

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

氏 名 張 宰赫

指導教員名 松永 茂樹

論文題名 Studies on sponge metabolites that inhibit the growth of yeasts with specific mutations

(海綿由来の酵母変異株に対する増殖阻害物質に関する研究)

真菌による感染は、近年の抗生物質の繁用ならびにエイズ、悪性腫瘍、臓器移植などに対する免疫抑制剤あるいは制がん剤などによる治療のため免疫力が低下した患者を中心に増加している。真菌症に有効な薬剤はポリエンマクロライド系のアンホテリシン B など限られたものしかなく、新しい作用機序あるいは新しい化学構造を持つ抗真菌剤の開発が急務とされている。海洋生物には陸産の生物には認められない生物活性や化学構造を持つ化合物が含まれることが知られており、海洋生物の示す多様性を考慮すると、海洋生物は未だ未開拓な生化学資源であると言える。この様な背景の下、本研究では日本沿岸で採集した海洋無脊椎動物から、特定の遺伝子に損傷がある出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の変異株に対する増殖阻害物質を探索した。細胞膜の生合成遺伝子に変異があるため抗真菌物質に対する感受性の高い *erg6* 変異株に対する活性に注目してスクリーニングを行い、有望な活性を示した 2 種の海綿から活性成分の単離と構造解析を試みた。その概要は以下の通りである。

1. スクリーニング

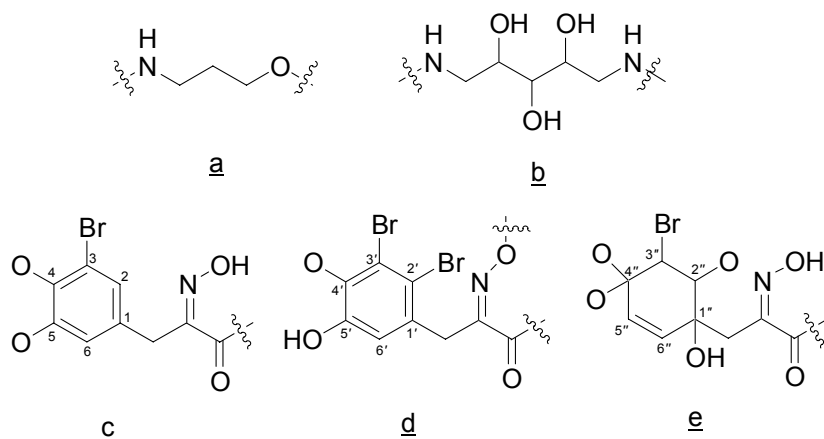
わが国沿岸産の海洋無脊椎動物 867 種由来の脂溶性および水溶性画分を試料とし、ペーパーディスク法を用いて出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の野生株および 13 種の変異株に対する増殖阻害活性を調べた。その結果、脂溶性画分および水溶性画分とも、海綿 (それぞれ 29 % および 18 %) およびホヤ (20 % および 15 %) が高頻度で活性を示した。これらの中から *erg6* 変異株のみに阻害活性を示した海綿 S01-117 および阻害の選択性は低い様々な変異株に対し強い阻害

活性示した海綿 S97-335 を選択した。

2. 大島新曾根産海綿 S01-117 からの化合物 A-D の単離および構造解析

大島新曾根において採集した深海海綿 S01-117 (1 kg) をメタノールで抽出後、クロロホルムと水で二層分配し、クロロホルム層をさらに 90%メタノールとヘキサンで分配した。活性が認められた 90%メタノール層をさらにクロロホルムと 60%メタノールで分配し、このクロロホルム層を ODS フラッシュクロマトグラフィーおよび ODS HPLC で精製し、化合物 A (26 mg)、化合物 B (57 mg)、化合物 C (0.5 mg) および化合物 D (0.8 mg) を得た。

まず、化合物 A の構造決定を行った。FABMS スペクトルで m/z 1080, 1082, 1084, 1086, 1088 (M+H)⁺ に 1:4:6:4:1 の強度比で分子イオンピークが検出されたことから、化合物 A は 4 個の酸素原子を含むことが示唆され、¹H および ¹³C NMR データを考慮して分子式を C₃₅H₃₆Br₄N₆O₁₄ と決定した。DMSO-*d*₆ 中の COSY, HOHAHA および HSQC データを解析し、部分構造 **a** および **b** が導かれた。また、炭素のケミカルシフト値を考慮して HMBC データを解析し、部分構造 **c**, **d** および **e** が得られた。なおこれらの部分構造中の交換性プロトンは ¹³C NMR スペクトルにおける重水素シフト実験により特定した。



