

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 11 年度博士課程進学

氏名 小林 宏行

指導教官名 北原 武

論文題目 脳神経保護作用を有するアミノ酸類の構造と合成に関する研究

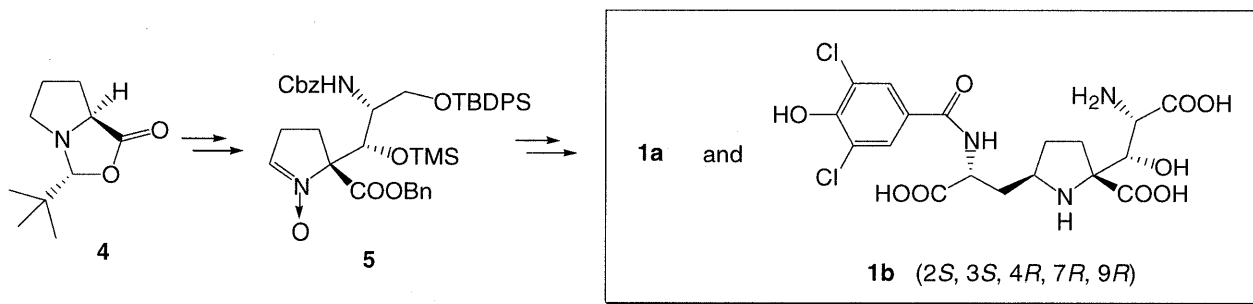
脳卒中に代表される脳虚血疾患によって生じる神経障害は、脳虚血ストレスにより細胞外に過剰に放出されたグルタミン酸により惹起される興奮毒性によるものと考えられている。このグルタミン酸毒性は、脳内のグルタミン酸レセプターを介した Ca^{2+} イオンの細胞内流入により発現するため、グルタミン酸レセプターのアンタゴニストは、脳虚血疾患を治療しうる薬剤として期待される。特に、このグルタミン酸レセプターの一つである AMPA/カイニン酸型レセプターのアンタゴニストとして見いだされた Quinoxalinedione 系化合物 NBQX は、スナネズミ脳虚血モデルにおいて、虚血負荷後の投与によっても神経細胞死が抑制されることが報告され、その臨床応用への研究が現在精力的に行われている。

そこで著者は、AMPA/カイニン酸型レセプターのアンタゴニストを微生物の二次代謝産物中から見いだすことを目的とし、AMPA/カイニン酸レセプターを多く発現しているニワトリ胚初代終脳神経細胞を用いたスクリーニング系により AMPA/カイニン酸型レセプターアンタゴニストの探索を行った。

1) Neuroprotectin A、B の単離および生物活性

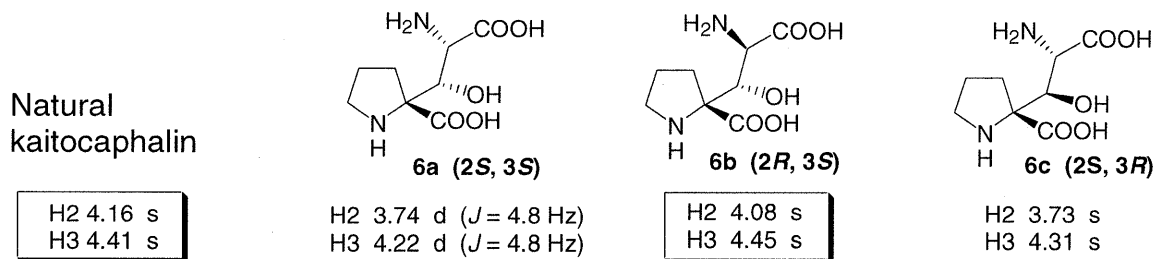
スクリーニングの結果、放線菌 *Streptomyces* sp. Q27107 株より新規 Complestatin 誘導体である Neuroprotectin A および B を発見した。ニワトリ胚初代終脳神経細胞に対して Neuroprotectin A および B の活性を評価したところ、既知のアンタゴニストである NBQX より約 10 倍強い活性を示した。また、Neuroprotectin A は神経細胞死を抑制する濃度では抗酸化作用が認められないため、本化合物の神経保護作用は抗酸化作用に基づいているのではないことが判明した。さらに、各種グルタミン酸レセプターに対して receptor binding assay を行ったところ、Neuroprotectin A は各種グルタミン酸レセプターに対する親和性が認められなかった。これらの結果より、Neuroprotectin A は興奮性のアミノ酸に対して未だ解明されていない経路で神経細胞を保護していることが示唆された。

