

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05365

研究課題名(和文)革新的な海藻養殖を可能にする藻類成長因子サルーシンのケミカルバイオロジー研究

研究課題名(英文)Chemical biology regarding the effect of an algae growth factor (thallusin) in order to provide a novel cultivation system for sea vegetable

研究代表者

山本 博文(Hirofumi, Yamamoto)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：70461366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、海水温の上昇や水質の変化が引き金となって天然に自生する大型藻類は減少し深刻な問題となっている。このような背景のもと、大型緑藻類に分類されるアオサ藻に対して、その生育を促す効果が確認されたサルーシンに着目し、そのメカニズムを解明するための分子ツール合成を試みた。既に得られている知見を基に、サルーシンのジピコリン酸部位にリンカーとなるアリルメチルエーテルを化学修飾し、種々の機能性分子を担持した。この構造活性相関研究に基づいた分子設計を通じて、磁気ビーズ担持型サルーシンをはじめ、ビオチンおよび光感受性官能基を担持したメチルサルーシン、新規蛍光標識型サルーシンの合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

50年以上も前から海水中のバクテリアが海藻の成長にとって欠かせない成長因子を産生している可能が予想されてきた。しかし、現在までにその効果が確認されたのは報告者らが証明したサルーシンのみである。したがって、本研究によって得られたサルーシンに関わる分子ツールの合成と構造活性相関に関する知見は、学術的価値、新規性ともに極めて高く、生物活性化合物の合成、ケミカルバイオロジー、藻類学(海洋生命科学)まで広範囲に影響を与えるインパクトの高い基礎的成果である。

研究成果の概要(英文)：Recently, there has been a decrease in the number and variety of marine plants in the oceans of the world. Although the exact mechanism for this reduction in biodiversity is unclear, we focused on thallusin, which is indispensable for forming the foliaceous morphology of green macroalgae, and attempted to synthesize the molecular tool of thallusin in order to elucidate the activation mechanism of thallusin.

Based on the experimental findings already obtained, allyl methyl ether was substituted on the moiety of dipicolinic acid in thallusin in order to support various functional molecules. Through the structure-activity relationship study with thallusin and its allyl methyl ether derivative, we eventually achieved the synthesis of a magnetic bead-supported thallusin, biotin- and photosensitive functional group-substituted methyl thallusin derivative, and a novel fluorescently labeled derivative.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：分子ツール 構造活性相関研究 葉状体形成促進活性

1. 研究開始当初の背景

周囲を海に囲まれた我が国(領海面積は世界6位)では、古くから豊富なビタミンやカルシウム、鉄分を含む海藻を貴重な栄養源として摂取してきた。しかし、近年では、温暖化に伴う急激な水質変化が引き金となって、天然に自生する海藻や天然養殖における海藻の水揚げ量は、その種類を含めて、減少の一途を辿っている。かつて、日本中の沿岸で天然養殖されていたアサキノリにおいては、最近、絶滅危惧1種に指定された。さらに、この貴重な食文化を築き上げてきたにもかかわらず、国内での海藻養殖や育種改良に関わる技術開発はごく一部の種類に限られ、陸上植物の栽培と比較しても出遅れているのが現状である。三陸沿岸で高級海藻として売られているマツモ等を例に観ても、地域復興のために本格的な養殖技術の開発が切望されながら、未だその技術は確立されていない。では「なぜ、海藻を養殖することは難しいのであろうか?」その理由の一つとして、海藻の発生・成長プロセスが未だ多くの謎に包まれているため、養殖やその技術開発に用いるための種苗(1~5 mm 程度の葉状体)を安定に培養することが困難であることが挙げられてきた。しかし、2005年、報告者の所属する研究グループらが、大型緑藻類の生活環(発生と生育のサイクル)の中で最も重要だと考えられる初期発生(遊走子からの葉状体形成)の過程を、藻類に付着するバクテリアが制御すること(藻類-微生物共生説)を見出し、バクテリアが生合成する藻類成長因子(サルーンシン)を発見した。サルーンシンは極微量の有機物質であったが、既に報告者らによって光学的に純粋な不斉合成を可能にした。そして、最近、サルーンシンを共生バクテリアが全く存在しない水槽内に直接添加することにより、これまで不可能と考えられてきたアサキノリ(大型緑藻類の一種)の無菌化種苗の作成とそれを用いた完全陸上養殖に成功した。

