

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410171

研究課題名(和文) スピンラベル剤をトレーサーとした非侵襲の薬剤挙動計測法の開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive analysis for agricultural chemical

研究代表者

波多野 豊平 (Hatano, Bunpei)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20333990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビタミンCなどの生体内抗酸化物質に対して耐性を有するイソインドール骨格をもったニトロキシラジカルを合成し、その耐性試験をおこなった。本研究により、テトラエチルイソインドール誘導体が高い抗酸化物耐性を示すことが明らかとなり、今後の研究の展開が期待される。さらに、灰色カビ菌に有効とされるフルジオキソニル誘導体を合成し、その農業試験活性を検討し、ニトロキシラジカルを導入できる部位の特定に至った。

研究成果の概要(英文)：We developed new spin label reagents based of isoindole framework. The spin label bearing four ethyl groups showed strong resistance to the reduction using L-sodium ascorbate. We also developed agricultural chemical based on fludioxonil, which has antibacterial activity for Botrytis Cinerea. We found that NH part of pyrrole with fludioxonil played an important role in antibacterial activity.

研究分野：有機化学

キーワード：スピンラベル剤 ESR 農薬

1. 研究開始当初の背景

電子スピン共鳴 (ESR : Electron Spin Resonance) は不対電子 (ラジカル) を検出する分光法の一つであり、不対電子を持った金属、もしくは、有機ラジカルの検出に用いられている。最近では、Lバンド ESR法の発展によって、生体内のイメージング法 (ESR-CT法) が開発されており、この手法は、「生物中のラジカルを、生物が生きたままイメージングできる」点において、生物および医学の分野から注目されている分析手法である。ESR計測においては、スピン剤が用いられる (図 1)。

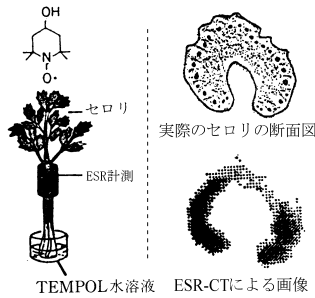


図 1 ESR-CT を用いたセロリの断面図
連携研究者 (尾形) 提供

スピン剤は、トラップ剤、プローブ剤、ラベル剤に大別され、例えば、ラベル剤は生体膜脂質などの生体機能を有する分子に導入され、その分子の生体内での周辺環境や運動状態の解析に用いられている (図 2)。

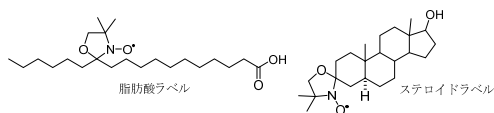


図 2

さらに、生体内をターゲットとした ESR 計測は、放射性同位体や蛍光を用いた他の計測法と比較して都合がよい。それは、「(1) 計測装置が簡易であり、野外での観測に適している。(2) 空間イメージングによる立体画像化に適している。(3) スピン部位が小さく、被ラベル分子の性質や機能を損なわずに導入できる。(4) 計測試薬の合成コストが安価である。」からである。ESR 計測は優れた生体計測法の一つであるが、その最大の問題点は、「ビタミン C によるニトロキシラジカルの還元」である。図 3 のように、スピン剤が、生体内に存在するビタミン C (L-(+)-ascorbic acid) によって ESR 不活性となるために、長期間の経時変化の測定は難しい。

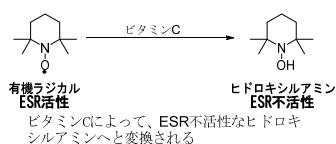


図 3

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) リンカー部位を有し、ビタミン C で失活しないスピンラベル剤の開発と (2) クリック反応を用いたスピンラベル部位の農薬への導入方法の確立である (図 4)。

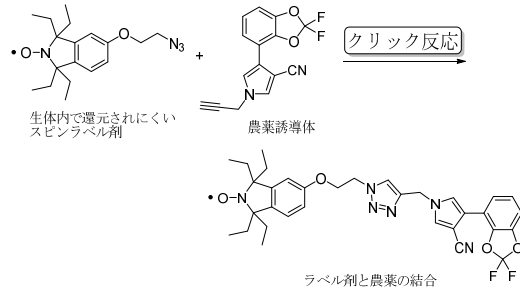


図 4

生体内に存在するビタミン C などの還元剤によって還元されにくいスピンラベル剤を開発することは、生体内の酸化酵素や活性酸素種の役割を解明する上で重要であり、これまでに、我々の研究室では CF-TMINO を報告している。しかし、CF-TMINO は合成とリンカー部位の導入が困難である。そこで、CF-TMINO と同等の耐還元性を有し、リンカー部分が導入可能なイソインドール骨格を基本骨格としたスピンラベル剤の合成を行う (図 5)。

