

生理活性を有するフロログルシノール
誘導体に関する生物有機化学的研究

1991年

本多一郎

目次

序論	1
第1章 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の合成と 光合成電子伝達系阻害活性	4
1-1 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の合成	8
1) 合成方法(1)	9
2) 合成方法(2)	10
1-2 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の 光合成電子伝達系(PET)阻害活性	12
1) 活性検定方法	12
2) 結果と考察	12
i) 直鎖 <i>N</i> -アルキルアミド誘導体	
ii) チオアミド誘導体	
iii) アニリド誘導体およびそのクロロ置換体	
iv) 他の置換アニリド(<i>N</i> -置換フェニルアミド)誘導体	
v) <i>N</i> -フェニルアルキルアミド誘導体	
vi) 光学活性体	
vii) アミド窒素原子上の水素の必要性	
viii) エステル誘導体	
1-3 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の光合成電子 伝達系阻害における定量的構造活性相関(QSAR)解析	24
1) パラメーターの選定と解析方法	25
2) 結果と考察	28
i) <i>N</i> -アルキルアミド誘導体、 <i>N</i> -フェニルアルキル アミド誘導体、 <i>N</i> -アルキルチオアミド誘導体	
ii) 置換アニリド(<i>N</i> -置換フェニルアミド)誘導体	
iii) 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のQSAR	
3) QSAR解析結果に基づく阻害剤の分子設計	36
1-4 まとめ	38

第2章 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の 光合成電子伝達系阻害様式の解析	40
2-1 熱発光グロー曲線による3-ニトロフロログルシ カルボン酸誘導体の阻害様式の解析	42
1) 測定方法	44
2) 結果と考察	45
2-2 除草剤抵抗性植物を用いた3-ニトロフロログルシ カルボン酸誘導体の阻害様式の解析	48
1) 検定に用いた除草剤抵抗性植物と検定方法	50
2) 結果と考察	52
2-3 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の阻害様式の考察	53
2-4 光合成反応中心の分子構造と3-ニトロフロログルシ カルボン酸誘導体の結合様相に関する考察	55
1) 3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体の D1タンパク質における結合部位の推定	61
2) ウレア構造を有する3-ニトロフロログルシカルボン酸 エステル誘導体のPET阻害活性	62
i) 合成方法と活性検定方法	
ii) 結果と考察	
iii) 除草剤抵抗性植物を用いた作用性の検討	
2-5 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の 植物に対する作用	68
1) モヤシマメ幼胚軸に対する3-ニトロフロログルシ カルボン酸誘導体の作用	69
i) 活性検定方法	
ii) 結果と考察	
iii) 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の発芽阻害活性	
2) タバコ光半独立栄養 (PM) 細胞に対する 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の作用	72
i) 検定に用いた培養細胞と検定方法	
ii) 結果と考察	
3) 温室内ポット試験における3-ニトロフロログルシ カルボン酸誘導体の除草活性	75

i) 活性検定方法	
ii) 結果と考察	
2-6 まとめ	78
第3章 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の 抗発癌プロモーター活性とアラキドン酸代謝系に対する作用	79
3-1 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の Epstein Barrウイルス早期抗原 (EBV-EA) 産生抑制活性	80
1) 活性検定方法	83
2) 結果	83
3) 考察	87
i) <i>N</i> -アルキルアミド誘導体	
ii) <i>N</i> -フェニルアルキルアミド誘導体	
iii) 置換アニリド誘導体	
iv) チオアミド誘導体	
v) エステル誘導体	
vi) まとめ	
3-2 3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体の マウス皮膚発癌二段階試験における抗発癌プロモーション活性	93
1) 活性検定方法	94
2) 結果と考察	94
3-3 3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体の アラキドン酸代謝系に対する作用-1 ヒト5-リポキシゲナーゼ (5-LO) 阻害活性	97
1) 活性検定方法	100
2) 結果	101
3) 考察	102
i) <i>N</i> -アルキルアミド誘導体	
ii) <i>N</i> -フェニルおよび <i>N</i> -フェノキシアルキルアミド誘導体	
iii) 置換アニリド誘導体	
iv) 3-ニトロフロログルシカルボン酸関連化合物の活性	
iv) まとめ	

3-4	3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の アラキドン酸代謝系に対する作用-2 シクロオキシゲナーゼ (CO) 阻害活性	106
	1) 活性検定方法	108
	2) 結果と考察	108
3-5	3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の5-LO 阻害活性とEBV-EA産生抑制活性における構造要求性の比較	108
3-6	まとめ	112
総合考察	3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の生理活性と 作用部位に関する考察	114
総-1	3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の 各種生理活性の相関	114
総-2	光合成電子伝達系とアラキドン酸代謝系の 受容部位に関する考察	114
実験の部		118
引用文献		147
謝 辞		157

略語表

本論文中では、以下の略語を用いた

BL	Burkitt's lymphoma
Chl	chlorophyl
CO	cyclooxygenase
DCC	<i>N,N</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCPIP	2,6-dichlorophenol indophenol
DMBA	dimethylbenzanthracene
DMSO	dimethylsulfoxide
DTT	dithiothreitol
EBV-EA	Epstein-Barr virus early antigen
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
THF	tetrahydrofuran
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethansulfonic acid
5-HETE	5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid
5-HPETE	5-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl- β -D-galactopyranoside
LS	Linsmaier-Skoog
LT	leukotriene
5-LO	5-lipoxygenase
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonic acid
mp	melting point
MS	mass spectrometry
NPC	nasopharyngeal carcinoma
NMR	nuclear magnetic resonance
ODC	ornithine decarboxylase
PA	photoautotrophic
PBS	phosphate buffered saline
PET	photoelectron transport
PG	prostaglandin
PLA ₂	phospholipase A ₂
PM	photomixotrophic

PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PS I, II	photosystem I, II
QSAR	quantitative structure activity relationship
TLC	thin layer chromatography
Tricine	tris(hydroxymethyl)methylglycine
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

本論文中の光合成電子伝達阻害型除草剤の正式名称

Atrazine	2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine
DCMU(Diuron)	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
Dinoseb	2- <i>sec</i> -butyl-4,6-dinitrophenol
Fenulone	3-phenyl-1,1-dimethylurea
Ioxynil	3,5-diiodo-4-hydroxybenzotrile
Simazine	2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-1,3,5-triazine
Terbutryn	2- <i>tert</i> -butylamino-4-ethylamino-6-methylthio-1,3,5-triazine

序 論

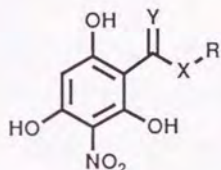
植物の生活環は、植物ホルモンを始めとする多くの内生生理活性物質の質的・量的バランスにより巧妙に調節されている。そこで、植物の生活環制御の仕組みを解明するためのアプローチとして、発芽、栄養生長、生殖生長、受精、結実などの各生育過程における内生生理活性物質の量的・質的変動を解析する手法と、外部から与えた生理活性物質に対する植物の反応を解析する手法とがある。この二つのアプローチは相補的なものであり、特に、新しい植物生理活性物質の発見を契機として、上述の研究が飛躍的に発展してきた。ここに、植物生理活性物質の探査研究の重要性を見いだすことができる。

植物生理活性物質として現在最も広範に利用されているものは除草剤である。除草剤は、農業生産技術の発展に大きな貢献をしたばかりではなく、植物生理・生化学の発展にも深く関わってきた。実際に、現在使用されている除草剤の大部分は、光合成、アミノ酸合成、脂肪酸合成、色素合成、植物ホルモンによる調節系など、植物に特徴的な代謝系の特異的阻害剤である。例えば、光合成阻害型除草剤であるDCMU (diuron, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) は標準的な光合成電子伝達系 (Photosynthetic Electron Transport, PET) 阻害剤として光合成研究には不可欠な試薬でもある。

植物に特徴的な生理過程のなかでも、光合成は、除草作用のターゲットとしてかなり以前から重要視されてきており、現在使用されている除草剤の約半数が光合成阻害剤である[1]。光合成阻害型除草剤の作用部位である光合成初期過程に関する研究は、近年急速に進展したが、今後の研究により解明すべき課題は多い。例えば、光合成細菌の光化学反応中心の立体構造はX線結晶構造解析により決定されたが[2]、植物の光化学反応中心については当該タンパク質の結晶化が、極く最近成功したば

かりである[3]。即ち現時点では、植物の反応中心の構造解析には、阻害剤を分子プローブとして用いるアプローチが重要である。また、それらの阻害剤が分子プローブとして効果的に機能するためには、既存の阻害剤とは構造的に、あるいは作用的に異なる新しいタイプのものが待望されている。

本研究においては、天然の光合成阻害物質であるグランジノール[4]をリード化合物とした光合成電子伝達系阻害剤の探索を第一の目的とした。化合物の分子デザインには、定量的構造活性相関解析の結果や、現在までに研究されている多くの既存の光合成阻害剤の構造活性相関に関する情報を利用した。



X= O or NH

Y= O or S

R= 種々の置換基

その結果、標準的な光合成阻害剤であるDCMUの10倍以上強力な阻害活性を有する化合物、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体(左図)を見いだした。また、阻害様式を詳細に検討した結果、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は既存の阻害剤とは微妙に異なる新しいタイプの光合成電子伝達系阻害剤であることが判明した。

一方、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は、天然の抗発癌プロモーター物質としてユーカリより単離されたユーグロバール類と類似の構造を有することから、本化合物の抗発癌プロモーター活性についても検討した。その結果、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は抗発癌プロモーターとしても有効なことが明らかとなった。また、抗発癌プロモーション活性につながる一次作用点として、抗炎症剤の一次スクリーニングに用いられているアラキドン酸代謝酵素に対する活性を検討し、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体が、アラキドン酸代謝酵素活性を阻害すること、すなわち抗炎症剤として有望なことを明かした。

本研究により、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体を始めとするフロログ

ルシノール誘導体が、比較的簡単な化学構造を有するにも拘わらず、多様な生理活性を示すことが判明した。このことは、このような低分子化合物が、生体内では複数の代謝系に対してある程度の親和性を有するという事実に因るものであろう。即ち、このような低分子化合物ではターゲット以外の代謝系に対しても何らかの影響を与えうる可能性を示している。しかし、化学構造の微細な違いが、例えば光合成阻害活性において、非常に大きな活性の変動として現われたことは、低分子化合物の中から特異性の高い代謝阻害剤あるいは代謝制御剤を創出しうる可能性を示唆している。

（以下は非常に薄い文字で印刷された文章であり、内容はほとんど読み取れない。概して、ルシノール誘導体の生物活性や代謝経路に関する記述と思われる。）



図1. ルシノール誘導体の化学構造

第1章 3-ニトロフロログルシニカルボン酸誘導体の合成と光合成 電子伝達系阻害活性

植物にとってエネルギー獲得のための必須な機能である光合成は、効率的な光エネルギー捕捉系、水からNADP⁺への電子伝達系とそれに共役したATP生成系（明反応）、および二酸化炭素固定系（暗反応）から構成されている。これらの系は、それぞれが効率良く働くために相互に連絡しており、巧妙な制御系により調節されている。この制御系の働きにより植物は、光の強度、温度、湿度や大気組成など、外的環境の変動に対応することができる。

吉田らにより、ユーカリ樹の一種であるローズガム (*Rose gum, Eucalyptus grandis*) の成熟葉中に含まれる光合成電子伝達系 (Photosynthetic Electron Transport, PET) 阻害活性物質として単離構造決定されたグランジノール、およびホモグランジノール (図1-1) [4]は、唯一の植物起源のPET阻害物質である。これらの化合物のユーカリ体内における光合成制御系への関与については現在のところ不明であるが、グランジノールがユーカリ植物中に普遍的に存在することから[5,6,7]、何らかの重要な生理的役割を担っているものと考えられている[8]。

グランジノールは、ジノセブ (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) (図1-2) などのフェノール型PET阻害剤と類似した化学構造を有している。

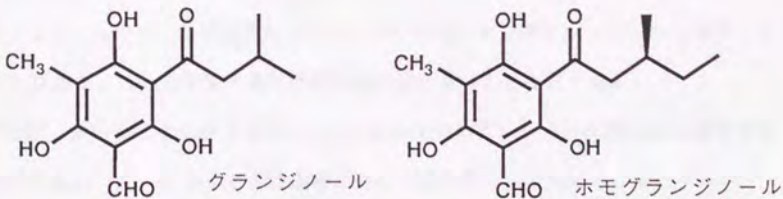


図1-1 グランジノール、ホモグランジノールの構造

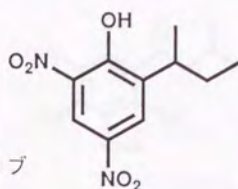


図1-2 ジノセブ

そこでグランジノールの化学構造をTrebstらの提出しているフェノール型PET阻害剤の構造要求性のモデル(図1-3)[9]に当てはめてみると、ホルミル基はフェノール性水酸基のパラ位の「強力な電子求引性置換基(R^3)」に、ケトン部分は「厳密な構造要求性を持つ、弱い電子求引性置換基(R^2)」に、母核のメチル基は「構造要求性を持たない疎水性置換基(R^4)」に対応するものと考えられる。

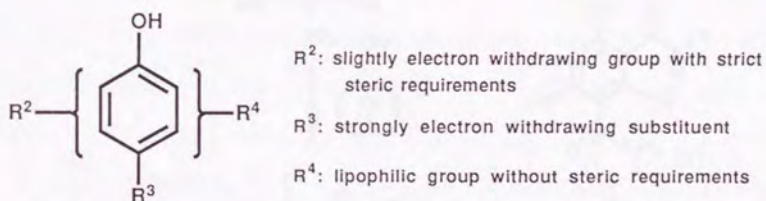


図1-3 フェノール型阻害剤の構造要求性に関するモデル(Trebstら[9])

しかしグランジノールの構造は、このモデルとは微妙に異なる点もある。即ちグランジノールでは、母核構造がフェノールではなくフロログルシノールであること、ニトロ基などの強力な電子求引性置換基を持たないことなどである。

吉田、米山らによるグランジノールを含むフロログルシノール誘導体の構造活性相関の検討(図1-4)から、PET阻害において高活性を示すためのフロログルシノール誘導体の構造要求性は以下のように要約されている[10~13]。

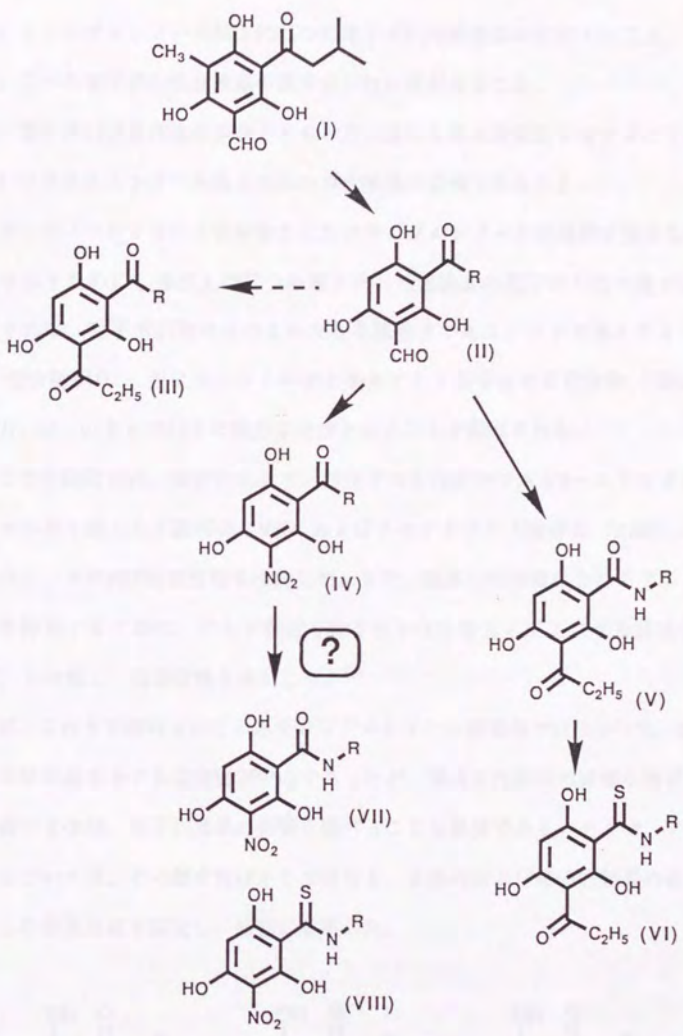


図1-4 フロログルシノール誘導体構造要求性の検討 (吉田ら[10~13])

————→ PET阻害活性向上
 - - - - -> PET阻害活性低下

- 1) フロログルシノール核上に二つの電子求引性置換基が存在すること。
- 2) 二つの電子求引性置換基の電子求引性に差が有ること。
- 3) 電子求引性置換基の少なくとも一方は適当な疎水性側鎖を有すること。
- 4) フロログルシノール核上の三つの水酸基は必須であること。

グランジノールをリード化合物としたフロログルシノール誘導体が強力なPET阻害活性を示すために、母核上の二つの電子求引性置換基の電子求引性の差が重要であるとすれば、電子求引性の差のより大きな組合せである、ニトロ基とアミド基(図1-4、化合物VII)、更には、ニトロ基とチオアミド基を有する化合物(図1-4、化合物VIII)は、いままで以上に強力な活性を示すことが期待される。

そこで本研究では、高活性を示すと期待される化合物である3-ニトロフロログルシノールカルボン酸アミド誘導体(VII)およびそのチオアミド誘導体(VIII)(図1-5)を合成し、そのPET阻害活性を検討した。また、阻害活性発現におけるアミド構造の役割を検討するために、アミド構造を含まない化合物としてエステル誘導体(化合物IX)を合成し、阻害活性を検定した。

一方、これまで検討されているフロログルシノール誘導体では[10~13]、直鎖のアルキル置換基を有する化合物が中心であったが、構造活性相関の詳細な解析には、置換基の立体的、電子的効果の影響を調べることも重要である。そこで、アミノ基側鎖については、その疎水性ばかりではなく、立体的および電子的効果の多様性を配慮した合成目標を設定し、研究に着手した。

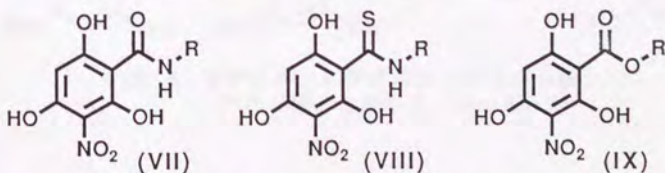


図1-5 本研究で合成した化合物

1-1 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の合成

第一の合成目標であるアミド誘導体 (VII) は、フロログルシノールにニトロ基およびアミド基が置換した化合物である。従って、フロログルシノールに対する親電子置換反応によりそれぞれの置換基を導入すれば合成できる。フロログルシノール核は対称的な位置に存在する三つの水酸基の寄与により親電子置換反応を受けやすいと考えられる。

アミド基のフロログルシノール核への導入にはいくつかの方法が可能である。最も直接的な方法は、フロログルシノールとイソシアン酸エステルをFriedel-Crafts反応させる方法である[14]。実際に米山らは、図1-6に示すようにフロロプロピオフェノンとイソシアン酸エステルをニトロベンゼン中塩化アルミニウムを触媒として反応させることより、対応するフロログルシンカルボン酸アミド類を得ている[12]。一方、吉田らはニトロフロロフェノンの合成において、図1-7に示すようにフロログルシノールへのアシル基導入の後、ニトロ化を行っている[10]。そこで予備実験として、フロログルシノールをイソシアン酸エステルと反応させた後、ニトロ化を行うことにより、目的とする3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体を合成した(図1-8, ルート1)。

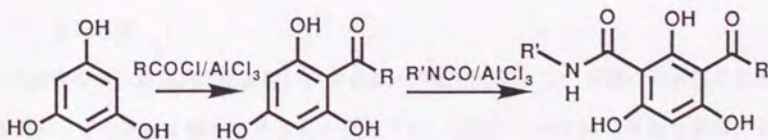


図1-6 3-アシルフロログルシンカルボン酸アミド類の合成方法 (米山ら[12])

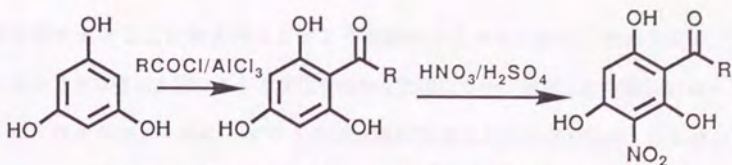


図1-7 ニトロフロロフェノン類の合成方法 (吉田ら[10])

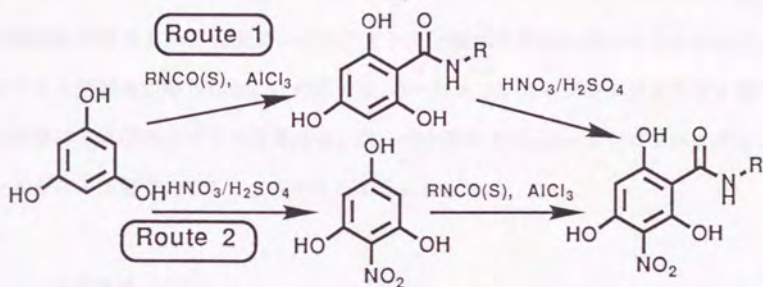


図1-8 フロログルシノールを原料とした3-ニトロフロログルシノールカルボン酸アミド類の合成方法として考えられる経路

1) 合成方法 (1)

本研究では、新規PET阻害剤の探索を第一の研究目的として多種の化合物を迅速に調製し、その活性を検定することを優先させ、収率については二次的な配慮にとどめたが、より効率的に目的物を得るために合成方法の改良を行った。即ち、前述の合成方法は、フロログルシノールのイソシアン酸エステルによる直接アミド化、アミド誘導体のニトロ化の両反応とも低収率であった。他方、共通の中間体から一工

程で目的とする化合物を得る方がより効率的であることから、先にフロログルシノールをニトロ化し、続いてアミド化を行なう方法について検討した(図1-8, ルート2)。

フロログルシノールのモノニトロ化は既に報告されているが[15]、ニトロフロログルシノールをイソシアン酸エステルで直接アミド化ができるかどうかがこの合成方法の問題点であった。

そこで種々の反応条件を検討した結果、ニトロフロログルシノールをイソシアン酸エステルとニトロベンゼン中で塩化アルミニウムと共に約80℃で1昼夜反応させることにより、50~60%の収率で対応する3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が得られた。同様に、イソチオシアン酸エステルを用いることにより、チオアミド誘導体が得られた。これにより、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体およびチオアミド誘導体は、同一の中間体である3-ニトロフロログルシノールから一工程で効率よく合成できるようになった。

2) 合成方法(2)

しかし合成方法(1)にも、イソシアン酸エステルあるいはイソチオシアン酸エステルの種類により収率が大きく変化するという限界が認められてきた。即ち、イソシアン酸およびイソチオシアン酸のアルキルエステルを用いる場合には比較的高収率で目的物が得られたが、これらの置換フェニルエステルおよびイソシアン酸ベンジルエステルでは殆ど反応が進行しなかった。この主な原因は、これらのエステルが不安定であり、反応中に分解してしまうためと考えられた[16, 17]。また、ニトロフロログルシノール自体も長時間加熱することにより分解する。そこで、次に3-ニトロフロログルシンカルボン酸からアミド誘導体を効率よく合成する方法について検討を加えた。

フロログルシンカルボン酸は脱炭酸しやすく、不安定な化合物であるが、比較的

入手しやすい化合物であるので、これを効率よくアミド化およびニトロ化することができれば3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が得られる。

そこでまず、フロログルシンカルボン酸のニトロ化を検討した。その結果、フロログルシンカルボン酸はアルカリ条件にすると容易に脱炭酸するが、酸性条件では比較的安定であり、室温下、60%硫酸中2~3当量の硝酸 ($d=1.38$) で容易にモノニトロ化されることが判明した(図1-9)。しかし、フロログルシノールと同様にジニトロ化が極めて容易に起こるため、この反応条件は、かなり厳密でなければならなかった。例えば70%硫酸ではジニトロ化が優先し、硫酸の濃度が50%以下では反応は進行しなかった。また、3-ニトロフロログルシンカルボン酸もアルカリ条件下では不安定であり、水溶性が高く精製が困難である。但し、以下に述べるアミド化反応には粗製物でも十分であることが判明したので、粗製物をそのままアミド化反応に用いることとした。

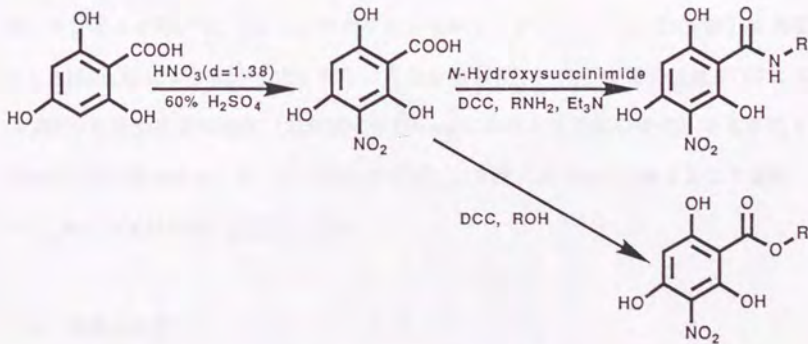


図1-9 フロログルシンカルボン酸を原料とした
3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド類および
エステル類の合成方法(合成方法(2))

3-ニトロフロログルシンカルボン酸のアミド化は、通常ペプチド合成に用いられるジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) と *N*-ヒドロキシコハク酸イミド共存下、アミンとのカップリング反応[18]により行った。アミド化の収率は50~60%であった。

この合成方法の採用により、これまで合成不可能であったアニリド誘導体を始めとする多様な3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の合成が可能となった。また、図1-9に示したようにアルコールとの類似の反応によりエステル誘導体も合成できるようになった。

本研究で用いた3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は、チオアミド誘導体以外は、この図1-9に示した方法で調製したものである。

1-2 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の光合成電子伝達系 (PET) 阻害活性

1) 活性検定方法

各化合物の光合成電子伝達系 (PET) 阻害活性は、ハウレンソウの破碎した葉緑体のチラコイドを用いて、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCPIP) を基質としたHill反応により測定した。即ち、各化合物存在下の光合成電子伝達系IIによるDCPIPの光還元速度の変化 (実験的には600 nmにおける吸光度の変化) をもとにそのPET阻害活性を算出した。また活性の指標としては、50%PET阻害をおこす濃度 (IC_{50} 値) の逆対数値 (pI_{50} 値) を用いた。

2) 結果と考察

i) 直鎖 *N*-アルキルアミド誘導体

構造活性相関を検討するに当たって、まず最初に、直鎖の *N*-アルキル側鎖を持つアミド誘導体を合成しそのPET阻害活性を検討した。

図1-10に示したように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体は、現在までに報告されているフロログルシノール誘導体の中では最高の活性を有する3-アシルフロログルシンカルボン酸アミド誘導体[12]およびチオアミド誘導体[13]の活性を上回る強力な光合成電子伝達阻害活性を示した。

3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の阻害活性はアミノ基側鎖の伸長に伴って上昇し、側鎖のアルキル基の炭素数が8~11の時に最も高い活性を示した(図1-11)。更にアルキル側鎖を長くすると、活性は徐々に低下した。このようなアルキル側鎖の伸長に伴う活性変動は、3-アシルフロログルシンカルボン酸アミド誘導体およびチオアミド誘導体の場合にも認められており、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が3-アシルフロログルシンカルボン酸アミド誘導体およびチオアミド誘導体と同じ阻害剤結合部位に作用していることが示唆される。

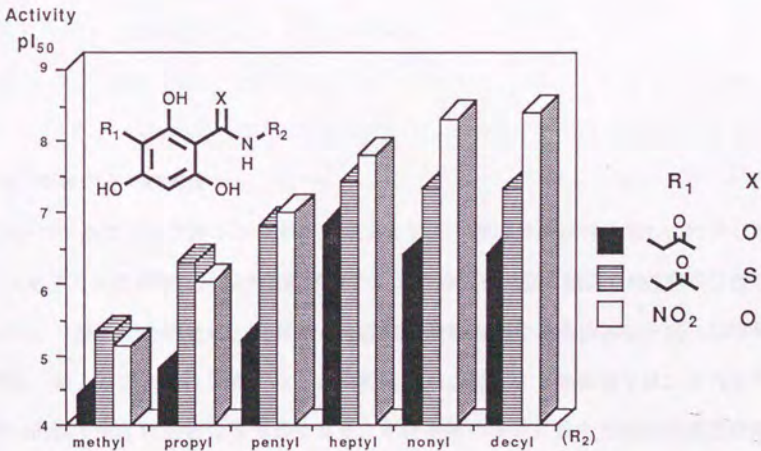


図1-10 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド類と他のフロログルシノール類縁体の活性
活性は pI_{50} 値(-Log(50%阻害濃度(M)))にて表記 (以下同様)

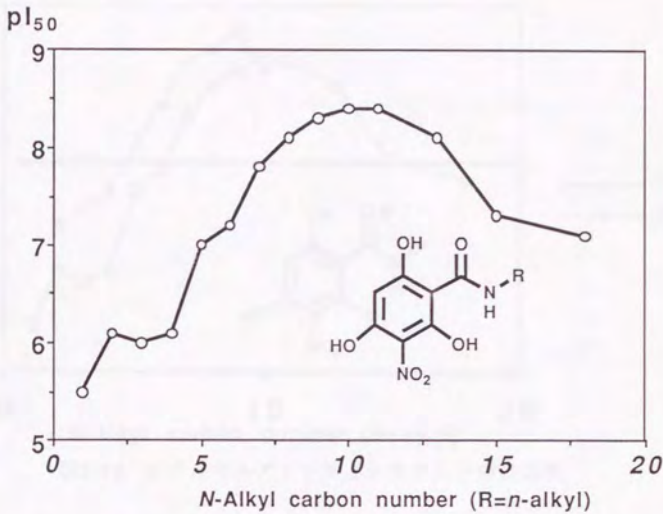


図1-11 直鎖N-アルキル体のアルキル鎖長と活性

ii) チオアミド誘導体

3-ニトロフロログルシンカルボン酸チオアミド誘導体の活性を図1-12に示した。

チオアミド誘導体は対応する前述のアミド誘導体を上回る強力なPET阻害活性を示した。一部の化合物では、既存の光合成阻害型除草剤であるDCMUを20~30倍も上回る、強力な阻害活性を有することが判明した。現在までの報告では、このような高い活性を示す化合物は限られており、本化合物は極めて強力な光合成電子伝達系阻害剤である。

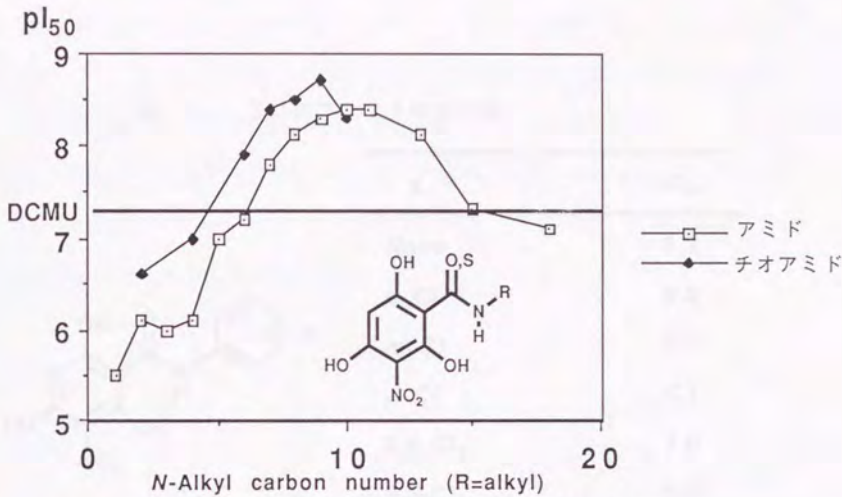


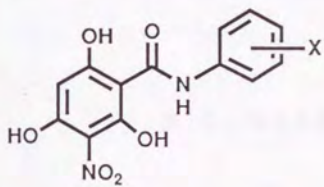
図1-12 N-アルキルアミド体とチオアミド体の活性

iii) アニリド誘導体およびそのクロロ置換体

光合成阻害剤を始めとする除草剤には、クロロフェニル基を持つ化合物が多いこと、また、多くの生理活性物質の構造活性相関の検討にもクロロ置換フェニル誘導体が頻繁に用いられていることから[19]、最初に、アニリド体（*N*-フェニル体）とそのクロロ置換体の活性を検討した。

表1-1に示したようにモノクロロ置換体では、無置換体に対してオルト置換体の活性は低下した。ジクロロ置換体の場合にも、オルト位に塩素原子を有する化合物の活性は低いことから、オルト位への塩素原子の導入は、活性を低下させることが判明した。一方、オルトクロロ置換体とは対照的に、メタ、パラ置換体の活性はいずれの場合にも無置換体に対して高いことから、メタ位およびパラ位への塩素原子の導入は、活性を上昇させることが明らかとなった。

表1-1 クロロアニリド体の活性



X	pI ₅₀
None	6.3
<i>o</i> -Cl	5.9
<i>m</i> -Cl	6.7
<i>p</i> -Cl	7.1
2,4-Cl ₂	7.0
2,3-Cl ₂	5.9
3,4-Cl ₂	7.2
3,5-Cl ₂	6.7

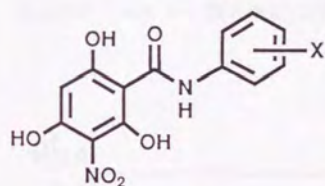
ベンゼン環のメタ位およびパラ位への塩素原子の導入により活性が上昇するという傾向は、他のPET阻害剤でも認められており[19]、このような活性の上昇は、塩素原子の疎水性あるいは電子吸引性に因るものと考えられている[19]。また、オルト位への置換基の導入による活性低下は、置換基の立体的効果によるものであり、置換基の立体的な嵩高さが化合物と受容部位との相互作用を妨害するためと考えられている[19]。

このように、3-ニトロフロログシカルボン酸アミド誘導体の活性に対する置換基の効果も、他のPET阻害剤の構造活性相関の研究から提出されている仮説により説明することができる。

iv) 他の置換アニリド (*N*-置換フェニルアミド) 誘導体

他の置換アニリド誘導体のPET阻害活性 (表1-2) ではパラ置換体のトリフルオロメチル置換体が最高活性を示した。トリフルオロメチル基は、塩素原子と同様に疎水性の電子吸引性置換基であり、塩素原子の場合と類似した置換基効果を及ぼしているために高活性を示すものと考えられる。一方、ニトロ基や、イソプロピル基およびジメチルアミノ基では活性は低下した。

表1-2 種々の置換基を有するアニリド体の活性



X	pI ₅₀	X	pI ₅₀
2-F	6.0	2-Me	5.8
3-F	6.6	3-Me	6.6
4-F	6.4	4-Me	6.1
2-CF ₃	5 >	4-Et	6.5
3-CF ₃	6.9	4- <i>n</i> Pro	7.0
4-CF ₃	7.6	4- <i>i</i> Pro	6.7
2-OMe	6.2	4-NO ₂	6.7
3-OMe	6.4	4-NMe ₂	5 >
4-OMe	5.9	None	6.4
3,4-(OMe) ₂	5 >	DCMU	7.2

一般的に3-ニトロプロログルシンカルボン酸アニリド誘導体のPET阻害活性は、直鎖アルキルアミド誘導体の活性の1/10以下であった。これは、ベンゼン環のような平面的で広がりを持った構造が母核に近接して存在することにより、例えば、活性

発現に好ましいコンフォーメーションをとりにくくなり、受容部位に対する親和性が低下するためと考えられる。特に、母核と最も近接しているオルト位に置換基を導入した場合に活性が低下するのは、このような立体障害の影響が顕著に現われるためと考えられる。

v) *N*-フェニルアルキルアミド誘導体

アニリド体の立体障害による活性低下を回避するために、母核からある程度の距離を隔てて疎水性部分を導入することが有効であると考えられた。そこで、母核とベンゼン環の間の距離と阻害活性の関係を*N*-フェニルアルキルアミド誘導体により検討した。合成した*N*-フェニルアルキルアミド誘導体の範囲では(*N*-フェニルブチルアミド誘導体まで)、直鎖*N*-アルキルアミド誘導体の活性を上回るものはないが、メチレン数の増加に伴って特徴的な活性変動(図1-13)が認められた。

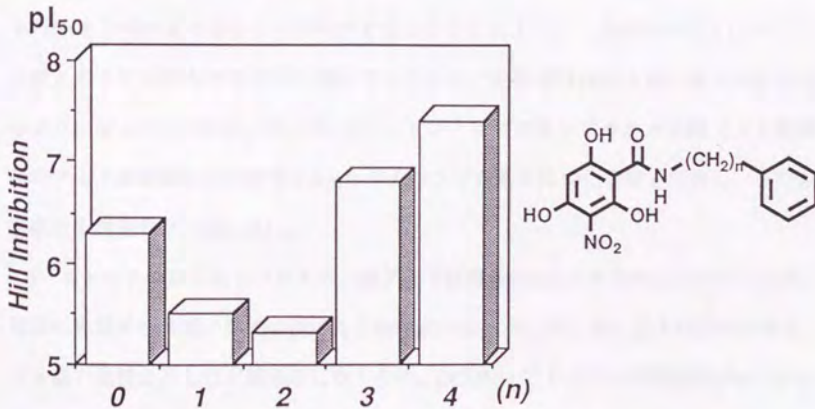


図1-13 *N*-フェニルアルキルアミド体の活性

即ち、アニリド体に比べて*N*-ベンジルアミド誘導体、*N*-フェネチルアミド誘導体とメチレン数の増加に伴って活性は低下したが、*N*-フェニルプロピルアミド誘導体では活性が再び上昇した。このことから、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が高活性を発現するためには、アミド窒素原子とベンゼン環が少なくとも3炭素結合以上離れている必要があることが判明した。この構造要求性は前述のような立体障害に因るものと考えられる。

vi) 光学活性体

不斉炭素原子を含む生理活性物質では、活性化合物の光学異性体が不活性であるのみならず、拮抗作用を示したり、全く異なる作用を有する場合が知られていることから、光学純度を維持し、高めるための合成研究が精力的に行われている[20]。殺虫剤や除草剤および植物生長調節剤などの農薬でも、光学異性体が全く異なった活性を示すことが多い[21]。

近年、ウレア、トリアジンなどの光合成阻害型除草剤の作用点が、チラコイド膜中のD1タンパク質であることが明かとなったことによって、阻害剤分子とD1タンパク質との3次元的な相互作用を検証するために、光学活性体の合成が盛んに行われるようになってきた[22]。そこで、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のアミド基側鎖に光学活性な α -メチルベンジル基を持つ化合物を合成し、その阻害活性を検定した(図1-14)。

3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の α -メチルベンジルアミド誘導体の光学異性体間の活性の差は約2倍程度であるが、明らかにS体の方がR体よりも高い活性を示した。図に示したように、DCMU、アトラジンの類縁体で α -メチルベンジル基を有する光学異性体でも、S体のほうがR体より、それぞれ7倍、15倍高い活性を示している[22]。なお、前節で説明したように、3-ニトロフロログルシ

シカルボン酸アミド誘導体のN-フェニルアルキルアミド誘導体の中では、N-ベンジルアミド誘導体は比較的低活性であり、光学異性以外の立体的要因が活性に影響している可能性もある。

