NMR による天然有機化合物の構造解析

廣 田 洋*

Structure Elucidation of Natural Organic Compounds by NMR

Hiroshi HIROTA*

This article deals with how modern and advanced NMR techniques (mainly various 2D ones) are manipulated for the structure elucidation of natural organic compounds by giving the examples which the author has been involved in. Examples shown here are a) urochordamines A and B, larval settlement/metamorphosis-promoting alkaloids from some ascidians, b) a novel kind of bile acid in chronic subdural hematoma, as an example for application of a very small amount of sample (*ca.* 70 μ g), c) 2-isocyanoallopupukeanane, a new sesquiterpene with a novel tricyclic skeleton from nudibranchs, d) a skeletally rearranged product from a derivative of terrecyclic acid A, as an example for utilization of 13 C-labelled compounds and 2D-INADEQUATE experiment, and e) orbiculamide A, a novel cytotoxic cyclic peptide from a marine sponge. Several new NMR techniques not mentioned in the examples are also listed.

Key words : Modern NMR techniques ; Natural organic compounds(s) ; Biologically active compounds(s) ; Alkaloid(s) ; Steroid(s) ; Sesquiterpenoid(s) ; Skeletal rearrangement ; 13 C-labelled compounds(s) ; Cyclic peptide(s) ; Marine sponge(s).

1. はじめに

NMR 法のこの十数年の進歩は目覚ましいものがあるが、とくに溶液の NMR 法の進歩においては、1) 超伝導磁石による高磁場化と 2) 二次元法を中心とする多重パルスの開発に大いに依存している。この長足の進歩に伴って、天然有機化合物の構造解析の分野にも、質(よ

り複雑な構造)、量(極微量)とも飛躍的な進歩・発展が見られた。また、天然物有機化学の守備範囲も大幅に広がり、従来は生体の二次代謝物を取り扱う分野と考えられていたが、現在はタンパク質、複合脂質等まで取り扱う場合も生じてきており生物化学領域との境界線がよりあいまいになりつつある。本特集号では別稿でタンパク質および糖質の構造解析に関する論文があるので、本稿

* 新技術事業団伏谷着生機構プロジェクト ()

* Fusetani Biofouling Project, ERATO, Research Development Corporation of Japan (c/o Niigata Engineering Co., Ltd.,)

で対象とする化合物は従来型の天然有機化合物のものに絞った。従来型の天然有機化合物に関しても、ごく最近構造決定された海産毒の maitotoxin (1; $C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$)¹⁾ のように分子量 3.4 KDa のポリエーテル系化合物をはじめとして、つぎつぎと複雑な構造・極微量の化合物の構造決定が NMR を主要な手段としてなされており、ますます NMR の有用性・重要性が認識されている。しかしながら、質量分析 (MS), IR, UV, CD 等の他の分光法の必要性が低下したわけではなく、これらの分光法も同時に利用しつつ天然有機化合物の構造研究は行われている。

以下には、筆者らの研究実例を用いて、実際の天然有機化合物の構造決定においてどのように NMR が利用されているかを具体的に述べる。

2. Urochordamines A および B の構造解析²⁾

まず、ごく最近構造決定した海洋天然有機化合物の例を述べる。

海洋付着生物の 1 つであるホヤの幼生はおたまじゃくし型で、孵化後一定時間 (種により異なるが、数時間から数日) 遊泳した後、基盤に付着し尾部吸収を伴う変態を行う。今回、ユウレイボヤ (*Ciona savignyi*) 幼生の付着・変態に影響を与える化合物の検索の過程で、青森県浅虫で採取されたユウレイボヤ成体の被囊 (1 kg) から、その幼生の付着・変態を促進する化合物として 2 種の新規化合物 urochordamine A (2; 3.7 mg) および

urochordamine B (3; 1.2 mg) を単離した。高分解能 FAB マススペクトル (positive; glycerol) から両化合物とも分子式は $C_{22}H_{26}BrN_2O$ であることがわかった^{*1)}。

