

ISSN 0919-0023

鹿児島科学研究所研究報告

Bulletin of the Kagoshima Science Scholarship Foundation

No. 18

2008

財団法人 鹿児島科学研究所

The Kagoshima Science Scholarship Foundation

ま え が き

当財団法人では、鹿児島県内の産業振興に寄与するための科学的な研究で、とくに化学またはバイオに関する研究に対して、毎年助成を行っております。

この「鹿児島科学研究所研究報告」第18号は、当財団法人が平成19年度に助成を行った研究の成果を収録したものであります。

平成20年7月

財団法人 鹿児島科学研究所

理事長 福 谷 明

目 次

1. 独自開発した癌遺伝子治療ベクターの性能向上の研究
..... 1
鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科
室伏 善照 ・ 小賤 健一郎

2. 生体高分子を用いたガスセンサーの研究と開発
..... 7
鹿児島大学理学部生命化学科
前田 環

3. 農業害虫ベイト剤の誘引物質探索並びに新規化合物の探索
～海洋生物ヤギ目、*briareum* sp.由来のジテルペン化合物に関する研究～
..... 15
鹿児島大学理学部生命化学科
岩川 哲夫

4. 揮発性有効成分のマイクロカプセル化技術の開発
..... 27
鹿児島大学工学部応用化学工学科
吉田 昌弘

独自開発した癌遺伝子治療ベクターの性能向上の研究

室伏 善照、小賤 健一郎

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科
〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘八丁目 35-1
TEL : 099-275-5219

要旨

癌遺伝子治療法は、癌の根治療法として有望であるが、期待された成果が得られていない。これは、その根幹をなす遺伝子導入ベクターの欠点に起因すると考えられている。現在、増殖制御型アデノウイルス（CRA ; Conditionally replicating adenovirus）は、従来型ベクターの欠点を克服する画期的なベクターとして癌治療において最も有望と期待されているが、最大の問題の1つである「標準化作製技術がない」ことから、その作製及び研究は非効率であった。我々は、世界で初めての「多因子で精密に癌を標的化する CRA（m-CRA; CRA regulated with multiple cancer-specific factors）の迅速かつ効率的な標準化作製技術」を開発し、これを基盤として、これまで非常に困難であった m-CRA の作製に成功した。これらの m-CRA は、従来型 CRA を遥かに凌ぐ、次世代 CRA にあたる革新的な基盤技術である。本研究課題では、m-CRA のさらなる性能向上を目指すため、m-CRA 作製技術のさらなる効率化と m-CRA の改良に取り組んだ。

1. 緒言

癌遺伝子治療法は革新的治療法として期待され、今日までに多くの臨床試験がなされているが、これまで癌の根治に至る成果は得られていない。これは、根幹となる遺伝子導入ベクターの開発が不十分なため、遺伝子導入効率が低い点、特異性が低い点等が問題点であり、従来のいかなる非増殖型ベクターでも「全ての癌細胞への遺伝子導入が不可能であるため癌の再発に至る」という根本的な問題が克服できていないためである。この問題を克服するとして、増殖制御型アデノウイルス（CRA; Conditionally replicating adenovirus）は、癌細胞特異的に増殖して癌細胞だけを殺す、革新的な癌遺伝子治療法として開発された^{1),2)}。CRA はウイルス学に基づいた非常に優れた画期的なシステムであり、その開発が期待され、近年、多くの癌遺伝子治療の臨床試験が試みられているが、当初期待された成果が得られていない³⁾。これは、既存の多くの CRA は技術的な制約により、単一因子でのウイルス増殖制御や癌特異化にとどまり、「癌と正常の細胞を完全に識別する癌特異化が困難」なことから癌特異化が不十分となり、「正常細胞での僅かながらのウイルス増殖」という問題が未だ残るためである。また、この問題の根本にある「CRA の技術的な制約」の最大の要因は、「CRA に関して標準化できる作製法がないこと」であり、このことが、CRA の基礎研究が進まない原因となっていた。そこで、我々は、これらの問題を根本的に解決する、異なる複数の癌特異化因子による精密なウイルス増殖制御と癌特異化を可能とする CRA（m-CRA; CRA regulated with multiple cancer-specific factors）の迅速かつ効率的な世界で初めての標準化作製法を開発した⁴⁾。

我々が独自開発した m-CRA 標準化作製技術は、アデノウイルスベクターのウイルス増殖制御部、治療（導入）遺伝子、アデノウイルスゲノムの3要素を独立した「パーツ」にして個別の自由設計を可能とし、最終的に簡単かつ確実にこの3パーツを「融合」という全く新しい発想と独創的なシステムであり、迅速かつ効率的な m-CRA の作製が可能となった (Fig. 1)。実際にこの技術を基盤として作製した Survivin 依存性 CRA は、既存の CRA^{1),5)-10)}のうちで、これまでに癌遺伝子治療で最も有用であったテロメラーゼ依存性 CRA¹¹⁾⁻¹³⁾を癌治療効果と癌特異性の両面で凌ぐ成果を得た¹⁴⁾。このことから、独自開発した m-CRA 標準化作製技術の有用性は実証された。ここで、我々は、m-CRA のさらなる性能向上を目指し、m-CRA 作製技術の効率向上と m-CRA の改良の達成を試みた。

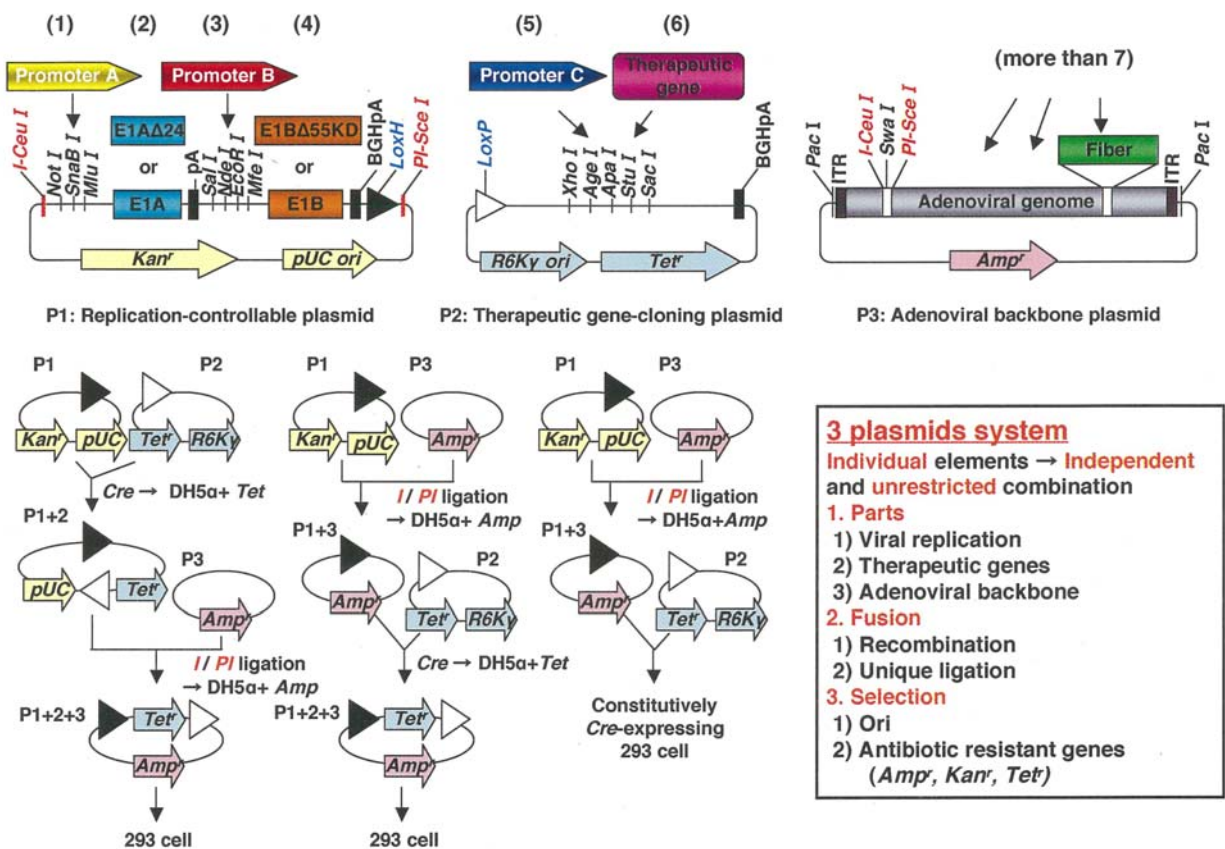


Fig. 1 Our original method for efficiently constructing diverse m-CRAs: 3 plasmids system. Elements involving viral replication, therapeutic genes, and adenoviral backbone were separately introduced into 3 plasmids of P1, P2, and P3, respectively, which comprised different sequence. Independently constructed plasmids were combined at high accuracy by transformation with Cre and specific antibiotics in specific Escherichia coli; transfection of the resulting P1+2+3 plasmids into 293 cells efficiently generated m-CRAs. Moreover, the simultaneous generation of diverse types of P1+2 and P3. Alternatively, co-transfection of P1+3 and P2 plasmids into Cre-expressing 293 cells directly generated m-CRA with therapeutic genes. Thus, our 3 plasmids system, which allows unrestricted construction and efficient fusion of individual elements, should expedite the process of generating, modifying, and testing diverse m-CRAs for the development of the perfect CRA for cancer therapy.

2. 実験

2.1. m-CRA 作製技術の効率向上

Fig. 1 における P1、P2 と P3 の各パーツ内のユニークサイト (MCS; multi-cloning site) を増加することにより、m-CRA の作製及び改変の簡便性ならびに確実性の向上を試みた。はじめに、m-CRA の作製及び改変で最も組換えの頻度が多く、さらに特異性に直接関与する、m-CRA の増殖制御領域である P1 内の MSC の検討を行った。Promoter A、Promoter B を欠損した P1 のシーケンス解析より候補となる制限酵素サイトを選択し、Promoter A を組込む MCS には新たに 5 つの制限酵素サイトを、Promoter B を組込む MCS には新たに 4 つの制限酵素サイトを組込むように、それぞれ oligonucleotide での設計を計画した。

2.2. m-CRA の改良

近年、癌特異性の向上について、従来の新規プロモーターの応用に加えて、アデノウイルスの遺伝子導入に関与するファイバーの改変の研究も盛んに行われている^{15,16}。これは、アデノウイルスのファイバーである coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を介した遺伝子導入に加えて、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列によるアデノウイルスと細胞の親和性の向上による遺伝子導入効率の向上を試みたものである。

我々は、より幅広い癌を治療対象とするために必要となる高効率の遺伝子導入を得るため、RGD 配列によるファイバー改変の有用性を検討した。はじめに、遺伝子導入効率の視覚化を可能とする EGFP (enhanced green fluorescent protein) を発現する非増殖型アデノウイルス (Ad.EGFP) と RGD 改変型 (Ad.EGFP-RGD) を癌細胞 X、Y に MOI (multiplicity of infection) 0.1、1、10、30 で感染させて導入効率を解析した。

同時に RGD 改変型 m-CRA を作製するため、これまでに m-CRA 作製技術を基盤として作製し、有用性を示した種々の m-CRA の RGD 改変型への改変を順次行った。

