

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710252

研究課題名(和文) インドールアルカロイド notoamide 類の鏡像異性体が生合成される経路の解明

研究課題名(英文) Studies on the biosynthesis of the notoamides family of prenylated indole alkaloids

研究代表者

加藤 光 (Kato, Hikaru)

熊本大学・生命科学研究部(薬学系)・助教

研究者番号：20547129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：NotoamidesはAspergillus属真菌が産生するインドールアルカロイドである。今回、notoamidesの生合成経路を明らかにするために、それらの生合成中前駆体として推定している[13C,15N]notoamide Sの取込実験を行ったが、期待した化合物は得られなかった。しかし、Aspergillus属真菌の代謝産物中からnotoamide Sの存在が見出されたため、notoamide Sがnotoamidesの生合成に関わっていることが示唆された。本研究室では、やはりnotoamide Sがnotoamidesの生合成前駆体であると考え、現在、取込実験の条件検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：The notoamides are a family of prenylated indole alkaloids produced by the marine-derived Aspergillus sp. To understand the molecular bases for their biogenesis, we conducted a precursor incorporation experiment using synthetic, [13C,15N]-notoamide S. Unfortunately, compounds containing a bicyclic[2.2.2]diazaoctane core, such as notoamides B and stephacidin A, were not isolated from this feeding experiment. We isolated, however, notoamide S from cultures of Aspergillus sp. It is suggested that notoamide S is involved in biosynthesis of notoamides. Therefore, we think that notoamide S must be biosynthetic precursor.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生合成 インドールアルカロイド Aspergillus 取込実験

### 1. 研究開始当初の背景

天然物の中には、Diels-Alder 反応により生成したと考えられる化合物が多く発見されている。しかし、これまで、具体的に Diels-Alderase の存在が確認されている例は 3 種類のみであった。本応募者らは、2 種類の *Aspergillus* 属真菌から Diels-Alderase により生成されたと推定されるアルカロイドの鏡像異性体を 3 組単離し、生合成機構に関する研究を行っている。本研究を遂行することにより、第 4、第 5 の Diels-Alderase の発見が期待できる。

本申請者は、大学院在籍時に、塚本教授(当時、准教授)指導のもと *Aspergillus protuberus* が産生するインドールアルカロイド notoamide の研究を行なった。そして、平成 23 年 3 月から再び notoamide の生合成研究を任されている。本研究室では、これまでに、能登半島で採集したイガイ (*Mytilus edulis galloprovincialis*) 由来の本真菌から 22 個の notoamides を単離し、それらのうち 18 個の新規化合物を notoamides A-R と命名した。また、11 個は特徴的な bicyclo-[2.2.2]diazaoctane 環を有していた。一方、Gloer らは、ハワイのキノコ由来の *Aspergillus amoenus* から、(-)-stephacidin A、(+)-notoamide B および (-)-versicolamide B を単離した (Gloer *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 3573-3577, 2008)。これら 3 個の化合物は、本研究室において見出された化合物のエナンチオマーであり、このことから 2 種の近縁の真菌が 3 組のエナンチオマーを産生するということが明らかになった(図 1)。このように 2 種の真菌においてエナンチオマーが産生されるためには、それぞれの真菌において逆の面選択性を示す分子内 Diels-Alder (IMDA) 反応が進行しているのではないかと考えられた。すなわち、2 種の真菌が逆のエナンチオ選択的 Diels-Alderase を有する可能性を示唆してい

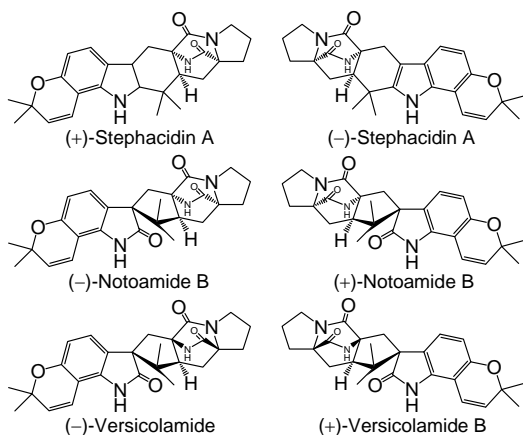


図 1 . 2 種の *Aspergillus* 属真菌から単離された 3 組のエナンチオマー

る。このことは、Nature Chemistry の Research Highlights で紹介された。

(<http://www.nature.com/nchem/reshigh/2008/0408/full/nchem.2008.3.html>)

### 2. 研究の目的

推定した IMDA 反応が進行していることを明らかにするために、はじめに、notoamides の生合成における前駆体として推定した notoamide E の  $^{13}\text{C}$  ラベル体の取込実験を行なった。その結果、notoamides C と D が見出されたが、IMDA 反応により生成すると考えられる化合物 (notoamide B など) は検出されなかった。これにより、IMDA 反応が進行する前駆体は notoamide E ではないことが明らかになった。

