



Title	オニヒトデAcanthaster Planci L.の主オリゴ配糖体 Thornasteroside Aの構造
Author(s)	小林, 資正
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32445
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	小 林 資 正
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 4 7 4 8 号
学位授与の日付	昭和 54 年 11 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	オニヒトデ <i>Acanthaster Planci</i> L. の主オリゴ配糖体 Thornasteroside A の構造
論文審査委員	(主査) 教授 北川 勲 (副査) 教授 池原 森男 教授 枡井雅一郎 教授 田村 恭光

論 文 内 容 の 要 旨

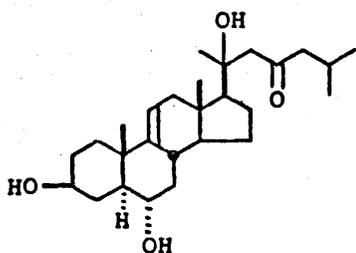
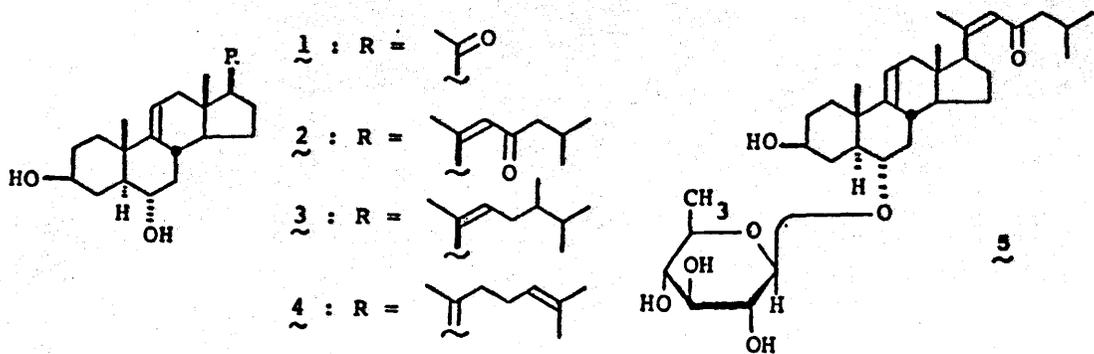
棘皮動物門(Echinodermata)はウミユリ(Crinoidea), ヒトデ(Asteroidea), クモヒトデ(Ophiuroidea) ウニ(Echinoidea), ナマコ(Holothuroidea)の5綱(class)に分類されている。

このうちヒトデ類はコレスタン型ステロイドの、ナマコ類はラノスタン型トリテルペノイドのサポニン等オリゴ配糖体を産生することで海洋生物中でも特異な存在として知られている。¹⁾

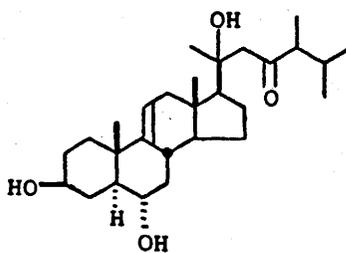
近年、和漢薬として重要な薬用人参や柴胡などが主要成分としてサポニン等オリゴ配糖体を含有していることもあって、広くオリゴ配糖体の化学的研究や生物活性の検討が盛んに行われている。一方、ヒトデ類やナマコ類などの海洋生物が産生するサポニン等オリゴ配糖体は、陸上生物のそれに比し化学構造上の特異性が期待されるが、すでに放卵抑制作用²⁾、イソギンチャクや2枚貝に逃避行動を起こさせる作用³⁾、抗ウイルス作用⁴⁾(以上ヒトデ類)、魚毒作用、溶血作用⁵⁾、抗菌作用⁶⁾、抗腫瘍作用⁷⁾(以上ナマコ類)などの種々の生物活性が明らかにされるなど興味深い化合物群である。

著者が、オニヒトデ *Acanthaster planci* のサポニン(オリゴ配糖体)の研究を開始して以来、これまでのところヒトデ類のサポニンに関しては、キヒトデ *Asterias amurensis* から放卵抑制因子として単離された *asterosaponin A*⁸⁾ の構造研究があるだけで、サポゲノールに関する研究が大部分を占めている。すなわち、個々のサポニンを単離することなくサポニン分画の酸加水分解により種々のサポゲノールが得られている。しかしながらそれらのサポゲノールが母サポニンの酸加水分解の際、二次的に生成したものかどうかは不明である。

