

氏 名 (本籍) 原 田 健 一

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 236 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 58 年 12 月 14 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 新 規 抗 生 物 質 Sporaviridin の 構 成 五 糖 類 ,
Viridopentaose の 構 造 に 関 す る 研 究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 南 原 利 夫 教 授 曳 野 宏

教 授 野 副 重 男

論文内容要旨

Sporavidin (SVD) は *Streptosporangium viridogriseum* が生産する塩基性水溶性抗生物質で、グラム陽性菌、抗酸性菌、白癬菌に対して強い発育抑制作用を示す以外に魚毒性や溶血作用などを示す興味深い化合物である。本化合物の構造研究は発見当時以来、種々試みられたが、その化学構造はまったく明らかにされていなかった。

著者は、本化合物のN-アセチル誘導体である SVD-N-Ac の単離精製中、溶出溶媒に用いたアンモニア水により、この誘導体がアグリコンを含む配糖体とオリゴ糖群に分解されることを発見した。後者には3成分が存在し、以下に述べる構造研究の結果、いずれもアミノ糖を含む五糖類であることが判明したので、viridopentaose A (1A), B (1B), C (1C) と命名された。

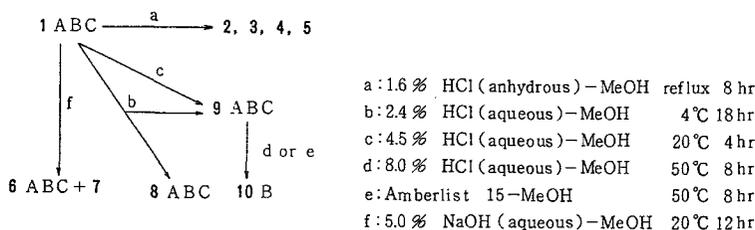
本論文では sporavidin の構成五糖類である viridopentaose A, B, C の構造を明らかにするとともに、これらの構造決定の過程で種々検討された ^{13}C -NMR, CIMS, molecular secondary ion mass spectrometry (SIMS) の各スペクトルについても論述する。

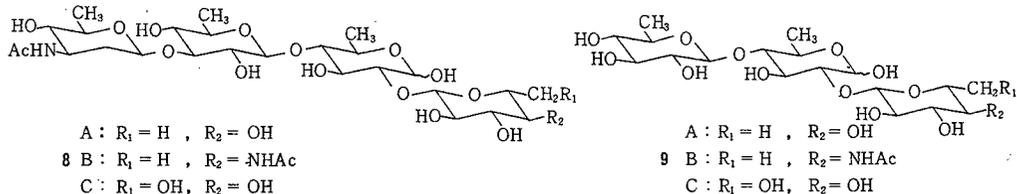
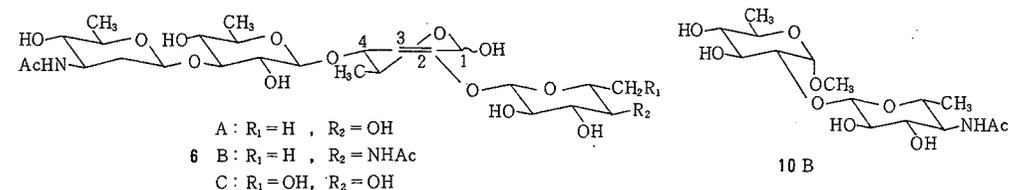
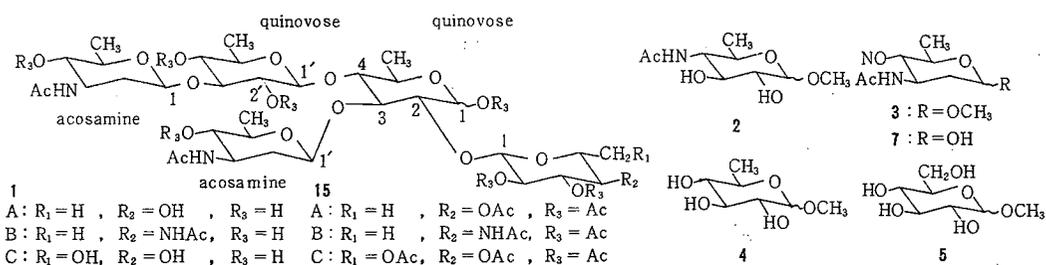
1. Viridopentaose A, B, C の構造

