

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 12 年度博士課程 進学

氏名 荒木貴宏

指導教官 伏谷伸宏

Studies on Cytotoxic Metabolites from Marine Sponges

(海綿からの細胞毒性物質に関する研究)

海綿は採集が容易であり、含有成分は細胞毒性、抗菌・抗カビ、酵素阻害など顕著な生物活性を示すことが多い。また、得られた化合物の化学構造も特異で、多種多様である。現在までに海綿から多くの細胞毒性物質が発見されているが、なかでも、halichondrin B, discodermolide, cryptophycin などは、有望な抗がん剤として臨床あるいは前臨床試験中である。また、その特異な作用機序から okadaic acid や calyculin 類は分子生物学のツールとして応用されている。

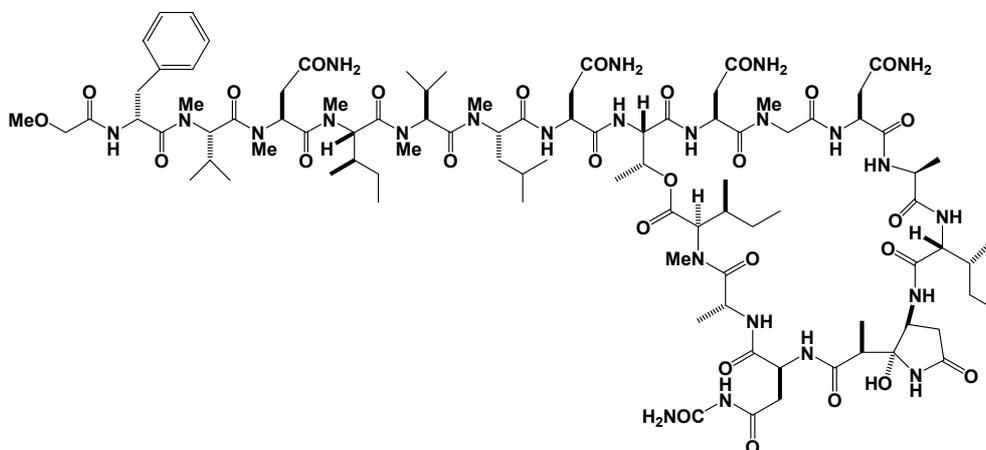
このような背景の下、本研究では細胞毒性試験で P388 マウス白血病細胞に対して顕著な活性を示した 2 種の鹿児島県下甑島産 *Theonella* 属海綿から活性物質の探索を試みた。その結果、2 種のペプチド、および 1 種のテトラミン酸マクロラクタムを単離し、構造決定を行った。その概要は以下の通りである。

1. 下甑島産 *Theonella* 属海綿からの細胞毒性物質 **koshikamide B** の単離と構造決定

脂溶性画分に P388 マウス白血病細胞に対して、顕著な細胞毒性を示した鹿児島県下甑島産海綿 *Theonella* sp. (湿重量 280 g) をエタノールで抽出後、細胞毒性を指標に溶媒分画、ODS フラッシュクロマトグラフィー、逆相 HPLC で順次精製した。HPLC において 3 つの活性ピークが得られたが、いずれのピークも同一の ^1H NMR スペクトルを与えたため、これらを合一して **koshikamide B (1)** と命名した活性物質 330 mg を得た。

Koshikamide B (1) は、FABMS および NMR スペクトルから分子量 2051 のペプチドと考え

られた。そこで、アミノ酸残基の同定を HOHAHA, COSY および HMBC などの 2 次元 NMR データならびにアミノ酸分析により行った。その結果、Ala 2 残基、Asn 3 残基、Ile, Phe, Thr, *N*-MeAsn, *N*-MeIle 2 残基, *N*-MeLeu, *N*-MeVal 2 残基, および Sar が同定できた。ピロリドン環を含む異常アミノ酸は、HMBC および ^{15}N HMQC データも加えて決定した。一方、 N^0 -カルバモイルアスパラギンは、NMR データのみでは決定できなかったため、モデル化合物を *Z*-L-Asn から調製し、ペプチド中のアミノ酸残基の NMR データと比較した。その結果、 ^{15}N のケミカルシフト値を含めほぼ同一の NMR データを与えたことからその構造を確認した。以上得られた 17 個のアミノ酸残基の配列を HMBC のデータから決定して平面構造を得た。



