

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611004

研究課題名(和文) アントシアニンの合成化学を基盤とした花色発現機構のケミカル
バイオロジー研究課題名(英文) Studies on mechanism of flower coloration based on synthesis of
anthocyanins

研究代表者

吉田 久美 (YOSHIDA, Kumi)

名古屋大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：90210690

研究成果の概要(和文)：

花色素アントシアニンの機能性研究、および生合成・膜輸送研究のさらなる展開を目指し、柔軟かつ効率的なアントシアニンの化学合成法の研究を行った。アントシアニンの生合成における鍵酵素であるアントシアニジン合成酵素(ANS)が酸化酵素であることにヒントを得て、配糖化フラボノールの金属還元によるアントシアニン合成を試みた。本反応が、フラボノール体からフラベノール体への還元と次のアントシアニンへの空気酸化の二段階の反応であることを明らかにした。さらに、種々の母核および配糖化様式のフラボノール体へ本反応を適用し、汎用性の高い反応であることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：

Anthocyanins are widely found in plants and play important roles in insect pollination, anti-oxidation, and protection from harmful light. Recently, these pigments have also shown potential as functional food colorants and can be useful dyes for organic solar-sensitized cells. To establish a new and efficient synthetic method of anthocyanins we tried to transform flavonol derivatives by metal reduction. We clarified that metal reduction of flavonol compound first gave corresponding flavenol compound, then this was oxidized by air to give anthocyanin. This reaction is mild and can be applicable for the synthesis of the acylated anthocyanin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：アントシアニン、フラベノール、生合成経路、アントシアニジン合成酵素、金属還元、空気酸化、シスロイコシアニジン、カテキン、ルチン

1. 研究開始当初の背景

花色素アントシアニンは、高等植物の花、葉、果実などに分布し赤～紫～青色を呈す色素で、抗酸化性に基づく種々の生理機能を持

ち、近年、安全かつ高機能性を持つ天然食品添加物として大きな需要を持つ。さらには近年色素増感太陽電池材料としても期待される。しかし、その供給のほとんどは天然の植物に依存してきた。そのため、機能性研究そ

の他のさらなる展開のためにも、柔軟かつ効率的なアントシアニンの化学合成法の確立が求められていた。

アントシアニンの構造は、発色団のアントシアニジンに1残基以上の糖が結合し、場合によってはさらに配糖化、あるいは有機酸によってアシル化され、複雑なものでは分子量が2,000 近くにもなる。しかし、アントシアニンの生合成経路の解明は、1～2残基の配糖化およびアシル化に留まり、これらの複雑なアントシアニンに関してはほとんど解明されていなかった。さらに、アントシアニンは植物の着色細胞の液胞中に数十 mM もの高濃度に蓄積する分子であるにも関わらず、その液胞輸送および蓄積の機構は全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではまず、アントシアニンの生合成経路を模して、シスロイコ体からの酸素（空気）酸化反応によるアントシアニン発色団の合成を鍵とする新規合成経路の確立を目指した。さらに、本反応のアシル化アントシアニン合成やデオキシアントシアニンの合成への適用を含めた汎用性の確認を行った。

また、アントシアニン関連化合物であるフラボノイド類やプロアントシアニジン類の生理活性の解明を目的に、共通中間体を用いる効率的な合成法の開発と供給も実施した。

これに加え、合成、あるいは天然から調製した配糖化フラボノールの金属還元によるアントシアニンへの変換反応について、詳細な反応経路を明らかにし、本反応の利用による種々のアントシアニン合成についても検討した。