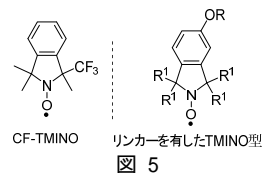


図 5

また、生体分子に関する研究において Sharpless らが提唱しているクリック反応を用いた例が数多く報告されており (図 6)、本研究においても、リンカー部位の導入にはクリック反応を用いた導入を目指す。

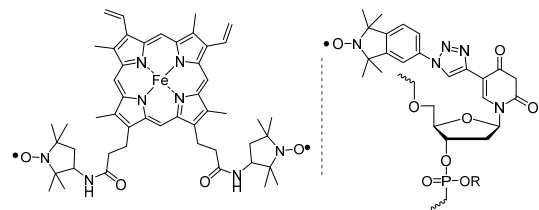


図 6

3. 研究の方法

(1) リンカー部位を有し、ビタミン C で失活しないスピンラベル剤の開発。

これまで、TMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) およびその誘導体が、スピンラベル剤として用いられてきた。しかし、生体内に多く存在するビタミン C に対する還元耐性は長くても数時間程度であると報告されており、生体内の計測に用いるためには、さらなる還元耐性の向上が求められている。

そこで本研究では、ビタミンCに対して耐還元性が良好である五員環骨格に着目し、中でも PROXYL 型をさらに発展させた、イソインドール骨格を基本骨格としたスピラベル剤の開発を行う。特に、後の農薬への導入を考慮し、足がかりとなる置換基を有したイソインドールニトロキシラジカルを合成し、ニトロキシラジカル周辺にかさ高い置換基を導入することでその耐還元性の向上を目指す(図7)。

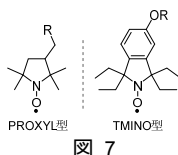


図 7

(2) クリック反応を用いたスピラベル部位の農薬への導入方法の確立。

殺菌剤を中心とする農薬は、多種多様な構造を有しており、それらにスピラベル剤を導入する簡便な導入方法の開発は、非常に重要である。そこで、本研究ではクリック反応に着目し、スピラベル部位の導入を試みる。クリック反応とは、銅触媒存在下、末端アセチレンとアジド化合物から 1,2,3-トリアゾール環を形成する反応であり、副反応が非常に起きにくい反応である。クリック反応を利用したスピラベル部位の導入を代表的な殺菌剤であるフルジオキシニル(商品名:セイビア)に対して行いその農薬活性評価をおこなう。

4. 研究成果

(1) リンカー部位を有し、ビタミンCで失活しないスピラベル剤の開発。

- スピラベル剤の合成ルートの開発 -

まず、図8の合成スキームにより、イソインドール骨格を持つスピラベル剤を合成した。安価に入手できる *m*-アニス酸(2)をブROM化して臭化物3を合成し、次にメタノール中、硫酸触媒存在下、エステル4を合成した。次に、エステル4をエチルマグネシウムプロミドと反応させ、アルコール5aを得た。この反応の際に副生成物として2級アルコール6aが得られたため、TEMPOで酸化し、エチルマグネシウムプロミドと反応させてアルコール5aに導いた。本副生成物の、酸化、エチル基の導入により、全体としてアルコール5aを収率90%で得ることができた。次に、アルコール5aを脱水し、オレフィン8aに変換した後、低温で *n*-ブチルリチウムを作用させ、DMFを反応させることでアルデヒド9aを高収率で得た。次に、塩基性条件下で、塩化ヒドロキシルアンモニウムで処理し、オキシム10aとし、オキシム10aを還元してヒドロキシルアミン11aに導いた。ヒドロキシルアミン11aのReverse-cope環化により、イソインドール誘導体12aを合成し、酸化反応とエチル基の導入を繰り返すことで、ヒドロキシルアミン16aを得た。最後に、NaWO₄触媒

