

ジ-*t*-ブチルパーオキシドを用いた 4-デオキシ-L-ラムノースの合成

藤原 剛*

Synthesis of 4-deoxy-*L*-rhamnose using di-*t*-butyl peroxide

Tsuyoshi Fujiwara

要 旨

L-ラムノースは抗酸菌の細胞壁のペプチドグルカンとアラビノガラクトタンとの結合点の構造 [→4)- α -L-Rha-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→)] を構成する鍵になる化合物であり、アラビノガラクタンのラムノースへの結合部位を無くした4-デオキシ-L-ラムノースは抗酸菌の生育阻害剤になる可能性を持つので、これを簡便に合成する方法について検討した。その結果、メチル 2, 3-ジ-*O*-イソプロピリデン-4-*O*-アセチル- α -L-ラムノピラノシドをジ-*t*-ブチルパーオキシドとトリフェニルシランの存在下で140℃、2時間加熱して得た4-デオキシ体を、トリフルオロ酢酸で加水分解して約22.4%の収率で4-デオキシ-L-ラムノースを合成した。この方法は比較的少量の4-デオキシ-L-ラムノースを簡単に合成することができ、大量合成に有用な合成法であると考えられたが、収率がやや低く改善が必要であった。

はじめに

ハンセン病は日本では現在新たに発症する人は1年間に数名程度にまで減少しているが、¹⁾ 世界では2005年1年間で約29.6万人が発症した重要な疾病である。²⁾ ハンセン病の治療は主としてリファンピシン、クロファジミン、DDSの三剤を併用する多剤療法が行われ³⁾ 効果を挙げているが、耐性菌の出現などの問題もあり新たな薬剤の開発が必要になって来ている。

細菌の細胞表層は宿主細胞との相互作用の場であり、細菌の感染、増殖にとって極めて重要な意味を持つため、広範な研究が進められてきた。ハンセン病はハンセン病菌 (*Mycobacterium leprae*) によって引き起こされる感染症であるが、ハンセン病菌や結核菌の属する抗酸菌の細胞表層はかなり特異な構造を持っていることが分かってきた。抗酸菌の細胞表層 (図1) はペプチドグリカンにアラビノガラクトタン (AG) が結合して細胞壁を構成している。このAGは直鎖状に結合したガラクトース鎖から樹状に枝分かれする形でアラビノース鎖が結合し、その非還元末端の水酸基が長鎖の脂肪酸であるミコール酸でエステル化されて脂質層を形成していることが明らかにされ

平成18年9月21日受理 *教養部教授

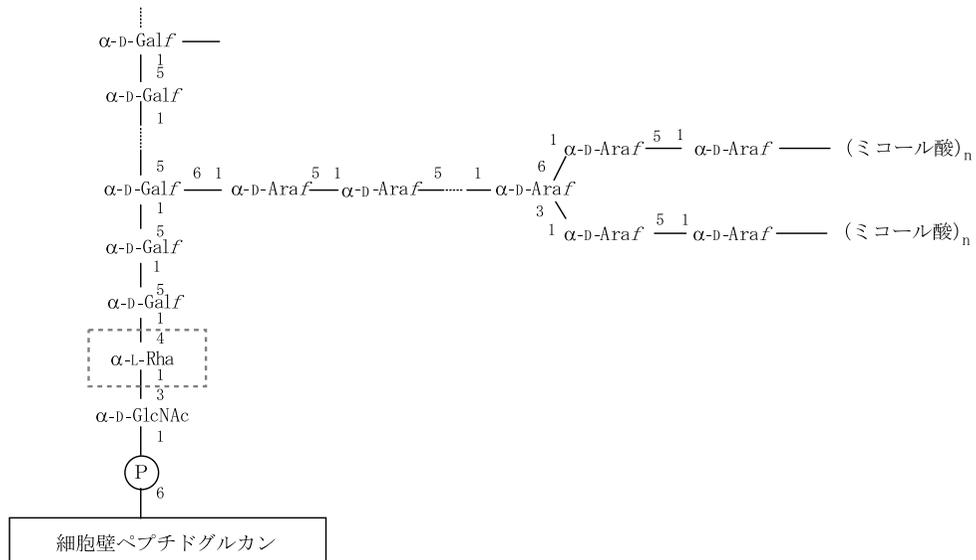
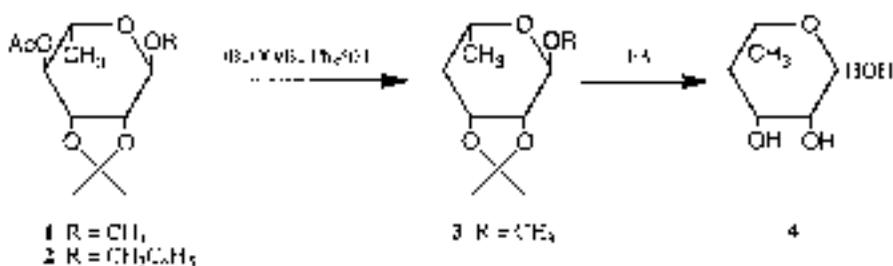


