

カテコール型ジテルペンの合成とそれらの生物活性

東京農工大学名誉教授
多田 全宏

1 カテコール型ジテルペンの生物活性

生物活性物質が活性を発現するには、分子全体の立体的な形と特定の官能基が必要な位置に配置された構造が必要である。ある生物活性物質と同じ炭素骨格を持った物質を合成しても、それだけではその生物活性物質の合成にはつながらない場合が多い。したがって、生物活性物質の合成では、骨格を構築する際に、最小限の変換反応で既定の位置に目的の官能基が導入できるような合成法を考える必要がある。また新たな官能基導入反応を開発する必要に迫られることも多いと言える。

優れた生物活性を有する複雑な構造の化合物を多段階の反応を駆使して数 mg でも合成することは大切なことであるが、更なる改良によって大量合成法を開発しなければ科学としての発展も応用の道も期待しにくい。様々な活性試験に供することの出来る量を容易に供給できる簡便な合成経路を確立することができれば、有用な天然生物活性物質を利用する道が開けると考えた。

近年、食品に含まれる栄養素以外の様々な生理活性物質、とりわけ抗酸化活性物質が注目されている。食品中の抗酸化活性物質は、ビタミン類、含硫化合物などを除けば、その多くはポリフェノール類であるが、抗酸化活性物質の宿命として酸素による酸化を受けやすく、空気中では不安定である。ポリフェノール類には、お茶のカテキン類をはじめとする多くの植物に含まれるフラボノイド型ポリフェノール、赤ワインの抗酸化活性物質として話題になる resveratrol をはじめとするスチルベン型ポリフェノール、ローズマリーの抗酸化活性物質であるフェノール性ジテルペン、ホップやシダ類の抗菌物質であるフロログルシノール類などが知られている。これらの物質には、抗酸化活性以外にも様々な生理活性が報告されている¹⁻¹⁰⁾。本来、ポリフェノール類は植物にとって微生物や寄生動物などに対する自己防御物質として役立っていると考えられる。

2 *ortho*-キノンと*ortho*-キノンメチド

我々は、カテコール類とそれらの酸化生成物の反応と生物活性に興味を持ち、研究を続けてきた。カテコール類は酸化されると *ortho*-キノンを生成するが、*ortho*-キノンは 2-ヒドロキシ-1,4-キノンメチドと互変異性の関係にある。いずれも不安定な化合物が多いためか、2-ヒドロキシ-1,4-キノンメチド（以下 *ortho*-キノンメチドと言う）の化学的性質や生物活性についての報告例は少ない。

カテコールが酸化されて生成する *ortho*-キノンと *ortho*-キノンメチドは互変異性体であるが、どちらが安定であるかについての報告はない。*ortho*-キノンと *ortho*-キノンメチドとの互変異性によく似た関係にあるのが、cyclopenta-1,2-dione とその互変異性体である 2-hydroxy-2-cyclopentenone の関係で

ある。この場合は後者が安定で 100% 2-hydroxy-2-cyclopentenone として存在していることが知られている (図 1)。

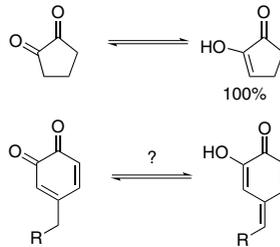


図1. Cyclopenta-1,2-dioneと2-hydroxy-2-cyclopentenone およびortho-キノンとortho-キノンメチドとの互変異性

天然のジテルペンである abietaquinone methide^{6,11)} の場合には、我々が行った MOPAC による計算の結果も *ortho*-キノンより *ortho*-キノンメチドの方が安定で、実験結果とも一致した。天然には比較的安定な *ortho*-キノンメチド構造を持ったジテルペンが知られており、図 2 に示したようなジテルペンが報告されている。抗腫瘍活性を持つ taxodone¹²⁻¹⁴⁾, taxodione¹²⁻¹⁴⁾, 抗マラリア活性を示す 3-*O*-benzoylhosloppone¹⁰⁾, 東アフリカで消化管内の寄生虫駆除薬として使われている植物の成分である abietaquinone methide, 抗ウイルス活性を示す sagequinone methide³⁾ などがある。また、生物活性の報告されていない maytenoquinone^{13,16-19)} 等もある。しかし、これら天然カテコール類とそれらの酸化物である *ortho*-キノンメチド類の化学的な性質や生物活性に関する報告は少なく、新しい知見が得られるのではないかと考えた。(図 2)。

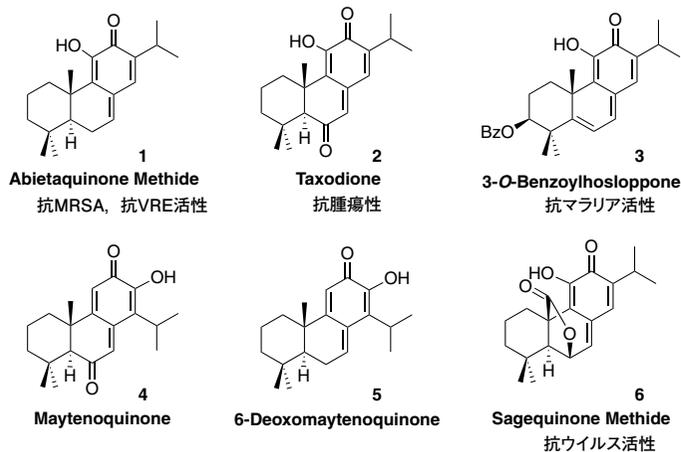


図2. キノンメチド型ジテルペン

そこで、キノンメチド型ジテルペンとしては、最も基本的な構造と考えられた abietaquinone methide とその関連するジテルペン類を合成し、生物活性を検討することにした。

3 立体選択的ポリエン環化反応による abietane 型ジテルペン類の全合成

Abietane 型ジテルペンは geranylgeranylpyrophosphate から連続的な環化反応を経て生合成されることが知られている。われわれは、geranylgeraniol に類似した修飾されたポリエンを用いて、不斉環化反応を行い、天然生理活性物質を合成することを計画した¹⁹⁾。予想した環化反応後の7位に不斉炭素を有するポリエンエステル7をニトロメタン中、Lewis 酸 (BF₃·OEt₂) 触媒により環化反応を行った。この反応において、7のエステル部分の R 基を大きくすると環化の立体選択性が向上することがわかった (図3)。すなわち、エステルの R 基が立体障害の小さいメチル基の場合は、8 と 9 が 1 : 3 の比で生成したのに対し、高高いイソプロピル基の場合は、8 と 9 が 1 : 10 の比で生成した。これは、環化の遷移状態において、7位のエステル基と14位水素との立体反発が、R 基の大きさによって異なり、立体的に小さいメチル基では、(I) と (II) とのエネルギー差は比較的小さいが、高高いイソプロピル基の場合には、(I) の遷移状態においてエステルと芳香環水素との立体的反発が大きくなり、(II) の遷移状態が優先するためであると推定した。

