総合論文

アルデヒドテルペノイドによるホスホリパーゼ A₂ 不活性化機構

田 中 克 典*・勝 村 成 雄*

The Inhibitory Mechanism of Phospholipase A₂ by Aldehyde Terpenoids

Katsunori TANAKA* and Shigeo KATSUMURA*

Recently, it has been reported that some unsaturated aldehyde terpenoids inhibit phospholipase A₂ (PLA₂), which catalyzes hydrolysis of the ester linkage at the *sn*-2 position of glycerophospholipids. Since the release of arachidonic acid from glycerophospholipids is the rate-limiting step in the production of eicosanoid mediators of inflammation, the inhibitory mechanism of PLA₂ by these aldehyde terpenoids has been of biochemical and medicinal interest.

It is known at present that the three aldehyde terpenoids, scalaradial, manoalide, and (*E*)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal compound **A** strongly inactivate PLA₂. As the inhibitory mechanism of PLA₂ by manoalide, our group has found that the irreversible modification of Lys 56 in the interfacial recognition site of bovine PLA₂ by manoalide is responsible for the inactivation of this enzyme. Although the real reaction mechanism between manoalide and the lysine residues of PLA₂ has not been elucidated, our model studies on the reactions between manoalide analogs and mono- and diamines strongly suggested that manoalide reacted with the two close lysine residues to give polymerized compounds. In the case of the (*E*)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal compound **A**, it would inhibit the hydrolytic activity of bovine pancreatic PLA₂ by the formation of the dihydropyridine derivatives resulting from the reaction with lysine residues of PLA₂ via 6 π -electrocyclization of the intermediary Schiff bases. Moreover, scalaradial also irreversibly reacts with lysine residues to inactivate PLA₂, and the production of the pyrrole derivative has been proposed by Cimino and coworkers based on the model reaction with methylamine.

Thus, it would be concluded that the irreversible formation of the product by the reaction with the lysine residue in the interfacial recognition site of PLA₂ is essential for sufficient inactivation of PLA₂ by unsaturated aldehyde terpenoids such as manoalide, scalaradial, and the (*E*)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal compounds.

Key words: Phospholipase A₂ (PLA₂), Manoalide, Scalaradial, (*E*)-3-Methoxycarbonyl-2,4,6-trienal, Lysine residue, Interfacial recognition site, Irreversible product, 1,2-Dihydropyridine

はじめに

天然物を対象とした合成化学の立場から“生体機能性物質の機能発現機構を分子レベルで理解する”という命題に対する1つのアプローチとして、興味深い生物活性

を有する有機低分子に焦点をあて、その構造的特徴と生物活性の関係を明らかにすることにより、酵素などの生体高分子についてのより深い理解をはかるという方策が考えられる。

ここでは、加水分解酵素ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)の加水分解能を阻害するアルデヒドテルペノイド類の合成とそれらの阻害機構について、筆者らが行ってきた研究成果を中心に紹介する。

* 関西学院大学理学部

* School of Science, Kwansei Gakuin University

イドはウシ腓液 PLA₂ の、この特異的なアニオン性ミセル状基質に対する加水分解能を強力に阻害することを明らかにした。さらに筆者らは新たに、ウシ PLA₂ に対しトリエンアル A がモノアライドよりさらに強力な阻害活性を示すことを見いだした¹³⁾。そこで、モノアライドおよびアルデヒド A のウシ PLA₂ 阻害機構を以下の方針のもとに検討してきた。①効率よい合成法の確立、②阻害剤の構造的特徴；類縁体の合成による必要な官能基および立体化学の解明、③阻害機構の解明；(3-1)有機反応としての理解、(3-2)特定のアミノ酸残基の役割についての情報。以下、モノアライドによるウシ PLA₂ 不活性化機構の結論と、新たに見いだした (*E*)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal A によるウシ PLA₂ 不活性化機構について報告し、加えて両者を比較・考察することによりアルデヒドテルペノイドによる PLA₂ 不活性化

機構の共通性について述べたい。

2. モノアライドによるウシ腓液由来 PLA₂ の不活性化機構¹²⁾

まず、PLA₂ を不活性化するために必要なモノアライド分子中の官能基を検討するため、モノアライドの簡便かつ効率的な合成法を確立した(図 4)。すなわち、文献既知のエステルから数段階を経て合成したアリルクロライドと、2,3-ジプロモフランから位置選択的リチウム化を経て合成したスズ基を持ったシリルフランを Pd(0)触媒のもとに一酸化炭素加圧下に反応させたところ、一酸化炭素の挿入を伴った望むクロスカップリング体が 90% の高収率で得られた。このカップリング体の β, γ 位の二重結合は極めて容易にカルボニル基の α, β 位へ異性化してしまうため、直ちにカルボニル基を LAH で還

Synthesis of Manoalide

(+); Inhibitory activity.
| |; Amount of the modified lysine residues after 90 minutes incubation.

