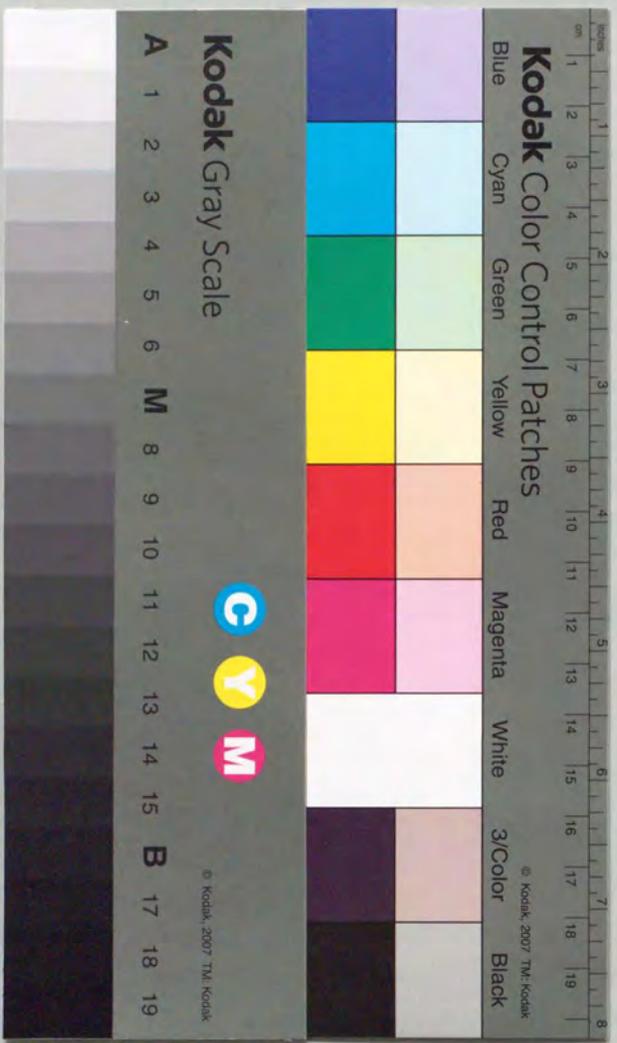


微生物代謝産物由来
新規抗腫瘍物質に関する研究

新藤一敏



①

微生物代謝産物由来
新規抗腫瘍物質に関する研究

新藤一敏

目次

緒言	1
----	---

本論

第1章 生体内チオール化合物と反応することにより活性を生じる 抗腫瘍抗生物質の探索系	
第1節 スクリーニング系の構築	10
第2節 スクリーニング系の既知抗腫瘍抗生物質に対する応答	15
第3節 まとめ	16
第2章 Cochleamycinsに関する研究	
第1節 Cochleamycinsの発見	17
第2節 Cochleamycinsの生産菌	18
第3節 Cochleamycinsの発酵生産	21
第4節 Cochleamycinsの単離と精製	22
第5節 Cochleamycinsの理化学的性状	23
第6節 Cochleamycinsの構造解析	25
第7節 Cochleamycinsの相対立体配置	42
第8節 分子力場計算を用いたCochleamycins A (1)の コンフォメーション解析	52
第9節 Cochleamycinsの生合成	57
第10節 Cochleamycinsのチオール化合物との反応	62
第11節 Cochleamycinsの生物活性	71
第12節 考察	75
第3章 Colony Forming Assay (CFA)を用いたヒト大腸癌に有効な 抗腫瘍抗生物質の探索系	

第1節	スクリーニング系の構築	79
第2節	スクリーニング系の既知抗腫瘍抗生物質に対する応答	83
第3節	まとめ	84
第4章 Vicenistatinに関する研究		
第1節	Vicenistatinの発見	85
第2節	Vicenistatinの生産菌	85
第3節	Vicenistatinの発酵生産	89
第4節	Vicenistatinの単離と精製	91
第5節	Vicenistatinの理化学的性状	92
第6節	Vicenistatinの構造解析	94
第7節	Vicenistatinの生物活性	105
第8節	考察	109
総括		111
実験の部		
第1章	機器分析	116
第2章	放線菌の分離、同定に関する実験	118
第3章	生物活性試験	119
第4章	Cochleamycinsに関する実験	125
第5章	Vicenistatinに関する実験	161
謝辞		169
引用文献		170

略号

COSY	correlated spectroscopy
DMSO	dimethylsulfoxide
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
FAB	fast atom bombardment
FD	field desorption
HTCA	human tumor colonyforming assay
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	high resolution
IC ₅₀	inhibitory concentration by 50%
IR	infrared absorption
ISP	International Streptomyces Project
LSPD	longrange selective proton decoupling
MeOH	methanol
MP	melting point
MS	mass spectrometry
MSD	mean survival days
MTT	3-[4, 5-dimethylthiazo-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide
NCI	national cancer institute
NMR	nuclear magnetic resonance

NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
ODS	octadecyl dimethyl silyl
PBS	phosphate buffered saline
Rf	ratio of flow
SDS	sodium dodecyl sulfate
TACu	tetra amine cuppersulfate
T/C	treatment/control
TGIR	tumor growth inhibition rate
TLC	thin layer chromatography
TMS	trimethyl silane
UV	ultra violet
dec.	decomposition
s	singlet
d	doublet
t	triplet
q	quartet
m	multiplet
br	broad
i.p.	intraperitoneally
i.v.	intravenously
s.c.	subcutaneously

緒言

1980年以降日本における死亡原因の第1位は癌によるものであり、この意味で癌に対する治療法の確立は緊急かつ非常に重大な課題である。確かに近年、種々の医療機器の開発や手術方法の改良により、癌の外科療法および放射線療法は目覚ましい進歩を遂げた。しかし癌を完全に取り除けない場合や幾つかの臓器に遠隔転移を起こしている場合など、上記二療法にも限界がある。しかしながら、化学療法剤は血流により全身隅々まで移行し、そこに存在する癌細胞を攻撃することにより、癌細胞の根絶をなしうると考えられる。そこで、術後化学療法 (adjuvant chemotherapy) の研究が古くから行われてきた。また、近年Freiらにより提唱された、術前に導入療法として化学療法を行うneoadjuvant chemotherapy¹⁾も多くの化学療法剤について検討されている。また更に、自家骨髄移植 (autologous bone marrow translation、A-BMT)を併用した大量化学療法の検討も乳癌を中心に米国で展開されつつある²⁾。化学療法後の白血球減少症に有効なG-CSF等の開発に伴い、第三の療法としての化学療法の重要性は今後ますます増大していくと思われる。

周知の様に抗腫瘍抗生物質の研究の歴史は長く、1951年梅沢らにより系統的研究が始められてから既に約半世紀を迎えようとしている。この間にmitomycin (1957年)³⁾、daunomycin (1969年)⁴⁾等、現在でも臨床上非常に有用な物質が発見されてきている。しかし白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍に対してはこれまでに得られた抗腫瘍剤による化学療法がある程度奏効するものの、消化器癌、肺癌などの固形癌に対する抗腫瘍剤の効果はいまだ十分ではないというのが現状である。この原因として以下の二点が考えられる。

(1) これまでの抗腫瘍剤の探索は癌細胞に対する単純な増殖抑制作用の強さを指標としたものであり、特定の作用機序を有する物質が見落とされていた可能性がある。

(2) ヒト癌—ヌードマウス移植系^{5,6)}が確立される以前の1980年代前半までの抗腫瘍剤の探索が、マウスP388白血病をはじめとするマウス腫瘍を第一次探索系として行われて来ており、ヒト癌に有効な物質が見落とされてきた可能性がある。

上記の問題点を勘案し、著者はヒト癌に有効な抗腫瘍抗生物質を探索する目的で、以下の二通りの観点からのアプローチを試みた。

(1) 新しい作用機序を有するヒト癌に有効な物質の探索系

＜生体内チオールと反応することにより生理活性を生ずる抗腫瘍物質の探索＞
近年の分子生物学的手法の進歩により癌細胞のさまざまな特性や、癌化に関係した細胞内の標的分子が次々と明らかになってきており、これらの標的分子に対する抗腫瘍剤の作用も明らかにされつつある。例えば、DNAトポロジ—に関与するトポイソメラーゼIの阻害作用を有するirinotecan^{7,8)}、トポイソメラーゼIIの阻害作用を有するetoposide^{9,10)}、微小管重合阻害剤 taxol^{11,12)} などが見い出され、現在臨床の場で広く使用されている。

また、増殖因子、癌遺伝子産物とそれらレセプター及び細胞内情報伝達機構を標的とした例としては、癌遺伝子産物 Src のチロシンキナーゼ機能阻害を有する herbimycin A¹³⁾、radicicol¹⁴⁾、Ras のファルネシル化の阻害作用を有する peptidocinnamides¹⁵⁾、manumycin¹⁶⁾、EGF receptor のチロシンキナーゼ阻害作用を有する erbstatin¹⁷⁾ などがあげられる。

これらの例のように新たに発見された知見を参考に、従来と異なる作用機序を有する物質が得られれば、新しい切り口の抗癌剤となる可能性がある。

そこで著者は上述の探索方針に基き、「生体内チオール化合物と反応することにより活性を生ずる抗腫瘍物質の探索のためのスクリーニング系」を考案し、実施した。

以下に本スクリーニング系の概要を記す。

生物は外来物質の解毒、代謝機構の一つとしてグルタチオン、メタロチオネインなどのチオール化合物を生産する。しかし近年、逆にこれらの物質により活性化を受け生理活性を示す物質が知られるようになった。Ishidaらにより報告され、Edo、Setoらによりそのクロモフォアの構造が明らかにされた neocarzinostatin^{18,19)}、Konishiらにより報告された esperamicins²⁰⁾ 等の bicyclic diynene 系抗腫瘍抗生物質²¹⁾ がその例である。Myersは neocarzinostatin クロモフォア分子中の diynene 構造がグルタチオン等の生体内チオール基により活性化を受け、Fig. 1 に示したように芳香環が生じる際（正宗-Bergmann 反応）に不安定なダイラジカルが発生し、これが DNA 鎖を切断することを推察した²²⁾。また平間らにより、diynene 構造を有するモデル分子の合成及び作用の検討が詳細に行われており、これら分子が実際に DNA 鎖切断作用のある事が報告されている²³⁾。Neocarzinostatin や esperamicins は、*in vivo* 評価系においてマウスやヒト癌に対して強い抗腫瘍効果を示す。特に neocarzinostatin は、1977年に上市され、現在でも胃癌、肝臓癌等の治療に使用されている薬剤である。

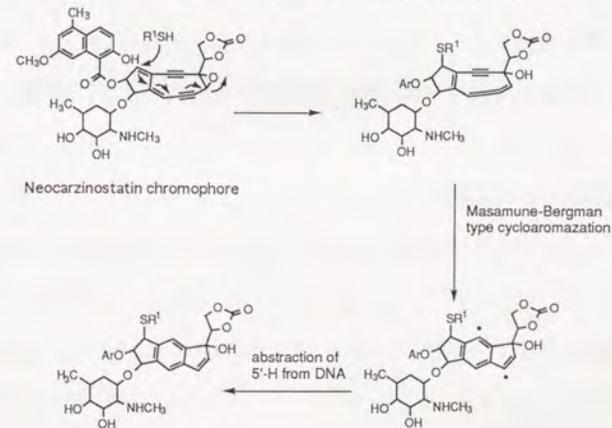


Fig. 1. Neocarzinostatin クロモフォアのラジカル発生機構

著者はこれらbicyclodiyne系抗腫瘍抗生物質の優れた抗腫瘍活性とユニークな活性化メカニズムに着目し、生体内チオールと反応し抗腫瘍活性を発現する様な物質をスクリーニングする系を構築した。

上述したような抗腫瘍物質を微生物培養液より探索するに際しては、bicyclodiyne系抗腫瘍物質がグラム陽性菌に対して抗菌性を示す事を利用し、簡便な *Bacillus subtilis* に対する抗菌作用を指標とすることにした。ポジティブコントロールとして neocarzinostatin を用い、これを特異的に拾いあげる様に系を工夫した。即ち、*Bacillus subtilis* を植菌した抗菌作用検定用合成培地に2-メルカプトエタノールを添加した培地と非添加培地を調製し、これらにneocarzinostatinを浸透させたペーパディスクを設置した。その結果、neocarzinostatinの抗菌阻止円は2-メルカプトエタノールの添加により減少することを見いだした。これは、neocarzinostatinが2-メルカプトエタノールと反応して瞬間的にラジカルを発生するが、培地成分により不活性化され失活するためと考えられた。また、adriamycin、actinomycin Dなどの抗腫瘍抗生物質の抗菌阻止円の大きさは、2-メルカプトエタノール含有及び非含有培地で影響を受けないことから、微生物の培養液から類繁に得られる抗菌作用を有する既知抗腫瘍抗生物質を効率的に排除できると考えられた。以上の検討結果より、著者は、2-メルカプトエタノール含有及び非含有培地で抗菌阻止円の直径に差の生じる物質を探索する事とした。

なお、本スクリーニング系で得られる化合物としては、bicyclodiyne系抗腫瘍抗生物質の様に生体内チオール化合物によりラジカルを発生するもの他に、sarkomycin²⁴⁾の様に、癌細胞中のチオール酵素の機能を阻害して抗腫瘍活性を発現する²⁵⁾ものも得られると考えられる。

また、癌細胞の中で発生している癌遺伝子産物のタンパク質中のシステインチオー

ル基と結合することにより、その機能を阻害するような化合物も得られる可能性がある。例えば *Src* の機能阻害剤である herbimycin A¹³⁾ の例が知られている。上原らは、herbimycin Aが *Src* チロシンキナーゼ活性中心近傍に存在するシステインチオール基と反応することにより阻害をひき起こすことを報告した (Fig. 2)。また一般にこのチロシンキナーゼ活性中心近傍に存在するシステインは共通に保存されているため、*Src* 以外でもチロシンキナーゼ活性を有する癌遺伝子機能タンパク (*Abl* 等) やEGFレセプターチロシンキナーゼも herbimycin Aにより阻害されることも報告している²⁶⁾。このような化合物が得られれば、*Src* 等の過剰発現により癌化がおきている場合の新しい抗腫瘍剤として期待でき、更に、癌細胞の増殖に対するシグナル伝達機能の解明に有効である。

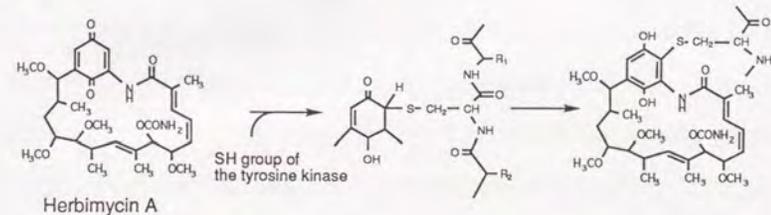


Fig. 2. Herbimycin Aと *Src*チロシンキナーゼの推定反応機構

(2) Disease-oriented screenの概念に準じた各種癌細胞に対する増殖抑制効果を指標として用いる探索系 <Colony Forming Assay (CFA)を用いたヒト固形癌に有効な物質の探索>

米国国立癌研究所 (NCI)では1975年より、P388 *in vivo*試験を第一次探索系に用いた抗腫瘍剤の探索を展開してきた。この系で活性を示した物質は、L1210、B16等の固定した動物腫瘍パネルで評価された²⁷⁾。このスクリーニングシステムは物質の活性

を中心においたものであり、compound-oriented screenと呼ばれる。このスクリーニングシステムに対して1985年の時点で、NCIでは以下の様な評価が下された。

(1) 見いだされた抗腫瘍剤の臨床効果は白血病や悪性リンパ腫については認められるが、固形癌については増殖のはやい少数の癌に認められるのみである。

(2) 動物実験癌における効果と、同一種のヒト癌に対する効果にほとんど相関がなく臨床の癌に対する抗腫瘍剤の効果が予見できない。

そこで、NCIではヒト固形癌に対して有効な物質を見出すため、1986年よりスクリーニング体系を全面的に改め、第一次探索系では各種ヒト固形癌細胞に対して*in vitro*で選択的に増殖抑制作用を示す物質を見出し、高次評価系としてはその物質に*in vitro*試験で高い感受性を示したヒト固形癌をヌードマウスに移植し、ヒト癌-ヌードマウス評価系を用いて薬効を評価する方針を選択した。本スクリーニングシステムは、ある特定の癌に選択性を持つ物質を第一選択とすることから、disease-oriented screenと呼ばれる^{28,29)}。NCIの第一次探索系は、その薬剤の各種ヒト癌細胞に対する増殖抑制作用の差、すなわち癌細胞の感受性の差をもって薬効を予測するという基本的なものである。しかし、この方法が現在のところ、最も抗腫瘍剤の*in vitro*と*in vivo*試験での活性予測性の高いものであると考えられる。現在までにNCIでは、本探索系でヒト卵巣癌や乳癌に有効性を示すpyrazoloacridine³⁰⁾や、前立腺癌や脳腫瘍に有効なphenylacetate^{31,32)}等が見いだされ、現在臨床試験中である。また、spicamycin³³⁾誘導体であるKRN5500³⁴⁾も、spicamycinがヒト胃癌に対して選択的に有効な化合物として再発見されたことを端緒として創製されたものである。

そこで著者は、上述の探索方針に基づき、ヒト大腸癌に有効な物質を探索する目的で、「Colony Forming Assay (CFA; 軟寒天中での癌細胞のコロニー形成を観察する

アッセイ法)を用いたスクリーニングアッセイ系」を考案し、実施した。以下に本スクリーニング系の概要を記す。

NCIに導入された、disease-oriented screenの考え方に従い、CFAを用いてヒト大腸癌に特異的に有効である物質を探索する系を実施した。

軟寒天中でのコロニー形成は癌細胞特有の足場非依存型 (anchorage independent) の増殖形態を反映しており、単層あるいは浮遊状態での増殖に比してより生体内での増殖形態に近いものである。従って、薬剤に対する反応も生体内に近く、Salmonらにより*in vitro*-*in vivo*試験での相関性が高いことが示されている³⁵⁾。探索の対象とする固形癌は、近年日本でも増加傾向の著しい大腸癌とし、CFAに使用する細胞株としてはヒト大腸癌COLO205を選択した。一方でマウス白血病細胞L1210に対する作用についても観察し、COLO205により選択的に強く作用する物質を探索した。この比較により、既存の抗腫瘍抗生物質の多くを排除することができた。

また本スクリーニング系で得られた物質については、ヒト大腸癌-ヌードマウスによる評価を行い、特異的な作用を更に*in vivo*で検討した。

以上の(1)及び(2)の探索系を用いて、放線菌、カビの培養液中に活性物質を探索した。その結果、著者らは土壌より分離した放線菌の培養液より(1)の系でcochleamycins A、A2、B、B2^{36, 37, 38, 39)}、また(2)の系でvicenistatin⁴⁰⁾と命名した新規抗腫瘍抗生物質を見出した。以降の各章で上記物質の生産菌の同定、単離、構造決定、生物活性等について述べる。

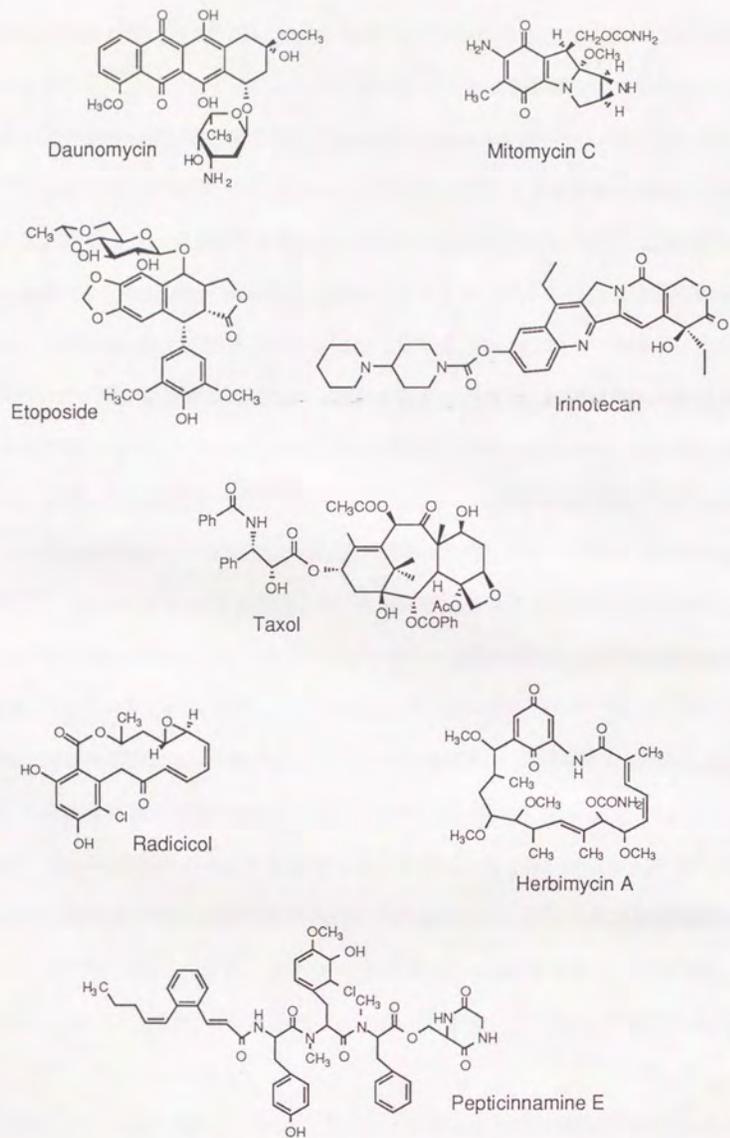


Fig. 3a. 抗腫瘍物質の構造

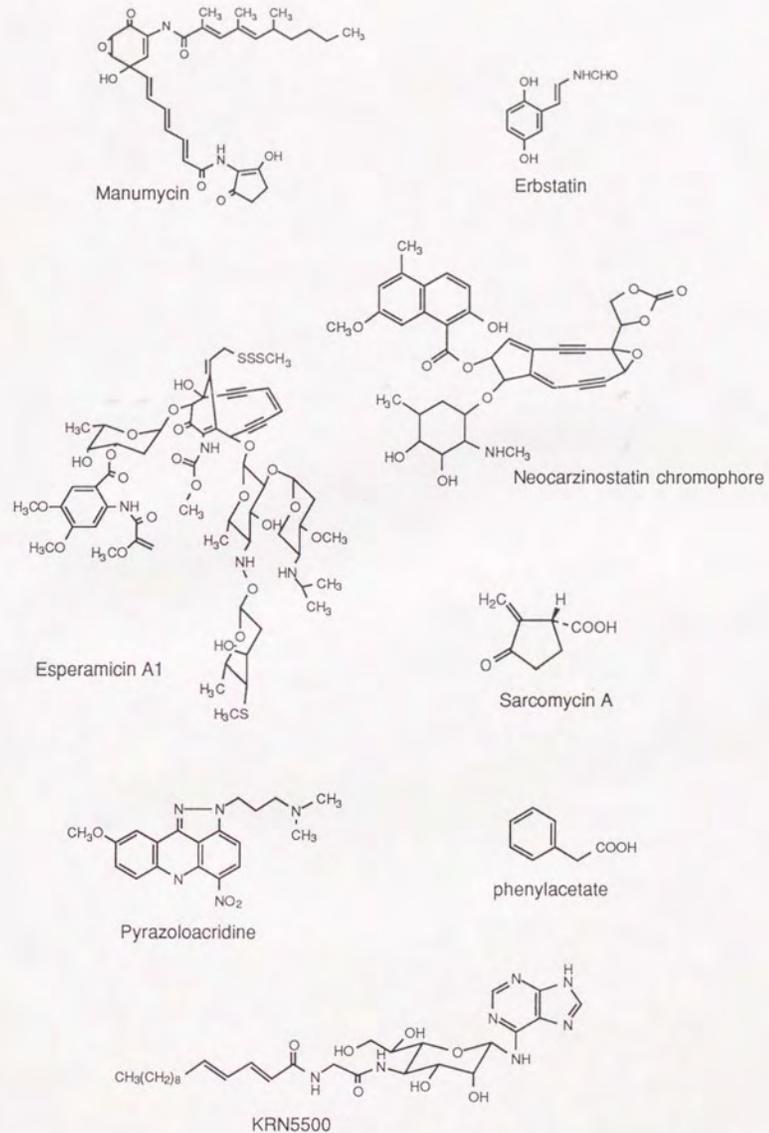


Fig. 3b. 抗腫瘍物質の構造

本 論

第1章 生体内チオール化合物と反応することにより活性を生じる
抗腫瘍抗生物質の探索系

第1節 スクリーニング系の構築

1. 背景

チオール基を有する生体内化合物と反応することにより抗腫瘍活性を生じる化合物の作用メカニズムとしては、現在までに以下に示す三種類が報告されている。

1) ラジカル発生によるDNA切断作用

第一には、一群の抗腫瘍抗生物質 (bicyclodiynene系抗腫瘍抗生物質) に存在する特徴的部分構造である diynene 構造が、グルタチオン等の生体内チオール化合物と反応すること及びそれに続いて起こる正宗-Bergmann反応により活性ラジカルが発生し、このラジカルが癌細胞のDNAを切断するという作用メカニズムがMyersにより報告されている²²⁾(緒言Fig. 1参照)。Ishidaらにより報告されたneocarzinostatin¹⁸⁾、Konishiらにより報告されたesperamicin²⁰⁾等がbicyclodiynene系抗腫瘍抗生物質として有名であり、これらの物質は上述の作用により癌細胞の増殖を極めて低濃度で抑制することが報告されている²¹⁾。また注目すべきこととして、これらbicyclodiynene系抗腫瘍抗生物質は*in vivo*評価系においてマウスやヒト癌に対して優れた抗腫瘍効果を示すことも報告されている²¹⁾。

2) 癌遺伝子産物の不活性化作用

第二には、癌細胞の中で発現している癌遺伝子産物中のシステインチオール基と結合することによりその機能を阻害するという作用メカニズムが報告されている。一例としてherbimycin Aは、癌遺伝子産物Src, Ab等のタンパク質中のシステインチオール基と非可逆的に結合することにより、そのチロシンキナーゼ機能を阻害することが上原らにより示されている²⁶⁾(緒言Fig. 2参照)。このような作用を有する化合物は

Src, Ab等のチロシンキナーゼに依存した癌細胞の増殖シグナル伝達機構を阻害するため、これら癌遺伝子産物の過剰発現により癌化が生じている場合の抗腫瘍剤として期待される²⁶⁾。

3) チオール酵素の不活性化作用

第三には、癌細胞中のチオール酵素のシステインチオール基と結合することによりその機能を阻害する作用メカニズムが報告されている。Sarkomycin²⁴⁾はDNAポリメラーゼの活性中心に存在するシステインチオール基と反応して不活性化することにより抗腫瘍効果を示すことが報告されている²⁵⁾。

著者は、以上の様に生体内チオール化合物に作用する物質には興味深い抗腫瘍活性が報告されている事に注目し、この様な活性を示す物質を選択的に探索するスクリーニング系の構築を行なった。

2. スクリーニング系の構築

Neocarzinostatin, esperamicins等のbicyclodiynene系抗腫瘍抗生物質は、上記の1)に示したラジカル発生によるDNA切断作用に基づき*Bacillus subtilis*に対して抗菌性を示すことが報告されている¹⁸⁾。そこで、*Bacillus subtilis*に対する抗菌作用がチオール化合物の添加により減弱あるいは増強される現象を指標とするスクリーニング系の構築を実施した。本スクリーニング系がbicyclodiynene系化合物を有効に選択出来るか否かの確認は、neocarzinostatinを用いて行うこととした。

具体的方法としては、代表的なチオール化合物を*Bacillus subtilis*抗菌作用検定用合成培地 (Table 1-1) に添加し、チオール化合物非含有培地と比較してneocarzinostatinの抗菌阻止円の直径に差が生じるか否かをペーパーディスク法により検討した。まず用いるチオール化合物について検討した。グルタチオン、L-システイン、2-メルカプトエタノールを用い、2mMの等濃度での各化合物のneocarzinostatin抗菌阻止円に

及ぼす影響を検討した。その結果をTable 1-2に示す。本表より明らかなように、グルタチオンはneocarzinostatin抗菌阻止円の直径を変化させなかった。一方、L-システイン及び2-メルカプトエタノールはneocarzinostatin抗菌阻止円の直径を減少させた。しかしL-システイン添加による抗菌阻止円直径の減少の割合は、2-メルカプトエタノールに比して小さいことが判明した。そこで、明瞭な結果が得られる2-メルカプトエタノールをスクリーニングに用いる事が適当であると判断した。なお、2-メルカプトエタノールの濃度が高いほど、抗菌阻止円の減少幅は大きくなったが、20mM以上の2-メルカプトエタノールの添加によって、*Bacillus subtilis*の生育が阻害される現象が認められた。そこでスクリーニングに用いる2-メルカプトエタノールの添加量は、2mMが適当であると判断した (Table 1-3)。以上の結果より、2mMの2-メルカプトエタノールを含有する検定培地と非含有検定培地間での抗菌阻止円の直径を比較する方法が、neocarzinostatinを始めとするbicyclodiyne系抗腫瘍抗生物質をスクリーニングする系となる事が判明した。スクリーニング系の概略をFig. 1-1に示す。

Table 1-1. 抗*Bacillus subtilis*作用検定培地組成

glucose	0.5%
20 amino acids	each 0.0075%
adenine, xanthine, hypoxanthine, guanine	
thymine, uracil, cytosine	each 0.0075%
sodium citrate·2H ₂ O	0.02%
KH ₂ PO ₄	0.12%
K ₂ HPO ₄	0.28%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.04%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%
agar	2%
pH	7.2

Table 1-2. Neocarzinostatinの抗*Bacillus subtilis*活性に対する2mMグルタチオン、L-システイン、2-メルカプトエタノール添加の影響

Compound	Diameter of inhibition zone (mm)
	(Neocarzinostatin 1000µg/ml)
None (control)	17.0
2mM glutathione	17.0
2mM L-cystein	15.5
2mM 2-mercaptoethanol	13.0

Disk diffusion assay. Neocarzinostatin was applied onto filter disks (8mmφ)

Table 1-3. Neocarzinostatinの抗*Bacillus subtilis*活性に対する2-メルカプトエタノール濃度の影響

	Diameter of inhibition zone (mm)			
	Neocarzinostatin (µg/ml)			
2-mercaptoethanol (mM)	1000	100	10	Growth of <i>B. subtilis</i>
none	17.5	12.0	9.0	Good
0.02	17.5	12.5	9.0	Good
0.2	17.5	12.0	9.0	Good
2	13.0	8.5	N.D.	Good
20	10.0	N.D.	N.D.	Poor

N.D.: Not Detected

Disk diffusion assay. Each concentration of neocarzinostatin was applied onto filter disks (8mmφ).

本スクリーニング系でneocarzinostatinの抗菌阻止円の直径が減少するのは、neocarzinostatinが2-メルカプトエタノールと反応して瞬間的にジラジカルを発生するものの、*Bacillus subtilis*の菌体内に入る前に分解され失活するためと考えられる。

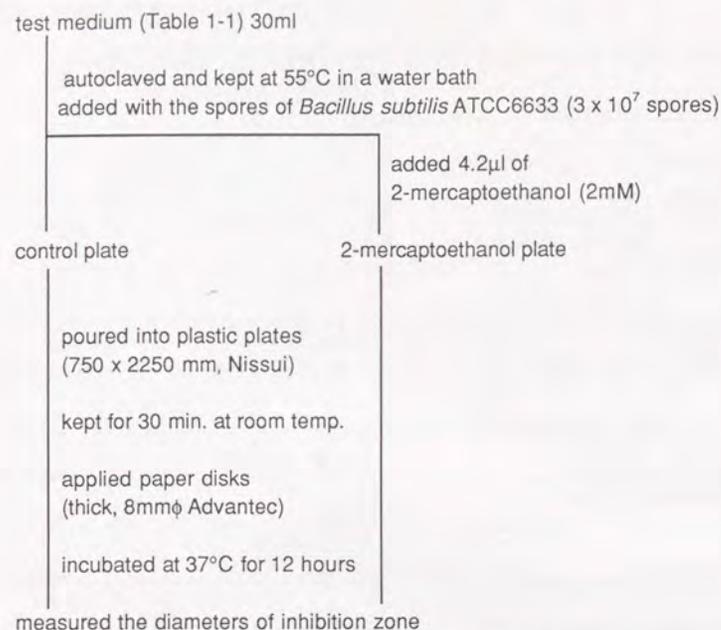


Fig. 1-1. スクリーニング系のプロトコール

Neocarzinostatinの様に生体内でラジカルを発生させる化合物は強い抗腫瘍活性を示すことが知られている事から、チオール化合物の添加により抗*Bacillus subtilis*活性が減少する化合物は、抗腫瘍活性を有する事が期待される。従って本スクリーニング系は、抗腫瘍活性を有する物質の微生物代謝産物からのスクリーニング系として有用であると考えられる。

一方で前記2)に示したような癌遺伝子産物のチオール基と付加反応することにより、その機能を阻害するような化合物も本スクリーニング系で陽性となる可能性がある。*Src* チロシンキナーゼを阻害する ansamycin系化合物である herbimycinは、2-メルカ

プトエタノールを含む培地中では、キノン部分がマイケル付加を受けて不活性化され、*Src*チロシンキナーゼ阻害活性が消失することが報告されている²⁶⁾。従って抗*Bacillus subtilis*活性を有し、上述の作用メカニズムを有する化合物も本スクリーニング系で陽性となることが考えられた。また前記3)に示したsarkomycinについても、そのチオール酵素阻害活性が2-メルカプトエタノールの添加で消失することが報告されている²⁵⁾。Sarkomycinは抗*Bacillus subtilis*活性を有することから、チオール酵素と反応することによりその機能を阻害する物質についても本スクリーニング系で陽性となることが考えられた。

なお、本スクリーニング系で陽性となった微生物培養液に含まれる活性物質が抗腫瘍活性を有することを確認するため、再現性及び予備抽出試験時にはP388マウス白血球細胞に対する*in vitro*増殖抑制活性試験を併せて実施することとした。

第2節 スクリーニング系の既知抗腫瘍抗生物質に対する応答

微生物代謝産物からの抗腫瘍抗生物質のスクリーニングに於いては、既知物質を早い段階で除去することがスクリーニングの効率の大きな決定要因となる。そこで、既知抗腫瘍抗生物質の本スクリーニング系における作用をペーパーディスク法で検討した。被験既知化合物としては、抗*Bacillus subtilis*活性を示す化合物の中で比較的高い頻度で微生物培養液に見い出される adriamycin⁴¹⁾、actinomycin D⁴²⁾、chartreusin⁴³⁾、dianemycin⁴⁴⁾、elaiophyllin⁴⁵⁾、quinomycin A⁴⁶⁾を選択した。各50μgを浸透させたペーパーディスクを用いて2mM 2-メルカプトエタノール含有及び非含有培地とでの抗菌阻止円直径を比較検討した。その結果をTable 1-4に示す。これらの既知化合物の中で抗菌阻止円の大きさに差が生じたものはなく、本スクリーニング系が生体内チオール化合物と反応することにより生理活性を生じる抗腫瘍抗生物

質に対して高い選択性を有することが明らかとなった。また同時に、本スクリーニング系を用いることにより既知抗腫瘍抗生物質を効率的に排除できる可能性が示された。

Table 1-4. 既知抗腫瘍抗生物質の本スクリーニング系での応答

	Diameter of inhibition zone (mm)	
	2-mercaptoethanol	
	None	2mM
Actinomycin D	17.0	17.0
Adriamycin	18.0	17.5
Chartreusin	17.5	18.0
Dianemycin	16.0	16.0
Elaiophylin	14.5	14.5
Quinomycin A	21.0	21.0
Neocarzinostatin	18.0	15.5

Disk diffusion assay. Each compound was applied onto filter disks (8mm φ) at the concentration of 50μg.

第3節 まとめ

抗腫瘍抗生物質を探索するスクリーニング系として、生体内チオールと反応して抗腫瘍活性を生じる物質の探索系を確立した。具体的なスクリーニング系としてはペーパーディスク法を用い、2mMの2-メルカプトエタノールを含有する検定培地上の *Bacillus subtilis* 抗菌阻止円の直径が、2-メルカプトエタノール非含有培地上での直径と比較して明らかに小さくなる物質を探索することにした。微生物培養液はペーパーディスクに50μlずつ添加して用いた。

以上の方法で、放線菌、カビ併せて約8500株のアセトン処理プロスを探索し、新規化合物として cochleamycins (第2章) を得た。

第2章 Cochleamycins に関する研究

第1節 Cochleamycinsの発見

青森県西目屋町の土壌から分離された放線菌DT136株の培養抽出物に、チオールの系で陽性となる活性を見いだした。活性物質の単離に際してP388マウス白血病細胞に対する増殖抑制活性についてもチオールの系での活性と平行して検討したところ、両アッセイ系で活性を示す2つの化合物 (A, A2) とP388マウス白血病細胞に対する増殖抑制活性のみを示す2つの化合物 (B, B2) が存在することが判明した。それぞれを単離し、構造解析を行ったところ、互に関連した特異なカルボサイクリックな構造を有する新規物質群であることが判明し、本物質を cochleamycins A、A2、B、B2^{36, 37, 38, 39)} と命名した (Fig. 2-1)。

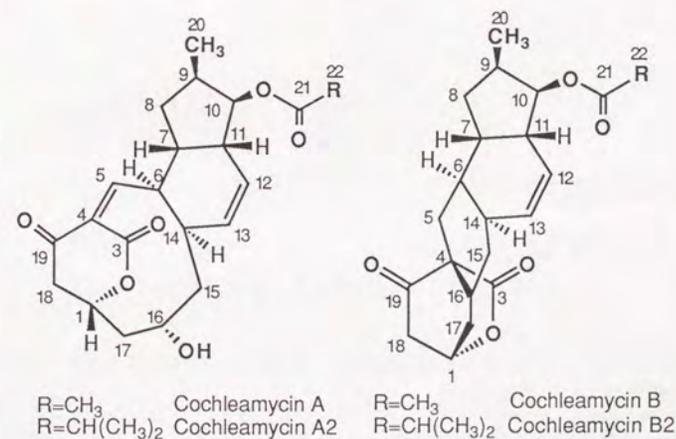


Fig. 2-1. Cochleamycinsの構造

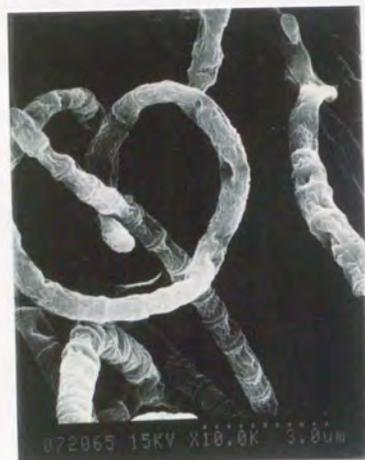
第2節 Cochleamycinsの生産菌

1. 形態

基生菌糸より生じた気菌糸は、単純分枝をなして伸長し、胞子の連鎖は30個程度で、胞子鎖は螺旋状であるがグループ状の胞子鎖も見られる。胞子の形は俵型で、大きさは約1.1 μ m x 0.8 μ mであり、その表面は平滑である。胞子嚢、鞭毛胞子、菌核などの特殊形態は認められない。DT136株の気菌糸の電子顕微鏡写真をFig. 2-2に示す。



a) 5,000倍



b) 20,000倍

Fig. 2-2. DT136株の電子顕微鏡写真

2. 各種培地上の生育状態

DT136株を各種培地に27 $^{\circ}$ C、3週間培養した結果をTable 2-1に示す。概要すると、DT136株はシュエクロース・硝酸塩及びグルコース・アスパラギン寒天培地での生

育は中程度であるが、その他の培地上では良く生育する。気菌糸の着生は、シュエクロース・硝酸塩寒天培地上では貧弱、またグルコース・アスパラギン寒天培地では中程度であるが、その他の培地では良く生育する。オートミール寒天培地上で黄色の可溶性色素の生産が認められる。

Table 2-1. DT136株の各種培地における生育状態

Sucrose-nitrate agar	G: Moderate R: Light olive gray Am: Poor; yellowish white Sp: None	Tyrosine agar	G: Good R: Pale yellow Am: Good; light olive gray Sp: None
Glucose-asparagine agar	G: Moderate R: Light olive gray Am: Moderate; light olive gray Sp: None	Nutrient agar	G: Good R: Pale yellowish brown Am: Good; yellowish white Sp: None
Glycerol-asparagine agar	G: Good R: Pale yellow Am: Good; light brownish gray Sp: None	Yeast extract-malt extract agar	G: Good R: Yellow Am: Good; light olive gray Sp: None
Inorganic salts-starch agar	G: Good R: Dull yellow Am: Good; light brownish gray Sp: None	Oatmeal agar	G: Good R: Yellow Am: Good; brownish gray Sp: Yellow

G: growth, R: reverse side of colony, Am: aerial mycelium, Sp: soluble pigment.

