

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16551

研究課題名(和文) 付着阻害活性天然物のメカニズム解明を目指した蛍光プローブの合成研究

研究課題名(英文) Synthetic study on fluorescent probe of antifouling natural products toward elucidation of molecular mechanism

研究代表者

梅澤 大樹 (Umezawa, Taiki)

北海道大学・地球環境科学研究所・准教授

研究者番号：20503618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、付着生物に対する付着阻害活性天然有機化合物をリードとし、蛍光プローブ合成を目的とする。阻害剤のリード化合物として、強い付着阻害活性と低毒性を併せ持つ Omaezallene (含臭素化合物) と Dolastatin 16 (環状ペプチド) に着目した。これらの付着阻害メカニズムを解明することで、理想的な化合物開発の糸口となる。

Omaezalleneでは、合成経路を応用することで、種々の誘導体を合成し、構造活性相関研究を進め蛍光標識体を合成できた。Dolastatin 16では、合成経路を確立するとともに、強力な付着阻害活性を持つことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study aims syntheses of fluorescent probe of antifouling natural products. As lead compounds for antifouling materials, omaezallene (brominated compound) and dolastatin 16 (cyclic peptide) are selected because these exhibit strong antifouling activity along with very low toxicity toward cypris larvae of Amphibalanus amphitrite. Elucidation of molecular mechanism of antifouling activity expects the development of ideal antifouling material. Syntheses of omaezallene derivatives was achieved, which includes fluorescent derivative. A new synthetic pathway to dolastatin 16 and the antifouling activity of synthetic sample were revealed. Functionalization method toward fluorescent compound was also developed.

研究分野：有機合成化学

キーワード：天然有機化合物 付着阻害 全合成

1. 研究開始当初の背景

海洋汚染の原因化合物のひとつとして、船底防汚剤塗料に用いられていたトリブチルスズ(TBT)を始めとした有機スズ化合物が指摘されている。TBTは、フジツボなどの海洋付着生物に対して、船舶外板への付着を防止する自己研磨型(塗料が徐々に溶け出す)防汚剤として開発された。これらの生物が船底に付着すると、船舶の推進性能に悪影響を与える。そのため、TBTは優れた防汚剤として30年以上も世界中で広く使用され続けた。しかし、その使用量の増加に伴い、溶け出したTBT濃度の高い海域では貝類の成長阻害や生殖器異常(メスの巻貝のオス化)などの現象が発見され、環境ホルモンとしてその使用を規制することが求められていた。国際海事機関(IMO)において、2008年に全ての船底から有機スズ塗料を排除することが決議された。現在、有機スズ化合物の代替品として銅や亜鉛を用いた防汚剤が使われているが、それらは重金属ゆえ未確認の副作用や毒性が懸念される。実際、国によってはその使用を禁止しているところもあり、さらなる代替品の開発が望まれている。

現在取り組まれている国内外の付着阻害に関する研究例として、生物が付かないように船底の形状を変えたり、特殊な加工を施した船底を用いる物理的方法や、化学的手段として、付着しにくいポリマー開発など、多方面から進められている。しかし、航行効率が悪くなるなど、いずれも重金属化合物より優れた方法の開発には至っていない。

2. 研究の目的

前述とは異なるアプローチとして、海洋生物(ウミウシ、紅藻、アメフラシなど)から、強い付着阻害活性を有する天然有機化合物が単離され、新奇防汚剤のリード化合物として注目を集めている。付着生物のキプリス幼生は、付着できる場所を探索後付着するが、海洋生物も付着の対象としており、海洋生物はこれら天然有機化合物を防御物質として用いていると考えられている。これら化合物の特徴として、強い付着阻害活性を持つ一方で、各種生物に対して毒性が弱いことが挙げられる。しかしながら、生体からは少量しか得られないため、各種研究(構造-活性相関研究、作用機序解明)に供するには限りがある。また、天然から得られる化合物からの誘導化は困難な場合が多い。これらの問題を解決する方法として、人工合成することが有効な手段となる。合成経路を応用することで得られる、類似化合物を用いる構造-活性相関研究や、分子レベルでの作用機序解明に有用なプローブ合成も推し進めることができる。結果として、強力かつ低毒性な化合物の分子設計が可能となり、船底防汚剤に関する環境問題が期待できる。

