

令和元年6月13日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03292

研究課題名(和文) 不良土壌を緑地化する革新的農薬の分子設計：ムギネ酸類のケミカルバイオロジー研究

研究課題名(英文) Molecular design of innovative agrochemicals for greening of infertile soil:
chemical biology of mugineic acids

研究代表者

難波 康祐 (NAMBA, Kosuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：50414123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、不良土壌を緑地化する革新的農薬の開発を目指し以下の成果を得た。

1. 天然の鉄キレート剤である2'-デオキシムギネ酸(DMA)の構造を改変した安価誘導体PDMAを開発し、PDMAが天然のDMAよりも優れた植物成長促進効果を示すことを明らかにした。ついで、PDMAの大量合成法を確立し実際に60g以上のPDMAを合成した。得られたPDMAを用いて圃場試験を実施し、PDMAの投与によってアルカリ性不良土壌でもイネが正常に生育することを確認した。
2. ムギネ酸・鉄錯体トランスポーターの標識プローブの開発に成功し、イネおよびオオムギの根に発現しているトランスポーターの可視化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全世界の陸地の約1/3は農耕に適さないアルカリ性の不良土壌で占められており、アルカリ性不良土壌での農耕の実現は食料問題を解決する有効な手段の一つとして期待されている。このため、本研究課題で開発されたPDMAとその実用化がもたらす社会的意義は極めて大きく、アルカリ性不良土壌を用いた圃場でイネの生育を達成した今回の成果は砂漠地域の緑地化を実現するための第一歩を踏み出したと言える。また、新たな概念に基づいて設計したムギネ酸・鉄錯体トランスポーター標識プローブの成功は、トランスポーターを標識する新手法として学術的にも大きな意義がある成果と言える。

研究成果の概要(英文)：In this research project, development of innovative fertilizer on alkaline soils was investigated, and the following results were obtained.

1. We have developed an inexpensive analog PDMA that modifies the structure of the natural iron chelator 2'-deoxymugineic acid (DMA) and revealed that PDMA has a better growth effect than natural DMA. Then, large scales synthesis of PDMA was established, and more than 60g of PDMA was actually synthesized. Field experiments were conducted using the synthetic PDMA, and it was confirmed that rice growth normally even in alkaline soils by the application of PDMA.
2. We succeed in developing a probe that specifically labels Fe(III)-mugineic acid transporter, and visualization of the transporter expressed on the roots of rice and barley was achieved.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ムギネ酸 アルカリ性不良土壌 ムギネ酸・鉄錯体 鉄イオントランスポーター ファイトシデロフォア 実用的合成 トランスポーター標識 低分子プローブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、世界人口は急激な増加の一途を辿っており、2050年頃には深刻な食糧危機に直面することが懸念されている。このため、全世界の陸地の約1/3を占めるアルカリ性不良土壌で農耕を実現させる手段の開発が期待されている。アルカリ性不良土壌では植物は鉄欠乏症を引き起こし枯れてしまうことが知られているが、我々はイネ科植物が根から分泌する鉄キレート剤である2'-デオキシムギネ酸(DMA)をイネの培地に添加すると、アルカリ性不良土壌でもイネが正常に生育することを見出した。しかしながら、DMAは土壌で容易に分解されること、また多大な合成コストを要することなどが肥料としての実用化に向けた大きな障壁となっていた。

