

# Hitachimycin (Stubomycin) 誘導体の合成とそれらの生物活性

著者	柴田 潔, 大原 輝彦, 薩摩林 貞美
雑誌名	日本歯科大学紀要. 一般教育系
巻	16
ページ	127-135
発行年	1987-03-20
URL	<a href="http://doi.org/10.14983/00000315">http://doi.org/10.14983/00000315</a>

# Hitachimycin(Stubomycin)誘導体の合成と それらの生物活性

Synthesis of Hitachimycin(Stubomycin) Derivatives  
and Their Bioactivities

歯学部 柴 田 潔  
大 原 輝 彦  
薩 摩 林 貞 美

Kiyoshi SHIBATA, Teruhiko OHHARA and Sadayoshi SATSUMABAYASHI

Chemical Laboratory, The Nippon Dental University,  
Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, JAPAN

(1986年11月28日 受理)

Hitachimycin (1, Stubomycin,<sup>1)</sup> 図1) は茨城県牛久市の土壌より分離された放線菌 (*Streptomyces* AM-4927) の培養液より単離された抗生物質で19員ラクタム環を中心骨格として、フェニル基およびエノール部分を含む5員環が結合した新規な構造であることが大村らにより決定された。<sup>2)</sup> 生物活性については、表1および2に示すような高い抗菌活性 (最小発育阻止濃度: MIC) を示すばかりでなく、抗腫瘍活性および抗原虫活性を有することが明らかにされた。また1の活性発現の作用機序については小宮山らにより報告されており、細胞外壁上のリポタンパクに含まれるリン脂質との特異的結合により細胞壁内外のイオン透過性をこわし、細胞内の物質を流失させることによる細胞損傷をおこすことが明らかにされた。<sup>3), 4)</sup> これらの作用機序は構造的に大きく異なるポリエーテル系およびポリエン系抗生物質と類似しており興味深いものである。

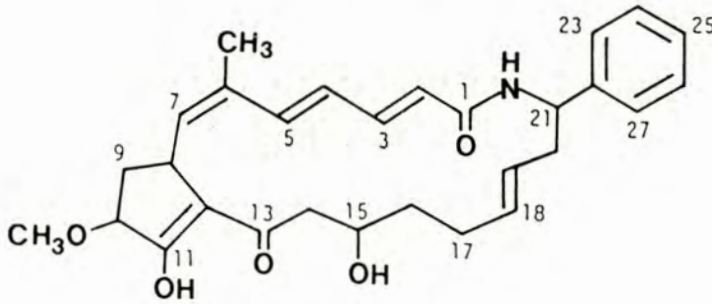


図 1 Hitachimycin (Stubomycin).

表 1 Antimicrobiol activites of hitachimycin

Test organisms	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
Bacillus subtilis PCI 219	0.4
Staphylococcus aureus FDA-209P	3.1
Mycobacterium smegmatis	3.1
Micrococcus luteus ATCC 1001	0.4
Escherichia coli NIHJ	>200
Pseudomonas aeruginosa	>200
Xanthomonas oryzae	>100
Candida albicans	>100
Saccharomyces sake	>200
Aspergillus niger	>100
Trichophyton interdigitale	6.3
Piricularia oryzae	3.2
Alternaria kikuchiana	6.3
Microsporium gypseum	12.5

表 2 Antitumor activities of hitachimycin

Treatment schedule	Dose (mg/kg/day)	Total dose (mg/kg)	MSD Ehrlich P388		I L S Ehrlich P388	
Untreated	—	—	19	12	—	—
Day 1	75	75	28(1)*	17	47	42
	150	150	51	17	168	42
	300	300	21	17	11	42
Day 1,5,9	25	75	33(1)	16	74	33
	50	150	16	15	-16	25
Day 1-9	8.8	75	21	15	11	25
	16.7	150	50(1)	11	163	-8
	33.3	300	33(1)	9	74	-25

MSD: Median survival day

ILS: Increased life span, express as percent increase over the untreated control mice.

