

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：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460026

研究課題名(和文) 藻類成長促進因子を分子標的とした革新的防藻剤の創製

研究課題名(英文) Development of an efficient inhibitor of green-algal morphogenesis inducer

研究代表者

山本 博文 (Yamamoto, Hirofumi)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：70461366

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)：グリーンタイドとは、一般的に、沿岸部等を真緑もしくは黄緑色に変える現象で、数種の微細緑藻類やアナアオサなどの緑藻類が異常増殖した状態である。グリーンタイドは、毎年、漁業や水産業等に甚大な被害や影響を及ぼすことから、今回、その発生を予防・防止するための防藻剤の創製を試みた。そして、緑藻類の成長必須因子であるサルーシンの構造活性相関研究を通じて、サルーシンに競合拮抗する防藻剤候補化合物を見出した。また、独自開発した酵素分割法を用いて、防藻剤候補化合物の不斉合成法を確立し、光学活性体およびその蛍光標識体の不斉合成を達成した。

研究成果の概要(英文)：Green tide is a common name for a phenomenon known as an algal bloom when it is caused by a few species of green microalgae and green algae such as *Ulva pertusa*. The bloom is usually found in coastal area to dye over green or yellowish green color. Because green tide causes damage to many coastal fisheries every year, we have attempted the synthesis of an effective inhibitor of green-algal morphogenesis inducer 'Thallusin' with the aim to prevent the occurrence of green tide. Thallusin, isolated from a marine bacterium, is the only known natural product induces formation of foliaceous morphology from the cellular state of green algae. On the basis of a structure-activity relationship study with Thallusin, we found out the competitive inhibitor at low concentrations. Moreover, we have established a synthetic pathway to the optical active inhibitor by utilizing enzymatic hydrolysis resolution. Asymmetric synthesis of the fluorescence-labeled inhibitor was also achieved.

研究分野：合成化学

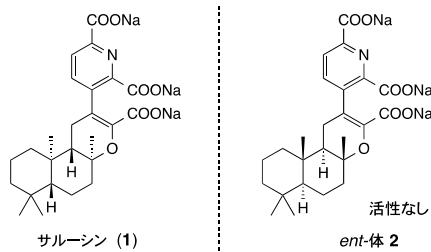
キーワード：不斉合成 蛍光標識物質 防藻剤 グリーンタイド

1. 研究開始当初の背景

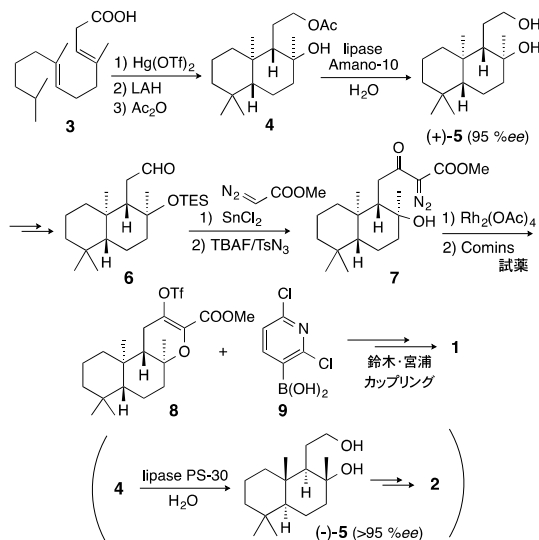
世界各地の海洋や湖沼を生息域とした緑藻類は、水質の維持や浄化において重要な役割を担っており、水生生態系の主要な歯車として機能している。しかし、近年では、温暖化に伴う水質の変化や人的な水質汚染等が引き金となって、しばしば異常増殖し、ある海域ではグリーンタイド(緑潮)とよばれる異様な緑海を作りだし、時には、ため池や湖水等を真緑色に染めるアオコの原因の一つとなる。緑藻類の爆発的な増殖現象は、自然環境への打撃はもちろんのこと、他の水棲生物や魚の死滅・腐敗をまねくことから、漁業をはじめ、取水源としての利用等にも甚大な被害を与えており、沿岸住民への健康被害も懸念されている。しかし、現段階においては有効な防止・予防策はない。最近では、東北地方の湖やため池の放射能汚染を除染する作業を苦しめる要因にもなった。

