

氏名・(本籍)	やま 山	だ 田	かおる 薫
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	理 第	9 3 8	号
学位授与年月日	平成 2 年 1 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
最終学歴	昭和49年 3 月 お茶の水女子大学理学部卒業		
学位論文題目	コケに含まれる生物活性成分		
論文審査委員	(主査) 教 授 吉 越 昭		
			教 授 小 倉 協 三 教 授 平 間 正 博

論 文 目 次

- 第一章 序
- 第二章 活性成分の探索
- 第三章 単離成分の構造決定と性質
- 第四章 単離成分の生物活性
- 第五章 まとめ

論文内容要旨

第一章 序

コケは蘚類と苔類に分けられ日本には約1500種が生育しているが、一般に病中害が少なく、何等かの生物活性物質を含んでいるのではないかと考えられる。苔類には植物体内に種々の化学成分を含む油体が存在し、これについては研究が進んでおり、テルペン類を始め多くの成分が報告されている。蘚類は心血管病の民間薬として用いられていたとの事実もあり、生物活性成分の含有が期待されるが、抽出成分の絶対量が苔類に比べてずっと少ないこともあって、その成分検討は脂肪酸を除いてほとんど行われておらず、これを知ることは天然物研究の上から重要と考えた。一方、現在臨床で用いられている医薬品を考えると、抗腫瘍剤の効果、抗菌剤の耐性等の問題から、全く新しい構造を持つ薬剤の開発が求められている。

著者はコケ植物に病中害が少ない事実に着目し、化学物質が関与している可能性を考えて、その含有成分から新規の生物活性物質を見出し、新しい抗生物質および抗腫瘍剤の要求に応えることを目標に、本研究を行った。

第二章 活性成分の探索

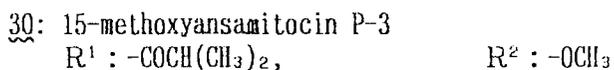
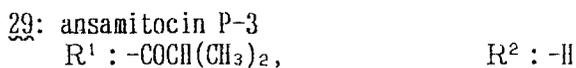
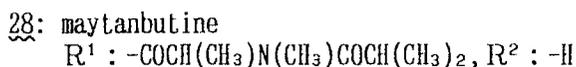
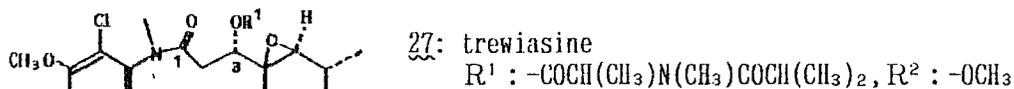
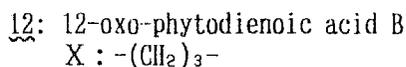
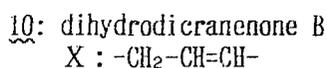
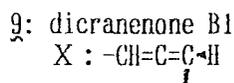
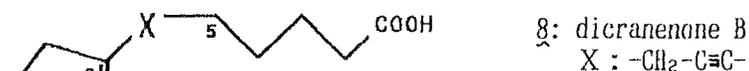
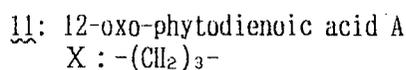
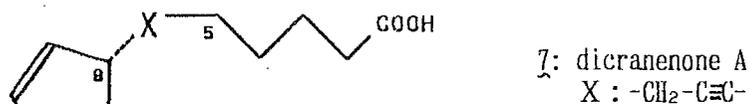
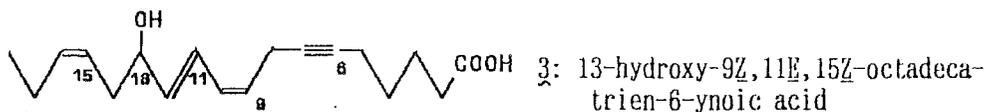
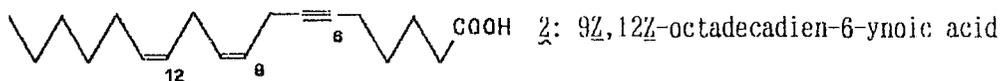
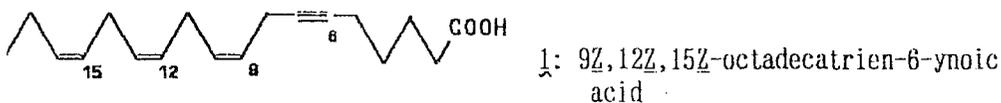
先ず、数種の菌を用いた抗菌活性試験と、マウスのリンパ性白血病細胞、P388を用いた *in vitro* 細胞毒性試験を生物活性の指標として、コケ抽出物のスクリーニングを実施した。それぞれ、180及び40検体について実施した結果、抗菌活性を示したコケ数種と、抗腫瘍活性を示したコケ2種を見出し活性成分の確認を行った。