3. 生理的性質及び炭素源の資化性

DT136株の各種生理的性質とPridham & Gottlieb寒天培地上における炭素源の資化性は、Table 2-2にまとめて示す通りである。

Table 2-2. DT136株の生理的性質および炭素源の資化性

Temperature for growth	15-37°C
Production of melanoid pigments:	
Tyrosine agar	Negative
Peptone-yeast extract-iron agar	Negative
Tryptone-yeast extract agar	Negative
Hydrolysis of starch	Negative
Liquefaction of gelatin	Negative
Peptonization of milk	Positive
Coagulation of milk	Negative
Utilization of carbon source:	
Utilized	L-arabinose, D-xylose, D-glucose D-fructose, sucrose, galactose D-mannose, maltose
Not utilized	inositol, L-rhamnose, raffinose D-mannitol, sorbitol

4. ジアミノピメリン酸の分析

細胞壁構成アミノ酸の一つであるジアミノピメリン酸を分析した結果、LL-ジアミノピメリン酸が検出された。

5. 考察

以上の菌学的性質を要約すると、DT136株は以下の特徴を有する。

(1) 孢子鎖は螺旋状ないしはループ状で、孢子の表面は平滑である。

(2) 気菌糸の着生はシュクロース・硝酸塩培地では少なく、またグルコース・アスパラギン寒天培地上では中程度であるが、その他の培地では良好である。気菌糸の色は黄味白～明るいオリーブ灰～明るい茶灰～茶灰であり、気菌糸の裏面の色は明るいオリーブ灰～うす黄～うす黄茶～にぶ黄～黄の色を示す。

(3) チロシン寒天培地、ペプトン・イースト・鉄寒天培地、トリプトン・イースト液体培地ではメラニン様色素を生成しないが、オートミール寒天培地上で黄色の

可溶性色素が認められる。

(4) イノシトール、L-ラムノース、ラフィノース、D-マンニトール、ソルビトールは資化されない。

(5) 細胞壁ジアミノピメリン酸はLLタイプである。

これらの結果から、DT136株はBergey's Manual of Determinative Bacteriology⁴⁷⁾より *Streptomyces* 属に属する菌株であると考えられる。よって、本菌株を *Streptomyces* sp. DT136と同定した。

本菌株は平成元年2月21日に通産省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されて、「微工研条寄第2298号」(FERM BP-2298)の番号を得ている。

第3節 Cochleamycinsの発酵生産

Cochleamycinsの発酵生産は、次のように行った。即ち、Table 2-3に示した生産培地100mlを分注滅菌した500ml容Erlenmeyer型フラスコに、*Streptomyces* sp. DT136株をスラントより一白金耳接種し、ロータリーシェーカー上で27°Cにて回転培養(200rpm)を行った。培養1~7日目に培養液をサンプリングし、培養液のpH、2000gにて10分間遠心分離して得た菌体量のサンプリング量に対する比率 [packed cell volume(%)]、及び *Bacillus subtilis* に対する抗菌力(阻止円直径)にて測定した培養上清中のcochleamycins量について、それらの経時的变化を観察した。Fig. 2-3に結果を示す。

Table 2-3. Cochleamycinsの生産培地

glucose	2.5%
soy bean meal	1.5%
dry yeast	0.2%
CaCO ₃	0.4%
pH	6.2

菌体量は、培養3日目まで順次増加した後、4日目からlysisによるためか減少した。培地のpHは、4日目から徐々に高くなり、7日目には8.3に達した。Cochleamycinsの生産は、培養3日目に始まり、培養5日目に最高に達した。

そこで、*Streptomyces* sp. DT136株を植菌したフラスコ50本を上記の条件で5日間培養し、cochleamycinsの精製に供した。

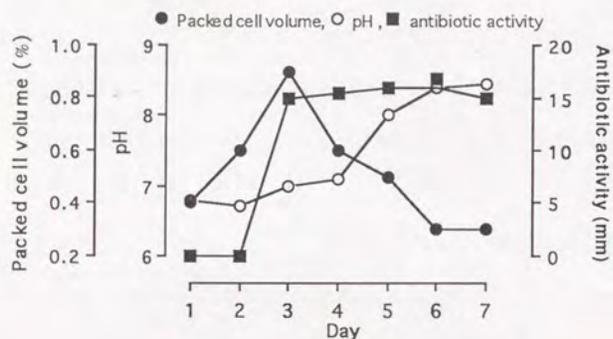


Fig. 2-3. *Streptomyces* sp. DT136株の培養経過

第4節 Cochleamycinsの単離と精製

Cochleamycinsの精製法をFig. 2-4に示す。即ち、前述の条件で培養した培養液（5リットル）を遠心分離（7000g, 20min）した後、培養上清を集めた。これを等量の酢酸エチルで2回抽出した。有機層を無水 Na_2SO_4 にて脱水後、減圧下にて濃縮して得た3.2gの固形物を用いて、クロロホルム：メタノール（50:1）を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。本クロマトグラフィーにより cochleamycin Bグループ次いでAグループが溶出された。各々の画分を濃縮乾固してAグループを含む画分45mg、Bグループを含む画分30mgを得た。Aグループ画分を

さらに分取HPLC（カラム；YMC-Pack ODS AM323、溶出液；75%メタノール、流速3ml/min、検出； A_{254} ）により精製し、純粋な cochleamycins A（10.0mg）及びA2（8.2mg）を得た。Bグループ画分は、ヘキサン：酢酸エチル（3:1）を溶出液としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、純粋な cochleamycins B（6.7mg）及びB2（6.5mg）を得た。

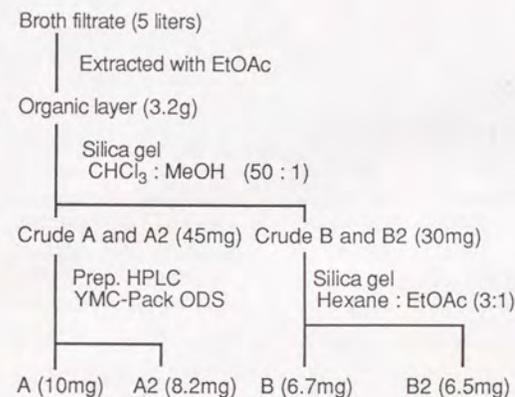


Fig. 2-4. Cochleamycinsの精製法

第5節 Cochleamycinsの理化学的性状

Cochleamycinsの理化学的性状をTable 2-4に示す。Cochleamycins A、A2、B、B2はすべて無色の粉末で、その分子式は、高分解能FABマスペクトルにより、それぞれ、 $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_6$ 、 $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_6$ 、 $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_5$ 、 $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_5$ と決定された。紫外吸収スペクトルにおいて、cochleamycins A、A2は、245nm付近に極大吸収を有しており、分子内に共役したカルボニル基が存在することが示唆された。Cochleamycins B、B2は

末端紫外外部吸収を示した。赤外吸収スペクトルでは、cochleamycins A、A2については3400cm⁻¹付近に水酸基に由来する吸収が認められた。またすべての成分で1710~1760cm⁻¹にカルボニル基に由来する強い吸収が認められ、複数のカルボニル基が分子内に存在することが示唆された。Cochleamycin Aの紫外吸収スペクトルをFig. 2-5に、赤外吸収スペクトルをFig. 2-6に示す。

Table 2-4. Cochleamycinsの理化学的性状

cochleamycin				
	A (1)	A2 (2)	B (3)	B2 (4)
m.p. (°C, dec.)	200 - 203	214 - 216	133 - 135	152 - 154
[α] _D ²⁴ (MeOH)	+107 (c 1.0)	+76 (c 1.0)	+83 (c 0.1)	+104 (c 0.1)
Molecular formula	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	C ₂₃ H ₃₀ O ₅
HRFAB-MS Calcd:	375.1906	403.2063	359.1802	387.2162
(M+H) ⁺ Found:	375.1857	403.2092	359.1830	387.2148
UV λ _{max} (ε)	245 (5460)	246 (4700)	End	End
IR ν (KBr) cm ⁻¹	3450, 2950 1750, 1715	3513, 2970 1734, 1709	2950, 1760 1740, 1735	2930, 1761 1730, 1701

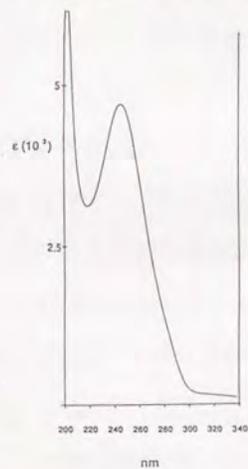


Fig. 2-5. Cochleamycin Aの紫外吸収スペクトル (メタノール中)

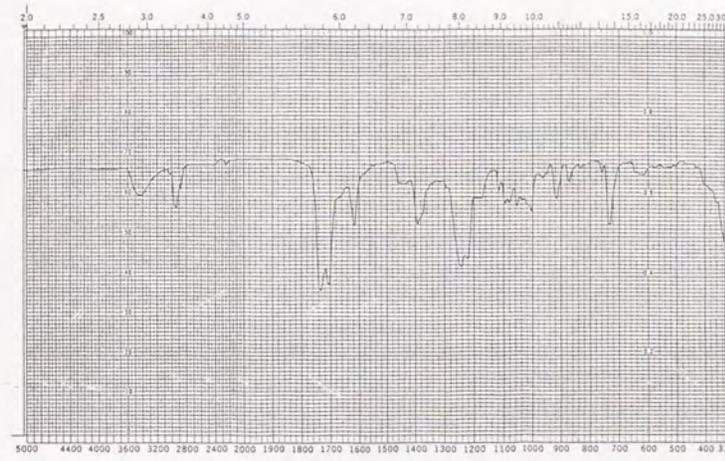


Fig. 2-6. Cochleamycin Aの赤外吸収スペクトル (KBr法)

第6節 Cochleamycinsの構造解析

1. Cochleamycin Aの構造解析

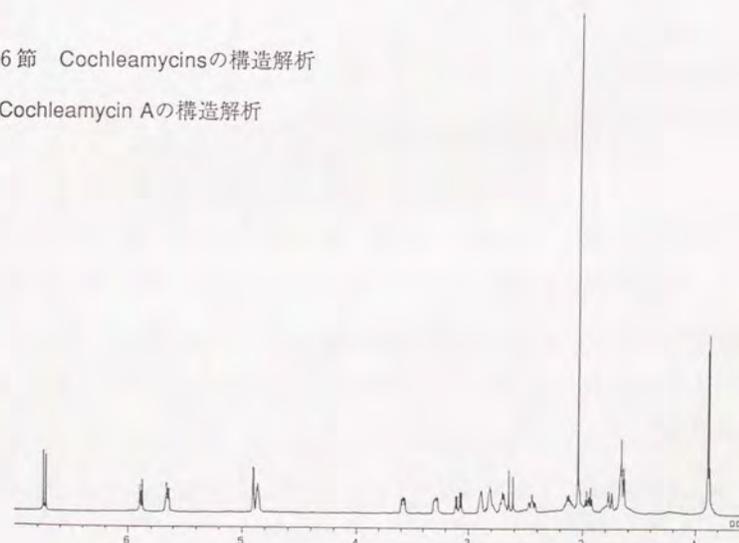


Fig. 2-7. Cochleamycin A (1)の¹H-NMR スペクトル (CDCl₃中)

Cochleamycin A (1)の重クロホルム中における500MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及びそのデータをFig. 2-7、Table 2-5に示す。本スペクトルでは、2本のメチルシグナル (δ_{H} 0.92 d、 δ_{H} 2.08 s)、3本の sp^2 メチンシグナル (δ_{H} 5.63、5.91、6.77)、 δ_{H} 1.68~4.98に16H分の sp^3 メチレン及びメチンのシグナルが観測された。

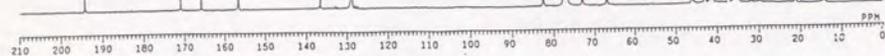


Fig. 2-8. Cochleamycin A (1)の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (CDCl_3 中)

1の重クロホルム中における125MHz $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル及びそのデータをFig. 2-8、Table 2-6に示す。本スペクトルでは21本のシグナルが観測され、DEPTスペクトルの解析によりこれらのシグナルは2本のメチル、4本のメチレン、11本のメチン、4本の sp^2 4級炭素シグナルであることが明らかとなった。また1は分子式中に窒素原子を含まないことから、 sp^2 4級炭素シグナルのうち、 δ_{C} 165.7、 δ_{C} 170.9のシグナルはエステルあるいはカルボン酸、 δ_{C} 194.2のシグナルは共役したケトンであることが示唆された。

Table 2-5. Cochleamycinsの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータ^a

Position	A (1) δ_{H}	A2 (2) δ_{H}	B (3) δ_{H}	B2 (4) δ_{H}
1	4.88 (ddd 2.4, 4.5, 7.5) ^b	4.88 (ddd 3.7, 4.5, 7.5)	4.98 (m)	4.97 (m)
5	6.77 (d 11.3)	6.76 (d 11.5)	1.65 ^c	1.65 ^c
6	3.30 (ddd 2.4, 5.6, 11.3)	3.30 (ddd 2.4, 5.5, 11.3)	1.82 ^c	1.82 ^c
7	2.72 (dddd 2.4, 7.0, 7.0, 10.0)	2.71 (dddd 2.4, 7.0, 7.0, 10.0)	2.25 (m)	2.25 (m)
8	1.68 ^c , 1.70 ^c	1.68 ^c , 1.70 ^c	2.47 ^c	2.47 ^c
9	2.05 ^c	2.15 (m)	1.59 ^c , 1.62 ^c	1.59 ^c , 1.62 ^c
10	4.94 (d 3.8)	4.90 (d 3.8)	2.15 (m)	2.07 (m)
11	2.84 (m)	2.80 (m)	4.88 (d 4.0)	4.86 (d 3.8)
12	5.63 (ddd 3.0, 3.0, 10.0)	5.67 (ddd 3.2, 3.2, 10.5)	2.64 (m)	2.62 (m)
13	5.91 (ddd 2.4, 2.4, 10.0)	5.91 (ddd 2.4, 2.4, 10.5)	5.62 (ddd 3.0, 3.0, 10.0)	5.63 (ddd 3.0, 3.0, 10.0)
14	2.92 (m)	2.91 (m)	5.37 (ddd 2.0, 3.2, 10.0)	5.37 (ddd 2.0, 3.2, 10.0)
15	1.69 ^c	1.69 ^c	2.47 ^c	2.47 ^c
16	1.97 (ddd 6.8, 6.8, 16.8)	1.97 (ddd 6.6, 6.6, 16.8)	1.46 (ddd 4.5, 10.0, 14.0)	1.47 (ddd 4.5, 10.0, 14.0)]
17	3.62 (ddd 2.4, 6.8, 16.8)	3.60 (ddd 2.4, 6.6, 16.8)	1.90 (ddd 3.5, 3.5, 14.0)	1.91 (ddd 3.5, 3.5, 14.0)
18	1.78 (ddd 2.4, 2.4, 15.5)	1.78 (ddd 2.4, 2.4, 15.5)	2.05 ^c	2.04 (m)
19	2.48 (ddd 4.5, 11.8, 15.5)	2.47 (ddd 4.5, 11.8, 15.5)	1.82 ^c	1.82 ^c
20	2.66 (d 19.0)	2.64 (d 19.0)	2.18 (ddd 1.5, 10.0, 14.5)	2.18 (ddd 1.5, 10.0, 14.5)
21	3.11 (dd 7.5, 19.0)	3.11 (dd 7.5, 19.0)	2.42 (dd 1.5, 19.0)	2.42 (dd 1.5, 19.0)
22	0.92 (d 7.0)	0.91 (d 7.0)	2.72 (ddd 3.2, 3.2, 19.0)	2.72 (ddd 3.2, 3.2, 19.0)
23	2.08 (s)	2.55 (qq 7.0, 7.0)	0.89 (d 6.8)	0.89
24	1.16 (d 7.0)	1.16 (d 7.0)	2.06 (s)	2.56 (qq 7.0, 7.0)
				1.17 (d 7.0)
				1.18 (d 7.0)

^a Taken in CDCl_3 .

^b Coupling constants in J=Hz.

^c Obscured by overlapping signals.

Table 2-6. Cochleamycinsの¹³C-NMRスペクトルデータ^a

Position	A (1)	A2 (2)	B (3)	B2 (4)
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	72.8 (d) ^b	72.7 (d)	73.0 (d)	73.0 (d)
3	165.7 (s)	165.7 (s)	169.9 (s)	170.0 (s)
4	136.1 (s)	136.1 (s)	60.4 (s)	60.3 (s)
5	154.0 (d)	156.5 (d)	24.7 (t)	24.6 (t)
6	40.6 (d)	40.9 (d)	31.9 (d)	32.0 (d)
7	35.6 (d)	35.6 (d)	39.4 (d)	39.5 (d)
8	34.9 (t)	35.1 (t)	35.5 (t)	35.5 (t)
9	35.5 (d)	35.6 (d)	35.5 (d)	35.7 (d)
10	82.2 (d)	82.3 (d)	82.6 (d)	82.1 (d)
11	42.5 (d)	42.6 (d)	42.8 (d)	42.8 (d)
12	128.6 (d)	128.5 (d)	129.3 (d)	129.3 (d)
13	128.6 (d)	128.5 (d)	130.2 (d)	130.2 (d)
14	34.5 (d)	34.6 (d)	29.0 (d)	29.0 (d)
15	41.1 (t)	41.1 (t)	38.2 (t)	38.2 (t)
16	66.5 (d)	66.5 (d)	30.3 (d)	30.4 (d)
17	45.6 (t)	45.7 (t)	33.3 (t)	33.2 (t)
18	41.1 (t)	41.1 (t)	41.3 (t)	41.3 (t)
19	194.2 (s)	194.2 (s)	203.1 (s)	203.3 (s)
20	13.9 (q)	13.9 (q)	14.1 (q)	14.1 (q)
21	170.9 (s)	176.8 (s)	170.8 (s)	176.8 (s)
22	21.1 (q)	34.3 (d)	21.1 (q)	34.4 (d)
23		19.0 (q)		19.0 (q)
24		19.1 (q)		19.1 (q)

^a Taken in CDCl₃

^b multiplicities in the DEPT spectra;

s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet.

前述した¹H-、¹³C-NMRスペクトルで観測された各シグナル間の帰属を行なうために、**1**の¹³C-¹H COSYスペクトルの解析を行ない、すべての¹H、¹³Cシグナルの相関を明らかにすることが出来た。次いで¹H-¹H COSYスペクトルを測定し、**1**に存在する¹H-¹Hスピン結合ネットワークを解析した。各シグナルの化学シフト及び観測されたスピン結合ネットワークを、スピン結合定数と共にFig. 2-9に示す。

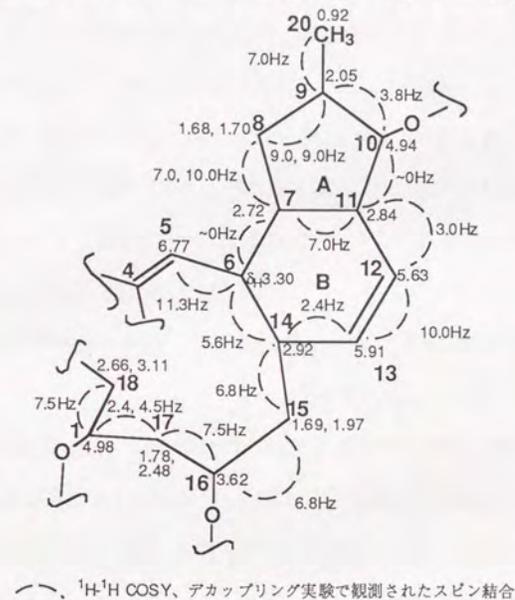


Fig. 2-9. Cochleamycin A (1)の部分構造

この結果、5-Hから14-Hを介した18-Hまでのスピン結合ネットワーク[5-H (δ_H 6.77)→6-H (δ_H 3.30)→14-H (δ_H 2.92)→15-H (δ_H 1.69, 1.97)→16-H (δ_H 3.62)→17-H (δ_H 1.78, 2.48)→1-H (δ_H 4.88)→18-H (δ_H 2.66, 3.11)]及び14-Hから10-Hまでのスピン結合ネットワーク[14-H→13-H (δ_H 5.91)→12-H (δ_H 5.63)→11-H (δ_H 2.84)→7-H (δ_H

2.72)→8-H (δ_H 1.68, 1.70)→9-H (δ_H 2.05)→10-H (δ_H 4.94)]が明らかとなった。更に9-Hと20-Hのメチル基との結合[9-H→20-H (δ_H 0.92)]も観測された。6-H、7-H及び10-H、11-H間の ^1H - ^1H スピン結合定数は0Hzに近く ^1H - ^1H COSYスペクトルではクロスピークが観測されなかった。しかし、デカップリング実験で6-H、10-Hシグナルの照射により7-H、11-Hのシグナルがそれぞれシャープになることより、C-6-C-7、C-10-C-11の結合が強く示唆された。さらにFig. 2-10に示すように、これらの結合はNOE差スペクトルにおいて6-H-7-H、10-H-11-H間にNOEが認められること、HMBCスペクトルにおいて6-H (δ_H 3.30)からC-7 (δ_C 35.6)に対して、また10-H (δ_H 4.94)からC-12 (δ_C 128.6)に対してC-H遠距離スピン結合が観測されることから証明された。以上の結果より、Fig. 2-10に示すように1にはC-7、C-8、C-9、C-10、C-11より構成されるシクロペンタン環 (A環)とC-6、C-7、C-11、C-12、C-13、C-14より構成されるシクロヘキセン環 (B環)がC-7-C-11で結合した部分構造が存在することを明らかにすることができた。

次に各炭素の結合について検討した。12-H (δ_H 5.63)、13-H (δ_H 5.91)のシグナルは ^{13}C - ^1H COSYスペクトルより sp^2 メチンであり、C-12 (δ_C 128.6) - C-13 (δ_C 128.6)間に二重結合が存在することが明らかとなった。 $\Delta_{12, 13}$ はスピン結合定数が $J_{12, 13}=10.0\text{Hz}$ であることからZ配向と決定した。5-H (δ_H 6.77)についても ^{13}C - ^1H COSYスペクトルより sp^2 メチンであることが判明した [C-5 (δ_C 154.0)]。Table 2-6に示す様に1の ^{13}C -NMRスペクトルでは4本の二重結合由来の sp^2 炭素が観測されており (δ_C 128.6、 δ_C 128.6、 δ_C 136.1、 δ_C 154.0)、このうち3本は上記のC-12 (δ_C 128.6)、C-13 (δ_C 128.6)、C-5 (δ_C 154.0)に帰属されている。従って残る δ_C 136.1の sp^2 4級炭素がC-5と結合するC-4であることが一義的に決定された。これはFig. 2-10に示すようにHMBCスペクトルにおいて、6-H (δ_H 3.30)から δ_C 136.1の sp^2 4級炭素にC-H遠距離ス

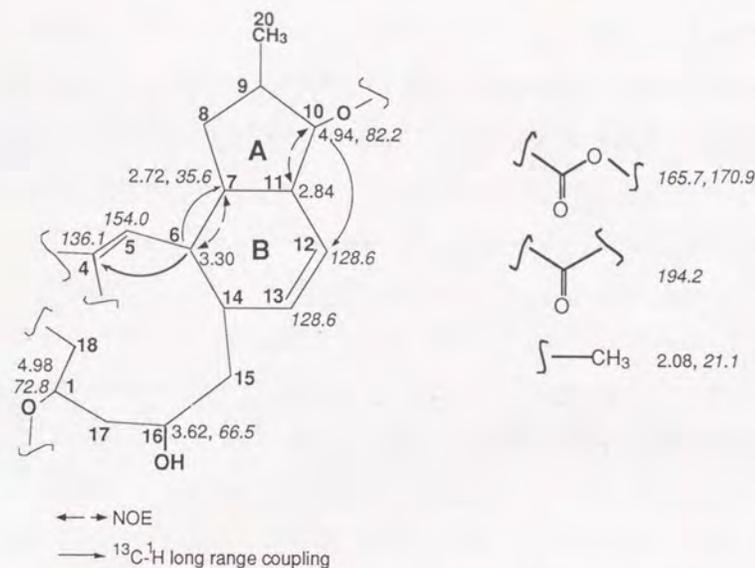


Fig. 2-10. Cochleamycin A (1)において観測されたC-H遠距離スピン結合とNOE

ピン結合が観測されることから確認された。またC-1 (δ_C 72.8)、C-10 (δ_C 82.2)、C-16 (δ_C 66.5)には酸素原子が結合していることが各炭素の ^{13}C 化学シフト値より判明した。これら炭素に結合した ^1H シグナルのうち1-H (δ_H 4.88)、10-H (δ_H 4.94)のシグナルは16-H (δ_H 3.62)に比してアシル化シフトを受けて低磁場に観測されていた。従って赤外吸収スペクトルより存在が示唆された水酸基はC-16に結合していることが強く示唆された。

以上の解析により判明した部分構造の他に、Fig. 2-10に示すように1を構成する炭素としては2個のカルボニル炭素 (δ_C 165.7、 δ_C 170.9)、1個のケトン炭素 (δ_C 194.2)、1個のシングレットメチル炭素 (δ_C 2.08、 δ_C 21.1)が存在することが ^{13}C -NMRスペクトル、 ^{13}C - ^1H COSYスペクトルより判明した。これら各構造間のつながりはHMBCス

ベクトルにより解析した。

Fig. 2-11に示すようにHMBCスペクトルにおいては、シングレットメチル 22-H (δ_H 2.08)から、カルボニル炭素C-21 (δ_C 170.9)に対してC-H遠距離スピン結合が観測され、アセチル基の存在が明らかとなった。更にアシル化による低磁場シフトを受けた10-H (δ_H 4.94)からもC-21に対してC-H遠距離スピン結合が認められることから、C-10にはアセトキシ基が結合している事が判明した。

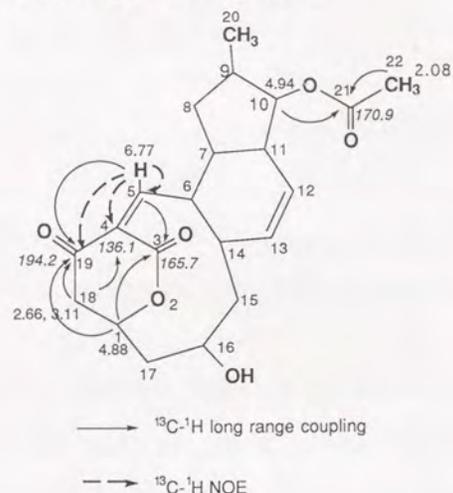


Fig. 2-11. Cochleamycin A (1)において観測されたC-H遠距離スピン結合と ^{13}C - ^1H NOE

またFig. 2-11に示すように、 sp^2 メチン5-H (δ_H 6.77)からはケトン炭素C-19 (δ_C 194.2)へC-H遠距離スピン結合が観測された。一方18-H (δ_H 2.66, δ_H 3.11)からもC-4 (δ_C 136.1)及びC-19へC-H遠距離スピン結合が認められた。このことからケトン炭素C-19は、 sp^2 4級炭素C-4とメチレン炭素C-18の間に存在することが判明し、C-5 - C-4 - C-19 - C-18 のつながりが証明された。更に sp^2 メチン5-H (δ_H 6.77)からはカル

ボニル炭素C-3 (δ_C 165.7)へもHMBCスペクトルでクロスピークが観測され、LSPD実験においてアシル化による低磁場シフトを示している1-H (δ_H 4.88)より同カルボニル炭素C-3にC-H遠距離スピン結合が観測された。この結果C-4 - C-3 - O-2 - C-1のつながりが判明し、C-1とC-3が酸素原子を介してラクトン環を形成していることが明らかとなった。この結果1にはC-1、O-2、C-3、C-4、C-19、C-18より形成される β -keto δ -lactone環が存在する事が示された。

$\Delta_{4,5}$ の幾何異性については ^{13}C - ^1H 間のNOEを観測することにより検討した。Fig. 2-12に5-H (δ_H 6.77)を照射して得られた ^{13}C - ^1H 差NOEスペクトルを示す。Fig. 2-11に示すように本スペクトルにおいて5-HよりC-4、C-5、C-19に対してNOEが観測され、 $\Delta_{4,5}$ はZ配向であることが判明した。

上記の解析により1のすべての結合が明らかとなり、Fig. 2-11に示すように1の平面構造を決定した。

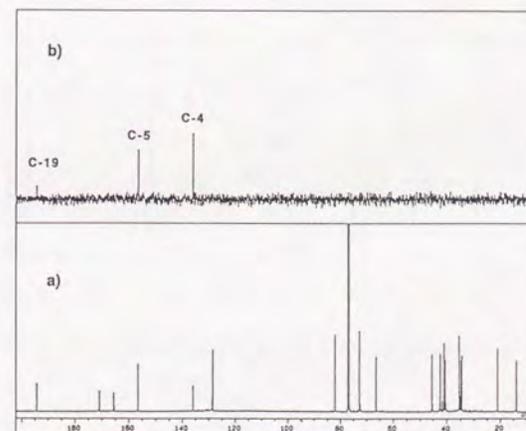


Fig. 2-12. Cochleamycin A (1)の ^{13}C - ^1H 差NOEスペクトル (CDCl_3 中)

a) Control, b) CH-NOE irr at δ_H 6.77 (5-H)

2. Cochleamycin A2の構造解析

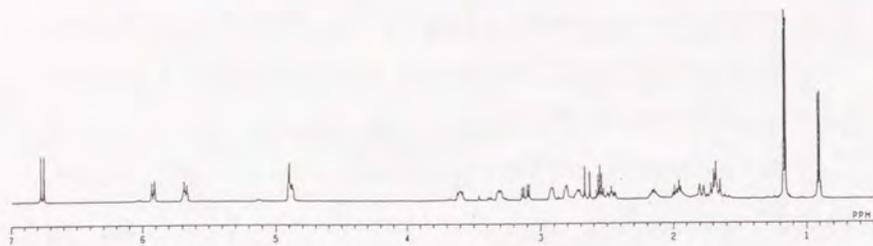


Fig. 2-13. Cochleamycin A2 (2) の¹H-NMRスペクトル (CDCl₃中)

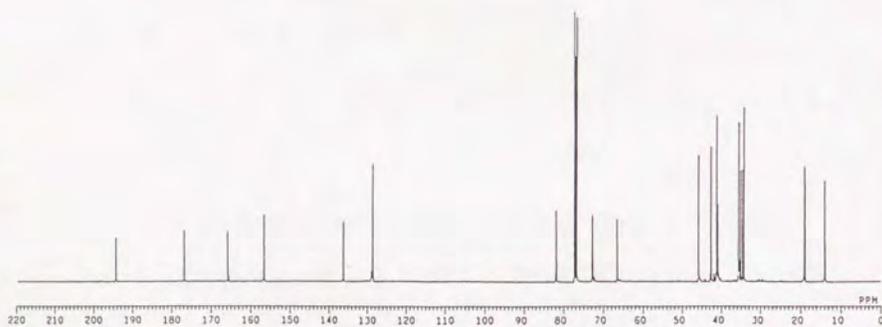


Fig. 2-14. Cochleamycin A2 (2) の¹³C-NMRスペクトル (CDCl₃中)

Cochleamycin A2 (2)の重クロロホルム中における¹H-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-13、Table 2-5に、¹³C-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-14、Table 2-6に示す。2の¹H-NMRスペクトルは1と極めて類似しており、2では1の

22-Hに由来するシグナル (δ_H 2.08、シングレットメチル) が消失し、新たに2本のダブルットメチルシグナル (δ_H 1.16、 δ_H 1.17)とこれと $J=7.0\text{Hz}$ でスピ結合したメチンシグナル (δ_H 2.55)が観測された。これ以外の部分のスペクトルデータはほぼ完全に同一であった。2の¹³C-NMRスペクトル及び¹³C-¹H COSYスペクトルの解析からも1のC-22のメチルシグナル (δ_C 21.1)が消失し、2本のメチル (δ_C 19.0、 δ_C 19.1)と1本のメチン (δ_C 34.3)のシグナルが新たに観測されていることが認められた。更に¹³C-NMRスペクトルより、1のC-21のカルボニル炭素のシグナルが2では5.9ppm低磁場へシフトしていること (δ_C 170.9 vs δ_C 176.8)も判明した。HRFAB-MSにより判明した2の分子式が1に比してC₂H₄分多いことを考慮すると、1と2の炭素骨格は同一であり、2は1のC-10に結合したアセトキシ基がイソブチリロキシ基に置換した化合物であることが強く示唆された。Fig. 2-15に示すように、これは2のHMBC実験で上述の2本のダブルットメチル (23-H、24-H)及び10-H (δ_H 4.90)よりC-21 (δ_C 176.8)に対してC-H遠距離スピ結合が観測されることから支持され、Fig. 2-15に示す様に2の平面構造を決定した。

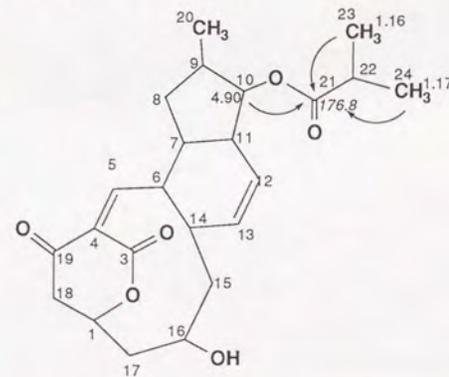


Fig. 2-15. Cochleamycin A2 (2)において観測されたC-H遠距離スピ結合

3. Cochleamycin Bの構造解析

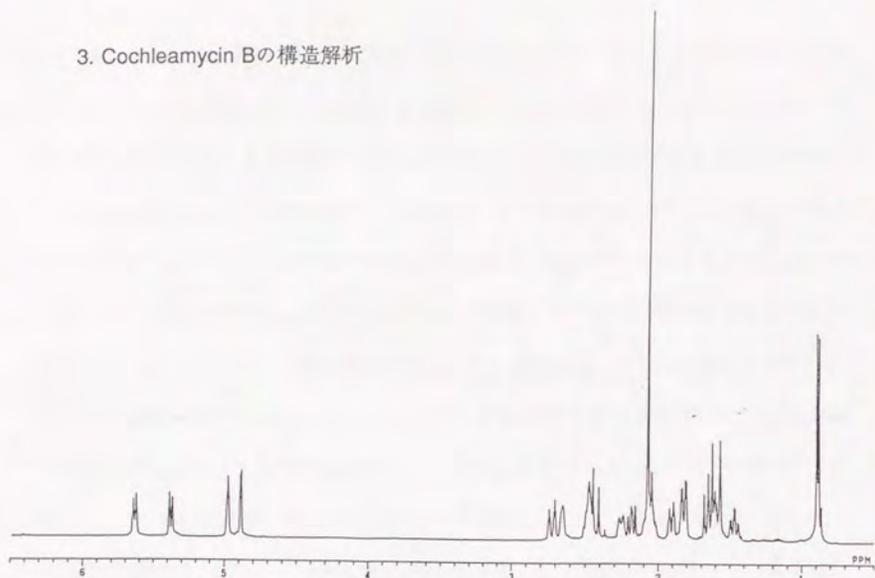


Fig. 2-16. Cochleamycin B (3) の¹H-NMRスペクトル (CDCl₃中)

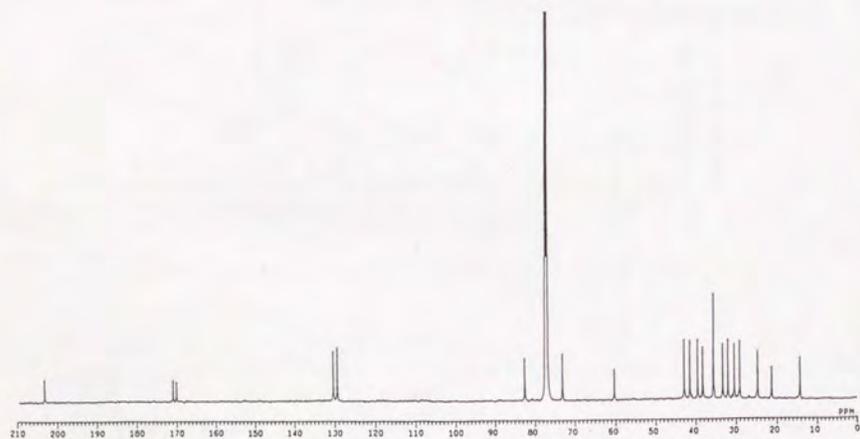


Fig. 2-17. Cochleamycin B (3) の¹³C-NMRスペクトル (CDCl₃中)

Cochleamycin B (3)の重クロロホルム中における¹H-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-16、Table 2-5に、¹³C-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-17、Table 2-6に示す。3の¹H-NMRスペクトルでは1のシクロペンタン環 (A環)、シクロヘキセン環 (B環)部分に相当するシグナルは良く保存されていた。しかし、一方1で δ_H 6.77に観測された sp^2 メチン (5-H)は3では観測されず、 δ_H 1.46~ δ_H 3.60の領域の sp^3 メチン及びメチレンのシグナルについてもシグナル数が1と比較して2H分多い事が積分値より明らかとなった。

3の¹³C-NMRスペクトルでは1と同様に21本のシグナルが観測されたが、1のC-4 (δ_C 136.1)、C-5 (δ_C 154.0)のシグナルは消失し、 δ_C 14.1~ δ_C 82.6に存在する sp^3 炭素のシグナル数が2本増加していた。3が紫外吸収を持たないことと考えあわせると、3では1のC-4 - C-5間の二重結合が消失し、C-4、C-5が sp^3 炭素となったことが示唆された。

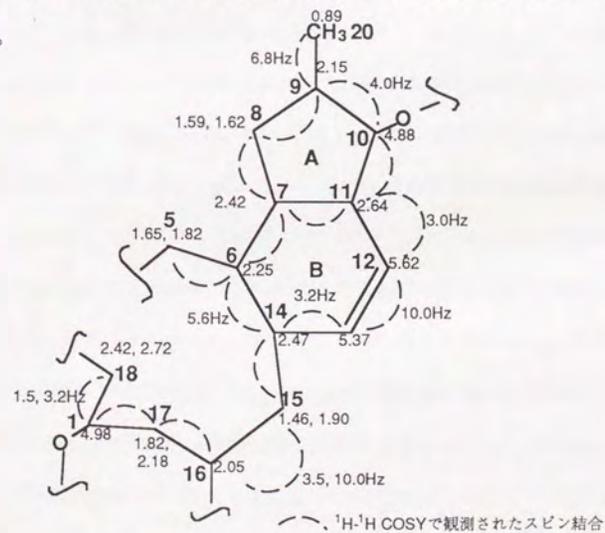


Fig. 2-18. Cochleamycin B (3)の部分構造

3の ^{13}C - ^1H COSYスペクトルを測定し、 ^1H 、 ^{13}C -NMRスペクトルで観測された各 ^1H と ^{13}C シグナルの相関を確認後、 ^1H - ^1H COSYスペクトルを測定して3に存在する ^1H - ^1H スピン結合スピンネットワークをFig. 2-18に示すように明らかにした。まず7-H~11-H間のシクロペンタン環 (A環)部分のスピン結合ネットワーク [7-H (δ_{H} 2.47) \rightarrow 8-H (δ_{H} 1.59, 1.62) \rightarrow 9-H (δ_{H} 2.15) \rightarrow 10-H (δ_{H} 4.88) \rightarrow 11-H (δ_{H} 2.64) \rightarrow 7-H]、6-H~14-H間のシクロヘキセン環 (B環)部分のスピン結合ネットワーク [6-H (δ_{H} 2.25) \rightarrow 7-H \rightarrow 11-H \rightarrow 12-H (δ_{H} 5.62) \rightarrow 13-H (δ_{H} 5.37) \rightarrow 14-H (δ_{H} 2.47) \rightarrow 6-H]を確認することができた。従って、1のA、B環部分の構造は3で保存されていることが明らかとなった。さらに5-HよりB環の6-H、14-Hを経て15-H、16-H、17-H、1-H、18-Hに至るスピン結合ネットワーク [5-H (δ_{H} 1.65, 1.82) \rightarrow 6-H \rightarrow 14-H \rightarrow 15-H (δ_{H} 1.46, 1.90) \rightarrow 16-H (δ_{H} 2.05) \rightarrow 17-H (δ_{H} 1.82, 2.18) \rightarrow 1-H (δ_{H} 4.98) \rightarrow 18-H (δ_{H} 2.42, 2.72)]も観測された。しかしながら1で δ_{H} 6.77に sp^2 メチンとして観測された5-Hは、3では δ_{H} 1.65、1.82に sp^3 メチレンとして観測された。また1で水酸基の結合した16-H (δ_{H} 3.62)は3では δ_{H} 2.05に観測され、 ^{13}C -NMRスペクトルにおいてもC-16炭素に関して同様の高磁場シフト (δ_{C} 66.5 vs δ_{C} 30.3)が認められた。このことより3ではC-16に酸素原子が結合していない事が明らかとなった。

3の ^1H - ^1H COSYスペクトルにおいては、5-Hのシグナルからは6-Hとのスピン結合のみが観測されること、また4-Hに相当するシグナルは3の ^1H -NMRスペクトルでは観測されないことからC-4は sp^3 4級炭素であると考えられた。3の ^{13}C -NMRスペクトルでは δ_{C} 60.4に sp^3 4級炭素が1と比較して新たに観測され、これがC-4のシグナルであることが強く示唆された。さらにFig. 2-19に示すように、3のHMBCスペクトルにおいて5-H (δ_{H} 1.65, 1.82)より δ_{C} 60.4のシグナルにC-H遠距離スピン結合が観測され、このシグナルがC-4であることが確認された。

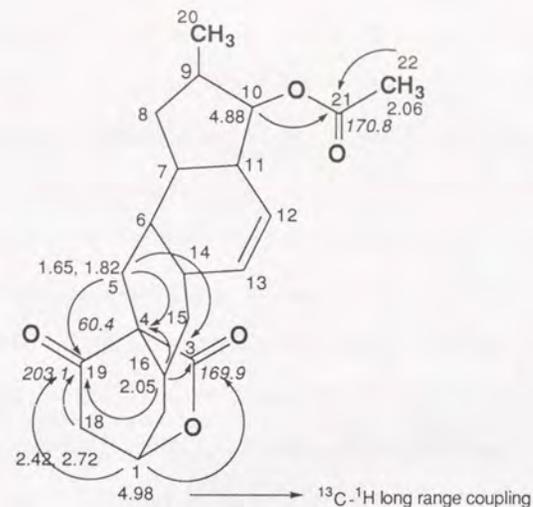


Fig. 2-19. Cochleamycin B (3)において観測されたC-H遠距離スピン結合

Fig. 2-19に示すように、3のHMBCスペクトルにおいて1-H (δ_{H} 4.98)、18-H (δ_{H} 2.42, 2.89)よりケトン炭素C-19 (δ_{C} 203.1)に対してC-H遠距離スピン結合が観測された。また同時に5-HからもC-19に対してC-H遠距離スピン結合が観測され、C-5 - C-4 - C-19 - C-18 - C-1のつながりが明らかとなった。また1-H (δ_{H} 4.98)、5-Hよりカルボニル炭素C-3 (δ_{C} 169.9)に対してC-H遠距離スピン結合が観測された。1-Hはその ^1H 化学シフトからアシル化を受けていることが明らかであり、この結果C-5 - C-4 - C-3 - O-2 - C-1のつながりが示された。従ってC-1、O-2、C-3、C-4、C-19、C-18よりなる1の β -keto δ -lactone環は、3でも保存されていることが判明した。1と比較して3ではC-3、C-19のシグナルが低磁場へシフトしていることは [C-3 (δ_{C} 165.7 vs δ_{C} 169.9)、C-19 (δ_{C} 194.2 vs δ_{C} 203.1)]、3での共役系の消失によるものであると合理的に説明することができる。3のHMBCスペクトルでは16-H (δ_{H} 2.05)は22-H (シング

