

ブラジル産ジョロウグモから単離された新規アシルポリアミンの構造決定¹⁾

西丸 貴弘*, 中嶋 暉躬**, 板垣 又丕***, 直木 秀夫****, 岩下 孝*****,
藤田 剛司*****, 山口 仁宏*****, 若宮 建昭*****

Structural Determination of Novel Acylpolyamines

from the Venom of *Nephila clavipes*, a Brazilian Joro spider

Takahiro NISHIMARU*, Terumi NAKAJIMA**, Yasuhiro ITAGAKI***, Hideo NAOKI****,
Takashi IWASHITA*****, Tsuyoshi FUJITA*****, Yoshihiro YAMAGUCHI*****,
and Tateaki WAKAMIYA*****

Acylpolyaminetoxins in spider venom are known to inhibit glutamatergic neuromuscular transmission of arthropods or glutamate receptor in the mammalian central nervous system. Therefore, these toxins seem to be valuable for elucidating the mechanism of glutamatergic neurotransmission in the brain.

Recently, a fraction containing novel acylpolyamine with molecular weight of 787 was obtained from *Nephila clavipes*, a Brazilian Joro spider, by HPLC purification of the crude venom. Three kinds of structures composed of five amino acids and one polyamine were proposed to these compounds by means of MS/MS analysis of the fraction. In the proposed structures, the sequence of four residues at left side in each molecule is the same. However, they differ from each other in the composition or the sequence of two amino acid residues at right side.

In the present study, the chemical syntheses of 1~3 and the comparison of synthetic compounds with natural products by means of MS-MS analysis were carried out to determine the structures of novel acylpolyamines.

Key words : Acylpolyaminetoxin, *N*-(4-Aminobutyl)glycine, *N*-(3-Aminopropyl)- β -alanine, Cadaverine, Putrescine, Spider toxin, MS-MS analysis

1. 緒言

グルタミン酸は昆虫や甲殻類等の節足動物における神経-筋間接合部における神経伝達物質として知られている²⁾。また、哺乳動物においては、中枢神経系での興奮性神経伝達物質として機能し、学習や記憶に密接に関与している³⁾。

一方、クモ毒の一種であるアシルポリアミン型の化合物は、グルタミン酸による神経伝達を強力かつ特異的に遮断する神経毒ペプチドであることが知られており⁴⁾、過剰のグルタミン酸放出が引き金となる脳虚血症やアルツハイマー病のような脳疾患の原因解明、またはそれらを含めた種々の脳神経科学における重要なツールとなることが期待される。

2. 目的

平成 17 年 6 月 11 日受理

* 総合理工学研究科理学専攻

** 星薬科大学

*** コロンビア大学

**** (株)ロビカルテクノセンター

***** サントリー生物有機科学研究所

***** 理学科

最近、中嶋らはブラジル産ジョロウグモ (*Nephila clavipes*) の毒囊から、分子量 787 の新規なアシルポリアミン数種を含む画分を得た。しかし、その量が極めて微量であったため、それらの分離精製および NMR による構造決定が不可能であった。そこで、混合試料の MS/MS スペクトルにおけるフラグメントピークの解析を行うことにより、Fig. 1 に示す 3 種類の推定構造式を提出し、それぞれ、NPTX-787-X (1)、NPTX-787-Y (2)、および NPTX-787-Z (3) と名付けた。

NPTX-787-X (1) は、4-ヒドロキシインドール-3-酢酸 (4-Hyia)、アスパラギン (Asn)、1, 5-ジアミノプロパン (カダベリン: Cad)、*N*-(4-アミノブチル)- β -アラニン (プトレアニン: Pua) 各 1 残基と *N*-(3-アミノプロピル)- β -アラニン (Apa) 2 残基の計 6 残基から構成されている。また、NPTX-787-Y (2) および NPTX-787-Z (3) はいずれも分子の左側 4 残基までは NPTX-787-X と共通の部分構造であるが、Fig. 1 の R に相当する右側 2 残基の塩基性アミノ酸の組成あるいは配列が NPTX-787-X と異なっている。

本研究では、新規ポリアミントキシンの構造を決めるために 1~3 の推定構造式に相当する化合物を合成し、それらの MS/MS スペクトルの比較検討により、天然物の構造決定を行うことを目的とした。

