

Highly Efficient and Selective Syntheses of Phycobilin Derivatives toward Analysis of structure and Function of Phytochrome

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Inomata, Katsuhiko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049372

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN
2001
11

金沢大学

フィトクロムの構造と機能解明を目指した
フィコビルリン誘導体の高効率・高選択的合成

(11440187)

平成11年度～平成13年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2))研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 猪股 勝彦

(金沢大学大学院自然科学研究科教授)

金沢大学附属図書館



8011-05253-5

はじめに

本報告書は平成11年度から13年度の3年間にわたり、文部科学省科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)：課題番号11440187）により行われた研究の成果報告書である。

本研究は、植物の主要な光レセプターであるフィトクロムが環境の光情報を認知し、その情報に応じて生育のプロセスを巧みに制御する機構を分子レベルで解明することを目指して、発色団部分（テトラピロール化合物の一種であるフィトクロモビルン）の高効率・高選択的一般合成法を開発することを目的に行ったものである。

その結果、以下のような成果を得ることができた。

1. まず、発色団であるフィトクロモビルン(PΦB)及びその代替物として用いられる集光性色素蛋白質フィコシアニンの発色団であるフィコシアノビルン(PCB)のA~D環に相当するピロール誘導体の簡便合成法並びにそれらのカップリング反応を開発した。
2. 上で開発した反応を駆使して、アポ蛋白質と再構成可能な側鎖カルボン酸が遊離の形の天然型 PΦB, PCB 及び 20 種以上の PCB 誘導体を世界に先駆けて合成した。また、18 位に光活性基を導入した PΦB 誘導体（構造・機能探索分子）の合成にも成功した。
3. 合成発色団とアポ蛋白質との再構成実験を行い、アポ蛋白質に対する結合効率や再構成フィトクロムの光可逆性に関するスペクトル的研究から、発色団の構成要素である A~D 環上の各側鎖の特異的役割並びにアポ蛋白質の発色団結合サイトの環境に関する重要な知見を得た。更にフィトクロム A, B の機能と発色団の構造に関する *in vivo* での実験から、新規で重要な知見を得た。
4. 引き続き、アポ蛋白質と発色団との相対的配置や相互作用などを解明するために、PΦB 並びに PCB 誘導体の更に簡便な合成法の開発を試み、入手容易なビリルビンを出発物質とする新規で簡便な一般合成法を確立することができた。
5. P_{fr} 型に対応すると考えられる CD 環部分の立体化学が E-syn 型で固定された PCB 誘導体の合成にも成功した。

これらの成果を基に、今後、有機合成化学と生物学の間の学際領域をさらに飛躍的に発展させるために貢献するとともに、植物が長い進化の末に獲得した光受容系の謎を解明し、そこで得られる知見に学びながら、高効率的人工光分子スイッチの設計・開発など工業的応用にも役立てていきたい。

本研究の遂行にあたり、下記の共同研究者の方々には多大のご協力、ご指導、ご助言等を頂いた。ここに改めて深謝申し上げたい。また労力を惜しまずにご協力頂いた多くの学生諸君、本報告書をまとめるに当たってご助力を賜った理学部化学科事務室の菅谷内さんに感謝申し上げたい。

共同研究者

木下 英樹 教授 (金沢大学理学部化学科)
和田敬四郎 教授 (金沢大学理学部生物学科)
古谷 雅樹 博士 (日立基礎研究所, 東京大学名誉教授)
半澤 宏子 研究員 (日立基礎研究所)

研究組織

研究代表者：猪股勝彦 (金沢大学大学院自然科学研究科教授)

交付配分額 (直接経費のみ)

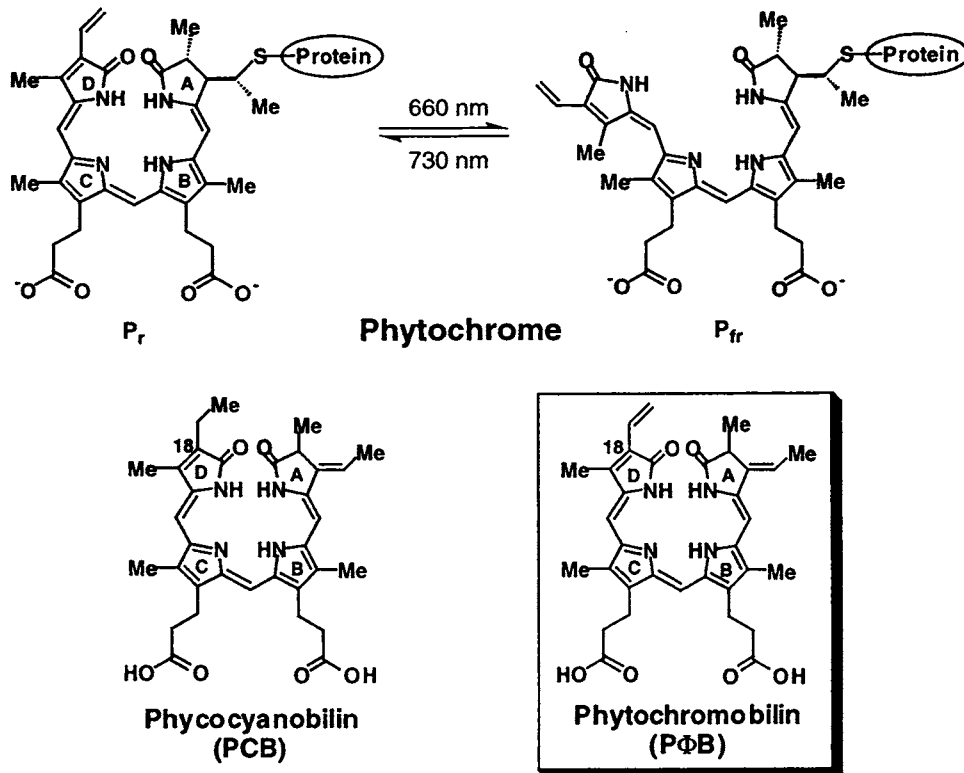
平成11年度	4,200千円
平成12年度	2,300千円
平成13年度	2,000千円
<hr/>	
総計	8,500千円

研究成果の概要

1. 研究の背景と目的

「赤・遠赤色光可逆的反応」は、植物の発生や生長・分化などの様々な過程に広く関係して、環境の光情報を植物に伝える重要な役割を果たしている。この反応は、細胞の膜系に依存する生理的現象や、酵素活性、生体物質の生合成など分子レベルの現象、さらには、その根源となる遺伝子発現の調節においても広範囲に見出されており、植物が生きて行くために欠くことのできない調節作用の一つであることが明らかになってきた。