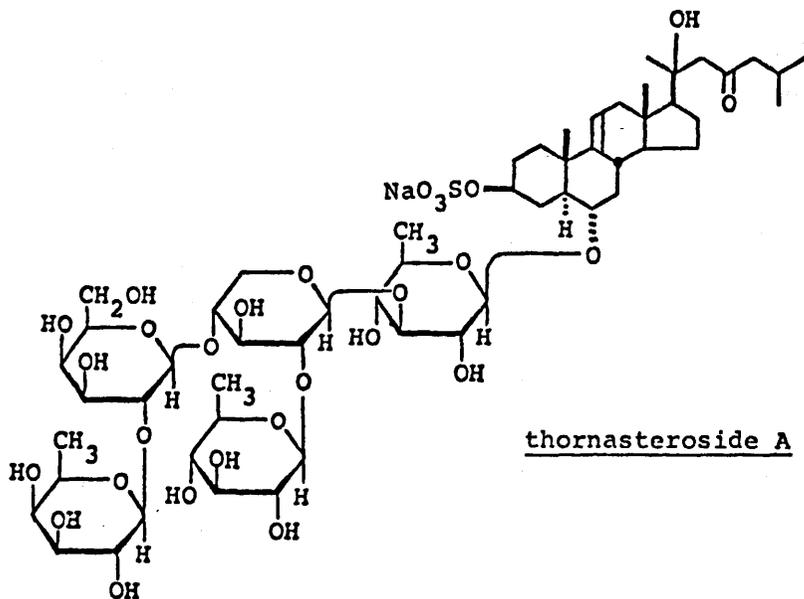
サンゴの天敵として知られるオニヒトデが産生するサポニン等オリゴ配糖体に関しても同様で、これまでにサポニン分画の酸加水分解で得られる主サポゲノールとして、**1**^{9a)}、**2**^{9b)}が、微量成分とし



thornasterol A (6)



thomasterol B (7)



thornasteroside A (8)

Chart 1

て、3, 4^{9c)}が、また部分水解物として、5^{9d)}が報告されているにすぎなかった。

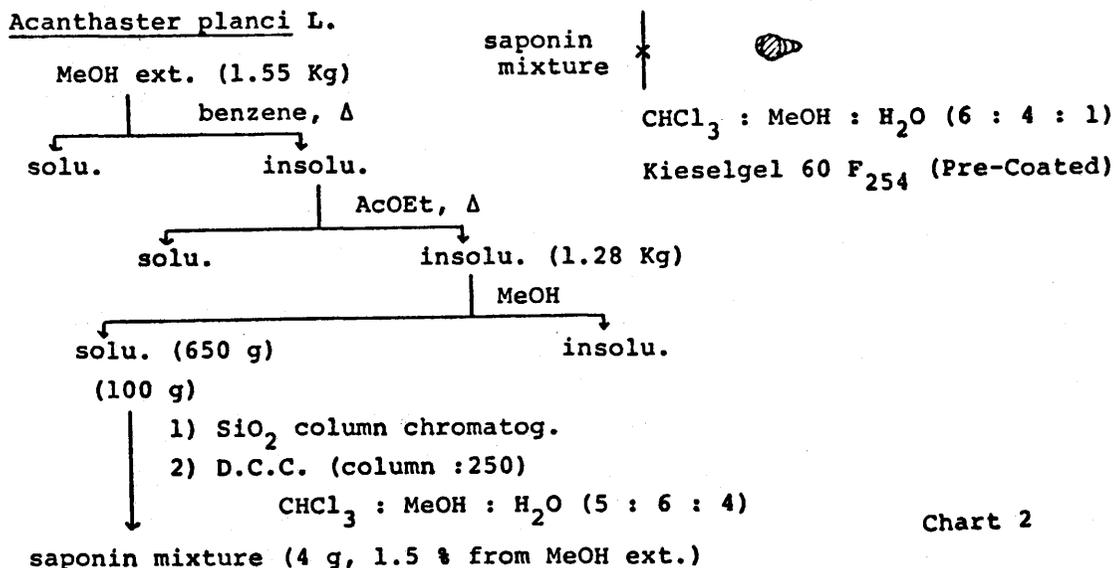
著者は、以下に述べるようにオニヒトデのオリゴ配糖体の化学構造を明らかにする事を目的として研究を行った。その結果、オニヒトデの天敵として知られるホラ貝 *Charonia lampas* の粗加水分解酵素を利用して真正サポゲノール thornasterol A (6) および thornasterol B (7) を得、その化学構造を明らかにすると共に、主オリゴ配糖体 thornasteroside A (8) の化学構造を明らかにすることができた。

本 論

第1章 真正サポゲノール thornasterol A および thornasterol B の構造

第1節 サポニン混合物の精製とその性質

和歌山県串本および沖縄にて採集したオニヒトデ *Acanthaster planci* のメタノール抽出エキスを、Chart 2 に示すように、ベンゼン、酢酸エチルで脱脂、メタノールで脱塩処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび液滴向流クロマトグラフィー(D.C.C.)¹⁰⁾を用いて精製し、サポニン混合物("thornasteroside")を得た。サポニン混合物は薄層図に示すように、種々のアグリコンおよび糖部分の複雑な混合物であり、potassium rhodizonate 試薬¹¹⁾に陽性で硫酸エステルが存在が認められる。サポニン混合物は2 N 塩酸で加水分解し、精製を容易にするためアセチル化すると主サポゲノールとして genin-1a(1a) を与えた。Genin-1a(1a) と脱アセチル化体 genin-1(1) の physical data は、すでに Shimizu^{9a)} および Djerassi^{9b)} 等が報告している主サポゲノールと一致した。



