カバの赤い汗に関する化学

橋本貴美子*

犀川 陽子

中田 雅也

Chemical Studies on the Red Sweat of the Hippopotamus

Kimiko Hashimoto*, Yoko Saikawa, and Masaya Nakata

Hippopotamus produces colorless sweat over its entire body. The color of the sweat turns red within a few minutes and then becomes brown during a few hours by producing polymers. We isolated the unstable red and orange pigments, called hipposudoric acid and norhipposudoric acid, respectively, responsible to the red coloration of the sweat. Syntheses of these pigments were performed using the Pschorr reaction for the formation of the fluorenone core and the oxidation in the last step producing the unstable diquinone as the key steps. The tautomeric structures of the common chromophore of these pigments in a protic solvent and in an aprotic solvent were also discussed.

Key words: *Hippopotamus amphibius*, red sweat, pigment, hipposudoric acid, norhipposudoric acid, fluorenediquinone, short hydrogen bond, Pschorr reaction

はじめに

自分達の経験から何となく汗は無色でしょっぱくて、暑い時にかくものと思い込んでいる人が多いと思うが、動物の世界はちょっと違う。まず、汗をかく動物というのが小数派であり、ウマ、ヒツジ、ロバ、ウシなどの家畜に多い¹⁾。これは、汗をかくて体温調節をしながら長時間の運動ができるということを示している。汗をかく動物は、パンティング(ゾウが耳をパタパタさせるとか、イヌが口をあけてハアハアと息をするような行動)をして血管の一部を冷やし、冷えた血液を循環させて体を冷やすとか、唾液や泥を塗りたくって(カンガルーやブタ)、その水分が蒸発するときに気化熱を奪うために冷えるという方法で体温調節を行う。こういう手段をもたない動物(ウオンバット)は暑ければ涼しいところへ避難するしかない。汗にはこういう体温調節のためのものの他、ドキリとしたり焦ったりしたときにかく精神性の汗がある。精神性の汗は、“手に汗にぎる”とか“冷や汗”、“汗顔”などの言葉に表れるもので、多くは手のひら、足の裏、時に額や背中などから分泌される。ヒトが手足に多くかくのは、四つ足の動物だった頃に、緊張する時(獲物を狙っている時や喧嘩をしようと構えている時など)にすべらないようにと出ている汗の名残り

だそうである。

さて、表題のカバは²⁾、毛のほとんど生えていない体全体に汗をかき、(1)昼間は汗をかくが夜はかかない、(2)興奮するとかく、(3)水の中でもかいている、という観察があり、(1)は体温調節の汗、(2)はヒトに似た精神性の汗、(3)は目的不明の汗である。この汗は容量が1ミリリットルもある巨大な皮下腺から分泌され、正式には汗と言わないらしいが、見た目は汗そっくりである。しかもこの汗は、分泌された直後は無色であるが、1-2分で赤く色づくため(この後数時間して茶色の高分子化合物の混合物に変化してしまう)、非常に目立つ。これを見た旅人が“カバは血の汗を流す”と伝えたことから、この不思議な話は世界中に広まった。我々はこの色の変化に興味をもち、その原因を探ることにした。

1. 不安定な色素の採集、保存、単離

上野動物園の協力により、2頭のカバ(ジローとサツキ)の汗を採集していただき、これを分析した。滅菌ガーゼを使い、飼育係さんに拭き取ってもらった汗は、1時間半ほどの大学(この研究は慶應義塾大学理工学部で行ったもの)までの道中に茶色に変色してしまっていた。それでも、ガーゼから抽出したものには色素以外の有機化合物がいくつか含まれていたため、危うく分析しそうになったが、これは滅菌ガーゼに付着している抗生物質であることに気づいた。この後、有機溶媒と水で洗浄したガーゼをしばらく使ったが、市販のキムワイブで

* 京都薬科大学 ()

* Kyoto Pharmaceutical University ()

良いことがわかり、以後はこれを用いた。色素が不安定であるため、キムワイプで拭き取ったサンプルはドライアイスで凍らせて持ち運ぶことにし、大学に着くとすぐに水で抽出した。この変色反応は、ひょっとして微生物が行っているかも知れないと考え、熱湯からの抽出も行った。色素は熱湯には思いのほか安定であったが、これを行わずとも、水抽出以降の操作を手早く行えば良いことがわかってきた。通常の天然物の分離操作は、抽出液を濃縮したのちに行う。ところが、この赤い抽出液は濃い状態にまで水を除去すると不可逆的に茶色のポリマーに変化してしまった。これは液性がアルカリ性のためではないか(カバの汗は pH 8.5–10.5 程度のアルカリ性の粘液)と考え、塩酸で中和した。ところがこの操作によっても抽出液は茶色に変色してしまった。そこで、色素は有機化合物であろうから、溶媒で抽出しようとした。ところがこの操作も、抽出液を茶色に変色させるだけだった。せめて TLC だけでも観察できないかと、シリカゲルや ODS を試したが、これもスポットが茶色になるばかり。抽出液は室温に放置すると茶色に変色してくるので、凍結保存しようとしたが、やはり茶色になるのみであった。これらの現象から、この色素は分子どう