このようにして Kaitocephalin の絶対立体配置を決定したことから、当研究室では L-proline から得られる光学活性なラクトン **4** からニトロン **5** を経て、**1a** の全合成が行われた。しかしながら、¹H-NMR と HPLC の保持時間が天然物とは一致しなかった。また、同ニトロン **5** から 9 位のエピマーである **1b** も合成されたが、これも天然物とは一致しなかった。合成された **1a** および **1b** と天然物の ¹H-NMR を比較すると、特に 2 位と 3 位のメチンプロトンが天然物ではシングレットに観測されるのに対し、合成した **1a** および **1b** では 4.3 Hz および 5.5 Hz のダブルットに観測されたことから、先に決定した絶対立体配置のうち、2 位ないし 3 位に誤りがあることが示唆された。

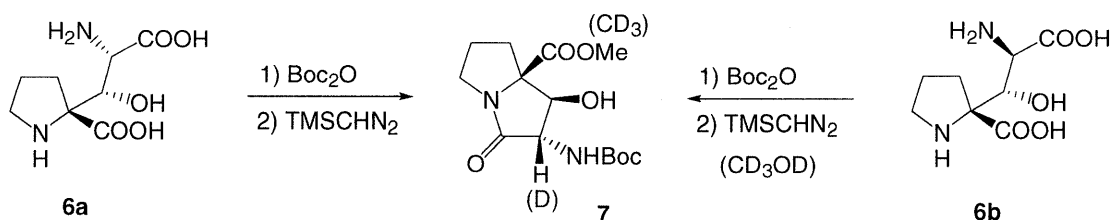


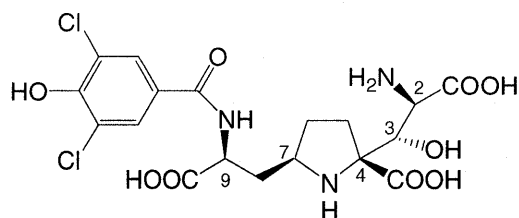
1a and 1b were not identical with natural kaitocephalin

そこで著者は、この 2 位と 3 位の立体の精査と、後の誘導体活性試験への供与のために **1a** の左側鎖が欠落した化合物 **6a** とその 2 位のエピマー **6b** および 3 位のエピマー **6c** を合成し、その 2 位と 3 位のメチンプロトンの化学シフトと結合定数を比較したところ、2 位のエピマーである **6b** が天然物と類似していることがわかった。



さらに、この **6a** および **6b** に対して、天然物から二環性の化合物 **2** を誘導したのと同様に Boc 化およびメチル化を行い、二環性の化合物を調製したところ、**6a** および **6b** から同じ立体を有する化合物 **7** が得られた。また、**6b** のモノ Boc 体に対してトリメチルシリルジアゾメタンによるメチル化を重メタノール中で行うと、カルボニルの α 位が重水素化された化合物が得られたことから、このメチル化の際に異性化が起こり、**7** が得られることが判明した。これらのことから、天然物の絶対立体配置は **6b** と同じ立体 (*2R, 3S*) であることが示唆された。これを指標にして *2R, 3S* 体の合成が行われた結果、¹H-NMR と HPLC の保持時間が一致し、更に旋光度の符号も一致した。これにより、最終的に kaitocephalin の絶対立体配置は *2R, 3S, 4R, 7R, 9S* であると確定した。

