

## FT-NMR의 藥學的 應用

俞炳高

서울대학교 藥學大學

### Pharmaceutical Application of FT-NMR

Byung Sul Yu

College of Pharmacy, Seoul National University

The principle of Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance and its usefulness in the fields of pharmacy and biological sciences are described. 1. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of triostin A and its mixture with purine derivatives were taken. From the analysis of the spectra it has established that triostin A, which exists in two symmetric conformers in chloroform solution, forms complexes only with purine derivatives by the participation of one of the conformers. 2. Also, the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of "intact" substances in the field of pharmacognosy were taken. From the spectra it was suggested that the method is very useful for natural product research in cooperation with the chemical method.

生體內 物質의 分子構造를 알아보는 것은 生命科學領域에서 큰 意義를 가진다. 最近 20餘年間 이러한 生體內 分子의 構造究明은 X線回折方法에 依하여 많이 進行되어 왔다. 그러나 X線回折에 依한 分子構造決定은 固體分子에 極限된 것으로 生體內的 어떤 分子活動이란 大部分이 溶液中에서 또는 液晶狀態에서만 이루어지는 것을 考慮할때 固體狀態의 構造보다는 溶液中에서의 分子의 構造 또는 舉動을 알아보는 手段이 要求되어진다. 이러한 手段으로서는 赤外吸收스펙트럼等 各種分光學的方法이 있으나 이들 方法도 여러가지 制限이 있어 分子構造에 關한 正確한 情報을 알기에는 어려움이 많다. 이들 分光學的方法中 核磁氣共鳴(NMR)은 比較的 많은 情報을 提供하고 있음은 周知의 事實이다. 그러나 現在까지의 研究로는 有機化合物의 構造決定이나 分析的인 目的의 것이 많았고 生命科學의 應用에도 單離精製된 生體內分子를 對象으로 함이 大部分의 경우였다.

高分解能 NMR이 他의 分光學의 手段에 比하여 보다 便利함은 分子中の 個個의 原子核에 由來하는 信號를 個別的으로 觀測할 수 있기 때문이다. 따라서 個個의 信號의 歸屬(assignment)만 可能하다면 어떤 分子의 立體的構造에 關한 原子레벨에서의 詳細한 情報을 얻을수 있음이 期待된다. 그러나 이런 核磁氣共鳴의 最大缺點으로는 그 感도가 낮은것으로 普通  $^1\text{H}$ -NMR스펙트럼에서 觀測이 可能한 濃度は 約 20mg/0.4 ml(5%)이고  $^{13}\text{C}$ -NMR스펙트럼에서는 보다 高濃도가 要求되고 있다. 따라서 試料의 溶液도가 낮은경우 이거나 微量만을 얻을수 있을 경우에는 測定이 困難하다. 또한 生理的인 條件보다 훨씬 높은 濃度에서의 測定은 그 意味를 再考케 되는 것이다.

最近 pulse FT(pulse Fourier Transform)法の 發達과 普及은 이러한 問題를 어느程度 克服하였다고 말할 수 있다. 即 從來의 CW(Continuous Wave)法에서는 1회의 掃引에 10~20分



