

## 第 33 回 (平成 17 年度) 研究奨励金受領者研究報告

消化管脂肪酸受容体 GPR120 を介した GLP-1 分泌誘導による糖尿病改善効果

京都大学大学院薬学研究科 足達哲也

【目的】 受容体の中で、G-タンパク質共役受容体 (GPCR) は、主たる創薬のターゲットとして注目され続けており、最近、特定の脂肪酸をリガンドとする GPCR が見いだされてきている。例えば、膵  $\beta$  細胞に存在しインスリン分泌を惹起するもの (GPR40)<sup>1)</sup>、脂肪細胞に存在しレプチン分泌を惹起するもの (GPR41)<sup>2)</sup> が報告されている。一方、

我々の研究グループではゲノム情報のバイオインフォマティクス解析に基づき、消化管に新規脂肪酸受容体 GPR120 が発現していることを見だし、この受容体を介して消化管ホルモンのグルカゴン様ペプチド (GLP-1) 分泌が惹起されることを明らかにした<sup>3)</sup>。GLP-1 などの消化管ホルモンは膵  $\beta$  細胞に作用しインスリン分泌を惹起する因子としてインクレチンと呼ばれ、抗糖尿病性物質として世界的に注目されている。糖尿病や肥満は世界的に深刻な生活習慣病であり、国内外での医療費を圧迫している疾患となっている。そこで本研究では、消化管に直接脂肪酸を投与することによって、GLP-1 の分泌が亢進するか否かを検討

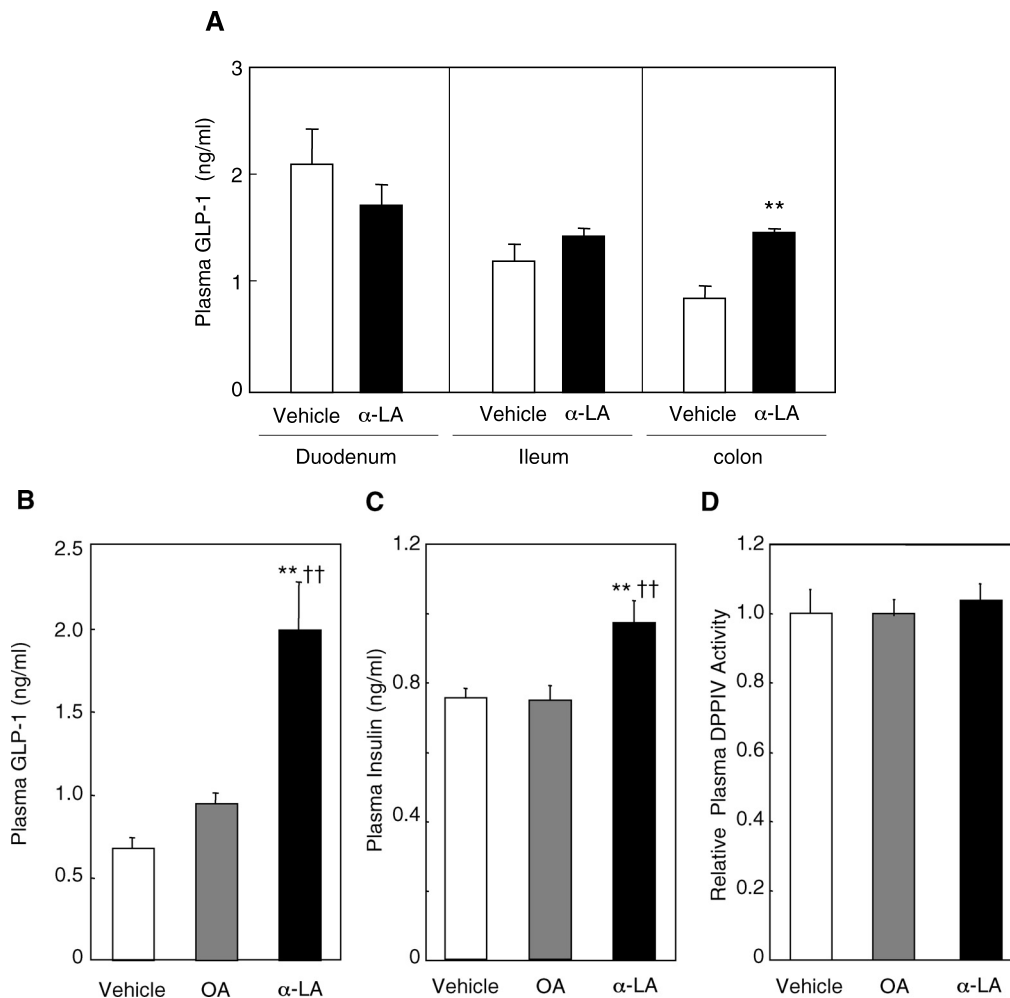


図 1 マウスへの遊離脂肪酸投与における GLP-1 分泌性

A:  $\alpha$ -LA の投与部位における GLP-1 の分泌性. \*\* $P < 0.01$  vs Vehicle.

B-D: オクタン酸 (OA),  $\alpha$ -LA および Vehicle (PEG400) 投与における GLP-1 (B), Insulin (C) の分泌レベルおよび血清ジペプチジルペプチダーゼ (DPPIV) 活性 (D). \*\* $P < 0.01$  vs Vehicle, †† $P < 0.01$  vs OA.