1

HPLC で 1 が 3 つのピークを与える理由は、ピロリドン環が開環したケトン型、およびさらにケトン基が溶媒のアルコールと反応し形成されるヘミアセタール型との平衡状態で 1 が存在するためであると考えた。実際、ケトン型が存在することは、1 を NaBH_4 で処理するとアルコール体に導かれることから確認することができた。

通常アミノ酸残基の絶対立体配置は、1 の酸加水分解物を Marfey 分析およびキラルカラムを用いる GC 分析により、それぞれ D,L-Ala, D-Phe, D-Ile, L-Thr, L-*N*-MeVal, L-*N*-MeAsn および L-*N*-MeLeu と決定した。なお、加水分解物中に L-Asp のみが検出されたことから、3 残基の Asn と N^0 -カルバモイルアスパラギンはすべて L 型と結論した。2 残基の *N*-MeIle については、次のように決定した。まず、*N*-MeIle を 1 の酸加水分解物から単離し、標品との ^1H NMR スペクトルを比較することで 2 残基とも *allo* 型であると決定した。また Marfey 分析から、それらは D 型, L 型 1 : 1 の混合物であったが、部分加水分解で得られたフラグメントの分析によりペプチド中での D 型と L 型の帰属を行った。D 型, L 型が各 1 残基存在する Ala も、このフラグメントを用いることで各々の位置を決定した。

ピロリドン環を含むアミノ酸の立体化学については、まず ROESY データならびに $^{2,3}\text{J}_{\text{C,H}}$

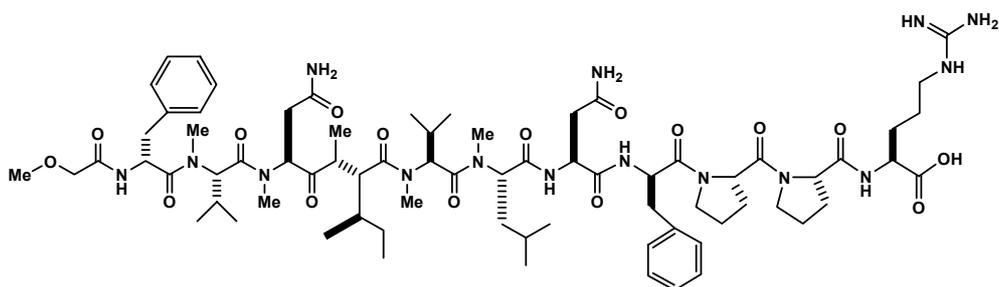
および $^3J_{\text{H,H}}$ 値の解析により相対立体配置を決定した。次いで、ピロリドン環部をアスパラギン酸へ誘導することにより最終的な立体化学の解明を試みた。種々の条件を検討した結果、エタノール中、75°Cで放置すると脱水反応が進行し、目的とするオレフィンが生成することを見出した。さらに、このオレフィンをオゾン酸化してイミドに導いた。Koshikamide B (1)は、酸加水分解によって4 mol 当量の L-Asp を与えたが、イミド体の酸加水分解物は、5 mol 当量の L-Asp を与えた。従って、ピロリドン環の4位の絶対配置は *S* であることが判明し、ピロリドンユニットの絶対立体配置を 2*S*、3*R*、4*S* と結論した。