上述したように、SVD-N-Ac はアンモニア水により分解され、3種の viridopentaose を与える。これらは Sephadex LH-20, シリカゲルクロマトグラフィーを繰り返すことにより、1A : mp 198–201°, 1B : mp 207–209°, 1C : mp 191–193° にそれぞれ分離・精製された。得られた3者は相互にきわめて類似しており、いずれもその ^{13}C -NMR スペクトルで5個のアノマー炭素シグナルを示すことから、五糖類と推定された。さらに、分子量については後述する各種 SI マススペクトルの結果から、最終的に A : 798, B : 839, C : 814 と決定した。
〔構成単糖と分岐位置について〕

構成単糖の構造とその構成比を決定するために、1.6% HCl/MeOH の条件でメタノリシ

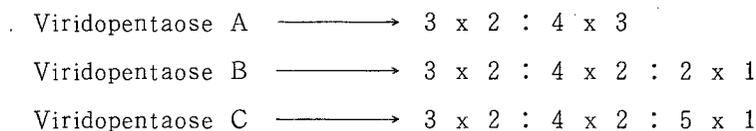
Scheme 1



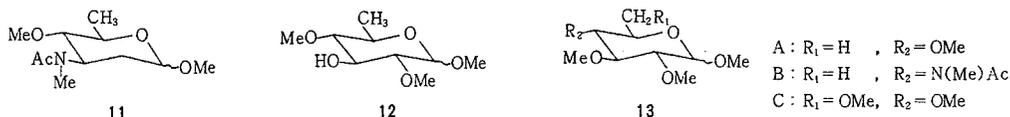


スをおこなった (Scheme 1)。その結果を下記に示す。

Scheme 2



また、分岐位置については箱守法により各完全メチル化体を調製後メタノリシスを実施した。その結果、各成分から共通に 4, 11, 12 が, 13 A, 13 B, 13 C はそれぞれ別々に得られた。



〔部分加水分解反応〕

糖鎖の配列を決める目的で酸性およびアルカリ性条件下での部分加水分解生成物の取得を検討した。2-デオキシ糖である N-acetylacosamine は他の構成単糖と比較して、酸性加水分解を受けやすく Scheme 1 に示されるように、各成分とも容易に四糖類 (8), 三糖類 (9) を与えた。

さらに、B シリーズでは条件を強めることにより二糖類 (10B) をも得ることに成功した。

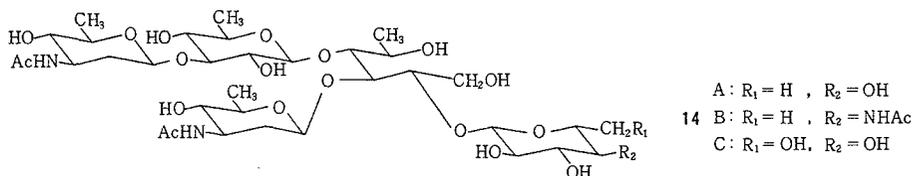
一方、5% NaOH による加水分解では、N-acetylglucosamine (7) が容易に脱離して、不飽和四糖類 (6) を高収率で与えた。

[viridopentaose A, B, C の構造]

以上の各種実験事実を踏まえ、さらに完全アセチル化体 (15) の $^1\text{H-NMR}$ (360 MHz) スペクトルを精査することにより、2 モルの quinovose と 2 モルの N-acetylglucosamine 部分から成る共通の四糖類に、A ではさらに quinovose が、B では N-acetylglucosamine が、また C では glucose が結合していることが判明した。以上の結果から、viridopentaose A, B, C はそれぞれ 1 A, 1 B, 1 C と決定された。