NMR による構造解析は、シグナルの重なりが少ない 3 を用いてまず行った。3 の 1H - 1H COSY および HMBC

スペクトルを図 1 および図 2 にそれぞれ示す。3 は 1H NMR においてシグナルの分離がよく、図 1 からわかるように 1H - 1H COSY スペクトルにおいてそのスピン結合の解析は容易であるが、むしろスペクトルが単純すぎて骨格構造を導きだすことは難しい。すなわち、 ^{13}C - 1H COSY データと互いにスピン結合しているプロトンの情報とからは、 CH_3 - CH_2 - $\dot{C}H$ -, $-CH_2$ - CH_2 -, $-CH$ - XH , 1,2,4-三置換ベンゼン (化学シフトも考慮して) の 4 つの部分構造しか明らかにできない。残りのプロトン (3 個のメチル基、および 2 個のメチンプロトン) にはスピン結合が見られない。この化合物 3 のように分子中に四級炭素 (9 個) とヘテロ原子 (9 個) を多く含むプロトン間情報に乏しい系においては、C-H 間の遠隔スピン結合情報が NMR における残された有力な手段である。

C-H 間の遠隔スピン結合を知る手法として、一次元の選択的遠隔スピンデカップリング (LSPD) 法と二次元の long-range C-H COSY 法あるいは COLOC 法が比較的古くから用いられてきたが、LSPD 法では情報量の問題、COLOC 法等では ^{13}C 検出と横緩和とによる感度の問題があり、汎用性には限界があった。Bax らにより 1986 年に報告された HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity) 法³⁾ は、 ^{13}C の磁化情報をより感度の高い 1H 核に戻して観測する、いわゆるインバースモードでの測定なので、C-H 間の遠隔スピン結合情報を高感度で検出することが可能となった。Bax らの報告が出た当初は、HMBC のパルス系列を出力するハードウェアの問題、装置の安定性の問題等のために、再現性のよいデータを得ることのできる装置が限定されていた。しかし最近の 2 次元法測定可能な装置のほとんどは、感度の良さはあるものの、HMBC 法が測定可能になっている。HMBC 法の弱点は、 ^{13}C 側の分解能が要求される場合にある。 ^{13}C が F1 側 (展開時間変化側) のインバースモードなので、200 ppm の幅を通常の 256 あるいは 512 段階程度の時間増加 (increment) で測定を行うと ^{13}C 分解能は 0.8 ないし 0.4 ppm ということになり、また、 ^{13}C 側の分解能を 2 倍にするには 2 倍の測定時間がかかるということである。したがって、試料がたくさんある場合には従来の long-range C-H COSY 法あるいは COLOC 法を好んで用いる人もいる。

さて、urochordamine B (3) において HMBC スペクトルを測定する (もちろんその前に ^{13}C - 1H COSY あるいは HMQC で C-H の帰属をつけておく) と、幸運なことに図 2 に示すように δ 126.1 を除くすべての四級炭素に相関シグナルが見られた。前述の部分構造のうちの 1,2,4-三置換ベンゼンを含む構造として、化学シフトも考慮す

*1) 実際の分子式決定はマススペクトルの情報のみから行ったわけではない。例えば、3 の FAB マススペクトルでは m/z 484 と 486 とに強度のはほぼ等しいピークを与え、後者は高分解能 FAB マススペクトルでは m/z 486.1448 に精密質量を与える。このマススペクトルから得られるいくつかの分子式の候補の中から、 1H および ^{13}C NMR をはじめとするその他の情報も加味して最適な分子式を選別し、構造決定後にフラグメントイオンピークも含めて矛盾をきたしていないことの確認を行い、最終的に分子式の確定を行った。

Fig.1 ^1H - ^1H COSY Spectrum of Urochordamine B (3) in CDCl_3 .

Fig.2 HMBC Spectrum of Urochordamine B (3) in CDCl_3 .