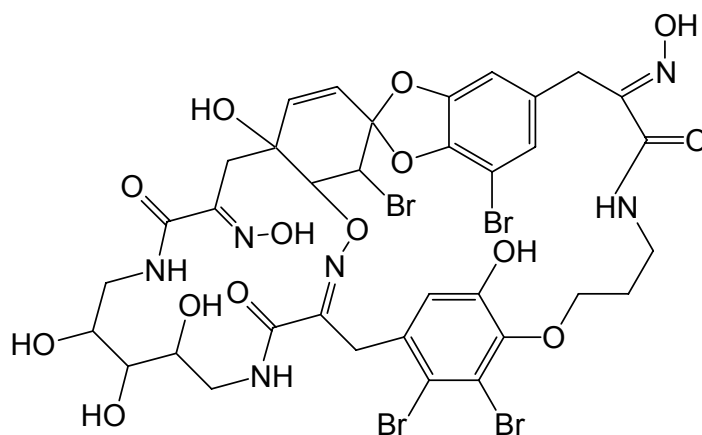
HMBC データを解析することにより、部分構造 **a** の窒素が部分構造 **c** のカルボニル炭素と、部分構造 **b** の 2 つの窒素が部分構造 **d** と **e** のカルボニル炭素とそれぞれ結合することが判明した。また、部分構造 **d** の 4' 位の炭素と部分構造 **a** のオキシメチレン水素の間に HMBC 相関が認められることから、部分構造 **d** の 4' 位の酸素と部分構造 **a** のオキシメチレンがエーテル結合を形成することが判明した。さらに部分構造 **d** のメチレン水素と部分構造 **e** の 1'' 位の水酸基に ROESY 相関が認められたことから、部分構造 **d** のオキシム酸素と部分構造 **e** の 2'' の炭素がオキシムエーテルを形成することが示唆された。したがって、残された部分構造 **c** の 4 位と 5 位の酸素は部分構造 **e** の 4'' 位とアセタールを形成することになる。

化合物 B は化合物 A と同一の FABMS データを与え、NMR スペクトルもよく似ていた。2 次元 NMR から化合物 A と同一の平面構造をもつことが示されたが、トリオール部のケミカルシフトに差が認められることから、両者はジアステレオマーの関係にあるものと考えられる。化合

物 C および D は FABMS データからそれぞれ分子量が 518 および 449 と推定され、NMR データからこれらの化合物もブロモチロシン由来の化合物であることがわかった。現在化合物 A および B の立体化学ならびに化合物 C および D の平面構造に関して、さらに構造解析を進めている。

化合物 A および B は *Saccharomyces cerevisiae* の *erg6* 変異株に対して弱いながら活性を示す一方、*Candida albicans* に対し強い活性を示し、さらに両者は *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* などのバクテリアに対し抗菌性を示した。

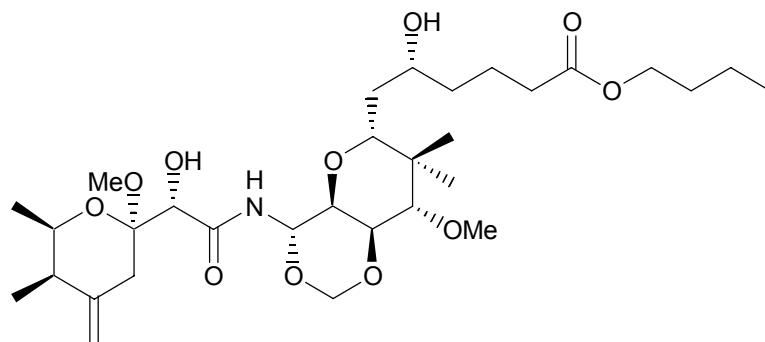
これまで多数のブロモチロシン誘導体が海綿から単離されているが、今回見出した化合物 A および B は既存の化合物と比べ以下のような化学構造上の新規性をもつ。(1) 2つのベンゼン環がいずれもカテコールが臭素化された構造をもち、部分構造 **d** にみられる 5 置換ベンゼン環を含む化合物は初めてである。(2) 部分構造 **e** はブロモチロシン由来と考えられるが、この部分構造も前例がない。(3) ベンゼン環がシクロヘキセン環とスピロケタールを形成すること。(4) オキシムエテル結合をもつこと。



化合物 A および B

3. 式根島産海綿 *Theonella* sp.からの化合物 C121A の単離と構造決定

式根島産海綿 *Theonella* sp. (凍結重量 700 g) をメタノールで抽出後、エーテルと水で二層分配し、水層をさらにブタノールで抽出した。活性が認められたブタノール層を ODS フラッシュクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC で順次精製し、新規化合物 C121A (1.5 mg) および既知の theopederin B (2.3 mg), C (2.0 mg) および D (0.5 mg) を単離した。化合物 C121A の分子式は FABMS および ^{13}C NMR データから $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{NO}_{11}$ と決定し、さらに各種二次元 NMR データを解析し theopederin B の Q-メチル基が Q-*n*-ブチル基に置き換わった化合物であることを決定した。化合物 C121A は野生株の成育を阻止する一方 *erg6* 変異株に対してより強い活性を示し、P388 マウス白血病細胞に対して IC_{50} 値 < 10.0 pg/mL と非常に強い細胞毒性を示した。



C121A

以上、本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の変異株の増殖阻害を指標とし2種の海綿から4種の新規 bromotyrosine 類縁体および1つの新規 theopederin 類縁体を単離、構造決定することができた。