この環境の光を吸収する光受容色素はフィトクロム(Phytochrome)と呼ばれる色素蛋白質で、特定波長の光(660 nm および 730 nm)で可逆的に相互変換する二つの異性体、すなわち、赤色光吸収型の P_r および遠赤色光吸収型の P_{fr} で存在することが知られている(下図参照)。



この極めて興味深い機能を有するフィトクロムに関する研究は、現在、組替え遺伝子操作の手法を用いてアポ蛋白質の一部の構造を変化させることにより機能がどのように変化するかといった問題を中心に行なわれている。一方、テトラピロール発色団であるフィトクロモビルン(Phytochromobilin)は、天然から極めて少量しか得られず、また、精製も極めて困難である。従って、発色団の構造変化によるフィトクロムの機能の変化や、アポ蛋白質と発色団との相対的配置や相互作用などの解明、更に光合成系遺伝子発現・調節機構の解明など、

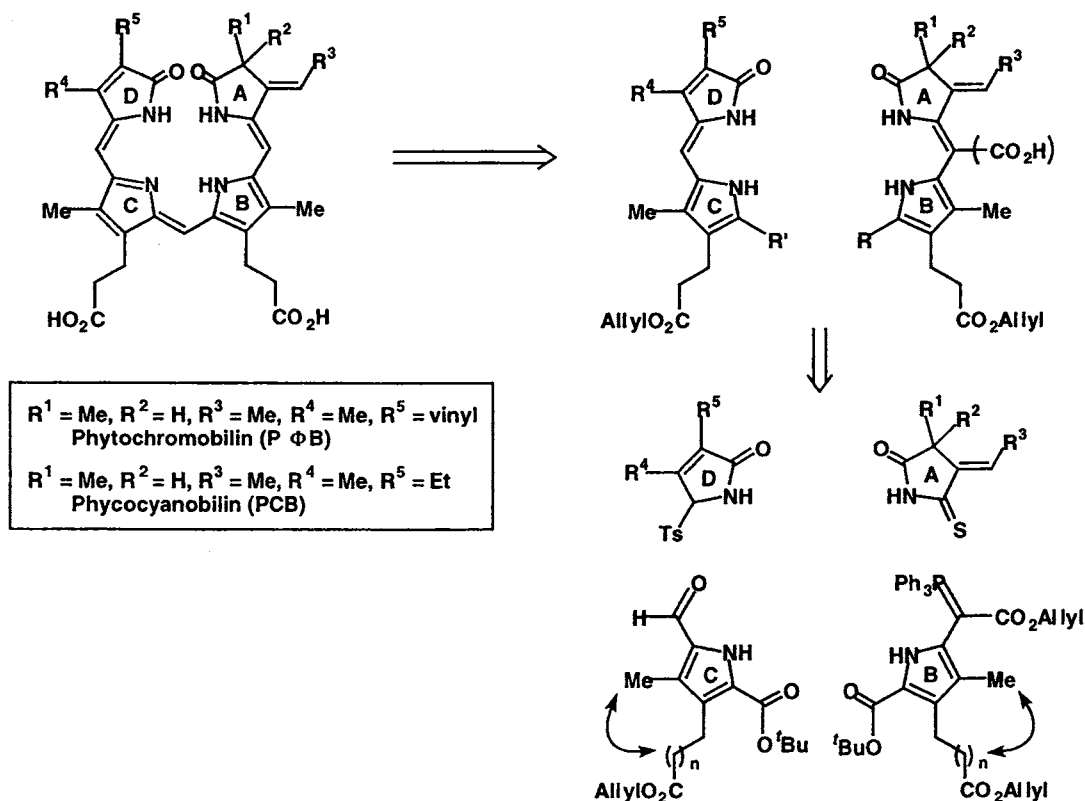
この分野を飛躍的に発展させるためには、これまで合成が困難とされてきたフィトクロモビルン及びその誘導体の合成法の確立が必須である。

そこで、本研究では、発色団であるフィトクロモビルン(PΦB) 及びその代替物として用いられる集光性色素蛋白質フィコシアニンの発色団であるフィコシアノビルン(PCB)のA~D環に相当するピロール誘導体の簡便合成法並びにそれらのカップリング反応を開発し、アポ蛋白質と再構成可能な側鎖カルボン酸が遊離の形の天然型 PΦB, PCB 及びそれらの種々の誘導体を合成することを目的とした。

2. 研究結果の要約

(1) 合成戦略

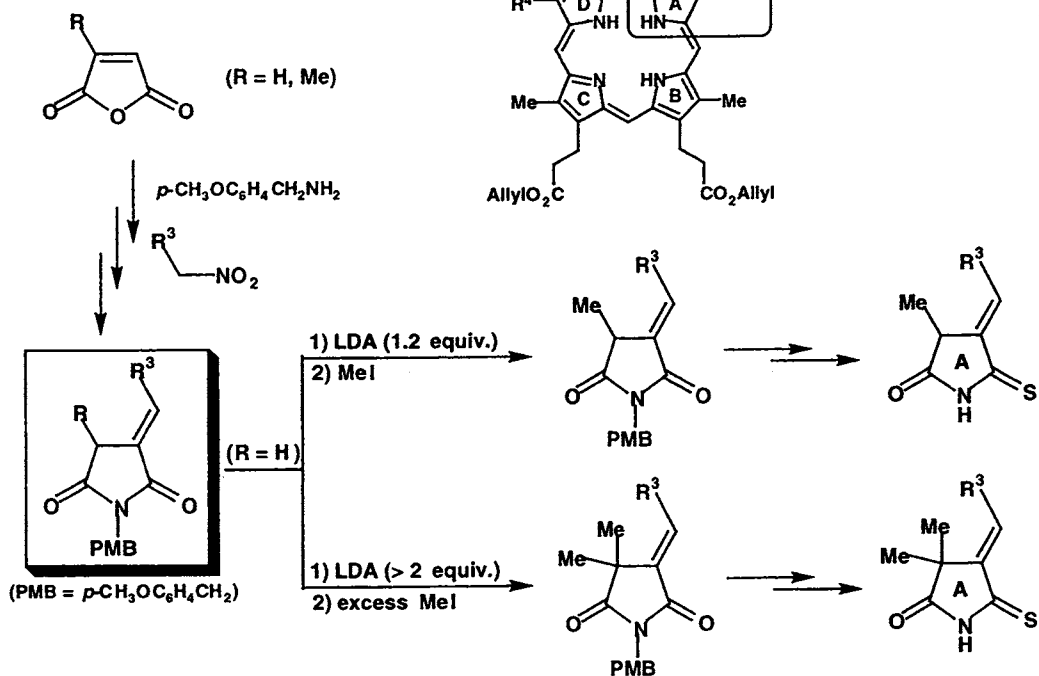
アポ蛋白質と再構成可能な側鎖カルボン酸が遊離の天然型 PΦB, PCB 及びそれらの任意の誘導体を自由に合成するために、テトラピロールの構成要素である4種のピロール誘導体、すなわちA~D各環の合成と、それらのカップリング法、及び保護基の脱離法を開発することにした。



