

海ホタル Luciferin および関連物質の合成研究 (第1報)

2-Amino-5-(3-indolyl)-pyrazine の合成

杉浦寿美, 井上昭二,^{1a)} 岸 義人, 後藤俊夫^{1b)}名城大学薬学部,^{1a)} 名古屋大学農学部^{1b)}

Synthesis of Cypridina Luciferin and Related Compounds. I.

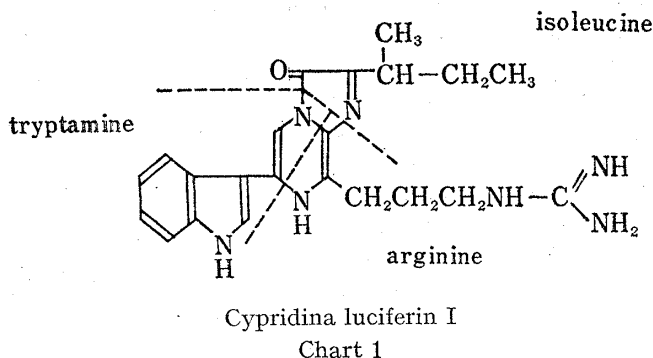
Synthesis of 2-Amino-5-(3-indolyl)-pyrazine

SUMI SUGIURA, SHOJI INOUE,^{1a)} YOSHITO KISHI and TOSHIO GOTO^{1b)}Faculty of Pharmacy, Meijo University^{1a)}and Department of Agricultural Chemistry, Nagoya University^{1b)}

(Received April 30, 1969)

To confirm the structure of Cypridina luciferin, synthesis of 2-amino-5-(3-indolyl)-pyrazine (XXI) was carried out by condensation of 3-indolylglyoxal and α -aminoacetamidine. We confirmed that the indolyl group in XXI is substituted at 5 and not at 6 position of the pyrazine ring in comparing the nuclear magnetic resonance spectrum of XXI with that of authentic 2-amino-5-phenylpyrazine (IX) obtained by condensation of phenylglyoxal aldoxime and aminoacetonitrile followed by reduction. IX was also synthesized from phenylglyoxal and α -aminoacetamidine. Ultraviolet spectral behavior of the pyrazine (XXI) is nearly identical with that of etioluciferin obtained from natural luciferin, indicating that both XXI and etioluciferin have the same chromophore.

海ホタル *Cypridina hilgendorffii* の生物発光の研究については, 1917 年 Harvey²⁾ によって始められて以来, 1957 年, 下村等³⁾ によってその発光物質, 海ホタル luciferin の抽出, 結晶化が行なわれ, 1966 年, 岸等⁴⁾ により I のような構造が提出された。



引続いてわれわれは, I の構造の確認および発光現象の解明を目的として, I の合成⁵⁾ を行なった。

海ホタル luciferin (I) は Chart 1 に示すように, isoleucine, tryptamine および arginine の 3 つのアミノ酸関連部分から成り立っていると考えられる。I における isoleucine 部分は酸化に対して不安定で, I の水溶液に海ホタル luciferase を加えると発光して, oxyluciferin (II) と

なり, さらに II は luciferase に共存する加水分解酵素 (?) により徐々に etioluciferin (III) に変化する。I は O_2/NH_4OH 処理で II と III の混合物に変化し, また II は HCl 処理で III になる。さらに III を Ba (OH)₂ 水溶液と封管中加熱すると etioluciferamine (IV) となる。⁴⁾

III および IV は比較的安定な物質であるので, 合成法として, まず IV を合成し, これをグアニジン化し, tryptamine と arginine の部位からなる III とし, 最終的に isoleucine に相当する keto acid を III に縮合, ついで還元することにより不安定な isoleucine 部位を組立てる方針を立てた。

1) Location: a) Yagotourayama, Tenpaku-cho, Showa-ku, Nagoya; b) Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya.