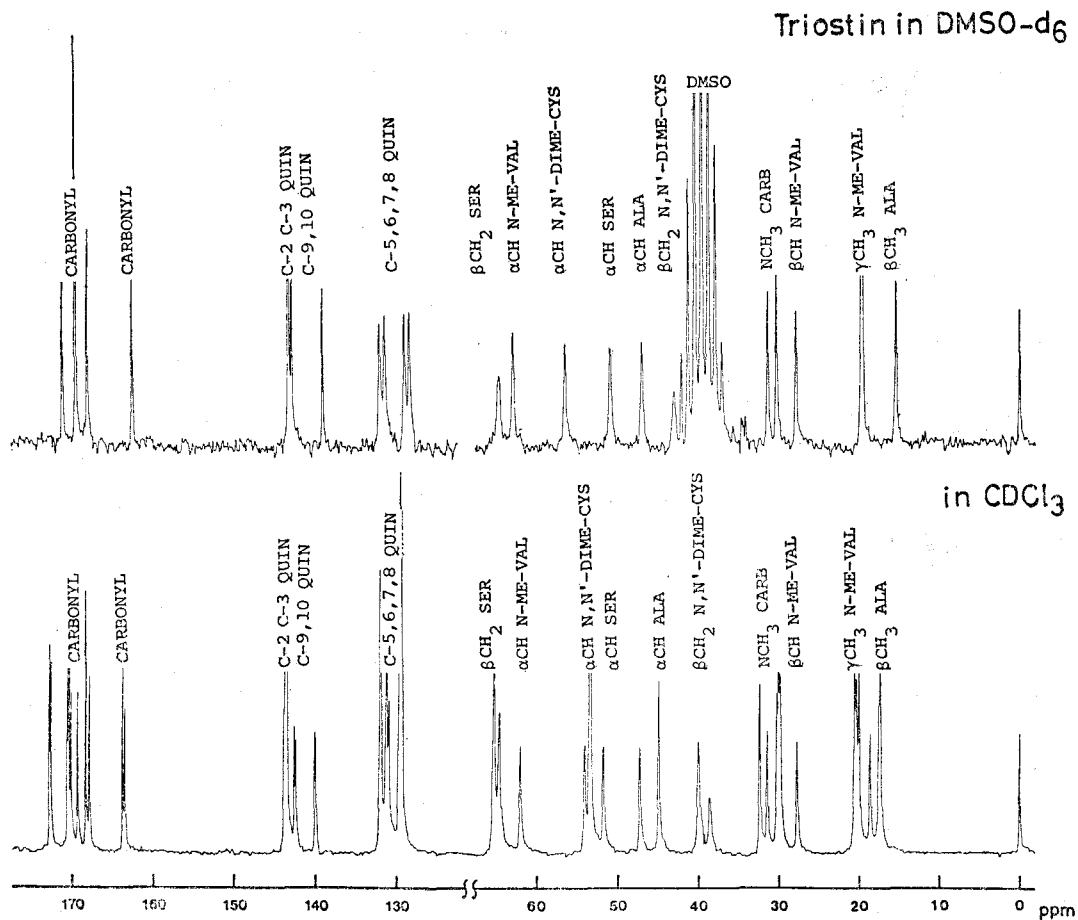


Fig. 3. <sup>13</sup>C nmr spectra of Triostin A.

의 구조에 관한 보고도 있다<sup>3-6)</sup>. 또한 많은 생화학적인 연구로 항균성 약물이 DNA와 작용하여 본래의 기능을 방해한다는 보고들이 많이 있다<sup>7-18)</sup>.

著者等은 數種 有機溶媒를 使用하여 triostin A의 溶液中에서의 立體的 異性體存在를 確認하고 이 物質이 核酸鹽基中 purine과 特異的 會合을 함을 FT-NMR測定으로 알아 보았다.

Triostin A의 CDCl<sub>3</sub> 및 CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液中에서의 <sup>1</sup>H-NMR스펙트럼은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 DMSO-d<sub>6</sub>溶液中에서의 스펙트럼과는 달리 倍數의 peak를 觀測할 수 있어 쉽게 溶媒種類에 따라 立體的 構造의 差異가 있음을 알 수 있어 CDCl<sub>3</sub> 溶液中에서는 非對稱性인 構造를 取하고 있음이 推定된다. 이와 같은 現象은 <sup>13</sup>C-NMR

스펙트럼에서도 나타난다(Fig. 3). 卽 CDCl<sub>3</sub> 溶液中에서는 50개의 炭素 peak를 觀測할 수 있음에 反하여 DMSO-d<sub>6</sub>溶液中에서는 그 半數인 25개의 peak만을 確認할 수 있었다. 이 事實은 triostin A가 溶媒에 따라 存在할 수 있는 立體的 構造가 첫째 2種의 立體異性體存在, 둘째로는 分子內異性體存在 또 세번째로는 單分子와 多重 分子의 存在等의 理由를 들 수 있으나 스펙트럼의 濃度變化, 溫度變化, 溶媒組成比의 變化實驗 또는 分子量測定等의 實驗結果 두번째의 同一分子內의 立體的 構造差에 依한 分子內異性體構成 이라는 結論으로 Fig. 4에 보이는 것 같은 모델을 提案하였다. 卽 DMSO-d<sub>6</sub> 溶液中에서는 對應하는 二殘基가 NMR的으로 等價인 것과 같은 對稱構造의 分子가 一種類 存在한다고 解析되며

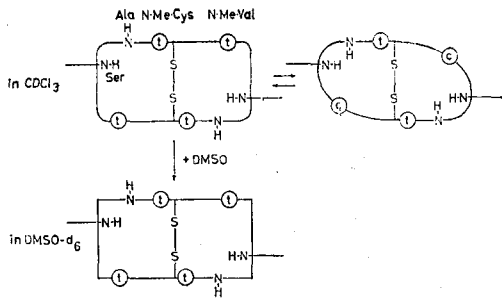


Fig. 4. A possible scheme for the relation among the two conformers in  $CDCl_3$  and  $DMSO-d_6$ . The symbols "t" and "c" represents *trans* and *cis* peptide bonds.

$CDCl_3$  또는  $CD_2Cl_2$  溶液中에서는 對稱構造의 分子가 二種類 共存하고 있어 그 存在比는 溶媒에 따라 달라진다고 생각된다.