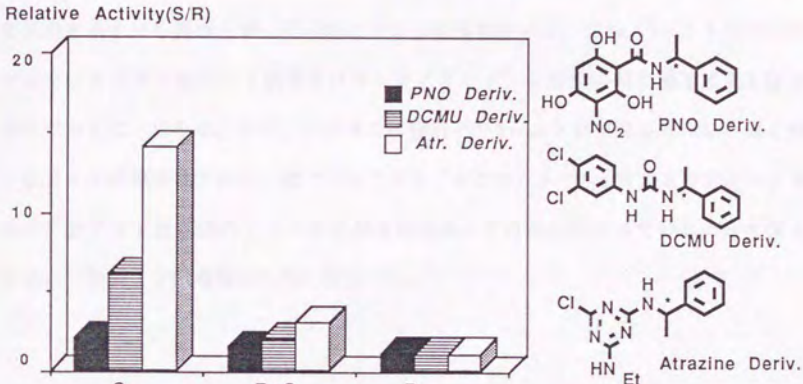


図1-14 3-ニトロフロログルシニカルボン酸アミド類ならびに DCMU, アトラジンの光学活性体(α -メチルベンジル誘導体)の活性

vii) アミド窒素原子上の水素の必要性

3-ニトロフロログルシニカルボン酸アミド誘導体は高活性な光合成電子伝達系阻害剤であり、Trebstらの示したフェノール型阻害剤の構造要求性のモデルに良く対応している。光合成阻害型除草剤には、この他に、DCMUに代表されるウレア型阻害剤や、アトラジンに代表されるトリアジン型阻害剤が知られている。フェノール型阻害剤とウレア/トリアジン型阻害剤とは、活性発現のための構造要求性ばかりで

はなく、作用様式も異なることが明らかにされている。例えば、フェノール型化合物はアミド基を持たないが、ウレア／トリアジン型阻害剤はアミド基を持ち、またアミド基窒素原子上の水素原子が高活性発現やD1タンパク質との結合に極めて重要であるとされている[23, 24]。

3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体は、フェノール型阻害剤の構造要求性を示すにも拘わらず、分子内にアミド構造を有する。即ち、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体はウレア／トリアジン型阻害剤の構造要素も併せ持っていることになる。また、これまでに検討した3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体はすべて二級アミドである。そこで、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のアミド構造が活性発現にどの程度関わっているのかを探るため、三級アミド誘導体の活性を検討した。

表1-3 種々の三級アミド体と対応する二級アミド体の活性

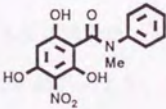
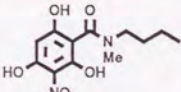
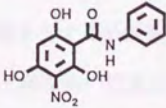
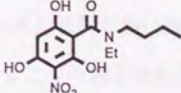
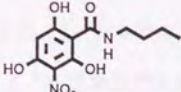
Compound	pl ₅₀	Compound	pl ₅₀
	<5		<5
	6.4		<5
			6.2

表1-3に示したように、*N*-アルキルアミド誘導体、アニリド誘導体のいずれにおいても、アミノ基窒素原子上の水素をアルキル置換した三級アミド化合物の活性は極端に低下した。即ち、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の高活性発現には、アミノ基窒素原子上の水素原子の存在が重要であることが判明した。このことは、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の場合にも、ウレア／トリアジン型阻害剤と同様に、アミノ基窒素原子上の水素原子が受容タンパク質（D1タンパク質）との結合に関与している可能性を示唆している。

フロログシノール型光合成電子伝達阻害剤の中で、吉田らによって検討されたニトロフロロフェノン誘導体（図1-4,化合物（IV））は、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体と同じくニトロ基を有するがアミド構造を持たないことから、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の阻害活性発現におけるアミド構造の役割を考察するためには適当な化合物である。

しかし、ニトロフロロフェノン誘導体では、ケトン側鎖の伸長に伴う活性変動は認められていない[10]。従って、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体とニトロフロロフェノン誘導体は、構造的には類似しているが、その阻害様式が異なっている可能性が示唆された。

viii) エステル誘導体

これまでの結果により、フロログシノール系化合物が高いPET阻害活性を示すためには、フロログシノール核が互いに異なる二つの電子吸引性基により置換されており、その二つの置換基の電子吸引性の差が大きく、またそのうち一方が適当な疎水性側鎖を有する必要性が再び示された。また、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の阻害活性の発現には、アミノ基窒素原子上の水素原子の存在が重要であることを述べた。そこで、第一の電子求引性置換基としてニトロ基を、第

二の電子求引性置換基としてアミド基やケトン基以外の置換基を有するフロログルシノール誘導体である、3-ニトロフロログルシノールカルボン酸エステル誘導体の阻害活性を検討した。

図1-15に示すように、3-ニトロフロログルシノールカルボン酸エステル誘導体の活性は、対応するアミド誘導体の1/10から1/100程度であったが、アルキル側鎖の伸長（即ち、疎水性の上昇）に伴って活性が上昇するという、アミド誘導体などと同様の傾向が認められた。

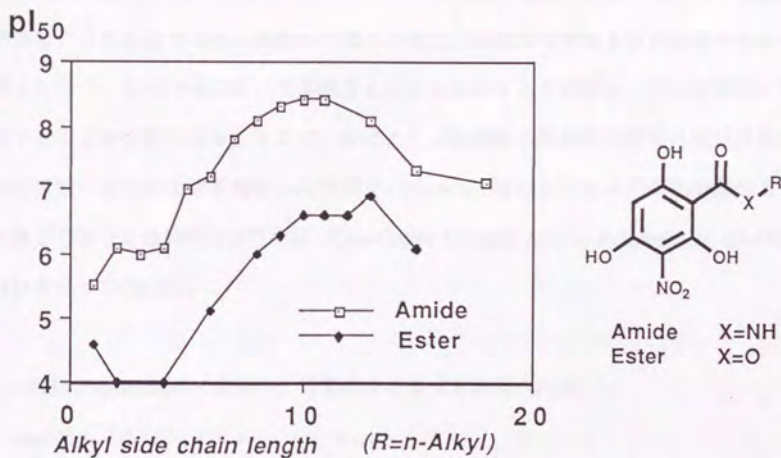


図1-15 3-ニトロフロログルシノールカルボン酸エステル体とアミド体の活性

以上、本節では、3-ニトロフロログルシノールカルボン酸誘導体の構造変換に伴う活性変動を検討することにより、定性的ながらも、3-ニトロフロログルシノールカルボン酸誘導体の結合部位近傍の構造要求性に迫った。

1-3 3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の光合成電子伝達系阻害における定量的構造活性相関 (QSAR) 解析

3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体は、フロログルシノール誘導体の中では最も強力な阻害活性を示すことから、前節で検討したその構造要求性をより定量化することができれば、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体のみならず、それ以外のフロログルシノール系光合成電子伝達阻害剤の構造と活性の関係についても貴重な情報が得られるものと考えられる。また、解析結果を生かすことにより、新しい阻害剤の分子デザインへの道も開けることが期待される。そこで、前節で検討した、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の阻害活性発現のための構造要求性を、より信頼性の高い結論へと導くために、定量的な解析を行う必要があると考えられた。このためには、化学構造と活性の関係をより詳細に、且つ定量的に解析することが必要である。そこで、特にアミノ基側鎖の置換基の物理化学的性質が阻害活性に及ぼす影響を解明する目的で、Hansch、藤田らによって研究が開始され発展してきた定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR) 解析を行った[19,25]。

一般に、QSAR解析の結果は、以下のような式で表現される。

$$\text{Log(IC}_{50}) = \text{AX}_1 + \text{BX}_2 + \text{CX}_3 + \dots + \text{const}$$

この式では、薬剤の生理活性（この場合には50%有効濃度、 IC_{50} ）を、化合物の化学的あるいは物理化学的性質（パラメーター、 X_n ）の線形一次結合で表している。それぞれのパラメーターの係数は重回帰分析法により求め、各係数の有意性を判定する。更に、有意な項それぞれの最適値を求めることで、最も有効な化合物の構造が推定できることになる。このような解析を行うためには、対象となる化合物の総

てが同一の作用部位に、同じ機構で作用する必要がある、通常は同一の基本骨格を有する化合物群について解析する。また各パラメーターには加成性が成立し、簡便法として、基本骨格の置換基の物理化学的パラメーターを用いて重回帰分析する方法が一般的には採られている。

そこで本研究では、フロログシノール核上の置換基の物理化学的パラメーターを用いてQSAR解析を行った。

1) パラメーターの選定と解析方法

生物を構成する単位である細胞はリン脂質の二重膜に包まれている。即ち、薬剤を効率的に作用部位に到達させるための最初で最も重要な障壁は、膜透過の過程である。従って、薬剤の構造活性相関を議論する場合、脂質二重膜透過性に係わるパラメーターが極めて重要である。藤田らは、多種多様な化合物のQSAR解析に、各化合物の水/1-オクタノールの分配係数を元にした疎水性パラメーターの導入を検討し、良好な結果を得ている[19, 25]。

疎水性パラメーターとしては、水/1-オクタノールの分配係数以外にも、分配(逆相)薄層クロマトグラフィーにおける R_f 値や逆相系高速液体クロマトグラフィーの保持時間などが用いられているが、違った系から求められた疎水性パラメーターの間には高い相関関係が認められている[19]。QSAR解析には、水/1-オクタノールの分配係数(実測値)が用いられることが多く、これまでに行われた多くの実験結果から、疎水性パラメーターには加成性が成り立つことが明らかとなっている[19]。即ち、各置換基の疎水性定数に基づいて、特定の分子構造における疎水性の寄与を解析することが可能である。

本研究のように破碎葉緑体を用いた検定系では、阻害剤分子とD1タンパク質にある受容部位が直接接触できる。一方、D1タンパク質は膜結合性の疎水性タンパク質

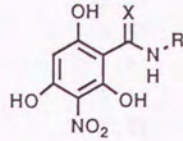
であり、阻害剤はD1タンパク質内で疎水性の高い Q_b 結合部位に結合するので、阻害剤分子の疎水性パラメーターは透過性よりも結合性を示すものであることが予想される。これまでに行われた多くのPET阻害剤のQSAR解析から、分子の疎水性が阻害活性に最も大きな影響を与えることが示されており、いずれの場合にも疎水性置換基底数を用いて良好な回帰式が得られている[26-28]。3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体についても、例えば、アルキルアミド誘導体のアルキル側鎖長と活性の関係からも明らかのように、分子の疎水性が阻害活性に大きな影響を与えているものと考えられた。

そこで本研究では疎水性置換基底数をまず第一にQSARパラメーターとして用いた。疎水性置換基底数は、既にHanschらにより報告されている N -置換安息香酸アミドの疎水性置換基底数 π （水/1-オクタノール系での分配係数を基にして決定されている[29]）を用いた。なお、Hanschらにより報告されていない置換基については、岩村らのアニリド類[30, 31]やトリアジン類[24, 27]についての実測値および計算値に基づいて計算した。また、オルト置換アニリド誘導体については、岩村などにより測定されたオルト置換アニリド類の分配係数[30]から求めた。

一方、置換基の電子的効果も活性に影響を与えることが知られている。そこで、電子的効果のパラメーターとしてHammettの置換基底数 σ [32]を用いて、特に、3-ニトロフロログルシカルボン酸アニリド誘導体について、その置換基の電子的効果が活性に及ぼす影響を検討した。

本解析に用いた化合物とその疎水性置換基底数、およびHammettの置換基底数を表1-4に示す。本解析には、前節において合成し、活性を検定した全てのアミド体及びチオアミド体を用いたが、比較的low活性であったエステル体は用いなかった。また本節においては、チオアミド体も広義のアミド体と考えて、活性傾向、高活性を示すための構造要求性などについて論じた。

表1-4 QSARパラメーター



No	X	R	π	σ	I(Ph)	I(Ar)	I(S)
1	O	Methyl	0.56	-0.01	0	0	0
2	O	Ethyl	1.1	-0.01	0	0	0
3	O	Propyl	1.64	-0.01	0	0	0
4	O	Butyl	2.18	0.01	0	0	0
5	O	Pentyl	2.72	-0.03	0	0	0
6	O	Hexyl	3.16	-0.03	0	0	0
7	O	Cyclohexyl	2.44	0	0	0	0
8	O	Heptyl	3.8	-0.04	0	0	0
9	O	Octyl	4.34	-0.04	0	0	0
10	O	Nonyl	4.88	-0.04	0	0	0
11	O	Decyl	5.42	-0.04	0	0	0
12	O	Undecyl	5.96	-0.04	0	0	0
13	O	Tridecyl	7.04	-0.04	0	0	0
14	O	Pentadecyl	8.12	-0.04	0	0	0
15	O	Octadecyl	9.74	-0.04	0	0	0
16	O	Benzyl	2.15	0.03	0	1	0
17	O	2-Phenethyl	2.74	0.02	0	1	0
18	O	(R)- α -Phenethyl	2.62	0.07	0	1	0
19	O	(S)- α -Phenethyl	2.62	0.07	0	1	0
20	O	3-Phenylpropyl	3.28	0.01	0	1	0
21	O	4-Phenylbutyl	3.82	0.01	0	1	0
22	O	2-Phenoxyethyl	2.09	0	0	0	0
23	O	2-(4-Cl-Phenoxy)ethyl	2.83	0	0	0	0
24	O	Phenyl	1.96	0.12	1	0	0
25	O	N-Me-Phenyl	1.92	0.12	1	0	0
26	O	2-Cl-Phenyl	2.08	0.15	1	0	0
27	O	3-Cl-Phenyl	2.95	0.16	1	0	0
28	O	4-Cl-Phenyl	2.92	0.15	1	0	0
29	O	4-Br-Phenyl	3.09	0.15	1	0	0
30	O	2-F-Phenyl	1.83	0.13	1	0	0

31	O	3-F-Phenyl	2.45	0.16	1	0	0
32	O	4-F-Phenyl	2.27	0.13	1	0	0
33	O	3,5-Cl ₂ -Phenyl	3.97	0.21	1	0	0
34	O	3,4-Cl ₂ -Phenyl	3.8	0.19	1	0	0
35	O	2,4-Cl ₂ -Phenyl	2.98	0.18	1	0	0
36	O	2,3-Cl ₂ -Phenyl	2.89	0.19	1	0	0
37	O	2-CF ₃ -Phenyl	1.97	0.19	1	0	0
38	O	3-CF ₃ -Phenyl	3.36	0.17	1	0	0
39	O	4-CF ₃ -Phenyl	3.27	0.19	1	0	0
40	O	2-Me-Phenyl	1.66	0.1	1	0	0
41	O	3-Me-Phenyl	2.32	0.11	1	0	0
42	O	4-Me-Phenyl	2.5	0.1	1	0	0
43	O	4-Et-Phenyl	3	0.1	1	0	0
44	O	4-iPr-Phenyl	3.54	0.1	1	0	0
45	O	4-Pr-Phenyl	3.55	0.1	1	0	0
46	O	2-MeO-Phenyl	1.47	0.11	1	0	0
47	O	3-MeO-Phenyl	2.1	0.14	1	0	0
48	O	4-MeO-Phenyl	1.83	0.11	1	0	0
49	O	3,4-(MeO) ₂ -Phenyl	1.97	0.1	1	0	0
50	O	4-NMe ₂ -Phenyl	1.37	0.02	1	0	0
51	O	4-NO ₂ -Phenyl	2.46	0.22	1	0	0
52	S	Ethyl	1.65	-0.11	0	0	1
53	S	Butyl	2.73	0.01	0	0	1
54	S	Hexyl	3.81	-0.03	0	0	1
55	S	Heptyl	4.35	-0.04	0	0	1
56	S	Octyl	4.89	-0.04	0	0	1
57	S	Nonyl	5.43	-0.04	0	0	1
58	S	Decyl	5.97	-0.04	0	0	1
59	S	Phenyl	2.51	-0.12	1	0	1

π ; 疎水性置換基定数

σ ; Hammettの置換基定数 (電子的パラメーター)

I(X); 擬変数 (詳細は本文参照)

2) 結果と考察

i) *N*-アルキルアミド誘導体、*N*-フェニルアルキルアミド誘導体、*N*-アルキルチオアミド誘導体

図1-16に示したように、*N*-アルキルアミド誘導体、*N*-フェニルアルキルアミド誘導体、*N*-アルキルチオアミド誘導体の活性は疎水性置換基定数と高い二次元の相関を有し、基本的な活性の強さがそれぞれの系列で異なっていることが認められた。即ち、各系列の化合物を区別する擬変数を導入すれば、すべての化合物の活性を疎水性置換基定数のみを変数とした回帰式で表すことができるはずである。

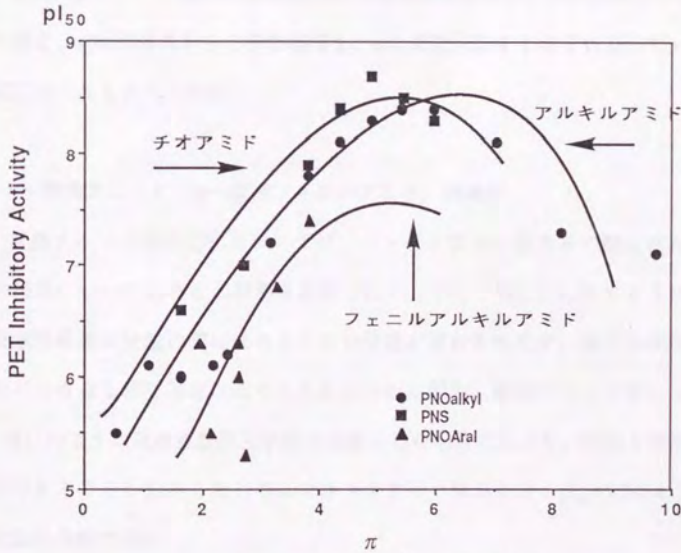


図1-16 各種化合物のPET阻害活性と疎水性置換基定数(π)との関係

そこで、チオアミド体についての擬変数I(S) (チオアミド体のみ1他のもので0)、およびアラルキル体についての擬変数I(Aral) (アラルキル体のみ1他は0) を導入して重回帰分析を行ったところ、式(1)に示すような極めて高い相関係数を持つ回帰式が得られた。この式のように疎水性置換基定数の2次式と各系列化合物に関する擬変数を用いて良好な回帰式が得られたことは、これらの化合物の阻害活性が基本的にはアミド基上の置換基の疎水性だけで説明できることを示している。

$$pI_{50} = 1.24 \pi - 0.10 \pi^2 - 0.89 I(\text{Aral}) + 0.38 I(\text{S}) + 4.39 \quad (\text{式 (1)})$$

(0.25) (0.025) (0.35) (0.36) (0.53) $n = 30, s = 0.36, r = 0.95$

当式において、括弧内は各係数の95%信頼限界を表す。 n は回帰式に用いた化合物の数を、 s は回帰式からの標準偏差を、 r は相関係数をそれぞれ表している(以下の式においてもすべて同様)

ii) 置換アニリド (N-置換フェニルアミド) 誘導体

置換アニリド体の活性については、ベンゼン環上の置換基の疎水性と電子的効果の両者について活性との関係を検討した。しかし、図1-17に示すように阻害活性と疎水性置換基定数の間にはかなり高い相関が認められたが、電子的置換基定数との間には有意な相関関係は認められなかった。即ち、置換アニリド体についても、式(2)のように疎水性置換基定数を変数とした回帰式により、構造と活性の関係を記述できることが分かった(フェニルチオアミド体および、 $pI_{50} < 5.0$ の4化合物を除いた24化合物で解析)。

$$pI_{50} = +0.54 \pi + 5.15 \quad (\text{式 (2)})$$

(0.23) (0.63) $n = 24, s = 0.37, r = 0.72$

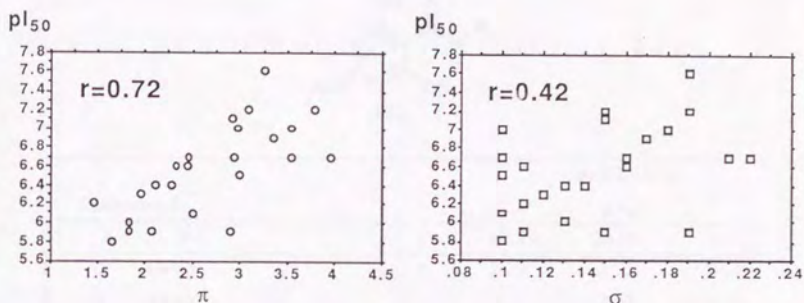


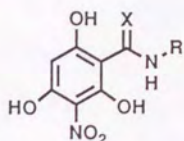
図1-17 アニリド体のPET阻害活性と π (疎水性置換基定数),
 σ (Hammettの置換基定数-電子的パラメーター)との相関

iii) 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のQSAR

以上のようにいずれの系列の化合物の活性も、疎水性置換基定数を変数とした回帰式により表すことができることから、式(1)にアニリド体の擬変数 $I(\text{Ph})$ を加えて重回帰分析を行うと、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体全体の活性を示す回帰式(3)が得られることが判明した(表1-5)。即ち、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の活性は、そのアミノ基側鎖の置換基の疎水性だけで定量的に説明できることが判明した。

$$\begin{aligned}
 pI_{50} = & 1.18 \pi - 0.09 \pi^2 - 0.32 I(\text{Ph}) - 0.84 I(\text{Aral}) + 0.38 I(\text{S}) + 4.48 & \text{(式(3))} \\
 & (0.22) \quad (0.02) \quad (0.25) \quad (0.37) \quad (0.32) \quad (0.46) \\
 & n = 55, s = 0.37, r = 0.92
 \end{aligned}$$

表1-5 QSAR解析結果



No.	Compound		Activity		
	X	R	Obs.	Calc.	ΔpI_{50}
1	O	Methyl	5.5	5.1	0.4
2	O	Ethyl	6.1	5.7	0.4
3	O	Propyl	6.0	6.2	-0.2
4	O	Butyl	6.1	6.6	-0.5
5	O	Pentyl	7.0	7.0	0.0
6	O	Hexyl	7.2	7.3	-0.1
7	O	Cyclohexyl	6.2	6.8	-0.6
8	O	Heptyl	7.8	7.6	0.2
9	O	Octyl	8.1	7.8	0.3
10	O	Nonyl	8.3	8.0	0.3
11	O	Decyl	8.4	8.1	0.3
12	O	Undecyl	8.4	8.1	0.3
13	O	Tridecyl	8.1	8.1	0.0
14	O	Pentadecyl	7.3	7.8	-0.5
15	O	Octadecyl	7.1	7.0	0.1
16	O	Benzyl	5.5	5.7	-0.2
17	O	2-Phenethyl	5.3	6.2	-0.9
18	O	(R)- α -Phenethyl	6.0	6.1	-0.1
19	O	(S)- α -Phenethyl	6.3	6.1	0.2
20	O	3-Phenylpropyl	6.8	6.5	0.3
21	O	4-Phenylbutyl	7.4	6.8	0.6
22	O	2-Phenoxyethyl	6.1	6.5	-0.4
23	O	2-(4-Cl-Phenoxy)ethyl	7.1	7.1	0.0
24	O	Phenyl	6.3	6.1	0.2
25	O	N-Me-Phenyl	<5		
26	O	2-Cl-Phenyl	5.9	6.2	-0.3
27	O	3-Cl-Phenyl	6.7	6.8	-0.1

28	O	4-Cl-Phenyl	7.1	6.8	0.3
29	O	4-Br-Phenyl	7.2	6.9	0.3
30	O	2-F-Phenyl	6.0	6.0	0.0
31	O	3-F-Phenyl	6.6	6.5	0.1
32	O	4-F-Phenyl	6.4	6.3	0.1
33	O	3,5-Cl ₂ -Phenyl	6.7	7.3	-0.6
34	O	3,4-Cl ₂ -Phenyl	7.2	7.3	-0.1
35	O	2,4-Cl ₂ -Phenyl	7.0	6.8	0.2
36	O	2,3-Cl ₂ -Phenyl	5.9	6.8	-0.9
37	O	2-CF ₃ -Phenyl	<5		
38	O	3-CF ₃ -Phenyl	6.9	7.1	-0.2
39	O	4-CF ₃ -Phenyl	7.6	7.0	0.6
40	O	2-Me-Phenyl	5.8	5.9	-0.1
41	O	3-Me-Phenyl	6.6	6.4	0.2
42	O	4-Me-Phenyl	6.1	6.5	-0.4
43	O	4-Et-Phenyl	6.5	6.8	-0.3
44	O	4- <i>i</i> Pr-Phenyl	6.7	7.1	-0.4
45	O	4-Pr-Phenyl	7.0	7.2	-0.2
46	O	2-MeO-Phenyl	6.2	5.7	0.5
47	O	3-MeO-Phenyl	6.4	6.2	0.2
48	O	4-MeO-Phenyl	5.9	6.0	-0.1
49	O	3,4-(MeO) ₂ -Phenyl	<5		
50	O	4-NMe ₂ -Phenyl	<5		
51	O	4-NO ₂ -Phenyl	6.7	6.5	0.2
52	S	Ethyl	6.6	6.6	0.0
53	S	Butyl	7.0	7.4	-0.4
54	S	Hexyl	7.9	8.0	-0.1
55	S	Heptyl	8.4	8.2	0.2
56	S	Octyl	8.7	8.4	0.3
57	S	Nonyl	8.5	8.5	0.0
58	S	Decyl	8.3	8.5	-0.2
59	S	Phenyl	7.0	6.9	0.1

obs.; 実際の活性値 (測定値) (pI_{50})

calc.; 回帰式より計算される予測値 (pI_{50})

ΔpI_{50} ; obs.- calc.

このようにして得られた式(3)から、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の構造と活性の関係は以下のように要約できる。

1. 活性発現にはアミド基側鎖の疎水性が重要な要因であり、 π の二乗項が有意であることから、その疎水性には最適値が存在する。なお、式(3)から求められる π の最適値は6.6であり、Kakkis[26]、清水[27]らにより報告されているHill反応阻害剤の疎水性の最適値とよく一致する。
2. アミド基の置換基としてフェニル基およびフェニルアルキル基の導入は活性を低下させる。
3. アミド体よりチオアミド体の活性が高い。

一方、活性発現にアミド基側鎖の電子的効果が影響しない理由は、フロログルシノール核の高度に非局在化した電子状態に比較して、アミド基側鎖の電子的効果は微小なためと考えられる。いいかえれば、フロログルシノール母核の電子状態は、結合部位との親和性において重要であるが、相対的に微小な側鎖部の種々の置換基による電子的変化は、この母核の電子状態に殆ど影響しないためと考えられる。

本解析により得られた式(3)の相関係数と標準偏差は、当式が3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の活性を十分に説明しているものと考えられるが、式(3)による阻害活性の計算値と実測値が95%信頼限界から大きくはずれる化合物が存在する。

例えば、表1-6に示すように*N*-ブチル体、*N*-シクロヘキシル体、*N*-ペンタデシル体、*N*-(3,5-ジクロロ)および*N*-(2,3-ジクロロフェニル)体の阻害活性の実測値は計算値よりもかなり低く、逆に、*N*-(4-フェニルブチル)体や*N*-(4-トリフルオロメチルフェニル)体、*N*-(2-メトキシフェニル)体の実測値は計算値よりも2~3倍高い。特に、実測値が計算値を大きく上回る化合物は、他の化合物と比べて活性部位とより高い親和性を持つため高活性を示すと考えられることか

ら、活性部位の高次構造を考察する上で重要な化合物である。例えば前項でも述べたように、*N*-フェニルアルキルアミド体では、アミド窒素原子とベンゼン環の間のアルキレン鎖の伸長に伴って阻害活性は一旦低下し、その後上昇した(図1-13)。即ち、*N*-フェネチル体は*N*-ベンジル体より低活性であったが、*N*-フェニルプロピル体、*N*-フェニルブチル体は高活性を示した。このような疎水性では説明できない活性変動のため、特に*N*-フェニルブチル体では計算値と実測値が大きくずれているのであろう。

表1-6 QSAR回帰式3では回帰できない化合物群

R	ΔpI_{50}	R	ΔpI_{50}
	-0.5		+0.6
	-0.6		+0.6
	-0.5		+0.5
	-0.9		
	-0.9		
	-0.6		

$\Delta pI_{50} = pI_{50}(\text{Obs.}) - pI_{50}(\text{Calc.})$

先に述べたように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の母核部においては電子的な結合要求性が存在する。またそのアミド基側鎖は、受容部位の疎水性領域と相互作用している。その疎水性領域はベンゼン環のような立体的に嵩高い構造を受け入れることができるが、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のアミド窒素原子から3~5炭素結合隔たった部位でおそらく立体的に狭くなっており、ベンゼン環のような嵩高い置換基を受け入れにくくなっているものと推定される(図1-18)。このことは、この立体的制約を考慮した阻害剤分子設計の重要性を示している。

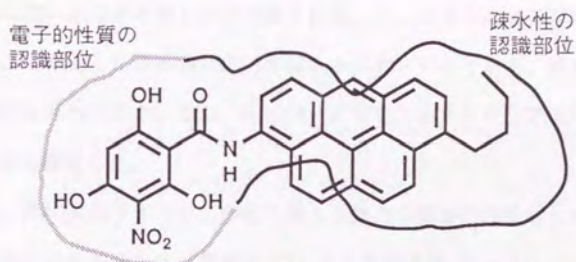


図1-18 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド類の結合部位仮想図

3) QSAR解析結果に基づく阻害剤の分子設計

3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のアミド窒素原子から3~5炭素結合離れた位置に存在する立体的制約を回避した化合物として、4-フェノキシアニリド体を検討した。これは図1-19に示すように、疎水性領域の狭い部分が丁度二つのベンゼン環の間に入るため、立体的制約を受けないものと考えられたからである。

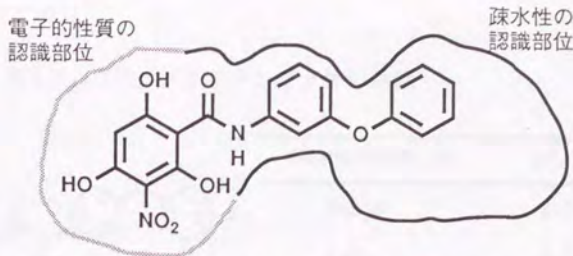


図1-19 フェノキシアニリド体の結合仮想図

また、これまでに検討したアニリド体では、疎水性置換基の導入により活性が上昇する傾向であったが、アニリン部分の疎水性置換基数 π は総て最適値(6.6)よりかなり小さいものばかりであった。従って、より疎水性の高い置換基を導入したアニリド体は高い活性を示すものと予想される。フェノキシル基の疎水性置換基数は、これまで検討した置換基に比べてはるかに大きいことから、疎水性の上昇による活性増大も期待できる。なお、4-(4-クロロフェノキシ)アニリド体も合成し、阻害活性を検定した。

その結果、表1-7に示すように、両化合物とも強力な阻害活性を示した。また、これらの化合物の示した活性は、回帰式(3)による計算値(4-フェノキシアニリド体=7.4、4-(4-クロロフェノキシ)アニリド体=7.6)を約4倍と大きく上回り、これらの化合物が疎水性だけでは説明できない結合部位との高い親和性を持つことが示唆された。なお、4-(4-クロロフェノキシ)アニリド体が4-フェノキシアニリド体より若干高い活性を示しているのは、塩素原子の導入に伴う疎水性の上昇によるものと考えられる。また、4-フェノキシアニリド体に較べるとベンゼン環の相対的位置が若干異なる*N*-フェノキシフェノキシエチル体も高活性を示した。以上の結果はすべて、前述のような受容部位の立体的制約についてのモデルを肯定するものである(図1-20)。

表1-7 フェノキシアニリド体の活性

Compound (X)	pI ₅₀
None	8.0
4-Cl	8.1
Ph-O-Ph-O-Et-NH	8.3

*N-(フェノキシフェノキシ)エチル体

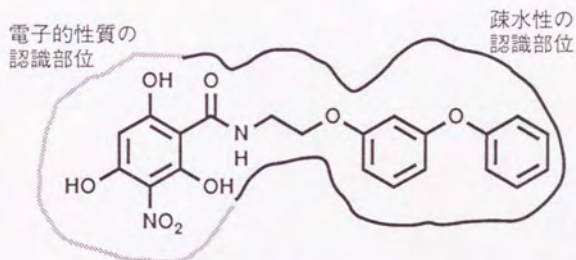
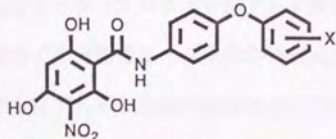


図1-20 フェノキシフェノキシエチル体の結合仮想図

1-4 まとめ

本章では高いPET阻害活性を目標に、種々の3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体を合成し、その活性を検定し、またこれらの活性について定量的な構造活性相関解析を行った。

まず合成法については、多種の類縁体を調製するための効率的な合成法を見だし、この方法を用いて多種多様な置換基を有する3-ニトロフロログルシンカルボン

酸誘導体の合成に成功した。合成した化合物のなかにはDCMUの20~30倍の活性を示す強力なPET阻害剤が存在し、合成ターゲットとして選定した3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の有効性を示した。また、種々の置換基を有する3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体を用いて、定量的構造活性相関解析を行い、そのアミド置換基の疎水性が活性発現に重要であることを示した。さらにQSAR解析からはずれる化合物の活性情報をもとに、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の結合部位近傍の立体的及び電子的要求性について考察を加えた。またこの考察に基づき、高活性が期待される新規な誘導体を設計・合成し、これらが予想したとおり高い活性を有することを確認した。

第2章 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の光合成電子伝達 阻害様式の解析

前章では、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の結合部位との相互作用について、化合物の物理化学的性質と阻害活性の相関の解析をもとに迫った。しかし、本化合物の詳細な作用性やその作用部位を明かにするためには、生化学的側面からの解析が必要不可欠である。そこで本章ではその作用性について検討した結果と、それをもとにしたより詳細な阻害様式の考察について述べる。

前章でも述べたように光合成阻害型除草剤は、その化学構造により、いくつかのグループに分けられる。例えば図2-1に示したアイオキシニルやジノセブに代表されるフェノール型化合物や、ジウロン、フェニユロンに代表されるウレア型、アトラジンやシマジンなどに代表されるシンメトリックトリアジン型化合物などである。

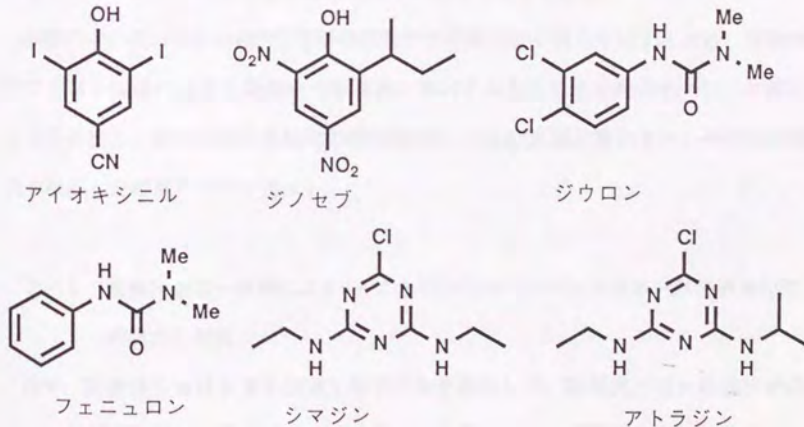


図2-1 光合成阻害型除草剤

これらの阻害剤は、生理・生化学的な作用性の違いから、フェノール型阻害剤とウレア／トリアジン型阻害剤とに分類されることが多い[33, 34]。例えば、トリブシン処理を施したチラコイド電子伝達の薬剤感受性は、ウレア／トリアジン型阻害剤に対しては低下するが、フェノール型阻害剤に対しては逆に上昇する[35]。また通常のチラコイドを用いたHill反応試験において、フェノール型阻害剤は、薬剤を加えてから阻害活性が一定の値になるまでに数分程度の遅延時間を必要とする[36]。

ところで、強力なPET阻害活性を有する3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体は、フェノール類似のフロログルシノールを母核を持ち、PET阻害における構造要求性も、Trebstらの提出しているフェノール型阻害剤の構造要求性[9]と良く対応しているが、ウレア／トリアジン型阻害剤の特徴的な構造要素であるアミド基も含んでいる。さらに、これらの誘導体のアミド基窒素原子上の水素をメチル基で置換すると顕著な活性低下が認められることは、ウレア／トリアジン型阻害剤の性質[27]と一致している。つまりこれらの新しい阻害剤はその化学構造的に、フェノール型およびウレア／トリアジン型阻害剤の両方の特徴を有している。

本章では、この新しいPET阻害剤の作用性や作用部位を明らかにするため、葉緑体中での電子伝達の過程を動的かつ物理的に解析する方法である熱発光グロー曲線による解析法と、除草剤抵抗性植物の葉緑体を用いたHill反応試験により、その作用様式を検討した結果について述べる。

2-1 熱発光グロー曲線による3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の阻害様式の解析

近年、葉緑体における電子伝達を解析する手段として、熱発光グロー曲線法が発達し、阻害剤研究への応用が進みつつある。熱発光とは、光照射をうけた葉緑体を瞬間的に液体窒素温度まで冷却した後、徐々に加温して行くと発光が観察される現

象であり、1957年Arnold, Sherwoodらによって発見されたが[37]、その機構は以下のように説明されている[38]。

光合成の明反応は一種の酸化還元反応であり、葉緑体中のアンテナクロロフィルによって捕捉された光エネルギーによって、水から電子を引き抜き酸素を発生する酸化反応と、引き抜いた電子をNADP⁺に渡しNADPH⁺を発生する還元反応が共役している系である。これらの反応はそれぞれ特定の受容体を通して進行する。例えば、酸素発生系ではJoliot[39]、Kok[40]らによって提唱された酸素発生系における電子供与体Sを、また引き抜かれた電子は光化学系IIの電子受容側に存在する2種類の特殊なプラストキノン (Q_A, Q_B) [41, 42]などの電子受容体を通して最終的にはNADP⁺に伝達される。

さて、光照射後直ちに葉緑体を極低温に急冷すれば、動的な分離状態にあるこれらの電子受容体が凍結し安定化される。この葉緑体を徐々に加熱して行くと、凍結されていた電子受容体上の電荷が移動を開始し、その一部が再結合することにより発光が起こる。解凍に伴う電荷の移動は、それぞれの電子受容体の安定化状態に固有な温度で急激に活発になるので、特定の温度領域で発光強度が高まる現象が観察される。このような発光を試料温度の関数としてプロットした曲線を熱発光グロー曲線という。図2-2に示すようにこの熱発光グロー曲線は照射と冷却の手順によって大きく影響を受けるが、一般に、-160°C、-80~-20°C、-10°C、+25°C、+45°Cおよび+55°C付近に計6個の発光ピークが観察される。これらの発光ピークのうち光合成反応に由来するのは、-10°Cおよび+25°C、+45°Cの、それぞれA、B₁、B₂と呼ばれるバンドである。また、照射光に閃光を用いた場合、1回の閃光によって観察されるピークはB₂バンドのみである。この発光は酸素発生系における電子供与体Sの酸化型S₂またはS₃と、光化学系IIの電子受容側に存在するQ_A、Q_Bのうち、二次電子受容体Q_Bが電子還元されたQ_B⁻との再結合に由来するものと考えられている[43, 44]。ここに、光

化学系IIの電子受容側を阻害する薬剤を添加すると、より低温側に発光するバンドに変化する。これはQバンドと呼ばれており、 Q_A から Q_B への電子伝達が阻害されたために、一電子受容体 Q_A の一電子還元型の Q_A が S_2 または S_3 との再結合によって発光するものと考えられている[43, 45]。