レットメチル) とシグナルが重なり合っており、22-HのT₁ノイズの影響で16-HからのC-H遠距離スピン結合を観測することはできなかった。そこでLSPD実験を試み16-Hを照射した結果、C-3、C-4、C-19に対してC-H遠距離スピン結合が観測された。これによりC-4とC-16の結合が証明され、前述の¹H-¹Hスピン結合ネットワークの解析から既に明らかとなっているC-16 - C-17 - C-1のつながりと考え合わせると、Fig. 2-19に示すように**3**にはβ-keto δ-lactone環及びC-16、C-17より構成される3-oxabicyclo [2,2,2]octane-2,6-dione構造が存在することを明らかにすることができた。またFig. 2-19に示すように、**3**のHMBCスペクトルにおいて10-H (δ_H 4.88)、22-H (δ_H 2.06)からC-21 (δ_C 170.8)に対してC-H遠距離スピン結合が観測されることから、**3**でもC-10にアセトキシ基が結合していることが示された。

この結果、**3**の平面構造はFig. 2-19に示すように決定された。

4. Cochleamycin B2の構造解析

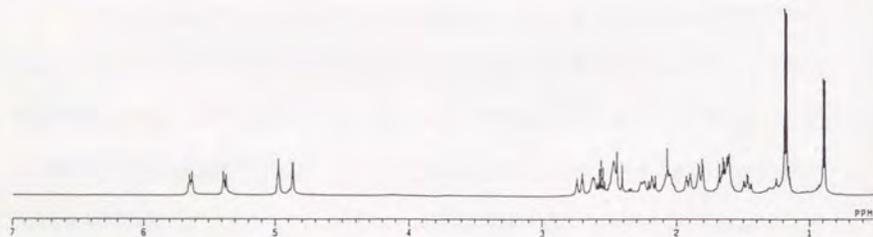


Fig. 2-20. Cochleamycin B2 (**4**) の¹H-NMRスペクトル (CDCl₃中)

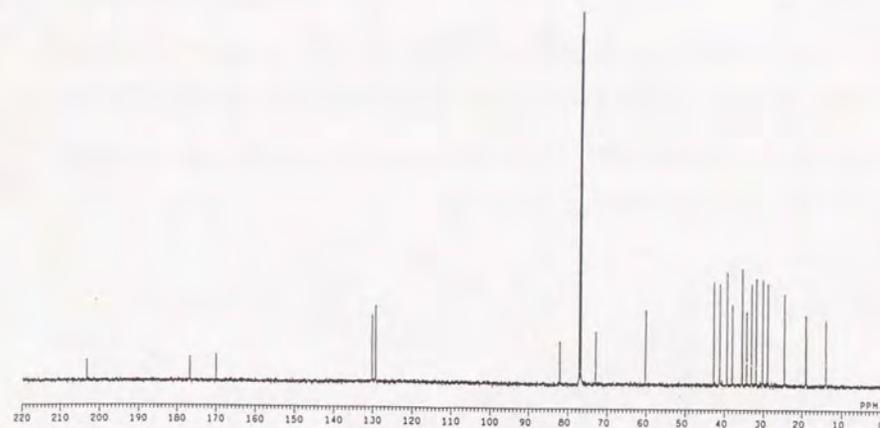


Fig. 2-21. Cochleamycin B2 (**4**) の¹³C-NMRスペクトル (CDCl₃中)

Cochleamycin B2 (**4**)の重クロロホルム中における¹H-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-20、Table 2-5に、¹³C-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-21、Table 2-6に示す。**4**の¹H-NMRスペクトルは**3**と極めて類似しており、**4**では**3**の22-Hに由来するシグナル (δ_H 2.06、シングレットメチル) が消失し、新たに2本のダブルットメチル (δ_H 1.17、δ_H 1.18)とこれとスピン結合したメチン (δ_H 2.56)が観測された。これ以外の部分のスペクトルデータはほぼ完全に同一であった。さらに**4**の¹³C-NMRスペクトル及び¹³C-¹H COSYスペクトルの解析からも、**3**のC-22のメチルシグナル (δ_C 21.1)が消失し、2本のメチル (δ_C 19.0、δ_C 19.1)と1本のメチンのシグナルが新たに観測されていることが認められた。また**4**の¹³C-NMRスペクトルより、**3**のC-21のカルボニル炭素のシグナルが**4**では6.0ppm低磁場へシフトしていること (δ_C 170.8 vs δ_C 176.8)が示された。これは**1**と**2**の間で認められた関係と同じであり、

4は3のC-10に結合したアセトキシ基がインブチリロキシ基に置換した化合物であることが強く示唆された。Fig. 2-22に示すように、これは4のHMBCスペクトルで2本のダブルレットメチル(23-H、24-H)及び10-H (δ_H 4.86)より、カルボニル炭素C-21 (δ_C 176.8)に対してC-H遠距離スピン結合が観測されることから支持され、2の平面構造は、Fig. 2-22に示す様に決定された。

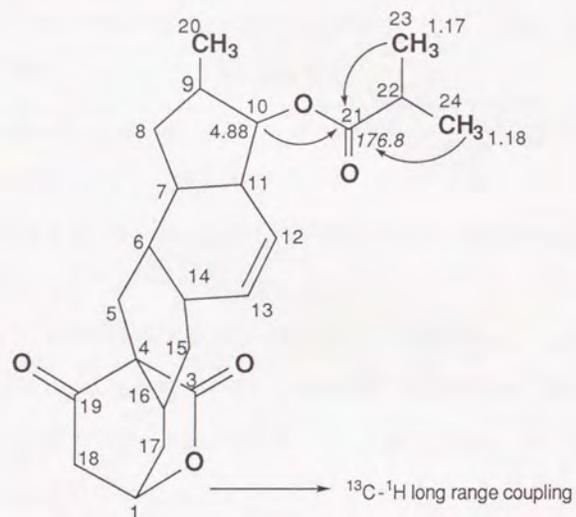


Fig. 2-22. Cochleamycin B2 (4)において観測されたC-H遠距離スピン結合

第7節 Cochleamycinsの相対立体配置

Cochleamycinsの相対立体配置をphase-sensitive NOESYスペクトル及び ^1H -NMRスペクトルのスピン結合定数より検討した。 ^1H -、 ^{13}C -NMRスペクトルより1と2、また3と4は同一の相対立体配置であることは明らかであったので、相対立体配置の検討には、シグナルの分離の良い2及び4を用いた。2及び4のNOESYスペクトルを

Fig. 2-23、2-24に、またcochleamycins Aグループ(1、2)及びBグループ(3、4)の相対立体配置をNOESYで観測されたNOEと共にFig. 2-26、2-28に示す。なお、ここでも説明の便宜上、Fig. 2-25に示すように各リングにA, B, Cの名称を与えた。

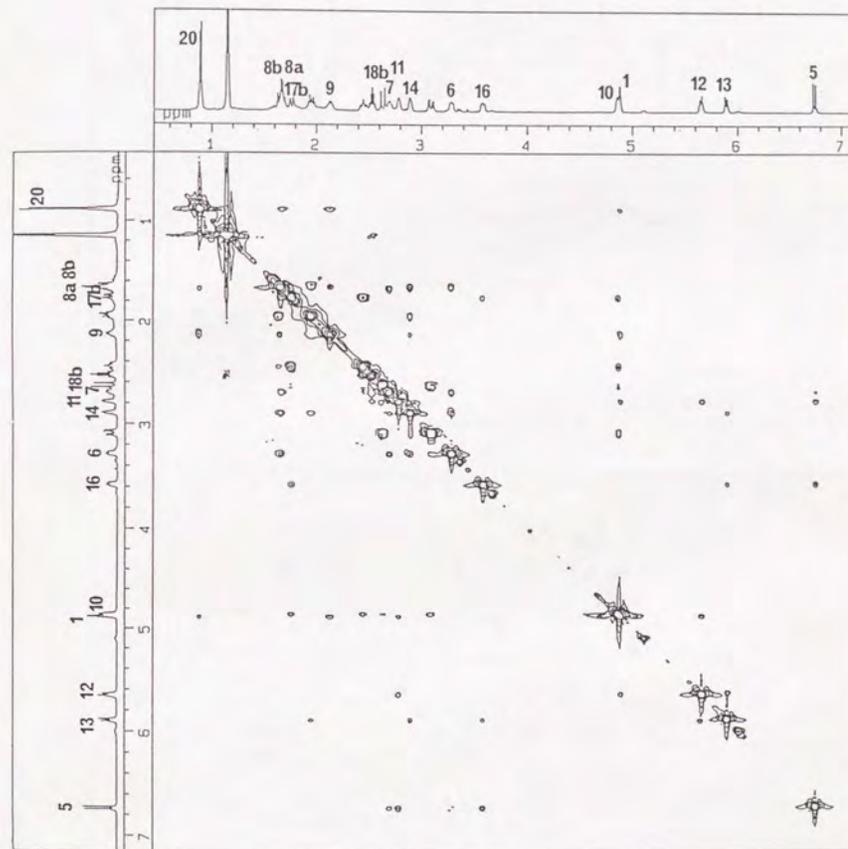


Fig. 2-23. Cochleamycin A2 (2)の phase sensitive NOESYスペクトル (CDCl_3 中)

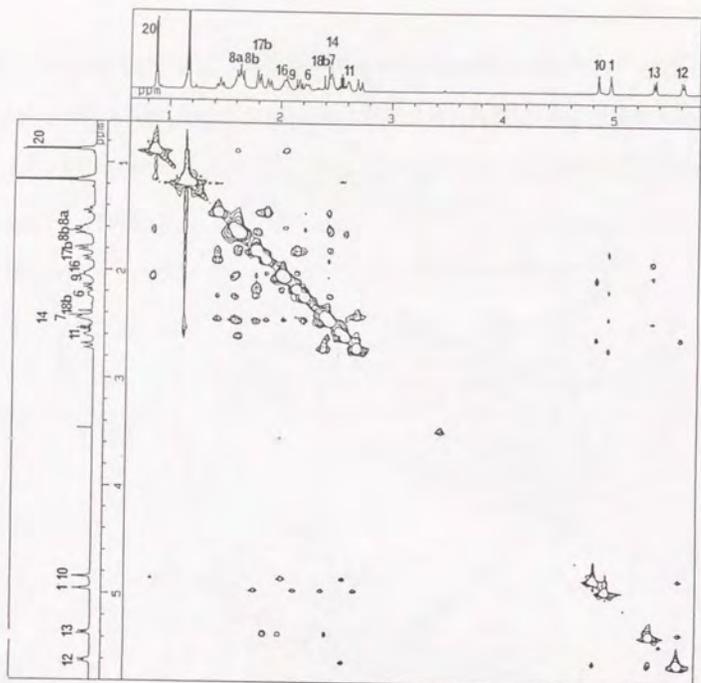


Fig. 2-24. Cochleamycin B2 (4)の phase sensitive NOESYスペクトル (CDCl₃中)

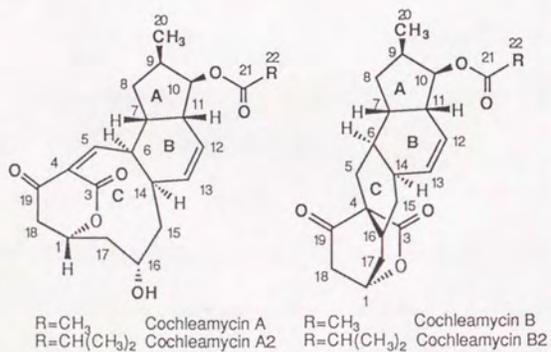


Fig. 2-25. 各環の名称

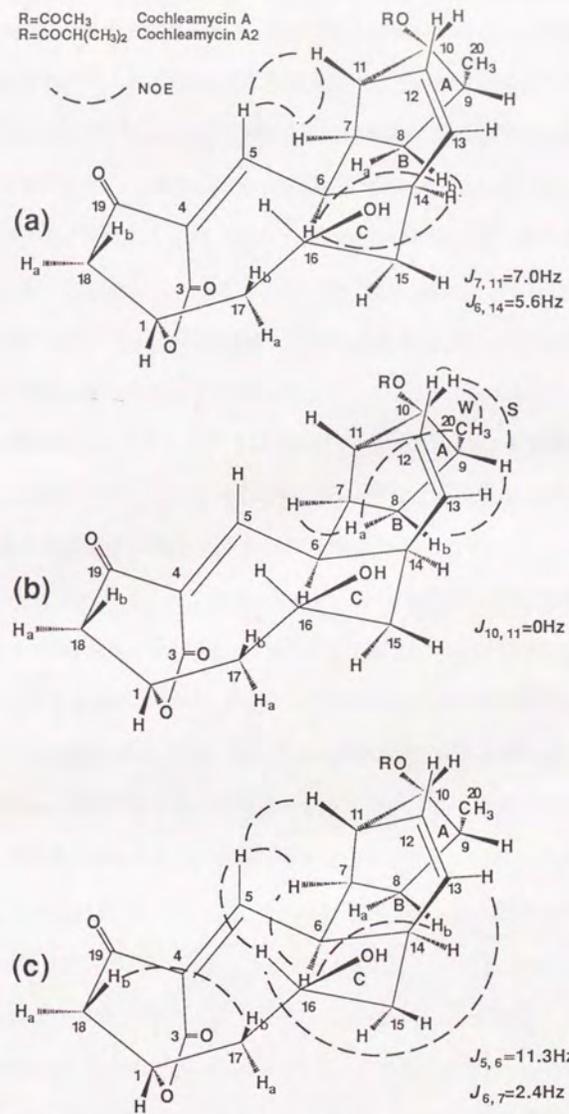


Fig. 2-26. Cochleamycins A (1), A2 (2)の相対立体配置及び2のNOESYスペクトルで観測されたNOE

まず2のAB環の結合 (C-7 - C-11)の相対立体配置について検討した。一般にシクロペンタン環のビシナルな*cis*プロトンの結合定数は約8Hz (二面角約0°)、ビシナルな*trans*プロトンの結合定数は約0Hz (二面角約90°)と報告されている⁴⁸⁾。Fig. 2-26 (a)に示すように2では $J_{7,11}=7.0\text{Hz}$ であることから、本結合が*cis*であることが示唆された。またこれは、C環の5-Hと7-H、11-Hの間にNOEネットワークが観測されることから支持された。

BC環の結合 (C-6 - C-14)については以下のように検討した。Fig. 2-26 (b)に示すように、A環の8位のメチレンプロトン8-Ha ($\delta_H 1.70$)、8-Hb ($\delta_H 1.68$)のうち、7-H - 8-HaでNOEが観測され、7-H - 8-Hbでは観測されなかった。従ってFig. 2-25に示すように7-HをB環のβ面側に位置するように記述すると、8-HbはB環のα面上に位置している。この8-Hbと6-H、14-Hの間にNOEネットワークが観測されることから、6-H、14-H共にB環のα面側に向いていることが示された。また $J_{6,14}=5.6\text{Hz}$ であることから、Karplusの式 ($J=10\cos^2\theta$)より6-Hと14-Hの二面角は45°前後であると推定された。Fig. 2-27 (a)に示すように結合が*cis*の場合、6-Hと14-Hは各環の同一面側に存在し、6-Hと14-Hの二面角は60°前後となる。従って観測されたNOEおよびスピン結合定数を合理的に説明することができる。二面角の若干の不一致は、B環がシクロヘキセン環であることに由来するひずみの寄与によるものと考えられる。

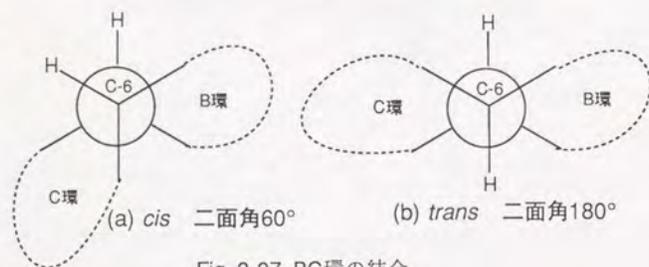


Fig. 2-27. BC環の結合

一方結合が*trans*の場合を想定すると、B環に対してC環が *axial-axial*型に結合した立体配座は極めて不利であるため、Fig. 2-27 (b)に示すような *equatorial-equatorial*型の立体配座について考察すればよいと考えられる。この場合6-Hと14-Hは*anti*となり、観測されたNOEおよび $J_{6,14}$ の値を説明することはできない。以上の結果より、BC環の結合は*cis*であると結論した。

次にA環の相対立体配置について検討した。Fig. 2-26 (b)に示すように9-H - 10-H間に強いNOEが観測され、20-CH₃ - 10-H間に認められるNOEは弱いものであった。従って9-Hと10-H、20-CH₃とC-10に結合した置換基 (イソブチロキシ基) はそれぞれ*cis*であることが明らかとなった。また7-H - 8-Ha ($\delta_H 1.70$)、8-Ha - 20-CH₃間にNOEが観測され7-H、8-Ha、20-CH₃が同一面側に位置していることが明らかとなった。これは逆の面側に位置する8-Hb - 9-H、9-H - 10-H間でNOEが観測されることから確認された。さらに $J_{10,11}=0\text{Hz}$ であること及び10-H - 12-H間でNOEが観測されることから10-Hと11-Hは*trans*であることが示され、A環部分の相対立体配置を決定することができた。

B環の相対立体配置については以下のように検討した。Fig. 2-26 (c)に示すように6-Hと7-H間ではNOEが観測され、 $J_{6,7}=2.4\text{Hz}$ であった。従って両プロトン間の二面角は60°前後であると推定された。しかしながらこれらの結果からは、直接的に6、7位の立体化学について結論することは出来なかった。そこで、周囲のプロトンの環境から立体化学を考察することとした。5-H - 6-H間ではNOEは観測されず、 $J_{5,6}=11.3\text{Hz}$ であることから5-Hと6-Hの二面角は180°に近いことが推定される。前述したように5-Hは11-HともNOE相関が認められることからB環のβ面上に位置していると考えられ、従って6-HはB環のα面側に向いていることが判明した。さらに5-H - 7-H間及び6-H - 8-Hb間でNOEが観測されることから6-Hと7-Hは*trans*であることが

判明し、B環の相対立体配置及びAB環部分の相対立体配置が明らかとなった。

C環と β -keto δ -lactone環の相対立体配置については、Fig. 2-26 (c)に示すように検討した。前述したようにC環の5-HはB環の β 面上に位置しており、C環の16-Hとこの5-Hとの間には渡環的なNOEが観測された。さらに16-HについてはB環の13-HともNOE相関が認められた。13-HとNOE相関が認められることから、16-Hは5-Hと同じC環の β 面側に存在することが判明した。また5-HとNOE相関が認められることから、16-HはC環の内側に位置していることも判明した。従ってC-16に結合した水酸基はC環の外側に位置していることが示された。また $\Delta_{4,5}$ はZであり（第6節参照）、18-H_b - 17-H_b間でNOEが観測されたことから、C環と β -keto δ -lactone環との位置関係は一義的に決定された。以上の結果より、Fig. 2-25に示すように2の相対立体配置を決定することが出来た。

次に4の相対立体配置について検討した。まず4のAB、BC間の結合について検討した。Fig. 2-28 (a)に示すように、2と同様にAB環の結合(C-7 - C-11)は*cis*であることが、C環の5-H、7-H、11-Hの間にNOEが観測されること及び $J_{7,11}=7.0\text{Hz}$ であることから判明した。またBC環の結合(C-6 - C-14)も*cis*であることが、B環の α 面上に位置する8-H_b (δ_{H} 1.59)、6-H、14-Hの間にNOEが観測されることおよび $J_{6,14}=3.8\text{Hz}$ であることから結論された。

さらに4のNOESYスペクトル解析の結果、Fig. 2-28 (b)に示すように4のAB環部分で観測されたNOEは2と完全に同一であり、C-9、C-10の相対立体配置を含めてこの部分の相対立体配置は2と4で保存されていることが判明した。

C環（シクロヘキサン環）のコンフォメーションについては、Fig. 2-28 (c)に示すように1, 3-*diaxial*の関係にある5-H_b (δ_{H} 1.65) - 16-H及び6-H - 15-H_b (δ_{H} 1.47)でNOEが観測されること、及び1, 2-*diaxial*の関係にある5-H_b - 6-H、15-H_b - 16-Hのスピ

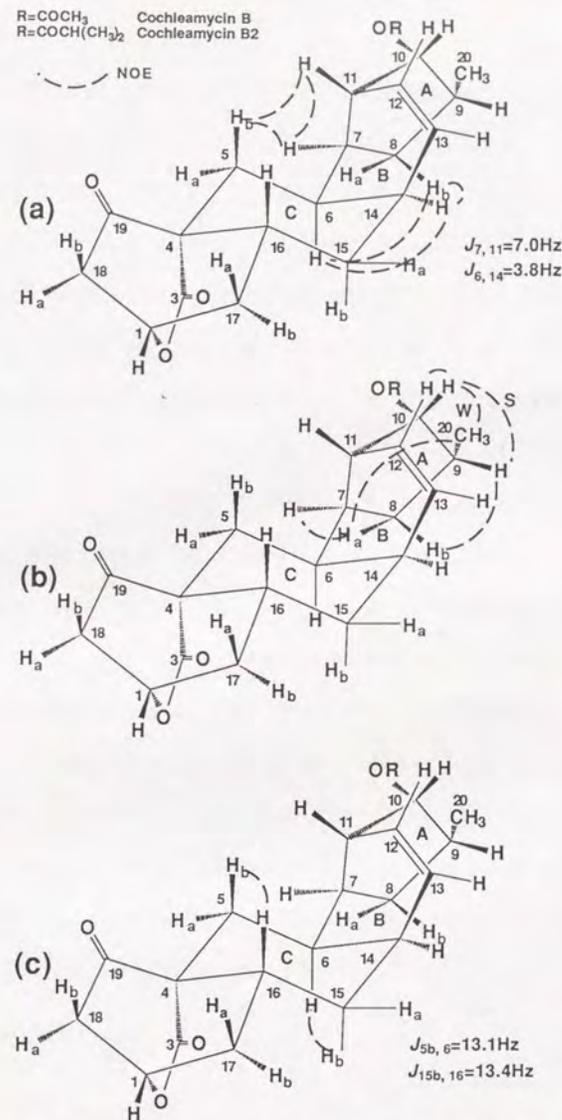


Fig. 2-28. Cochleamycins B (3), B2 (4)の相対立体配置及び4のNOESYスペクトルで観測されたNOE

結合定数が $J_{5b,6}=13.1\text{Hz}$ 、 $J_{15b,16}=13.4\text{Hz}$ であることからchair型であることが明らかとなった。従って16-Hは*axia*配向でC環の β 面側にC環に対して垂直に立っていることが示された。

次にC環とC-1、O-2、C-3、C-4、C-16、C-17、C-18、C-19より構成される3-oxabicyclo [2, 2, 2]octane-2,6-dione構造との立体配置についてFig. 2-29に示すように検討した。3-oxabicyclo [2,2,2]octane-2,6-dione構造は、極めて固定したコンフォメーションを取っていると考えられる。この際、Fig. 2-29 (a)及び(b)に示すようにビシクロ環上の δ -ラクトン環とシクロヘキサノン環の位置関係の異なる2通りの立体配置が考えられる。

4の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいてはC-1を介して結合している sp^3 メチレン炭素C-17、C-18の17-Hb ($\delta_{\text{H}} 1.82$)と18-Ha ($\delta_{\text{H}} 2.72$)の間にはW-配座構造に由来する遠隔スピ結合 ($J=3.2\text{Hz}$)が観測されている。またNOEに関してはFig. 2-29のNOESYスペクトルに示すように、*axia*配向であるC環の16-H ($\delta_{\text{H}} 2.04$)と17-Ha ($\delta_{\text{H}} 2.18$)間、17-Haと18-Hb ($\delta_{\text{H}} 2.42$)間で相関が認められている。3-oxabicyclo [2,2,2]octane-2,6-dione構造が(a)の配置である場合、上述したW-配座構造に由来する遠隔スピ結合及び2つのNOEが合理的に説明できる。一方 (b)の配置の場合、16-Hから遠いはずの17-Hbに対してNOEが観測されていることとなり合理的に説明できない。従って、3-oxabicyclo [2, 2, 2]octane-2,6-dione構造は (a)の配置であることが明らかとなった。以上の結果より、Fig. 2-25に示すように4の相対立体配置を決定することが出来た。

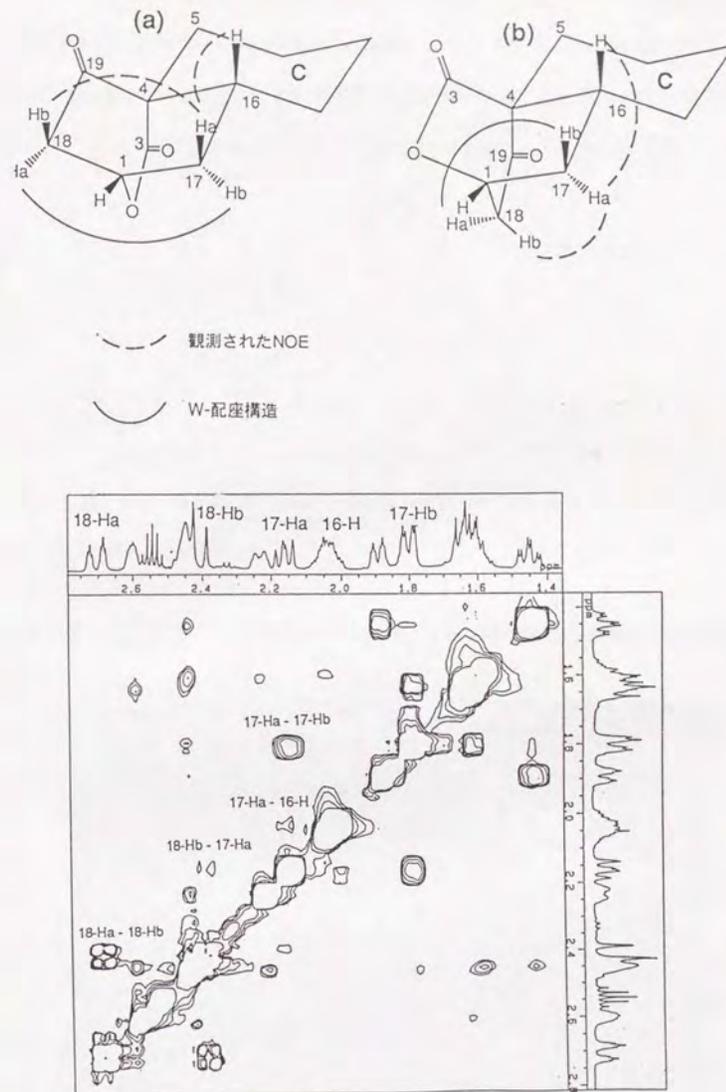


Fig. 2-29 C環と3-oxabicyclo [2,2,2]octane-2,6-dione構造との立体配置

第8節 分子力場計算を用いた cochleamycin A (1) のコンフォメーション解析

最近、cochleamycins と極めて類似した構造を有する macquarimicins が、Johnson らにより報告された^{49,50}。Macquarimicins の構造を Fig. 2-30 に示す。

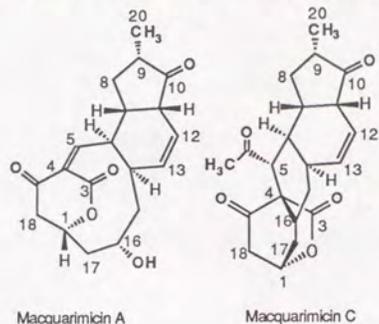


Fig. 2-30 Macquarimicin A, B の構造

Macquarimicins の相対立体配置は X 線結晶構造解析により決定されており信頼できると考えられるが、前節で決定した 1 の相対立体配置と macquarimicin A の相対立体配置とは、C-9 のみが異なっている。そこで cochleamycins の相対立体配置を確認するため、1 の溶液中での安定なコンフォメーションを分子力場計算を用いて解析した。

1. 方法

良好な結合長、結合角をもつ分子モデルを作成するために X 線解析で求められているシクロペンタン、シクロヘキセンの 2 つの環をデータベースより抽出し、この 2 つの環を融合することにより、AB 環部分を構築した。また、 δ -lactone 環部分も同様にシクロヘキセンより構築した。この 2 つのフラグメントを Tripos 力場⁵¹の標準的結合長、結合角を用いて結合し、Fig. 2-30 に示すモデルを作製した。各環構造の一部を切断して (Fig. 2-31 破線部分) 全体を線型の分子構造にした後、 \rightarrow 印で示す 13 個の結合

を 5° 刻みで回転させ、1 の環構造をとれるコンフォメーションを網羅的に検索した。このようにして求めたコンフォメーションは Fig. 2-31 に示す R100、R400 の 2 つの型に分類された。

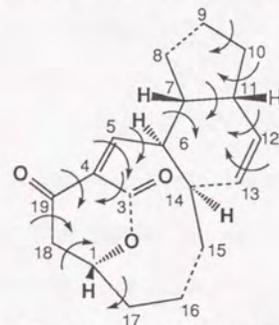


Fig. 2-31. Cochleamycin A (1) のシュミレーションモデル

さらに確認のため分子動力学 (Molecular Dynamics) 計算により 700K \rightarrow 200K への simulated annealing を試み、いくつかのコンフォメーションを発生させたが、R100 あるいは R400 型以外のものは見い出さなかった。

最後に C-9、C-10、C-16 に置換基を導入し、1 の全構造を完成させた。R100、R400 のコンフォメーションを Fig. 2-32 に示す。

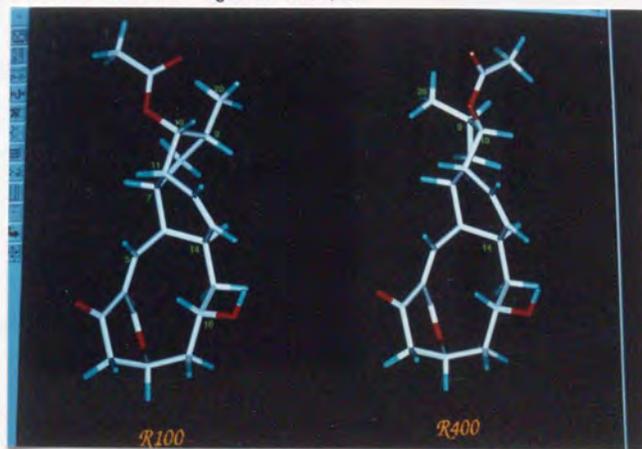


Fig. 2-32. 分子力場計算により算出された cochleamycin A (1) の溶液中のコンフォメーション R100, R400

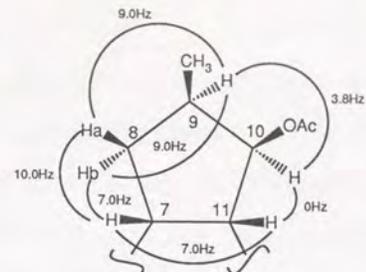
2. ビシナルスピン結合定数、原子間距離を用いた各コンフォメーションの検討

R100、R400のコンフォメーションは、1のB環(シクロヘキセン環)、C環、β-keto δ-lactone環部分についてはほぼ同じであった。この部分のコンフォメーションは、Fig. 2-26に示すNOESYスペクトルより推定される相対立体配置と良い一致を示した。

しかし両コンフォメーションは、シクロペンタン環部分で大きく異なっていた。すなわちFig. 2-33に示すように、シクロペンタン環のC-7、C-8、C-10、C-11により形成される面に対して、R100はB環とC-9が*syn*、R400は*anti*である。そこで、それぞれのシクロペンタン環のビシナルスピン結合定数を二面角(θ)よりKarplusの式($J=10\cos^2\theta$)に準じて推定し、実測値と比較した。また1では9-H-14-H間でNOEが観測されることから、これらの原子間の距離も合わせて検討した。結果をFig. 2-33(a)、(b)に示す。R100のビシナルスピン結合定数は $J_{7,8b}$ [実測値 7.0Hz vs 計算値 1.7Hz (二面角114°)]、 $J_{8b,9}$ [実測値 9.0Hz vs 計算値 5.4Hz (二面角43°)]以外は実測値と非常に良い一致を示し、また9-H-14-H間の距離も2.7Åと、NOEが観測される範囲内であった。一方R400のビシナルスピン結合定数と実測値はかなり異なっており、9-H-14-H間の距離も4.6Åと計測されNOEが観測されるには遠すぎると判断された。従って、1はR100に近い*syn*型のコンフォメーションをとることが強く示唆された。

R100において8-Ha、8-HbがFig. 2-33のα面側に20°程度シフトして位置すると、7-H-8-Ha、Hb-9-H間の計算されるビシナルスピン結合定数は、全体的に実測値と一致が良くなる傾向にある($J_{7,8a}$ [実測値 9.9Hz vs 計算値 9.5Hz (二面角13.3°)]、 $J_{7,8b}$ [実測値 7.0Hz vs 計算値 4.9Hz (二面角134°)]、 $J_{8a,9}$ [実測値 9.0Hz vs 計算値 6.1Hz (二面角141°)]、 $J_{8b,9}$ [実測値 9.0Hz vs 計算値 8.5Hz (二面角23°)])。従ってスピン結合定数からは、この形が溶液中のコンフォメーションにより近いことが考えられる。

<observed>



<calcd.>

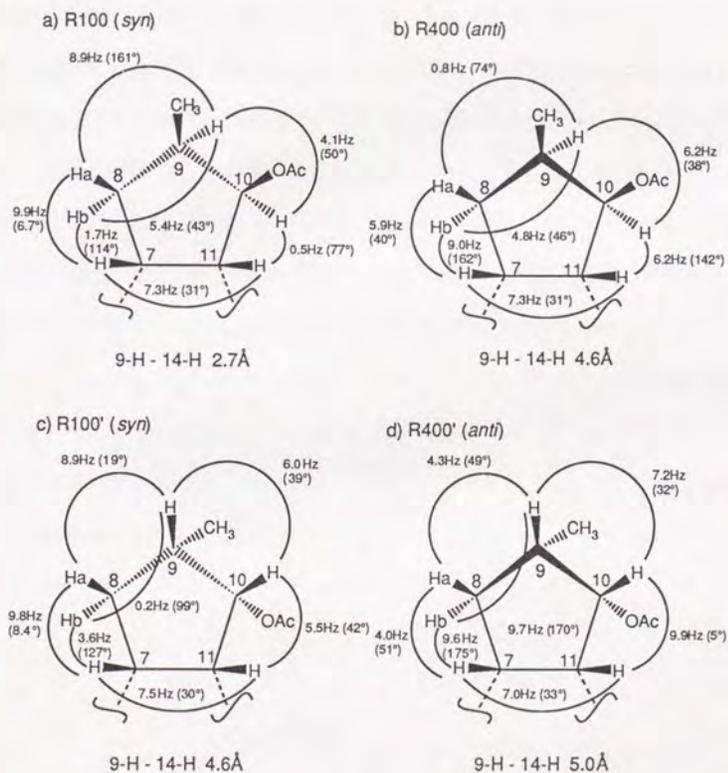


Fig. 2-33. 算出された各コンフォメーションのシクロペンタン環部分のビシナル結合定数及び9-H-14-H間の距離の実測値との比較

3. Macquarimicin Aの構造との比較

前述したように、cochleamycinsと極めて類似した構造を有するmacquarimicinsが、Jacksonらにより報告された^{49, 50}。1とmacquarimicin Aとは、C-9の相対立体配置の相違が異なっている。そこでmacquarimicin Aと同じC-9の立体配置を有する化合物(5)(Fig. 2-34)を想定し、その安定なコンフォメーションを1と同様の手法を用いて分子力場計算により推定した。なお、5におけるC-10の立体配置は1のNOE実験の結果より設定した。この場合も1と同様にシクロペンタン環C-9の向きの異なる2つのコンフォメーションが算出された[R100' (*syn*)、R400' (*anti*)]。次にそれぞれのシクロペンタン環部分のビシナルスピン結合定数を、二面角(θ)よりKarplusの式($J=10\cos^2\theta$)に準じて推定した。また9-H - 14-H間の原子間の距離も合わせて検討した。結果をFig. 2-33 (c)、(d)に示す。推定されたビシナルスピン結合定数は、R100'、R400'共に1の実測値と大きく異なり、また9-H - 14-H間の距離も4 Å以上であった。従って1のC-9の相対立体配置はmacquarimicin Aと異なる事が分子力場計算によるデータからも支持された。

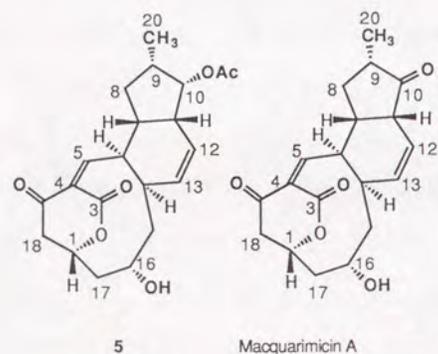


Fig. 2-34. 想定化合物(5)及びmacquarimicin Aの構造

第9節 Cochleamycinsの生合成

Cochleamycinsは特異なcarbocyclic構造を有しており、その生合成機構に興味を持たれた。そこでcochleamycinsの炭素骨格の由来を調べるために、¹³Cラベル前駆体の取り込み実験を行った。Cochleamycinsは生合成的にはポリケタイドであることが予想されたため、培養液に[1-¹³C]、[2-¹³C]、[1, 2-¹³C₂]酢酸ナトリウム、及び[3-¹³C]プロピオン酸ナトリウムを添加し、cochleamycinsに取り込ませた。各¹³Cラベル前駆体の添加はcochleamycinsの生産の始まる直前である培養開始48時間後に、1g/literの割合で培養液に加えることにより行った。この結果、1、3においてはTable 2-7に示すように、[1-¹³C]酢酸ナトリウムの添加により、C-1、3、6、8、12、14、16、19、21の¹³Cシグナルの面積強度が3~7倍に増加し、[2-¹³C]酢酸ナトリウムの添加により、C-4、5、7、11、13、15、17、18、22の¹³Cシグナルの面積強度が3~7倍に増加した。また[3-¹³C]プロピオン酸ナトリウムの添加では3のC-10の¹³Cシグナルの面積強度が18.5倍増加した。さらに[1,2-¹³C₂]酢酸ナトリウム取り込み実験を行い、各炭素の¹³C-¹³Cスピン結合定数を測定することにより、各々の酢酸単位を明らかとすることができた(Table 2-7)。以上の結果より、1、3の炭素骨格の由来をFig. 2-35に示すようにすべて明らかにすることができた。また本化合物群がポリケタイド系の生合成経路により生合成されることを証明することができた。

Table 2-7. 各種 ^{13}C ラベル前駆体添加実験における cochleamycins A (1), B (3)の ^{13}C シグナル強度の変化^{a)}

Carbon atom	[1- ^{13}C]Acetate		relative ^{13}C intensities ^{a)}		[3- ^{13}C]Propionate	Coupling constant (Hz)		Acetate unit $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
	A(1)	B(3)	[2- ^{13}C]Acetate	B(3) ^{b)}		[1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetate	A(1)	
1	7.0	3.9	0.6	0.7	1.0	35.2	34.6	17-1
3	3.6	6.0	0.6	1.4	1.4	66.0	47.5	3-4
4	0.6	0.8	3.5	4.9	0.6	66.0	47.5	
5	0.6	0.8	3.3	4.4	1.5	39.5	34.0	5-6
6	4.1	7.6	0.8	1.2	2.0	39.5	34.0	
7	0.9	1.1	3.2	6.5	1.1	33.0	32.6	7-8
8	5.8	3.9	1.1	1.4	0.8	33.0	32.6	
9	0.9	0.6	1.8	1.2	0.8			
10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0			
11	0.7	0.8	3.5	7.0	1.0	39.0	39.0	11-12
12	5.1	4.9	0.8	1.3	1.0	39.0	39.0	
13	0.5	0.6	3.5	5.1	1.4	43.5	40.0	13-14
14	4.3	4.3	0.9	1.3	1.3	43.5	40.0	
15	0.8	0.6	3.4	4.6	1.4	39.0	33.8	15-16
16	3.5	10.4	0.6	1.6	1.3	39.0	33.8	
17	0.5	0.9	4.8	5.9	1.8	35.2	34.6	
18	0.7	1.2	3.4	7.2	1.8	39.6	38.0	18-19
19	3.7	4.7	0.9	1.1	1.2	39.6	38.0	
20	1.2	0.6	2.0	1.6	18.5			
21	4.3	6.8	0.9	1.3	0.7	58.5	59.5	21-22
22	0.5	0.7	3.7	3.4	2.0	58.5	59.5	

^{a)} Peak area ratio of ^{13}C enriched to natural abundance.

^{b)} In this experiment, cochleamycin A (1) was obtained only in a trace amount preventing to take ^{13}C NMR spectral data.