した。

【方法】 8 週齢雄性 C57BL/6J を麻酔下にて開腹し、十二

指腸、回腸あるいは結腸部分にカニューレを施した。試験物質として長鎖不飽和脂肪酸である  $\alpha$ -リノレン酸 ( $\alpha$ -LA)、中鎖飽和脂肪酸オクタン酸 (OA) を用い、それら

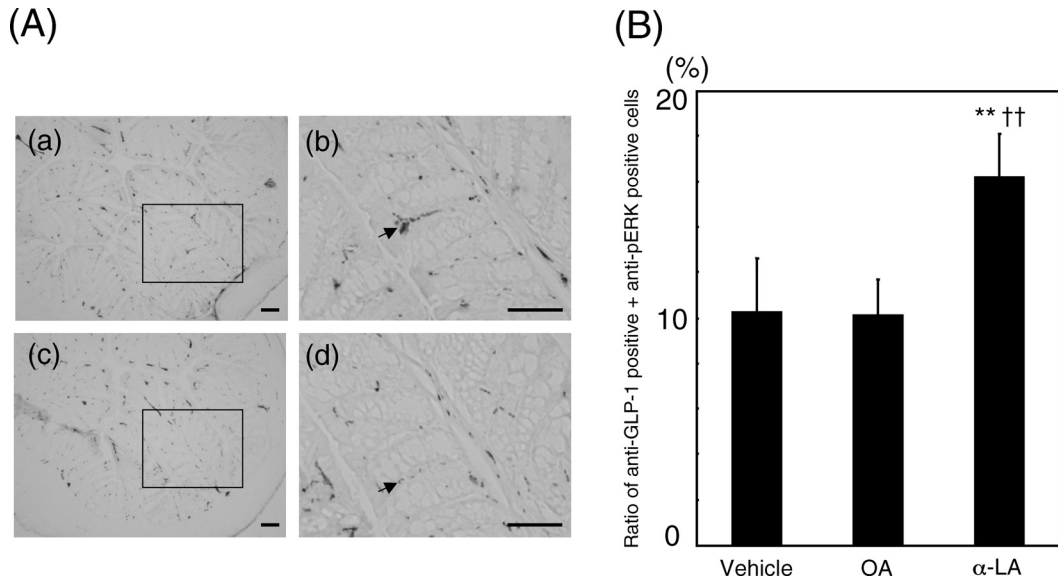


図 2 結腸における免疫組織化学的解析

A:  $\alpha$ -LA の投与後における結腸組織切片を作製し、抗 GLP-1 抗体 (a), (c) および抗リン酸化 ERK 抗体 (b), (d) で免疫組織染色を行った。(c), (d) は (a), (b) を拡大した写真。矢印は GLP-1 抗体および抗リン酸化 ERK 抗体陽性細胞。バー: 100  $\mu$ m。  
B: 総 GLP-1 陽性細胞における GLP-1 およびリン酸化 ERK 陽性細胞の割合。 \*\* $P$ <0.01 vs Vehicle, †† $P$ <0.01 vs OA.

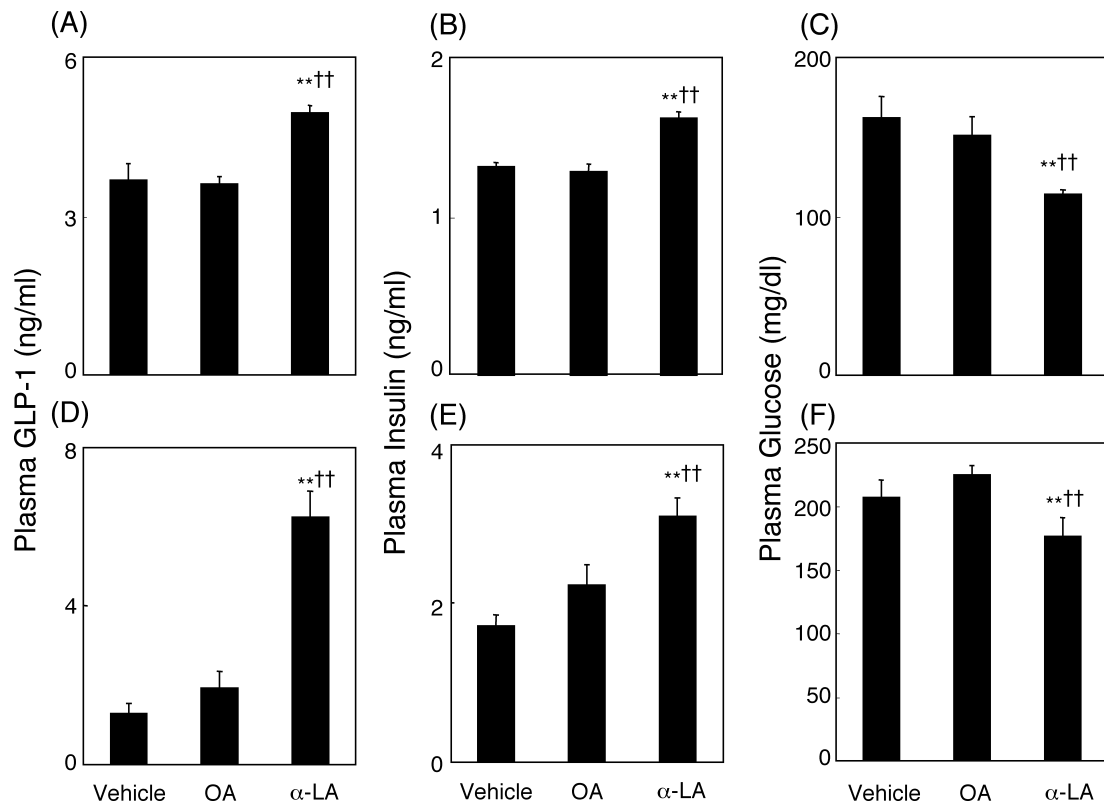


図 3 2 型糖尿病モデルにおける結腸における  $\alpha$ -LA の糖尿病改善作用

GLP-1 (A, D), インスリン (B, E), および血糖値 (C, F). 対照 C3H/He マウス (A-C), 糖尿病 NSY マウス (D-F). \*\* $P$ <0.01 vs Vehicle, †† $P$ <0.01 vs OA.