3. 結果

3.1. m-CRA 作製技術の効率向上

P1 の Promoter A 及び Promoter B を組込む MCS について検討、設計した制限酵素の配列による各プロモーターの発現に影響を及ぼす可能性の検討を合わせて行う必要があるため、設計した oligonucleotide の配列を中心に、さらにより有用性の高い MCS の検討を行う必要があった。

3.2. m-CRA の改良

今回行った癌細胞 X、Y における、Ad.EGFP 及び Ad.EGFP-RGD の遺伝子導入効率の比較、検討を行った結果、癌細胞 X で僅かながら Ad.EGFP-RGD で少なくとも 5%以上の遺伝子導入効率の向上がみられた (data not shown)。今回の実験条件は再検討する必要があったが、僅かでも RGD 改変で遺伝子導入効率が向上することが示唆されたことから、m-CRA を RGD 改変することで m-CRA の感染効率ならびに増殖能の向上が期待できると思われた。したがって、現在行っている RGD 改変型 m-CRA の作製は有意義であり、今後得られる RGD 改変型 m-CRA の有用性は期待できるものと思われた。

4. 考察

本研究課題は、我々が独自開発した m-CRA 作製技術の効率向上と m-CRA の性能向上を目指し、基盤技術ならびに m-CRA のさらなる改良を目的とするものであり、本報告は、その開発経過と有用性を報告するものである。

本基盤技術である m-CRA 作製技術は、現在複数の m-CRA の同時作製を可能とする唯一の技術であり、これまで不可能であった、複数の m-CRA を同時に比較、検討することが可能になった。このことから、m-CRA 作製技術のさらなる効率化は、癌遺伝子治療法の開発と発展につながるものと考えられる。また、すでに開発した Survivin 依存性 CRA が有用な癌治療薬となり得ることから、本研究課題で期待された成果が得られたとき、性能向上化 m-CRA そのものが非常に有用な癌治療薬となると考える。以上のことから、m-CRA の性能向上の試みは、癌治療の発展につながり、「癌の根治」という社会的要望に応え得ることからも非常に有意義であり、また将来的に鹿児島島の癌医療向上に寄与できるものと考えられる。

5. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究費助成を頂いた財団法人鹿児島科学研究所に心より深謝申し上げます。

6. 引用文献

1. Bischoff, J. R. et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 373-6 (1996).
2. Alemany, R., Balague, C. & Curiel, D. T. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 18, 723-7 (2000).
3. Everts, B. & van der Poel, H. G. Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther* 12, 141-61 (2005).
4. Nagano, S., Oshika, H., Fujiwara, H., Komiya, S. & Kosai, K. An efficient construction of conditionally replicating adenoviruses that target tumor cells with multiple factors. *Gene Ther* 12, 1385-93 (2005).
5. Fueyo, J. et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19, 2-12 (2000).
6. Heise, C. et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 6, 1134-9 (2000).
7. Rodriguez, R. et al. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 57, 2559-63 (1997).
8. Hallenbeck, P. L. et al. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 10, 1721-33 (1999).
9. Adachi, Y. et al. A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Res* 61, 7882-8 (2001).
10. Nettelbeck, D. M., Rivera, A. A., Balague, C., Alemany, R. & Curiel, D. T. Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the

- tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* 62, 4663-70 (2002).
11. Huang, T. G., Savontaus, M. J., Shinozaki, K., Sauter, B. V. & Woo, S. L. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Gene Ther* 10, 1241-7 (2003).
 12. Wirth, T. et al. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res* 63, 3181-8 (2003).
 13. Kim, E. et al. Ad-mTERT-delta19, a conditional replication-competent adenovirus driven by the human telomerase promoter, selectively replicates in and elicits cytopathic effect in a cancer cell-specific manner. *Hum Gene Ther* 14, 1415-28 (2003).
 14. Kamizono, J. et al. Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication. *Cancer Res* 65, 5284-91 (2005).
 15. Dmitriev, I. et al. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 72, 9706-13 (1998).
 16. Nakamura, T., Sato, K. & Hamada, H. Effective gene transfer to human melanomas via integrin-targeted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 13, 613-26 (2002).

Improvement of original conditionally replicating adenovirus for cancer gene therapy

Yoshiteru Murofushi, Ken-ichiro Kosai

Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan

Abstract

Recently, the cancer gene therapy is promising as a radical treatment of the cancer, but the result expected is not achieved. This suggests that it is a cause that the gene transduction vectors which compose the base is insufficient. Currently, whereas conditionally replicating adenovirus (CRA) is most promising and expected as the epoch-making vector overcoming the defects of the conventional vectors in cancer therapy, the inefficiency of the construction and the research of them were caused by one of the biggest problems, “There is no standard method for constructing CRA”. We developed the first “A rapid and efficient method for constructing CRA regulated with multiple cancer-specific factors (m-CRA) that specifically target cancer cells” and could generate m-CRA that was very difficult to construct. These m-CRAs are superior to the conventional CRAs and innovative basic technologies generating the next generation of CRA. To improve the performance of m-CRAs, we here addressed the increasing efficiency of method for constructing m-CRA.

生体高分子を用いたガスセンサーの研究と開発

前田 環

鹿児島大学理学部生命化学科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-2 1-3 5

TEL : 099-285-8102

要旨

本研究は、生体内における酸素分子キャリアとして知られるヘモグロビンやミオグロビン等のタンパク分子が一酸化炭素に対して高い選択性を持つという特徴を生かし、電気化学的な方法と組み合わせることで高い選択性を持ち、簡便、迅速かつ精密に血中や気相中の一酸化炭素などの有毒ガス濃度を定量できる方法の開発を目指すものである。従来の CO ガスセンサーは固体表面での触媒反応を利用する接触燃焼方式であるが他の燃焼性のガスの影響を受けやすいという選択性の点で問題がある。本研究では生体内における酸素分子キャリアとして知られるヘモグロビンやミオグロビンなどのタンパク分子と酸素分子や一酸化炭素分子との強い相互作用を検出に利用することにより、大がかりな装置を必要とせず携帯可能であるが、選択的に高いガス分析装置の開発を目指すものである。また火災や事件現場では迅速性を要求されることから大がかりな装置を利用した精密な測定法は利用出来ないため、携帯性を重視した簡便な方法が求められる。

本研究では、表面に自己組織化単分子膜 (SAM, Self Assembled Monolayer) を形成した金基板のセンサーとしての有効性を確かめるため、モデル物質として 11-メルカプトウンデカン酸を用いて電位応答性の検討を行い、FTIRAS による表面状態の調査を行った。

1. 緒言

ヘモグロビンは酸素キャリアとしての役割を持つが、呼気から血液中に溶解した一酸化炭素と強く結合するため生体各所に酸素を運搬することができず、空気中に 0.4% 程含まれると概ね 30 分程度で人は死に至る。一酸化炭素は酸素分子と類似した構造の低分子気体であるが無色、無臭の有毒ガスで気付きにくく火災のときの悲惨な死因の半数を占める。そのため携帯可能で簡便、迅速かつ精密に大気中、血中や気相中の一酸化炭素などの有毒ガス濃度を定量できる方法の開発が望まれる。ナノスケールの精密さは要求されるが大がかりな装置ではないため開発が成功すれば鹿児島県内の企業でも生産可能と思われ地場産業育成に役立つと思われる。小型で取扱が簡便でかつ、選択性を高めることで防災、医療、犯罪捜査、環境計測分野から家庭内での利用まで幅広い用途が期待できる。研究の中心は装置の中核部となり高選択性センサー部分を構成する、ガス感応性バイオチップの研究と開発である。この部分は電極表面に構築した自己組織化単分子膜とガス分子受容体としてセンサーの役割を担うヘモグロビン分子からなる。ヘモグロビンは等電点 pH が 6.8-7.0 の荷電高分子であり pH により正味の電荷密度が変化し表面電位の変化を引き起こす。また、そのコンホメーションは pH の影響を受け酸性領域でアンフォールディングを起こし、酸素の結合力が低下することが知られている。したがってヘモグロビンをセンサーとして利用するためには pH の効果を調べる必要がある。

当研究室ではこれまで分光学的方法、電気化学的方法その他の手法を用いることにより自己組織化単分子膜表面の環境評価について基礎的な研究を行ってきた。SAM は膜形成物質を溶解した溶媒中に金基板を浸すだけで調製可能である。



ω 位に機能性の官能基を導入することによって固体表面や粉体表面の性質を変えることができるため多方面での応用が期待されるため近年急速に発展してきたナノテクノロジーの分野において注目をあびている。

また、応用と同時に基礎的な研究も進められている。表面の濡れ特性や接着性の制御、表面修飾により媒体中での各種反応をコントロールすることが期待されるため、SAM の基本的性質を知ることは重要である。ガスとの相互作用に伴うヘモグロビン部分の環境変化を電気化学的手法を用いて電気信号に変換することで小型の装置を開発できる。

本研究では荷電基周辺の環境変化が表面電位に及ぼす効果を調べるため、SAM 形成試薬である ω 位にカルボキシル基を荷電基として持つ 11-メルカプトウンデカン酸 (11-mercaptoundecanoic acid, MUA) と荷電基をもたない n-ドデシルメルカプタン (n-Dodecyl mercaptane, nDM) を最も単純なモデル物質として選んだ。これらの SAM で修飾した金電極を用い、溶液の pH の変化と SDS 添加による表面環境の変化に対する

電位応答性より SAM 表面に存在する解離基状態の変化を調べた。SDS はタンパクの変成剤としても利用される鎖長 12 の典型的な陰イオン性界面活性剤であり、疎水相互作用や静電相互作用により結合部位の極性環境を変化させるために使用した。

2. 実験

除酸素した 10mM の MUA ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$, 95% 以上/ Aldrich) を含むメタノール溶液中に金基板を N_2 雰囲気下で 24 時間浸することで MUA-SAM を金基板上に形成した。nDM-SAM も同様にして調製した。物理吸着した MUA 分子を除去するため、調製した MUA-SAM をメタノールと多量の超純水でリンスした。金基板に作製した SAM 表面の環境変化を検出するため起電力測定装置を組み立てた。電極は 1 mm ϕ の金線の先端を酸素バーナーで熔解し球状 ($d \approx 3 \text{ mm}$) にしたものを使用した。参照電極は Ag-AgCl 電極を利用し、起電力測定は HORIBA pH/ION METER F-24 を用い、全ての測定は 25°C の恒温槽中

で N_2 雰囲気下で行った。表面解離基の FT-IRAS 測定は、Perkin Elmer の FTIR 分光光度計 Spectrum One A を使用した。

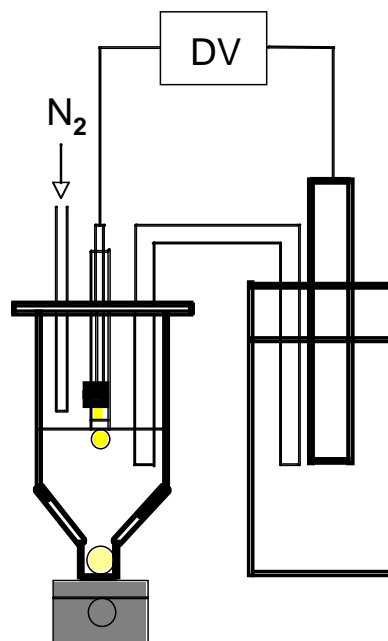


Fig. 1 Electrical cell system for emf measurements of SAM modified gold electrode.

