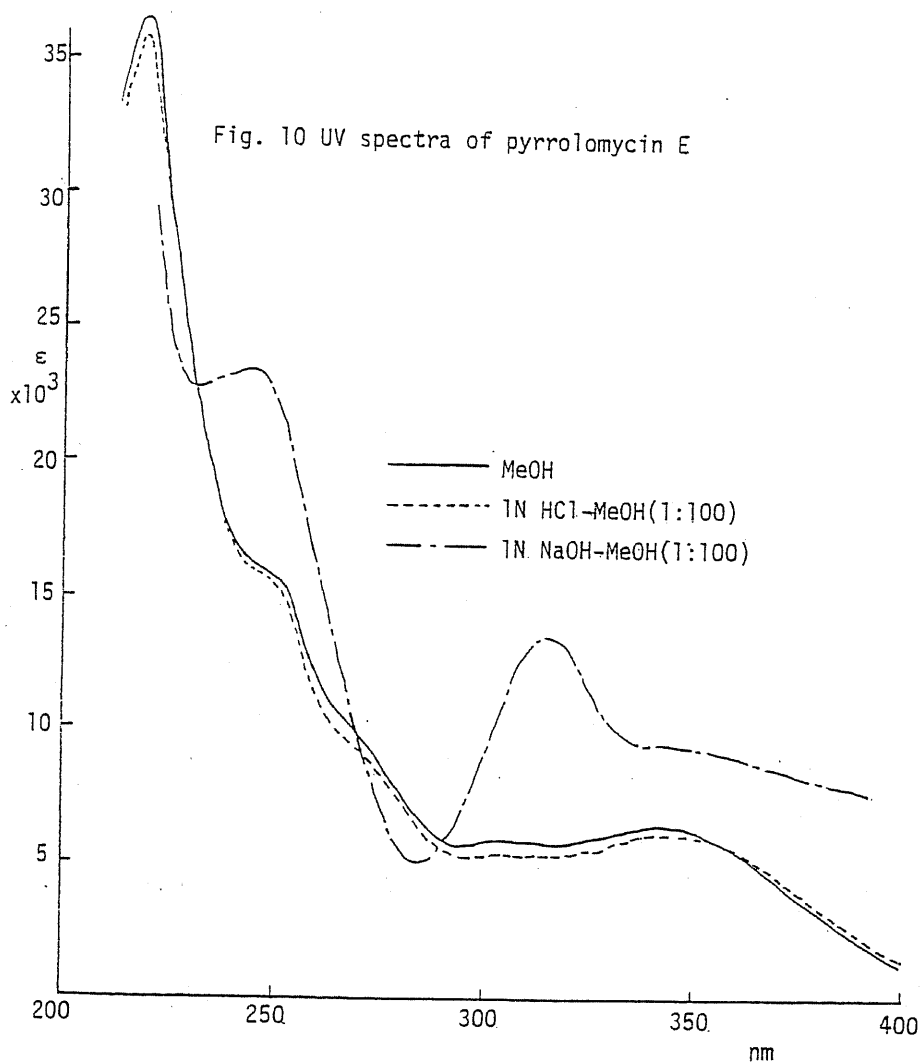
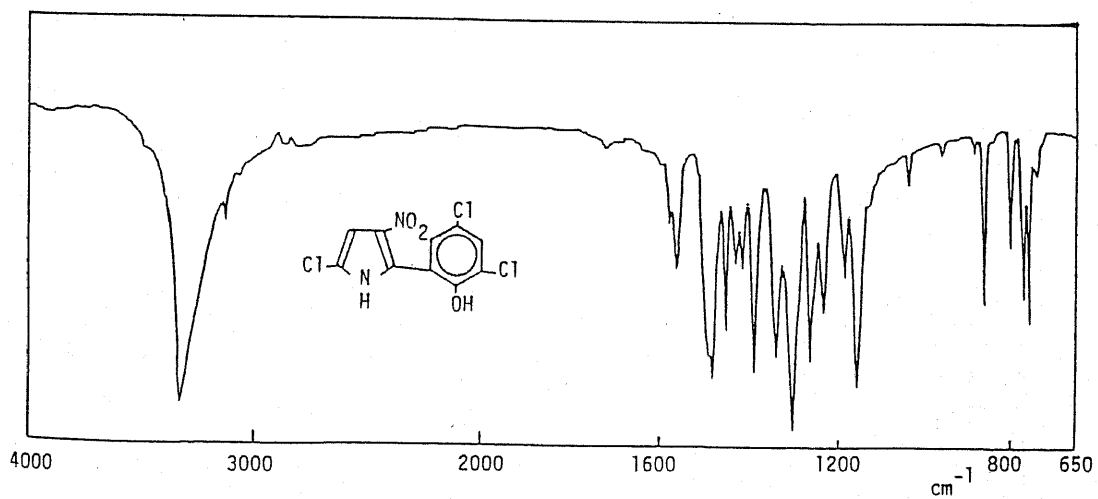
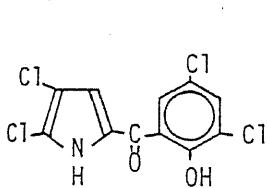


Fig. 11 IR spectrum of pyrrolomycin E (KBr)

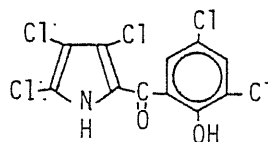


第4節 pyrrolomycin A~E および関連化合物の生物学的性状

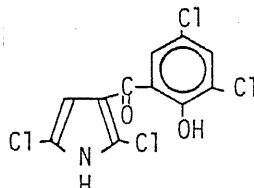
pyrrolomycin A~E および PM-C, D の位置異性体で、今回新たに合成した思および思の MIC 値は Table 3 にまとめて示したとおりである。各化合物の活性の強弱は、対象となる微生物によってバラエティがあり、PM 群として一括して論じられないのが特徴であるが、全般的に PM-D がグラム陽性細菌、陰性細菌、真菌のいずれに対しても最も活性が強い。ところが、PM-D とくらべてピロール環に置換した塩素原子が一つ少ないだけの PM-C は非常に活性が弱く、グラム陰性細菌、真菌には無効である。一方、PM-C, D の位置異性体である思、思



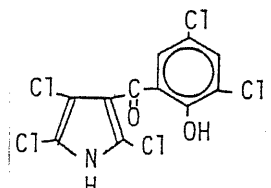
pyrrolomycin C (3)



pyrrolomycin D (4)



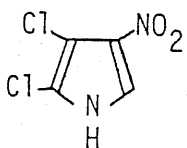
(10)



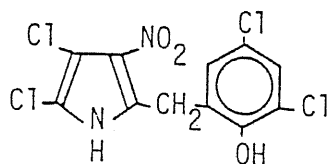
(11)

の MIC を比較すると、ピロール環に置換した塩素原子が一つ少ない思の方が思より活性が強く、PM-C と D の関係とは逆になっており興味ある結果を示している。

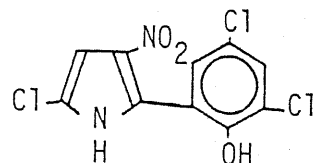
また、ニトロピロールを有する pyrrolomycin A, B, E の比較をすると、ピロール環のみの PM-A はグラム陽性細菌、陰性細菌、真菌にほぼ同程度の



Pyrrolomycin A (1)



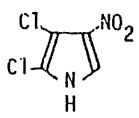
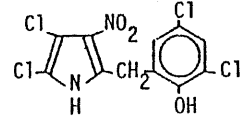
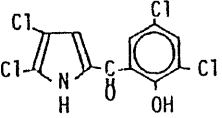
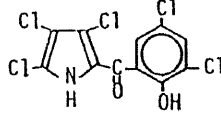
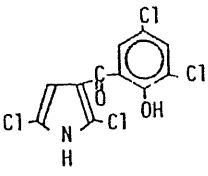
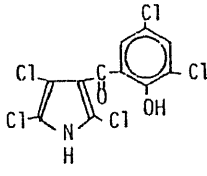
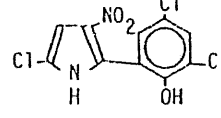
pyrrolomycin B (2)



pyrrolomycin E (5)

MIC 値を有しているが、PM-B はグラム陽性細菌に対しては PM-A より強く、グラム陰性細菌に対してはほぼ同等、真菌に対しては弱い。また PM-E はグラム陽性細菌に対しては PM-A とほぼ同等であったが、グラム陰性細菌、真菌には無効で PM-A より劣る結果であった。

Table 3 Biological activities of pyrrolomycin A, B, C, D and E and related compounds

Test organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
	 pyrrolomycin A (1)	 pyrrolomycin B (2)	 pyrrolomycin C (3)	 pyrrolomycin D (4)	 (10)	 (11)	 pyrrolomycin E (5)
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	3.13	0.20	0.20	≤ 0.025	≤ 0.025	0.78	1.56
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	6.25	0.10	≤ 0.025	≤ 0.025	≤ 0.025	0.39	—
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	6.25	0.39	0.39	≤ 0.025	≤ 0.025	0.39	1.56
<i>Bacillus anthracis</i> No.119	1.56	0.10	0.10	≤ 0.025	—	—	≤ 0.05
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	6.25	12.5	>100	6.25	100	> 50	>100
<i>Citrobacter freundii</i> GN-346	6.25	12.5	>100	6.25	100	> 50	>100
<i>Salmonella typhi</i> O-901-W	3.13	12.5	>100	6.25	100	> 50	>100
<i>Shigella sonnei</i> EW-33 Type I	6.25	12.5	>100	12.5	—	—	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	12.5	12.5	>100	6.25	100	> 50	>100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	6.25	12.5	>100	1.56	12.5	25	6.25
<i>Proteus morgani</i> Kono	6.25	12.5	>100	6.25	100	> 50	—
<i>Proteus mirabilis</i> J-0013	6.25	12.5	>100	1.56	—	—	—
<i>Serratia marcescens</i> MB-3848	6.25	25	>100	12.5	100	> 50	> 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB-3829	12.5	12.5	>100	25	100	> 50	>100
<i>Candida albicans</i> C-A-24	100	100	>100	100	> 50	> 50	>100
<i>Cryptococcus neoformans</i> Cr-1	25	100	>100	6.25	3.13	1.56	>100
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 530324	6.25	100	>100	6.25	1.56	12.5	100
<i>Trichophyton interdigitale</i> No.2	3.13	100	>100	12.5	0.78	3.12	100
<i>Aspergillus fumigatus</i> Saito	25	100	>100	100	> 50	> 50	>100

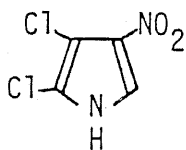
マウスに腹腔内投与して試験した急性毒性は、一般的に活性の強い化合物ほど毒性も強い傾向を示している (Table 4)。但し兎はグラム陰性菌以外に対しては PM-D とほぼ同等の強い活性を有しているにもかかわらず、毒性は $1/10$ 以下でありこの点でも興味ある物質といえる。

Table 4 Acute toxicity of pyrrolomycins and related compound (intraperitoneally injected to mice)

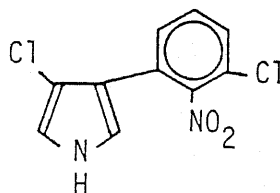
	LD ₅₀
pyrrolomycin A	21.2 mg/kg
pyrrolomycin B	ca. 100 mg/kg
pyrrolomycin C	< 50 mg/kg
pyrrolomycin D	< 20 mg/kg
pyrrolomycin F ₁	ca. 50 mg/kg
pyrrolomycin F _{2a} , F _{2b} and F ₃ (mixture)	ca. 50 mg/kg
<u>10*</u>	ca. 500 mg/kg

* 3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole

pyrrolomycin A については、比較的強い抗真菌活性と急性毒性を考慮して外用真菌剤としての開発を検討し白癬菌症に対する感染治療試験を予備的に行なった。対照薬剤としては抗白癬菌剤として市販されている pyrrolnitrin (12) (商品名ピロエース) を用い、実験動物にはモルモットを供しその背部の毛をそり、Trichophyton mentagrophytes



pyrrolomycin A (1)



pyrrolnitrin (12)

を接種し薬剤を8日間塗布した。その結果、還元培養陰性率^(注)はPM-Aが62.5%であるのに対しピロエースは12.5%でPM-Aの方が良好であった。また実験後の病巣の肉眼所見においても皮ふの肥厚、潮紅等が少なくピロエースより優れていた。

また、ハチ毒のpeptideであるmelittin ($C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$) や polyene系抗生物質であるtrichomycin ($C_{61}H_{86}N_{2}O_{21} \cdot 2H_2O$) は細胞膜のリン脂質の分解を触媒するphospholipaseの活性化物質であることが知られている。K. Umezawaら⁶⁾によると、PM-B, C, Dはphospholipaseを直接活性化はしないがmelittinやtrichomycinの作用を増強させ、従って赤血球の溶血やarachidonic acid ($CH_3(CH_2)_4(CH=CH-CH_2)_4CH_2CH_2COOH$) の遊離を引き起すということがある。

(注) 治療実験終了後、各病巣より皮ふ切片を採取し、サブロー寒天培地にて7日間培養し白黴菌の発育の有無を観察する。分母に切片の数、分子に菌が発育しなかった切片の数をとり計算した。

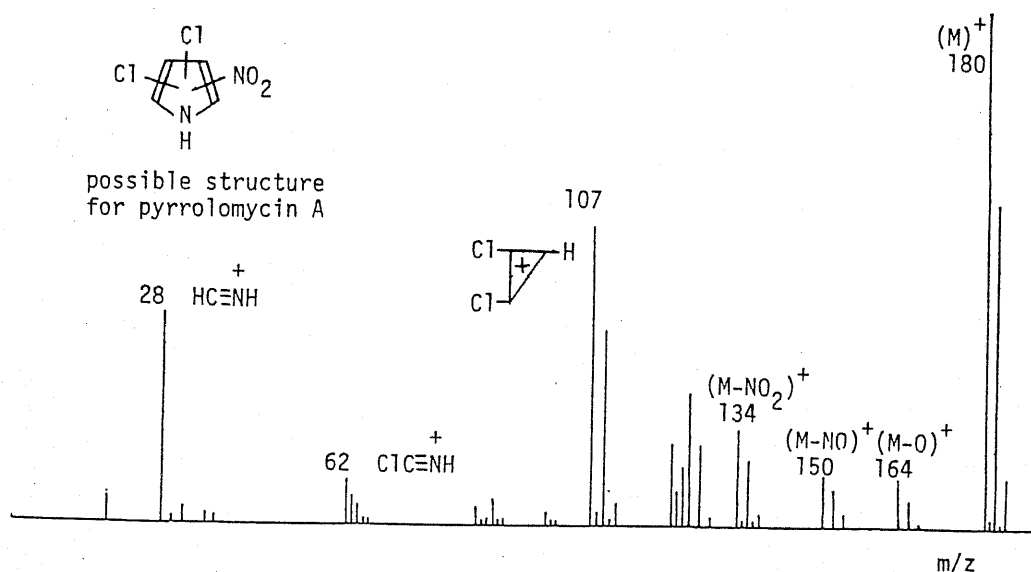
第2章 pyrrolomycin A~E の 構造決定と合成

第1節 pyrrolomycin A の構造決定と合成

§1 pyrrolomycin A の骨格の決定

pyrrolomycin A は融点、 $211\sim 213^{\circ}\text{C}$ の黄色針状晶で中性、酸性水には不溶であるがアルカリ性水や有機溶媒には可溶である。分子式はマスマスペクトルおよび元素分析値から $\text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ と決定した。IR スペクトルにおいて $1505, 1370\text{ cm}^{-1}$ に吸収があること (Fig. 7), マスマスペクトルにおいて m/z 164 ($\text{M}-\text{O}$)⁺, 150 ($\text{M}-\text{NO}$)⁺, 134 ($\text{M}-\text{NO}_2$)⁺ のフラグメントピークが観察されたこと (Fig. 12) によりニトロ基の存在が示唆された。また, 重アセトン中で測定した $^1\text{H-NMR}$ において δ 11.30 ppm に

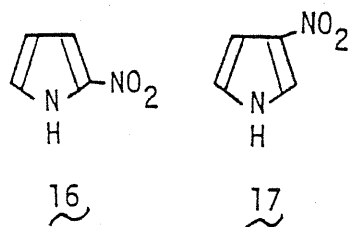
Fig. 12 Mass spectrum of pyrrolomycin A



認められた巾広いシグナルは重水を加えると消失することによりNHまたはOHに由来するものと推定した。またPM-Aは過剰のジアゾメタンで処理するとメチル化され、アルカリ性水にも不溶になり、¹H-NMRにおいて δ 11.30 ppmのシグナルは消失し新たにN-CH₃に相当する δ 3.83 ppmのシグナルが観測された。以上のことからpyrrolomycin Aはジアゾメタンでメチル化される酸性のNH基を有するものと考えられる。従ってPM-Aの構造はピロール環にニトロ基と2原子の塩素が置換した化合物であると推定した。

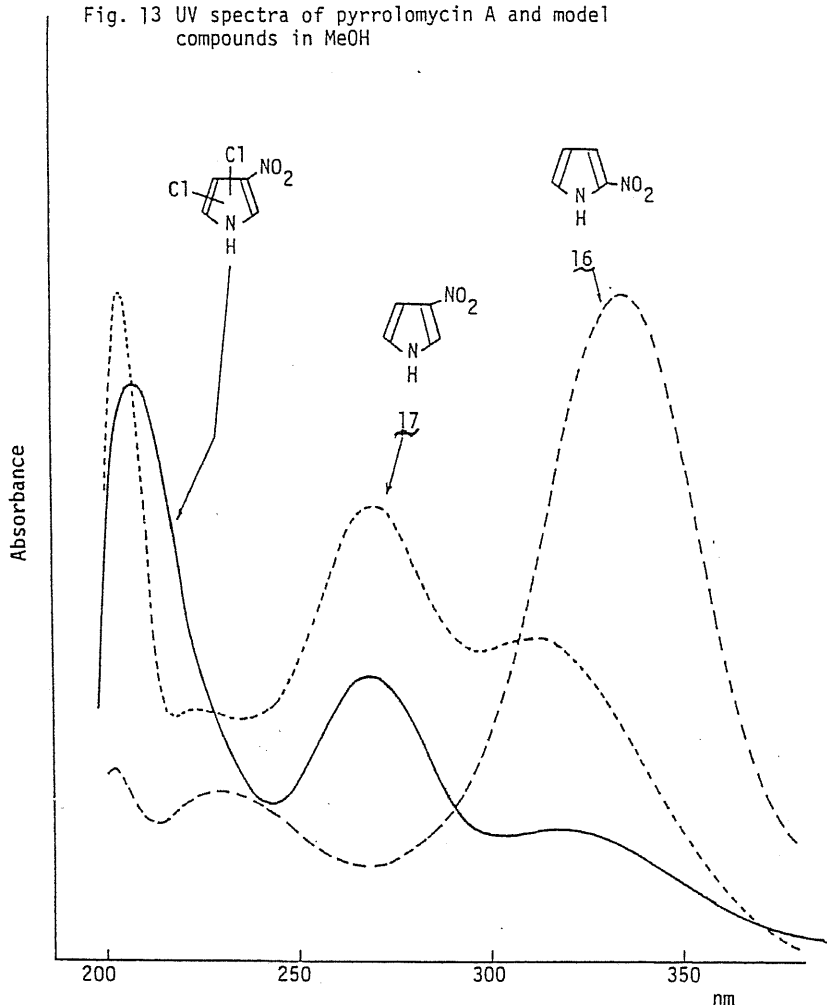
そこで、まずピロール環上のニトロ基の置換位置をUV吸収によって推定した。文献^{7,8)}によるとメタノール中で測定した2-nitropyrrole (16)の吸収極大は335 nm (ϵ 16,900)であり、3-nitropyrrole (17)は268 nm (ϵ 7,240)である。一方PM-Aの吸収極大の測定値は268 nm (ϵ 7,400)であり、ニトロ基は β 位(2位)に置換しているものと考えた。

このことを確認するため、16の標品を文献^{9,10)}に従い、無水酢酸中でピロールに硝酸を反応させ、2-nitropyrrole (16)および3-nitropyrrole (17)を合成した。そして、



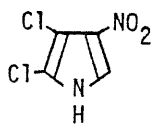
それぞれUV吸収を比較のため測定した。その結果はFig. 13に示したとおりで、pyrrolomycin Aの β 位はニトロ基で置換されているものと推定できる。

Fig. 13 UV spectra of pyrrolomycin A and model compounds in MeOH

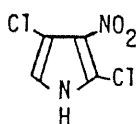


ニトロ基がβ位に存在する場合，pyrrolomycin Aの2原子の塩素のうち少なくとも1原子はピロロール環のα位に置換しているはずであり，PM-Aの構造に対し次の3つの式を考えることができる。

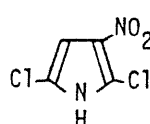
Chart 5



17



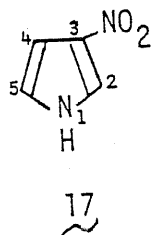
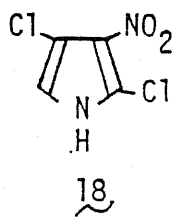
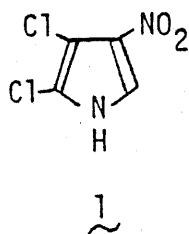
18



19

そこで pyrrolomycin A における塩素原子の置換位置を¹H-NMRの結合定数から決定することを試みた。前述した如く，PM-Aのピロロール環の炭素4

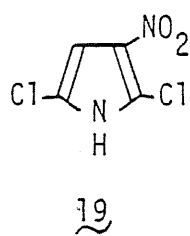
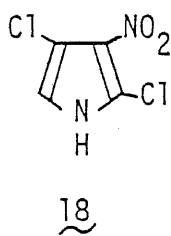
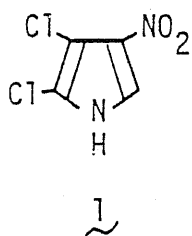
原子のうち3原子は置換されているが1原子は置換されておらず水素が結合している。従って $^1\text{H-NMR}$ でピロールのNHとのカップリングが観測されるはずである。まず、PM-Aを重アセトンに溶解して測定したところ、シグナルの分裂は認められず、Table 2に示したように δ 7.94にシングレットとして観測された。そこで、トリフロロ酢酸を1滴加えて、液性を酸性にしてピロール環のNHの解離をおさえて測定するとNHとのカップリングが観測され $J=3.8\text{ Hz}$ であった。この J 値は文献値^{7,11)}を参考にすると、一般的には β に比べ α カップリングが大きな値を示し、この場合には α カップリングに対応する。しかし、3-nitropyrole (17) の場合は $J_{1,4}$ と $J_{1,5}$ が 2.65 Hz ⁷⁾で、 α カップリングと β カップリングが同じ値を示す場合もあることを考えると、 $J=3.8\text{ Hz}$ だからといって α カップリングであると断定はできなかつたものの、その可能性は大きい。ところが、 α カップリングだとしてもそれに対応する可能な構造は2つあり、これだけでPM-Aの構造を決定することはできなかつた。そこで合成的手法を用いて構造決定することを試みた。



§ 2 pyrrolomycin A の構造決定

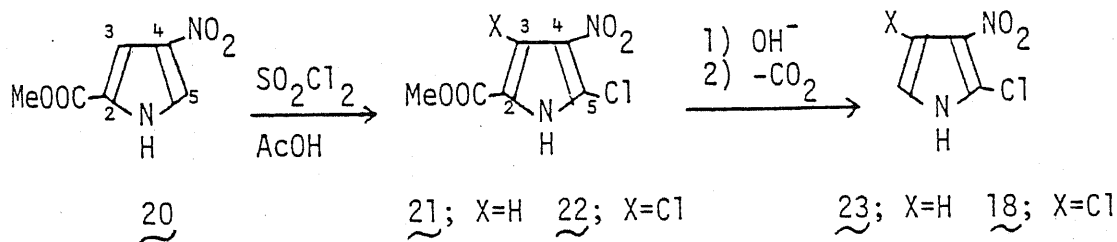
dichloro- β -nitropyrrole の合成には 2 つのルートがある。すなわち dichloropyrrole のニトロ化のルートと 3-nitropyrrole のクロル化のルートである。前者は dichloropyrrole が不安定なことから、ニトロ基が β 位に入りにくいという問題がある。^{7,10,12)} 一方、3-nitropyrrole は酸性溶媒中で安定でありクロル化が可能である。さて、dichloropyrrole である pyrrolomycin A の構造に対して可能な式は前に述べたが Chart 5 に示した 3 つである。

Chart 5



そこでまず、2,4-dichloro-3-nitropyrrole (18) を合成すべく methyl 4-nitropyrrole-2-carboxylate (20)^{13,14)} を出発原料として選んで Chart 6 に示した方法で 2,4-dichloro-3-nitropyrrole (18) の合成を試みた。methyl

Chart 6

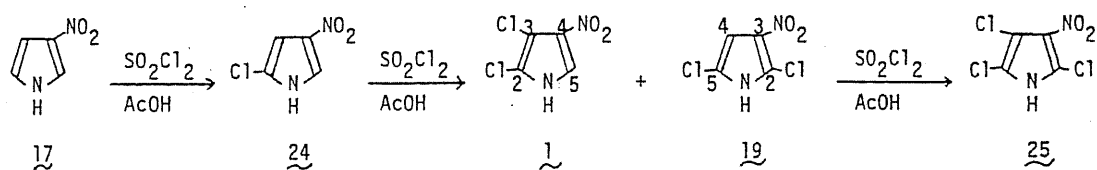


4-nitropyrrole-2-carboxylate (20) を酢酸中でスルフィルクロライドと 80°C で反応させ methyl 5-chloro-4-nitropyrrole-2-carboxylate (21) および methyl

3,5-dichloro-4-nitropyrrole-2-carboxylate (22) の混合物を得、分別結晶によりそれぞれを分離した。methyl 3,5-dichloro-4-nitropyrrole-2-carboxylate (22) をアルカリ加水分解し、さらにエチレングリコール中で 190°C に加熱して脱炭酸させ 2,4-dichloro-3-nitropyrrole (18) を得た。ところがこの化合物の物理的性質は天然より得た pyrrolomycin A とは異っており、その位置異性体であった。

そこで、出発物質として 3-nitropyrrole (17)^{9,10} を選んで 2,3-dichloro-4-nitropyrrole (18) および 2,5-dichloro-3-nitropyrrole (19) の合成を chart 7 に示した方法で試みた。3-nitropyrrole (17) は methyl 4-nitro-