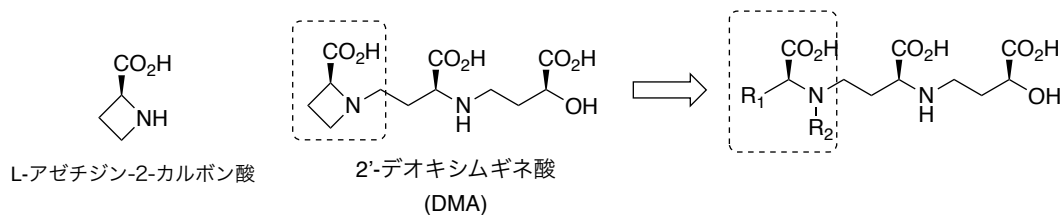
2. 研究の目的

本研究では、DMAの機能をより高め、かつ安価に供給可能な誘導体を開発し、アルカリ性不良土壌での農耕を実現可能にする革新的肥料を供給することを目的とする。

上記の目的のためには、イネ科植物の根に存在するムギネ酸・鉄錯体トランスポーターを通過する誘導体の開発が必要となる。DMA誘導体のスクリーニングに加え、誘導体の分子設計の指針を得るために、トランスポーターの3次元構造およびムギネ酸・鉄錯体を取り込んだ複合状態でのトランスポーターの構造解明を試みる。また、誘導体の有効な投与方法などを明らかにするために、誘導体の植物体内での挙動の解明、根に発現しているトランスポーターの挙動を解明する新たな分子プローブの開発などについても取り組む。

3. 研究の方法

(1) DMAの合成コストが高くなる最も大きな要因は、原料に高価なL-アゼチジン-2-カルボン酸が必要であることであった。また、土壌中での安定性の低さはL-アゼチジン-2-カルボン酸の4員環の歪みに由来することが予想された。原料コストと安定性の問題を同時に解決すべく、L-アゼチジン-2-カルボン酸を安価なアミノ酸に置き換えた誘導体を合成し、それらの活性と土壌での安定性を評価する。



(2) 上記の検討で見出した新規誘導体の大量合成法を確立する。ついで、この誘導体を用いてアルカリ性不良土壌での圃場試験を実施し、肥料としての有効性を確認する。

(3) トランスポーターの3次元構造を解明するため、トランスポーターの結晶化を容易にするトランスポーター阻害剤を開発する。すなわち、ムギネ酸にかさ高い置換基を導入し、トランスポーターの通過阻害活性を評価する。

(4) ムギネ酸の挙動を追跡するためのプローブ開発：独自に開発したコンパクト蛍光分子1,3a,6a-トリアザペンタレンの蛍光特性評価と高機能化を行う。

(5) トランスポーターの挙動を可視化するため、トランスポーターを特異的に蛍光標識化する手法の確立を行う。上記(3)で開発したトランスポーター阻害剤に光親和性標識基と蛍光基を導入した分子プローブの合成と評価を行う。

4. 研究成果

(1) L-アゼチジン-2-カルボン酸の代わりにL-プロリン、L-ピペコリン酸、グリシン、N-

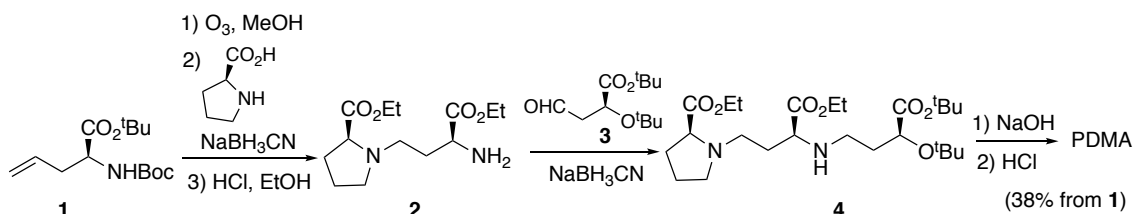
メチルグリシン、β-アラニン、5-アミノ吉草酸を導入した DMA 誘導体を合成した。合成した各誘導体を用いてイネの成長促進活性を調査したところ、L-プロリンおよび L-ピペコリン酸誘導体が天然の DMA を上回る優れた成長促進活性を示すことを見出した。一方、グリシン等の鎖状の誘導体は成長促進活性を示さなかったことから、鉄輸送活性には環状構造が必要であることが明らかとなった。また、L-プロリン誘導体 (PDMA) および L-ピペコリン誘導体 (PiDMA) の土壌中での安定性は大幅に向上しており、一度の投与で成長促進活性が長期間保持されることも明らかとなった。

【特許取得】 「新規な複素環含有アミノ酸化合物及びその用途」 難波康祐、村田佳子、番号 6347396、取得年 2018 年

(2) 上記で見出した環状誘導体のうち、原料の入手容易性を考慮して L-プロリン誘導体 (PDMA) を実用化のリード化合物として決定した。PDMA を基に、更なる構造活性相関を行なった結果、優れた土壌安定性を示す誘導体が得られた。

