

生理活性物質に関する有機化学的研究

石 神 健

①

生理活性物質に関する有機化学的研究

石神 健

生理活性物質に関する有機化学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命化学専攻

平成6年度博士課程進学

石神 健

指導教官 東京大学教授 北原武

目次

序論	1
第1部 活性酸素生成を作用機構とする抗腫瘍抗生物質の研究	
序章	3
第1章 活性酸素生成を作用機構とする抗腫瘍抗生物質のスクリーニング	6
第2章 Menoxymycin A、B、Medermycinに関する研究	
第1節 Menoxymycin A、Bの発見	8
第2節 Menoxymycin A、Bの発酵生産	10
第3節 Menoxymycin A、Bの単離、精製	11
第4節 Menoxymycin A、Bの理化学的性質	13
第5節 Medermycinの同定	19
第6節 Menoxymycin Aの構造研究	20
第7節 Menoxymycin Bの構造研究	24
第8節 Menoxymycin A、B、Medermycinの生物活性	32
第9節 考察	38
第3章 Cororubicinに関する研究	
第1節 Cororubicinの発見	41
第2節 Cororubicinの発酵生産	42
第3節 Cororubicinの単離、精製	43
第4節 Cororubicinの理化学的性質	45
第5節 Cororubicinの構造研究	48
第6節 Cororubicinの生物活性	64
第7節 考察	67
第2部 光学活性な生理活性物質の合成研究	
序章	71
第1章 アメリカヤシゾウムシ (Rhynchophorus palmarum) の集合フェロモンRhynchophorolの両鏡像体合成	
第1節 合成の目的	73
第2節 合成計画	74
第3節 合成	75
第4節 結果	81

第2章 ACAT阻害剤であるAcaterinの4つの立体異性体の合成	
第1節 合成の目的	82
第2節 合成計画	83
第3節 合成	84
第4節 結果	94
第3章 細胞周期阻害剤であるRadicicolの合成研究	
第1節 合成の目的	96
第2節 合成計画	98
第3節 合成	100
第4節 Radicicolのプロープ合成	106
第5節 結果	111
結論	112
実験の部	
第1部の実験	113
共通実験	113
MenoxymycinのNMRスペクトル	117
CororubicinのNMRスペクトル	120
Cororubicinのメタノリシス	123
第2部の実験	124
第1章の実験	124
第2章の実験	132
第3章の実験	143
参考文献	154
謝辞	163

略語表

ACAT	acyl-CoA: cholesterol acyltransferase
ADR	adriamycin
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
br	broad
COSY	correlated spectroscopy
d	doublet
DBU	1, 8-diazabicyclo [5. 4. 0]-7-undecene
DCC	<i>N, N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DHP	dihydropyran
DIBAL	diisobutylaluminum hydride
DMAP	dimethylaminopyridine
DMF	dimethylformamide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
DNB	3, 5-dinitrobenzoyl
e.e.	enantiomeric excess
EE	ethoxyethyl
FAB	fast atom bombardment
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear shift quantum correlation
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IR	infrared absorption
LAH	lithiumaluminum hydride
LDA	lithium diisopropylamide
m	multiplet
<i>m</i>	<i>meta</i>
MCPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid
MP	melting point
Ms	methanesulfonyl
MS	mass spectrum

MTPA	α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid
NBT	nitro blue tetrazolium
NMR	nuclear magnetic resonance
ODS	octadecylsilane
PHB	polyhydroxybutylate
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
PMBM	<i>p</i> -methoxybenzyloxymethyl
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
q	quartet
REF	embryonic fibroblast
s	singlet
SOD	superoxide dismutase
t	triplet
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyranyl
TLC	thin layer chromatography
TMS	tetramethylsilane or trimethylsilyl
TNF	tumor necrosis factor
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
UV	ultraviolet

序論

個々の生物が恒常性を維持するためには、例えばホルモンなどにより細胞間の微妙な情報伝達を行い、酵素蛋白質による代謝の制御が行われなければならない。また個体間の認識や情報伝達には、昆虫に見られるフェロモンのような低分子化合物が関与することが多い。

さらに微生物による代謝産物である低分子有機化合物、抗生物質が、他の微生物の発育や代謝を阻害することも既知の事実であるし、この抗生物質が高等生物の細胞に対し、DNA合成阻害や細胞周期阻害などという形で毒性を示し、実際に抗癌剤として用いられる例も多い。

このような、生物の営む精妙な生命現象に微量で関与し、影響を与える物質は総称して生理活性物質とよばれている。

生理活性物質に関する研究は近年めざましく、様々な活性物質が発見もしくは合成され、様々な活性の機構が解明され、臨床の医薬や研究用試薬として応用されている。この生理活性物質に関する研究を有機化学的に見ると、主に「ものとり」としての立場と「合成」としての立場とがあるが、いずれも単独では成立も発展もしない。

優れた活性物質が単離されたが天然物として得られる量に制限があり構造決定・活性の生化学的研究に支障をきたせば、全合成による構造・立体の決定や確認、活性試験への試料の供給が有効な手段となる。逆に新規活性物質の探索という点では、たしかに合成的手法で多数の化合物を合成し活性物質を探索するのも理論上可能であるが、特に骨格に関しては有機化

学者の想像力を遙かに逸脱するような天然物が発見されることも多く、リード化合物を天然物に求めるのは有意義である。その後に類縁体・誘導体合成による構造活性相関の解明や、薬剤としてより安全で強力な新化合物の合成や、場合によっては作用機構解明のためのプローブ合成などが必要となる。

私は生理活性物質の研究上の基盤である有機化学の立場から、生物機能の解明に多少でも関与したいという観点で、生理活性物質に関する研究を行ったので以下本論文で述べる。

第1部では、活性酸素生成を作用機構とする新規抗腫瘍抗生物質、menoxymycinおよびcororubicinを微生物の培養液より発見したので、その単離・構造決定・活性について述べる。

第2部では昆虫フェロモンであるrhynchophorol、ACAT阻害剤であるacaterin、細胞周期阻害剤であるradicicolに関する合成研究について述べる。

第1部 活性酸素生成を作用機構とする抗腫瘍抗生物質の研究

序章

現在癌の治療法として最も有効とされているのは外科手術療法である。しかし一部の早期癌は外科手術療法により完治するものの、進行癌では広範な浸潤や転移などを伴うためこの方法には限界がある。したがって外科手術療法に加えて化学療法などの併用が不可欠であり、抗癌剤の開発研究はますます重要となっている。

抗癌剤の研究は1940年代のナイトロジェンマスタードに始まるが、1950年代になると微生物の代謝産物の中に抗腫瘍活性を示す例が多く見出され、抗腫瘍抗生物質の研究が急速に発展した。主な例としては1954年のアクチノマイシンD¹⁾、1957年のマイトマイシンC²⁾、1963年のダウノマイシン³⁾、1966年のプレオマイシン⁴⁾、1969年のアドリアマイシン⁵⁾、1975年のアクラシノマイシンA⁶⁾の発見などがあげられる。これらの薬剤が腫瘍細胞に傷害を与える機構は様々であるが、多くのものはDNAに作用することにより抗腫瘍活性を示す。このような抗腫瘍抗生物質の中には、プレオマイシンなどのように活性酸素の発生を作用機構としているものがある。プレオマイシンでは、鉄と錯体を作った後にDNAと結合し、酸素分子を還元して活性酸素を発生させる⁷⁾。この活性酸素がDNA鎖を攻撃し切断する。アンスラサイクリン系抗生物質でもキノン環がセミキノンラジカルに代謝され、これが酸素分子と反応して活性酸素を発生することが知られているが⁸⁾、

抗腫瘍活性に対する直接の関与には疑問が持たれている。

これらの抗腫瘍抗生物質の中には現在臨床で用いられているものも多いが、抗腫瘍作用が強いものは副作用も強く、副作用の弱いものは抗腫瘍作用も弱いという問題を抱えている。つまり抗癌剤のほとんどは、腫瘍細胞のみならず正常細胞をも攻撃しており、これが副作用となって現われるのである。したがって正常細胞には毒性がなく、選択的に腫瘍細胞のみを攻撃するような抗腫瘍物質の開発が必要とされており、いかに選択性を持たせるかが重要な課題となっている。

一方1975年にOldらによって、腫瘍に出血性壊死をもたらす物質として、腫瘍壊死因子 (TNF) が発見された⁹⁾。TNF発見にいたる歴史は1893年のコレラ毒素にさかのぼる。これは死菌によるワクチンであり、実際に腫瘍の縮小や消失がみられた例もあったが、外科手術療法や放射線療法の発達とともに使われなくなった¹⁰⁾。しかしこの作用機構に興味を持ったOldらは、BCGやリポ多糖を投与されたマウスが血液中に抗腫瘍因子であるTNFを大量に作り出すことを発見した。後に、TNFはBCGやリポ多糖により活性化されたマクロファージが産生し、アミノ酸157個からなる蛋白質であることが判明した¹¹⁾。

TNFによる細胞傷害作用は腫瘍細胞に対し特異的であることから、当初はこれを癌患者に投与することにより腫瘍細胞のみが傷害され、きわめて有効な抗癌剤となることが期待された。しかしTNFはサイトカインの1つであり、腫瘍細胞以外に対しても様々な生理作用を示すために副作用も生じ、抗癌剤としての利用にはまだ問題がある¹²⁾。

TNFがある種の腫瘍細胞を特異的に傷害する詳しい機構はまだ不明であるが¹³⁾⁻¹⁴⁾、TNFにより O_2 などの活性酸素の産生が促進されることが知られている。また最近になって、正常細胞ではTNFによりMn-SODが誘導され、Mn-SODが誘導される細胞はTNFに対し抵抗性を持つことが明らかになった¹⁵⁾⁻¹⁶⁾。したがって腫瘍細胞傷害の機構に細胞内での活性酸素の発生が関与しており、Mn-SODが誘導される細胞では、細胞内に発生した O_2 の不活性化が可能であるために傷害を受けずにすむと考えられている。

ある種の腫瘍細胞は悪性化の過程でMn-SOD等の活性酸素消去系を失っていることが知られている。このような腫瘍細胞では、TNFのような活性酸素発生を作用機構とする物質により、選択的に細胞傷害が引き起こされる可能性が考えられる。この現象を利用し、活性酸素消去系を失った腫瘍細胞に対し、細胞内に活性酸素を発生させることによって選択的な細胞死をもたらすような物質を微生物の代謝産物に求めスクリーニングした。その結果ナフトキノン系のmenoxymycin A、Bおよびアンストラサイクリン系のcororubicinという新規抗腫瘍抗生物質を見出した。

以下では、これらの化合物のスクリーニング、発酵生産、単離・精製、構造決定、生物活性について述べる。

第1章 活性酸素生成を作用機構とする抗腫瘍抗生物質のスクリーニング

活性酸素を生成する抗腫瘍抗生物質のスクリーニング系としてマウスの神経芽細胞腫とラットの網膜神経細胞とのハイブリドームである

N18-RE-105細胞を用いた。このN18-RE-105細胞は、グルタミン酸毒性に対して特に高い感受性を持つことが知られている¹⁷⁾。グルタミン酸はグルタミン酸レセプターを介して細胞内に活性酸素を発生させ、細胞を傷害するが、グルタミン酸レセプターを持たない多くの通常細胞に対しては全く活性を示さない。このグルタミン酸による細胞傷害は活性酸素消去物質によって中和することができる。したがって、この細胞に対するグルタミン酸様活性を指標にした検定法により、活性酸素生成を作用機構とする抗腫瘍抗生物質を探索することが可能である。

本検定法では、N18-RE-105細胞に微生物の培養濾液もしくは菌体抽出液を添加し、培養2日後までに見られる細胞傷害活性を顕微鏡下で観察した。さらに細胞傷害活性を示したサンプルのうち、この活性が活性酸素消去剤DTT 250 μ Mを添加することによって抑制されるものを活性物質と判定した。

図1-1に本細胞における細胞傷害活性と、DTTによるこの抑制効果を示す。Aに示すようにコントロールでは、N18-RE-105細胞はプレートに接着して突起を伸展している。これに活性物質を添加すると、Bに示すようにプレートから剥離して死滅しているのがわかる。さらにCに示すように、活性

物質の添加4時間前に250 μ MのDTTを添加した場合には、コントロールとほとんど変わらない状態で生存している。

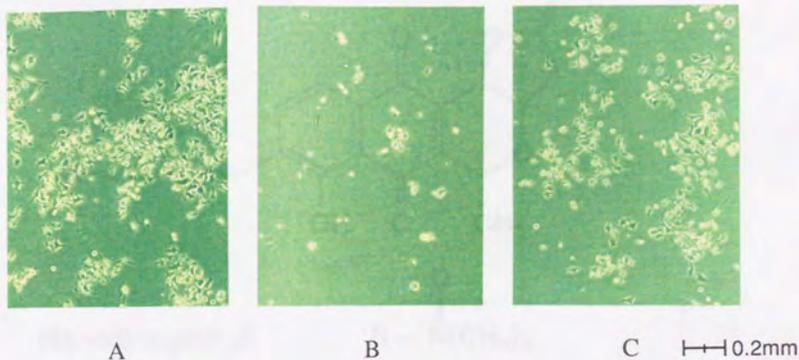
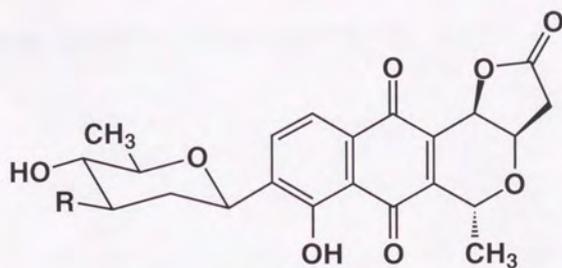


図1-1 N18-RE-105細胞に対する増殖阻害活性とDTTによる抑制効果
(A: コントロール、B: 活性物質添加、C: 活性物質+DTT添加)

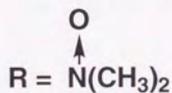
本系により、土壌分離菌約6500株についてスクリーニングした結果、*Streptomyces*属に属する放線菌KB10株および*Micromonospora*属に属する放線菌JY16株の代謝産物中に活性を見いだした。

第2章 Menoxymycin A、Bに関する研究

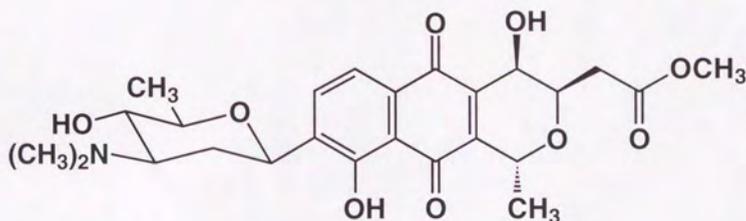
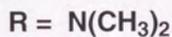
第1節 Menoxymycin A、Bの発見



Menoxymycin A



Medermycin



Menoxymycin B

N18-RE-105細胞を用いたスクリーニングにおいて、土壌から分離した *Streptomyces*属に属する放線菌KB10株の培養濾液が強い細胞傷害活性を示し、DTTの添加によってこの活性が抑制された。本活性物質を精製した結

果3つの活性成分が得られ、構造解析により、このうち1つは既知物質の medermycin¹⁸⁾であると同定した。また他の2つは新規物質であると判明し、これらを menoxymycin A、Bと命名した。本章ではこれらの物質の発酵生産、単離、構造解析、活性について述べる。

物質名	分子量	元素分析
Medermycin	374	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₄
Menoxymycin A	374	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₄
Menoxymycin B	374	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₄

第2節 Menoxymycin A、Bの発酵生産

第1節で示したmenoxymycin A、Bの生産菌である *Streptomyces* sp. KB10株の培養は、表2-1に示す前培養培地および生産培地を用いて行った。

Preculture medium	Soluble starch	1.0%
	Polypepton	1.0%
	Molasses	1.0%
	Beef extract	1.0%
	pH 7.2	
Production medium	Glycerol	2.0%
	Molasses	1.0%
	Casein	0.5%
	Polypepton	0.1%
	CaCO ₃	0.4%
	pH 7.2	

表2-1 KB10株の前培養および生産培地

上記前培養培地15mlを50ml容大型試験管に分注し、これにKB10株の培養スラントより1白金耳接種し、27℃、2日間振盪し、前培養とした。さらに上記生産培地100mlずつを500ml容こぶ付き三角フラスコに分注し、これに前培養液2mlを接種して、ロータリーシェーカー上にて27℃、7日間回転培養を行った。

