

次にこの水平 30 ミクロンの中心位置に減衰なしの XFEL を 1 パルス照射した。これは「測定に利用する強度の X 線で結晶に損傷を与える」ための照射である。最後に最初と全く同じ、つまり 1% に減衰させた X 線を利用した条件で 31 枚の回折データを取得した。最初と最後の合計 62 枚の回折イメージ上のスポットの数を結晶上の照射位置に対してプロットしたのが図 2 右である。照射後のプロットでは中心に高強度 XFEL パルスが照射されているので損傷により最も観測された回折点が少なく、そこから離れるほど回折点の数は照射前のリファレンス (赤) に近づいている。このグラフから減衰なしで照射された 10 keV (波長約 1.24 Å) の XFEL の中心位置からおおよそ 11 ミクロン程度の位置までが放射線損傷により影響を受けていることが分かる。同様の測定を縦方向についても行った結果、概ね水平方向と同様の結果を得た。我々はこの結果により無損傷に近づくようなセーフティマージ

ンを付加し、各照射点間の距離を 50 ミクロンとし実験を行うこととした。減衰なしの XFEL 1 パルスの照射での吸収線量はプログラム RADDOSE15 を用い 9.8 MGy となった。参考までにシンクロトロン放射光施設の BL32XU を用いた場合、同じビームサイズ、同じ吸収線量照射では照射位置から 3 ミクロン程度となり SACLA で得られた 11 ミクロンよりも狭くなっていた。詳細を検討する測定は行っていないが、凍結結晶に 1010~1011 光子の XFEL パルスを照射した後、顕微鏡で観察するとビームサイズより大きな径で結晶がえぐれたような照射痕が残ることが確認できる。このことから XFEL 照射の際には通常の放射線損傷に加え、結晶を「削り取る」ような損壊も起きているのではないかと考えている。このように削り取るような損壊はシンクロトロンビームラインでも室温の蛋白質結晶に高強度 X 線を照射した際に観測することができる。

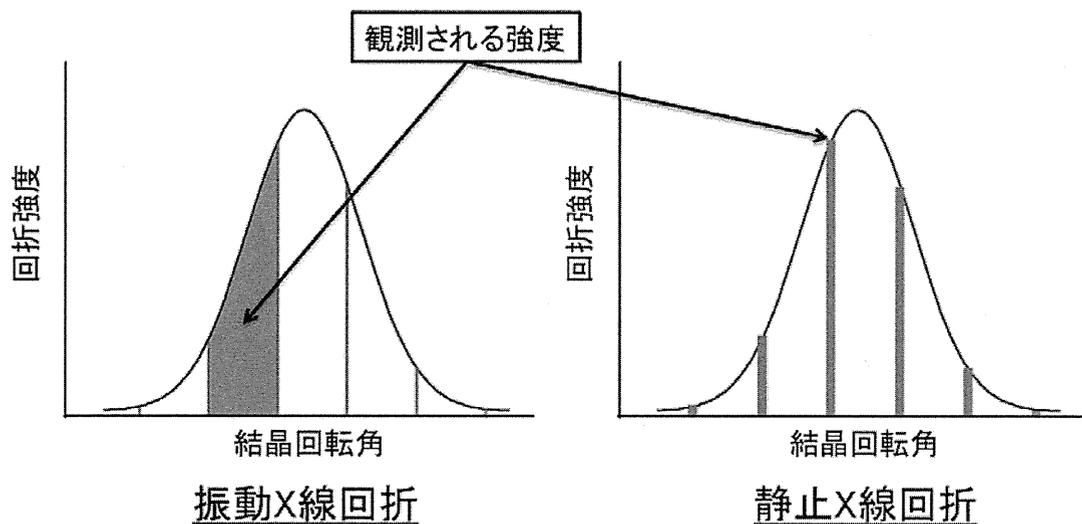


図 4 従来法(振動 X 線回折)と SALCA で利用している方法(静止 X 線回折)の違い

振動 X 線回折では結晶を回転させながら回折強度(ロッキングカーブ)を得る(左)。一方、静止 X 線回折ではロッキングカーブを複数の固定角度でサンプリングした強度を得る(右)

【静止回折像を収集する条件決定】

さて本実験で最も重要な、二つ目の実験パラメータ「照射点間の回転角度」について我々が実験を行う前にどのようなことを検討したかについて簡単に触れておきたい。

シンクロトロン放射光を用いた結

晶構造解析では回折データ収集の際にいわゆる“振動写真法”と呼ばれる測定方法を用いる。この方法ではタンパク質結晶を回転させながら X 線を照射し 1 枚の回折イメージを得る。回折イメージ上に観測されるある反射強度に注目すると回転方向に強度プロファイルを持っており(以下ロッキングカーブ) 1 枚の回折イメージ上に観

測される強度は図 4 に示したように全体の強度(完全反射強度)の一部である(部分反射強度)場合が多い。データ収集時には結晶は連続した回転角度をカバーするように多数の回折イメージを取得するので、最終的にはそれぞれのイメージ上に観測された部

分反射強度をすべて足しあわせたものをその反射の回折強度（完全反射強度）として取り扱う。

ところが、フェムト秒パルス X 線を照射している間に結晶を回転させることは（今のところ）ゴニオメータの最大回転速度の制限から不可能であるため、SACLA では従来の振動写真法を用いることはできない。このため結晶をある角度に固定し X 線を照射・回折イメージを取得する“静止写真法”を用いなければならない。図 4 右に静止写真法を用いた測定についての概略図を示した。回折強度を不連続にサンプリングするため、得られた強度を足しあわせても全体の強度を得ることができない。もちろん、この角度ステップを小さくしていけば正確に反射強度を測定することはできるが、構造解析のために集めなければならない回折イメージのフレーム数は増える。特に今回の測定のように 1 イメージごとに無損傷な結晶体積へ XFEL を照射しなければならない実験では必

