

令和元年6月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01908

研究課題名(和文)作用機序解明を指向したクロロスルフォリピッド蛍光プローブの合成研究

研究課題名(英文) Synthetic Study on Chlorosulfolipids Fluorescent Probe Directed toward Elucidation of Action Mechanism

研究代表者

松田 冬彦 (Matsuda, Fuyuhiko)

北海道大学・地球環境科学研究所・教授

研究者番号：10219446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Danicalipin AあるいはMytilipin Cなどのクロロスルフォリピッド類(CSLs)は黄金色藻から最初に単離された一群の天然有機化合物で、直鎖の炭素骨格に多数の塩素原子が結合する特異な構造を有している。多彩な生物活性を示すが、特に、食中毒の原因物質として特定されていることから注目されている。本研究では、CSLsの特異な生物活性の分子レベルでの作用機序解明を目指し、Mytilipin CとDanicalipin Aの分子中に蛍光発色団を導入した誘導体(蛍光プローブ)の合成を目指した研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CSLsは多彩な生物活性を示し、その特異な分子構造と相まって注目されている。特に、食中毒の原因物質として特定されていることから、生物活性発現の分子レベルでの作用機序解明が喫緊の課題で、社会的意義も大きい。分子レベルでの活性発現作用機序の解明には、CSLsの蛍光プローブの合成が必須である。しかしながら、多数のCSLsの全合成が報告されているものの、蛍光プローブの合成を指向した研究は現在までに報告例はなく、その学術的意義は大きい。

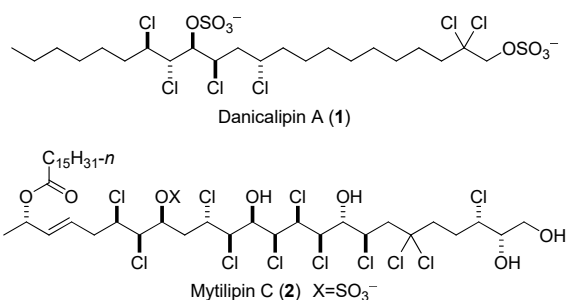
研究成果の概要(英文)：Chlorosulfolipids (CSLs), first isolated from the freshwater alga, are a unusual family of natural products includes Danicalipin A and Mytilipin C. CSLs are unique in featuring straight chain hydrocarbon skeleton densely functionalized with chlorine atoms. They have drawn considerable attention as substances of toxicological concern, because some of them display cytotoxicity and are associated with seafood poisoning. Due to the unprecedented structure and interesting biological activity, CSLs recently garnered interest as targets of total synthesis. Several groups including our group have achieved total syntheses of CSLs. In this research, synthetic study on fluorescent probes of Mytilipin C and Danicalipin A directed toward elucidation of action mechanism was carried out. We developed synthetic process to stereoselectively construct polychlorinated skeleton of Mytilipin C. We also succeeded synthesis of fluorescent probe of Danicalipin A which exhibited toxicity against brine shrimp.

研究分野：有機合成化学、天然物化学

キーワード：全合成 クロロスルフォリピッド 含塩素化合物 構造活性相関 プローブ分子 エポキシド

1. 研究開始当初の背景

Danicalipin A (1)やMytilipin C (2)などのクロルスルホリピッド類(CSLs)は類似した構造を持つ一群の天然有機化合物で、枝分かれのない長鎖の炭素骨格に多数の塩素原子が結合し、さらに、硫酸エステルを有することで両親媒性を示す。1962年に黄金色藻の抽出物に強い魚毒活性が見出されて以来、黄金色藻の毒性に関する研究が盛んに行われ、黄金色藻の抽出物が多様な生物活性を示すことが明らかになった。その後、このような一連の生物活性の原因物質として CSLs が単離・構造決定された。1は黄金色藻から毒成分として単離された CSLs の主成分の一つである。また、2は2002年に地中海産ムラサキイガイの食中毒の原因物質として特定されている。このようなことから、CSLsはその特異な構造と生物活性に多大な関心を集めている。CSLsは多数の不斉炭素原子を持つが、その立体化学は、有効な決定法がなかったため、単離および平面構造の決定から40年近く不明のままであった。2001年に CSLs の相対立体化学の決定に JBCA法(J-Based Configuration Analysis)が有効なことが示され、その後、多くの CSLs の立体化学が絶対立体化学も含めて決定されている。一方、CSLsはその特異な構造から、有機合成化学の面からも注目を集め、2009年に最初の全合成が報告されて以降、多くの全合成が報告されている。我々も2011年に1の立体選択的な不斉全合成を達成している。