ると 3a-置換 1-methyl-6-bromophysostigmine 部分構造 (4)が推定できる。この構造の存在は UV 等からも支持され、またコケムシから単離・構造決定された dihy-

droflustramine C(5)⁴⁾との ^{13}C NMR データの比較からも確認できた。この 3a 位には、 ^1H NMR から存在が明らかとなっていた *n*-propyl 基が結合することも HMBC ス

ベクトルから結論できる。残った $C_8H_9N_5O$ 部分はこの *n*-propyl 基に置換し、不飽和度 7 を有することになる。HMBC スペクトルデータを素直に解析してみると、-N-C (151.5) -C (147.6) H (8.02) -N-C (147.0) -NMe (29.7, 3.61) -C (150.2) NH (4.33) -NMe (29.5, 3.51) -CO (159.3) -[カッコ内は δ 値] というつながりが明らかとなる。不飽和度 7 と唯一相関シグナルのない四級炭素 (δ 126.1) を考慮すると、容易に pteridine 骨格が推定でき、UV 等のデータも矛盾しない。以上で urochordamine B (3) の平面構造が明らかとなった。

Urochordamine A (2) についても同様の構造解析法によって、同一の平面構造をもつ立体異性体であることが判明した。

Urochordamine A および B の立体化学の検討は、NOESY (phase sensitive) スペクトルを用いた。絶対値表示 NOESY と比べて phase sensitive モードの NOESY は、1) 同一のデジタル分解能を得るには測定時間が 2 倍かかる、2) データ処理の際にきちんと位相合わせをせねばならない (慣れてしまえば全く問題とはならないが、不慣れの場合、適切なウィンド関数の選択の必要性和相まって、非常に長時間を費やしてしまうことがある) という弱点があるが、1) NOE の正負がわかる、2) 化学交換による相関ピークやゴーストピークとの識別が容易になる、3) シグナルの形状が分散型になることにより裾を引かないためとくに対角ピーク付近でのシグナルの重なりが少なくなる等の余りある利点がある。

両化合物 (2 および 3) とも、8a-H と 9-H の間に相関ピークが見られることから縮環部位の 8a 位と 3a 位とは *cis* ということになる。したがって、両者は C9 位に関する立体異性体ということになるが、鎖状の不斉炭素の立体化学の決定は困難な場合が多い。しかし、この場合には、2 においては C10 の両メチレンプロトンともベンゼン環上の 4-H との NOE があり、一方 3 の C10 メチレンの片方のプロトンが C3 メチレンプロトンと NOE が見られることから、urochordamine A および B はそれぞれ構造式 2 および 3 に示すような C9 位の立体異性体であることが決定できた (絶対立体配置に関してはまだ不明である)。

3. 慢性硬膜下血腫内容液に含まれるステロイド代謝物の構造解析^{5,6)}

ここでは、サンプル量が比較的少量であっても骨格がありふれたものであれば比較的容易に推定構造が出せる例をあげる。以下に構造決定法を示す。

慢性硬膜下血腫症例の手術の際に摘出した 12 例の血腫内容液約 300 ml^{*2)} から、約 100 μ g の UV (λ_{max} 240 nm) を有する不飽和カルボン酸 6 を単離した。6 の 1H

NMR スペクトルおよびメチルエステル誘導体、トリメチルシリルエーテル誘導体の MS スペクトルからステロイド誘導体らしいことが推定できた。この量の試料を得るのに、大きな病院の脳外科でも数カ月を要したことから、サンプルの増量を待たずに、誘導体化・活性テスト等で使用した残りの試料約 70 μ g で構造解析を行うことにした。

MS スペクトルから分子式 $C_{27}H_{42}O_4$ (MW 430) が明らかとなった。一次元の 1H NMR および 1H - 1H COSY スペクトル (図 3) は CD_3OD 溶媒中で通常の presaturation 法で水シグナルの除去を行いながら測定した。 ^{13}C NMR は、 ^{13}C -enriched (99.95% atom % ^{13}C) CD_3OD 中で測定した^{*3)} (図 4) が、一晚 (約 14 時間) の測定時間では四級炭素はほとんど見えなかった。

構造解析は一次元の 1H NMR のスペクトルから始め、 δ 0.75 と 1.22 にステロイド骨格の核間メチル基に特徴的な 2 本の 1 重線が見られること、 δ 5.73 に β 置換の α, β -不飽和カルボニル基の α 位と考えられる比較的鋭い 1 重線があること、 δ 3.92 に水酸基の付け値のプロトンと思われる 1 H 分のシグナルが見られることなどがわかる。この段階までで、分子中にある 4 つの酸素原子

