

氏名 (生年月日) おがわ けい こ 小川 慶子 (1989年10月23日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博第169号

学位授与の日付 2018年3月17日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 *Nigella* 属植物クロタネソウに含まれる oxazonigelladine および damasterpene 類の単離・構造研究と抗 HSV-1 活性評価

論文審査委員 (主査) 教授 松田 久司

(副査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 渡辺 徹志

論文内容の要旨

序章

過去から現在までの創薬研究の歴史において、天然物化学は多大な貢献を果たしてきた。天然物の構造的特徴として豊富なキラル炭素、縮環構造、高度酸素化が挙げられる。この構造的特性から天然物は構造の多様性に富んでおり、有機化学的手法では合成が困難な希少骨格の供給源として医薬創出率の向上への貢献が期待される。¹⁾ 希少化合物の機能性は未解明なものも多く、それらを明らかにすることは天然物化学の命題である。近年、新たなヘルペス治療薬の開発は喫緊の課題である。その背景として、アシクロビルなどのヘルペス治療薬は全てウイルス DNA 複製阻害作用に基づいており、いずれも核酸誘導体であり、それに伴い耐性ウイルスの出現が報告されている現状がある。そこで著者は特徴的な構造を有する天然物から核酸誘導体と異なる骨格を持つ抗単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 活性物質の探索を試みた。標的化合物としてキラル炭素を多く持ち骨格に多様性があるジテルペン、さらに窒素原子により活性の増強が期待できるジテルペンアルカロイドに焦点を絞った。すなわちその研究素材としてテルペンアルカロイドを含むことで知られるキンポウゲ科植物に注目し、特に特徴的なアルカロイド成分が報告されているにも関わらずその含有成分の構造解析が不十分である *Nigella* 属植物クロタネソウ (*Nigella damascena*) に着目した。

第1章 クロタネソウ (*N. damascena*) 成分の単離と構造決定

N. damascena 種子をメタノールで熱時抽出し、酢酸エチル、*n*-ブタノール、水を用いて可溶性分画に分離した。酢酸エチル分画を順相カラムクロマトグラフィー [シリカゲル、*n*-Hexane-EtOAc→CHCl₃-MeOH-H₂O] により分離した。多波長検出型 HPLC 分析における UV 吸収パターンや NMR 解析から、含窒素化合物を含む分画や複数の芳香環を有するテルペン分画を推定することができた。そこで逆相カラムクロマトグラフィー、次いで HPLC により繰り返し精製することで 1 種の新規アルカロイド oxazonigelladine (**1**)、8 種の新規ドラベラン型ジテルペンおよびジテルペンアルカロイド damasterpene I-VIII (**2-9**) を単離した。これらの化学構造は 1 次元および 2 次元 NMR をはじめとする各種物理化学的データにより決定した。**1** は天然物において珍しい isoxazolidinone 骨格を有しており、その窒素原子と酸素原子の直接結合の確認が必要不可欠であった。そこで各種溶媒を検討することで結晶化を試みた。その結果、酢酸エチル:エタノール:アセトニトリル = 1:1:1 を用いた場合に結晶化に

成功し、X線単結晶構造解析法により構造を確認することができた。一般的に isoxazolidinone 骨格は窒素原子と酸素原子の電子的反発により不安定であると予想されるが、**1** は比較的安定な化合物として単離された。その理由として、**1** は共鳴安定化により化学的安定性が向上していることが考えられた。一方、damasterpene 類は高度に酸素官能基を持つ特徴的な構造を有していた。