阻害様式が確立されているDCMU（ウレア型阻害剤）、アトラジン（トリアジン型阻害剤）、アイオキシニル（フェノール型阻害剤）を添加した時の熱発光は、図2-3に示すようにQバンドとして現われるが、その発光温度は異なっており、それぞれ、 $+6\sim+8^\circ\text{C}$ 、 $+2\sim+4^\circ\text{C}$ 、 $-10\sim-7^\circ\text{C}$ にピークが現われる[46, 47]。これは、これらの三種の阻害剤がいずれも系II内の電子伝達の同じ段階（ Q_A から Q_B への電子伝達）を阻害するにも拘わらず、阻害様式（結合部位）が微妙に異なっていることによる。従って、新規な阻害剤のQバンドの発光温度を測定することによって、その阻害剤がどのタイプに属するかを決定することが可能である。

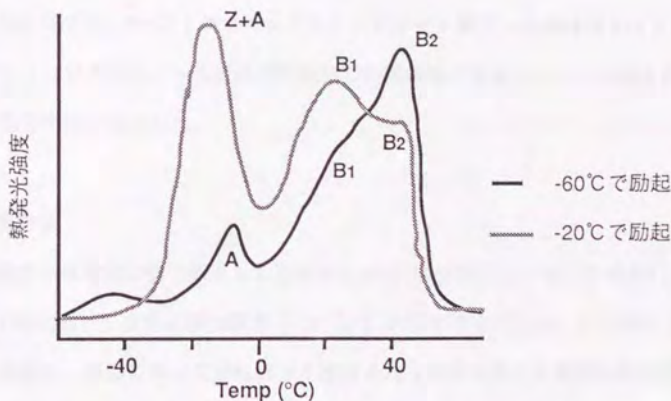


図2-2 熱発光グローカーブとその励起温度依存性 [38]

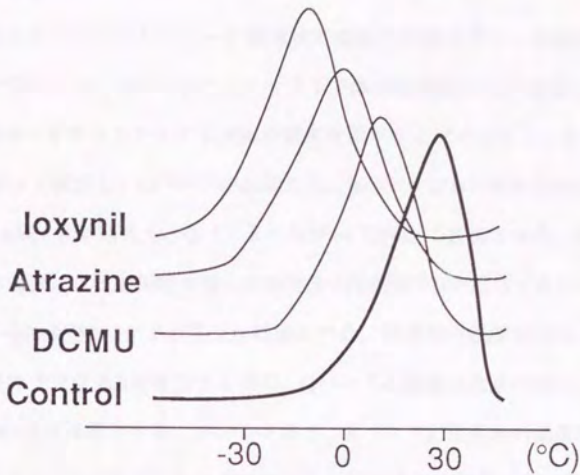


図2-3 各種PET阻害剤存在下の熱発光グロー曲線

そこで本研究では、3-ニトロフロログシカルボン酸アミド誘導体をはじめとする種々のフロログシノール誘導体で処理した葉緑体の熱発光グロー曲線を測定し、その阻害様式を解析した。

1) 測定方法

種々の濃度の被験化合物で処理した葉緑体を -20°C に冷却したのち、半値幅 $5\ \mu\text{sec}$ の閃光を1回照射し、直ちに液体窒素(-196°C)温度まで冷却した。この試料を $0.8^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ で昇温し、昇温に伴って葉緑体より放出される微弱な発光を光電子像倍管を備えた検出器で検出した。これを温度の関数としてプロットし熱発光グロー曲線を得た。

2) 結果と考察

供試した総てのフロログルシノール誘導体で類似の熱発光グロー曲線が得られたので、その一例として、*N*-オクチルチオアミド体の熱発光グロー曲線を図2-4に示す。添加する*N*-オクチルチオアミド体の濃度を徐々に上げていくと、Bバンドの強度がそれに従って減少し、Qバンドが出現した。Bバンドは*N*-オクチルチオアミド体の濃度が3 μ M付近で消失し、Qバンドのみが+4 $^{\circ}$ C付近に観測された。即ち、阻害剤が低濃度の場合には阻害剤結合型と非結合型の光化学系IIが混在するため、それぞれに由来するQおよびBバンドの発光が観測される。阻害剤の濃度が高まるにつれて阻害剤結合型の光化学系IIが増加するので、Qバンドの強度は次第に増大し、その分だけBバンドの強度は低下する。いかえると、Bバンドが阻害剤の濃度増加に対応して低温シフトしてQバンドになるのではなく、阻害された割合に応じてQバンドの強度が増するのである。阻害剤添加時のこのような熱発光グロー曲線の変化は、供試したフロログルシノール型阻害剤に共通して認められたことから、これらの阻害様式はいわゆる"all-or-none"型であることが判明した。また、そのQバンドピーク温度を表2-1に示す。

5位に核置換基のないニトロフロロフェノン誘導体(1)では、Qバンドがウレア/トリアジン型阻害剤の発光温度に近い+4 $^{\circ}$ Cに現われるが、5位にプロピル基を有するニトロフロロフェノン誘導体(2)ではフェノール型阻害剤の発光温度に近い-10 $^{\circ}$ Cに観測された。一方、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体(3~7)は、いずれもウレア/トリアジン型阻害剤と類似の発光温度を示した。

3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体を始めとするフロログルシノール型光合成電子伝達系阻害剤の構造要求性は、フェノール型阻害剤の構造要求性のモデルに良く対応しており、フェノール型阻害剤と類似した阻害様式を持つものと考えられていた。

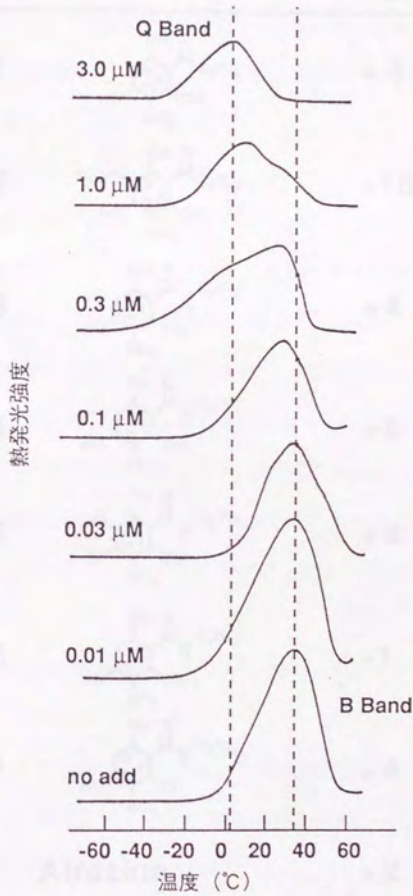
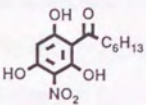
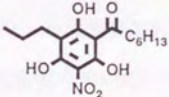
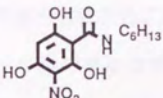
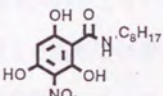
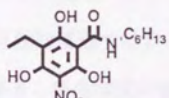
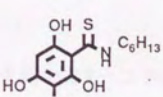
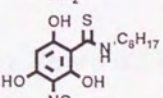


図2-4 種々の濃度のN-オクチルチオアミド誘導体共存下の熱発光グロー曲線

表2-1 各種フロログルシノール誘導体による
熱発光グロー曲線Qバンドピーク温度

No.	Structure	Q band peak temp(°C)
1		+4
2		-10
3		+4
4		+6
5		+4
6		-1
7		+4
	Atrazine	+2
	DCMU	+6
	loxynil	-7

しかし、熱発光グローブ曲線によれば、典型的なフェノール型阻害剤であるアイオキシニル（発光温度 -7℃）に近い発光温度を持つ化合物は、母核にプロピル基を有するニトロフロロフェノン誘導体（2）（発光温度 -10℃）のみであった。他のフロログルシノール誘導体の示した発光温度はいずれも -1~+7℃ の範囲であり、これらの化合物はフェノール型阻害剤ではなく、むしろアトラジン（+2℃）やDCMU（+6℃）と類似の阻害様式を持つことが示唆された。

最近、Oettmeierらは、フェノール型阻害剤の一種であるアイオキシニル類縁体のフォトアフィニティーラベル化合物を用いて、フェノール型阻害剤もD1タンパク質のウレア／トリアジン型阻害剤の結合部位近傍に結合することを明らかにしている[48]。

Trebstらの提唱したフェノール型の構造要求性をもつ3-ニトロフロログルシノールカルボン酸アミド誘導体が、D1タンパク質中のウレア型阻害剤およびフェノール型阻害剤の両結合部位に完全に嵌まり込むとは考えにくい、両方の結合部位に対して親和性を有するために高活性を発現するものと推定される。しかし、熱発光グローブ曲線による解析は、現状の温度分解能では2~3℃の微妙な変化を検出するのは困難であり、前述以上の詳細な構造と結合様式の関係の考察は不可能である。

2-2 除草剤抵抗性植物を用いた3-ニトロフロログルシノールカルボン酸誘導体の阻害様式の解析

トリアジン系除草剤、特にアトラジンは、主要穀物のトウモロコシに対して高い安全性を示すことから、最も広範に且つ大量に使用されて来た除草剤の一つである。しかし、長年に及ぶ同系の薬剤の使用の結果として、ノボロギク (*Senecio vulgaris*) [49]、アオビユ (*Amaranthus retroflexus*) [50]、シロザ (*Chenopodium album*) [51]を始めとする多数のトリアジン系除草剤抵抗性雑草が出現した。これらの抵抗性雑草における薬剤の代謝や吸収／移行性には感受性種との差は認められないが[52, 53]、

単離した葉緑体の電子伝達系はトリアジン系除草剤に非感受性である[54, 55]。より詳細な検討の結果、これらの除草剤抵抗性雑草では、葉緑体の光化学系IIの反応中心を構成するタンパク質の一つである32kDのタンパク質（D1タンパク質）にアミノ酸変異の起きていることが明らかとなった[56, 57]。その後、高濃度の阻害剤や変異原性物質の存在下で緑藻類などを培養し、除草剤抵抗性変異植物を作出することにより、そのD1タンパク質のアミノ酸変異と抵抗性発現の関係も調べられている。

表2-2に示したように、除草剤抵抗性植物のD1タンパク質のアミノ酸変異部位は、いずれも、アジドアトラジン (^{214}Met) [58]やアジドモニユロン (^{237}Tyr , ^{254}Tyr) [59]が結合するアミノ酸残基の近傍である。また、光合成細菌ではトリアジン系除草剤の一種であるターブトリン (2-*tert*-butylamino-4-ethylamino-6-methylthio-1,3,5-triazine) が反応中心に結合した状態でX線結晶回折が行われており、Lサブユニットの ^{223}Ser あるいは ^{224}Ile と水素結合していることが示されている[60]。この結合部位は、D1タンパク質では ^{264}Ser あるいは ^{269}Asn に相当するものと推定されており[34]、表中のアミノ酸変異の起きている場所は、まさにこの結合部位に対応する。またこれらの抵抗性変異体の葉緑体における電子伝達は、各種の阻害剤に対して異なった感受性（交差抵抗性）を示すことが知られている。一般に、アトラジン抵抗性植物の葉緑体における電子伝達は、トリアジン型阻害剤には高い抵抗性を示し、ウレア型阻害剤であるDCMUに対しても多少の抵抗性を示すが、フェノール型阻害剤には逆に感受性を示す[61]。また、その後作出されたDCMU耐性ラン藻では、トリアジン型阻害剤に対してはやや抵抗性を示すが、フェノール型阻害剤に対する感受性はやはり上昇することが知られている[62]。このように、除草剤抵抗性植物の葉緑体の電子伝達系は、トリアジン型、ウレア型、フェノール型阻害剤に対してそれぞれ異なった感受性を示すことから、ある阻害剤に対する交差抵抗性を解析することにより、その阻害剤のタイプ分けが可能である。

表2-2 代表的な除草剤抵抗性植物とそのD1タンパク質アミノ酸変異部位

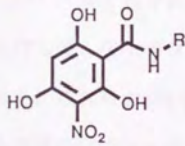
Resistant plant	Mutation point	Ref.
<i>Amaranthus hybridus</i>	²⁶⁴ Ser-Gly	[56, 57]
<i>Solanum nigrum</i>	²⁶⁴ Ser-Gly	[63]
<i>Clamydomonas reinhardtii</i> (DCMU4)	²⁶⁴ Ser-Ala	[64]
(Dr2)	²¹⁹ Val-Ile	[65, 66]
(Ar207)	²⁵⁵ Phe-Tyr	[65, 66]
(MZ2)	²⁵¹ Ala-Val	[67, 68, 69]
cyanobacterium <i>Anacystis nidulans</i> R2	²⁶⁴ Ser-Gly	[70, 71]

1) 検定に用いた除草剤抵抗性植物と検定方法

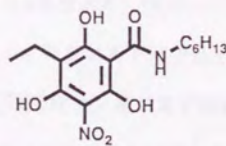
そこで本研究では、京都大学細胞実験センター佐藤文彦助教授ならびにヘブライ大学Hirschberg教授らの協力を得て、アトラジン抵抗性アブラナ、アトラジン抵抗性タバコ光独立栄養（photoautotrophic, PA）培養細胞、アトラジン抵抗性およびDCMU抵抗性ラン藻のチラコイドを用いて、Hill反応試験により3-ニトロフロログルシソナルカルボン酸誘導体の、これらの植物に対する交差抵抗性を検討した。検討に用いた各植物と、そのD1タンパク質中のアミノ酸変異を表2-3に示す。また交差抵抗性（R/S値）は、抵抗性植物（resistant biotype）に対するHill反応阻害活性（ IC_{50} 値；50%阻害濃度）を、対応する感受性（野生）種（susceptible, wild type）に対するHill反応阻害活性（ IC_{50} 値）によって除算して算出した。また、本検定に用いた3-ニトロフロログルシソナルカルボン酸誘導体、フロログルシノール誘導体を図2-5に示す。

表2-3 本研究に用いた除草剤耐性植物とそのD1タンパク質アミノ酸変異部位

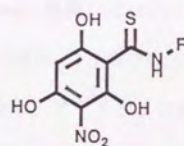
Resistant plant	Mutation point	Herbicide	Ref.
1) <i>Brassica napus</i>	²⁶⁴ Ser-Gly	Atrazine	[72]
2) Tobacco PA	²⁶⁴ Ser-Thr	Atrazine	[73]
3) Cyanobacterium Di22	²⁵⁵ Phe-Leu ²⁶⁴ Ser-Ala	DCMU	[62,74]
4) Cyanobacterium Di1	²⁶⁴ Ser-Ala	DCMU, Atrazine	[62,74]



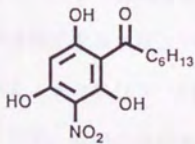
- 1: R=C₆H₁₃
 2: R=C₇H₁₅
 3: R=C₈H₁₇



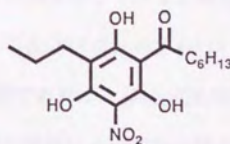
4



- 5: R=C₆H₁₃
 6: R=C₇H₁₅
 7: R=C₈H₁₇



8



9

図2-5 本検定に用いた化合物 (結果は表2-4参照)

2) 結果と考察

実験に用いた抵抗性植物の標準的な阻害剤に対するR/S比は、例えば、アトラジン抵抗性の*Brassica napus* ($^{264}\text{Ser-Gly}$ 変異) [72]では、アトラジンに対して1450倍、DCMU、アイオキシニルに対してそれぞれ2.9倍、0.5倍であった。佐藤らによって作出されたアトラジン抵抗性のタバコPA細胞 ($^{264}\text{Ser-Thr}$ 変異) [73]では、アトラジン457倍に対し、DCMU、アイオキシニルではそれぞれ24倍、0.9倍であった。即ち、これらのアトラジン抵抗性植物の電子伝達系は、ウレア型阻害剤であるDCMUにはわずかに抵抗性を示すが、フェノール型阻害剤であるアイオキシニルに対しては逆に感受性を示した。一方、Hirschbergらによって作出された2種のDCMU抵抗性ラン藻 [62, 74]の光合成電子伝達系におけるR/S比は、Di22株 ($^{255}\text{Phe-Leu}, ^{264}\text{Ser-Ala}$ 変異)ではDCMUに対して1093倍の抵抗性比を示したのに対し、アトラジン、アイオキシニルに対してはそれぞれ1.7倍、0.9倍であり、Di1株 ($^{264}\text{Ser-Ala}$ 変異)ではDCMUの565倍に対して、アトラジン、アイオキシニルではそれぞれ129倍、1.1倍であった。すなわち、これらの2種のDCMU抵抗性ラン藻の電子伝達系は、アトラジンに対してはある程度の抵抗性を示すが、アイオキシニルに対してはほとんど抵抗性を示さないか (Di22株)、逆に感受性を示した (Di1株)。このように、本実験で供試した除草剤抵抗性植物の光合成電子伝達系は、フェノール、トリアジン、およびウレア型阻害剤に対して明確な感受性差異を有している。特に、被験化合物がフェノール型の阻害様式であれば、いずれの変異株においても1以下 (Di1株では1前後) のR/S比を与え、トリアジン、ウレア型であれば、1以上のR/S比を与える筈である。

そこで、前項の熱発光グローブ曲線によって阻害様式を検討したフロログルシノール誘導体を中心として、その抵抗性比について検討を行ったところ、表2-4に示すようにいずれの化合物においても、またいずれの除草剤抵抗性植物においても抵抗性比は、フェノール型化合物と類似であることを示唆する1以下の値を示した。

表2-4 各種除草剤抵抗性植物のフロログルシノール誘導体に対する抵抗性比

Resistant plant	Bra.*	Tob.*	Di22*	Di1*
**Compound	R/S			
1	0.1	0.1	0.3	0.3
2	0.6	0.1	0.4	0.3
3	0.4	0.1	0.4	0.4
4	0.1	0.1	0.2	0.8
5	0.2	0.4	0.6	0.7
6	0.7	0.6	1.0	0.4
7	0.3	0.3	0.3	0.1
8	0.2	0.1	0.1	0.5
9	0.2	0.2	0.9	0.8
DCMU	2.9	24.0	1093.0	565.0
Atrazine	1453.0	457.0	1.7	129.0
Ioxynil	0.5	0.9	0.9	1.1

*各種植物は表2-3,**化合物は図2-5参照

即ち本解析によれば、これらのフロログルシノール誘導体は、典型的なフェノール型化合物の阻害様式を有することが示唆された。

2-3 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の阻害様式の考察

前2節で述べたように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の阻害様式について解析したところ、熱発光グローブ曲線による解析ではこれらがウレア/トリアジン型、除草剤抵抗性植物に対する交差抵抗性の解析ではこれらがフェノール型の阻害様式を示す結果が得られた。この両方法による解析結果が互いに整合しない理由については、次の二つの可能性が考えられる。

第一には、どちらの解析法においても既存阻害剤については詳しく調べられているが、新規な化合物については十分なデータが蓄積されていないためである。この

ような例は他のPET阻害剤においても示されている。たとえばPhillipsらは、シアノアクリレート誘導体（図2-6）は、熱発光法ではDCMU類似の発光ピークを示すが[75]、アトラジン抵抗性アブラナを用いたHill反応試験では、置換基の種類によって、ウレア型あるいはフェノール型の挙動を示すことを報告している[72]。

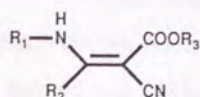


図2-6 シアノアクリレート誘導体

第二には、熱発光法が、阻害剤の物理化学的結合状態をエネルギー状態として反映するのに対して、Hill反応阻害活性は、結合部位への結合強度を反映すると考えられるため、両解析における阻害剤の結合の意味が異なるためである。即ち前者は、阻害剤結合部位における阻害剤の結合の強弱に無関係に、結合による電子伝達阻害のエネルギー状態の変化を観測していると考えられる。一方後者は、結合部位における阻害剤の結合の強弱そのものを直接的に反映している有効な検定系と考えられるが、変異した阻害剤結合部位に結合しないタイプの阻害剤では（例えばアトラジン抵抗性植物に対するフェノール型阻害剤の結合）、その交差抵抗性の示す意味は、結合に関する直接的情報を含まないため曖昧である。本章において採用したこれらの阻害剤の結合様式解析法は、このようにまだ完全なものとはいえないが、ここで行ったように多くの新規阻害剤の解析に用いていくなかで、阻害剤の性質を明かにしていくと共に、その信頼性も増していくことであろう。

いずれにしても、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体に代表されるフロログルシノール系阻害剤は、現在までに知られている他の阻害剤とはその作用性が微妙に異なるものであることが示唆された。

2-4 光合成反応中心の分子構造と3-ニトロフロログルシニカルボン酸誘導体の結合様相に関する考察

高等植物の光合成明反応機構については、つい最近まで不明な点が多かった。しかし近年、分子生物学を中心とする生命科学の発展により、光合成の明反応系を構成するチラコイド膜上の機能タンパク質や電子担体などに関する多くの知見が蓄積され、図2-7に示すようにその詳細が明らかにされた。特に、光合成の初期過程を司る光化学系（photosystem: PS）IIについては、最小構成単位としてのタンパク質複合体の単離なども行われ[3]、このタンパク質複合体への各種阻害剤の結合様式なども説明されつつある。

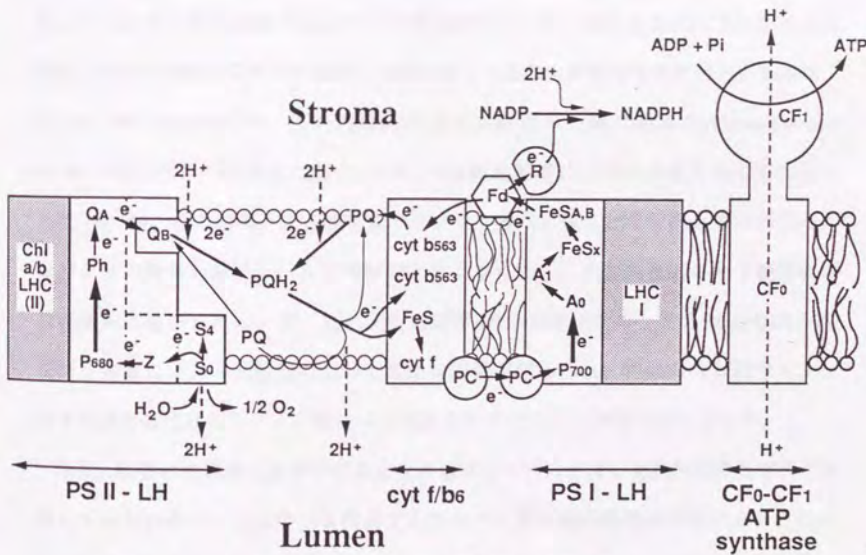


図2-7 光合成明反応の反応中心の模式図 [1]

—————▶ 電子の流れ
 - - - - -▶ H⁺の流れ

植物のPSII反応中心を構成するタンパク質のうちD1タンパク質(32kD)は、光合成電子伝達系阻害剤と特異的に結合することが、アジドアトラジンを用いたフォトアフィニティーラベル実験により明かにされた[76]。また前述したようにD1タンパク質の特定の部位にアミノ酸変異が起こると、光合成電子伝達阻害剤に対する耐性が発現することも判明している。

一方、単純ではあるが高等植物の光合成反応中心と相同性の高い機構を有する光合成細菌の光合成反応中心については、さらに詳細な研究が進んでいる[77]。例えば、紅色光合成細菌の反応中心における最初の安定な電子受容体はキノン(Q_A)であり、このキノンは2価の非ヘム鉄と共役して電子を別のキノン(Q_B)へ伝達することや、内部に固定されているフェオフィチンの役目などが分子生理学的に解析されている。従って、紅色光合成細菌の反応中心の構造解析により、高等植物のPS II反応中心の機能と構造を理解するための重要な情報が得られることが期待されていた。実際に、Michel、Deisenhoferらは、代表的な紅色光合成細菌の一種である*Rhodospseudomonas viridis*の反応中心の結晶化に成功し[78]、X線結晶解析によりその高次構造を決定した[2, 60, 79]。その結果、光合成色素やキノン、非ヘム鉄などの配置とその周囲のタンパク質の関係を分子レベルで理解できるようになり、光合成反応の分子機構解明は画期的に進歩した。一方、紅色光合成細菌のL、MサブユニットとPS IIのD1、D2タンパク質には、一次構造において高い相同性が認められ、特に非ヘム鉄やキノンなどの結合部位は同じアミノ酸により構成されていることが明らかとなった。

現在、植物の光合成反応中心は結晶化に成功しているが[3]、X線結晶構造解析が完結していないので、反応中心を構成するタンパク質の高次構造は不明である。しかし、阻害剤結合部位を含むD1タンパク質の高次構造の推定には、前述のように多くの類似点を持つ紅色光合成細菌の反応中心の構造に関するデータを利用することができる。Trebstらは、これらの知見をもとに、D1タンパク質の折り畳みを図2-8に示

すように予想している[34]。さらに彼らは、MichelらがX線結晶解析により明らかにした*R.viridis*の反応中心における α -フェナントロリンとタープトリンの結合部位に関する結果[60]をもとに、フェノール型阻害剤は非ヘム鉄に配位しているHis (L-190, D1-215)に結合し、ウレア/トリアジン型阻害剤はSer (L-223, D1-264)に結合すると推定し、これら二つのタイプの阻害剤で認められるトリス処理や反応応答性の差を説明している[34]。同時に、D1タンパク質上のこの二つのアミノ酸残基 (^{215}His と ^{264}Ser)は、Michelらの*R.viridis*の反応中心の結晶化の過程で抜け落ちたと考えられている Q_B の結合部位であるとし、図2-9のようにその結合部位を予想している[34]。

一方、種々の阻害剤のフォトアフィニティーラベル化誘導体を用いた実験により、トリアジン型阻害剤であるアトラジンのアジド誘導体は ^{214}Met と ^{215}His から ^{225}Arg の間の一つのアミノ酸に結合し[58]、ウレア型阻害剤であるモニュロンのアジド誘導体は ^{237}Tyr と ^{274}Tyr に結合することが示された[59]。一方、フェノール型阻害剤は、アジド化アイオキシニルが ^{249}Val に結合することや[48]、フェノール型阻害剤抵抗性ラン藻のD1タンパク質においては、 ^{266}Asn に変異があることが示された[80, 81]。図2-10にこれら現在までに示された、フォトアフィニティーラベルによってラベルされるアミノ酸、ならびに除草剤抵抗性植物において変異しているアミノ酸を示す。Oettmeierらは、これらの結果をもとにD1タンパク質の高次構造に関して考察し、 ^{249}Val と ^{215}His が立体的に近接している可能性を示唆している[48]。

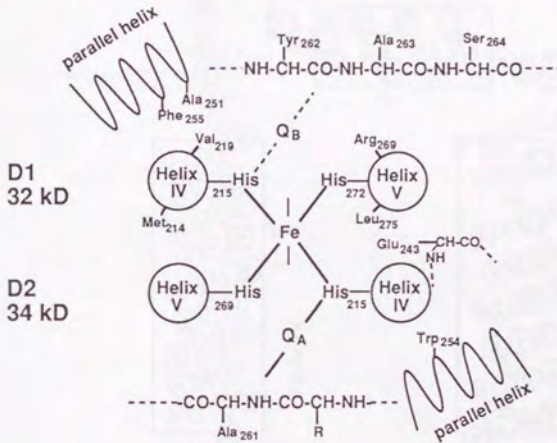


図2-9 植物光合成反応中心タンパク質複合体におけるQAおよびQBの結合部位予想図 (Trebstら[34])

QAの結合部位: *R. viridis* の反応中心における結合部位(X線解析により決定)を直接対応する植物タンパク質(D2)中のアミノ酸にあてはめたもの

QBの結合部位: *R. viridis* における競争阻害剤(*o*-phenanthroline, terbutryn)の結合をもとにその結合部位を推定しこれを対応する植物タンパク質(D1)中のアミノ酸にあてはめたもの(QBは*R. viridis* 結晶中では抜け落ちる)

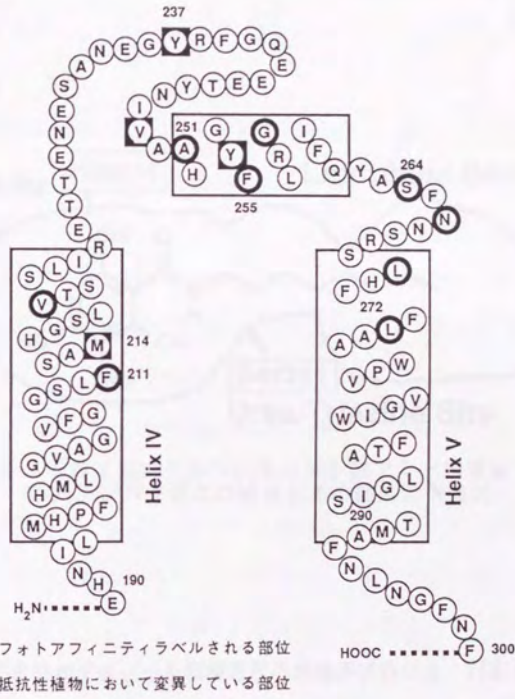


図2-10 D1タンパク質においてフォトアフィニティラベルによりラベルされるアミノ酸と除草剤抵抗性植物において変異が見られるアミノ酸 (Oettmeierら[48])

1) 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のD1タンパク質における結合部位の推定

以上のような知見を総合すると、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のD1タンパク質における結合部位を、図2-11のように推定することができる。

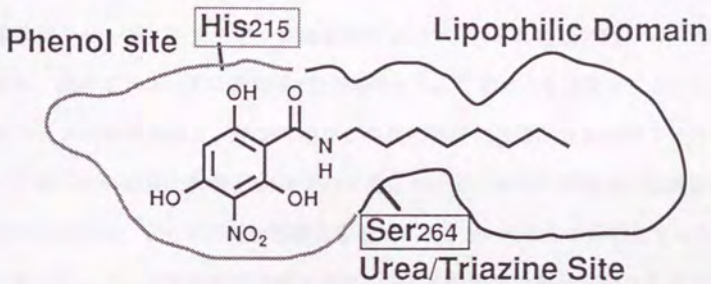


図2-11 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のD1タンパク質との結合とその部位の予想図

本化合物の構造要求性がフェノール型阻害剤の構造要求性に良く対応していることから、結合部位もやはりフェノール型阻害剤と類似であるものと予想される。即ちTrebstらの推定するように、先ず²¹⁵Hisに配位するのであろう。一方、本化合物が熱発光グローブ曲線解析においてウレア／トリアジン型阻害剤の発光温度ピークを示したこと。また、アミド基窒素原子上の水素のアルキル化に伴う活性低下もウレア／トリアジン型阻害剤の構造要求性に当て嵌まることから、本化合物のアミド部分はウレア／トリアジン型阻害剤結合部位である²⁶⁴Serの近傍に位置することが推定され

る。また、アミド基側鎖の方向にはQSAR解析からも示唆された広い疎水性領域が存在するが、フェニルアルキルアミド誘導体の活性を考慮すると、その疎水性領域はアミド構造の近傍（2~3炭素結合長付近）で幾分狭くなっているものと考えられる。

2) ウレア構造を有する3-ニトロフロログルシンカルボン酸エステル誘導体のPET阻害活性

これまでの検討で明かとなったように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体は、ウレア/トリアジン型阻害剤およびフェノール型阻害剤の両方の特徴を有する、極めてユニークな新規PET阻害剤である。このような性質は、これらが構造的にフェノール性母核と、ウレア類などの活性発現に必須とされるアミド結合を有し、これらの官能基の配置がD1タンパク質におけるこれらの官能基の認識部位に適合しているため、どちらの結合部位にも近づきうるということを示唆している。

そこで、フェノール型阻害剤の結合部位に対して親和性の高いフロログルシノール核と、ウレア/トリアジン型阻害剤結合部位に対して親和性の高いアミド基の間の隔たりを最適化することにより、フェノール型阻害剤結合部位およびウレア/トリアジン型阻害剤結合部位の両方にうまく嵌まり込む、高活性化合物が得られる可能性が高い。また逆に、フェノール型阻害剤結合部位とウレア/トリアジン型阻害剤結合部位の相対的な位置関係を推定することも可能である。

以上のような観点から、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のフロログルシノール核から、ある程度の距離を隔ててアミド基を有する化合物の合成を検討することにした。このような条件を満足する化合物としては種々の誘導体が考えられるが、本研究ではウレア誘導体を検討することにした。その理由は、ウレア型阻害剤では活性発現に疎水性置換基が必要であり、この点は3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体と類似の構造要求性であることが挙げられる。また、

トリアジン骨格と比較すると、ウレア骨格を導入するほうが高活性を期待できること（アトラジンのHill反応阻害活性はDCMUの1/5程度であり、ウレア型阻害剤ではDCMUを凌ぐ高活性化合物[28]も知られているが、報告されているトリアジン型阻害剤の活性は最高のものでDCMU程度である[27]）も挙げられる。

フロログルシノール核とウレア構造を含んだ側鎖を3-ニトロフロログルシノール炭酸アミド誘導体の様にアミド基により連結した場合は、アミド基がウレア型阻害剤結合部位に親和性を持つため、ウレア構造の影響を検討しにくいと考えられる。活性発現には、Trebstらの提唱したフェノール型阻害剤の置換基要求性（第1章、図1-3）を満たすことも必要であり、また、実際の合成の容易さも考慮すると、エステル結合により母核と側鎖を連結するのが適当であると考えられる。前章でも述べたが、3-ニトロフロログルシノール炭酸エステル誘導体は、その側鎖の伸張に伴う活性上昇の傾向がアミド誘導体と同様であり、アミド誘導体と類似の阻害様式を持つものと推定される。しかも、3-ニトロフロログルシノール炭酸エステル誘導体は対応するアミド誘導体より低活性であり、ウレア型阻害剤結合部位に対するエステル部分の親和性はそれほど高くないものと考えられる。従って、ウレア型阻害剤結合部位とフェノール型阻害剤結合部位に対して、同一分子内の別々の部分構造が相互作用するためには、エステル側鎖に、疎水性置換基を持つウレア構造がある距離を隔てて結合している化合物が最適である。そこで、このような化合物を合成し、その阻害活性を検討した。

i) 合成方法と活性検定方法

ウレア構造を有するエステル類は、前章で述べたアルキル置換基を持つエステル類と同様の方法により合成した。即ち、図2-12に示すようにまず適当な鎖長を持つアミノアルコールと各種イソシアヌ酸エステルを非水溶媒中で反応させ末端にアル

コールを有する種々のウレアを合成し、これをTHF中3-ニトロフロログルシカルボン酸とDCCを用いて縮合させることにより目的とするエステル誘導体を調製した。ウレア部の置換基は、代表的なウレア型阻害剤であるDCMUの疎水性部分構造であ3,4-ジクロロフェニル基を中心に合成した。また、ウレア構造とエステル間の距離は2~4炭素結合長とし、DCMUなどとの構造類似性を考慮し、アルキルエステル側のアミド基窒素原子上の水素をメチル化した化合物やクロロ置換基を持たないフェニルウレア化合物も合成した。またこれらの化合物のPET阻害活性の検定には、ホウレンソウの破碎葉緑体におけるHill反応阻害試験（第1章と同様）を用いた。

ii) 結果と考察

ウレア部分のみ、即ち、 ω -ヒドロキシアルキルウレア類では、*N*-メチル基を有する化合物（化合物3のウレア部分）に弱い阻害活性（ $pI_{50}=5.8$ ）が認められたのみで、他の化合物はいずれも阻害活性を示さなかった（ $pI_{50}<4.0$ ）。このように、ウレア構造の二つの窒素原子の内、フェニル基置換されていない窒素原子上の水素がメチル化された化合物が高活性を示すことは、DCMUなどのフェニルウレア誘導体で一般に確認されている[82]。即ち、これらの ω -ヒドロキシアルキルウレア類は、低活性ではあるが、基本的にはDCMUなどのウレア型阻害剤と同様に作用することが示唆される。

側鎖にウレア構造を有する3-ニトロフロログルシカルボン酸エステル誘導体は、表2-5に示したように、前章で述べたアルキルおよびフェニルアルキル側鎖をもつエステル誘導体と同等以上の阻害活性を示した。また、その活性は、ウレア部分の置換基、ウレア部分とエステルとの間のメチレンの数によって大きく変動した。

アルキルおよびフェニルアルキル側鎖をもつエステル誘導体ではアミド誘導体と同様に、側鎖の疎水性が活性に最も重要である事が示唆されていた。しかし、アル

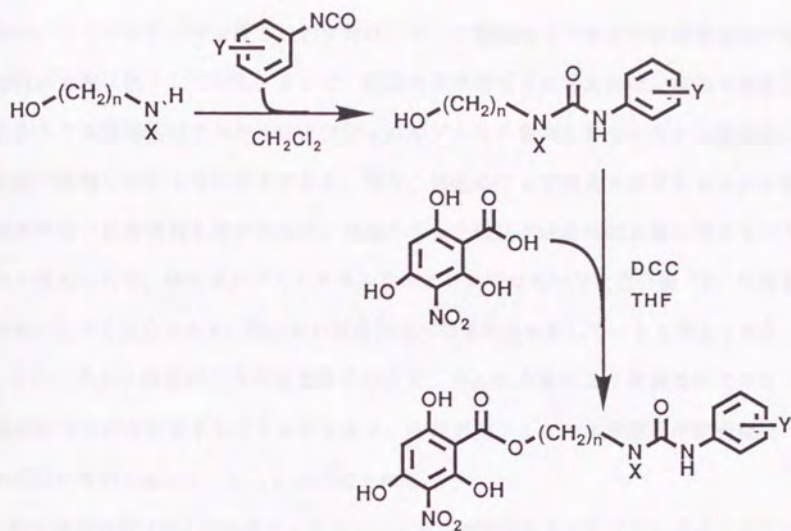
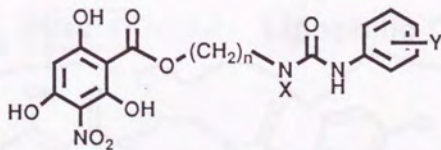


図2-12 ウレア側鎖を持つエステル誘導体の合成

表2-5 ウレア側鎖をもつエステル誘導体のPET阻害活性



Compound	n	X	Y	pl ₅₀
1	2	H	None	5.7
2	2	H	3,4-Cl ₂	7.7
3	2	Me	3,4-Cl ₂	6.8
4	3	H	3,4-Cl ₂	6.4
5	4	H	3,4-Cl ₂	6.6

キル、フェニルアルキル基と比較すれば、ウレア構造をもつ本化合物側鎖全体の疎水性は全般に低下している。そこで、側鎖の疎水性だけを考えれば、本節で検討したエステル誘導体はアルキルおよびフェニルアルキル側鎖をもつエステル誘導体より低い活性しか示さないはずである。即ち、側鎖にウレア構造を有するエステル誘導体が高い阻害活性を示す理由は、側鎖のウレア構造が結合部位と親和性をもつためと考えられる。特にウレアとエステルをエチレンでつないでた化合物(2)の活性は他に比べて強力であり、特に高い結合部位への親和性を有していると考えられる。

また、ウレア構造の二つの窒素原子のうち、フェニル基により置換されていない窒素原子上の水素原子をメチル化すると、活性が低下しこの水素原子が結合部位への配位に有利に働いていることが示唆された。

即ち当化合物は図2-13に示すようにフェノール部位ばかりでなくウレア/トリアジン類結合部位とされる²⁶⁴Serにもより強く作用するため他の化合物より高活性を示していると考えられる。

