
分子認識能を有する低分子天然有機化合物

柿 澤 寛

1. はじめに

分子認識は生物体における極めて基本的な機能であり、酵素の特異性、遺伝情報の伝達と発現、その他の生体内外の情報伝達、細胞間の相互認識などにかかわっている。低分子物質がこれらの過程に関与するときには専ら基質あるいは伝達物質として作用し生物体に存在する蛋白質とか核酸などの高分子物質のもつ認識能力に依存している。構成要素が一定に配列したこれらの高分子は精密な高次構造を形成して基質分子に対する正確な認識と選択的な応答をしている。高分子体が有するこの分子認識の概念をもとにして生物有機化学などでは、金属陽イオン認識のためのポリエーテルとか各種の陰イオンのためのポリアミドなどが化学合成されている。

海洋棲のスポンジとか微生物の代謝産物から新規生物活性物質を探索する過程で著者は抗ビールス物質プチロマイカリン (Ptilomycalin) 類および抗カビ物質カルトロミシン (Quartromicin) 類を単離・構造決定した。これらの物質は蛋白質とか核酸に比べるとはるかに低分子量の物質であるが、前者は多環性のグアニジン化合物であり特定のカルボン酸イオンに対して選択的に結合する機能を持っており、また後者は4個のケトテロン酸が一つの環内に連結している特異な構造であり各種の金属イオンと結合することが出来るが特にカルシウムイオンに高い選択性を有していることが明らかになった。この報告はこれらの物質の構造と機能について研究した結果の概要である。(1), (2)

2. プチロマイカリン (Ptilomycalins)

プチロマイカリン類は抗ビールス性物質として紅海産のスポンジから単離された。ビス (トリフルオロアセチル) 誘導体の高分解能FAB質量スペクトルはプチロマイカリンの分子式が $C_{45}H_{70}N_6O_5$ であることを示していた。プロトン(1H -)および炭素-13核磁気共鳴 (^{13}C -NMR) スペクトルからこの分子にはスベルミジン基と長鎖のアルキル基 (δ 1.25) が存在することが推測された。これらの原子団を含む分子の右半分の構造はメタノールとの反応により ω -ヒドロキシパルミチルスベルミジンが生成することから明らかになった。分子の残りの左半分のメチル-1番からメチル-20番の間の炭化水素骨格はHOHAHAおよびその他のNMRスペクトルの解析により解明された。このような炭化水素の他にこの物質には重水の重水素と交換しうる水素原子の存在が検出されたが、この

活性水素はグアニジン基の一部であることが分かった。さらにIRスペクトルにエステルグループが現れていることからこのグアニジン部分とスペルミジン基とはエステル結合により連結しているこ

