

氏名(本籍)	盧	載	燮
学位の種類	薬	学	博士
学位記番号	薬	第	281号
学位授与年月日	昭和63年	6月	29日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		

学位論文題目 Studies on Cardiotonic Steroids with
Special Reference to Korean Toad
Venom (強心性ステロイドとくに韓国産ガ
マ毒成分に関する研究)

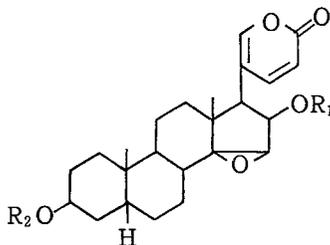
論文審査委員 (主 査)
教授 南 原 利 夫 教授 野 副 重 男
教授 鶴 藤 丞

論文内容要旨

ガマ毒より得られる漢薬“Ch'an Su”（韓国語では“Seomso”）はジギタリスと共に古くから強心利尿薬として心不全の治療等に用いられている。その有効成分は、Wielandをはじめとする多くの研究者によって検討され、活性本体である強心性ステロイドの他に、インドール塩基、ペプチド、アミノ酸、脂肪酸、多糖体、ステロール等の存在が明らかにされている。

従来、これらの強心性ステロイドは、bufogenin (1) とその3位にsuberoylarginineが結合した、いわゆる“bufotoxin” (6) とに大別されていた。しかし、島田らは、日本産ガマ外皮成分を検索し、bufotoxinの他に、コハク酸、アジピン酸、ピメリン酸を構成ジカルボン酸とする homologs (2, 4, 5), さらに硫酸抱合体が含まれていることを明らかにした (Chart 1)。また、植物界にしかみられなかったカルデノリドが動物界にもcardenobufotoxinとして存在することをはじめて見出した。ついで北米産、台湾産ガマ外皮からbufotoxinのアルギニンがグルタミン、ヒスチジン等に置き換ったanalogの含まれることを明らかにした。

シナヒキガエル“*Bufo bufo gargarizans* Cantor” は、中国および韓国に分布し、毒腺の分泌物はCh'an SuあるいはSeomsoとして用いられている。しかし、その有効成分に関しては、僅かにKomatsuらがresibufogeninを報告しているのみで、いまだ十分な検討がなされていない。以上の観点より、今回シナヒキガエル成分の検索をおこない、新規bufotoxin homologs, 硫酸抱合体の単離に成功した。



- 1 : $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{H}$
- 2 : $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_2 \text{CO-L-Arg} \cdot \text{OH}$
- 3 : $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_3 \text{CO-L-Arg} \cdot \text{OH}$
- 4 : $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_4 \text{CO-L-Arg} \cdot \text{OH}$
- 5 : $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_5 \text{CO-L-Arg} \cdot \text{OH}$
- 6 : $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_6 \text{CO-L-Arg} \cdot \text{OH}$
- 7 : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CO}(\text{CH}_2)_2 \text{CO-L-Arg} \cdot \text{OH}$
- 8 : $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{SO}_3\text{H}$

Chart 1

一方、最近キョウチクトウ科、ニシキギ科等の植物から、ステロイド核の2 α , 3 β 位で糖が二重に結合した、いわゆる変形糖を有する強心配糖体が単離され、その特異な化学構造から生理作用に多大の関心が寄せられている。この種配糖体は、従来の方法では真性ゲニンを得ることができず、それが構造解明上ひとつの隘路となっている。そこでこの点に検討を加え新規開裂法を開発すると共に、そのメカニズムを明らかにした。さらに、以上のようなbufotoxin関連物質および変形糖を持つ配糖体の構造活性相関を、Na⁺, K⁺-ATPase阻害活性を指標として検討した。

乾燥固化シナヒキガエル成分の検索

乾燥固化したシナヒキガエル(100匹)を粉碎く、抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HP LC)など各種クロマトグラフィーで精製し、新規bufotoxin homolog(3)を得た。このものの構造は各種機器データ、分解反応等よりcinobufagin 3-glutaryl-L-arginineと推定された。そこでcinobufagin(1)より活性エステル(10)を経て標品を合成し、直接比較同定した(Chart 2)。先に日本産ガマ外皮の成分としてC₄, C₆, C₇, C₈のジカルボン酸を持つbufotoxin homologsが明らかにされているが、今回新たにC₉のジカルボン酸を持つhomologの存在が証明された。なお、これ以外に既知のbufogenins 7種, bufotoxinおよびhomolog 8種が単離され標品との直接比較により同定した。

