

トリプトファンの酸素酸化反応についての研究

—ホルミルキヌレニン, キヌレニン, ピロリドンカルボン酸
誘導体への変換—

1982年2月

賀 登 志 朗

トリプトファンの酸素酸化反応についての研究

ホルミルキヌレニン, キヌレニン, ピロリドン
カルボン酸誘導体 への 変換

賀 登 志 朗

目 次

<u>序 論</u>	-----	1
------------	-------	---

<u>第 一 章</u>	<i>Tryptophan</i> の水溶液中における 光増感酸素化反応	
第 一 節	3a-Hydroxypyrroloindole の生成 -----	11
第 二 節	3a-Hydroperoxypyrroloindole の単離と精製 -----	21
第 三 節	50°C 付近での <i>Tryptophan</i> の 光増感酸素化反応 -----	23
第 四 節	3a-Hydroperoxypyrroloindole の反応性 (Formylkynurenine への変換)	
第 一 項	種々の条件下における分解反応 -----	25
第 二 項	種々の緩衝液中における分解反応 -----	29
第 三 項	3a-Hydroperoxypyrroloindole から formylkynurenine 生成の反応機構 に対する考察 -----	33
第 四 項	3a-Hydroperoxypyrroloindole の酸による 分解反応 -----	36

<u>第 二 章</u>	<i>Tryptophan</i> の種々の緩衝液中における 光増感酸素化反応	
第 一 節	<i>Tryptophan</i> から formylkynurenine への直接 変換法 (<i>Tryptophan</i> 2,3-dioxygenase の モデル反応) -----	38

第二節 種々の pH における酸化生成物の解析

第一項 *Acetate buffer, Phosphate buffer* ----- 42

第二項 酸性, アルカリ性水溶液 ----- 47

第三項 総括 ----- 48

第三章 *Tryptophan* の光増感酸化反応の
機構に対する考察 ----- 50

第四章 *Oxytryptophan* の *kynurenine* への酸化反応

第一節 *Oxytryptamine* ----- 52

第二節 *Oxytryptophan* ----- 60

第五章 *Oxytryptophan* から *o-aminophenylpyrrolidone*
carboxylic acid への変換
(*ring transformation*)

第一節 *Oxytryptamine* ----- 69

第二節 *Oxytryptophan* ----- 74

結 語 ----- 82

実験の部

第一章に関する実験 ----- 89

第二章に関する実験 ----- 104

第三章に関する実験 ----- 114

第四章に関する実験 ----- 117

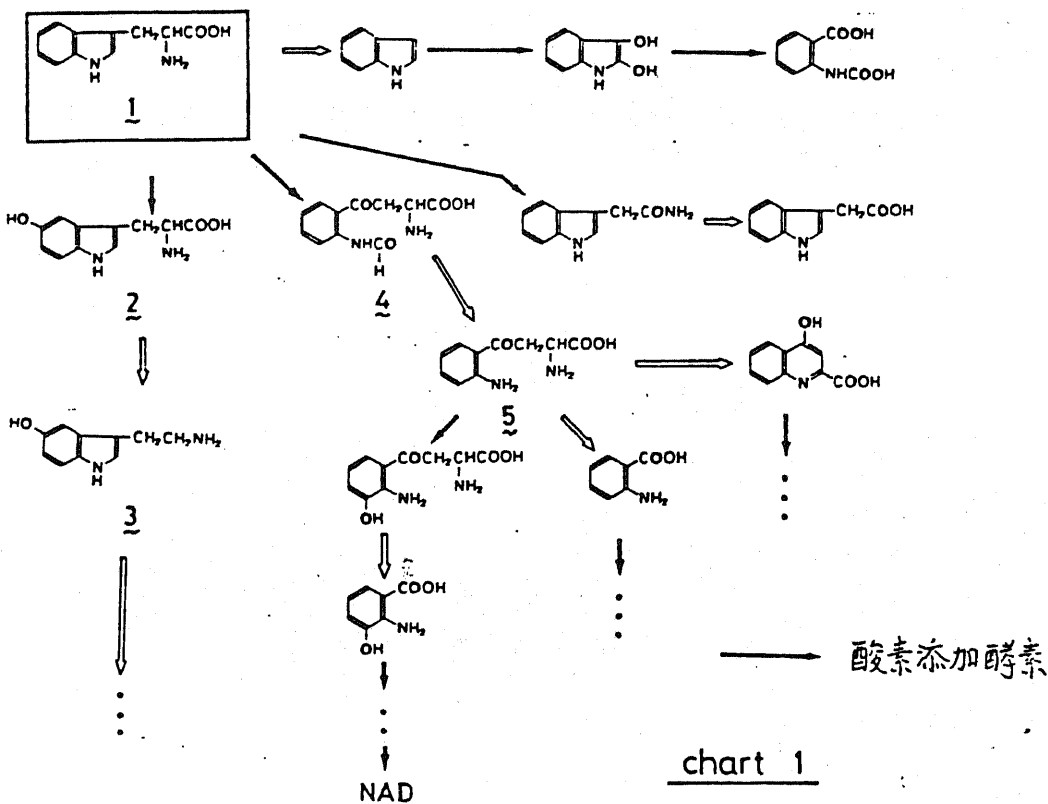
第五章に関する実験 ----- 126

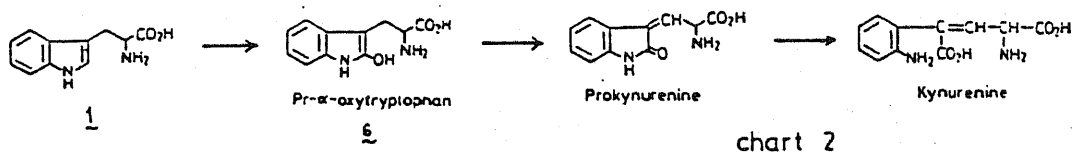
謝 辞 ----- 132

参考文献 ----- 133

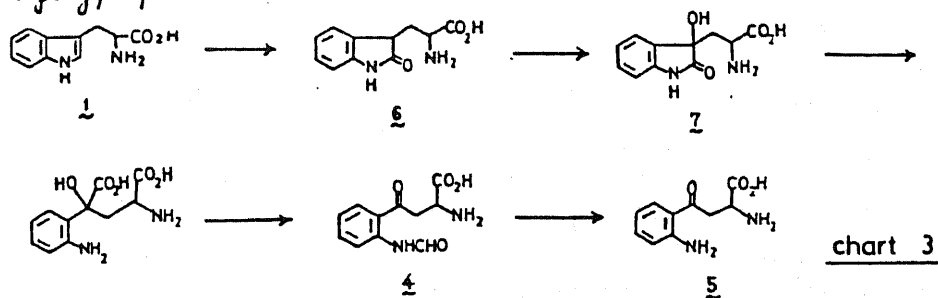
序 論

動物にとって必須アミノ酸である *tryptophan* 1 はタンパク質合成に利用される他に、chart 1で示した様な *5-hydroxytryptophan* 2 を経て *serotonin* 3 を生成する経路と *formylkynurenine* 4, *kynurenine* 5 を経て NAD に至る経路が主要な代謝経路である。



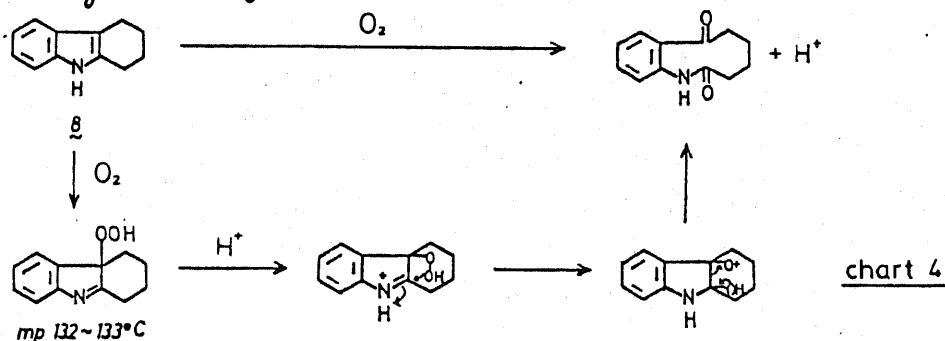


1944年 tryptophan 1 のオゾン酸化によって formylkynurenine 4 が合成され⁴⁾。1949年 Heidelberger らは formylkynurenine 4 がこの代謝における中間体である事を提案し⁵⁾。Knox らによって確かめられた⁶⁾。一方 Julian らは 3-置換 oxindole は 3 位で空気酸化を容易に受け dioxindole 体になる事を明らかにし、これらの事から chart 3 に示す様な tryptophan 1 から dioxytryptophan 7 を経る経路を提案した⁷⁾。



しかし早石ら⁸⁾、Mason ら⁹⁾、Knox ら^{5,10)} による研究で、oxy-tryptophan 6 は kynurenine 5 へ代謝されない事が明らかにされ、この経路が否定された。

1957年早石らは tryptophan 2,3-dioxygenase 触媒によるこの反応を $^{18}\text{O}_2$ 及び H_2^{18}O を用いて検討した結果、formylkynurenine 4 へ取り込まれた酸素原子は分子状酸素に由来しているものである事を確かめた¹¹⁾。この酸化反応における基質の変化の機構は Witkop らの tetrahydrocarbazole 8 の空気酸化の実験事実 (chart 4) に



る類推から chart 5 に示す 3-hydroxyindolenine 9 から dioxetane 10 を経て formylkynurenine 4 が生成する様な経路が広く受け入れられている。¹³⁾ しかし tryptophan 1 の酸素酸化、あ

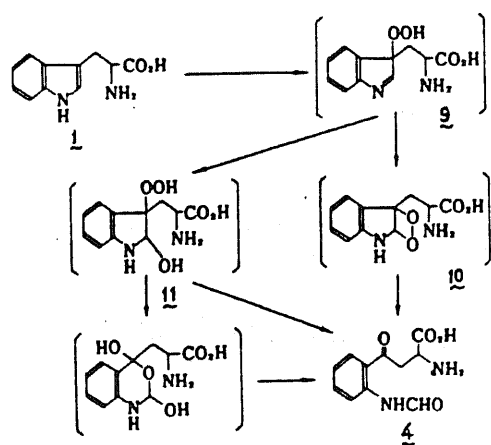


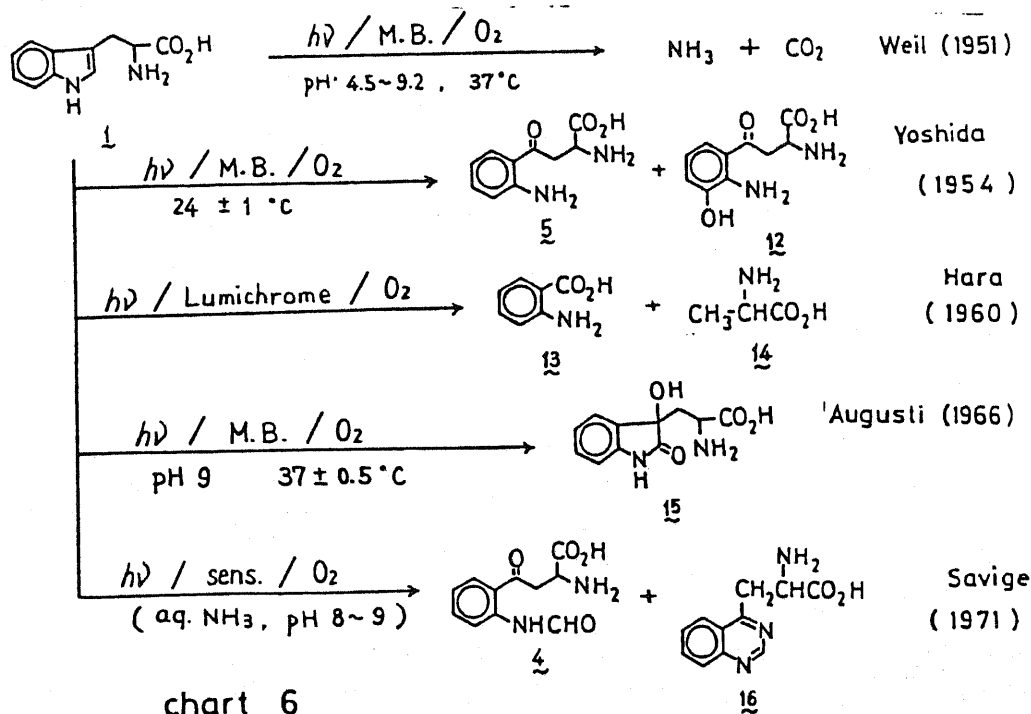
chart 5

るいは酵素反応においてこの経路の実験的証拠は未だ見い出されていない。一方 Hamilton は 3-hydroperoxyindolenine 9 から dioxetane 10 への 4 員環を形成する反応はエネルギー的にかなり不利であると考え、dioxetane 10 を経ない formylkynurenine 4 への変換として新たな反応機構を提唱した。即ち

3-hydroperoxyindolenine 9 に先ず H_2O が付加し、hydrate 中間体 12 となりこれより直接または Baeyer-Villiger 型転位を起こして formylkynurenine 4 になる機構である。¹⁴⁾ この tryptophan 1 から formylkynurenine 4 への酵素反応に対応する化学的酸化反応としては 1944 年の Witkop によるオゾン酸化に始まり、過酸酸化¹⁶⁾、放射線分解¹⁷⁾、光酸化¹⁸⁾、金属錯体¹⁹⁾、光増感酸素酸化²⁰⁾ による方法が検討されている。しかしいづれの酸化においても酵素反応の機構で考えられている 9, 10, 11 等の中間体の単離、証明は未だなされていない。²¹⁾ 上記の酸化反応の中で光増感酸素酸化反応は酸素分子を直接基質に導入できる事、緩和な反応条件での酸化反応を行なえる事などから酵素反応を有機化学的に追求する手段としては有用なものと思われる。

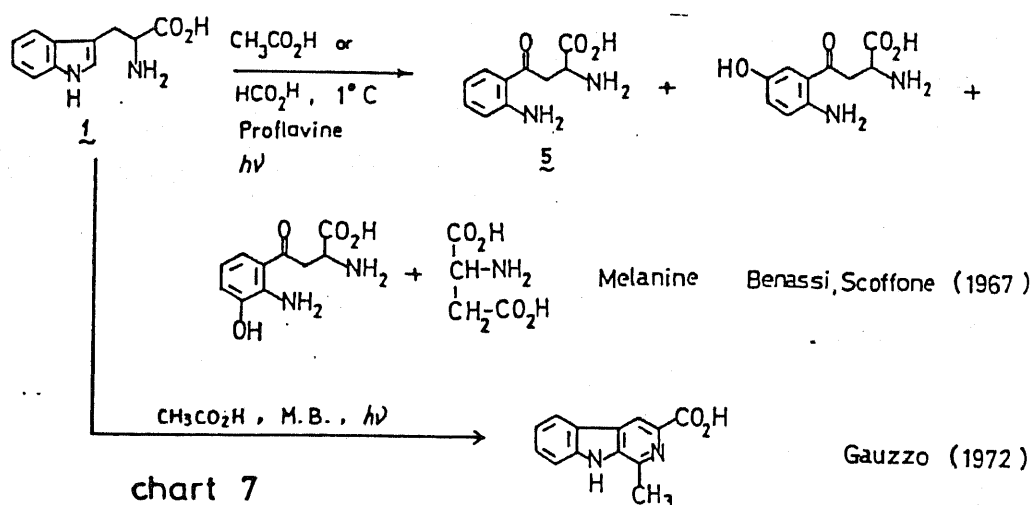
Tryptophan 1 の光増感酸素酸化反応は 1950 年頃より多くの研究者によって研究されており、それを要約すると以下の様になる。1951 年 Weil らは tryptophan 1 の水溶液に Methylene Blue を加えて種々の pH (4.5~9.2) で光照射をすると O_2 の吸収及び CO_2 , NH_3 の発生が見られ、この酸化速度の optimal pH が 8.5 である事を報告している。^{20a)} その後 Shugar も Riboflavine を用い tryptophan の酸化に及ぼす pH の影響を検討し、Weil らの結果と同様 pH が高くなると酸

化速度が速くなる事を確かめた。^{20c)} 1954年吉田らは Methylene Blue を用い L-tryptophan 1 の増感酸化を行ない *kynurenine* 5, 3-hydroxy *kynurenine* 12 が生成している事を UV スペクトル, ペーパークロマトグラフィー, ninhydrin 呈色反応などが



ら確認している。^{20d)} また原は Lumichrome を増感剤として用いた反応を行ない *anthranilic acid* 13, *alanine* 14 を単離同定した。^{20e)} 1962年 Sluyterman は Proflavine 光増感酸化における pH の影響を O_2 吸収量から調べ、pH 3~9 の範囲では容易に酸化は進行するが中性付近 (pH 5~6) で酸化速度は 30% 程度遅くなる事を見出した。^{20f)} 更に 1966年 Augusti らは pH 9 で Methylene Blue を加えて光照射すると *dioxyindolyl-alanine* 15 と推定できる物質が主生成物として得られる事を報告している。²⁰ⁱ⁾ 1971 年になり Savage は Methylene Blue などの種々の増感剤を用いて水溶液中での反応を検討し、pH 6~9 では *formylkynurenine* 4 が主生成物として得られる事を確かめ、反応液から *formylkynurenine* 4 を低収率 (< 2%) ながら単離する事に初めて成功している。しかしながらこの反応からは Augusti らによって報告された 15 は全く得られなかった。一方酢酸アンモニウムで pH 7 にし

て反応すると *formylkypurine* が得られるが、稀アンモニウム水または重炭酸アンモニウムで pH 8~9 にして光照射すると、少量の *formylkypurine* と 10~15% の *guanine* 15 が生成する事を確認した^{20a)} (chart 6)。今まで述べた様な水溶液中の反応ばかりではなく、最近では酢酸、ギ酸等の非水溶媒中での *tryptophan* の酸化反応も報告されている²²⁾ (chart 7)。



以上の様に *tryptophan* の増感酸化においてはこの酸化に及ぼす pH, 増感剤の影響等が研究され、また酸化生成体においても研究者によりそれぞれ異なった生成物を低収率で得ているのみである。更にそれらの構造決定も主として UV スペクトル, 呈色反応, ペーパークロマトグラフィーなどで推定しているにすぎない。また反応機構の検討もほとんとな

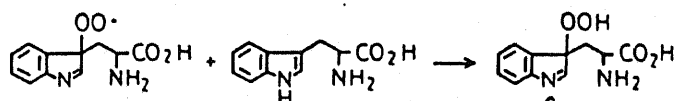
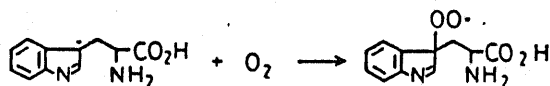
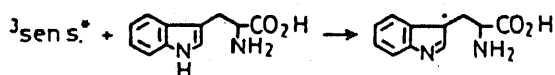


chart 8

されておらず、Weil^{20a)} 及び吉田^{20d)}により chart 8 に示す様な radical 機構が他の反応の類推から提案されているのみである。即ち増感剤 Methylene Blue が光照射に

より励起し、これが *tryptophan* から水素を引き抜いて *tryptophan radical* が生じる。その *tryptophan radical* と酸素との反応で 3-hydroperoxyindolenine が生成する機構である。

近年色素増感酸化反応の研究が盛んになり、その機構も chart 8 の様な励起増感剤による水素引き抜き (Type I) による反応だけでなく、色素から酸素へのエネルギー移動によって生成する一重項酸素 (1O_2) による機構 (Type II) が明らかにされてきた²³⁾。また 1O_2 と enamine との反応機構も次第に解明され、窒素上に水素をもつ enamine では ene 反応が起こり hydroperoxide が生成するのに対し、三

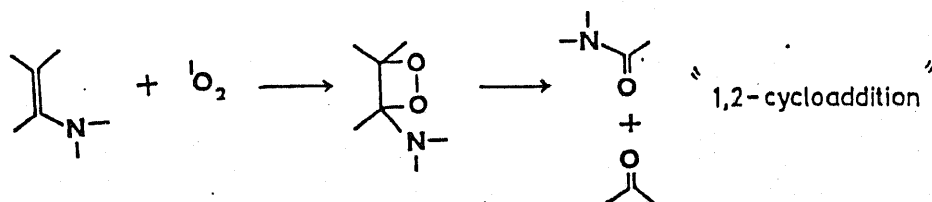
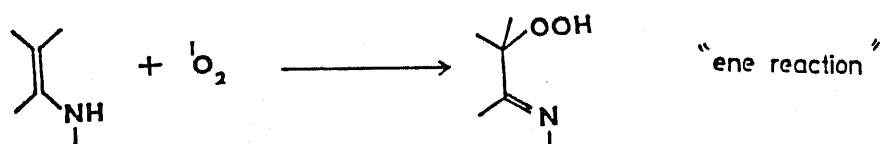
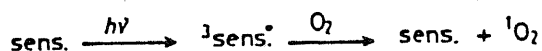


chart 9

'dioxetane'

級 enamine では '1,2-cycloaddition' により dioxetane が生成し、これが開裂して ketone または aldehyde と amide が生成する事が明らかになった²⁴⁾ (chart 9)。

1972 年 Kearns らは *tryptophan* ($10^{-4} M$) の Methylene Blue ($2 \times 10^{-3} mM$) 共存下による光増感酸素化反応では溶媒を H_2O -MeOH (1:1) から D_2O - CD_3OD (1:1), H_2O から D_2O に代えると反応速度が増加する事、及びこの反応が Singlet oxygen quencher (N_3 , tetramethylethylene) によっても阻害される事などから少なくともこの程度の濃度では実際の反応種が 1O_2 である事を証明した。しかしながら高濃度の反応や他の増感剤を用いた反応の場合には 1O_2 が反応種でない機構²⁵⁾ がより重要になってくる可能性もある。

Tryptophan の増感酸化において反応が Type I, Type II のとら

らで進行するにせよ酵素反応の中間体として推定されている 3-hydroperoxyindolenine²⁶ が先ず生成する事が予想される。この²⁶は dioxetane 10 を経由して formylkynurenine²⁷ へに変換するルートの他に²⁸の側鎖の窒素の関与で開環して 3a-hydroperoxypyrroloindole 17 の生成が考えられ、dioxetane 形成より容易に起こる事が考えられる (chart 10)。

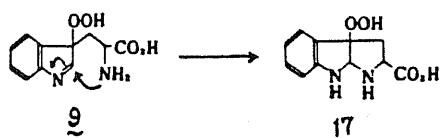


chart 10

我々の研究室においては既に tryptophan のモデル化合物として tryptamine,

tryptophan 誘導体 18, 23, 30, 32 を用い、種々の条件下で光増感酸素化反応を検討し、chart 11 に示した様な結果を得ている。²⁹

いずれの化合物においても低温 (<0°C) では formylkynurenine 誘導体 28, 37 はほとんど得られず、3-hydroperoxy indolenine

▶ Tryptamine 誘導体の増感酸化

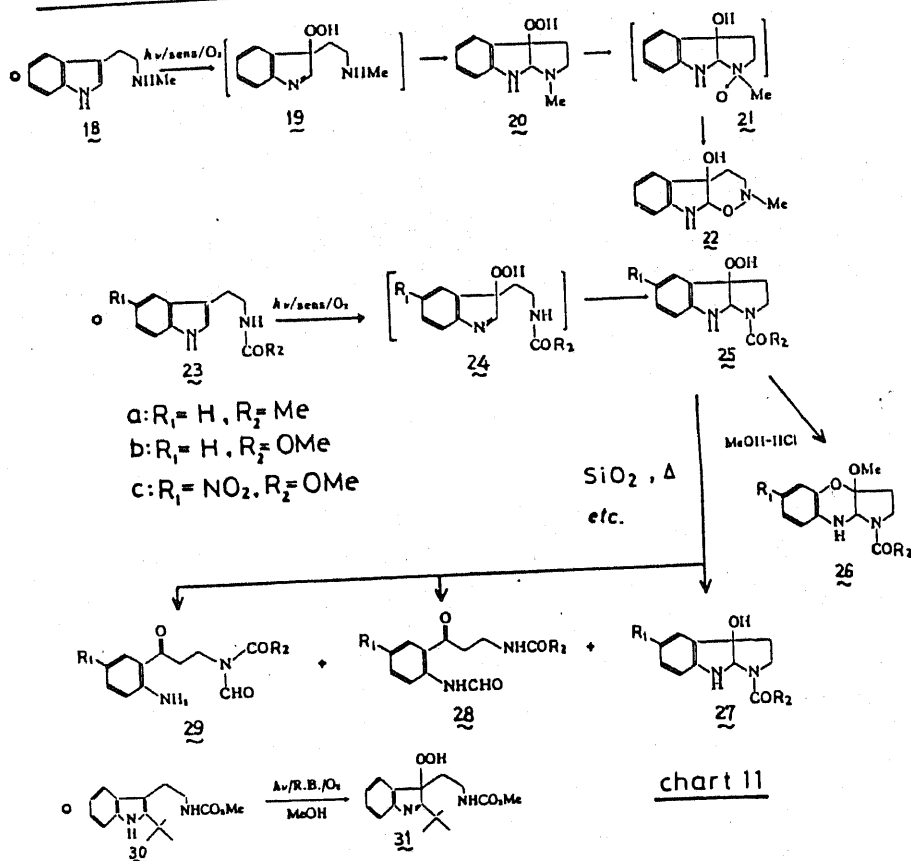


chart 11

► Tryptophan 関連化合物の増感酸化

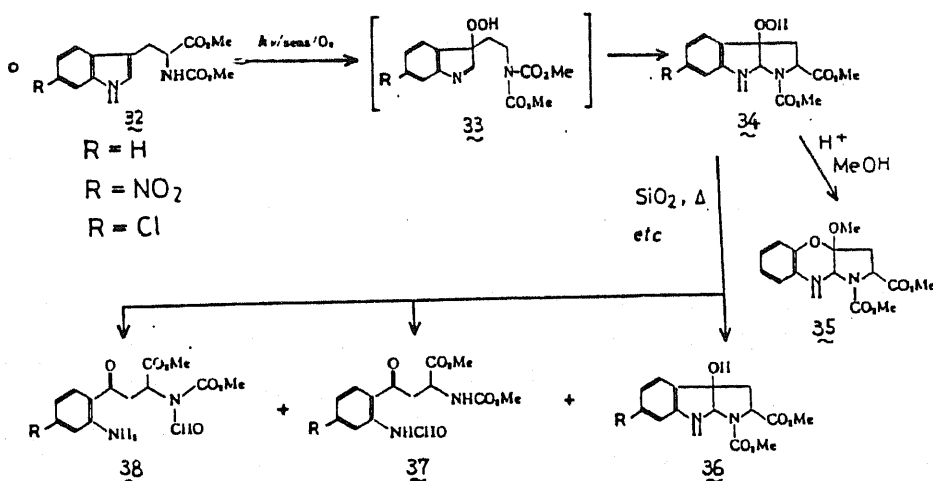


chart 11

誘導体 19, 24, 31, 33 から予想の側鎖アミノ基の関与による 3a-hydroperoxypyrroloindole 20, 25, 34 が主生成物として得られている。なお indole の 2 位に *t*-Butyl 基をもつ Tryptamine 誘導体 30 の場合には 3-hydroperoxy indolenine 31 を安定に単離する事に成功している。^{27h)} これら単離された 3a-hydroperoxypyrroloindole 誘導体 20, 25, 34 はいずれも室温では不安定であり、20 では容易に分子内酸化還元反応が起こり、oxazinoindole 誘導体 22 に変化するのに対し、25, 34 では SiO_2 , 加熱等種々の条件下で 27 + 28 + 29, 36 + 37 + 38 に変換する。28, 37 は formylkynurenine 誘導体であるが、29, 38 は formyl 基が Nb 原子にあり、今まで知られていない Nb-formylkynurenine 誘導体と言う事ができる。

