

植物シデロフォア的一种ムギネ酸の構造活性相関に関する研究

西丸 貴弘

Study on the Structure Activity Relationship of a Phytosiderophore, Mugineic Acid

Takahiro NISHIMARU

Faculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-osaka City 577-8502, Japan

(Received March 27, 2006)

To study the structure-activity relationship of mugineic acid (MA), a phytosiderophore isolated from *Hordeum velugare* L. var. *Minorimugi*, several 2-deoxymugineic acid (DMA) analogues were synthesized. ¹H-NMR spectra of DMA analogues and their Co(III) complexes were first measured and analyzed to elucidate the structures of metal complexes. CD spectra of the Co(III) and Fe(III) complexes of DMA analogues were then measured and compared with those of MA. Furthermore, the interaction between the Fe(III) complexes of DMA analogues and the phytosiderophore-Fe(III) complex transporter found in maize was examined.

Key words—mugineic acid (MA); 2-deoxymugineic acid (DMA); phytosiderophore; phytosiderophore-Fe(III) complex transporter; structure activity relationship

1. 序論

植物の成長及び機能の維持には、多くの金属元素が関与している。中でもクロロフィルの生合成、呼吸や光合成における電子伝達及び多くの酵素活性化に鉄は必須な元素の1つである。緑色植物には多くの鉄が含まれているにも関わらず、古い葉から新しい葉への鉄の移動は行われず、植物は絶えず鉄の供給を必要としている。若葉を黄変あるいは白色化させる黄白化症は鉄欠乏によって起こるもので、成長は止まりついには枯死する。^{1,2)} イネ (*Oryza sativa* L.) は、古くから栽培植物の中では鉄欠乏症を起こし易い植物の1つとして知られている。ところが、同じイネ科の植物である大麦 (*Hordeum vulgare* L. var. *Minorimugi*) は、鉄欠乏を起こし難い。この現象に着目した岩手大学の高城らは、水耕栽培した大麦の根の洗液中に、水酸化第二鉄を可溶化するキレーターを見出した。³⁾ さらに、彼らは鉄欠乏状態に置かれた大麦の根の洗液より、強い鉄キレート能を有するアミノ酸の一種ムギネ酸 (MA: 1) を

単離し、その構造を決定した。⁴⁾ その後、ライ麦 (*Secale cereale* L.) から3-ヒドロキシムギネ酸,⁵⁾ オーツ麦 (*Avena sativa* L.) からアベニン酸,⁶⁾ 小麦 (*Triticum aestivum* L.) から2-デオキシムギネ酸 (DMA: 2),⁷⁾ ビール麦 (*Hordeum vulgare* L. *distichum*) から3-エピヒドロキシムギネ酸⁸⁾ 及びディスティコン酸 A⁹⁾ など種々の MA 様シデロホアが発見された。

上記のような事実から、イネ科植物の一部は根からシデロフォアを分泌し、土壤中の不溶性鉄を可溶化させたのち、鉄(III)錯体を形成して根内に取り込む機構を有するものと推定された。¹⁰⁾ さらに、大麦は鉄キレート物質として知られる EDTA などの鉄(III)錯体をほとんど吸収せず、MA—鉄(III)錯体のみを選択的に吸収することも明らかにされた。¹⁰⁾ したがって、植物が MA—鉄(III)錯体を吸収する機構には、その構造を認識する輸送タンパク質が関わっていると考えられた。実際、大麦の鉄欠乏状態の根からムギネ酸鉄錯体輸送タンパク質 (HvYS1) が最近になり同定された。¹¹⁾ しかし、その詳細な輸送機構はいまだ解明されていない。

2. DMA 類縁体の分子設計

MA—鉄(III)錯体と構造が類似すると考えられている MA—コバルト(III)錯体の X 線結晶構造解

近畿大学工学部化学科天然物有機化学研究室 (〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1)

e-mail: nishimalu@mail.goo.ne.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会近畿支部有機合成若手セミナー優秀発表賞の受賞を記念して記述したものである。

析の結果、MAの2位の水酸基は金属錯体形成に関与しないことが明らかとなっている。¹²⁾ われわれはこの事実に着目し、鉄イオン輸送に関わるMAの構造活性相関を明らかにするために、その2位の水酸基が欠如したDMAを基本構造とする種々の類縁体を分子設計した (Fig. 1)。すなわち、DMAの構成単位の一つL-アゼチジン-2-カルボン酸部位をグリシンに置き換えた3、その3位炭素の立体が反転した4、さらにβ-アラニン、アスパラギン酸あるいはリジンに置き換えた5、6及び7などである (Fig. 1)。本研究では、これら各種合成類縁体の鉄(III)錯体形成能、及びそれらの立体構造と鉄イオン輸送能との関係を明らかにすることにした。^{13,14)}