또한  $CDCl_3$  溶液中에  $DMSO-d_6$ 를 加하여주면  $CDCl_3$  溶液中에서 보여주던 한쪽의 分子種의 存在比가 次次 크게되어 마침내는 다른 또 하나의 構造는 없어지고 一種類의 分子構造만이 殘存함을 確認할 수 있었다. 이와 같이 溶媒에 따라 異性體가 存在하는 原因으로서는 triostin A 分子中의 N-methyl valine과 N-methyl cystine 殘基의 N-methyl peptide 結合의 周圍의 *cis-trans* 轉換 異性體의 存在라고 推定하였다.

다음은 이 peptide 系 抗生物質이 核酸合成을 阻害하여 抗菌 또는 抗癌作用의 機作을 알아볼 目的으로 各種 核酸鹽基인 9-ethyl adenine(A) 1-cyclo hexyl uracil(U) 2'3'5'-isobutylic carbonyl ester guanine(G)의 各誘導體와 triostin A와 的 會合性을  $CDCl_3$  溶液中에서  $^1H$  및  $^{13}C$ -MR 스펙트럼을 測定 調査하였다.

Tr, A 및 이들 混合物 Tr+A의 低磁場領域에서  $^1H$ -NMR 스펙트럼은 Fig. 5에 表示한바와 같다. 이 스펙트럼에서 보는바와 같이 triostin A의 amide 性 NH 信號 및 quinoxaline  $C_3H$  信號가 豫想한대로 triostin A의 NMR 스펙트럼에서 觀測된다. 여기에 同一濃度의 adenine 溶液을 加하였을때(Tr+A圖) 本來의 Tr의 信號가 shift 하고 그 peak의 強度도 變化함을 觀測할 수 있다. 即 7.25 ppm에 位置하였던 Ala 2 NH와

5.85 ppm에 位置하던 adenine의  $NH_2$ 는 Tr+A 圖에서는 低磁場쪽으로 移動하였으며 反對로 8.84ppm에 位置한 Ser 2 NH와 9.56ppm에 있던 quinoxaline 2  $C_3H$ 와 adenine의 CH는 高磁場方向으로 移動하였다. 이에 對應하는 異性體 1의 Ser 1 NH, Ala 1 NH 또는 quinoxaline 1  $CH_3$  들의 proton의 位置變化는 없음을 觀測할 수 있으며 또한 이들 peak의 強度도 異性體 1이 減少에 反하여 異性體 2의 경우에는 增加하였음이 觀測되었다.

이러한 實驗值로 부터  $CDCl_3$  溶液中에서 核酸鹽基 adenine은 triostin A의 二 異性體中 한쪽인 異性體 2와 強한 會合體를 形成함을 示唆하고 있다.

그 結合樣式은 이들 Tr+A의 NMR 스펙트럼의 濃度變化 또는 溫度變化實驗의 結果로서 triostin A의 Ala NH와 adenine의  $NH_2$ 가 強한 水素結合을 하고 있으며 Tr中 quinoxaline 環과 adenine 環은 서로 重複된 狀態의 立體的 結合樣式을 取하고 있음이 밝혀졌다.

다음 A 以外의 다른 核酸鹽基誘導體 G, 및 U와의 結合如否를 알아보기 爲하여 Tr+A, Tr+G 및 Tr+U의  $CDCl_3$  溶液中에서의  $^1H$ -NMR 스펙트럼은 그림 6에 表示하였다. 그림에서 보는바와 같이 Tr+G의 경우 Tr+A의 경우와 大端히 類似한 shift를 나타내어 Tr의 Ser 2 NH와 quinoxaline 2  $CH_3$  信號는 高磁場으로 移動하였고 Ala 2 NH 및 guanine  $NH_2$ 는 低磁場方向으로 移動하였음을 觀測할 수 있었다.

Tr+U의 경우는 이들 purine 鹽基와 달리 NMR 스펙트럼상 아무런 shift도 觀測할 수 없었다.

이러한 實驗結果로서 triostin A는 各種 核酸鹽基中 選擇性會合을 일으켜  $CDCl_3$  溶液中에서 A나 G와 같은 purine 과는 結合을 形成하나 U와 같은 pyrimidine 鹽基와는 아무런 結合도 形成하지 않음을 알 수 있었다.

다음 Tr+A 混合溶液의  $^{13}C$ -NMR 스펙트럼은 그림 7에 表示하였다. 그림에서 볼 수 있는 바 triostin A의 各共鳴信號(下端)의 強度가 adenine 溶液을 加하여 減으로써 變化하여 相對적으로 強하게 되고 原來 強하게 나타났던 peak들은 弱

