



| | |
|---------------------|---|
| Title | 抗腫瘍抗生物質生産菌株が微量に生産する生物活性化合物に関する研究 |
| Author(s) | 阿部, 尚樹 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(農学) |
| Dissertation Number | 乙第4436号 |
| Issue Date | 1993-12-24 |
| DOI | https://doi.org/10.11501/3076756 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/51218 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | 000000272834.pdf |



抗腫瘍抗生物質生産菌株が微量に
生産する生物活性化合物に関する研究

阿部尚樹

①

『抗腫瘍抗生物質生産菌株が微量に
生産する生物活性化合物に関する研究』

阿部 尚樹

謝辞

本論文をまとめるにあたり終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学農学部教授・市原 耿民博士に心より感謝の意を表します。

また、本論文をまとめるにあたり御親切な御指導を頂きました北海道大学農学部・教授水谷 純也博士並びに同・冨田 房男博士に深く感謝の意を表します。

また、本研究の機会を与えて下さり、御指導、御鞭撻を頂きましたサッポロビール（株）常務取締役研究開発本部長・鈴木 渉氏、取締役静岡工場長・上村 稔氏並びに取締役ビール製造本部副本部長・勢渡 和麿氏に深く感謝致します。

また、本研究をまとめるにあたり終始温かい御助言、ご鞭撻を頂きましたサッポロビール（株）医薬開発研究所所長・渡辺 信宏氏、探索研究部長・棟方 正信博士、腫瘍薬理研究部長・竹尾 駿氏、榎 伸康博士、中北 保一博士、内田 秀明氏（現・名城大学）、中村 武彦博士、佐藤 令一博士（現・東京農工大学）に深く感謝致します。

さらに、本研究を行うにあたり終始有益な御助言、御協力を頂きましたサッポロビール（株）・新井 好史博士、岡本 能弘氏、嘉茂 邦子さん、水野 秋子さん、植木（旧姓・佐澤） 寿美さん、さらに探索研究部、腫瘍薬理研究部並びに生産技術研究部の皆様に心より感謝致します。

一方、本研究において HMBC スペクトル並びに CD スペクトルを測定頂きました北海道大学農学部・福士 江里さん、同・箭田 浩士氏に感謝致します。

本研究において、私の天然物有機化学における研究に携わる最初の機会を与えて下さり、さらに、その分野における基本的な技術、考え方を修得するにおいて懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学名誉教授・坂村 貞雄博士並びに北海道大学農学部付属農場助教授・佐藤 博二博士に心より深く感謝の意を表

します。

最後に、本論文の作成にあたり心の支えとなり、叱咤激励と共に惜しみない協力を与えてくれた妻・阿部 麻奈美に心より感謝致します。

目次

| | 頁 |
|--|----|
| 緒 論 | 1 |
| 第 1 部 <u>Streptomyces</u> sp. HP530 株の生産する Saptomycin 類に関する研究 | |
| 第 1 章 本 論 | 25 |
| 第 1 節 生産菌の分類 | 25 |
| 第 2 節 生産菌の培養 | 28 |
| 第 3 節 HPLC 分析 | 30 |
| 第 4 節 Saptomycin 類の精製・単離 | 31 |
| 第 5 節 Saptomycin 類の物理化学的性質 | 34 |
| 第 6 節 Saptomycin 類の構造解析 | 40 |
| 6-1 Saptomycin A 及び F の構造解析 | 40 |
| 6-2 Saptomycin B、C ₁ 及び C ₂ の構造解析 | 42 |
| 6-3 Saptomycin D、E、G 及び H の構造解析 | 47 |
| 第 7 節 Saptomycin 類の <u>N,N</u> -dimethylvancosamine 部分の構造解析 | 50 |
| 第 8 節 Saptomycin 類の生物活性 | 56 |
| 8-1 Saptomycin 類の抗菌活性 | 56 |
| 8-2 Saptomycin 類の細胞障害活性 | 57 |
| 8-3 Saptomycin 類の抗腫瘍活性 | 58 |
| 8-3-1 Meth A 担癌マウスに対する延命効果 | 58 |
| 8-3-2 P388 担癌マウスに対する延命効果 | 59 |
| 8-3-3 Saptomycin D の各種マウス実験腫瘍系 に対する延命効果 | 59 |
| 8-3-4 Saptomycin D のヒト固形腫瘍(MKN45, WiDr) に対する抗腫瘍活性 | 60 |
| 第 9 節 Saptomycin D 関連化合物の Acyl 化誘導体に おける抗腫瘍活性 | 61 |
| 9-1 Acyl 化誘導体の調製 | 61 |
| 9-2 Acyl 化誘導体の細胞障害活性 | 62 |

| | | |
|------|---|----|
| 9-3 | Acyl 化誘導体の P388 並びに Meth A 担癌マウス に対する延命効果 | 63 |
| 9-4 | Acyl 化誘導体のヒト固形腫瘍(WiDr)に対する 抗腫瘍活性 | 63 |
| 第10節 | 考察 | 64 |
| 第2章 | 実験部 | 68 |
| 第1節 | 生産菌の分離 | 70 |
| 第2節 | 生産菌の分類 | 70 |
| 第3節 | 生産菌の培養 | 70 |
| 3-1 | 生産培地 | 70 |
| 3-2 | 培養 | 70 |
| 第4節 | 生産物の HPLC 分析 | 70 |
| 4-1 | サンプルの調製 | 70 |
| 4-2 | HPLC 分析 | 71 |
| 第5節 | Saptomycin 類の精製・単離 | 71 |
| 5-1 | Saptomycin A、B、C ₁ 、C ₂ 、F の精製・単離 | 71 |
| 5-2 | Saptomycin D、E、G、H の精製・単離 | 72 |
| 第6節 | Saptomycin 類の物理化学定数及び スペクトルデータ | 73 |
| 6-1 | Saptomycin A のスペクトルデータ | 73 |
| 6-2 | Saptomycin B のスペクトルデータ | 73 |
| 6-3 | Saptomycin C ₁ のスペクトルデータ | 73 |
| 6-4 | Saptomycin C ₂ のスペクトルデータ | 73 |
| 6-5 | Saptomycin D のスペクトルデータ | 73 |
| 6-6 | Saptomycin E のスペクトルデータ | 74 |
| 6-7 | Saptomycin F のスペクトルデータ | 74 |
| 6-8 | Saptomycin G のスペクトルデータ | 74 |
| 6-9 | Saptomycin H のスペクトルデータ | 74 |
| 第7節 | Deacetylsaptomycin D 及び E の誘導並びに 物理化学定数及びスペクトルデータ | 75 |
| 7-1 | Deacetylsaptomycin D の誘導 | 75 |
| 7-2 | Deacetylsaptomycin D の物理化学定数及び スペクトルデータ | 75 |
| 7-3 | Deacetylsaptomycin E の誘導 | 76 |

| | | |
|-------|--|----------|
| 7-4 | Deacetylsaptomycin E の物理化学定数及び スペクトルデータ | 76 |
| 第8節 | Saptomycin D の Acyl 化体の誘導並びに物理化学 定数及びスペクトルデータ | 78 |
| 8-1 | 11- <u>0</u> -acetyl saptomycin D の誘導 | 78 |
| 8-2 | 11- <u>0</u> -acetyl saptomycin D の物理化学定数及び スペクトルデータ | 78 |
| 8-3 | 11- <u>0</u> -propionyl saptomycin D の誘導 | 78 |
| 8-4 | 11- <u>0</u> -propionyl saptomycin D の物理化学定数 及びスペクトルデータ | 79 |
| 8-5 | Deacetyl-3 [~] , 11- <u>0</u> -dipropionyl saptomycin D の 誘導 | 79 |
| 8-6 | Deacetyl-3 [~] , 11- <u>0</u> -dipropionyl saptomycin D の 物理化学定数及びスペクトルデータ | 80 |
| 8-7 | 11- <u>0</u> -butyryl saptomycin D の誘導 | 80 |
| 8-8 | 11- <u>0</u> -butyryl saptomycin D の物理化学定数及び スペクトルデータ | 80 |
| 8-9 | Deacetyl-3 [~] , 11- <u>0</u> -dibutyryl saptomycin D の 誘導 | 81 |
| 8-10 | Deacetyl-3 [~] , 11- <u>0</u> -dibutyryl saptomycin D の 物理化学定数及びスペクトルデータ | 81 |
| 第9節 | 生物活性試験 | 82 |
| 9-1 | 抗菌活性試験 | 82 |
| 9-2 | 細胞障害活性試験 | 82 |
| 9-2-1 | 細胞 | 82 |
| 9-2-2 | <u>in vitro</u> 細胞障害活性の測定 | 82 |
| 9-3 | 抗腫瘍活性試験 | 83 |
| 9-3-1 | 細胞 | 83 |
| 9-3-2 | マウス | 83 |
| 9-3-3 | <u>in vivo</u> 抗腫瘍効果 | 83 |
| チャート | | 84 - 125 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 第2部 | <u>Streptomyces</u> sp. G324 株の生産する Oxopropaline 類に関する研究 | |
| 第1章 | 本論 | 127 |
| 第1節 | 生産菌の分類 | 127 |
| 第2節 | 生産菌の培養 | 130 |
| 第3節 | Oxopropaline 類並びに Lavendamycin の 精製・単離 | 131 |
| 第4節 | Oxopropaline 類の物理化学的性質 | 133 |
| 第5節 | Oxopropaline 類の構造解析 | 135 |
| 5-1 | Oxopropaline A の構造解析 | 135 |
| 5-2 | Oxopropaline B の構造解析 | 140 |
| 5-3 | Oxopropaline D の構造解析 | 141 |
| 5-4 | Oxopropaline E の構造解析 | 142 |
| 5-5 | Oxopropaline G の構造解析 | 143 |
| 第6節 | Oxopropaline 類並びに Lavendamycin の 細胞障害活性 | 144 |
| 第7節 | 考察 | 145 |
| 第2章 | 実験部 | 150 |
| 第1節 | 生産菌の分離 | 152 |
| 第2節 | 生産菌の分類 | 152 |
| 第3節 | 生産菌の培養 | 152 |
| 3-1 | 生産培地 | 152 |
| 3-2 | 培養 | 152 |
| 第4節 | 培養状況の分析 | 152 |
| 第5節 | Oxopropaline 類の精製・単離 | 154 |
| 第6節 | Oxopropaline 類の物理化学定数及びスペクトル データ | 154 |
| 6-1 | Oxopropaline A のスペクトルデータ | 154 |
| 6-2 | Oxopropaline B のスペクトルデータ | 154 |
| 6-3 | Oxopropaline D のスペクトルデータ | 155 |
| 6-4 | Oxopropaline E のスペクトルデータ | 155 |
| 6-5 | Oxopropaline G のスペクトルデータ | 155 |
| 第7節 | Lavendamycin 及び Harman の物理化学定数及び スペクトルデータ | 155 |
| 7-1 | Lavendamycin のスペクトルデータ | 155 |

| | | |
|------|---|-----------|
| 7-2 | Harman のスペクトルデータ | 155 |
| 第8節 | Oxopropaline 類の酸加水分解 | 156 |
| 第9節 | Oxopropaline 類の酸メタノリシス及び p-bromobenzoyl 化 | 156 |
| 9-1 | 酸メタノリシス及び p-bromobenzoyl 化 | 156 |
| 9-2 | 1- α -O-Me-rhamnose のスペクトルデータ | 156 |
| 9-3 | 2,3,4-tri-O-(p-bromobenzoyl)-1- α -O-Me- rhamnose のスペクトルデータ | 157 |
| 第10節 | 細胞障害活性試験 | 157 |
| 10-1 | 細胞 | |
| 10-2 | <i>in vitro</i> 細胞障害活性の測定 | 157 |
| チャート | | 158 - 176 |
| 総括 | | 177 |
| 要約 | | 181 |
| 参考文献 | | 184 |

緒論

近年、わが国における平均寿命が延長する一方において、死因となる疾患も大きく変化が認められる。なかでも悪性腫瘍（癌）は1981年に脳卒中を抜き死因の第一位を占めるにいたり年間約16万人が死亡した^{1, 2)}。そして、1985年には年間約19万人強の人々がその生命を失い、その後、現在に至るまで死亡数は増加を示し、さらに今後も増加傾向を示すであろうと予測されている^{3, 4)}。最近、致死性の疾患として AIDS（後天性免疫不全症候群）に対する関心が高まっているが、依然として、癌に対してはより身近な致死性疾患としての関心が高いと思われる。わが国における癌は、胃癌をはじめとする消化器癌が多く、なかでも組織的には上皮性組織由来の癌（carcinoma）が、比較的多い。しかし、生活様式の欧米化に伴い、これまでわが国で比較的発生頻度の低かった、肺癌、大腸癌、女性の乳癌も次第に増加する一方、高齢者の増加に伴う前立腺癌の発生も増加する傾向にある^{1, 3)}。

癌治療の方法としては、外科的療法、放射線療法などの一時療法に加え薬物による癌化学療法がある。血液性の癌を除き第一次選択としては外科的療法がとられ制癌剤による治療手段は二次的なものである。しかしほとんどの場合、治療が行われるときには進行癌の状態となっており、転移増殖が進行している場合に、その治療として、外科、放射線療法のみを頼っては、患者に対する治療効果、あるいは治癒に十分な結果を得ることがきわめて困難であると考えられる。たとえば、胃癌の進行癌におけるリンパ節、肝臓、肺その他の組織への転移が少なくないことや、乳癌の進行癌での近傍のリンパ節、骨髄、肺への転移などが事実として認められている。このような癌転移を抑制し、治療するには制癌物質による癌化学療法による方法が唯一のものであり、制癌剤が進行癌の治療に果たす役割はきわめて高い³⁾。

癌化学療法の歴史は比較的新しく、30年くらい前より急速に発展してきた。その効果としては、過去において、必ず死に至る病と言われた小児の急性白血病、ホジキン病、ユーイング病、睾丸腫瘍、ウィルムス腫瘍、パーキット腫瘍、胎児性横紋筋肉腫、絨毛癌、網膜膠腫などは、5年生存治癒がみられる。また、制癌剤の効果により腫瘤の縮小と生存期間の延長が認められるものとして、皮膚癌、卵巣癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、上記他の白血病、上記他の悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、膵島細胞腫、神経芽腫などがある¹⁾。

現在、癌化学療法に用いられている制癌剤は、以下のように分類されている。

- 1) アルキル化薬 (Alkylating agents)
- 2) 代謝拮抗物質 (Antimetabolites)
- 3) 抗生物質 (Antibiotics)
- 4) 植物由来物質 (Plant products)
- 5) ホルモン類 (hormones)
- 6) その他 (Miscellaneous)

この中で天然物由来の化合物が主に占める分野は、抗生物質、植物由来の物質である。天然物由来の化合物で現在臨床における癌化学療法に用いられている化合物を Fig.1 に示す。

Actinomycin D (ACT-D) は1954年に Waksman らにより Streptomyces antibiotics の培養濾液より見いだされた化合物で2重鎖 DNA のデオキシグアノシン部分と結合して DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの作用を阻害するのが、主な作用機作である。静脈内投与により用いられるが、血中半減期は約36時間と長く組織に結合する度合いも高い。臨床上の適応症として、小児のウィルムス腫瘍、絨毛上皮腫、胎状奇胎などがあげられるが、副作用として、骨髄抑制、おう吐、脱毛、口内炎、下痢などの消化器症状がみられる。さらに放射線増感剤としても働き、遅延型の放射線反応をひきおこすことがある^{1, 5)}。

Mitomycin C (MMC) は1958年、秦らにより Streptomyces caespitosus より分離され、他の抗生物質と異なり in vivo において官能基2個ないし3個のアルキル化剤へと活性化される。生体内では主として肝臓で代謝をうけ、血中からの消失も比較的早く、半減期は10から15分位である。MMC は胃、膵臓、結腸などの癌や乳癌の腺癌、頭頸部癌、慢性骨髄性白血病などの治療に用いられる。副作用については、骨髄抑制が主であり、やや遅延して現れかつ蓄積型である^{1, 6)}。

Neocarzinostatin は1964年に石田らにより Streptomyces neocarzinostatics の培養濾液から発見された高分子抗生物質で、作用機作として癌細胞の DNA 合成と分裂阻害が示されている。主として静脈内投与により胃癌、膵臓癌などの消化器癌や急性白血病の治療に用いられている。消化器系への副作用のほか白血球、血小板減少、発熱発疹、肝機能障害などが認められる¹⁾。

Bleomycin (BLM) は1962年梅沢らにより Streptomyces verticillus の培養濾液より見いだされた複合抗生物質で少なくとも13種の成分が存在し、A₂ がもっとも有効性が高いと思われる。BLM は DNA と直接結合して細胞に働きその結果 DNA、RNA 及び蛋白合成が抑制される。また、DNA における単鎖切断ももたらす。BLM の作用は細胞周期に関係なく働くと考えられており、腫瘍細胞、肝及び腎臓に存在するアミノペプチダーゼの一種の作用で分解を受ける。この酵素は、皮膚と肺にほとんど存在しないため、これらの部分が影響を受け易い。静脈内投与す

ると、血中からの消失が早く、その半減期は約2時間である。皮膚で分解されにくいことから、臨床上、扁平上皮癌に対する卓越した効果が報告されている。骨髄抑制効果は弱い、治療を受けた患者に肺繊維症が現れることがある^{1,7)}。

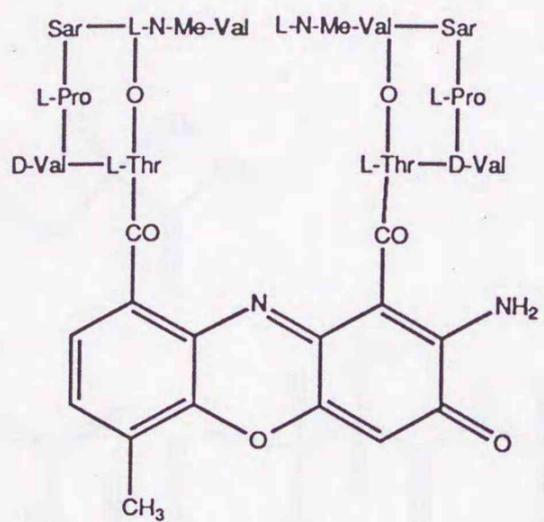
Chromomycin A₉ (CHRM) は1960年 Streptomyces griseus より単離された抗生物質で RNA の合成阻害や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの阻害作用が報告されている。臨床的な効果は単独ではあまり強くなく悪性リンパ腫、肺癌には有効率が高いといわれる。消化器系への副作用のほか白血球や血小板の減少もみられ注射部位から洩れると強い疼痛と壊死をもたらす¹⁾。

Daunomycin (DNR) は1964年に DiMarco らにより Streptomyces peuceitius より発見され、Adriamycin (ADR) は Arcamone らにより1969年に Streptomyces peuceitius var. caesius より単離された、ともに Anthracycline 系の化合物である。これらの化合物の構造上の違いは、14位の水酸基の違いであり薬理学的特性や毒性は類似している。静脈内投与すると両薬剤とも肝臓内でかなりの代謝を受け活性及び不活性形に変換する。その後、組織と強く結合し主として胆汁中に排泄される。血液-脳関門を通過することはない。ADM の血中よりの消失が遅いため間歇的高投与量による治療法が広く採用されている。両薬剤とも副作用として激しい骨髄抑制、脱毛、口内炎、おう吐、心毒性が見られる。まれに ADR による腎臓毒性、色素沈着、発疹などが見られる。Anthracycline は一般に免疫抑制能は低いものの突然変異誘発性、催奇形性発性などの性質をそなえている。作用機作としては、DNA と3塩基対に1分子の割合で結合し (intercalation) DNA を鋳型とする RNA 及び DNA ポリメラーゼ反応を阻害することが主なものと考えられている。構造上の違いはわずかであるにもかかわらず、制癌スペクトルにおいて ADR と DNR は異なった効果を示す^{1,8,9)}。

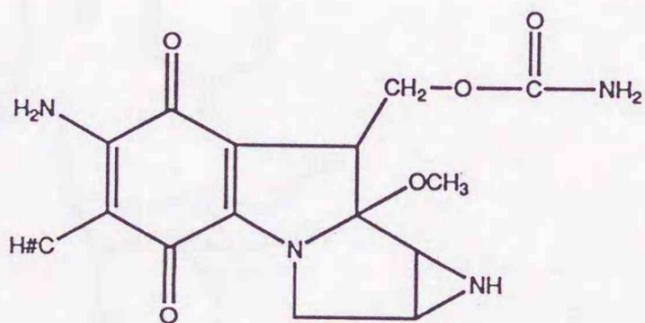
Aclacinomycin (ACR) は1971年に梅沢らにより見いだされた Anthracycline 系の化合物で1982年に上市された。この化合物は ADR、DNR に比べ心毒性が軽減されている¹⁰⁾。

Vinblastine、Vincristine はツルニチニチソウ (Vinca rosea) より分離された。これらの化合物は母核の巨大分子上の側鎖でメチル基 (Vinblastine) とフォルミル基 (Vincristine) の差のみである。この両者は共に細胞の microtubule 蛋白と結合することによって抗腫瘍活性を示すと考えられる。免疫抑制作用は弱い。両化合物とも化学的、ないし作用上の類似点は多いが、抗腫瘍性並びに毒性のスペクトルは相違し、交差耐性を示さない。Vincristine の主な副作用は中枢神経系への影響であり、一方 Vinblastine の場合は、骨髄毒性である。Vincristine は急性白血病、悪性リンパ腫、小児腫瘍の治療に静注により用いられ、Vinblastine は悪性リンパ腫や絨毛性腫瘍の治療に用いられる¹⁾。

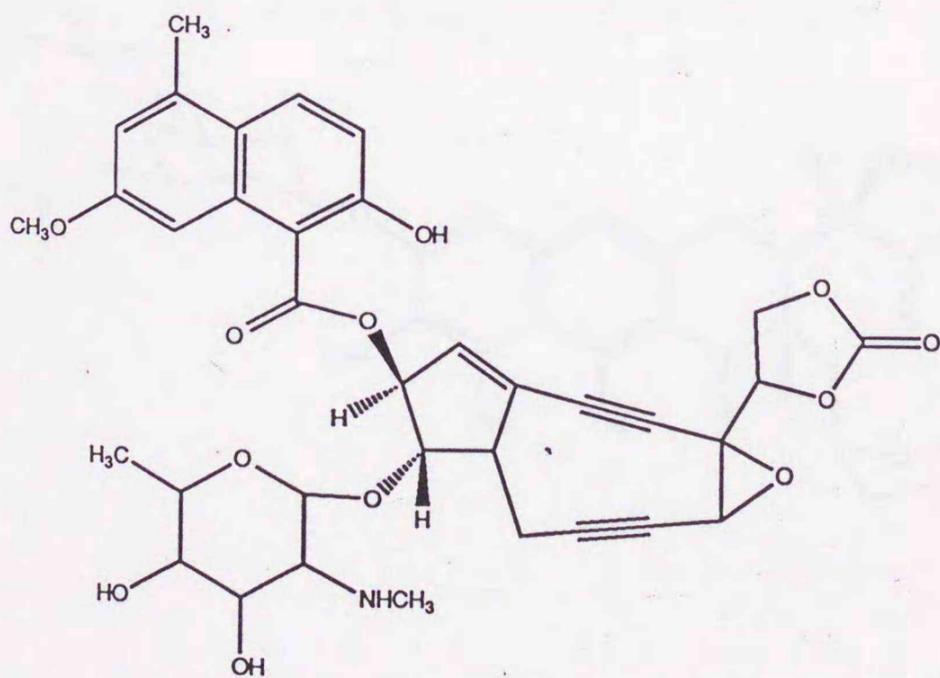
Fig. 1. 現在臨床で使用されている天然物起源の化合物



Actinomycin D



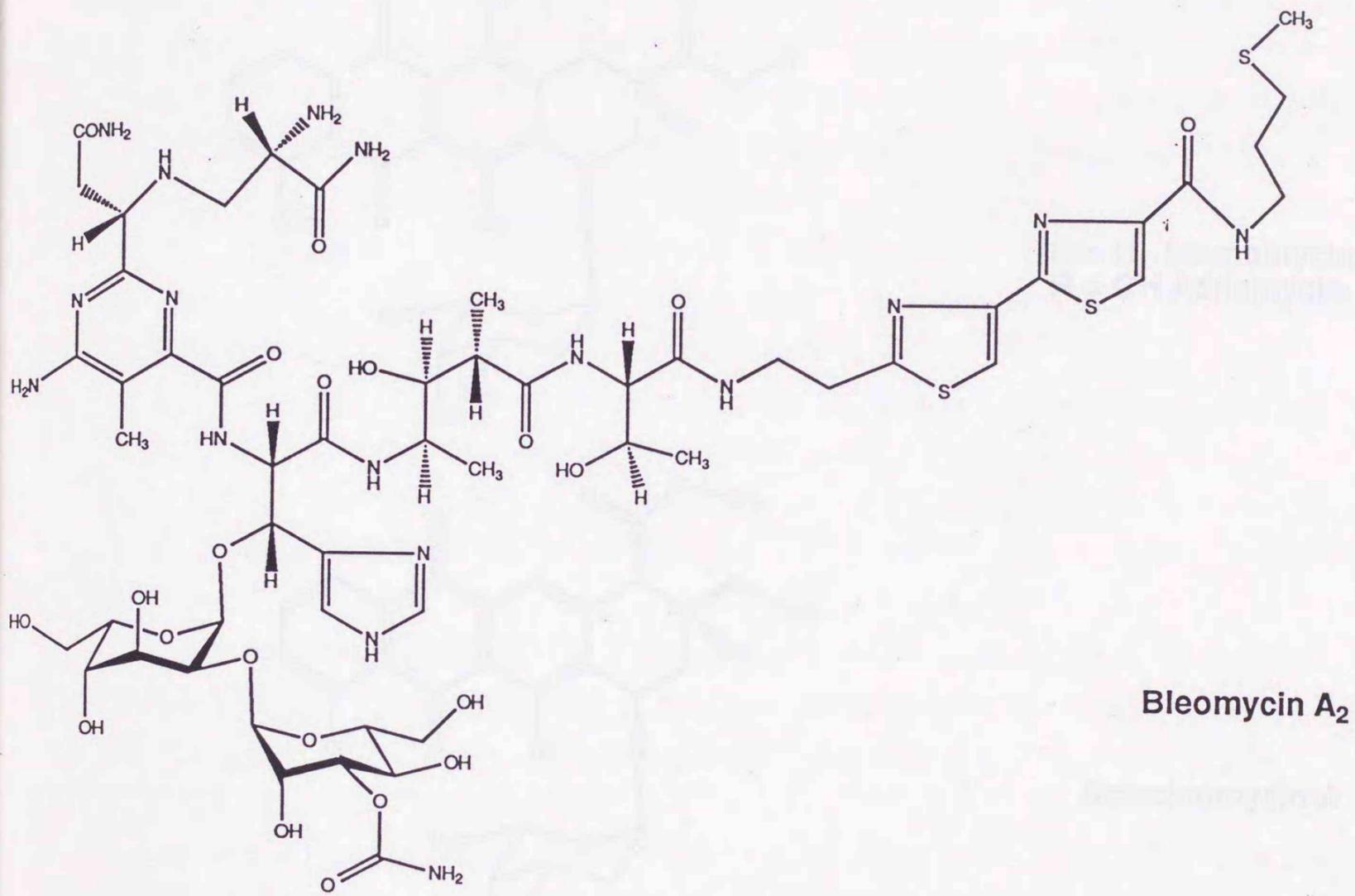
Mitomycin C



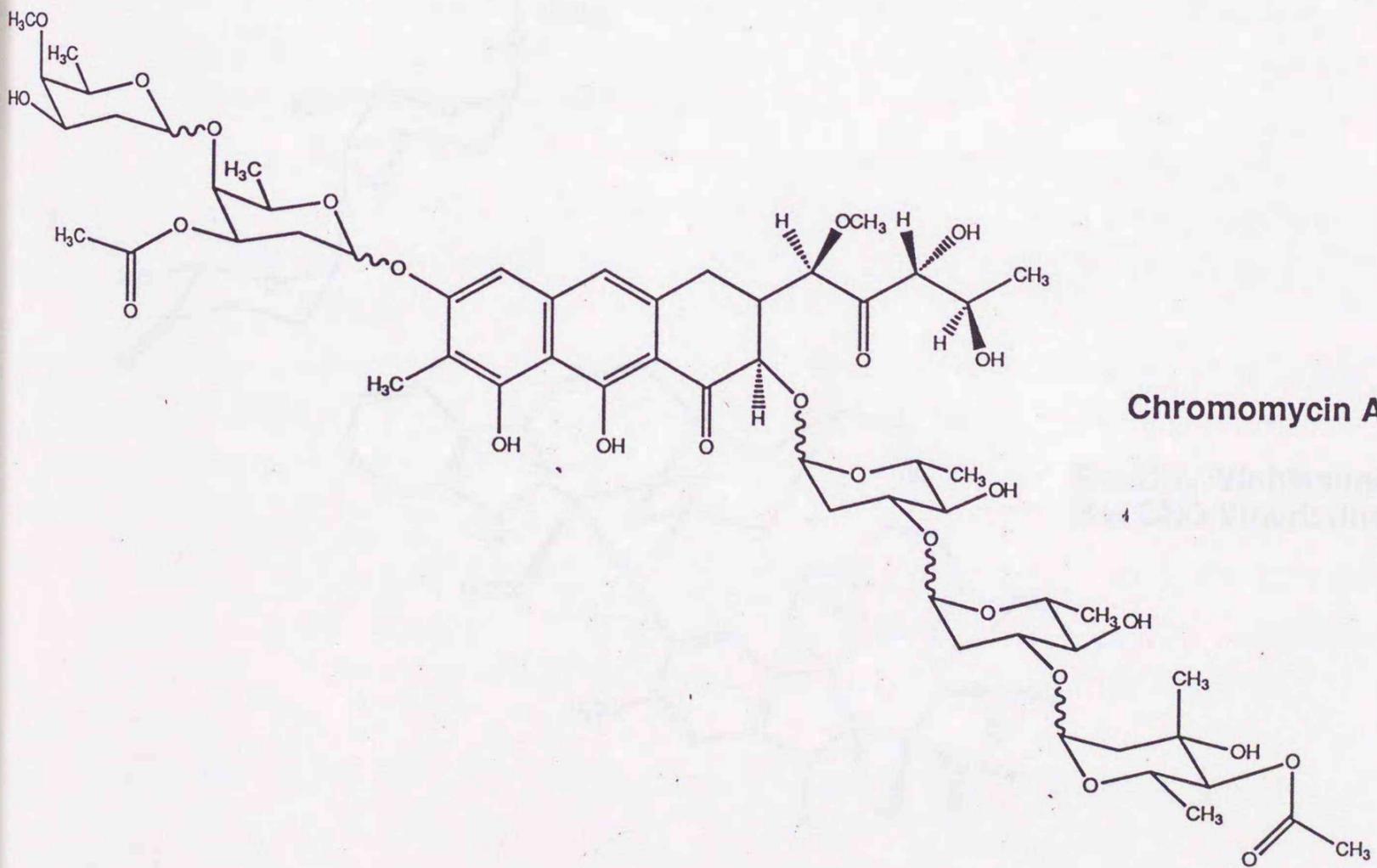
Neocarzinostatin

Ala-Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Val-Thr-Pro-Ser-Ser-Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Thr-Val-Val-Lys
 Val-Ala-Gly-Ala-Gly-Leu-Gln-Ala-Gly-Thr-Ala-Tyr-Asp-Val-Gly-Gln-Cys-Ala-Trp-Val
 Asn-Thr-Gly-Val-Leu-Ala-Cys-Asp-Pro-Ala-Asn-Phe-Ser-Ser-Val-Thr-Ala-Asp-Ala-Asp
 Gly-Ser-Ala-Ser-Thr-Ser-Leu-Thr-Val-Arg-Arg-Ser-Phe-Glu-Gly-Phe-Leu-Phe-Asp-Gly
 Thr-Arg-Trp-Gly-Thr-Val-Asp-Cys-Thr-Thr-Ala-Ala-Cys-Gln-Val-Gly-Leu-Ser-Asp-Ala
 Ala-Gly-Asp-Gly-Pro-Glu-Gly-Val-Ala-Ile-Ser-Phe-Asn 113

Fig. 1. (続き)



Bleomycin A₂



Chromomycin A₃

この他に臨床では用いられていない多くの天然物起源の抗腫瘍性物質が見ついている。これらの化合物は、その作用機作により1) DNA に作用する物質、2)ヌクレオチド生合成系に作用する物質、3)微小管系に作用する物質、4)タンパク質合成系に作用する物質、5) SH 阻害物質などに分類される¹¹⁾。特に微生物由来の抗生物質が多数発見されており、主な化合物として1)には Echinomycin¹²⁾、Anthramycin¹³⁾、Pluramycin A¹⁴⁾、Saframycin A¹⁵⁾、Streptonigrin¹⁶⁾、CC-1065¹⁷⁾ など、2)には Cordycepin¹⁸⁾、Tubercidin¹⁹⁾、Coformycin²⁰⁾、Angustmycin²¹⁾、Oxanosine²²⁾、Bredinine²³⁾、5-Azacytidine²⁴⁾ などの核酸系化合物が含まれ、3)としては、Ansamitocin²⁵⁾、4)として Puromycin²⁶⁾、Cycloheximid²⁷⁾、5)として Sarkomycin²⁸⁾、Showdomycin²⁹⁾、Naphthomycin³⁰⁾ などがあげられる。これらの化合物の構造を Fig. 2 に示す。

新しい抗腫瘍抗生物質は1970年頃を境に一時下火になっていた感があったが、近年ユニークなタイプの化合物が相次いで報告されてきた³¹⁾。

Spergualin³²⁾ は、微生物化学研究所のグループにより発見された化合物で、誘導された15-deoxyspergualin がより強い抗腫瘍活性を示した³³⁾。この化合物は、免疫抑制作用も同時に有することから、臓器移植後の拒絶反応を抑える薬剤としても注目されている。

Leptomycin³⁴⁾、Kazusamycin³⁵⁾ は、それぞれ東京大学、北里研究所のグループにより見いだされた新規化合物で、マウス移植の各種白血病、固型癌に対し活性が認められている。類縁の化合物として、Anguinomycin A、B³⁶⁾、Leptolstatin³⁷⁾ などが見つかっている。

Rhizoxin は、東京大学などのグループにより稲立枯れ病の病原菌 Rhizopus chinensis により生産される毒素として発見された³⁸⁾。本化合物は、Vinca アルカロイドに類似した抗腫瘍活性を有することが判明したが、Vincristine-Adriamycin 耐性腫瘍に有効性が確認されている。

Elsamicin A³⁹⁾ は、ブリストル・マイヤーズにより見いだされた新規化合物で、既知の抗腫瘍抗生物質 Chartreusin の糖アナログで物性、活性、体内動態において Chartreusin の欠点とされていた性状が改善されており、臨床研究が進められている。

FR-900,482 は、藤沢薬品により Streptomyces sandaensis No.6897 の培養物より発見された化合物で、マウスの in vivo の試験でマウス白血病、固型腫瘍のみではなく、ヌードマウス移植の各種人癌に対しても良好な活性を示すことが示された^{40, 41)}。

Rebeccamycin は、ブリストル・マイヤーズにより発見された Saccharothrix

sp. C-38,383 により生産される Indolocarbazole 系の抗生物質で、黄色の結晶性化合物である⁴²⁾。Rebeccamycin は、各種の実験腫瘍の増殖を抑制し、8~250 mg/kg/day の投与により、担癌動物で有意な延命効果が認められた。その作用は DNA 合成阻害で RNA や蛋白質には影響を与えない。関連化合物としては、4'-Deschlororebeccamycin⁴³⁾、AT-2433⁴⁴⁾ が報告されている。Indolocarbazole 系の抗生物質としては、北里研究所より報告された Staurosporine⁴⁵⁾ が知られているが、この化合物は、抗腫瘍活性が弱く、構造中の imido と amido の違いによる可能性がある³¹⁾。

Esperamicin は、ブリストル・マイヤーズのグループによって *Actinomadura verrucosospora* sp. より単離された抗腫瘍抗生物質で非常に強い抗腫瘍活性を示す化合物で⁴⁶⁾、*in vitro* で各種腫瘍細胞の増殖を 1~3pg/ml の濃度で阻害し、マウス白血病 P388、B16メラノーマ、Lewis 肺癌 (LL) などの実験腫瘍系に著しい抗腫瘍効果を示した。Esperamicin A₁ は現在臨床研究が進められている。類縁の化合物は、藤沢薬品、パーク・デービス、レダリーなどのグループからもほぼ同時期に単離が報告されている。これらの化合物の DNA 切断作用は、ラジカルの生産に起因するとした報告がなされている⁴⁶⁾。すなわち、トリスルファイドの一部が開裂し、硫黄がブリッジヘッドの α, β -不飽和ケトンにマイケル付加することにより、ふたつのアセチレン結合の両端の炭素が接近し、ベンゼン環へ閉環する。このときラジカルが発生し DNA 鎖が切断される。同様な 1,5-diyne-3-ene 構造をもつ化合物としては Dynemicin A が最近報告されている⁴⁷⁾。

これらの化合物の構造を Fig. 3 に示す。

Fig. 2. 臨床で使用されていない抗腫瘍抗生物質

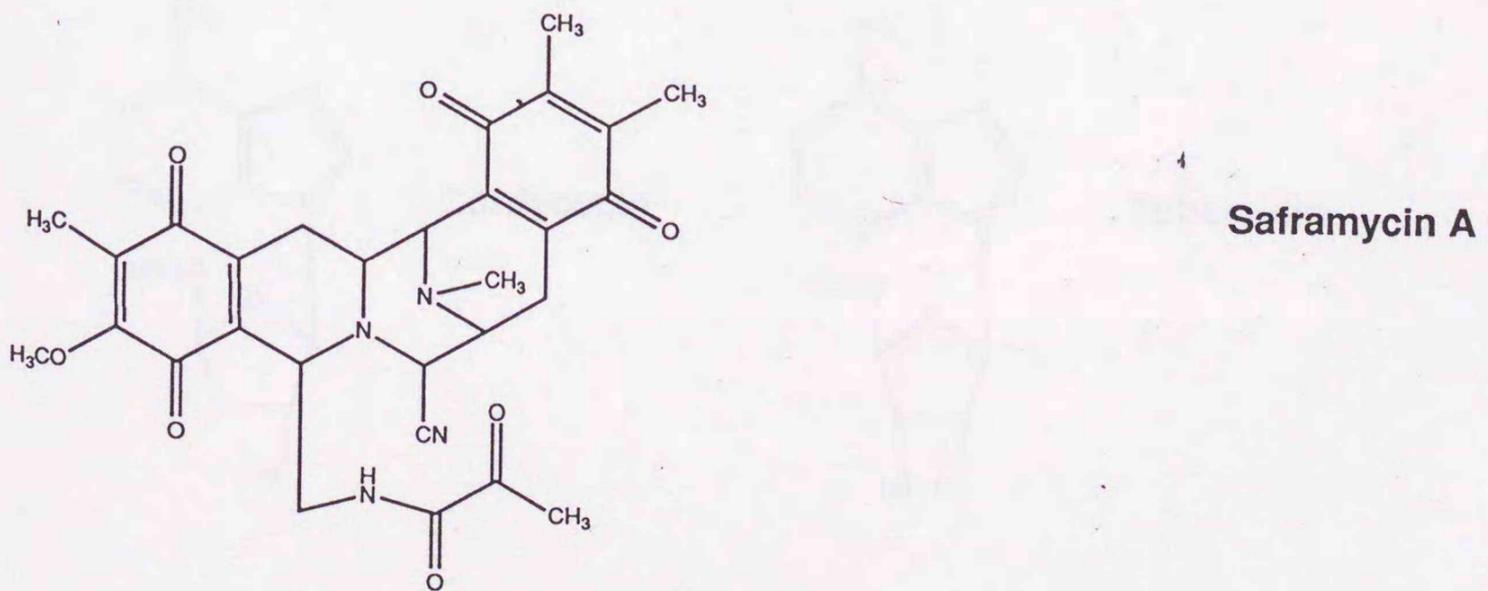
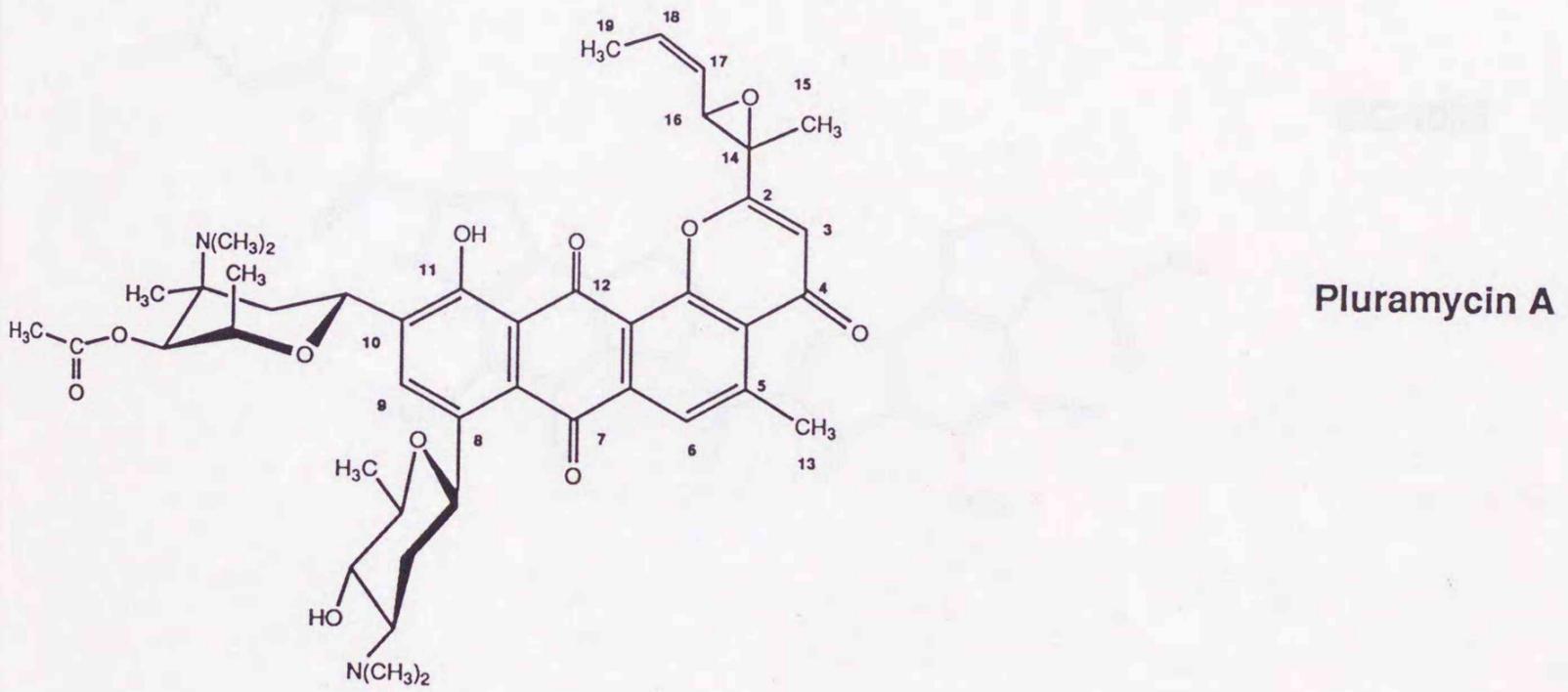
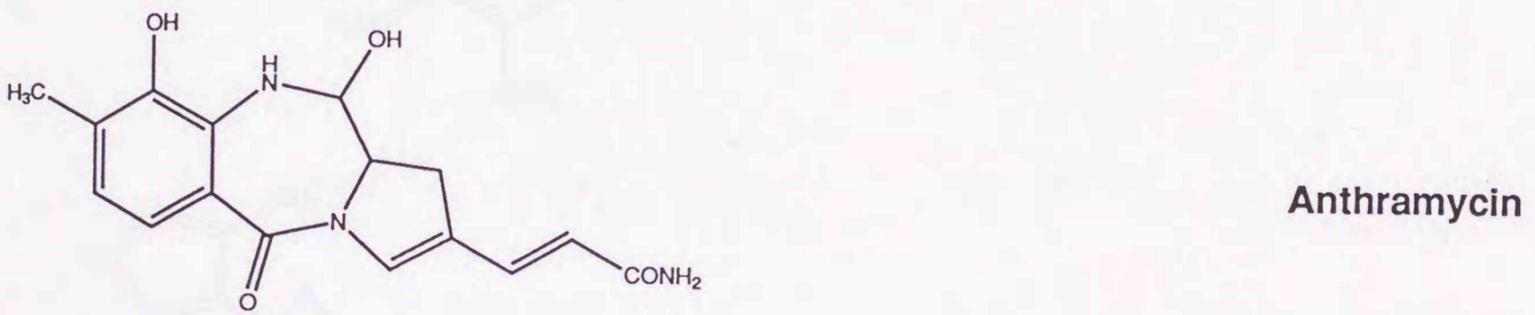
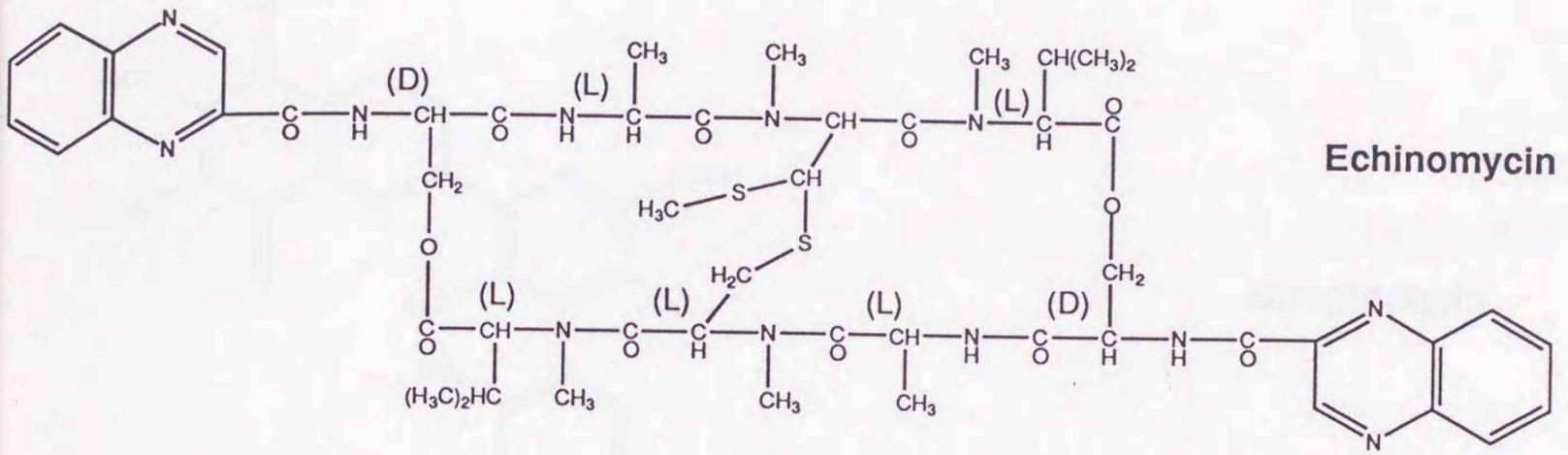
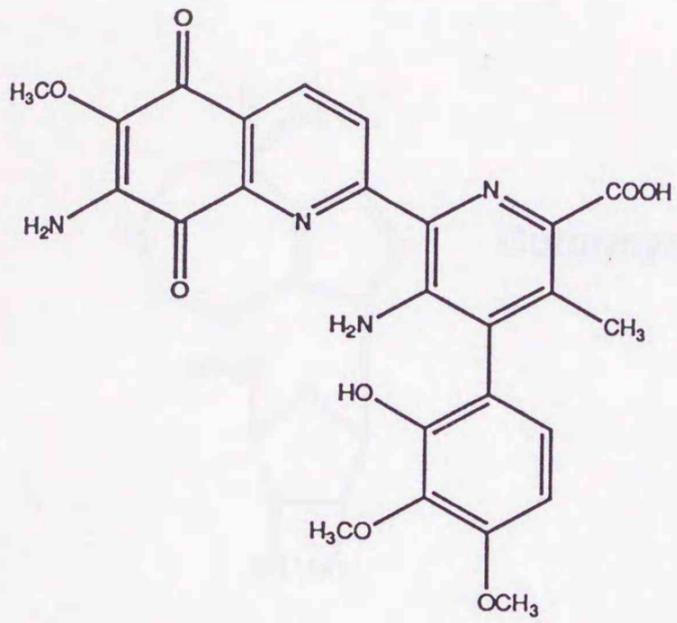
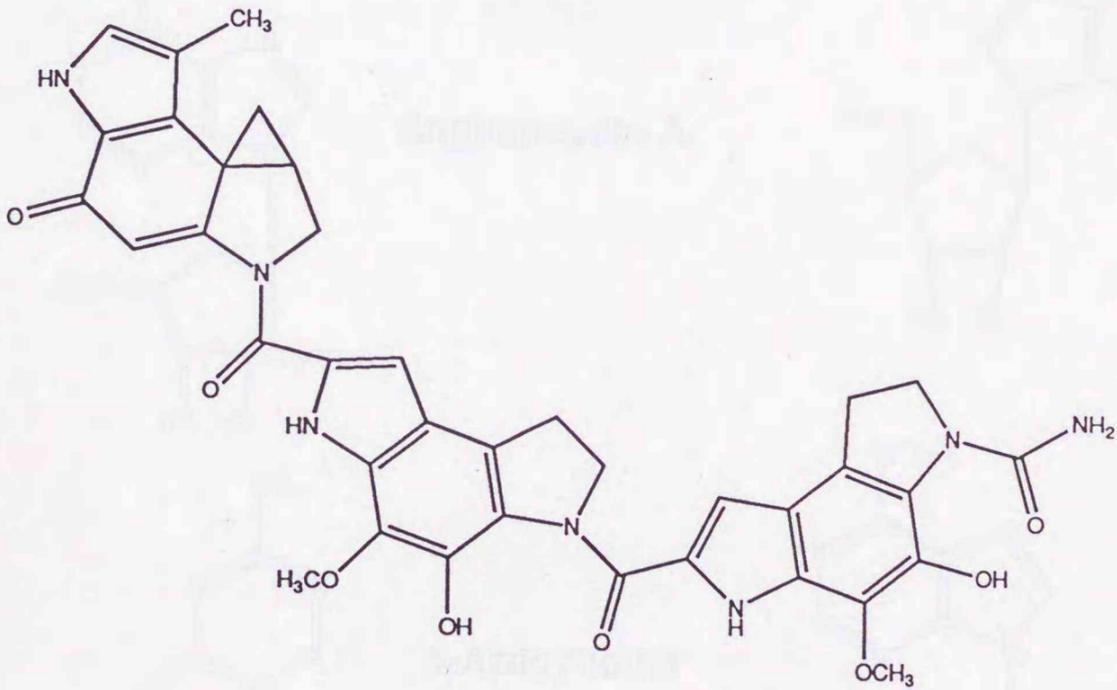


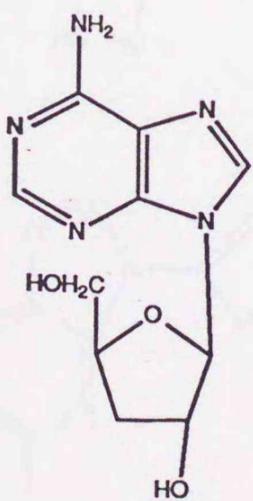
Fig. 2. (続き)



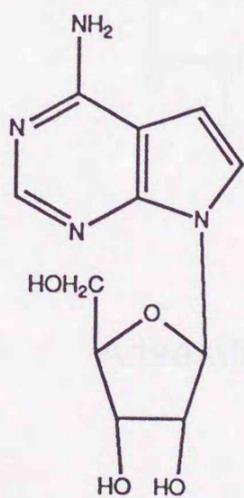
Streptonigrin



CC-1065

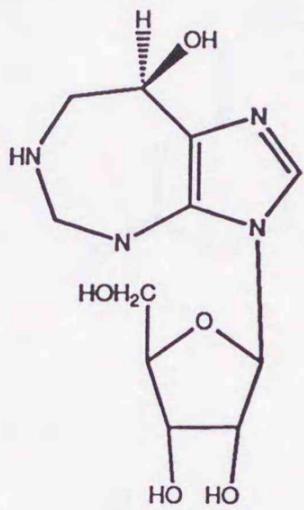


Cordycepin

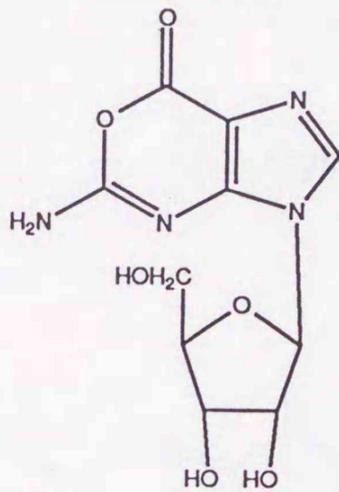


Tubercidin

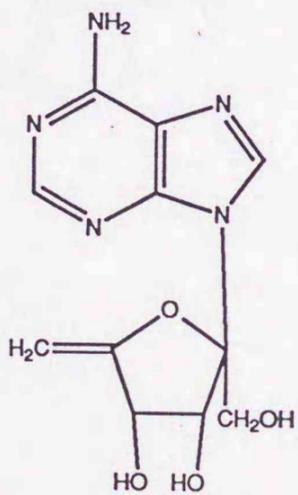
Fig. 2. (続き)



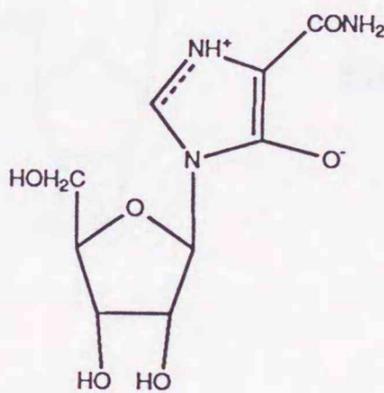
Coformycin



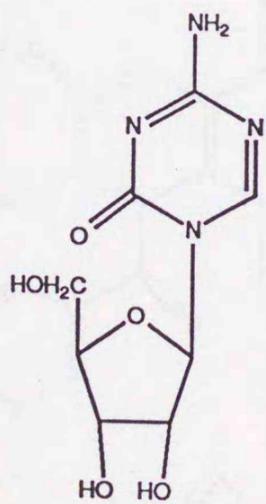
Oxanosine



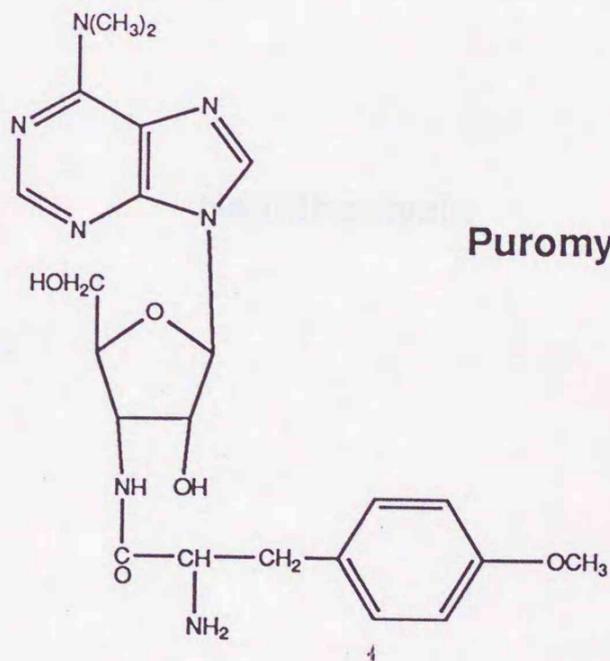
Angustmycin A



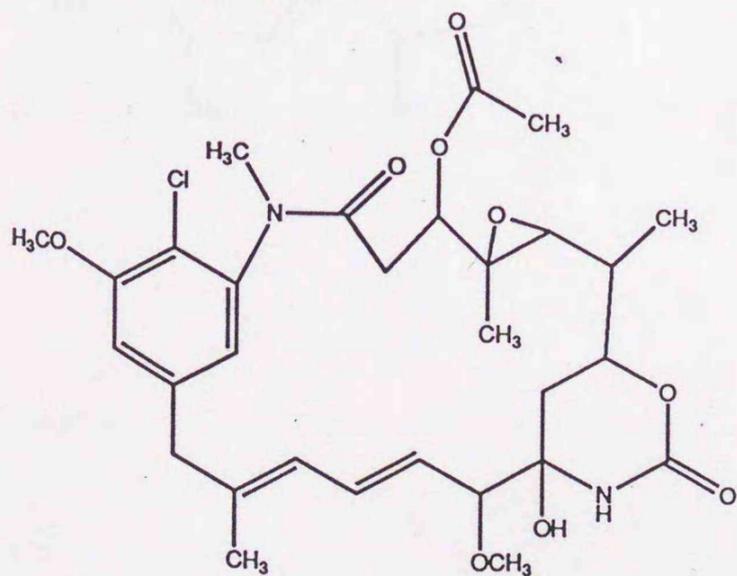
Bredinine



5-Azacytidine

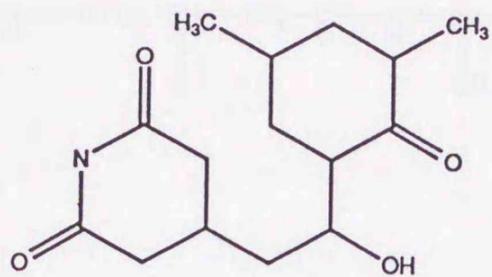


Puromycin

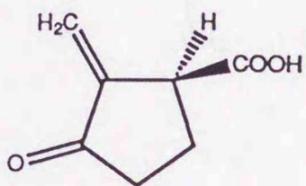


Ansamitocin P-1

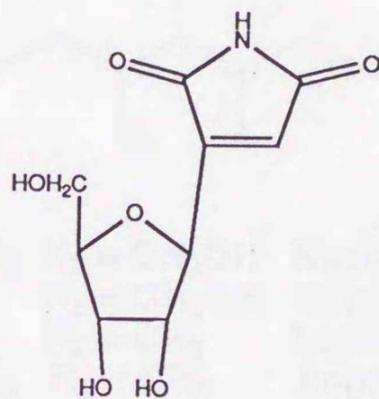
Fig. 2. (続き)



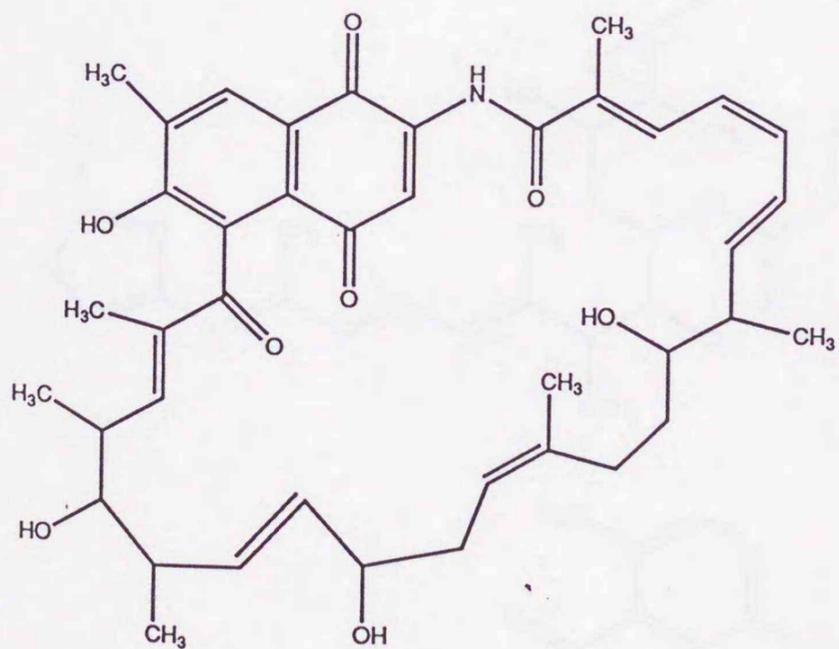
Cycloheximide



Sarkomycin

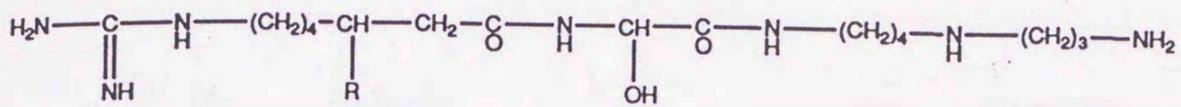


Showdomycin

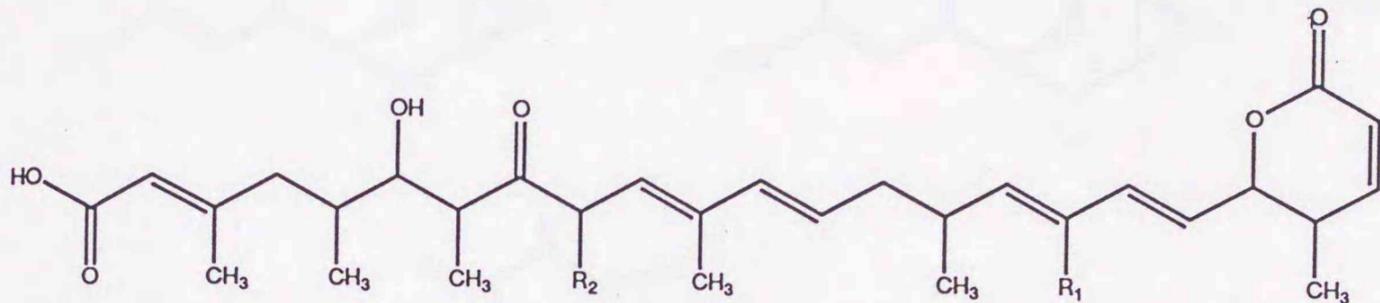


Naphthomycin

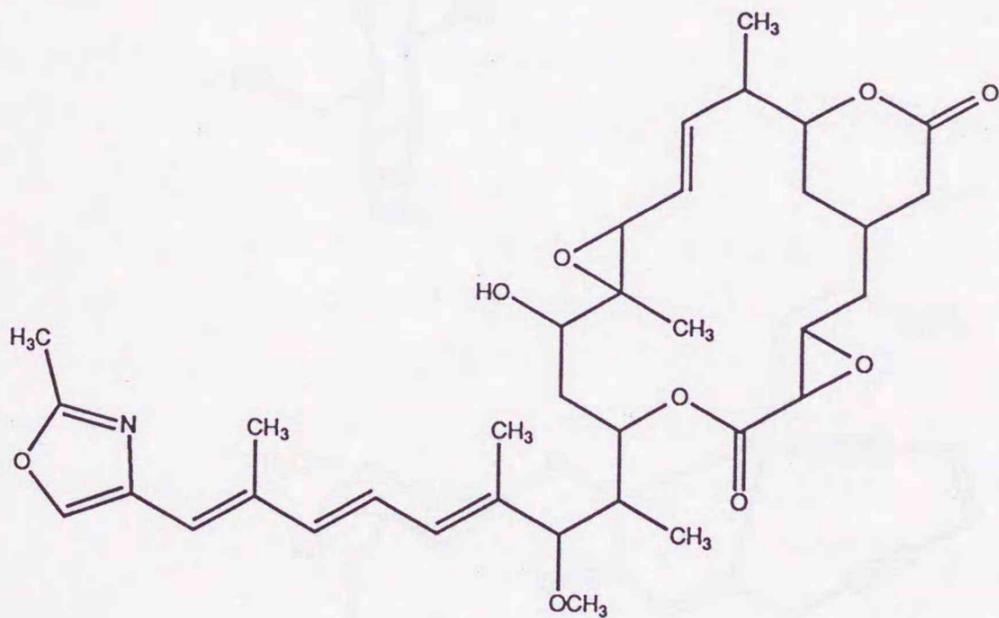
Fig. 3. 近年発見された抗腫瘍抗生物質



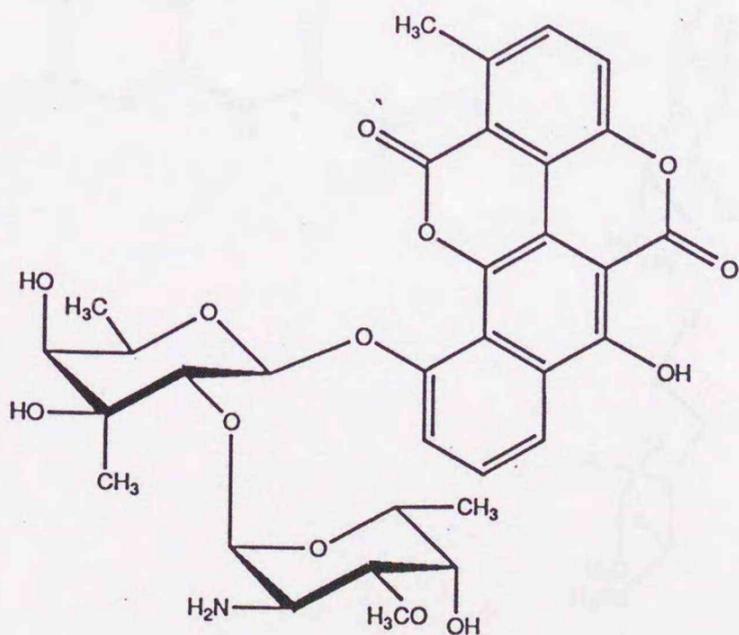
R = OH Spergualin
R = H 15-deoxyspergualin



R₁ = CH₂CH₃ R₂ = CH₂OH Kazusamycin A
R₁ = CH₃ R₂ = CH₂OH Kazusamycin B
R₁ = CH₃ R₂ = CH₃ Leptomycin A
R₁ = CH₂CH₃ R₂ = CH₃ Leptomycin B

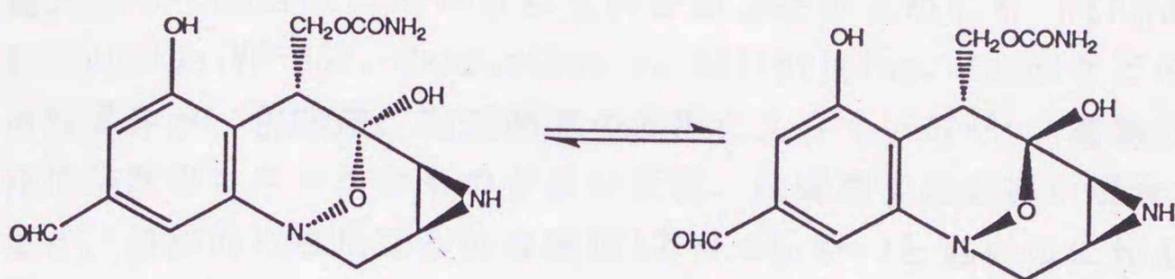


Rhizoxin

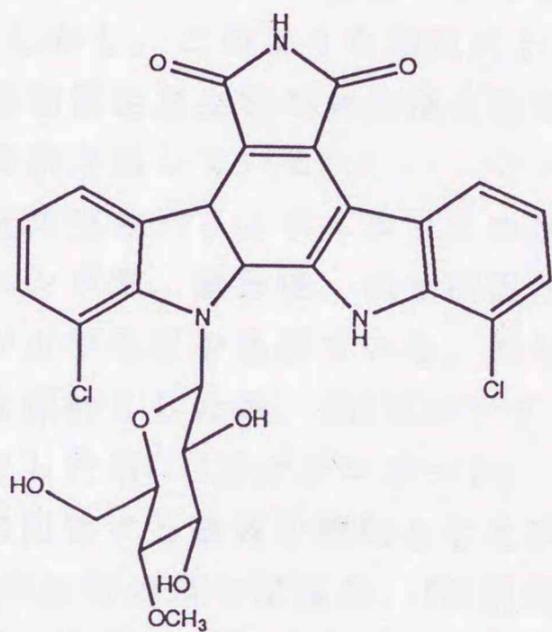


Elsamicin A

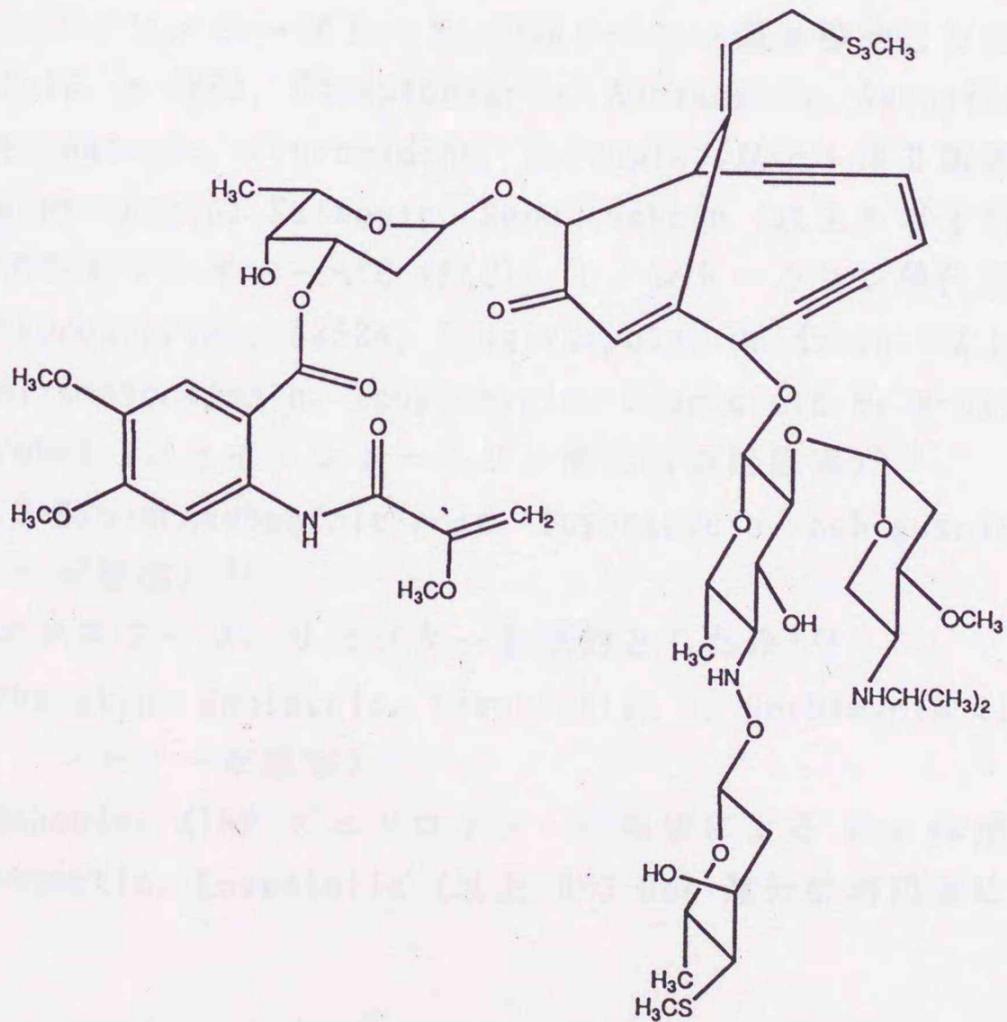
Fig. 3. (続き)



FR-900,482



Rebeccamycin



Esperamicin A₁

先に述べたように、天然物由来の抗腫瘍物質としては微生物由来の抗生物質に加え、植物由来の化合物として Vinblastine、Vincristine が実際の臨床で制癌剤として癌治療に用いられているが、そのほかにも Etoposido (VP-16)、Teniposide (VM-26)、Camptothecin、Ellipticine、Taxol などの化合物あるいはその誘導体が、前臨床、臨床開発の段階に入っている⁴⁸⁾。植物の場合、その構造や作用機序のユニークなものが多い反面、抗腫瘍活性が弱い場合や毒性が強い場合など、最終的に有用なものは検体1万分の0.5~1と低いのに加え、群生地域が限られており数量にも限りがあることから、深刻な環境破壊に至った例もある。近年においては、海洋生物にその起源をおく抗腫瘍物質で、有用な化合物も発見されている⁴⁹⁾。しかし、このような物質においては、海洋生物の共生の特殊性により、本来の抗腫瘍物質生産生物が共生微生物であるなどの可能性を有し、再現性において不安な要素を残している。

一方、最近の癌のバイオサイエンスの進展に伴う新しい作用機作をねらいとしたスクリーニングや、固形癌、抗癌剤耐性、癌の転移などに的を絞ったスクリーニングなどが近年注目をあびている。例えば、(1)トポイソメラーゼ I, II、DNAリペアー系を標的とした系、(2)プロテインキナーゼC、イノシトールリン酸代謝回路を標的とした系、(3)オンコジーン、リセプターを標的とした系、(4)細胞周期を特異的に阻害する物質を標的とした系、(5)固形癌を標的とした疾病指向系、(6)腫瘍部位の血管の新生阻害系、(7)抗癌剤耐性機構を標的とした系などである。これらの系により効果が示された合成化合物を含む主な化合物をまとめると、

(1)トポイソメラーゼ I, II、DNAリペアー系を標的とした系⁵⁰⁾

VP-16, m-AMSA, Streptonigrin, Adriamycin, Amonafide, Saitopin, S116, Terpentecin, Clerocidine, Saitopin (以上トポ II 阻害),

Camptothecin, Saitopin, Rebeccamycin (以上トポ I 阻害)

(2)プロテインキナーゼC (PKC)、イノシトールリン酸代謝回路を標的とした系
Staurosporine, K252a, Sangivamycin, Daidzein (以上 PKC 阻害)⁵¹⁾

Psi-tectorigenin, Inostamycin, Piericidin B₁ N-oxide, Pendolmycin, Orobol (以上イノシトールリン酸代謝回路阻害)⁵²⁾

2,3-Dihydroxybenzoic acid, Toyocamycin, Echiguanine A, B (以上 PI-4 キナーゼ阻害)⁵²⁾

(3)オンコジーン、リセプターを標的とした系⁵²⁾

Erbstatin, Genistein, Lavendustin A, Herbimycin (以上 EGF レセプターチロシンキナーゼ阻害)

Oxanosine (IMP デヒドロゲナーゼ阻害による Ras 作用の阻害)

Compactin, Lovastatin (以上 HMG-CoA 還元酵素阻害による Ras 作用の阻害)

(4)細胞周期を特異的に阻害する物質を標的とした系⁵³⁾

Trichostatin A, C, Kazusamycins, Leptomycins (以上 G₁、G₂ 期阻害)

(5)固形癌を標的とした疾病指向系⁵⁴⁾

特に無し

(6)腫瘍部位の血管の新生阻害系

TNP-470, Eponemycin

(7)抗癌剤耐性機構を標的とした系⁵⁵⁾

Lactoquinomycin, Resorathiomycin (以上多剤耐性細胞に有効)

Verapamil, Dipyridamole, Cepharanthine, AHC-52, Nifedipine, Niludipine
(以上 P 糖タンパクを標的)

SDB-etylenediamine (抗癌剤の効果増強)

E-64, Leupeptin (以上 Bleomycin 耐性に有効)

Cadeguomycin (Ara-C 耐性に有効)

このように、精製・単離技術の進んだ現在においても、天然には未知の骨格を有する抗腫瘍性物質が依然として多数残されており、この中には臨床において現存する化合物よりも有用な活性・構造を持つ化合物が必ずや存在すると思われる。

現在、我国における新制癌剤の開発においては治療効果と安全性の面で従来の制癌剤よりも優れた薬剤を開発する必要があり、その方向性として、1)従来の制癌剤の構造を化学的に修飾することによる類似体(アナログ)の開発、2)新規な構造ないし作用機序を有する薬剤の開発の両面より検討されている⁵⁶⁾。このような状況において、従来より最も検討されている分野ではあるものの、スクリーニングによる微生物由来の抗生物質の検討は、微生物による発酵生産物が環境要因に影響されることにより、生産物質の変化、生産量の変化、微量成分による最良のアナログの生産などの可能性を十分に残していると思われる。また、過去の探索研究の成果が示すように発酵生産物の多用性は非常に広く、さらには、ほぼ時期を同じくして非常に活性の強い新規骨格を持つ化合物が、世界中で複数のグループにより発見されることがときたまあることなど、世界的な規模でのプラスミドの交換の可能性、従来のスクリーニングとは異なった特異な探索方法を開発することにより従来より、眠っていた化合物を発見できる可能性など、有用物質の探索源としての魅力はまだまだ尽きてはいないことを示している。

本研究は、これまでに述べてきた経緯のもと、臨床において有効な制癌剤の開発を目的とし、微生物の発酵代謝産物をその探索源に、NCI 等で行われている各種人癌細胞を用いた細胞障害活性を指標としたスクリーニング系⁵⁴⁾を細胞の数を

8種に絞った系により有用物質の探索を実施するなか、特に、既知の強力な抗腫瘍物質を生産する菌における微量な活性成分に着目し、より活性が強く、抗腫瘍スペクトルの広い、さらには癌細胞に対し特異性の強い化合物の検討を行った。この研究を実施するにあたり、背景としては、

- 1) 抗腫瘍スペクトルは ADM、DNR や Vinblastine、Vincristine に見られるように構造上はほんの僅かの違いで大きく異なることが知られている。
- 2) 抗腫瘍活性を持つ物質の多くは抗菌活性も同時に有しており、あまりに強力なアナログは生産量が抑えられている可能性がある。
- 3) 突然変異、あるいは培地組成の変化により、微量成分の生産量が増えた株が見いだされる可能性がある。
- 4) 近年、心毒性の軽減した Anthracycline 系の化合物が相次いで報告されているように、抗腫瘍活性が同等あるいは多少劣っていても、癌細胞に対する特異性、安全性の面で優れたアナログ化合物が見つかる可能性がある。
- 5) 付随的な成果ではあるが、生合成前駆体などの学問的に興味を引く化合物を得る可能性がある。
- 6) 新しい分離精製技術及び装置の開発により、微量成分の単離が可能となり、さらに機器分析装置等の改良等で、それら微量成分の構造解析が可能となった。などが挙げられる。

以上のような可能性をもとに、鋭意、ヒト腫瘍細胞を含む各種腫瘍細胞を用いたスクリーニングにより、微生物の生産する微量成分新規抗腫瘍性化合物の検討を行った。

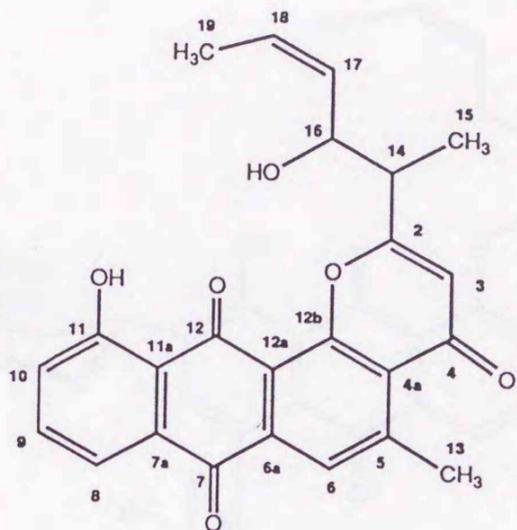
第一部で述べるように、*Streptomyces* sp. HP530 株からは、Pluramycin 系新規化合物 Saptomycin A、B、C₁、C₂、D、E、F、G 及び H の9種化合物を単離構造決定した (Fig. 4)。さらに、Saptomycin D、E、G 及び H が自然変異によって生じた変異株により生産されることを示し、Saptomycin D、E より Deacetyl 誘導体を調製し、アミノ糖部分のコンフォメーションが Acetyl 基の有無によって変化することを明らかにした。さらに *in vitro* の細胞障害性試験、抗菌試験、*in vivo* での抗腫瘍試験によって、構造と活性の相関について検討を行った。この結果、*in vitro* では Deacetylsaptomycin E が最も強い活性を示したものの、毒性も強く、*in vivo* においては Saptomycin D がマウス繊維肉腫 Meth A に対し最も強い延命効果を示した。そこで、炭素数の違う Acyl 基を導入した Saptomycin D の誘導体を調製し、細胞障害活性並びに Meth A に対する抗腫瘍活性試験を行ったところ、いくつかの化合物に強い細胞障害活性並びに延命効果が認められた。Saptomycin D 及びその誘導体について、ヌードマウスに移植したヒト腫

瘍細胞、MKN45(Gastric carcinoma)、WiDr (Colorectal carcinoma) に対する腫瘍の増殖抑制活性を検討したが、抑制傾向は示したものの、有意差は認められなかった。現在、Saptomycin D は米国国立癌研究所(National Cancer Institute, NCI)において、ヌードマウスに移植した各種ヒト腫瘍細胞に対する *in vivo* で活性試験が進行中である⁵⁷⁻⁶⁰⁾。

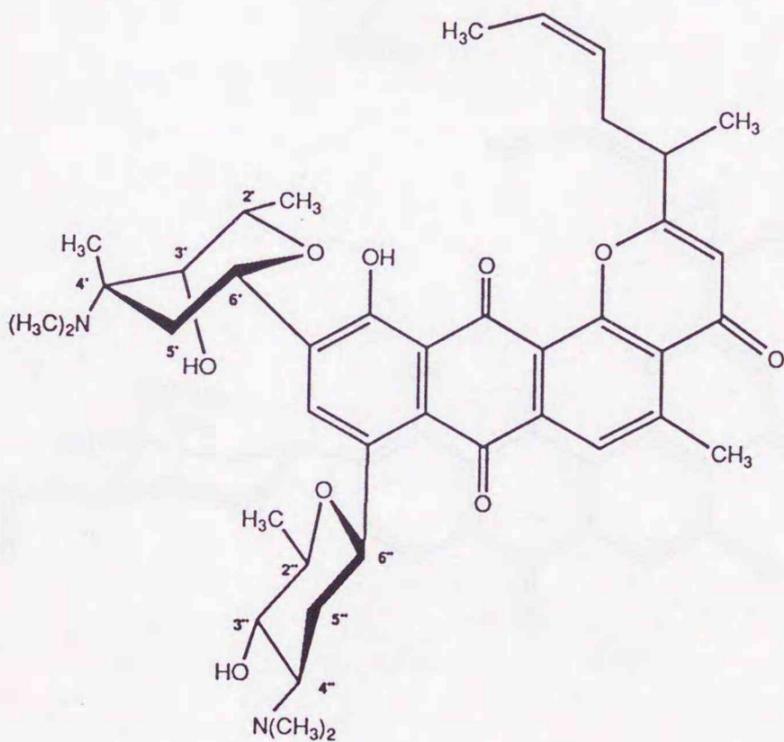
第二部においては、抗腫瘍抗生物質 Lavendamycin を生産する菌株である放線菌 *Streptomyces* sp. G324 株が β -carboline 骨格を持つ新規アルカロイドである Oxopropaline A、B、D、E 及び G の5種化合物を生産することを見だし、その単離構造決定、並びに細胞障害活性について述べる(Fig. 5)。これらの化合物は、各種腫瘍細胞に対し細胞障害活性を示す。活性は、Lavendamycin に比べ弱いものであったが、これらの化合物は、Lavendamycin と構造的に共通の部分構造を有しており、生合成的に興味ある構造を持つ。また、 β -carboline 骨格を持つ化合物には、種々の薬理活性が知られていることから他の生理活性を持つ可能性も期待できる^{61, 62)}。

以上の結果は、先に述べた抗腫瘍抗生物質を生産する菌株が、新規な高活性化合物を生産している可能性を証明し、さらに、関連化合物が同時に生産されているもので未だに知られていない化合物の存在を示した。このような探索をさらに継続することにより、目的とする臨床的に有効な抗腫瘍抗生物質を必ずや得ることが可能であると考えられる。

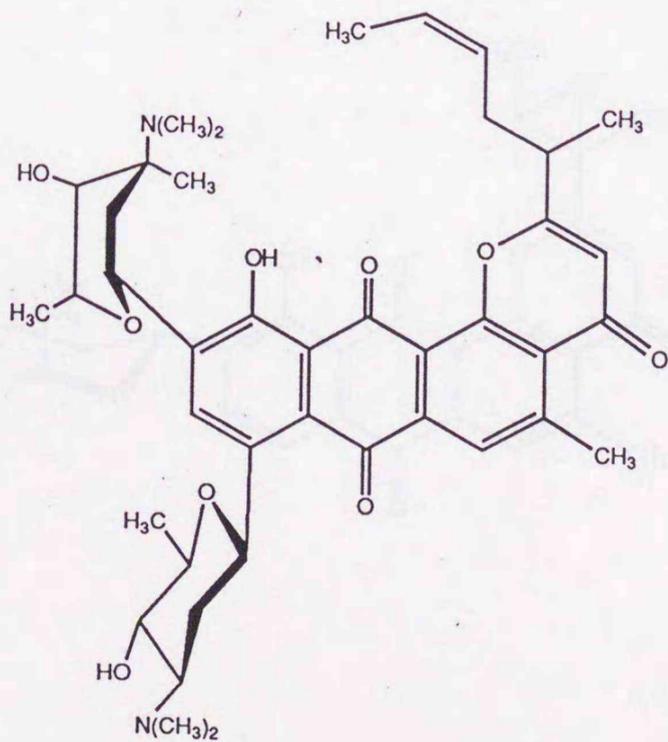
Fig.4. Saptomycin A, B, C₁, C₂, D, E, F, G 及び H



Saptomycin A

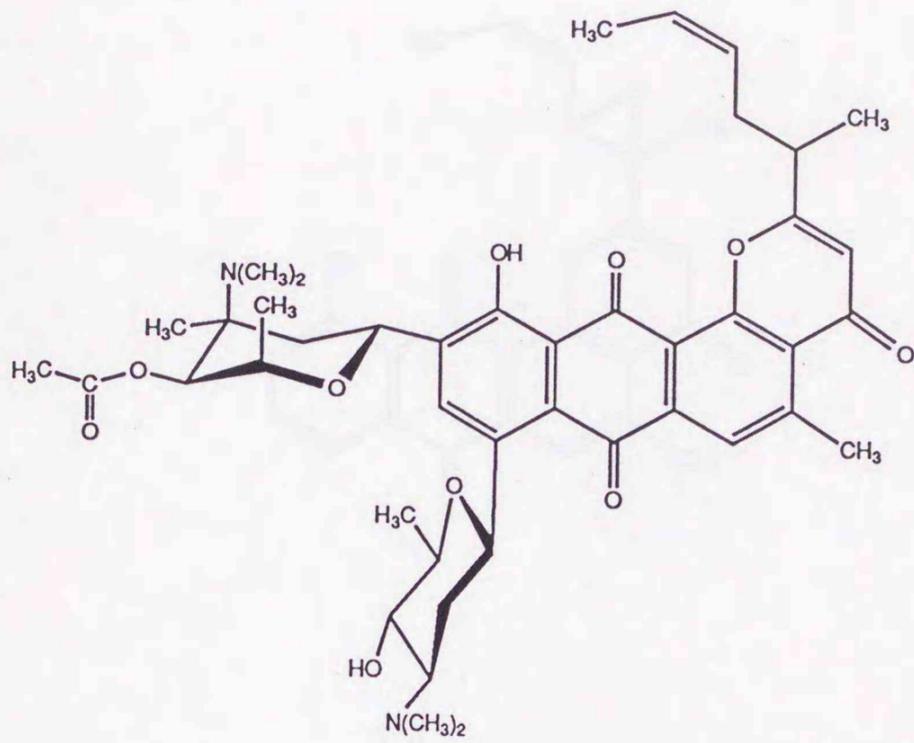


Saptomycin B

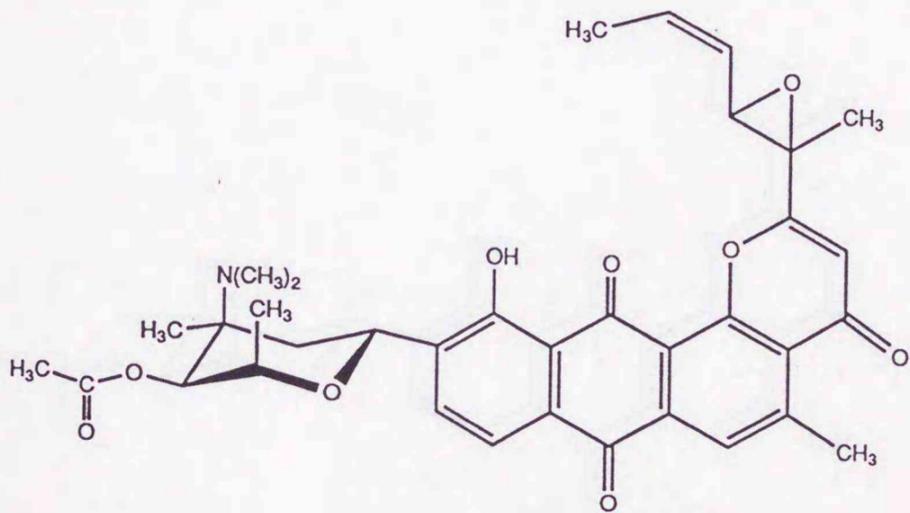


Saptomycin C₁

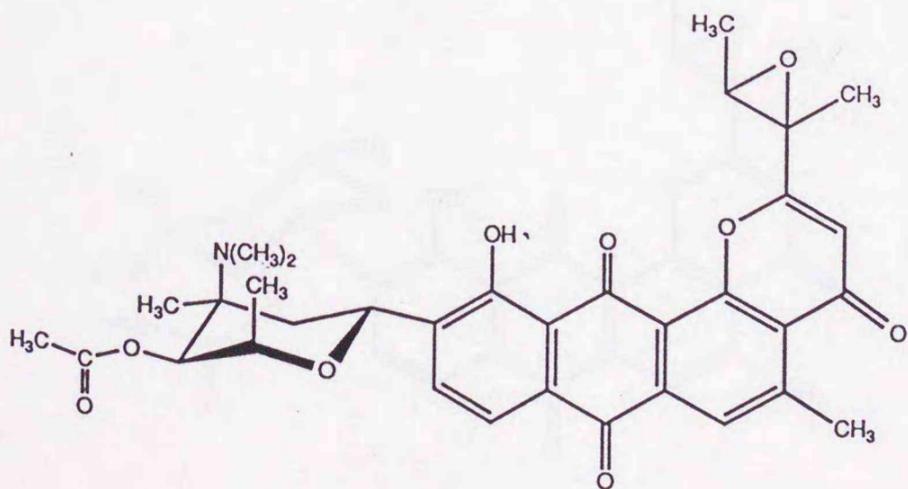
Fig.4. (続き)



Saptomycin C₂

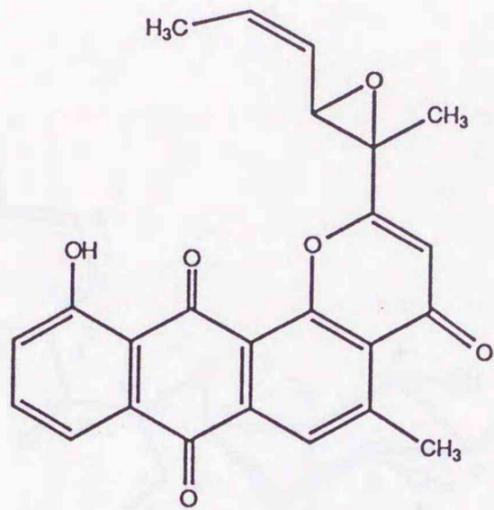


Saptomycin D

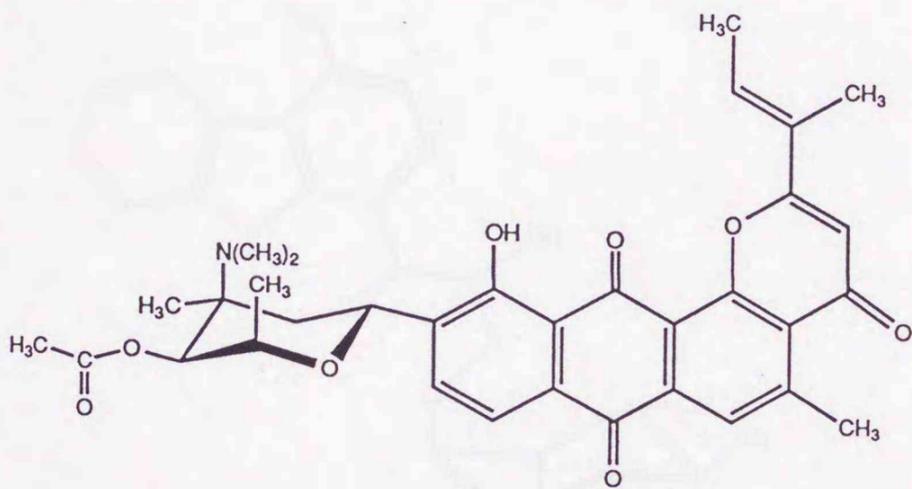


Saptomycin E

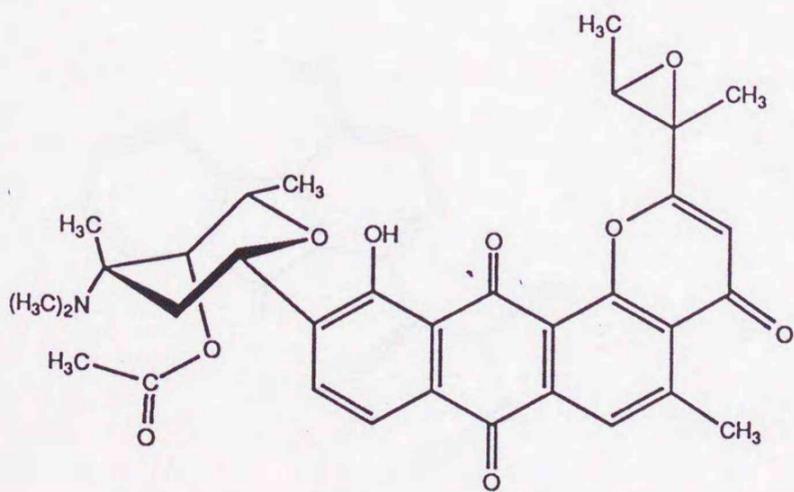
Fig.4. (続き)



Saptomycin F

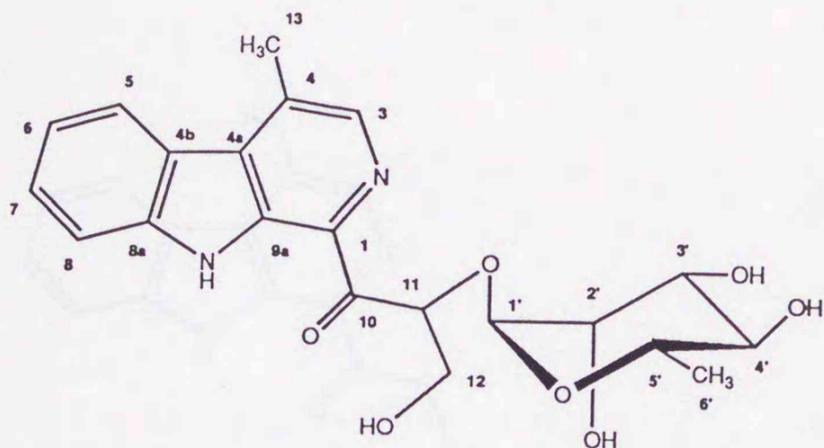


Saptomycin G

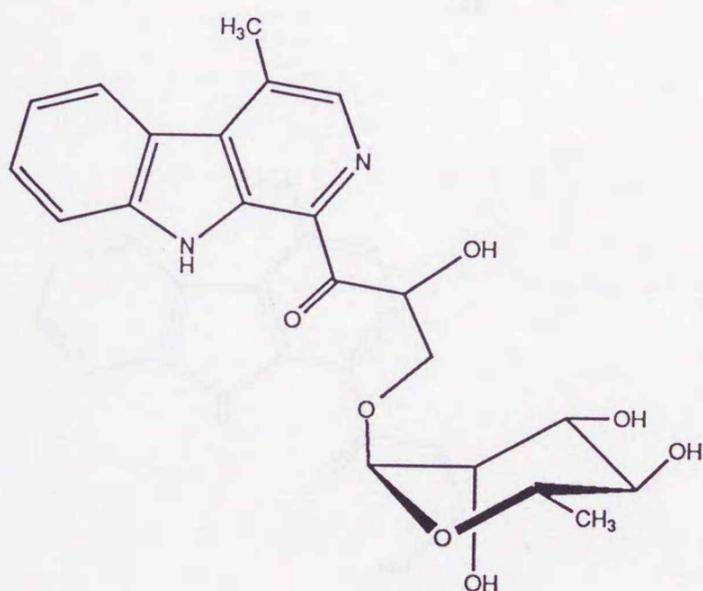


Saptomycin H

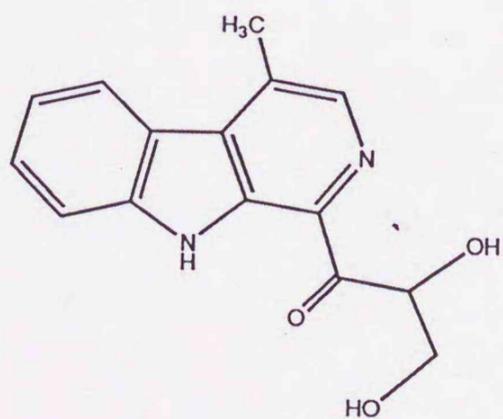
Fig.5. Oxopropaline A, B, D, E 及び G



Oxopropaline A

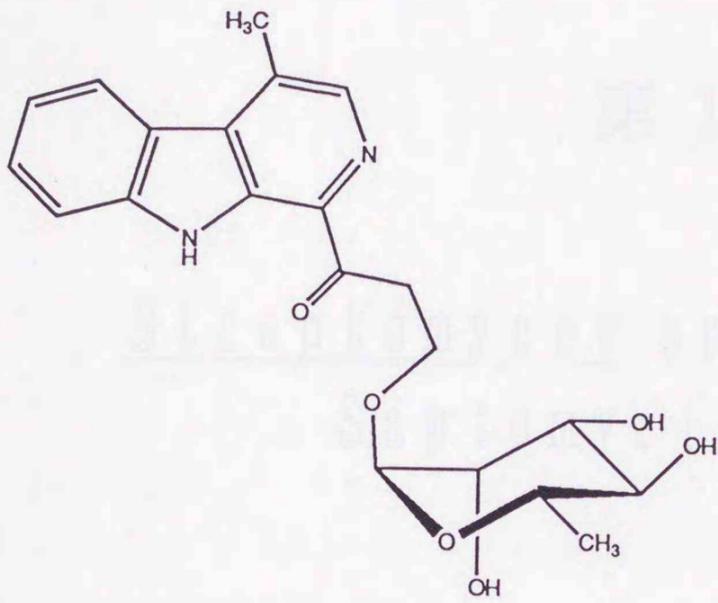


Oxopropaline B

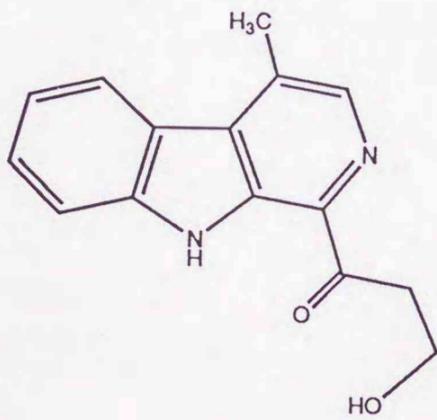


Oxopropaline D

Fig.5. (続き)



Oxopropaline E



Oxopropaline G

第 1 部

Streptomyces sp. HP530 株の生産する Saptomycin 類に関する研究

第1章 本論

各種腫瘍細胞を用いた微生物からの新規抗腫瘍化合物探索の過程において、千葉県市川市の土壌より分離した、一放線菌が、抗腫瘍抗生物質 Pluramycin 類似の抗腫瘍活性を持つ新規化合物 Saptomycin 類を生産することを見いだした。さらに研究を進めたところ、*Streptomyces* sp. HP530 と命名した本菌株が、自然変異による突然変異をしばしば起こし、その中の一変異株が、親株においては極微量にしか生産されていないと思われる成分を、主生産物として生産していることを HPLC を用いた分析により見いだした。その結果、親株の菌体からは、既知の化合物である β -Indomycinone と共に、新規化合物 Saptomycin A、B、C₁、C₂、及び F の5種新規化合物を単離・構造決定し、一方、変異株からは、現在までに Ankinomycin が知られているだけの、アミノ糖を1つだけ持つ Pluramycin 群化合物である Saptomycin D、E、G 及び H の4種新規化合物を単離・構造決定した。さらに、最も抗腫瘍活性の強い Saptomycin D より Deacetyl 誘導体及び数種の Acyl 化誘導体を調製し、立体構造の検討並びに抗腫瘍活性についての構造と活性の相関について検討を行った。

第1節 生産菌の分類

Saptomycin 類を生産する HP530 株は、以下のような菌学的性質を有する。

(1) 形態的特徴

栄養菌糸は各種培地上でよく発達し、分断は起こさない。分枝した栄養菌糸から形成される気菌糸はイエロー系あるいはホワイト系の色調を呈し10~50個以上の胞子の連鎖が認められ、直線状から曲線状をしている。胞子表面は平滑でその大きさは $0.6 \times 1 \sim 1.2 \mu\text{m}$ で円柱状である。菌核、胞子のう、遊走子は見出されない。

(2) 各種培地における性状

各種培地上における培養性状を Table 1-1 に示す。色調として () 内に示す番号は、ISCC-NBS Color-Name chart に記載のものを用い、28℃ 2週間目の各培地における観察の結果である。

(3) 生理的性状

HP530 株の生理的性状を Table 1-2 及び 1-3 に示す。

(4) 細胞壁組織

全菌体中のジアミノピメリン酸を分析した結果、LL型であった。

以上、HP530 株の菌学的性状を要約すると、LL-ジアミノピメリン酸を有し、気菌系の形態は直線状または曲線状で、胞子の表面は平滑である。気菌系の色調はイエロー系を呈し、栄養菌系はイエロー系またはパープル系の色調を呈する。可溶性色素は、ペプトン・酵母エキス寒天培地でブラウンからオレンジ系の色素を生産する。

これらの諸性質から HP530 株は、*Streptomyces* 属に属する菌株と考えられ、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版及び ISP 報告 International Journal of Systematic Bacteriology 第18巻、69頁、279頁（1968年）、同19巻、391頁（1969年）、同22巻、265頁（1972年）より検索した結果、*Streptomyces fluorescens*、*Streptomyces puniceus* が近縁種として挙げられる。しかし、*Streptomyces fluorescens* は基底菌系の色調において本菌株とは異なり、*Streptomyces puniceus* は L-arabinose を利用せず、ブルーの可溶性色素を生産する点で異なる。したがって、本菌株は *Streptomyces* 属に属する新菌株と考えられ、*Streptomyces* sp. HP530 として、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第2786号（FERM BP-2786）として寄託されている。

Table 1-1. HP530 株の培養性状.

| Medium | Growth | Aerial mycelium | Reverse | Soluble pigment |
|---|----------|--|--------------------------------|----------------------|
| Yeast extract-malt extract agar (ISP-2) | Good | Abundant Pale yellow (89) | Deep orange yellow (69) | None |
| Oatmeal agar (ISP-3) | Good | Abundant Yellowish white (92) | Deep grayish yellow (91) | None |
| Inorganic salt-starch agar (ISP-4) | Good | Abundant Yellowish white (92) | Strong yellow (84) | None |
| Glycerin-asparagine agar (ISP-5) | Moderate | Abundant Yellowish white (92) | Vivid deep redish purple (243) | None |
| Peptone-yeast extract agar (ISP-6) | Good | Abundant Pale orange yellow (73) | None | Brownish orange (54) |
| Tyrosine agar (ISP-7) | Moderate | Abundant Yellowish white (92) | Vivid deep redish purple (243) | None |
| Peptone-nitrate agar (ISP-8) | Moderate | Abundant Yellowish white (92) | Vivid deep purplish red (257) | None |
| Nutrient agar | Good | Abundant Yellowish white (92) | Deep brown (56) | None |
| Czapek's agar | Moderate | Moderate Pale greenish yellow (104) | Vivid deep purplish red (257) | None |

The color index in the parenthesis () is in accordance with ISCC-NBS Color-Name Chart and represents the result of observation on the second week at 28°C on each medium.