要フレーム数の増加は、利用する結晶数の増加、測定時間の増大につながるため非効率的であると判断した。しかしながら理由のある確かな測定条件の選定はこの時点ではできていなかった。

そこで、我々はシンクロトロン放射光を用いた静止写真法のデータ測定により、どの程度の角度ステップであれば原子分解能で精密な構造解析が可能であるかを検討した。まず、ニワトリ卵白リゾチームの凍結結晶を用いて、SPring-8 偏光電磁石ビームライン BL26B2 において振動写真法により取得したデータセット、また同じ結晶から角度ステップ 0.05° 、総データがカバーする結晶回転角度が 90° の静止写真法により取得したデータセットを準備した。前者のデータを用いて PDB に登録されている高分解能モデルを用いて構造精密化を行ったリゾチームの原子座標を「正しい構造」として取り扱った。同様に角度ステップ 0.05° の静止写真法データについて

も振動写真法により得られたものとして MOSFLM により積分し構造解析を行った。さらに、同じデータセットを 1 枚毎、2 枚毎、3 枚毎、と飛ばして作成した仮想的な 0.10° 、 0.15° 、 0.20° ステップの静止写真データセットを用いて、それぞれ回折データ処理プログラムである MOSFLM で積分・構造解析を行った。表 1 にこの結果を示した。それぞれから得られた構造因子を用いて構造の精密化を行った後、信頼度因子 (R-factor) や正しい構造との座標の違いを評価した。結果として、 0.2° ステップの静止写真法であれば得られる構造を原子分解能で評価することが可能であると判断した。この時、結晶のモザイク角が 0.4° 程度であったため、我々はモザイク角の半分程度のステップ角度を選択すれば原子分解能かつ精密構造解析が可能であると判断した。

実際には、凍結 CcO 結晶を用いて SACLA で収集したいくつかの結晶の平

均的なモザイク角が 0.3° 程度であったためその半分よりも小さな 0.1° というステップ角度を選定し静止写真のデータ収集を行った。この方法は後に、Ilme Schlichting⁵ により SFX (Serial Femto-second Crystallography) と区別化するために「Serial Femtosecond Rotation Crystallography (以下 SF-ROX)」と命名された。

ステップ [deg.]	反射 数	$\langle I/\sigma \rangle$	R_{merge} [%]	R_{free}/R [%]	r.m.s.d. [Å]	C.C.
0.05(rot)	110,528	35.0(10.8)	3.5(16.1)	18.6/16.8	-	0.891
0.05	110,931	26.3(3.9)	5.2(46.5)	20.5/17.1	0.031	0.899
0.10	111,577	21.2(4.6)	6.0(39.4)	19.8/17.0	0.033	0.900
0.20	109,082	11.0(3.4)	10.8(51.5)	20.2/17.4	0.033	0.897

表 1. 静止写真法で収集したデータを用いた精密化の妥当性評価。同じニワトリ卵白リゾチームの結晶から 0.05° 振動写真法および 0.05° 静止写真法で回折データを収集した。

0.10°、0.20° ステップの静止写真データは 0.05° 静止写真法のデータを間引いて仮想的に作成し、各データを独立のものとして MOSFLM/SCALA で処理して PDBID:1LZC のリゾチームを初期モデルとして座標・温度因子の精密化を行った。原子座標の r.m.s.d. (平均二乗偏差) の計算では 0.05° 振動写真法で得られたデータで精密化した座標に対して、各データで精密化した座標を用いて評価した。C.C. は精密化で得られた最終モデルとマップとの相関係数 (phenix.get_cc_mtz_pdb を用いて計算) を示している。

(Evaluation of precision of structure factors obtained by various oscillation steps of still method.)

【実施した測定とデータ精度】

実際に XFEL の高フラックス微小ビームを用いた測定の手順を簡単に以下に記す。凍結 Cc0 結晶をゴニオメータにマウントし、結晶の最も広い面を XFEL 光軸に垂直にし、この角度を 0° とした。複数結晶からデータ収集をすることが前提であったので、結晶マウント後この作業を必ず行い、0~135° 分のデータを収集することを目指した。露光点間の距離 50 ミクロン、静止写真のステップ角度 0.1° で測定を行った。Cc0 結晶は平均的な結晶サイズは 500 × 500 × 50 ミクロン、静止写

真のステップ角度 0.1°で測定を行った。Cc0 結晶は平均的な結晶サイズは 500 × 500 × 100~200 ミクロン程度であったため、多いものだと 1 結晶から 100 枚程度 (約 10°分) の角度が連続する回折イメージが取得可能であった。実験が終了した時点で、76 個の結晶を用いておおよそ 135°分のデータを収集することができた。それぞれの結晶については CCP4 プログラムである MOSFLM を用いて指数付け、各イメージ上に観測 (表 2) データ処理の結果および精密化の結果 *() 内に最外殻の情報を記載された反射強度の積分を行った。1,170 枚の回折イメージから最終的には表 2 に示す統計値のデータを取得することができた。