2. 研究の目的

CSLsは多彩な生物活性を示し、特に、食中毒の原因物質として特定されていることなどから、生物活性発現の作用機序解明が喫緊の課題である。本研究では、CSLsの分子レベルでの活性発現作用機序の解明を目指し、1と2の分子構造の中に蛍光発色団を導入した誘導体(蛍光プローブ)の合成を目的とした。分子レベルでの作用機序解明には蛍光プローブの合成は必須である。しかしながら、多数の CSLs の全合成が報告されているものの、蛍光プローブの合成を指向した研究は現在までに報告例がない。

3. 研究の方法

(1) CSLsは塩素原子が結合した多数の不斉炭素原子を有するため、その全合成には、高度に立体制御された効率のよい塩素原子の導入法の開発が求められる。その一環として、アリル・エポキシドの塩化物イオンによる開環反応を系統的に検討し、新たな立体選択的な塩素原子導入法を見出す。

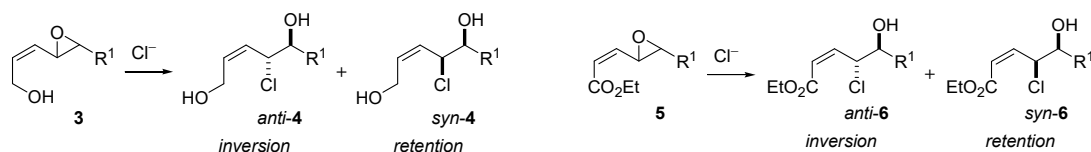
(2) Mytilipin C (2)の全合成研究を行う。1の全合成の過程で見出した合成手法や(1)で行う研究の成果を駆使し、2の多数の不斉炭素原子の立体制御法を確立する。

(3) Danicalipin A (1)の蛍光プローブの合成を行う。1の全合成で確立した合成法に基づき、その蛍光プローブの合成を行い、その生物活性を検討する。生物活性の評価方法としては brine shrimp に対する毒性試験を用いる。これは CSLs の生物活性を調べる標準的な方法である。

4. 研究成果

(1) CSLsの全合成には高度に立体制御された効率のよい塩素原子の導入法の開発が求められる。CSLsの全合成の過程で、分子内に塩素原子を既に有する基質にさらに塩素原子の導入を試みると、予期せぬ立体選択性が見られことが報告されている。例えば、通常、立体反転で進むことが知られているアリル・エポキシドの塩化物イオンによる開環反応において、立体化学が保持された生成物が副生し、立体選択性が大幅に低下する場合がある。この現象は分子内の塩素原子による隣接基関与で説明されている。このタイプのアリル・エポキシドの開環反応は CSLs の全合成で有用な反応であるが、系統的な研究は行われていない。我々はアリル基側を合成上有用なアリルアルコールないし α 、 β -不飽和エステルとしたアリル・エポキシド **3** ないし **5** について、分子内の塩素原子の位置と立体化学を様々に変えた基質を合成し、塩化物イオンによる開環反応の立体選択性を検討した。幾つかの結果を次ページの表にまとめた。アリルアルコール **3** の場合、Et₄NCl を BF₃OEt₂ 共存下で反応させると (Et₄NCl/BF₃OEt₂)、開環反応が進んだ。**3b** および **3d** では立体化学が保持されたクロロヒドリン syn-**4b** ないし syn-**4d** が各々副生した。対照実験として塩素原子を有しない **3a** についてまったく同じ条件で開環反応を行ったが、完全に立体反転で反応が進んでおり、**3b** および **3d** では塩素原子の隣接基関与により立体選択性が低下することは明らかである。また、**3b** および **3d** とは塩素原子とエポキシドの相対立体化学が異なる **3c** および **3e** では、立体反転のみで反応が進んだ。分子内塩素原子の立体化学が重要なことが分かった。ここで見出した立体異性体における立体選択性の違いは、塩素原子の隣接基関与により五員環あるいは四員環のクロロニウムイオンが生成すると仮定すると、仮定されたクロロニウムイオンの安定性に基づき無理なく説明できる。一方、 α 、 β -不飽和ケトン **5** では、Et₄NCl/BF₃OEt₂ の