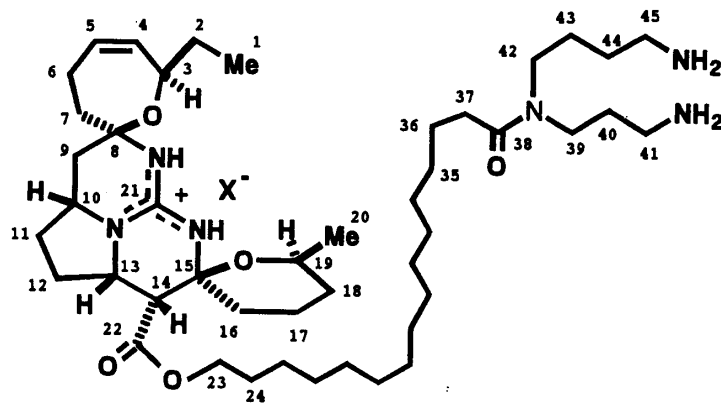


図1 プチロマイカリン-Aの構造

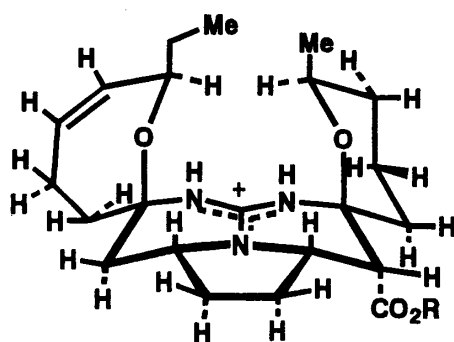


図2 プチロマイカリン-Aの多環部分の構造

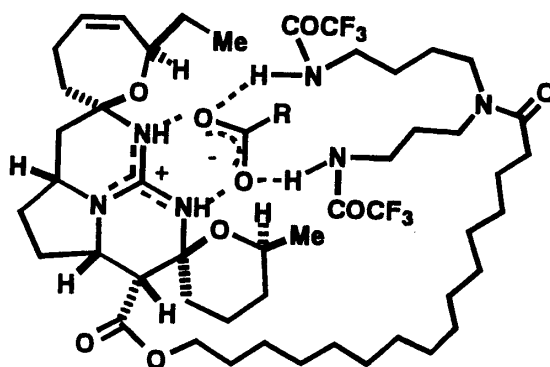


図3 トリフルオロアセチルプチロマイカリンにカルボキシレートがキレートした全構造

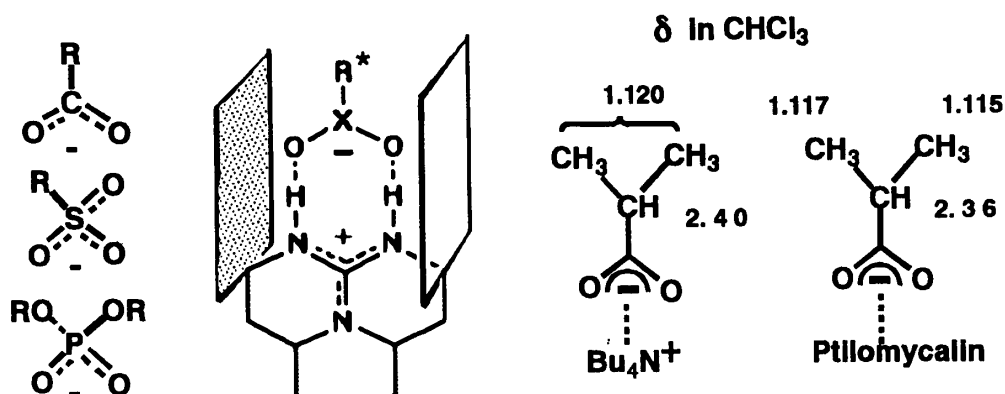


図4 プチロマイカリンのグアニジンを含むキラルな環境にトラップされたカルボキシレート、アルキルスルホネート、およびアルキルフォスフェート。イソ酪酸のプロキラルのメチルは核磁気共鳴スペクトル上で不等価に観測される。ブチルアンモニウム塩では等価に現れる。

とが分かった。このようにしてプチロマイカリンの総ての原子の配列順序が解明され、さらにNOESYおよびROESYによる観測から全体の立体配座も決定された。

プチロマイカリンにはグアニジニウムカチオンおよびスペルミジンのような極性原子団が存在するにもかかわらず、この物質は非極性物質のような挙動を示す。このことから、トリフルオロアセチルプチロマイカリンは分子が図2のような立体的な形になり、対応するイオン種がグアニジニウムと対をなし、全体が非極性の炭化水素基によってとり囲まれていることが考えられる。このようにしてプチロマイカリンは小型の分子であるにもかかわらず分子認識に適した構造を持っていることが予測された。すなわちi) 分子の凹部に存在するグアニジニウムは2組の強い水素結合(N-H \cdots O)によってカルボキシル基と特異的な対をなす、ii) このグアニジニウムをとり囲んでいる脂質グループは外部の分子と疎水的に親和することが出来る、iii) 凹部は不斉環境にあるのでキラル分子を識別する機能を有している等の可能性が考えられる。このような機能をもつカゴ型凹部に陰イオン有機物が閉じ込められるかどうかをNMRスペクトルの測定によって検討した。⁽³⁾

トリフルオロアセチルプチロマイカリン(2)のクロロフォルム溶液を2-メチルプロピオン酸ナトリウム水溶液と振盪したところ、クロロフォルム相のNMRスペクトルはちょうど1モルのメチルプロピオン酸イオンが有機相に移動して2と結合体を形成していることを示していた。種々の濃度(0.3–0.6mM)でメチルプロピオン酸イオンのメチルについて測定しても、このシグナルの化学シフトは0.01ppm以上変化しなかった。このようにメチルの化学シフトが濃度変化に対して不変であることは結合体の強さを反映している。さらに注目すべきことに、この結合体でメチルプロピオン酸イオンの2個のメチルはNMRスペクトル上に異なって現れてきた。これはプチロマイカリンが2個のプロキラルのメチルを識別することが可能なためであり、予想どおりかご状の不斉な環境を提供していることを示している。キニジンのような光学活性の天然アルカロイドもメチルプロピオン酸イオンに対して同様の作用を示すが、プチロマイカリンに比べて濃度の高い環境のみで現れその作用は低濃度で消失してしまう。このことは洞穴型の受容部をもつプチロマイカリンの卓越性を示