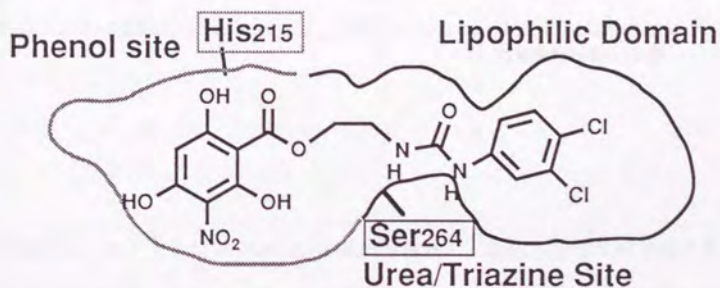
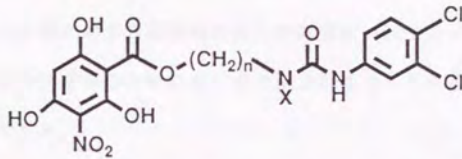


図2-13 ウレア側鎖を持つエステル体のD1タンパク質との結合とその部位の予想図

iii) 除草剤抵抗性植物を用いた作用性の検討

またこれらの化合物の作用性を除草剤抵抗性植物をもちいて検討した。その結果表2-6に示すように、いずれの誘導体ともフェノール型阻害様式であることを示す1.0前後の交差抵抗性を示した。

表2-6 ウレア側鎖を持つ3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸エステル誘導体の除草剤抵抗性植物に対する交差活性



Resistant plant			Bra.*	Di22*	Tob.*
Compound	n	X	R/S		
1	2	H	1.2	0.8	1.0
2	2	Me	0.4	0.3	2.5
3	3	H	1.0	0.1	0.1
4	4	H	0.7	0.3	0.4

*各種植物は表2-3参照

本実験で用いたアトラジンやDCMUの抵抗性植物は、抵抗性を示す除草剤の結合部位アミノ酸が変異したため、これらの除草剤と結合不能となり結果的に高い交差抵抗性を示す。すなわち、これらのウレア側鎖をもつ3-ニトロフロログルシカルボン酸エステル誘導体が、本実験でアトラジンやDCMU的な挙動を示さずフェノール型の挙動をしたことは、本化合物がウレア/トリアジン結合部位に結合していない

いではなく、本化合物にアルキルアミド誘導体やアルキルエステル誘導体と同じくフェノール部位との強い結合が存在していることを示すものと考えられる。

本研究で検討した側鎖にウレア構造を有するフロログルシノール誘導体が、ウレア／トリアジン型阻害剤結合部位とフェノール型阻害剤結合部位の両方に作用していることを証明する直接的証拠は得られていない。また、既存阻害剤の性質を検討することで発展し、本章でも用いたこれらの2つの新しい除草剤作用性に関する解析も、先に述べたとおり、新規化合物の性質を詳細に検討するためには十分に有効な方法とは言えない。しかしこのような現状において、本研究で行ったように阻害剤結合部位タンパク質に対する阻害剤の結合を考慮にいれて分子デザインを行うことは、高活性な化合物を得るためにも、また結合部位タンパク質の高次構造の解明のためにも重要である。

本章でのアプローチはまだ不完全なものであるが、このようなアプローチを続けることが今後とも必要である。

2-5 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の植物に対する作用

前節までの検討から、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は*in vitro*において強力なPET阻害活性を示すことが明らかとなった。この活性が*in vivo*でどのように発現されるかということは応用的に非常に興味深い。そこで本節では、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の除草活性の検定を行った。生物活性試験としては、簡便な*in vivo*モデル検定系としてのモヤシマメ幼胚軸試験、および光合成阻害型除草剤に感受性の高いタバコ光半独立栄養培養 (photomixotrophic: PM) 細胞試験ならびに畑、水田状態における除草活性を検定するための温室内ポット試験を行った。このうち、前2者の試験法は、簡便な方法であるため除草剤スクリーニング法としての有効性の検討も兼ねて行った。なお本実験においては直鎖のN-アルキル側鎖を有す

るアミドおよびチオアミド誘導体を用いた。また本節中の写真については、アミド誘導体をPNO-X、チオアミド誘導体をPNS-X (X:アルキル鎖長) と記した。

1) モヤシマメ幼胚軸に対する3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の作用

i) 活性検定方法

発芽後1週間程度のモヤシマメ幼胚軸を、種々の濃度の3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の水溶液で栽培し、モヤシマメの状態を観察した。

ii) 結果と考察

写真2-1~2-3に示すように、*N*-エチル体 (PNO-2)、*N*-ブチル体 (PNO-4, PNS-4) など、*N*-アルキル側鎖の短い化合物を100 ppm以上含む溶液中で栽培すると、栽培開始後1日目よりモヤシマメが枯れ始めた。これらのモヤシマメには葉全体が焼ける様な症状が認められた。一般に光合成阻害型除草剤は、殺草活性を発現するのに処理後数日を必要とし、また処理植物に認められる症状も、葉の白化を伴うものとされていることから、これらの殺草機構は光合成阻害ではない可能性が示唆された。また*in vitro*では強力なPET阻害活性を示した*N*-アルキル側鎖の長い化合物群 (例えばPNO-6, PNS-9) は、300 ppmという高濃度でも目立った活性を示さなかった。

3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体のHill反応阻害におけるQSAR解析の結果得られた π の最適値は6.6であったが、*N*-メチルアミド体 (PNO-1) のLog Pの実測値 (-0.24) からLog Pの加成性に基づいて計算すると、そのHill反応阻害の最適Log Pは5.8となる。このLog Pの値は岩村らにより報告されている典型的なPET阻害剤であるアニリド誘導体やシメトリートリアジン等のHill反応阻害におけるLog Pの最適値 (6程度) と良く一致している[24]。



写真2-1 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のモヤシマメ幼胚軸に対する影響(処理後1日目)



写真2-2 3-ニトロフロログルシンカルボン酸チオアミド誘導体のモヤシマメ幼胚軸に対する影響(処理後1日目)

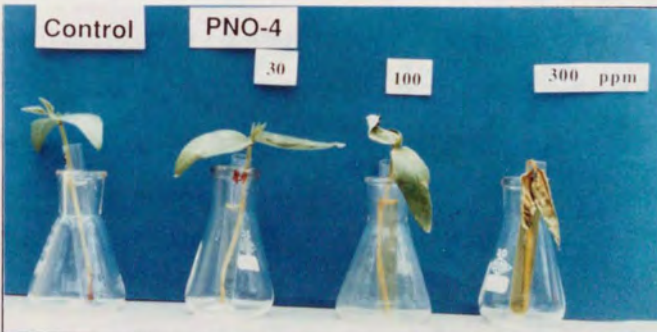


写真2-3 PNO-4のモヤシマメ幼胚軸に対する影響の濃度依存性(処理後3日目)

しかし、既存の光合成阻害型除草剤のLog Pの平均値は2.5であることから[26]、強力な *in vitro* Hill反応阻害活性をもつ3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体が *in vivo*において顕著な殺草活性を示さないのは、疎水性が高すぎるために生体膜を透過しにくく、作用発現の場である葉緑体中のチラコイド膜まで到達していないことなどが考えられる。

一方、短いN-アルキル側鎖を持つ化合物のモヤシマメ幼胚軸に対する殺草活性は、光合成阻害以外の活性に基づくものと考えられる。本研究のリード化合物であるグランジノールは、元々発芽阻害活性物質として単離構造決定されたものであり[5]、その後合成された他のフロログシノール誘導体の発芽阻害活性についても検討されている[11,83,84]。これらのフロログシノール誘導体の発芽阻害活性では、母核上の電子吸引性置換基（アシル基）のアルキル側鎖がブチル基以上の場合、活性が顕著に低下することが報告されている。

iii) 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の発芽阻害活性

そこでクレス種子を用いて3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体、チオアミド誘導体の発芽阻害活性を検討した。その結果両化合物ともほぼ同様な傾向で発芽阻害活性が認められた（図2-14、図にはチオアミド誘導体の活性を示した）。発芽阻害活性はHill反応阻害とは対照的に、N-アルキル側鎖がC₇以下の場合に強く、C₈以上では極端に低下した。このような3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の発芽阻害活性とN-アルキル側鎖長の関係は、モヤシマメ幼胚軸に対する殺草活性の場合と類似している。即ち、短いN-アルキル側鎖を有する3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の殺草活性は、光合成生理とは無関係の発芽生理を阻害する活性と同様な作用機作によるものである可能性が推察される。これらの活性はさほど強力なものではないのでこれ以上の追求は行わなかったが、考えられる共

通の作用機作としては、フェノール型化合物に認められるとされている、ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系に対する脱共役活性[85]が考えられる。

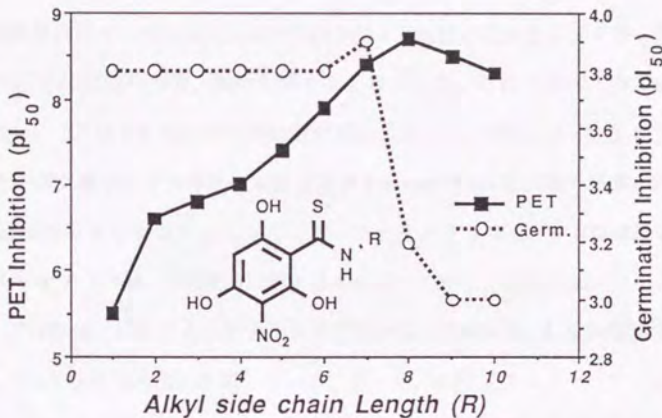


図2-14 3-ニトロフロログルシカルボン酸チオアミド誘導体のPET阻害活性と発芽阻害活性

2) タバコ光半独立栄養 (PM) 細胞に対する3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の作用

i) 検定に用いた培養細胞と検定方法

佐藤らによって分離されたタバコ光半独立栄養 (photomixotrophic: PM) 培養細胞を被験化合物を含む培地で培養し、細胞の変化を観察、その重量の変化を測定して、被験化合物のタバコPM細胞に対する作用性を検定した。本タバコPM細胞は、既存除草剤に対して除草活性と相関の高い反応を示す性質を有することが報告されているものである[86, 87]。

ii) 結果と考察

図2-15および写真2-4~2-8に結果を示す。この検定の結果からも明らかなように、*N*-ブチルアミド体 (PNO-4) および *N*-ブチルチオアミド体 (PNS-4) は 10^4 M、*N*-オクチルアミド体 (PNO-8) および *N*-ノニルチオアミド体 (PNS-9) は 10^5 M の高濃度処理区では対照薬剤に用いたDCMUよりも強い殺細胞活性を示したが、低濃度処理区では細胞の形態、数に影響を与えなかった。これに比べてDCMUを処理した区では、 10^6 Mでも明らかに細胞数が減少している。即ち、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体は本検定系でも *in vitro* Hill反応試験の結果に対応するほどの活性は示さなかった。しかし、*N*-オクチルアミド体 (PNO-8) および *N*-ノニルチオアミド体 (PNS-9) がそれぞれ *N*-アルキル側鎖の短い *N*-ブチルアミド体 (PNO-4) および *N*-ブチルチオアミド体 (PNS-4) より高活性であったことは、Hill反応阻害活性と相関している。従って、本検定系はモヤシマメ幼胚軸試験よりも明瞭に *in vitro* PET 阻害活性が反映される試験系であることが示唆された。

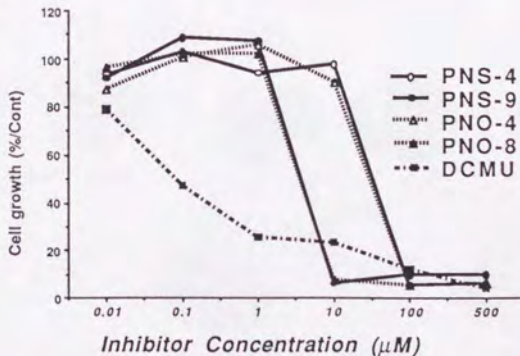


図2-15 タバコPM細胞生育に対する
3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の効果

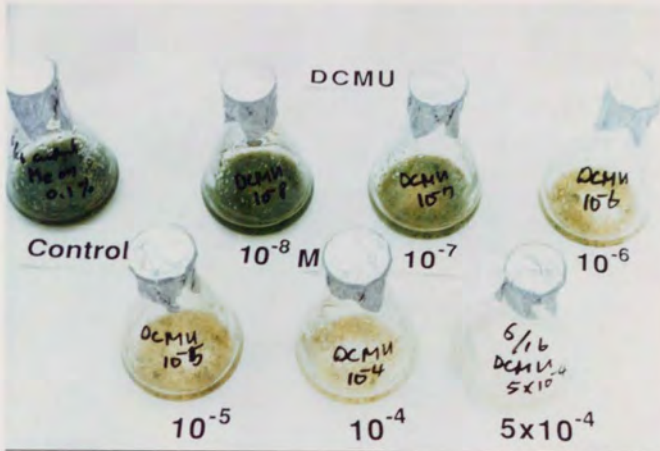


写真2-4 DCMU処理したタバコPM培養細胞の生育状態

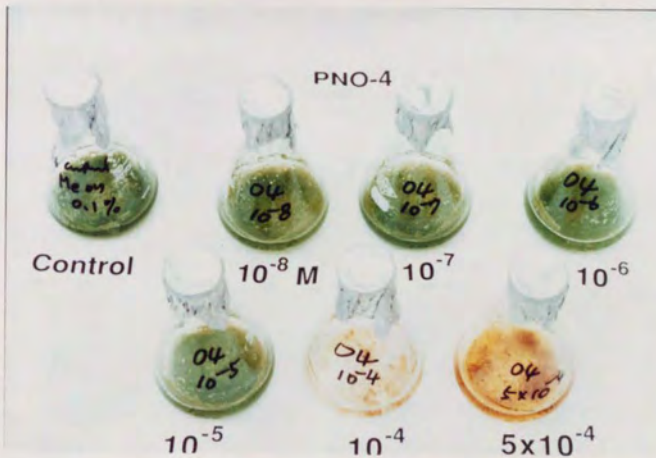


写真2-5 PNO-4 で処理したタバコPM培養細胞の生育状態

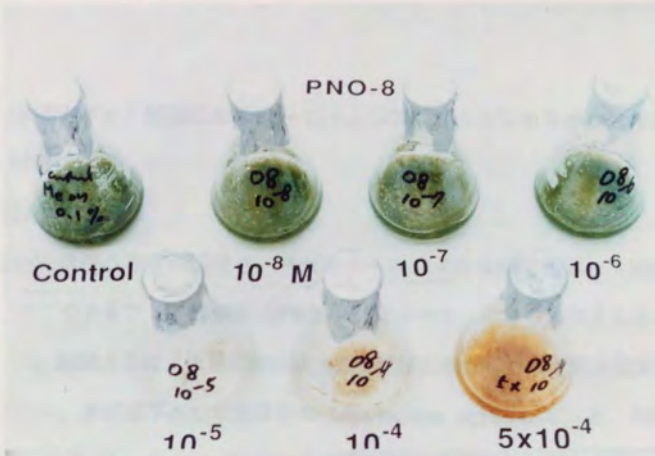


写真2-6
PNO-8

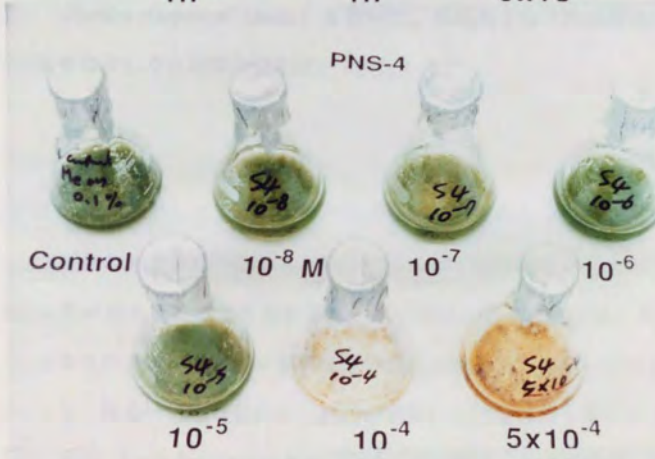


写真2-7
PNS-4

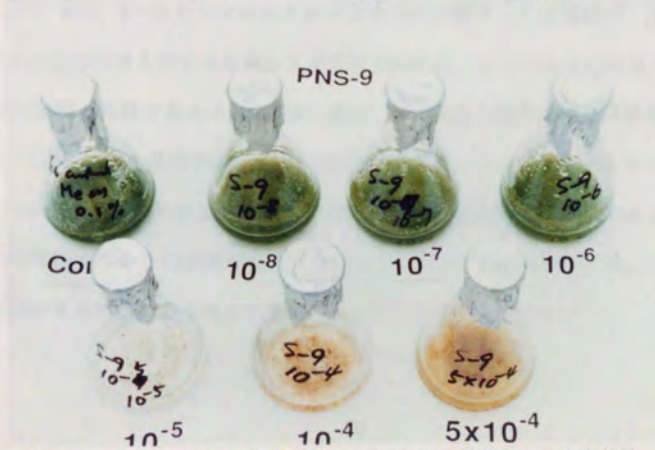


写真2-8
PNS-9

写真2-6,7,8 PNO,PNS類で処理したタバコPM培養細胞の生育状態

3) 温室内ポット試験における3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の除草活性

i) 活性検定方法

一般的に現在の除草剤開発の一次スクリーニングでは温室内ポット試験が用いられる。そこでチオアミド誘導体 (PNS-X) について、この方法による除草活性検定を行った。試験方法は、水田状態の湛水処理試験と畑地状態の茎葉処理試験を用い、被験植物は、水田雑草として食用ビエ (*Echinochloa oryzicola* L.) を、畑雑草としてはイチビ (*Abutilon theophrasti* Medic.) を用いた。被験化合物の除草活性は完全枯殺を5、無害を0とした6段階評価を用いて検定した。

ii) 結果と考察

検定結果を表2-7に示した。先の二種の生理検定の結果からも予想されるとおり、試験したいずれのチオアミド体にも、本試験において既存除草剤に比べて特に顕著な有効性は見いだすことができなかった。その理由としては、前述したように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の膜透過性が悪いために作用点まで到達できないこと、あるいは植物体内で比較的短時間に分解されてしまうことなどが考えられる。また、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が、*in vitro* では強力なPET阻害活性を示すにも拘わらず殺草活性をほとんど示さない理由としては、全く別の解釈も可能であろう。Trebstは最近、PET阻害と除草活性とは直接関連しておらず、D1タンパク質の代謝回転の阻害が除草活性となって現われるという仮説を提唱している[88]。この仮説によれば、PET阻害活性物質の中には、D1タンパク質の代謝回転を阻害しない化合物が存在可能であり、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体がそれに当て嵌まるかも知れない。

表2-7 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の除草活性

plant compound	conc. (%)	Echinochloa Abtuilon	
		herbicidal activity	
PNS-1	1	3	3
	0.3	1	1
	0.1	0	0
PNS-2	1	3	3
	0.3	0	1
	0.1	0	
PNS-4	1	2	1
	0.3	0	1
	0.1	0	0
PNS-6	1	0	3
	0.3	0	1
	0.1	0	0
PNS-8	1	0	1
	0.3	0	0
	0.1	0	0
PNS-10	1	0	3
	0.3	0	1
	0.1	0	0
Atrazine	1	5	5
	0.3	5	5
	0.1	5	4

2-6 まとめ

本章では、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体のPET阻害の様式を、熱発光グロー曲線解析と、除草剤抵抗性植物由来の葉緑体を用いたPET阻害試験により詳細に検討した。これらの解析の結果は、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体が、フェノール性PET阻害剤特有の傾向を示すと共に、ウレア/トリアジン型PET阻害剤の性質を持つことを示唆した。この結果と、現在までに明かとなっている光合成電子伝達系反応中心の分子構造に関する知見をもとに、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の光合成電子伝達系反応中心における結合部位に関する考察を行った。また、このような阻害様式をさらに強調する新規な化合物として、ウレア構造を有する3-ニトロフロログルシカルボン酸エステル体を設計・合成しその活性を検討した。その結果、この化合物群も予想したとおり強力なPET阻害活性を発揮することを確認した。本研究で用いたような生物学的実験結果とその考察を阻害剤設計に積極的に役立てていく手法は、今後ますます重要になっていくであろう。

以上の他に、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体の*in vivo*レベルの活性についても検討を加えた。現在までに検討した範囲では、3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体は*in vivo*においては顕著な活性を示さなかった。その原因についての明確な結論を得るには至っていない。この問題は、今後3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体のPET阻害に関する研究をより深めていくうえの重要な課題のひとつとなるであろう。

第3章 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の抗発癌プロモーター活性とアラキドン酸代謝系に対する作用

近年、ユーカリ属植物から種々の生理活性物質が単離されている。興味深いことに、これらの生理活性物質の多くはフロログルシノール誘導体と見なすことができる。例えばXuらは漢方薬として赤痢、マラリアやその他の微生物病の治療に用いられている *Eucalyptus robusta* の葉から、抗マラリア活性を有する robustadiol (図3-1) を単離構造決定している[89]。また中山らは、*Eucalyptus perriniana* の葉から、抗菌活性を持つ物質として本研究のリード化合物となったグランジノールそのものを単離している[7]。一方多田らは、やはりフロログルシノール構造を有する化合物に抗ヘルペスウイルス活性があることを報告している[90]。

以上のようなユーカリ属植物に含まれるフロログルシノール構造を有する生理活性物質の中でも、小塚らがニワトリ受精卵における抗炎症活性を指標として単離構造決定した euglobal 類 (図3-1) [91, 92] は、興味深い化合物群である。即ち、小塚らはまた、euglobal 類に抗発癌プロモーター活性が有することを、抗発癌プロモーター物質の一次スクリーニング法である Epstein-Barr Virus 早期抗原 (EBV- EA) 産生抑制試験を用いて明らかにしている[93, 94]。このことは、euglobal 類あるいは euglobal 類の構造類縁体の中から、有効な抗ガン剤の見いだされる可能性を示唆している。

後述するように、euglobal 類の抗発癌プロモーター活性が、euglobal 類に含まれるフロログルシノール構造に由来するものと考えられていることから、本章では、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の抗発癌プロモーター活性について述べる。

また本章では、抗発癌プロモーター活性に関連が深いと考えられている、アラキドン酸代謝系に対する3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の作用についても併せて検討した。

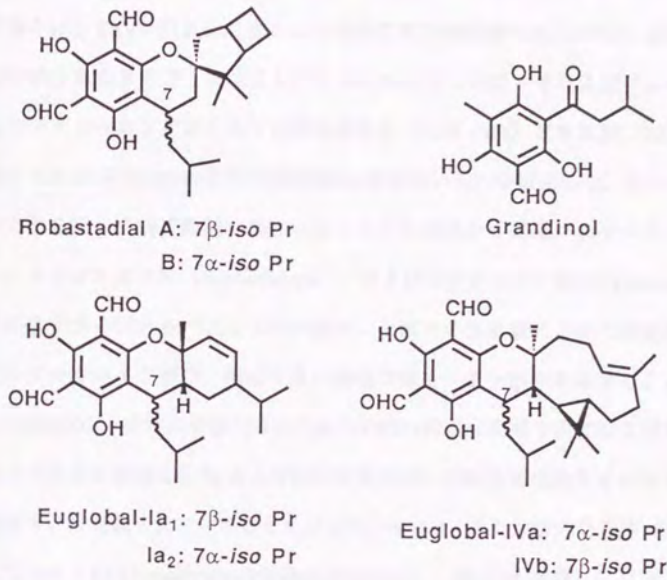


図3-1 ユーカリより単離された
フロログルシノール部分構造を有する生理活性物質

3-1 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体のEpstein Barrウイルス早期 抗原 (EBV-EA) 産生抑制活性

Epstein-Barrウイルス (EBV) は1964年、Epsteinらが中央アフリカの子供の頸部にできやすいバーキット・リンパ腫 (Burkitt's lymphoma: BL) 患者の培養細胞から発見したウイルスであり[95]、その後の研究から、本ウイルスはBLや中国広東地方に多い上咽頭癌 (Nasopharyngeal carcinoma: NPC) を惹き起こす発癌ウイルスであることが明かとなった[96]。一方、山本、H. zur Hausenらは、EBVを*in vitro*で活性化する多

く、物質が*in vivo*発癌実験で発癌プロモーター活性を示すことを報告した[97, 98]。伊藤らは、EBVが引き起こすこれらの悪性新生物疾患（BLとNPC）は特有の地理病学的分布を示すことに注目し、山本らの方法を発展させた発癌プロモーターの新しいスクリーニング法としてEBV早期抗原（EBV-EA）産生試験（EBVゲノムを内蔵するBL由来のEBV非産性培養細胞Raji株を用いる）を開発した。また、伊藤らはこの方法を用いて病因論的立場から広くヒト生活環中の発癌プロモーターの検索を行い、トウダイグサ科（*Euphorbiaceae*）、およびジンチョウゲ科（*Thymelaeceae*）の植物中に含まれるジテルペンエステル類や、土壤中の放線菌によって産生されるインドールアルカロイド類が、極めて高い発癌プロモーター活性を有することを明らかにした[99,100]。さらに伊藤らは、これらのEBV活性化物質を含有する植物種の出産地および分布を調査し、BLおよびNPC多発地域にEBV活性化物質を含有する植物が生育あるいは植栽されていることを示している[96]。また、強力な発癌プロモーターとしてTPA（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate）（図3-2）が既にクロトン油より単離されているが[101, 102]、クロトン油はトウダイグサ科の植物である巴豆（*Croton tiglium*の実）を圧搾して得られるものであり、この植物の分布もNPCの発病地域と良い相関を示すことが報告されている[96]。

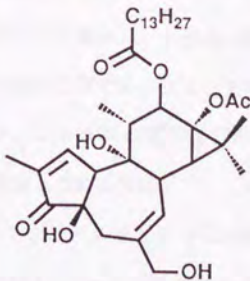


図3-2 TPA

一方岡本らは、EBV-EA産生試験を用いて、発癌プロモーターの作用するプロモーション段階を阻害する化合物の検索を行い、レチノイン酸などのマウス皮膚発癌二段階実験における効果的な発癌プロモーション阻害剤が、EBV-EA産生抑制試験においてTPAなどの発癌プロモーターの活性を抑制することを示した[103]。

即ち、EBV-EA産生抑制試験がマウス皮膚発癌二段階実験における抗発癌プロモーター検索のための優れた*in vitro*試験系であることを明らかにした。その後徳田らは精力的に本系を用いた発癌プロモーション阻害剤の研究を行い、種々の抗発癌プロモーター活性を有する物質を発見するとともに、本系がマウス皮膚発癌二段階試験などの*in vivo*での抗発癌プロモーター試験と相関の高い優れた*in vitro*試験系であることを示している[104, 105]。

前述したように、小塚らによってEBV-EA産生抑制活性が存在することが示されたeuglobalやrobustadiol (図3-1)などは、フロログルシノール類縁体と見なせるが、同時にテルペノイド構造部分を有し、そのテルペン部分がEBV-EA産生抑制活性発現に重要である可能性も考えられる。また、その構造は、代表的な抗菌性物質であるフラボノイド類縁体とも考えることもできる。そこで小塚らは、フラボノイド類のEBV-EA産生抑制活性に注目し、種々のフラボノイド類がEBV-EA産生抑制活性を示すことを見いだした[106]。一方euglobal類はそのテルペン部分だけでは活性を示さず、その示すEBV-EA産生抑制活性はフロログルシノール部分構造に由来することを明らかにした。実際にEBV-EA産生試験系において、グランジノールを含むフロログルシノール誘導体はフラボノイド類の示した活性を上回るばかりでなく、euglobal類よりも1オーダー以上高い抑制活性を示すことが明らかとなった[94]。以上の結果から小塚らは、euglobal類のEBV-EA産生抑制活性には、フロログルシノール部分構造が必須であること、またそのフロログルシノール核が二つ以上のホルミル、ケトン、ニトロ等の電子吸引性置換基により置換されている場合に高活性を示すものと推定している[94]。

グランジノールをリード化合物として発展してきたフロログルシノール型PET阻害剤の中でも、3-ニトロフロログルシノール誘導体は最も強力な阻害活性を示し、その構造活性相関についても本研究で詳細に検討してきた。また、予備的な試

験により3-ニトロフロログシカルボン酸誘導体のEBV-EA産生抑制活性が確認されたことから、3-ニトロフロログシカルボン酸誘導体のEBV-EA産生抑制活性の詳細な検討を行った。

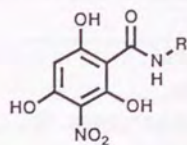
1) 活性検定方法

活性の検定には伊藤らの方法を用いた。即ち、EBVゲノムを含むRaji細胞を活性検定の材料として用いた。Raji細胞はTPAで処理すると、その早期抗原を産生する。ここに被験化合物を共存させると、被験化合物に抗発癌プロモーター活性が存在すれば、濃度依存的に早期抗原の産生が抑制される。産生する早期抗原の量をHelneらの間接蛍光抗体法[107]を用いて検出し、被験化合物無処理区に対する百分率を算出し、被験化合物のEBV-EA産生抑制活性を検定した。また、試料の一部をトリパンブルーで染色し（死細胞が染色される）、被験化合物の細胞毒性を検定した。検定はRaji細胞 1×10^6 個を20 ngのTPA（32 nM）で処理し、被験化合物はモル濃度でTPAの10～1000倍量添加した。細胞毒性は1000倍量添加区で検定し、特に強い毒性の見られた試料については、低濃度処理試料も用いて検定した。なお、細胞生存率が80%を越えるときは無毒性と判定した。

2) 結果

3-ニトロフロログシカルボン酸のアミド誘導体、チオアミド誘導体、エステル誘導体のEBV-EA産生抑制活性をそれぞれ、表3-1～3-5に示す。表には表記濃度の化合物で処理したときのEA産生率を、無処理区のEA産生率に対する百分率で示した。また括弧内にはこのときの細胞生存率を百分率で示した。

表3-1 N-アルキルアミド体のEBV-EA産生抑制活性



No.	Inhibitor Conc.	1000	500	100	10
		(mol ratio/32nM TPA)			
	R	EA production(%/Cont)		(viability %)	
1	Methyl	43 (70)	69	93	100
2	Ethyl	13 (80)	24	68	100
3	Propyl	8 (75)	20	67	95
4	Butyl	0 (75)	9	36	76
5	Hexyl	0 (10)	11 (70)	39	65
6	Octyl	0 (10)	0 (55)	23	56
7	Decyl	13 (55)	40 (50)	61	87
8	Undecyl	23 (65)	37	72	100
9	Tridecyl	0 (60)	0	29	95
10	Octadecyl	0 (60)	0	48.2	82.3

表3-1~3-5 EBV-EA 活性は無処理区に対するEA産生率 (%) で表示
括弧内は細胞生存率 (%) を示す

表3-2 N-フェニルアルキルアミド体のEBV-EA産生抑制活性

No.	Inhibitor Conc.	1000	100	10
		(mol ratio/32nM TPA)		
	R*	EA production(%/Cont)		(viability %)
11	Phenyl	0 (40)	71.4 (80)	100
12	Benzyl	0 (70)	64.3	100
13	Phenethyl	0 (60)	57.1	91.6
14	Phenylpropyl	0 (70)	31.8	92.8
15	Phenylbutyl	0 (30)	0 (70)	88
16	N-Me-Phenyl	48 (80)	52	78

*化合物の基本構造は表3-1参照

表3-3 各種置換アニリド体のEBV-EA産生抑制活性

No.	Inhibitor Conc.	1000		
		(mol ratio/32nM TPA)		
R*		EA production(%/Cont)	(viability %)	
17	2-Cl-Phenyl	0(20)	28.9(80)	100
18	3-Cl-Phenyl	0(20)	42.9(80)	92.3
19	4-Cl-Phenyl	0(20)	85.6(80)	100
20	2,3-Cl ₂ -Phenyl	0(60)	0	57
21	2,4-Cl ₂ -Phenyl	0(20)	47.9(80)	64.6
22	3,4-Cl ₂ -Phenyl	0(40)	36(80)	85.9
23	3,5-Cl ₂ -Phenyl	0(20)	89(80)	100
24	4-Br-Phenyl	0(20)	49.6(60)	100
25	2-F-Phenyl	0(50)	45.8	86.5
26	3-F-Phenyl	0(60)	58.5	100
27	4-F-Phenyl	0(60)	92.7	100
28	2-CF ₃ -Phenyl	0(20)	0(80)	100
29	3-CF ₃ -Phenyl	0(20)	91(80)	100
30	4-CF ₃ -Phenyl	0(40)	49.8(80)	100
31	2-Me-Phenyl	0(50)	73.3	95.5
32	3-Me-Phenyl	41(50)	100	100
33	4-Me-Phenyl	47(50)	69.4	100
34	2-OMe-Phenyl	0(60)	56.6	83.8
35	3-OMe-Phenyl	0(40)	53.7	100
36	4-OMe-Phenyl	52(60)	78.5	100
37	3,4-OMe ₂ -Phenyl	0(60)	36.8	100
38	4-Et-Phenyl	0(60)	28.2	100
39	4-nPro-Phenyl	42(50)	58.9	92.7
40	4-iPro-Phenyl	0(60)	41	86.9
41	4-NMe ₂ -Phenyl	0(50)	68.5	90.3
42	Phenoxy-Et	0(60)	21.5	93.9
43	4-Cl-Phenoxy-Et	0(50)	68.4	100
44	Phenoxyphenyl	33(60)	69.9	82.3
45	4-Cl-Phenoxyphenyl	47(60)	72.8	88.5
46	2,4-Cl ₂ -Phenoxyphenyl	54(70)	79	93.9
47	2,4,6-Cl ₃ -Phenoxyphenyl	68(50)	94.8	100

*化合物の基本構造は表3-1参照

表3-4 チオアミド誘導体のEBV-EA産生抑制活性

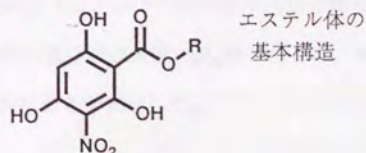
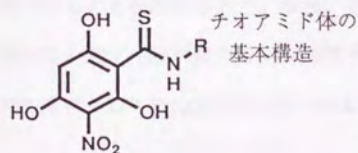
No.	Inhibitor Conc.	1000	500	100	10
R		EA production(%/Cont) (viability %)			
S1	Methyl	0 (65)	39	98	100
S2	Ethyl	0 (60)	0	69	100
S3	Butyl	0 (70)	0	52	100
S4	Hexyl	0 (60)	0	36	90
S5	Octyl	0 (50)	0	15	70
S6	Nonyl	0 (60)	0	27	63
S7	Decyl	0 (60)	0	59	88

基本構造は下図に示す

表3-5 エステル誘導体のEBV-EA産生抑制活性

No.	Inhibitor Conc.	1000	100	10	
					(mol ratio/32nM TPA)
R		EA production(%/Cont) (viability %)			
E1	Ethyl	0 (80)	37.5	87.5	
E2	Butyl	0 (80)	41.7	72.5	
E3	Hexyl	0 (40)	82.3 (70)	100	
E4	Octyl	0 (50)	30.8	65.0	
E5	Decyl	0 (60)	23.6	59.8	
E6	Dodecyl	0 (60)	0	64.1	
E7	Pentadecyl	0 (50)	56.3	88.5	
E8	Phenyl	0 (60)	83.3	100	
E9	Benzyl	0 (60)	0	38.7	
E10	Phenylpropyl	0 (60)	33.9	87.5	

基本構造は下図に示す



これらの化合物はTPAの1000倍から10倍（モル/モル）の範囲の投与によってTPAによるEBウイルスの発現を抑制した。代表的な抗発癌プロモーターであり、多くの抗発癌プロモーション実験系（*in vivo*, *in vitro*）において有効な活性を示すレチノールは、本試験系においてTPAの50倍～100倍（モル/モル）程度で早期抗原の産生を50%抑制（ IC_{50} ）することから[103]、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は有効なEBV-EA産生抑制物質であるといえる。

3) 考察

本研究で検討した3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は、その側鎖置換基の構造から、アミド体、チオアミド体、エステル体に大別される。またアミド体は、*N*-アルキルアミド体、置換アニリド体および*N*-フェニルアルキルアミド体の3つに分けられる。そこで、各系列別に構造と活性の関係を評価・考察する。

i) *N*-アルキルアミド誘導体

N-アルキルアミド体の活性は図3-3に示したように、側鎖の伸長に伴って上昇し、 C_9 アルキル付近で最高活性に達しその後活性が低下した。

一方、TPAの1000倍量においてはかなり強い細胞毒性が観測され、活性の上昇に伴って細胞毒性も増大する傾向を示した。しかし、EBV-EAの産生を50%抑制する濃度では80%以上の細胞が生存していることから、*N*-アルキルアミド体は若干の毒性を示すものの有効なEBV-EA産生抑制活性をもち、抗発癌プロモーターとして有望であることが示唆された。なお、本図のように、以下の図に示す各化合物の抑制活性は、EBV-EAの産生を50%抑制するモル濃度の逆対数、 pI_{50} 値で示した。また、細胞毒性はTPAの1000倍処理における細胞生存率で表示した。

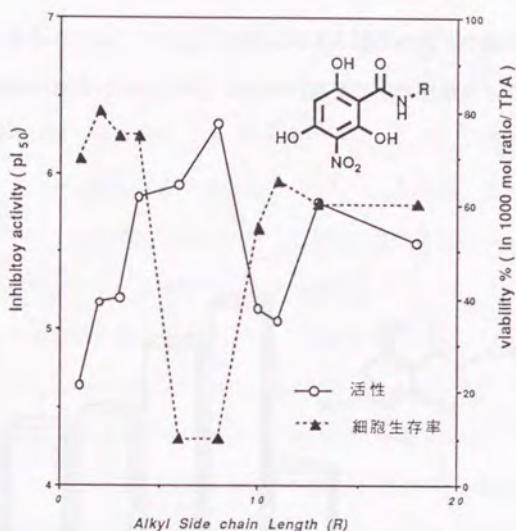


図3-3 N-アルキルアミド体の
EBV-EA産生抑制活性と細胞生存率

ii) N-フェニルアルキルアミド誘導体

N-フェニルアルキルアミド体 (図3-4) は、フェニル基をC₃~C₄のアルキル基と見なした場合、対応するN-アルキルアミド体より低活性であった。また、活性上昇に伴って細胞毒性も増大した。このことから、EBV-EA産生抑制においては、フェニル基の様な立体的に高い置換基のアミド基側鎖への導入は、活性を低下させるものと考えられる。

EBV-EA産生試験系は、生きた細胞に直接被験化合物を与える *in vivo* にかなり近い実験系であり、化合物の膜透過や移行性などの要因もEBV-EA産生抑制活性に影響を与えると考えられている。従って、N-フェニルアルキルアミド体の活性の傾向から、直ちに抑制剤の受容部位がこのような化合物を受け入れにくいと断定すること