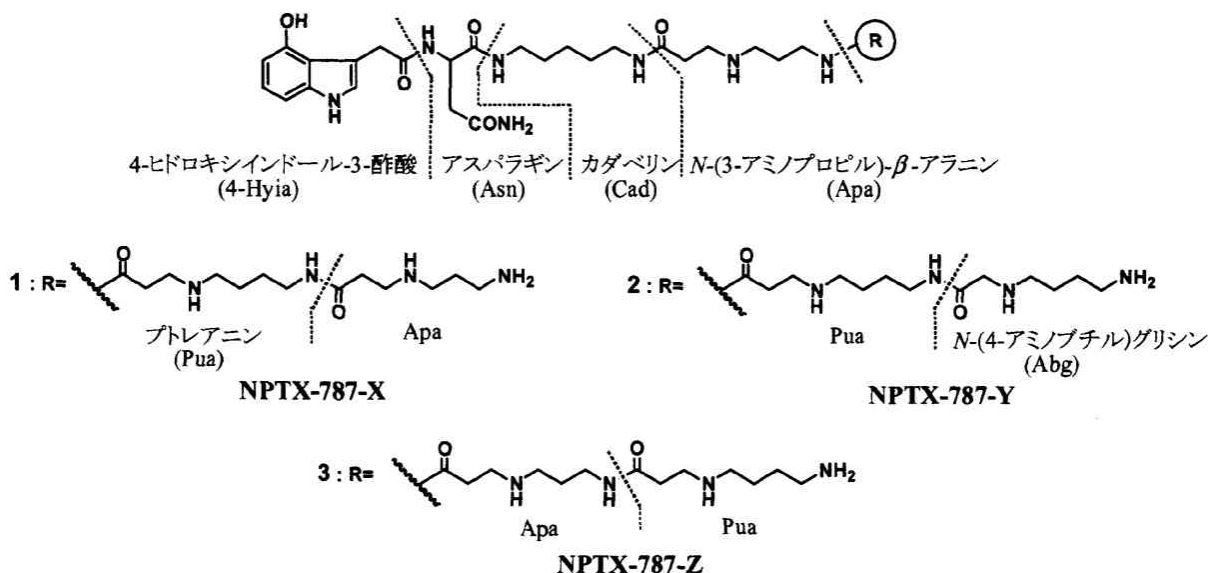


Fig. 1 Proposed structures of NPTX-787s.

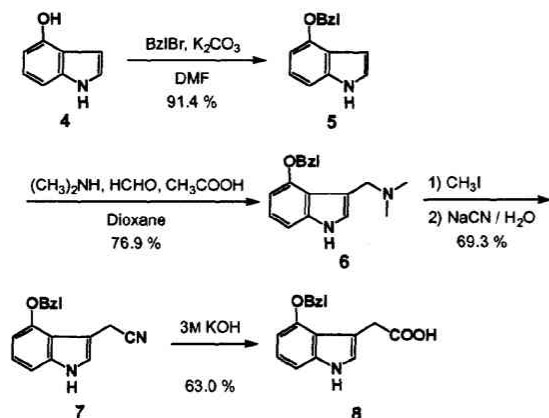
3. NPTX-787-X ~ Z の合成

推定構造式 1~3 で示される NPTX-787-X ~ Z の合成を進めるにあたり、まず、市販品として入手できない 4-Hyia, Cad, Apa, Pua, *N*-(4-アミノブチル)グリシン (Abg) の各構成単位誘導体の調製を行った。

3.1 各構成単位誘導体の調製

3.1.1 4-ベンジルオキシインドール-3-酢酸の調製

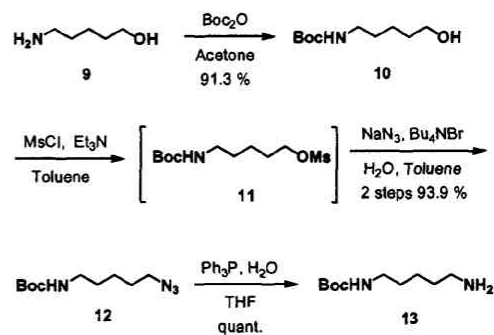
4-Hyia は最終脱保護時に接触還元を適用することから、4位水酸基をベンジル (Bzl) 基で保護することにした。市販の 4-ヒドロキシインドール (4) のフェノール性水酸基をベンジル化後、Mannich 反応で 4-ベンジルオキシシグロミン (6) とした。さらに、ヨードメタンにより 4 級アンモニウム塩とした後、シアン化ナトリウムを用いてニトリル体 7 へと導き、Stoll らの方法^{5, 6)} で、4-ベンジルオキシインドール-3-酢酸 (4-Boia) (8) を調製した (Scheme 1)。



Scheme 1 Preparation of 4-benzyloxyindole-3-acetic acid (4-Boia).