Data collection/processing	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions a, b, c (標準偏差)	182.60 (0.38), 204.51 (0.55), 178.29 (0.46)
Resolution*	27.33-1.90 (2.00-1.90)
Observed reflections*	1,903,997 (256,844)
Independent reflections*	500,669 (71,920)
Averaged redundancy*	3.8 (3.6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^*$	6.7 (2.1)
Completeness(%)*	96.2 (95.1)
R_{int}^*	0.243 (0.408)
$CC_{1/2}^*$	0.872 (0.583)
Refinement	
Resolution	27.33 - 1.90
No. of reflections (all / free)	473,986 / 25,158
R / R_{free}	0.195 / 0.230
R.m.s. deviations	
Bond length (Å)	0.027
Bond angles (degrees)	2.33

(表 2) データ処理の結果および精密化の結果 *() 内に最外殻の情報を記載 (Data statistics and refinement results)

【配位子の構造】

これまで記載したような回折実験により得られたデータを用いてCc0の構造解析を行った。精密化に関する情報は表2にまとめた。余談になるが冗長度に関して、SF-ROXの場合には「部分反射強度を足しあわせた後の完全反射強度としての冗長度」であって、従来の振動写真法で評価する“冗長度”と同じである。いわゆるSFXのモンテカルロ積分データのそれ（部分反射強度も“1個”と数えた反射の数）とは厳密には定義が異なっている。

さて今回の目的であった配位子の構造についてはまず酸素還元中心の電子密度図を2Fo-Fcマップにより確認した。配位子はこれまでのCc0酸化型構造と同様、Fea3-CuBの間に存在しており特に大きな構造変化は認められなかった。定量的に配位子の結合長を検討するために我々はここに酸素原子が2個存在することを前提とし、その結合長に通常精密化時に利用する束縛条件を適用しないで(束縛条件なしの)原子座標の精密化を行った。束縛条件なしの精密化後の酸素原子間距離は1.7 Åとなった。これと同じ精密化をシンクロトンビームラインBL44XUと400個以上の結晶から得たデータに適用すると1.9 Åであり6、その数値よりも0.2 Å短いものとなった。さらに電子密度図に基づき酸素化合物の結合距離を決定するために、今度は逆に配位子の酸素間の結合距離に0.1 Åずつ1.2 Å(分子状酸素)~1.8 Åという束縛条件を与えて構造精密化

を行い、得られた構造因子を用いてFo-Fcマップ(差フーリエ電子密度図)を比較した。この結果、酸素結合距離が1.5 Åと1.6 Åの結合長の時に残余電子密度の量が最も減少して見えることが分かったため、酸化型Cc0中の配位子結合距離が1.55 Åであるとして精密化を行い最終構造とし、配位子の化学種が過酸化イオンであると結論づけた。他にもこれまでの高分解能構造解析において放射線損傷量が増えた際に次第に高くなる水分子の電子密度の評価からも得られた構造が無損傷であるという確証を得ることが出来た14。

【高フラックス微小X線で得られる回折分解能】

冒頭でも述べたが今回最も重要な目的は「X線による損傷を受けていない高分解能」のタンパク質結晶構造解析であった。結果として大きな凍結結晶を用いるメリットは十分あったと考えている。実験に利用する結晶サイズと分解能の関係について今回の実験結果を踏まえて少し考察しておきたい。

X線検出器で観測できる回折強度と実験に用いるパラメータの関係を示した著名なDarwinの式がある16。この式から、回折強度はX線で照らされた結晶体積に含まれる単位格子の数に比例し、結晶の体積が大きいほど得られる強度シグナルは強くなることがわかる(直感的にも正しい)。次にCc0の場合には結晶格子体積はおおよそ

6 Å³ となっており、例えばニワトリ卵白リゾチームの 0.2 Å³ に比較して非常に大きいといえる。これは単純に Cc0 の分子量が約 400 kDa であるのに対してリゾチームは約 18 kDa、という分子の大きさを反映しているとも言える。このように大きな分子の結晶であればあるほど必然的に結晶格子は大きくなるため、大きな結晶を利用することで回折分解能を向上することは有効であろう。

確認実験の結果として図 5 に Cc0 酸化型結晶のサイズと SACLA の X 線を照射した時に得られる回折分解能の関係をプロットした。Cc0 酸化型の異なるサイズの凍結結晶を準備し、同じ結晶から 1 パルス XFEL 照射で回折イメージを 1 枚取得、これを異なる照射点で繰り返して 10 枚ずつ回折イメージを取得し、それぞれを積分した後、得られた回折強度のシグナル・ノイズ比が 2 未満になる境界を最大分解能とし d^2 として結晶サイズ（対数）に対してプロットしてある。この図から明らかかなように少なくとも入射光子数を一定にした場合、Cc0 凍結結晶では結晶のサイズが大きくなるにつれ回折分解能は向上していることがわかる。

ただ、論文のレビューアからは大きな結晶は成長過程で質が落ちる、回折実験中に結晶そのものによる吸収が大きくなる、などの理由で大きな結晶だからといって一概に高分解能回折が得られるとも限らない、とのご意見を頂いたことも付け加えておきたい。

【X 線自由電子レーザーを利用した回折実験の展望】

今回の結果に関連してよく受ける質問に「XFEL を用いて放射線損傷以前に回折データが撮れるならば得られる分解能がシンクロトロン放射光に比較して向上しているのではないか？」というものがある。今回の実験結果では、同品質の結晶に同程度の光子数入射をすればいずれの施設でも同程度の回折分解能が得られることを確認したのみである。この際の吸収線量は 9.8 MGy/イメージであり、放射線損傷がさほど重篤ではない露光条件であるため、今後、XFEL の強度が“桁”で強くなってきた場合には、上記のようなことが観測できるかどうかを確かめる必要があるものであると考えられる。