Table 1-2. HP530 株の生理的性状.

| | |
|---|---------------|
| Growth temperature range (ISP2 or yeast extract - malt extract agar, incubation for 14 days) | 15 - 37 °C |
| Growth pH range (ISP2 or yeast extract - malt extract agar, incubation for 14 days) | pH 5.5 - 11.4 |
| Gelatin liquefaction | positive |
| Hydrolysis of starch | positive |
| Coagulation of skim milk | positive |
| Peptonization of skim milk | positive |
| Reduction of nitrate | positive |
| Decomposition of cellulose | negative |

Table 1-3. HP530 株の炭素源の資化性.

| |
|---|
| Positive utilization: L-arabinose, D-xylose, L-rhamnose, D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-mannitol, salicin |
| Negative utilization: sucrose, raffinose, inositol |

第2節 生産菌の培養

Saptomycin 類を生産する *Streptomyces* sp. HP530 株は、親株、変異株とも pH7.0に調整した glucose、oatmeal、Pharma media、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ 、 $CaCO_3$ より成る培地100mlを張り込んだ500ml容三角フラスコで30℃、4日間振とう培養により1次種培養を行い、さらに500mlの同培地を張り込んだ3L容三角フラスコで同じく30℃、4日間振とう培養によって2次種培養を行った。この2次種培養液を15Lの同培地を張り込んだ30Lジャーファメンターによって、それぞれ親株は96時間、変異株は72時間の通気攪拌培養による本培養を行った。Saptomycin 類の生産量は HPLC 分析によりモニターした。Fig. 1-1 及び Fig. 1-2 に経時的な生産量の変化を示した。

Fig.1-1. Saptomycin 類の生産量の経時変化 (親株).

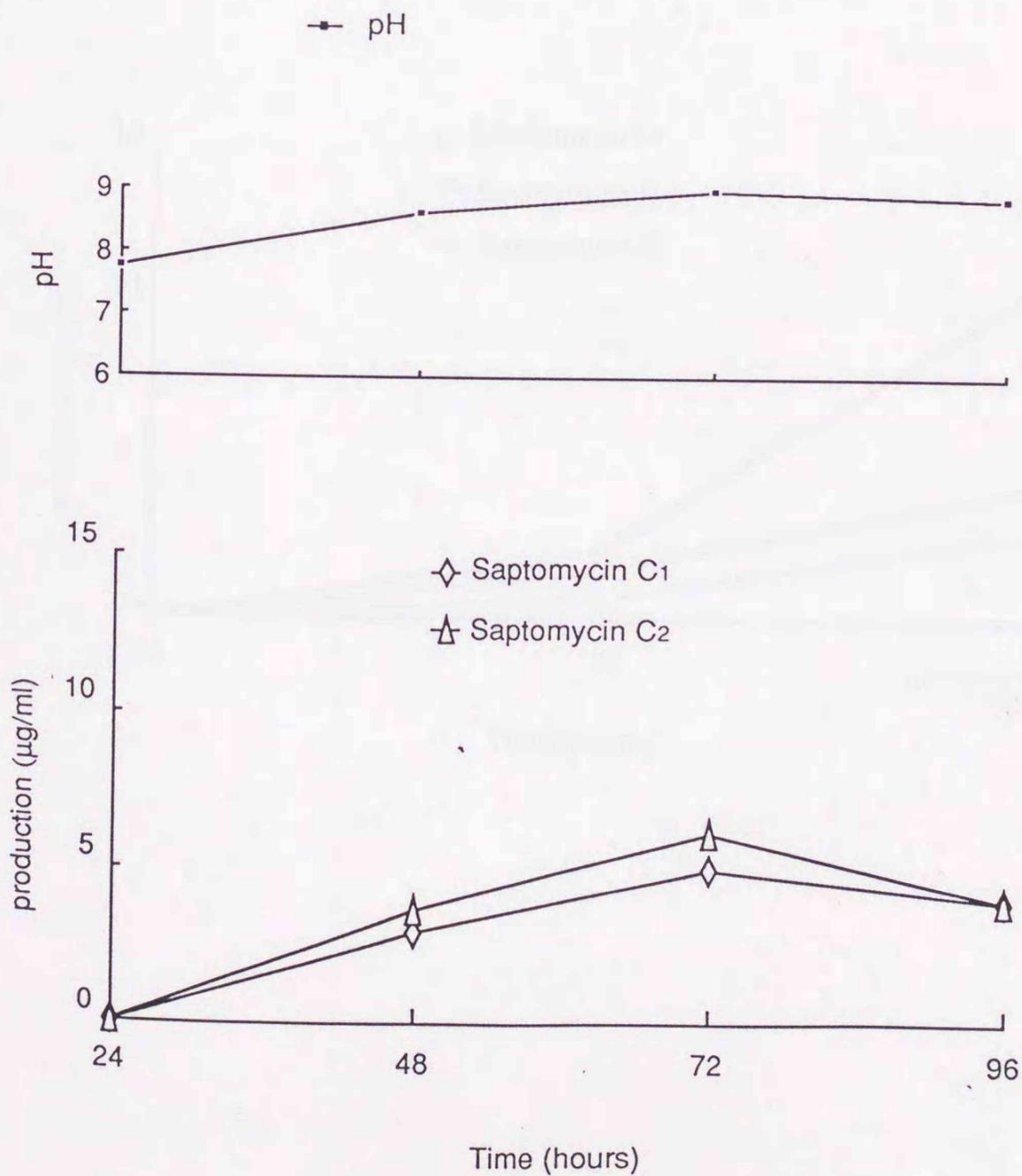
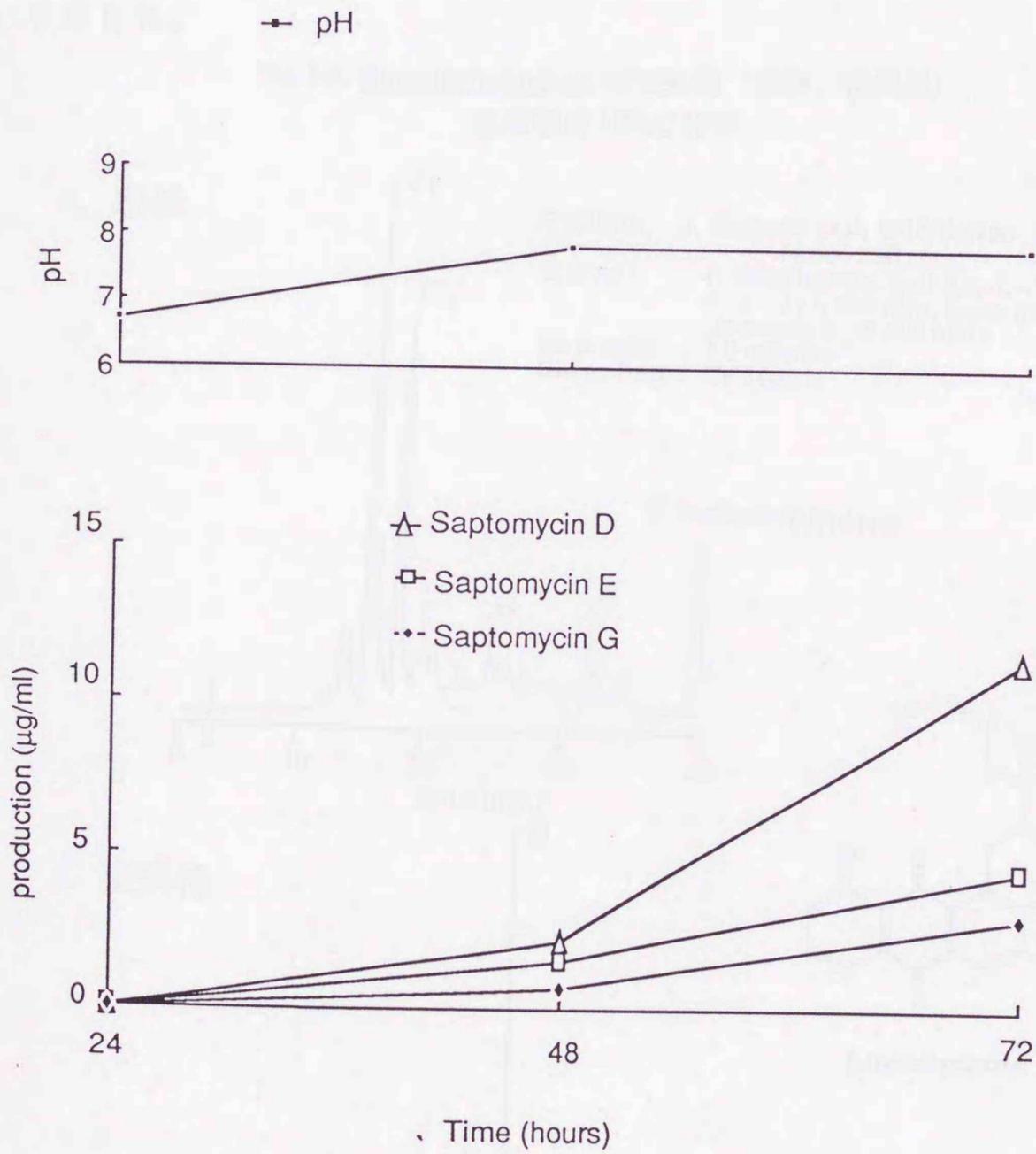


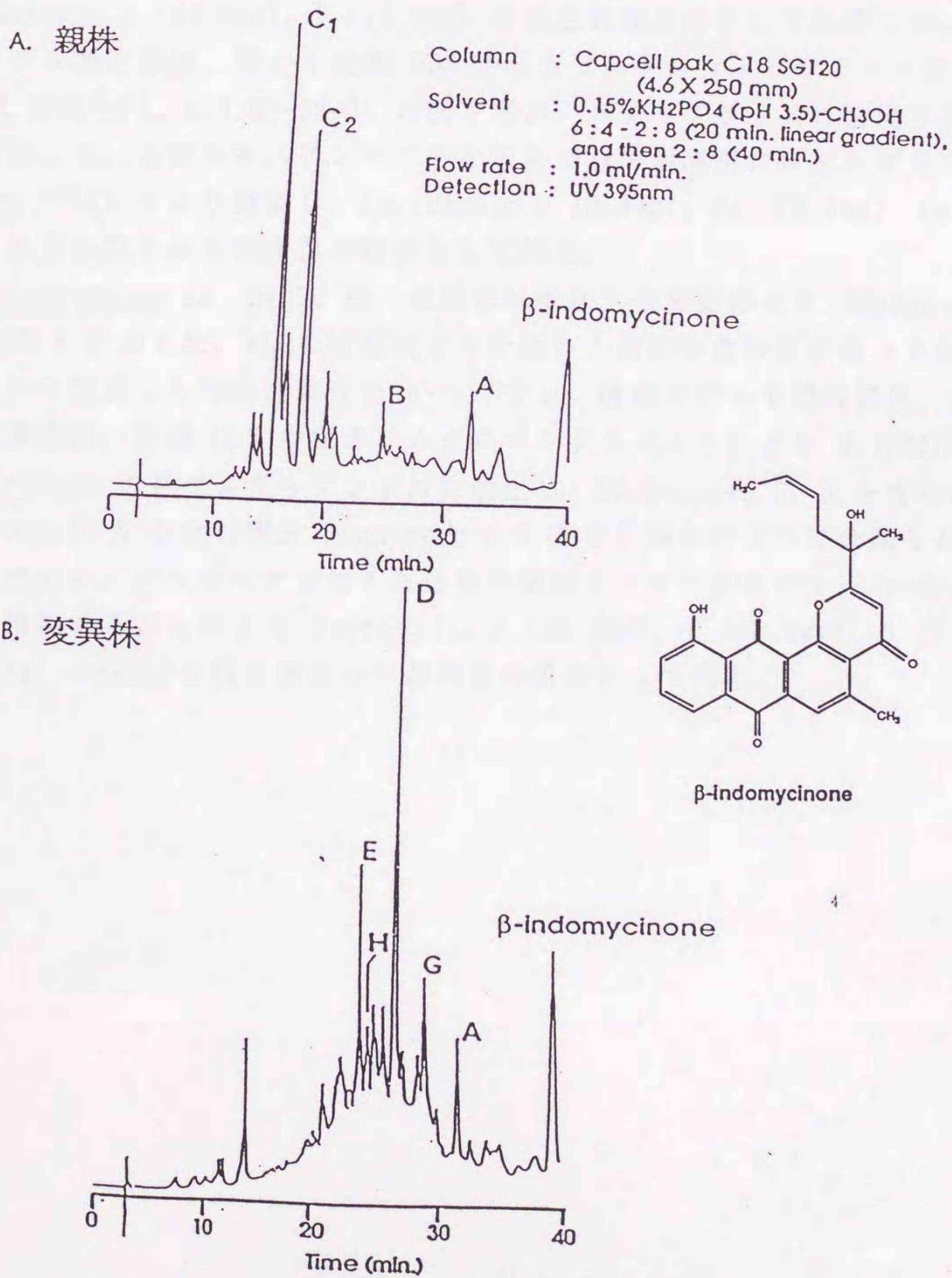
Fig.1-2. Saptomycin 類の生産量の経時変化 (変異株).



第3節 HPLC分析

Saptomycin 類の生産についての分析を、395nmでのUV吸収を指標に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いておこなった。HP530 株の親株、変異株のそれぞれにおいて培養後の生産物を検討した結果を Fig. 1-3 に示す。結果として親株は、Saptomycin A、B、C₁、C₂、F 及び β -Indomycinone を生産し、一方変異株は、Saptomycin A、D、E、F、G、H 及び β -Indomycinone を生産していることが認められた。得られた HPLC のチャートは親株と変異株とで大きなパターンの違いを示した。

Fig. 1-3. *Streptomyces* sp. HP530 株 (親株、変異株)
生産物の HPLC 分析



Saptomycin F was eluted at 50 minutes in both analyses, thus the peak of this compound did not appear on these charts.

第4節 Saptomycin 類の精製・単離

第2節に述べた方法により培養して得られた *Streptomyces* sp. HP530 株の親株、変異株、それぞれ30L、45Lの培養液からの Saptomycin 類の精製・単離例について、手順の概略を Fig. 1-4 に示す。

Saptomycin A、B、C₁、C₂ 及び F はその脂溶性である性質より *Streptomyces* sp. HP530 株・親株の主として培養菌体より得られた。30Lの培養液より分離して得た菌体を含む固形物を、80%アセトンで抽出し、濃縮後、アセトンを除いた水溶液を得た。さらに、この水溶液を *n*-ヘキサン、酢酸エチルで順次抽出し、濃縮後、3.1gのヘキサン抽出部と1.8gの酢酸エチル抽出部を得た。ヘキサン抽出部を逆相 ODS 中圧カラムクロマトグラフィーにより CH₃CN-H₂O の系で分画することにより、Saptomycin A (24.0mg)、F (11.0mg) を黄色針状結晶として単離した。一方、酢酸エチル抽出部は、同じく逆相 ODS 中圧カラムクロマトグラフィーにより、今度は 0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)-CH₃OH の系を用い、ステップワイズに溶出することにより分画した。各画分を、アンモニアを加えた分取用薄相クロマトグラフィー (prep.-TLC) により精製し、Saptomycin B (3.4mg)、C₁ (15.7mg)、C₂ (10.6mg) をそれぞれ黄色から黄赤色の粉末として得た。

Streptomyces sp. HP530 株・変異株はやはり培養菌体より Saptomycin D、E、G 及び H を与えた。45Lの培養液より分離した菌体を含む固形物より80%アセトンを用いて抽出した脂溶性画分を *n*-ヘキサン、酢酸エチルで順次抽出、酢酸エチル相を濃縮後、逆相 ODS 中圧カラムクロマトグラフィーにより 0.15%KH₂PO₄ (pH 3.5)-CH₃OH の系でステップワイズに溶出し、Saptomycin E、H を含む画分、Saptomycin D を含む画分、Saptomycin G を含む画分の3つに分画した。それぞれの画分を、アンモニアを加えた分取用薄相クロマトグラフィー (prep.-TLC) により精製することにより Saptomycin D (36.1mg)、E (22.6mg)、G (2.1mg)、H (3.5mg) の4種化合物を黄色から黄赤色の粉末として得た。

Fig. 1-4. Saptomycins A, B, C1, C2, D, E, F, G 及び H の精製・単離.

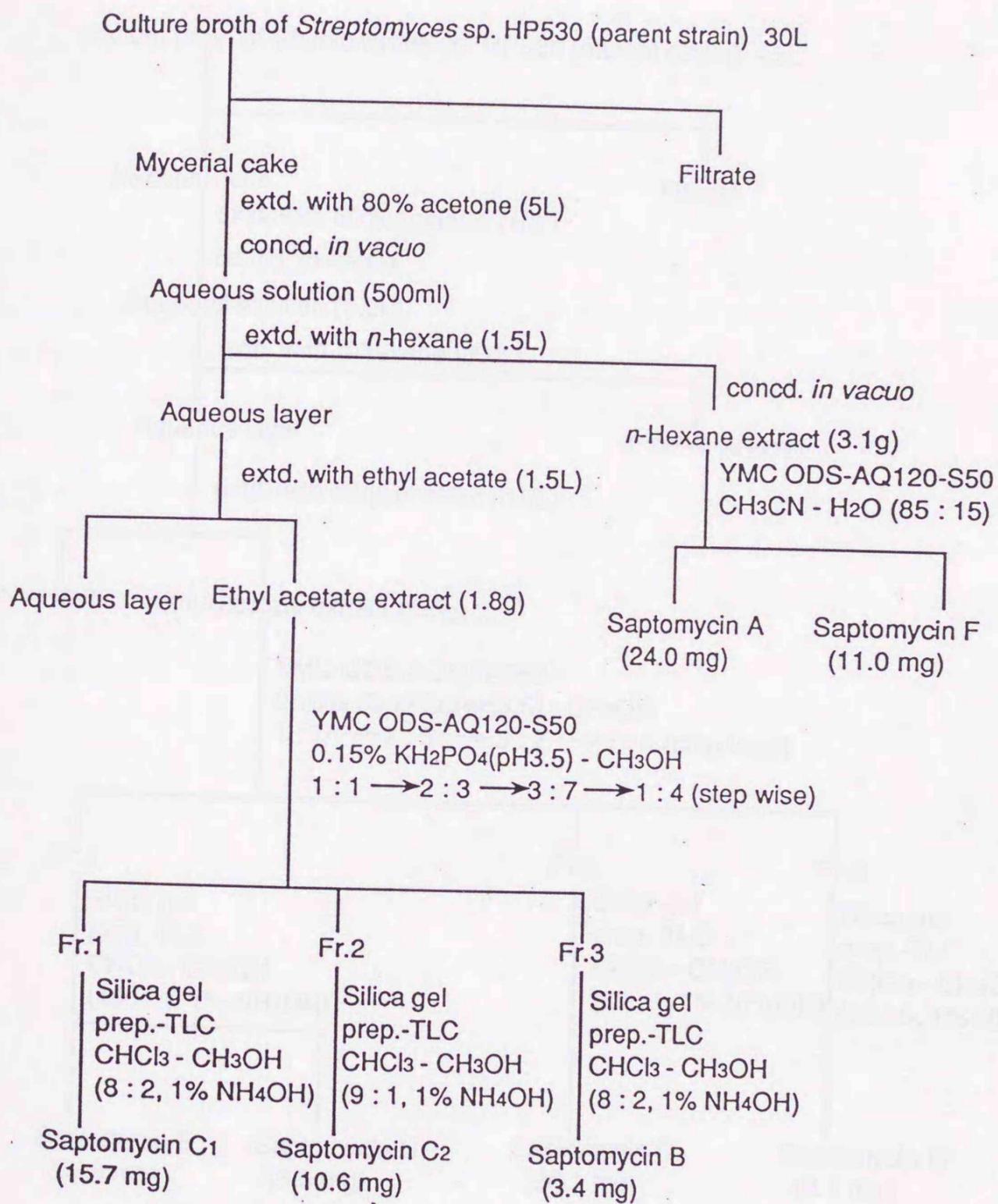
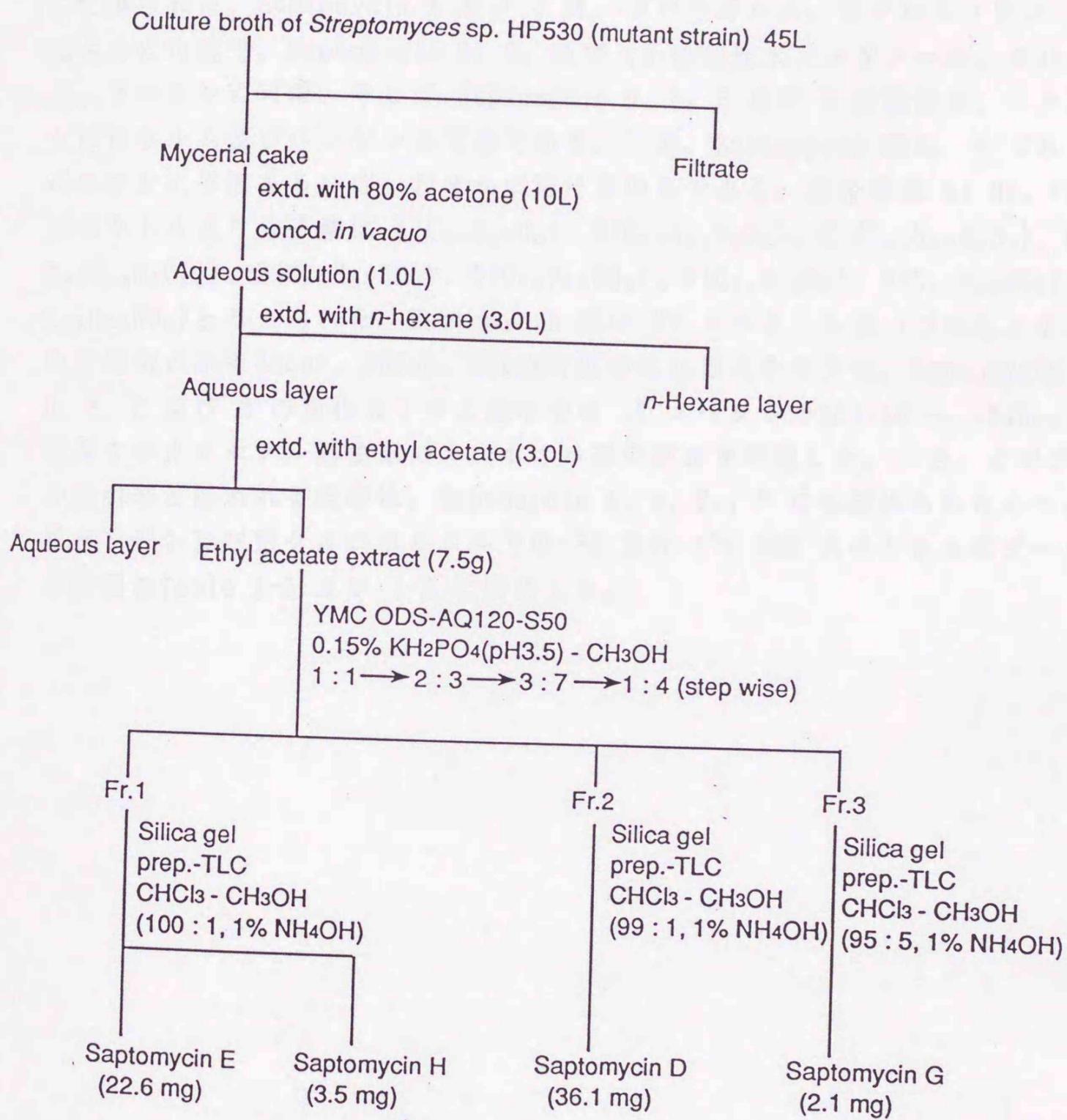


Fig. 1-4. (続き)



第5節 Saptomycin 類の物理化学的性質

Saptomycin A、B、C₁、C₂、D、E、F、G 及び H の物理化学的性質を Table 1-4 に要約する。Saptomycin 類は黄色針状結晶、黄色粉末、または、黄赤色粉末として得られた。Saptomycin A 及び F は、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチルに可溶で、Saptomycin B、C₁ 及び C₂ は酸性水、メタノール、クロロホルム、アセトンに可溶、そして Saptomycin D、E、G 及び H は酸性水、メタノール、クロロホルム及びベンゼンに可溶である。一方、Saptomycin 類は、いずれも *n*-ヘキサンに不溶あるいは、わずかに溶けるのみである。高分解能 EI-MS、FAB-MS スペクトルより分子量は A(C₂₄H₂₀O₆)、B(C₄₁H₅₂N₂O₉)、C₁(C₄₁H₅₂N₂O₉)、C₂(C₄₃H₅₄N₂O₁₀)、D(C₃₅H₃₇NO₉)、E(C₃₃H₃₅NO₉)、F(C₂₄H₁₈O₆)、G(C₃₃H₃₅NO₈)、H(C₃₃H₃₅NO₉)と与えられた。Saptomycin 類の UV スペクトルはいずれもメタノール中で特徴のある 245nm、265nm、415nm 付近の吸収極大を与えた。Saptomycin C₂、D、E、G 及び H の臭化カリウム錠中での IR スペクトルは 1740 ~ 1745cm⁻¹ に吸収帯を与えアセチル基由来のカルボニル基の存在を示唆した。一方、このアセチル基由来と思われる吸収は、Saptomycin A、B、C₁、F には認められなかった。重ベンゼン及び重クロロホルム中での ¹H 及び ¹³C NMR スペクトルのデータ並びに帰属を Table 1-5 及び 1-6 に要約した。

Table 1-4. Saptomycins A, B, C₁, C₂, D, E, F, G及び Hの物理化学的性質.

| | A | B | C ₁ | C ₂ | D |
|--|--|---|---|--|---|
| Appearance | yellow needles | yellowish red powder | yellowish red powder | yellow powder | yellowish red powder |
| $[\alpha]_D^{20}$ (c0.1, CHCl ₃) | -12.5° | +106.0° | +196.0° | +202.7° | +152.0° |
| Molecular formula | C ₂₄ H ₂₀ O ₆ | C ₄₁ H ₅₂ N ₂ O ₉ | C ₄₁ H ₅₂ N ₂ O ₉ | C ₄₃ H ₅₄ N ₂ O ₁₀ | C ₃₅ H ₃₇ NO ₉ |
| HRFAB-MS (m/z) (M+H) ^a | | | | | |
| Calcd: | 404.1260 (M) ^a | 717.3751 | 717.3751 | 759.3857 | 616.2546 |
| Found: | 404.1219 | 717.3747 | 717.3743 | 759.3818 | 616.2556 |
| UV λ_{max} nm (ϵ) | 244(35,600) 270(21,800) 418(8,600) | 247(53,800) 268(41,200) 427(13,700) | 245(52,000) 265(sh 38,400) 425(11,500) | 243(44,400) 264(sh 26,400) 426(8,900) | 246(51,600) 265(sh 29,000) 418(9,800) |
| IR (KBr) cm ⁻¹ | 3480, 1670 1600 | 3460, 1670 1650, 1600 | 3430, 1665 1590 | 3480, 1740, 1660 1635, 1590 | 3470, 1745 1642, 1590 |

a) HREI-MS, M⁺

Table 1-4. (続き).

| | E | F | G | H |
|--|---|--|---|---|
| Appearance | yellow powder | yellow needles | yellow powder | yellow powder |
| $[\alpha]_D^{20}$ (c0.1, CHCl ₃) | +147.0° | +106.9° | +118.0° | -105.0° |
| Molecular formula | C ₃₃ H ₃₅ NO ₉ | C ₂₄ H ₁₉ O ₆ | C ₃₃ H ₃₅ NO ₈ | C ₃₃ H ₃₅ NO ₉ |
| HRFAB-MS (m/z) (M+H) ^a | | | | |
| Calcd: | 590.2390 | 402.1103 (M) ^a | 574.2441 | 590.2390 |
| Found: | 590.2398 | 402.1133 | 574.2362 | 590.2412 |
| UV λ_{max} nm (ϵ) | 244(47,200) 265(sh 28,000) 425(10,800) | 244(49,000) 270(30,600) 415(11,900) | 242(46,800) 270(29,800) 415(9,600) | 245(40,100) 263(sh 26,400) 415(9,200) |
| IR (KBr) cm ⁻¹ | 3470, 1665 1642, 1590 | 3480, 1670 1650, 1595 | 3460, 1740 1650 | 3450, 1740 1660, 1585 |

a) HREI-MS, M⁺

Table 1-5. Saptomycins A, B, C₁, C₂, D, E, F, G 及び H の ¹H NMR ケミカルシフト.

| Proton | A ^a | B ^a | C ₁ ^a | C ₂ ^a | D ^b |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 3-H | 6.28 s | 6.27 s | 6.25 s | 6.24 s | 6.58 s |
| 13-H _s | 3.02 s | 3.03 s | 3.01 s | 3.00 s | 2.90 s |
| 6-H | 8.09 s | 7.99 s | 7.96 s | 7.96 s | 7.98 s |
| 8-H | 7.83 d (7.5) | | | | 7.99 d (7.9) |
| 9-H | 7.69 dd (7.5, 8.4) | | | | 8.02 d (7.9) |
| 10-H | 7.36 d (8.4) | | | | |
| 14-H | 2.99 dq (3.8, 7.0) | 2.88 ddq (6.3, 7.1, 6.5) | 2.86 ddq (7.2, 7.0, 6.8) | 2.85 ddq (6.9, 7.5, 6.0) | |
| 15-H _s | 1.45 d (7.0) | 1.52 d (6.5) | 1.44 d (6.8) | 1.46 d (6.0) | 1.68 s |
| 16-H _a | 5.01 dd (8.5, 3.8) | 2.50 ddd (7.1, 8.0, 14.1) | 2.53 ddd (7.0, 7.3, 14.2) | 2.51 ddd (7.5, 6.8, 14.1) | 4.06 dd (7.6, 1.2) |
| 16-H _b | | 2.74 ddd (6.3, 7.3, 14.1) | 2.70 ddd (7.0, 7.2, 14.2) | 2.70 ddd (7.2, 6.9, 14.1) | |
| 17-H | 5.50 dd (8.5, 10.5) | 5.42 ddd (8.0, 7.3, 10.9) | 5.41 m | 5.41 m | 5.32 ddq (7.6, 11.2, 1.8) |
| 18-H | 5.65 dq (10.5, 7.0) | 5.58 dq (6.8, 10.9) | 5.55 dq (10.9, 6.7) | 5.55 m | 5.70 ddq (1.2, 11.2, 7.1) |
| 19-H _s | 1.70 d (7.0) | 1.61 d (6.8) | 1.59 d (6.7) | 1.59 d (6.8) | 1.63 dd (1.8, 7.1) |
| 2'-H | | 3.87 dq (6.0, 1.0) | 4.04 br q (6.4) | 4.32 dq (4.5, 6.8) | 4.40 dq (5.2, 6.8) |
| 2'-CH ₃ | | 1.52 d (6.0) | 1.50 d (6.4) | 1.51 d (6.8) | 1.63 d (6.8) |
| 3'-H | | 3.33 br s | 3.36 br s | 5.15 d (4.5) | 5.36 d (5.2) |
| 3'-OAc | | | | 2.20 s | 1.80 s |
| 4'-CH ₃ | | 1.23 s | 0.72 s | 0.93 s | 0.89 s |
| 4'-N(CH ₃) ₂ | | 2.26 s | 2.25 s | 2.36 s | 2.37 s |
| 5'-H _a | | 2.10 dd (12.5, 11.5) | 2.01 dd (6.7, 13.5) | 1.75 dd (6.7, 13.1) | 1.42 dd (10.1, 14.0) |
| 5'-H _b | | 2.33 dd (12.5, 3.0) | 2.61 dd (3.1, 13.5) | 2.45 dd (3.1, 13.1) | 2.60 dd (3.1, 14.0) |
| 6'-H | | 4.95 dd (11.5, 3.0) | 5.43 overlap | 5.55 dd (3.1, 8.7) | 5.79 dd (3.1, 10.1) |
| 2''-H | | 3.54 dq (8.8, 6.5) | 3.56 dq (8.5, 6.0) | 3.55 dq (6.8, 9.3) | |
| 2''-CH ₃ | | 1.42 d (6.5) | 1.43 d (6.0) | 1.44 d (6.8) | |
| 3''-H | | 3.40 dd (9.4, 8.8) | 3.24 dd (9.2, 8.5) | 3.28 dd (9.5, 9.3) | |
| 4''-H | | 3.01 ddd (9.4, 8.9, 1.5) | 2.99 m | 2.92 m | |
| 4''-N(CH ₃) ₂ | | 2.47 s | 2.38 s | 2.36 s | |
| 5''-H _a | | 1.3 overlap | 1.31 m | 1.40 m | |
| 5''-H _b | | 2.2 overlap | 2.28 m | 2.24 m | |
| 6''-H | | 5.35 br d (9.6) | 5.44 br d (8.9) | 5.41 br d (9.0) | |

a) Measured at 400MHz in CDCl₃; ppm from TMS.

b) Measured at 400MHz in C₂D₂; ppm from TMS.

Coupling constants (Hz) are in parentheses.

Table 1-5. (続き)

| Proton | E ^a | F ^a | G ^b | H ^b |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| 3-H | 6.47 s | 6.53 s | 6.22 s | 6.47 s |
| 13-H _a | 2.86 s | 3.02 s | 2.90 s | 2.85 s |
| 8-H | 7.97 s | 8.08 s | 7.90 s | 7.90 s |
| 8-H | 7.95 d (7.9) | 7.82 d (7.4) | 7.94 s ^c | 7.89 d (8.0) |
| 9-H | 7.98 d (7.9) | 7.67 dd (7.4, 8.4) | 7.94 s ^d | 8.10 d (8.0) |
| 10-H | | 7.36 d (8.4) | | |
| 14-H | | | | |
| 15-H _a | 1.56 s | 1.83 s | 1.52 s | 1.56 s |
| 16-H _a | 2.99 q (5.4) | 4.24 d (8.0) | 7.38 q (7.6) | 3.07 q (5.4) |
| 16-H _b | | | | |
| 17 ^e | 0.99 d (5.4) | 5.42 ddq (8.0, 11.0, 1.6) | 1.57 d (7.6) | 1.01 d (5.4) |
| 18-H | | 6.05 dq (11.0, 7.0) | | |
| 19-H _a | | 1.89 dd (1.6, 7.0) | | |
| 2-H | 4.34 dq (5.1, 6.6) | | 4.36 dq (5.2, 6.8) | 3.65 br. q (6.3) |
| 2'-CH ₃ | 1.58 d (6.6) | | 1.60 d (6.8) | 1.29 d (6.3) |
| 3-H | 5.30 d (5.1) | | 5.32 d (5.2) | 4.92 br. s |
| 3'-OAc | 1.76 s | | 1.77 s | 1.96 br. s |
| 4'-CH ₃ | 0.84 s | | 0.86 s | 0.94 br. s |
| 4''-N(CH ₃) ₂ | 2.32 s | | 2.33 s | 2.09 s |
| 5'-H _a | 1.40 dd (10.0, 14.0) | | 1.42 dd (10.0, 14.1) | 1.87 dd (10.6, 12.4) |
| 5'-H _b | 2.58 dd (2.5, 14.0) | | 2.59 dd (3.2, 14.1) | 2.17 br. d (12.4) |
| 6'-H | 5.74 dd (2.5, 10.0) | | 5.73 dd (3.2, 10.0) | 5.14 br. d (10.6) |
| 2''-CH ₃ | | | | |
| 3''-H | | | | |
| 4''-H | | | | |
| 4''-N(CH ₃) ₂ | | | | |
| 5''-H _a | | | | |
| 5''-H _b | | | | |
| 6''-H | | | | |

a) Measured at 400MHz in CDCl₃; ppm from TMS.b) Measured at 400MHz in C₂D₂; ppm from TMS.

c) Coupling between 8-H and 9-H was not observed for the two protons to resonate at the same value of chemical shift.

d) At C-17, GH in septomycin F and CH₃ in septomycins E, G and H.

Coupling constants (Hz) are in parentheses.

Table1-6. Saptomycins A, B, C₁, C₂, D, E, F, G及びHの¹³C NMRデータ.

| Position | A ^{a)} | B ^{a)} | C ₁ ^{a)} | C ₂ ^{a)} | D ^{b)} |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 2 | 170.7s | 172.3s | 172.4s | 172.3s | 167.1s |
| 3 | 112.2d | 111.3d | 111.3d | 111.3d | 109.9d |
| 4 | 178.8s | 179.3s | 179.3s | 179.3s | 178.4s |
| 4 _a | 126.6s | 126.1s | 126.0s | 126.3s | 126.6s |
| 5 | 150.3s | 149.7s | 149.7s | 149.6s | 149.7s |
| 6 | 125.6d | 126.6d | 126.6d | 126.7d | 125.8d |
| 6 _a | 136.0s | 137.1s | 137.0s | 137.1s | 136.2s |
| 7 | 181.7s | 183.6s | 183.5s | 183.6s | 181.3s |
| 7 _a | 132.2s | 126.4s | 126.1s | 126.1s | 131.1s |
| 8 | 119.5d | 140.0s | 139.7s | 140.5s | 119.4d |
| 9 | 136.7d | 132.4d | 132.9d | 132.3d | 133.6d |
| 10 | 125.9d | 138.4s | 138.1s | 138.3s | 140.7s |
| 11 | 162.8s | 158.8s | 159.7s | 159.3s | 159.4s |
| 11 _a | 116.7s | 115.6s | 116.0s | 115.9s | 116.3s |
| 12 | 187.7s | 188.0s | 188.1s | 188.0s | 188.0s |
| 12 _a | 119.6s | 119.2s | 119.2s | 119.2s | 119.9s |
| 12 _b | 156.5s | 156.4s | 156.7s | 156.4s | 156.3s |
| 13 | 24.3q | 24.2q | 24.3q | 24.2q | 24.0q |
| 14 | 44.9d | 39.0d | 39.0d | 39.0d | 59.1s |
| 15 | 13.5q | 17.6q | 17.6q | 17.6q | 14.4q |
| 16 | 68.9d | 31.6t | 31.6t | 31.6t | 61.6d |
| 17 | 128.7d | 125.4d | 125.4d | 125.4d | 124.1d |
| 18 | 130.1d | 126.7d | 126.7d | 126.6d | 133.4d |
| 19 | 12.9q | 12.9q | 12.8q | 12.9q | 13.7q |
| 2' | | 67.7d | 67.0d | 69.8d | 70.8d |
| 2'-CH ₃ | | 18.0q | 17.7q | 14.9q | 14.7q |
| 3' | | 70.3d | 70.8d | 76.9d | 76.9d |
| 3'-OCOCH ₃ | | | | 170.6s | 169.7s |
| 3'-OCOCH ₃ | | | | 21.3q | 20.7q |
| 4' | | 58.9s | 57.3s | 57.8s | 58.0s |
| 4'-N(CH ₃) ₂ | | 36.7q | 36.7q | 39.3q | 39.7q |
| 4'-CH ₃ | | 11.0q | 12.2q | 13.7q | 13.8q |
| 5' | | 36.9t | 33.1t | 41.1t | 43.0t |
| 6' | | 72.5d | 69.9d | 64.9d | 64.1d |
| 2'' | | 77.7d | 77.4d | 77.7d | |
| 2''-CH ₃ | | 18.6q | 18.9q | 18.9q | |
| 3'' | | 71.2d | 71.8d | 71.7d | |
| 4'' | | 67.7d | 67.3d | 67.5d | |
| 4''-N(CH ₃) ₂ | | 40.4q | 40.3q | 40.4q | |
| 5'' | | 28.6t | 28.4t | 28.7t | |
| 6'' | | 75.4d | 75.1d | 75.3d | |

a, b) Measured at 100MHz in (a) CDCl₃ or (b) C₆D₆; ppm from TMS.

Table 1-6. (続き)

| Position | E ^{a)} | F ^{a)} | G ^{b)} | H ^{b)} |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2 | 167.8 s | 167.4 s | 163.4 s | 167.7 s |
| 3 | 109.5 d | 110.1 d | 109.0 d | 109.7 d |
| 4 | 178.3 s | 178.9 s | 178.9 s | 178.3 s |
| 4 _a | 126.7 s | 126.5 s | 126.6 s | 126.6 s |
| 5 | 149.8 s | 149.8 s | 149.7 s | 149.8 s |
| 6 | 125.9 d | 125.3 d | 125.5 d | 125.8 d |
| 6 _a | 136.2 s | 136.0 s | 136.2 s | 136.2 s |
| 7 | 181.3 s | 181.6 s | 181.2 s | 181.2 s |
| 7 _a | 131.1 s | 132.1 s | 131.1 s | 131.3 s |
| 8 | 119.4 d | 119.4 d | 119.3 d | 119.3 d |
| 9 | 133.6 d | 136.4 d | 133.5 d | 133.8 d |
| 10 | 140.7 s | 125.9 d | 140.6 s | 139.9 s |
| 11 | 159.4 s | 162.6 s | 159.4 s | 158.9 s |
| 11 _a | 116.3 s | 116.7 s | 116.3 s | 116.4 s |
| 12 | 188.1 s | 187.1 s | 188.3 s | 188.0 s |
| 12 _a | 119.9 s | 119.8 s | 119.7 s | 119.9 s |
| 12 _b | 156.3 s | 156.5 s | 156.2 s | 156.3 s |
| 13 | 24.0 q | 24.2 q | 24.0 q | 24.0 q |
| 14 | 57.4 s | 59.0 s | 126.4 s | 57.3 s |
| 15 | 13.6 q | 14.3 q | 11.7 q | 13.5 q |
| 16 | 61.7 d | 61.4 d | 133.5 d | 61.5 d |
| 17 | 13.8 q | 123.2 d | 14.5 q | 13.7 q |
| 18 | | 134.1 d | | |
| 19 | | 13.9 q | | |
| 2' | 70.8 d | | 70.8 d | 71.7 d |
| 2'-CH ₃ | 14.7 q | | 14.8 q | 18.2 q |
| 3' | 76.9 d | | 76.8 d | 72.0 d |
| 3'-OCOCH ₃ | 169.6 s | | 169.6 s | 170.3 s |
| 3'-OCOCH ₃ | 20.6 q | | 20.7 q | 20.9 q |
| 4' | 58.0 s | | 58.0 s | 63.6 s |
| 4'-N(CH ₃) ₂ | 39.7 q | | 39.7 q | 37.5 q |
| 4'-CH ₃ | 13.8 q | | 13.8 q | 11.7 q |
| 5' | 43.0 t | | 42.9 t | 38.2 t |
| 6' | 64.1 d | | 64.2 d | 70.4 d |
| 2'' | | | | |
| 2''-CH ₃ | | | | |
| 3'' | | | | |
| 4'' | | | | |
| 4''-N(CH ₃) ₂ | | | | |
| 5'' | | | | |
| 6'' | | | | |

a, b) Measured at 100MHz in (a) CDCl₃ or (b) C₆D₆; ppm from TMS.

第6節 Saptomycin 類の構造解析

Saptomycin 類の UV スペクトルは共通のクロモフォアとして 11-hydroxy-4H-anthraceno[1,2-b]pyran-4,7,12-trione を持つことを示唆し、同じクロモフォアを持つ抗腫瘍抗生物質群である Pluramycin グループの化合物と近い構造であることが予想された¹⁴⁾。しかし、Saptomycin 類の ^1H 及び ^{13}C NMR をはじめとする各種スペクトルのデータは、既知の Pluramycin グループの化合物とは、異なった特徴を示した。そこで、Saptomycin 類の構造解析を試みた。

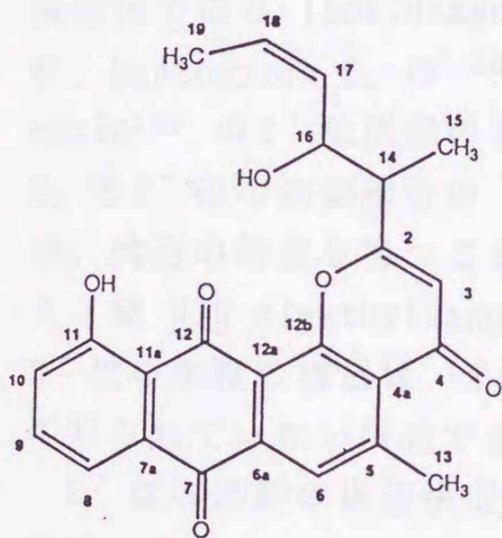
6-1 Saptomycin A 及び F の構造解析

Saptomycin A 及び F の分子式は、HREI-MS よりそれぞれ $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_6$ 、 $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{O}_6$ と与えられた。この結果は、既知の Pluramycin 群化合物に特徴的に見られる8位と10位のアミノ糖が欠落した構造を示唆した。Saptomycin A 及び F の ^1H NMR スペクトルは非常にシンプルな形状を示し、この構造的な特徴を支持した。Saptomycin A と F の共通な構造を示す特有なシグナルとして、3-H (δ 6.28 及び δ 6.53)、6-H (δ 8.09 及び δ 8.08)、8-H (δ 7.83 及び δ 7.82)、9-H (δ 7.69 及び δ 7.67)、10-H (δ 7.36)、13- CH_3 (δ 3.02) を与えた。このような性状を示す化合物としては、 α -Indomycinone⁶³⁾、SF2330⁶⁴⁾、SS43405D⁶⁵⁾、及び E⁶⁶⁾、 β -Indomycinone、Rubiflavinone C-1 及び C-2⁶⁷⁾、Hydramycin⁶⁸⁾ が知られている。これらの化合物は、2位の側鎖にのみ違いを示すが、Saptomycin A 及び F はこれらの既知化合物とは、異なった側鎖を持つことが ^1H NMR スペクトルより示された。

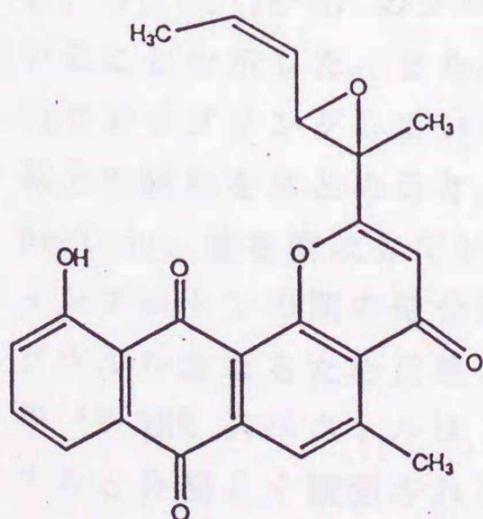
Saptomycin A の ^1H NMR スペクトルは、2位の側鎖が2個のメチル基 (δ 1.45 及び δ 1.70)、2個のオレフィンプロトン (δ 5.50 及び δ 5.65)、1個の O-CH グループ (δ 5.01) 及び1個の CH グループ (δ 2.99) の6個の炭素より成ることが示唆された。 ^1H - ^1H COSY により 2-hydroxy-1-methyl-3-pentenyl 基を持つことが明かとなった。17-H と 18-H の結合定数は 10.5 Hz でオレフィン部分の立体配置は Z 体と決定した。このアルキル鎖は 既知物質 SS21020C⁶⁹⁾ の2位の側鎖と共通の部分構造であることより ^1H NMR スペクトルを比較したところ、側鎖部分のシグナルにおいてよい一致を示した。さらに、 ^{13}C NMR についても同様な比較を行ったところ、SS21020C (δ 130.4 d; δ 125.6 d; δ 68.8 d; δ 44.9 d; δ 13.3 q; δ 12.7 q) に対し Saptomycin A (δ 130.1 d; δ 128.7 d; δ 68.9 d; δ 44.9 d; δ 13.5 q; δ 12.9 q) と共通な部分構造を持つことを支持した。

Saptomycin F の2位側鎖の構造解析は主として ^1H 及び ^{13}C 等の NMR データの解析により行った。 ^1H NMR 及び ^1H - ^1H COSY 実験の結果より構造として立体配置が Z 体 ($J_{17,18} = 11.0$ Hz) である 1,2-dihydroxy-1-methyl-3-pentenyl 基ある

いは、1,2-epoxy-1-methyl-3-pentenyl 基を持っていることが推定された。 ^1H 及び ^{13}C NMR における16位の化学シフト ($\delta_{\text{H}}4.26 / \delta_{\text{C}}61.4$) は 14,16-dihydroxyl 化合物である PD121,222⁷⁰⁾ における16位の化学シフト ($\delta_{\text{H}}4.86 / \delta_{\text{C}}71.7$) と大きく異なり、14,16-epoxy 化合物である Pluramycin A¹⁴⁾ の化学シフト ($\delta_{\text{H}}4.15 / \delta_{\text{C}}61.7$) とよく一致した。以上の結果より、Saptomycin A 及び F の構造はそれぞれ 11-hydroxy-5-methyl-2-(2-hydroxy-1-methyl-3-(Z)-pentenyl)-4H-anthraceno[1,2-b]pyran-4,7,12-trione 及び 11-hydroxy-5-methyl-2-(1,2-epoxy-1-methyl-3-(Z)-pentenyl)-4H-anthraceno[1,2-b]pyran-4,7,12-trione と決定した。



Saptomycin A



Saptomycin F

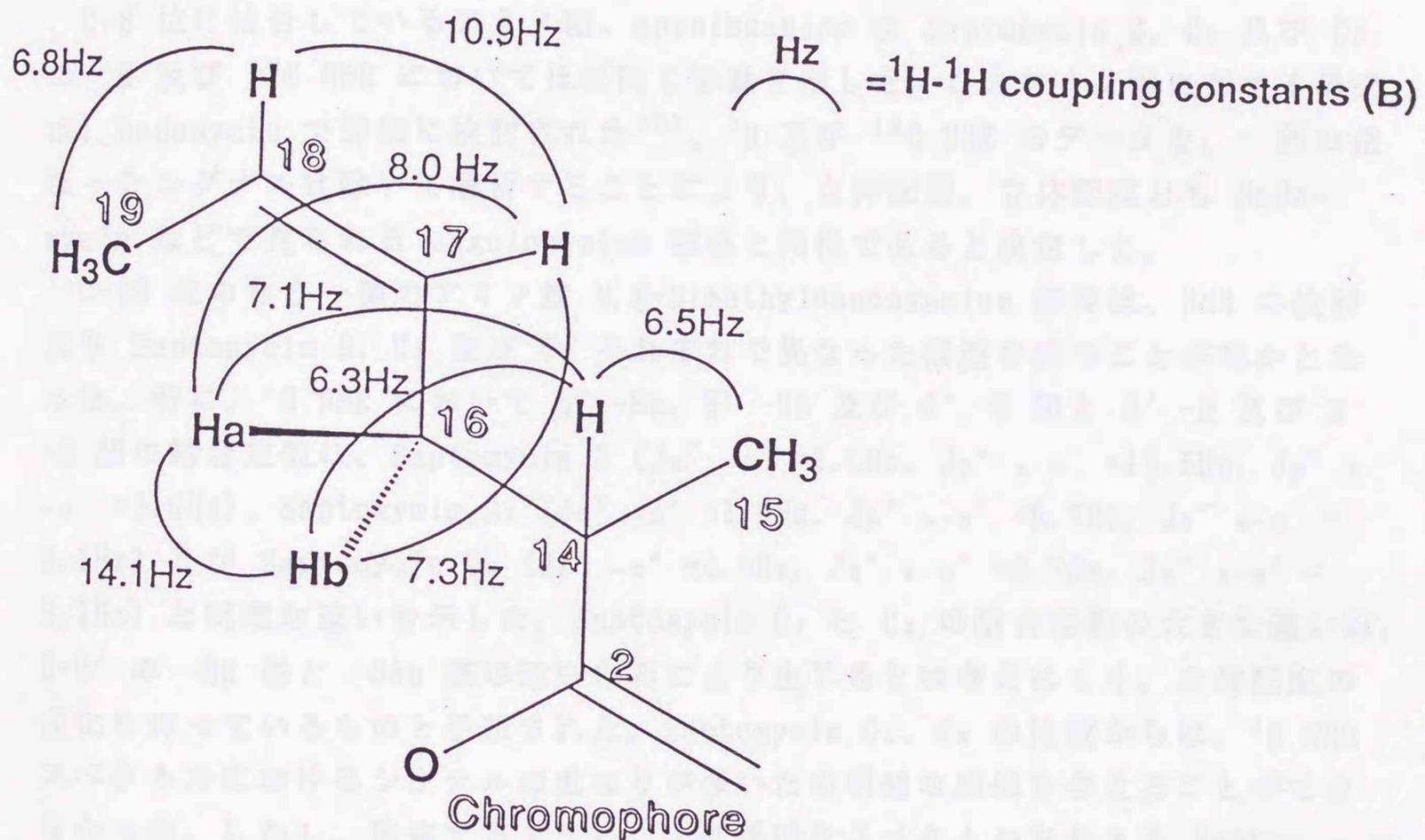
6-2 Saptomycin B、C₁ 及び C₂ の構造解析

HRFAB-MS より Saptomycin B、C₁ 及び C₂ の分子式は、それぞれ C₄₁H₅₂N₂O₉、C₄₁H₅₂N₂O₉、C₄₃H₅₄N₂O₁₀ と与えられた。さらに、それぞれの ¹³C NMR スペクトルの解析より3種化合物に共通な41本のシグナル (6×C-CH₃, 4×N-CH₃, 3×methylene, 8×methine, 5×-CH=, 11×C=, 3×C=O, 1×quaternary carbon) を認めた。Saptomycin C₂ はさらにアセチル基由来と思われる2本のシグナルを与えた (C-CH₃, C=O)。この結果は、Saptomycin B、C₁ 及び C₂ が構造的に関連性の強いことを示した。Saptomycin C₁ の ¹H NMR スペクトルは、Kidamycin⁷¹⁾、Hedamycin⁷²⁾、Rubiflavins⁶⁷⁾ の ¹H NMR スペクトルと類似の形状を示し、これらのスペクトルの違いは、2位の側鎖部分のシグナルにのみ認められた。一方、Saptomycin B は、やはり2位の側鎖部分を除いて、Kidamycin の6'位の立体配置異性体である Isokidamycin⁷¹⁾ と非常に近い ¹H NMR スペクトルを与えた。さらに、Saptomycin C₂ の ¹H NMR スペクトルも Pluramycin A 及び Neopluramycin¹⁴⁾ の2'位側鎖のアナログであることを示した。Saptomycin B、C₁ 及び C₂ の2'位の側鎖部分の ¹H 及び ¹³C NMR におけるシグナルはこれら3種の化合物が、共通の構造を持つことを示したことから、構造的には10位に結合しているアミノ糖 N,N-dimethylvancosamine 部分にのみ違いがあることが認められた。また、2'位の側鎖の構造は ¹H 及び ¹³C NMR における挙動より既知の関連化合物において知られていない構造であることが明かとなった。

2'位の側鎖の構造決定は、主として Saptomycin C₁ を用いたデカップリング実験によって行った。¹H NMR における側鎖部分のシグナルへの照射を繰り返すことにより、 δ 2.86(14-H) のプロトンは、 δ 2.53(16-H_a)、 δ 2.70(16-H_b) 及び δ 1.44(15-H₃) メチル基とカップリングしていること、 δ 5.41(17-H) 及び δ 5.55(18-H) の2個のオレフィンプロトンはお互いにカップリングしているほか、さらに δ 5.41(17-H) のプロトンは δ 2.53(16-H_a)、 δ 2.70(16-H_b) の2個のプロトンと、 δ 5.55(18-H) のプロトンは δ 1.59(19-H₃) のメチル基とカップリングしていることを示した。また、 δ 2.53(16-H_a) と δ 2.70(16-H_b) のプロトンは14.2 Hzでカップリングしていることより、ジェミナルプロトンであることを示した。以上の結果をまとめると、C-14 より C-19 までの2位側鎖は 1-methyl-3-pentenyl 基を構成していることが認められた。しかし、17-H⁴と 18-H のオレフィンプロトンの間の結合定数は 17-H と N,N-dimethylvancosamine の 6'-H シグナルが重なるため正確に得ることができなかった。これに対し、Saptomycin B の ¹H NMR スペクトルは δ 5.42(17-H) 及び δ 5.58(18-H) のシグナルが他のシグナルと分離よく観測されることにより17-H と 18-H の結合定数は10.9Hzと確定し、オレフィン部分の立体配置は Z と決定した。以上の結果より Saptomycin B、C₁

及び C₂ における共通な 2 位の側鎖の構造を決定した。その構造を Fig. 1-5 に示す。

Fig. 1-5. Saptomycins B, C₁ 及び C₂ の 2 位側鎖の構造.

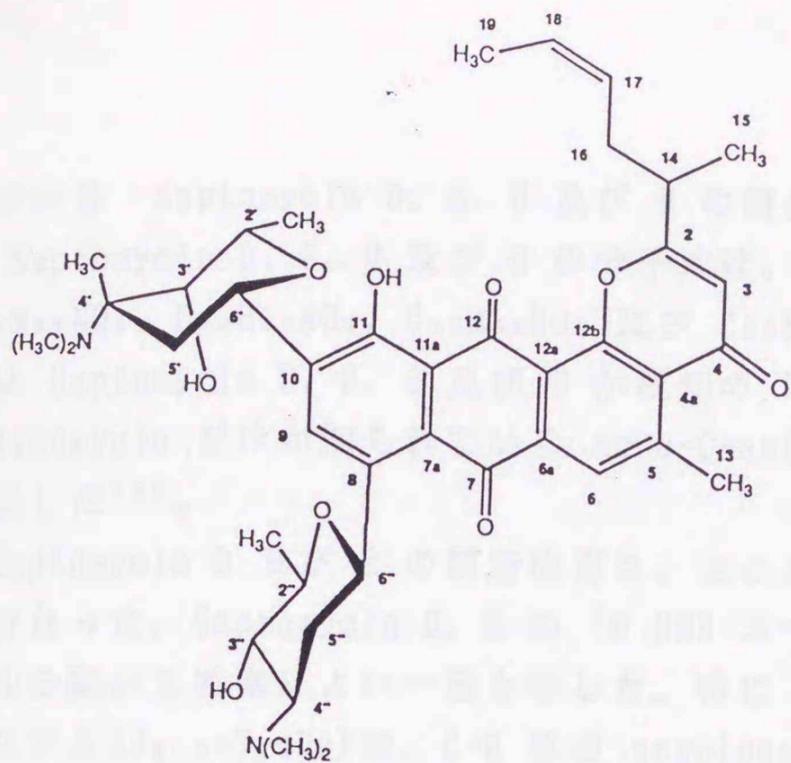


Saptomycin B、C₁ 及び C₂ の UV スペクトルは Saptomycin A、F のものと類似の形状を示すことよりクロモフォアーとして同じ、Pluramycin 群化合物でよく知られている 11-hydroxy-4H-anthraceno[1,2-b]pyran-4,7,12-trione を持つ可能性を強く示唆した。さらに、Saptomycin B、C₁ 及び C₂ の ¹H NMR スペクトルはこの骨格の置換様式を特徴づけるシグナルとして 3-H(δ 6.27, δ 6.25 及び δ 6.24)、6-H(δ 7.99, δ 7.96 及び δ 7.96) 及び 9-H(δ 8.43, δ 8.31 及び δ 8.25) を示した。これらのシグナルは、ほとんどの Pluramycin 群の化合物で特徴的にみられる C-8 位と C-10 位に C-C で結合している2個のアミノ糖の存在を示唆した。

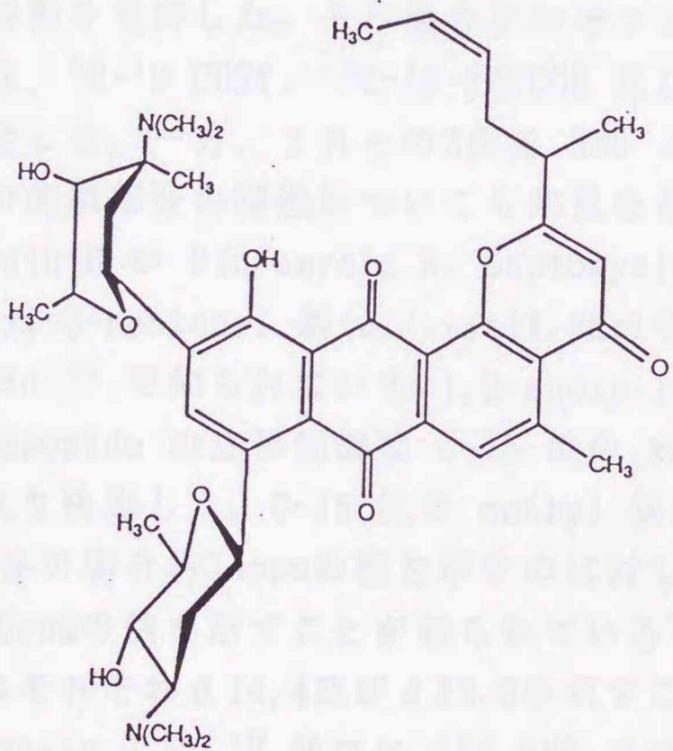
C-8 位に結合しているアミノ糖、angolosamine は Saptomycin B、C₁ 及び C₂ の ¹H 及び ¹³C NMR においてほぼ同じ挙動を示した。このアミノ糖に対する研究は、hedamycin で詳細に検討された⁷²⁾。¹H 及び ¹³C NMR のデータを、一部の重なったシグナルは除いて解析することにより、立体配置、立体配座とも Hedamycin などで見られる angolosamine 部位と同様であると決定した。

C-10 位のもう一個のアミノ糖 N,N-dimethylvancosamine 部位は、NMR の検討より Saptomycin B、C₁ 及び C₂ それぞれで異なった構造を持つことが明らかとなった。特に、¹H NMR において 5' -Ha、5' -Hb 及び 6' -H 間と 2' -H 及び 3' -H 間の結合定数は、Saptomycin B ($J_{2'-3'} = 1.0\text{Hz}$, $J_{5'-a-e'} = 11.5\text{Hz}$, $J_{5'-b-e'} = 3.0\text{Hz}$)、Saptomycin C₁ ($J_{2'-3'} < 1.0\text{Hz}$, $J_{5'-a-e'} = 6.7\text{Hz}$, $J_{5'-b-e'} = 3.1\text{Hz}$) 及び Saptomycin C₂ ($J_{2'-3'} = 4.5\text{Hz}$, $J_{5'-a-e'} = 8.7\text{Hz}$, $J_{5'-b-e'} = 3.1\text{Hz}$) と明確な違いを示した。Saptomycin C₁ と C₂ の結合定数の大きな違いは、C-3' の -OH 基と -OAc 基の違いのみにより生じるとは考えにくく、立体配座の変化も伴っているものと予想された。Saptomycin C₁、C₂ の比較からは、¹H NMR スペクトルにおけるシグナルの重なりが多いため明確な結果を与えることができなかった。しかし、後述するように、より単純なスペクトルを与える Saptomycin D 及び E において誘導体を用いた検討により C-3' 位の Acetyl 化に伴う糖リングの立体配座の可逆的変化、並びにそれぞれの立体配座を明らかにした(第7節)。この結果との比較より Saptomycin C₁、C₂ それぞれの N,N-dimethylvancosamine 部位の構造を決定した。また、それぞれの構造の関連付けについては、Saptomycin C₂ を室温下、メタノール中、48時間処理することにより Saptomycin C₁ を誘導し確認した。Saptomycin B は Saptomycin C₁ の C-6' 立体配置異性体であることを Isokidamycin との ¹H 及び ¹³C NMR のデータの詳細な比較検討により証明した。Kidamycin 及び Isokidamycin の ¹H NMR データは N,N-dimethylvancosamine 部位において 6' -H、4' -CH₃、2' -H の化学シフトが明かに異なった値を示している⁷¹⁾ [Kidamycin (δ 5.40, δ 0.77 及び δ 4.07),

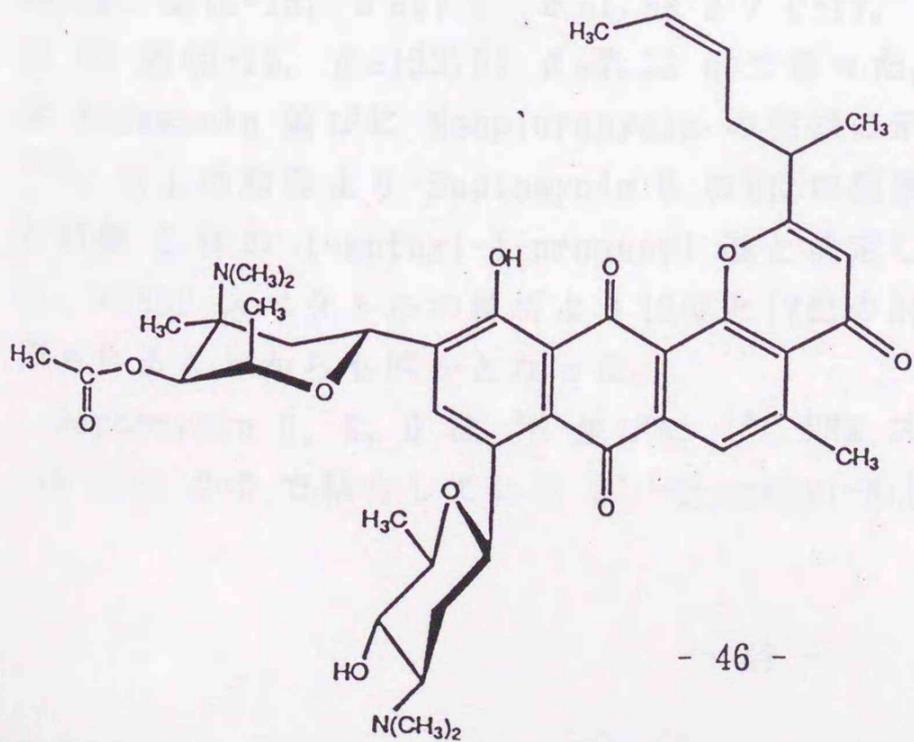
Isokidamycin (δ 4.83, δ 1.21 及び δ 3.83)]. 一方、Saptomycin B 及び C₁ についてもこれとよく一致した結果を与えた[Saptomycin C₁ (δ 5.43 δ 0.72 及び δ 4.04), Saptomycin B (δ 4.95, δ 1.23 及び δ 3.87)]. さらに、¹³C NMR における Kidamycin 及び Isokidamycin の立体配置の違いによる化学シフトの違いも C-6'、4' -CH₃、C-5' で明確に示された^{7,2)} [Kidamycin (δ 69.5, δ 12.3 及び δ 33.6), Isokidamycin (δ 72.3, δ 10.9 及び δ 37.0)]. 同様に Saptomycin B、C₁ も明確な化学シフトの違いを示した[Saptomycin C₁ (δ 69.9, δ 12.2 及び δ 33.1), Saptomycin B (δ 72.5, δ 11.0 及び δ 36.9)]. 以上の結果より Saptomycin B、C₁ 及び C₂ の構造を以下のように決定した。



Saptomycin B



Saptomycin C₁



Saptomycin C₂

6-3 Saptomycin D、E、G 及び H の構造解析

Saptomycin D、E、G 及び H の分子式は、HRFAB-MS スペクトルよりそれぞれ $C_{95}H_{97}NO_9$ 、 $C_{93}H_{95}NO_9$ 、 $C_{93}H_{95}NO_8$ 及び $C_{93}H_{95}NO_9$ と与えられた。これらの分子式は Saptomycin D、E、G 及び H が既知の Pluramycin 群化合物としては、Ankinomycin だけが知られている mono-C-aminoglycosyl 化合物である可能性を示唆した⁷³⁾。

Saptomycin D 及び E の構造決定は、主として 1H 及び ^{13}C NMR の解析を通して行なった。Saptomycin D、E の 1H NMR スペクトルは C-2 位の側鎖部分のシグナルを除いて非常によい一致を示した。特に H-8 と H-9 の AB タイプのスピンスystem ($J_{8-9}=7.9\text{Hz}$)は、C-8 位の angolosamine の欠落した Ankinomycin タイプの置換様式の特徴を与えた。 ^{13}C NMR において C-8 位の化学シフト (δ 119.4) もこの特徴を支持した。その他のクロモフォア一部分の 1H 、 ^{13}C NMR スペクトルの帰属は、 1H - 1H COSY、 ^{13}C - 1H HETCOR 及び long range ^{13}C - 1H HETCOR 実験により確定した。一方、これらの2次元 NMR スペクトルを含むスペクトルデータは C-2 位の側鎖部分の構造についても知見を与えた。この結果より導かれる構造は、Saptomycin D が Pluramycin A、Saptomycin F と同じ Z 立体配置の 1,2-epoxy-1-methyl-3-pentenyl 基 ($J_{17-18}=11.2\text{Hz}$)を持つこと、Saptomycin E が Epoxy kidamycin⁷⁴⁾ で知られている 1,2-epoxy-1-methyl 基を持つことを示した。両化合物の epoxide の立体配置は C-15 位の methyl 基の ^{13}C NMR における化学シフトにより決定した。C-15 位の methyl 基は Hedamycin や Ankinomycin のように cis 体の場合約 14ppm の値を示すのに対し、Altromycin のような trans 体の場合約 19ppm の値を示すことが知られている⁷⁵⁾。Saptomycin D 及び E においてこの値はそれぞれ δ 14.4 及び δ 13.6 を示すことより、cis 体と決定した。

Saptomycin G の 1H 並びに ^{13}C NMR スペクトルは、Saptomycin D、E との比較から C-2 位の側鎖にのみ違いを認めた。Saptomycin G の側鎖は4個の炭素により構成されている。その内訳としては、1個の4級炭素 (C-14, δ_c 126.4)、2個の methyl 基 (C-15, δ_c 11.7; δ_H 1.52 s / C-17, δ_c 14.5; δ_H 1.57 d)、そして1個の CH 基 (C-16, δ_c 133.5; δ_H 7.38 q)であった。化学シフト並びに結合定数の値は Kidamycin 並びに Neopluramycin の側鎖の示すそれらの値とよく一致した^{14, 71)}。以上の結果より Saptomycin G の2位の側鎖は Kidamycin⁴、Neopluramycin と同様 E 体の 1-methyl-1-propenyl 基と決定した。さらに、立体配置については、NOESY スペクトルの解析より 15位と 17位の2個の methyl 基の間に NOE が観測されることから明かとなった。

Saptomycin D、E、G は 1H 並びに ^{13}C NMR スペクトルの解析より共通な C-10 位に C-C で結合している 3' -O-acetyl-N,N-dimethylvancosamine を持つこ

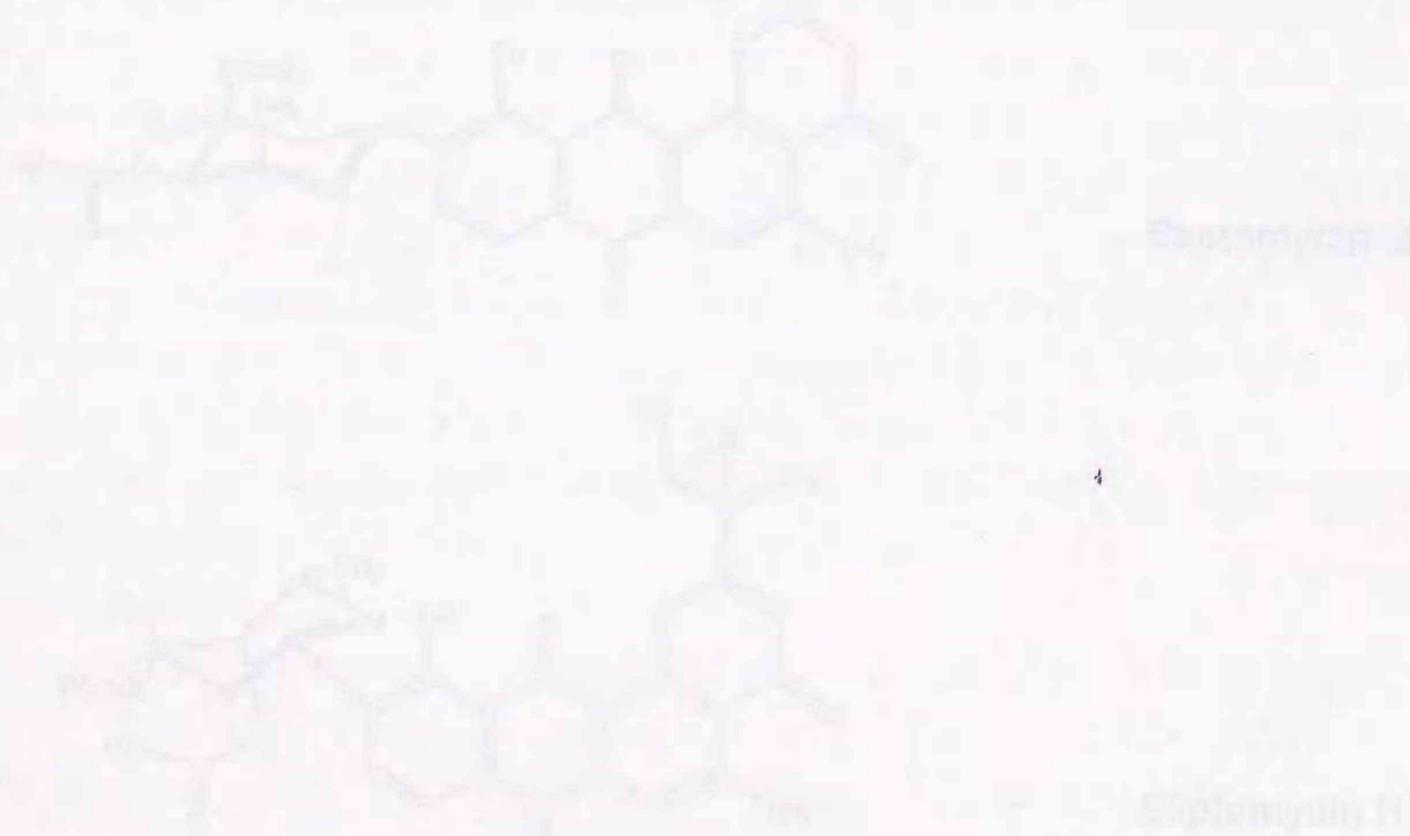
とが認められた。同種の糖は、Pluramycin A、Neopluramycin において知られている。この糖の立体配座は、結合定数の検討により chair form と決定した ($J_{5' a-6'} = \text{ca. } 10.0\text{Hz}$, $J_{5' b-6'} = \text{ca. } 3.2\text{Hz}$, $J_{2' -3'} = \text{ca. } 5.2\text{Hz}$)。さらに詳細な検討については、第7節において述べる。

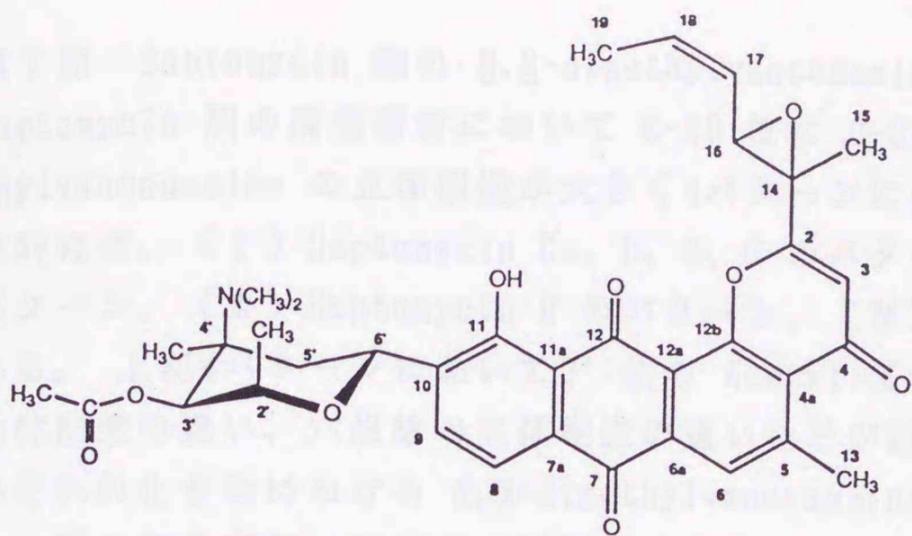
Saptomycin H は他の Saptomycin 類と同様 ^1H 及び ^{13}C NMR スペクトルの解析より Saptomycin E の 3'-O-acetyl-N,N-dimethylvancosamine の6'位の立体配置異性体であることが考えられた。Saptomycin H と B の6'位の ^1H NMR の化学シフト及び ^1H - ^1H 結合定数の比較は糖部分の立体配置の共通性を示した [Saptomycin B ($\delta_{6' -\text{H}} = 4.95$, $J_{2' -3'} = 1.0\text{Hz}$, $J_{5' a-6'} = 11.5\text{Hz}$, $J_{5' b-6'} = 3.0\text{Hz}$) Saptomycin H ($\delta_{6' -\text{H}} = 5.14$, $J_{2' -3'} < 1.0\text{Hz}$, $J_{5' a-6'} = 10.6\text{Hz}$, $J_{5' b-6'} < 2.0\text{Hz}$)]。

さらに、Saptomycin H と E は NOESY スペクトルにおいて異なった挙動を示し、結合定数の値との検討から立体配座を決定した。これについても詳細は第7節において述べる。

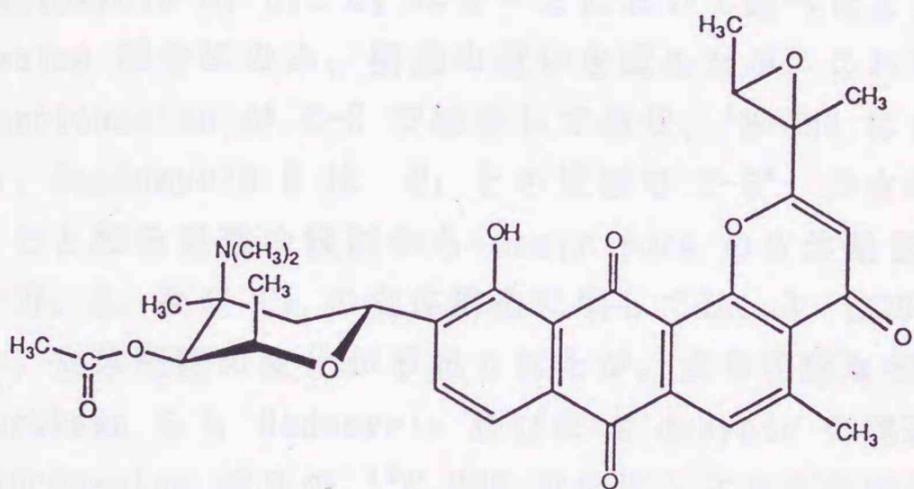
以上の結果より Saptomycin D、E、G 及び H の構造を以下のように決定した。

なお、Saptomycin A~H の絶対構造の決定は行わなかったが、Pluramycin 群の化合物との生物学的な関連性を考慮すると Saptomycin 類の絶対構造も、すでに詳細に検討されている Kidamycin⁷⁶⁾、Hedamycin⁷⁷⁾ と同様な絶対構造をとるものと予想される。

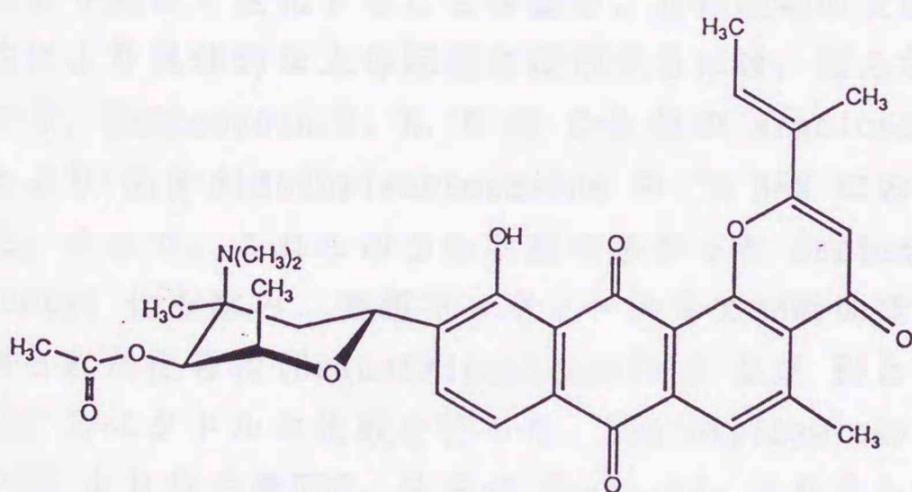




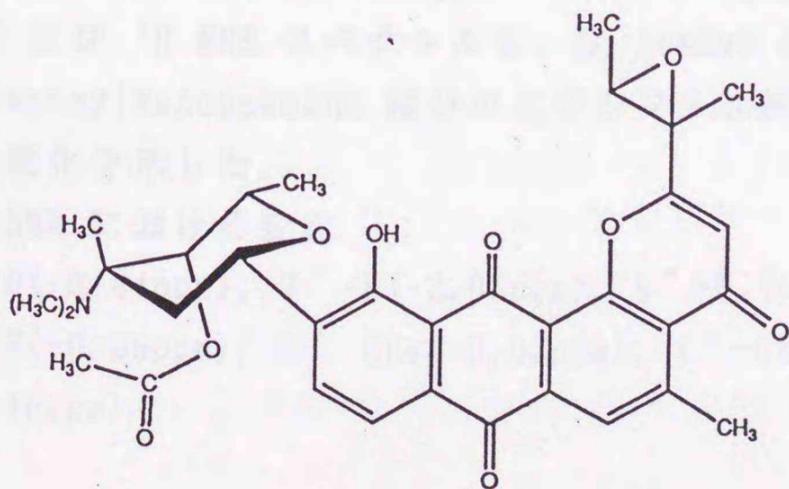
Saptomycin D



Saptomycin E



Saptomycin G



Saptomycin H

第7節 Saptomycin 類の *N,N*-dimethylvancosamine 部分の構造解析

Saptomycin 類の構造解析において C-10 位に C-C 結合している *N,N*-dimethylvancosamine の立体構造が大きく4パターンに分かれることが明かとなった。具体的には、(I) Saptomycin C₂, D, E, G のパターン、(II) Saptomycin C₁ のパターン、(III) Saptomycin B のパターン、(IV) Saptomycin H のパターンである。上記4パターンにおいて3'位の Acetyl 基の存在の有無に加え、6'位の立体配置の違い、六炭糖の立体配座の違いなどが認められた。これらの検討は、それぞれの化合物における *N,N*-dimethylvancosamine 部分の ¹H NMR におけるプロトン間の結合定数、並びに NOESY スペクトルにより示された NOE により行った。Saptomycin B, C₁, C₂ は 6-2 において述べたように、*N,N*-dimethylvancosamine 部分にのみ、構造の違いを認めたが、これら3化合物は、さらに C-8 位に angolosamine が C-C で結合しており、¹H NMR におけるシグナルの重なりなどから、Saptomycin B は C₁ との比較で C-6' の立体配置の変化した異性体であることと結合定数の検討から chair form の立体配座をとることが明かとなった。一方、C₁ 及び C₂ の立体構造に関しては、3'位の Acetyl 基の存在の有無により、立体配座の変化が予想されたが、より明確な知見を得ることができなかった。Furukawa らも Hedamycin 並びに Kidamycin の構造研究より *N,N*-dimethylvancosamine 部分の ¹³C NMR の化学シフトにおけるシグナルが3'位の Acetyl 化により大きく変化することを認め、立体配座の変化を示唆したものの、同様な理由により具体的な立体配座を提示するには、至らなかった⁷²⁾。

一方、Saptomycin D, E, G は C-8 位の angolosamine が欠落した構造であることより *N,N*-dimethylvancosamine の ¹H NMR におけるシグナルが分離よく示された。そこで、これらのうち収量の多かった Saptomycin D 及び E について Deacetyl 化を試み、室温下メタノール中で48時間攪拌することによりほぼ定量的に得られた化合物 (Deacetylsaptomycin D 及び E) と、¹³C 及び ¹H NMR 並びに NOESY スペクトルの比較を行った。Deacetylsaptomycin D は FAB-MS 並びに HR FAB-MS より分子量573、分子式 C₃₃H₃₅N₃O₈ と与えられた。IR スペクトルは、Saptomycin D に見られた 1745cm⁻¹ のアセチル基由来の吸収バンドが、欠落しており ¹³C 及び ¹H NMR スペクトルも、脱 Acetyl が起こったことを示したが、*N,N*-dimethylvancosamine 部分の化学シフトは脱 Acetyl のみでは説明できない大幅な変化を示した。

a) ¹H NMR における変化

2'-H (-0.44ppm), 3'-H (-2.05ppm), 5'-H_a (+0.45ppm), 5'-H_b (-0.19ppm),
6'-H (-0.06ppm), 2'-CH₃ (-0.02ppm), 4'-CH₃ (-0.21ppm), 4'-N(CH₃)₂
(-0.46ppm)

b) ^{13}C NMR における変化

C-2' (-1.8ppm), C-3' (-5.7ppm), C-5' (-5.9ppm), C-6' (+3.2ppm), 2'-CH₃ (+2.7ppm), 4'-CH₃ (-0.5ppm), 4'-N(CH₃)₂ (-2.7ppm)

Furukawa らの報告によると^{71, 72)}、Kidamycin 及び Isokidamycin の Acetyl 化において Kidamycin は Saptomycin D と同様 N,N-dimethylvancoamine 部分の ^{13}C 及び ^1H NMR スペクトルの化学シフトに大きな変化を示したものの、Isokidamycin は通常の Acetyl 化に伴う程度の化学シフトの変化しか示さなかった。Kidamycin の Acetyl 化における化学シフトの変化は、Saptomycin D における Deacetyl 化とほぼ反対の結果を与えた。

a) ^1H NMR における変化

2'-H (+0.25ppm), 3'-H (+1.85ppm), 6'-H (-0.02ppm), 2'-CH₃ (-0.08ppm), 4'-CH₃ (+0.22ppm), 4'-N(CH₃)₂ (+0.04ppm)

b) ^{13}C NMR における変化

C-2' (+3.0ppm), C-3' (+4.9ppm), C-4' (+0.5ppm), C-5' (+8.4ppm), C-6' (-4.7ppm), 2'-CH₃ (-2.9ppm), 4'-CH₃ (+1.5ppm), 4'-N(CH₃)₂ (+2.3ppm)

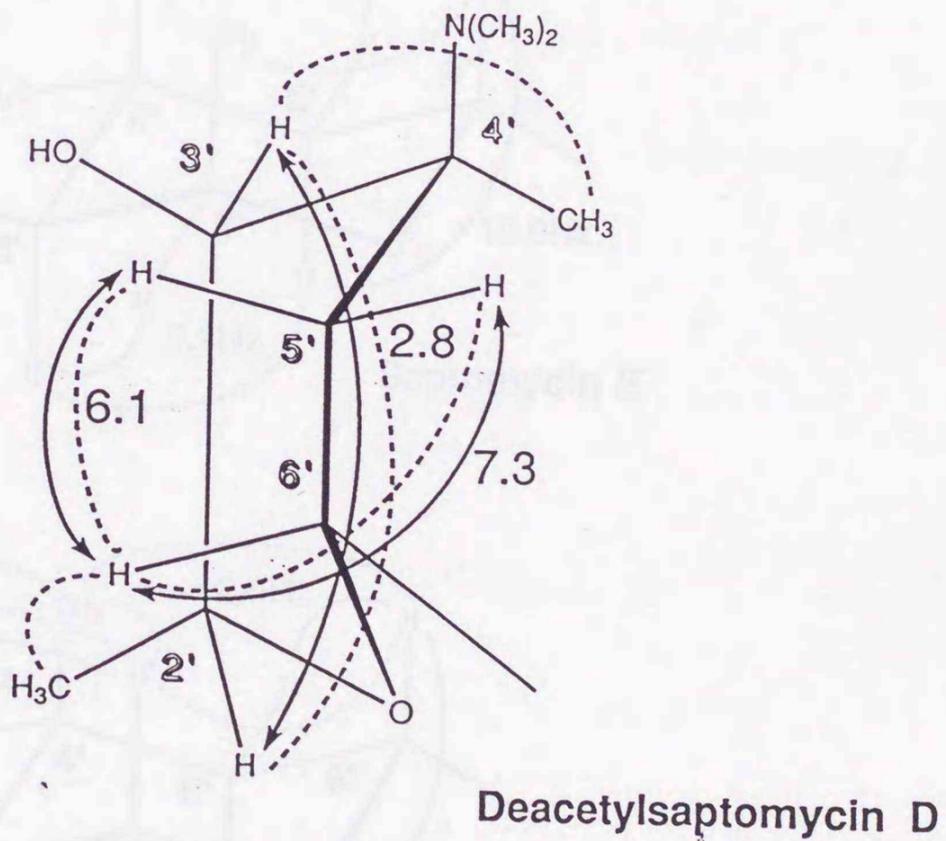
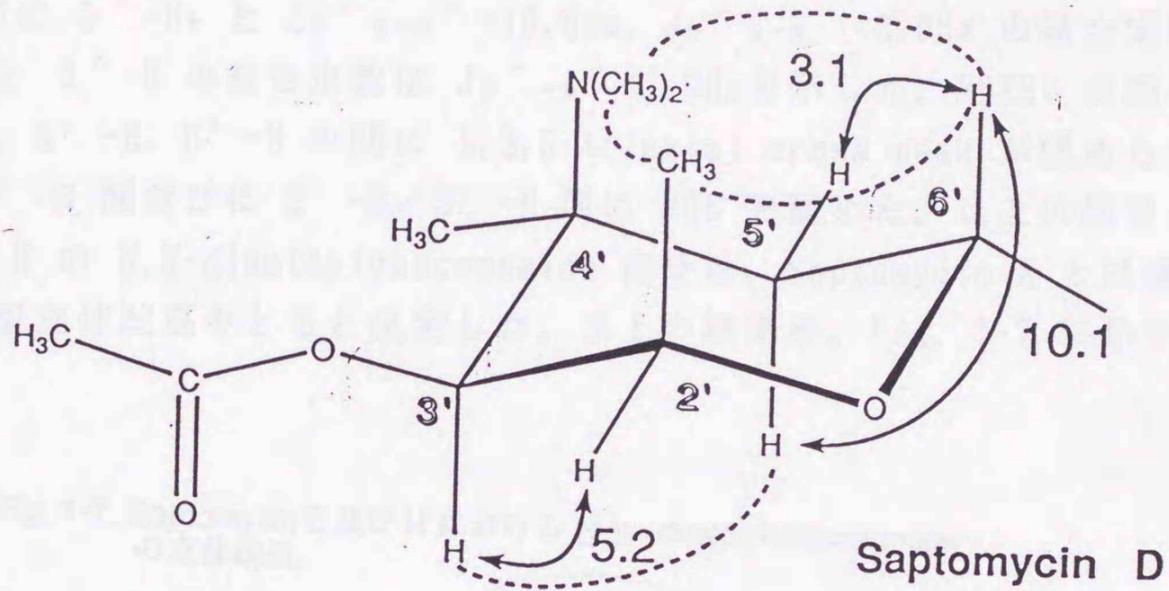
(^{13}C - ^1H HETCOR 実験により C-3' と C-6' の帰属が逆になっていることを確認した。)

この解析より、Saptomycin D 及び関連化合物において N,N-dimethylvancoamine 部分の 3' 位の Acetyl 基の有無は立体配座の変化を引き起こすことが示され、一方、6' 位立体配置異性体である Isokidamycin は 3' 位の Acetyl 基の有無が立体配座に影響を与えないことを示した。このことより、Saptomycin B 並びに H は同じ立体配座を持つことが示唆された。

N,N-dimethylvancosamine 部分の立体配座の決定は、NOESY 実験並びに、 ^1H NMR スペクトルの ^1H - ^1H 結合定数をもとに行った。Saptomycin D において 6'-H は 5'-H_a 並びに 5'-H_b と ABX スピンシステムでカップリングしており、結合定数は $J_{5'-\text{a}-6'} = 10.1\text{Hz}$ 、 $J_{5'-\text{b}-6'} = 3.1\text{Hz}$ を示すことより、6'-H と 5'-H_a はアキシヤル-アキシヤルの関係、6'-H と 5'-H_b はアキシヤル-エクソトリアルの関係であることが示された。2'-H と 3'-H の結合定数は $J_{2'-3'} = 5.2\text{Hz}$ を示した。これらのプロトン間の結合定数は Altromycin の N,N-dimethylvancosamine 部分の結合定数に非常に近い値を示した⁷⁵⁾。さらに、NOESY 実験の結果は、Saptomycin D と Altromycin の N,N-di-methylvancosamine 部分の立体配座の類似性を支持した。NOESY 実験において 2'-CH₃、4'-N(CH₃)₂、6'-H の間に 1,3,5-triaxial cross peak が認められ、5'-H_a、3'-H の間に 1,3-diaxial cross peak が観察された。これらの結果から、Saptomycin D の N,N-dimethylvancosamine 部分は Altromycin と同様、chair form の立体配座と決定

した。一方、Deacetylsaptomycin D においては 6'-H は 5'-H_a 並びに 5'-H_b と $J_{5'a-6'} = 7.3\text{Hz}$ 、 $J_{5'b-6'} = 6.1\text{Hz}$ の結合定数を示し、2'-H と 3'-H の結合定数は $J_{2'-3'} = 2.8\text{Hz}$ を示した。NOESY スペクトルからは、NOE が 2'-H/3'-H 間、2'-CH₃/6'-H 間、5'-H_a/6'-H 間、5'-H_b/6'-H 間、そして 3'-H/4'-CH₃ 間に認められた。この結果は、Kidamycin⁷¹⁾、Hedamycin⁷²⁾ 及び Ankinomycin⁷³⁾ などと同じ挙動であることより Deacetylsaptomycin D における N,N-dimethylvancosamine 部分の立体配座は、boat form に近く完全には固定されていない twist form 立体配座であると決定した。結果の要約を Fig. 1-6 に示す。以上の結果をまとめると、Saptomycin D の N,N-dimethylvancosamine 部分は chair form の立体配座をとり、Deacetyl 化により立体配置の変化を伴わずに立体配座のみ boat form に近い形に変化することが示された。Saptomycin E 及び G においても N,N-dimethylvancosamine 部分は Saptomycin D と同じ立体配座をとることが NMR 等のスペクトルデータより認められたため、同様な条件において Saptomycin E の Deacetyl 化を行い、Deacetylsaptomycin E の N,N-dimethylvancosamine 部分も Deacetylsaptomycin D と同様な立体配座をとることを明らかにした。このことより、収量が少ないため直接 Deacetyl 化は行わなかったものの、Saptomycin G においても同様な立体配座変化が起こるものと推定された。

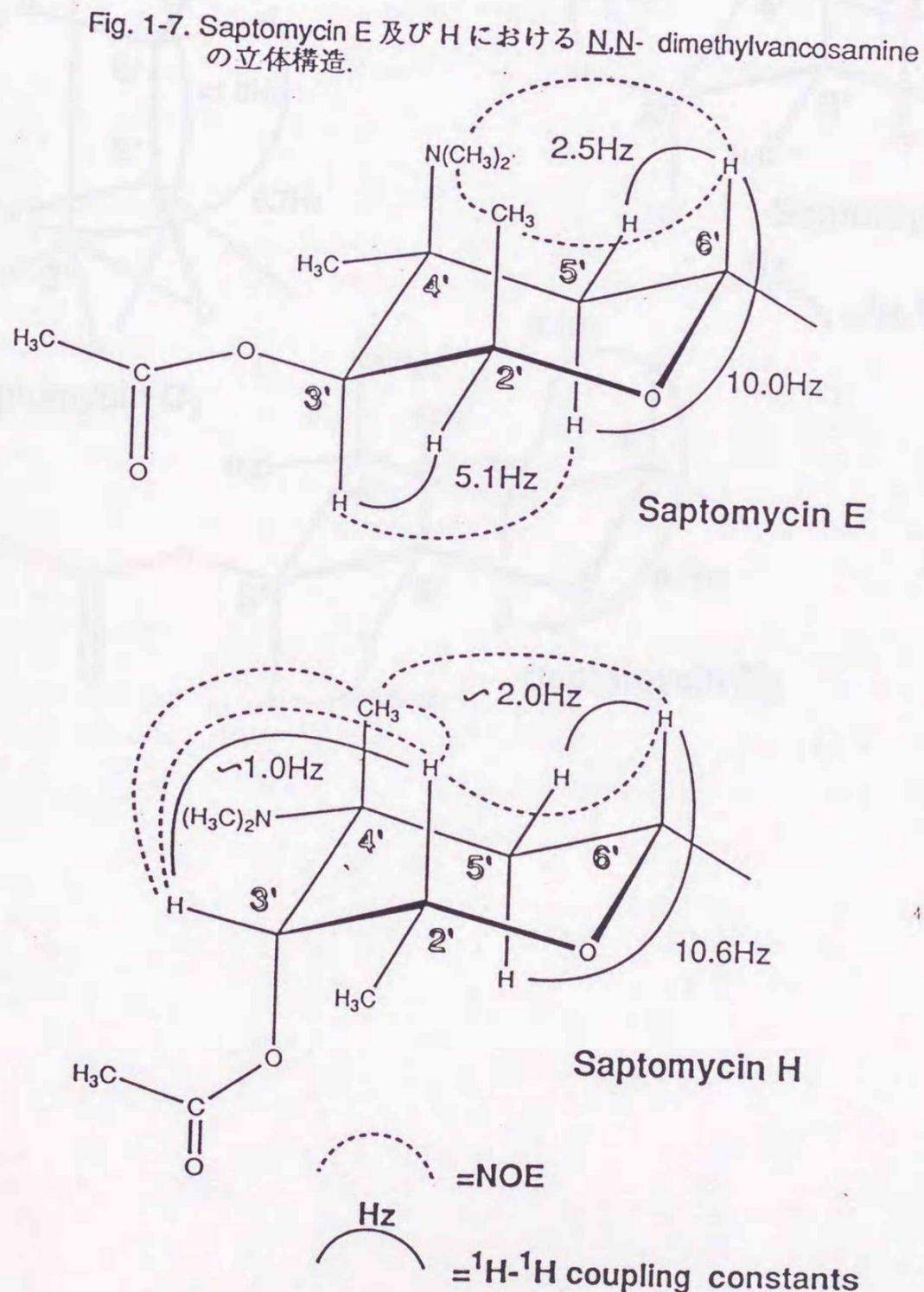
Fig. 1-6. Saptomycin D 及び Deacetylsaptomycin D における N,N -dimethylvancosamine の立体構造.



