



生物活性解明と新機能物質創成を指向した
天然有機化合物の合成化学的研究

17580092

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 清田 洋正
東北大学 大学院農学研究科 助教授

<はしがき>

この報告書は、平成17～18年度の日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(C)「生物活性解明と新機能物質創成を指向した天然有機化合物の合成化学的研究」(研究課題番号17580092)の研究成果をまとめたものである。

多くの生命現象には、低分子有機化合物が信号伝達物質として重要な働きを担っている。これらの現象を解明し、人類のために応用するには、鍵物質に関する有機化学的研究が必須である。本研究では、抗生物質類、植物毒素類、植物ホルモン類、海産天然物質等について、構造の解明や光学活性体の全合成・部分合成を達成し、生物学的な知見を得ることができた。これらの成果が、新規な農薬・医薬リード化合物の開発に役立つことを願っている。

本研究に関わった東北大学大学院農学研究科生物有機化学分野の皆様と学内外共同研究者に深く感謝する。

研究組織

研究代表者： 清田 洋正 (東北大学大学院農学研究科助教授)
(研究協力者： 桑原 重文 (東北大学大学院農学研究科教授))
(研究協力者： 山田てい子 (東北大学大学院農学研究科技術専門職員))
(研究協力者： 貫名 学 (山形大学農学部教授))
(研究協力者： 佐藤 實 (東北大学大学院農学研究科教授))
(研究協力者： 渡邊 敏彦 (東北工業大学非常勤研究員))
(研究協力者： 本間 良夫 (島根大学医学部教授))
(研究協力者： 上田 実 (東北大学大学院理学研究科教授)
(研究協力者： Bill J. Baker (米・南フロリダ大学化学科教授))
(研究生・学生： 操 海群、中村葉子、榎場努、五十嵐正拓、
島崎泰治、三浦絢子、朝光優子、横尾雄友、
阪内啓之、高井健太郎、古川博之、浅尾洋樹、
佐藤宏樹、高田朋子、松崎晶子、田中功二)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	3,000,000	0	3,000,000
平成18年度	700,000	0	700,000
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

原著論文 (*印: 責任著者)

- 1* H. Furukawa, H. Kiyota, T. Yamada, M. Yaosaka, R. Takeuchi, T. Watanabe, S. Kuwahara, Stereochemistry of Enacyloxins 4. Completion of Structure Assignment with (13'R, 14'R, 15'S)-Configuration of Enacyloxins, a Series of Antibiotics from *Frateuria* sp. W-315, *Chem. Biodivers.*, **4**, in press (2007).
- 2* M. Shimasaki, H. Kiyota, M. Sato, S. Kuwahara, Synthesis of (S)-Gizzerosine, a Potent Inducer of Gizzard Erosion in Chicks, *Tetrahedron*, **62**, 9628-9634 (2006).
- 3 Y. Nakamura, R. Miyatake, A. Matsubara, H. Kiyota, M. Ueda, Enantio-differential Approach to Identify the Target Cell for Glucosyl Jasmonate-type Leaf-closing Factor, by Using Fluorescence-labeled Probe Compounds, *Tetrahedron*, **62**, 8805-8813 (2006).
- 4* Y. Asamitsu, Y. Nakamura, M. Ueda, S. Kuwahara, H. Kiyota, Synthesis and Odor Descriptions of Both Enantiomers of Methyl 4,5-Didehydrojasmonate, a Component of Jasmin Absolute, *Chem. Biodivers.*, **3**, 654-659 (2006).
- 5 Y. Nakamura, H. Kiyota, T. Kumagai, M. Ueda, Direct Observation of the Target Cell for Jasmonate-type Leaf-closing Factor: Genus-specific Binding of Leaf-movement Factors to the Plant Motor Cell, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 2893-2897 (2006).
- 6 L. G. de Oliveira, L. C. Dias, H. Sakauchi, H. Kiyota, Spirofungins A and B: A Reassignment of Kiyota's Spiroketals, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 2413-2418 (2006).
- 7* M. Shimasaki, H. Kiyota, M. Sato, S. Kuwahara, Facile Synthesis of (S)-Gizzerosine, a Potent Inducer of Gizzard Erosion in Chicks, Using Successive Zinc-mediated and Palladium-catalyzed Coupling Reactions, *Synthesis*, 3191-3192 (2005).
- 8* Y. Nakamura, H. Kiyota, R. Ueda, S. Kuwahara, Synthesis to Determine the Absolute Configuration of (-)-Pyricuol, a Phytotoxin Isolated from Rice Blast Disease Fungus, *Magnaporthe grisea*, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 7107-7109 (2005).
- 9* T. Sugiyama, H. Kiyota, T. Watanabe, T. Oritani, Intramolecular Migration of Long Chain Acyl Group of Enacyloxin IIa Methyl Ester, *Nat. Prod. Res.*, **19**, 581-584 (2005).
- 10* Y. Nakamura, H. Kiyota, S. Kuwahara, First Synthesis of (+)-Pteroenone, a Marine Antifeedant Isolated from Pteropod, *Clione antarctica*, *Synlett*, 635-636 (2005).
- 11* A. Miura, H. Kiyota, S. Kuwahara, Synthesis of Southern (C1'-C11') Fragment of Pamamycin-635A, *Tetrahedron*, **61**, 1061-1067 (2005).