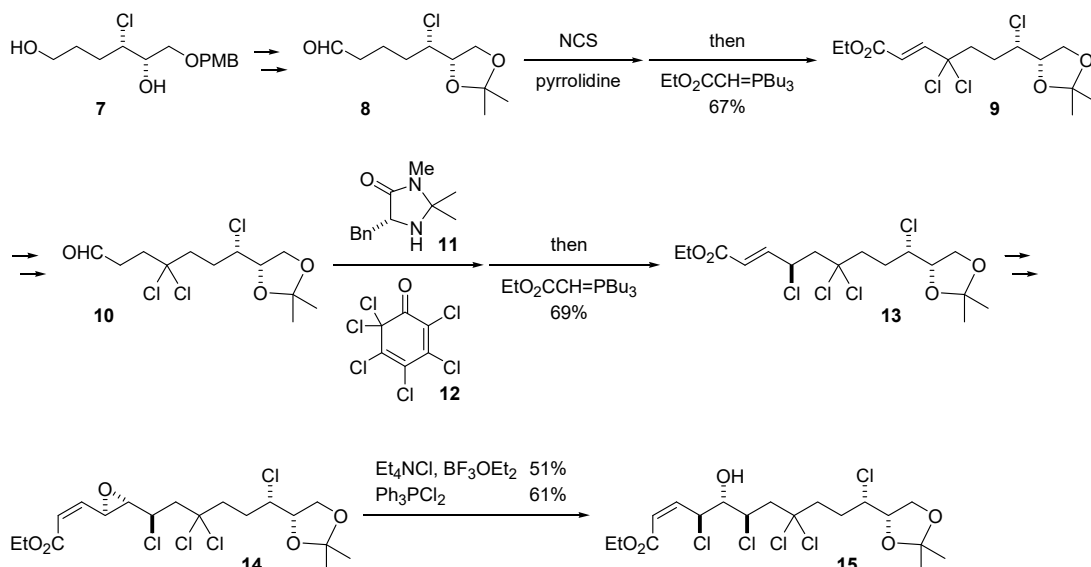
条件の他に、反応操作がより簡便な Ph_3PCl_2 でも開環反応が進行した。3 とは対照的に全ての反応で立体反転による生成物、クロロヒドリン anti-6 のみが得られた。α, β-不飽和エステルを導入してアリル位の反応性を下げることにより、塩素原子の隣接基関与による立体選択性の低下を防げることが分かった。また、生成物 anti-6 のエステル部分はさらに合成を進める手掛かりとして利用可能で、この反応は CSLs の全合成で大変有用と考えている。



Substrate	Conditions	anti:syn	Yield	Substrate	Conditions	anti:syn	Yield
	Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	100:0	89%		Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ Ph_3PCl_2	100:0	90%
	Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	74:26	98%		Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ Ph_3PCl_2	100:0	97%
	Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	100:0	89%		Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ Ph_3PCl_2	100:0	91%
	Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	95:5	92%		Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ Ph_3PCl_2	100:0	64%
	Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	100:0	87%		Et_4NCl , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ Ph_3PCl_2	100:0	93%

