

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710239

研究課題名（和文） 疫病菌卵孢子誘導機構解明を目指した $\alpha 1$ を基盤とするケミカルバイオロジー研究課題名（英文） Chemical biology on *Phytophthora* mating hormone $\alpha 1$

研究代表者

矢島 新 (YAJIMA Arata)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30328546

研究成果の概要（和文）：本研究では疫病菌の新規防除法を開発する為に、疫病菌の有性生殖メカニズムをケミカルバイオロジー的な手法により明らかにすべく検討を行った。まず、疫病菌の有性生殖において A2 株が放出し A1 株に卵孢子形成を誘導する $\alpha 2$ の可能な 4 種の立体異性体を合成することに成功した。ただ一つの立体異性体のみ活性があることから、天然物の絶対立体配置を決定した。確立した合成法に基づき、 $\alpha 1$ をリガンドとする化学プローブを合成した。

研究成果の概要（英文）：The novel sexual oospore inducing hormone $\alpha 2$ produced by A2 mating type of *Phytophthora* was synthesized. The absolute configuration of the natural product was determined. The chemical probes of hormone $\alpha 1$ derivatives were also prepared.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー、疫病菌、*Phytophthora*、化学プローブ、有機合成化学、全合成

1. 研究開始当初の背景

疫病菌 *Phytophthora* はジャガイモやトマトなどの重要作物に寄生し、全世界で甚大な被害を与えている病原糸状菌である。疫病菌は 60 種以上が知られているが、その多くは植物病原菌である。ジャガイモ疫病による経済的損失は世界で年間数十億ドルにのぼり、疫病菌の防除には毎年膨大な量の農薬が用いられているが、近年農薬耐性種が出現し、特に米国では疫病菌が原因とされる櫛の突然の立ち枯れ(sudden oak death)が急速に拡大し問題化している。このように疫病菌が悪性化、耐性化するのには彼らの生活環が関係し

ている。彼らの中には通常の有糸分裂による増殖の他に、有性生殖を行うものがある。有性生殖により次世代は遺伝的多様性を獲得することが可能となり、農薬耐性等を得るに至るのである。しかもその際形成される卵孢子(oospore)は、固い二重の殻に覆われていて、乾燥や高温等の悪条件でも数十年生き続ける事が可能で、条件が整うと発芽して次世代が誕生するという非常に厄介な特性を有しており防除を困難にしている。従来型の農薬(殺菌剤)では歴史的に見て必ず耐性菌の問題が発生するが、有性生殖の仕組みを理解し、有性生殖を効果的に妨害することが可能

となれば、原理的に耐性菌の出現しえない疫病菌防除の新基軸を打ち出す事が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は疫病菌の新規防除法の開発であるが、その前段階として疫病菌有性生殖メカニズムを明らかにしていく必要がある。疫病菌の有性生殖は古くから知られている現象ではあるが、その機構に関する知見は驚くほど少ない。特に卵胞子の誘導機構に関しては全くの手つかずの状態である。申請者は疫病菌有性生殖に於ける卵胞子形成に重要な役割を果たす鍵となる物質 $\alpha 1$ の立体化学が活性発現に重要であることを明らかにしている。言い換えれば、疫病菌には $\alpha 1$ の特定の構造を特異的に認識するレセプターが存在するはずである。しかもそれらは多種の *Phytophthora* に共通である可能性が高い。そこで申請者は本研究に於いて以下の内容について明らかにすることを目的として研究を行った。

(1) $\alpha 1$ の誘導体の合成と構造活性相関

$\alpha 1$ は比較的小さい分子ではあるが、修飾可能な部位が分子に偏り無く存在している。よって様々な誘導体のデザインが可能である。申請者らが既に開発した方法により合成した天然型 $\alpha 1$ のサンプルを用いて修飾可能な部位の特定を行う。また、さらに効率的な合成法を開発することによりサンプルの大量供給を可能とすると共により柔軟な誘導体デザインを可能にする。

(2) $\alpha 1$ をプローブとするケミカルバイオロジー

構造活性相関解析をもとに $\alpha 1$ の蛍光ラベル化を行う。これらを用いて $\alpha 1$ レセプターの局在性解析を行うとともに、標的タンパク質同定のための基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

疫病菌 *Phytophthora* の卵胞子誘導ホルモン $\alpha 1$ は、多種の *Phytophthora* に対して卵胞子形成を誘導することから、疫病菌に共通のホルモン様物質である可能性が指摘されている。そこで、 $\alpha 1$ をプローブとしたケミカルバイオロジー解析を行う。その為に、 $\alpha 1$ 誘導体のデザイン及び合成により構造活性相関解析の為にサンプル供給、それらサンプルの生物検定試験、構造活性相関をもとにしたケミカルプローブの合成、ケミカルプローブを用いた標的の局在性の解析の実験が必要となる。各実験は手法ごとに代表者、連携研究者により遂行されるが、随時相互に情報をフィードバックすることで効率的に行う。