第3節 Menoxymycin A、B単離、精製

Menoxymycin A、Bの単離、精製法を図2-1に示す。

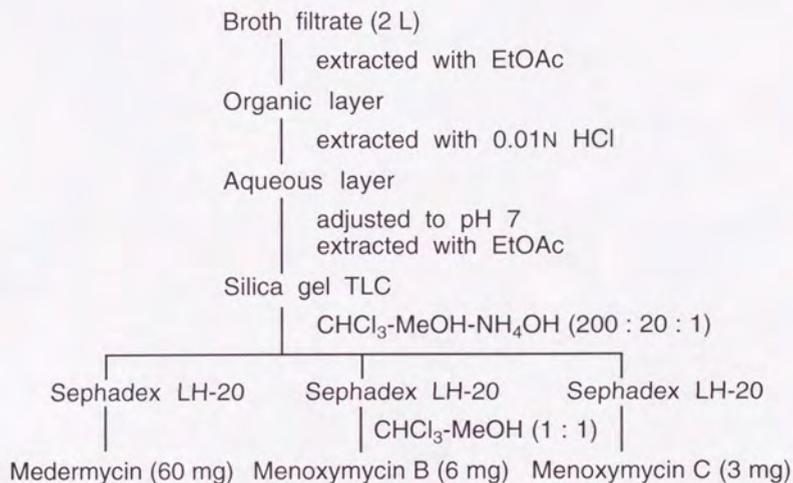


図2-1 Menoxymycin A、Bの単離、精製

KB10株の培養液 (2 L) から遠心分離によって菌体を除去した培養濾液を 1 Lの酢酸エチルで2回抽出した。これを0.01Nの塩酸で逆抽出した後、中和して再び酢酸エチルで抽出した。有機層を減圧濃縮し、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (クロロホルム：メタノール：濃アンモニア水=200 : 20 : 1) によってmenoxymycin A、Bを分離した。それぞれの画分を Sephadex LH-20カラム (2.5 ϕ \times 50 cm) を用いて、クロロホルム—メタノー

ル(1:1)でゲル濾過を行った。これらの活性画分を濃縮することにより、黄色粉末であるmedermycinおよびmenoxymycin A、Bをそれぞれ60 mg、6 mg、3 mg得た。

第4節 Menoxymycin A、Bの理化学的性質

Menoxymycin A、Bの理化学的性質を表2-2に示す。

	Menoxymycin A	Menoxymycin B	Medermycin ²⁰⁾
Appearance	Yellow powder	Yellow powder	Yellow powder
MP (°C)	168 ~ 173 (dec.)	93 ~ 97 (dec.)	151 ~ 159 (dec.)
Molecular formula	C ₂₄ H ₂₇ NO ₉	C ₂₅ H ₃₁ NO ₉	C ₂₄ H ₂₇ NO ₈
HRFAB-MS (<i>m/z</i>)			
found	474.1758 (M+H) ⁺	490.2163 (M+H) ⁺	458.1829 (M+H) ⁺
calcd.	474.1764	490.2077	458.1843
[α] _D ²¹	+232° (c 0.10, MeOH)	+239° (c 0.11, MeOH)	+317° (c 0.2, MeOH)
UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	215 (49,500) 249 (13,600) 418 (5,400)	215 (41,300) 252 (11,300) 427 (5,600)	215 (37,600) 254 (10,700) 432 (4,800)
λ _{max} ^{MeOH+NaOH} nm (ε)	208 (76,600) 261 (12,000) 276 (12,000) 540 (5,000)	225 (34,400) 262 (11,000) 279 (11,000) 551 (5,300)	222 (32,200) 262 (8,700) 273 (8,600) 558 (5,000)
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹	3425, 1770, 1660, 1645	3475, 1740, 1665, 1645	1790, 1665, 1650

表2-2 Menoxymycin A、Bとmedermycinの理化学的性質

後述するように、medermycinは黄色粉末で、メタノール中にて215nm、254nm、432nmに紫外可視吸収極大を示し、アルカリの添加によるシフトが観測されたこと(図2-2)、FABマススペクトルでは*m/z* 458の(M+H)⁺イオンピークを示し(図2-5)、高分解能FABマススペクトルによって分子式をC₂₄H₂₇NO₈と決定されたこと等の理化学的性質が一致した¹⁸⁾⁻²⁰⁾。

Menoxymycin Aも黄色粉末で、図2-3に示すようにmedermycinとほぼ同じような紫外可視吸収を示し、アルカリシフトも観測された。したがって両

者は同様のクロモフォアを有することが示唆された。FABマススペクトルにおいて、 m/z 474の(M+H)⁺イオンピークを示し(図2-6)、高分解能FABマススペクトルによって分子式をC₂₄H₂₇NO₉と決定した。赤外吸収スペクトル(図2-8)において、水酸基(3425 cm⁻¹)、 γ -ラクトン(1770 cm⁻¹)、キノン(1660, 1645 cm⁻¹)に由来する吸収が観測された。

Menoxymycin Bも黄色粉末で、図2-4に示すように他の2つとほぼ同じような紫外可視吸収を示し、アルカリシフトも観測されたことによりBも同様のクロモフォアを有することが示唆された。FABマススペクトルにおいて、 m/z 490の(M+H)⁺イオンピークを示し(図2-7)、高分解能FABマススペクトルによって分子式をC₂₅H₃₁NO₉と決定した。赤外吸収スペクトル(図2-9)において、水酸基(3475 cm⁻¹)、medermycinとmenoxymycin Aに見られた γ -ラクトンの代わりにエステルカルボニル(1740 cm⁻¹)、キノン(1665, 1645 cm⁻¹)に由来する吸収が観測された。

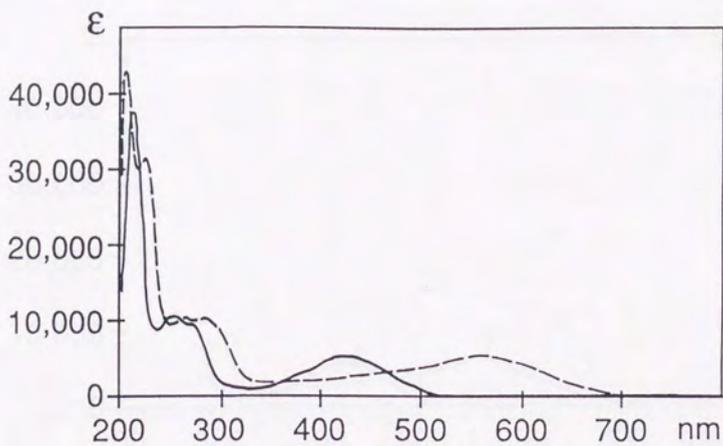


図2-2 Medermycinの紫外可視吸収スペクトル

(—MeOH、---0.01N NaOH-MeOH)

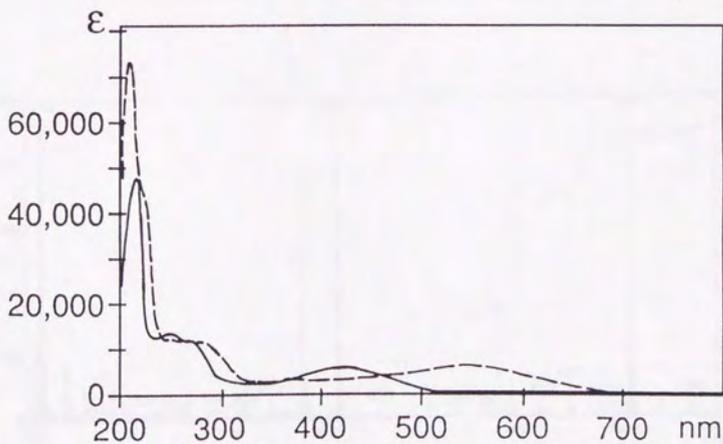


図2-3 Menoxymycin Aの紫外可視吸収スペクトル

(—MeOH、---0.01N NaOH-MeOH)

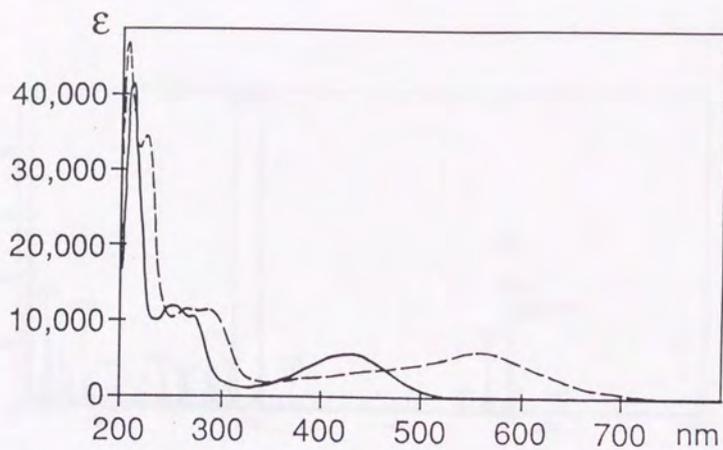


図2-4 Menoxymycin Bの紫外可視吸収スペクトル

(—MeOH、---0.01N NaOH-MeOH)

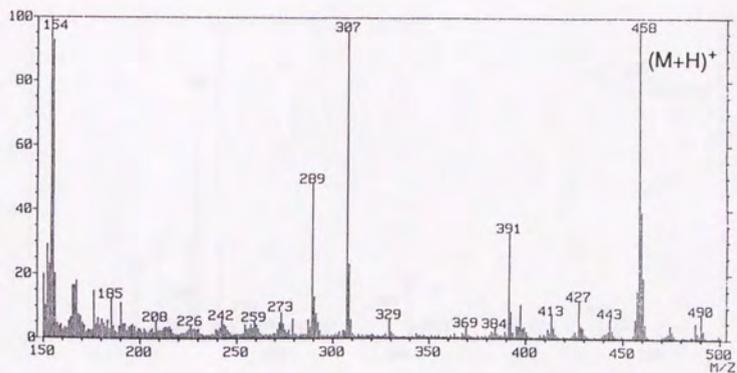


図2-5 MedermycinのFABマススペクトル

(マトリックス：*m*-ニトロベンジルアルコール)

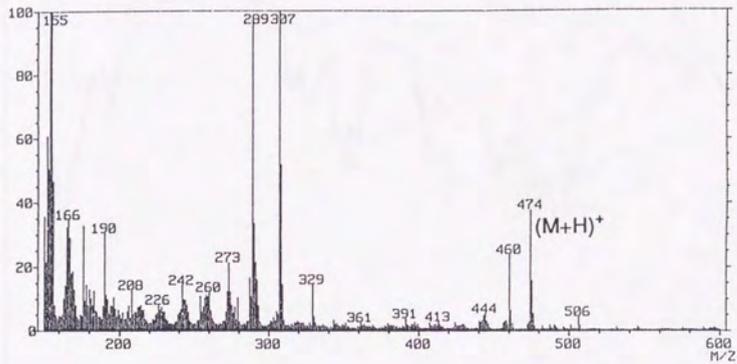


図2-6 Menoxymycin AのFABマススペクトル

(マトリックス：*m*-ニトロベンジルアルコール)

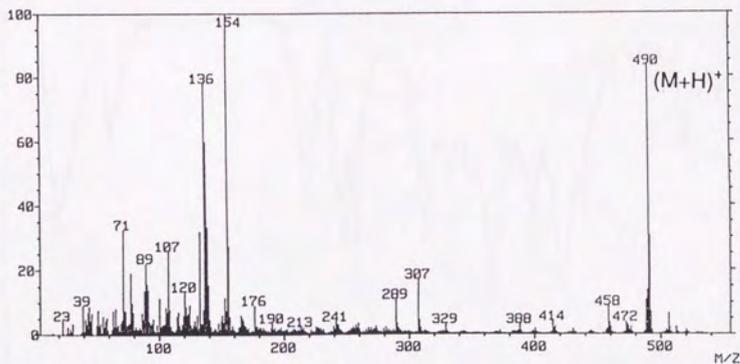


図2-7 Menoxymycin BのFABマススペクトル

(マトリックス：*m*-ニトロベンジルアルコール)

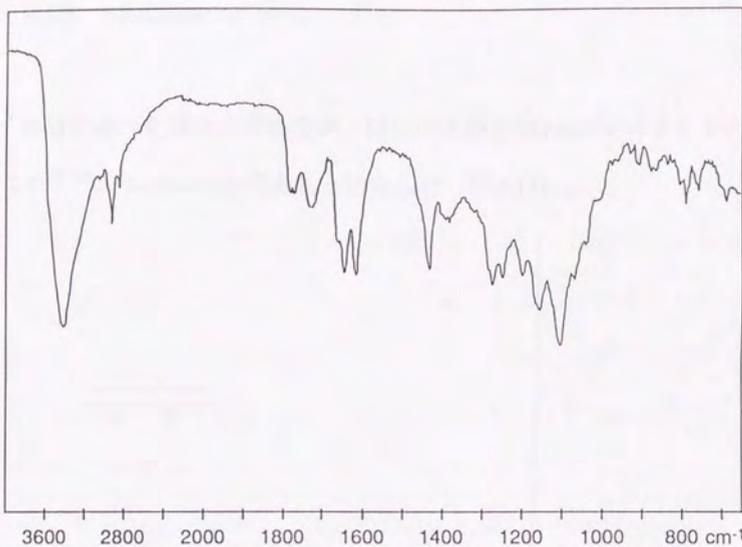


図2-8 Menoxymycin Aの赤外吸収スペクトル (KBrディスク法)

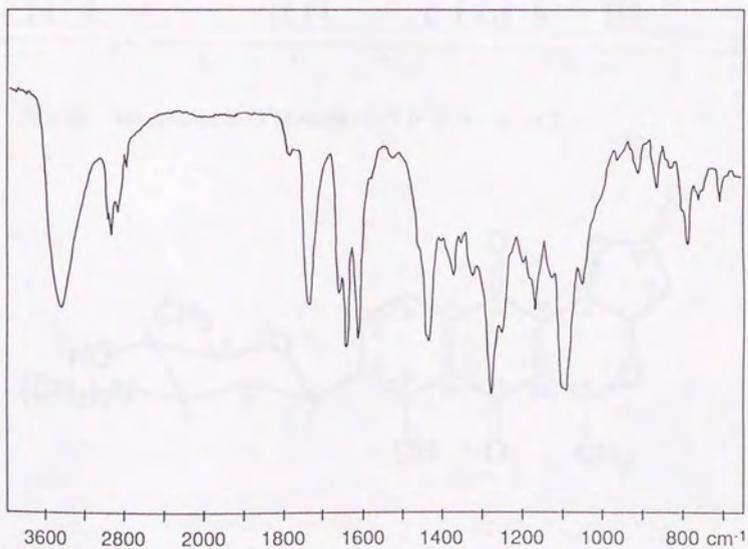


図2-9 Menoxymycin Bの赤外吸収スペクトル (KBrディスク法)

第5節 Medermycinの同定

前節で述べた理化学的性質や、図2-10に示す¹H-NMRスペクトルの比較により¹⁸⁾⁻²⁰⁾、medermycinであると同定した(図2-11)。

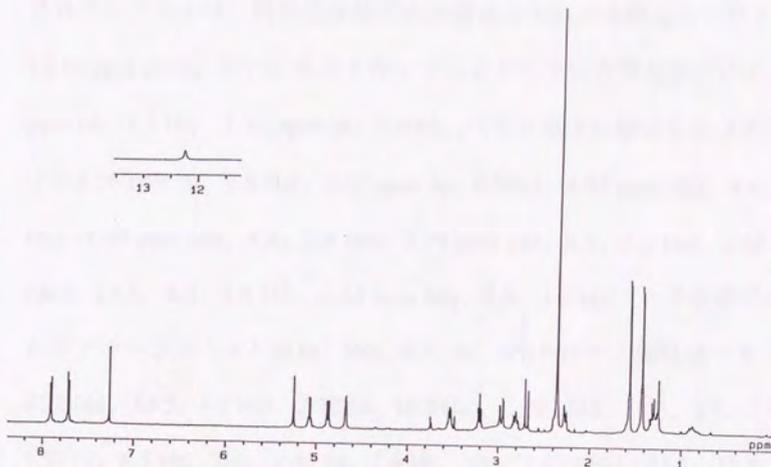


図2-10 Medermycinの¹H-NMRスペクトル (CDCl₃)

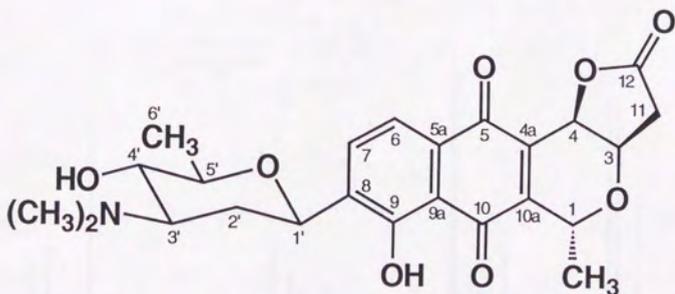


図2-11 Medermycinの構造

第6節 Menoxymycin Aの構造研究

(1) Menoxymycin Aの¹H-NMRスペクトルの解析

図2-12に示すように、menoxymycin Aの¹H-NMRスペクトルにおいて観測されたシグナルは、低磁場領域に水素結合している水酸基のプロトン 12.30 ppm (brs)、互いにオルトカップリングしている芳香族プロトン7.92 ppm (d, 7.5 Hz)、7.72 ppm (d, 7.5Hz)、ヘテロ原子に結合したメチンプロトン5.26 ppm (d, 2.8 Hz)、5.07 ppm (q, 6.5Hz)、4.95 ppm (dd, 9.6、2.0 Hz)、4.69 ppm (dd, 4.8、2.8 Hz)、3.74 ppm (dd, 8.5、8.0 Hz)、3.68 ppm (ddd, 11.5、8.5、3.5 Hz)、3.64 ppm (dq, 8.0、5.6 Hz)、ヘテロ原子に結合したメチルプロトン3.29 (s, 3H)、3.25 (s, 3H)のほか、脂肪族プロトン 2.98 (dd, 16.5、4.8 Hz)、2.70 (d, 16.5 Hz)、2.59 (ddd, 11.5、3.5、2.0 Hz)、1.57 (d, 6.5 Hz、3H)、1.47 (d, 5.6 Hz、3H)、1.43 (ddd, 11.5、11.5、9.6 Hz)であった。