\* Number of cured mice.

化合物 **1** は上記のように様々な生物活性を示すにもかかわらず利用されていない最大の問題点はその溶解性にあり、水系および有機系のいずれの溶媒にも溶けにくく(1000 $\mu$ g/ml以下)、溶媒に分散した状態で用いる投与方法しか見いだされなためである。また、この方法も高濃度においては投与部分に不溶性による蓄積が生じ幹部への到達量が投与量を反映せず、低濃度では懸濁剤そのものの毒性があらわれ明確な最適最大有効量を求めることが出来ない。

これらの問題点を改善するとともに実際の構造上の活性部位を明らかにすることを目的として、化合物 **1** を溶解性の高いアシル体に変換し構造を決定するとともにその活性を測定したので報告する。

### 結果および考察

化合物 **1** の分子中には水酸基が11位及び15位に依存するので、この部分についてのアシル化の反応性および生成物についての検討を行った。即ち、ピリジン溶媒中、塩基(4-ジメチルアミノピリジン)の存在下で、**1**に酸無水物(acetic anhydride, propionic anhydride, *n*-butylic anhydride)を加えると、いずれの場合にも3種類の反応混合物を与えた。これら3種の生成物はアシル基の炭素鎖が長くなるにつれて R<sub>f</sub> 値が上昇することから、化合物間の R<sub>f</sub> 値が離れた酸無水物として無水酪酸を用いた場合の生成物を分離して構造解析を行った。

反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=100:1)にて分離精製し、TLC(Benzene:Acetone=8:2)において R<sub>f</sub> 値 0.8, 0.7 および 0.6 を示す化合物を含む画分をそれぞれ分取し、濃縮乾固して化合物**2**(20mg, 13.8%), **3**(26mg, 23.4%) および**4**(8mg, 13.9%)を得た。

化合物 **2** はマスペクトルにおいて分子イオンピーク M<sup>+</sup> (m/z)617を示し、**1**と比較して 140 マスユニット大きく、ブチリル基が二個置換したことを示している。また、<sup>1</sup>H NMR においても二個のブチリル基に相当するシグナルが  $\delta$  0.92(t, J=7.4Hz, 3H), 0.99(t, J=7.4Hz, 3H), 1.60(tt, J=7.4Hz, 2H), 1.71(tt, J=7.4Hz, 2H), 2.20(t, J=7.4Hz, 2H), および 2.47(t, J=7.4Hz, 2H)に観測された。<sup>13</sup>C NMR においては Sp<sup>3</sup> 領域に INEPT スペクトルでメチルおよびメチレンと判断される6個のシグナル [ $\delta$ : 13.5, 13.7, (CH<sub>3</sub>), 18.5, 18.1, 35.8, 36.1, (CH<sub>2</sub>)], そして Sp 領域の  $\delta$ : 170.0, および 172.9 のエステルカルボニル炭素のシグナルの出現により二個のブチリル基の導入が示唆された。ブチリル基の **1** への置換位置としては11位, 15位の水酸基またはアミド窒素のいずれかで

あると考えられたが、IR スペクトル (KBr) で  $1640\text{cm}^{-1}$  (アミド I) および  $1530\text{cm}^{-1}$  (アミド II) の吸収が見られたことから、窒素原子への置換が生じていないこと、また  $1770\text{cm}^{-1}$  および  $1730\text{cm}^{-1}$  にエノールエステルおよびエステルの吸収が見られることから11位および15位の水酸基がアシル化されブチルエステルが生成していることが判明した。また、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおいて11位炭素のケミカルシフトが  $\delta_c$  185.5から  $156.2(\Delta-29.3)$  へと高磁場シフトし **1** のケトエノールの互変位可能なエノール形構造がエステル化によってエノールに固定された状態となったことを示すものである。また、15位炭素のケミカルシフト値は  $\delta$  68.1 から  $69.0(\Delta 0.9)$ 、と16位は  $39.1$  から  $36.3(\Delta -2.8)$  へと変化し、これは15位へのアシル基の置換による置換基効果 (いわゆる  $\alpha$ ,  $\beta$  シフト) と考えられる。このことより化合物 **2** の構造を 11,15-Di-O-butrylhitachimycin (**2**) と決定した。(図2)