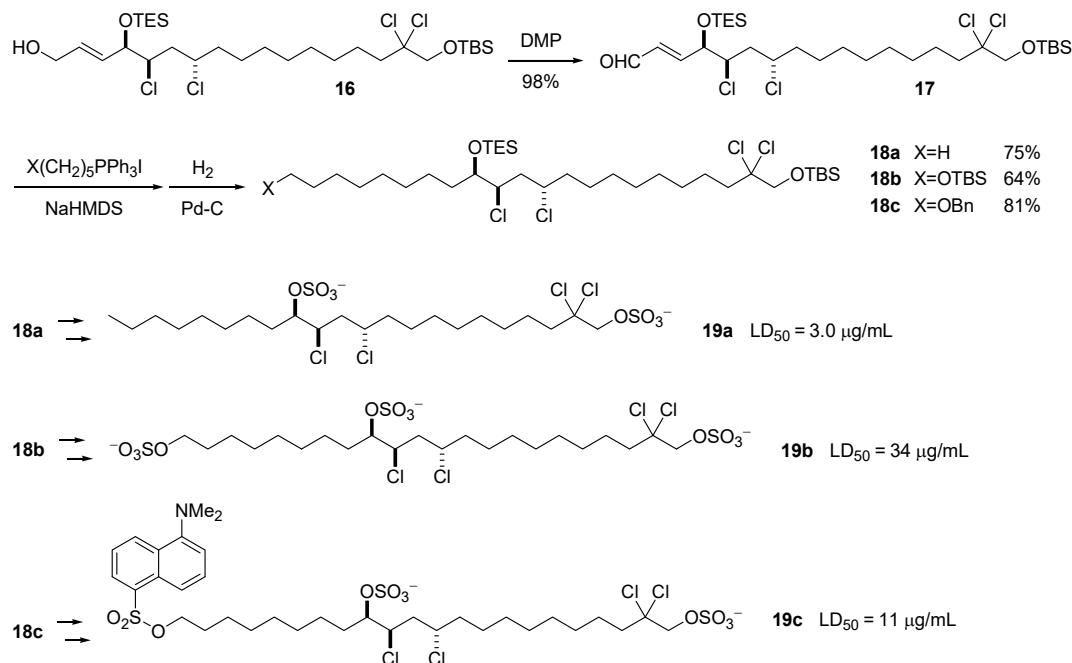
$\text{R}^2 = n\text{-C}_8\text{H}_{17}$

(2) Mytilipin C (2) の全合成研究を行った。下記の図に概略をまとめた。ジオール 7 より合成を開始した。7 の供給については、Danicalipin A (1) の全合成の際に確立した合成方法を用いることで大量合成が可能であった。7 より一炭素増炭を経て、アルデヒド 8 とした。8 と NCS を pyrrolidine 共存下で反応させると、α-ジクロロ化が高収率で起こり、反応系中に Wittig 試薬を加えることで、不安定なジクロロアルデヒドを単離することなく、α, β-不飽和エステル 9 を得た。この α-ジクロロ化の反応条件は 1 の全合成の過程で見出したもので、既存の α-ジクロロ化と比較して、モノクロロアルデヒドなどの副生成物がほとんど生成せず、大変有用である。9



