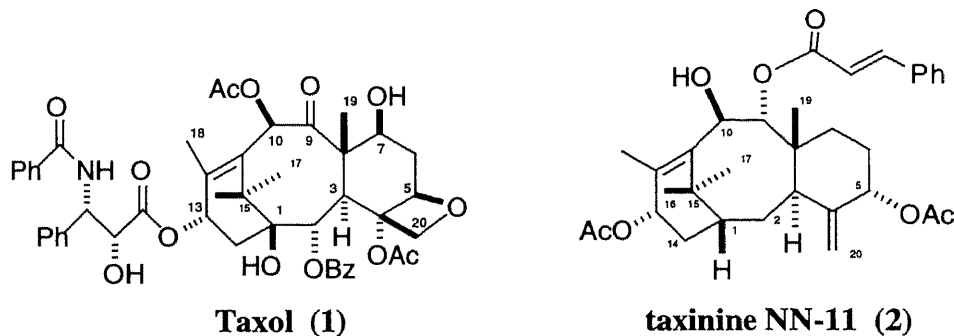


イチイ培養細胞（カルス）から生産された 新規タキサンジテルペンの構造決定

環境工学技術系 坂井 淳一

1. 新規抗癌剤タキソール (1) は、日本に於いても卵巢癌の新薬として承認されたが、その供給は不足し一刻も早い大量生産が望まれている。そこで、我々の研究室では再生可能資源として入手容易な日本イチイ (*taxus cuspidata*) の針葉部¹⁾、ならびにその針葉部から誘導したカルス培養細胞²⁾を (1) の供給源として検討し、その結果、日本産イチイの針葉部ならびにその培養カルスの両方から、比較的高い含有量で (1) が存在することを確かめ報告した。また近年、複数の抗癌剤に対して同時に耐性を有する多剤耐性癌の耐性発現の原因である p-糖蛋白の薬剤排出能に対して、幾つかのタキサン化合物に阻害作用があることが報告³⁾され大きく注目されている。一方、イチイのカルス培養による(1) の生産の検討は数多く行なわれているが、(1)以外のタキサン化合物の挙動についての研究、報告は極わずかである。そこで我々は、大量培養が可能なイチイカルスが生産するタキサン化合物に p-糖蛋白阻害作用があれば多剤耐性癌の克服に大きく貢献できると考え、カルスが生産するタキサン化合物の探索と構造決定、生理活性評価を進めている。今回は、多剤耐性癌克服に向けてのリード化合物をイチイカルスの生産するタキサン化合物に求める過程において、これまでに知られていない新規タキサン化合物 taxinine NN-11 (2) を見出したので⁴⁾、この (2) を例としてイチイカルスよりの生理活性化合物の単離方法の実際と、主に NMR (核磁気共鳴分光分析法) を用いた構造決定方法について紹介する。



2. 実験

外植体ならびにカルス誘導、培養 :

1997年1月17日、仙台市青葉山において採取したイチイ (*taxus cuspidata*) 針葉の若い茎を外植体として用い、オーキシンとして NAA (ナフチル酢酸) 0.5 mg/L を添加した改変ガンボーク B5 培地に置床し、暗所下 25°C で 60

日間培養し、イチイカルスを誘導した。その後、同一培地で60日ごとに増殖性の良いカルスを選抜して継代を行い9次培養まで行った。このカルスを同一培地にオーキシシン（植物ホルモン）として methyl jasmonate 100 mM を添加した生産培地で60日間培養して得た新鮮カルス 721.1 g を用いた。