の溶媒 (vehicle) としてポリエチレングリコール 400 を用いた。100  $\mu$ l/min の速度で 100 nmol/g body weight となるようカニューレション部から投与した。15 分後に門脈より採血を行い、血漿中の GLP-1 およびインスリン含量を測定した。また消化管はホルマリン固定を行い、抗 GLP-1 および抗リン酸化 ERK 抗体にて免疫染色を行った。さらに 2 型糖尿病モデルである NSY マウス (雄性 40 週齢) を用いて、脂肪酸を同様に投与し、門脈血における GLP-1 およびインスリン含量を測定した。

【結果】 結腸への  $\alpha$ -LA の投与によって Vehicle に比して有意に GLP-1 分泌亢進が認められ (図 1A, B), その作用は OA および溶媒のみの投与では認められなかった。さらに、インスリンの上昇も認められ、その作用は OA および Vehicle の投与では認められなかった (図 1C)。また、GLP-1 分解酵素であるジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) の活性阻害が認められなかったことから (1D),  $\alpha$ -LA の投与による血中 GLP-1 レベルの上昇は、GLP-1 分解阻害によるものではなく、分泌の亢進であることが示唆された。また免疫組織化学的解析により、 $\alpha$ -LA の GLP-1 分泌促進作用に付随し、結腸の内分泌組織での抗 GLP-1

陽性細胞におけるリン酸化 ERK の上昇が確認された (図 2)。さらに、結腸への  $\alpha$ -LA 投与により、2 型糖尿病モデル NSY マウスにおいて、血糖値の低下が認められた (図 3)。

【結論】 結腸への活性脂肪酸  $\alpha$ -LA の投与により GLP-1 分泌が惹起され、それに伴ってインスリン分泌が亢進することが示唆された。また、2 型糖尿病においては  $\alpha$ -LA の投与により血糖の低下が認められた。長鎖不飽和脂肪酸の消化管への作用が、GLP-1 分泌亢進しその結果として糖尿病改善に寄与する可能性が示唆された<sup>4)</sup>。今後は脂肪酸およびその類縁化合物の生活習慣病治療および予防に向けた創薬への応用に研究を進める。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Itoh Y. *et al.*, *Nature*, **422**, 173-176 (2003).
- 2) Xiong Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1045-50 (2004).
- 3) Hirasawa A. *et al.*, *Nat. Med.*, **11**, 90-94 (2005).
- 4) Adachi T. *et al.*, *Biochem Biophys Res. Commun.*, **340**, 332-337 (2006).

## 複素環含有抗生物質生合成に関与する新規遺伝子産物の生化学的解析

富山県立大学工学部生物工学科 尾仲宏康

放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産することが知ら

れており、産業微生物として大変有用な菌群である。放線菌の生産する化合物の中にはヘテロ環を含有するものも少なくない。筆者らはヘテロ環のうち、インドロカルバゾール環および、チアゾール環、オキサゾール環に着目し、各構造を含む化合物であるレベッカマイシン、スタウロスポリン、ゴードスポリンの生合成経路の遺伝学的解明を行っ