3 結果および考察

3-1 MUA-SAM 金電極の起電力におよぼす SDS の添加効果

SAM 表面に位置する MUA 解離基の環境が SDS 添加によりどのような影響を受けるか調べるため、MUA-SAM 修飾金電極の起電力変化を測定した。SDS 濃度は、低濃度→高濃度方向へ変化させた。測定開始前に金電極を SDS 溶液に浸しコンディショニングを行った。図 2 はコンディショニング時間が 2.5 時間と 8 時間の結果を示す。コンディショニング時間を変えるだけでスタート電位が約 120mV も差があり、電位の立ち

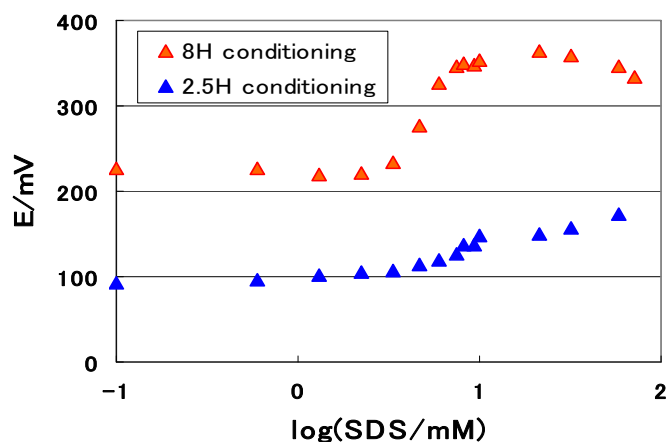


Fig. 2 Effects of the conditioning time on emf profiles.

上がり方も異なることが判る。以降の実験では大きな起電力変化を示した 8 時間コンデンシヨニングを採用した。

図 3 は SDS 添加による MUA-SAM 修飾金電極の起電力変化を異なる 3 種類の pH (pH=1.7, 5.5, 11.5) で比較したものである。図中の矢印は cmc を示す。pH によりその挙動が大きくことなることが判る。電位変動の大きい pH1.7 以外は何れも特徴のある変化を示している。cmc 以上ではいずれも SDS 濃度の増加に伴い正側への起電力のシフトが見られるが、cmc 以下では pH により挙動が異なる。pH5.5 では起電力の変化は極めて小さいのに対し pH11.5 のアルカリ性環境では SDS 濃度の増加により規則的に負側にシフトする。アルカリ性環境では ω 位のカルボキシル基は完全解離し負荷電であり、同じ負荷電の SDS 分子との静電反発が予想されるが濃度の増加と共にその吸着量が増加していることを示唆している。この結果は pH5.5 の表面環境に比べてアルカリ領域の表面環境がより SDS との相互作用が大きいことを示す。

SAM 表面の荷電基の効果を検討するため、表面に荷電基を持たない nDM-SAM における起電力測定結果を図 4 に示した。nDM-SAM 金電極の挙動は MUA-SAM 金電極のそれと似た挙動を示した。

pH5.5 の場合、nDM-SAM 電極の起電力は MUA-SAM より負にシフトし、pH12.5 の場合電位の負側へのシフトが小さく SDS 濃度による電位変化も小さい。これらの電位挙動の違いは、nDM-SAM が MUA-SAM に比べて荷電を持たず高いパッキング密度を持つため、SAM を構成する nDM 分子間への SDS の分配が起こりにくく、一方 MUA-SAM では 解離基間静電反発のため

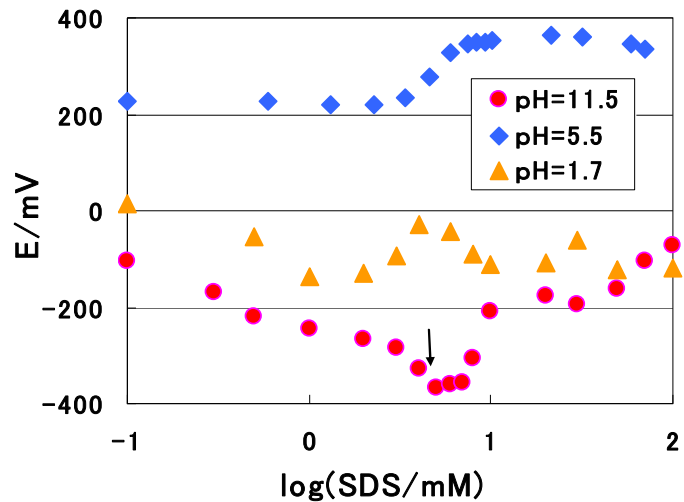


Fig.3 Emf profiles measured with MUA-SAM electrode at different pH.

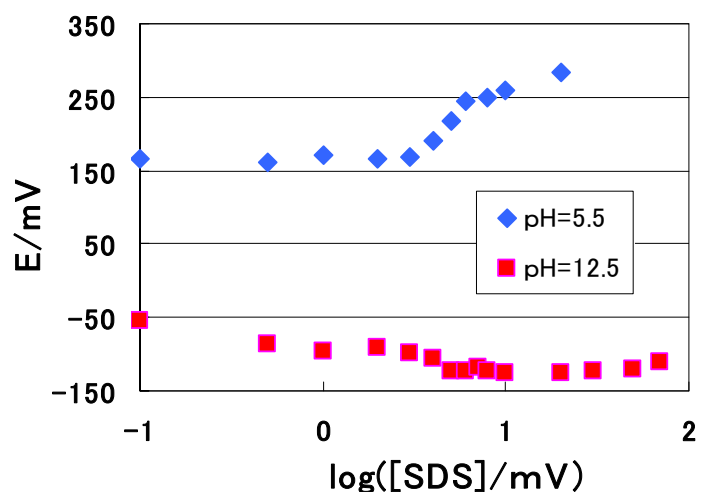


Fig.4. Emf profiles measured with nDM-SAM electrode at different pH.

SAM 表面構造が乱れ分配し易いことを反映していると思われる。

3-2 FT-IRAS の測定

SAM 表面の環境変化による解離基の状態を調べるために FT-IRAS の測定を行った。

図 5 は MUA-SAM と nDM-SAM の FT-IRAS 測定結果である。MUA-SAM のスペクトルには、 $-\text{CH}_2-$ 基と $-\text{COOH}$ 基による吸収ピークが存在し、一方 nDM-SAM には $-\text{CH}_3$ 基の吸収ピークが存在することより、また $-\text{SH}$ の吸収ピーク 2550cm^{-1} が見られないことから、MUA-SAM と nDM-SAM の形成が確認できる。また $-\text{CH}_2-$ の伸縮振動の波数が MUA-SAM (2848cm^{-1}) に比べて nDM-SAM (2840cm^{-1}) では低波数にシフトしていることは nDM-SAM の方が欠陥や乱れが少ないことを示す。

図 6 にそれぞれ 0.1mM 、 10mM 、 100mM の SDS 溶液中に MUA-SAM を浸漬した後気相中で測定した FT-IRAS の結果を示した。

0.1mM SDS では、SDS 添加前後でスペクトルに大きな変化は見られず SDS 分子の吸着を示す $-\text{CH}_3$ の吸収ピークも観測されなかった。しかし、 10mM 、 100mM と SDS 濃度を増していくと、 $-\text{CH}_3$ の吸収ピークが検出されるようになり、 10mM からは SDS 分子の $-\text{S}=\text{O}$ の吸収ピークも観測された。これらの結果は SDS 濃度の増加につれ SDS 分子の SAM 表面への吸着がおこることを示している。また、 10mM では COOH と COO^- のピーク強度はほぼ等しいが、

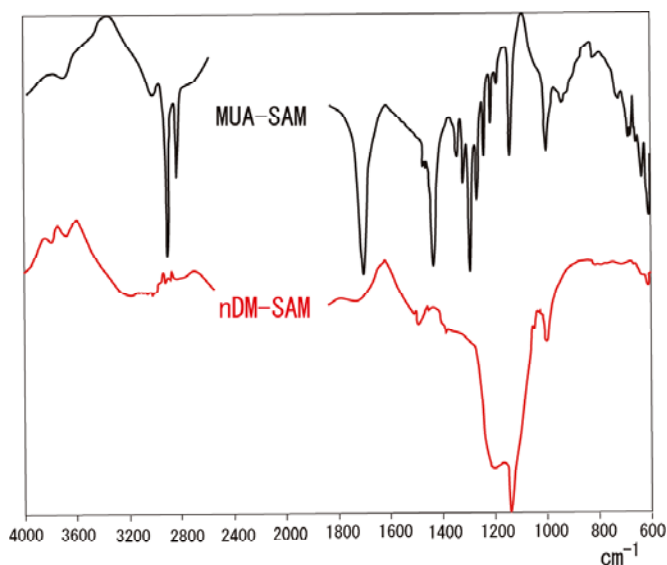
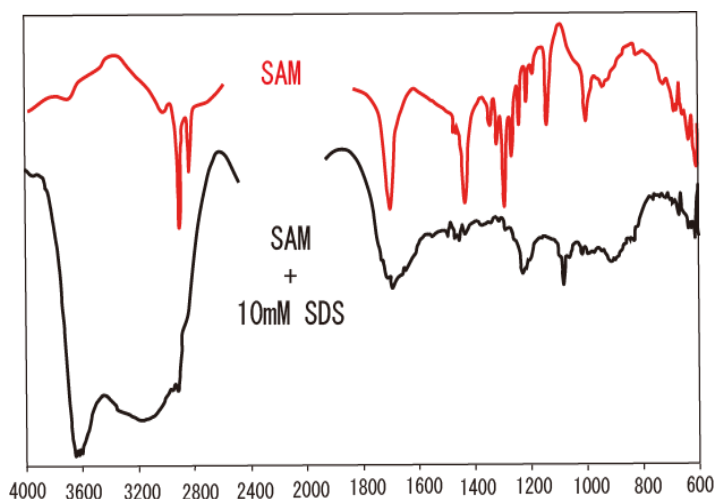
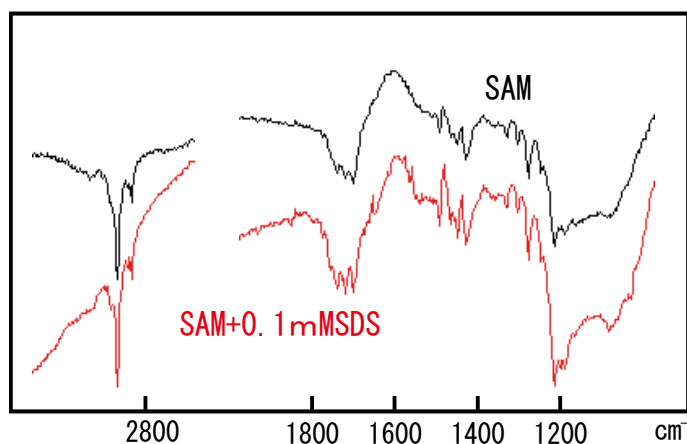


Fig.5 Characteristic features of FT-IRAS of MUA-SAM and nDM-SAM.