【特許出願】 「複素環含有アミノ酸又はその塩、並びにそれを用いた肥料及び植物成長調整剤」 難波康祐、鈴木基史、米良茜、特願：2018-160612、出願年 2018 年

圃場試験を行うために以下の PDMA の大量合成法を確立した。すなわち、丸岡触媒によって容易に入手可能な L-アシルグリシン **1** を出発原料とし、オゾン酸化を行なった後、反応溶液に直接 L-プロリンと NaBH₃CN を加えプロリン連結体を得る。この段階で酸塩基分配により過剰の L-プロリンや試薬を除去し、ついでエタノール塩酸で処理して **2** へと導く。**2** の酸塩基分配を行なった後、アルデヒド **3** との還元的アミノ化を行い PDMA の保護体 **4** を得る。ショートパスクロマトグラフィーによって **4** を精製した後、最後に脱保護を行うことで PDMA を総収率 38% で得るというものである。本合成経路によって実際に 62g の PDMA を得たことから、PDMA を用いた圃場試験が可能となった。



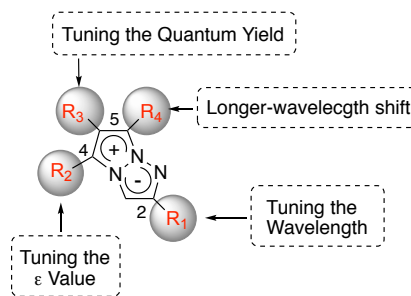
得られた PDMA を用いて、実際のアルカリ性不良土壌での圃場試験を行なった。通常の土と混ざらないようにコンクリートブロック塀で囲った小規模圃場を作成した。この圃場でイネの栽培を行なったところ、イネは正常に生育し最終的に米を収穫することができた。以上の結果より、PDMA がアルカリ性不良土壌での優れた植物成長促進剤であることが明らかとなった。現在、PDMA の実用化に向け合成ルートの更なる改良を行なっている。



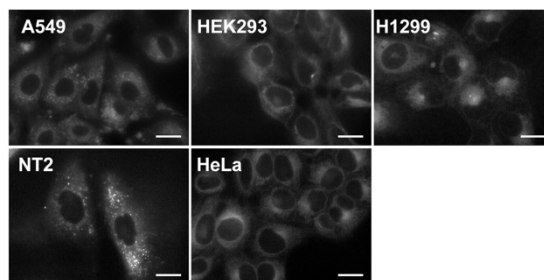
(3) トランスポーターの通過を阻害する誘導体を種々検討し、ムギネ酸の 2'位に立体的にかさ高いマロンアミド側鎖を導入した誘導体が阻害活性を示すことを明らかにした (論文投稿準備中)。また、種々の多環性トロパン骨格を一段階で構築する手法を開発した。これにより、多環性骨格を網羅的に構築することが可能となり、阻害剤探索のための新たな分

子骨格が提供可能となった(*Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 9508-9513 (**Hot Paper**))。

(4) 独自の蛍光プローブ 1,3a,6a-トリアザペンタレン (TAP) の機能評価と高機能化に取り組み、TAP の C4 位および 6 位の置換基効果を明らかにした。すなわち、C4 位の置換基はモル吸光係数を制御可能であること、また C6 位への置換基の導入は長波長シフトを生じることを明らかにした (*Chem. Pharm. Bull.*, **2016**, *64*, 830–837; *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 539-542)。



また、種々の置換様式を有する TAP 誘導体の細胞染色実験を行なったところ、2 位にビフェニル基を導入した基質が細胞に迅速に取り込まれることが明らかとなった。さらに、取り込まれた蛍光分子は洗浄により容易に除去できることから、本誘導体は新たな細胞染色試薬として現在市販されている (*PLoS ONE*, **2016**, *11*, e0160625)。



さらに、TAP を連結した化合物は機械的刺激に応じて蛍光を発するメカノクロミック蛍光を示すことが明らかとなり、機械的な刺激を検知する新たなプローブへの展開が可能となった (*Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 17727-17733)。