NOE (dashed arrow)

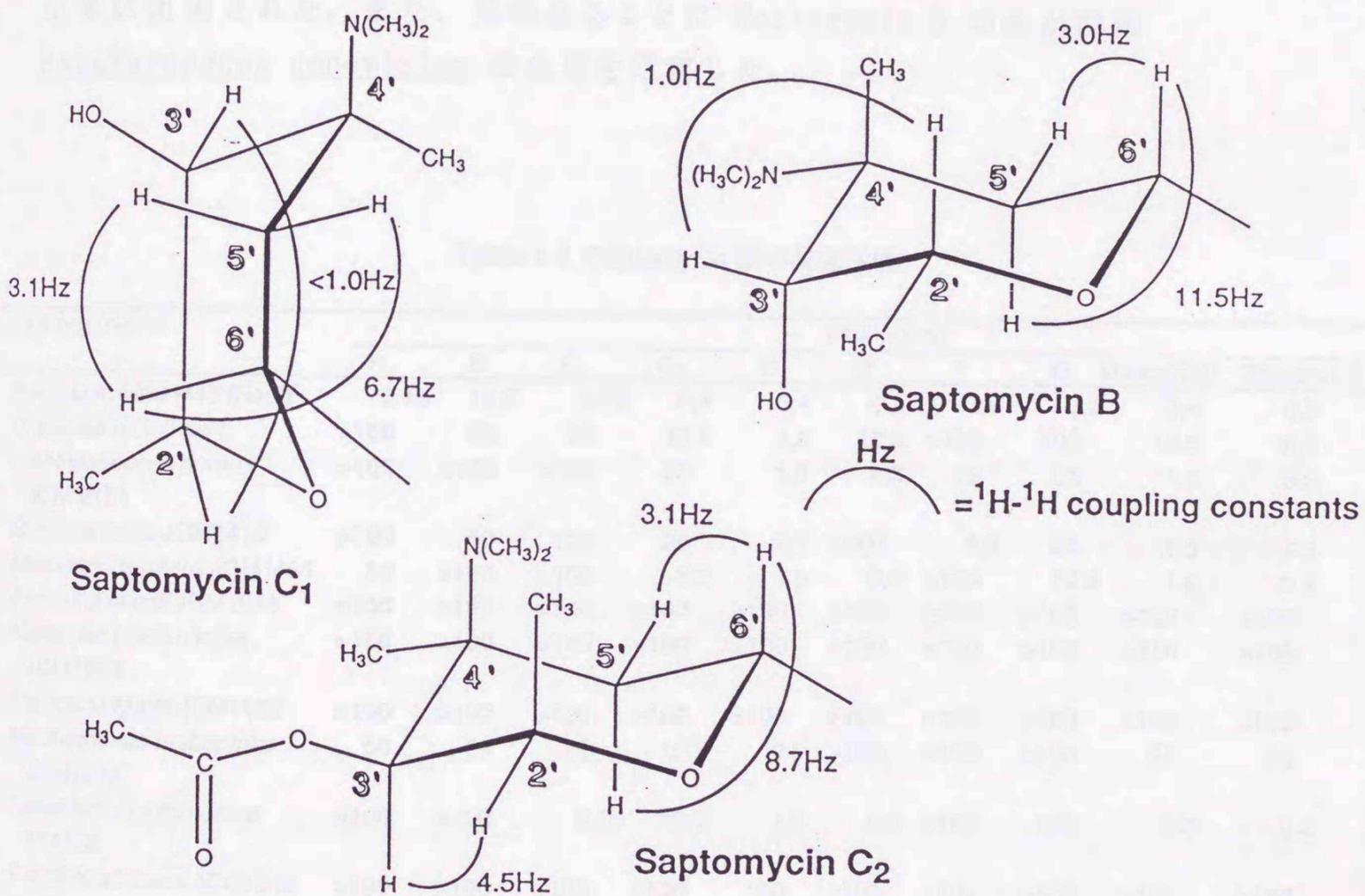
 Coupling constants (Hz) (solid arrow)

Saptomycin H は 6-3 に述べたように、Saptomycin E の C-6' 位の立体配置異性体であることが示された。Saptomycin H の *N,N*-dimethylvancosamine 部分の立体配座の決定は、Saptomycin E との NOESY 実験並びに、 ^1H NMR スペクトルの ^1H - ^1H 結合定数の比較をもとに行った。Saptomycin H において 6'-H は 5'-H_a 並びに 5'-H_b と $J_{5'-a-6'} = 10.6\text{Hz}$ 、 $J_{5'-b-6'} < 2.0\text{Hz}$ の結合定数を示し、2'-H と 3'-H の結合定数は $J_{2'-3'} < 1.0\text{Hz}$ を示した。NOESY 実験において 4'-CH₃、2'-H、6'-H の間に 1,3,5-triaxial cross peak が認められ、4'-CH₃/3'-H 間並びに 2'-H/3'-H 間に NOE を認めた。以上の結果より Saptomycin H の *N,N*-dimethylvancosamine 部分は、Saptomycin E とは違ったタイプのイス型立体配座をとると決定した。以上の結果を、Fig. 1-7 に示す。



Saptomycin E、H、Deacetylsaptomycin E の N,N-dimethylvancosamine 部分の検討より これに対応する Saptomycin C₂、B、C₁ の N,N-dimethylvancosamine 部分の構造を Fig. 1-8 に示すように決定した。

Fig. 1-8. Saptomycin B, C₁ 及び C₂ における N,N-dimethylvancosamine の立体構造.



第8節 Saptomycin 類の生物活性

Saptomycin 類の細胞障害活性、抗腫瘍活性並びに抗菌活性を検討した。

8-1 Saptomycin 類の抗菌活性

Saptomycin A ~ G 並びに Deacetylsaptomycin D、E の MIC (minimal inhibitory concentration) を Table 1-7 に示す。Saptomycin H は収量が少なかったため MIC の測定ができなかった。結果として、Saptomycin 類すべてにより組換え欠損株 (recombination deficient strain) *Bacillus subtilis* M45 の生育は阻害された。また、興味あることに Saptomycin D のみが酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育を阻害した。

Table 1-7. Saptomycin 類の抗菌活性.

| Test organisms | MIC (μg/ml) | | | | | | | | | |
|---|-------------|------|----------------|----------------|------|------|------|------|------------|------------|
| | A | B | C ₁ | C ₂ | D | E | F | G | Deacetyl-D | Deacetyl-E |
| <i>Bacillus subtilis</i> M45 (Rec ⁻) ^a | 3.13 | 12.5 | 3.13 | 6.4 | 0.4 | 0.2 | 1.6 | 3.2 | 0.4 | 0.2 |
| <i>B. subtilis</i> H17 (Rec ⁺) | >100 | 50 | 25 | 12.5 | 3.2 | 12.5 | >100 | 100 | 12.5 | 6.3 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> JCM2151 | >100 | >100 | >100 | 25 | 1.6 | 6.3 | 25 | 50 | 1.6 | 3.2 |
| <i>S. epidermidis</i> JCM2414 | >100 | 50 | 100 | 25 | 3.2 | >100 | 6.3 | 25 | 6.3 | 6.3 |
| <i>Micrococcus luteus</i> JCM1464 | 50 | >100 | >100 | 3.2 | 1.6 | 0.8 | >100 | 12.5 | 1.6 | 0.4 |
| <i>Escherichia coli</i> JCM1649 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM1662 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Proteus vulgaris</i> JCM1668 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Xanthomonas maltophilia</i> JCM1975 | 50 | 50 | 25 | 12.5 | 3.2 | >100 | >100 | >100 | 50 | 25 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 | >100 | >100 | 6.25 | 12.5 | 1.6 | 0.8 | >100 | 100 | 3.2 | 0.4 |
| <i>Candida albicans</i> JCM1542 | >100 | >100 | >100 | >100 | 100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCM1499 | >100 | >100 | >100 | >100 | 6.3 | >100 | >100 | >100 | 50 | >100 |

^a Recombination deficient.

8-2 Saptomycin 類の細胞障害活性

Saptomycin A ~ H 並びに Deacetylsaptomycin D、E の *in vitro* 細胞障害活性を MTT (microculture tetrazolium) 法により検討し、50%増殖阻害活性 (IC₅₀) 値をプロビット法で求めた。Saptomycin A 以外の化合物は投与量に依存した活性を示した。特に、Saptomycin D、E、H、Deacetylsaptomycin D 及び E は強い活性を示した。

Table 1-8. Saptomycin 類の *In vitro* 細胞障害活性.

| Cell lines | IC ₅₀ value (µg/ml) | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-----|----------------|----------------|-------|-------|-----|------|-------|------------|------------|
| | A | B | C ₁ | C ₂ | D | E | F | G | H | Deacetyl-D | Deacetyl-E |
| P388 (Leukemia) | >100 | 3.4 | 0.30 | 0.32 | 0.035 | 0.042 | 1.7 | 0.11 | 0.025 | 0.0043 | 0.0087 |
| Meth-A (Fibrosarcoma) | ND | ND | ND | 0.43 | 0.12 | 0.047 | 3.4 | 0.58 | 0.032 | 0.053 | 0.028 |
| A549 (Lung carcinoma) | 100 | 9.5 | 0.85 | 0.52 | 0.075 | 0.058 | 2.4 | 0.69 | 0.035 | 0.020 | 0.032 |
| PC-3 (Lung carcinoma) | >100 | 13 | >1.0 | 0.46 | 0.10 | 0.11 | 2.5 | 0.73 | 0.049 | 0.051 | 0.032 |
| MKN45 (Gastric carcinoma) | 100 | 5.3 | 0.48 | 0.33 | 0.047 | 0.042 | 1.9 | 0.14 | 0.020 | 0.018 | 0.012 |
| MKN74 (Gastric carcinoma) | >100 | 6.0 | 0.85 | 0.54 | 0.064 | 0.079 | 2.5 | 0.20 | 0.036 | 0.036 | 0.029 |
| SW48 (Colorectal carcinoma) | >100 | 6.0 | 0.57 | 0.91 | 0.069 | 0.052 | 1.9 | 0.21 | 0.024 | 0.023 | 0.019 |
| WiDr (Colorectal carcinoma) | 80 | 5.6 | 0.51 | 0.67 | 0.057 | 0.052 | 2.3 | 0.11 | 0.021 | 0.020 | 0.012 |

120hr culture in RPMI1640 10%FBS, MTT assay, IC₅₀ value was calculated with Probit's method.

ND: not determined

8-3 Saptomycin 類の抗腫瘍活性

マウス実験腫瘍系及びヌードマウス可移植性ヒト癌細胞を用い Saptomycin 類の抗腫瘍活性について検討した。以下に検討した腫瘍細胞、マウス並びに実験系を示す。

| 細胞 | マウス | 実験系 |
|--------------------|------------------|-------|
| Meth A 繊維肉腫 (マウス) | CDF ₁ | ip-ip |
| P388 白血病 (マウス) | CDF ₁ | ip-ip |
| ルイス肺癌(LL) (マウス) | BDF ₁ | ip-ip |
| Colon 26 結腸癌 (マウス) | CDF ₁ | ip-ip |
| B16 黒色肉腫 (マウス) | C57/b | ip-ip |
| MKN45 胃癌 (ヒト) | ヌードマウス | sc-ip |
| WiDr 大腸癌 (ヒト) | ヌードマウス | sc-ip |

ip-ip: 腹腔内移植腹腔内投与

sc-ip: 皮下移植腹腔内投与

8-3-1 Meth A 担癌マウスに対する延命効果

Saptomycin A ~ G、Deacetylsaptomycin D、E の Meth A 担癌マウスに対する延命効果を ip-ip 系で検討した結果を Table 1-9 に示した。Saptomycin A、B 及び G については活性がないか、あるいは弱いものであったが、Saptomycin C₁、C₂、D、E、F 及び Deacetylsaptomycin D、E は担癌マウスに延命効果を示した。

Table 1-9. Saptomycin 類のMeth A に対する延命効果.

| Dose(mg/kg) | T/C (%) | | | | | | | | | |
|-------------|---------|-----|----------------|----------------|------|------|-----|-----|------------|------------|
| | A | B | C ₁ | C ₂ | D | E | F | G | Deacetyl-D | Deacetyl-E |
| 50.0 | 110 | - | - | - | - | - | 151 | - | - | - |
| 20.0 | - | - | - | - | - | >192 | - | 123 | - | 83 |
| 10.0 | - | 108 | 177 | - | - | >196 | - | 115 | - | >187 |
| 5.0 | - | 100 | 185 | >196 | - | 127 | - | 123 | - | 183 |
| 2.5 | - | 100 | 177 | >196 | - | 104 | - | 112 | - | - |
| 2.0 | - | - | - | - | >215 | - | - | - | 185 | - |
| 1.25 | - | 92 | 208 | >193 | - | - | - | - | - | 107 |
| 1.0 | - | - | - | - | 192 | - | - | - | 123 | - |
| 0.6 | - | - | - | 193 | - | - | - | - | - | - |
| 0.5 | - | - | - | - | 123 | - | - | - | 108 | - |
| 0.25 | - | - | - | - | 108 | - | - | - | 92 | - |

Six mice (CDF₁, female) were inoculated ip with 1x10⁶ Meth-A cells on day 0. Each sample dissolved in CH₃OH - PBS(-) (1 : 9) was administered ip on day 1 - 4. The increase in life span was indicated as T/C (%).

8-3-2 P388 担癌マウスに対する延命効果

Saptomycin C₁、C₂、D、E 及び Deacetylsaptomycin D の P388 担癌マウスに対する延命効果を ip-ip 系で検討した (Table 1-10)。Saptomycin C₁、C₂ 及び E において T/C が上昇していた。

Table 1-10. Saptomycin 類のP388 に対する延命効果.

| Dose(mg/kg) | T/C (%) | | | | |
|-------------|----------------|----------------|-----|-----|------------|
| | C ₁ | C ₂ | D | E | Deacetyl-D |
| 15.0 | - | - | - | 125 | - |
| 5.0 | 129 | 129 | 113 | - | 78 |
| 2.5 | 129 | 129 | 113 | - | 100 |
| 1.25 | 107 | 114 | 100 | - | 100 |
| 0.63 | 114 | 129 | 106 | - | 100 |

Six mice (CDF₁, female) were inoculated ip with 1x10⁶ P388 cells on day 0. Each sample dissolved in CH₃OH - PBS(-) (1 : 9) was administered ip on day 1 - 4. The increase in life span was indicated as T/C (%).

8-3-3 Saptomycin D の各種マウス実験腫瘍系に対する延命効果

Meth A の系において最も強い活性を示した Saptomycin D について P388、LL、Colon 26 及び B16 の4種マウス腫瘍系に対する効果を ip-ip 系で検討した。この結果を Table 1-11 に示す。

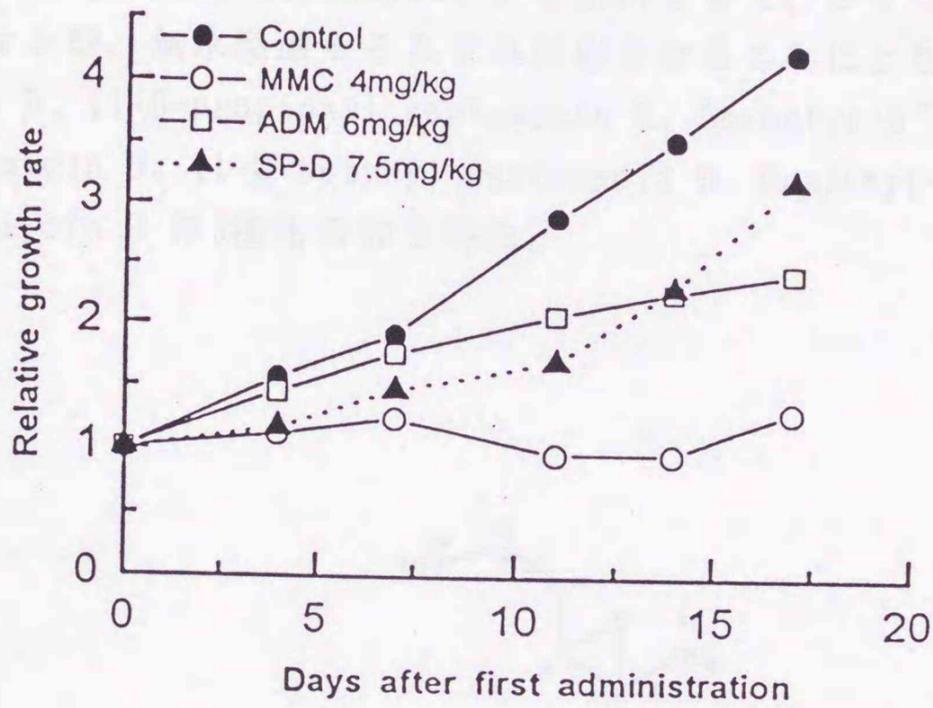
Table 1-11. Saptomycin D の抗腫瘍活性.

| Dose(mg/kg) | T/C (%) | | | |
|-------------|---------|-----|----------|-----|
| | P388 | LL | Colon 26 | B16 |
| 2.0 | 133 | 131 | 107 | 97 |
| 1.0 | 107 | 131 | 113 | 121 |
| 0.5 | 107 | 94 | 107 | 110 |
| 0.25 | 107 | 94 | 110 | 118 |

Each sample dissolved in CH₃OH - PBS(-) (1 : 9) was administered ip on day 1, 4 and 7. The increase in life span was indicated as T/C (%).

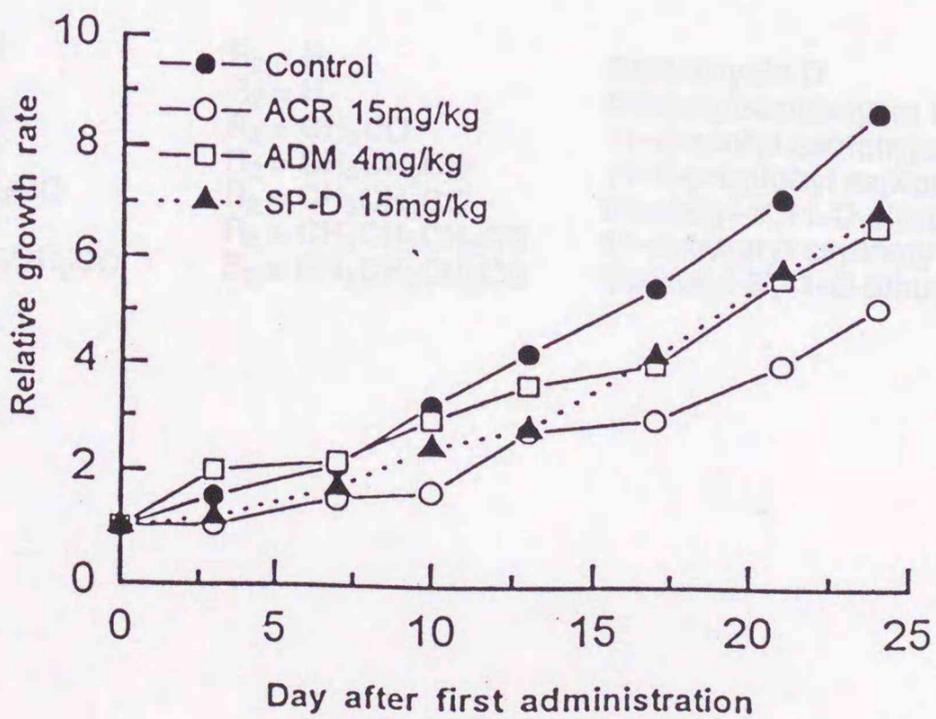
8-3-4 Saptomycin D のヒト固形腫瘍 (MKN45, WiDr) に対する抗腫瘍活性
MKN45、WiDr に対する Saptomycin D の増殖抑制効果を、ヌードマウスを用い
た sc-ip の系で検討した。結果を Fig. 1-9、1-10 に示す。Saptomycin D は
Adriamycin、Aclacinomycin A と同じ程度の抑制傾向を示した。

Fig. 1-9. MKN45に対するSaptomycin Dの増殖抑制効果



MMC= Mitomycin C
ADM= Adriamycin
ACR= Aclacinomycin A
SP-D= Saptomycin D

Fig. 1-10. WiDrに対するSaptomycin Dの増殖抑制効果



9-2 Acyl 化誘導体の細胞障害活性

調製した Acyl 化誘導体を用いて *in vitro* 細胞障害活性を検討した。結果を Table 1-12 に示す。propionyl 基を 3', 11 位に導入したものが最も強い活性を示した。

Table 1-12. Saptomycin D Acyl化誘導体の *In vitro* 細胞障害活性 .

| Cell lines | IC ₅₀ value (ng/ml) | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|--------|
| | 3'-O- 11-O- | Ac Ac | Pr Pr | Ac Pr | Bu Bu | Ac Bu | Ac H | H H |
| P388 (Leukemia) | | 17.9 | 7.2 | 30.6 | 11.8 | 19.0 | 35.0 | 4.3 |
| Meth A (Fibrosarcoma) | | 134.2 | 96.8 | 147.5 | 260.0 | 143.6 | 120.0 | 53.0 |
| A549 (Lung carcinoma) | | 40.6 | 14.6 | 51.4 | 44.9 | 35.4 | 75.0 | 20.0 |
| PC-3 (Lung carcinoma) | | 38.9 | 15.9 | 41.9 | 36.4 | 35.3 | 100.0 | 51.0 |
| MKN45 (Gastric carcinoma) | | 14.6 | 9.5 | 31.1 | 16.0 | 14.1 | 47.0 | 18.0 |
| MKN74 (Gastric carcinoma) | | 43.0 | 26.2 | 105.3 | 51.6 | 53.8 | 64.0 | 36.0 |
| SW48 (Colorectal carcinoma) | | 42.6 | 15.9 | 47.9 | 32.5 | 26.3 | 69.0 | 23.0 |
| WiDr (Colorectal carcinoma) | | 30.7 | 14.8 | 143.1 | 269.5 | 34.6 | 57.0 | 20.0 |

120hr culture in RPMI1640 10%FBS, MTT assay, IC₅₀ value was calculated with Probit's method.

Ac=CH₃CO- Pr=CH₃CH₂CO- Bu=CH₃CH₂CH₂CO-

9-3 Acyl 化誘導体の P388 並びに Meth A 担癌マウスに対する延命効果
 Acyl 化誘導体の P388 並びに Meth A に対する延命効果を検討した (Table 1-13)。P388 に対しては全ての化合物が無効であったが、Meth A に対しては、Deacetyl-3',11-O-dibutyryl saptomycin D を除く化合物は強い延命効果を示した。

Table 1-13. Saptomycin D Acyl化誘導体のMeth A、P388に対する抗腫瘍活性。

| 3'-O- | 11-O- | T/C (%) | |
|-------|-------|---------|--------|
| | | P388 | Meth A |
| Ac | Ac | 113 | >200 |
| Pr | Pr | 113 | >185 |
| Ac | Pr | 113 | 174 |
| Bu | Bu | 113 | 104 |
| Ac | Bu | 113 | >185 |

20 mg/kg of each sample dissolved in CH₃OH - PBS(-) (1:9) was administered ip on day 1-4. The increase in life span was indicated as T/C (%).

Ac=CH₃CO- Pr=CH₃CH₂CO- Bu=CH₃CH₂CH₂CO-

9-4 Acyl 化誘導体のヒト固形腫瘍 (WiDr) に対する抗腫瘍活性
 Deacetyl-3',11-O-dibutyryl saptomycin D を除く Acyl 化誘導体の WiDr に対する増殖抑制効果を、Saptomycin D 並びに Deacetylsaptomycin D と共にヌードマウスを用いた sc-ip の系で検討した (Table 1-14)。陽性コントロールとしての Mitomycin C に比較して有意な活性を示すと判断される化合物は認められな

Table 1-14. Saptomycin D Acyl化誘導体のWiDrに対する増殖抑制効果。

| 3'-O- | 11-O- | T/C (%) | | |
|------------------------|-------|---------|-------|-------|
| | | Day0 | Day10 | Day14 |
| Ac | Ac | 100 | 108 | 115 |
| Pr | Pr | 100 | 128 | 110 |
| Ac | Pr | 100 | 100 | 108 |
| Ac | Bu | 100 | 119 | 131 |
| MMC (positive control) | | 100 | 60 | 32 |

20 mg/kg of each sample dissolved in CH₃OH - PBS(-) (1:9) was administered ip on day 1, 4 and 7. The increase in life span was indicated as T/C (%).

Ac=CH₃CO- Pr=CH₃CH₂CO- Bu=CH₃CH₂CH₂CO-

第10節 考察

千葉県市川市の土壌より分離した一放線菌 *Streptomyces* sp. HP530 株が強い抗腫瘍活性を示す Pluramycin 類似の新規化合物 Saptomycin A、B、C₁、C₂、F の5化合物を生産することを見いだした。構造解析の結果、これらの化合物は、既知の Pluramycin 群の化合物と2位の置換基にのみ、その違いを認めるものであった。Pluramycin 群の化合物は特徴として、母核に 11-hydroxy-4H-anthraceno [1,2-b]pyran-4,7,12-trione を持つ化合物群で、1986年までは、この母核の8位に C-C 結合でアミノ糖 angolosamine、10位に同じく C-C 結合でアミノ糖 *N,N*-dimethylvancosamine が結合しているタイプの化合物、あるいは糖がまったくついていないタイプの化合物しか知られていなかった。バリエーションとしては、C₄あるいはC₈ユニットの2位の側鎖によるもの、13位の CH₃ が CH₂COOH に変化したもの (SS43405D⁶⁵⁾)、*N,N*-dimethylvancosamine の、3'-OH が Acetyl 化されているものと、アーティファクトと言われている *N,N*-dimethylvancosamine の 6' 位の立体配置の変化した化合物 (Isokidamycin⁷¹⁾)、angolosamineの光による分解産物である Photohedamycin A などの一連の化合物⁷⁸⁾ が知られているのみであった。具体的には、アグリコンのみの7化合物 (α -Indomycinone⁶³⁾、SF2330⁶⁴⁾、SS43405D⁶⁵⁾、及び E⁶⁶⁾、 β -Indomycinone、Rubiflavinone C-1 及び C-2⁶⁷⁾) と、2個のアミノ糖を持つ12化合物 (Pluramycin¹⁴⁾、Neopluramycin¹⁴⁾、Kidamycin⁷¹⁾、Hedamycin⁷⁹⁾、PD121,222⁷⁰⁾、Epoxykidamycin⁷⁴⁾、Rubiflavin A⁸⁰⁾、C-1、C-2、D、E⁶⁷⁾、SS21020C⁸⁹⁾) さらに Isokidamycin(Rubiflavin F) が知られており、それぞれの angolosamine が光により分解していくことにより、新たな構造を持った化合物へと変化することが明かとなっていた。今回、構造決定した Saptomycin A、B、C₁、C₂、F もこれらの系列に属する化合物であった。2位の側鎖の構造は、NMR 等のデータを詳細に検討し、既知化合物との比較より決定した。アグリコンのみの Saptomycin A、F の2位側鎖はそれぞれ 2-hydroxy-1-methyl-3-(Z)-pentenyl 基、1,2-epoxy-1-methyl-3-(Z)-pentenyl 基と決定し、2個のアミノ糖を持つ Saptomycin B、C₁、C₂ の2位側鎖は、1-methyl-3-(Z)-pentenyl 基と決定した。

一方1989年以降、これら従来の系列に属さないタイプの関連化合物が次々と発見された。1989年には Ankinomycin(Meiji Seika Kaisha)⁷³⁾、⁴A51493A(Eli Lilly and Company)⁸¹⁾、1990年には Altromycins(Abott Laboratories)⁷⁵⁾、DC 92-B(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)⁸²⁾、1991年には Sapurimycin(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)⁸³⁾ が報告された。アグリコンのみのタイプでも、Hydramycin (Bristol-Myers Squibb Research Institute)⁶⁸⁾ のように非常に活性の強い化合物が報告された。これらの事実は、従来のタイプとは違ったタイプの Plura-

mycin 群の化合物で、より強い活性を持った化合物がまだ発見される可能性があることを示唆した。中でも、Ankinomycin は *in vivo* で強い活性を示すことより、angolosamine の欠落したアミノ糖1個の化合物は制癌剤の候補として有望と思われた。

このような背景の中、Saptomycin A、B、C₁、C₂、F を生産する *Streptomyces* sp. HP530 株において、生産物が HPLC 分析で、異なったパターンを示す、自然変異によると思われる変異株の存在が明かとなった。この菌株を分離し、もとの菌株を親株、分離した菌株を変異株として変異株の生産物質の検討を行った。HPLC、TLC の挙動から、従来より知られているアミノ糖を持たないタイプと、2個のアミノ糖を持つタイプの、中間の極性を持つ化合物群を主として生産していることが示された。この性状は、唯一知られているモノアミノグリコシドであり、かつ、強力な抗腫瘍活性を示す Ankinomycin のタイプの化合物の可能性を示唆した。各種機器分析による構造解析の結果、Saptomycin D、E、G、H は予想通り Ankinomycin 類似のモノアミノグリコシドであった。しかし、2位の側鎖と、アミノ糖の3'位に Acetyl 基が置換していること、これに伴いアミノ糖部分の立体構造が変化していることが違いとして認められた。そこで、立体構造と生物活性を検討するため、Deacetylsaptomycin D 及び E を誘導し、比較検討を行った。その結果、Deacetyl 化により *N,N*-dimethylvancosamine の立体配座が chair form から、boat form に近い twist form の立体配座に変化することを明らかにし、Ankinomycin と2位の側鎖のみ異なる構造となることを示した。また、Saptomycin E の6'位の立体配置異性体である Saptomycin H との比較より Saptomycin H におけるアミノ糖の立体配座は Saptomycin E とは違うタイプの chair form をとることを明らかにした。これにより、シグナルの重なりなどから明確に決定することができなかった、Saptomycin B、C₁、C₂ の *N,N*-dimethylvancosamine の立体配座も決定した。絶対配置についての検討は行わなかった。

以前の報告において、Isokidamycin はアーティファクトの可能性があると報告されているが、Saptomycin 類の精製・単離に酸処理は行っていないこと、pH3.5 のリン酸緩衝液中で立体配置の変化は起きないこと、また、Saptomycin E を文献記載の方法⁷¹⁾により Saptomycin H に誘導しようとするすると2位の側鎖が先に変化し、複数の化合物が誘導されるが、原料 (Saptomycin E) が消費された時点において主な反応生産物は、アミノ糖部分にまったく変化を起こしていないことを確認した (データ未発表) ことなどから、立体配置の変化は、酵素的に誘導される可能性が高く、Saptomycin B 及び H は、アーティファクトではない可能性が高いと思われる。

Saptomycin 類の生物活性として、抗菌活性、細胞障害活性、*in vivo* 抗腫瘍活性の検討を行った。抗菌活性はグラム陽性菌に対し活性を示したが、特に DNA 修復能を欠損した *Bacillus subtilis* M45 に強い活性を示し、修復能を持つ *Bacillus subtilis* H18 に対する抗菌活性とに著しい差を示すことより、すべての Saptomycin 類に DNA 損傷を作用機作とする活性が認められた。構造的には、2位の側鎖に epoxide を持つ Saptomycin D、E 及び F 並びに D、E の Deacetyl 誘導体が、強い活性を示した。細胞障害活性は、Deacetylsaptomycin D、E に最も強い活性を認めた。一方、ジアミノグリコシドである Saptomycin C₁ と B では6^位での立体配置の違いにより10倍近く活性に差がでるが、モノアミノグリコシドである Saptomycin E と H においては、6^位での立体配置の違いからくる活性の違いはまったく認められなかった。光による構造変化、並びに立体配置の変化は1/50~1/100に活性の低下を引き起こすとの報告がある⁸⁴⁾。また、全体にモノアミノグリコシドに強い活性が見られたが、Saptomycin G はジアミノグリコシドの Saptomycin C₁、C₂ と同じ程度の活性しか示さなかった。今回の結果は、細胞障害活性において、2位の側鎖の違いと、8位と10位の2個のアミノ糖の存在の有無あるいは立体構造の違いなどが、お互いに作用しあって、そのバランスが活性の強弱を決定していることを示した。従って、最も強い細胞障害活性を示す化合物を得るためには、母核に結合している3個の置換体のバランスの調和を考えた構造活性相関を検討する必要があると思われる。

in vivo での抗腫瘍活性の検討は、マウス、ヒトの各種腫瘍細胞を移植したマウスに対して行った。マウス繊維肉腫 Meth A に対しての抗腫瘍活性は、細胞障害活性の結果との直接的な相関は認められなかった。最も強い活性を示したのは Saptomycin D であり、最も強い細胞障害活性を示した Deacetylsaptomycin E は Saptomycin C₁、C₂ よりも弱い活性しか示さなかった。Meth A に対して強い延命効果を示した Saptomycin C₁、C₂、D、E 及び Deacetylsaptomycin D のマウス白血病 P388 に対する延命効果を検討したが、有意な活性 (T/C >130%) を示す化合物は認められなかった。Saptomycin D はさらに、P388、LL、Colon26、B16 の4種のマウス腫瘍に対する抗腫瘍活性を検討した。この実験においては P388、LL に弱いながらも延命効果を示した。Saptomycin D は *in vitro* においては、ヒト腫瘍細胞 MKN45、WiDr に対し強い細胞障害活性を示すことから、⁴これらの固形腫瘍に対する増殖抑制活性も検討した。結果としては、Adriamycin、Aclacinomycin A と同程度の若干の抑制傾向を示すものの、Mitomycin C ほどの十分な抑制は示さなかった。以上の結果は、満足のいく結果ではなかったものの、細胞障害活性の強さから *in vivo* での活性の発現は何等かの工夫により実現できるものと考えられるため、さらに誘導体の検討を行った。

Ankinomycin について3'位と11位に炭素数1~5の Acyl 基を導入することにより細胞障害活性は低下するものの P388 に対する抗腫瘍活性の著しい上昇と毒性の軽減が認められたという報告がある⁸⁵⁾。そこで、Saptomycin D 及び Deacetylsaptomycin D についても炭素数1~4の Acyl 基の導入を検討した。Saptomycin D は3'位に Acetyl 基を持つことから、3'位、11位に長さの異なる Acyl 基を導入することによる効果も興味もたれた。細胞障害活性、Meth A、P388、WiDr に対する抗腫瘍活性の検討を行った。結果として、細胞障害活性においては、Deacetyl-3',11-dipropionyl saptomycin D で活性の上昇が認められたが、他の誘導体からは、Saptomycin D と同程度の活性しか得ることができなかった。*in vivo* の抗腫瘍活性は、Deacetyl-3',11-dibutyryl saptomycin D を除いて、Meth A に対し強い延命効果を示したが、P388、WiDr に対しては有意な活性は、どの化合物に対しても見られなかった。興味あることには、Ankinomycin で最も強い抗腫瘍活性を示した 3',11-dibutyryl 体が、Saptomycin D においては唯一抗腫瘍活性を示さなかった。この結果も、Saptomycin においては、部分的な構造変換による活性の上昇よりも、全体の構造的なバランスにおいて活性が増減する可能性の高さを示唆した。

結果として、目的とする臨床で有効な Saptomycin 関連化合物を、現在まで得るには至っていない。しかし、一連の化合物が Meth A に対して、特異的ともいえる強い抗腫瘍活性を示すことから、その抗腫瘍スペクトルに興味を持たれ、現在、より広範なヒト癌に対する抗腫瘍効果を検討するため、米国国立癌研究所 (NCI) において Saptomycin D の検討が行われている。この結果を受けて今後の方針の決定を行う予定である。

なお、本論では述べなかったが、Deacetylsaptomycin D は ^{13}C NMR において、溶媒が C_6D_6 と CDCl_3 では、2'位と6'位の化学シフトが逆転することを HMQC 並びに ^{13}C - ^1H HETCOR により確認した。このデータを実験部に記す。

第2章 実験部

本研究においては、主に以下の機器を使用してスペクトルの測定をおこなった。

- ・ NMR スペクトル
Varian VXR400 spectrometer
JEOL GSX-270 spectrometer
- ・ EI-MS 及び FAB-MS スペクトル
JEOL JMS-SX102 spectrometer
- ・ IR スペクトル
Hitachi 270-30 spectrometer
- ・ UV スペクトル
Hitachi 200-20 spectrometer
- ・ 旋光度
Horiba SEPA-200 spectrometer

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析・分取は、以下の機器により行った。

- ・ 分析
Hewlett-Packard HP1090 liquid chromatography system
- ・ 分析並びに分取
JASCO liquid chromatography system
RHEODYNE 7125 sample injector
JASCO 880-PU pump (×2)
JASCO 875-UV detector
JASCO 880-30 solvent mixing module
SIC Chromatocoder 12 integrator
GILSON Model 201 fraction collector

中圧液体クロマトグラフィーによる分取は、以下の機器により行った。

- ・ 分取
Yamazen corp. No.540-SY-2CSC pump
Yamazen corp. prepUV-10V.HC detector
Yamazen corp. SS-100 recorder
ADVANTEC SF2120 fraction collector

各種クロマトグラフィーは以下の担体を用いた。

・シリカゲル薄層クロマトグラフィー

Merck Kiesel gel 60 F₂₅₄ Art. No. 5715

Merck Kiesel gel 60 F_{254s} Art. No. 5554

Merck Kiesel gel 60 F_{254s} Art. No. 13794

・中圧カラムクロマトグラフィー

YMC ODS-AQ 120-S50

・高速液体クロマトグラフィー

Shiseido Capcell pak C18 SG120 (4.6φ×250 mm)

その他、検討過程並びに大量分取時には、以下の担体等を適宜使用した。

・シリカゲルクロマトグラフィー

Merck Kiesel gel 60 Art. No. 9385

Wako Wakogel C-200

・中圧カラムクロマトグラフィー

Wako Wakogel FC-40

・高速液体クロマトグラフィー

Waters prep. Nova pak HR C18 (25φ×100 mm)

Shiseido Capcell pak C18 SG120 (6.0φ×250 mm)

第1節 生産菌の分離

HOP JUICE 33%、agar 1.5%より成る培地をpH7.2に調整し、これを分離培地として、千葉県市川市の土壌より分離した。さらに、培養を繰り返す過程におけるHPLCを用いた生産物の分析から、生産物のパターンの変化した菌株が混在することが明かとなった。そこで、単孢子分離によりこれら2種の菌株を分離し、少なくとも90%以上を占める優勢な菌株をHP530株・親株とし、劣勢な菌株をHP530株・変異株とした。

第2節 生産菌の分類

Saptomycin類を生産する菌株の形態的並びに生理学的特徴は、ShirlingとGottliebの方法に従って評価した⁸⁶⁾。細胞壁の分析は、Beckerらの方法⁸⁷⁾及びYamaguchiの方法⁸⁸⁾により実施した。炭素源の資化性はPridham and Gottlieb's培地上での生育により検討した⁸⁹⁾。

第3節 生産菌の培養

HP530・親株、並びに変異株は同じ条件下において培養した。

3-1 生産培地

glucose 0.5%、oatmeal 3.0%、Pharma media 1.0%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%、 $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.002%、 $CaCO_3$ 0.3%より成る培地をpH7.0に調整して用いた。

3-2 培養

上記生産培地100mlを500ml三角フラスコに分注して121℃、15分滅菌した。このフラスコに凍結乾燥した菌体を植菌し4日間、30℃で培養し1次種培養液とした。次に、同じ培地を500mlずつ分注し、滅菌した3本の3L三角フラスコに20mlずつ1次種培養液を植菌し同じく4日間、30℃で培養し2次種培養液とした。さらに、15Lの同培地を張り込んだ30Lジャーファメンター3基に2次種培養液を3%容と成るように植菌した。250rpmの回転数、1vvmの通気量、30℃で親株は96時間、変異株は、72時間の通気攪拌培養を行った。

第4節 生産物のHPLC分析

4-1 サンプルの調製

親株、変異株それぞれの培養液を20mlサンプリングし3,000rpmで、15分間遠心分離した。上澄液を除いた菌体を含む固形分を20mlのアセトンに30分間浸漬した後、3,000rpmで、15分間遠心分離した。濾過した遠心上澄液は、減圧下濃縮乾固した。このアセトン抽出部を20mlの蒸留水に溶解し、40mlの酢酸エチルで抽出した。

酢酸エチル抽出部を濃縮乾固した後、1.0mlのメタノールに溶解し、サンプルとした。

4-2 HPLC 分析

以下の条件により、分析を行った。

カラム：Capcell pak C18 SG120 (4.6×250 mm, Shiseido Co. Ltd.)

溶媒：0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)-CH₃OH (6:4→2:8 linear gradient for 20minutes and then isocratic elution with 2:8 for 40 minutes.)

流速：1.0ml/min.

検出：UV 395nm

第5節 Saptomycin 類の精製・単離

5-1 Saptomycin A、B、C₁、C₂、F の精製・単離

HP530・親株を第3節の方法で培養して得られた培養液をシャープレス型遠心濾過装置により菌体を含むケーキと濾液とに分離し、得られた菌体を含むケーキを80%アセトン5Lに浸漬した。室温中3時間攪拌後、菌体等固形分を濾過により除去し、アセトン抽出液を得た。抽出液より減圧下アセトンを除去、10倍濃縮し500mlとした。この濃縮液を1.5 Lのn-ヘキサンで洗浄後、残部を1.5L酢酸エチルで抽出を行った。このn-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮し油状抽出物3.1gを得た。得られた油状抽出物を少量の酢酸エチルに溶解し、化学修飾シリカゲル (ODS-AQ 120-S50, YMC) 600mlを充填したカラムに付しCH₃CN-H₂O混合液 (85:15) で展開溶出するクロマトグラフィーを行った。活性を示す画分をまとめ、減圧下乾固することにより純粋な Saptomycin A 及び F をそれぞれ24.0mg、11.0mg得た。一方、酢酸エチル層も無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で濃縮、油状抽出物1.8gを得た。得られた油状抽出物を少量のメタノールに溶解し、化学修飾シリカゲル (YMC ODS-AQ 120-S50) 500mlを充填したカラムにのせ0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)-CH₃OH混合液 (1:1)、0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)-CH₃OH混合液 (2:3) で順次溶出、洗浄した。さらに0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)-CH₃OH混合液 (3:7)、0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)-CH₃OH混合液 (1:4) で展開溶出するクロマトグラフィーを行った。このクロマトグラフィーにおいては Saptomycin C₁、Saptomycin C₂ 次いで Saptomycin B の順に溶出する。それぞれの物質を含む画分をまとめ減圧下で濃縮乾固し、油状活性画分を得た。それぞれの油状活性画分を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲル分取用薄層板 (Kiesel gel 60, F₂₅₄S, NO.13794, Merck) 上へのせ、CHCl₃-CH₃OH 混合液 (Saptomycin C₂; 9:1, 1% NH₄OH を含む、Saptomycin B 及び C₁; 8:2, 1% NH₄OH を含む) により展開するクロマトグラフィーを

行った。それぞれの薄層板からかきとったシリカゲルより、クロロホルムを用いて溶出を行い、得られたクロロホルム溶液を減圧下濃縮し、メタノールを加えたところ Saptomycin B 及び C₁ は黄赤色の沈澱を生じ、一方、Saptomycin C₂ は黄色の沈澱を生じた。それぞれの沈澱を濾過にて集めヘキサンで洗浄、減圧乾燥して純粋な Saptomycin B、C₁、C₂ を黄赤色粉末または黄色粉末としてそれぞれ 3.4mg、15.7mg、10.6mg 得た。

5-2 Saptomycin D、E、G、H の精製・単離

HP530・変異株を第3節の方法により培養後、培養液をシャープレス型遠心濾過装置により菌体を含むケーキと濾液とに分離し、得られた菌体を含むケーキを80%アセトン10Lに浸漬した。室温中3時間攪拌後、菌体等固形分を濾過により除去し、アセトン抽出液を得た。抽出液より減圧下アセトンを除去、10倍濃縮し1,000mlとした。この濃縮液を3.0Lのn-ヘキサンで洗浄後、残部を3.0L酢酸エチルで抽出を行い、この酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で濃縮、油状抽出物7.5gを得た。得られた油状抽出物を少量のメタノールに溶解し、化学修飾シリカゲル(YMC ODS-AQ 120-S50) 1,000mlを充填したカラムにのせ0.15%KH₂PO₄(pH3.5)-CH₃OH混合液(1:1)、0.15%KH₂PO₄(pH3.5)-CH₃OH混合液(2:3)、0.15%KH₂PO₄(pH3.5)-CH₃OH混合液(3:7)で順次溶出、洗浄した。さらに0.15%KH₂PO₄(pH3.5)-CH₃OH混合液(1:4)で展開溶出するクロマトグラフィーを行った。このクロマトグラフィーにおいては Saptomycin E、次いで Saptomycin E と H の混合画分、Saptomycin D、Saptomycin G が順次溶出する。それぞれの物質を含む画分をまとめ減圧下で濃縮乾固し、油状活性画分を得た。それぞれの油状活性画分を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲル分取用薄層板(Kiesel gel 60, F₂₅₄S, Art. NO. 13794)上にのせ、CHCl₃-CH₃OH 混合液(Saptomycin E 及び H; 100:1, 1% NH₄OH を含む、Saptomycin D; 99:1, 1% NH₄OH を含む、Saptomycin H; 95:5, 1% NH₄OH を含む)により展開するクロマトグラフィーを行った。薄層板からかきとったそれぞれの物質を含むシリカゲルより、クロロホルムを用いて溶出を行った。得られたクロロホルム溶液を減圧下濃縮し、メタノールを加えたところ Saptomycin D を含む画分からは黄赤色の沈澱が、Saptomycin E、G、H を含む画分からは黄色粉末がそれぞれ生じた。それぞれの沈澱を濾過にて集めヘキサンで洗浄、減圧乾燥して純粋な Saptomycin D、E、G、H の黄赤色または黄色粉末をそれぞれ 36.1mg、22.6mg、2.1mg、3.5mg 得た。

第6節 Saptomycin 類の物理化学定数及びスペクトルデータ

Saptomycin 類の物理化学定数は、Table 1-4、1-5 及び 1-6 にまとめた。以下に章末にまとめたスペクトルのチャート番号を示す。

6-1 Saptomycin A のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 1 (EI)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 2
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 3
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 4
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 5

6-2 Saptomycin B のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 6 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 7
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 8
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 9
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 10

6-3 Saptomycin C₁ のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 11 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 12
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 13
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 14
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 15

6-4 Saptomycin C₂ のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 16 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 17
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 18
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 19
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 20

6-5 Saptomycin D のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 21 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 22
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 23
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 24

- ・炭素核核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 25
- ・DEPT スペクトル: Chart 26
- ・ ^1H - ^1H COSY スペクトル: Chart 27
- ・ ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトル: Chart 28
- ・NOESY スペクトル: Chart 29

6-6 Saptomycin E のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 30 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 31
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 32
- ・水素核核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 33
- ・炭素核核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 34
- ・NOESY スペクトル: Chart 35

6-7 Saptomycin F のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 36 (EI)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 37
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 38
- ・水素核核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 39
- ・炭素核核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 40

6-8 Saptomycin G のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 41 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 42
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 43
- ・水素核核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 44
- ・炭素核核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 45

6-9 Saptomycin H のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 46 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 47
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 48
- ・水素核核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 49
- ・炭素核核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 50
- ・NOESY スペクトル: Chart 51

第7節 Deacetylsaptomycin D 及び E の誘導並びに物理化学定数及びスペクトルデータ

7-1 Deacetylsaptomycin D の誘導

14.3mgの Saptomycin D をメタノール28mlに溶解し、室温下48時間攪拌した。反応終了後、メタノールを減圧下濃縮した。ほぼ定量的に得られた黄赤色の粉末を、分取用 TLC プレート (Kiesel gel 60 Art. NO. 13794, Merck) を用い、 CHCl_3 - CH_3OH (9:1) 混合液で展開し精製した。結果として、黄赤色粉末として12.3mgの Deacetylsaptomycin D を得た。

7-2 Deacetylsaptomycin D の物理化学定数及びスペクトルデータ

- ・形状: Yellowish red powder
- ・旋光度: $[\alpha]_D^{20} +271^\circ$ (c 0.1, CHCl_3)
- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 52 (FAB-Pos.)
 m/z 574 ($\text{M}+\text{H}$)⁺
- ・高分解能質量 (MS) スペクトル:
 m/z 574.2408 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{NO}_8$: 574.2441
- ・紫外外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 53
 λ_{max} (CH_3OH) nm (ϵ) 246(51,600), 265(sh 29,000), 418(9,800)
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 54
 ν_{max} (KBr) cm^{-1} 3460, 1680, 1640, 1600
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 55
(C_6D_6 , 400MHz) δ 13.61(1H, s, 11-OH), 7.93(1H, d, $J=8.0$, 9-H), 7.92(1H, s, 6-H), 7.90(1H, d, $J=8.0$, 8-H), 6.52(1H, s, 3-H), 5.73(1H, dd, $J=6.1$ and 7.3, 6'-H), 5.66(1H, ddq, $J=11.1, 7.1$ and 1.2, 18-H), 5.27(1H, ddq, $J=7.5, 11.1$ and 1.8, 17-H), 4.03(1H, dd, $J=7.5$ and 1.2, 16-H), 3.96(1H, dq, $J=2.8$ and 6.5, 2'-H), 3.31(1H, d, $J=2.8$, 3'-H), 2.85(3H, s, 13- H_3), 2.41(1H, dd, $J=13.7$ and 6.1, 5'- H_b), 1.91(6H, s, 4'- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.87(1H, dd, $J=13.7$ and 7.3, 5'- H_a), 1.63(3H, s, 15- H_3), 1.61(3H, d, $J=6.5$, 2'- CH_3), 1.60(3H, dd, $J=7.1$ and 1.8, 19- H_3), 0.68(3H, s, 4'- CH_3)
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 56(C_6D_6 , 400MHz), 57(CDCl_3 , 400MHz)
データは、Table 1-15 にまとめて示す。
- ・ ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトル:
Chart 58 (C_6D_6 , 400MHz), 59 (CDCl_3 , 400MHz)
- ・NOESY スペクトル: Chart 60

7-3 Deacetylsaptomycin E の誘導

8.0mgの Saptomycin E をメタノール16mlに溶解し、室温下48時間攪拌した。反応終了後、メタノールを減圧下濃縮した。ほぼ定量的に得られた黄色の粉末を、分取用 TLC プレート (Kiesel gel 60 Art. NO. 13794) を用い、 CHCl_3 - CH_3OH (9:1) 混合液で展開し精製した。結果として、黄色粉末として5.5mgの Deacetyl saptomycin E を得た。

7-4 Deacetylsaptomycin E の物理化学定数及びスペクトルデータ

- ・形状 : Yellow powder
- ・旋光度 : $[\alpha]_D^{20} +159^\circ$ (c 0.1, CHCl_3)
- ・質量 (MS) スペクトル : Chart 61 (FAB-Pos.)
 m/z 548 ($\text{M}+\text{H}$)⁺
- ・高分解能質量 (MS) スペクトル :
 m/z 548.2311 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{NO}_8$: 548.2285
- ・紫外外部吸収 (UV) スペクトル : Chart 62
 λ_{max} (CH_3OH) nm (ϵ) 245(54,100), 266(sh 32,000), 415(11,000)
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル : Chart 63
 ν_{max} (KBr) cm^{-1} 3480, 1678, 1648, 1605
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル : Chart 64
(C_6D_6 , 400MHz) δ 13.73(1H, s, 11-OH), 7.94(1H, d, $J=8.0$, 9-H), 7.93(1H, s, 6-H), 7.90(1H, d, $J=8.0$, 8-H), 6.48(1H, s, 3-H), 5.74(1H, dd, $J=6.3$ and 7.3, 6'-H), 3.95(1H, dq, $J=2.8$ and 6.5, 2'-H), 3.31(1H, d, $J=2.8$, 3'-H), 2.96(1H, q, $J=5.4$, 16-H), 2.86(3H, s, 13- H_3), 2.43(1H, dd, $J=13.7$ and 6.3, 5'- H_b), 1.90(6H, s, 4'- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.90(1H, dd, $J=13.7$ and 7.3, 5'- H_a), 1.61(3H, d, $J=6.5$, 2'- CH_3), 1.56(3H, s, 15- H_3), 0.98(3H, d, $J=5.4$, 17- H_3)
0.67(3H, s, 4'- CH_3)
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル : Chart 65
データは、Table 1-15 にまとめて示す。
- ・NOESY スペクトル : Chart 66

Table 1-15. Deacetylsaptomycin D 及び E の ^{13}C NMR ケミカルシフト .

| Carbon | Chemical shifts (δ) | | |
|-----------------------------|--|---------------------|--|
| | Deacetylsaptomycin D (C_6D_6) | (CDCl_3) | Deacetylsaptomycin E (C_6D_6) |
| C-2 | 167.1 s | 167.5 s | 167.9 s |
| C-3 | 109.9 d | 109.7 d | 109.4 d |
| C-4 | 178.3 s | 179.0 s | 178.3 s |
| C-4a | 126.6 s | 126.5 s | 126.7 s |
| C-5 | 149.6 s | 149.9 s | 149.7 s |
| C-6 | 125.7 d | 125.8 d | 125.8 d |
| C-6a | 136.2 s | 136.2 s | 136.2 s |
| C-7 | 181.3 s | 181.5 s | 181.3 s |
| C-7a | 131.1 s | 130.7 s | 131.1 s |
| C-8 | 119.2 d | 119.2 d | 119.2 d |
| C-9 | 133.4 d | 134.0 d | 133.3 d |
| C-10 | 141.5 s | 140.5 s | 141.5 s |
| C-11 | 159.7 s | 159.5 s | 159.7 s |
| C-11a | 116.5 s | 116.1 s | 116.5 s |
| C-12 | 187.9 s | 187.7 s | 187.9 s |
| C-12a | 119.9 s | 119.8 s | 119.2 s |
| C-12b | 156.4 s | 156.4 s | 156.3 s |
| C-13 | 24.0 q | 24.2 q | 24.0 q |
| C-14 | 59.0 s | 59.1 s | 57.4 s |
| C-15 | 14.4 q | 14.4 q | 13.6 q |
| C-16 | 61.5 d | 61.7 d | 61.8 d |
| C-17 | 124.0 d | 123.2 d | 13.7 q |
| C-18 | 133.3 d | 133.1 d | - |
| C-19 | 13.7 q | 13.9 q | - |
| C-2' | 69.0 d | 68.0 d | 69.0 d |
| C-3' | 71.2 d | 70.9 d | 71.2 d |
| C-4' | 58.0 s | 59.1 s | 58.0 s |
| C-5' | 37.1 t | 35.0 t | 37.0 t |
| C-6' | 67.3 d | 68.1 d | 67.4 d |
| 2'- CH_3 | 17.4 q | 17.5 q | 17.4 q |
| 4'- CH_3 | 13.3 q | 13.4 q | 13.3 q |
| 4'- $\text{N}(\text{CH}_3)$ | 37.0 q | 37.1 q | 37.0 q |

δ from TMS, 100MHz

第8節 Saptomycin D の Acyl 化体の誘導並びに物理化学定数及びスペクトルデータ

8-1 11-O-acetyl saptomycin D の誘導

Saptomycin D 36.9mgをピリジン2.0ml中に溶解し、冷却下、無水酢酸0.5mlを加え、室温中15時間攪拌した。反応液を氷水10mlに注ぎ、クロロホルム20mlで2回抽出を行った。水層とクロロホルム層に分離後、クロロホルム層を50mlの蒸留水で洗浄、次いで、飽和食塩水50mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで一晩乾燥した。硫酸ナトリウムを濾過にて除き、得られたクロロホルム溶液を、減圧下濃縮し、黄色油状物質を得た。この油状物質を少量のクロロホルムに溶解し、分取用 TLC プレート (Kiesel gel 60 Art. NO. 13794, Merck) を用い、 CHCl_3 - CH_3OH (50:1) 混合液で展開し精製した。TLC プレートからかきとった本物質を含むシリカゲルより、50mlのクロロホルムを用いて溶出を行った。得られたクロロホルム溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水50mlで洗浄し、分離後、クロロホルム層を減圧下、濃縮乾固し黄色の 11-O-acetyl saptomycin D 14.6mgを得た。

8-2 11-O-acetyl saptomycin D の物理化学定数及びスペクトルデータ

- ・形状：Yellow powder
- ・旋光度： $[\alpha]_D^{20} +87.2^\circ$ (c 0.1, CHCl_3)
- ・質量 (MS) スペクトル：Chart 67 (FAB-Pos.)
 m/z 658 ($M+H$)⁺
- ・高分解能質量 (MS) スペクトル：
 m/z 658.2657 ($M+H$)⁺ calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{NO}_{10}$: 658.2653
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル：Chart 68
 λ_{max} (CH_3OH) nm (ϵ) 239(35,900), 257(sh 31,000), 358(8,800)
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル：Chart 69
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル：Chart 70 (CDCl_3 , 400MHz)
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル：Chart 71 (CDCl_3 , 400MHz)

8-3 11-O-propionyl saptomycin D の誘導

Saptomycin D 9.2mgをピリジン1.0ml中に溶解し、冷却下、無水プロピオン酸0.2mlを加え、室温中48時間攪拌した。反応液を氷水10mlに注ぎ、クロロホルム20mlで2回抽出を行った。水層とクロロホルム層に分離後、クロロホルム層を50mlの蒸留水で洗浄、次いで、飽和食塩水50mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで一晩乾燥した。硫酸ナトリウムを濾過にて除き、得られたクロロホルム溶液を、減圧下濃縮し、黄色油状物質を得た。この油状物質を少量のクロロホルムに溶解

し、分取用 TLC プレート (Kiesel gel 60 Art. NO. 13794, Merck) を用い、 CHCl_3 - CH_3OH (50:1) 混合液で展開し精製した。TLC プレートからかきとった本物質を含むシリカゲルより、50mlのクロロホルムを用いて溶出を行った。得られたクロロホルム溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水50mlで洗浄し、分離後、クロロホルム層を減圧下、濃縮乾固し黄色の 11-0-propionyl saptomycin D 5.0mgを得た。

8-4 11-0-propionyl saptomycin D の物理化学定数及びスペクトルデータ

- ・形状: Yellow powder
- ・旋光度: $[\alpha]_D^{20} +101.7^\circ$ (c 0.1, CHCl_3)
- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 72 (FAB-Pos.)
 m/z 672 ($\text{M}+\text{H}$)⁺
- ・高分解能質量 (MS) スペクトル:
 m/z 672.2776 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{NO}_{10}$: 672.2809
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 73
 λ_{max} (CH_3OH) nm (ϵ) 240(32,900), 263(28,000), 361(7,200)
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 74
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 75 (CDCl_3 , 400MHz)
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 76 (CDCl_3 , 400MHz)

8-5 Deacetyl-3',11-0-dipropionyl saptomycin D の誘導

Saptomycin D 11.0mgを20mlメタノール中に溶解し、室温中48時間反応させた後、メタノールを減圧下濃縮乾固し、定量的に Deacetylsaptomycin D を得た。得られた Deacetylsaptomycin D をピリジン1.0ml中に溶解し、冷却下、無水プロピオン酸0.2mlを加え、室温中48時間攪拌した。反応液を氷水10mlに注ぎ、クロロホルム20mlで2回抽出を行った。水層とクロロホルム層に分離後、クロロホルム層を50mlの蒸留水で洗浄、次いで、飽和食塩水50mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで一晩乾燥した。硫酸ナトリウムを濾過にて除き、得られたクロロホルム溶液を、減圧下濃縮し、黄色油状物質を得た。この油状物質を少量のクロロホルムに溶解し、分取用 TLC プレート (Kiesel gel 60 Art. NO. 13794, Merck) を用い、 CHCl_3 - CH_3OH (50:1) 混合液で展開し精製した。TLC プレートからかきとった本物質を含むシリカゲルより、50mlのクロロホルムを用いて溶出を行った。得られたクロロホルム溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水50mlで洗浄し、分離後、クロロホルム層を減圧下、濃縮乾固し黄色の Deacetyl-3',11-0-dipropionyl saptomycin D 7.3mgを得た。

8-6 Deacetyl-3',11-O-dipropionyl saptomycin D の物理化学定数及び
スペクトルデータ

- ・形状：Yellow powder
- ・旋光度： $[\alpha]_D^{20} +110.7^\circ$ (c 0.1, CHCl₃)
- ・質量 (MS) スペクトル：Chart 77 (FAB-Pos.)
 m/z 686 (M+H)⁺
- ・高分解能質量 (MS) スペクトル：
 m/z 686.2929 (M+H)⁺ calcd. for C₃₉H₄₄N₁₀: 686.2965
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル：Chart 78
 λ_{max} (CH₃OH) nm (ϵ) 240(37,000), 263(31,400), 360(7,800)
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル：Chart 79
- ・水素核磁気共鳴 (¹H NMR) スペクトル：Chart 80 (CDCl₃, 400MHz)
- ・炭素核磁気共鳴 (¹³C NMR) スペクトル：Chart 81 (CDCl₃, 400MHz)

8-7 11-O-butryl saptomycin D の誘導

Saptomycin D 8.6mgをピリジン1.0ml中に溶解し、冷却下、無水酪酸0.2mlを加え、室温中48時間攪拌した。反応液を氷水10mlに注ぎ、クロロホルム20mlで2回抽出を行った。水層とクロロホルム層に分離後、クロロホルム層を50mlの蒸留水で洗浄、次いで、飽和食塩水50mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで一晩乾燥した。硫酸ナトリウムを濾過にて除き、得られたクロロホルム溶液を、減圧下濃縮し、黄色油状物質を得た。この油状物質を少量のクロロホルムに溶解し、分取用 TLCプレート (Kiesel gel 60 Art. NO. 13794, Merck) を用い、CHCl₃-CH₃OH (50:1) 混合液で展開し精製した。TLCプレートからかきとった本物質を含むシリカゲルより、50mlのクロロホルムを用いて溶出を行った。得られたクロロホルム溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水50mlで洗浄し、分離後、クロロホルム層を減圧下、濃縮乾固し黄色の 11-O-butryl saptomycin D 5.4mgを得た。

8-8 11-O-butryl saptomycin D の物理化学定数及びスペクトルデータ

- ・形状：Yellow powder
- ・旋光度： $[\alpha]_D^{20} +94.8^\circ$ (c 0.1, CHCl₃)
- ・質量 (MS) スペクトル：Chart 82 (FAB-Pos.)
 m/z 686 (M+H)⁺
- ・高分解能質量 (MS) スペクトル：
 m/z 686.2939 (M+H)⁺ calcd. for C₃₉H₄₄N₁₀: 686.2966
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル：Chart 83

- $\lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{OH})\text{nm} (\epsilon)$ 238(40,400), 260(sh 35,600), 358(8,900)
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 84
 - ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 85 (CDCl_3 , 400MHz)
 - ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 86 (CDCl_3 , 400MHz)

8-9 Deacetyl-3',11-O-dibutyryl saptomycin D の誘導

Saptomycin D 9.2mgを20mlメタノール中に溶解し、室温中48時間反応させた後、メタノールを減圧下濃縮乾固し、定量的に Deacetylsaptomycin D を得た。得られた Deacetylsaptomycin D をピリジン1.0ml中に溶解し、冷却下、無水酪酸0.2mlを加え、室温中48時間攪拌した。反応液を氷水10mlに注ぎ、クロロホルム20mlで2回抽出を行った。水層とクロロホルム層に分離後、クロロホルム層を50mlの蒸留水で洗浄、次いで、飽和食塩水50mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで一晩乾燥した。硫酸ナトリウムを濾過にて除き、得られたクロロホルム溶液を、減圧下濃縮し、黄色油状物質を得た。この油状物質を少量のクロロホルムに溶解し、分取用 TLC プレート (Kiesel gel 60 Art. NO. 13794, Merck) を用い、 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (50:1) 混合液で展開し精製した。TLC プレートからかきとった本物質を含むシリカゲルより、50mlのクロロホルムを用いて溶出を行った。得られたクロロホルム溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水50mlで洗浄し、分離後、クロロホルム層を減圧下、濃縮乾固し黄色の Deacetyl-3',11-O-dibutyryl saptomycin D 7.3mgを得た。

8-10 Deacetyl-3',11-O-dibutyryl saptomycin D の物理化学定数及びスペクトルデータ

- ・形状: Yellow powder
- ・旋光度: $[\alpha]_D^{20} +80.2^\circ$ (c 0.1, CHCl_3)
- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 87 (FAB-Pos.)
 m/z 714 ($\text{M}+\text{H}$)⁺
- ・高分解能質量 (MS) スペクトル:
 m/z 714.3263 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{NO}_{10}$: 714.3279
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 88
 $\lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{OH})\text{nm} (\epsilon)$ 238(32,100), 260(sh 31,700), 360(7,000)
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 89
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 90 (CDCl_3 , 400MHz)
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 91 (CDCl_3 , 400MHz)

第9節 生物活性試験

9-1 抗菌活性試験

滅菌済み5cmシャーレに、培地5mlに対し最終濃度が100 μ g/mlより2倍希釈系列のサンプル溶液を、各濃度につき2枚ずつ分注する。オートクレーブ後、60 $^{\circ}$ Cに保温した培地を5mlずつ分注し、均一になるように混ぜ、固まらせる。検定菌懸濁液を、10⁷ cells/mlに希釈し、96穴プレートに移す。滅菌済み4連チップに検定菌希釈液をつけ、寒天表面に植菌する。寒天表面の検定菌液が乾燥した後、一晚培養する。

判定：完全に発育が阻止された最低濃度をもって感受性をあらわす。(MIC)

検定菌：

| 菌名 | | 液体培養 |
|---|-------|----------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> M45 Rec- | G(+) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Bacillus subtilis</i> H18 Rec+ | G(+) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Staphylococcus aureus</i> JCM2151 | G(+) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> JCM2414 | G(+) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Micrococcus luteus</i> JCM1464 | G(+) | 30 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Escherichia coli</i> JCM1649 | G(-) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM1662 | G(-) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Proteus vulgaris</i> JCM1668 | G(-) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Xanthomonas maltophilia</i> JCM1975 | G(-) | 30 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 | G(-) | 35 $^{\circ}$ C HIB |
| <i>Candida albicans</i> JCM1542 | Yeast | 30 $^{\circ}$ C YPMG |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCM1499 | Yeast | 30 $^{\circ}$ C YPMG |

9-2 細胞障害活性試験

9-2-1 細胞

in vitro 試験においてはマウス由来の P388 白血病細胞、Meth A 線維肉腫細胞、およびヒト細胞は A549 肺癌細胞、PC-3 肺癌細胞、MKN45⁴ 胃癌細胞、MKN74 胃癌細胞、SW48 大腸癌細胞、WiDr 大腸癌細胞を使用した。

9-2-2 *in vitro* 細胞障害活性の測定

細胞溶液100 μ lを96穴平底マイクロプレートに蒔き込み、CO₂インキュベーター中で培養した。24時間後に種々の濃度の被験サンプル25 μ lを添加し、更に96時間

培養した。培養終了の4時間前に、5mg/mlの MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 溶液20 μ lを各穴に添加した。生細胞は、ミトコンドリアの脱水素酵素の働きで MTT を還元して不溶性の色素に変換することより、培養終了後上清を捨て、イソプロピルアルコールにて色素を抽出し、530 nmでの吸光度を測定し、生細胞の数を測定した。サンプル非添加のウェルの吸光度と、添加したウェルの吸光度から50%障害活性を示す濃度(IC₅₀値)を算出した。

9-3 抗腫瘍活性試験

9-3-1 細胞

in vivo 試験では Meth A、P388、MKN45、WiDr の他にマウス由来の Colon 26 結腸癌、ルイス(LL)肺癌、および B16 黒色腫を使用した。

9-3-2 マウス

雌性 CDF1、BDF1、C57BL/6 及びヌードマウスはチャールスリバー(株)より購入し、1週間の予備飼育後に使用した。

9-3-3 *in vivo* 抗腫瘍効果

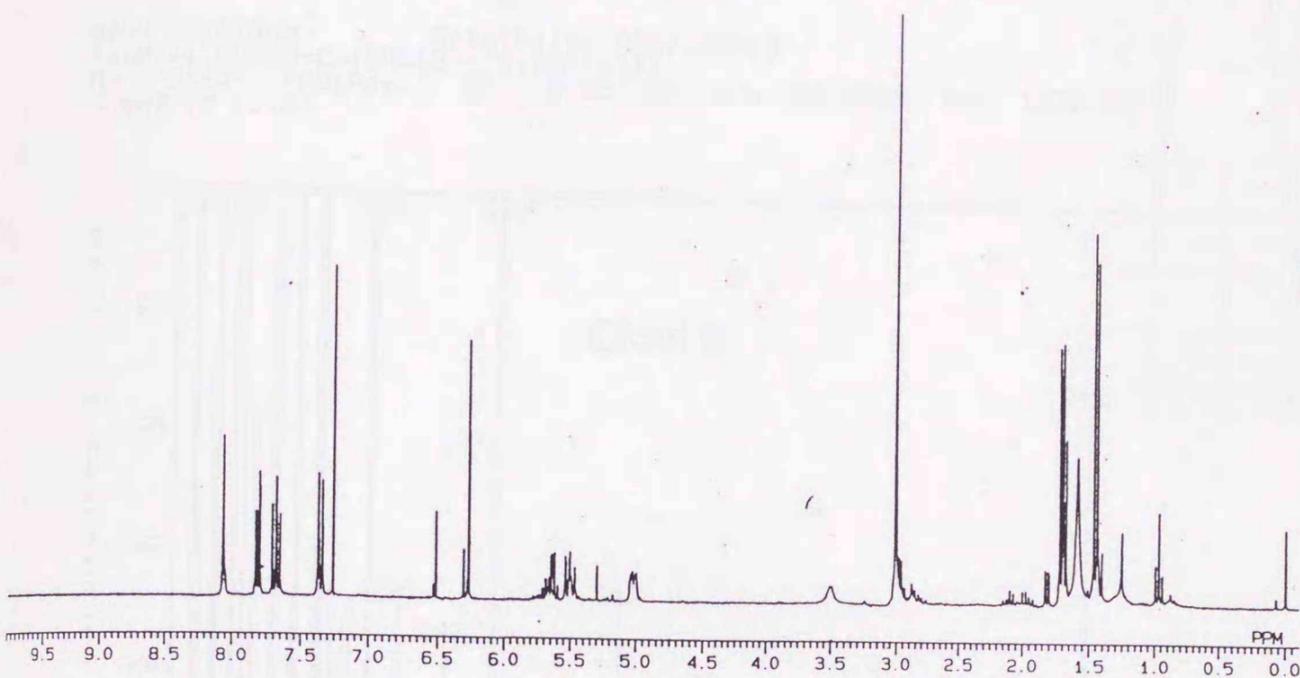
1) 腹腔内移植系

1 \times 10⁷個/mlに調製した癌細胞100 μ lをマウス腹腔内に移植した。腫瘍細胞マウスの組み合わせは次のとおりである。Meth A-CDF1、P388-CDF1、LL-BDF1、Colon26-CDF1、B16-C57BL/6。サンプルは腫瘍細胞移植後翌日より4日間連続、あるいは移植後1、4、7日目に腹腔内に投与し、生存日数を観察した。結果は、コントロール群(生理食塩水投与群)に対するサンプル投与群の生存日数の延長をT/C%で表した。

2) 固形癌系

3 \times 10⁷個/mlに調製した MKN45 あるいは WiDr 細胞100 μ lをヌードマウス体側皮下に移植した。腫瘍塊が約200mm³になった時点から3日おきに3回、サンプルを腹腔内に投与した。投与終了後10日目に腫瘍塊の大きさを測定し、コントロール群の増殖率およびサンプル投与群の増殖率を算出した。

Chart 4



14-SEP-89 09. 47. 17
 DFILE SAVING
 COMNT ENOKI-1 (0914)
 EXMOD SGNON
 OBNUC 1H
 OBFIN 5400.0 Hz
 POINT 16384
 FREQU 4000.0 Hz
 SCANS 16
 ACQTM 2.048 sec
 PD 4.000 sec
 PW1 5.0 us
 IRFIN 5400.0 Hz
 IRATN 0
 IRRPW 50 us
 TEMP. 27.0 c
 SLVNT CDCL3
 EXREF 0.00 ppm
 BF 0.10 Hz
 RGAIN 24
 XE 2701.6630 Hz
 XS -225.6703 Hz

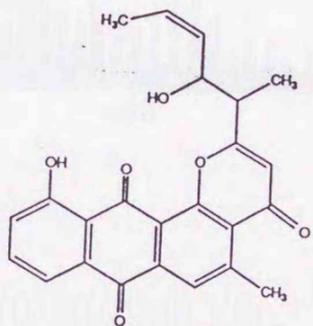
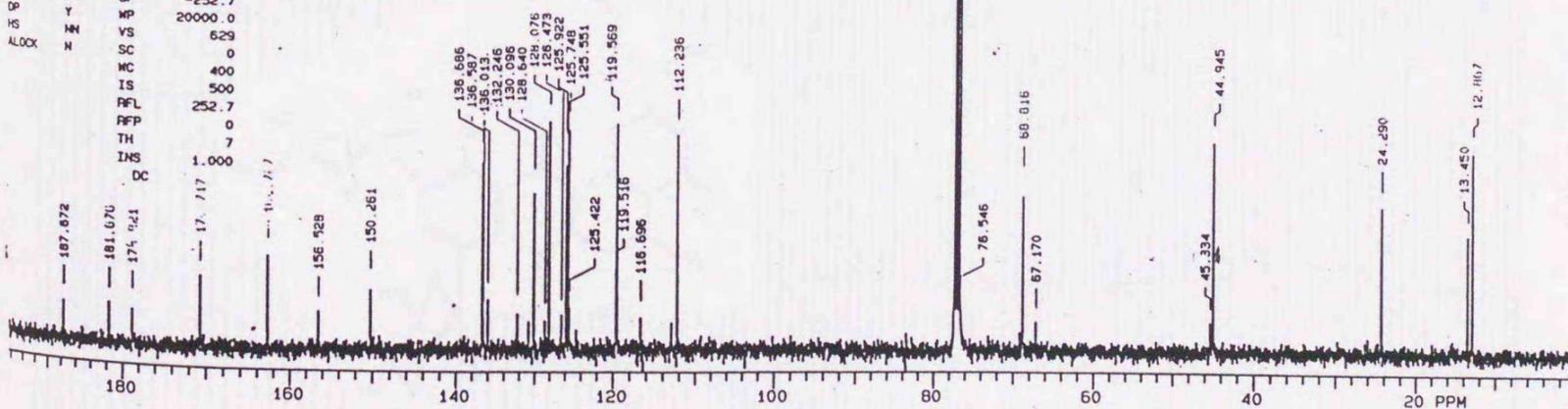


Chart 5

VARIAN VXR-4
 TAKAHASHI
 804 FILE ENOKI-1 (0914)
 DATE 1-2-89
 SOLVENT CDCL3
 FILE

Saptomycin A

ACQUISITION DEC. & VT
 TN 13.750 DN 1.750
 SM 20000.0 DO 75.0
 AT 0.750 DM YYY
 NP 30016 DMH S
 PW 4.6 DMH 9900
 PI 0 DHP 59.0
 DI 0 DLP 20
 D2 0 HOMO N
 TO -79.6
 NT 200000 PROCESSING
 CT 42432 SE 0.318
 PWSO 9.3 LB 1.000
 BS 64 MATH F
 SS 0
 IL N DISPLAY
 IN N SP -252.7
 DP Y WP 20000.0
 HS HN VS 629
 ALOCK N SC 0
 WC 400
 IS 500
 RFL 252.7
 RFP 0
 TH 7
 INS 1.000
 DC



MASS SPECTRUM Data File: ABE7.DAT;3
 Sample: HP530-C (CHCl3 + G:DMF=1:1)
 RT 0'24" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 186.0000 Int. 1324.50
 Scan# (2 to 4)

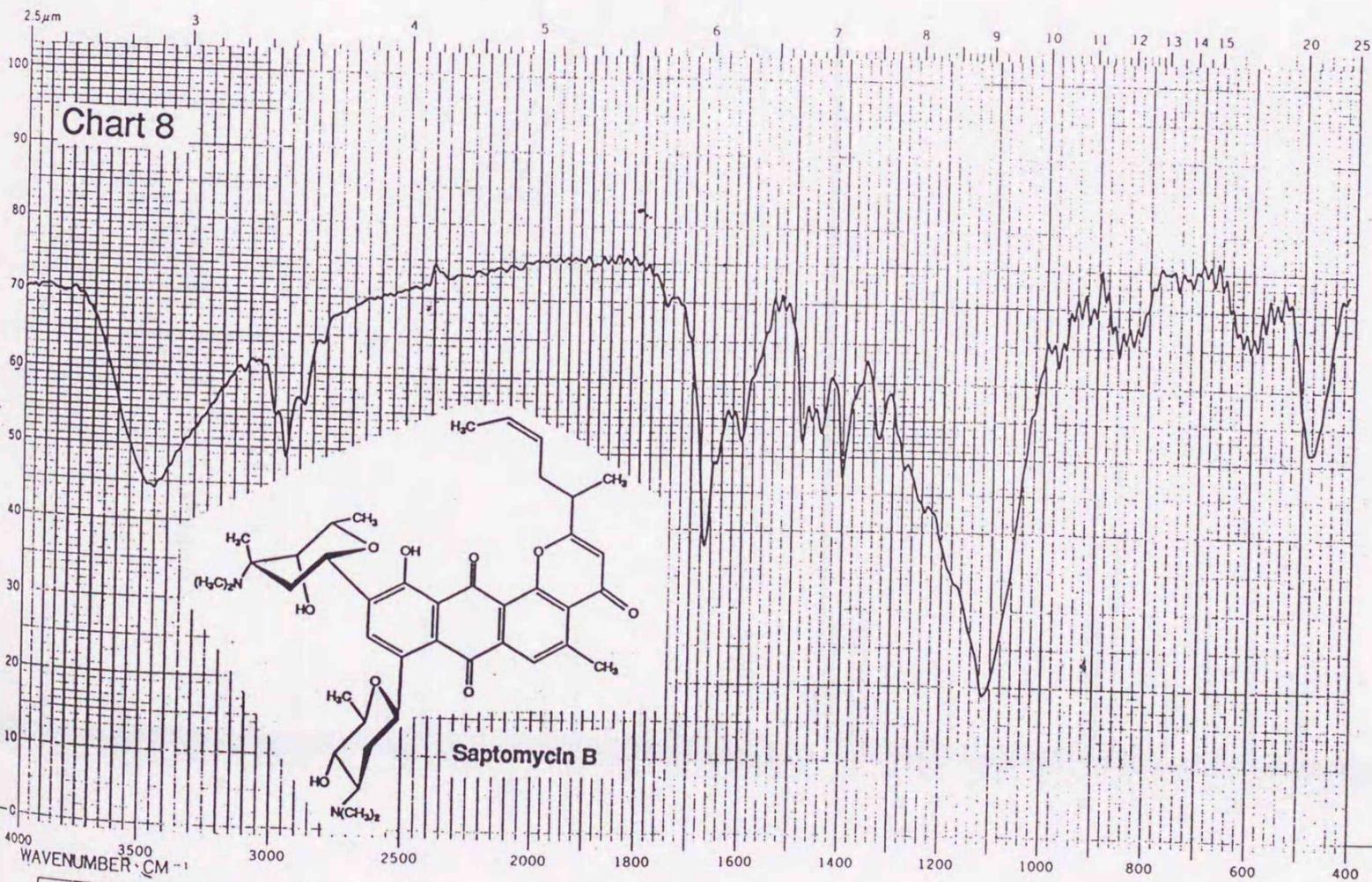
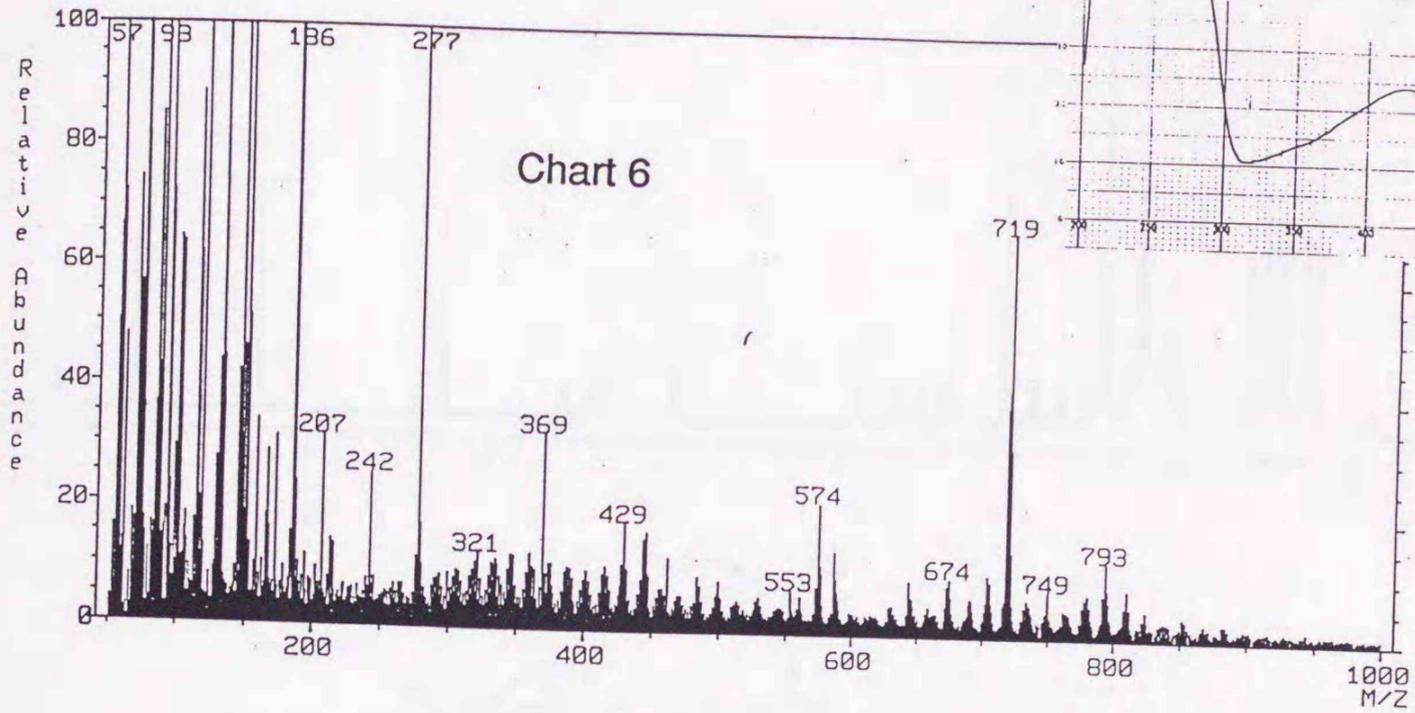


Chart 9

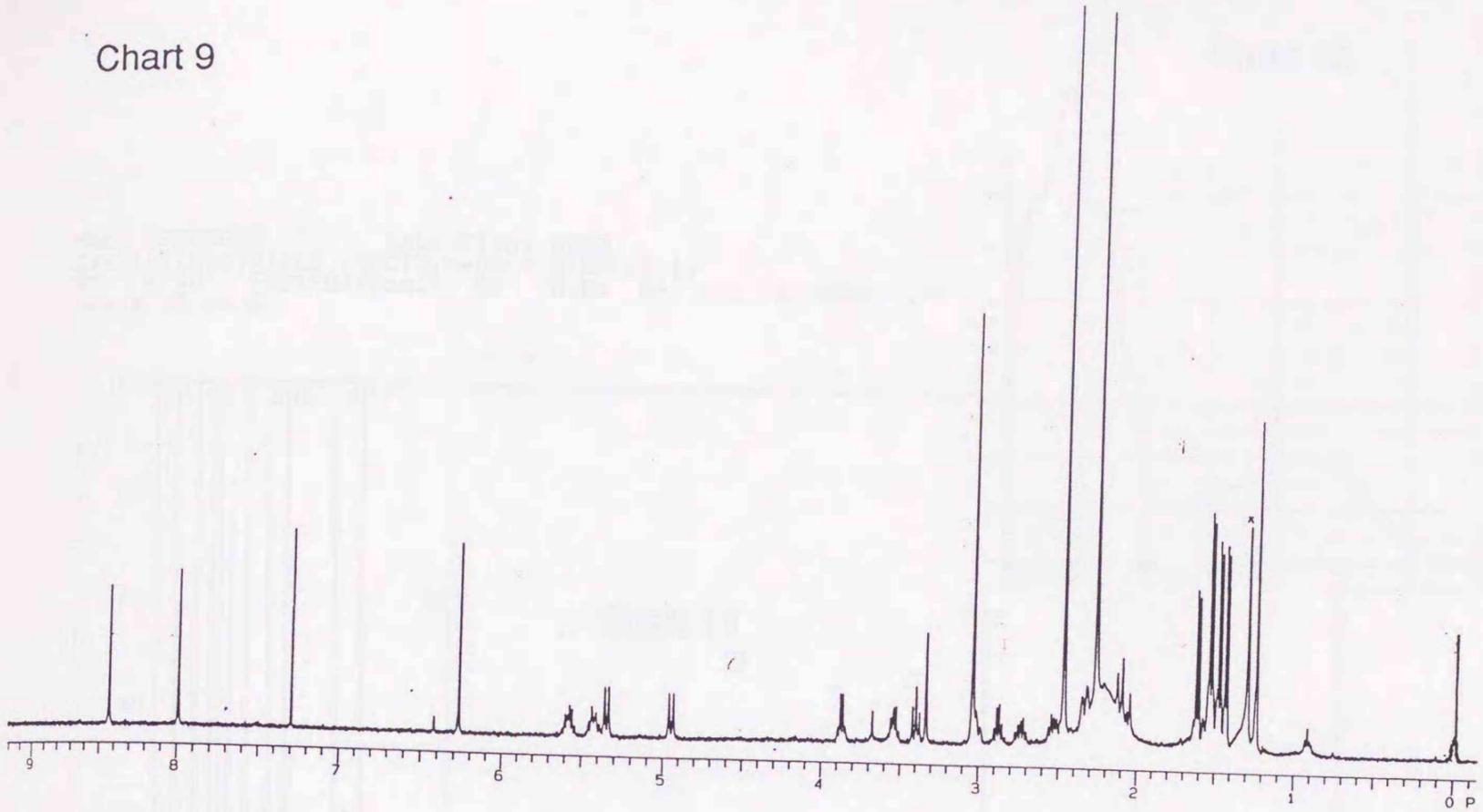
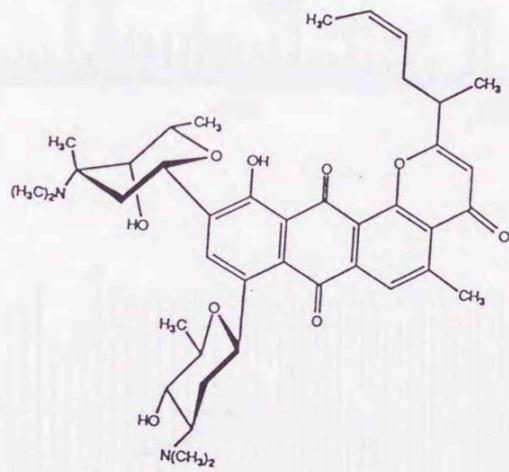