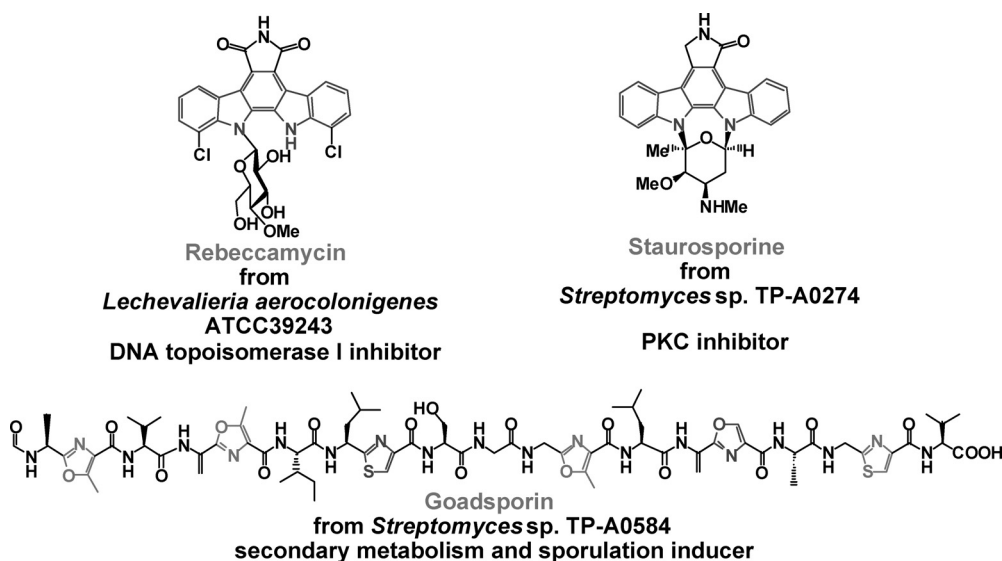


図 1 インドロカルバゾールおよびゴードスポリンの化学構造

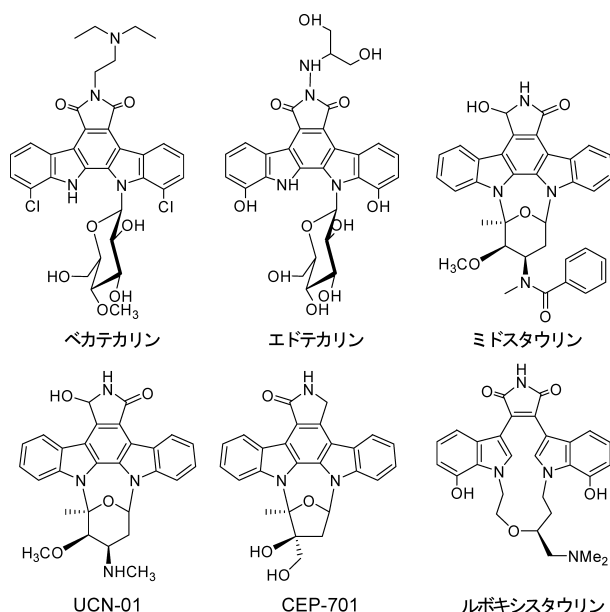


図 2 現在臨床試験中のインドロカルバゾール化合物

てきた<sup>1)</sup> (図 1)。

インドロカルバゾール骨格を有する天然化合物は、放線菌由来の産物を主として多数報告されている。強力なプロテインキナーゼ活性を有するスタウロsporinやDNAトポイソメラーゼ阻害剤であるレベッカマイシンなど多くの興味深い生理活性物質が存在するために、医薬品、特に抗癌剤などへの産業利用が期待される化合物群である。現在6種類のインドロカルバゾール系化合物が抗がん剤、白血病治療薬、糖尿病性眼疾患の治療薬として臨床試験が進められており、医学的利用価値が高い化合物として国内外で高い注目を集めている (図 2)。その生合成経路については、これまでほとんど知られていなかったが、近年、我々のグループの他、複数の欧米グループの精力的な研究により生合成機構の全貌が遺伝子レベルで明らかになった。これらの成果によってコンビナトリアル生合成を用いた新規

アナログ創製法なども実現しつつあり、インドロカルバゾール医薬品の創製等が期待されるまでになっている。

また、学術的にもインドロカルバゾール生合成に関与する酵素群は興味深く、これまでに知られていないユニークな触媒反応をする酵素が多数存在することが明らかになった。現在では、その反応触媒機構の精密解析等へ研究の興味がシフトしつつある。

## スタウロsporin生合成におけるインドロカルバゾール骨格形成反応の推定

本研究では、特にスタウロsporin生合成系をモデルに、インドロカルバゾール骨格の形成に関与する酵素の解析を行った。スタウロsporin生産菌である *Streptomyces* sp. TP-A0274 のスタウロsporin生合成遺伝子クラスターは15個の遺伝子からなる<sup>2)</sup>。このうち、インドロカルバゾール骨格を形成するのに必要な酵素遺伝子は *staO*, *staD*, *staP*, *staC* の4つである。これら4つの遺伝子産物の働きは遺伝子破壊株の解析から同定され、図3のような経路でインドロカルバゾール骨格であるK252cができあがると推定できた。まず、生合成前駆体であるトリプトファンが *StaO* の働きで酸化して、インドールピルビン酸のイミン体となる。次に、既知の蛋白とは相同性のほとんどない *StaD* の作用によりインドールピルビン酸のイミン体2分子がカップリング反応して、クロモピロリン酸 (CPA) を作る。そして、シトクロム P450 酵素である *StaP* が CPA 内の2個のインドール環同士を aryl-aryl カップリング反応によって閉環し、それに続けて、CPA のピロール環に付加している2個のカルボン酸の脱炭酸をおこなう。モノオキシゲナーゼである *StaC* はカルボン酸の脱炭酸後に同じ位置に付加する酸素原子の修飾を調節していると考えられている<sup>3)</sup>。このように、イミン体のカップリング反応には新規一次構造を持つ分子量120 kDaの巨大酵素である *StaD* が、また、その後の閉環脱炭酸反応には通常は

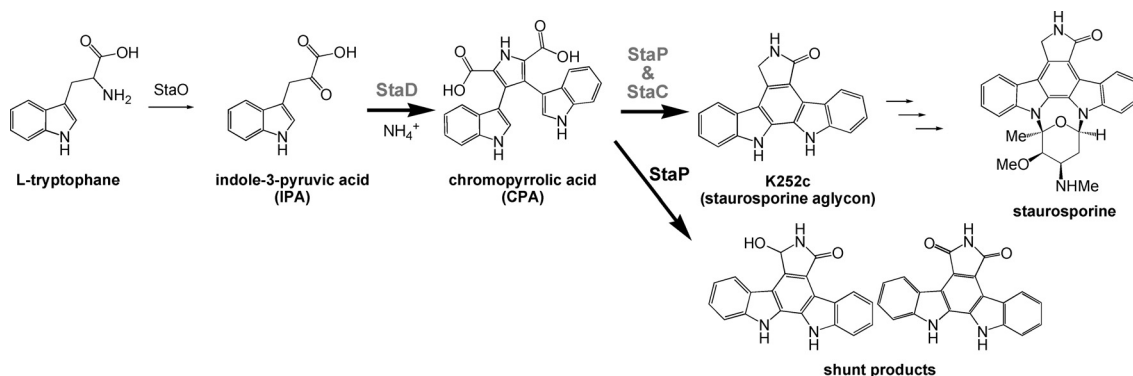


図 3 *Streptomyces* sp. TP-A0274 のスタウロsporin生合成経路

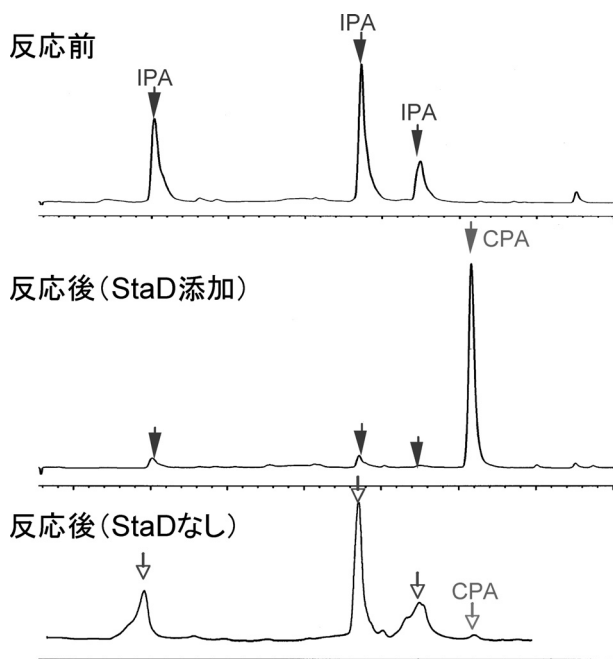


図4 精製StaDによるCPA形成反応の同定  
反応前は基質であるIPAのみが確認されたが、精製StaD (60 nM) を添加後 30℃ 30分インキュベート後ではCPAのピークがHPLCで確認できる。また、StaDを加えなくてもCPAは微量だが検出される。

