海洋由来Aspergillus属真菌が生産するインドールアルカロイドの構造と生合成研究

氏　　　　名	加藤　光
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博甲第 1107 号
学位授与の日付	平成２１年３月２３日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第４条第１項)
学位授与の題目	海洋由来 Aspergillus 属真菌が生産するインドールアルカロイドの構造と生合成研究
論文審査委員（主査）	太田　富久（医薬保健研究域・教授）
論文審査委員（副査）	小谷　明（医薬保健研究域・教授），国嶋　崇隆（医薬保健研究域・教授），垣内　信子（医薬保健研究域・准教授），塚本　佐知子（千葉大学・教授）

Abstract

Eleven new prenylated indole alkaloids, named notoamides A - D (**1** - **4**), E (**11**), and F - K (**5** - **10**), were isolated from a marine-derived *Aspergillus* sp. Their structures, including absolute configurations, were elucidated by spectroscopic methods. **11** was postulated to be a putative biosynthetic precursor of the notoamides, and appeared only on the culture incubated for 5 days and immediately disappeared. Through precursor feeding and incorporation experiments with synthetic ^{13}C-labelled **11** in the minimal medium, it was revealed that **11** was incorporated into **3** and **4** and 3-*epi*-notoamide C (**13**) along with three new minor alkaloids, notoamides E2 - E4 (**14** - **16**). Although **13** was not isolated from the culture in the normal medium, the yield of **7** in the feeding experiment was more than one of **3**. Compounds containing a bridged bicycle[2.2.2]diazaoctane ring, such as **1** and **2** and stephacidin A (**12**), were not isolated from this feeding experiment. **14** - **16** were not isolated from the culture of the fungus in the normal medium. This result suggests that the presence of excess **11** in the growth medium alters the metabolite profile of this fungus.

第1章

海洋由来*Aspergillus*属真菌が生産する新規プレニルインドールアルカロイド

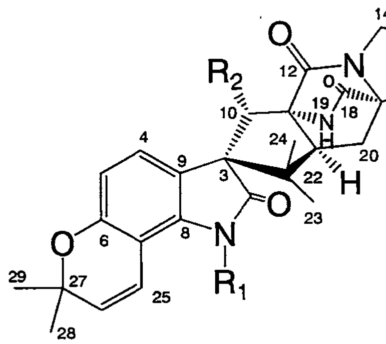
目的

海洋由来真菌は、構造的に新奇で生物活性のある二次代謝産物の豊富な資源であり、医薬品シーズの重要な供給源である[1]。本研究では、そのような代謝産物を探索し、イガイから単離された海洋由来*Aspergillus*属真菌の抽出物を、細胞毒性を指標として選別した。本章では、本真菌から単離された新規化合物である10種のプレニルインドールアルカロイド notoamides A - D および F - K（**1** - **10**）の単離、絶対立体化学を含む構造決定、そして、生物活性について述べる[2, 3]。さらに、**2** - **4** などの推定生合成経路についても述べる。

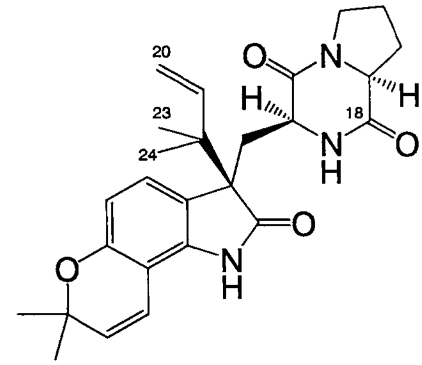
方法と結果

*Aspergillus*属真菌を麦芽エキス寒天培地上で培養し、その EtOH 抽出物を液々分配した。そして、細胞毒性の認められた *n* - BuOH 可溶部と 90% MeOH - H_2O 可溶部を合わせ、その混合物を ODS カラムクロマトグラフィーで分画した。続いて、80% MeOH - H_2O で溶出した画分をさらに ODS HPLC で精製し、10種の新規インドールアルカロイド notoamides A－D および F－K（**1**－**10**）を得た（Figure 1）。

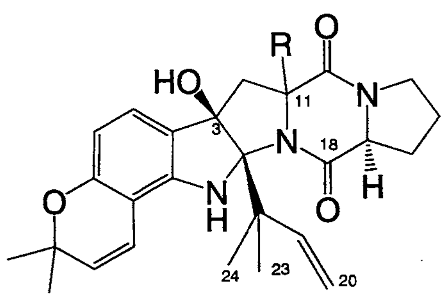
1－**10** の平面構造および相対立体配置は各種 NMR スペクトルを解析し、決定した。絶対配置は、キラル TLC による分析および CD スペクトルの解析により決定した。