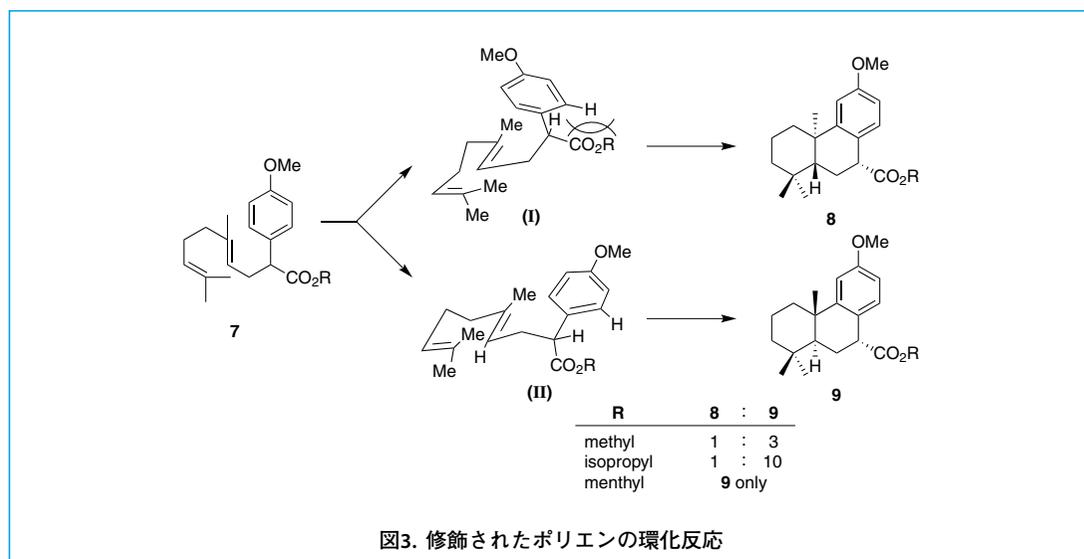
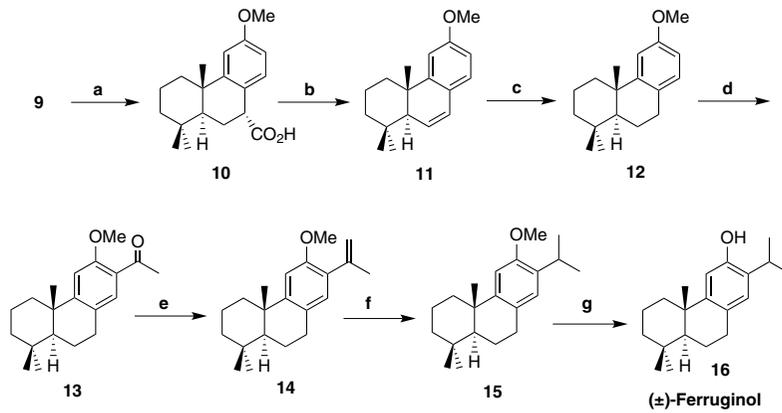


図3. 修飾されたポリエンの環化反応

この立体選択的ポリエン環化反応を利用して12種類のジテルペンを合成した。

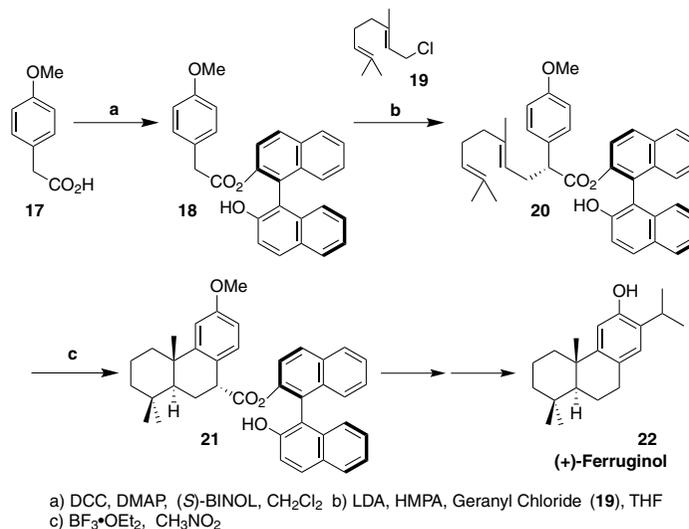
エステル7の環化により選択的に得られた9からの ferruginol (16)^{20,21)}の合成経路を図4に示す。化合物9を加水分解してカルボン酸に変換した後、キノリン中、四酢酸鉛により脱炭酸させ、得られた6,7位に二重結合を有する化合物11をさらに接触還元し12を合成した。次に12をFriedel-Craftsアシル化した後、Wittig反応および接触還元を行って、13位にイソプロピル基を導入し、15を合成した。最後に水素化ナトリウム、エタンチオールを用いてメチルエーテルを脱保護し、(±)-ferruginol (16)を合成した。



a) KOH, MeOH, H₂O b) Pd(OAc)₄, Cu(OAc)₂, Quinoline c) Pd/C, H₂ d) AlCl₃, CH₃COCl, CH₂Cl₂
e) *n*-BuLi, (Ph)₃PCH₂Br, THF f) Pd/C, H₂ g) NaH, EtSH, DMF

図4. (±)-Ferruginolの合成

次に、この反応のエステル部分に1,1'-bi-2-naphthol (BINOL)を用い、ferruginolの不斉合成を行った。カルボン酸 **17** を DCC, DMAP を用いてキラル試薬 (*S*)-(-)-1,1'-bi-2-naphthol (BINOL) と脱水縮合させエステル **18** に変換し、これを LDA, HMPA, そして geranyl chloride (**19**) を作用させることにより、95% de でジアステレオ選択的にゲラニル基を導入した **20** を合成した。次に、**20** を同様に BF₃·OEt₂ で処理したところ、立体選択的に環化反応が進行し、**21** が得られた (図5)。得られた **21** から図4と同様の経路で (+)-ferruginol (**22**) を合成した。また、(*R*)-(+)-1,1'-bi-2-naphthol (BINOL) を用いて同様の反応経路によって (-)-ferruginol (**23**) を合成した。

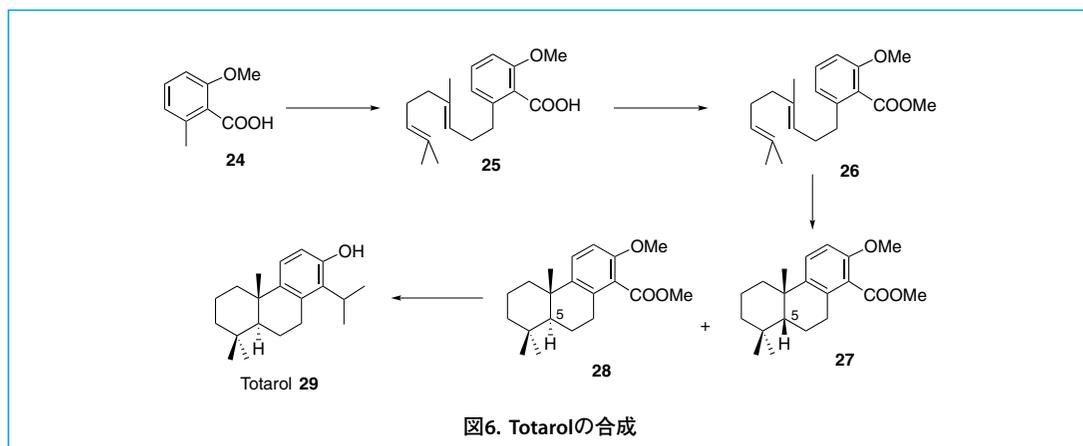


a) DCC, DMAP, (*S*)-BINOL, CH₂Cl₂ b) LDA, HMPA, Geranyl Chloride (**19**), THF
c) BF₃·OEt₂, CH₃NO₂