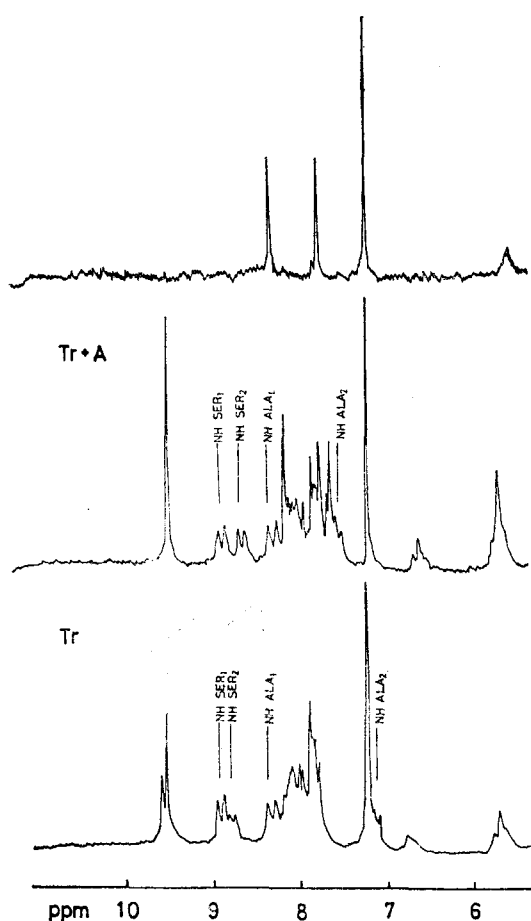


Fig. 5. Low field region of  $^1\text{H}$  nmr spectra of triostin A(Tr), 9-ethyladenine(A) and the mixture of two compounds(Tr+A) in  $\text{CDCl}_3$ . The concentration of each solute is 0.1M.

화된 것을 觀測할 수 있다(上端). 이는  $\text{CDCl}_3$  溶液中에 共存하는 triostin A의 두 異性體中 한 쪽의 異性體가 adenine과 會合하여 會合치 않은 異性體의 peak와는 對照의으로 變化가 일어난 것으로 解析된다. 또한 adenine注加로서 原來의 triostin A의 各炭素信號는 아무런 shift도 일어나지 않았으나 carbonyl의 炭素만은 變化가 있어 167.9 ppm의 位置에서 172.6 ppm으로 約 0.5 ppm 移動하였음을 觀測하였다. 實際 이 位置의 carbonyl性 炭素가 triostin A 分子中 各種 carbonyl 中 어떤 것이라는 正確한 歸屬은 할 수 없었으나 이 實驗値는 adenine溶液의 注加로 因하여 이

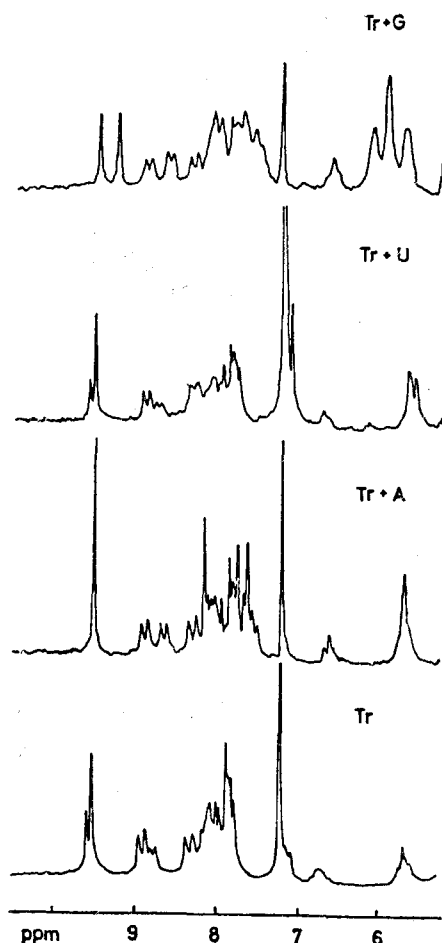


Fig. 6. Low field region of  $^1\text{H}$  nmr spectra of Tr, Tr+A, Tr+G, and Tr+U in  $\text{CDCl}_3$ . The concentration of each solute is 0.1M.

루어져 있으며 adenine의  $\text{NH}_2$ 가 水素結合에 關與한 것을 考慮할 때 triostin A 中의 어떤  $\text{C}=\text{O}$  가 purine의  $\text{NH}_2$ 水素結合의 對應部位로 關與하였음이 明白한 것이다. 即, 이와 같은  $^{13}\text{C}$ -NMR의 實驗結果는  $^1\text{H}$ -NMR로 觀測不可能하였던 purine  $\text{NH}_2$ 의 水素結合相對位를 알아내는데 重要한 役割을 하였다고 말할 수 있다.