存在下、過酸化水素を作用させて、スピラベル剤1aを合成した。同様にして、テトラメチル体1bも合成した。

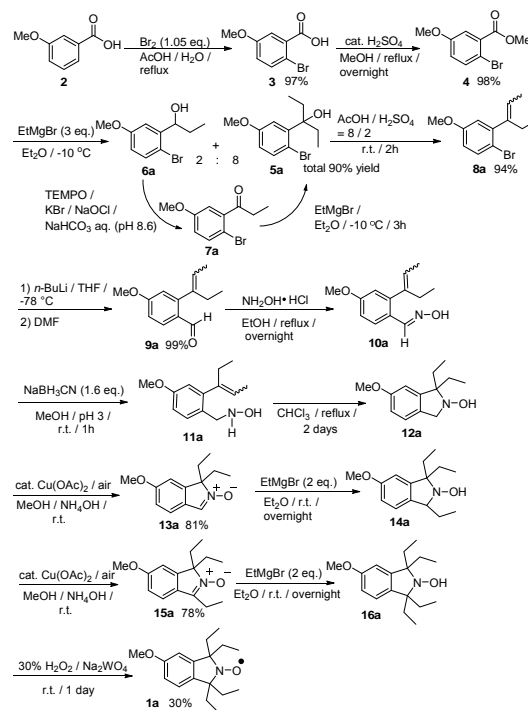


図 8

- スピラベル剤の ESR 評価 -

合成したスピラベル剤(1a (TEIO型)および1b (TMIO型))に対して ESR 測定を行った。両スピラベル剤(1aおよび1b)とも吸収線の数、g 値および超微細結合定数(a_N)においてニトロキシラジカルに特徴的なスペクトルを示した(図9)。

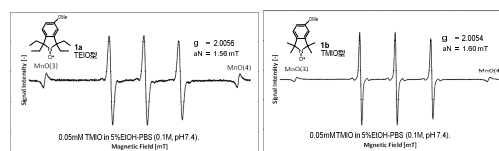


図 9

次に、合成したスピラベル剤を用いて、ビタミンCによる還元耐性の比較を行った。比較対象として、一般に広く用いられている PROXYL 型のスピラベル剤を用いた(図10)。

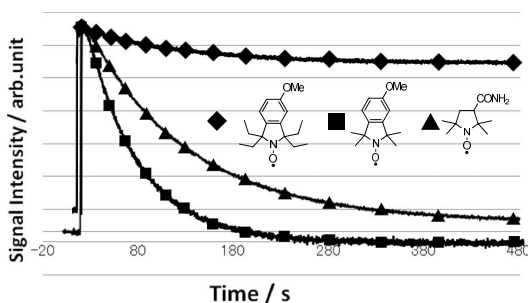


図 10

スピラベル剤 1a (TEIO 型) および 1b (TMIO

型)、比較対象として PROXYL 型のスピラベル剤に対して 1000 倍濃度のビタミン C (L-(+)-ascorbic acid)を加え測定を行った。TMIO 型ならび PROXYL 型は、測定開始から急激なラジカルの減少が見られた。一方、TEIO 型は、ゆるやかにラジカル濃度が減少した。図 10 より還元反応における初期段階の反応速度定数 k を求めたところ、1a (TEIO 型)の場合、 $9.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、1b (TMIO 型)の場合、 $22.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、比較対象として用いた PROXYL 型は、 $13.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であった。

反応速度定数において、大きな差が見られなかったため、ビタミン C 存在下におけるニトロキシラジカルの残存率の評価を行った。結果を図 11 に示す。スピラベル剤 1a (TEIO 型)および 1b (TMIO 型)、比較対象として PROXYL 型のスピラベル剤に対して、ビタミン C 存在下、ニトロキシラジカルの初期濃度に対する残存率の変化を 1, 4, 8, 15, 29 日後に測定した。1 日後に、スピラベル剤 1a (TEIO 型)では、51%の残存率を示した。一方、エチル基をメチル基に変換した 1b (TMIO 型)では、ビタミン C に対する還元耐性を示さず、ニトロキシラジカルの残存率は 0%であった。また、比較対象物である PROXYL 型では、8%まで減した。スピラベル剤 1a (TEIO 型)は、4 日、8 日、15 日後においても高い残存率を示し、15 日後においては、26%の残存率を示した。一方、PROXYL 型では 4 日後から 5~10%程度の残存率であり、スピラベル剤 1a (TEIO 型)は、優れた耐還元性を示すことが明らかとなった。