3.1.2 カダベリン誘導体の調製

Cad 誘導体の調製は、Mattigly の方法⁷⁾ を参考にして行った。すなわち、5-アミノ-1-ペンタノール (9) のアミノ基を *t*-ブトキシカルボニル (Boc) 基で保護した後にメシラート 11 とし、アジ化ナトリウムと臭化テトラブチルアンモニウムを用いてアジ化物 12 へと導いた。得られたアジ化物 12 は、接触還元を行うと 2 級および 3 級アミンを生成する事が明らかになっているため⁸⁾、トリフェニルホスフィンによりアミノ基に変換し Cad 誘導体 13 を調製した (Scheme 2)。

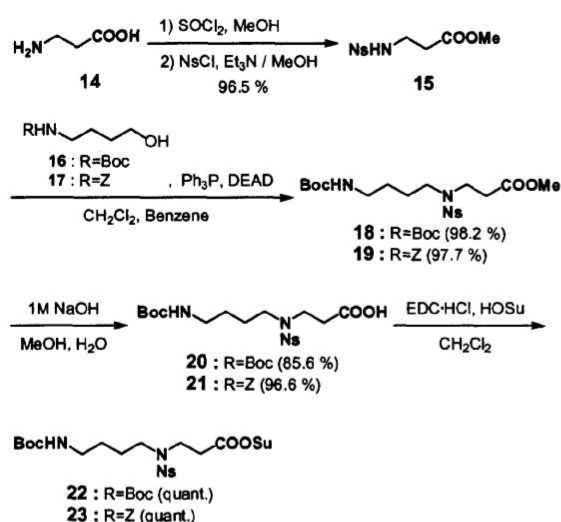


Scheme 2 Preparation of Cad derivative.

3.1.3 プトレアニン誘導体の調製

β -アラニン (14) のカルボキシル基をメチルエステル化した後 Ns 基で保護した。得られた 15 と *N*-Boc-4-アミノ-1-ブタノール (16) および *N*-Z-4-アミノ-1-ブタノール (17) をそれぞれアジカルボン酸ジエチル (DEAD) とトリフェニルホスフィンを用いる光延-福山アルキル化法⁹⁾ で縮合し、Pua 誘導体 18 および 19 とした。次に、これらをけん化後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC-HCl) と *N*-ヒドロ

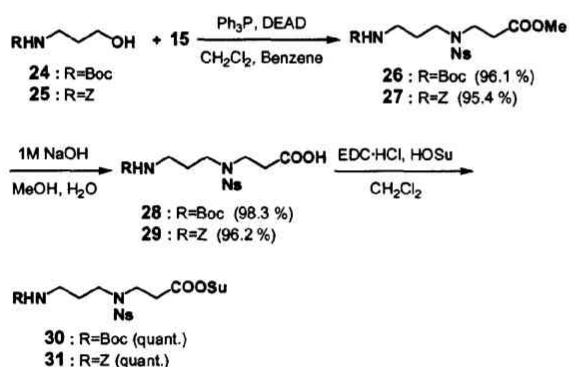
キシコハク酸イミド (HOSu) により活性エステル体 **22** および **23** とした (Scheme 3).



Scheme 3 Preparation of active ester derivative of Pua.

3.1.4 *N*-(3-アミノプロピル)-β-アラニン誘導の調製

Pua 誘導体の調製と同様に、3-アミノ-1-プロパノールのアミノ基を Boc 基または Z 基で保護した **24** または **25** と、Ns-アミド **15** を光延-福山アルキル化法で縮合した。このようにして得られた Apa 誘導体 **26** および **27** のメチルエステルをけん化後、活性エステル体 **30** および **31** とした (Scheme 4).