100mMでの強度比はCOOH<COO⁻である。これらの結果は、SDS濃度の増加に伴うSDSの吸着量の増加によりCOOHの解離が進むことを示唆する。以上の結果よりSDS添加による起電力の変化はSAM表面へのSDSの吸着と、その結果としておこる表面の極性環境の変化によるCOOHの解離の効果を含むことが判る。

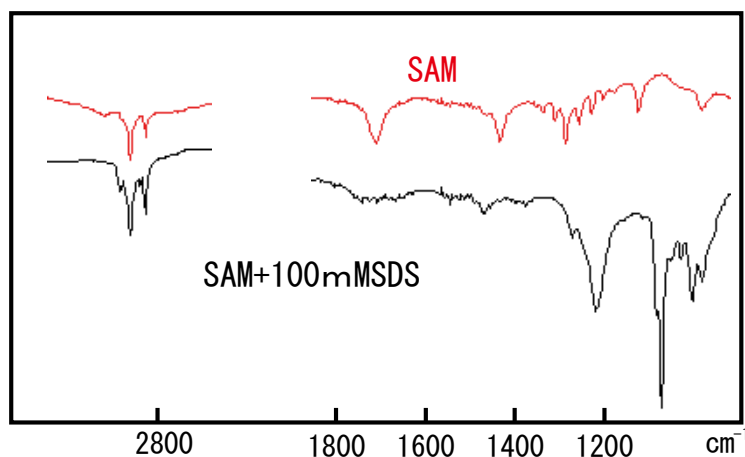


Fig.6 IRA spectrums of MUA-SAM in the presence and absence of different concentrations of SDS.

電極表面に固定した官能基周囲の環境変化に伴う起電力応答性について今回得られた基礎的な知見をもとに、より複雑な系であるヘモグロビンを表面に導入した系について今後研究予定である。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいた財団法人鹿児島科学研究所に篤く感謝申し上げます。

5. 参考文献

- (1) Effect of Amphiphiles on Dissociation of Surface Carboxyl Group of SAM Modified Electrode, 自己組織化膜修飾金電極の表面カルボキシル基の解離に及ぼす両親媒性物質の効果, ○富來秋子・前田環, 第 58 回コロイドおよび界面化学討論会要旨集, 406 (2005)
- (2) Effect of ambient environment on dissociation behavior of self assembled membrane of 11-mercaptoundecanoic acid on gold electrode, 11-Mercaptoundecanoic acid 自己組織化単分子膜の解離挙動に及ぼす周囲環境の効果, ○富來秋子・古江麻衣子・前田環, 第 59 回コロイドおよび界面化学討論会要旨集, 515 (2006)

Studies on surface environments around the MUA-SAM modified gold electrode for the development of gas-sensors utilizing biopolymer

Tamaki Maeda

Department of Chemistry and BioScience, Faculty of Science, Korimoto,
Kagoshima University Kagoshima 890-0065, Japan

For the developments of electrochemical gas-sensing devices of high sensitivity utilizing biopolymers, SAM modified gold electrode was prepared by immobilizing the self assembled monolayer of mercaptoundecanoic acid (MUA-SAM) on it. Characteristic properties of the MUA-SUM modified gold electrode were measured potentiometrically as a function of three kinds of pHs (2.2, 7.0, 11.0) and surfactant (SDS) concentrations ranging from far below the cmc ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) to those above the cmc ($1 \times 10^{-1}\text{M}$). FT-IRAS spectra indicated the evidence of environmental change around the omega-functional groups resulting from the surfactant adsorption on SAM. Emf profile of MUA-SAM modified gold electrode was discussed by considering the surface charge of adsorption layer.

農業害虫ベイト剤の誘引物質探索並びに新規化合物の探索

ー海洋生物ヤギ目、*Briareum* sp. 由来のジテルペン化合物に関する

研究ー

岩川 哲夫

鹿児島大学理学部生命化学科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-35

TEL 099-285-8115

奄美大島産ヤギ目、*Briareum* sp. のメタノール抽出部ジクロロメタン可溶部から新たに新ブリアラン型ジテルペン、briarlides I-K (1-10) を 10 種単離し、それらの構造を明らかにしたので報告する。

1. 緒言

当初、『農業害虫ベイト剤の誘引物質探索ならびに新規化合物の探索』のテーマで研究を行う予定であったが、ベイト剤用誘引物質探索は諸般の事情により検討に至らず次年度に持ち越す。今回は「海洋生物ヤギ目、*Briareum* sp. 由来のジテルペン化合物に関する研究」について報告する。

Briareum 属 (Family Goronacea) に属するヤギ目の軟体サンゴは、高度に酸素化されたブリアラン型ジテルペンを産生し、しかもそれらは細胞毒性、¹⁾⁻²⁾ 抗炎症性、³⁾⁻⁵⁾ 抗ウイルス性、抗殺虫性、⁷⁾⁻⁸⁾ および抗付着性活性⁹⁾ のような活性を示す、興味深い化合物群である。

私たちはこれまで、奄美大島産の *Briareum* 属のメタノール抽出部ジクロロメタン可溶部から細胞毒性を示す 8 種のブリアラン型ジテルペン、briarlides A (1)-H (8) を単離し、構造と活性の相関を明らかにしてきた。¹⁰⁾ 更にジクロロメタン抽出部を精査した結果、10 種の新ブリアラン型ジテルペン、briarlides I-K (1-10) を単離したのでその構造について報告する。

2. 実験

奄美大島で採取された *Briareum* sp. (wet weight: 1.7 kg, collection no. 262) を細断し MeOH で 3 回抽出した。MeOH 抽出部を水に溶解し CH₂Cl₂ で抽出した。その CH₂Cl₂ 可溶部 (15.4 g) うち 5.2 g をシリカゲル 40 g を使用し、カラムクロマトグラフィーを行った。溶出溶媒を 100 mL ごと、19 フラクションに分画した： 1-2 (CH₂Cl₂-*n*-hexane, 4:1), 3-4 (CH₂Cl₂), 5-6 (MeOH-CH₂Cl₂, 1:49), 7-11 (MeOH-CH₂Cl₂, 1:19), 12-13 (MeOH-CH₂Cl₂, 1:9), 14-17 (MeOH-CH₂Cl₂, 1:4), 18-19 (MeOH)。フラクション 5-12 (4.4

g)を CH_2Cl_2 -MeOH の溶媒系で再びシリカゲルクロマトグラフィーを行い、引き続き MeOH- H_2O および CH_3CN - H_2O の溶媒系を用い HPLC (ODS)で精製することにより、新規化合物を単離した：化合物 **1** (1.2 mg), **2** (0.9 mg), **6** (1.7 mg), **7** (9.8 mg), **8** (17.0 mg), **9** (1.6 mg)。ジクロロメタン抽出部(9.9 g)を上記と同じ方法でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、フラクション 5-13 (7.3 mg)をシリカゲルクロマトグラフィーや HPLC によって、化合物 **3** (2.8 mg)と **5** (1.3 mg)が得られた。

Briarlide I (1): amorphous, $[\alpha]_D +27^\circ$ (*c* 0.06, MeOH); IR (film) ν_{max} 3538, 1788, 1746, 1221 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 707.3275 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{O}_{14}$, 707.3279).

Briarlide J (2): amorphous, $[\alpha]_D +13^\circ$ (*c* 0.07, MeOH); IR (film) ν_{max} 3503, 1782, 1740, 1215 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 539.2102 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_{12}$, 539.2128).

Briarlide K (3): amorphous, $[\alpha]_D -74^\circ$ (*c* 0.14, MeOH); IR (film) ν_{max} 3549, 1784, 1744, 1238, 1213 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 567.2461 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_{12}$, 567.2442).

Briarlide L (4): amorphous, $[\alpha]_D -45^\circ$ (*c* 0.07, MeOH); IR (film) ν_{max} 3549, 1784, 1744, 1238, 1213 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 649.3221 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_{12}$, 649.3224).

Briarlide M (5): amorphous, $[\alpha]_D +52^\circ$ (*c* 0.06, MeOH); IR (film) ν_{max} 3420, 1782, 1738, 1213 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 595.2759 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_{12}$, 595.2755).

Briarlide N (6): amorphous, $[\alpha]_D -83^\circ$ (*c* 0.07, MeOH); IR (film) ν_{max} 3547, 1784, 1744, 1236 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 565.2275 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_{12}$, 565.2285).

Briarlide O (7): amorphous, $[\alpha]_D -106^\circ$ (*c* 0.12, MeOH); IR (film) ν_{max} 3515, 1782, 1742, 1248, 1213 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 649.3228 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_{12}$, 649.3224).

Briarlide P (8): amorphous, $[\alpha]_D +49^\circ$ (*c* 0.39, MeOH); IR (film) ν_{max} 3504, 1782, 1742, 1248, cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 587.2108 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{12}\text{Na}$, 587.2104).

Briarlide Q (9): amorphous, $[\alpha]_D -50^\circ$ (*c* 0.08, MeOH); IR (film) ν_{\max} 3522, 1786, 1745, 1215 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 631.3094 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_{12}$, 649.3224).

Briarlide R (10): amorphous, $[\alpha]_D +120^\circ$ (*c* 0.06, MeOH); IR (film) ν_{\max} 3526, 1784, 1732, 1242, 1215 cm^{-1} ; ^1H NMR (see Table 1); ^{13}C NMR (see Table 2); positive-ion HREIMS m/z 507.220 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_{10}$, 507.2230).