Fig. 4

元、生じたアルコールをエトキシエチル基で保護した。このようにして得た α -シリルフラン誘導体に対し光増感酸素酸化を行うことにより、フラン環の官能基選択的な酸化により望む γ -ヒドロキシブテノリドを位置特異的に得、これを酸処理することにより89%でセコモノアライドを合成した。セコモノアライドは光照射によりモノアライドへ定量的に変換した。

以上のように確立した合成法を用いて図4に示す数種類の類縁体1-5を合成した。それらのウシPLA₂に対する阻害活性を検討した結果を図5に示す。阻害活性テストは以下のようにして行った。ウシの腭液から単離したPLA₂と類縁体1-5とを一定時間反応させ、各類縁体によって非可逆的に修飾されたPLA₂であるPLA₂₁-PLA₂₅を調製した。一方、基質としてはコール酸ナトリウムによってアニオン性混合ミセル状としたジドデカノイルホスファチジルコリンを用いた。この混合ミセルに対し、修飾PLA₂および非修飾PLA₂をそれぞれ作用させ、遊離したドデカン酸の量をpHスタット法で測定することによりPLA₂の加水分解能を測定した^{12c)}。図5における縦軸はPLA₂の加水分解能を、阻害剤を共存させていないコントロールとの比較においてパーセント表示している。

末端にアルデヒド基のない2、および側鎖19位にアルデヒド基のない3ではウシPLA₂阻害活性は全く認められない。明らかにPLA₂不活性化のためにはモノアライドに存在する2つのアルデヒド官能基が必要である。ま

Bovine pancreatic PLA₂ was incubated with monoalide derivatives in 50 mM Tris/HCl buffer at 40 °C and pH 8.0. At appropriate time intervals, PLA₂ activity toward anionic mixed micelles of 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine with cholic acid was measured by the pH-stat method at 25 °C, pH 7.0, and ionic strength 0.2 in the presence of 10 mM CaCl₂.

Fig. 5

た興味深いことに、類縁体1がモノアライドより強力な阻害活性を示すセコモノアライド(SM)と同程度の阻害活性を示すのに対し、類縁体4, 5は1と同じ官能基を持つにも拘わらず、全く阻害活性を示さなかった。すなわち、モノアライド類縁体がPLA₂を不活性化するためには、相応の親油性部となる炭化水素部が必要であり、水溶液中で会合する必要性を示している。類縁体4や5は会合度が低いためにウシPLA₂に認識されないと推定された。

次に、セコモノアライドおよび類縁体1とウシPLA₂とを反応させたとき、非可逆的に修飾されるアミノ酸残基について調べた。先と同様にしてウシ腭液PLA₂にセコモノアライドおよび1を作用させ、修飾されたPLA₂であるPLA_{2SM}, PLA₂₁をそれぞれ調製し、これら修飾PLA₂のアミノ酸分析を行った。その結果、ウシPLA₂には11個のリジン残基が存在するが、PLA_{2SM}においては90分後に6個分が、PLA₂₁においては2個分のリジン残基の減少がみられた(図4)。一方、Leu, Ala, Ile, Argなどの組成変化は全く認められなかった。このようにセコモノアライドおよび類縁体1はウシPLA₂のリジン残基のみを非可逆的に修飾し、アニオン性ミセル状基質に対する加水分解能を80-90%不活性化させていることが明らかとなった。

そこで、化合物1によって非可逆的に修飾されるLys残基の同定を試みた。まず、先と同様にして修飾PLA₂₁を調製し、それに存在する7個のジスルフィド結合のジチオスレイトール処理による切断、続く4-ビニルピリジン処理を経て、ジスルフィド基がジビリジルエチル基で保護された修飾PLA₂を得た。この修飾PLA₂をリジンエンドペプチダーゼ消化によってLysのC末端で選択的に切断し、得られた各ペプチドフラグメントをアミノ酸シーケンサーにより解析した結果、Lys56が非可逆的に修飾されていることが明らかとなった^{12c)}。