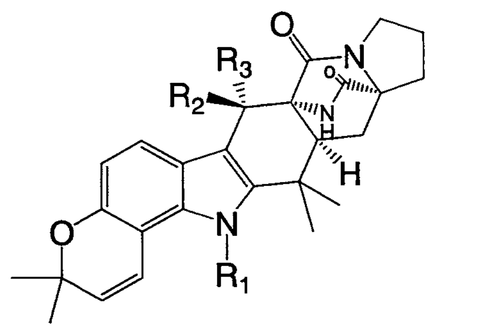
1 (R_1 = OH, R_2 = H)
2 (R_1 = R_2 = H)
7 (R_1 = R_2 = OH)



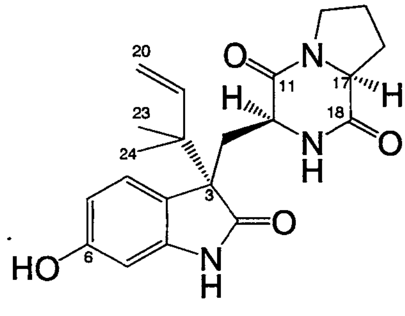
3



4 (R = α-H)
10 (R = β-OH)



5 (R_1 = R_2 = H, R_3 = OMe)
6 (R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OMe)
8 (R_1 = H, R_2, R_3 = O)

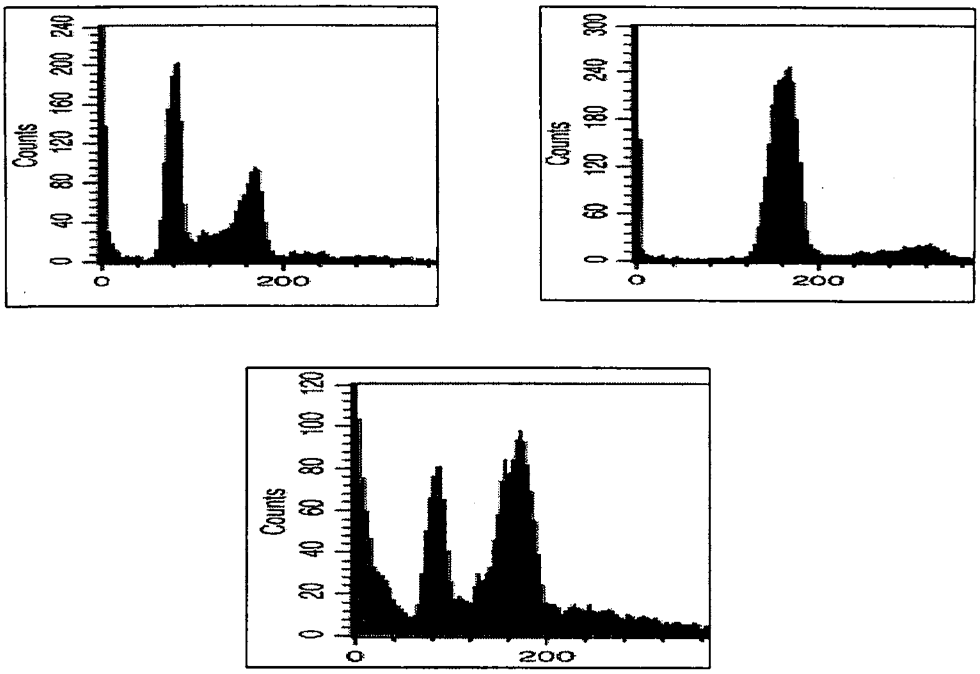


9

Figure 1. Structures of the compounds **1** - **10**.

1 と **8** は HeLa 細胞に対し IC_{50} が 27 および 21 μg/mL で細胞毒性を示し、その他の化合物の IC_{50} は 50 μg/mL 以上であった。さらに、**3** は 6.3 μg/mL

で G2/M 期における細胞周期阻害活性を示した（Figure 2)。



Notoamide C (**3**) (6.3 μg/mL)

Figure 2. Flow cytometric analysis.