Scheme 4 Preparation of active ester derivative of Apa.

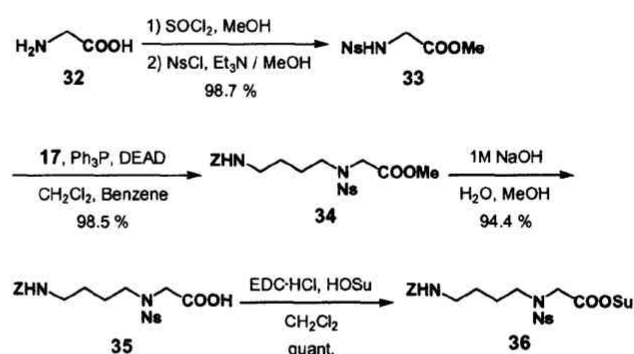
3.1.5 *N*-(4-アミノブチル)グリシン誘導体の調製

Abg 誘導体は、グリシン (**32**) から導いた *N*-Ns-グリシンメチルエステル (**33**) と *N*-Z-4-アミノブタノール (**17**) を縮合し、最終的に活性エステル体 **36** として調製した (Scheme 5).

3.2 NPTX-787-X (1) の合成

まず Cad 誘導体 **13** と Z-アスパラギン (Z-Asn) の縮合を EDC-HCl / *N*-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド (HONb) 法を用いて行った。得られた化合物 **37** の Z 基を接触還元により除去後、4-Boia (**8**) と 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-ト

リアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM)¹⁰⁾ を用いて縮合した。縮合生成物 **38** の Boc 基をギ酸で除去後、Apa 活性エステル誘導体 **30** と縮合し、目的化合物 **1**~**3** の合成の共通中間体 **39** へと導いた。その後、ギ酸による Boc 基の除去と、Pua および Apa 活性エステル誘導体との縮合を繰り返して、NPTX-787-X 完全保護体 **40** へと導いた。得られた **40** の Ns 基をチオフェノールと炭酸セシウムを用いて除去後、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いて精製し、還元の際に触媒毒となる硫黄を含む成分を完全に除去した。このようにして精製した **41** の Bzl 基と Z 基を接触還元で除去後、RP-HPLC を用いて再び精製し NPTX-787-X (**1**) を得た (Scheme 6).



Scheme 5 Preparation of active ester derivative of Abg.

3.3 NPTX-787-Y (2), NPTX-787-Z (3) の合成

NPTX-787-Y (**2**) の合成は NPTX-787-X (**1**) と同様の方法を用いて行った。すなわち、前述の共通中間体 **39** の Boc 基を除去後、Pua および Abg 活性エステル誘導体を順次縮合した。得られた完全保護体 **42** の Ns 基を除去、RP-HPLC による精製、Bzl 基と Z 基の除去、RP-HPLC による精製を順次行い、NPTX-787-Y (**2**) を合成した (Scheme 7)。NPTX-787-Z (**3**) の合成も同様に共通中間体 **39** から行った (Scheme 8).

4. NPTX-787-X-Z と天然物の質量分析法による比較検討

上記のようにして合成した化合物 NPTX-787-X~Z (**1**~**3**) について、エレクトロスプレーイオン化液体クロマトグラフィー四重極型質量分析計飛行時間型質量分析計マスマスペクトロメトリー/マスマスペクトロメトリー (ESI-LC-Q-TOF-MS/MS)、およびマトリックスレーザー支援脱離イオン化磁場型質量分析計マスマスペクトロメトリー/マスマスペクトロメトリー (MALDI-Magnetic-sector-MS/MS) の測定を行い、天然物のスペクトルとの比較検討を行った。