*A. protuberus* の培養物からは、IMDA 反応における中間体と想定される notoamides M と Q が単離されており、これによりピシクロ環の生合成に IMDA 反応が関与している可能性が強く示唆されている。そこで、同位体ラベル化された推定前駆体 (notoamide S) の取込実験を行い、IMDA 反応が進行する前駆体を調べることを目的とした。また、versicolamide B の生合成経路を調べるために、同位体ラベル化された 6-*epi*-Notoamide T の取込実験も行うことにした(図 2)。

### 3. 研究の方法

#### (1) [ $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ]Notoamide S の取込実験

*Aspergillus* 属真菌用の最小培地中、*A. protuberus* に対して [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]notoamide S の取込実験を行った。2 週間培養後、培養液をろ過し、菌体とろ液を *n*-BuOH で抽出した。それぞれの抽出液を合わせ、水と分配して脱塩した。*n*-BuOH 層の溶媒を除去し、残留物を *n*-hexane と 90% MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  で分配した。得られた 90% MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  層を ODS クロマトグラフィーで分画し、85% MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  で溶出する notoamides が豊富に含まれる画分を得た。その画分を ODS および phenyl-hexyl HPLC により精製し、8 種の notoamides を単離した。単離した化合物の構造は、各種 NMR スペクトルおよび MS スペクトルを解析することにより決定した。

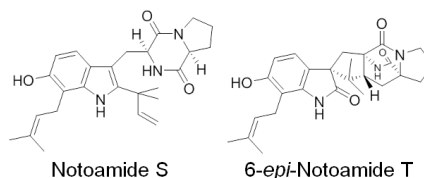


図 2 . Notoamide S と 6-*epi*-notoamide T の構造

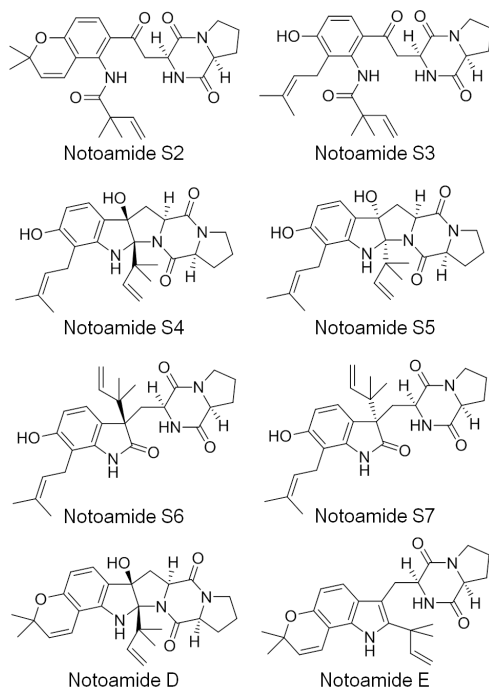


図 3 .  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ Notoamide S の取込実験により得られた化合物の構造

#### (2) $^{13}\text{C}$ 6-*epi*-Notoamide T の取込実験

6-*epi*-Notoamide T は、ピラン環を形成することで versicolamide B に変換されると考えられる。そこで、(1) と同様に、 $^{13}\text{C}$ 6-*epi*-notoamide T の取込実験を行った。2 週間培養後、(1) と同様に分画および精製し、8 種の notoamides を単離した。単離した化合物の構造は、各種 NMR スペクトルおよび MS スペクトルを解析することにより決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ Notoamide S の取込実験により得られた化合物の構造

$^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ Notoamide S を取り込ませて得られた 8 個の notoamides のうち、6 個は新規化合物 notoamides S2–S7 であり、2 個は既知化合物の notoamides D および E であった (図 3)。Notoamide S2 と S3 は、インドールの 2、3 位の二重結合が開裂しているのが特徴的で、このような notoamide は、取込実験でのみ見出されている。Notoamide S4 と S5 は、インドールの 2 位と窒素で環を形成していた。また、notoamides S6 と S7 は 2 位のイソプレニル基が 3 位にピナコール転移していた。このように、本取込実験において、これまでには見出されなかった特異な構造を有する notoamide 類縁体を産生させることに成功した。