第2節 真正サポゲノールの単離とその構造

真正サポゲノールを得る目的で種々の粗酵素を用いてサポニン混合物の加水分解を検討した結果、

オニヒトデの天敵として知られるホラ貝 *Charonia lampas* の粗グリコシダーゼがサボゲノール硫酸エステル混合物を与えることを見出した。

得られるサボゲノール硫酸エステル混合物は、ピリジン処理後、緩和な条件で solvolysis (dioxane- K_2CO_3) すると、サボゲノール混合物を与えた。アセチル化後、薄層分離を行い、genin-1a (1a, 8%) および genin-2a (2a, 36%) の他に、2種の新サボゲノールのアセチル化体 diacetyl-thornasterol A (6a, 40%) および diacetyl-thornasterol B (7a, 13%) を得た。(Chart 3)

Genin-2a の physical data は Djerassi 等の報告している 2a^{9b} と一致した。

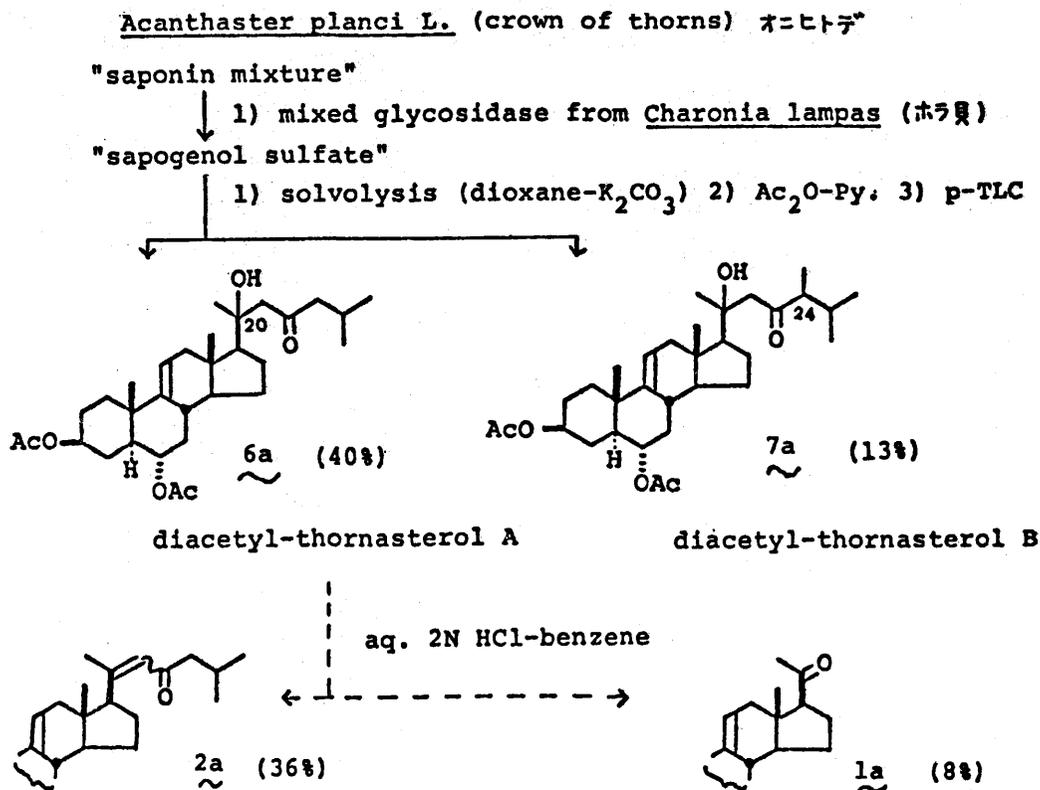


Chart 3

主サボゲノール diacetyl-thornasterol A (6a) は 210 nm 以上には UV 吸収はなく、IR スペクトルにおいてアセチル化されにくい水酸基 ($3500cm^{-1}$)、アセチル基 ($1742cm^{-1}$)、ケトン ($1705cm^{-1}$) の存在を示している。¹H-NMR において 2 個の 2 級アセトキシル基 (6H.S, δ 2.00 and 2H.m, δ 4.55 ~ 4.90), C-11 位の olefinic proton (1H.m, δ 5.30) の他、水酸基のつけ根 (C-20) の 3 級メチル基 (3H.S, δ 1.30) およびケトンと 3 級炭素の間に位置するメチレン (C-22) (2H, br.S, δ 2.51) のシグナルが特徴的にあらわれている。また Mass スペクトルにおいても Chart 4 に示すように β -hydroxy-carbonyl moiety の McLafferty-type の開裂に由来する特徴的なフラグメ

ントイオン(m/e 356, m/e296) があらわれている。また FD-Mass スペクトル¹²⁾を測定した結果、m/e 516(base peak) に分子イオンが観測された。

さらに、diacetyl-thornasterol A (**6 a**) は酸処理 (2 N 塩酸-ベンゼン) により genin-2 a (**2 a**) および genin-1 a (**1 a**) を与えた。