図5. (+)-Ferruginolの合成

4 Totarol の合成

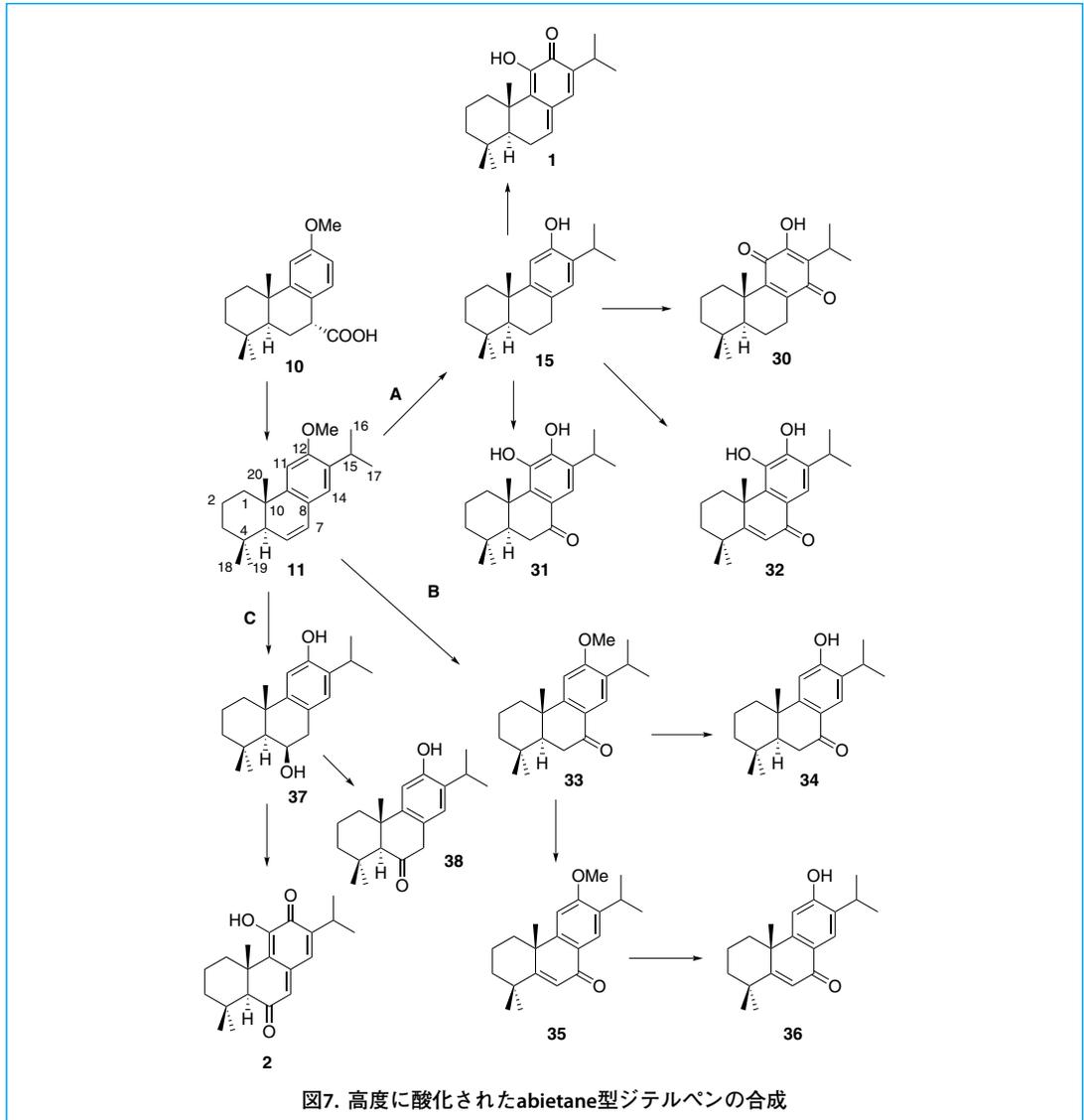
Totarane 骨格は abietane 骨格とはイソプロピル基の結合位置が異なるが、同様の修飾されたポリエン **24** を用いて環化反応を行い、totarol²²⁾ (**29**) を合成することに成功した²³⁾。Totarol (**29**) の合成について簡単に述べる。2-Methoxy-6-methylbenzoic acid (**24**) から LDA によって生成させたジアニオンに geranyl chloride (**19**) を反応させゲラニル基を導入した。次に、これをメチル化し、メチルエステル **26** を得た。メチルエステル **26** を $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ によって環化させ、(5 α :5 β , 3:1) 混合物と思われる三環性化合物 **27** を得た。この三環性化合物混合物 **27** のメチルエステルをイソプロピル基に変換した後、 BBr_3 を用いてメチルエーテルを外し、目的の totarol (**29**) を合成した。Totarol は高価であるが、市販されているので、比較したところ、スペクトルデータが合成品と一致した。



5 高度に酸化された abietane 型ジテルペンの合成とその抗 VRE および抗 MRSA 活性

前述した、図4の ferruginol (**16**) の合成経路にある化合物 **15** を共通中間体として、A, B, C 三つの合成経路で、図7に記した酸化様式の異なる 12 種類のジテルペン、abietaquinone methide (**1**), taxodione (**2**), 6,7-dehydroferruginol methyl ether²⁴⁾ (**11**), ferruginol (**15**), royleanone¹³⁾ (**30**), demethylcryptojaponol²⁵⁾ (**31**), salvinolone^{26,27)} (**32**), sugiol methyl ether^{28,29)} (**33**), sugiol^{24,30,31)} (**34**), 5,6-dehydrosugiol methyl ether (**35**), 5,6-dehydrosugiol (**36**) および 6 β -hydroxyferruginol (**37**) のラセミ体を合成した³²⁾。長くなるので詳細については省略するが、図7の経路Aでは、まず ferruginol (**16**) のオルト位酸化により (\pm)-abietaquinone methide (**1**) を合成した。次に保護基を使いながら、para 位の酸化により royleanone (**30**) を、ベンジルの7位の酸化により demethylcryptojaponol (**31**) および salvinolone (**32**) を合成した。経路Bでは、まず、化合物 **11** のヒドロホウ素化により誘導したアルコールを sugiol methyl ether (**33**) に酸化し、次に 12 位を脱保護して sugiol (**34**) を得た。

最後に 5-6 位に二重結合を導入し、5,6-dehydrosugiol methyl ether (**35**) および 5,6-dehydrosugiol (**36**) を合成した。経路Cでは、化合物 **11** をエポキシ化した後、epoxideの開環により 6 β -hydroxyferruginol (**37**) を合成し、さらに 11 位の酸化によりキノンメチド化合物の一つである (\pm)-taxodione (**2**) を合成した。



6 合成したジテルペンの抗生物質耐性菌に対する抗菌活性

近年、VRE（バンコマイシン耐性腸球菌）、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）は各地の病院で深刻な被害を与えており、これらの抗生物質耐性菌に対する抗菌物質の発見が強く求められている。これまでにフェノール性水酸基を有する abietane 型ジテルペンはマツ科、スギ科、マキ科など広範囲の植物から単離され、抗菌活性、抗腫瘍活性、抗ウイルス活性などの様々の生理活性を示すことが報告されている。我々は高度に酸化された abietane 型ジテルペンが VRE、MRSA に対して抗菌作用を有するのではないかと考えた。このようにして合成した 12 種類の abietane 型天然物の抗 VRE および抗 MRSA 活性を測定した³²⁾。

合成したラセミ体のジテルペンを用いて VRE（VanA, VanB と VanC）および MRSA（664, 730 と 996）に対する活性を測定したところ、そのうち 6 個の化合物が比較的強い活性を示した（表 1）。

11-Hydroxy-12-oxo-7,9(11),13-abietatriene (abietaquinone methide, **1**) は一番強い活性を示し、その MIC は VRE と MRSA の両方に対して 0.5–1 µg/mL で、vancomycin の活性に比べ、それぞれ 30–500 倍、2–4 倍に達した。もう一つのキノンメチド構造を有する taxodione (**2**, MIC: 4–10 µg/mL) も MRSA および VRE に対して抗菌活性を示すことが明らかになった。Ferruginol は (±)- 体、天然体 (+)-ferruginol よりも、非天然体である (-)-ferruginol の方が強い活性を示したが、活性自体は弱かった。