以上のように、モノアライドと同等の阻害活性を示すより構造の簡単な類縁体1は、ウシPLA₂に存在する11個のリジン残基のうち、56番目のリジン残基を優先的に修飾することが判明した。そこで両者がどのような反応をするのかを調べるため、リジン残基のモデルとして1級アミンを用い、1との反応を検討した(図6)。

まず1等量のヘキシルアミンとの反応では、アミノアセタール6がほぼ単一物として得られた。この置換体6は、水処理により簡単に元の1へ戻るため非可逆的な修飾体には相当しない。しかし、モノアライド分子中 γ -ヒドロキシブテノリドのヘミアセタール部が、1級アミンに対して最も反応性に富むことが明らかになった。次に1

Fig. 6

に1等量の1,6-ヘキサジアミンを反応させたところ様相は一変し、各種有機溶媒に不溶な橙色パウダーが生成した。この不溶物は1とジアミンとが反応してできた高分子化合物と推定される。また、1級ジアミンの炭素数について検討したところ、炭素数5以上のジアミンの場合のみ、1は橙色不溶物を与えることがわかった。この結果をコンピュータグラフィックスを用いて考察すると、ウシPLA₂の最もとりやすい立体配座においては、Lys 56のアミノ基とLys 53のアミノ基との距離は7.8 Åと見積もることができ、この長さは1,5-ペンタンジアミンの2つのアミノ基の距離7.6 Åによく相当しており、セコモノアライドの2つのアルデヒド間の距離7.5 Åにもよく相当していることは興味深い。

ところで、我々の研究に先だて、JacobsおよびDennisらはそれぞれハチ毒液、コブラ毒液由来のPLA₂を用いてモノアライドによるPLA₂不活性化機構を検討している^{9,10}。彼らもPLA₂の不活性化にはリジン残基の非可逆的な修飾が必要であると報告しており、それぞれ異なった反応機構を仮定している。図7に示すJacobsらの仮定では、モノアライド1分子に対し2個

Fig. 7

のリジン残基が反応し、2個目はPLA₂分子内の他のリジン残基が反応するというものである^{8,9i,n}。一方、Dennisらのものは、モノアライドの2つのアルデヒドに対し1つのリジン残基が反応するというものである(図8)¹⁰。筆者らのモデル反応の結果からは、得られた橙色不溶物がモノアライドによるPLA₂の非可逆的生成物に相当すると仮定すると、Jacobsらの説を支持する。

Fig. 8

以上のように、モノアライドとPLA₂のリジン残基が、どのような非可逆生成物を与えるかという点において明確な知見を得るには至らなかったが、モノアライドがウシPLA₂を不活性化するためには、①2つのアルデヒド基、②十分な疎水性炭素鎖、③ウシPLA₂を構成する56番目のリジン残基の非可逆的な修飾が必要であることを明らかにした。

PLA₂触媒(活性)部位は、His48, Asp49, Asp99であると推定されており、Lys 56は触媒部位に直接的には関係しない。しかし冒頭で述べたように、基質であるミセル状のグリセロリン脂質は、単分子分散状のリン脂質(基質)に比べ1万倍加水分解されやすいという事実から、PLA₂酵素には先に述べた触媒部位に加え界面認識部位が存在すると推定されている。NoelらはウシPLA₂のsite-directed mutagenesisによる実験結果より、56番目のリジン残基はウシPLA₂の界面認識部位を構成し、アニオン性のミセル状グリセロリン脂質の認識を担っているアミノ酸残基であると報告している¹⁴。そこで、モノアライドによるPLA₂不活性化機構として、会合したモノアライドがウシPLA₂の界面認識部位に認識され、その部位に存在する56番目のリジン残基を非可逆的に修飾し、それによってPLA₂のカチオン性を持つ界面認識部位を変化させ、アニオン性のミセル状グリセロリン脂質に対する認識を阻害し、その結果ウシPLA₂を不活性化すると推定することができた(図9)。なお、モノアライドがLys 56を非可逆的に修飾することにより

Fig. 9

ウシ PLA₂ 触媒部位のコンフォメーションが変化し、PLA₂ 加水分解能が低下した可能性が考えられる。この問題に対してはさらなる検討が必要であるが、モノアライドによって修飾された PLA₂ はミセル状基質に対し強力に不活性化されるが、一方、単分子分散状基質に対してはその加水分解能が全く阻害されないという結果を我々は得ている^{12c)}。従って、モノアライドの非可逆的修飾が PLA₂ 触媒部位に影響を及ぼし、加水分解能を阻害している可能性は少ないと考えられる。