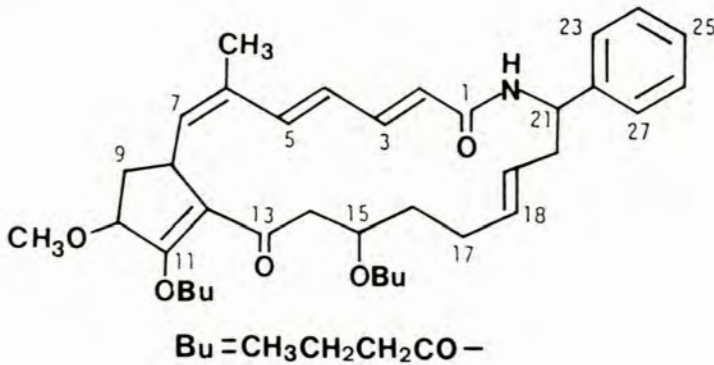


図 2

化合物 **3** はマスマスペクトルにおいて分子イオンピーク  $\text{M}^+$  ( $m/z$ )529 を示した。イオンピーク値より **3** は **1** にブチリル基が導入されたものから水分子 (18マスコット) が除かれた分子と推定される。 $^1\text{H}$  NMR では  $\delta$  1.01(t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H), 1.76(tt,  $J=7.4\text{Hz}$ , 2H), 2.58(t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 2H) にブチリル基に基づくシグナルが見られた。また、 $\delta$  6.06(d,  $J=15.2$ , 1H) および 6.18(ddd,  $J=15.2$ , 9.5 and 4.3Hz, 1H) に新たなシグナルが観測され **1** で見られた15位 ( $\delta$  3.90) のオキシプロトンが消失していた。同様に  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでもブチリル基のシグナル ( $\delta_c$  13.7, 18.0, 35.8 および170.5) が見られ、14位および15位にあたるメチレンおよびオキシメチン(**1**では  $\delta$  68.1および46.5) が消失し、新たに  $\text{Sp}^2$  領域に二個のシグナル ( $\delta$  123.8 および142.4) が見られた。あらたに生じた炭素のケミカルシフト値は **1** の構造上 **2** および **3** 位のそれと類似し、カルボニル基の  $\alpha$  お

よびβ位の値と一致する。また11位については、化合物**2**と同様に $\delta$  150.4( $\Delta$ -35.1)にシグナルが見られ、ブチリル基が導入されたことは明らかである。以上から11位にはブチリル基がまた、14,15位間には15位水酸基の脱離(βエリミネーション)が生じ二重結合と生ったことが推定され化合物**3**の構造を 11-*O*-Butyryl-15-dehydro-14-enohitachimycin(**3**)と決定した。(図3)