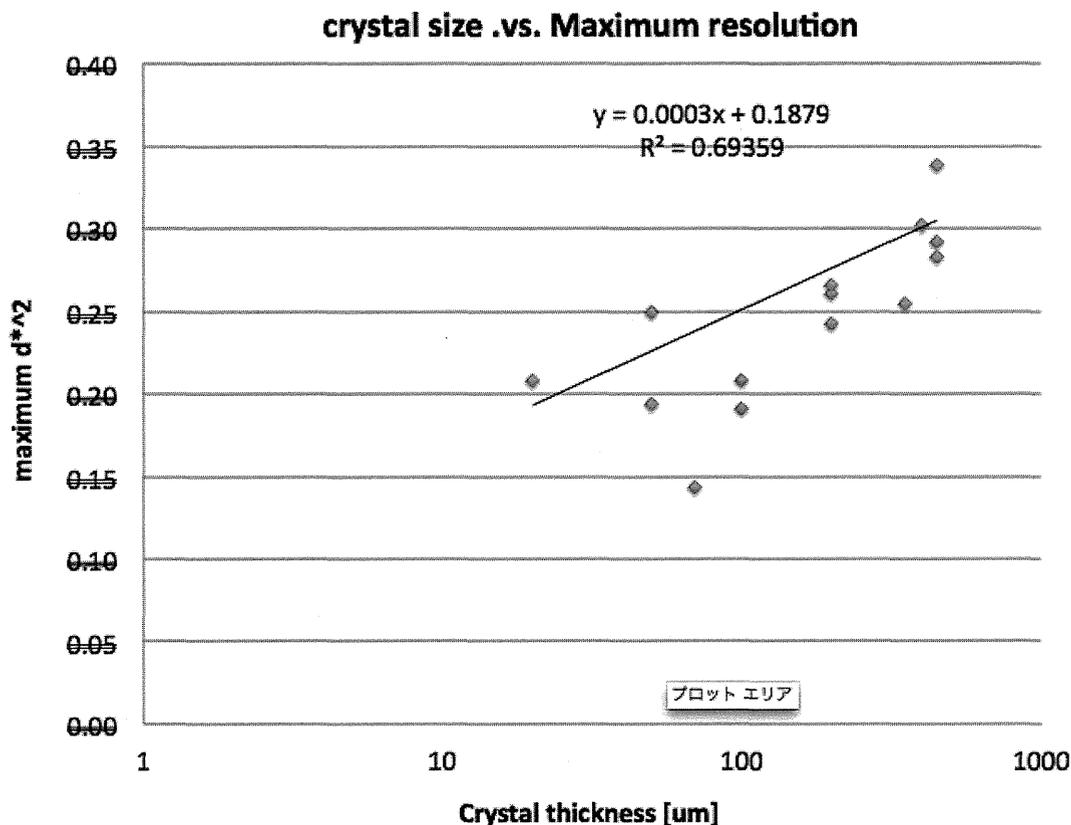


図 5 得られる最大分解能と結晶サイズの関係（実測値） 結晶サイズの異なる酸化型 Cc0 凍結結晶を用い、回折像を 10 枚/結晶ずつ取得した。それぞれ指数付け、積分を行った後各反射のシグナルノイズ比を評価し 2 以上となるものをそのイメージの最大分解能とした。結晶ごとに平均の最大分解能を計算しその逆数の二乗を結晶サイズに対してプロットしている

【X線自由電子レーザー施設における高フラックス微小X線を利用した実験のまとめ】

新しい光源 XFEL を用いて、従来のタンパク質の X 線結晶構造解析における大きなジレンマを解決することができた。「分子量 40 万超」の「膜タン

パク質複合体である」チトクロム酸化酵素の「高分解能」かつ「無損傷」の構造を決定したことで、「その機能を理解するために重要な」構造情報を得ることができた、とも言い換えることができる。

XFEL の利用はタンパク質の結晶構造解析に新たな可能性を与え、我々はその特徴の一つを活用し構造生物学の大きな一歩を踏み出した。現在までにこの手法を光化学 II (Photosystem II) の無損傷構造解析に適用することにも成功しており 17、SF-ROX を一つの重要な構造解析基盤技術として確立できたと考えている。次の目標は XFEL の極短パルス性を活用し、ポンププローブ時分割構造解析を高分解能で実現することであり、現在その準備

を進めている。CcO の酵素反応過程を高分解能ムービーにすることを実現し、XFEL を用いてタンパク質結晶構造解析に「時間軸」を与える技術確立を目指したい。

1. Tsukihara, T. et al. *Science* 269, 1069-1074 (1995).

2. Muramoto, K. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7881-7886 (2007).

3. Muramoto, K. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 7740-7745 (2010).

4. Hirata, K. et al. *Nat Meth* 11, 734-736 (2014).

5. Schlichting, I. *Nature* 517, 26-27 (2015).

6. Aoyama, H. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 2165-2169 (2009).

7. Hirata, K. et al. *J. Synchrotron Rad* (2004). 11, 60-63 [doi:10.1107/S0909049503024129] 1-4 (2003). doi:10.1107/S0909049503024129

8. O'Neill, P. et al. *J Synchrotron Rad* 9, 329-332 (2002).

9. Neutze, R. et al. *Nature* 406, 752-757 (2000).

10. Fromme, P. & Spence, J. C. *Current Opinion in Structural Biology* 21, 509-516 (2011).

11. Schlichting, I. & Miao, J. *Current Opinion in Structural Biology* 22, 613-626 (2012).

12. Ueno, G. et al. *J. Synchrotron Rad* (2005). 12, 380-384 [doi:10.1107/S0909049505004735] 1-5(2005). doi:10.1107/S0909049505004735