2) E.N. Harvey, "Bioluminescence," Academic Press, N.Y., 1952.

3) O. Shimomura, T. Goto, Y. Hirata, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 929 (1957).

4) Y. Kishi, T. Goto, Y. Hirata, O. Shimomura, F.H. Johnson, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 3427.

5) Y. Kishi, T. Goto, S. Inoue, S. Sugiura, H. Kishimoto, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 3445.

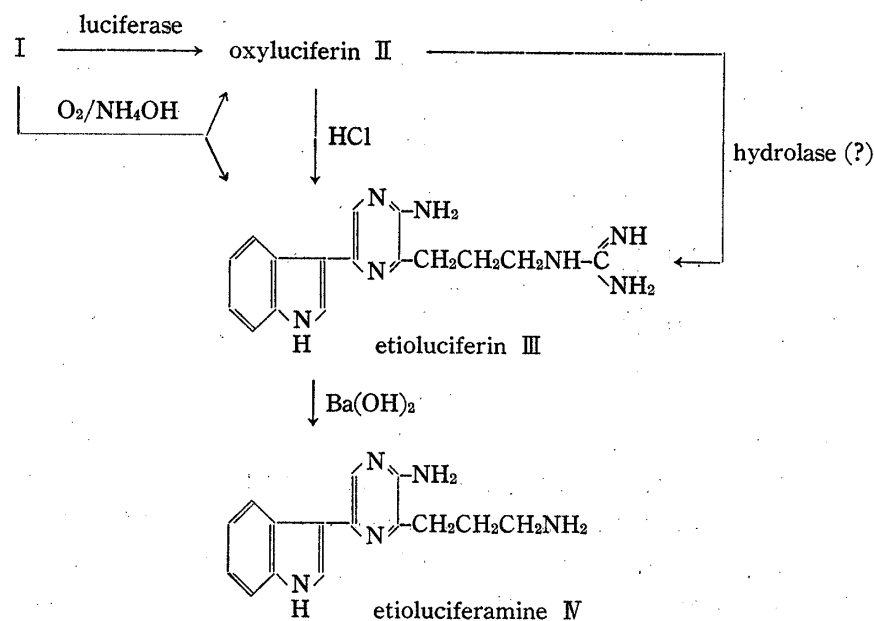


Chart 2

この合成を始めるに先立ち, etioluciferin (III) の構造決定において, ピラジン核におけるインドリル基とアミノ基とが, *para* 位に結合している事は一応証明されているが, 合成的にこの点を確認しておく必要がある. これを行なうため, 5 位に置換基をもった 2-aminopyrazine 類が最も確実に得られる Spring 等⁶⁾ の方法に注目した.

そこでまず, 3-indolyl methyl ketone⁷⁾ から 3-indolylglyoxal aldoxime (V) を合成し, Spring 等⁶⁾ の条件に従って, $CHCl_3$ 中, aminoacetonitrile (VI) と加熱してみたが, 目的とする閉環体は得られなかった.