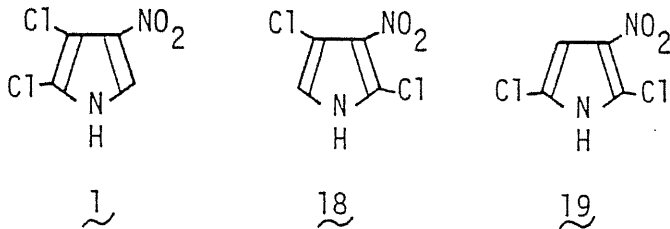
Chart 7



pyrrole-2-carboxylate (20) にくらべてスルフリルクロライドと反応しやすく、酢酸中、室温で 2 mol のスルフリルクロライドと反応し 2,3-dichloro-4-nitropyrrole (18) と 2,5-dichloro-3-nitropyrrole (19) の混合物を生成した。なお、添加するスルフリルクロライドを 1 mol にすると 2-chloro-3-nitropyrrole (24) が、3 mol にすると 2,4,5-trichloro-3-nitropyrrole (25) がそれぞれ単一生成物として得られた。2,3-dichloro-4-nitropyrrole (18) と 2,5-dichloro-3-nitropyrrole (19) の混合物はベンゼン-酢酸エチル (4:1) の系を用いたシリカゲルの分取 TLC によって各々に単離し、取得量はほぼ 1:1 であった。得られた 2,3-dichloro-4-nitropyrrole (18) および 2,5-dichloro-3-nitropyrrole (19) の物理的性質は、いずれも先に得た 2,4-dichlo-

10-3-nitropyrrole (18) とは異なり, 2,3-dichloro-4-nitropyrrole (17) が天然に得られた PM-A と同じ性状を有していることが判明した。ところがこの時点では 17 と 19 における塩素原子の置換位置は, すでに述べた下記の 3 つの構造式のうち, 2,4-di-

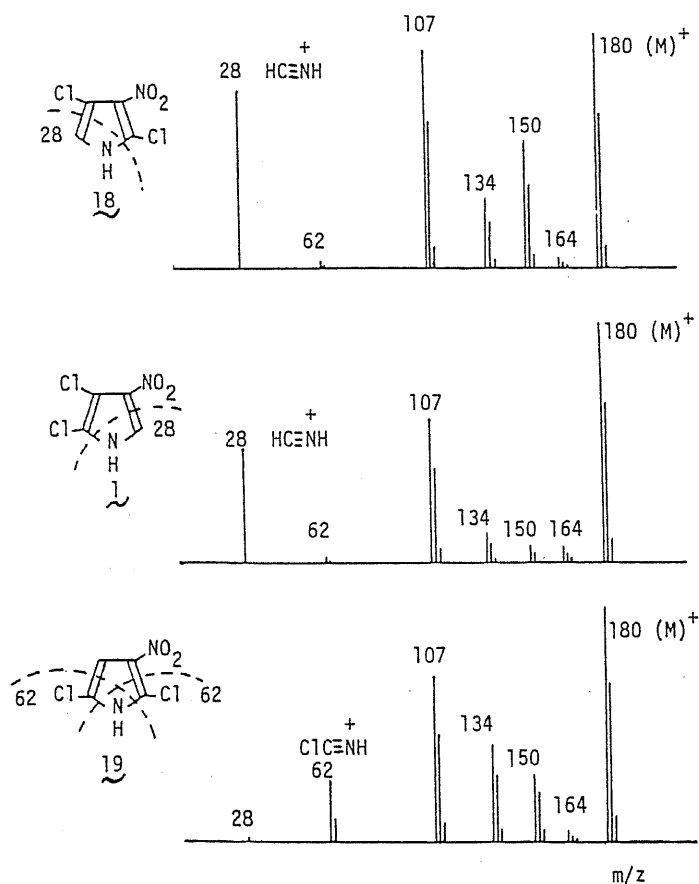
Chart 5



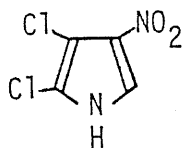
chloro-3-nitropyrrole (18) を除いた残りの 2 つ, つまり一方が 2,3-dichloro- で他方が 2,5-dichloro-誘導体であるという形でしか決定されていない。

そこで, 17 と 19 の塩素原子の置換位置を決定するため $^1\text{H-NMR}$ における $J_{\text{NH-CH}}$ の比較をした。重アセトン中に 1~2 滴のトリフロロ酢酸を加えて測定した J 値は, 天然の PM-A と同定された化合物 17 が 3.8 Hz , PM-A とは異なる化合物 19 が 2.9 Hz であった。従って, 3.8 Hz は α カップリングに, 2.9 Hz は β カップリングに由来するもの, すなわち, 化合物 17 は 2,3-dichloro-4-nitropyrrole であり, 19 は 2,5-dichloro-3-nitropyrrole であると推定するのが妥当であると考えた。

この結論をさらに確認するためマススペクトルのフラグメントパターンの検討をした。Fig. 14 において m/z 28 のピークは $\text{HN}\equiv\text{CH}$ に由来し, m/z 62 は $\text{HN}\equiv\text{CCl}$ に由来するものと考えられる。すなわち, m/z 62 が大きなピークとして観察される化合物 19 ではピロール環の 2 つの α 位はいずれも塩素原子で置換されており, 一方 m/z 28 が大きい化合物 17 では 1 つは無置換のままであることを示し

Fig. 14 Mass spectra of three dichloro- β -nitropyrroles

ている。このことは α 位の1つが無置換の2,4-dichloro-3-nitropyrrole (18) においても m/z 28 のイオンピークが大きく観察されることによっても裏付けられている。従って pyrrolomycin A (1) は 2,3-dichloro-4-nitropyrrole であると決定した。



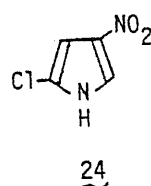
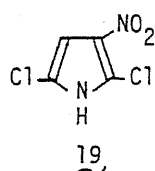
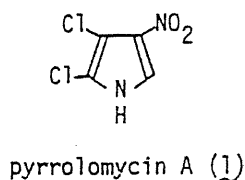
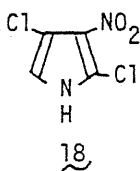
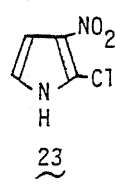
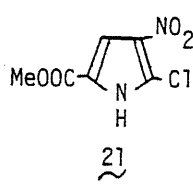
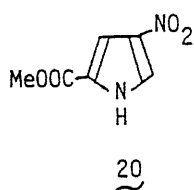
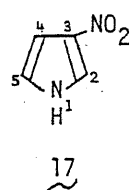
pyrrolomycin A (1)

かくして pyrrolomycin A の構造は決定したが、PM-A および合成した関連化合物の $^1\text{H-NMR}$ データを Table 5 に一括して示した。この表はそれぞれ

Table 5 ^1H NMR spectra of chlorinated 3-nitropyrroles

Compounds	ppm(acetone- d_6)			J(Hz)*					
	C ₂ -H	C ₄ -H	C ₅ -H	1-2	1-4	1-5	2-4	4-5	2-5
<u>17</u>	7.79	6.91	6.71	3.5	2.6	2.6	1.6	3.2	2.0
<u>20</u>	7.96	7.28	COOMe	3.6	2.8	-	1.7	-	-
<u>21</u>	Cl	7.35	COOMe	-	3.0	-	-	-	-
<u>23</u>	Cl	6.79	6.92	-	2.8	3.0	-	3.6	-
<u>18</u>	Cl	Cl	7.10	-	-	3.1	-	-	-
<u>1</u>	7.94	Cl	Cl	3.8	-	-	-	-	-
<u>19</u>	Cl	6.78	Cl	-	2.9	-	-	-	-
<u>24</u>	7.80	6.69	Cl	3.4	2.6	-	1.9	-	-

* $J_{\text{NH-CH}}$ of 20, 21, 18, 1 and 19 were obtained in $\text{CF}_3\text{COOH-acetone-}d_6$.



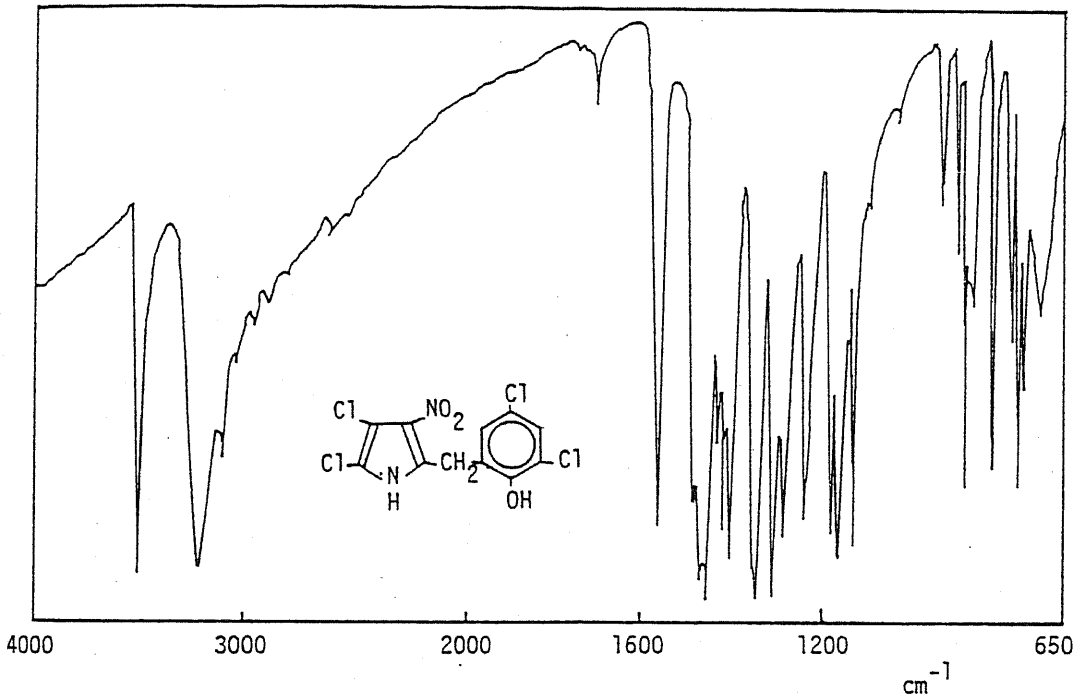
れの構造を矛盾なく説明している。すなわち、ピロール環の α 水素は β 水素より低磁場で共鳴し、電気陰性基(Cl, NO_2)が置換すると、とりのプロトンは低磁場へシフトする。¹¹⁾従って pyrrolomycin A (1) のニトロ基に隣接したピロール環上の α 水素は δ 7.94 ppmで、同じ2つの塩素原子を持つ 2,4-dichloro-3-nitropyrrole (18) (α -H, δ 7.10 ppm) や 2,5-dichloro-3-nitropyrrole (19) (β -H, δ 6.78 ppm) と比較すると最も低磁場にシフトしている。また結合定数(J値)については3 Hz以上の場合は α カップリング[3-nitro-

pyrrole(2) の 1 例を除いて], 3 Hz 以下の場合は β カップリングであるといえる。この場合塩素原子の影響はほとんどない。なお, pyrrolomycin A (h) の ^{13}C -NMR について言及すると Table 2 に示したとおり δ 105.0 (s, C-3), 115.9 (s, C-2), 120.6 (d, C-5), 133.4 (s, C-4) に 4 つのシグナルはすべて認められ 5 位の炭素は無置換のためダブルレットのシグナルを示した。

第2節 pyrrolomycin B の構造決定

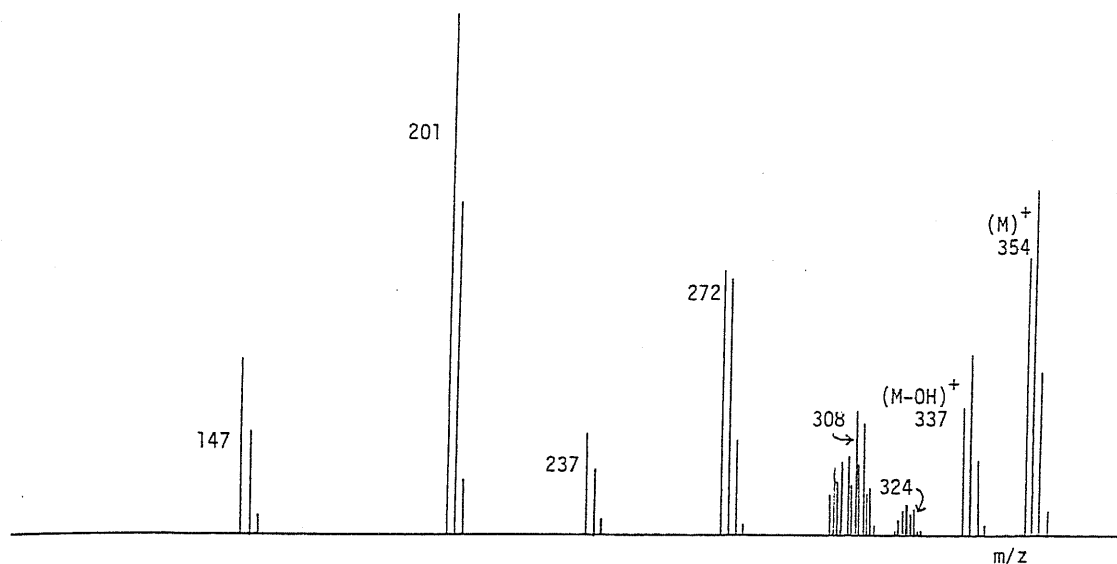
pyrrolomycin B は融点 $222\sim 225^\circ\text{C}$ の黄色針状晶で中性, 酸性水には不溶であるがアルカリ性水や有機溶媒には可溶である。分子式はマススペクトルおよび元素分析値から $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_3$ と決定した。IR スペクトルからニトロ基 (1575 , および 1350

Fig. 5 IR spectrum of pyrrolomycin B (KBr)



cm^{-1}), 芳香環の NH (3200cm^{-1} 付近) および水酸基 (3500cm^{-1}) の存在が示唆された。また, マススペクトルにおいて大きな M^+ のピーク (m/z 354) が認められる以外に, m/z 337 ($\text{M}-\text{OH}^+$), 324 ($\text{M}-\text{NO}^+$) および 308 ($\text{M}-\text{NO}_2^+$) が観測される (Fig. 15, p.32) ことによりニトロ基の存在が支持されることから芳香族ニトロ化合物であると考へた。¹⁵⁾ また, 重アセトン中で測定した $^1\text{H-NMR}$ において, δ 4.42 ppm のシグナルは芳香環には含まれたメチレンであり, また δ 7.32

Fig. 15 Mass spectrum of pyrrolomycin B



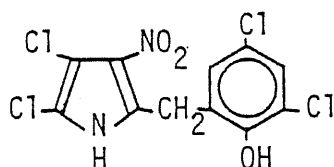
および δ 7.16 ppm (いずれもダブルット, $J=2.5$ Hz) は芳香環 (ケミカルシフト値から多分ベンゼン環と思われる) 上の互いにメタ位にある2つのプロトンの存在を示唆している。以上の分析データをまとめると, pyrrolomycin B には4置換のベンゼン環, ニトロ基, 水酸基, メチレンが存在すると推定され, 分子式からこれらを差引くと C_4HCl_4N が残る。この式で示される骨核が芳香環であることを考えると炭素がすべて置換されたピロール環であろうと推測した。さらに, ^1H-NMR においても δ 8.3 ~ 6.8 ppm にベースラインのもり上りのような広いシグナルが存在し, これは重水を添加すると消失することから, ピロール環の NH であろうと考えた。

pyrrolomycin B を無水酢酸とピロジンで処理し1晩放置すると mono-O-acetylpyrrolomycin B が得られた。このアセチル体はほとんど無色で融点 $180 \sim 181^\circ C$ を示し, マススペクトルで m/z 396 (M^+) にピークを示した。IR スペクトルでは PM-B で認められた 3500 cm^{-1} 付近の吸収が消失し, 新たに 1735

および 1200 cm^{-1} 付近に O-アセキルに由来する吸収が生じた。

以上の知見を総合すると, pyrrolomycin B はピロール環とベンゼン環がメチレンを介して結合し, 塩素4原子, ニトロ基および水酸基が2つの環上に置換しており, さらにベンゼン環では2つのプロトンがメタ位に存在することがわかった。

これらの知見をもとに完全な構造決定は, 単結晶X線結晶解析によって行なった。解析用の pyrrolomycin B の単結晶はメタノールから再結し黄色薄片として得た。X線回折装置として Philips PW 1100 を用い X線源として $\text{Cu K}\alpha$ を用いて行ない, 1352 個の反射を得た。解析は MULTAN フォグラム¹⁶⁾ を用いた直接法で行なった。その結果, pyrrolomycin B の構造を 2-(3,5-dichloro-2'-hydroxybenzyl)-4,5-dichloro-3-nitropyrrole と決定した。



pyrrolomycin B (2)

なお, Fig. 16 には ORTEP フォグラム¹⁷⁾ で作成した透視図に原子間きょりと結合角度および結晶データを示し, Table 6 には最終原子座標を示した。

これらの解析によりベンゼン環上の水酸基は, ピロール環の窒素原子と分子内水素結合を形成しているきょりにあり, またニトロ基の2つの酸素原子はピロール NH およびベンゼン環上の水酸基と分子間水素結合を形成していることが判明した。

Table 6 The final atomic coordinates for
 non-hydrogen atoms($\times 10^4$) and
 hydrogen atoms($\times 10^3$)

	x	y	z
N(1)	-620(5)*	4675(0)	2916(14)
C(2)	-126(5)	3838(5)	4138(15)
C(3)	-755(6)	3032(5)	2878(14)
C(4)	-1639(6)	3422(6)	885(15)
C(5)	-1508(6)	4425(6)	976(18)
C(6)	899(6)	3888(6)	6354(15)
C(7)	2078(6)	3666(5)	4932(15)
C(8)	2545(6)	4348(6)	3034(15)
C(9)	3645(6)	4168(7)	1789(16)
C(10)	4281(7)	3323(8)	2512(18)
C(11)	3814(7)	2666(7)	4475(18)
C(12)	2715(6)	2804(6)	5682(16)
N(2)	-518(6)	2033(5)	3574(14)
O(1)	182(7)	1814(4)	5601(17)
O(2)	-1010(11)	1393(5)	1987(16)
O(3)	1913(5)	5187(4)	2435(12)
C1(1)	-2682(2)	2816(2)	-1201(5)
C1(2)	-2312(2)	5327(2)	-856(6)
C1(3)	4193(2)	5041(2)	-617(5)
C1(4)	4618(2)	1632(2)	5568(7)
H(C10)	513(6)	319(6)	202(14)
H(O3)	82(10)	531(12)	176(23)
H(C12)	246(6)	233(6)	728(15)
H(C6)	57(8)	351(8)	804(16)

*(): estimated standard deviations

第3節 pyrrolomycin CおよびDの構造 決定と合成

§1 スペクトルデータによる構造解析

pyrrolomycin CおよびDはそれぞれ融点 $220 \sim 221^\circ\text{C}$ および $195 \sim 198^\circ\text{C}$ を示す黄色針状晶で中性、酸性水には不溶であるがアルカリ性水や有機溶媒には可溶である。分子式はマススペクトルおよび元素分析値から pyrrolomycin C: $\text{C}_{11}\text{H}_5\text{Cl}_4\text{NO}_2$, pyrrolomycin D: $\text{C}_{11}\text{H}_4\text{Cl}_5\text{NO}_2$ と決定した。重アセトン中で測定した $^1\text{H-NMR}$ において PM-C は δ 11.1 および 11.8 ppm 付近に各々 1H 分の巾広いシグナルを, PM-D では 10.3 ppm 付近に 2H 分のシグナルを認められた。これらのシグナルは, いずれも重水を添加すると消失するので NH または OH に由来するものと考えた。また, NH, OH の存在は IR スペクトルにおいて 3300cm^{-1} 付近に吸収があることによっても支持される。分子式において, PM-D は PM-C より塩素が 1 原子多く置換した式であり, またそれらの IR スペクトルは非常によく似ており, さらに $^{13}\text{C-NMR}$ データも両者の類似性を示唆している (Table 7)。すなわち, PM-C, D 共に 11 原子の炭素原子のうち 1 原子はカルボニル炭素 (PM-C: δ 183.2, PM-D: δ 183.0) であり残り 10 原子はすべて芳香環の炭素である。そのケミカル

Table 7 ^{13}C NMR of pyrrolomycin C and D

PM-C	111.8,	119.6,	123.1,	124.0,	124.2,	125.1,	128.8,	129.2,	133.8,	154.5,	183.2
	(s)	(d)	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)	(d)	(d)	(s)	(s)
PM-D	118.5,	121.1,	123.6,	124.8,	125.9,	126.1,	129.9,	130.1,	134.0,	153.7,	183.0
	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)	(d)	(s)	(d)	(s)	(s)

Fig. 7 IR spectrum of pyrrolomycin C (KBr)

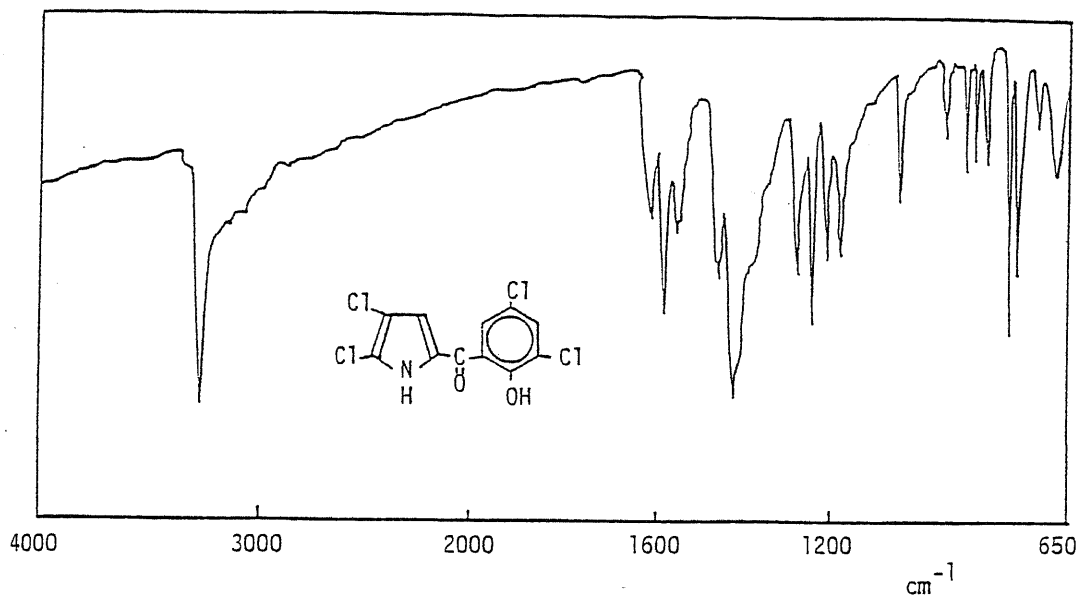
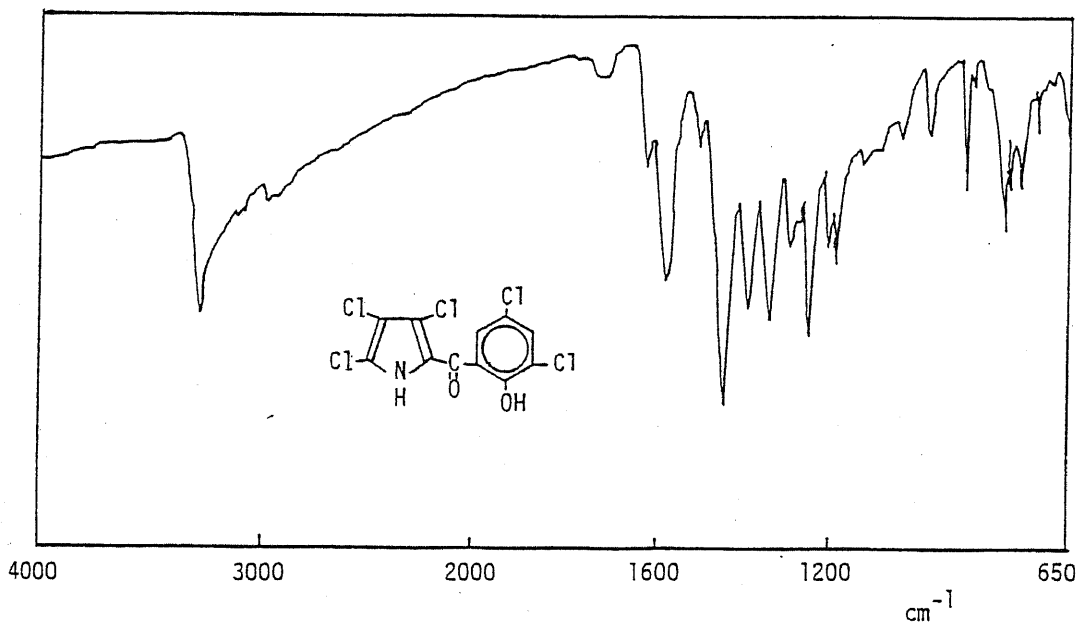


Fig. 9 IR spectrum of pyrrolomycin D (KBr)