3. 研究の方法

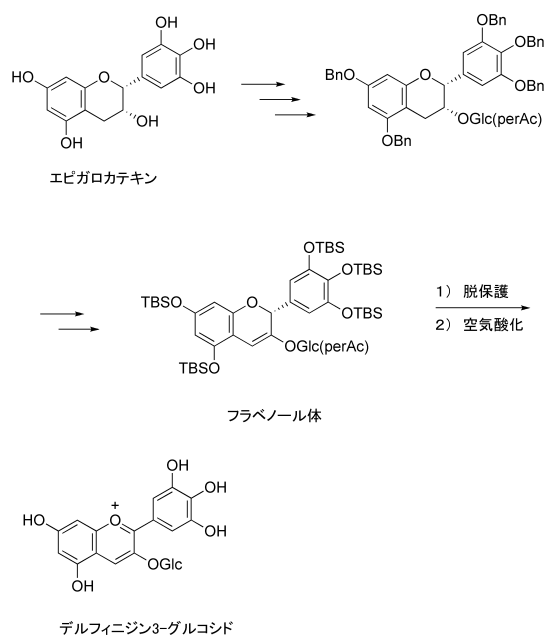
4. 研究成果

(1) 新規分子設計中間体フラベノールの空気酸化によるアントシアニンの合成

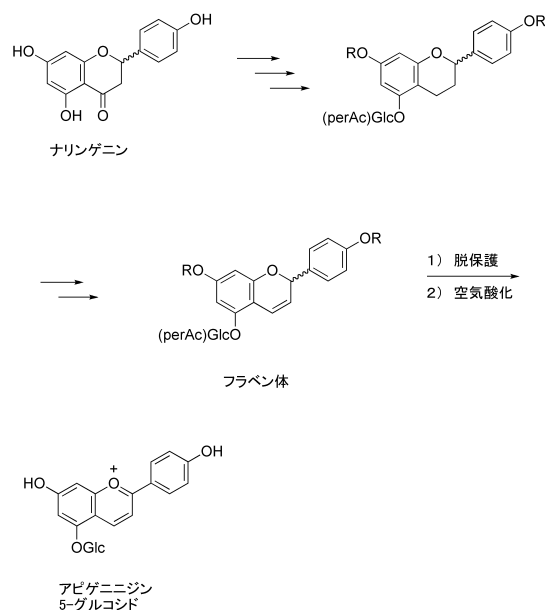
既に、カテキンのヒドロキシル基を Bn 基で保護した後、トリクロロアセトイミデート糖と TMSOTf を用いてグルコシル化反応を行うことにより、 β -選択的に71%の収率で配糖体を得ている。さらに、母核の保護基を TBS 基に変換した後、DDQ 酸化による水の付加反応を立体特異的に行い、生合成中間体を模したロイコ体を合成した。しかし、種々の条件でロイコ体を酸化したがアントシアニンをほとんど与えなかった。そこで、鍵中間体として、エノール体（フラベノール体）を分子設計した。エノール体では、酸化に対する2位の活性化と同時に4位のカチオン生成による高分子化反応

の抑制が期待できるものと考えた。ロイコ体に MsCl を作用させることにより容易にフラベノール体を合成できた。アセチル基を除去した後、フェノール性ヒドロキシル基に結合した TBS 基の除去を酸性条件化で進めつつ空気酸化することにより、シアニジン 3-O-グルコシドの合成に成功した。

そこで、本法を用いて、エピガロカテキンを原料に、同様の経路でフラベノール体へと誘導し、これを空気酸化したところ、デルフィニジン 3-O-グルコシドの合成を達成した (Scheme 1)。



Scheme 1

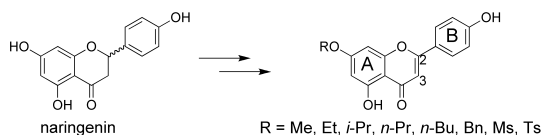


Scheme 2

同様の経路により、ナリングениンの5, 7, 4-ヒドロキシ基を保護した後、5位だけを脱保護して配糖化し、続いて4位を酸化後脱水して3, 4位-フラベン誘導体へと導いた。次いで脱保護の後、酸性条件下で空気酸化することにより、3-デオキシアントシアニンであるアピゲニジジン 5-グルコシドを合成することができた (Scheme 2)。

(2) 分子設計したフラボノイド類の合成

抗インフルエンザウイルス剤の開発を目指して、7-置換アピゲニン類を種々分子設計して合成した。さらにこれらのフラボノイド類のシアル酸転移酵素の阻害効果を調べた。市販のナリングениンを出発原料として、Scheme 3 に示したアピゲニン誘導体を合成した。