3. (E)-3-Methoxycarbonyl-2,4,6-trienal 化合物類によるウシ膵液 PLA₂ の不活性化機構¹³⁾

一方我々は、アルデヒドテルペノイド構造をもつ新規な PLA₂ 阻害剤の開発を検討するうちに、エステル基とアルデヒド基が E 体である A は、ウシ PLA₂ に対しモノアライド以上の阻害活性を示し、その Z 異性体 B は全く阻害活性を示さないことを見いだした(図 10)。そこでその阻害機構を検討すべく、モノアライドの阻害機構解明の際に得られた知見を参考にし研究を行ってきた。

まず、このような研究を効率よく行うために、効率的な A の合成法の確立を目指した。種々検討の結果、アセチレンへのヒドロメタル化を鍵反応とした高立体選択的な A の合成法を確立した。すなわち、図 10 に示すよう

a) LDA, CIP(O)(OEt)₂ / THF, then 2 eq. LDA; 81% b) *n*-BuLi, (CH₂O)_n / THF; quant. c) *i*-BuMgCl, Cp₂TiCl₂ / ether, then CO₂ / THF; 73% d) N,N,N',N'-tetramethylguanidine, MeI / benzene; 71% e) MnO₂ / CH₂Cl₂; quant. f) *n*-BuLi / THF; 86% g) ¹O₂ / CH₂Cl₂; 91% h) DBU, MeI / DMF; 82%

Fig. 10

に β -イオンからエノールリン酸エステルを経てアセチレンとし¹⁵⁾、これに1炭素の増炭を行って7とした。これにTi触媒によるグリニャール試薬のヒドロメタル化を実現させ、炭酸ガスと反応させることでE体8のみを73%の収率で得た^{16,17)}。次いでメチルエステル化、続く酸化により収率よくAの合成を達成することができた。一方、Z体B¹⁸⁾は以下のように合成した。スルホン9と、3-フランメタノールより誘導したクロロメチルシリルフラン10¹⁹⁾とのカップリングにより11を得、これを一重項酸素酸化により γ -ヒドロキシブテノリド12とした²⁰⁾。これに、3等量のジアザビスクロウンデセン存在下にヨウ化メタンと反応させることで、1段階でメチルエステル化と脱スルホン化を行い、二重結合の異性化を伴うことなく高立体選択的にZ体Bへの変換を実現した²¹⁾。このように、(E)-、(Z)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal 両異性体をそれぞれ立体選択的に合成す

ることに成功した。

さて、Aに存在するどの官能基がPLA₂不活性化に必要であるかを調べるため、Aの類縁体として化合物C、D、E、F、G、H、Iを合成しそのPLA₂阻害活性を調べた(図11、12)。化合物C-Hは先に確立したアセチレンへのヒドロマグネシウム化を鍵反応として、または対応するZ異性体をまず合成した後、光異性化することによって得た。化合物Iは新たな Wittig 試薬 3-(2-trimethylsilylfuryl)triphenylphosphonium methylideを開発し^{18b,22)}、これとtrans-ジヒドロシクロシトラール²³⁾との Wittig 反応を鍵としてまずZ異性体を合成し、次いでこの光異性化により合成することができた。なお、PLA₂の阻害活性テストに用いた条件はモノアライドの阻害活性テストに用いた条件と全く同じである。

図11、12から明らかなように、C、D、EはAと同様に強力なPLA₂阻害活性を示したが²⁴⁾、エステル基をメチ

Fig.11

Fig.12

ル基にかえた類縁体 F, また, エステル基とアルデヒド基の位置を入れかえた類縁体 G, さらに二重結合の一部欠けた類縁体 H および I においては PLA₂ 阻害活性が認められなかった。これらの結果よりウシ PLA₂ を不活性化するためには, (*E*)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal の系に存在するすべての官能基が必要であることが明らかとなった。この官能基配列の必要性は, 後にアミンとのモデル反応によって明確に理解された。

次に, これら化合物が非可逆的に修飾するウシ PLA₂ のアミノ酸残基について調べた (図 10, 11)。モノアライドの場合と同様に, 化合物 A, C, D, E によって非可逆的に修飾された PLA_{2A}, PLA_{2C}, PLA_{2D}, PLA_{2E} をそれぞれ調製し, これら修飾 PLA₂ のアミノ酸分析を行った結果, 各 PLA_{2A}-PLA_{2E} においてリジン残基のみの減少がみられた。このように, 化合物 A, C, D, E はモノアライドの場合と同様に, ウシ PLA₂ のリジン残基のみを非可逆的に修飾していることが判明した。