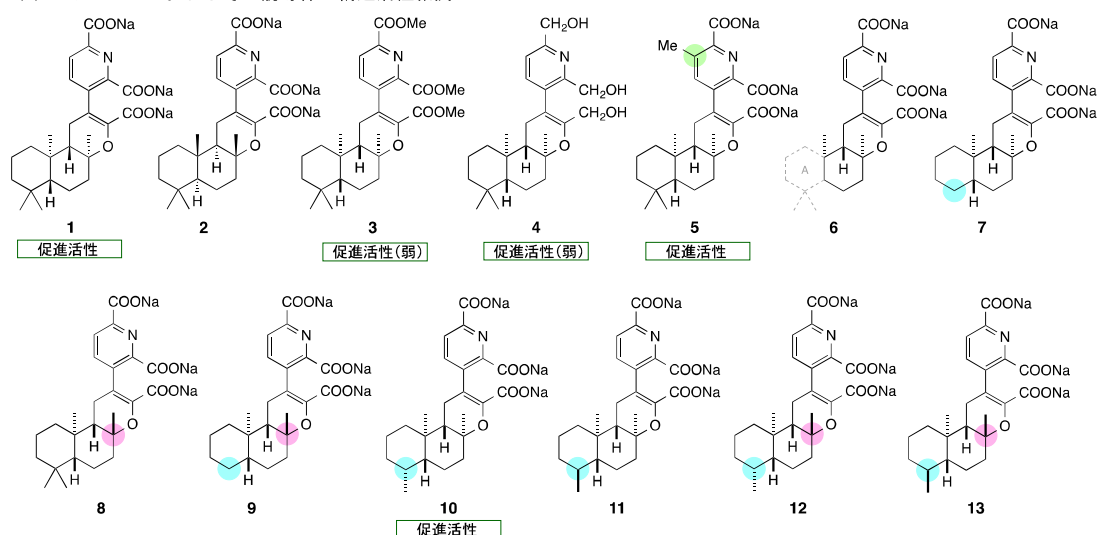
2. 研究の目的

海藻の進化は多系統にわたり、その生活環も多様で不明な点が多い。そのため、種の分類をみても、一般的に色と葉形を基準とした古典的な方法が用いられているのが現状である。したがって、分類や養殖条件についての新たな指標のために、海藻の発生と生育に関わる基盤情報としてサルーンシンによって引き起こされる一連の発生・成長カスケードを分子生物学(遺伝子学的)の見地から解明するための分子ツール(磁性ビーズ担持型、ビオチン担持型、蛍光色素担持型サルーンシン)の合成を試みた。

3. 研究の方法

これまで、報告者らはサルーンシンの全合成研究において、光学的に純粋なサルーンシン(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。その後、2014年度に採択された基盤研究(C)期間 2014-2016 課題番号 26460026「藻類成長因子を分子標的とした革新的防藻剤の開発」の一環として行った構造活性相関研究において、活性に影響を与えない化学修飾可能なサルーンシンの構造部位を特定している。したがって、これらの知見(特に、サルーンシン誘導体 5 がサルーンシンと同程度の活性を示す知見)を基に、磁性ビーズやビオチン誘導体、蛍光分子へのサルーンシンおよび *ent*-サルーンシンの担持を試みた。

図1 サルーンシンおよびその誘導体の構造活性相関

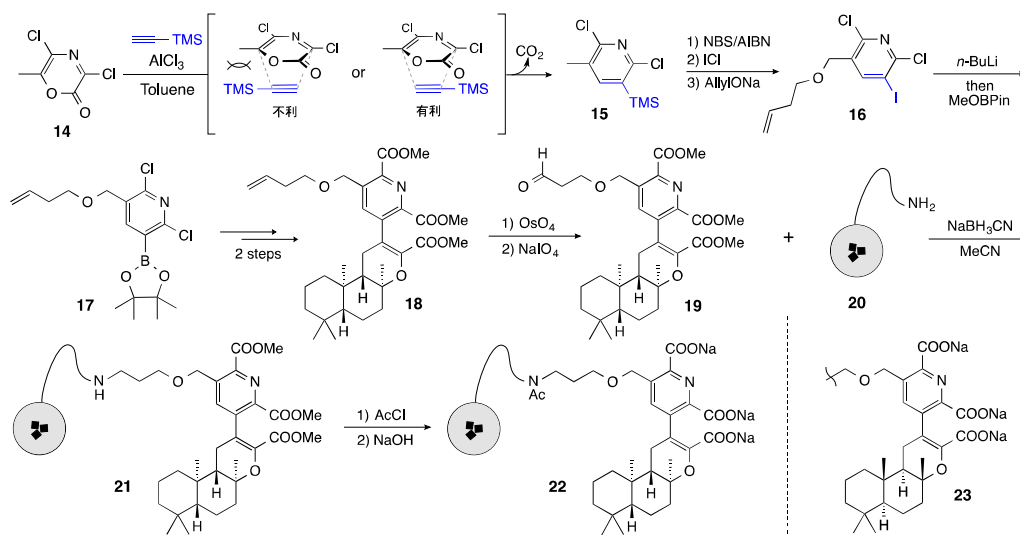


4. 研究成果

まず、磁気ビーズへの連結のために、その足がかりとしてジピコリン酸の5位にメチルアリルエーテルを置換したメチルサルーンシン誘導体 18 の合成に着手した。シアノヒドリンから調製

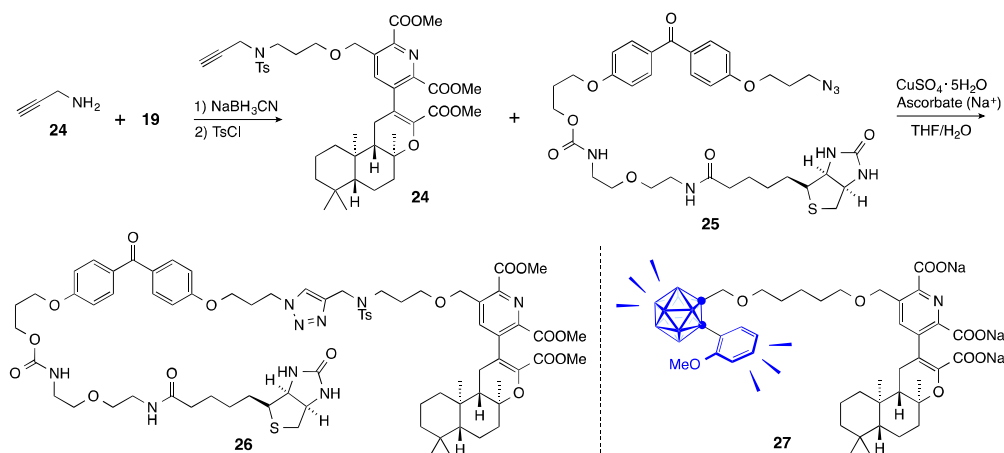
可能な3,5-ジクロロ-6-メチル-2*H*-1,4-オキサジ-2-ノン(14)を原料にTMSアセチレンを混合して加熱還流することで逆電子要請型のアザヘテロディールスアルダー反応を行った。本反応では理論上2つのTSが考えられるが、オキサジノンに置換されたメチル基がTMS基との立体反発を避けて速度論的に反応するため、化合物15が選択的に得られた。その後、メチル基をモノプロモメチル基へと誘導し、塩化ヨウ素で処理することでTMS基をヨウ素へと変換した。次いでアリルアルコキシドで処理することで化合物16とし、ヨウ素をボロン酸エステルへと変換した。その後は、報告者らが既に確立した方法に準じて化合物18とした。そして、得られた化合物18の末端二重結合を利用して磁気ビーズへの担持を試みた。モデル化合物等を用いてオレフィンメタセシス反応等の方法を検討したが、収率と再現性の観点から還元的アミノ化反応による方法を選択した。具体的には、アミノ基を有する高磁気応答性ビーズ(FGビーズ)20をアルデヒドへと導いた19と混合して還元的アミノ化反応を行った。磁気ビーズへの担持率は回収した19から算出した。その後、水酸化ナトリウムを用いて21から直接、加水分解することを試みたが、連結部位に生じた二級アミンとジピコリン酸由来のメチルエステルとのアミノリシスが競争したことから、アミノ基をアセチル基で保護したのち、トリカルボン酸塩22へと導いた。本手法を用いて、活性を示さない*ent*-体23の合成も達成した。

スキーム1 磁気ビーズ担持型サルーンシンの合成



ビオチンおよび光感受性官能基の担持においては、まず、化合物19に対してプロパルギルアミン(24)を還元的アミノ化反応によって縮合した。その後、二級アミンをトシル基で保護した後、クリック反応によって別途に調製したビオチン誘導体25と連結した。本反応においては硫酸銅がジピコリンエステルとキレート形成するため触媒反応として進行することはなかったが、過剰量(3当量)の硫酸銅を添加することで目的の26が収率49%で得られた。また、開発段階のカルバボラン基盤型新規蛍光物質をメタセシス反応によってサルーンシんに導入することも成功した。これらのビオチンおよび光感受性官能基担持型26、蛍光色素担持型サルーンシン27においてもエナンチオディファレンシャル法によるアッセイを念頭に、それぞれのエナンチオマーを合成した。これらの化合物を活用することで、既にサルーンシんに親和性を示すアオサ藻由来のタンパクを確認しており、現在、構造決定を含めて解析中である。

スキーム2 ビオチン及び光感受性官能基担持型メチルサルーンシンの合成



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山本博文	4. 巻 75
2. 論文標題 ヒトエグサ養殖におけるサルーシンの活用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本海水学会誌	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本博文	4. 巻 75
2. 論文標題 ヒトエグサ養殖におけるサルーシンの活用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本海水学会誌	6. 最初と最後の頁 19～25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本博文, 山崎直人, 佐々木郁雄, 今川 洋	4. 巻 77
2. 論文標題 塩メタセシス反応を利用した水銀塩触媒反応の開発と不均一系触媒の設計	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 有機合成化学協会誌	6. 最初と最後の頁 982-993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5059/yukigoseikyokaisi.77.982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本博文, 山崎直人, 葛西祐介, 今川洋	4. 巻 73
2. 論文標題 海藻養殖における海水の不思議：藻類成長因子の機能とその応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本海水学会誌	6. 最初と最後の頁 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirofumi Yamamoto, Yuichi Takagi, Naoto Yamasaki, Tadashi Mitsuyama, Yusuke Kasai, Hiroshi Imagawa, Yutaro Kinoshita, Naohiro Oka, Masanori Hiraoka	4. 巻 74
2. 論文標題 Syntheses of thallusin analogues and their algal morphogenesis-inducing activities	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 7173-7178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2018.10.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本博文
2. 発表標題 海藻生活環における海水の不思議：藻類成長因子サルーシンの合成と応用
3. 学会等名 143回日本薬学会中国四国支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大城彩里, 住友健人, 山崎直人, 江角朋之, 兼目裕充, 浅川義範, 葛西祐介, 今川洋, 葛原隆, 山本博文
2. 発表標題 磁気ビーズ担持型サルーシンの合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎直人, 高見明香, 中原華, 上田ゆかり, 谷野公俊, 山本博文
2. 発表標題 海藻養殖に応用可能な徐放性肥料の開発とヒトエグサへの応用
3. 学会等名 第5回徳島マリンサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本博文
2. 発表標題 海藻養殖における海水の不思議：藻類成長因子の機能とその応用
3. 学会等名 日本海水学会第70年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本博文
2. 発表標題 葉状体形成促進因子サルーシンの合成と実応用
3. 学会等名 第29回日本プロセス化学会東四国地区フォーラムセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本博文
2. 発表標題 藻えよ海，伸びる海藻，化学からの挑戦
3. 学会等名 有機合成化学協会第53回天然物化学談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本博文
2. 発表標題 気候変動に対応した漁業技術の紹介；ヒトエグサ養殖技術の開発
3. 学会等名 第三回徳島マリンサイエンスシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本博文
2. 発表標題 海藻養殖における海水の不思議：藻類成長因子の機能とその応用
3. 学会等名 日本海水学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

藻類成長因子を用いた海藻栽培技術イノベーション
<http://www.bunri-u.ac.jp/brand17/>
 リサーチマップ（山本博文）
<https://researchmap.jp/Hirofumi-Yamamoto>
 徳島文理大学薬学部生薬研究所
<http://p.bunri-u.ac.jp/lab/lab23/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関