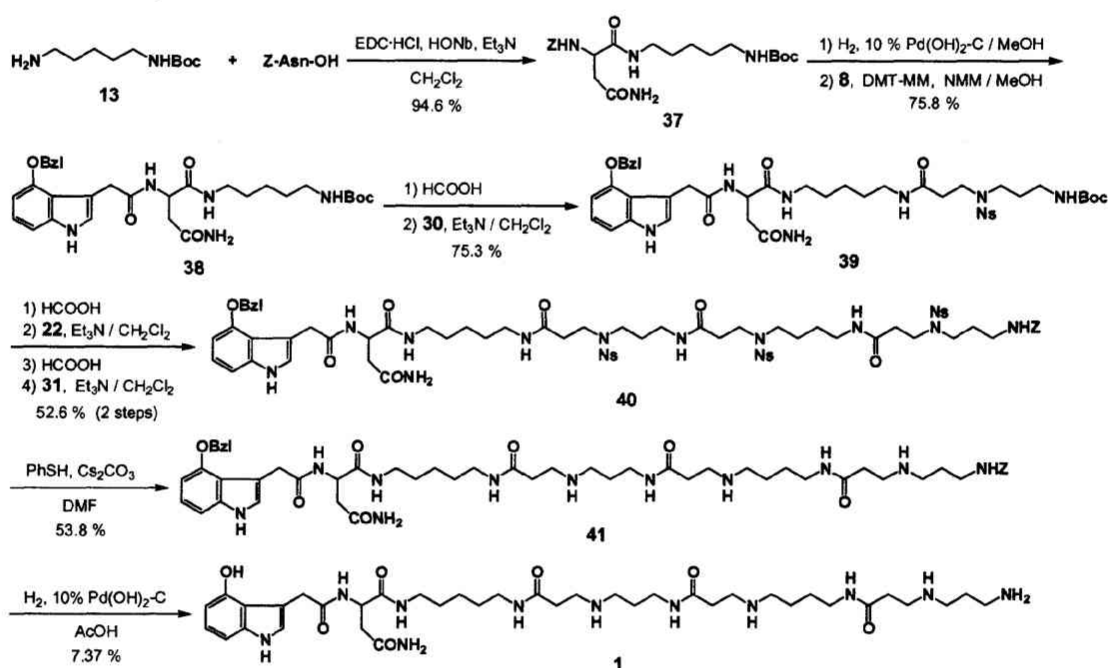
ESI-LC-MS/MS の測定結果から、化合物 **1** および **3** のスペクトルパターンは天然物と類似している点が多く、毒の成分としてこれらが含まれているものと推定される。一方、化合物 **2** のスペクトルは、全体的に天然物のスペクトルパターンとは全く異なっていることから、天然物には **2** が含まれていないと考えられる (Fig. 2).

次に、ESI-LC-MS/MS よりもさらに詳しいデータを得るために、高エネルギー衝突誘起解離 (High energy-CID) による MALDI-sector-MS/MS の測定を行った。なお、この測定には Na 付加イオンを用いることにした。その結果、天然物と合成化合物 1-3 のスペクトルにおいて、 m/z 594 以下の低質量領域では種々の切断様式に基づくフラグメントが混在するため、その相違を論ずることは出来ない。しかしながら、 m/z 700~800 にはそれぞれの構造に由来する明確な相違が認められた (Fig. 3)。これまでの多数のアシルポリアミン系クモ毒の MS スペクトルによる解析から、Fig. 3 に示すように NPTX-787-X の Apa 残基は矢印で示した β - γ 間の結合から順次切断が生じ、 m/z 736 が構造の特徴を示すフラグメントとなることが分かる。NPTX-787-Y においても Abg 残基の矢印で示した β - γ 間以降の結合が切断され、この場合は m/z 737 のフラグメントが特徴的なものとなる。一方、NPTX-787-Z ではアミノ酸配列の相違により右側末端成分である Pua 残基の β - γ 間で切断された m/z 722 と γ - δ 間で切断された 737 のフラグメントが