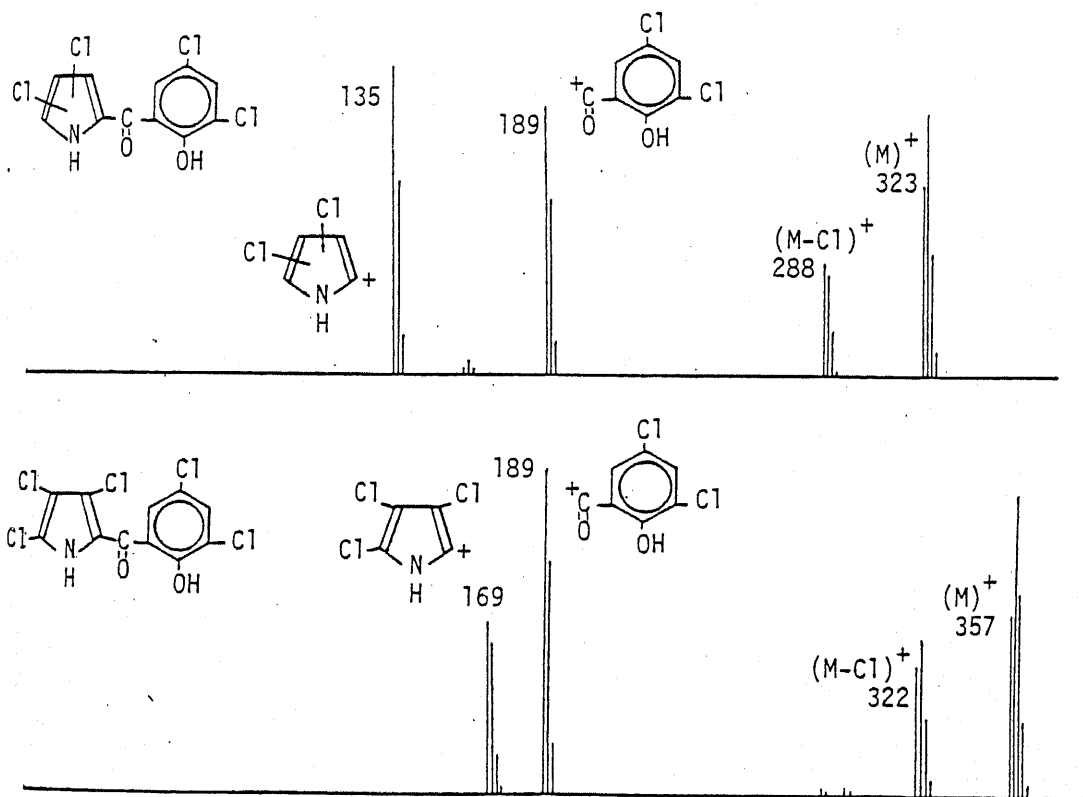


シフトやカップリングにおいても、PM-Cの δ 119.5のダブルレットに対応するシグナルがPM-Dでは δ 121.1にシングレットとして観測される点を除いてはよく類似している。これらのことからPM-CとDは相互に非常に類似した構造であろうと考えた。

そして両者の各種スペクトルデータを、既にX線解析によって構造が決定している pyrrolomycin B のデータと比較、検討した結果以下のことが判明した。

- (1) PM-C, D にはニトロ基は存在しない (IR, 元素分析値)。
- (2) PM-C, D にはメチレン基はないが、カルボニル基が存在する (^{13}C -NMR, IR)。
- (3) PM-C, D はピロール環とベンゼン環がカルボニル基を介して結合している (^1H -NMR, MS)。

Fig. 17 Mass spectra of pyrrolomycin C and D

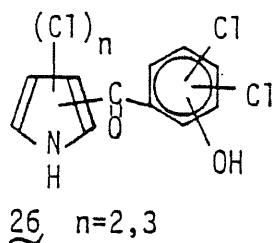


すなわち、Fig. 17 に示したマススペクトルにおいて PM-C, D とともに共通に m/z 189 に塩素 2 原子を含むフラグメントピークが認められ、dichlorosalicyloyl イオンに由来するものと考えられる。また、ピロール環部分に由来するピークとして PM-C では m/z 135, PM-D で

は169が認められる。

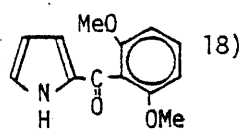
- (4) PM-C, Dのベンゼン環部分はいずれも4置換ベンゼンで, J値はいずれも2.4 Hzであることから2つのプロトンはメタ位にあるものと推定した($^1\text{H-NMR}$)。

以上をまとめると, PM-C, Dの構造は式(26)で示される。

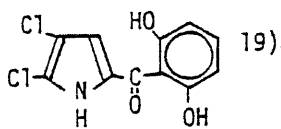


次に, ベンゾイル基のピロール環への結合位置はUV吸収を測定して推定した。メタノール中で測定した pyrrolomycin C の吸収極大は327, 340 nm, pyrrolomycin D は336, 370 nmであった。一方, PM-C, Dの類似化合物の吸収極大はChart 8に示し

Chart 8



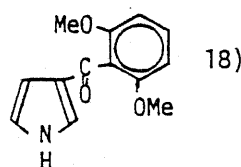
λ_{max} ; 296nm ($\epsilon 1.6 \times 10^4$)



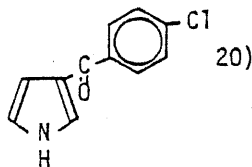
310nm ($\epsilon 1.3 \times 10^4$)

pyrrolomycin C

pyrrolomycin D

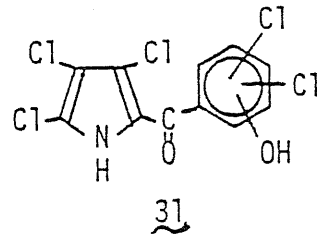
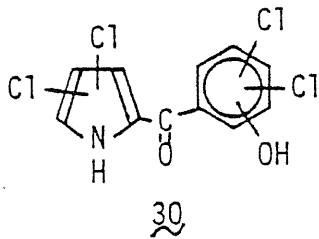
327nm ($\epsilon 1.48 \times 10^4$)336nm ($\epsilon 1.37 \times 10^4$)340nm ($\epsilon 1.46 \times 10^4$)370nm ($\epsilon 1.44 \times 10^4$)

λ_{max} ; 249nm ($\epsilon 1.0 \times 10^4$)



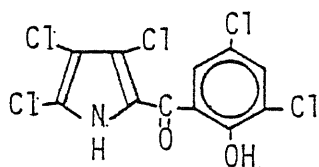
254nm ($\epsilon 1.5 \times 10^4$)

たばかりである。すなわち、 β -benzoylpyrrole誘導体で入max 250 nm付近に吸収極大を示すが α -benzoylpyrrole誘導体では300 nm付近に吸収極大を示す。pyrrolomycin CおよびDはいずれも300 nm以上に吸収極大を示し、より多くの置換基が導入された α -benzoylpyrrole誘導体であると推定できる。従ってPM-Cは式(30)、PM-Dは式(31)で示



される構造であろうと推定したが、ベンゼン環上の塩素原子と水酸基の置換位置、PM-Cにおけるピロール環上の塩素原子の置換位置が決定できなかった。そこで合成的手法によってこれらを解決した。

シリカゲルの分取 TLC で分離しジクロピロール体 (35), トリクロピロール体 (36) に対応するテメフル体 (37, 38) をそれぞれ単離した。両者ともベンゼンから再結晶しいずれも黄色針状晶として得、融点, 元素分析値, $^1\text{H-NMR}$ 等の分析の結果, 37 は pyrrolomycin C に, 38 は pyrrolomycin D に一致することが判明した。従って pyrrolomycin D は 5-(3,5'-dichlorosalicyloyl)-2,3,4-trichloropyrrole と決

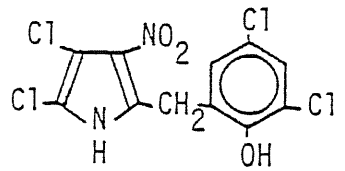


pyrrolomycin D (4)

定した。しかし, pyrrolomycin C はピロール環上の塩素原子の置換位置が決定できなかった。そこで別の方法により PM-C の構造を決定した。

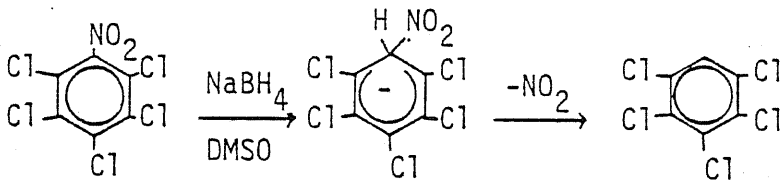
§ 3 Pyrrolomycin C と B との関連

pyrrolomycin B はすでに述べたように X 線解析で構造が決定されている。従って Pyrrolomycin C と B との構造上の関連がつけられれば PM-C のピロール環上の塩素原子の置換位置が決定できることになる。Lamson らは Chart 10 に示した 39 のような多



pyrrolomycin B (2)

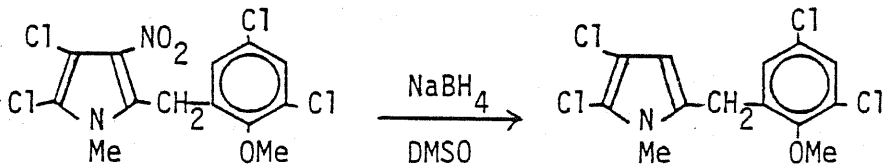
Chart 10



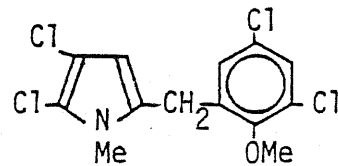
39

クロル化ニトロベンゼンを DMSO 中で水素化ホウ素ナトリウムで処理するとニトロ基の脱離が起ることを報告している²⁵⁾。この脱ニトロ反応を PM-B の

Chart 11

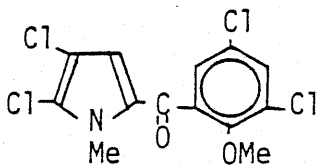


40

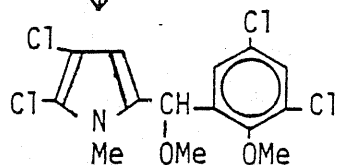
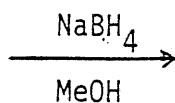


41

DDQ / MeOH

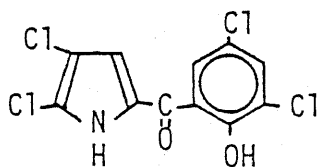


43

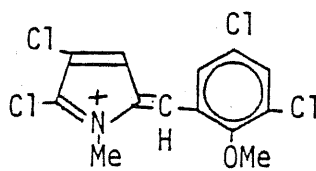


42

N,Oジメチル誘導体(40)に適用し脱ニトロ体(41)を高収率で得た(Char 11, 前ページ)。この脱ニトロ体[5-(3',5'-dichloro-2'-methoxybenzyl)-2,3-dichloro-1-methylpyrrole (41)]の構造は¹H-NMRにおいて δ 5.78 ppmに1H分のシグナルが認められたこと, マススペクトルで m/z 337, 339, 341, 343にM⁺およびその同位体のピークが認められたこと, および元素分析値等によって確認した。さらに脱ニトロ体(41)をケトン基で酸化してpyrrolomycin CのN,Oジメチル体(42)に誘導することを試みたができなかった。しかし, 脱ニトロ体をメタノール中でDDQ(2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone)酸化するとメトキシ体(42)が得られた。メトキシ体[5-(3',5'-dichloro-2'-methoxyphenyl) methoxy-methyl-2,3-dichloro-1-methylpyrrole](42)の構造は¹H-NMRにおいてO-CH₃のシグナルが新たに認められたことおよびマススペクトルにおいて m/z 367, 369, 371, 373にM⁺および³⁷Clによる同位体のピークが認められたこと等によって確認した。一方pyrrolomycin CのN,Oジメチル体(43)をメタノール中で水素化ホウ素ナトリウムで還元するとメトキシ体(42)が得られた。従ってpyrrolomycin CとBの関連がっまPM-Cは5-(3',5'-dichloro-salicyloyl)-2,3-dichloropyrroleと決定した。なお, DDQ-MeOH酸化およびNaBH₄-MeOH還元においては, いずれも中間体(44)を経て, これにMeOHが附加したものと考えている。



pyrrolomycin C (3)

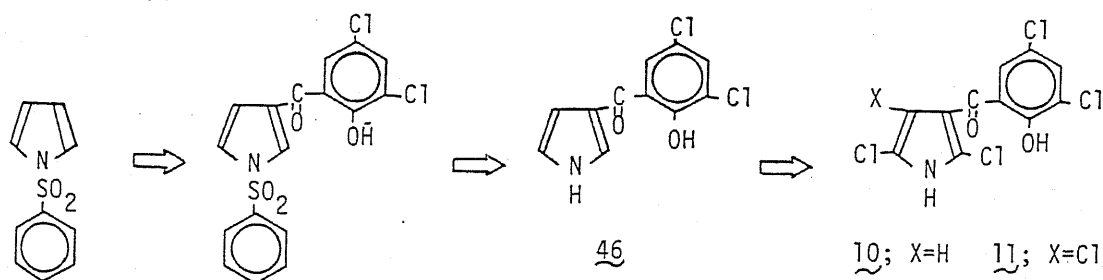


第4節 pyrrolomycin C および D の位置異性体の合成

pyrrolomycin C および D の構造 - 活性相関を究明する一環としてピロール環のβ位にアシル基を結合した pyrrolomycin C および D の位置異性体の合成を試みた。一般にピロール環のα位はβ位に比べ活性に富んでおり、求電子置換反応を行なうと通常はα位に優先的に置換されることが知られている。ところが最近 Rokach らはピロール環の窒素に benzenesulfonyl 基を導入し、α位の活性を抑制しておいて Friedel-Crafts 反応を行なうとβ位に選択的に acyl 基が置換すると報告している²⁶⁾

そこで、この方法を応用し 1-benzenesulfonylpyrrole (45)²⁷⁾ を出発原料として pyrrolomycin C および D の異性体である 3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) および 3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,4,5-trichloropyrrole (11) の合成を試みた。これらの化合物の合成中間体として 3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)pyrrole (46) を設定し、これをクロル化して目的物を得ようとした (Chart 12)。Rokach らの方法²⁶⁾ を応用して 3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)pyrrole (46) の合成

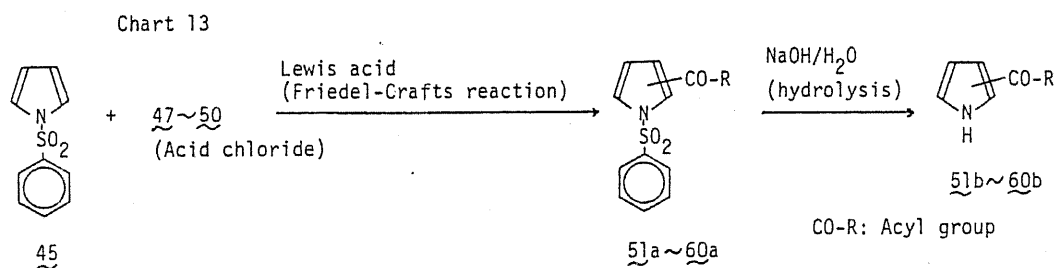
Chart 12



を試みたが文献とは異なり β 位への選択的置換は起らず、むしろ α 位への置換が圧倒的多数であった。そこで Friedel-Crafts 反応に用いる触媒の種類と導入するアシル基の種類を検討した結果、それらのうちによって置換の配向性が異なるという知見を得た。また目的化合物である 3-(3,5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) および 3-(3,5'-dichlorosalicyloyl)-2,4,5-trichloropyrrole (11) は 1-benzene-sulfonylpyrrole (45) を前もって対応するジまたはトリクロル体にしておき、それを Friedel-Crafts 反応によってアシル化する方法で得ることができた。

§ 1 Friedel-Crafts 反応による 1-benzenesulfonylpyrrole のアシル化の配向性の検討

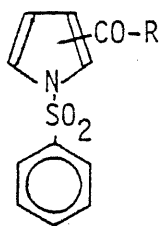
1-benzenesulfonylpyrrole (45) に導入する酸クロライドとしては, benzoyl chloride (47), 3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride (48), m-nitrobenzoyl chloride (49) および p-methoxybenzoyl chloride (50) を用い, 触媒のルイス酸としては無水塩化アルミニウム (以下単に $AlCl_3$ と記す) および無水塩化チタニウム (以下単に $TiCl_4$) を用いた。反応は Chart 13 のとおり行なった。すなわち, 1-benzenesulfonylpyrrole (45) お



よび酸クロライドである 47~50 の塩化メチレン (または 1,2-ジクロロエタン) 溶液にルイス酸を添加し Friedel-Crafts 反応させ, 反応物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより α 置換体と β 置換体 (51a~60a) に分離した。得られた α , β の各置換体の収率は Table 8 にまとめたとおりである。

Table 8 Yields of α and β substituted compounds(%)

Compounds			Lewis acids	
Acyl group	Substitutional position		AlCl ₃	SnCl ₄
Benzoyl	α	<u>51a</u>	2%	51
	β	<u>52a</u>	42	35
3,5-Dichloro-2-methoxybenzoyl	α	<u>53a</u>	0	46
	β	<u>54a</u>	0	3
3,5-Dichlorosalicyloyl	α	<u>55a</u>	45	0
	β	<u>56a</u>	12	0
m-Nitrobenzoyl	α	<u>57a</u>	1	32
	β	<u>58a</u>	32	5
p-Methoxybenzoyl	α	<u>59a</u>	4	37
	β	<u>60a</u>	51	45



CO-R: Acyl group

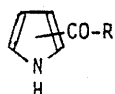
各々のアシル基の置換位置は以下の方法で決定した。51a~60aをChart 13(前ページ)に示した如くアルカリによる加水分解でbenzenesulfonyl基を脱離し α (β)-アシルピロール(51b~60b, Table 9参照, 次ページ)にした。アシルピロールの紫外部吸収では、通常260~300nmと220~250nm付近に2つの吸収帯を有し、 α 置換体と β 置換体を比較すると α 置換体の吸収極大の方が β 置換体より長波長側にあり、吸光度は、 α 置換体では長波長側の方が短波長側より大きく、 β 置換体では逆になる³⁷⁾。たとえば、2-(2',6'-dimethoxybenzoyl)pyrroleでは吸収極大は296nm(ϵ 16,000)であるが、3-(2',6'-dimethoxybenzoyl)pyrroleでは249nm(ϵ 10,000)および274nm

(ϵ 8,200) である¹⁸⁾ $^1\text{H-NMR}$ においては, ピロ-ル環の炭素に結合した3つのプロトンのうち, $\text{C}_4\text{-H}$ のケミカルシフトは α 置換体, β 置換体に向わず最も高磁場にシフトするが, α 置換体と β 置換体の $\text{C}_4\text{-H}$ を比較すると α 置換体の方が高磁場である¹¹⁾。これらの知見に基づいて各置換位置を決定した (Table 9)。また, 2-benzoylpyrrole (51b)⁴⁰⁾ お

Table 9 Some physico-chemical properties of α and β substituted compounds

Compounds		UV λ_{max} MeOH nm(ϵ)	$^1\text{H NMR}$ δ_{CDCl_3} ppm 3($\text{C}_4\text{-H}$)	Rf value on TLC(SiO_2) [*]	
Acyl group	Substitutional position			A	B
Benzoyl	α	51b 246(8530), 305(16360)	6.26	0.39	0.68
	β	52b 248(11620), 280(sh, 6870)	6.65	0.18	0.43
3,5-Dichloro-2-methoxybenzoyl	α	53b 220(sh, 15350), 301(17250)	6.25	0.44	0.73
	β	54b -	6.67	0.28	0.56
3,5-Dichloro-salicyloyl	α	55b 227(16570), 260(5020), 329(sh, 10900), 342(11450)	6.36	0.47	0.76
	β	56b 215(21800), 261(8080), 272(sh, 7770), 342(9950)	6.65	0.29	0.58
m-Nitrobenzoyl	α	57b 226(18550), 256(sh, 10370), 309(15270)	6.32	0.36	0.70
	β	58b 222(20530), 259(15340)	6.77	0.17	0.50
p-Methoxybenzoyl	α	59b 223(9120), 268(sh, 7980), 310(19260)	6.26	0.31	0.67
	β	60b 215(sh, 14150), 279(15870)	6.65	0.12	0.43

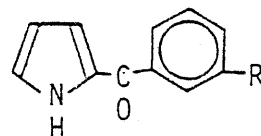
*Solvent system A: benzene-ethyl acetate(5:1)
B: chloroform-methanol(10:1)



CO-R: Acyl group

よび 3-benzoylpyrrole (52b)²⁶⁾ はいずれも文献値の融点と一致し, 2-(3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl)pyrrole (54b)は pyrrolomycin C, D の合成の中同体として得たもの (34, p. 41 参照) と一致した。さらに, 2-(m-nitrobenzoyl)pyrrole (57b) は Chart 14 に示す方法で 2-benzoylpyrrole (51b) に導きその置換位置を確認した。また, Table 10 (次ページ) に示した如く $^1\text{H-NMR}$ においてピロ-ル環上のプロトンの結合定数も α 置換体として文献値¹¹⁾ と一致した。なお, これらの数値はデカッカリ

Chart 14



R=NO₂ (57b)

↓ 1) Pd/H₂

R=NH₂ (61)

↓ 2) HNO₂-H₃PO₂

R=H (51b)

ング法により確認した。

以上の分析結果に基づいてアシル化の配向性を検討すると、酸クロライドとして benzoyl chloride (42), m-nitrobenzoyl chloride (49), p-methoxybenzoyl chloride (50) を用い、触媒に $AlCl_3$ を用いた場合は、

ほぼ Rokach らの報告²⁶⁾と同じく β 置換体が圧倒的に生成したが、 $SnCl_4$ を触媒とした場合 (Rokach らは報告していない) は α 置換体の収率が上昇した。

Table 10 Coupling constants of α acylated pyrroles (Hz)

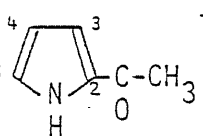
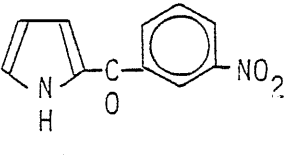
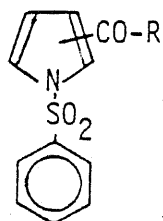
 11)	$J_{3,4}$	$J_{3,5}$	$J_{4,5}$
	3.75	1.35	2.40
 57b	$J_{3,4}$	$J_{3,5}$	$J_{4,5}$
	4.0	1.4	2.5

Table 8 Yields of α and β substituted compounds (%)

Compounds			Lewis acids	
Acyl group	Substitutional position		$AlCl_3$	$SnCl_4$
Benzoyl	α	51a	2%	51
	β	52a	42	35
3,5-Dichloro-2-methoxybenzoyl	α	53a	0	46
	β	54a	0	3
3,5-Dichlorosalicyloyl	α	55a	45	0
	β	56a	12	0
m-Nitrobenzoyl	α	57a	1	32
	β	58a	32	5
p-Methoxybenzoyl	α	59a	4	37
	β	60a	51	45



CO-R: Acyl group

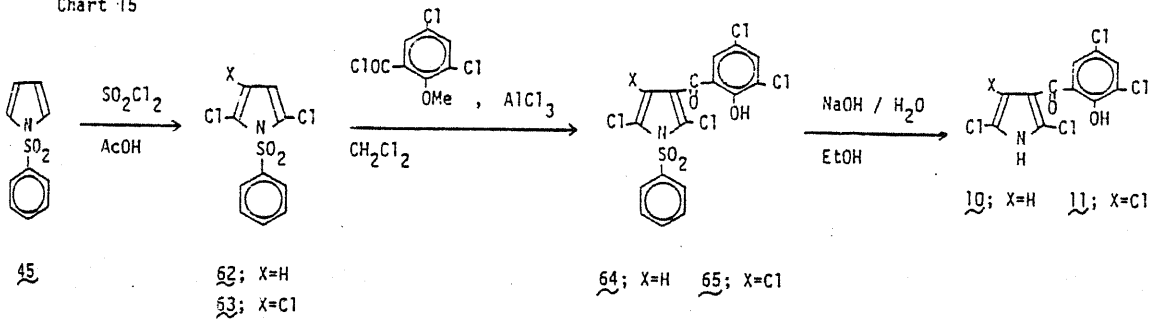
一方、酸クロライドに 3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride (48) を用いた場合は、触媒は $AlCl_3$ でも $SnCl_4$ でも α 置換体の方が高収率で得られたが、 α 置換体に対する β 置換体の相対生成比は $AlCl_3$ を用いた場合の方が $SnCl_4$ の場合より大きかった。Rokachらは β 位に置換が起る理由として求電子試薬の「かたさ」を挙げているが 3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride (48) を試薬として用いた場合は必ずしもそうともいえない結果であった。この理由については試薬のオルト効果も考えられ明確ではない。

なお、 $AlCl_3$ を用いるヒアシリウムイオンとの錯体を形成する際、そのオルト位にあるメトキシ基 [3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride (48) の場合] は脱離し水酸基になるが、パラ位にあるメトキシ基 [p-methoxybenzoyl chloride (50) の場合] は脱離せず、いずれも予想通りの結果であった。

§ 2 pyrrolomycin C, D の異性体の合成

前述した如く 3-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) および 3-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,4,5-trichloropyrrole (11) の合成中副産物として設定した 3-(3,5-dichlorosalicyloyl)pyrrole (46) の合成収率が悪かったので、原料の 1-benzenesulfonylpyrrole (45) をあらかじめクロル化しておいて後にアシル化するという Chart 15 の方法を検討した。45 のクロル

Chart 15

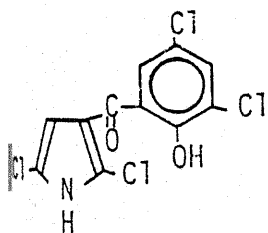


化の際 1-benzenesulfonyl-2,5-dichloropyrrole (62) は比較的収率よく得られたが、1-benzenesulfonyl-2,3,5-trichloropyrrole (63) は低収率でしか得られなかった。1-benzenesulfonyl-2,5-dichloropyrrole (62) に 3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride を Friedel-Crafts 反応させアシルカリ加水分解して目的物質である 3-(3,5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) を 1-benzenesulfonylpyrrole (45) からの収率 35% で得た。同様に 3-(3,5'-dichlorosalicyloyl)-2,4,5-trichloropyrrole (11) を 45 からの収率 0.3% で得た。

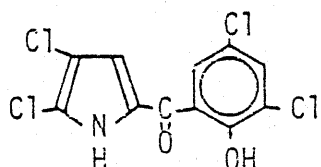
なお、1-benzenesulfonyl-2,5-dichloropyrrole (62) は、マスマスプロトロンで m/z 275, 277, 279 にジクロロ化合物の M^+ およびその同位体のピークが観測されること、 $^1\text{H-NMR}$ で δ 6.08 ppm に pyrrole 環上の 3, 4 位の等価のプロトンがシングレットとして認め

られ、その積分値はベンゼン環のプロトンを対照にすると2H分に相当することによって置換した塩素原子の数とその位置を確認した。1-benzene-sulfonyl-2,3,5-trichloropyrrole (63) についても同様にマススペクトルで m/z 309, 311, 313, 315 にトリクロロ化合物の M^+ およびその同位体のピークが観測され、 $^1\text{H-NMR}$ でも δ 6.13 ppm に1H分のシグナルが認められることにより置換した塩素原子の数、位置を確認した。