総説

- 1* H. Kiyota, Synthesis of Naturally Derived Bioactive Compounds of Agricultural Interest, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 317-324 (2006).

著書

- 1* H. Kiyota, Synthetic Studies of Heterocyclic Antibiotics Containing Nitrogen Atoms, in "Top. Heterocycl. Chem.", vol. 6, Bioactive Heterocycles I, Springer, pp. 181-214 (2006).
- 2* H. Kiyota, T. Oritani, S. Kuwahara, Synthesis and Biological Evaluation of Abscisic Acid, Jasmonic Acid and their Analogs, "New Discoveries in Agrochemiscals", ACS, pp. 246-254 (2005).

(2) 口頭発表

招待講演

- 1 清田洋正*、マクロリド抗生物質ポリナクチン類の合成研究、第7回日本農芸化学会北海道・東北支部若手シンポジウム、2006.11.12

国際学会

- 1 Hiroyuki Sakauchi*, Yuko Shimizu, Emi Higashi, Mikiko Kojima, Yuko Asamitsu, Luiz C. Dias, Shigefumi Kuwahara, Hiromasa Kiyota, Synthetic Studies of Spirofungins A and B, 11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, 2006.8.6-11
- 2 Hiromasa Kiyota*, Hiroki Asao, Yasuharu Shimasaki, Yoko Nakamura, Takafumi Takai, Shigefumi Kuwahara, Synthetic Studies of Biologically Active Natural Products of Agricultural Interest, 11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, 2006.8.6-11
- 3 Yoko Nakamura*, Ryoji Miyatake, Hiromasa Kiyota, Minoru Ueda, Fluorescence Studies on the Nyctinasty of *Albizzia* Plants, an Enantio-differential Approach Using Enantio-pair of Fluorescence-labeled Leaf Closing Factors, ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, 2006.7.23-28
- 4 H. Tsumura*, H. Kiyota, S. Mishima, M. Inoue, H. Ishikura, Y. Homma, Differentiation of Human Acute Myeloid Leukemia Cells in Primary Culture in Responce to Derivatives of Methyl Jasmonate, Plant Stress Hormone, 11th Congress of the European Haematology Association, 2006.6.16
- 5 Akira Morita*, Hiromasa Kiyota, Shigefumi Kuwahara, Enantioselective total synthesis of litseaverticillols A and B, 7th Tetrahedron Symposium, 2006.5.26
- 6 Takashi Nakahata, Akira Morita, Yoko Nakamura, Hiromasa Kiyota, Shigefumi Kuwahara*, Synthesis of Some Semiochemicals Produced by Insects and Microorgacnisms, The 3rd Asia-Pacific Conference of Chemical Ecology & 5th Asia-Pacific Congress of Entomology (APCE), Jesu Island, South Korea, 2005.10.19

国内学会

- 1 猪俣翔*、中村葉子、宮武良至、清田洋正、岡田正弘、上田実、ネムノキの就眠運動をコントロールする生理活性物質とその生物有機化学的研究、日本化学会第87回春季年会、2007.3.25
- 2 中村葉子*、松原輝、宮武良至、清田洋正、上田実、二重蛍光染色法による *Albizzia* 属植物就眠・覚醒物質の部位特異的結合、日本農芸化学会2007年度大会（東京）、2007.3.26