第三章 単離成分の構造決定と性質

抗菌活性を示したコケからは、活性成分として炭素18個でシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジン (PG) 類似の新規物質群 (7~10) を単離、構造決定し、起源植物 (*Dicranum*) に因んでディクラネノン (dicranenone) 類と命名した。また、これらの前駆体で、イネイモチ病菌に対して優れた抗菌活性を持つ直鎖高度不飽和脂肪酸類 (1~3) を見出した。

これらの構造決定は各種スペクトルの測定によった。更に、1と2は混合物を白金触媒存在下、接触水素化するとステアリン酸のみを定量的に得たこと、またこれらの混合物をオゾン分解してアジピン酸モノメチルとヘキサナールを得たことにより構造が確認された。

7及び11の絶対構造は、それらの NMR と CD データを PGA_2 , 11 の13位エピマー、および関連化合物の文献データと比較して決定した。先ず、11は9,13位結合定数が6Hzで、トランス体である PGA_2 の NMR 実測地および *trans*-12-oxo-phytodienoic acid A の文献値と異なること、アルカリ処理によりほぼ100%異性化することが確認されたので相対的立体構造は9,13-*cis*と決定された。アルカリ処理で得た11の13位エピマーは、200-230nm 領域における CD の符号が *trans* 体で絶対構造既知の PGA_2 と一致していたので、 PGA_2 と同一の絶対構造であると考え



られ、従って11は9R,13Sと決定した。7は9,13位結合定数が6Hzであること、9,13位プロトン間に最大のNOEが観測されたこと、光学不活性のトランス-ジャスモン酸から合成されたtrans-dicranenone Aと一致しないことから、その相対立体化学は、9,13-cisと決定され、またCDは11と符号が一致したことから絶対構造は9R,13Sと決定した。9の $[\alpha]_D$ は正の値で、Loweの法則からアレン部分の絶対構造を決めることができた。

11, 12は亜麻仁の酵素を用いてリノレン酸から合成されている既知物質であるがこれまでに天然から見出された例はなく、コケからこれらが見出されたことは、実際の植物体内でもリポキシゲナーゼによるリノレン酸の酸化的環化反応が進んでいることが証明された最初の事実となった。この生合成経路はよく研究されており、アラキドン酸からPG類へ至る経路とは異なっており、リノレン酸の13-過酸化物を経る機構が提唱されている。7は相当する脂肪酸(1)から生合成されると考えられるが、今回、7を含有していたコケから13-過酸化物由来と考えられる3が単離され、この推定が裏付けられた。

また、植物に広く分布し、ホルモン様の活性を示すジャスモン酸がリノレン酸から出発して11を経て生合成されることを示す証明として、その中間体と考えられるシクロペンテノン化合物を見出したことは意義深い。これらは抗菌活性の他にもいくつかの生物活性を示した。

他に、直鎖高度不飽和脂肪酸のモノグリセリド、ジグリセリド、グリコリピド、芳香族カルボン酸エステル及びテルペン類が単離、同定された。

一方、抽出物に強い抗腫瘍性が認められたヒメコクサゴケの活性成分含有率はきわめて低く、構造決定に至るまでには大量のコケを必要とし、その採集をはじめ、単離精製には数々の障壁があった。しかしその活性画分はin vivoでも延命効果を示すことが確認され、各種カラムクロマト、HPLCを繰り返し、その活性本体として4種のメイタンシノイド(27~30)を単離したが、コケ及び日本産植物からは初めて単離された例である。この内、30は新規物質である。

単離された成分はいずれも微量で、構造決定は400MHz¹H-NMRによった。4種はいずれもよく似たパターンを示したので、その内の1つについてデカップリング及び2D測定を行い、部分構造を明らかにした。このケミカルシフト値と結合定数を詳細に検討した結果、芳香環を含むマクロライド構造が予想され、trewiasine(27)と完全に一致した。第二、第三の物質もそれぞれ、maytanbutine(28)及びansamitocin P-3(29)と同定された。最後の物質は29の15位メチレンプロトンの代わりにメトキシプロトンと酸素化されたメチンプロトンが観測された。更に11,13位オレフィンプロトン及び21位プロトンが低磁場シフトし、17位プロトンが高磁場シフトしていることが観測され、これらの相異は27を28と比較した時と全く同じ傾向であった。また、MSではよく似たパターンを示し、29に比べ、それぞれ30マスユニット多いフラグメントが見られ、水素1個がメトキシ基に置換したことを示唆し、文献未記載の新規メイタンシノイド、15-methoxyansamitocin P-3(30)と同定された。