しが近づくとう重合するような性質をもつことがわかる。それでは、どの程度までなら濃縮しても大丈夫なのかを UV スペクトルを指標にして決めることを試した。しかし、赤色を示す吸収は、生成してくる茶色の色素の吸収と重なってしまい、断念した。得られる汗の色はその度ごとに異なっているのであるが、ここは実験者の勘に頼って濃縮を行うしかなかった。何度も失敗を繰り返すうちに、 10^{-5} M 程度までなら濃縮しても大丈夫であることがわかった。この濃度は、色素の構造決定後に算出した数値である(図 1)。

以上のように、注意深く濃縮した抽出液からの色素の単離について次に検討した。前述のように吸着力の強い分離剤を用いると茶色に変色してしまうため、ゲルろ過を行うことにした。Sephadex G-15 を用いて分離を行ったところ、茶色と赤色の混じった分画が先に溶出され、あとからオレンジ色の分画が得られた。濃度の薄いサンプルを使ったため、展開された色素のバンドはブロードであったが、色素を含む分画を 2 つに分けることができた。次に茶色と赤色の混じった分画を濃縮せずに、さらに Sephadex G-25 によって分離したところ、茶色分画、赤色分画の順に溶出されたことから、汗には

Fig. 1 Isolation scheme of red and orange pigments and preparations of their samples for measurements of analytical data.

茶色、赤色、オレンジ色と3種の色素が含まれており、この順に分子量が小さくなることがわかった。これら色素はゲルろ過には耐えることがわかったので、この段階でそれぞれの色素分画の保存について検討した。赤色分画には Sephadex G-25、オレンジ色分画には Sephadex G-15 のパウダーをそれぞれ加え、分子どうしが近づかないようにして凍結乾燥したところ、いずれの色素も数カ月間冷凍保存できることがわかった。不安定であり、なかなか量が得られない貴重なサンプルは、ここでやっと保存できるようになった。ゲルとともに凍結したサンプルは、緩衝液により溶出できたので、次にこれら分画のイオン交換による精製を試みた。通常はカラムを通して行いが、そうすると溶出にかかる時間が長く、その間に色素は分解していく。そこで、バッチ法を用いて精製を行った。まず、赤色色素の混合物を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.1) でゲルから溶出させ、陰イオン交換樹脂 (QAE Sephadex A-25) に吸着させ、非吸着成分を除いた後、1.7 M NaCl / 緩衝液により溶出した。以上の操作を重水から調製したバッファーを用いて行い、溶出液を濃縮をせずに直接 ^1H NMR を測定したところ、赤色色素の純品が溶液として得られたことがわかった。しかし、酸化段階の高い色素はプロトン数が少ないため、骨格に関する情報は得られなかった。また、 ^{13}C NMR スペクトルは濃いサンプルが調製できないこと、測定に時間がかかること、低温にはできないことから測定できなかった。この時点で得られた情報は ^1H NMR と UV スペクトルのみであった。オレンジ色色素についても、多少条件は異なるが赤色色素と同様の処理を行い、対応する分析データを得た。どちらの色素も不安定であり、これ以上の分析データは得られなかったため、より安定な化合物へ化学的変換を行い、さらなる構造解析を行うことにした。

ここまでの分離操作の過程で不思議に思ったことは、色素の分子量が 300 程度と小さい分子でありながら、Sephadex G-25 (分子量 1000–5000 対応)、G-15 (分子量 1500 対応) といった大きい分子量用のゲルで分離ができたということである。後からわかったことであるが、純粋になった色素をもう一度ゲルに添加し、ゲルから溶出させようとしてもうまくいかない。また、純粋になった色素は、ゲルろ過後の色素に比べて格段に不安定である。これらのことから、最初のゲルろ過の段階では、色素は粘性物質に包み込まれており、みせかけの分子量が大きくなっていたために、高分子用のゲルで分離ができたのではないかと考えている。また、この粘液にくるまれているおかげで、不安定さが緩和されていたものと推測できる。