2. 研究の目的

このような背景のもと、今回、緑藻類の成長促進因子サルーシンに着目し、これを模造した拮抗物質(アンタゴニスト)を創製することで、緑藻類特異的な防藻剤(グリーンタイド防止剤)の開発を試みた。



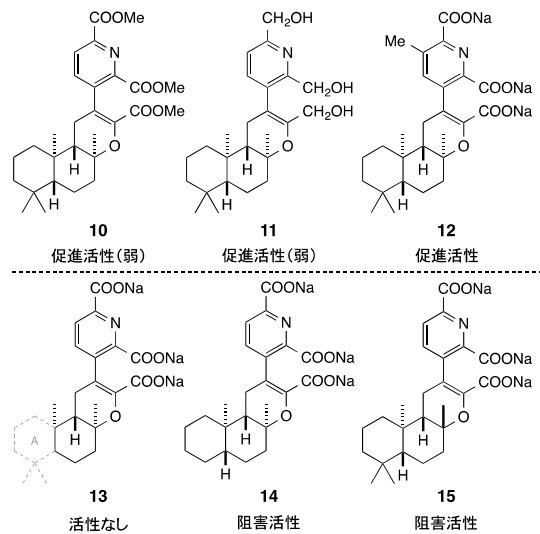
スキーム1 サルーシンの改良合成法



2005年、海洋バイオ研の松尾らによって、藻類の付着バクテリア *Zobellia uliginosa* の培養上清から、緑藻類の成長過程に不可欠な因子としてサルーシン(1)が単離・構造決定された [*Science*, 2005, 307, 1598]. 葉状体としての意味をもつ「*thallus*」と、導くの「*induce*」を

名前の語源とするサルーシン (thalassin) は、緑藻類の生活環において最も重要な葉状形態形成の過程を僅か最小有効濃度(MEC)1 ag/mL (10^{-18} g/mL)で誘導する。サルーシンが発見された当時は、この類い稀な作用と活性の力価から、その作用メカニズムにも注目が集まったが、天然から抽出されるサルーシンが極少量(180 Lの培養液を用いても僅か0.14 mg)に制限されるため、具体的な検討には至っていない。このような背景のもと、報告者らは23年度 JST A-steps 探索ステージにより、サルーシンの化学的供給を目的とした全合成研究に着手した。そして、サルーシンのラセミ体(1と2の1:1混合物)全合成を経て、二度にわたる抜本的な改良を重ね、光学的に純粋な1と活性を全く示さないent体2のつくり分けに成功した。

サルーシン誘導体と構造活性相関



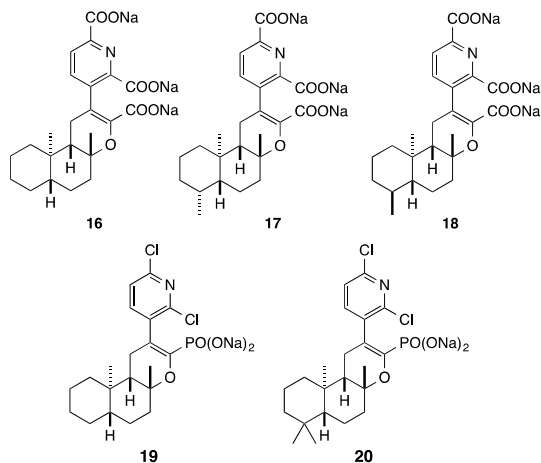
さらに、構造活性相関研究の一環として、その類似体を合成し、マキヒトエ(緑藻の一種)に対するアッセイ試験を行うことで、マキヒトエがサルーシンのテルペン骨格を極めて厳密に認識していることを突き止めた。テルペン骨格の重要性を裏付ける興味深い知見として、A環部の2つのメチル基を取り除いた14や、B/C環部の核間メチル基を反転した15が、サルーシンとは真逆の活性となる成長抑制作用を示すことを見出した。この14と15については、香川県下において毎年緑藻由来のアオコ被害が問題になるため池の水を(水質処理業者のご協力のもと)採取し、効果を確認したところ、有意な成長抑制効果を示すことが分かった。しかし、その増殖を完全に抑制するためには、少なくとも100~1000 pg/mL以上の14もしくは15の添加が必要になる。そこで今回は、この藻類成長抑制効果を実用的な防藻剤として具現化するため、14と15をシード化合物とすることで、さらに強力な防藻剤候補化合物の創製を試みた。また、緑藻-サルーシン関連系によって引き起こされる一連の成長(増殖)カスケードを解