はできない。しかしながら、フェニル基導入による活性の低下の傾向は、高活性な化合物の分子設計を行うにあたって、ひとつの重要な指針を示すものである。

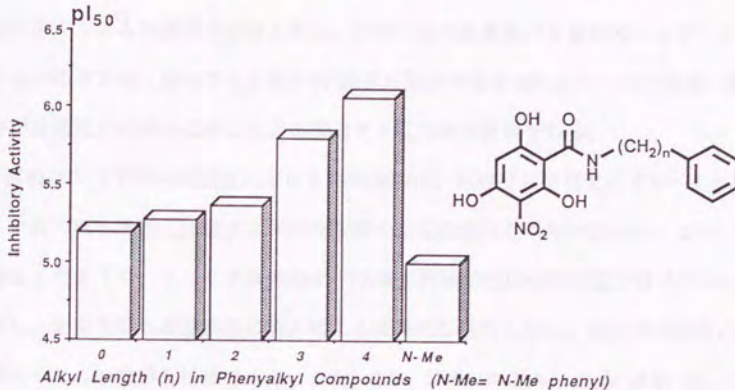


図3-4 N-フェニルアルキルアミド体のEBV-EA産生抑制活性

iii) 置換アニリド誘導体

置換アニリド体は、アルキルアミド体に比べると全般に低活性ではあるが、明瞭なEBV-EA産生抑制活性を示した。図3-5に種々のクロロ置換アニリド体の活性を示した。

EBV-EA産生抑制における置換アニリド体の構造要求性は、PET阻害の場合とは異なっている。即ちPET阻害阻害活性の場合には、オルト位置換体はパラ位、メタ位置換体に比べると低活性であったが、EBV-EA産生抑制活性の場合には逆に、オルト位置換体が最も高い活性を示した。また、メタ位置換体では活性が上昇したが、パラ位置換体の活性は若干低下した。同様の傾向は二置換体でも認められたが、特に

オルト位への置換基導入による活性上昇が顕著であった。その他、フッ素原子 (25, 26, 27) (オルト・メタ・パラの順、以下同じ)、トリフルオロメチル基 (28, 29, 30)、メチル基 (31, 32, 33)、メトキシル基 (34, 35, 36) (表3-3参照) などいずれの場合にもオルト置換体が最も高い活性を示した。このようなオルト位への置換基の導入による特異的な活性上昇は、オルト位の置換基の立体障害により、アニリド部分のベンゼン環がアミド基の SP^2 炭素の結合平面からねじれ、その結果、膜透過や結合部位との結合に適した立体構造をとるためと推定される。

置換アニリド体の高濃度における細胞毒性は、同程度の活性を示す N -アルキルアミド体の細胞毒性と比較するとかなり強く、安全性の点からは好ましくない。また前述したように、アニリド体のEBV-EA産生抑制活性は全般に低活性であった。しかし、オルト位への置換基の導入による特異的な活性上昇は、高活性化合物の分子設計のための重要な情報である。また、2,3-ジクロロアニリド体 (20) および 2,4-ジクロロアニリド体 (21) 体はアニリド体の中では比較的高い活性を示したが、このうち2,3-ジクロロアニリド体 (20) 体は細胞毒性が低く注目に値する。

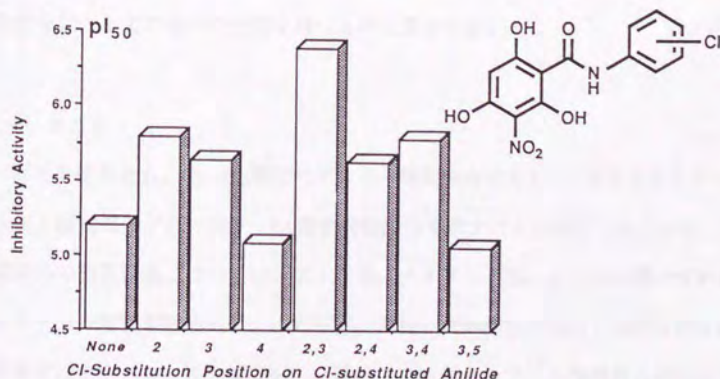


図3-5 クロロ置換アニリド体のEBV-EA産生抑制活性

iv) チオアミド誘導体

チオアミド体については直鎖N-アルキル基を持つものしか合成していないが、アミド体では直鎖のN-アルキル体が最も高い活性を示したことを考慮すると、構造要求性の検討は十分可能であると思われる。チオアミド体の活性と細胞毒性を図3-6, 3-7に示す。

チオアミド体のアミド基側鎖のアルキル鎖長の変化に伴うEBV-EA産生抑制活性の変動は、アミド体の場合と同じ傾向であった。全般的に、チオアミド体の活性はアミド体の活性に及ばなかったが、チオアミド体の細胞毒性はアミド体に比べてかなり弱かった。即ち、アミド体で高活性化化合物を得ることができれば、チオアミド体とすることによって、おそらく若干の活性低下は伴うものの、細胞毒性を下げることが可能であるものと考えられる。

v) エステル誘導体

エステル体の場合も、アミド体と類似の傾向を示した。また、チオアミド体と同様に、細胞毒性はかなり改善されている(図3-6, 3-7)。特に、ベンジルエステル体(E9, 表3-5参照)は高い活性を示すが比較的低毒性であり、抗発癌プロモーター活性化化合物としての優れた性質を持つものと思われる。

vi) まとめ

以上の結果から、 $C_8 \sim C_{10}$ 程度のアリキル側鎖を有する3-ニトロフロログルシノールボン酸誘導体が高いEBV-EA産生抑制活性を示すことが判明した。また、ニトロ基以外の核置換基については、アミド基、チオアミド基、エステル基いずれにおいても十分な活性が認められ、これら三つ系列の間の活性の差は、PET阻害の場合ほど顕著ではなかった。この傾向が、一連のフロログルシノール類縁体の構造活性相関

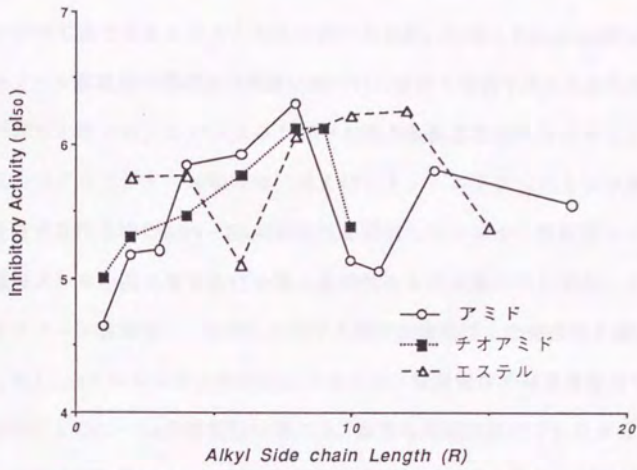


図3-6 チオアミド、エステル誘導体のEBV-EA産生抑制活性

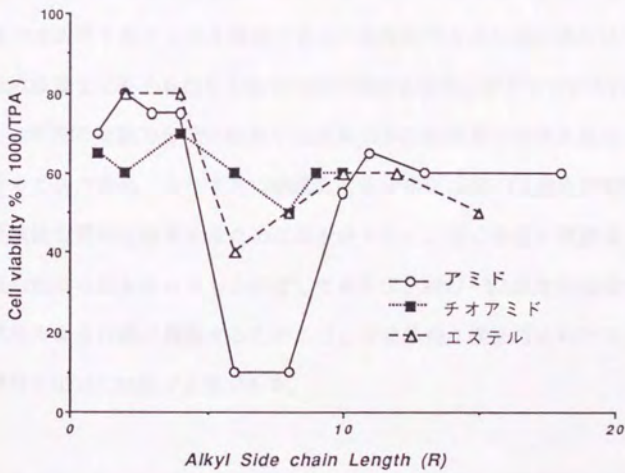


図3-7 チオアミド、エステル誘導体のEBV-EA産生試験系における細胞生存率 (被験化合物はTPAの1000倍濃度)

にすべて当てはまるかどうかは不明であるが、小塚らの euglobal 類およびフロログルシノール誘導体の構造活性相関に基づいた考察とは若干異なる点も明らかになった。

即ち小塚らは、フロログルシノール核の置換基の組み合わせとしてケトン-ホルミル（グランジノール類縁体）およびケトン-ニトロ（ニトロフロロフェノン類）を有する化合物の EBV-EA 抑制活性を検討しているが、側鎖部にプロピル基などの低級アルキル基を有する化合物に高活性なものが多いことから、これらのフロログルシノール誘導体に一般的に存在する発芽阻害活性との関連性を指摘している[94]。しかし、3-ニトロフロログルシノールカルボン酸誘導体の発芽阻害活性（第2章図2-15参照）と EBV-EA 抑制活性の間には、顕著な相関は認められなかった。

一方核置換基については、小塚らの結果と本研究の結果を総合すると、ホルミル-ケトンの組合せ、即ちグランジノールの類縁体が最も高活性であるものと考えられる。また小塚らによれば、ホルミル-ケトン体の場合には、光合成電子伝達系阻害では活性を低下させる傾向であった核置換アルキル基の導入は、EBV-EA 抑制活性の顕著な上昇をもたらしたが同時に細胞毒性も上昇させている[94]。

本研究では強力な光合成電子伝達系阻害活性物質の探索を目的とした分子設計を行ってきたため、これまでに合成した化合物は EBV-EA 産生抑制活性における構造要求性を詳細に検討するためには十分でない。特に母核の置換基については、電子吸引性基の組み合わせしか検討しておらず、EBV-EA 産生抑制活性における構造要求性をより詳細に検討するためには、今後多様な置換様式のプロログルシノール誘導体を用いた研究が必要である。

3-2 3-ニトロフロログルシノールカルボン酸アミド誘導体のマウス皮膚発癌二段階試験における抗発癌プロモーション活性

前述したように EBV-EA 産生抑制活性試験は *in vivo* における抗発癌プロモーション

ン活性と高い相関を示し、有用かつ簡便迅速な抗発癌プロモーター検索系であるが、抗発癌プロモーターとしての有効性は、*in vivo* 試験によって最終的に評価される必要がある。フロログシノール誘導体の*in vivo*における抗発癌プロモーション活性については現在まで検討されておらず、これらの化合物の*in vivo*試験における抗発癌プロモーターとしての有効性は不明であった。そこで、EBV-EA検定系において高い活性を示したN-オクチルアミド体および、対照として比較的低活性であったN-メチルアミド体について、マウス皮膚発癌二段階試験によりこれらの*in vivo*での抗発癌プロモーション活性を検討した。

1) 活性検定方法

6週令のSiC:ICR雌マウス15匹に、イニシエーターとしてDMBA (ジメチルベンズアントラセン) 390 nmolを塗布し、その一週間後から、20週にわたり週二回の割合で1.7 nmolのTPAを塗布した。TPA処理の一時間前に85 nmol (TPAの50倍モル)の被験化合物を塗布し、被験化合物のTPAによって誘導される発癌プロモーションにおよぼす影響を検定した。被験化合物の活性は腫瘍を発生したマウスの数とマウス一匹あたりの腫瘍発生数の平均値を無処理群 (TPAのみの処理) と比較することによって判定した。

2) 結果と考察

図3-8および写真3-1~3-3に示すとおり、N-オクチル体およびN-メチル体のいずれもTPAの50倍処理により、マウス皮膚での腫瘍の発現を抑制し、特にマウスあたりの腫瘍の発生数を顕著に抑制した。即ち、これらの化合物は有効な抗発癌プロモーター活性を示すことが確認された。またこれらの化合物の活性の間には、EBV-EA産生抑制活性の場合ほどの差はみられなかった。

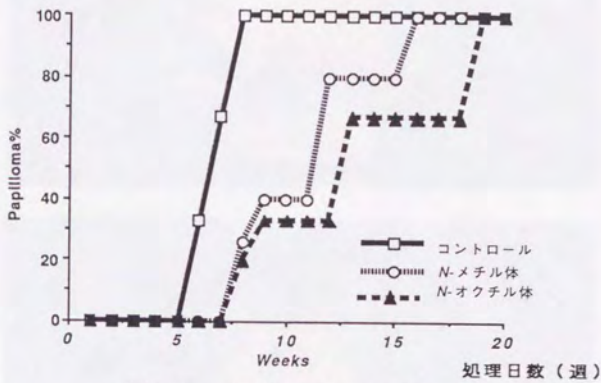


図3-8a パピローマの発生率

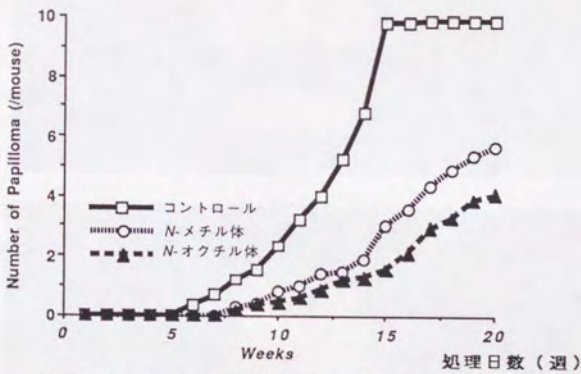


図3-8b マウス一匹当たりの平均パピローマ数

図3-8 3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミドの
マウス皮膚発癌二段階試験における抗発癌プロモーター活性



写真3-1
TPAのみ
(コントロール)



写真3-2
N-メチル体



写真3-3
N-オクチル体

写真3-1,2,3 3-ニトロフロロゲルシンカルボン酸アミド誘導体の塗布による発癌プロモーション (TPAによって誘導される) の抑制状態

本検討により、これらの3-ニトロフロログルシカルボン酸誘導体が、抗発癌プロモーターとして有効な活性を有することが示された。また、EBV-EA産生抑制試験における差ほどの活性差が両化合物間で見られなかったことは、EBV-EA産生抑制試験系でさほど高活性を示さなかった化合物の中にも、マウス皮膚二段階発癌試験系において、十分有効な抗発癌プロモーター活性を示す化合物が存在する可能性を示唆している。また本結果は、3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体に代表されるすべてのフロログルシノール誘導体が、抗発癌プロモーターとして *in vivo* の試験においても有効であることを示すものではないが、その可能性を強く示唆するものであろう。

3-3 3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体のアラキドン酸代謝系 に対する作用-1 ヒト5-リポキシゲナーゼ (5-LO) 阻害活性

前節に述べた抗発癌プロモーター活性の検定では、TPAを発癌プロモーターとして用いた。TPAの作用部位や作用性については種々の検討が行われており、特に前節で述べたようなマウス皮膚の発癌二段階試験における作用性は良く検討されている[108]。TPA処理によってマウス皮膚に惹起される反応は、発癌プロモーションの他に、DNA合成の促進[109, 110]、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 活性の向上[111, 112]、プロスタグランジン (PG) 類の合成促進[113, 114, 115]などが挙げられる。これらの反応のうち特に注目されるのは、生体内で炎症や免疫反応のメディエーターとして働いているとされているPG類の合成促進である。

現在のところ、TPAによる発癌プロモーション作用は、PG類に代表されるアラキドン酸代謝産物を媒介として起こっている可能性が有力視されている。例えば、TPAによってマウス皮膚に引き起こされるODC活性の誘導やDNA合成促進はPG類合成の鍵酵素であるシクロオキシゲナーゼ (CO) の阻害剤であるインドメタシンによ

って阻害され、これはPGE₂投与により回復することが知られている[116]。一方、アラキドン酸代謝の他の鍵酵素であるホスホリパーゼA₂ (PLA₂) や5-リポキシゲナーゼ (5-LO) の阻害剤もTPAによる発癌プロモーションやODC活性の向上を抑制することも報告されている[117, 118, 119]。また、S. Fishcerらは、種々の系統のマウスを用いて皮膚発癌二段階試験における各種アラキドン酸代謝酵素系阻害剤の影響を詳細に検討し、PLA₂阻害剤や5-LO阻害剤は、いずれの系統のマウスにおいても発癌プロモーションを阻害するが[120]、インドメタシンはSENCERマウスにおいてむしろ発癌プロモーションを促進することを報告している[121]。これらのことから、S. FischerらはTPAによって惹起されるマウス皮膚発癌プロモーションにおいては、シクロオキシゲナーゼ産物よりもリポキシゲナーゼ産物が重要な役割を示している可能性を示唆している。

一方、PG類、ロイコトリエン (LT) 類[122,123]などのアラキドン酸代謝産物が密接に関与していることが知られている炎症反応との関連も、詳細に検討されている。例えば、TPAに代表される発癌プロモーターはいずれも炎症性を示すこと、発癌プロモーターによって惹起された炎症を阻害する化合物の大部分が抗発癌プロモーター活性を示すことが報告されている[124]。

即ち、前節において3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体、特に3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が発癌プロモーションを*in vivo*においても抑えることを示したが、これらの化合物は同時に抗炎症活性を有することも期待された。また小塚らが、抗炎症活性との関連で、抗発癌プロモーション活性物質に到達したという事実からも、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体を含めたフロログルシノール誘導体の抗炎症活性の有無について興味もたれた。そこで3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の抗炎症性についても検討した。

抗炎症剤の一次スクリーニングとしては、アラキドン酸代謝酵素系に対する作用

を検討することが一般的である。また抗炎症剤スクリーニングにおいては、CO、5-LO、PLA₂などに対する阻害活性が重要な指標とされ、よく用いられている。これらの酵素の阻害剤は数多く知られているが、図3-9に示すとおりこのうち特に5-LOの阻害剤には、フラボノイド類やコーヒー酸などのようにフロログルシノールと類似の構造を有すると考えられるフェノール型化合物が数多く存在する[125]。特にコーヒー酸類縁体は、5-LOに特異的に作用することが知られ、有望な選択的5-LO阻害剤として合成化学的、生物学的検討が行われている[126]。

一方、これらの化合物の抗発癌プロモーション活性についても検討されており、例えばケルセチンなどのフラボノイド類は、抗発癌プロモーター活性を示すことが報告されている[127]。

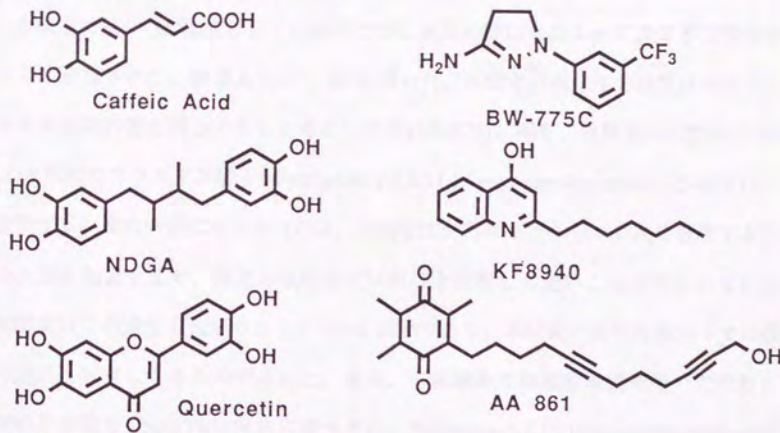


図3-9 種々の5-リボキシゲナーゼ阻害剤

コーヒー酸に対する化学構造の類似性からも、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体のアラキドン酸代謝系に対する作用として、5-LOに対する作用を検討することが最も有効であると考えられる。

そこで本研究では、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体のうち特にアミド誘導体について、その5-LOに対する阻害活性を検討することにした。

また、抗炎症活性と抗発癌プロモーション活性との関連性や、TPAの作用機構を考察するためには、アラキドン酸代謝系の他の酵素、例えば、PG類の生合成初発酵素であるCOや、細胞膜内に組み込まれているアラキドン酸を遊離させるPLA₂に対する作用も検討する必要がある。そこで本研究では数種の化合物についてそのCOに対する作用も検討した（次節で詳述する）。

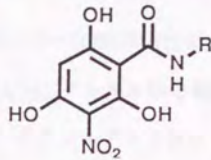
1) 活性検定方法

本検定には5-LO酵素として、日本たばこ産業の野口らによって遺伝子工学的手法により作製された、組替えヒト5-LOを用いた。本酵素の生化学的性質は現在のところ天然由来の物と同じであると考えられている[128]。即ち、当酵素は天然のヒト5-LOと同様にアラキドン酸を5-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid (5-HPETE) に変換する。また一般にヒト5-LOは、5-HPETEからロイコトリエンA₄を合成する二つの反応を触媒するが、後者の反応速度は前者と比較して遅いことが知られている。本酵素はこの点でも天然のヒト5-LOと同様であり、本研究に用いた条件下では後者の反応は無視しうるものであった。なお、本実験系では粗酵素液を用いたため、比較的不安定な5-HPETEは容易に還元され、5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid (5-HETE) が少量生成した。従って被験化合物の阻害活性は、基質であるアラキドン酸から変換された5-HPETE と5-HETE の総量の無処理区に対する比により判定し、その50%阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。

2) 結果

表3-6に示すように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体はヒト5-LO阻害活性を示した。また本実験系におけるコーヒー酸のIC₅₀は1000 μMであった。

表3-6 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のヒト5-LO阻害活性



No.	R	IC ₅₀ (μM)	No.	R	IC ₅₀ (μM)
1	Methyl	5900	20	2-Cl-Phenyl	1400
2	Ethyl	3000	21	3-Cl-Phenyl	450
3	Butyl	2600	22	4-Cl-Phenyl	300
4	Hexyl	400	23	2-F-Phenyl	4500
5	Heptyl	180	24	3-F-Phenyl	1200
6	Octyl	160	25	4-F-Phenyl	510
7	Undecyl	200	26	2-CF ₃ -Phenyl	200
8	Tridecyl	430	27	3-CF ₃ -Phenyl	370
9	Pentadecyl	720	28	4-CF ₃ -Phenyl	110
10	Octadecyl	1600	29	2,3-Cl ₂ -Phenyl	150
11	Phenyl	1000	30	3,4-Cl ₂ -Phenyl	130
12	Benzyl	1800	31	3,5-Cl ₂ -Phenyl	190
13	2-Phenethyl	460			
14	3-Phenylpropyl	60	32	N-Methyl-Butyl	7100
15	4-Phenylbutyl	35	33	N-Ethyl-Butyl	1900
16	5-Phenylpentyl	40	34	N-Me-Phenyl	9200
17	4-Phenoxybutyl	270			
18	6-Phenoxyhexyl	160			
19	8-Phenoxyoctyl	50	Cont*	Caffeic acid	1000

Cont*; positive control

3) 考察

前節などと同様に、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のヒト5-LO阻害活性について、側鎖の置換様式により、*N*-アルキルアミド誘導体、*N*-フェニルおよび*N*-フェノキシアルキルアミド誘導体、置換アニリド誘導体に分類し、各々の活性傾向について以下詳述する。なお図中の活性は pI_{50} ($-\text{Log}(IC_{50})$) で表記した。

i) *N*-アルキルアミド誘導体

N-アルキルアミド誘導体のヒト5-LO阻害活性は、図3-10に示すように側鎖アルキル基の伸張に伴って上昇し、 $C_7 \sim C_{11}$ アルキル体で最高活性となりその後低下する。この中で最高の活性を示した*N*-オクチルアミド体は、代表的な選択的5-LO阻害剤であるコーヒー酸の5倍程度の活性を示した。

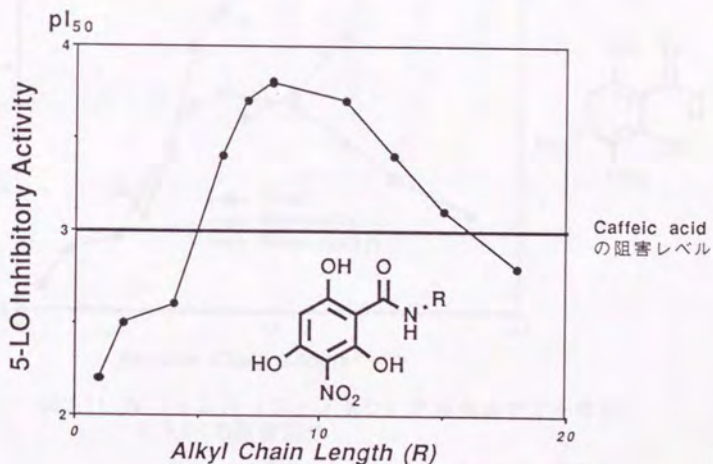


図3-10 直鎖*N*-アルキルアミド体のヒト5-LO阻害活性

ii) *N*-フェニルおよび*N*-フェノキシアルキルアミド誘導体

図3-11に示すようにフェニル（フェノキシ）基を末端に持つアミド誘導体は、*N*-アルキルアミド誘導体と同様にアルキル基の伸張による活性の上昇が認められたが、*N*-アルキルアミド誘導体よりも全体的に高い活性を示した。フェニル基およびフェノキシル基をC₃~C₅程度のアルキル基（図中ではC₄として表示）に相当すると考えた場合には、この活性の差を説明できない。即ち、ヒト5-LOの阻害には、側鎖にベンゼン環のような高高い置換基の存在が好ましいことが示唆された。なお、フェニル基あるいはフェノキシル基とアミド窒素原子間のアルキレン側鎖の伸長による活性低下は、供試した化合物の範囲では認められなかった。

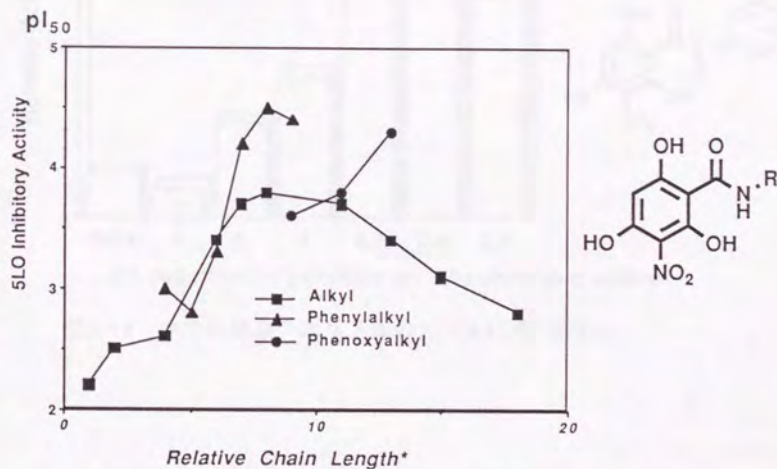


図3-11 *N*-フェニル（フェノキシ）アルキルアミド体のヒト5-LO阻害活性

(*フェニル基の長さをアルキル4鎖長分として表示)

iii) 置換アニリド誘導体

置換アニリド誘導体では、無置換体 (11) に比べてパラ位置置換体が高いヒト5-LO阻害活性を示した (図3-12にはクロロ置換体の活性を示す)。特に、疎水性置換基である塩素原子およびトリフルオロメチル置換体で顕著な活性上昇が認められた。ジクロロ体 (29) ~ (31)、および2-トリフルオロメチル体 (26)、4-トリフルオロメチル体 (28) (表3-6参照) ではコーヒー酸の5~10倍強力な活性を示した。

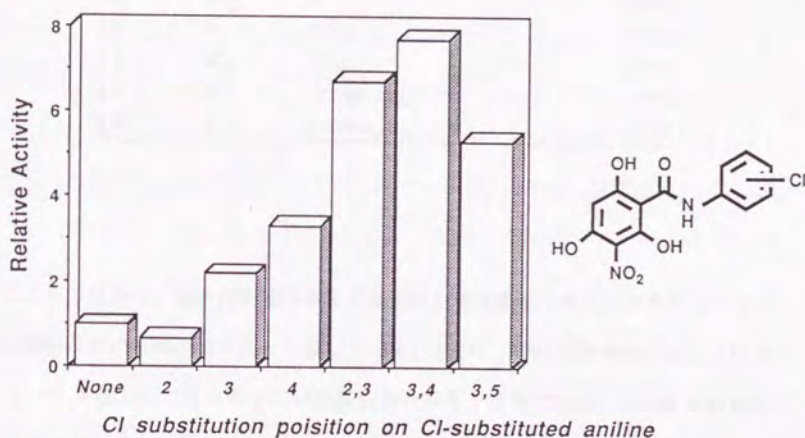
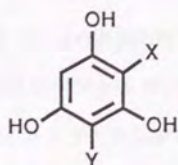


図3-12 クロロ置換アニリド体のヒト5-LO阻害活性

iv) 3-ニトロフロログルシンカルボン酸関連化合物の活性

一方、表3-7に示したように、疎水性側鎖を持たないフロログルシノール (35)、ニトロフロログルシノール (36)、フロログルシンカルボン酸 (37) および3-ニトロフロログルシンカルボン酸 (38) は、いずれも低活性であった。

表3-7 3-ニトロフロログルシincarボン酸関連化合物のヒト5-LO阻害活性



No.	X	Y	IC ₅₀ (μM)
35	H	H (Phloroglucinol)	<10000
36	NO ₂	H	4300
37	H	CO ₂ H	4300
38	NO ₂	CO ₂ H	2500
39	H	CONHC ₆ H ₁₃	700
40	H	CONHC ₁₀ H ₂₁	20

これらの結果は、疎水性側鎖の存在が高活性発現に重要であることを示しており、PET阻害における構造要求性と一致している。しかし、PET阻害活性には、フロログルシノール核上に二つの電子求引性置換基の存在が必要であり、その組み合わせとしてはニトロ基とアミド基（あるいはチオアミド基）が最適であったが、ヒト5-LO阻害活性ではニトロ基を持たないアミド体（39, 40）にも活性が認められた。また、PET阻害では必須であったアミド基窒素原子上の水素も、ヒト5-LO阻害では必ずしも必要ではない。即ち、N-メチル体（32, 34）では、それぞれに相当するアミド基水素を持つ化合物（3, 20）と比べ活性は低下するが、N-エチル体は、同程度の活性を示した（33 vs 3）。PET阻害では、化合物32~34はいずれも低活性であり、ヒト5-LO阻害とPET阻害におけるアミド基窒素原子上の水素の役割は明らかに異なっていることが判明した。

iv) まとめ

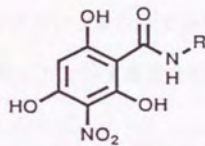
以上の様に、アミノ基側鎖に適当な疎水性置換基を有する3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体は強力なヒト5-LO阻害活性を示すことが判明した。特に、本研究で検討した3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の中では、*N*-フェノキシオクチル体や、*N*-フェニルブチル体が最も高活性であり、そのヒト5-LO阻害活性はコーヒー酸の20~30倍強力であった。コーヒー酸の活性に対する相対活性(文献値)で比較すれば、*N*-フェノキシオクチル体や*N*-フェニルブチル体の活性は、近年発展著しいコーヒー酸誘導体のうちの高活性なものには及ばないが[126]、他のタイプの阻害剤、例えばKF8540 [129]やAA-86I[130](それぞれコーヒー酸の25倍、5倍)(化合物は図3-9参照)よりは強力な5-LO阻害剤である。しかし、本実験に用いた組替えヒト5-LO酵素は、多核型白血球や好塩基球から得られる5-LO酵素に比べて阻害剤に対する感受性が低い(コーヒー酸の IC_{50} 値は前者で1000 μ M、後者では5 μ M)。また、多核型白血球や好塩基球から得られる5-LO酵素を用いる検定方法では、インドメタシンによりシクロオキシゲナーゼを阻害した条件で5-LOの活性を測定するので、本研究の結果と文献値を直接比較することには問題がある。今後、*in vivo*における抗炎症作用の検討など、多くの5-LO関連の活性を検討することで、本研究で行った5-LO阻害活性の検定方法と抗炎症活性との関わりが明らかになって行くものと考えられる。特に、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体は、構造的に新しいタイプの5-LO阻害剤として位置づけることができることから、今後その有効性について種々の検討を加えて行くことが必要であろう。

3-4 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のアラキドン酸代謝系 に対する作用-2 シクロオキシゲナーゼ(CO)阻害活性

前節では3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体がヒト5-LOを阻害す

ることを示した。しかし前述したように、COやPLA₂も発癌プロモーションや炎症に関わる重要な酵素である。このうち特にCOは、アスピリンに代表される非ステロイド抗炎症剤の一時作用点であり[122]、抗炎症活性を検定する場合極めて重要な酵素である。そこで代表的な3-ニトロフロログルシカルボン酸アミド誘導体についてCOの阻害活性を検定することにした。

表3-8 3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミド誘導体のシクロオキシゲナーゼ阻害活性



compound conc.	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M
R	PGE ₂ synthesis (%/ Control)	
Butyl	49.5	76.5
Hexyl	33.7	66.2
Octyl	26.4	71.1
Undecyl	44.1	68.7
Tridecyl	53.9	65.7
Phenyl	31.2	85.1
2-Cl-Phenyl	39.5	114.9
4-Cl-Phenyl	23.7	100.7
Phenylbutyl	24.8	104.7
Indometacine*		31.6

*positive control

1) 活性検定方法

COとしてはウサギ腎臓髄質ミクロソーム画分を用い、放射性標識されたアラキドン酸を基質として阻害剤存在下で反応させ、生成するPGE₂の量を測定することにより阻害効果を検討した。

2) 結果と考察

表3-8に示すように3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体はインドメタシンの10倍程度の量でインドメタシンと同等の活性を示すことが判明した。

近年のアラキドン酸代謝酵素阻害剤研究においては、選択的なこれらの酵素の阻害剤に加えて、ふたつ以上の酵素に有効な阻害活性を有する阻害剤も重要視される[131]。即ち、本結果は3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が、有効なアラキドン酸代謝系阻害剤であることを示す重要な知見である。

3-5 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の5-LO阻害活性とEBV-EA産生抑制活性における構造要求性の比較

3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のアラキドン酸代謝系酵素阻害活性と、前章で述べたEBV-EA産生抑制活性あるいは抗発癌プロモーション活性における構造要求性を比較することは、発癌プロモーターであるTPAの作用機構や、発癌プロモーションの機構を探るためにも極めて重要である。そこで以下では、多数の化合物について活性を検定した、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のヒト5-LO阻害とEBV-EA産生抑制活性における構造要求性を比較する。

N-アルキルアミド体の両活性は図3-13のような傾向を示す。N-オクチル誘導体まで両活性ともアルキル鎖長の伸張にしたがって上昇している。N-オクチルを越えるアルキル鎖長の伸張と活性の関係は、両活性で異なるがともに活性の顕著な上昇

は見られず、*N*-オクチル付近に活性の極大があるという点で、両活性の構造要求性は、ほぼ類似であるといえる。

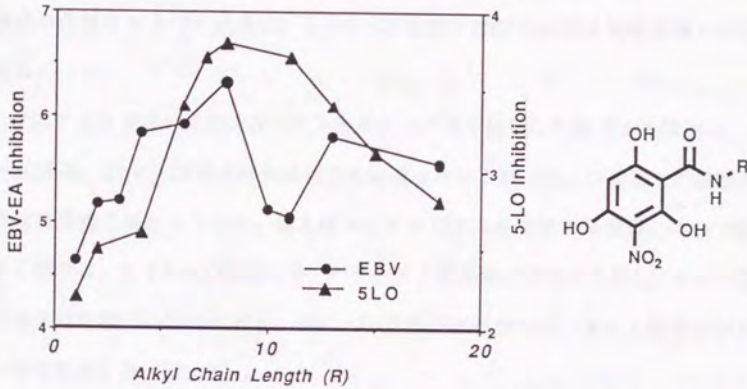


図3-13 *N*-アルキルアミド体のEBV-EA産生抑制活性とヒト5-LO阻害活性との活性傾向の比較

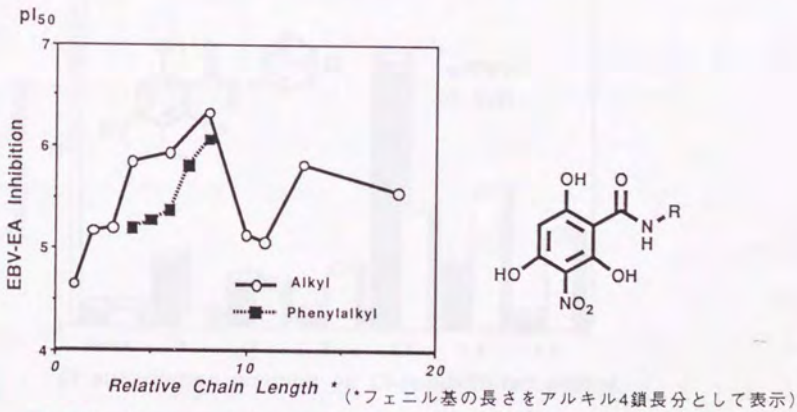


図3-14 *N*-アルキル体、*N*-フェニルアルキル体のEBV-EA産生抑制活性
(ヒト5-LO阻害の活性傾向については図3-11参照)

一方、*N*-フェニルアルキルアミド体の活性傾向をみると、ヒト5-LO阻害活性の方は側鎖の伸張に従って活性が大きく上昇し、*N*-アルキルアミド体の活性を凌ぐ(図3-11)。しかしながらEBV-EA産生抑制活性は、*N*-フェニルアルキルアミド体の活性は*N*-アルキルアミド体より低い(図3-14)。即ち、*N*-フェニルアルキル置換基の活性におよぼす効果は、ヒト5-LO阻害とEBV-EA産生抑制活性で対照的である。

置換アニリド体の活性が*N*-アルキルアミド体と比較して低下する傾向は、ヒト5-LO阻害、EBV-EA産生抑制活性とも似通っているが、フェニル基上の置換基の効果は両活性で異なっている。例えばモノクロロアニリド体の無置換アニリド体に対する活性は、ヒト5-LO阻害では、パラ、メタ置換体で活性が上昇し、オルト置換体では活性が低下したのに対し、EBV-EA産生抑制活性では、オルト置換体が最も高い活性を示した(図3-15)。

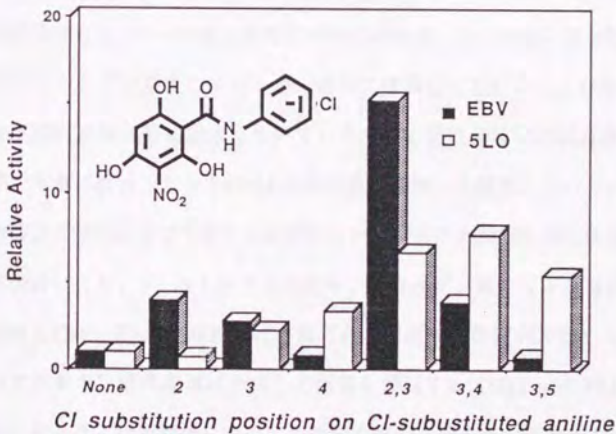


図3-15 クロロ置換アニリド体のEBV-EA産生抑制活性とヒト5-LO阻害活性との活性傾向の比較

また、アミド基窒素原子上の水素をアルキル置換した三級アミド体の活性は、それぞれの系で明らかに異なっていた。即ち、ヒト5-LO阻害活性では、*N*-メチル-*N*-フェニル体および、*N*-メチル-*N*-ブチル体では対応する二級アミド体に比べて明らかに活性が低下しているが、*N*-エチル-*N*-ブチル体では対応する二級アミド体とほとんど同じ程度の活性を示している。このことは、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のヒト5-LO阻害においては、アミド基窒素原子上の水素は必ずしも必要ではないことを示唆している。これとは対照的にEBV-EA産生抑制(PET阻害でも同様)では、これらの三級アミド体の活性は、対応する二級アミド体に比べて明らかに低下し、活性発現にはアミド基窒素原子上の水素が重要であるものと考えられる。この点においてもヒト5-LO阻害活性とEBV-EA産生抑制活性における構造要求性は異なっている。しかし最近、マウス皮膚発癌二段階試験においては、三級アミド体である*N*-エチル-*N*-ブチル体も有効な抗発癌プロモーター活性を示すことが示唆された[132]。