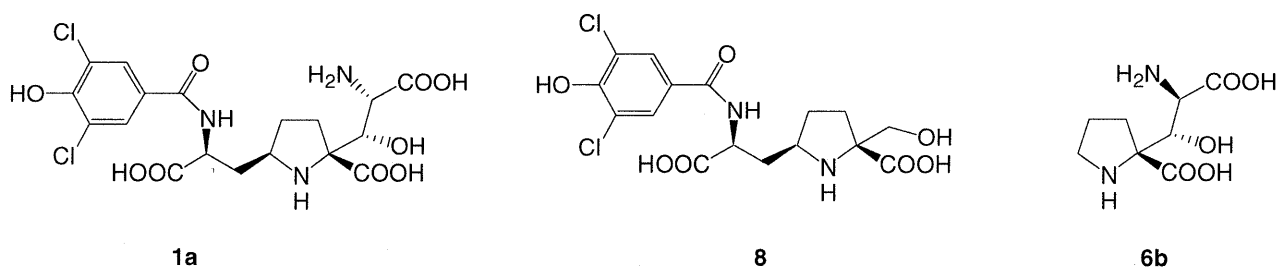




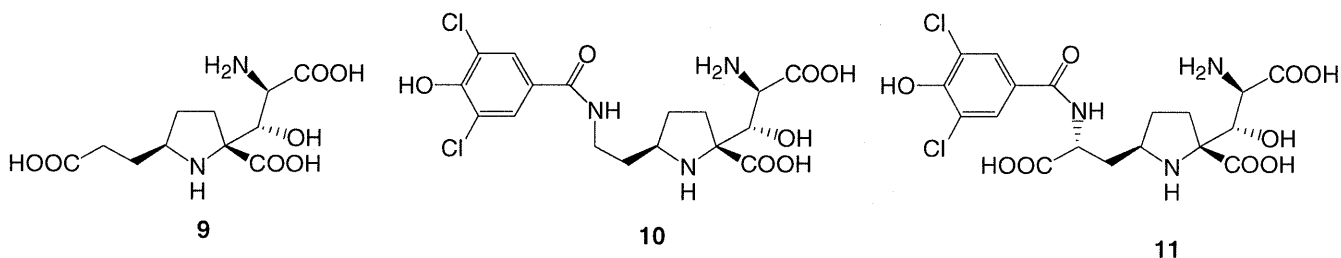
Kaitocephalin (2*R*, 3*S*, 4*R*, 7*R*, 9*S*)

3) Kaitocephalin 誘導体の合成と活性評価

以上のようにして、Kaitocephalin の絶対立体配置を決定したので、次に本化合物の活性部位を解明するために、各種誘導体に対する活性の評価を行った。まず、Kaitocephalin の右末端のグリシン部位が欠落した化合物 **8** を合成し、先に合成された天然物の 2 位のエピマーである **1a** および左側鎖が欠落した化合物 **6b** と共にラット海馬神経細胞に対して活性の評価を行った。



その結果、**1a** は天然物より弱いながらも活性は認められたが、**8** や **6b** には活性が認められなかった。**8** に活性が認められないことから、右末端のアミノ酸部位は活性に必須であり、さらに **1a** が弱い活性であることから、2 位の立体も天然物である *R* 体の方が強いことが判明した。また、**6b** に活性がないことから、左側鎖も活性発現には重要であることが明らかとなった。そこで、現在は左側鎖の一部をもたない **9**、**10** および 9 位のエピマー **11** を合成し、これらの化合物の活性の評価をすることにより、どの部位が活性発現に必要なかをより詳細に解明する予定である。さらに、活性に関与しない部位が明らかとなれば、その部位にビオチンと結合させた化合物を合成し、その化合物を用いて未知のグルタミン酸レセプター複合蛋白質の探索に役立てたいと考えている。



論文

- 1) Hiroyuki Kobayashi, Kazuo Shin-ya, Koji Nagai, Ken-ichi Suzuki, Yoichi Hayakawa, Haruo Seto, Bong-sik Yun, In-ja Ryoo, Chang-Jin Kim and Ick-dong Yoo *Journal of Antibiotics*, **2002**, *in press*.
- 2) Hiroyuki Kobayashi, Kazuo Shin-ya, Kazuo Furihata, Yoichi Hayakawa, Haruo Seto *Tetradedron Letters*, **2001**, 42, 4021.
- 3) Masayuki Okue, Hiroyuki Kobayashi, Kazuo Shin-ya, Kazuo Furihata, Yoichi Hayakawa, Haruo Seto, Hidenori Watanabe and Takeshi Kitahara *ibid.*, **2002**, *in press*.