そこでウシ PLA₂ のリジン残基のモデルとして 1 級アミンを用い, A との反応を検討した。その結果, A にジオキサン中でプロピルアミンを作用させたところ, 図 13 に示すように直ちに 1,2-ジヒドロピリジン誘導体 K がほぼ定量的に生成した。これは中間に生成したイミン J の 6π-アザ電子環状反応によって生成したと考えられる。また, 化合物 C, D, E においてもプロピルアミンとの反応によって, Schiff 塩基中間体を経た環化反応が速やかに進行し, 対応する 1,2-ジヒドロピリジン誘導体 DHP_C-DHP_E を与えた²⁵⁾。一方, 阻害活性を示さない立体異性体 B ならびに類縁体 F, G, H, I の場合は, 90 分

の反応時間内では Schiff 塩基 SCF_B-SCF_I を与えるのみであった。このように, 中間体である Schiff 塩基から 6π-アザ電子環状反応がスムーズに進行するためには, アルデヒドの 3 位のエステル基および 2, 4, 6-トリエナル系が必要であることが明らかとなった。

Okamura らは, 13-*tert*-ブチル-13-*cis*-レチナールは *n*-ブチルアミンと室温 1 時間で反応し, 対応する 1,2-ジヒドロピリジン誘導体を与えることを見いだしている (図 14)²⁶⁾。さらに同グループによって, 6π-アザ電子環

Fig. 14

状反応の反応速度に及ぼす 1-アザトリエン上の置換基の立体的, 電子的影響が調べられている。今回, 筆者らが得た, (*E*)-3-methoxycarbonyl-1-aza-2,4,6-triene 系における 3 位のメトキシカルボニル基および 6 位の二重結合が 6π-アザ電子環状反応を著しく促進するという知見は, これまでに報告されておらず非常に興味深い²⁷⁾。

以上の結果は先の構造活性相関の結果とよく対応している。従って, A などの不飽和エステルアルデヒド類の

Fig. 13

Fig. 15

PLA₂阻害機構として、(E)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienalがPLA₂のリジン残基と非可逆的に反応し、対応する1,2-ジヒドロピリジン誘導体を与えることによってその酵素活性を低下させることが強く示唆された。

さらに、これらモデル反応の結果は図15に示すように、化合物Cにより修飾されたPLA₂ (PLA_{2c})のMALDI-TOFマスペクトルによっても支持される。化合物CとPLA₂を60分反応させた後のスペクトルにおいて、PLA₂由来の(M+H)⁺イオンピークP1が確認され、さらにこれより178マスユニット高質量側、および356マスユニット高質量側にそれぞれイオンピークP2, P3が現れている。先のモデル反応で用いた*n*-プロピルアミンとその対応するCの1,2-ジヒドロピリジン誘導体との質量差は丁度178であることから、ピークP2はCがPLA₂に対し1分子、ピークP3は2分子付加しジヒドロピリジン誘導体となった修飾PLA_{2c}由来の(M+H)⁺イオンピークであることがわかる。このように化合物Cが、PLA₂のリジン残基をジヒドロピリジン誘導体として修飾していることが明確に観察された。

ところで分子Eは2個分のリジン残基を修飾する。これらの不飽和エステルアルデヒド類はウシPLA₂に存在

する11個のリジン残基のうち、どのリジン残基を優先的に修飾し、PLA₂を不活性化するのであろうか。そこで、モノアライドの際と同様、化合物Eにより非可逆的に修飾されたウシPLA₂(修飾PLA₂)を単離した後、7個のS-S結合の切断、生じる-SH基の保護を行い、その後リジエンドペプチダーゼとAsp-Nの2種類の酵素によってそれぞれ酵素消化を行った。得られた各種ペプチドフラグメントのMALDI-TOF-マスペクトルの解析を行った結果、Lys56とLys113およびLys116が修飾されていることが明らかになった^{13b)}。この場合においてもモノアライドの場合と同様、Lys56が非可逆的に修飾されていることが判明した。

従って、化合物AやEに代表される(E)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal類のウシPLA₂阻害機構として、この場合もモノアライドと同様にウシPLA₂の界面認識部位を構成するLys56と反応し、非可逆の生成物として1,2-ジヒドロピリジン誘導体を与え、その結果、アニオン性ミセル状グリセリン脂質に対する酵素活性を強力に不活性化させると結論づけることができる。