この様に 3a-hydroperoxypyrroloindole 誘導体から formyl-kynurenine 誘導体と同時に Nb-formylkynurenine 誘導体も生成する事から、この変換経路として chart 12 に示す様な

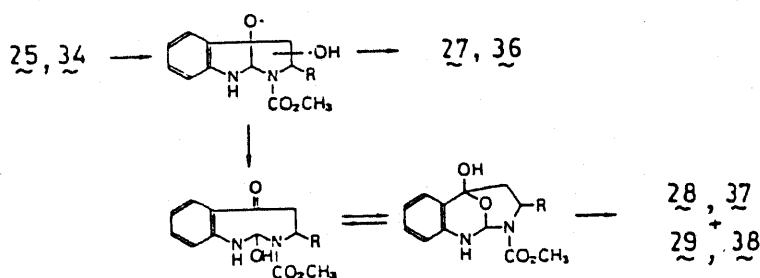


chart 12

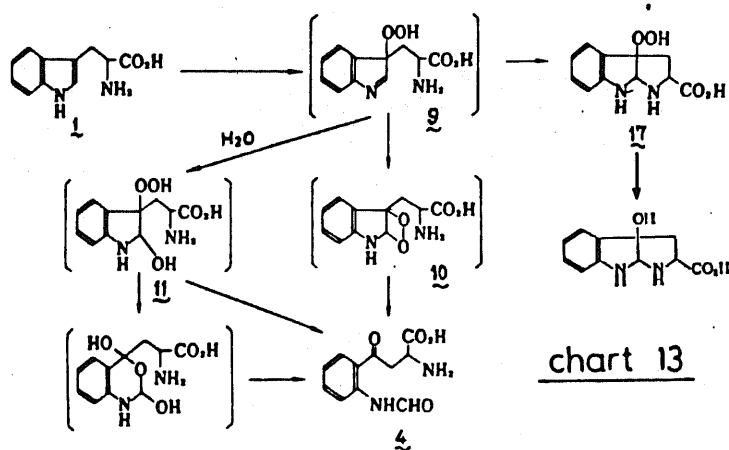
経路を提案した。^{21a)}

一方 3a-hydroperoxy pyrroloindole 誘導体は酸によって容易に Baeyer-Villiger 型の転位を起こし、1,4-benzoxazine 誘導体 25, 35 に変化する。

この様に tryptamine, tryptophan 誘導体と 1O_2 との反応で対応する三環性の hydroperoxide を単離した事から、

3-hydroperoxy indolizine が第一の中間体である事が間接的に証明され、またこの様な低温 ($<0^\circ\text{C}$) では dioxetane 形成よりも側鎖の窒素が関与して 5 員環を形成する方が容易である事が明らかにされた。またこの三環性の hydroperoxide 25, 34 が kynurenine 誘導体に変換する新しい経路のある事が示された。

以上のモデル実験の結果から考察すると tryptophan 自体の水溶液中における増感酸化においても従来から推定されていた dioxetane pathway はかりでなく、3a-hydroperoxy-pyrroloindole 17 を経由する formylkynurenine を生成の可能性もあると思われる。更に Hamilton 説による formylkynurenine を生成の可能性もある。そこで著者は研究室での今までの成果の上に立って最終目標である tryptophan 自体の光増感酸素化反応を詳細に検討することにした (chart 13)。



また一方三環性の hydroperoxide 17 を還元して得られる hydroxy 体 39 は oxytryptophan と酸化段階が同じである。これに対応する oxytryptamine 系列の oxy-

tryptamine 40 は indole alkaloid の全合成の有用な出発物質としてよく用いられているが、これは free base としては不安定であるとされてきた。その理由としては 40 が容易に o-aminophenyl pyrrolidone 41 に変換する為ではないかと推定されている。²⁸⁾ そこで 40 の反応性を検討したところ

40 は塩基性条件下で空気酸化を受けて kynurenamine 42 になる事が判った。²⁹⁾ そこで oxytryptophan 6 についての酸素酸化及び oxytryptamine 40 の酸素酸化について詳細な検討を行なう事にした。また 6, 40 より pyrrolidone 41, 43 に変換する条件も併せて検討した (chart 14)。

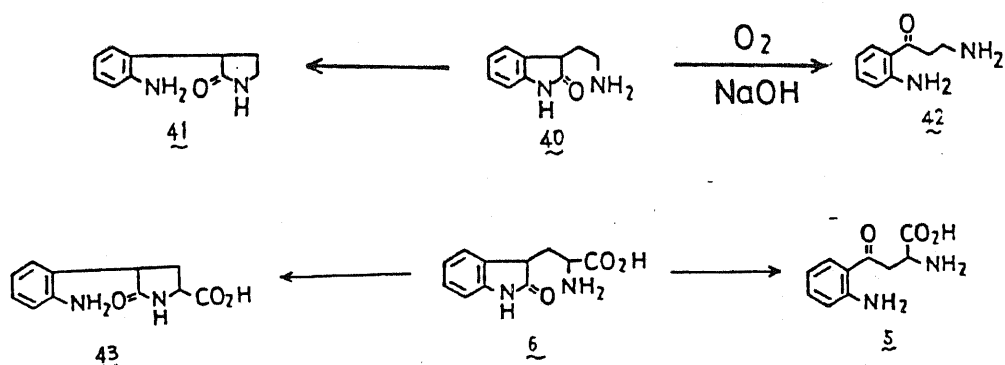
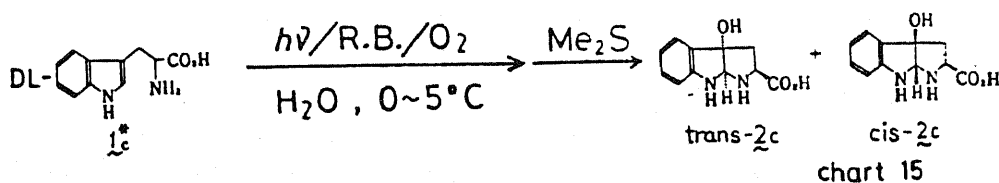


chart 14

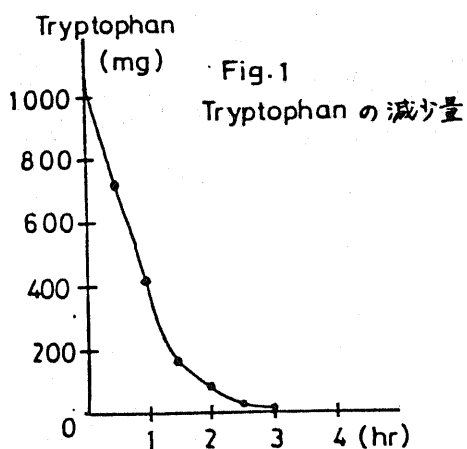
第一章 Tryptophan の水溶液中における

光増感酸素化反応

第一節 3a-Hydroxypyrroloindole の生成 27h) 30)



先ず我々の研究室で既に検討された tryptophan 誘導体の光増感酸素化反応の条件を参考にして tryptophan の水溶液中における増感酸化を行なった。即ち DL-tryptophan^{*} 1.02g (5mM) の水溶液 (285 ml) の中へ消泡剤として EtOH (15 ml), 増感剤として Rose Bengal (以下 R.B. と略す, 90 mg $\cdots$ $\frac{1}{50}$ モル当量) を加えて $0\sim 5^\circ\text{C}$ で酸素を通じながら液体 filter ($\text{CuCl}_2 \cdot \text{CaCl}_2$, $490\text{nm} < \lambda < 610\text{nm}$) を透して halogen lamp (500W)



で内部照射すると UV スペクトル, TLC 及び高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す.) から 3.5 時間後に tryptophan の消失が認められる。なお tryptophan の 30 分毎の減少量を HPLC から求めると

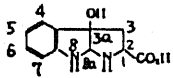
Fig. 1 の様になる。反応液は KI starch test 陽性であり、過酸化物の生成が確認される。そこで Me_2S を反応液に加えて室温で約 1 時間攪拌し、KI

starch test 陰性を確かめた後 EtOH 及び過剰の Me_2S を留去する。次に R.B. を除去する為に反応液に少量の酢酸を加えて弱酸性にした後 CH_2Cl_2 抽出し、得られた水層を凍結乾

* 序論と本論以降の化合物番号は異なる。a: L 体, b: D 体, c: DL 体

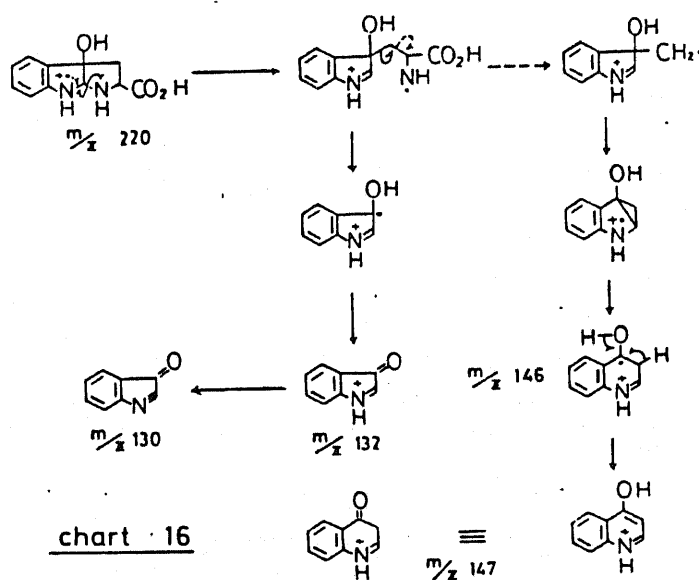
燥によって濃縮する。これを弱酸性陽イオン交換樹脂 Amberlite CG-50 (COOH form) のカラムクロマトグラフィーで分離すると、3a-hydroxypyrrolisindole 2c* が2つの立体異性体 (cis と trans) の混合物として約85%の収率で淡褐色 powder として得られる。しかし formylchymeninin 2c の生成は UV スペクトル, TLC 及び HPLC において認められなかった (chart 15)。立体異性体の混合物である淡褐色 powder は H₂O-EtOH から分別再結晶により2つの立体異性体に分離できた。即ち難溶性で低極性 (SiO₂-ⁿ-PrOH/H₂O = 7/3) の異性体 cis-2c が mp. 251~252°C (dec.) を示す無色微針状晶として、また易溶性で高極性 (SiO₂-ⁿ-PrOH/H₂O = 7/3) の異性体 trans-2c が mp. 223~224°C (dec.) を示す無色鱗片状晶として得られた。これらのスペクトルデータは Table 1 に示す。

Table 1 2c のスペクトルデータ

cis- <u>2c</u>		trans- <u>2c</u>
less polar isomer	TLC	more polar isomer
251 ~ 252 °C (dec.)	mp.	223 ~ 224 °C (dec.)
237, 294	UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ nm	237, 293
3340, 2965, 2730, 1610, 1585, 1490, 1405, 1340, 1275, 1200	IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3350, 3140, 1605, 1595, 1483, 1410, 1390, 1318
220 (M ⁺ , 94), 177 (23), 175 (38), 158 (42), 148 (27), 147 (81), 146 (85), 133 (28), 132 (100), 130 (81), 120 (31)	Mass: m/z (%)	220 (M ⁺ , 94), 177 (27), 175 (32), 158 (28), 148 (20), 147 (62), 146 (60), 133 (30), 132 (100), 130 (42), 120 (26)
2.73 (1H, t, J=12.12 Hz) 2.99 (1H, q, J=12.7 Hz) 4.27 (1H, q, J=12.7 Hz) 5.53 (1H, s) 6.87 (1H, d, J=8 Hz) 7.00 (1H, t, J=8 Hz) 7.35 (1H, t, J=8 Hz) 7.42 (1H, d, J=8 Hz)	NMR: $\delta^{5\% \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{D}_2\text{O}}$ ppm C ₃ -H (<u>ABX</u>) C ₃ -H (<u>ABX</u>) C ₂ -H (<u>ABX</u>) C _{8a} -H C ₇ or C ₄ -H C ₅ or C ₆ -H C ₆ or C ₅ -H C ₄ or C ₇ -H	2.94 (2H, d, J=6 Hz) 4.72 (1H, t, J=6 Hz) 5.45 (1H, s) 6.82 (1H, d, J=8 Hz) 6.96 (1H, t, J=8 Hz) 7.32 (1H, t, J=8 Hz) 7.40 (1H, d, J=8 Hz)

* 2a, 2b, 2c はそれぞれ L, D, DL の 3a-hydroxypyrrolisindole の cis, trans の立体異性体の mixture を示す。立体異性体を明示する時は cis-2c, trans-2c の様に示す。
 ** TLC (担体-展開溶媒) *** singlet, doublet, triplet, quartet, multiplet, double-doublet をそれぞれ s, d, t, q, m, dd と表記。

2c の UV スペクトルは典型的な Ph-N-C-N 型の吸収を示し、IR スペクトルは $3340, 3350 \text{ cm}^{-1}$ に NH, OH に基づく吸収、 $1610, 1605 \text{ cm}^{-1}$ に CO_2^- の吸収が見られる。Mass スペクトルから m/z 220 に分子イオン peak が見え、更に chart 16 に示した様な fragmentation から m/z 147, 146, 132, 130 の fragment peak が見え、この事より 3a 位に OH 基の存在する事が明らかとなる。NMR スペクトルは C2 位のメチンプロトンと

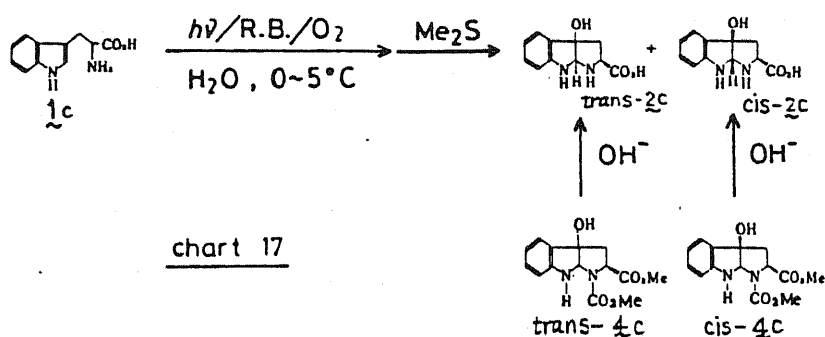


C3 位のメチレンプロトンが ABX 型を示し、8a 位のメチンプロトンは $5.53, 5.45 \text{ ppm}$ に一重線として観測される。以上のスペクトルデータを既に得られている tryptamine, tryptophan 誘導体の 3a-hydroxypyrroloindole のデータと比較検討する事及び Savage^{16e)} による tryptophan 1c

の過酢酸酸化によって得られた 2c のそれぞれの異性体のスペクトルデータとの比較から 2c の構造を確認した。

Savage はそれぞれの異性体の立体化学を決定していないのでこれら化合物の立体化学を決定する為、既に X 線回析によって 3a 位の OH 基と C2 位の COOCH_3 基の関係が trans であると判明している^{27e)} trans-4c をアルカリ加水分解すると mp. $223 \sim 224^\circ \text{C}$ (dec.) の 3a-hydroxypyrroloindole (trans-2c) が得られ、これは先に得られた trans-2c と混融、スペクトルデータにより同定した。またもう一方の異性体 cis-4c からは高融点の cis-2c が生成し、先に得られた cis-2c と混融、スペクトルデータで同定した。なお 2c のどちらの異性体もこのアルカリ加水分解の条件では epimerization が殆んど起こらない事から難溶性の異性体は cis, 易溶性の異性体は trans と決定した (chart 17)。

L-Tryptophan 1a 及び D-tryptophan 1b の同様な増感酸化



によって得られる立体異性体の混合物である 3a-hydroxy-pyrrolaindole-2 も H₂O-EtOH から分別再

結晶を行なう事により難溶性、易溶性の異性体に分離でき、2aのそれぞれのスペクトルデータを示す (chart 18).

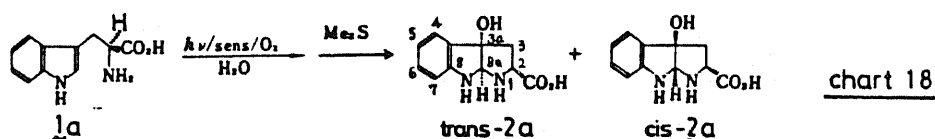


Table 2 2a の スペクトルデータ

cis-2a (易溶性)		trans-2a (難溶性)
less polar isomer	TLC (SiO ₂ - ⁿ -PrOH/H ₂ O 3/7)	more polar isomer
229.5 ~ 230 °C (dec.)	m p.	231.5 ~ 232 °C (dec.)
t _R = 6.5 min	HPLC Fig. 2)	t _R = 4.5 min
237 (6500), 294 (2000)	UV Fig. 3): λ _{max} ^{H₂O} (ε)	235.5 (6590), 294 (2140)
3530, 3300, 1620, 1480, 1405, 1370, 1340	Fig. 4) 5) IR : ν _{max} ^{KBr} cm ⁻¹	3450, 3270, 3140, 1615, 1470, 1380, 1318
220 (M ⁺ , 75), 177 (27), 175 (24), 148 (20), 147 (71), 146 (70), 133 (27), 132 (100), 130 (56), 120 (56)	Mass : m/z (%)	220 (M ⁺ , 100), 177 (32), 175 (32), 158 (27), 148 (20), 147 (71), 146 (67), 133 (29), 132 (98), 136 (36), 120 (30)
2.73 (1H, t, J=12.12 Hz) 3.00 (1H, q, J=12.7 Hz) 4.26 (1H, q, J=12.7 Hz) 5.51 (1H, s) 6.86 (1H, d, J=8 Hz) 7.01 (1H, t, J=8 Hz) 7.35 (1H, t, J=8 Hz) 7.46 (1H, d, J=8 Hz)	NMR Fig. 6) 7) 5% CF ₃ CO ₂ H-D ₂ O δ ppm C ₃ -H (ABX) C ₃ -H (ABX) C ₂ -H (ABX) C _{8a} -H C ₇ or C ₄ -H C ₅ or C ₆ -H C ₆ or C ₅ -H C ₄ or C ₇ -H	2.92 (2H, d, J=7 Hz) 4.69 (1H, t, J=7 Hz) 5.39 (1H, s) 6.86 (1H, d, J=8 Hz) 6.98 (1H, t, J=8 Hz) 7.30 (1H, t, J=8 Hz) 7.40 (1H, d, J=8 Hz)

なおこれら異性体の立体化学については2cのNMRスペクトルとの比較から2aの立体異性体の内で8a位のメチンプロトンが低磁場 shift, C2位のメチンプロトンが高磁場 shift しているものを cis, もう一方の異性体を trans とした。また TLC も 2c 同様 trans が cis よりも高い極性を示す。

この cis, trans は TLC のみならず HPLC によっても分離確認でき、反応混合物の cis, trans の比率は約 3:2 である事が判った (Fig. 2)。2a, b の cis, trans のそれぞれの CD スペクトルは Fig. 8 (P. 16) に示すとおりであり、cis-2a, trans-2b は 295, 238 nm で負の、trans-2a, cis-2b は 296, 239 nm で正の cotton 効果を示す。

Fig. 2 2a の HPLC

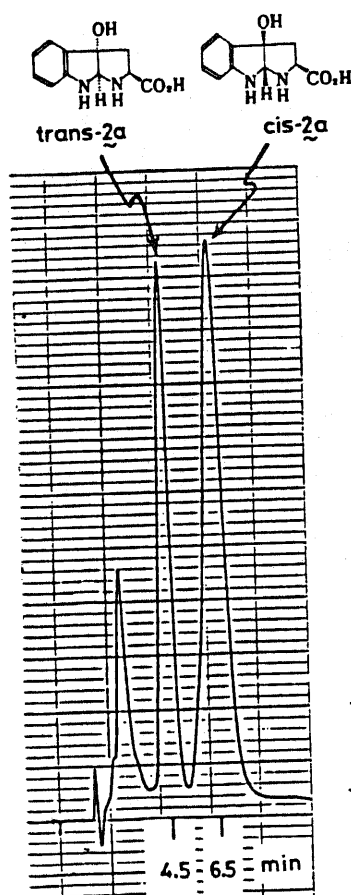
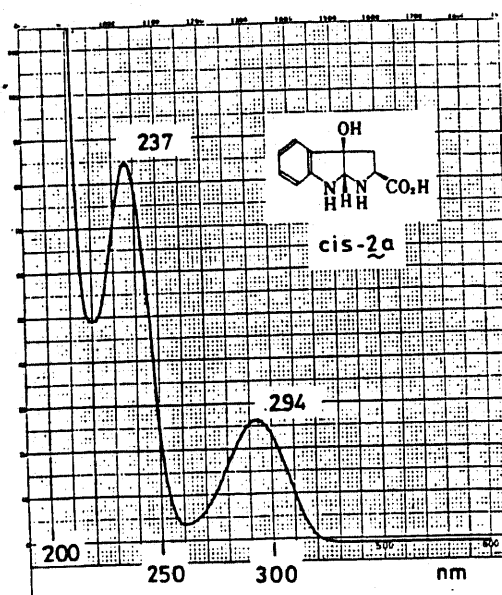


Fig. 3 cis-2a の UV スペクトル (H₂O)



Packing Material: 3011-C

Eluent: 0.5MKH₂PO₄

Press: 20~30 kg/cm²

Temp.: 60°C

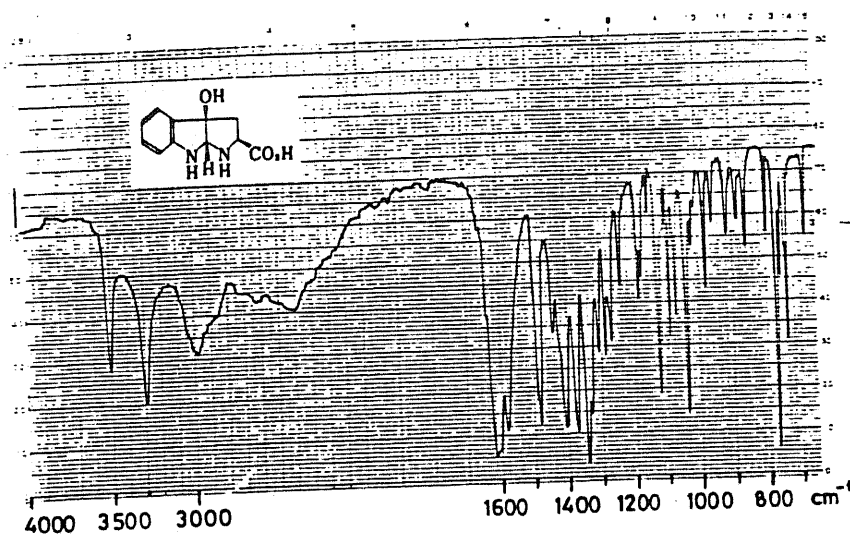


Fig. 4

cis-2a の IR スペクトル
(KBr)

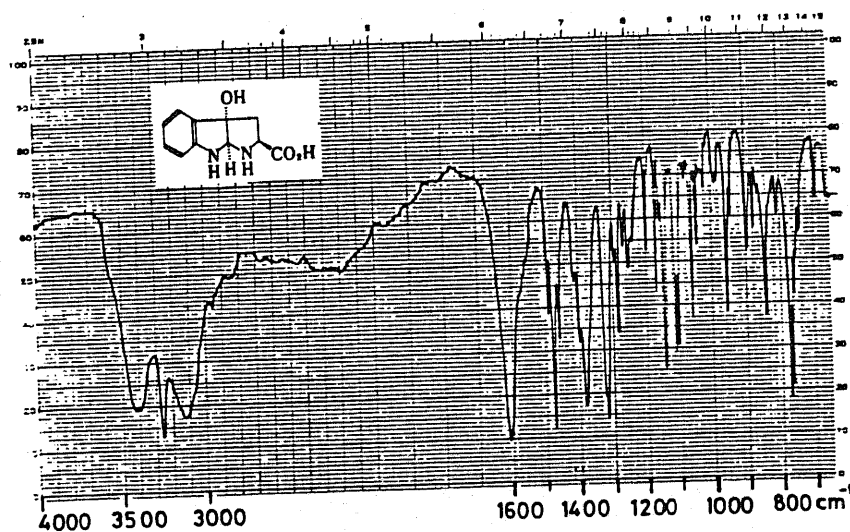


Fig. 5

trans-2a の IR スペクトル
(KBr)