抽出ならびに単離：

上記の新鮮カルスを凍結乾燥して乾燥カルス 74.1 g とし、ヘキサン (13 mL/g dry callus) で浸透、攪拌 (1h) 後、ろ過を行う。この浸透、攪拌、ろ過の操作を3回行った。続いて酢酸エチル (13 mL/g) でヘキサンと同様の操作を行い、減圧下で濃縮し酢酸エチル抽出部 1673.0 mg (2.258 % from dry callus) を得た。得られた酢酸エチル抽出部をフラッシュカラムクロマトグラフィー (silica gel 83.7 g, silica gel 60, 230-400 mesh) で計5フラクションに分離し (Fr.1-3 酢酸エチル/ヘキサン=5/5, Fr.4 酢酸エチル=100%, Fr.5 メタノール=100%)、続いてFr.2 (549.3 mg) を順相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) [酢酸エチル/ヘキサン=5/5; GL-inertsil 10 ϕ ×250 mm] で計4フラクションに分離 (F2-1:tR 0~10 min, F2-2:tR 10~32 min, F2-3:tR 32~37 min, F2-4:tR 37~60 min) した。続いてF2-1 (202.1 mg) を順相 HPLC [酢酸エチル/ヘキサン=2/8; GL-inertsil 10 ϕ ×250 mm] で分取したところ **taxinine NN-11 (2)** (tR 39.7 min, 19.2 mg: 0.026 % from dry callus) を得た。(Scheme1)

構造決定：

taxinine NN-11 (2) の構造については主に、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、各種 2D-NMR で決定した。(2)の物性ならびに NMR データをまとめて Table 1. に示した。

(2) は高分解能 EI-MASS 分析の結果、精密分子量 550.2931、 $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_7$ の組成であることがわかった。続いて、 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ を測定した結果、 δ 1.86, 1.71, 1.22, 0.79 に4本のメチル基、 δ 2.08 と 2.17 に2本のアセトキシ基の s のメチルが認められ、 δ 5.21 と 4.86 に互いにカップリングしたシグナルがあることから2個のアセトキシ基が置換した典型的なタキサ-4(20),11-ジエン骨格を想定した。また、 δ 6.52 と 7.76 に 16.1Hz で関連したプロトンと 7.54、7.40 にフェニル基が一個存在することから trans-シンナモイルオキシ側鎖の存在が示唆された。 δ 5.92 には d と t が重なった形で2個のプロトンがありこれは H-H COSY により 18 位のメチル基とのロングレンジカップリングならびに δ 5.05 のプロトンと 10.5 Hz でカップリングしていることから各々 13, 9 および 10 位の酸素官能基付け根のプロトンと推定された。また、 δ 5.37 の br t のプロトンは δ 1.88 と 1.72 の高磁場の2個のプロトンと関連し5位のプロトンと思われた (Fig.1 A)。次に $^{13}\text{C-NMR}$ ならびに DEPT を測定し、さらに、HMQC スペクトルによりプロトン化した炭素の帰属を行なった。しかしながら、 $^1\text{H-NMR}$ で9位と13位のプロトンが完全に重なっていたので両者の区別をつけるため溶媒を pyridine-d₅