(1) $\alpha 1$ 誘導体のデザイン及び合成

申請者らのこれまでの研究により $\alpha 1$ の活性

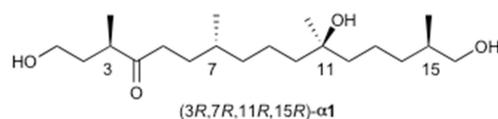


図1 ホルモン $\alpha 1$ の構造

発現に7位及び11位の立体化学が重要であることが明らかとなっている。他の立体異性体は全く活性を保持していないことから、7位から11位にかけての構造は改変することができないと考えられた。しかしながら幸いな事に、 $\alpha 1$ には修飾可能な部位が両端の水酸基を始め複数存在していることから様々な誘導体のデザインが可能であった。特にどちらか一方でも水酸基に修飾が可能であれば、そこからリンカーを介して蛍光発色団の導入や、アフィニティーゲルの作成も比較的容易に行うことが可能であると考えられた。すなわち誘導体の候補としてはまず、1位及び16位水酸基の様々な修飾体を合成することとした。これは申請者が既に保有している $\alpha 1$ のサンプルから容易に調製可能である。その他の誘導体としては4位カルボニル基の還元体やその誘導体が挙げられるが、これも合成した $\alpha 1$ より容易に導くことが出来ると考えられた。特に $\alpha 1$ は1位水酸基と4位カルボニル基間のヘミアセタール構造との平衡状態にあり、安定性にやや問題があることから、これらの部分が修飾可能であれば今後の研究にとって大きなメリットとなる。生物活性試験の結果全ての官能基が修飾不能であることも考慮しておかなければならない。その際には3位異性体混合物は活性低下が見られないという現在までの知見がブレークスルーをもたらす可能性がある。すなわち3位メチル基は不要である可能性もあり、3位周辺は修飾可能であることも考えられた。また、15位に関してはその立体化学が活性発現に重要か否かは明らかとされていないので、15位に関する検討も必要であると考えられた。申請者らが開発した合成ルートに従えば、3位および15位の立体異性体(非天然型)を合成することは可能ではあるが、効率の面でやや問題を抱えていた。そこで、 $\alpha 1$ の非天然型立体異性体の効率的な新規合成法を開発することとした。その合成法は、非天然型 $\alpha 1$ 合成だけでなく、3位ないし15位デメチル体の合成や、異なる置換基を導入した化合物の合成にも適用可能な合成スキームをデザインすることにより、幅広い誘導体の合成法を確立することとした。

(2) ケミカルプローブの合成

生物活性試験によって得られた知見をもとに、 $\alpha 1$ をリガンドとするケミカルプローブを合成する。プローブとしてはまず蛍光プローブを調製するが、どのようなリンカーが適し

ているのか、発色団には何を選択するべきか等の過去の知見は一切無いので、様々な誘導体の検討が必要であると考えられた。本研究の成否はいかに適切なケミカルプローブを作成できるかに依存しているが、 $\alpha 1$ の性質すなわち水溶性等に関する知見は有しているため、その情報をもとにして適切と考えられるリンカー等の絞り込みが可能であると考えた。

4. 研究成果

誘導体の候補としてはまず、1位及び16位水酸基の様々な修飾体を合成した。その他の誘導体としては4位カルボニル基の還元体やその体を合成した $\alpha 1$ より容易に導くことが出来た。申請者らが以前開発した合成ルートに従えば、3位および15位の立体異性体(非天然型)を合成することは可能ではあるが、効率の面でやや問題を抱えていた。そこで、 $\alpha 1$ の非天然型立体異性体の効率的な新規合成法を新たに開発した。

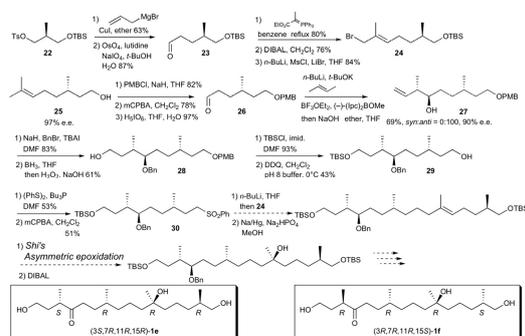


図2 $\alpha 1$ の新規合成法

鍵反応としては、三位の立体化学の構築にBrown不斉クロチル化を用いた。また、11位水酸基の立体に関しては、Shi不斉エポキシ化を用いることで簡便に不斉三級水酸基を立体的に導入することができた。フラグメントの結合にはスルホンカップリングを用いることにより、全ての不斉中心の立体を保持したままの $\alpha 1$ の効率的合成法を確立することができた。本合成法により、3位および15位の立体異性体だけでなく、3位デメチル体も容易に合成可能であった。

合成したそれらの生物活性を評価した結果、活性発現には3位、15位の立体化学は重要ではないことを明らかとした。すなわち3位の異性体は天然物と全く同等の活性を有しており、15位の立体異性体は天然物の約三分の二の活性を有していた。また、種々の誘導体の生物活性試験の結果より、1位水酸基は活性発現に重要であるが、16位水酸基のp-プロモフェニルカーバマート体に天然物の