以上のように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のEBV-EA産生抑制活性とヒト5-LO阻害活性の構造要求性は、その側鎖に疎水性置換基の存在が重要である点では類似しているが、細部では異なっていることが示された。EBV-EA産生抑制試験は動物細胞を用いているために活性発現には膜透過性も関わっているが、本章で検討したヒト5-LO阻害活性は抽出した酵素を用いているために、化合物の膜透過性の影響は考慮する必要がない。両活性の詳細な関係は明らかではないが、本検討により、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のヒト5-LO阻害活性とEBV-EA産生抑制活性の間にある程度の相関関係が認められたことは、TPAがアラキドン酸代謝系に作用して活性を発現する[133]というTPAの発癌プロモーションにおける作用機構についての従来の説を支持するものである。

3-6 まとめ

以上本章では、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体に、有効な抗発癌プロモーション活性が存在すること、また3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体が炎症性につながるとされているアラキドン酸の代謝系酵素阻害活性を有することを明らかにした。また、抗発癌プロモーション活性とアラキドン酸代謝系酵素阻害活性との関連について、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のEBV-EA産生抑制活性とヒト5-LO阻害活性の構造要求性を検討することによって考察を加えた。そして3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体が高活性を示すための両活性の構造要求性に、細部では異なるものの、多くの類似点があることを認めた。即ち本研究により、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体、特に3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体のアラキドン酸代謝系酵素阻害活性を有すること、また抗発癌プロモーターとしての活性を有することが明かとなり、これらの活性の間にある程度の相関関係が認められた。この結果は、前述したように、TPAの発癌プロモーションにおける作用機構に、アラキドン酸代謝系が関与しているとする従来の説を支持するとともに、5-リボキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼによって誘導されるロイコトリエン類やプロスタグランジン類が、発癌プロモーションに何らかの影響を与えていることを示唆するものであろう。

前述したように、ロイコトリエン類やプロスタグランジン類などのアラキドン酸代謝物と発癌プロモーションとの関係については現在でもまだ決定的な証拠が得られていない。本化合物のような新規な母核をもつ阻害剤を開発し、その性質を解明していくことは、この問題を解決するための有効なアプローチのひとつであろう。

3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体に代表されるフロログルシノール誘導体の抗発癌プロモーション活性や、アラキドン酸代謝系に関する活性の

研究はまだその端緒についたばかりで、高活性発現のための構造最適化も行っていない。また、アラキドン酸代謝物は動物の種々の生理的局面において重要な役割を果たしているため、フロログシノール誘導体の種々の生理的過程に対する活性の検討が必要である。そのためには、今後、フロログシノール誘導体に関する有機化学および生理生化学的研究のより一層の発展が望まれる。

総合考察 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の生理活性と作用部位に関する考察

総-1 3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の各種生理活性の相関

本研究により3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体が、植物の光合成電子伝達系や動物のアラキドン酸代謝系など、種々の生理反応に作用することが判明した。特にアミド体では、そのアミド基側鎖の構造と活性の関係には異なる生理試験系において類似した傾向が認められた。そこで、PET阻害活性、EBV-EA産生抑制活性、ヒト5-LO阻害活性の相関を検討した(図 総-1,2,3)。

この図からも明かなように、PET阻害活性とEBV-EA産生抑制活性の間の相関はかなり低く(相関係数0.34)、EBV-EA産生抑制活性とヒト5-LO阻害活性の間には中程度の相関(相関係数0.47)が認められた。これに対して、PET阻害活性とヒト5-LO阻害活性の間には比較的高い相関(相関係数0.66)が認められた。この事実は、PET阻害とヒト5-LO阻害における、3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体の作用点ないしは作用性がかなり類似していることを示唆する。そこで、PET系のD1タンパク質、アラキドン酸代謝系の酵素について、その薬剤受容部位と3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体との相互作用について考察した。

総-2 光合成電子伝達系とアラキドン酸代謝系の受容部位に関する考察

PET系とアラキドン酸代謝系の共通点は、その反応の基質がD1タンパク質ではプラストキノン、アラキドン酸酵素系ではアラキドン酸であり、いずれも脂溶性化合物であることである。いずれの系においても、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体の疎水性置換基のLog Pの増大が阻害活性を上昇させたことから、反応基質との構造類似性が阻害活性発現に重要な意味をもつことが示唆された。

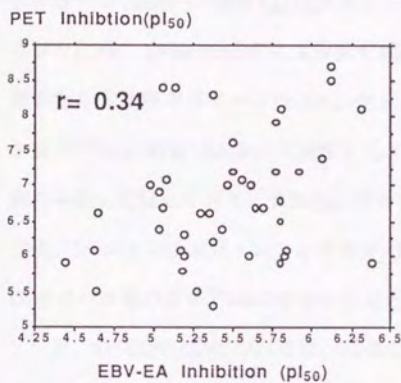


図 総-1 PET阻害活性と
EBV-EA産生抑制活性

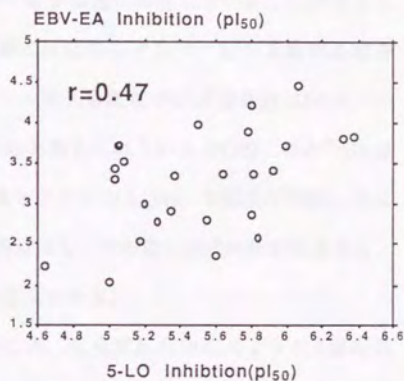


図 総-2 EBV-EA産生抑制活性と
ヒト5-LO阻害活性

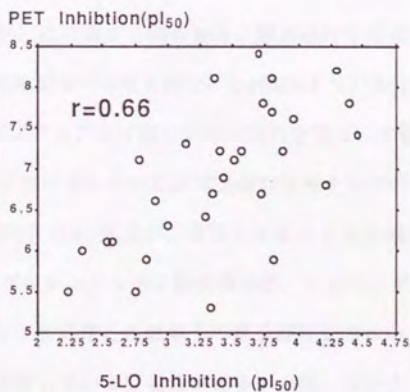


図 総-3 PET阻害活性とヒト5-LO阻害活性

図 総-1,2,3 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド類
の示した各活性間の相関 (r=相関係数)

フロログルシノール核とこれらの酵素系における受容部位との親和性を説明する場合に重要なのは鉄原子の存在であろう。D1タンパク質においては、タンパク質中に存在する2価非ヘム鉄が Q_A , Q_B のキノン間の電子伝達に共役していることが示されており[134]、Deisenhoferらによる光合成細菌の反応中心タンパク質のX線結晶構造解析からも確認されている[2, 60]。フェノール型光合成電子伝達阻害剤はD1タンパク質の ^{215}His に結合(あるいは配位)していると考えられているが[34]、この ^{215}His は非ヘム鉄に配位しており、また Q_B も結合するとされている[34]。本論文で考察したように、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体も、その阻害様式の解析結果から、D1タンパク質のこの ^{215}His に結合することが推定される。

一方、5-LOやCOについては、現在のところ、光合成反応中心のようにX線結晶構造解析による高次構造の検討は行われていない。しかし酵素の生化学的性質は詳しく検討されている。即ち、ヒト5-LOは一個の非ヘム鉄をもつことが最近発見された[135]。また石井らはESRスペクトル解析により、ダイズリボキシゲナーゼで証明されているように[136]、この鉄が三価の場合に酵素活性を発現することを最近確認した[137]。一方、一般にCOはヘム鉄を持つことが知られている[138]。また松本らは、5-LOの非ヘム鉄に配位するアミノ酸について検討を加え、本研究で用いたヒト5-LOと種々のリボキシゲナーゼにおいてほぼ完全に保存されている546番目から558番目までの配列中の550番目のHis残基が、重要であることを指摘している[139]。従って、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体が、リボキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼにおいても、反応中心の鉄原子の結合部位近傍にその母核を位置させ、その反応を直接的に阻害している可能性がある。今後、フォトアフィニティーラベル化合物などを用いた研究により、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体とD1タンパク質やリボキシゲナーゼなどとの結合に関与するアミノ酸残基の解析を行う必要がある。そのような解析を通じて受容体特有の結合様式が明らかになれば、新

規な特異的な光合成阻害剤やアラキドン酸代謝阻害剤の分子設計に強力な指針が与えられるであろう。一方、3-ニトロフロログルシンカルボン酸誘導体が鉄原子を反応中心に持つタンパク質に一般的な親和性があるならば、チトクローム系タンパク質なども阻害する、いわゆる選択性のない毒物である危険性も懸念される。ある物質が選択毒性を有するかどうかを決定するためには、可能な限り多くの生理検定系における活性を調べる必要があるが、生命体の全酵素系に対する影響を調べることは非現実的である。選択的活性を有する化合物を検索するための有効な方法は、PET阻害について本研究などによって行ってきたように、特定の生理活性の向上を狙うことであろう。そのためには、ターゲットである酵素や代謝系の生理生化学に関する十分な理解に基づいた分子設計が最も重要である。

現時点では、本研究で阻害作用のターゲットに設定した光合成電子伝達系、Epstein Barrウイルス早期抗原産生現象、アラキドン酸代謝系などは、分子生物学的領域で突出した進歩を遂げている生理反応であるが、完全には分子レベルの解明に至っていない。従って、阻害剤と受容部位との相互作用の論理的最適化を行うことはまだ可能となっていない。しかし、本研究のように可能なかぎり生物情報を採り入れながら生理活性分子の設計を行うことは、新しいターゲットを探索するための重要なアプローチとなるであろう。

実験の部

1) 3-ニトロフロログルシincarボン酸誘導体の合成

1. フロログルシノールを原料とした3-ニトロフロログルシincarボン酸アミドおよびチオアミドの合成

1) ニトロフロログルシノールの合成[15]

機械式かき混ぜ器をそなえた500 ml容の4つ口フラスコ中、12.6 g (0.1 mol)のフロログルシノールを200 mlの50 % (v/v)硫酸に溶解させた。室温下温度上昇に注意しながら、50 %硫酸60 mlと濃硝酸(60% HNO_3) 12.6 mlの混液を徐々に加え、1時間室温下で攪拌した。これを1 lの氷水にあげ、沈澱を濾取した。沈澱を少量の冷水で洗浄したのち、熱水より再結晶して、ニトロフロログルシノールの針状結晶を得た。収量11.5 g。

MS; m/z (rel. int.): 213 (M⁺, 100%), 183 (45), 166 (30), 155(35)

2) ニトロフロログルシノールからの3-ニトロフロログルシincarボン酸アミドおよびチオアミドの合成

本工程は用いるイソシアネートが異なることにより反応時間、分離及び再結晶条件が微妙に異なるが本質的には共通の方法を用いた。一般的な例を以下に示す。

i) *N*-ヘキシル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミドの合成

塩化カルシウム乾燥管をつけたよく乾燥した200 mlのフラスコ中、1) で得られたニトロフロログルシノール680 mg (4 mmol)を無水ニトロベンゼン50 mlに溶解し、1.5 g (12 mmol)の無水塩化アルミニウムを加えた。反応液は直ちに黒色を呈した。ヘキシルイソシアネート520 mg (4 mmol)を加えたのち約70℃に加熱し一昼夜攪拌を続けた。反応液を放冷後100 mlの1 N塩酸水溶液中に加えたのち、約30分攪拌した。ニトロベンゼン層を分取した後、水層を酢酸エチルで抽出し、これをニトロベンゼン層と合わせて、飽和食塩水で洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧下濃縮した。ヘキサン:酢酸エチル=ギ酸=300:100:1を用いるシリカゲルカラムにより精製後、熱ヘキサンから再結晶し*N*-ヘキシル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミドを700 mg得た。

融点 73-74 °C

¹H-NMR (δ-CDCl₃/ TMS ppm): 0.9 (3H, t, *J*=6Hz), 1.2-2.0 (8H), 3.5 (2H, d, t, *J*=6Hz,6Hz), 6.1 (1H, s),

8.3 (1H, br), 16.1 (1H, br)

ii) *N*-ヘキシル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズチオアミドの合成

塩化カルシウム乾燥管をつけたよく乾燥した200 mlのフラスコ中、1) で得られたモノトロフロログルシノール680 mg (4 mmol)を無水ニトロベンゼン50 mlに溶解し、1.5 g (12 mmol)の無水塩化アルミニウムを加えた。反応液は直ちに黒色を呈した。ヘキシルイソチオシアネート680 mg (4 mmol)を加えたのち約70 °Cに加熱し一昼夜撹拌を続けた。反応液を放冷後100 mlの1 N塩酸水溶液中加入し、約30分撹拌した。ニトロベンゼン層を分取し、水層を酢酸エチルで抽出した。これをニトロベンゼン層と合わせて、飽和食塩水で洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧下濃縮した。ヘキサン：酢酸エチル：ギ酸=300:100:1を用いるシリカゲルカラムにより精製後、熱ヘキサンから再結晶し*N*-ヘキシル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズチオアミドを900 mg得た。

融点 126-128 °C

¹H-NMR (δ-CDCl₃/TMS ppm): 0.9 (3H, t, *J*=6Hz), 1.2-2.0 (8H), 3.7 (2H, d,t, *J*=6Hz,6Hz), 6.1 (1H, s), 9.6 (1H, br), 11.0 (1H, br), 14.4 (1H, br)

2. フロログルシンカルボン酸を原料とした3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体および、エステル誘導体の合成

1) 3-ニトロフロログルシンカルボン酸の合成

機械式かき混ぜ器をそなえた500 ml容の4つフラスコに、200 mlの60% (v/v)硫酸を入れ、18.8 g (0.1 mol)のフロログルシンカルボン酸を徐々に加え、均一になるまで(約15分くらい)撹拌した。ここに60%硝酸15.6 mlを徐々に加え、氷冷を保ちながら約3時間撹拌した。

反応液を200 gの氷水中にかけ、生じた沈澱を濾取した。沈澱を氷冷した塩酸性飽和食塩水で洗浄したのち、500 mlの熱メタノールで十分に抽出した。不溶物を濾別後減圧下濃縮乾燥し、収量20 gで3-ニトロフロログルシンカルボン酸の粗製物を得た。粗製物は、このままで次の工程に用いることができ、本製法においてもこのまま用いることとした。より精製するときは以下の方法によった。

粗製物5 gをアセトンを溶媒とする活性炭のカラムにより精製し、熱酢酸エチルから再結晶し、ほぼ純粋な3-ニトロフロログルシンカルボン酸3 gが得られた。

融点 170 °C (分解)

¹H-NMR (δ-DMSO-d₆/TMS ppm): 5.6 (1H, s)

本精製物は、分離前の粗製物より不安定であるため、保存には適さない。また前述した通り粗製物でも以下の反応に支障がないことが判明しているため、以下ではすべて粗製物を反応原料として用いた。

2) 3-ニトロフロログルシンカルボン酸からの3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体および、エステル誘導体の合成

当工程も基本的にはいずれも同一であり、各アミンの反応性の違いにより、反応条件が一部異なるのみである。以下、代表的なものについてその反応条件を記す。

i) *N*-ブチル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミドの合成

塩化カルシウム乾燥管をつけたよく乾燥した200 mlのフラスコ中、1) で得られた3-ニトロフロログルシンカルボン酸の粗結晶860 mg (4 mmol)を720 mg (6 mmol)の*N*-ヒドロキシスクシニミドとともに無水THF100 mlに室温にて溶解し、その後水冷した。ここに830 mg (4 mmol)のジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のTHF溶液を徐々に加えた後、約20分間攪拌を続けた。更に300 mg (4 mmol)の*n*-ブチルアミンのTHF溶液を滴下し、反応液を室温に戻し約3時間攪拌した。

不溶物をひだおり濾紙によって濾別したのち、濾液を減圧下濃縮後、ヘキサン:酢酸エチル:ギ酸=300:100:1を用いるシリカゲルカラムにより精製した。熱ヘキサンより再結晶し*N*-ブチル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミドを700 mgを得た。

融点 98-100 °C

¹H-NMR (δ-CDCl₃/TMS ppm): 1.0 (3H, t, *J*=6Hz), 1.2-2.0 (4H), 3.5 (2H, d, t, *J*=6Hz,6Hz), 6.1 (1H, s), 8.3 (1H, br), 11.3 (1H, s), 13.7 (1H, s), 16.1 (1H, s)

ii) *N*-(3',4'-Cl₂-フェニル)-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミドの合成

塩化カルシウム乾燥管をつけたよく乾燥した200 mlのフラスコ中、1) で得られた3-ニトロフロログルシンカルボン酸の粗結晶860 mg (4mmol)を720 mg (6mmol)の*N*-ヒドロキシスクシニミドとともに無水THF100 mlに室温にて溶解し、その後水冷した。ここに830 mg (4 mmol)のDCCのTHF溶液を徐々に加えた後、約20分間攪拌を続けた。更に680 mg (4mmol)の3,4-Cl₂-アニリンのTHF溶液を滴下した。その後、トリエチルアミン800 mg (8mmol)を添加し、室温に戻した。その後6時間攪拌した。

不溶物をひだおり濾紙によって濾別したのち、濾液を減圧下濃縮後、ヘキサン:酢酸エチル:ギ酸=200:100:1を用いるシリカゲルカラムにより精製した。熱メタノールより再結晶し、*N*-(3',4'-Cl₂-フェニル)-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンズアミド800 mgを得た。

融点 181-183 °C (分解)

¹H-NMR (δ-DMSO-d₆/ TMS ppm): 6.0 (1H, s), 7.2 (1H, s), 7.7-7.8 (2H, m)

本化合物は、前例に示した方法をそのまま適用することでは合成が不可能であった。そこで反応条件について種々検討した結果、反応中にトリエチルアミンを添加することにより反応が迅速に進行し、目的物が得られることが明らかになった。また目的物を得られまでに長い反応時間を要する化合物においても、トリエチルアミンの添加により、反応が迅速に進行し、目的物が得られることが明らかとなった。したがって、他のアミド体の合成においても反応の進行具合を検討しながら、適宜反応系にトリエチルアミンを添加した。

iii) 3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンゾエートの合成

エステル体の合成についても基本的には本方法が応用できた。ただしエステル体を合成する際には、*N*-ヒドロキシスクシニミドは不要であった。以下に反応例を挙げる。

(オクチル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンゾエートの合成)

塩化カルシウム乾燥管をつけたよく乾燥した200 mlのフラスコ中、1) で得られた3-ニトロフロログルシカルボン酸の粗結晶860 mg (4 mmol)とオクタノール700 mg (6 mmol)を、室温にて溶解し、その後氷冷した。ここに、830 mg (4 mmol)のDCCのTHF溶液を徐々に加えた。このまま約30分間搅拌を続けた。不溶物をひだおり濾紙によって濾過したのち、濾液を減圧濃縮後、ヘキサン:酢酸エチル:ギ酸=500:100:1を用いるシリカゲルカラムにより精製した。熱メタノールから再結晶し、オクチル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンゾエート700 mgを得た。

融点 47-49 °C

¹H-NMR (δ-CDCl₃/ TMS ppm): 0.9 (3H, t, *J*=7Hz), 1.3-1.7 (10H), 1.9 (2H, m), 4.4 (2H, t, *J*=7Hz),
6.2 (1H, s), 11.5 (1H, s), 12.7 (1H, br), 12.9 (1H, s)

これらの方法を用い合成した全化合物の物性値を表E1-1~E1-4, E2-1,2に示す。

表 E1-1 3-ニトロプロログルシカルボン酸アミド誘導体の¹H-NMRスペクトル

No.	N-substituent	¹ H-NMR (δ-CDCl ₃ /TMS ppm.)	Solvent (A)-Acetone-d ₆ , (D)-DMSO-d ₆
1	Methyl	4.5 (d, 2H, J=5Hz), 6.2 (1H, s), 8.3 (1H, br), 11.3 (1H, s), 13.8 (1H, s), 16.1 (1H, s)	
2	Ethyl	1.3 (3H, t, J=7Hz), 3.5 (2H, d, t, J=7Hz, 7Hz), 6.1 (1H, s)	
3	Propyl	1.0 (3H, t, J=7Hz), 1.2-2.0 (m, 2H), 3.4 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.3 (1H, br), 11.3 (1H, s), 13.7 (1H, s), 16.1 (1H, s)	
4	Butyl	1.0 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (br, 4H), 3.5 (2H, d, t, J=7Hz, 7Hz), 6.1 (1H, s), 8.3 (1H, br), 11.3 (1H, s), 13.8 (1H, s), 16.3 (1H, s)	
5	Pentyl	1.0 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (6H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.3 (1H, br), 16.1 (1H, br)	
6	Hexyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (8H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.3 (1H, br), 16.1 (1H, br)	
7	Heptyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (10H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.1 (1H, br), 11.2 (1H, s), 13.8 (1H, s), 16.1 (1H, br)	
8	Octyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (12H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br), 16.1 (1H, br)	
9	Nonyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (14H), 3.4 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br), 11.2 (1H, s), 13.8 (1H, s), 16.1 (1H, br)	
10	Decyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (16H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br), 16.1 (1H, br)	
11	Undecyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (18H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br), 16.1 (1H, br)	
12	Tridecyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (22H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br), 16.1 (1H, br)	
13	Pentadecyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (26H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br)	
14	Octadecyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (32H), 3.4 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br)	
15	Cyclohexyl	1.0-2.3 (11H), 6.1 (1H, s), 8.2 (1H, br), 11.2 (1H, br), 13.8 (1H, br), 16.1 (1H, br)	
16	Phenyl	5.8 (1H, s), 7.0-7.8 (5H, m) (A)	
17	2-Cl-Phenyl	6.1 (1H, s), 7.2-7.8 (3H, m), 8.1-8.3 (1H, m) (D)	
18	3-Cl-Phenyl	6.1 (1H, s), 7.2-8.0 (4H, m) (D)	

19	4-Cl-Phenyl	5.9 (1H, s), 7.2 (2H, d, $J=10\text{Hz}$), 7.6 (2H, d, $J=10\text{Hz}$) (D)
20	3,5-Cl ₂ -Phenyl	6.1 (1H, s), 7.3 (1H, t, $J=2\text{Hz}$), 7.7 (2H, d, $J=2\text{Hz}$) (D)
21	4-Br-Phenyl	6.1 (1H, s), 7.6 (4H, s) (D)
22	Benzyl	4.6 (2H, d, $J=5\text{Hz}$), 6.1 (1H, s), 7.3 (s, 5H), 8.6 (1H, br), 11.3 (1H, br), 13.7 (1H, br), 15.9 (1H, br)
23	Phenethyl	2.9 (2H, t, $J=6\text{Hz}$), 3.7 (2H, d, t, $J=6\text{Hz}$, 6Hz), 6.0 (1H, s), 7.1 (5H, s), 8.2 (1H, br), 11.3 (1H, s), 13.7 (1H, s), 16.1 (1H, s)
24	(R)- α -Phenethyl	1.6 (d, 3H, $J=7\text{Hz}$), 5.2 (1H, d, q, $J=7\text{Hz}$, 7Hz), 6.0 (1H, s), 7.2 (5H, s), 8.4 (1H, br), 15.9 (1H, br)
25	(S)- α -Phenethyl	1.6 (d, 3H, $J=7\text{Hz}$), 5.2 (1H, d, q, $J=7\text{Hz}$, 7Hz), 6.0 (1H, s), 7.2 (5H, s), 8.4 (1H, br), 15.9 (1H, br)
26	Phenylpropyl	2.0 (2H, t, t, $J=7\text{Hz}$, 7Hz), 2.7 (2H, t, $J=7\text{Hz}$), 3.4 (2H, d, t, $J=7\text{Hz}$, 7Hz) 6.0 (1H, s), 7.1 (5H, s), 8.2 (1H, br), 11.3 (1H, s), 13.5 (1H, s), 16.1 (1H, s)
27	Phenylbutyl	1.7 (4H, t, t, $J=7\text{Hz}$, 7Hz), 2.6 (2H, t, $J=7\text{Hz}$), 3.4 (2H, d, t, $J=7\text{Hz}$, 7Hz) 6.1 (1H, s), 7.1 (5H, s), 8.3 (1H, br), 11.3 (1H, s), 13.7 (1H, s), 16.1 (1H, s)
28	N-Me-Phenyl	3.3 (s, 3H), 5.7 (1H, s), 7.1 (5H, s) (D)
29	3,4-Cl ₂ -Phenyl	6.0 (1H, s), 7.2 (1H, s), 7.7-7.8 (2H, m) (D)
30	2,3-Cl ₂ -Phenyl	6.1 (1H, s), 7.2 (2H, d, $J=6\text{Hz}$), 8.1-8.3 (1H, m) (D)
31	2,4-Cl ₂ -Phenyl	6.1 (1H, s), 7.2 (1H, d, d, $J=2\text{Hz}$, 10Hz), 7.4 (1H, d, $J=2\text{Hz}$), 8.3 (1H, d, $J=10\text{Hz}$) (D)
32	4-CF ₃ -Phenyl	6.0 (1H, s), 7.5 (2H, d, $J=10\text{Hz}$), 7.7 (2H, d, $J=10\text{Hz}$) (D)
33	4-iPro-Phenyl	1.2 (6H, d, $J=7\text{Hz}$), 2.6-2.9 (1H, m), 5.9 (1H, s), 6.9 (2H, d, $J=8\text{Hz}$), 7.2 (2H, d, $J=8\text{Hz}$) (D)
34	4-NMe ₂ -Phenyl	2.9 (6H, s), 5.9 (1H, s), 6.7 (2H, d, $J=9\text{Hz}$), 7.4 (2H, d, $J=9\text{Hz}$) (D)
35	Phenoxy-Et	3.8 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 4.2 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 6.1 (1H, s), 6.8-7.2 (5H) (D)
36	4-Cl-Phenoxy-Et	3.8 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 4.2 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 6.1 (1H, s), 6.8 (2H, d, $J=9\text{Hz}$) (D)
37	2-F-Phenyl	6.0 (1H, s), 6.8-7.3 (3H, m), 7.9-8.2 (1H, m) (D)
38	3-F-Phenyl	6.1 (1H, s), 6.6-6.9 (1H, m), 7.1-7.7 (3H, m) (D)
39	4-F-Phenyl	6.1 (1H, s), 6.8-7.2 (2H, m), 7.3-7.9 (2H, m) (D)
40	3-OMe-Phenyl	3.8 (3H, s), 6.2 (1H, s), 6.5-6.8 (1H, m), 6.9-7.4 (3H, m) (D)
41	3,4-OMe ₂ -Phenyl	3.8 (3H, s), 6.1 (1H, s), 6.8 (1H, d, $J=9\text{Hz}$), 7.0 (1H, d, d, $J=9\text{Hz}$, 2Hz), 7.2 (1H, d, $J=2\text{Hz}$) (D)
42	2-CF ₃ -Phenyl	6.0 (1H, s), 7.1-8.1 (4H, m) (D)
43	3-CF ₃ -Phenyl	6.1 (1H, s), 7.2-8.0 (3H, m), 8.1 (1H, br) (D)

44	4-Et-Phenyl	1.2 (3H, t, J=7Hz), 2.6 (2H, q, J=7Hz), 5.6 (1H, s), 7.0 (2H, d, J=8Hz), 7.4 (2H, d, J=8Hz) (D)
45	4-nPro-Phenyl	1.1 (3H, t, J=7Hz), 1.4-1.9 (2H, m), 2.6 (2H, q, J=7Hz), 5.6 (1H, s), 7.0 (2H, d, J=8Hz), 7.4 (2H, d, J=8Hz) (D)
46	2-Me-Phenyl	2.3 (3H, s), 6.1 (1H, s), 6.9-7.3 (3H, m), 7.6-7.9 (1H, m) (D)
47	3-Me-Phenyl	2.3 (3H, s), 6.1 (1H, s), 6.8-7.4 (4H, m) (D)
48	4-Me-Phenyl	2.3 (3H, s), 6.1 (1H, s), 7.1 (2H, d, J=8Hz), 7.4 (2H, d, J=8Hz) (D)
49	2-OMe-Phenyl	3.9 (3H, s), 6.1 (1H, s), 6.8-7.1 (3H, m), 8.1-8.3 (1H, m) (D)
50	4-OMe-Phenyl	3.8 (3H, s), 6.1 (1H, s), 6.8 (2H, d, J=9Hz), 7.4 (2H, d, J=9Hz) (D)
51	Phenoxybutyl	1.2-2.0 (4H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 4.0 (2H, t, J=6Hz), 6.1 (1H, s), 6.9-7.3 (5H), 8.3 (1H, br), 11.2 (1H, br), 16.1 (1H, s)
52	Phenoxyhexyl	1.2-2.0 (8H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 4.0 (2H, t, J=6Hz), 6.1 (1H, s), 6.9-7.3 (5H), 8.3 (1H, br), 11.2 (1H, br), 16.1 (1H, s)
53	Phenoxyoctyl	1.2-2.0 (12H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 4.0 (2H, t, J=6Hz), 6.1 (1H, s), 6.9-7.3 (5H), 8.3 (1H, br), 11.2 (1H, br), 16.1 (1H, s)
54	Phenoxydecyl	1.2-2.0 (16H), 3.5 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 4.0 (2H, t, J=6Hz), 6.1 (1H, s), 6.9-7.3 (5H), 8.3 (1H, br), 11.2 (1H, br), 16.1 (1H, s)
55	Phenoxydodecyl	1.2-2.0 (20H), 3.4 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 4.0 (2H, t, J=6Hz), 6.1 (1H, s), 6.9-7.3 (5H), 8.3 (1H, br), 11.2 (1H, br), 16.1 (1H, s)
56	Phenoxyphenoxyethyl	3.8 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 4.1 (2H, t, J=6Hz), 6.1 (1H, s), 6.8-7.3 (9H), 8.6 (1H, t, J=6Hz), 11.1 (1H, br), 15.9 (1H, s)
57	Phenylpentyl	1.2-1.8 (6H), 2.6 (2H, t, J=7Hz), 3.4 (2H, d, t, J=7Hz, 7Hz), 6.1 (1H, s), 7.0-7.3 (5H), 8.2 (1H, br)
58	3-(3,4Cl ₂ -Phenyl)-urea	6.1 (1H, s), 7.4 (2H, d, J=2Hz), 7.9 (1H, d, J=2Hz), 8.6 (1H, s), 9.2 (1H, s), 11.5 (1H, br) (D)
59	Phenoxyphenyl	6.2 (1H, s), 6.9-7.6 (9H), 9.9 (1H, br), 11.2 (1H, s), 15.9 (1H, s)
60	4-Cl-Phenoxyphenyl	6.2 (1H, s), 7.0 (2H, d, J=9Hz), 7.1 (2H, d, J=9Hz), 7.3 (2H, d, J=9Hz), 7.6 (2H, d, J=9Hz), 10.6 (1H, br), 11.3 (1H, br) (D)

表 E1-2 3-ニトロフロログルシナルボン酸チオアミド誘導体の¹H-NMRスペクトル

No.	N-substituent	¹ H-NMR (δ-CDCl ₃ /TMS ppm.)
S1	S-Methyl	3.3 (3H, d, J=6Hz), 6.2 (1H, s)
S2	S-Ethyl	1.3 (3H, t, J=7Hz), 3.5-3.9 (2H, m), 6.1 (1H, s)
S3	S-Butyl	1.0 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (4H), 3.7 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 9.4 (1H., br), 11.0 (1H, br), 14.4 (1H, br)
S4	S-Hexyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (8H), 3.7 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 9.6 (1H., br), 11.0 (1H, br), 14.4 (1H, br)
S5	S-Heptyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (10H), 3.7 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 9.6 (1H., br), 11.0 (1H, br), 14.4 (1H, br)
S6	S-Octyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (12H), 3.7 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 9.6 (1H., br), 11.0 (1H, br), 14.4 (1H, br)
S7	S-Nonyl	0.9 (3H, t, J=7Hz), 1.2-2.0 (14H), 3.7 (2H, d, t, J=7Hz, 7Hz), 6.1 (1H, s), 9.6 (1H., br)
S8	S-Decyl	0.9 (3H, t, J=6Hz), 1.2-2.0 (16H), 3.7 (2H, d, t, J=6Hz, 6Hz), 6.1 (1H, s), 9.6 (1H., br), 11.0 (1H, br), 14.4 (1H, br)

表 E1-3 3-ニトロフロログルシナルボン酸エステル誘導体の¹H-NMRスペクトル

No.	O-substituent	¹ H-NMR (δ-CDCl ₃ /TMS ppm.)
E1	Methyl	4.0 (3H, s), 6.2 (1H, s), 11.5 (1H, br), 12.5 (1H, br), 13.0 (1H, br)
E2	Ethyl	1.5 (3H, t, J=7Hz), 4.5 (2H, q, J=7Hz), 6.1 (1H, s), 11.5 (1H, br), 12.7 (1H, br), 12.9 (1H, br)
E3	Butyl	1.0 (3H, t, J=7Hz), 1.6 (2H, m), 1.9 (2H, m), 4.5 (2H, t, J=7Hz), 11.6 (1H, br), 12.7 (1H, br), 13.0 (1H, br)
E4	Hexyl	0.9 (3H, t, J=7Hz), 1.3-1.7 (6H), 1.9 (2H, m), 4.4 (2H, t, J=7Hz), 6.2 (1H, s), 12.5 (1H, br)
E5	Octyl	0.9 (3H, t, J=7Hz), 1.3-1.7 (10H), 1.9 (2H, m), 4.4 (2H, t, J=7Hz), 6.2 (1H, s), 11.5 (1H, s), 12.7 (1H, br), 12.9 (1H, s)
E6	Nonyl	0.9 (3H, t, J=7Hz), 1.3-1.7 (12H), 1.9 (2H, m), 4.4 (2H, t, J=7Hz), 6.2 (1H, s), 11.5 (1H, s), 12.7 (1H, br), 12.9 (1H, s)
E7	Decyl	0.9 (3H, t, J=7Hz), 1.3-1.7 (14H), 1.9 (2H, m), 4.4 (2H, t, J=7Hz), 6.2 (1H, s), 11.5 (1H, s), 12.7 (1H, br), 12.9 (1H, s)

E8	Undecyl	0.9(3H,t,J=7Hz), 1.3-1.7(16H), 1.9(2H,m), 4.4(2H,t,J=7Hz), 6.2(1H,s), 11.5(1H,s), 12.7(1H,br), 12.9(1H,s)
E9	Dodecyl	0.9(3H,t,J=7Hz), 1.3-1.7(18H), 1.9(2H,m), 4.4(2H,t,J=7Hz), 6.2(1H,s), 11.5(1H,s), 12.7(1H,br), 12.9(1H,s)
E10	Tridecyl	0.9(3H,t,J=7Hz), 1.3-1.7(20H), 1.9(2H,m), 4.4(2H,t,J=7Hz), 6.2(1H,s), 11.5(1H,s), 12.7(1H,br), 12.9(1H,s)
E11	Pentadecyl	0.9(3H,t,J=7Hz), 1.3-1.7(24H), 1.9(2H,m), 4.4(2H,t,J=7Hz), 6.2(1H,s), 11.5(1H,s), 12.7(1H,br), 12.9(1H,s)
E12	Phenyl	6.2(1H,s), 7.2-7.6(5H), 11.5(1H,s), 12.6(1H,br), 13.2(1H,s)
E13	Benzyl	5.5(2H,s), 6.2(1H,s), 7.2-7.6(5H), 11.5(1H,s), 12.7(1H,br), 13.0(1H,s)
E14	Phenylpropyl	2.1(2H,t,t,J=7Hz,7Hz), 2.8(2H,t,J=7Hz), 4.4(2H,t,J=7Hz), 6.2(1H,s), 7.2-7.5(5H), 11.5(1H,s), 12.8(1H,br), 13.0(1H,br)

表 E1-4 3-ニトロフロログシカルボン酸エステル誘導体 (ウレア誘導体)
の¹H-NMRスペクトル

No.	Substituent	¹ H-NMR(δ-DMSO-d ₆ /TMS ppm.)
U1	3,4-Cl ₂ -Ph-Et	3.7(2H,d,t,J=6Hz,6Hz), 4.4(2H,t,J=6Hz), 6.1(1H,s), 6.3(1H,t,J=6Hz), 7.2(1H,d,d,J=9Hz,2Hz), 7.3(1H,d,J=9Hz), 7.8(1H,d,J=2Hz), 8.9(1H,s)
U2	3,4-Cl ₂ -Ph-N-Me-Et	3.0(3H,s), 3.7(2H,t,J=6Hz), 4.4(2H,t,J=6Hz), 6.0(1H,s), 7.3(1H,d,J=9Hz), 7.4(1H,d,J=9Hz), 7.8(1H,s), 8.5(1H,s)
U3	3,4-Cl ₂ -Ph-Pro	1.9(2H,m), 3.7(2H,d,t,J=6Hz,6Hz), 4.4(2H,t,J=6Hz), 6.1(1H,s), 6.3(1H,t,J=6Hz), 7.2(1H,d,d,J=9Hz,2Hz), 7.3(1H,d,J=9Hz), 7.8(1H,d,J=2Hz), 8.9(1H,s)
U4	3,4-Cl ₂ -Ph-Bu	1.6(2H,m), 2.0(2H,m), 3.2(2H,d,t,J=6Hz,6Hz), 4.4(2H,t,J=6Hz), 6.1(1H,s), 6.3(1H,br), 7.2(1H,d,d,J=9Hz,2Hz), 7.3(1H,d,J=9Hz), 7.8(1H,d,J=2Hz), 8.6(1H,s)
U5	Ph-Et-urea	3.7(2H,d,t,J=6Hz,6Hz), 4.4(2H,t,J=6Hz), 6.1(1H,s), 6.3(1H,t,J=6Hz), 6.8-7.4(5H), 8.9(1H,s)

表 E2-1 3-ニトロフロログルシンカルボン酸アミド誘導体、チオアミド誘導体の物性値
(融点、高分解能マスペクトル分析値)

No.	N-Substituent	mp	Mol. Formula	HRMS Spectra (M ⁺)	
				MW. Calc.	MW. Found
1	Methyl	163	C ₈ H ₈ O ₆ N ₂	228.0382	228.0392
2	Ethyl	149-150	C ₉ H ₁₀ O ₆ N ₂	242.054	242.05
3	Propyl	146-147	C ₁₀ H ₁₂ O ₆ N ₂	256.0695	256.0665
4	Butyl	98-100	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ N ₂	270.0852	270.0858
5	Pentyl	78-80	C ₁₂ H ₁₆ O ₆ N ₂	284.1008	284.0975
6	Hexyl	73-74	C ₁₃ H ₁₈ O ₆ N ₂	298.1165	298.1148
7	Heptyl	93-95	C ₁₄ H ₂₀ O ₆ N ₂	312.1321	312.1317
8	Octyl	84-86	C ₁₅ H ₂₂ O ₆ N ₂	326.1478	326.1499
9	Nonyl	76-78	C ₁₆ H ₂₄ O ₆ N ₂	340.1634	340.1613
10	Decyl	92-94	C ₁₇ H ₂₆ O ₆ N ₂	354.1791	354.1824
11	Undecyl	99-100	C ₁₈ H ₂₈ O ₆ N ₂	368.1947	368.1937
12	Tridecyl	97-98	C ₂₀ H ₃₂ O ₆ N ₂	378.2155*	378.2186*
13	Pentadecyl	102-103	C ₂₂ H ₃₆ O ₆ N ₂	406.2468*	406.2507*
14	Octadecyl	105-106	C ₂₅ H ₄₂ O ₆ N ₂	448.2938*	448.2963*
15	Cyclohexyl	127-130	C ₁₃ H ₁₆ O ₆ N ₂	296.1008	296.1036
16	Phenyl	182-183	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₆	290.0539	290.0561
17	2-Cl-Phenyl	194-196	C ₁₃ H ₉ ClN ₂ O ₆	324.0149	324.0103
18	3-Cl-Phenyl	199-201d	C ₁₃ H ₉ ClN ₂ O ₆	324.0149	324.0139
19	4-Cl-Phenyl	186-188d	C ₁₃ H ₉ ClN ₂ O ₆	324.0149	324.0157
20	3,5-Cl ₂ -Phenyl	176-179d	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₆	357.9759	357.9712
21	4-Br-Phenyl	169-171d	C ₁₃ H ₉ BrN ₂ O ₆	367.9644	367.9689
22	Benzyl	151-152d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	286.0590*	286.0566*
23	Phenethyl	142-143d	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₆	318.0851	318.0846
24	(R)- α -Phenethyl	97-98d	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₆	300.0746*	300.0724*
25	(S)- α -Phenethyl	97-98d	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₆	300.0746*	300.0791*
26	Phenylpropyl	102-103	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₆	332.1008	332.0974
27	Phenylbutyl	101-102	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	346.1165	346.1166
28	N-Me-Phenyl	204-205d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	304.0695	304.0714
29	3,4-Cl ₂ -Phenyl	181-183d	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₆	357.9759	357.9737

