

機関番号：12601

研究種目：基盤(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：20580108

研究課題名(和文) NMR による複雑な鎖状化合物の立体化学を決める—その手法の開発と応用

研究課題名(英文) Developments of new methods of NMR for stereochemistry of complicated chain structure compounds

研究代表者

降旗一夫 (FURIHATA KAZUO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：20219091

研究成果の概要(和文)：複雑な天然有機化合物の構造解析、主として、1) プロトン-プロトンのシグナルの重なり合う領域でのプロトン-プロトンのスピン結合定数を観測する、2) high order スピン系を解析する、3) プロトン-炭素間の遠隔スピン結合定数を観測する、という三点に重点をおいた新しい測定法の開発を目的とした。第一は、プロトン-プロトンのスピン結合による複雑なスピン系を単純化する方法として、Selective J-resolved HMBC法の開発をした。この方法は、隣接プロトンをすべてdecouplingし複雑なスピン系に置いても目的とするlong range JCHの観測を可能とした。さらに、新しくSelective-COSY-J-resolved HMBC法の開発に取り組んだ。この方法は感度の低い観測困難なプロトンの感度を如何に高めるかという観点から開発された。その結果、従来観測困難なプロトンでのlong range JCHの測定を可能にすることが出来た。第二はシグナルが重なっている場合や化学シフトが接近したhigh order スピン系ではプロトン-プロトン、スピン結合定数の解析は困難になる。この問題を解決する方法としてJ-resolved HMQC法を報告してきた。しかし、multipletに分裂したhigh order spin系ではfirst order スピン結合であってもspinの解析は困難となる場合がある。この問題を解決する方法としてselective pulseを検討し、Selective J-resolved HMQC-1, -2を開発した。

研究成果の概要(英文)：

In order to observe long range JCH couplings and JHH couplings, we have developed Selective J-resolved HMBC, Selective COSY-J-resolved HMBC and Selective J-resolved-HMQC.

#### Selective J-resolved HMBC

Determination of long-range C-H couplings (JC-H) is getting important for stereochemical studies of natural products. The J-resolved HMBC-1 method is a method of choice for this purpose with high sensitivity. The shapes of cross peaks, however, become complex by H-H couplings and long-range JC-H resulting in difficult analysis of complicated spin systems. In order to overcome these problems associated with J-resolved HMBC-1, we have developed a new technique, Selective J-resolved HMBC. The new method incorporating proton-proton decoupling into J-resolved HMBC-1 enables to suppress JH-H and to observe only long-range C-H couplings with complicated molecules having short T2.

#### Selective COSY-J-resolved HMBC

We present an improved version named Selective COSY-J resolved HMBC. This method enhances the sensitivity of cross peaks of methine proton signals attached to a methyl group in J-resolved HMBC or Selective J-resolved HMBC, and enables to determine its long range JCH couplings. J-resolved HMBC or Selective J-resolved HMBC were developed for observation of long range JCH couplings by the J-scaling pulse sequence into HMBC. Application of this new technique to model compounds, portmicin and monazomycin, proved that this method is useful for determination of JC H of complicated molecules.

#### Selective J-resolved HMQC

Analysis of H-H J coupling constants is important for relative stereochemical studies of natural organic compounds. Overlapping protons or strongly coupled protons make analysis of H-H J coupling constant difficult. This problem can be solved by utilizing a proton attached to  $^{13}\text{C}$ . In a strongly coupled HA and HB spin system, HA attached to  $^{13}\text{C}$  and HB connected to  $^{12}\text{C}$  constitute a weak coupled proton system resulting in a large chemical shift difference between HA and HB spread by CA-HA J-coupling. Thus the HA-HB J constant can be clearly determined by analyzing HA. In order to overcome this problem, we developed a new method, selective J-resolved HMQC by decoupling two adjacent protons. Application of this method to a model compound, monazomycin with a complicated structure proved its effectiveness for stereochemical studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学、生物有機化学