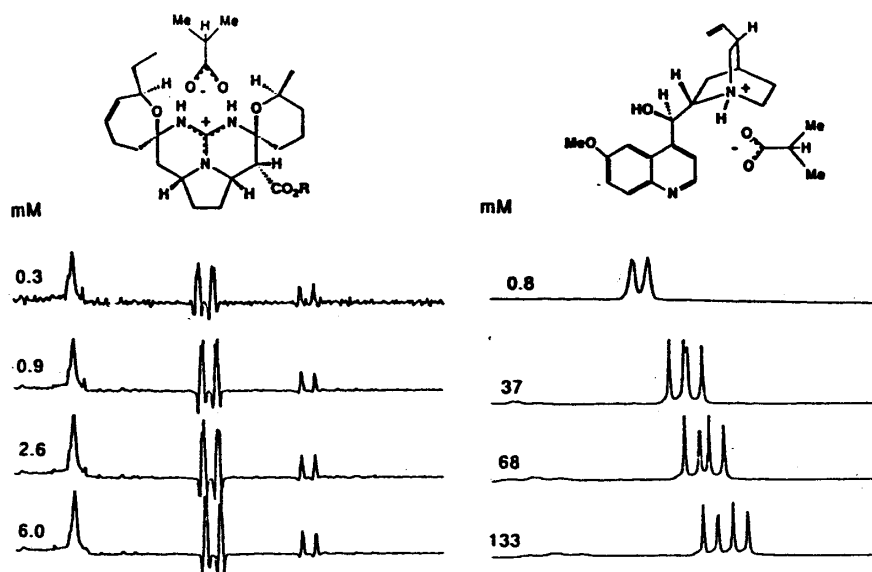


図5 プチロマイカリンおよびキニンの存在下におけるイソ酪酸のメチルのNMRシグナル。イソ酪酸の2個のメチルはプチロマイカリンの存在下には0.3mMの低濃度でも異なった化学シフトを示している。キニンでは高濃度では同様のシフト差を示すが濃度の低下にともない急激に効果は減少し、0.8mMでは消失している。

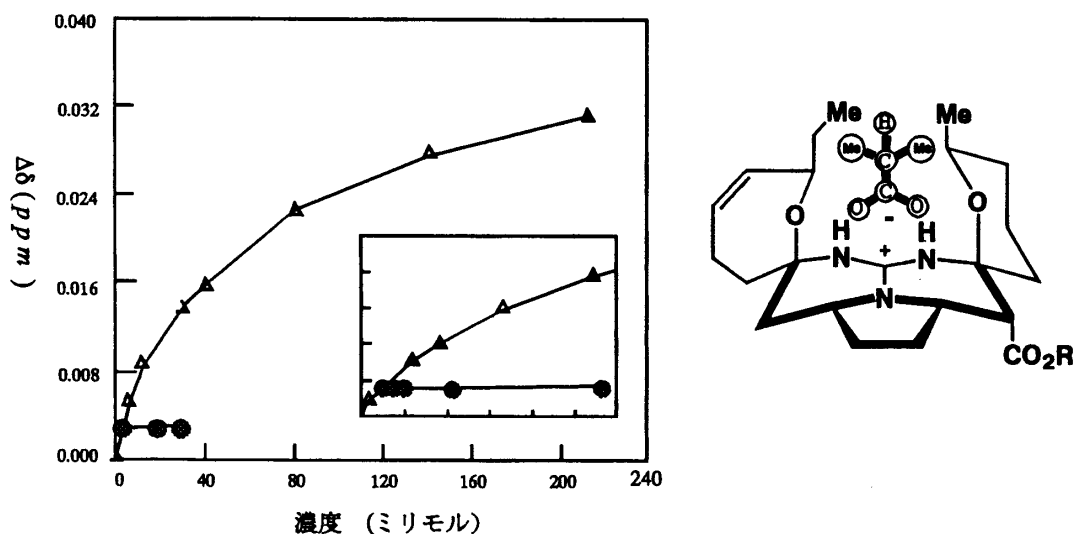
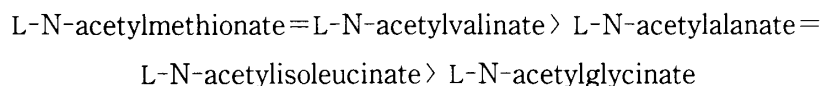