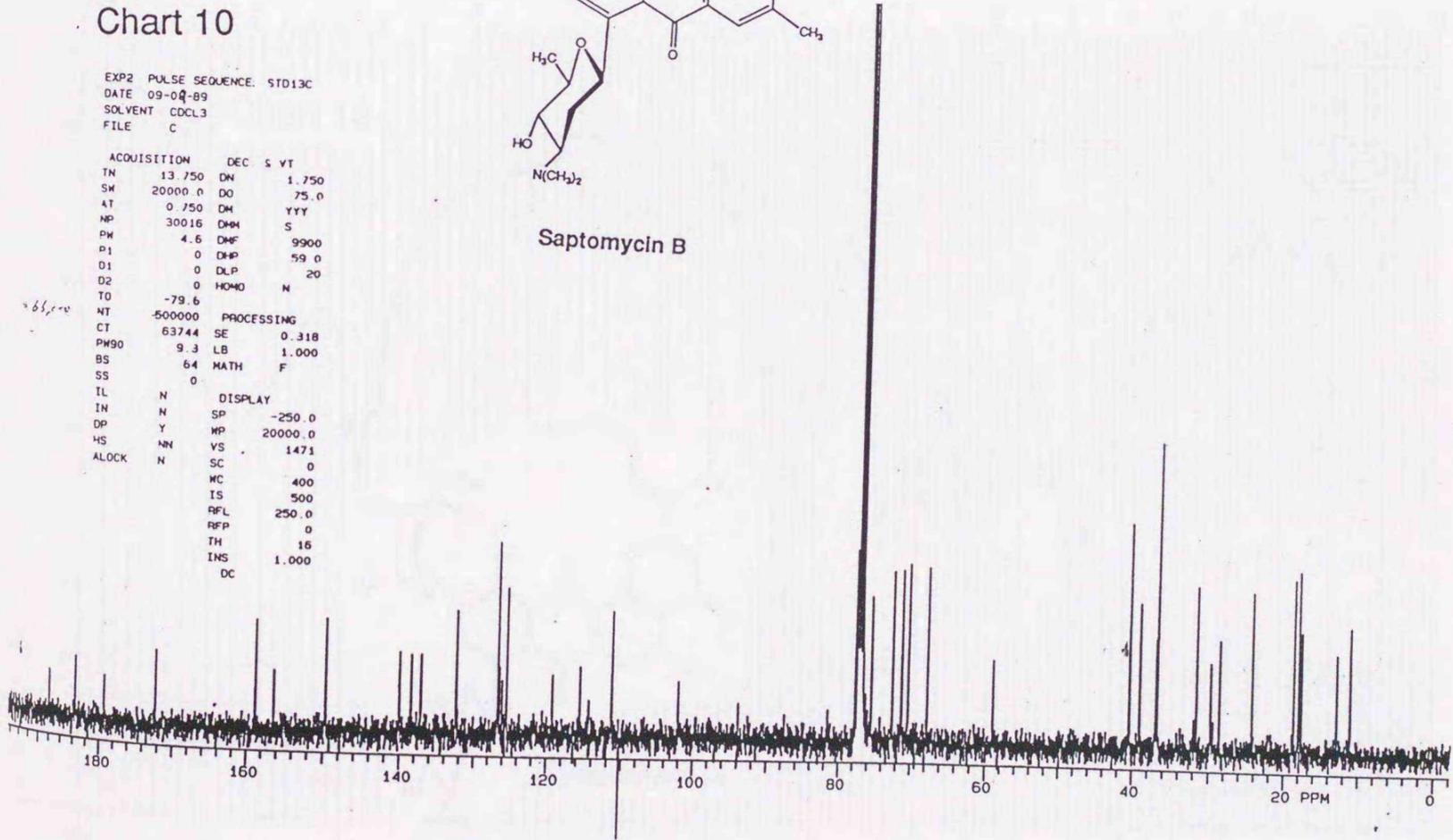
Chart 10

EXP2 PULSE SEQUENCE. STD13C
 DATE 09-04-89
 SOLVENT CDCL3
 FILE C

| ACQUISITION | DEC | S | VT |
|-------------|---------|---------|---------|
| TN | 13.750 | DN | 1.750 |
| SW | 20000.0 | DO | 75.0 |
| AT | 0.750 | DM | YYY |
| NP | 30016 | DMH | S |
| PH | 4.6 | DMF | 9900 |
| P1 | 0 | DHP | 59.0 |
| D1 | 0 | DLP | 20 |
| D2 | 0 | HOMO | N |
| TO | -79.6 | | |
| NT | -500000 | | |
| CT | 63744 | SE | 0.318 |
| PH90 | 9.3 | LB | 1.000 |
| BS | 64 | MATH | F |
| SS | 0 | | |
| IL | N | DISPLAY | |
| IN | N | SP | -250.0 |
| DP | Y | WP | 20000.0 |
| HS | NN | YS | 1471 |
| ALOCK | N | SC | 0 |
| | | WC | 400 |
| | | IS | 500 |
| | | RFL | 250.0 |
| | | RFP | 0 |
| | | TH | 16 |
| | | INS | 1.000 |
| | | DC | |



Saptomycin B



MASS SPECTRUM Data File: ABE6
 Sample: SC1131-E2 (CHCl₃:MeOH + G:DMF=1:1)
 RT 0'40" FAB(FD)(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 207.0000 Int.
 Scan# (5 to 6)

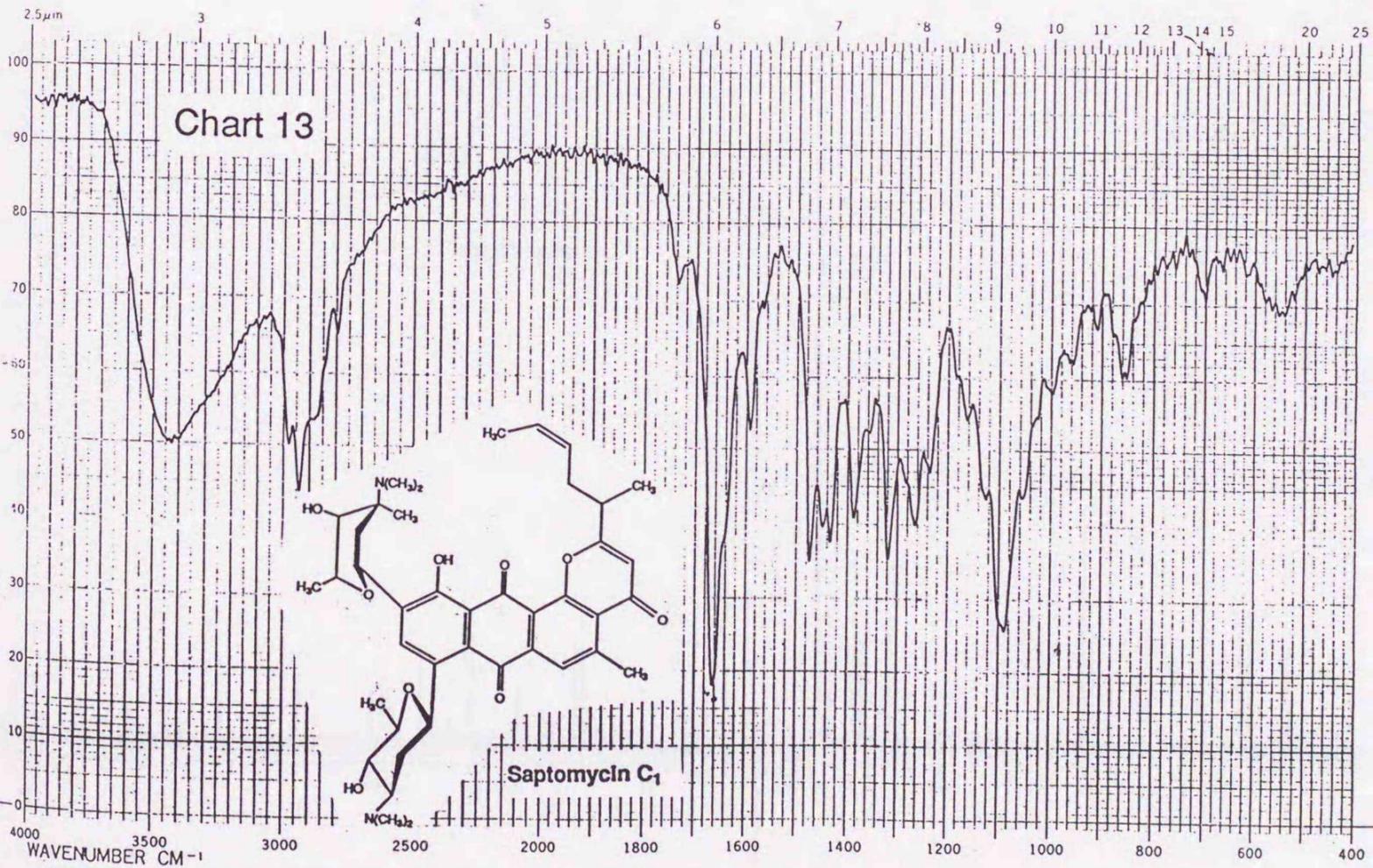
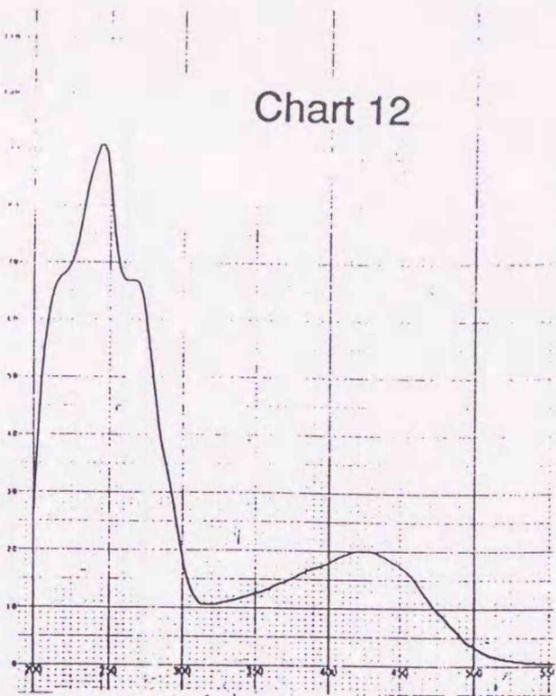
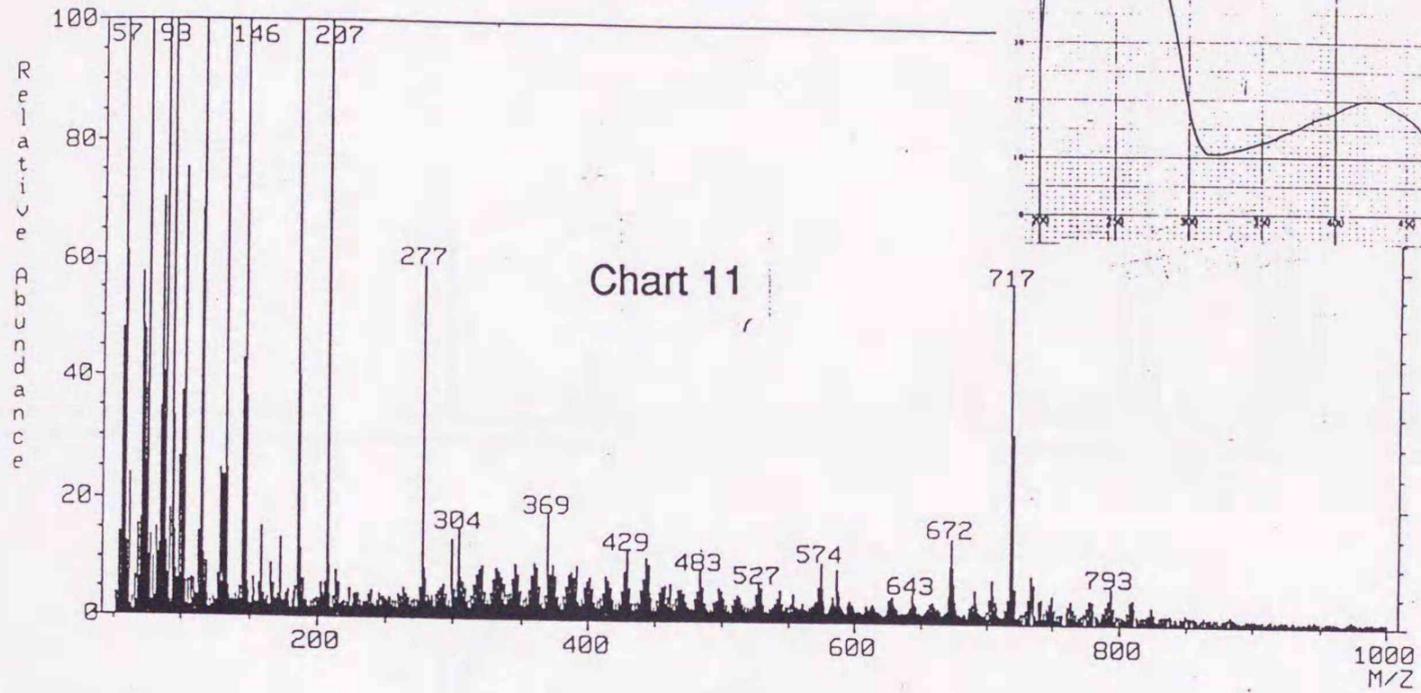


Chart 14

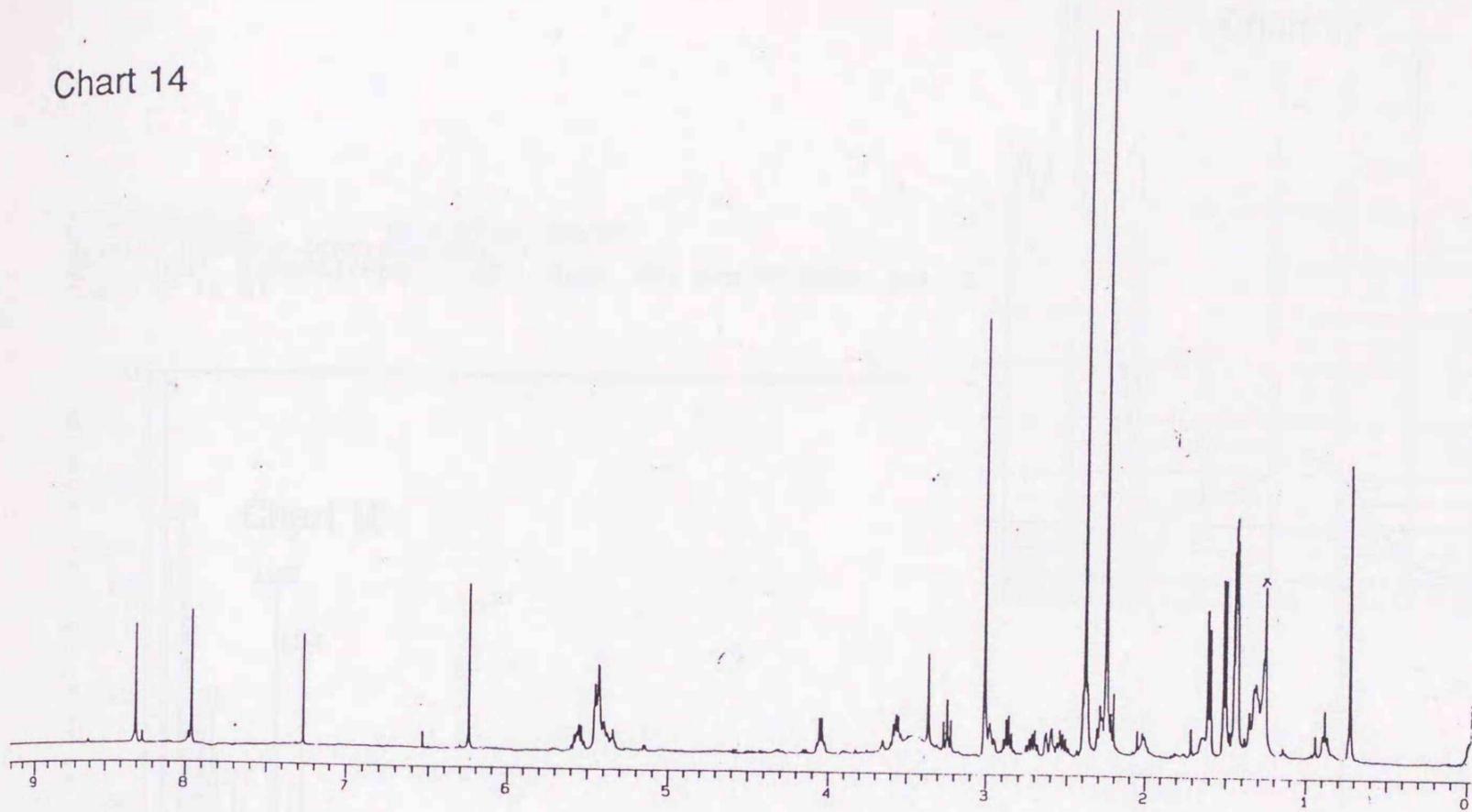
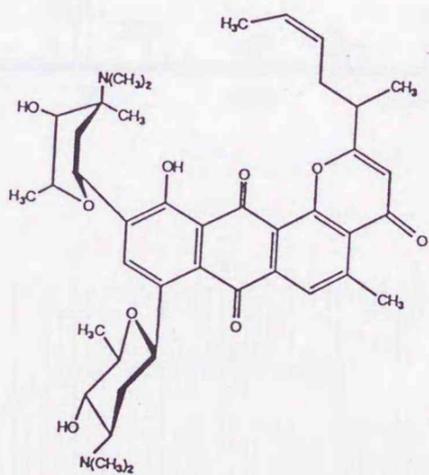
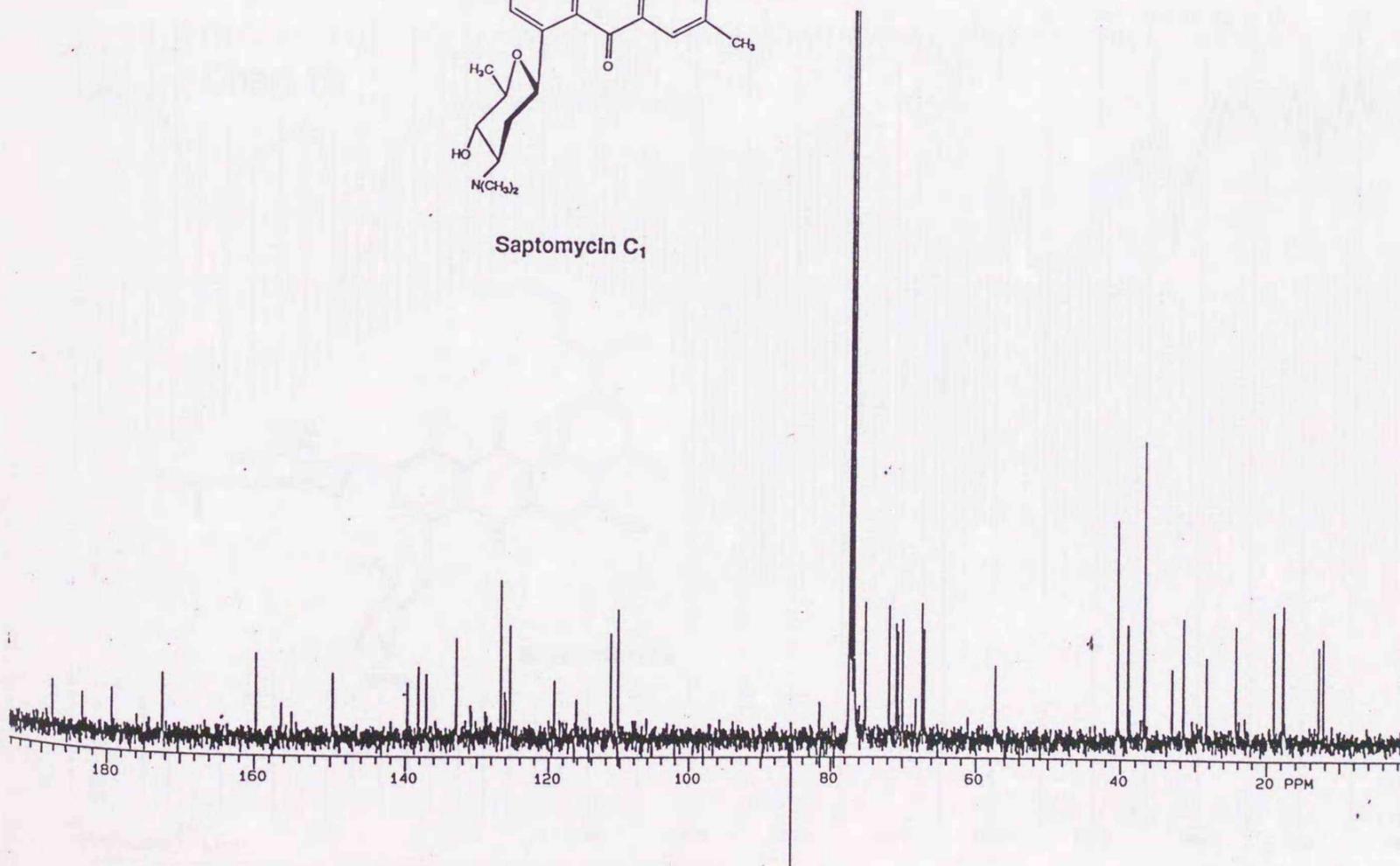


Chart 15



Saptomycin C₁



MASS SPECTRUM Data File: ABE37
 Sample: HP530C2 (CHCl3 + NBA)
 RT 1'00" FAB(FD)(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 55.0000 Int. 1
 Scan# (7 to 8)

Chart 17

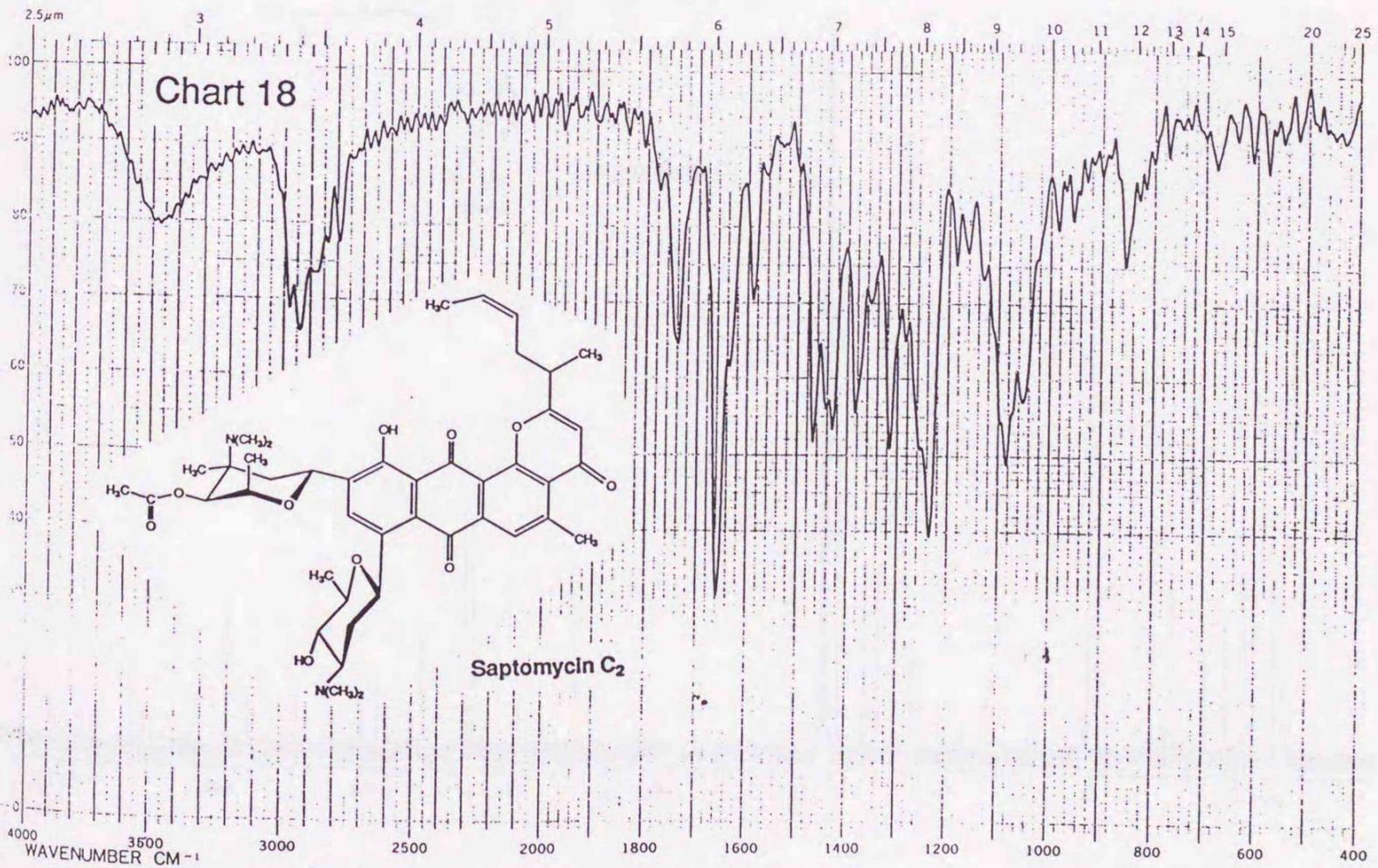
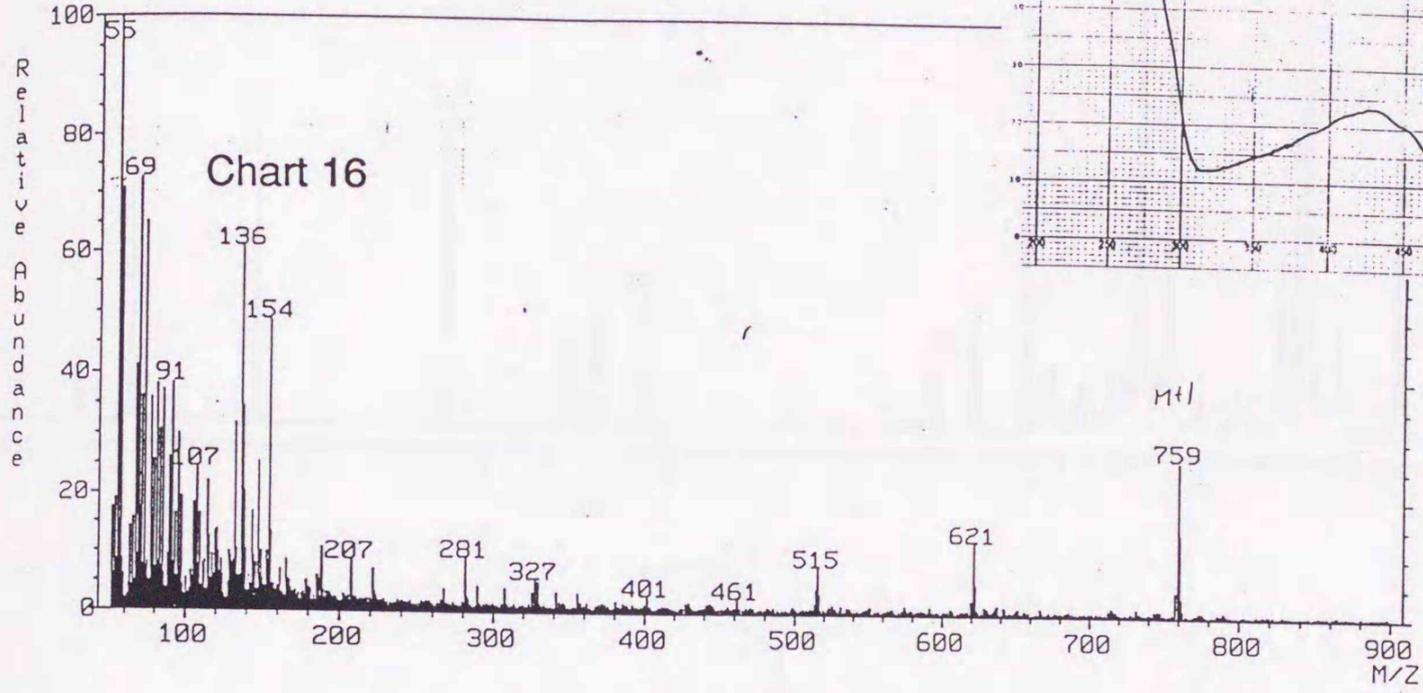
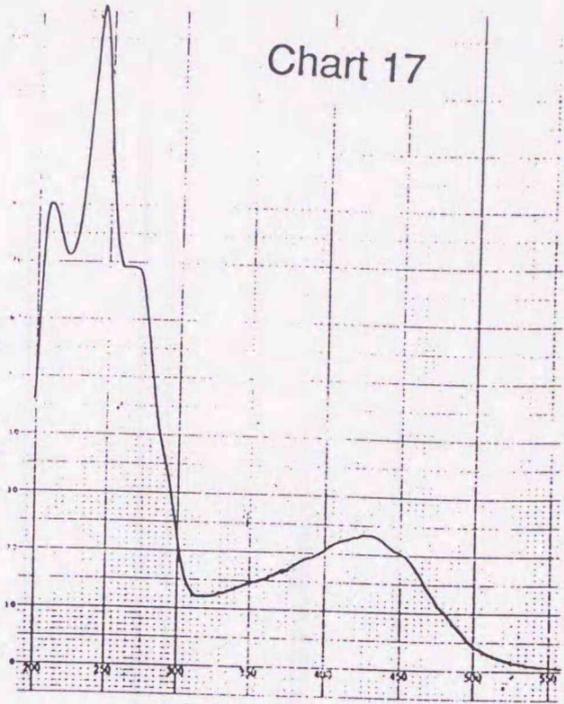


Chart 19

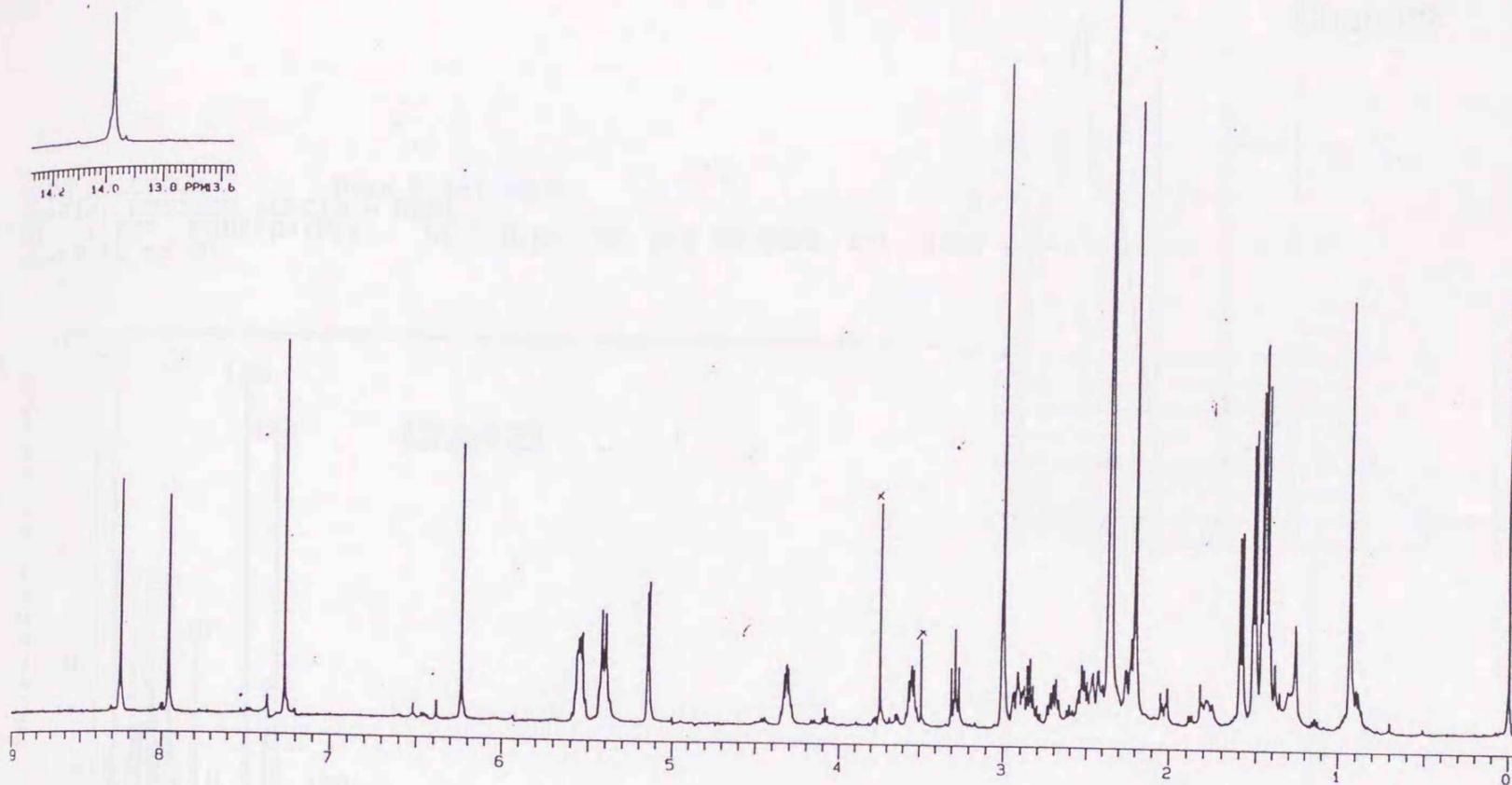
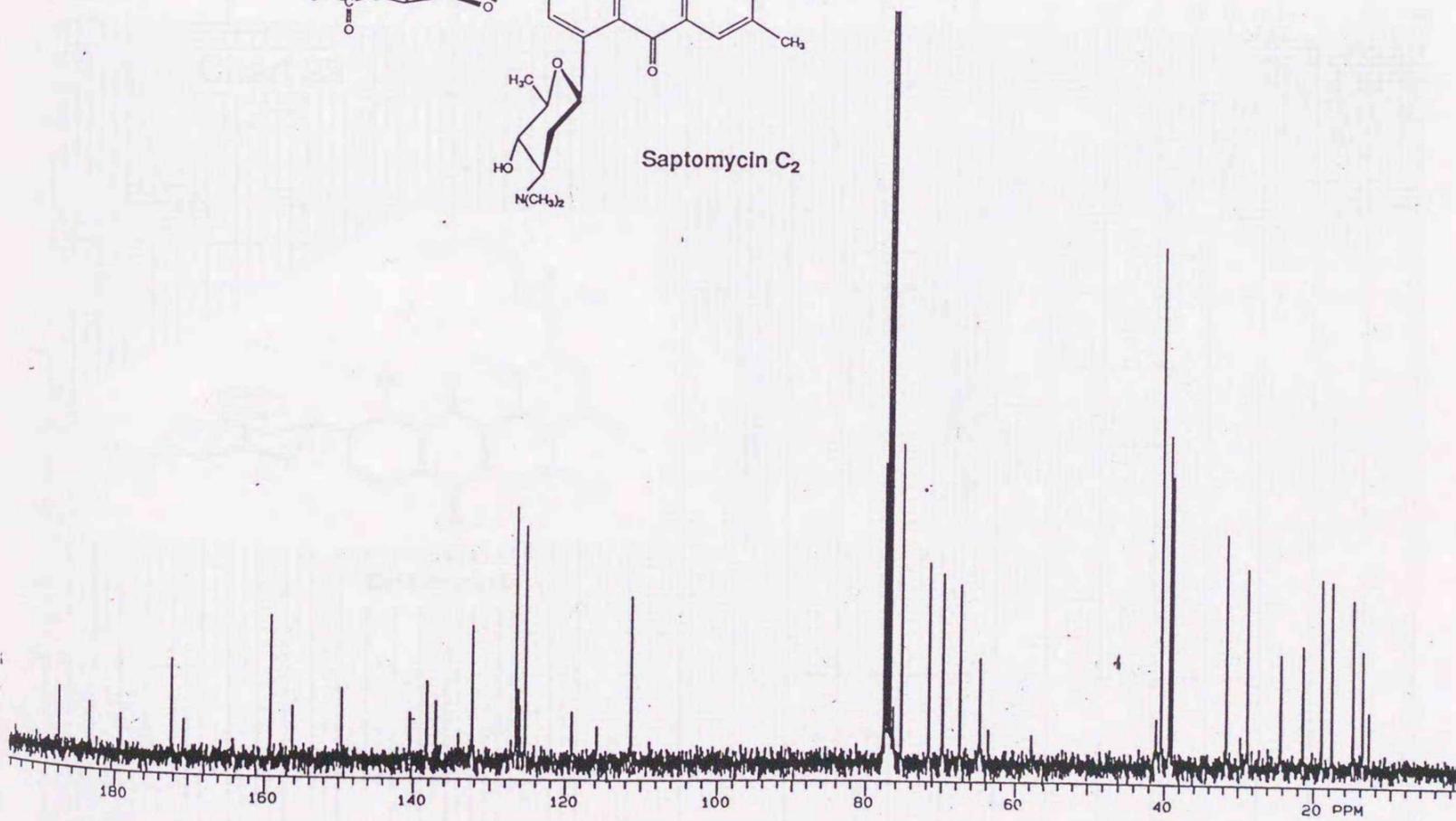
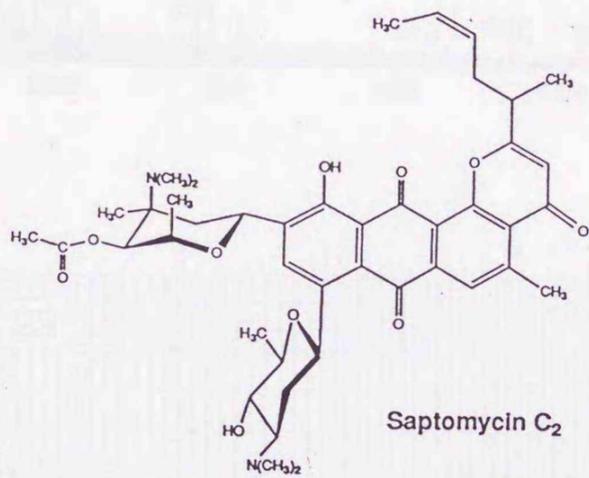


Chart 20



MASS SPECTRUM Data File: ABE9
 Sample: HP530D2 (CHC13 + NBA)
 RT 1'00" FAB(FD)(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 55.0000 Int. 1212
 Scan# (6 to 8)

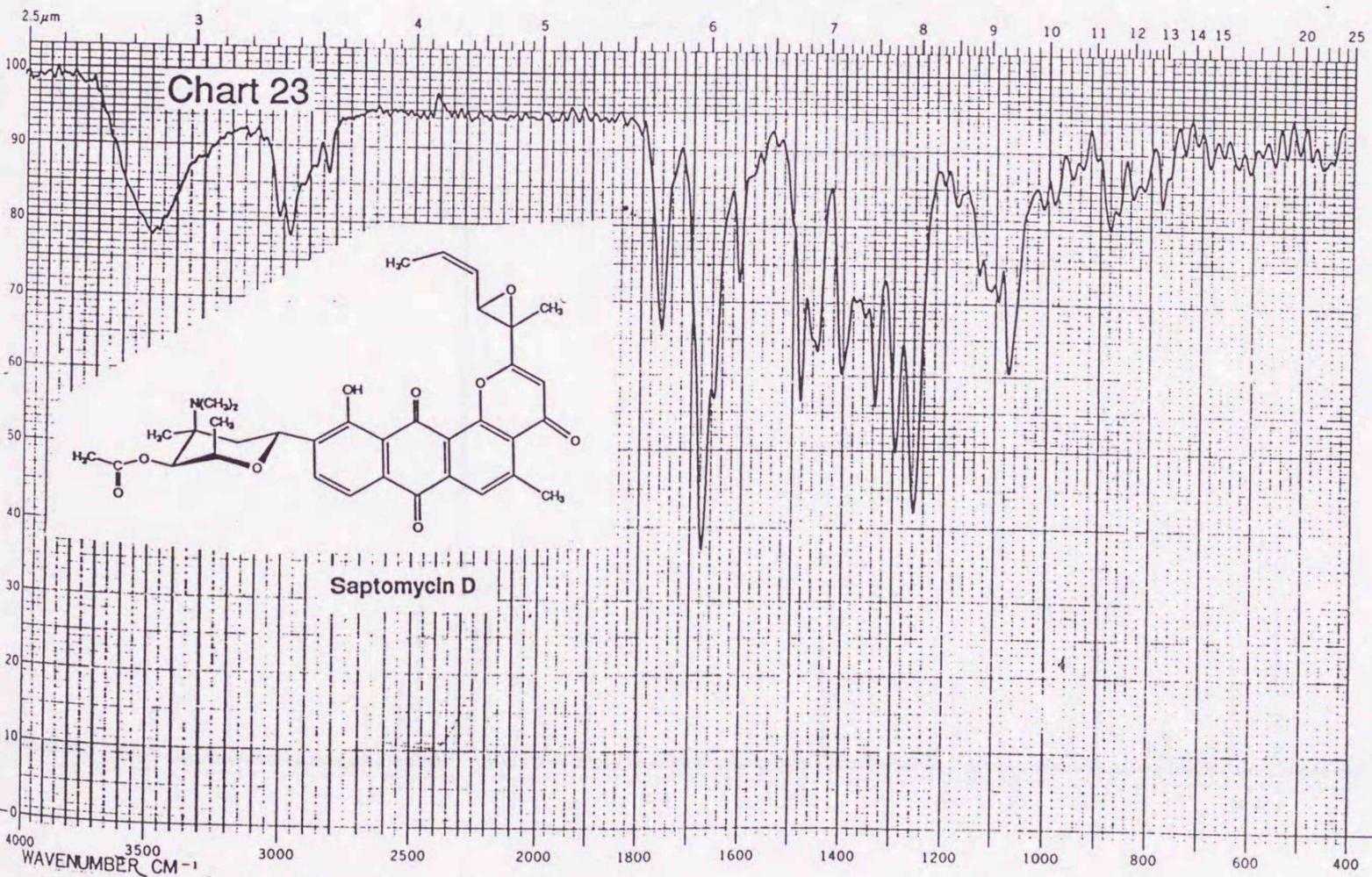
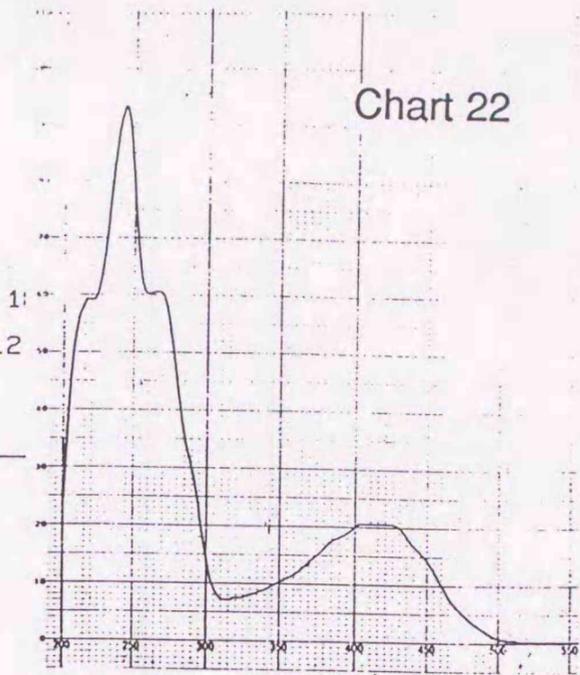
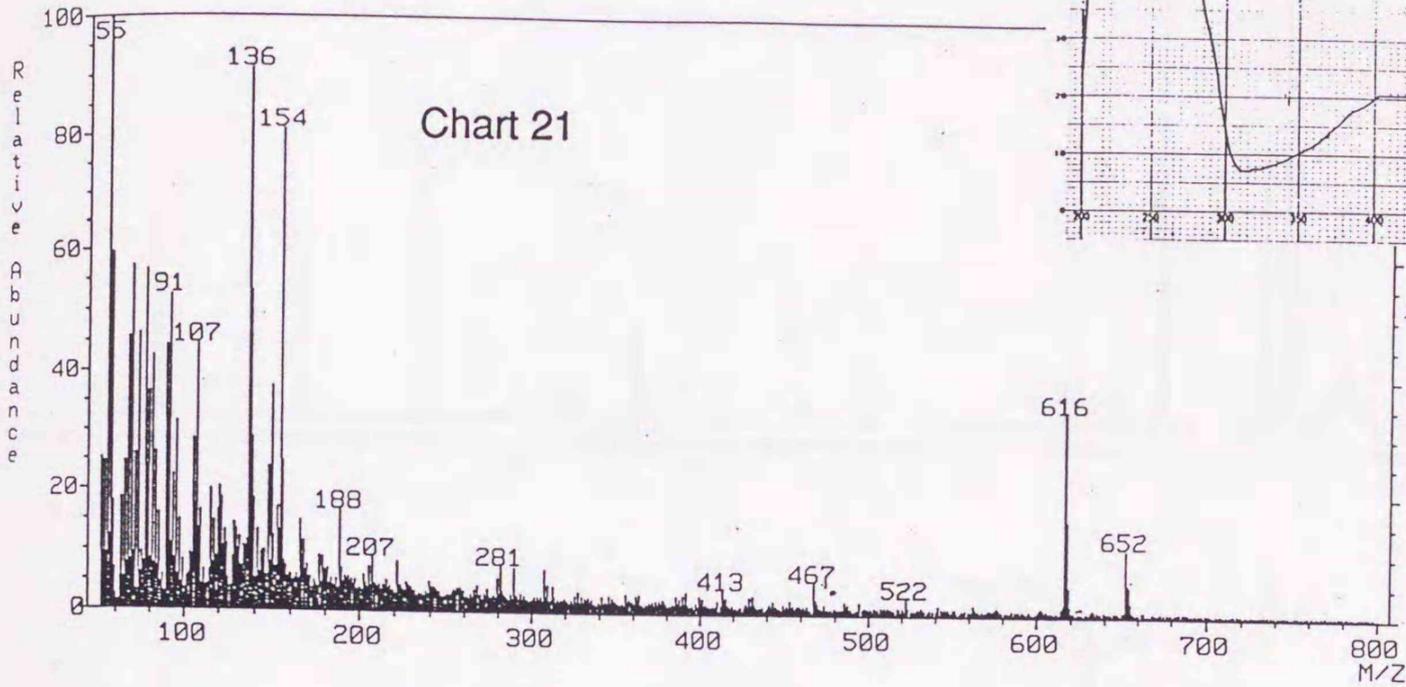


Chart 24

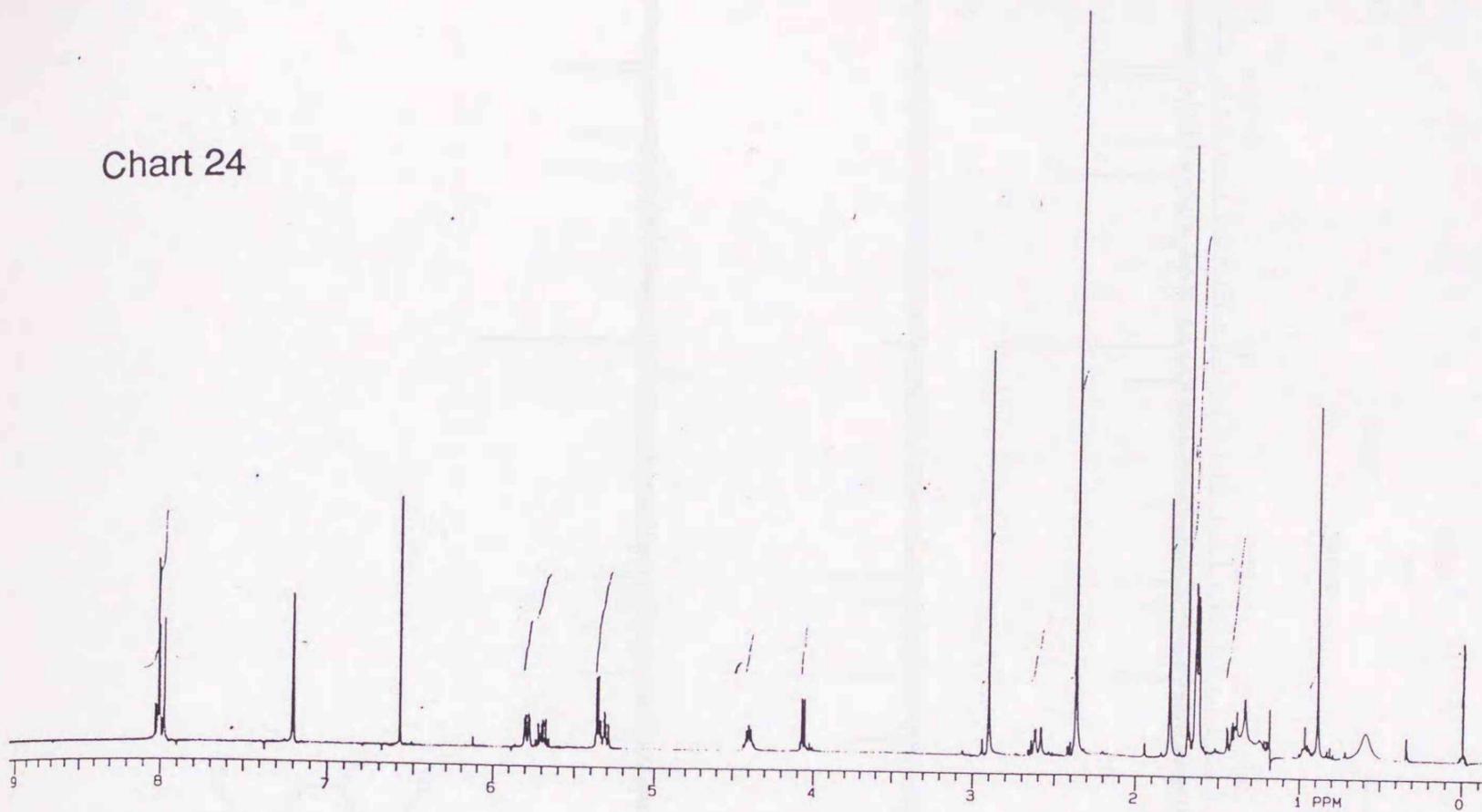


Chart 25

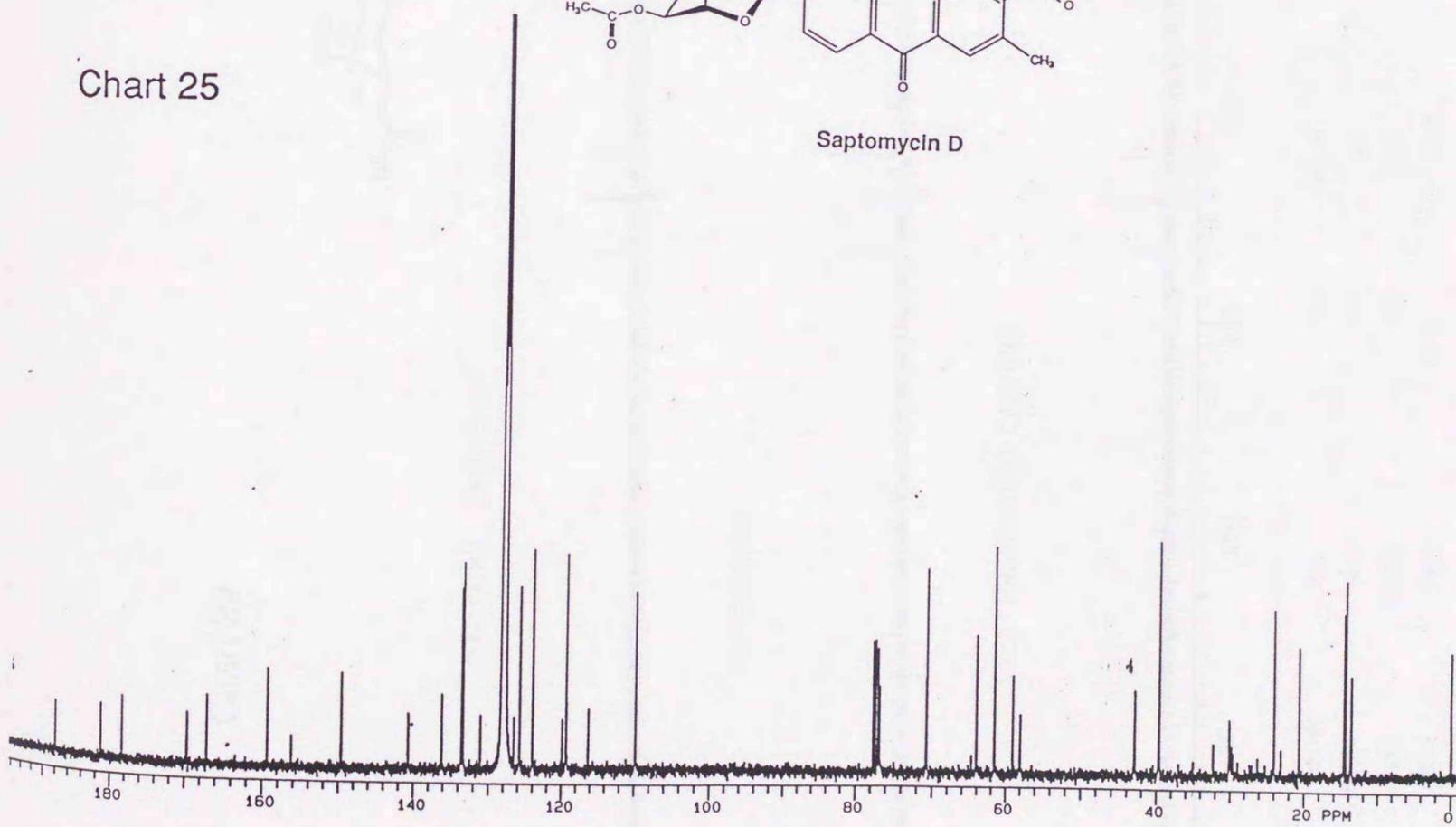
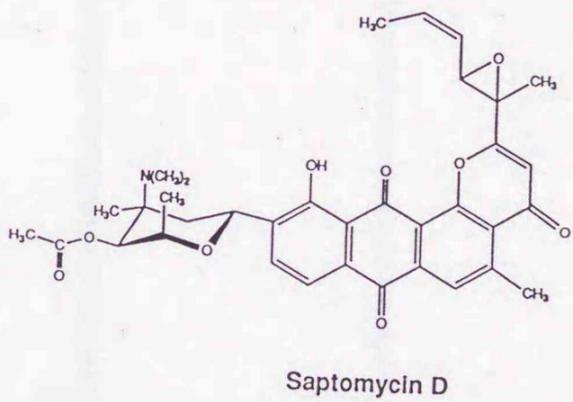
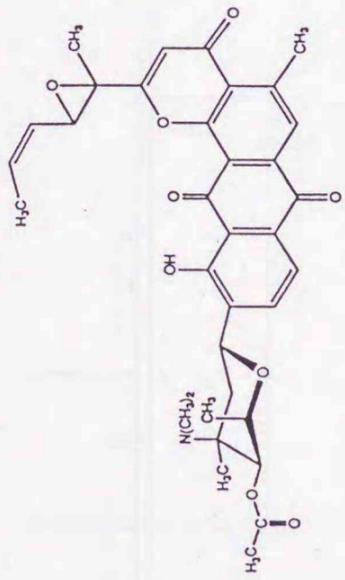


Chart 26

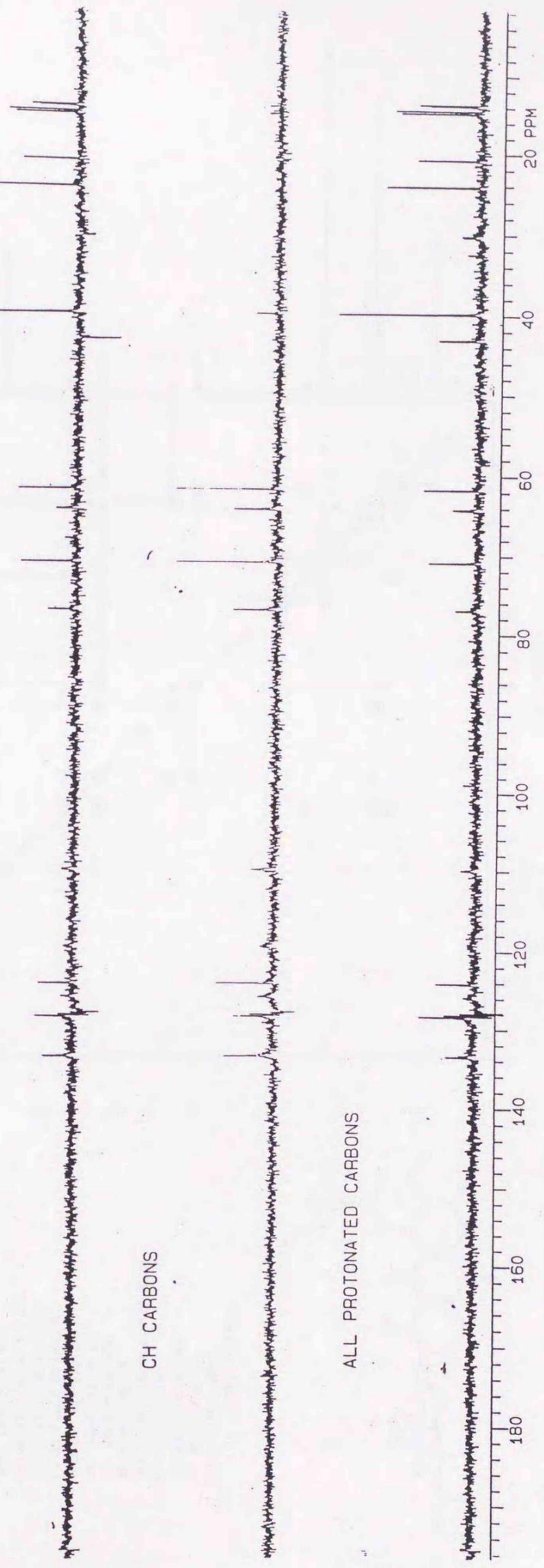


Saptomycin D

CH2 DOWN, CH/CH3 UP

CH CARBONS

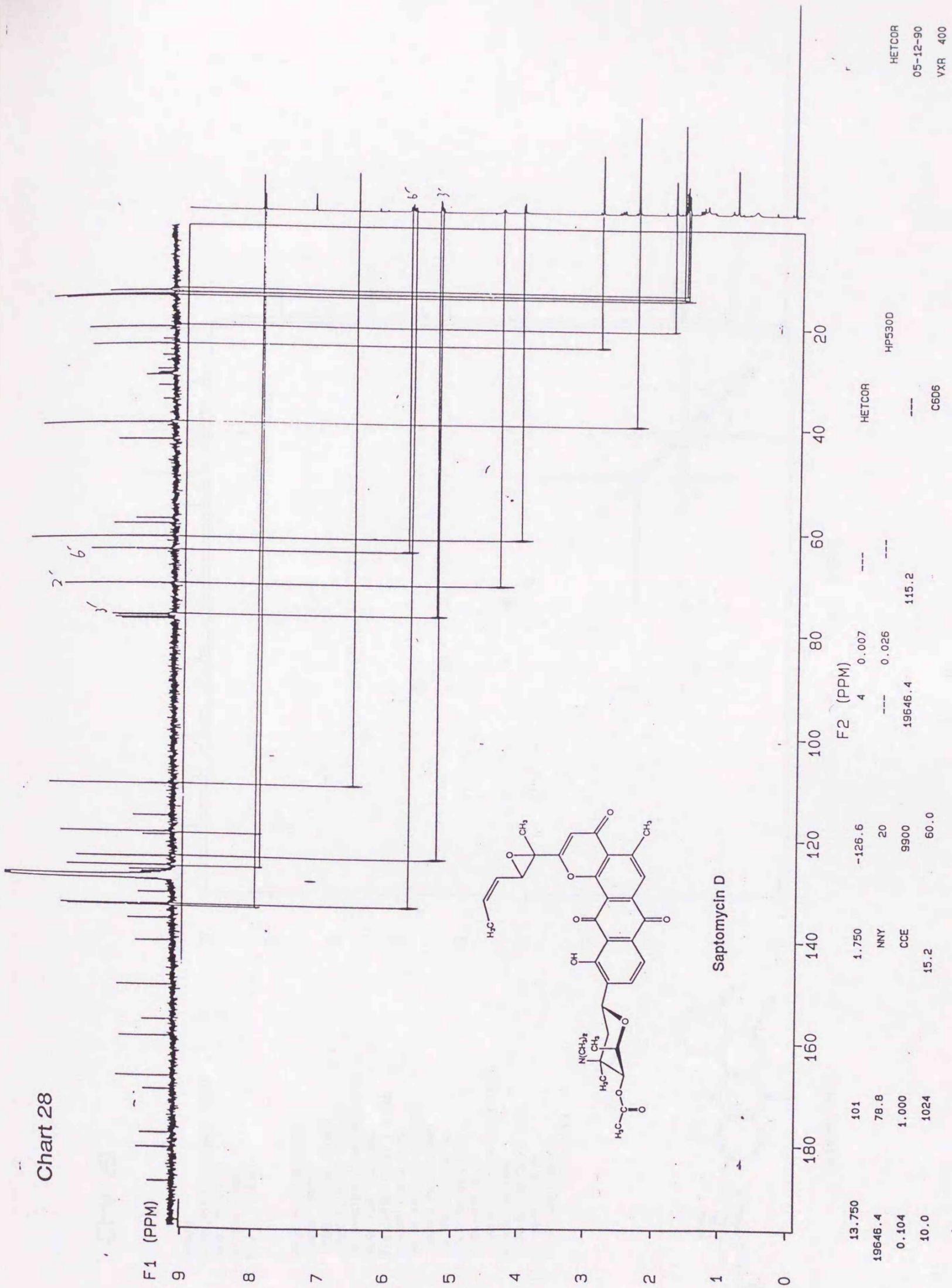
ALL PROTONATED CARBONS



| Chemical Shift (PPM) | Assignment |
|----------------------|------------|
| 13.750 | 101 |
| 19646.4 | 78.8 |
| 0.715 | 2.000 |
| 10.0 | 5824 |
| 1.750 | 903.0 |
| 1.750 | NNY |
| 15.2 | CCE |
| 15.2 | 60.0 |
| 64 | DEPTGL |
| 2.500 | HP530D |
| 19646.4 | --- |
| 111.7 | --- |
| 60.0 | C6D6 |

04231
04-24-90
VXR 400

Chart 28



MASS SPECTRUM Data File: ABE10
 Sample: HP530E (CHCl3 + NBA)
 RT 1'03" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 137.0000 Int. 1
 Scan# (10 to 11)

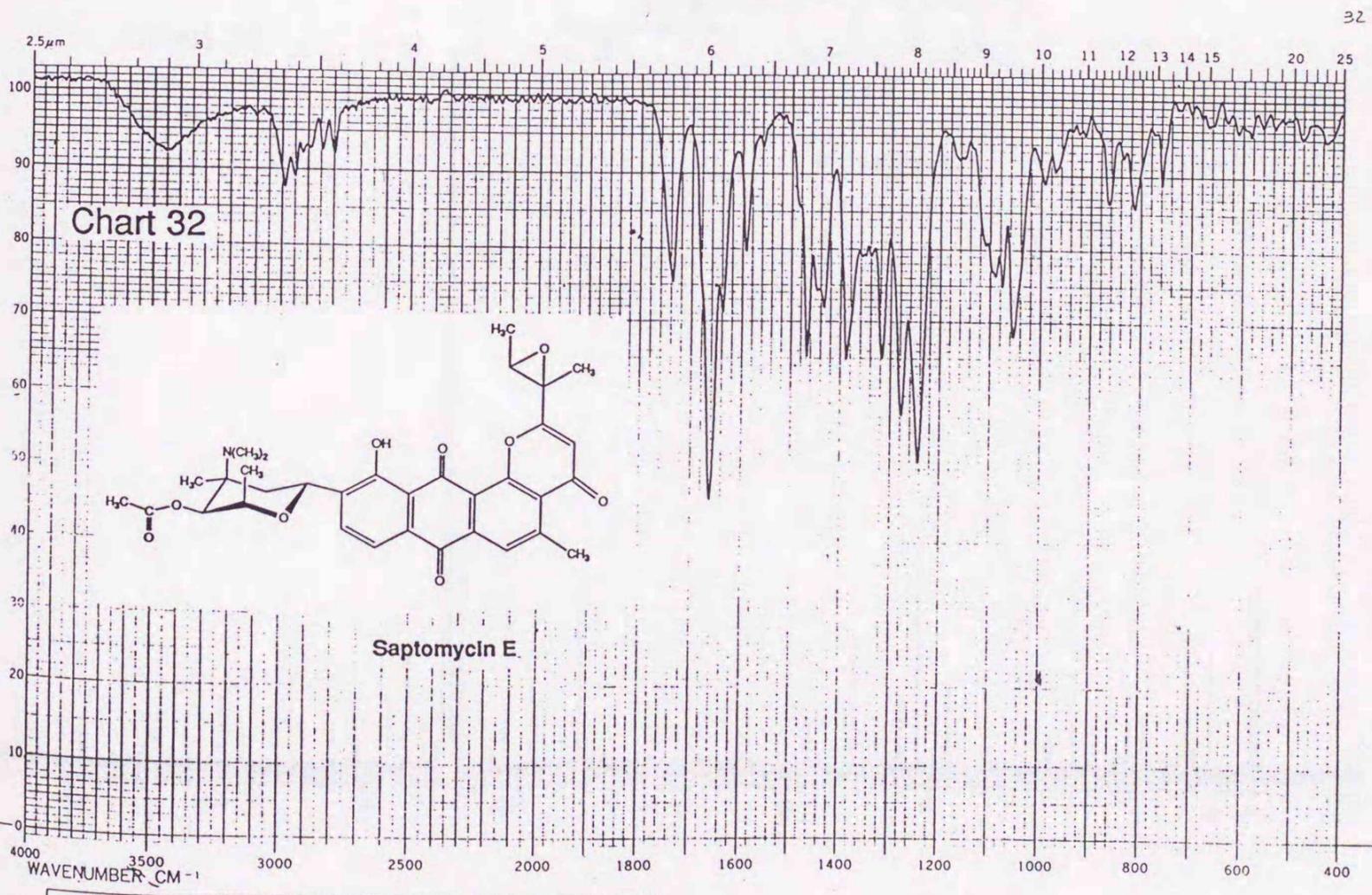
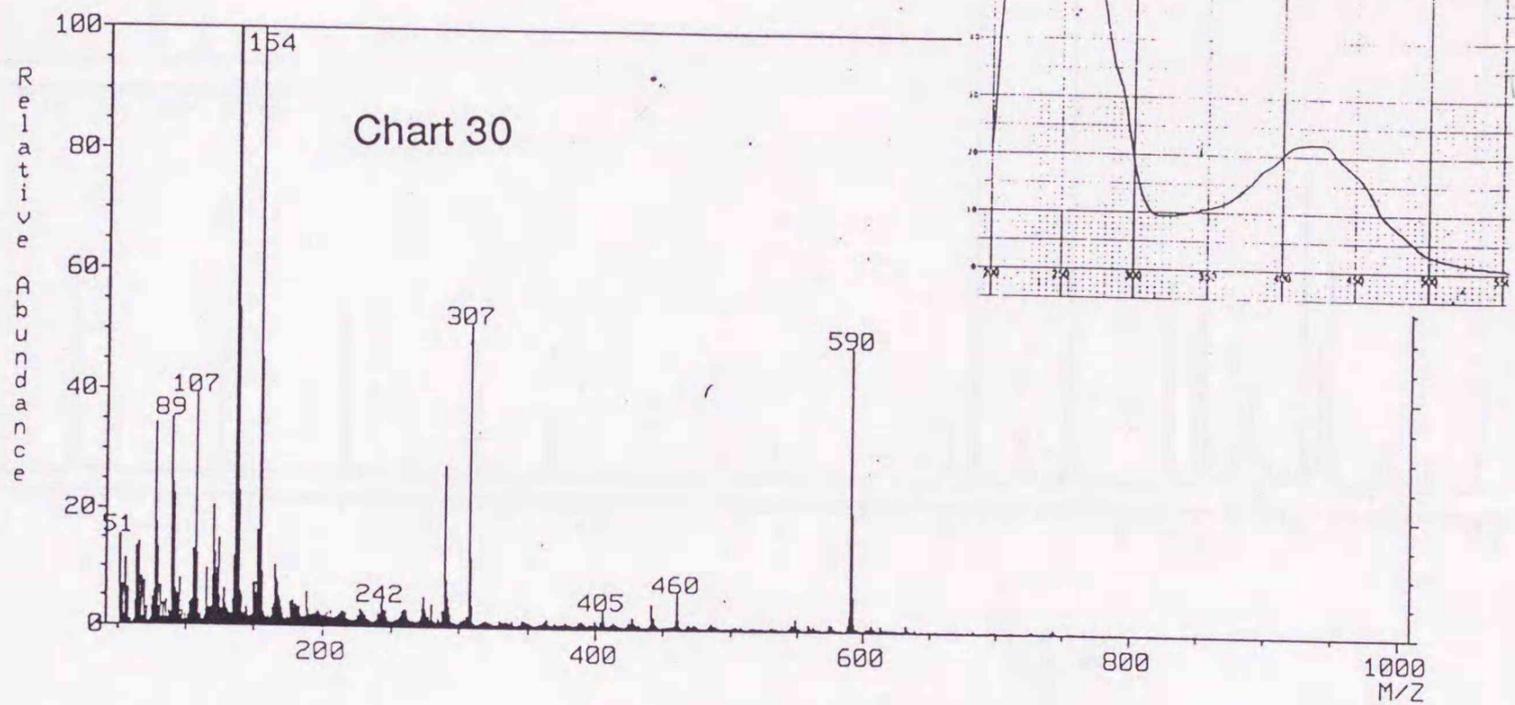


Chart 33

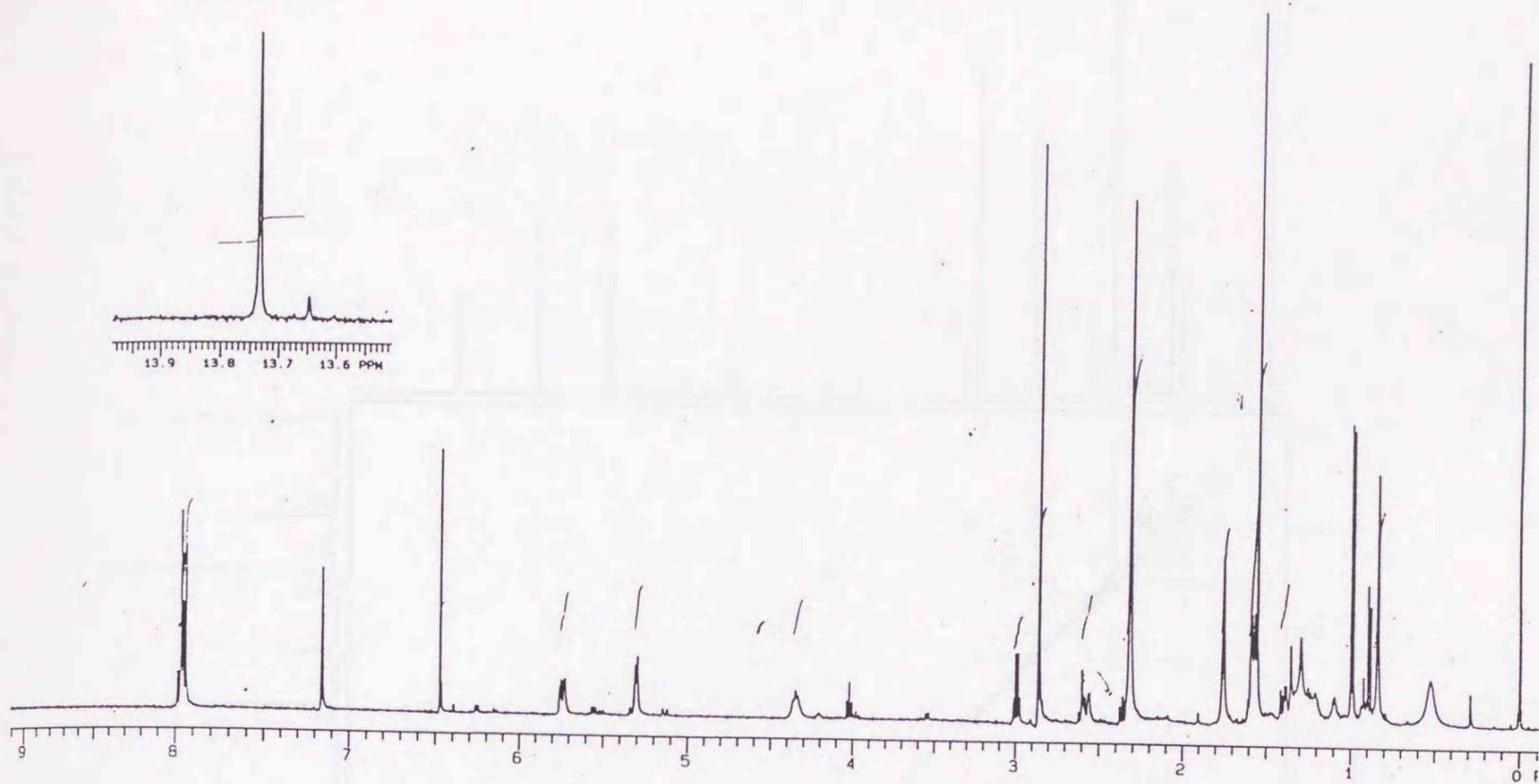
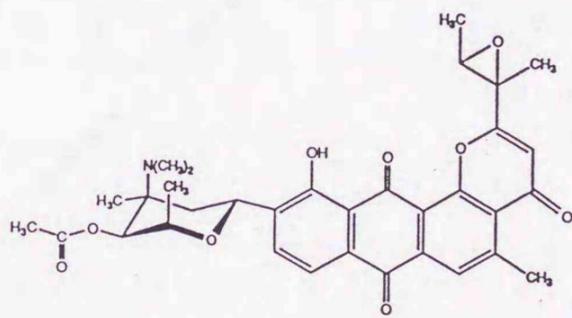


Chart 34



Saptomycin E

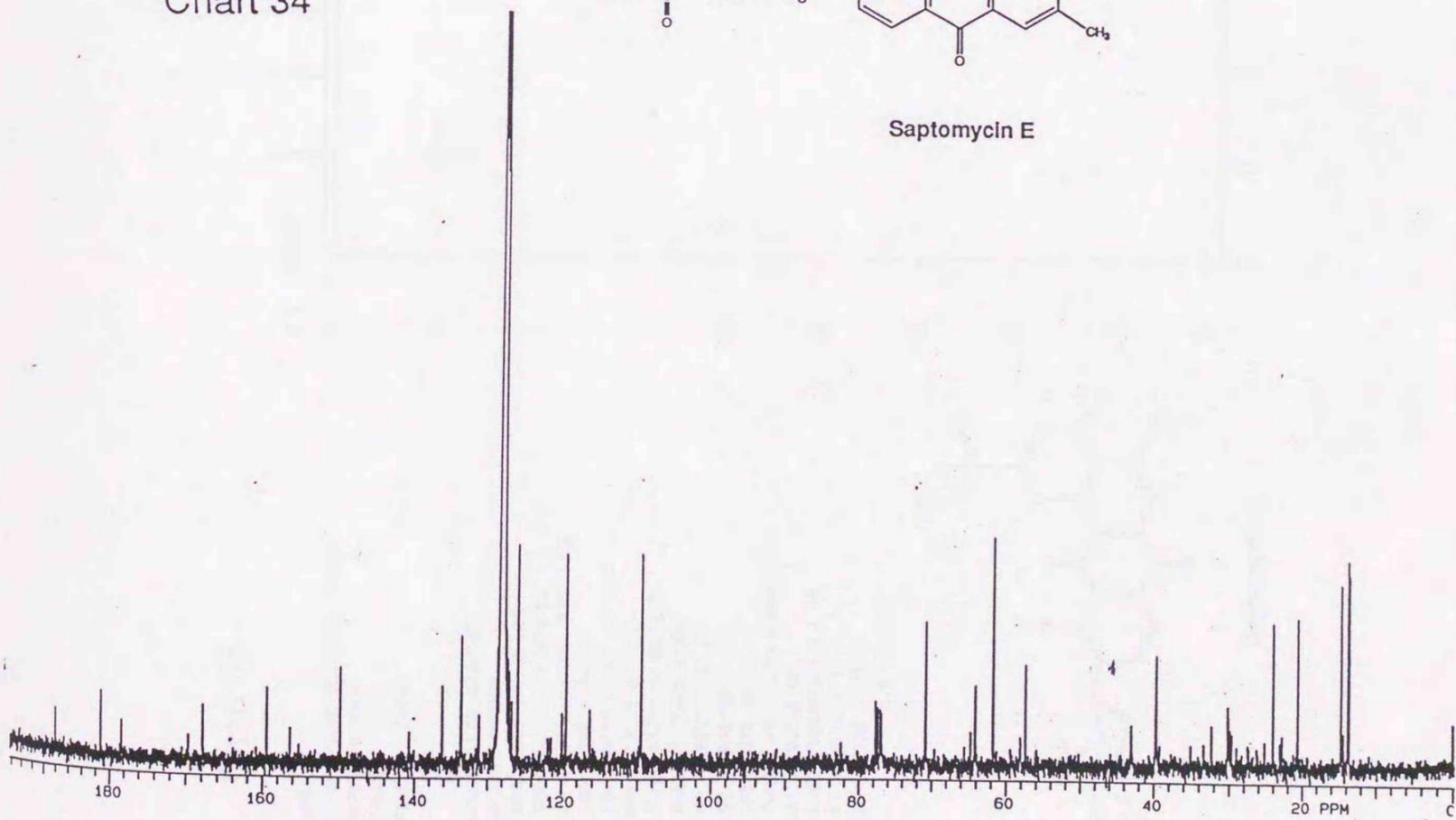
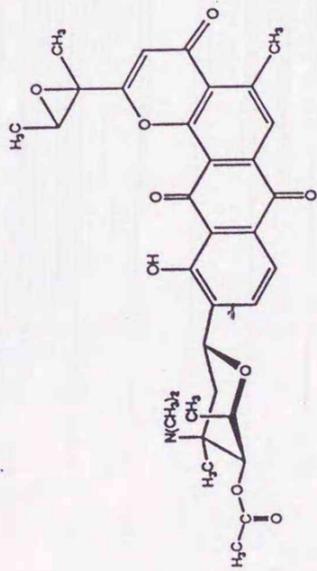


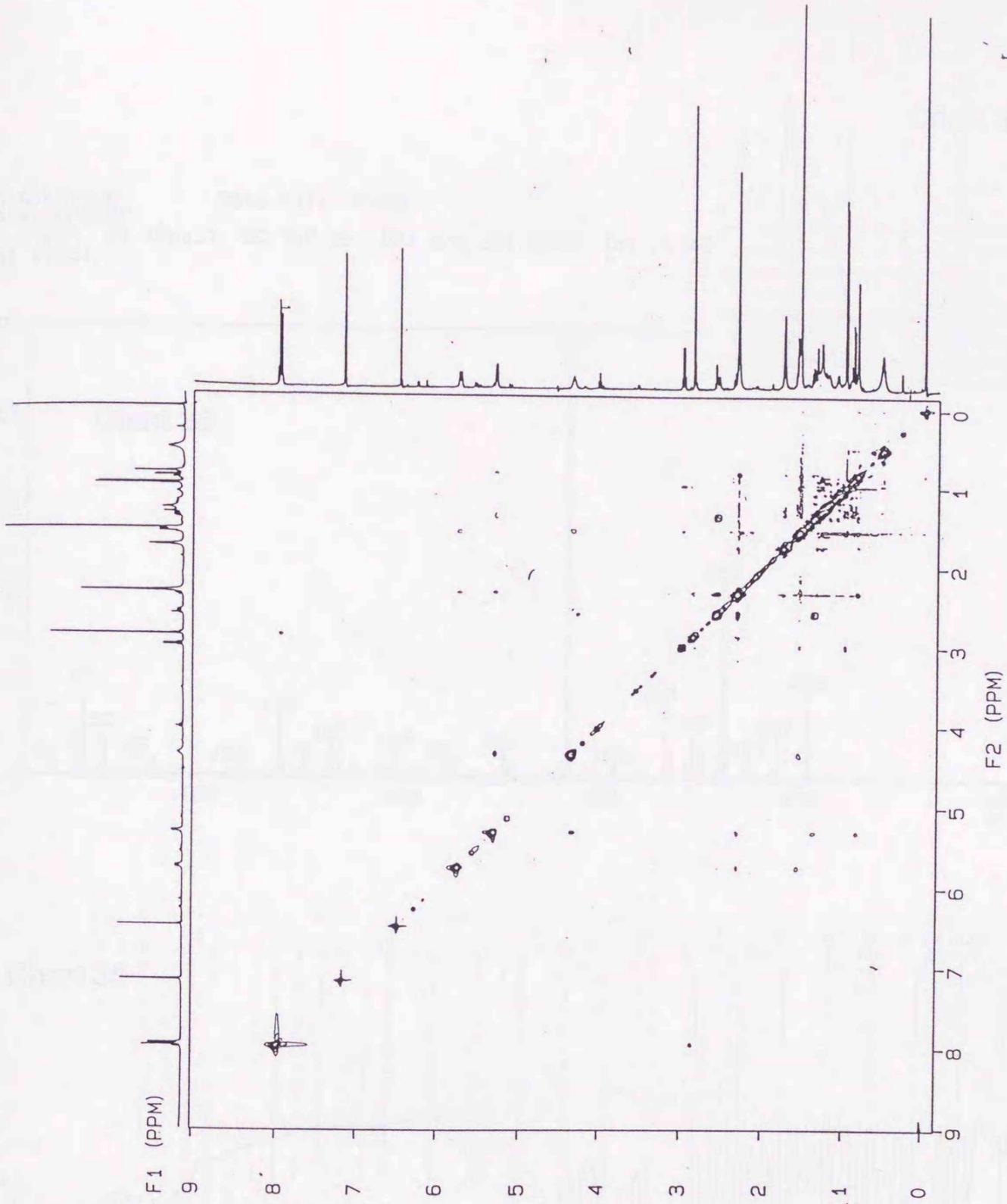
Chart 35

HP530E
 EXP8 PULSE SEQUENCE: NOESY
 DATE 04-25-90
 SOLVENT C6D6
 FILE 04232

NOESY PULSE SEQUENCE
 OBSERVE PROTON
 FREQUENCY 399.95 MHZ
 SPECTRAL WIDTH 3670 HZ
 2D SPECTRAL WIDTH 3669.7 HZ
 ACQ. TIME 0.14 SEC
 RELAXATION DELAY 1.0 SEC
 MIXING TIME 0.5 SEC
 PULSE WIDTH 90 DEGREES
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPETITIONS 16
 NO. INCREMENTS 256
 SPIN RATE 20 HZ
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.1 HZ
 FT SIZE 1K X 1K
 TOTAL TIME 2 HOURS
 8.6 MINUTES



Saptomycin E



MASS SPECTRUM Data File: EN08
 Sample: HP530F
 RT 2'24" EI (Pos.) GC 318.9c BP: m/z 281.0000 Int. 1342
 Scan# (145)

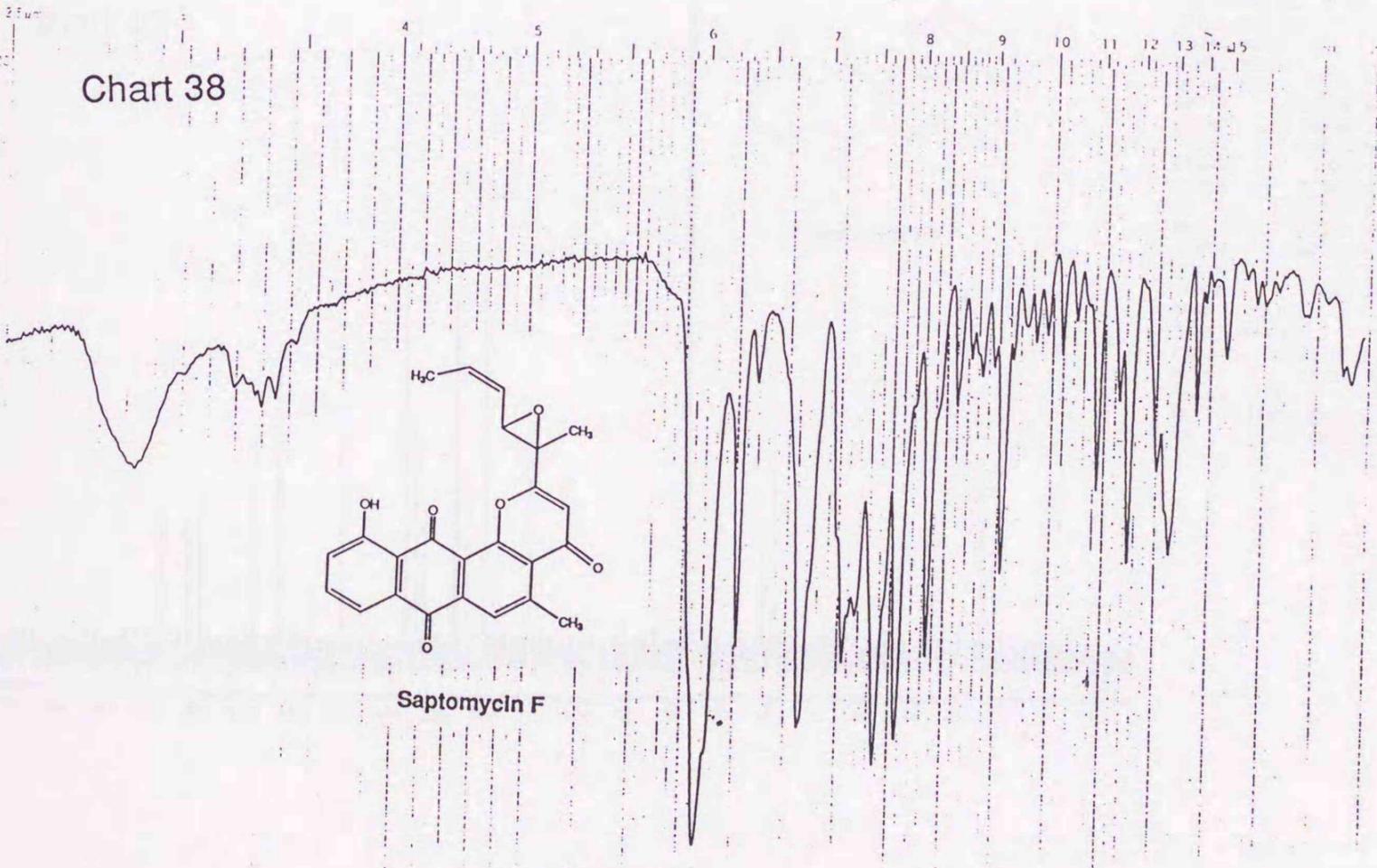
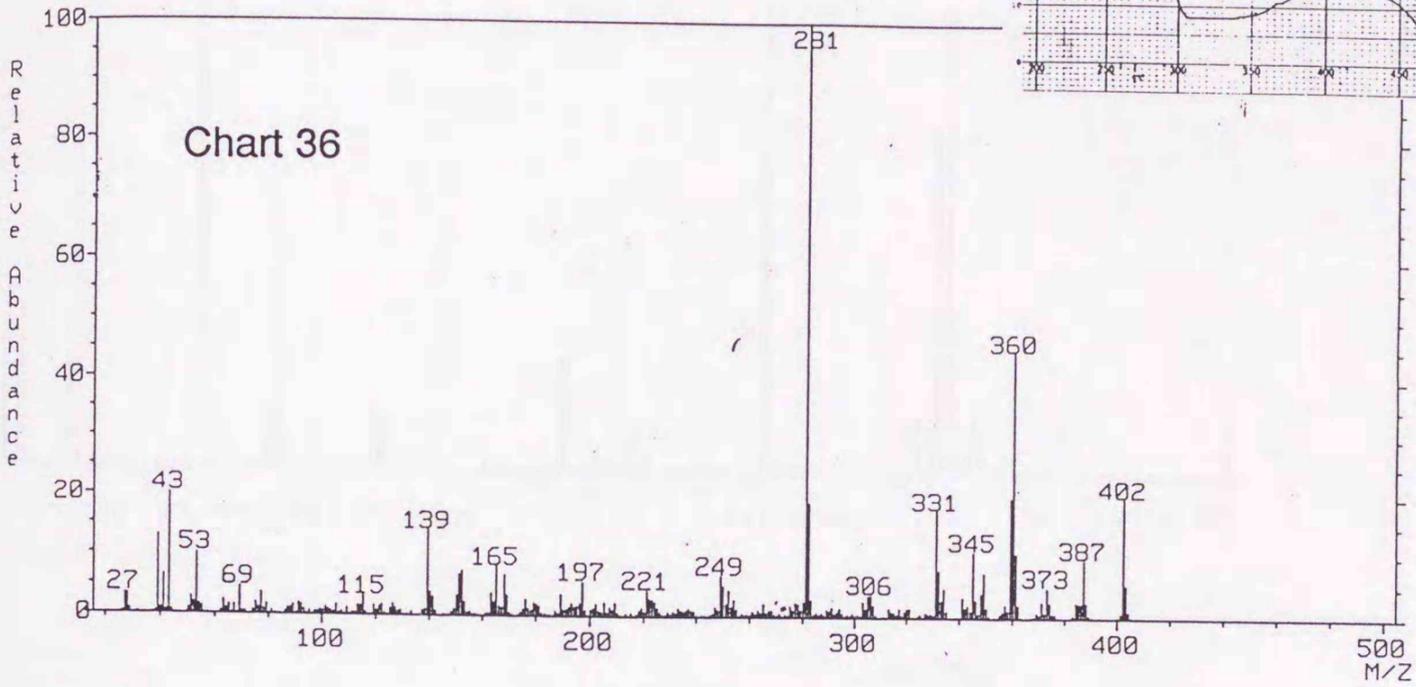
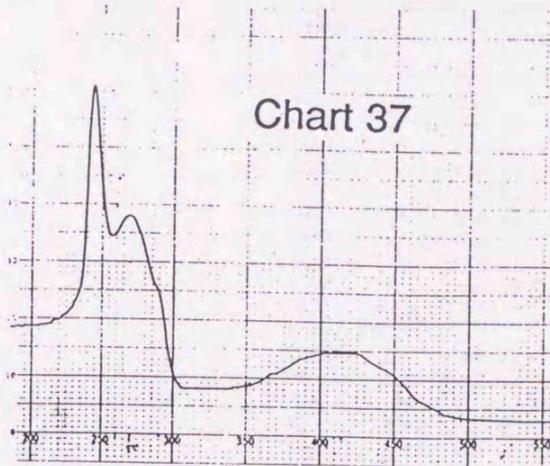
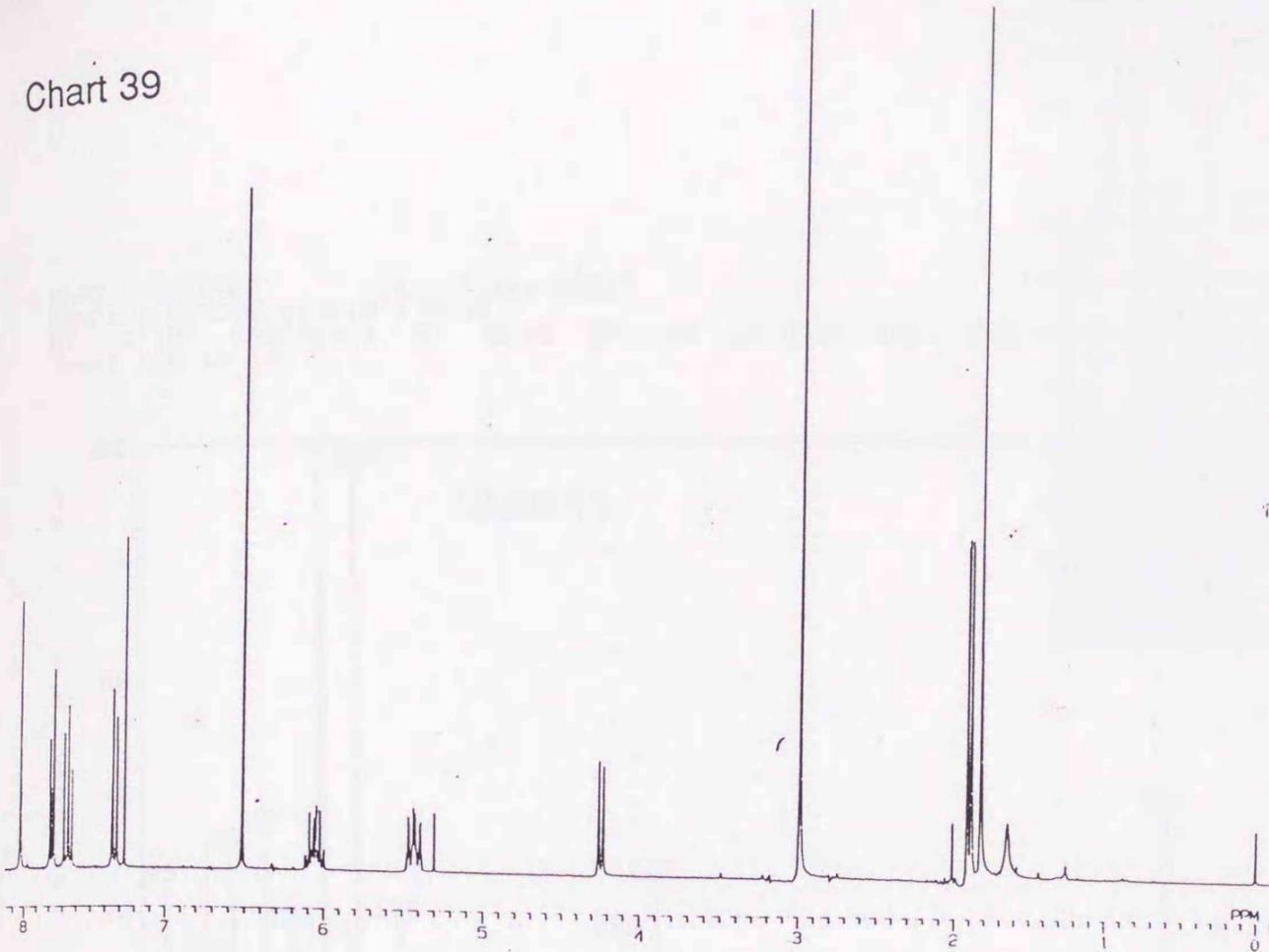
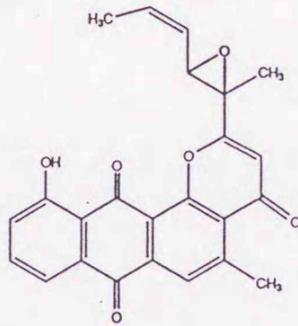


Chart 39

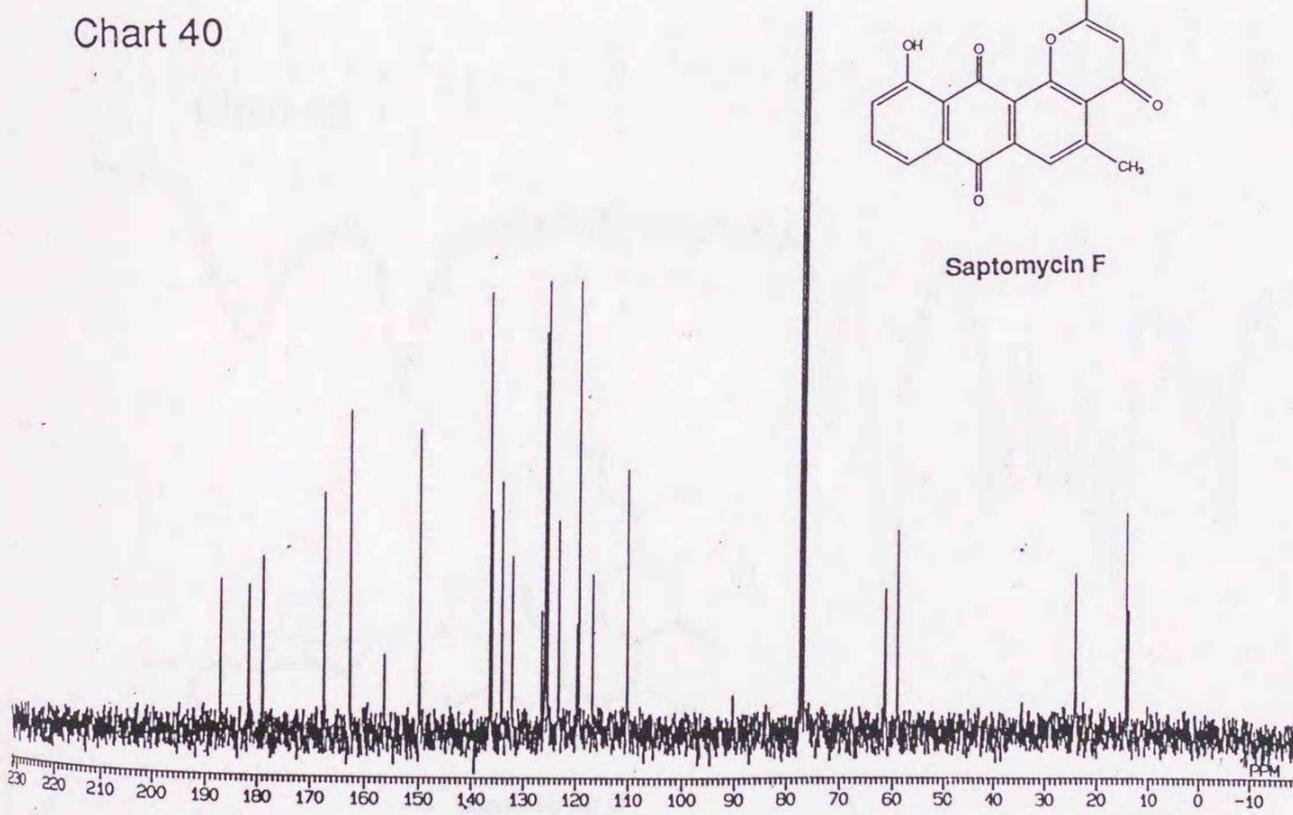


23-FEB-90 17. 10. 45
 DFILE SAVING
 COMNT 1H-NORMAL-CONDI
 EXMOD SGNON
 OBNUC 1H
 OBFIN 5400.0 Hz
 POINT 16384
 FREQU 4000.0 Hz
 SCANS 16
 ACQTM 2.048 sec
 PD 4.000 sec
 PW1 5.0 us
 IRFIN 5400.0 Hz
 IRATN 0
 IRRPW 50 us
 TEMP 27.0 c
 SLVNT CDCL3
 EXREF 0.00 ppm
 BF 0.10 Hz
 RGAIN 24
 XE 2242.1070 Hz
 XS 11.7234 Hz