3. 結果および考察

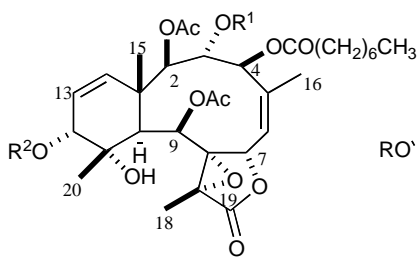
Briarlides I-R (1-10)は、8,17-epoxy 基および9-acetyl 基が存在する一般的なブリアラン骨格をもっている。全体構造は、1D NMR (Tables 1 & 2) および ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC, NOESY などの 2D NMR 実験によって決定され、それらの構造は、6員環の違いに従って、二つのクラスに分けることができた。一つのクラスはC-11, 12-が酸化され、C-13, 14 二重結合をもつ化合物であり、briarlides I-N (1-6) が属する。二番目のクラスはbriarlides O-R (7-10)が属し、C-11, 12 二重結合と14-acetyl 基をもっている化合物である。

Briarlide I (1)は、白色固体として単離され、その分子式は高分解FBMSによって $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{O}_{14}$ であると決定された。IR スペクトルによって、tertiary hydroxyl 基(ν_{\max} 3538 cm^{-1})、 γ -lactone carbonyl(ν_{\max} 1788 cm^{-1})、および ester carbonyl (ν_{\max} 1746 cm^{-1})の存在が示された。 ^1H NMR スペクトルからは、4個の acetyl protons (δ 2.02 x 2, 2.15, 2.31, 3H each, s) および octanoyl protons (δ 0.88, 3H, t, $J = 6.8$ Hz, 1.27, 8H, m, 1.56, 2H, overlapped, δ 2.25, 2H, dt, $J = 3.3, 7.3$ Hz)に起因する共鳴が見られた。H-2 から H-4、H-6 から H-7、H-9 から H-10、そして H-12 から H-14 の配列は ^1H - ^1H COSY スペクトルから確認された。 ^1H NMR スペクトルの化学シフトやカップリングパターンは、H-3 (δ 6.09, 1H, dd, $J = 1.7, 10.6$ Hz) が briarlide D (11)¹⁰⁾のそれと比べて 1.25 ppm だけ低磁場シフトをしていることを除いて酷似していた。それ故、1の構造はC-2, C-3, C-4, C-9 および C-12 がアシル化された、3-acetylriarlide Dであると帰属された。

Briarlide J (2)、 $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$ 、の IR スペクトルによって、hydroxyl 基 (ν_{\max} 3503 cm^{-1})、 γ -lactone carbonyl (ν_{\max} 1782 cm^{-1}) および ester carbonyl (ν_{\max} 1740 cm^{-1})の存在が明らかになった。3個の acetyl 基 (δ 2.13, 2.22, 2.27, 3H each, s)が C-2, C-4, および C-9 の位置に結合していることが、H-2 (δ 4.70, 1H, s), H-4 (δ 4.86, 1H, overlapped), および H-9 (δ 5.92, 1H, d, $J = 4.0$ Hz)の ^1H NMR スペクトルの化学シフトにより推定され、Hydroxyl 基が3位にあることが、H-3 (δ 4.86, 1H, overlapped)と H-15 (δ 1.32, 3H, s)が低磁場シフトしていることから確証された。¹⁰⁾ ^1H NMR スペクトルはまた、briarlide B (13)のそれと比べると、acetyl 基が1個少ないことと、H-12 (δ 3.70, 1H, br d, $J = 6.2$ Hz)のケミカルシフトが 1.02 ppm だ

け高磁場シフトしていることを除いて、¹H NMR スペクトルはお互いによく似ていた。従って、**2**の構造は 12-deacetyl briarlide B である。

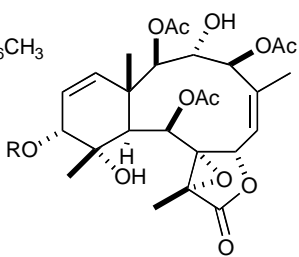
Briarlide K (**3**), C₂₈H₃₈O₁₂, の ¹H NMR スペクトルは **2**のそれと似ているが、acetyl 基が 1 個少なく、*n*-butanoyl protons (δ 0.98, 3H, t, *J*=7.3 Hz, 1.68, 2H, overlapped, δ 2.38, 2H, t, *J*=7.3 Hz)のピークが新たに現れている。また、H-2 (δ 3.22, 1H, s) は **2**の化学シフト (δ 4.70)と比べると、高磁場シフトしているので、C-2 に hydroxyl 基が結合していると推定された。*n*-Butanoyl 基の位置は、H-4 (δ 4.90, 1H, d, *J* = 10.6 Hz) が C-21 (δ_c 173.5)と HMBC 相関していることより、C-4 であると推定された。Briarlide (**K**)の相対立体化学が **3**と同じであることが、**3**の ¹H NMR のカップリングコンスタントや NOE スペクトルとの比較によって決定された。すなわち、NOE スペクトルにおいて、H-20 (δ 1.23, 3H, br s)から H-12 (δ 4.78, 1H, d, *J* = 6.1 Hz) および H-15 (δ 1.19, 3H, s)への相関により、これらの水素は β-face に位置することが分かった。H-2 は H-15 と NOE 相関がなく、H-4 および H-10 (δ 2.69, 1H, d, *J* = 4.0)に相関があるので、H-2, H-4 および H-10 は、H-15 と逆の面 (α) に位置していると推定される。H-3 (δ 4.83, 1H, dd, *J* = 3.7, 10.6 Hz)が β 配置であることは、H-3 と H-4 間の大きなカップリングコンスタント (*J*=10.6)によって確認された。H-7 (δ 5.69, 1H, d, *J* = 9.7 Hz)は、H-3 と H-7 間の NOE によって β 配置であった。H-9 (δ 5.92, 1H, d, *J* = 3.9 Hz)と H-10 の小さなカップリングコンスタント (*J* = 3.9 Hz) および、H-9 と H-15, H-18 (δ 1.69, 3H, s)、および H-20 への NOE 相関によって、H-9 が α 配置、H-18 が β 配置であると決定された。¹¹⁾



1 R¹=Ac R²=Ac

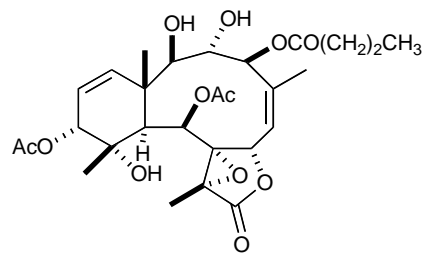
11 R¹=H R²=Ac

12 R¹=H R²=H

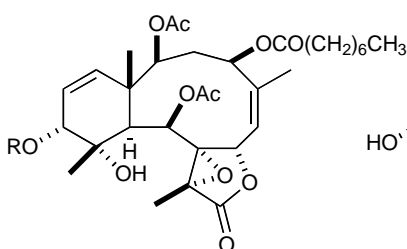


2 R=H

11 R=Ac

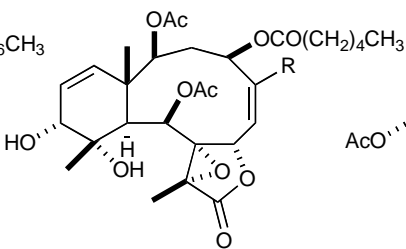


3



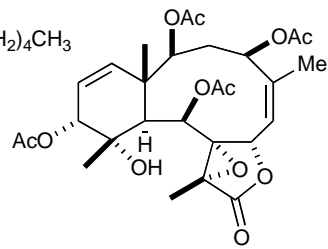
4 R=Ac

14 R=H

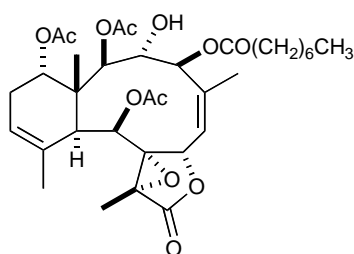


5 R=CH₂OH

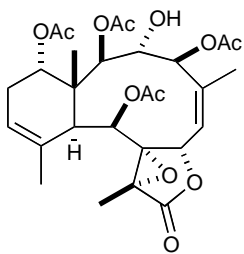
15 R=CH₃



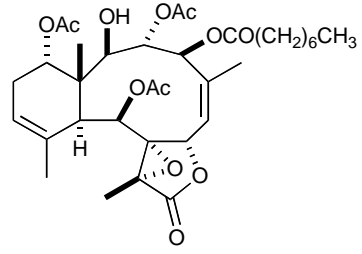
6



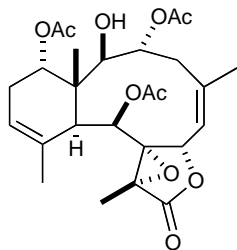
7



8



9



10

Table 1. ¹H NMR Data of Compounds**1-10**.

no.	1	2	3	4	5
2	4.58 (br s)	4.70 (s)	3.22 (s)	4.54 (br d, 6.2)	4.62 (d, 7.2)
3α				2.07 ^b	2.10 ^b
β	6.09 (dd, 1.7, 10.6)	4.86 ^b	4.83 (dd, 3.7, 10.6)	2.94 (dd, 13.3)	3.01 (dd, 12.6, 14.7)
4α	5.14 (br d, 10.6)	4.86 ^b	4.90 (d, 10.6)	5.10 (br dd, 5.3, 13.3)	5.01 (dd, 5.1, 12.6)
β					
6	5.59 (br d, 7.0)	5.50 (br d, 9.3)	5.46 (br d, 9.7)	5.46 (br d, 9.5)	5.79 (br d, 9.2)
7	5.95 ^b	5.73 (d, 9.3)	5.69 (d, 9.7)	5.78 (d, 9.5)	5.76 (d, 9.2)
9	5.95 (d, 4.4)	5.92 (d, 4.0)	5.92 (d, 3.9)	5.90 (d, 4.0)	5.95 (d, 3.8)
10	2.77 (d, 4.4)	2.59 (d, 4.0)	2.96 (d, 3.9)	2.69 (d, 4.0)	2.49 (d, 3.8)
12	4.69 (d, 6.2)	3.70 (br d, 6.2)	4.78 (d, 6.1)	4.71 (d, 6.4)	3.66 (d, 6.2)
13	5.95 (dd, 6.2, 10.3)	5.83 (dd, 6.2, 10.3)	5.91 (dd, 6.1, 10.3)	5.90 (dd, 6.4, 10.3)	5.82 (dd, 6.2, 10.4)
14	5.57 (d, 10.3)	5.36 (d, 10.3)	6.02 (d, 10.3)	5.49 (d, 10.3)	5.36 (d, 10.4)
15	1.16 (s)	1.32 (s)	1.19 (s)	1.19 (s)	1.18 (s)
16	2.20 (d, 1.1)	2.09 (d, 1.5)	2.05 (s)	2.16 (d, 1.1)	4.33 (br s)
18	1.67 (s)	1.70 (s)	1.69 (s)	1.68 (s)	1.70 (s)
20	1.22 (br s)	1.16 (br s)	1.23 (br s)	1.22 (br s)	1.15 (br s)
MeCO	2.02 x 2, 2.15,	2.13, 2.22,	2.05 (s), 2.25 (s)	2.07, 2.11,	2.14, 2.24 (each s)
	2.31 (each s)	2.27 (each s)		2.24 (each s)	
C_nH_{2n+1}	0.88 (3H, t, 6.8),		0.98 (t, 3H, 7.3), 1.68 (2H) ^b	0.88 (3H, t, 6.8), 1.29 (8H, m),	0.89 (3H, t, 6.8) , 1.30 (4H, m),
CO	1.27 (8H, m),				
	1.56 (2H) ^b , 2.25 (2H, dt, 3.3, 7.3)		2.38 (t, 2H, 7.3)	1.61 (2H, m), 2.30 (2H, t, 7.5)	1.59 ^b (2H), 2.30 (2H, t, 7.5)