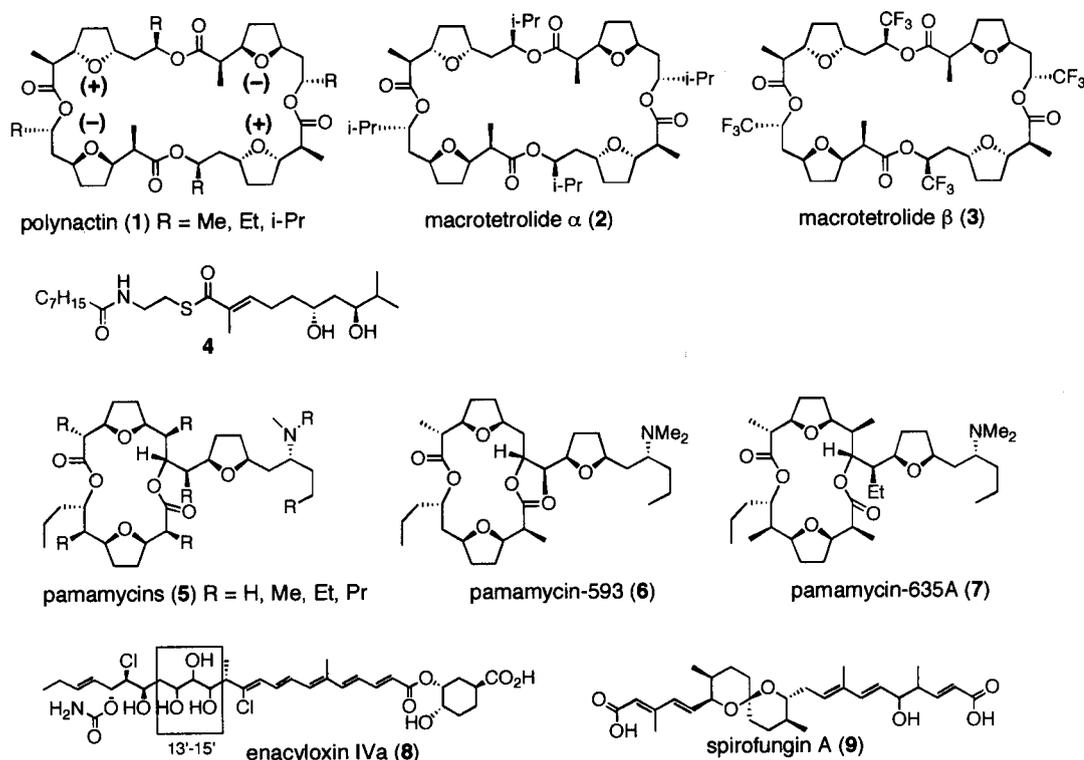
- 3 高井健太郎*、花館忠篤、大井秀一、桑原重文、清田洋正、抗生物質ポリナクチン類フッ素化アナログの化学合成研究、日本農芸化学会2007年度大会（東京）、2007.3.26
- 4 ネムノキの就眠運動をコントロールする生理活性物質とその生物有機化学的研究、中村葉子*、宮武良至、松原輝、清田洋正、上田実 日本農芸化学会北海道・東北支部合同支部会（札幌）、2006.11.11
- 5 高井健太郎*、花館忠篤、大井秀一、桑原重文、清田洋正、マクロテトラオリド抗生物質polynactin類アナログの創製研究、有機合成シンポジウム、2006.10.11
- 6 抗生物質ポリナクチン類フッ素化アナログの化学合成研究、高井健太郎*、花館忠篤、桑原重文、清田洋正、有機合成シンポジウム、2006.6.13
- 7 中村葉子*、清田洋正、上田実ジャスモン酸配糖型蛍光プローブ化合物を用いた *Albizzia* 属植物就眠運動の生物有機化学、日本農芸化学会2006年度大会（京都）、2006.3.26
- 8 浅尾洋樹*、阪内啓之、桑原重文、清田洋正、鎖状アルコール類のシクロプロパン化アナログの合成と香気活性、日本農芸化学会2006年度大会（京都）、2006.3.26
- 9 三浦絢子*、滝川真弥、桑原重文、清田洋正、パママイシン-635Aの南半球部の合成、日本農芸化学会2006年度大会（京都）、2006.3.26
- 10 抗生物質ポリナクチン類フッ素化アナログの化学合成研究 高井健太郎*、花館忠篤、桑原重文、清田洋正、日本農芸化学会2006年度大会（京都）、2006.3.26
- 11 生理活性を有する光学活性天然有機化合物の合成研究、清田洋正*、中村葉子、島崎泰治、高井隆文、桑原重文、第21回 農薬デザイン研究会（東京）、2005.11.9
- 12 高井健太郎*、清田洋正、桑原重文、抗生物質ポリナクチン類フッ素化アナログの化学合成研究、日本農芸化学会東北支部大会（第140回・山形）、2005.10.22
- 13 中村葉子*、清田洋正、上田留美、桑原重文、イネいもち病菌毒素pyricuolの合成と絶対立体配置決定、日本農芸化学会東北支部大会（第140回・山形）、2005.10.22
- 14 古川博之*、清田洋正、渡邊敏彦、桑原重文、ポリエーテル系抗生物質enacyloxin類の絶対立体配置の決定、日本農芸化学会東北支部大会（第140回・山形）、2005.10.22
- 15 阪内啓之*、清田洋正、桑原重文、鎖状アルコール類のシクロプロパン化アナログの合成と香気活性、日本農芸化学会東北支部大会（第140回・山形）、2005.10.22
- 16 朝光優子*、清田洋正、桑原重文、光学活性なmethyl 4,5-didehydrojasmonateの合成と香気活性、日本農芸化学会東北支部大会（第140回・山形）、2005.10.22
- 17 中村葉子*、永野秀治、清田洋正、上田実、ジャスモン酸配糖体型就眠物質を基盤とした機能性分子プローブの開発、化学系学協会東北大会（仙台）、2005.9.23
- 18 中村葉子*、永野秀治、清田洋正、上田実、ネムノキの就眠運動解明を目指した蛍光プローブ分子の創製と生物有機化学、第40回 天然物談話会（熱川）、2005.7.14