2. ^{13}C - NMR スペクトル

^{13}C -NMR スペクトルは天然有機化合物、とくに糖類や配糖体の構造決定には非常に有用な手段であり、今後さらに繁用されると考えられる。上述の分解反応を中心とした構造決定と並行して、 ^{13}C -NMR スペクトルによる構造解析を実施した。著者はまず構成単糖の化学シフトの帰属をおこない、これを基に現在この分野では最も信頼度の高い経験則である "glycosidation shift" を適用し、上述の二、三、四、五糖類および dihydroviridopentaose (14) の順にその帰属をおこなった。



その結果、四糖類までは確実に glycosidation shift が矛盾なく適用され、各単糖の結合位置を決定することができた。しかしながら、複雑な分岐構造を有する viridopentaose の場合には異常な高磁場シフトが観察され、この経験則は適用できないことが明らかとなった。この結果は本経験則に対する 1 つの警告であり、適用にあたっては十分な配慮が必要であることを示唆するものである。

3. 質量スペクトルによる構造解析

質量分析法を用いてオリゴ糖の構造解析をおこなう場合には、その熱不安定で難揮発性の性質のために困難を伴うことが多く、確実に効果的な質量分析法がほとんど見当たらないのもこの理由によると考えられる。

今回、著者はオリゴ糖に対する有効な質量分析法を開発する目的で、2つのアプローチを試みた。1つはメチル化オリゴ糖に対するCIMSの適用であり、他は未修飾糖に対するmolecular SIMSの応用である。いずれの方法においても確実に分子イオン種と適確な配列イオンを与えるか否かに注目した。

CIMSでは種々のモデル実験により次の一般則を導いた (Chart 1)。

1) 試薬ガスにアンモニアを用いた場合には、 $(M + \text{NH}_4)^+$ が強く出現するために分子量に関する知見が得られるのに対し、イソブタンCIマススペクトルではむしろフラグメントイオンの情報をより確実に入手することができる。

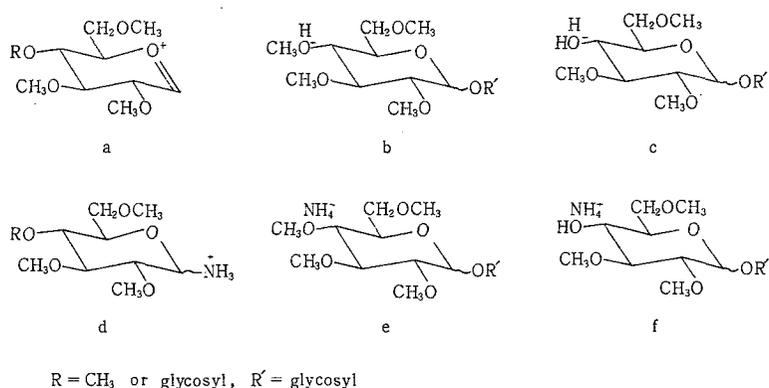


Chart 1

2) フラグメンテーションはグリコシド結合の開裂に限定され、さらにアノマー炭素側の切断が優先する。

3) イソブタンCIマススペクトルに出現するフラグメントイオンはオキシニウム型イオン、aとプロトン化型に大別される。後者にはメチル基転移イオン、bと水素転移イオン、cの両者が存在する。

4) アンモニアCIマススペクトルでも2種のフラグメントイオンに区別される。1つはオキシニウム型イオンにアンモニア分子が付加したイオン、d (a + NH₃)であり、他はアンモニウム付加型イオンである。後者にはメチル基転移イオン、eと水素転移イオン、fが含まれる。