2. 不安定な色素の安定誘導体への変換および構造決定

色素は漠然とキノン系化合物であろうと予想していた。それは、人のメラニン生成や、きのこの変色には、チロシンからドーパ、さらにドーパキノンやドーパクロムになり重合していくという過程が知られており、その変色過程は無色から赤、さらに茶色と、カバの汗と同様の変色過程をたどるからである。そこで赤色色素の水溶液にヒドロサルファイトナトリウムを加えて、還元反応を行ったところ溶液は無色になり、反応溶液を酸性にすると色素由来の化合物を有機溶媒で抽出できることがわかった。しかし、この抽出物も不安定であり、濃縮しているうちに着色してきた。キノンが還元されて無色のヒドロキノンになったのであれば、この化合物はフェノール性水酸基があるはずなので、これを保護すれば安定化するであろうと考えジアゾメタンを加えた。反応は進行したが、まだ酸化されやすい性質が残っており濃縮の際に着色してきた。そこで、ジアゾメタン処理した化合物をさらに TBSCl と反応させたところ、得られた化合物は幸運なことに結晶化した(本物の“汗の結晶”!)。X 線構造解析により、化合物 1 のような構造であることがわかった(図 2)。なお、C9 位の立体配置はラセミであった。ここまで来れば、あとは分子量がわかれば構造もわかる。天然物を還元したわけであるから、何段階酸化すれば元に戻るのかがわかる。この X 線構造解析で判明した構造からは、1 段階(2 電子)酸化すればモノキノン(2 通りの可能性がある)、2 段階(4 電子)でジキノンという 3 通りの可能性が考えられる。この色素は水に溶けているので、MS スペクトルを測定するには、水と混ざるグリセロールなどをマトリックスとして使う FABMS などが適しているが、この色素溶液はイオン交換樹脂から溶出させるために、濃い塩を含むバッファーを用いている。この塩が MS 測定の邪魔になる。通常は ODS を詰めたチップを通すなどの方法で脱塩をするが、この色素は ODS に触れると重合してしまうため使用できない。そこで透析膜(分画分子量 10,000)を使って、氷水に対して 1 時間程の透析を行った。分子量 60 程度の塩と分子量 300 程度の色素との差であるが、MS スペクトルを測定できるくらいまでには脱塩することができた。しかし、化合物由来のピークのどれが分子イオンピークなのかわからない。サンプルに水が含まれていると、EI や FAB のような強いイオン化法ではイオン化室の中でキノン類は還元を受けるからである(ヒドロキノンは酸化されることもある)³⁾。MS のデータはサンプル量が少なくても良いし、薄いサンプルでも測定できるのでデータが得られるのが当然と考えていた。しかも、すでに合成も始めており、中間体の性質から天然物の構造

Fig. 2 The red and orange pigments (2 and 3, respectively) responsible for the coloration of the hippopotamus' sweat and a derivative 1 of 2 for X-ray analysis.

は推定できていたにもかかわらず、納得してもらえないような MS データが得られなかった。最終的には不活性ガス雰囲気下で LC-ESI-MS を使ってデータを得ることができた。といっても、これもすんなり成功したわけではない。陰イオン交換で用いたリン酸緩衝液は ESI-MS には適していないため(イオン化を阻害したり、スプレー部にリン酸塩が析出するため)、その溶液のまま測定してもデータは得られなかった。結局、赤色色素はギ酸-トリエチルアミン緩衝液に溶けた状態で測定を行い、オレンジ色色素はゲルろ過後の水溶液をそのまま測定することによって MS データを得ることができた(図 1)。MS の結果から、これら色素は 2 段階酸化されたジキノン型であることがわかり、ここで赤色色素にはヒポスドル酸(hipposudoric acid, 2)、オレンジ色色素にはノルヒポスドル酸(norhipposudoric acid, 3)と名前をつけた。Hippo はカバから(ラテン語の hippo は本来は馬の意味)、sudor はラテン語の発汗、汗という意味である。ちなみに nor は炭素が 1 つ足りないという接頭語である⁴⁾。

3. 色素の互変異性体および溶液中での構造

これで構造が決ったかに思えるが、この化合物にはいくつもの互変異性体が存在する。このうちのどの構造が主に存在しているのかを決定しなければならなかった。考え得る 5 つの構造のうち、C の構造は排除できることがわかった(図 3)。これは、オレンジ色色素の重水中の ¹H NMR スペクトルにおいて、9 位のプロトンシグナルの積分値が減少することがなかったことからわかった。もし、この構造が互変異性体の平衡に関わっているならば、積分値は減少するはずである。残りの 4 つを比べると、A, B は分子内水素結合を有するが、D, E にはそれがないため、A, B の方がより安定なのではないかと考えた。そこで、そのことを確かめるために、クロモフォア部分のみのモデル化合物 4 を合成した(図 4)。モデル化合物 4 はカルボン酸を持たないためか、有機溶媒にも溶けた。対応するジヒドロキノンを重クロロホルム中 DDQ で酸化し、生じた沈殿物をろ別し、そのまま ¹H NMR スペクトルを測定した。すると、16.05 ppm という低磁場にシグナルが観測され、このプロトンは非常に