酸素の付加反応を行うはずのシトクロム P450 が関与するなど、これまでに例のない特殊な反応が連続しておこることによってインドロカルバゾール骨格が形成されることが明らかとなった。

#### CPA 合成酵素・StaD の生化学的解析<sup>4)</sup>

インドロカルバゾール生合成における鍵中間体はクロモピロリン酸 (CPA) である。CPA をインドールピルビン酸より生成する酵素・StaD は唯一ビオラセイン生合成遺伝子である VioB 以外には相同性が見られないユニークな酵素である。VioB についてはビオラセイン合成に関与する酵素の一つであることしか分かっていなかったため、StaD がどのような反応機構で CPA を生成するかは不明であった。そこで、我々はまず、大腸菌で組換え StaD を発現し、組換え蛋白発現を行った。その結果、StaD は分子

量 500 kDa にもなる巨大 4 両体ヘム酵素であることを明らかにした。次に StaD 蛋白の酵素反応を同定するために、基質であるインドールピルビン酸とこの基質をイミン体に変換するためのアンモニウムイオンを添加し、試験管内でインキュベートすることにより、CPA の生産を確認することに成功した (図4)。また、興味深いことに、本反応は StaD 酵素が存在しなくても効率が悪いながらも進み、極微量の CPA を生成することが分かり、StaD はこの反応を加速する酵素であることが明らかとなった。なお、その際の、 $K_{cat}/K_{uncat}$  は 101.2 (250  $\mu$ M IPA 添加時) であり、CPA 生成における StaD の添加効果はかなり大きいことが示された。

#### 今後の展開

本研究奨励により、StaD の生化学的解析を進めることができた。前述したように、インドロカルバゾール生合成には、StaD が関与する反応の他にも特殊な反応が存在している。最近、我々は、StaD が生成する CPA をインドロカルバゾールに変換するシトクロム P450StaP の立体構造解析に成功した。StaP は一般的なシトクロム P450 酵素が行う酸素添加反応ではなく、ヘムから直接基質の電子を引き抜き、基質にインドールカチオンラジカルを形成させることにより、インドロカルバゾール骨格を形成するというこれまで知られている P450 反応とは異なるユニークな反応であることを明らかにした<sup>5)</sup>。今後は、StaD の立体構造解析についても研究を進め、その反応機構について詳細に明らかにしたいと考えている。

#### References

- 1) H. Onaka, *Actinomycetol*, **20**, 62-71 (2006).
- 2) H. Onaka, S. Taniguchi, Y. Igarashi and T. Furumai, *J. Antibiot (Tokyo)*, **55**, 1063-71 (2002).
- 3) H. Onaka, S. Taniguchi, Y. Igarashi and T. Furumai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 127-38 (2003).
- 4) S. Asamizu, Y. Kato, Y. Igarashi and H. Onaka, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 2923-2926 (2007).
- 5) M. Makino, H. Sugimoto, Y. Shiro, S. Asamizu, H. Onaka and S. Nagano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11591-11596 (2007).

糖鎖接着により高次構造をとる、小さな 15 残基ペプチド体の分子認識研究—蛋白質の機能構造相関関係解明を目指して

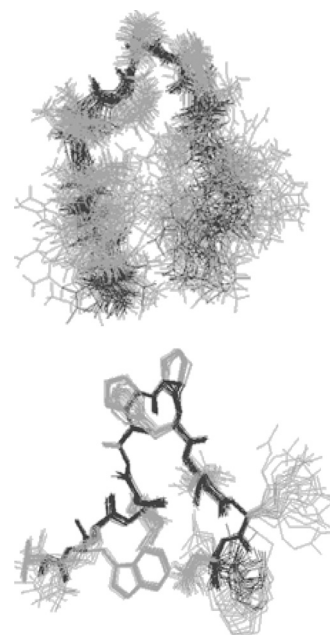
産業技術総合研究所北海道センター 清水弘樹

インフルエンザの感染、発病は、インフルエンザウイルス表面に存在するヘマグルチニンによってヒトの細胞に結合し、ノイラミダーゼを用いてヒトの細胞から離脱し、増殖していくシステムを取る。インフルエンザの特効薬として近年注目をあびているタミフルは、このノイラミダーゼの構造を精査し、そのポケットの形を基に設計、開発された。このように標的化合物の形を基に開発された薬は他に、肺がん治療薬のイレッサ、慢性骨髄性白血病のグリベックがあるが、その数は決して多くない。しかし新薬開発手法は、新しい創薬研究法として注目されるコンセプトである。

我々は、タンパク質における活性と、その活性部位の構造の相関関係の解明をすすめている。標的タンパク質は一般に巨大分子であり、その構造研究は結晶化して X 線解析をおこなうのが一般的である。しかしこれでは、分子が機能を発揮する溶液中での構造を反映していないこともある。実際にペロ毒素認識 Gb<sub>3</sub> 糖鎖リガンド研究において標的タンパク質と認識リガンドの混合体の X 線解析が溶液中と異なった結果を与えたこともあった。溶液中の分子構造を調べるのに最適な手法として NMR 法があるが、一般にタンパク質は NMR 法で扱うには大きすぎる。そこで、活性部位のみ取り出した部分構造をターゲットにして研究を進めることもあるが、これでは高次構造が変わってしまったり、エントロピー損失の影響などからその活性を失うことも少なくない。そこで我々は、逆に「小さなペプチドレベルで分子認識をもつ化合物を探索し、その構造活性相関を精査し、その知見をタンパク質の機能研究へ展開」することを指向した。