明するため、防藻剤候補化合物の蛍光標識体を作製した。

3. 研究の方法

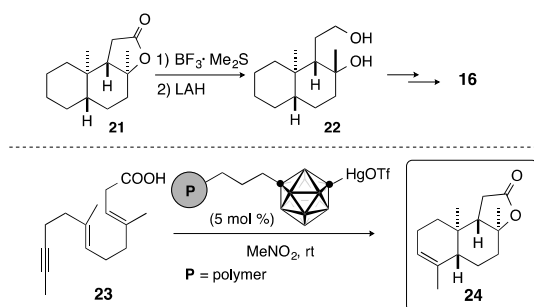
まず、抑制効果を確認した **14** と **15** を化学的にハイブリダイゼーションした **16** や、その類似体 **17**, **18**, **19** を網羅的にラセミ合成した。具体的な合成法についてはスキーム 2 に示す。

防藻剤候補化合物



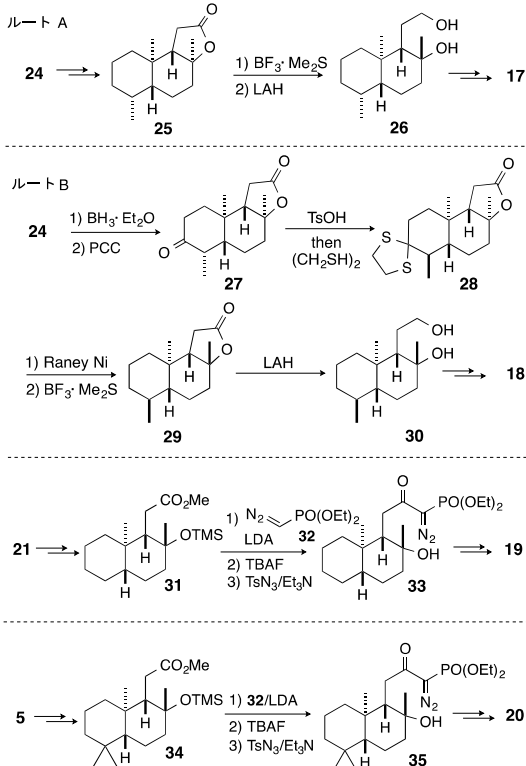
化合物 **16** に関しては、既に確立した **14** と **15** の合成法を組み合わせることで達成できた。また、**17** と **18** の合成においては、報告者らが新たに開発した不均一系触媒（カルバボラニル水銀トリフラート）を用いて効率的に調製可能な三環性化合物 **24** を共通の合成中間体として利用した。