Scheme 1

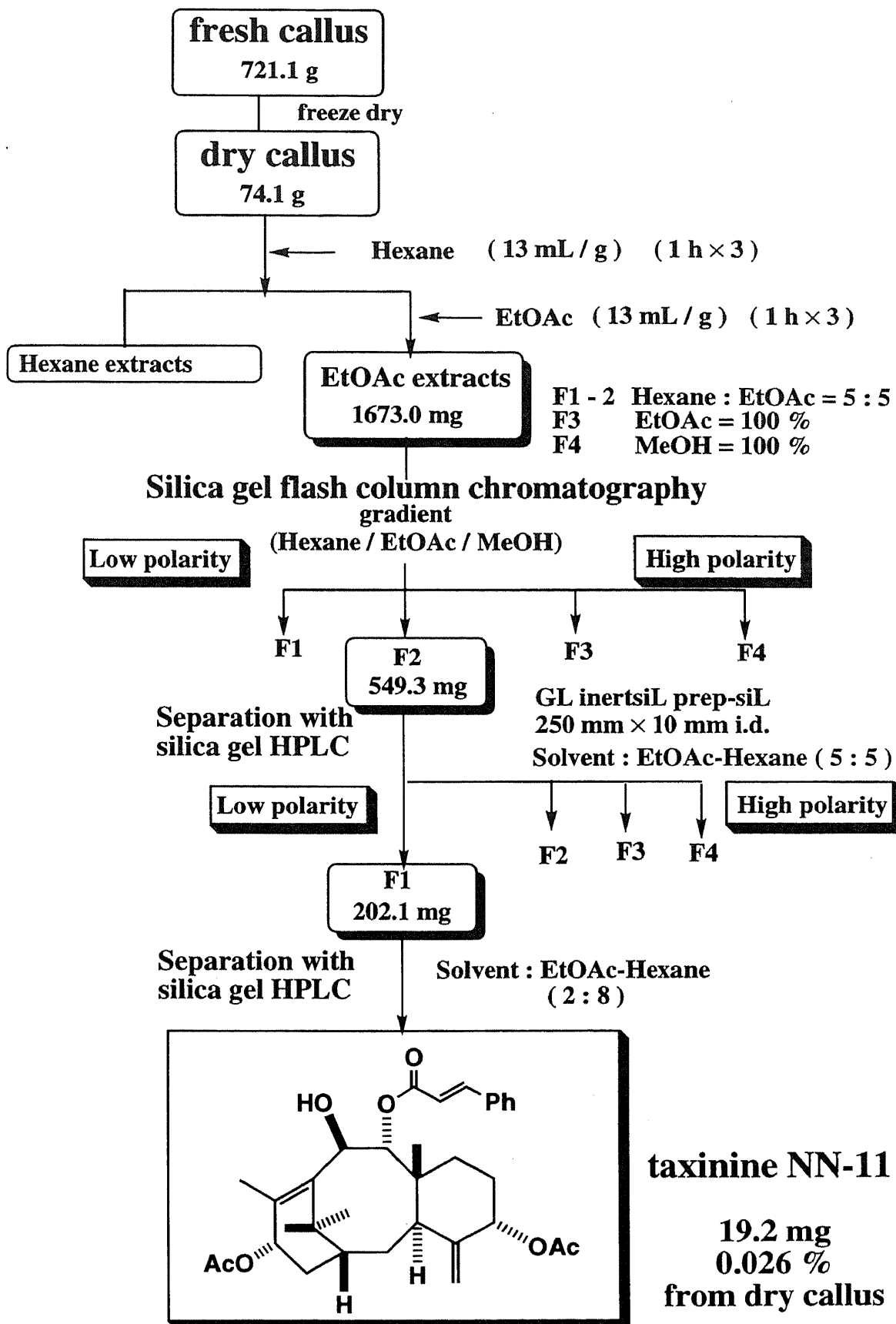
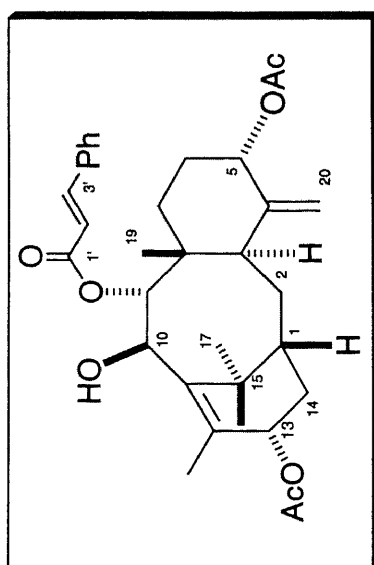