図6 プチロマイカリン (○) およびキニン(△) 存在下におけるイソ酪酸の濃度とそのメチルの化学シフトの差の変化

している。

プチロマイカリンの凹部の構造はLehnが人工的に合成した不斉分子を識別するグアニジン誘導体⁽⁴⁾に類似した構造を有しているが、この物質についてN-アシルアミノ酸の対掌体を区別する徴候を見いだすことは出来なかった。しかし一連のアシルアミノ酸との挙動を追跡した結果プチロマイカリンは特定のアミノ酸に強い結合性を有していることが分かった。L-N-アセチルアラニンとプチロマ

イカリンとの結合体のクロロフォルム溶液をL-N-アセチルメチオニンイオンの水溶液と振盪すると有機相のアセチルアラニンはずべてアセチルメチオニンに入れ替わってしまい、逆に有機相にL-N-アセチルメチオニン結合体を溶かしておきL-N-アセチルアラニン水溶液と振盪しても後者は有機相に移動しなかった。このような実験を各種のアミノ酸誘導体について繰り返した結果、N-アシルアミノ酸が有機相に移動してプチロマイカリンと結合体を形成する能力は次のような順序になった。これはプチロマイカリンの凹部の選択性を示している。



プチロマイカリンはこのようにメチルプロピオン酸のプロキラルメチルを識別し、また特定のアシルアミノ酸と結合する機能を有しているが、相手分子のキラリティーを識別することは出来ない。これは酸の結合するグアニジウム周辺の脂肪族原子団の構造が比較的対称であるためと考えられる。

3. カルトロミシン (Quartromicins)

生理活性物質を探索する過程で新たに抗微生物カルトロミシン類が *Amycolatopsis orientalis* No.Q427-8 から見いだされた。この菌の培養液を非解離性の樹脂で抽出したのちクロマトグラフなどで精製することにより3種類の活性物質、カルトロミシン-A₁、-A₂、および-A₃が単離された。

カルトロミシンA₁ (C₇₈H₈₈O₃₀) およびA₃ (C₇₈H₉₂O₃₀) の分子式が78個の炭素原子を示すのに対してそれぞれの¹³C-NMRスペクトルは39種の炭素原子の存在しか示していなかった。したがってこの抗菌性物質は対称性の二量体構造をとっていることになる。このスペクトルは¹H-NMRスペクトルと共にさらに糖の存在を示唆していたが、これは酸加水分解するとD-ガラクトースが生じることにより