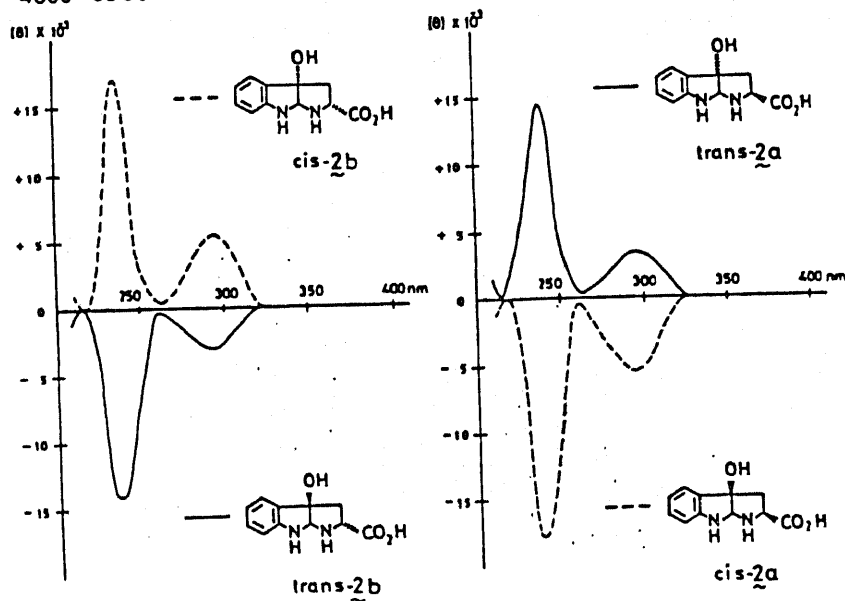


Fig. 8

CD スペクトル (H₂O)

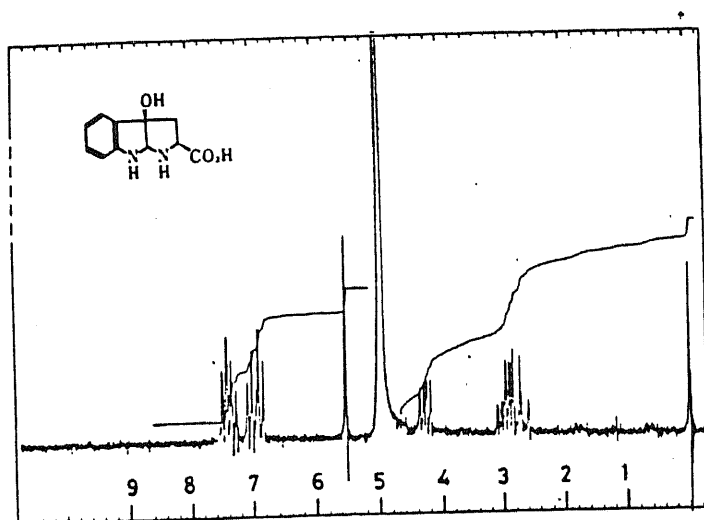


Fig. 6

cis-2a の NMR スペクトル
(5% CF₃CO₂H-D₂O)

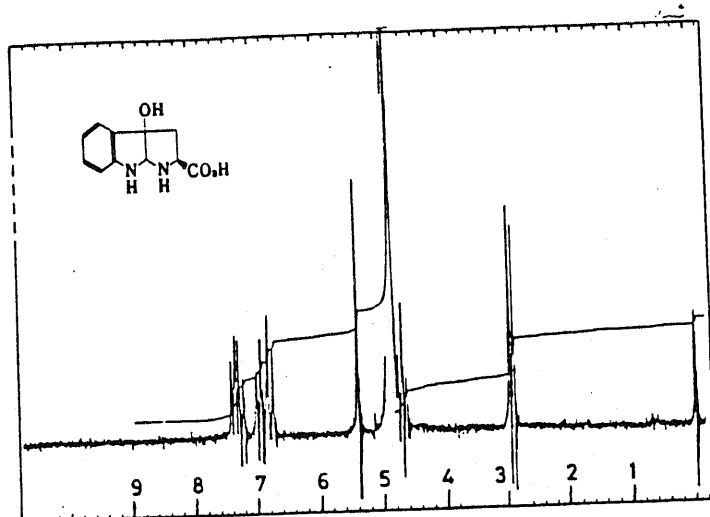


Fig. 7

trans-2a の NMR スペクトル
(5% CF₃CO₂H-D₂O)

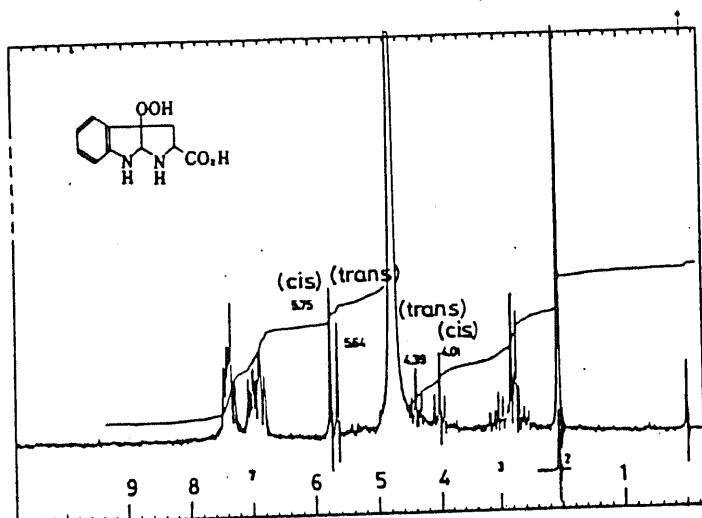


Fig. 10 :

5a の NMR スペクトル
(D₂O)

前述した *tryptophan* 1c の増感酸化において増感剤の R.B. が *L-tryptophan* 1a に対してどれに1必要かを調べる為に $\frac{1}{50}$ モル当量から $\frac{1}{1000}$ モル当量へと次第に減少させて反応した結果は Table 3 に示す。2a の収率はイオン交換樹脂で分離して得た 3a-hydroxypyrrroleindole 2a の fraction (cis, trans の混合物) を UV 定量する事によって求めた。

Table 3 種々の R.B. 量での *L-tryptophan* 1a 1.02g (5mM) の増感酸化

mg (mM)	モル当量	反応時間 (hr)	2a (%)	recovery (%)	その結果 $\frac{1}{50}$ モル当量から $\frac{1}{300}$ モル当量では反応にはほとんど差はない。 $\frac{1}{1000}$ モル当量でも反応は進行するが反応時間が長くなり5時間を要する。しかし R.B. を用いないと反応は進行せず <i>tryptophan</i> 1a を定量的に回収する。以上の事より <i>tryptophan</i> 1a の増感酸化において R.B. は <i>tryptophan</i> に対して $\frac{1}{300}$ モル当量で十分である事が判った。更に R.B. 以外の増感剤として種々の色素を用いて増感酸化を検討し、Table 4 の結果を得た。
100 (0.1)	$\frac{1}{50}$	3.5	80	—	
50 (0.05)	$\frac{1}{100}$	"	81	—	
25 (0.025)	$\frac{1}{200}$	"	80	—	
15 (0.015)	$\frac{1}{300}$	"	83 (83) ^{a)}	—	
5 (0.005)	$\frac{1}{1000}$	5.0	81	—	
0		3.5	—	99	

a) HPLC により求めた収率 (P. 42 以降参照)

時間が長くなり5時間を要する。しかし R.B. を用いないと反応は進行せず *tryptophan* 1a を定量的に回収する。以上の事より *tryptophan* 1a の増感酸化において R.B. は *tryptophan* に対して $\frac{1}{300}$ モル当量で十分である事が判った。

更に R.B. 以外の増感剤として種々の色素を用いて増感酸化を検討し、Table 4 の結果を得た。

Table 4 種々の色素を用いた *L-tryptophan* 1a の増感酸化

sensitizer	mg (mM)	モル当量	反応時間 (hr)	2a (%)	recovery (%)
Methylene Blue ^{a)}	18 (0.05)	$\frac{1}{100}$	1.5	65 (71)	—
" ^{a)}	6 (0.015)	$\frac{1}{300}$	1.6	83	—
Eosin Y ^{b)}	15 (0.2)	$\frac{1}{70}$	3.0	64	—
Proflavine ^{c)}	12 (0.05)	$\frac{1}{50}$	3.5	23	54
Ⓟ-Rose Bengal ^{a)}	11g		8.0	16	86

a) 1a : 1.02g (5mM) 使用 c) 1a : 520 mg (2.5mM) 使用

b) 1c : 306 mg (1.5mM) 使用

Eosin Y の反応では 2c の収率低下、また Proflavine の反応では反応の進行が遅くなる結果を得た(この点に関連した事は P. 41 参照)。一方 Methylene Blue (以下 M.B. と略す。)を $\frac{1}{300}$ モル当量用いた反応では反応はスムーズに進行し、

収率も R.B. の場合とほぼ同じ結果が得られた。更にこの条件で 3a-hydroxypyrroloindole を合成すると、短時間で収率良く反応が進行するだけでなく、CH₂Cl₂ 抽出による R.B. の除去という操作に比べて、M.B. はイオン交換樹脂 (Amberlite CG-50) に付着される為生成物を分離する際容易に M.B. を除ける事から有用であると思える。しかし tryptophan を 2.04g (10 mM) 用いた場合 (P. 20 参照) 及び M.B. を 1/100 モル当量用いた反応の時には 3a-hydroxypyrroloindole 2a の収率低下が見られる。また CH₂Cl₂ 抽出では M.B. を除去する事が困難であり、イオン交換樹脂が使えない反応においては R.B. を使用する方が良い。

最近 R.B. を polymer に付着させた polymer support R.B. (以下 ⊕-R.B. で示す。) を使った増感酸化が報告されている³¹⁾ ⊕-R.B. は 1) 色素が退色しない。2) 分離操作が非常に容易である。3) 何度でも使用できる。等の利点をもっている。そこで ⊕-R.B. を文献既知の方法で合成^{31c)} (chart 19) し、2,3-diphenyl-1,4-dioxene³²⁾ を用いた増感酸化によってこの

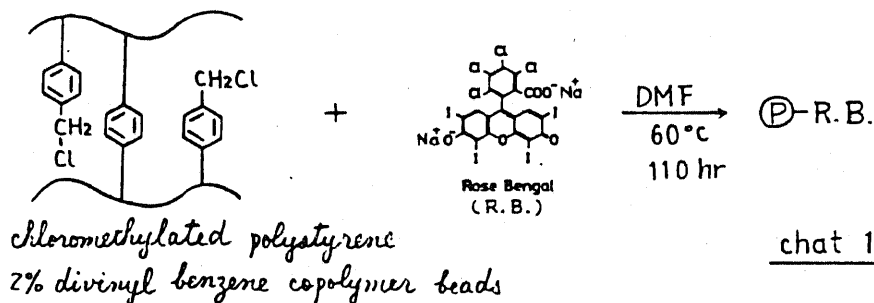


chart 19

⊕-R.B. の活性を確認した後^{31c)} ⊕-R.B. を用いて L-tryptophan 1a の増感酸化を検討した。しかし反応は非常に遅く、8 時間後においても 2a は 16% 生成するのみで 1a を 86% 回収した。最近 Schaap らは hydrophilic polymer を合成し、その polymer と R.B. との反応で合成した増感剤 (⊕-R.B. と表示する。chart 20) を用い水溶液中での増感酸化を行なっ

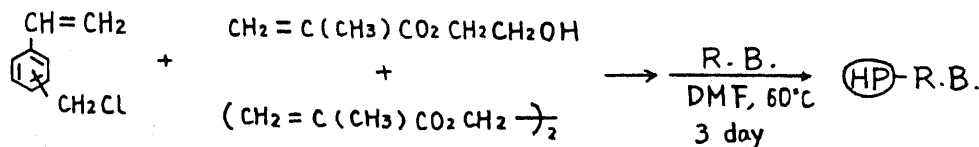


chart 20

ている。³³⁾更に彼らはこの(HP)-R.B.は'hydrophilic nature'の為 nonpolar な溶媒中では使えないとも報告している。この事より(Ⓟ)-R.B.を用いた水溶液中の反応がスムーズに進行しない理由はこの'hydrophilic nature'をこの(Ⓟ)-R.B.がもたない為であろうと思われる。

次にM.B. ($\frac{1}{300}$ モル当量)を用いて50% EtOH-H₂O 溶媒中の反応及び5% EtOH-H₂O中で tryptophan 1を2倍の濃度にした場合の増感酸化を検討した(Table 5)。Table 4のM.B. ($\frac{1}{300}$ モル当量)による結果と比べてM.B.の反応はいづれもその収率が低下した。しかしR.B.を用いると tryptophan 濃度を2倍にしても反応時間が長くなるだけで収率良く2aが得られる事が判った。

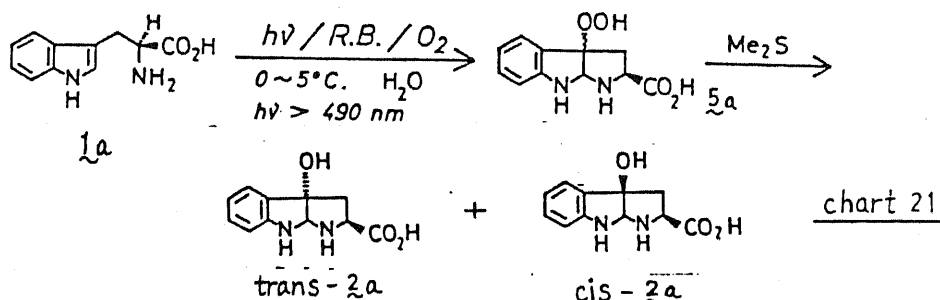
Table 5 tryptophan の種々の条件下における増感酸化

tryptophan	sensitizer ($\frac{1}{300}$ モル当量)	h ν	溶媒 (300 ml)	反応時間	2 (%)
1a, 1.02g (5mM)	M.B.	> 300 nm	50% EtOH-H ₂ O	100 min	54 (2a)
1c, 2.04g (10mM)	"	"	5% EtOH-H ₂ O	2.5 hr	55 (2c)
1a, "	R.B.	490 < 610 nm	"	7.0 hr	77 (2a)

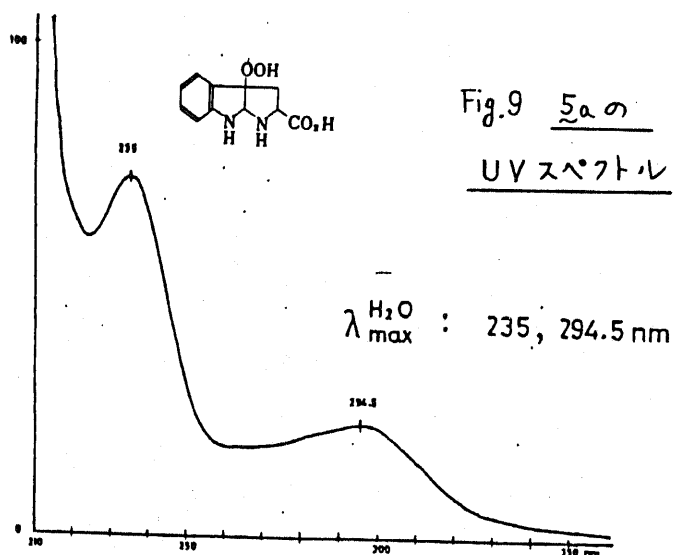
以上の結果から tryptophan 1.02g (5mM), 溶媒として5% EtOH-H₂O (300 ml), 増感剤としてR.B. (15 mg, $\frac{1}{300}$ モル当量)を用いた場合の反応が最も 3a-hydroxypyrroloindole 2の収率が良く、また後処理も比較的容易であるのでこの条件での増感酸化反応を標準の反応として以下の実験を行なった。

第二節 3a-Hydroperoxypyrroloindole の単離と精製 ^{27h) 30) 34)}

前節で述べた様に *tryptophan* 1 の水溶液中における増感酸化, 続く Me_2S 還元で収率良く 3a-hydroxypyrroloindole 2 が得られたので次に中間体の 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a の単離を検討した (chart 21).



L-Tryptophan 1a 1.02 g (5 mM) を 5% EtOH 溶液 (300 ml) 中で R.B. を増感剤として 0~5°C で増感酸化すると 3.5 時間で *tryptophan* 1a は消失する (Iodometry より 99% の活性が認められる。). 反応液を酢酸酸性にした後 CH_2Cl_2 抽出を行なって R.B. を除き、得られた水層 (Iodometry より 92% の活性が認められる。) を凍結乾燥すると 5a が淡褐色の powder (Iodometry より約 85% の活性が認められる。) として得られる。これを更に精製する為に、Sephadex G-10 カラムに通し、目的の fraction を凍結乾燥するとほぼ無色の powder (Iodometry より約 85% の活性が認められる。) の 5a が得られる。5a の UV



スペクトルは典型的な Ph-N-C-N 型 ($\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 236, 294 nm) を示し、(Fig. 9) Mass スペクトルにおいて分子イオン peak が m/z 236 にわずかではあるが認められる。また IR スペクトル (KBr) においては 1615 cm^{-1} 付近に中広く CO_2^- の吸収が見える。

* 他は peak が小さくて読みとれない。

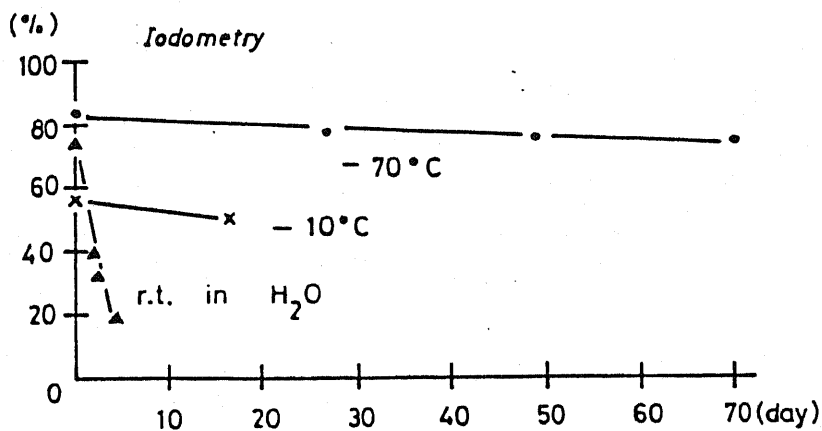
重水中のNMRスペクトルは8a, C₂位のメチンプロトンを除く芳香族プロトンや高磁場側の signal が 3a-hydroxypyrrrole-indole 2の cis,trans 混合物と類似している (Fig. 10, P.).

Hydroxy 体 2a の cis,trans の NMR スペクトルより類推した 5a の C₂位のメチンプロトンは 4.01 (cis), 4.39 (trans) ppm にそれぞれ三重線として見られ, cis,trans の 8a 位のメチンプロトンは 2a より低磁場 shift して, 5.64 (trans), 5.75 (cis) ppm に鋭い一重線として観測される (Table 6). この 8a 位のメチンプロトンの積分比より cis,trans の比率はほぼ 6:4 になっている。また cis,trans は TLC (SiO₂- $\frac{H_2O}{H_2O}$) = 7/3 で分離できる他 HPLC によっても分離でき, 保持時間 8 分, 12 分にそれぞれ約 6:4 の比率で peak があらわれる。

Table 6 5a の NMR スペクトル (D₂O)

250 ~ 3.25 (2H, m, C ₃ -H)
[4.01 (0.6H, t, J=8Hz, C ₂ -H, cis)
[4.39 (0.4H, t, J=8Hz, C ₂ -H, trans)
[5.64 (0.4H, s, C _{8a} -H, trans)
[5.75 (0.6H, s, C _{8a} -H, cis)
6.70 ~ 7.15 (2H, m, Arom. H)
7.15 ~ 7.60 (2H, m, Arom. H)

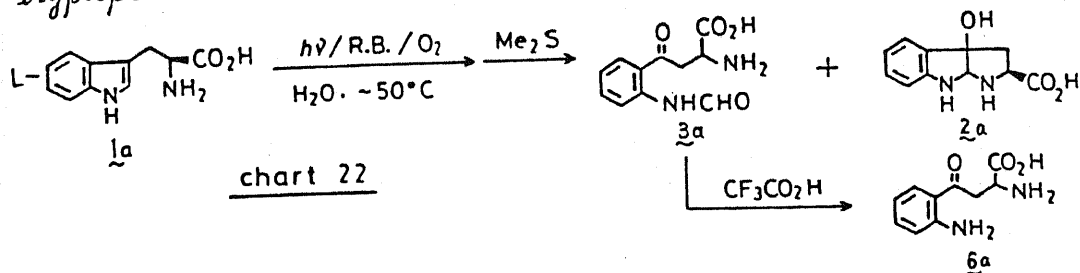
Fig. 11 5a の安定性



この 5a は不安定で, 室温下約 1 日放置すると黒変し, H₂O に不溶なものとなる。powder 5a の -10°C, -50~-70°C における安定性を iodometry で追跡すると Fig. 11 の様になり, -50~-70°C の deep freezer 中に保存すれば 70 日間後でもほとんど変化せず保存できる事が判った。またこの 5a の水溶液を室温で放置すると分解は速く, iodometry より, 5 日間で約 20% に減少し, 約 7 日後には KI starch test 陰性になる。

第三節 50°C 付近での tryptophan の光増感酸化反応

前述の様に tryptophan の水溶液中での増感酸化を 0~5°C で行なうと、もっぱら三環性の hydroperoxide Σ が生成する事が明らかとなったが、我々の研究室での tryptophan 誘導体の増感酸化の知見では反応温度が高くなると formylkynurenine 誘導体の生成が見られる様になる。^{(4), (27)} そこで tryptophan の増感酸化を 50°C 付近で行なう (chart 22)。



即ち反応温度を約 50°C に保ち、前述と同様なスケールで tryptophan 1a の増感酸化を 2.5 時間行なうと、1a は消失したが、反応液の KI starch test はなお陽性である。そこで反応液を室温に冷却後 Me₂S を加えて還元する。過剰の Me₂S, EtOH を留去後酢酸を加えて酸性にし、R.B. を CH₂Cl₂ で抽出除去する。水層*に CF₃CO₂H を加えて室温で攪拌し、formylkynurenine 3a を kynurenine 2a に加水分解する。強酸性陽イオン交換樹脂 Dowex 50-X8 によって分離すると 2a が 21%, 3a-hydroxypyrrroloindole 2a が 48% 得られた。

この様に 0~5°C における反応では全く検出されなかったが、50°C での反応では kynurenine 2a として 21% 単離でき、tryptophan 誘導体で得られている結果と同様な結果が得られた。

更に反応温度を 80~90°C に上げ同様の反応を 3 時間行なったが、この際 tryptophan 1a の残存がかなり見られる。反応混合物の TLC では 2a の生成は全く認められないが、

formylkynurenine が予想したよりはかなり少ないながら認められた。先と同様の後処理を行なったところ 2a が 8%, 及び未反応の tryptophan 1a が 12% 得られた。

更にこの反応においては CH₂Cl₂ 抽出により R.B. と共に CH₂Cl₂ 層に移行する生成物が多量に。しかし CH₂Cl₂ 可溶部は TLC 上

* Amberlite CG-50 で直接分離する事も可能。

多数のspotが見られるので分離精製は行なっていない。

反応温度約 50°C の反応においては 2.5 時間で原料は消失し、また 80~90°C の反応では 3.5 時間後においても TLC からかなりの tryptophan 1a が認められる。これは一旦生成した 3-hydroperoxy indolenine 2a が熱によって原料の 1a へ戻る経路がある為とも考えられる。

3-Hydroperoxy indolenine が加熱により脱酸素して indole 誘導体になる例としては 8^{35a)}, 9^{35b)} の場合について当研究室でのデータがある (chart 23)。その他 lophin hydroperoxide³⁶⁾ でも知られている。

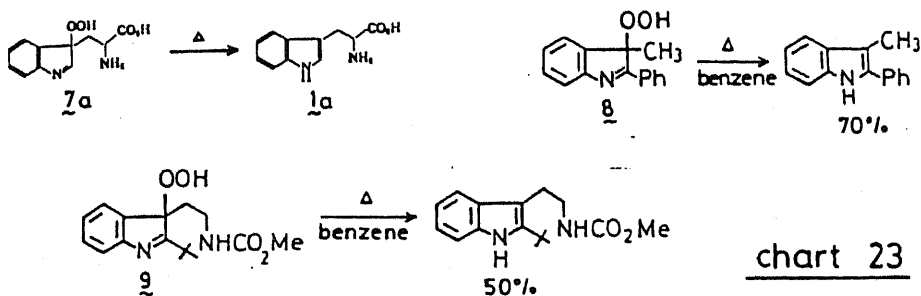


chart 23

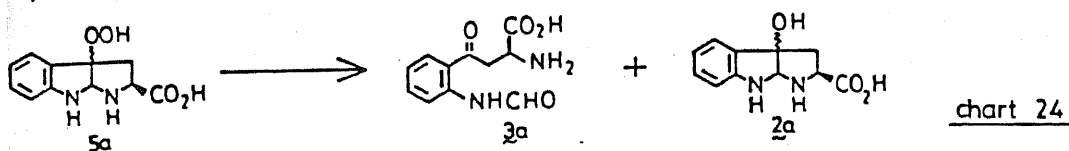
しかし 80~90°C での反応では kynurenine 5a, 1a の他に多くの有機溶媒可溶部分が生成している事から 3-hydroperoxy indolenine 2a が 1a に戻るだけでなく複雑な分解を起こしているものと思われる。