(5) ムギネ酸・鉄錯体トランスポーター阻害剤に光親和性基と蛍光基を導入した分子プローブの合成を達成し、根に発現しているトランスポーターの標識化に成功した。現在、本分子プローブのトランスポーターへの選択性を調査している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- 1) R. Sato, R. Okamoto, T. Ishizuka, A. Nakayama, S. Karanjit, K. Namba. Microwave-Assisted Tertiary Carbon Radical Reaction for Construction of Quaternary Carbon Center. *Chem. Lett.* **2019**, *46*, 414-417. (査読有り) doi.org/10.1246/cl.190040
- 2) M. Ito, A. Mera, T. Mashimo, T. Seki, S. Karanjit, E. Ohashi, A. Nakayama, K. Kitamura, T. Hamura, H. Ito, K. Namba. Synthesis and Evaluation of 1,3a,6a-triazapentalene (TAP)-bonded system. *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 17727-17733. (**Cover Picture**) (査読有り) doi.org/10.1002/chem.201804733
- 3) K. Namba, Y. Murata. Organic Chemistry Research on the Mechanistic Elucidation of Iron Acquisition in Barley. *Bio. Pharm. Bull.*, **2018**, *41*, 1502-1507. (査読有り) doi.org/10.1248/bpb.b18-00070
- 4) K. Namba. My Own Path in Being a Young PI and Meeting Lots of Peopple. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2018**, *76*, 740-742. (査読無し) doi.org/10.5059/yukigoseikyokaisi.76.740
- 5) Y. Hase, K. Suzuki, N. Kamekura, M. Shibuya, Y. Takahashi, K. Namba, T. Fujisawa. *J. Pharmacological and Toxicological Methods*, **2018**, *94*, 71-76. (査読有り) doi.org/10.1016/j.vascn.2018.05.005