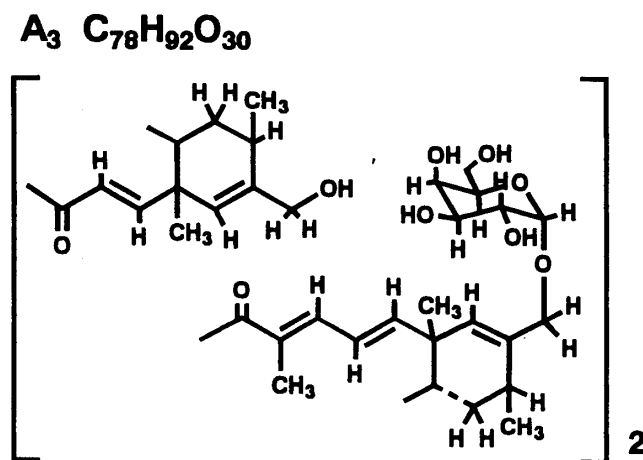


図7 カルトロミシンA₃の部分構造

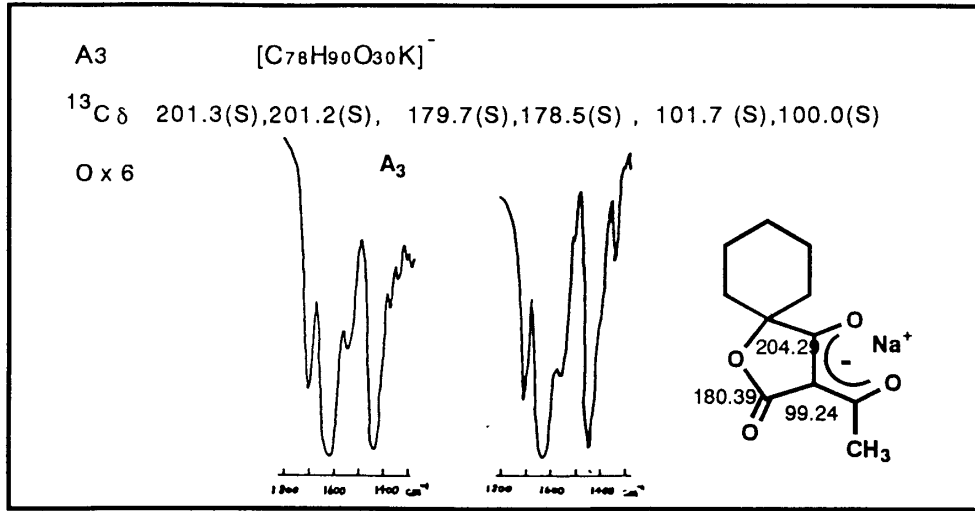


図8 カルトロミシンA₃の水素原子非相関炭素原子の¹³C-NMR化学シフトIRスペクトルおよびテトロン酸ナトリウムのスペクトル性質

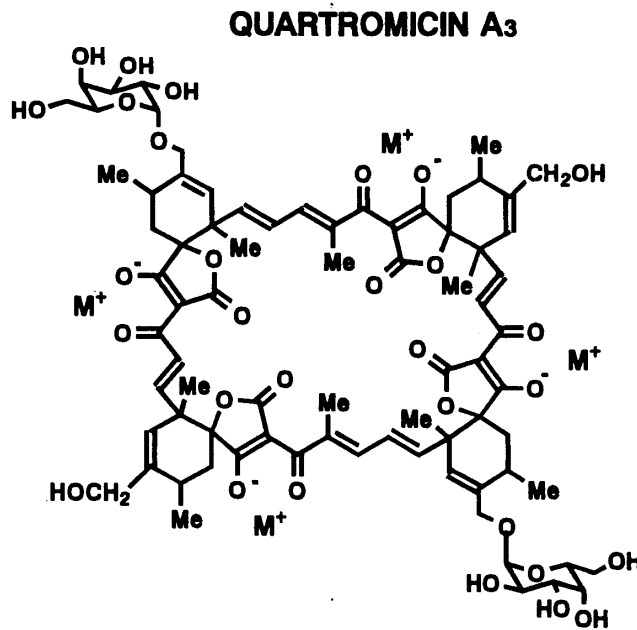


図9 カルトロミシンA₃の構造, M⁺は金属または水素イオン

確認された。アグリコンであるデガラクトシルカルトロミシン-A₁および-A₃も得られたが収率が低い上にNMR測定用溶媒に溶解性が低いため、構造決定は主に配糖体A₃について行われた。

通常の二次元NMRスペクトルは部分構造4および5が存在することを示していたが、これらの部分構造には対称性のA₃の半構造部分の炭素原子39のうち33が存在している。残りの6個の炭素原子に由来すると考えられるスペクトルは次のような異常性を示していた；(1)A₃のIRスペクトルが1620と1450cm⁻¹にカルボン酸イオンの存在を思わせる強い吸収を示すこと；(2)帰属されていない残りの

Mass (Negative) Spectrum of A_1 :