付着阻害天然有機化合物として、当研究室では、紅藻から得られた **Omaezallene** と、ア

メフラシから得られた **Dolastatin 16** に着目した。本研究では、これらの全合成経路の確立とメカニズム解明に有用な知見を与える蛍光プローブを合成することを目的とした。

3. 研究の方法

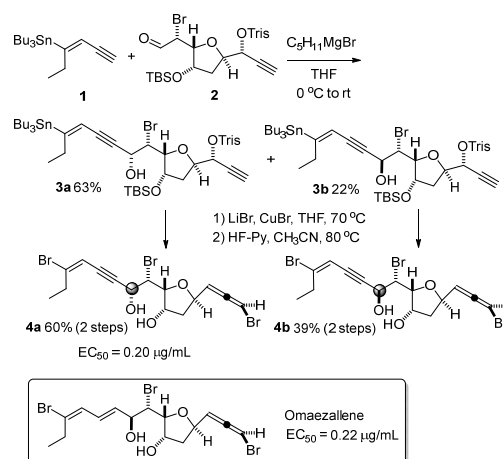
Omaezallene はすでに合成経路を確立していたので、蛍光プローブ合成に向けて、合成経路と短縮と蛍光官能基の導入を両立しうる、アルキン誘導体を合成、付着阻害活性を検討することとした。

Dolastatin 16 では、まず合成経路を確立することとした。その後は、蛍光官能基を導入するために、**Dolastatin 16** 中の、異常アミノ酸を官能基化することとした。

4. 研究成果

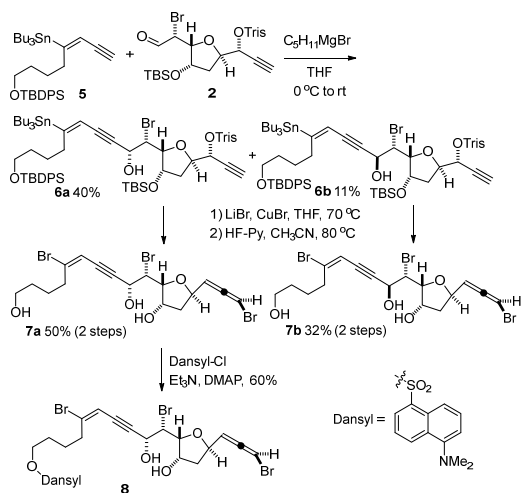
Omaezallene

これまでの知見から、①**Omaezallene** の両方の不飽和結合を有する側鎖、②分子中心付近の2つの水酸基、が強い付着阻害活性に重要な役割を果たしていることを明らかにしていた。また、効率的にプローブ分子を供給するためには、左側鎖導入の短工程化が必要であった。これらを解決する方法として、アルキン誘導体 **4** に着目した。その合成を下図に示す。**Omaezallene** 全合成の際の中間体であるアルデヒド **2** に対して、別途合成したエンイン **1** から発生させたアセチリドを付加させると、プロパルギルアルコール **3** のジアステレオマー混合物を与えた。これらは容易に分離可能であり、それぞれを目的化合物へと導いた。非天然型のジアステレオマーの付着阻害活性は、**Omaezallene** とほぼ同等であった。このことは、**Omaezallene** のジアステレオマーの活性が弱くなることとは対照的であった。天然型のジアステレオマー **4b** の付着阻害活性は、現在検討中である。



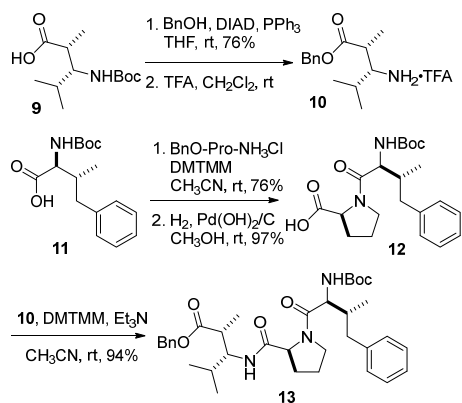
アルキン誘導体が強い付着阻害活性を有することを確認したので、エンイン **1** の官能基化を経て、蛍光官能基を導入することを計画した。シリルエーテルを有するエンイン **5** を同様に合成し、同様の方法で付加させた。