13. Murakami, H. et al. *J. Appl. Cryst* (2012). 45, 234-238 [doi:10.1107/S0021889812003585] 1-5(2012). doi:10.1107/S0021889812003585

14. Sanishvili, R. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 6127-6132 (2011).

15. Murray, J. W. et al. *J Synchrotron Rad* 12, 268-275 (2005).

16. Holton, J. M. & Frankel, K. A. *Acta Cryst* (2010). D66, 393-408 [doi:10.1107/S0907444910007262] 66, 393-408 (2010).

17. Suga, M. et al. Nature 517, 99-103 (2015).

C. 研究結果

今年度は過去の研究で明らかにした磁性抗がん剤候補物質と同じ組成で、磁性を有さない化合物の結晶構造解析を行うことを目指し、大型放射光施設 SPring-8 高フラックス微小ビームライン BL32XU を用いた回折実験を行った。数ミクロン～10ミクロン程度の磁性を有さない二量体結晶をタンパク質結晶構造解析に用いる凍結ループを用いて大量に凍結し、10ミクロンの集光ビームを用いてループ内を探索した。

D. 考察

結果として単結晶様の回折斑点を観測することに成功し、回折データ処理プログラムを用いて格子定数を決定したところ、磁性を有する物質の結晶のそれとは異なる結晶格子定数であることが分かった。この時点で、磁性を有する物質と同じ組成でありながら磁性の有無が分子の構造によって異なっていることが示唆されている。現在、構造解析に必要な完全なデータ収集を実現できていない。

E. 結論

これまでの取り組みと回折点探索プログラムの開発により数ミクロンの微小結晶から回折データを収集するまではかろうじて進めることはできているが、微小結晶ごとに回折能力が

まちまちで、「良好な回折データを収集する」ことが非常に困難であるということが分かっている。この問題点を解決するために現在、窒化シリコン膜などを利用して微小結晶をより大面積（現状の数百ミクロンから数ミリ角）に散布してより多くの結晶をスクリーニングしてデータ収集を行うということを試みている。

F. 健康危険情報 なし

G. 論文発表

1. 論文発表

1. Hirata K, et al. Nature Methods 11, 734-736 (2014)
2. Kumazaki K, Hirata K, Nureki O et al. Nature. 22;509(7501):516-20(2014)
3. Suga M, Kunio Hirata, Jian-Ren Shen et al. Nature (2014)
4. Wang J, Hirata K, Qi Hu et al. Cell Research (2014) 24:1486-1489.
5. Tanabe H, Hirata K, Yokoyama S et al. J Struct Funct Genomics. 2015 Jan 10.
6. 生物物理学会誌に XFEL 無損傷構造解析手法の開発に関する掲載予定

2. 学会発表

- 1 IUCr2014 にて BL32XU に関するポスター発表 Aug 2014
- 2 SPring-8 シンポジウムにて BL32XU の現状と展望について口頭発表 (Sept 2014)
- 3 結晶学会にて BL32XU の現状について口頭発表 (Nov 2014)
- 4 日本放射光学会年会・企画講演にて BL32XU と今後のタンパク質微小結晶構造解析について口頭発表 (Jan 2015)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担） 研究報告書

磁性抗がん剤を用いた医療機器の開発

研究分担者 星野雄二郎
国立大学法人横浜国立大学 有機化学学 特別研究教員

研究要旨：

新たな機能を有する抗がん活性新規化合物の創製を目標とした。様々な既存抗がん剤に、鉄サレン錯体を結合させて、磁性を有する生物活性分子を設計した。合成法は鉄錯体の化学反応性が未知の部分が多く、その点を考慮した合成経路を設計した。その結果、新規鉄サレン錯体の創製とその構造を決定することに成功した。

A. 研究目的

鉄サレン錯体は N_2O_2 型四座配位子からなるシッフ塩基錯体の一種である。平面四配位錯体を形成しやすく、錯体構造や物性研究が広く行われている化合物である。近年、鉄サレン錯体がDNAを開裂することが報告されるなど、生体との関連も注目されている化合物である。

最近石川、江口らは抗腫瘍活性を有する有機化合物に鉄サレン錯体を結合することにより、機能性抗がん剤の可能性を示すことに成功した。そこで我々は、機能性を付与するのに適した鉄サレン錯体の構造を設計し、その合成法を開発することを目的とした。

機能性を付与した抗がん剤の開発により、これまで以上に患者への負担を軽減した抗がん剤治療への期待が高まる。

B. 研究方法

石川、江口らが見出した鉄サレン錯体の構造を元に、抗がん剤への結合方法の検討と、鉄サレン錯体の化学構造の解析を行った。合成化学の知識を基礎に、抗腫瘍活性化合物の選択的保護、脱保護、鉄サレン錯体との結合方法を検討した。鉄サレン錯体の構造解明のため、核磁気共鳴分光法、赤外分光法、高速液体クロマトグラフィー、元素分析、質量分析、示差熱分析、単結晶X線結晶構造解析などを駆使した。

(倫理面への配慮)
特に該当する項目はありません。

C. 研究結果

抗がん剤などの生物活性を有する化合物の多くは、複数の官能基を有する多官能性有機化合物である。化学反応を分子内の特定部位において選択的に行い高い収率を得るためには、これらの官能基を選択的に保護する必要があり、また、役目が終了した後には速やかに脱保護できる必要がある。これらを踏まえつつ、適切な合成経路を設計し、いくつかの案を提案した。重要な点は鉄錯体の化学反応性と反応系中での溶解性であり、多くの場合結合段階は全体の合成経路の終盤に位置づけ、錯体形成は最終段階とすることで、その問題の回避を行った。