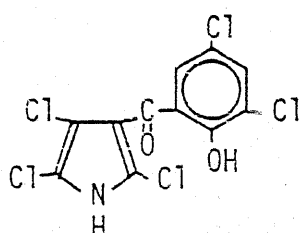
また、3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) はマススペクトルで m/z 323, 325, 327, 329 にテトラクロロ化合物の M^+ およびその同位体のピークが観測されること、および元素分析値は pyrrolomycin C と同じであるが、融点 (10: 184°C, PM-C: 220~221°C), λ_{max} (10: 260nm, PM-C: 327, 340nm), $^1\text{H-NMR}$ におけるピロール環上のプロトンのケミカルシフト (10: 6.47, PM-C: 7.09 ppm) およびシリカゲル TLC の R_f 値 (hexane-EtOAc-AcOH 100:20:1 10: 0.22, PM-C: 0.35) が pyrrolomycin C とは異なり、benzoyl 誘導体がピロール環の β 位に結合していることを証明している。同様に 3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,4,5-trichloropyrrole (11) についてもマススペクトル (M^+ : m/z 357) は PM-D と同じであるが融点 (11: 257~260°C で発泡分解, PM-D: 195~198°C) および TLC (benzene-acetone 2:1 11: 0.83, PM-D: 0.78) が異なり、 β 位に結合しているものと判断した。



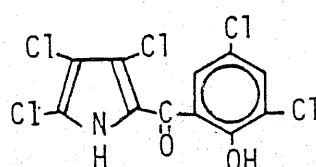
(10)



pyrrolomycin C (3)



(11)



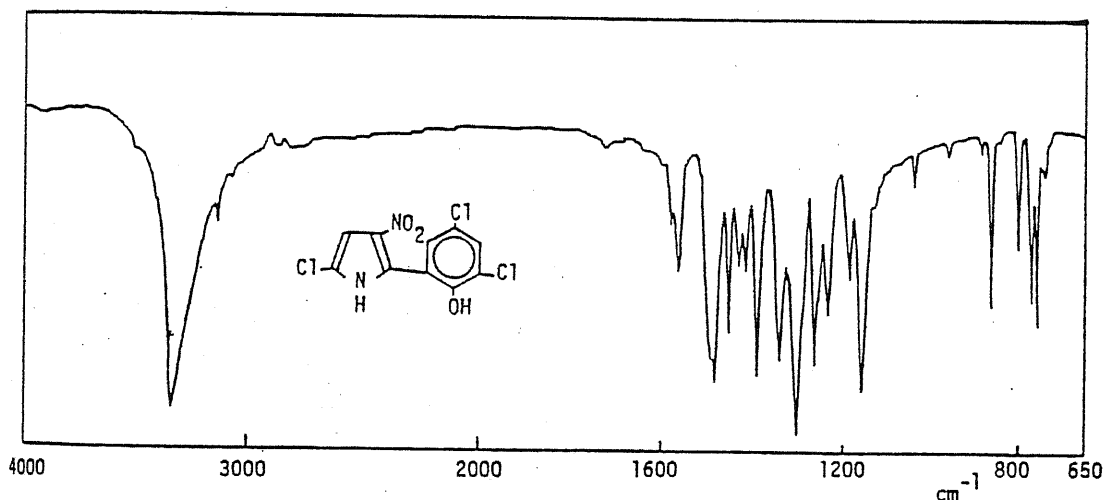
pyrrolomycin D (4)

第5節 pyrrolomycin Eの構造決定

pyrrolomycin Eは融点 250°C 以上の黄色針状晶で中性、酸性水には不溶であるがアルカリ性水や有機溶媒には可溶である。分子式はマススペクトルおよび元素分析値から $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3$ と決定した。この化合物の構造は以下の手順で決定した。

- マススペクトルで m/z 260 ($\text{M}-\text{NO}_2$)⁺が認められること、IRで $1555, 1380\text{cm}^{-1}$ に吸収が認められることからニトロ基が存在する。

Fig. 11 IR spectrum of pyrrolomycin E (KBr)

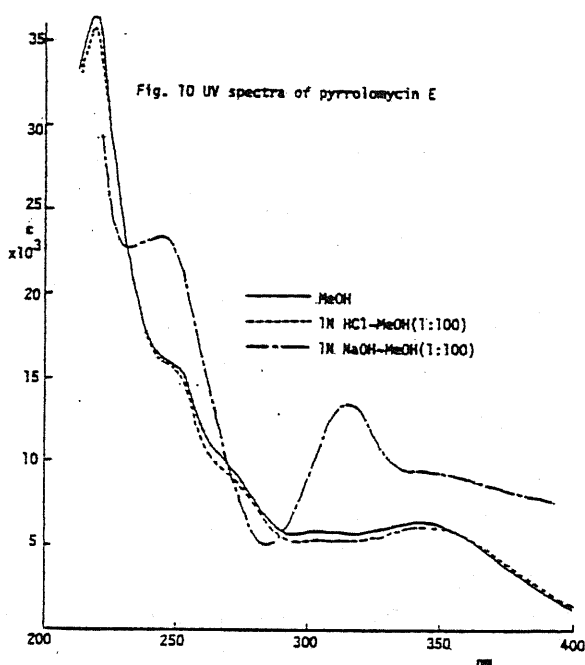


- 重アセトン中で測定した¹H-NMRにおける δ 7.42, 7.54 ppm ($J=2.5\text{Hz}$)のダブルットのシグナルは4置換ベンゼンのメタ位のプロトンに由来すると考えられる。これはpyrrolomycin B, C, Dのベンゼン環部分によく似ている。
- また¹H-NMRで δ 10.3 ppm付近に2H分の広いシグナルが認められ、重水の添加で消失すること、IRで 3300cm^{-1} 付近に強い吸収があることからNH, OHの存在が示唆される。
- ¹H-NMRにおいてPM-Bに認められた δ 4.42 ppm

のメチレンに由来するシグナルがなく, IRにおいてPM-C, Dに認められた 1600cm^{-1} 付近のケトンに由来する吸収もない。これらのことは $^{13}\text{C-NMR}$ において, カルボニル, メチレン炭素に由来するシグナルがないことによっても確認できる。さらに $^{13}\text{C-NMR}$ はすべての炭素は芳香環に由来していることを示唆している。従って, 分子式を考慮するとpyrrolomycin Eはピロール環とベンゼン環が直接結合した構造であろうと推定した。

5) $^1\text{H-NMR}$ において, PM-Aで行なったように, トリフロロ酢酸を加えてピロールのNHの解離をおさえて測定すると, $\delta 6.80$ のシングレットであったシグナルが $J=2.8\text{Hz}$ のダブルットに分裂した。これはピロールNHとの β カップリングに相当しピロール環の β 位の1つは無置換であると考えた。

6) PM-EのUVスペクトルは β -nitro-pyrrole誘導体のスペクトルによく似ている。このことは, PM-Eのニトロ基がピロール環の β 位に置換しているというだけでなく, ピロール環とベンゼン環が同一平面にはなく, 立体障害のため共鳴阻害を起していることが推定でき



る。さらにこの要因は2つの芳香環の結合位置のオルト位に大きな置換基が各々存在することを示唆している。

以上のことを総合して pyrrolomycin E の構造は 2-(3,5'-dichloro-2'-hydroxyphenyl)-5-chloro-3-nitro-pyrrole であると推定した。なお、この構造は PM-E をジアゾメタンで処理して得た N, O ジメチル体 (66) を用いた X 線解析によって確認した。

Chart 16

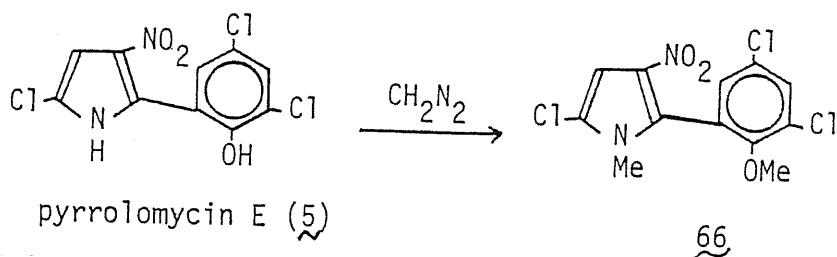
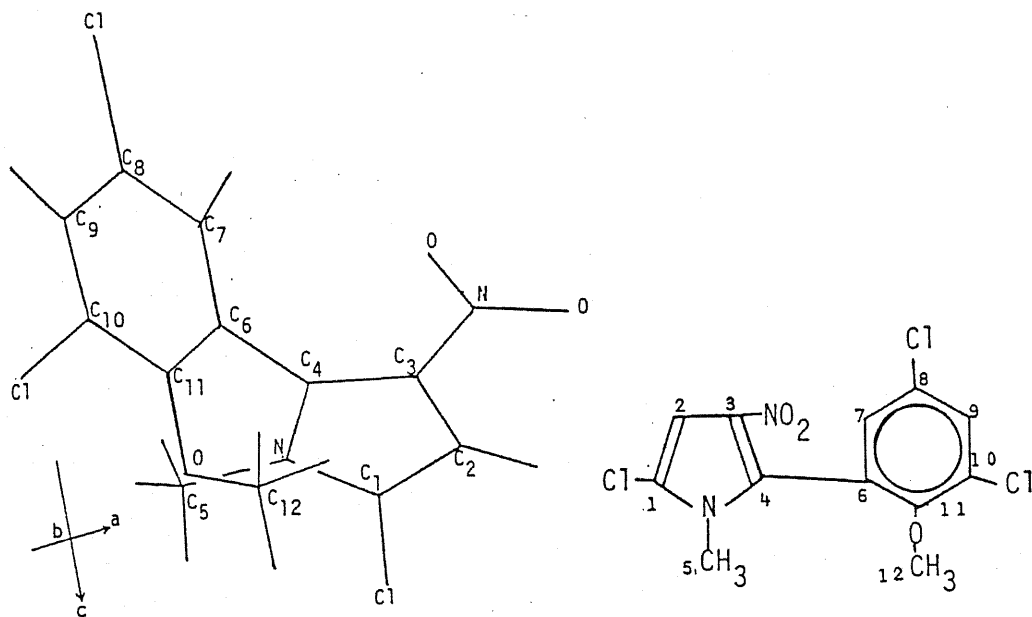


Fig. 18 X-ray analysis of dimethylpyrrolomycin E



Monoclinic, $P2_1/n$

a; 18.260, b; 8.739, c; 8.907, α ; 90, β ; 96.5, γ ; 90

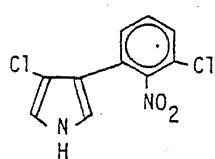
Z; 4, cell volume; 1412\AA^3 , density; 1.57, R; 7%

第3章 臭素イオンの添加培養で得られる pyrrolomycin F₁~F₃ について

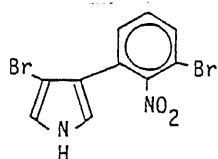
第1節 ハロゲンイオンの添加培養

塩素原子を含有する抗生物質では、生産菌を、臭素イオンを添加した培地で培養し臭素原子を含んだ物質の生産に成功している例が多い。たとえば

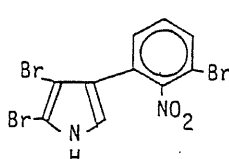
Chart 17



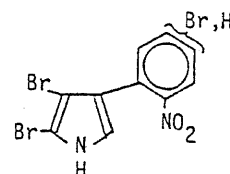
pyrrolnitrin (12)



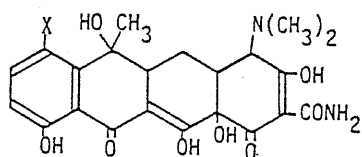
bromonitrin A (67)



bromonitrin B (68)

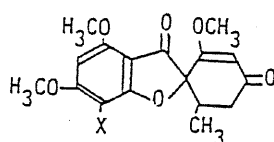


bromonitrin C (69)



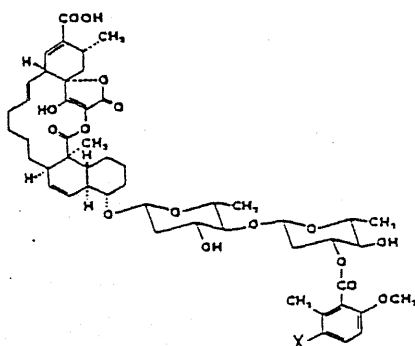
chlorotetracycline (70); X=Cl

bromotetracycline (71); X=Br



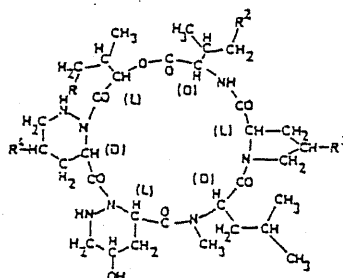
griseofulvin (72); X=Cl

bromo-analogue of 72 (73); X=Br



chlorothricin (74); X=Cl

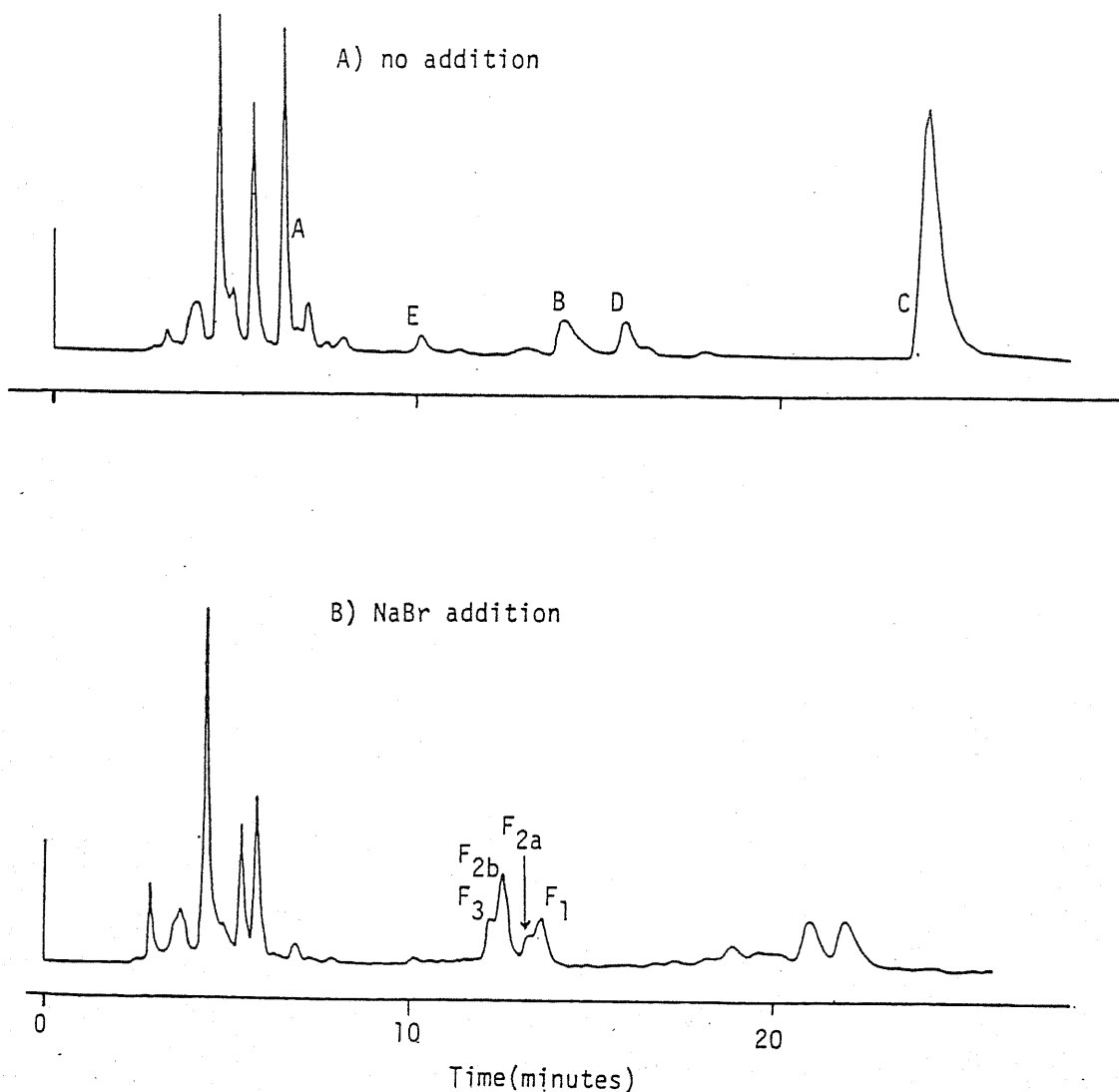
bromothricin (75); X=Br

monamycins (76); R₁, R₂, R₃=H or Me, R₄=Clbromomonamycins (77); R₁, R₂, R₃=H or Me, R₄=Br

す、pyrrolmitrin (12)²⁾ に対する bromomitrin A (67),
 B (68), C (69)²⁸⁾, chlorotetracyclin (70)²⁹⁾ に対する bromo-
 tetracycline (71)³⁰⁾, griseofulvin (72)³¹⁾ に対する bromo-
 analogue (73)³²⁾, chlorothricin (74)³³⁾ に対する bromo-
 thricin (75)³⁴⁾, および monamycins (76)³⁵⁾ に対する bromo-
 monamycins (77)³⁶⁾ などである (chart 17, 前ページ参
 照)。

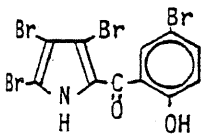
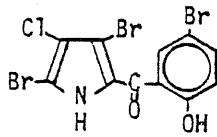
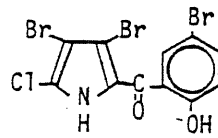
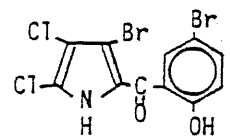
そこで本菌においても塩素以外のハロゲンイオ
 ンを添加して培養した場合、生産物がどう変化す
 るかを検討した。すなわち、培養液中の生産物を

Fig. 19 Effect of NaBr on the production of pyrrolomycin Fs



酢酸エチルで抽出し，HPLCを用いて成分分析を行なった。Fig.19A(前ページ)には通常の培地で培養した場合の各成分の溶出パターンを示した。pyrrolomycin A, E, B, D, Cの順に溶出した。この培地に0.1%の臭化リードを添加して培養した場合の溶出パターンをFig.19Bに示した。臭化リードを添加するとPM-A~Eは生産されず，代わりにpyrrolomycin F₁, F_{2a}, F_{2b}およびF₃と命名した新しい4成分が生産されていることが判った。

次に，臭素イオンの添加量とPM-F各成分の生成比率の関係を調べた。その結果，臭素イオンの添加量を0.05, 0.1, 0.2%と増加させるにつれて，構成ハロゲンが臭素4原子であるPM-F₁の相対的

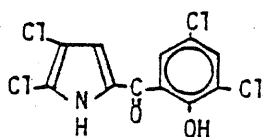
Pyrrolomycin F₁ (6)pyrrolomycin F_{2a} (7)pyrrolomycin F_{2b} (8)pyrrolomycin F₃ (9)

な比率は上昇し，逆に構成ハロゲンが臭素2原子，塩素2原子であるPM-F₃の比率は減少した。臭素3原子，塩素1原子のPM-F_{2a}, F_{2b}の比率は顕著な変化を示さなかった。

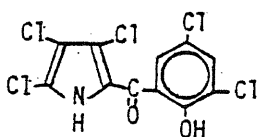
培地にその他のハロゲンイオン(塩素，ヨウ素，フッ素)をそれぞれ0.1%ずつ添加してもHPLCの溶出パターンは無添加の場合と同じであり，抗生物質の総生産量も変化しなかった。従って，ヨウ素，フッ素を構成元素として含んだ新しい抗生物質は生産されていないと解釈した。

かくして，ハロゲンイオンの添加培養の検討を行なったが，臭素のみがとりこまれ臭素を含んだ新物質(PM-F₁~F₃)が生産されることが判った。そこで，臭素イオンの添加培養によって得られた

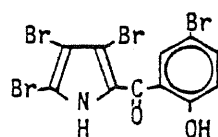
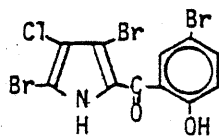
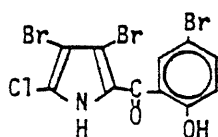
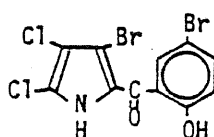
既知の化合物について, PM-F₁~F₃と比較検討して
みる。まず, bromonitrins の場合, bromonitrin B,
Cは親化合物 (pyrrolnitrin) とハロゲン原子の置換
位置が異なっているが, Aは親化合物の塩素の代り
に臭素が置換しただけのものである。また, bromo-
tetracyclin, griseofulvin の bromo-analogue, bromothricin
は「いずれも塩素に代って臭素原子が入っただけの
ものである。(bromomomamycinsは臭素原子の置換位
置は決定されていないが, 生合成的観点から Chart
15 (p. 51) に示した如く単に塩素と臭素が置き代っ
たものと推察される。) ところが, pyrrolomycins に
おいては, 臭素イオンの添加で得られたすべての
化合物 (PM-F₁~F₃) には単に塩素と臭素が置き代っ
ただけのものではなく, 置換位置も変化している。
すなわち, 親化合物 (pyrrolomycin C, D) のベンゼン
環はすべて 3,5-dichloro-体であるのに対し, pyrrolo-
mycin F₁~F₃では 5-bromo-体である。この点で既知



pyrrolomycin C (3)



pyrrolomycin D (4)

Pyrrolomycin F₁ (6)pyrrolomycin F_{2a} (7)pyrrolomycin F_{2b} (8)pyrrolomycin F₃ (9)

の臭素化物とは異なっている。また, PM-F₁~F₃ の
ピロール環部分は, 加えた臭素イオンの量によっ
てモノブロム体, ジブロム体, トリブロム体の生
成比が変化し, あたかも塩素原子と臭素原子が競
争的に置換しているかのようである。これらの二

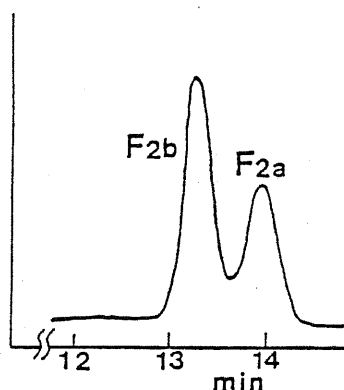
とを考えると、本生産菌において、ベンゼン環部分のブロム化とピロール環部分のブロム化に関与している酵素が、それぞれどのように作用しているのか興味を持たれる。

第2節 pyrrolomycin F₁ ~ F₃の単離と 物理的性状

pyrrolomycin F₁ ~ F₃の単離は, pyrrolomycin A ~ E
に準じて行なった。すなわち, Table 1 に示した
種培地, 生産培地のいずれにも 0.1%の臭化ソーダ
を添加して培養し, 得られた whole broth (25 l) を酸
性にして酢酸エチルで抽出し, アルミナおよびシ
リカゲルのカラムクロマトを順次行ない, さらに
Sephadex LH-20 のカラムクロマトを行ないメタノ
ール-水 (3:2) の混合溶媒で展開すると pyrrolomy-
cin F₁, F_{2a} と F_{2b} の混合物, F₃ の順に溶出した (chart 16)。

Chart 18 Isolation of pyrrolomycin F₁, F_{2a}, F_{2b} and F₃

Whole broth (25 liters)
| adjusted pH 2
EtOAc extract (20 liters)
| conc.
| washed with water (pH 7.5)
Alumina column (200 g)
| EtOAc-conc. HCl (500:7)
Silica gel column (200 g)
| benzene-EtOAc (10:1)
LH-20 column
| MeOH-water (3:2)
PM-F₃ PM-F₂ PM-F₁
160 mg 320 mg 400 mg
|
HPLC
|
PM-F_{2a} PM-F_{2b}



Separation of PM-F_{2a} and F_{2b} by HPLC
Column; TSK-GEL LS-410 (4x300mm)
Eluent; CH₃CN-H₂O-0.2M AcONH₄ (13:7:1)
(pH 6.4 by Et₃N)
Flow rate; 0.7 ml/min.
Detection; UV 313nm

PM-F の各成分は, その構造上ではピロール環上
の置換基が塩素か臭素かというわけがなすがいし
かはないが, 各成分の分子量のうちがいと化学構造に
由来する LH-20 に対するアフィニティの差によっ

で分離できたのであろうと理解できる。しかし、PM-F₂は未だ混合物であり、その分離にはHPLCを用いた。すなわち、分析用のHPLCカラムに1回約1mgのPM-F₂混合物を注入し、PM-F_{2a}とF_{2b}に分離した。この操作を20回くりかえすことによりpyrrolomycin F_{2a}を6mg、F_{2b}を7mg得ることができた。HPLCの大きなカラムを用いて1回の操作で分離することを検討したが、カラムを大きくすると分離が悪くなり成功しなかった。また、展開液のpHが分離に大きな影響をおよぼし、pH 6.4±0.1の範囲をはずれると分離が悪くなった。

かくして得られた各成分の物理的性状はTable 8に示したとおりである。pyrrolomycin Fの各成分とも黄色針状晶でC₁₁H₅NO₂X₄(Xはハロゲン原子を表わす)で示される分子式を有し、シリカゲルTLCでも同じR_f値を示した。溶解性やUV吸収(Fig. 20, 22, 24)も類似し、IR(Fig. 21, 23, 25)では3200cm⁻¹付近にNH, OHの、1620cm⁻¹付近に水素結合したカルボニル基の吸収が共通に観測される。ハロゲンの含有比率は56~64%に達しpyrrolomycin D(49%)よりさらにその比率が高くなっている。

Table 11 Physical data of pyrrolomycin F₁, F_{2a}, F_{2b} and F₃

	pyrrolomycin F ₁	pyrrolomycin F _{2a}	pyrrolomycin F _{2b}	pyrrolomycin F ₃
Appearance	Yellow needles	Yellow needles	Yellow needles	Yellow needles
Melting point(°C)	188-190	182	206-208	192-193
Elemental analysis	Calcd.		Calcd.	Calcd.
	Found		Found ¹⁾	Found
	C	26.28 26.17	28.83 28.70	31.92 31.78
	H	1.00 0.99	1.10 1.14	1.22 1.16
	N	2.79 2.88	3.06 3.09	3.38 3.39
halogen	63.57 63.52	60.04 60.29	55.74 55.21	
Molecular weight(MS)	499	455	455	411
Molecular formula	C ₁₁ H ₅ Br ₄ NO ₂	C ₁₁ H ₅ Br ₃ ClNO ₂	C ₁₁ H ₅ Br ₃ ClNO ₂	C ₁₁ H ₅ Br ₂ Cl ₂ NO ₂
UV λ _{max} ^{MeOH} nm(ε)	268(6000)		267(6400) ¹⁾	268(7000)
	316(13100)		315(15600)	314(17000)
¹ H NMR(δ,acetone-d ₆)	6.91(1H, d)	6.93(1H, d)	6.93(1H, d)	6.98(1H, d)
	7.57(1H, dd)	7.54(1H, dd)	7.53(1H, dd)	7.61(1H, dd)
	7.73(1H, d)	7.78(1H, d)	7.66(1H, d)	7.73(1H, d)
Rf on TLC ²⁾	0.30	0.30	0.30	0.30
Rt on HPLC ³⁾ (minutes)	13.9	13.7	12.8	12.4

1) Analyzed sample was mixture of pyrrolomycin F_{2a} and F_{2b}.