共同研究者の慶応大学の松原らは、ファージ提示法によって、オリゴ糖認識能を持つ 15 残基のペプチド体を探索し、3 種類の非天然型化合物の釣り上げに成功した。本研究では、その中で比較的強い結合力を示す 15 残基の p3 ペプチド体 (VWRLAPPFSNRLLP) と GM1 オリゴ糖 (Galβ1→3GalNAcβ1→4(NeuAcα2→3)Galβ1→4Glcβ1→1'Cer) の分子接着系に着目し、結合様式の解明を目指した。

まず、CSI-MS 法 (コールドスプレーイオン化質量分析法) により、p3 と GM1 オリゴ糖間の単分子同士の結合定数を検証した。ファージ提示法で選択した後の引き続いて



NMR による p3 構造解析: p3 単独 (上) と GM1 混在時 (下)

行われた QCM 法 (水晶共振子マイクロバランス法) では解離定数が  $\mu\text{M}$  レベルであったが、CSI-MS 法では mM レベルに低下した。これは、QCM 法では一方の分子を単分子膜化することから、クラスター効果による結合の強化分も読み込まれたものになっているため、と考えられる。逆の見地から見ると、分子-分子認識は、クラスター効果によって 1000 倍もの結合力増加が可能になる、とも言える。

次に NMR 法によって分子接着時の構造を精査した。すると、p3 ペプチド自体は単独では非常に“揺らいだ”構造を取っていたが、GM1 糖鎖認識時には、一部 2 次構造を取り、主鎖だけでなく Trp の側鎖インドール基などで強い収束構造をとることが分かった。一般にタンパク質はその高次構造を取るが故に種々の機能を発現すると言われている。今回、15 残基という短いペプチド体が高次構造をとることを明らかにできたのは、タンパク質の構造活性相関研究に極めて有意義な知見となると思われる。今後は、「糖鎖側の認識構造」を明らかにするとともに、構造活性相関研究、さらに創薬研究へと展開する所存である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご理解をいただき、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に感謝申し上げます。

#### 〈参 考〉

- 1) H. Shimizu, N. Fujitani, T. Ohta, N. Nagahori, Y. Komata, N. Miura, T. Matsubara, T. Sato, S.-I. Nishimura: *Glycoconjugate J.*, 22, 261 (2005).

- 2) N. Fujitani, H. Shimizu, T. Matsubara, T. Ohta, Y. Komata, N. Miura, T. Sato, S.-I. Nishimura: *Carbohydr. Res.*, Special Issue; Glycomimetics, **342**, 1895 (2007).

## 〈要 約〉

ファージ提示法によって見つけ出された非天然型 15 残基ペプチドである p3 は、GM1 オリゴ糖との間に比較的高い接着能があることが報告されている。そこで NMR 法によって、GM1 の有無による p3 ペプチドの構造研究を行った。すると、p3 ペプチドはそれ自身では非常に“揺らいだ”構造を取っていたが、GM1 糖鎖認識時には、一部 2 次

構造を取り、主鎖だけでなく Trp の側鎖インドール基などで強い収束構造をとることが分かった。

一般にタンパク質は高次構造を取るが故に種々の機能を持つと言われている。15 残基という短いペプチド体が高次構造を取るのは珍しい。今後は、「糖鎖側の認識構造」を明らかにするとともに、構造活性相関研究、さらに創薬研究へと展開する所存である。

最後に、本研究の推進にご援助いただきました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝いたします。

## 母子親和行動にオキシトシン/オキシトシン受容体システムが果たす役割の解析

自治医科大学生理学講座神経脳生理学部門 高柳友紀

## 緒言

下垂体後葉ホルモンのオキシトシン (OXT) とその受容体 (OXTR) は、アゴニスト・アンタゴニストを用いた研究によって、社会行動と親和行動に重要であることが示されていた。本研究奨励金受領者の作製した OXTR 遺伝子欠損 (*Oxtr*<sup>-/-</sup>) マウスには母性行動低下が認められた<sup>1)</sup>。一方で幼若期の *Oxtr*<sup>-/-</sup> マウスでは、母親から隔離したときに野生型 (WT) マウスでは観察される超音波発声がほとんど認められなかった<sup>1)</sup>。これらの結果は母子親和行動の形成あるいは表出において、母子共に OXTR が重要な因子であることを示している。そこで、本研究では母子間の親和関係における OXT/OXTR 系の働きを明らかにする目的で、母性行動あるいは母親に対する仔の求愛行動において脳のどの部位の OXT/OXTR 系が活性化されるのかの解析を行うことを目的とした。

## 方法および結果

1. 母性行動が誘発されるときに OXT/OXTR 系活性化される脳部位の解析: 母性行動誘発時に OXT/OXTR 系が機能する脳部位を明らかにする目的で、神経活動マーカーである c-Fos の免疫組織化学による解析を行った。未経産マウス (WT, *Oxtr*<sup>-/-</sup>) のケージに生後 1~3 日の WT 仔マウスを 5 分間入れ、仔の超音波発声またはにおいによる母性行動誘発刺激を与えた。仔マウスへの暴露開始 80 分後に灌流固定を行って脳を単離し、それぞれの切片について c-Fos 蛋白質の発現を観察した。