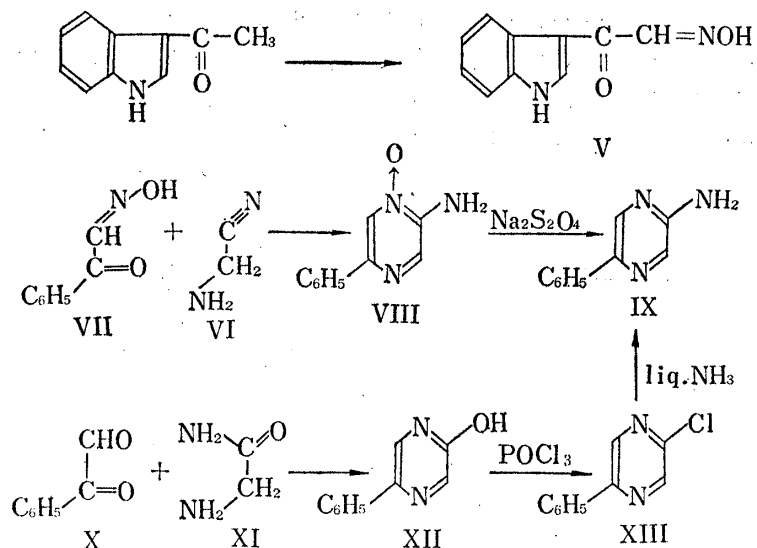


Chart 3

しかし, V の代りに phenylglyoxal aldoxime (VII) を用いて VI と縮合させたところ, 低収率ながら 2-amino-5-phenylpyrazine 1-oxide (VIII) が得られた. ついで VIII を $Na_2S_2O_4$ により還元し, 置換基の位置の確実な 2-amino-5-phenylpyrazine (IX) を合成した. 一方 IX は phenylglyoxal (X) と α -aminoacetamide (XI) から 2-hydroxy-5-phenylpyrazine (XII) を得, XII を $POCl_3$ で処理し 2-クロル体 (XIII) とした後, これを液体アンモニアと封管中 170° に加熱しても得られたが, この方法はインドリル基をもつ etioluciferamine

6) W. Shapp, F.S. Spring, *J. Chem. Soc.*, 1951, 932.

7) 真島利行, 小竹無二雄, 日化, 43, 936 (1922).

(IV) の合成法に適用することは困難である。しかし以上の実験で得られた IX は、もし別法で同種のピラジン類を合成した場合、確実に置換基の位置を証明することが出来る標品となるので、2-aminopyrazine 類の別途合成法の 1 つとして、従来行なわれているジカルボニル化合物とジアミン類による閉環反応⁸⁾を検討した。

この方法によれば、XIV および XV における置換基の種類により、縮合閉環の方向が 2 通り考えられ、最終的に XVIa および XVIb の 2 種類の誘導体を得られる可能性がある。

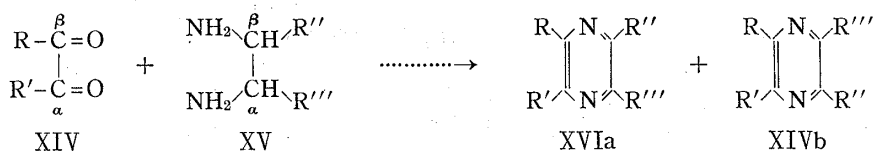


Chart 4

この場合、もし XIV の β 位のカルボニル基が α 位より活性で、また一方、XV における β 位のアミノ基の塩基性が α 位のそれよりも強い場合は、アルカリ条件下では、縮合は XVIa の方向に進むと考え、ジカルボニル化合物として phenylglyoxal (X), ジアミン類として α -aminoacetamidine (XVII)⁹⁾ を用い、KOH アルカリ中で縮合¹⁰⁾を行なったところ、生成物は Spring 等⁶⁾の反応条件を適用して得られた N-oxide (VIII) を還元して得た 2-amino-5-phenylpyrazine (IX) に一致した。

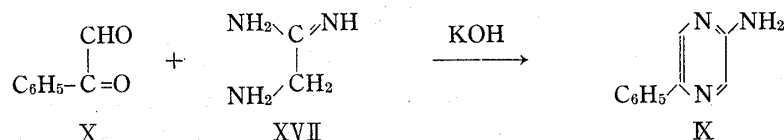


Chart 5

以上のモデル実験から glyoxal 類と α -aminoamidine 類の縮合によって、2-aminopyrazine 類の 5 位に置換基を有する誘導体を合成し得ることがわかった。またこの反応条件では、インドリル基の存在は、反応障害とならないので、3-indolyl chloromethyl ketone (XVIII)⁷⁾ から Sanna¹¹⁾の方法によって 3-indolylglyoxal を合成し、これを安定な酸性亜硫酸塩 (XIX) として単離、o-phenylenediamine と縮合させ、quinoxaline 誘導体 (XX) として確認した後、XIX を KOH を含む 50% MeOH 溶液中、 α -aminoacetamidine (XVII) と -10° で縮合させて、mp $230-231^\circ$ の生成物 XXI を得た。

