

氏名	河村 篤
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	博 甲 第 7645 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	数理解物質科学研究科
学位論文題目	Isolation and Structure Determination of Aplysiasecosterols A, B, and C: Three Novel 9,11-Secosteroids from the Sea Hare <i>Aplysia kurodai</i> (海洋軟体動物アメフラシ由来の新規 9,11-セコステロイド化合物アプリアセコ ステロール A, B, C の単離・構造決定)

主査	筑波大学教授	理学博士	木越 英夫
副査	筑波大学教授	工学博士	鍋島 達弥
副査	筑波大学教授	理学博士	市川 淳士
副査	筑波大学教授	理学博士	長瀬 博

論 文 の 要 旨

天然物はその構造の意外性や顕著な生物活性ゆえに、これまで医薬品として多く用いられてきた。たとえば、天然物そのものやその誘導体などが抗炎症薬として用いられている例は多く、現在も更なる抗炎症薬の開発が求められている。炎症反応とは、生物が有害な刺激から自身を守るために発動される反応であり、その過剰反応が疾患につながるということが知られている。そして、この原因の一つに誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が過剰に生産した一酸化窒素 (NO) によるものがある。そこで本研究では、この NO 生産を阻害する抗炎症活性物質の探索を目的とした。

海洋軟体動物アメフラシ (*Aplysia kurodai*) からは、様々な生物活性物質が発見されているが、これまでにアメフラシ由来の抗炎症活性物質の探索研究は報告されておらず、新規な物質の発見が期待される。この様な背景から今回、三重県にて採取したアメフラシ由来の抗炎症活性物質の探索を行った。

抗炎症活性試験は、リポ多糖 (LPS) の添加により刺激されたマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞の NO 生成を定量することにより行った。また、この活性試験に細胞毒性物質を含む試料を用いた場合、細胞数減少の結果として NO 濃度が低下するため、細胞毒性の評価も同時に行った。これら 2 種の生物活性試験により、細胞生存下での NO 生産抑制効果を評価した。

アメフラシ (湿重量 54.8 kg) の含水エタノール抽出物について、抗炎症活性試験を指標に分離し、顕著な活性を示す画分を得た。この活性画分を逆相 HPLC で精製することで、新規 9,11-セコステロイド化合物 aplysiasecosterol A, B, C (AsA, AsB, AsC) をそれぞれ 6.7 mg, 2.8 mg, 1.6 mg 単離した。

HR-ESI マススペクトルより AsA の分子式を $C_{27}H_{44}O_7$ と決定した。さらに、一次元、二次元の各種 NMR 解析より、AsA は γ -ジケトン構造を含む新規三環性骨格、シクロペンタン環 (ステロイド D 環)、および側鎖構造から成る平面構造であることを決定した。

次いで、結合定数および NOE の解析、およびモデル化合物の密度汎関数理論 (DFT) に基づく構造最適化を組み合わせて、AsA の側鎖上 C-24 位の二級ヒドロキシ基を除く相対立体化学について決定した。

さらに、ECD スペクトルの測定値と計算値の比較により AsA の絶対立体配置の決定を試みた。測定溶媒に MeOH を用いて ECD スペクトルを測定した結果、312 nm に負の第一コットン効果が、286 nm に正の第二コットン効果がそれぞれ観測された。この結果を、三環性骨格部分のモデル化合物について、Gaussian 09 を用いた励起状態計算による ECD スペクトルの計算値と比較して、三環性骨格部分の絶対立体配置を決定した。最後に、改良モッシャー法により C-24 位ヒドロキシ基の立体配置を *R* と決定することで、AsA の全絶対立体配置を決定した。

HR-ESI マススペクトルより AsB, AsC の分子式を AsA と同じ $C_{27}H_{44}O_7$ と決定した。各種 NMR スペクトルの解析から、AsB, AsC は共役した 1,4-ジケトンを含むデカリン骨格 (ステロイド AB 環)、シクロペンタン環 (ステロイド D 環)、および側鎖構造から成る平面構造であることを決定し、両者はその化学シフト値の相違から側鎖上 C-24 位のジアステレオマーであると推定した。また、ROE 解析から AsB, AsC の D 環部分の相対立体配置を決定した。さらに、AsB, AsC に改良モッシャー法を適用し、C-24 位ヒドロキシ基の絶対立体配置をそれぞれ AsB は *R*、AsC は *S* と決定した。