結果로서 FT-NMR에 依하여 peptide性抗生物質인 triostin A의 立體的 異性體存在를 究明하였으며 또한 이들의 抗癌作用의 本態를 아는데 도움이 되고져 各種 核酸誘導體의 會合性을 調查한 結果 purine과 강한 會合을 形成함을 알았다. 그 結合樣式은 purine의  $\text{NH}_2$ 와 triostin A

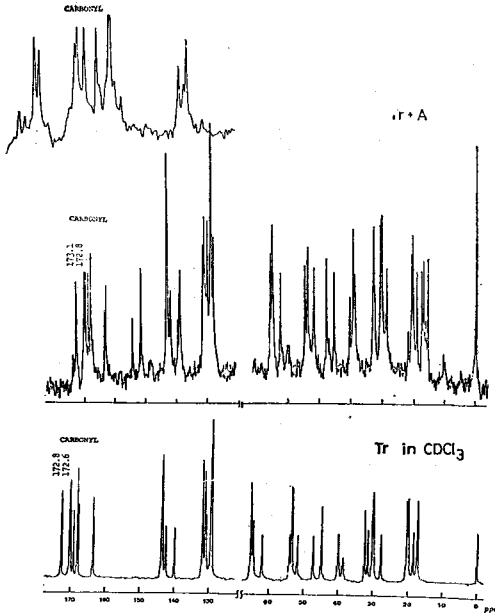


Fig. 7.  $^{13}\text{C}$  nmr spectra of triostin A and the mixture solution of triostin A and 9-ethyladenine in  $\text{CDCl}_3$ .

의 Ala NH가 수소결합에 關與하고 quinoxaline 環과 purine環이 重複되는 立體的結合임을 濃度變化實驗 등으로 밝힐수 있었으며 그 結合比는 Tr 1 : A 1의 比일도 計算할 수 있었다.

**不均一系試料例 : intact試料에 의한 各種 植物成分의  $^{13}\text{C}$ -NMR**

過去の 化學的方法이란 大部分이 例外없이 複

雜한 物質組成을 가지는 系가 나타내는 性質을 純粹한 物質로서 構成되어 있다는 事實 即, 組成이 明白한 系(model系)가 나타내는 性質로 表示코저하는 單純化過程을 中心으로 하고 있었다. 近年에 이르러 크로마토그래프法에 依하여 이루어지는 代表的인 分離手法의 發達이라든가 여러 種類의 分光學의 手法에 依하여 이루어지는 同定手法의 發達等に 依하여 廣範圍한 化學的 領域에 걸쳐 이와같은 方法論은 크게 影響을 입어 極端의 경우에는 完全한 組成이 알려진系 以外的인 研究對象으로 할 수 없다는 생각까지 하게 되었다.

하나 最近 生物學의 研究分野에서 例컨대 生體膜을 對象으로 하는 경우에는 不均一系이기 때문에 機能을 發現하는 系를 分子線上에서 研究함에는 過去の 純粹한 性質로 이루어졌다는 생각에는 限界가 있음이 밝혀지고 있다<sup>19)</sup>.

따라서 各分野에서 "intact"한 天然試料를 使用하여 研究가 活潑히 進行되고 있으며 여기에서는 高分解能 FT-NMR을 使用하여 過去の "純"系만을 取扱하는 手段으로 부터 脫皮하여 生物의 不均一系를 破壞치 않은 狀態에서 直接 觀察할 수 있는 方法을 몇가지 例를 들어 紹介코저 하는 바이다.

例 1, 日本産植物 「aoki」(*Aucuba japonica* Thunberg)의  $^{13}\text{C}$ -NMR<sup>20)</sup> : 日本各地의 庭園樹인 「aoki」의 果實을 外徑 12mm의 NMR試料管에 直接注入하여 半透明狀의 種子部分을  $^{13}\text{C}$ -NMR스펙트럼을 測定한 結果를 Fig. 8에 表示하였다.

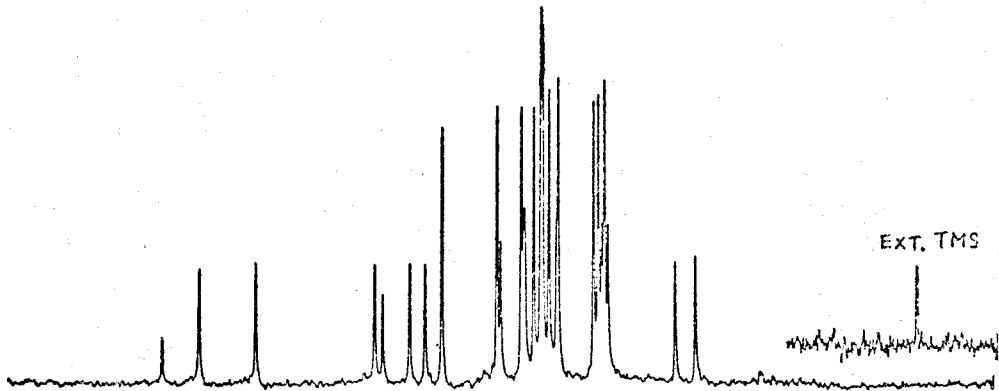


Fig. 8. The 25.2 MHz  $^{13}\text{C}$  nmr spectrum of a single aoki seed. Spectrum width, 5,000 Hz; 7,500 transients were accumulated. (insert) TMS in carbon tetrachloride, measured right after the spectrum of seed was recorded.