生成したプロパルギルアルコール **6** もそれぞれ分離することができた。主生成物である **6a** シリル基を脱保護した後に、1 級水酸基に選択的にダンシル基を導入し、蛍光プローブを合成できた。現在、**8** の付着阻害活性を検討している。

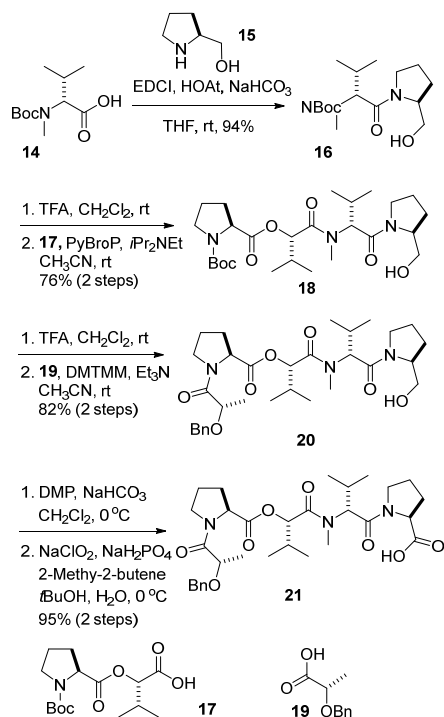


Dolastatin 16

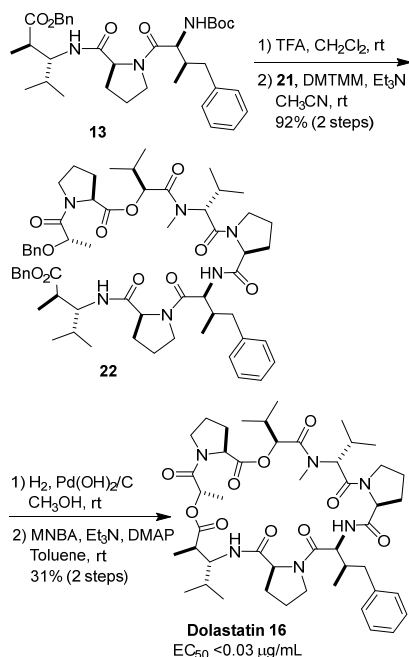
Dolastatin 16 は上側フラグメント **21** と下側フラグメント **13** をカップリングした後に、マクロラクトン化反応によって合成することとした。初めに、下側フラグメントの合成を下図に示す。すでに合成を報告している異常アミノ酸 **11** とプロリンベンジルエステルを縮合、さらに異常アミノ酸 **10** とペプチド化して目的化合物 **13** を得た。



上側フラグメント **21** の合成を次に示す。各種検討の結果、プロリンではなくプロリノールを用いると、上側フラグメントの合成に対して、良い結果が得られることを見出した。プロリノール **15** と Boc-N-メチルバリン **14** の縮合反応は、EDCI と HOAt を用いると高収率で目的化合物 **16** を与えた。別途合成したエステル **17** とのカップリング反応は、詳細な条件検討の末、PyBrop を用いた際に、良好な収率で進行することを見出した。その後、2 工程で乳酸ユニット **19** を導入し、プロリノール部の 1 級水酸基をカルボン酸へと酸化することで、上側フラグメント **21** の合成を完了した。