4. スカララジアルによるPLA₂の不活性化機構⁷⁾

他方、スカララジアル13もハチ毒PLA₂を不活性化することが報告されており、13はモノアライドと同様に2つのアルデヒド基を有することから、PLA₂のリジン残基と非可逆の生成物を与える可能性が考えられる。Ciminoらは、リジン残基のモデルとしてメチルアミンを用いてスカララジアルとの反応を検討している^{7b)}。図16に示すように反応は2段階を経て進行する。まず、C20位アルデヒド基とメチルアミンとの間でSchiff塩基を形成した後、さらに分子内でC19位アルデヒド基と反応しイミニウムイオン14を与える。このイミニウムイオン14は、酸処理により簡単に元の13へ戻るため非可逆の修飾体には相当しない。この段階では、PLA₂の活性は顕著に阻害されていないことが、Jacobsらによるハチ毒液PLA₂を用いた研究によって証明されている^{9a)}。さらにその後C16位で水分子、または他のリジン残基による求核反応が進行し、続く脱水を伴って非可逆の生成物に相当するピロール誘導体15を与えると推定されている。

Ciminoらのグループはさらに、スカララジアルのC18エビマーである類縁体16はハチ毒PLA₂に対し不活性化作用をほとんど示さず、またメチルアミンとのモデル反応において非可逆の生成物を与えないという興味深い知見を報告している。彼らはこの結果をC19アルデヒド基がアキシアルである16では2つのアルデヒド

Fig.16

基が遠く離れており、C20位での Schiff 塩基形成の後、続く C19 アルデヒド基との反応が速やかに進行しないためであると考察している。以上のように、スカララジアルの場合においてもモノアライド、(E)-3-methoxycarbonyl-2,4,6-trienal 化合物の場合と同様、PLA₂ のリジン残基と反応し非可逆的の生成物を与えることで PLA₂ を不活性化する可能性が指摘されている。

おわりに

筆者らはこれまでに、モノアライドがウシ PLA₂ を不活性化するためには、PLA₂ のリジン残基の非可逆的な修飾が必要であることを明らかにしてきた。さらに、A などの不飽和エステルアルデヒド類が、モノアライドと同様に PLA₂ のリジン残基と非可逆的に反応し、対応する 1,2-ジヒドロピリジン誘導体を与え、その酵素活性を低下させると結論づけることができた。他方、スカララジアルの場合においても、1級アミンとのモデル反応の結果より、リジン残基と反応し非可逆的の生成物であるピロール誘導体を与えることによって PLA₂ を不活性化する可能性が指摘されている。

このようにアルデヒドテルペノイドによる PLA₂ 不活性化機構として、ミセル状基質認識部位を構成するリジン残基と反応し非可逆的の生成物を与えることにより、ミセル状基質の認識を妨げる結果であると結論づけられる。またこの結論を言い換えれば、PLA₂ に存在するリジン残基と反応し非可逆的の生成物を与えることのできるある種のアルデヒドテルペノイドのみが、PLA₂ の加水分解能を強力に不活性化すると結論づけることができる。

謝 辞 本研究は、大阪薬科大学生化学教室の池田研究室との共同研究により成り立ったものであり、池田潔教授、藤井忍助手には心から感謝いたします。MALDI-

TOF-MS はサントリー生物有機科学研究所の板垣又不博士のご指導によるものであり、深く感謝いたします。また、文献記載の共同研究者に対しても深く感謝の意を表します。本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって行われたものであり、感謝いたします。

(平成 11 年 4 月 19 日受理)

文 献

- 1) E.A. Dennis, "The Enzymes", Vol.16, ed. by P.D. Boyer, Academic Press, New York, 1983, p.307
- 2) 例えば, (a) 池田潔, 手島圭三, 蛋白質 核酸 酵素, **32**, 1422 (1987); (b) 諏訪頼正, 蛋白質 核酸 酵素, **36**, 333 (1991); (c) C.R. Pace-Asciak, W. L. Smith, "The Enzymes", Vol.16, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York, 1983, p.543
- 3) (a) M. Waite, "Handbook of Lipid Research: The Phospholipases", Vol.5, ed. by D.J. Hanahan, Plenum Press, New York, 1987, p.111; (b) D.L. Scott, P.B. Sigler, "Advances in Protein Chemistry", Vol.45, ed. by V.N. Scumaker, Academic Press, San Diego, 1994, p.53
- 4) B.W. Dijkstra, J. Drenth, K.H. Kalk, *Nature*, **257**, 2155 (1982)
- 5) (a) H.M. Verheij, A.J. Slotboom, G.H. de Hass, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **91**, 91 (1981); (b) M.M.G. M. Thunnissen, E. AB, K.H. Kalk, J. Drenth, B.W. Dijkstra, O.P. Kuipers, R. Dijkman, G.H. de Haas, H.M. Verheij, *Nature*, **347**, 689 (1990); (c) S.P. White, D.L. Scott, Z. Otwinowski, M.H. Gelb, P.B. Sigler, *Science*, **250**, 1560 (1990); (d) D.L. Scott, Z. Otwinowski, M.H. Gelb, P.B. Sigler, *ibid.*, **250**, 1563 (1990); (e) D.L. Scott, S.P. White, J.L. Browning, J.J. Rosa, M.H. Gelb, P.B. Sigler, *ibid.*, **254**, 1007 (1991)