また、今回の取込実験では、IMDA 反応が進行して生合成されたと思われる化合物は得られなかった。

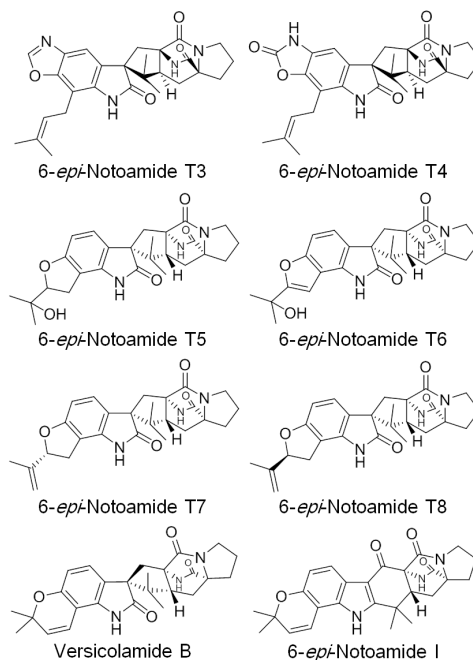


図 4 .  $^{13}\text{C}$ 6-*epi*-Notoamide T の取込実験により得られた化合物の構造

##### (2) $^{13}\text{C}$ 6-*epi*-Notoamide T の取込実験により得られた化合物の構造

$^{13}\text{C}$ 6-*epi*-Notoamide T を取り込ませて得られた 8 個の notoamides のうち、7 個は新規化合物 6-*epi*-notoamides T3–S8 および 6-*epi*-notoamide I であり、1 個は既知化合物の versicolamide B であった (図 4)。6-*epi*-Notoamide T3 は、6-*epi*-notoamide T のインドール環にオキサゾール環が付加され、かつピナコール転位を起こした構造であった。また、6-*epi*-notoamide T4 は、6-*epi*-notoamide T3 が酸化されたものであった。6-*epi*-Notoamides T3 および T4 のように、インドール環にオキサゾール環が結合した骨格は、天然物として初めて発見された。6-*epi*-Notoamide T5 は、6-*epi*-notoamide T がピラン環を形成せず、フラン環を形成し、かつピナコール転位した構造であり、また、6-*epi*-notoamide T6 は、6-*epi*-notoamide T5 が酸化された構造であった。6-*epi*-Notoamides T7 および T8 はエピマーとして得られ、6-*epi*-notoamide T5 から脱水が起こった構造である。6-*epi*-Notoamide T5–T8 のように、ピラン環の代わりにフラン環が形成された notoamides は初めて発見された。

##### (3) まとめ

最近、我々は、notoamides を産生する新たな真菌 *Aspergillus taichungensis* を入手した。現在、我々は、notoamides を産生する 3 種の *Aspergillus* 属真菌を保有している。そして、それらの菌から得られる notoamides には様々な立体異性体が存在しており、それらの

立体異性体は、3種の菌によって生合成される割合が大きく異なっている。Notoamide B を例に挙げれば、*A. protuberus* は - 体のみを産生するが、*A. amoenus* と *A. taichungensis* は + 体のみを産生する。このように異なる立体異性体が産生される仕組みを解明するため、引続き、推定生合成前駆体の取込実験を行っている。

ところで、共同研究者らが notoamide B などの推定生合成前駆体である notoamide S の取込実験を *A. amoenus* に対して行ったところ、期待通り notoamide B などの化合物が生合成された。我々は *A. protuberus* に対して notoamide S の取込実験を行ったが、期待した化合物は生合成されなかった。現在、取込実験の条件検討を行っている。なお、これまでは天然物としては存在の認められていなかった notoamide S を、今回、菌 C の代謝産物中から見出すことに成功した。これにより、notoamide S を含む推定生合成経路が実際に存在することが支持された。

また、これまでに notoamides の生合成研究のために推定生合成前駆体の取込実験を行い、多くの新規化合物が得られた。それらの化合物の中には、(±)-6-*epi*-notoamide T の取込実験で得られたオキサゾール環を有する 6-*epi*-Notoamides T3 および T4 など、新規な骨格を有するものも含まれている。Notoamides の生合成経路における特定の化合物が過剰に存在する条件下、何かしらのメカニズムで新たな生合成経路が活性化されたものと考えている。

#### 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)

Sunderhaus, J. D., McAfoos, T. J., Finefield, J. M., Kato, H., Li, S., Tsukamoto, S., Sherman, D. H., Williams, R. M. Synthesis and Bioconversions of Notoamide T: A Biosynthetic Precursor to Stephacidin A and Notoamide B. *Org. Lett.* **15** (1), 22–25 (2013)、査読有  
DOI: 10.1021/ol302901p

##### [学会発表](計5件)

賀儀山一平、中原高志、加藤光、塚本佐知子、*Aspergillus taichungensis* が産生する notoamide 類縁体の構造について、日本薬学会第 134 回年会、平成 26 年 3 月 28 日、熊本県(熊本大学)  
中原高志、加藤光、塚本佐知子、*Aspergillus* 属真菌が産生する新規インドールアルカロイド notoamides U–W の構造、日本薬学会第 133 回年会、平成 25 年 3 月 28 日、神奈川県(パシフィコ横浜)

加藤光、中原高志、山口道考、塚本佐知子、<sup>[13C, 15N]</sup>Notoamide S の取込実験により得られた新規 notoamides の構造、日本薬学会第 133 回年会、平成 25 年 3 月 28 日、神奈川県(パシフィコ横浜)  
中原高志、山口道考、加藤光、塚本佐知子、6-*epi*-Notoamide T の取込実験から得られた新規化合物の構造、平成 24 年 11 月 1 日、熊本県(熊本大学)  
中原高志、山口道考、加藤光、塚本佐知子、Notoamide 類のピラン環形成に関する生合成研究、日本生薬学会第 59 回年会、平成 24 年 9 月 17 日、千葉県(かずさアカデミアパーク)

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/shoyaku/site/TOP.html>

#### 6 . 研究組織

研究代表者

加藤 光 (KATO, Hikaru)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20547129