第四節 3a-Hydroperoxypyrroloindole から formylkynurenine への変換

(27h, 30)

第一項 種々の条件下における分解反応

既に 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a の安定性のところで述べたが 5a は水溶液中室温で放置すると約 7 日で 5a は完全に分解する。そこでこの分解生成物を確認する為反応液を Amberlite CG-50 (COOH form) で分離すると、3a-hydroxypyrroloindole 2a が 67% 得られる他に formylkynurenine 3a がわずか 5% ではあるが得られた (chart 24)。



そこで次に 5a の水溶液の加熱による分解反応を検討し、その結果を Table 7 に示す。

Table 7 3a-Hydroperoxypyrroloindole 5a の水溶液の加熱による分解

Method	5a (mg)	H ₂ O (ml)	反応時間 (min)	3a (%)	2a (%)
A ^{a)}	202	1000	6.0	28	21
	224	200	9.5	21	40
B ^{b)}	506	200	21.5	16	39
	214	50	15.0	18	53
	236	10	12.5	12	50

- a) 5a を少量の水に溶かし、沸騰水中へ加え、KI starch test 陰性になるまで加熱する。
b) 5a の水溶液を予め 120~130°C に加熱してある油浴中で KI starch test 陰性になるまで加熱する。

これらの結果から 5a の濃度、加熱の方法により多少はらつきはあるものの formylkynurenine 3a の収率はたかだか 12~28% であり、2a も 21~53% の収率で生成している。しかし tryptophan 誘導体の 3a-hydroperoxypyrroloindole を有機溶媒中で加熱分解した場合に得られた (序論参照) 様な Nb-formyl 体の生成は認められなかった。なお生成した formylkynurenine 3a は tryptophan 1a の O₃ 酸化によって別途合成して得られたサンプルと TLC, UV スペクトル, 融点,

呈色反応, IR スペクトル, HPLC によって比較同定した。

以上の様に 3a-hydroperoxide 5a から formylkynurenine 3a が少量ではあるが得られた事から、更に formylkynurenine 3a の収率向上を目的として種々検討を行なった。

先ず tryptamine 誘導体の 3a-hydroperoxypyrrroleindole の結果を参考にし、銅、鉄イオンの添加による効果を検討した。即ち 5a の水溶液中へ金属イオンを加え、分解反応を追跡し、生成物を分離した結果を Table 8 に示す。

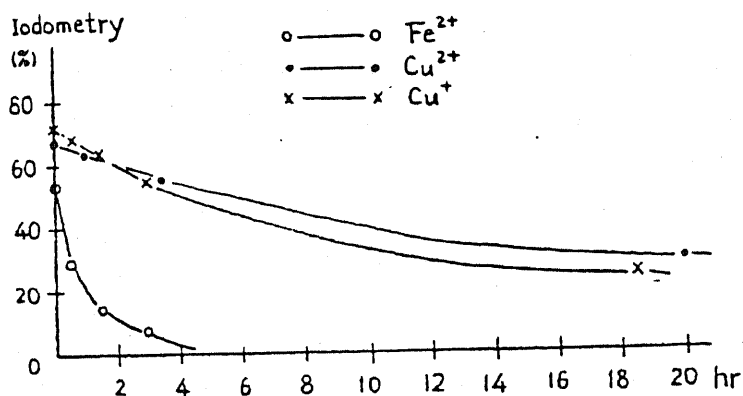
Table 8 金属イオンによる 3a-hydroperoxypyrrroleindole 5a の分解

R_{un}	5a (mg)	H ₂ O (ml)	Metal ion (モル量)	反応時間 ^{a)} (hr)	3a (%)	2a (%)
1	240	100	Fe ³⁺ (0.1)	1.0	4	54
2	193	200	Fe ³⁺ (1.0)	24	1 ^{b)}	17
3	249	100	Fe ²⁺ (0.1)	4.5	1	51
4	225	〃	Cu ²⁺ (0.1)	68	9	59
5	225	〃	Cu ⁺ (0.1)	87	6	60

a) KI starch test 陰性になるまでの時間 b) kynurenine として定量

3a-Hydroperoxide 5a の水溶液に室温で FeCl₃ (0.1 倍モル当量) を添加すると分解は速くなり、1 時間で KI starch test 陰性となる。反応混合物を分離すると 3a が 4%, 2a が 54% 得られた (Run 1)。Fe³⁺ を 0.1 倍モル当量加えると、分解は 0.1 倍モル当量の場合よりも遅く、2a, 3a とも収率は低い (Run 2)。FeSO₄ (0.1 倍モル当量) を添加した場合の分解は速く約 4 時間 (iodometry による経時変化は Fig. 12) で KI starch test 陰性になり、

Fig. 12 5a の分解速度



3a が 1%, 2a が 51% 得られる (Run 3)。CuSO₄・CuCl (0.1 倍モル当量) の添加では分解は余り加速されず 3a 6~9%, 2a 約 60% が得られた (Run 4, 5, Fig. 13)。

この様に Cu^+ , Cu^{2+} と比べ Fe^{2+} , Fe^{3+} による分解の促進は顕著に認められたが、いずれの場合も 3a-hydroxypyrroloindole 2a が主分解物であった。

序論で述べた様に tryptamine 誘導体の 3a-hydroperoxypyrroloindole の SiO_2 触媒による分解反応が良く検討されているので次に 2a の SiO_2 存在下における分解を検討した。この反応では溶媒が H_2O であるのでカラム用の SiO_2 が使用できない為海砂を用いて行なった。即ち 2a の水溶液中に海砂を加え、室温で放置したが、分解は非常に遅く 68 時間後でも 2a が 16% 残存していたが反応を止め、 Me_2S で 2a を還元後分離すると formylkynurensine 2a が 2~3%, 2a が 72% 得られ、未反応の 2a を還元して得られた 2a を除くと 2a の収率は 56% になる。この様に 2a の分解において tryptamine 誘導体の場合とは異なり SiO_2 がこの分解に関与した様子は見られない。この原因としては海砂がカラム用の SiO_2 とは異なって触媒作用をほとんど示さない為か、溶媒の違いによる為ではないかと考えられる。

次に 2a の水溶液の光照射による分解を検討し、その結果を Table 9 に示した。

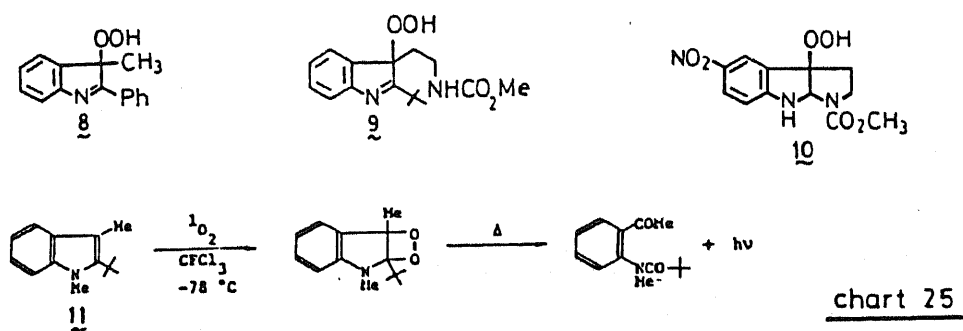
Table 9 光照射による 3a-hydroperoxypyrroloindole 2a の分解 (0~5°C)

h ν (nm)	光源	2a (mg)	H $_2$ O (ml)	反応時間 (hr)	2a (%)	2a (%)	2a (%)
>300	500W halogen lamp	281	350	5	5	38	53
253.7	低圧 Hg lamp (10W)	225	120	5	12	38	27
"	低圧 Hg lamp (60W)	202	300	0.5	11	34	—

500W halogen lamp による照射では 5 時間後でも 53% の 2a が残存し、分解は遅く 2a が 5%, 2a の分解によって生成した 2a が 38% 得られた。これに対して低圧水銀 lamp による照射では分解が促進されるが 2a の収率は 11~12% 程度である。

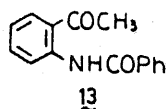
3-Hydroperoxyindolenine 誘導体が aprotic 溶媒中塩基の存在下で分解すると化学発光が認められる事は 1966 年 McCapra ら³⁷⁾が見い出して以来数例の報告がある。^{38a)} 当研究室においても ^{35a)} 8, ^{35b)} 9, ^{38b)} 10 の 3-hydroperoxyindolenine, 3a-hydroperoxypyrroloindole を DMSO 中加熱すると化学発光が観測される

事を見い出しており、生成物の単離、同定を行なっている。更に松浦らは11の -78°C での増感酸化により *dioxetane* の生成を確認し、これを室温に上げると化学発光が見られる事を報告している (chart 25)³⁹⁾。



そこで 3a-hydroperoxytryptolindole 5a の化学発光が見られるかどうかを検討した。5a 約 500 mg に少量の DMSO を加え、暗所において $170 \sim 200^{\circ}\text{C}$ に一気に加熱すると、短時間(約 10 秒)ではあるが肉眼で認められる淡青色の弱い発光が見られた。この発光スペクトルの測定は北海道大学金岡教授、畑中博士に依頼したが、強度が弱く測定できなかった。9,10-Dibromoanthracene 及びアルカリを共存させたが化学発光に変化は認められなかった。

また発光終了後の生成物の分離を検討したが、生成物は複雑な混合物であり、*kynurenine* 5a が確認できなかっただけでなく、単離精製できる化合物も得られなかった。この様に加熱により 5a から弱いながら化学発光が見られた事は *dioxetane* の分解による励起 *formylkynurenine* 3a が生成している可能性も考えられる。しかし 5a の発光スペクトルが測定できておらず、また 8 の発光スペクトルがケトアミド体 13 の蛍光スペクトルと一致しない結果も得られている^{35a)} 事から *dioxetane* の生成の確かなる証拠としては不十分である。



第二項 種々の緩衝液中における分解反応⁴⁰⁾

次に単離した 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a の緩衝液中における分解反応を検討した (chart 26)。その結果は Table 10 に要約した。

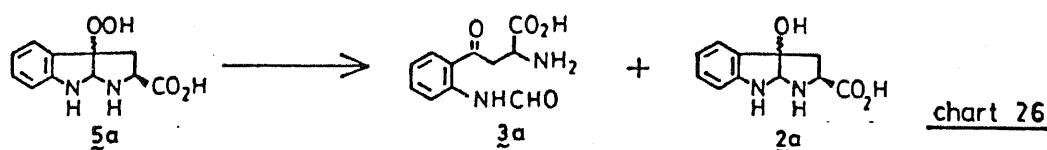


Table 10 緩衝液中における 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a の分解

R _n	5a (mg)	buffer solution	pH	ml	反応時間 ^{b)}	3a (%)	2a (%)
1	209	HEPES ^{a)}	7.3	100	5.5 hr	9	68
2	205	1/30 MKH ₂ PO ₄ - 1/30 MNa ₂ HPO ₄	7.2	40	23.0	43	38
3	229	1/5 MKH ₂ PO ₄ - 1/5 MNa ₂ HPO ₄	8.1	"	22.0	43	30
4	381	0.1 MNa ₂ HPO ₄ - 0.1 MNaOH	11.6	"	5.5	23	20
5	215	0.2 MH ₃ BO ₃ + 0.2 MKCl - 0.2 MNaOH	9.4	"	22.0	25	trace
6	223	1/20 MNa ₂ CO ₃ - 0.1 MNaHCO ₃	8.8	"	80 min	57	7
7	204	"	10.3	"	110	48	9
8	200	0.2 M Na ₂ CO ₃	11.2	"	110	33	+
9	227	10% Na ₂ CO ₃ - 30% HCl	9.7	50	10	62	trace
10	225	10% Na ₂ CO ₃ - CH ₃ CO ₂ H	9.3	40	10	72	6
11	261	"	10.3	50	10	56	20
12	226	"	7.0	40	10	57	-
13	239	H ₂ CO ₃	3.9	50	60	-	101

a) HOCH₂CH₂N  NCH₂CH₂SO₃H

b) KI starch test 陰性になるまでの時間

広く知られている zwitterion 性緩衝液 HEPES を pH 7.3 に調整し、5a を溶解して室温で攪拌すると 5.5 時間で 5a は消失する。反応液を Amberlite CG-50 (COOH form) で分離すると formylkynurenine 3a が 9%, 3a-hydroxypyrroloindole 2a が 68% 得られた (Run 1)。次に pH 7.2 に調整したリン酸 buffer を用いると HEPES buffer よりも分解は遅く、23 時間後に KI starch test 陰性になり分離すると 3a が 43%, 2a が 38% 得られた (Run 2)。この様に緩衝液により分解の速さ及び生成物に差がある事、更にリン酸 buffer を用いた場合 3a が

今までの最高の43%得られた事から5aから3aへの効率よい条件を検討した。

先ず pH 8.1 に調整したリン酸 buffer 中での 5a の分解は pH 7.2 の場合とほぼ同じ 22 時間を要し、反応液から 3a が 30%, 2a が 43% 得られた (Run 3)。更に pH 11.6 のリン酸 buffer 中では分解は促進するが、3a, 2a の収率は低下する (Run 4)。次に pH 9.4 のホウ酸 buffer 中での分解を行なったが反応速度の促進及び 3a の収率向上は見られなかった (Run 5)。しかし pH 8.8 の Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer を用いると分解反応は速くなり、formylkynurenine 3a の収率が 57% に向上した (Run 6)。そこでこの buffer を用いて更に検討した。

即ち pH を 10.3 に上げた同様の buffer 中で反応を行なったところ反応時間はむしろ長くなり、3a, 2a の収率は低下した (Run 7)。また 0.2N Na_2CO_3 (pH 11.2) を用いてもほぼ同様に 3a, 2a の収率が低下した (Run 8)。この様に Run 6, 7, 8 の条件では満足すべき収率ではないが、formylkynurenine 3a が主生成物になる事が明らかとなった。Formylkynurenine 3a の収率が低い原因としては 3a がアルカリ性水溶液中で不安定であると考えられるので、この事を確認する為 3a の水溶液中における安定性を検討した。その結果が Table 11 に示されている。

Table 11 Formylkynurenine 3a の安定性

R_{un}	condition	pH	反応時間	recovery (3a) (%)
1	H_2O (r.t.)	6.6	72 hr	84
2	H_2O (reflux)	"	1	42
3	1/100 N NaOH	12.0	24	17
4	2N NaOH	>12.0	10 min	trace
5	1/20 M Na_2CO_3 - 1/10 M NaHCO_3	8.8	60	54
6	"	10.2	60	53
7	0.2N Na_2CO_3	11.3	60	47
8	10% Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	9.3	10	67
9	15% Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	7.2	10	81

Formylkynurenine 3a を H_2O に溶かし室温で 72 時間攪拌した後分離すると、3a が 84% 回収された (Run 1)。しかしこの水溶液を 1 時間加熱すると、回収率は 42% に低下する (Run 2)。3a

を 1/100 N NaOH に溶解し室温で 24 時間攪拌すると 3a を 17% 回収されるので、他に TLC より多くの生成が認められ

る (Run 3). 2N NaOH 中での 3a の分解は更に速く溶解後 10 分で 3a はほとんど残存しない (Run 4). 次に Table 10 の Run 6, 7 で用いた buffer 中に 3a を溶解すると 1 時間後 3a の回収率はそれぞれ 54%, 53% になった (Run 5, 6) また Run 7 の 0.2N Na_2CO_3 中においては 1 時間後 3a の回収率は 47% に低下する。以上の様にアルカリ水溶液中 3a は不安定である為 3a の収率を向上させるには短時間で 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a が分解する条件を見い出す必要がある。

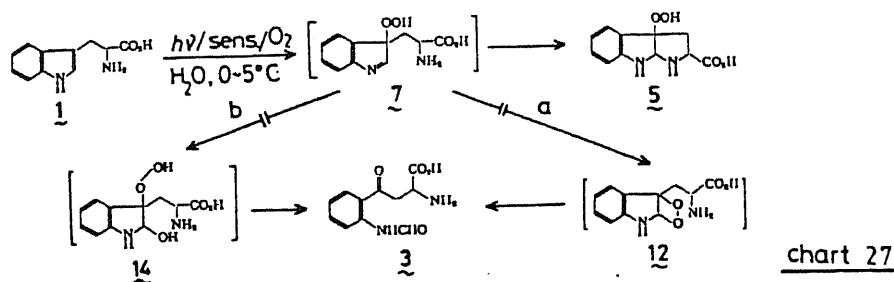
pH 9.7 に調整した 10% Na_2CO_3 -HCl 溶液を用いて 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a の分解反応を行なうと 5a は約 10 分で消失し、分離すると 3a が 62% 得られ、3a は痕跡程度しか確認できなかった (Table 10, Run 9). また 10% Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (pH 9.3) に変えても分解は速く、3a を 72% という良い収率で得た (Run 10). しかし pH 10.3 にすると 3a の収率は低下した (Run 11). これら反応液中における 3a の安定性を検討したところ、pH 9.3 においては約 10 分後 67%, pH 7.2 においては 10 分後 81% しか 3a を回収できない事が判った (Table 11, Run 8, 9). この結果は Na_2CO_3 -HCl (または $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) 溶液中においても 3a はアルカリ性よりも中性の方が安定である事を示している。そこで pH 7.0 に調整した Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中に 5a を溶解すると、アルカリ性の時と同様に 5a は約 10 分で完全に分解し、3a が 57% の収率で得られた (Table 10, Run 12). この Na_2CO_3 -HCl (または $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) 溶液中 5a が効率良く 3a に変換する理由の一つに炭酸イオンの関与があると考えられたので、 CO_2 で飽和させた炭酸水 (pH 3.9) の中で 5a の分解を検討した。しかし反応は全く起こらず 1 時間後 5a を還元を行ない 3a としてほぼ定量的に回収した (Run 13). この様に炭酸イオンのみの関与で 5a から 3a への変換が起こるのではない事が判ったが、詳細な点は今のところ不明である。

以上の様に 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a の熱, 金属イオン, 光, 緩衝液中での分解反応を検討した結果、5a は Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (HCl) 系の溶液中で formylkynurenine 3a へ選択的かつ速かに変換する事が明らかになり、tryptophan 2a $\rightarrow$ 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a $\rightarrow$ formylkynurenine 3a の変換条件を確立する事ができた。

著者の合成した 3a-hydroperoxypyrrroleindole 5a の酵素系への取り込み実験は京都大学医学部早石修教授らによって検討されたが緩衝液中での 5a の分解が速く、酵素系への取り込みが起こったという証拠は得られなかった。

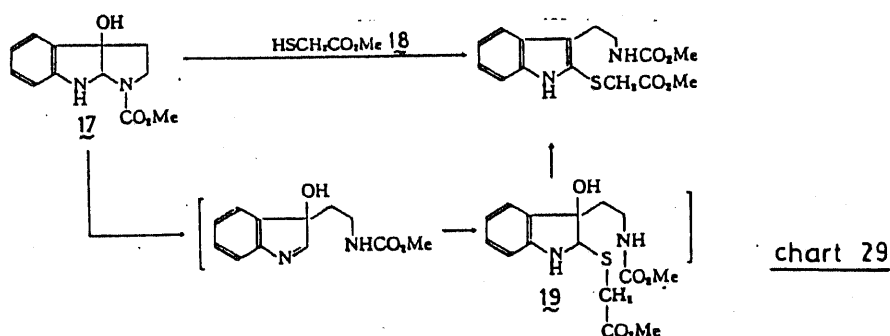
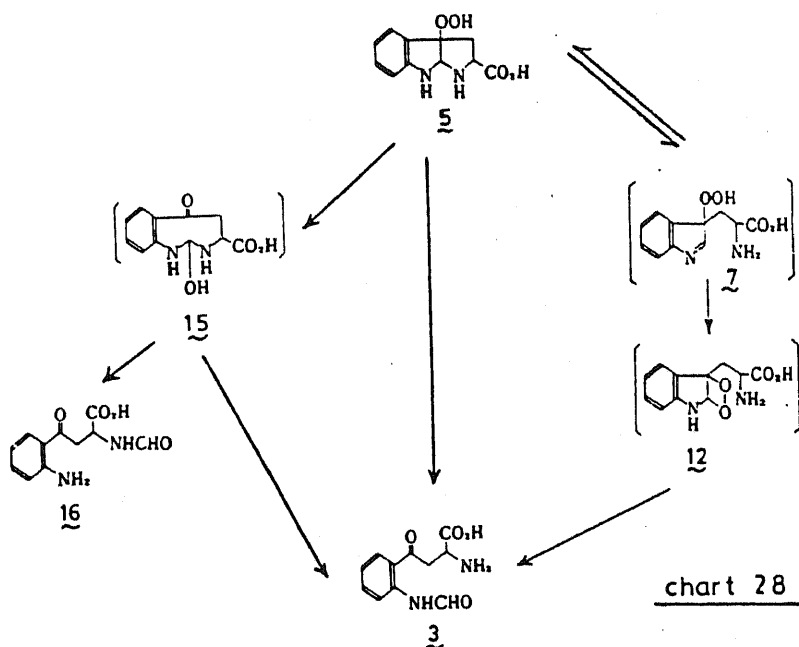
第三項 3a-Hydroperoxypyrroloindole から formylkynurenine が生成する反応機構に対する考察

L-Tryptophan 1a の水溶液中における 0~5°C の増感酸化において、3a-hydroperoxypyrroloindole 5a がほぼ定量的に得られた。5a が単離できた事は 3-hydroperoxy indolenine 7a を安定な形で単離した事になり、従来より推定されていた中間体 7a の存在が証明できた。またこの反応で formylkynurenine 3a の生成が認められなかった事実は chart 27 において path a がこの反応条件では起こらないばかりか、7a に H₂O が付加した水和物 14a を経由する path b も否定される。



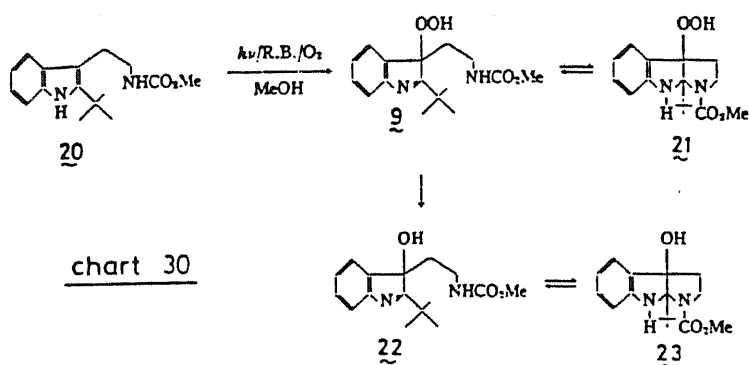
前節で述べた様に 5 は加熱等種々の条件で 3 と 3a が生成するが、3 の生成する機構としては chart 28 に示す path が考えられる。即ち tryptamine, Tryptophan 誘導体の 3a-hydroperoxypyrroloindole から formylkynurenine 誘導体, Nb-formylkynurenine 誘導体が生成する際に提案された 8 員環の hydroxy ketone 15 を経る path (序論 P. 8 参照) が 5 の場合にも考えられる。しかし 5 から 3 への変換の際に Nb-formylkynurenine 16 の生成が認められない為、この path 以外に第二の path として cyclic tautomer 5 から一旦 open chain tautomer の indolenine 7 に戻り、これから dioxetane 12 を経て 3 が生成する path が考えられる。

5 と 7 との間に ring-chain の互変異性が存在する事については chart 29 に示す様に 3a-hydroxypyrroloindole 17 を methyl thioglycolate 18 の様な強い求核剤の存在下で加熱すると 2-alkyl thioglycolate 19 が高収率で得られる事が当研究室の渡辺によって見い出されている⁴¹⁾。また同じく当研究室の片岡は indole の 2 位に t-Butyl 基をもつ tryptamine



誘導体 20 の増感酸化により得た 3-hydroperoxy indolenine 2 の重クロロホルム中の NMR スペクトルにおいて閉環体である 3α-hydroperoxypyrroloindole 21 との間に平衡が観測され、更に還元された 3-hydroxy indolenine 22 も重クロロホルム中及び重メタノール中の NMR スペクトルで 23 との間に平衡が存在する事を確かめた^{27h) 35b)} (chart 30).