- 6) (a) D.E. de Silva, P.J. Scheuer, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1611 (1980); (b) *idem, ibid.*, **22**, 3147 (1981)
- 7) (a) G. Cimino, S. de Stefano, L. Minale, *Experientia*, **30**, 846 (1974); (b) G. Cimino, G. Sodano, A. Spinella, *Tetrahedron*, **43**, 5401 (1987); (c) M.S. de Carvalho, R.S. Jacobs, *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 1621 (1991)
- 8) B.C.M. Potts, D.J. Faulkner, R.S. Jacobs, *J. Nat. Prods.*, **55**, 1701 (1992)
- 9) Inhibitory mechanism toward bee venom PLA₂: (a) E.S. Burley, B. Smith, G. Cutter, J.K. Ahlem, R.S. Jacobs, *Pharmacologist*, **24**, 138 (1982); (b) J.C. de Freitas, L.A. Blankemeier, R.S. Jacobs, *Experientia*, **40**, 864 (1984); (c) R. S. Jacobs, P. Culver, R. Langdon, T. O'Brien, S. White, *Tetrahedron*, **41**, 981 (1985); (d) K. B. Glaser, R.S. Jacobs, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 449 (1986); (e) C.F. Bennett, S. Mong, M. A. Clarke, L.I. Kruse, S.T. Crooke, *Biochem. Pharm.*, **36**, 733 (1987); (f) M.R. Kernan, D.J. Faulkner, R.S. Jacobs, *J. Org. Chem.*, **52**, 3081 (1987); (g) K.F. Albizzati, T. Holman, D. J. Faulkner, K.B. Glaser, R.S. Jacobs, *Experientia*, **43**, 949 (1987); (h) M.R. Kernan, D.J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **53**, 2773 (1988); (i) K.B. Glaser, T.S. Vedvick, R.S. Jacobs, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 3639 (1988); (j) M.R. Kernan, D.J. Faulkner, L. Parkanyi, J. Clardy, M.S. de Carvalho, R.S. Jacobs, *Experientia*, **45**, 388 (1989); (k) K.B. Glaser, M. S. de Carvalho, R.S. Jacobs, M.R. Kernan, D.J. Faulkner, *Mol. Pharmacol.*, **36**, 782 (1989); (l) M.S. de Carvalho, R.S. Jacobs, *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 1621 (1991); (m) B. C.M. Potts, R.J. Capon, D.J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **57**, 2965 (1992); (n) B.C.M. Potts, D.J. Faulkner, M.S. de Carvalho, R.S. Jacobs, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5093 (1992); (o) A.R. Ortiz, M.T. Pisabarro, F. Gago, *J. Med. Chem.*, **36**, 1866 (1993)
- 10) Inhibitory mechanism toward cobra venom PLA₂: (a) D. Lombardo, E.A. Dennis, *J. Biol. Chem.*, **260**, 7234 (1985); (b) R.A. Deems, D. Lombardo, B.P. Morgan, E.D. Mihelich, E. A. Dennis, *Biochim. Biophys. Acta*, **917**, 258 (1987); (c) L.J. Reynolds, B.P. Morgan, G.A. Hite, E.D. Mihelich, E.A. Dennis, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5172 (1988); (d) E.J. Reynolds, E.D. Mihelich, E.A. Dennis, *J. Biol. Chem.*, **266**, 16512 (1991); (e) L.J. Reynolds, E.D. Mihelich, E.A. Dennis, *ibid.*, **266**, 16512 (1992); (f) L.A. Plesniak, S.C. Boege-
man, B.W. Segelke, E.A. Dennis, *Biochemistry*, **32**, 5009 (1993); (g) E.A. Dennis, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13057 (1994); (h) I.D. Bianco, M. J. Kelley, R.M. Crowl, E.A. Dennis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1250**, 197 (1995)
- 11) (a) B.W. Dijkstra, J. Brenth, H.H. Kalk, *Nature*, **289**, 604 (1981); (b) B.W. Dijkstra, K. H. Kalk, W.G.J. Hol, J. Drenth, *J. Mol. Biol.*, **147**, 93 (1981)
- 12) (a) S. Katsumura, Q. Han, H. Kadono, S. Fujiwara, S. Isoe, S. Fujii, H. Nishimura, K. Ikeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 1263 (1992); (b) S. Katsumura, Q. Han, S. Fujiwara, S. Isoe, H. Nishimura, S. Inoue, K. Ikeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 1267 (1992); (c) S. Fujii, Y. Tahara, M. Toyomoto, S. Hada, H. Nishimura, S. Inoue, K. Ikeda, Y. Inagaki, S. Katsumura, Y. Samejima, T. Omori-Satoh, C. Takasaki, K. Hayashi, *Biochem. J.*, **308**, 297 (1995); (d) 勝村成雄, 科学と工業, **68**, 207 (1994)
- 13) (a) K. Tanaka, M. Kamatani, H. Mori, S. Fujii, K. Ikeda, M. Hisada, Y. Itagaki, S. Katsumura, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 1185 (1998); (b) *idem, Tetrahedron*, **55**, 1657 (1999)
- 14) J.P. Noel, C.A. Bingman, T. Deng, C.M. Dupureur, K.J. Hamilton, R.-T. Jiang, J.-G. Kwak, C. Sekharudun, M. Sundaralingam, M.-D. Tsai, *Biochemistry*, **30**, 11801 (1991)
- 15) E. Negishi, A.O. King, W.L. Klima, *J. Org. Chem.*, **45**, 2526 (1980)
- 16) F. Sato, H. Ishikawa, H. Watanabe, T. Miyake, M. Sato, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, 718
- 17) P.J. Kocienski, C.J. Love, R.J. Whitby, G. Costello, D.A. Roberts, *Tetrahedron*, **45**, 3839 (1989)
- 18) M. Ito, Y. Katsuta, Y. Yamano, K. Tsukida, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 987
- 19) (a) D. Goldsmith, D. Liotta, M. Saindane, L. Waykole, P. Bowen, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5835 (1983); (b) S.P. Tanis, D.B. Head, *ibid.*, **25**, 4451 (1984)
- 20) S. Katsumura, K. Hori, S. Fujiwara, S. Isoe, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4625 (1985)
- 21) 12 のメチルエステル化 (MeI, *i*-Pr₂NEt/DMSO; 88% yield), 続く脱スルホン化 (DBU, Pd(PPh₃)₄/DMSO; 94% yield) を 2 段階で行うと A と B が 2 : 5 の比率で得られた。
- 22) T. Hata, K. Tanaka, S. Katsumura, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 1731 (1999)
- 23) A. Torrado, B. Iglesias, S. Lopez, A.R. de Lera, *Tetrahedron*, **51**, 2435 (1995)