したがって diacetyl-thornasterol A の構造を 3 β , 6 α -diacetoxy-5 α -cholest-9 (11)-en-20-ol-23-one (**6 a**) と決定した。

Diacetyl-thornasterol B (**7 a**) は、diacetyl-thornasterol A (**6 a**) とよく類似したサポゲノールである。その ¹H-NMR スペクトルは C-24 の 2 級メチル基のシグナルを有する以外 **6 a** とよく一致し、20-hydroxy-23-one 側鎖構造を有するものと考えられる。

7 a の Mass スペクトルは Chart 4 に示すように diacetyl-thornasterol A (**6 a**) と非常に酷似し、C-23 ケトンの α 開裂に由来するフラグメントイオンから C-24 メチル基の存在が判明した。また、**7 a** の FD-Mass スペクトルを測定した結果、m/e 530 (base peak) に分子イオンが観測された。

したがって、diacetyl-thornasterol B の構造は、24-methyl-3 β , 6 α -diacetoxy-5 α -cholest-9 (11)-en-20-ol-23-one (**7 a**) と決定した。

第3節 Thornasterol A および thornasterol B の真正性について

酵素加水分解で得られた 4 種のサポゲノールはそれぞれ特徴的な CD 極大を有することから、母サポニンの CD スペクトルとの比較検討を行った。(Table I, Fig 1 a, Fig 1 b, Fig 1 c)

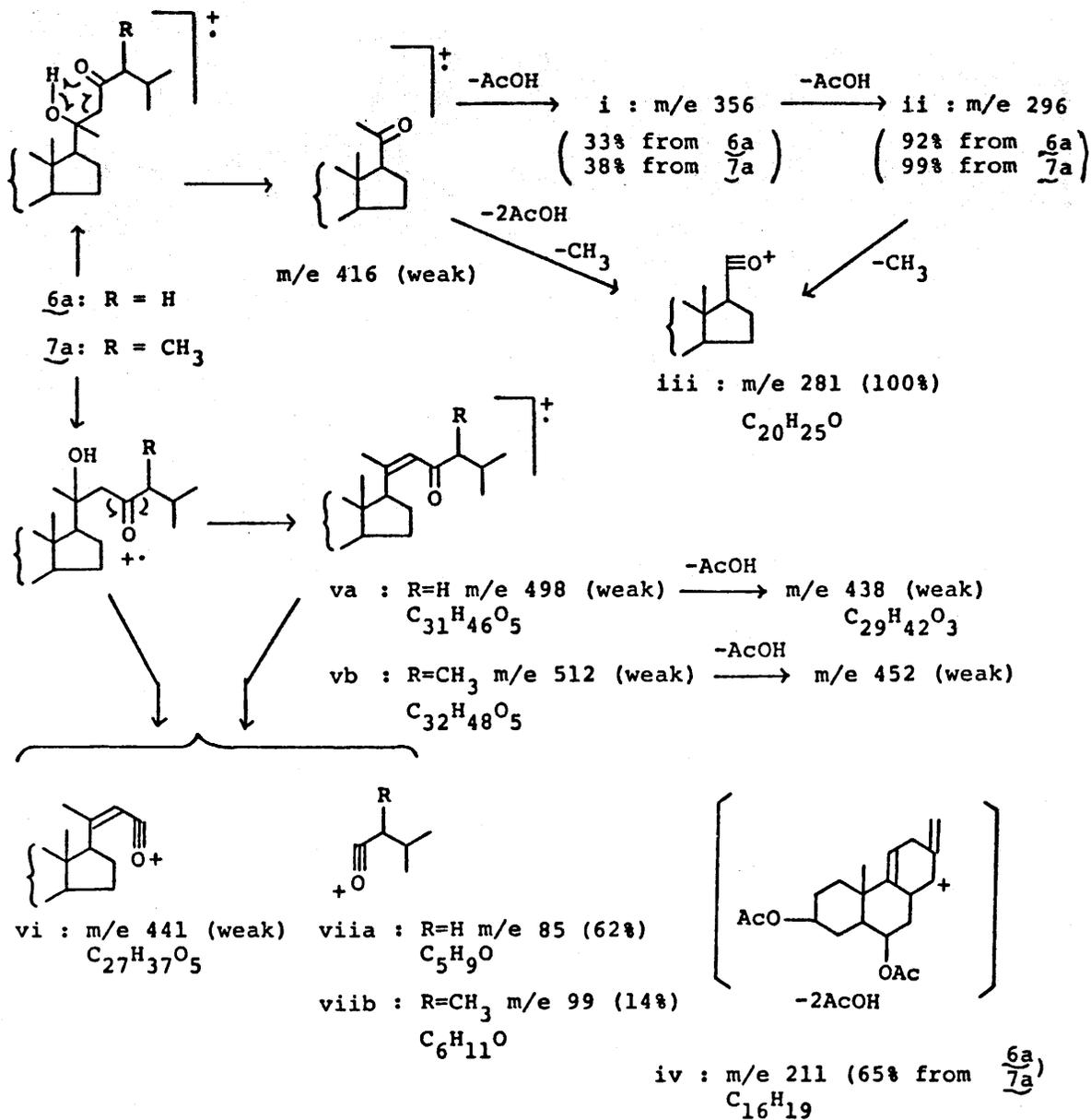
サポニン混合物は約 200 nm に $\Delta^9(11)$ 二重結合の $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移に由来する強い正の極大¹³⁾, 248 nm に $\alpha\beta$ -不飽和ケトンの $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移に由来する弱い負の極大, および 293 nm に C-23 ケトンの $n \rightarrow \pi^*$ 遷移に由来する強い負の極大を有している。