*2) 慢性硬膜下血腫は軽微な頭部外傷の後数週間の経過を経て頭蓋内に被膜を有する血腫が蓄積増大してくる疾患である。この血腫内容液中の lipoxigenase 産物の検討の過程で、アラキドン酸誘導体とは化学構造の異なる本稿の不飽和カルボン酸 6 を単離した。

*3) 溶媒による大きな ^{13}C シグナルが receiver gain あるいは dynamic range の上限を決めてしまい、極微弱なシグナルはいくら積算回数を増やしてもノイズの中にあることになる。そこで、極微量試料を数万回以上の積算回数で ^{13}C NMR を測定する際には、現在国内で容易に入手可能なものは ^{13}C CD_3OD 位しかないが、 ^{13}C の濃縮された溶媒を用いるのが有効である。

Fig. 3 ^1H - ^1H COSY Spectrum of 7α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic Acid (6) in CD_3OD (80 scans, 13 h).

Fig. 4 ^{13}C NMR Spectra of 7α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic Acid (6) in $^{12}\text{CD}_3\text{OD}$.

のうち2つはカルボキシル基(メチルエステル化されたことより), 1つは α,β -不飽和カルボニル基, 1つは水酸基を形成していることが推定できる。次にステロイド骨格と仮定して ^1H - ^1H COSY スペクトルを解析してみる。 δ 2.67 のシグナルは δ 5.73 とも δ 3.92 とも相関が見られること等から相関ピークをたどっていくと, 図5に示す a, b, c の3種の部分構造等が容易に推定でき

る。これらの部分構造をステロイド骨格にはめ込んでいき, いくつかの構造の候補を挙げる*4)。候補のそれぞれ

*4) ^1H NMR スペクトル上にシグナルは分離して現われているのに帰属に用いなかったピークがいくつかある。結論的には不純物由来のものであり帰属に用いなかったのは正しいことであったが, 実際の解析段階の当初から不純物として除外していた訳ではない。 ^1H - ^1H COSY スペクトルでの交差ピークがなかったり, 相関の相手のシグナルが ^1H NMR スペクトル上では強度がきわめて弱かったりしていたため不純物の可能性が高かったため, 積極的に解析に用いなかったのである。

Fig. 5 Partial Structures of 6.

れについて、 ^{13}C NMR での化学シフトを加性則および類似化合物の文献データとの比較から推定し、実際に得られているスペクトル(図4)データと照合し、構造式6(7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenic acid)に絞り込んだ。この段階で文献検索を行ったところ、この化合物が正常ヒト血清中に、量的には少ないが、存在することをGC/MSで見出したという論文が1988年に出されている⁷⁾ことがわかったが、単離され物理データが得られたのはこれがはじめての例である。また、6はこの慢性硬膜下血腫やクモ膜下出血後の髄液中に循環血中の5~20倍濃度で存在していることがわかり、この胆汁酸類縁化合物の機能・生合成に興味が持たれている。また、C25位の立体化学に関しては合成的に検討中である⁶⁾。

4. 2-Isocyanoallopupukeanane の構造解析⁸⁾

ここでは、新規骨格のセスキテルペン化合物についての構造解析例を取り上げる。

八丈島で採集したウミウシの一種 *Phyllidia pustulosa* に含まれる抗カビ成分として既知化合物の9-isocyano-pupukeanane(7)、9-epi-9-isocyano-pupukeanane(8)など

7: $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{NC}$

8: $\text{R}^1 = \text{NC}$, $\text{R}^2 = \text{H}$

9

導体の1つであるエポキシド11を酸触媒($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$)により開環反応を起こさせたと、単一生成物として骨格転位生成物12が得られた。分子式は転位の前後で変

とはIR(2160 cm^{-1})から示唆され、 ^{13}C NMR スペクトルでプロトンノイズデカップリング条件でも ^{14}N に隣接した ^{13}C の δ 61.3と153.2のシグナルが ^{14}N とのスピン結合に由来する $J=4\sim 7\text{ Hz}$ 、強度比1:1:1の3重線で現われることから支持される^{*5)}。