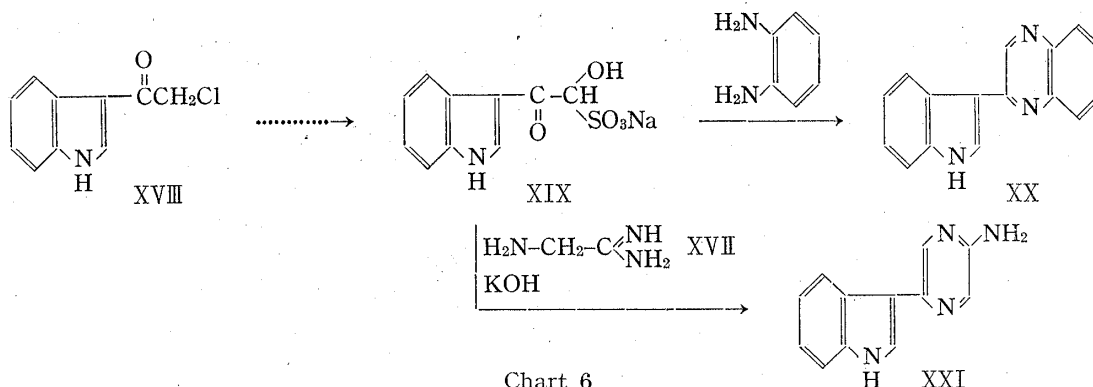


Chart 6

生成物は Mass Spectrum m/e : 210 (M^+), NMR, 元素分析などによりインドリル基の結合した 2-aminopyrazine であることは確実である。ここでインドリル基が 6 位でなく 5 位に結合している事は、先に述べた 2-amino-5-phenylpyrazine (IX) の合成からも推定出来るが、さらに次のように推定した。すなわち amino-

8) R.C. Elderfield, "Heterocyclic Compounds," Vol. 6, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1957, pp. 388-399.

9) M. Mengelberg, *Chem. Ber.*, **89**, 1185 (1956).

10) 本法を *Tetrahedron Letters*, **1966**, 3445. に発表後同一条件による合成法が D. Pitre, S. Boueri によって *Chem. Ber.*, **100**, 560 (1967) に発表された。

11) G. Sanna, *Gazz. Chem. Ital.*, **72**, 363 (1942) [*C. A.*, **37**, 6662 (1933)].

pyrazine の NMR Spectrum (D_2O solution) では 3 個の核プロトンシグナルが現われるが、その間のカップリング定数は 3.0, 1.5, 0.2 cps の 3 種が認められ、このうち最も大きい $J=3.0$ cps は、 $J_{5,6}$ (*ortho*) にもとづくものと考えられ、他の 2 つが $J_{3,5}$ (*meta*) と $J_{3,6}$ (*para*) である。次に置換基位置の確実な 2-amino-5-phenylpyrazine (IX) の NMR Spectrum をみると、 J は 1 個で 1.5 cps である。これは $J_{3,6}$ (*para*) にもとづく事が確実であるから、aminopyrazine の場合は、 $J_{3,6}$ (*para*) の方が $J_{3,5}$ (*meta*) より大きく、約 1.5 cps であることがわかる。一方合成で得られた XXI の NMR spectrum では、ピラジン核のプロトンのカップリング定数は 1.6 cps を示す。これは $J_{3,6}$ に一致するから、インドリル基の置換基は 5 位と決定出来、生成物は 2-amino-5-(3'-indolyl)pyrazine (XXI) である。ここに得た XXI の UV spectrum は MeOH 中、228 $m\mu$, 274 $m\mu$, 369 $m\mu$ に極大吸収が認められ、HCl の添加により 224 $m\mu$, 308 $m\mu$, 420 $m\mu$ にシフトする。この挙動は海ホタル luciferin (I) の分解物 etioluciferin (III) に一致している。すなわち etioluciferin (III) においても、アミノ基とインドリル基の置換位置は *para* である。