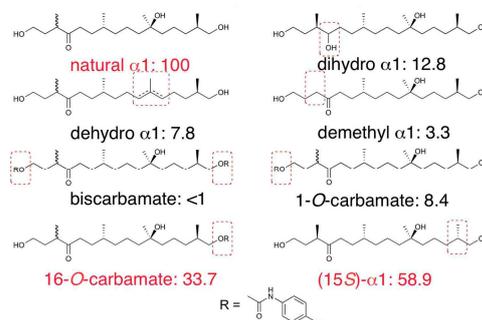
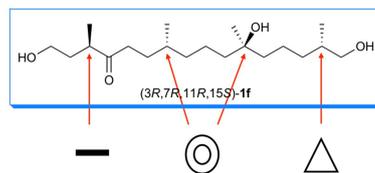


図3 $\alpha 1$ の構造活性相関

約三分の二程度の活性が見られたことから、16位水酸基は活性発現に重要ではなく、誘導化が可能であるという $\alpha 1$ を基盤とするケミカルプローブ合成の為に重要な知見を得ることに成功した。

本研究過程において、疫病菌の有性生殖においてA2株が放出しA1株に卵胞子形成を誘導する $\alpha 2$ が新たに単離同定された。平面構造はNMRスペクトルにより明らかにされたが絶対立体配置は未定であった。そこで $\alpha 2$ の立体化学を決定する目的で、 $\alpha 2$ の可能な4種の立体異性体を、スルホンカップリングを鍵段階として合成することに成功した。合成品の生物検定を行ったところ、ただ一つの立体異性体のみに活性があることを見だし、天然物の絶対立体配置を決定することができた。

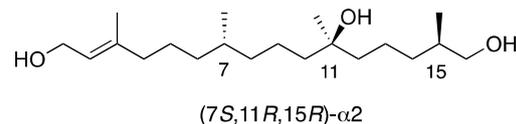


図4 $\alpha 2$ の構造

興味深いことに $\alpha 2$ の絶対立体配置は $\alpha 1$ と同様であることから、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の生合成にある種の共通性がある可能性が示唆された。

$\alpha 2$ は $\alpha 1$ よりも単純な構造を有しており、合成が比較的容易であった為、合成した $\alpha 2$ を化学プローブへと誘導して疫病菌の卵胞子形成に重要となる標的物質の探索を行う検討をした。 $\alpha 1$ の誘導体合成によって得られた知見に従って、プローブ化を行う足がかりを構築する為、 $\alpha 2$ の16位水酸基をアミノ基に変換した化合物や、水酸基をカーバマートに誘導化した化合物を合成した。それらの化合物の生物検定試験を行ったところ、 $\alpha 2$ は $\alpha 1$ と異なり16位水酸基を誘導化すると活性が無くなるという知見が得られた。また、1位水酸基の修飾によっても活性が消失した。 $\alpha 2$

は $\alpha 1$ と比べてレセプターの認識がかなり厳密であることが示唆された。よって $\alpha 2$ をリガンドとする化学プローブの合成は困難であると考えられる。次に $\alpha 2$ の全合成に用いた手法を応用することにより、 $\alpha 1$ のより簡便な新規合成法の開発に成功した。本合成手法の開発により、 $\alpha 1$ の大量供給が可能となり、化学プローブの合成を容易とすることができた。これら一連の成果は主に有機合成化学を基盤とした超微量天然生理活性有機化合物である、疫病菌の卵胞子形成誘導ホルモンの立体化学の決定や、サンプルの大量供給による詳細な生物検定試験の実施、各種誘導体合成による構造活性相関の解明に寄与するものである。国内外でさがけて本成果をあげることに成功し、成果の一部に関しては学会発表を行っている。特筆すべき成果として、新規ホルモンである $\alpha 2$ の全合成、天然物の立体化学の決定に成功すると共に、ホルモン $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ の生合成に関する知見を得ることに成功した。本成果については、Nature Chemical Biology 誌に投稿中である。残念ながら $\alpha 2$ のプローブ化は困難であると考えられるが、 $\alpha 1$ をリガンドとする化学プローブの合成法は確立できたので、それらを用いて標的分子の解析を行うことが可能であると考えられる。

(2)研究分担者
無

(3)連携研究者
無

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)

[学会発表](計3件)

Arata Yajima, Makoto Ojika, Keisuke Shikai, Tadashi Imaoka, Tomoyo Asano, Jinhua Qi, Molli D. Shylaja, Harumi Kanazawa, Tomoo Nukada, Youji Sakagami, Goro Yabuta, Synthesis and SAR studies of Phytophthora mating hormone $\alpha 1$, IKCOC-11、2009.11、於京都

Arata Yajima, Synthetic studies on agriculturally important bioactive natural compounds、5th Sino-Japanese Symposium on Organic Chemistry for Young Scientists、2009.10 於 Chengdu

四海圭祐、今岡忠、浅野友世、威建華、Molli D Shylaja、金沢晴海、小鹿一、矢島新、額田恭郎、藪田五郎 疫病菌 *Phytophthora* の繁殖誘導ホルモン $\alpha 1$ の構造活性相関、日本農芸化学会年度大会、2009年3月、於福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢島 新 (YAJIMA Arata)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30328546