図1 抗酸菌の細胞表層の構造

た。⁴⁻⁷⁾ AGを構成するD-アラビノースとD-ガラクトースはいずれもフラノース型であるなど極めて特異な構造であり、ミコール酸とともに抗酸菌の特異性を支配していると考えられる。このAGとペプチドグリカンの結合点はペプチドグリカンを構成するムラミン酸で、(AG)-(1→5)- α -D-Araf-(1→4)- α -L-Rha-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→が6位にホスホジエステル結合を介して結合している。⁴⁻⁷⁾ この結合点の構造では4位が置換されたラムノースがAGとペプチドグリカン結合のキーポイントになっており、AGのラムノースの4位への結合が阻害されれば、正常な細胞壁が形成できなくなると考えられる。このラムノースは生体内ではdTDP-グルコースからトランスフェラーゼによってdTDP-ラムノースに変換され、AGに組み込まれることが明らかにされた。⁴⁾ 従って4位に水酸基を持たないラムノース(4-デオキシラムノース)がdTDP-トランスフェラーゼの拮抗阻害剤になりハンセン病菌の増殖を抑制することが考えられる。Yufangらは実際に抗酸菌の増殖にはdTDP-ラムノースの生成が不可欠であることを報告している。⁸⁾ また、ラムノースは人ではほとんど見られない糖であるので、抗酸菌のラムノース合成系の阻害剤として4-デオキシラムノースを用いても人に影響する可能性は小さいと考えられ、ハンセン病菌や結核菌に対する抗菌剤になる可能性がある。dTDP-グルコーストランスフェラーゼやdTDP-ラムノースに関する様々な研究が行われている。

4-デオキシラムノースはこれらの研究の出発物質であるが、その合成についてはやや困難がある。デオキシ糖の合成法としては、エステル化した水酸基を紫外線照射によって脱離させる方法、⁹⁾ ジメチルスルフォキシド等で水酸基を酸化してケト化し水素添加してデオキシ化する方法、⁹⁾ 水素化トリブチル錫で遊離の水酸基を脱酸素化する方法、^{10,11)} グリカールを経由する方法¹²⁾ などがあるが、合成した4-デオキシラムノースを使ってその生物学的な活性を調べるためにはある程度の量が必要になるので、簡便で効率の良い合成法が必要になる。この実験ではある程度の量の試薬



を扱えること、装置の簡便さや試薬の取り扱いの点などを考慮するとジ-*t*-ブチルパーオキシドによるラジカル反応でエステル化した水酸基を解裂して脱酸素化する方法¹²⁾が適していると考えられるので、この方法を用いて4-デオキシ-L-ラムノースの合成を行った。