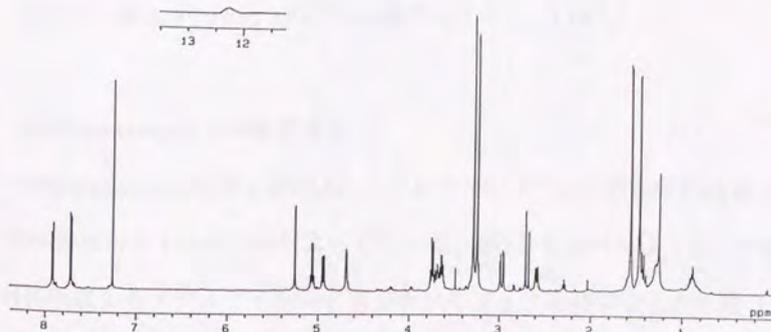


図2-12 Menoxymycin Aの¹H-NMRスペクトル (CDCl₃)

(2) Menoxymycin Aの ^{13}C -NMRスペクトルの解析

図2-13に示すように menoxymycin Aの ^{13}C -NMRスペクトルにおいて、3本のカルボニル炭素188.4、181.1、173.9 ppm、8本の芳香族炭素157.8、149.6、136.9、135.4、133.8、130.4、119.8、114.3 ppm、ヘテロ原子に結合した9本の炭素77.8、75.9、72.9、71.3、68.5、66.4、66.2、58.4、52.7 ppm、4本の脂肪族炭素36.9、29.7、18.5、17.8 ppmの計24本のシグナルが観測された。

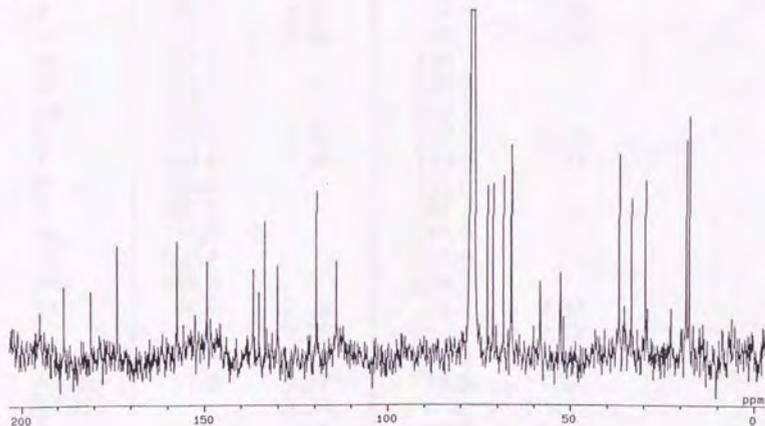


図2-13 Menoxymycin Aの ^{13}C -NMRスペクトル (CDCl_3)

(3) Menoxymycin Aの構造決定

Menoxymycin Aの構造決定は、メデルマイシン²⁰との理化学的性質およびNMRスペクトルの比較によって行った。第5節で述べたようにこの紫外可視吸収よりメデルマイシンと同じクロモフォアを持つことが示唆され、分子式は $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_9$ であり、メデルマイシンよりも酸素原子1つ大きいだけ

であった。また表2-3に示すように ^1H -および ^{13}C -NMRスペクトルデータをメデルマイシンと比較すると、両者は非常に類似しており、異なっているのは窒素原子に隣接している水素、炭素（表中イタリックで示す）の化学シフトだけであった。

	Menoxymycin A		Medermycin	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	66.2	5.07	66.3	5.08
3	68.5	4.69	66.5	4.69
4	66.4	5.26	68.7	5.25
4a	135.4		134.9	
5	181.1		180.8	
5a	130.4		129.7	
6	119.8	7.72	119.6	7.71
7	133.8	7.92	133.5	7.91
8	136.9		138.6	
9	157.8		157.7	
9a	114.3		114.0	
10	188.4		187.8	
10a	149.6		149.2	
11	36.9	2.98	37.0	2.97
		2.70		2.69
12	173.9		173.5	
1-Me	17.8	1.57	18.8	1.57
9-OH		12.30		12.25
1'	72.9	4.95	72.2	4.87
2'	29.7	2.59	28.2	2.26
		1.43		1.30
3'	75.9	3.68	67.2	2.78
4'	71.3	3.74	71.5	3.20
5'	77.8	3.64	77.6	3.53
6'	18.5	1.47	18.9	1.43
3'-NMe ₂	58.4	3.29	40.3	2.34
	52.7	3.25		

表-3 Menoxymycin Aとメデルマイシン²⁰⁾との ^1H -および ^{13}C -NMRスペクトルの比較 (CDCl₃)

つまりメデルマイシンにおいてプロトンシグナルが2.78 ppm (3'-H)、2.34 ppm (3'-NMe₂)、炭素シグナルが67.2 ppm (C-3')、40.3 ppm (3'-NMe₂)に認められたのが、menoxymycin Aではそれぞれ、3.68 ppm (3'-H)、3.29、3.25 ppm (3'-NMe₂)、75.9 ppm (C-3')、58.4、52.7 ppm (3'-NMe₂)といずれも低磁場シフトしていた。特にメデルマイシンでは等価に観測されたジメチルアミノ基に由来する炭素シグナルが、menoxymycin Aでは非等価になっていることが最も大きな変化であった。これらの変化は、menoxymycin Aにおいてはメデルマイシンの窒素原子がN-オキシドになっていると考えることにより合理的に説明できるので、menoxymycin Aの構造を図-14のように決定した。

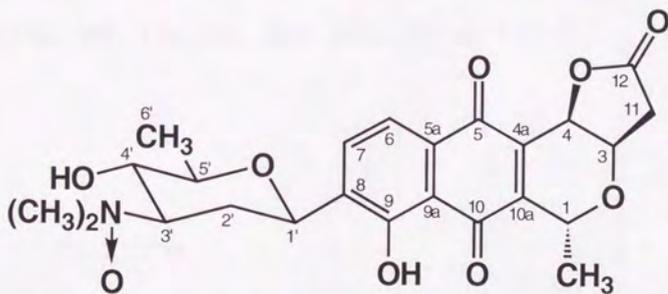


図-14 Menoxymycin Aの構造

第7節 Menoxymycin Bの構造研究

(1) Menoxymycin Bの¹H-NMRスペクトルの解析

図2-15に示すように、menoxymycin Bの¹H-NMRスペクトルにおいて観測されたシグナルは、低磁場領域に水素結合している水酸基のプロトン 12.33 ppm (brs)、互いにオルトスピ結合している芳香族プロトン7.87 ppm (d, 7.7 Hz)、7.67 ppm (d, 7.7Hz)、酸素原子に結合したメチンプロトン5.02 ppm (q, 6.9Hz)、4.86 ppm (dd, 10.7、2.0 Hz)、4.66 ppm (d, 2.5 Hz)、4.35 ppm (dt, 2.5、6.5 Hz)、3.52 ppm (dq, 9.0、6.0 Hz)、3.18 ppm (dd, 9.0、9.0 Hz)、メトキシプロトン3.75 (s, 3H)、2本分の等価なN-メチルプロトン2.32 (s, 6H)のほか、2.84 (d, 6.5 Hz、2H)、2.74 ppm (ddd, 12.4、9.0、3.5 Hz)、2.25 (ddd, 12.4、3.5、2.0 Hz)、1.56 (d, 6.9 Hz、3H)、1.42 (d, 6.0 Hz、3H)、1.28 (ddd, 12.4、12.4、10.7 Hz)であった。

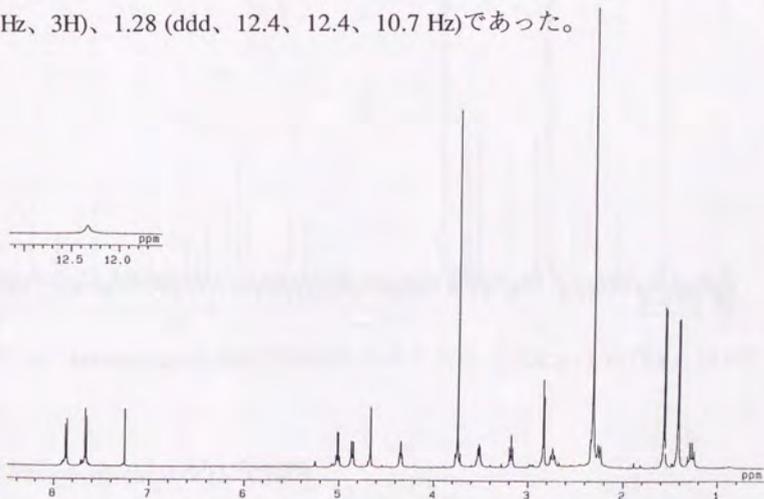


図2-15 Menoxymycin Bの¹H-NMRスペクトル (CDCl₃)

(2) Menoxymycin Bの ^{13}C -NMRスペクトルの解析

図2-16に示すように menoxymycin Bの ^{13}C -NMRスペクトルにおいて、3本のカルボニル炭素189.3、182.7、171.9 ppm、8本の芳香族炭素157.5、146.7、141.2、138.1、133.2、130.3、119.2、114.2 ppm、ヘテロ原子についた7本の炭素72.0、71.3、67.6、67.6、67.1、59.3、51.8 ppm、N-メチルの炭素40.0 ppm、3本の脂肪族炭素35.5、28.3、18.3、17.7 ppmの計23本のシグナルしか観測されず、分子式 $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NO}_9$ と比較して2本不足していた。次に示すHSQCスペクトルにより、77.4 ppmのシグナルが CDCl_3 のピークに隠れており、40.0 ppmのメチルは2つ分であることが判明した。

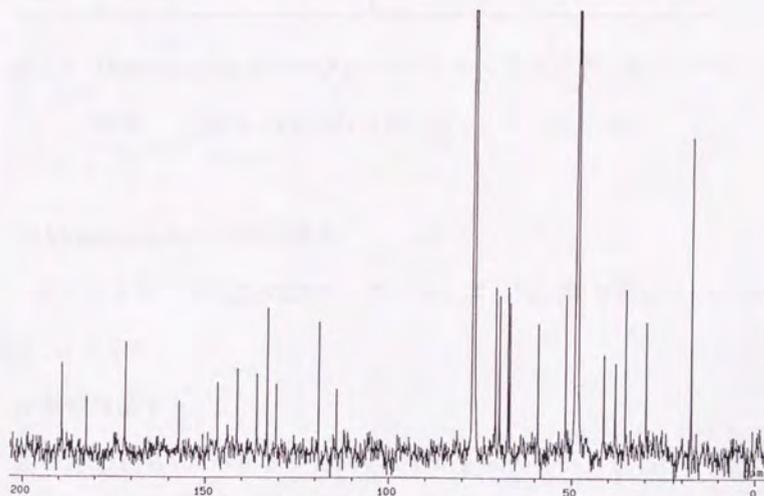


図2-16 Menoxymycin Bの ^{13}C -NMRスペクトル ($\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD} = 10 : 1$)

(3) Menoxymycin Bの ^1H - ^{13}C 相関

表2-4にmenoxymycin BのHSQCスペクトルの解析結果を示す。また最終

的に決定した構造に基づくナンバリングも示す。

	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1	67.1	5.02	11	35.5	2.84
3	67.6	4.35	12	171.9	
4	59.3	4.66	1-Me	17.7	1.56
4a	141.2		12-OMe	51.8	3.75
5	182.7		1'	72.0	4.86
5a	130.3		2'	28.3	2.25
6	119.2	7.67			1.28
7	133.2	7.87	3'	66.8	2.74
8	138.1		4'	71.3	3.18
9	157.5		5'	77.4	3.52
9a	114.2		6'	17.6	1.42
10	189.3		4'-NMe ₂	40.0	2.32
10a	146.7				

表2-4 Menoxymycin BのHSQCスペクトルによる炭素、水素シグナルの
帰属 (CDCl₃:CD₃OD = 10:1)

(4) Menoxymycin Bの部分構造

一次元および二次元のNMRスペクトルによって決定された2つの部分構造I、IIを示す。

(i) 部分構造 I

まず¹H-¹H COSYスペクトルにおいて4.86 ppmのメチン (1'-H) と2.25、1.28 ppmのメチレン (2'-H) の間、このメチレンと2.74 ppmのメチン (3'-H) の間、続いて3.18 ppmのメチン (4'-H)、3.52 ppmのメチン (5'-H)、1.42 ppmのメチル (6'-H) と、連続したスピン結合が観測されたことにより、1'-位から6'-Meまでのつながりが証明できた。さらにこれらのプロトンの

スピン結合定数は、2'-Hと3'-H_aが $J = 10.7$ Hz、3'-H_aと4'-Hが $J = 12.4$ Hz、4'-Hと5'-Hが $J = 9.0$ Hz、5'-Hと6'-Hが $J = 9.0$ Hzとなっていることから、これらは図2-17のようにテトラヒドロピラン環を形成しており、すべての置換基はエクアトリアル配向であると決定した。またHMBCスペクトルにおいて、2.32 ppmのN-メチルプロトンから66.8 ppmのC-4'への遠距離スピン結合が観測されたことにより、ジメチルアミノ基の置換位置も決定された。以上の部分構造はアミノ糖に相当するが、2'位のカーボンが72.0 ppmに観測されることから、この糖はC-グリコシド結合していると結論した。

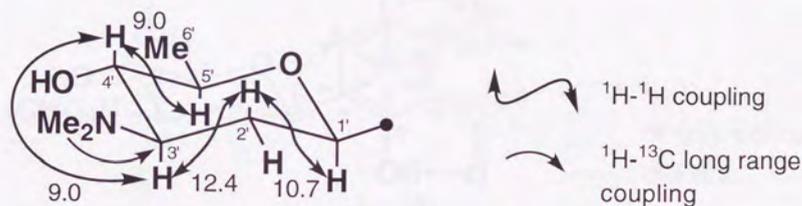


図2-17 Menoxymycin Bの糖部分の構造

次に7.87 ppm (7-H)と7.67 ppm (6-H)の芳香族プロトンが互いに7.7 Hzでオルトスピン結合していることから1,2,3,4-置換ベンゼンの存在が示唆された。HMBCスペクトルにおいて、7.87 ppmのプロトン(7-H)から157.5 (C-9)、130.3 ppm (C-5a)の炭素へ、7.67 ppmのプロトン(6-H)から138.1 (C-8)、114.2 ppm (C-9a)の炭素へ、それぞれメタ位への遠距離スピン結合が観測された。7.67 ppmのプロトン(6-H)からは182.7 ppm (C-5)のキノン

カルボニル炭素へもスピ結合が観測され、このカルボニルの置換位置も判明した。また157.5 ppmの炭素 (C-9) に置換している12.33 ppmの水酸基が水素結合していると考えられるので、もう1個のキノンカルボニルC-10 (189.3 ppm) の位置も判明した。さらに先ほどの糖部分の4.86 ppmのプロトン (1'-H) から、138.1 (C-8)、133.2 ppm (C-7) の炭素へ遠距離スピ結合が観測されたので、糖の結合位置も明らかになり、部分構造 I の存在が示された (図2-18)。

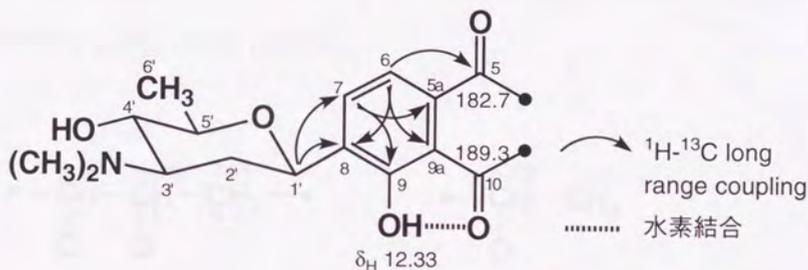


図2-18 部分構造 I

(ii) 部分構造 II

まず $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSYスペクトルにおいて4.66 ppmのメチン (4-H) と4.35 ppmのメチン (3-H)、さらにこのプロトンと2.84 ppmのメチレン (11-H) の間にスピ結合が観測され、また1.56 ppmのメチル (1-Me) と5.02 ppmのメチン (1-H) の間にもスピ結合が見られたので、図2-19のような2つのユニットが判明した。HMBCスペクトルにおいて、1.56 ppmのメチル (1-Me) から

146.7 ppmの芳香族炭素 (C-10a) に、5.02 ppmのメチン (1-H) から146.7 (C-10a)、141.2 ppm (C-4a) の2つの芳香族炭素と67.6 ppmのメチン (C-3) に、さらに4.66 ppmのメチン (4-H) から同じく146.7 (C-10a)、141.2 ppm (C-4a) の芳香族炭素に遠距離スピン結合が観測され、2つのユニットが芳香環と酸素原子をはさんで6員環を形成していることがわかった。また4.35 ppmのメチン (3-H)、2.84 ppmのメチレン (11-H)、3.75 ppmのメトキシプロトン (12-OMe) から171.9 ppmのカルボニル炭素 (C-12) への遠距離スピン結合が観測されたことにより、メチルエステルの存在も明らかになり部分構造 II が示された (図2-20)。

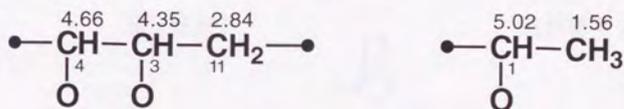


図2-19 ^1H - ^1H COSYスペクトルによる2つのユニット

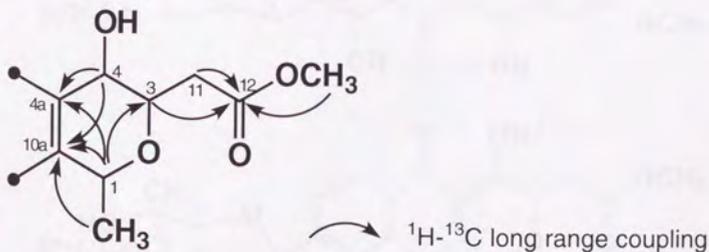


図2-20 部分構造 II

(5) Menoxymycin Bの構造決定

これまでにすべての水素、炭素は部分構造 I、II に帰属されているが、II の 5.02 (1-H)、4.66 ppm (4-H) のプロトンから I の 2 つのカルボニル炭素のいずれかへ遠距離スピン結合が観測されなかったために、2 つの部分構造が互いにどちら向きに結合しているかは決定できなかった。したがって図2-21に示すような 2 通りの推定構造が可能であった。

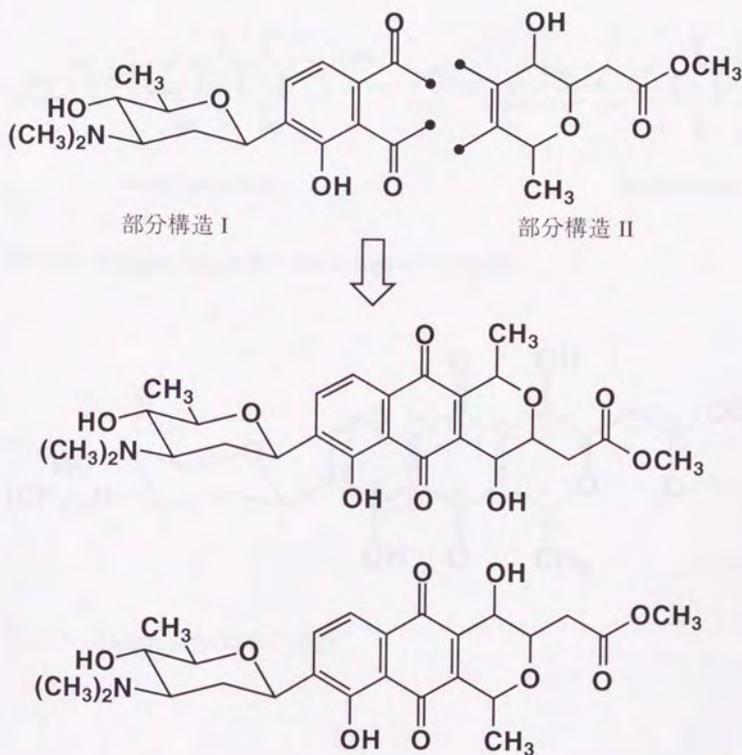


図2-21 Menoxymycin Bの2つの推定構造

この2つの推定構造からの実際の構造の決定は、加水分解反応により容易に行うことができた。つまりmenoxymycin Bを0.02Nリン酸中、50℃、1時間の加熱によりメチルエステルが加水分解され、遊離したカルボン酸が4位の水酸基と5員環ラク톤を形成することにより、medermycin²⁰⁾に変換された(図2-22)。したがってmenoxymycin B構造を、立体を含めて最終的に図2-23のように決定した。

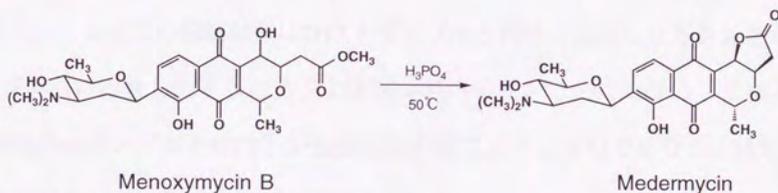


図2-22 Menoxymycin Bのmedermycinへの変換

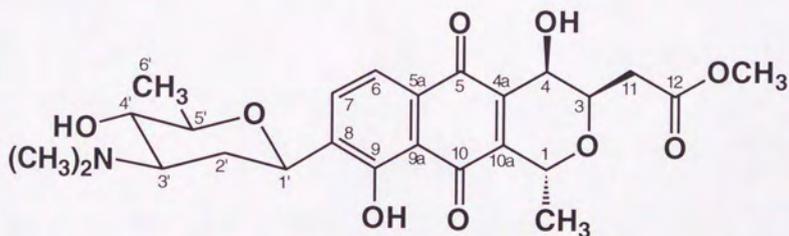


図2-23 Menoxymycin Bの構造

第8節 Menoxymycin A、Bの生物活性

(1) KB細胞、N18-RE-105細胞に対する細胞傷害活性

ヒトの扁平上皮癌由来のKB細胞に対するmenoxymycin A、Bの細胞傷害活性を図2-24に示す。いずれの場合もKB細胞に対して強い細胞傷害活性を示し、その IC_{50} はそれぞれ $0.86 \mu\text{M}$ 、 $0.22 \mu\text{M}$ であった。またこれらの細胞傷害活性は活性酸素消去剤であるDTTを $250 \mu\text{M}$ 添加することにより抑制された。しかもこの抑制効果はDTTをサンプルと同時に添加したときよりも、4時間前に添加したときの方がより強く見られた。このことより、この抑制効果はサンプルとDTTとが直接反応することによるのではなく、活性酸素が関与している可能性が示唆された。

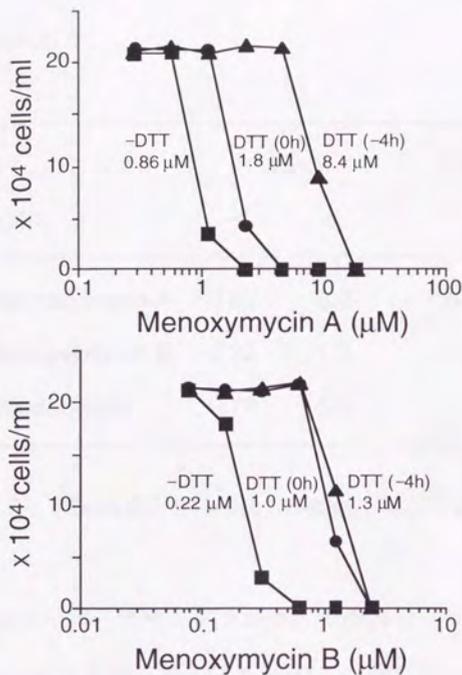


図2-24 KB細胞に対するmenoxymycin A、Bの細胞傷害活性 (数値は IC_{50} を示す。-DTTはDTT無添加、DTT (0h) はDTT同時添加、DTT (-4h) はDTT4時間前添加を示す。)

表2-5にKB細胞およびマウスの神経芽細胞腫とラットの網膜神経細胞のハイブリドーマであるN18-RE-105細胞に対するmenoxymycin A、Bおよびmedermycinの細胞傷害活性を示す。いずれの場合もこれらの化合物は強い細胞傷害活性を示し、DTTの添加によってこの活性が強く抑制されている。また全体的にKB細胞に対するよりもN18-RE-105細胞に対し、強い活性が

認められた。

DTT	KB		N18-RE-105	
	-	+	-	+
Menoxymycin A	0.86	8.2	0.14	2.4
Menoxymycin B	0.22	1.3	0.023	0.34
Medermycin	0.17	5.9	0.033	0.74

表2-5 KB細胞とN18-RE-105細胞に対する細胞傷害活性 (IC_{50} μ M)

(2) スーパーオキシドラジカルの検出

スーパーオキシドラジカル (O_2^-) の検出にはNBT法を用いた²¹⁾。NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) は O_2^- により還元されると、水に不溶性である青色のブルーホルマザンを生じる (図2-25)。この化合物による吸光度をピリジン中で測定することにより、 O_2^- 量を測定した。

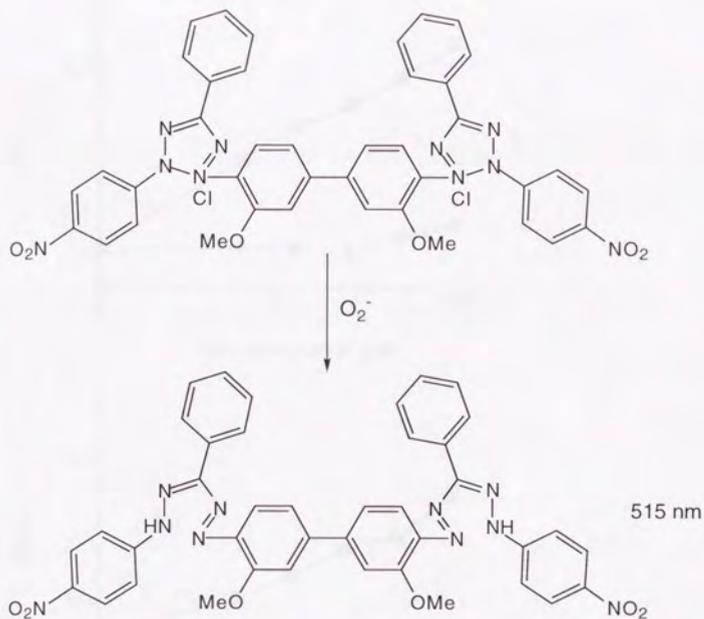


図2-25 NBT法の発色機構

N18-RE-105細胞 (6×10^5 cells) のホモジェネートにmenoxymycin A、BもしくはmedermycinのいずれかとNBTを加え、37℃で30分間インキュベートした。このとき同時にSODを500 unit添加した場合についても行った。これらの反応液から遠心分離によってブルーホルマザンの沈殿を集めピリジンに溶解し、515 nmでの吸光度を測定した。結果を図2-26に示す。

Menoxymycin A、B、medermycinいずれの場合も濃度依存的にNBTが還元されており、SODの添加でこの反応が抑えられていることから、スーパーオキシドラジカルの発生が確認された。

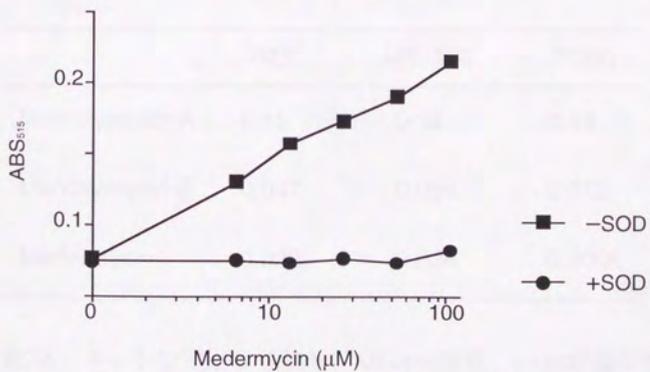
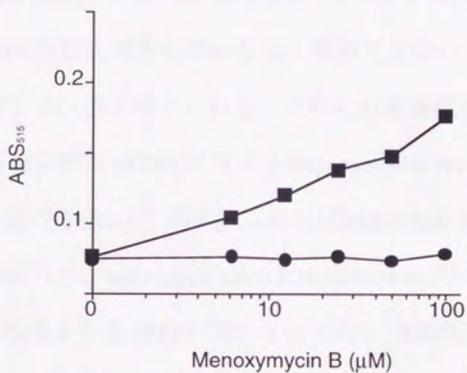
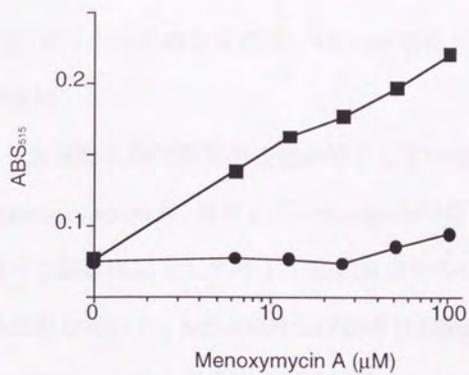


図2-26 NBT法によるスーパーオキシドラジカルの測定

(3) ラット胎児繊維芽細胞、ME-180細胞およびP388細胞に対する増殖阻害活性

正常細胞と活性酸素消去能が低下していると考えられる腫瘍細胞に対するmenoxymycin A、Bおよびmedermycinの細胞傷害活性を比較した。このような腫瘍細胞としてヒト子宮頸癌由来のME-180細胞とマウスP388白血病細胞を用いた。ME-180細胞は誘導性のMn-SODの発現が低下しており、TNFに対して高い感受性を示す¹⁵⁻¹⁶⁾。またP388細胞は培地中にDTTなどのSH化合物を添加しないと全く増殖できないことから、活性酸素消去能が低下していると考えられる。これらの腫瘍細胞と正常細胞であるラット胎児線維芽細胞 (REF) に対するmenoxymycin A、Bおよびmedermycinの細胞傷害活性を表2-6に示す。これらはREFとME-180細胞に対し同程度の活性を示したが、menoxymycin BとmedermycinはP388細胞に対しより強い細胞傷害活性を示し (REFに対し3～4倍)、腫瘍細胞による選択性が認められた。

	REF	ME-180	P388
Menoxymycin A	0.15	0.18	0.15
Menoxymycin B	0.047	0.051	0.012
Medermycin	0.028	0.024	0.0096

表2-6 ラット胎児繊維芽細胞、ME-180細胞、P388細胞に対する細胞傷害活性 (IC₅₀ μM)

第9節 考察

Streptomyces sp. KB10株がmedermycinと同時に生産するmenoxymycin A、Bは、5-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノンを骨格を有する新規抗腫瘍抗生物質であった。Aはmedermycinの窒素原子がN-オキシドになった化合物であり、Bはmedermycinの γ -ラクトンが開裂してメチルエステルになった化合物であった。Medermycinに対して、精製時と同様の操作を行なってもmenoxymycinは生成してこないのも、これはアーティファクトではないと考えられた。

これらの化合物は、*in vitro*において種々の腫瘍細胞に対して強い抗腫瘍活性を示し、この抗腫瘍活性は活性酸素消去剤であるDTTの添加により顕著に抑制された。さらにこの抑制効果は、DTTをmenoxymycinやmedermycinと同時に加えた場合よりも事前に加えておいた場合の方がより強く認められた。したがって、この抑制効果はこれらの化合物とDTTとの直接の反応によるのではないと考えられ、作用機構に活性酸素が関与していることが示唆された。また腫瘍細胞のホモジェネートを用いた実験では、これらの化合物が活性酸素である O_2 を産生していることが確認された。このようなナフトキノンを基本骨格に持つ化合物は、細胞内のシトクロムP-450レダクターゼなどの酵素により1電子還元されて、セミキノンラジカルに変換されることが知られている²²⁾⁻²³⁾。このセミキノンラジカルはさらに酸素分子を還元して O_2 を産生し、自らは再びキノンにもどる。こうして大量に発生した活性酸素がDNAなどを攻撃して細胞に傷害を与え、腫瘍