外側中隔野、内側視索前野は母性行動制御に中心的な役割を果たすことが知られ、OXTR の発現部位でもある。

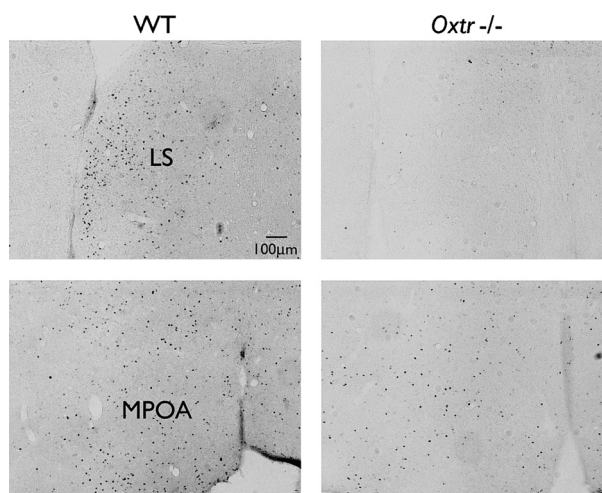


図 1 仔と対面させた WT, *Oxtr*<sup>-/-</sup> 未経産マウスの外側中隔野 (LS; 上), 内側視索前野 (MPOA; 下) における c-Fos の免疫組織化学染色。

*Oxtr*<sup>-/-</sup> ではこの領域の c-Fos 陽性細胞の数が WT に比較して少ない様子が認められた (図 1)。この結果は *Oxtr*<sup>-/-</sup> の母性行動低下には、外側中隔野、内側視索前野の神経活動の低下が影響していることを示唆した。

2. 母子分離によって OXT/OXTR 系が活性化される仔の脳部位の解析: 母子分離によって仔マウスが母親への求愛行動を示すときに OXT/OXTR 系が機能する脳部位を明らかにする目的で、OXT と c-Fos の二重免疫染色による解析を行った。生後 7 日目の C57BL/6J マウスを母親と同腹仔から隔離し、温度 34℃、湿度 85~90% の環境下に二時間静置した。その後、灌流固定を行って脳を単離し、OXT と c-Fos の発現を観察した。コントロールには直前まで母親と接触していたマウスを用いた。

母親と隔離したマウスにおいて、視索上核で c-Fos と OXT の二重染色陽性細胞が多く存在する傾向が認められた (図 2)。このような傾向は室傍核に存在する OXT 陽性細胞には認められなかった。また、OXTR が発現し、社会

コントロールマウス

母親と隔離したマウス

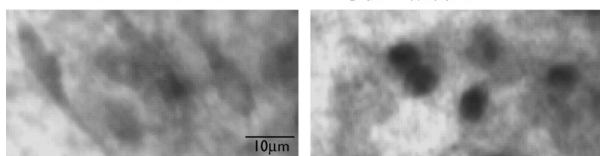


図2 母親と隔離した C57BL/6J 仔マウスの視索上核における OXT および c-Fos の免疫組織化学染色 (黒: 核 (c-Fos), 灰色: 細胞質 (OXT)).

行動との関連が示されている部位 (嗅球, 外側中隔野, 扁桃体) にも c-Fos の発現が認められた. これらのことから, 母親との隔離刺激によって仔マウスの脳では視索上核の OXT 産生ニューロンが選択的に活性化され, 樹状突起から脳内への OXT 放出がおこり, 母親への求愛行動が表れる可能性が示唆された.

#### 今後の展開

現在, 母性行動誘発刺激を与えたマウスの脳で発現していた c-Fos について, 母性行動制御に関わる他の部位の観察を進めている. 今後は, ウイルスベクターを用いて OXTR 遺伝子を局所的に導入し, *Oxtr*<sup>-/-</sup>マウスの母性行動異常が回復する脳部位を同定する.

また, 母仔分離時の仔マウスの脳について, 引き続き OXT と c-Fos の二重免疫染色による解析を続けている.

今後は, OXT の濃度を測定して視索上核からの OXT 放出についての解析を進める. 更に, *Oxtr*<sup>-/-</sup>仔マウスに対して母仔分離を行って c-Fos の発現を観察し, 超音波発声低下の原因となる脳部位を解析する. 一方で, 現在我々は超音波発声の解析装置を導入し, 実験系を検討中である. 今後はこれを用いて, 薬剤, 遺伝子の局所的な導入を行った仔マウスについて解析を行い, その効果を確かめていく.

仔は幼若期における母親との接触が少ないと幼若期に問題行動を起こすだけでなく, 成体になってからの不安行動やストレス応答反応が亢進し, さらに母性行動が低下傾向になり, 世代を越えて影響を及ぼす. 幼若期の虐待は PTSD を起こすことも知られる. 一方, 母性行動も仔の母親に対する行動によって大きな影響を受ける. 本研究は母仔の親和関係における OXT/OXTR 系の役割を明らかにするものであり, 母子関係に由来する様々な精神・神経疾患の治療への応用が期待される.

最後に, 本研究を遂行するにあたり, 研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします.

#### 文 献

- 1) Takayanagi, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 16096-16101 (2005).