研究成果の概要

「生物活性」は生体高分子が織りなす作用であるが、そこには引き金となる鍵低分子有機化合物が介在する。生物活性を信号である低分子化合物から解明する手段として、これらの生物有機化学的研究（単離・構造決定・合成・全合成・構造活性相関）を行った。

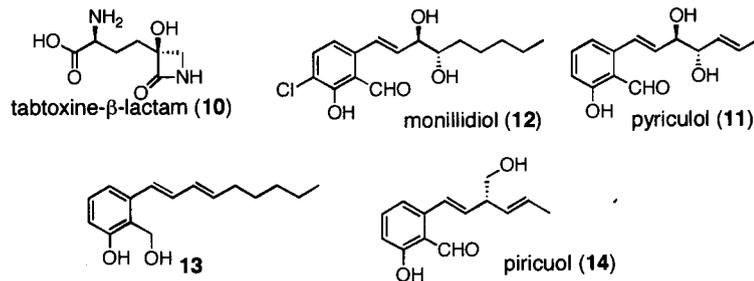
1. 抗生物質類

- 1-1. **ポリナクチン類(1)**は殺ダニ活性の他免疫抑制、抗多剤耐性を示すテトラマクロリドであり、単量体の両鏡像体が交互にエステル結合する特異な構造を有している。本研究では、より高活性なアナログ・テトライソプロピル体**2**及びテトラトリフルオロメチル体**3**を設計、全合成を行った。**2**は天然型**1**の有する免疫抑制活性・細胞毒性を示さなかった。また生合成アナログ基質**4**は生産菌*Streptomyces griseus*によって四量体に変換された。設計した四量体の発酵生産への道を開く結果である。
- 1-2. 気菌糸誘導物質**パママイシン類(5)**は、側鎖にアミノ基を有する極めて珍しい抗生物質である。本研究では全合成研究を行い、最も活性の強い**593(6)**の北半球部及び南半球部、**パママイシン635A(7)**の南半球部の合成を達成した。
- 1-3. **エナシロキシシン (ENX) 類(8)**は*Frateriia* sp. W-315 株により生産される、他に例のないポリエン鎖状抗生物質である。単離から20年以上経ても不明であった13',14'15'-位の絶対立体配置をJ-resolved HMBCやROESY等2D NMRを駆使して決定した。また全合成研究もを行い、側鎖ポリオール部の一部及びシクロヘキサン環部分を合成した。
- 1-4. 混合物として微量単離された抗菌物質**スピロファンジン類(9)**は細胞周期阻害物質レベロマイシンの同族体である。スピロアセタール部分の新規合成により以前提唱した構造を訂正し、形式合成を達成した。



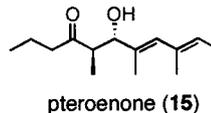
2. 植物毒素類

- 2-1. タバコ野火病の原因毒素**タブトキシニン-β-ラクタム(10)**は、植物を非選択的に枯死に至らしめるため、抵抗性育種開発による選択的農業としての応用が期待されている。効率的全合成経路の開発を行った。
- 2-2. 深刻な病害である黄桃灰星病やイネいもち病菌毒素としてサリチルアルデヒド型化合物**(11,12)**が単離されているが、生合成経路は未確定である。推定生合成中間体**13**の合成を達成した。新規骨格を有するイネいもち病菌毒素**ピリクオール(14)**の光学活性体合成を行い、絶対立体配置を決定した。



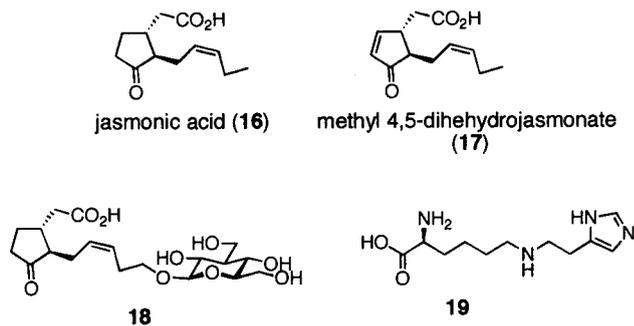
3. 海産忌避物質

- 3-1. 「流水の天使」として知られるクリオネは忌避物質**プテロエノン(15)**を生産することで補食魚類から身を守るが、端脚類の一種はクリオネを背面に捕らえることで同じ補食魚類から逃れるという偏利共生関係が知られている。この興味深い共生関係と忌避の一般性、構造活性相関を調べるため、**15**の全4立体異性体の合成を行った。