強い水素結合をしているということがわかった⁵⁾。他のプロトンシグナルは 9 位プロトンを除き、対称に現れていることから、この化合物は室温では非常に速い平衡状態(4a ⇌ 4b)にある、あるいは電子が非局在化したジケトネートにプロトンが付加した構造 4c をとっていることが考えられる⁶⁾。この解離するプロトンが 2 つの酸素原子の真ん中にあるのか？それともどちらかの酸素原子に近い位置にあるのか？という問題は、論文を書く時に、“tautomerism”なのか“resonance”なのかと問題になったが、化学的にも興味ある問題である⁷⁾。詳細は未だわからないが、同様な互変異性を含む化合物 F-K と比較してみると、浅いダブルミニマムのエネルギー間を行き来している状態のようである(図 5)⁸⁻¹⁴⁾。N や O の 2 つのヘテロ原子にはさまれたプロトンは基本的にはどちらかの原子に近い位置でポテンシャルエネルギーが最小となる。ヘテロ原子間の距離が離れていればこの 2 つの最小ポテンシャルの間にあるエネルギー障壁は高くなる。この微妙な距離は周囲の構造によって変化するため、類似の構造をもっていても置換基が異なっている場合は、問題となるプロトンの位置は同じとは限らない。計算によれば(H₂O.....H.....OH₂)⁺の最安定構造における原子間距離(O.....O)は 2.4 Å となるので^{14, 15)}、かなり近い構造のものもある(図 5)。また、水素結合の望ましい角度が 180 度であることから、この X.....H.....X を含む環の大きさが大きい方が、この配置をとりやすいため、容易にプロトン移動が起こる(エネルギー障壁が低い)と予想される。また、2 つのポテンシャルが最小となる位置が近くなるほどトンネル効果で移動するプロトンも増えるようになり、最後にはどちらの経路で移動したのか区別がつかなくなる。プロトン移動において互変異性を含むような系で¹⁵⁾、2 つのエネルギー最小の位置が一致して 1 つになり、2 つの原子のまん中にあるものはまだ見つかっていないようである。一方で、プロトン移動において互変異性を含まない系では L, M のようなジカルボン酸のモノアニオンにおいて、水素原子は 2 つの酸素原子のまん中にあるという例が知られている¹⁴⁾。興味ある問題であるが、色素 2 や 3 についてこのような性質を明らかにするにはさらに実験が必要である。

詳細な構造はわからないが、互変異性体の構造につい

Fig. 3 Possible tautomers of the pigments.

Fig. 4 Structural candidates of model compound 4 in CDCl_3 at rt.

Fig. 5 Some examples of compounds with very short hydrogen bond.

ては我々の推定は当たっており、主な互変異性体は A と B であることがわかった。ところが、この溶液の色はカバの汗の色とはまるで異なり、赤紫色をしていた。当然 UV-VIS スペクトルも天然物とは異なった吸収スペクトルを示していた。ここで、エノールをアニオンにすれば UV スペクトルは変わるのではないかと考え、その溶液にトリエチルアミンを加えてみたところ、溶液はカバの汗の色に変わり、UV-VIS スペクトルも天然物のスペクトルと類似してきた。この重クロロホルム溶液を 50% 水-メタノール溶液に変えると、この溶液もカバの汗の色に変わる。この程度の塩基を加える、あるいはプロトン性溶媒を加えるとスペクトルが大きく変化すると

いうことは、酸性度の高いプロトンが存在するためと考えられるので、モデル化合物 4 の $\text{p}K_a$ を測定してみることにした。モデル化合物 4 は水のみには溶けずらいので、50% 水-メタノール溶液中で $\text{p}K_a$ を測定した。比較のために、 $\text{p}K_a$ が既知のものや類似の構造をもつものを同条件下で測定した結果を既知データ¹⁶⁾とともに表 1 に示す。この結果から、モデル化合物 4 は水中であれば $\text{p}K_a$ が 2 程度と推定され、非常に強い酸であることがわかった。色素の構造がわかった時に不思議に思ったことは、単にキノン、フェノールのような構造をもつだけなのに有機溶媒に全く抽出されないという点であったが、この $\text{p}K_a$ 値から判断すると、2 および 3 はプロトンが解

Table 1 pK_a values of the red and orange pigments related compounds.

	50% H ₂ O - CH ₃ OH	H ₂ O ¹⁶⁾
4	2.7 - 3.3	----
11.8	10
10.6	----
----	9.0
5.6	4.5±0.5
CH ₃ CO ₂ H	5.6	4.5±0.5 (4.76)

in an aprotic solvent

in a protic solvent

Fig. 6 Structures of the pigments in solutions (R = H or CO₂H, R' = CH₂CO₂H).