Table 1. NMR Spectral Data of **taxinine NN-11** in CDCl₃

position	¹³ C ^{a)}	connected ¹ H ^{b)}	H-H COSY ^{c)}	HMBC ^{d)}
1	40.53 (d)	1.86 (m)		H14α, Me16, 17, H3
2	28.29 (t)	β) 1.80 (m) α) 1.72 (m)		H1, H3, H14αβ
3	38.07 (d)	3.04 (brd, 6.1)		H2αβ, H1, H5, H20ab, Me19
4	148.88 (s)	-		H3, H6αβ, H20b
5	76.44 (d)	5.37 (brt, 3.0)		H6αβ, H20ab
6	27.49 (t)	α) 1.88 (m)		H7, H5
7	27.44 (t)	β) 1.72 (m) β) 1.80 (m) α) 1.86 (m)		H5, H9, Me19
8	43.15 (s)	-		H3, H7αβ, H9, Me19
9	80.61 (d)	5.92 (d, 10.5)		H7β, H10, Me19
10	70.61 (d)	5.05 (brd, 10.5)		H9
11	138.18 (s)	-		H9, H10, Me16, 17, 18
12	134.10 (s)	-		H10, H13, H14β, Me18
13	70.93 (d)	5.92 (brt, 7.0)		H14αβ, Me18
14	31.95 (t)	β) 2.71 (ddd, 15, 10, 10) α) 1.09 (brdd, 15.0, 7.0)		H1, H13
15	39.35 (s)	-		H1, H10, H14α, Me16, 17
16	31.44 (q)	1.22 (s)		17Me
17	27.36 (q)	1.71 (s)		16Me
18	14.98 (q)	2.00 (d, 1.5)		-
19	17.82 (q)	0.79 (s)		H3, H9
20	114.07 (t)	a) 5.21 (d, 1.0) b) 4.86 (d, 1.2)		H3, H5
5-OAc	169.96 (s)	-		H5
9-OAc	170.50 (s)	-		H13
1'	21.80 (q)	2.08 (s)		-
2'	21.46 (q)	2.17 (s)		-
3'	167.72 (s)	-		H9, H2', H3'
q-Ph	117.73 (d)	6.52 (d, 16.1)		H3'
o-	145.78 (d)	7.76 (d, 16.1)		o-Ph
m-	134.29 (s)	-		H3', m,p-Ph
p-	128.90 (d)	7.54 (m)		
	128.18 (d)	7.40 (m)		
	130.46 (d)	7.40 (m)		

a) multiplicities were determined by DEPT, b) connections were determined by HMQC, c) determined by PFG-COSY, d) correlations from C to the indicated protons.



taxinine NN-11

5α,13α-diacetoxy-9α-cinnamoyloxy-10β-hydroxy-taxa-4(20),11-diene

HRMS C₃₃H₄₂O₇

550.2936 (found)

550.2931 (calcd)

mp 228 - 231 °C

[α]_D²⁰ + 99.8 ° (c 0.538, CHCl₃)

IR 2960, 1732, 1642,
1252 cm⁻¹ (CHCl₃)

に替えて測定したところ 9 位は δ 6.18 に、13 位は δ 6.10 に分離した。引き続き HMBC により 4 級炭素を含めた全骨格の平面構造を決定し、酸素官能基、シンナモイルオキシ側鎖の置換位置を決定した (Fig.1 B)。問題の 9 位と 13 位の置換基は 9 位のプロトンとシンナモイルオキシ側鎖のカルボニル炭素のあいだに相関が見られ、13 位のプロトンはアセトキシ基のカルボニルと相関していたことからこれまでは報告例のない 9-シンナモイルオキシの新規タキサンジテルペンであることが明らかとなった。立体化学を含めた(2) の構造は、NOESY スペクトル (Fig.1 C) により決定し、5 α ,13 α -diacetoxy-9 α -cinnamoyloxy-10 β -hydroxy-taxa-4(20),11-diene と決定した。