4. その他

- 4-1. 植物ホルモン**ジャスモン酸(16)**に関連して次の研究成果を得た。ジャスモン油香気成分**4,5-ジデヒドロジャスモン酸メチル(17)**の酵素触媒を用いた両鏡像体合成を行い、絶対立体配置を決定した。天然型の香気は非天然型より優れていた。**17**は高い白血病細胞分化誘導活性を示した。ネムノキ就眠誘導物質**18**のアグリコン部両鏡像体のプローブを合成、蛍光実験により天然型プローブの有効性が示された。
- 4-2. 鶏や養殖魚等に使用される飼料魚粉中に生成する胃潰瘍誘発物質**ジゼロシン(19)**の効率的合成を行い、魚粉の品質評価法開発のために供給した。



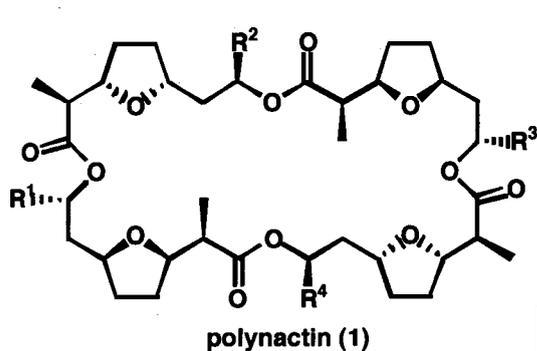
以上のように、この2年間に様々な生理活性物質に関する合成化学的研究を展開した。今後更に生物学者と共同して、生命現象の鍵を明らかにしてゆきたい。

抗生物質 polynactin 類アナログの化学合成研究

(東北大院農) ○高井健太郎、花館忠篤、桑原重文、清田洋正

Polynactin は *Streptomyces* 属放線菌の培養液から単離された macrotetraolide 抗生物質の総称である。数種類のグラム陽性菌に対し抗菌活性を示し、側鎖 R の嵩高さが増すに従いこの活性は増加する¹⁾。また近年 P170 糖タンパク質を介在した多剤耐性細胞に対する阻害活性²⁾、免疫抑制活性³⁾が報告された。作用機構等は明らかとなっていないが、抗菌活性と同様の構造活性相関があるのか、興味深いところである。

我々は以上の観点から、天然型モノマー由来としては最も嵩高い *i*-Pr 基側鎖を有する macrotetrolide α (**1j**)及び CF₃ 基を側鎖に導入した CF₃ analog (**1k**)を設計し、その合成に着手した。因に Priestley らは計算化学の手法により、**1j** が他の天然型 polynactin よりも強い K⁺

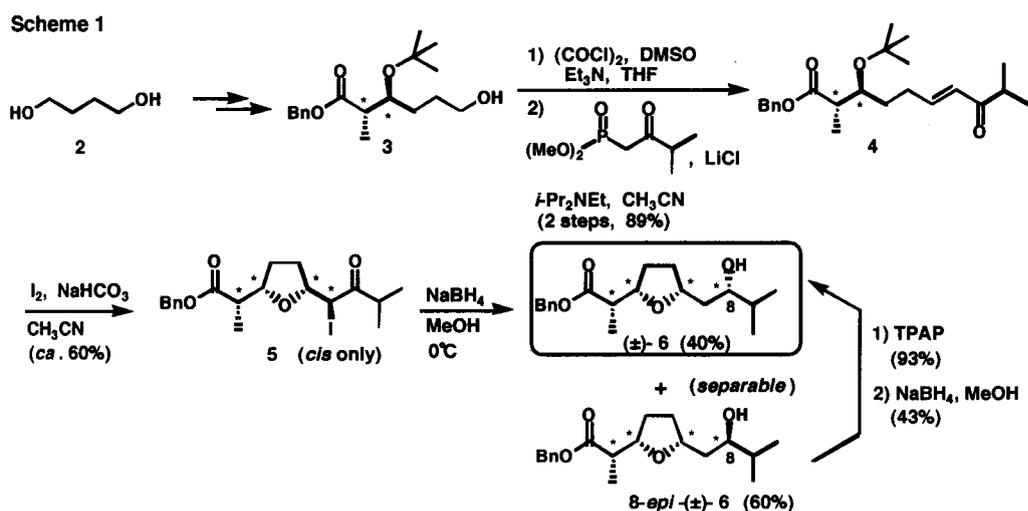


	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
nonactin (1a)	Me	Me	Me	Me
monactin (1b)	Me	Me	Me	Et
dinactin (1c)	Me	Et	Me	Et
trinactin (1d)	Me	Et	Et	Et
tetanactin (1e)	Et	Et	Et	Et
macrotetrolide B (1f)	Et	<i>i</i> -Pr	Et	<i>i</i> -Pr
C (1g)	Et	Me	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr
D (1h)	Et	Me	Et	<i>i</i> -Pr
G (1i)	Et	Me	<i>i</i> -Pr	Me
macrotetrolide α (1j)	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr
CF ₃ analog (1k)	CF ₃	CF ₃	CF ₃	CF ₃