離し、負電荷が非局在化することで分極した結合に水和水が起こり、アニオンが安定化され水溶性となり、有機溶媒で抽出されなかったと考えられる。これもすぐに結論がでたわけではない。極性が高いものほど極性の溶媒に溶けるのではなかったか？そうすると、プロトン解離し

て生じた電荷は酸素原子に局在化している方が、分子としての極性は高いのではないかと？電子が非局在化してしまつたら逆に極性が小さくはしないか？と悩んだ。“溶ける”という現象は簡単ではない¹⁷⁾。結局、色素のクロモフォアは非プロトン性溶媒の中では短い水素結合をした互変異性体(あるいはジケトネートにプロトン化された構造)⁶⁾の平衡として存在し、プロトン性溶媒中ではほとんど解離したアニオンとして存在することになる(図6)。カバの汗は強アルカリ性であるので、色素は完全に解離した形で溶けていることになる。

このようにして赤色色素の構造がわかると、オレンジ色色素の構造も種々のデータを赤色のものと比較することによって決定することができた。ただし、還元によってヒドロキノンにする際には、ハイドロサルファイトナトリウムではうまくいかず接触水素添加反応を用いる、MS測定の際にも条件が異なるなど、化合物の性質が多少異なるため、条件の微調整が必要であった(図1)。

4. 色素の汗中での役割

このようにして、カバの汗に含まれる赤色とオレンジ色の色素の構造がわかったが、この色素がカバにとって何かメリットがあるのかどうかを調べてみることにした。カバの汗の役割については、汗がUVカットの役割を果たしているのではないかと考えられてきた。これはアルビノ(先天的色素欠乏症で、通常は弱く成体になるまでに死んでしまう)の成体が観察されるとか、けんか早いめいつつも傷が絶えないのに、その傷が泥の中でも治りが早いという観察に基づいていた。そこで、まず両色素のUVスペクトルを調べた。地上に降り注ぐ有害な紫外線は290 nm(280 nmとすることもある)–400 nmのものを指し、便宜上290–320 nmの光をUV B、320 nm–400 nmの光をUV Aと呼んでいる。この範囲の光を吸収すれば、サンスクリーンとしての最低限の条件は満たしていることになる。赤色色素もオレンジ色色素もこの領域の光を吸収することがわかり、とりあえずはUVカットとして役立つであろう。“とりあえず”と書いたのは、我々が使うサンスクリーンは他にも条件を備えていなければならないため、カバの場合も同様に考えれば、という意味である。我々の使用しているUVカット剤は光を反射するものと吸収するものを混合してある。反射剤としては金属酸化物が使われ、吸収剤として有機化合物が使われる。この吸収剤の方は、光を吸収し、そのエネルギーを熱または光として放出し、元の状態に戻ることが必須で、途中で別の化合物へと不可逆的に変化してしまつてはいけない。また、エネルギーを酸素に渡し、有害活性酸素を作る働きが大きいのもまずい(ただ

し、この現象は皮膚上の菌類を殺すことにつながるかもしれない)。これらの性質についてはまだ調べていない。ちなみに、我々の体にも UV に対抗する機能が備わっている。ヒスチジン由来のウロカニン酸が主に UV B を吸収して (UV A も多少吸収する)、可逆的に *cis-trans* 異性化をすることで光のエネルギーを消費する¹⁸⁾。長波長側の UV A に対してはメラニン、FAD、NAD、リボフラビン等が対応する。ウロカニン酸を含めこれらの化合物はどれも活性酸素を作るため、長所と短所ともに持ち合わせていることになるが、長所が勝っているのだそうである¹⁹⁾。

次に傷が治りやすいという性質について調べることにした。これは、組織を再生するような活性があるか、あるいは傷が膿んだりせずに治るのかであろう。我々は常在菌に対する抗菌活性があるかどうかを調べた。色素はいずれも不安定であるため、活性試験は分解との競争ではあるが、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) と肺炎を起こす可能性のある菌 (*Klebsiella pneumoniae*) に対して活性が見られた。いずれもグラム陰性菌に属する菌であるところが特徴的である。両色素の活性を比べると若干赤色素の方が強かった。

これらの結果から、言い伝えのように、両色素はカバの生活に多少は役にたっているであろうことが推定できた。

5. 色素の合成²⁰⁾

次にこれら色素の合成について述べる。天然物は採集時期が限られ (ゴールデンウィーク明けから 10 月頃までの間、週 1 度程度でかつ晴れた日のみ)、微量しか得られない上に不安定であるため、これらの性質を調べるには合成によって供給するしかない。