$[M-3H+2Na]^-$, $[M-3H+Na+K]^-$, $[M-4H+2Na+K]^-$, $[M-4H+Na+2K]^-$

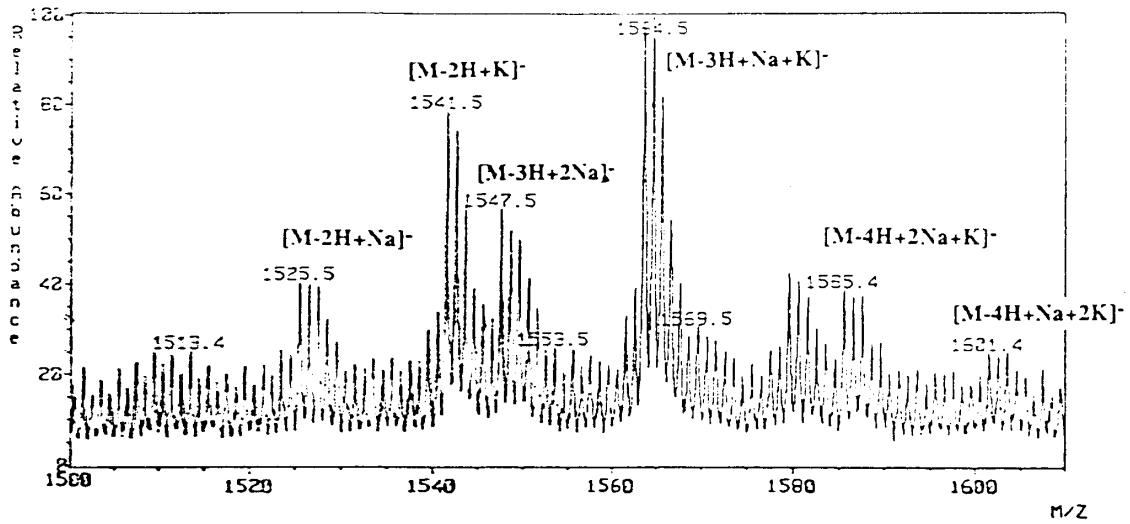


図10. カルトロミシン A_3 の陰イオン質量スペクトル

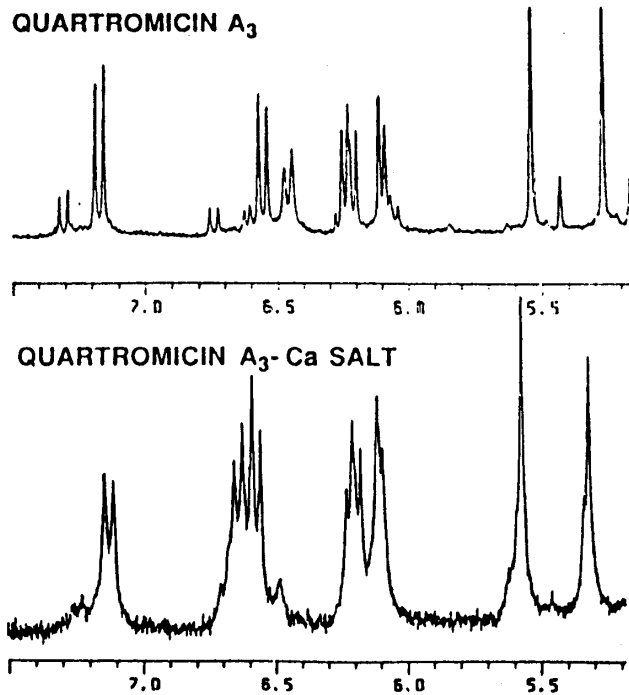


図11 カルトロミシン A_3 のNMRスペクトル

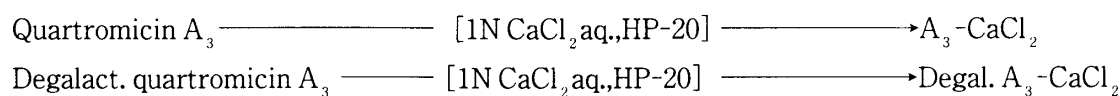
炭素原子の ^{13}C NMRシグナルはカルボニルおよびオレフィンの化学シフトに相当するが、それぞれ対をなしているように見うけられ(201.29/201.17; 179.68/178.51; 101.73/99.95), これは対称性の分子の半面部分にさらに2種類の類似した構造が存在していることを示唆している; (3)しかしながら、これらのほとんどのすべての炭素原子はCOLOCおよびLSPDスペクトル上で図7の部分構造のどの水素原子とも相関を示していない; (4)UVスペクトルで236nm(ϵ 57000)と300nm(50000)に現れる吸収極大は両者とも1モル濃度の水酸化ナトリウム溶液を加えても変化せず、このような挙動は図7の部分構造の発色団によっては説明できない。

隠れている炭素原子から構成されている部分の構造を知るために種々の化学反応をおこない次の結果が得られた; (a) A_3 は水素化ホウ素ナトリウムにより[C(1)=OおよびC(16)=Oが還元され]258nmにUV吸収極大を示す物質を生じ; (b)接触水素化すると[C(2)=C, C(17)=CおよびC(20)=Cが還元されC(6)=CとC(24)=Cは立体障害のために変化しないで]233と267nmに吸収極大をもちIRスペクトルの1620と1460 cm^{-1} に吸収帯をもつ還元生成物を与える; (c)この還元生成物は水素化ホウ素ナトリウムによりUV吸収が238nmにシフトする。これらの還元実験のうち(a)の水素化試薬による生成物のUV吸収スペクトルがテトロン酸(吸収極大260nm)を思わせる挙動を示し、また問題の炭素原子がCOLOCスペクトルなどで水素原子と明確な相関を示さないことなどから、 A_3 にはアシルテトロン酸型の発色団が存在することが推定された。この場合水素化試薬によりアシル基のみが変化をうけてテトロン酸部分は反応しないで残るものと考えられ、また水素化物(b)のUVスペクトルが3-アセチルテトロン酸のナトリウム塩(λ_{max} 231, 256nm)によく似ていることなどはこの推定を支持している。さきに示した ^{13}C -NMRスペクトルで問題の6個の炭素原子が類似した2群に分類されることからテトロン酸部分は2種類存在することになり、また化学シフト δ 90.43/89.30から2個の四級炭素原子は酸素原子と結合している sp^3 型炭素[C(12), (30)]であることが明らかになった。