表1. 合成したフェノール性ジテルペンのMRSAおよびVREに対する最小阻止濃度 (µg/mL)

compounds	Strains, MIC (µg/mL)					
	MRSA			VRE		
	MRSA996	MRSA730	MRSA664	VanA	VanB	VanC
1	1	1	0.5	0.5	1	0.5
31	4	4	6	8	8	8
32	6	6	8	16	16	16
38	4	4	4	4	6	6
37	8	8	8	8	16	16
2	10	8	8	4	6	4
vancomycin	2	2		256	128	16
(±)-Ferruginol			125			62.5
(+)-Ferruginol			> 125			> 125
(-)-Ferruginol			62.5			31.3

Abietaquinone methide (**1**) は東アフリカで、消化管内の寄生虫駆除薬として使われている植物の成分である。この研究によって、カテコール型ジテルペンとキノンメチド型ジテルペンが抗菌活性物質として期待できることがわかった。さらに詳しい生物活性試験を行うためには、天然と同じ光学活性体を多量に効率的に合成する必要があった。

7 フェノールのオルト位酸化反応

ここまでの研究で、カテコール構造を持つジテルペンには強い抗酸化作用と同時に、強い抗菌活性、抗癌作用をもつことが分かってきたので、カテコール構造を効率的に合成する必要があった。これまでよく使われてきたフェノールのオルト位酸化反応としては、benzoyl peroxide (BPO), benzeneseleninic anhydride, 2-iodoxybenzoic acid (IBX) を用いた例が多い。しかしこれらの試薬には不安定で爆発の危険性や人体への毒性などの問題点があり、簡便かつ安全なフェノールのオルト位酸化方法の開発が求められていた。我々も以前の合成では、フェノールのオルト位酸化に benzoyl peroxide を用いていたが、benzoyl peroxide を取り扱っていた日本と台湾の工場で相次いで爆発事故があり、benzoyl peroxide の試薬としての利用は難しいことがわかった。その後、benzeneseleninic anhydride および 2-iodoxybenzoic acid (IBX) を使った酸化を試みたが、いずれもうまくいかなかった。

Kubota³³⁾ らは *m*-chloroperbenzoic acid (*m*CPBA) を用いて DMF 中酸化を行ったところ、爆発が起き、爆発後の生成物から過酸化ジアシルである *m*-chlorobenzoyl peroxide (*m*CBPO, **39**) を得たと報告している。このことは *m*CBPO が比較的安定な化合物である可能性を示している。事実、我々の実験では、*m*CBPO の固体をガラス管中加熱すると 110 °C 以上でゆっくり泡を出しながら融解し、爆発的な融解は起こらなかった。

7-1 mCBPO を用いたフェノールのオルト位酸化

各種のカルボン酸を dicyclohexylcarbodiimide (DCC) と反応させ付加物を生成させた後, *m*-chlorobenzoic acid (*m*CBA) を加え, 各種過酸化ジアシルを合成した。合成した過酸化ジアシルは取り出すことなくそのまま用い, フェノールのオルト位酸化を試み, 収率, 生成物などを比較した。その結果, *m*CBPO (39) は大変結晶性がよく, 比較的安定であり, 生成物が複雑でなく, 取扱いが容易であったので, *m*CBPO (39) を用いることにした³⁴⁾。*m*CBPO を用いて各種フェノールのオルト位酸化を行った結果を表 2 に示す³⁵⁾。

表 2 に示した各種フェノールの酸化生成物はいずれもオルト位酸化されていた。反応条件を検討した結果, クロロホルム中アルゴン気流下, 16 時間加熱還流条件でも特段の問題を起こすことはなく, オルト位酸化を行うことができた。収率は特に優れているとは言えないが, これまで反応が進まなかったフェノールにおいても簡単な操作で酸化できた。

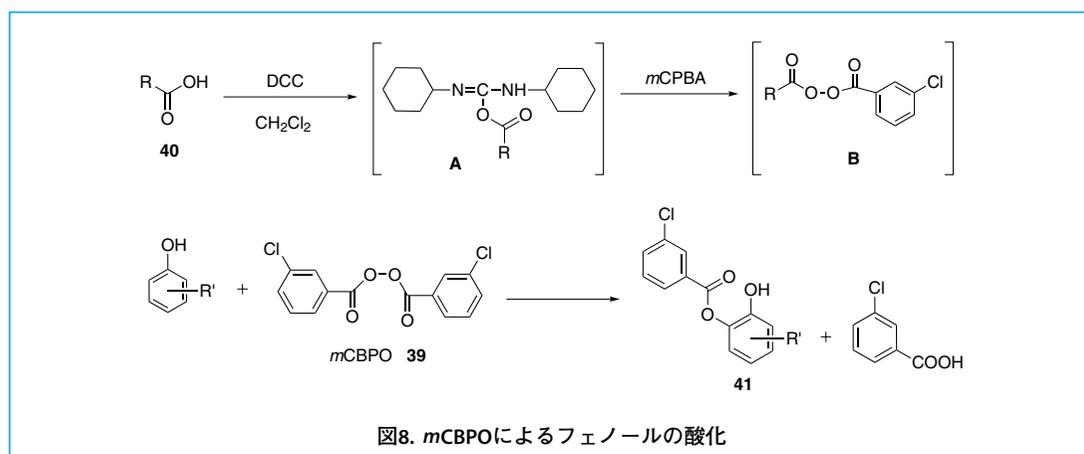


表2. フェノールのオルト位酸化生成物と収率

Entry	Phenol	Yield (%) ^{a)}
1	<i>o</i> -Cresol	n.r.
2	<i>m</i> -Cresol	35
3	<i>p</i> -Cresol	75
4	2,3-Xylenol	11
5	3,4-Xylenol	39 (3,4-diMe : 4,5-diMe = 1 : 3)
6	3,5-Xylenol	33
7	2,4-Xylenol	n.r.
8	3,4,5-Trimethylphenol	56
9	4-Isopropylphenol	29
10	4- <i>tert</i> -Butylphenol	17
11	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	n.r.

a) Estimated by ¹H-NMR of the diacetate. n.r.: no reaction.

m-Chlorobenzoyl peroxide (*m*CBPO) は一般に広く使われている市販の過酸化物である *m*-chloroperbenzoic acid (*m*CPBA) から容易に調製できる比較的安定な過酸化物である。上記のように *m*CBPO は大変結晶性がよく, 融点を測定すると 112 °C からわずかに気泡を生じながらゆっくりと融

解と熱分解を開始し、ピークは 121 °C である。1 時間で半分が分解する温度は 103 °C である。これまでのところ、実験室のスケールの実験では急激に分解するようなことは起こっていない。表 3 では、*m*CBPO と *p*CBPO の分解温度、発熱量、発火温度は BPO と *o*CBPO のそれらよりも高い³⁶⁾。原料の入手しやすさなどを考慮すると、実験室で用いる試薬としては *m*CBPO が適していることがわかる。

表3. Benzoyl peroxide (BPO)とその塩素化誘導体(CBPO)の熱安定性の比較

Peroxide	Decomposition temp.		Heat of decomposition (kJ/mol)	Ignition temp. (°C)
	Initial	Peak (°C)		
BPO	107	108	300	106
<i>m</i> CBPO	112	121	245	114
<i>o</i> CBPO	89	102	270	87
<i>p</i> CBPO	129	135	190	127

8 植物成分を原料にしたカテコール型ジテルペンの合成

フェノールのオルト位酸化が簡便にできるようになったので、この方法を天然から容易に得られるフェノール性ジテルペンに適用し、多くのカテコール型ジテルペンを効率よく合成することができた³⁷⁾。

カテコール型ジテルペンには類似した炭素骨格を有する abietane 骨格、totarane 骨格および podocarpene 骨格がある。Abietane 骨格は C 環のイソプロピル基が 13 位、totarane 骨格は 14 位、podocarpene 骨格にはイソプロピル基がないという違いがある。