結果と考察

I. 反応条件の検討

合成の出発材料としては1, 2, 3位が保護基でマスクされ、4位がアセチル化されたラムノース必要であるので、1をラムノースから合成して用いた。これからラジカル反応によって4位のOH基を除去する反応について、ジ-*t*-ブチルパーオキシドとトリフェニルシランおよび1の量比、反応時間について条件を検討した。1から目的物である3への変換割合は出発物質1当量に対してジ-*t*-ブチルパーオキシドとトリフェニルシランがそれぞれ2および4当量の時、40~45%で最も高かったが、ジ-*t*-ブチルパーオキシドとトリフェニルシランが1に対して2~6倍の間で生成率はあまり変わらなかった。この結果はSanoらがイソプロピリデンリボフラノシドなどで報告している結果と一致している。¹³⁾ また、反応時間については2時間を超えると2の生成率はほぼ一定になり、12時間ではやや減少する傾向が見られた(図2)。この合成の最終目標である4-デオキシ-L-ラムノース(4)の合成には1を出発物質とすると1位のメチル基を除去するために酸による加水分解が必要になるので、水素添加によって簡単に除去できるベンジル体の方が望ましい。そこで1の代わりにベンジル体(2)について反応条件を検討したが、反応中に着色黒

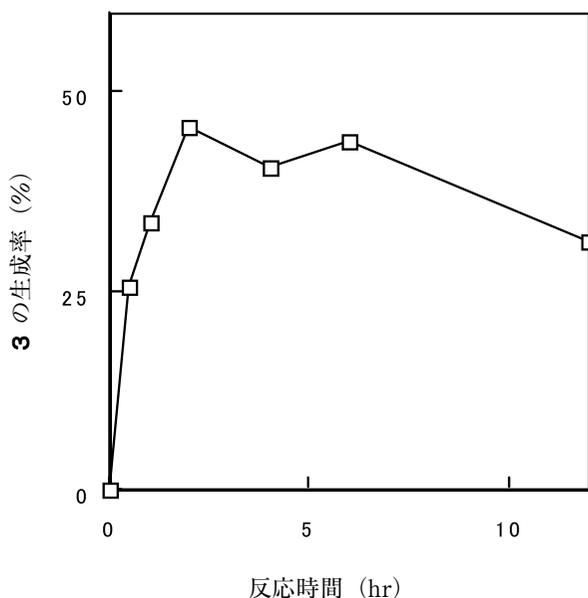


図2 反応時間と3の生成率

化する傾向があり反応後の分離精製が困難になることが分かった。これらの結果から **4** の合成には **1** を出発材料にし、**1** とジ-*t*-ブチルパーオキシドとトリフェニルシランのモル比を 1 : 2 ~ 6 : 2、反応温度 140°C、反応時間 2 ~ 6 時間の条件が適当であることが分かった。

II. 4-デオキシ-L-ラムノース (**4**) の合成

化合物 **4** の合成は生理活性を調べるために必要な量数百 mg を得るために数グラムの **1** から出発することにした。一般に一度に取り扱う量が増えるると目的物の収率が減少する。特にこの反応のようにラジカル反応を行う場合は残存する酸素によって目的物の生成が減少する可能性が高い。また、装置が大きくなると残存する酸素を除去するのが難しくなる。そこで、使用する **1** の量を 2 g までに制限し、溶融した反応液を真空ポンプを使って吸引する操作を 5 回繰り返すことで残存する酸素を極力除去した。反応時間は反応率が上限に達する 2 時間にした。反応後の反応溶液には多量の珪素化合物が含まれていて、ここから **3** を溶媒で効率よく抽出するのはかなり困難であった。そこで反応溶液を 20 mmHg, 150°C で直接減圧蒸留して溜出してくる画分 (1.93 g、2 回の反応分を合算) を集めた。この画分からシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって **3** を精製した。