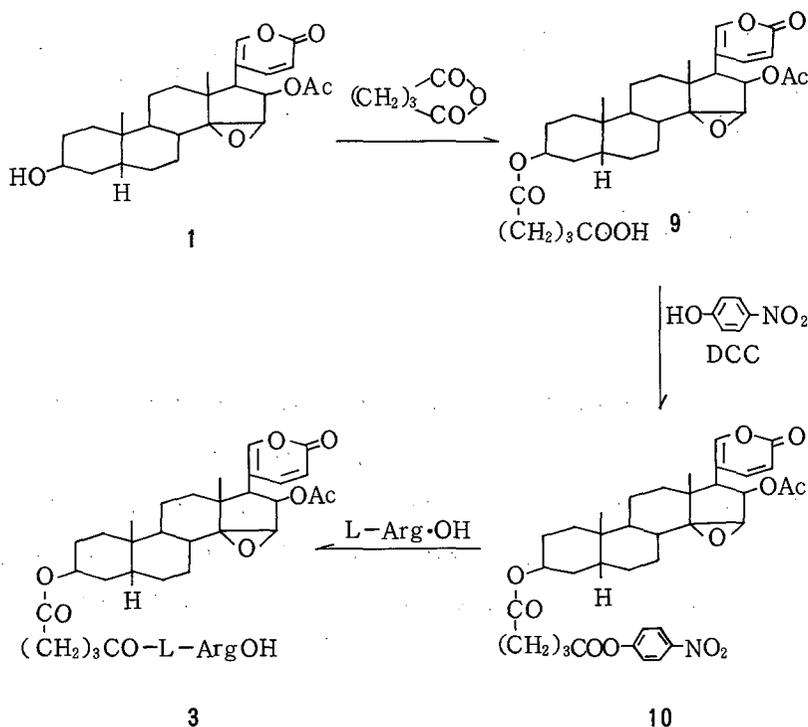


Chart 2

シナヒキガエル外皮成分の検索

韓国で捕捉したシナヒキガエル (26匹) の外皮を剥離し, 抽出, 分離を行い新規bufotoxin homolog (7) を得た。このものの構造は, 各種機器データ, 分解反応より desacetylcinobufagin 3-succinyl-L-arginine と決定した。先に日本産ガマ外皮より desacetylcinobufagin 3-succinate は単離されているが, アルギニンが結合した形で得られたのは, これが初めてである。また同様にして既知のbufotoxin homolog 2種も単離同定した。さらに新規硫酸抱合体として cinobufagin 3-sulfate (8) を単離し, 合成品との直接比較により構造を明らかにした。

変形糖を有する強心配糖体結合開裂法の開発

最近ニシキギ科に属する *Elaeodendroside glaucum* Pers. の種子より変形糖を有する一連の強心配糖体 (11, 12 など) が単離され, elaeodendroside と命名された。これら配糖体は, 従来の酸水解, 酵素処理等によって真性ゲニン (13 など) は得られないが, 以下の方法を用いて配糖体結合を開裂しうることを見出した (Chart 3)。

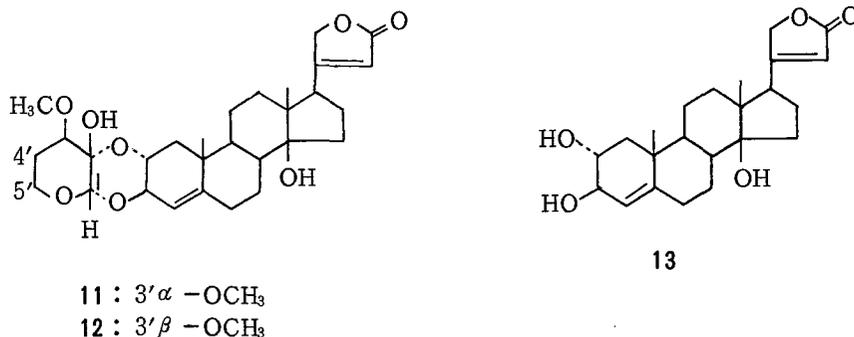


Chart 3

まず北川らのピリジン/無水酢酸によるサポニングルクロニド結合開裂法を適用した。その結果開裂には熱および塩基を必要とし, ピリジンまたはトリエチルアミン/トルエン中加熱還流することにより真性ゲニンが得られた。またヒドラジン分解, アルミナ処理によっても同様目的が達せられた。さらに上記条件下における3'-methoxyl基の異性化, 重水素交換反応などの知見に基づき, ヘミケタールが開裂し, 2'-ケトン体 (14) を経るChart 4に示すようなメカニズムを推定した。