Abietaquinone methide と同じ炭素骨格を持った dehydroabietic acid は、紙やプラスチックの添加剤として欠かせない物で、植物から大量に分離され、安価に入手することができるので、これを合成原料にした abietaquinone methide の効率的な合成法を考えた。この合成についての記述は省略するが、安価な合成原料から abietaquinone methide の効率的な合成法を確立した¹¹⁾。その後、合成中間体として用いた ferruginol (22) はスギ樹液から容易に得られることが分かった。以後の abietane 骨格を有するカテコール型ジテルペンの合成では、スギの樹液から分離した 22 を用いた。

その後、totarane 骨格を有する totarol (42) がヒバの葉から約 2% の収率で得られることが分かった。これに関しては 1961 年にイギリスの Hodges がヒバから totarol を分離したことを報告している。Totarane 骨格を有するカテコール型ジテルペンの合成では、ヒバの葉から分離した 42 を用いることができる。

一方、podocarpene 骨格を有するカテコール型ジテルペンの合成については、ferruginol (22) を原料とし、イソプロピル基を除去することによって podocarpene 骨格に導いた。

それぞれのカテコール類の合成は、上記の *m*CBPO を用いたフェノールのオルト位酸化反応を利用して、カテコールを合成することを基本的な方針とした。詳細については省略する。

8-1 Totarane 型カテコール類の合成

天然の totarol (42) を用いて、上記の *m*CBPO によるフェノールのオルト位酸化を行った。Totarol (42) を CH_2Cl_2 中 *m*CBPO によって酸化し、オルト位酸化生成物 43 とその分子内エステル交換生成物 44 の混合物を得た。この混合物を LAH 還元したところ、カテコール 45 が得られた。カテコール 45 は酸素下の実験でも単離できるほど安定であった。カテコール 45 を酸化銀で酸化したところ *ortho*-キノン 46 が得られたが、¹H NMR では、キノンメチド化合物 47 が約 1% 含まれていることが確認できた。

キノン **46** から **47** への異性化は非常に遅く、PPTS 存在下還流したところ、**47** が次第に増加するのが ^1H NMR から観測できた。キノン **46** とキノンメチド **47** の混合物をシリカゲルに吸着した状態（またはガラス表面）で数日間、空气中で放置したところ **46**、**47** および maytenoquinone (**48**) の混合物が得られた。他の totarane 化合物の合成に関しては引用文献をご覧ください^{23,37)}。

Totarol (**42**) の酸化物であるカテコール **45**、キノン **46**、およびキノンメチド **47** は、常温、空気下、安定であり、シリカゲルクロマトグラフィーによって分離し、それらの ^1H NMR を測定し、その存在を確認することができた。一方、ferruginol の相当する酸化物であるカテコールは空气中で容易に酸化され、酸化生成物であるキノンは速やかに異性化し、abietaquinone methide (**1**) が得られた。Totarol (**42**) と ferruginol (**22**) とはイソプロピル基と水酸基の結合する位置が異なるだけの違いであるが、各々の酸化物の安定性には大きな違いが見られた。

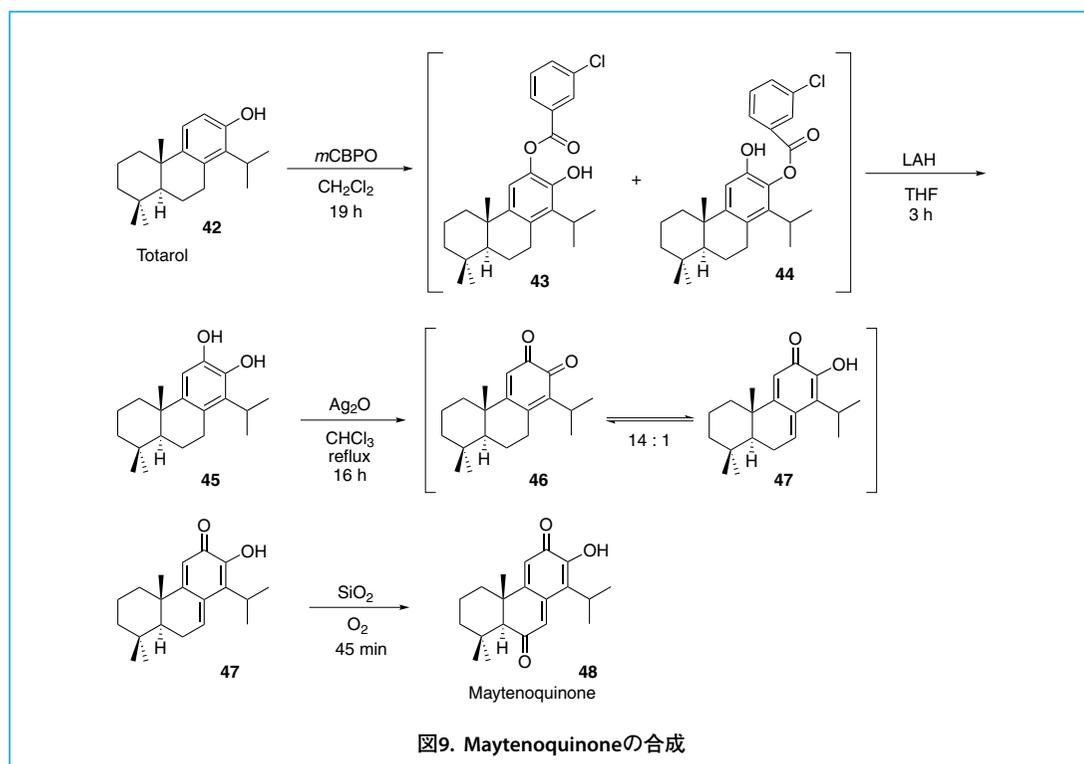
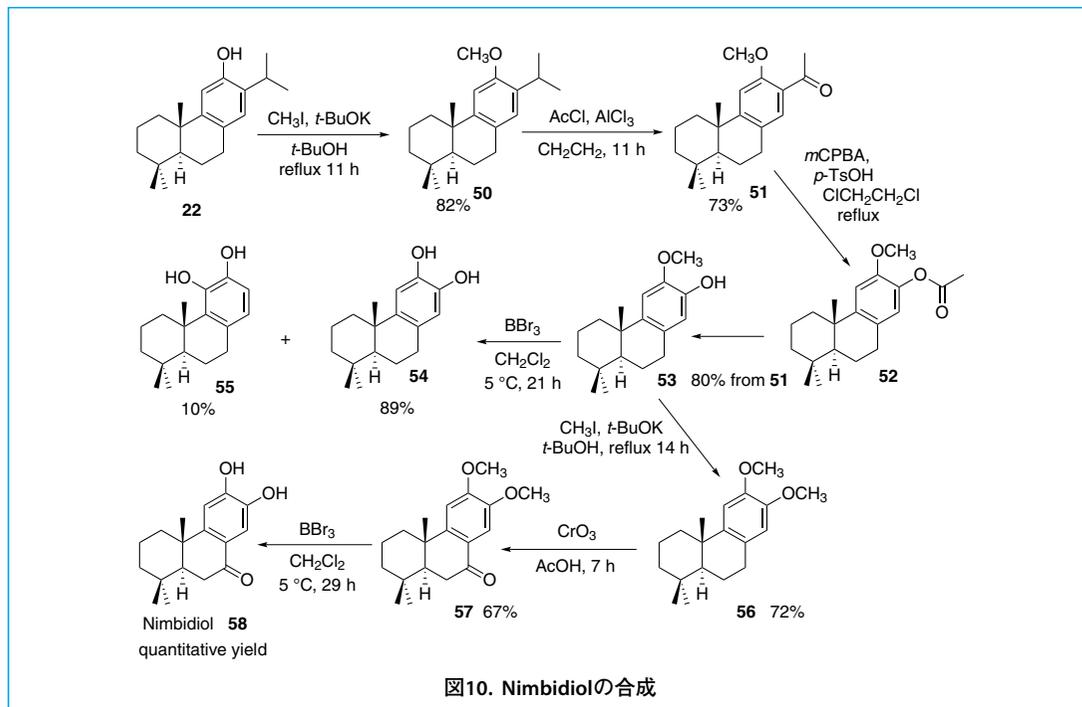