Scheme 3

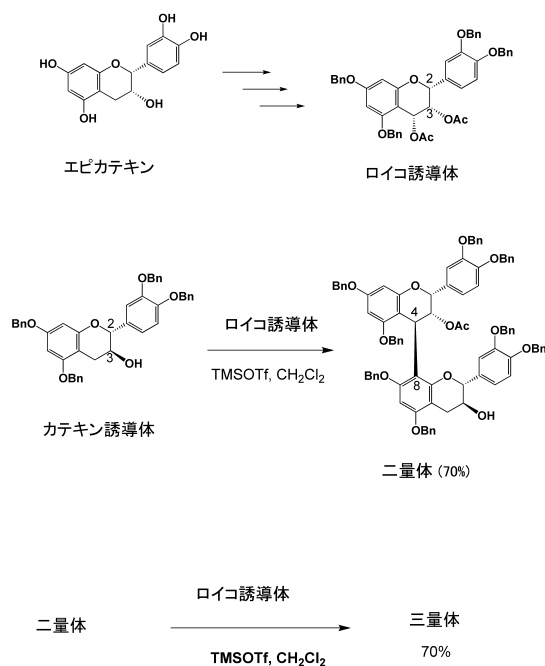
これらの化合物のガラクトース α -2, 6-および α -2, 3-シアル酸転移酵素阻害活性を測定した。その結果フラボン骨格の 2, 3位の二重結合が活性発現に必要で、B 環の親水性が高いほど活性が上昇し、一方 A 環のヒドロキシ基がアルキル置換されることも活性上昇に寄与することが明らかになった。

(3) プロアントシアニン類の合成

プロアントシアニン類は、植物の種子や種皮に含まれるカテキン類の重合体である。抗アレルギーや抗動脈硬化作用などの種々の生理活性を持ち、その構造と活性の相関に興味を持たれるが、天然に存在する重合度や立体の異なる複雑な混合物からの単離は極めて困難で、構造決定も5量体以上では達成されていない。そこで、重合度を制御して、かつ立体選択的なプロアントシアニン類の合成を行った。

プロシアニン類の立体化学を確定するために、位置および立体選択的な縮合法を開拓した。(-)-エピカテキンより誘導したロイコ誘導体をカテキン誘導体とルイス酸存在下で反応させることにより、ほぼ選択的に二量体を得た。さらにこの反応を一段階ずつ繰り返すことにより、三量体、四量体を合成した (Scheme 4)。得られたオリ

ゴマーは完全アセチル化体へと誘導して、さらにその構造を確定した。



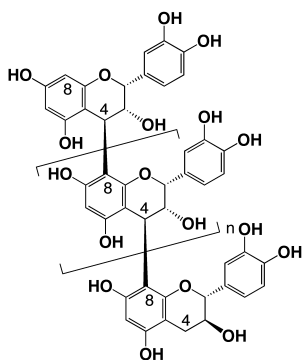
Scheme 4

本反応では、新たに形成される 4→8 の結合の立体が、3 位の立体により制御され、トランス配置の結合となることがわかった。さらに、供与体を受容体に対して 1.5 当量用いるだけで高収率に目的物が得られる反応を開発することができた。

供与体側のロイコ体誘導体の 2, 3 位の立体配置がカテキン型のもを調製することにより、全てのモノマーユニットがカテキン型の重合体を得られる。一方、受容体側のカテキン誘導体をエピカテキン誘導体とすることで、エピカテキンをモノマーユニットとする重合体を得られる。これを選択することにより、望んだモノマーユニットを順番に持つプロアントシアニンが合成でき、汎用性の高いことも特徴である。

植物の種皮はプロアントシアニンが多量に含まれることが知られている。本研究では、アズキ (*Vigna angularis*) の種皮の水抽出物にプロアントシアニン類が多量に含まれることを見いだしたので、その単離も行った。種皮の水抽出物からプロアントシアニン画分を得て、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを含めた各種のクロマトグラフィーを繰り返して、二、三、四量体を単離した。前述で立体選択的に合成した化合物と機器分析データを比較することにより、構造を同定した。アズキ種皮のプロシアニンは、いずれも末端だけが (+)-カテキンで 8 位方向へ (-)-エピカテキンが

重合した構造を有することがわかった (Scheme 5)。生合成における何らかの制御機構の存在が示唆された。



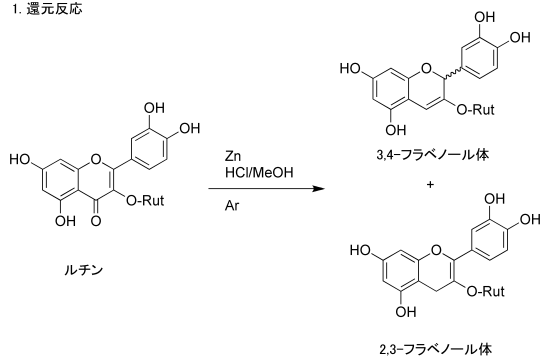
アズキ種皮のプロシアニジン類
n = 0-2

Scheme 5

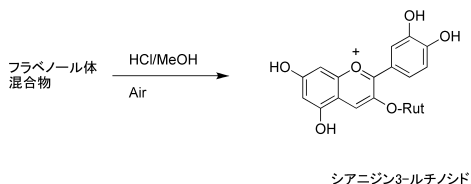
(4) 配糖化フラボノールの金属還元反応によるアントシアニンへの変換

配糖化フラベノールの還元および酸化反応によるアントシアニンへの変換における反応性について、種々溶媒、還元剤、酸化剤、およびラジカルスカベンジャーを共存させるなどの条件を変えて調べた。