考察

Notoamide 類の生合成として、構造的に Figure 3 に示す経路が考えられる。この図の中で、notoamide E（**11**）は推定生合成中間体であり、多様な notoamide 類が生合成される際の分岐点となる化合物であると考えられる。また、stephecidin A（**12**）は、本真菌の培地中に存在している既知化合物である。

本経路では、**11** から三つのルートが存在すると考えられる。一つ目は、**11** が酸化された後、分子内 Diels - Alder 反応により環化され、**12** が生成する。そして、**12** がさらに酸化され、pinacol 転移し、**2** が生成する[4]。二つ目および三つ目のルートでは、**11** のインドール環の二重結合が α 面または β 面か

ら酸化され、**3** または **4** が生成する[5)]。そして、それらの化合物がさらに酸化されるなどして、他の notoamide 類が生合成されると考えられる。

このように、**11** を生合成中間体とし、多様な化合物が生成されると考えられる。しかし、**11** は、本章で述べた notoamide 類の単離の際には存在を認められなかった。次章では、**15** を、本真菌の培養物から探索した結果について述べる。

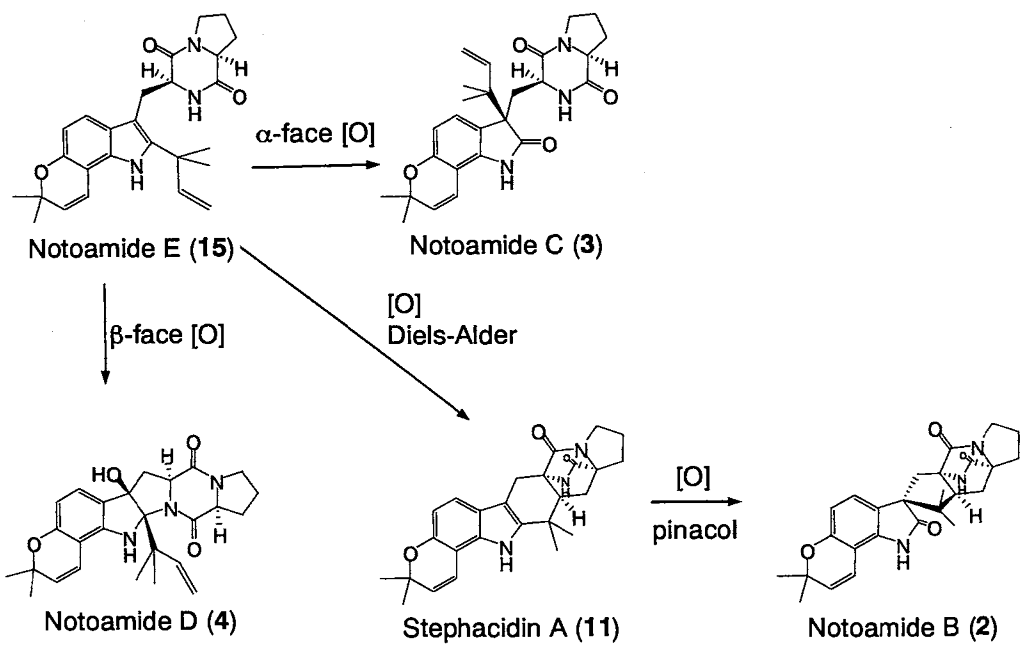


Figure 3. Hypothetical biosynthetic pathway of notoamides and **12**.

第2章

海洋由来 *Aspergillus* 属真菌からの notoamide E（**11**）の探索

目的

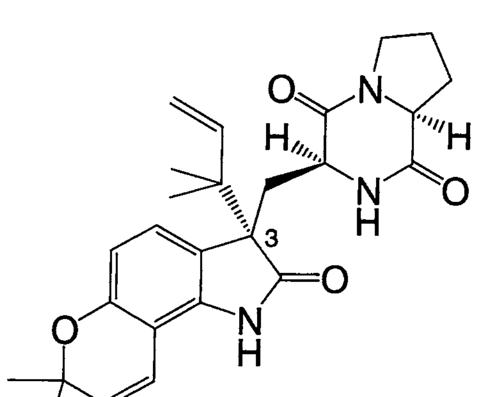
Figure 3 で生合成中間体として提案した **11** は、本真菌の 20 日間の培地中には存在を認められなかった。そこで、本実験では、初めに本真菌の **11** 生産量の経時変化を調べた。次に、^{13}C ラベルされた **11** の取り込み実験を行うことにより、notoamide 類の生合成研究を行った[6)]。