D. 考察

鉄サレン錯体の合成は、鉄(II)化合物から合成する方法、鉄(III)化合物から合成する方法など、様々な条件を検討した。これらの合成検討において酸素や水の影響が重要であることが明らかとなった。すなわち、脱水、脱気を十分に行うことが適切な鉄サレン錯体の合成において重要であることを明らかにした。

E. 結論

単剤多機能抗がん剤を目指した鉄錯体の設計および合成を行った。抗腫瘍活性を有する有機化合物を適切に保護し、鉄サレン錯体と結合反応を検討し、最終段階で結合

することで対応する化合物の合成に成功した。鉄錯体の構造を種々の分析手段を利用して解析をし、その構造に関する重要な知見を得た。

鉄錯体による多機能性付与は抗がん剤だけに留まらず、様々な有機分子へと応用が可能であり、我々の長年の研究成果に裏づけされたコンピュータによる予測技術を含めて、次世代の創薬手法の代表例となることが考えられ、わが国に普及を目指していきたい。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Hoshino, Y. Shimbo, N. Ohtsuka, K. Honda, “ Self-propagated Lossen rearrangement induced by a catalytic amount of activating agents under mild conditions,” *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 710-712.

2. 学会発表

1. 星野雄二郎、西村豪剛、本田 清、チタン-環状ヒドロキサム酸触媒を用いた2-アリルフェノールの不斉エポキシ化、日本化学会第 94 回春季年会、名古屋、2014.3.27-30.

2. 白石奈々恵、本田 清、星野雄二郎、2,2'-スピロビインダン-1,1'-ジオンからの *N*-ヒドロキシアザシクロペンタ[c]ペンタレノンの合成検討、日本化学会第 94 回春季年会、名古屋、2014.3.27-30.

3. 大塚尚哉、本田 清、星野雄二郎、Lossen 転位を経由したカルボン酸からアミンのワンポット合成、日本化学会第 94 回春季年会、名古屋、2014.3.27-30.

4. 本田 清、田中健太、池谷愛里、置塩真奈美、星野雄二郎、オルトキノンメチドを経由した多置換フラボノイドの選択的合成、日本化学会第 94 回春季年会、名古屋、2014.3.27-30.

5. 星野雄二郎、大塚尚哉、奥野盛朗、新保雄基、本田 清、連鎖型 Lossen 転位によるアミンのワンポット合成、第 3 回 JACI/GSC シンポジウム、東京、2014.5.22-23.

6. 中後孝洋、小谷朋弘、伊藤ありさ、星野雄二郎、本田 清、金属カルベノイド錯体による窒素イリドの連続的[2,3]転位-脱離反応、第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、和歌山、2014.9.20-22.

7. 詫摩俊介、星野雄二郎、白石奈々恵、本田 清、1,1'-二置換-2,2'-スピロビインダンの立体選択的合成研究、第 68 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、新潟、2014.11.29-30.

8. 平岡 隼、星野雄二郎、大塚尚哉、本田 清、
o-アリルフェノールの触媒的不斉エポキシ化：有用含酸素縮合二環式化合物のダイバ
ージェント合成への応用、第 68 回有機合成
化学協会関東支部シンポジウム、新潟、
2014.11.29-30.

9. 本田 清、梶本菜緒、畔柳歩大、武藤真
梨奈、星野雄二郎、イソインドールの Diels-
Alder 環化付加体における窒素活性化によ
る骨格変換、第 68 回有機合成化学協会関東
支部シンポジウム、新潟、2014.11.29-30.

10. 森田順也、星野雄二郎、本田 清、ピロ
ロイミダゾール骨格を有する光学活性ヒド
ロキサム酸の合成と不斉酸化反応への応用、
日本化学会第 95 春季年会、千葉、
2015.3.26-29.

11. 田中健太、重松洋輔、星野雄二郎、本
田 清、オルトキノンメチドとアルキニルシ
ランとの分子間環化付加反応、日本化学会
第 95 春季年会、千葉、2015.3.26-29.

3. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許所得

無し。

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

本研究課題に関連した事項として、生物活
性天然有機化合物合成や新規多機能性有機
化合物合成への応用を目指した環状ヒドロ
キサム酸を配位子とする不斉エポキシ化反
応の開発研究の研究成果を以下にまとめる。

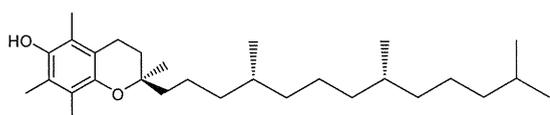
ピロイミダゾール骨格を有する光学活性 ヒドロキサム酸の合成と不斉酸化反応への 応用