Table I. Yields of and CD Data for **1 a**, **2 a**, **6 a**, and **7 a** in Comparison with CD Data for Saponin Mixture

	Yield (%) ^{a)}	CD data
Saponin mixture		[θ] 200 (pos. max.)
		[θ] 248 (neg. max.)
		[θ] 293 (neg. max.)
		[θ] 293
Diacetyl-thornasterol A (6 a)	40	[θ] 197 +45000 (pos. max.)
		[θ] 292 - 2500 (neg. max.)
Diacetyl-thornasterol B (7 a)	13	[θ] 197 +38000 (pos. max.)
		[θ] 305 +1000 (pos. max.)
Genin-1a (1 a)	8	[θ] 287 +6400 (pos. max.) ^{b)}
Genin-2 a (2 a)	36	[θ] 246 -10600 (neg. max.) ^{b)}
		[θ] 246

a) The yields are calculated from the total acetylation product of sapogenol mixture prior to TLC separation.

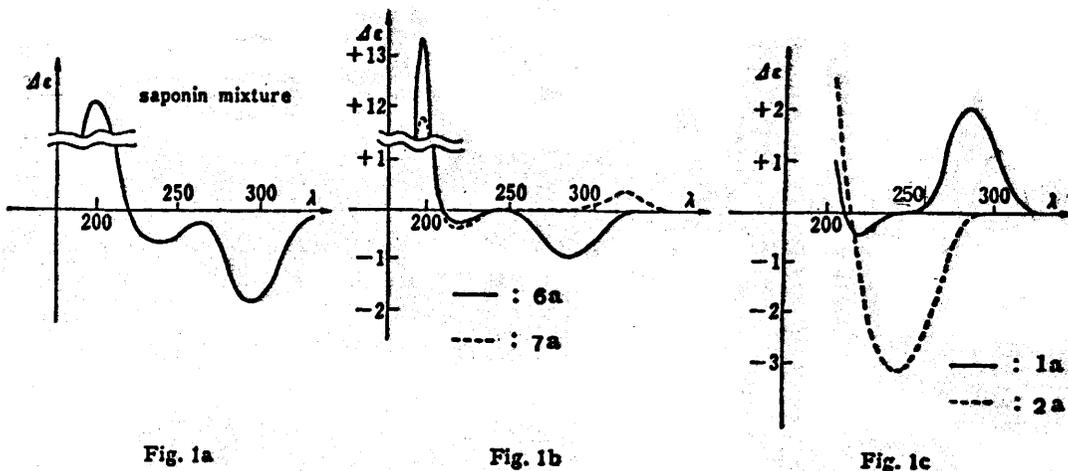
b) The CD spectra below 210 nm of **1 a** and **2 a** were not measured.



The elemental compositions of the fragment ions given with the chemical formulae were determined by high resolution MS.

Chart 4

それぞれのCD曲線の極大位置および分子楕円率の比較から thornasterol A (6) および thornasterol B (7) が真正サポゲノールであり genin-1 (1) は二次的に生成したサポゲノールであることが判明した*。



第4節 硫酸エステルの結合位置

硫酸エステルの結合位置を決定するため、硫酸エステルの結合しない水酸基をケトンに変換し、CDスペクトルによる検討を行った。

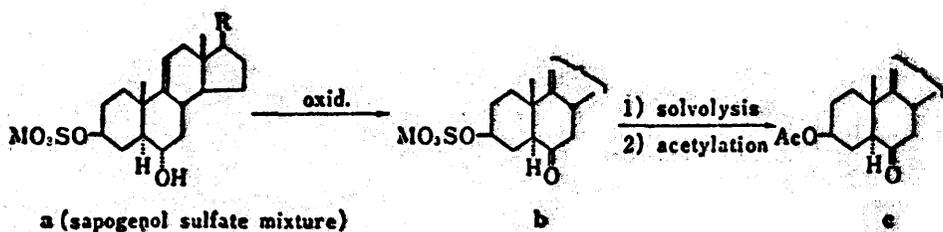


Chart 5

すなわち酵素加水分解で得られたサポゲノール硫酸エステル混合物を CrO_3 -pyridine 酸化, solvolysis(dioxane-pyridine), ひきつづきアセチル化後薄層分離し, KA-1 (9, 14%), KA-2 (10, 18%), KA-3 (11, 60%) の3種のケトン体を得た。(Chart 6)