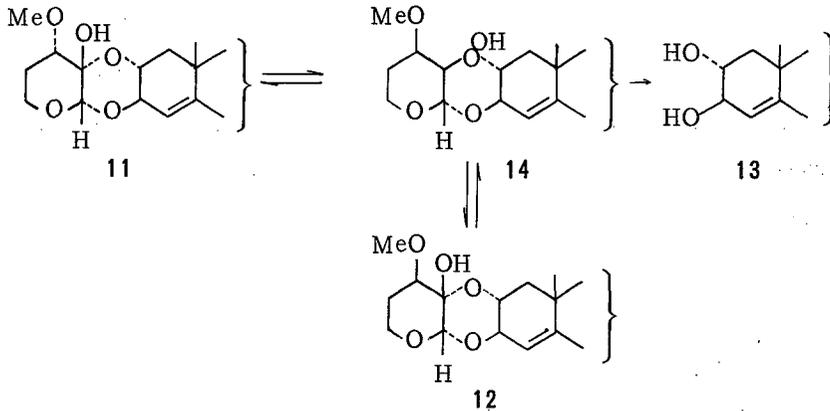


Chart 4

Bufotoxin関連物質および変形糖を有する強心配糖体の構造活性相関

Na^+ , K^+ -ATPaseは生体膜に広く分布し、 Na^+ , K^+ の能動輸送に関与する重要な酵素である。Ouabainに代表される強心性ステロイドは、この酵素がリン酸化された E_2 型のコンホメーションをとる時、特異的に結合し、無機リン酸の脱離する反応を抑制することが知られている。従って強心作用の指標として Na^+ , K^+ -ATPase阻害活性が用いられ、その測定には種々の方法が知られている。しかし、いずれの方法も一長一短があり十分とは言えない。最近島田らは、基質であるATPと生成するADPの量比をUV検出HPLCで定量し測定する。簡便で、感度、精度に優れる方法を開発した。そこで、まず本法を用いて、bufotoxin関連物質50種の阻害率 (I_{50}) を測定し、構造活性相関について考察した。Bufogenin (1) とその3位にsuberoylarginineが結合したbufotoxin (6) を比較したところ、後者の方がやや強い作用 (1~4.5倍) を示した。この関係は、digitoxigeninと合成的に得たdigitoxigenin 3-suberoyl-L-arginineにおいても同様であった。ついでbufotoxin のジカルボン酸部を異にするhomologs (2~5) の I_{50} を比較した。炭素鎖が最も短いコハク酸が阻害活性は最も弱く、長くなるに従って強くなる傾向を示したがセバシン酸以上ではほぼ同じ程度であった。



さらにアミノ酸部を異にするanalogについて比較したが、アルギニンを含むものが最も活性が高く、中性、酸性アミノ酸では約1/10に減弱した。また、アミノ酸の立体配置との関係を合成標品を用いて検討したところ、アルギニン、ヒスチジン、グルタミンいずれもD体、L体の違い

による有意な差は認められなかった。硫酸抱合体（8）およびグルクロン酸抱合体についても考察したが、いずれも対応するゲニンに比べ1/10~1/20の阻害活性を示すにとどまった。

以上の結果、ジカルボン酸部、アミノ酸部の構造は生物活性の発現に大きく関与することが判明した。すなわち、アミノ酸残基の性質によって酵素-bufotoxin複合体の安定性が異なり、阻害作用に影響を与えるものと考えられた。また、複合体の形成には、ゲニン部とアミノ酸部との間に適当な距離が必要であることを推測させた。

前述の通り、変形糖を有する強心配糖体の生物活性にも多大の関心もたれることから、bufotoxin類と同様にこれらおよび関連物質20種について Na^+ 、 K^+ -ATPase阻害活性を検定し、以下のような結果を得た。