2) SiO₂; hexane-EtOAc-AcOH(100:20:1)

3) TSK-GEL LS-410

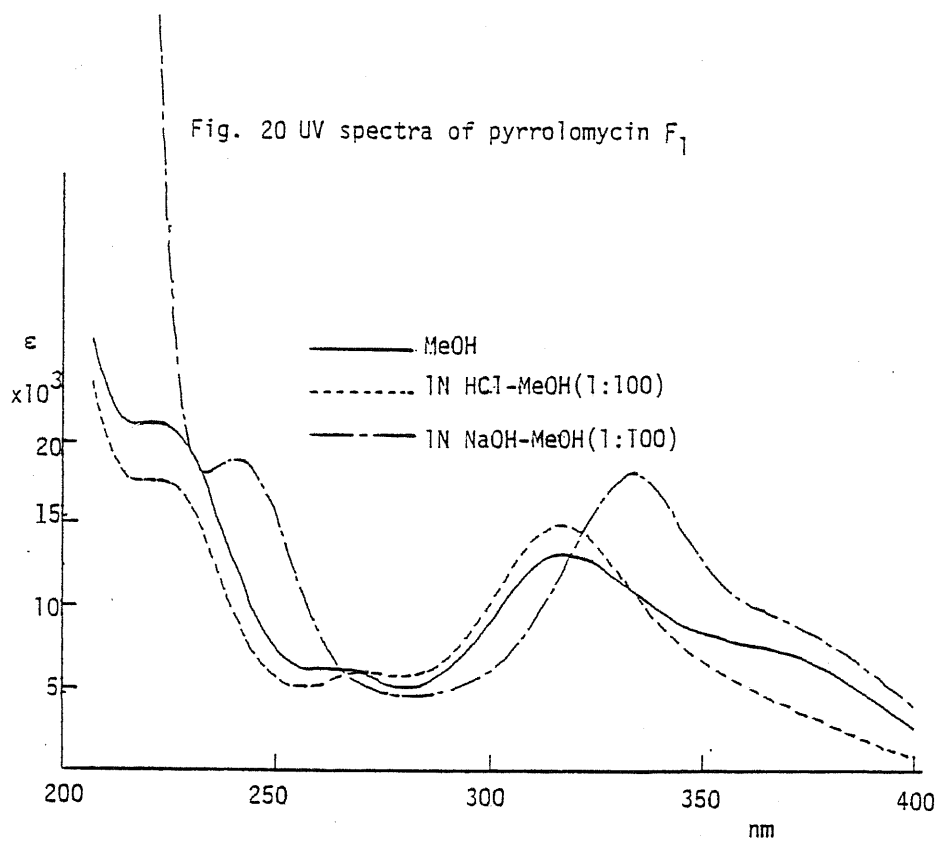
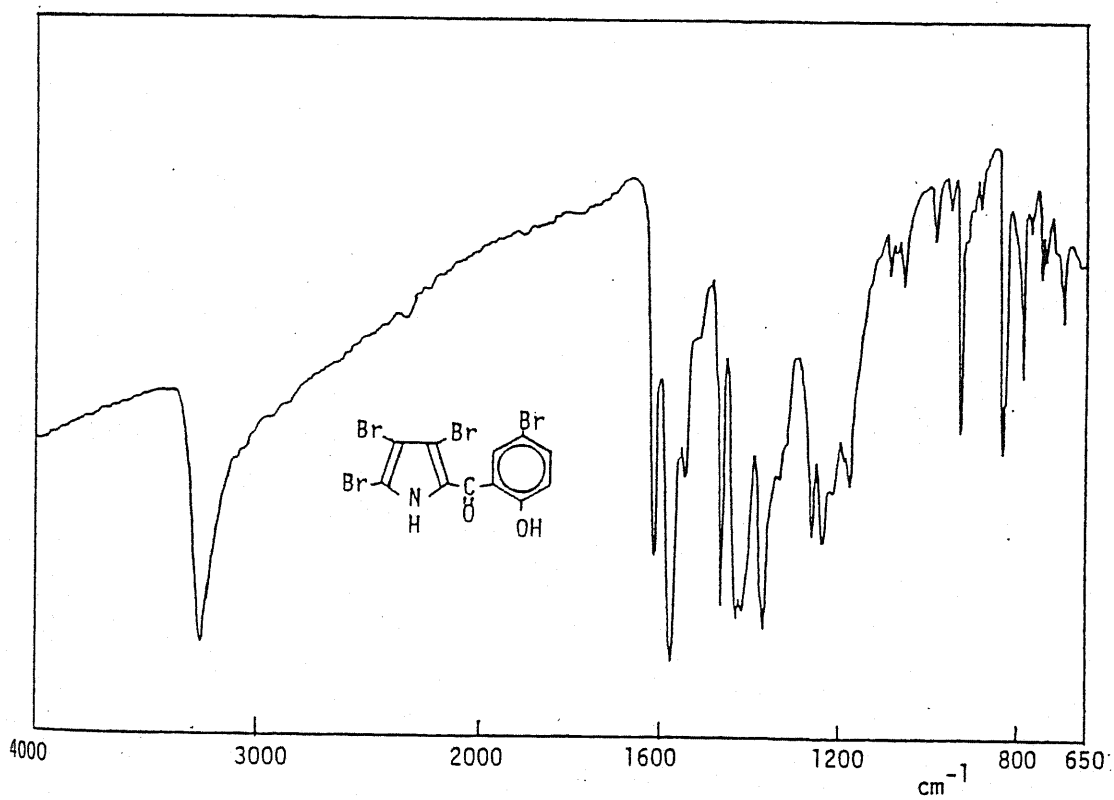
Fig. 20 UV spectra of pyrrolomycin F₇Fig. 21 IR spectrum pyrrolomycin F₇ (KBr)

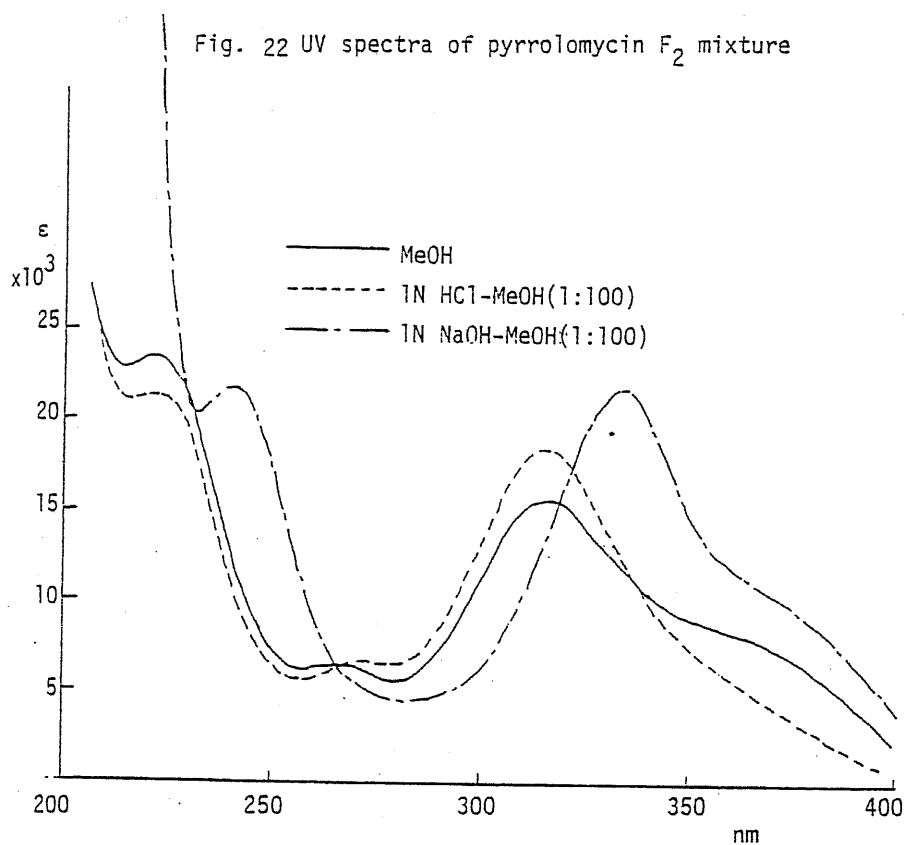
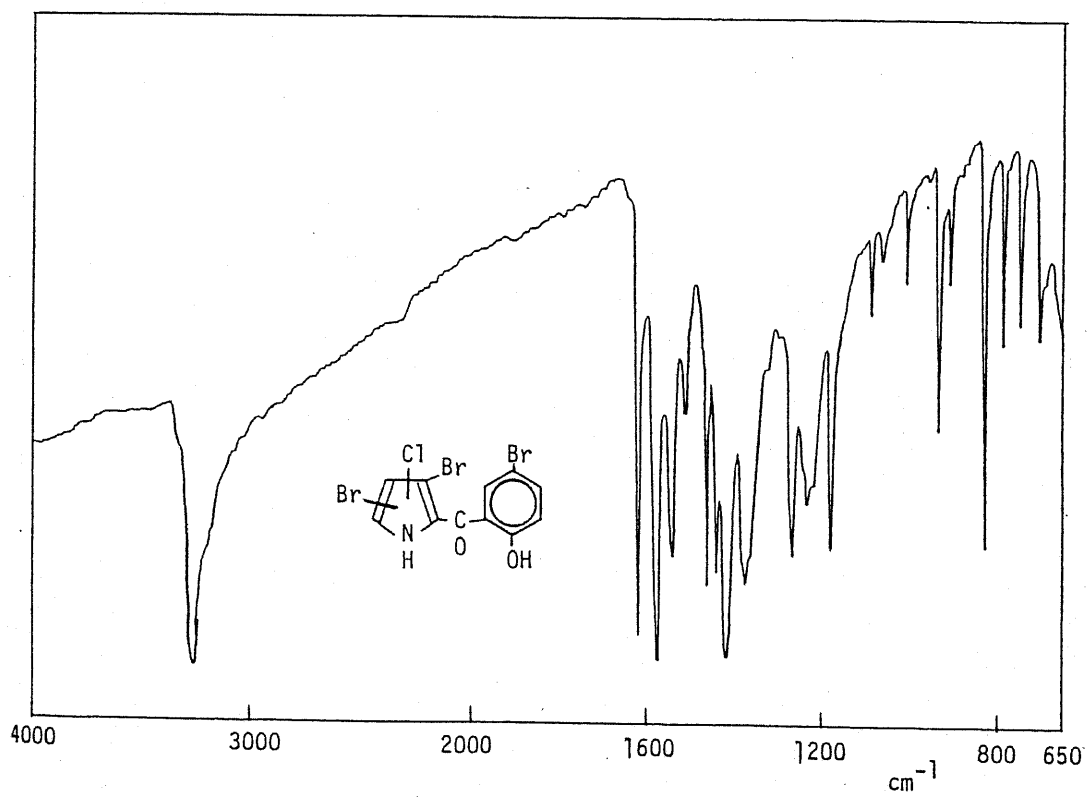
Fig. 22 UV spectra of pyrrolomycin F₂ mixtureFig. 23 IR spectrum of pyrrolomycin F₂ mixture (KBr)

Fig. 24 UV spectra of pyrrolomycin F₃

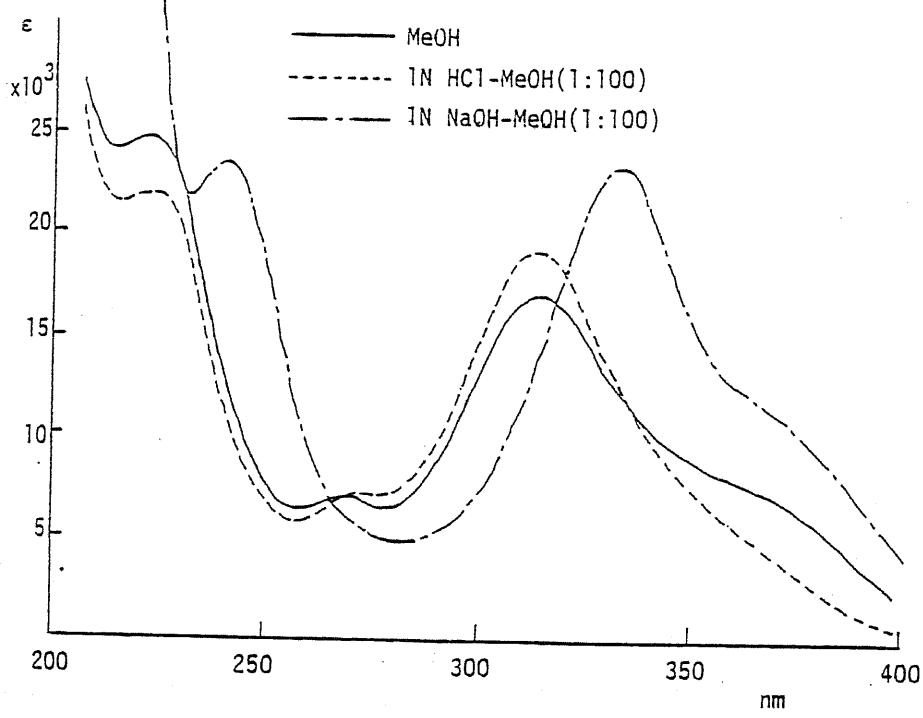
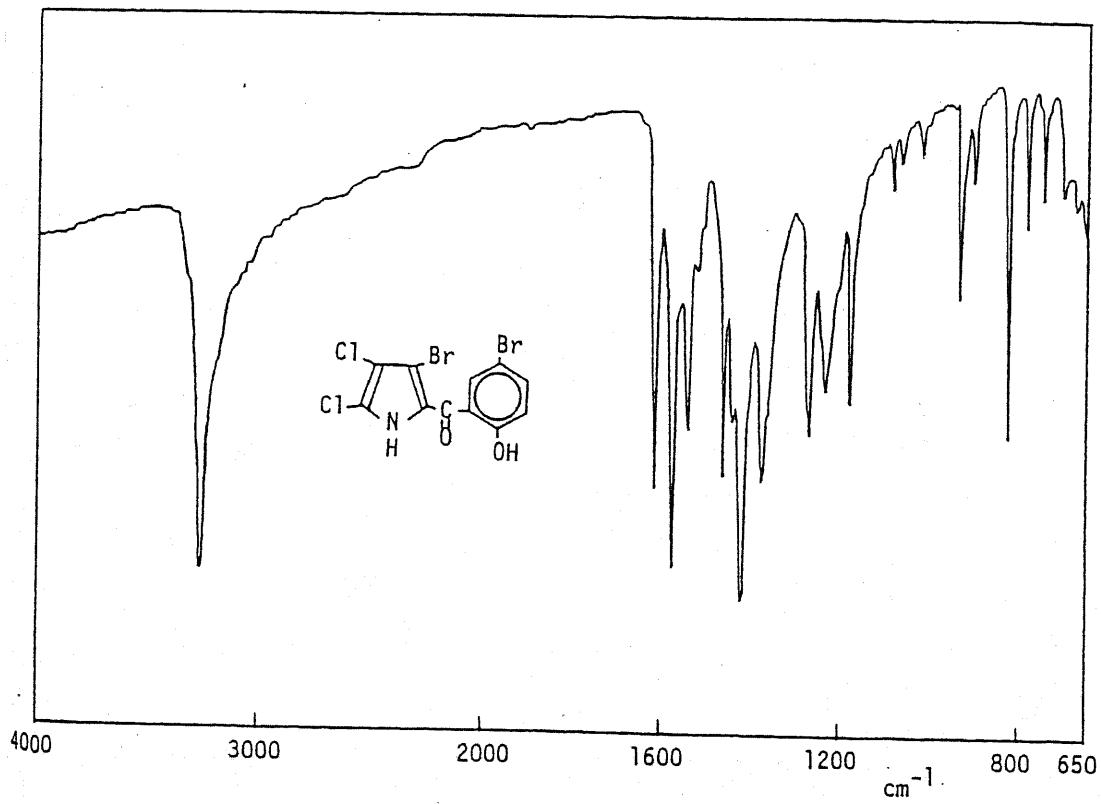


Fig. 25 IR spectrum of pyrrolomycin F₃ (KBr)



第3節 pyrrolomycin F₁~F₃の構造 決定とF₁の合成

前述した如く pyrrolomycin F₁~F₃ の分子式は C₁₁H₅NO₂X₄ (X はハロゲン) で表現され、この式は PM-C と同じである。また IR は PM-F 各成分は相互によく類似し、さらに 3200 cm⁻¹ (NH, OH),

Fig. 21 IR spectrum pyrrolomycin F₁ (KBr)

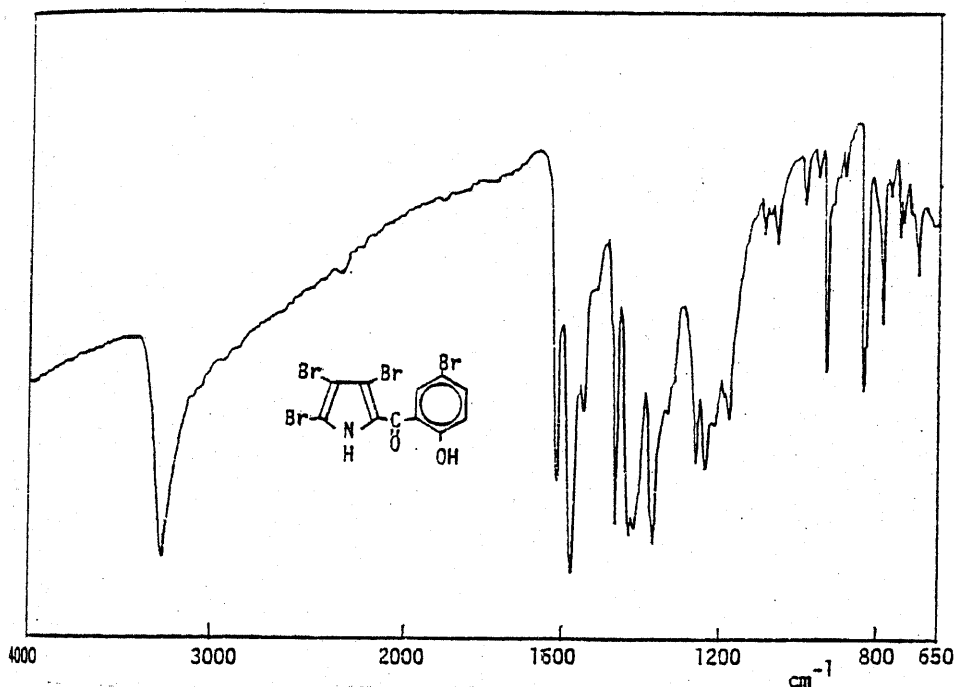
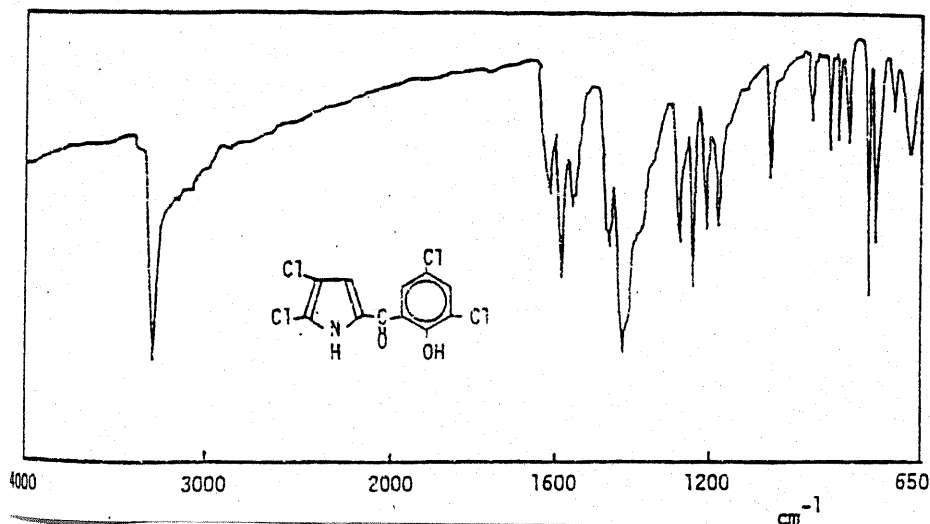


Fig. 7 IR spectrum of pyrrolomycin C (KBr)



1600cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$)付近の吸収はPM-Cにも認められ、これともよく似ている。また、 ^{13}C -NMRでPM-Cでは δ 183.2 ppmに $\text{C}=\text{O}$ のシグナルが認められるがこれに対応するシグナルはPM-F₁, F_{2a}, F_{2b}, F₃にも184.6, 184.2, 183.8, 184.5にそれぞれ検出されている。これらのことを考えるとpyrrolomycin Fの各成分はいずれもPM-Cに(従ってPM-Dにも)非常に類似した構造を有しているものと推測した。従ってPM-Fの各成分の構造解明に当ってはPM-C, Dと比較しつつ行なったが、まずはじめに構成ハロゲンがすべて臭素であるPM-F₁について検討した。Fig. 26 (p. 64)に示したマススペクトルにおいて m/z 199, 201のフラグメントピークは臭素、水酸基で置換されたベンゾイルイオンに由来するものであり、PM-C, Dにおける m/z 189, 191, 193のピークに対応するものと考えた。また m/z 301, 303, 305, 307のピークは3原子の臭素が置換したピロールに由来するものでPM-Dにおける m/z 169, 171, 173に相当するものと考えた。 ^1H -NMRにおける δ 6.91 (d, $J=8.8\text{Hz}$), 7.57 (dd, $J=8.8, 2.5\text{Hz}$) および 7.73 ppm (d, $J=2.5\text{Hz}$)の3つのシグナルは、1,2,4の3置換ベンゼンのものであり、先のマススペクトルからの推定を支持している。以上のことからPM-F₁の構造は、3原子の臭素が置換したピロール環に臭素原子と水酸基が置換したベンゾイル基が結合しているものと推定した。なお、ベンゾイル基の置換位置は、UV吸収において316 nmに吸収極大を有することからピロール環の α 位であるうと推定した³⁷⁾。従ってPM-F₁は 63 式で表わされるものと考えた。