化合物 AsB, AsC の MTPA エステル化において、3,11,24-tris-MTPA エステルが単一の化合物として得られたが、この化合物は低温で保管しても AB 環上 C-3 位の MTPA エステル基が徐々に加水分解され、一週間後には全てが 11,24-bis-MTPA エステルに変換された。この原因として、AB 環上の C-3 位と C-5 位の 1,3-ジオールがシス配置であり、1,3-ジアキシャル構造をとることで、隣接基関与により C-3 位の MTPA エステル基の加水分解が促進されたと推測した。

そこで、C-3 位と C-5 位の 1,3-ジオールのアセトニド反応により、シス配置を確認した。以上から、C-3 位と C-5 位のヒドロキシ基をシス配置と決定し、AsB, AsC の AB 環の相対立体配置が、*cis* 縮環型もしくは *trans* 縮環型のいずれかであると考えられた。

上述の結果を踏まえ、詳細な ROE 解析とモデル化合物の分子力場計算による配座解析を組み合わせることにより、AB 環の相対立体配置について *cis* 縮環型であると決定した。

一般的なステロイド化合物の C-9-C-11 の結合が酸化開裂した 9,11-セコステロイド化合物は天然から多く単離されており、AsB, AsC はこの 9,11-セコステロイド化合物と同様の炭素骨格を有している。そのため、AsB, AsC の AB 環上 C-19 位のメチル基、およびステロイド D 環部分の絶対立体配置は一般的なステロイド化合物と同じであると考えられる。従って、AsB, AsC の全絶対立体配置を決定した。

化合物 AsA は、一般的な 9,11-セコステロイド化合物の D 環および側鎖部分と同様の構造を有する一方、AB 環構造を持たず、過去に例が無い三環性骨格を有している。また、AsB は今回 AsA と同じ生物から単離した 9,11-セコステロイド化合物であり、D 環および側鎖部分の構造が同一で

ある。以上のことから、AsB は AsA の生合成前駆体であると推定し、新規骨格を有する AsA の生合成経路について考察した。まず、2 回の α -ケトール型 1,2-転位に伴う骨格転位が起こり、その後、エノール構造の立体選択的プロトン化、および分子内アセタール化により AsA が生成すると考えた。現在、AsB を生合成前駆体とした上述の生合成経路により AsA が有する特異な三環性骨格が生成されていると推定している。

AsA, AsB, AsC について、マウスマクロファージ由来 RAW 264.7 細胞を用いた抗炎症活性試験を行った結果、いずれも 100 μ M でも活性は見られなかった。なお、これら 3 つの化合物を単離後、分離に用いた画分を除く残り全ての画分 (16 画分) について活性評価を行った。その結果、2 つの画分にのみ顕著な抗炎症活性が確認された。従って、AsA, AsB, AsC を含んでいた抗炎症活性画分の活性本体はこれら 2 つの画分に含まれていると考えられ、今後その発見が期待できる。

また、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa S3 およびヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 を用いた細胞毒性評価も検討した。その結果、化合物 AsA は HL-60 細胞に対して中程度の細胞毒性 (IC_{50} 16 μ M) を示した。また、AsB, AsC は両方の細胞に対して活性を示さなかった。以上から、AsA の三環性骨格部分が細胞毒性を示すのに必要な構造である可能性が示唆された。

審 査 の 要 旨

[批評]

本論文で著者は、抗炎症活性物質の探索を目指して、海洋軟体動物の成分検索を行い、活性画分を得た。この画分についての成分検索を行った結果、極微量成分として新型の骨格を持つセコステロイド化合物とその生合成前駆体関連化合物を発見した。これらの精密な抽出単離実験の技術は、博士レベルのもとと評価される。ついで、これらの化合物の構造について、絶対立体価額を含めた構造決定を行っているが、この結果は著者が得た実験事実と報告されている情報に基づいたものであり、論理的な結論が導かれていると判断できる。また化学実験のみならず、計算科学を駆使して構造決定を行ってより確実な構造を提案している点も、評価できる。対象となった化合物の構造は、これまでに報告されていない骨格を含んでおり、その生合成や生物活性に興味を持たれるが、著者は、同時に発見された類縁体の構造と有機反応機構に基づいて、生合成経路を提案している。また、単離した化合物についての抗炎症活性や腫瘍細胞増殖阻害活性についての検定の結果を報告している。残念ながら、抗炎症活性画分から発見された化合物であるにも関わらず、その活性を示さなかったが、その細胞増殖阻害活性を見いだすとともに、別の活性化合物の存在を提唱している。

以上のように、本論文は天然物化学分野で高く評価される内容であり、博士論文としてふさわしい内容と評価される。

[最終試験結果]

平成28年2月10日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。