精製された **3** の IR ではエステルに由来する吸収、OH に由来する吸収がともに認められず、**1** の 4-*O*-acetyl 基が脱離して水素に置換されたことを示した。¹H-NMR (図 3) では **1** のアセチル基に由来するシグナルと H-4 のシグナル (4.17 ppm) が消失し、高磁場に大きくシフトした 1.794 ppm に H 2 個分に相当するマルチプレットシグナルが観測された。また、¹³C-NMR では、**1** では 75.889 ppm にあった C-4 のシグナルが **3** では 36.221 ppm に高磁場シフトしていた。このシグナルは **4**

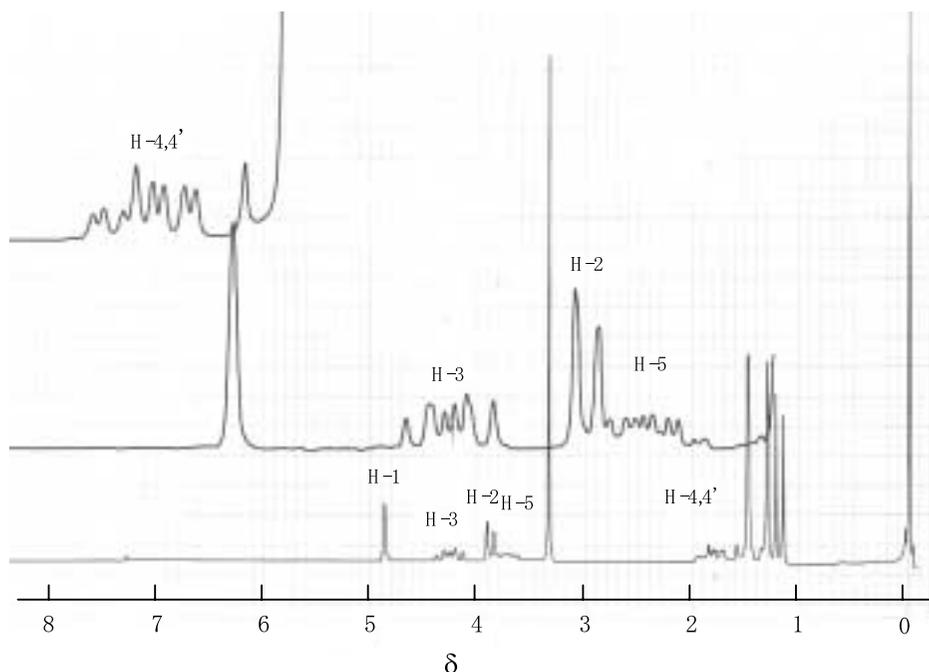


図 3 **3** の ¹H-NMR

の¹³C-DEPT-NMRでは(-)の極性を示しメチレン炭素であることを示した。また、**3**のマススペクトルでは親イオンは観測されなかったが、強度の大きいM⁺-15(m/z187)やM⁺-31(m/z171)が観測された。以上のことから**3**は**1**の4-デオキシ体である事が確認された。

ついで**3**をトリフルオロ酢酸で加水分解して**4**を得た。得られた**4**はIRと重水中の¹H-NMRで構造を確認した。その際、重水中で(約20℃)はα体約60%、β体約40%のアノメリック混合物になっていることが分かった。これは**4**をピリジン中でTMS化してGLCで分析した結果(α体57.6%、β体42.4%)とほぼ同じであった。今回の合成では3.6gの**1**から286mgの**4**を得た。この量は生理活性等を調べる研究を始めることができる量であり、現在ハンセン病菌への取り込みとその影響について検討している。