序論

第一節 光学活性クロマン化合物

第一項 光学活性クロマン化合物の生理活 性と合成

クロマン化合物とは、ベンゼン環とピラ



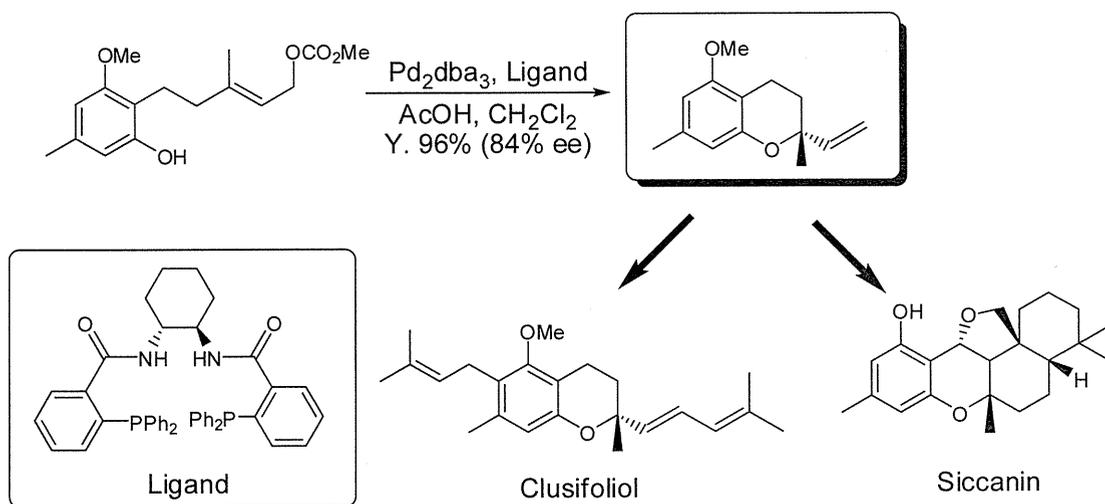
α -Tocopherol

Figure 1

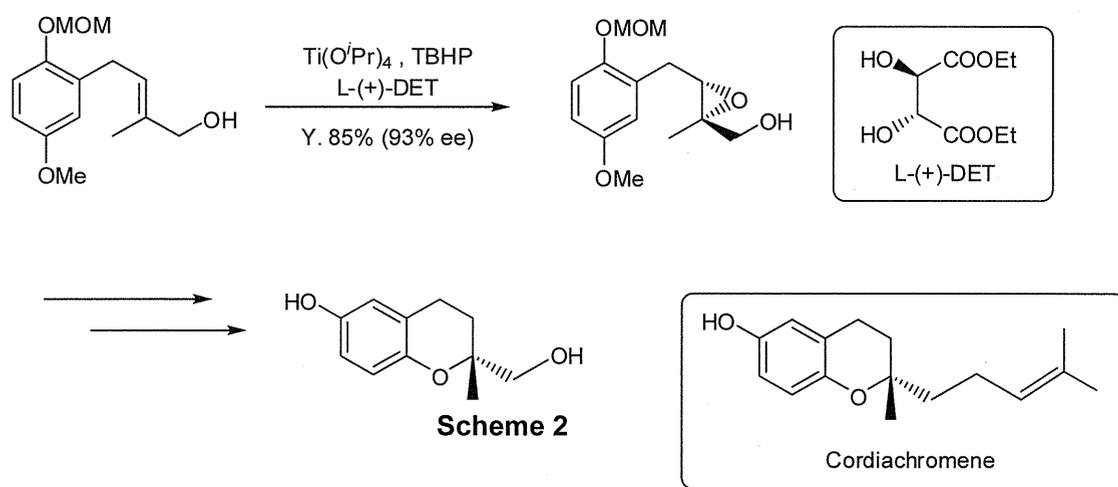
ン環が縮合した二環式の化合物である。そ
の 2,2-二置換体はビタミンEとして知られ
る α -Tocopherol (Figure 1)など、生理活性物

質によくみられる特徴的な骨格である。そ
れらの多くは 2 位に不斉炭素を有しており、
光学活性な化合物である。そのため、これ
までに 2,2-二置換クロマン化合物を立体選
択的に合成する様々な方法が研究され、報
告されてきた。

例えば近年、Trost らは独自に開発した不
斉アリル位アルキル化反応を利用して、光
学活性 2,2-二置換クロマン化合物の
Clusifoliol や Siccanin の全合成を達成した
(Scheme 1)。Clusifoliol は抗腫瘍活性を示
し⁽¹⁾、Siccanin は抗菌活性を示すことが知ら
れている⁽²⁾。対応するアリルカーボナート
から不斉アリル位アルキル化反応を利用し
て 2 位に不斉炭素を尾構築しているのが鍵



Scheme 1



反応である。

また、Kischleger らは、Sharpless の不斉エポキシ化反応を利用し、Cordiachromene の中間体であるクロマンメタノールの立体選択的合成を報告している。これは対応するアリルアルコールを不斉エポキシ化し、光学活性なエポキシドを得た後、フェノール性水酸基を脱保護し立体選択的に環化することにより光学活性クロマンを得ている (Scheme 2)。しかしこの経路では、フェノール性水酸基の保護・脱保護する必要があり、収率や環境に配慮した合成法の観点から反応ステップ数を減らし最適化した合成方法の開発が望まれている。また Cordiachromane は抗炎症作用を示すことが

知られている⁽³⁾。

第二項 2,2-二置換クロマノール： Stachybotrin 類

近年、2 位にテルペノイド側鎖をもつ光学活性 3-クロマノール Stachybotrin 類の単離が報告された。1992 年、Xu らはアメリカのフロリダ州の海水から *Stachybotris* 属の新規な菌である *Stachybotris* sp.(CS-710-1) を採取した⁽⁴⁾。この *Stachybotris* sp.(CS-710-1) の培養液 2400ml の抽出液から、二次代謝物として 31.2 mg の Stachybotrin A と 15.4 mg の Stachybotrin B を単離した。(Figure 2)