より還元を経て、アルデヒド **10** とした。**10** に対して MacMillan 触媒 **11** と Leckta quinone **12** を用いて不斉 α -モノクロロ化を行い、反応系中に Wittig 試薬を加えて、不安定なモノクロロアルデヒドを単離せずに、 α 、 β -不飽和エステル **13** を得た。立体異性体としては **13** のみが得られており、不斉 α -モノクロロ化は高選択的に進んでいることが分かった。**13** より Sharpless 不斉エポキシ化を経て、 α 、 β -不飽和エステル **14** とした。**14** について塩化物イオンによるエポキシ開環反応を検討した。前項にまとめたエポキシ開環反応の立体選択性に関する検討結果に基づき、 $\text{Et}_4\text{NCl}/\text{BF}_3\text{OEt}_2$ の条件を用いたところ、開環反応は予想通り完全に立体反転で進行し、クロロヒドリン **15** を単一の生成物として得た。また、反応操作がより簡便な Ph_3PCl_2 でも開環反応が進行し、やはり、**15** が単一の生成物として得られた。以上の実験結果から **2** の右半分の立体選択的な構築法が確立できたと考えている。

(3) Danicalipin A (**1**) の誘導体を三種類合成し、brine shrimp に対する毒性を検討した。下記の図に概略をまとめた。合成はアリルアルコール **16** を出発物質として行った。**16** は **1** の全合成の重要合成中間体で、大量合成が可能である。**1** の全合成では最終段階で anti-1,2-ジクロリド部分を構築しているが、収率、立体選択性ともに必ずしも高くない。そこで anti-1,2-ジクロリド部分の毒性に対する影響を調べることにした。**16** を酸化したアルデヒド **17** を得た。**17** に対して $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{PPh}_3\text{I}$ と NaHMDS を用いて Wittig 反応を行い、炭素鎖を延長し、得られたジエンを還元し、シリルエーテル **18a** とした。**18a** から脱保護と硫酸エステル化を経て、ビス-硫酸エステル **19a** を得た。**19a** は brine shrimp に対して、**1** ($\text{LD}_{50}=2.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$) と同程度の毒性を示し、anti-1,2-ジクロリド部分は毒性に影響しないことが分かった。なお、黄金色藻から **1** より塩素原子の少ない同族体がマイナー成分として得られているが、同様に塩素原子の数が少なくなっても毒性に影響しないことが報告されている。以上の結果を踏まえ、**1** よりはるかに合成が容易な **19a** の左末端に蛍光プローブ合成に必要な酸素官能基を導入することにした。**17** に $\text{TBSO}(\text{CH}_2)_5\text{PPh}_3\text{I}$ あるいは $\text{BnO}(\text{CH}_2)_5\text{PPh}_3\text{I}$ を用いた Wittig 反応を行い、水素添加を経て、各々シリルエーテル **18b** と **18c** を得た。**18b** から脱保護と硫酸エステル化を経て、トリス-硫酸エステル **19b** とした。**19b** は **1** の両親媒性を消失した誘導体で、予想通り水溶性を示し、brine shrimp に対する毒性も大幅に低下した。一方、**18c** から脱保護、ダンシル化、および硫酸エステル化を経て、蛍光発色団を有する蛍光プローブ、ビス-硫酸エステル **19c** を得た。**19c** はやや毒性が低下したものの、蛍光プローブとして用いるには適した毒性であった。蛍光顕微鏡による観測を行ったところ、brine shrimp 中での **19c** の局在を明らかにすることができた。CSLs の分子レベルでの作用機序解明のための蛍光プローブ合成に向けて重要な指針が得られたと考えている。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① N. Kinoshita-Terauchi, K. Shiba, T. Umezawa, F. Matsuda, T. Motomura, K. Inaba, *J. Photochem. Photobiol. B*, 査読有, **192**, 2019, 113 – 123
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.01.010>
- ② T. Umezawa, N. I. Prakoso, M. Kannaka, Y. Nogata, E. Yoshimura, T. Okino, F. Matsuda, Synthesis and Structure-Activity Relationship of Omaczallene Derivatives, *Chem. Biodiversity*, 査読有, **16**, 2019, e1800451