^a Chemical shift values are in ppm from TMS; multiplicities and *J* values are presented in parentheses. ^b Overlapped with other signals

no.	6	7	8	9	10
2	4.53 (d, 6.2)	5.02 (br s)	5.02 (br s)	3.87 (br d, 9.9)	3.71 (d, 9.9)
3 α	2.95 (dd, 13.3)	4.91 ^b	4.88b	6.10 (d, 10.3)	5.59 (dd, 6.2, 12.1)
β	2.07 ^b				
4 α	5.09 (dd, 5.3, 13.2)	4.91 (d, 11.0)	488 ^b	5.13 (br d, 10.3)	2.11 (m)
β					3.02 (br dd, 6.2, 13.5)
6	5.47 (br d, 9.5)	5.52 (br d, 10.1)	5.53 (br d, 9.7)	5.51 (br d, 9.5)	5.40 (br d, 9.7)
7	5.79 (d, 9.5)	5.77 (d, 10.1)	5.78 (d, 9.7)	5.89 (d, 9.5)	5.62 (d, 9.7)
9	5.91 (d, 4.2)	5.76 ^b (br s)	5.76 (3.3)	5.88 ^b (br s)	5.82 (d, 2.2)
10	2.69 (d, 4.2)	2.81 (br s)	2.81 (br s)	2.65 ^b	2.67 ^b
12	4.71 (d, 6.2)	5.44 (m)	5.44 (br d, 5.5)	5.44 (m)	5.45 (br d, 4.0)
13	5.90 (dd, 6.2, 10.3)	2.04 (m)	2.04 (m)	2.11 (m)	2.07 ^b
			2.21 ^b	2.21 (m)	2.23 (m)
14	5.49 (d, 10.3)	4.73 (br s)	4.73 (m)	5.15 (br s)	5.20 (m)
15	1.19 (s)	1.16 (s)	1.16 (s)	0.84 (s)	0.86 (s)
16	2.16 (s)	2.19 (br s)	2.20 (br s)	2.06 (d, 1.5)	1.89 (br s)
18	1.68 (s)	1.64 ^b	1.64 (s)	1.64 (s)	1.63 (s)
20	1.22 (br s)	1.86 (br s)	1.86 (br s)	1.89 (br s)	1.88 (br s)
MeCO	2.07, 2.07, 2.10, 2.25 (each s)	1.96, 2.15, 2.23 (each s)	1.96, 2.13, 2.16, 2.24 (each s)	2.02, 2.11, 2.21	2.03, 2.07, 2.14
C_nH_{2n+1}CO		0.87 (3H, m), 1.28 (8H, m), 1.64 (2H, m), 2.37 (2H, m)		0.88 (3H, t, 6.6), 1.28 (8H, m), 1.56 (2H, m), 2.28 (2H, m), 1.56 (2H, m), 2.28 (2H, m)	

^bThese values may be exchangeable.

Table 2. ¹³C NMR Data of Compounds **1-10**.^a

no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	47.0	47.1	48.6	46.9	46.7	46.9	45.4	45.4	45.7	45.7
2	76.7	76.7	76.2	77.6	78.0	77.6	71.8	71.8	72.2	71.7
3	70.7	71.3	70.9	38.5	38.2	38.5	70.8	70.7	72.2	72.0
4	76.0	76.8	74.6	72.0	69.4	72.0	76.6	76.9	76.5	34.4
5	140.3	141.1	140.8	144.8	146.5	144.7	142.1	142.1	141.0	140.3
6	125.3	124.2	123.9	122.7	124.0	122.8	123.5	123.6	123.7	120.4
7	73.2	73.6	73.5	73.5	73.4	73.5	73.7	73.7	73.8	74.8
8	71.5	71.2	71.5	71.2	71.0	71.2	70.4	70.4	71.0	71.1
9	65.1	65.4	65.1	65.3	65.7	65.3	67.7	67.6	67.6	68.0
10	43.6	43.7	44.7	43.8	43.3	43.8	44.0	44.0	45.1	44.4
11	72.6	73.7	72.4	72.1	73.6	72.5	133.1	133.0	133.3	133.4
12	73.2	70.2	73.4	72.5	70.4	73.2	120.9	120.9	121.2	120.1
13	123.2	125.1	121.0	122.6	124.9	122.6	25.9	25.9	26.2	26.3
14	140.1	138.0	142.1	140.5	138.4	140.5	73.0	73.0	74.1	74.2
15	15.5	15.5	14.1	15.5	15.1	15.4	15.0	15.1	13.1	13.3
16	25.5	25.5	26.0	25.6	65.8	25.7	24.9	25.0	25.2	27.2
17	64.7	64.5	64.8	64.7	64.3	64.7	63.3	63.3	64.1	64.0
18	9.8	9.6	9.6	9.7	9.7	9.6	9.5	9.5	9.9	9.8
19	170.5	170.7 ^b	170.3	170.4	170.6	170.4	170.9	170.9	170.8	170.9
20	21.2	21.4	21.5	21.2	21.4	21.2	24.7	24.7	24.5	24.6
MeC	20.9,	20.8,	20.9,	20.9, 21.0,	21.2,	20.9,	20.8, 21.3,	20.8,	21.0, 21.1,	21.0,
O	20.9,	21.1,	21.4		21.6	21.0,		21.1,		21.2,
										21.1,
										21.3
MeC	168.7,	168.4,	168.4,	168.2,	168.1,	168.2,	168.8,	168.9,	168.4,	169.2,
O	169.7,	170.3 ^b ,	169.6	169.8,	171.1,	169.8,	169.9,	169.9,	170.0,	169.6,
	169.9	170.7		170.0		170.0,	170.9	170.6,	170.5	170.8
						170.0		170.9		
C₂H_{2n}	14.1,		13.6,	14.0, 22.6,	13.8,		14.0, 22.6,		14.2,	
+1-CO	22.6,		18.4,	24.8, 28.9,	22.2,		24.9, 28.9,		22.6, 24.7,	
	24.7,		36.1,	29.0, 31.6,	24.5,		29.0, 31.6,		28.9, 29.0,	
	28.8,		173.5	34.2, 172.9	31.2,		34.3, 173.5		31.6, 34.2,	
	29.0,				34.2,				173.2	
	31.6,				173.1					
	31.2,									
	172.7									

^aChemical shift values for **1-2** and **5-9** are in ppm from TMS (δ 0.00) and for **3-4** from CDCl₃ (δ 77.0), respectively.^bThese values may be exchangeable.

Briaralides L-N (**4-6**)は、C-2 (δ 4.53-4.62, 1H, d, $J = 6.2-7.2$ Hz)およびC-4 (δ 5.01-5.10, 1H, dd, $J = 5.1-5.3, 12.6-13.3$ Hz)に acyl 基、C-3 (δ 2.07-2.10, 1H, overlapped, δ 2.94-3.01, 1H, dd, $J = 12.6-13.3, 13.3-14.7$ Hz)に methylene 基が存在することが、violalides H, I, および N⁽¹²⁾⁻¹³⁾の場合と同様、¹H NMR および NOE スペクトルによって示唆された。

Briaralide L (**4**), C₃₄H₄₈O₁₂, の ¹H NMR スペクトルによって、3個の acetyl 基 (δ 2.07, 2.11, 2.24, 3H each, s) および1個の *n*-octanoyl 基 (δ 0.88, 3H, t, $J = 6.8$ Hz, δ 1.29, 8H, m, δ 1.61, 2H, m, δ 2.30, 2H, t, $J = 7.5$ Hz)の存在が示され、violalide H (**14**)の ¹H NMR とほとんど変わらなかったが、acetyl 基が1個多いことと、H-12 (d 4.71, 1H, $J = 6.4$)のケミカルシフトが **14** のそれと比べると 1.03 ppm だけ低磁場シフトしていた。*n*-Octanoyl 基の位置は、H-4 (δ 5.10, 1H, br dd, $J = 5.3$ and 13.3 Hz) と C-21 (δ_c 172.9, s)に HMBC 相関が見られることによって、C-4 であると決定された。以上の結果より、briaralide L は 12-acetylviolalide H であり、その相対立体化学は NOE 相関より推定された； H-2/H-4, H-10, H-9, H-9/H-18, H-20, H-12/H-20。

Briaralide M (**5**), C₃₀H₄₂O₁₂, の ¹H NMR スペクトルによって、2個の acetyl 基 (δ 2.14, 2.24, 3H each, s) および1個の *n*-hexanoyl 基 (δ 0.89, 3H, t, $J = 6.8$ Hz, δ 1.30, 4H, m, δ 1.59, 2H, overlapped, δ 2.30, 2H, t, $J = 7.5$ Hz)の存在が明らかになった。**5** と violalide I (**15**)³⁾ の ¹H NMR を比較すると、**15** の C-5 methyl 基が hydroxymethyl 基 (δ 4.33, 2H, br s)に酸化されていることが示された。*n*-Hexanoyl 基は H-4 (δ 5.01, 1H, dd, $J = 5.1$ and 12.6 Hz)と C-21 (δ_c 173.1)との HMBC 相関間により、C-4 位に結合していることが推定された。相対立体化学は、¹H NMR のカップリングパターンや NOE 相関が **15** と類似していることより決定した。それ故、briaralide M は構造 **5** をもつ。

Briaralide N (**6**), C₂₈H₃₆O₁₂, は ¹H NMR スペクトルにおいて、4個の acetyl 基のプロトン (δ 2.07, 2.07, 2.10, 2.25, 3H each, s)の存在が示され、また、**4** の ¹H NMR スペクトルと似ているが、**4** に存在する *n*-octanoyl 基が欠如し、その代わりに、1個の acetyl 基が現れたことが示唆された。従って、briaralide N は **6** の構造をもっている。

Briaralides O-R (**7-10**) は C-11 と C-12 間に二重結合があり、C-14 位に acetyl 基がある briarane 化合物である。NMR スペクトルにおいて、4級炭素 (δ_c 133.0-133.4, C-11), methines (δ_c 120.1-121.2, d, C-12, δ_H 5.44-5.45, 1H, H-12)、acyl が結合した炭素の付け根のプロトン (δ_H 4.73-5.20, H-14, δ_c 73.0-74.2, C-14)の存在が示された。また、そのプロトンの位置は、H-15 (δ 0.84-1.16, 3H, s) との NOE 相関により H-14 であることが決定された。化合物 **7-9** はまた、化合物 **1-3** の場合と同様、C-2, C-3, C-4, および C-9 位が酸化され、化合物 **10** は、C-2, C-3, および C-9 位が酸化されていることが明らかになった。

Briaralide O (**7**), C₃₄H₄₈O₁₂, は、hydroxyl 基 (ν_{\max} 3515 cm⁻¹), γ -lactone carbonyl (ν_{\max} 1782 cm⁻¹), そして ester carbonyl (ν_{\max} 1742 cm⁻¹)の存在が IR スペクトルによって推定された。¹H NMR スペクトルにおいては、3個の acetyl 基 (δ 1.96, 2.15, 2.23,

3H each, s)、*n*-octanoyl 基 (δ 0.87, 3H, m, δ 1.28, 8H, m, δ 1.64, 2H, m, δ 2.37, 2H, m)、アシル化された炭素に結合した 3 個の protons (δ 5.02, 1H, br s, H-2, δ 4.91, 1H, d, $J = 11.0$ Hz H-4, δ 4.73, 1H, m, H-14)、および化合物 **2** のように水酸基が結合した炭素の付け根の proton (δ 4.90, 1H, overlapped, H-3) の共鳴が観測された。*n*-Octanoyl が C-4 に結合していることは、H-4 と C-21 (δ_c 173.5) との HMBC 相関より推定された。相対立体化学は ^1H NMR のカップリングパターンと NOE 相関により決定された; H-2/H-10, H-3/H-7, H-9/H-18, H-20, H-14/H-15。それ故、briarlide **0** は **7** の構造をもつ。