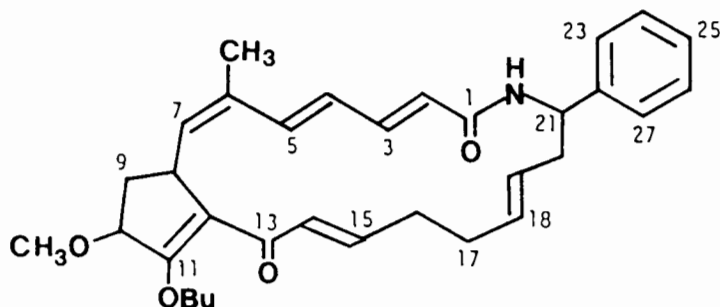


図 3

化合物**4**はマスペクトルにおいて分子イオンピーク  $M^+(m/z)687$  を示し、イオンピーク値より、**4**は**1**にブチリル基が3個導入したものであることがしめされた。IR スペクトル(KBr)で  $1530\text{cm}^{-1}$  (アミドII)の吸収が見られることより、ブチリル基はアミドには結合していない。また  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいては3個のブチリル基に相当するシグナルが見られ、また14位は $\delta$  5.15(d,  $J=8.2\text{Hz}$ , 1H), 15位は $\delta$  5.25( $\Delta$ 1.36, ddd,  $J=10.3$  and  $8.2\text{Hz}$ , 1H)に低磁場シフトしている。同様に $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでも3個のブチリル基によるシグナル(13.5,  $13.7 \times 2$ , 18.2, 18.5, 35.8, 36.1, 36.3, 170.1, 171.1, 172.5)が見られ、14位のメチレン炭素および13位のカルボニル炭素のシグナルが消え、二個のオレフィニック炭素( $\delta$  144.3 および120.1)が見られた。ケミカルシフト値より13および14位間で二重結合が形成され、13位部位がエノールエステルと成っているものと推定し以下に示す構造を提出した。

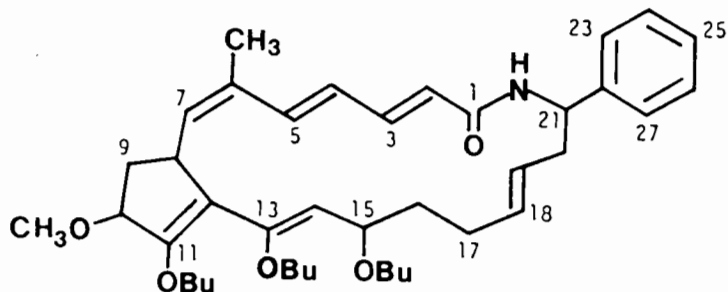


図 4

通常のアシル化合物(2)以外に化合物3, 化合物4が生成したが, これらは4-ジメチルアミノピリジンの塩基性によるものと考えられる。1では塩基による15位水酸基の脱離は生じないことから, 15位に脱離基(リービング グループ)としてブチリル基が結合して2が生成し, その後脱離が生じて3ができ, 一方, 2が生成した後, 塩基により13位

表3  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Chemical shift values of hitachimycins

Carbon No.	Hitachimycin (1)		2		3		4	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
-CONH-	5.40	167.6	5.56d	166.7	5.52d	166.7	5.48d	166.5
2	5.93	124.5	5.97d	124.6	5.95d	124.0	5.93d	124.1
3	7.25	141.9	7.20dd	141.2	7.42dd	142.1	7.23dd	141.9
4	6.40	127.8	6.34dd	127.3	6.44dd	127.9	6.37dd	127.1
5	7.08	136.9	7.07d	136.3	7.23d	136.7	7.07d	136.7
6	-	131.5	-	132.9	-	130.6	-	132.0
7	5.24	134.9	5.18d	134.2	5.49d	133.4	5.15d	135.6
8	4.10	35.1	4.21dd	38.1	4.18dd	33.5	3.98dd	39.5
9	★	35.5	★	36.0	★	35.3	★	35.5
10	4.50	81.2	4.98dd	81.1	4.03dd	81.8	4.88dd	80.1
11	-	185.5	-	156.2	-	150.4	-	149.3
12	-	112.6	-	128.4	-	122.9	-	123.8
13	-	196.5	-	194.7	-	200.7	-	144.3
14	★	46.5	★	47.2	6.06d	123.8	5.15cd	120.1
15	3.90	68.1	5.35	69.0	6.18ddd	142.4	5.25ddd	67.5
16	★	39.1	★	36.3	★	33.0	★	36.5
17	★	29.4	★	29.0	★	31.9	★	29.3
18	5.40	134.4	5.40	123.6	5.42	133.1	5.25	133.7
19	5.40	126.9	5.40	126.9	5.49	127.4	5.42	126.6
20	★	41.6	★	42.2	★	41.7	★	40.6
21	5.40	52.4	5.28	51.7	5.50	51.8	5.30	51.8
22	-	142.2	-	141.7	-	141.5	-	141.8
23		126.9		126.3		126.4		126.3
24		128.7		128.6		128.7		128.7
25	7.32 S	127.4	7.26 S s	127.3	7.34 s	127.4	7.33 s	127.3
26		128.7		128.6		128.7		128.7
27		126.9		126.3		126.4		126.3
6-CH <sub>3</sub>	1.90	20.0	1.87s	20.0	1.90s	20.3	1.89s	20.0
10-OCH <sub>3</sub>	3.58	58.1	3.34s	56.7	3.51s	58.1	3.26s	55.8