図9. Maytenoquinoneの合成

8-2 Podocarpane 型カテコール (**54**, **55**, **58**) の合成

Podocarpane 骨格の合成について少し説明する。Podocarpane 骨格には abietane 骨格や totarane 骨格にある C 環のイソプロピル基がない。Ferruginol methyl ether は Friedel–Crafts アシル化条件下で 13 位のイソプロピル基が ipso 置換され、nimbosone (**51**) を 73% の収率で生成した。次に、Baeyer–Villiger 反応により酸素原子の挿入を試みたところ、*m*CPBA、*p*-TsOH 反応条件下で Baeyer–Villiger 反応後、生成物であるエステル **52** は容易に加水分解し、反応時間 14 h では化合物 **53** のみを得られた。次に、保護基を除去し、podocarpa-8,11,13-triene-12,13-diol (**54**) を得た。カテコールをジメチルエーテル **56** に変え、保護してから酸化クロム (VI) でベンジル位を酸化した。最後に脱メチル保護により目的の nimbidiol³⁸⁾ (**58**) を合成した。



9 合成した天然ジテルペンカテコールおよびキノンメチドの抗菌活性

感染症によって死亡する人の数は、先進国では少なくなったと思われているが、全世界的に見ると抗生物質が広く用いられている今日でも、死亡原因の第2位を占めており、依然として恐ろしい病気になることには変わりはない。日米欧の感染症薬の市場規模は年間約2兆6,405億円（2008年）である。先進国では抗生物質耐性菌の院内感染が多数報告されており、大きな社会問題になっている。VRE（バンコマイシン耐性腸球菌）、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）は世界中の病院で深刻な被害を与えており、抗VREおよび抗MRSA活性物質の発見は強く求められている。

ニキビ（座瘡）は思春期頃から皮膚に生ずる慢性炎症性疾患で、ニキビの発症と悪化は食生活やストレスなどの要因と毛穴に寄生したアクネ菌や黄色ブドウ球菌、皮膚ブドウ球菌の増殖（感染症）が重要な役割を果たすと考えられている。現在までに本疾患の治療薬として使用が認められている医療外用抗菌薬は、種類が少なく古いものが多く、臨床治療に応用できる薬剤が少ない。このため、日本のみならず海外でもニキビ（座瘡）の治療効果を持つ新規の有効な治療薬が求められている。

これまでに述べたようにして天然ジテルペンフェノールから合成したカテコールおよびキノンメチドの抗菌活性を測定した（図11、表4）。試験した合成化合物のうち、最小生育阻止濃度（MIC）が1 μg/mLのものは、MRSA *Staphylococcus aureus* ATCC 33592については3化合物、アクネ菌 *Propionibacterium acnes* ATCC 6919についても3化合物あった。Abietane骨格を有するフェノール、カテコールおよびキノンメチド型化合物の抗MRSAおよび抗VRE活性を測定した結果、abietaquinone methide (1) および taxodione (2) が強い抗MRSAおよび抗VRE活性を示した。Totarane骨格化合物については、MRSAに対する活性では、8,11,13-totaratriene-12,13-diol (45) が1 μg/mLで強かった。Podocarpane型カテコールは比較的弱い活性を示し、化学的にも不安定であった。以上のように植物由来のフェノール性ジテルペンは、抗生物質耐性菌に対して十分な強さの抗菌活性を示す物質があることがわかった⁷⁾。

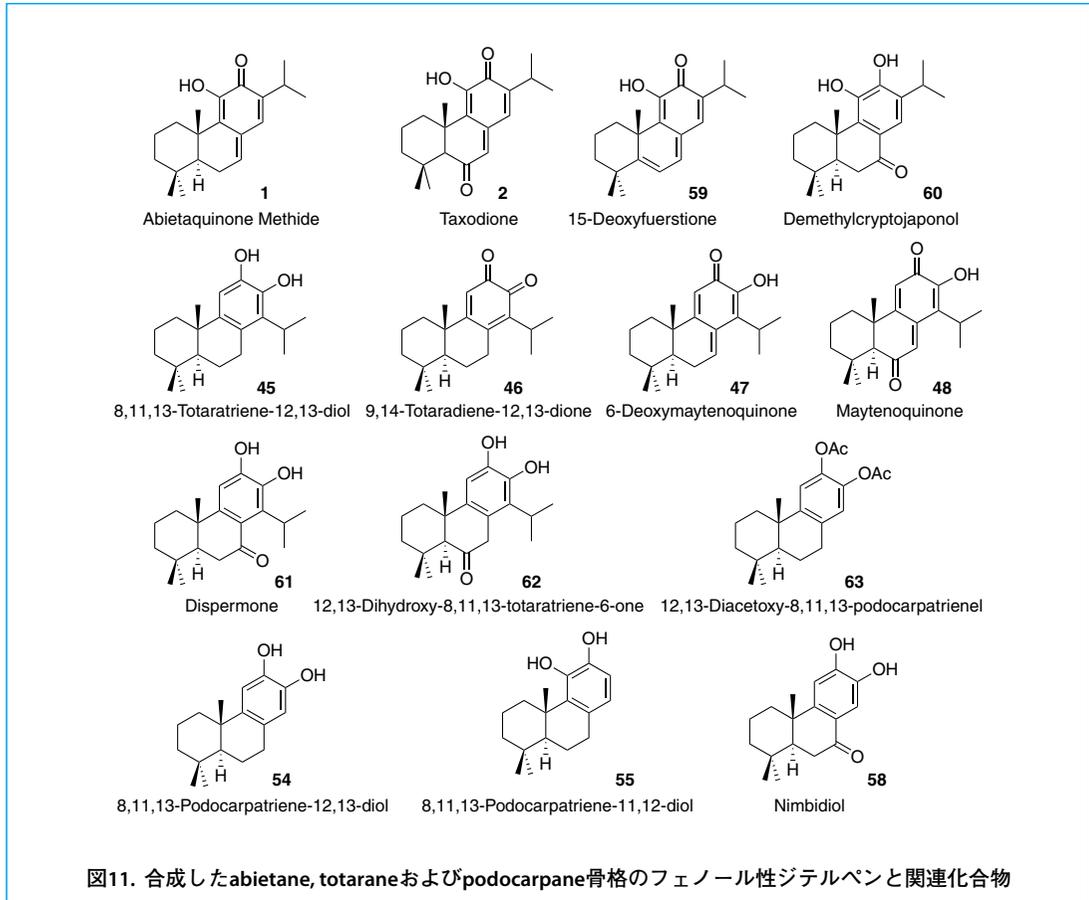


表4. Abietane, totarane および podocarpene 化合物のMRSA および *P. acnes* に対する最小阻止濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

Compound	MRSA	<i>P. acnes</i>
1	1	1
2	10	10
59	10	3
60	10	X
45	1	1
46	3	1
47	3	X
48	1	3
61	10	X
62	3	30
63	> 100	> 100
54	3	10
55	10	10
58	30	X
Vancomycin	1	X
Ampicillin	X	0.1

X : not measured.