(2) A環合成

まず、A環の側鎖を自由に交換可能な合成法として、無水マレイン酸あるいは無水シトラコン酸を出発物質とする次式に示したような合成手法を開発した。この合成法により、フィトクロモビルン(PΦB)の2位にメチル基を持たない誘導体やジメチル化された誘導体、さらに2位あるいは3位が一炭素増炭された誘導体などを合成することができた。

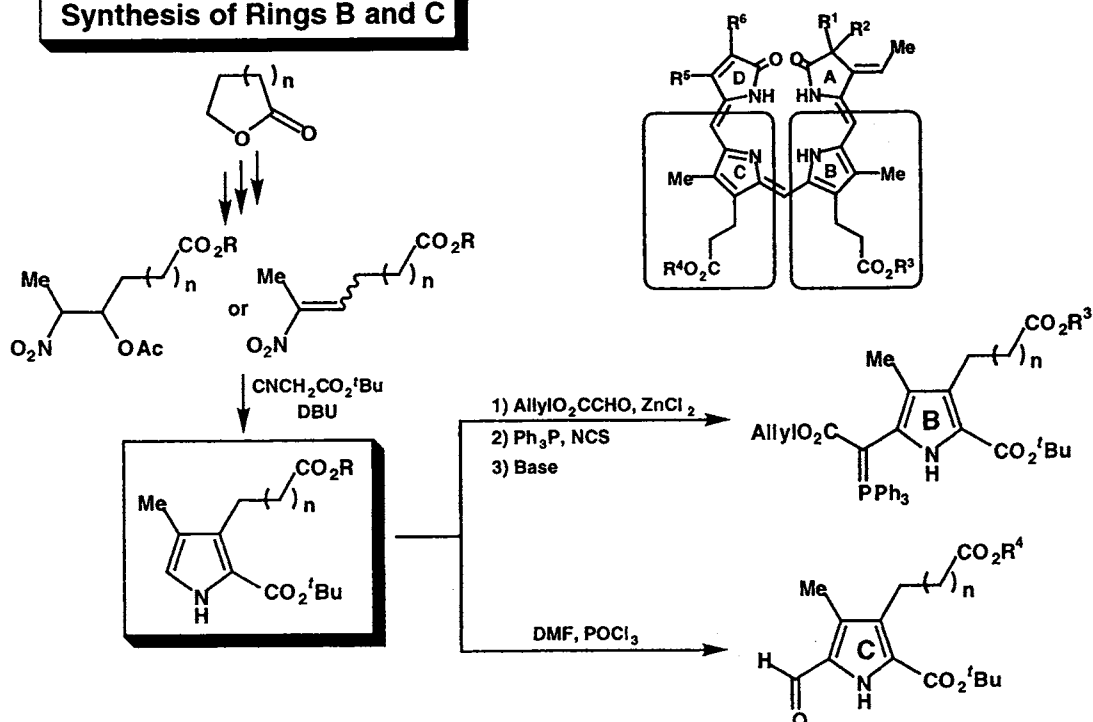
Synthesis of Ring A



(3) B, C環合成

次にB, C環については, カルボン酸側鎖の長さを自由に変換できる手法として, ラクトンを出発物質とする合成法を開発した。鍵中間体となるピロールを調製後, B環に相当するイリド及びホルミル化によりC環へ誘導した。この

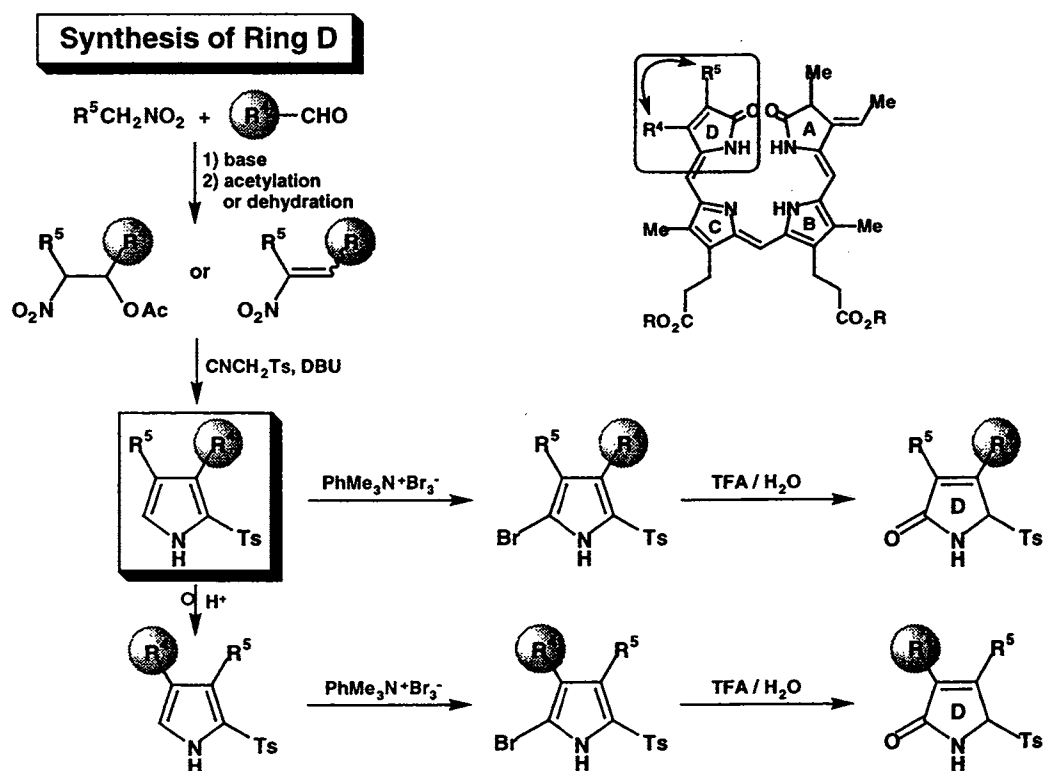
Synthesis of Rings B and C



手法を応用して、カルボン酸側鎖とメチル基を交換することも可能となった。

(4) D環合成

従来、「赤・遠赤色光可逆的反応」は、発色団のCD環部分の二重結合が光により異性化するために引き起こされる現象として理解されてきた。そこで、D環が修飾された多様なフィトクロムを調製するために、D環の置換基を自由に交換できる合成手法として、鍵中間体の2-トシルピロールの簡便合成法の開発とトシル基の転位反応、及びそれらの対応するピロリノンへの変換反応を確立した。