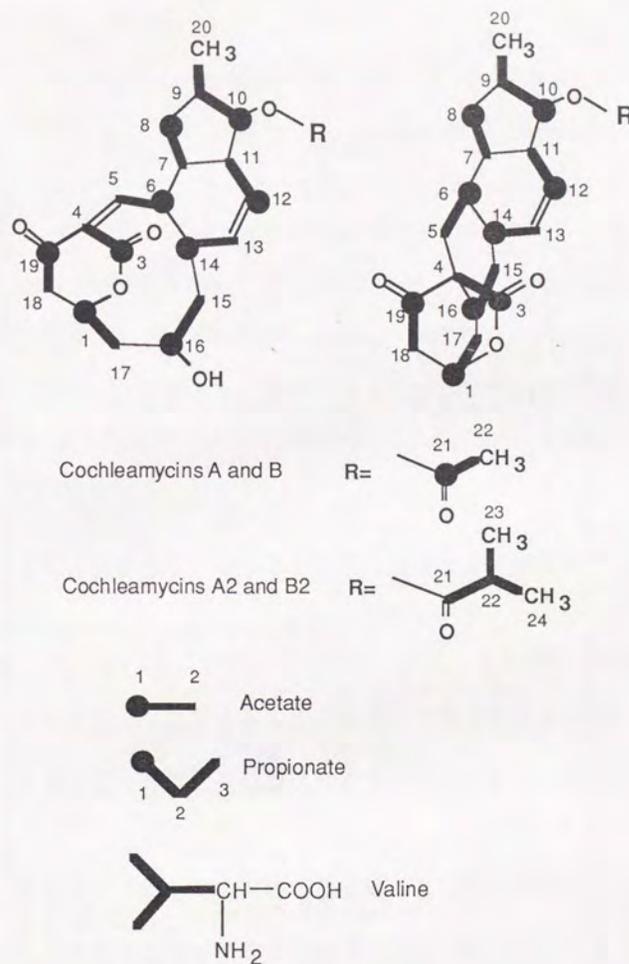


Fig. 2-35. 各種 ^{13}C ラベル前駆体のcochleamycinsへの取り込みパターン

Table 2-8. 各種 ^{13}C ラベル前駆体添加実験における cochleamycins A2 (2), B2 (4) の ^{13}C シグナル強度の変化^{a)}

Carbon atom	^{13}C Acetate		relative ^{13}C intensities ^{a)}		Coupling constant (Hz)		Acetate unit $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$
	[1- ^{13}C]Acetate A2 (2)	B2 (4)	[2- ^{13}C]Acetate A2 (2)	B2 (4)	[1,2- ^{13}C]Acetate A2 (2) ^{b)}	B2 (4) ^{b)}	
1	7.9	6.4	1.7	1.1	35.9		17-1
3	4.1	4.4	0.7	1.4	66.2	1.2	3-4
4	0.5	0.5	2.4	2.8	66.2	0.6	
5	1.6	0.6	3.7	2.9	39.5	0.8	5-6
6	4.9	2.7	1.4	1.0	39.5	0.5	
7	1.0	0.6	2.5	2.5	33.1	0.5	
8	6.1	2.9	0.7	1.3	33.1	0.6	
9	1.1	0.9	1.7	1.2		0.8	
10	1.0	1.0	1.0	1.0		1.0	
11	0.5	0.5	2.5	3.3	39.5	0.8	11-12
12	9.8	3.8	1.0	1.2	39.5	1.3	
13	0.8	1.0	2.5	2.1	40.4	1.0	13-14
14	3.8	3.6	0.7	1.2	40.4	1.0	
15	1.0	0.8	2.7	2.9	39.5	1.1	15-16
16	11.5	3.1	1.4	0.9	39.5	1.1	
17	0.6	0.5	2.8	3.0	35.9	0.8	
18	1.0	0.5	2.7	2.3	39.5	0.9	
19	5.1	5.4	0.9	1.2	39.5	0.9	
20	1.5	1.0	1.5	1.3	11.2	1.1	
21	0.9	1.1	0.7	1.4	0.6	0.6	
22	0.8	0.4	0.5	1.2	0.6	0.8	
23	0.9	1.0	1.0	1.2	0.6	0.6	
24	1.2	0.8	0.9	0.8	1.0	1.0	

^{a)} Peak area ratio of ^{13}C -enriched to natural abundance.

^{b)} In this experiment, cochleamycin A2 (2) was obtained only in a trace amount preventing to take ^{13}C NMR spectral data.

^{c)} In this experiment, cochleamycin B2 (4) was obtained only in a trace amount preventing to take ^{13}C NMR spectral data.

2, 4についてもTable 2-8に示すように、共通部分であるアグリコン (C-1 ~ C-20) の炭素骨格の生合成は1, 3と完全に同一であった。

しかし、1, 3との構造上の相違点である2, 4のイソブチリル部分の ^{13}C シグナルは、 ^{13}C ラベル酢酸及びプロピオン酸ナトリウムの添加実験では面積強度の増加は認められなかった。Cochleamycinsと同じくポリケタイド生合成経路であるマクロライドにおいて、Omuraらはイソブチリル部分がバリン由来であるという報告⁵²⁾をしている。そこで、[2,3,4,5- ^2H]D,L-バリンの添加実験を行った。この結果、Fig. 2-36に示すように4の22, 23, 24-Hの65%が ^2H に置換して観測され、イソブチリル部分がバリン由来であることが判明した。以上の結果より、2及び4の炭素骨格の由来を、Fig. 2-34に示すように全て明らかにする事ができた。なお、生合成機構についての考察は第12節で説明する。

(b)

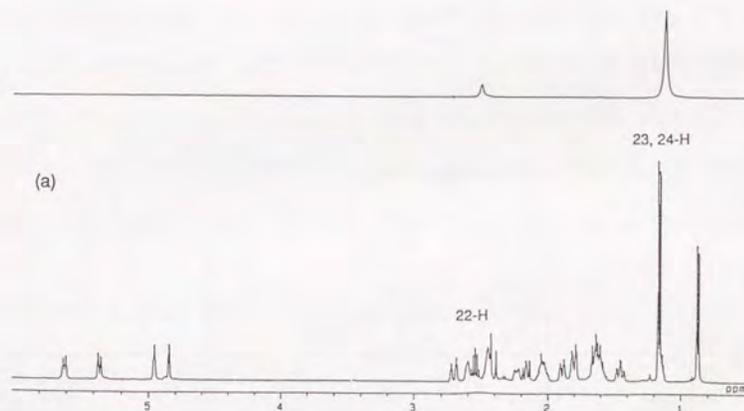


Fig. 2-36.

(a) Cochleamycin B2 (4)の500MHz ^1H -NMRスペクトル (CDCl_3 中)

(b) [2,3,4,5- ^2H]D,L-バリン添加実験により観測された cochleamycin B2 (4)の76.8MHz ^2H -NMRスペクトル (CDCl_3 中)

第10節 Cochleamycinsのチオール化合物との反応

前述したように *Streptomyces* sp. DT136株の培養抽出物から、チオールの系で活性を示す新規化合物 cochleamycins A、A2、B、B2を得た。Cochleamycinsはすべて P388マウス白血病細胞に対して増殖抑制作用を示した (Table 2-11 p.72参照)。そこでこれらの物質がチオールの系で活性を示し、癌細胞増殖抑制作用を示す機構について検討した。

1. チオールの系に対する cochleamycinsの作用

Cochleamycinsを50 μ gずつペーパーディスクに浸透させ、第1章に記載した方法でコントロール及び2mMメルカプトエタノール入りプレート上での *Bacillus subtilis* に対する抗菌阻止円の直径を測定した。また、cochleamycinsとL-システインとの反応性を調べるため2mM L-システインを含むプレートでの *Bacillus subtilis* に対する抗菌阻止円の直径もあわせて測定した。その結果をTable 2-9に示す。Cochleamycin Aグループ(1、2)は *Bacillus subtilis* に抗菌作用を示し、その抗菌阻止円の直径は2-メルカプトエタノール、L-システインを含むプレートで減少した。これは1、2がこれらの物質と反応し不活性化するためと考えられる。Bグループ(3、4)は癌細胞に対する増殖抑制作用を示すものの *Bacillus subtilis* に抗菌作用を示さず、チオールの系では陰性であった。従って本試験ではチオール化合物との反応性は検討できなかった。

Table 2-9. チオール化合物が cochleamycin A (1)、A2 (2)の抗 *Bacillus subtilis* 活性へ与える影響

Compound	Dose (μ g/disk)	Diameter of inhibition zone (mm)		
		Control	+2-mercaptoethanol (2mM)	+L-cystein (2mM)
Cochleamycin A (1)	0.5	0	0	0
	5	15.0	0	10.0
	50	22.0	13.5	17.5
Cochleamycin A2 (2)	0.5	0	0	0
	5	16.0	0	11.0
	50	24.5	14.0	19.0

2. Cochleamycinsの2-メルカプトエタノールとの反応

以上の結果より1、2はチオール化合物と反応し、不活性化される可能性が示されたため cochleamycins と2-メルカプトエタノールの反応性を検討した。室温で、cochleamycins (5~10mg)をメタノール1mlに溶解し、これに2当量の2-メルカプトエタノールを加え攪拌した。反応の進行はTLCで1時間観察した。その結果、Bグループ(3、4)は2-メルカプトエタノールと反応しないが、Aグループ(1、2)は瞬時に反応し、付加体を与えることが判明した。

1の2-メルカプトエタノール付加体(6)についてその構造を検討した。6の単離は上述の反応液を濃縮後、シリカゲルカラム [クロロホルム-メタノール (15:1)]を用いて行った (収率70.3%)。6の理化学的性質を以下に示す。外観 無色粉末; 融点($^{\circ}$ C) 140~142 (dec.); 分子式 $C_{23}H_{32}O_7S$; FAB-MS m/z 453 (M+H) $^{+}$; UV λ_{max} nm(ϵ) 274(5400); IR v (KBr) cm^{-1} 3412, 2919, 1732, 1716, 1668, 1255。

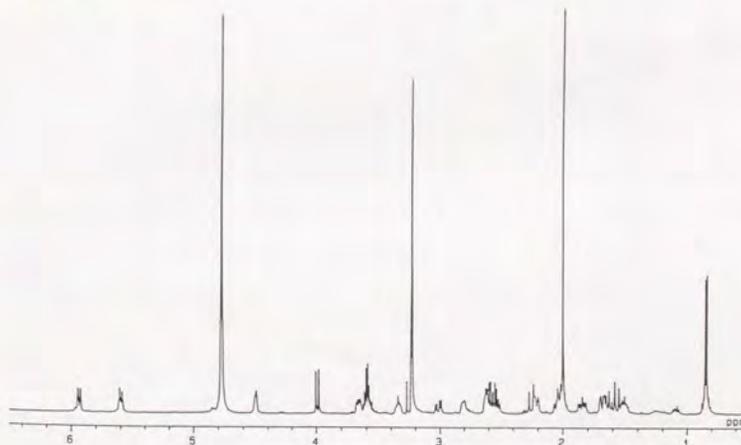


Fig. 2-37. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール付加体(6)の 1H -NMR

スペクトル (CD_3OD 中)

6の¹H-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-37、Table 2-10に示す。本スペクトルでは1で δ_H 6.77に観測された5-Hのシグナルが消失し、 δ_H 4.00 (d $J=11.6$ Hz)に新たなシグナルが観測された。また1では観測されなかった δ_H 2.53、2.60及び δ_H 3.58、3.61に、互いにスピン結合したシグナルが認められ、その¹H化学シフトからこれらが2-メルカプトエタノール由来のシグナルであることが判明した。またその積分値から1分子の2-メルカプトエタノールが付加したことが示され、これはFAB-MSスペクトルで6が m/z 453に(M+H)⁺イオンを与えることから証明された。

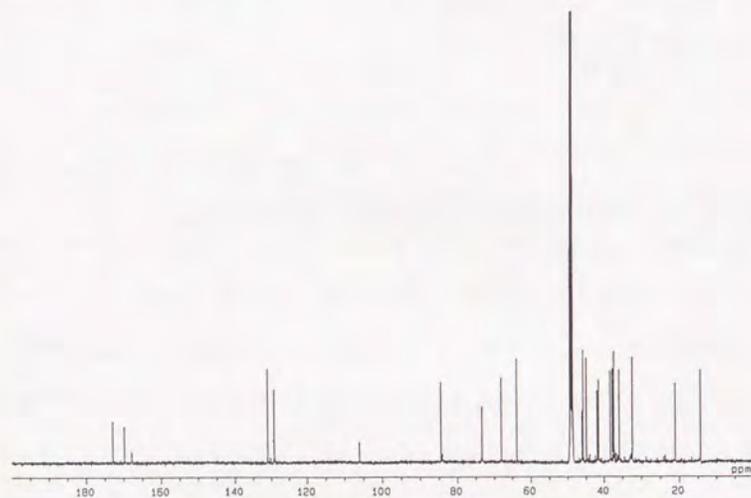


Fig. 2-38. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール付加体(6)の¹³C-NMRスペクトル (CD₃OD中)

6の¹³C-NMRスペクトル及びそのデータをFig. 2-38、Table 2-10に示す。本スペクトルでは1と比較して δ_C 35.9、 δ_C 63.8に2-メルカプトエタノール由来のシグナルが新たに観測され、¹H-NMRスペクトルの解析と同様に1分子の2-メルカプトエタノールが付加したことを支持した。また1で観測されたC-4 (δ_C 136.1)、C-5 (δ_C 154.0)、C-19 (δ_C 194.2)のシグナルが消失し、新たに δ_C 41.9に1本、 δ_C 106.1に1本、 δ_C 167.9~ δ_C 172.9の領域に1本、1では認められなかったシグナルが観測された。

Table 2-10. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール付加体(6)の¹H、及び

¹³ C-NMRスペクトルデータ ^a		
Position	δ_H	δ_C
1	4.50 (m)	73.4 (d) ^c
3		169.8 (s)
4		106.1 (s)
5	4.00 (d 11.6)	41.9 (d)
6	2.21 (m)	45.8 (d)
7	3.34 (m)	38.3 (d)
8	1.52 ^b , 1.64 ^b	37.7 (t)
9	2.00 ^b	37.3 (d)
10	4.76 ^b	84.4 (d)
11	2.62 (m)	44.9 (d)
12	5.60 (ddd 3.0, 3.0, 10.4)	129.2 (d)
13	5.94 (br d 10.4)	131.0 (d)
14	2.80 (m)	32.4 (d)
15	1.56 ^b , 1.87 (ddd 6.1, 6.5, 16.8)	41.5 (t)
16	3.66 (dd 4.9, 10.6)	68.1 (t)
17	1.69 ^b , 2.04 ^b	46.1 (t)
18	2.25 (d 17.7), 3.02 (dd 6.7, 17.7)	33.0 (t)
19		167.9 (s)
20	0.88 (d 6.7)	14.3 (q)
21		172.9 (s)
22	2.00 (s)	21.1 (q)
2'	2.53 (dd 6.7, 13.4), 2.60 (dd 6.7, 13.4)	35.9 (t)
3'	3.58 (dd 6.7, 11.3), 3.61 (dd 6.7, 11.3)	63.8 (t)

^a Taken in CD₃OD

^b Obscured by overlapping signals.

^c Multiplicities observed in the DEPT spectra;

s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet.

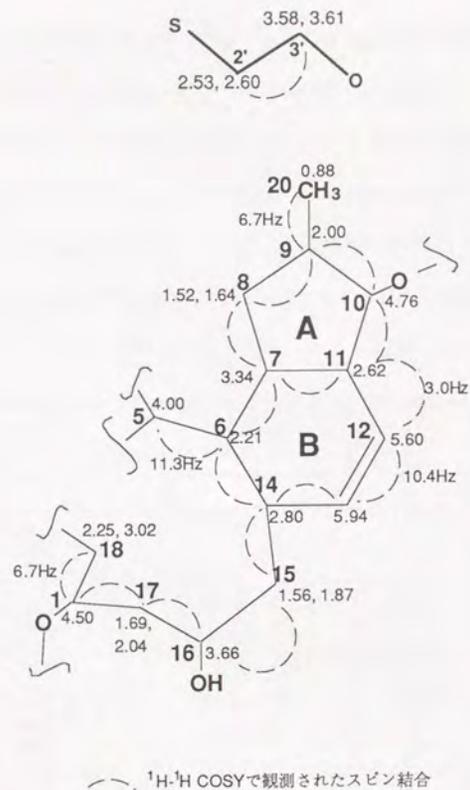


Fig. 2-39. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール付加体(6)の部分構造

次に ^{13}C - ^1H COSYスペクトルを測定し、各 ^1H 、 ^{13}C シグナル間の相関を確認後、 ^1H - ^1H COSYスペクトルの解析を行った。この結果、Fig. 2-39に示すように2-メルカプトエタノール由来のシグナルが帰属された。[C-2' (δ_{H} 2.53、2.60、 δ_{C} 35.9)、C-3' (δ_{H} 3.58、3.61、 δ_{C} 63.8)]。また1同様にシクロペンタン環 (A環)、シクロヘキセン環 (B環)部分のスピ結合ネットワーク、5-Hから18-Hまでのスピ結合ネットワークが観測された。このうち5位以外は ^1H 、 ^{13}C シグナルの化学シフトは1と良い一致を示し、

この部分の構造は6で保存されていることが示された。しかしながら1では δ_{H} 6.77に観測された5-Hの sp^2 メチンは、6では δ_{H} 4.00に観測された。さらに1では δ_{C} 154.0と sp^2 炭素領域に観測されたC-5が、6では δ_{C} 41.9と大きく高磁場側にシフトして観測された。以上のことから6は1に存在したC4-C5の二重結合が消失し、C-5が sp^3 メチン炭素となった構造を有していることが判明した。

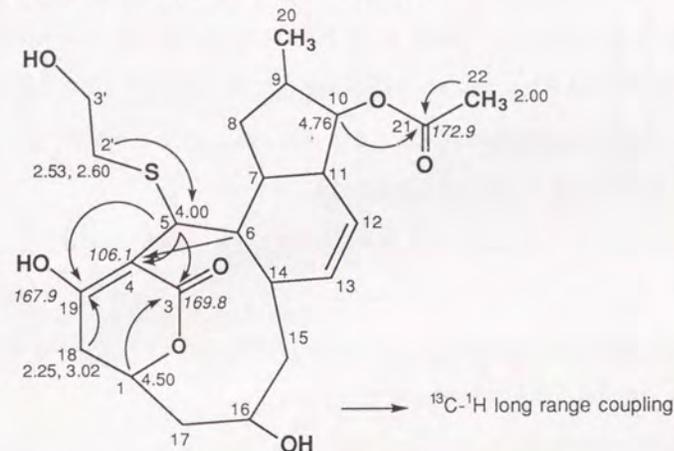
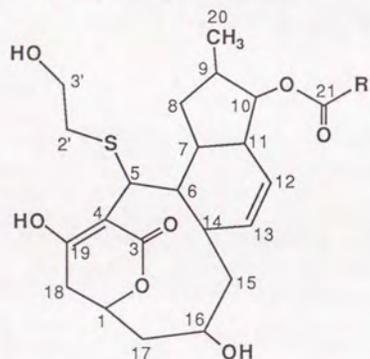


Fig. 2-40. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール付加体(6)において観測されたC-H遠距離スピ結合

Fig. 2-40に示すように、6のHMBCスペクトルにおいて2-メルカプトエタノールの2'-H (δ_{H} 2.53、2.60)よりC-5に対してC-H遠距離スピ結合が観測された。これにより2-メルカプトエタノールのSH基がC-5に付加したことが明らかとなった。またFig. 2-40に示すように5-H、6-H (δ_{H} 2.21)より δ_{C} 106.1の4級炭素に対してC-H遠距離スピ結合が観測され、 δ_{C} 106.1のシグナルがC-4であることが明らかとなった。さらに5-H、18-H (δ_{H} 2.25)より δ_{C} 167.9の4級炭素に対してC-H遠距離スピ結合が観測さ

れ、 δ_c 167.9のシグナルがC-19であることが判明した。C-19の ^{13}C 化学シフトは1では δ_c 194.2に観測されたが、6では δ_c 167.9と高磁場にシフトして観測されている。C-19に隣接するC-4の ^{13}C 化学シフトが δ_c 106.1であることも考慮すると、6ではC-4-C-19間の結合が二重結合であり、1ではケトン炭素として観測されたC-19が6ではエノール型で存在すると考えるとこの高磁場シフトをよく説明することができる。さらに1-H (δ_H 4.50)、5-Hからカルボニル炭素C-3 (δ_c 169.8)に対してC-H遠距離スピ結合が認められ、 δ -lactone環の存在も確認された。6はC-4-C-5の二重結合の消失にもかかわらず紫外吸収を有するが(λ_{max} 274nm)、これはC-19-C-4-C-3よりなる共役系が存在することによると説明することができる。

上記の結果より、6はFig. 2-41に示す構造を有することが明らかにされた。この構造より、6は1のC-5に2-メルカプトエタノールがマイケル付加することにより生成した物質であると考えられる。なお、本反応は立体選択的に進行すると考えられ、6のC-5の立体異性体は反応生成物中に認められなかった。



R=CH₃ Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール付加体(6)
R=CH(CH₃)₂ Cochleamycin A2 2-メルカプトエタノール付加体(7)

Fig. 2-41. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール付加体(6)および cochleamycin A2 2-メルカプトエタノール付加体(7)の構造

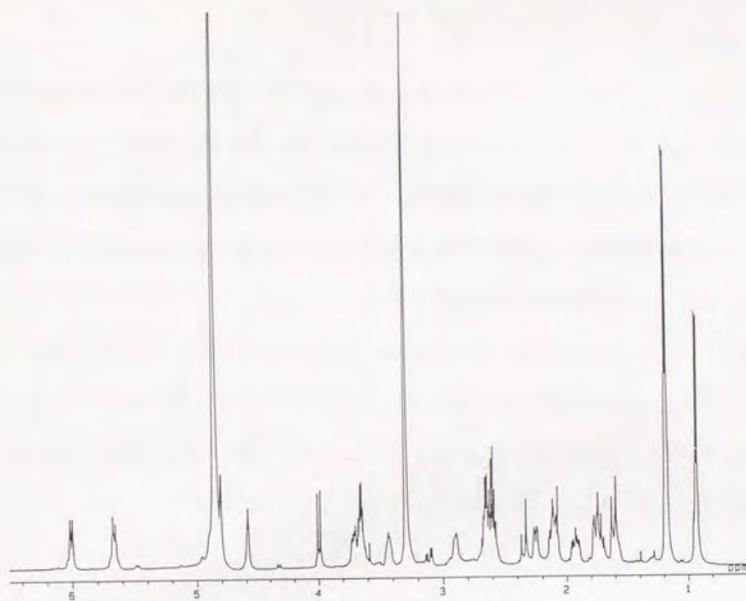


Fig. 2-42. Cochleamycin A2 2-メルカプトエタノール付加体(7)の ^1H -NMRスペクトル (CD₃OD中)

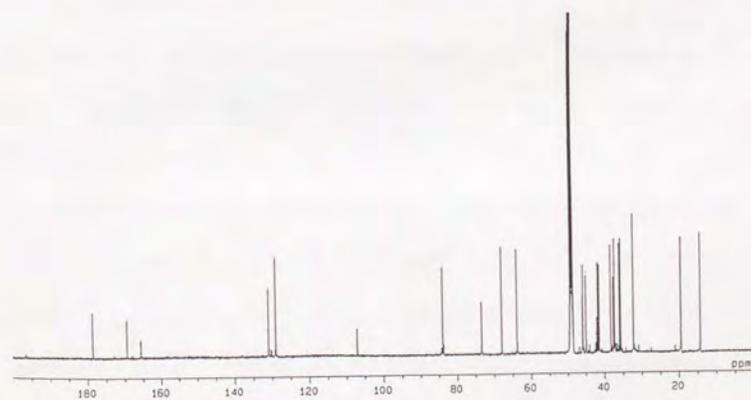


Fig. 2-43. Cochleamycin A2 2-メルカプトエタノール付加体(7)の ^{13}C -NMRスペクトル (CD₃OD中)

2の2-メルカプトエタノール付加体(7)の ^1H 、 ^{13}C -NMRスペクトルをFig. 2-42、2-43にそれぞれ示す。これらのスペクトルは6と極めて類似しており、元々の1と2の相違点部分以外のシグナルは完全に同一であった。従って7は、Fig. 2-41に示すように1の場合と同様に、2-メルカプトエタノールのSH基が2のC-5にマイケル付加した化合物であると決定された。

3. CochleamycinsのL-システインとの反応

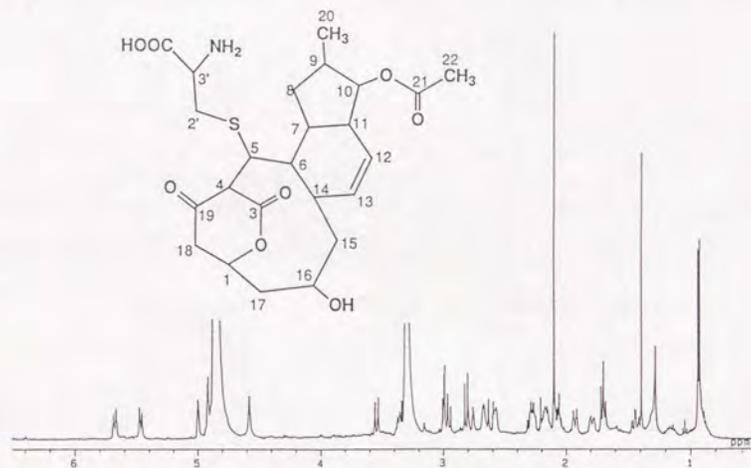


Fig. 2-44. Cochleamycin A L-システイン付加体(8)の ^1H -NMRスペクトル
(CD_3OD 中)

次に、CochleamycinsのL-システインに対する反応性について検討した。室温で、cochleamycins (5~7mg)を30%メタノール1mlに溶解し、これに2当量のL-システインを加え攪拌した。反応の進行はTLCで1時間観察した。2-メルカプトエタノールの

場合と同様に、1及び2はL-システインと反応し、数分内に1及び2のスポットは消失した。

1とL-システインの反応生成物(8)について反応液を濃縮後、シリカゲルカラム[クロロホルム-メタノール(2:1)]により精製した(収率19.8%)。8は極めて不安定であり、 ^1H -NMRスペクトルの測定のみしか行えず詳細な構造解析は不可能であった。Fig. 2-44に8の ^1H -NMRスペクトルを示す。しかし、6の ^1H -NMRスペクトルとの比較で考察すると、 $\delta_{\text{H}} 3.56$ (dd $J=2.7, 11.0\text{Hz}$)に5-H、 $\delta_{\text{H}} 2.94\sim 3.02$ にL-システインに由来するシグナルが観測されており、6、7と同様に、Fig. 2-43に示すように8もL-システインが1のC-5にマイケル付加した化合物であると考えられる。また8は、紫外吸収を示さず、6の ^1H -NMRでは観測されなかった4-Hに帰属される $\delta_{\text{H}} 4.96$ (d $J=2.7\text{Hz}$)のシグナルが認められることから、C-19はケト型であると推察される。

第11節 Cochleamycinsの生物活性

1. Cochleamycinsの癌細胞増殖抑制作用及び抗菌作用

Cochleamycinsは、*in vitro*において各種癌細胞に対して増殖抑制活性を示した。MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide]法による試験結果をTable 2-11に示す。また、1、3のP388マウス白血病細胞に対する*in vivo*での抗腫瘍活性試験の結果をTable 2-12に示す。試験は 1×10^6 個のP388白血病細胞を0日目にマウスの腹腔に移植し、1、3を各濃度で1、5、9日目に腹腔内投与する事により行った。1、3は25、50、100mg/kgの投与濃度で有意な担癌マウスの延命効果は認められなかった。

1、2はグラム陽性菌に対して抗菌作用を示した。結果をTable 2-13に示す。一方、3、4は50 μg /ディスクの濃度で抗菌作用を示さなかった。なお、1、2の2-メルカプ

トエタノール付加体 6、7 は50 μ g/mlの濃度で、P388細胞に対する増殖抑制効果、*Bacillus subtilis* に対する抗菌活性ともに示さなかった。

Table 2-11. Cochleamycinsの各種癌細胞に対する *in vitro*での増殖抑制活性

		IC ₅₀ (μ g/ml)				
		Cell line				
		P388	HL60	K562	COLO205	HT29
Cochleamycin	A (1)	1.6	14.0	6.2	16.5	19.1
	A2 (2)	2.0	12.8	7.0	16.5	20.8
	B (3)	2.6	4.3	6.2	16.0	9.8
	B2 (4)	4.0	6.8	6.2	18.0	12.0

Table 2-12. Cochleamycins A (1)およびB (3) のP388マウス白血病に対する *in vivo*での抗腫瘍活性

Compound	Dose (mg/kg/day)	MST ^a (days)	T/C (%)
Control	0	10.0 \pm 0.00	100
Cochleamycin A (1)	25	10.7 \pm 1.21	107
	50	10.8 \pm 0.84	108
	100	10.2 \pm 0.41	102
Cochleamycin B (3)	25	11.2 \pm 1.02	112
	50	9.8 \pm 0.36	96
	100	6.2 \pm 1.56	62

P388 mouse leukemia cells (1X10⁶ cells) were inoculated i.p. into CDF₁ mice on day 0. Drugs were administered i.p. on days 1, 5 and 9.

^a Mean survival time of deceased mice.

^b Mean \pm SD.

Table 2-13. Cochleamycins A (1)およびA2 (2)の抗菌活性

Organism	Medium ^a	Diameter of inhibition zone (mm)	
		A (1)	A2 (2)
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	I	16	18
<i>S. aureus</i> MS14146 ^b	I	11	12
<i>S. aureus</i> MS14287 ^b	I	15	17
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	I	25	26
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	I	15	15
<i>B. subtilis</i> PCI 219	I	15	17
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	I	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	I	0	0
<i>Candida albicans</i> Yu 1200	II	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	II	0	0

Plate diffusion assay. Each compound was applied onto filter disks (8mm ϕ) at the concentration of 50 μ g. The disks were placed on plates seeded with the tested microorganisms on the top of the agar.

^a I: Nutrient agar (DIFCO), II: Sabouraud dextrose agar (DIFCO).

^b Methicillin resistant strains.

2. RSV/NIH3T3細胞のpp60^{src}チロシンキナーゼ活性に対する cochleamycins A (1)、A2 (2)の影響

1がL-システインとも速やかに反応することから、1、2がタンパク質中のシステインのSH基と反応し、癌遺伝子産物の機能を阻害する可能性もあると考えられる²⁶⁾。そこで1、2がherbimycin AのようにSrcチロシンキナーゼを阻害する活性を有するか否かを検討した。ラウス肉腫ウイルスを感染させたラット繊維芽細胞(RSV/NIH3T3)のpp60^{src}のチロシンキナーゼ活性に対する1、2の影響を調べた^{53, 54)}。細胞破砕物より、抗Src抗体でpp60^{src}を回収し、1、2存在下でのpp60^{src}のエノラーゼリン酸化能をオートラジオグラフィーで測定した。アッセイ法の概略をFig. 2-45に示す。

1および2は10 μ g/mlの濃度で阻害活性を示さなかった (Fig. 2-46)。

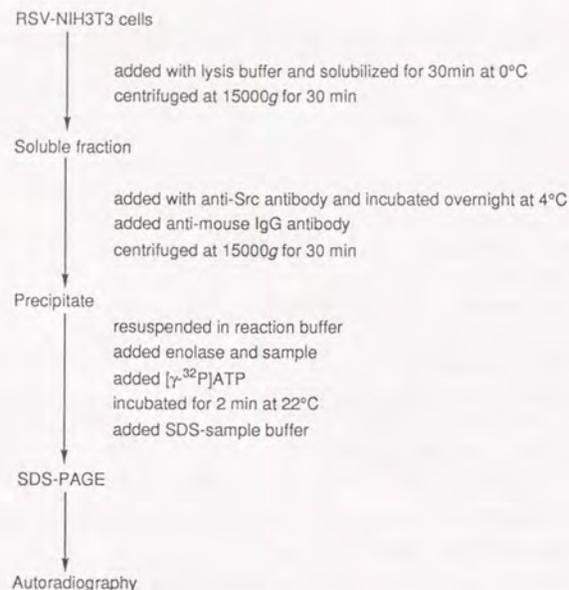


Fig. 2-45. pp60^{src} チロシンキナーゼ阻害活性測定法

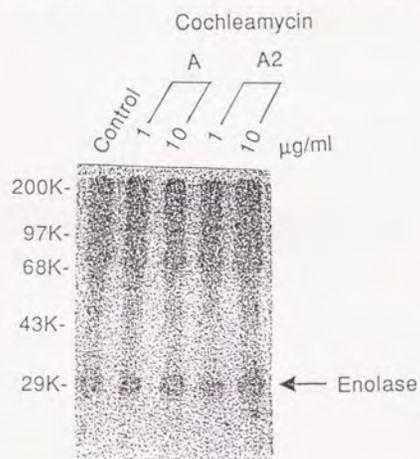


Fig. 2-46. Cochleamycins A (1), A2 (2)のpp60^{src}チロシンキナーゼ阻害活性

第12節 考察

Cochleamycinsは、特異なcarbocyclic骨格を有する新規抗腫瘍抗生物質である。本物質の生合成機構に興味を持ち、 13 Cラベル前駆体の取り込み実験を行うことによりその炭素骨格の由来を明らかにすることができた。

通常、ポリケチド系の物質の炭素骨格は、酢酸等の構成単位がhead to tail結合により取り込まれ生合成される⁵⁵⁾。Cochleamycinsの場合も、C-5 - C-6の酢酸単位をスターターユニットと考えるとhead to tailルール通り一列に並べる事が出来る。しかしながら、C4 - C-5の部分のみはtail to tailの結合が生じている。この点について、以下の様に考察した。

Cochleamycinsの生合成経路をFig. 2-47に示すように推測した。まず、通常のポリケチドの生合成経路を経て、9のような物質が中間体として生合成される。9のC-5位はアリル位で酸化を受けやすく、arnebino⁵⁶⁾でも報告されている様に酸化を受けて末端のメチル基 (C-5)がアルデヒドへと変換され10が生成すると考えられる。このアルデヒドへの酸化により、反応性の増大したC-6 - C-7の二重結合がジエノフィルとなって、これとC-11~C-14からなるジエンとの間でDiels-Alder反応が進行し、シクロヘキセン環が生じ、11へと変換される。このような放線菌での分子内Diels-Alder反応による生合成は、nogarcidin等でも報告されている^{57, 58)}。さらにこの分子内環化反応の結果、C-5のアルデヒドとC-4の活性メチレンが空間的に近い位置に存在することとなり、C-4がC-5にAldol反応し化合物12となり、これが脱水してcochleamycin Aグループが生成すると考えられる。Cochleamycins AグループからBグループへの変換は以下のように説明可能である。Cochleamycin A (1)に於てはFig. 2-26 (p. 45)に示すように、C-4 - C-5の二重結合はC-16の近傍に存在する。C-4 - C-5の二重結合が還元され、生じた化合物13のC-4位のアニオンにより、C-16へのSN2

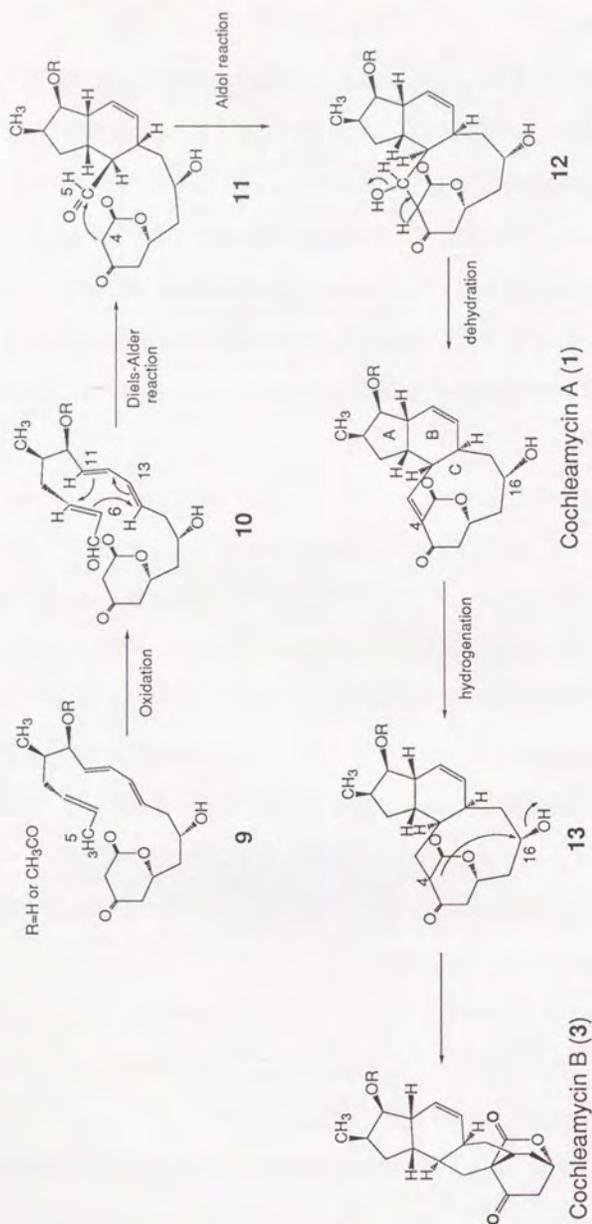


Fig. 2-47. 推定される cochleamycin A (1) 及び B (3) の生成経路

型の求核的置換反応が進行し、cochleamycin B (3) が生成すると考えられる。勿論、協奏的に反応が進行し、1 から 3 が一気に生合成されるとも考えられる。このような環化反応は、イソプレノイド経路の生合成に於ける閉環反応と類似のものであると推察される⁵⁹⁾。上記のような反応が生じれば C-16 の相対立体は、cochleamycins A グループと B グループで反転するはずであり、これは実際の結果と一致する。また cochleamycins が Diels-Alder 反応により生成する場合、cochleamycins のシクロヘキセン環 (B 環) の 6-H と 7-H は *trans* であることから、仮想中間体 9 のジエノフィルの二重結合 (C-6 - C-7) は *trans* でなければならぬと推察される。この分子内 Diels-Alder 反応の遷移状態については不明であるが、生成物の相対立体配置より、Fig. 2-48 に示すように *endo* 遷移状態を経由するとするとジエノフィルがジエンに対し上面から、*exo* 遷移状態を経由するとすると、ジエノフィルがジエンの下面側から付加するものと推察される。

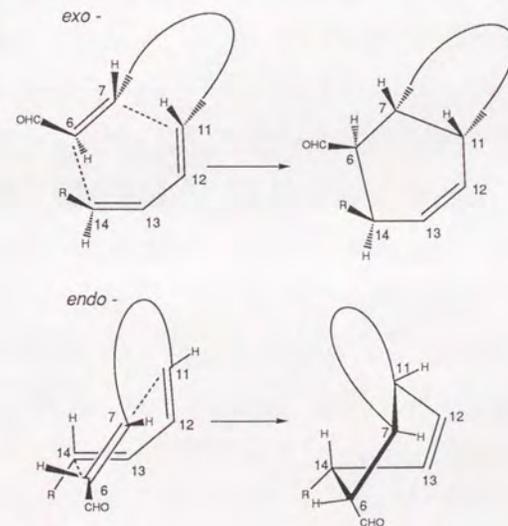


Fig. 2-48. Diels-Alder 反応における立体的考察

前述したように最近Jacksonらにより、極めて cochleamycins と類似した構造を有する macquarimicins が報告された^{49,50}。Macquarimicins の構造を Fig. 2-30 (p. 52) に示す。Macquarimicins と cochleamycins の相対立体配置は C-9 部分のみが異なっているのみであることから、両者の生合成経路はある時点までは完全に同一ではないかと考えられる。

上述の生合成経路は化学的な類推によるものであり、Diels-Alder 反応と Aldol 縮合の順序が逆であることも十分ありうると考えられる。今後、直接生合成中間体を単離することにより生合成経路の詳細な検討を行いたい。

Cochleamycins A グループは 2 つのカルボニル基 (C-3, C-19) と共役した二重結合 (C-4 - C-5) を有し、求核性のある化合物による付加反応を受けやすい物質であると考えられる。実際、第 10 節で明らかにした様に、1、2 と 2-メルカプトエタノールをメタノール中で共存させると、瞬時に 1、2 のスポットが消失して 2-メルカプトエタノール付加体が生成された。2-メルカプトエタノール付加体 6、7 は *Bacillus subtilis* に対して抗菌作用を有さないため、これが 1、2 が本スクリーニング系で陽性となる理由であると考えられる。また 1 は L-システインとも反応することから、1、2 がタンパク質中のシステインの SH 基と反応する可能性も高いと考えられる。残念ながら 1、2 は Src チロシンキナーゼ活性を阻害しなかった。これは上原らがヨードアセトアミド、N-エチルマレイミドに関して報告しているように、1、2 の分子が小さすぎるために活性中心に届かず阻害がかからないという可能性も考えられる²⁹。1、2 の他のチロシンキナーゼ阻害作用、例えば EGF、PDGF レセプターの自己リン酸化に対する阻害作用については今後の検討課題である。

第 3 章 Colony Forming Assay (CFA) を用いたヒト大腸癌に有効な抗腫瘍抗生物質の探索系

第 1 節 スクリーニング系の構築

1. 背景

近年多くの抗腫瘍物質が開発されているものの、残念ながら年々増加傾向にある大腸癌等の固形癌に奏効する薬剤は未だ殆ど得られていないのが現状である。そこで 1986 年、NCI よりヒト固形癌に有効な抗腫瘍物質を開発するためのスクリーニング概念として disease-oriented screen が提唱された^{28,29}。これは癌細胞の抗腫瘍物質に対する感受性が多様であることを重視した考え方であり、様々な癌種に対して *in vitro* での抗腫瘍物質感受性試験を実施することにより、特定の固形癌に選択性の高い抗腫瘍物質を見出そうとするものがある。

著者は上記の考え方に従い、ヒト癌細胞に対する *in vitro* 抗腫瘍物質感受性試験として、軟寒天中での癌細胞のコロニー形成能を指標とする Colony Forming Assay (CFA) に注目した。本方法は、軟寒天中でのコロニー形成が細胞が癌化することによって示す普遍的な増殖形態であること、また腫瘍組織の発育にコロニー形成能をもつ stem cell が関与していると考えられることを基に、1977 年 Hamburger と Salmon により開発された試験法である⁶⁰。Salmon らは種々の抗腫瘍物質と共に 1 時間培養した癌細胞の軟寒天中でのコロニー形成能を検討し、コロニー形成を抑制する抗腫瘍物質は、その癌細胞を用いた *in vivo* 抗腫瘍活性試験においても抗腫瘍効果の認められる可能性が高いことを報告している³⁵。

Corbett らは CFA で癌細胞を軟寒天中に植え込んだ後、寒天表面上に抗腫瘍物質を浸透させたペーパーディスクを設置して培養すると、その周囲にコロニー増殖阻止

円が生じる現象を見出した^{61, 62)} (Fig. 3-1)。また、同濃度の抗腫瘍物質を浸透させたペーパーディスクを寒天表面上に設置しても、CFAに用いる癌細胞によってコロニー増殖阻止円の大きさに差が生じることを報告した^{61, 62)}。この場合、コロニー増殖阻止円の大きさの差は抗腫瘍物質に対する各癌細胞の感受性の差と判定できることができる。そこでCorbettらは、種々のマウス固形癌細胞及びマウス白血病L1210細胞をCFAに用い、同一濃度の抗腫瘍物質に対するこれら細胞間での感受性の差を上記のペーパーディスク法を用いて検討した^{61, 62)}。この方法は1細胞につき1枚のシャーレを用いることで各細胞間の薬剤に対する感受性の差を評価できるため、多くのサンプルを迅速に検定できる点で優れた方法である。



Fig. 3-1. ペーパーディスクの周囲に生じたコロニー増殖阻止円
(細胞はヒト大腸癌COLO205)

Corbettらの検討の結果、既知抗腫瘍抗生物質acivicin^{63, 64)} (Fig. 3-2)がCOLON#38, #9 (マウス大腸癌)に、またacetoxycycloheximide⁶⁵⁾ (Fig. 3-2)がPanc#3 (マウス膵臓

癌)に特異的に有効な物質として選抜されることが報告されている^{61, 62)}。Acivicin、acetoxycycloheximideはこれらの細胞を用いた*in vivo*での抗腫瘍活性試験で優れた抗腫瘍効果を示しており^{61, 62)}、Corbettらの方法は*in vivo*での抗腫瘍活性を良く予見することが示された。

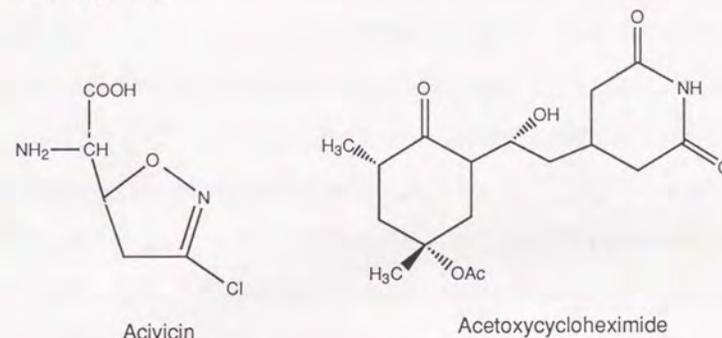


Fig. 3-2. Acivicin及びacetoxycycloheximideの構造

2. スクリーニング系の構築

以上より、著者は、ヒト固形癌に対して選択的に有効な抗腫瘍抗生物質を微生物代謝産物よりスクリーニングする方法として、かれらの方法に準拠した手法を採用することにした。

スクリーニングの対象とする固形癌種としては大腸癌を選択した。大腸癌は食生活の欧米化に伴い、日本でも患者数が急激に増加傾向にあり、今世紀末までには癌による死亡率で胃癌を抜き、肺癌、乳癌とともにヒトの悪性腫瘍のなかで主要な位置を占めるようになることが推定されている⁶⁶⁻⁶⁸⁾。大腸癌に対する化学療法としては5-FU⁶⁹⁾、CDDP⁷⁰⁾、mitomycin C³⁾等の薬剤を使用する 경우가多いが、必ずしも良好な治療成績は得られていないのが現状である^{71, 72)}。

具体的な手法としては、マウス白血病L1210細胞及びヒト大腸癌COLO205細胞⁷³⁾を用いてCFAを実施し、そのシャーレ上に微生物培養液を浸透させたペーパーディスクを設置した。CO₂インキュベーター中で10日間培養後、ペーパーディスクの周囲に生じたコロニー増殖阻止円の半径を測定し、COLO205のコロニー形成をL1210と比べてより強く抑制する活性を、大腸癌に選択的に有効な物質の活性の指標とした。スクリーニングに際しては、それぞれの細胞に対する選択性を評価するために必要に応じて微生物培養液を適宜希釈して使用した。

なお、本スクリーニング法は結果判定までに10日を要することから、活性物質の単離においてはMTT法を用いたマウス白血病P388細胞に対する*in vitro*細胞増殖抑制活性を指標として用いた。化合物が単離された際には本アッセイ系で再試験を行い、活性の確認を行った。

詳細なスクリーニング系のプロトコールは以下に示す通りである。

(1) 腫瘍細胞

COLO205、L1210細胞はRPMI1640培地にpenicillin G 100U/ml、streptomycin 100µg/ml及び牛胎仔血清 10%を添加した培地で継代維持した。

(2) Colony Forming Assay

2-1) 下層の作製

寒天 (agar noble: Difco社製)を蒸留水にて3.6% (w/v)に懸濁し、120℃で20分オートクレーブにて溶解滅菌した。その後使用までの間、55℃の温浴中に保存した。培養液はpenicillin G 100U/ml、streptomycin 100µg/ml及び牛胎仔血清 15%を含有したRPMI1640培地を用いた。この培養液も使用までの間、55℃の温浴中に保存した。

3.6%寒天溶液と培養液を1:5の容積比で混合し、0.6%寒天含有培養液を作製した。これを35mm径のシャーレに1mlずつ分注し、室温で硬化させた(30分間)。

2-2) 上層の作製

下層と同一の3.6%寒天溶液を使用までの間、40℃温浴中に保存した。培養液は下層と同一組成のRPMI1640培地を用いた。この培養液は使用までの間40℃の温浴中に保存した。生細胞数をTrypan Blue Dye Exclusion法により測定後、RPMI1640培地中に生細胞数として 2×10^6 /mlになるように添加した。

3.6%寒天溶液と細胞を懸濁したRPMI1640培地を1:9の容積比で混合し、0.3%寒天含有培養液を作製した。これを直ちに硬化した0.6%寒天含有培養層(下層)上に1mlずつ重層し、室温で硬化させた(30分間)。

2-3) サンプルの添加

同一の微生物培養液を浸透させたペーパーディスク(東洋濾紙、thin、6mm)を2枚用意し、L1210、COLO205細胞を含有するシャーレの端に1枚ずつ設置した。なお、ペーパーディスクは微生物培養液を浸透させた後、3時間以上クリーンベンチ内でよく乾かしたものを使用した。

以上の条件で35mm径シャーレを10日間、5%CO₂インキュベーター中で培養し、L1210、COLO205細胞を含む培地上のペーパーディスクの周囲に生じた増殖阻止円の半径を測定した。

第2節 スクリーニング系の既知抗腫瘍抗生物質に対する応答

本スクリーニング系で、一般的な既知抗腫瘍抗生物質であるactinomycin Dやadriamycinがどのような応答を示すかを検討した。結果をTable 3-3に示す。表より明らかなように、L1210とCOLO205に対して両化合物は0.1~10µg/mlの濃度で増殖阻止円を形成したが、いずれの濃度でも明らかにL1210に対してより強く作用し、大腸癌COLO205に対する選択性は示さなかった。よって本スクリーニング系において

COLO205に選択的に強く作用する物質を選抜することにより、既知抗腫瘍抗生物質を除去できる可能性が示唆された。

Table 3-1. Actinomycin D及びadriamycinの本スクリーニング系での応答

Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition radius (mm)	
		COLO205	L1210
Actinomycin D	0.1	7	12
	1	10	20
	10	15	>30
Adriamycin	0.1	10	12
	1	16	24
	10	20	>30

第3節 まとめ

ヒト大腸癌に有効な抗腫瘍抗生物質を探索するスクリーニング系としてColony Forming Assay (CFA)を用いた手法を確立した。具体的にはマウス白血病L1210及びヒト大腸癌COLO205を用いてCFAを実施し、それぞれの細胞に対する薬剤の感受性を試験を試験した。感受性試験にはCorbettらの用いたペーパーディスク法を採用し、COLO205に選択的に強く作用する物質を探索した。本スクリーニング系を用いて放線菌、カビの約5500株のアセトン処理プロスより探索を行い、新規物質vicenistatin⁴⁰⁾ (第4章)を得た。

第4章 Vicenistatinに関する研究

第1節 Vicenistatinの発見

群馬県桐生市の土壌から分離された放線菌HC34株の菌体抽出物が、CFAの系で活性を示すことを見いだした。P388マウス白血病細胞に対して増殖抑制作用を示す活性物質を単離し、構造解析を行ったところ、20員環ラクタム構造と新規なアミノ糖を有する新規物質であることが判明し、本物質をvicenistatin⁴⁰⁾ (Fig. 4-1)と命名した。

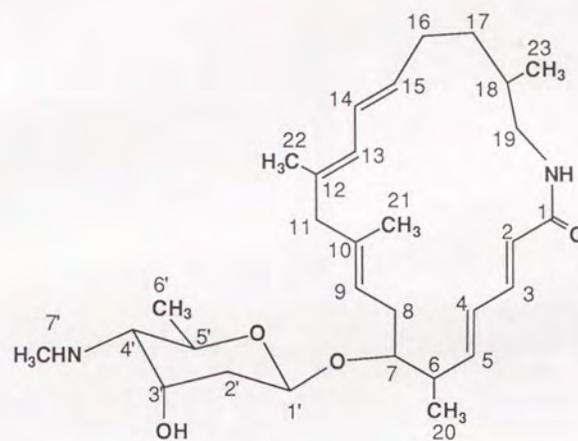


Fig. 4-1. Vicenistatinの構造

第2節 Vicenistatinの生産菌

1. 形態

基生菌糸より生じた気菌糸は、単純分枝をなして伸長し、胞子の連鎖は10~50個程度で、胞子鎖は直鎖およびループ状である。胞子の形は円筒型または長円形で、大

きさは約0.5~0.7 μm x 0.7~1.6 μm であり、その表面は平滑である。胞子囊、鞭毛胞子、菌核などの特殊形態は認められない。HC34株の気菌糸の電子顕微鏡写真をFig. 4-2に示す。



a) 5,000倍

b) 20,000倍

Fig. 4-2. HC34株の電子顕微鏡写真

2. 各種培地上の生育状態

HC34株を各種培地に27 $^{\circ}\text{C}$ 、3週間培養した結果をTable 4-1に示す。概要すると、HC34株は、グリセロール・アスパラギン寒天培地及びチロシン寒天培地での生育は貧弱であり、シュクロース硝酸塩寒天培地および栄養寒天培地での生育は中程度であるが、その他の培地上では良好である。気菌糸は、グルコース・アスパラギン寒天培地、スターチ無機塩寒天培地、イースト・麦芽寒天培地およびオートミール

寒天培地では良く着生する。スターチ無機塩寒天培地、チロシン寒天培地、イースト・麦芽寒天培地、オートミール寒天培地上で薄赤色の可溶性色素の生産が認められる。

Table 4-1. HC34株の各種培地における生育状態

Sucrose - nitrate agar	G: Moderate R: Greenish white Am: Moderate; bluish white Sp: None	Tyrosine agar	G: Poor R: Dark yellowish brown Am: Poor; dark yellowish gray Sp: Pale red
Glucose - asparagine agar	G: Good R: Grayish yellow green Am: Good; grayish yellow Sp: None	Nutrient agar	G: Moderate R: Yellowish white Am: Poor; yellowish white Sp: None
Glycerol - asparagine agar	G: Poor R: Pinkish white Am: Poor; pinkish white Sp: None	Yeast extract - malt extract agar	G: Good R: Dark red Am: Good; light greenish gray Sp: Pale red
Inorganic salts - starch agar	G: Good R: Dull red purple Am: Good; light olive gray Sp: Pale red	Oatmeal agar	G: Good R: Red purple Am: Good; light greenish gray Sp: Pale red

G: growth, R: reverse side of colony, Am: aerial mycelium, Sp: soluble pigment.

3. 生理的性質及び炭素源の資化性

HC34株の各種生理的性質とPridham & Gottlieb寒天培地上における炭素源の資化性は、Table 4-2にまとめて示す通りである。

Table 4-2. HC34株の生理的性質および炭素源の資化性

Temperature for growth	8-30°C
Production of melanoid pigments:	
Tyrosine agar	Negative
Peptone - yeast extract - iron agar	Negative
Tryptone - yeast extract agar	Negative
Hydrolysis of starch	Negative
Liquefaction of gelatin	Negative
Peptonization of milk	Negative
Coagulation of milk	Negative
Utilization of carbon source:	
Utilized	L- arabinose, D- xylose, D- glucose, D- fructose, sucrose, inositol, raffinose, D- mannitol, galactose, D- mannose, maltose
Not utilized	L- rhamnose, sorbitol

4. ジアミノピメリン酸の分析

細胞壁構成アミノ酸の一つであるジアミノピメリン酸を分析した結果、LL型であることが判明した。

5. 考察

以上の菌学的性質を要約すると、HC34株は以下の特徴を有する。

- (1) 孢子鎖は直鎖及びループ状で、孢子の表面は平滑である。
- (2) 気菌糸の着生はグルコース・アスパラギン寒天培地、スターチ無機塩寒天培地、イースト・麦芽寒天培地およびオートミール寒天培地上では良好である。気菌糸の色は灰味黄緑～明るいオリーブ灰～明るい緑味灰であり、気菌糸の裏面の色は緑味白～暗い黄茶～黄茶白～ピンク白～にぶ赤紫～暗い赤～赤紫の色を示す。
- (3) チロシン寒天培地、ペプトン・イースト・鉄寒天培地、トリプトン・イース

ト液体培地ではメラニン様色素を生成しないが、うす赤色の可溶性色素が認められる。

- (4) L-ラムノース、ソルビトールは資化されない。
- (5) 細胞壁ジアミノピメリン酸はLLタイプである。

これらの結果から、HC34株はBergey's Manual of Determinative Bacteriology⁴⁷⁾より *Streptomyces* 属に属する菌株であると考えられる。種までの同定は終わっていないため、本菌株を *Streptomyces* sp. HC34株と同定した。

なお、本菌株は平成3年12月16日に通産省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されて、「微工研条寄第3680号」(FERM BP-3680)の番号を得ている。

第3節 Vicenistatinの発酵生産

1. 生産培地

Vicenistatin の培養には、Table 4-3に示した生産培地を用いた。なお、ジャーファーマンターにて培養する場合は、本培地に消泡剤として、Nissan Disfoam CA-123 (日本油脂(株))を0.02%添加した。

Table 4-3. Vicenistatinの生産培地組成

Potato starch	3.0%
Soya flake	1.5%
Yeast extract	0.2%
Corn steep liquor	0.5%
NaCl	0.3%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
CaCO ₃	0.3%
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0005%
pH	7.2

2. 種母の調製

上記生産培地100mlを分注滅菌した500ml容Erlenmeyer型フラスコに、*Streptomyces* sp. HC34株をスラントより一白金耳接種し、ロータリーシェーカー上で27℃にて3日間振盪培養(200rpm)を行い、これを種母とした。

3. 本培養

種母培地と同じ組成を有する生産培地30リットルを50リットル容ジャーファーマンターに分注滅菌し、これに上記種母100mlを接種して、27℃にて5日間、150rpm、0.5v/v/mの通気攪拌培養を行った。

4. 培養経過

培養1~6日目に培養液をサンプリングし、培養液のpH, 2000gにて10分間遠心分離して得た菌体量のサンプリング量に対する比率 [packed cell volume(%)]、及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC)にて測定した菌体アセトン抽出液中のvicenistatin量について、経時的变化を観察した。その結果をFig. 4-3に示す。

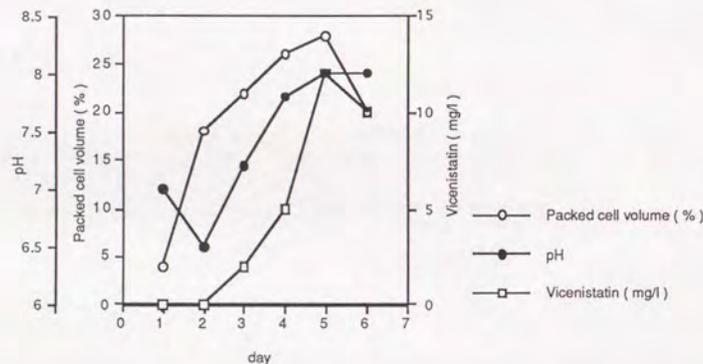


Fig. 4-3. *Streptomyces* sp. HC34株の培養経過

菌体量は、培養5日目まで順次増加した後、6日目にlysisによるためか、減少した。培地のpHは、培養初期に6.5まで下がった後、徐々に上昇し7.8前後で平衡に達した。Vicenistatinの生産は、培養3日目に始まり、培養5日目に最高に達した。

そこで、*Streptomyces* sp. HC34株の培養期間を5日と決定し、培養5日目の菌体画分をvicenistatinの精製に供した。

第4節 Vicenistatinの単離と精製

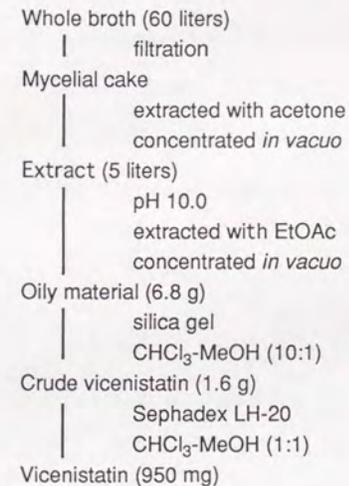


Fig. 4-4. Vicenistatinの精製法

Vicenistatinの精製法をFig. 4-4に示す。即ち、前述の条件で培養した培養液(60リットル)にセライト2kgを添加し、これを濾布濾過して得た菌体を20リットルのアセトンで抽出した。抽出液を5リットルに濃縮後、濃縮液を3N NaOHでpH10に調整し、

これを等量の酢酸エチルで2回抽出した。有機層を無水 Na_2SO_4 にて脱水後、減圧下にて濃縮して得た6.8gについて、クロロホルム：メタノール (10:1)を溶出液としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。活性画分を集めて減圧下濃縮し、得られた粗vicenistatin (1.6g)を、クロロホルム：メタノール (1:1)を展開溶媒としたセファデックスLH-20に供し、純粋なvicenistatin (950mg)を得た。

第5節 Vicenistatinの理化学的性状

Vicenistatin (1)の理化学的性状をTable 4-4に示す。1は無色の粉末で、その分子式は、高分解能FABマスペクトルにより $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_4$ と決定した。紫外吸収スペクトル (Fig. 4-5)において1は、235、240、268nmに極大吸収を有しており、分子内にジエンと共役したカルボニル基が存在することが示唆された。赤外吸収スペクトルでは 3400cm^{-1} に水酸基に由来する吸収と 1655cm^{-1} に2級アミドに由来する吸収が認められた (Fig. 4-6)。

Table 4-4. Vicenistatin (1)の理化学的性状

Appearance	Colorless powder
MP(°C)	151 ~ 153 (dec.)
$[\alpha]_D^{25}$	-3° (c 0.1, MeOH)
Molecular formula	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{N}_2$
HRFAB-MS Calcd:	501.3692
Found:	501.3697 (M+H) ⁺
UV λ_{max} (ε)	235 (35000), 240 (35800)
(in MeOH)	268 (13700)
IR (KBr) νcm^{-1}	3400, 3300, 2920, 1655, 1625, 1540, 990

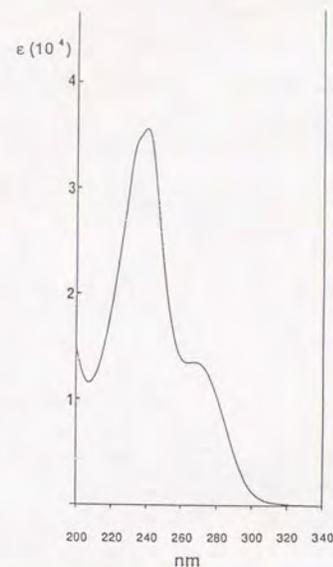


Fig. 4-5. Vicenistatin (1)の紫外吸収スペクトル (メタノール中)

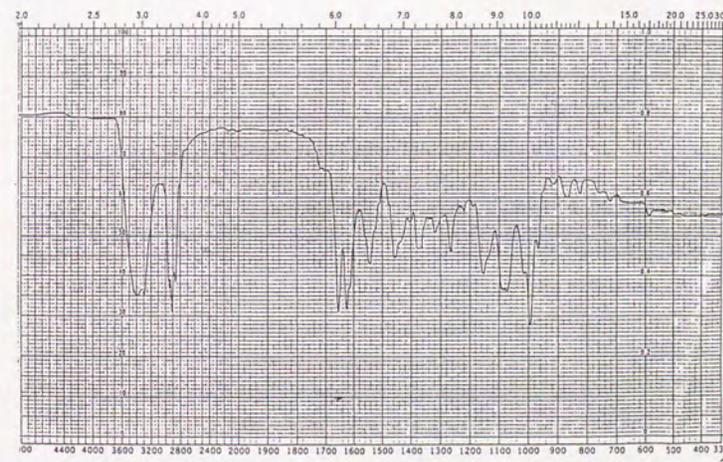


Fig. 4-6. Vicenistatin (1)の赤外吸収スペクトル (KBr法)

第6節 Vicenistatinの構造解析

1の有機溶媒に対する溶解度は低く、NMR測定のために種々の溶媒を用いてその溶解度を検討したところ、ピリジンに最もよく溶解した。そこで、1のNMRスペクトルの測定は全て重ピリジン中で実施した。

1. Vicenistatinの¹H-NMR解析

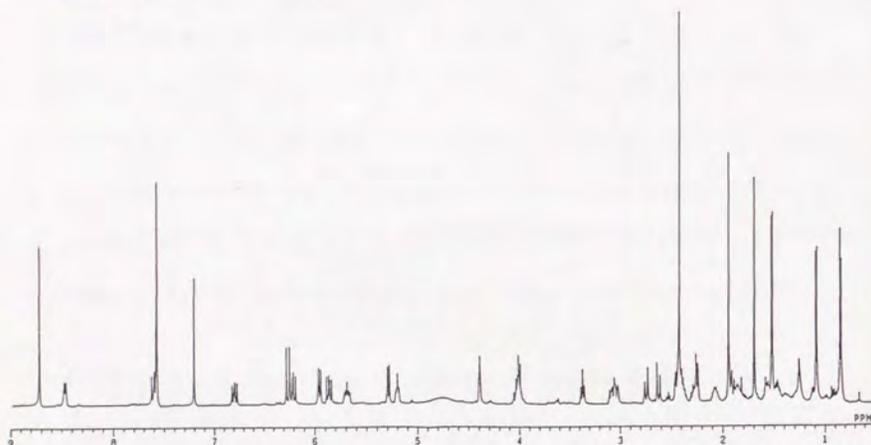


Fig. 4-7. Vicenistatin (1)の¹H-NMRスペクトル (pyridine-d₅中)

1の重ピリジン中の500MHz ¹H-NMRスペクトルおよびそのデータをFig. 4-7, Table 4-5に示す。本スペクトルでは、6本のメチル [ダブレットメチル (δ_H 0.84、1.08、1.52)、シングレットメチル (δ_H 1.68、1.94、2.42)]、8本のオレフィンメチン (δ_H 5.20、5.68、5.86、5.95、6.20、6.26、6.79、7.59)、1本のアミドプロトン (δ_H 8.47)、 δ_H 1.48~5.29に19H分の sp^3 メチレン及びメチンのシグナルが観測された。

Table 4-5. Vicenistatin (1)の¹Hおよび¹³C-NMRスペクトルデータ^a

Position	δ_H	δ_C
1		166.4 (s ^d)
2	6.26 (15.0 ^b)	124.7 (d)
3	7.59 (dd 11.5, 15.0)	140.2 (d)
4	6.20 (dd 11.5, 15.5)	128.4 (d)
5	5.86 (dd 10.0, 15.5)	143.2 (d)
6	2.40 ^c	46.1 (d)
7	3.36 (ddd 2.8, 9.0, 9.0)	85.9 (d)
8	2.27 ^c , 3.08 (ddd 2.8, 7.5, 9.0)	36.5 (t)
9	5.20 (dd 7.5, 7.5)	122.3 (d)
10		134.8 (s)
11	2.62 (d 15.0), 2.74 (d 15.0)	49.5 (t)
12		134.1 (s)
13	5.95 (d 11.5)	127.9 (d)
14	6.79 (dd 11.5, 15.0)	128.4 (d)
15	5.68 (ddd 5.8, 6.0, 15.0)	132.6 (d)
16	2.07 (m), 2.39 ^c	27.9 (t)
17	1.48 ^c , 1.57 ^c	33.0 (t)
18	1.86 ^c	33.6 (d)
19	3.03 (ddd 3.0, 5.0, 13.5), 4.00 (m)	43.5 (t)
19-NH	8.47 (br d 6.2)	
20	1.08 (d 6.5)	18.7 (q)
21	1.68 (s)	18.0 (q)
22	1.94 (s)	17.3 (q)
23	0.84 (d 6.5)	17.8 (q)
1'	5.29 (dd 3.0, 9.5)	100.7 (d)
2'	1.90 (ddd 2.8, 9.5, 14.5), 2.43 ^c	39.5 (t)
3'	4.39 (ddd 2.8, 3.0, 4.2)	63.4 (d)
4'	2.24 (dd 3.0, 9.8)	65.3 (d)
5'	4.02 (dq 6.5, 9.8)	71.5 (d)
6'	1.52 (d 6.5)	19.6 (q)
7'	2.42 (s)	34.0 (q)

^a Taken in pyridine-d₅.

^b Coupling constants in Hz.

^c Obscured by overlapping signals.

^d Multiplicities in DEPT spectra;

s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet.

2. Vicenistatinの¹³C-NMR解析

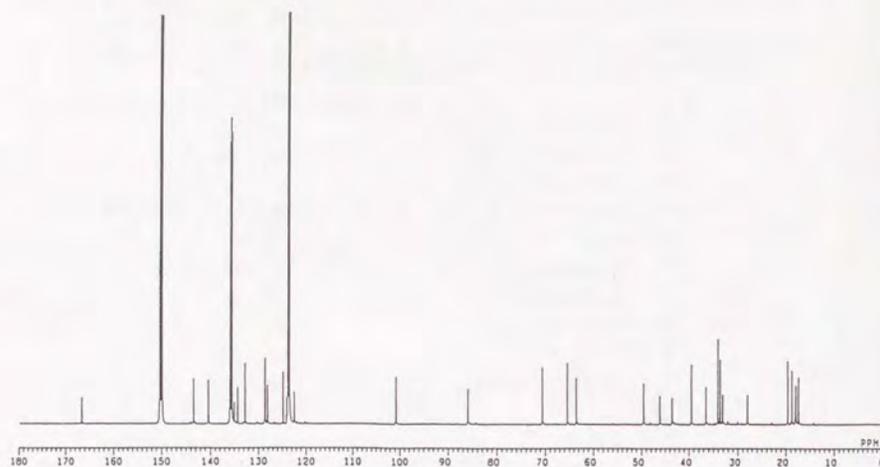


Fig. 4-8. Vicenistatin (1)の¹³C-NMRスペクトル (pyridine-d₅中)

1の重ピリジン中の125MHz ¹³C-NMRスペクトルおよびそのデータをFig. 4-8、Table 4-5に示す。本スペクトルでは30本のシグナルが観測され、DEPTスペクトルからメチル炭素シグナルが6本、メチレン炭素シグナルが6本、メチン炭素シグナルが15本、sp²4級炭素シグナルが3本であることが明らかとなった。また4級炭素シグナルのうち、 δ_c 166.4のシグナルはアミドカルボニルに由来することがその¹³C化学シフト値、また前述した赤外吸収スペクトルの1655cm⁻¹の吸収の存在より示唆された。

1の¹³C-¹H COSYスペクトルを測定し、¹Hシグナルと¹³Cシグナルの相関を確認した。次に、¹H-¹H COSY及び¹Hデカップリング実験を行い、1に存在するスピン結合ネットワークを解析した。Fig. 4-9に示すように、この結果2-Hから9-Hまでのスピン

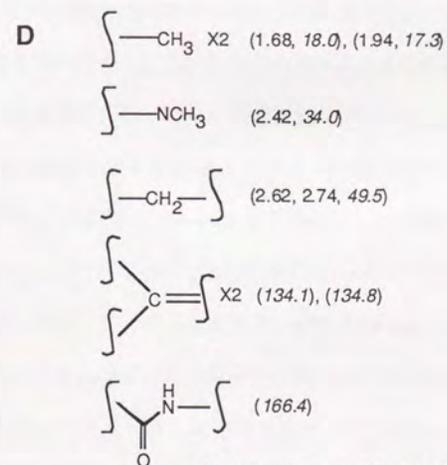
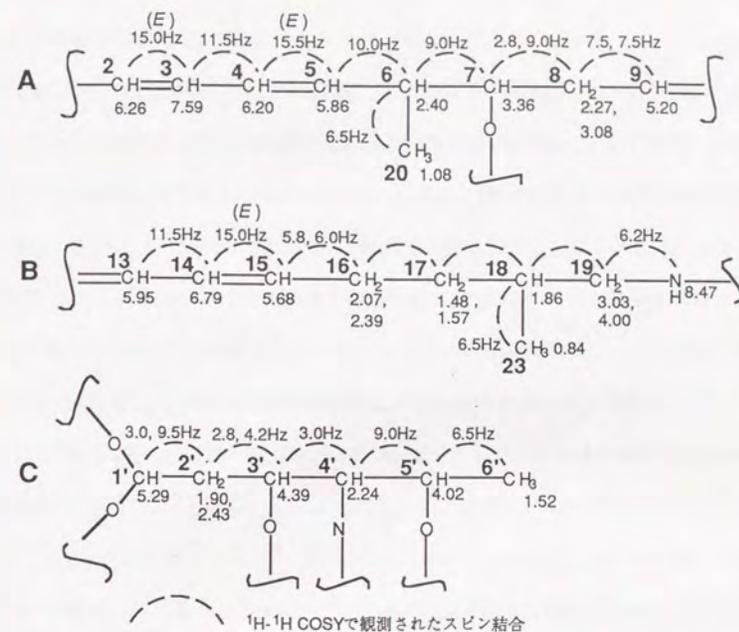


Fig. 4-9. Vicenistatin (1)の部分構造

結合ネットワーク [2-H (δ_H 6.26)→3-H (δ_H 7.59)→4-H (δ_H 6.20)→5-H (δ_H 5.86)→6-H (δ_H 2.40)→7-H (δ_H 3.36)→8-H (δ_H 2.27, 3.08)→9-H (δ_H 5.20)]及び 6-H - 20-H (δ_H 1.08, δ_C 18.7)間のスピン結合が観測された。また各炭素原子の ^{13}C 化学シフトより C-2 (δ_C 124.7) - C-3 (δ_C 140.2)、C-4 (δ_C 128.4) - C-5 (δ_C 143.2)間の結合は二重結合であることが判明した。 $\Delta_{2,3}$ 、 $\Delta_{4,5}$ はスピン結合定数 ($J_{2,3}=15.0$ 、 $J_{4,5}=15.5\text{Hz}$)よりE配向であると決定した。C-9 (δ_C 122.3)についてもその ^{13}C 化学シフトより sp^2 炭素であると判明した。C-8 (δ_C 36.5)はメチレン炭素であり、 ^1H - ^1H COSYスペクトルでは9-Hは8-Hとのみスピン結合が認められることからC-9は sp^2 4級炭素 (C-10)と結合していることが明らかとなった。C-7 (δ_H 3.36, δ_C 85.9)には酸素原子が結合していることもその ^{13}C 化学シフトより判明した。以上の結果より、Fig. 4-9に示す部分構造Aの存在が明らかとなった。

同様に13-Hから19-Hに至るスピン結合ネットワーク [13-H (δ_H 5.95)→14-H (δ_H 6.79)→15-H (δ_H 5.68)→16-H (δ_H 2.07, 2.39)→17-H (δ_H 1.48, 1.57)→18-H (δ_H 1.86)→19-H (δ_H 3.03, 4.00)]及び 18-H - 23-H (δ_H 0.84)間のスピン結合が観測された。また各炭素原子の ^{13}C 化学シフトよりC-14 (δ_C 128.4) - C-15 (δ_C 132.6)間の結合は二重結合であることが示された。 $\Delta_{14,15}$ はスピン結合定数 ($J=15.0\text{Hz}$)よりE配向と決定した。C-13 (δ_C 127.9)についてもその ^{13}C 化学シフトより sp^2 炭素であると判明した。 ^1H - ^1H COSYスペクトルでは13-Hは14-Hとのスピン結合のみが認められることから、C-13は sp^2 4級炭素 (C-12)と結合していることが明らかとなった。スピン結合ネットワークの末端に存在する19-Hは、 δ_H 8.47にブロードダブレットとして観測されるシグナルともスピン結合していた。 ^{13}C - ^1H COSYスペクトルでは、この δ_H 8.47のブロードダブレットシグナルに対応する炭素シグナルは存在しないことから、C-19はアミドあるいは2級アミンの窒素原子と結合していることが判明した。以上の結果より

Fig. 4-9に示す部分構造Bの存在が明らかとなった。

さらに1'-Hから6'-H間のスピン結合ネットワーク [1'-H (δ_H 5.29)→2'-H (δ_H 1.90, 2.43)→3'-H (δ_H 4.39)→4'-H (δ_H 2.24)→5'-H (δ_H 4.02)→6'-H (δ_H 1.52)]が観測された。対応する炭素の ^{13}C 化学シフト値より、C-3' (δ_C 63.4)、C-5' (δ_C 71.5)には酸素原子が結合していることが明らかとなった。1'位はその ^1H 、 ^{13}C 化学シフト値 (δ_H 5.29, δ_C 100.7)よりヘミアセタールであることが判明した。4'位にはその ^1H 、 ^{13}C 化学シフト値 (δ_H 2.24, δ_C 65.3)より窒素原子が結合している事が示唆された。以上の結果より Fig. 4-9に示す部分構造Cの存在が明らかとなった。

以上で明らかとなった部分構造A、B、Cの他に、1を構成する炭素としてはFig. 4-9の部分構造Dに示すようにシングレットメチルが2個 [C-21 (δ_H 1.68, δ_C 18.0), C-22 (δ_H 1.94, δ_C 17.3)], NCH_3 が1個 [C-7' (δ_H 2.42, δ_C 34.0)], 孤立したメチレンが1個 [C-11 (δ_H 2.62, 2.74, δ_C 49.5)], sp^2 4級炭素が2個 [C-10 (δ_C 134.8)、C-12 (δ_C 134.1)], アミドカルボニル が1個 [C-1 (δ_C 166.4)]存在することも前述の ^{13}C - ^1H COSYスペクトルより判明した。

これらの各炭素及び部分構造間の結合を明らかにするため、HMBCスペクトルを測定しC-H遠距離スピン結合を観測した。Fig. 4-10に示すようにHMBCスペクトルにおいて δ_H 1.68のシングレットメチル (21- CH_3)より部分構造AのC-9 (δ_C 122.3)及び δ_C 134.8の sp^2 4級炭素に対してC-H遠距離スピン結合が観測された。従って δ_C 134.8のシグナルがC-9と二重結合を形成するC-10であること、このC-10にはメチル基 (C-21)が結合していることが判明した。21- CH_3 からはさらに孤立したメチレン (δ_C 49.5) に対してもC-H遠距離スピン結合が観測され、C-10はこのメチレン (C-11)と隣接していることが明らかとなった。

また δ_H 1.94のシングレットメチル (22- CH_3)より部分構造BのC-13 (δ_C 127.9)及び

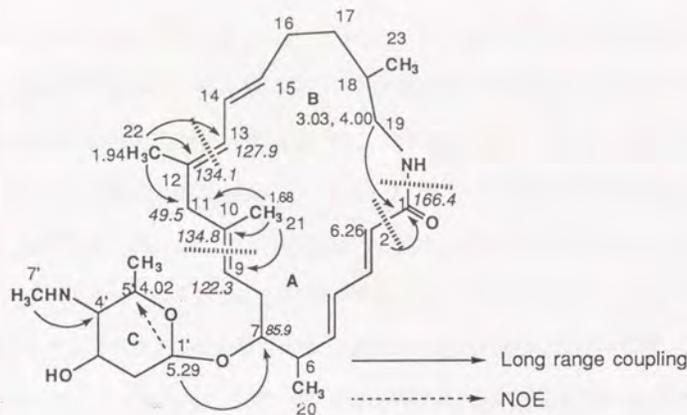


Fig. 4-10. Vicenistatin (1)において観測されたC-H遠距離スピン結合及びNOE

δ_c 134.1の sp^2 4級炭素に対してC-H遠距離スピン結合が観測された。従って δ_c 134.1のシグナルがC-13と二重結合を形成するC-12に帰属された。またこのC-12には、メチル基(C-22)が結合していることも判明した。さらに22-CH₃からは、前述の孤立したメチレン(C-11)に対してもC-H遠距離スピン結合が認められた。以上の結果より部分構造AのC-9と部分構造BのC-13はC-10 - C-11 - C-12を介して結合していることが判明し、1にはC-9~C-13よりなる構造が存在することが示された。

さらにHMBCスペクトルでは、部分構造Aの2-H (δ_H 6.26)と部分構造Bの19-H (δ_H 3.03, 4.00)よりアミドカルボニル (δ_c 166.4)に対してC-H遠距離スピン結合が観測された。前述したように19-HはNHのシグナルとスピン結合していることから、C-2は直接に、C-19は窒素原子を介してアミドカルボニル炭素(C-1)と結合していることが明らかとなった。以上より1のアグリコン部分の構造が判明し、1には20員環ラクタム構造が存在することが判明した。

Fig. 4-10に示すように1のNOE実験において、部分構造Cの1'-Hと5'-Hの間にNOE

が観測され、部分構造Cはhexopyranose環を形成していることが判明した。またHMBCスペクトルにおいて¹H-NMRスペクトルで δ_H 2.42に観測されるNCH₃からhexopyranose環のC-4' (δ_c 65.3)に対してC-H遠距離スピン結合が観測された。従って1は2,6-デオキシ-4-アミノ糖(2)を有する事が明らかとなった。

そこで本アミノ糖のメチルグリコシド(3)を単離する目的で、1を5%塩酸-メタノール中、100°Cで40分間還流した。反応物を減圧下濃縮後、シリカゲルカラム[クロロホルム-メタノール(5:1)]を用いて3を精製した(収率57%)。3の理化学的性質を以下に示す。外観 無色粉末；融点(°C) 185~185 (dec.)；分子式 C₉H₁₇NO₃；FD-MS *m/z* 175 (M⁺)。3の重メタノール中での¹H-及び¹³C-NMRスペクトルデータをTable 4-6に示す。

Table 4-6. Methyl β-D-vicenisaminide (3)の¹H、及び¹³C-NMRスペクトルデータ^a

1'	4.75 (dd 2.5, 9.5) ^b	100.4
2'	1.67 (ddd 2.8, 9.5, 14.5)	38.8
	2.03 (ddd 2.5, 4.2, 14.5)	
3'	4.35 (ddd 2.8, 3.0, 4.2)	62.4
4'	2.91 (dd 2.8, 9.0)	63.3
5'	4.01 (dq 6.5, 9.0)	68.0
6'	1.36 (d 6.5)	18.7
4'-CH ₃	2.74 (s)	31.3
1'-OCH ₃	3.44 (s)	56.7

^a Taken in CD₃OD.

^b Multiplicity and coupling constant (*J*=Hz) are in parentheses.

Fig. 4-11に示すように、3の $J_{1',2ax}$ 、 $J_{4',5}$ はそれぞれ1,2-diaxialにより9.5Hz、9.0Hzと大きなスピン結合定数を示すことから、1'-H、4'-H、5'-Hはaxial配向であることが判明した。また3'-Hは隣接のプロトンとの結合定数が小さく($J_{2ax,3}$ =2.8Hz、 J_{2eq}

$J_{3,4}=4.2\text{Hz}$ 、 $J_{3,4}=3.0\text{Hz}$)、*equatorial* 配向であると決定した。従って、**3**はmethyl 4-methylamino-2,4,6-trideoxy- β -ribohexopyranoside と決定された。

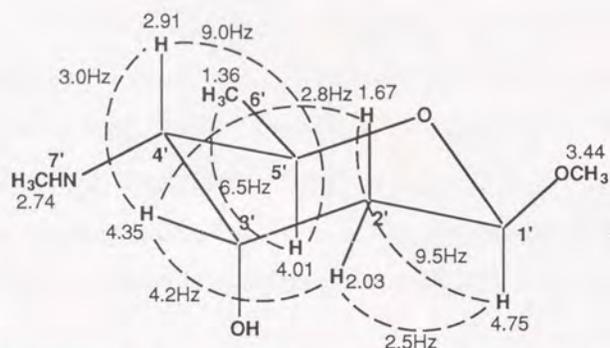


Fig. 4-11. Methyl β -D-viceniaminide (**3**)において観測されたスピン結合

さらに**3**の絶対立体配置を決定するために、梅沢らによって開発されたtetraamine copper (II) sulfate 法⁷⁴⁾を適用した。隣接する水酸基とアミノ基を有するアミノ糖と Cu^{2+} との錯体は、正或いは負の大きな旋光度を有する。本法はこの旋光度の符号により絶対立体配置を決定する方法である。その結果、tetraamine copper (II) sulfate 存在下で、**3**の $[\alpha]_{435}^{24}$ は大きく負にシフト $\{[\alpha]_{435}^{24}(\text{c } 0.04, \text{H}_2\text{O}) -5^\circ$ 、 $[\alpha]_{435}^{24}(\text{c } 0.04, \text{tetraamine copper (II) sulfate}) -503.5^\circ\}$ することが判明し、**2**がD糖であることが明らかとなった。そこで絶対立体配置を含めて、**2**を 4-methylamino-2,4,6-trideoxy- β -D-ribohexopyranose と決定した。検索の結果、**2**は新規なアミノ糖であることが判明し、viceniamine と命名した。

Fig. 4-10に示すように、**1**のHMBCスペクトルにおいて**2**の1'-Hから20員環ラクタムのC-7に対してC-H遠距離スピン結合が観測されることより、**2**はラクタム環のC-7

に結合していることが判明した。また前述したように1'-Hと2'-Haxのスピン結合定数は9.5Hzであること、1'-H、5'-H間でNOEが観測されることから1'-Hは*axia*配向であることが確認された。従って**2**のラクタム環との結合は β である事も明らかとなった。

前述したように、**1**に存在する二重結合 $\Delta_{2,3}$ 、 $\Delta_{4,5}$ 、 $\Delta_{14,15}$ の立体化学についてはそのスピン結合定数より*E*配向であると決定した。 $\Delta_{9,10}$ 、 $\Delta_{12,13}$ の立体化学については、Fig. 4-12に示す様にこれら二重結合に結合したメチル基C-21、C-22がそれぞれ δ_{C} 18.0、 δ_{C} 17.3と高磁場に観測されること、及び9-Hと21-H、13-Hと22-Hの間にはNOEが観測されないことから、両者共に*E*配向であることが明らかとなった。

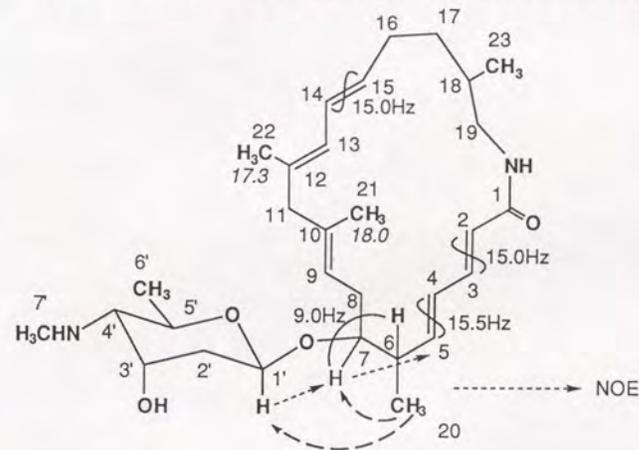


Fig. 4-12. Vicenistatin (**1**)において観測されたNOE

次に、20員環ラクタム環のC-6、C-7の相対立体配置について検討した。Fig. 4-12に示すように20- CH_3 、7-H、1'-Hの間及び5-Hと7-Hの間にNOEが観測され、6-Hと7-Hの間にはNOEは観測されなかった。また $J_{6,7}=9.0\text{Hz}$ であることから、6-Hと7-Hの

二面角は180°に近いと推定された。

C-6 - C-7間でラクタム環構造が*gauche*配置⁷⁵⁾である場合、相対立体配置はFig. 4-13 (a) ~ (d)に示す4通りが可能である。このうち二面角に関する条件を満たしているものは(a)のみである。また(a)の場合、観測されたNOEについてもすべて合理的に説明することができる。一方ラクタム環構造が*anti*配置である場合、Fig. 4-13 (e)、(f)が可能であるが、二面角及びNOEを矛盾なく説明できるものはない。

従ってC-6、C-7の相対立体配置はFig. 4-13 (a)に示すようであり、6-Hと7-Hは*trans*であることが明らかとなった。

C-18の相対立体配置については現在検討中である。以上の結果から、1の構造をFig. 4-12に示すように決定した。

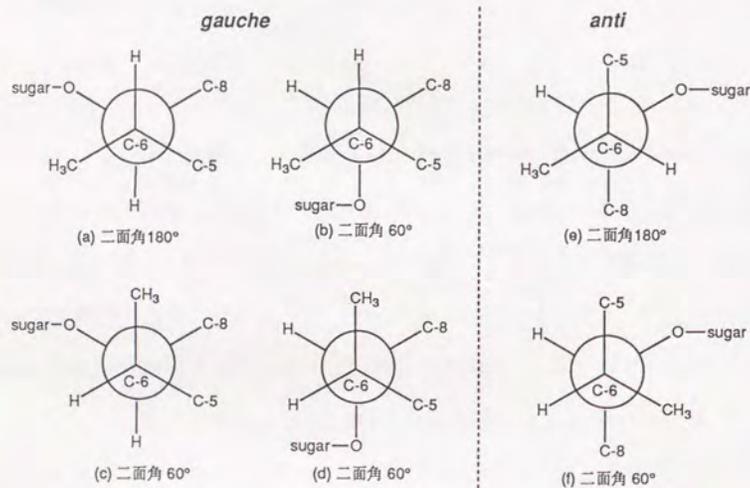


Fig. 4-13. C-6、C-7部分の相対立体配置

第7節 Vicenistatinの生物活性

1. Vicenistatin (1)の*in vitro*での細胞増殖抑制活性

1の各種癌細胞に対する*in vitro*での細胞増殖抑制活性をMTT法で検討した。その結果をTable 4-7に示す。またCFAでの、1の各濃度におけるマウス白血病細胞L1210及びヒト大腸癌細胞COLO205に対するコロニー増殖阻止円の半径をTable 4-8に示す。どちらの方法においても、1がL1210よりもCOLO205に対して強い増殖抑制活性を有することが示された。

Table 4-7. Vicenistatin (1)の各種癌細胞に対する*in vitro*での増殖抑制活性

Cell line	IC ₅₀ (μg/ml)
L1210	0.32
COLO 205	0.19
HT29	0.34
LOX	1.26
A549	0.18
HL60	0.10
K562	0.04

Table 4-8. CFAにおけるvicenistatin (1)のコロニー形成抑制活性

Compound	Concentration (μg/ml)	Inhibition radius (mm)	
		COLO205	L1210
Vicenistatin	0.1	0	0
	1	10	7
	10	18	15
Adriamycin	0.1	0	0
	1	16	24
	10	20	>30

Each concentration of drugs was applied onto 6mm paper disks.