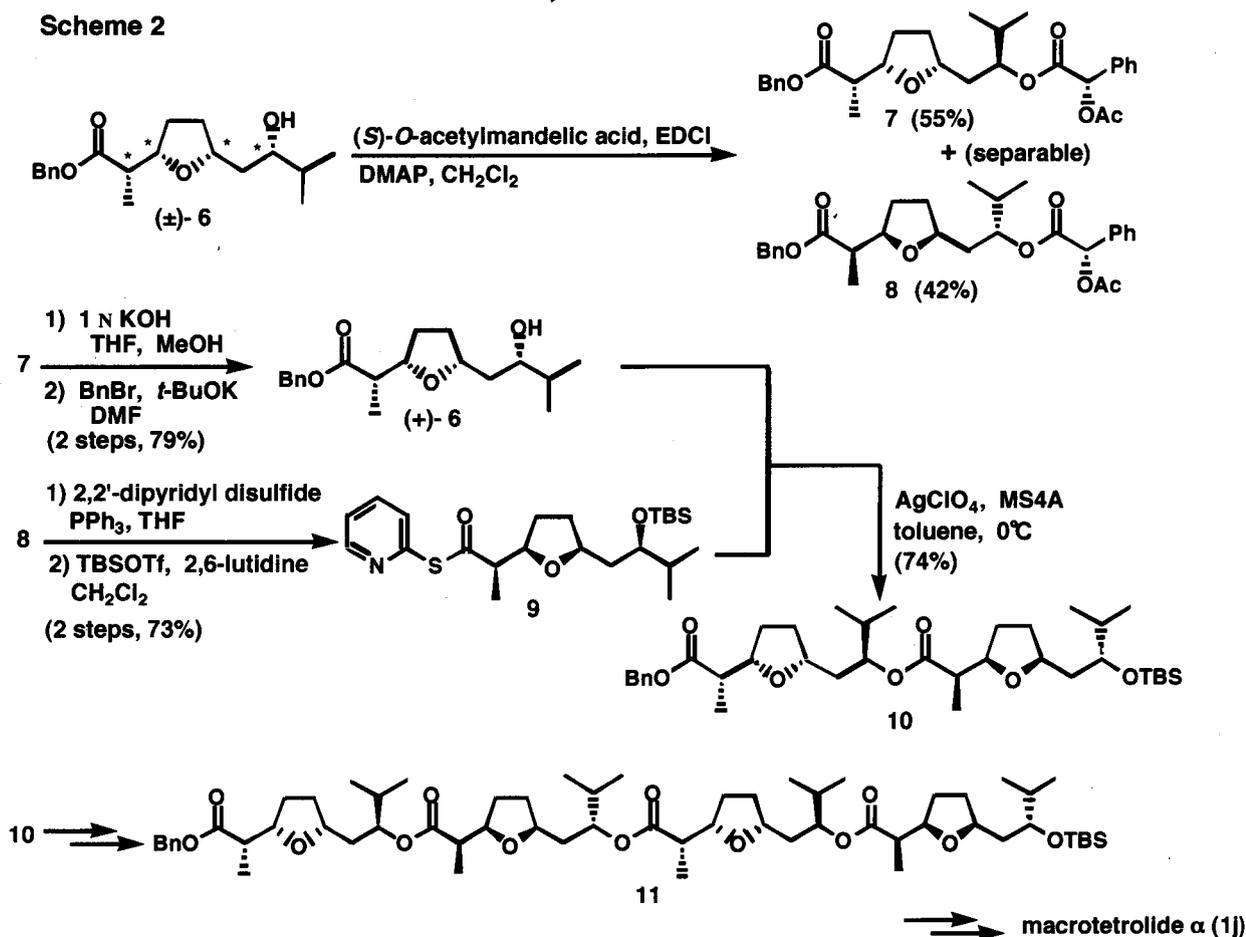
イオン捕捉能を有することを予想している⁴⁾。

1. Macrotetrolide α (**1j**)の合成研究及び生理活性試験

1,4-Butanediol (**2**)を出発原料とし、数工程を経てベンジルエステル**3**へと導いた。その後 Horner 反応により増炭、シス選択的なヨードエーテル化反応によりシス配置のフラン環化合物**5**を構築した。続いて NaBH₄により脱ヨウ素化とカルボニル基の還元を同時に行い、望む立体化学を有する(\pm)-**6**と、水酸基のエピマー**8-epi-(\pm)-6**を得た。エピマーの水酸基は反転が困難であったので、酸化、還元を繰り返すことで(\pm)-**6**へと導いた(Scheme 1)。