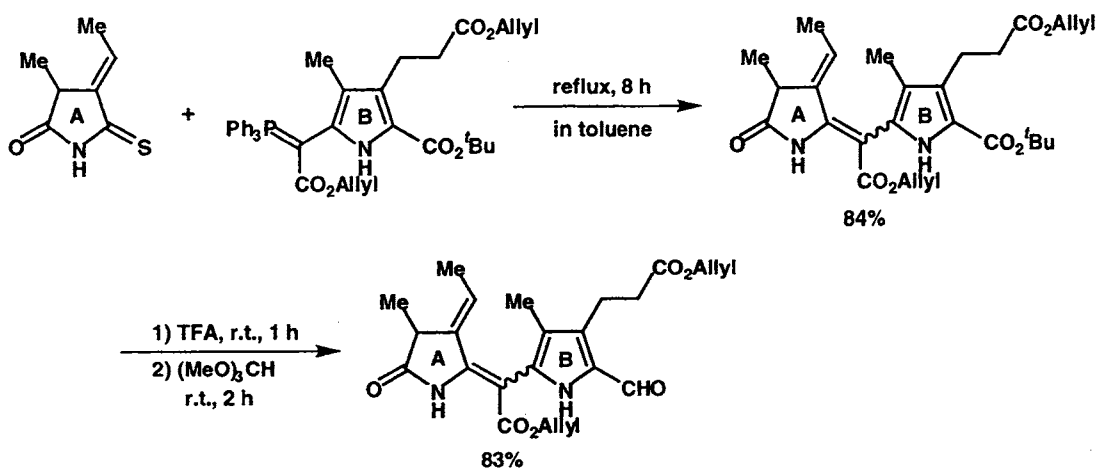
(5) A, B環のカップリング反応

上述したように、発色団の構成要素としてのA～D環に相当するピロール誘導体の実践的合成手法を確立することができた。そこで次に、これらを用いてテトラピロール骨格を構築するために、まず、A, B環のカップリング反応を開発した。上で得られたA環とB環とを、いわゆる thio-Wittig 型反応によりカップリング (Method A) して得られるAB環は、メソ位にエステル基を有するため、発色団合成の最終段階で、これを脱保護し、酸性条件下で脱炭酸しなければならない。しかし、発色団の18位がビニル基であるフィトクロモビリンは酸性条件下で極めて不安定で、分解してしまうことが判明した。そこで、thio-Wittig 型反応とは別に、メソ位にエステル基を持たないAB環の合成法 (Method B) を開発する必要があった。

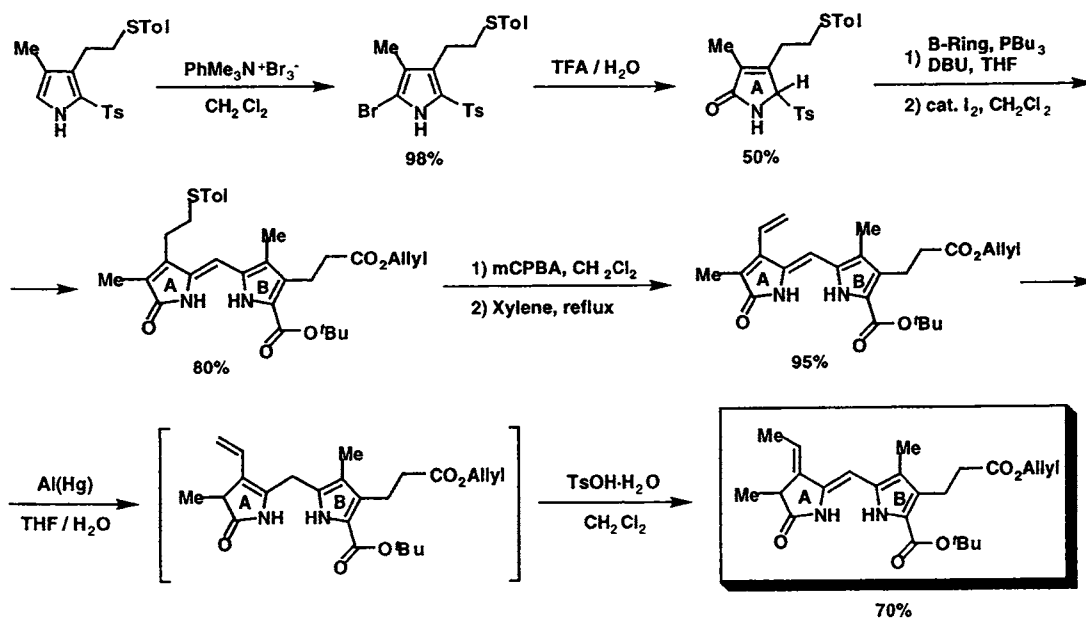
後者の手法はC, D環のカップリング法として独自に開発した反応を応用するもので、後述するように、この合成手法を駆使することにより、わずか二種

類のピロールから出発して、天然型のフィトクロモビリンを効率的に合成することが可能になった。

Coupling of A and B Rings: Method A



Coupling of A and B Rings: Method B

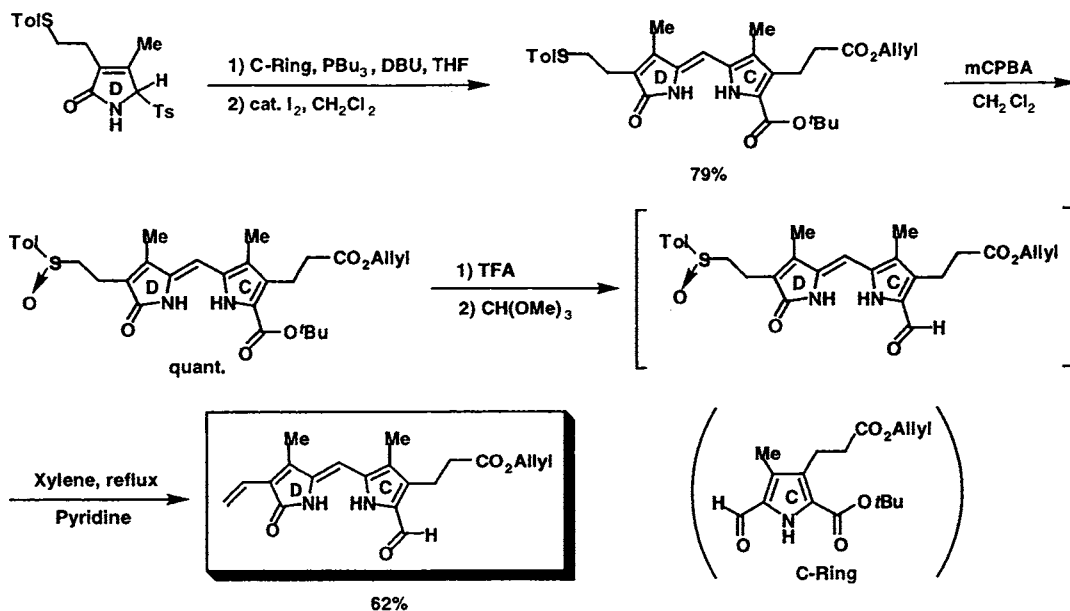


(6) C, D環のカップリング反応

C/D環は、上で得られたD環ピロリノンとホルミルピロールを DBU およびトリブチルホスフィン存在下でカップリングすることにより、高収率で得ることができた。18位がビニル基となるフィトクロモビリンのC/D環合成を次式に示