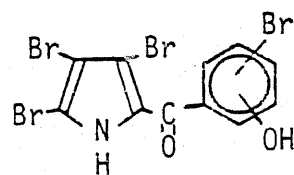


Fig. 26 Mass spectra of pyrrolomycin F components

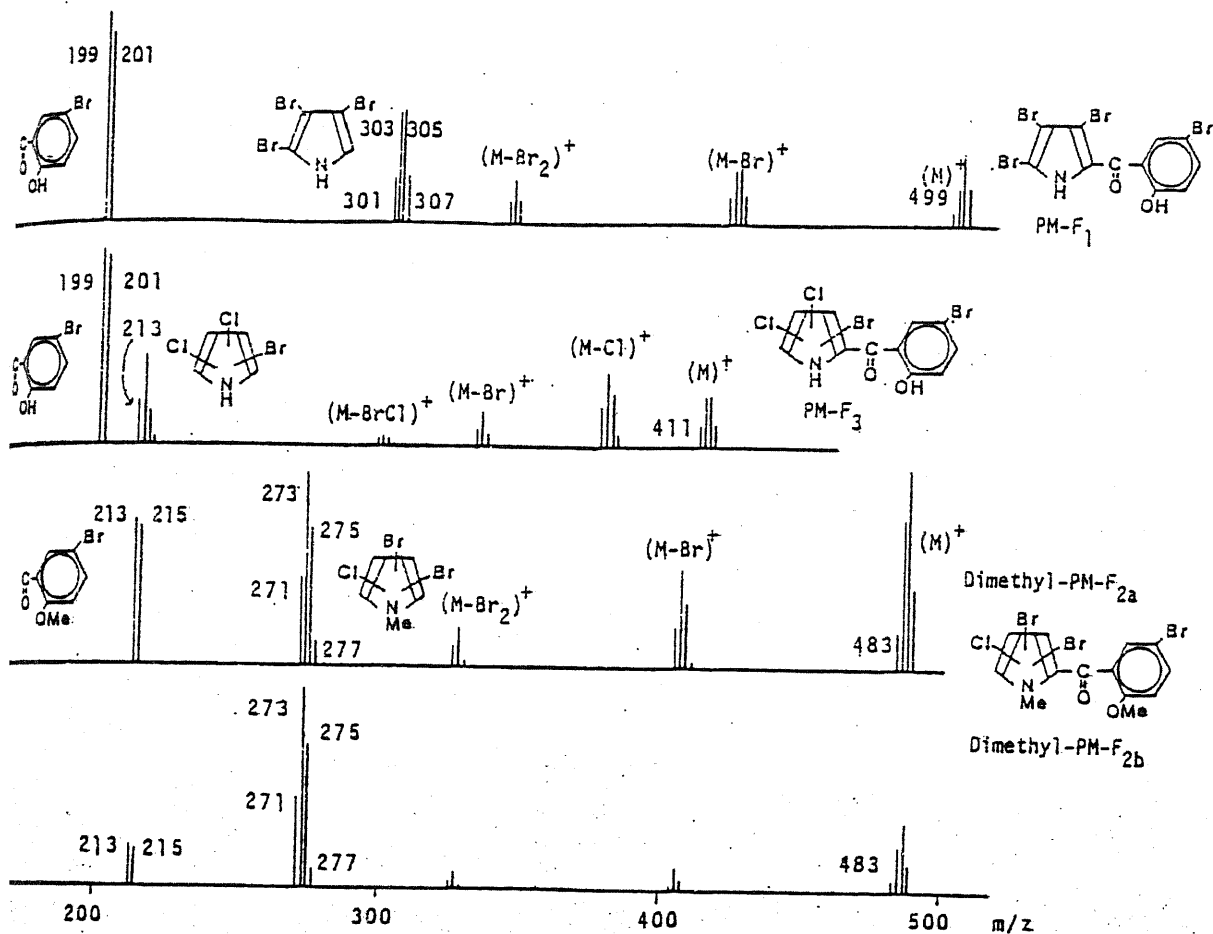
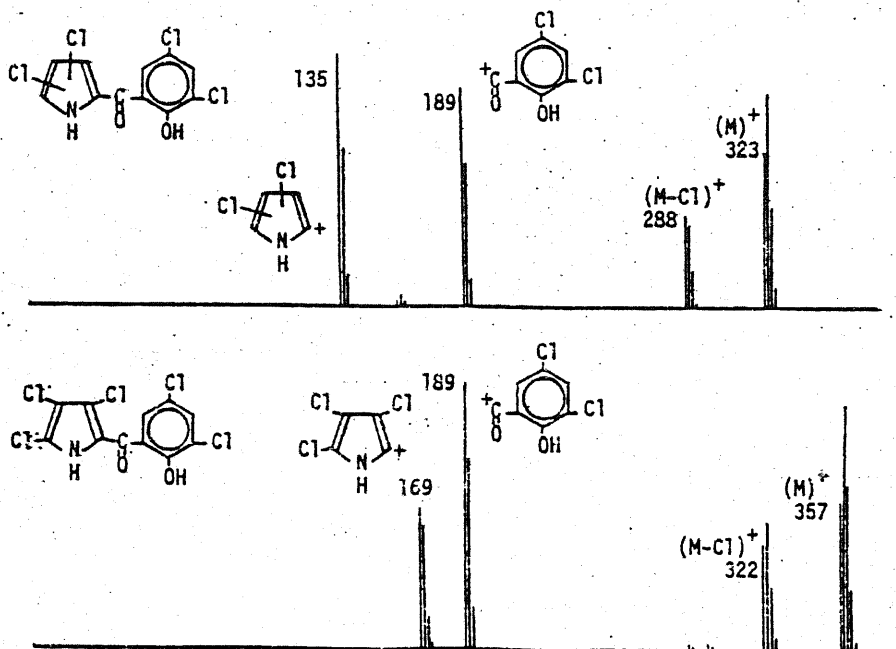
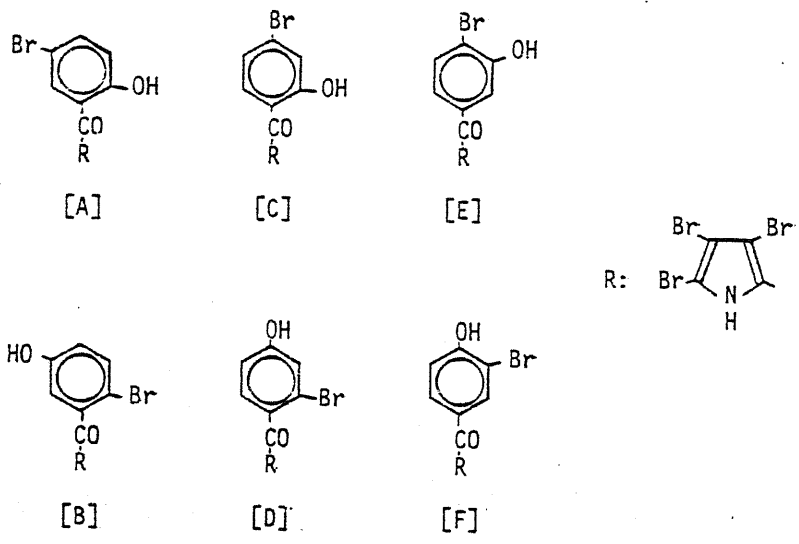


Fig. 17 Mass spectra of pyrrolomycin C and D



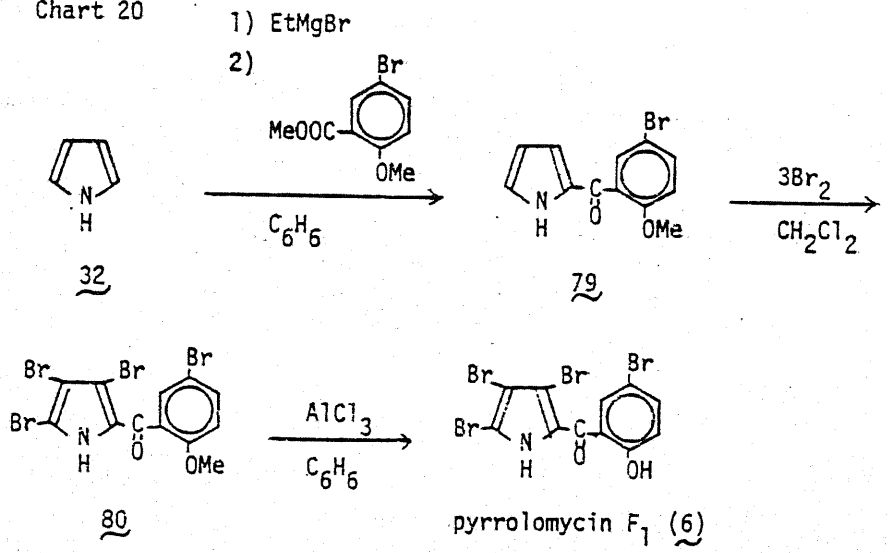
以上の推定に基づくと, pyrrolomycin F₁ に対し
 て可能性のある構造は Chart 19 に示した 6 種類が
 考えられる。このうち, PM-C, D との関連から最
 初に [A] 式を選択し, これを PM-C, D の合成法に準じ

Chart 19



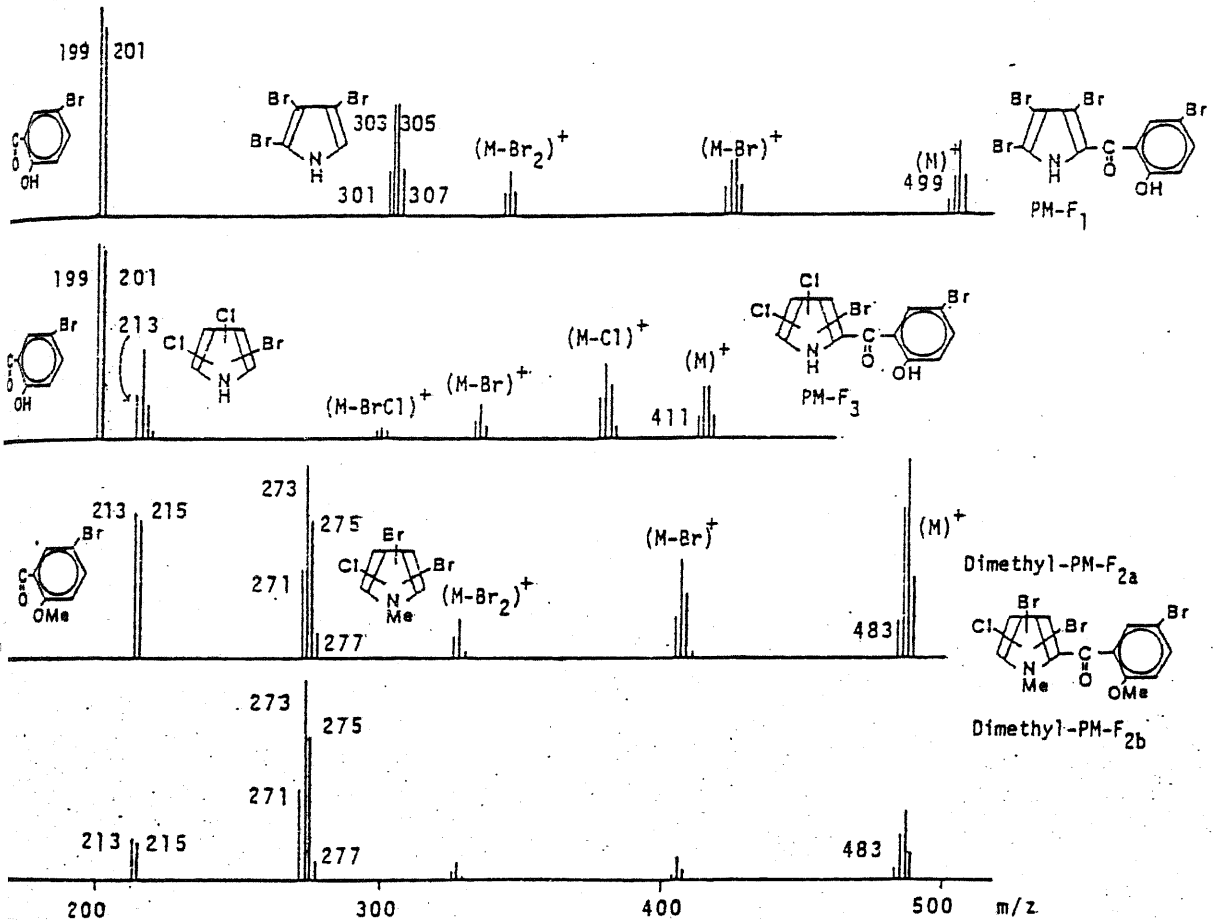
て合成した (Chart 20)。得られた化合物の各種スペ
 クトルデータを測定したところ, 天然に得られた
 pyrrolomycin F₁ に一致した。従って PM-F₁ は 2-(5-
 bromosalicyloyl)-3,4,5-tribromopyrrole と決定した。

Chart 20



次に, pyrrolomycin F_{2a}, F_{2b}, および F₃ の構造
について検討した。PM-F₃ のマスペクトルでは

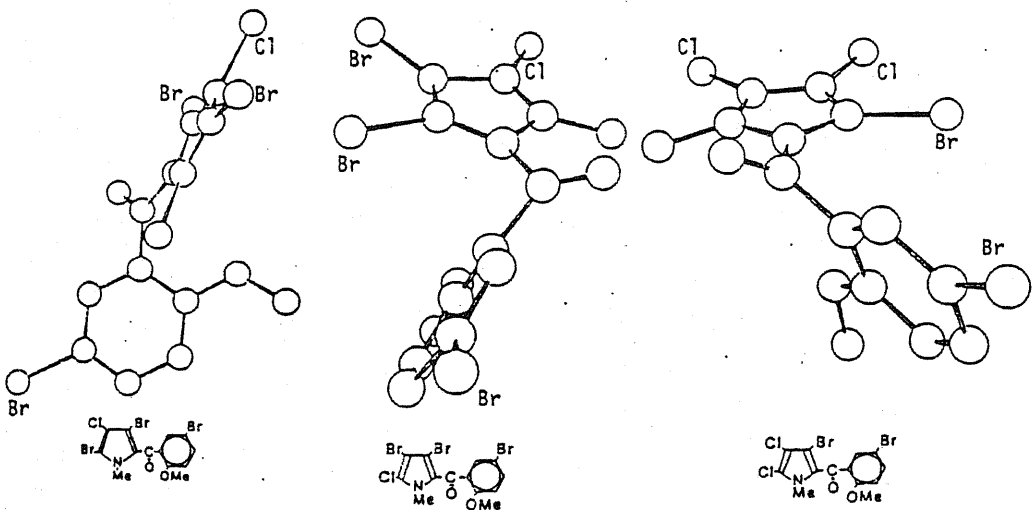
Fig. 26 Mass spectra of pyrrolomycin F components



PM-F₁ と同じく m/z 199, 201 に N,O-dimethyl PM-F_{2a}
および F_{2b} の場合は 14 マス 大きい m/z 213, 215 に
モノブロム化合物のイオンピークが認められる。
また ¹H-NMR では PM-F₁ の 3 置換ベンゼンに由来
するシグナルに対応するシグナルが PM-F_{2a}, F_{2b}, F₃
にも認められる。従ってこれら 3 つの化合物は,
PM-F₁ と同じベンゼン環部分を有しているであら
うと推測した。一方, マスペクトルにおいてピ
ロロル環部分に相当するフラグメントピークは,
PM-F₃ では m/z 213, 215, 271, 273 であり dimethyl-
PM-F_{2a} および F_{2b} では 271, 273, 275, 277 である。

従って PM-F₁ のピロール環部分とのうがいは置換しているハロゲン原子のうちかといふことができ。すなわち、PM-F₁ ではピロール環はすべて臭素原子で置換されているが、PM-F_{2a}, F_{2b} では2原子の臭素と1原子の塩素で置換され、PM-F₃ では1原子の臭素と2原子の塩素で置換されている。さらに PM-F_{2a}, F_{2b} では置換位置が異なっている。このような物質の構造をスペクトルデータや合成的手法によって決定することは非常に困難なことに思われたので、X線解析にゆだねることにした。各天然化合物から直接には、X線に適した単結晶は得られなかったので、ジアゾメタンで処理して得られた N, O ジメチル体 (81, 82, 83) を用いて解析した。各化合物の透視図 (水素原子は示していない) と結晶データは Fig. 27 にまとめて示した。

Fig. 27. X-ray analysis of dimethylpyrrolomycin F_{2a}, F_{2b} and F₃



Triclinic, $\bar{P}1$

a; 8.527, b; 11.676, c; 8.395

α ; 75.2, β ; 110.0, γ ; 95.8

Z; 2, V; 761.3A³, D; 2.12

R=7%

dimethyl PM-F_{2a} (81)

Triclinic, $\bar{P}1$

a; 8.267, b; 12.098, c; 8.260

α ; 103.3, β ; 92.0, γ ; 103.3

Z; 2, V; 762.8A³, D; 2.12

R=10%

dimethyl PM-F_{2b} (82)

Triclinic, $\bar{P}1$

a; 12.008, b; 8.242, c; 8.209

α ; 91.8, β ; 108.2, γ ; 102.8

Z; 2, V; 752.3A³, D; 1.95

R=9%

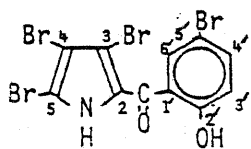
dimethyl PM-F₃ (83)

かくして PM-F_{2a}: 2-(5'-bromosalicyloyl)-3,5-dibromo-4-chloropyrrole, PM-F_{2b}: 2-(5'-bromosalicyloyl)-3,4-dibromo-5-chloropyrrole, PM-F₃: 2-(5'-bromosalicyloyl)-3-bromo-4,5-dichloropyrrole と決定した。このように構造が決定した後には, ¹³C-NMR に対する各炭素の帰属を検討した結果, Table 12 に示したように帰属するのが妥当と推定した。

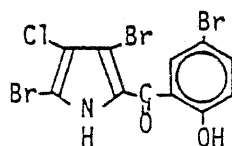
Table 12 ¹³C chemical shifts* of pyrrolomycin F components

Carbon	Chemical shift (multiplicity)			
	PM-F ₁	PM-F _{2a}	PM-F _{2b}	PM-F ₃
2	131.0(s)	130.8(s)	129.5(s)	128.0(s)
3	106.9(s)	103.9(s)	106.6(s)	104.5(s)
4	105.8(s)	116.9(s)	101.6(s)	114.1(s)
5	109.6(s)	107.7(s)	123.0(s)	120.3(s)
1'	124.8(s)	125.5(s)	126.4(s)	125.0(s)
2'	158.7(s)	158.7(s)	158.0(s)	158.5(s)
3'	120.0(d)	120.3(d)	120.0(d)	120.0(d)
4'	137.6(d)	137.3(d)	136.7(d)	137.6(d)
5'	111.4(s)	111.1(s)	111.0(s)	111.4(s)
6'	134.4(d)	134.5(d)	133.8(d)	134.3(d)
C=O	184.6(s)	184.2(s)	183.8(s)	184.5(s)

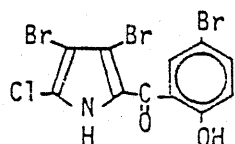
* Chemical shifts are reported in ppm down field from internal TMS.



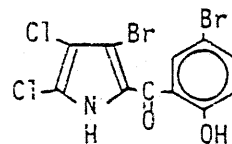
pyrrolomycin F₁ (6)



pyrrolomycin F_{2a} (7)



pyrrolomycin F_{2b} (8)



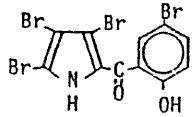
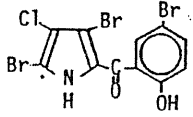
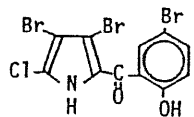
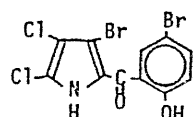
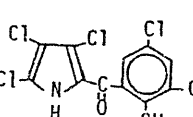
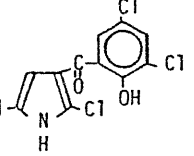
pyrrolomycin F₃ (9)

第4節 pyrrolomycin F₁~F₃の生物学的性状

既に述べたように PM-A~D および PM-C, D の異性体の中では, PM-D と 3-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) が全般的に活性が強かった。そこでこの2成分と PM-F₁~F₃ の抗微生物活性を比較し Table 13 に示した。その結果, グラム陽性細菌に対しては、いずれの成分も非常に強い活性を示し甲乙つけ難い。グラム陰性細菌に対しては, PM-F_{2b} および 10 はほとんど無効であったが, これら以外はすべて中程度の活性を示した。さらに, 真菌に対しては, PM-F₁, F_{2a}, F₃ がほぼ同等で最も強く, PM-D はこれらの中では最も弱かった。以上を総合すると, 臭素原子を含有する PM-F 各成分は, 塩素原子のみを含有する物質 (PM-A~D, 10, 11) より強い抗菌活性を有しているといえる。すなわち, 臭素イオンの添加培養によって活性が強化された物質が得られたことになる。

そこで, 臭素の導入によって得られた誘導体と原物質との生物活性について既知の物質と比較考察した。まず pyrrolnitrin の生産菌から臭素イオンの添加培養によって得られた bromonitrins の活性を, 親化合物である pyrrolnitrin と比較すると, bromonitrin A が $1/8$, B が $1/30$, C が $1/150$ といずれも活性が低下している。²⁸⁾ また, griseofulvin の bromo-analogue は griseofulvin より約 $1/8$ に,³²⁾ bromothricin でも親化合物の $1/2 \sim 3/4$ に³⁴⁾ 活性が低下している。bromomonamycin のうち1成分は対応する monamycin に比べ $1/3$ に活性が低下している。³⁶⁾ bromotetracycline のみが chlorotetracycline とほぼ同等

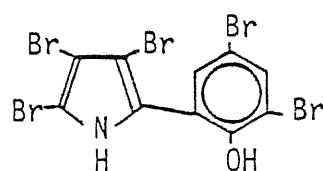
Table 13 Antimicrobial activities of pyrrolomycins and related compound

Test organisms	MIC (ug/ml)					
	 Pyrrolomycin F ₁ (5)	 pyrrolomycin F _{2a} (7)	 pyrrolomycin F _{2b} (8)	 pyrrolomycin F ₃ (9)	 pyrrolomycin D (4)	 (10)
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	< 0.05	≤ 0.025	≤ 0.025	< 0.05	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	< 0.05	0.10	0.05	< 0.05	≤ 0.025	≤ 0.025
<i>Bacillus anthracis</i> No.119	< 0.05	≤ 0.025	0.05	< 0.05	≤ 0.025	—
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	6.25	12.5	> 50	6.25	6.25	100
<i>Citrobacter freundii</i> GN-346	6.25	12.5	> 50	12.5	6.25	100
<i>Salmonella typhi</i> O-901-W	6.25	12.5	> 50	12.5	6.25	100
<i>Shigella sonnei</i> EW-33 Type I	6.25	25	> 50	12.5	12.5	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI-602	6.25	12.5	> 50	6.25	6.25	100
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	3.13	12.5	12.5	3.13	1.56	12.5
<i>Serratia marcescens</i> MB-3848	3.13	3.13	3.13	3.13	12.5	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB-3829	12.5	100	> 50	25	25	100
<i>Candida albicans</i> C-A-24	100	> 100	> 100	100	100	> 50
<i>Cryptococcus neoformans</i> Cr-1	0.78	0.78	3.12	0.78	6.25	3.13
<i>Trichophyton metagrophytes</i> 530324	0.78	0.78	1.56	0.78	6.25	1.56
<i>Trichophyton interdigitale</i> No.2	0.78	0.78	12.5	3.13	12.5	0.78
<i>Aspergillus fumigatus</i> Saito	> 100	> 100	> 100	> 100	100	> 50

の活性を維持している。³⁸⁾これにひきかえ PM-F の各成分は、逆に活性が強化されておりこの点にかいても興味ある結果を示している。

さらに、天然に分離された臭素を含有する抗生物質は一般に海水中から分離された微生物によって生産される例が多く、それらの大部分は弱い活性しか有していない。³⁹⁾ただ一つの例外は pentabromopseudilin (15) で、グラム陽性細菌には強力な活性を示している。⁵⁾しかし、真菌には無効である。

pyrrolomycin F₁ ~ F₃ の急性毒性は Table 4 に示したとおりで、PM-F₁ は約 50 mg/kg の LD₅₀ 値であった。従って、PM-F₁ は PM-D より低毒性であり、臭素イオンの添加培養によって活性の面のみでなく、毒性の面でも有用性の増した化合物が得られたことになる。しかし、3-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) の LD₅₀ は約 500 mg/kg であり、これと比べると 10 倍も毒性が強いことになる。



pentabromopseudilin
(15)

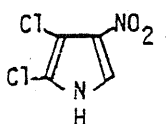
Table 4 Acute toxicity of pyrrolomycins and related compound (intraperitoneally injected to mice)

	LD ₅₀
pyrrolomycin A	21.2 mg/kg
pyrrolomycin B	ca. 100 mg/kg
pyrrolomycin C	<50 mg/kg
pyrrolomycin D	<20 mg/kg
pyrrolomycin F ₁	ca. 50 mg/kg
pyrrolomycin F _{2a} , F _{2b} and F ₃ (mixture)	ca. 50 mg/kg
10*	ca. 500 mg/kg

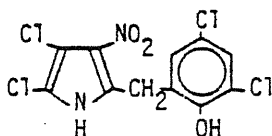
* 3-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole

結 語

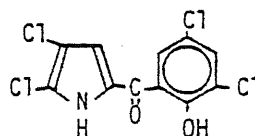
Actinosporangium vitaminophilum sp. nov.
 が生産する 9 種類の抗生物質群 pyrrolomycin A, B, C, D, E, F₁, F_{2a}, F_{2b}. および F₃ を単離し、それぞれの構造を決定した。このうち、pyrrolomycin F₁, F_{2a},



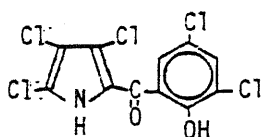
pyrrolomycin A (1)



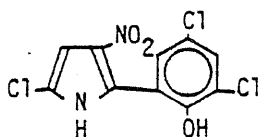
pyrrolomycin B (2)



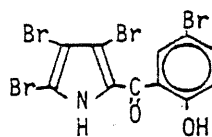
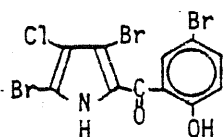
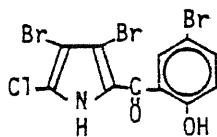
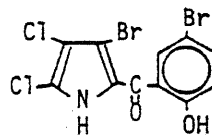
pyrrolomycin C (3)



pyrrolomycin D (4)



pyrrolomycin E (5)

Pyrrolomycin F₁ (6)pyrrolomycin F_{2a} (7)pyrrolomycin F_{2b} (8)pyrrolomycin F₃ (9)

F_{2b} および F₃ は臭素イオンの添加培養によって得られた物質である。これら 9 種類の抗生物質はいずれもピロール環を有し、構成元素として塩素または臭素原子を 1 分子中 2~5 原子含有していることが特徴である。さらに pyrrolomycin A, B, E はピロール環にニトロ基が置換した構造であり天然に得られた最初のニトロピロール抗生物質である。また、pyrrolomycin 群抗生物質は、ピロール環のみの pyrrolomycin A, ピロール環の α 位にベンジル誘導体が置換した B, ベンゾイル誘導体が置換した C, D, F₁, F_{2a}, F_{2b}, F₃, そしてフェニル誘導

体が置換した E とバラエティに富んでいる。

pyrrolomycin 群抗生物質はすべてグラム陽性細菌に有効で、さらに pyrrolomycin A, D, F1, F2a, F2b, F3 はグラム陰性細菌、真菌にも活性を有している。

さらに pyrrolomycin C, D の位置異性体の合成を行なった。すなわちピロ

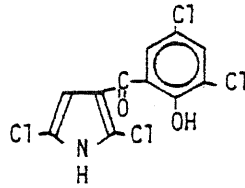
ール環のβ位にベンゾイル誘導体を有する異性体

3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (10) およ

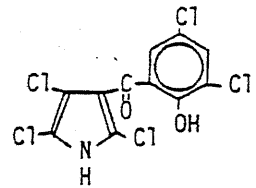
び 3-(3',5'-dichlorosalicylo-

yl)-2,4,5-trichloropyrrole (11) を合成した。このうち、

(10) はグラム陽性細菌、真菌に対し pyrrolomycin D と同等ないしそれ以上の活性を有し、しかも毒性は 1/10 以下に軽減され、より有用性の増した化合物である。



(10)



(11)

謝 辞

本研究を遂行するに当り、終始御指導と御鞭達を賜ゆりまして千葉大学薬学部・坂井進一郎教授に深く感謝致します。また、Pyrrrolomycin B の X 線による構造解析で御協力いただいた広島大学医科学部総合薬学部・中村昭四郎教授、金田幸助教授、東京大学薬学部・飯高洋一教授、貴重御助言をいただいた千葉大学薬学部・相見則郎教授に感謝します。

本研究に際し種々の御便宜と御激励をいただいたことに、明治製菓(株)前専務取締役・仁井田太郎博士、同製菓中央研究所長・石川哲夫博士、同醗酵技術研究所長・伊藤辰男氏、同品研究所博士、同醗酵技術研究所長・近藤信一氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の構造決定、合成あるいは添加培養についで御指導いただいた同薬品研究所の井上重治博士、小山正夫氏、児玉佳男氏、その他種々の御支援を賜り、下さった類々、NMR、マスの分析、下った薬品用発酵研究所の庄村支元、M I 培養、精製に御協力した方々の御支援に感謝致します。