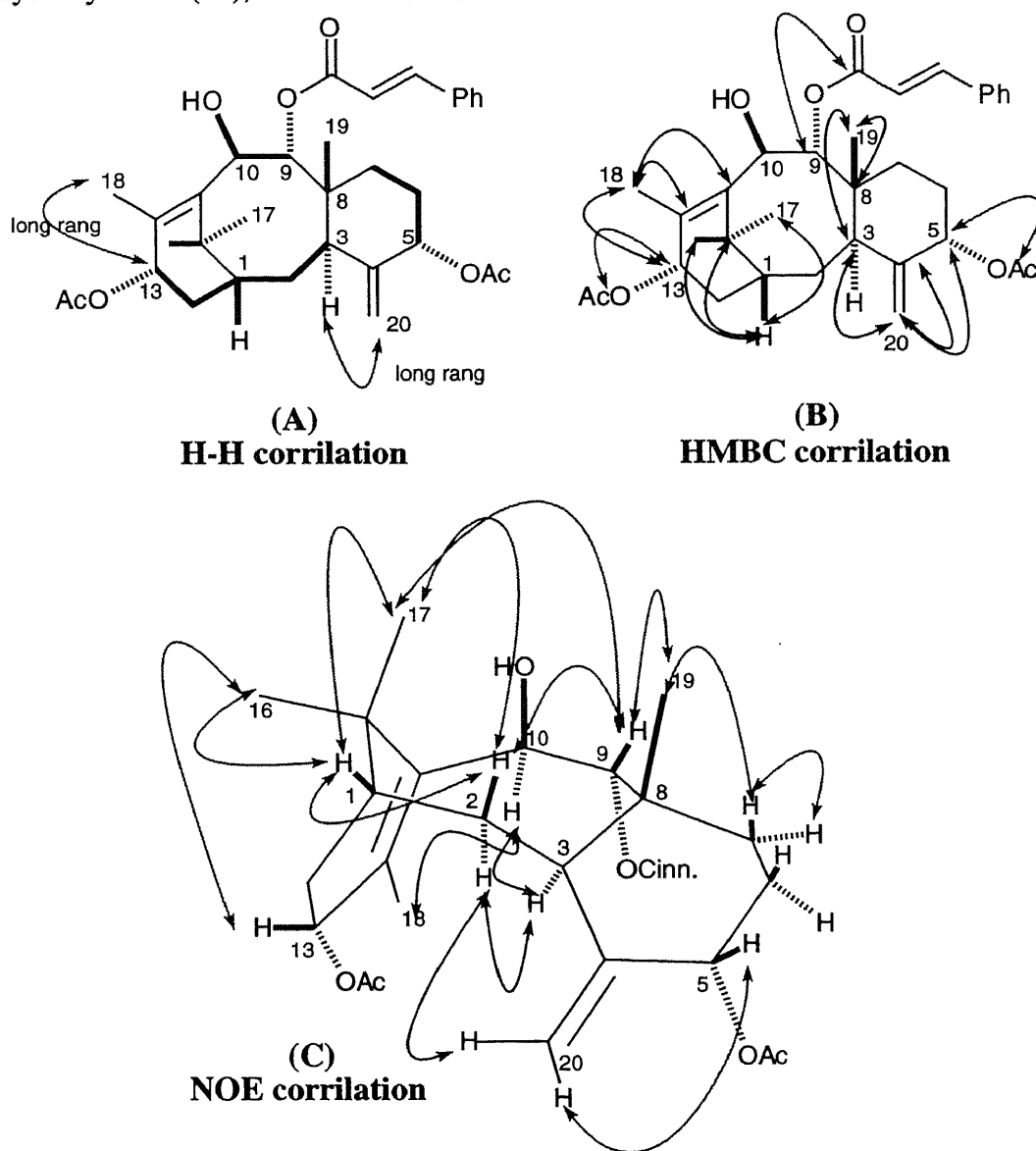


Fig. 1 Structure of taxinine NN-11

謝辞

本研究は本学 工学部 安東政義 教授の指導により行われたものであり、適切な助言を賜った本学 農学部 内山武夫 教授ならびに本学 自然科学研究科 萩原久大 教授、鈴木敏夫助教授に深く謝意を表します。また、本研究を共同して担当して頂いた工学部 安東研究室の学生諸氏に深く感謝致します。

本研究の一部は文部省平成 10 年度科学研究費補助金 奨励研究(B) 10915014 の援助により行われた。

文献

- 1) M. Ando, J. Sakai, et al., *J. Nat. Prod.*, 60, 499 (1997)
- 2) 安東政義・坂井淳一, 他, 第 40 回天然有機物討論会(1998 年 10 月, 福岡) 講演要旨集 p.353 ;
坂井淳一, 第 1 回新潟大学工学部技術発表会報告集, p.42 (1999 年 1 月)
- 3) J. Kobayashi, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1555 (1998).
- 4) 安東政義・坂井淳一, 他, 第 43 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (1999 年 10 月, 福岡), 講演要旨集 p.279