赤色素 2 の構造をよく見ると、この化合物はホモゲンチジン酸 5 が酸化的に二量化したものであることがわかる (スキーム 1, ルート a)。フェノールは塩基性条件下で空気酸化されやすいため、ひょっとしてホモゲンチジン酸をアルカリ雰囲気ですれば合成できるのではと考え実験したが、単に茶色のポリマーが生成するのみであった。そこで、別の経路 (ルート b) を考えた。フルオレン骨格をどう合成するか、赤色素とオレンジ色素の違いは 9 位のカルボン酸の有無のみであるので、共通中間体から両方ができるように、というのが逆合成のポイントである。目的化合物 2 および 3 は対応するヒドロキノン 6 または 7 を酸化すれば得られる。6, 7 は共通の中間体 8 から適宜炭素鎖を延長すれば良い。フルオレン 8 はアニリン誘導体 9 からジアゾニウム化を経て Pschorr 反応を行い閉環すれば合成できる。さらに 9 はヒドロキノンジメチルエーテル誘導体 10 と 11 のカップ

Scheme 1 Retrosynthetic scheme of hipposudoric acid 2 and norhipposudoric acid 3.

リングにより合成できると考えた。

出発物質として 2,5-ジメトキシトルエン 10 を用い、これをプロモ化して 12 とした (スキーム 2)。もう一方の出発物質である 2,5-ジメトキシベンズアルデヒド 11 をニトロ化すると 2 つの位置異性体 13, 14 が 3:1 で得られた。12 をハロゲン-リチウム交換によりリチオ化し、これと 13 をカップリングさせた後、PCC 酸化によりケトンへと酸化し 15 を得た。15 のニトロ基を鉄で還元してアミン 9 としたのちに、亜硝酸イソアミルで酸化してジアゾニウム塩とした。これをワンポットでヒドロキノンによって分解してラジカルを発生させ、温和な条件下で Pschorr 反応を行い²¹⁾、目的のフルオレン 8 を 79% の収率で得た。側鎖のメチル基を NBS でプロモ化して 16 とし、これを 2 と 3 の合成における共通中間体とした。まずヒポスドール酸 2 を合成するために TMSCN を TBAF 存在下作用させて、置換反応とシアニヒドリンの合成を同時に行い 17 とした。シアニヒドリンを BF₃·Et₂O 存在下に Et₃SiH で還元して 18 とし、この化合物の脱メチル化とニトリルの加水分解を HBr/AcOH で同時に行い、不安定なヒドロキノン 6 を得た。一方で、オレンジ色素の前駆体となるヒドロキノン 7 は、16 を Et₃SiH で還元しフルオレン 19 としてからプロモ基を置換してニトリル 20 を得て、ニトリルとメチルエーテルを同時に加水分解することによって得ることができた。

あとはこれらヒドロキノン類を酸化するだけであるが、生成物が不安定な化合物であるため、生成が確認で

きても単離が難しいのではないかと予想された。さらに、2段階酸化をするとなると、強い酸化剤でなければ反応しないのではないかという不安があった。また、水系で反応を行わなければ生成物がすぐに重合するであろうと思われたので、水に溶ける酸化剤として塩化鉄(III)を使用した。色素前駆体を含水グリセロール(グリセロール:水=10:1)に溶かし、そこへ塩化鉄を粉のまま加え、素早くかき混ぜる。この時には、粘性が高いためマグネチックスターラーではなく薬さじを使う。混ぜると瞬時に着色するので、これをすぐに水で薄めて陽イオン交換樹脂を通して鉄イオンを除く。これを次にさらに陽イオン交換樹脂を通して精製し、溶出液のUV-VISおよび ^1H NMR スペクトルを測定して収率を出す。試薬を混ぜてからスペクトル測定までの間、およそ5分程度であろうか、すべてを準備してかからないと、収率よく生成物を得ることはできない。このように、収率を再現性よく評価できるようにしてから、酸化の条件検討を行った。グリセロールを溶媒として用いたのは、粘性が高いため分子の拡散が遅く、ポリマー化が抑えられるのではないかと考えたからである。また、カバの汗も粘液であり、これが色素の安定化に効果があるのではないかと

と考えたからである。この条件下での収率は10%程度(2段階)であったが、グリセロールを加えずに水のみを溶媒として用いた場合には、溶液は赤からすぐに茶色に変色してしまうため、グリセロール添加は効果的であることがわかった。より温和な条件を検討したところ、銅触媒存在下での空気酸化が良好な結果を与えた。0.5 M 炭酸水素ナトリウム水溶液(pH 8.3)中でこの酸化を行うと35%の収率で目的の2が得られた。この時に少量の3が副成する。この反応をもう少し酸性の条件下(0.2 M リン酸緩衝液(pH 6.1))で行うと、目的の2が8.4%、3が6.8%得られた。赤色色素2を上記酸化条件に付してもオレンジ色色素3は生成しないし、原料のヒドロキノン6をアルカリや酸にさらしても脱炭酸は起こらない。このことから、脱炭酸が起こるタイミングは、この酸化過程で生じる中間体からであるということがわかった。一方で、7のノルヒポスドール酸3への酸化は、上記酸性条件下に行うと36%の収率で目的物を与えた。このようにして不安定な赤色色素もオレンジ色色素も合成することができた。