^1H - ^1H COSY スペクトル(図6)で交差ピークをたどると図6中に示される部分構造が得られる。また、三級メチル基の一方(δ 1.32)は、広幅でありイソニトリル基の結合した四級炭素(δ 61.3)に付いているものと思われる。もう一方の三級メチル基も加えた図6中の部分構造の●に2つの四級炭素を入れて結合をつなげばこの化合物の平面構造が得られることになる。これにはHMBCスペクトル(図7)が有効で、図7の解析から図8に示すHMBC 相関図と平面構造が得られた。

NOESY スペクトルでは図9に示すような結果が得られ、平面構造の確認とともに9の立体化学も明らかとなった。この9の炭素骨格は7および8類縁の9-pupukeananyl cation が1,2-アルキルシフトした骨格を有することから allopupukeanane 骨格と命名され、したがって9は2-isocyanoallopupukeananeと命名された。

5. Terrecyclic acid A 誘導体の骨格転位反応生成物の構造解析^{9,10)}

この例では、 ^{13}C 標識化合物を用いた場合に得られるNMR 情報を中心に述べる。

放線菌 *Aspergillus terreus* Thom No.14 の代謝産物で抗腫瘍性セスキテルペンである terrecyclic acid A(10)¹¹⁾は歪みのかかった骨格構造を有している。この10の誘

数種のイソシアノ基を有するセスキテルペン(分子式はすべて $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}$)を単離した。そのうちの1種である新規骨格を有する化合物9の構造解析法について説明する。分子式中のN原子がイソニトリル基($-\text{NC}$)であるこ

*5) ^{14}N は窒素元素中で99.63%の天然同位体存在比を占めているが、核スピンの1で四極子モーメントを持つ。このために ^1H NMR スペクトルでは隣接プロトンのシグナルが広幅化することがある。一方、 ^{13}C NMR のスペクトル上では ^{14}N によるスピン分裂や広幅化は通常観測されないあるいは見落とされているが、窒素の周りが対称的なイソニトリル基ではスピン分裂し J_{CN} が観察されることのほうが多い。

Fig. 6 ^1H - ^1H COSY Spectrum of 2-Isocyanoallopupukeanane (9) in CDCl_3 and Partial Structures of 9.

Fig. 7 HMBC Spectrum of 2-Isocyanoallopupukeanane (9) in CDCl_3 .

Fig. 8 Planar Structure of 2-Isocyanoallopupukeanane (9). Arrows show main HMBC correlations (H → C).

Fig. 9 Stereostructure of 2-Isocyanoallopupukeanane (9). Arrows show NOE correlations.

ならず $C_{15}H_{24}O_3$ であり, また 12 は容易にジアセチル体に誘導された。

1H - 1H および ^{13}C - 1H COSY スペクトルから図 10 に示される部分構造群が導き出せる。可能な転位反応の経路

Fig. 11 Possible Rearrangement Pathway from 11 to 12.

Fig. 10 Partial Structures of Skeletally Rearranged Product (12).

を考慮すると, 図 11 の反応経路で構造式 12 の転位生成物が得られたと推定される(構造式 12 につけたナンバリングは化合物命名法に則ったものではなく, 10 がこの経路で転位したと仮定したときの 10 由来の炭素位置を示している)。

このことの確証を得るために, 最適遠隔 J_{CH} 値として 2.5~16.5 Hz までの数種の値を用いて HMBC スペクトルを測定した(例えば, 図 12)。しかしながら, 12 の 4 つの環がすべて 5 員環であり, また HMBC からは $^2J_{CH}$ と $^3J_{CH}$ との区別ができないために, C1 の四級炭素と直接結合した原子を一義的に決定するには至らなかった。

そこで $^{13}CH_3COONa$ から生合成された ^{13}C 標識の 10 (10'; ●が ^{13}C 標識炭素)¹²⁾を用いて, 11 への変換および 11 の転位反応を行い, ^{13}C 標識の 12 (12')を得た。10' の平均 ^{13}C 取り込み率は約 5% であるが, 同一分子中に

Fig.12 HMBC Spectrum of Skeletally Rearranged Product (12) in CDCl_3 .

Fig.13 ^{13}C NMR Spectra of $12'$ (^{13}C -Enriched) in C_6D_6 at 125 MHz.