Bu (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-)

2 (δc) 13.5(q), 13.7(q), 18.1(t), 18.5(t), 35.8(t), 36.2(t), 170.0(s), 172.9(s)

3 13.7(q), 18.0(t), 36.8(t), 170.5(s)

4 13.5(q), 13.7(q)×2, 18.0(t), 18.2(t), 18.5(t), 35.8(t), 36.1(t), 36.3(t), 170.1(s), 171.1(s), 172.7(s)

★ signal unisolated from other one.

Chemical shifts in ppm are downfield from Me<sub>4</sub>Si.

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nmr spectra were measured in CDCl<sub>3</sub> with a Varian XL-400.

カルボニル基のエノール化が生じ水酸基が生成したところにアシル化がおこり **4** ができたものと推定した。これらの機構を検討すべく **2** について **1** と同様な条件のもとにアシル化を行った。その結果、TLC のクロマトスキャナーによるクロマトグラムより **2** から **3** , **4** への変換が同時に起こることを確認した。

表 4 Antimicrobial actiivities of hitachimycin derivatives

Compounds	2	3	4
Bacillus subtilis PCI 219	0.4	1.56	>50
Staphylococcus aureus FDA-209P	6.25	12.5	>50
Mycobacterium smegmatis	>50	>50	>50
Micrococcus luteus ATCC 1001	6.25	>50	>50
Escherichia coli NIHJ	>50	>50	>50
Pseudomonas aeruginosa	>50	>50	>50
Xanthomonas oryzae	>50	>50	>50
Candida albicans	>50	>50	>50
Saccharomyces sake	>50	>50	>50
Aspergillus niger	>50	>50	>50
Trichophyton interdigitale	25	>50	>50
Piricularia oryzae	6.25	50	>50
Alternaria kikuchiana	12.5	25	>50
Microsporum gypseum	>50	>50	>50

表 5 Cytocidal and hemolysis activities of hitachimycin derivatives

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Compound				
	1	2	3	4	
anti-HeLa	25.00	++++	++++	+++	+++
	6.30	+++	++++	++	++
	1.56	++	++++	-	-
	0.39	-	++	-	-
	0.10	-	-	-	-
hemolysis	25.00	+	-	-	-
	6.30	-	-	-	-
	1.56	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-



ブチリル基を導入した誘導体 **2**, **3** の細菌類に対する活性は何れも減少し, またグラム陰性菌に対する活性も **1** と同様に活性を示さない。その一方で *in vitro* における殺細胞作用は **2** では上昇を示した抗腫瘍剤の副作用として出現する溶血性 (hemolysis) については減少し目的の副作用の少ない抗腫瘍剤の方向に誘導されていることがうかがえる。今後, *in vivo* における活性結果が持たれる。水酸基のアシル化は活性上昇に有効であり, **1** に存在する置換基および構造を変化させた場合には活性低下することから今後母核を変化することなく種々の置換基の導入を検討する予定である。