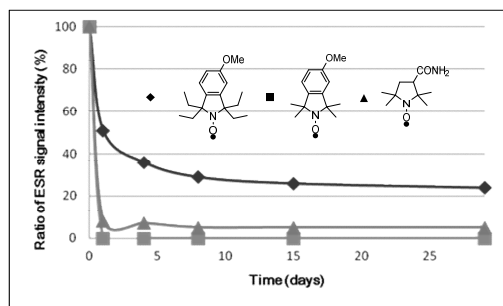


図 11

このように、スピラベル剤 1a (TEIO 型)は、図 10 のような数時間程度の初期減少速度においては、他のスピラベル剤との明確な違いが見られなかったものの、ラジカル残存率においては、優れた特性を示した。今後、実際の生体内 ESR 計測を行い、スピラベル剤 1a (TEIO 型)の有用性を明らかにしていきたい。

(2) クリック反応を用いたスピラベル部位の農薬への導入方法の確立

- スピラベル部位の合成 -

まず、農薬とのクリック反応を行うスピラベル部位の合成を行った。合成スキームを図 12 に示す。また、本段階では、農薬の活

性部位について考察を施すため、合成がより簡単な PROXYL 型スピラベル剤を用いて検討を行っている。

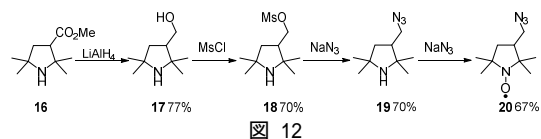


図 12

エステル 16 を、 LiAlH_4 を用い還元し、アルコール 17 を 77%収率で得た。次に、アルコール 17 に対して MsCl を作用させ、メシル体 18 としたのちに、 NaN_3 と反応させ、アジド基 19 へと導いた。最後に、 Na_2WO_4 を触媒として、ラジカル化反応を行い、ニトロキシラジカル 20 を 67%収率で得た。

- スピラベル部位を持った殺菌剤フルジオキソニル誘導体の合成 -

次に、スピラベル部位を持った殺菌剤フルジオキソニル誘導体の合成を行った。また、比較検討のため、ニトリル部位をアルデヒドに変換したアルデヒド 24 の合成も行った。

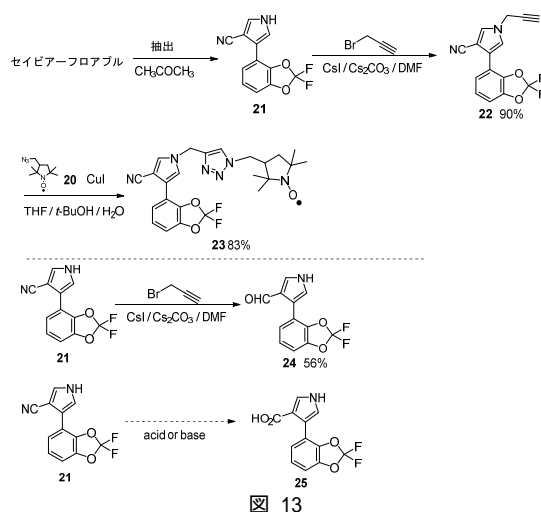


図 13

市販のセイピアフロアブルからフルジオキソニル 21 を抽出し、ピロール部位にプロパルギル基を導入することで、フルジオキソニル誘導体 22 を合成した。最後に、ニトロキシラジカル 20 とのクリック反応を行い、スピラベル部位を持ったフルジオキソニル誘導体 23 を高収率で合成した。本クリック反応では、遮光条件下でクリック反応を行わないと、誘導体 23 は得られず、原料が回収された。活性部位の検討のために、ピロール環のニトリル部位を変換したアルデヒドにアルデヒド 24 の合成も効率よく進行した。しかし、カルボン酸誘導体 25 の合成では、酸、塩基において種々の条件を検討したが、反応は進行せず、フルジオキソニルの骨格も回収できなかった。今後、さらに誘導体合成のルートを検討していく予定である(図 13)。

- スピラベル部位もった農薬誘導体の農薬活性試験 -

合成した農薬誘導体の農薬活性試験を行い、誘導体の農薬活性度合いを検討した。以下に測定結果を示す(図 14)。なお、検討条件は、菌株として *Botrytis cinerea* を用い、試験試料は、各誘導体 100 mM の DMSO 溶液を調整後、界面活性剤 5 % の水溶液で希釈し、1 mM とし、ペーパーディスクにしみこませたものを試料とした。培養は、*Botrytis cinerea* のコロニーをシャーレ中央に移植後、25 °C で 2 日間、培養後、抗菌活性を目視で判断した。