実験の部

- MP : 未補正, ヤマトMP-21型を用いてガラス毛细管で測定した。
- UV : 日立200-20型および日立340型分光光度計を用いて測定した。
- IR : 日立260-10型赤外分光計を用いて臭化カリウム錠として測定した。
- ¹H-NMR : Varian T-60型, 日立R-24型, Varian XL-100型, 日本電子FX-200型を用いてTMSを内部標準として測定し, δ 値で表示した。
- ¹³C-NMR : 日本電子FX-200型を用いてTMSを内部標準として測定し, δ 値で表示した。
- マスマス構造 : 日立M-80型, M-60型, RMU-7M型を用いて測定した。
- HPLC : Waters 液体クロマト装置を用い, カラム; TSK-GEL LS-410 (4x300 mm, 東洋曹達), 展開溶媒; アセトニトリル-水-0.2M酢酸アンモニウム (13:7:1) をトリエチルアミンでpH6.4に調整, 流速; 0.7 ml/分, 検出; UV 313 nm の波長, の各条件で行なった。
- アルミナクロマト : Merck Aluminiumoxide 90 (70~230 mesh) Art. 1097 を使用した。
- シリカゲルクロマト : 和光純薬ワユ-ゲルC-100, C-200, Merck Silica gel 60 (230~400 mesh) Art. 9385 を使用した。
- シリカゲル分取TLC : Merck Silica gel 60F254 (厚さ2mm) Art. 5717 を使用した。

TLC: Merck Silica gel 60F254 (厚さ0.25mm)
Art. 5715 を使用した。

X線解析: Philips X線回折装置を用い, X線原
として $\text{Cu K}\alpha$ を用いた。

MIC: 日本化学療法学会法に従って, 寒天希
釈法により測定した。

乾燥: 溶液の場合は無水芒硝を用い, 溶媒の場
合は各々に適した乾燥法を用いた。

濃縮: 減圧下で行なった。

第1章第2節に関する実験

pyrrolomycin A~E の生産

yeast-starch 斜面寒天培地に培養した Actinosporangium vitaminophilum sp. nov. の3白金耳ずつを Table 1 に示した殺菌してある種培地 20 ml (100 ml 容三角フラスコに入れた) 2本に無菌的に接種し、28°Cで5日間振盪培養し一次種培養液とした。一次種培養液 40 ml を同組成の殺菌した培地 800 ml (5 l 容三角フラスコに入れた) に無菌的に接種し、28°Cで2日間振盪培養し二次種培養液とした。二次種培養液 800 ml を同組成の殺菌した培地 25 l (50 l 容ジャー培養槽に入れた) に無菌的に接種し、28°Cで2日間通気攪拌培養し三次種培養液とした。三次種培養液 8 l ずつを、Table 1 に示した組成の殺菌してある生産培地 270 l を含む 570 l 容培養槽 2基に無菌的に接種し、通気量 250 l/分、攪拌レウの回転数 130 rpm で 28°Cで5日間通気攪拌培養した。培養力価は Bacillus subtilis ATCC 6633 を被検菌とし、 10^{-10} - 10^{-1} デイスク拡散法による生物検定法で測定した。

pyrrolomycin A~E の単離

培養が終了した菌体を含む全培養液 (500 l, pyrrolomycin A として 60 μ g/ml) を塩酸で pH 3 に調整し、酢酸エチル (300 l) で攪拌抽出し、ケイソウ土を濾過助剤として加えフィルタープレスを用いて濾過し、有機層を分離した。有機層を水洗後濃縮乾固し黒色油状物を得、トルエン (5 l) で抽出し、重曹水で洗淨後 2 l に濃縮しアルミナ (1.5 kg) のカラムに吸着させた。このカラムを (1) 酢酸エチル、(2) 酢酸エチル-メタノール (10:1)、(3) 酢酸エチル-

メタノール(1:1), (4) 酢酸エチル - 濃塩酸(100:1) の 4種類 の溶媒系で順次展開すると, (1) の区分に pyrrolomycin A と E が分離して, (2) の区分に pyrrolomycin B が, (4) の区分に pyrrolomycin C と D の混合物が溶出した。PM-A を含む画分(3.5g) を濃縮すると結晶が析出し, ベンゼンから再結晶して 8.8g の黄色針状晶を得た。PM-E を含む画分(1g) を濃縮乾固し酢酸エチルで再結晶して 2.0g の黄色針状晶を得た。PM-B を含む画分(1.5g) を濃縮乾固し酢酸エチルで再結晶し 1.5g の黄色針状晶を得た。PM-C と D の混合物を含む画分(1g) を濃縮しシリカゲルの粉末 20g と混合し溶媒を留去した後, シリカゲルカラム(500g) の上部にのせ, ヘキサン - 酢酸エチル - 酢酸(100:20:1) の混合溶媒で展開し PM-C と D に分離した。それぞれを濃縮乾固し, ベンゼンから再結晶して PM-C を 1.3g, PM-D を 1.2g いずれも黄色針状晶として得た。

第2章第1節に関する実験

pyrrolomycin A (L) の 1-メチル化

pyrrolomycin A (L) (181 mg, 1.0 mmol) を酢酸エチル 15 ml に溶解し, 過剰の CH_2N_2 (エーテル溶液) を加え 1 時間放置後, 5N HCl を加えて余剰の CH_2N_2 を分解し反応液を乾固した。残渣をエタールで再結晶し 1-methylpyrrolomycin A の無色結晶 185 mg (収率 95%) を得た。mp 122~123°C, Anal. Calcd. for $\text{C}_5\text{H}_4\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$: C, 30.80; H, 2.07; N, 14.36; Cl, 36.36. Found: C, 30.75; H, 2.04; N, 14.49; Cl, 36.52. $^1\text{H-NMR}$ (アセト- d_6) 3.82 (3H, s, N-Me), 8.03 (1H, s, C2-H)

methyl 5-chloro-4-nitropyrrole-2-carboxylate (21) および methyl 3,5-dichloro-4-nitropyrrole-2-carboxylate (22)

methyl 4-nitropyrrole-2-carboxylate (20)^{13,14} (3400 mg, 20 mmol) を酢酸 100 ml に懸濁し SO_2Cl_2 (2.43 ml, 31 mmol) を加え室温で 18 時間, さらに 80°C で 1 時間攪拌した。反応液を乾固し酢酸エチル 100 ml で抽出し重曹水で洗浄後乾燥し乾固した。残渣をベンゼンで結晶化し二番品を含め 450 mg (収率 9%) の 22 を得た。この結晶には少量の 21 が混入していたがこれ以上精製せず次の工程に進んだ。一方母液も乾固した後, ベンゼンで再結晶し 1800 mg (収率 42%) の 21 を得た。21: mp 202~204°C, Anal. Calcd. for $\text{C}_6\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_4$: C, 35.23; H, 2.46; N, 13.69. Found: C, 35.10; H, 2.30; N, 13.82. $^1\text{H-NMR}$ (アセト- d_6) 3.89 (3H, s, COMe), 7.35 (1H, s, C3-H)

2,4-dichloro-3-nitropyrrole (18)

22 (450 mg, 1.9 mmol) をメタノール 20 ml に溶解し 10% NaOH 水溶液 10 ml を加え 75~80°C で 1 時間攪拌後メタノールを留去した。残った水溶液を 5% HCl で酸性にし酢酸エチル 100 ml で抽出し、飽和食塩水で洗浄後乾燥し、乾固し 386 mg の遊離酸を無色粉末として得た。このうち 300 mg をエチレンジグリコール 10 ml に溶解し 190°C で 1 時間加熱脱炭酸した後、冷却し酢酸エチルと水を各々 50 ml ずつ加え酢酸エチルに抽出し、重曹水、水で洗浄後乾燥し乾固した。残渣をシリカゲルの分取 TLC (ベンゼン-酢酸エチル 5:1 で展開) によって精製し、ベンゼンから再結晶し思を黄色針状晶として 92 mg (22 からの収率 27%) 得た。mp 184~186°C. Anal. Calcd. for $C_4H_2Cl_2N_2O_2$: C, 26.52; H, 1.14; N, 15.67; Cl, 39.32. Found: C, 27.13; H, 1.14; N, 15.67; Cl, 39.32.

2-chloro-3-nitropyrrole (23)

21 (600 mg, 2.9 mmol) を 22 と同様に加水分解して 502 mg の遊離酸を得た。このうち 410 mg を思を得たのと同様に脱炭酸し 270 mg の粗製物を得、シリカゲルの分取 TLC (ベンゼン-酢酸エチル 5:1 で展開) によって精製し、ベンゼンから再結晶し 23 を褐色結晶として 124 mg (21 からの収率 37%) 得た。mp 173~175°C. Anal. Calcd. for $C_4H_3ClN_2O_2$: C, 32.79; H, 2.06; N, 19.12; Cl, 24.19. Found: C, 32.58; H, 2.24; N, 19.06; Cl, 24.48.

2,3-dichloro-4-nitropyrrole (L) および 2,5-dichloro-3-nitropyrrole (19)

3-nitropyrrole (17)^{9,10} (112 mg, 1.0 mmol) を酢酸 10 ml に

溶解し、ジクロロメタンに溶解した 10% (w/v) SO_2Cl_2 溶液 (2.7 ml, 2.0 mmol) を加え室温で 2.5 時間攪拌し乾固した。残渣を酢酸エチル 5 ml に溶解し再度乾固し黄色のクロル化物 173 mg を得た。これをシリカゲルの令取 TLC (ベンゼン-酢酸エチル 4:1 で展開) により R_f 値の大きい方から順に a, b, c, d の 4 区分に分離し、それぞれシリカゲルからメタノールで溶出し濃縮乾固した。a: ベンゼンから再結晶し 2,5-dichloro-3-nitropyrrole (19) を黄色結晶として 85 mg (収率 47%) 得た。mp 147~150°C
 Anal. Calcd. for $\text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$: C, 26.52; H, 1.10; N, 15.47. Found: C, 27.01; H, 1.09; N, 14.66 b: TLC の結果, 2-chloro-4-nitropyrrole (24) と 2,3-dichloro-4-nitropyrrole (L) の混合 (46 mg) であった。c: ベンゼン-酢酸エチル (10:1) から再結晶し 2,3-dichloro-4-nitropyrrole (L) を黄色結晶として 24 mg (収率 13%) 得た。mp 211~213°C Anal. Calcd. for $\text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$: C, 26.52; H, 1.10; N, 15.47 Found: C, 26.90; H, 1.16; N, 15.30 ここで得たものは培養液から得た Pyrrolomycin A と混融しても融点降下を示さず, TLC, ¹H-NMR においても一致した。d: TLC の結果, 2,4,5-trichloro-3-nitropyrrole (25) (17 mg, 収率 8%) であった。

2-chloro-4-nitropyrrole (24)

3-nitropyrrole (12) (113 mg, 2.0 mmol) を酢酸 10 ml に溶解し 15°C に冷却しつつ, ジクロロメタンに溶解し 10% (w/v) SO_2Cl_2 溶液 (1.36 ml, 1.0 mmol) を加え 4 時間攪拌後溶媒を留去した。残渣をベンゼンから再結晶し 24 を無色針状晶として 79 mg (収率 54%) 得た。mp 159~164°C Anal. Calcd. for $\text{C}_4\text{H}_3\text{ClN}_2\text{O}_2$: C, 32.78; H, 2.06; N, 19.12 Found: C, 33.02; H, 2.01; N, 18.77

2, 4, 5-trichloro-3-nitropyrrole (25)

3-nitropyrrole (17) (112 mg, 1.0 mmol) を酢酸 10 ml に溶解し SO_2Cl_2 (405 mg, 3.0 mmol) を加え室温で 4 時間攪拌後乾固した。残渣 (230 mg) を酢酸エチル 50 ml で抽出し重曹水で洗浄, 乾燥後乾固した。ベンゼンから再結晶し 25 を褐色プリズム晶として 123 mg (収率 57%) 得た。mp 182°C (decomp.)

Anal. Calcd. for $\text{C}_4\text{HCl}_3\text{N}_2\text{O}_3$: C, 22.30; H, 0.47; N, 13.00. Found: C, 23.77; H, 0.66; N, 12.45

第2章第3節に関する実験

2-(3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl)pyrrole (34)

pyrrole (32) (670 mg, 10 mmol) を乾燥ベンゼン 30 ml に溶解し, 冷却下に EtMgBr の 3 mol エーテル溶液 (4 ml, 12 mmol) を加えた後, 20°C で 30 分間攪拌した。この溶液に methyl 3,5-dichloro-2-methoxybenzoate (2200 mg, 10 mmol) を加え, 25°C で 1 時間攪拌した。反応液を 100 ml の氷水に注ぎ, 濃塩酸 5 ml を加え酸性にし有機層を分離し, 乾燥後乾固した。残渣をヘキサンで結晶化し 34 を無色結晶として 1060 mg (収率 39%) 得た。mp 114~115°C, Anal. Calcd. for $C_{12}H_9Cl_2NO_2$: C, 53.36; H, 3.36; N, 5.19; Cl, 26.25. Found: C, 54.01; H, 3.13; N, 5.07; Cl, 25.99 IR: 3290 (NH, OH), 1635 (C=O)

5-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,3-dichloropyrrole (37) から 5-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,3,4-trichloropyrrole (38)

34 (238 mg, 0.88 mmol) を乾燥ジクロロメタン 15 ml に溶解し, 冷却下に SO_2Cl_2 (370 mg, 2.74 mmol) を加え 20°C で 1 時間攪拌し乾固した。残渣に乾燥ベンゼン 30 ml を加え再度濃縮乾固後, 残渣に新たに乾燥ベンゼン 30 ml を加え溶解し, 無水 $AlCl_3$ (250 mg, 1.87 mmol) を加え 20°C で 2 時間激しく攪拌した。反応液を氷水 100 ml に注ぎ濃塩酸 5 ml を加え酸性にして有機層を分離し, 水洗, 乾燥後乾固して 37 と 38 の混合物 300 mg を黄色粉末として得た。これをシリカゲルの分取用 TLC に行しヘキサン-酢酸エチル-酢酸 (100:20:1) で展開し, R_f 0.45 の区分のシリカゲル粉末をかきとり酢酸エチル-酢酸 (10:1) で溶出し溶媒を留去して黄

色結晶 110mg を得た。ベンゼンから再結晶して 37 の黄色針状晶 59mg (収率 18%) を得た。mp 220~221°C
 Anal. Calcd. for $C_{11}H_5Cl_4NO_2$: C, 40.66; H, 1.55; N, 4.31; Cl, 43.63. Found: C, 40.92; H, 1.53; N, 4.24; Cl, 43.26

一方分取用 T L C の R_f 0.28 の区分から同様に操作して 90mg の粗結晶を得、ベンゼンから再結晶して 38 の黄色針状晶 58mg (収率 16%) を得た。mp 195~198°C, Anal. Calcd. for $C_{11}H_4Cl_5NO_2$: C, 36.76; H, 1.12; N, 3.90; Cl, 49.32. Found: C, 36.41; H, 1.10; N, 3.78; Cl, 49.58

こゝに得た 37, 38 はそれぞれ培養液から得た pyrrolomycin C, D と混融しても融点降下を示さず, IR, ¹H-NMR もそれぞれ一致し, 37 は PM-C, 38 は PM-D と同定した。

N, O-dimethylpyrrolomycin B (40)

pyrrolomycin B (3) (320mg, 0.90mmol) を酢酸エチル 20ml に溶解し過剰の CH₂N₂ (エーテル溶液) を加え室温で 1 時間放置した。反応終了後余剰の CH₂N₂ を酢酸を加えて分解後, 乾固した。残渣をメタノールから再結晶し 40 を 271mg (収率 78%) 得た。mp 172~173°C. Anal. Calcd. for $C_{13}H_{10}Cl_4N_2O_3$: C, 40.66; H, 2.65; N, 7.39; Cl, 36.92. Found: C, 40.94; H, 2.65; N, 7.25; Cl, 36.65. ¹H-NMR (CDCl₃) 3.48 (3H, s, N-Me), 3.82 (3H, s, O-Me), 4.53 (2H, s, -CH₂-), 6.85 (1H, d, J=2.4Hz, ベンゼン環), 7.36 (1H, d, J=2.4Hz, ベンゼン環). IR 1505, 1330cm⁻¹ (NO₂)

5-(3,5'-dichloro-2'-methoxybenzoyl)-2,3-dichloro-1-methylpyrrole (41)

40 (197mg, 0.51mmol) を DMSO 25ml に溶解し

NaBH₄ (400 mg, 10.5 mmol) を加え 20°C で 8 時間攪拌後, 50 ml の酢酸エチルと水を加え酢酸エチル層を分離し飽和食塩水で洗浄後乾燥し, 濃縮乾固して 41 を無色アワ状粉末として 149 mg (収率 85%) 得た。 Anal. Calcd. for C₁₃H₁₁Cl₄NO: C, 46.05; H, 3.27; N, 4.13; Cl, 41.82. Found: C, 44.66; H, 3.38; N, 4.52; Cl, 40.77. ¹H-NMR (CDCl₃) 3.35 (3H, s, N-Me), 3.78 (3H, s, O-Me), 3.87 (2H, s, -CH₂-), 5.78 (1H, s, (4-H) ピロール環), 6.88 (1H, d, J=2.4 Hz, ベンゼン環), 7.27 (1H, d, J=2.4 Hz, ベンゼン環), MS m/z 337(M)⁺, 339(M+2)⁺, 341(M+4)⁺, 343(M+6)⁺

5-(3',5'-dichloro-2'-methoxyphenyl)-methoxy-methyl-2,3-dichloro-1-methylpyrrole (42) (41 の DDQ 酸化)

41 (40 mg, 0.12 mmol) をメタノール 5 ml に溶解し, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (DDQ) (40 mg, 0.18 mmol) を加え室温で 8 時間反応させた。反応液を濃縮乾固し残渣をシリカゲルの分取 TLC に付しベンゼンで展開し, シリカゲルからメタノールで溶出し, ベンゼンから結晶化して 42 を無色結晶として 8 mg (収率 18%) 得た。 mp 67~74°C ¹H-NMR (CDCl₃) 3.32 (3H, s, N-Me), 3.60 (3H, s, O-Me), 3.62 (3H, s, O-Me), 5.52 (1H, s, -CH), 5.61 (1H, s, (4-H) ピロール環), 7.36 (2H, s, ベンゼン環) MS m/z 367(M)⁺, 369(M+2)⁺, 371(M+4)⁺, 373(M+6)⁺

N, O-dimethylpyrrolomycin C (43)

pyrrolomycin C (3) (325 mg, 1.0 mmol) を酢酸エチル 20 ml に溶解し, 室温で過剰の CH₂N₂ (エチル溶液) を加え 10 分間反応させ余剰の CH₂N₂ を酢酸を加えて分解し, 反応液を濃縮乾固し 43 を無色粉末として 346 mg (収率 98%) 得た。 mp 85~87°C.

Anal. Calcd. for $C_{13}H_9Cl_4NO_2$: C, 44.23; H, 2.57; N, 3.97; Cl, 40.17. Found: C, 44.04; H, 2.49; N, 3.88; Cl, 40.35. 1H -NMR ($CDCl_3$) 3.83 (3H, s, N-Me), 4.06 (3H, s, O-Me), 6.50 (1H, s, C₄-H, ピロール環), 7.19 (1H, d, J=2.7 Hz, ベンゼン環), 7.49 (1H, d, J=2.7 Hz, ベンゼン環)

5-(3',5'-dichloro-2'-methoxyphenyl) methoxy-methyl-2,3-dichloro-1-methylpyrrole (43) (43のNaBH₄還元)

43 (95 mg, 0.27 mmol) をメタノール 10 ml に溶解し NaBH₄ (30 mg, 0.79 mmol) を加え室温で 1 時間攪拌した。反応液に酢酸エチルと水を 50 ml ずつ加え反応物を有機層に抽出し、飽和食塩水で洗浄後乾燥し乾固した。残渣のアワ状物質をシリカゲルの分取 TLC に付しベンゼンで展開し、シリカゲルからメタノールで溶出しベンゼンから再結晶して 42 を無色結晶として 40 mg (収率 40%) 得た。mp 68~74°C Anal. Calcd. for $C_{14}H_{13}Cl_4NO_2$: C, 45.56; H, 3.55; N, 3.80; Cl, 38.42. Found: C, 45.38; H, 3.46; N, 3.78; Cl, 38.05 ここで得た 43 は 41 の DDQ 酸化によって得た 42 と混融しても融点降下を示さず TLC, 1H -NMR, マススペクトルにおいても一致した。

第2章第4節 §1 に関する実験

benzoylpyrrole (51b, 52b)

i) $AlCl_3$ を用いて

1-benzenesulfonylpyrrole (45) (413 mg, 2 mmol) を 3 ml の $ClCH_2CH_2Cl$ に溶解し, benzoyl chloride (47) (254 μ l, 2.2 mmol) を加え溶解し氷冷下で攪拌しつつ $AlCl_3$ (640 mg, 4.8 mmol) を 35 分かけて 5 回に分けて加えた。さらに室温で 1 時間攪拌後氷冷した 1N HCl 10 ml を加え 40 分攪拌後有機層を分離し 0.2N HCl, 2% Na_2CO_3 , 水で順次洗い乾燥後乾固して 710 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO_2 40 g) に付し 1-benzenesulfonyl-2-benzoylpyrrole (51a) 15 mg および 1-benzenesulfonyl-3-benzoylpyrrole (52a) 263 mg を得た。それぞれを 2N NaOH-EtOH に溶解し室温で 2 時間攪拌後 EtOH を留去しベンゼン抽出, 水洗, 乾燥後乾固し 2-benzoylpyrrole (51b) および 3-benzoylpyrrole (52b) を得た。51b はベンゼンから再結晶し mp $77\sim 78^\circ C$ (文献値 $77\sim 78^\circ C$ ⁴⁰)。52b もベンゼンから再結晶し mp $98\sim 98.5^\circ C$ (文献値 $96\sim 97^\circ C$ ²⁶)。

ii) $SnCl_4$ を用いて

45 (416 mg, 2.0 mmol) を 5 ml の CH_2Cl_2 に溶解し, 47 (580 μ l, 5.0 mmol) を加え溶解し氷冷下で攪拌しつつ 3 ml の CH_2Cl_2 に溶解した $SnCl_4$ (573 μ l, 5.0 mmol) を 40 分かけて滴下した。さらに 3 時間加熱還流した後氷冷した 1N HCl 15 ml を加え 2 時間攪拌後有機層を分離し 0.1N HCl, 5% Na_2CO_3 , 水で順次洗い乾燥後乾固して 689 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO_2 40 g) に付し 51a 316 mg および 52a 217 mg を得た。

3,5-dichlorosalicyloylpyrrole (55b, 56b)

45 (1.001mg, 4.8 mmol) を 14 ml の $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ に溶解し 3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride (48) (1.319mg, 5.5 mmol) を加え溶解し氷冷下で攪拌しつつ AlCl_3 (1442 mg, 10.8 mmol) を 50分かけて 5回に分けて加えた。さらに室温で 1 時間 30分攪拌後氷冷した 1N HCl 20 ml を加え 40分攪拌後有機層を分離し 0.1N HCl, 4% NaHCO_3 , 水で順次洗い乾燥後乾固して 1744mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO_2 75g) に付し t-benzenesulfonyl-2-(3,5-dichlorosalicyloyl)pyrrole (55a) 869mg および t-benzenesulfonyl-3-(3,5-dichlorosalicyloyl)pyrrole (56a) 251mg を得た。55a はベンゼンから再結晶し黄色針状晶を得た。mp 166~167°C Anal. Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_4\text{S}$: C, 51.53; H, 2.80; N, 3.54 Found: C, 51.49; H, 2.84; N, 3.50 56a もベンゼンから再結晶し黄色針状晶を得た。mp 154°C Found: C, 51.53; H, 2.83; N, 3.51 それぞれを 2N NaOH-EtOH に溶解し室温で 2 時間攪拌後 EtOH を留去し pH 6 に調整しベンゼン抽出, 水洗, 乾燥後乾固し 2-(3,5-dichlorosalicyloyl)pyrrole (55b) および 3-(3,5-dichlorosalicyloyl)pyrrole (56b) を得た。55b はベンゼンから再結晶し黄色針状晶を得た。mp 158.5~159°C Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_2$: C, 51.59; H, 2.76; N, 5.47 Found: C, 51.42; H, 2.77; N, 5.38 56b はベンゼン-酢酸エチルから再結晶し黄色針状晶を得た。mp 185~186°C Found: C, 51.63; H, 2.77; N, 5.45

3,5'-dichloro-2'-methoxybenzoylpyrrole (53b, 54b)

45 (218mg, 1.05 mmol) を 6 ml の CH_2Cl_2 に溶解し 48 (277mg, 1.16 mmol) を加え溶解し氷冷下で攪拌しつつ 4 ml の CH_2Cl_2 に溶解した SmCl_4 (573 μl , 5.00 mmol) を 30分かけて滴下した。さらに 50分加熱還流した後

氷冷した 1N HCl 10 ml を加え 40 分攪拌後有機層を分離し 0.1N HCl, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い乾燥後乾固して 292 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO₂ 15 g) に付し 1-benzenesulfonyl-2-(3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl)pyrrole (53a) 197 mg および 1-benzenesulfonyl-3-(3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl)pyrrole (54a) 12 mg を得た。53a はベンゼンから再結晶し無色針状晶を得た。mp 119~120°C Anal. Calcd. for C₁₈H₁₃Cl₂NO₄S : C, 52.69; H, 3.19; N, 3.41 Found: C, 52.79; H, 3.20; N, 3.41 それぞれを 2N NaOH-EtOH に溶解し室温で 3 時間攪拌後 EtOH を留去しベンゼン抽出, 水洗, 乾燥後乾固し 2-(3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl)pyrrole (53b) および 3-(3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl)pyrrole (54b) を得た。53b はベンゼンから再結晶し無色針状晶を得た。mp 114.5~115.5°C (34 として得たもの: 114~115°C p.89 参照) 54b の高分解能マスマスペクトル: Calcd. for C₁₂H₉Cl₂NO₂: M⁺ 269.0008; M⁺², 270.9980; M⁺⁴, 272.9950 Found: M⁺, 268.9977 (1オン強度 26.0); M⁺², 270.9991 (18.5); M⁺⁴, 272.9950 (4.4)

m-nitrobenzoylpyrrole (57b, 58b)

i) AlCl₃ を用いて

45 (421 mg, 2.03 mmol) を 7 ml の CH₂Cl₂ に溶解し m-nitrobenzoyl chloride (49) (430 mg, 2.32 mmol) を加え溶解し氷冷下で攪拌しつつ AlCl₃ (703 mg, 5.27 mmol) を 50 分かけて 5 回に分けて加えた。さらに 1 時間加熱還流した後氷冷した 1N HCl 15 ml を加え 50 分攪拌後有機層を分離し 0.1N HCl, 5% Na₂CO₃, 水で順次洗い乾燥後乾固して 694 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO₂ 40 g) に付し 1-benzenesulfonyl-2-(m-nitrobenzoyl)pyrrole (57a) を 9 mg,