スキーム 2 **16**, **24** の合成ルート



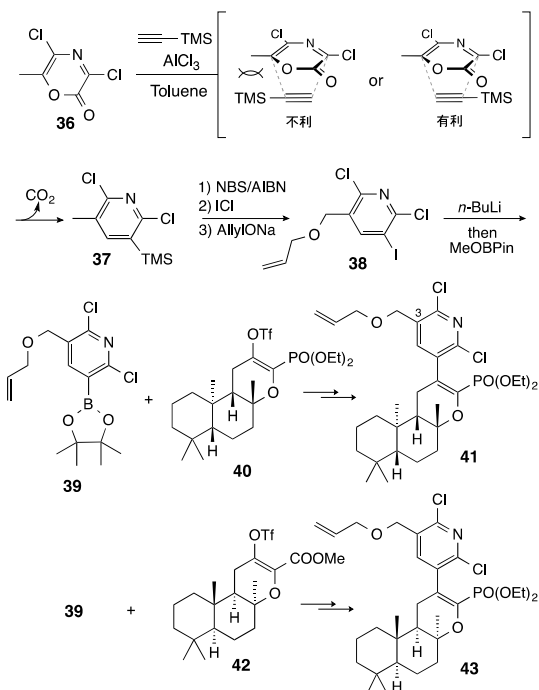
つまり、スキーム 3 に示すように、**24** の二重結合を速度論的に還元後、 $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$ 錯体を添加して、熱力学的に安定な **25** へと核間メチル基を反転したのち、ジオール **26** とするルート A と、**24** にカルボニル基を導入して α -メチル基を異性化した後に、**28** からの脱硫、核間メチル基の反転を行うルート B に分けてジアステレオ選択的な合成を行った。**19**, **20** のリン酸誘導体については、**32** に示したリン酸アジドを従来法に応用することで合成できた。

スキーム 3 **17-20** の合成ルート



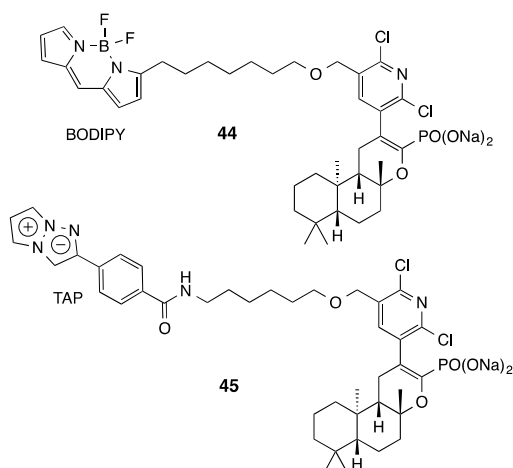
合成した化合物群はマキヒトエの遊走子に添加し、サルーン添加系をポジティブコントロールとして、その阻害活性を確認した。この成果として、化合物 **20** に強力な成長抑制効果を見出した。

スキーム 4 メタセシス反応を利用した蛍光標識体



ついで、エナンチオディファレンシャル法の利用を念頭に、光学活性な **20** の蛍光標識体合成に取り組んだ。一般的に、蛍光標識体の合成において問題となるのは、「どのような

蛍光物質をどの位置へ導入するか」という問題である。本関連化合物への導入箇所については、これまでの構造活性相関研究の知見から、ジピコリン酸部位の3位が最適だと考察していた。したがって、メタセシス反応により蛍光プローブを導入する前提で、3位にアリル基を有する光学活性な **41** と **43** の合成を目指した。それらの合成において鍵となる **39** の調製から述べる(スキーム4)。



シアノヒドリンから単段階で調製可能な **36** に対して、 AlCl_3 存在下、トリメチルシリルアセチレンを反応させた。本反応では、メチル基の立体障害を避けた位置選択的なアザヘテロ型のディールス・アルダー反応が進行し、**37** が良好な収率で生成した。次いで、NBS, AIBN 存在下、メチル基をプロモ化し、ICI を添加して TMS 基をヨウ素に変換したのち、アリルアルコキシドと反応させることで **38** へと変換した。続いて *n*-BuLi を添加し MeOBPin で処理することで目的の **39** とした。その後、独自開発した酵素分割法から調製した光学活性な両エナンチオマー **40**, **42** と鈴木宮浦カップリング反応することで **41**, **43** とした。最終的には、アリル基を有する種々の蛍光プローブとクロスメタセシス反応することで、有力な分子ツール候補化合物 **44**, **45** の両エナンチオマーの合成を達成した。