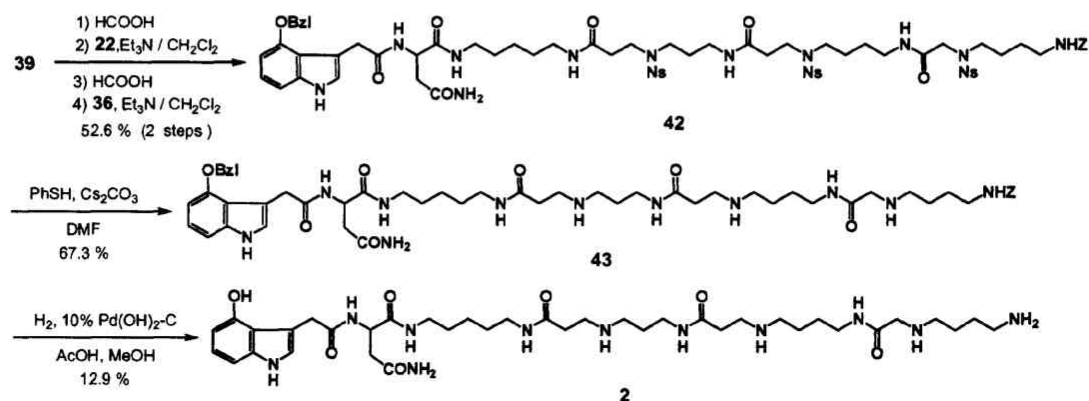
生成する。天然物のスペクトルには NPTX-787-X と Z に特徴的な m/z 722 および 736 が明瞭に確認できる。また、 m/z 737 のフラグメントは、NPTX-787-Y に由来するのではなく、NPTX-787-Z に由来するものと考えるのが妥当であろう。この事実は前述の、NPTX-787-Y が含まれていないという推論を支持するものである。

5. 結論

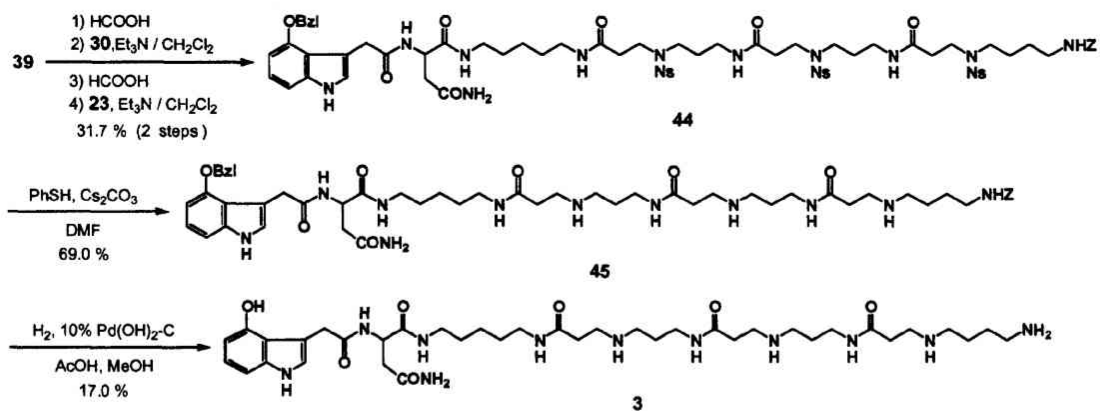
ブラジル産ジョロウグモ *Nephila clavipes* の毒囊から得られた分子量 787 の新規アシルポリアミン毒に対し、MS/MS スペクトルの解析結果から提出された推定構造式に基づき、NPTX-787-X (1)、NPTX-787-Y (2)、NPTX-787-Z (3) を合成した。さらに、これら合成化合物と天然物の MS/MS スペクトルの測定を行い、詳細な比較検討を行った結果、天然物の構造は NPTX-787-X および NPTX-787-Z であることを決定することができた。



Scheme 6 Synthesis of NPTX-787X (1).



Scheme 7 Synthesis of NPTX-787-Y (2).



Scheme 8 Synthesis of NPTX-787-Z (3).