スクリーニングで強い抗腫瘍性を示したもう1つのコケ、オオトラノオゴケの活性本体もこれら4種のメイタンシノイドであった。

メイトンシノイドの構造から、その真の生産者がコケ自体ではなく、コケに共生している微生物ではないかとの疑問が残ったが、これを明らかにすることと、15位が酸素化されたメイトンシノイドが大量に生産できる可能性を期待して、メイトンシノイドを見出したコケ、及びその周辺から微生物を単離、培養し、メイトンシノイド生産菌をスクリーニングしたが、これらを微生物が生産していることを裏付けるような結果は得られなかった。

また、コケの根元の堆積物中に、コケから見出されたメイトンシノイドの1つ、ansamitocin P-3が高濃度で認められ、同時に既知の植物起源の抗腫瘍性物質である deoxypodophyllotoxin も見出された。メイトンシノイドが動物細胞のみでなく、真菌や植物にも著しい殺細胞作用を示すという報告が見られること、メイトンシノイドを含有していたコケが大きな純群落を作って生育していること等を考え合わせると、コケから見出されたこれらの生物活性成分がコケの根元に堆積した腐葉土を介して、その植物の防御機構或は自らに適した環境調節に何等かの役割を果たしているのではないかと想像される。

第四章 単離成分の生物活性

本研究で単離したコケの成分の生物活性の総括を行い、次のような結果を得た。

trien-6-yn 酸は抗イネイモチ病菌活性と共に抗 SRS-A 活性を示し抗アレルギー作用が期待された。

Dicranenone 類はA型と B1 のみに抗菌活性があり、これらは弱い細胞毒性も示した。

新規メイトンシノイドである15-methoxyansamitocin P-3の活性は他のメイトンシノイドに比べると若干弱い、既知の抗腫瘍剤アドリアマイシンより2桁強かった。

第五章 まとめ

研究の結果、当初に期待した通り、種々の生物活性を示す新規物質をいくつか見出すことができた。

抗菌活性を有する一連の新規物質群、dicranenone 類を単離し、絶対構造を含む立体構造を決定した。これは、その生物活性の他に、直鎖高度不飽和脂肪酸の植物酵素による酸化的閉環反応が天然で実際に起こっていることを証明し、また植物成分でうるジャスモン酸がリノレン酸から生合成されることを示した点で意義深い。

抗腫瘍活性成分として、新規物質1種を含む4種のメイトンシノイドを見出した。既知の抗腫瘍剤に比べ強い活性がみられるので副作用の問題がなければ実用の可能性もあると考えられる。その起源、生産の意義等、興味深い課題について若干の検討と考察を加えた。

論文審査の結果の要旨

一般に、コケ類には病虫害が少ないなど、何等かの生物活性成分が含まれていることが示唆される。一方、コケのうちで苔類の化学成分は比較的良く研究されているのに対して、蘚類に関しては殆ど研究が行われていない。著者は新規な化学構造をもった生物活性成分を見出すことを目標として蘚類の化学成分研究を行った。すなわち、数種の菌を用いた抗菌活性試験と、マウスのリンパ球白血病細胞を用いた *in vitro* 細胞毒性試験を活性指標として、それぞれ180および40検体について抽出物のスクリーニングを実施した結果、抗菌活性を示す数種のコケと抗腫瘍活性を示す2種のコケを見出し、活性成分の分離と構造決定を行った。

抗菌活性を示すコケからはプロスタグランジン様構造をもつ新化合物, dicranenone A,B,B1, および dihydrodicranenone B を, またリノレン酸から酵素合成で得られているが天然物として初めてである12-oxophytodienoic acid A および B を単離し, 化学的方法と¹H NMR スペクトルで立体構造を含めた構造を, さらに円二色性スペクトルで絶対構造を決定した。その他の成分として dicranenone 類の生合成前駆体と考えられる高度不飽和脂肪酸3種, そのモノグリセリド, ジグリセリド, グリコリピド, 芳香族カルボン酸エステル, テルペン類等を単離同定した。これらの生理活性テストの結果, 9Z,12Z,15Z-octadecatrien-6-ynoic acid にイネいもち病に優れた抗菌活性があり, dicranenone A および B1 に抗菌活性と弱い細胞毒性が見られた。

一方, 強い抗腫瘍活性を示したヒメコクサゴケとオオトラノオゴケの活性成分の含有率は極めて低かったが, それから4種のメイタンシノイド, trewiasine, maytanbutine, ansamitocin P-3 が得られ, それに加えて新規化合物として強い抗腫瘍性を示す15-methoxyansamitocin P-3 が単離された。メイタンシノイドの真の生産者がコケ自体ではなく, 共生する微生物ではないかとの推定もあったので, コケおよびその周辺にいる微生物の培養も行ったが, この推定を証明するような結果は得られなかった。

以上の結果は, 著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって, 山田薫提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。