30	2,3-Cl ₂ -Phenyl	190-193d	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₆	357.9759	357.9753
31	2,4-Cl ₂ -Phenyl	220-223d	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₆	357.9759	357.9769
32	4-CF ₃ -Phenyl	229-231d	C ₁₄ H ₉ F ₃ N ₂ O ₆	358.0412	358.0363
33	4- <i>i</i> Pro-Phenyl	161-164	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₆	332.1008	332.1009
34	4-NMe ₂ -Phenyl	160-164d	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₆	333.096	333.0963
35	Phenoxy-Et	145-148d	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₇	334.0801	334.0757
36	4-Cl-Phenoxy-Et	159-161d	C ₁₅ H ₁₃ ClN ₂ O ₇	368.0411	368.043
37	2-F-Phenyl	164-166d	C ₁₃ H ₉ FN ₂ O ₆	308.0444	308.0483
38	3-F-Phenyl	203-205d	C ₁₃ H ₉ FN ₂ O ₆	308.0444	308.0403
39	4-F-Phenyl	199-202d	C ₁₃ H ₉ FN ₂ O ₆	308.0444	308.0416
40	3-OMe-Phenyl	186-189d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₇	320.0644	320.0611
41	3,4-OMe ₂ -Phenyl	204-207d	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₈	350.075	350.078
42	2-CF ₃ -Phenyl	148-150d	C ₁₄ H ₉ F ₃ N ₂ O ₆	358.0412	358.0439
43	3-CF ₃ -Phenyl	172-175d	C ₁₄ H ₉ F ₃ N ₂ O ₆	358.0412	358.0417
44	4-Et-Phenyl	185-188d	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₆	318.0851	318.0882
45	4- <i>n</i> Pro-Phenyl	175-177d	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₆	332.1008	332.1005
46	2-Me-Phenyl	192-194d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	304.0695	304.0733
47	3-Me-Phenyl	191-193d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	304.0695	304.0684
48	4-Me-Phenyl	192-195d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	304.0695	304.0682
49	2-OMe-Phenyl	215-217d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₇	320.0644	320.061
50	4-OMe-Phenyl	204-207d	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₇	320.0644	320.0646

Thioamides

S1	S-Methyl	166-168d	C ₈ H ₈ O ₅ N ₂ S	226.0048*	226.0044*
S2	S-Ethyl	162-164	C ₉ H ₁₀ O ₅ N ₂ S	240.0205*	240.0218*
S3	S-Butyl	119-121d	C ₁₁ H ₁₄ O ₅ N ₂ S	286.0623	286.0646
S4	S-Hexyl	126-128	C ₁₃ H ₁₈ O ₅ N ₂ S	296.0830*	296.0807*
S5	S-Heptyl	121-123	C ₁₄ H ₂₀ O ₅ N ₂ S	310.0987*	310.0963*
S6	S-Octyl	123-124	C ₁₅ H ₂₂ O ₅ N ₂ S	324.1144*	324.1152*
S7	S-Nonyl	117-119	C ₁₆ H ₂₄ O ₅ N ₂ S	338.1300*	338.1280*
S8	S-Decyl	119-121	C ₁₇ H ₂₆ O ₅ N ₂ S	352.1457*	352.1447*

mp: d; decomposition temperature

HRMS: *; confirmed by M⁺-18 peak

表 E2-2 3-ニトロフロログリンカルボン酸誘導体 (アミド、チオアミド、エステル)
の物性値 (融点、元素分析値)

No.	Substituent	mp.	Mol. Formula	Elemental analyses							
				C%(C)	C%(F)	H%(C)	H%(F)	N%(C)	N%(F)		
51	Phenoxybutyl	108-109	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₇	56.35	56.19	5.01	5.01	7.73	7.61		
52	Phenoxyhexyl	101-102	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₇	58.46	58.38	5.68	5.68	7.18	7.12		
53	Phenoxyoctyl	89-90	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₇	60.28	60.2	6.26	6.25	6.69	6.63		
54	Phenoxydecyl	87-88	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₇	61.87	61.82	6.77	6.78	6.27	6.19		
55	Phenoxydodecyl	98-100	C ₂₅ H ₃₄ N ₂ O ₇	63.28	62.54	7.22	7.11	5.9	5.93		
56	Phenoxyphenoxylethyl	117-118	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₈	59.16	59.04	4.25	4.24	6.57	6.53		
57	Phenylpentyl	71-73	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₆	59.99	60.18	5.59	5.69	7.77	7.56		
58	3-(3,4Cl ₂ -Phenyl)- urea	237-239d	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ N ₄ O ₇	40.31	40.25	2.42	2.4	13.43	13.23		
Esters											
E2	Ethyl	93-94	C ₉ H ₉ N ₂ O ₇	44.45	44.03	3.73	3.62	5.6	5.6		
E3	Butyl	70-71	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₇	48.71	47.66	4.83	4.72	5.16	4.88		
E4	Hexyl	38-40	C ₁₃ H ₁₇ N ₂ O ₇	52.17	52.48	5.73	5.74	4.68	4.79		
E5	Octyl	47-49	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₇	55.04	55.25	6.47	6.48	4.28	4.51		
E6	Nonyl	51-52	C ₁₆ H ₂₃ N ₂ O ₇	56.3	56.38	6.79	6.86	4.1	4.15		
E7	Decyl	54-55	C ₁₇ H ₂₅ N ₂ O ₇	57.45	57.93	7.09	7.19	3.94	4.13		
E8	Undecyl	56-60	C ₁₈ H ₂₇ N ₂ O ₇	58.52	58.7	7.37	7.42	3.79	3.71		
E9	Dodecyl	63-65	C ₁₉ H ₂₉ N ₂ O ₇	59.52	59.48	7.62	7.6	3.65	3.53		

実験の部

E10	Tridecyl	70-71	C ₂₀ H ₄₁ NO ₇	60.44	60.37	7.86	7.78	3.52	3.36
E12	Phenyl	121-123	C ₁₃ H ₉ NO ₇	53.62	54.22	3.11	3.38	4.81	4.94
E13	Benzyl	91-93	C ₁₆ H ₁₁ NO ₇	58.37	54.83	3.37	3.64	4.25	4.43
E14	Phenylpropyl	83-84	C ₁₆ H ₁₅ NO ₇	57.66	57.6	4.54	4.55	4.2	4.1
U1	3,4-Cl ₂ -Ph-Et-urea	162-164	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₆	43.07	43.29	2.94	2.95	9.42	9.39
U2	3,4-Cl ₂ -Ph-N-Me-Et-urea	150-152	C ₁₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ O ₆	44.37	44.75	3.29	3.4	9.13	9.19
U3	3,4-Cl ₂ -Ph-Pro-urea	164-166	C ₁₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ O ₆	44.37	44.42	3.29	3.33	9.13	9.1
U4	3,4-Cl ₂ -Ph-Bu-urea	157-159	C ₁₈ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₆	45.59	45.57	3.61	3.6	8.86	8.79
U5	Ph-Et-urea	125-127	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₆	50.93	51.01	4.01	4.12	11.14	10.86

mp; d shows decomposition temperature
 Elemental analyses: C%, H%, N%, O%; Calculated
 C% (F), H% (F), N% (F); Found

2) 光合成電子伝達系阻害活性試験

各化合物の光合成電子伝達系阻害活性は、ホウレンソウより調製した葉緑体を用いたHill反応試験により検討した。

1. 葉緑体の調製

茎の部分を除いたホウレンソウの葉100gをよく水洗いした後、脱イオン水でよくすすいだ。これをミキサー中に氷冷した調製用緩衝液(0.4 M ショ糖, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 50 mM Tricine pH 7.8) 300 mlを加え、ミキサーで約20秒間破砕した後、8層に重ねたガーゼで濾過した。濾液を冷却遠心器で6000 x gで10分間遠心し、上澄みを捨てて沈澱部分を100 mlの緩衝液に懸濁した。この際絵筆などの先の柔らかいものを使い、沈澱をほぐすようにして懸濁させると葉緑体を傷めずにうまく行うことができる。ついで600 x gで2分間遠心し、生じた沈澱を除き、上澄み部分を用いて再び6000 x gで10分間の遠心操作を繰り返しおこなった。操作終了後適量の緩衝液で懸濁させ、下記に示すようにその総クロロフィル量を測定し、プラスチックチューブに入れ液体窒素で凍結保存しておく。PET試験の際はこれを解凍して、氷冷下暗所で保存しながら使用した。

(クロロフィルの定量)

葉緑体懸濁液10 μ lに80%アセトン4 mlを加え、1500 x gで約3分間遠心し上清を得る。この液の663 nm (A_{663}) と645 nm (A_{645})の吸光度を測定し以下の式により総クロロフィル (Chl) 量を算出する。

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) = (12.7 \times A_{663} - 2.59 \times A_{645}) \times 400$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) = (22.9 \times A_{645} - 4.67 \times A_{663}) \times 400$$

$$\text{総Chl } (\mu\text{g/ml}) = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

2. 光合成電子伝達系(PET)阻害活性の測定

各化合物のPET阻害活性は、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCPIP) を電子受容体とするHill反応の阻害により検定した。即ち、被験化合物存在下におけるDCPIPの光還元速度を非存在下と比較することで、被験化合物のHill反応阻害活性を検定することができる。また、DCPIPの光還元量は600 nmにおける吸光度の減少により定量することができる。そこで本実験においては、DCPIPの光還元を経時的に測定するため、キューベットに光を照射できるように改良したUV吸収測定装置を用いた。照射する光は、600 Wのハロゲンランプを光源とし、熱除去のための水槽と赤フィルターを通

して測定器に導入した。またこの光導入部には光照射、遮断のために外側に金属製のシャッターを設けた。

Hill反応液は、暗所でディスポーザブルのキュベット中、2 mlの測定用緩衝液（20 mM メチルアミン、50 μ M DCPIP, 50 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7.0）、0.1 mg/ml 程度のクロロフィル濃度に単離液（0.4 M ショ糖, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 50 mM Tricine pH 7.8）で希釈した葉緑体10 μ l（終濃度0.5 μ g/mlクロロフィル）、被験化合物のエタノール溶液5-20 μ lを順次加え振盪攪拌することにより調製した。被験化合物を溶解するのに用いたエタノールはこの範囲ではHill反応に影響を与えなかった。また化合物の性質によって、阻害活性が発現するまでにある程度のインキュベーション時間を必要とするものがあることが知られている。本実験においては、暗所で約5分のインキュベーションを行った後光を照射しHill反応を開始させた。Hill反応により観測されるDCPIPの光還元速度をコントロールの速度と比較し、被験化合物のHill反応阻害（PET阻害）活性を算出した。またこれらの測定は室温（20-27 $^{\circ}C$ ）でおこなった。

各化合物の活性は、50% PET阻害を示す濃度（ IC_{50} ）の逆対数値（ pI_{50} ）で表した。

3) 熱発光グロー曲線の測定

熱発光は、葉緑体中で起こった光化学反応およびそれに伴う電子伝達反応の逆反応によって起こる発光現象である。本研究では試料（葉緑体）を加熱することでこの反応を起こさせ、放出される光を検出、記録した。この発光収率は非常に低いため通常はフォトカウンター必要とする。測定装置の概略を図E-1に示す。本装置は、レンズ系を含むサンプルホルダー部とフォトカウンティング部に分けられる。サンプルホルダー部には、加熱することができるようにヒーターを内蔵し、加熱に伴う試料温度の変化を銅-コンスタンタン熱電対により測定した。加熱に伴って試料から放出された光を、レンズ系を通して集光し、赤のカットオフフィルターを通してフォトカウンティング部の光電子増倍管（浜松ホトニクスR1333）により検知した。さらに、光電子増倍管からの信号を増幅した後、フォトカウンティングユニットに入れてフォトン数を計測し、出力をアナログ変換してX-YレコーダーのY端子に接続した。先の試料温度測定のための熱電対からの出力をX軸端子に接続して同時記録することより、温度の関数として熱発光強度を記録した。

1. 試料の前処理

葉緑体は、Hill反応に用いたものと同様にホウレンソウより調製し、400-500 $\mu\text{g Chl/ml}$ の濃度となるように、測定溶液 (25 % (v/v) グリセロール, 50 mM MES-NaOH (pH = 6.5), 10 mM MgCl_2) で希釈し、オレンジ色の連続光を45秒間照射した後、室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) で5分間暗順応させ、その後氷冷した。ただし室温が低いときには、7分間暗順応させた。以上の操作はすべて暗い緑色光下で行なった。

2. 熱発光測定の手順

上記の方法にしたがって処理を行なった葉緑体懸濁液80 μl をサンプルホルダーにのせた2 cm 角の濾紙に均一に塗布し、アクリル板で覆った。この試料を-20 $^{\circ}\text{C}$ に冷却した後、半値幅5 μsec の閃光を1回照射し、照射後ただちに液体窒素温度下 (-196 $^{\circ}\text{C}$) で試料を凍結させ、測定装置に移した。測定装置内にてこの試料を毎秒0.8 $^{\circ}\text{C}$ ずつ昇温していき、そのときの発光強度を温度の関数として、X-Yレコーダーで記録した。阻害剤存在条件下において熱発光測定を行なうときは、葉緑体懸濁液180 μl に各濃度の阻害剤1.8 μl を加えた試料を作成し、このうちから80 μl ずつ用いた。

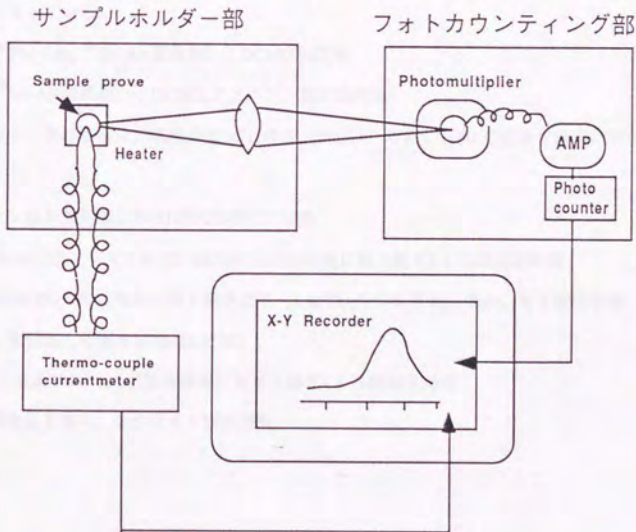


図 E-1 熱発光測定装置の概要

4) 除草剤抵抗性植物の葉緑体を用いたHill反応阻害活性の検定

1. 植物材料

1) アブラナ (²⁶⁴Ser-Gly 変異株)

アトラジン抵抗性を示すセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の葉緑体は、発芽後1カ月間温室内で生育させた植物体の若い葉を用いて調製した。

2) タバコ光独立栄養培養細胞 (²⁶⁴Ser-Thr 変異株)

アトラジン、DCMUに対して交差抵抗性を示すタバコ光独立栄養培養細胞 (PA細胞) は、京都大学農学部山田康之教授より供与された。

タバコPA細胞は、通常の倍量のビタミンと10 μMナフタレン酢酸 (NAA), 1 μMカイネチンを含む糖無添加のLinsmaier-Skoog (LS) 基本培地 (表E3-1) を用い、1-2%に富化したCO₂濃度、明所下 (6000-8000 Lux) で100 rpm振盪培養した。細胞は26℃前後で培養し、3週間毎に継代培養を行った。

3) ラン藻の人為的変異株 (Di22, Di1各変異株)

用いたラン藻の変異株cyanobacterium *Synechococcus* R2 (*Anacystis nidulans* R2) は、Hirschberg教授 (The Hebrew Univ. of Jerusalem, Israel) より供与されたものであり、次のような薬剤耐性を示すことが明らかになっている。

Di22 (²⁵⁵Phe-Leu, ²⁶⁴Ser-Ala 変異株) : DCMU抵抗性

Di1 (²⁶⁴Ser-Ala 変異株) : DCMU, アトラジン交差抵抗性

これらのラン藻の培養は、薬剤添加BG11培地 (表E3-2) を用い、30℃前後で以下に示す方法により行った。

- i) ラン藻を薬剤添加BG11寒天培地にて培養
- ii) 30 ml三角フラスコ中の5 mlのBG11液体培地に植え継ぎ3-4日間振盪培養
- iii) 50 ml BG11液体培地に植え継ぎ通気 (3% CO₂を含む空気) 培養。ある程度増殖したら薬剤を添加し培養を継続 (3日間)
- iv) 2 l培養ビン (BG11液体培地) に植え継ぎ4-5日間通気培養
- v) 植物体を集め、チラコイド膜を調製

表 E3-1 Linsmaier-Skoog (LS) 培地の組成

	mg/ml	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20.6
KNO ₃	199	18.8
KH ₂ PO ₄	170	1.25
CaCl ₂ /2H ₂ O	440	3.0
MgSO ₄ /7H ₂ O	370	1.5
		μM
MnSO ₄ /4H ₂ O	22.3	100
H ₃ BO ₄	6.2	100
ZnSO ₄ /7H ₂ O	8.6	30
KI	0.83	5.0
Na ₂ Mo ₄ /2H ₂ O	0.25	1.0
CuSO ₄ /5H ₂ O	0.25	0.1
CoCl ₂ /6H ₂ O	0.25	0.1
Na ₂ EDTA	37.3	100
FeSO ₄ /7H ₂ O	27.8	100
イノシトール	100	
チアミン塩酸塩	0.4	

表 E3-2 BG11 培地の組成

	mg/L	mM
NaNO ₃	1500	18
MgSO ₄ /7H ₂ O	65	0.3
CaCl ₂ /2H ₂ O	36	0.3
K ₂ HPO ₄	40	0.3
Na ₂ CO ₃	20	0.2
		μM
NaMgEDTA	1	2.7
Ferric ammonium citrate	6	20
Citric acid	6	30
H ₃ BO ₄	2.86	46
MnCl ₂ /4H ₂ O	1.84	9.3
ZnSO ₄ /7H ₂ O	0.22	0.8
Na ₂ MoO ₄ /2H ₂ O	0.39	1.6
CuSO ₄ /5H ₂ O	0.08	0.3
Co(NO ₃) ₂ /6H ₂ O	0.05	0.2

2. 葉緑体及びチラコイド膜の調製

アブラナ及びタバコPA細胞からの葉緑体の調製は、前章に述べたホウレンソウの葉緑体の調製と同様に行った。

ラン藻については、以下のような方法でチラコイド膜を調製し実験に供した。

- i) ラン藻を集め35℃で9000 x g, 10 min遠心
- ii) 沈澱を50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)に懸濁、これを35℃, 12000 x g, 10 min遠心
- iii) 沈澱を0.4 M マンニトール, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) (調製液)に懸濁
- iv) リゾチーム処理
- v) 調製液で、最終濃度0.25 mg Chl./mlに希釈
- vi) リゾチームおよびEDTA (最終濃度 1.5 mg/ml, 2 mM) を添加
- vii) 35℃で2時間細胞壁を消化後35℃, 12000 x g, 10 min遠心
- viii) 沈澱を調製液に懸濁し35℃, 12000 x g, 10 min遠心
- ix) 沈澱を少量の調製液で懸濁し15倍量の20 mM HEPES NaOH (pH 7.0)を加えて攪拌
- x) MgCl₂添加 (最終濃度 5 mM) 後2-3滴のDNase Iを加えて攪拌-以後は水冷化にて操作
- xi) 2 M ショ糖, 200 mM HEPES NaOH (pH 7.0), 40 mM MgCl₂を加えショ糖濃度を0.5 Mにした後攪拌、遠心 (36000 x g, 15 min, 0℃)
- xii) 沈澱を0.5 M ショ糖, 50 mM HEPES NaOH (pH 7.0), 10 mM MgCl₂で懸濁後遠心 (36000 x g, 15 min, 0℃) - 数回繰り返す。
- xiii) 沈澱を少量の1 M ショ糖, 50 mM HEPES NaOH (pH 7.0), 10 mM MgCl₂で懸濁
- xiv) 懸濁液を液体窒素中に滴下し粒状に凍結した後保存 (-80℃)

(クロロフィルの定量)

藻体のクロロフィル定量: 藻体の懸濁液20 mlに100%メタノール2 mlを加え100倍の希釈液を作り、3500 x gで1-2分遠心した。この上澄みの665 nm(A₆₆₅)の吸光度を測定し下記の計算式よりクロロフィル含量を定量した。

$$\text{Chl} (\mu\text{g/ml}) = 13.42 \times (A_{665}) \times 100$$

チラコイドのクロロフィル定量: チラコイド膜懸濁液10 μlに80%アセトン2 mlを加え200倍の希釈液を作成し、3500 x gで1-2分遠心した。この上澄みの663 nm(A₆₆₃)の吸光度を測定し下記の計算式よりクロロフィル含量を定量した。

$$\text{Chl} (\mu\text{g/ml}) = 12.19 \times (A_{663}) \times 100$$

3. PET阻害試験

これらの植物の単離葉緑体及びチラコイドを用いたHill反応は、ホウレンソウの場合と同様に行った。

5) ウレア側鎖をもつ3-ニトロフロログルシンカルボン酸エステル類の合成

本化合物の合成も基本的には1)と同様である。即ち、先ずフロログルシンカルボン酸をニトロ化して3-ニトロフロログルシンカルボン酸を得た。ついでこれにやはり前章のエステル誘導体の合成の項で述べたようにウレア側鎖を持つアルコールを、DCCを用いてカップリングさせ、目的とするウレア側鎖を持つエステル誘導体を合成した。

また、合成に用いた各種ウレア側鎖を持つアルコールの合成も、基本的にはすべて同様に方法によって得ることができた。以下、代表的なものについてその反応条件を記す。

1. ウレア側鎖部の合成

(*N*-ヒドロキシエチル-*N*-フェニルウレアの合成)

塩化カルシウム乾燥管をつけた200 mlのフラスコ中、1-アミノエタノール 0.61 g (10 mmol) を室温にて塩化メチレンに溶解し、攪拌しながら氷冷した。塩化メチレンに溶解したフェニルイソシアネート 1.19 g (10 mmol) を滴下し、約1時間攪拌を続けたのち、析出した結晶を濾取すると、目的とする*N*-ヒドロキシエチル-*N*-フェニルウレアが定量的に得られた。

$^1\text{H-NMR}$ (δ - CDCl_3 , CD_3OD /TMS ppm): 3.3(2H, m), 3.7 (2H, m), 7.0-7.5 (5H)

同様に、用いるイソシアネートを3,4-ジクロロフェニルイソシアネートとし各種アミノアルコールと反応させると、各種*N*-ヒドロキシアールキル-*N*-3,4-ジクロロフェニルウレアを得ることができた。

2. ウレア側鎖部と3-ニトロフロログルシンカルボン酸のカップリング

(2-(3-フェニルウレイド)エチル)-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンゾエートの合成)

3-ニトロフロログルシンカルボン酸の粗結晶860 mg (4 mmol)を*N*-ヒドロキシエチル-*N*-フェニルウ

レア1.8 g (10 mmol)とともに無水THF100 mlに、室温で溶解し、その後氷冷した。ここに、830 mg (4 mmol)のDCCのTHF溶液を徐々に加えた。このまま約20分間攪拌を続け、その後室温に戻し、3時間攪拌した。

反応液の不溶物をひだおり濾紙によって濾過し、減圧下濃縮後、ヘキサン:酢酸エチル:ギ酸=100:1を用いるシリカゲルカラムにより精製した。

ヘキサン:酢酸エチルから再結晶し、(2-(3-フェニルウレイド)エチル)-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシベンゾエートを800 mg得た。

融点 125-127℃

¹H-NMR (δ-DMSO-d₆/TMS ppm): 3.7 (2H, d, t, J=6Hz,6Hz), 4.4 (2H, t, J=6Hz), 6.1 (1H, s), 6.3 (1H, t, J=6Hz), 6.8-7.4 (5H), 8.9 (1H, s)

各化合物の物性値は表E1-4, E2-2に表示した。

6) *In vivo* 除草活性試験

1. モヤシマメ幼胚軸試験

播種後約1週間~10日のモヤシマメ幼胚軸を葉のついたまま長さ約8 cmに水切りした。これを2 mlの試料を含む小試験管にいれ、昼27℃夜20℃に保たれたガラス温室中で培養し、適宜蒸留水を補充しながら、生長を観察した。

2. タバコ光mixotrophic細胞生育試験

タバコ光mixotrophic細胞は京都大学山田教授から供与された。この細胞0.5 gを50 ml三角フラスコ中、0.5-0.25 mlの試料のメタノール溶液を含む12.5 mlのLS改変培地 (3%ショ糖、10 μMナフタレン酢酸、1 μMカイネチン、2倍量のビタミン類を含むLS基本培地 (培地組成は表E3-1参照)) 中で2週間、明所 (6000-8000 lux) 下、26℃にて生育させた。培地を吸引濾過により取り除き、細胞の生重量を測定し、また形態を観察した。試料の生育阻害活性は、対照区に対する重量比で判定し、IC₅₀ (50%生育阻害濃度) および、pI₅₀ (IC₅₀の逆対数値) を求めた。

3. ポット試験による除草活性試験

ポット試験による除草活性試験では、供試化合物を9倍量のキャリア（ジークライト:97%、ソルボール800A:1.5%、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム:1.5%（w/w））と均一に混和して製剤した10%（w/w）水和剤を用いた。

1) 茎葉処理試験（畑地条件）

畑土壌（壤土）を充填した200 cm²の磁製ポットに、イチビの種子を0.5 cmの深さに播種し、出芽後（イネ科雑草の2葉期）に、所定量の薬剤を含む水和剤水希釈液を10 l/aの水量で茎葉に噴霧処理した。薬剤処理後、それぞれのポットをガラス室内（20～30℃）に20日間静置し、除草活性を評価した。

2) 湛水土壌処理（水田条件）

代かき状態の水田土壌（洪積火山灰土、埴壤土）を充填した200 cm²の磁製ポットに、食用ビエの種子を土壌表層より0.5 cmの深さに混合した。次いで湛水深を2 cmとし、3日後に所定量の薬剤を含む水和剤水希釈液を10 l/aの水量で水面に滴下処理した。薬剤処理後、それぞれのポットをガラス室内（20～30℃）に21日間静置し、除草活性を評価した。

4. クレス種子発芽試験

内径5 cmのディスポーザブルのペトリ皿に直径5 cmの濾紙を敷き、これに被験化合物のエタノール溶液を染み込ませたのち、風乾してエタノールを除去した。この後1 mlの蒸留水を加え、クレス種子を25粒均一に播種した。ペトリ皿をアルミ箔で覆い、25℃で48時間培養した後、未発芽種子の数をから発芽阻害活性を検定した。

7) Epstein Barr Virus 早期抗原 (EBV-EA) 産生抑制試験

1. EBV-EA産生抑制試験の実験条件

1) 培地の調製

粉末RPMI-1640培地を表E4に示す組成になるように、脱塩後2度蒸留した蒸留水に溶かした。この際、小指の先程のドライアイスを加えpHを6.0位まで下げ溶解を容易にした。粉末が完全に溶解した後、緩衝剤として炭酸水素ナトリウム(0.56 g/1000 ml)を、抗生物質としてペニシリンGカリウム (20万単位) および硫酸ストレプトマイシン(250 mg)を加えた。この溶液を滅菌濾過し、RPMI-1640培地とした。この培地に牛胎児血清(FBS)を、細胞培養用には8%になるように、EBV-EA産生抑制試験用には4%になるように加え基礎培地として実験に用いた。

2) Raji cell の培養

Epstein-Barr Virus早期抗原(EBV-EA)産生指示細胞であるRaji cellの培養にはポリスチレン製270 ml容(75 cm²)細胞培養フラスコを使用し、8% FBSを含むRPMI-1640培地を用いて、CO₂インキュベーター内で、37℃、5% CO₂存在下で培養した。細胞数が1-2 x 10⁶ cells/mlになった時点で、これを約5倍に希釈して継代的に培養した。なおこの植え継ぎ操作は3-4日に1度の頻度で行なった。EBV-EA産生抑制試験には細胞数が1-2 x 10⁶ cells/mlになったステージの細胞を用いた。

3) Raji cell の保存および解凍

Raji cellは適宜以下に示すような方法で凍結保存した。即ち、細胞数が1-2 x 10⁶ cells/mlになった時点で、細胞を含む培養液を150 x gで10分間遠心し、上澄みを除いた後、細胞にDMSOを10%含む8% FBS/RPMI-1640培地を加えて1.5 x 10⁷ cells/mlになるように懸濁させ、-80℃で凍結保存した。凍結した細胞の解凍は30℃の水浴上で行なった。解凍後細胞を8% FBS/RPMI-1640培地で3回洗浄した後、保存したときの5倍量の8% FBS/RPMI-1640培地で培養した。

4) 被験化合物溶液の調製

被験化合物溶液の調製は実験の直前に行なった。溶媒にはDMSOを用い、培養液中の最終的なDMSOの濃度が、早期抗原産生に影響を与えない1.0%以下になるように調製した。

5) TPA 溶液ならびにn-酪酸溶液の調製

TPAは1 μg/mlの濃度になるようにDMSOに溶解し、これを原液として-20℃で保存し、使用の際には20 ng/mlの濃度になるようにRPMI-1640培地で希釈して使用した。TPAによるEA発現率を上げ、検出感度を高めるために用いるn-酪酸ナトリウムは0.5 Mの無菌溶液として4℃で保存した。

2. EBV-EA 産生抑制試験

4% FBSを含むRPMI-1640培地(1 ml/tube)に*n*-酪酸(4 mM)およびTPA(20 ng/ml)を加え、さらに所定量の被験化合物溶液をプラスチック試験管に加えて検定用培地とした。あらかじめ8% FBS/RPMI-1640培地で培養しておいた検索用の指示細胞のあるRaji cellを遠心分離操作で集め、これを 1×10^6 cells/mlになるように検定培地に懸濁した。この懸濁液を37℃, 5% CO₂存在下で48時間培養後、遠心を行ない上清を除去、Mg, Caなどを含まないリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))(KCl 200 mg/l, KH₂PO₄ 200 mg/l, NaCl 8 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l) 0.1 mlで懸濁した。この細胞懸濁液をEBV-EA産生抑制試験および指示細胞の生存率の試験に使用した。

1) EA産生細胞率の測定

EBV-EA産生細胞率の測定は以下に示すとおり間接蛍光抗体法[107]で行なった。1.0 mlの検定用培地で反応させた細胞を150 x gで10分間遠心分離し、上清を除いた後PBS(-)を0.1 ml加え細胞を懸濁した。この懸濁液を無蛍光スライドガラスに塗抹し、風乾後、このスライドガラスをアセトン中に10分間浸漬して細胞をスライドガラス表面に完全固定し、これを検鏡用の試料として用いた。一次抗体として、EBV-EA抗体価が高い上咽頭癌(nasopharyngeal carcinoma; NPC)患者の血清[EA(+), カプシド抗原(viral capsid antigen; VCA)(+)]をあらかじめ反応に最適な抗体価となるようにPBS(-)で希釈調整しておき、これをスライドガラス上の各スポットに載せた後、水を含ませたペーパータオルを入れたペトリ皿内に置き、37℃で45分間抗原抗体反応を行なわせた。反応終了後、スライドガラスを約100 mlのPBS(-)に浸漬し、容器ごと30秒間振盪洗浄を行なった。この洗浄操作を2回行なった後にスライドガラスを風乾、つづいて二次抗体として、PBS(-)で20倍に希釈した蛍光性イソチオシアン酸エステル(fluorescein isothiocyanate; FITC)標識ヒトIgG抗体(ヤギ)を同スポットにのせ、一次抗体反応と同様に37℃で45分間反応させた。反応終了後、PBS(-)で2回洗浄し、無蛍光グリセリンを20%含むPBS(-)で封入を行ない、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。EA産生細胞はFITCの蛍光を発するため容易に判断することができる。TPAのみを加えたEA産生細胞(陽性細胞)を対照として各被験化合物を加えた陽性細胞を観察しその割合を百分率で表して抑制効果として記録した。各処理については、最低250細胞観察、2連で行ない、結果はその平均値で示した。

2) 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定はトリパンブルー染色法によって行なった。即ち、細胞懸濁液0.05 mlに、トリパンブルーを0.25%含むPBS(-)溶液0.05 mlを加え軽く攪拌後、懸濁液の一部を血球計算板に取り、生細

胞数と、トリパンブルーによって染まっている死細胞数をそれぞれ計測した。なお結果は2連での平均値で示した。

表E-4 RPMI-1640培地組成 (1000 ml中)

L-アルギニン	200.0 mg
L-アスパラギン (一水塩)	56.8 mg
L-アスパラギン酸	20.0 mg
L-シスチン二塩酸塩	65.0 mg
L-グルタミン酸	20.0 mg
L-グルタミン	300.0 mg
グルタチオン	1.0 mg
グリシン	10.0 mg
L-ヒスチジン	15.0 mg
L-ヒドロキシプロリン	20.0 mg
L-イソロイシン	50.0 mg
L-ロイシン	50.0 mg
L-リジン塩酸塩	40.0 mg
L-メチオニン	15.0 mg
L-フェニルアラニン	15.0 mg
L-プロリン	20.0 mg
L-セリン	30.0 mg
L-スレオニン	20.0 mg
L-トリプトファン	5.0 mg
L-チロシン	20.0 mg
L-バリン	20.0 mg
ビオチン	0.2 mg
パントテン酸カルシウム	0.25 mg
塩化コリン	3.0 mg
葉酸	1.0 mg
イノシトール	35.0 mg
ニコチン酸アミド	1.0 mg
バラアミノ安息香酸	1.0 mg
塩化ピリドキシン	1.0 mg
リボフラビン	0.2 mg
塩酸チアミン	1.0 mg
シアノコバラミン	5.0 µg
塩化ナトリウム	6.0 g
塩化カリウム	0.4 g
硝酸カルシウム (無水)	69.5 mg
リン酸一水素ナトリウム (無水)	801.0 mg
硫酸マグネシウム (無水)	48.8 mg
ブドウ糖	2.0 g
フェノールレッド	5.0 mg

8) マウス皮膚発癌二段階試験

6週令のSlc:ICR雌マウスの背部を剃毛した後、その翌日に剃毛した部分の皮膚に390 nmolのジメチルベンズアントラセン(DMBA)を含む0.1 mlのアセトン溶液を一回塗布した。DMBA塗布一週間後に同じ部位に12-*O*-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート(TPA)1.7 nmolを含む0.1 mlのアセトン溶液を週二回、20週にわたって塗布した。被験化合物の腫瘍発生抑制効果を見る操作として、上記TPAの塗布60分前に被験化合物をTPAに対して50倍すなわち85 nmolを含むアセトン溶液を塗布し、同様の処理を20週にわたって行ない腫瘍の発生状態を観察した。試験動物数は各処理群とも15匹を使用した。腫瘍発生抑制効果は、腫瘍を発生したマウスの数とマウス1匹あたりの腫瘍発生数の平均値を無処理群と比較することにより判定した。

9) ヒト5-リボキシゲナーゼ酵素阻害活性測定

1. ヒト5-リボキシゲナーゼ (5-LO) の調製

1) ヒト5-LOの大腸菌による生産

ヒト5-LO産生大腸菌(菌株 MV1184/ph5LOKC)を100 µg/mlのアmpiシリンを含むLB培地12.5 ml (Bacto tryptone 10 g/l, Yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, NaOH (pH=7.5))に、白金耳で少量接種し、30℃終夜培養(約12時間)にて前培養した。増殖した菌体5 mlを、TYSG培地500 ml (Bacto tryptone 10 g/l, Yeast extract 5 g/l, NaCl 20 g/l, グリセロール 20 ml/l, pH = 7.8) (3 l ひだつき三角フラスコ2本を用いる)に移植し、180 rpm, 22℃, 10時間培養した。この後、フラスコ1本あたり120 µmolのインプロビル-β-D-ガラクトピラノシド(IPTG)を添加し(ヒト5-LOを誘導する)、終夜(180 rpm, 22℃, 14時間)培養した。この菌体よりヒト5-LOを調製した。

2) ヒト5-LOの調製(大腸菌からの抽出、精製)

前記のヒト5-LOを産生した大腸菌菌体を、6000 rpm, 6 min 遠心で集菌した後、生理食塩水で2回洗浄した(菌体重量約15 g)。酵素の抽出効率を上げるため、この菌体を、KP-1 Buffer 150 ml (50 mM リン酸緩衝液, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH = 7.1))に懸濁し、70℃で保存した。保存液を溶かした後、酵素の失活を避けるため、ジチオスレイトール(DTT)、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)をそれぞれ0.3 mg/ml, 0.5 mMになるように加え、その後リゾチームを0.5 mg/mlになるよ

うに添加し、これを氷中1時間放置した。以下の操作は、酵素の失活を避けるためすべて氷冷ないし4℃で行なった。超音波で処理(1分間隔で1分間、5回繰り返す)し完全に菌体を破砕した後、6500 rpm、20分間遠心し、その上清を得た。得られた上清は、よく氷冷したメスシリンダーでその液量を測定し、176 g/lのよく粉砕した硫酸を加えた(30%硫酸)。このとき、2 NのNaOH溶液でpHを7.7.5に保った。硫酸が完全に溶解しても約1時間攪拌を続けた。6500 rpm、20分間遠心してその上清を得、これに同様に198 g/lのよく粉砕した硫酸を加えた(60%硫酸)。以下も同様に処理し、6500 rpm、20分間遠心の沈殿、即ち30%-60%硫酸画分を得た。これを適量のTES Buffer(50 mM Tris HCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% (v/v) グリセロール, pH = 7.9)に溶解し、透析してヒト5-LOの粗酵素溶液を得た。得られた粗酵素溶液は-70℃で保存した。

(タンパク質含量の測定)

粗酵素液を0.1 M Tris bufferで種々の濃度に希釈した溶液20 μ lにprotein assay dye reagent (BioRad社)の5倍希釈液1 mlを添加し、30℃、5分反応させた。この溶液の595 nmの吸収(A_{595})を測定し、ウシ γ -グロブリンを標準タンパク質溶液として定量した。本粗酵素液のタンパク質含量は20 mg protein/mlであった。