デオキシ糖の合成法には様々なものがあるが、特別な装置が必要なものや合成のステップが長く手間がかかるものが多い。この合成法はごく簡単に合成できる**1**から特別な装置や器具を使うことなく二段階の反応のみで**4**を合成できるので、**4**を合成する簡便な方法として有用であると考えられる。しかしながら全体収率が約22.4%で、dTDP-グルコーストランスフェラーゼの阻害活性が期待されるdTDP-4-デオキシラムノース等を合成する出発物質を得る方法として使うには収率が低く問題がある。収率が低くなった原因は**1**から**3**への変換率が40%程度と低い事と反応液から**3**を抽出する過程でのロスが大きいことによると思われるのでいくつかの反応条件を検討したが、**1**から**3**への変換率はあまり変わらなかった。更に詳細に反応条件を検討する必要があるが、同様の方法、条件でイソプロピリデン化したりボフラノシド、グルコフラノース、アラビノフラノース、マンノピラノースから対応するデオキシ体を70%程度の収率で得られる事が報告されている¹³⁾ので、**1**の構造に由来する問題がある可能性も検討する必要がある。また、反応溶液から減圧蒸留して得た画分をGLCで分析したところ、検出された成分のうちの約65%が**3**であった。従って減圧蒸留によってトリフェニルシランやその分解物などから**3**を比較的きれいに抽出できたことを示している。生成した**3**を減圧蒸留によってどの程度回収できたかは不明であるが、シリカゲルカラムで精製した後の収率が約33.3%であることを考えると、**3**の回収が不十分であったか、または**3**は揮発性があるので減圧蒸留の過程でかなりの量の**3**が失われてしまったことが考えられる。減圧蒸留の条件の検討と効率の良い抽出法を検討する必要があると考えられる。

実験の部

ジ-*t*-ブチルパーオキシドはICN Biomedicals製の試薬を、トリフェニルシランは信越化学工業製のものを使用した。本実験で行った反応は高度の乾燥条件が必要であったので固体試薬とガラス器具は五酸化リンを入れたデシケータ中で減圧下で3日間以上乾燥してから使用した。

反応条件の検討は20mgの**1** (0.077mmole) と所定量のトリフェニルシランをスクリュウキャップ付の試験管に取り、加熱溶融した後窒素を通じて脱気し、ジ-*t*-ブチルパーオキシドを加えて窒素気流中で封管にして加熱した。反応温度については、予備的な実験の結果からSanoらの報告にある140℃で固定した。反応液はTLCとGLCで分析した。

反応生成物の分離精製はLichroprep Si60 Lobarカラムを用いてヘキサン-ベンゼン (1 : 1)、ベンゼン、ベンゼン-アセトン (50 : 1) の溶媒で行った。ガスクロマトグラフィー (GLC) は Cp-Sil-5 CBカラム (25m × 0.32mmID、ジーエルサイエンス) を用い、カラム温度を80から280°C まで10°C/minで昇温させて行った。また、反応生成物は同じカラムを付けたGCMS-QP1000 (島津製作所) ガスクロマトグラフ質量分析計で加速電圧70eVでマススペクトルを測定した。旋光度は堀場SEPA2000旋光度計でクロロフォルムまたは純水中で光路長10cmのセルを用いて測定した。IR スペクトルは日立260-10赤外分光光度計で液膜状態で測定した。¹H-NMR (90MHz) および¹³C-NMR (22.3MHz) は日立R-90核磁気共鳴装置で測定した。またこの合成の最終化合物 **4** (4-デオキシ-L-ラムノース) についてはBAUKER AM-300(300MHz)でD₂Oを溶媒として¹H-NMR と¹³C-DEPT-NMRスペクトルを測定した。