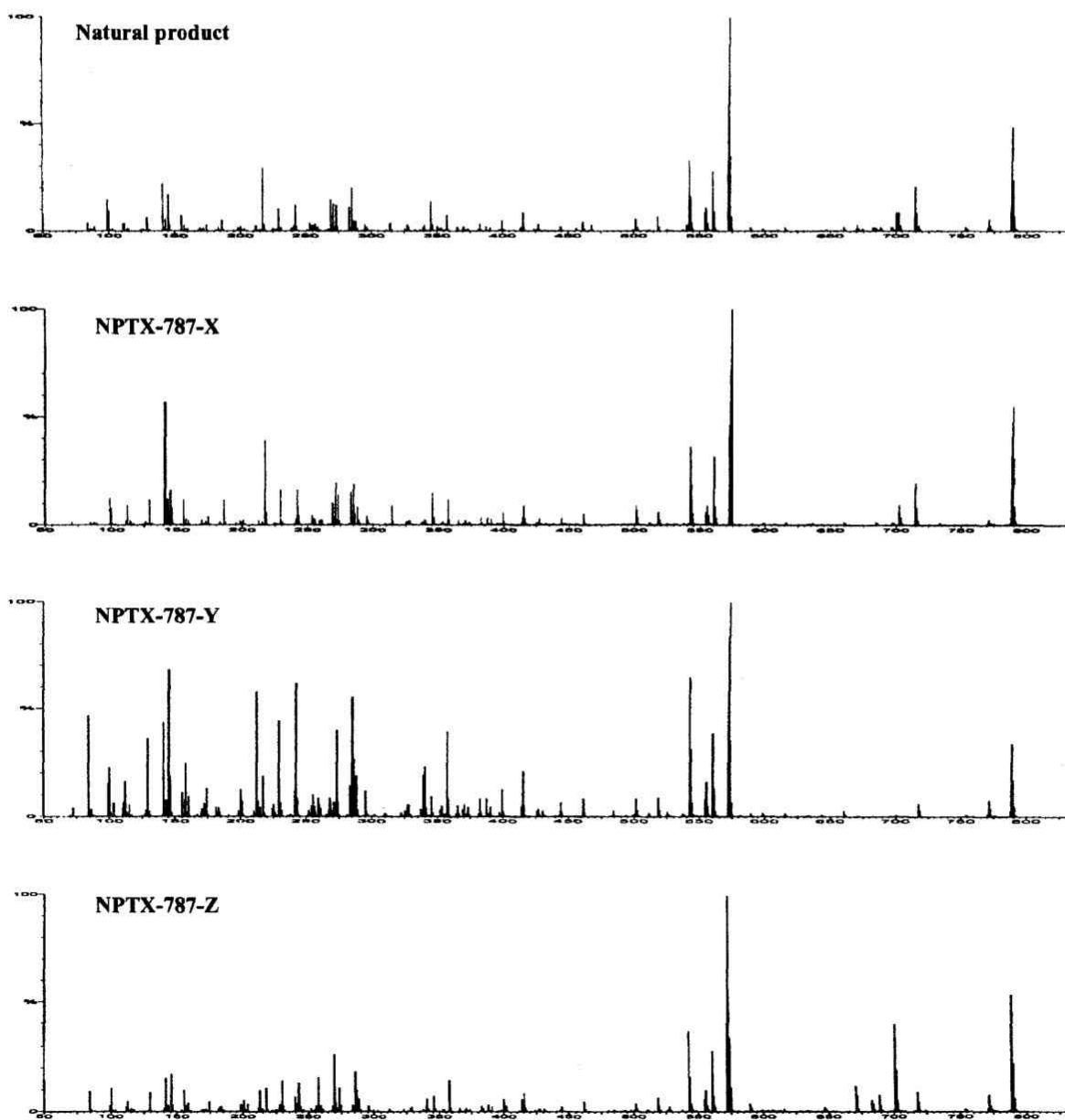


Fig. 2 ESI-Q-TOF-LC-MS/MS spectra of synthetic NPTX-787-X~Z (1-3) and natural product [(787 + H)⁺].