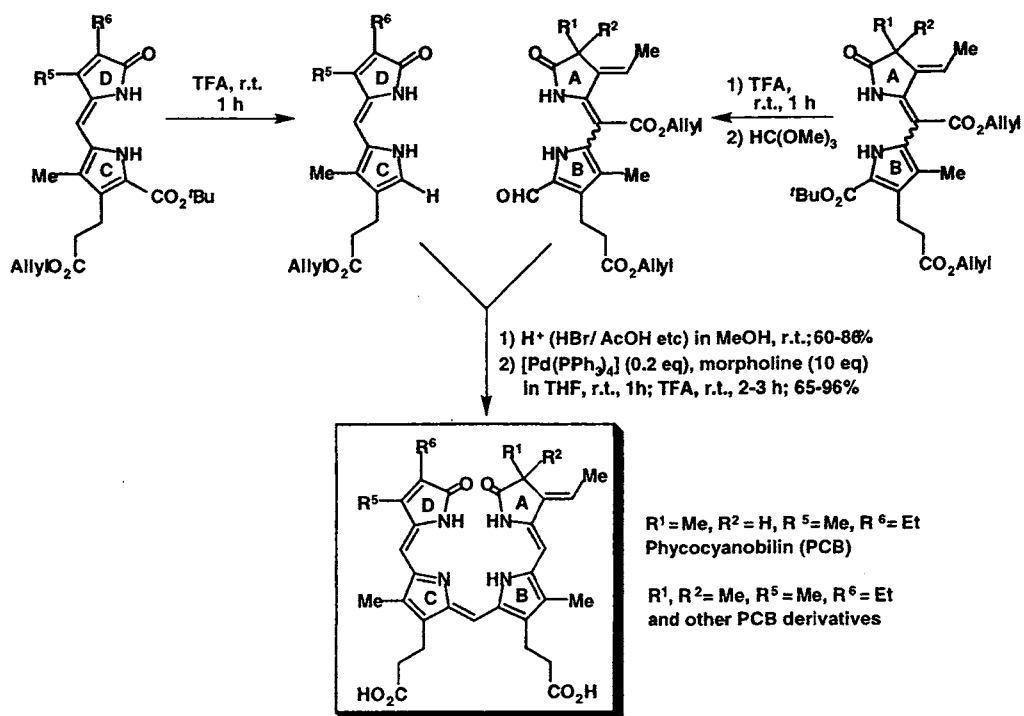
す。

Coupling of C and D Rings



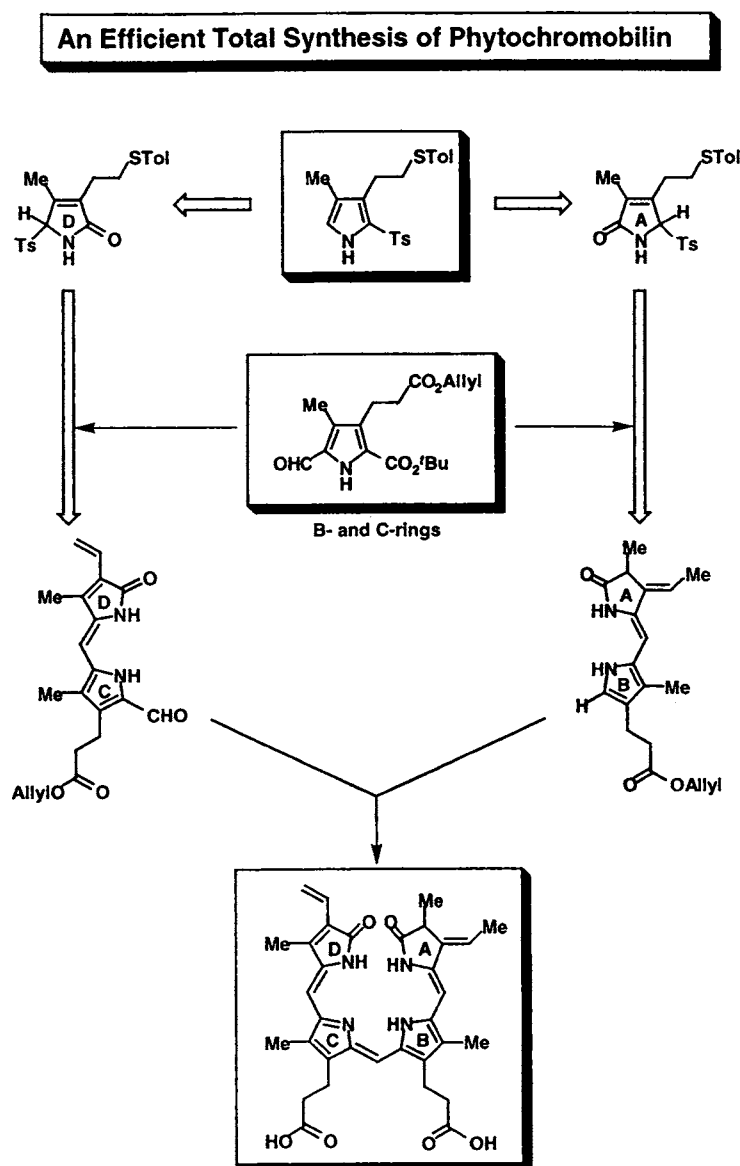
(7) テトラピロール骨格の構築

上で調製したAB環及びCD環をメタノール中、酸性条件下でカップリングすることにより、目的のテトラピロール骨格を構築することができた。引き続き、3ヶ所のアリルエステルをパラジウム触媒存在下、モルホリンを作用させ