以上の知見をviridopentaoseに適用した結果、確実に分子イオン種と配列イオンが得られることが確認され、本手法の有用性が示された。

一方、molecular SIMSにおいては、試料とマトリックス素材のプロトン親和力のあり方がマススペクトルパターンを支配するという観点に立って考察を加えた。

オリゴ糖としては、プロトン親和力が異なる中性オリゴ糖, viridopentaose, アミノ配糖体抗生物質を用い, マトリックス素材としてはグリセロールの他, アミド系のN-2-ヒドロキシエチルホルムアミド (HEF), アミン系のジエタノールアミン (DEA) を選定した。

代表例として3種の viridopentaose の各スペクトルにおける分子イオン種を Table 1 にまとめた。マトリックスを形成しない状態 (dry surface) のスペクトルの分子イオン領域には主に $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$, $(M+Ag)^+$ の3種のカチオン化したイオン種が出現している。とくに銀付加イオンにはその同位体 (107, 109) に由来する二重線で出現するので, 分子量決定には有用である。事実, 3種の viridopentaose はこの方法により決定された。

Table 1

	dry surface	glycerol	HEF	DEA	NaCl
1 A	905 $(M+Ag)^{+*}$	821 $(M+Na)^+$	888 $(M+HEFH)^+$	904 $(M+DEAH)^{+*}$	821 $(M+Na)^{+*}$
	907 $(M+K)^+$	799 $(MH)^+*$	821 $(M+Na)^+$	821 $(M+Na)^+$	
	837 $(M+K)^+$		799 $(MH)^+*$	799 $(MH)^+$	
	821 $(M+Na)^+$				
	799 $(MH)^+$				
1 B	946 $(M+Ag)^{+*}$	862 $(M+Na)^+$	929 $(M+HEFH)^+$	945 $(M+DEAH)^{+*}$	862 $(M+Na)^{+*}$
	948 $(M+K)^+$	840 $(MH)^+*$	862 $(M+Na)^+$	862 $(M+Na)^+$	
	878 $(M+K)^+$		840 $(MH)^+*$	840 $(MH)^+$	
	862 $(M+Na)^+$				
1 C	921 $(M+Ag)^+$	837 $(M+Na)^+$	904 $(M+HEFH)^+$	920 $(M+DEAH)^{+*}$	837 $(M+Na)^{+*}$
	923 $(M+K)^+$	815 $(MH)^+*$	837 $(M+Na)^+$	837 $(M+Na)^+$	
	853 $(M+K)^+$		815 $(MH)^+*$	815 $(MH)^+$	
	837 $(M+Na)^{+*}$				

Asterisks indicate major molecular ion species in each vertical column.

Fast atom bombardment (FAB) 法で必須条件とされているグリセロールマトリックスでは, $(M+Na)^+$ とともに MH^+ が強く出現している。主なフラグメンテーションはCIMSと同様にグリコシド結合のアノマー炭素側の開裂であり, その結果生成する各配列イオン (Fig. 1) はいずれもアミノ糖を含有するのが特徴的である。なお, これらのフラグメンテーションはB/Eリンク・スキャン法によって最終的な証明をおこなった。

HEF や DEA は著者が中性オリゴ糖のために新たに開発したマトリックス素材であり, $(M+HEFH)^+$ や $(M+DEAH)^+$ の付加型分子イオンを形成することが明らかとなっている。viridopentaose の HEF, DEA マトリックススペクトルでは, いずれも付加型分子イオンと MH^+ が出現しているが, $(M+DEAH)^+$ がより強く出現しているのは, DEA のプロトン親和力が高いためと考えられる。また, これらのフラグメンテーションはグリセロールマトリックスのそれと