キーワード：long range JCH, Selective J-resolved HMBC, Selective J-resolved HMQC, Selective COSY-J-resolved HMBC

#### 1. 研究開始当初の背景

近年の分離精製技術の進歩や新しい生理活性物質を求めめる広範な研究活動の結果、これまでに知られていなかったタイプの天然有機化合物が次々と単離されつつある。これら化合物は微量にしか得られず、かつ複雑な構造を有するものが多いが、近年の NMR 技術、特に二次元 NMR の急速な進歩によって、その複雑な化合物の構造解析は容易に行えるようになってきた。

この NMR 技術の開発により天然有機化合物の研究対象は新たな局面を迎えている。その一つが立体化学の問題である。複雑な化合物であっても糖のような固定した環構造を有する化合物では比較的容易に立体構造を明らかにすることは可能であるが、不斉炭素を多く含んだ環状マクロライドのような化合物では、その全立体構造を決定することは不可能と考えられてきた。

#### 2. 研究の目的

一方、近年の合成化学は、目を見張る技術進歩があり、極めて複雑な構造の化合物でも合成研究がなされるようになってきた。しかし、不斉炭素を多く有する立体構造が不明な化合物では、多大な労力と時間を要することからまだまだ敬遠されている。そのため、天然から単離した化合物の構造研究では、平面

構造ばかりでなく、全相対立体構造の決定をも明らかにしていくことが今や必須になりつつある。しかし、相対立体構造の研究では、大部分のケースでは化学分解の併用により立体構造の決定が部分的になされているのが現状である。そのため全立体構造の決定までには至っていない化合物が多い。

NMR による全立体構造の決定を妨げる最大の理由は、シグナルが重なっている領域でのスピン結合定数の解析が困難であるためである。また、long range C-H スピン結合定数は、プロトン-プロトンのスピン結合定数と同様、以前から立体化学研究に有用であることは知られていた。しかし、 $^{13}\text{C}$  に直結したプロトンを対象にした解析では、感度が通常  $100$  分の  $1$  と低下するため、測定は困難となり、複雑な有機化合物への応用は困難を極めていた。従ってこのようなスピン結合定数を如何に測定し解析するかは、有機化合物の立体構造解析にとって、重要なポイントである。

本研究の目的は、複雑な天然有機化合物の構造解析、主として感度の低いブロードなシグナルからの構造情報を得ることを目的にし、

1) プロトン-プロトンのシグナルの重なり合う領域でのプロトン-プロトンのスピン

結合定数を観測する。

2) High order スピン系を解析する。

3) マルチプレットに分裂したブロードなシグナルを解析する。

4) プロトン-炭素間の遠隔スピン結合定数を観測する。

という四点に重点をおいた新しい測定法を開発することにある。

特に、HMBC 法の測定が可能な最少のサンプル量を用いての long range JCH と JHH の同時測定を重点課題とする。また、分子立体構造解析システムを稼働させ、得られたスピン結合定数をもとに、立体構造既知化合物をモデルとして、その有用性、信頼性を検討するとともに、新規天然有機化合物の立体構造解析に応用する。

### 3. 研究の方法

複雑な有機化合物の構造解析、立体構造の解析における問題点を把握し、NMR による新しい測定法を検討する。特に、複雑な化合物の構造解析において、どのような方法に基づいて構造決定されているかを検討する。また、化合物の立体構造に関しては、どのように研究されてきたかを把握する。我々のアイデアをもとにどのようにして立体構造の解明が可能か検討を加える。

スピン運動の理論的な解釈や知識をもとに、プロトン-プロトン間、更には、プロトン-炭素間との遠隔スピン結合を如何にして効率よく観測するのかを計算に基づいて検討をする。その理論計算をもとに、パルス系列の設計とプログラム化にとりかかる。設計されたパルス系列に対する NMR 装置の改造、ハードウェアの改造を行う。開発された測定法を NMR 装置に用いて基礎測定実験を行い実際のサンプル測定に応用するためのデータを測定する。