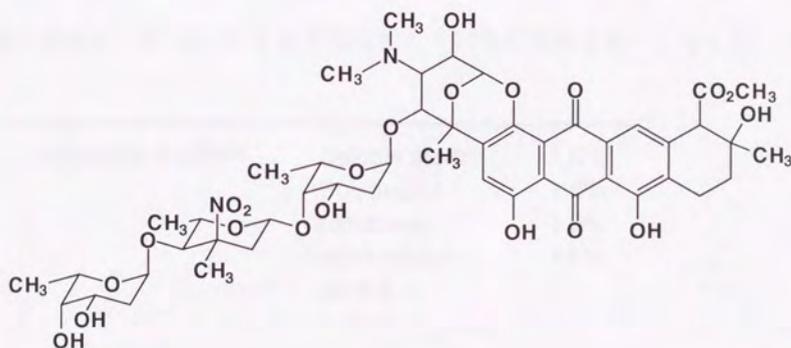
細胞死をもたらしていると考えられる。正常細胞はSODやグルタチオンなどの活性酸素除去系を持つためにこのような活性酸素を除去できるが、腫瘍細胞の中には悪性化の過程で活性酸素除去系を失う例があり、このような細胞は活性酸素に対して強い感受性を示す。したがってmenoxymycin A、B、medermycinのような化合物は、こうした細胞に対して選択的に働く抗癌剤となる可能性が示唆された。しかし、Mn-SODの発現が低下していることが知られているME-180細胞¹⁵⁾¹⁶⁾に対する細胞傷害活性は、正常細胞であるラット胎児繊維芽細胞に対するそれとほぼ同等であった。したがってこれらの化合物の産生する活性酸素 O_2 の除去には、Mn-SODは関与していないことが示唆された。これはMn-SODがミトコンドリアに局在しているのに対して、menoxymycinの標的がDNAであるためと考えられる。野本らはmedermycinがDNA合成を選択的に阻害することを報告しており、menoxymycinも活性酸素を介してDNA鎖を切断し、細胞を傷害する作用機構が推定される。一方P388細胞に対する細胞傷害活性はmenoxymycin Aではラット胎児繊維芽細胞とほぼ同等であったが、menoxymycin BおよびmedermycinはP388細胞に対し特異的に強い細胞傷害活性を示し、 IC_{50} はラット胎児繊維芽細胞の場合の3倍から4倍であった。P388細胞は培地中にSH化合物を添加しないと増殖しないことから、活性酸素除去系の1つであるグルタチオンの生合成あるいは活性化能が低下していると考えられる。Menoxymycin Bおよびmedermycinはこのような細胞に対して選択的に細胞傷害活性を示す可能性がある。

以上のように、新規化合物menoxymycin A、Bおよびmedermycinは活性酸

素生成を作用機構とする抗腫瘍抗生物質であり、特にmenoxymycin Bおよびmedermycinでは、活性酸素消去系を失った腫瘍細胞に対し選択的に細胞傷害活性を示す可能性が示唆された。今後より多くの腫瘍細胞を用いた選択性の検討、動物実験における効果など、menoxymycinの生物活性について一層の検討が必要であると考えられる。

第3章 Cororubicinに関する研究

第1節 Cororubicinの発見



N18-RE-105細胞を用いたスクリーニングにおいて、土壌から分離した *Micromonospora* 属に属する放線菌JY16株の菌体アセトン抽出液が強い細胞傷害活性を示し、DTTの添加によってこの活性が抑制された。本活性物質を精製した結果、橙色の活性物質が得られ、cororubicinと命名した。構造解析によりcororubicinはアンスラサイクリン系の新規物質であると判明した。本章ではこの物質の発酵生産、単離、構造解析、活性について述べる。

第2節 Cororubicinの発酵生産

第1節で示したようにcororubicinの生産菌である *Micromonospora sp.* JY16 株の培養は、表3-1に示す前培養培地および生産培地を用いて行った。

Preculture medium	Soluble starch	1.0%
	Polypepton	1.0%
	Molasses	1.0%
	Beef extract	1.0%
	pH 7.2	
Production medium	Soluble starch	2.5%
	Fish meal	1.0%
	Soybean meal	0.5%
	CaCO ₃	0.2%
	pH 無調整	

表3-1 JY16の前培養および生産培地

上記前培養培地15 mlを50 ml容大型試験管に分注し、これにJY16株の培養スラントより1白金耳接種し、27℃、2日間振盪培養し、種母とした。さらに前培養培地100 mlずつを500 ml容こぶ付き三角フラスコに分注し、これに上記種母2 mlを接種して、ロータリーシェーカー上にて27℃で2日間前培養を行った。50 L容ジャーファーマンターに生産培地30 Lを分注し、上記前培養液600 mLを接種し、27℃、7日間、通気量30 L/min、攪拌300 rpmにて培養を行った。

第3節 Cororubicinの単離、精製

Cororubicinの単離、精製法を図3-1に示す。

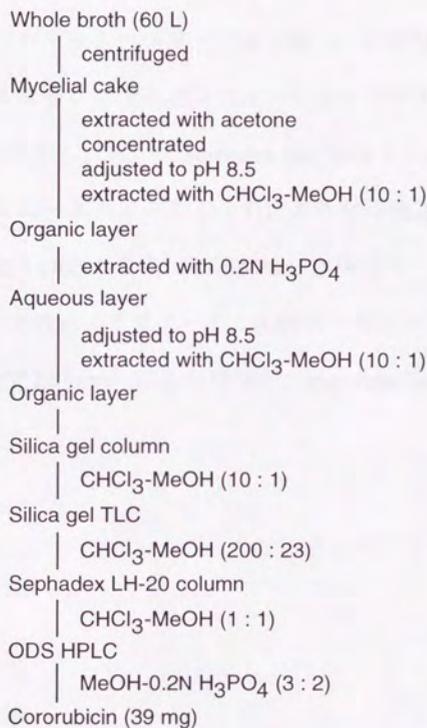


図3-1 Cororubicinの単離、精製

JY16株の培養液 (60 L) からシャープレス連続遠心分離機により得られた菌体に18 Lのアセトンを加えて活性成分を抽出した。アセトンを濃縮除去

後、濃縮液のpHを8.5に調整し、1 Lのクロロホルム—メタノール (10 : 1) で2回抽出した。これを0.2Nのリン酸で逆抽出した後、再びpHを8.5に調整し、500 mlのクロロホルム—メタノール (10 : 1) で2回抽出した。有機層を減圧濃縮し、シリカゲルカラム (4 ϕ \times 15 cm) を用いてクロマトグラフィーを行い、クロロホルム—メタノール (10 : 1) で溶出した。活性画分を集め、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにおいてクロロホルム—メタノール (200 : 23) で展開し、続いてSephadex LH-20カラム (2.2 ϕ \times 47 cm) を用いて、クロロホルム—メタノール (1 : 1) によりゲル濾過を行った。ここで得られた粗精製物をODSカラム (YMC-Pack D-ODS-7、20 ϕ \times 250 mm、YMC社製) を用いたHPLC (メタノール : 0.2Nリン酸メタノール = 3 : 2、19.8 ml/min、検出UV 220 nm) により精製し、cororubicinを39 mg得た。

第4節 Cororubicinの理化学的性質

Cororubicinの理化学的性質を表3-2に示す。

Appearance	Orange powder
MP (°C)	192 ~ 194
Molecular formula	C ₄₈ H ₆₂ N ₂ O ₂₁
HRFAB-MS (<i>m/z</i>)	
found	1003.3970 (M+H) ⁺
calcd.	1003.3924
[α] _D ²¹	+630° (c 0.11, MeOH)
UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	208 (22,900), 237 (45,200), 261 (25,600), 294 (8,600), 476 (15,500)
λ _{max} ^{MeOH+NaOH} nm (ε)	207 (84,200), 244 (41,800), 292 (8,300), 539 (14,600)
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹	3450, 1729, 1663, 1623, 1545

表3-2 Cororubicinの理化学的性質

Cororubicinは橙色粉末で、図3-2に示すようにメタノール中にて476 nm、294 nm、261 nm、237 nm、207 nmに紫外可視吸収極大を示し、アルカリの添加による長波長側へのシフトが観測された。FABマススペクトルにおいて、*m/z* 1003の(M+H)⁺イオンピークを示し(図3-3)、高分解能FABマス

スペクトルによって分子式を $C_{48}H_{62}N_2O_{21}$ と決定した。赤外吸収スペクトル (図3-4) において、水酸基 (3450 cm^{-1})、エステルカルボニル (1729 cm^{-1})、キノンカルボニル ($1663, 1623\text{ cm}^{-1}$)、ニトロ基 (1545 cm^{-1}) に由来する吸収が観測された。

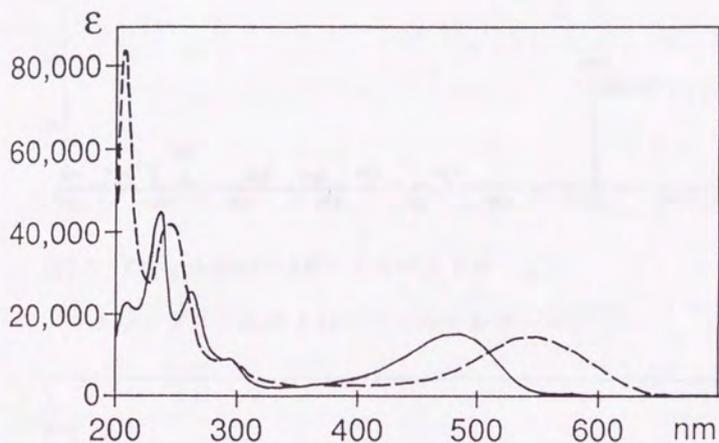


図3-2 Cororubicinの紫外可視吸収スペクトル

(—MeOH、---0.01N NaOH-MeOH)

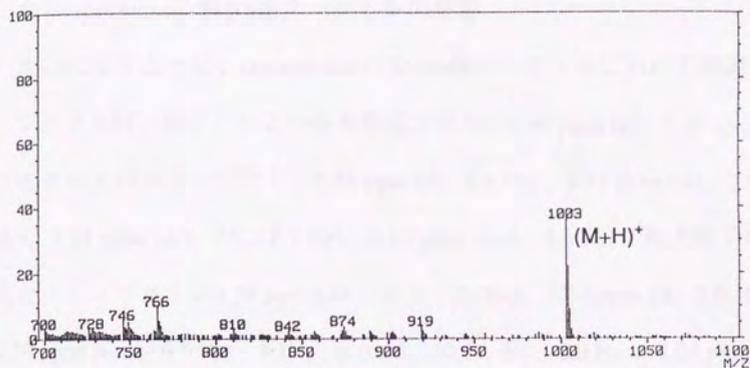


図3-3 CororubicinのFABマススペクトル
(マトリックス：*m*-ニトロベンジルアルコール)

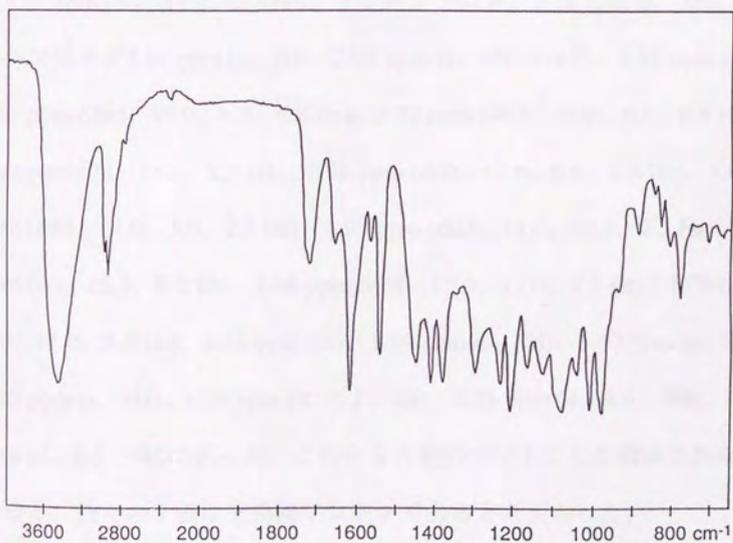


図3-4 Cororubicinの赤外吸収スペクトル (KBrディスク法)

第5節 Cororubicinの構造研究

(1) Cororubicinの¹H-NMRスペクトルの解析

図3-5に示すように、cororubicinの¹H-NMRスペクトルにおいて観測されたシグナルは、独立した2つの芳香族プロトン7.39 ppm (s)、7.16 ppm (s)、アセタールのメチンプロトン5.76 ppm (d, 3.4 Hz)、5.54 ppm (dd, 2.5、2.5 Hz)、5.21 ppm (dd, 9.0、2.3 Hz)、4.89 ppm (brd, 3.5 Hz)、酸素原子に結合したメチンプロトン4.56 ppm (dd, 11.3、3.4 Hz)、4.53 ppm (d, 2.0 Hz)、4.39 ppm (brq, 6.5 Hz)、4.15 ppm (ddd, 10.5、5.0、2.0 Hz)、4.04 ppm (dq, 9.2、6.1 Hz)、3.93 ppm (q, 6.6 Hz)、3.79 ppm (m)、3.77 ppm (m)、3.54 ppm (q, 2.7 Hz)、3.29 ppm (q, 9.2 Hz)、窒素原子に結合したメチンプロトン3.18 ppm (dd, 11.3、2.0 Hz)、メトキシプロトン3.78 ppm (s, 3H)、N-メチルプロトン3.04 ppm (s, 3H)、2.92 ppm (s, 3H)のほか、3.82 ppm (s)、3.03 ppm (ddd, 19.0、6.8、6.8 Hz)、2.72 ppm (ddd, 19.0、6.8、6.8 Hz)、2.47 ppm (dd, 15.3、2.3 Hz)、2.28 ppm (ddd, 13.0、6.8、6.8 Hz)、2.05 ppm (ddd, 14.0、5.0、2.5 Hz)、1.99 ppm (ddd, 14.0、10.5、2.5 Hz)、1.93 ppm (dd, 15.3、9.0 Hz)、1.86 ppm (ddd, 13.0、13.0、3.5 Hz)、1.76 ppm (dd, 13.0、5.8 Hz)、1.76 ppm (m)、1.69 ppm (s, 3H)、1.67 ppm (s, 3H)、1.29 ppm (s, 3H)、1.26 ppm (d, 6.1、3H)、1.23 ppm (d, 6.6、3H)、1.19 ppm (d, 6.5、3H)であった。これら55個のプロトンしか観測されなかったため、残りの7個は交換性プロトンであると考えられた。

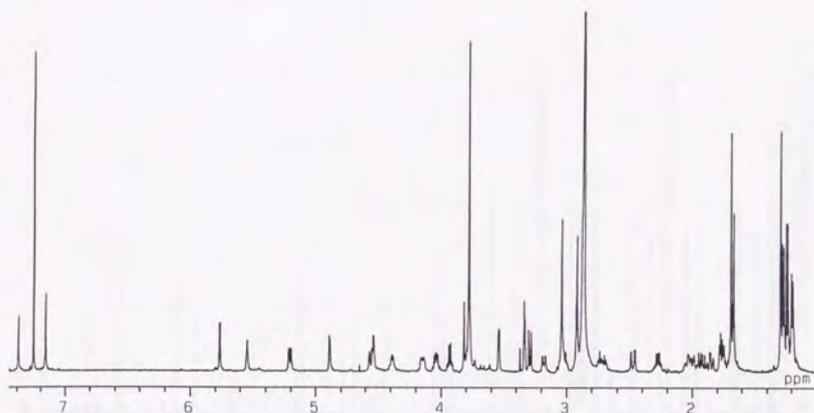


図3-5 Cororubicinの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル ($\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD} = 10 : 1$)

(2) Cororubicinの $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルの解析

図3-6に示すように cororubicinの $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいて、3個のカルボニル炭素191.2、180.0、172.8 ppm、12個の芳香族炭素159.9、155.9、147.7、142.2、139.3、132.8、131.2、122.1、119.6、116.7、114.6、112.5 ppm、4個のアセタール炭素101.6、99.4、98.9、97.2 ppm、メトキシ炭素52.4 ppm、N-メチルの炭素44.0 ppmの他、ヘテロ原子についた14個の炭素88.5、83.5、82.1、81.2、76.6、70.5、70.2、68.7、68.5、67.4、66.8、65.0、64.4、61.0 ppm、12個の脂肪族炭素56.1、41.4、33.3、32.4、32.2、27.9、24.8、23.5、20.7、18.2、16.5、16.4 ppmの計47本のシグナルしか観測されなかった。しかし後に示すHSQCスペクトルにより、44.0 ppmのメチルは2個分であると判明し、分子式 $\text{C}_{48}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{21}$ をよく支持する結果と

なった。

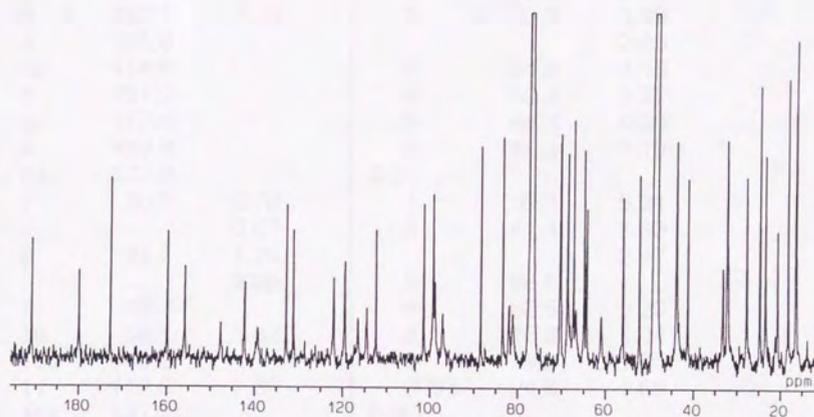


図3-6 Cororubicinの ^{13}C -NMRスペクトル ($\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD} = 10 : 1$)