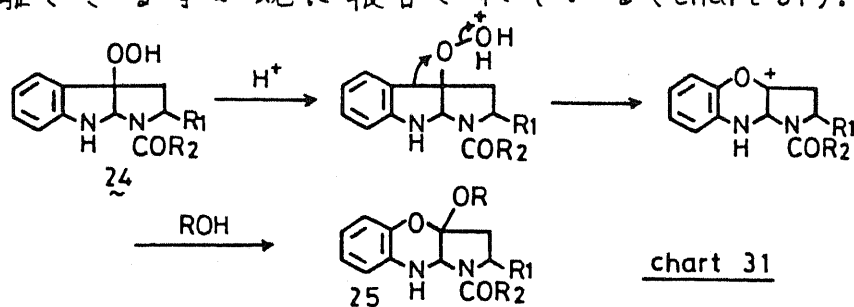
以上の様なモデル化合物で得られた証拠より、tryptophan 自身の 5 と 7 との間にも平衡が存在する事が考えられる。Tryptophan 1 の場合に Nb-formylkynurenine 16 が得られない事、及び緩衝液中で 5 から 3 への収率が良くなる事から最初の path よりも第二の path の可能性が強いと考えられるが、3-hydroperoxy indolenine 7 から formylkynurenine 3 へは



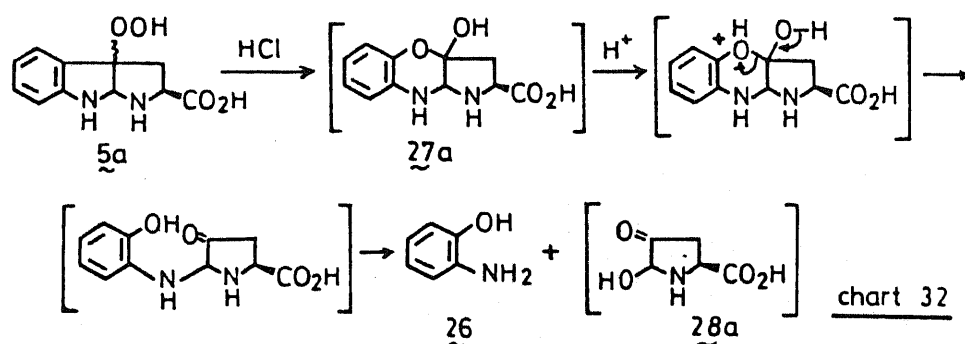
dioxetane 12 を経由するのか或いは水和物 14 経由かについては区別し難い。またこれら以外の 5 から 3 への path がある可能性も除外できない。

第四項 3a-Hydroperoxypyrroloindoleの酸による分解反応

序論で述べた様に *tryptamine*, *tryptophan* 誘導体の 3a-hydroperoxypyrroloindole 24 を酸で処理すると酸触媒により Baeyer-Villiger 型転位反応を起こして 1,4-benzoxazine 25 が単離できる事が既に報告されている (chart 31).



1,4-Benzoxazine 25 は硫酸で処理すると o-aminophenol 26 が単離でき、これは 25 が加水分解して生成すると考えられている。



そこで 3a-hydroperoxypyrroloindole 5 の酸による反応を検討した。即ち L-tryptophan 1a の 0~5°C における増感酸化によって得られた反応液 (3a-hydroperoxide 5a が主生成物である事を確認) に塩酸を加え、室温で 17 時間攪拌すると KI starch test が陰性になる。この反応液を後処理すると 1,4-benzoxazine 型の化合物は得られず、o-aminophenol 26 が 40% 得られた。他に 3a-hydroxy 体 2a が 24% 得られた。o-Aminophenol 26 は標品の融点、UV スペクトル、IR スペクトル、TLC との比較により同定した。この結果は 5a が *tryptamine*, *tryptophan* 誘導体の場合と同様に塩酸によって Baeyer-Villiger 型転位が起こり、先ず 1,4-benzoxazine 27a が生成するが、この

27aは単離できず反応系中で直ちに加水分解を受けて
 o-aminophenol 26 へ変換したものと考えられる (chart 32).
 同時に生成すると考えられる proline 誘導体 28a の単離を
 試みたが、成功しなかった。

この様に 5 から塩酸で容易に o-aminophenol 26 が生成す
 る事は、tryptophan 1 から o-aminophenol 26 の生合成ル
 ートとして chart 33 に示すルートが現在知られているか。
 このルートの他に tryptophan 1 から 5 を経るルートの可
 能性もあると思われる。

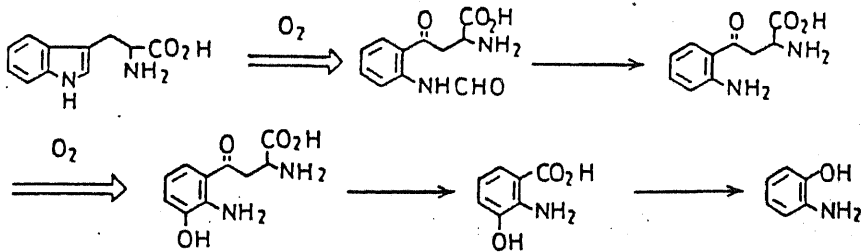


chart 33

第二章 Tryptophan の種々の緩衝液中における 光増感酸化反応

第一節 Tryptophan から formylkynurenine への 直接的変換法 (Tryptophan 2,3-dioxygenase のモデル反応)

前述した様に 0~5°C での tryptophan 1 の増感酸化では formylkynurenine 2 の生成は全く認められないが、約 50°C での反応においては少量ながら 2 の生成が確認された。しかし収率は低く tryptophan 2,3-dioxygenase のモデル反応とはなりにくい。一方単離した 3a-hydroperoxypyrrolo-indole 3 は 10% Na₂CO₃-HCl (または CH₃CO₂H) 溶液中ではよく分解し、2 が収率良く得られる事が明らかとなったのでこの溶液中における L-tryptophan 1a の増感酸化を検討した (chart 34)。その結果を Table 12 に示す。

L-Tryptophan 1a 510 mg (2.5 mM) を 10% Na₂CO₃-HCl (285 ml):

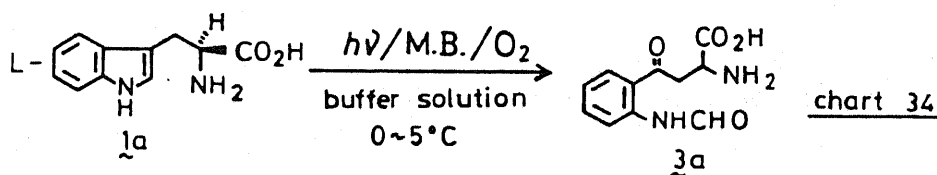


Table 12 Na₂CO₃-HCl (CH₃CO₂H) 溶液中における L-tryptophan 1a
の増感酸化

R _{un}	buffer solution	reaction temp.(°C)	M.B.(%濃)	initial pH	hν(nm)	反応時間(min)	3a(%)	2a(%)
1	10% Na ₂ CO ₃ -HCl	7~20	0.1	9.4	>300	30	43	—
2	〃	0~5	〃	6.9	〃	〃	40	—
3	〃	〃	0.02	〃	〃	〃	37	—
4	7% Na ₂ CO ₃ -CH ₃ CO ₂ H	〃	〃	7.1	>550	90	52	—
5	5% 〃	〃	〃	6.9	〃	30	50	—
6	5% NaHPO ₄ -CH ₃ CO ₂ H	〃	〃	7.0	〃	120	trace	45
7	5% Na ₂ CO ₃ -CH ₃ CO ₂ H	〃	〃	〃	〃	30	54 ^{a)}	—
8	2% 〃	〃	〃	〃	〃	25	37 ^{b)}	—

a) Me₂S で還元した場合: 40% b) Me₂S で還元した場合: 29%

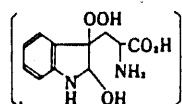
pH 9.4) - EtOH (25 ml) に溶解して、増感剤として M.B. ($\frac{1}{10}$ モル当量) を加え内温約 20°C で酸素を通じながら Pyrex filter ($>300\text{ nm}$) を透して 500W halogen lamp を照射すると、UV スペクトルより約 30 分で $1a$ は消失する。UV スペクトル, TLC ($\text{SiO}_2 - n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O} = 7/3$) から *formylkynurenine* $3a$ の生成が認められたので直ちに Amberlite CG-50 で分離すると、 $3a$ のみが 43% の収率で得られた (Table 12, Run 1). 同様の反応を $0\sim 5^{\circ}\text{C}$, pH 6.5 で行なう (Run 2) か、M.B. 量を $\frac{1}{50}$ モル当量に減少させた場合 (Run 3) にもほぼ同様の結果が得られた。一方 pH 7.1 の 7% $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中で M.B. ($\frac{1}{50}$ モル当量) を加えて Pyrex filter ($>300\text{ nm}$) ではなく液体 filter ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $>550\text{ nm}$) を透した光を照射すると反応は少し長くなるが、*formylkynurenine* $3a$ の収率が 52% に向上した (Run 4). また Na_2CO_3 の変わりに NaHCO_3 を用いて反応すると約 30 分で $1a$ は消失し、 $3a$ を 50% 得た (Run 5). しかし Na_2CO_3 , NaHCO_3 の変わりに $\text{NaHPO}_4 - \text{NaOH}$ (pH 7.0) の緩衝液を用いると反応速度は遅くなり、 $3a$ は痕跡量しか認められず $3a$ -hydroxypyrroloindole $2a$ のみが得られ、上述の溶液とは全く異なった結果となった (Run 6). この様に $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (HCl) 中で *tryptophan* の増感酸化を行なうと、*formylkynurenine* が比較的収率良く直接得られる事が明らかとなり、この条件での増感酸化が *tryptophan* 2,3-dioxygenase のモデル反応として良い事が判った。

一方 5% $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 中で前述と同様の反応を行なったところ、 $1a$ は約 30 分で消失する。しかし Run 1~5 の反応液は KI starch test 陰性であったのに対して、この反応で得られた反応液は KI starch 陽性を示す。中間体と考えられる過酸化物 [A] の分子量を $3a$ -hydroperoxypyrroloindole と同じ 236 と仮定すると *iodometry* から [A] の収率は約 40% となる。この反応液を室温に放置すると約 1 時間で KI starch test 陰性になり、分離すると $3a$ のみが 54% の収率で得られた。また [A] の構造を確認する為に反応液を Me_2S で還元後分離すると、 $5a$ が還元されて得られると予想した $2a$ は全く得られず、また単離精製できる様な生成物も得られず $3a$ のみが 40% の収率で得られた (Run 7). また 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中の反応においても約 30 分で $1a$ は消

失し、反応液は KI starch test 陽性である。Iodometry より [A] の収率は約 50% で、室温下放置すると約 3.5 時間後に KI starch test 陰性となる。これを分離すると先と同様 3a のみが 37% 得られる。それに対して直接還元すると 3a は 29% に減少する (Run 8)。

この様に $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中における増感酸化では一旦 5 が生成、これから 3 が生成するのではなく、5 以外の過酸化化物 [A] が生成し、 $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中で [A] は 3 に変化すると考えられる。この構造未知化合物 [A] は 7~10% $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中では反応中に *formylkynurenine* 3 に変化すると考えられ、反応終了時には存在しないが、2~5% $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中では反応終了時にも残存し、KI starch test は陽性となる。この [A] は還元しても 3 や 3a-*hydroxypyrroloindole* 3 に変化しない事、及び反応終了時の反応液の pH がアルカリ性になっている事から [A] として 14 も考えられるが、14 であれば還元すると *oxy-Tryptophan*^{**29} かまたは 3a-*hydroxypyrroloindole* 3 が単離されてもよいはずであり、[A] の構造は不明である。

なお対照実験として 1a を 10% $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液に溶解させ室温で 90 時間攪拌すると、1a を 82% 回収する以外に 3a を 7% 得た。この様に $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中の反応では増感剤、酸素、光が欠けると速かなる 1 から 3 への変換が起こらない事は明らかである。



14

- * $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中で酸素を通じながら増感酸化を行なうと、 CO_2 ガスが逃げる為か反応の進行と共に pH は高くなる。
($\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中 (pH 6.9) に酸素を通じると、15 分後 (pH 7.6), 30 分後 (pH 7.7), 60 分後 (pH 8.1) の様に pH が上がる。)

- ** *hydroxytryptophan*^{56) 67)}, *α-hydroxytryptophan*^{55) 57) 16b)}, *2-hydroxytryptophan*^{60) 62a) 63)}, *β-oxindole-3-alanine*⁵⁷⁾, *β-3-oxindolyl-alanine*⁵⁶⁾ の様な種々の名称があるが著者はこの名称で統一する。

既に *tryptophan* の水溶液中での増感酸化において種々の増感剤によって反応速度に差がある事を述べたが、 Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中における反応でも種々の増感剤を用いて増感酸化を行ない、その結果を Table 13 に示した。

Table 13 種々の増感剤における Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 中での *tryptophan* 1a の増感酸化

sensitizer*	モル当量	$h\nu$ (nm)	反応時間 (hr)	3a (%)	recovery (1a) (%)
Toluidine Blue (T.B.)	0.06	>400	2.0	37	—
Rose Bengal (R.B.)	0.02	>490	3.5	58	—
Rhodamine B (Rh.B)	"	"	4.5	18	71
Acriflavine (A.F.)	"	>400	3.0	35	43
Proflavine (P.F.)	"	"	"	21	46
Acridine Orange (A.O.)	"	"	"	28	54

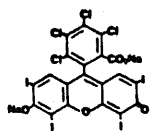
T.B. では M.B. よりも反応は遅く、*formylkynurenine* 3a の収率も低い。それに対して R.B. では反応は遅いが、比較的収率良く 3a を得る。しかし R.B. を用いた反応は反応液から色素を除去する事が困難である為、3a の合成には M.B. と比べ不利である。一方 R.B. と同じ Xanthene 系の Rh.B. では反応は非常に遅く、4.5 時間反応を行なっても *tryptophan* 1a を 71% 回収する。

また Acridine 系の色素はいずれも反応は遅く、3 時間反応しても約 50% の 1a を回収する。

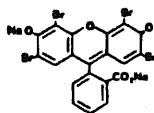
以上の様に Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中の反応も水溶液中の反応とほぼ同様な結果を得た。

*

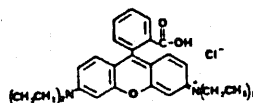
Rose Bengal



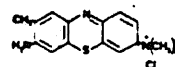
Eosin Y,



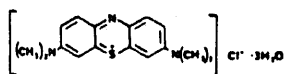
Rhodamine B



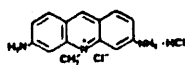
Toluidine Blue



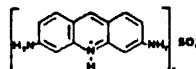
Methylene Blue,



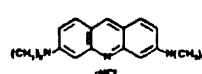
Acriflavine



Proflavine



Acridine Orange,



第二節 種々の pH における酸化生成物の解析⁴⁰⁾

第一項 Acetate buffer, Phosphate buffer

序論で述べた様に *tryptophan* の増感酸化における pH の影響の研究は 1951 年以來研究され、いづれも高い pH で酸化反応が速い事を報告しているが、その際の生成物についての検討はなされていない。^{20a, b, c, f, g, i, k, l})

前述のごとく水溶液中の増感酸化では 3a-hydroperoxypyrroloindole 5 のみが得られ、 Na_2CO_3 - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 溶液中では formylkynurenine 5 のみが得られ、条件が変わる事により生成物も変化する事が判った。そこで acetate buffer, phosphate buffer を用いた種々の pH における増感酸化の速さ(第二節第三項参照)とその生成物を検討した。

この反応の追跡は UV スペクトル, HPLC を使い、*tryptophan* 1a の消失した時点で反応を終える。反応液は還元後 Amberlite CG-50 で分離し、3a-hydroxypyrroloindole 2a と 3a の UV スペクトルを観測する事で定量する他に HPLC による定量も行なった (chart 35)。その結果を Table 14 に示す。

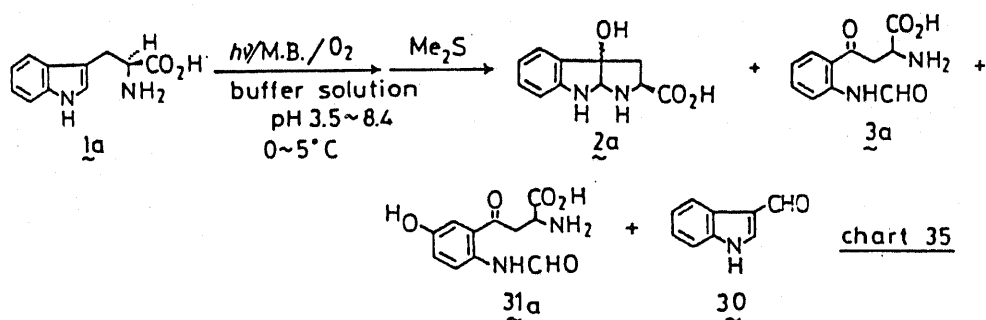


Table 14 種々の pH における L-tryptophan 1a の増感酸化

Run	buffer solution (ml)	pH	1a mg (mM)	M.B. (% 1.5g)	反応時間 (hr)	2a (%)		3a (%)	31a (%)	30	recovery 1a (%)
						UV	HPLC				
1	$\frac{1}{10}$ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (10) - $\frac{1}{10}$ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (320)	6.2	499 (2.4)	$\frac{1}{100}$	1.0	47	46	—	—	trace	—
2	" (80) - " (320)	5.3	502 (2.5)	"	1.5	68	69	—	—	"	—
3	" (204) - " (196)	4.6	500 (2.5)	"	4.0	62	69	—	—	—	—
4	$\frac{1}{5}$ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (204) - " (196)	4.7	502 (2.5)	"	1.5	54	61	—	—	—	27

5	$\frac{1}{5}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (328) - $\frac{1}{5}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (72)	4.0	204 (1.0)	$\frac{1}{50}$	3.5	54	63	—	—	—	—
6	" (370) - " (30)	3.5	205 (")	"	"	53	55	—	—	—	—
7	" (") - " (")	3.6	" (")	$\frac{1}{100}$	"	58	66	—	—	—	—
8	$\frac{1}{10}\text{KH}_2\text{PO}_4$ (10) - $\frac{1}{10}\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (320)	8.4	506 (25)	$\frac{1}{50}$	1.0	14	15	trace	17	trace	—
9	" (50) - " (400)	7.7	503 (")	$\frac{1}{100}$	"	18	15	"	21	"	—
10	" (150) - " (300)	7.1	505 (")	"	"	58	59	"	trace	"	—
11	" (400) - " (50)	5.9	509 (")	"	2.0	56	74	1	"	"	1

pH 6.2 に調整した acetate buffer ($\frac{1}{10}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ - $\frac{1}{10}\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$: 285 ml - EtOH 15 ml) に tryptophan 1a 499 mg (2.4 mM) (この量以上の 1a を用いると、buffer に溶解後 pH が変動する。) を溶解し、酸性からアルカリ性まで広く使用できる増感剤として M.B. ($\frac{1}{100}$ モル当量) を加えて 0~5°C で酸素気流下 500 W halogen lamp で光照射すると、約 1 時間で 1a は消失する。反応液を分離すると 3a-hydroxypyrroloindole 2a が 47% (UV 定量, HPLC: 46%) 得られるが formylkynurenine 3a の生成は確認できず、痕跡量の 3-formylindole 30 の生成を確かめた (Table 14, Run 1)。pH 5.3 では反応の進行は少し遅くなるが、生成物は Run 1 と同様 2a (UV 定量: 68%, HPLC: 69%) と痕跡量の 30 を得た (Run 2)。pH 4.6 での反応は 1a が消失するのに 4 時間必要であるが、生成物としては 2a のみであった (UV 定量: 62%, HPLC: 69%) (Run 3)。なお同様の反応を 1.5 時間で中断すると、1a を 27% 回収する他に 2a を約 60% 得た (Run 4)。この事から反応が長くなると 2a の生成と共に分解が起こっている事が明らかとなった。pH 4.0, 3.5 の反応では 1a を acetate buffer 中に溶解した際、pH が変動しない様に 1a の量を 204 mg (1 mM) に減らして反応した。しかし反応はかなり遅く、1a が消失するのに 3.5 時間を要した。生成物は 2a のみである (Run 5, 6)。なお M.B. の量が $\frac{1}{100}$ モル当量でも $\frac{1}{50}$ モル当量でも生成物の収率はあまり変化しない (Run 7)。

以上の様に acetate buffer を用いた酸性側の反応では、生成物として 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a を 2a として 50~70% の収率で得た。

次に 1a 505 mg (2.5 mM) を phosphate buffer ($\frac{1}{10}\text{M KH}_2\text{PO}_4$ - $\frac{1}{10}\text{M Na}_2\text{HPO}_4$: pH 8.4) に溶解し、M.B. ($\frac{1}{50}$ モル当量) 存在下

酸素を通じながら光照射すると(内温: 0~5°C) 約1時間で1aが消失する。還元後分離すると2aを15%得た他に、痕跡量の3aの生成が認められた。更にイオン交換樹脂による分離で3aの前に溶出する未知化合物3laがあり、H₂Oを留去すると淡黄色 powder になり、今までの増感試薬では得られなかった新しい生成物が得られた(Run 8)。pH 7.7 の同様な反応(M.B. は 1/100 モル当量に減らす。)では Run 8 と同じく 1a は1時間で消失し、生成物に関しても 2a を18% (UV 定量, HPLC: 15%) 得る他に痕跡量の 3a と 3la を 330mg 得た(Run 9)。更に pH 7.1 にすると 2a の収率が向上し、約 60% 得られる他に微量の 3la が得られた(Run 10)。しかし pH 5.9 に下げると反応は遅くなり、1a の消失に2時間を要する。生成物は 2a が得られる他に 3a を得た。しかし 3la の生成は認められなかった(Run 11)。なお phosphate buffer 中のいずれの反応の場合にも 3a の生成を TLC から認めた。

この未知化合物 3la のスペクトルデータは Table 15 に示

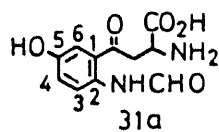


Table 15 3la のスペクトルデータ

UV	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$	235, 261 ^{sh} , 340 nm
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}-\text{OH}^-}$	243, 285 ^{sh} , 357 nm
IR	$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$	3200 br, 1635 br, 1510 cm^{-1}
NMR b) $\delta_{\text{ppm}}^{\text{5\%CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{D}_2\text{O}}$		3.78 ~ 4.12 (2H, m, CH ₂)
		4.48 ~ 4.75 (1H, m, CH)
		7.25 (1H, dd, J=9, 2 Hz, C ₄ -H)
		7.61 (1H, d, J=2 Hz, C ₆ -H)
		7.90 (1H, d, J=9 Hz, C ₃ -H)
HPLC ^{a)}		$t_R = 10.7 \text{ min}$

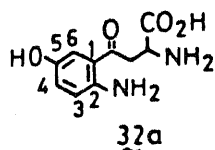
a) Packing Material: Nucleosil 5C-18
 Eluent: $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 9/1$, Press: 110 kg/cm²
 Temp.: r.t. cf) 1a: $t_R = 19.4 \text{ min}$,
 2a: $t_R = 15.3 \text{ min}$

b) CHO は観測されない。

これらのデータより 3la の構造は

すとおりであり、UV スペクトルは formylkynurenine 型の吸収を示し、アルカリを添加すると深色移動(酸を加えると元の吸収に戻る。)する事から formylkynurenine は自身でなく、ベンゼン部位へ OH 基が導入されているのではないかとと思われる。また NMR スペクトルから 7.25 ppm は 4 位のプロトン、7.61 ppm は 6 位のプロトン、7.90 ppm は 3 位のプロトンであると思われる。3 位のプロトンの低磁場 shift が観測される。

5-hydroxy-formylkynurenine であると推論した。31aを $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ - D_2O に溶解し、約1時間後に再びNMRスペクトルを測定すると31aとは異なる結果が得られた。これは31aから脱formyl化して32aが生成したと思われる。32aのスペクトルデータを Table 16 に示す。UVスペクトルは *kynurenine* 型



を示し、アルカリを添加すると31aと同様深色移動する。NMRスペクトルでは3位のプロトンが高磁場にshiftして7.51 ppm に観測される。次に31aの構造

Table 16 32a のスペクトルデータ

UV	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$	220, 255 ^{sh} , 319, 382 nm
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}-\text{OH}^-}$	229.5, 409 nm
NMR	$\delta^{\text{5\%CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{D}_2\text{O}}$	4.06 (2H, d, $J=4\text{Hz}$, CH_2)
		4.70 (1H, t, $J=5\text{Hz}$, CH)
		7.31 (1H, dd, $J=9, 2\text{Hz}$, $\text{C}_4\text{-H}$)
		7.51 (1H, d, $J=9\text{Hz}$, $\text{C}_3\text{-H}$)
		7.66 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, $\text{C}_6\text{-H}$)

を確実にする為に以下の反応を行ない34aを得た。即ち31a 130 mg を H_2O 120 ml に溶解し、 $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ 1 ml を加えて室温で攪拌すると、UVスペクトルから約2時間後に32aの生成が認められる。この反応液をアルカリ

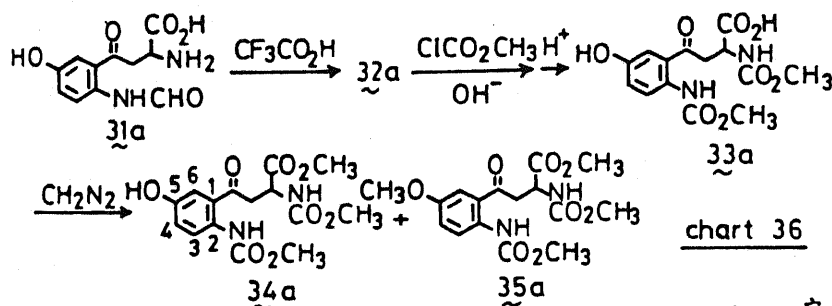
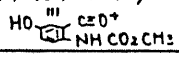


chart 36

性にして ClCO_2CH_3 でアシル化を行ない酸性にした後 CH_2Cl_2 抽出すると33aを得る。33aの Et_2O 溶液に CH_2N_2 を加えてメチル化をし、 SiO_2 カラムで分離すると淡黄色 caramel として34aを得る。(メチル化を短時間で止めた為か35aは少量しか得られず、34aが主生成物となった。)(chart 36) 34aのスペクトルデータを Table 17 に示す。UVスペクトルでアルカリ添加による深色移動が見られ、NMRスペクトルでベンゼン部位の chemical shift 及び coupling pattern より5位にOH基がある事が推定される。Massスペクトルで34aの分子量に対応する m/z 354 に分子イオン peak が認められる。以上の事より34aの構造は支持されるが、純品を得る