Briarlide **P** (**8**)、 $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$ 、の ^1H NMR のスペクトルは、4 個の acetyl 基のプロトンの共鳴を示している (δ 1.96, 2.13, 2.16, 2.24, 3H each, s) が、化合物 **7** のそれとよく似ているが、唯一の違いは、**7** に見られる *n*-octanoyl 基が acetyl 基に代わっていることである。それ故、化合物 **8** の構造を briarlide **P** と決定した。

Briarlide **Q** (**9**)、 $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_{12}$ 、は化合物 **7** の異性体である。 ^1H NMR スペクトルも **7** のそれとよく似ているが、H-2 (δ 3.87, 1H, br d, $J = 9.9$ Hz) および H-3 (δ 6.10, 1H, d, $J = 10.3$ Hz) がそれぞれ、1.15 ppm 高磁場シフト、1.20 ppm 低磁場シフトしていた。このことは、C-2 がヒドロキシ化され、C-3 がアシル化されていることを示唆している。C-2 の水酸基の位置は、H-14 (δ 5.15, 1H, br s) が **7** のそれと比較すると、0.42 ppm 低磁場シフトしていることによっても支持された。これは C-2 の水酸基による異方性効果による非遮蔽に起因している。*n*-Octanoyl 基は H-4 (δ 5.13, 1H, br d, $J = 10.3$ Hz) と C-21 (δ_c 173.2, s) との HMBC 相関によって、C-4 に結合していると推定した。カップリングパターンや NOE 相関に基づいて相対立体配置は、**9** のように描かれる。

Briarlide **R** (**10**)、 $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$ 、と **7-9** の ^1H NMR スペクトルを比較することにより、10 員環部分の H-6 (δ 5.40, 1H, br d, $J = 9.7$ Hz), H-7 (δ 5.62, 1H, d, $J = 9.7$ Hz), H-9 (δ 5.82, 1H, d, $J = 2.2$ Hz), および H-10 (δ 2.67, 1H, overlapped) は容易に帰属された。 δ 5.59 (1H, $J = 6.2, 12.1$ Hz) の double-doublet は、H-7 と NOE 相関に基づき H-3 帰属できるが、その H-3 は C-4 methylene protons (δ 2.11, 1H, m, δ 3.02, 1H, br dd, $J = 6.2, 13.5$ Hz) とカップリングしている。 δ 3.71 (1H, d, $J = 9.9$ Hz) のプロトンは、hydroxyl proton (δ 2.66, 1H, d, $J = 9.9$ Hz) とカップリングし、更に H-10 と NOE 相関を示したので、H-2 と帰属された。ケミカルシフトとカップリングパターン (doublet) から、C-2 に水酸基が結合していることが推定された。従って、briarlide **R** 構造 **10** をもつ。

Briarlides **0-R** のように 11,12-二重結合 および 14-アセチル基をもつような briareum それほど頻繁には遭遇しない化合物である。¹⁴⁾ これら新化合物の生物活性試験は単離された量が少なく行うことができなかった。¹⁵⁾

References

- 1) J.-H. Sheu, P.-J. Sung, J.-H. Su, G.-H. Wang, C.-Y. Duh, Y.-C. Shen, M.-Y. Chiang, I.-T. Chen, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1415-1420, and references therein.

- 2) S.-L. Wu, P.-J. Sung, M.-Y. Chiang, J.-Y. Wu, J.-H. Sheu, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1415-1420.
- 3) J. Shin, M. Park, W. Fenical, *Tetrahedron.* **1989**, *45*, 1633-1638.
- 4) E. O. Pordesimo, F. J. Schimitz, L. S. Ciereszko, M. B. Hossain, D. van der Helm, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2344-2357.
- 5) J. Kobayashi, J.-F. Cheng, H. Nakamura, Y. Ohizumi, Y. Tomotake, T. Matsuzaki, K. J. S. Grace, R. S. Jacobs, Y. Kato, L. S. Brinen, J. Clardy, *Experientia* **1991**, *47*, 501-502.
- 6) S. J. Coval, S. Cross, G. Bernardinelli, C. W. Jefford, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 981-984.
- 7) R. L. Hendrickson, J. H., II Cardellina, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 6565-6570.
- 8) J. H., II. Cardellina, *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 365-374.
- 9) P. A. Keifer, K. L. Rinehart, I. R. Hooper, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4450-4454.
- 10) T. Iwagawa, N. Nishitani, S. Kurosaki, H. Okamura, M. Nakatani, M. Doe, K. Takemura, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1412-1415.
- 11) T. Iwagawa, N. Takenoshita, H. Okamura, M. Nakatani, M. Doe, K. Shibata, M. Shiro, *Heterocycles* **1998**, *48*, 123-128.
- 12) T. Iwagawa, K. Takayama, H. Okamura, M. Nakatani, M. Doe, *Heterocycles* **1999**, *51*, 1653-1659.
- 13) T. Iwagawa, T. Hirose, N. Takenoshita, H. Okamura, M. Nakatani, M. Doe, K. Takemura, *Heterocycles* **2000**, *53*, 1789-1792.
- 14) J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 1-49.
- 15) T. Iwagawa, N. Nishitani, M. Nakatani, M. Doe, Y. Morimoto, K. Takemura, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 31-35.

4. 謝辞

本研究は鹿児島化学研究所のご援助のもとで行うことができましたことを心から深謝申し上げます。本実験に携われた鹿児島大学理学部生命化学科有機生化学講座の西谷直人修士、研究に関して示唆を頂いた当講座の岡村浩明准教授、中谷宗弘名誉教授、大阪市立大学院理学研究科の土江松美博士、森本善樹教授、サンケイ化学(株)の松永禎史氏、畑中正博氏、および竹村薫氏に感謝申し上げます。

**Studies on the Briarane diterpenes
from the soft coral *Sarcophyton glaucum***

Tetsuo IWAGAWA

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science, Kagoshima University
1-2-35 Korimoto Kagoshima 890-0065, Japan

Abstract

The gorgonian soft corals belonging to the genus *Briareum* (phylum Cnidaria, order Gorgonacea, family Briareidae) have proved to be a rich source of highly oxygenated briarane-type diterpenes that exhibit a range of biological properties such as cytotoxic,^{1,2} anti-inflammatory,³⁻⁵ antiviral,^{3,6} insecticidal,^{7,8} and antifouling activity.⁹ Our previous investigations of this organism, collected at Amami Oshima in the southern region of Kagoshima Prefecture, afforded eight new briaranes designated as briaralides **A-H**, exhibiting cytotoxicity toward Vero and MDCK cells.¹⁰ Further investigation of the extract has yielded 10 additional new briaranes, briaralides **I-R (1-10)**.

揮発性有効成分のマイクロカプセル化技術の開発

吉田昌弘

鹿児島大学工学部応用化学工学科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40

TEL:099-285-8526

和文要旨

本研究は、燻蒸効果のある揮発性有効成分であるアリルイソチオシアネートに着目し、本成分を固定化するマイクロカプセルの調製を行なった。ポリウレタ骨格を有するカプセル壁材を用いたマイクロカプセル調製の最適化および生物試験評価を行った。

1. 研究背景および目的

農作物の生産において、連作や栄養の片寄った土壌管理等々が長年積み重ねられると、土壌中では作物の根を侵す病原菌や害虫が巧みに繁殖し密度を高め、生産活動が困難となる。そのため、農地では定期的に土壌中から病原菌、線虫、ウイルスなどを取り除く(不活性化する)必要がある。その手法の一つとして、土壌燻蒸剤を用いた防除法がある。本研究では、安全性および環境保全の観点から食品添加物であるアリルイソチオシアネートを選択し、燻蒸剤として蒸散がコントロールできるデバイスを構築することを目的とする。具体的には、マイクロカプセル化技術を採用し、調製手法の確立を目指した。

2. 実験

2. 1 マイクロカプセル調製

水相は、蒸留水に分散安定剤としてゼラチンを添加したものを用意した。有機相は、壁材としてジイソシアン酸トリレンとイソシアン酸フェニル(モル比が1:1 2:1 3:1 4:1)、芯物質として揮発性有効成分、また界面活性剤としてソルビタンモノオレエートを混合したものを用意した。次に、調製した水相にマグネチックスターラーで攪拌しながら有機相を添加し、10分間攪拌することによりO/Wエマルジョンを形成した。その後、窒素雰囲気下で150rpm、50℃で2時間壁材反応を行った。さらに、ろ過、洗浄し、30分間凍結乾燥を行いマイクロカプセルを回収した。調製スキームをFig.1に示す。

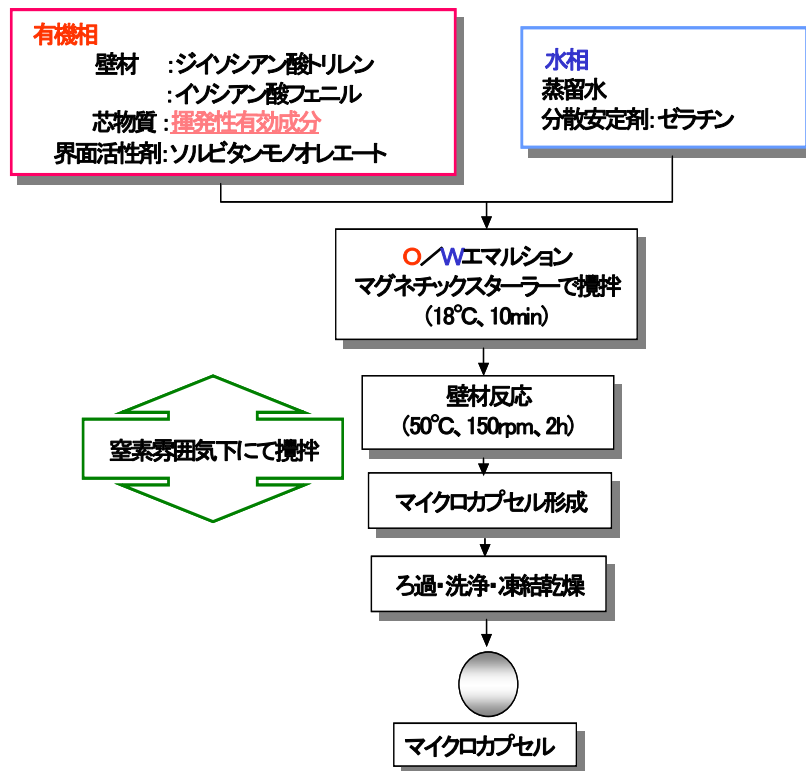


Fig.1 マイクロカプセル調製スキーム

2. 2 蒸散実験

調製したマイクロカプセルをシャーレに入れ、25°Cに保ったインキュベーターにて保持した。その後、経時的にサンプリングを行い、マイクロカプセル中の揮発性有効成分含有量をガスクロマトグラフィーにて定量することで蒸散率を算出した。

2. 3 生物試験

1/5000a ワグネルポットにネコブセンチュウ幼虫密度が102頭/20g（土壌）に揮発性有効成分を内包したMC、及びその原体を添加した。ワグネルポットに適用する原体の処理量は30L/10aと設定した。その後7日間燻蒸、さらに7日間ガス抜きし、2日間催芽させたキュウリ種子を5粒/ポット播種し、40日後にセンチュウ密度、ネコブ寄生状況、薬害を調査した。