これらの結果カルトミシン A_3 の構造は3であると決定された。確認のために合成したアセチルテトロン酸のナトリウム塩のIRスペクトルは図8のように1630と1450 cm^{-1} に強い吸収を示しカルトロミシンとよく一致し、またこの合成物質の ^{13}C -NMRスペクトルも2組の炭素によく似たシグナルを示し構造を支持していた。このようにしてカルトロミシン A_3 は図9の化学構造をもつことが明らかになった。カルトミシン A_1 (1)および A_2 (2)についても A_3 との各種のスペクトルの比較および化学的な相互関係から構造が決定された。炭素-炭素結合のみで環状骨格を形成している単環性の抗菌性物質はごく少数しか知られていないが、カルトロミシンはこのような様式の天然物のうちで最大の環を有する物質である。さらにこれらの分子には4個ものケトテトロン酸が一つの環の中に隣接して配列するという特異な構造が存在するが、このために化学的にも特異な機能を有していることが明らかになった。ICP分析を行うと精製した試料であってもカルトロミシンにはつねにナトリウム、カリウムおよびカルシウムなどの金属イオンが含まれており、これらのイオンの含有比は培養調製のたびごとに異なっている。さらにカルトロミシンの陰イオン型FAB質量スペクトルには[M-4H+Na+2K] $^-$ および[M-4H+2Na+K] $^-$ の親イオンが現れることからこの物質は解離して3ないし4個のアルカリイオンと結合していることが明らかになった。これらのイオンは鉍酸で処理して

表1 カルトロミシン塩類のICP分析

| 試料 | 金属イオン (モル数) | Na | K | Mg | Ca | 総イオン数 |
|---|----------------|------|------|------|------|-------|
| 培養 ロット 1 | | 1.91 | 0.52 | 0.04 | 0.28 | 3.07 |
| 培養 ロット 2 | | 1.56 | 0.64 | 0.08 | 0.45 | 3.26 |
| A ₃ -CaCl ₂ | | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 1.55 | 3.13 |
| Degal.A ₃ -CaCl ₂ | | 0.24 | 0.02 | 0.02 | 1.43 | 3.16 |



も水素イオンで置換することが出来ない。このような挙動はカルトロミシンがアルカリおよびアルカリ土類金属イオンに対して極めて強い結合性を有していることを示している。複数のイオン種を含有しているカルトロミシンのNMRスペクトルが複雑なパターンを示すことはこれらのイオンがNMRの時間尺度内では交換しないことを示唆している。

このアルカリイオン塩を塩化カルシウム水溶液に加えるとNMRが明瞭なパターンに変わることは、結合イオン種がすべてカルシウムに置換されることを示唆している。実際に、このようにして調製した試料についてICP分析を行ったところすべてのアルカリイオンがカルシウムに置き換えられていた「表1」。さらに塩化ナトリウムと塩化カルシウムの混合水溶液から調製した試料もカルシウムのみを含有していた。カルトロミシンからガラクトースを取り除いたアグリコンも各種のイオンと結合するが、もはやカルシウムに対する選択性は示さない。これらの実験結果はカルトロミシンが他のイオンに優先してカルシウムに選択的に結合し、この機能はテトロン酸の配列とガラクトースによることを示している。

4. まとめ

紅海産のスポンジから単離されたプチロマイカリンは凹形の分子の底部に極性の高いグアニジニウム基が存在し、その周りを炭化水素環がとり囲みさらに開口部には外来の陰イオンを経てスベルミジン基が水素結合しているというかご形の構造を持っている。海洋生物から今までに発見されているグアニジン化合物はフグ毒テトロドトキシンとか赤潮の有毒物質サキシトキシンなどに見られるようにグアニジニウム基が分子の主要部分をなし外部に露出しているため水溶性であり脂質には全く溶解しない。これに対し、プチロマイカリンは陽イオン極性基が分子の内部に位置し、陰イオンを取り込むため脂溶性物質となっている。また、分子内に取り込む陰イオン種について選択性を示し特定のアシルアミノ酸に対して強い親和性を示したり、さらに光学対掌グループを識別する可能性を示していた。これらの特異性はかご形の内部構造に依存しているものと考えられる。