Chart 40

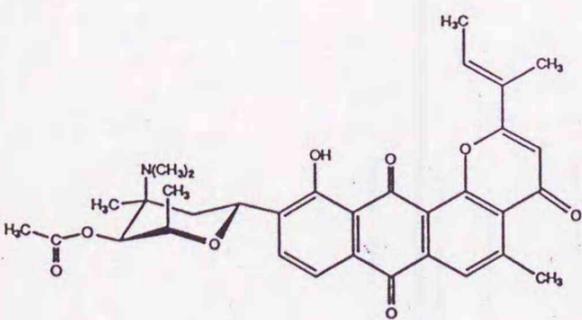
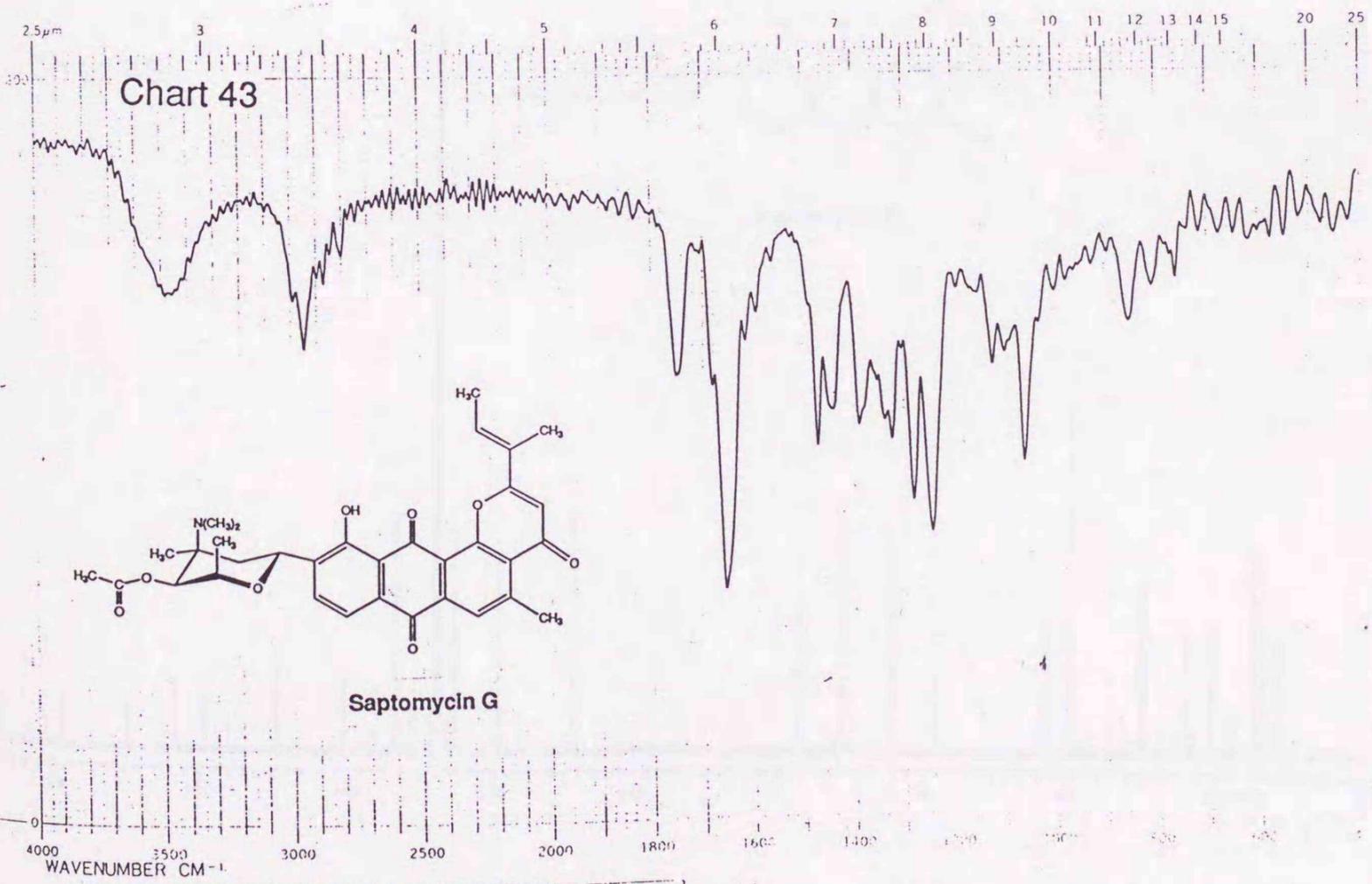
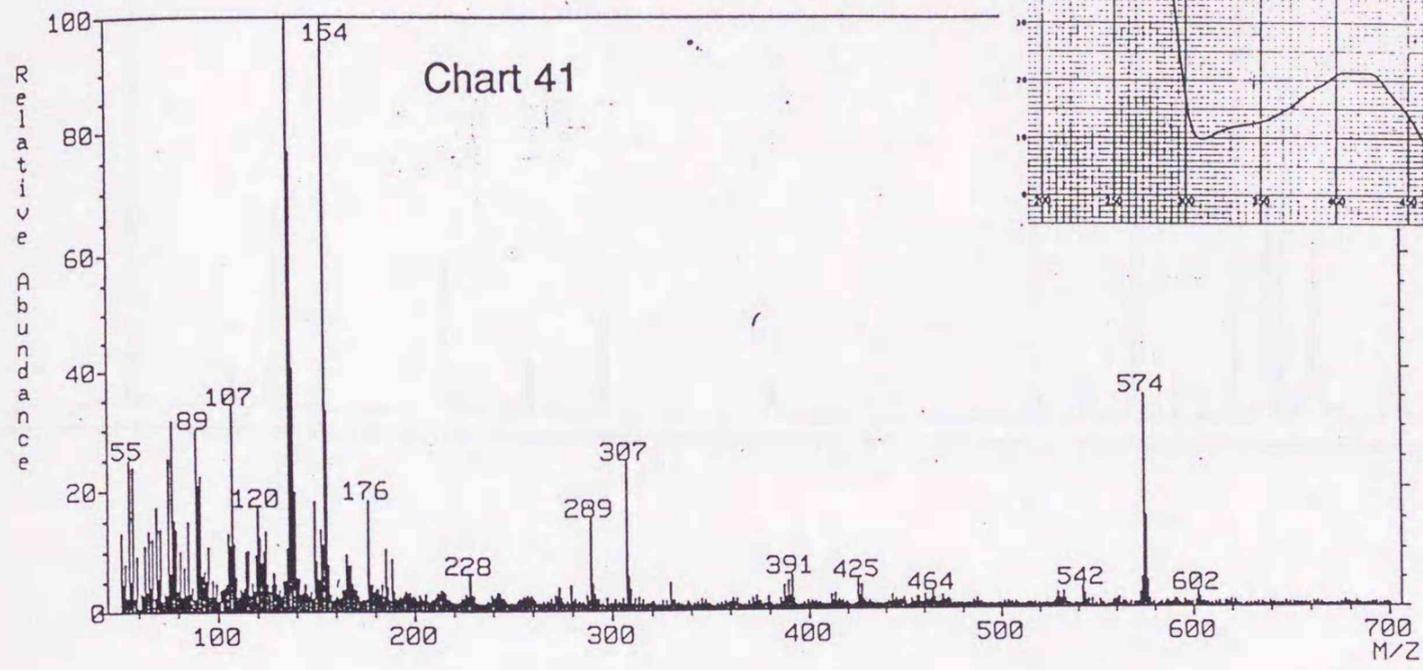
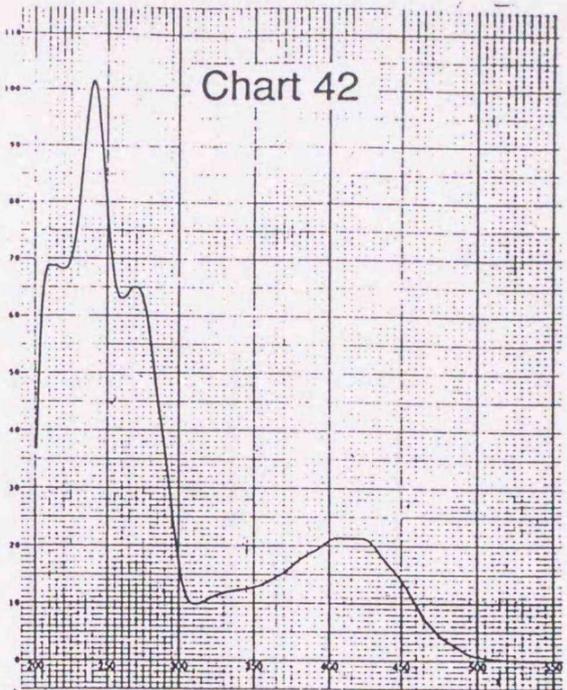


Saptomycin F



23-FEB-90 20. 10. 40
 DFILE SAVING
 COMNT H540E
 EXMOD SGBCM
 OBNUC 13C
 OBFIN 5600.0 Hz
 POINT 32768
 FREQU 17006.8 Hz
 SCANS 1024
 ACQTM 0.963 sec
 PD 2.037 sec
 PW1 5.0 us
 IRFIN 5400.0 Hz
 IRATN 0
 IRRPW 50 us
 TEMP 27.0 c
 SLVNT CDCL3
 EXREF 77.00 ppm
 BF 1.00 Hz
 RGAIN 28
 XE 17006.8000 Hz
 XS 0.0000 Hz

MASS SPECTRUM Data File: ABE17
 Sample: HP530G (CHCl3 + NBA)
 RT 1'10" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 136.0000 Int. 1211
 Scan# (10 to 12)



Saptomycin G

Chart 44

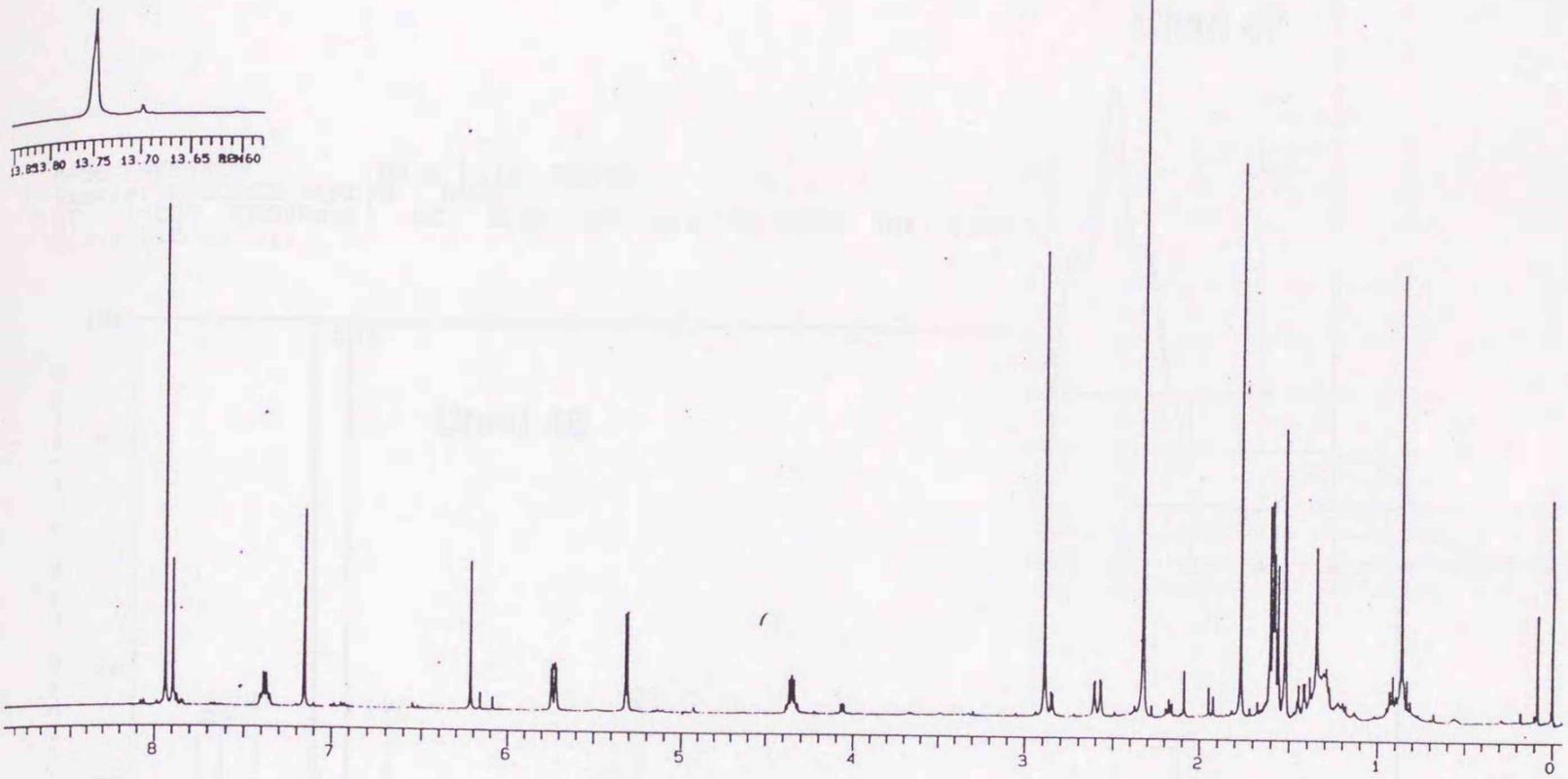
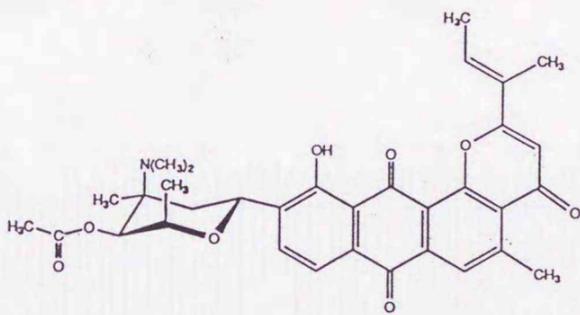
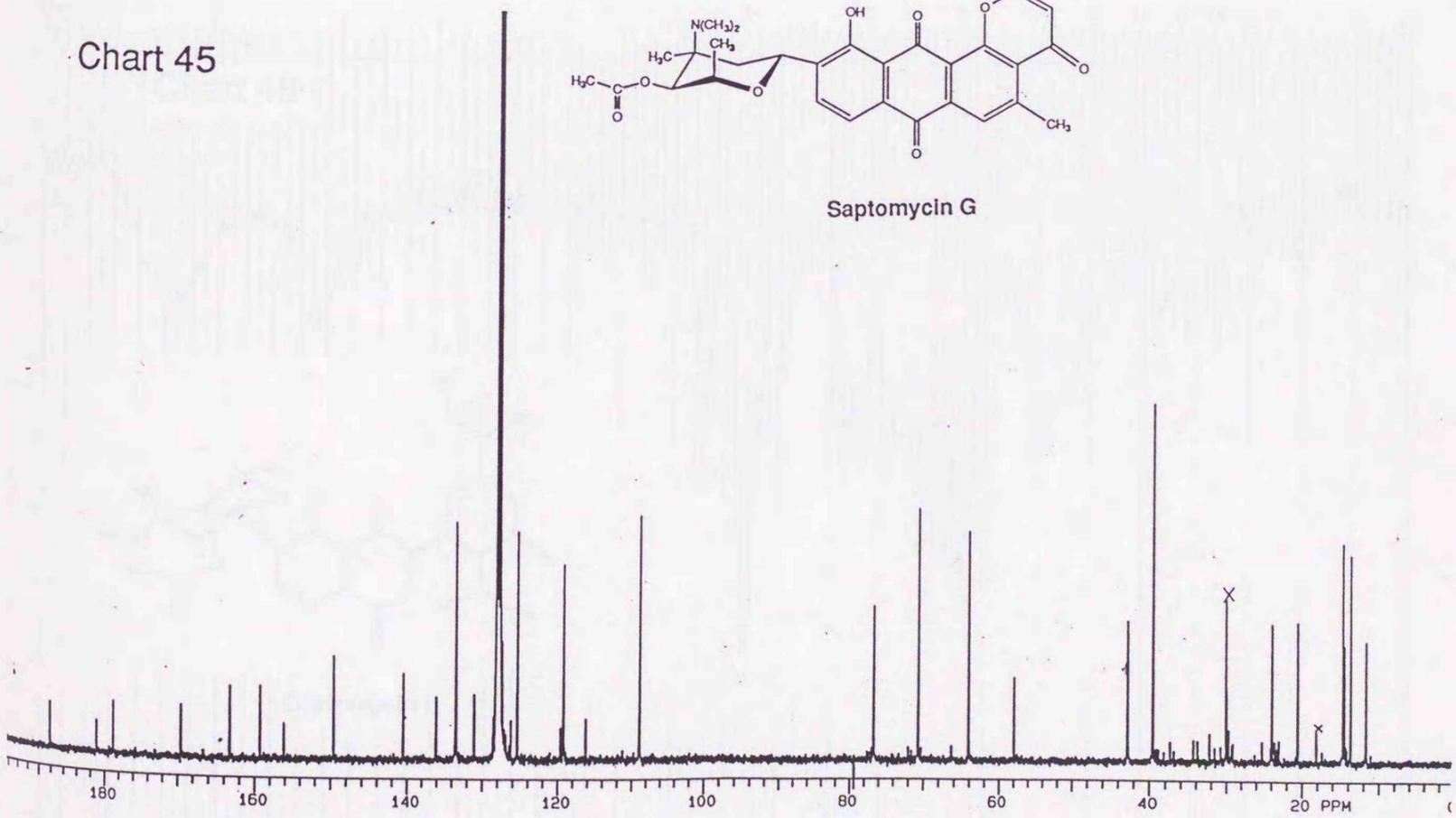


Chart 45



Saptomycin G



MASS SPECTRUM Data File: ABE16
 Sample: HP530E3 (CHCl3 + NBA)
 RT 1'03" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 136.0000 Int. 1304
 Scan# (10 to 11)

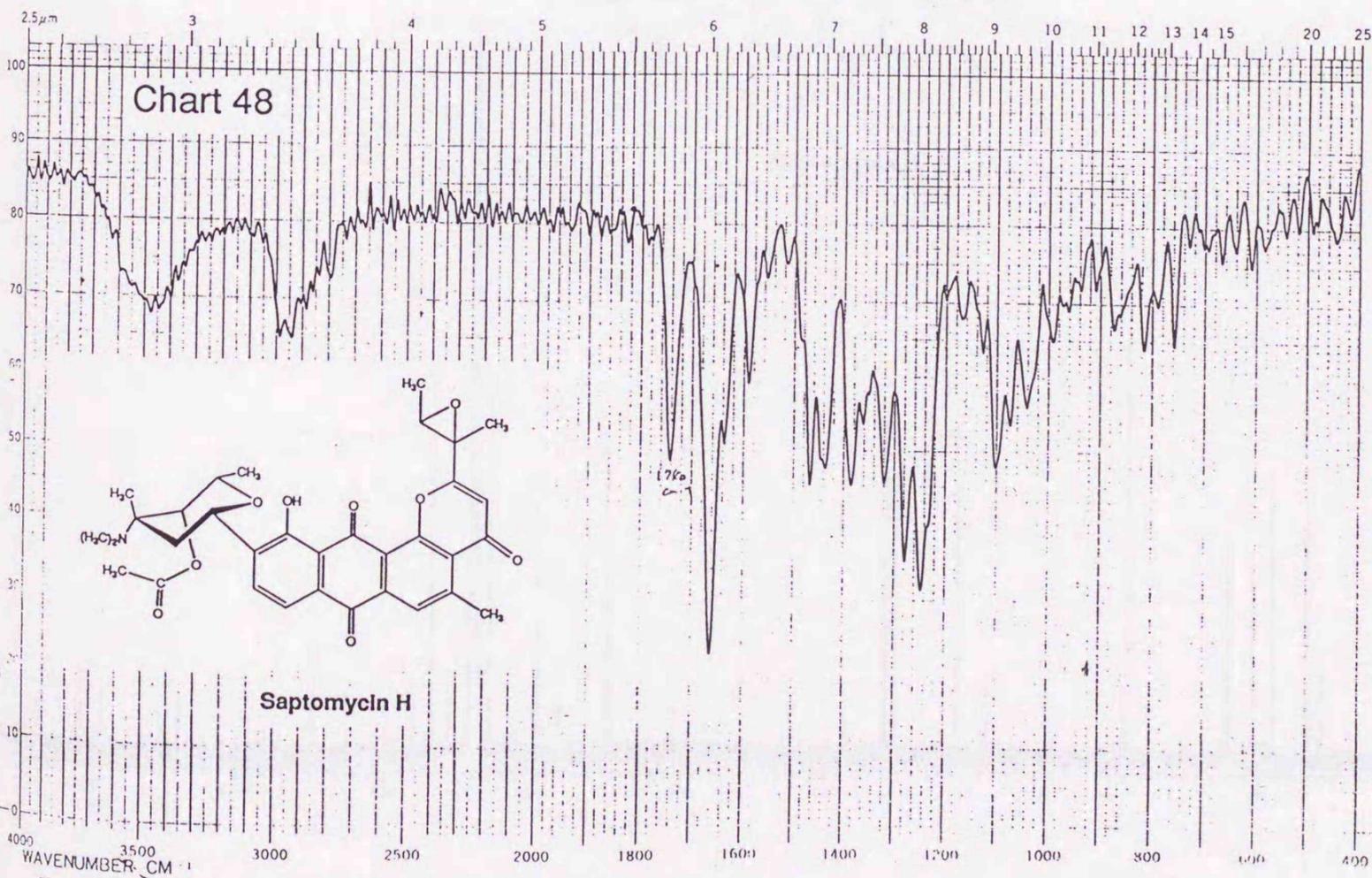
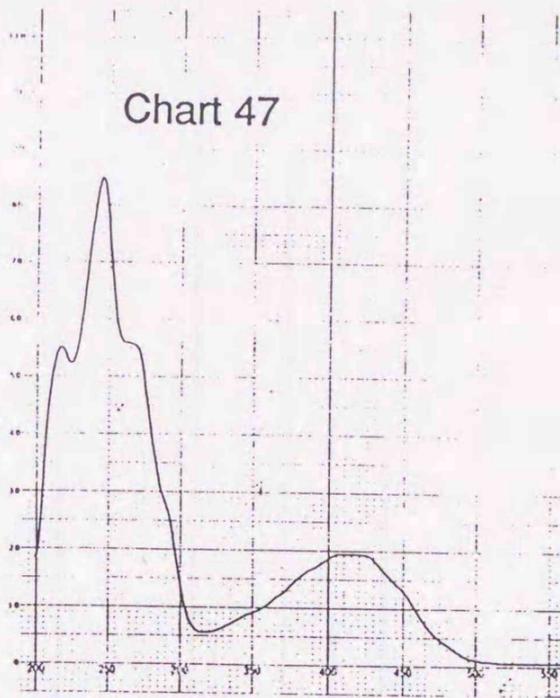
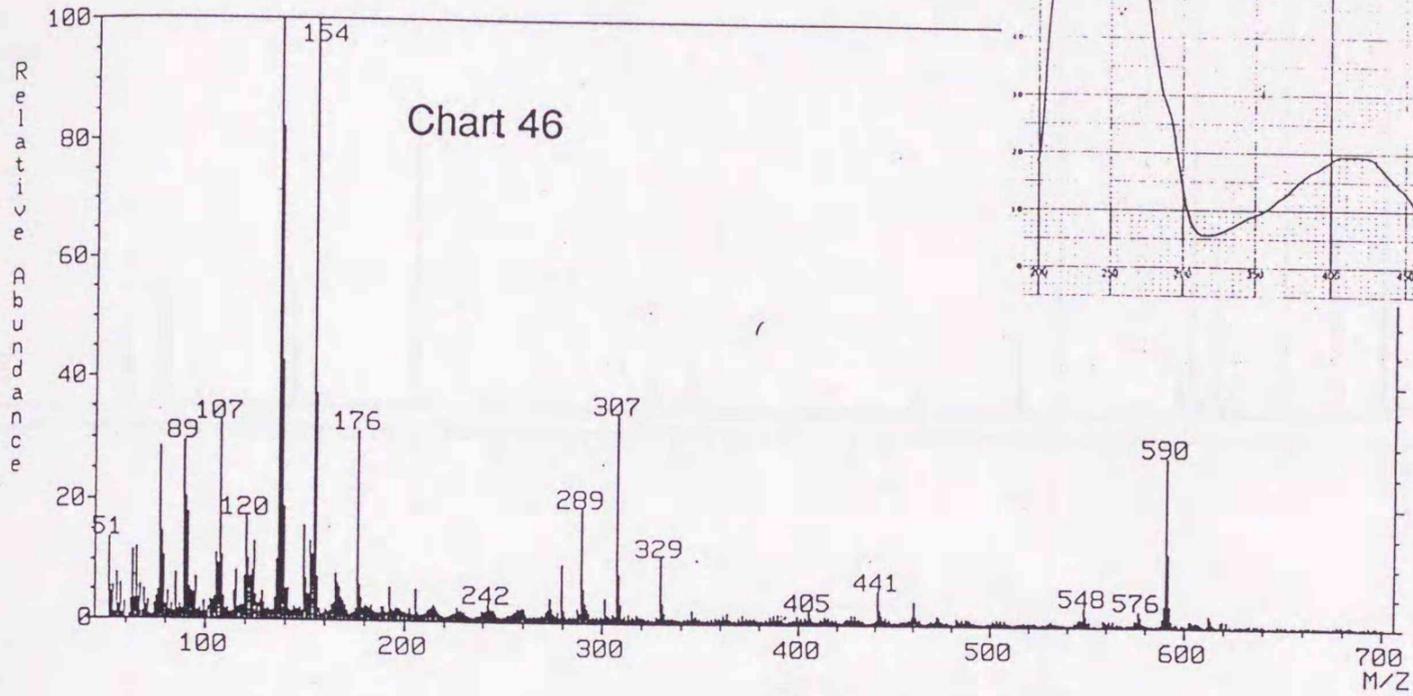


Chart 49

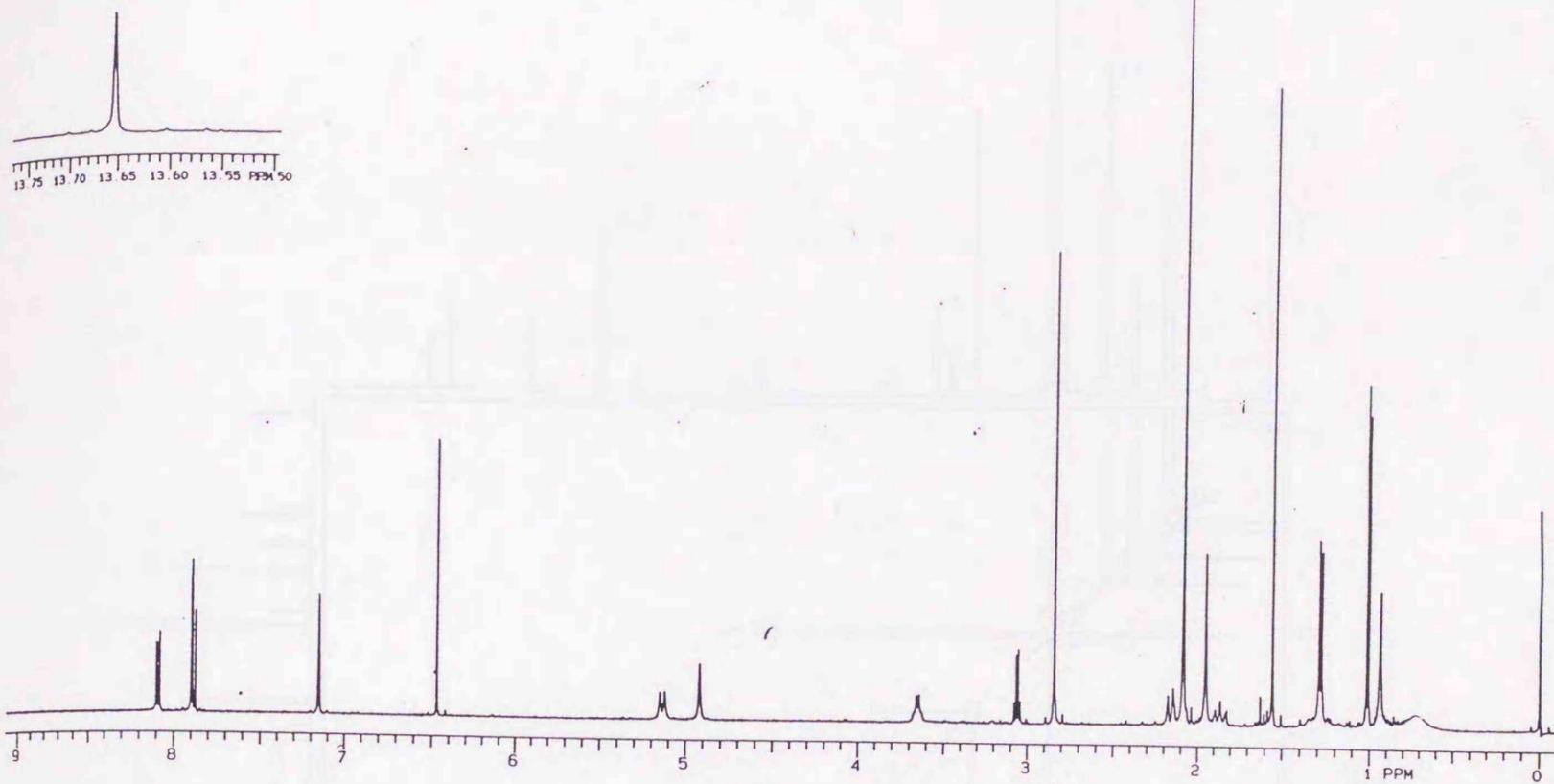
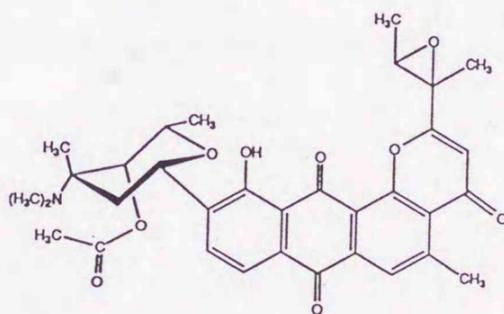


Chart 50



Saptomycin H

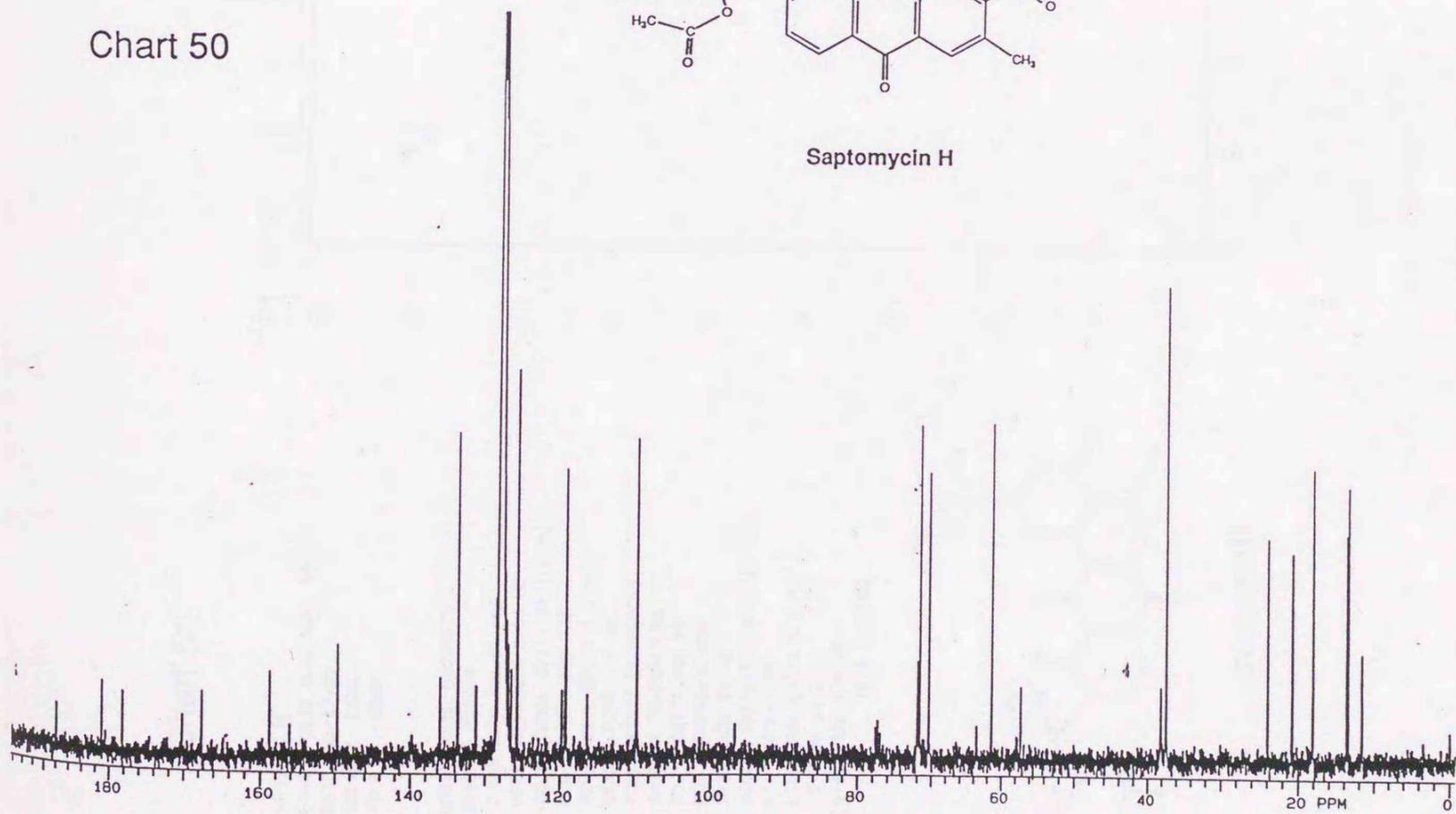
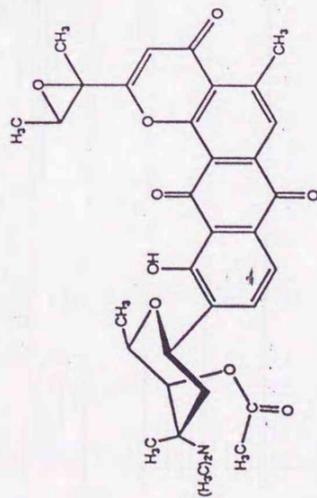


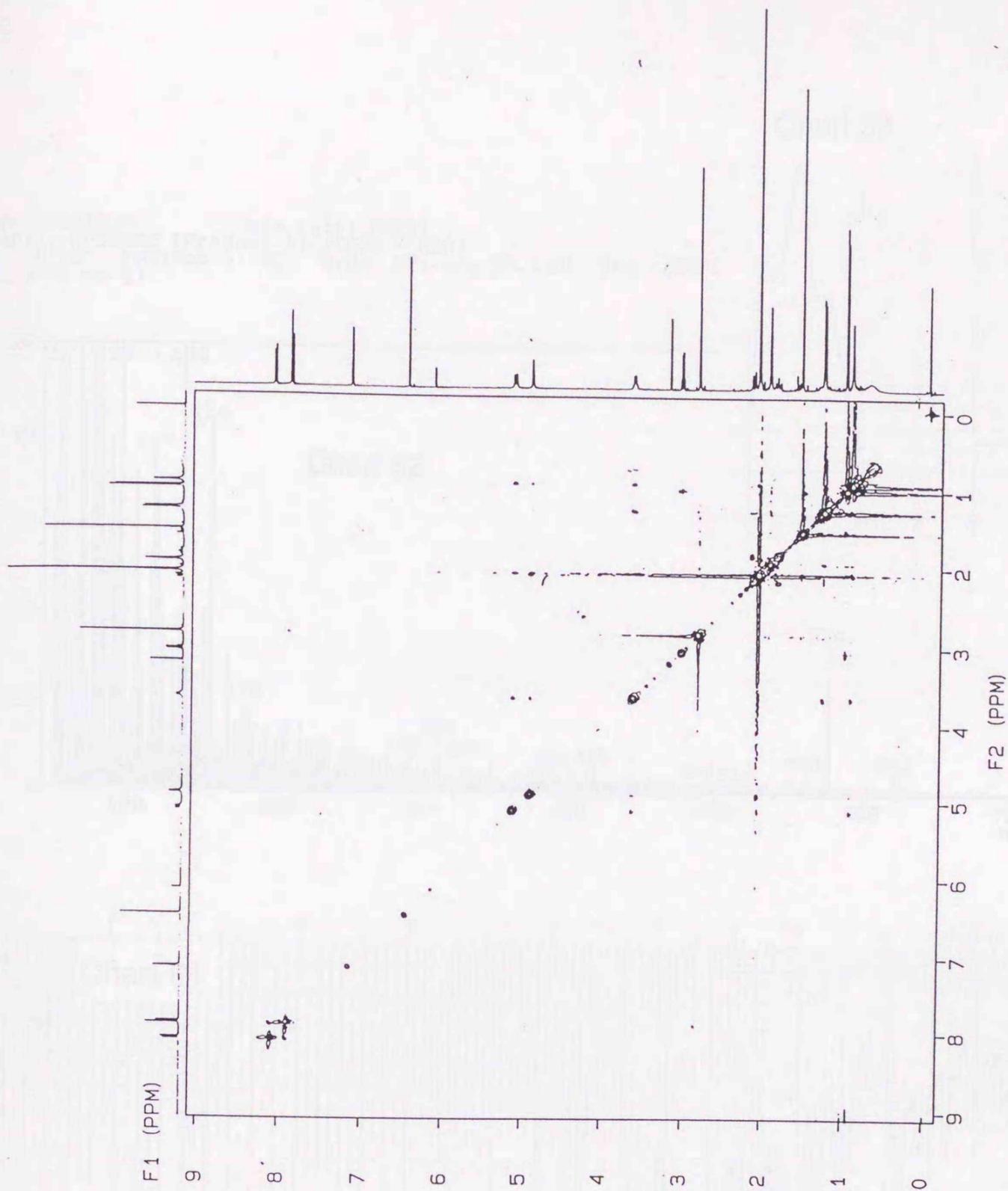
Chart 51

HP530EX H
 EXP8 PULSE SEQUENCE: NOESY
 DATE 90-10-05
 SOLVENT C6D6
 FILE NOESY

NOESY PULSE SEQUENCE
 OBSERVE PROTON
 FREQUENCY 399.95 MHZ
 SPECTRAL WIDTH 3701 HZ
 2D SPECTRAL WIDTH 3701.0 HZ
 ACQ. TIME 0.138 SEC
 RELAXATION DELAY 1.0 SEC
 MIXING TIME 0.2 SEC
 PULSE WIDTH 90 DEGREES
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPETITIONS 16
 NO. INCREMENTS 256
 SPIN RATE 20 HZ
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.1 HZ
 FT SIZE 1K X 1K
 TOTAL TIME 1 HOUR
 45.4 MINUTES



Saptomycin H



MASS SPECTRUM Data File: ABE11
 Sample: HP530D2 [Product 1] (C6D6 + NBA)
 RT 0'28" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 95.1101 Int. 1570.
 Scan# (5 to 6)

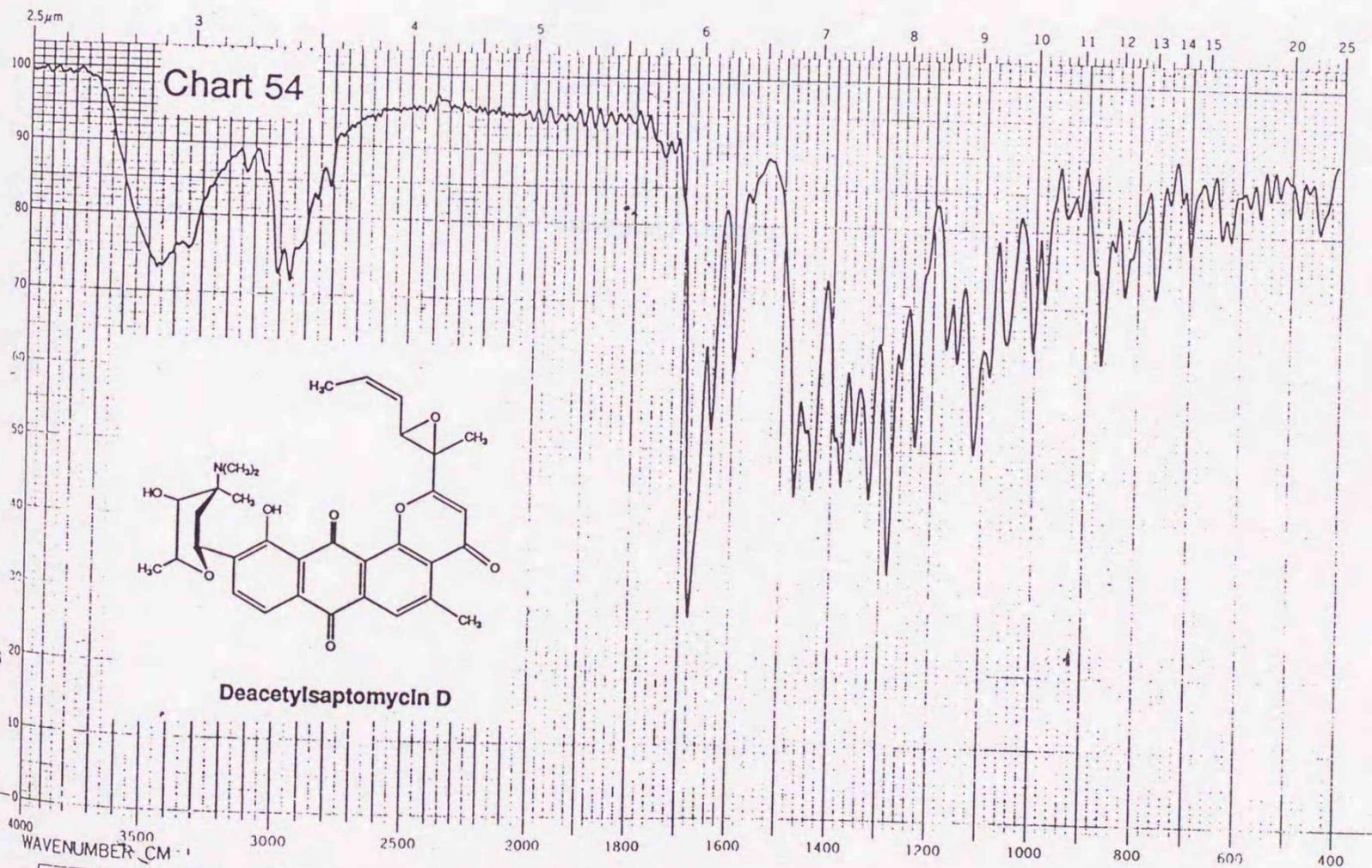
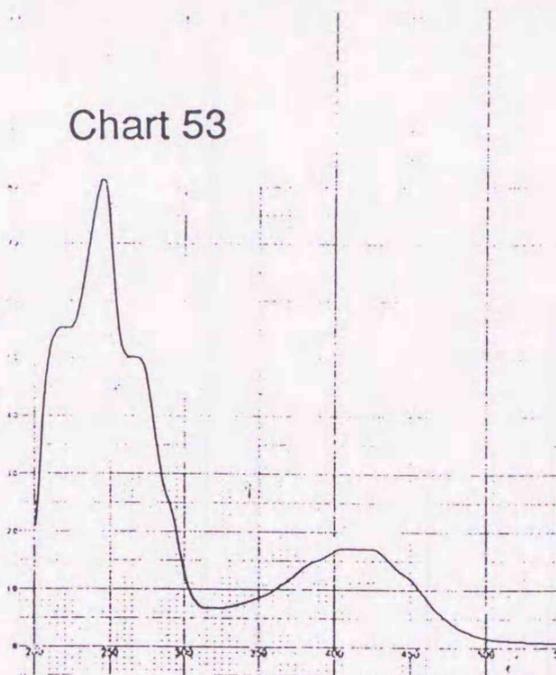
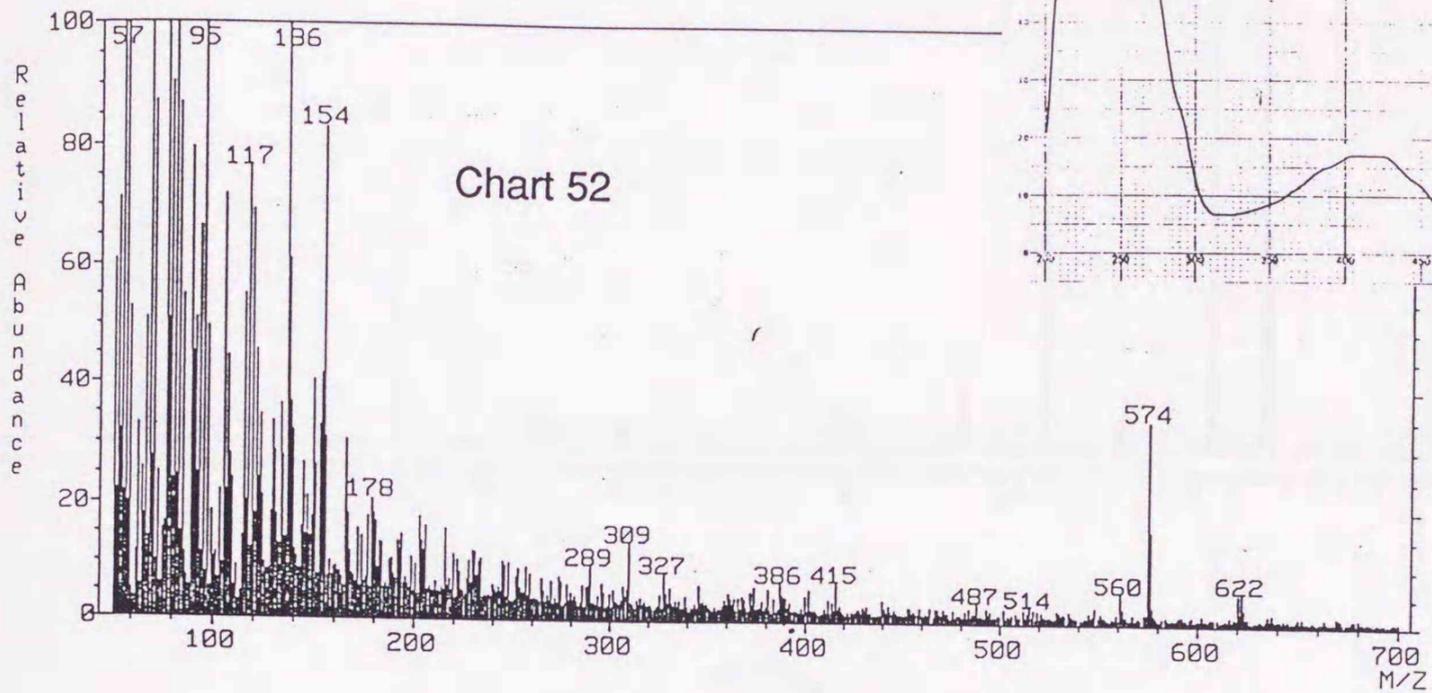
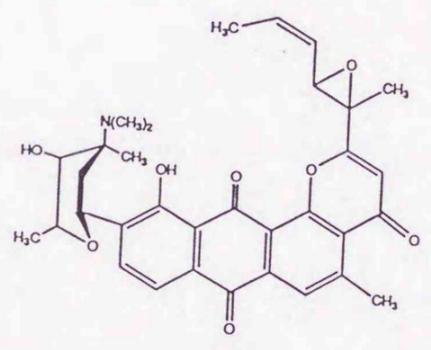
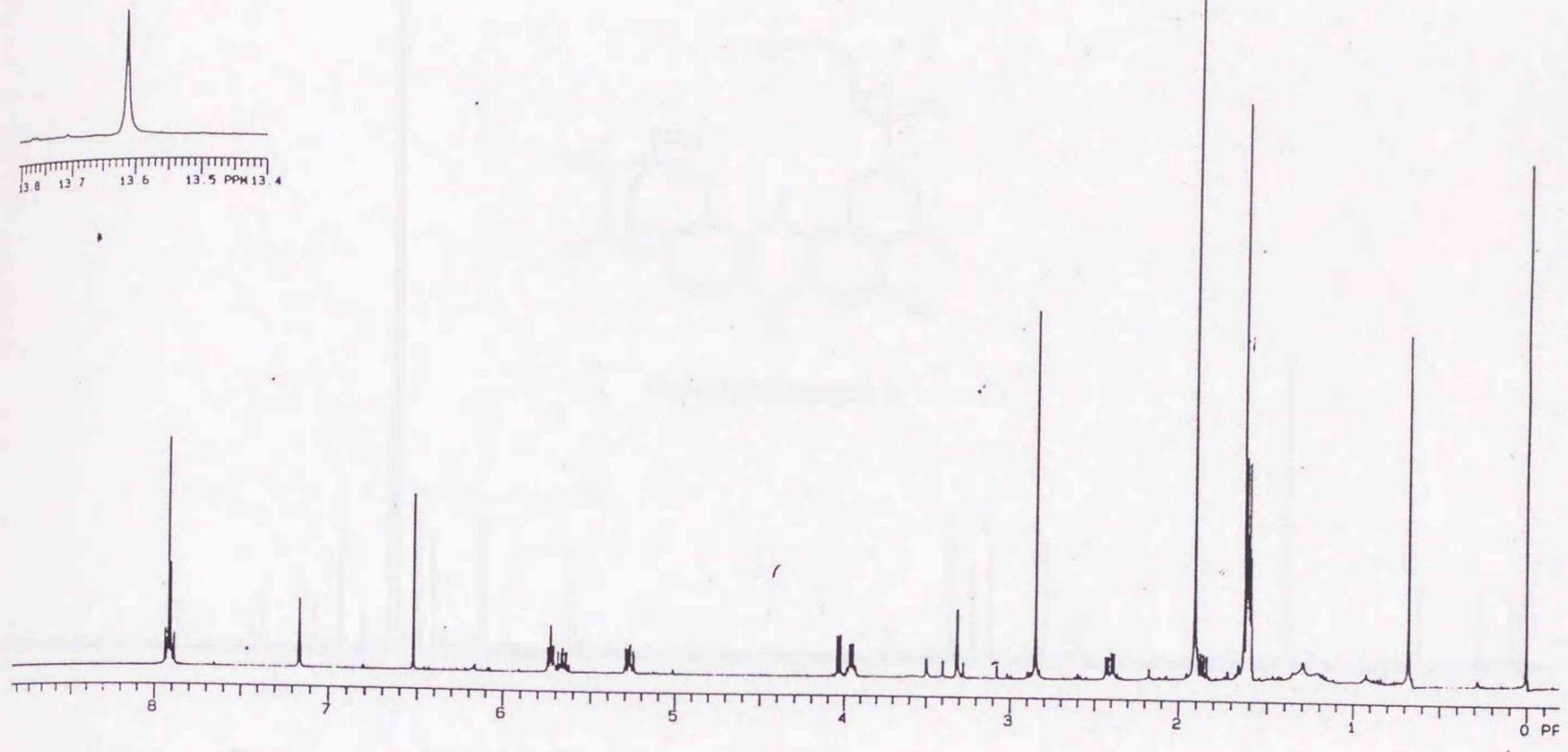
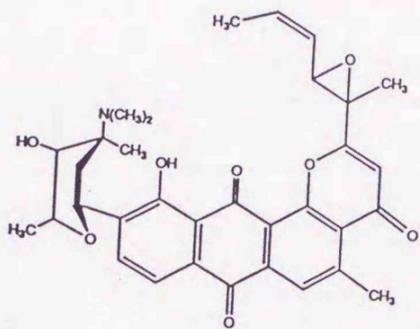


Chart 55

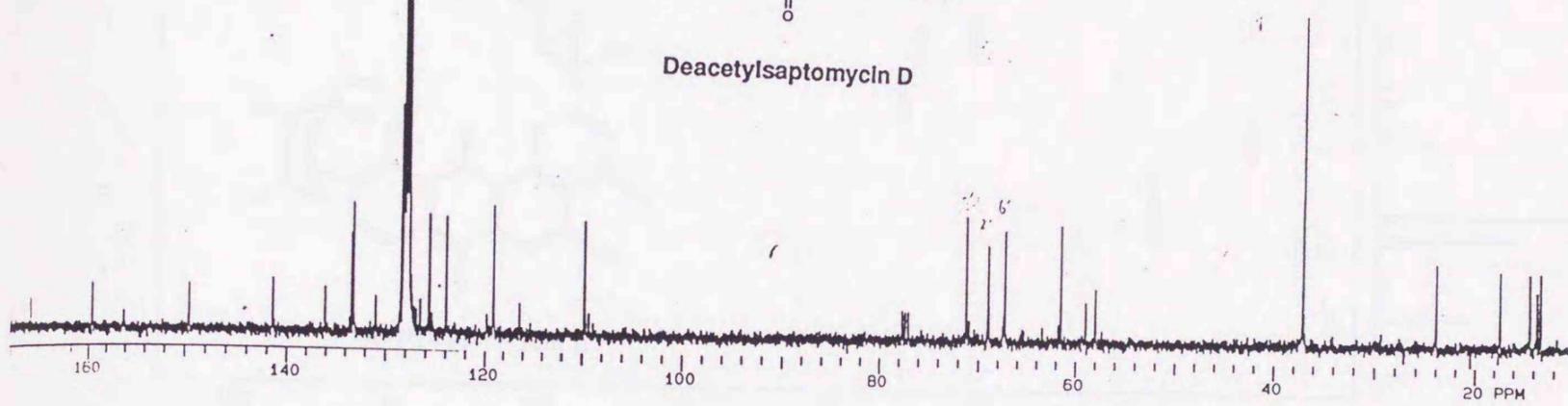


Deacetylsaptomycin D

Chart 56

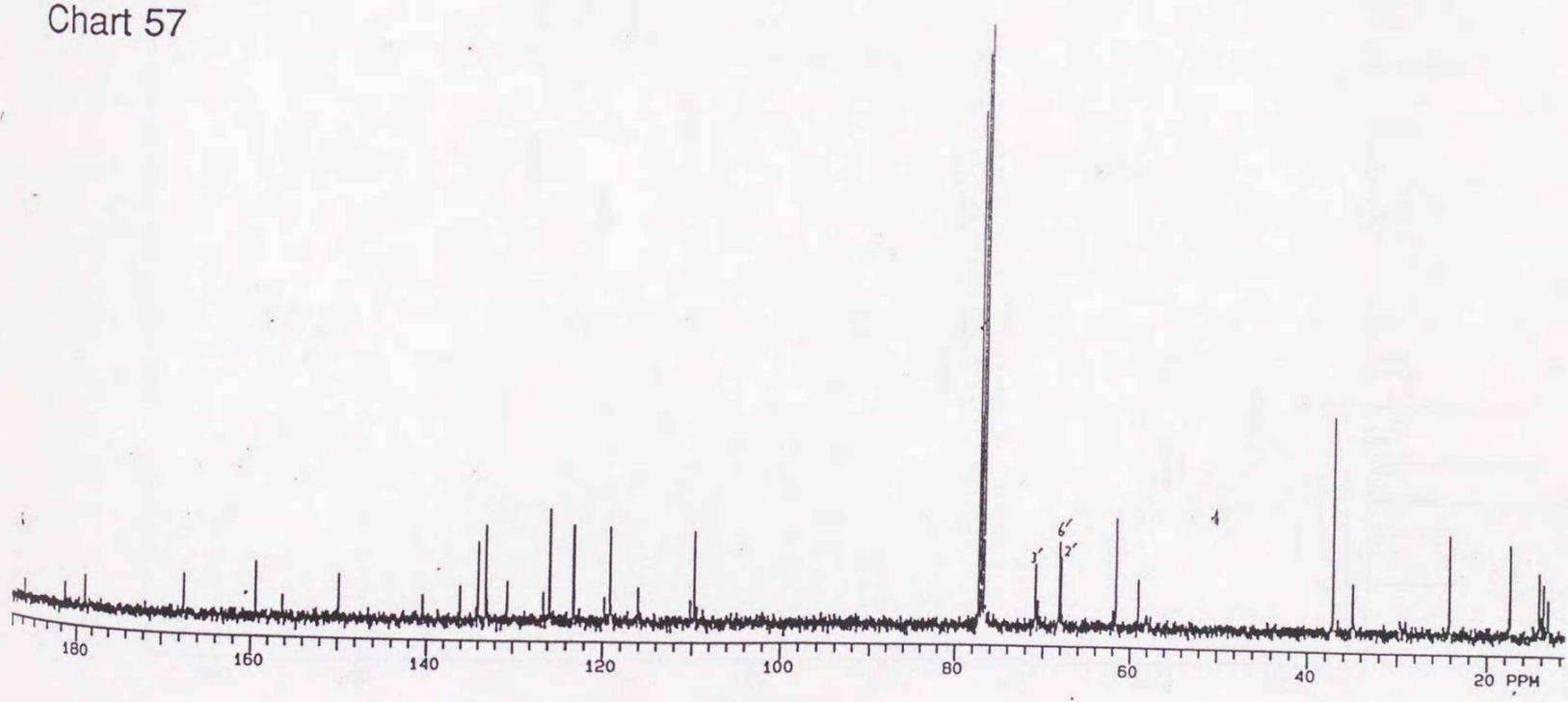


Deacetylsaptomycin D



| | | | | | | | | | |
|---------|--------|-------|------|---------|-----|-------|--------|----------------------|----------|
| 13.750 | 101 | 1.750 | 96.9 | 32 | --- | --- | STD13C | | |
| 16155.1 | -815.7 | YYY | 20 | 1.000 | --- | --- | | DEACETYLSAPTOMYSIN D | C |
| 0.751 | 0 | S | 9900 | 16155.1 | --- | 960.2 | | | 91-09-02 |
| 5.0 | 8576 | 15.8 | 60.0 | | | | (C6D6) | | YXR 400 |

Chart 57



| | | | | | | | | | |
|---------|-------|-------|------|---------|-----|--------|---------|----------------------|----------|
| 13.750 | 101 | 1.750 | 75.0 | 32 | --- | --- | STD13C | | |
| 20000.0 | -79.6 | YYY | 20 | 1.000 | --- | --- | | DEACETYLSAPTOMYSIN D | C |
| 0.750 | 0 | S | 9900 | 18109.0 | --- | 1013.2 | | | 91-09-05 |
| 5.0 | 6464 | 15.8 | 60.0 | | | | (CDCl3) | | YXR 400 |

Chart 58

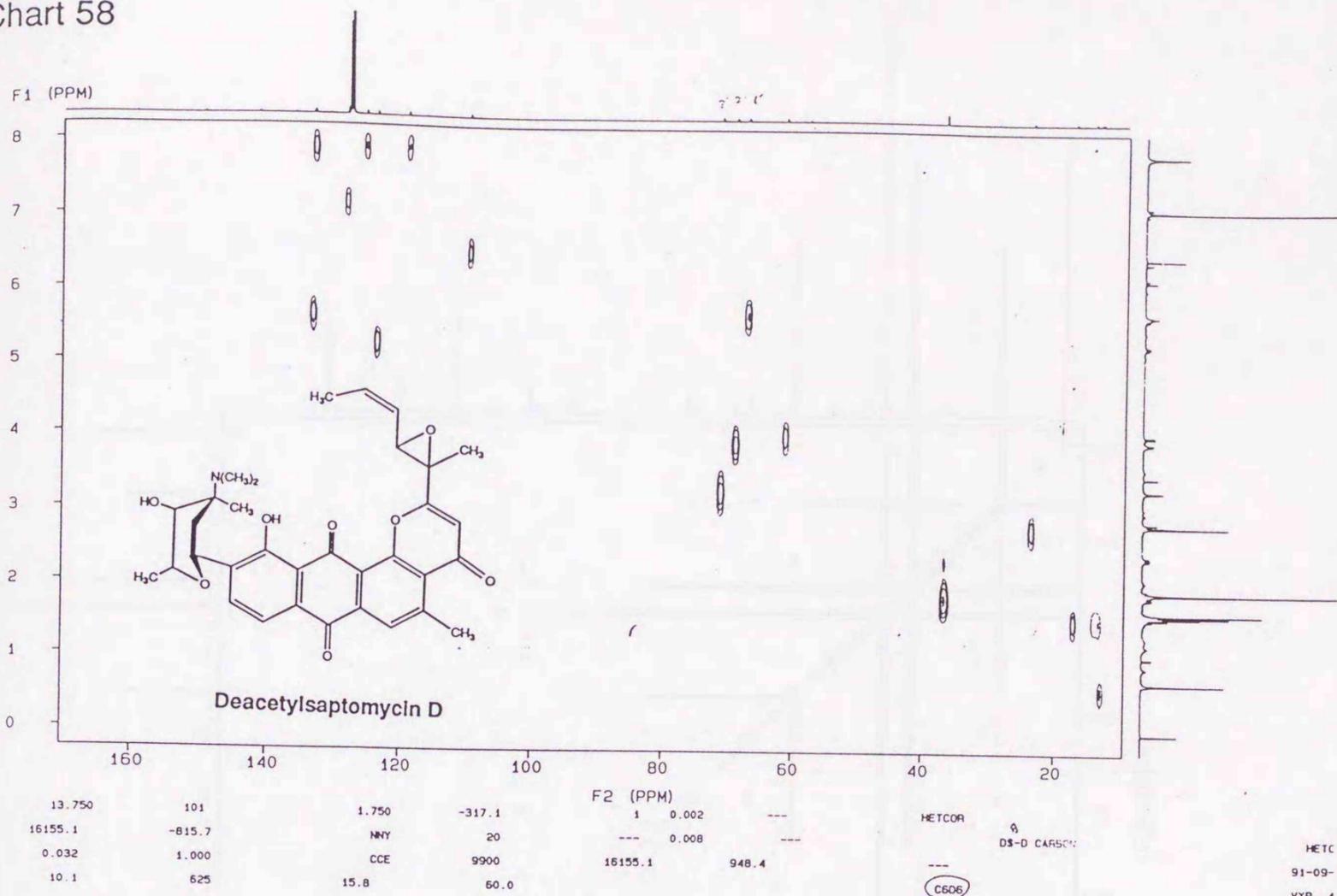


Chart 59

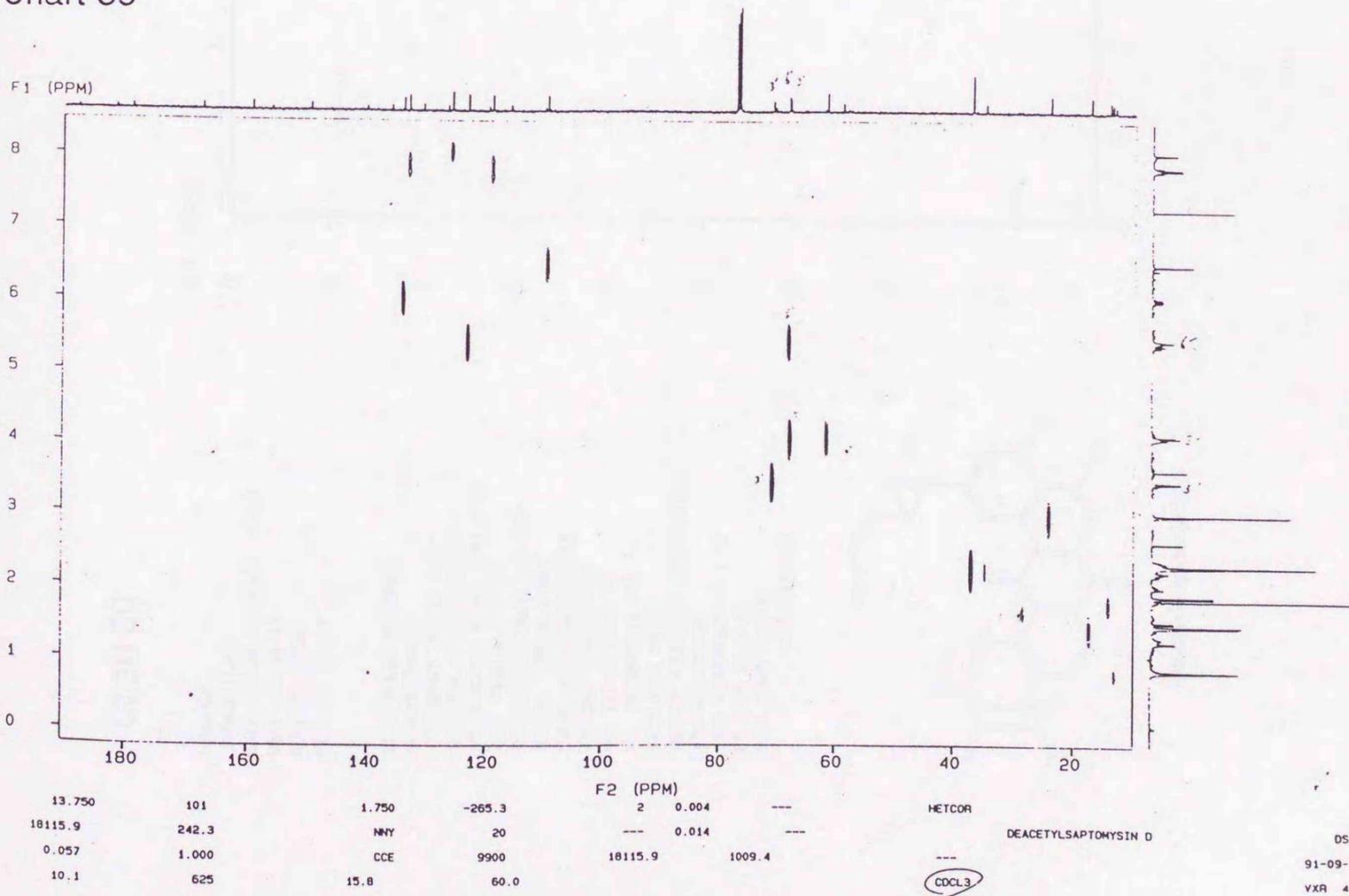
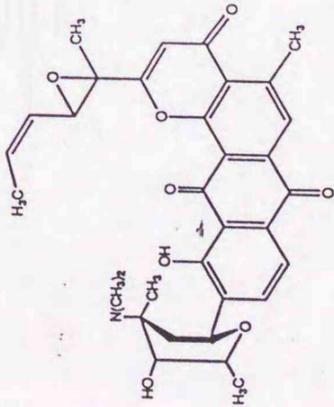


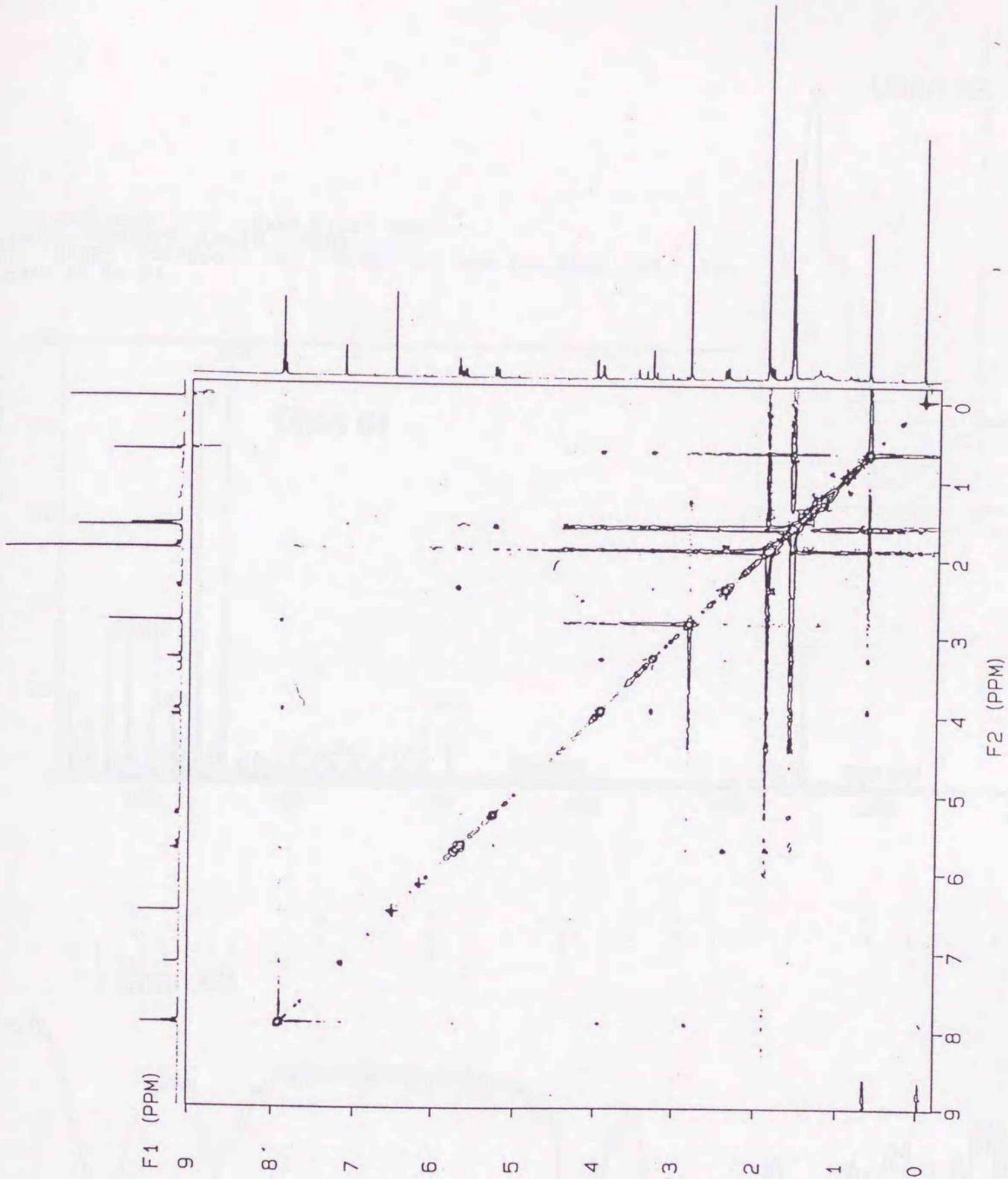
Chart 60

HP53002
 (DEACETYL-D)
 EXP8 PULSE SEQUENCE: NOESY
 DATE 90-09-10
 SOLVENT C6D6
 FILE NOESY

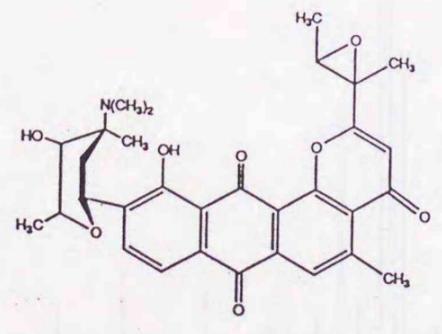
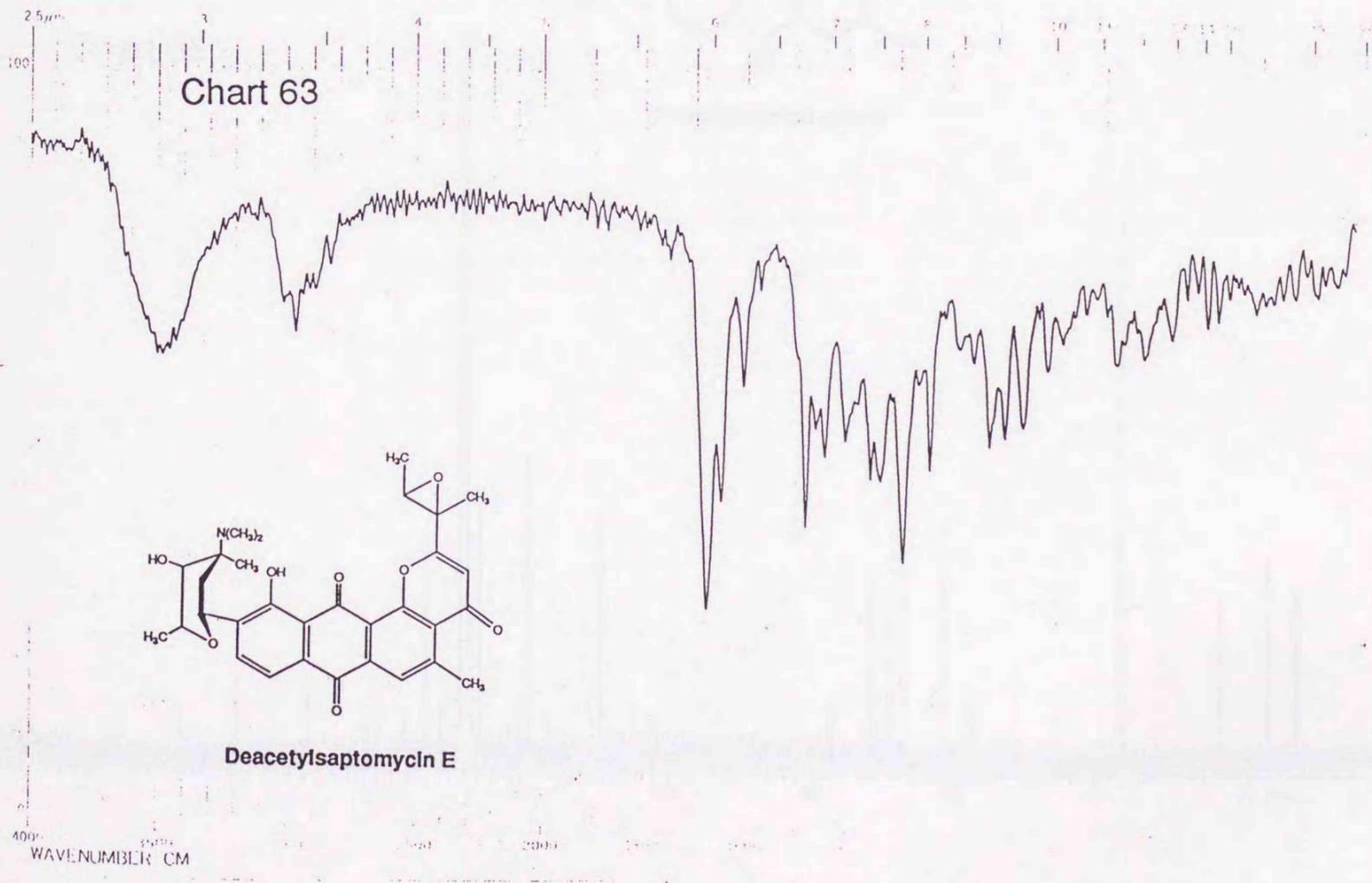
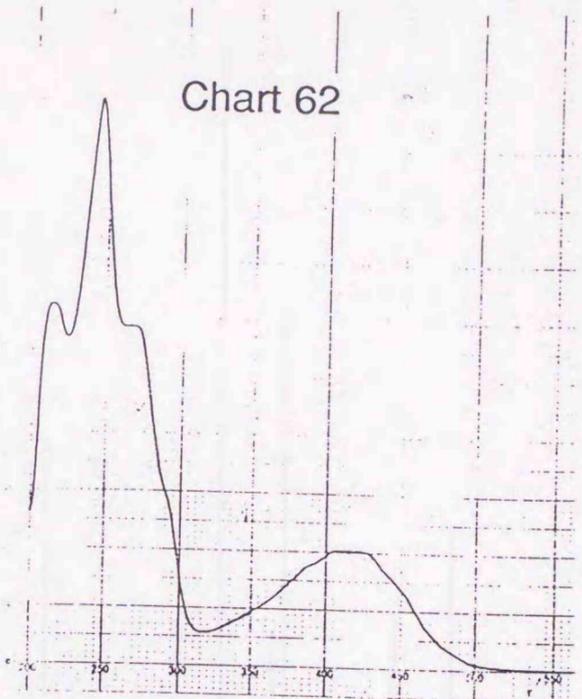
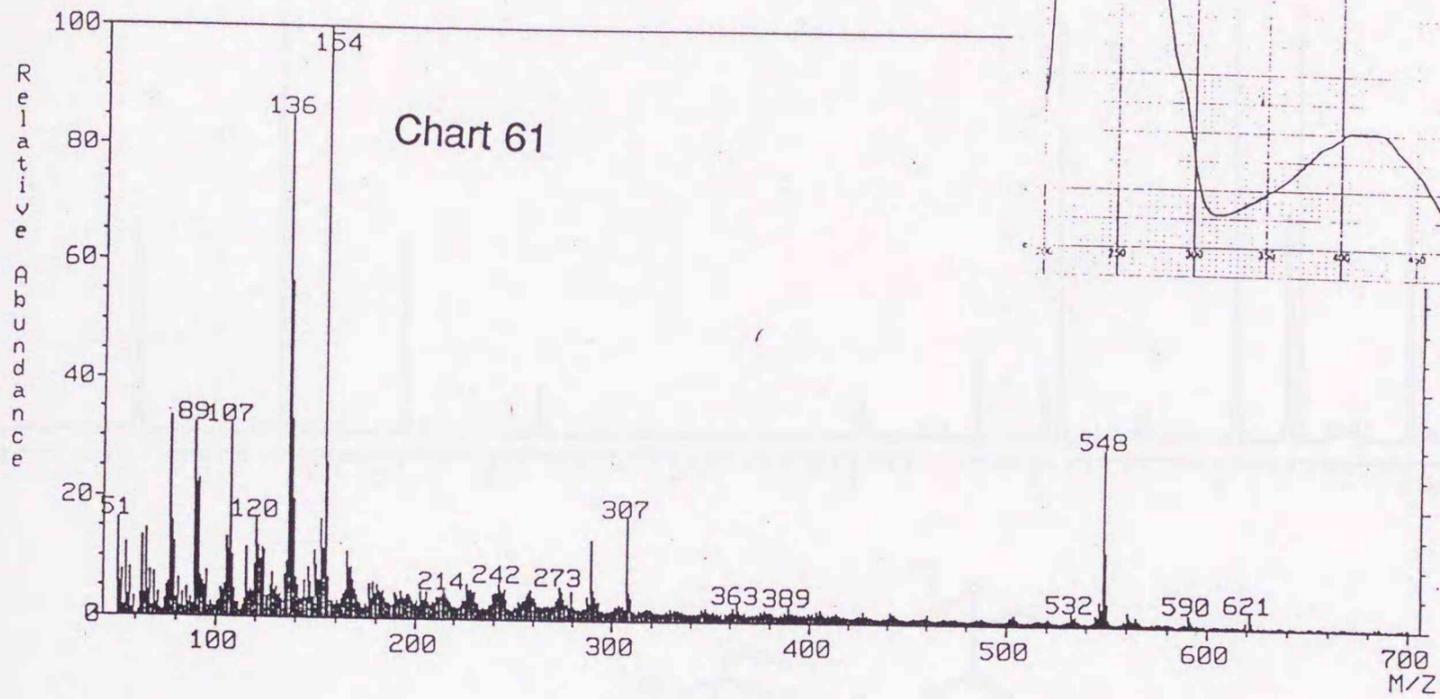
NOESY PULSE SEQUENCE
 OBSERVE PROTON
 FREQUENCY 399.95 MHZ
 SPECTRAL WIDTH 3682 HZ
 2D SPECTRAL WIDTH 3681.9 HZ
 ACQ. TIME 0.139 SEC
 RELAXATION DELAY 1.0 SEC
 MIXING TIME 0.2 SEC
 PULSE WIDTH 90 DEGREES
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPEATITIONS 16
 NO. INCREMENTS 256
 SPIN RATE 20 HZ
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.1 HZ
 FT SIZE 1K X 1K
 TOTAL TIME 1 HOUR
 45.5 MINUTES



Deacetylsaptomycin D



MASS SPECTRUM Data File: ABE15
 Sample: HP530E2 (CHCl3 + NBA)
 RT 0'42" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 154.0000 Int. 114E
 Scan# (6 to 8)



Deacetylsaptomycin E

Chart 64

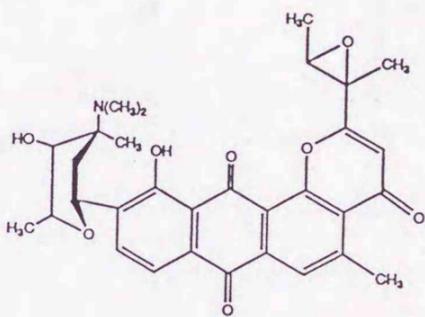
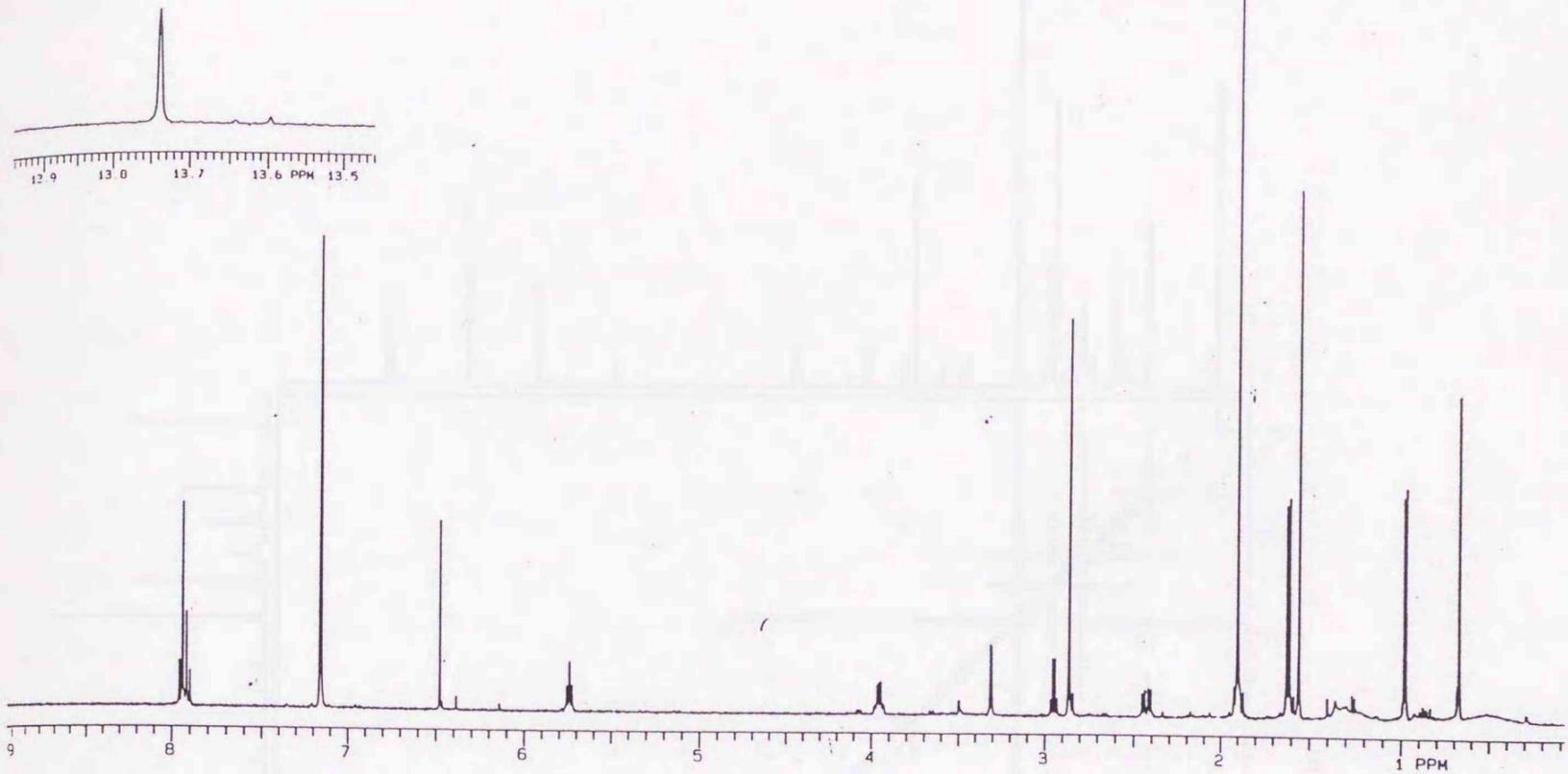


Chart 65

Deacetylsaptomycin E

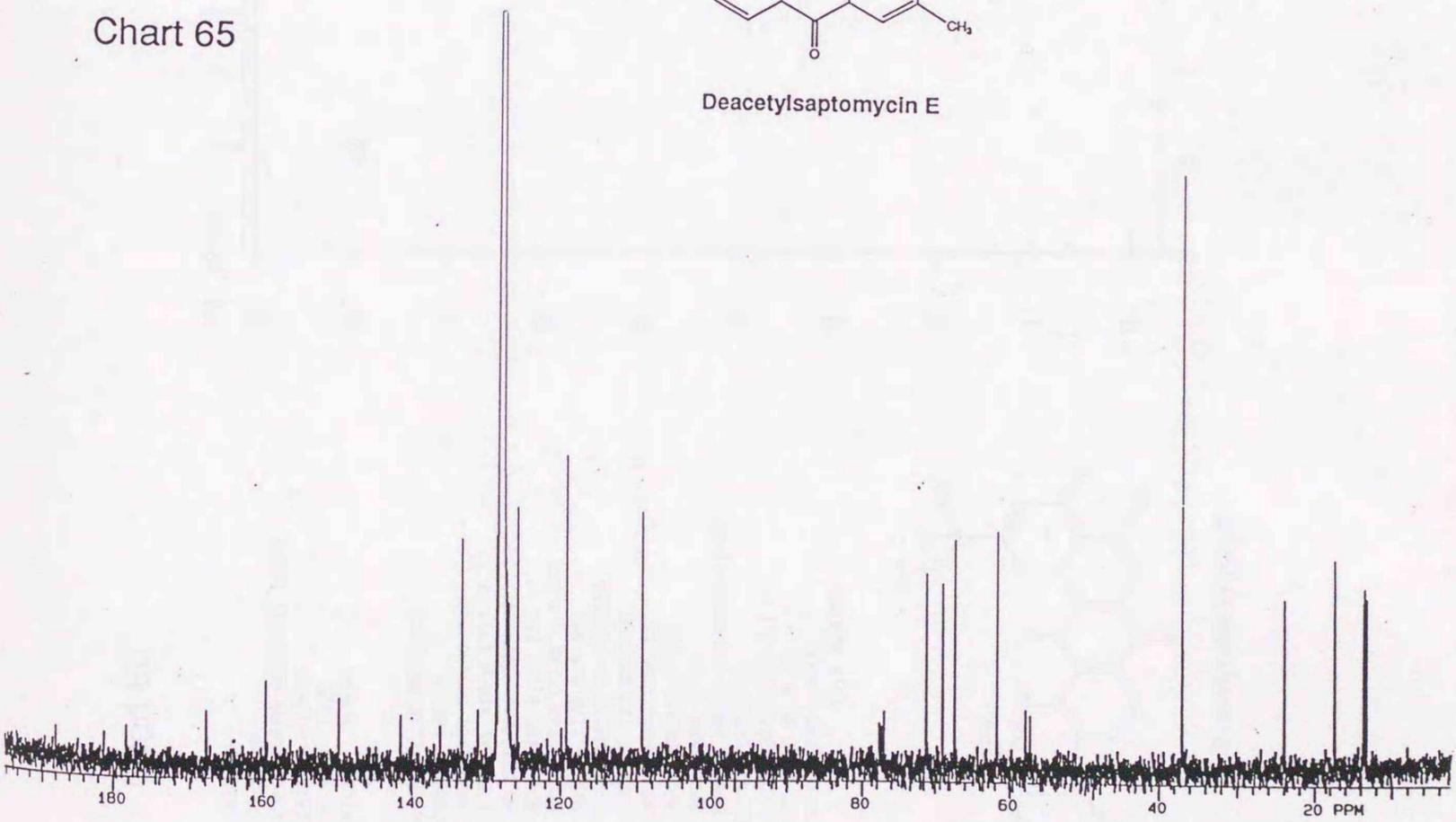
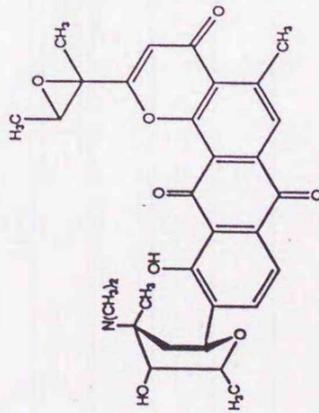


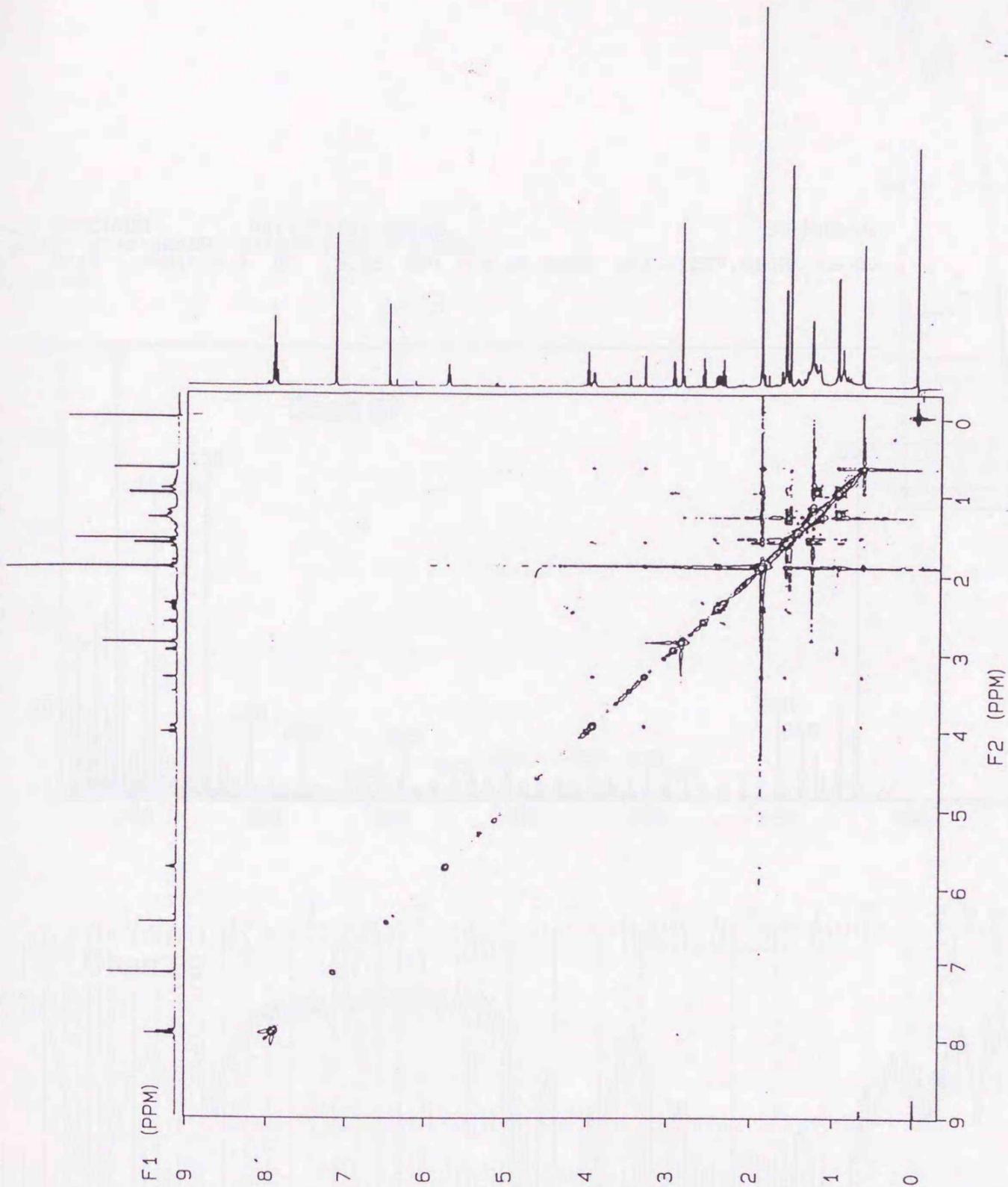
Chart 66

HP530E2
 90-10-18
 EXP8 PULSE SEQUENCE: NOESY
 DATE 90-10-19
 SOLVENT C6D6
 FILE NOESY

NOESY PULSE SEQUENCE
 OBSERVE PROTON
 FREQUENCY 399.95 MHZ
 SPECTRAL WIDTH 3727 HZ
 2D SPECTRAL WIDTH 3727.2 HZ
 ACQ. TIME 0.137 SEC
 RELAXATION DELAY 1.0 SEC
 MIXING TIME 0.2 SEC
 PULSE WIDTH 90 DEGREES
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPETITIONS 16
 NO. INCREMENTS 256
 SPIN RATE 20 HZ
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.1 HZ
 FT SIZE 1K X 1K
 TOTAL TIME 1 HOUR
 45.4 MINUTES



Deacetyl/saptomycin E



MASS SPECTRUM Data File: ABE39 30-MAR-91
 Sample: 11-o-acetyl HP530D (CHCl3 + NBA)
 RT 0'14" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 85.0000 Int. 1277.4180 Lv 0.
 Scan# (3)

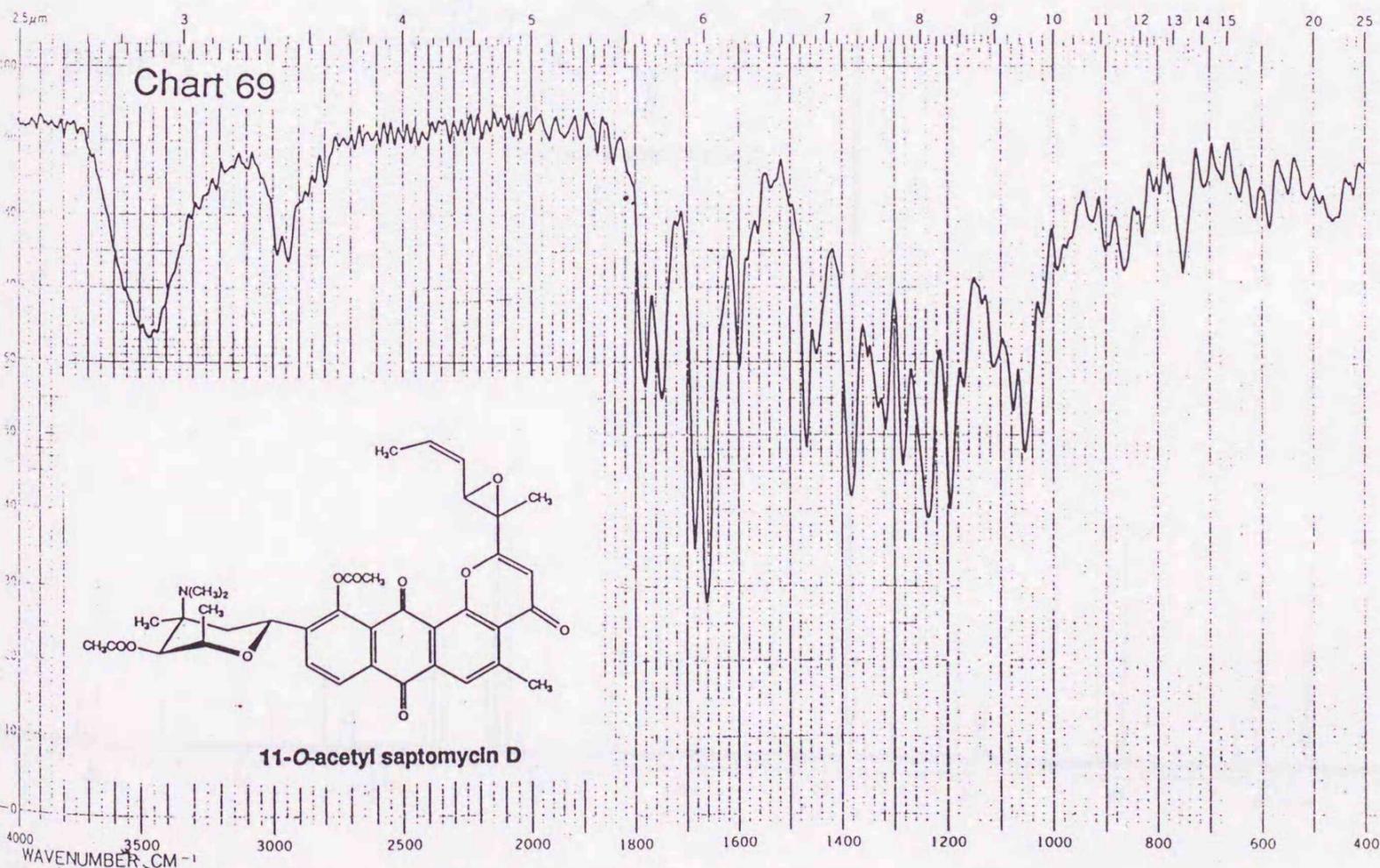
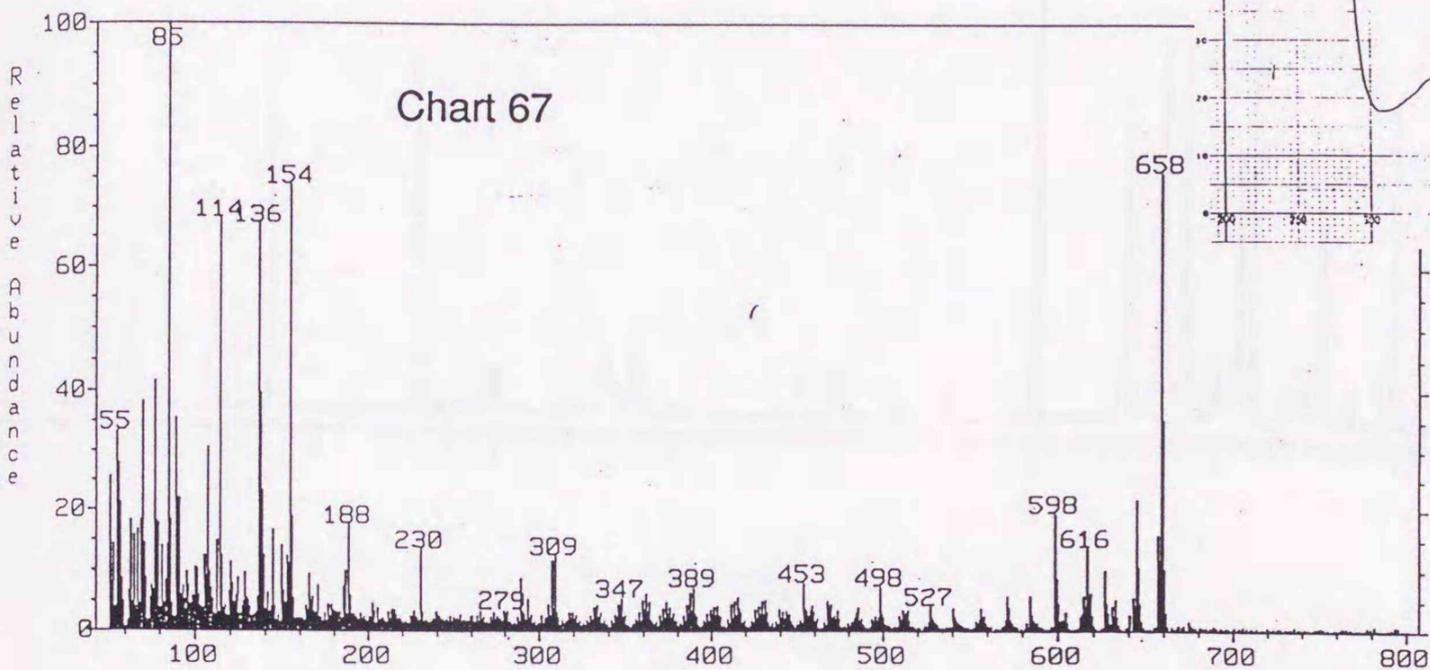
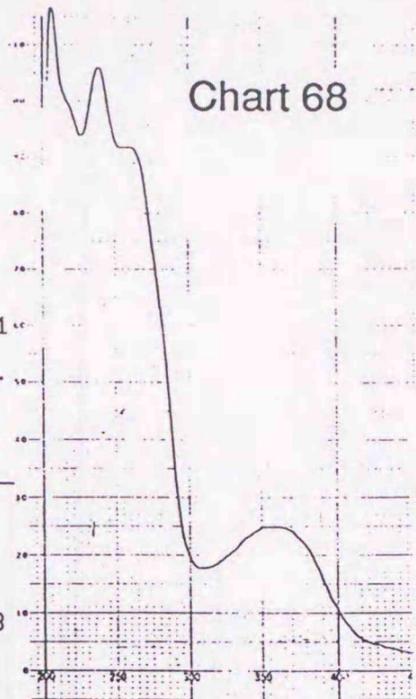