方法と結果

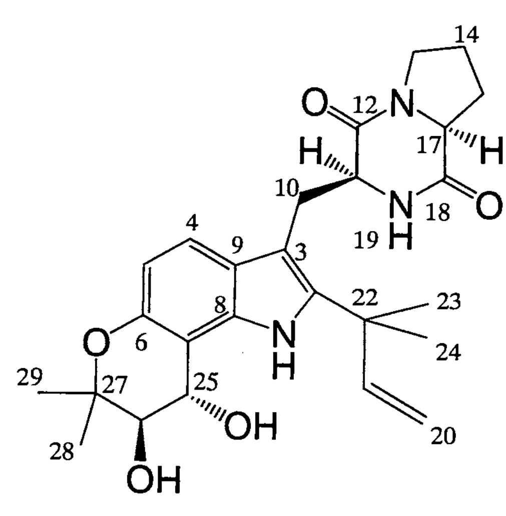
Notoamide 類の生合成中間体として推定していた **11** は、20 日間の培地中には存在が認められなかった。このことから、**11** は培養の初期にのみ存在し、ただちに他の化合物に変換されると考えた。そこで、より短期間の培養物を HPLC と NMR により分析し、**11** が五日間培養した培地中にのみ存在し、次の日には消失するということを明らかにした。次に、麦芽エキス寒天培地で本真菌を五日間培養し、その抽出物から **11** の単離と構造決定に成功した。

続いて、Figure 23 で提案した生合成経路を検討するために、^{13}C ラベルされた **11** を用い、最小培地中で取り込み実験を行った。そして、**11** が **3**、**4** および 3 - *epi* - notoamide C（**13**）に取り込まれ、さらに、新規化合物 notoamides E2 - E4（**14** - **16**）が得られた（Figure 4)。**13** は、通常の栄養が豊富な培地では認められなかったが、本取り込み実験においては **3** よりも高い収量で得られた。一方、**1**、**2** および **12** などのようなビシクロ[2.2.2]ジアザオクタン環を有する化合物は、本取り込み実験では得られなかった。

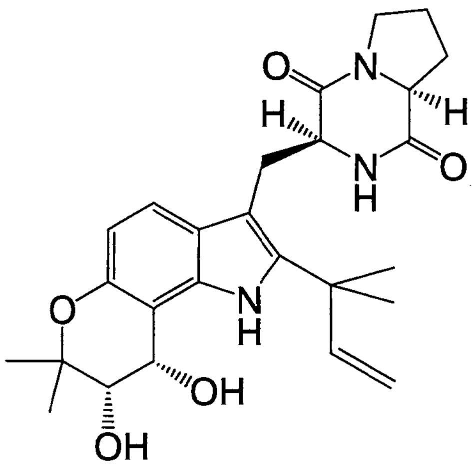
14－**16** の平面構造および相対立体配置は各種 NMR スペクトルを解析し、決定した。絶対配置は、キラル TLC による分析および CD スペクトルの解析より決定した。



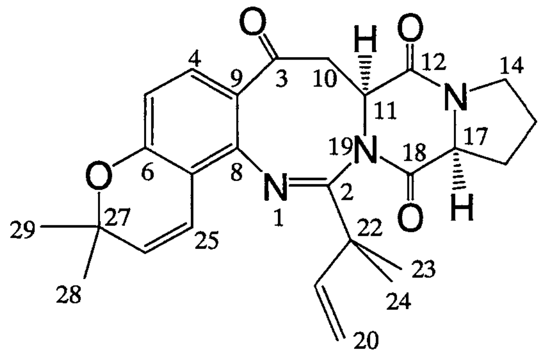
3-*epi*-notoamide C (**13**)



notoamide E2 (**14**)



notoamide E3 (**15**)



notoamide E4 (**16**)

Figure 4. Structures of the compounds **13** - **16**.

考察

11 が五日間培養した培地中にのみ存在し、次の日には消失したことから、**11** は、菌により生長の早い時期に生産された後、ただちに他の化合物に変換されると考えられる。

最小培地を用いた取り込み実験により **3**、**4** が得られ、**1** や **2** は得られなかった。さらに、取り込み実験を通常の培地で行った場合、^{13}C ラベルされていない **1** と **2** が得られた。これらの結果から、**1** や **2** などのビシクロ[2.2.2]ジアザオクタン環を含む化合物の形成のためには、通常の培地に含まれる栄養が必須であると考えられる。これより、Figure 3 で提案した経路とは異なり、**1** や **2** などのビシクロ[2.2.2]ジアザオクタン環を有する化合物は、**11** を経由して生合成されていないと思われる。

14 および **16** - **18** は、通常の栄養が豊富な培地では単離されなかった。よって、培地中の過剰な **15** の存在は、本真菌の代謝産物を変化させると考えられる。

結 論

海洋由来 *Aspergillus* 属真菌の培養物から、11 個の新規プレニルインドールアルカロイド notoamides A - D（**1** - **4**）、E（**11**）、F - K（**5** - **10**）を単離した[2, 3]。**1** と **7** の有する 1 - ヒドロキシ - 2 - オキシンドール骨格は、本研究で初めて天然資源から見出されたものである。さらに、最小培地中、過剰量の **11** 存在下、3 - *epi* - notoamide C（**13**）および新規化合物 notoamides E2 - E4（**14** - **16**）が得られた[6]。