1. 還元反応



2. 酸化反応

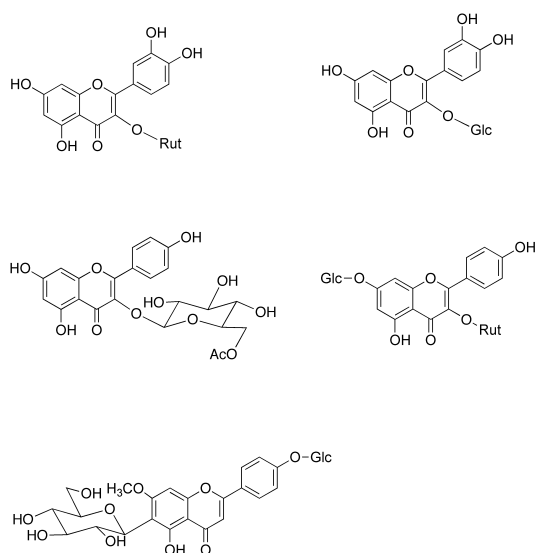


Scheme 6

ルチンを酸性溶媒に溶かし、アルゴン雰囲気下で金属還元を行なうと、還元体である2,3-フラベノール体と2位の立体の違いに

基づく2種類の3,4-フラベノール体の混合物をまず与えることがわかった。この混合物のいずれから、酸性下で空気酸化すると効率よくシアニジン3-ルチノシドに変換されることが明らかになった (Scheme 6)。この反応はケルセチン3-グルコシドなど他の配糖化フラボノールでも同様に高効率で進行して、対応するアントシアニンへと変換できた (Scheme 7)。

本反応を適用した出発物質



Scheme 7

亜鉛末を用いた配糖化フラベノールの還元反応においては、メタノールを用いると反応が最も速やかで、エタノールを用いると溶解性の問題で反応が遅いことがわかった。また水中でも、非常に反応は遅くなるが進行することがわかった。還元反応の際に用いる酸は、塩化水素だけでなく、塩酸、硫酸でも反応は進んだが、トリフルオロ酢酸では反応は遅かった。酸の濃度は、ある程度高い必要があり、希薄な酸では進行が遅かった。

一方、還元して得られたフラベノール体からアントシアニンへの酸化反応においては、塩化水素や硫酸、硫酸の他、トリフルオロ酢酸でも支障なく反応が進行して、アントシアニンへ変換されることがわかった。

ラジカルスカベンジャーの有無は、酸化反応にあまり影響を与えなかった。

フラボノール類の金属還元によるアントシアニンへの変換反応は、20世紀初頭から柴田ら、ロビンソンらにより検討され、その後も種々の実験報告があるが、いずれも収率が20~30%程度と低かった。本研究により、この反応が、単にフラボノールからアントシアニンへの一段階の還元反応ではなく、フラベノール体への還元とアントシアニンへの酸化反応の組み合わせでおきていることが初

めて明らかになり、高収率でアントシアニンへと変換できることが明らかになった。さらに、本反応は種々のフラボノールやフラボンに適用可能であり、アシル化アントシアニンの合成にも用いることのできる汎用性の高い有用なものであることを実証できた。