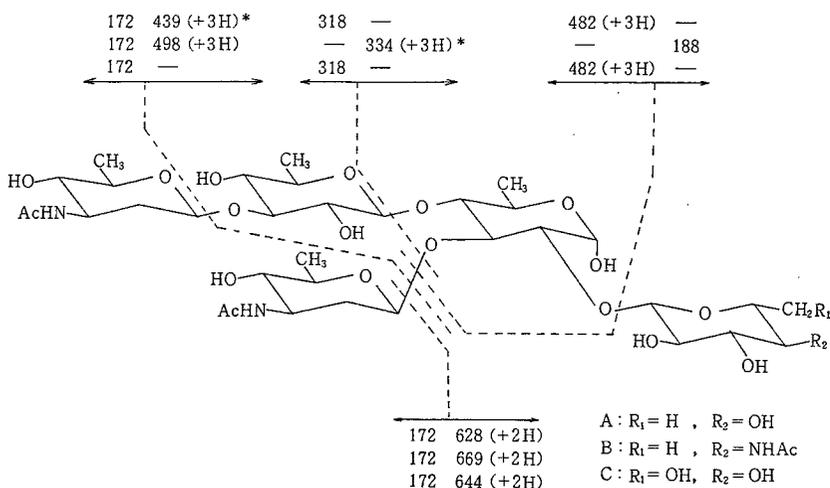


Fig. 1

よく類似している。

特定の金属塩をマトリックスに添加して特徴的なスペクトルパターンを取得することも可能である。NaCl - グリセロールによるスペクトルに出現している分子イオン種は (M+Na)⁺ のみであり、他のスペクトルとは著しい相違が認められる。

今回、viridopentaose を中心に未修飾オリゴ糖の構造解析に対して、molecular SIMS を適用し、従来の方法では取得困難であった分子イオン種や構造情報に富んだ配列イオンが確実に得られることを確認するとともに、適当なマトリックス素材を選択すれば目的に応じたスペクトルが得られることも判明した。さらに、有機化学的な側面から本手法のイオン化について考察を加えた。その結果、liquid matrix を利用する SIMS が CIMS に類似し、ともにイオン-分子反応を主体とするプロセスが生起することも明らかとなった。

審査結果の要旨

Sporaviridin (SVD) は、*Streptosporangium viridogriseum* が産生する塩基性水溶性抗生物質で、種々の興味深い生物活性を示す。しかし、その構造はオリゴ糖を有する配糖体と推定されているものの未だ明らかにされるにはいたっていない。

そこで、まずSVDの構成単糖について検討を加え、これらがD-quinovose, D-glucose, D-viosamine, D-acosamine, L-vancosamineの計5種であることを明らかにした。また、SVDのN-アセチル誘導体は、アンモニア水により、アグリコンを含む配糖体とオリゴ糖群に分解されることを見出した。後者は viridopentaose A, B, C の3成分からなり、いずれも五糖類である。これらは上述の構成単糖のうち、L-vancosamine を除く4種からなり、その構造は酸およびアルカリによる分解反応の結果から決定した。

一方、分解反応を中心とした構造決定と並行して、 ^{13}C -NMRスペクトルによる構造解析を行った。その結果、信頼度の高い経験則とされている“glycosidation shift”は、四糖類までの各分解生成物には適用可能であるが、viridopentaose では異常な高磁場シフトが観察され、複雑なオリゴ糖にこれを適用する際の警告を得た。

さらにオリゴ糖に対し有効な質量分析法を開発する目的で、2つのアプローチを試みた。その1つは完全メチル化オリゴ糖に対する chemical ionization mass spectrometry (CIMS) の適用であり、いま1つは未修飾オリゴ糖に対する molecular secondary ion mass spectrometry (SIMS) の応用である。前者では、再現性が良く規則正しい開裂則を得ることに成功し、これを viridopentaose に応用して糖鎖の配列決定をおこない、その有用性を示した。また後者においては、従来の手法では取得困難であった分子イオン種や配列イオンが確実に得られることを確かめ、さらに独自の新しいマトリックス素材を開発し、本質量分析法におけるイオン化について有機化学的な側面からの考察を加えた。

以上、本論文はSVDの構成五糖類である viridopentaose A, B, C の構造を明らかにするとともに、これらの構造決定の過程で ^{13}C -NMR, CIMS, SIMS に関して数々の新知見を得たものであり、学位論文として価値ある内容と認める。