

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 10 年度博士課程 進学

氏 名 脇本 敏幸

指導教官名 伏谷 伸宏

論文題名 **Studies on New Calyculin Derivatives**

(和訳 新規カリクリン誘導体に関する研究)

タンパク質脱リン酸化酵素 1 および 2A は真核生物に共通に存在する、セリンおよびスレオニン残基のリン酸エステル基を加水分解する酵素で、タンパク質の機能調節に関わる重要な働きをしている。その阻害剤として、海綿から得られた okadaic acid、calyculin A をはじめ、藍藻類の産生する microcystin 類、および放線菌の産生する tautomycin などが知られている。これら阻害剤はそれぞれ非常に異なる化学構造を有するにも関わらず、同じ酵素に対して競合阻害することから、その酵素に対する結合様式の解明は非常に興味深い問題である。しかしながら、これまでに calyculin 類の酵素に対する阻害機構に関する知見はほとんど得られていない。そこで本研究では、新しい calyculin 誘導体の検索、および calyculin A を化学修飾した誘導体を調製し calyculin 類の構造-活性相関を調べ、酵素との結合に関与する構造要因を明らかにした。

1. 単離

伊豆半島産 *Discodermia calyx* (1.7 kg) をエタノールで抽出後、溶媒分画、シリカゲルおよび ODS のフラッシュクロマトグラフィーで分画後、ODS-HPLC で繰り返し精製した。その結果、calyculin J (2)、calyculinamide A (3) および calyculinamide F (4) と命名した 3 つの新規誘導体を得た。さらに *D. calyx* (4.0 kg) を同様に処理して des-*N*-methyl-calyculin A (5)、および dephosphonocalyculin A (6) と命名した新規誘導体を得た。また、式根島産 *D. calyx* (10 kg) を分画し得られたフラクションを DAD-HPLC により分析したところ、230 nm の吸収を示さない新規誘導体を検出した。このピークを含むフラクションをさらに ODS HPLC によって精製したところ hemicalyculin A (8) を得た。

2. 構造決定

CalyculinJ の分子式は、高分解能 FABMS から $C_{50}H_{80}BrN_4O_{15}P$ と決定した。次に、各種 2 次元 NMR スペクトルデータをもとに平面構造を解析した結果、9 位に臭素が付加し、8 位と 11 位がエーテル結合を介してテトラヒドロフラン環を形成した構造を有し、それ以外の部分構造は **1** と同一であることが明らかになった。さらに NOESY の解析によりテトラヒドロフラン環周辺の相対立体化学を明らかにした。その他の不斉炭素の立体化学に関しては **1** を化学変換して calyculin J に導いて全構造の証明を行った。

Calyculinamide A (**3**)、calyculinamide F (**4**)、des-N-methyl-calyculin A (**5**)についてもスペクトルデータの解析から平面構造を決定した。なお、calyculinamide A は収量が 0.1 mg と微量であったが、スペクトルデータを詳細に検討することにより、**1** のニトリルに水が付加した構造をもつものと推定した。さらに、**1** のニトリルを加水分解すると、**3** が得られたことから立体化学を含めた構造を確定できた。

Dephosphonocalyculin A (**6**)の分子量は 928 で、calyculin A より 80 マスユニット小さかった。各種 2 次元 NMR スペクトルを解析したところ、炭素骨格は **1** と同一であることがわかった。分子量を考慮すると、17 位のリン酸基が欠落した構造を持つものと推定される。しかし、**6** において 17 位から離れた部分の 1H と ^{13}C のケミカルシフト値は **1** のそれらとは大きく異なっていた。したがって複数の不斉炭素における立体化学が相違している可能性が否定できなかった。そこで化学変換により構造の証明を行うことにした。Calyculin A のリン酸エステルだけを選択的に除去することが困難だったが、**1** をアセトナイド化後、pyridine/dioxane による加溶媒分解を行ったところ、**7** を得ることができた。一方、dephosphonocalyculin A をアセトナイド化すると、同一の化合物が得られたことから、**6** の構造を確認することができた。