스펙트럼에서 確認할 수 있는 것처럼 種子를 直接 測定하므로써 高分解能의 스펙트럼이 얻어진다. 이 스펙트럼에서는 쉽게 歸屬할 수 있는 種子內의 蔗糖(sucrose)의 peak들을 觀測할 수 있는 以外에 本植物의 主成分인 aucubin에 其因하는 peak를 包含하고 있음을 알 수 있다.

이 植物의 主成分인 aucubin의 化學的構造는 이미 種子로부터 抽出單離되어 알려져 있으며 이들 純物質의 水溶液의  $^1\text{H}$  또는  $^{13}\text{C}$ -NMR과 "intact"한 種子의 스펙트럼의 化學 shift值를 比較하여 細胞內에서의 成分의 構造를 究明할 수 있었다. 種子를 直接 觀測하여서는 모든  $^1\text{H}$ -NMR의 知見은 얻지 못할지라도 이와 같은  $^{13}\text{C}$ -NMR測定과 같은 二重共鳴法에 依하여서는 많은  $^1\text{H}$  shift值를 알 수 있음이 有用한 方法이다.

또한 本植物의 主成分인 aucubin은 果實뿐만 아니라 全草에 分散含有되고 있어 實際 줄기, 또는 一部分을 直接 NMR試料管에 넣어 같은 스펙트럼을 얻을 수 있었으며 이는 過去の 天然物 化學에서 成分을 調査함에 일일이 構成物質을 抽出單離하여 構造를 決定하여야 하는 複雜한 過程에 比하여 成分을 單離하지 않고 直接 알 수 있는 研究方法으로 過去の 方法에 相補의인 手段으로 有利한 것이라 確信하는 바이다.

例 2. 茴香의 anethole의 存在狀態<sup>21)</sup>: 油分은 植物細胞內에서 油滴이라는 液狀으로 存在하고 있음이 알려지고 있다.

따라서 植物組織中에서 이러한 狀態로 存在하리라 豫想되는 植物精油의  $^{13}\text{C}$ -NMR을 알아보았다.

茴香은 中國南部産의 小權木(*Illicium verum* Hooker filius)의 袋果(follicle)을 乾燥한 것으로 木質의 果皮中の 1個씩의 種子를 含有하고 있으며 特有한 香氣는 果實中の 精油 anethole에 其因한다. 이들의 果皮(pericarp)와 種子(seed)를 分離하여 이들을 各各 天然의 狀態로  $^{13}\text{C}$ -NMR을 測定한 스펙트럼이 Fig. 9이다. 實驗值에 依하면 種子部位의 스펙트럼은 典型的인 triglyceride의 peak만을 보여주고 있으며 anethole의 存在는 確認할 수 없다. 한편 果實을 쪼개어 種子를 꺼낸後의 果皮를 12mm試料管에 태워 測定한

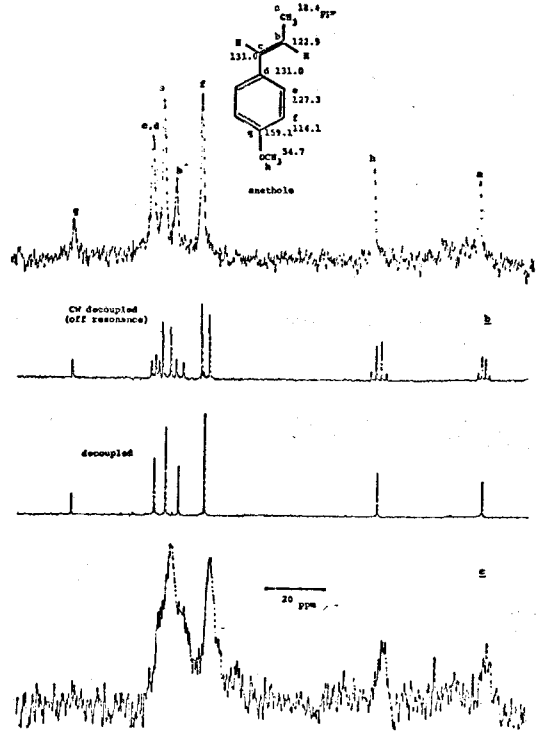


Fig. 9. Proton decoupled  $^{13}\text{C}$  Fourier transformed spectra of anethole contained in *star anise* pericarps. The spectra were run on a Vairan XL-100 spectrometer at 25.2MHz and at room temperature. The 12mm sample tubes contained solid samples were spun usually at 70-80 rps. Chemical shifts of anethole are relative to the external tetramethylsilane (TMS) in the other sample tube. (a) Half-pericarps of *star anise*. (b) Neatanethole. (c) Powdered pericarps.