3. DMA類縁体7の合成

イネ科植物から見出された各種シデロフォアは、既に生合成経路も発見され、¹⁵⁾ 化学合成もいろいろな方法で行われている。^{9,16,17)} われわれがデザインしたDMA類縁体の合成は、還元的N-アルキル化反応を鍵反応として行われた。これらの内、3-6の合成については既に発表しているの、¹⁸⁾ ここでは最近行った7の合成について説明する。類縁体7は、そのリジン部位の側鎖アミノ基が錯体形成に關

与することなく大麦に取り込まれれば、このアミノ基に蛍光標識基などを導入した化合物の創製が可能となることから、興味を持たれる化合物である。

類縁体7の合成は、Scheme 1に示すように、まずリジン誘導体8とアスパラギン酸から調製したアルデヒド体9をトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム [Na(OAc)₃BH] により縮合した。次に、縮合生成物10の遊離となっている2級アミノ基を、将来のε-アミノ基への各種置換基導入を考慮して、t-ブトキシカルボニル (Boc) 基の除去条件に安定で、ベンジルオキシカルボニル (Z) 基と選択的に除去することのできる2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル (Troc) 基で保護した。このようにして得られた11のBoc基を20% TFA/CH₂Cl₂ 溶液で選択的に除去後、リンゴ酸から調製したアルデヒド体12と再び還元的N-アルキル化で縮合して13に

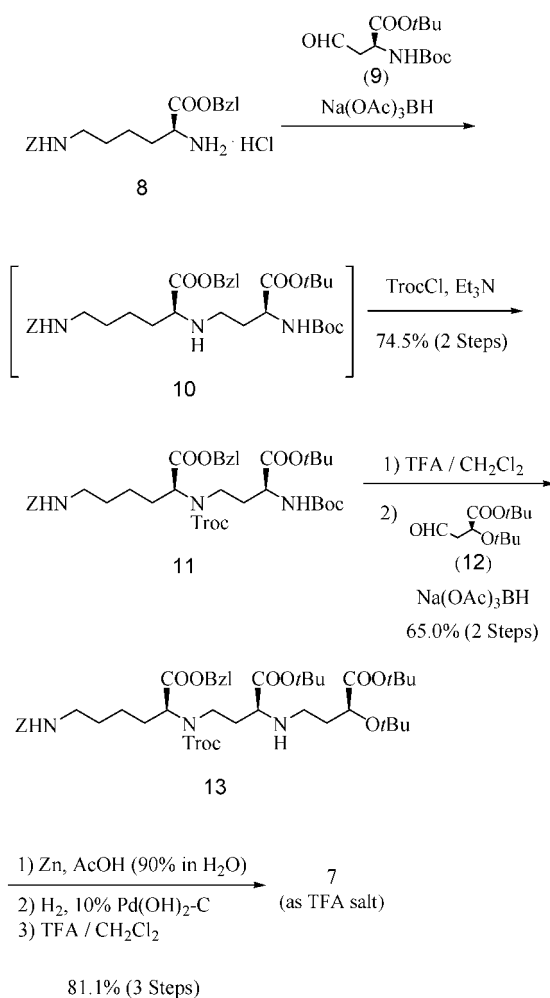
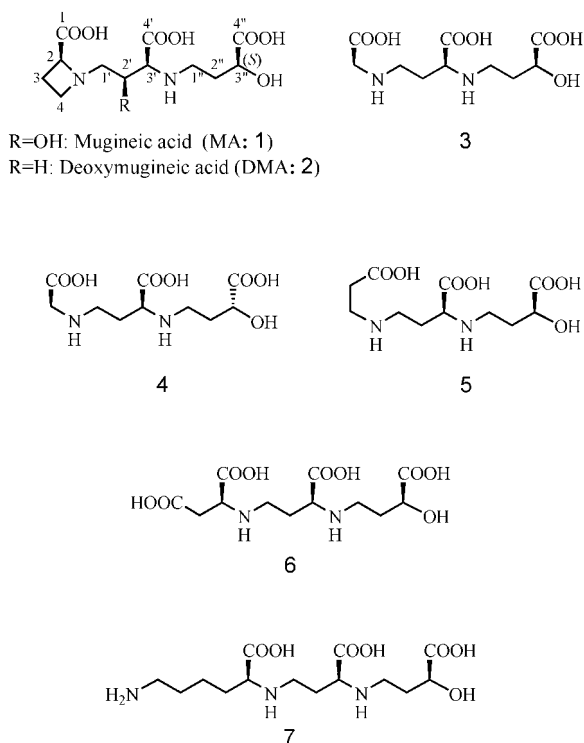