2. 4 内包量分析

サンプリングしたマイクロカプセル0.2gを乳鉢ですり潰した後、20ml容メスフラスコに入れアセトンで定容した。メスフラスコは超音波浴槽に入れ、10分間超音波を照射し、マイクロカプセル中のアリルイソチオシアネートをアセトンに溶出させた。これを50ml容サンプル

ル瓶に移し、テルモシリンジおよびメンブレンフィルターを用いて 20ml 容サンプル瓶にろ別した。ピペットマンを用いて正確に測りとったろ液 5ml を 10ml 容メスフラスコに入れ、これに内部標準溶液である 1-ペンタノール 0.05g を入れた後、アセトンで定容した。その後、ガスクロマトグラフィー用バイアル瓶にサンプル溶液を入れ、分析を行った。

3. 結果および考察

調製したマイクロカプセルの SEM 写真を Fig. 2 に示す。形状は球形であり、平均粒径は 250 μm であった。

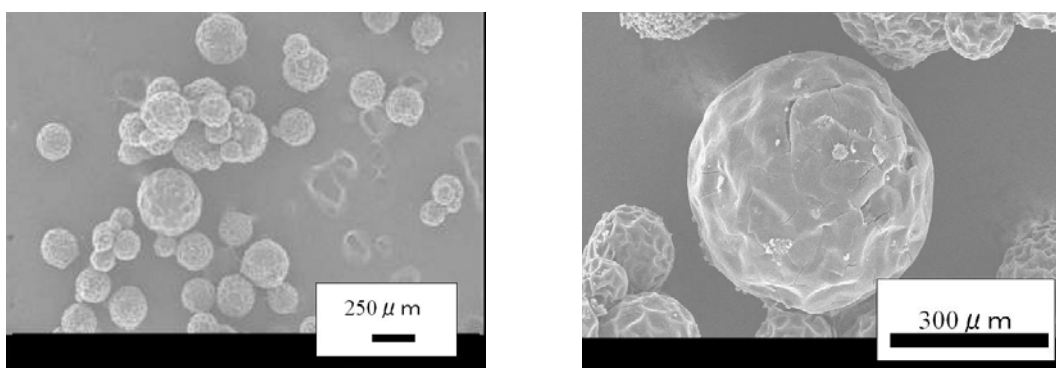


Fig. 2 マイクロカプセルのSEM写真

壁材であるジイソシアン酸トリレンとイソシアン酸フェニルのモル比の最適化を行った。結果を Fig. 3 に示す。図よりジイソシアン酸トリレンとイソシアン酸フェニルのモル比が 4 : 1 が回収率、含有率ともに高く、最適であることがわかった。

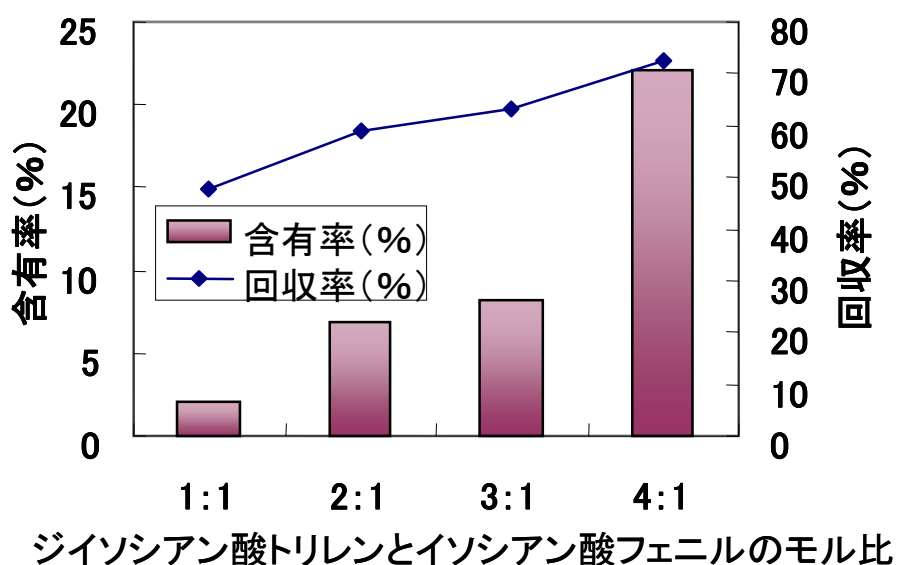


Fig. 3 ジイソシアン酸トリレンとイソシアン酸フェニルのモル比変化における含有率

ジイソシアン酸トリレンとイソシアン酸フェニルのモル比が 4:1 で調製したマイクロカプセルで蒸散実験を Fig. 4 に示す。図より、1 週間で約 100% 徐放したことがわかった。

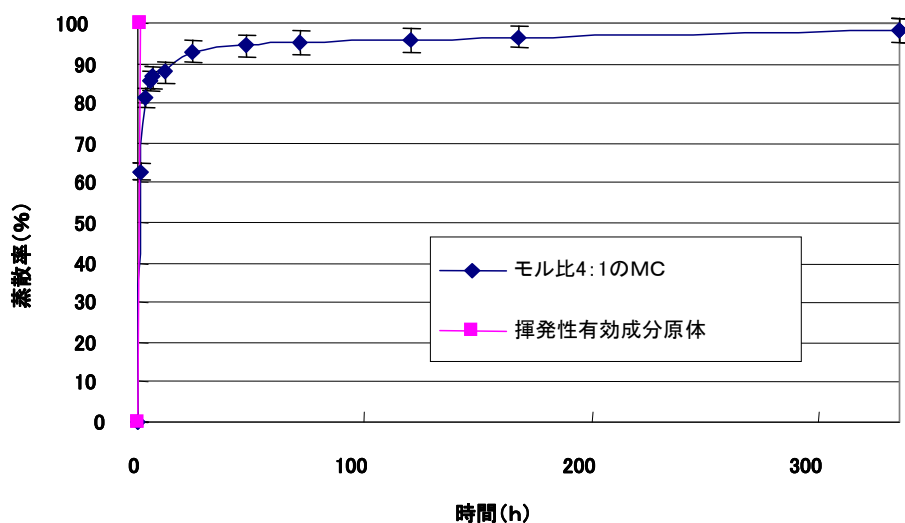


Fig. 4 揮発性有効成分の蒸散挙動

蒸散実験で用いたMCで生物実験を行った。各処理量にて播種する前、播種 40 日後のセンチュウ駆除率の結果を Fig. 5 に示す。

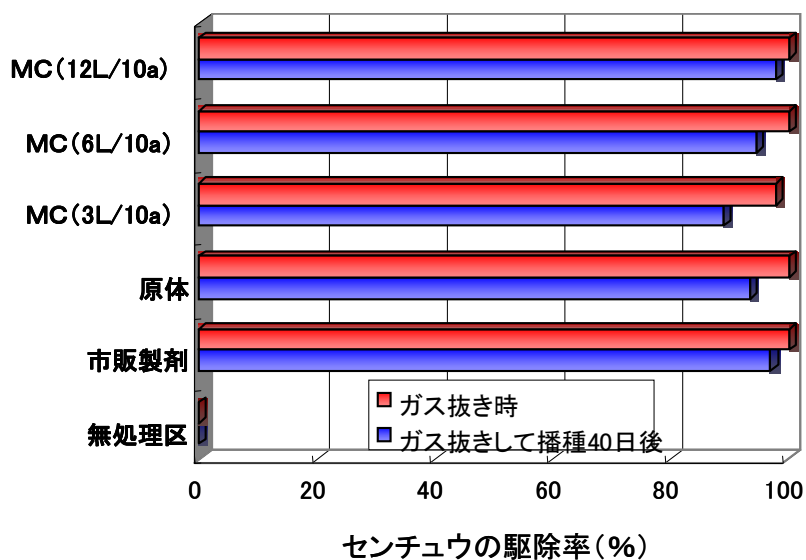


Fig. 5 生物実験におけるセンチュウ駆除率

播種 40 日後のセンチュウの駆除率は、MC (12 L/10a)、MC (6 L/10 a) とともに揮発性有効成分原体より優れた効果を示した。

また、生育高、根部重量への影響を Fig. 6 に示す。揮発性有効成分内包 MC は、播種 14 日

後までの発芽、生育に及ぼす影響はなく、またその後の生育に及ぼす影響もないことがわかった。

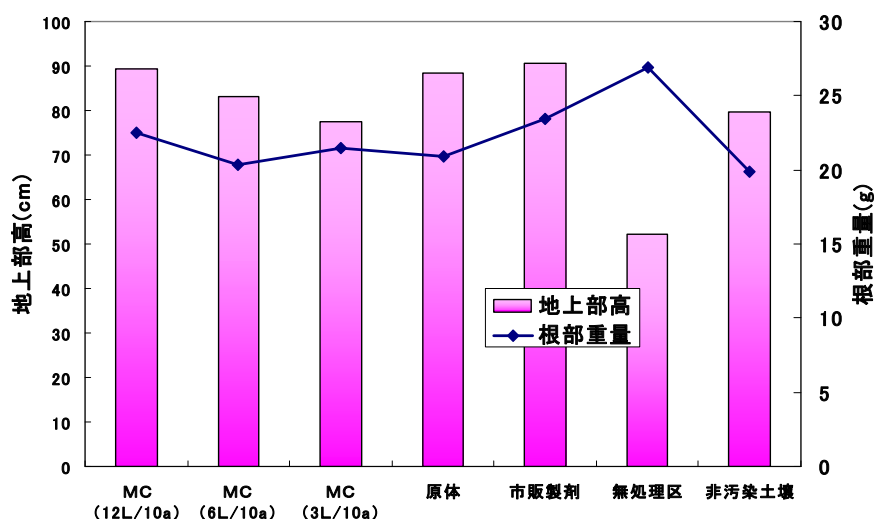


Fig. 6 生物実験における播種 40 日後の生育高、根部重量への影響

4. 結論

本研究では、揮発性有効成分を内包するマイクロカプセルの調製を行った。壁材であるジイソシアン酸トリレンとイソシアン酸フェニルのモル比を変化させることによって、揮発性有効成分の高含有化に成功した。また、徐放実験により、マイクロカプセル化によって揮発性有効成分を徐放抑制しつつ、芯物質が約 100%徐放することを確認できた。さらに、生物実験によりマイクロカプセル化における害虫駆除効果があり、薬害がでなかったことが確認できた。

5. 謝辞

本研究開発に対し資金援助して頂いた (財) 鹿児島科学研究所に厚く御礼申し上げます。また、本研究開発でフィールド試験ご協力して頂いたサンケイ化学 (株) 畑中正博 氏、松永禎史 氏に感謝致します。

Microencapsulated agrochemicals immobilized allyl isothiocyanate

Masahiro Yoshida

Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

In this study, we prepared microcapsule containing allyl isothiocyanate by interfacial polymerization.

The particle diameters of the prepared microcapsule were of about 250 μ m. In the controlled release experiment, the controlled release of microencapsulated allyl isothiocyanate was effectively able to suppress compared to that of unimmobilized allyl isothiocyanate in 30 °C. In the field test, it was clarified that the prepared microcapsules had a good performance.

平成20年7月30日 発行

鹿児島市南栄二丁目9番地
(サンケイ化学株式会社内)

電話 099-268-7588

財団法人 鹿児島科学研究所