$^{13}\text{C}$ -NMR스펙트럼에서는 反對로 triglyceride의 peak는 觀測되지 않고 anethole의 peak만을 確認할 수 있다. 即 이는 茴香果實中の anethole은 種子가 아닌 果皮에만 包含되어 있음을 쉽게 알 수 있는 것이다. 더우기 그 存在狀態는 液狀으로 움직이기 쉬운 狀態임이 明白하다고 말할 수 있다. 그림에서 (b)는 市販의 anethole의  $^{13}\text{C}$ -NMR스펙트럼으로 "intact"狀態의 스펙트럼과 잘 一致함을 알 수 있다. 그런데 試料인 果皮는 단단한 木質이므로 試料管에 채울 때 空隙이 생기므로 그림의 (a)처럼 長時間 精算을 하였을지라도 S/N비가 좋지않아 이를 乳鉢에서 잘 研磨

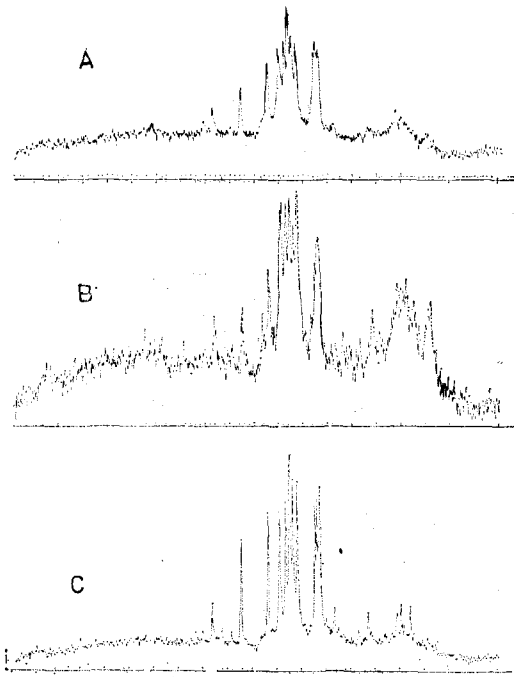


Fig. 10. Proton decoupled  $^{13}\text{C}$  Fourier transformed spectra of 6 years old Ginseng root. The spectra were run on a Varian XL-100 spectrometer at 25.2 MHz and at room temperature. (A; bark, B; lateral roots, C; central part)

하여 粉末狀으로한 果皮試料를 試料管에 均一하게 채워 測定하여 보았다. 그 結果는 그림中 (C)와 같이 期待와는 달리 anethole의 peak가 極端的으로 protoning을 일으켰음이 觀測되었다. 卽이는 果皮를 機械的으로 粉碎하여 즙으로써 包含되어 있는 anethole의 油滴은 그 運動성이 低下되어진 것으로 생각된다.

이러한 現象은 intact한 果皮試料中の 油滴의 存在狀態와 밀접한 相關성이 있는 것으로 anethole은 天然果皮中에서는 柔細胞組織中에 油滴으로 局在化하고 있었던 것이 粉末化하므로 組織이 破壞되어 木質의 組織粉末속으로 均一하게 스며들어 anethole의 運動성이 當然히 弱화되어진 것이라 解釋되어 진다.

以上과 같은 解釋은 光學顯微鏡에 依한 組織學的 知見과 잘 一致하고 있다.

以上은 intact試料를 使用 어떤 成分의 存在部位를 쉽게 調查할 수 있는 例가 될 것이다.

例 3. 人蔘成分調查例: 前記 두 例에서는 FT-NMR의 應用으로 成分의 構造 또는 所在를 쉽게 파악한 例로 들었다. 本欄에서는 어떤 植物成分의 存在部位뿐만 아니라 植物成長에 따른 質, 또는 量의 變化와 같은 植物生理學的 應用例를 들고자 한다.

人蔘(*Panax Ginseng*)의 成分研究는 우리나라를 비롯하여 많은 研究가 盛行되어 各種 saponin을 單離 構造도 究明된 바이다. 그러나 이들은 모두 例外없이 化學的인 處理方法으로 單離되어진 것으로 處理過程中 微量의인 破壞 또는 無視되는 成分의 경우 아직도 밝혀진바 없어 이런 見地에서 人蔘의 intact試料를 使用하여  $^{13}\text{C}$ -NMR을 測定하므로써 어떤 情報를 얻을 수 있다면 이는 有效成分을 檢索하는데 큰 도움을 주리라 생각된다. 特히 成長年限別의 試料를 使用 그 成長過程과 어떤 成分間의 相關性을 찾을 수 있다면 이는 過去 人蔘研究에 對하여 絕對的인 相補研究라 아니할 수 없을 것이다.

著者는 韓國產 人蔘(水蔘)의 6年根을 使用 各各 皮, 肉 또는 未根部位를 分離하여  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 測定하여 보았다(Fig. 10).