Table 17 34a のスペクトルデータ

UV	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$	236, 263, 366 nm
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}-\text{OH}^-}$	248, 277 ^{sh} , 408 nm
IR	$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$	3340 br (NH), 1730 br (C=O), 1530 (NHCO)
Mass	m/z (%)	354 (M ⁺ , 32), 194 (12), 162 (100) 
NMR	δ^{CDCl_3} a)	3.32 ~ 4.02 (2H, m, CH ₂) 3.69 (3H, s, CO ₂ CH ₃) 3.76 (3H x 2, s, 2 x CO ₂ CH ₃) 4.57 ~ 4.83 (1H, m, CH) (D ₂ O 添加) 4.69 (1H, dd, J=4.4 Hz) 5.92 (1H, br. d, NHCO) 7.05 (1H, dd, J=9.3 Hz, C ₄ -H) 7.27 (1H, d, J=3 Hz, C ₅ -H) 8.21 (1H, d, J=9 Hz, C ₃ -H) 10.48 (1H, s, Ar-NH)

a) OH は観測されない。

側では 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a が主生成物であり、formylkynurenine 3a は痕跡量しか得られないが、アルカリ性側になると 5a の収率が低下し、痕跡量の 3a と 5-hydroxyformylkynurenine 3a が約 20% 生成する事が明らかとなった。

には至っていない。
なお 35a の構造は UV スペクトルでアルカリ添加による深色移動が見られない事、及び Mass スペクトルで m/z 368 に分子イオン peak が認められる事から推定した (実験の部参照)。

34a の様に tryptophan のベンゼン部位へ OH 基が導入された化合物が tryptophan の増感酸化で得られたという報告は少なく、吉田ら^{20d)} 及び Benassi ら^{22a)} の例のみである。

この様に phosphate buffer において酸性

第二項 酸性、アルカリ性水溶液

今まで述べた様に *tryptophan* の増感酸化を水溶液中、緩衝液中で行なうと生成物が異なる事が判った。

そこで更に酸性及びアルカリ性水溶液中での増感酸化の検討を行ない Table 18 の結果を得た。

Table 18 酸性、アルカリ性水溶液中での L-*tryptophan* 1a の増感酸化

Run	solvent	pH	反応時間 (hr)	反応温度 (°C)	2a (%)		3a ^{a)} (%)	recovery (1a) (%)
					UV	HPLC		
1	5% HCl	< 1	4.0	0~5	—	—	—	77
2	1/100 N HCl	2.5	5.0	〃	81	98	—	2~3
3	1/10 N CH ₃ CO ₂ H	3.0	4.5	〃	67	75	—	trace
4	2~3% Na ₂ CO ₃	8~9	2.0	30	—	—	29	—
5	〃	〃	2.0	50	—	—	11	—

a) CF₃CO₂H で加水分解した後 *kynurenine* 2a として定量

5% HCl (285 ml) - EtOH (15 ml) に *tryptophan* 1a 1.02 g (5 mM) を溶解し、M.B. (1/300 モル当量) を増感剤として 0~5°C で 4 時間光照射したが、反応は全く進行せず 1a を 77% 回収した (Table 18, Run 1)。一方 1/100 N HCl (pH 2.5) 中の反応では水溶液中の反応と比べ反応は遅いが、5 時間後にほぼ 1a が消失する。Me₂S で還元して分離すると、2a を 81% (UV 定量, HPLC: 98%) の収率で得た (Run 2)。また 1/10 N CH₃CO₂H (pH 3.0) 中、1a 507 mg (2.5 mM), M.B. (9 mg, 1/100 モル当量) の条件で反応すると、4.5 時間後にほぼ 1a は消失し、2a を 67% (UV 定量, HPLC: 75%) の収率で得た (Run 3)。

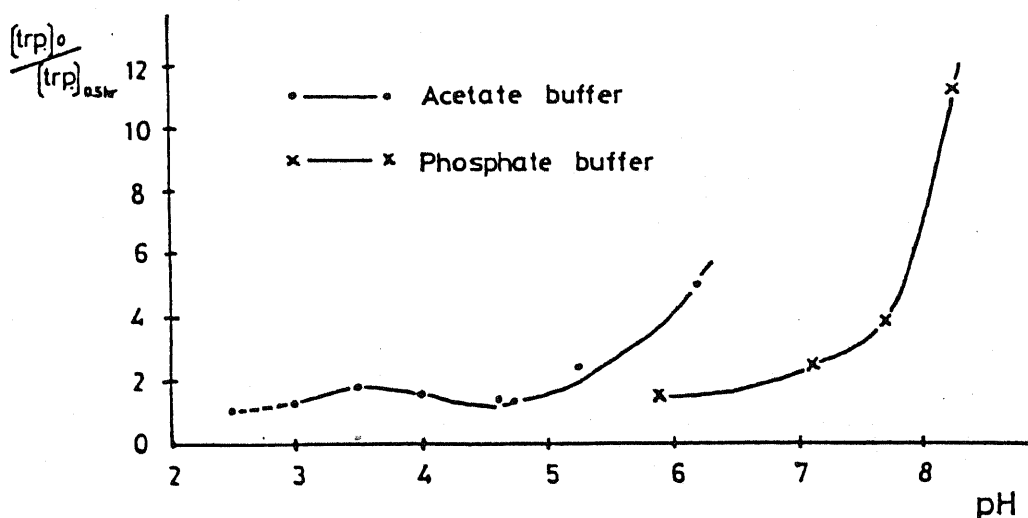
Na₂CO₃ 水溶液中 (pH 8~9) 内温約 30°C で反応を行なうと (1a: 1.02 g) 2 時間で 1a は消失する。多くの生成物が TLC から認められるが、分離すると *formylkynurenine* 2a (CF₃CO₂H で加水分解し *kynurenine* 2a として定量) が約 29% 得られた。しかし 3a の生成は認められなかった (Run 4)。内温を 50°C に上げて先と同様な反応を行なうと 3a の収率低下が認められた (Run 5)。

以上の様に < pH 1 では増感酸化は進行しないが、pH 2.5~3.0 付近では反応は遅いが 2a のみ生成する。しかしアルカリ性水溶液中の反応は複雑になり、2a は得られないが、3a を少量得る事ができる。

第三項 総括

前節で述べた $\frac{1}{10}$ N $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, $\frac{1}{100}$ N HCl , acetate buffer, phosphate buffer 中における増感酸化の反応速度を求めた。方法としては HPLC から得られる Tryptophan 1a の反応 30 分後の減少率を求め、縦軸に 1a の減少率、横軸に種々の pH をとりプロットすると Fig. 13 が得られる。この結果から、以前の研究者らによって報告された結果と同様 pH が高くなると酸化速度も速くなる事が明らかとなった。

Fig. 13 L-Tryptophan の増感酸化の反応速度

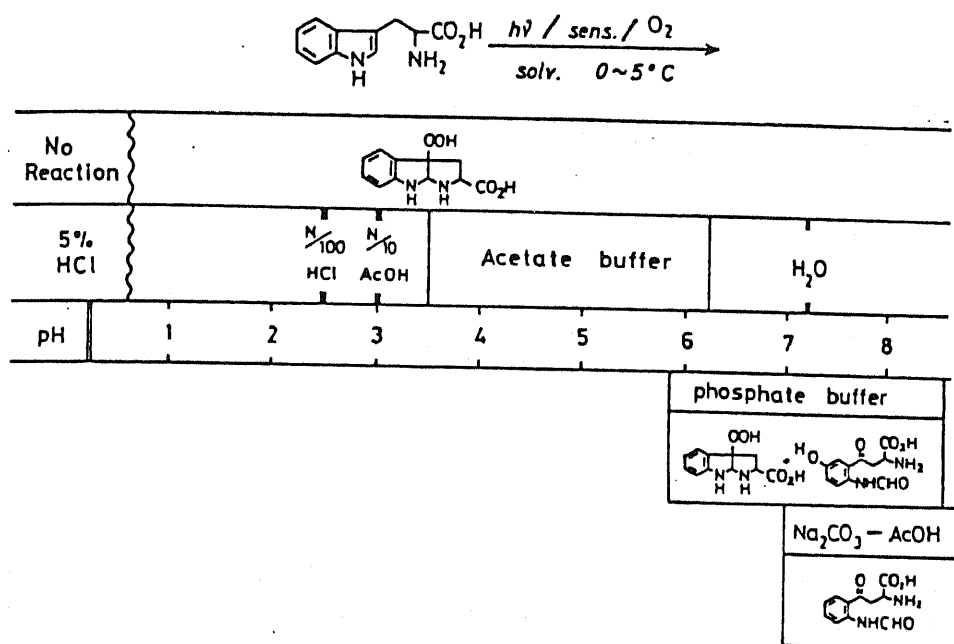


次に L-tryptophan 1a の種々の溶媒中における増感酸化の生成物をまとめると Fig. 14 になる。pH 1 以下の 5% HCl 中では反応は進行しないが、 $\frac{1}{100}$ N HCl (pH 2.5), $\frac{1}{10}$ N $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (pH 3.0), acetate buffer (pH 3.6~6.2) の溶媒中及び水溶液での反応からは 3a-hydroperoxypyrroloindole 5a のみ生成するのに対して phosphate buffer (pH 5.9~8.4) 中の反応では 5a の生成に加えて微量の formylkynurenine 3a が得られた。また phosphate buffer のアルカリ性側では 5-hydroxy-formylkynurenine 3a 及び 5a が得られる事が明らかとなった。一方 Na_2CO_3 (または NaHCO_3) - $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (または HCl) 中の反応では 3a のみを得る。

この様に酸性, 中性, アルカリ性によって生成物が異

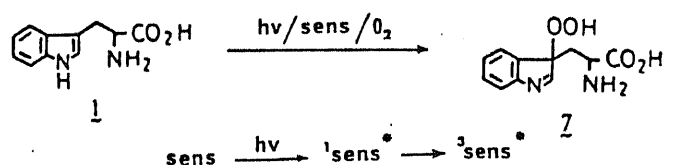
なるだけでなく、同じ pH でも溶媒の種類により生成物が変わってくる事が判った。しかしかなり広い範囲で 3a-hydroperoxypyrroloindole が主生成物となり、formylkynurenine は特殊な溶媒中における反応の場合にのみ得られた。

Fig. 14 Products Analysis of Photooxygenation of Tryptophan

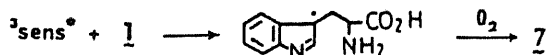


第三章 Tryptophan の光増感酸素化反応 の機構に対する考察

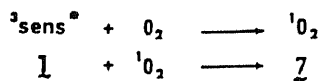
光増感酸素化反応の機構としては励起三重項増感剤による水素引き抜き (Type I), 一重項酸素が反応種となる機構 (Type II) に加えて electron transfer による機構が知られている (chart 37).



1, Type I Process



2, Type II Process



3. Electron transfer



chart 37

Tryptophan 1 の水溶液中における増感酸化について、Weil^{20a)}, 吉田ら^{20d)}は初期に

Type I 様の radical 機構を提案しているが、近年になって Kearns²⁵⁾は Type II の機構を証明している。既に当研究室の吉川^{27b)}は tryptamine 誘導体の増感酸化の研究の一環として radical

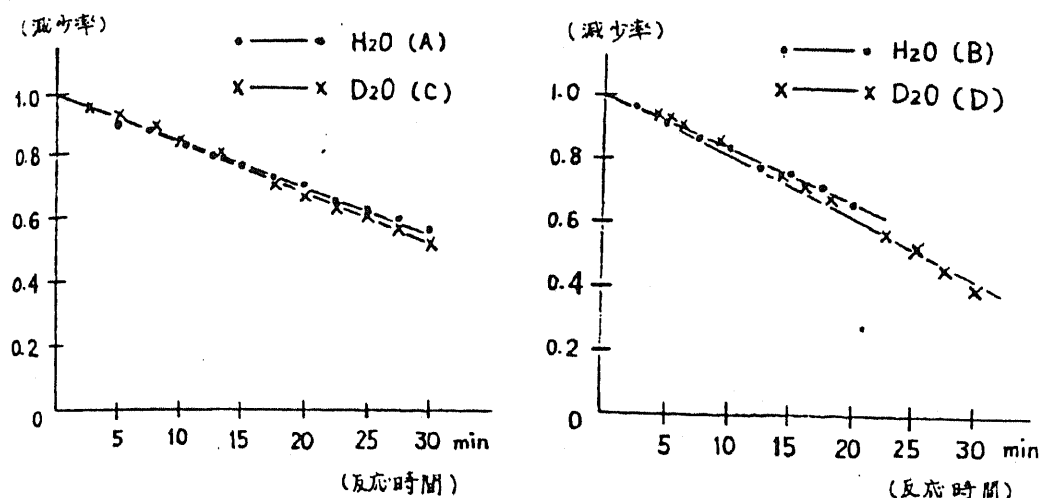
inhibitor として知られている 2,6-di-*t*-butyl phenol を加えても反応に影響がないことから増感酸化が Type I によるものではなく、 1O_2 によるものと推論した。⁴¹⁾

そこで著者の行なった実験条件で 1O_2 が反応種であるかどうかを検討する為次の 2 種の実験を行なった。

先ず第一の実験としては 1O_2 の消光剤として知られている triethylenediamine (DABCO) を加えて水溶液中の増感酸化を行なったが、DABCO が存在しない場合と比べて少し反応が遅くなった以外はほとんど影響が見られなかった。第二の実験としては Kearns によって行なわれた方法、即ち 1O_2 の反応であれば H_2O-CH_3OH 溶媒中の反応と比べて D_2O-CD_3OD 溶媒中の反応は 10 倍速くなる事を利用して検

討した。L-Tryptophan 1a 1.02 g (5 mM) の水溶液 (5% EtOH-H₂O, 300 ml) に R.B. 15 mg ($\frac{1}{300}$ モル当量) を加えた溶液と同じ濃度の D₂O-CD₃OD 溶液を用い、内温 0~5°C で外部照射による増感酸化を行ない、1a の減少率を HPLC から求めプロットすると Fig. 15 の様になる。この結果から溶媒効果はほとんど認められず、反応が ¹O₂ によるという積極的証拠は得られなかったが、これだけの実験では ¹O₂ 経由の反応を否定できない。

Fig. 15 D₂O 中、H₂O 中における L-tryptophan 1a の減少率

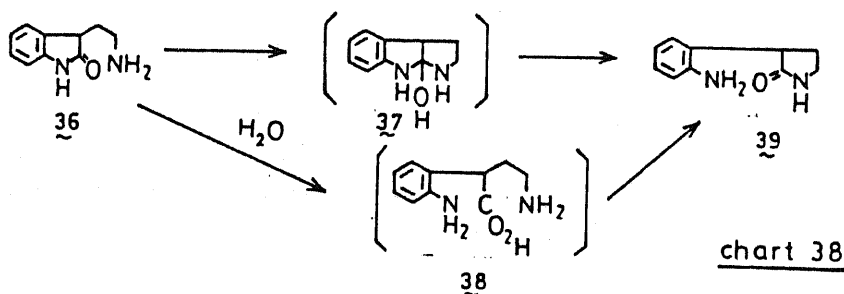


今まで述べてきたこの水溶液、緩衝液中における著者の行なった条件での増感酸化の反応が Type I によるものか、Type II によるものか、または Electron transfer によるものか、そのいずれかを積極的に支持する結果は得られておらず区別できない。既に当研究室の古田土と巢組はギ酸中での tryptamine, tryptophan 誘導体の増感酸化で酸化的二量化が起こる事を見い出し、この事は消光実験の結果より Electron transfer による機構を提出している。⁴³⁾ しかし tryptophan を 50% MeOH 中で R.B. を用いて増感酸化すると、¹O₂ 消光剤の結果からほぼ 100% ¹O₂ による反応であり、Thionine を用いると ¹O₂ の反応が 60%、Type I による反応が 40% であるという報告がある事から ¹O₂ による酸化が少なくとも部分的に起こっていると推論できる。

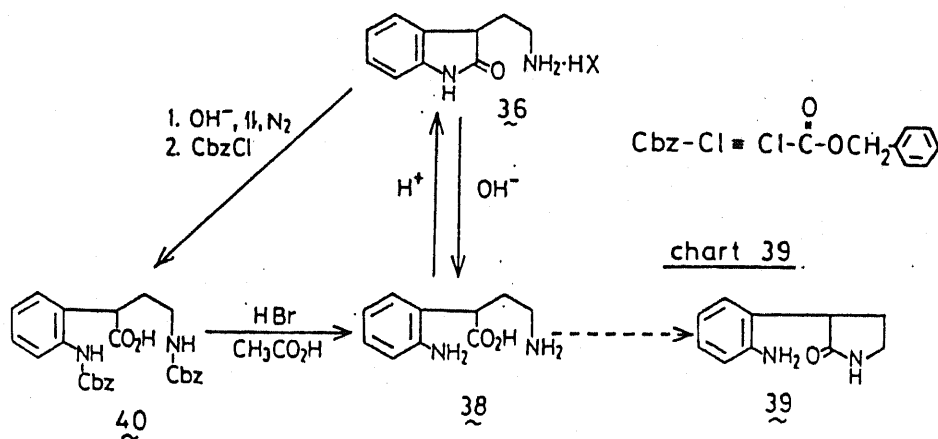
第四章 Oxytryptophan の kynurenine への酸化反応

第一節 Oxytryptamine

序論で述べた様に oxytryptamine* 36 は free base の状態では不安定であると考えられており、塩酸塩等の塩として保存されている。この不安定な原因としては以前より N,N'-acyl 転位を起こし o-aminophenyl pyrrolidone 39 に変化する為であると考えられていた。²⁸⁾ この中間体としては 37 または 38 が考えられるが、これらの中間体や反応機構については明らかにされていない (chart 38)。



1958 年 Witkop らは chart 39 に示される様に oxytryptamine 36 の塩酸塩を 2N NaOH と窒素気流下で加熱還流すると oxindole 環が加水分解を受けて amino acid 38 になり、これを Cbz-Cl で処理すると di-Cbz 体 40 が得られる事を見い出している。

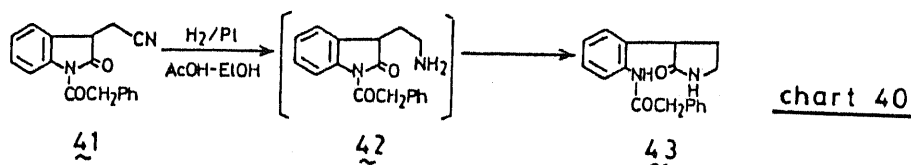


この 40 の Cbz 基を酢酸中 HBr で除去すると 38 ではなく、再閉環した oxindole 36 を結晶性の HBr 塩として得ている。

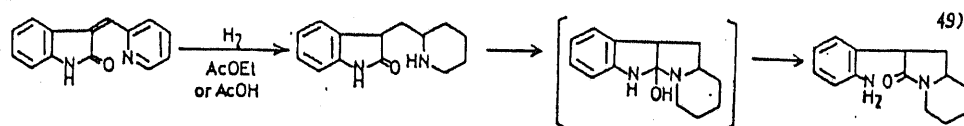
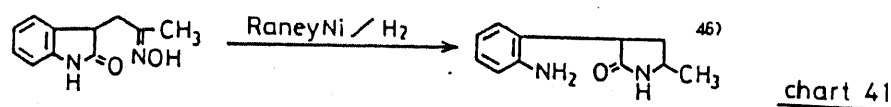
* α-hydroxytryptamine²⁸⁾, 2,3-oxindolylethylamine^{46), 50)} 等の名称があるが著者はこの名称で統一する。

そしてこの母液中に³⁹と思われる化合物を電気泳動によって検出しているが、³⁹を単離証明するには至っていない。²⁸⁾

一方 Wenkert らは 1958 年 *cyanomethyl oxindole* 誘導体⁴¹を接触還元すると対応する *amine* ⁴²は単離できず、アミノ基の隣接基効果による *N,N'*-acyl 転位で生成したと考えられる *pyrrolidone* ⁴³が生成する事を見出した (chart 40)。

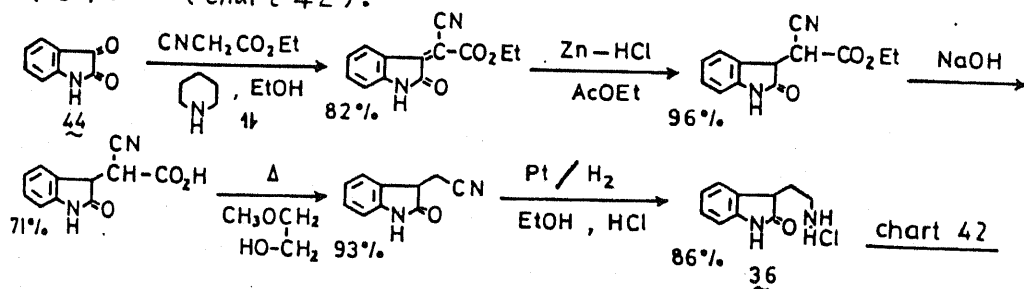


また Isip⁴⁶⁾, Hendrickson⁴⁷⁾, van Tamelene⁴⁸⁾, Thio⁴⁹⁾ 等によっても同様な acyl 転位の例が報告されている (chart 41)。

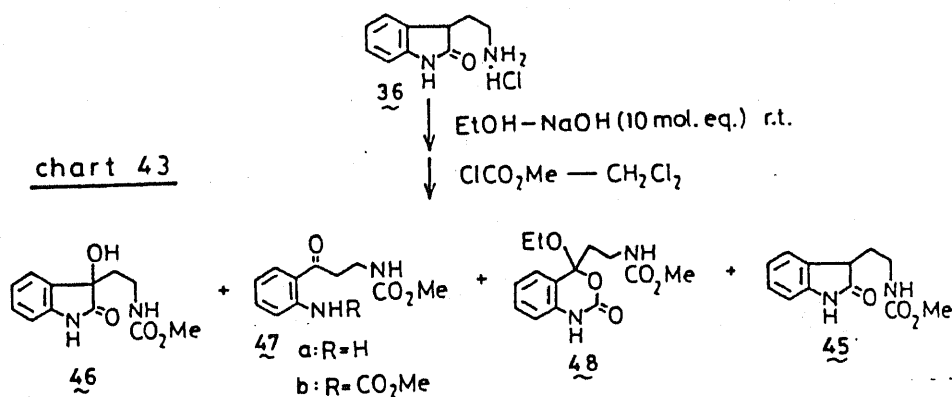


この様に *oxindole* 誘導体から対応する *pyrrolidone* に容易に変化している例が報告されているが、*oxytryptamine* ³⁶ 自身については Witkop 以来この点に関する研究は行なわれていない。そこで著者は先ず *oxytryptamine* ³⁶ の安定性について検討した。

Oxytryptamine ³⁶ · HCl は Harley-Mason らの方法により、*isatin* ⁴⁴ を出発物質として 5 段階を経る方法によって合成した⁵⁰⁾ (chart 42)。



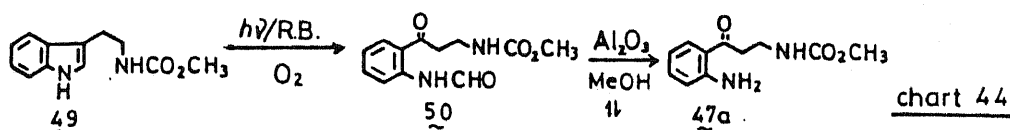
oxytryptamine 36 · HCl 808 mg に 20 % NaOH 約 30 ml を加え、すばやく CH_2Cl_2 抽出を行なって得られた free base の oxytryptamine 36 218 mg を MeOH 30 ml に溶解し、室温で 1 時間撹拌を行なった後、36 が更に変化するのを防ぐ為に直ちに ClCO_2CH_3 で acyl 化すると Nb-methoxycarbonyl oxytryptamine 45 を融点 $127 \sim 128^\circ\text{C}$ の結晶として 94 % 得た。それに比べ 24 時間後に ClCO_2CH_3 で反応させると 45 が 63 % に減少し、free base が何らかの変化をしている様子がうかがわれた。しかし 45 以外の生成物の分離確認はできなかった。そこで次に oxytryptamine 36 · HCl の EtOH 溶液中に 10 倍モル当量の NaOH を加えて室温で 60 分撹拌を行なうと、反応液の UV スペクトルは 36 の oxindole 特有の 250 nm の吸収から複雑な吸収へと変化していく。 ClCO_2CH_3 で acyl 化を行なった後 SiO_2 カラムにて分離すると pyrrolidone 39 の生成は認められず原料 36 を 45 として 43 % 回収した他に dioxtryptamine 誘導体 46 を主生成物として無色ラメル状で 14 %、lysergamine 誘導体 47a+b を 3 %、それに構造未知の化合物 48 を少量得た (Table 19, Run 1) (chart 43)。



46 の構造は UV スペクトルが 45 と類似し ($\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 254, 290^{sh} nm) Mass スペクトルでは 45 より酸素が 1 個多い m/z 250 に分子イオン peak が見られる事、及び CDCl_3 中の NMR スペクトルでは 45 で見られた 3 位のメチンプロトン ($\delta_{\text{ppm}}^{\text{CDCl}_3}$ 3.40) が消失し、4.90 ppm に OH 基のプロトン (D_2O 添加によって消失する。)が認められる事よりこの構造を推定した。

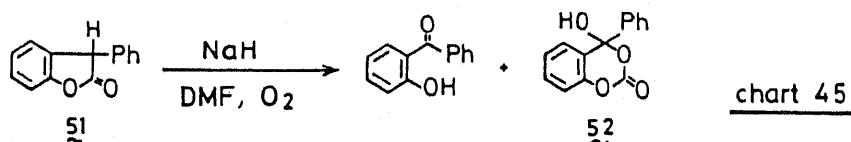
47a の構造は既に Nb-methoxycarbonyl tryptamine 49 の増感酸化によって得られた 50 を Al_2O_3 によって脱 formyl 化した標