続いて(±)-6に(S)-O-acetylmandelic acidを縮合させ、光学活性なモノマーに分割した。ダイマーへの縮合に向け、両鏡像体をそれぞれ縮合基質へと変換し、DCC、EDCIを用いる方法、山口法等を試みたが、いずれも無反応もしくは低収率であった。そこでAgClO₄を用いた向山-Corey法の変法⁵⁾を試みたところ、反応はよく進行し、高収率でダイマー10を得ることに成功した。同様の方法でテトラマー11への縮合、最終的にマクロラクトン化を行い、目的物であるmacrotetrolide α (1j)の合成を達成した⁶⁾ (Scheme 2)。



合成した macrotetrolide α (1j)の、免疫抑制活性及び抗癌活性測定の結果を以下に示す。対照サンプルとして、天然型 polynactin 類、FK506 及び cyclosporin A を用いた。予想に反して、今回合成した 1j は他の天然型 polynactin 類よりも各種活性が低く、これらの活性では、「側鎖 R が嵩高い程高活性である」という相関が適応されない可能性が示唆された。

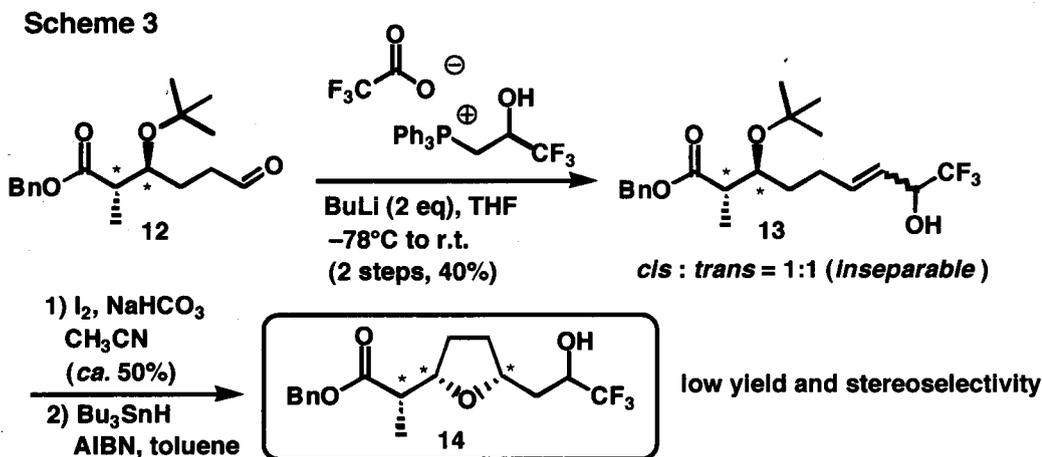
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ (ng/ml)	
					MLR	EL4
macrotetrolide α (1j)	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	63	250
dinactin (1c)	Me	Et	Me	Et	3.9	7.8
trinactin (1d)	Me	Et	Et	Et	3.9	7.8
tetanactin (1e)	Et	Et	Et	Et	3.9	7.8
FK506					0.2	5<
cyclosporin A					13	50<

(MLR : 免疫抑制活性の指標)
(EL4 : 抗癌活性の指標)

2. CF₃ analog (1k)の合成研究

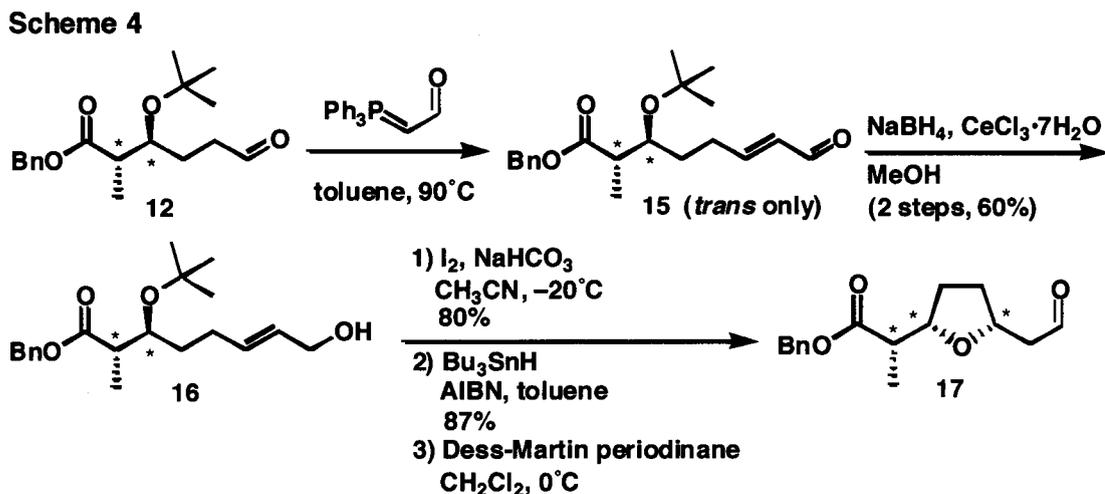
CF₃基は大きな電子吸引効果及び高高さをもつため、化合物の性質に大きな変化をもたらすと考え、合成に着手した。