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4件) 全て査読有り

- 1) Yoshida, K., Mori, M., Kondo, T.: Blue Flower Color Development by Anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 884-915 (2009).
 - 2) Hidari, I.P.J. K., Oyama, K-I., Ito, G., Nakayama, M., Inai, M., Kanai, Y., Watanabe, K-I., Yoshida, K., Furuta, T., Kan, T., Suzuki, T.: Identification and characterization of flavonoids as sialyltransferase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 609-613 (2009).
 - 3) Oyama, K-I., Kuwano, M., Ito, M., Yoshida, K., Kondo, T.: Synthesis of procyanidins by stepwise- and self-condensation using (+)-catechin and (-)-epicatechin as a key building monomer. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 3176-3180 (2008).
 - 4) Oyama, K-I., Kondo, T., Yoshida, K.: Synthesis of oriented anti-virus 7-O-substituted apigenins. *Heterocycles*, **76**, 1607-1615 (2008).
- [学会発表] (計14件)
- 1) 尾山公一、近藤忠雄、吉田久美: 酸化反応によるフラベン配糖体から3-デオキシアントシアニンへの変換反応. 日本農芸化学会2011年度大会(京都)2011. 3. 25-28.
 - 2) 近藤忠雄、尾山公一、吉田久美: 配糖化フラボノール還元体の構造と反応性. 日本農芸化学会2011年度大会(京都)2011. 3. 25-28.
 - 3) 尾山公一、近藤忠雄、吉田久美: 3-デオキシペラルゴニジン5-グルコシドの合成. 日本農芸化学会2010年度大会(東京)2010. 3. 27-30.
 - 4) Oyama, K., Yoshida, K., Kondo, T.: Synthesis of anthocyanins by the air oxidation. Pcifichem2010 (Honolulu, USA) December 15-20, 2010.
 - 5) Kondo, T., Oyama, K., Yoshida, K.: Efficient transformation of flavonol 3-glycoside to the corresponding

anthocyanin via the flavenol by Clemmensen reduction followed by air oxidation. Pcifichem2010 (Honolulu, USA) December 15-20, 2010.

- 6) Yoshida, K.: Synthesis of flavonoid for clarification of blue flower color development. The 6th International Symposium on Integrated Synthesis. (Kobe, JAPAN) October 23-24, 2010.
- 7) Yoshida, K.: Chemistry of Flavonoids in Color Development: XXV International Conference on Polyphenols. (Montpellier, FRABCE) August 23-27, 2010.
- 8) Kondo, T., Bjorøy, Ø., Tokunou, K., Oyama, K.-I., Yoshida, K.: Transformation of flavonol glycoside to the corresponding anthocyanin. XXV International Conference on Polyphenols. (Montpellier, FRABCE) August 23-27, 2010.
- 9) Yoshida, K., Oyama, K.-I., Mori, M., Kondo, T.: Structure and Synthesis of Flower Pigment, Anthocyanins. *The 4th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia*. (Bangkok, THAILAD) November 29-December 3, 2009.
- 10) Kondo, T., Bjorøy, Ø., Oyama, K., Tokuno, K., Yoshida, K.: Highly efficient transformation of the anthocyanin by Clemmensen reduction from 3-glycosylflavonol through the flavenol as a key intermediate. 5th International Workshop on Anthocyanins. (Nagoya, JAPAN) September 15-18, 2009.
- 11) 左一八、後藤志帆、尾山公一、中山美穂、吉田久美、古田巧、菅敏幸、鈴木隆. シアル酸転移酵素阻害剤の探索および作用機構. 日本生化学会中部支部会・例会シンポジウム(名古屋)2009. 5. 23.
- 12) 尾山公一、関口由紀子、近藤忠雄、吉田久美: 生合成経路に基づくアントシアニンの新規合成法の開発. 日本農芸化学会2009年度大会(福岡)2009. 3. 27-29.
- 13) 尾山公一、桑野美幸、伊藤実恵、吉田久美、近藤忠雄: 3,4-ジアセトキシフラバン誘導体を用いたプロシアニジンの合成. 第39回中部化学関係学協会支部連合秋季大会(名古屋)2008. 11. 8-9.
- 14) 近藤忠雄、尾山公一、Bjorøy, Ø.、中村早岐、得能一成、河口聡志、山川大輔、吉田久美: 花色素アントシアニンの新規合成法. 第50回天然有機化合物討論会(福岡)2008. 9. 30-10. 2.

[図書] (計2件)

- 1) 吉田久美、近藤忠雄、Cyanidin 3-*O*- β -D-glucoside 「天然物の全合成 2000～2008(日本)」(有機合成化学協会編) 化学同人、京都、pp. 44(2009. 6. 8).
- 2) 吉田久美、近藤忠雄、花の色とアントシアニン「アントシアニンの科学 -生理機能・製品開発の新展開-」(津田孝範、須田郁夫、津志田藤二郎編著) 建帛社、東京、pp. 47-73 (2009. 4. 30).

[その他]

ホームページ等

<http://www.info.human.nagoya-u.ac.jp/lab/yoshida/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 久美 (YOSHIDA KUMI)

名古屋大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号：90210690

(2) 研究分担者

尾山 公一 (OYAMA KIN-ICHI)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・
技術専門職員
研究者番号：80402460

(3) 連携研究者

なし