Table II に示すようにCDスペクトルの比較から, KA-1 (9), KA-2 (10), KA-3 (11) はすべてC-6ケトン体であり, 硫酸エステルはC-3水酸基に結合していたことが判明した。

* genin-2 (2) の真正性についてはさらに検討が必要であると考えられる。

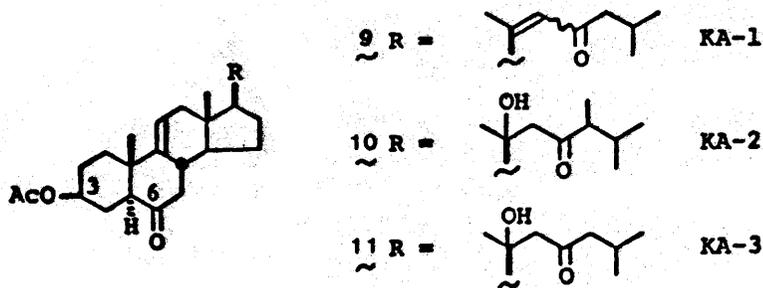


Chart 6

Table II. Yields of and CD Data for 9, 10, and 11 in Comparison with ORD Data for 12 and 13

	Yield(%) ^{a)}	CD or ORD Data	
KA-1 (9)	14	[θ] 244	-12000 (neg. max.)
		[θ] 292	- 6100(neg. max.)
KA-2 (10)	18	[θ] 293	- 6600(neg. max.)
KA-3 (11)	60	[θ] 293	- 7420(neg. max.)
5α-Cholestan-3-one (12) ¹⁴⁾		[Φ] 265	- 2380(trough)
		[Φ] 307.5	+ 3050(peak)
3β-Acetoxy-5α-cholestan-6-one (13) ¹⁴⁾		[Φ] 270	+ 4050(peak)
		[Φ] 306	- 3580(trough)

a) The yields are calculated from the total acetylation product prior to TLC separation.

第2章 主オリゴ配糖体 thornasteroside A の構造

第1節 主オリゴ配糖体 thornasteroside A の単離とその性質

中圧カラムクロマトグラフィーを用いてサポニン混合物から主オリゴ配糖体 thornasteroside A (8) を単離した。thornasteroside A (8) は原子吸光スペクトルおよび元素分析の結果、1個の硫酸エステルのナトリウム塩を含むことを示している。

また thornasteroside A (8) はホラ貝粗グリコシダーゼを用いた酵素加水分解, solvolysis (dioxane-pyridine), アセチル化すると, サボゲノールとして diacetyl-thornasterol A (6a) を単一に与えた。

第2節 プレグナン型オリゴ配糖体 dsp-1 への変換

前述のごとく thornasteroside A (8) はステロイド型アグリコンの側鎖部分が容易に二次的変化をうけやすいことから, 糖部構造を明らかにする目的で Chart 7 に示すように変換反応を行った。ま

ず, solvolysis(dioxane-pyridine)により硫酸エステルを切断し, ひきつづき retro aldol 反応によりアグリコンの側鎖部分をより安定なメチルケトンに変換しプレグナン型オリゴ配糖体 dsp-1 (14) とし, dsp-1 (14) の構造について検討した。

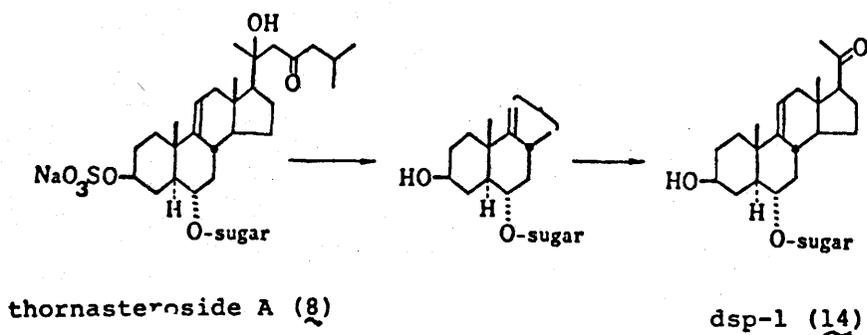


Chart 7

第3節 Dsp-1 の構造

Dsp-1 (14) は CD スペクトルにおいてプレグナン型アグリコンのメチルケトンに由来する正の極大 ($[\theta]_{287} + 6300$) を有しており, 酵素加水分解 (粗ナリンギナーゼ) するとサボゲノールとして genin-1 (1) を単一に与えた。また dsp-1 (14) をメタノリシスし, 構成糖としてキノボース, キ