抗菌性物質として培養菌から見出された3種のカルトロミシン類は炭素原子で構成されるマクロ

環の中に4個のテトロン酸が存在するという新しいタイプの天然有機化合物であった。同一環内に4個のテトロン酸が近接して存在するため酸解離度が高く無機陽イオンに対して強い結合性を示している。特にカルシウムイオンに強い親和性を持ち、ナトリウムとかカリウム塩にカルシウムイオン溶液を加えるとこれらのアルカリイオンを放出してすべてカルシウムと結合してしまう高度の選択性を有している。また、ナトリウム・カリウムの混合塩の核磁気共鳴スペクトルに比べカルシウム塩が明確なスペクトルを示すことは後者の安定した構造を反映している。ラクトース糖基を除去したカルトロミシンではカルシウムイオンに対する選択性が消失することから、選択性はテトロン酸部分の他に糖部分が重要な役割をなしていることが分かる。生物体で重要な機能を果たしている酵素とか核酸に比べてプチロマイカリンおよびカルトロミシンは著しく低分子の有機化合物であるが特異的な選択結合能力を有していることは分子認識の機構解明に役立つものと考えられる。また、カルトロミシンは生体内のカルシウムの研究に寄与するもの期待される。

(かきざわ・ひろし 産業情報学科)

参考文献

- (1) Kashman Y., Hirsh S., McConnell O. J., Ohtani I., T.Kusumi, Kakisawa H., 1989, Ptilomacalin A: A novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8925-8926.
- (2) Kusumi T., Ichikawa A., Kakisawa H., Tsunakawa M., Konishi M., 1991, The structures of quartromicins A₁, A₂, and A₃, novel macrocyclic antiviral antibiotics possessing four tetronic acid moieties. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8947-8948.
- (3) Echavarren A., Galan A., Lehn T. -M., de Mendoza J., 1989, Chiral recognition of aromatic carboxylate anions by an optically active receptor containing a rigid guanidinium binding subunit, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4994.
- (4) Ohtani I., Kusumi T., Kakisawa H., 1992, An insight into the configuration of ptilomicalin A. The NMR properties of trifluoroacetylated spermidine analogues. *Tetrahedron Letters*, **35**, 2525-252.
- (5) Ohtani I., Kusumi T., Kakisawa H., Kashman Y., Hirsh S., 1992, Structure and chemical properties of ptilomycalin A. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8472-8479.
- (6) Kusumi T., Kakisawa H., 1993, Anion-recognition ability of organic molecules and their precise dynamic features, in *Dynamic aspects of natural product chemistry, summary report of research project supported by the grant-in-aid for scientific research on priority areas from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.*
- (7) 楠見武徳, 柿澤寛, 1995, 陰イオン種認識能を有する低分子天然有機化合物の動的挙動と機能発現の研究, 文部省科学研究費補助金重点領域研究「動的天然物化学」成果報告書。

The structure and dynamic properties of natural products possessing ability to recognize molecules and ions.

Hiroshi Kakisawa

The chemical structure of ptilomicalin, an antiviral alkaloid obtained from a marine sponge, and of quartromicins, antibiotic nonalkaloids from a fungous metabolite, has been determined on the bases of chemical and spectroscopic analyses. The alkaloid is composed of a polysubstituted guanidine located in the bottom of concave carbon framework, which is connected to spermidine through ω -hydroxy fatty acid. Ptilomicalin has been found to recognize particular anions of some amino acid derivatives and to differentiate the prochiral methyl groups of isobutyric acid. The molecular features of these behaviors were deduced by detailed NMR analyses.

Quartromicin A₃ has structure consisting of four tetronic acid moieties in a single macrocyclic ring and galactose. This compound exists as mixed salts of sodium and potassium when isolates. Treatment of the mixture with an aqueous solution of calcium chloride results in complete exchange of alkali metal ions initially present with calcium cation. On the contrary, an addition of sodium chloride solution to the calcium salt of A₃ caused no replacement with sodium cation at all. Moreover, the broad signals of the ¹H NMR spectrum of A₃-mixed salt remarkably sharpens in the spectrum of quartromicin A₃-Ca. This finding suggests that the calcium salt of quartromicin A₃ has a fixed conformation, presumably because calcium cations are incorporated and fixed tightly to the macrocyclic ring comprised of tetronic acids.

Key words: natural products, molecular recognition, ptilomicalin, quartromicins, calcium ion.