그림에서 보는바와 같이 六年根의 皮, 肉 또 未根部位 모두 나타내는 peak는 差異가 있어 이를 어떤 特定成分의 對照的인 스펙트럼으로 各 스펙트럼을 歸屬할 수 있다면 이와 같은 實驗結果는 人蔘의 成分研究 또는 製法方法等에도 重要한 役割을 할 수 있는 相補的 研究手段이 되리라 믿어 마지않는 바이다.

이는 비단 人蔘研究에 局限된 것이 아니며 其他의 天然物 特히 生藥植物의 成長過程 採取時期別 또는 採取部位에 따른 有效成分을 쉽게 screening 하는 方法으로 尙後  $^{13}\text{C}$ -NMR의 intact試料測定은 發展시킬 價値가 있음을 附言코자 한다.

例 4. 其他의 應用例<sup>22~24</sup>: 植物成分의 存在뿐만이 아니라 이는 最近 微生物醱酵過程中の *in situ*觀測 또는 심지어 動物의 生命活動을 수반하는 物質의 動的變化的 直接測定方法으로 昆蟲의 變態過程 또는 鳥類의 卵의 孵化過程等を  $^{13}\text{C}$  또는  $^{31}\text{P}$ -NMR을 利用 直接 觀測하는 實驗



이 最近 盛行하고 있어 많은 成果가 있음이 報告되고 있다.

以上の 例들로 밝힌 바 不均一系의 試料를 分離 또는 破壞함이 없이 FT-NMR을 利用 生體內 物質의 舉動을 쉽게 觀測함은 앞으로의 化學分野뿐 아니라 生命科學分野의 生理現象 또는 有效物質을 檢索하는데 期待되는 것으로 보다 많은 應用이 要求된다. (本稿中一部實驗例는 日本國 味の素 中央研究所의 甲斐莊博士의 好意에 依하여 전재하였음을 附記한다)

<1978. 1. 5 接受>

## 문 헌

1. N.M.R에 關한 代表的成書 : Pople, J.A., Schneider, W.G. and Bernstein, H.J.: "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance" McGraw-Hill, (1959), Bovey, F.A., "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press (1969), Farrar, T.C. and Becker, E.D., "Pulse and Fourier Transform NMR", Academic Press (s971).
2. Kuroya, M., Ishida, N., Katagiri, K. Shoji, J., Yoshida, T., Mayama, M., Sato, K., Matsuura, S., Niinomi, Y. and Shiratori, O.: *J. Antibiotics*, **A14**, 324 (1961).
3. Dell, A., Williams, D.H., Morris, H.R., Smith, G.A., Feeney, J. and Roberts, G.C.K.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 2497 (1975).
4. Martin, D.G., Mizsak, S.A., Biles, C., Stewart, J.C., Baczynski, I. L. and Meulman, P.A.: *J. Antibiotics*, **28**, 332 (1975).
5. Otsuka, H., Shoji, J., Kawano, K. and Kyogoku, Y.: *J. Antibiotics*, **29**, 107 (1976).
6. Kawano, K., Higuchi, N. and Kyogoku, Y.: 14th Symposium of Peptide Hiroshima (1976).
7. Ward, D.C., Reich, E. and Goldberg, I.H.: *Science*, **149**, 1259 (1965).
8. Waring, M.J.: *Nature*, **219**, 1320 (1969).
9. Waring, M.J. and Makoff, A.: *Mol. Pharmacol*, **10**, 214 (1974).
10. Waring, M.J. and Wakelin, L.P.: *Nature*, **252**, 653 (1974).
11. Waring, M.J., Wakelin, L.P.G. and Lee, J.S.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **407**, 200 (1975).
12. Sobell, H.M., Jain, S.C., Shakore, T.D. and Nordman, C.E.: *Nature*, **231**, 200 (1971).
13. Jain, S.C. and Sobell, H.M.: *J. Mol. Biol.*, **68**, 1 (1972).
14. Patel, D.J.: *Biochemistry*, **13**, 2388 (1974).
15. Krugh, T.R. and Neely, J.W.: *Biochemistry*, **12**, 4418 (1973).
16. Patel, D.J.: *Biochemistry*, **13**, 1476 (1974).
17. Patel, D.J.: *Biochemistry*, **13**, 2396 (1974).
18. Krugh, T.R. and Chen, Y.C.: *Biochemistry*, **14**, 4912 (1975).
19. Kainoshyo, M.: 15th Symposium on Nuclear Magnetic Resonance Tokyo (1976).
20. Kainoshyo, M.: *Tetrahedron Lett.*, **47**, 427(1976).
21. Kainoshyo, M. and Konishi, H.: *Tetrahedron Lett.*, **51**, 4757 (1976).
22. Eakin, R.T.: *FEBS Letters*, **28** (1972).
23. Garlick, P.B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, (1977).
24. Colman, A. and Gadion, A.: *Eur. J. Biochem.*, **61** (1976).