品^{27c)} (chart 44) と混融し融点降下が起こらない事、更に TLC,



UV スペクトル, IR スペクトルとを比較する事で決定した。

構造未知化合物 48 は融点 202~203°C を示し、IR スペクトルで *Nb*-methoxycarbonyl に基づく carbonyl の吸収が 1728 cm⁻¹, amide II band が 1555 cm⁻¹ に観測される他に 1692 cm⁻¹ に carbonyl の吸収が見られる。また CDCl₃ 中の NMR スペクトルから重水添加によって消失するプロトンが 2 個 (NH) 及び EtO 基の存在が判る。Mass スペクトルでは 1-methoxybenzoxazinone 48 に対応する *m/z* 294 が分子イオン peak として観測され、UV スペクトルは 238, 280 nm に極大吸収をもつ事からこの未知化合物の構造として 1-methoxybenzoxazine-3-one 48 が推定される。これは更に元素分析及び 48 を EtOH 中 2N H₂SO₄ と加熱還流すると kynurenamine 47a になる事から支持される。²⁹⁾ 類似の反応例としては Houlihan らが 1968 年 3-phenyl-2-cumaranone 51 をアルカリ性で DMF 溶液中空気酸化すると、4-phenyl-1,3-benzodioxane-4-ol-2-one 52 が生成する事を報告している⁵¹⁾ (chart 45)。



以上の実験は oxytryptamine 36 の free base が反応条件下で空気酸化を受けている事を示唆している。そこでこの点を明らかにすべく詳細な検討を行なった。

Table 19 oxytryptamine のアルカリ溶液中における酸素酸化

R _u _n	solvent	base	反応時間		46 (%)	47 (%)	48 (%)	45 (%)
1	EtOH	NaOH	60 min	air	14	3	6	43
2	〃	〃	〃	Ar.	—	4	2	71
3	〃	〃	〃	O ₂	—	34	—	—

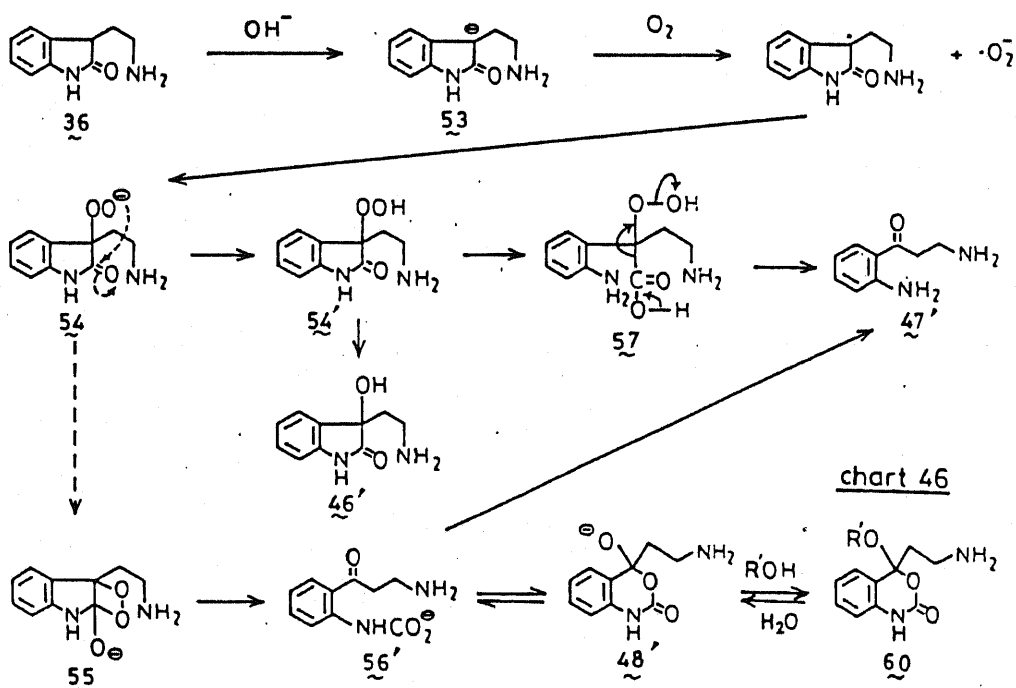
4	EtOH	NaOH	15 min	O ₂	—	15	28	—
5	〃	NaOEt	60	〃	—	21	20	—
6	〃	〃	15	〃	—	18	30	—
7	50% H ₂ O - EtOH	NaOH	〃	〃	—	22	17	—
8 ^{a)}	EtOH	NaOEt	〃	〃	2	21	22	—
9 ^{b)}	〃	〃	〃	〃	—	24	11	—
10	〃	〃	3 hr	〃	—	37	22	—

a) acyl 化の時間が長い。

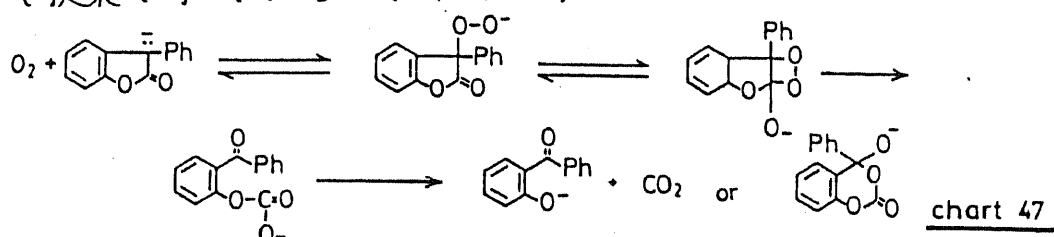
b) 還元後 acyl 化を行なう。

先ずこの反応を酸素のない状態即ち Argon 雰囲気下で 60 分行なうと微量の酸化生成体も得られるが、主として 45 のみを得られた (Table 19, Run 2)。そこで積極的に酸素を反応中に通じ同様の反応を 60 分行なうと、原料回収は全くなく *kynurenamine* 47 のみが 34% で得られた (Run 3)。一方この反応を短時間 (15 分) 行なうと、47 は 15% に減少するかわりに 1,3-benzoxazinone 48 を 28% の収率で得た (Run 4)。この事は反応中に 48 が 47 へ変化する可能性のある事を示唆していると考えられる。

Oxytryptamine 36 から 46, 47, 48 が生成する機構は chart 46 の様に推定される。



先ず oxytryptamine 36 の 3 位の π -プロトンが base により引き抜かれ、carbanion 53 が生成し、これが酸素分子と反応して 3-hydroperoxide 54 になり、これから dioxetane 55 を経て carbamate 56 になり、56 は carbonyl 基に反応して閉環体[~]を生成し、一方脱炭酸すると 47 が生成する。他方 3-hydroperoxide 54 が反応中のアルカリによって還元されると 45 になる。また反応液中に過剰の H_2O が存在する場合には 54 が加水分解を受けて amino acid 57 になり、脱炭酸すると 47 が生成する可能性も除外できない。類似の反応機構は Houlihan らによって 52 の生成と関連して提議されている⁵¹⁾ (chart 47)。



Carbamate 56 の生成の証拠としては 45 の水溶液または EtOH 溶液中に NaOH を加え UV スペクトルで経時化を連続的に追うと 45 の 251 nm の吸収が次第に carbamate 56 の吸収と思われる ketoamide 型の極大吸収 262, 342 nm へ変化していく様子が見られる (Fig. 16)。なおこの条件では tryptamine 47a への変化は見られない。

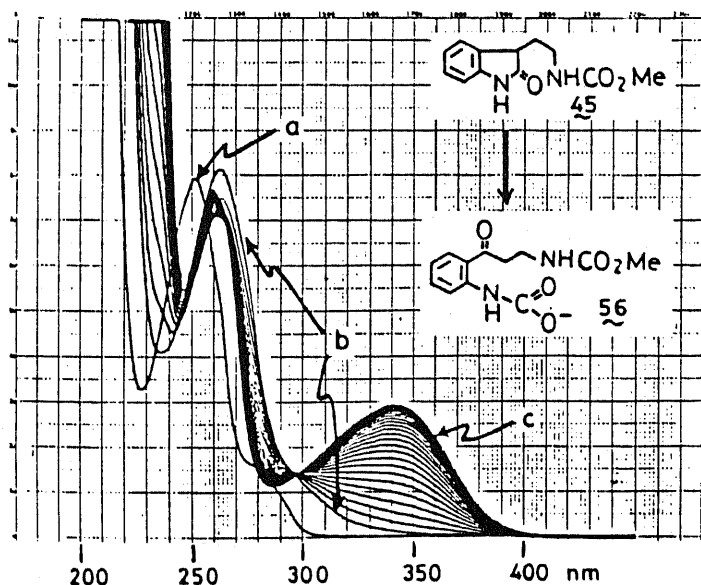
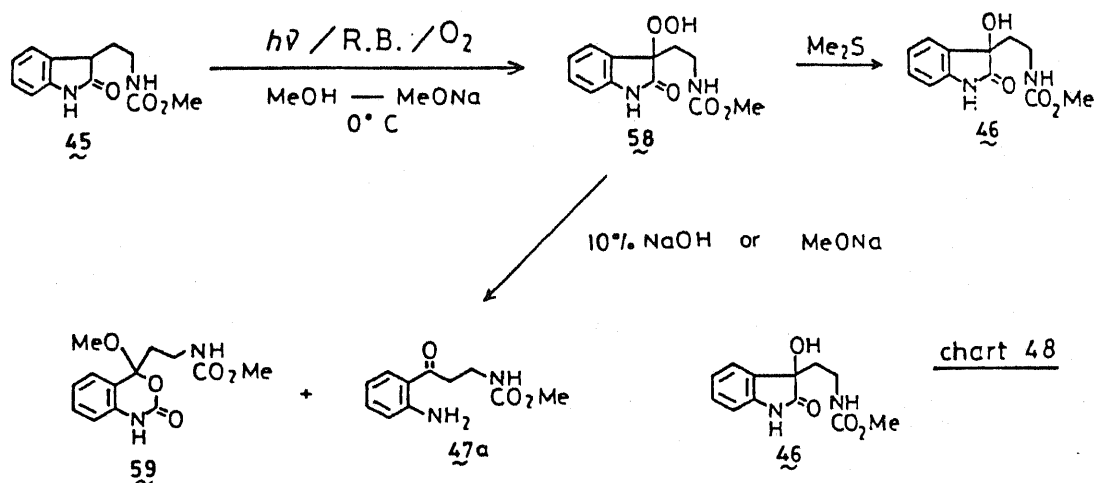


Fig. 16 45 の水溶液に NaOH を添加した時の経時変化。

- a: 45 in H_2O (EtOH)
- b: + NaOH (直後)
- c: 2 時間後 (5 分毎に測定)

更に *oxytryptamine* の酸化反応の中間体として仮定した 3-hydroperoxide 54 から 46, 47, 48 が生成する事を確実にする為には 54 の別途合成を考えたが、前述のとおり 36 の free base の *oxytryptamine* 45 を用い、base 共存下光増感酸素化反応を行ない、目的とする 3-hydroperoxide 58 を oil として得た (chart 48)。この構造は KI starch test 陽性である事、Me₂S で還元すると *di-oxytryptamine* 誘導体 46 が生成する事、及び



UV スペクトル, NMR スペクトル, Mass スペクトルによって推定されている。58 を MeOH 中 10% NaOH または NaOEt を加え氷冷却下 60 分攪拌後分離すると、59 が主生成物として 54% 及び 42% で得られ、更に 46 (trace, 3%), 47a (9%, 9%) が少量得られ、先の機構が支持された。²⁹⁾

更にこの反応を種々の条件で検討し、Table 19, Run 5~10 の結果を得た。base として NaOH の代わりに NaOEt を用い酸素気流下 60 分反応を行なったところ、47 が 21%, 48 が 20% 得られた (Run 5)。なおこの反応を短時間 (15 分) で中断すると 48 が 30% に向上し、47 は 18% になる (Run 6)。一方溶媒を 50% 含水 EtOH に変えて酸素気流下 15 分反応すると、全体の収率は低下するが、47 が主生成物となる (Run 7)。この結果 Run 3 と Run 5 との比較及び Run 6 と Run 7 との比較から H₂O が存在する場合には無水の場合と比べ、47 の収率が僅かながら向上する事から 54 の加水分解によっても *kyurenamine* 47' が生成する path もある事が推察される。Run 8 では Run 6 と同様な反応条件で反応を行な

た後、acyl 化の時間を長くした。またこれらの反応では反応終了時の反応液が弱いながら KI starch test 陽性を示す為、酢酸に溶解した Me_2S を反応液に加えて還元する (Run 9) と 48 の収率は低下し、47 の収率が僅かではあるが向上する。更に Run 5 と同様の反応を 60 分から 3 時間と長くすると全体に収率が向上し、47 が主生成物となる (Run 10)。この結果から長時間反応すると 1,3-benzoxazine 60 から 47 が生成する可能性が認められる。

次に acyl 化及び反応中に一旦生成した 60 から kynurenamine 47 への変換が起こるかどうかを 48 を用いて検討した。即ち 48 103 mg の EtOH 溶液 5 ml に 1N NaOH (8.8 倍モル当量) を加え、酸素気流下室温で 1 時間の攪拌及び 48 89 mg の EtOH 溶液 15 ml 中に 10% NaOH (48 倍モル当量) を加え、直ちに ClCO_2CH_3 (93 倍モル当量) で acyl 化 (反応時間約 30 分) を行なう。だが 48 から 47a への変化は認められず、48 を 91%, 78% それぞれ回収した。この結果は前述の類推と矛盾する様であるが、48 は反応中に生成する 60 とは異なり、側鎖の窒素が acyl 化されている為と考えられ 60 から 48 の生成を否定するものではない。

以上の様に oxytryptamine 36 の free base が不安定な理由は N,N'-acyl 転位が起こる為ではなく、容易に空気酸化を受けて kynurenamine が生成する為と結論づけられる。Oxindole 誘導体のアルカリ溶液中における空気酸化の報告例としては 61⁵²⁾, 62⁵³⁾, 63⁵⁴⁾, oxytryptophan^{29 16c)}, 64⁵¹⁾ について見られ、64 を除きすべて対応する dioxindole 誘導体を得ている。64 は DMF-NaH/ O_2 という条件下の反応で 2-amino benzophenone 誘導体 65 を得ており、著者の結果と類似している (chart 49)。

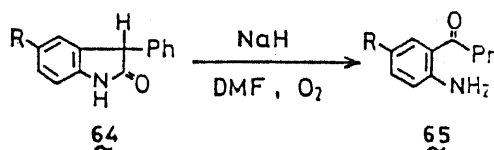
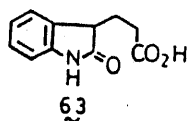
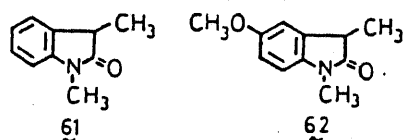
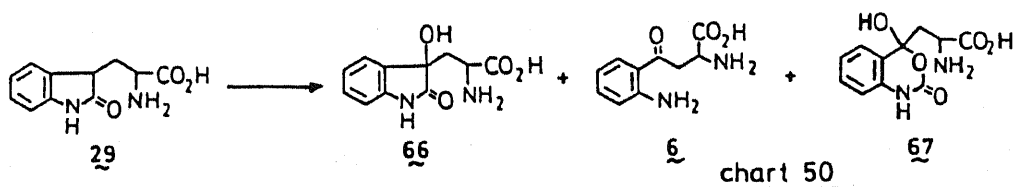


chart 49

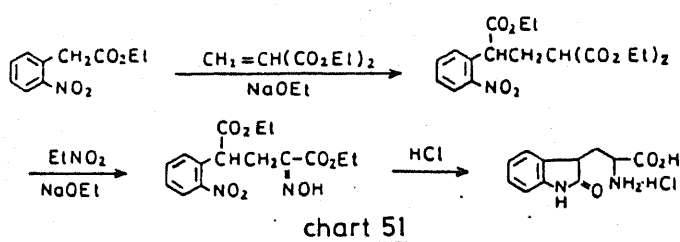
第二節 Oxytryptophan

Oxytryptamineの酸化反応の知見を基にしてこの反応をoxytryptophan 29^aへ応用した。既にSavigeは空气中oxytryptophan 29^cのアルカリ性水溶液中における酸化でdioxtryptophan 66^cが生成したと報告しているが、^{16e)}他の生成物を得たという記載はない。しかし前述のoxytryptamineの結果から類推するとdioxtryptophan 66以外にもkynurenine 6と1,3-benzoxazinone 67が生成すると予想される(chart 50)。なお1,3-benzoxazinone 67は既にSavigeがtryptophanの過酢酸^{16e)}による酸化で得たと報告している。



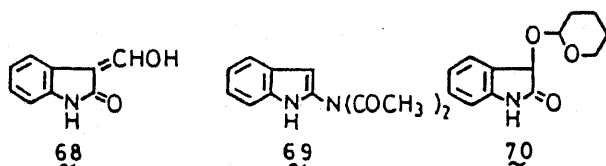
先ず最初に原料であるoxytryptophan 29の合成を検討した。Oxytryptophanの合成は古くより多くの研究者によって行なわれていて、その型として3つに分ける事ができる。即ち1)核合成を経る方法、2)indoleまたはoxindole誘導体を原料として側鎖を導入する方法、3)tryptophanを用いる方法の3つの型である。なお第3の型はA. tryptophan誘導体からの合成法、B. tryptophan自体を用いる合成法という2つに分ける事ができる。

1)の型としては小竹らの報告例がある⁵⁵⁾(chart 51)。



2)の型としては isatin 44を原料として3工程を経る方法⁵⁶⁾、68を原料として4工程を経る方法⁵⁷⁾、69を原料と

して3工程を経る方法⁵⁸⁾、更に70を原料として6工程を経る方法⁵⁹⁾がある。



3-A) としては大野らによる71を加水分解する方法⁶⁰⁾、Savigeの

* L-tryptophanから得られるものをa, DL-tryptophanから得られるものをcとする。

3a-hydroxypyrroloindole 2 の加水分解^{16c)}及び UV 照射⁶¹⁾という方法がある (chart 52). 3-B) としては *tryptophan* の H_2O_2

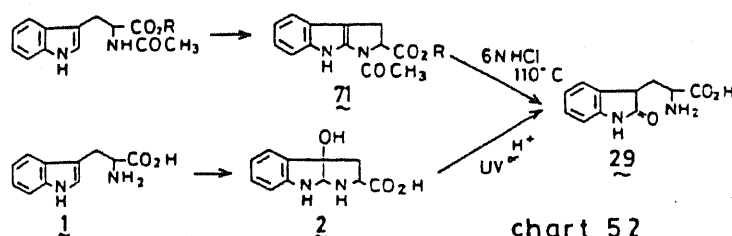


chart 52

改良法⁶³⁾ (1968年, Veronese), それに DMSO 酸化⁶⁴⁾ (1976年, Savige, 1979年 Szabo-Pusztay) がある (chart 53).

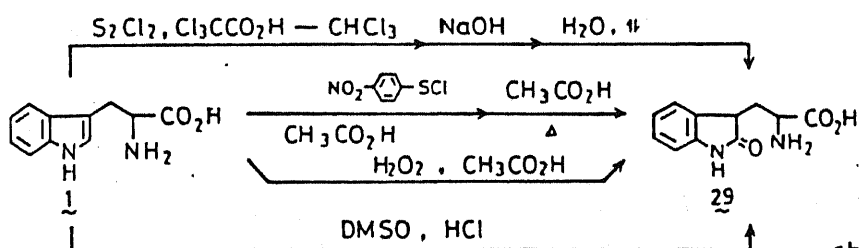


chart 53

原料合成という目的から収率の良い事、工程数の少ない事、原料の入手が容易な事が必要となり、種々の合成法の中から光学活性体を得やすい事も考慮して *tryptophan* の DMSO 酸化と 3a-hydroxypyrroloindole 2 からの合成法をとり上げた。しかし前者の文献は速報であり実験の部の記載がないので先ず反応条件及び後処理について検討した。

L-Tryptophan 1a 1.02g (5mm), DMSO 3.13g (50 倍モル当量), 36% HCl 10.51g (100 倍モル当量) を室温で約 15 分撹拌すると、UV スペクトルより *tryptophan* 1a は消失し、oxy-*tryptophan* に特有の 251nm の吸収があらわれてくる。直ちに N_2 気流下で過剰の DMSO, HCl を減圧留去で除いたところ、得られた黒褐色状の残渣に目的とする oxytryptophan 29a は認められず、減圧留去の段階で 29a が分解したものである。そこで DMSO, HCl 量を次第に減少させて検討した結果 DMSO, HCl をそれぞれ 1.5 倍モル当量用い、溶媒として $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ を使うと室温では反応は進行しないが、内温 70~90°C に加温すると約 30 分で 1a は消失し、29a の生成が認められる。なお溶媒として THF を用いると反

底は進行せず、また DMSO, HCl 量が 1.1 倍モル当量では 70~90°C で 1.5 時間反応を行なってもかなりの量の *tryptophan* が残存する。

後処理の方法としては大野らの報告⁶⁰⁾した方法に従った。即ち反応液を Amberlite CG-400 ($\text{NH}^+\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ form) のカラムにのせ、目的物 29a を樹脂に付着させ、 H_2O で溶出させると 29a の fraction が得られ、これを濃縮すると 29a が粉状物として析出してくる。この方法により *tryptophan* 1a 20.4g (0.1M) を使用した時に最高収率 92% で *oxytryptophan* 29a を得た。(*Tryptophan* の量が 1~60g の反応でも 80~90% の収率で 29a が得られる。)

一方第一章第一節で述べた様に *tryptophan* の増感酸化-還元により収率良く 3a-hydroxypyrroloindole 2a を得ているのでこの加水分解による *oxytryptophan* 29a の合成法について Savige の方法を検討改良した。即ち *tryptophan* 1a の増感酸化-還元で得られた 2a を INHCl 中 N_2 気流下 80~90°C で 45 分加熱し、Amberlite CG-400 にて分離すると *tryptophan* 1a からの収率 76% で *oxytryptophan* 29a を得た。*Tryptophan* 1 から *oxytryptophan* 29 の生成機構としては前者については chart 54 の (1)(2) が考えられ、その加水分解については (3) が考えられる。

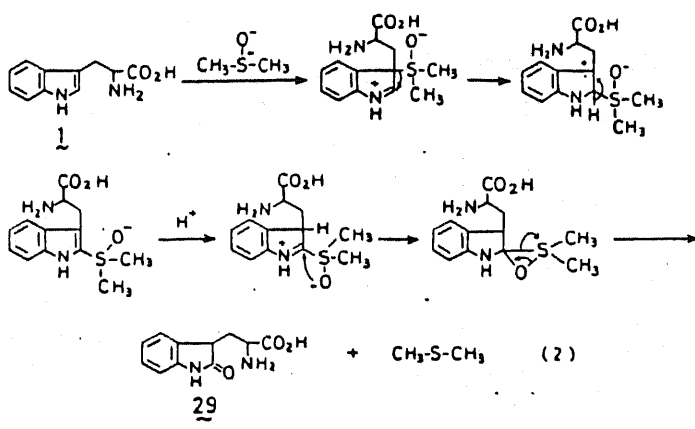
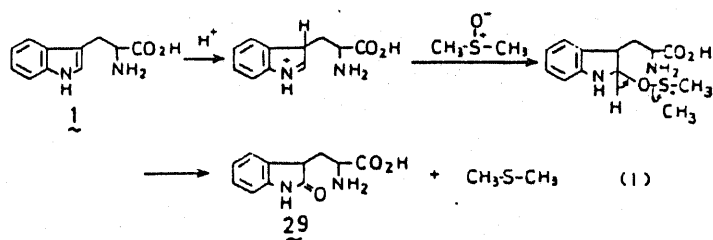
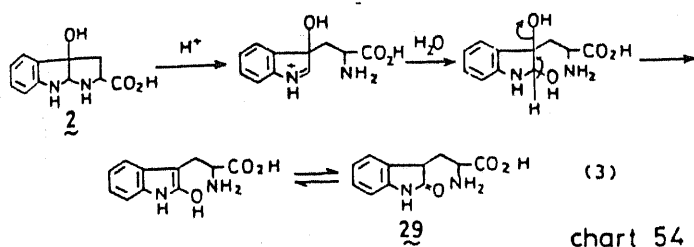
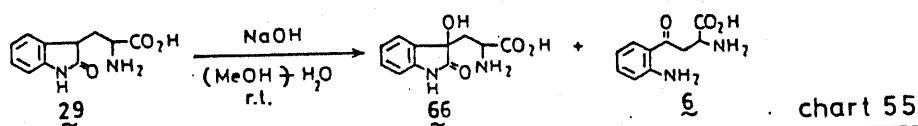


chart 54



合成した oxytryptophan 29a は融点 252~253 °C (dec.) を示し、HPLC より保持時間が 12.5 分と 13.6 分にそれぞれの peak をもつ diastereoisomer の混合物である事が判るが 2 つの peak の分離はよくない。これらは NMR スペクトルにおいて側鎖の C₂ 位のメチンプロトンがそれぞれ 4.43 ppm と 4.52 ppm に観測され、この積分値からその存在比を求めると 3:2 ~ 5:4 の比率になる。単一の diastereoisomer の単離精製には成功せず混合物のまま以下使用した。



この様にして合成した oxytryptophan 29a の水溶液中における安定性について検討した。Oxytryptophan 29a の水溶液 (128 mg/20 mL) を室温で 145 時間攪拌後分離すると 29a が 61% 以上回収されるが他の酸化生成体として kynurenine 6a が 2%, dioxytryptophan 66a が約 2% 生成している事が判った (Table 20, Run 1) (chart 55)。

Table 20 Oxytryptophan 29a のアルカリ性水溶液中での酸素酸化

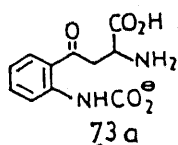
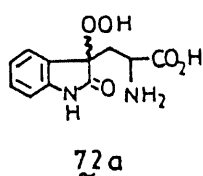
R u n	NaOH (モル当量)		溶媒	反応温度	反応時間	a) 後処理	66a (%)	6a (%)	recovery (%)
1	—	air	H ₂ O	r.t.	145 hr	B	~2	2	>61
2	10	"	"	"	4	A	46	35	—
3	"	O ₂	"	"	20 min	"	43	22	—
4	"	"	"	"	4 hr	"	27	52	—
5	"	"	H ₂ O-MeOH	"	4	"	30	47	—
6	"	air	"	"	5	"	56	40	—
7	"	"	"	"	4	B	19	49	—