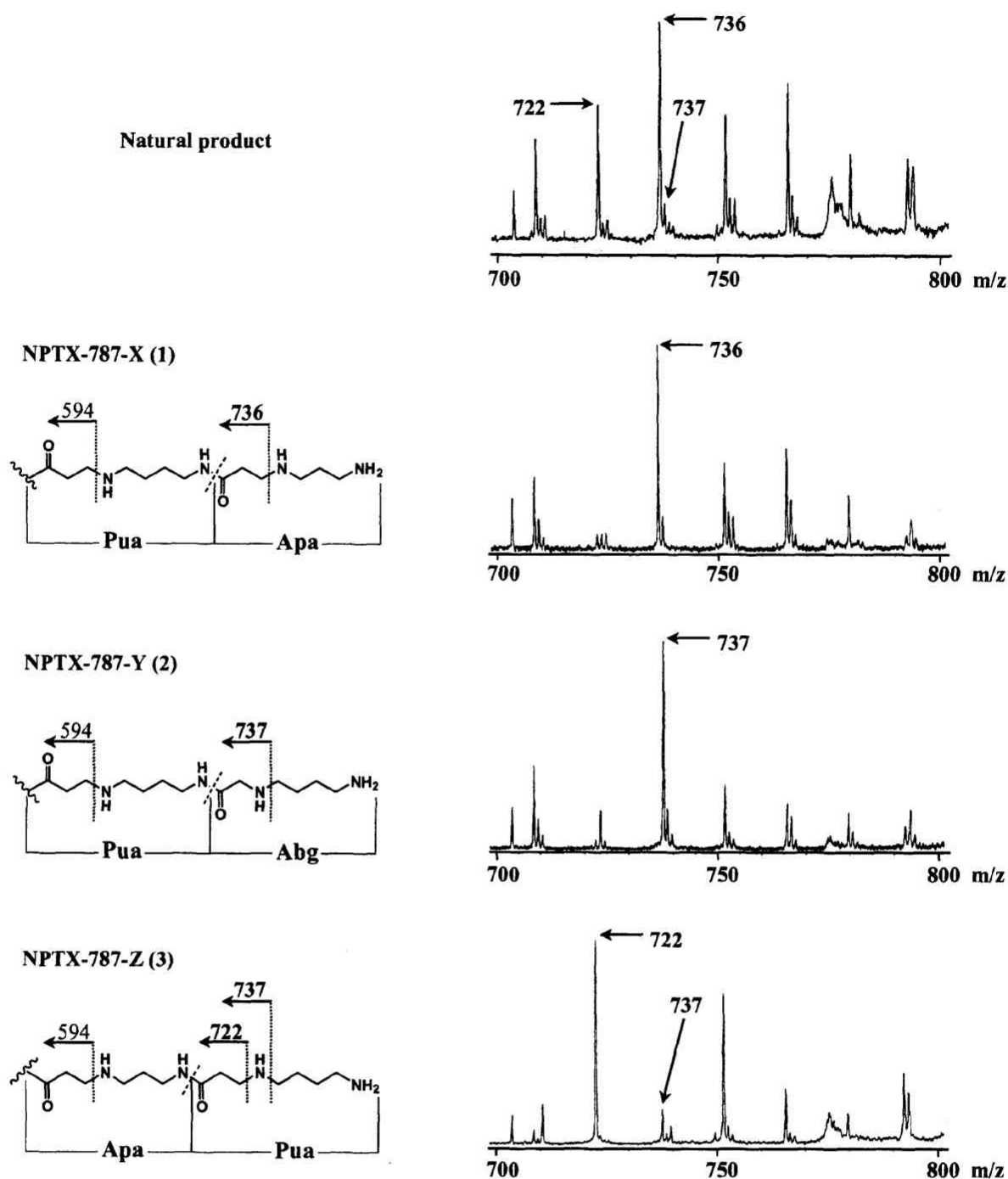


Fig. 3 MALDI-sector-MS/MS spectra of synthetic NPTX-787-X~Z (1~3) and natural product [(787 + Na)⁺].

参考文献

- 1) The First Asia-Pacific International Peptide (2004年10月31日~11月3日, 福岡) において一部発表. T. Nishimaru, Y. Yamaguchi, T. Nakajima, Y. Itagaki, H. Naoki and T. Wakamiya, *Peptide Science 2004*, (2005), 669.
- 2) P. A. Briley, M. T. Filbin, G. G. Lunt and P. D. Turner, *Mol. Cell Biochem.*, **39** (1981), 347.
- 3) J. Willetts, R. L. Balster and J. D. Leander, *Trend Pharmacol. Sci.*, **11** (1990), 423.
- 4) N. Kawai, A. Niwa and T. Abe, *Brain Res.*, **247** (1982), 169.
- 5) A. Stoll, F. Troxler, J. Peyer and A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta*, **38** (1955), 1452.
- 6) A. Ek. and B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.*, **76** (1954), 5579.
- 7) P. G. Mattingly, *Synthesis*, (1990), 366.

- 8) T. Wakamiya, T. Kinoshita, Y. Hattori, Y. Yamaguchi, H. Naoki, G. Corzo and T. Nakajima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77** (2004), 331.
- 9) T. Fukuyama, C-K. Jow and Mui Cheung, *Tetrahedron Lett.*, **36** (1995), 6373.
- 10) M. Kunishima, C. Kawachi, K. Hioki, K. Terao and S. Tani, *Tetrahedron*, **57** (2001), 1551.