Scheme 2 Syntheses of hipposudoric acid 2 and norhipposudoric acid 3.

a) $\text{Br}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (75 %); b) conc $\text{HNO}_3/0^\circ\text{C}$ (57 %); c) $t\text{-BuLi}/\text{THF}$, -78°C then $13/-78^\circ\text{C}$ to rt; d) PCC, $\text{NaOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (96%, 2 steps); e) $\text{Fe}/\text{AcOH}-\text{H}_2\text{O}$, 80°C (86 %); f) isoamyl nitrite, AcOH , then hydroquinone / acetone (79 %); g) NBS, BPO/benzene, reflux (92%); h) TMSCN , TBAF/THF (69%); i) Et_3SiH , $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 0°C (99 %); j) 48% aq $\text{HBr}-\text{AcOH}/\text{reflux}$; k) CuSO_4 , air, 0.5 M aq NaHCO_3 (35%, 2 steps); l) Et_3SiH , TFA/ 0°C (79%); m) NaCN/DMF , 50°C (80%); n) 48% aq $\text{HBr}-\text{AcOH}/\text{reflux}$; o) CuSO_4 , air, 0.2 M phosphate buffer (pH 6.1) (36%, 2 steps).

おわりに

なぜカバの汗は赤くなるのかという疑問から研究が始まったわけだが、原因色素の構造が決まり、合成もできて一区切りである。現在はこれらの色素前駆体の構造や、前駆体が色素へ変換されるメカニズム等の研究を行っている。それにしても、課題はまだ山積みである。なぜこれら色素は濃縮によって重合するのか？重合はどの位置から始まるのか？汗の中では色素は比較的安定そうに見えるがなぜか？他の動物の色のついた汗の色素の構造は？等々。

自然が与えてくれる研究テーマは実にバラエティーに富んでいる。研究は我々が意図する方向に進むわけではなく、常になぜ？と考えさせられる。わかっていたようで、わかっていない事実にも気づかされる。このあたりがさらなる研究の原動力なのではないだろうか。そうだとすれば、研究は非常に個人的な事柄であるが、願わくば研究成果がどこかで役に立ってほしいものである。ただし、この「役に立つ」は、誰かが論文を読んで、「ああそうか」と納得することである。

謝 辞 長年にわたり汗の採集のお世話になった上野動物園の方々、吉原正人氏、永井清氏、井田素靖氏、小宮輝之氏、松崎勝氏、栗田武治氏、猪俣康真氏、大塚和夫氏、野口利夫氏、田口眞隆氏、高木明氏、藤本卓也氏、斉藤譲一氏、山口歩氏、坂本和弘氏、原田美乃里氏、後藤悟紀氏また京都市動物園の方々、高橋鉄雄氏、渡邊英博氏、秋久成人氏、平田洋義氏に感謝いたします。また機器分析の測定やご助言をいただいた奥野智旦教授、数馬恒平博士、真壁みどり氏(以上弘前大学)、上田実教授(元慶應義塾大学)、X線の測定でお世話になった植本昌信博士(元慶應義塾大学)、抗菌活性試験について実験およびご指導下さいました西村吉雄博士、五十嵐雅之博士(財団法人、微生物化学研究会)、汗に関するご助言をいただきました小川徳雄博士(東海医療技術専門学校)に感謝いたします。また、投稿論文(Nature)の査読をしていただきました Wolfgang Steglich 博士(ミュンヘン大学)に感謝いたします。

(2006年6月30日受理)