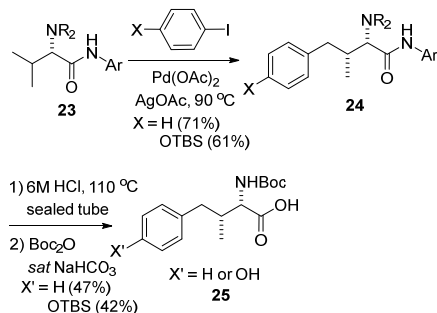


上側フラグメントと下側フラグメントのカップリング反応と、続くマクロラクトン化による Dolastatin 16 の全合成を下図に示す。下側フラグメントの Boc 基を脱保護した後に、DMTMM を用いて収率よくカップリング生成物 **22** を得た。2つのベンジル基を除去、最後にマクロラクトン化により、全合成を達成した。合成物をタテジマフジツボのキブリス幼生に対する付着阻害活性を評価したところ、天然物同様に、非常に強い活性を持つことを確認した。



Dolastatin 16 への蛍光官能基導入に向けて、異常アミノ酸 **11** の官能基化を試みた。種々検討した結果、C-H 活性化反応をバリン誘導体

23 に適用することで、目的化合物が得られることを見出した。市販品から短工程で合成できる 23 に、パラジウム触媒の存在下でヨウ化アリールを作用させて 24 を合成した。その後の 2 工程で、水酸基を導入した異常アミノ酸 25 へと導いた。現在、蛍光官能基導入に向けて、本化合物を利用して Dolastatin 16 誘導体への変換を検討している。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①L. O. Casalme, A. Yamauchi, A. Sato, J. G. Petitbois, Y. Nogata, E. Yoshimura, T. Okino, T. Umezawa, F. Matsuda, Total Synthesis and Biological Activity of Dolastatin 16、査読有、*Org. Biomol. Chem.*, 2017,15, 1140-1150.
doi10.1039/c6ob02657e

[学会発表] (計 9 件)

①L. O. Casalme、佐藤彰則、飴田康人、梅澤大樹、松田冬彦、*Synthetic Study on Dolastatin 16*、日本化学会北海道支部 2015 年夏季研究発表会、2015 年 7 月 18 日、北海道教育大学函館校 (函館市)

②L. O. Casalme、佐藤彰則、飴田康人、梅澤大樹、松田冬彦、*Synthetic Study on Dolastatin 16*、第 57 回天然有機化合物討論会、2015 年 9 月 9 日、神奈川県民ホール (横浜市)

③T. Umezawa, E. Yoshimura, Y. Nogata, T. Okino, F. Matsuda, Total synthesis and structure-activity relationship of omaezallene toward the development of molecular probe for antifouling substance、The international chemical congress of pacific basin societies、2015 年 12 月 16 日、ホノルル (アメリカ)

④L. O. Casalme、梅澤大樹、松田冬彦、*Synthetic Study on Dolastatin 16*、第 57 回天然有機化合物討論会、2016 年 3 月 25 日、同志社大学京田辺キャンパス (京田辺市)

⑤甘中美帆、梅澤大樹、松田冬彦、オマエザレン誘導体の合成研究、日本化学会北海道支部 2015 年夏季研究発表会、2016 年 7 月 23 日、室蘭工業大学 (室蘭市)

⑥山内有紗、梅澤大樹、松田冬彦、dolastatin 16 誘導体の合成研究、日本化学会北海道支部 2015 年夏季研究発表会、2016 年 7 月 23 日、

室蘭工業大学 (室蘭市)

⑦梅澤大樹、プローブ合成を指向した着生阻害天然物の全合成、第 11 回化学生態学研究会、2016 年 7 月 1 日、湯の川プリンスホテル (函館市)

⑧T. Umezawa、Total Synthesis of Antifouling Natural Products toward Development of Molecular Probe、the International Conference on Biodiversity and Chemical Biology of Marine and Terrestrial Life in the Philippine Region、2016 年 10 月 19 日、ボホール (フィリピン)

⑨T. Umezawa、Total Synthesis of Antifouling Natural Products toward Development of Molecular Probe、International Conference on Chemistry, Chemical Process and Engineering、2016 年 11 月 16 日、ジョグジャカルタ (インドネシア)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅澤 大樹 (UMEZAWA, Taiki)
北海道大学・大学院地球環境科学研究所・
准教授
研究者番号：20503618