なお koshikamide B (1)は、P388 マウス白血病細胞に対して IC₅₀ 値 0.45 μg/mL の増殖阻害活性を示した。

2. 下甌島産 *Theonella* 属海綿からの細胞毒性物質 Koshikamide A₂ の単離と構造決定

Koshikamide B (1)の精製途中で、1とは異なる細胞毒性物質が存在することが認められたので、その単離と構造決定を試みた。すなわち、ODS フラッシュクロマトグラフィーにおいて、1よりも早く溶出する 80%メタノール画分をゲル濾過後、ODS-HPLC によって、koshikamide A₂ (2) 8.7 mg を得た。

Koshikamide A₂ (2)は当研究室で単離、構造決定された koshikamide A₁ (3)と類似した ¹H NMR スペクトルを与えた。そこで、各種 2D NMR および FABMS データを解析した結果、koshikamide A₁の C 末端にアルギニン残基が結合した直鎖ペプチドであることが判明した。なお、詳細な NMR データの解析から、2は *cis-trans* 異性化による2種類のコンフォーマーとして存在することが明らかとなった。アミノ酸残基の絶対配置は、酸加水分解物の Marfey 誘導体の HPLC 分析、ならびに2の酵素分解物と koshikamide A₁ (3)の NMR データを比較することで下図のように決定した。2は P388 マウス白血病細胞に対して、IC₅₀ 値 6.7 μg/mL の細胞毒性を示した。



2. koshikamide A₂

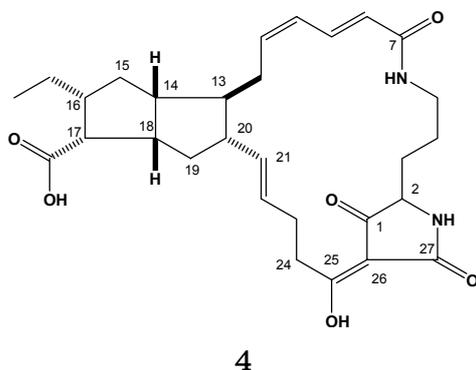
3. koshikamide A₁: Δ L-Arg¹¹

3. 下甌島産 *Theonella* 属海綿からの細胞毒性テトラミン酸ラクタムの単離と構造決定

鹿児島県下甌島産海綿の脂溶性画分が P388 マウス白血病細胞に対して有望な細胞毒性を示したので、活性物質の解明を試みた。海綿 1.5 kg (湿重量) をエタノールで抽出後、溶媒

分画、ODS フラッシュクロマトグラフィー、ODS-HPLC で順次分画し、1.7mg の細胞毒性物質 **4** を得た。

化合物 **4** の分子式は高分解能 FABMS から $C_{29}H_{39}N_2O_6$ と決定された。各種 NMR データの解析の結果、**4** はカルボン酸とエチル基が結合した 4 置換 bicyclo[3.3.0]octane 環、アルケン鎖、ジエンアミド、そしてテトラミン酸を有することが明らかとなった。COSY, HMBC、および FABMS データの解析から、得られた部分構造を連結しテトラミン酸を介したマクロラクタム構造を構築した。bicyclo[3.3.0]octane 環の相対立体化学は、NOE の相関関係により構築した。**4** は P388 マウス白血病細胞に対して、 IC_{50} 値 $2.2 \mu\text{g/mL}$ の細胞毒性を示した。



以上本研究では、海綿からの新規細胞毒性物質の探索を目的として、スクリーニングで強い活性が認められた 2 種の *Theonella* 属海綿から、活性物質の単離と同定を試みたところ、下甌島産 *Theonella* 属海綿から koshikamide B (**1**) と命名した新規ペプチドラクトンを単離して、分子量が 2000 を超える今までにはないタイプのペプチドであることを明らかにするとともに、5 残基の *N*-Me アミノ酸が連続的に配列した直鎖ペプチドの koshikamide A₂ (**2**) を単離・構造決定した。さらに、別の下甌島産 *Theonella* 属海綿から 1 種の新規テトラミン酸マクロラクタムを単離・構造決定し、海綿が細胞毒性物質の探索源として優れていることを示した。