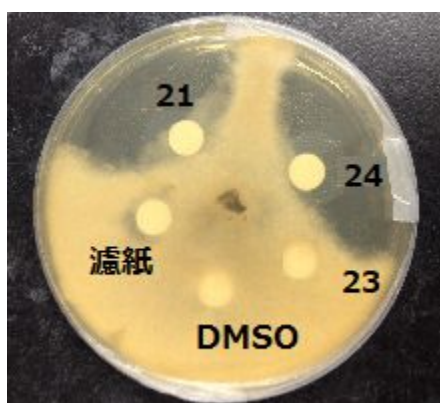


図 14

合成した農薬誘導体を灰色カビに対して試験したところ、スピラベル剤を有する誘導体 23 では全く活性を示さなかった。これに対して、アルデヒド誘導体 24 では、フルジオキソニル 21 と同等の農薬活性を示したことが分かった。このことより、フルジオキソニルの活性部位の一つは、ピロール環の NH 部位であると推測でき、スピラベル剤の導入は、この位置以外で導入する必要があることが明らかとなった。今後、作物内での農薬の浸透移行過程などを明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. M. Kusakari, Y. Ohta, H. Nakagawa, H. Katagiri, T. Kijima, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Enantio-resolution of 2-methoxy-2-(1-naphthyl)propionic acid using diastereomeric salt formation with chiral phenylethylamine", *Tetrahedron Lett*, **2014**, *55*, 4114 - 4116. (査読あり)

〔学会発表〕(計 19 件)

1. S. Kishimoto, T. Kijima, W. Fujiwara, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Optical resolution of 1,2-diphenylethylenediamine using diastereomeric salt formation method", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.

2. Y. Takino, T. Kijima, W. Fujiwara, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Alcohol oxidation reaction using nitroxyl radical as catalyst", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
3. H. Tanno, T. Kijima, W. Fujiwara, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Synthesis and application of C2-symmetric chiral pyrrolidine ligand", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
4. B. Hatano*, Y. Saito, T. Kijima, W. Fujiwara, S. Murakami, S. Matsuba, "Synthesis and properties of nitroxyl radical based on isoindole derivative", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
5. X. Sun, T. Kijima, W. Fujiwara, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Triflate catalyzed allylation of N, S-acetals using allylsilane reagent", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
6. W. Fujiwara, T. Kijima, S. Murakami, S. Matsuba, B. Hatano*, "Asymmetric synthesis of M₂NP acid using a chiral auxiliary", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
7. Y. Taguchi, Y. Nakazawa, R. Mashiko, B. Hatano*, S. Murakami, T. Kijima, "Synthesis of optically organoselenidees using chiral auxiliaries", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
8. P. Samori, Y. Yoshida, M. Kusakari, S. Murakami, B. Hatano*, N. Ohya, T. Kijima, "Effect of alkyl tail length of allylic substrate analogs to the enantioselectivity of farnesyl pyrophosphate synthase from *Geobacillus stearothermophilus*", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
9. N. Suzuki, T. Ooi, S. Murakami, B. Hatano*, T. Kijima, "Development of biosensor system by degradation of azo dyes using azoreductase from *Geobacillus stearothermophilus*", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
10. T. Kijima, K. Shimizu, S. Murakami, B. Hatano*, N. Ohya, "Facile dynamic kinetic resolution of amino acid esters in organic media by enzymatic hydrolysis combined with racemases from *Pseudomonas putida*", *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.
11. X. Wang, N. Satio, B. Hatano*, S.

Murakami, T. Kijima, “ Redox-responsive vesicles prepared from double armed alkyl ferrocene with aza-18-crown-6 ether molecules ” , *PACIFICHEM 2015*, Dec. 15 - 20, (2015), Honolulu, Hawaii.

〔その他〕

ホームページ等

<http://hatano.yz.yamagata-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

波多野 豊平 (HATANO, BUNPEI)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20333990

(2)連携研究者

尾形 健明 (OGATA, TATEAKI)

山形大学・大学院理工学研究科・名誉教授

研究者番号：50091830

木島 龍朗 (KIJIMA, TATSURO)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：50272084

伊藤 智博 (ITO, TOMOHIRO)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：60361276