メチル 2,3-ジ-O-イソプロピリデン-4-デオキシ- α -L-ラムノピラノシド (**3**) — メチル 2,3-ジ-O-イソプロピリデン- α -L-ラムノピラノシドをアセチル化して得たメチル 2,3-ジ-O-イソプロピリデン-4-O-アセチル- α -L-ラムノピラノシド (**1**) 2.0g とトリフェニルシラン6.8g を肉厚のガラス試験管に入れて良く混和した。これに減圧装置を繋ぎ、窒素ガスを封入して常圧下で軽く加熱して完全に溶解した。ついで、この状態で徐々に減圧して気泡を追い出した後、氷水で冷却して内容物を固体化した。脱気を完全にするためこの操作を5回繰り返した後、ジ-*t*-ブチルパーオキシド3.3mlを加えた。これを窒素ガス気流下でシールして140°Cで2時間加熱した。反応後内容物を、同様の方法で1.6gの**1**から得た分と合わせ、20mgHgで減圧蒸留して70°Cで溜出する部分を除いた後、20mgHg, 150°Cで溜出する画分を回収した (1.93g)。これをヘキサンに溶かしてシリカゲルカラムに負荷した。ベンゼン-ヘキサン (1 : 1) でカラムを洗い、ベンゼンで溶出して**3**を得た (収量932mg, 収率33.3%)。

Tlc : Rf 0.47 (ベンゼン-アセトン50 : 1)。[α]_D²⁰-41.36 (c 4.01, クロロフォルム), IR (液膜) ν_{\max} 3600~3100cm⁻¹ および2000~1600cm⁻¹ にOHまたはアセチル基に由来する吸収を認めない。¹H-NMR (クロロフォルム-*d*, 90MHz) : δ 1.531 (d, 3 H, H-6, *J* 6.38 Hz), 1.335 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.516 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.794 (m, 2 H, H-4 and H-4'), 3.376 (s, 3 H, OCH₃), 3.73 (m, 1 H, H-5), 3.918 (dd, 1 H, H-2, *J* 0.66, 5.82 Hz), 4.329 (m, 1 H, H-3), 4.902 (d, 1 H, H-1, *J* 0.66 Hz)。¹³C-NMR (クロロフォルム-*d*, 22.3 MHz) : δ 21.268 (C-CH₃), 26.334 (C(C*H₃)₂), 28.226 (C(C*H₃)₂), 36.221 (C-4), 54.743 (OCH₃), 62.006 (C-5), 71.07 (C-2 or C-3), 72.808 (C-3 or C-2), 98.898 (C-1), 108.693 (C*(CH₃)₂)。マススペクトル (EI, 70eV, Mw 202.250, m/z100以上を記載、() 内はm/z59を基準ピークとする相対強度) : m/z100 (88.7), 101 (20.6), 113 (37.6), 115 (7.4), 127 (29.4), 143 (11.1), 155 (5.0), 171 (33.3), 187 (33.5)。

4-デオキシ-L-ラムノピラノース (**4**) — 化合物**3** (400mg) を3Mトリフルオロ酢酸 (TFA) 10mlに溶かして100°Cで1.5時間加熱した後メタノールを加えながら濃縮乾固した。これを水2ml-メタノール10mlの混液に溶かしアンバーライト120 (OH⁻) で中和した。樹脂を廬去し、廬液を活性炭処理して濃縮乾固した後再度活性炭処理して**4**を得た (収量210mg, 収率67.5%)。

[α]_D²⁰-6.5 (c 10.0, メタノール) (0 min) → -7.1 (30min), IR (液膜) : ν_{\max} 3700~3000cm⁻¹ にOHに由来する強い吸収を認める。¹H-NMR(D₂O, 300 MHz) : δ 1.157(d, 3 H, H-6, *J* 6.32 Hz),

1.214 (m, 1 H, H-4), 1.603 (m, 1 H, H-4'), 3.534 (m, 1 H, H-5), 3.635 (m, H-2 α), 3.663 (m, H-2 β), 3.9 - 4.1 (m, H-3 α and H-3 β), 4.620 (d, H-1 β , J 0.88 Hz), 5.069 (d, H-1 α , J 1.72 Hz), ¹³C-DEPT-NMR (D₂O, 74.3 MHz, () 内の α , β はそれぞれ α アノマー、 β アノマーに由来するシグナルであることを示し、+、- はシグナルの極性を示す) : δ 23.924 (C-6 β , +), 24.183 (C-6 α , +), 37.871 (C-4 β , -), 39.671 (C-4 α , -), 67.797 (α , +), 69.015 (α , +), 71.915 (β , +), 72.354 (β , +), 73.083 (α , +), 73.967 (β , +), 98.102 (C-1 β , +), 98.938 (C-1 α , +)。