DOI: 10.1002/cbdv.201800451

- ③ 梅澤大樹, 松田冬彦, 着生阻害活性天然有機化合物と誘導体の合成研究, *Sessile Organisms*, 査読有, **35**, 2018, 1 – 10
DOI: <https://doi.org/10.4282/sosj.35.35>
- ④ M. Kumagai, K. Nishikawa, H. Matsuura, T. Umezawa, F. Matsuda, T. Okino, Antioxidants from the Brown Alga *Dictyopteris undulata*, *Molecules*, 査読有, **23**, 2018, 1214
DOI: 10.3390/molecules23051214
- ⑤ J. G. Petitbois, L. O. Casalme, J. A. V. Lopez, W. M. Alarif, A. Abdel-Lateff, S. S. Al-Lihaibi, E. Yoshimura, Y. Nogata, T. Umezawa, F. Matsuda, T. Okino, Serinolamides and Lyngbyabellins from an *Okeania* sp. Cyanobacterium Collected from the Red Sea, *J. Nat. Prod.*, 査読有, **80**, 2017, 2708 – 2715
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00449
- ⑥ J. A. V. Lopez, J. G. Petitbois, C. S. Vairappan, T. Umezawa, F. Matsuda, T. Okino, Columbamides D and E: Chlorinated Fatty Acid Amides from the Marine Cyanobacterium *Moorea bouillonii* Collected in Malaysia, *Org. Lett.*, 査読有, **19**, 2017, 4231 – 4234
DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01869
- ⑦ J. Suzuki, N. Miyano, S. Yashiro, T. Umezawa, F. Matsuda, Total Synthesis of (–)-Kainic Acid and (+)-*allo*-Kainic Acid through SmI₂-Mediated Intramolecular Coupling between Allyl Chloride and an α,β -Unsaturated Ester, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, **15**, 2017, 6557 – 6566
DOI: 10.1039/c7ob01427a
- ⑧ T. Umezawa, Y. Hasegawa, I. S. Novita, J. Suzuki, T. Morozumi, Y. Nogata, E. Yoshimura, F. Matsuda, Design, Synthesis, and Antifouling Activity of Glucosamine-Based Isocyanides, *Mar. Drugs*, 査読有, **15**, 2017, 203
DOI: 10.3390/md15070203
- ⑨ Y. Nogata, E. Yoshimura, T. Okino, T. Umezawa, F. Matsuda, Total Synthesis and Biological Activity of Dolastatin 16, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, **15**, 2017, 1140 – 1150
DOI: 10.1039/c6ob02657e
- ⑩ 梅澤大樹, 西川慶祐, 沖野龍文, 松田冬彦, 着生阻害活性を有する天然有機化合物の全合成, 有機合成化学協会誌, 査読有, **74**, 2016, 689 – 699
DOI: <https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.74.689>

[学会発表] (計 5 件)

- ① 玉川竜太郎, 梅澤大樹, 松田冬彦, エポキシド開環反応における隣接基関与の検討, 北海道支部 2018 年夏季研究発表会学, 2018 年
- ② 秋山拓哉, 前田武志, 梅澤大樹, 松田冬彦, Danicalipin A 誘導体の合成研究, 第 59 回天然有機化合物討論会, 2017 年
- ③ 秋山拓哉, 前田武志, 梅澤大樹, 松田冬彦, Danicalipin A 誘導体の合成研究, 北海道支部 2017 年夏季研究発表会学, 2017 年
- ④ 小倉陽祐, 佐藤匠, 梅澤大樹, 松田冬彦, Mytilipin C の合成研究, 第 28 回万有札幌シンポジウム, 2016 年
- ⑤ 小倉陽祐, 梅澤大樹, 松田冬彦, Mytilipin C の合成研究, 北海道支部 2016 年夏季研究発表会学, 2016 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：沖野 龍文
ローマ字氏名：(OKINO, Tatsufumi)
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学院地球環境科学研究院
職名：教授
研究者番号 (8 桁)：30280910

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：梅澤 大樹
ローマ字氏名：(UMEZAWA, Taiki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。