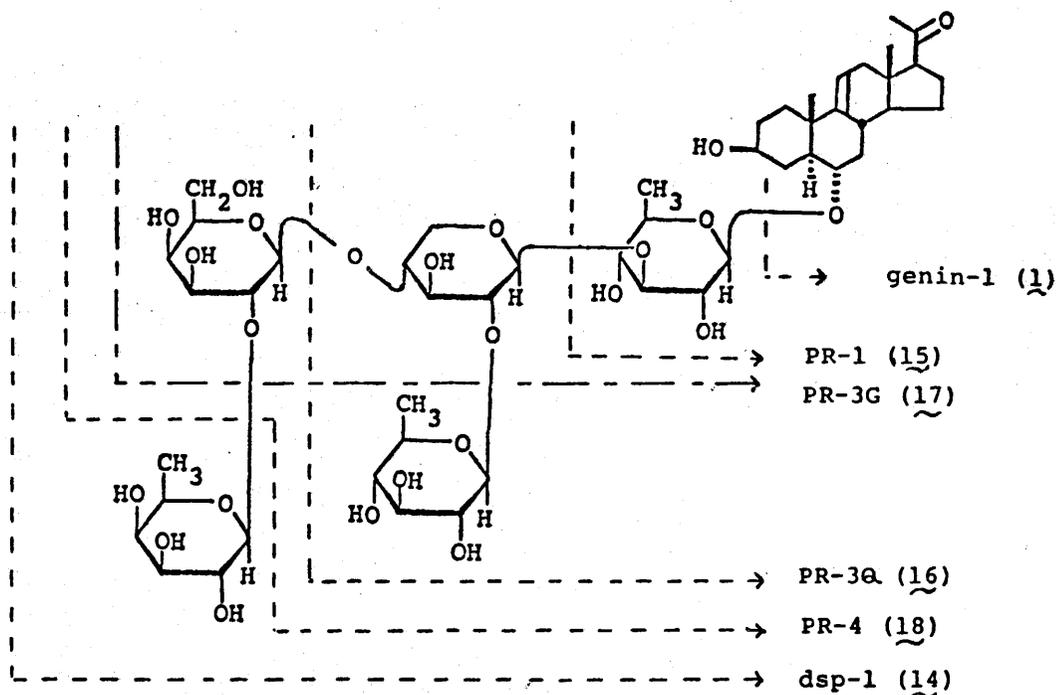


Chart 8

シロース, ガラクトース, フコース*をGLCにて同定した。

Dsp-1 (14) は緩やかな酸加水分解により, genin-1 (1) および4種の部分水解物PR-1 (15), PR-3Q (16), PR-3G (17), PR-4 (18) を与えた。

これらの部分水解物はメタノリシスするとそれぞれ構成糖として, PR-1 (15) はキノボース, PR-3Q (16) はキノボース, キシロースを, PR-3G (17) と PR-4 (18) はキノボース, キシロース, ガラクトースを与えた。

PR-1 (15) はCDスペクトルにおいて正の極大 ($[\theta]_{285} + 8800$) を有しプレグナン型アグリコンであることを示している。

PR-1 (15) は $\text{CH}_3\text{I}/\text{DMSO}/\text{NaH}$ の条件でメチル化¹⁵⁾すると tetra-O-methyl 誘導体 (15a) を与えた。15aは¹H-NMRスペクトルにおいて β -quinovopyranoside結合(⁴C₁form)に基づく1個のanomeric proton (δ 4.22 d, $J=7$) の存在を示した。

15aのMassスペクトルから, PR-1 (15) のmethyl carbonyl moietyもメチル化され, tertiary-butyl carbonyl, isopropyl carbonyl, ethyl carbonyl moietyの混合物に変換されたことが判明した。このことをさらに明らかにするため, pregnenolone (19) を用いて同様にメチル化を行なったところ4種のメチル化体20, 21, 22, 23を与え上記の結果と一致した。

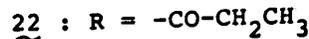
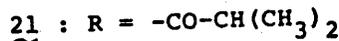
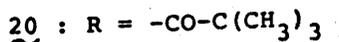
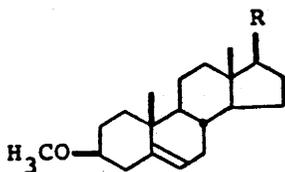
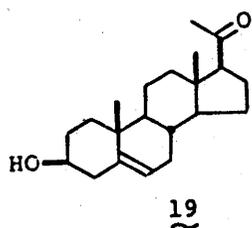


Chart 8

15aはメタノリシスするとmethyl 2, 3, 4-tri-O-methyl-quinovo-pyranosideを与え, TLC, GLCにて同定した。

また15のFD-Massスペクトルを測定した結果, m/e 478(base peak)に分子イオン(M⁺)が観測された。

したがってPR-1 (15)の構造は, genin-1 (1)の6-O- β -D-quinovopyranosideと決定した。

同様にして, PR-3Q (16), PR-3G (17), PR-4 (18)のメチル化を行ない, 完全メチル化体のphysical dataおよびメタノリシス生成物の検討から, それぞれの構造を決定した。

Dsp-1 (14)は完全メチル化すると, trideca-O-methyl 誘導体 (14a)を与えた。14aの¹H-NMRスペクトルにおいて大きなJ値でcouplingするanomeric proton: δ 4.25 (d, $J=8$), δ 4.36 (d, $J=7$), δ 4.56 (d, $J=6$), δ 4.59 (d, $J=7.5$), δ 4.81 (d, $J=7$)を与えすべて β 結合(⁴C₁form)していることを示した。