- 24) 疎水基の影響についてはモノアライドの場合とは異なり、Cのように、大きな疎水性部を持たない化合物においても著しいPLA₂不活性化がみられた。そこでさらにA, C, D, Eの疎水性部分が阻害活性に与える影響について調べた。図12の活性テストの条件より低濃度におけるA, C, D, Eについて、PLA₂不活性化能力を比較したところ、環構造を持つ化合物A, Eの方が鎖状化合物C, Dより強い不活性化を示すという、新たな知見が得られた。
- 25) 化合物A, C, D, Eと*n*-プロピルアミンとの反応によって得られる各1,2-ジヒドロピリジン誘導体は酸に非常に不安定であった。そこで、dioxane-*d*₈またはC₆D₆溶媒中、NMRによってこれらの反応を追跡した。
- 26) (a) A.R. de Lera, W. Reischl, W.H. Okamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4051 (1989); (b) D.F. Maynard, W.H. Okamura, *J. Org. Chem.*, **60**, 1763 (1995), and references cited therein.
- 27) R.X.-F. Ren, N. Sakai, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3619 (1997)

会員増強運動にご協力を!!

本協会では会員増強運動を展開しております。お知り合いの友人・学生に是非ご入会をお勧め下さいますようお願い申し上げます。本協会の財政基盤は会費に大きく依存しています。あなたの行動が明日の協会を支えます。

なお、入会申込書は、本年度協会誌の毎号に綴込みのものをご使用下さい。また、事務所に一報下されば直ちにお送りいたします。

事務局：社団法人 有機合成化学協会 会員係

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 1-5 化学会館（電話 03-3292-7621）