10 ローズマリーの抗酸化活性物質, carnosic acid の効率的な製造

ローズマリーは地中海地方原産のシソ科香草で、ローマ時代からスパイス、化粧品および薬草として使われてきた。用途は極めて多様で食品の鮮度保持（抗酸化活性、抗菌活性）、ポトフやカレーなど肉料理のスパイス、また、薬用としては鎮痛、鎮静、関節炎、不眠、脳動脈硬化改善などの効果が知られている³⁹⁻⁴⁴。ローズマリーには、強い抗酸化作用と抗菌作用を有する carnosic acid (66), carnosol (67), rosmanol などが含まれていることが知られている。特に、carnosic acid (66) には、脳神経細胞死防止効果、脂肪吸収防止効果、抗炎症作用、糖尿病患者の血糖値低下効果、美白効果などの活性があることが報告されている。市販の carnosic acid はローズマリーの葉から抽出・分離されており、ローズマリーの葉の生産量と価格によりその供給量は大きく変わり、非常に高価（0.5 g で 630 ドル以上）である。ローズマリー抽出物は食品添加物として使用することが認められているが、高純度の carnosic acid が安価に供給されれば、食品添加物、サプリメント、医薬、化粧品などとして利用されることが期待される。

一方、サワラは日本特産のヒノキ科の常緑高木でヒノキによく似ている。サワラの葉には pisiferic acid (64) とその誘導体が多く含まれており 64 が主成分である⁴⁵。Pisiferic acid (64) とローズマリーの主要抗酸化活性物質である carnosic acid 66 の構造はよく似ており、炭素骨格は同じで、唯一の違いは carnosic acid の方が 11 位に水酸基が 1 つ多いことである（図 10）。したがって、pisiferic acid の水酸基（12 位）の隣（11 位）に水酸基を導入することができれば、carnosic acid を簡単に入手することができるようになると考えた。サワラは容易に入手できる日本特産のバイオマスである。

はじめに、東京農工大学府中キャンパス内にあるサワラの葉から pisiferic acid (64) の分離・精製を試みた。サワラの生葉をメタノールなどのアルコール類によって熱抽出し、抽出物は水—酢酸エチルで液—液抽出後、酢酸エチル層を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけた。得られた粗 pisiferic acid (64) を再結晶することによって容易に精製 pisiferic acid (64) を得ることができた。Pisiferic acid の収率はサワラ生葉から約 0.6% で、植物成分としてはかなり多い。Pisiferic acid は結晶性もよく、分離・精製は容易であった。

サワラから得られた 64 のオルト位酸化を試みた。これまでに研究してきた mCBPO によるフェノールのオルト位酸化反応を 64 に適用して carnosic acid (66) を合成することを考えた。Pisiferic acid (64) を塩化メチレンに溶解させた後、mCBPO を加えた。この溶液を室温、アルゴン下で 16 時間放置した後、濃縮した。濃縮残渣は酢酸エチルに溶かし、ヘキサンを加えて析出した結晶を口別した。母液をさらに濃縮し、オルト位酸化された carnosic acid のモノエステル (65) を含む混合物が得られた。粗精製の 65 のエステル基を 1% NaOH 水溶液と NaBH₄ を用いて、アルゴン下、還元的条件下で加水分解した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン—酢酸エチル—酢酸）で精製し、66 を得ようとした。しかしこの反応で副生成物としてできる m-chlorobenzoic acid と 66 とを分離することが意外に困難で、収率がよくないことが分かった。このため、mCBPO による酸化反応は効率的でないことがわかり、他の製造法を考えることにした。

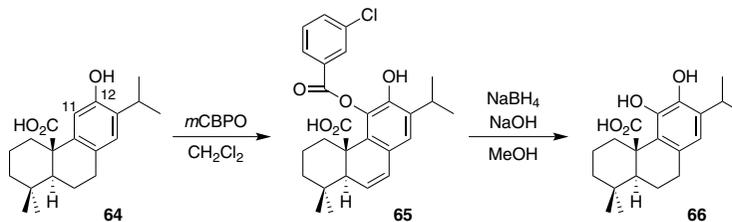


図12. mCBPOによるcarnosic acid (66)の合成

次に、IBX による酸化反応と生成する *ortho*-キノンを生離することなく直接還元することを試みた。Pisiferic acid (64) を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ の混合溶媒中 IBX 酸化後、生成物を NaBH_4 還元した。生成物は抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、carnosic acid (66) (1.5 g, 4.60 mmol) を 72% の収率 (1 ポット 2 段階) で得た。次に、carnosic acid (66) を酸化銀によって酸化し、ローズマリーのもう一つの抗酸化活性物質である carnosol (67) を合成することができた (67%)^{46,47)}。

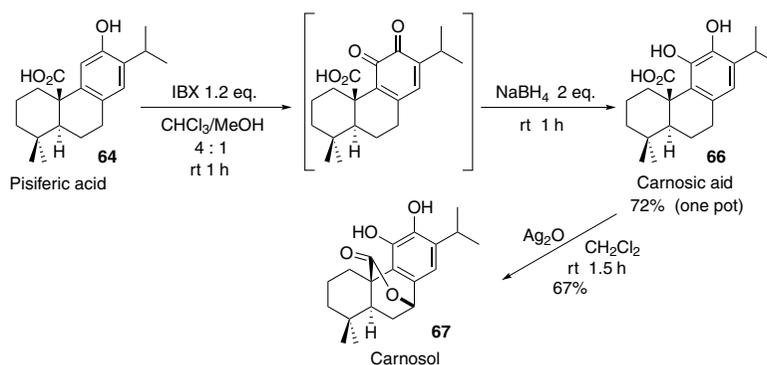


図13. Pisiferic acid (64) からcarnosic acid (66) とcarnosol (67) の合成

その後、実験室での研究成果を基に企業にご協力をいただき、工業的な規模での carnosic acid の生産の可能性を探った。これまでにサワラの葉から pisiferic acid の大規模分離に成功し、carnosic acid の合成についてもより大きなスケールでの合成に成功している。以上のようにして合成された carnosic acid (66) と carnosol (67) は、試薬として販売されることになっていると聞いている。

次に、合成 carnosic acid の抗菌活性の測定と毒性試験を行った。抗菌活性は合成した carnosic acid (66) と carnosol (67) を用いて MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) *S. aureus* ATCC 33592 とアクネ菌 *P. acnes* ATCC 6919 に対する最小阻止濃度 (MIC) を測定した。この結果、合成 66 は強い抗 MRSA および抗アクネ菌活性を示すことがわかった (表 5)。合成した 66 と 67 の最小阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) は各々、抗 MRSA 活性が MIC 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、抗アクネ菌活性が MIC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で比較的強い活性である。また、合成 carnosic acid (66) の抗アクネ菌活性 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は報告された天然 carnosic acid の活性 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) よりもかなり強かった。

次に、マウスを用いて動物毒性を調べた。天然から分離した 66 は高価で、これまでわずかな量しか入手できなかったため、毒性についての本格的な研究はされてきていなかった。合成された carnosic

acid (66) と合成原料である pisiferic acid (64) のマウスでの単回経口投与試験について検討した結果、carnosic acid は 2,000 mg/kg までは特に懸念される毒性症状は見られなかった。原料である pisiferic acid は高用量の経口投与 (2,000 mg/kg) では中枢神経に対する軽い毒性症状が見られた。いずれも特別問題になる症状は見られなかった。人間は carnosic acid を長い間食べてきた経験があり、それほど心配していない。

表5. 合成されたローズマリー抗酸化物質の抗菌活性 (MIC µg/mL)