8	10	O ₂ (15分) N ₂ (4時間)	H ₂ O	r.t.	4hr 15min	A	24	54	—
9	5	O ₂ (30分) N ₂ (18時間)	H ₂ O-MeOH	〃	18hr 30min	B	29	54	—
10	5	air	〃	30°C	5 hr	〃	25	57	—
11	5	O ₂	〃	50~60°C	20min	〃	trace	61	—
12	5	〃	〃	〃	3 hr	〃	trace	14	—
13	5	air	〃	r.t.	1	〃	~45	~33	—
14	3	〃	H ₂ O	〃	6	A	55	22	—
15	2	O ₂	H ₂ O-MeOH	50~60°C	3hr 30min	B	24	39	trace

a) A: 反応液 (KI starch test 陽性) を還元後イオン交換樹脂で分離

B: 反応液 (KI starch test 陽性 または 陰性) を直接イオン交換樹脂で分離

次に oxytryptophan 29a (230 mg, 1 mM) の水溶液 (30 ml) に 10 倍モル当量の NaOH を加え室温で攪拌したところ、HPLC から 29a は約 4 時間で消失する。生成物に関しては保持時間 7.0, 7.7 分に 72a の diastereoisomer に対応すると思われる 2 つの peak が先ず最初に観測され、これが次第に減少して保持時間 10.7 分に 73a と思われる peak が次第に増大する。UV



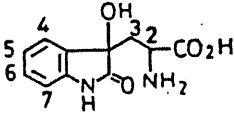
スペクトルからは oxytryptophan 29a の 251 nm の吸収が次第に減少して 73a に対応すると思われる 232, 259, 347 nm の吸収が増大する。反応液の KI starch

test が弱いながら陽性を示す為、CH₃CO₂H に溶解した Me₂S を反応液に添加し還元する (A 法)。還元後の UV スペクトルは kynurenine 6a の吸収 ($\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}</$

Dioxytryptophan 66a は diastereoisomer を H₂O-EtOH から分別再結晶する事で分離し、それぞれのスペクトルデータ (Table 21) により構造を推定した。これは Savige が得ている α -, β -dioxylindolyl-DL-alanine 66c のスペクトルデータと類似している。

この様に Savige の報告とは異なり、oxytryptophan 29a のアルカリ性水溶液中での空気酸化によって dioxytryptophan 66a だけでなく kynurenine 5a も生成する事が明らかとなった。そこで種々の条件下でこの反応を検討した (Table 20, Run 3~15)。

Table 21 L-Dioxytryptophan 66a のスペクトルデータ

難溶性異性体		易溶性異性体
229.5 ~ 230 °C (dec.)	mp.	206.5 ~ 207.5 °C (dec.)
t _R = 7.0 min	HPLC ^{a)}	t _R = 8.0 min
3180 br, 1715, 1625	IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3160 br, 1717, 1622
249 ^{sh} (4590), 255 (4770) 290 (1550)	UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ (E) nm	248 ^{sh} , 256, 291
2.40 (1H, dd, J=9, 16 Hz) 2.68 (1H, dd, J=16, 4 Hz) 4.64 (1H, dd, J=4, 9 Hz) 7.11 (1H, d, J=8 Hz) 7.24 (1H, t, J=8 Hz) 7.39 (1H, t, J=8 Hz) 7.58 (1H, d, J=8 Hz)	NMR: $\delta_{\text{ppm}}^{5\% \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{D}_2\text{O}}$ C ₃ -H ABX C ₃ -H ABX C ₂ -H ABX C ₇ -H C ₅ -H C ₆ -H C ₄ -H	2.36 (1H, dd, J=4, 16 Hz) 2.65 (1H, dd, J=9, 16 Hz) 4.73 (1H, dd, J=4, 9 Hz) 7.04 (1H, d, J=8 Hz) 7.18 (1H, t, J=8 Hz) 7.24 (1H, t, J=8 Hz) 7.45 (1H, d, J=8 Hz)
C: 55.93, H: 5.12, N: 11.86	Calcd. for C ₁₁ H ₁₂ O ₃ N ₂	hygroscopic
C: 55.65, H: 5.24, N: 11.76	Found	

a) Packing Material: Nucleosil 5C-18, Eluent: H₂O/MeOH = 9/1, Press: 110 kg/cm², Detect

先ず酸素気流下で同様の反応を行なうと、空気中での反応と比べ反応は速く約20分で *oxytryptophan* 31a は消失し、A法の後処理を行なうと *dioxytryptophan* 66a が43%、*kynurenine* 5a が21%得られる (Run 3)。一方この反応を4時間行なうと *dioxytryptophan* 66a の収率は低下し、*kynurenine* 5a の収率は向上する (Run 4)。反応溶媒を H₂O から H₂O-MeOH に変えてみたが、反応の様子、生成物にはほとんど変化が認められなかった (Run 5, 6)。後処理として Me₂S で還元する事なく反応終了後直ちに反応液を Amberlite CG-50 で分離する (B法) と *dioxytryptophan* 66a がかなり減少する (Run 7)。しかしこの理由については今のところ不明である。Run 3 の反応において原料消失後、over-oxidation 防止の為 N₂ 気流下で 72a から 73a への効率の良い変換による *kynurenine* 5a の収率向上を目的として 29a の消失後更に4時間攪拌したが、Run 4 の場合と大差のない結果が得られた (Run 8)。同様に N₂ 気流下反応液の KI starch test が陽性から陰性になるまで長時間攪拌したが、Run 4, 8 と類似の結果になり、*kynurenine* 5a の収率は向上しなかった (Run 9)。次に反応温度を室温から約 30°C へと少し上げて空気中5時間反応を行なったところ、反応液の KI starch test が陰性を示す為直ちに Amberlite CG-50 のカラムで分離した (B法)。この際カラムの中で脱炭酸している様子が認められる。分離の結果 *kynurenine* 5a の収率が向上し、57%の収率で得られた (Run 10)。更に酸素気流下反応温度を 50~60°C に上げて約20分反応を行なうと、*dioxytryptophan* 66a はほとんど得られず、*kynurenine* 5a が61%で得られた (Run 11)。Run 11 と同様の反応を長時間行なうと *kynurenine* 5a の収率は低下し、反応も複雑になる (Run 12)。次にアルカリ量の反応におよぼす影響を調べたところ、5倍モル当量では10倍モル当量の時とほぼ類似の結果を得た (Run 13) が、3倍モル当量では反応が遅くなる (Run 14)。特に2倍モル当量では反応温度 50~60°C で酸素気流下3.5時間反応を行なったにもかかわらず *oxytryptophan* 29a が微量ながら認められた (Run 15)。

この *oxytryptophan* 29a のアルカリ性水溶液中での酸素酸化の経時変化を UV スペクトルで追跡すると Fig. 17 の様

になる。即ち 29a の水溶液 (UV 濃度) 中に NaOH を加えると、先と同様 29a の $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 251 nm の吸収から次第に carbamate 73a に対応すると思われる $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 258, 342 nm へ変化する*。

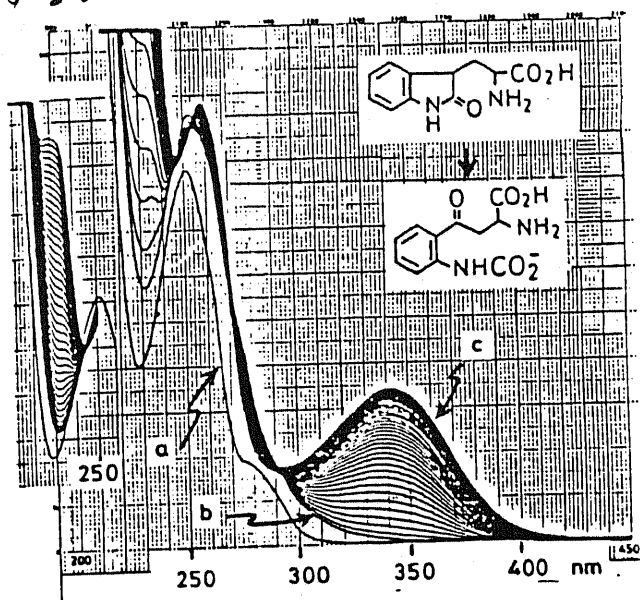


Fig. 17 29a の水溶液に NaOH を添加した時の経時変化。

- a: 29a in H₂O
- b: + NaOH (直後)
- c: 2時間10分後 (5分毎に測定)

次に単離した *dioxytryptophan* 66a の難溶性の異性体 128 mg (0.5 mM) の水溶液に 10 倍モル当量の NaOH を加え、酸素気流下室温で 5 時間攪拌すると HPLC の pattern は保持時間 6.8 分の 66a の peak が次第に減少し、保持時間 2.9 分の新しい peak が増大するのが認められる。また UV スペクトルからは 66a の 255, 290 nm の吸収から 235, 286 nm の吸収へと変化が見られる。しかし反応液に酸を加えると、HPLC における 2.9 分の peak は消失し、6.8 分の peak のみが見られ、また UV スペクトルにおける 235, 286 nm の吸収は消失し、66a の吸収に戻る。これを分離すると *dioxytryptophan* 66a の難溶性の異性体をほぼ定量的に回収する事から chart 57 に示す様に *dioxytryptophan* 66a がアルカリ水溶液

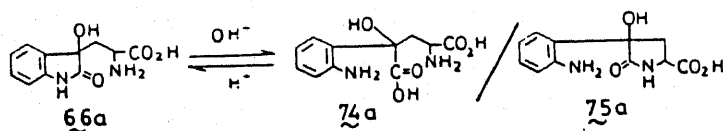


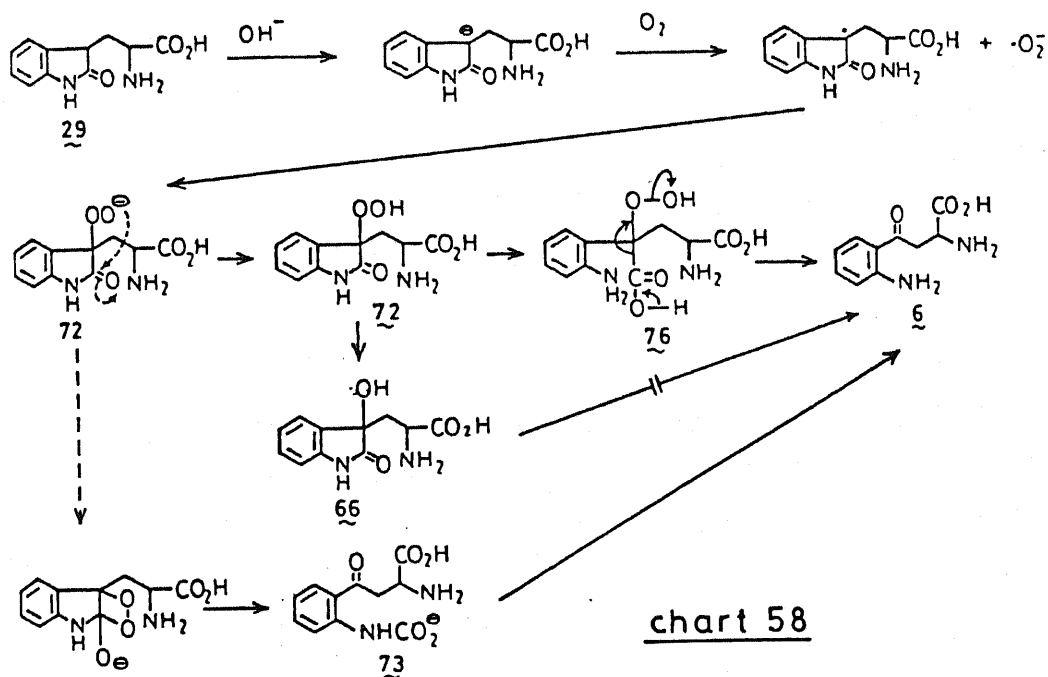
chart 57

中ラフタム環の開裂を起こし *diamino acid* 74a になるか。

* 29a の含水 MeOH 溶液中に NaOH を加えた場合も同様な結果が得られた。

74a が閉環して pyrrolidone carboxylic acid 誘導体 75a になるものと思われる。

以上の結果から oxytryptophan 29 から dioxytryptophan 66, kynurenine 6 の生成機構を考察すると, chart 58 に示す様に oxytryptamine 29 と同様に先ず 3-hydroperoxide 72' が生成し, dioxetane 経由で carbamate 73 になり, 73 は還元の際また



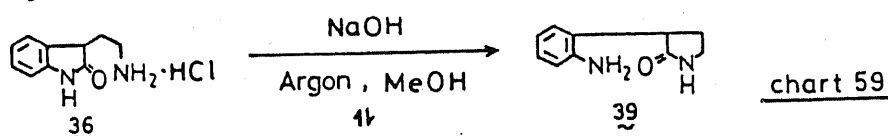
はイオン交換樹脂の中で脱炭酸を起こして kynurenine 6 が生成すると考えられる。しかし 72 が加水分解を受けて diamino acid 76 になり、これから kynurenine 6 が生成する可能性も否定できない。72 が反応系中または Me₂S で還元されると, dioxytryptophan 66 が生成し、この 66 から kynurenine 6 への変換は起こらない。なお oxytryptamine 36 の反応の時得られた benzoxazinone 型化合物 67 が oxytryptophan 29 の反応の場合には全く得られなかったが、この理由としては 69 がこの条件では不安定である為ではないかと考えられる。

序論で述べた様に酵素系の実験では oxytryptophan 29 から kynurenine 6 への変換は起こっていないが、^{57, 81, 93, 10)} 著者が行なった様な非酵素の実験においては容易に 29 から 6 への変換が起こり、従来より知られていた tryptophan → formylkynurenine → kynurenine 経路以外にも tryptophan → oxytryptophan → kynurenine の経路がある事を明らかにすることができた。

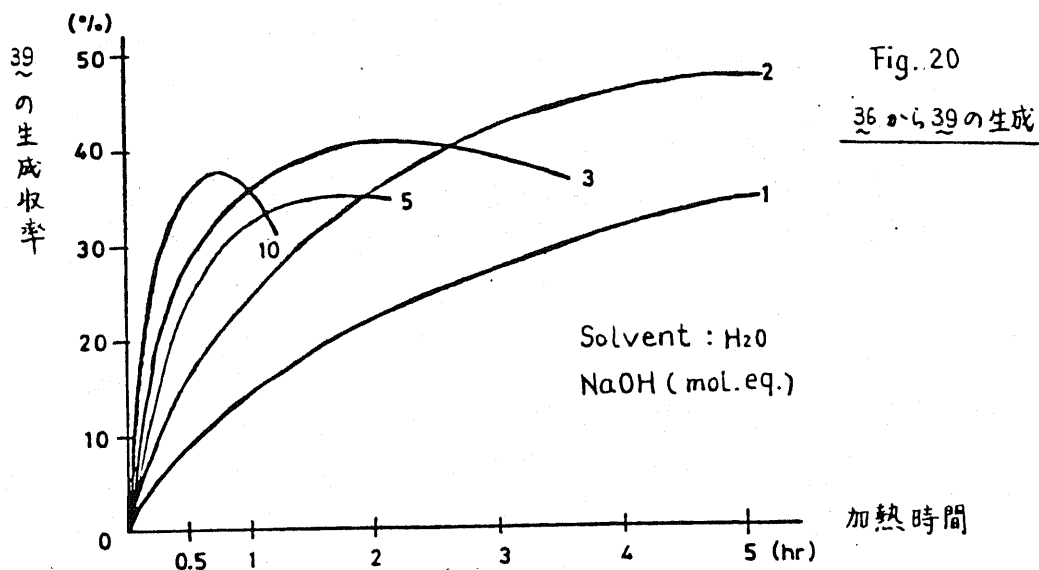
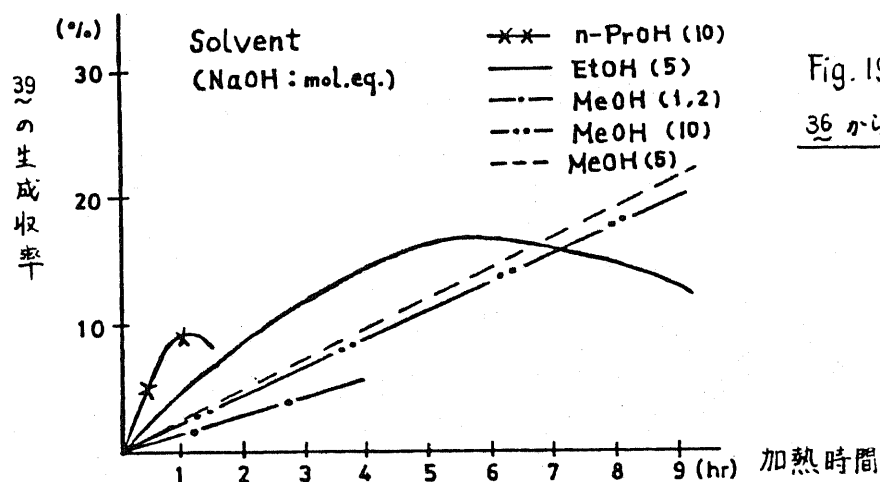
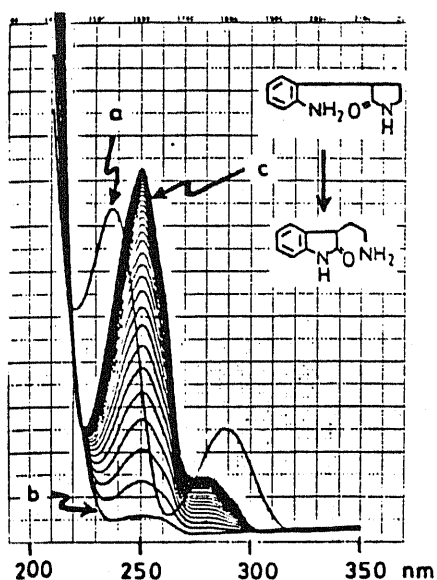
第五章 Oxytryptamine から pyrrolidone carboxylic acid への変換 (ring transformation)

第一節 Oxytryptamine

前述の様に oxytryptamine 36 は塩基性条件下酸素の存在で酸素酸化が起こり易く、N,N'-acyl 転位を起こした pyrrolidone 39 は生成しない事が判ったので、次に oxytryptamine 36 から対応する pyrrolidone 39 へ変換する条件を検討した。Argon 雰囲気下 oxytryptamine 36·HCl を MeOH に懸濁させ、その中に 10% NaOH (10 倍モル当量) を加え、室温では反応が進行しない為加熱還流を 9~10 時間行なった後、反応液を CH₂Cl₂ 抽出すると目的とする pyrrolidone 39 のみが CH₂Cl₂ 層から融点 120.5~121.5°C の結晶として 32% の収率で得られた。この 39 の構造は UV スペクトルが o-toluidine 型の吸収 ($\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 236, 288 nm) を示す事、IR スペクトルにおいて carbonyl の吸収が 36 の 1700 cm⁻¹ から 1650 cm⁻¹ に変わっている事、NMR スペクトルで aromatic プロトンが高磁場へ shift している事、更に Mass スペクトルにおいて分子イオン peak が m/z 176 に見え、fragmentation が 36 とほぼ類似している事、及び元素分析により支持される (chart 59)。



ここで得られた 39 の EtOH 溶液 (UV 濃度) に酸を加え、UV スペクトルで経時変化を連続的に追跡すると、39 の o-toluidine 型の吸収からゆっくりと 250nm に極大吸収をもつ oxytryptamine へ変化していく様子が認められる (Fig. 18)。アルカリを NaOH から NaOEt に代えて同様の反応を行なったが 39 の収率が 39% と若干向上したのみであった。そこで 39 の収率向上を目的として溶媒、アルカリ (NaOH) 量を変え種々の条件で反応を行ない pyrrolidone 39 の生成量を HPLC で定量する事によって反応を追跡した (詳細は実験の部参照)。Fig. 19, 20 にこれらの結果をまとめた。

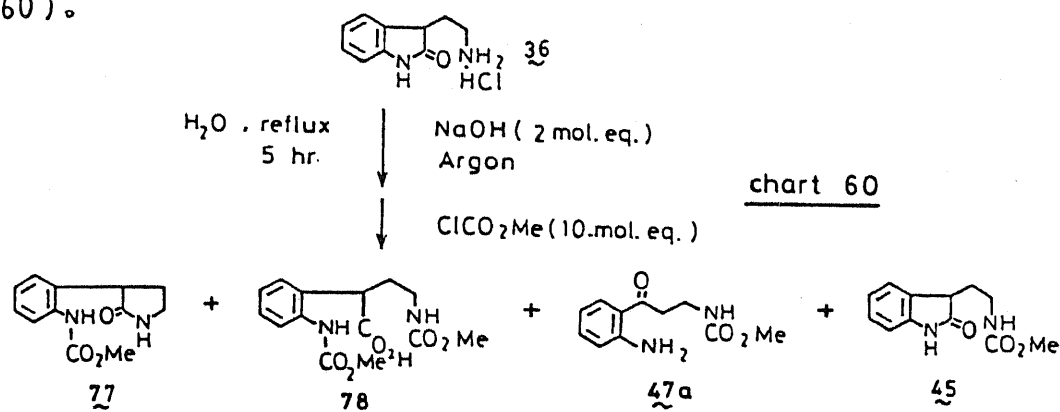


MeOHを溶媒としてNaOH量を10倍モル当量から5倍モル当量に減少させて反応を行なったが、反応の様子には10倍モル当量の場合とほぼ同じで、時間毎に39の生成は少しずつではあるが増加する。しかし9時間後における39の収率は僅か20%程度であり、36を45として21%回収する。更にNaOH量を2倍モル当量、1倍モル当量へと減少させると反応は非常に遅くなり、5時間後においても39は5%以下の収率で45を約70%得た。次に溶媒をMeOHからEtOHに代えNaOH量が5倍モル当量という条件で反応を行なうと、39が5時間後に最高16%の収率になり、次第に収率は減少し9時間後は13%になる。またn-PrOH、NaOH(10倍モル当量)という条件では1時間後9%の収率になるが、時間とともに副反応が起こりHPLCのpeakが複雑になる(Fig. 19)。

溶媒をアルコール系からH₂Oに変え、NaOH量が10倍モル当量で反応を行なうと反応は非常に速く、39の収率は15分後30%、45分後37%になる。しかしこれ以上反応を長くすると収率は低下し、2時間後の収率は30%になる。なおこの場合36を45として約20%回収する。NaOH量を5倍モル当量にすると10倍モル当量の場合より反応は少し遅くなるが、ほぼ同様な傾向を示し、39の最高収率は1.5時間後の34%である。NaOH量を3倍モル当量に減少させると反応2時間後までは39の収率向上が認められるが、次第に減少していく。しかし2倍モル当量まで減らすと反応はかなり遅くなるが、時間毎に収率向上が見られ11時間後に39は最高収率49%になり、原料の36を45として約20%回収する。1倍モル当量のNaOHを加えた場合即ちoxytryptamine 36のfree baseにおいても2倍モル当量の反応よりも収率は低下するが反応は進行し、9時間後39の収率が34%になり、更に36を45の形で約30%回収する(Fig. 20)。

以上検討した種々の条件の中で39の収率が最も良かった条件、即ち溶媒はH₂O、NaOHは2倍モル当量を用い、5時間加熱還流を行なった後39以外の原料及び他の生成物を単離する為に反応液をClCO₂CH₃でacyl化し、SiO₂カラムで分離すると、45が15%得られる他にpyrrolidone 39の

アミノ基が *acyl* 化された 77 を融点 $144.5 \sim 146^\circ\text{C}$ の結晶として 40% 得た。それに加えて酸化生成体 47a が 2% 得られ、更に 39 生成の中間体と考えられる *oxindole* 環が加水分解を受けた 78 も *caramel* 状として 6% 得られた (chart 60)。



77 のスペクトルデータは Table 22 に示す。この構造はジアゾ test が陰性を示し、NMR スペクトルから *aniline* の NH が 39 と比べ低磁場に shift し、 $\text{C}_3\text{-H}$ が低磁場 shift している事、 CO_2CH_3 基が 3.75 ppm に観測される事、IR スペクトルでラフタム環の carbonyl 基 (1683 cm^{-1}) 以外に 1735 cm^{-1} に carbonyl の吸収及び *amide II band* (1530 cm^{-1}) が認めら

Table 22 77 のスペクトルデータ

IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$	3210 (NH), 1735, 1683 (CO), 1530 (NHCO)
UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} (\epsilon) \text{ nm}$	232 (7550), 267 ^{Sh} (401)
NMR: $\delta^{\text{CDCl}_3} \text{ ppm}$	2.47 (2H, s, $\text{J}=7\text{ Hz}$, $\text{C}_4\text{-H}$) 3.32~3.62 (2H, m, $\text{C}_5\text{-H}$) 3.75 (3H, s, COOCH_3) 3.88 (1H, t, $\text{C}_3\text{-H}$) 6.76~7.44 (4H, m, $\text{C}_4, 5, 6\text{'-H, NH}$) 7.66 (1H, d, $\text{J}=8\text{ Hz}$, $\text{C}_3\text{'-H}$) 8.78 (1H, s, Ar-NH)
Mass:	

に極大吸収が見られ、NMR スペクトルから 2 個の COOCH_3 が観測され及び Mass スペクトルから 78 に対応する m/z 310 が認められる事から構造を推定した。

この 78 は 1958 年 Witkop らが単離した 40 と類似の化合物である。²⁸⁾

以上の様に収率はそれほど良くないが、36 をアルカリ性水溶液中酸素のない条件で加熱還流すると N,N'-acyl 転位を起こした pyrrolidone 39 が生成する事が判った。