Chart 70

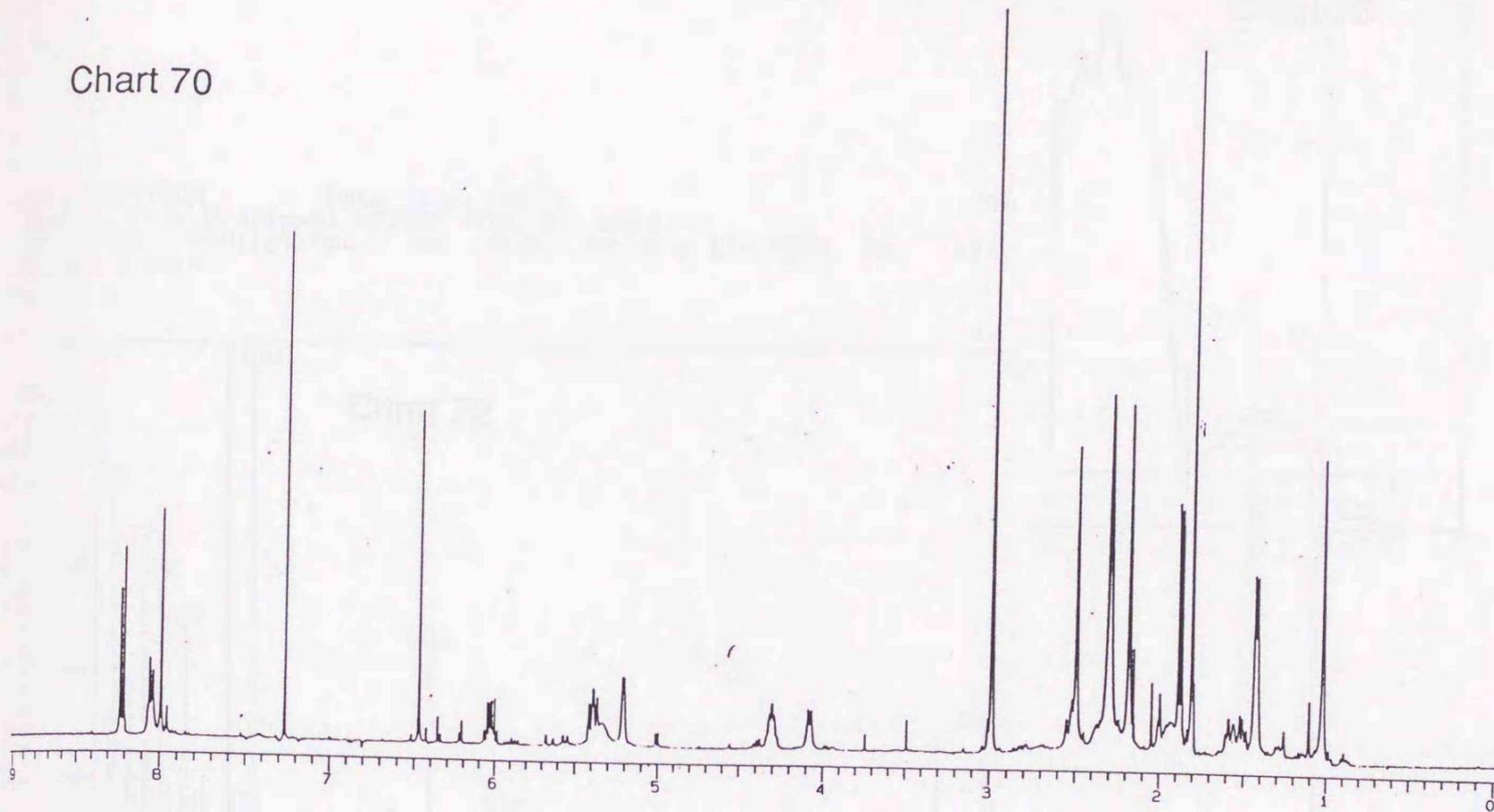
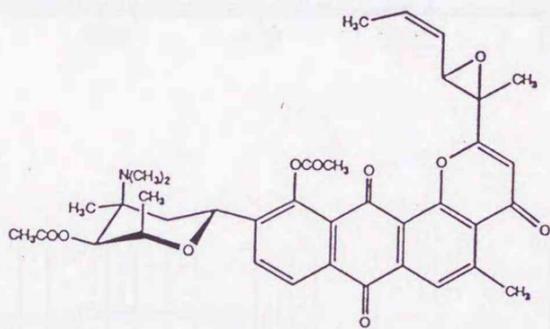


Chart 71



11-O-acetyl saptomycin D

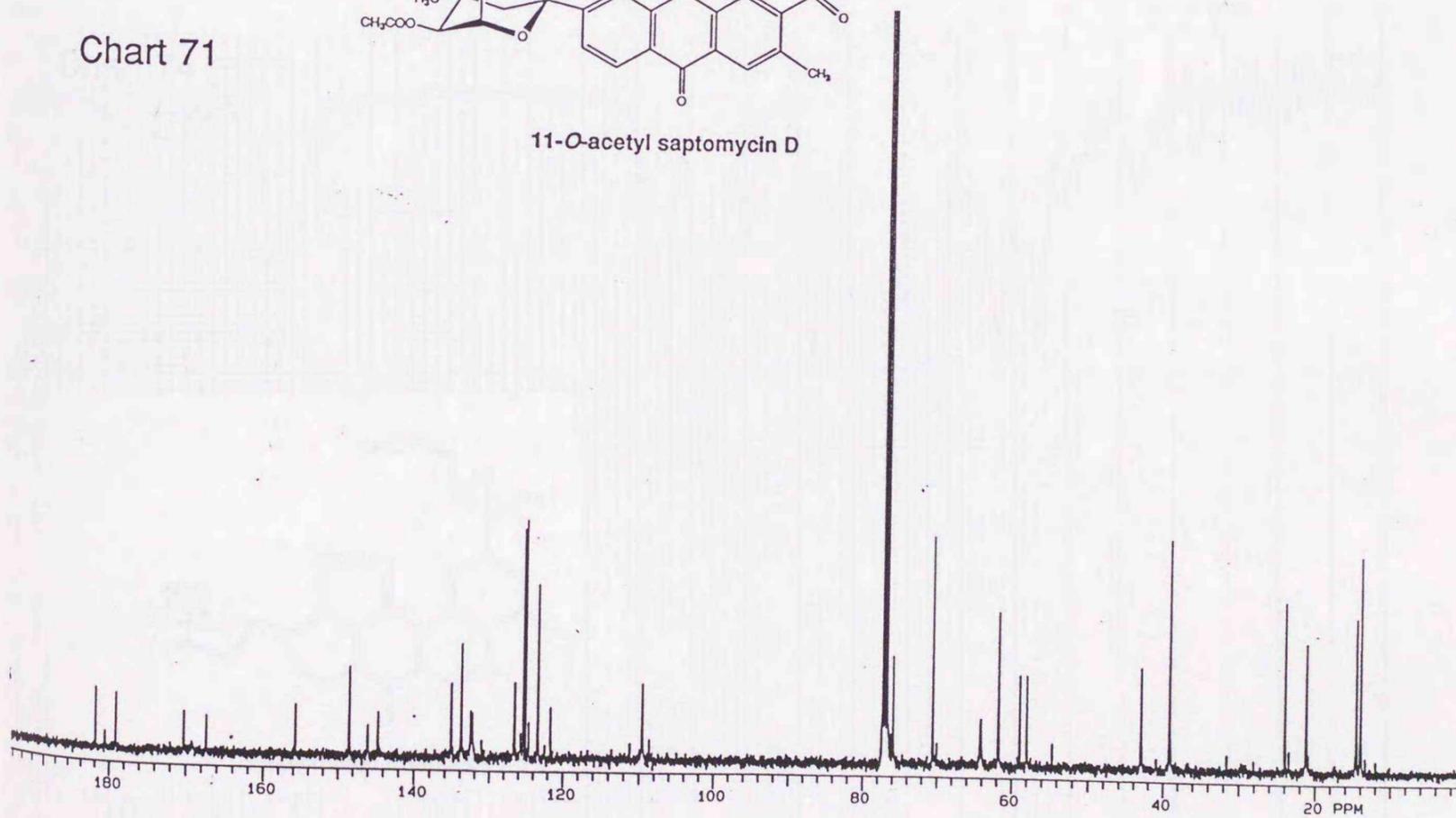


Chart 75

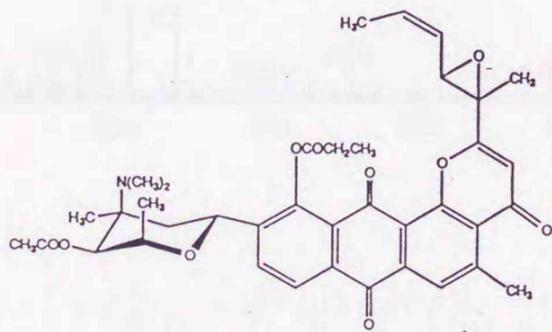
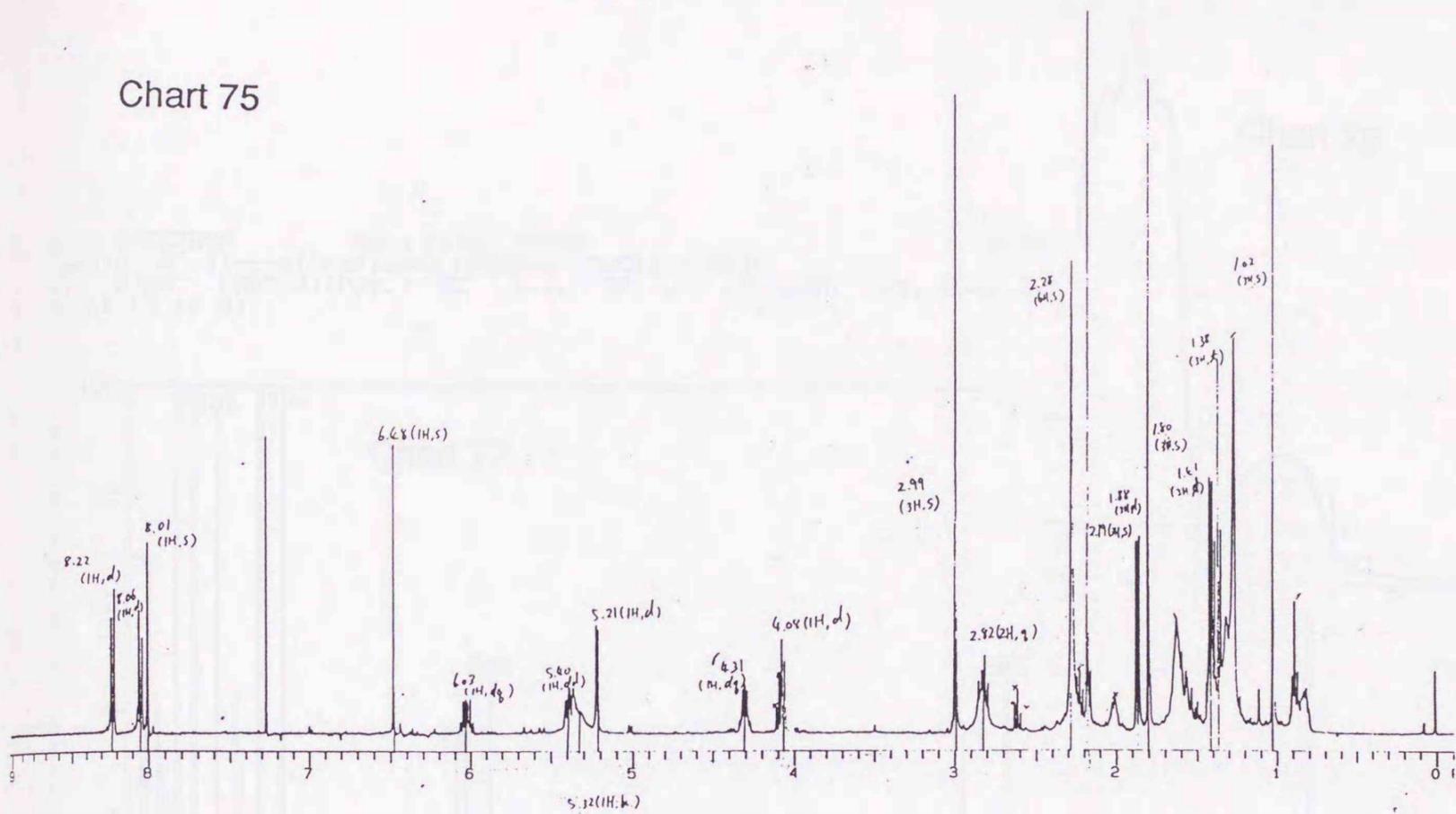


Chart 76

11-O-propionyl saptomycin D

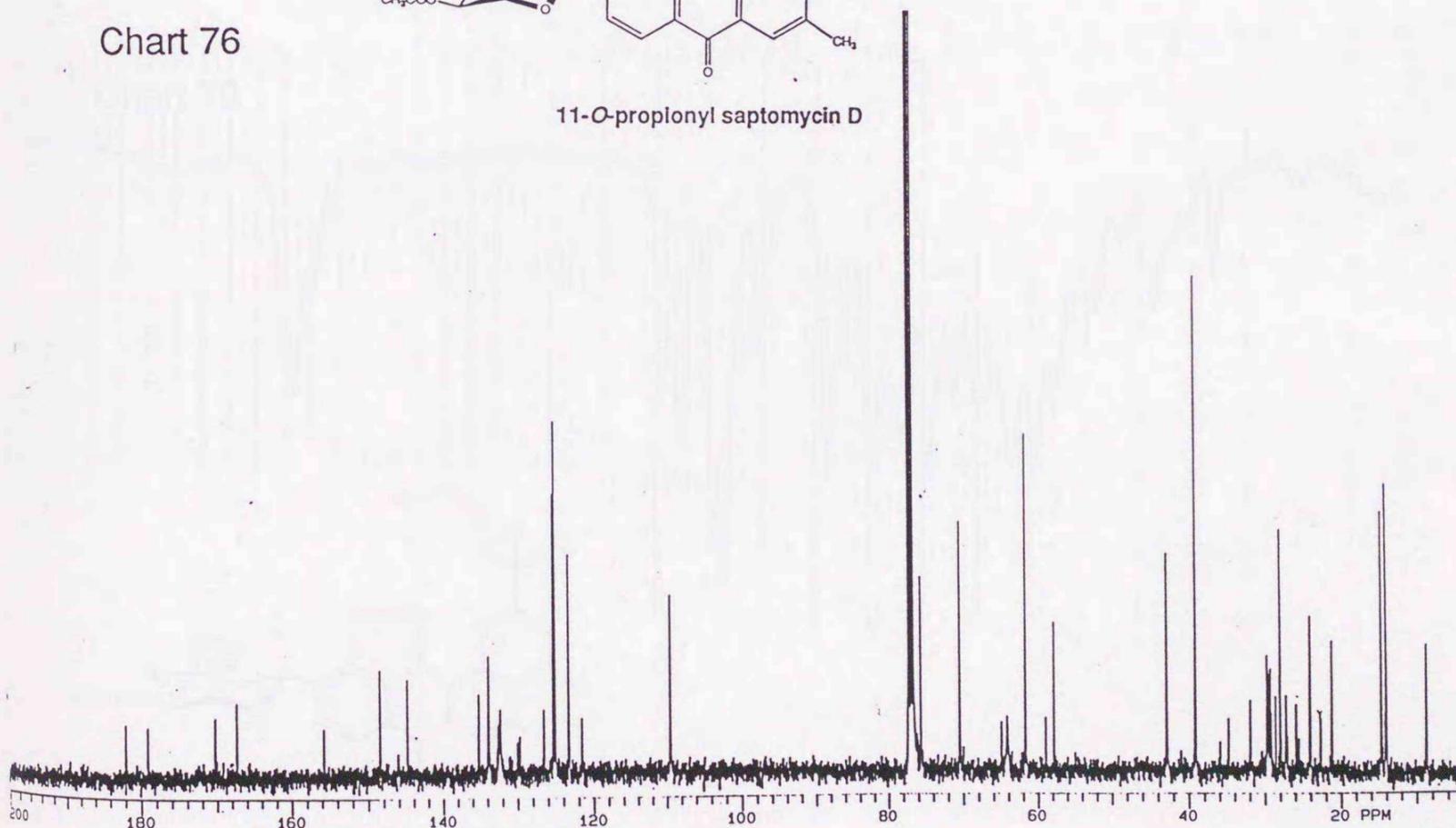


Chart 80

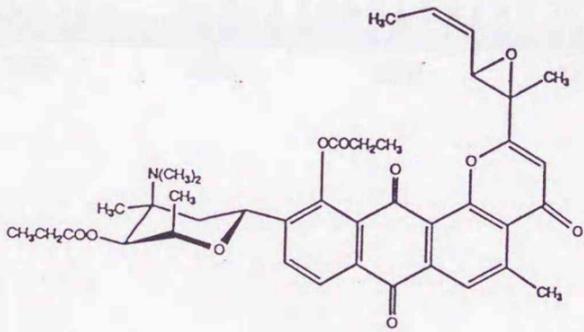
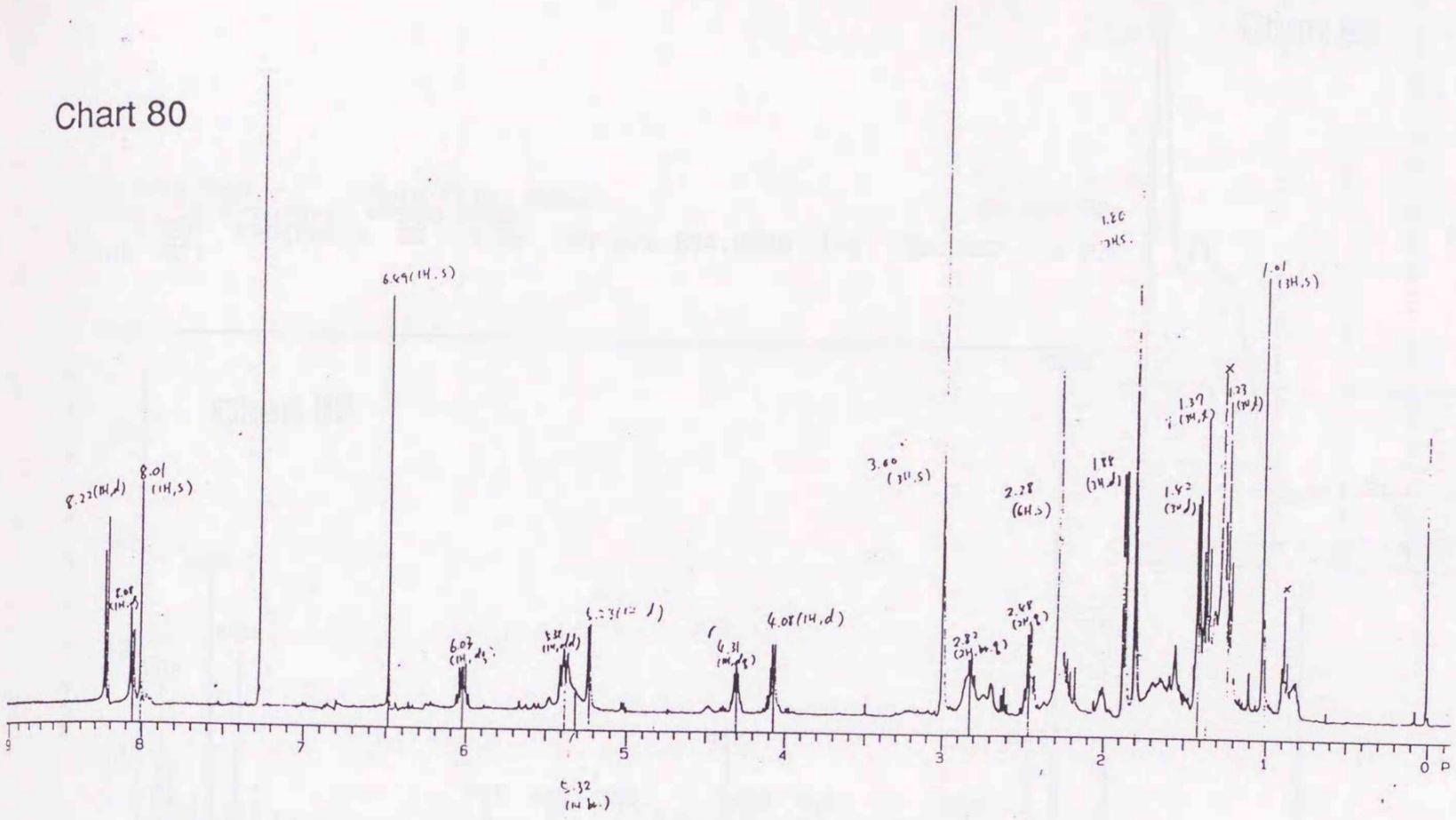


Chart 81

3',11-O-dipropionyl saptomycin D

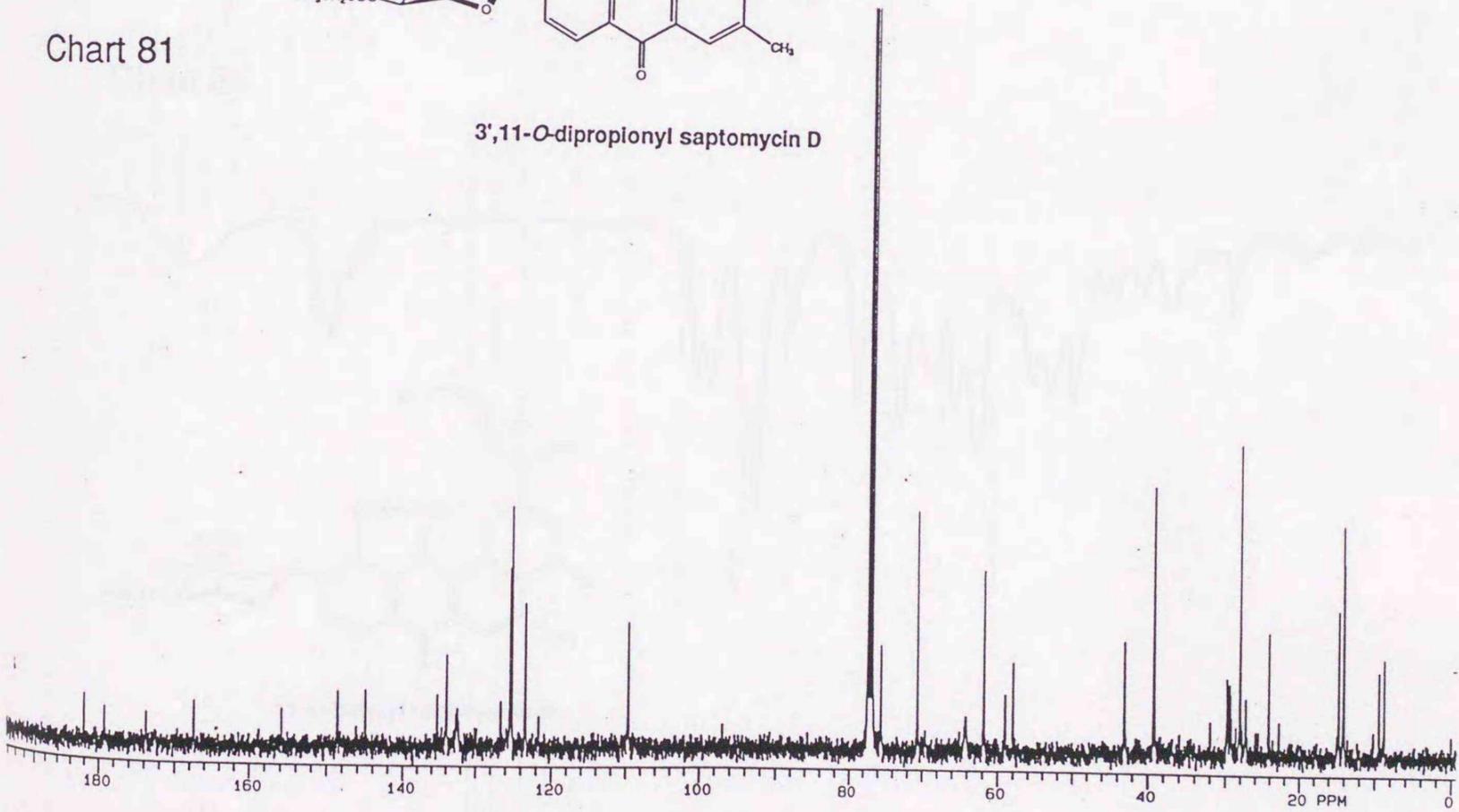


Chart 85

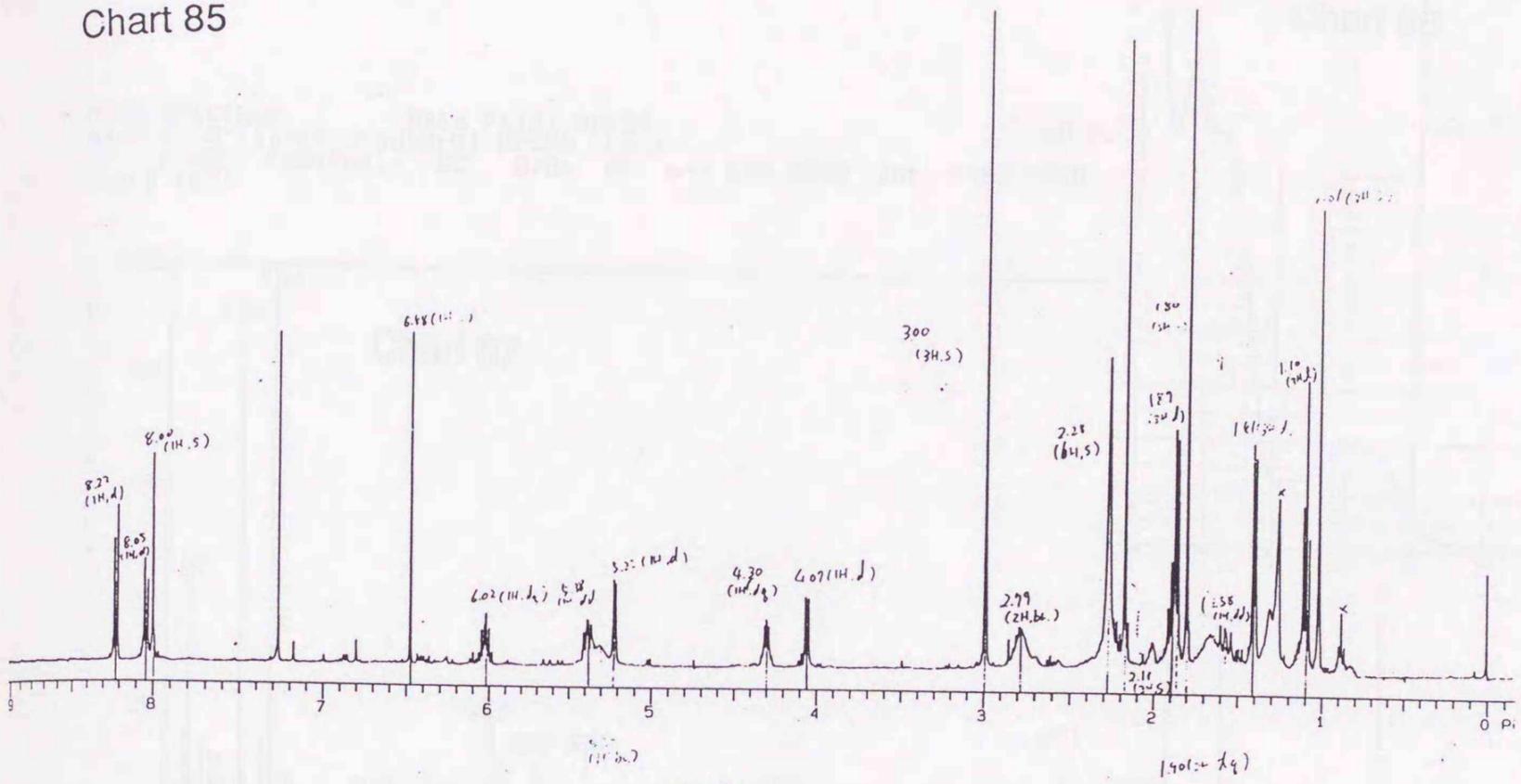
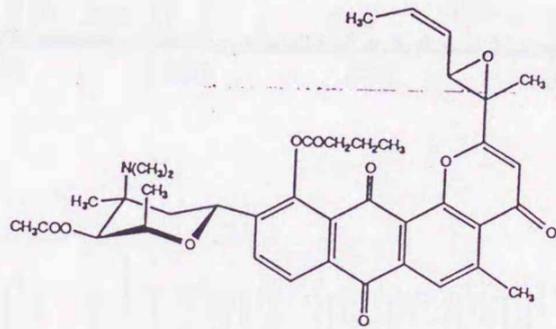
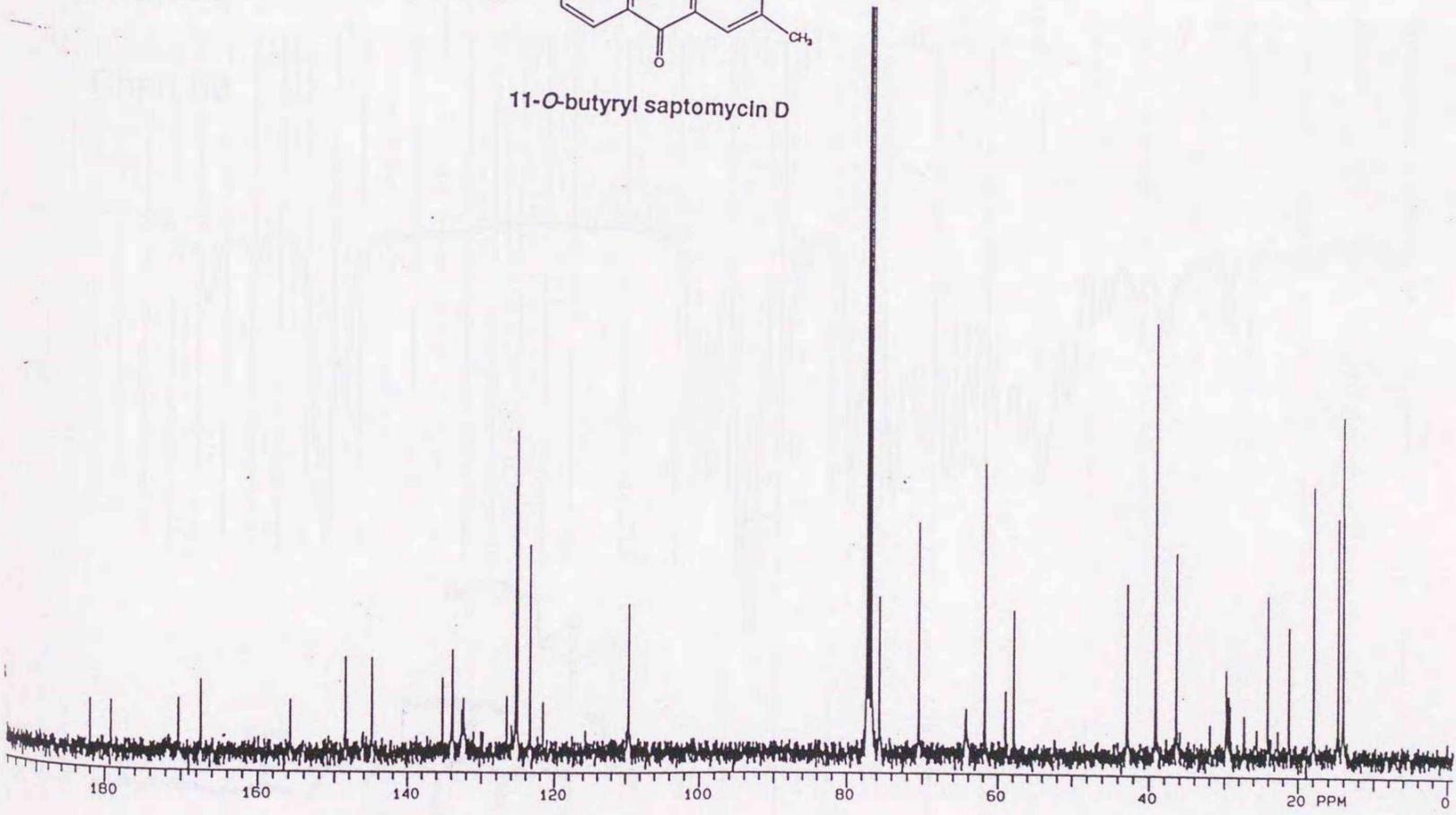


Chart 86



11-O-butyl saptomycin D



第 2 部

Streptomyces sp. G324 株の生産する Oxopropaline 類に関する研究

第1章 本論

ヒト腫瘍細胞を含む各種腫瘍細胞を用いた細胞障害活性試験による新規抗腫瘍性物質探索の過程において、静岡県藤枝市の土壌より分離した一放線菌が、強い抗腫瘍活性を示す既知抗生物質 Lavendamycin⁹⁰⁾ を生産することを見いだした。さらに、*Streptomyces* sp. G324 株と命名した本菌株は、HPLC による分画並びに活性試験、ダイオードアレーによる UV スペクトルの検討などから、共通のクロモフォアを持つ、数種の細胞障害活性を示す化合物を生産していることが示唆された。各種担体等を繰り返し用いて精製を行い、5種の化合物を単離した。機器分析による構造解析の結果、これらの化合物は、 β -carboline を基本骨格に持つ新規化合物群であることが明かとなった。Oxopropaline A、B、D、E、Gと命名したこれらの化合物の化学構造の検討並びに、細胞障害活性についての検討を行った。

第1節 生産菌の分類

Oxopropaline を生産する G324 株は、以下のような菌学的性質を有する。

(1) 形態的特徴

栄養菌糸は各種培地上でよく発達し、分断は起こさない。分枝した栄養菌糸から形成される気菌糸はレッド系の色調を呈し10~50個以上の胞子の連鎖が認められ、ラセン状をしている。胞子表面は平滑でその大きさは $0.6 \times 1 \sim 1.2 \mu\text{m}$ で円柱状である。菌核、胞子のう、遊走子は見出されない。

(2) 各種培地における性状

各種培地上における培養性状を Table 2-1 に示す。

色調として () 内に示す番号は、ISCC-NBS Color-Name chart に記載のものを、28°C 2週間目の各培地における観察の結果である。

(3) 生理的性状

生理的性状を Table 2-2 及び 2-3 に示す。

(4) 細胞壁組成

全菌体中のジアミノピメリン酸を分析した結果、LL型であった。

以上、G324 株の菌学的性状を要約すると、LL-ジアミノピメリン酸を有し、気菌糸の形態はラセン状で、胞子の表面は平滑である。気菌糸の色調はレッド系を呈した。また、メラニンを産出する。

これらの諸性質から G324 株は、*Streptomyces* 属に属する菌株と考えられ、

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版及びISP報告 International Journal of Systematic Bacteriology 第18巻、69頁、279頁(1968年)、同19巻、391頁(1969年)、同22巻、265頁(1972年)より検索した結果、*Streptomyces katrae* が近縁種として挙げられる。そこで、*Streptomyces katrae* JCM4777 と直接、培養・生理性状を比較した。その結果、G324 株は気中菌糸が湿潤化を起こすこと、*Streptomyces katrae* が、サリシンを利用する点、及び銅イオンに感受性を示す点に違いが見られる。したがって、本菌株は *Streptomyces* 属に属する新菌株と考えられ、*Streptomyces* sp. G324 として、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第3948号 (FERM BP-3948) として寄託した。

Table 2-1. G324株の培養性状.

| Medium | Growth | Aerial mycelium | Reverse | Soluble pigment |
|---|--------|---|----------------------------|--------------------------|
| Yeast extract-malt extract agar (ISP-2) | Good | Abundant(Hygroscopic) Moderate reddish brown(43) | Dark yellowish brown(78) | None |
| Oatmeal agar (ISP-3) | Good | Abundant(Hygroscopic) Light reddish brown(42) | Deep yellowish brown(75) | None |
| Inorganic salt-starch agar (ISP-4) | Good | Abundant(Hygroscopic) Dark reddish brown(44) | Colorless | None |
| Glycerin-asparagine agar (ISP-5) | Good | None | Black red(21) | None |
| Peptone-yeast extract agar (ISP-6) | Good | None | Colorless | Dark yellowish brown(78) |
| Tyrosine agar (ISP-7) | Good | Abundant Moderate reddish brown(43) | Black red(21) | None |
| Peptone-nitrate agar (ISP-8) | Good | None | Colorless | None |
| Nutrient agar | Good | None | Colorless | None |
| Czapek's agar | Good | Abundant Grayish yellowish pink(32) | Strong yellowish brown(74) | None |

The color index in the parenthesis () is in accordance with ISCC-NBS Color-Name Chart and represents the result of observation on the second week at 28°C on each medium.

Table 2-2. G324株の生理的性状.

| | |
|---|----------|
| Growth temperature range (ISP2 or yeast extract - malt extract agar, incubation for 14 days) | 20-38°C |
| Gelatin liquefaction | negative |
| Hydrolysis of starch | positive |
| Coagulation of skim milk | negative |
| Peptonization of skim milk | positive |
| Reduction of nitrate | positive |
| Decomposition of cellulose | negative |

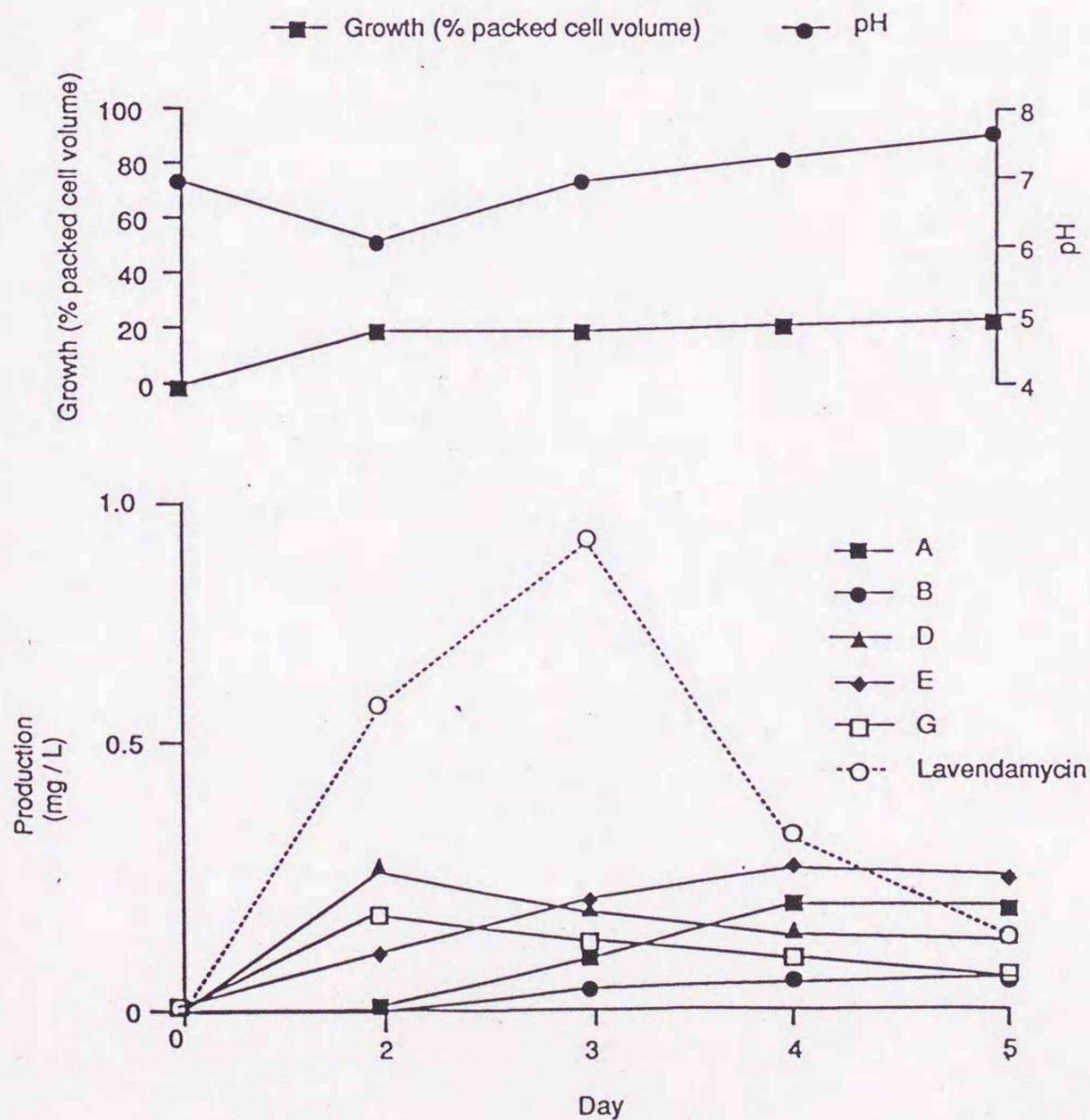
Table 2-3. G324株の炭素源の資化性.

| |
|--|
| Positive utilization: D-gulucose, D-xylose, D-arabinose, D-fructose, D-mannose sucrose, trehalose |
| Negative utilization: L-rhamnose, raffinose, D-mannitol, inositol, D-galactose, lactose |

第2節 生産菌の培養

Oxopropaline 類並びに Lavendamyacin を生産するための培養は、以下のような方法により実施した。dextrin、glucose、peptone、corn steep liquor、CaCO₃ より成る培地100mlを分注した500ml容三角フラスコにより35℃、3日間振盪培養し種培養液を調製した。上記種培養液を、同じ培地組成を持つ培地をそれぞれ100ml分注した Lavendamyacin 精製においては25本の、G324物質精製においては80本の500ml容三角フラスコに2%ずつ接種し、35℃、5日間振盪培養を行った。Oxopropaline 類、Lavendamyacin の生産量の評価は、HPLC 分析により380nmでの UV 吸収により行った。Oxopropaline 類の生産の傾向として、経時的变化が認められた。Oxopropaline D、G 及び Lavendamyacin は、培養における比較的早い段階で集積され、次いで、これらの化合物にとって代わるように Oxopropaline A、B、E が生産されてきた。結果を Fig. 2-1 に示す。

Fig. 2-1. Oxopropaline 類の生産量の経時変化.

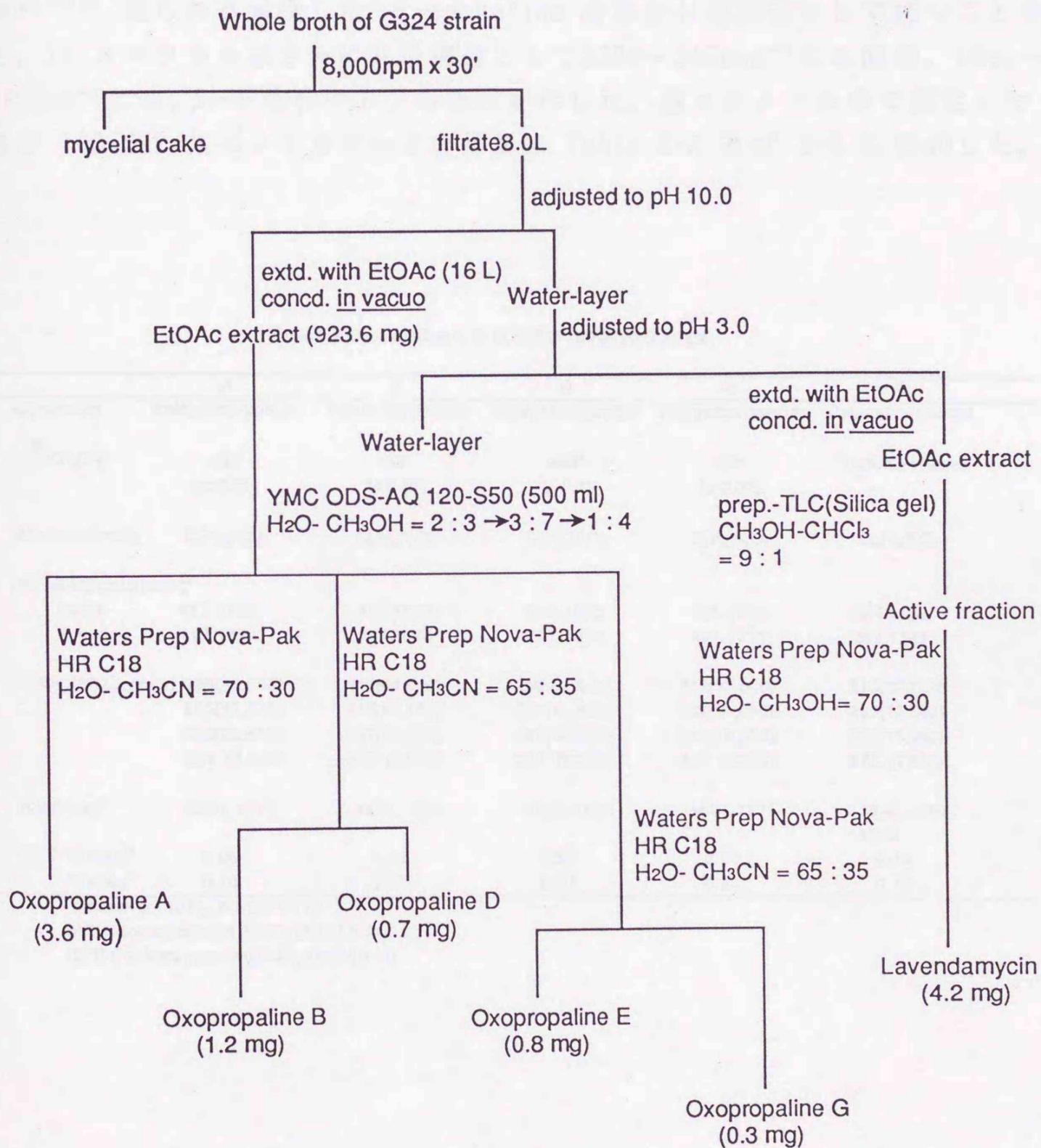


第3節 Oxopropaline 類並びに Lavendamycin の精製・単離

第2節に述べた方法により培養して得られた Streptomyces sp. G324 株の培養液からの Oxopropaline 類並びに Lavendamycin の精製・単離例についての手順の概略を Fig. 2-2 に示す。

得られた培養液を、遠心分離により菌体を含む固形分と上澄液とに分離した。約8Lの上澄液をpH10.0に調整し、16Lの酢酸エチルを加え攪拌し、塩基性酢酸エチル抽出部を得た。水層はさらにpH3.0に再調整し、再度16Lの酢酸エチルを加え攪拌し、酸性酢酸エチル抽出部を得た。塩基性酢酸抽出部は、逆相 ODS 中圧カラムクロマトグラフィーで、 H_2O-CH_3OH の系により段階的に溶出させ Oxopropaline A を含む画分、Oxopropaline B と D を含む画分、Oxopropaline E と G を含む画分の3つに分画した。それぞれの画分を、分取用 HPLC カラムを用い、 CH_3CN-H_2O の系で精製し、Oxopropaline A (3.6mg)、B (1.2mg)、D (0.7mg)、E (0.8mg) 及び G (0.3mg) をそれぞれ淡黄色粉末として得た。一方、酸性酢酸エチル抽出部は分取用シリカゲル薄相クロマトグラフィーにより $CHCl_3-CH_3OH$ の系により分画し、さらに活性画分を分取用 HPLC カラムを用い、 CH_3OH-H_2O の系で精製し Lavendamycin 4.2mg を黄赤色粉末として得た。

Fig. 2-2. Oxopropaline A, B, D, E, G 及び Lavendamycin の精製・単離.



第4節 Oxopropaline 類の物理化学的性質

Oxopropaline A、B、D、E 及び G の物理化学的性質を Table 2-4 に要約した。Oxopropaline 類はそれぞれ淡黄色粉末として得られ、メタノール、アセトニトリルによく溶解し、一方、*n*-ヘキサン、水に不溶であった。Oxopropaline 類のメタノール中での UV スペクトルは Lavendamycin⁹⁰⁾ や他の β -carboline 化合物⁹¹⁻⁹³⁾ 見られる共役した β -carboline 骨格を共通構造として持つことを示した。IR スペクトルはさらに共通構造として 3380~3450 cm^{-1} に水酸基、1665~1680 cm^{-1} に α , β -不飽和ケトンの存在を示した。重メタノール中で測定した ^1H 及び ^{13}C NMR スペクトルデータの帰属は Table 2-5 及び 2-6 に要約した。

Table 2-4. Oxopropaline A, B, D, E 及び G の物理化学的性質.

| | A | B | D | E | G |
|--|--|--|--|--|--|
| Appearance | Pale yellow powder |
| $[\alpha]_D^{20}$ (CH_3OH) | +56° (c 0.05) | -39° (c 0.02) | +30° (c 0.1) | -39° (c 0.02) | Optically inactive |
| Molecular formula | $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$ | $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$ | $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ | $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ | $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ |
| HRFAB-MS (m/z) ($\text{M}+\text{H}^+$) ^a | | | | | |
| Calcd: | 417.1662 | 417.1662 | 271.1082 | 401.1713 | 255.1133 |
| Found: | 417.1671 | 417.1674 | 271.1086 | 401.1713 | 255.1141 |
| UV (CH_3OH) λ_{max} nm (ϵ) | 220(43,800) 265(15,500) 288(22,800) 381 (9,600) | 218(44,900) 265(15,100) 287(22,300) 378 (8,000) | 219(31,000) 264(10,600) 287(16,300) 381 (6,200) | 218(32,800) 262(11,000) 284(16,800) 377 (6,300) | 218(33,700) 263(12,500) 284(18,900) 375 (7,200) |
| R (KBr) cm^{-1} | 3380, 1675 | 3450, 1680 | 3430, 1680 | 3430, 1675 | 3540, 3340 1665 |
| TLC ^b Rf value ^c | 0.06 | 0.13 | 0.53 | 0.24 | 0.74 |
| Rf value ^d | 0.10 | 0.22 | 0.57 | 0.33 | 0.76 |

a) Kiesel gel 60 F₂₅₄ Art. No. 5715

b) TLC solvent system (CHCl_3 -MeOH, 9:1)

c) TLC solvent system (CH_2Cl_2 -MeOH, 9:1)

Table 2-5. Oxopropaline A, B, D, E 及び G の ¹H NMR ケミカルシフト .

| Position | A | B | D | E | G |
|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 3-H | 8.32 (s) | 8.31 (s) | 8.30 (s) | 8.26 (s) | 8.27 (s) |
| 4-CH ₃ | 2.94 (s) | 2.95 (s) | 2.94 (s) | 2.92 (s) | 2.92 (s) |
| 5-H | 8.27 (d, 8.0) | 8.27 (d, 8.0) | 8.27 (d, 8.0) | 8.24 (d, 7.9) | 8.25 (d, 8.1) |
| 6-H | 7.35 (dd, 8.0, 7.2) | 7.36 (dd, 8.0, 7.2) | 7.35 (dd, 8.0, 7.2) | 7.33 (dd, 7.9, 7.3) | 7.34 (dd, 8.1, 7.1) |
| 7-H | 7.60 (dd, 8.3, 7.2) | 7.61 (dd, 8.2, 7.2) | 7.61 (dd, 8.2, 7.2) | 7.59 (dd, 8.2, 7.3) | 7.59 (dd, 7.1, 7.1) |
| 8-H | 7.75 (d, 8.3) | 7.74 (d, 8.2) | 7.74 (d, 8.2) | 7.72 (d, 8.2) | 7.72 (d, 7.1) |
| 11-H _a | 5.97 (dd, 7.0, 3.9) | 5.72 (dd, 5.2, 3.3) | 5.59 (t, 4.1) | 3.61 (m) | 3.54 (t, 6.2) ^{a)} |
| 11-H _b | - | - | - | 3.94 (m) | - |
| 12-H _a | 3.90 (dd, 11.8, 7.0) | 4.01 (dd, 10.4, 5.2) | 4.10 (d, 4.1) ^{a)} | 3.92 (ddd, 9.8, 6.4, 5.3) | 4.08 (t, 6.2) ^{a)} |
| 12-H _b | 4.03 (dd, 11.8, 3.9) | 4.21 (dd, 10.4, 3.3) | - | 4.24 (ddd, 9.8, 7.2, 5.5) | - |
| 1'-H | 4.96 (d, 1.5) | 4.56 (d, 1.5) | - | 4.76 (d, 1.6) | - |
| 2'-H | 4.04 (dd, 3.4, 1.5) | 3.61 (dd, 3.5, 1.5) | - | 3.73 (dd, 3.4, 1.6) | - |
| 3'-H | 3.80 (dd, 10.0, 3.4) | 3.58 (dd, 9.1, 3.5) | - | 3.55 (dd, 9.5, 3.4) | - |
| 4'-H | 3.33 (dd, 10.0, 9.5) | 3.30 (dd, 9.5, 9.1) | - | 3.32 (dd, 9.5, 9.5) | - |
| 5'-H | 3.73 (dq, 9.5, 6.2) | 3.72 (dq, 9.5, 6.2) | - | 3.64 (dq, 9.5, 6.3) | - |
| 6'-H ₂ | 0.85 (d, 6.2) | 1.24 (d, 6.2) | - | 1.20 (d, 6.3) | - |

Measured at 400MHz in CD₃OD; ppm from TMS.

a) Two protons as methylene signal.

Table 2-6. Oxopropaline A, B, D, E 及び G の ¹³C NMR ケミカルシフト .

| Position | A | B | D | E | G |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 134.2 s | 133.4 s | 133.8 s | 135.3 s | 135.3 s |
| 3 | 140.1 d | 139.7 d | 140.1 d | 139.7 d | 139.7 d |
| 4 | 134.6 s | 134.5 s | 134.9 s | 134.1 s | 134.1 s |
| 4 _a | 131.1 s | 131.0 s | 131.5 s | 131.1 s | 131.1 s |
| 4 _b | 122.2 s | 122.0 s | 122.4 s | 122.2 s | 122.1 s |
| 5 | 124.5 d | 124.4 d | 124.8 d | 124.5 d | 124.5 d |
| 6 | 121.8 d | 121.6 d | 122.0 d | 121.6 d | 121.7 d |
| 7 | 129.6 d | 129.5 d | 129.9 d | 129.6 d | 129.6 d |
| 8 | 113.5 d | 113.3 d | 113.6 d | 113.4 d | 113.3 d |
| 8 _a | 143.2 s | 143.1 s | 143.5 s | 143.2 s | 143.2 s |
| 9 _a | 136.3 s | 136.1 s | 136.6 s | 136.0 s | 136.0 s |
| 10 | 200.6 s | 201.2 s | 202.2 s | 202.4 s | 203.1 s |
| 11 | 80.5 d | 74.3 d | 76.6 d | 38.7 t | 41.8 t |
| 12 | 63.9 t | 69.7 t | 66.5 t | 64.1 t | 58.8 t |
| 13 | 18.0 q | 17.8 q | 18.2 q | 17.9 q | 17.9 q |
| 1' | 103.6 d | 101.7 d | | 101.8 d | |
| 2' | 72.2 d | 71.8 d | | 72.3 d | |
| 3' | 72.5 d | 72.0 d | | 72.3 d | |
| 4' | 73.8 d | 73.7 d | | 73.9 d | |
| 5' | 70.3 d | 71.3 d | | 69.8 d | |
| 6' | 17.6 q | 17.8 q | | 17.9 q | |

Measured at 100MHz in CD₃OD; ppm from TMS.

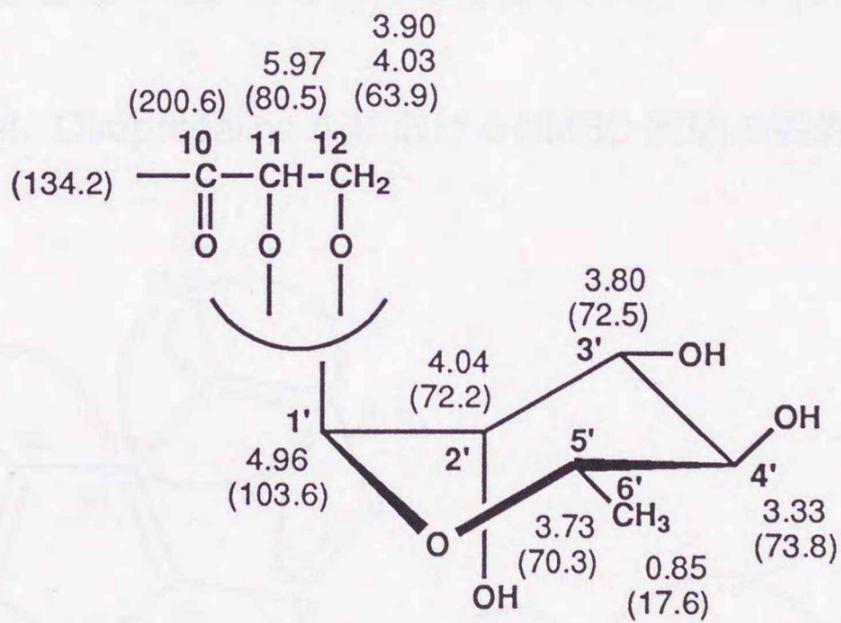
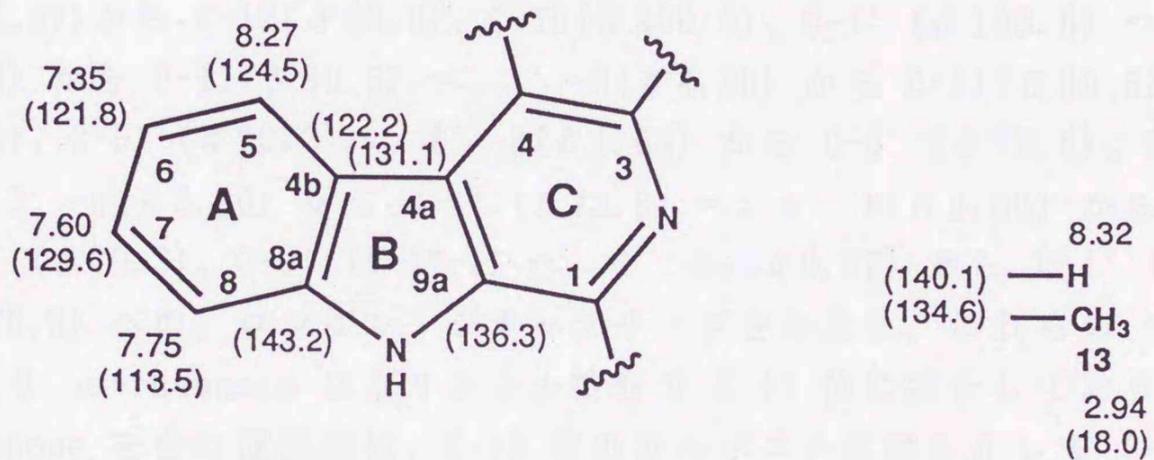
第5節 Oxopropaline 類の構造解析

5-1 Oxopropaline A の構造解析

Oxopropaline A は HRFAB-MS 及び ^1H NMR スペクトルの解析より分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$ [m/z 417.1671 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; calcd. 417.1662] と与えられた。UV スペクトルはメタノール中において、 λ_{max} 220、265、288、381nm に吸収極大を与えることより、共役した β -carboline 骨格を基本骨格に持つことが示唆された。これは、市販の β -carboline 化合物である Harman (Aldrich Chem. Co.) の UV スペクトルとの直接比較からも支持された。IR スペクトルにおける 3380cm^{-1} の幅広い吸収と 1675cm^{-1} の強い吸収は、それぞれ、複数の水酸基と α 、 β -不飽和ケトンの存在を示した。

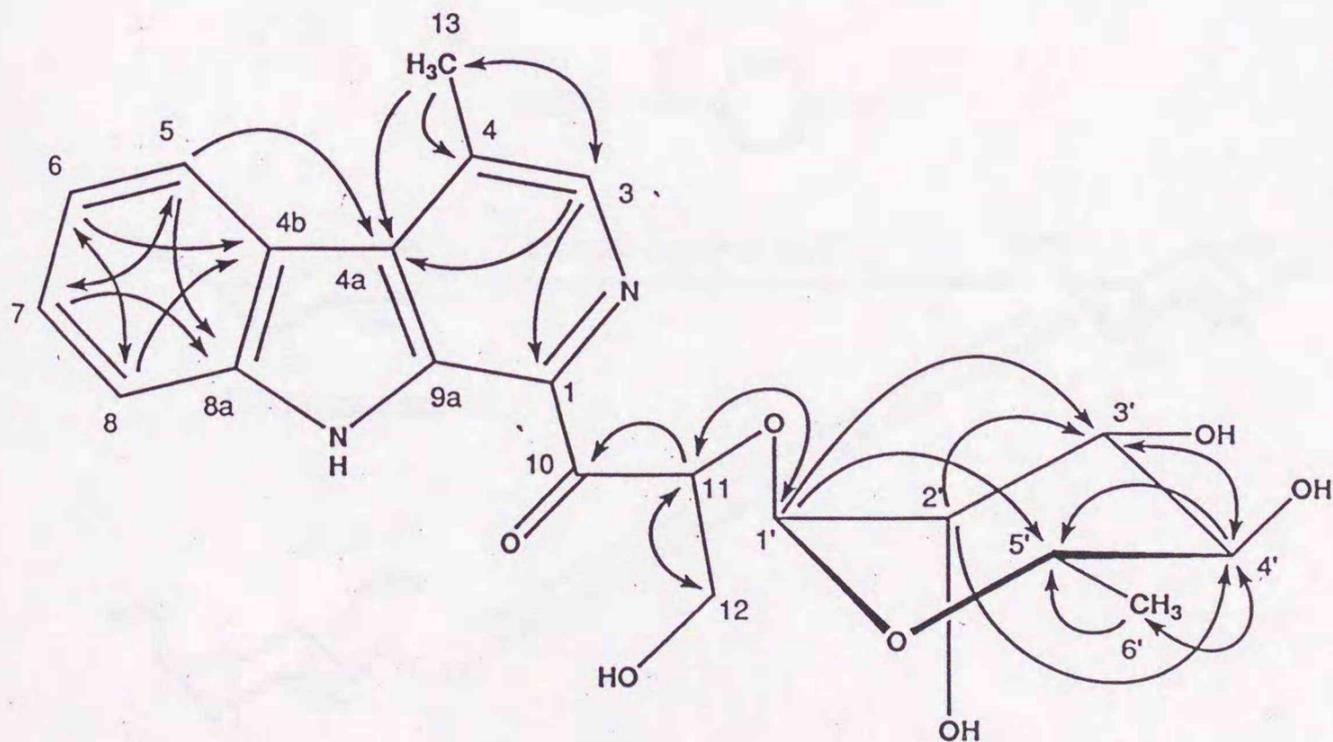
重メタノール中での ^{13}C NMR スペクトルと DEPT 実験の結果は、1個のカルボニル炭素、11個の sp^2 混成軌道を持つ炭素原子、6個の酸素原子に結合したメチン炭素、1個の酸素原子に結合したメチレン炭素、2個のメチル炭素の計21個の炭素原子の存在を示した。さらに、 ^1H NMR、 ^1H - ^1H COSY、 ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトルの解析より Fig. 2-3 に示す部分構造が導かれた。 sp^2 混成軌道を持つ炭素原子 (C-1~C-9_a) 及び関連する5個の芳香族性プロトン (δ 8.32、 δ 8.27、 δ 7.75、 δ 7.60、 δ 7.35) は2置換された C 環を持つ β -carboline 骨格の化合物であることを示した。一つの置換基は、3個のお互いにカップリングしていて、かつ、酸素原子に結合している炭素上のプロトン (δ 5.97、 δ 4.03、 δ 3.90) を持つことから、酸素原子に結合したメチン (δ_{C} 80.5, C-11) と、酸素原子に結合したメチレン (δ_{C} 63.9, C-12) の結合したグループが、カルボニル炭素 (δ_{C} 200.6, C-10) を介してクロモフォア-と結合していることが示唆された。これより、メチル基 (δ_{C} 18.0, δ_{H} 2.94) は、直接C環に置換していることが予想された。残った6個の炭素原子 (δ 103.6、 δ 73.8、 δ 72.5、 δ 72.2、 δ 70.3、 δ 17.6) は、糖部分を構成していた。 ^1H NMR における糖部分の結合定数、 ^{13}C NMR スペクトルにおける化学シフトの帰属は、この糖が α -rhamnose であることを示した。

Fig. 2-3. Oxopropaline A の部分構造及びケミカルシフト
 $[\delta_H (\delta_C) \text{ in } CD_3OD]$.



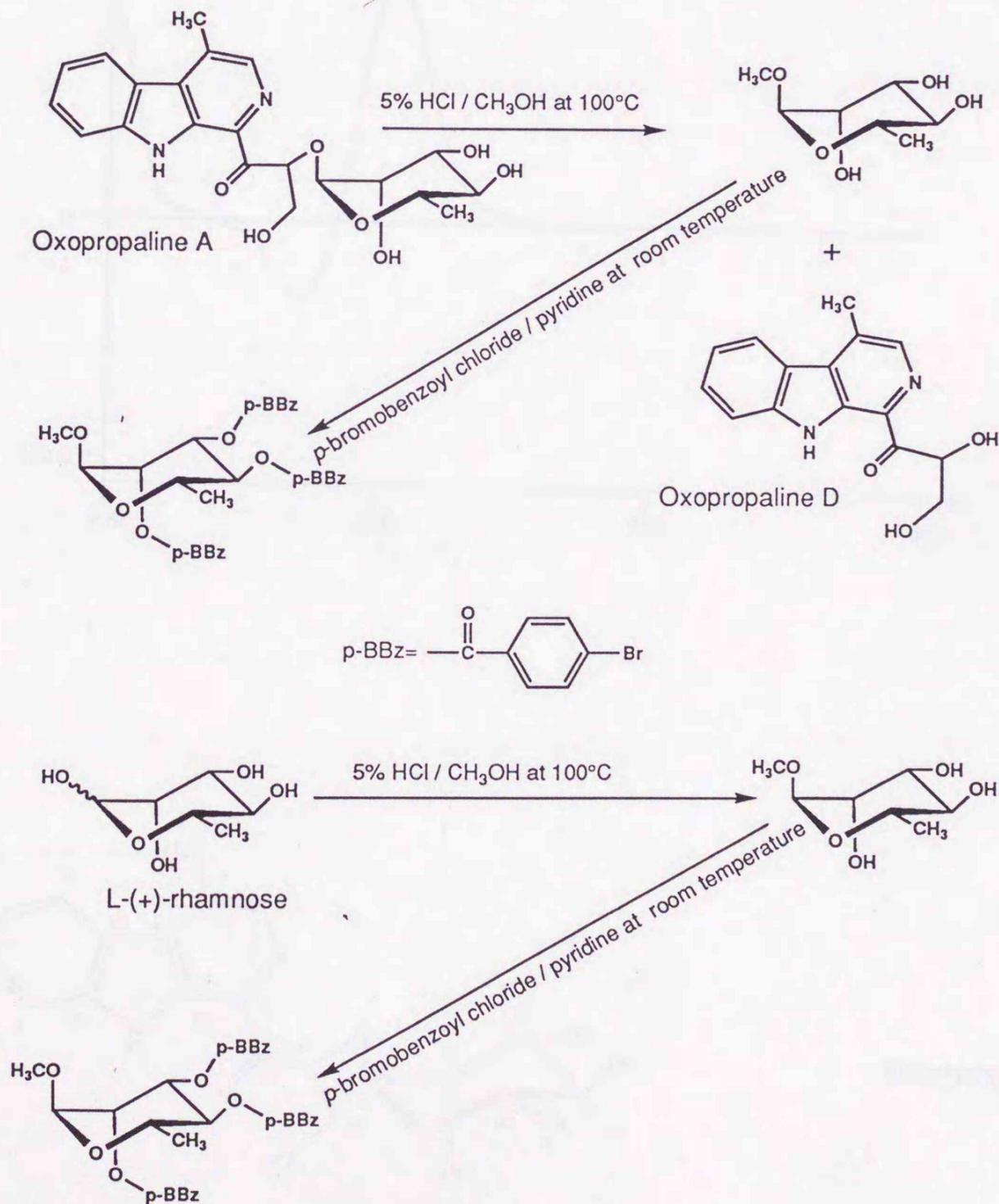
推定された部分構造間の関係、並びに ^1H NMR 及び ^{13}C NMR スペクトルの完全な帰属は HMBC スペクトルにより決定した。5-H(δ 8.27) から C-4_a(δ 131.1)、C-7(δ 129.6)、C-8_a(δ 143.2) に、6-H(δ 7.35) から C-4_b(δ 122.2)、C-8(δ 113.5) に、7-H(δ 7.60) から C-5(δ 124.5)、C-8_a(δ 143.2) に、8-H(δ 7.75) から C-6(δ 121.8)、C-4_b(δ 122.2) に、それぞれロングレンジカップリング示し、A 及び B 環部分の構造を支持した。さらに、13-H₃(δ 2.94) から C-4_a(δ 131.1)、C-4(δ 134.6)、C-3(δ 140.1) に、H-3(δ 8.32) から C-4_a(δ 131.1)、C-1(δ 134.2) に、それぞれロングレンジカップリングを示すことから、メチル基は C-4 位に、もう1個の置換基は C-1 位に置換している構造を与えた。さらに、11-H(δ 5.97)から C-12(δ 63.9)、C-10(δ 200.6)、C-1'(δ 103.6) へ、12_a-H(δ 3.90) から C-11(δ 80.5) へ、1'-H(δ 4.96) から C-11(δ 80.5)、C-3'(δ 72.5)、C-5'(δ 70.3)へ、2'-H(δ 4.04) から C-3'(δ 72.5)、C-4'(δ 73.8) へ、3'-H(δ 3.80) から C-4'(δ 73.8) へ、4'-H(δ 3.33) から C-3'(δ 72.5) C-5'(δ 70.3)、C-6'(δ 17.6) へ、6'-H₃(δ 0.85) から C-4'(δ 73.8)、C-5'(δ 70.3) への、ロングレンジカップリングを与えた。これらの HMBC データの解析より α -rhamnose はグリコシル結合で C-11 位に結合しており、この rhamnose を含む置換基は、C-10 位のカルボニル炭素を介して C-1 位に結合していることが明かとなった。この結果の要約を Fig. 2-4 に示す。

Fig.2-4. Oxopropaline A におけるHMBC 実験の要約.



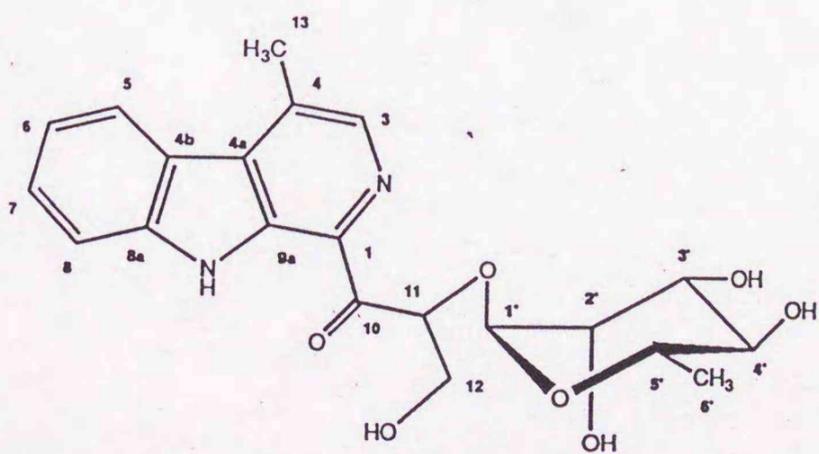
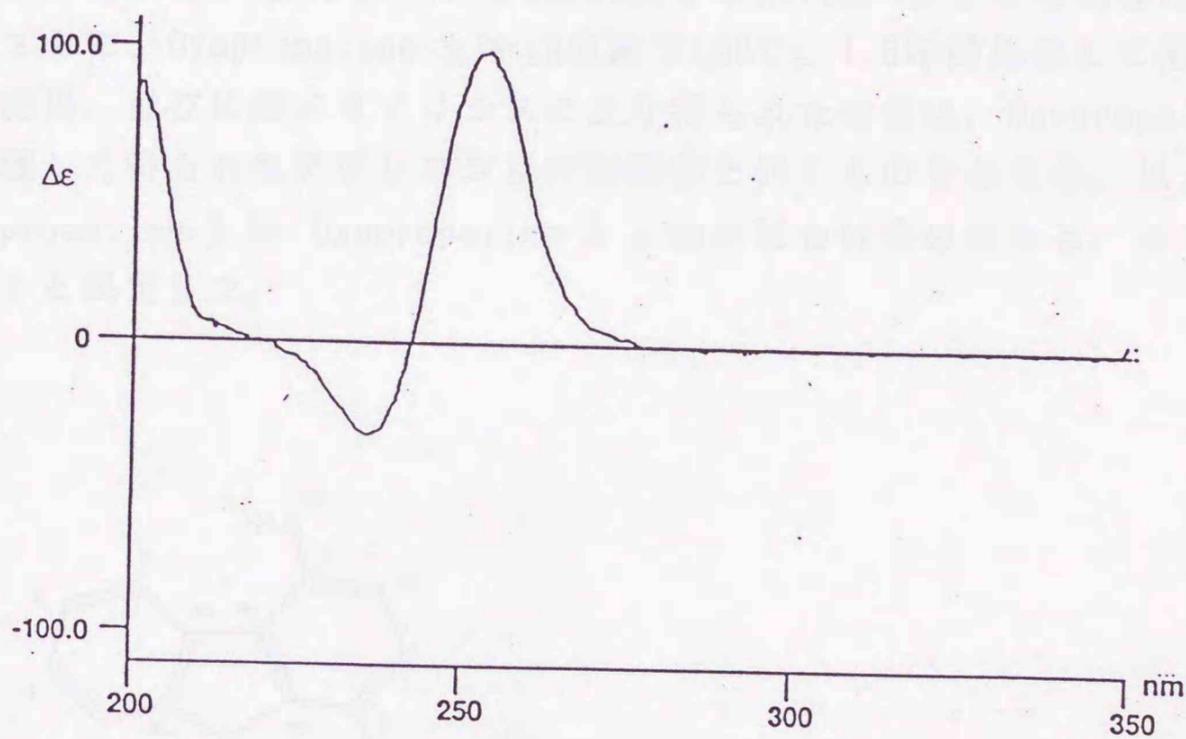
さらに構造を確認するため Oxopropaline A を1N塩酸で100℃、1.5時間処理して酸加水分解を行った。Oxopropaline A の加水分解により得られた糖は、TLC で標品の rhamnose と同じRf値を与えた。rhamnose の絶対構造を決定するため Oxopropaline A の酸メタノリシスとそれに続く per-*p*-bromobenzoyl 化を行った (Scheme 2-1)⁹⁴⁾。

Scheme 2-1. Oxopropaline A 及び L-(+)-rhamnoseの酸メタノリシスと per-*p*-bromobenzoyl化.



誘導した 2,3,4-tri-O-(p-bromobenzoyl)-1- α -O-methyl-rhamnose の CD スペクトルは、標品の L-(+)-rhamnose から同様に得た誘導体の CD スペクトルと一致した (Fig. 2-5)。以上の結果より Oxopropaline A の構造を以下のように決定した。

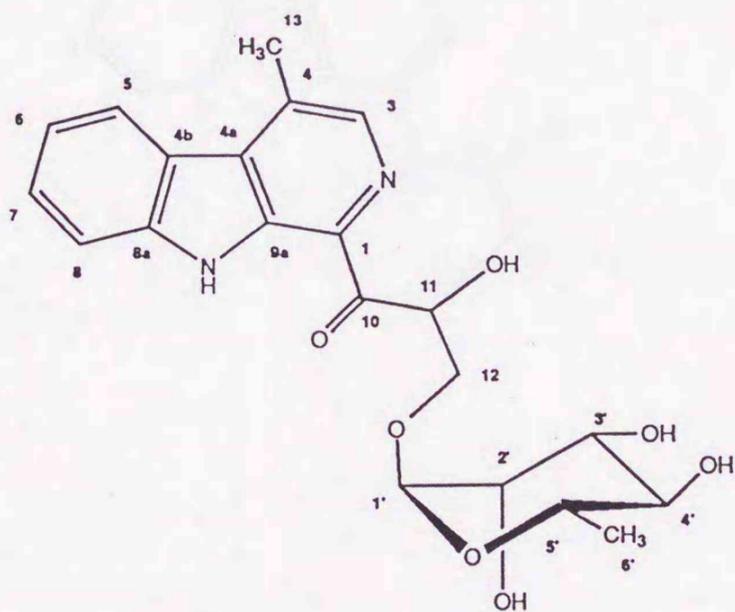
Fig. 2-5. Oxopropaline A 由来 2,3,4-tri-p-bromobenzoyloxy-1-methoxy-rhamnose の CD スペクトル (In CH₃CN at 22°C).



Oxopropaline A

5-2 Oxopropaline B の構造解析

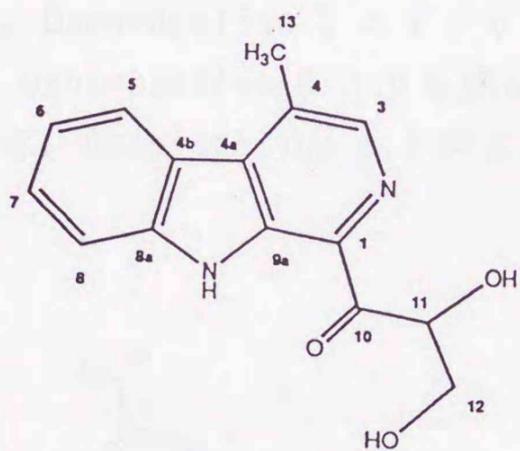
Oxopropaline B は Oxopropaline A と同じ分子式 $C_{21}H_{24}N_2O_7$ [m/z 417.1674 ($M+H$)⁺; calcd. 417.1662] と与えられた。UV 及び IR スペクトルも Oxopropaline A と類似の形状を示した。一方、 ^{13}C 及び 1H NMR スペクトルは C-1 位の側鎖部分と rhamnose 部分についてのみ Oxopropaline A との違いを示した。C-11 位の ^{13}C 及び 1H NMR における化学シフトは、Oxopropaline B ($\delta_c 74.3 / \delta_H 5.72$) において Oxopropaline A ($\delta_c 80.5 / \delta_H 5.97$) よりも高磁場にシフトしており、C-12 位では逆に Oxopropaline B ($\delta_c 69.7 / \delta_H 4.01$ 及び $\delta_H 4.21$) において Oxopropaline A ($\delta_c 63.9 / \delta_H 3.90$ 及び $\delta_H 4.03$) よりも低磁場にシフトしていた。さらに、Oxopropaline B を 1N 塩酸で 100°C、1.5 時間処理して酸加水分解を行った結果、並びに酸メタノリシスにより得られた結果は、Oxopropaline A を同様に処理して得られたアグリコン及び糖部分と同じものを与えた。以上の結果より Oxopropaline B は Oxopropaline A と糖の結合位置の異なる、以下に示す構造であると決定した。



Oxopropaline B

5-3 Oxopropaline D の構造解析

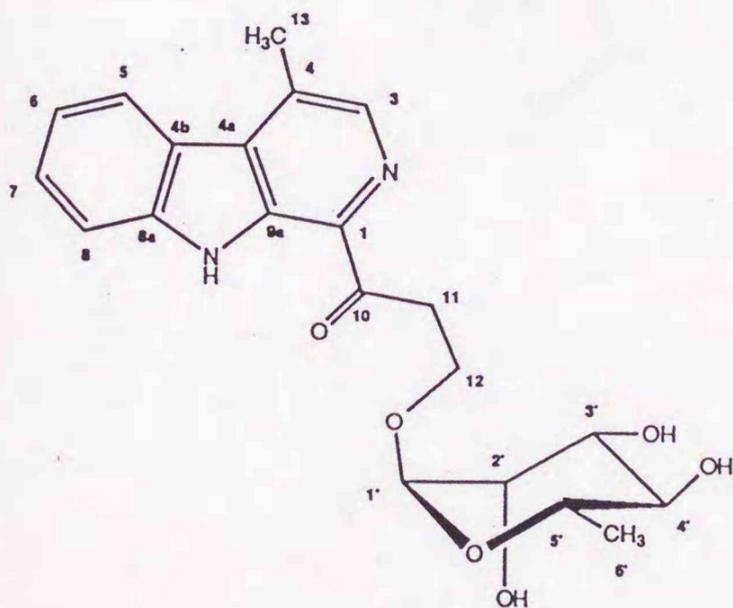
Oxopropaline D は分子式 $C_{15}H_{14}N_2O_3$ と与えられた。Oxopropaline D の UV 及び IR スペクトルも Oxopropaline A と類似の形状を与えた。Oxopropaline D の ^{13}C 及び 1H NMR スペクトルは Oxopropaline A 及び B よりもさらに単純なシグナルを与えた。分子量及び ^{13}C 及び 1H NMR スペクトルの検討から Oxopropaline D の構造は、derhamnosyl Oxopropaline A と示唆された。Oxopropaline D の 1H NMR スペクトル並びに TLC 上での Rf 値は Oxopropaline A、B の酸加水分解により得られたアグリコン部分と同様な結果を与えた。以上の結果より Oxopropaline D の構造は、4-methyl-1-(1-oxo-2,3-dihydroxy-propyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole と決定した。なお、C-11 位の立体化学については決定していない。



Oxopropaline D

5-4 Oxopropaline E の構造解析

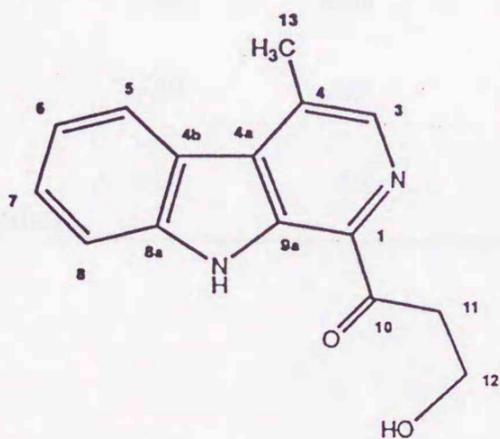
Oxopropaline E は HRFAB-MS スペクトルの解析より分子式 $C_{21}H_{24}N_2O_6$ [m/z 401.1713($M+H$) $^+$; calcd. 401.1713] と与えられ、Oxopropaline A 及び B より酸素原子が1個少ない分子式を与えた。UV 及び IR スペクトルは、やはり Oxopropaline A、B と類似の形状を与えた。 1H NMR スペクトルにおいて Oxopropaline E は、Oxopropaline B における C-11 位のメチンプロトン (δ 5.72) の代わりにジェミナルカップリングを示すメチレンプロトン (δ 3.61, δ 3.94) が観測された。Oxopropaline E の ^{13}C NMR スペクトルも、Oxopropaline B における酸素原子に直接結合しているメチン炭素 (C-11 δ 74.3) が、メチレン炭素 (δ 38.7) に置き代わっていることを示した。これらの分光学的な検討結果は、Oxopropaline E の構造が 11-dehydroxy oxopropaline B であることを示唆した。Oxopropaline E を 1N塩酸で 100°C、1.5時間処理して酸加水分解を行った結果、並びに酸メタノリシスにより得られた結果は、未知のアグリコン部と共に、Oxopropaline A、B 並びに標品の L-(+)-rhamnose から誘導された糖部分と同じ物質を与えた。Oxopropaline E のアグリコン部分は、Oxopropaline A、B のアグリコンである Oxopropaline D よりも低い極性を示す物質であった。さらに、このアグリコンは、Oxopropaline G と同じ TLC 上での R_f 値、HPLC での保持時間を与えた。



Oxopropaline E

5-5 Oxopropaline G の構造解析

Oxopropaline G は、HRFAB-MS スペクトルの解析より分子式 $C_{15}H_{14}N_2O_2$ [m/z 255.1141(M+H)⁺; calcd. 255.1133] と決定した。UV 及び IR スペクトルは他の Oxopropaline 類と同様な形状であった。Oxopropaline G の ^{13}C 及び 1H NMR スペクトルは Oxopropaline D と同じような、単純なスペクトルを与えた。 1H NMR スペクトルにおける特徴的な A_2B_2 1H - 1H スピンシステムが C-1 側鎖由来の2個の三重線 (δ 3.54、 δ 4.08)として観測された。一方、 ^{13}C NMR においては、それぞれのメチレンプロトンに対応する炭素が δ 41.8及び δ 58.8に観測された。以上の結果より Oxopropaline G の構造は 11-dehydroxy oxopropalined (4-methyl-1-(1-oxo-3-hydroxy-propyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole と決定した。



Oxopropaline G

第6節 Oxopropaline 類及び Lavendamycin の細胞障害活性

Oxopropaline 類及び Lavendamycin の *in vitro* 細胞障害活性試験の結果を Table 2-7 に示す。Oxopropaline D 及び G は濃度依存性の細胞障害活性を示した。

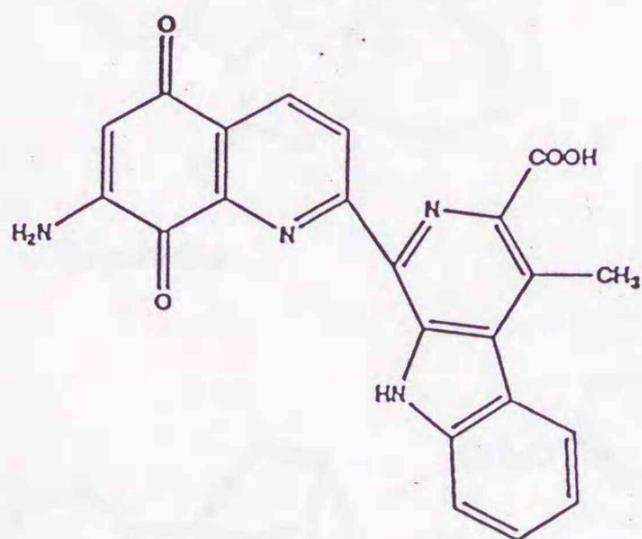
Table 2-7. Oxopropaline A, B, D, E, G及び Lavendamycinの *In vitro*細胞障害活性 .

| Cell lines | IC ₅₀ value (µg/ml) | | | | | Lavendamycin |
|--------------------------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------|
| | A | B | D | E | G | |
| P388 (Leukemia) | >50 | 41 | 31 | >50 | 43 | 0.06 |
| A549 (Lung carcinoma) | >50 | >50 | 17 | >50 | 32 | NT |
| MKN45 (Gastric carcinoma) | >50 | >50 | 39 | >50 | 33 | 0.10 |
| MKN74 (Gastric carcinoma) | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | NT |
| WiDr (Colon adenocarcinoma) | >50 | 49 | 38 | >50 | 45 | 0.09 |

NT = not tested

第7節 考察

微生物の産生する新規抗腫瘍物質探索の過程において、静岡県藤枝市の土壌から分離した一放線菌 *Streptomyces* sp. G324 株が *Streptomyces lavendulae* より単離され構造決定された、強い抗腫瘍活性を示す抗腫瘍抗生物質 Lavendamycin を生産していることを見だし、さらに、この菌株が細胞障害活性を示す新規な β -carboline 化合物 Oxopropaline 類を生産していることを見いだした。

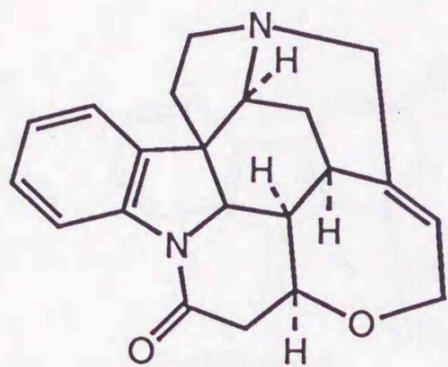


Lavendamycin

β -carboline 骨格のようなインドール核を持つ化合物は、主として植物より分離され、1000種以上のものが知られている。この中には、猛毒として知られる Strychnine⁹⁵⁾、精神安定剤、血圧降下剤として重要な医薬品である Reserpine⁹⁶⁾、末梢血管拡張作用を持つ Yohimbine⁹⁷⁾、抗不整脈剤として用いられている Ajmaline⁹⁸⁾、血管拡張薬として本態性高血圧患者に優れた効果をもたらす Vincamine⁹⁹⁾ (Fig. 2-6) など、その多くが強い生理活性を有している。また、Vincoside を経て生合成される Vincristine、Vinblastine が制癌剤として白血病等の治療に用いられていることは、緒論でも述べた通りである。一方、微生物が生産する β -carboline を母核とする化合物としては、Lavendamycin のほかには、*Streptomyces alboverticillatus* の生産する β -galactosidase 阻害剤の Pyridindolol¹⁰⁰⁾、*Penicillium verrucosum* の生産するマイコトキシン Verruculogen¹⁰¹⁾、さらに *Aspergillus fumigatus* の生産する Fumitremorgin A¹⁰²⁾ が知られているのみである (Fig. 2-7)。

本菌株における初期のスクリーニングの過程で、同じ UV スペクトルを示す一連の化合物 (Oxopropaline 類) が、ある種のヒト腫瘍細胞に対し特異的な細胞障害活性を示すことが認められた。UV スペクトルは Oxopropaline 類が共役した β -carboline を母核とする化合物群であることを示唆した。併産する Lavendamycin もその構造の一部に β -carboline 骨格を持つことから、この可能性は高

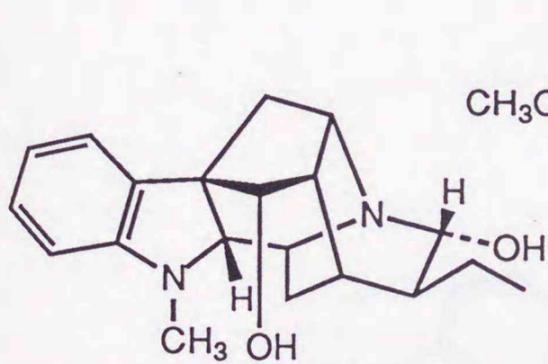
Fig. 2-6. 重要な生理活性を示す主なインドールアルカロイド.



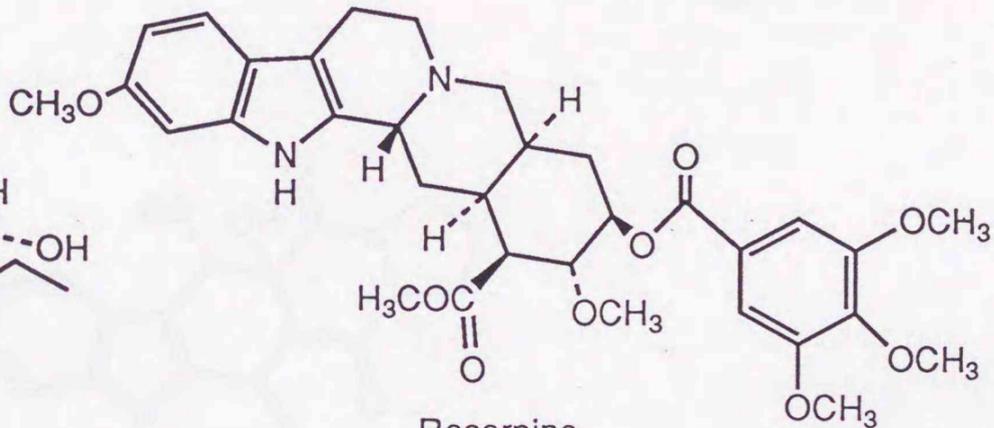
Strychnine



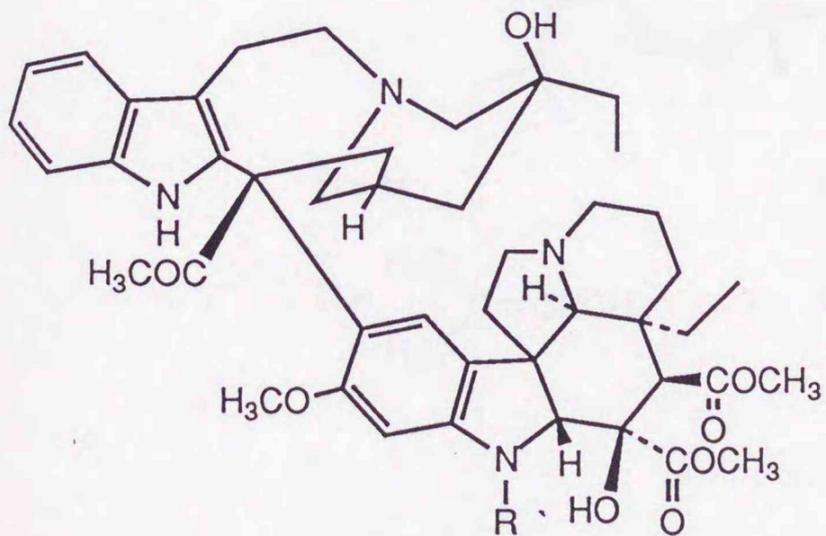
Vincamine



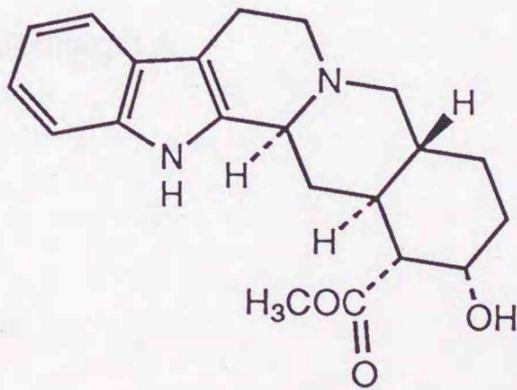
Ajmaline



Reserpine

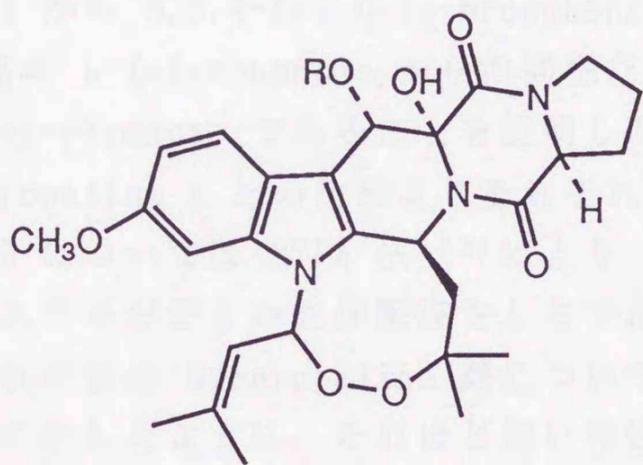
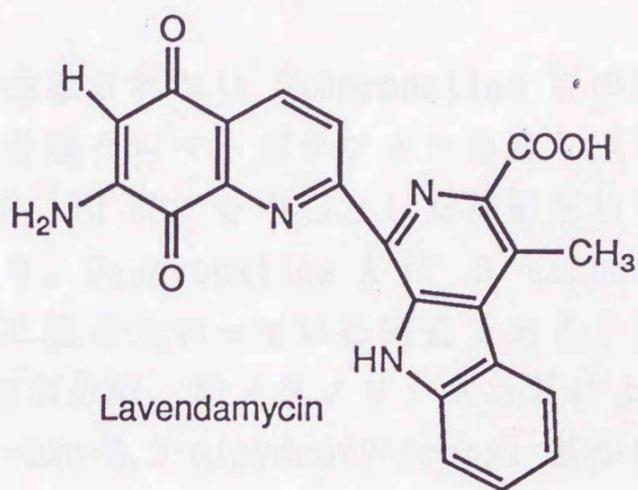
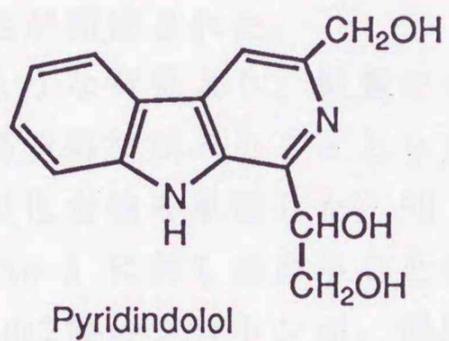


R = CH₃, Vinblastine
R = CHO, Vincristine



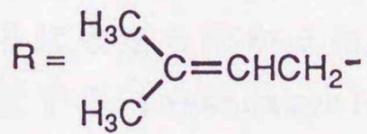
Yohimbine

Fig. 2-7. 微生物の生産する β -carboline アルカロイド.