文 献

- 1) 汗の常識・非常識, 小川徳雄, 講談社ブルーバックス, 1998
- 2) S. K. Eltringham, *The Hippos*, Poyser Natural History Series, London (1999)
- 3) R. W. A. Oliver, R. M. Rashman, *J. Chem. Soc. (B)*, 1971, 341
- 4) (a) Y. Saikawa, K. Hashimoto, M. Nakata, M. Yoshihara, K. Nagai, M. Ida, T. Komiya, *Nature*, 429, 363 (2004); (b) 橋本貴美子, 犀川陽子, 中田雅也, 化学, 60, 24 (2005)
- 5) (a) J. Emsley, *Chem. Soc. Rev.*, 9, 91 (1980); (b) F. Hibbert, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 22, 113 (1986); (c) F. Hibbert, J. Emsley, *ibid.*, 26, 255 (1990); (d) C. L. Perrin, *Science*, 266, 1665 (1994)
- 6) 有機化学のためのスペクトル解析法, M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, 化学同人, 2000, p 90
- 7) (a) F. Hibbert, J. Emsley, *Adv. Phys. Org. Chem.*, 26, 255 (1990); (b) F. Hibbert, *ibid.*, 22, 113 (1986); (c) C. L. Perrin, *Science*, 266, 1665 (1994)
- 8) S. L. Baughcum, R. W. Duerst, W. F. Rowe, Z. Smith, E. B. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6296 (1981)
- 9) H. Fuess, H. J. Lindner, *Chem. Ber.*, 108, 3096 (1975)
- 10) Y.-B. Dong, X. Zhao, G.-X. Jin, R.-Q. Huang, M. D. Smith, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003, 4017
- 11) S. Bratan-Mayer, F. Strohmusch, W. Haensel, *Z. Naturforsch. (B)*, 31, 1106 (1976)
- 12) H. L. Ammon, U. Mueller-Westerhoff, *Tetrahedron*, 30, 1437 (1974)
- 13) P. Goldstein, K. N. Trueblood, *Acta Cryst.*, 23, 148 (1967)
- 14) C. L. Perrin, J. B. Nielson, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 12734 (1997) and references therein
- 15) (a) P. Gilli, V. Bertolasi, V. Ferretti, G. Gilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 909 (1994); (b) V. Bertolasi, P. Gilli, V. Ferretti, G. Gilli, *ibid.*, 113, 4917 (1991)
- 16) Organic Chemistry, J. B. Hendrickson, D. J. Cram, G. S. Hammond, 3rd Ed., McGraw-Hill Kogakusha, 1970
- 17) (a) 有機化学反応と溶媒, 奥山格, 丸善, 1998; (b) 高木定夫, 化学, 24, 986 (1969)
- 18) (a) T. Mohammad, *Tetrahedron Lett.*, 43, 8897 (2002); (b) J. D. Simon, *Acc. Chem. Res.*, 33, 307 (2000)
- 19) 太陽紫外線と健康, 菅原努, 野津敬一, 裳華房ポピュラーサイエンスシリーズ, 1999
- 20) Y. Saikawa, K. Moriya, K. Hashimoto, M. Nakata, *Tetrahedron Lett.*, 47, 2535 (2006)
- 21) (a) R. Pschorr, *Chem. Ber.*, 29, 496 (1896); (b) F. W. Wassmundt, W. F. Kiesman, *J. Org. Chem.*, 60, 196 (1995); (c) R. I. Duclos, Jr., J. S. Tung, H. Rapoport, *ibid.*, 49, 5243 (1984)

PROFILE

橋本貴美子 京都薬科大学・助教授 博士
(理学)

〔経歴〕1984年北海道大学理学部化学科卒業、1986年同修士課程修了後、アップジョンファーマシューティカルズ、日本ケミファを経て北海道大学大学院博士課程へ戻る、1992年日本学術振興会特別研究員、1994年関西学院大学理学部化学科実験実習指導補佐、1996年慶應義塾大学理工学部応用化学科助手、1999年名古屋大学大学院生命農学研究科リサーチアソシエート、2001年理化学研究所植物科学研究センターテクニカルスタッフ、2003年慶應義塾大学理工学部准訪問研究員、2004年より現職。〔専門〕天然物化学、有機合成化学。〔連絡先〕e-mail: [redacted]

中田雅也 慶應義塾大学理工学部応用化学科・教授 工学博士

〔経歴〕1975年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業、1978年同工学部助手、1980年同大学院工学研究科博士課程退学、1986年同理工学部専任講師、1986-87年米国ハーバード大学博士研究員、1992年同理工学部助教授、2000年より現職。〔専門〕天然物化学、有機合成化学。〔連絡先〕[redacted]

[redacted], e-mail: [redacted]

犀川陽子 慶應義塾大学理工学部応用化学科・助手 博士(理学)

〔経歴〕1998年慶應義塾大学理工学部応用化学科卒業、2002年同理工学部助手(有期)、2003年同大学大学院理工学研究科博士課程退学、2004年より現職。〔専門〕天然物化学。〔連絡先〕[redacted]

[redacted], e-mail: [redacted]

次号予定

巻頭言

チョットゼイタクなハナシ：目先生のこと、ストーク先生のこと鈴木 啓介
総説および総合論文

シトクロム P-450 酵素を範とするルテニウム触媒を用いる酸化触媒反応の開拓村橋 俊一
反応性中間体化学の新展開：一重項ビラジカルの場合安倍 学
 π 電子系カチオン種の高度安定化法の開拓と電子構造解明への応用西長 亨
生物科学研究におけるスクアリン酸の活用とその進歩品田 哲郎ら
官能基化フラレーンの合成と構造中村 栄一ら
 γ - γ -ジアルコキシアリルジルコニウム種を用いた炭素-炭素結合形成反応の開発田口 武夫ら

Review de Debut

触媒的不斉多成分連結型反応難波 康祐

十字路

NICS西長 亨
Bioisostere品田 哲郎
Bioconjugate molecule品田 哲郎
光誘起電荷分離松尾 豊

新しい合成ほか