Fig. 1. Structures of MA (1), DMA (2) and DMA Analogues 3-7

Scheme 1. Synthetic Route to the DMA Analogue 7

導いた。最後に, Troc 基, Z 基, *t*Bu 基を順次除去して, 目的とする DMA 類縁体 **7** を得ることができた。

4. DMA 類縁体のコバルト(III) 錯体の ¹H NMR による解析

これまでに合成した DMA 類縁体の鉄(III) 錯体の構造を推定するために, まず鉄錯体と構造が類似するコバルト(III) 錯体をそれぞれ調製し, それらの ¹H NMR 測定を行った。この結果について, DMA 類縁体 **3—6** のコバルト(III) 錯体の比較を例に挙げて説明する (Fig. 2)。まず, 配位子となる **3** のスペクトル (Fig. 2(a)) とそのコバルト(III) 錯体のスペクトル (Fig. 2(b)) を比較すると, 後者では錯体形成に関与する極性官能基が結合した炭素上のプロトンの化学シフトが大きく変化し, さらにすべてのメチレンプロトンは完全に非等価に現れている。これらの事実から, **3** が図中に示すような構造の錯体を形成していると示唆され, MA で得られた結果とよく一致することが明らかになった。⁹⁾

一方, **3** の 3 位炭素の立体配置が反転した **4** のコバルト(III) 錯体 (Fig. 2(c)) は, **3** の錯体とは全く異なるスペクトルを与えた。そのパターン及びスペクトルが全体的にブロードであることから, **3** のように安定な 6 配位構造を形成していないのではないかと推定される。

DMA 類縁体 **6** (Fig. 2(e)) は, β -カルボキシル基が関与する錯体構造も考えられたが, DMA 類縁体 **3** 及び **5** のコバルト(III) 錯体 (Figs. 2(b) 及び 2(d)) のスペクトルと比較検討した結果, 前者と同じタイプの構造であることが示唆された。したがって, **6** のアスパラギン酸部位の β -カルボキシル基は, 錯体形成に関与していないことが明らかとなった。また, DMA 類縁体 **7** (Fig. 2(f)) も **3** のコバルト(III) 錯体と同じタイプの構造であることが示唆され, リジン部位の ϵ -アミノ基もやはり錯体形成に関与していないことが確かめられた。なお, いずれの ¹H NMR スペクトルにおいても, コンホマーに由来すると思われるシグナルが認められるが, この点に関しては今後より詳細な検討が必要である。

5. DMA 類縁体コバルト(III) 及び鉄(III) 錯体の CD スペクトルによる解析

DMA 類縁体コバルト(III) 錯体の構造に関する

新たな知見を得るために, CD スペクトルの解析を行った。配位子となる MA 及び DMA 類縁体の CD スペクトルにおいては, 210—250 nm でそれぞれに特有の吸収を示すが, それよりも長波長側の領域では全く変化がない (Fig. 3(a))。一方, コバルト(III) 錯体は, 明らかに錯体形成に基づくと思われる CD スペクトルを与えた (Fig. 3(b))。これらのスペクトルを比較検討すると, **3, 6** 及び **7** のコバルト(III) 錯体はいずれも MA—コバルト(III) 錯体と極めて類似したスペクトルパターンを与えている。しかし, β -アラニン部位が関与した錯体を形成する DMA 類縁体 **5** のコバルト(III) 錯体は, MA—コバルト(III) 錯体と基本的なスペクトルパターンは類似しているが, 500 nm 付近の吸収が異なるスペクトルを与えた。さらに, DMA 類縁体 **3** の 3 位炭素の立体配置が反転した DMA 類縁体 **4** のコバルト(III) 錯体は, 他のコバルト(III) 錯体と比べて全く異なるスペクトルを与えた。

次に MA 及び DMA 類縁体 **3—7** の鉄(III) 錯体の調製を行い, それらの CD スペクトルを測定した (Fig. 3(c))。MA—鉄(III) 錯体と DMA 類縁体 **3—7** の鉄(III) 錯体のスペクトルを比較すると, コバルト(III) 錯体の場合と同様に, **4** の錯体は顕著に, また **5** の錯体はやや異なるパターンを与えた。一方, **3, 6** 及び **7** のスペクトルはいずれも MA の錯体と類似したパターンを与えた。これらの結果から, DMA 類縁体 **3—7** の鉄(III) 錯体は, コバルト(III) 錯体類似の構造を有していることが示唆された。したがって, 前述のコバルト(III) 錯体の ¹H NMR を解析することにより, 鉄(III) 錯体の構造を推定できると考えられる。