Compound	MRSA	<i>P. acnes</i>
Carnosic acid (66)	10	1
Carnosol (67)	30	10

合成 carnosic acid (66) の生物活性はまだ十分に測定されておらず、応用研究はこれからの課題である。しかし、ローズマリーは様々な形で人間に利用されてきた歴史があり、ニキビなど医療用外用薬、抗炎症剤、抗酸化活性物質、化粧品、サプリメント、食品添加物など様々な商品の素材になる可能性があると考えている。合成された天然物なので許認可を受ける必要がある。この研究の原料であるサワラは日本に広く分布し、栽培は容易である。この研究成果が実用化されれば林業の活性化や低炭素社会の実現にも寄与できると期待されている。

以上、ジテルペンに関する研究の経過をまとめてみた。植物の世界ではジテルペンは比較的ありふれた化合物で、構造的に目新しいものではなく、合成化学として最先端の反応を求められるものでもない。しかし、有機化学工業が石油を原料として成り立っていられる時間はどのくらい残されているのだろうか。植物を有効に利用する化学工業は持続的な社会の構築を考える時に必要な技術であることは間違いないと考えている。

参考文献

1. H. Muroi, I. Kubo, *J. Appl. Bacteriol.* **1996**, *80*, 387.
2. G. B. Evans, R. H. Furneaux, M. B. Gravestock, G. P. Lynch, G. K. Scott, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1953.
3. M. Tada, T. Hara, C. Hara, K. T. Chiba, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1475.
4. O. Batista, M. F. Simões, A. Duarte, M. L. Valdeira, M. C. de la Tore, B. Rodriguez, *Phytochemistry* **1995**, *38*, 167.
5. C. W. Brandt, L. G. Neubauer, *J. Chem. Soc.* **1939**, 1031.
6. J. E. Dellar, M. D. Cole, P. G. Waterman, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 735.
7. A. Ulubelen, U. Sönmez, G. Topu, C. Bozok-Johansson, *Phytochemistry* **1996**, *42*, 145.
8. A. Ulubelen, G. Topcu, C. Eris, U. Sönmez, M. Kartal, S. Kurucu, C. Bozok-Johansson, *Phytochemistry* **1994**, *36*, 971.
9. L. Moujir, A. M. Gutierrez-Navarro, L. San Andres, J. G. Luis, *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1493.
10. H. Achenbach, R. Walbel, M. H. H. Nkunya, and H. Weenen, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3781.
11. M. Tada, K. Ishimaru, *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 1412.
12. S. M. Kupchan, A. Karim, C. Marcks, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3912; S. M. Kupchan, A. Karim, C. Marcks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5923.
13. Y. Tezuka, R. Kasimu, J. X. Li, P. Basnet, K. Tanaka, T. Namba, S. Kadota, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 107.
14. N. N. Sabri, A. A. Abou-donia, A. M. Assad, N. M. Ghazy, A. M. El-lakang, M. S. Tempesta, D. R. Sanson, *Planta Medica* **1989**, *55*, 582.
15. J. D. Martín, *Tetrahedron* **1973**, *29*, 2553.

16. T. Matsumoto, T. Ohmura, S. Usui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1957.
17. L. Harrison, Y. Asakawa, *Phytochemistry* **1987**, 26, 1211.
18. R. H. Burnell, M. Jean, S. Marceau, *Can. J. Chem.* **1988**, 66, 227.
19. M. Tada, S. Nishiiri, Z. Yang, Y. Imai, S. Tajima, N. Okazaki, Y. Kitano and K. Chiba, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2000**, 2657.
20. Y. Tezuka, R. Kasimu, J. X. Li, P. Basnet, K. Tanaka, T. Namba, S. Kadota, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 107.
21. L. J. Harrison, Y. Asakawa, *Phytochemistry* **1987**, 26, 1211.
22. M. Taniguchi, A. Chapya, I. Kubo, K. Nakanishi, *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 2910.
23. M. Tada, J. Kurabe, H. Yasue and T. Ikuta, *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 287.
24. W. C. Su, J. M. Fang, Y. S. Cheng, *Phytochemistry* **1994**, 35, 1279.
25. J. A. Hueso-Rodriguez, M. L. Jimeno, B. Rodriguez, G. Savona, M. Bruno, *Phytochemistry* **1983**, 22, 2005.
26. R. R. Gil, G. A. Cordell, *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 181.
27. L. Z. Lin, G. Blasko, G. A. Cordell, *Phytochemistry* **1989**, 28, 177.
28. Y. H. Kuo, M. T. Yu, *Phytochemistry* **1996**, 42, 779.
29. W. C. Su, J. M. Fang, Y. S. Cheng, *Phytochemistry* **1996**, 41, 255.
30. J. Gao, G. Han, *Phytochemistry* **1997**, 44, 759.
31. Y. H. Kuo, T. R. Wu, M. C. Cheng, Y. Wang, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38, 3195.
32. Z. Yang, Y. Kitano, K. Chiba, N. Shibata, H. Kurokawa, Y. Doi, Y. Arakawa, M. Tada, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 347.
33. A. Kubota, H. Takeuchi, *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, 8, 1076.
34. M. Tada and K. Ishimaru, *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54, 1412.
35. M. Tada, R. Ishiguro and R. Izumi, *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 239.
36. Y. Hara, H. Nakamura, T. Jinnouchi, K. Matsuyama, M. Shimizu, *Kogyo Kagaku* **1991**, 52, 356.
37. M. Tada, J. Kurabe, T. Yoshida, T. Ohkanda and Y. Matsumoto, *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58, 818.
38. P. L. Majumder, D. C. Maiti, W. Kraus, M. Bokel, *Phytochemistry* **1987**, 26, 3021.
39. S. C. Etter, *J. Herbs Spices Med. Plants* **2004**, 11, 121.
40. N. Nakatani and R. Iwatani, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, 48, 2081.
41. T. Satoh, K. Kosaka, K. Itoh, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Y. Shimojo, C. Kitajima, J. Cui, J. Kamins, S. Okamoto, M. Izumi, T. Shirasawa, S. A. Lipton, *J. Neurochem.* **2008**, 104, 1116.
42. K. Kosaka, T. Miyazaki, H. Ito, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2001), JP 2001158745, A 20010612.
43. K. Kosaka, K. Shimizu, H. Hamura, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2006), JP 2006199666, A 20060803.
44. K. Ninomiya, H. Matsuda, H. Shimoda, N. Nishida, N. Kasajima, T. Yoshino, T. Morikawa, M. Yoshikawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1943.
45. D. Xiao, M. Kuroyanagi, T. Itani, H. Tatsuura, M. Udayama, M. Murakami, K. Umehara, N. Kawahara, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 1479.
46. M. Tada, T. Ohkanda and J. Kurabe, *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58, 27.
47. M. Tada, PCT Int. Appl. (2009), WO 2009151057 A1.

(Received February 2011)

執筆者紹介

多田 全宏 (Masahiro Tada) 東京農工大学名誉教授

[ご経歴] 1974年3月 東京大学理学系研究科博士課程修了(理学博士), 1974年4月-1975年9月 アメリカ合衆国カリフォルニア大学(バークレー)化学科博士研究員(W. G. Dauben 教授研究室), 1976年4月-1977年3月 日本学術振興会奨励研究員(東京大学理学部化学科所属), 1977年4月-9月 東京大学理学部化学科助手, 1977年10月 東京農工大学農学部講師, 1983年7月 東京農工大学農学部助教授, 1988年4月 東京農工大学農学部教授, 2004年4月 東京農工大学大学院・共生科学技術研究院教授, 2001年4月-2003年3月 東京農工大学附属図書館長(評議員)併任, 2009年3月東京農工大学 定年退職(名誉教授), 2009年4月-11月 東京農工大学農学部特任教授

[専門分野] 有機化学, 天然物有機科学

研究テーマ: 天然生理活性物質の効率的な合成と新規生物活性物質の創生

寄稿論文 TCI 関連製品

C2488 Carnosic Acid

20mg 6,400 円 100mg 22,200 円