対応するゲニンに比し、変形糖を有する配糖体の方が活性が高く（7~24倍）、糖部のmethoxyl基の立体配置（11と12など）によっても活性は異なった。さらにステロイド核上2 α 位への水酸基の導入は活性を減弱させるが、そのアセテートでは逆に活性が増強された。さらにC環の置換基も活性に大きく影響し、とくにdiosphenol型のもの（14）は活性が高く、ケトール構造の違い（15, 16）により30倍以上の差がみられた（Chart 5）。

以上のように、シナヒキガエルの強心成分を検索し、ジカルボン酸部にグルタル酸を有する新規bufotoxin homolog（3）等の単離に成功したが、今日までの知見と合せ、いわゆる“bufotoxin”の定義・概念を変えたものとして、その意義は大きい。

強心性ステロイドの構造活性相関は、ステロイド核上の置換基、特に14 β 位の水酸基、17 β 位の α 、 β -不飽和ラクトンに着目して研究されてきた。しかし、今回の成績から、抱合形式やステロイドA、C環上の置換基も生物活性に著しく影響することが明らかとなった。これらの知見は、作用機序の解明に重要な示唆を与え、優れた強心薬の開発に大きく役立つものと期待される。

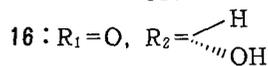
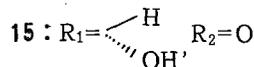
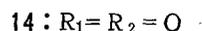
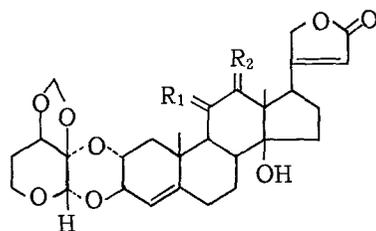


Chart 5

審査結果の要旨

本論文は、韓国産シナヒキガエルに含まれるプロトキシニン類並びに変形糖を有する強心配糖体の化学的研究を展開し、これら強心性ステロイドが示す Na^+ , K^+ -ATPase阻害活性の構造活性相関について考察したものである。

まず、乾燥固化したシナヒキガエルの抽出物を各種クロマトグラフィーに付し新規プロトキシニンを得た。各種機器データ、分解反応などからcinobufagin 3-glutaryl-L-arginineと推定され、活性エステル法で得た標品との直接比較により同定した。このほか既知のプロゲニン7種、プロトキシニン8種も単離同定された。また、外皮成分を検索した結果、desacetylcinobufagin 3-succinyl-L-arginine, cinobufagin 3-sulfateなどの存在が証明された。

つぎに、変形糖を有するelaodendrosideについて、配糖体開裂の条件を種々吟味した。ピリジノン-無水酢酸法、ピリジン（またはトリエチルアミン-トルエン）中加熱還流法、ヒドラジン分解法、およびアルミナ処理法について検討し、それらの結果および重水素交換反応の知見などを考え合せ、ヘミケタールの開裂、2'-ケト体を経る反応機構を推定した。

最後に、これら強心性ステロイドが示す Na^+ , K^+ -ATPaseの阻害活性を系統的に調べ、構造活性相関について考察を加えた。このとき阻害活性の測定は、基質ATPと生成物ADPの量比をUV検出HPLCで定量する方法によった。プロトキシニンホモログの阻害活性は、ジカルボン酸部の炭素鎖が伸長するにしたがって強くなる傾向が見られ、セバシン酸以上ではほぼ同じであった。さらにアミノ酸部を異にするアナログにおいては、アルギニンを有するものが最も活性が高く、中性、酸性アミノ酸では減弱し、D体、L体の差は認められなかった。さらに硫酸あるいはグルクロン酸が結合した抱合体は対応するゲニンに比べ1/10~1/20の阻害活性を示すにとどまった。

一方、変形糖を有する強心配糖体などについても関連物質20種をとりあげ Na^+ , K^+ -ATPase阻害活性を検定し、構造との関係を考察した。その結果、糖部の構造、ステロイド核上の置換基が阻害活性に著しい影響をおよぼすことが明らかとなった。

以上、本研究は未詳の点が多かった韓国産シナヒキガエルの強心成分を最近の分析法を駆使して精査し、従来欠除していたグルタル酸をジカルボン酸部とするプロトキシニンホモログなど数々の新規物質を単離同定すると共に、変形糖をもつ強心配糖体の開裂反応のメカニズムを究明し、さらにこれらの構造活性相関を Na^+ , K^+ -ATPaseを指標として系統的に考察したものであり、ドラッグデザインに役立つところきわめて大である。よって学位を与えるに十分値する内容と認める。