開発した測定法の実用化に取り組む。様々な有機化合物を対象にして、測定サンプルの大きさ、量、T<sub>2</sub> の長さを検討し、測定条件の最適化をはかる。また、それと同時に、データ処理方法の検討をはかる。もっとも効率の良い window 関数を開発し、S/N のよいスペクトルを得るための実験をする。新しい測定法の確立後、測定パラメーター、測定マクロ、を作成し、広く NMR ユーザー、天然物化学者が利用できる NMR ソフトを作成する。

さらには複雑な化合物の立体化学研究への応用を着手する。その対象としては平面構造のみが決定されている monazomycin への立体構造解明に挑戦する。最近この化合物の全シグナル帰属が終了した。そのため、プロトン-プロトンのスピン結合ばかりでなく、long range JCH の解析が容易になり、相対立体構造の解析は可能になる可能性が高まっている。これらのデータを元に、立体構造解析プログラム、ジスタントジオメトリー法の

適用を試みる。現在のところ、天然有機化合物へのジスタントジオメトリー法の適用は困難と言われているが、この実験の検討を試み、実験手法として確立する。

### 4. 研究成果

複雑な天然有機化合物の構造解析、主として、1) プロトン-プロトンのシグナルの重なり合う領域でのプロトン-プロトンのスピン結合定数を観測する、2) high order スピン系を解析する、3) プロトン-炭素間の遠隔スピン結合定数を観測する、という三点に重点をおいた新しい測定法の開発を目的とした。第一は、プロトン-プロトンのスピン結合による複雑なスピン系を単純化する方法として、Selective J-resolved HMBC 法を開発した。この方法は、隣接プロトンをすべて decoupling し複雑なスピン系に置いても目的とする long range JCH の観測を可能とした。さらに、新しく Selective COSY-J-resolved HMBC 法の開発に取り組んだ。この方法は感度の低い観測困難なプロトンの感度を如何に高めるかという観点から開発された。その結果、従来観測困難なプロトンでの long range JCH の測定を可能にすることが出来た。第二はシグナルが重なっている場合や化学シフトが接近した high order スピン系ではプロトン-プロトン、スピン結合定数の解析は困難になる。この問題を解決する方法とし J-resolved HMQC 法を報告してきた。しかし、multiplet に分裂した high order spin 系では first order スピン結合であっても spin の解析は困難となる場合がある。この問題を解決する方法として selective pulse を検討し、Selective J-resolved HMQC-1, -2 を開発した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

(1). Yasuhiro Igarashi, Hiromu Ogura, Kazuo Furihata, Naoya Oku, Chantra Indananda, and Arinthip Thamchaipenet Maklamicin, an Antibacterial Polyketide from an Endophytic Micromonospora sp. J. Nat. Prod. 査読有、2011, 74, 670-6

(2). Kazuo Furihata, Mitsuru Tashirob and Haruo Setoc

BIRD-J-resolved HMBC and BIRD-high resolution HMBC pulse sequences for measuring hetero nuclear long-range coupling constants and proton-proton spin coupling constants in complicated spin systems

Magn. Reson. Chem. 査読有、2011, 49, 53-58

(3). Kazuo FURIHATA, Sakurako SHIMOTAKAHARA, Yoichi SHIBUSAWA, and

Mitsuru TASHIRO  
An Effective Pulse Sequence for Detecting  
a Ligand Binding with a Protein  
Receptor Using a WET Sequence and the  
Repeated Z-Filters

ANALYTICAL SCIENCES 査読有、2010, 26  
1107-1110

(4). Keiichiro Motohashi, Takashi Toda,  
Masayuki Sue, Kazuo Furihata, Yoshikazu  
Shizuri, Yoshihide Matsuo, Hiroaki Kasai,  
Kazuo Shin-ya, Motoki Takagi, Miho  
Izumikawa, Yukio Horikawa, Haruo Seto.  
Isolation and structure elucidation of  
tumescenamides A and B, two peptides  
produced by Streptomyces tumescens  
YM23-260.