R = H,

Verruculogen



Fumitremogin A

いと思われ、また、すでに述べたように、微生物の生産する β -carboline 骨格を持つ化合物は4種程度しか知られていないことから、Oxopropaline 群は新規化合物である可能性が高いと思われた。一方、 β -carboline を母核とする化合物が多彩な活性を示すことから、Oxopropaline 類も細胞障害活性をベースにした抗腫瘍活性が期待された。

このような背景より、微量にしか生産されない Oxopropaline 群の精製・単離並びに構造解析試みることにした。各種クロマトグラフィーを繰り返し用いてそれぞれの化合物を単離した。 ^1H 及び ^{13}C NMR を中心とした構造解析を Oxopropaline A に対し進めることにより、Oxopropaline A は β -carboline 骨格の C環部分の2個のプロトンが、置換基に置き代わっている構造であることが明らかとなった。さらに、HMBC 法並びに酸加水分解、酸メタノリシスなどにより検討を行った結果、4位にメチル基、1位に 1-oxo-2,3-dihydroxy-propyl 基が置換しており、さらに、1-oxo-2,3-dihydroxy-propyl 基の2位の水酸基に rhamnose がグリコシル結合している構造であることを決定した。さらに、rhamnose については、Oxopropaline A から 2,3,4-tri-O-(p-bromobenzoyl)-1- α -O-methyl-rhamnose を誘導し、標品の L-(+)-rhamnose からの同様な誘導體との CD スペクトルの比較により、L-(+)-rhamnose であることを証明した。Oxopropaline B、D、E、G については Oxopropaline A との比較よりそれぞれの構造を決定した。Oxopropaline A、B、D については MTPA 法¹⁰³⁾により C-11 位の絶対構造の検討を行ったが、MTPA エステルが正しい立体配座をとらず絶対構造の決定には至らなかった。

単離したそれぞれの Oxopropaline 類について、細胞障害活性を試験したところ Table 2-7 に示したように、それほど強い活性は示さず、また、特異性もほとんど認められなかった。この点については、Lavendamycin との併用効果、何等かの原因による細胞の培養中の pH の変化による活性への影響、など検討したが明確な結果を得るには至らなかった。

この菌の生産する Lavendamycin は Streptonigrin と生合成的に密接な関係が考えられている¹⁰⁴⁾。Streptonigrin において、分子中のベンゾキノン部は5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸が、2,4-ジアミノフェノールに変換されて C_6N_2 ユニットとして取り込まれると推定されている¹⁰⁵⁾。一方、フェニルピリジン部分は、 β -carboline が起源であるとする説がある¹⁰⁴⁾。この2つの説を結ぶためには、 C_3 ユニットが必要と考えられるが、Oxopropaline 類は、Lavendamycinに見られる C-3 位のカルボキシル基が欠損しているものの、C-1 位に C_3 ユニットが置換していることより、Lavendamycin 生合成の前駆体にかなり関連する構造であると考えられる。このことから、Oxopropaline 群の化合物は、興味ある化合物と考えられる。

Oxoplopaline 群の化合物は、抗腫瘍活性においては、当初予想していたほどの効果は認められなかったものの、さきに述べたように、 β -carboline 化合物が多彩な生理活性を有することより、今後なんらかの有用な活性が見いだされる可能性があり、また、Lavendamycin の生合成の解明の面からも有用な化合物群と考えられる。

第2章 実験部

本研究においては、主に以下の機器を使用してスペクトルの測定をおこなった。

- ・ NMR スペクトル

Varian VXR400 spectrometer

JEOL GSX-270 spectrometer

Bruker AM500 instrument (HMBC測定)

- ・ FAB-MS スペクトル

JEOL JMS-SX102 spectrometer

- ・ IR スペクトル

Hitachi 270-30 spectrometer

- ・ UV スペクトル

Hitachi 200-20 spectrometer

Hewlett-Packard diode array instrument (HP1090 liquid chromatography system)

- ・ 旋光度

Horiba SEPA-200 spectrometer

- ・ CD スペクトル

JASCO J-20A automatic recording spectropolarimeter

JASCO DP-500N data processor

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析・分取は、以下の機器により行った。

- ・ 分析

Hewlett-Packard HP1090 liquid chromatography system

- ・ 分析並びに分取

JASCO liquid chromatography system

RHEODYNE 7125 sample injector

JASCO 880-PU pump (×2)

JASCO 875-UV detector

JASCO 880-30 solvent mixing module

SIC Chromatocoder 12 integrator

GILSON Model 201 fraction collector

中圧液体クロマトグラフィーによる分取は、以下の機器により行った。

・分取

Yamazen corp. No.540-SY-2CSC pump

Yamazen corp. prepUV-10V.HC detector

Yamazen corp. SS-100 recorder

ADVANTEC SF2120 fraction collector

各種クロマトグラフィーは以下の担体を用いた。

・シリカゲル薄層クロマトグラフィー

Merck Kiesel gel 60 F₂₅₄ Art. No.5715

Merck Kiesel gel 60 F_{254s} Art. No.5554

Merck Kiesel gel 60 F_{254s} Art. No.13794

・中圧カラムクロマトグラフィー

YMC ODS-AQ 120-S50

・高速液体クロマトグラフィー

Wako Wakosil-II 5C18 HG (4.6φ×250 mm)

Waters prep. Nova pak HR C18 (25φ×100 mm)

その他、検討過程並びに大量分取時には、以下の担体等を適宜使用した。

・シリカゲルクロマトグラフィー

Merck Kiesel gel 60 Art. No.9385

Wako Wakogel C-200

・中圧カラムクロマトグラフィー

Wako Wakogel FC-40

・高速液体クロマトグラフィー

Shiseido Capcell pak C18 SG120 (4.6φ×250 mm)

Shiseido Capcell pak C18 SG120 (6.0φ×250 mm)

Wako Wakosil-II 5C18 AR (4.6φ×250 mm)

Wako Wakosil-II 5C18 AR (20φ×250 mm)

第1節 生産菌の分離

starch 0.05%、glucose 0.05%、peptone 0.02%、yeast extract 0.01%、meat extract 0.01%、NZ-amine type A 0.01%、CaCO₃ 0.01% agar 1.5%より成る培地を pH7.0に調整し、これを分離培地として、静岡県藤枝市の土壌より分離した。

第2節 生産菌の分類

Oxopropaline 類を生産する菌株の形態的並びに生理学的特徴は、Shirling と Gottlieb の方法に従って評価した⁸⁶⁾。細胞壁の分析は、Becker らの方法⁸⁷⁾及び Yamaguchi の方法⁸⁸⁾により実施した。炭素源の資化性は Pridham and Gottlieb's 培地上での生育により検討した⁸⁹⁾。

第3節 生産菌の培養

3-1 生産培地

dextrine 2.0%、glucose 1.0%、peptone 1.0%、corn steep liquor 0.5%、CaCO₃ 0.2%より成る培地を pH7.0に調整して用いた。

3-2 培養

上記生産培地100mlを3本の500ml三角フラスコに分注して121℃、15分滅菌した。このフラスコにスラントに培養した菌体を植菌し3日間、35℃でロータリーシェイカーを用い100rpmで培養し種培養液とした。次に、同じ培地を100mlずつ分注し滅菌した、80本の500ml三角フラスコに2mlずつ種培養液を植菌し5日間、35℃で培養を行った。

第4節 培養状況の分析

培養の経時的な状況の分析は、1日毎の growth、pH、Oxopropaline 類及び Lavendamycin の生産量のサンプリングにより行った。growth は培養液を 3000 rpm で10分間遠心分離を行ったときの菌体を、固形分の体積により評価した。Oxopropaline 類及び Lavendamycin の生産量は HPLC の分析により評価した。HPLCのサンプルは以下のように調製した。各々10mlの培養液を Oxopropaline の分析ではpH10.0に調整し、一方、Lavendamycin の分析ではpH2.0に調整した後、10mlの酢酸エチルをそれぞれに加えた。それぞれの混合液を10分間攪拌し、3000 rpmで10分間遠心分離を行った。上澄液は2層に分かれることより、酢酸エチル層を取り出し減圧下濃縮乾固した後、10mlのメタノールに溶解して HPLC サンプルとした。

《HPLC 分析》

以下の条件により、分析を行った。この条件下での Oxopropaline 類及び Lavendamycin の HPLC における挙動を Fig. 2-8 に示す。

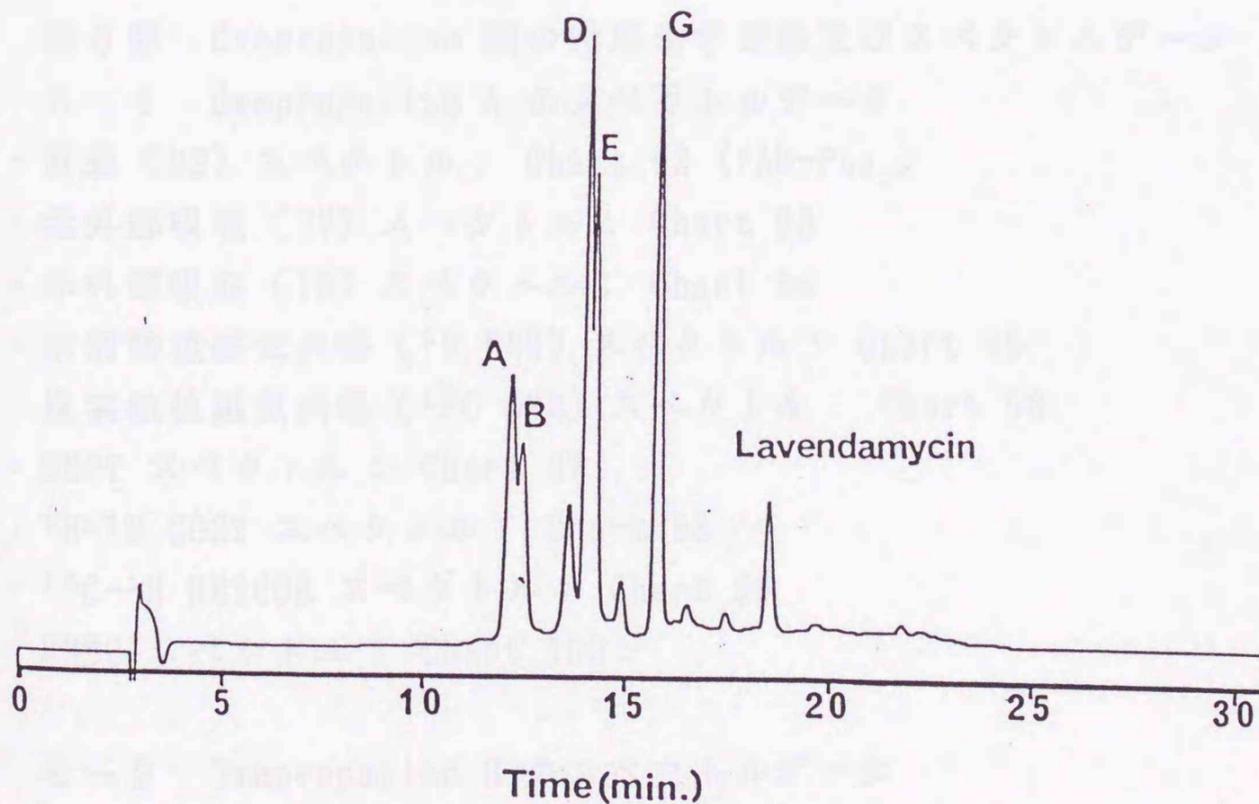
カラム：Wako sil-II 5C18 HG (4.6×250 mm, Wako Pure Chemical Industries. Ltd.)

溶媒：0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)-CH₃CN(7:3 for 6 minutes, 7:3 to 3:7 linear gradient for 9 minutes, 3:7 to 15:85 linear gradient for 2 minutes and then isocratic with 15:85 for 13 minutes)

流速：1.0ml/min.

検出：UV 380nm

Fig. 2-8. Oxopropaline 群並びに Lavendamycin の HPLCにおける挙動.



第5節 Oxopropaline 類の精製・単離

第3節の方法により培養終了後、培養液を8,000rpmで30分間遠心分離することにより菌体を含むケーキと濾液とに分離した。濾液は、pH10.0に調整後、8Lの酢酸エチルで2回抽出した。この酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で濃縮、油状抽出物923.6mgを得た。得られた油状抽出物を少量のメタノールに溶解し、化学修飾シリカゲル (YMC ODS-AQ 120-S50, YMC) 500mlを充填したカラムにのせH₂O-CH₃OH混合液(2:3)、H₂O-CH₃OH混合液(3:7)、H₂O-CH₃OH混合液(1:4)で順次展開溶出するクロマトグラフィーを行った。このクロマトグラフィーにおいては Oxopropaline A 含む画分、次いで Oxopropaline B と D を含む画分、さらに Oxopropaline E と G を含む画分が順次溶出する。減圧濃縮後、得られたそれぞれの油状活性画分を少量のメタノールに溶解し、Oxopropaline A を含む溶液はCH₃CN-H₂O混合液(3:7)、Oxopropaline B と D を含む画分、Oxopropaline E と G を含む画分はそれぞれCH₃CN-H₂O混合液(35:65)を溶離液とした HPLC (Prep-Novapak HR-C18 25φ×100 mm, Waters)を用いて、分速11.8mlの流速で、UV吸収280nmのモニターにより分取を行った。得られた各画分を減圧下濃縮したところそれぞれ薄黄色の粉末が生じた。この粉末を減圧乾燥して純粋なOxopropaline A 3.6mg、Oxopropaline B 1.2mg、Oxopropaline D 0.7mg、Oxopropaline E 0.8mg及び Oxopropaline G 0.3mgを薄黄色粉末として得た。

第6節 Oxopropaline 類の物理化学定数及びスペクトルデータ

6-1 Oxopropaline A のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 92 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 93
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 94
- ・水素核磁気共鳴 (¹H NMR) スペクトル: Chart 95
- ・炭素核磁気共鳴 (¹³C NMR) スペクトル: Chart 96
- ・DEPT スペクトル: Chart 97
- ・¹H-¹H COSY スペクトル: Chart 98
- ・¹³C-¹H HETCOR スペクトル: Chart 99
- ・HMBC スペクトル: Chart 100

6-2 Oxopropaline B のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 101 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 102
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 103

- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 104
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 105

6-3 Oxopropaline D のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 106 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 107
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 108
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 109
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 110

6-4 Oxopropaline E のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 111 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 112
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 113
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 114
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 115

6-5 Oxopropaline G のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 116 (FAB-Pos.)
- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 117
- ・赤外部吸収 (IR) スペクトル: Chart 118
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 119
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 120

第7節 Lavendamycin 及び Harman の物理化学定数及びスペクトルデータ

7-1 Lavendamycin のスペクトルデータ

- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 12 (CH₃CN-0.15%KH₂PO₄ (pH3.5)=85:15)
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 122 (DMSO-d₆)

7-2 Harman のスペクトルデータ

- ・紫外部吸収 (UV) スペクトル: Chart 123 (CH₃OH)
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 124 (CD₃OD)
- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 125 (CD₃OD)

第8節 Oxopropaline 類の酸加水分解

各サンプル (Oxopropaline A 4.6mg、B 2.2mg、E 4.0mg) を 1N 塩酸中で 1.5 時間 100°C で反応した。反応の結果、得られた糖及びアグリコンはそれぞれ TLC 並びに HPLC により決定した。糖部分は n -PrOH-H₂O-NH₄OH (6:2:1) で展開し、アンスロン試薬で検出した。Oxopropaline A、B、E よりそれぞれ得られた糖は、すべて標品の L-(+)-rhamnose (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.) と直接比較において TLC 上で同じ Rf 値 (0.45) を与えた。一方、Oxopropaline A、B より得られたアグリコン (それぞれ 3.9mg 及び 1.1mg) は HPLC 分析において、Oxopropaline D と同じ保持時間を示した。また、Oxopropaline E から得られたアグリコン (1.6mg) は、Oxopropaline G と同じ保持時間を与えた。

第9節 Oxopropaline 類の酸メタノリシス及び p-bromobenzoyl 化

9-1 酸メタノリシス及び p-bromobenzoyl 化

4.0mg の Oxopropaline A 及び 5.0mg の L-(+)-rhamnose をそれぞれ 0.5ml の 5% 塩酸メタノール (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.) に溶解し、100°C、2 時間処理した。Oxopropaline A より得られたサンプルは、減圧下、濃縮乾固した後 10ml の蒸留水に溶解した。水溶液を 10ml の酢酸エチルで抽出し、水層部を減圧下、濃縮乾固した。Oxopropaline A 及び L-(+)-rhamnose それぞれより得たメチルグリコシドを分取用 TLC (Merck Art.No.16485, n -PrOH-H₂O-NH₄OH=6:2:1) により分取し精製した。精製したメチルグリコシドは、 α -L-(+)-rhamnose 及び β -L-(+)-rhamnose との ¹³C NMR の比較より 1- α -O-Me-rhamnose と決定した¹⁰⁶⁾。それぞれのメチルグリコシドを各々 0.5ml のピリジンに溶解し、それぞれに、1.0 mg の p-bromobenzylchloride を加えた。室温下、24 時間反応を行い、それぞれのサンプルを、減圧下濃縮し、分取用 TLC (Merck Art.No.16485, n -hexane-EtOAc=4:1) により精製した。その結果、Oxopropaline A 及び L-(+)-rhamnose から得たサンプルよりそれぞれ、0.25mg、0.65mg の反応生成物を得た。両生成物の TLC (Merck Art.No.5554, n -hexane-EtOAc=4:1) 上における挙動は同じ Rf 値 (0.42) を示した。また、両生成物のアセトニトリル中の CD スペクトルも同じ曲線を与えた。Oxopropaline B 及び E の上記条件による酸メタノリシスにより、得られた糖誘導体は、標品の L-(+)-rhamnose から得られた誘導体とを TLC により比較した。それぞれのメチルグリコシドは TLC (Merck Art.No.5554, n -PrOH-H₂O-NH₄OH=6:2:1) 上で、同じ Rf 値 0.58 を与えた。

9-2 1- α -O-Me-rhamnose のスペクトルデータ

・水素核磁気共鳴 (¹H NMR) スペクトル: Chart 126 (D₂O)

- ・炭素核磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトル: Chart 127 (D_2O)

9-3 2,3,4-tri-O-(p-bromobenzoyl)-1- α -O-Me-rhamnose のスペクトルデータ

- ・質量 (MS) スペクトル: Chart 128 (EI)
- ・水素核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトル: Chart 129 (CDCl_3)
- ・円二色性 (CD) スペクトル: Chart 130 (CH_3CN)

第10節 細胞障害活性試験

10-1 細胞

in vitro 試験においてはマウス由来の P388 白血病細胞、およびヒト細胞は A549 肺癌細胞、MKN45 胃癌細胞、MKN74 胃癌細胞、WiDr 大腸癌細胞を使用した。

10-2 *in vitro* 細胞障害活性の測定

細胞溶液 $100\mu\text{l}$ を 96 穴平底マイクロプレートに蒔き込み、 CO_2 インキュベーター中で培養した。24 時間後に種々の濃度の被験サンプル $25\mu\text{l}$ を添加し、更に 96 時間培養した。培養終了の 4 時間前に、 5mg/ml の MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 溶液 $20\mu\text{l}$ を各穴に添加した。生細胞は、ミトコンドリアの脱水素酵素の働きで MTT を還元して不溶性の色素に変換することにより、培養終了後上清を捨て、イソプロピルアルコールにて色素を抽出し、 530nm での吸光度を測定し生細胞の数を測定した。サンプル非添加のウェルの吸光度と、添加したウェルの吸光度から 50% 障害活性を示す濃度 (IC_{50} 値) を算出した。

MASS SPECTRUM Data File: ABE44
 Sample: G324A (in Gly)
 RT 0'21" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 93.0358 Int. 62.
 Scan# (1 to 8)

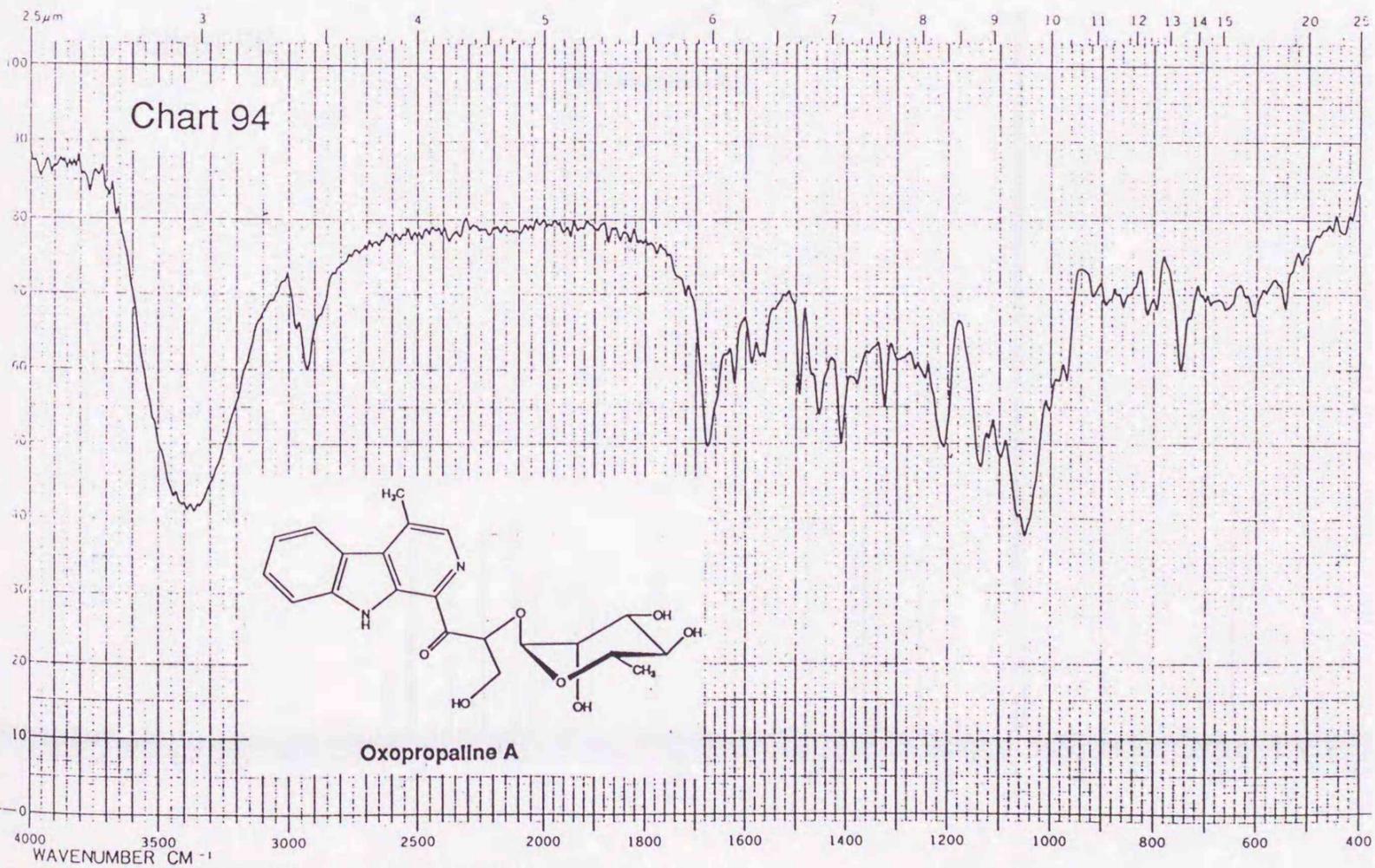
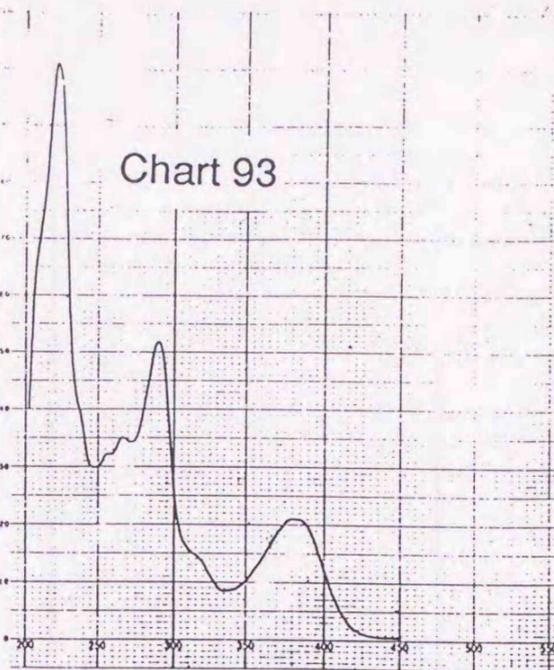
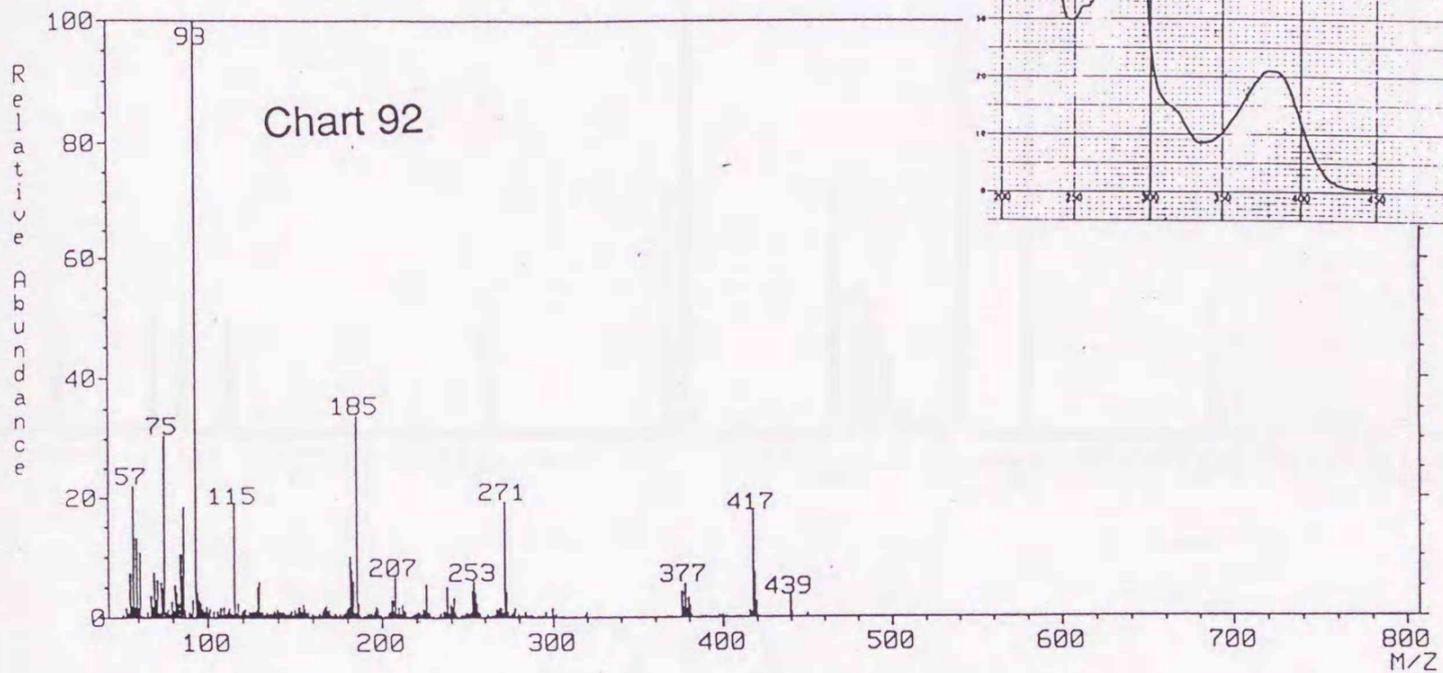


Chart 95

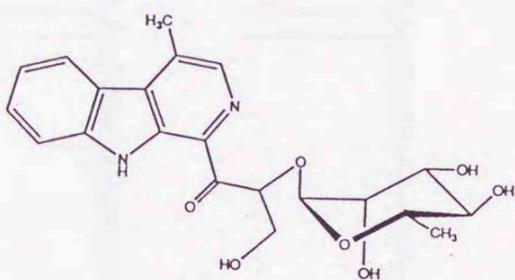
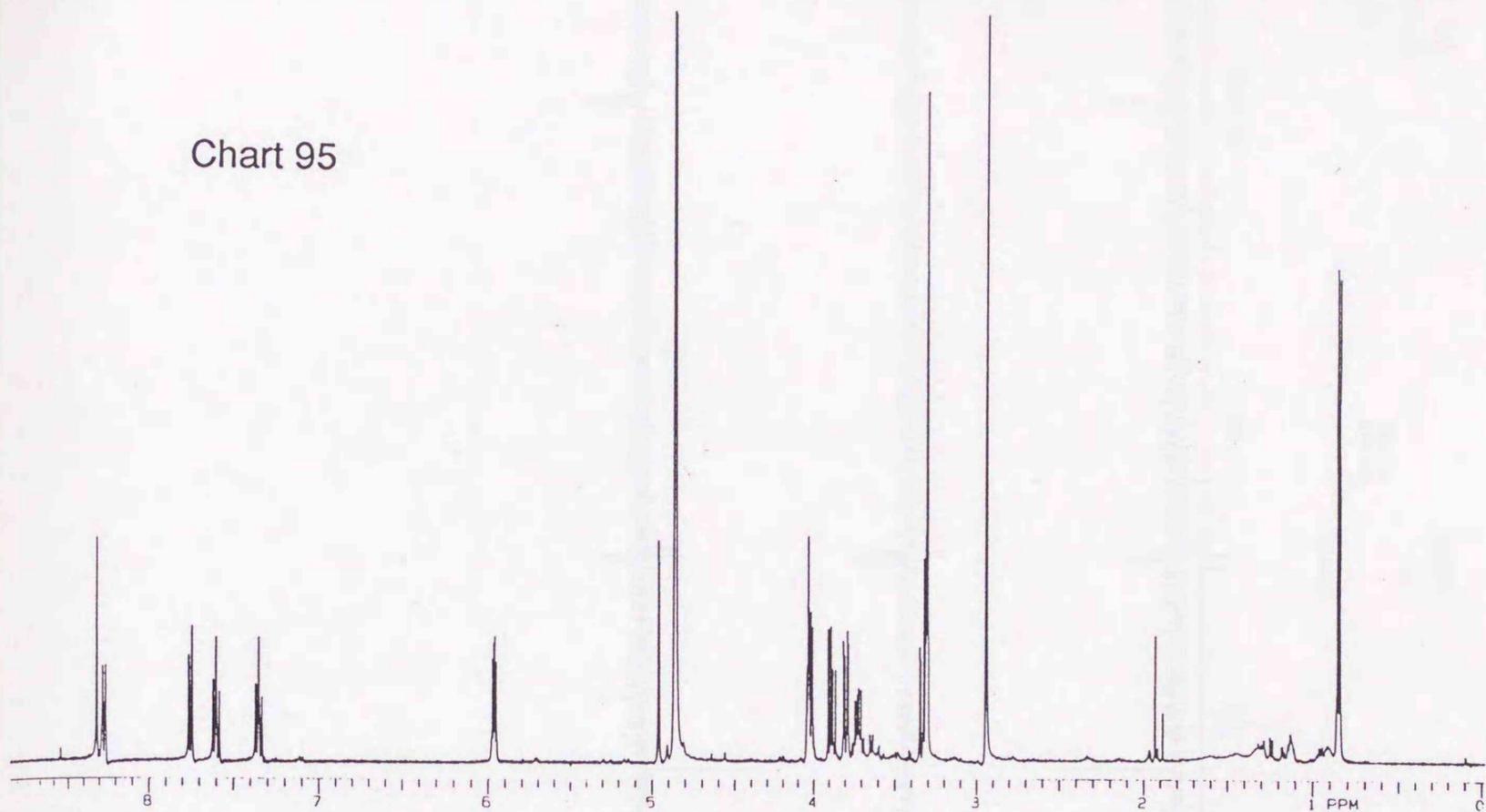


Chart 96

Oxopropaline A

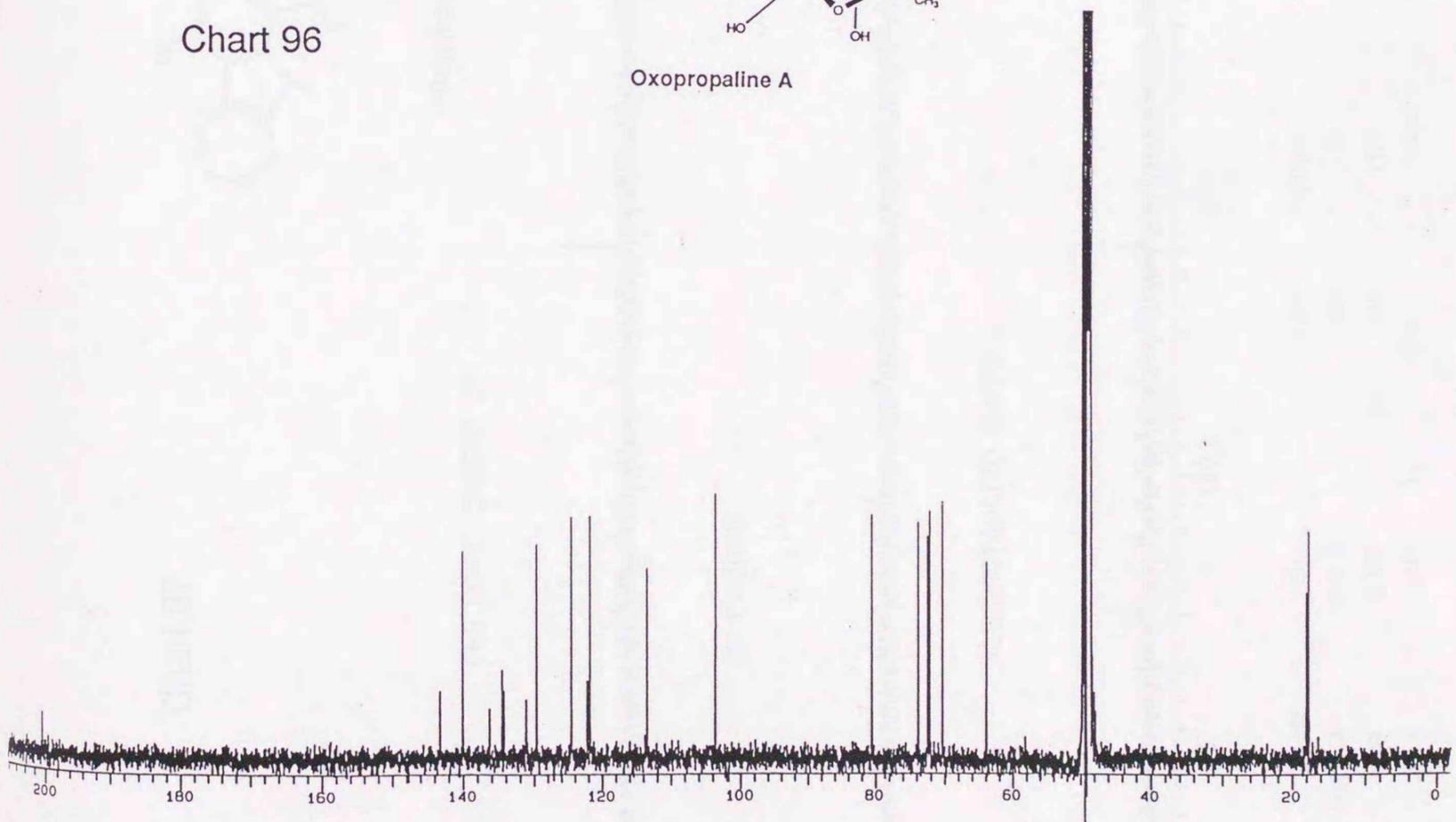
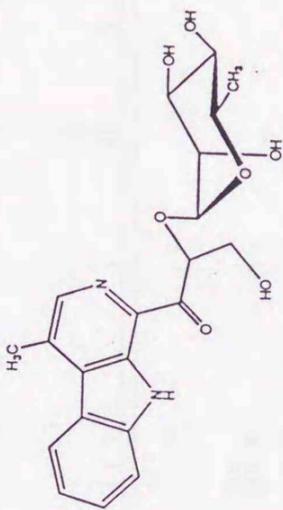
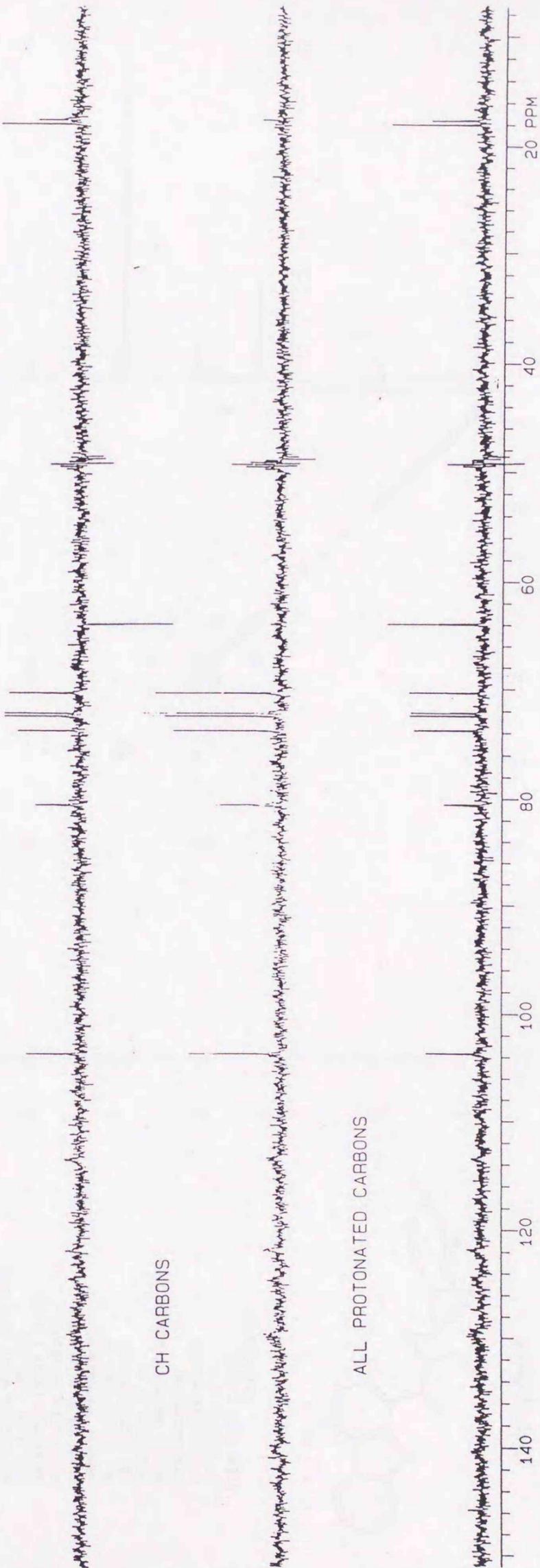


Chart 97



Oxopropaline A

CH2 DOWN, CH/CH3 UP



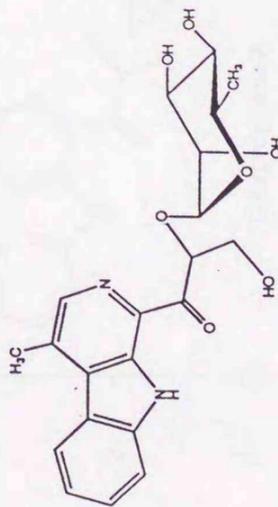
| PPM | Integration | Assignment | DEPTGL | Other Labels |
|---------|-------------|------------|---------|------------------|
| 13.250 | 1.250 | -2046.4 | 64 | |
| 14577.3 | NNY | 20 | 2.500 | G324A2 5678S9 |
| 0.751 | CCE | 9900 | 14577.3 | 617.7 |
| 10.1 | 15.8 | 60.0 | CO300 | |

DEPTGL
91-12-18
VXR 400

Chart 98

6324A2
 567869
 EXP4 PULSE SEQUENCE: COSY
 DATE 91-12-18
 SOLVENT CD300
 FILE COSY

COSY PULSE SEQUENCE
 OBSERVE PROTON
 FREQUENCY 399.952 MHZ
 SPECTRAL WIDTH 3172 HZ
 2D SPECTRAL WIDTH 3171.6 HZ
 ACQ. TIME 0.161 SEC
 RELAXATION DELAY 1.0 SEC
 PULSE WIDTH 90 DEGREES
 FIRST PULSE 90 DEGREES
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPEATITIONS 16
 NO. INCREMENTS 256
 SPIN RATE 20 HZ
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 PSEUDO-ECHO SHAPED
 FT SIZE 1K X 1K
 TOTAL TIME 1 HOUR
 32.3 MINUTES



Oxopropaline A

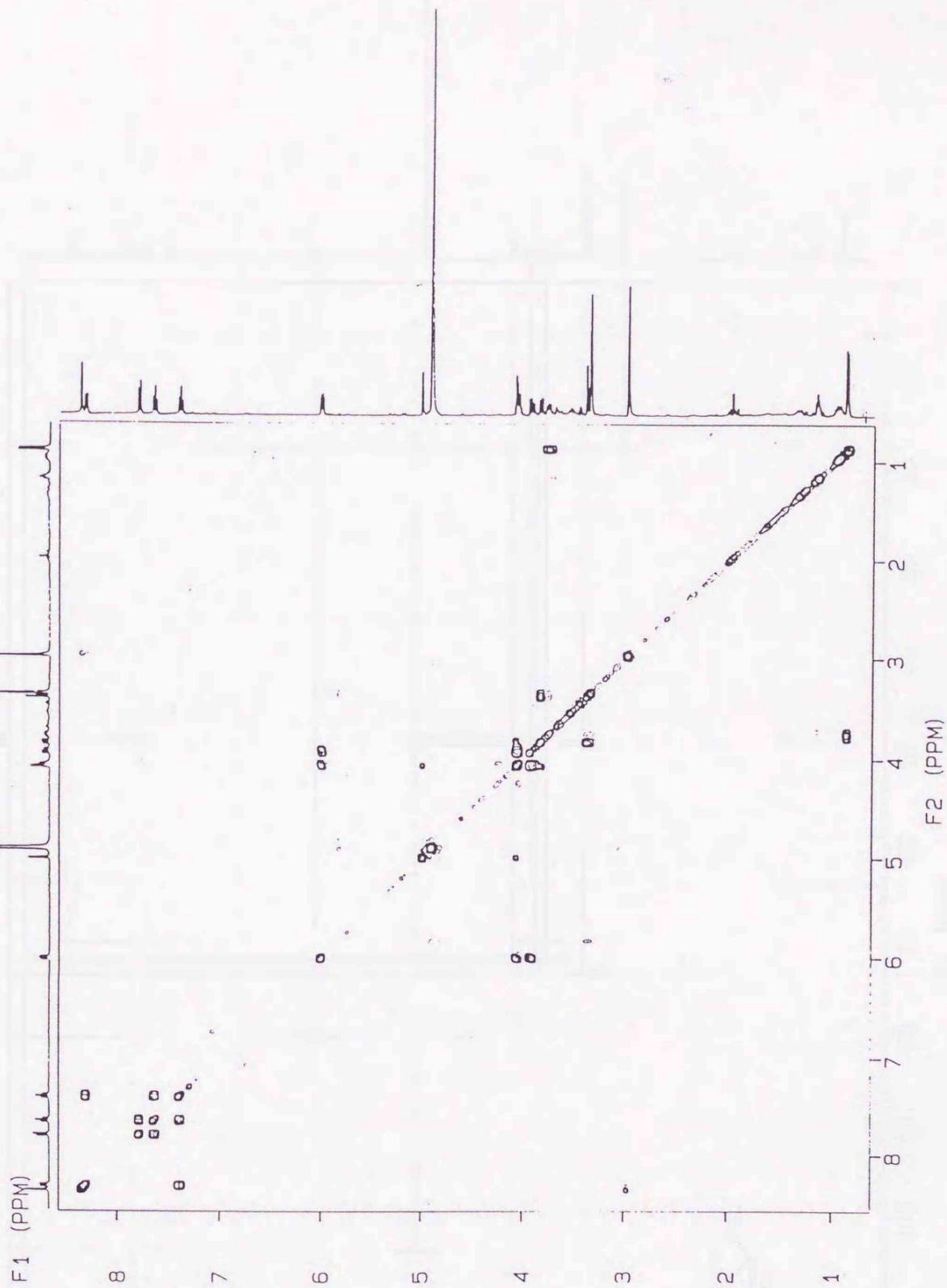
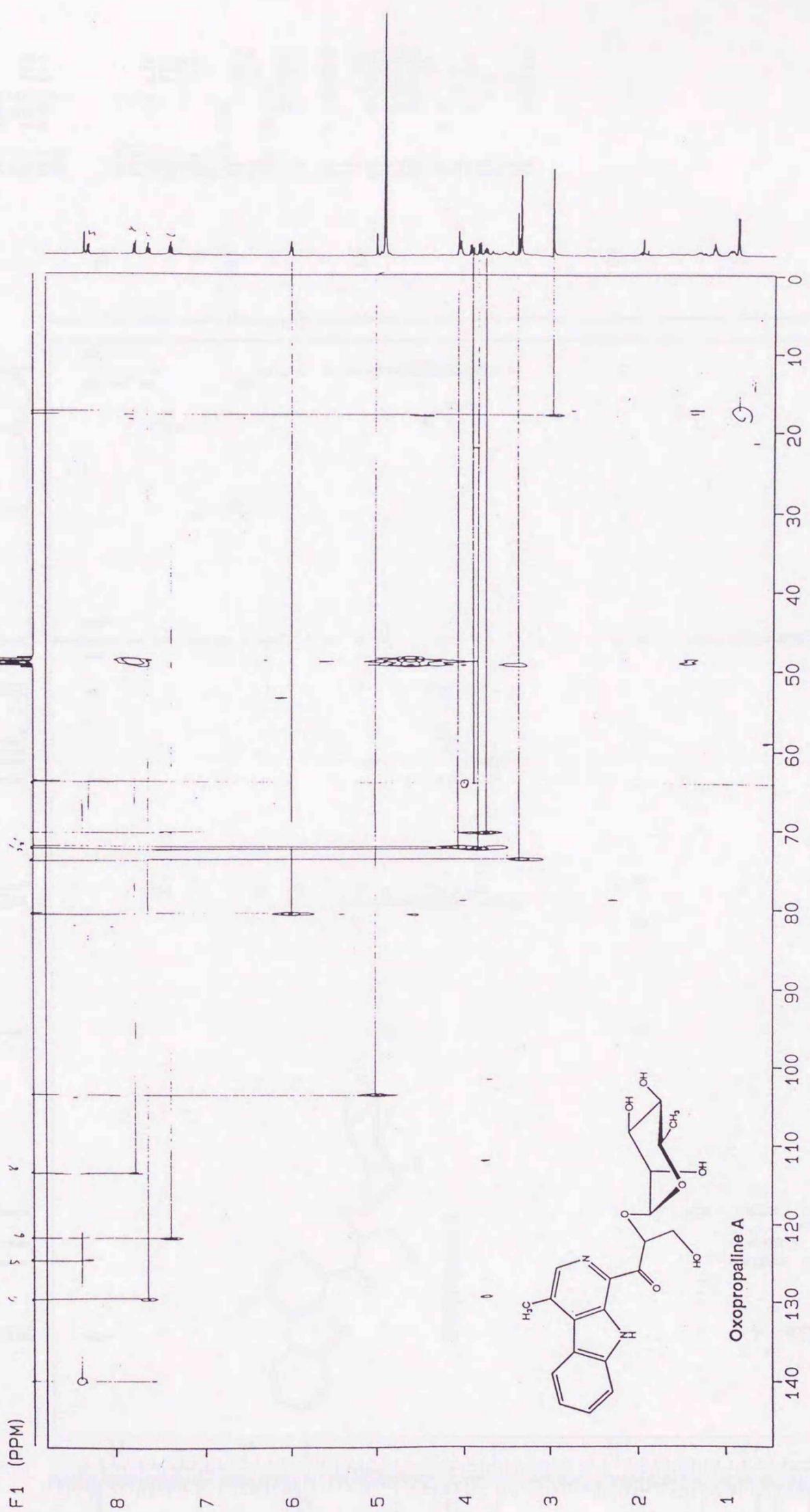


Chart 99



| F1 (PPM) | F2 (PPM) | Integration | Assignment |
|----------|----------|-------------|------------|
| 13.250 | 101 | 1.250 | 1.250 |
| 14925.4 | -3019.4 | 20 | NNY |
| 0.069 | 1.000 | 9900 | CCE |
| 10.1 | 800 | 15.8 | 15.8 |
| | -1409.4 | | |
| | 14925.4 | | |
| | 0.004 | | |
| | 0.017 | | |
| | -14.6 | | |
| | 60.0 | | |

HETCOR
91-12-18
VXR 400

6324A2
567889

HETCOR

CD300

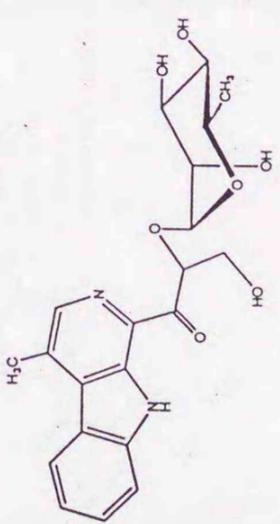
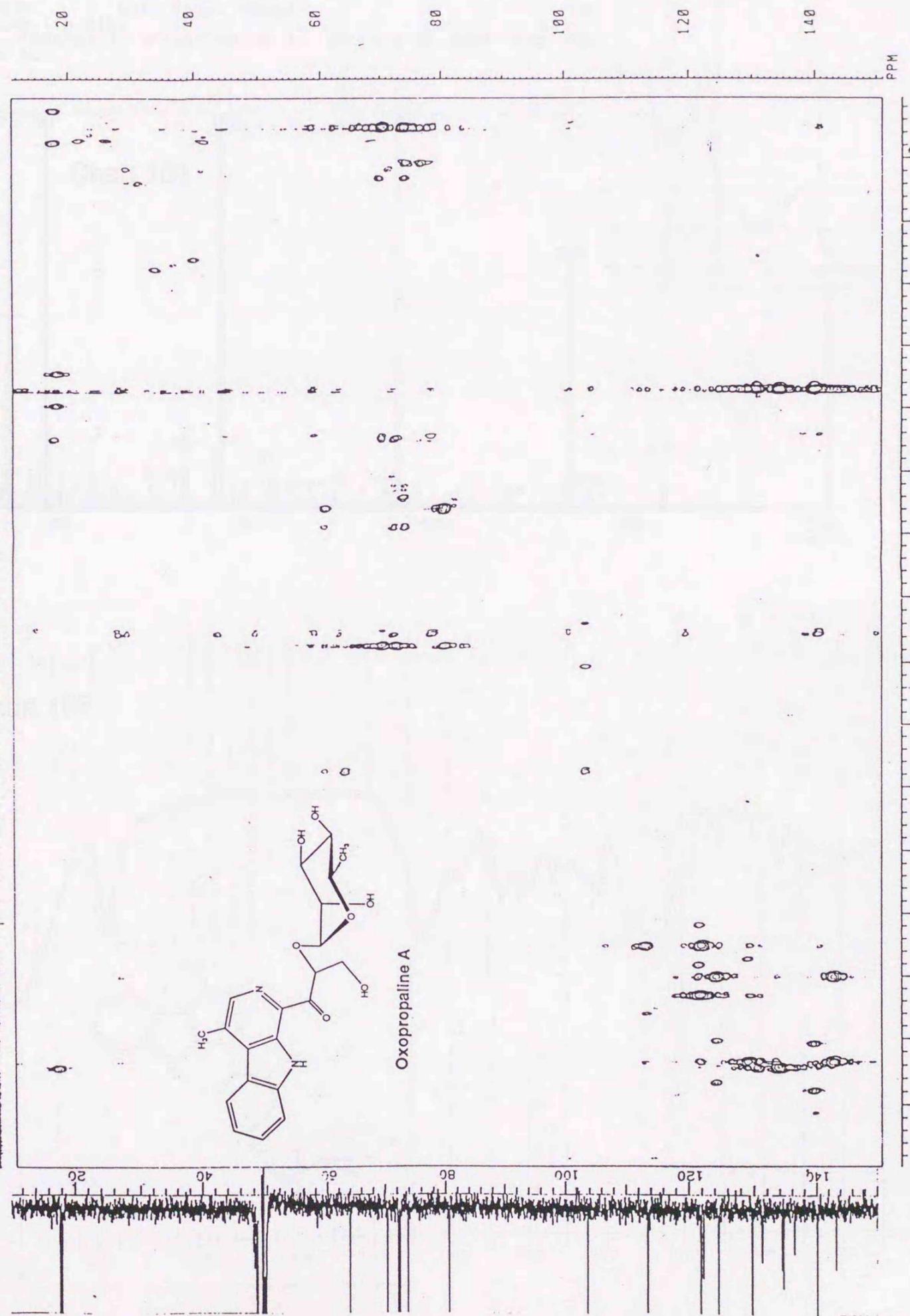
0.3244

Chart 100

P1CCS12C.SMX
 F2 PROJ: 001
 P1CCS12B.001
 AU PROG:
 INVR2LP.AU
 DATE 13-5-92

SI2 2048
 SI1 512
 SW2 4237.200
 SW1 6802.617
 NDB 2

WDN2 C
 WDN1 C
 LB2 -30.000
 LB1 -1.000
 GB2 .600
 GB1 .010
 MC2 M
 PLIM ROW: 6.986F
 F1 .522F
 F2 .522F
 AND COLUMN:
 F1 150.986F
 F2 11.277F
 D1 1.500000
 SI 1H
 P1 11.40
 D2 .0036000
 P3 6.40
 D4 .0600000
 D0 .0000030
 P2 22.60
 R0 0.0
 R1 0.0
 DE 150.00
 NS 256
 DS 2
 NE 124
 IN .0000284



MASS SPECTRUM Data File: ABE63
Sample: G324B (in Gly)
RT 1'10" FAB(Pos.) GC-214748300.0c BP: m/z 94.0000 Int. 132
Scan# (4 to 12)

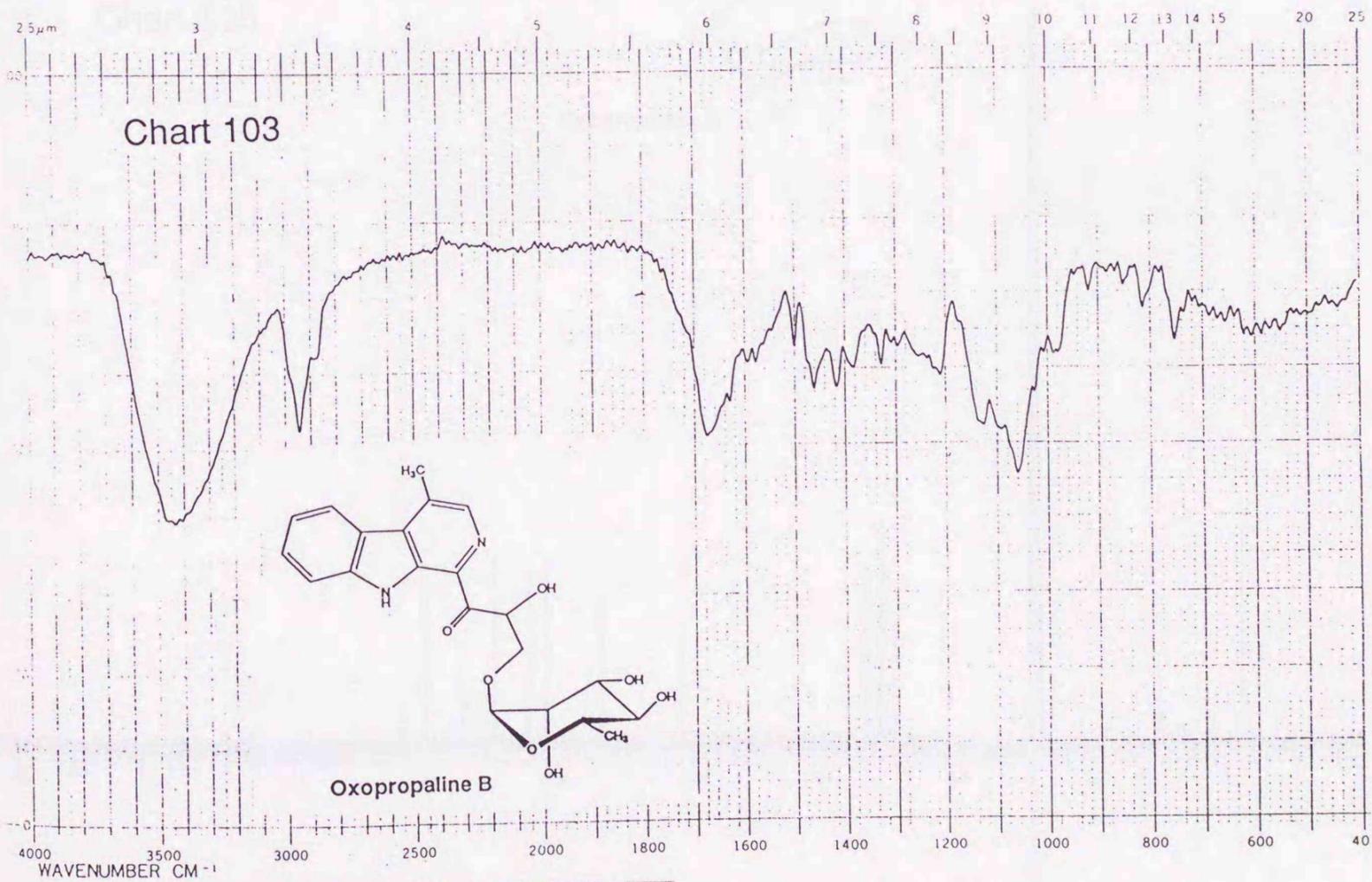
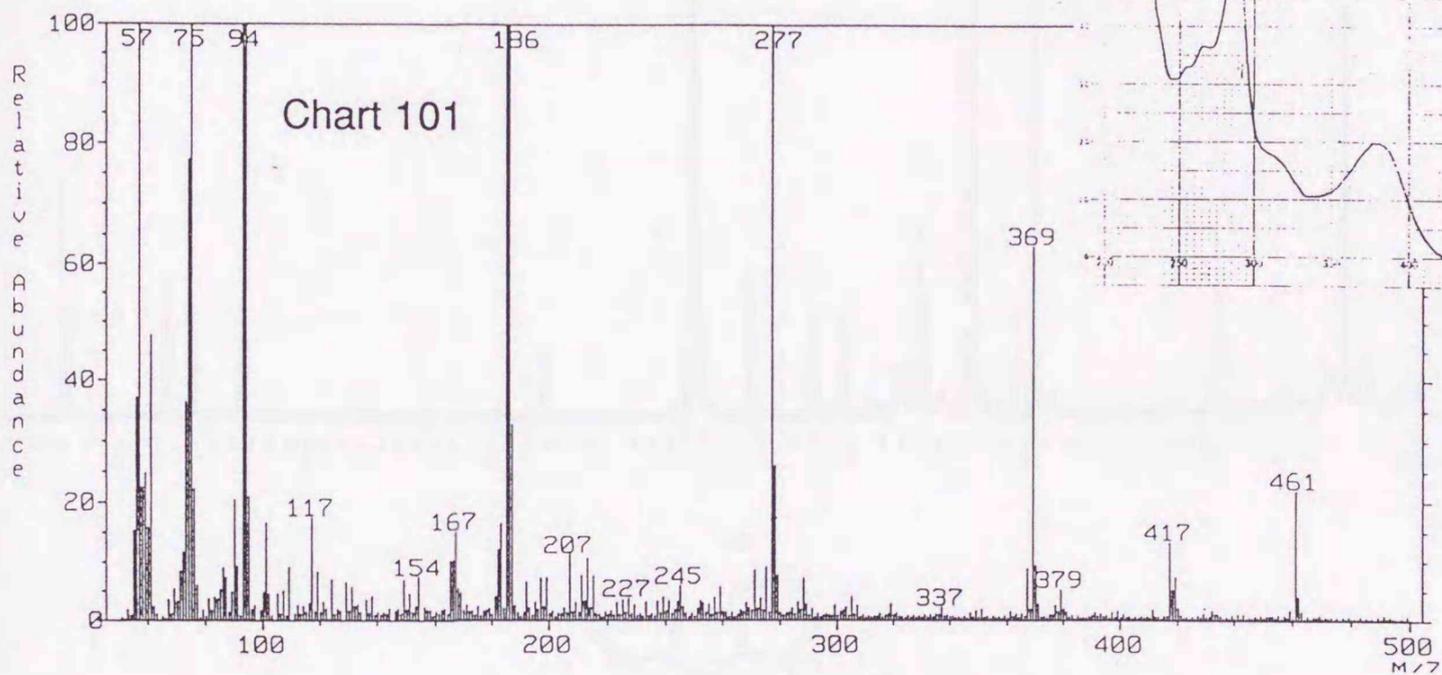


Chart 104

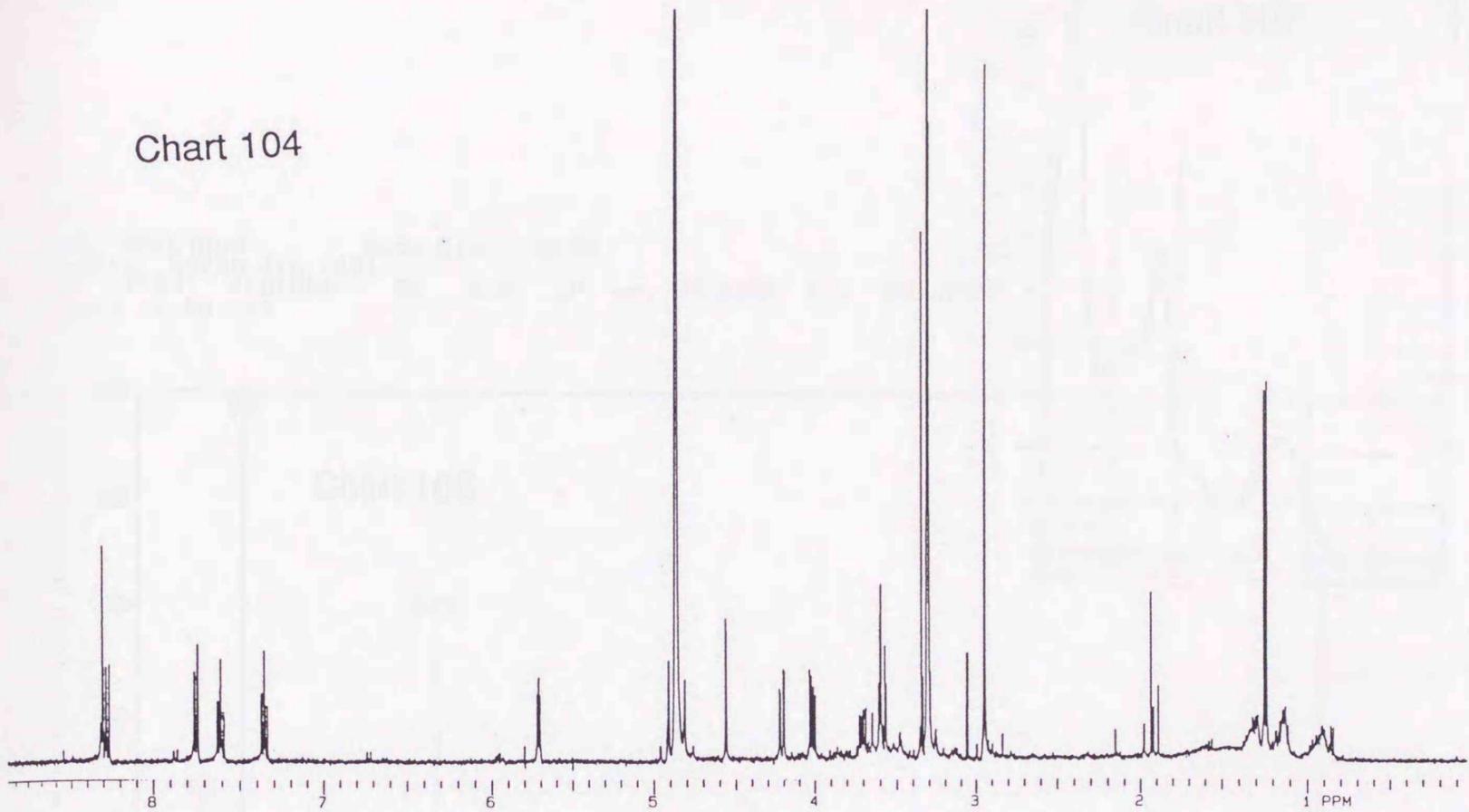
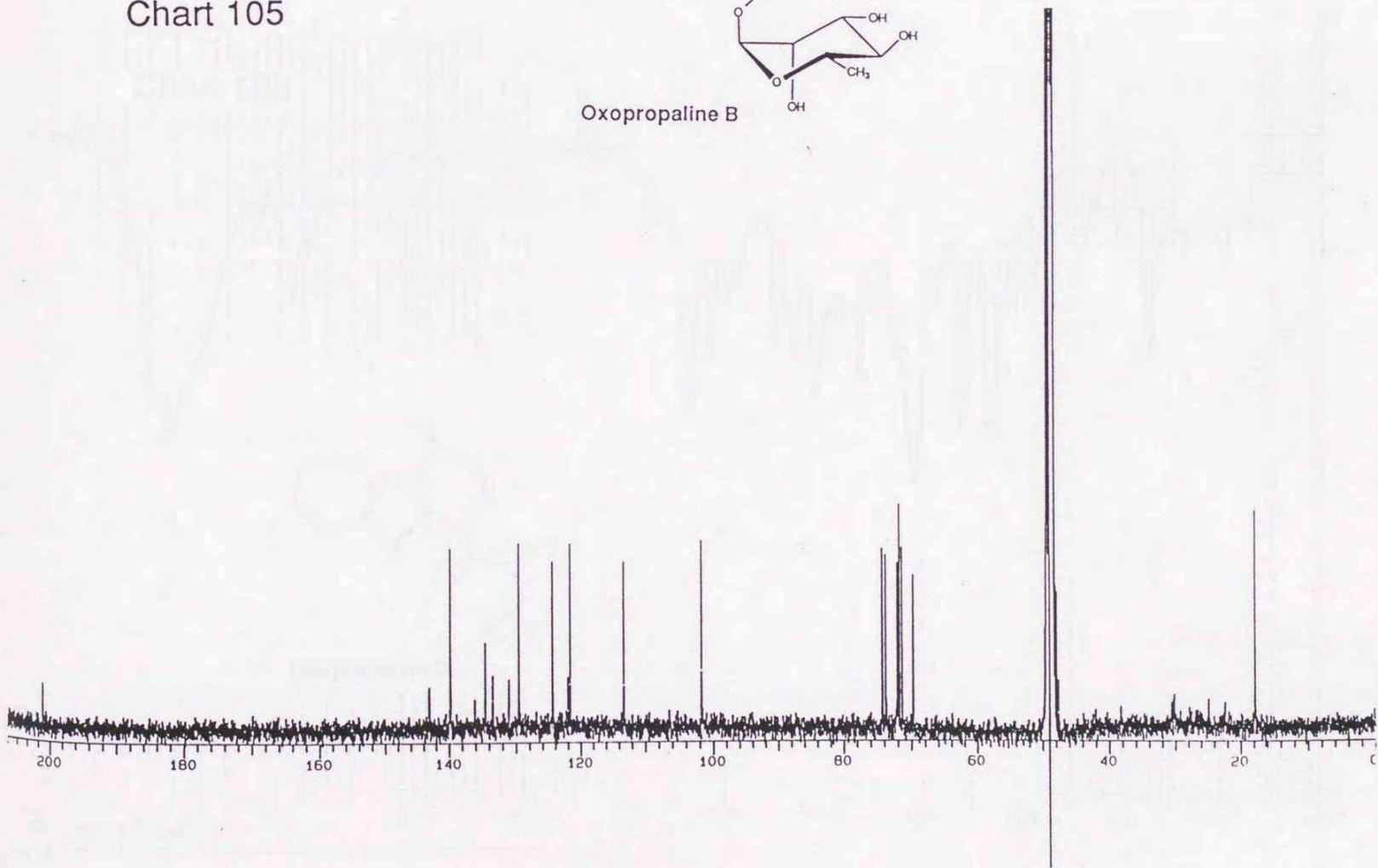
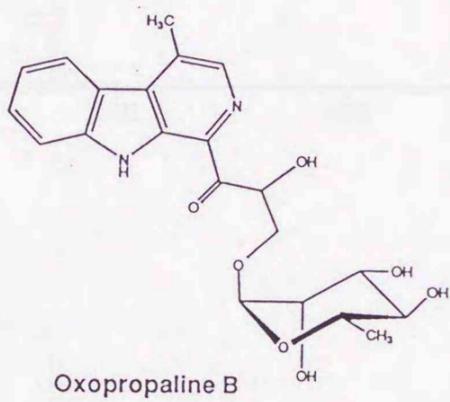


Chart 105



MASS SPECTRUM Data File: ABESB
Sample: G324D (in Gly)
RT 1'10" FAB(Pos.) GC 0.0c BP: m/z 93.0000 Int. 360.8727
Scan# (4 to 18)

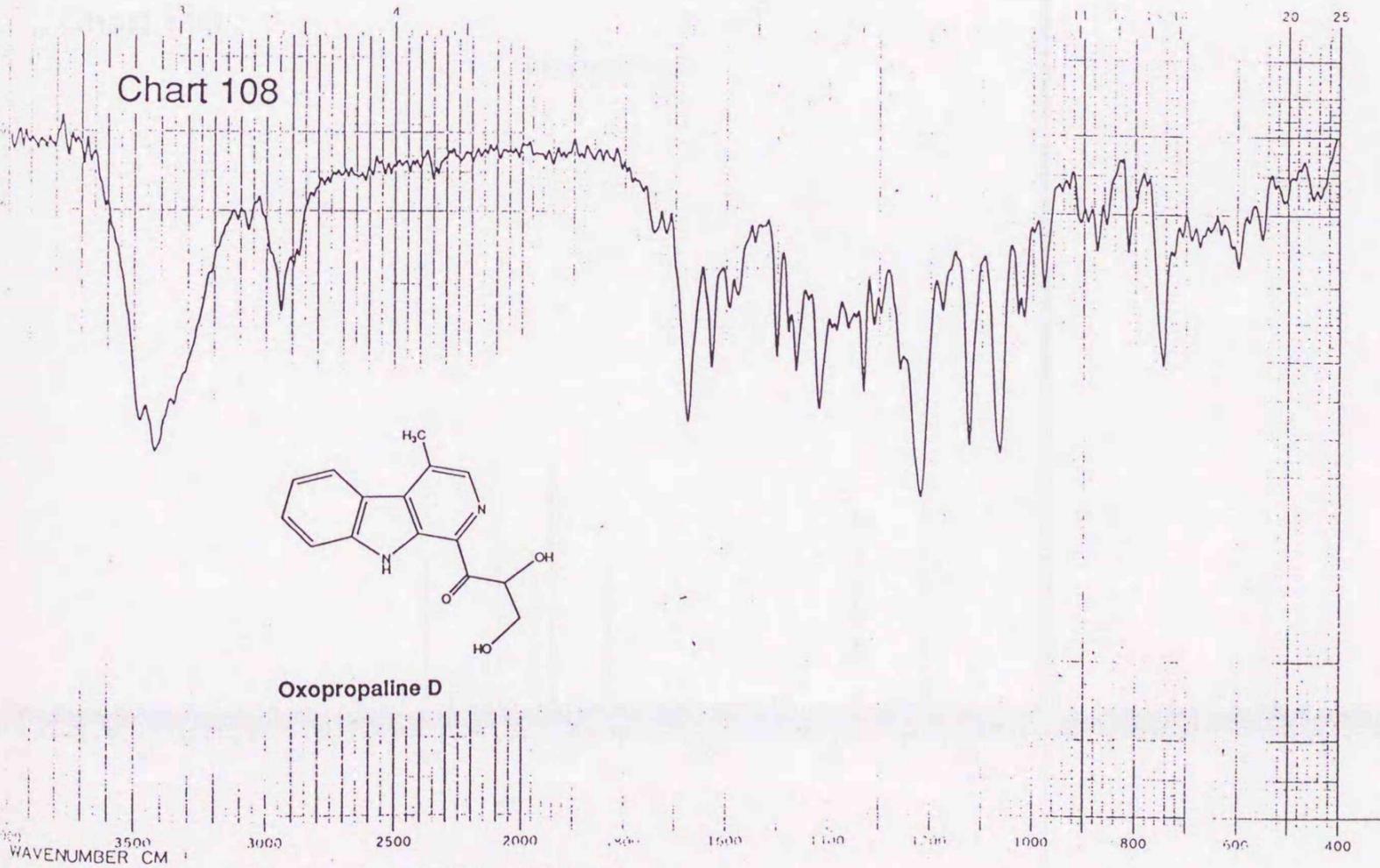
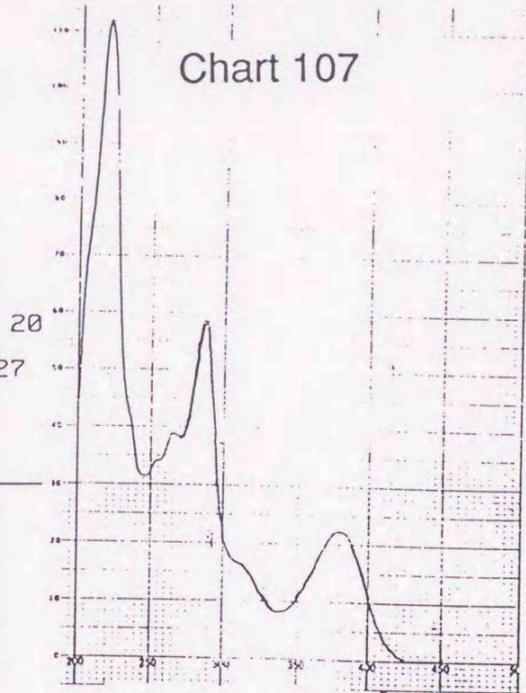
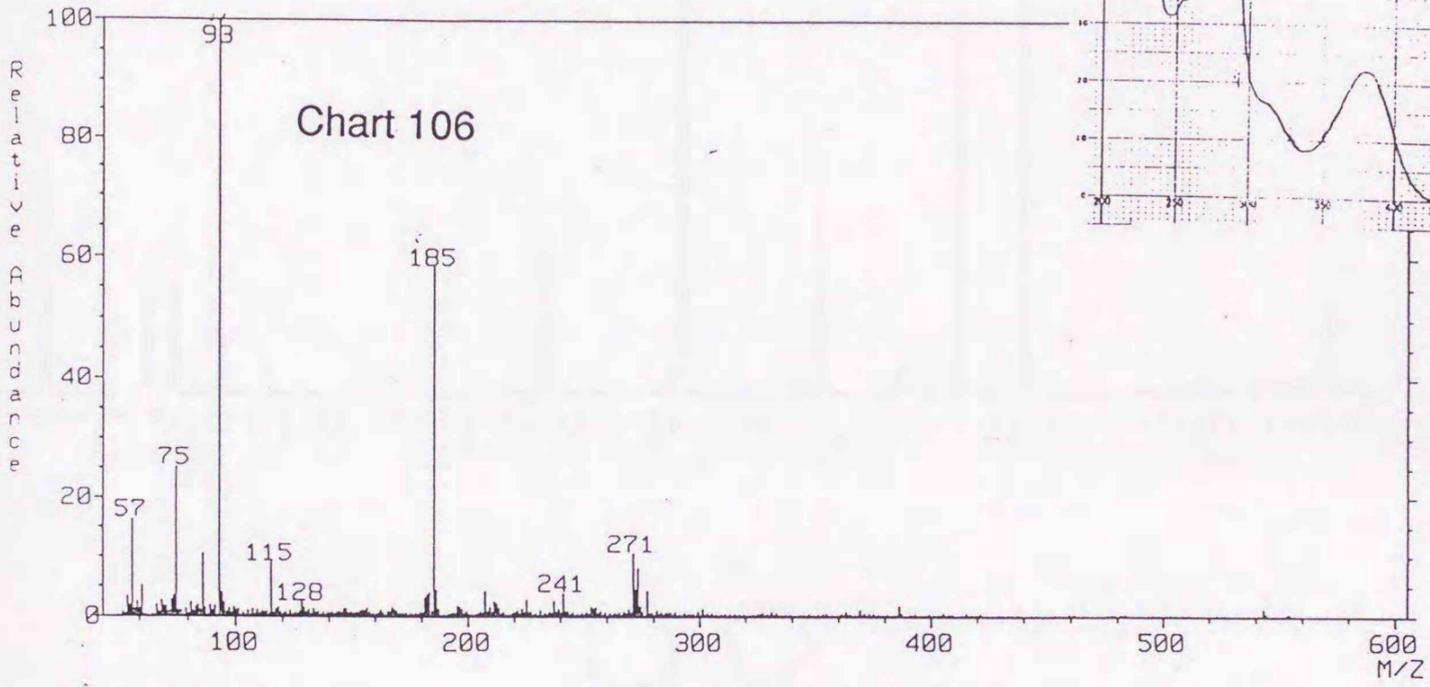


Chart 109

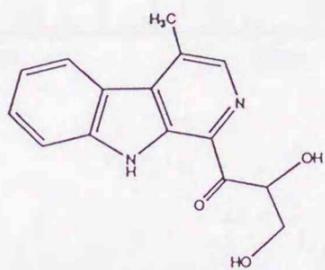
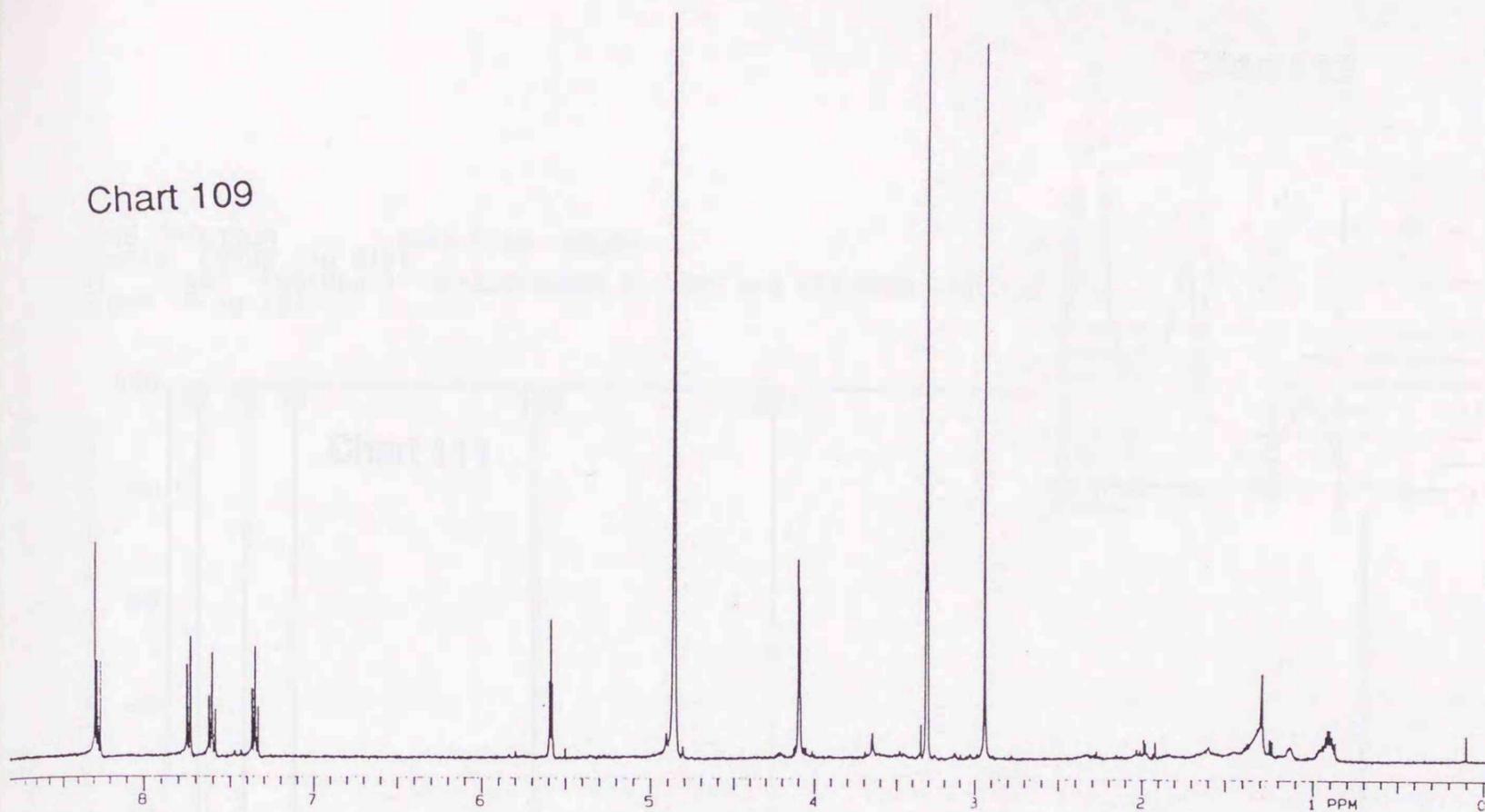
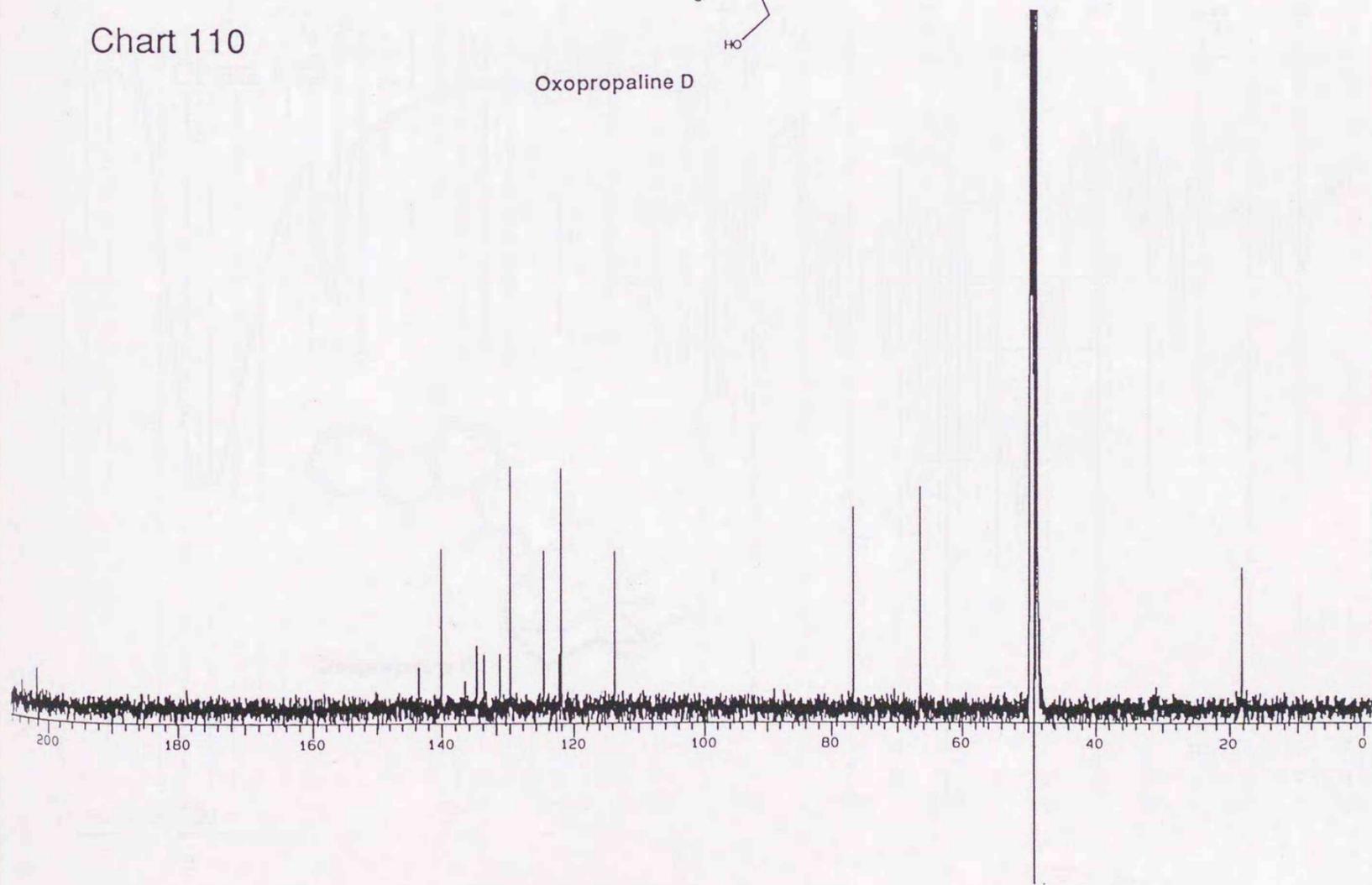


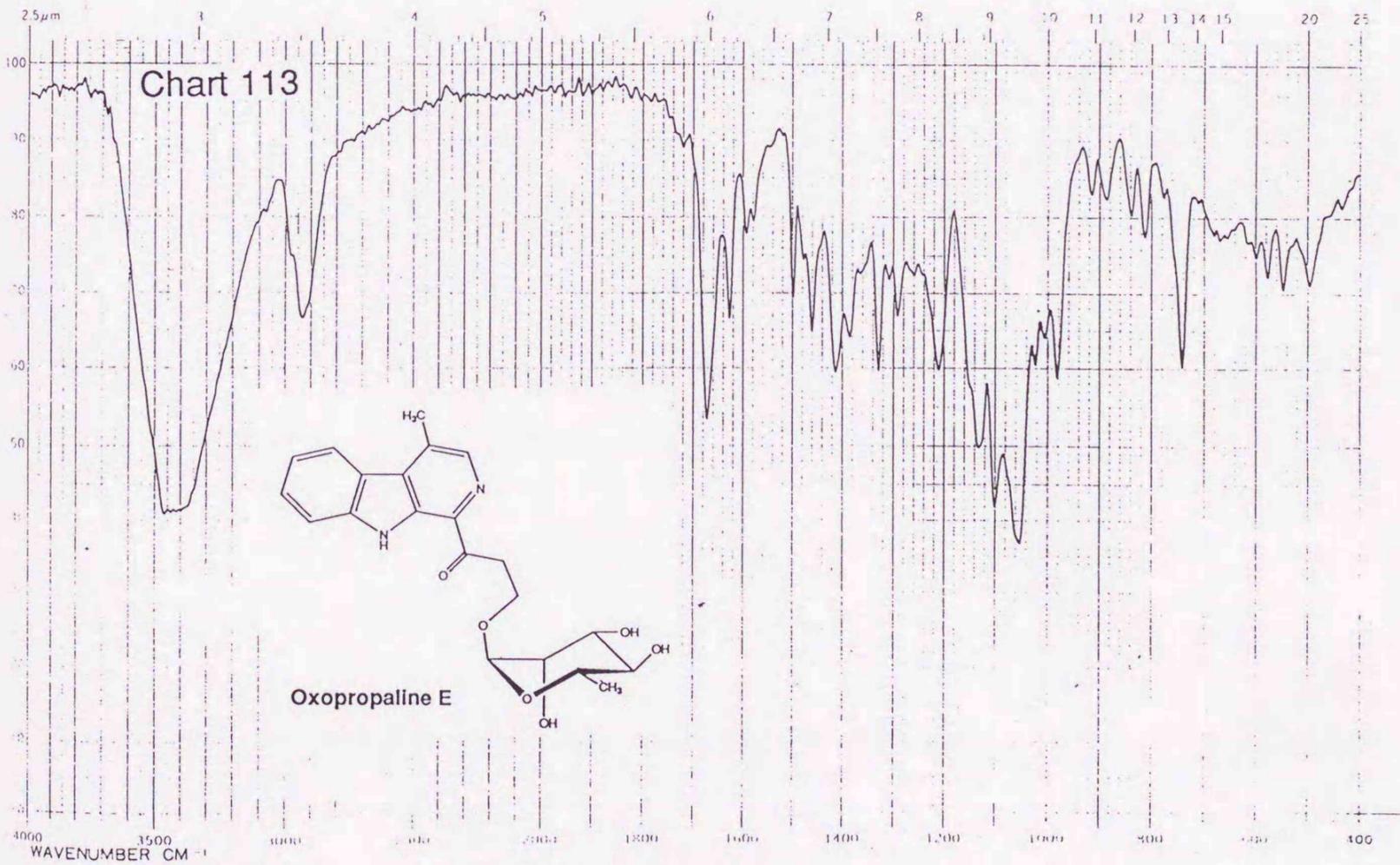
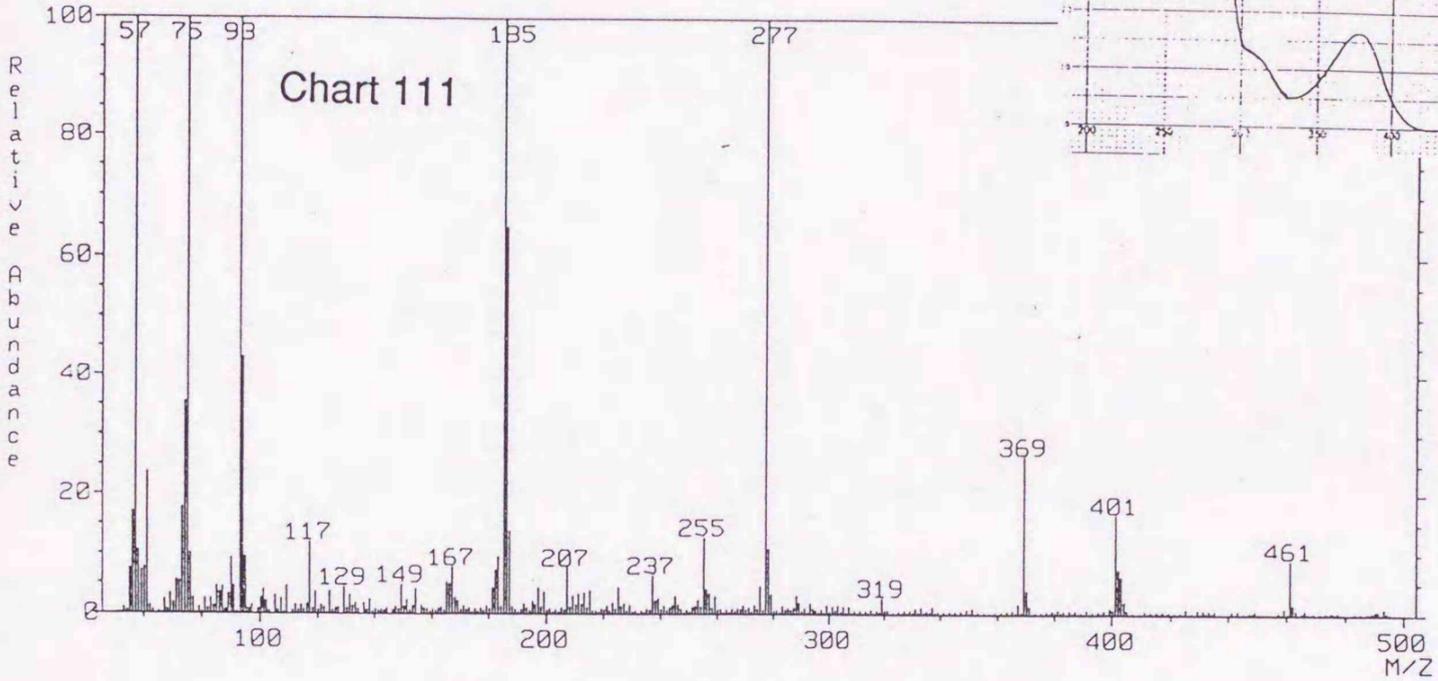
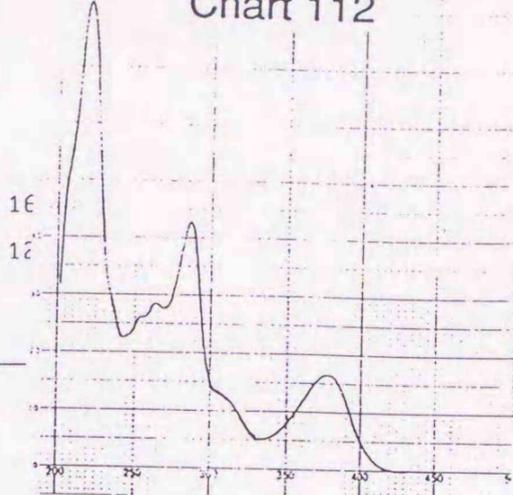
Chart 110

Oxopropaline D



MASS SPECTRUM Data File: ABE64
 Sample: G324E (in GLY)
 RT 1'10" FAB(Pos.) GC-214748300.0c BP: m/z 277.0000 Int. 12
 Scan# (6 to 10)

Chart 112



MASS SPECTRUM Data File: ABE64
 Sample: G324E (in Gly)
 RT 1'10" FAB(Pos.) GC-214748300.0c BP: m/z 277.0000 Int. 12
 Scan# (6 to 10)