Hemicalyculin A の分子式は高分解能 FABMS および 1H NMR スペクトルより $C_{36}H_{55}N_2O_{10}P$ と決定した。また、 1H NMR スペクトルにおいて *O*-メチル、5 本のシングレットの *C*-メチル、3 本のダブルット *C*-メチル等の calyculin 類に特徴的なシグナルが認められた。しかしながら、オキサゾールおよび *N*-メチルに由来するシグナルは認められなかった。COSY および HMQC スペクトルの解析の結果、1 位から 26 位の部分構造は calyculin A と同一であることがわかり、HMBC スペクトルにおいて 25 位および 26 位のプロトンから 118.8 ppm の炭素への相関が得られたことにより末端はニトリルであることが明らかとなった。

Hemicalyculin A の立体化学について NOESY およびプロトン間の結合定数を用いて検討をした結果、1 位から 8 位、および 15 位から 25 位に至る部分構造の相対立体化学は calyculin A と同一だった。しかしながら、9 位から 13 位の立体化学については NMR データからは明らかにすることが出来なかった。そこで、両化合物に共通するすべての不斉中心を含む二重結合で挟まれた部分構造を得ることにより、その絶対立体化学を含めた全構造を決定することを試

みた。まず、calyculin A の 11 位、13 位の 1,3-ジオールをアセトナイドで保護し、34 位と 35 位の 1,2-ジオールを NaIO_4 により開裂し、ジメチルアミノ基含む末端ユニットを取り除いた。さらに *p*-bromobenzylbromide を用いてリン酸基を保護し、得られた生成物をオゾン酸化した後に還元的に処理をし立体化学を保持したフラグメント(9)を 30%の収率で得ることができた。一方、hemicalyculin A も同様に処理した結果、50%の収率でフラグメント(9)を得ることが出来た。両者の ^1H NMR スペクトルおよび旋光度が一致したことにより、hemicalyculin A の全構造を決定することが出来た。また、hemicalyculin A は一重項酸素によるオキサゾールの開裂を経て、calyculin A より生成することを明らかにした。

3. 構造-活性相関

calyculin A の構造-活性相関を検討するために、上記の海綿由来の誘導体の他に、calyculin A を化学修飾した誘導体を調整した。すなわち、 NaIO_4 による 1,2-ジオールの開裂によって得られた NaIO_4 product (10)、および 9 の保護基を脱保護した spiroketal fragment (11)を調整した。以上の化合物について酵素阻害活性を入念に検討した。この結果、calyculin A のリン酸エステル基、テトラエン、および 1,3-ジオールが酵素に対する阻害活性に重要であることがわかった。また、hemicalyculin A のタンパク質脱リン酸化酵素 1 γ および 2A に対する阻害の IC_{50} 値はそれぞれ 14 nM および 1.0 nM であった。一方、calyculin A の IC_{50} 値は 8.2 nM および 1.0 nM であり、hemicalyculin A は calyculin A に匹敵する酵素阻害活性を示すことが明らかとなった。したがって、calyculin A の 2 つ γ -アミノ酸ユニットは酵素阻害活性に関与しないことが明らかになった。一方、P388 マウス白血病細胞に対する IC_{50} 値は hemicalyculin A が 450 ng/mL、calyculin A が 170 pg/mL であり、hemicalyculin A の細胞毒性は calyculin A に対して大きく低下していることが認められた。したがって、ジメチルアミノ基を含む末端の部分構造は calyculin A の高い細胞膜透過性に寄与していることが示唆された。

本研究によって、calyculin A の酵素阻害活性および細胞毒性に関与する部分構造が明らかになった。これらの知見は、タンパク質脱リン酸化酵素 1 および 2A に対する選択的阻害物質の開発のみならず、カルシニューリン等の他のセリン・スレオニンホスファターゼに対する阻害物質の開発に寄与するものと考えられる。

表 1 Calyculin 誘導体の酵素阻害活性と細胞毒性

	IC_{50} (PP1 γ)	IC_{50} (PP2A)	IC_{50} (P388)
Calyculin A (1)	8.2 nM	1.0 nM	170 pg/mL
Hemicalyculin A (8)	14 nM	1.0 nM	450 ng/mL
NaIO_4 Product (10)	9.0 nM	1.1 nM	40 ng/mL
Dephosphonocalyculin A (6)	>10 μM	>10 μM	>5.0 $\mu\text{g/mL}$
11,13- <i>O</i> -isopropylidene-1	>10 μM	>10 μM	2.0 $\mu\text{g/mL}$
Spiroketal Fragment (11)	>10 μM	>10 μM	-