4. 研究成果

水質浄化の目的で、これまでも様々な藻類除去薬が開発されてきた。しかし、これらの薬効は強酸化作用や細胞毒性に基づくため、その他の水棲生物やバクテリア等が共存する環境(自然界)への使用は制限されている。したがって、毎年各地で問題となるグリーンタイドは、それぞれの自治体が自主的に年間数千万円もの費用を投じて、人的に回収し廃棄している。しかし、まったく処理が追いつかないのが現状で、夏場には腐敗や悪臭に関する被害があとを絶たない。現在、これらの問題は温暖化に伴って日本やヨーロッパ諸国を中心に世界規模で広がりつつあり、有効な防止策や防藻剤の開発が待ち望まれると

ころである。このような状況を踏まえれば、今回報告者が見出した防藻剤候補化合物は、これまで懸案であった緑藻の大繁殖を防止するための有効な一手になる。本研究は、今や環境問題として位置づけられた緑藻被害の解決策として、自然環境に配慮した全く新しい防藻剤の開発を目指した研究であり、こういった取り組みや成果の集積が、今後の水生生態学や生物学の基盤となって、生態系バランスの整った豊かな環境の継続と実現に寄与するものと確信する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. H. Yamamoto, N. Yamasaki, H. Hamauchi, S. Shiomi, I. Sasaki, K. Seyama, Y. Mima, M. Nakano, T. Kawakami, H. Miyataka, Y. Kasai, H. Imagawa. A Heterogeneous Mercury Salt Catalyst Stabilized by *m*-Carbaborane. *RSC Adv.*, **2015**, 5, 94737- 94742.
2. H. Yamamoto, Y. Takagi, T. Oshiro, T. Mitsuyama, I. Sasaki, N. Yamasaki, A. Yamada, H. Kenmoku, Y. Matsuo, Y. Kasai, H. Imagawa. Total Synthesis of (-)-Thallusin; Utilization of Enzymatic Hydrolysis Resolution. *J. Org. Chem.*, **2014**, 79, 8850-8855.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 山本博文: 塩メタセシス反応を用いた効率の触媒反応系の構築と機能性分子探索への応用, 有機合成化学協会中国・四国支部会(広島), 平成 28 年 11 月
2. H. Yamamoto, Y. Takagi, T. Oshiro, T. Mitsuyama, N. Yamasaki, Y. Kasai, H. Imagawa, H. Kenmoku, Y. Matsuo, Synthesis of a Series of Thallusin Analogues and their Growth Promoting Activity for Green Macroalgae, International Symposium on Natural Products for the Future 2016, 平成 28 年 9 月
3. 木下優太郎, 山本博文, 平岡雅規, ヒロハノヒトエグサの成長と成熟に対する形態形成誘導物質サルーシンの影響, 日本藻類学会第 40 大会(東京), 平成 28 年 3 月
4. H. Yamamoto, Y. Takagi, T. Oshiro, T. Mitsuyama, I. Sasaki, N. Yamasaki, A. Yamada, H. Kenmoku, Y. Matsuo, Y. Kasai, H. Imagawa. Total Synthesis of (-)-Thallusin, The Inaugural Symposium, The Phytochemical Society of Asia 2015, 平成 27 年 9 月
5. 三間靖子, 山崎直人, 葛西祐介, 山本博文, 今川 洋, *m*-カルバボラニル水銀トリフラートをを用いたファルネシルジエン誘導体のタンデム環化反応, 日本薬学会第 135 年会(神戸), 平成 27 年 3 月
6. 大住悠介, 山田晃代, 久米あかね, 葛西祐介, 山本博文, 今川 洋, サルーシンの

アンタゴニストを指向した類縁体の合成
研究, 日本薬学会第 135 年会(神戸), 平
成 27 年 3 月

〔その他〕

徳島文理大学薬学部薬品製造学教室

ホームページ : <http://p.bunri-u.ac.jp/lab04/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 博文 (YAMAMOTO, Hirofumi)

徳島文理大学・薬学部薬学科・准教授

研究者番号 : 7 0 4 6 1 3 6 6

(2) 連携研究者

兼目裕充 (KENMOKU, Hiromichi)

徳島文理大学・生薬研究所・准教授

研究者番号 : 1 0 3 9 9 4 3 8