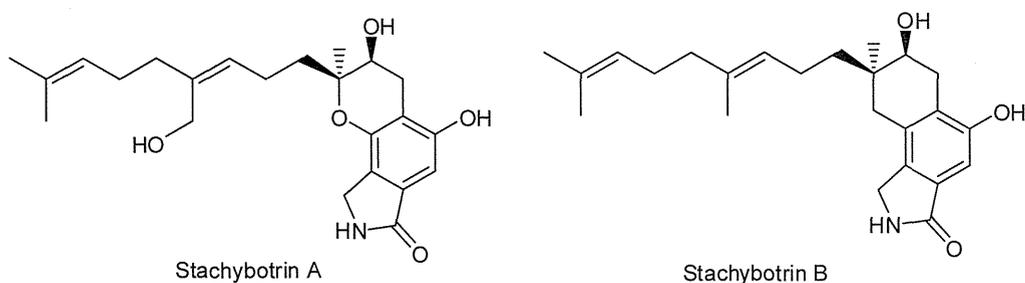


Figure 2

これらの化合物の構造の解析は、分光学的スペクトルを基になされ、2位と3位の相対立体化学は NOESY 法のスペクトルデータから提案された。まず、4位のアキシャル位の水素と2位のメチルの間に相関関係がみられ、このことから、両者は空間的に近い距離にあることが分かり、これにより2位のメチル基もジヒドロピラン間に対してアキシャル位であることが確認された。また2位のメチル基は3位の水素との間にも相関関係があったことから、3位の水素がエクソトリアルの位置にあり、3位のヒドロキシル基は2位のメチル基とトランスの関係にあるという結論に達した。

Stachybotrin A、B は、枯草菌(ATCC6051) や糞生菌 *Ascobolus furfuraceus* (NRRL6460)、*Sordaria fimicola* (NRRL6459) に対する阻害活性を示した。また Stachybotrin A は弱いながらもヒトの固形癌細胞系に対する細胞毒性も示した($ED_{50} 20\text{-}3\text{-}0 \mu\text{g/ml}$)。

更に1993年、大正製薬株式会社の折居らは、埼玉県大宮市の落葉から採取した新規な菌である *Stachybotrins parvispora* (F-4708) の培養液 6200ml から 9.2mg の Stachybotrins C(NG-122)や 3.2 mg の NG-121、3.7 mg の Parvisporin(NG-123) を単離した⁽⁵⁾(Figure 3)。

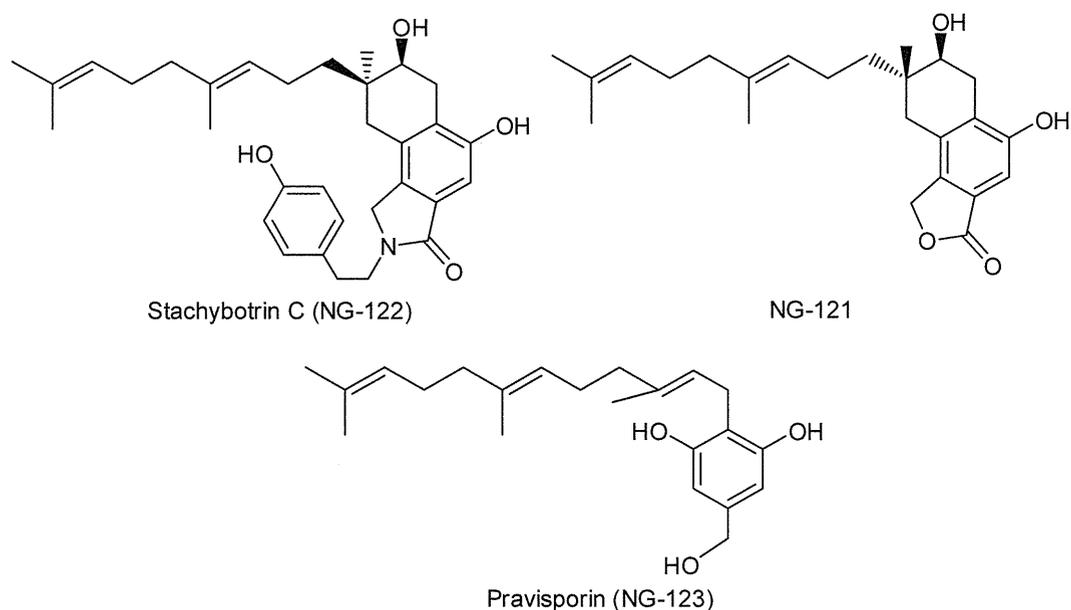


Figure 3

これらの化合物の2位と3位の相対立体化学は、Stachybotrin A、Bと同様にNOESY法のスペクトルデータから提案され、2位のメチル基と3位のヒドロキシル基はシスの関係であることが導かれている⁽⁶⁾。またこれらの化合物は、神経成長因子(NGF)活性およびその増強作用を示すことが報告されている^(5,7)。NGFはアルツハイマー型認知症の治療薬として、近年非常に注目されている⁽⁸⁾。

また、PettusらとLiらは2002年、2003年にそれぞれ2,2-二置換クロマノール化合物

であるF11334-A₃、ChiricanineBを合成することに成功している^(9,10)(Figure 4)。

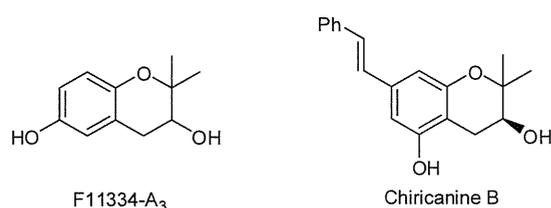


Figure 4

F11334-A₃はスフィンゴエミナラーゼ阻害活性のある化合物である。そしてChiricanine Bは2001年にIosetらによって*Lonchocarpus chiricanus*の根から単離され