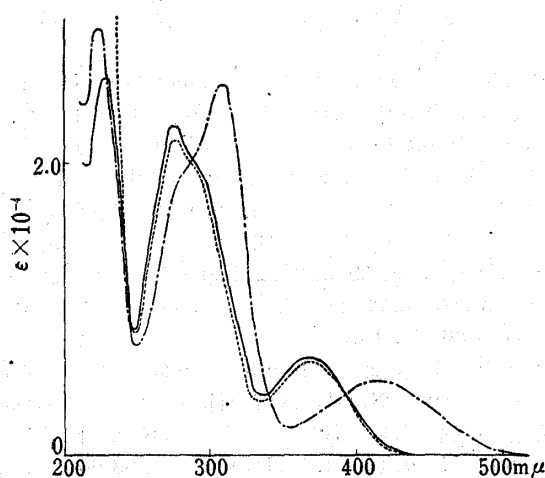


Fig. 1. Ultraviolet Spectra of XXI
 $5 \times 10^{-5} M$ (MeOH)

— : neut
--- : 2N HCl 50 μl
.... : 2N NaOH 50 μl

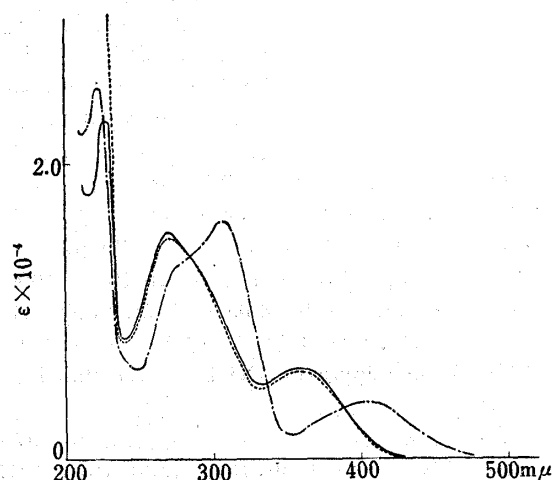


Fig. 2. Ultraviolet Spectra of III
 $5 \times 10^{-5} M$ (MeOH)

— : neut
--- : 2N HCl 50 μl
.... : 2N NaOH 50 μl

実験の部¹²⁾

3-Indolylglyoxal Aldoxime (V) 3-Indolyl methyl ketone⁷⁾ 1.9 g を EtOH 38 ml に溶解し氷水にて冷却、攪拌下、HCl ガスを導入しながら、別に MeOH (0.58 g) と $NaNO_2$ (0.91 g) より発生させた methyl nitrite を導入、さらに HCl ガスの導入を 20 min 続け、析出した橙色結晶を濾取、これを 10% NaOH 溶液に溶解し不溶物を濾別した後、濾液を HCl 酸性にして得た橙色結晶を濾取、MeOH から再結晶 mp 206° (decomp.) 無色針状晶 0.6 g (26%) を得る。IR $\nu_{max}^{KBr} cm^{-1}$: 3280, 1645, 1590, 1528, 1236, 1019, 828. Anal. Calcd. $C_{10}H_8O_2N_2$: C, 63.82; H, 4.26; N, 14.89. Found: C, 63.51; H, 4.12; N, 14.66.

2-Amino-5-phenylpyrazine 1-oxide (VIII) Aminoacetonitrile (VI) の硫酸塩 5 g を $CHCl_3$ 30 ml に懸濁、これに N-methylmorpholine 4.8 g と phenylglyoxal aldoxime (VII) 3 g を加え 20 hr 還流、反応液は次第に褐色となる。冷後不溶物を濾取、 $CHCl_3$ にて充分熱浸し、この浸液と先の濾液とを合し、 $CHCl_3$ 留去、ここに得た濃縮残渣を 10% HCl 溶液にて酸性となし不溶物濾別、濾液を 10% NaOH 溶液にてアルカリ性となし、これを濃縮乾固してふたたび $CHCl_3$ 抽出、抽出液は Na_2SO_4 で乾燥、溶媒を留去して得た結晶を MeOH から再結晶、mp 235° (decomp.) 無色針状晶 0.5 g (14%) を得る。本品の EtOH 溶液は $FeCl_3$ 試薬により深青色を呈する。Mass spectrum m/e : 187 (M^+). IR $\nu_{max}^{KBr} cm^{-1}$: 3375, 3280, 1637, 1560, 1478, 1350, 1170, 917. NMR ($DMSO-d_6$) (ppm): 7.05 (2H, broad s., D_2O 添加により消失); 7.23—7.62 (3H, m.); 7.78—8.05 (2H, m.); 8.22 (1H, s.); 8.74 (1H, s.). Anal. Calcd. $C_{10}H_9ON_3$: C, 64.17; H, 4.81; N, 22.46. Found: C, 64.32; H, 4.71; N, 22.56.

12) 融点はすべて未補正。スペクトル類はつぎの機器により測定した。IR: 日本分光 IR-G, IR-S, IR-E. UV: 柳本 ORD 185-A, Perkin-Elmer 202. NMR: Varian A-60 (TMS=0 ppm) Mass: 日立 RMU-6E.

2-Amino-5-phenylpyrazine (IX) i) VIII から得る方法——VIII 200 mg を EtOH 16 ml に加温溶解, これに H_2O 5 ml を加え, 加熱, 攪拌下 30 min ごとに 0.5 g ずつの $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を約 7 g 加え, さらに反応液を FeCl_3 試薬により呈色しなくなるまで加熱, 攪拌を続けた後 (約 3 hr), 反応液を冷却, 不溶物を濾別, 濾液を濃縮し, 得た残渣を熱ベンゼンにて抽出, 可溶部分を稀 EtOH から再結晶, mp 141—143° 無色針状晶 121 mg (67%) を得る. Mass Spectrum m/e : 171 (M^+). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3340, 3175, 1650, 1590, 1536, 1484, 1389, 1028, 1012, 696. NMR ($\text{DMSO}-d_6$) (ppm): 6.53 (2H, broad s., D_2O 添加により消失); 7.27—7.66 (3H, m.); 7.8—8.09 (3H, m.); 8.57 (1H, d., $J=1.5$ cps). Anal. Calcd. $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3$: C, 70.15; H, 5.30; N, 24.55. Found: C, 69.87; H, 5.22; N, 24.26.

ii) 2-Chloro-5-phenylpyrazine (XIII) から得る方法——XIII 1.9 g と液体アンモニア 100 ml をオートクレープ中に入れ, 170°, 150 気圧にて約 6 hr 加熱後, アンモニアを放出して得た残渣を熱ベンゼンにて抽出, ベンゼンを留去し, 残渣を稀 EtOH から再結晶, 無色針状晶 1.4 g (82%) を得る. 本品は i) の方法から得たものに mp, Mass および IR spectrum がすべて一致した.

iii) Phenylglyoxal (X) と α -aminoacetamidine (XVII) の縮合による方法——X の hydrate 5.6 g を MeOH 30 ml に溶解, -10° に冷却, 攪拌下に XVII の臭化水素酸塩 8.7 g を H_2O 15 ml に溶解したものを加える. 次いで 20% KOH 溶液 25 ml を滴加 ($\text{pH}>11$), 徐々に室温にもどし, さらに 1 hr 攪拌後析出した結晶を濾取, 濾液を濃縮, ここに析出した結晶を濾取し, 両方の結晶を合し稀 EtOH から再結晶, 無色針状晶, 3.9 g (62%) を得る. 本品の物理定数は, i), ii) の方法から得たものに一致した.

2-Hydroxy-5-phenylpyrazine (XII) α -Aminoacetamide (XII) の塩酸塩 12.1 g を MeOH- H_2O (4:1) 125 ml に懸濁, -30° で 12.5 N NaOH 溶液 13.2 ml を滴加, さらに NaOH 4.4 g を含む MeOH 溶液 50 ml を滴加 ($\text{pH}>11$), 溶液は透明となる. これに -20° 以下で phenylglyoxal (X) の hydrate 20 g を含む MeOH 溶液 100 ml を滴加, そのまま 2 hr 攪拌を続け徐々に室温にもどし, さらに 2 hr 攪拌後 AcOH 酸性とする. 析出した橙色針状晶を濾取, 濾液を濃縮して得られた結晶と合し, AcOEt から再結晶, mp 203—206° 淡黄色プリズム晶 14.5 g (64%) を得る. さらに MeOH から再結晶を繰返すと mp 207—210° 無色プリズム晶を得る. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2800, 1663—1647 (broad), 1611—1600 (broad), 1498, 1308, 1235, 990. NMR ($\text{DMSO}-d_6$) (ppm): 7.26—7.65 (3H, m.); 7.89—8.05 (2H, m.); 8.06 (1H, d., $J=1.5$ cps), 8.14 (1H, d., $J=1.5$ cps). Anal. Calcd. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ON}_2$: C, 69.75; H, 4.68; N, 16.27. Found: C, 69.33; H, 4.86; N, 16.11.

2-Chloro-5-phenylpyrazine (XIII) XII 9.5 g に 4 倍量の POCl_3 を加え, 30 min 還流後過剰の POCl_3 を留去. 残渣を水中に注ぎ, 析出せる結晶をエーテル抽出, 抽出液は 10% NaOH 溶液で洗い, 水洗, Na_2SO_4 で乾燥後エーテル留去, ヘキサンから再結晶, mp 97—99° 無色針状晶 7.4 g (70%) を得る. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3060, 2280, 1600, 1460, 1445, 1330, 1312, 1130, 1026, 1015, 804, 788. Anal. Calcd. $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_2\text{Cl}$: C, 63.00; H, 3.70; N, 14.70. Found: C, 63.40; H, 3.53; N, 14.77.

3-Indolylglyoxal sodium bisulfite (XIX) Indole 58.5 g を用い, 真島等の方法⁷⁾に従い, 3-indolyl chloromethyl ketone (XVIII) を得る. この場合, 真島等の用いた MeI の代りに EtBr を用い, 生成物を MeOH から再結晶, mp 236° (decomp.) 無色針状晶 40 g (41%) を得た. Mass Spectrum m/e : 193 (M^+). Anal. Calcd. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ONCl}$: C, 62.59; H, 4.11; N, 7.23. Found: C, 62.08; H, 4.09; N, 7.13. ここに得た XVIII 35 g に 5 倍量のピリジンを加え, 加熱溶解, さらに 40 min 加熱攪拌, 析出した結晶を濾取, エーテルにて洗い, 粗製の 3-indacylpyridinium chloride を得, これを MeOH-acetone から再結晶 mp 276° (decomp.) 無色プリズム晶 47.5 g (96%) を得る. Anal. Calcd. $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ON}_2\text{Cl}$: C, 66.06; H, 4.80; N, 10.27. Found: C, 65.80; H, 4.63; N, 10.25. 次にこの pyridinium chloride 45 g と p -nitroso- N,N -dimethylaniline hydrochloride 30.8 g を H_2O 360 ml と EtOH 90 ml の混液に溶解, 攪拌下 $15-20^\circ$ で 10% NaOH 溶液 132 ml を加え 15 min 攪拌, 析出したレンガ色の結晶を濾取, 水洗し 50 g (99%) の α -(3-indolylcarbonyl)- N -(p -dimethylaminophenyl)-nitron を得, この nitron 体は精製困難なため, 直ちに Sanna の方法¹¹⁾に準じて加水分解を行なった. すなわち粗製品 28 g を 25 倍量の H_2O に懸濁, これを 25 倍量の 15% H_2SO_4 溶液中, 攪拌しながら 10° で加える. 10 min 後不溶物を濾別. 濾液はエーテル抽出, Na_2SO_4 乾燥後エーテル留去, 残渣に NaHSO_3 濃厚水溶液を加え, 析出した酸性亜硫酸塩 (XIX) を濾取, H_2O から再結晶, 無色鱗片状晶 13.3 g (52%) を得る. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3340, 1635, 1620, 1527, 1448, 1406, 1252, 1235, 1195, 1118, 1091, 1030, 933. Anal. Calcd. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5\text{NSNa}$: C, 43.32; H, 2.91; N, 5.05. Found: C, 42.78; H, 2.67; N, 4.72.

2-(3-Indolyl)quinoxaline (XX) XIX 277 mg を H_2O 8.3 ml に加温溶解した後室温にもどし, 攪拌下 o -phenylenediamine 108 mg を含む水溶液 1.5 ml を加え, 次いで NaOH 44 mg を含む水溶液 4.4 ml を加え, 約 1.5 hr 攪拌を続ける. ここに析出した黄色結晶を濾取, 水洗し MeOH から再結晶, mp 209° 黄色針状晶 206 mg (84%) を得る. Mass Spectrum m/e : 245 (M^+). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1615, 1552, 1445, 1170, 1130, 755, 740. Anal. Calcd. $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3$: C, 78.37; H, 4.49; N, 17.14. Found: C, 78.24; H, 4.32; N, 16.93.

2-Amino-5-(3-indolyl)pyrazine (XXI) XIX 1 g を 50% MeOH 100 ml に懸濁し, -10° に冷却攪拌下に XVII の臭化水素酸塩 850 mg および 3N KOH 溶液を加え, そのまま攪拌を続けた後, 徐々に温度を室温にもどし, 5 hr 攪拌する. 析出した沈殿を濾別, 濾液を減圧濃縮して得た結晶を濾取, 水洗, 乾燥後, MeOH- CHCl_3 (1:5) に溶解し, ワコーゲル C 100 カラムを通過させ, MeOH から再結晶, mp 230—231° 黄色プリズ

△晶 370 mg (49%) を得る. Mass Spectrum m/e : 210 (M^+). UV $\lambda_{\max}^{\text{methanol}} m\mu$ (ϵ): 228 (26000), 274 (22000), 369 (6700); UV $\lambda_{\max}^{\text{methanol-HCl}} m\mu$ (ϵ): 224 (29000), 308 (25000), 420 (5000). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3500, 3220, 1624, 1550, 1485, 1390, 1358, 1203, 1030, 973, 742. NMR (DMSO-d_6) (ppm): 6.13 (2H, broad s., D_2O により消失); 7.01—7.56 (3H, m.) 7.86 (1H, d., $J=2.8$ cps, D_2O 添加により s.); 7.99 (1H, d., $J=1.6$ cps); 8.11—8.33 (1H, m.); 8.43 (1H, d., $J=1.6$ cps); 11.42 (1H, broad, D_2O 添加により消失). Anal. Calcd. $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4$: C, 68.57; H, 4.76; N, 26.67. Found: C, 68.21; H, 4.77; N, 26.32.

謝辞 本研究にあたり御鞭撻を賜った名古屋大学 平田義正教授に深謝します. また実験の一部を担当された岸本久子氏, ならびに元素分析を担当された名城大学分析センターの諸氏に感謝致します.