1-benzensulfonyl-3-(m-nitrobenzoyl)pyrrole (58a) を 231 mg 得た。57a はベンゼンから再結晶し無色柱状晶を得た。mp 164~165°C Anal. Calcd. for $C_{17}H_{12}N_2O_5S$: C, 57.30; H, 3.39; N, 7.86 Found: C, 57.51; H, 3.46; N, 7.79 58a はメタノール-酢酸エチルから再結晶し無色アクリズム晶を得た。mp 172~173°C Found: C, 57.33; H, 3.44; N, 7.85 それぞれを 2N NaOH-EtOH に溶解し室温で 2 時間攪拌後 EtOH を留去しベンゼン抽出, 水洗, 乾燥後乾固し 2-(m-nitrobenzoyl)pyrrole (57b) および 3-(m-nitrobenzoyl)pyrrole (58b) を得た。57b はベンゼンから再結晶し淡褐色粒状晶を得た。mp 132~133.5°C Anal. Calcd. for $C_{11}H_8N_2O_3$: C, 61.11; H, 3.73; N, 12.96 Found: C, 61.08; H, 3.75; N, 13.00 1H -NMR ($CDCl_3$, 重水 1 滴添加) 6.40 (1H, dd C₄-H), 6.91 (1H, dd C₃-H), 7.24 (1H, dd C₅-H) 58b もベンゼンから再結晶し淡褐色針状晶を得た。mp 138.5~139.5°C Found: C, 61.07; H, 3.78; N, 12.96

ii) $SnCl_4$ を用いて

45 (6210 mg, 30 mmol) を 80 ml の CH_2Cl_2 に溶解し 49 (13,900 mg, 75 mmol) を加え溶解し氷冷下で攪拌しつつ 30 ml の CH_2Cl_2 に溶解した $SnCl_4$ (8600 μ l, 75 mmol) を 1 時間かけて滴下した。さらに 6 時間加熱還流した後 1 晩室温で攪拌した。この反応液に氷冷した 1N HCl 100 ml を加え 4 時間攪拌後有機層を分離し 0.1N HCl, 5% Na_2CO_3 , 水で順次洗い乾燥後乾固して 18068 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO_2 300g) に付し 57a 3458 mg, および 58a 544 mg を得た。

p-methoxybenzoyl pyrrole (59b, 60b)i) AlCl₃ を用いて

45 (425 mg, 2.05 mmol) を 7 ml の CH₂Cl₂ に溶解し p-methoxybenzoyl chloride (50) (418 mg, 2.45 mmol) を加え溶解し氷冷下で攪拌しつつ AlCl₃ (784 mg, 5.87 mmol) を 45 分かけて 5 回に分けて加えた。さらに 1 時間加熱還流した後氷冷した 1 N HCl 10 ml を加え 2 時間攪拌後有機層を分離し 0.2 N HCl, 4% NaHCO₃, 水で順次洗い乾燥後乾固して 692 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO₂ 15 g) に付し 1-benzenesulfonyl-2-(p-methoxybenzoyl)pyrrole (59a) 27 mg および 1-benzenesulfonyl-3-(p-methoxybenzoyl)pyrrole (60a) 357 mg を得た。59a はベンゼンから再結晶し無色砂状晶を得た。mp 104~105°C Anal. Calcd. for C₁₈H₁₅NO₄S: C, 63.33; H, 4.43; N, 4.10 Found: C, 63.64; H, 4.41; N, 3.95 60a はベンゼンから再結晶し無色砂状晶を得た。mp 105~106°C Found: C, 63.37; H, 4.44; N, 4.06 それぞれを 2 N NaOH-EtOH に溶解し室温で 5 時間攪拌後 EtOH を留去しベンゼン抽出, 水洗, 乾燥後乾固し 2-(p-methoxybenzoyl)pyrrole (59b) および 3-(p-methoxybenzoyl)pyrrole (60b) を得た。59b はベンゼンから再結晶し無色針状晶を得た。mp 112~113°C Anal. Calcd. for C₁₂H₁₁NO₂: C, 71.62; H, 5.51; N, 6.96 Found: C, 71.67; H, 5.50; N, 6.94 60b はベンゼン-酢酸エチルから再結晶し無色針状晶を得た。mp 108~109°C Found: C, 71.88; H, 5.57; N, 6.88

ii) SnCl₄ を用いて

45 (413 mg, 2.00 mmol) を 5 ml の CH₂Cl₂ に溶解し 50 (398 mg, 2.33 mmol) を加えて溶解し氷冷下で攪拌しつつ 3 ml の CH₂Cl₂ に溶解した SnCl₄ (573 μl, 5.00 mmol)

を30分かけて滴下した。さらに50分加熱還流した後氷冷した1N HCl 15mlを加え40分攪拌後有機層を分離し0.2N HCl, 5% NaHCO₃, 水で順次洗い乾燥後乾固して650mgの油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO₂ 15g) に付し59a 250mg および60a 306mgを得た。

2-(m-aminobenzoyl)pyrrole (61)

5%パラジウムカーボン207mgをEtOH 30mlが入っている接触還元装置に入れ、攪拌しつつH₂ガスを導入し吸収させた。これに2-(m-nitrobenzoyl)pyrrole (57b) (847mg, 3.9 mmol) を加え室温で激しく攪拌しつつH₂ガスを導入した。H₂ガスの吸収がとまったとき反応液を濾別し濾液を乾固し油状物768mgを得た。これをシリカゲルカラムクロマト (SiO₂ 40g) に付し61 631mgを得た。ベンゼン-酢酸エチルから再結晶し淡黄色針状晶を得た。mp 109~111°C Anal. Calcd. for C₁₁H₁₀N₂O: C, 70.95; H, 5.41; N, 15.05 Found: C, 71.01; H, 5.45; N, 15.05

2-benzoylpyrrole (51b)

61 (500mg, 2.69 mmol) に水 350μl, 濃塩酸 1040μl を加え80°Cに加熱しペースト状にした。これを氷-食塩浴で冷却し、あらかじめ氷冷したNaNO₂ (230mg, 3.3 mmol) の水溶液 550μl を-8~-3°Cに保ちつつ20分かけて滴下した。滴下後さらに20分攪拌しあらかじめ氷冷した50% H₃PO₂ 1440μl を-5~0°Cに保ちつつ15分かけて滴下した。滴下後さらに1時間攪拌し冷蔵庫に1晩放置した。この反応液に水 20ml を加えベンゼン 20ml で3回抽出し、抽出液を合併し2N NaOH, 水で洗い乾燥後乾固し218mgの黄色油状物を得た。これをシリカゲルカラムク

ロマト (SiO_2 15g) に付し 161mg の 5**b** を得た。ベンゼン-ヘキサンから再結晶し無色針状晶を得た。標品と混融しても融点降下を示さず、IRも完全に一致した。

第2章第4節 §2 に関する実験

1-benzenesulfonyl-2,5-dichloropyrrole (62) および 1-benzenesulfonyl-2,3,5-trichloropyrrole (63)

1-benzensulfonylpyrrole (45)²⁷⁾ (1393 mg, 6.73 mmol) を 16 ml の酢酸に溶解し氷冷下 3 ml の酢酸に溶解した SO_2Cl_2 (530 μl , 6.56 mmol) を 25 分かけて滴下し、50~60°C で 2 時間攪拌した。反応液を再び氷冷し 5 ml の酢酸に溶解した SO_2Cl_2 (540 μl , 6.68 mmol) を 20 分かけて滴下し再度 50~60°C で 2 時間攪拌後、室温で 1 晩放置した。反応液を 100 ml の氷水に注ぎベンゼン 40 ml で 2 回抽出し抽出液を合併し、水洗、乾燥後乾固し 1919 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトに付しヘキサン-ベンゼン 2:1 で展開し 62 を 1129 mg (収率 61%)、63 を 84 mg (収率 4%) 得た。62 をヘキサンから再結晶し無色柱状晶として得た。mp 80°C. Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{S}$: C, 43.49; H, 2.56; N, 5.07. Found: C, 43.54; H, 2.59; N, 5.07. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 6.08 (2H, s, C_{3,4}-H, ピロール環), 7.45~8.05 (5H, m, ベンゼン環) 63 もヘキサンから再結晶し無色針状晶として得た。mp 52~54°C Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$: C, 38.67; H, 1.95; N, 4.51 Found: C, 38.72; H, 2.02; N, 4.60 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 6.13 (1H, s, C₄-H, ピロール環), 7.45~8.05 (5H, m, ベンゼン環)

1-benzene sulfonyl-3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (64)

62 (361 mg, 1.31 mmol) および 3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride (407 mg, 1.70 mmol) を 4 ml のジクロロメタンに溶解し氷冷下で無水 AlCl_3 (487 mg, 3.65 mmol) を 50 分かけて 6 回に分けて加えた。さらに 1 時間

加熱還流した後、氷冷した 1N HCl 10 ml を加え 45 分間攪拌後有機層を分離し 0.1N HCl, 4% 重曹水, 水で順次洗浄後乾燥, 乾固して 501 mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトに付しベンゼン-ヘキサン 1:1 で展開し 64 を 290 mg (収率 48%) 得た。ベンゼンから再結晶し黄色ワリズム晶として得た。mp 149~150°C Anal. Calcd. for $C_{17}H_9Cl_4NO_4S$: C, 43.89; H, 1.95; N, 3.01. Found: C, 43.99; H, 2.00; N, 3.00. なお, シリカゲルカラムをベンゼン-ヘキサン 3:1 で展開すると 3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (19) が溶出し 52 mg (収率 12%) 得られた。

3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,5-dichloropyrrole (19)

64 (128 mg, 0.28 mmol) を 2N NaOH とエタノールの混合溶媒に溶解し, 室温で 2 時間攪拌後エタノールを留去し希塩酸で pH 6 に調整し, ベンゼン抽出, 水洗, 乾燥後乾固して 10 を 86 mg (収率 96%) 得た。ベンゼンから再結晶し黄色ワタ状晶を得た。mp 184°C Anal. Calcd. for $C_{11}H_5Cl_4NO_2$: C, 40.65; H, 1.55; N, 4.31 Found: C, 40.81; H, 1.63; N, 4.33 1H -NMR (アセトン- d_6) 6.47 (1H, s, C4-H, ピロロール環), 7.55~7.75 (2H, m-like, ベンゼン環) UV λ_{max}^{MeOH} 260 nm (ϵ 6800), 345 nm (ϵ 4200)

1-benzenesulfonyl-3-(3',5'-dichlorosalicyloyl)-2,4,5-trichloropyrrole (65)

63 (190 mg, 0.61 mmol) および 3,5-dichloro-2-methoxybenzoyl chloride (273 mg, 1.14 mmol) を 5 ml のジクロロメタンに溶解し氷冷下で無水 $AlCl_3$ (321 mg, 2.40 mmol) を 1 時間かけ 7 回に分けて加えた。さらに 7 時間加熱還流した後氷冷した 1N HCl 10 ml を加え 40 分

同攪拌後有機層を分離し 0.1N HCl, 4% 重曹水, 水で順次洗淨後乾燥し, 乾固して 244mg の油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトに付しベンゼン-ヘキサン 1:1 で展開し 65 を 26mg (収率 8.5%) 得た。マスマクトルの測定 Calcd. for $C_{17}H_8Cl_5NO_4S$: m/z 497 (M)⁺, 499 ($M+2$)⁺, 501 ($M+4$)⁺

3-(3,5-dichlorosalicyloyl)-2,4,5-trichloropyrrale (II)

65 (30mg, 0.060mmol) を 2N NaOH と エタノールの混合溶媒に溶解し, 室温で 2 時間攪拌後エタノールを留去し希塩酸で pH6 に調整し, ベンゼン抽出, 水洗, 乾燥後乾固して II を 18mg (収率 83%) 得た。ベンゼンから再結晶し黄色微針状晶を得た。mp 190°C 付近で褐変し 257~260°C で発泡分解。高分解能マスマクトル Calcd for $C_{11}H_4Cl_5NO_2$: m/z 356.8684 (M)⁺, 358.8653 ($M+2$)⁺, 360.8625 ($M+4$)⁺, 362.8595 ($M+6$)⁺ Found: 356.8699 (3.5%) (M)⁺, 358.8651 (5.9%) ($M+2$)⁺, 360.8623 (3.4%) ($M+4$)⁺, 362.8579 (1.3%) ($M+6$)⁺ ¹H-NMR (アセトン-d₆) 7.63 (2H, s, ベンゼン環) UV λ_{max}^{MeOH} 260nm (OD 0.43), 345nm (OD 0.29) (測定溶液の濃度不明)

第2章第5節に関する実験

N, O-dimethylpyrrolomycin E (66)

pyrrolomycin E (5) (100 mg, 0.34 mmol) を酢酸エチル 15 ml に懸濁し, 過剰の CH_2N_2 (エーテル溶液) を加え室温で4時間攪拌した。余剰の CH_2N_2 を酢酸を加えて分解し濃縮乾固し, 残渣をエタノールで結晶化させ 66 を無色プリズム晶として 73 mg (収率 67%) 得た。mp 161~162°C Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3$: C, 42.95; H, 2.70; N, 8.35; Cl, 31.69. Found: C, 42.83; H, 2.64; N, 8.34; Cl, 31.83. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 3.36 (3H, s, N-Me), 3.60 (3H, s, O-Me), 6.83 (1H, s, C4-H, ピロ - ル環), 7.18 (1H, d, $J=2.4$, ベンゼン環), 7.55 (1H, d, $J=2.4$, ベンゼン環)

第3章に関する実験

pyrrolomycin F₁~F₃ の生産

yeast-starch 斜面寒天培地に培養した Actinosporangium vitaminophilum sp. nov. の3白金耳を、Table 1 に示した種培地に 0.1% の臭化ソーダを加えた組成の、殺菌した種培地 20 ml (100 ml 容三角フラスコに入れた) に無菌的に接種し 28°C で5日間振盪培養し、一次種培養液とした。一次種培養液 4 ml を同組成の殺菌した培地 80 ml (500 ml 容三角フラスコに入れた) に無菌的に接種し、28°C で2日間振盪培養し二次種培養液とした。二次種培養液 50 ml を同組成の殺菌した培地 1 l (5 l 容三角フラスコに入れた) に無菌的に接種し 28°C で2日間振盪培養し三次種培養液とした。三次種培養液 1 l を、Table 1 に示した生産培地に 0.1% の臭化ソーダを加えた組成の、殺菌した培地 35 l (50 l 容ジャー培養槽に入れた) に無菌的に接種し、通気量 35 l / 分、攪拌ハラの回転数 300 rpm の条件下で 28°C で5日間通気攪拌培養した。培養力価は、Bacillus subtilis ATCC 6633 を用いた生物検定法によって測定した。

pyrrolomycin F₁~F₃ の単離

培養が終了した菌体を含む全培養液 (25 l, pyrrolomycin A として 300 μg/ml) を塩酸で pH 2 に調整し、酢酸エチル (20 l) で攪拌抽出し、ケイソウ土を濾過助剤として加えフィルタープレスを用いて濾過し、有機層を分離した。有機層を水洗後濃縮乾固し黒色油状物を得た。油状物を酢酸エチル (30 ml) に溶解しアルミナカラムフロマト (200 g) に付し酢酸エチル-濃塩酸 (500:7) で展開し活性区 (1000 ml)

を濃縮乾固し褐色油状物(4.4g)を得た。この油状物を5mlのメタノールに溶解しシリカゲル粉末(5g)と混合し乾燥しシリカゲルカラム(200g)の上部にのセベンゼン-酢酸エチル(10:1)で展開し活性区分(350ml)を濃縮乾固し黄色粉末(980mg)を得た。このうち150mgをメタノール3mlに溶解し、メタノール-水(3:2)で膨潤、充填したセファデックスLH-20のカラム(650ml)にのせ同じ溶媒で展開し18mlずつに分画し、フラクション236~247(PM-F₃区分), 256~300(PM-F_{2a}, F_{2b}区分), 311~330(PM-F₁区分)をそれぞれ濃縮しPM-F₃を18mg, PM-F_{2a}とF_{2b}の混合物を62mg, PM-F₁を34mg得た。PM-F₁, F₃はベンゼンから再結晶しいずれも黄色針状晶として得た。またPM-F_{2a}とF_{2b}の混合物のうち20mgをメタノール1mlに溶解し、1回約50 μ lをHPLC装置に注入しPM-F_{2a}とF_{2b}に分離した。この操作を20回くりかえし、PM-F_{2a}を6mg, F_{2b}を7mg得、いずれもベンゼンから再結晶し黄色針状晶として得た。

培地に添加したハロゲンイオンの影響

yeast-starch 斜面寒天培地に培養した *Actinosporangium vitaminophilum* sp. nov. の3白金耳を Table 1 に示した殺菌した種培地 20ml (100ml 容三角フラスコに入れた) に無菌的に接種し 28°C で 2 日間振盪培養し種培養液とした。種培養液 4ml ずつを Table 1 に示した生産培地およびこの培地に NaBr, NaI, NaCl, NaF をそれぞれ 0.1% ずつ添加した培地 (計 5 種類の培地になる) 80ml (500ml 容三角フラスコに入れた) に無菌的に接種し、28°C で 6 日間振盪培養した。得られた 5 種類の培養液から各 40ml を pH 2 としそれぞれ酢酸エチル

40 ml で抽出し, 有機層を濃縮乾固し残渣をメタノール 1 ml に溶解し検液とした。検液 10~100 μ l を HPLC に注入し, 溶出する各ピークごと, または一定時間 (20~30 秒) ごとに溶出液を分画し, Bacillus stearothermophilus を検定菌として抗菌活性を測定し, UV (313 nm) で検出した溶出曲線と対応させた。

培地に添加した NaBr 量の影響

前項と同様にして得た種培養液を, Table 1 に示した生産培地に 0.05%, 0.1%, 0.2% の NaBr を添加した培地 (3 種類の培地になる) 80 ml (500 ml 容三角フラスコに入れた) に無菌的に接種し 28°C で 6 日間振盪培養した。得られた 3 種類の培養液から各 40 ml を pH 2 としそれぞれ酢酸エチル 40 ml で抽出し, 有機層を濃縮乾固し残渣をメタノール 1 ml に溶解し検液とした。検液 5 μ l ずつを HPLC に注入し UV (313 nm) で検出した溶出曲線の PM-F の各成分に相当するピークの高さを測定し, PM-F の各成分の相対的な存在比率を求めた。

2-(5'-bromo-2'-methoxybenzoyl)pyrrole (79)

pyrrole (33) (1460 mg, 22 mmol) を乾燥ベンゼン 100 ml に溶解し冷却下に EtMgBr 3 mol エーテル溶液 (8 ml, 24 mmol) を加えた後 20°C で 30 分間攪拌した。この溶液に methyl 5-bromo-2-methoxy benzoate (6 ml, 20 mmol) を加え室温で一晩放置した。反応液を氷水 100 ml に注ぎ濃塩酸 10 ml を加え酸性にし有機層を分離し飽和食塩水で洗浄し乾燥後乾固した。残渣を NaOH (4g) を含む 80% メタノール 50 ml に溶解し 10 分間加熱還流した。反応液のメタノールを留去し酢酸エチル 100 ml で抽出し乾燥後乾固した。

残渣をヘキサン-酢酸エチルで再結晶し、79を無色結晶として610 mg (収率11%) 得た。mp 86~87°C.
 Anal. Calcd. for $C_{12}H_{10}BrNO_2$: C, 51.45; H, 3.60; N, 5.00. Found: C, 51.25; H, 3.45; N, 4.89

2-(5'-bromosalicyloyl)-3,4,5-tribromopyrrole (82)

79 (280 mg, 1.0 mmol) を乾燥ジクロロメタン 10 ml に溶解し臭素 (0.16 ml, 3.0 mmol) を加え反応液を室温で1時間攪拌後濃縮乾固し80を含む残渣を得た。これをベンゼン 50 ml に溶解し無水 $AlCl_3$ (500 mg, 3.7 mmol) を加え室温で激しく攪拌した。反応液を希塩酸、水で洗浄後乾燥し乾固した。残渣をベンゼン-ヘキサンで再結晶し82を黄色針状晶として143 mg (収率28%) 得た。mp 188~189°C. ここに得た82は培養液から得た pyrrolomycin F₁ と混融しても融点降下を示さず、¹H-NMR, IR, 元素分析値も P.M-F₁ に一致した。

N, O-dimethylpyrrolomycin F₃ (83)

pyrrolomycin F₃ (9) (20 mg, 0.05 mmol) をアセトン 2 ml に溶解し過剰の CH_2N_2 (エーテル溶液) を加え室温で2時間放置した。反応液を濃縮乾固し83を20 mg (収率94%) 得た。メタノール-ヘキサンから再結晶し無色板状晶を得た。mp 142°C. Anal. Calcd. for $C_{13}H_9Br_2Cl_2NO_2$: C, 35.46; H, 2.31; N, 3.25; Found: C, 35.72; H, 2.42; N, 3.15

文 献

- 1) T.Shomura, S.Amano, J.Yoshida, N.Ezaki, T.Ito & T.Niida, Int. J. Syst. Bacteriol., 33, 557 (1983)
- 2) H.Imanaka, M.Kousaka, G.Tamura & K.Arima, J. Antibiot., 18, 207 (1965)
- 3) R.Takeda, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 23, 165 (1959)
A.J.Birch, P.Hodge, R.W.Rickards, R.Takeda & T.R.Watson, J.Chem. Soc., 2641 (1964)
- 4) B.Cavalleri, G.Volpe, G.Tuan, M.Berti & F.Parenti, Curr. Microbiol., 1, 319 (1978)
- 5) P.R.Burkholder, R.M.Pfister & F.H.Leitz, Appl. Microbiol., 14, 649 (1966)
- 6) K.Umezawa, S.Miura, T.Matsushima, S.Muramatsu, T.Sawa & T.Takeuchi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 105, 82 (1982)
- 7) K.J.Morgan & D.P.Morrey, Tetrahedron, 22, 57 (1966)
- 8) Z.Yoshida, T.Kobayashi & H.Yamada, Bull. Chem. Soc. Jpn., 45, 313 (1972)
- 9) I.J.Rinkes, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 53, 1167 (1934)
- 10) A.R.Cooksey, K.J.Morgan & D.P.Morrey, Tetrahedron, 26, 5101 (1970)
- 11) T.J.Batterham, "NMR Spectra of Simple Heterocycles," John Wiley and Sons, Inc., New York, 1973
- 12) K.J.Morgan & D.P.Morrey, Tetrahedron, 27, 245 (1971)
- 13) W.J.Hale & W.V.Hoyt, J. Am. Chem. Soc., 37, 2538 (1915)
- 14) P.Bélanger, Tetrahedron Lett., 2505 (1979)
- 15) H.Budzikiewicz, C.Djerassi & D.H.Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds," Holden-Day Inc., 1967, 中川有造, 池田正澄 訳 丸善 1973
- 16) G.Germain, P.Main & M.M.Woolfson, Acta Crystallogr., A27, 368 (1971)
- 17) C.K.Johnson, "ORTEP, Report ORNL-3794," Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, 1965
- 18) B.W.Cue, Jr., J.P.Dirlam, L.J.Czuba & W.W.Windisch, J. Heterocycl. Chem., 18, 191 (1981)
- 19) R.Takeda, J. Am. Chem. Soc., 80, 4749 (1958)

- 20) J.R.Carson & N.M.Davis, *J.Org. Chem.*, 46, 839 (1981)
- 21) K.Bailey & A.H.Rees, *Can. J. Chem.*, 48, 2257 (1970)
- 22) D.G.Davis & P.Hodge, *Tetrahedron Lett.*, 1673 (1970)
- 23) D.M.Bailey & R.E.Johnson, *Tetrahedron Lett.*, 3555 (1970)
- 24) G.R.Birchall, C.G.Hughes & A.H.Rees, *Tetrahedron Lett.*, 4879 (1970)
- 25) D.W.Lamson, P.Ulrich & R.O.Hutchins, *J. Org. Chem.*, 38, 2928 (1973)
- 26) J.Rokach, P.Hamel, M.Kakushima & G.M.Smith, *Tetrahedron Lett.*, 22, 4901 (1981)
- 27) E.P.Papadopoulos & N.F.Haidar, *Tetrahedron Lett.*, 1721 (1968)
- 28) M.Ajisaka, K.Kariyone, K.Jomon, H.Yazawa & K.Arima, *Agr. Biol. Chem.*, 33, 294 (1969)
- 29) C.R.Stephens, L.H.Conover, R.Pasternack, F.A.Hochstein, W.T.Moreland, P.P.Regna, F.J.Pilgrim, K.J.Brunings & R.B.Woodward, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3568 (1954)
- 30) P.Sensi, G.A.DeFerrari, G.G.Gallo & G.Rolland, *Il Farmaco(Pavia) Ed. sci.*, 10, 337 (1955)
- 31) J.MacMillan, *J. Chem. Soc.*, 1823 (1959)
- 32) J.MacMillan, *J. Chem. Soc.*, 2585 (1954)
- 33) A.Gerhard, R.Muntwyler & W.Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta*, 58, 1323 (1975)
- 34) W.Keller-Schierlein, R.Muntwyler & H.Zähner, *Experientia*, 25 786 (1969)
- 35) C.H.Hassall, R.B.Morton, Y.Ogihara & D.A.S.Phillips, *J. Chem. Soc.(C)*, 526 (1971)
- 36) M.J.Hall, B.O.Handford, C.H.Hassall, D.A.S.Phillips & A.V.Rees, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 3, 380 (1973)
- 37) H.H.Jaffé & M.Orchin, "Theory and Application of Ultraviolet Spectroscopy," John Wiley and Sons, Inc., New York, 1962
- 38) G.C.Barrett, *J. Pharm. Sci.*, 52, 309 (1963)
- 39) M.J.Weinstein & G.H.Wagman(eds.), "Antibiotics; Isolation, Separation and Purification," Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1978
- 40) I.Hasan, E.R.Marinelli, L.C.Lin, F.W.Fowler & A.B.Levy *J. Org. Chem.*, 46, 157 (1981)