2. Vicenistatin (1)の*in vivo*での抗腫瘍活性

2-1. Vicenistatin (1)のP388、L1210マウス白血病に対する*in vivo*での抗腫瘍活性

1のマウス白血病P388、L1210に対する抗腫瘍活性を検討した。試験は 1×10^6 個の細胞を0日目にマウスの腹腔に移植し(1群6匹)、1を各濃度で1、5、9日目に腹腔内投与する事により行った。Table 4-9に示すように2.5、5、10mg/kgの投与濃度ではP388、L1210での試験において有意な延命効果(T/C 120%以上)は認められず、1はP388、L1210に対して抗腫瘍活性を示さなかった。10mg/kgの投与では両試験とも対照群より生存日数が短くなることが観察された。これは1の毒性によるものと考えられ、これ以上の投与は不可能であった。

Table 4-9. Vicenistatin (1) の P388及びL1210マウス白血病に対する*in vivo*での抗腫瘍活性

Tumor		Dose(mg/kg)	MST ^a (days)	T/C(%)
L1210	control	0	9.1±0.3 ^b	100
	vicenistatin	10	7.5±0.6	82
		5	9.7±0.5	107
		2.5	9.3±0.5	102
P388	control	0	9.0±0.5	100
	vicenistatin	10	4.5±2.9	50
		5	9.2±0.4	102
		2.5	10.2±0.4	113

L1210 and P388 mouse leukemia cells (1×10^6 cells) were inoculated i.p. into CDF1 mice (n=6) on day 0. Vicenistatin was administered i.p. on days 1, 5 and 9.

^a Mean survival time of deceased mice.

^b Mean±SD.

2-2. Vicenistatin (1)のヒト大腸癌に対する*in vivo*での抗腫瘍活性

次に、ヌードマウス評価系を用いて1のヒト大腸癌Co-3⁷⁶⁾、COLO205⁷⁹⁾、COL-5、LoVo⁷⁷⁾、HT29⁷⁸⁾、LS-180⁷⁹⁾に対する抗腫瘍効果を検討した。試験は、ヌードマウスの皮下に移植したヒト大腸癌が100~300mm³程度の大きさになった時点で、腫瘍体積の平均が均一になるように群分けし(1群5匹)、1を5日間連続で尾静脈内投与することにより行った。投与開始日より、週2回、約3週間にわたって腫瘍体積と体重を測定した。[1-(薬剤投与群の腫瘍体積/コントロール群の腫瘍体積)]x 100をTumor Growth Inhibition Rate (T.G.I.R., %)として、この値が50%以上であり、かつMann-WhitneyのU検定で有意であった場合に有意な腫瘍増殖抑制効果を有すると判定した。なお、抗腫瘍試験は、Co-3に対して8mg/kgを投与したときに死亡例が認められたため(1/5)、これ以外の実験では、6mg/kgを至適投与濃度として実施した。

Table 4-10, 11に示すように、1はヒト大腸癌Co-3 (T.G.I.R. 65%)、COLO205 (T.G.I.R. 53%)に対して有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。特にCo-3に対しては、mitomycin C (T.G.I.R. 58%)を凌ぐ抗腫瘍効果が認められた。しかしながらTable 4-12に示すように、同じヒト大腸癌でもCOL-5、LoVo、HT29、LS-180に対しては、ヌードマウス評価系でT.G.I.R.は50%以下であり無効であった。

Table 4-10. Vicenistatin (1)のCo-3ヒト大腸癌に対する *in vivo*での抗腫瘍活性

Compound	Dose(mg/kg/day)	Treatment schedule	TGIR (%) ^{a)}
Vicenistatin	8	day 1~5	65*
	2	day 1~5	52*
Mitomycin C	6.7	day 1	58*

Fragments of Co-3 human colon cancer were implanted subcutaneously into athymic mice. When the tumor size reached 100~300mm³, vicenistatin was administered intravenously daily for five days.

^{a)} Maximum value of TGIR through 3 weeks.

* Significantly different from vehicle (p<0.05)

Table 4-11. Vicenistatin (1)のCOLO205ヒト大腸癌に対する *in vivo*での抗腫瘍活性

Compound	Dose(mg/kg/day)	Treatment schedule	TGIR (%) ^{a)}
Vicenistatin	6	day 1~5	53*
Mitomycin C	6.7	day 1	80*

Fragments of COLO205 human colon cancer were implanted subcutaneously into athymic mice. When the tumor size reached 100~300mm³, vicenistatin was administered intravenously daily for five days.

^{a)} Maximum value of TGIR through 3 weeks.

* Significantly different from vehicle (p<0.05)

Table 4-12. Vicenistatin (1)のCOL-5、LoVo、HT29 およびLS-180ヒト大腸癌に対する *in vivo*での抗腫瘍活性

Tumor	Vicenistatin		TGIR (%) ^{a)}
	Dose(mg/kg/day)	Treatment schedule	
COL-5	6	day1~5	33
LoVo	6	day1~5	12
HT29	6	day1~5	35
LS-180	6	day1~5	47

Fragments of human colon cancer were implanted subcutaneously into athymic mice. When the tumor size reached 100~300mm³, vicenistatin was administered intravenously daily for five days.

^{a)} Maximum value of TGIR through 3 weeks.

第8節 考察

1は20員環ラクタムと新規アミノ糖(vicenisamine)よりなる新規骨格を有する抗腫瘍抗生物質である。ラクタム環を有する抗腫瘍抗生物質としては、hitachimycin⁸⁰⁾、fluvirucins⁸¹⁾、BE-14106⁸²⁾等が報告されている。BE-14106はvicenistatinと同じ20員環ラクタムを有しているがアミノ糖は結合していない。また fluvirucins はアミノ糖を有しているが16員環ラクタムである。従って1は、類縁化合物のない新規骨格を有する化合物であると考えられる。

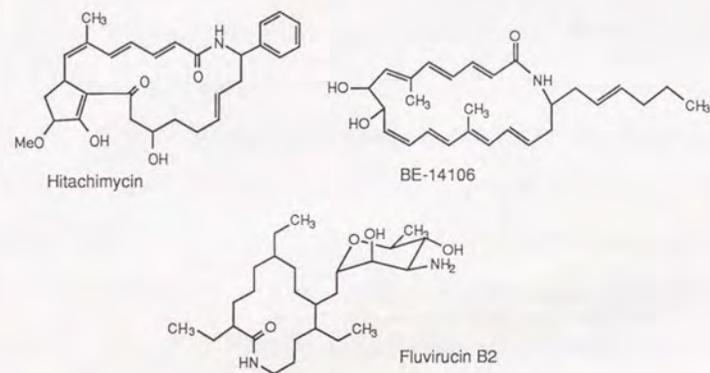


Fig. 4-14. ラクタム環を有する既知抗腫瘍抗生物質

1はヒト大腸癌Co-3、COLO205に対してヒト癌ノードマウス評価系で有意な増殖抑制効果を示した。特にCo-3に関してはmitomycin Cを凌ぐ抗腫瘍効果を示した。しかしながら他の大腸癌COL-5、LoVo、HT29、LS-180に対しては無効であった。すなわち1はある種の大腸癌にのみ選択的に有効であり、その作用メカニズムに興味を持たれる。またanthracycline系抗腫瘍抗生物質の様に、糖部分の化学修飾により

抗腫瘍効果の増強及び抗腫瘍スペクトルの拡大が認められた例もあることから^{83, 84)}、**1**の化学修飾により抗腫瘍効果の増強も期待できる。

CFA及びMTT法における**1**のCOLO205とL1210に対する*in vitro*増殖抑制活性の値から、それぞれの細胞に対する感受性の差の算出を試みた。その結果、**1**のCOLO205とL1210に対する感受性の差は、CFAを用いた場合の方がMTT法よりも大きいことが判明した。

CFA

$$\frac{\text{L1210に対して阻止円半径10mmを与える濃度 (1.0}\mu\text{g/ml)}}{\text{COLO205に対して阻止円半径10mmを与える濃度 (2.4}\mu\text{g/ml)}^a} = 2.40$$

*阻止円半径はサンプル濃度のlogに比例するとして算出

MTT法

$$\frac{\text{L1210に対するIC}_{50} (0.32\mu\text{g/ml})}{\text{COLO205に対するIC}_{50} (0.19\mu\text{g/ml})} = 1.68$$

*In vivo*での抗腫瘍活性試験において、**1**はL1210に対しては抗腫瘍活性を示さなかったが、COLO205に対しては有意な増殖抑制効果を示したことを考慮すると、**1**は*in vivo*ではL1210と比較してCOLO205に非常に強い増殖抑制活性を有すると考えられる。従ってこれらの細胞間で感受性の差が大きく認められるCFAは、MTT法と比較してより*in vivo*での増殖抑制活性を良く予見していると考えられる。

なお、**1**の報文発表後⁴⁰⁾、Brillらにより**1**の単離及び生物活性に関する報告がなされた。この中では、**1**の抗菌作用が報告されている^{85, 86)}。

生化学上の新知見に基づく新たな作用機構を有する抗腫瘍剤の探索は、癌化学療法の新たな突破口として非常に重要である。著者はbicyclodiyne系抗腫瘍抗生物質やherbimycin A等、生体内チオールと作用する物質には興味深い抗腫瘍活性が見い出されている事に注目して、生体内チオールと反応することにより生理活性を示す物質の探索を微生物代謝産物から試みた。スクリーニング系としてはペーパーディスク法を用い、2-メルカプトエタノール含有培地上の*Bacillus subtilis* 抗菌阻止円の直径が、2-メルカプトエタノール非含有培地上での直径と比較して減少する物質を探索した。その結果、新規化合物 cochleamycins A、A2、B、B2を見出した。

また、NCIで提唱されたdisease-oriented screen の考え方に従い、colony forming assay (CFA)を用いて、ヒト大腸癌COLO205及びマウス白血病L1210に対するコロニー形成抑制活性を比較することにより、ヒト大腸癌に特異的に作用する物質を微生物代謝産物より探索した。その結果、新規化合物 vicenistatin を見出した。

本研究では、これらの物質の生産菌の同定、発酵生産、物質の単離精製と構造決定、合成、生物活性に関して、詳細なる検討を行った。以下にその結果を要約する。

1) Cochleamycins

Cochleamycins A、A2、B、B2は*Streptomyces* sp. DT136株の培養抽出物より見い出された特異な carbocyclic構造を有する新規化合物である。本物質の平面構造を¹H-¹H COSY、¹³C-¹H COSY、HMBC等のNMRスペクトルを用いて決定し、相対立体構造はphase-sensitive NOESYスペクトルを用いて決定した。さらに構造の確認も含めて、cochleamycin Aの溶液中のコンフォメーションを分子力場計算により解析した。また各炭素の生合成的由来を¹³C及び²H 前駆体の取り込み実験により検討

し、cochleamycinsの炭素骨格は8モルの酢酸、1モルのプロピオン酸から生合成されることを明らかにした。また、cochleamycins A2、B2のC-10に結合したイソブチル部分はバリンから生合成されることを明らかにした。さらにcochleamycinsの生合成経路について考察し、分子内Diels-Alder反応、aldol縮合反応、還元的渡環反応等の関与を推察した。また、cochleamycinsがチオールの系で活性を示す理由を検討した結果、cochleamycins A、A2が2-メルカプトエタノールやL-システインと付加物を形成することを見い出した。

Cochleamycinsの生物活性については、*in vitro*の生物活性としてcochleamycinsの種々の癌細胞に対する細胞増殖抑制効果(MTT法)と、cochleamycins A、A2の抗菌作用(ペーパーディスク法)を検討した。Cochleamycinsは各種癌細胞に対して、1.6~20.8 μ g/mlのIC₅₀値で増殖抑制作用を示した。また抗菌作用の検討の結果、cochleamycins A、A2はグラム陽性菌にのみ活性を有し、グラム陰性菌や酵母に対しては抗菌活性を持たないことが明らかとなった。*In vivo*の生物活性としては、マウス白血病P388に対する抗腫瘍効果を検討した。Cochleamycins A、BはP388に対しては延命効果を示さなかった。

前述したように、cochleamycins A、A2はL-システインと反応し付加物を与えることから、これらの物質がherbimycin Aのようにタンパク質中のL-システインのSH基と反応することにより、Srcチロシンキナーゼを阻害する可能性が考えられた。そこでラウス肉腫ウイルスを感染させたラット繊維芽細胞(RSV/NIH3T3)細胞抽出物のSrcチロシンキナーゼに対する阻害活性を、エノラーゼのリン酸化活性を指標として検討した。残念ながらcochleamycins A、A2には阻害活性は見い出されなかったが、これは上原らがヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド等のSH阻害剤を用いて検討した結果から²⁶⁾、cochleamycins A、A2に分子の高高さが足りないことが阻害活性

を示さないことの原因ではないかと推察した。

2) Vicenistatin

Vicenistatinは、*Streptomyces* sp. HC34株の培養菌体抽出物より見い出された20員環ラクタム構造と新規アミノ糖よりなる新規骨格を有する化合物である。本物質の平面構造は¹H-¹H COSY、¹³C-¹H COSY、HMBC等のNMRスペクトルを用いて決定し、またアミノ糖及びC-6,C-7部分の相対立体構造をNOE差スペクトル及び¹H-NMRのスピン結合定数より明らかにした。アミノ糖については、vicenistatinをメタノリシスしてmethyl glycosideを単離し、tetraamine copper (II) sulfate法を適用してD糖であることを明らかにした。本糖は新規なアミノ糖であったので、vicenisamineと命名した。

Vicenistatinの生理活性については、*in vitro*の作用としてMTT法及びCFAにおける癌細胞増殖抑制作用を検討した。いずれの方法に於ても、vicenistatinはマウス白血病細胞L1210よりもヒト大腸癌細胞COLO205に強く作用することが明らかとなった。特にCFAにおいて、vicenistatinがL1210に比してよりCOLO205に強く作用する傾向が認められた。さらに*in vivo*での作用を検討した結果、vicenistatinはマウス白血病L1210、P388に対しては延命効果を示さず、ヒト大腸癌COLO205、Co-3に対しては有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。従って、vicenistatinはP388に対する*in vivo*抗腫瘍効果を第一次スクリーニング系として用いた従来のスクリーニング系の場合、見落とされる可能性の高い物質であり、disease-oriented screeningの重要さとCFAの*in vitro*-*in vivo*相関性の高さを示すものと考えられた。

Cochleamycins A、A2は、チオール基と付加反応することの出来る物質であると

考えられる。Cochleamycins A、A2にはSrcチロシンキナーゼ阻害作用は認められなかった。しかしながら、前述したように分子が小さすぎる事がその原因であると考えれば、化学修飾により活性を見いだすことが可能なはずである。今後、cochleamycins A、A2のC-10に結合する側鎖をより大きなものに置換し、構造活性相関を検討する必要があるだろう。

また、cochleamycins A、A2のシステインチオール基を活性中心に有するチオール酵素に対する阻害活性も今後の検討課題である。Sarkomycinはcochleamycins等と同じくチオール基と反応性を有するが⁸⁷⁾、この物質はチオール酵素の一つであるDNAポリメラーゼを阻害することが報告されている²⁵⁾。今後、様々なチオール酵素との反応性を検討することにより、特異的な活性を見いだす事が期待される。

Vicenistatinに関しては、その作用機構の解明に興味を持たれる。Vicenistatinはマウス白血病P388やL1210に対しては抗腫瘍効果を示さず、ヒト大腸癌COLO205、Co-3に活性を示すこと、またvicenistatinが新規な骨格を有することから、このような固形癌に特有な未知の機構に作用している可能性が示唆される。そのような機構が見いだされれば、抗腫瘍物質の探索の新たな切り口となりうると考えられる。

現在までのところvicenistatinの抗腫瘍効果は限られた大腸癌にのみ認められ、治療係数も小さいことから、抗腫瘍スペクトルの拡大及び治療係数の向上を目指しての誘導体の合成も必要である。現在臨床で使用されているirinotecan^{7, 8)}(camptotecin誘導体)やetoposide^{9, 10)}(podophyllotoxin誘導体)も誘導体合成の結果見いだされたものであり、より活性の強いvicenistatin誘導体の検討が必要である。

なお、最近NCIとの共同研究において、vicenistatinがヒトメラノーマLOXに対しても増殖抑制活性を有することが判明した(T.G.I.R. 73%)。1996年3月現在、vicenistatinはNCIにおいて前臨床試験を展開中である。

癌という疾患は様々な要因から成り立っており、その克服には多面的なアプローチが必須である。本研究では、マイクロな視点から、癌細胞に対する抗腫瘍剤の特定の作用に注目して、生体内チオールと反応することにより生理活性を示す物質を探索した(チオールの系)。また、マクロな視点から、癌細胞の*in vivo*での増殖形態及び抗腫瘍剤に対する反応に注目して、CFAを用いて大腸癌に特異的に作用する物質を探索した(CFAの系)。本研究が、新しい抗腫瘍抗生物質探索のアプローチの参考となれば幸いである。

実験の部

第1章 機器分析

1) 融点 (MP)

柳本製作所微量融点測定装置を用いて測定した。融点の補正は行っていない。

2) 比旋光度 ($[\alpha]_D$)

日本分光Jasco DIP-140旋光計を使用し、長さ10cmのセルで測定した。

3) 赤外吸収スペクトル (IR)

日本分光Jasco A-3赤外分光計を用いた。

4) 紫外吸収スペクトル (UV)

日立製作所U-3200分光光度計で測定した。

5) FDマススペクトル (FD-MS)

日立製作所M-80質量分析計を用いた。

6) FABマス及び高分解能FABマススペクトル (FAB-MS、HRFAB-MS)

日本電子JMS-SX/SX102A Tandem質量分析計で測定した。グリセロールをマトリックスとして用いた。

7) ^1H 及び ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル (^1H 、 ^{13}C -NMR)

日本電子GX500及び α 500スペクトロメーターを使用した。

8) シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC)

Silica gel 60 F254 プレート (E. Merck) を用いた。検出にはUVランプ (254nm)、あるいはリンモリブデン酸 (モリブデン酸ナトリウム 12g, H_3PO_4 1.5ml, H_2SO_4 25ml, H_2O 500ml) による発色を用いた。

9) カラムクロマトグラフィー

シリカゲルはWako gel C-200 (和光純薬) を用いた。

ゲル濾過ではSephadex LH-20 (ファルマシア) を用いた。

10) HPLC

ポンプ: Liquid Chromatograph Model 510 (Waters)

インジェクター: Injector U6K (Waters)

検出器: UV-VIS Spectrophotometric Detector SPD-6AV (島津製作所)

を使用した。

1) 培地

形態、生育状態の検討と生理学的試験の実施に当たっては Shirling と Gottlieb によって記載された方法⁸⁸⁾及び関連した文献に従った^{89, 90)}。ISPに記載された培地は Difco製の粉末培地を用いた。糖の資化性の判定には、Pridham と Gottlieb によって記載された⁹¹⁾無機塩基礎培地 (ISP No.9, Difco) に糖を1%添加して調製した斜面寒天培地を用いた。

2) 培養と観察

27℃のインキュベーター内で3週間、静置培養を行った後、観察を実施した。コロニー、気菌糸、及びコロニーの裏面の色の判定は、JISによる現代実用色見本帖 (日本色彩) の色彩表記に従った。

3) ジアミノピメリン酸の分析

Lechevalier と Lechevalier の方法⁹²⁾に従い、詳細については成書⁹³⁾を参考にして実施した。

4) 形態

基生菌糸、気菌糸の形態は、光学顕微鏡 (XF-71、ニコン) により観察し、胞子表面の状態などの詳細な観察には走査型電子顕微鏡 (S-800、日立製作所) を用いた。

1) 試薬、タイプカルチャー

Adriamycin, actinomycin D, mitomycin C, herbimycin A はSigmaから購入した。Neocarzinostatinは山ノ内製薬販売のネオカルチノスタチン注「科薬」を使用した。これ以外の抗腫瘍抗生物質については、当研究所で単離された物質を用いた。

マウス由来抗*v-Src*モノクローナル抗体、protein A結合セファロースはOncogene Scienceから購入した。ウサギ由来抗マウスIgG抗体はY Laboratoriesから購入した。エノラーゼはSigmaから購入した。

抗菌試験に使用した菌株はIFOより購入した。Methicillin耐性*Staphylococcus aureus*は群馬大学医学部 井上先生に分与していただいた。

2) *In vitro* 細胞増殖抑制活性

2-1 腫瘍細胞株

試験に使用した各種細胞株は種々の研究機関より購入あるいは分与された細胞である。培地はRPMI 1640培地にpenicillin G 100U/ml, streptomycin 100µg/ml及び牛胎仔血清10%を加えたものを用いた。さらに一部の培養液には、 5×10^{-5} Mの2-メルカプトエタノールを添加した。

2-2 細胞増殖抑制活性測定法: MTT 法

*In vitro*細胞増殖抑制活性はMTT法により測定した。

試験に使用した各種癌細胞懸濁液を 5×10^4 cells/mlとなるように調製し、これを平底96穴マイクロプレートの各ウェルに100µlずつ加えた。メタノールで種々の濃度に調製した被試験物質を2µlずつ各ウェルに加え、5%CO₂インキュベーター内で、

37℃で3日間培養した。培養後、2-3の方法で作製したMTT溶液を10μl/ウェルずつ添加し、さらに4時間培養した。その後、0.04N塩酸を含有したイソプロピルアルコールを100μl/ウェルずつ加え、超音波発生機により細胞を破碎し、細胞内に生じた沈殿色素を溶解させた。各ウエルのOD₅₅₀値をMTP-22型マイクロプレート光度計(測定波長λ₁=550nm、参照波長λ₂=620nm)を用いてOD₅₅₀値を測定した。

2-3 MTT溶液の調製法

MTTをPBS (-)を用いて5mg/mlに懸濁し、超音波により溶解後、4℃で保存した。MTT溶液の調製は実験前日に行った。

2-4 細胞増殖抑制作用

細胞の増殖抑制率は、次の式により算出した。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = [(a) - (b)] / (a) \times 100$$

(a) : 被試験物質無添加ウェルのOD₅₅₀値

(b) : 被試験物質添加ウェルのOD₅₅₀値

尚、薬剤各濃度のOD₅₅₀値は、3ウェルの平均値として求めた。

また、各濃度における増殖抑制率から最少二乗法によりIC₅₀値を算出して求めた。

3) マウス腫瘍に対する *in vivo* 抗腫瘍活性試験

3-1 使用動物

6週令のCDF₁系雌性マウスを使用した。マウスは日本チャールズリバー社より購入した。SPF動物室内で飼育し、水および餌は自由に摂取させた。一群は原則として6匹を使用した。

3-2 マウス腫瘍

P388白血病細胞, L1210白血病細胞を使用した。P388及びL1210細胞はRPMI

1640培地にpenicillin G 100U/ml, streptomycin 100μg/ml及びウシ胎仔血清10%を加えた培養液中で継代維持し、実験に供した。

3-3 抗腫瘍活性の測定

継代維持したP388及びL1210細胞をHank's液で2回洗浄した後、Trypan blue dye exclusion法で生細胞数を計数した。5 × 10⁶ cells/mlとなるようにHank's液で懸濁した細胞を、0.2ml (1 × 10⁶ cells)ずつCDF₁系マウスの腹腔内に移植した。移植後1、5、9日目に、98%生理食塩水、1%DMSO、1%クロモフォア(界面活性剤)に溶解した被試験薬物を0.2ml腹腔内投与し各マウスの生存日数を計測した。

抗腫瘍活性は、薬物投与群のマウスの生存延命効果を指標に行った。即ち、各群のマウスの平均生存日数(mean survival time: M. S. T.)を求め、対照群(生理食塩水投与群)に対する延命率(T/C (%)) T:薬剤投与群のM. S. T., C:対照群のM. S. T.)で示した。

4) ヒト大腸癌腫瘍に対する *in vivo* 抗腫瘍活性試験

4-1 使用動物

ヌードマウス(BALB/c nu/nu、雌、6週令)は日本エスエルシーより購入し、SPF条件下で約1週間予備飼育し、実験に用いた。なお、全期間を通して飼料、水は自由に摂取させた。

4-2 抗腫瘍活性測定

ヌードマウスの皮下で継代移植しているヒト大腸癌腫瘍を切り出し、培地(10%ウシ胎児血清含有RPMI1640)中で約2mm³角の立方体に細切し移植腫瘍片とした。この移植腫瘍片を移植針を用いてヌードマウスの皮下に一匹につき一片ずつ移植した。2~4週間後、移植腫瘍片の体積が約100~300 mm³になった時点で、腫瘍体積の平均

が均一になるように群分けした(1群5匹)。各濃度に調製した被試験薬物の注射溶液(溶媒; 98%生理食塩水、1%DMSO、1%クロモフォア) $10 \mu\text{g}$ を尾静脈より5日間連続投与し、またコントロール群には同量の溶媒を投与して、投与開始日より週2回、約3週間にわたって腫瘍体積と体重を測定した。すなわち、各マウスの皮下に移植した腫瘍の長径[a、(mm)]、短径[b、(mm)]および高さ[c、(mm)]をノギスを用いて測定し、腫瘍体積(TV)= $axbxc/2$ (mm^3)とした。さらにX日目(day X)の相対腫瘍体積(RTV)を $RTV(\text{day X})=TV(\text{day X})/TV(\text{day 1})$ として計算した。Day xにおけるサンプル投与群の腫瘍増殖抑制率[T.G.I.R., (%)]を $T.G.I.R.=[1-\text{サンプル投与群のRTV}(\text{day X})/\text{コントロール群のRTV}(\text{day X})] \times 100$ として求めた。T.G.I.R. 50%以上かつMann-WhitneyのU検定で有意であった場合に有効と判定した。なお、第5章のTable中には腫瘍体積測定期間中に得られたT.G.I.R.値の中で最大の値を記した。

5) *In vitro* 抗菌活性

5-1 接種用菌液の調製

使用した細菌及び酵母は、良く生育したスラントより一白金耳ずつ滅菌したnutrient broth (Difco)、Sabouroud dextrose broth (Difco) (各々 5ml/試験管)へそれぞれ植菌し、細菌は37°Cで、酵母は27°Cで24時間振盪培養した。培養後、生理食塩水を用いて、約 1×10^8 cells/ml の濃度に希釈しこれを接種用菌液とした。

5-2 試料の調製

被試験化合物をメタノールに1mg/mlの濃度となるように溶解し、これを50 μl ずつペーパーディスク(東洋濾紙、thick、8mm)に浸透させた。これを室温で1時間以上乾燥後使用した。

5-3 検定

検定用寒天培地は、細菌にはnutrient agar (Difco)、酵母にはSabouroud dextrose agar (Difco)を使用した。オートクレーブで溶解した各培地は、使用まで45°Cの湯浴中で保存した。これに5-1で調製した接種用菌液を1%添加し、よく攪拌後10mlずつクリーンベンチ中にて120mm径の丸型シャーレに分注した。1時間以上クリーンベンチ中で放置し表面を乾燥させた後、5-2で調製したpaper diskを寒天上に置いた。細菌は37°Cのインキュベーター中で24時間、酵母は27°Cのインキュベーター中で48時間培養後、ペーパーディスクの周囲に生じた阻止円の直径を測定した。

6) RSV/NIH3T3細胞pp60^{src} tyrosine kinase 活性測定法

60mm径の丸型シャーレに 2.5×10^6 個のRSV/NIH3T3細胞を撒き(2mlの5%ウシ胎児血清含有DMEM培地中)一晚培養後、細胞を1mlのPBS(-) (10mM Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含リン酸バッファー、pH7.4)中ラバーポリスマンで剥がし取った。これを15ml遠沈管に移し、1,000rpmで5分間遠心分離し上澄み液を除いた。この沈殿に400 μl の細胞可溶化バッファー(lysis buffer、Table E3-1)を添加し、氷上で30分間細胞を可溶化後、15,000gにて30分間遠心分離を行った。得られた可溶画分に、一次抗体として10 μg のマウス由来抗v-Srcモノクローナル抗体を添加し、15分間毎に3回攪拌し、その後4°Cで一晩インキュベートした。次に二次抗体として、ウサギ由来抗マウスIgG抗体10 μg を添加して4°Cで1時間インキュベートした。さらにprotein A結合セファロース100 μl を添加し、4°Cで1時間インキュベートした後、15,000gで1分間遠心分離し上澄み液を取り除いた。この沈降物に細胞可溶化バッファーを300 μl 加え、15,000gで1分間遠心分離を行い、上澄み液を除く操作を3回繰り返し、免疫複合体沈降物を洗

浄した。ただし、3回目の洗浄の際には、この懸濁液を1.5mlのマイクロテストチューブに分注 (50 μ g protein/チューブ) してから遠心分離した。こうして作成した免疫沈降物を酵素源として、それぞれのチューブに34 μ lの反応バッファー (reaction buffer、Table E3-2)、基質としての6 μ lの0.4mg/mlエノラーゼ及び2mlのテストサンプルを加え、22 $^{\circ}$ Cで10分間プレインキュベート後、10 μ lの[γ - 32 P] ATP (400nCi/チューブ)を添加して22 $^{\circ}$ Cで2分間 *in vitro* kinase 反応を行った。反応はSDS-sample buffer (Table E3-3)を50 μ l添加し、5分間沸騰水に浸して停止させた。このサンプル15 μ lを12.5%アクリルアミドのSDS-PAGEにかけ、オートラジオグラフィーにてチロシンリン酸化エノラーゼ量を測定した。

Table E3-1 Lysis buffer 組成

20mM HEPES
1% TX-100
10% glycerol
0.1mg/ml of leupeptin
1mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)
100 μ M Na ₃ VO ₄
pH 7.4

Table E3-2 Reaction buffer組成

20mM HEPES
1mM MnCl ₂
10mM MgCl ₂
pH 7.4

Table E3-3 SDS sample buffer組成

42mM TRIS
10% glycerol
2.3% SDS
5% 2-mercaptoethanol
0.002% bromo phenol blue

1) Cochleamycin A

外観;	無色粉末
融点 ($^{\circ}$ C);	200~203 (dec.)
[α] _D ²² ;	+107 $^{\circ}$ (c1.0, MeOH)
分子式;	C ₂₁ H ₂₆ O ₆
HRFAB-MS <i>m/z</i> ((M+H) ⁺);	
Calcd:	375.1906
Found:	375.1857
紫外吸収スペクトル;	本文Fig. 2-5に示す。
UV λ_{\max} nm in MeOH (e);	245 (5460)
赤外吸収スペクトル;	Fig. 2-6に示す。
IR (KBr) v cm ⁻¹ ;	3450、2950、1750、1715、1710、1240
¹ H-NMRスペクトル;	本文Fig. 2-7に示す。
¹³ C-NMRスペクトル;	本文Fig. 2-8に示す。
¹ H、 ¹³ C-NMRスペクトルデータ;	本文Table 2-5、Table 2-6に示す。
¹ H- ¹ H NOE差スペクトル;	Fig. E4-1に示す。
¹³ C- ¹ H NOE差スペクトル;	本文Fig. 2-12に示す。
DEPTスペクトル;	Fig. E4-2に示す。
¹ H- ¹ H COSYスペクトル;	Fig. E4-3に示す。
2D C-H相関スペクトル;	Fig. E4-4に示す。
HMBCスペクトル;	Fig. E4-5に示す。

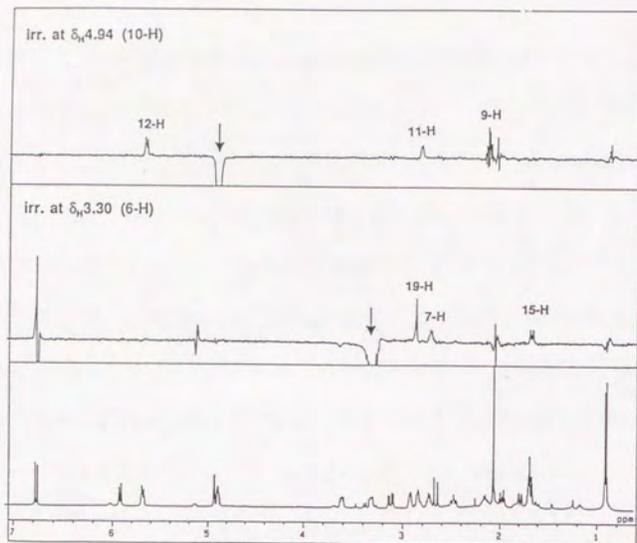


Fig. E4-1. Cochleamycin A (1)のNOE差スペクトル (CDCl₃中)

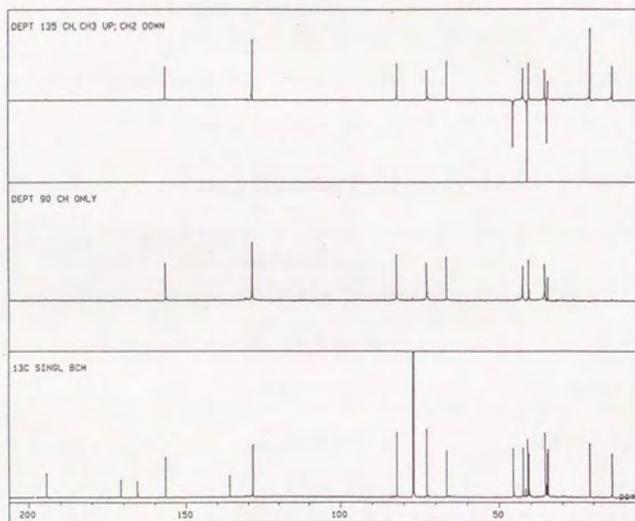


Fig. E4-2. Cochleamycin A (1)のDEPTスペクトル (CDCl₃中)

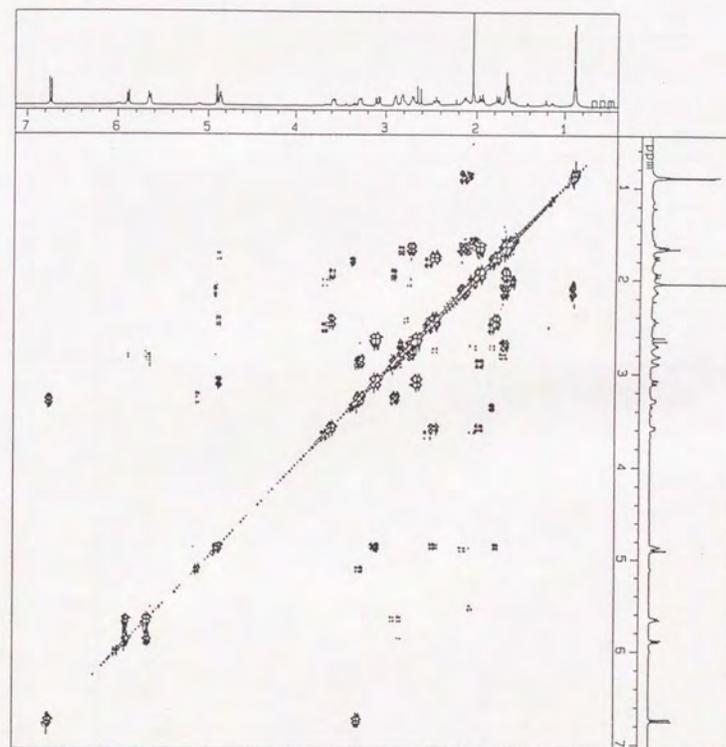


Fig. E4-3. Cochleamycin A (1)の¹H-¹H COSYスペクトル (CDCl₃中)

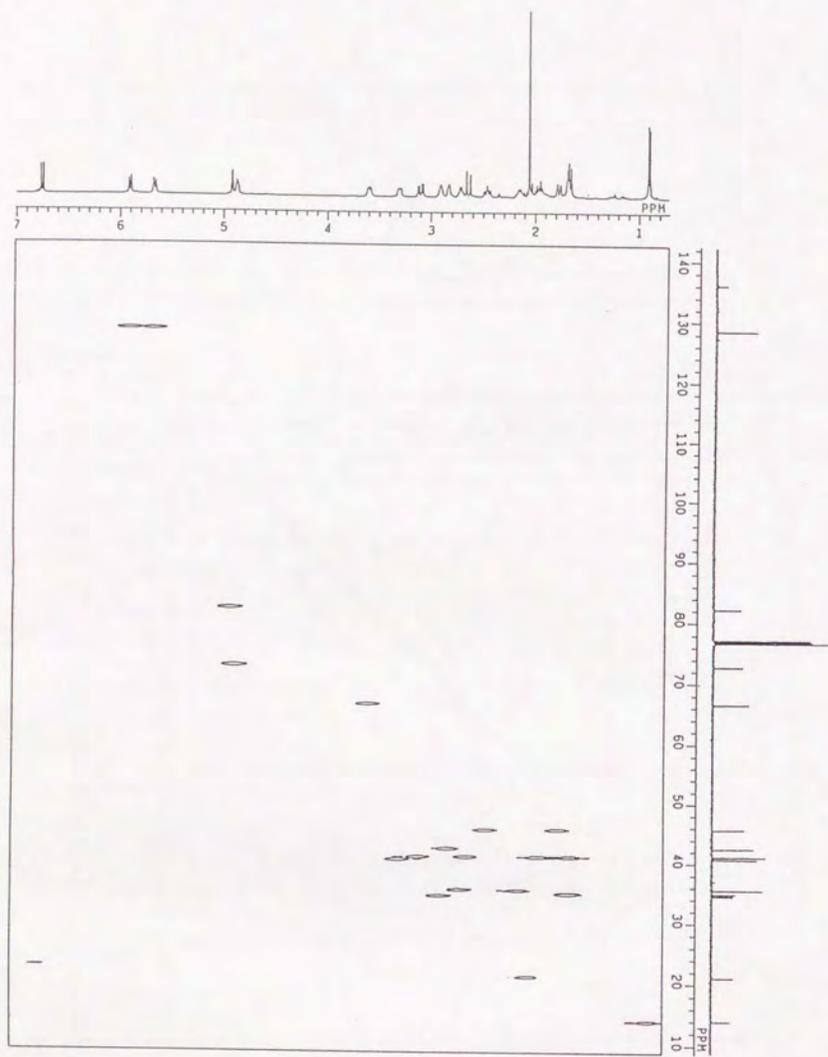


Fig. E4-4. Cochleamycin A (1)の2D CH相関スペクトル (CDCl₃中)

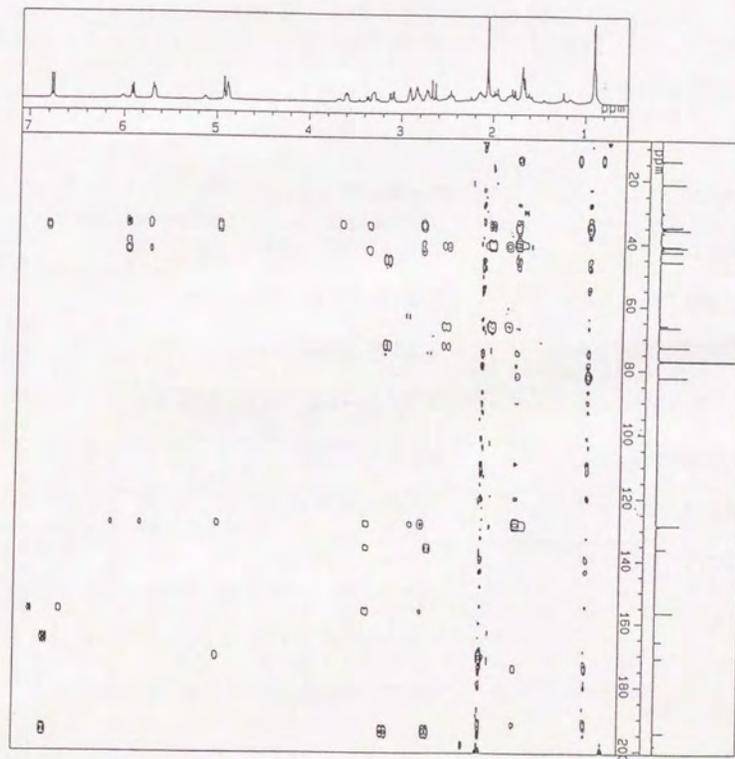


Fig. E4-5. Cochleamycin A (1)のHMBCスペクトル (CDCl₃中)

2) Cochleamycin A2

外観；	無色粉末
融点 (°C)；	214~216 (dec.)
$[\alpha]_D^{22}$ ；	+76° (c 1.0, MeOH)
分子式；	$C_{23}H_{30}O_6$
HRFAB-MS m/z ((M+H) ⁺)；	
Calcd:	403.2063
Found:	403.2092
紫外吸収スペクトル；	Fig. E4-6に示す。
UV λ_{max} nm in MeOH (ϵ)；	246 (4700)
赤外吸収スペクトル；	Fig. E4-7に示す。
IR (KBr) ν cm^{-1} ；	2950、1760、1740、1735、1240
¹ H-NMRスペクトル；	本文Fig. 2-13に示す。
¹³ C-NMRスペクトル；	本文Fig. 2-14に示す。
¹ H、 ¹³ C-NMRスペクトルデータ；	本文Table 2-5、Table 2-6に示す。
2D C-H相関スペクトル；	Fig. E4-8に示す。
HMBCスペクトル；	Fig. E4-9に示す。
NOESYスペクトル；	本文Fig. 2-23に示す。

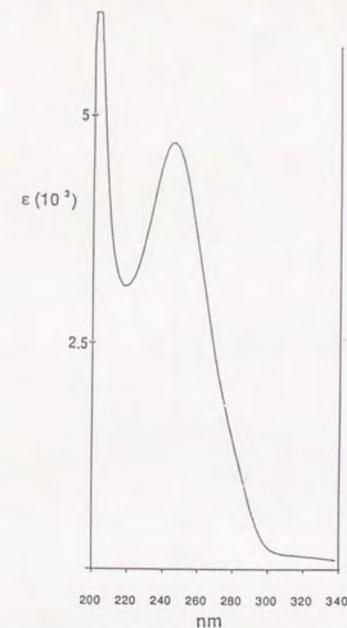


Fig. E4-6. Cochleamycin A2 (2)の紫外吸収スペクトル (メタノール中)

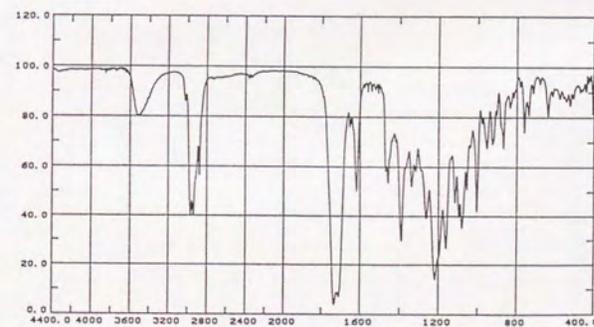


Fig. E4-7. Cochleamycin A2 (2)の赤外吸収スペクトル (KBr法)

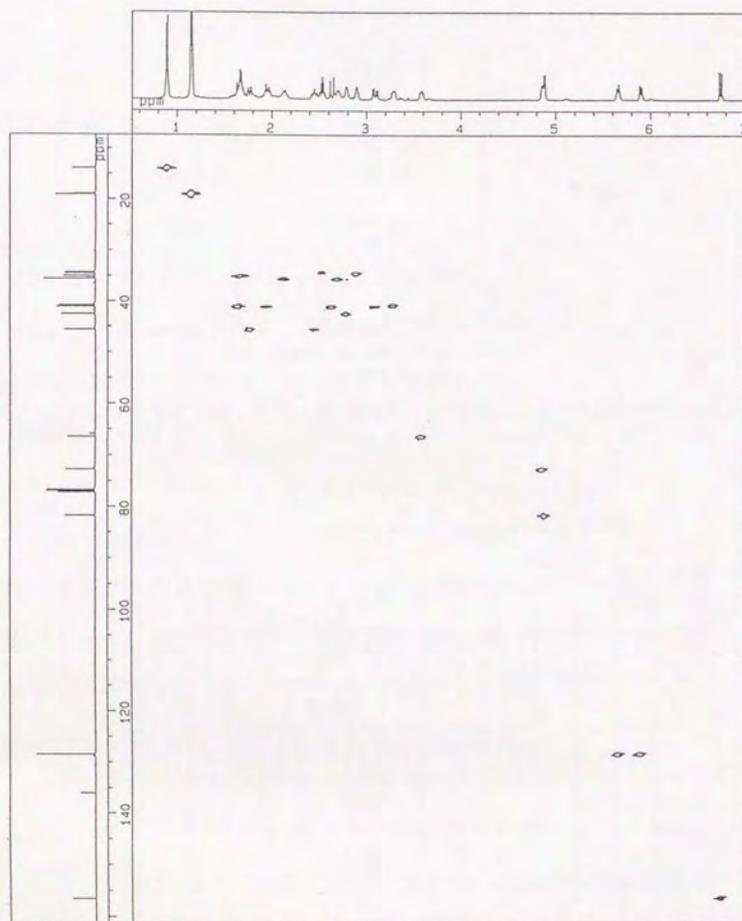


Fig. E4-8. Cochleamycin A2 (2)の2D CH相関スペクトル (CDCl₃中)

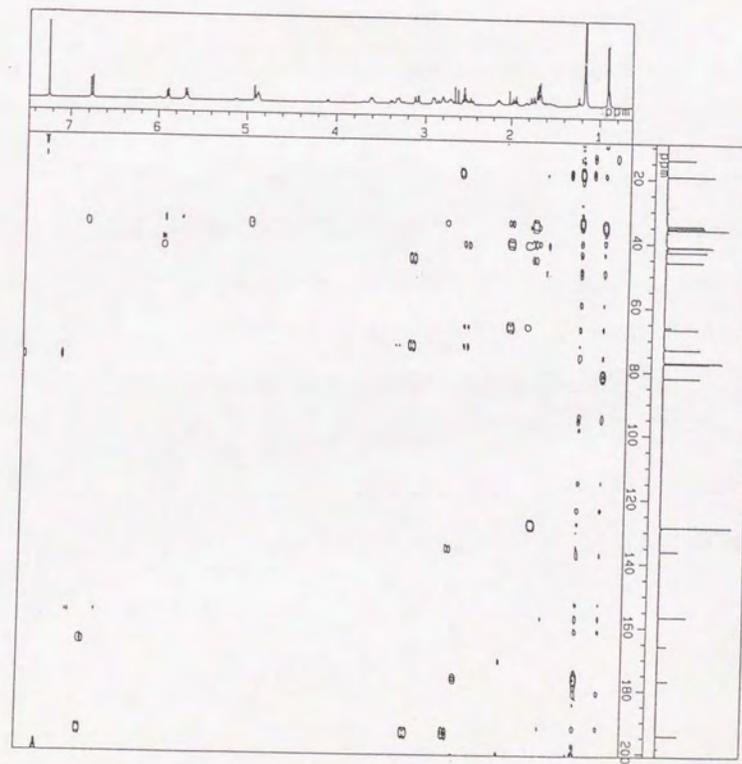


Fig. E4-9. Cochleamycin A2 (2)のHMBCスペクトル (CDCl₃中)

3) Cochleamycin B

外観； 無色粉末
融点 (°C)； 133~135 (dec.)
[α]_D²²； +83° (c0.1, MeOH)
分子式； C₂₁H₂₆O₅
HRFAB-MS *m/z* ((M+H)⁺)；
Calcd: 359.1802
Found: 359.1830
紫外吸収スペクトル； End absorption
赤外吸収スペクトル； Fig. E4-10に示す。
IR (KBr) ν cm⁻¹； 2950、1760、1740、1735、1240
¹H-NMRスペクトル； 本文Fig. 2-16に示す。
¹³C-NMRスペクトル； 本文Fig. 2-17に示す。
¹H、¹³C-NMRスペクトルデータ； 本文Table 2-5、Table 2-6に示す。
¹H-¹H COSYスペクトル； Fig. E4-11に示す。
2D C-H相関スペクトル； Fig. E4-12に示す。
HMBCスペクトル； Fig. E4-13に示す。

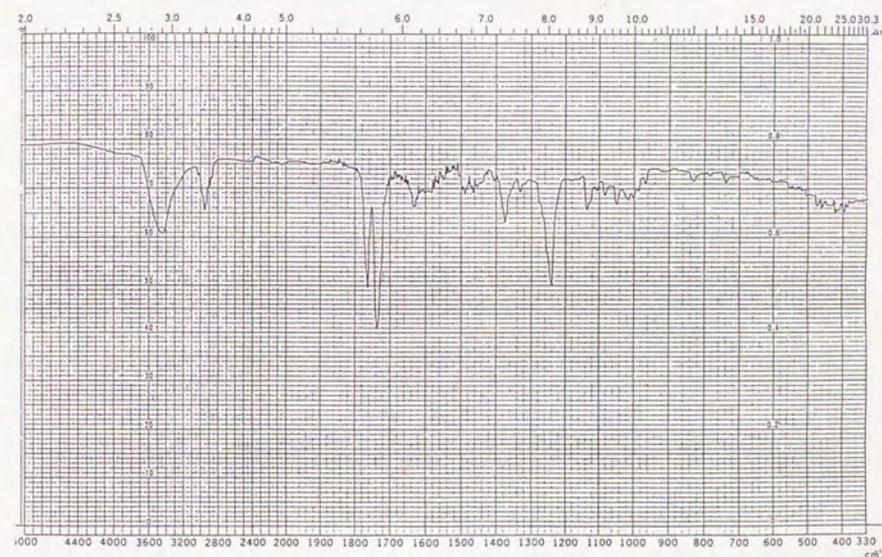


Fig. E4-10. Cochleamycin B (3)の赤外吸収スペクトル (KBr法)

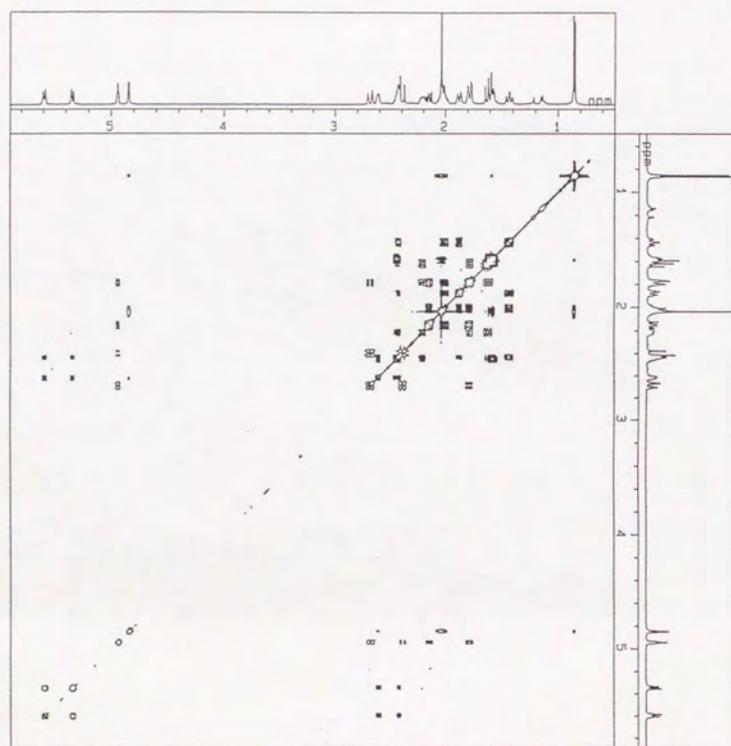


Fig. E4-11. Cochleamycin B (3)の ^1H - ^1H COSYスペクトル (CDCl_3 中)

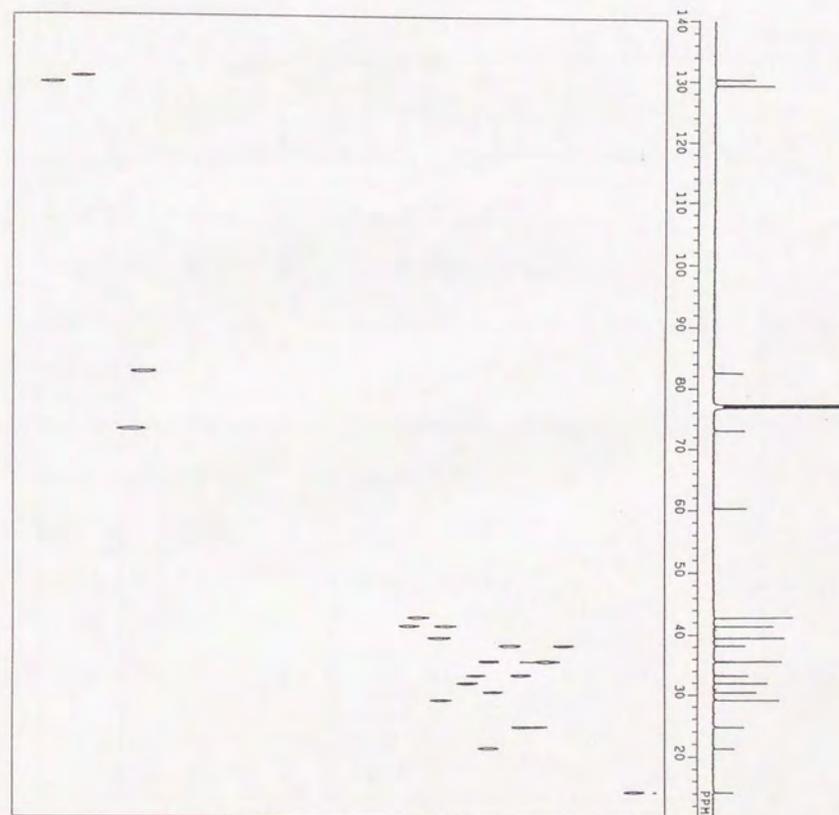
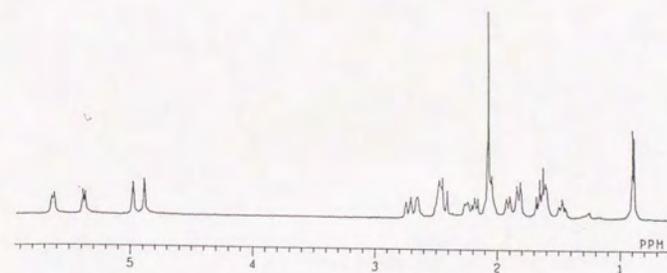


Fig. E4-12. Cochleamycin B (3)の2D CH相関スペクトル (CDCl_3 中)

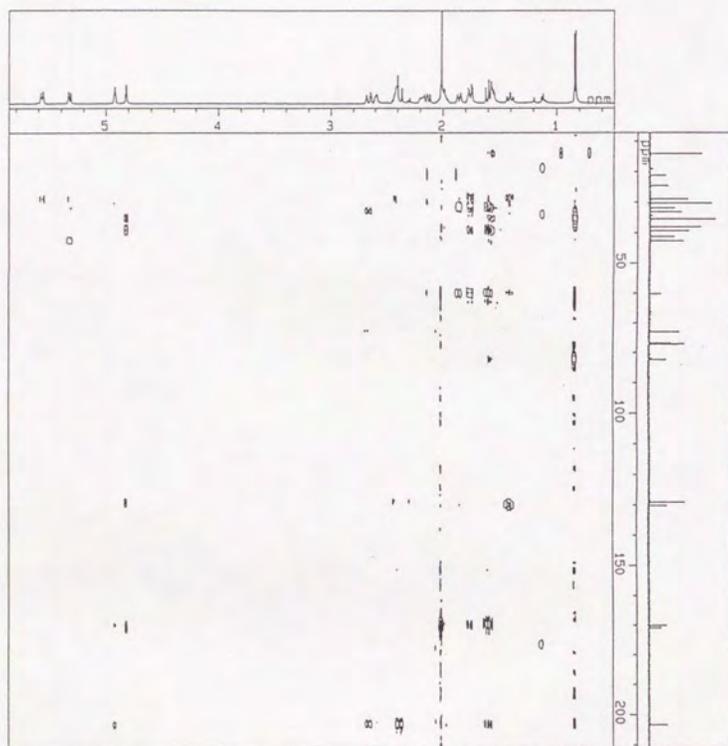


Fig. E4-13. Cochleamycin B (3)のHMBCスペクトル (CDCl₃中)

4) Cochleamycin B2

外観;	無色粉末
融点 (°C);	152~154 (dec.)
[α] _D ²² ;	+104° (c0.1, MeOH)
分子式;	C ₂₃ H ₃₀ O ₅
HRFAB-MS m/z ((M+H) ⁺);	
Calcd:	387.2162
Found:	387.2148
紫外吸収スペクトル;	End absorption
赤外吸収スペクトル;	Fig. E4-14に示す。
IR (KBr) v cm ⁻¹ ;	2930、1761、1730、1701
¹ H-NMRスペクトル;	本文Fig. 2-20に示す。
¹³ C-NMRスペクトル;	本文Fig. 2-21に示す。
¹ H、 ¹³ C-NMRスペクトルデータ;	本文Table 2-5、Table 2-6に示す。
2D C-H相関スペクトル;	Fig. E4-15に示す。
HMBCスペクトル;	Fig. E4-16に示す。
NOESYスペクトル;	本文Fig. 2-24に示す。

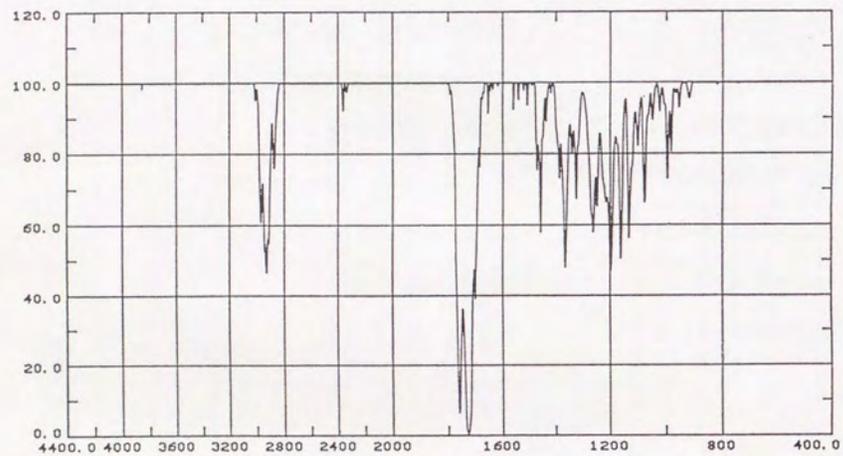


Fig. E4-14. Cochleamycin B2 (4)の赤外吸収スペクトル (KBr法)

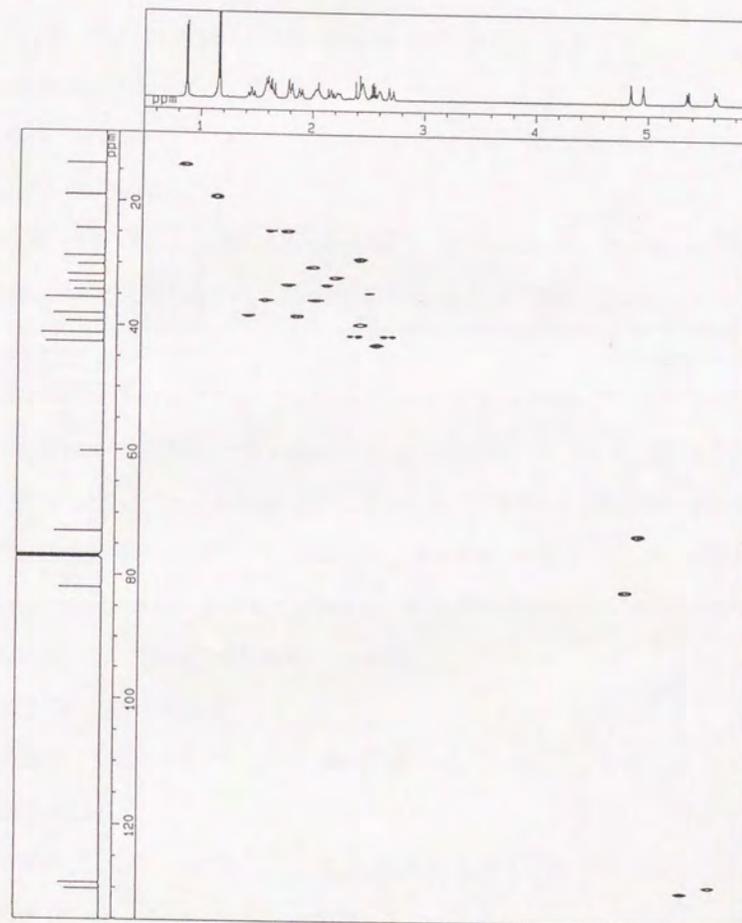


Fig. E4-15. Cochleamycin B2 (4)の2D CH相関スペクトル (CDCl₃中)



Fig. E4-16. Cochleamycin B2 (4)のHMBCスペクトル (CDCl₃中)

5) CochleamycinsのHPLC

Cochleamycins A、A2の精製の際に用いたHPLCの条件は以下の通りである。

カラム：YMC pack ODS AM323 (250mm x 10mm (ID)、山村科学)

展開溶媒：75%メタノール水溶液

流速：3ml/min

検出：紫外吸収254nm

上記の条件でHPLCを行いcochleamycins A、A2を精製した。Cochleamycins A、A2は、それぞれ保持時間7.2、10.5分の単一ピークとして溶出された。

6) Cochleamycin A の2-メルカプトエタノール 付加体の調製

Cochleamycin A (1) 10mgを2mlのメタノールに溶解し、これに3.8μl (2当量)の2-メルカプトエタノールを添加した後、攪拌しながら室温で5分間反応させた。反応物を減圧下で濃縮し、得られた濃縮物をシリカゲルカラムを用いて、クロロホルム-メタノール (15:1)を溶出液として精製し、1の2-メルカプトエタノール 付加体 (6) (8.5mg、収率 70.3%)を無色粉末として得た。

以下に6の理化学的性質を示す。

外観；	無色粉末
融点 (°C)；	140~142 (dec.)
分子式；	C ₂₃ H ₃₂ O ₇ S
FAB-MS <i>m/z</i> ((M+H) ⁺)；	453
紫外吸収スペクトル；	Fig. E4-17に示す。
UV λ _{max} nm in MeOH (ε)；	274 (5400)
赤外吸収スペクトル；	Fig. E4-18に示す。

IR (KBr) ν cm^{-1} ; 3412、2929、1732、1716、1668、1255
 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル; 本文 Fig. 2-37 に示す。
 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル; 本文 Fig. 2-38 に示す。
 ^1H 、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルデータ; 本文 Table 2-10 に示す。
 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ スペクトル; Fig. E4-19 に示す。
2D C-H 相関スペクトル; Fig. E4-20 に示す。
HMBC スペクトル; Fig. E4-21 に示す。

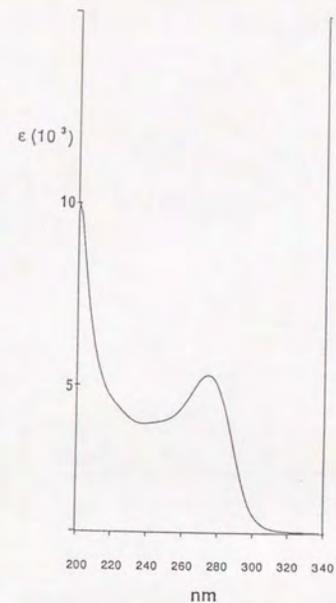


Fig. E4-17. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール 付加体 (6) の紫外吸収スペクトル (メタノール中)

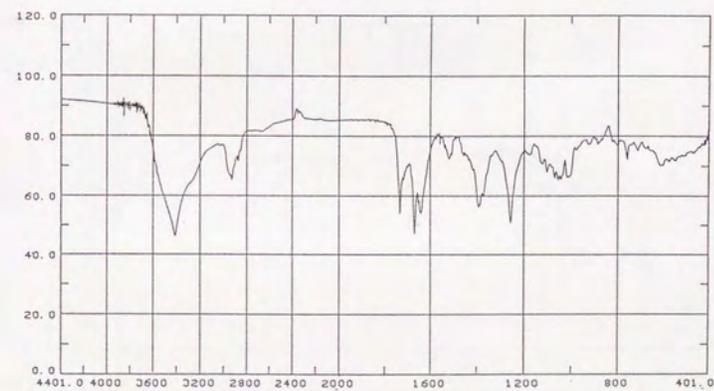


Fig. E4-18. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール 付加体 (6) の赤外吸収スペクトル (KBr法)

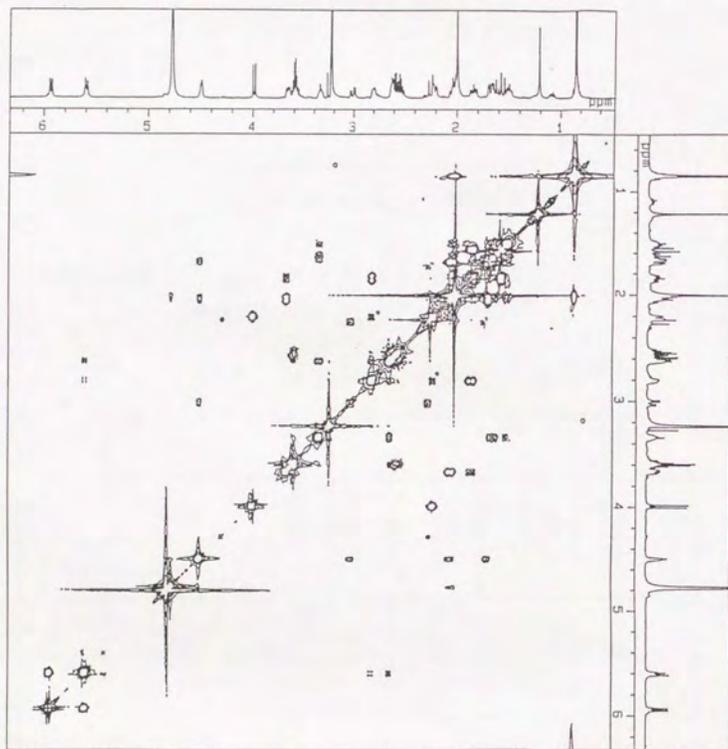


Fig. E4-19. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール 付加体 (6)の ^1H - ^1H COSYスペクトル (CD_3OD 中)

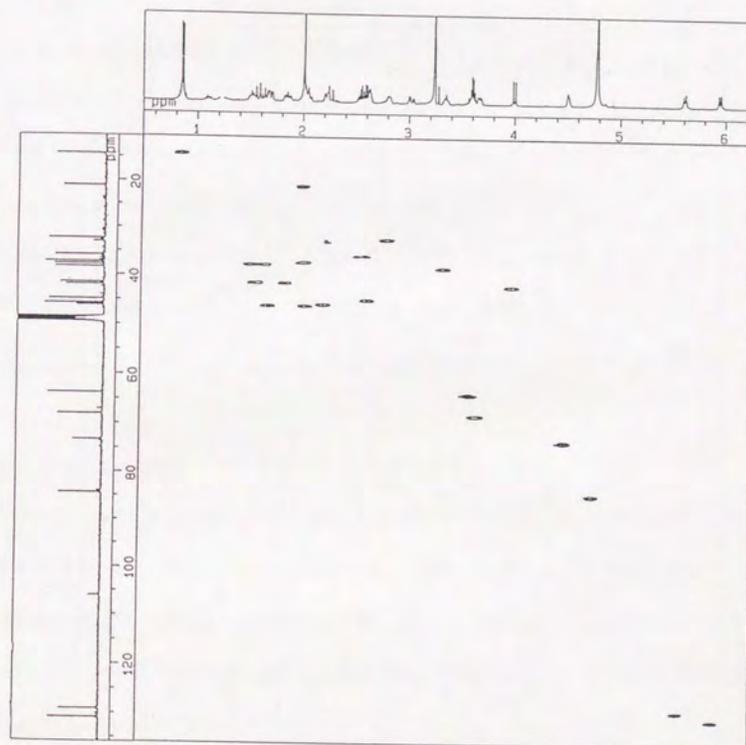


Fig. E4-20. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール 付加体 (6)の2D CH相関スペクトル (CD_3OD 中)

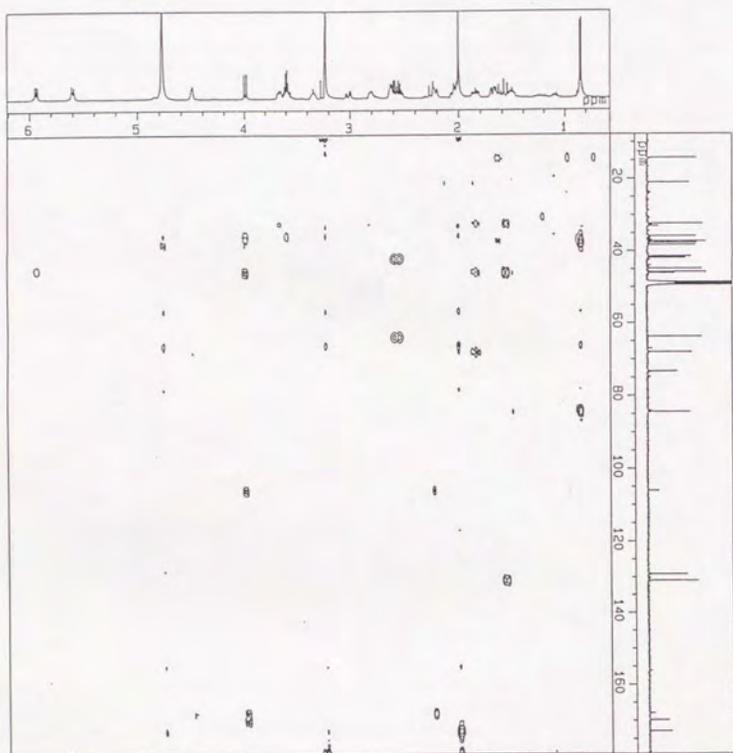


Fig. E4-21. Cochleamycin A 2-メルカプトエタノール 付加体 (6) の HMBCスペクトル (CD₃OD中)

7) Cochleamycin A2の2-メルカプトエタノール付加体の調製

方法は5)に準拠した。6.3mgのcochleamycin A2より2-メルカプトエタノール付加体 (7) (5.8mg、収率77.0%)を無色粉末として得た。

以下に7の理化学的性質を示す。

外観；	無色粉末
融点 (°C)；	102~104 (dec.)
分子式；	C ₂₅ H ₃₆ O ₇ S
FAB-MS <i>m/z</i> ((M+H) ⁺)；	481
紫外吸収スペクトル；	Fig. E4-22に示す。
UV λ _{max} nm in MeOH (ε)；	245 (5100), 272 (5200)
赤外吸収スペクトル；	Fig. E4-23に示す。
IR (KBr) ν cm ⁻¹ ；	3419, 2937, 1728, 1668, 1388
¹ H-NMRスペクトル；	本文Fig. 2-42に示す。
¹³ C-NMRスペクトル；	本文Fig. 2-43に示す。

8) Cochleamycin A のL-システイン付加体の調製

Cochleamycin A (1) 8mgを2mlの50%メタノールに溶解し、これに水に溶解した5mg (2当量)のL-システインを添加した後、攪拌しながら室温で5分間反応させた。反応物を減圧下で濃縮し、得られた濃縮物をシリカゲルカラムを用いて、クロロホルム-メタノール (2:1)を溶出液として精製し、1のL-システイン反応物 (2.1mg、収率19.8%)を無色粉末として得た。

¹H-NMRスペクトル； 本文Fig. 2-44に示す。

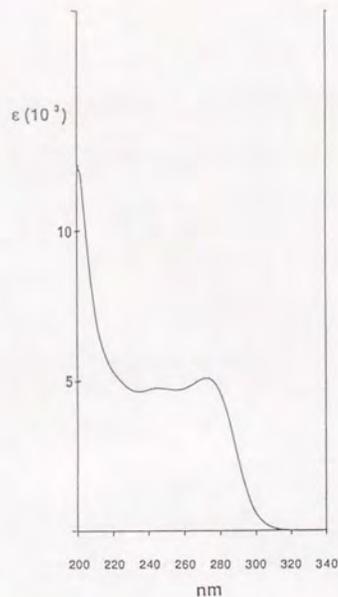


Fig. E4-22. Cochleamycin A2 2-メルカプトエタノール 付加体 (7) の紫外吸収スペクトル (メタノール中)

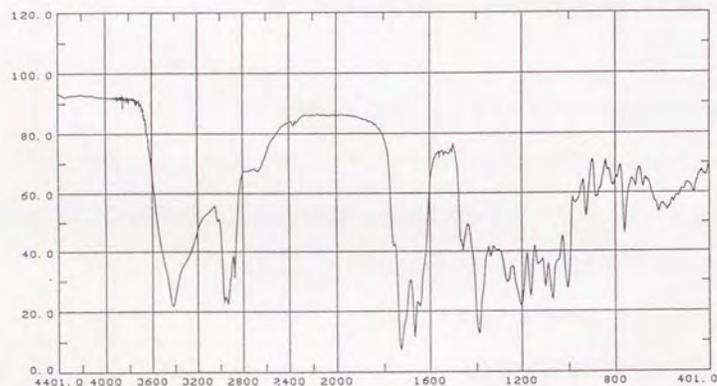


Fig. E4-23. Cochleamycin A2 2-メルカプトエタノール 付加体 (7) の赤外吸収スペクトル (KBr法)

9) 生合成実験

9-1 試薬

[1-¹³C]、[2-¹³C]、[1,2-¹³C]酢酸ナトリウム、[3-¹³C]プロピオン酸ナトリウム、[2,3,4,5-²H]D,L-バリンはMSD Isotope社より購入した。

9-2 培養

滅菌済み生産培地100mlを含むイボ付き500ml Erlenmeyerフラスコ10本に、*Streptomyces* sp. DT136株をスラントより一白金耳ずつ接種し、27℃で48時間培養した。ここにろ過滅菌済み (バリンは1g/30ml蒸留水、それ以外は1g/10ml蒸留水) の各種標識体を100mg/フラスコとなるように添加した。さらに72時間培養後、第2章に示した精製法でcochleamycinsを精製した。

9-3 結果

[¹³ C]-cochleamycin Aの ¹³ C-NMRスペクトル	Fig. E4-24に示す。
[¹³ C]-cochleamycin A2の ¹³ C-NMRスペクトル	Fig. E4-25に示す。
[¹³ C]-cochleamycins A, Bの ¹³ C-NMRスペクトルデータ	本文Table 2-7に示す。
[¹³ C]-cochleamycin Bの ¹³ C-NMRスペクトル	Fig. E4-26に示す。
[¹³ C]-cochleamycin B2の ¹³ C-NMRスペクトル	Fig. E4-27に示す。
[¹³ C]-cochleamycins A2, B2の ¹³ C-NMRスペクトルデータ	本文Table 2-8に示す。
[² H]-cochleamycin A2の ² H-NMRスペクトル	本文Fig. 2-36に示す。

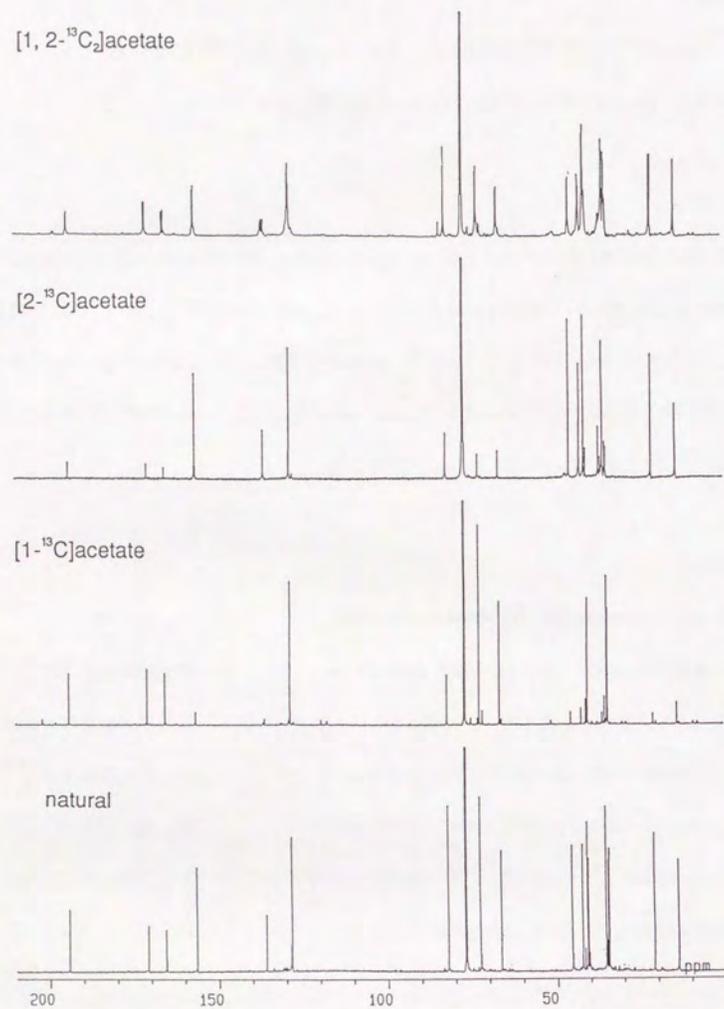


Fig. E4-24. [¹³C]-cochleamycin Aの¹³C-NMRスペクトル

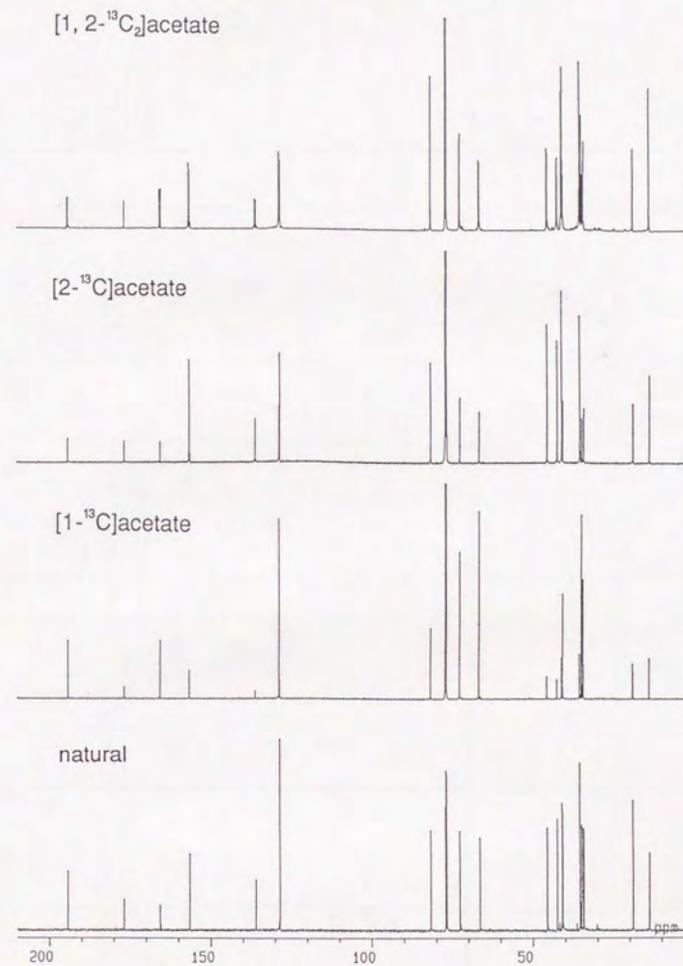


Fig. E4-25. [¹³C]-cochleamycin A2の¹³C-NMRスペクトル

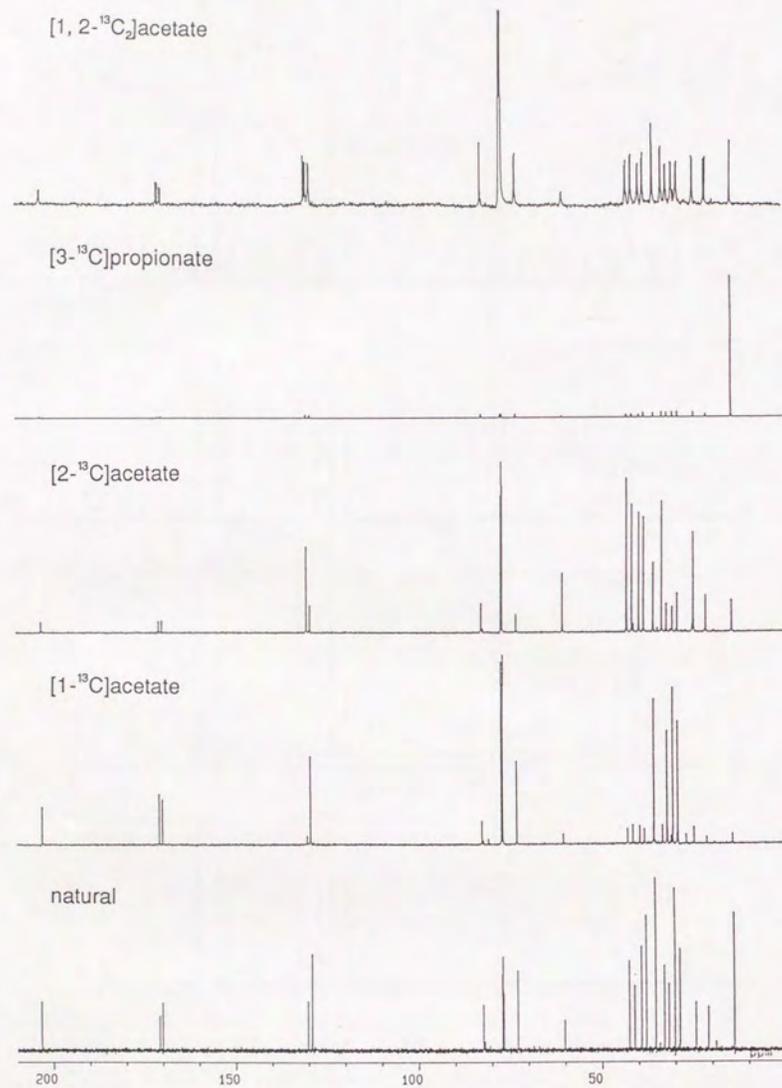


Fig. E4-26. $[^{13}\text{C}]$ -cochleamycin Bの ^{13}C -NMRスペクトル

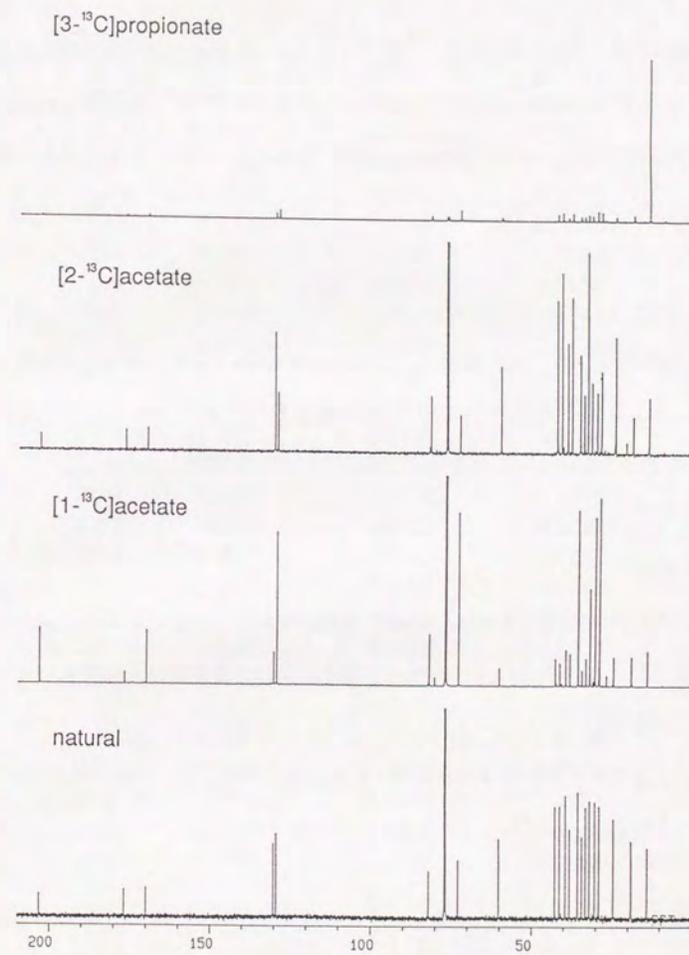


Fig. E4-27. $[^{13}\text{C}]$ -cochleamycin B2の ^{13}C -NMRスペクトル

10) コンピューターによる cochleamycin A の溶液中コンフォメーションの推定

10-1 使用機種

分子力場計算、構造最適化計算、コンフォメーション発生、分子動力学計算及び分子モデル表示のためのコンピューターグラフィクスは、Silicon Graphics社 IRIS-Indigo2コンピューター上でSybyl (米国Tripos社)パッケージを利用して実施した。分子力場はTripos力場⁵¹⁾を使用した。