謝 辞

化合物 4 の ¹H-NMR と ¹³C-DEPT-NMR スペクトルを測定していただいたコロラド州立大学微生物学教室の Michel McNeil 博士に感謝いたします。

資料および文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センターホームページより : <http://idsc.nih.gov/disease/leprosy/index.html>.
- 2) 世界保健機関ホームページより : <http://www.who.int/lep/situation/prevalence/en/index.html>.
- 3) 世界保健機関ホームページより : <http://www.who.int/lep/mdt/en/index.html>.
- 4) Dean C. Crick, Seabratra Mahapatra and Patrick J. Brennan, Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*, *Glycobiology*, **11** (2001), 107R-118R.
- 5) Michael McNeil, Mamadou Daffe and Patrick J. Brennan, Evidence for the Nature of the linkage between the arabinogalactan and peptidoglycan of Mycobacterial cell walls, *Journal of microbiological chemistry*, **265** (1990), 18200 - 18206.
- 6) Mamadou Daffe, Patrick J. Brennan and Michael McNeil, Predominant structural feature of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ¹H- and ¹³C NMR analyses. *Journal of biological chemistry*, **265** (1990), 6734-6743.
- 7) Yufang Ma, Richard J. Stern, Michael S. Scherman, Varalakshmi D. Vissa, Wenxin Yan, Victoria Cox Jones, Fangqiu Zhang Scott G. Franzblau, Walter H. Lewis, and Michael R. MacNeil, Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wallsynthesis: genetics of dTDR-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45** (2001), 1047 - 1416.
- 8) Yufang Ma, Fei Pan and Michael McNeil, Formation of dTDP-rhamnose is essential for growth of mycobacteria, *Journal of Bacteriology*, (2002), 3392 - 3395.
- 9) Jean-Pierre Pete and Charles Portella, A general and convenient photochemical method for the preparation of Deoxysugars, *Synthesis* (1977), 774-776.
- 10) Bernd Giese, Kay S. Groninger, Tom Witzel, Hans-Gert and Reiner Sustman, Synthesis of 2-deoxysugars, *Angewandte chemie international edition in english*, **26** (1987), 233-234.
- 11) Wilhelm P. Neumann, Tri-*n*-butyltin hydride as reagent in organic synthesis, *Synthesis*, (1987), 665-683.
- 12) J. S. Brimacombe, The synthesis of rare sugars, *Angewandte chemie international edition*, **6** (1969), 233-234.

- 13) Hiroshi Sano, Toshimitsu Takeda and Toshihiko Migita, A novel method for the deoxygenation of acetylated sugars, *Synthesis* (1988), 402 - 402.

Summary

L-Rhamnose is a key compound which composes the binding point structure [\rightarrow 4)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] of cell wall peptidoglycane and arabinogalactane of mycobacteria. 4-Deoxy-L-rhamnose, potential inhibitor of growth of mycobacteria, was synthesized in about 22.4% yield by heating methyl 2,3-di-*O*-isopropylidene-4-*O*-acetyl- α -L-rhamnopyranoside at 140 °C for 2 hours with di-*t*-butylperoxide and tributylsilane followed by acid hydrolysis with trifluoroacetic acid. This method is simple and easy for the synthesis of 4-deoxy-L-rhamnose, useful for the mass preparation of 4-deoxy-L-rhamnose. However, the yield was low, and therefore, the conditions of the conversion reaction are to be improved.