- 6) T. Okamoto, M. Shibata, S. Karanjit, A. Nakayama, M. Yoshida, K. Namba. Direct Synthesis of Polycyclic Tropinones via Condensation-(4+3) Cycloaddition Cascade Reaction. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 9508-9513. (Hot Paper) (査読有り) doi.org/10.1002/chem.201802011
- 7) Asymmetric Total Synthesis and Structure Revisions of Eurotiumide A and Eurotiumide B, and Evaluation of their Fluorescent Properties as Natural Probes. A. Nakayama, H. Sato, S. Karanjit, N. Hayashi, M. Oda, K. Namba. *Eur. J. Org. Chem.*, **2018**, 4013-4017. (査読有り) doi.org/10.1002/ejoc.201800535
- 8) K. Sangita, M. Kashihara, A. Nakayama, L. K. Shrestha, K. Ariga, K. Namba. Highly active and reusable hydrotalcite-supported Pd(0) catalyst for Suzuki coupling reactions of aryl bromides and chlorides. *Tetrahedron*, **2018**, *74*, 948-954. (Front cover) (査読有り) doi.org/10.1016/j.tet.2017.12.056
- 9) K. Namba, K. Takeuchi, Y. Kaihara, K. Tanino: Total Synthesis of Palau'amine. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2017**, *75*, 1094-1101. (査読有り) doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.75.1094
- 10) T. Hayashi, A. Osawa, T. Watanabe, Y. Murata, A. Nakayama, K. Namba. Development of 1,3a,6a-Triazapentalene-labeled Enterobactin as a Fluorescence Quenching Sensor of Iron Ion. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 1961-1964. (Front cover) (査読有り) doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.011
- 11) A. Mera, M. Ito, A. Nakayama, K. Namba. Synthesis of 2,6-disubstituted-1,3a,6a-triazapentalenes and their fluorescence properties. *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 539-542. (査読有り) doi.org/10.1246/cl.170078
- 12) E. Harada, K. Sugase, K. Namba, Y. Murata. The helical propensity of the extracellular loop is responsible for the substrate specificity of Fe(III)-phytosiderophore transporters. *FEBS Lett.*, **2016**, *590*, 4617-4627. (査読有り) doi: 10.1002/1873-3468.12482.
- 13) J. Sawada, A. Osawa, T. Takeuchi, M. Kaneda, S. Oishi, N. Fujii, A. Asai, K. Tanino, K. Namba. Functional 1,3a,6a-triazapentalene scaffold: Design of fluorescent probes for kinesin spindle protein (KSP). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 5765-5769. (査読有り) doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.10.047
- 14) R. Kamada, F. Tano, F. Kudoh, N. Kimura, Y. Chuman, A. Osawa, K. Namba, K. Tanino, K. Sakaguchi. Effective Cellular Morphology Analysis for Differentiation Processes by a Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene Derivative Probe in Live Cells. *PLoS ONE*, **2016**, *11*, e0160625. (査読有り) doi.org/10.1371/journal.pone.0160625
- 15) M. Yoshida, S. Ohno, S. Eguchi, T. Mizuguchi, K. Namba. Direct cyclization of 1,3-diaryl propargylic alcohols with dicarbonyl compounds by palladium-boric acid dual-catalyst system. *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 5633-5639. (査読有り) doi.org/10.1016/j.tet.2016.07.055
- 16) K. Takeuchi, A. Nakayama, K. Tanino, K. Namba. Facile Guanidine Formation under Mild Acidic Conditions. *Synlett*, **2016**, *27*, 2591-2596. (査読有り) DOI: 10.1055/s-0035-1562478
- 17) A. Nakayama, N. Satoshi, O. Akira, M. Akane, O. Ayumi, T. Keiji, K. Namba. Substituent Effect at C4-Position of 1,3a,6a-Triazapentalene. *Chem. Pharm. Bull.*, **2016**, *64*, 830-837. (査読有り) doi.org/10.1248/cpb.c16-00196
- 18) M. Yoshida, A. Kobayashi, A. Nakayama, K. Namba: Synthesis of functionalized 2,3-dihydropyrroles by oxidative radical cyclization of N-Sulfonylenamino esters with alkenes. *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 2544-2551. (査読有り) doi.org/10.1016/j.tet.2016.03.055
- 19) M. Yoshida, A. Kobayashi, K. Namba, Synthesis of 2,3-Dihydro-4H-furo[3,2-c]chromen-4-one Derivatives by Oxidative Radical Cyclization of 4-Hydroxy-2H-chromen-2-one with Alkenes. *Heterocycles*, **2016**, *93*, 737-744. (査読有り) DOI: 10.3987/COM-15-S(T)27

[学会発表]

(計 135 件 (招待講演 24 件))

〔図書〕（計 2 件）

- 1) K. Namba, E.Ohashi. Chapter 6, Kinetic control in Natural Product Synthesis, *Kinetic Control in Synthesis and Self-Assembly*, Elsevier, 2019, 109-126.
- 2) 難波康祐、第4章 連続環化反応を鍵としたパラウアミンの全合成、天然有機化合物の全合成～独創的なものづくりの反応と戦略～、化学同人、2018年、70-77.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：新規イノン化合物及びその用途

発明者：中山淳、寺町順平、安倍正博、難波康祐、伊藤孝司、辻大輔

権利者：徳島大学

番号：2018-203219

出願年：2018年

国内外の別：国内

名称：複素環含有アミノ酸又はその塩、並びにそれを用いた肥料及び植物成長調整剤

発明者：難波康祐、鈴木基史、米良茜

権利者：徳島大学、愛知製鋼株式会社

番号：2018-160612

出願年：2018年

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：新規な複素環含有アミノ酸化合物及びその用途

発明者：難波康祐、村田佳子

権利者：徳島大学、愛知製鋼株式会社

番号：6347396

取得年：2018年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/bot/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：村田 佳子

ローマ字氏名：(MURATA, Yoshiko)

所属研究機関名：公益財団法人サントリー生命科学財団

部局名：生物有機科学研究所

職名：主席研究員

研究者番号（8桁）：60256047

研究分担者氏名：中山 淳

ローマ字氏名：(NAKAYAMA, Atsushi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（薬学域）

職名：助教

研究者番号（8桁）：60743408

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中山 哲

ローマ字氏名：(NAKAYAMA, Akira)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。