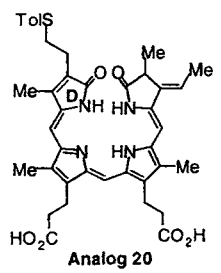
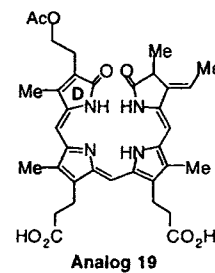
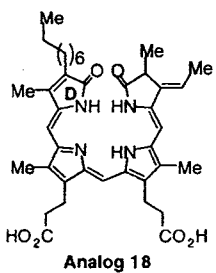
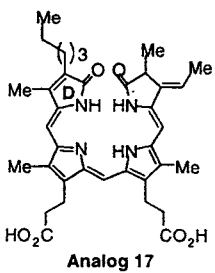
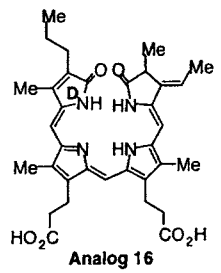
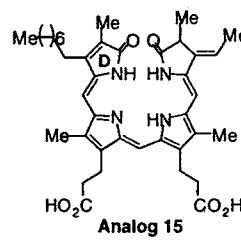
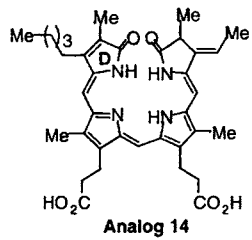
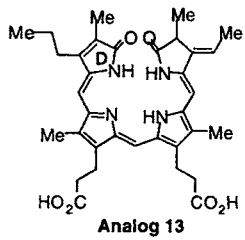
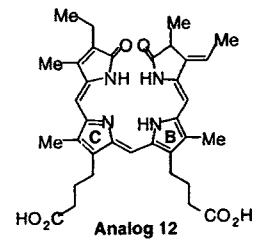
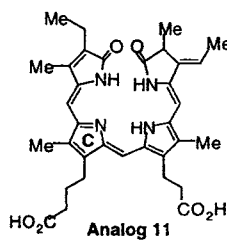
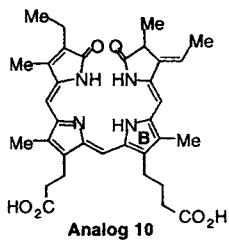
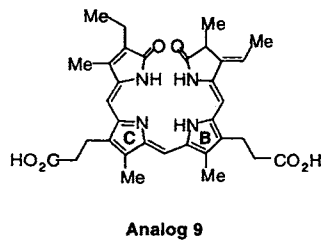
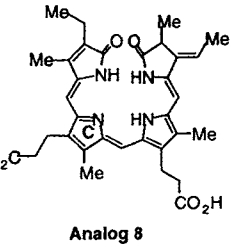
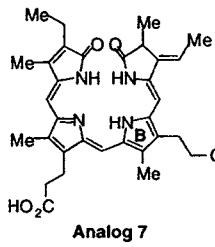
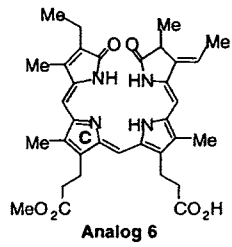
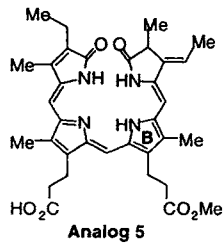
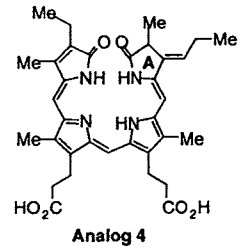
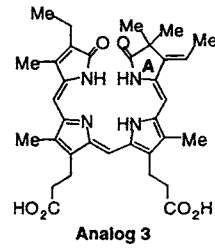
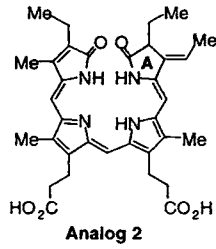
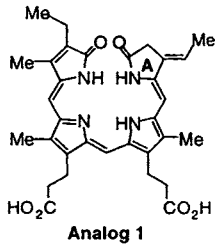
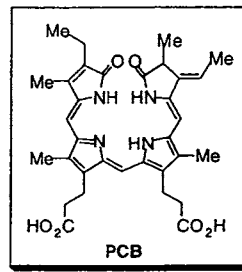
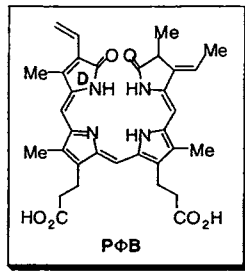


ることにより一気に脱保護した後，トリフルオロ酢酸で処理して，アポ蛋白質と再構成可能な側鎖カルボン酸が遊離の形のフィコシアノビルン及びその20種以上の誘導体を合成することができた。

また，天然型フィトクロムの発色団であるフィトクロモビルンは，次式で示したように，わずか二種類のピロールから出発して効率的に全合成することができた。

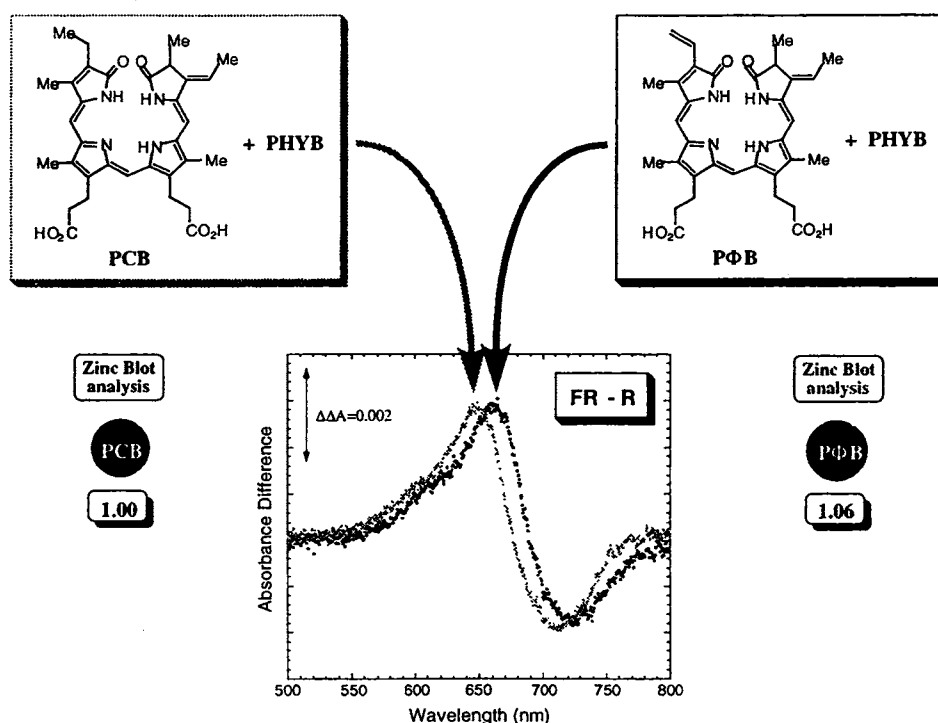


本研究で開発したフィコビルン誘導体の合成手法を駆使することにより，次ページに示したように，天然型の PΦB 及び PCB だけでなく，A～D環の各側鎖を修飾した20種以上の PCB 誘導体を合成することができた。