10-2 方法

詳しくは本文第2章、第8節に記した。cochleamycin Aと同じ相対立体配置を有するコンフォメーションとしてR100、R400が得られた。またC-9の立体の異なる想定化合物(5)のコンフォメーションとしてはR100'、R400'が得られた。

10-3 結果

10-2で得られたR100、R400、R100'、R400'について、各原子の座標軸上の位置及び計算されたそれぞれのエネルギーを記す。なお、各炭素原子のナンバリングについては本文Fig.2-1に示したものと同一である。酸素原子のナンバリングは、その酸素原子に結合した炭素原子のナンバーを賦したものとした。結合する炭素原子が2つ存在する場合は、小さいほうのナンバーを採用した。

<R100>

1) 原子座標

Position	X	Y	Z
C-1	-5.9085	-3.9800	5.7702
C-3	-6.9840	-1.9862	6.3393
C-4	-5.8740	-1.7608	7.2827
C-5	-5.1821	-0.6263	7.4470
C-6	-5.3199	0.5824	6.5556
C-7	-4.9570	1.8795	7.3333
C-8	-5.2923	3.2095	6.5899
C-9	-4.0185	4.0970	6.6652
C-10	-3.1933	3.4801	7.8240
C-11	-3.4543	1.9552	7.7136
C-12	-2.5273	1.2680	6.7389
C-13	-2.9352	0.5614	5.6774
C-14	-4.3866	0.3665	5.3215
C-15	-4.6192	-0.9783	4.5489
C-16	-3.8886	-2.2618	5.0895
C-17	-4.6816	-3.5953	4.8691
C-18	-5.6077	-4.2661	7.2736
C-19	-5.5005	-2.9702	8.0230
C-20	-3.2455	4.1376	5.3158
C-21	-1.0325	3.4540	8.7365
C-22	0.4252	3.7933	8.5838
O-1	-7.0507	-3.1125	5.6201
O-3	-7.8720	-1.1604	6.2084
O-10	-1.8055	3.8578	7.7175
O-16	-3.3774	-2.1442	6.4273
O-19	-5.0964	-2.9293	9.1740
O-21	-1.4459	2.8620	9.7218

2) エネルギー

Bond stretching Energy:	2.174
Angle Bending Energy:	15.364
Torsional Energy:	20.248
Out of Plane bending Energy:	0.446
1-4 van der Waals Energy:	4.787
Van der Waals Energy:	5.849
Total Energy:	48.868 kcal/mol

<R400>

1) 原子座標

Position	X	Y	Z
C-1	-6.0303	-4.1496	5.8522
C-3	-7.0615	-2.1787	6.5648
C-4	-5.8191	-1.9036	7.3082
C-5	-5.1469	-0.7463	7.3402
C-6	-5.4684	0.4422	6.4697
C-7	-5.0024	1.7517	7.1649
C-8	-5.4123	3.0559	6.4413
C-9	-4.6058	4.0987	7.2411
C-10	-3.2028	3.4413	7.3929
C-11	-3.4620	1.8981	7.3128
C-12	-2.7188	1.2109	6.1838
C-13	-3.2836	0.4926	5.2037
C-14	-4.7640	0.2362	5.0927
C-15	-5.0682	-1.1343	4.3928
C-16	-4.2109	-2.3809	4.8226
C-17	-4.9815	-3.7439	4.7561
C-18	-5.4761	-4.3994	7.2885
C-19	-5.2890	-3.0873	7.9924
C-20	-4.5891	5.5011	6.5765
C-21	-1.0348	3.8009	6.4350
C-22	-0.3638	3.3653	7.7211
O-1	-7.2097	-3.3201	5.8824
O-3	-7.9838	-1.3806	6.5703
O-10	-2.3720	3.9151	6.3097
O-16	-3.4875	-2.2198	6.0536
O-19	-4.7017	-3.0129	9.0599
O-21	-0.3455	4.0916	5.4707

2) エネルギー

Bond stretching Energy:	2.352
Angle Bending Energy:	18.221
Torsional Energy:	20.137
Out of Plane bending Energy:	0.446
1-4 van der Waals Energy:	4.808
Van der Waals Energy:	7.208
Total Energy:	53.171 kcal/mol

<R100>

1) 原子座標

Position	X	Y	Z
C-1	-5.8610	-3.9434	5.6857
C-3	-6.9730	-2.0072	6.3700
C-4	-5.8519	-1.7998	7.3051
C-5	-5.1852	-0.6573	7.5127
C-6	-5.3687	0.5838	6.6769
C-7	-5.0497	1.8575	7.5082
C-8	-5.3985	3.1965	6.7890
C-9	-4.0459	3.9316	6.6307
C-10	-3.2806	3.4917	7.9060
C-11	-3.5458	1.9648	7.8917
C-12	-2.6028	1.2900	6.9197
C-13	-2.9886	0.6286	5.8221
C-14	-4.4335	0.4548	5.4340
C-15	-4.6537	-0.8517	4.5940
C-16	-3.8926	-2.1486	5.0573
C-17	-4.6626	-3.4851	4.7809
C-18	-5.5249	-4.2937	7.1681
C-19	-5.4363	-3.0337	7.9791
C-20	-4.2091	5.4587	6.4129
O-1	-7.0255	-3.0981	5.5974
O-3	-7.8847	-1.2004	6.2958
O-10	-3.8812	3.9971	9.1192
O-16	-3.3649	-2.0925	6.3928
O-19	-5.0132	-3.0383	9.1240
O-21	-2.6850	5.9081	8.8759

2) エネルギー

Bond stretching Energy:	2.238
Angle Bending Energy:	14.227
Torsional Energy:	21.682
Out of Plane bending Energy:	0.426
1-4 van der Waals Energy:	5.135
Van der Waals Energy:	4.364
Total Energy:	48.071 kcal/mol

<R400'>

1) 原子座標

Position	X	Y	Z
C1	-6.0154	-4.1384	5.6526
C3	-7.0864	-2.1783	6.3334
C4	-5.9196	-1.9491	7.2053
C5	-5.2419	-0.8029	7.3454
C6	-5.4691	0.4158	6.4878
C7	-5.1296	1.6977	7.2977
C8	-5.6453	3.0242	6.6924
C-9	-4.7761	4.0977	7.3935
C-10	-3.3615	3.4618	7.3237
C-11	-3.6069	1.9320	7.5140
C-12	-2.6950	1.1507	6.5953
C-13	-3.1182	0.4112	5.5634
C-14	-4.5759	0.2457	5.2189
C-15	-4.8392	-1.0820	4.4241
C-16	-4.0685	-2.3745	4.8854
C-17	-4.8603	-3.7109	4.6791
C-18	-5.6092	-4.4475	7.1266
C-19	-5.4729	-3.1642	7.8932
C-20	-5.2122	4.3764	8.8596
C-21	-1.9682	5.1555	8.3296
C-22	-2.3504	6.1920	7.2944
O-1	-7.1801	-3.2906	5.5961
O-3	-7.9983	-1.3700	6.2813
O-10	-2.4273	3.8885	8.3404
O-16	-3.4788	-2.2906	6.1934
O-19	-4.9889	-3.1361	9.0134
O-21	-1.2088	5.4806	9.2281

2) エネルギー

Bond stretching Energy:	2.447
Angle Bending Energy:	17.582
Torsional Energy:	19.798
Out of Plane bending Energy:	0.445
1-4 van der Waals Energy:	4.798
Van der Waals Energy:	4.800
Total Energy:	49.870 kcal/mol

第5章 Vicenistatin に関する実験

1) Vicenistatin

外観;	無色粉末
融点 (°C);	151~153 (dec.)
$[\alpha]_D^{22}$;	-3° (c0.1, MeOH)
分子式;	$C_{30}H_{48}N_2O_4$
HRFAB-MS m/z ((M+H) ⁺);	
Calcd:	501.3692
Found:	501.3697
紫外吸収スペクトル;	本文Fig. 4-5に示す。
UV λ_{max} nm in MeOH (ϵ);	235 (35000)、240 (35800)、268 (13700)
赤外吸収スペクトル;	本文Fig. 4-6に示す。
IR (KBr) ν cm^{-1} ;	3400、3300、2920、1655、1625、1540、990
¹ H-NMRスペクトル;	本文Fig. 4-7に示す。
¹³ C-NMRスペクトル;	本文Fig. 4-8に示す。
¹ H、 ¹³ C-NMRスペクトルデータ;	本文Table 4-5に示す。
NOE差スペクトル;	Fig. E5-1に示す。
DEPTスペクトル;	Fig. E5-2に示す。
¹ H- ¹ H COSYスペクトル;	Fig. E5-3に示す。
2D C-H相関スペクトル;	Fig. E5-4に示す。
HMBCスペクトル;	Fig. E5-5に示す。

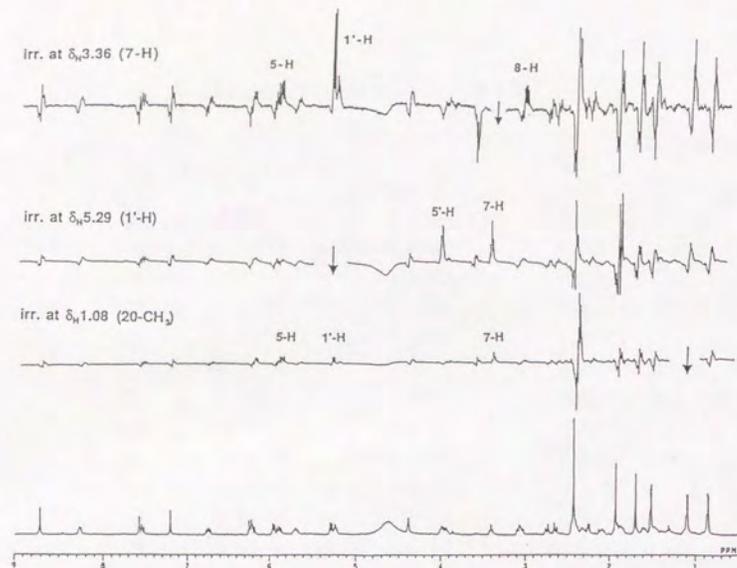


Fig. E5-1. VicenistatinのNOE差スペクトル (pyridine- d_5 中)

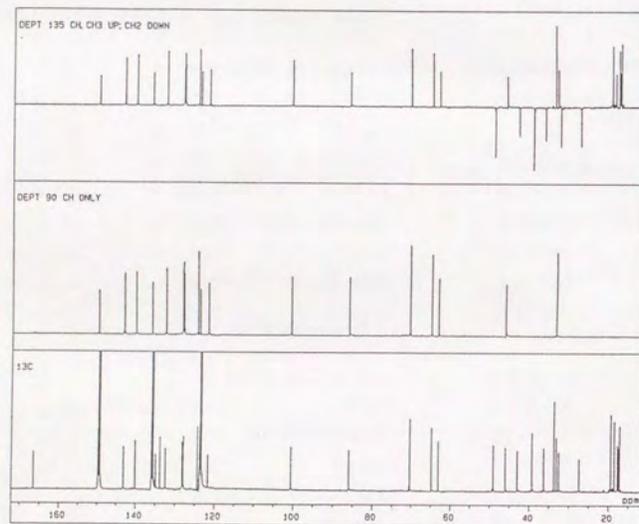


Fig. E5-2. VicenistatinのDEPTスペクトル (pyridine- d_5 中)

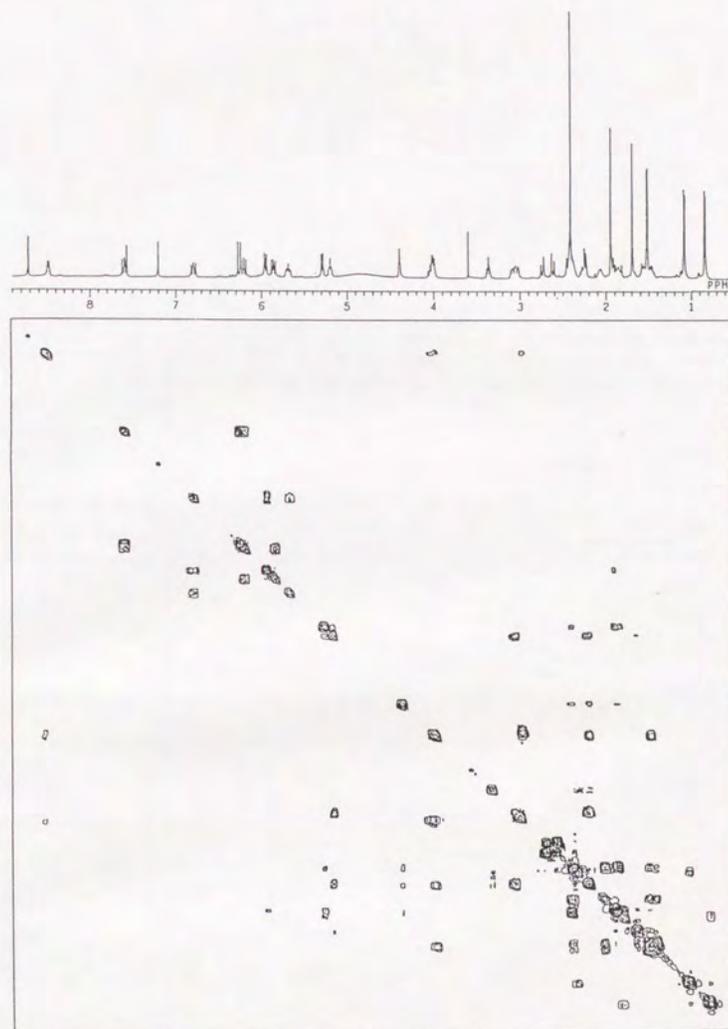


Fig. E5-3. Vicenistatinの ^1H - ^1H COSYスペクトル (pyridine- d_5 中)

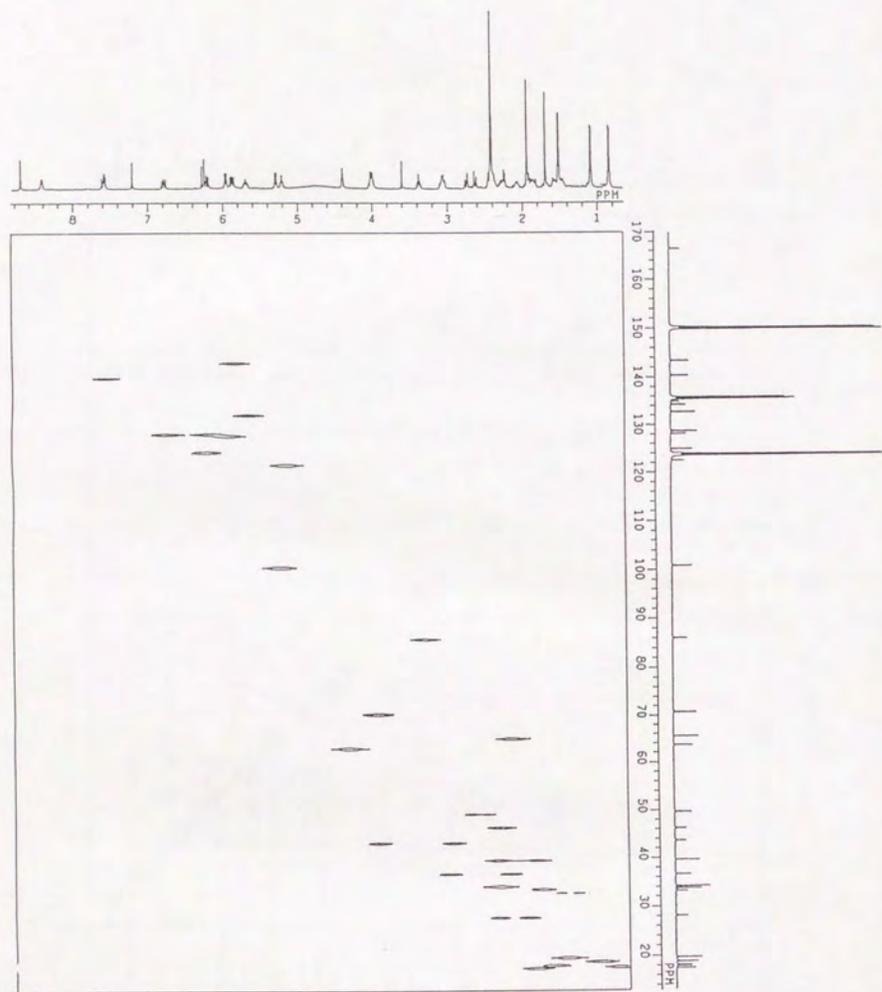


Fig. E5-4. Vicenistatinの2D CH相関スペクトル (pyridine- d_5 中)

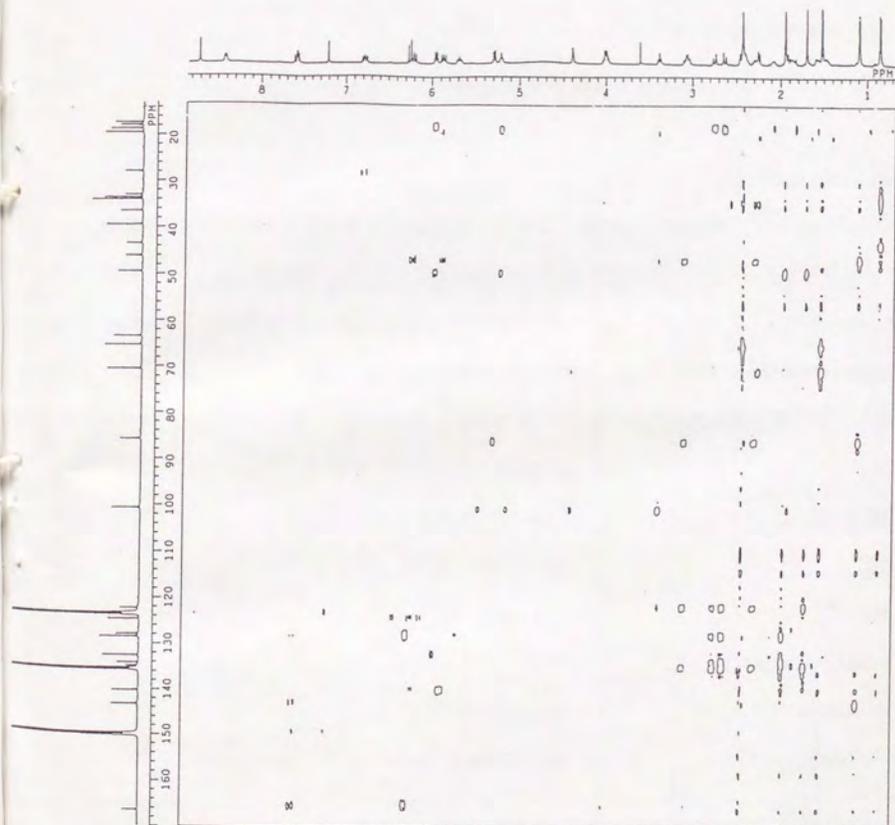


Fig. E5-5. VicenistatinのHMBCスペクトル (pyridine- d_5 中)

2) Vicenistatin のHPLC

Streptomyces sp. HC34株のvicenistatin生産性の経時変化を測定するため、以下のHPLC条件にて、培養菌体中のvicenistatin含量を定量した。

カラム：YMC AM-312 (150mm x 6mm (ID)、山村科学)

展開溶媒：80%MeOH

流速：1ml/min

検出：紫外吸収254nm

上記の条件でvicenistatinは保持時間 8.7分の単一ピークとして溶出された。

3) Vicenistatin のメタノリシス

Vicenistatin (1) 50mgを5% 塩酸-メタノール(10ml)に溶解し、100°Cで40分間還流しながら反応させた。反応液を減圧下で濃縮し、得られた濃縮物をシリカゲルカラムを用いて、クロロホルム-メタノール (5:1)を溶出液として精製し、methyl β -D-vicenisaminide (3)(9.2mg、収率57%)を無色粉末として得た。

以下に3の理化学的性質を示す。

外観；	無色粉末
融点 (°C)；	183~185 (dec.)
$[\alpha]_D^{24}$	-47° (c 0.4, H ₂ O)
分子式；	C ₈ H ₁₇ NO ₃
FD-MS m/z ((M) ⁺)；	175
¹ H-NMRスペクトル；	Fig. E5-6に示す。
¹³ C-NMRスペクトル；	Fig. E5-7に示す。

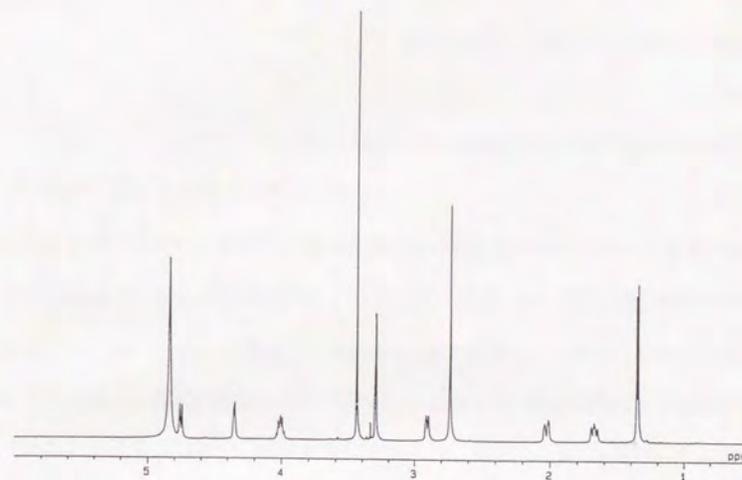


Fig. E5-6. Methyl β -D-vicenisaminide (3)の¹H-NMRスペクトル (CD₃OD中)

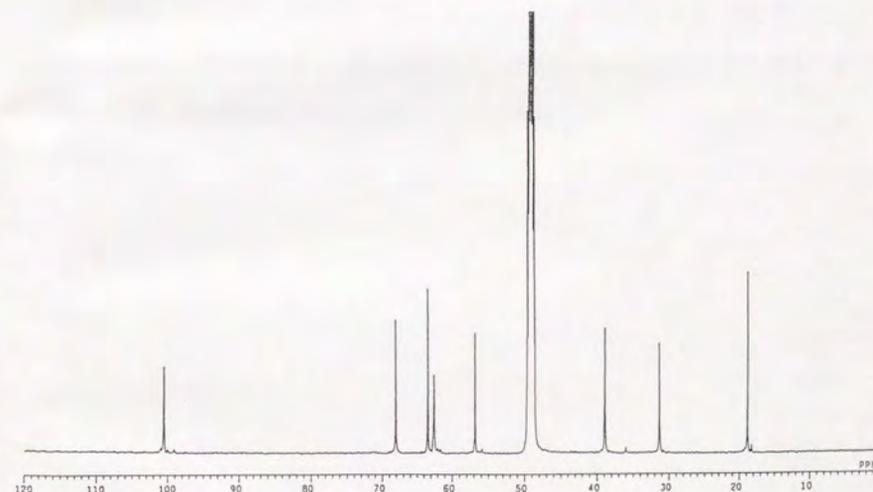


Fig. E5-7. Methyl β -D-vicenisaminide (3)の¹³C-NMRスペクトル (CD₃OD中)

4) 2の絶対立体配置の決定 (TACu法)

4-1 試薬

Tetraamine copper(II) sulfate はSigmaより購入した。

4-2 測定

HPLC用蒸留水10mlに3を4mg溶解した溶液を調製し、水銀ランプを用いて435nmにおける旋光度 ($[\alpha]_{435}^{24}$ c 0.04, H₂O)を測定した。またHPLC用蒸留水10mlに、3を4mgとtetraamine copper(II) sulfate 0.395gを溶解した溶液を調製し、同様に435nmにおける旋光度 ($[\alpha]_{435}^{24}$ c 0.04, tetraamine copper(II) sulfate)を測定した。 $\Delta[M]_{TACu}$ は以下の式により算出した。

$$\Delta[M]_{TACu} = ([\alpha]_{435}^{24} \text{ tetraamine copper(II) sulfate} - [\alpha]_{435}^{24} \text{ H}_2\text{O}) \times 175 \text{ (3の分子量)} / 100$$

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所 瀬戸治男教授に深く感謝いたします。

また本研究に際し、御指導、御援助をいただきました慶応義塾大学理工学部 井本正哉助教授ならびに宇井英明博士、東京工業大学理学部 柿沼勝巳教授に深謝いたします。

本研究を行う機会をお与え下さいましたキリンビール株式会社専務取締役 (医薬事業本部長) 故笹原徹博士、医薬探索研究所所長 福島英明博士に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり有益な御助言、御援助をいただきましたキリンビール株式会社医薬事業本部 望月順一郎博士、河合弘行博士、医薬探索研究所 榊原和征博士、伊澤敏雄博士、内田丈士博士、小林栄一氏、飯島洋博士に深謝いたします。

さらに種々の御助言、御協力をいただきましたキリンビール株式会社、浦田哲郎氏、小田川淳雄氏、肥塚靖彦博士、磯江敏幸博士、加藤慎一郎博士、上正原勝博士、松岡道子氏はじめ医薬探索研究所の皆様、とりわけ有機化学G天然物の皆様に心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Frei, E. III: *Cancer*, **50**, 1979~1992 (1982)
- 2) Frei, E. III, Antman, K., Teicher, B., Eder, P. and Schnipper, L.: *J. Clin. Onc.*, **7**, 515~526 (1989)
- 3) Webb, J. S., Conculich, D. B., Mowat, J. H., Patrick, J. B. Broschard, R. W., Meyer, W. E., Williams, R. P., Wolf, C. F., Fulmor, W., Pidacks, C. and Lancaster, J. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3185~3188 (1962)
- 4) Arcamone, F., Franceschi, G., Orezzi, P., Cassinelli, G., Barbier, W. and Mondelli, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5334~5335 (1964)
- 5) Inoue, K., Fujimoto, S. and Ogawa, M.: *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.*, **18**, 13~20 (1983)
- 6) Fujita, F., Fujita, M. and Taguchi, T.: *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **11**, 1635~1643 (1984)
- 7) Wall, M. E. and Wan, M. C.: *J. Med. Chem.*, **16**, 417 (1980)
- 8) Kawato, Y., Yasuoka, M. and Matsuki, K. 第46回日本癌学会総会、東京 (1987)
- 9) Rosencweig, M., Vonhoff, D. D. and Henney, J. E.: *Cancer*, **40**, 334~336 (1977)
- 10) Liu, L. F.: *An. Rev. Biochem.*, **58**, 351~375 (1989)
- 11) Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and McPhail, A. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325~2328 (1971)
- 12) Rowinsky, E. K., Cazenave, L. A. and Donehower. R. C.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1247~1259 (1990)

- 13) Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 672~675 (1985)
- 14) Kwon, H. J., Yoshida, M, Fukui, Y., Horinouchi, S., Beppu, T.: *Cancer Res.*, **52**, 6926~6930 (1992)
- 15) Omura, S., Vanderpyl, D., Inokoshi, J., Takahashi, Y. and Takeshima, H.: *J. Antibiot.*, **46**, 222~228 (1993)
- 16) Hara, M., Akasaka, K., Akinaga, S., Okabe, M., Nakno, H., Gomez, R., Wood, D., Uh, M. and Tamanoi, F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2281~2285 (1993)
- 17) Umezawa, H., Imoto, M., Sawa, T., Isshiki, K., Matsuda, N., Uchida, T., Iinuma, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: *J. Antibiot.*, **39**, 170~173 (1986)
- 18) Ishida, N., Miyazaki, K., Kumagai, K. and Rikimaru, M.: *J. Antibiot.*, **18**, 68~76 (1965)
- 19) Edo, K., Mizugaki, M., Koide, Y., Seto, H., Furihata, N., Otake, N. and Ishida, N.: *Tetrahedron Lett.*, **26**, 331~335 (1985)
- 20) Golik, J., Dubay, G., Groenewold, G., Kawaguchi, H., Konishi, M., Krishnan, B., Ohkuma, H., Saitoh, K. and Doyle, T. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3462~3463 (1987)
- 21) Nicolaou, K. C., Smith, A. L. and Yue, E. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5881~5888 (1993)
- 22) Myers, A. G.: *Tetrahedron Lett.*, **28**, 4493~4496 (1987)
- 23) 平間正博: *有機合成化学*, **49**, 1033~1041 (1991)
- 24) Umezawa, H., Takeuchi, T., Nitta, K., Okami, Y., Yamamoto, T. and Yamaoka,

- S.: J. Antibiot. **A6**, 147~152 (1953)
- 25) Sung, S. C. and Quastel, J. H.: Cancer Res., **23**, 1549~1555 (1963)
- 26) 上原至雅、深澤秀輔: 蛋白質. 核酸. 酵素, **38**, 1950~1959 (1993)
- 27) Driscoll, J. S.: Cancer Treatment Reports, **68**, 63~76 (1984)
- 28) Boyd, M. R., Shoemaker, R. H. and Chabner, B. A.: New Drug Development
In: "Thoracic Oncology", Part 7, Chapter 51, W. B. Saunders (ed.) (1986)
- 29) 鶴尾隆: 癌と化学療法, **14**, 2809~2815 (1987)
- 30) Sebolt, J. S., Scavono, S. V., Pinter, C. D., Hamelehle, K. L. and Vonhoff, D.
D., Jackson, R. C.: Cancer Res., **47**, 4299~4304 (1987)
- 31) Samid, D., Shack, S. and Myers, C. E.: J. Clin. Invest., **91** 2288~2295 (1993)
- 32) Ram, Z., Samid, D., Walbridge, S., Oshiro, E. M., Viola, J. J., Tao-cheng, J. H.,
Shack, S., Thibault, A., Myers, C. E. and Oldfield, E. H.: Cancer Res., **54**,
2923~2927 (1994)
- 33) Hayakawa, Y., Nakagawa, M., Kawai, H., Tanabe, K., Nakayama, H.,
Shimazu, A., Seto, H. and Otake, N.: J. Antibiot., **36**, 934~937 (1983)
- 34) Kamishohara, M., Kawai, H., Sakai, T., Isoe, T., Hasegawa, K., Mochizuki, J.,
Uchida, T., Kataoka, S., Yamaki, H., Tsuruo, T. and Otake, N.: Oncology Res.,
6, 383~390 (1994)
- 35) Salmon, S. E., Hamburger, A. W., Soehnen, B., Durie, B. G. M., Alberts, D. S.
and Moon, T. E.: New Engl. J. Med., **298**, 1321~1327 (1978)
- 36) Shindo, K. and Kawai, H.: J. Antibiot., **45**, 292~295 (1992)
- 37) Shindo, K., Matsuoka, M. and Kawai, H.: J. Antibiot., **49**, 241~243 (1996)
- 38) Shindo, K., Iijima, H. and Kawai, H.: J. Antibiot., **49**, 244~248 (1996)

- 39) Shindo, K., Sakakibara, M., Kawai, H. and Seto, H.: J. Antibiot., **49**, 249~252
(1996)
- 40) Shindo, K., Kamishohara, M., Odagawa, A., Matsuoka, M. and Kawai, H.: J.
Antibiot., **46**, 1076~1081 (1993)
- 41) Franceschi, G., Penco, S., Selvo, A. and Arcamone, F.: Tetrahedron Lett., **10**,
1007~1010 (1969)
- 42) Bullock, E. and Johnson, A. W.: J. Chem. Soc. 3280~3285 (1957)
- 43) Leach, B. E., Calhoun, K. M., Johnson, L. E., Teeters, C. M. and Jackson, W.
G.: J. Am. Chem. Soc., **75**, 4011~4012 (1953)
- 44) Hamill, R. L., Hoehn, M. N., Pittenger, G. E., Chamberlin, J. and Gorman, M.:
J. Antibiot., **22**, 161~164 (1969)
- 45) Arcamone, F. M., Bertazzoli, C., Ghione, M. and Scotti, T.: Giorn. Microbiol., **7**,
207~216 (1959)
- 46) Kuroya, M., Ishida, N., Katagiri, K., Shoji, J., Yoshida, T., Mayama, M., Sato,
K., Matsuura, S., Niinome, Y. and Shiratori, O.: J. Antibiot., **A14**, 324~329
(1961)
- 47) Pridham, T. G. and Tresner, H. D.: Genus I. *Streptomyces*, Waksman and
Henrici 1943.: In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed.
Ed., R. E. Buchanan, *et al.*, pp. 748~829, Williams & Wilkins Co., Baltimore
(1974)
- 48) Silverstain, R. B., Bassler, G. C., Morrill, T. C.: [Spectrometric Identification of
Organic Compounds] 4th ed. Johnson Wiley & Sons, Inc. (1981)
- 49) Jackson, M., Karwowski, J. P., Theriault, R. J., Rasmussen, R. R., Hensey, D.

- M., Humphrey, P. E., Swanson, S. J., Barlow, G. J., Premachandran, U. and McAlpine, J. B.: *J. Antibiot.*, **48**, 462~466 (1995)
- 50) Hochlowski, J. E., Mullally, M. M., Henry, R., Whittern, D. M. and McAlpine, J. B.: *J. Antibiot.*, **48**, 467~470 (1995)
- 51) Clark, M., Cramer, R. D. and Opdenbosch, N. V.: *J. Comp. Chem.*, **10**, 982~1012 (1989)
- 52) Omura, S., Tsuzuki, K., Tanaka, Y., Sakakibara, H., Aizawa, M. and Lukacs, G.: *J. Antibiot.*, **36**, 614~616 (1983)
- 53) June, C. H., Fletcher, M. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Siegel, J. N., Phillips, A. F. and Samelson, L. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7722~7726 (1990)
- 54) Imoto, M., Nakamura, T., Tanaka, S. and Umezawa, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1700~1701 (1994)
- 55) 大岳望: 生合成の化学, pp. 28~62, 大日本図書 (1986)
- 56) Manners, G. D. and Jurd, L.: *J. Chem. Soc., Perkin I*, 405~410 (1977)
- 57) Cane, D. E. and Yang, C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 784~787 (1984)
- 58) Oikawa, H., Murakami, Y. and Ichihara, A.: *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4533~4536 (1991)
- 59) Heffman, E.: *Steroid Biochemistry*, pp. 1~11, Academic Press, New York (1970)
- 60) Hamburger, A. M. and Salmon, S. E.: *Science*, **197**, 461~463 (1977)
- 61) Corbett, T. H.: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **26**, 332 (1985)
- 62) Wozniak, A., Corbett, T. and Samso, M.: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **27**,

- 381 (1986)
- 63) Martin, D. G., Duchamp, D. J. and Chidester, C. G.: *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2549~2552 (1973)
- 64) Poster, D. S., Bruno, S., Penta, J. Neil, G. L. and McGovern, J. P.: *Cancer Clin. trials*, **4**, 327~330 (1981)
- 65) Rao, K. V. and Cullen, W. P.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1127~1132 (1960)
- 66) 渡辺晃、大方高志、遠藤克博、佐藤恒明、鶴浦章: *内科*, **56**, 10~13 (1985)
- 67) Greeger, D. H.: *Cancer*, **28**, 131~134 (1971)
- 68) Winawer, S. J., Sherlock, P., Schottenfeld, D., Miller, D. G.: *Gastroenterology*, **70**, 783~789 (1976)
- 69) Heidelberger, C., Griesbach, L., Montag, B. J., Mooren, D., Cruz, O., Schnittzer, R. J. and Grunberg, E.: *Cancer Res.*, **18**, 305~317 (1958)
- 70) 高橋克俊、海老原和雄、本田恭成、西川清広、喜多瑞子、大村美奈子、柴崎千恵子: *癌と化学療法*, **9**, 624~630 (1982)
- 71) Blijham, G. H.: *Anti-Cancer Drugs*, **2**, 233~245 (1991)
- 72) 古江尚: *癌と化学療法*, **18**, 529~534 (1991)
- 73) Semple, T. U., Quinn, L. A., Woods, L. K. and Moore, G. E.: *Cancer Res.*, **38**, 1345~1355 (1978)
- 74) Umezawa, S., Tsuchiya, T. and Tatsuta, K.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **39**, 1235~1243 (1966)
- 75) Eliel, E. L., Allinger, N. L., Angyal, S. J. and Morrison, G. A.: [*Conformational Analysis*], Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, Inc. (1965)

- 76) Kubota, T., Nakada, M., Tsuyuki, K., Inaba, T., Asanuma, F., Ishibiki, K. and Abe, O.: Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **77**, 502~507 (1986)
- 77) Drewinko, B., Romsdahl, M. M., Yang, L. Y., Ahearn, M. J. and Trujillo, J. M.: Cancer Res., **36**, 467~475 (1976)
- 78) Fogh, J. and Trempe, G.: New human tumor cell lines. *In Human Tumor Cells In Vitro. Ed., J. Eogh*, pp.115~141, Plenum Press, New York, N.Y. (1975)
- 79) Tom, B. H., Ruzky, L. P., Jaksys, M. M., Oyasu, R., Kaye, C. and Kahan, B.: *In Vitro*, **12**, 180~191 (1976)
- 80) Omura, S., Nakagawa, A., Shibata, K. and Sano, H.: Tetrahedron Lett., **23**, 4713~4716 (1982)
- 81) Naruse, N., Tsuno, T., Sawada, Y., Konishi, M. and Oki, T.: J. Antibiot., **44**, 741~755 (1991)
- 82) Kojiri, K., Nakajima, S., Suzuki, H., Kondo, H. and Suda, H.: J. Antibiot., **45**, 868~874 (1992)
- 83) Umezawa, H., Nakajima, S., Kawai, H., Komeshima, N., Yoshimoto, H., Urata, T., Odagawa, A., Tatsuta, K., Otake, N. and Takeuchi, T.: J. Antibiot., **40**, 1058~1061 (1987)
- 84) Umezawa, H., Takahashi, Y., Kinoshita, M., Naganawa, H., Matsuda, T., Ishizaka, M., Tatsuta, K. and Takeuchi, T.: J. Antibiot., **32**, 1082~1084 (1979)
- 85) Brill, G. M., Whittern, D. N., Jackson, M., Swanson, S. J., Chen, R. H. and McAlpine, J. B.: Program and Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33, pp. 201 (1993)
- 86) Jackson, M., Karwowski, J., Sunga, G., Barlow, G., Villarreal, R., Johnson, P.,

- Kohl, W., Scherr, M., Rasmussen, R., Swanson, S., Tanaka, K., Kadam, S. and McAlpine, J. B.: Program and Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33, pp. 201 (1993)
- 87) 田中信男:抗生物質の作用メカニズム, pp.39, 東京大学出版会 (1981)
- 88) Shirling, E. B. and Gottlieb, D.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**, 313~340 (1966)
- 89) 微生物の分類と同定 (下)、長谷川武治編、学会出版センター (1995)
- 90) 放線菌の同定実験法、日本放線菌研究会編、日本放線菌研究会事務局 (1985)
- 91) Pridham, T. G. and Gottlieb, D.: *J. Bacteriol.*, **56**, 107~114 (1948)
- 92) Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**, 435~443 (1970)
- 93) 長谷川徹、清野明雄:I. 細胞壁 II. 放線菌の細胞壁:微生物の化学分類法、駒形和男編、学会出版センター (1982)