これまでに、notoamide 類や stephacidin 類などのプレニルインドールアルカロイドは 50 種以上報告されている。しかしながら、本真菌のように、単一の菌から 22 種もの同族体が見出されたことは初めてである。このように、一種の菌から多様な構造のプレニルインドールアルカロイドが単離されたことにより、大きく分けて二つの問題がこれまでに議論されている。

一つ目は、notoamide 類を構造的に検討し、Figure 3 に示すような推定生合成経路が提案されたことである。これにより、それぞれの反応経路が生体模倣的に合成研究され[4, 5]、合成された **2** - **4** の NMR スペクトルは天然物のスペクトルと一致した。さらに、その経路の存在を確かめるために ^{13}C ラベルされた **11** の取り込み実験を行い、**3** と **4** は **11** に由来することが明らかになった。一方、Figure 3 で示した **1**、**2** および **12** などのビシクロ[2.2.2]ジアザオクタン環を有する化合物は、本取り込み実験では得られなかった[6]。

二つ目は、本真菌から単離された **2** および **12** の鏡像異性体が、同属ではあるが異なる真菌の代謝産物中から見出されたことである。そのように同属の二種の真菌からそれぞれ鏡像異性体が得られることから、生合成においては、立体配置が決定される際の反応機構に差異が存在すると考えられる。すなわち、ビシクロ[2.2.2]ジアザオクタン環が形成される際の分子内 Diels - Alder 反応（IMDA）が、選択的に逆の面から起こると提案されている[7]。このように、同属の二種の菌において、選択的に逆の面から IMDA が起こると

いう報告は、Nature Chemistry の Research Highlights でも紹介された[8)]。

引 用 文 献

1) Blunt *et al. Nat. Prod. Rep.* 2007, *24*, 31

2) Kato, H.; Yoshida, T.; Tokue, T.; Nojiri, Y.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M.; Tsukamoto, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, *46*, 2254 - 2256.

3) Tsukamoto, S.; Kato, H.; Samizo, M.; Nojiri, Y.; Onuki, H.; Hirota, H.; Ohta, T. *J. Nat. Prod.* 2008, *71*, 2064 - 2067.

4) Greshock, T. J.; Grubbs, A. W.; Tsukamoto, S.; Williams, R. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, *46*, 2262 - 2265.

5) Grubbs, A. W.; Artman Ⅲ, G.D.; Tsukamoto, S.; Williams, R.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, *46*, 2257 - 2261.

6) Tsukamoto, S.; Kato, H.; Greshock, T. J.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M. submitted to *J. Am. Chem. Soc.*

7) Greshock, T. J.; Grubbs, A. W.; Jiao, P.; Wicklow, D. T.; Gloer, J. B.; Williams, R. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, *47*, 3573 - 3577.

8) http://www.nature.com/nchem/reshigh/2008/0408/full/nchem.2008.3.html（インターネット上で紹介されている）

学位論文審査結果の要旨

本研究は、海洋真菌は能登沿岸地方で採取した海洋由来 *Aspergillus* 属真菌の培養物（２００枚の寒天培地で培養）から１１種の新規プレニルインドールアルカロイド notoamides A-K を単離、化学構造の決定を行った後に、生合成中間体と考えられた化合物の標識体を用いて生合成実験を行った結果をまとめたものである。同真菌からはこれまでに２２種もの同族体が単離されており、まれに見る構造多様性を示している。それらの中で多量に含有されている主代謝産物 notoamide A や B は構造中にジアザビシクロ [2.2.2] オクタン環を持っており、生合成的な分子内 Diels-Alder 反応成績体であると考えられた。生合成経路における共通中間体と考えられた、ジケトピペラジン側鎖を持つプレニルインドール notoamide E が単離されたことから、^{13}C 標識した notoamide E を用いて生合成実験を行った結果、notoamide A や B は得られなかったが、ジケトピペラジン側鎖を持つ同族体 notoamides C および D の生合成中間体であることが証明された。

本研究で用いた真菌と同属の *Aspergillus* 属真菌からは、notoamides B の鏡像異性体類が単離されており、２種の同属菌において生合成的に起こると考えられている分子内 Diels-Alder 反応が互いに逆の選択性を示すというユニークさは Nature Chemistry の Research Highlights でも紹介された。

以上のことから本研究は、天然物化学の基礎研究における新規性を示したものとして意義は大きく，博士（薬学）に相当すると判断する。