^{13}C が多重標識されている確率がきわめて高い $10'$ を用いた。そのため、 $12'$ の一次元のプロトンノイズデカップリングの ^{13}C NMR スペクトル(図13)において $\text{C}(1)$, $\text{C}(2)$, $\text{C}(11)$ はそれぞれ多重線として現われ、 $\text{C}(2)$ - $\text{C}(1)$ - $\text{C}(11)$ 結合の存在が示唆された。しかし、これらの各炭素シグナルにおけるピークの大きな分裂間隔が約 33 Hz でほぼ同一であること、および、 $^3J_{\text{CC}}$ によって各ピー

クが広幅化していることのために $\text{C}(2)$ - $\text{C}(1)$ - $\text{C}(11)$ 結合の存在を確認することはできない。そこで、この $12'$ (2 mg) について二次元 INADEQUATE スペクトルの測定を行ったところ、測定時間 12.3 h で図14に示すように $\text{C}(1)$ - $\text{C}(2)$ および $\text{C}(1)$ - $\text{C}(11)$ の間のみ相関ピークが見られた。これによって、 $\text{C}(2)$ - $\text{C}(1)$ - $\text{C}(11)$ 結合の存在が明らかとなり、HMBC の結果とも併せて、 12 の構

Fig. 14 2D-INADEQUATE Spectrum of 12' (^{13}C -Enriched) in C_6D_6 .

造の確認ができた。

この場合は菌の terrecyclic acid A(10)生産能が高かったこともあり、培地に標識された酢酸を加えることによって比較的容易に標識された 10 を得ることができた。一般に生体の二次代謝物の生合成実験は、不確定要素が多く当たりはずれの見込みが難しい。本稿のほかの項で材料としている海綿あるいはホヤといった海棲動物になると、生合成実験は不可能に近く研究例は非常に少なく¹³⁾、NMR を用いた生合成研究はさらに難しい。

6. 細胞毒性ペプチド orbiculamide A の構造解析¹⁴⁾

Theonella 属の海綿については、国内だけでも数グループによって研究が行われており、これまでに生物活性においても化学構造においても種々の興味ある化合物が 10 種以上単離・構造決定されている¹⁵⁾。ここでは八丈島で採集した *Theonella* 属海綿(これから cyclotheonamides¹⁶⁾, aurantosides¹⁷⁾ も得られている)から得られたペプチド orbiculamide A(13; 湿重量 10.5 kg から 39.2 mg; 収率 $3.7 \times 10^{-4}\%$)の構造解析について述べる。この化合物のマウス白血病細胞 P 388 に対する細胞毒性(*in vitro*) IC_{50} は $4.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。分子式は FAB/MS [negative, glycerol matrix; m/z 980, 978(1:1, $\text{M}-\text{H}^-$)] および NMR データから $\text{C}_{46}\text{H}_{62}\text{BrN}_9\text{O}_{10}$ と判明した。 ^1H NMR および ^{13}C NMR スペクトルから 13 はペプチド性化合物と思われたので、まず通常のアミノ酸分析を行い、

プロリン(Pro), アラニン(Ala), 2-アミノ酪酸(Aba), オルニチン(Orn)の存在が示されたが、まだ数種のアミノ酸残基が 13 には存在すると考えられた。これらの残基および全構造については 2D NMR を用いて構造決定した。溶媒としては $\text{DMSO}-d_6$ と CD_3OH を用いた^{*6)}。

*6) 溶媒の選択が重要な場合も多くある。例えば i) 構造解析の難易を決めたり, ii) 多種の溶媒で測定する(酸あるいは塩基の添加、測定温度の変化も考慮すべきである)ことにより、配座交換・化学平衡などに関する非常に有益な情報が得られる場合もある。混合溶媒を用いることもよく行われており、例えば $\text{CDCl}_3-\text{C}_6\text{D}_6$, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOH}$, $\text{D}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ などの混合溶媒がよく用いられている。