## 実 験

本研究を行うにあたり, 理化学機器は以下のものを用いた。融点は谷沢社製 No.587305, また UV スペクトルは日立社製 124-spectrophotometer を用い, 吸収強度をモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) で表した。赤外吸収スペクトルは, 日立社製285 形赤外分光光度計を用い, ポリスチレンフィルムを外部標準として値を補正した。Mass スペクトルは, 日本電子社製 JMS D-100 及び DX-300 を用い 70eV にて測定した。NMR スペクトルはブルカ社製 AM400, バリアン社製 NM400 及び日本電子社製MX-60 を用い, 重クロロホルムを溶媒とし, また内部標準として TMS を用いた。

分離及び精製において, カラムクロマトグラフィーは和光純薬社製シリカゲルワコーゲル C-200 をまた分取用シリカゲルプレートはメルク社製 (No.5554, 0.05mm, F<sup>254</sup>) また反応検出用としてメルク社製アルミプレート (No.5554, 0.05mm, F<sup>254</sup>) を用いて行った。

*11,15-Di-O-butrylhitachimycin* (**2**), *11-O-Butryl-15-dehydroxy-15-dehydro-14-enohitachimycin* (**3**)  
そして *11,13,15-Tri-O-butryl-13-hydroxy-13-deoxo-13-enohitachimycin* (**4**)

ピリジン (2.0ml) 中に **1** (100mg,  $2.1 \times 10^{-4}$  mol) を溶解後, 無水酪酸 (0.5ml,  $3.1 \times 10^{-3}$  mol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (82mg,  $6.8 \times 10^{-4}$  mol) を加え, 室温にて1時間攪拌放置した。次いで反応を TLC で検出後, 反応液を冷水 (30ml) 中にあげ, さらにクロロホルムにて3回抽出を行った。抽出液を無水硫酸ナトリウムにて脱水し, 減圧下濃縮乾固した。得られた濃褐色粉末をシリカゲルカラムクロマトグラフィにて精製し, TLC (Benzen: Acetone=8:2 にて *R<sub>f</sub>* 値 0.8, 0.7, 0.6 をそれぞれ示す画分を濃縮して, **5**, (20mg, 13.9%), **6**, (26mg, 23.4%), **7**, (18mg, 13.9%) をそれぞれ得た。

- 2** : mp.182~185℃(decomp), Mass(m/z) 617(M<sup>+</sup>), IR (cm<sup>-1</sup>) 1730(ester), 1765 (ester), 1640(amide I ), 1620(C=O), 1530(amide II )
- 3** : mp.169~173℃(decomp), Mass(m/z) 529(M<sup>+</sup>), IR (cm<sup>-1</sup>) 1750(ester), 3100~3700(OH) 1580(C=O), 1620(amide I ), 1520(amide II )
- 4** : mp.126~128℃(decomp), Mass(m/z) 687(M<sup>+</sup>), IR (cm<sup>-1</sup>) 1760(ester) 1730 (ester), 1650(amide I ), 1530(amide II )

## 文 献

- 1) ŌMURA, SATOSHI., AKIRA. NAKAGAWA, KIYOSHI. SHIBATA and HIROSHI. SANO: The Structure of Hitachimycin, a Novel Macrocyclic Lactam involving β-phenylalanine. *Tetrahedron Lett.* 23 : 4713~4716 (1982)
- 2) UMEZAWA, IWAO.; HIDEO. TAKESHIMA, KANKI. KOMIYAMA, YOSHI. KOH, HIROSHI. YAMAMOTO and MASAE. KAWAGUCHI : A new Antitumor Antibiotic, Stubomycin. *J. Antibiotics* 34: 259~265 (1981)
- 3) KOMIYAMA, KANKI.; KEN-ICHI. EDANAMI, HIROSHI. YAMAMOTO and IWAO. UMEZAWA: Antitumor Activity of a New Antitumor Antibiotic Stubomycin. *J. Antibiotics* 35: 703~706 (1982)
- 4) KOMIYAMA, KANKI.; KENICHI. EDANAMI, AKIRA. TANŌH, HIROSHI. YAMAMOTO and IWAO UMEZAWA: Studies on The Biological Activity of Stubomycin. *J. Antibiotics* 36: 301~311 (1983)