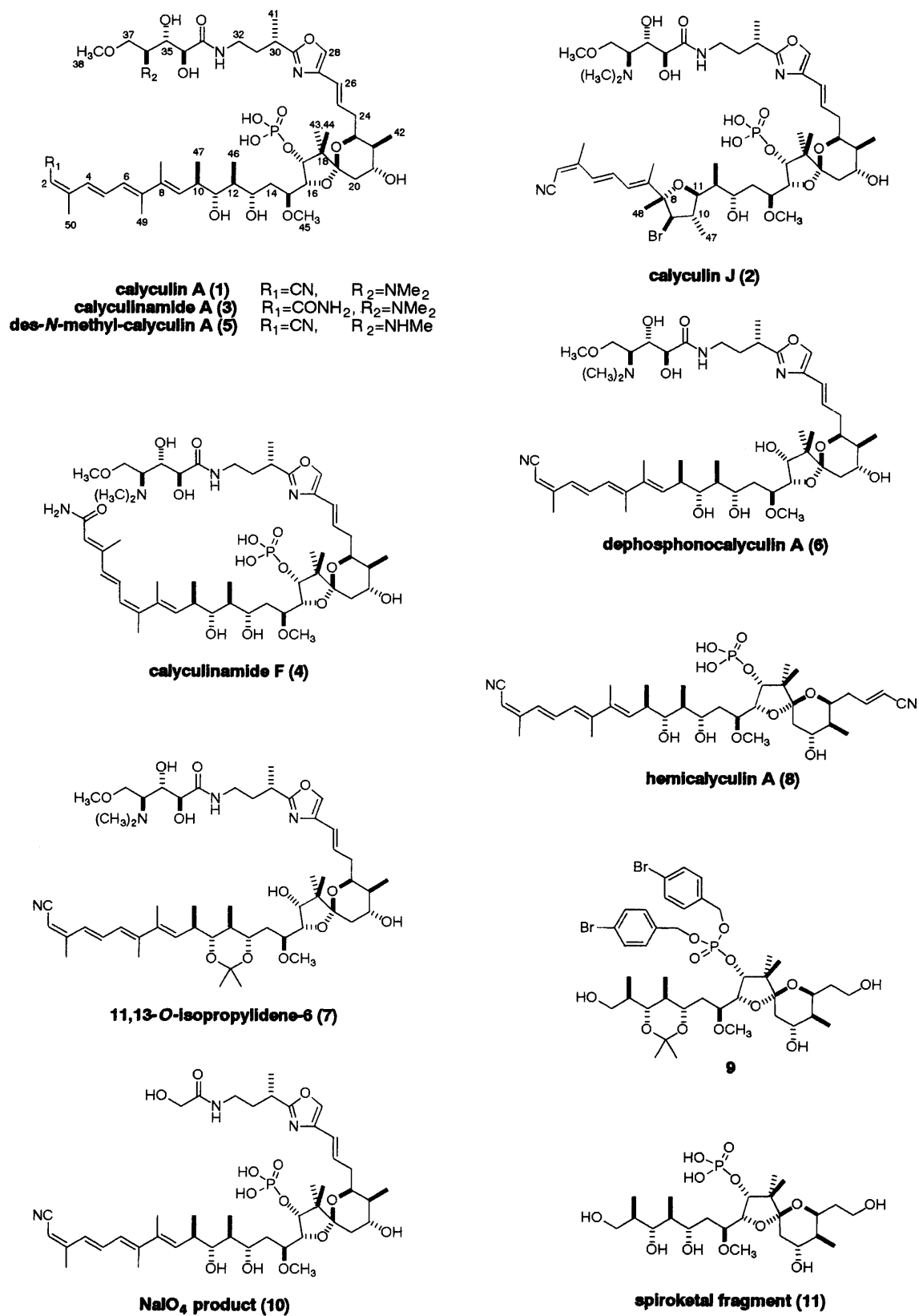


図1 Calyculin誘導体の構造