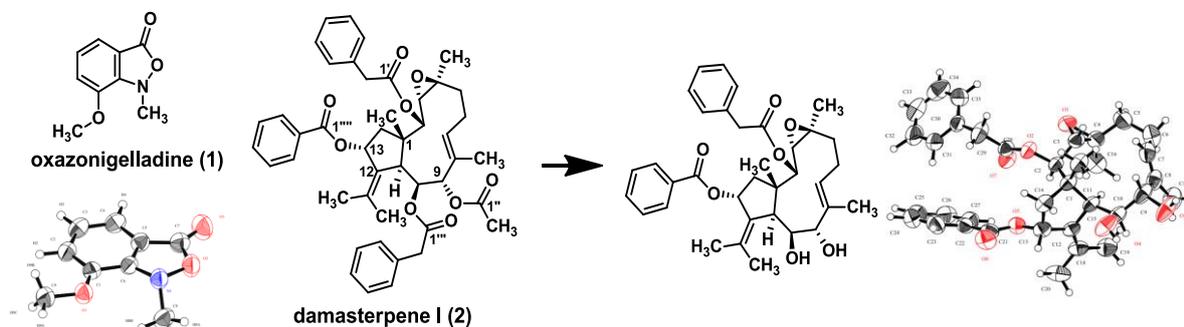


図 1. Oxazonigelladine (**1**)、damasterpene I (**2**) の構造と X 線単結晶構造解析法による ORTEP 図

Damasterpene 類は 8~10 カ所の光学活性中心をもつため、立体構造の決定に X 線単結晶構造解析法および励起子キラリティー法の適用を計画した。種々の検討により damasterpene I (**2**) はアシル基を部分的に切断すると結晶性が向上し単結晶を形成したため X 線単結晶構造解析法によりその立体化学構造を決定した。一方、励起子キラリティー法では 12 位の二重結合と 13 位のベンズイル基によって生じる Cotton 効果を測定することで 13 位の絶対立体配置の決定を試みた。**2** の CD スペクトルを測定したところ、Cotton 効果は不明瞭であった。その原因として複数のアシル基による相互作用が考えられたため余分なアシル基を除いた誘導体へと導き CD スペクトルを測定したところ、明確な負の Cotton 効果 (223.0 nm, $\Delta\epsilon = -5.55$) が観測されたことから **2** の 13 位の絶対立体配置が *R* であると決定できた。一方、キンボウゲ科植物 *N. sativa* 種子について *N. damascena* と比較のため成分探索研究を行った。その結果、4 種の主要既知ドラベラン型ジテルペン (**13-16**) を単離同定した。得られた成分を比較すると環構造の二重結合位置の違いから両者は異なるコンフォメーションをとることが示唆された。

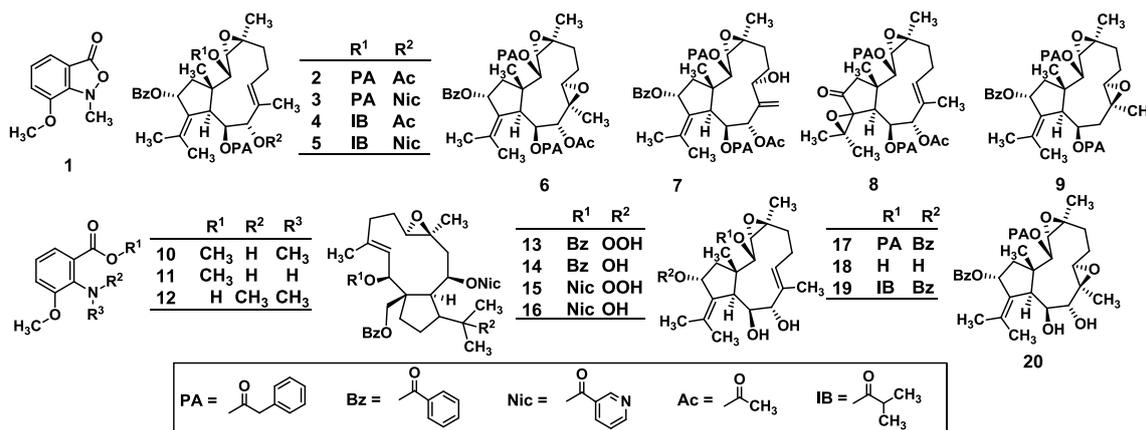


図 2. *Nigella* 属植物から得られた化合物 (**1-16**) および誘導体 (**17-20**) の構造

第 2 章 単離化合物の抗 HSV-1 活性評価

単離成分について Vero 細胞を用い plaque reduction assay 法により抗 HSV-1 活性の評価を行った。結果として、**6** [$35.0 \pm 3.7\%$, $10 \mu\text{M}$] をはじめ数種のドラベラン型ジテルペンが有意な抗 HSV-1 活性を示した。そこで、構造活性相関を検討する目的で単離ジテルペンを段階的に脱アシル化し同様に活性を評価した。アシル基の数に注目すると、2 カ所にアシル基が結合した化合物は活性を示したが [**17**, $32.0 \pm 1.5\%$, $10 \mu\text{M}$]、アシル基を 4 カ所もしくはアシル基を持たない化合物は活性を示さなかった。さらに、

damasterpene の 9 位のアシル基の種類に着目すると、ニコチン酸を有する化合物 **3** および **5** はアセチル基を有する化合物 **2** および **4** よりも活性が高かった。抗 HSV-1 活性とは対照的に damasterpene VIII (**9**) では 10 μM において細胞毒性を示さずに細胞変性効果に起因するプラーク径の拡大が観察された。プラーク径を増大させる天然有機化合物は著者の知る限り前例がない。一方、**1** はそれのみでは抗 HSV-1 活性を示さないにも関わらず、アシクロビル [32.5 \pm 12.9%, 1 μM] と併用することによりアシクロビルの抗 HSV-1 活性を増強した [64.6 \pm 15.3%, アシクロビル 1 μM + 150 μM]。

総括

著者は *Nigella* 属植物から珍しい骨格を持つ **1** および複雑な構造を有するドラベラン型ジテルペン類を単離し、絶対立体配置も含めた化学構造を決定した。一部のドラベラン型ジテルペンは顕著ではないが有意な抗 HSV-1 活性を示し、その構造活性相関の一部を明らかにした。加えて、アシクロビルの作用増強効果を有する **1** やプラーク径の増大作用を示す **9** など珍しい機能性を有する化合物を見出した。本研究結果により、これまで未解明であった化合物の機能性の一部が明らかになり、創薬領域における新たな知見に繋がることが期待される。文献: 1) Feher, M.; Schmidt, J. M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218–227.

審査の結果の要旨

アシクロビルに代表される従来のヘルペス治療薬は核酸誘導体であり、ウイルス DNA 複製阻害に基づき作用を示す。また、これらの治療薬には、いずれも耐性ウイルスの出現が報告されている。そのため、核酸誘導体とは異なる構造を有する新たなヘルペス治療薬の開発は重要な課題の一つである。申請者は、特徴的なアルカロイド成分が報告されているにも関わらず、その含有成分探索が不十分であるキンポウゲ科 *Nigella* 属植物クロタネソウ (*Nigella damascena*) に着目し、成分研究を行うとともに単離成分の抗単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 活性評価を行った。

1) クロタネソウ (*N. damascena*) 成分の単離と構造決定

N. damascena 種子から、各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC により繰り返し分離精製を行うことで 1 種の新規アルカロイド oxazonigelladine、8 種の新規ドラベラン型ジテルペンおよびジテルペンアルカロイド damasterpene I–VIII を単離した。これらの化学構造は 1 次元および 2 次元 NMR をはじめとする各種スペクトルデータの詳細な解析および化学的手法を用いて決定した。Oxazonigelladine は天然物において珍しい isoxazolidinone 骨格を有しており、X 線単結晶構造解析法によりその構造を確認することができた。一般的に isoxazolidinone 骨格は窒素原子と酸素原子の電子的反発により不安定であると予想されるが、oxazonigelladine は比較的安定な化合物として単離された。一方、damasterpene 類は高度に酸素官能基を持つ特徴的な構造を有しており、8~10 ヲ所の光学活性中心をもつ化合物であることが明らかになった。Damasterpene 類の立体化学構造は、NOESY スペクトル解析、励起子キラリティー解析および X 線単結晶構造解析を行うことにより決定した。

2) クロタネソウ (*N. damascena*) 単離化合物の抗 HSV-1 活性評価

N. damascena 種子から得られた成分について Vero 細胞を用い plaque reduction assay 法により抗 HSV-1 活性の評価を行った。その結果、数種のドラベラン型ジテルペンが顕著ではないが有意な抗 HSV-1 活性を示すことが明らかになった。また、アシル基の数や種類などの違いによって活性に差異があるこ

となど構造活性相関の一部を明らかにした。さらに、oxazonigelladine は、そのみでは抗 HSV-1 活性を示さないにも関わらず、アシクロビルと併用することによりアシクロビルの抗 HSV-1 活性を増強する知見を得ることができた。

著者は *Nigella* 属植物から珍しい骨格を持つ oxazonigelladine および複雑な構造を有するドラベラン型ジテルペン類を単離し、各種スペクトルデータの詳細な解析および化学的手法を用い、絶対立体配置も含めた化学構造を決定した。また、幾つかのドラベラン型ジテルペンは有意な抗 HSV-1 活性を示すことを見出すとともに、その構造活性相関の一部を明らかにした。本研究は、創薬領域における新たな知見に繋がることが期待されるとともに天然物化学分野をリードする研究として高く評価できる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士 (薬学) の学位論文としての価値を有するものと判断する。