#### イネファイトアレキシンの生合成解明を指向したジテルペン類の合成研究

東京農業大学応用生物科学科 矢島 新

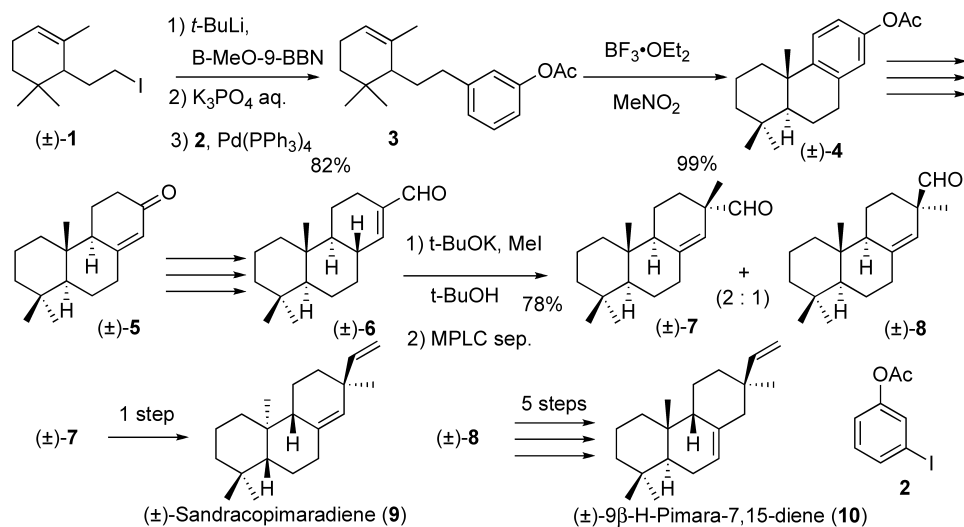
イネいもち病は, 稲作に於いて現在でも最も注意の要する病害である. いもち病菌に対するイネの防御機構にファイトアレキシンの関与が重要であることが明らかとなってきたが, その生合成は未だ完全には解明されていない. ファイトアレキシンは健康な植物体には存在せず, 菌感染などの外的刺激を受けると初めて生合成される抗菌物質であり, その生合成経路, 生合成遺伝子の解明により, イネ自身の防御機構を理解することは防疫の観点から重要である. そこで, イネジテルペンファイトアレキシンの生合成を解明する為のアプローチとして, 各種のイネファイトアレキシン関連ジテルペンの合成研究を行い, イネファイトアレキシン生合成を解明することを目的とした.

#### 1. 三環性ジテルペン類の新規合成法の開発

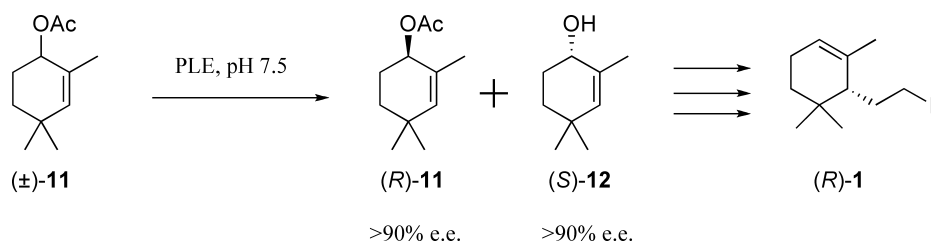
まず *B*-アルキル鈴木-宮浦カップリングを鍵段階として用いる, 様々なジテルペン合成に応用可能な方法論を開発することが出来た. すなわち, ヨウ化  $\gamma$ -シクロホモゲニール (1) と 2 をカップリングすることにより, 閉環前駆体を得た後, Lewis 酸処理によって閉環し三環性化合物を好収率で得ることに成功した. 13-位酸素官能基を足がかりとして, 様々なジテルペン類に誘導可能なエノン 5 を経てエナール 6 とし, 四級メチル基を導入し, 7 および 8 を 2:1 で得た. 両異性体を用いることにより, オリザレキシン類の生合成中間体 (±)-サンダラコピマラジェン (9), モミラクトン類の生合成中間体 (±)-9 $\beta$ H-ピマラ-7,15-ジエン (10) の新規合成法を開発することが出来た.

#### 2. 光学活性体の合成研究

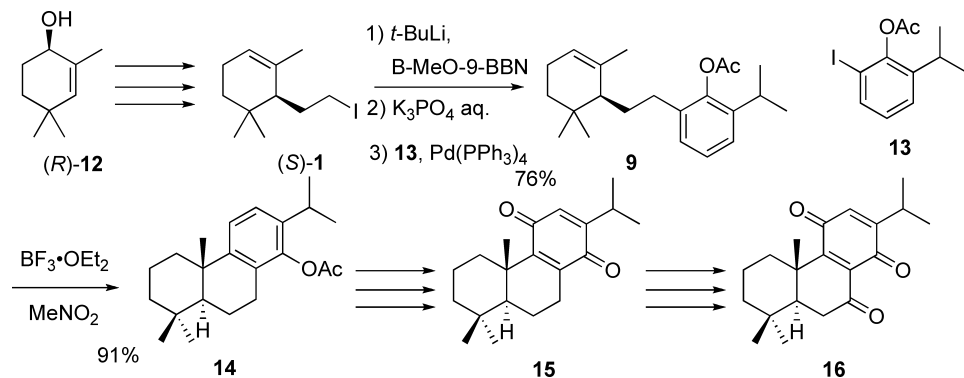
常法に従い, ラセミ体の 11 から豚肝臓エステラーゼ (PLE) による速度論的加水分解反応により, 90% e.e. 以上の鏡像体的に純粋な 11 と 12 を得ることが出来た. これらは, 常法に従い光学活性な 1 まで導いた後, 上述の方法



Scheme 1. Synthesis of racemic diterpenes.



Scheme 2. Preparation of the optically active intermediates.



Scheme 3. Synthesis of cryptoquinone and 12-deoxyroyleanone.

に従って光学活性な *ent*-サンダラコピマラジェン (9) を合成することに成功した。

### 3. Cryptoquinone, 12-deoxyroyleanone の全合成

開発した手法を用いて、本法の有用性を示すため途上国において現在でも深刻な問題となっているリューシュマニア症の予防に有効な 12-デオキシロイレアノン (15) 及びイネいもち病菌に対する抗菌活性を有するクリプトキノン (16) の合成研究を行った。異なる置換位置、様々な置換基を有するハロゲン化アリアルとヨウ化  $\gamma$ -シクロホモゲラニ

ル (1) との *B*-アルキル鈴木-宮浦カップリングは円滑に進行し、その後の閉環反応も好収率にて三環性化合物を与えた。本法により 12-デオキシロイレアノン (15) の不斉全合成を達成すると共にクリプトキノン (16) の形式合成を達成することが出来た。

### 今後の展開

今回開発に成功した方法論に従い、様々なジテルペン類の合成が可能であると考えられる。それらの合成品を標品としてイネジテルペンファイトアレキシンの生合成に関与

する酵素，遺伝子群を解析していく予定である．

最後に，本研究の遂行にあたり御援助を頂きました（財）  
農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします．