

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05849

研究課題名(和文)位置・立体選択的反応を鍵段階とする生物活性物質の合成研究

研究課題名(英文) Synthetic Studies of Bioactive Substances Based on Site- and Stereoselective Reactions

研究代表者

須貝 威 (Sugai, Takeshi)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：60171120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物活性物質を化学合成により充分量供給するには、酵素触媒科学的手法、純有機合成化学的手法、天然に豊富な配糖体などからの「半合成」のそれぞれが優位性を示す局面を十分に理解し、相乗的な組み合わせが大切である。本研究では、市販で入手容易な出発物質を適切に化学変換し、それらに市販で入手容易な酵素触媒を組み合わせる、効率良い合成経路の確立・実践した。1)鎖状ポリオールや環状ポリフェノールを基質とし、市販・入手容易なリパーゼ触媒によるアセチル化・脱アセチル化や化学的手法など位置選択的変換を検討した。2)配糖体を出発原料とし、糖鎖部位の選択的変換や、糖鎖部分をアグリコンの保護基とする選択的変換を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3年間の研究を通じ、天然資源や酵素触媒がうまく使えるようになったため、生物活性物質の生物作用解明や前臨床・臨床試験への提供などが実現する可能性が増大した。また、多くの研究者に再現・活用してもらえる機会も増え、さらなる発展や波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the organic process chemistries, the integrated use of chemo- (organic synthesis) enzymatic (biotechnology) transformation approach as well as the utilization of naturally occurring starting materials takes advantages over individual procedures, towards the best solution to make the design and diagram for target compounds. Catalytic activities of cheaply commercially available lipases in transesterification in organic solvents were demonstrated for deprotection of phenolic esters and esterification of aliphatic alcohols. I achieved the syntheses of catatherasmols and tournefolin B, based on the site-selectivity which was clarified through this study. In contrast, the complementary use of chemical site-selectivity on transformation of aromatic substances enabled the new efficient syntheses of polymethoxybenzenes. Finally, partial hydrolysis of naturally occurring C-glycoside flavone in high-pressure steam sterilizer provided an efficient route to chafuroside B.

研究分野：有機化学、生物有機化学、生物資源科学

キーワード：位置選択的反応 リパーゼ 脱アセチル化 高圧蒸気滅菌器 加水分解 ポリオール 半合成 天然配糖体

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

酵素触媒による変換は高い選択性を示すので、生物活性物質の合成における変換ツールとして有用と考えられてきた。しかし「基質特異性」による制約のため、応用範囲は必ずしも広いとはいえず、これまで、ラセミ体に含まれる鏡像異性体分離（速度論的分割）や不斉還元などが主な利用形態だった。近年は進化工学的手法を活用した、組み換え体酵素触媒の利用が多数報告されているが、特定の基質に対する比活性は高いものの一般性に欠け、さらに知的財産に関する権利保護という観点からは、他の研究者が自由に使える機会が減り、学術・産業上の協働、発展を必ずしも促進していない、という状況が進みつつあった。

## 2. 研究の目的

上記の背景に鑑み本研究者は、生物活性物質を充分量供給、また新規な誘導体を合成するには、酵素触媒科学的手法、純有機合成化学的手法、さらには天然に豊富な配糖体などからの「半合成」のそれぞれが優位性を示す局面を十分に理解し、相乗的に組み合わせることが大切と考えた。本研究では、市販で入手容易な出発物質を適切に化学変換し、それらに市販で入手容易な酵素触媒を組み合わせる、効率良い合成経路の確立・実践を主たる目的とした、このような組み合わせで天然資源や酵素触媒がうまく使えるようになれば、目的物とする生物活性物質の生物作用解明や前臨床・臨床試験への提供などが実現可能になるとともに、多くの研究者に再現・活用してもらえる機会も増え、さらなる発展や波及効果が期待される。

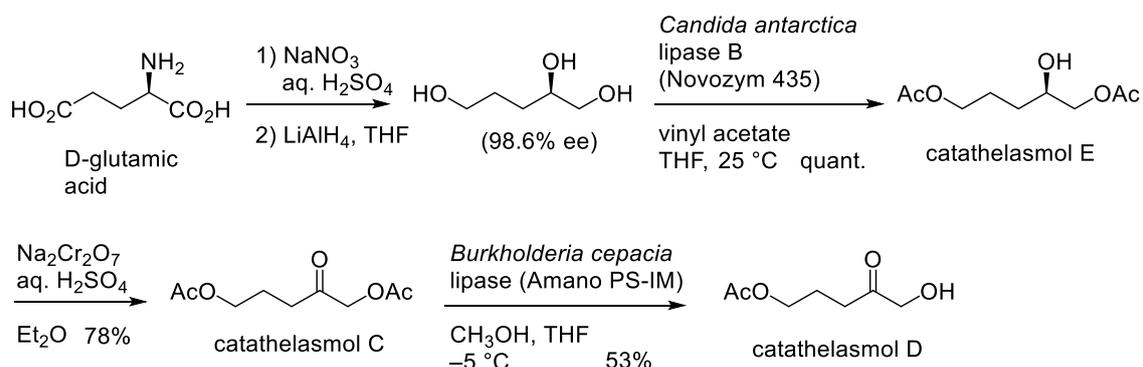
## 3. 研究の方法

生物活性物質の新しい合成に寄与しうる2つの手法として、1)鎖状ポリオールや環状ポリフェノールを基質とし、市販・入手容易なリパーゼ触媒によるアセチル化・脱アセチル化や化学的手法など位置選択的変換を検討する；2)配糖体を出発原料とし、糖鎖部位の選択的変換や、糖鎖部分をアグリコンの保護基とする選択的変換を検討する。また糖鎖部位の一部を生物活性物質の炭素骨格構築として活用する。

さらに1)および2)に付随し、適切な（化学的）保護基導入や酸化還元段階に関する調節も検討し、望まない酸化還元など副反応も可能な限り阻止する。

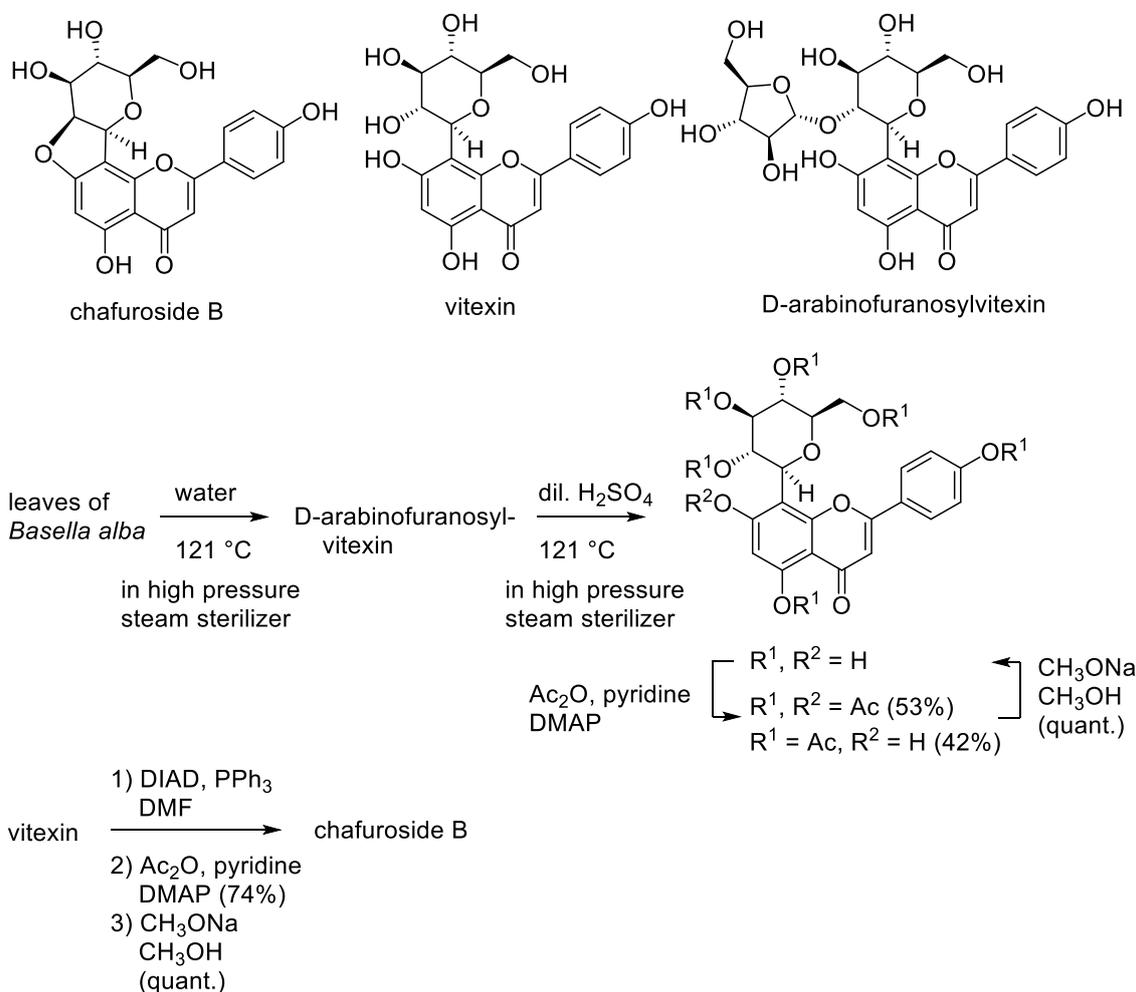
## 4. 研究成果

2019年度は、生物活性物質の新しい合成法に寄与しうる2つの手法のうち、1)鎖状ポリオールを基質とし、化学的手法・リパーゼ触媒による脱アセチル化など位置選択的変換を重点的に検討した。



リパーゼによるエステル加水分解やアルコールのエステル化は、立体障害、脱離能、求核

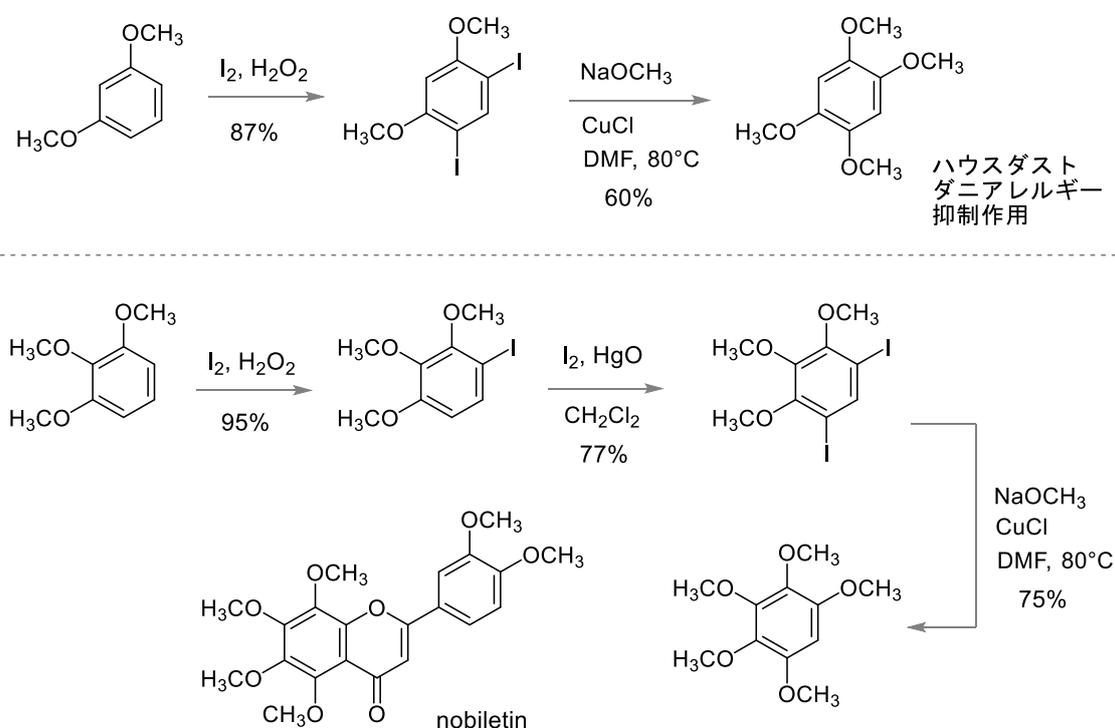
剤の性質に大きな影響を受けることが知られているが、鎖状ポリオールで検証した。その結果としてキノコ的一种オオモミタケから単離され、11 $\beta$ -HSD阻害作用を示すcatatherasmol類(C, D, E)を、同一骨格を持つD-glutamic acidから網羅的に合成した。出発原料から誘導したpentane-1,2,5-triolに対し、*Candida antarctica*リパーゼ B (Nozozyme 435)を触媒とし酢酸ビニルを用いたアシル化で、catatherasmol Eが定量的に得られた。アセチル化の位置選択性はリパーゼの種類や基質の絶対立体配置に影響を受けた。(R)-体のトリオールでは二か所の第一級アルコールのみがアセチル化されたが、(S)-体では第二級アルコールもアセチル化された化合物が副生した。*Burkholderia cepacia*リパーゼ (Amano PS) を触媒とした場合は反応性が低下した。本合成ではカタセラスモールEの両鏡像体を合成し、比旋光度の符号の比較により、従来提唱されていた天然物の絶対立体配置を確認した。重クロム酸酸化(78%)によりcatatherasmol Cとし、カルボニル基に隣接する1-位の選択的脱保護(53%)によりcatatherasmol Dを得た。位置選択的脱保護には*B. cepacia*リパーゼを触媒とし、メタノールを求核剤とするエステル交換が有効であった。ルイス酸Sc(OTf)<sub>3</sub>触媒による反応の選択性、あるいは、*C. antarctica*リパーゼ Bを用いた反応の選択性を大幅に上回った。



2020年度は、2つの手法のうち、2) 配糖体を出発原料として活用する半合成の試みについて重点的に検討した。フラボノイドは天然資源として、しばしば配糖体の形で産出されるが、アグリコンや単糖配糖体に変換して利用する場合には、効率よく、かつ選択的な糖部分除去の条件確立が求められる。天然資源由来のフラボノイド配糖体の中には、有用な生物活性を示すものの、ごく少量しか得られない化合物が多く、それらを安価・大量に入手可能な出発原料から効率よく

合成する手法の確立は非常に重要である。具体的には、ウーロン茶の茶葉から単離された **chafuroside B** の新しい調製法について検討した。 **chafuroside B** は皮膚に対しUVB保護作用を示す化合物である。しかし茶葉中の含有量は非常に少ない (1 gあたり29.4 ng) ので、天然資源から容易かつ大量に得られる材料から「半合成」する量的供給が望まれている。本研究では、野菜「ツルムラサキ」 (*Basella alba*) に含まれる **D-arabinofuranosylvitexin** を、高圧・高温条件において温度および時間を精密にコントロール可能な高圧蒸気滅菌器(オートクレーブ)中で熱水抽出した溶液を酸加水分解し、 **chafuroside B** と同一の炭素骨格を持つ **vitexin** を得た。

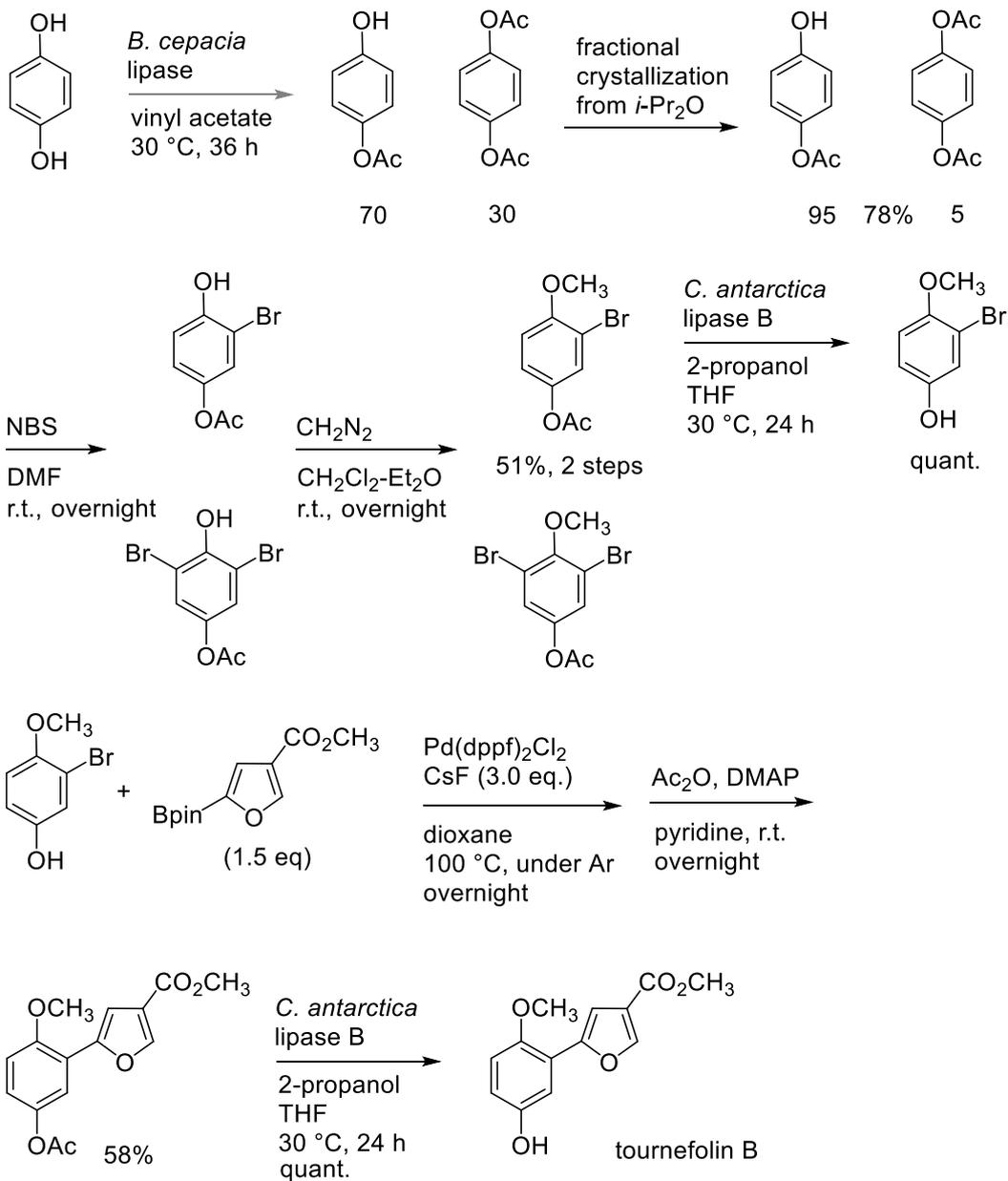
この実験では、栽培、生産時期が異なる、徳島産、宮城産、秋田産を比較した。どの産地のツルムラサキを用いても、得られた **vitexin** の量に差はほとんどなかった。同一の品種で、栽培法にも大きな違いがないと考えられる。なお、粗生成物はアセチル化を経て簡易的なシリカゲルカラムクロマトグラフィーで十分に精製可能であった。 **vitexin** は光延法で閉環し、 **chafuroside B** とした。「ツルムラサキ」生葉1 gを出発原料にした場合、約600 μgの **chafuroside B** が得られるようになったことから、ウーロン茶から抽出・製造する方法に比べ格段に効率が良い。



生物活性フラボノイドやプレニルフェノール類の合成前駆体調製には、容易かつ大量に得られる原料から出発し、正しい位置でフェノール・メチルエーテルを導入する手法が求められる。中間化合物の反応性や安定性にとって大切な「酸化段階や芳香環の電子密度」の設計と制御、それを実現する保護基の導入や反応条件が重要である。2021年度は、芳香環のハロゲン化、および酵素触媒による位置選択的・温和な条件下変換反応を検討した。1,3-dimethoxybenzeneをI<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の条件で2ヨウ化物とし、銅触媒存在下メトキシル化によりアレルギー炎症抑制作用を持つ1,2,4,5-tetramethoxybenzeneを合成した。同様の手法は、ポリメトキシフラボンとして名高い **nobiletin** の合成前駆体である **pentamethoxybenzene** の合成にも有用で、1,2,3-trimethoxybenzeneから出発しメトキシル化の前駆体となる2ヨウ化物の調製には、折戸らのHgO-I<sub>2</sub>が最も有効であった。対応する臭化物および構造の異なるヨウ化物の調製、メトキシル化も比較した。

一方、高度に酸化されたプレニルヒドロキノンの一種、 **tournefolin B** の合成前駆体となる

3-bromo-4-methoxybenolの調製に際し、出発物質として選んだhydroquinoneに対し、*B. cepacia* 由来のリパーゼを用いたモノアセチル化が有効で、4-hydroxyphenyl acetateが高い収率で得られた。臭素化、メチル化して得た3-bromo-4-methoxyphenyl acetate、およびフラン部位とのカップリングによって得られた化合物からtournefolin Bの調製では、保護基として用いた酢酸エステルの除去に*C. antarctica* リパーゼBを活用した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuki Kurahayashi, Kengo Hanaya, Shuhei Higashibayashi, Takeshi Sugai	4. 巻 84
2. 論文標題 Improved preparation of vitexin from hot water extract of Basella alba, the commercially Malabar spinach (“Tsurumurasaki” in Japanese) and the application to semisynthesis of chafuroside B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1554-1559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1761286	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 Rinta Hashiba, Riichi Hashimoto, Momoko Nishiguchi, Toshifumi Kobayashi, Kengo Hanaya, Shuhei Higashibayashi, and Takeshi Sugai	4. 巻 84
2. 論文標題 Comprehensive Semisyntheses of Catathelasmols C, D, and E from D-Glutamic Acid, Utilizing Lipase-catalyzed Site-selective Reactions on Intermediates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1754159	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 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Takeshi Sugai
2. 発表標題 Enzyme-assisted syntheses of bioactive compounds, originated from Scripps days
3. 学会等名 2019 Scripps Korea Society Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Sugai
2. 発表標題 Development of the synthetic routes utilizing the selectivity in enzyme catalysis
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Sugai
2. 発表標題 Advantages of lipase-catalyzed transformation in organic synthesis
3. 学会等名 European Federation of Biotechnology Conference 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須貝威
2. 発表標題 酵素触媒や生物資源を活用した有用物質合成法への挑戦
3. 学会等名 第78回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sugai, R. Tsunekawa, K. Kurahayashi, R. Fujita, K. Hanaya, S. Higashibayashi
2. 発表標題 Utilization of naturally occurring glycosylated forms for the synthesis of flavonoids
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Process Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Sugai, R. Fujita, R. Hashimoto, Y. Yamashita, K. Hanaya, S. Higashibayashi
2. 発表標題 The Utilization of enzyme-mediated acylation and de-acylation in the transformation of heterocycles
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Kurahayashi, K. Hanaya, S. Higashibayashi, T. Sugai
2. 発表標題 A semisynthesis of chafuroside B from D-arabinofuranosylvitexin, extracted from raw leaves of <i>Basella alba</i>
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Hashimoto, K. Hanaya, S. Higashibayashi, T. Sugai
2. 発表標題 Site-selective lipase-catalyzed deacetylation on sterically hindered naphthohydroquinone diacetate
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須貝 威, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 酵素触媒反応および生物資源を活用した、生物活性物質の合成
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉林一樹, 恒川龍二, 藤田理愛, 花屋賢悟, 東林修平, 須貝 威
2. 発表標題 天然植物資源から出発し、位置・化学選択的変換を活用した、ポリフェノール類の合成研究
3. 学会等名 第36回有機合成化学セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須貝 威
2. 発表標題 酵素触媒と生物資源を活用する有用物質合成
3. 学会等名 第17回有機合成化学談話会（湯河原セミナー2019）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須貝 威, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 位置・化学選択的な酵素触媒反応を活用した、生理活性物質の合成研究
3. 学会等名 第45回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須貝 威, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 入手容易な生物資源から出発し、酵素触媒反応を活用した生物活性物質の合成
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須貝 威, 橋本理一, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 リバーゼ触媒による, ポリフェノールアセタート脱アセチル化の位置選択性の検討と応用
3. 学会等名 第22回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須貝 威, 橋本理一, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 ポリフェノールアセタート類を基質とする、リパーゼ触媒反応の位置選択性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉林一樹, 花屋賢悟, 東林修平, 須貝 威
2. 発表標題 天然より豊富に得られるアラピノシルビテキシンを出発原料としたチャフロシドBの調製
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 須貝 威, 本田桂子, 横山芹香, 橋本理一, 安井将満, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 芳香族メチルエーテルを部分構造に含む天然有機化合物の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田桂子, 横山芹香, 橋本理一, 安井将満, 東林修平, 花屋賢悟, 須貝 威
2. 発表標題 芳香族メチルエーテルを部分構造に含む天然有機化合物の合成研究.
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須貝 威, 橋本理一, 本田桂子, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 位置・官能基選択的酵素触媒反応の、有機合成への応用
3. 学会等名 第37回有機合成化学セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須貝 威, Qi Ziyu, 松島昌輝, 井上浩義, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 フラボノイド合成に有用な選択的変換
3. 学会等名 第50回複素環化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須貝 威, Qi Ziyu, 本田桂子, 橋本理一, 小林俊文, 花屋賢悟, 東林修平
2. 発表標題 天然・生物活性物質合成を志向した、メトキシベンゼン類の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

受賞：2019年度有機合成化学協会賞（学術的なもの、有機合成化学協会）、「酵素触媒の選択性を活用した有用物質合成法の開拓」、2020；2020年度化学教育賞（日本化学会）「高校生から大学生までを惹きつける生物有機化学と実験」、2021

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
---------	---------