Journal of Antibiotics 査読有、(2010),  
63(9), 549-552.

(5). Masato Shirai, Masaaki Okuda,  
Keiichiro Motohashi, Masaya Imoto, Kazuo  
Furihata, Yoshihide Matsuo, Atsuko  
Katsuta, Yoshikazu Shizuri, Haro Seto.  
Terpenoids produced by actinomycetes:  
isolation, structural elucidation and  
biosynthesis of new diterpenes,  
gihornenolones A and B from  
Verrucospora gihornensis YM28-088.  
Journal of Antibiotics 査読有、(2010),  
63(5), 245-250.

(6). Kazuo Furihata, Mitsuru Tashiro,  
Haruo Seto.  
High-resolution-HMBC (HR-HMBC), a new  
method for measuring heteronuclear  
long-range coupling constants  
Magnetic Resonance in Chemistry 査読有、  
2010, 48, 179-183

(7). Kazuo Furihata, Sakurako  
Shimotakahara, Yoichi Shibusawa and  
Mitsuru Tashiro  
Application of WET sequence for the  
detection of the ligand signals resonating  
close to water

Magn. Reson. Chem. 査読有、2009, 47,  
971-976

(8). Kazuo Furihata, Mitsuru Tashiro,  
Haruo Seto.  
Selective J-resolved HMBC, an efficient  
method for measuring heteronuclear  
long-range coupling constants.  
Magnetic Resonance in Chemistry 査読有、  
(2009), 47(10), 814-818.

[学会発表] (計 12 件)

(1). 平成 20 年度日本農芸化学会大会 (名古屋)

隆旗一夫、瀬戸治男、  
HMBC 法の新しい応用測定 --- Selective  
J-resolved-HMBC 法について

(2). 平成 20 年度 第 47 回 NMR 討論会 (つくば)

隆旗一夫、田代 (下高原) 櫻子、田代充、  
Water 選択励起 pulse の開発-新 Water-LOGSY  
法について

(3). 平成 21 年度 第 48 回 NMR 討論会 (福岡)  
隆旗一夫、田代 (下高原) 櫻子、渋澤庸一、  
田代充、

STD 法と WaterLOGSY 法 軽水近傍でのシグナル  
検出について

(4). 平成 22 年度 第 49 回 NMR 討論会 (東京)  
隆旗一夫、

High Order Spin 系の解析 - Selective  
J-resolved HMQC 法の応用

(5). 2008 年  
The 49th Experimental Nuclear Magnetic  
Resonance Conference (U. S. A)

K. Furihata, and H. Seto:  
Selective J-resolved-HMBC, A New Method  
for Measuring Heteronuclear Long Range  
Coupling Constants

(6). 2009 年  
The 50th Experimental Nuclear Magnetic  
Resonance Conference (U. S. A),

K. Furihata, and H. Seto:  
Selective Hard Pulse J-resolved-HMBC, A  
New Method for Measuring Heteronuclear  
Long Range Coupling Constants

(7). 2010 年  
The 51th Experimental Nuclear Magnetic  
Resonance Conference (U. S. A),

K. Furihata and H. Seto:  
Selective J-resolved-HMQC, A New Method  
for Measuring Proton-Proton Coupling  
Constants of High Order Spin System

(8). 2011 年  
The 52th Experimental Nuclear Magnetic  
Resonance Conference (U. S. A),

K. Furihata:  
Selective COSY-J-resolved-HMBC, A New  
Method for Improving Sensitivity of Cross  
Peaks of Methine Proton Signals

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

降旗一夫 (FURIHATA KAZUO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：20219091

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：