このサンプル 13 の場合には、 $\text{DMSO}-d_6$ 中でもシグナルの広幅化はほとんど見られず 2D の交差ピークもよく出ていたのはほとんどの構造解析は $\text{DMSO}-d_6$ 中で行えたが、最終的なつめ(とくに HOHAHA, ROESY)は CD_3OH 中での測定を行った。容易に H-D 交換可能なシグナル(アミドプロトンなど)をメタノール溶媒中でも消さないために CD_3OD ではなく CD_3OH を用いているが、スペクトル上に出現する強大な OH シグナルをきれいに消去せねばならないのが面倒な点である。しかし、タンパク質を扱っている研究者らのおかげで、水シグナル消去のためのよいパルス系列がどんどん開発されている。我々は装置のシムを十分に上げて、開発されている水消去のパルス系列を利用すればよい。

まず、2-bromo-5-hydroxytryptophan 残基(Bhtrp, 14)の存在は、HMBC スペクトル(図15; この図からはみだしているが、インドール上のNH(δ 10.85)と同一環上の4個のCの間にも HMBC 相関が見られる)から多くの情報(14内の矢印参照)が得られ、また UV データ($\lambda_{\max}$ 203, 220, 269, 303 nm)もこれを支持した。

14

15

次に、theoalanine と名づけたアミノ酸残基(Thl, 15)の構造は、やはり HMBC スペクトルから多くの情報(15内の矢印参照)を得たが、oxazole 環の存在はそれらの化学シフト・HMBC 相関とともに5位の $^1J_{CH}$ が207 Hz と非常に大きいこと(この $^1J_{CH}$ 値は HMBC スペクトル上に、他の $^1J_{CH}$ 値と大きく異なるために消え残った $^1J_{CH}$ から読み取った)から判断し、他の部分も 1H - 1H COSY とともに HMBC から構造の推定を行った。この Thl 残基は酸加水分解でアラニンを生じることおよび NMR 上で Ala の存在は示されなかったことより、アミノ酸分析で示された Ala はこの Thl 由来である。

アミノ酸分析では検出されなかったが、HOHAHA ス

ペクトル(図16)等から明らかになった 1H NMR のスピン系[0.94(6H, d), 1.85(1H, m), 1.38(1H, m), 5.12(1H, m)]からロイシン残基と思われるシグナルがある。この NH と直接結合した CH のプロトン(δ 5.12)は δ 195.9 の C と HMBC 相関があるなどの事実から、cyclotheonamides で見られたと同様の α -ケトアミド構造を有する新規アミノ酸残基(theoleucine, Tle, 16)の存在が示された。

16

NMR において、以上のほかに、Pro, Aba, Orn のアミノ酸分析で検出されたアミノ酸残基と3-メチル吉草酸残基(3 Mv)の存在も明らかであった。

以上の7個の断片(Pro, Aba, Orn, Bhtrp, Thl, Tle, 3 Mv)のつながりも HMBC を中心とした2D NMR より明らかとなった(図17参照)。CD₃OH 中での HMBC スペクトルで Orn と Pro 間以外はすべてアミド結合(NH-CO)に HMBC 相関が見られた。Orn と Pro 間のつながりは NOESY および ROESY スペクトルで、Orn の

Fig. 15 HMBC Spectrum of Orbiculamide A(13) in CD₃OH at 313 K. Numbers in the Figure are correlation peaks between amino acid residues as shown in Fig. 17.

Fig. 16 HOHAHA Spectrum of Orbiculamide A(13) in CD_3OH at 313 K.

Fig. 17 Planar Structure of Orbiculamide A(13). Arrows show correlations between amino acid residues.

— : HMBC correlation (Numbers correspond to those in Fig. 15)
 - - - : NOESY correlation
 ····· : ROESY correlation

α -メチンプロトンとProの δ -メチレンプロトン間に相関シグナルが見られることで証明できた。

以上で13の平面構造が明らかとなったが、立体化学に関してはNMRではなく、各残基あるいはその誘導体をキララなGC、LC等で分析して決定した。

なお、この13と非常に類似したペプチド keramamides B-D が、やはり *Theonella* 属海綿から、同時期に単離・構造決定された¹⁸⁾。

7. おわりに

最初にも述べたが、本稿では天然有機化合物の対象を従来型のもので、かつ、筆者らの取り扱った化合物に限定したため、天然有機化学者がすでに用いているNMRの最新技法のいくつか、および、近い将来使用可能な技法を紹介できなかった。以下にそれらの技法を羅列する。