(8) 合成発色団とアポ蛋白質との再構成

このようにして化学合成された発色団を遺伝子工学の手法で大量発現させたアポ蛋白質と *in vitro* で再構成させたところ、PΦB 及び PCB については、次図に示したように、天然から得られた発色団を用いた場合と同等の結合効率を示し、また、生成したホロ蛋白質は、天然フィトクロムと同様の光可逆性を示した。

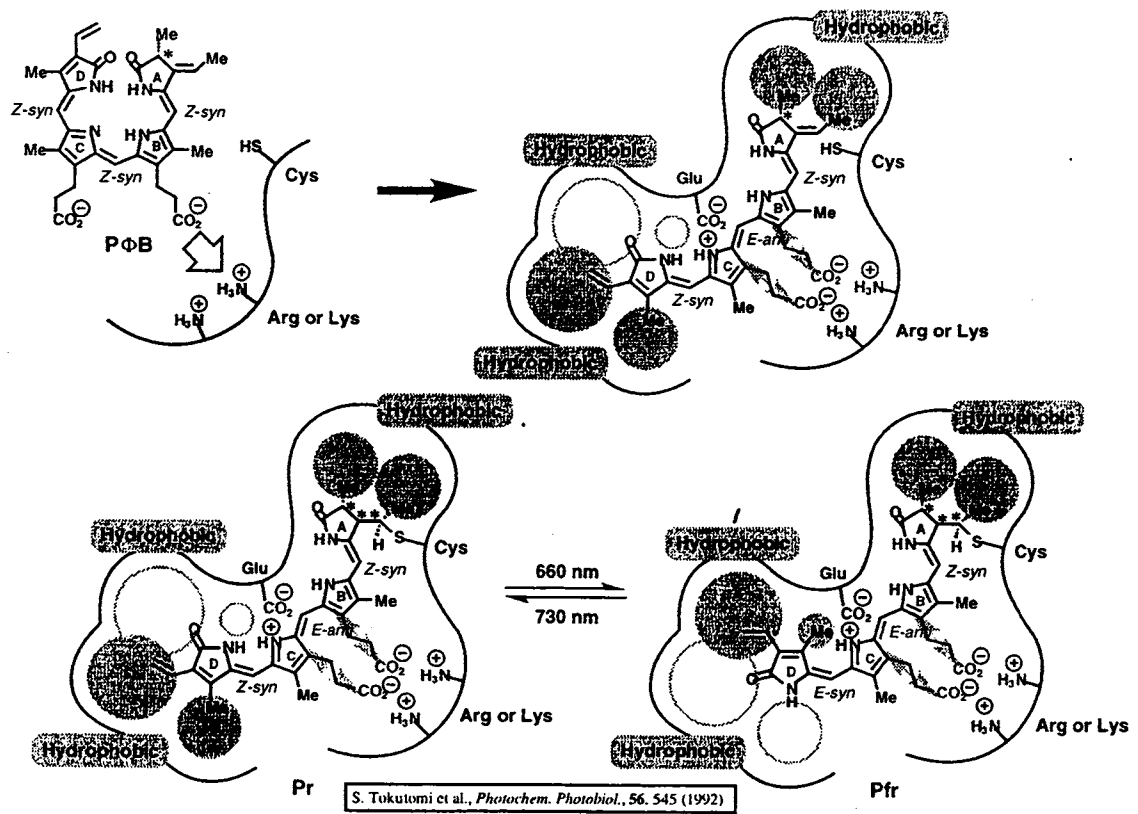


また、他の 20 種類の各種発色団とアポ蛋白質との再構成実験を行い、アポ蛋白質に対する結合効率や再構成フィトクロムの光可逆性に関するスペクトル的研究から、次図に示したように、発色団の構成要素である A~D 環上の各側鎖の特異的役割並びに発色団結合サイトの環境に関する重要な知見を得た。

更にフィトクロム A, B の機能と発色団の構造に関する *in vivo* での実験からも、新規で重要な知見を得ることができた。

引き続き、アポ蛋白質と発色団との相対的配置や相互作用などを解明するために、PΦB 並びに PCB 誘導体の更に簡便な合成法の開発を試み、入手容易なピリルビンを出発物質とする新規で簡便な一般合成法を確立するとともに、P_{fr} 型に対応すると考えられる CD 環部分の立体化学が *E*-syn 型で固定された PCB 誘導体の合成にも成功した。

今後、P_r 型および P_{fr} 型で立体化学を固定したフィコビルリン誘導体をアポ蛋白質と結合させて得られる結晶について X 線構造解析を行い、フィトクロムの構造に関する更に詳細な知見を得る予定であるが、この X 線結晶構造解析を実現するためには、純粋なホロ蛋白質を単離する必要がある。そこで、今後、発色団を樹脂に固定化したアフィニティークロマトグラフィーを確立する。



3. 発表論文

- 1) Total Synthesis of (\pm)-Phytochromobilin Starting from Two Pyrrole Derivatives.
T. Kakiuchi, H. Kinoshita, and K. Inomata,
Synlett, **1999**, 901-904.
- 2) An Efficient Method to Construct the A,B-Rings Component toward Total Syntheses of Phycocyanobilin and Its Derivative as a Photoprobe.
K. P. Jayasundera, H. Kinoshita, and K. Inomata,
Bull. Chem. Soc. Jpn., **73**, 497-505 (2000).
- 3) Efficient Synthesis of B- and C-Rings Components of Phycobilin Derivatives for Structure/Function Analysis of Phytochrome.
A. Ohta, D. Sawamoto, K. P. Jayasundera, H. Kinoshita, and K. Inomata,
Chem. Lett., **2000**, 492-493.
- 4) Total Syntheses of Phycocyanobilin Derivatives Bearing a Modified A-Ring toward the Structure/Function Analysis of Phytochrome.
D. Sawamoto, H. Nakamura, H. Kinoshita, S. Fujinami, and K. Inomata,
Chem. Lett., **2000**, 1398-1399.
- 5) *In vitro* Assembly of Phytochrome B Apoprotein with Synthetic Analogs of the Phytochrome Chromophore.
H. Hanzawa, K. Inomata, H. Kinoshita, T. Kakiuchi, K. P. Jayasundera, D. Sawamoto, A. Ohta, K. Uchida, K. Wada, and M. Furuya,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **98**, No. 6, 3612-3617 (2001).
- 6) A Highly Efficient Method for the Preparation of A/B-Ring Component of Phycobilin Derivatives Starting from Bilirubin.
D. Sawamoto and K. Inomata,
Chem. Lett., **2001**, 588-589.
- 7) An Efficient Method for the Conversion of 2-Bromo-5-tosylpyrroles to the Corresponding 5-Tosylpyrrolinones as the D-Ring of Phycocyanobilin Derivatives.
S. Takeda, K. P. Jayasundera, T. Kakiuchi, H. Kinoshita, and K. Inomata,
Chem. Lett., **2001**, 590-591.
- 8) Structural Requirement of Bilin Chromophore for the Photosensory Specificity of Phytochromes A and B.
H. Hanzawa, T. Shinomura, K. Inomata, T. Kakiuchi, H. Kinoshita, K. Wada, and M. Furuya,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **99**, No. 7, 4725-4729 (2002).