(3) Cororubicinの ^1H - ^{13}C 相関

表3-3にcororubicinの炭素、水素シグナルの、HSQCスペクトルに基づく解析結果を示す。また最終的に決定した構造に基づくナンバリングも示す。

	δ_C	δ_H		δ_C	δ_H
1	147.7		S-1		
2	139.3		1	98.9	5.54
3	122.1	7.16	2	33.3	1.99
4	155.9				2.05
4a	114.6		3	64.4	4.15
5	191.2		4	82.1	3.77
5a	112.5		5	66.8	4.39
6	159.9		6	16.5	1.19
6a	132.8		S-2		
7	20.7	2.72	1	99.4	5.21
		3.03	2	41.4	1.93
8	32.2	1.76			2.47
		2.28	3	88.5	
9	68.7		4	83.5	3.29
10	56.1	3.82	5	70.2	4.04
10a	142.2		6	18.2	1.26
11	119.6	7.39	3-Me	24.8	1.69
11a	131.2		S-3		
12	180.0		1	101.6	4.89
12a	116.7		2	32.4	1.76
13	27.9	1.29			1.86
COO-	172.8		3	65.0	3.79
-OMe	52.4	3.78	4	70.5	3.54
1'	97.2	5.76	5	67.4	3.93
2'	68.5	4.56	6	16.4	1.23
3'	61.0	3.18			
4'	81.2	4.53			
5'	76.6				
6'	23.5	1.67			
N-Me ₂	44.0	2.92			
		3.04			

表3-3 CororubicinのHSQCスペクトルによるカーボン、プロトンの帰属

(CDCl₃ : CD₃OD = 10 : 1)

(4) Cororubicinの部分構造

一次元および二次元のNMRスペクトルによって以下に述べる5つの部分

構造S-1、S-2、S-3およびI、IIを決定した。

(i) 部分構造S-1

部分構造S-1を図3-7に示す。まず ^1H - ^1H COSYスペクトルにおいて1.19 ppmのメチル(6-H)と4.39 ppmのメチン(5-H)の間、このメチンと3.77 ppmのメチン(4-H)の間、続いて4.15 ppmのメチン(3-H)、2.05、1.99 ppmのメチレン(2-H)、5.54 ppmのアノメリックプロトン(1-H)と、連続したスピ結合が観測されたことにより、S-1の1-位から6-位までのつながりが判明した。またHMBCスペクトルにおいて、5-HからC-1への遠距離スピ結合が観測されたことにより、テトラヒドロピラン環の形成が判明した。さらにこれらのプロトンのスピ結合定数は、1-Hと2-H_a、2-H_bがいずれも $J=2.5$ Hz、2-H_aと3-Hが $J=10.5$ Hz、2-H_bと3-Hが $J=5.0$ Hz、3-Hと4-Hが $J=2.0$ Hzとなっていることから、置換基は1-位と4-位がアクシアル、3-位がエクアトリアルであると決定した。部分構造S-1の化学シフトを既知であるarugomycin(図3-15)の2-デオキシフコシド部分と比較することにより(表3-4)²⁴⁾、6-位のメチルはエクアトリアルであり、3-位に水酸基が置換し、4-位はエーテル結合していると判明した。したがって部分構造S-1は2-デオキシ- α -フコシドであると決定した。またcororubicinのメタノリシスにより得られたメチル 2-デオキシ- α -フコシドの $[\alpha]_D^{21}$ は -120° (c 0.48, CHCl₃)であり、文献値の $[\alpha]_D^{25} = -119^\circ$ (c 0.68, CHCl₃)²⁵⁾と比較することによりL-体であると決定した。

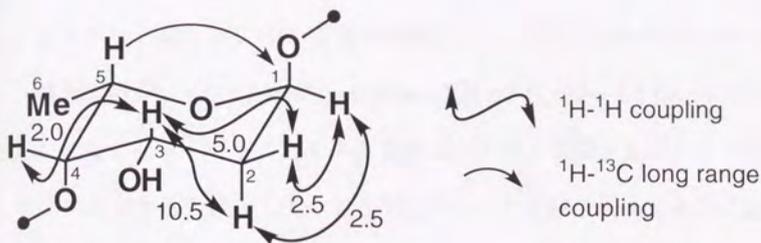


図3-7 部分構造S-1

	S-1	arugomycin
1	98.9	100.0
2	33.3	34.6
3	64.4	65.0
4	82.1	82.3
5	66.8	67.9
6	16.5	17.1

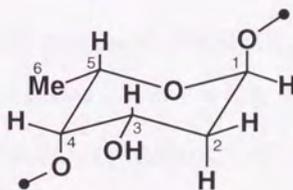


表3-4 Cororubicinの部分構造S-1とarugomycinの2-デオキシ- α -フコシド部分の炭素化学シフトの比較²⁴⁾

(ii) 部分構造S-2

部分構造S-2を図3-8に示す。まず $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSYスペクトルにおいて1.26 ppmのメチル (6-H) と4.04 ppmのメチン (5-H) の間、このメチンと3.29 ppmのメチン (4-H) の間スピン結合が観測された。また5.21 ppmのメチン (1-H) と2.47、1.93 ppmのメチレン (2-H) の間にもスピン結合が観測された。さらにHMBCスペクトルにおいて、5-HからC-1とC-3へ、2-HからC-3とC-4へ、3-MeからC-2とC-3とC-4への遠距離スピン結合が観測されたことによ

り、テトラヒドロピラン環の存在が判明した。またこれらのプロトンのスピン結合定数が、1-Hと2-H_aが $J=9.0$ Hz、1-Hと2-H_bが $J=2.3$ Hz、4-Hと5-Hが $J=9.2$ Hzとなっていることから、置換基は1-位、4-位、5-位ともにエクアトリアルであると決定した。C-3の化学シフトが88.5 ppmであることから、この炭素には水酸基あるいはニトロ基が置換していると考えられたが、化学シフトを既知物質であるarugomycinのβ-デシロニトロシド部分と比較した結果(表3-5)²⁴⁾、部分構造S-2はβ-デシロニトロシドであると決定した。なおニトロ基の存在は第4節で示したように1545 cm⁻¹の赤外吸収により判明した。またcororubicinのメタノリシスにより得られたメチルβ-デシロニトロシドの $[\alpha]_D^{21}$ は-10° (c 0.06, MeOH)であり、文献値の $[\alpha]_D^{23}$ -13° (c 0.10, MeOH)²⁶⁾と比較することによりL-体であると決定した。

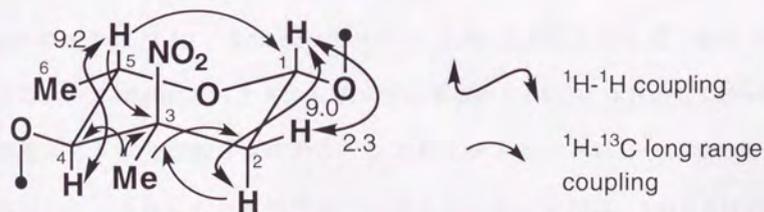


図3-8 部分構造S-2

	S-2	arugomycin
1	99.4	99.7
2	41.4	41.9
3	88.5	89.5
4	83.5	83.6
5	70.2	70.6
6	18.2	18.6
3-Me	24.8	24.9

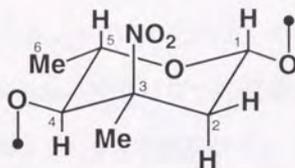


表3-5 Cororubicinの部分構造S-2とarugomycinの β -デシロニトロシド部分の炭素化学シフトの比較²⁴⁾

(iii) 部分構造S-3

部分構造S-3を図3-9に示す。まず ^1H - ^1H COSYスペクトルにおいて1.23 ppmのメチル (6-H) と3.93 ppmのメチン (5-H) の間に、また4.89 ppmのアノメリックプロトン (1-H) から1.86、1.76 ppmのメチレン (2-H)、続いて3.79 ppmのメチン (3-H)、3.54 ppmのメチン (4-H) と連続したスピン結合が観測された。HMBCスペクトルにおいて、6-Hから4-Cへ、1-Hから5-Cへの遠距離スピン結合が観測されたことにより、テトラヒドロピラン環の存在が判明した。さらにこれらのプロトンのスピン結合定数は、1-Hと2-H_aが $J=3.5$ Hz、1-Hと2-H_bが $J<1.0$ Hz、2-H_aと3-Hが $J=13.0$ Hz、2-H_bと3-Hが $J=5.8$ Hz、3-Hと4-Hが $J=2.7$ Hzとなっていることから、置換基は1-位と4-位がアクシアル3-位がエクアトリアルであると決定した。部分構造S-3の化学シフトを既知であるarugomycinの2-デオキシフコシド部分と比較することにより (表3-6)²⁴⁾、6-位のメチルはエクアトリアルであると決定し、部分構造

S-3は部分構造S-1と同様、2-デオキシ- α -フコシドであると決定した。またC-4の化学シフトが、部分構造S-1やarugomycinの場合に比べ高磁場シフトしていることから、部分構造S-3ではC-3およびC-4の水酸基がフリーであると判明した。部分構造S-1と同様に、この2-デオキシ- α -フコシドはL-体であると決定した。

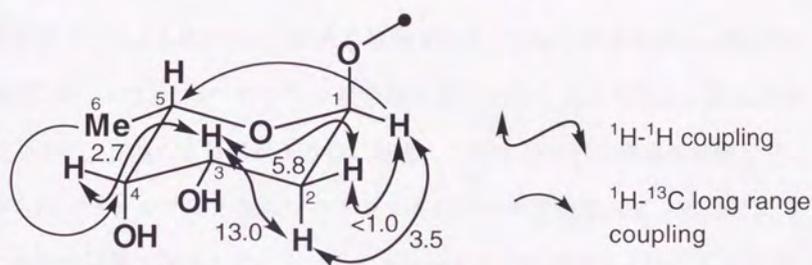


図3-9 部分構造S-3

	S-3	arugomycin
1	101.6	100.0
2	32.4	34.6
3	65.0	65.0
4	70.5	82.3
5	67.4	67.9
6	16.4	17.1

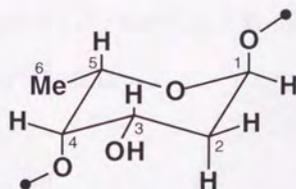


表3-6 Cororubicinの部分構造S-3とarugomycinの2-デオキシ- α -フコシド部分の炭素化学シフトの比較²⁴⁾

(iv) 部分構造 I

部分構造 I を図3-10に示す。まず ^1H - ^1H COSYスペクトルにおいて5.76 ppmのアノメリックプロトン (1'-H) から4.56 ppmのメチン (2'-H)、続いて3.18 ppmのメチン (3'-H)、4.53 ppmのメチン (4'-H) と連続したスピン結合が観測され、1'-位から4'-位までのつながりが判明した。HMBCスペクトルにおいて、アノメリックプロトン1'-HからC-6'と芳香族炭素C-1へ、1.67 ppmのメチルプロトン (6'-H) からC-4'、C-5'および芳香族炭素C-2へ、また芳香族プロトン3-HからC-5'と芳香族炭素C-1、C-4aへのメタスピン結合が観測され、C-2、C-4への小さな遠距離スピン結合も認められた。以上の結果により、2個の6員環が芳香環に結合した図3-10に示す構造が判明した。さらにジメチルアミノ基のプロトンからC-3'への遠距離スピン結合によりこの置換位置も決定した。しかしC-12aへはいずれのプロトンからも遠距離スピン結合が観測されないために、このC-12aの帰属はできなかった。またプロトンのスピン結合定数は、1'-Hと2'-Hが $J = 3.4 \text{ Hz}$ 、2'-Hと3'-Hが $J = 11.3 \text{ Hz}$ 、3'-Hと4'-Hが $J = 2.0 \text{ Hz}$ であったので、1'~6'から成る糖の置換基の立体は1'-位と4'-位はアクシアル、2'-位と3'-位はエクアトリアルであると決定した。

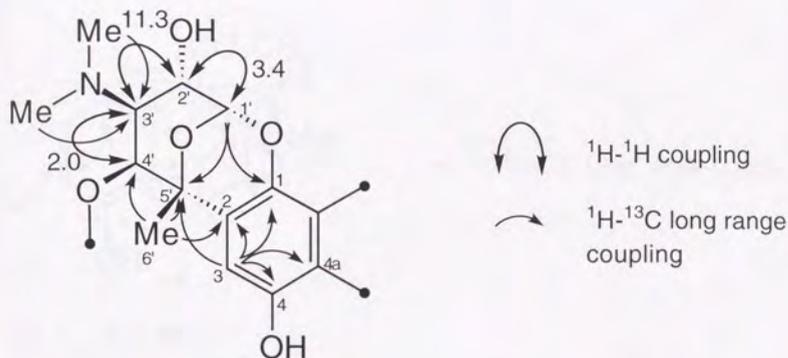


図3-10 部分構造 I

(v) 部分構造 II

部分構造 IIを図3-11に示す。¹H-¹H COSYスペクトルにおいて3.03、2.72 ppmのメチレン (7-H) と2.28、1.76 ppmのメチレン (8-H) の間にスピ結合が観測された。HMBCスペクトルにおいて、7-HからC-6、C-6a、C-9、C-10aに、8-HからC-6a、C-9に、13-HからC-8、C-9、C-10に、さらに10-HからC-9、C-10a、C-11、C-13および172.8 ppmのエステルカルボニル炭素にそれぞれ遠距離スピ結合が観測された。また7.39 ppmの芳香族プロトン (11-H) からメタ位のC-5aとC-6a、3.78 ppmのメトキシプロトンから172.8 ppmのエステルカルボニル炭素にも遠距離スピ結合が観測された。これらのNMRデータより、芳香環とシクロヘキサン環が結合した図3-11のような部分構造の存在が判明した。しかしC-11aへの遠距離スピ結合が観測されなかったためにこの炭素の帰属はできなかった。

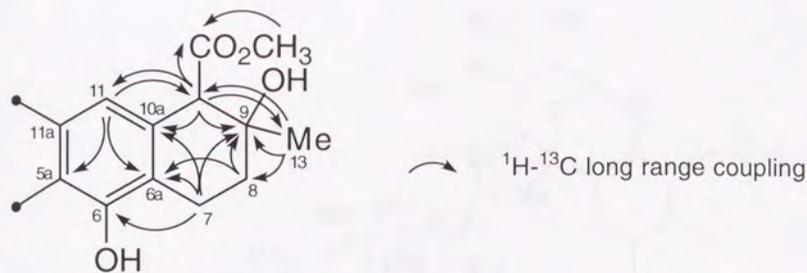


図3-11 部分構造 II

(5) Cororubicinの構造決定

次にこれまでに判明した部分構造間のつながりを示す。まず I の4'-HからS-1のアノメリック炭素C-1 (98.9 ppm) への遠距離スピ結合が観測されたことにより、4'-位に糖S-1が置換していることが判明した。さらにS-2のアノメリックプロトン1-HからS-1のC-4 (82.1 ppm) に、またS-3のアノメリックプロトン1-HからS-2のC-4 (83.5 ppm) にも遠距離スピ結合が観測されたので、図3-12に示すように、S-1、S-2、S-3の3個の糖は1,4-結合でつながったトリサッカライド構造を形成し、アグリコンの4'-位に置換していることが判明した。

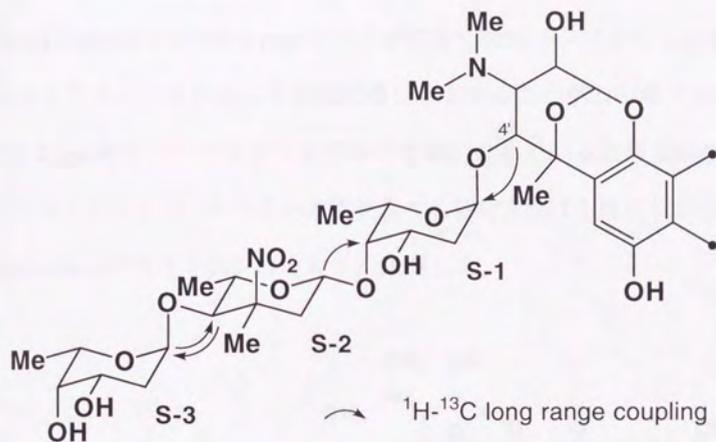


図3-12 部分構造S-1、S-2、S-3およびIの結合

以上の結果より決定した2個の部分構造を図3-13に示す。

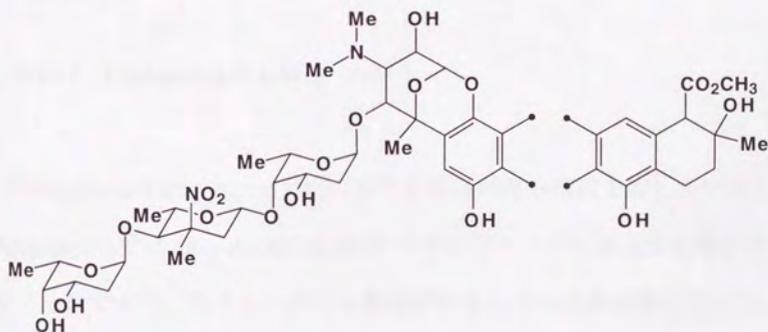


図3-13 2つの部分構造

残るユニットは2個のキノンカルボニルのみであるが、その化学シフト

は191.2 ppmおよび180.0 ppmと一方が大きく低磁場シフトしている。水素結合したキノンカルボニルは低磁場シフトすることが知られているので、191.2 ppmのキノンカルボニルのみが水素結合していると考えられる。一方のキノンカルボニルのみが水素結合する結合方法は1通りしかないので、cororubicinの構造を図3-14のように決定した。