- 1) 多次元(三および四次元)NMR。三次元 NMR に関しては、本誌にもすでに紹介されている¹⁹⁾。
- 2) 磁場勾配法。用語は英語でもまだ定まっていないようである。GE(S)[Gradient Enhanced or Echo Spectroscopy], PFGS[Pulsed Field Gradient Spectroscopy], GRASP[Gradient Spectroscopy]等が用いられている。
- 3) 測定法ではないが、グラフィックスコンピュータ等によるNMRデータを用いた分子あるいは分子間相互作用の立体構造解析。
- 4) 多核NMR。例えば、 ^{19}F , ^{31}P , ^{17}O , ^{15}N , 金属核。
- 5) より大きな外部磁場の利用。ごく最近 750 MHz のNMR装置は、製品化がはじまっている。
- 6) LC-NMR。まだ市販されていないが、NMRメーカー内ではすでにデータをとっている。

最後に、伏谷伸宏教授(東京大学農学部)、松永茂樹博士(同)、廣田 陽教授(静岡県立大学)、塚本佐知子博士(新技団着生機構プロジェクト)をはじめ、ここに紹介した研究の共同研究者の方々に深謝します。また、本稿の

執筆にあたり印刷中の投稿原稿のコピーをご恵与くださった安元 健教授(東北大学農学部), 村田道雄助教授(東京大学理学部)に感謝致します。

(平成5年3月15日受理)

文 献

- 1) M. Murata, H. Naoki, T. Iwashita, S. Matsunaga, M. Sasaki, A. Yokoyama, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2060 (1993)
- 2) S. Tsukamoto, H. Hirota, H. Kato, N. Fusetani, *Tetrahedron Lett.*, in press
- 3) A. Bax, M.F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093 (1986)
- 4) M.V. Laycock, J.L.C. Wright, J.A. Findlay, A.D. Patil, *Can. J. Chem.*, **64**, 1312 (1986)
- 5) K. Nagata, K. Takakura, T. Asano, Y. Seyama, H. Hirota, N. Shigematsu, I. Shima, T. Kasama, T. Shimizu, *Biochim. Biophys. Acta*, **1126**, 229 (1992)
- 6) 廣田 洋, 永田和哉, 重松伸治, 日化第61春季年会 4C141 (1991)
- 7) M. Axelson, B. Mörk, J. Sjövall, *J. Lipid Res.*, **29**, 629 (1988)
- 8) N. Fusetani, H.J. Wolstenholme, S. Matsunaga, H. Hirota, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 7291 (1991)
- 9) H. Hirota, S. Kakita, A. Hirota, M. Nakagawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1598
- 10) 廣田 洋, 日化第58春季年会 2IL16 (1989)
- 11) e.g.) A. Hirota, M. Nakagawa, H. Sakai, A. Isogai, *J. Antibiotics*, **35**, 783 (1982); A. Hirota, M. Nakagawa, H. Hirota, T. Takahashi, A. Isogai, *ibid.*, **39**, 149 (1986)
- 12) A. Hirota, M. Nakagawa, H. Sakai, A. Isogai, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 835 (1984)
- 13) e.g.) M.J. Garson, *Nat. Prod. Rep.*, **6**, 143 (1989)
- 14) N. Fusetani, T. Sugawara, S. Matsunaga, H. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7811 (1991)
- 15) e.g.) M. Kobayashi, K. Kawazoe, T. Katori, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1773 (1992)
- 16) N. Fusetani, S. Matsunaga, H. Matsumoto, H. Takebayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7053 (1990)
- 17) S. Matsunaga, N. Fusetani, Y. Kato, H. Hirota, *ibid.*, **113**, 9690 (1991)
- 18) J. Kobayashi, F. Itagaki, H. Shigemori, M. Ishibashi, K. Takahashi, M. Ogura, S. Nagasawa, T. Nakamura, H. Hirota, T. Ohta, S. Nozoe, *ibid.*, **113**, 7812 (1991)
- 19) 大内宗城, 河野静江, 有合化, **48**, 577 (1991)