4. 口頭発表

- 1) JAYASUNDERA, K. P., 木下英樹, 猪股勝彦
An Efficient Method for the Construction of A,B-Rings Component toward Total Syntheses of Phycocyanobilin and its Derivative
有機合成化学北陸セミナー
1999年10月 (福井)
- 2) K. Inomata
Total Synthesis of Phytochromobilin and Its Derivatives for the Structure/Function Analysis of Phytochrome
9th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers (FCFP-IX)
1999年11月 (中国, 海南省海口) 招待講演
- 3) 澤本大介, 猪股勝彦
ビリルビンを出発物質として用いるフィコビルン誘導体の高効率の構築法
日本化学会第78春季年会
2000年3月 (船橋)
- 4) 中村 洋, 澤本大介, 木下英樹, 猪股勝彦
3,3'-ジヒドロフィコシアノビルン誘導体の合成
日本化学会第78春季年会
2000年3月 (船橋)
- 5) 武田秀造, 垣内貴司, 木下英樹, 猪股勝彦
フィトクロモビリンの全合成
日本化学会第78春季年会
2000年3月 (船橋)
- 6) 太田敦子, 木下英樹, 猪股勝彦
B, C環部分を修飾したフィコシアノビルン誘導体の全合成
日本化学会第78春季年会
2000年3月 (船橋)
- 7) K. Inomata
Contribution of Organic Chemistry to Analysis of Chromophore Function in Phytochromes
13th International Congress on Photobiology (Photomorphogenesis, Structure and function of phytochrome)
2000年7月 (米国, San Francisco) 招待講演

- 8) 中村 洋, 木下英樹, 猪股勝彦
3,3'-ジヒドロフィコシアノビリルン誘導体の合成
有機合成化学北陸セミナー
2000年10月(富山)
- 9) 武田秀造, 垣内貴司, 木下英樹, 猪股勝彦
フィトクロモビリルの全合成
有機合成化学北陸セミナー
2000年10月(富山)
- 10) 澤本大介, 猪股勝彦
ビリルルンを出発物質として用いるフィコビリルン誘導体の高効率の構築法
有機合成化学北陸セミナー
2000年10月(富山)
- 11) K. Inomata
Contribution of Organic Chemistry to Analysis of Chromophore Function in
Phytochromes
2nd International Conference on Basic Sciences and Advanced Technology
(BSAT-II)
2000年11月(エジプト, アシュート大学) 招待講演
- 12) 猪股勝彦
フィトクロムの構造と機能解明のためのフィコビリルン誘導体の合成
信州大学繊維学部特別講演会
2000年12月(信州大学) 招待講演
- 13) 横田和也, Jayasundera, K.P., 木下英樹, 猪股勝彦
D環部分に光活性基を導入したフィコシアノビリルン誘導体の全合成
日本化学会第79春季年会
2001年3月(神戸)
- 14) 武田秀造, 木下英樹, 猪股勝彦
フェニルセレノエチル基をビニル基等価体として用いたフィトクロモビリル
ンの合成
日本化学会第79春季年会
2001年3月(神戸)
- 15) 澤本大介, 猪股勝彦
ビリベルジンジアリルエステルを出発物質として用いるフィコビリルン誘導
体の高効率の構築法
日本化学会第79春季年会
2001年3月(神戸)

- 16) 中村 洋, 木下英樹, 猪股勝彦
立体化学的に固定化されたCD環を有するフィコシアノビルリン誘導体の合成
日本化学会第79春季年会
2001年3月(神戸)
- 17) K. Inomata
Contribution of Organic Chemistry to Analysis of Chromophore Function in
Phytochromes
11th International Symposium on Fine Chemistry and Functional Polymers
(FCFP-XI)
2001年7月(中国, ハイラル) 招待講演
- 18) 猪股勝彦
フィトクロムの構造と機能解明のための有機合成化学的アプローチ
京都大学大学院工学研究科物質エネルギー化学専攻特別講演会
2001年10月(京都市, 吉田本町) 招待講演
- 19) 横田和也, Jayasundera K.P., 木下英樹, 猪股勝彦
D環を修飾したフィコビルリン誘導体の合成
有機合成化学北陸セミナー
2001年10月(石川)
- 20) 澤本大介, 中村 洋, 木下英樹, 猪股勝彦
A環部分を修飾したフィコビルリン誘導体の合成
有機合成化学北陸セミナー
2001年10月(石川)
- 21) K. Inomata
Total Synthesis of Phytychromobilin Derivatives toward Analysis of Chromophore
Function in Phytochromes
Singapore International Chemical Conference (SICC-2), "Frontiers in
Chemical Design and Synthesis"
2001年12月(シンガポール) 招待講演
- 22) 猪股勝彦
フィトクロムの構造と機能解明を目指した有機合成化学的戦略
文部科学省研究費補助金特定領域研究(A)「多元素環状化合物の創製」
第1回公開シンポジウム
2002年1月(京都市) 招待講演

- 23) 星井博昭, 中村 洋, 木下英樹, 猪股勝彦
D環 18 位にチオール基を導入した 3,3'-ジヒドロフィコシアノビリル誘導
体の合成
日本化学会第 81 春季年会
2002 年 3 月 (東京)
- 24) 平田ゆかり, 中村 洋, 木下英樹, 猪股勝彦
CD環部位の立体化学を固定したフィコシアノビリル誘導体の合成
日本化学会第 81 春季年会
2002 年 3 月 (東京)
- 25) 澤本大介, 中村 洋, 木下英樹, 猪股勝彦
A環部分を修飾したフィコビリル誘導体の合成
日本化学会第 81 春季年会
2002 年 3 月 (東京)
- 26) 横田和也, Jayasundera K.P., 木下英樹, 猪股勝彦
D環を修飾したフィコビリル誘導体の合成
日本化学会第 81 春季年会
2002 年 3 月 (東京)
- 27) K. Inomata
Structure and Function of Phytochrome Chromophores
The Gordon Research Conference on Photosensory Receptor & Signal
Transduction
2002 年 5 月 (Il Ciocco in Tuscany, Barga, Italy) 招待講演
- 28) K. Inomata
Total Synthesis of Phytochromobilin Derivatives toward Analysis of Chromophore
Function in Phytochromes
2nd International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines
(ICPP2)
2002 年 6 月 30 日 ~ 7 月 5 日 (京都) 招待講演