* 褐藻から得られるポリサッカライド(fucoidan)の構成成分としてL-フコースが知られていることから, フコースについては別途に単離して旋光度からD-フコースと決定した。

また14aはメタノリシスすると methyl 2, 3, 4-tri-O-methyl-quinovopyranoside, methyl 2, 3, 4-tri-O-methyl-fucopyranoside, methyl 3, 4, 6-tri-O-methyl-galactopyranoside, methyl 3-O-methyl-xylopyranoside, methyl 2, 4-di-O-methyl-quinovopyranoside を与えた。したがって dsp-1 の構造は14式であらわされることが判明した。

上記第2節の dsp-1 (14) と thornasteroside A (8) の関係から, thornasteroside A の構造は 20-hydroxy-6 α -O- β -D-fucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl (1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl- (1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl-5 α -cholest-9 (11)-en-23-on-3 β -yl sodium sulfate (8) と決定した。

第4節 “Thornasteroside” の生物活性

オニヒトデのサポニン混合物“thornasteroside”はマウスに対する急性毒性として 300 mg/kg (P.O.) で致死, 筋弛緩作用 100 ~ 200 mg/kg (P.O.) 20 ~ 50 mg/kg (i.p.), 中枢抑制 25 ~ 50 mg/kg (i.p.) などの作用を示した。

結 論

- 1) オニヒトデ *Acanthaster planci* が産生するオリゴ配糖体の構造研究を行い, ホラ貝の加水分解酵素を利用して真正サボゲノール thornasterol A および thornasterol B を得, その化学構造を明らかにした。
- 2) 主オリゴ配糖体 thornasteroside A を単離し, その化学構造を明らかにすることができた。真正サボゲノールをも含め化学構造が明らかにされたサポニンとして, ヒトデ類からは thornasteroside A が初めての例である

引用文献

- 1) 橋本芳郎 “魚貝類の毒” 東京大学出版会, 1977, p 275.
- 2) 池上晋, 農化, 50, R, 233, (1976).
- 3) A.M.Mackie, R.Lasker, and R.T.Grant, Comp. Biochem. Physiol., 26, 415 (1968).
- 4) Y.Shimizu, Experientia, 27, 1188 (1971).
- 5) T.Yamanouchi, Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 4, 183 (1955).
- 6) I.Kitagawa, H.Yamanaka, M.Kobayashi, T.Nishino, I.Yosioka, and T.Sugawara, Chem.pharm.Bull., 26, 3722 (1978).
- 7) a) R.F.Nigrelli and P.A.Zahl, Proc.Soc.Exptl.Bid, Med., 81, 379 (1952).
b) T.D.Sulliran, K.T.Ladue, and R.F.Nigrelli, Zoologica(New York), 40, 49 (1955).
- 8) a) S.Ikegami, Y.Hirose, Y.Kamiya, and S.Tamura, Agr.Biol.Chem., 36, 1843 (1972).
b) Idem, ibid., 36, 2453 (1972).
- 9) a) Y.Shimizu, J.Am.Chem.Soc., 94, 4051 (1972).
b) Y.M.Sheikh, B.M.Tursch, and C.Djerassi, J.Am.Chem.Soc., 94, 3278 (1972).
c) Idem, Tetrahedron Letters, 1972, 3721.

- d) Y.M. Sheikh and C. Djerassi, *ibid.*, **1973**, 2927.
- 10) T. Tanimura, J.J. Pisano, Y. Ito, and R.L. Bowman, *Science*, **169**, 54, (1970).
- 11) a) J.J. Schneider and M.L. Lewbart, *J. Biol. Chem.*, **222**, 787 (1966).
b) D.P. Burma, *Anal. Chim. Acta.*, **9**, 513 (1953).
- 12) H.D. Beckey and H.R. Schulten, *Angew. Chem. internat. Edit.*, **14**, 403 (1975).
- 13) A.I. Scott and A.D. Wrixon, *Tetrahedron*, **26**, 3695 (1970).
- 14) C. Djerassi and W. Klyné, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 2390.
- 15) S. Hakomori, *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205 (1964).

論文の審査結果の要旨

本論文は、棘皮動物門ヒトデ綱のオニヒトデ *Acanthaster planci* L. が産生するステロイド系オリゴ配糖体の化学構造研究を行い、まず、1) オニヒトデの天敵ホラガイ *Charonia lampas* の加水分解酵素を利用して、真正サボゲノール thornasterol A および thornasterol B を得、それらの化学構造を明らかにし、次いで2) 主オリゴ配糖体 thornasteroside A を単離し、その化学構造を明らかにしている。

その研究過程において、オリゴ配糖体の抽出分離に優れた工夫があるのみならず、化学構造研究においても独創性の高い手法が応用されている。そして、真正サボゲノール部の構造も含めて、その全化学構造が明らかにされたのは、ヒトデ類のサポニンとしては、thornasteroside A が初めての例である。

以上の成果は、薬学博士の学位請求論文として、充分価値あるものと認められる。