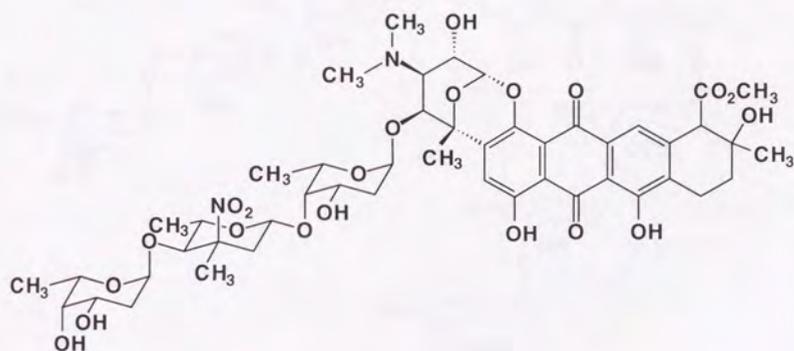


図3-14 Cororubicinの全構造

Cororubicinはarugomycin (図3-15)²⁴⁾ と類似の部分構造を有している。ArugomycinではcororubicinのS-3のデオキシフコースに相当する糖がディジノースであり、さらに7位にも糖鎖が結合している点が異っている。このarugomycinの還元分解物であるAG6 (図3-16)²⁷⁾ は、cororubicinと同一のアグリコンを有していると考えられるので、両者のアグリコン部分の¹³C-NMRスペクトルを比較した(表3-7)。両者の化学シフトは非常によく一致し、同一のアグリコンを有することを支持すると共に、相対立体配置も

同一であることを示唆した。また、C-5、C-11a、C-12、C-12aの化学シフトもこのAG6との比較により、前に示した表3-3の通りであると帰属した。

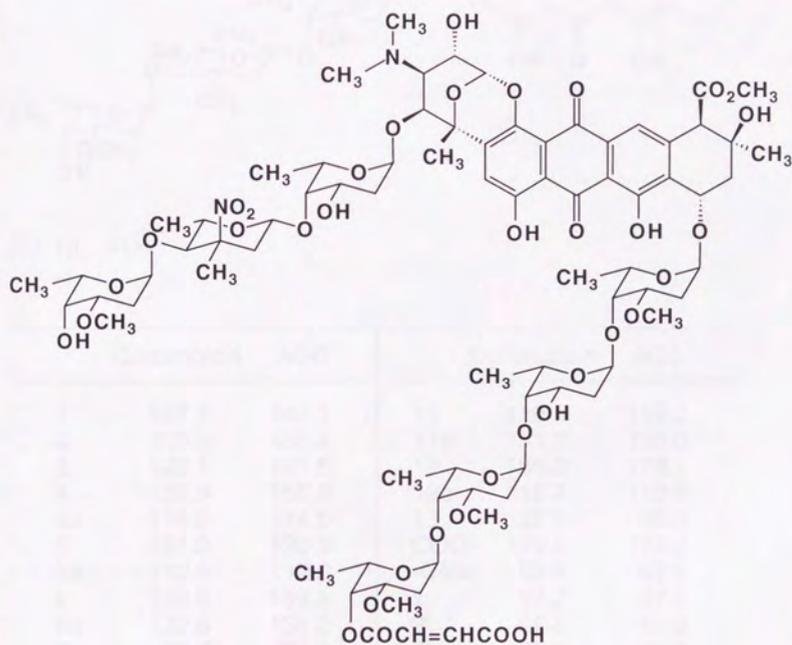


図3-15 Arugomycin²⁴⁾

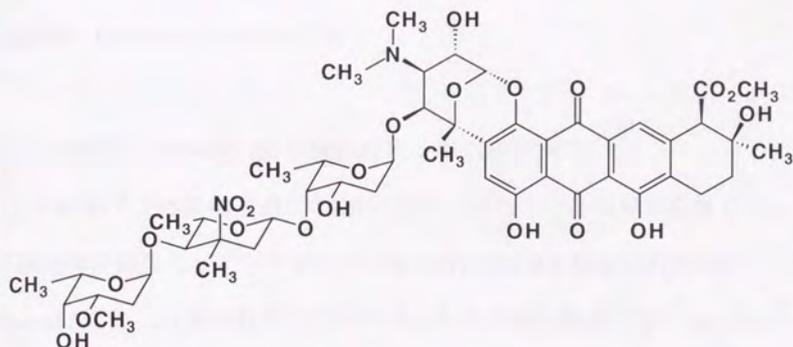


図3-16 AG6²⁷⁾

Cororubicin			AG6		
1	147.7	147.7	11	119.6	119.2
2	139.3	139.4	11a	131.2	133.0
3	122.1	121.8	12	180.0	179.1
4	155.9	155.9	12a	116.7	116.6
4a	114.6	114.6	13	27.9	28.9
5	191.2	190.9	COO-	172.8	173.0
5a	112.5	112.6	-OMe	52.4	52.9
6	159.9	159.8	1'	97.2	97.4
6a	132.8	131.2	2'	68.5	68.8
7	20.7	21.0	3'	61.0	61.5
8	32.2	33.4	4'	81.2	81.6
9	68.7	70.5	5'	76.6	77.2
10	56.1	55.8	6'	23.5	24.0
10a	142.2	141.8	N-Me ₂	44.0	44.7

表3-7 CororubicinとAG6のアグリコンの¹³C-NMRスペクトルの比較²⁷⁾

第6節 Cororubicinの生物活性

(1) KB細胞、N18-RE-105細胞に対する細胞傷害活性

ヒトの扁平上皮癌細胞由来のKB細胞と、マウスの神経芽細胞腫とラットの網膜神経細胞のハイブリドームであるN18-RE-105細胞に対する、cororubicinと、代表的なアンストラサイクリン系抗生物質として知られるadriamycin²⁸⁾の細胞傷害活性を表3-4に示す。いずれの場合も強い細胞傷害活性が認められたが、cororubicinはadriamycinの1/5から1/8程度の活性を示した。しかしcororubicinによる細胞傷害活性は活性酸素消去剤であるDTT 250 μ Mの添加により抑制されたのに対し、adriamycinによる活性はDTTの添加ではほとんど抑制されなかった。またいずれの化合物もN18-RE-105細胞に対し、KB細胞に対するよりも強い増殖阻害活性を示した。

DTT	KB		N18-RE-105	
	-	+	-	+
Cororubicin	4.3	10	0.84	2.9
Adriamycin	0.79	0.76	0.11	0.12

表3-8 KB細胞とN18-RE-105細胞に対する増殖阻害活性とDTTによる抑制効果 (IC_{50} μ M)

(2) スーパーオキシドラジカルの検出

スーパーオキシドラジカル O_2^- の検出には前章と同様、N18-RE-105細胞のホモジェネートを用いたNBT法²¹⁾で行った。この結果生じたブルーホルマザンのピリジン中、515 nmでの吸光度を測定した結果を図3-17に示す。このようにブルーホルマザンが検出され、SODの添加でその生成が抑制されていることから、スーパーオキシドラジカルの発生が確認された。

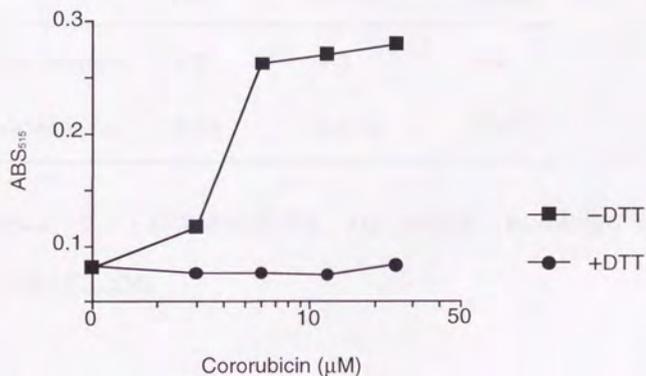


図3-17 NBT法によるスーパーオキシドラジカルの測定

(3) ラット胎児繊維芽細胞、ME-180細胞およびP388細胞に対する増殖阻害活性

前章で用いた活性酸素消去能が低下していると考えられる腫瘍細胞であるヒト子宮頸癌由来のME-180細胞¹⁵⁾⁻¹⁶⁾とマウスP388白血病細胞に対する細胞傷害活性を、正常細胞であるラット胎児線維芽細胞 (REF) の場合と比

較した。これらの細胞に対するcororubicinおよびadriamycinの細胞傷害活性を表3-5に示す。CororubicinではME-180細胞とP388細胞に対し、正常細胞の場合より2倍程度強い細胞傷害活性が見られた。またadriamycinは正常細胞と比べて、ME-180細胞と特にP388細胞に対して極めて強い細胞傷害活性を示し、双方の化合物で活性酸素消去能が低下していると考えられる細胞に対する選択性が認められた。

	REF	ME-180	P388
Cororubicin	2.3	1.1	1.2
Adriamycin	0.22	0.048	0.011

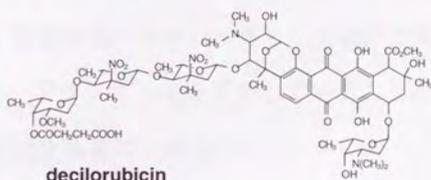
表3-9 ラット胎児繊維芽細胞、ME-180細胞、P388細胞に対する細胞傷害活性 (IC_{50} μ M)

第7節 考察

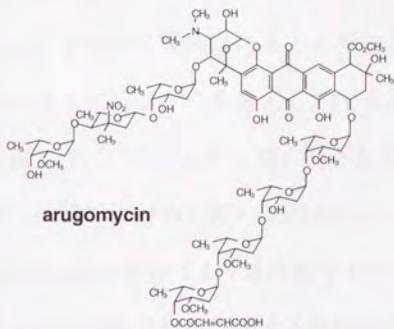
Micromonospora sp. JY16株が生産するcororubicinは、新規アンスラサイケリン系抗腫瘍抗生物質であった。このcororubicinは、1968年に単離されたnogalamycin²⁹⁾、1983年に単離されたdecilorubicin³⁰⁾⁻³¹⁾、1984年に単離されたarugomycin^{24),27),32)-34)}、1993年に単離されたrespinomycin³⁵⁾⁻³⁶⁾と同様に、D環にアミノ糖がグリコシド結合とC-C結合によって結合した構造を持ち、さらにトリサッカライド鎖が結合した化合物であった。



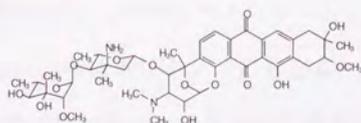
nogalamycin



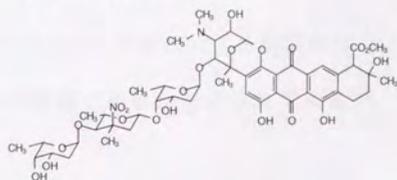
decilorubicin



arugomycin



respinomycin A2



cororubicin

これらのうち、7位に水酸基もしくは糖が置換しておらずメチレンとなっている化合物は、respinomycin A2とこのcororubicinだけであり、極めて特徴的な構造であると言える。

アンスラサイクリン系抗生物質の中には抗腫瘍活性を示すものが多く、中でも1969年に発見されたadriamycin²⁸⁾は非常に強い抗腫瘍活性を有し、現在臨床で用いられている。Cororubicinも*in vitro*において種々の腫瘍細胞に対して強い細胞傷害活性を示した。またcororubicinの細胞傷害活性は活性酸素消去剤であるDTTの添加により抑制されたのに対し、adriamycinの活性はDTTで抑制されなかった。アンスラサイクリン系抗生物質は活性酸素を生成することが知られており、腫瘍細胞のホモジェネートを用いた実験では、cororubicinもスーパーオキシドラジカルO₂⁻を産生していることが確認された。アンスラサイクリン系抗生物質は、細胞内のシトクロムP-450レダクターゼなどの酵素により1電子還元されて、相当するセミキノラジカルに変換されることが知られている⁸⁾。このセミキノラジカルは直ちに酸素分子を還元してO₂を産生し、自らは再びキノンにもどる(図3-17)。こうして大量に発生した活性酸素は細胞内に傷害を与え得るが、抗腫瘍作用の直接の原因かについては疑問が持たれており、adriamycinの場合はより低濃度でトポイソメラーゼIIに対する阻害が起り、これが抗腫瘍活性を発揮する直接の作用機構であると推定されている³⁷⁾。

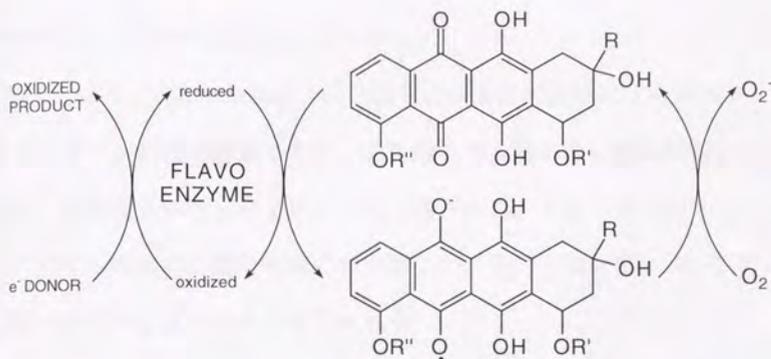


図3-17 アンスラサイクリンの活性酸素生成機構⁸⁾

Adriamycinでは細胞傷害活性のDTTによる抑制効果が見られず、cororubicinでのみ見られたことから、このcororubicinによる細胞傷害活性の作用機構はadriamycinとは異っていることが考えられた。正常細胞に比べ、Mn-SOD活性やグルタチオン濃度が低下していると考えられるME-180細胞やP388細胞に対して選択的な細胞傷害活性を示したこと、DTTにより活性が抑制されたこと等から、細胞内での活性酸素生成がcororubicinの作用機構に関与していると考えられる。一方、adriamycinもME-180細胞やP388細胞にきわめて選択的な活性を示したことから、DTTでは消去できない活性酸素が細胞傷害作用の発現に関与している可能性がある。実際、adriamycinがトポイソメラーゼIIとDNA切断複合体を形成した後、細胞死に至る過程についてはほとんど解明されていないので、そのいずれかの段階で活性酸素が関与する余地は残されている。もしそうであるならば、adriamycinの優れた抗腫瘍効果にこのような腫瘍細胞の活性酸素消去能低

下が関わっている可能性も考えられる。

以上のようにcororubicinは、活性酸素生成を作用機構とする新規アンシラサイクリン系抗生物質であり、活性酸素消去能が低い腫瘍細胞に対し選択的に細胞傷害活性を示す可能性が示唆された。今後トポイソメラーゼIIに対する作用や、動物実験での効果など、その生物活性についてのより一層の検討が必要であると考えられる。

第2部 光学活性な生理活性物質の合成研究

序章

現代の有機合成化学においては、様々な不斉反応の開発や分析技術の発達にともない、目的物を光学的に純粋に合成することは比較的容易なこととなった。純粋な光学活性体を合成することは、無論それ自体が有意義なことであるが、生理活性という観点から見たときにさらに意味を持つ。多くの天然生理活性物質は光学活性体として存在するし、実際活性を示すのは一方の鏡像体のみで、他方は活性がなかったり、逆に活性を阻害したりする例もある。したがって活性試験を目的にキラルな化合物を合成するためには、純粋な光学活性体の合成は必須である。

数十年前に問題となった催奇性をもつサリドマイド³⁸⁾⁻³⁹⁾を例にすれば、(R)-体と(S)-体の間で薬理作用には大差ない。実際の薬剤はラセミ体で用いられていた。しかしその催奇性を検討するモデル実験での奇形発生率は(S)-体を投与した場合に著しく、(R)-体でははるかに低くなっている。もともと(R)-体も体内でのラセミ化により(S)-体を生じ、これによる催奇形性を有するので、必ずしも純粋な(R)-体のみを用いていれば悲劇は起こらなかったとはいいがたいが、鏡像体間の活性差を印象付ける強烈な例である。こうした鏡像体間の活性差はその化合物のレセプターとの関係によると考えられるが、薬剤に限らず、グルタミン酸のうまみやカルボンのにおい、昆虫フェロモンなど、広範にみられ、構造活性相関の意味からも興味深い。

したがって、活性の点からみれば、(R)-体と(S)-体は鏡像体とはいえ全く別の化合物とも考えることができる。

一方光学活性体を得る方法は、主に、(1) 中間体もしくは目的物の光学分割、(2) 光学活性原料からの出発、(3) 不斉反応の利用の3つがある。

(1) は酵素や光学分割剤を用いラセミ体を分割するので1度に両鏡像対が得られるが、選択的ではないため必要な鏡像体は50%しか得られない。

(2) は原料としては限られた化合物しか用いることができないし、一方の鏡像体しか入手できないこともある。しかし原料が高光学純度であって、合成途中それが維持できれば目的物も高光学純度で得られる。(3) は最近進展がはげしく、Sharplessの不斉エポキシ化⁴⁰⁾・不斉ジヒドロキシ化⁴¹⁾、BINAP・ルテニウム錯体による不斉水素化⁴²⁾など、かなり選択性のよい手法が確立されてきた。これらの手法を目的に合わせて適当に組み合わせることでより効率的な合成が望める。

私はこのように活性と密接に結びつくような光学活性体の合成を目的に各種生理活性物質の合成を行ったので以下に述べる。第1章ではアメリカヤシゾウムシの集合フェロモンであるrhynchophorolの両鏡像体合成について述べる。第2章ではACAT阻害剤であるacaterinとその立体異性体の合成について述べる。第3章では細胞周期阻害剤radicolの全合成およびプローブ合成について述べる。

第1章 アメリカヤシゾウムシ (*Rhynchophorus palmarum*) の集合フェロモン、rhynchophorolの両鏡像体合成

第1節 合成の目的

アメリカヤシゾウムシ (*Rhynchophorus palmarum*) は、熱帯アメリカ地方や西インド諸島に生息するココナッツや油ヤシの主な害虫である。1991年にRochatらによって、このアメリカヤシゾウムシの雄が集合フェロモンを生産していることが発見され⁴³⁾、つづいてその主成分が

(*E*)-6-methyl-2-hepten-4-ol (**1**) であることが決定されrhynchophorolと命名された⁴⁴⁾。かれらによって合成されたラセミのrhynchophorolはアメリカヤシゾウムシに対して誘引性を示したが天然物の絶対立体配置は不明であった。この立体化学の解明を目的としてrhynchophorolの両鏡像体を高い光学純度で合成したので本章で述べる。



図1-1 Rhynchophorolの両鏡像体

第2節 合成計画

Rhynchophorolの合成において最も問題となる点は4位の不斉な水酸基である。1976年にChanらによって (*S*)-**1**が、化学的な光学分割の手法を用いて合成されていたが⁴⁵⁾、私は近年発達してきた2級アルコールの酵素による光学分割を用いることにした。2級アルコールの光学分割には2通りの手法がある。a) ラセミのアルコールに対して立体選択的にアセチル化する方法と b) アルコールをアシル化したラセミのエステルを立体選択的に加水分解する方法である。中間体としては**2**のような、3-メチルブタナールとプロピンから合成できるアルコールを考え、これを半還元することにより**1**に導けると考えた。光学分割は**1**または**2**の段階で行うものとし、a) または b) の手法を用い、入手可能なリパーゼもしくはエステラーゼをスクリーニングすることにした。

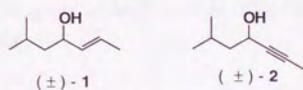
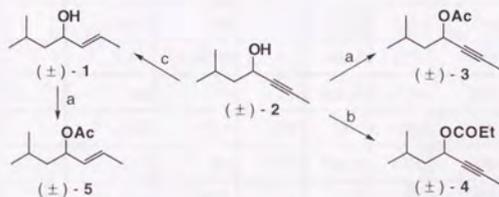


図1-2 合成計画

第3節 合成

酵素を用いた光学分割を試みるに当たり、まずその基質となる化合物の合成を行った。(±)-6-メチル-2-ヘプチン-4-オール (**2**) は既知の方法⁴⁵⁾に従い、3-メチルブタナールとプロピンより調製した。つづいて(±)-**2** をアシル化し、アセテート(±)-**3** およびプロパノエート(±)-**4** へと導いた。また(±)-**2** を水素化アルミニウムリチウムで還元し(±)-**1**、これをアセチル化することで(±)-**5** を得た (Scheme 1-1)。



Scheme 1-1 酵素的光学分割のための基質合成

Reagents: a) Ac_2O , $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$, 93% for **3**, 94% for **5**. b) $(\text{EtCO})_2\text{O}$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$, 94%. c) LiAlH_4 , THF, 50%.

ここでこれらの基質を用いた光学分割であるが、まず前節で示した a) の方法を試みた。様々な酵素とビニルアセテートを用いて(±)-**2** の不斉アセチル化⁴⁶⁾を試みたところ、反応は極めて遅く、比較的反応速度の速かったリパーゼAKやP (Amano) では光学活性な **3** は得られなかった。そこでこの方法はあきらめ、b) の不斉加水分解による方法を試みた。スクリーニングにおける光学純度は文献値⁴⁵⁾に基づいて $[\alpha]_D$ の比較により計算し、後にこの実験で明らかになった正しい $[\alpha]_D$ に基づいて計算し直した。加水分解

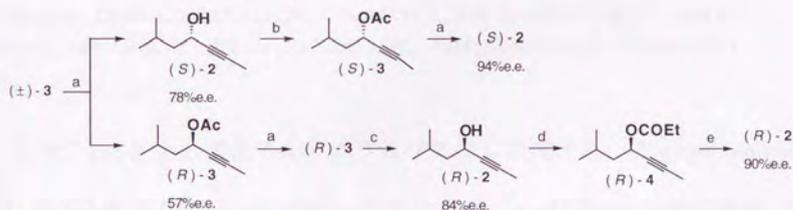
のスクリーニングはすべて20%メタノール/pH7.5リン酸緩衝溶液中で行い、反応が進んだ反応条件を表1-1に示す。

Entry	Substrate	Enzyme	Temp.	Time	Produced alcohol			Recovered ester		
					Yield	Isomer	e.e.	Yield	Isomer	e.e.
1	(±)-3	PPL	r.t.	5days	9%	(R)-(+)	2%	89%	(S)-(-)	0%
2	(±)-3	PLE	r.t.	20min	53%	(R)-(+)	17%	38%	(S)-(-)	
3	(±)-3	PLE	-20°C	23.5h	44%	(R)-(+)	15%	41%	(S)-(-)	
4	(±)-3	MY	r.t.	54.5h	19%	(R)-(+)	40%	59%	(S)-(-)	12%
5	(±)-3	A	r.t.	7h	27%	(S)-(-)	75%	65%	(R)-(+)	31%
6	(±)-3	P	r.t.	48.5h	7%	(R)-(+)	14%	82%	(S)-(-)	2%
7	(±)-3	OF	r.t.	26.5h	14%	(R)-(+)	47%			
8	(±)-3	F-AP15	r.t.	43.5h	21%	(S)-(-)	69%	60%	(R)-(+)	
9	(±)-3	PS	r.t.	9days	30%	(R)-(+)	23%	31%	(S)-(-)	16%
10	(±)-5	PLE	-5°C	38h	20%	(R)-(+)	10%			
11	(±)-5	MY	r.t.	3days	11%	(R)-(+)	12%			
12	(±)-4	PPL	r.t.	7.7h	12%	(R)-(+)	15%	77%	(S)-(-)	2%
13	(±)-4	PLE	4°C	30min	34%	(R)-(+)	12%	50%	(S)-(-)	9%
14	(±)-4	MY	r.t.	4h	27%	(R)-(+)	56%	58%	(S)-(-)	25%
15	(±)-4	A	r.t.	23h	20%	(S)-(-)	21%	59%	(R)-(+)	12%
16	(±)-4	P	r.t.	21h	32%	(S)-(-)	31%	56%	(R)-(+)	16%
17	(±)-4	OF	r.t.	6.7h	13%	(R)-(+)	70%	51%	(S)-(-)	20%
18	(±)-4	F-AP15	r.t.	6days	29%	(S)-(-)	74%	64%	(R)-(+)	31%
19	(±)-4	PS	r.t.	7days	32%	(R)-(+)	22%	46%	(S)-(-)	14%

表1-1 光学分割のための酵素のスクリーニング

この結果、(S)-(-)-体を得る例の中では、(±)-3 に対しリパーゼ A (Amano) を室温で作用させた場合 (Entry 5)、(R)-(+)-体を得る例の中では、(±)-4 に対しリパーゼ OF (Meito) を室温で作用させた場合 (Entry 17) に高

い光学純度が得られ、それぞれ75%e.e.、70%e.e.であった。これら2種のリパーゼを用いてプレパラティブスケールでの分割を行った。Scheme 1-2に示すように(±)-**3**をリパーゼAで処理後、カラムクロマトグラフィーにより(S)-**2** (78% e.e.)を40%で得、(R)-エンリッチされた**3** (57% e.e.)を54%で回収した。この(S)-**2**をさらに精製するために再びアセチル化してリパーゼAで処理することで、(±)-**3**からの総収率24%で94% e.e.の(S)-**2**を得た。回収した(R)-**3**は再びリパーゼAで処理し、回収後加水分解により84% e.e.の(R)-**2**を得た。これは対応するプロピオネート(R)-**4**に変換後、リパーゼOFで加水分解することで、(±)-**3**からの総収率16%で90% e.e.の(R)-**2**を得ることができた。

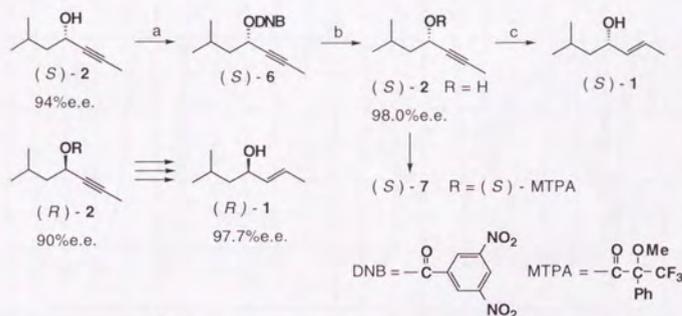


Scheme 1-2 (±)-**3** の酵素的光学分割

Reagents: a) Lipase A (Amano), pH = 7.5 phosphate buffer, 20% MeOH aq. soln., 40% (S)-**2** and 54% (R)-**3**, 65% for (S)-**2** of 94% e.e., 74% for (R)-**3** of 84% e.e. b) Ac₂O, C₅H₅N, 92%. c) KOH, MeOH, 91%. d) (EtCO)₂O, C₅H₅N, 92%. e) Lipase OF (Meito), pH = 7.5 phosphate buffer, 20% MeOH aq. soln., 48%.

次に Scheme 1-3 に示すように、**2** の両鏡像体は対応する3,5-ジニトロベンゾエート **6** に変換し、再結晶を繰り返してさらに精製し、加水分解で **2**

に戻すことで最終的に (*S*)-**2** は98.0% e.e.、(*R*)-**2** は97.7% e.e. にまで向上できた。最終的な光学純度は対応する (*R*)-Mosher エステル⁴⁷⁾の HPLC 分析により決定した。



Scheme 1-3 **1** の両鏡像体の合成

Reagents: DNBCl, DMAP, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 72% for (*S*)-**7**, 60% for (*R*)-**7**. b) K_2CO_3 , MeOH / CH_2Cl_2 , 68% for (*S*)-**2**, 83% for (*R*)-**2**. c) LiAlH_4 , THF, 61% for (*S*)-**1**, 74% for (*R*)-**1**.

最後に (*S*)-**2** を水素化アルミニウムリチウムで還元し、(*S*)-rhyncophorol (**1**) を (\pm)-**2** より6.6% (7段階) で得た。 $[\alpha]_D^{18} = -11.0$ (in chloroform)、<文献値⁴⁵⁾: $[\alpha]_D^{18} = -9.88$ (in chloroform)>であった。同様に (*R*)-**2** を還元し、(*R*)-rhyncophorol (**1**) を (\pm)-**2** より5.5% (9段階) で得た。 $[\alpha]_D^{18} = +10.9$ (in chloroform) であった。IRおよび¹H NMRスペクトルは文献値⁴⁴⁾とよく一致した(図1-3 ~ 1-5)。

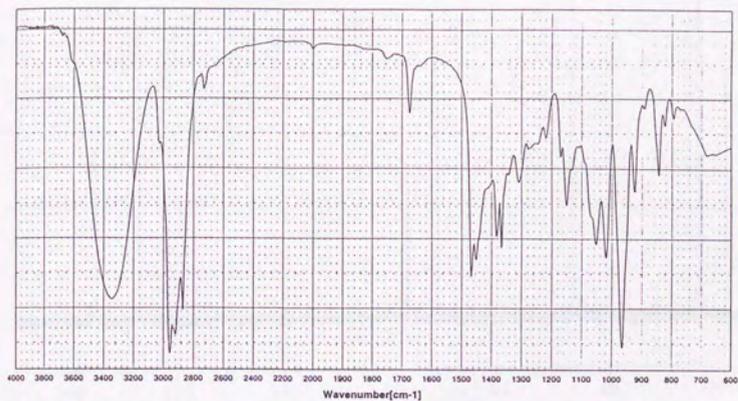


図1-3 Rhynchophorolの赤外吸収スペクトル (film)

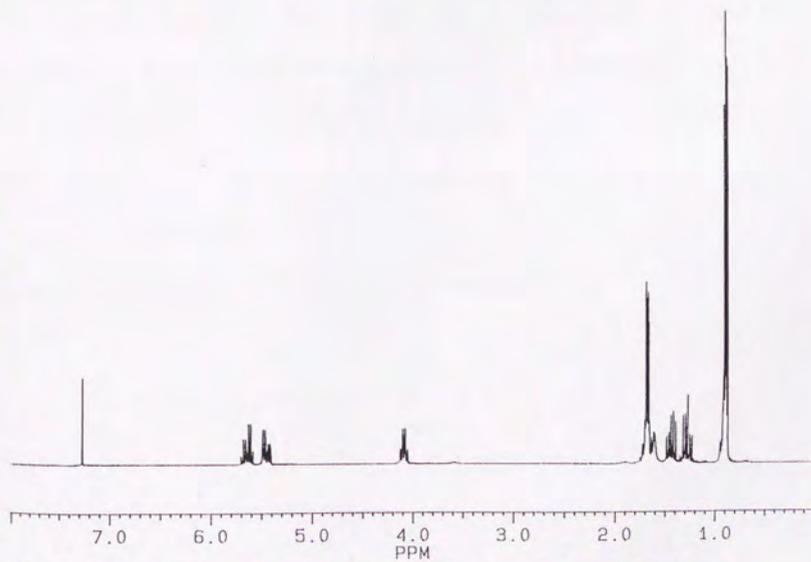


図1-4 Rhynchophorolの¹H-NMRスペクトル (300MHz in CDCl₃)

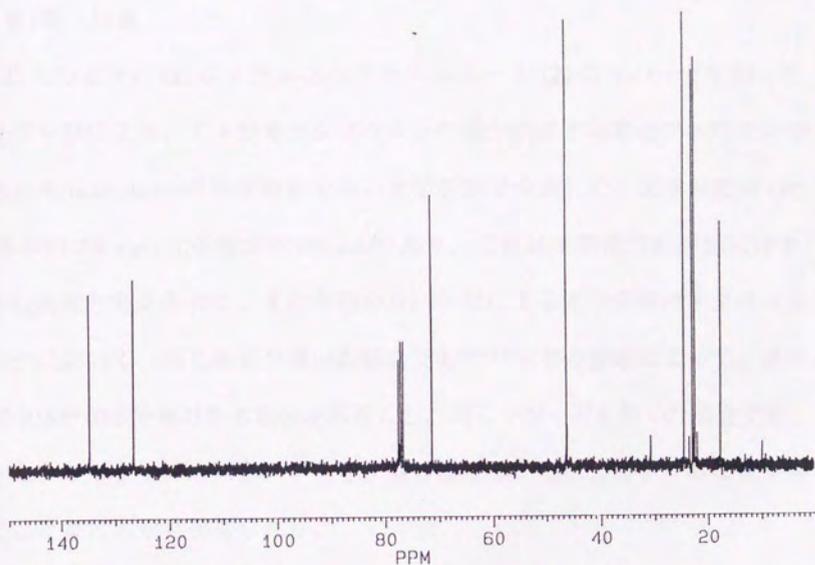


図1-5 Rhynchophorolの ^{13}C -NMRスペクトル (75MHz in CDCl_3)

第4節 結果

以上のように(±)-6-メチル-2-ヘプチン-4-オール (**2**) のリパーゼを用いた光学分割により、アメリカヤシゾウムシの雄が生産する集合フェロモンである rhynchophorol の両鏡像体を高い光学純度で合成した。光学純度は (*R*)-体が97.7% e.e.、(*S*)-体が98.0% e.e.であり、これは生物活性の評価には十分な純度と考えられた。また今回のリパーゼによる光学分割のスクリーニングにおいて、同じ基質を用いた場合でもリパーゼの種類によって、逆の鏡像体が加水分解される場合があること、同じリパーゼを用いた場合でも、アセテートとプロピオネートとで、逆の鏡像体が加水分解される場合があることなどの知見が得られた。

この合成の直後に Oehlschlager らによっても両鏡像体の合成がなされ、生物活性試験も行われた⁴⁸⁾。かれらは(±)-**1** を酒石酸ジイソプロピルを用いた Sharpless の不斉エポキシ化による光学分割を用い光学活性体へと導いたが、(*R*)-体が90.7% e.e.、(*S*)-体が91.4% e.e.であった。またかれらの活性試験により、集合フェロモンとしての活性を示すのは、(*S*)-**1** であり、(*R*)-**1** にはほとんど活性がないことが明らかになった。以後はこの合成されたフェロモンが害虫駆除等に実用化されることが期待される。