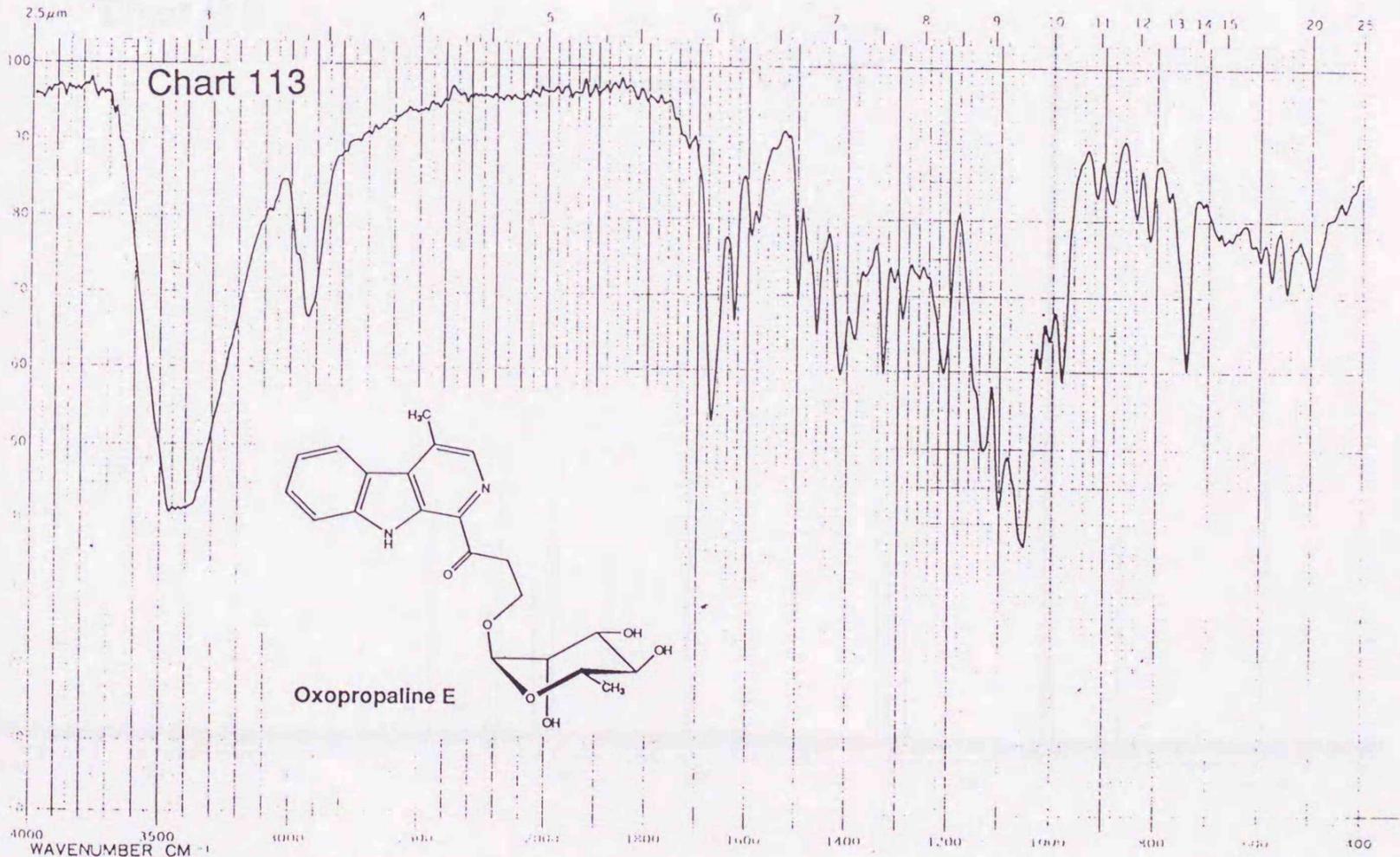
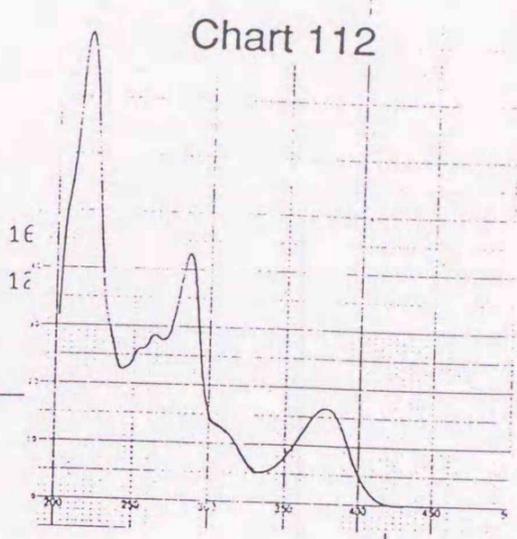
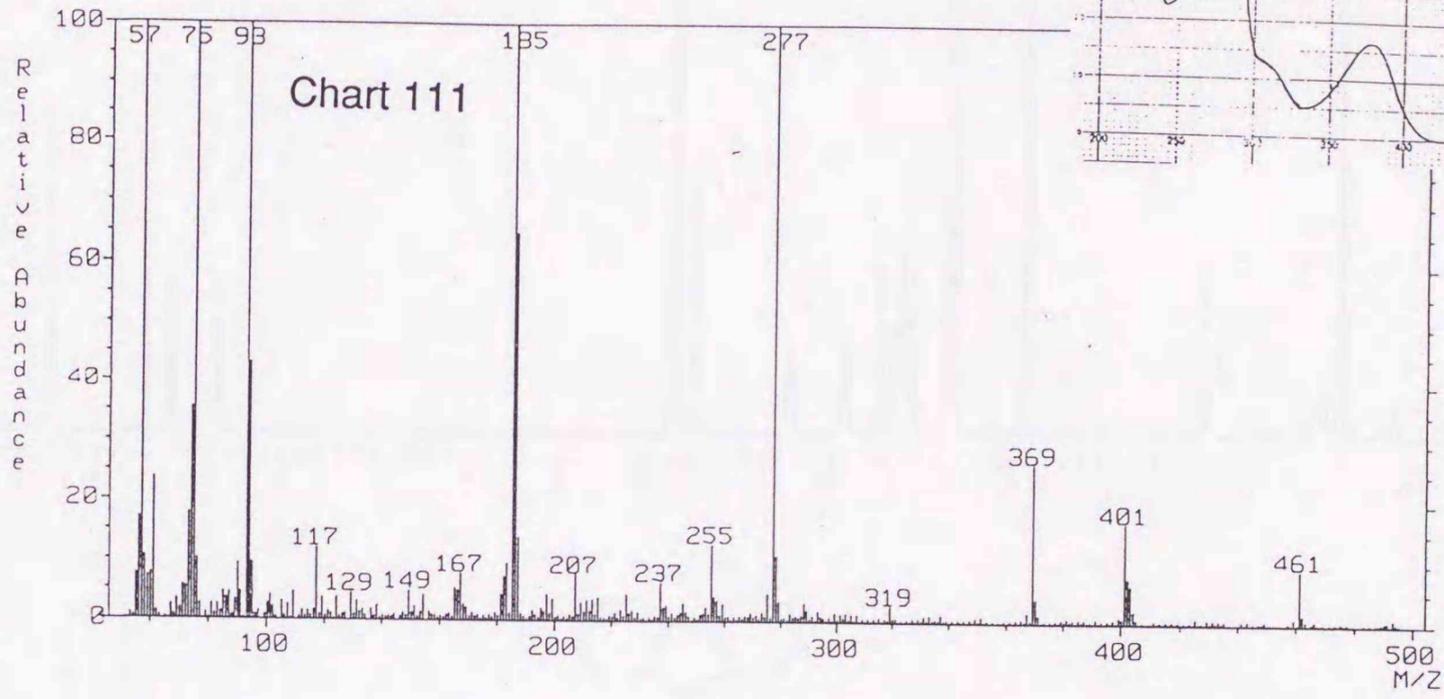


Chart 114

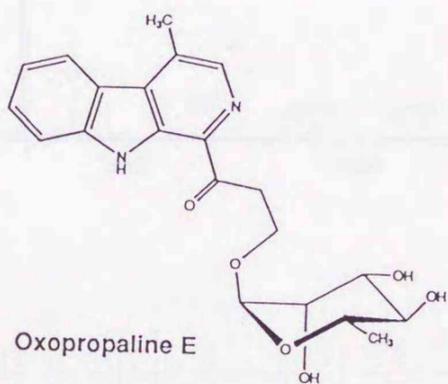
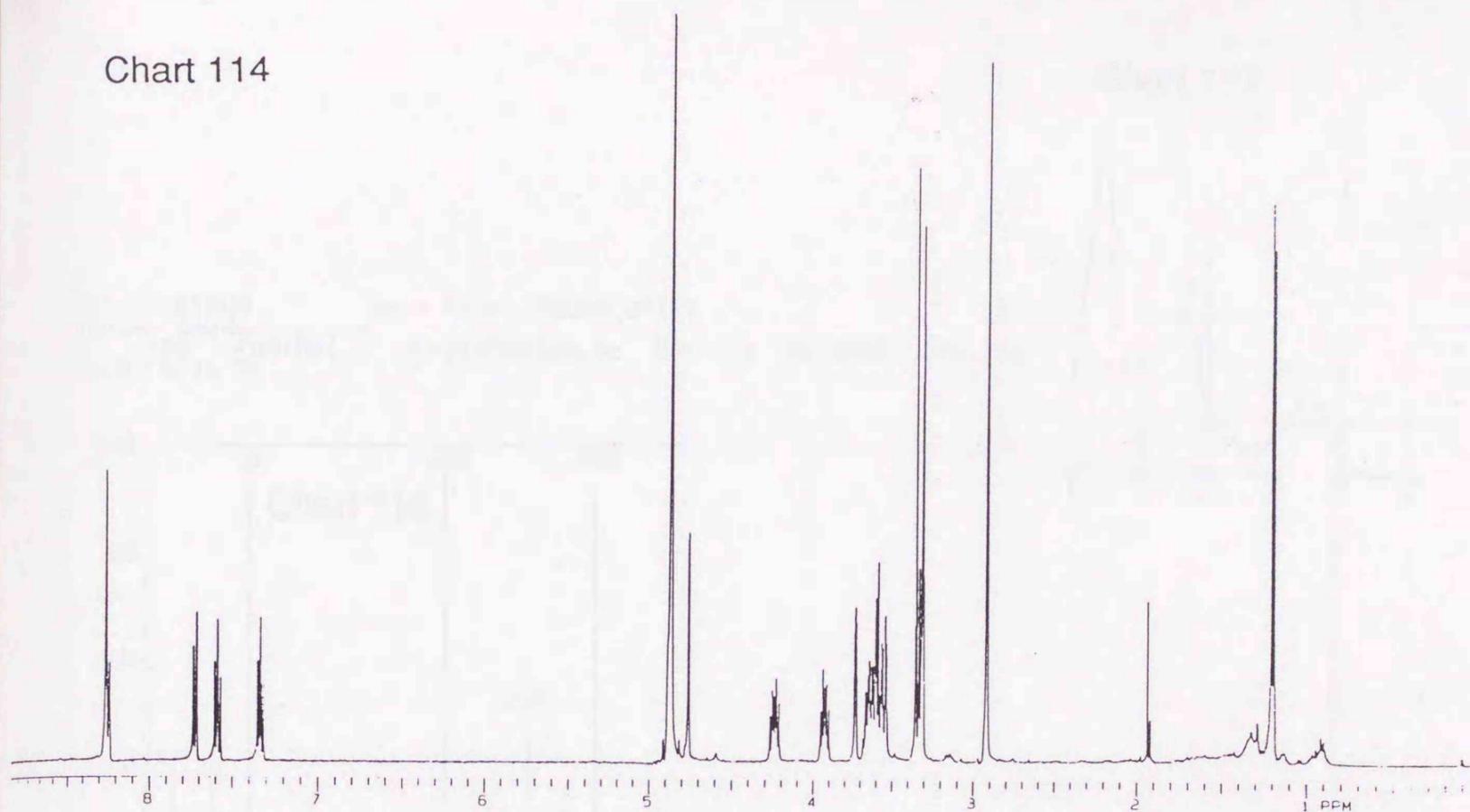


Chart 115

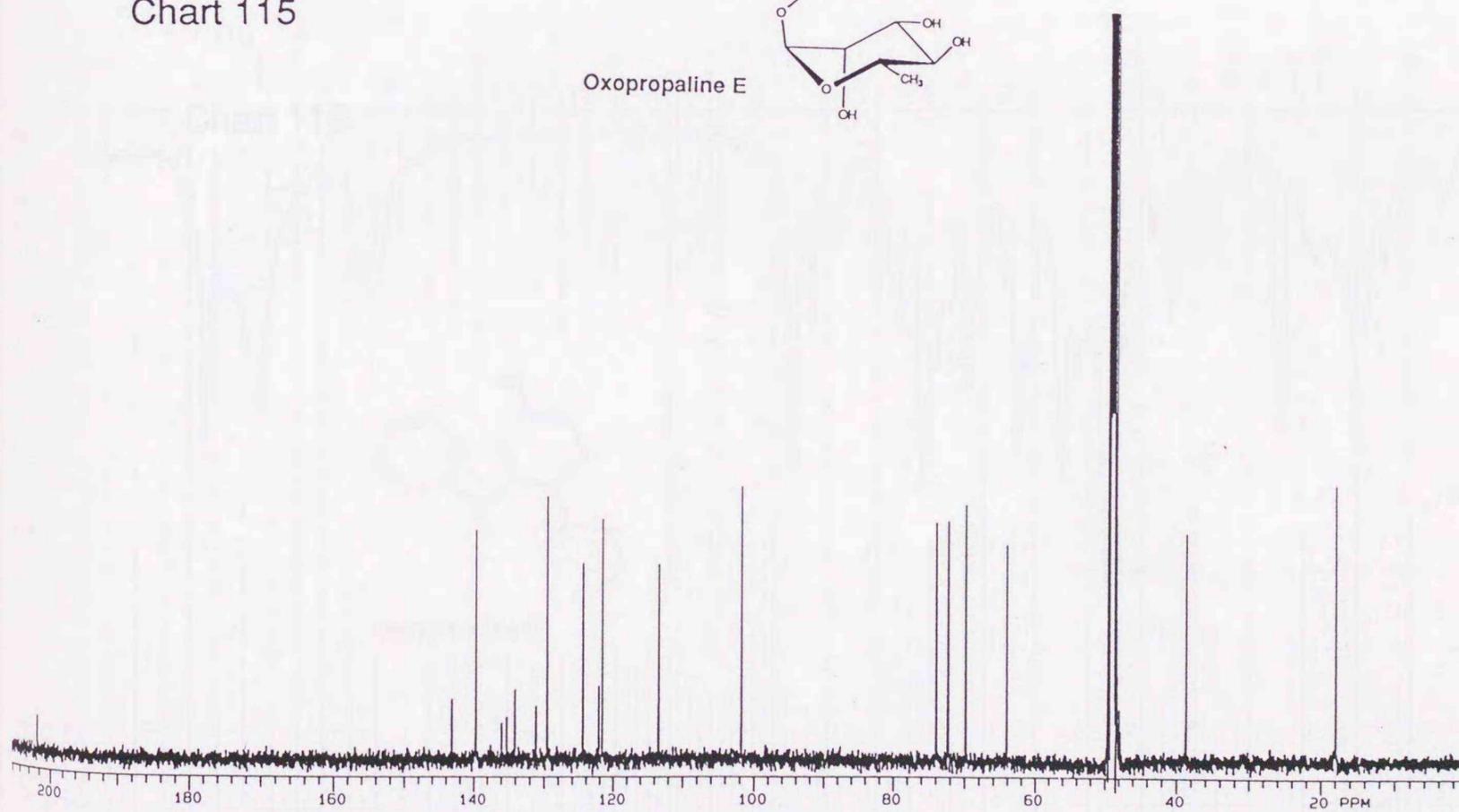


Chart 117

MASS SPECTRUM Data File: ABE69.DAT;1
Sample: G324G (in GLY)
RT 1'00" FAB(Pos.) GC-214748300.0c BP: m/z 185.0000 Int. 51.
Scan# (6 to 9)

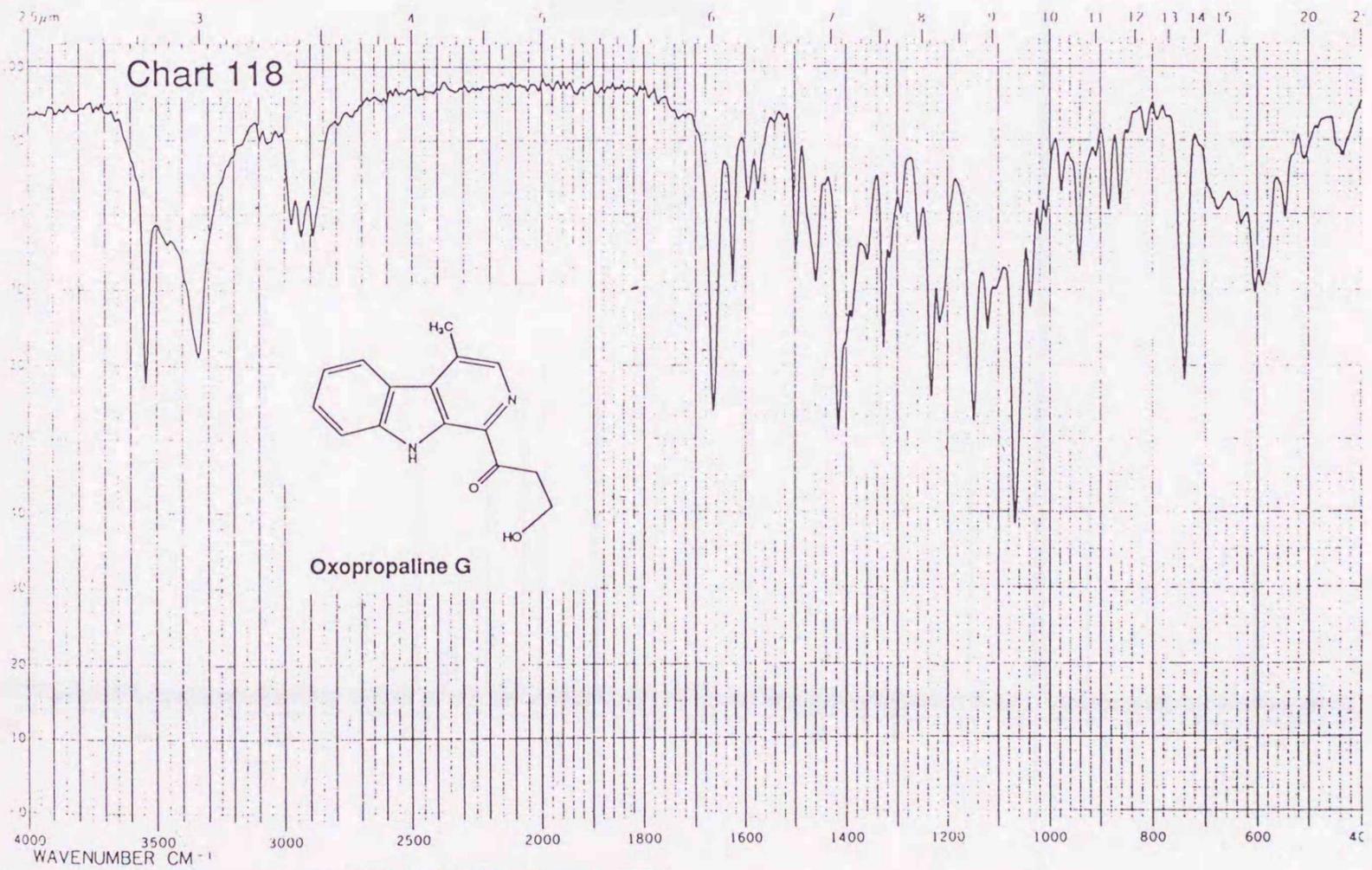
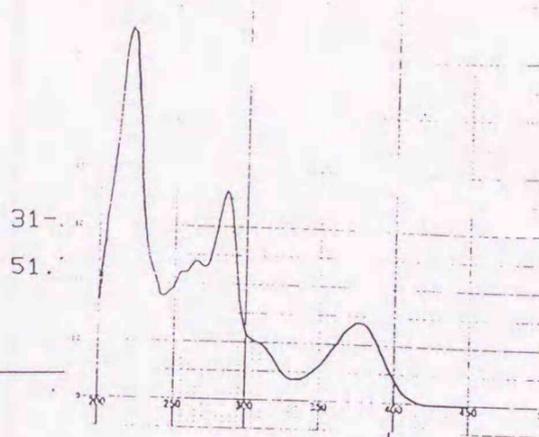
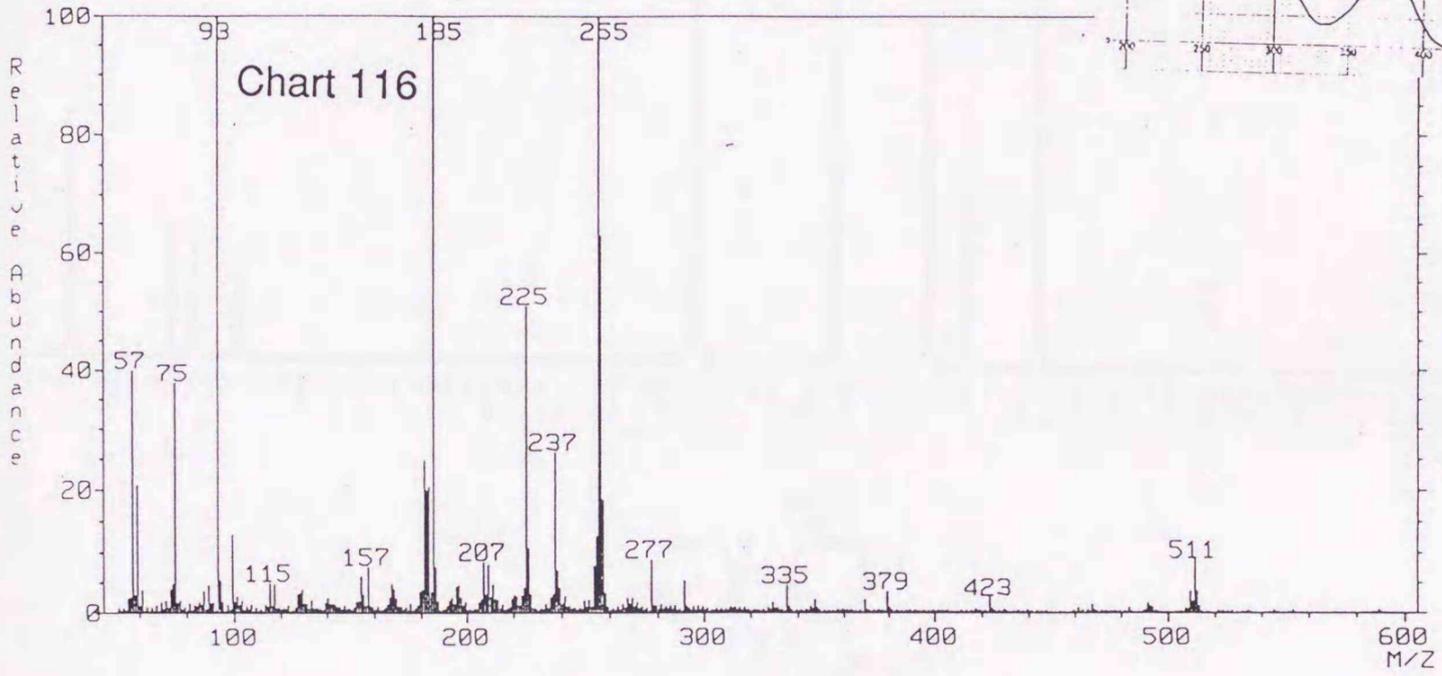
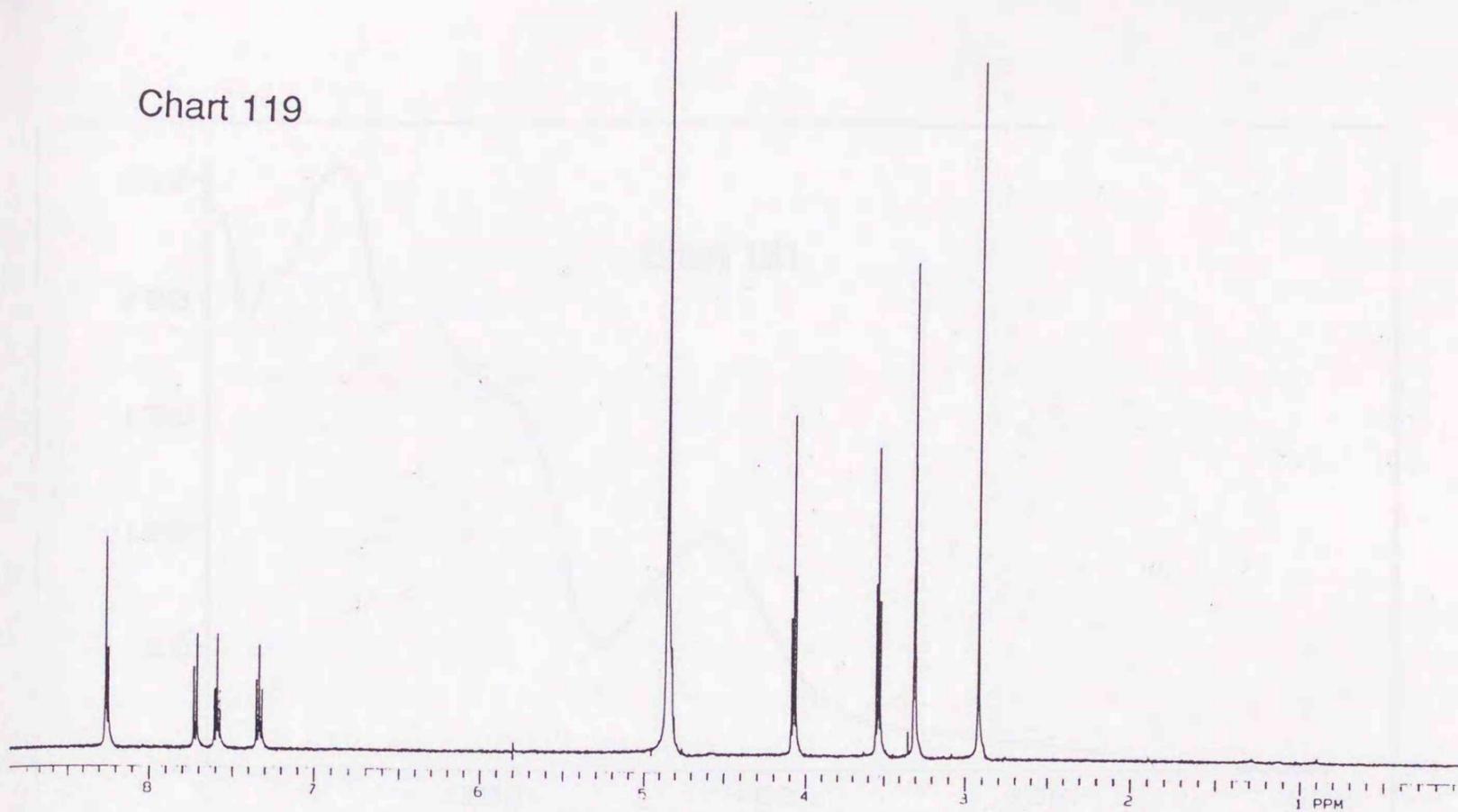
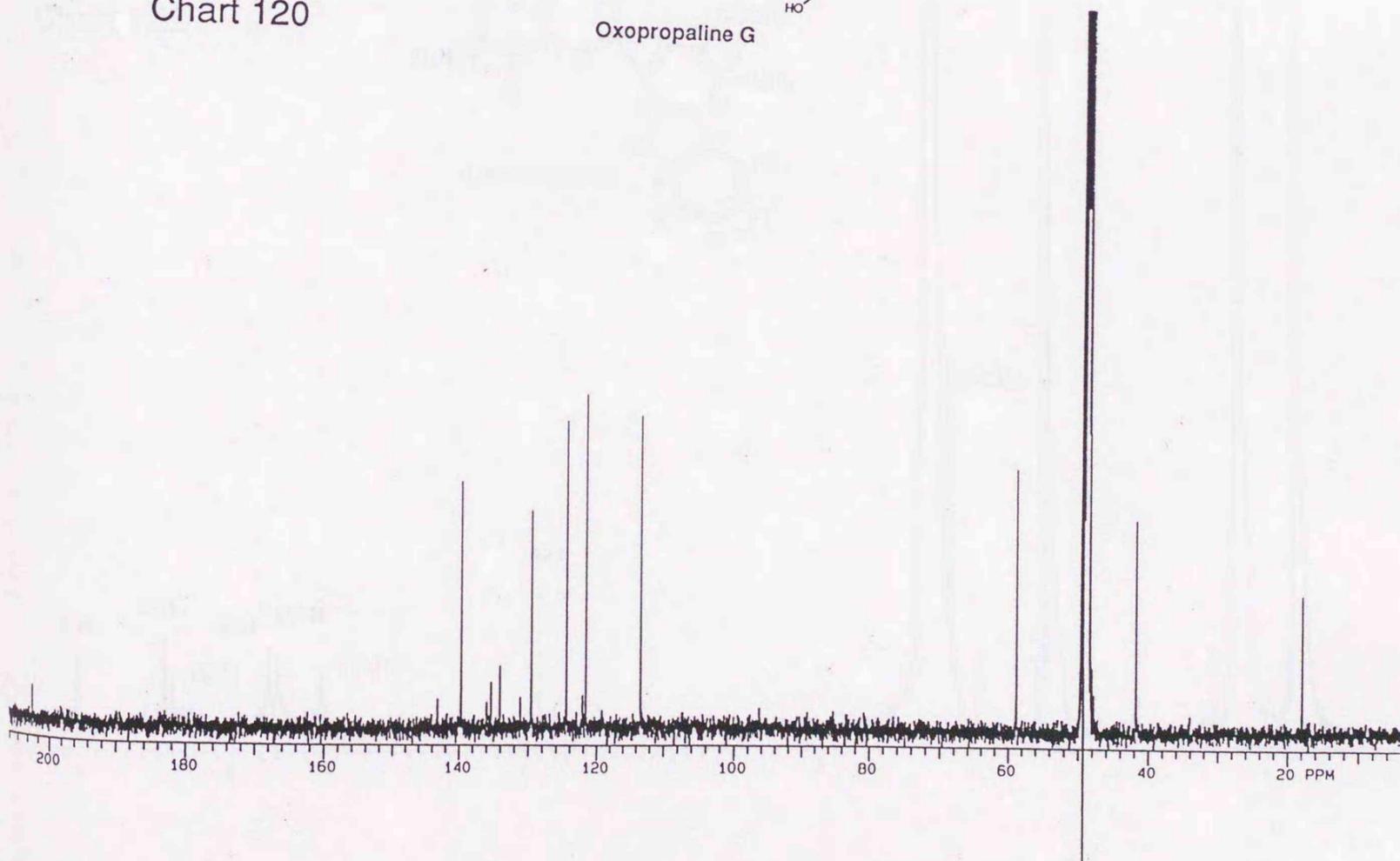


Chart 119



Oxopropaline G

Chart 120



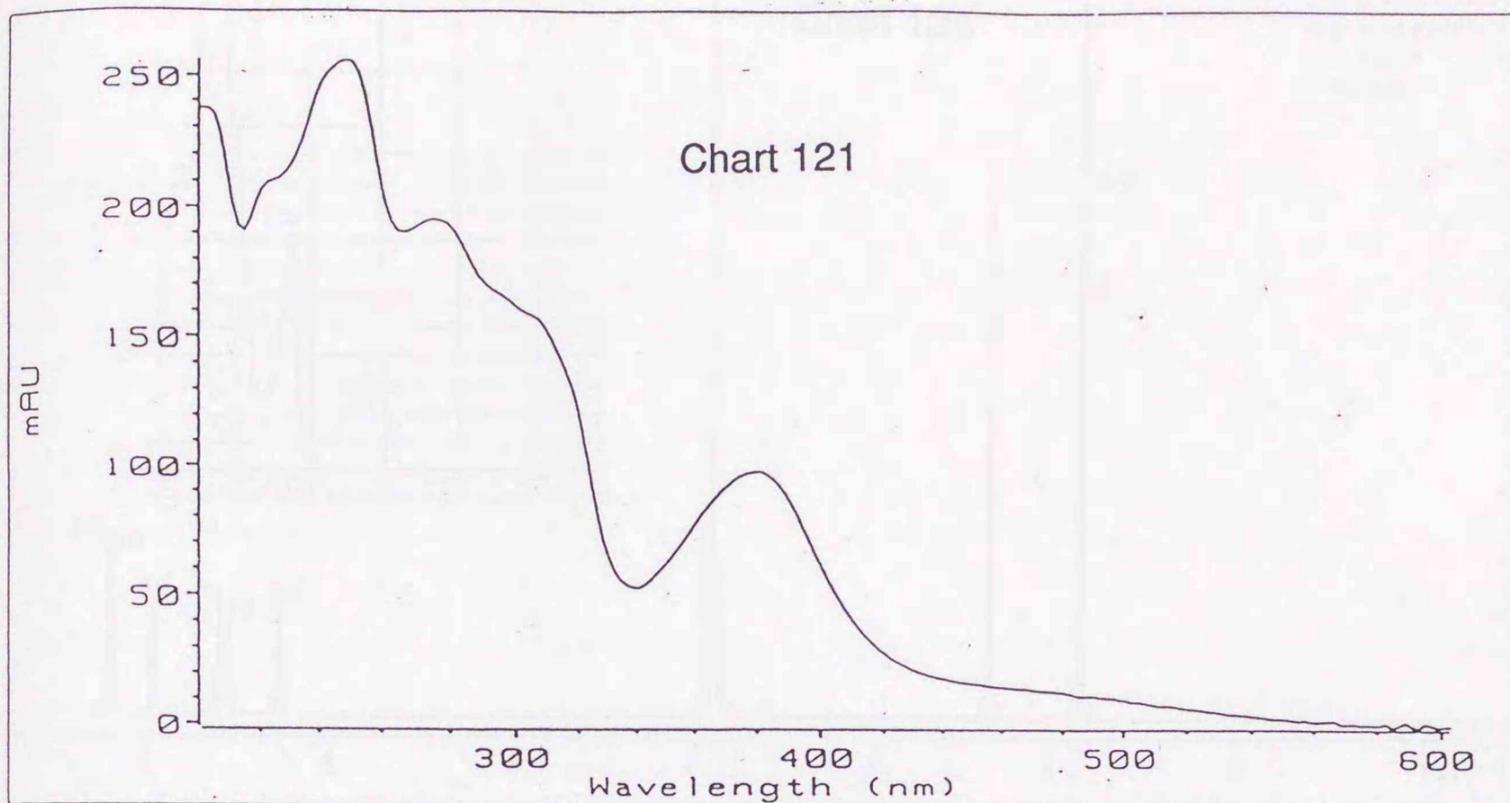
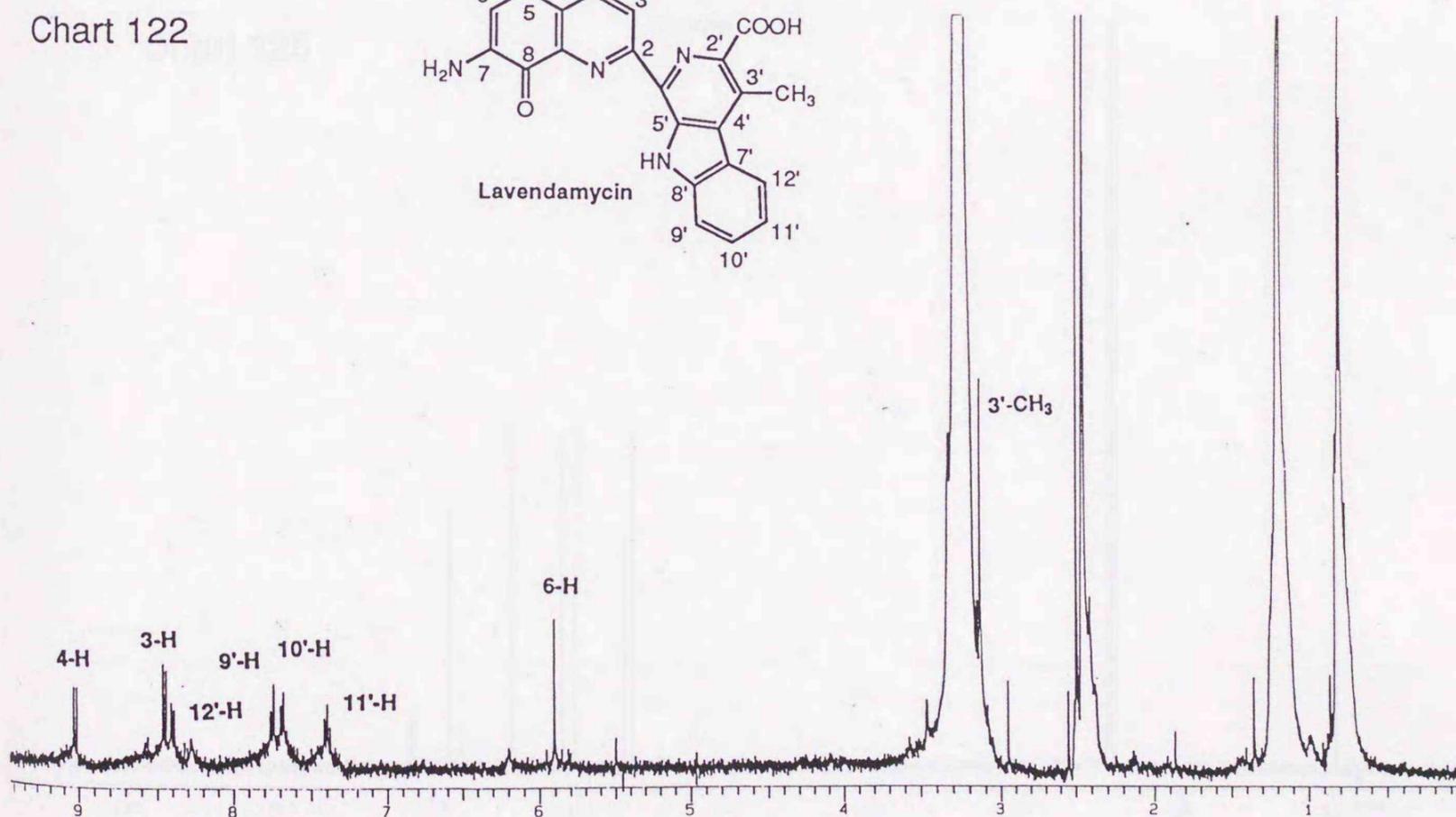
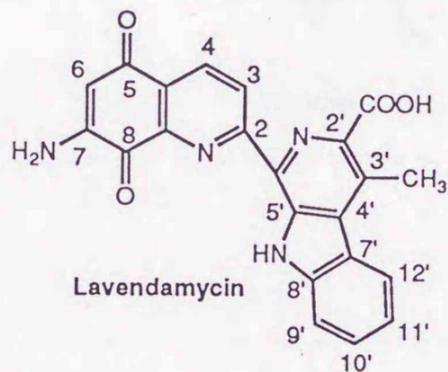


Chart 122



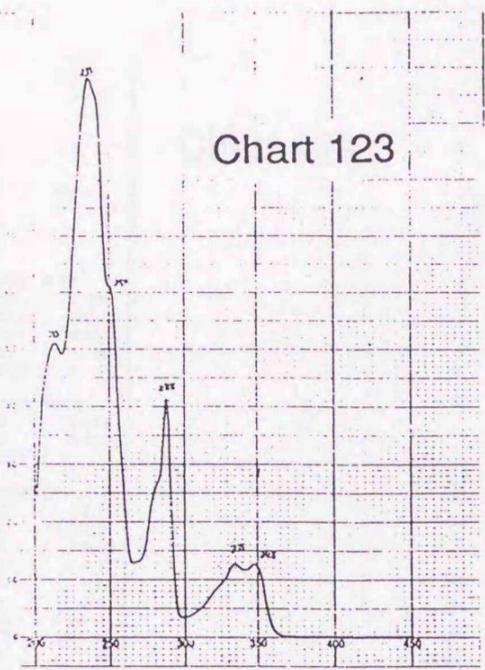
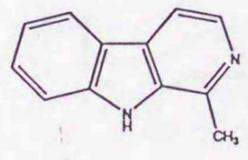
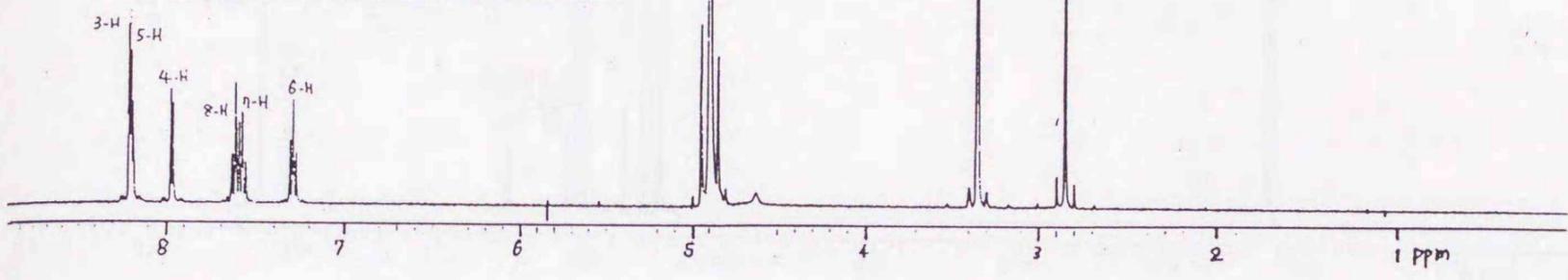


Chart 123

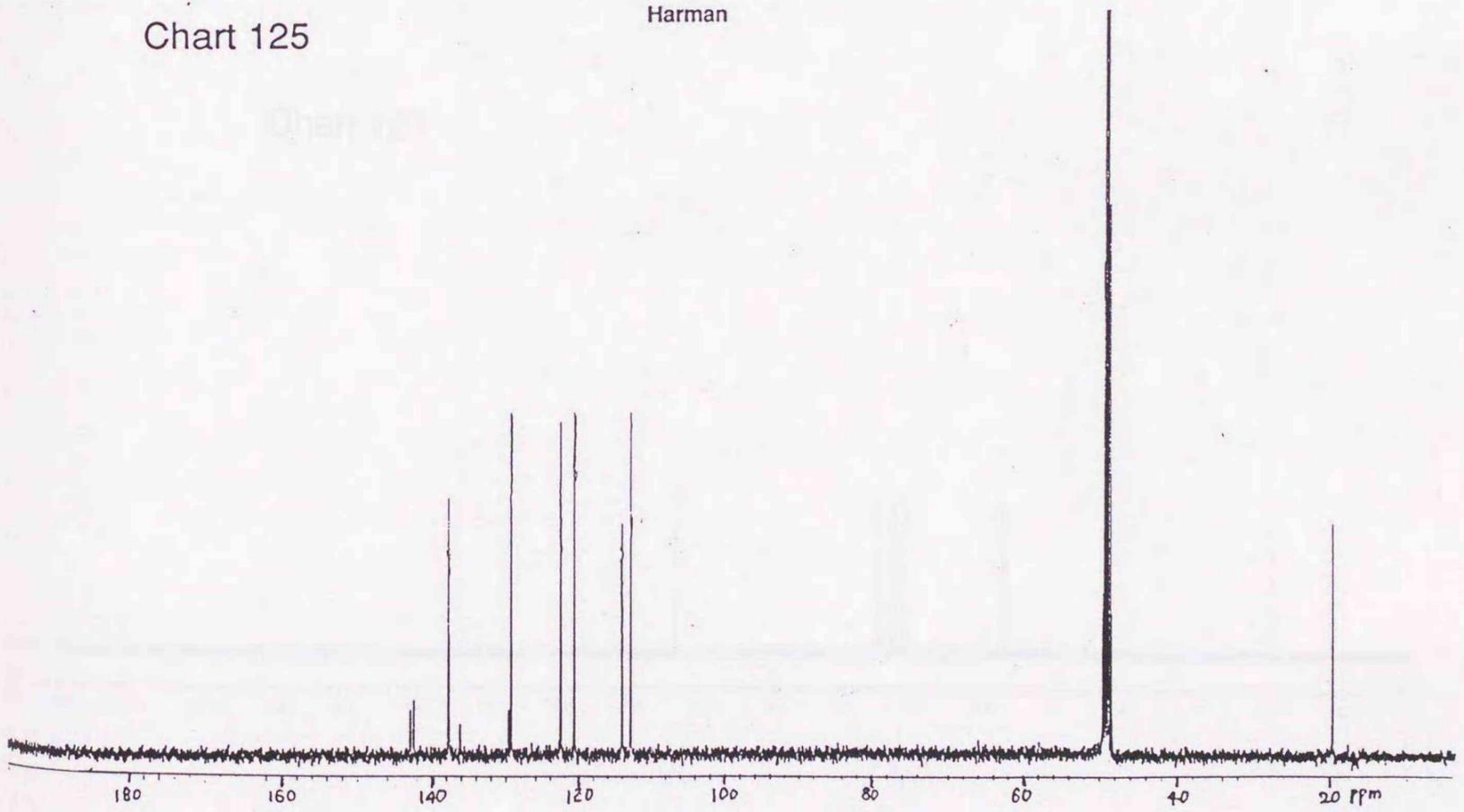
Chart 124

CD₃OD
 TMS
 3-H 8.20 d (J=5.5)
 4-H 7.97 d (J=5.5)
 5-H 8.17 d (J=5.5, 1.5)
 6-H 7.59 d (J=17.5, 5.5)
 7-H 7.55 dd (J=7.5, 5.0, 1.0)
 8-H 7.63 d (J=6.0)
 10-H₂ 2.85 s



Harman

Chart 125



0-ME L-(+) RHA IN ...
 EXP. NO. ...
 DATE ...
 SOLVENT ...
 FILE ...

Chart 126

| ACQUISITION | DEC. & VT |
|-------------|------------|
| TR 1.500 | DN 1.500 |
| SM 5000.0 | DO -365.1 |
| AT 3.002 | DM NNN |
| MP 30016 | DLP 20 |
| PH 20.3 | HOMO N |
| P1 0 | |
| D1 0.500 | PROCESSING |
| D2 0 | SE 3.183 |
| TO -114.9 | LB 0.100 |
| NT 4 | MATH F |
| CT 4 | |
| PW90 30.5 | DISPLAY |
| BS 8 | SP -2.1 |
| SS 0 | WP 2207.2 |
| IL N | VS 293 |
| IN N | SC 0 |
| DP Y | WC 400 |
| HS NN | IS 213 |
| ALOCK Y | RFL 2180.0 |
| | RF 1851.8 |
| | TH 8 |
| | INS 1.000 |
| | DC |

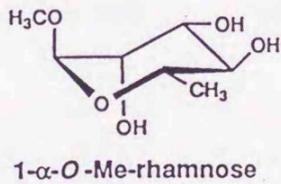
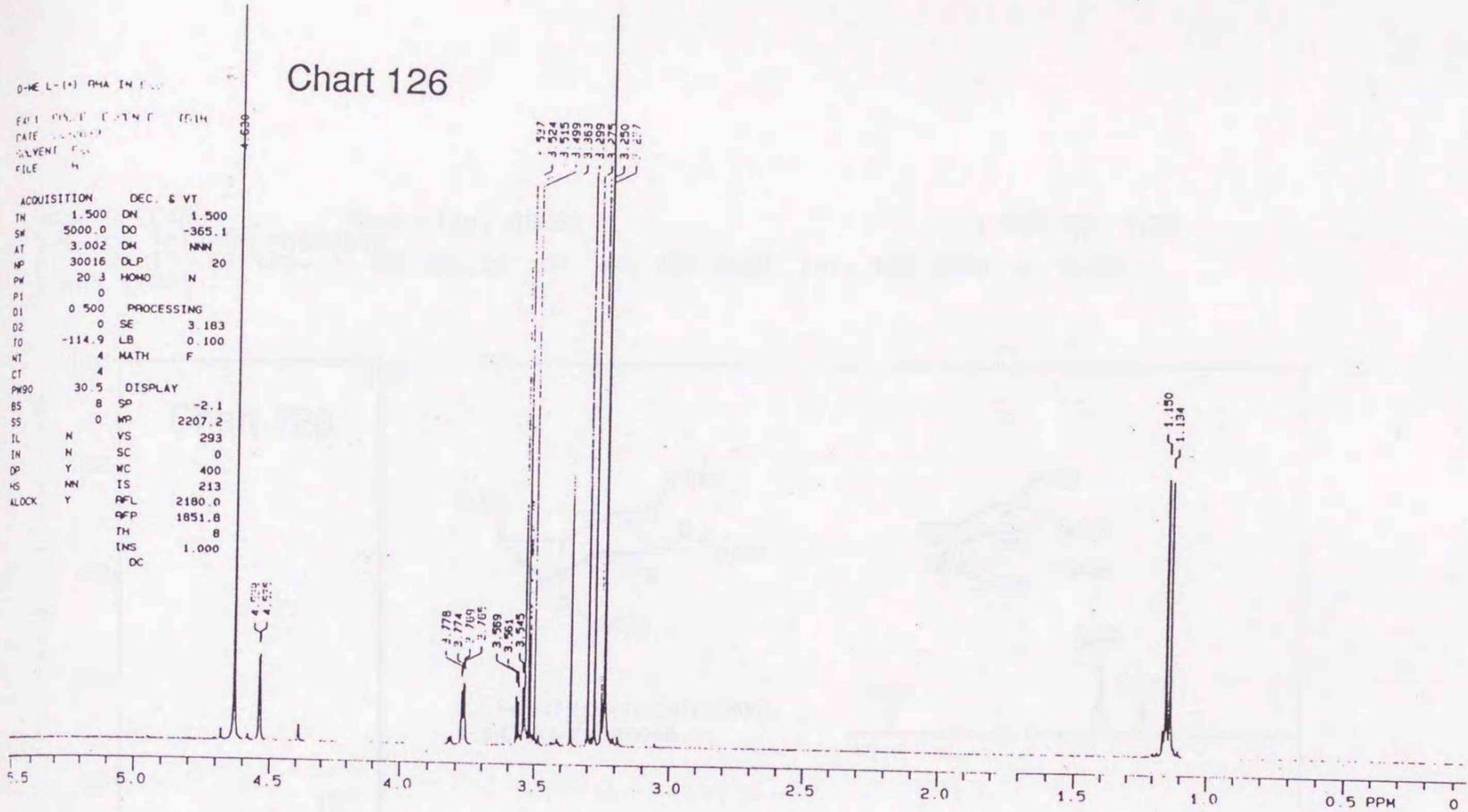
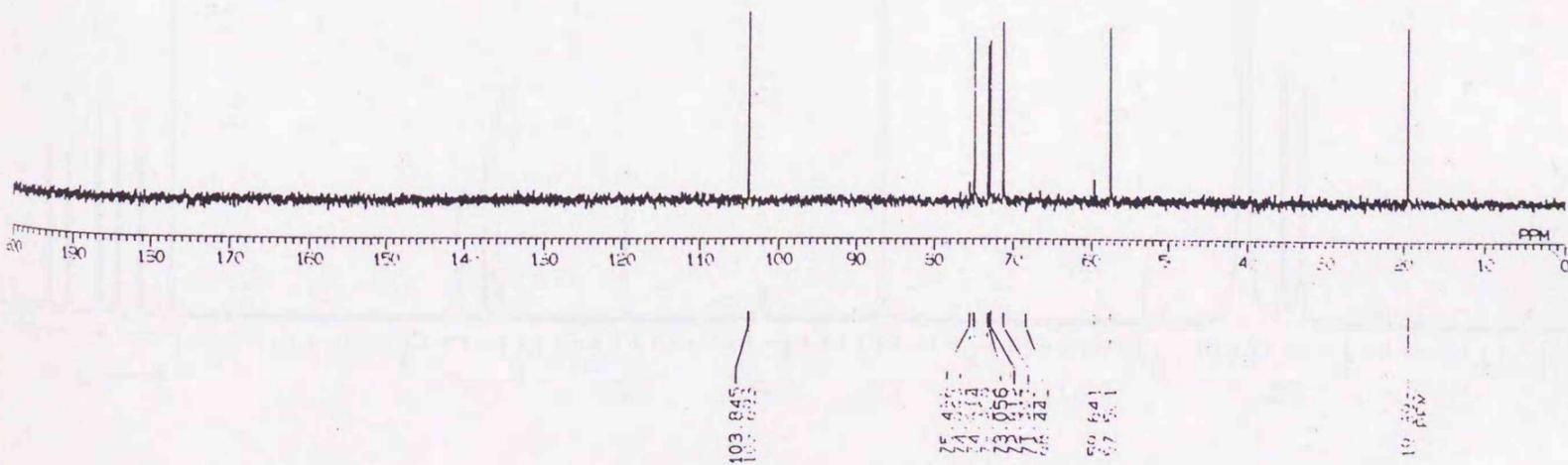


Chart 127



MASS SPECTRUM Data File: ABE85 1-MAR-93 9:34
 Sample: Tris-BB rhamnose
 RT 3'21" EI (Pos.) GC 125.1c BP: m/z 183.0000 Int. 109.3994 Lv 0.00
 Scan# (202)

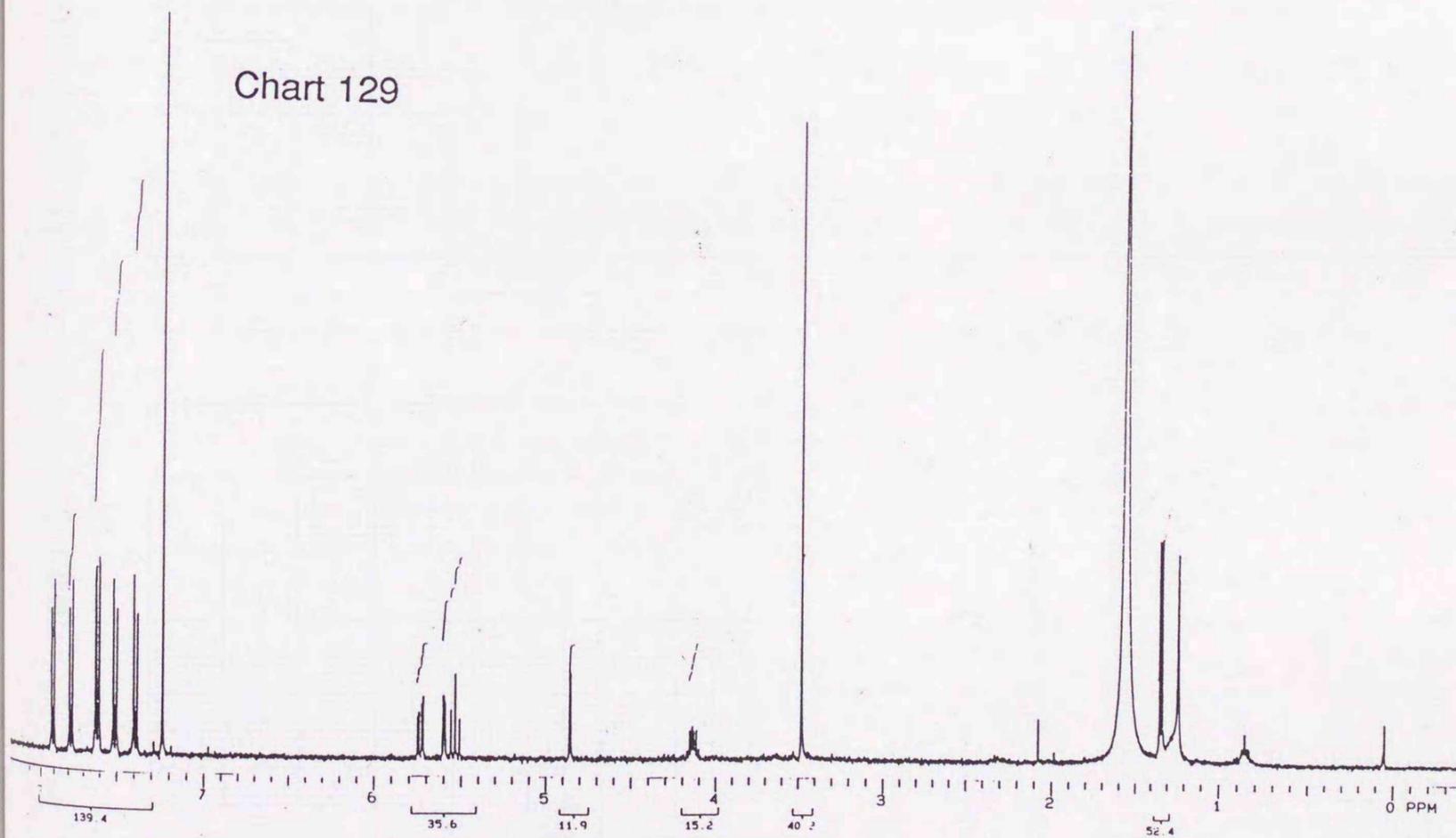
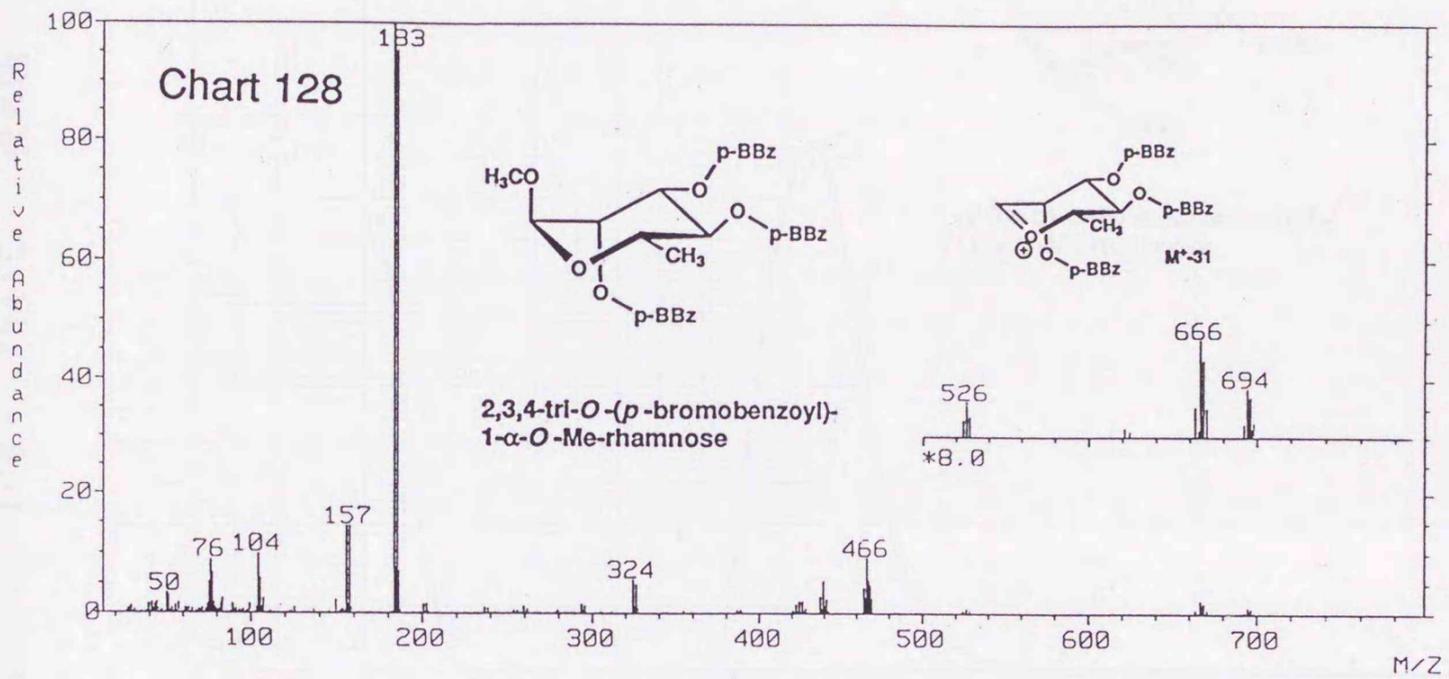
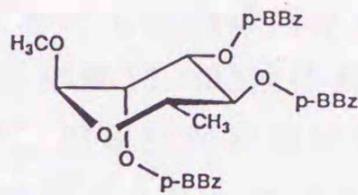
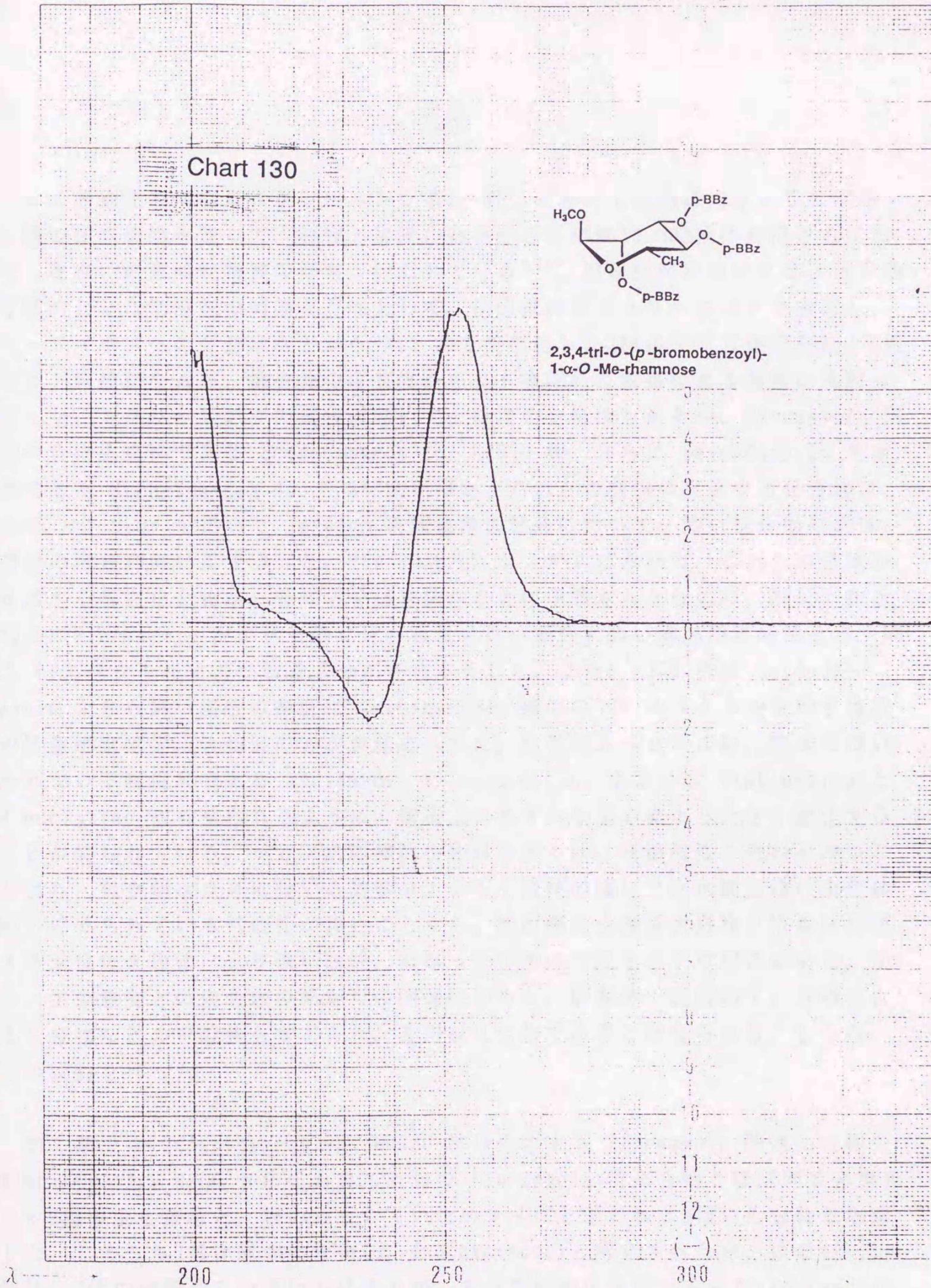


Chart 130



2,3,4-tri-O-(p-bromobenzoyl)-
1- α -O-Me-rhamnose



MODEL J-20 JAPAN SPECTROSCOPIC CO. LTD. TOKYO JAPAN

SPECTRUM NO.

SAMPLE

DATE

総括

ヒト癌細胞を用いたスクリーニング系は NCI において疾病指向系として常時 60種の腫瘍細胞を使って、植物・海洋生物を中心に年間15,000検体が供されており、現在、鋭意活性物質の探索が行われている⁵⁴⁾。当研究所においては、固形癌を標的とした制癌剤の開発を目的として、疾病指向系スクリーニングを検討し、ヌードマウスへの生着率などから NCI 法を簡素化した2種のマウス腫瘍細胞と6種のヒト癌細胞を選び、微生物の培養物からヒト癌細胞に効果のある物質の検討を行った。スクリーニングの過程において、数種の合格株を得る中、Pluramycin 関連化合物生産株である *Streptomyces* sp. HP530 株、さらに Lavendamycin 生産株である *Streptomyces* sp. G324 株を得た。これらの菌株の生産する化合物は、Meth Aや WiDr を用いた *in vivo* 抗腫瘍活性試験において、強い延命効果或は、腫瘍の増殖抑制効果を示した。HP1090 HPLC システムにおいて、これらの菌株が生産する活性化合物が、既知の骨格を持つことは予想されたものの、HP530 株は既知の Pluramycin 群の化合物に比べ極性の低い部分に強い細胞障害活性を示す同じ UVスペクトルを持つ微量成分が存在すること、また、G324 株は Lavendamycin よりも高い極性の部分に Lavendamycin 類似の UV スペクトルを示す複数の微量細胞障害活性物質の存在が認められた。抗腫瘍スペクトルは、臨床で用いられている制癌剤である Adriamycin と Daunomycin、あるいは Vinblastine と Vincristine にも見られるように、構造上のわずかな違いにより大きく変化することが知られている。一方、抗腫瘍抗生物質の多くは、抗菌活性も合わせ持つことより、微生物は自身に対する影響の上からも活性の強い二次代謝産物の生産は極力抑えられている可能性が強いことから、抗腫瘍抗生物質生産株が微量に生産する活性化合物は、より強い活性、異なった特徴の活性を示す可能性がある。また、主生産物との生合成の面からの関連性からも、前駆体、制御因子、分岐による生産物などの可能性も考えられ、有用な化合物であると考えられることから、その検討を行った。

第1部では *Streptomyces* sp. HP530 株の生産する Pluramycin 関連化合物の検討を行った。HPLC 分析において既知の Pluramycin 群化合物とほぼ同じ挙動を示す2種の主生産物と、糖の結合していないタイプと思われる3種の化合物を単離した。このうち1種は既知化合物(β -Indomycinone)と同定されたが、他の4種化合物は、2位の側鎖のみの違いではあるが、すべて新規化合物であった(Saptomycin A, C₁, C₂, F)。さらに、HPLC による分析はこれら2グループの中間の極性を示す

微量活性物質の存在を示唆した。そのうちの1種化合物を単離し、構造解析を行ったところ、Saptomycin C₁ の6' 位立体配置異性体である Saptomycin B を構造決定した。Saptomycin B と同じ程度の極性を示す化合物を比較的多量に生産する株を得るため、単孢子分離した株を培養し、HPLC により生産物の分析を行ったところ、目的の極性付近の化合物のみを主生産物とする、自然変異によると思われる変異株を分離した。この変異株を大量に培養し、親株では微量にしか生産されないと思われる化合物の単離、構造決定を試みた。各種クロマトグラフィーを繰り返し用い、4種の化合物を得た。これらの化合物の各種機器分析を用いた構造解析の結果、これら4種化合物はすべて、他に1種の化合物 (Ankinomycin) しか知られていない、モノアミノグリコシドの新規化合物であることが判明した。これらの化合物の構造を決定し、Saptomycin D、E、G、H と命名した。これらの化合物に関しては、さらに、Deacetylsaptomycin D、E を誘導し、アミノ糖部分 (*N,N*-dimethylvancosamine) の3' 位の置換基効果及び6' 位の立体配置の違いによる立体配座の変化についての構造的知見を得た。その結果、3' 位がフリーの水酸基の場合は、boat form に近い twist form をとり、Acetyl 基などによりエステル化されると chair form の立体配座をとることが明かとなった。また、6' 位の立体配置の変化した、Saptomycin B 及び H においては、3' 位の置換基の有無によらず、Deacetylsaptomycin D、E とは違うタイプの chair form をとることを示した。以上の知見をもとに、Saptomycin A~H の相対配置を決定した。

Saptomycin 類の生物活性は、抗菌活性、細胞障害活性 (*in vitro*)、抗腫瘍活性 (*in vivo*) について検討した。抗菌活性は菌によって多少のばらつきは認められるものの、全般的には Saptomycin D において最も強い活性が認められた。また、細胞障害活性試験においては、Deacetylsaptomycin D、E に強い活性を認めた。抗腫瘍活性試験は、マウス腫瘍系 Meth A を中心に、P388、LL、Colon 26、B16 並びにヒト腫瘍系 MKN45、WiDr について行った。Meth A については、Saptomycin C₁、C₂、D に有効な活性が認められたものの、他の腫瘍系に対しては顕著な活性は示さなかった。以上の結果をまとめると、Saptomycin 類はその母核にキノン部分を持つことから、この官能基において活性が発現されることが予想されるが、一方、各種生物活性試験の結果は、2位の側鎖、8位の angolosamine、10位の *N,N*-dimethylvancosamine の3カ所の構造が相互に関連しあって、それぞれの生物活性に対する特異性、有効性、選択性などに影響を与えているものと考えられる。さらに、3' 位、11位に長さの異なる Acyl 基を導入し5種の誘導体を調製し、細胞障害活性、抗腫瘍活性の改善を試みたものの有効な結果は得られなかった。Saptomycin 類において、微量生産物と考えられる Saptomycin D、E さらにそこから誘導した Deacetylsaptomycin D、E は、腫瘍細胞に対する細胞障害活性

において、従来より知られているタイプの主生産物である化合物 (Saptomycin C₁、C₂) に比べ、10~100倍もの強い活性を示すことから、本研究において一つの目的としていた、主生産物よりも非常に活性の強い微量生産物の発見に値する化合物であった。*in vivo* においては、現在まで期待した効果を得ていないが、米国癌研究所 (NCI) においてさらに検討を行っている。

第2部においては、*Streptomyces* sp. G324 株の生産する Lavendamycin 類似の UV スペクトルを示す、複数の微量細胞障害活性物質の検討を行った。本菌株の生産する物質は、スクリーニングの過程において、マウス白血病細胞 P388 と比較してヒト胃癌細胞 MKN45 に対して特異的な細胞障害活性を示した。主生産物として Lavendamycin が同定された。Lavendamycin はその構造上の特徴から、抗腫瘍抗生物質 Streptonigrin との生合成的な関連が指摘されているが、この Streptonigrin も我々のスクリーニングにおいて、P388 と比較してヒト大腸癌細胞 SW48 に対して特異的な細胞障害活性を示した。これらの実験結果より、同様な構造的特徴を持つ化合物は、広く制癌剤のスクリーニングに用いられている P388 細胞における感受性に対し、ヒト癌細胞における感受性の方が勝っている可能性があり、また、スクリーニングに用いているヒト癌細胞が、固形癌由来の細胞であることから、現在、制癌剤開発の課題となっている固形癌の治療効果も期待できると考えられた。そこで、本菌株の生産する化合物の HP1090 HPLC システムを用いた分析、並びに細胞障害活性試験の詳細な検討を行ったところ、Lavendamycin よりも極性の高い画分に、Lavendamycin、Streptonigrin の UV スペクトルと類似のスペクトルを持った、複数の微量生産物の存在が認められた。そこでこれらの化合物の精製・単離を試みた。各種クロマトグラフィーを用いて単離した5種の化合物について、各種機器分析により構造解析を行ったところ、これらの化合物は、 β -carboline を基本骨格に持ち、1位に C₃ ユニットを共通に持つ新規な化合物群であることが明かとなった。さらに、このうち3種の化合物は、1位の側鎖に L-(+)-rhamnose をグリコシル結合している構造であることが示された。すべての化合物の構造を決定し Oxopropaline A、B、D、E、G と命名した。 β -carboline を基本骨格に持つ化合物は、主に、植物より発見されており、微生物からは、過去に4種の化合物が見つかったのみである。*in vitro* での細胞障害活性試験の結果は、予想に反して、特異性のある強い活性は認められなかった。しかし、Oxopropaline 類は、構造上の特徴、並びに培養過程における存在量の変化等、Lavendamycin の生合成を考える上で、非常に重要な知見を与える化合物群であると考えられる。また、Oxopropaline 類が弱いながらも細胞障害活性を示すことから、他の β -carboline 化合物が多様な生理活性を示すこととも考え

合わせ、Oxopropaline 類も何らかの重要な生理活性をもつ可能性が強いと思われる。

以上、『抗腫瘍抗生物質生産菌株が微量に生産する生物活性化合物に関する研究』として、2種の菌株について検討を行ってきた。当初の目的であった、臨床で有効な制癌物質の発見には完全には至ってはいないものの、Saptomycin においては、一定の成果を得たと思われる。今後の展開如何によっては、更なる成果も期待できると思われる。また、Oxopropaline においては、制癌剤の開発に関しては、まったく期待とはずれの結果となったが、緒論においても述べたように、主生産物である Lavendamycin の生合成を考える上で、重要な知見を与えるものと思われる。また、他の活性が期待できる面からも今後検討を残すものであると思われる。本研究と同様、抗腫瘍抗生物質生産微生物の持つ潜在能力に着目し、種々のサテライト抗生物質を得た例として Saframycin 類がある¹⁰⁷⁾。この例でも認められるような、目的指向生合成による新規誘導体の作成にまで発展させることにより、さらに抗腫瘍活性の強い化合物の発見も可能と思われる。本研究において得られた結果は、方向性として本テーマのめざすものが、一定の成果を上げることが可能なことを示した。従って、今後さらに本研究を進めることにより、最終目的である、臨床で有効な制癌剤の開発に対し合致した化合物を提供できると思われる。

Summary

The studies of minor bioactive compounds from the strain producing antitumor antibiotics.

In the course of our investigation aimed at the discovery of novel antitumor antibiotics from microorganisms, we discovered two strains, *Streptomyces* sp. HP530 and *Streptomyces* sp. G324, producing pluramycin group compounds and lavendamycin, respectively. The compounds from these strains gave strong antitumor activities *in vivo*. Further, *Streptomyces* sp. HP530 yielded several minor compounds which had lower polarities and similar UV spectra as known pluramycin group compounds, while *Streptomyces* sp. G324 also produced minor compounds which had higher polarities and UV spectra similar to lavendamycin. Both groups of minor compounds inhibited the growth of tumor cell lines. The antitumor spectra of compounds were known to be changed due to a slight difference in the structure of the compounds, such as the examples of adriamycin and daunomycin, and that of vinblastine and vincristine. On the other hand, most of the antitumor compounds also had antimicrobial activities. This behavior suggested that the strain yielding a known antibiotic could produce more active minor compounds against tumor cell lines and the microorganism producing itself or compounds with other specific activities. In addition, the minor compounds were of interest in the relationship of the biosynthesis of the main antitumor antibiotics. Therefore, I investigated the minor bioactive compounds from the strain producing antitumor antibiotics.

In chapter 1, the investigation of saptomycins, which are novel pluramycin-group antibiotics from *Streptomyces* sp. HP530, was described. Saptomycins A, C₁, C₂, F and β -indomycinone were isolated from the mycelial cake of the strain. The structures of saptomycins C₁ and C₂, being main products, were closely related to those of pluramycin and rubiflavins, which possessed two aminosugars. Saptomycins A and F and β -indomycinone had the same chromophore without the two aminosugars. HPLC analysis of the products suggested the presence of minor antitumor compounds, which provided the polarities between the two groups of saptomycins. One compound was isolated and named saptomycin

Summary

B. Saptomycin B was the configuration isomer at the C-6' of saptomycin C₁. A further investigation resulted in an interesting observation that the producing strain frequently mutated and the natural mutant produced several new compounds showing similar polarities as that of saptomycin B, found in the HPLC analysis. Four compounds were isolated from the mycelial cake, the structures elucidated in and designated saptomycins D, E, G and H. Saptomycins D, E, G and H were determined to be mono-C-aminoglycosyl compounds, as is ankinomycin. Deacetylsaptomycin D and E at 3'-OH were derived from saptomycins D and E, respectively. The conformation of N,N-dimethylvancosamine moieties were examined using NOE experiments and ¹H-¹H coupling constants in the ¹H NMR spectra of saptomycins E and H, the configuration isomer at the C-6' of saptomycin E, and deacetylsaptomycin E. The results of the experiments showed that the conformation of the 3'-OH compounds such as deacetylsaptomycins D and E and saptomycin C₁ was a boat-like twist form and that of 3'-OAc compounds as saptomycins C₂, D, E and G was a chair form. On the other hand, the conformation of the configuration isomer at C-6' as saptomycins B and H was not altered on the structure at C-3' and showed a different type of chair form from that of saptomycin E. Thus, the relative structures of the saptomycins were determined.

The biological activities of the saptomycins and deacetyl derivatives were examined upon antimicrobial activities, *in vitro* cytotoxic activities and *in vivo* antitumor activities. Saptomycin D was the most active antimicrobial agent of all the saptomycins. Deacetylsaptomycins D and E showed strong *in vitro* cytotoxic activities against tumor cell lines. In the *in vivo* antitumor experiments, saptomycins C₁, C₂ and D gave strong activities against murine fibrosarcoma Meth A cell, while these antibiotics showed weak activities against other tumor cell lines *in vivo*. The results of these bioactive experiments suggested that saptomycins had active sites like the quinone moiety, the C-2 side chain, the C-8 angolosamine moiety and the C-10 N,N-dimethylvancosamine moiety and a combination of these active sites resulted in specificity, effectiveness and selectivity on the biological activities. Further, five acyl derivatives at 10-OH and 3'-OH were prepared and examined upon *in vitro* cytotoxic activities and *in vivo* antitumor activities. But these compounds can not give a sufficient *in vivo* effect. Suptomycins

Summary

D and E, which were minor products from the strain, and deacetylsaptomycins D and E, which were derived from saptomycins D and E, showed a 10-fold to 100-fold stronger activity against several antitumor cell lines *in vitro* than the main products, such as saptomycins C₁ and C₂. Thus, saptomycins D and E were the compounds meeting the goal of my investigation.

In chapter 2, the investigation of oxopropalines from *Streptomyces* sp. G324 was reported. This strain produced lavendamycin as the main antibiotic. It was pointed out that the antibiotic was related to streptonigrin during biosynthesis. In my studies, I found that the strain produced minor cytotoxic compounds, having the UV spectra similar to those of lavendamycin and streptonigrin. Five compounds were isolated from the broth of the strain and the structures of the compounds were elucidated by instrumental analyses. These compounds possessed the characteristic common chromophore as a conjugated β -carboline, and a C₃ unit at the C-1 position. In addition, three of their compounds had a rhamnosyl moiety at the C-1 side chain. All the compounds' relative structures were determined and named oxopropalins A, B, D, E and G. Oxopropalins gave weak activity against several tumor cell lines *in vitro*. The time course of oxopropaline fermentation and the structure of the oxopropalines suggested that oxopropalines were the significant compounds to elucidate the lavendamycin biosynthesis. On the other hand, some β -carboline compounds were known to be bioactive agents, such as pyridindolol, verruculogen and fumitremorgin A; hence the oxopropalines were expected to have potent bioactivities.

The results of the investigation supported that the direction of my research was correct to obtain new antitumor agents for clinical use, and hence it seems that further investigation will present such a useful compound.

参考文献

- 1) ファルマシアレビュー NO.6 :
「がん制圧への化学」, 日本薬学会, 1981
- 2) 清藤純夫 :
遺伝, 43, 74 (1989)
- 3) ファルマシアレビュー NO.23 :
「続がん制圧への化学」, 日本薬学会, 1987
- 4) 藤本大三郎 :
「がんの転移はくいとめられるか」, 共立出版(株), 1986
- 5) S. A. Waksman :
“Actinomycin; Nature Formation and Activities.” , Interscience Pub.,
1968
- 6) S. K. Carter & S. T. Crooke :
“Mitomycin; Current Status and New Developments.” , Academic Press,
1979
- 7) S. K. Carter, S. T. Crooke & H. Umezawa :
“Bleomycin, Current Status and New Developments.” , Academic Press,
1979
- 8) H. DiMarco, R. Silvestrini, M. Gaetani, M. Soldati, P. Orezzi, T. Dasdia,
B. M. Scarpinato & L. Valentini :
Nature, 201, 706 (1964)
- 9) F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol
& C. Spella :
Biotechnol. Bioenz., 11, 1101 (1969)
- 10) T. Oki, T. Takeuchi, S. Oka & H. Umezawa :
Recent Results Cancer Res., 76, 21 (1981)
- 11) 田中信男 :
「抗生物質研究の最先端」, 東京化学同人, 16章, 抗腫瘍抗生物質, 現代化
学, 増刊9
- 12) A. Dell, D. H. Williams, H. R. Morris, G. A. Smith, J. Feeney & G. C. K.
Roberts :
J. Am. Chem. Soc., 97, 2497 (1975)

- 1 3) W. Leimgruber, A. D. Batcho & F. Schenker :
J. Am. Chem. Soc., 87, 5793 (1965)
- 1 4) S. Kondo, M. Miyamoto, H. Naganawa, T. Takeuchi & H. Umezawa :
J. Antibiot., 30, 1143 (1977)
- 1 5) T. Arai, K. Takahashi & A. Kubo :
J. Antibiot., 30, 1015 (1977)
- 1 6) K. V. Rao, K. Bieman & R. B. Woodward :
J. Am. Chem. Soc., 85, 2532 (1963)
- 1 7) V. L. Reynold, J. P. McGovren & L. H. Hurley :
J. Antibiot., 39, 319 (1986)
- 1 8) K. G. Cunningham, S. A. Hutchinson, W. Manson & F. S. Spring :
J. Chem. Soc., 2299 (1951)
- 1 9) S. Suzuki, S. Marumo :
J. Antibiot., 13, 360 (1960)
- 2 0) H. Nakamura, G. Koyama, Y. Iitaka, M. Ohno, N. Yagisawa, S. Kondo, K. Maeda & H. Umezawa :
J. Am. Chem. Soc., 96, 4327 (1974)
- 2 1) H. Hoeksema, G. Slomp & E. E. van Tamelen :
Tetrahedron Lett., 1787 (1964)
- 2 2) N. Shimada, N. Yagisawa, H. Naganawa, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi & H. Umezawa :
J. Antibiot., 34, 1216 (1981)
- 2 3) K. Mizuno, M. Tujino, M. Takada, M. Hayashi, K. Atsumi, k. Asano & T. Matsuda :
J. Antibiot., 27, 775 (1974)
- 2 4) M. E. Bergy & R. R. Herr :
Antimicrob. Ag. Chemoth., 625 (1966)
- 2 5) S. M. Kupchan, A. R. Branfman, A. T. Sneden, A. K. Verma, R. G. Dailey, Y. Komoda & Y. Nagao :
J. Am. Chem. Soc., 97, 5294 (1975)
- 2 6) O. Jardetzky :
J. Am. Chem. Soc., 85, 1823 (1963)
- 2 7) E. C. Kornferd, R. G. Jones & T. V. Parke :
J. Am. Chem. Soc., 71, 150 (1949)

- 28) R. K. Hill, P. J. Foley & L. A. Gardella :
J. Org. Chem., 32, 2330 (1967)
- 29) Y. Tsukada, Y. Nakagawa, H. Kano, T. Sato, M. Shiro & H. Koyama :
Chem. Comm., 975 (1967)
- 30) T. H. Williams :
J. Antibiot., 28, 85 (1975)
- 31) 小西正隆 :
化学と生物, 26, 90 (1988)
- 32) 竹内富雄 :
癌と化学療法, 11, 2633 (1984)
- 33) H. Iwasawa, S. Kondo, D. Ikeda, T. Takeuchi & H. Umezawa :
J. Antibiot., 35, 1665 (1982)
- 34) T. Hamamoto, S. Gunji, H. Tuji & T. Beppu :
J. Antibiot., 36, 639 (1983)
- 35) 梅沢巖 :
癌と化学療法, 11, 2674 (1984)
- 36) Y. Hayakawa, K. Adachi & N. Komeshima :
J. Antibiot., 40, 1349 (1987)
- 37) K. Abe, M. Yoshida, H. Naoki, S. Horinouchi & T. Beppu :
J. Antibiot., 46, 735 (1993)
- 38) S. Iwasaki, H. Kobayashi, J. Furukawa, M. Namikoshi, S. Okuda, Z. Sato
I. Matsuda & T. Noda :
J. Antibiot., 37, 354 (1984)
- 39) M. Konishi, K. Sugawara, F. Kofu, Y. Nishiyama, K. Tomita, T. Miyaki &
H. Kawaguchi :
J. Antibiot., 39, 784 (1986)
- 40) I. Uchida, S. Takase, H. Kayakiri, S. Kiyoto, N. Hashimoto, T. Toda,
S. Koda & Y. Morimoto :
J. Am. Chem. Soc., 109, 4108 (1987)
- 41) K. Shimomura, O. Hirai, T. Mizota, S. Matsumoto, J. Mori, F. Shibata &
H. Kikuchi :
J. Antibiot., 40, 600 (1987)
- 42) J. A. Bush, B. H. Long, J. J. Catino, W. T. Bradner & K. Tomita :
J. Antibiot., 40, 668 (1987)

- 43) J. A. Matson :
公開特許公報, 昭61-148, 92 (1986)
- 44) アン・カミレ・ホラン, イエルシイ・コーリック, シェームス・アントリー・マトソン, マハッシュ・コルト・ハンタース・ハ
テル :
公開特許公報, 昭61-106, 592 (1986)
- 45) S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y.
Takahashi & R. Masuma :
J. Antibiot., 30, 275 (1977)
- 46) J. Golik, G. Dubay, G. Groenwold, H. Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan,
H. Ohkuma, K. Saitoh & T. W. Doyle :
J. Am. Chem. Soc., 109, 3462 (1987)
- 47) M. Konishi, H. Ohkuma, K. Matsumoto, T. Tuno, H. Kamei, T. Miyaki, T. Oki
H. Kawaguchi, G. D. VanDuyne & J. Clardy :
J. Antibiot., 42, 1449 (1989)
- 48) 新田和男 :
化学療法の領域, 3, 18 (1987)
- 49) 北条泰輔 :
ファルマシア, 25, 681 (1989)
- 50) 中野洋文 :
癌と化学療法, 18, 1550 (1991)
- 51) 長田裕之 & 磯野清
日本農芸化学会誌, 63, 56 (1989)
- 52) 梅澤一夫 :
生化学, 64, 160 (1992)
- 53) 吉田稔 & 別府輝彦
日本農芸化学会誌, 63, 60 (1989)
- 54) Michael R. Boyd :
Principles & Practices of Oncology, 3, 1 (1989)
- 55) 鈴木日出夫
癌と化学療法, 17, 335 (1990)
- 56) 塚越茂 :
癌と化学療法, 20, 425 (1993)
- 57) N. Abe, N. Enoki, Y. Nakakita, H. Uchida, R. Sato & N. Watanabe :
J. Antibiot., 44, 908 (1991)

- 58) N. Abe, N. Enoki, Y. Nakakita, H. Uchida, T. Nakamura & M. Munekata :
J. Antibiot., 46, 692 (1993)
- 59) N. Abe, Y. Nakakita, T. Nakamura, N. Enoki, H. Uchida & M. Munekata :
J. Antibiot., 46, (1993) in press
- 60) N. Abe, N. Enoki, Y. Nakakita, H. Uchida, T. Nakamura & M. Munekata :
J. Antibiot., 46, (1993) in press
- 61) N. Abe, Y. Nakakita, T. Nakamura, N. Enoki, H. Uchida, S. Takeo & M.
Munekata :
J. Antibiot., 46, (1993) in press
- 62) N. Abe, N. Enoki, Y. Nakakita, H. Uchida, T. Nakamura & M. Munekata :
J. Antibiot., 46, (1993) in press
- 63) H. Brockmann :
Angew. Chem., 80, 493 (1968)
- 64) J. Itoh, T. Tsuyuki, K. Fujita & M. Sezaki :
J. Antibiot., 39, 780 (1986)
- 65) M. Matumoto, K. Nagaoka, T. Asaoka, K. Yokoi & T. Nakazima :
Jpn. Kokai 139394(86), June 26, 1986
- 66) M. Matumoto, K. Nagaoka, S. Ishizeki, K. Yokoi & T. Nakazima :
Jpn. Kokai 189280(86), Aug. 22, 1986
- 67) H. Nadig & U. Séquin :
Helv. Chim. Acta, 70, 1217 (1989)
- 68) M. Hanada, K. Kaneta, Y. Hoshino, M. Konishi & T. Oki :
J. Antibiot., 44, 824 (1991)
- 69) M. Narita, K. Asaoka, K. Yano, K. Kukita, K. Yokoi & T. Nakazima :
Jpn. Kokai 274693(86), Dec. 4, 1986
- 70) H. Nadig, U. Séquin, R. H. Bunge, T. R. Hurley, D. B. Murphey &
J. C. French :
Helv. Chim. Acta, 68, 953 (1985)
- 71) M. Furukawa, I. Hayakawa, G. Ohta & Y. Iitaka :
Tetrahedron, 31, 2989 (1975)
- 72) U. Séquin & M. Furukawa :
Tetrahedron, 34, 3623 (1978)

- 7 3) Y. Sato, H. Watabe, T. Nakazawa, T. Shomura, H. Yamamoto, M. Sezaki & S. Kondo :
J. Antibiot. , 42 , 149 (1989)
- 7 4) K. Byrne, S. K. Gonda & B. D. Hilton :
J. Antibiot. , 38 , 1040 (1985)
- 7 5) G. M. Brill, J. B. Mcalpine, D. N. Whittern & A. M. Buko :
J. Antibiot. , 43 , 229 (1990)
- 7 6) M. Furukawa, A. Itai & Y. Iitaka :
Tetrahedron Lett. , 1973 , 1065 (1973)
- 7 7) M. Zehnder, U. Séquin & H. Nadig :
Helv. Chim. Acta , 62 , 2525 (1979)
- 7 8) A. Fredenhagen & U. Séquin :
Helv. Chim. Acta , 68 , 391 (1985)
- 7 9) U. Séquin :
Tetrahedron , 34 , 761 (1978)
- 8 0) H. Nadig & U. Séquin :
Helv. Chim. Acta , 63 , 2446 (1980)
- 8 1) J. W. Paschal, J. L. Occolowitz, S. H. Larsen, L. D. Boeck & F. P. Mertz :
J. Antibiot. , 42 , 623 (1989)
- 8 2) T. Yasuzawa, Y. Saitoh & H. Sano :
J. Antibiot. , 43 , 485 (1990)
- 8 3) Y. Uosaki, T. Yasuzawa, M. Hara, Y. Saitoh & H. Sano :
J. Antibiot. , 44 , 40 (1991)
- 8 4) A. Fredenhagen & U. Séquin :
J. Antibiot. , 38 , 236 (1985)
- 8 5) Y. Sato, T. Nakazawa, H. Yamamoto, M. Sezaki & S. Inoue :
Jpn. Kokai 223581(90), Sep. 5, 1990
- 8 6) E. B. Shirling & D. Gottlieb :
J. Syst. Bacteriol. , 16 , 313 (1966)
- 8 7) B. Becker, M. P. Lechevalier, R. E. Gordon & H. A. Lechevalier :
Appl. Microbiol. , 12 , 421 (1964)
- 8 8) T. Yamaguchi :
J. Bacteriol. , 89 , 444 (1965)

- 89) T.G. Pridham & D. Gottlieb :
J. Bacteriol., 56, 107 (1948)
- 90) D.M. Balitz, J.A. Bush, W.T. Bradner, T.W. Doyle, F.A. O'Herron &
D.E. Nettleton :
J. Antibiot., 35, 259 (1982)
- 91) T. Aoyagi, M. Kumagai, T. Hazato, M. Hamada, T. Takeuchi & H. Umezawa :
J. Antibiot., 28, 555 (1975)
- 92) A. I. Scott :
"Interpretation of the ultra-violet spectra of natural products
(International series of monographs of organic chemistry, Vol.7)"
pp.176-177, 297-303, Pergamon Press, 1964
- 93) K. Stuart & R. Woo-Ming :
Heterocycles, 3, 223 (1975)
- 94) W.T. Wiesler, N. Verova, M. Ojika, H.V. Mayers, M. Chang, P. Zhou,
L-C. Lo, M. Niwa, R. Takeda & K. Nakanishi :
Helv. Chim. Acta, 73, 509 (1990)
- 95) R.B. Woodward, W.J. Brehm & A.L. Nelson :
J. Am. Chem. Soc., 69, 2250 (1947)
- 96) N. Neuss, E. Boaz & J.W. Forbes :
J. Am. Chem. Soc., 76, 2463 (1954)
- 97) E.E. Tamelen, M. Shamma & P. Aldrich :
J. Am. Chem. Soc., 78, 4628 (1956)
- 98) M.F. Bartlett, R. Sklar, W.I. Taylor, E. Schlittler, R.L.s. Amai,
P. Beak, N.V. Bringi & E. Wenkert :
J. Am. Chem. Soc., 84, 622 (1962)
- 99) J. Mokry, I. Kompis & P. Sefcovic :
Tetrahedron Lett., 1962, 433
- 100) M. Kumagai, H. Naganawa, T. Aoyagi, H. Umezawa, H. Nakamura & Y.
Iitaka :
J. Antibiot., 28, 876 (1975)
- 101) J. Fayos, D. Lokensgard, J. Clardy, R.J. Cole & J.W. Kirksey :
J. Am. Chem. Soc., 96, 6785 (1974)
- 102) M. Yamazaki, H. Fujimoto & T. Kawasaki :
Chem. Pharm. Bull., 28, 245 (1980)

103) J. A. Dale, H. S. Mosher :

J. Am. Chem. Soc., 95, 512 (1973)

104) A. J. Herlt, R. W. Rickards & J.-P. Wu.

J. Antibiot., 33, 516 (1985)

105) 中川 彰 :

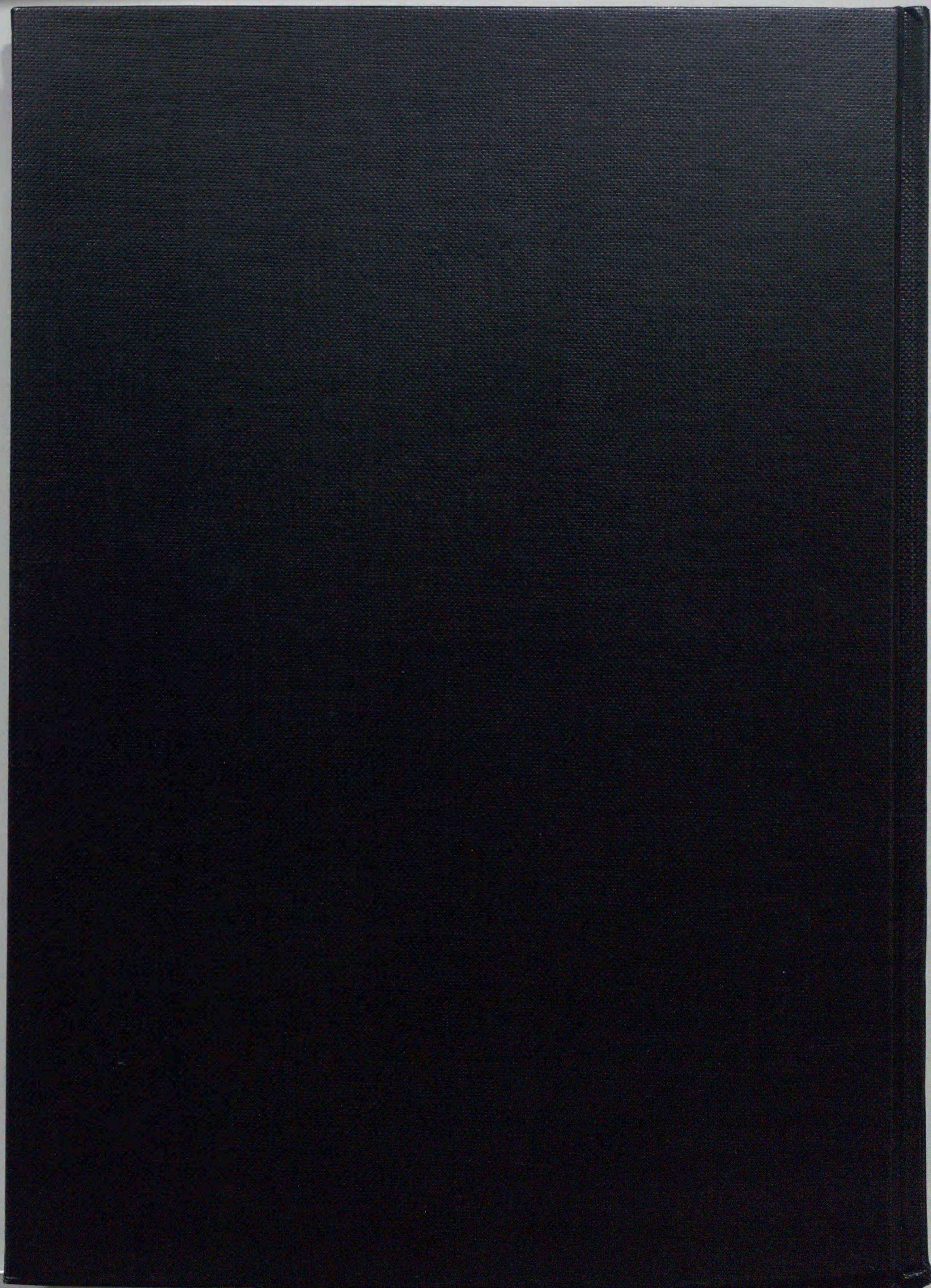
「抗生物質研究の最先端」, 東京化学同人, 9章, 抗腫瘍抗生物質, 現代化学, 増刊9

106) E. Breitmaier & W. Voelter :

“¹³C NMR spectroscopy. Methods and applications in organic chemistry.” p251, Verlag Chemie Weinheim, 1978

107) 新井 正 :

癌と化学療法, 11, 2617 (1984)



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