2. 酵素阻害活性検定

得られた粗酵素液を用いて以下に示すように被験化合物の阻害活性を検討した。

被験化合物のDMSO溶液10 μ l、ヒト5-LO粗酵素溶液10 μ lを含む98 μ lの検定溶液(0.1M TrisHCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM ATP, 1 mM 還元型グルタチオン pH 8.0)を30℃、2分振盪した(前処理)。ここに基質として50 mMのアラキドン酸2 μ lを添加し、30℃、10分振盪することにより酵素反応を進行させた。0℃のメタノール(内部標準物質として13-OH-リノレン酸 200 ng/mlを含む)300 μ l, 1 Mの酢酸水溶液1 μ lを添加することによって反応を停止し、10000 rpm、10分間遠心しメタノール層を上清として得、これをHPLC分析(分析条件; カラム: Capcell Pak C₁₈ 4.6 ϕ x 150 mm; 溶媒: メタノール: 水: 酢酸 = 75: 25: 0.01; カラム温度: 38℃; 流速: 1.2 ml/min; 検出: UV 233 nm (吸収))に供した。

被験化合物の阻害活性はアラキドン酸より誘導される5-HETEと5-HPETEのピーク面積の和を内部標準(13-OH-リノレン酸)を基準として求め、阻害剤無処理区との比をもとに判定した。

本検定条件における阻害剤無添加時の酵素活性は1.8 nmol product (5-HETE+5-HPETE)/mg proteinであった。また本検定条件において、約 10^{-3} Mのコヒー酸(阻害活性のPositive Control)が、酵素活性を50%阻害した。

10) シクロオキシゲナーゼ酵素阻害活性測定法

1. シクロオキシゲナーゼの調製

(ウサギ腎臓ミクロソームより酵素を調製)

- i) ウサギより腎臓を摘出し、その表皮、脂肪を除去。以下の作業は氷冷下 (4℃) にて行った。
- ii) 腎臓を約3等分し、リン酸緩衝液 (0.1 M, pH=7.5, 1 mM 還元型グルタチオン) に浸漬。
- iii) 腎臓の皮質を除去、内側にある脂肪も除去。
- iv) テフロンガラスホモジナイザーを用いて破碎。
- v) 9000 x g, 15 min遠心し、固形物を除去 (RA-3, 9000 rpm)。
- vi) 二重のガーゼにて濾過。
- vii) 濾液を100000 x g, 1 hr 超遠心 (RP-30, 30000 rpm)。
- viii) 上清を捨て、沈殿が舞い上がらないように軽くバッファーで洗浄。最初に用いた腎臓随質と同じ重さのバッファーで沈殿を懸濁。
- ix) これをガラスホモジナイザーに移し、ホモジナイザーを数回ピストン運動させ均一にホモジナイズ。これを粗酵素液として検定に用いた。また本粗酵素は-80℃の保存で1年以上活性を維持した。

2. 阻害活性検定

上記の粗酵素液を用い以下の条件で被験化合物の当酵素に対する阻害活性を検定した。

i) 検定溶液

10 mM	ヘモグロビン	5 μl
40 mM	トリプトファン	50 μl
80 mM	還元型グルタチオン	10 μl
0.5 M	リン酸バッファー (pH 7.5)	40 μl
H ₂ O		63 μl
Enzyme		20 μl
		188 μl

ii) 反応

被験化合物 (DMSO溶液) 2 μl, 1.35 μCiアラキドン酸 (エタノール溶液) 10 μl, 検定溶液

188 μ l を混合し37°C, 20 分反応 (連続振盪)

- iii) 停止 1 N HCl 50 μ l 添加、ジエチルエーテル250 μ l にて抽出
- iv) 分離 2000 rpm, 5 min 遠心
- v) 分析 ジエチルエーテル相50 μ l を TLC にて展開

TLC条件

TLC : Wattman HPTLC 10 x 10 cm, 0.2 mm thickness (No. 4805-411)

Solvent : CHCl_3 :MeOH: CH_3COOH = 108: 6: 6

- vi) 展開後TLC をFuji BA100 Film に露光 (終夜)
- vii) BA100 Film Reader にて読み取り
阻害活性は各化合物処理区のプロスタグランジン E_2 (PGE_2)画分の放射活性をコントロールの PGE_2 画分の値の百分率として検定。
- viii) 本検定系において、インドメタシン (Positive Control) は約 10^{-6} - 10^{-7} Mの IC_{50} 値を示した。

参考文献

- 1 C. Fedtke (1982), *Biochemistry and physiology of herbicide actions*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 20-85.
- 2 J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel (1985), Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution, *Nature*, **318**, 618-624.
- 3 吉坂琢磨, 三木邦夫, 笠井暢民, 佐藤公行, 三室守, 岩城雅代, 伊藤繁 (1991), 高等植物光化学系II 反応中心複合体の結晶化標品の調製とその性質, 日本化学会春季年会講演予稿集, p 1214.
- 4 S. Yoshida, T. Asami, T. Kawano, K. Yoneyama, W. D. Crow, D. M. Paton and N. Takahashi (1988), Photosynthetic inhibitors in *Eucalyptus grandis*, *Phytochemistry*, **27**, 1943-1946.
- 5 W. D. Crow, T. Osawa, D. M. Paton and R. R. Willing (1977), Structure of grandinol: A novel root inhibitor from *Eucalyptus grandis*, *Tetrahedron Lett.*, 1073.
- 6 M. Bolte, J. Bowers, W. D. Crow, D. M. Paton, A. Sakurai, N. Takahashi, M. Uji-ie and S. Yoshida (1984), Germination inhibitor from *Eucalyptus pulverulenta*, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 373-376.
- 7 R. Nakayama, M. Murata, S. Homma and K. Aida (1990), Antibacterial compounds from *Eucalyptus perriniana*, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 231-232.
- 8 T. D. Sharkey, G. F. Stevenson and D. M. Paton (1982), Effects of G, a growth regulator from *Eucalyptus grandis* on photosynthesis, *Plant Physiol.*, **69**, 935-938.
- 9 A. Trebst, W. Donner and W. Draber (1984), Structure activity correlation of herbicides affecting plastoquinone reduction by photosystem II: Electron density distribution in inhibitors and plastoquinone species, *Z. Naturforsch.*, **39c**, 405-411.
- 10 S. Yoshida, T. Asami, Y. Tsuchihashi, M. Uji-ie, K. Yoneyama and N. Takahashi (1989), Biological activity of nitrochlorophenone derivatives, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 229-233.
- 11 K. Yoneyama, T. Asami, W. D. Crow, N. Takahashi and S. Yoshida (1989), Photosynthetic electron transport inhibition by chlorophenone derivatives, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 471-475.
- 12 K. Yoneyama, M. Konnai, T. Takematsu, H. Iwamura, T. Asami, N. Takahashi and S. Yoshida (1989), Photosynthetic electron transport inhibition by 3-acyl-2,4,6-trihydroxybenzamide derivatives, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1953-1959.
- 13 K. Yoneyama, M. Konnai, T. Takematsu, T. Asami, N. Takahashi and S. Yoshida (1989), Inhibition of photosynthesis by 3-acyl-2,4,6-trihydroxythiobenzamide derivatives, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2281-2282.
- 14 R. Leuckart and M. Schmidt (1885), Über die Einwirkung von Phenylcyanat auf Phenole und Phenoläther, *Chem. Ber.*, **18**, 2338-2341.

- 15 S.V. Dubiel Jr. and S. Zuffanti (1954), Nitro derivative of phloroglucinol, *J. Org. Chem.*, **19**, 1359-1362.
- 16 F. Effenberger and R. Gleiter (1964), Die Friedel-Crafts-reaktion von Isocyanaten mit Benzolderivaten, *Chem. Ber.*, **97**, 472-479.
- 17 P. A. S. Smith and R. O. Kan (1964), Cyclization of isothiocyanate as a route to phthalic and homophthalic acid derivatives, *J. Org. Chem.*, **29**, 2261-2265.
- 18 G.W. Anderson, J.E. Zimmerman and F.M. Callahan (1964), The use of esters of *N*-hydroxysuccinimide in peptide synthesis, *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1839-1842.
- 19 薬物の構造活性相関, 構造活性相関懇談会編集, 化学の領域増刊122号, 南江堂
- 20 有機合成の最前線—高選択性を追求する—(1985), 向山光昭, 土橋源一編, 現代化学 増刊3号, 東京化学同人
- 21 Stereoselectivity of pesticides-Biological and chemical problem-; Chemicals in agriculture vol. 1 (1988), Eds. E. J. Ariëns, J. J. S. van Rensen and W. Welling, Elsevier, Amsterdam.
- 22 G. Gardner and J. R. Sanborn (1987), The role of chirality in the activity of photosystem II herbicides, *Z. Naturforsch.*, **42c**, 663-669.
- 23 Y. Shigematsu, F. Sato and Y. Yamada (1989), Binding model for phenylurea herbicides based on analysis of a Thr264 mutation in the D-1 protein of Tobacco, *Pesticide Biochem. Physiol.*, **35**, 33-41.
- 24 K. Mitsutake, H. Iwamura, R. Shimizu and T. Fujita (1986), Quantitative structure- activity relationships of photosystem II inhibitors in chloroplasts and its link to herbicidal action, *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 725-732.
- 25 C. Hansch and T. Fujita (1964), ρ - σ - π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1616-1625.
- 26 E. Kakkis, V. C. Palmire Jr., C. D. Strong, W. Bertsch, C. Hansch and U. Schirman (1984), Quantitative structure-activity relationships in the inhibition of photosystem II in chloroplasts by phenylureas, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 133-144.
- 27 R. Shimizu, H. Iwamura and T. Fujita (1988), Quantitative structure-activity relationships of photosystem II inhibitory anilides and triazines. Topological aspects of their binding, *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1276-1283.
- 28 I. Takemoto, R. Yoshida, S. Sumida and K. Kamoshita (1985), Quantitative structure-activity relationships of herbicidal *N*-substituted phenyl-*N*-methoxy-*N*-methylureas, *Pesticide Biochem. Physiol.*, **23**, 341-348.

- 29 Pomona Colledge Medicinal Chemistry database
- 30 中川好秋, 岩村俊-私信
- 31 林善明 (1983), 博士論文, 京都大学農学部.
- 32 C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K-H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien (1973), "Aromatic" substituent constants for structure-activity correlations, *J. Med. Chem.*, **16**, 1207-1216.
- 33 A. Trebst and B. Depka (1985), Inhibition of photosynthetic electron transport by halogenated 4-hydroxy-pyridines, *Z. Naturforsch.*, **40c**, 391-399.
- 34 A. Trebst (1987), The three-dimensional structure of herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II, *Z. Naturforsch.*, **42c**, 742-750.
- 35 P. Böger and K. J. Kunert (1979), Differential effects of herbicides upon trypsin-treated chloroplasts, *Z. Naturforsch.*, **34c**, 1015-1025.
- 36 S. Reimer, K. Link and A. Trebst (1979), Comparison of the inhibition of photosynthetic reactions in chloroplasts by dibromothymoquinone, bromonitrothymol and ioxynil, *Z. Naturforsch.*, **34c**, 419-426.
- 37 W. Arnold and H. Sherwood (1957), Are chloroplasts semiconductors?, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **43**, 105-114.
- 38 井上頼直 (1979), 後続発光・熱発光などによる解析, 光合成の機作, 蛋白質・核酸・酵素 別冊, **21**, 72-81.
- 39 P. Joliot, G. Barbieri and R. Chabaud (1969), Un nouveau modele des centres photochimiques du system II, *Photochem. Photobiol.*, **10**, 309-329.
- 40 B. Kok, B. Forbush and M. McGloin (1970), Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-1: A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457-475.
- 41 H. J. Van Gorkom (1974), Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem II as a bound semiquinone anion, *Biochim. Biophys. Acta*, **347**, 439-442.
- 42 B. R. Velthuys and J. Amesz (1974), Charge accumulation at the reducing site of system 2 photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 85-94.
- 43 A. W. Rutherford, A. R. Crofts and Y. Inoue (1982), Thermoluminescence as a probe of photosystem II photochemistry: The origin of the flash-induced glow peak, *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 457-465.
- 44 Y. Inoue and K. Shibata (1978), Oscillation of thermoluminescence at medium-low temperature, *FEBS Lett.*, **85**, 193-197.

- 45 S. Demeter, I. Vass (1984), Charge accumulation and recombination in photosystem II studied by thermoluminescence, *Biochim. Biophys. Acta*, **764**, 24-32.
- 46 I. Vass and S. Demeter (1982), Classification of photosystem II inhibitors by thermodynamic characterization of the thermoluminescence of inhibitor-treated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 496-499.
- 47 T. Asami, H. Koike, Y. Inoue, N. Takahashi and S. Yoshida (1988), Structure activity relationships and physiological aspects of new photosynthetic electron transport inhibitors, 3-alkylaminoalkyliden-2H-pyran-2,4(3H)-diones (APs), *Z. Naturforsch.*, **43c**, 857-861.
- 48 W. Oettmeier, K. Masson and J. Höfelfeld (1989), [¹²⁵I]Azide-oxynil labels Val₂₄₉ of the photosystem II D-1 reaction center protein, *Z. Naturforsch.*, **44c**, 444-449.
- 49 G. F. Ryan (1970), Resistance of common groundsel to simazine and atrazine, *Weed Sci.*, **18**, 614-616.
- 50 D. Peabody (1974), Herbicide tolerant weeds appear in western Washington, *Weeds Today*, **5**, 14.
- 51 J. D. Bandeen and R. D. McLaren (1976), Resistance of *Chenopodium album* to triazine herbicide, *Can. J. Plant Sci.*, **56**, 411-412.
- 52 S. R. Radosevich and A. P. Appleby (1973), Studies on the mechanism of resistance to simazine in common groundsel, *Weed Sci.*, **21**, 497-501.
- 53 K. I. N. Jensen, J. D. Bandeen and V. Souza Machado (1977), Studies on the differential tolerance of two lamb's-quarters selections to triazine herbicide, *Can. J. Plant Sci.*, **57**, 1169-1177.
- 54 V. Souza Machado, C. J. Arntzen, J. D. Bandeen and G. R. Stephenson (1978), Comparative triazine effects upon system II photochemistry in chloroplasts of two common lambsquarters (*Chenopodium album*) biotypes, *Weed Sci.*, **26**, 318-322.
- 55 S. R. Radosevich, K. E. Steinback and C. J. Arntzen (1979), Effect of photosystem II inhibitors on thylakoid membranes of two common groundsel (*Senecio vulgaris*) biotypes, *Weed Sci.*, **27**, 278-282.
- 56 K. Pfister, S. R. Radosevich and C. J. Arntzen (1979), Modification of herbicide binding to photosystem II in two biotypes of *Senecio vulgaris* L., *Plant Physiol.*, **64**, 995-999.
- 57 J. Hirschberg and L. McIntosh (1984), Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*, *Science*, **222**, 1346-1348.
- 58 P. K. Wolber, M. Eilmann, and K. E. Steinback (1986), Mapping of the triazine binding site to a highly conserved region of the Q_B-protein, *Arch. Biochim. Biophys.*, **248**, 224-233.
- 59 R. Dostatni, H. E. Meyer and W. Oettmeier (1988), Mapping of two tyrosine residues involved in the quinone-(Q_B) binding site of the D-1 reaction center polypeptide of photosystem II, *FEBS Lett.*, **239**, 207-210.

- 60 H. Michel, O. Epp, and J. Deisenhofer (1986), Pigment-protein interaction in the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *EMBO J.*, **5**, 2445-2451.
- 61 K. Pfister and C. J. Arntzen (1979), The mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes, *Z. Naturforsch.*, **34c**, 996-1009.
- 62 N. Ohad, D. A. Shapira, H. Koike, Y. Inoue, I. Ohad and J. Hirschberg (1990), Amino acid substitution in the D1 protein of photosystem II affects Q_B -stabilization and accelerates turnover of D1, *Z. Naturforsch.*, **45c**, 402-408.
- 63 J. Hirschberg, A. Bleecker, D. J. Kyle, L. McIntosh and C. J. Arntzen (1983), The molecular basis of triazine-herbicide resistance in higher-plant chloroplasts, *Z. Naturforsch.*, **39c**, 412-420.
- 64 J. M. Erickson, M. Rahire, P. Bennoun, P. Delepeleire, B. Diner and J. D. Rochaix (1984), Herbicide resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* results from a mutation in the chloroplast gene for the 32-kilodalton protein of photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 3617-3621.
- 65 R. E. Galloway and L. J. Mets (1984), Atrazine, Bromacil, and Diuron resistance in *Chlamydomonas*, *Plant Physiol.*, **74**, 469-474.
- 66 J. M. Erickson, M. Rahire, J. D. Rochaix and L. Mets (1985), Herbicide resistance and cross resistance: Changes at three distinct sites in the herbicide-binding protein, *Science*, **228**, 204-207.
- 67 H. Janatkova and F. Wildner (1982), Isolation and characterization of metribuzine-resistant *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 227-233.
- 68 N. Pucheu, W. Oettmeier, U. Heisterkamp, K. Masson and G. F. Wildner (1984), Metribuzine-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Z. Naturforsch.*, **39c**, 437-439.
- 69 U. Johanningmeier, U. Bodner and G. F. Wildner (1987), A new mutation in the gene coding for the herbicide-binding protein in *Chlamydomonas*, *FEBS Lett.*, **211**, 221-224.
- 70 S. S. Golden and L. A. Sherman (1984), Biochemical and biophysical characterization of herbicide-resistant mutants of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2, *Biochim. Biophys. Acta*, **764**, 239-246.
- 71 S. S. Golden and R. Haselkorn (1985), Mutation of herbicide resistance maps within the *psbA* gene of *Anacystis nidulans* R2, *Science*, **229**, 1104-1107.
- 72 J. N. Phillips and J. L. Huppatz (1987), Cyanoacrylate inhibitors of photosynthetic electron transport in atrazine susceptible and atrazine resistant *Brassica* chloroplasts, *Z. Naturforsch.*, **42c**, 670-673.
- 73 F. Sato, Y. Shigematsu and Y. Yamada (1988), Selection of an atrazine-resistant tobacco cell line having a mutant *psbA* gene, *Mol. Gen. Genet.*, **214**, 358-360.
- 74 J. Hirschberg, N. Ohad, I. Pecker and A. Rahat (1987), Isolation and characterization of herbicide resistant mutants in the cyanobacterium *Synechococcus* R2, *Z. Naturforsch.*, **42c**, 758-761.

- 75 J. N. Phillips--私信
- 76 G. Gardner (1981), Azideatrazine: Photoaffinity label for the site of triazine herbicide action in chloroplasts, *Science*, **211**, 937-940.
- 77 三木邦夫, J. Deisenhofer, H. Michel (1989), 紅色光合成細菌の反応中心複合体の立体構造, 蛋白質・核酸・酵素, **34**, 726-740.
- 78 H. Michel (1982), Three-dimensional crystals of a membrane protein complex: The photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, **158**, 567-572.
- 79 J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel (1984), X-ray structure analysis of a membrane protein complex: Electron density map at 3Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, **180**, 385-398.
- 80 G. Ajilani, I. Meyer, C. Vernotte and C. Astier (1989), Mutation in phenol-type herbicide resistance maps within the *psbA* gene in *Synechocystis* 6714, *FEBS Lett.*, **246**, 207-210.
- 81 S. Creuzet, G. Ajilani, C. Vernotte and C. Astier (1990), A new Ioxynil resistant mutant in *Synechocystis* PCC 6714: Hypothesis on the interaction of Ioxynil with the D1 protein, *Z. Naturforsch.*, **45c**, 436-440.
- 82 N. E. Good (1961), Inhibitors of the Hill reaction, *Plant Physiol.*, **36**, 788-803.
- 83 M. L. Bolte, W. D. Crow, N. Takahashi, A. Sakurai, M. Ujji-ie and S. Yoshida (1985), Structure/activity relationships of grandinol: a germination inhibitor in *Eucalyptus*, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 761-768.
- 84 K. Yoneyama, M. Konnai, T. Takematsu, S. Yoshida, N. Takahashi and W. D. Crow (1987), Germination inhibitory activity of grandinol analogues, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2607-2608.
- 85 中沢透, 浅見行一 (1975), ミトコンドリア (UPバイオロジー 12), 東京大学出版会, pp. 52-56.
- 86 佐藤文彦 (1987), 光独立栄養培養細胞を用いた光合成阻害型除草剤抵抗性に関する研究, 昭和62年度科学研究費補助金 (一般研究C) 研究成果報告書
- 87 F. Sato, S. Takeda and Y. Yamada (1987), A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings, *Plant Cell Reports*, **6**, 401-404.
- 88 A. Trebst--私信
- 89 R. Xu, J. K. Snyder and K. Nakanishi (1984), Robustadiols A and B from *Eucalyptus robusta*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **106**, 734-736.

- 90 M. Tada, T. Takakuwa, M. Nagai and T. Yoshii (1990), Antiviral and antimicrobial activity of 2,4-diacylphloroglucinol, 2-acylcyclohexane-1,3-diones and 2-carboxamidocyclohexane-1,3-diones, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3061-3063.
- 91 M. Kozuka, T. Sawada, F. Kasahara, E. Mizuta, T. Amano, T. Komiya and M. Goto (1982), The granulation inhibiting principles from *Eucalyptus globulus* Labill II: The structures of euglobal -Ia1, -Ia2, -Ib, -Ic, -IIa, -IIb and -IIc, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1952-1963.
- 92 M. Kozuka, T. Sawada, E. Mizuta, F. Kasahara, T. Amano, T. Komiya and M. Goto (1982), The granulation-inhibiting principles from *Eucalyptus globulus* Labill III: The structures of Euglobal-III, -IVb and -VII, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1964-1973.
- 93 M. Takasaki, T. Konoshima, T. Shingu, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima and M. Kozuka (1990), Structures of euglobal-G1, -G2 and -G3 from *Eucalyptus grandis*, three new inhibitors of Epstein-Barr virus activation, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1444-1446.
- 94 M. Takasaki, T. Konoshima, K. Fujitani, S. Yoshida, H. Nishimura, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima and M. Kozuka (1990), Inhibitors of skin-tumor promotion. VIII. Inhibitory effects of euglobals and their related compounds in Epstein-Barr virus activation.(1), *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2737-2739.
- 95 M. A. Epstein, B. G. Achong and Y. M. Barr (1964), Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma, *Lancet*, **1**, 702-703.
- 96 伊藤洋平 (1985), 基礎の立場から, *医学のあゆみ*, **134**, 1162-1169.
- 97 N. Yamamoto and H. zur Hausen (1979), Tumor promoter TPA enhances transformation of human leukocytes by Epstein-Barr virus, *Nature*, **280**, 244-245.
- 98 H. zur Hausen, G. W. Bornkamm, R. Schmidt and E. Hecker (1979), Tumor initiators and promoters in the induction of Epstein-Barr virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 782-785.
- 99 Y. Ito, M. Kawanishi, T. Harayama and S. Takabayashi (1981), Combined effects of the extracts from *Croton tiglium*, *Euphorbia lathyris*, or *Euphorbia tirucalli* and *n*-butylate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells, *Cancer Lett.*, **12**, 175-180.
- 100 Y. Ito, S. Yanase, F. Fujita, T. Harayama, M. Takashima and H. Imanaka (1981), A short-term in vitro assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr virus, *Cancer Lett.*, **13**, 29-37.
- 101 E. Hecker (1968), Carcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae, *Cancer Res.*, **28**, 2338-2349.
- 102 E. Hecker, H. Bartsch, H. Bresch, M. Gschwendt, E. Härle, G. Kreibich, H. Kubinyi, H. U. Schairer, Ch. v. Szczepanski and H. W. Thielmann (1967), Structure and stereochemistry of the tetracyclic diterpene phorbol from *Croton tiglium* L., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 3165-3170.

- 103 H. Okamoto, D. Yoshida and S. Mizusaki (1983), Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced induction in Epstein-Barr virus early antigen in Raji cells, *Cancer Lett.*, **19**, 47-53.
- 104 H. Ohigashi, H. Takamura, K. Koshimizu, H. Tokuda and Y. Ito (1986), Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae* L., *Cancer Lett.*, **30**, 143-151.
- 105 T. Matsumoto and H. Tokuda (1990), Antitumor-promotion activity of sesquiterpene isolated from an herbal spices; in Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II, Ed. by Y. Kuroda, D. M. Shankel and D. Maters, Plenum Publishing Corp., pp. 423-427.
- 106 T. Konoshima, M. Takasaki, M. Kozuka, A. Inada, T. Nakanishi, H. Tokuda and T. Matsumoto (1989), Studies on inhibitors of skin tumor promotion (V); Inhibitory effects of flavonoids on Epstein-Barr virus activation II, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 135-141.
- 107 G. Helne and W. Helne (1966), Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma, *J. Bacteriol.*, **91**, 1248-1256.
- 108 S. M. Fischer (1985), Arachidonic acid metabolism and tumor promotion; in Arachidonic acid metabolism and tumor promotion, Ed. S. M. Fischer and T. J. Slaga, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 21-47.
- 109 H. Hennings and R. K. Boutwell (1970), Studies on the mechanism of skin tumor promotion, *Cancer Res.*, **30**, 312-320.
- 110 S. H. Yuspa, T. Ben, E. Patterson, D. Michael, K. Elgjo and H. Hennings (1976), Stimulated DNA synthesis in mouse epidermal cell cultures treated with 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Cancer Res.*, **36**, 4062-4066.
- 111 T. G. O'Brien, R. C. Simsiman and R. K. Boutwell (1975), Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis by tumor-promoting agents, *Cancer Res.*, **35**, 1662-1670.
- 112 T. G. O'Brien, R. C. Simsiman and R. K. Boutwell (1976), The effect of colchicine on the induction of ornithine decarboxylase by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Cancer Res.*, **36**, 3766-3770.
- 113 C. L. Ashendel and R. K. Boutwell (1979), Prostaglandin E and F levels in mouse epidermis are increased by tumor-promoting phorbol esters, *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 623-627.
- 114 E. Brensnick, P. Meunier and M. Larden (1979), Epidermal prostaglandins after topical application of a tumor promoter, *Cancer Lett.*, **7**, 121-125.
- 115 G. Fürstenberger and F. Marks (1980), Early prostaglandin E synthesis is an obligatory event in the induction of cell proliferation in mouse epidermis *in vivo* by the phorbol ester TPA, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **92**, 749-756.

- 116 A. K. Verma, C. L. Ashendel and R. K. Boutwell (1980), Inhibition by prostaglandin synthesis inhibitors of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity, the accumulation of prostaglandins, and tumor promotion caused by 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Res.*, **40**, 308-315.
- 117 T. Nakadate, S. Yamamoto, H. Iseki, S. Sonoda, S. Takemura, A. Ura, Y. Hosono and R. Kato (1982), Inhibition of 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion by nordihydroguaiaretic acid, a lipoxygenase inhibitor, and *p*-bromophenacyl bromide, a phospholipase A₂ inhibitor, *Gann*, **73**, 841-843.
- 118 T. Nakadate, S. Yamamoto, M. Ishii and R. Kato (1982), Inhibition of 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity by phospholipase A₂ inhibitors and lipoxygenase inhibitor, *Cancer Res.*, **42**, 2841-2845.
- 119 S. M. Fischer, G. D. Mills and T. J. Slaga (1982), Inhibition of mouse skin tumor promotion by several inhibitors of arachidonic acid metabolism, *Carcinogenesis*, **3**, 1243-1245.
- 120 S. M. Fischer, G. Fürstenberger, F. Marks and T. J. Slaga (1987), Event associated with mouse skin tumor promotion with respect to arachidonic acid metabolism: A comparison between SENCER and NMRI mice, *Cancer Res.*, **47**, 3174-3179.
- 121 S. M. Fischer, G. L. Gleason, G. D. Mills and T. J. Slaga (1980), Indomethacin enhancement of TPA tumor promotion in mice, *Cancer Lett.*, **10**, 343-350.
- 122 J. R. Vane (1971), Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nature (London), New Biol.*, **231**, 232-235.
- 123 B. Samuelsson (1983), Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Science*, **220**, 568-575.
- 124 M. Gschwendt, W. Kittstein, G. Fürstenberger and F. Marks (1984), The mouse ear edema: a quantitatively evaluable assay for tumor promoting compounds and for inhibitors of tumor promotion, *Cancer Lett.*, **25**, 177-185.
- 125 講座プロスタグランジン 7 (1988), 鹿取信, 室田誠逸, 山本尚三編, 東京化学同人, pp. 183-201.
- 126 M. Sugiura, Y. Naito, Y. Yamaura, C. Fukaya and K. Yokoyama (1989), Inhibitory activities and inhibition specificities of caffeic acid derivatives and related compounds toward 5-lipoxygenase, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1039-1043.
- 127 T. Nakadate, S. Yamamoto, E. Aizu and R. Kato (1984), Effects of flavonoids and antioxidants on 12-*o*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate caused epidermal ornithine decarboxylase induction and tumor promotion in relation to lipoxygenase inhibition by these compounds, *Gann*, **75**, 214-222.
- 128 M. Noguchi, T. Matsumoto, M. Nakamura and M. Noma (1989), Expression of human 5-lipoxygenase cDNA in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **249**, 267-270.

- 129 S. Kitamura, K. Hashizume, T. Iida, E. Miyashita, K. Shirahata and H. Kase (1986), Studies on lipoxygenase Inhibitors II KF8940 (2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide); A potent and selective inhibitor of 5-lipoxygenase produced *Pseudomonas methanica*, *J. Antibiot.*, **39**, 1160-1166.
- 130 T. Yoshimoto, C. Yokoyama, K. Ochi, S. Yamamoto, Y. Maki, Y. Ashida, S. Terao and M. Shiraishi (1982), 2,3,5-trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadiynyl)-1,4-benzoquinone (AA861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis, *Biochim. Biophys. Acta*, **713**, 470-473.
- 131 星恵子 (1990), 非ステロイド抗炎症剤のダブルインヒビター作用, *医薬ジャーナル*, **26**, 933-937.
- 132 徳田春邦-私信
- 133 E. Bresnick, G. Bailey, R. J. Bonney and P. Wightman (1981), Phospholipase activity in skin after application of phorbol esters and 3-methylcholanthrene, *Carcinogenesis*, **2**, 1119-1122.
- 134 S. Itoh, X. S. Tang and K. Sato (1986), Interaction of the high-spin Fe atom in the photosystem II reaction center with the quinones Q_A and Q_B in purified oxygen-evolving PS II reaction center complex and in PS II particles, *FEBS Lett.*, **205**, 275-281.
- 135 M. D. Percival (1991), Human 5-lipoxygenase contains an essential iron, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10058-10061.
- 136 J. J. M. C. de Groot, G. A. Verdink, J. F. G. Vliegthart, J. Boldingh, R. Wever and B. F. van Gelder (1975), Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1, *Biochim. Biophys. Acta*, **377**, 71-79.
- 137 石井聡-私信
- 138 講座プロスタグランジン 3 (1988), 鹿取信, 室田誠逸, 山本尚三編, 東京化学同人, pp. 359-379.
- 139 松本隆志 (1989), 5-リボキシゲナーゼ遺伝子のクローニング, *現代医療*, **21**, 3095-3100.

謝 辞

本論文は1987年4月より1989年3月までの間、日本たばこ産業より理化学研究所薬剂作用研究室への国内留学中に行った研究を中心として纏めたものであります。本研究を進めるに当たりましては、テーマの設定から実行、その発展に至りますまで理化学研究所 高橋信孝理事、薬剂作用研究室 吉田茂男主任研究員に全面的にご指導ご鞭撻頂きました。厚くお礼申し上げます。また、日本たばこ産業研究開発本部 加藤邦雄部長、並びに野間正名調査役、日本たばこ産業中央研究所 野口正雄所長、基本第一研究部 小岩井晃部長、松崎敏明主任研究員には、入社早々にこのような国内留学の機会を与えてくださいましたことに心より感謝致します。また、日本たばこ産業生命科学研究所 加藤邦雄所長、並びに小尾幸照所長、松下肇副所長、野間正名副所長、小岩井晃副所長、柴垣真主任研究員には、社内での組織改正にもかかわらず、本研究の継続をお許しいただいたことに心より感謝致します。また、本論文はこれ以外にも多くの方々のご協力のお陰で完成したものであります。

まず、合成した化合物の元素分析におきましては、理化学研究所 元素分析室の皆様にお世話になりました。第1章の定量的構造活性相関解析におきましては、京都大学農学部農芸化学科細胞有機化学研究室 岩村俣教授、並びに林哲良博士にお世話になりました。第2章の熱発光グローブ曲線解析では、理化学研究所太陽光エネルギー研究グループ井上頼直主任研究員、ならびに小池裕幸研究員をはじめとする同研究室の皆様、また日本女子大学4年生 智片裕香嬢にお世話になりました。除草剤抵抗性植物を用いた解析では、京都大学農学部細胞実験センター 山田康之教授ならびに佐藤文彦助教授、ヘブライ大学 Hirschberg教授に貴重な試料を快く提供して下さいましたことを深く感謝いたします。また実際の測定では、理化学研究所フロンティア研究員 郭尚洙博士、薬剂作用研究室 一瀬勝紀技師並びに日本女

子大学4年生 木谷緑嬢にご尽力頂きました。また、*in vivo*除草活性検定におきましては、理化学研究所フロンティア研究員 郭尚洙博士、薬剤作用研究室 一瀬勝紀技師、日本女子大学4年生 智片裕香嬢、同 鈴木雅夕子嬢、宇都宮大学雑草科学研究センター長 近内誠登教授、米山弘一助教授、小笠原勝助手にお世話になりました。これらの皆様に心から感謝致します。また第3章のEBV-EA産生抑制活性検定および、マウス皮膚発癌二段階試験につきましては、ほぼ全面的に京都府立医科大学生化学教室 岩島昭夫教授、西野輔翼助教授並びに徳田春邦助手、京都薬科大学天然物化学教室 小塚睦夫教授にお世話になりました。またこれら諸先生方におきましては、研究内容を本論文に掲載することを快く承諾して下さいました。厚くお礼申し上げます。アラキドン酸代謝酵素阻害活性測定におきましては、日本たばこ産業生命科学研究所 野間正名副所長、松本隆志主任研究員、野口正人博士に貴重なご助言ご助力を頂いたほか、同研究所 古野雅司研究員、福嶋敦研究員、大久保美穂嬢、同医薬研究所 福原克也主任研究員、同たばこ中央研究所 松崎敏明主任研究員、二宮正紀研究員に実際の阻害活性検定におきましてご協力頂きました。心よりお礼申し上げます。

また理化学研究所薬剤作用研究室の皆様、また同研究室への各企業からの受託研究生の皆様、理化学研究所留学中快適な生活環境を提供して下さいました日本フィルター朝霞工場の皆様、日本たばこ産業中央研究所基本第一研究部の皆様、同生命科学研究所第5研究チーム、第6研究チームの皆様をはじめとする生命科学研究所の皆様、同医薬研究所第3研究チームの皆様、日本たばこ産業青葉台研究所の守衛所の皆様には、本研究および本論文の完成を暖かく見守ってくださり、ときにご助力、叱咤激励を頂きました。心よりお礼申し上げます。

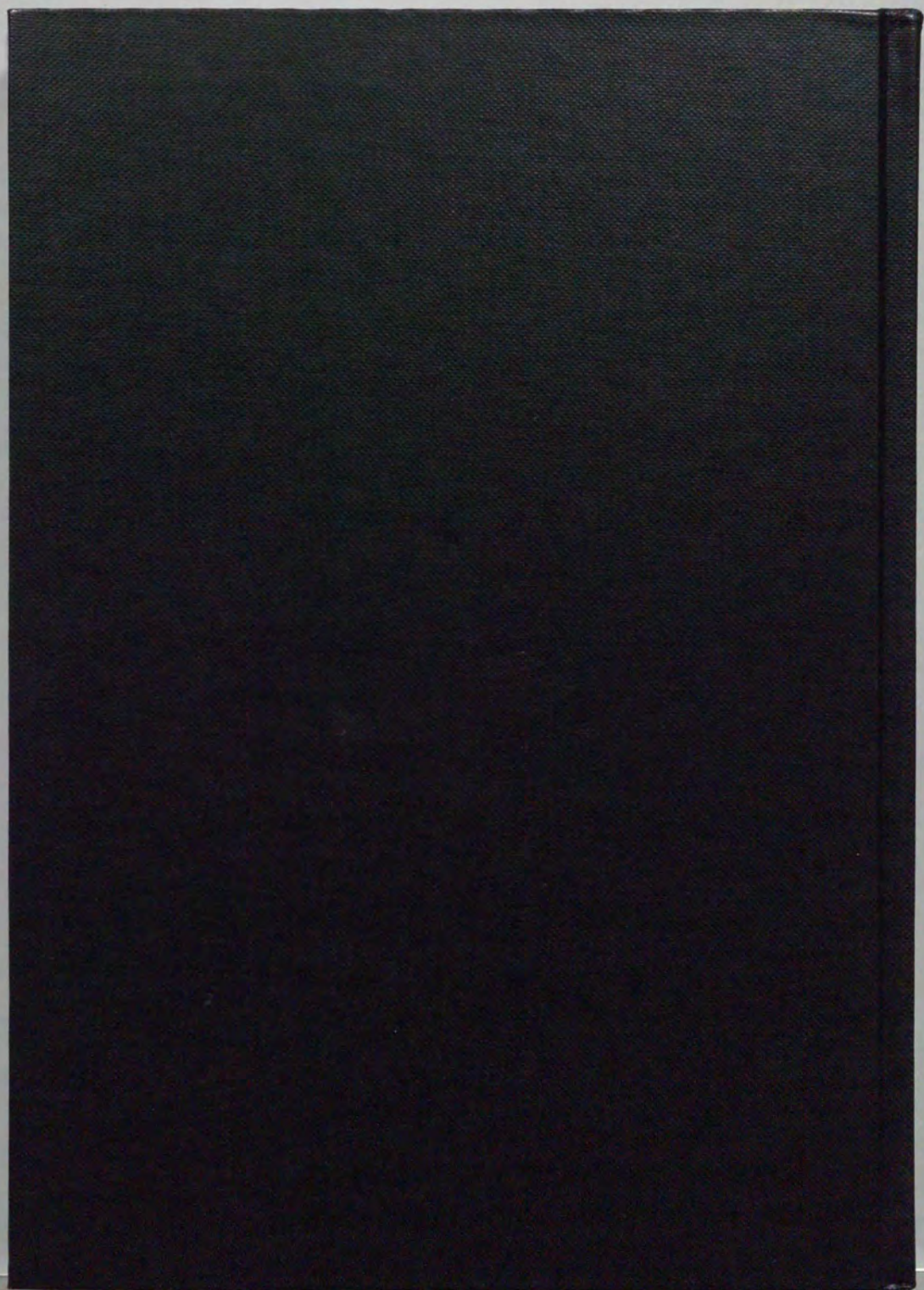
また日本たばこ宮崎一丁目アパートのルームメイトとして、二年間公私共にお世話になりました山本好久氏に心より感謝いたします。

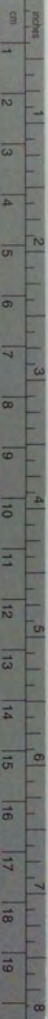
最後になりましたが、本論文の内容全てにわたって、詳細にご指導ご鞭撻頂きました宇都宮大学雑草科学研究センター 米山弘一助教授、理化学研究所薬剤作用研究室 吉田茂男主任研究員、東京大学農学部農芸化学科農薬学研究室 室伏旭教授、山口五十磨助教授に心より感謝致します。

また私事で恐縮ではありますが、私のような者をここまで育ててくれた両親をはじめとする家族、親族一同、小中高等学校の恩師に感謝致します。そして、本論文の完成を心待ちにしながら永遠の旅に発たれた父の冥福を祈り、本論文を墓前に捧げます。

平成3年10月

本多 一郎





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