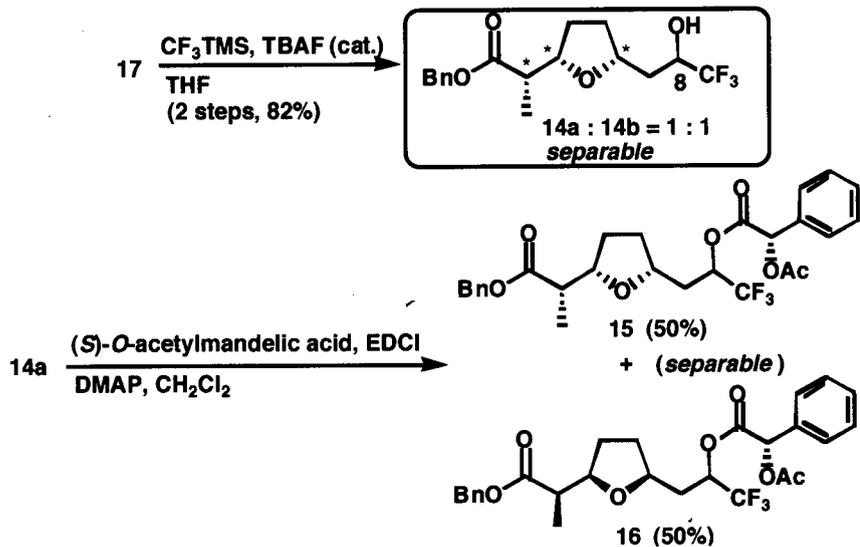
1jの合成中間体であるアルデヒド12に対するCF₃基の導入に向け、Knoevenagel反応、Horner反応等を試みたが、いずれも結果は芳しくなく、唯一1,1,1-trifluoropropene oxideから導いたWittig試薬⁷⁾を用いた場合でのみ、CF₃基の導入、モノマーへの変換が可能であった(Scheme 3)。しかしながらこれらは低収率、低立体選択性であり、Wittig反応での塩基、添加物、温度等各種条件検討を行うも、結果の改善に至らなかった。そこで初めにシス配置のフラン環を構築し、その後にCF₃基を導入することを試みた。



アルデヒド12から数工程で望むシス配置のフラン環を有する17へと導き、CF₃TMS、触媒量のTBAFで処理することでCF₃基を導入した⁸⁾。Scheme 3に比べ工程数はかかるものの、立体選択性、収率は改善された。

ここではモノマー14の8位水酸基の相対立体配置を決定することが困難であったため、一方のジアステレオマーを(*S*)-*O*-acetylmandelic acidを用いて光学分割したところ、その一方の異性体が結晶化した。現在X線結晶構造解析を試みている(Scheme 4)。





今後は 8 位水酸基の立体化学を決定後、CF₃ analog (**1k**)を合成し、生理活性試験を行う予定である。Macrotetrolide α (**1j**)の生理活性試験の結果から、免疫抑制活性、抗癌活性は側鎖の嵩高さのみでは高活性が期待できないと思われるが、CF₃基の導入は、polynactin に嵩高さ、さらに疎水性の向上をもたらすことができ、生理活性において新たな知見を得ることが可能であると考ええる。

参考文献

- 1) E. Meyers, F. E. Pansy, D. Perlmann, D. A. Smith, F. L. Weisenborn, *J. Antibiot.*, **18**, 128 (1965).
- 2) N. B. Marie, P. Elene, F. Marina, G. S. Aelette, *Eur. J. Biochem.*, **223**, 125 (1994).
- 3) Y. Tanouchi and H. Shichi, *Immunology*, **63**, 471 (1998).
- 4) J. W. Lee and N. D. Priestley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 1725 (1998).
- 5) H. Gerlach and A. Thalmann, *Helv. Chim. Acta*, **57**, 2661 (1974).
- 6) T. Hanadate, H. Kiyota, T. Oritani, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2118 (2001).
- 7) T. Kubota, M. Yamamoto, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 2603 (1992).
- 8) G. K. S. Prakash, R. Krishnamurti, G. A. Olah, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 393 (1989).