6. DMA 類縁体鉄(III) 錯体の取り込み試験

MA の構造—活性相関解明のため, 各 DMA 類縁体—鉄(III) 錯体の細胞内への取り込み試験を行った。これまでの試験では, 大麦に ⁵⁹Fe(III) で放射性ラベルした錯体を取り込ませる手法で行っていた。¹⁰⁾ しかし, 本研究では, このような放射性同位体を用いる代わりに, 2001 年に Curie らが黄白化症を起こすトウモロコシから見出した, 植物シデロフォアの輸送タンパク質 (ZmYS1)¹⁰⁾ を発現させた鉄吸収欠損酵母 (*fet3fet4*) の発育によって, 鉄(III) 錯体の取り込みを調べることにした。MA—及び DMA 類縁体—鉄(III) 錯体の取り込み試験

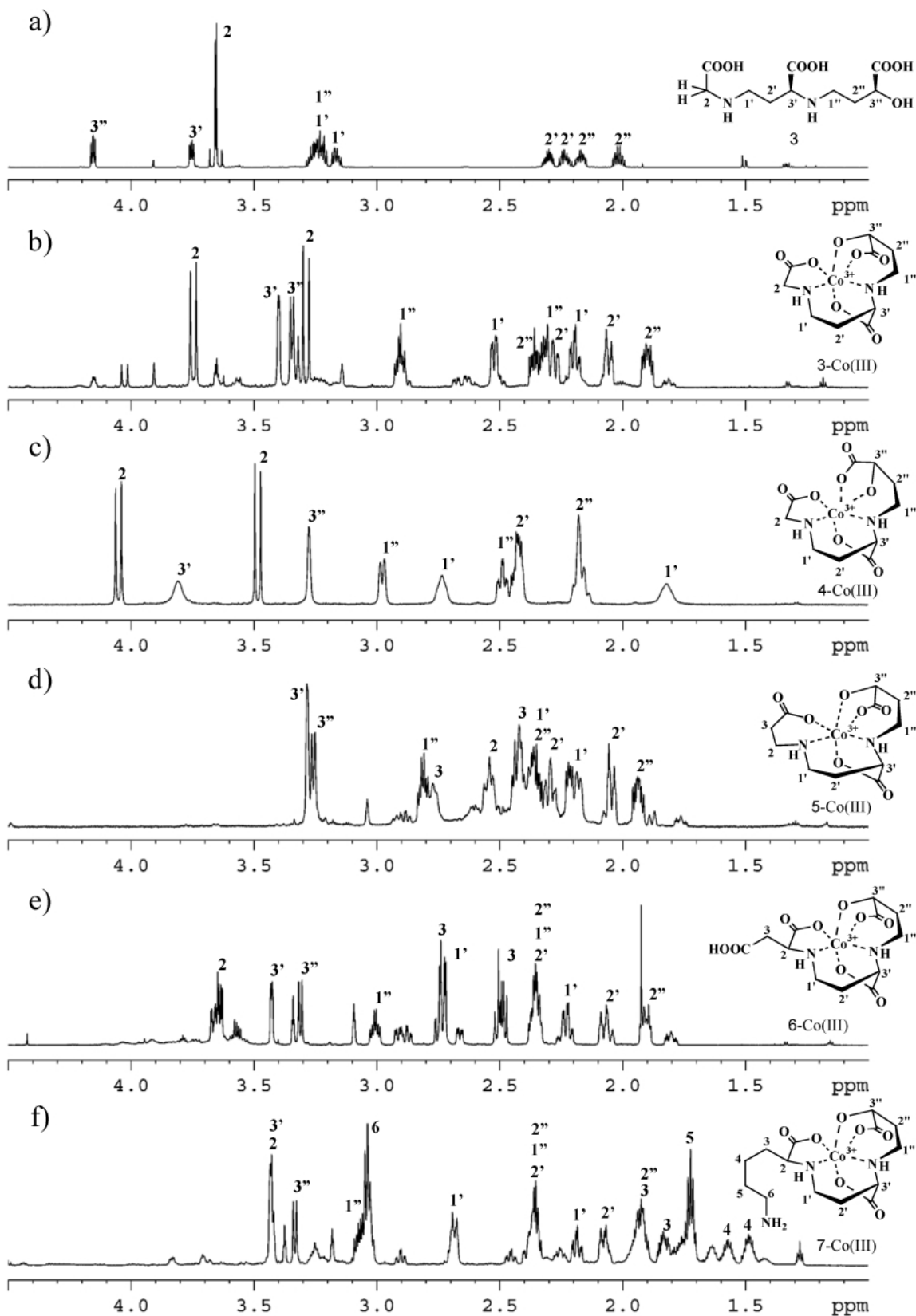


Fig. 2. ^1H NMR Spectra of DMA Analogue 3 and Co(III) Complexes of DMA Analogue 3—7

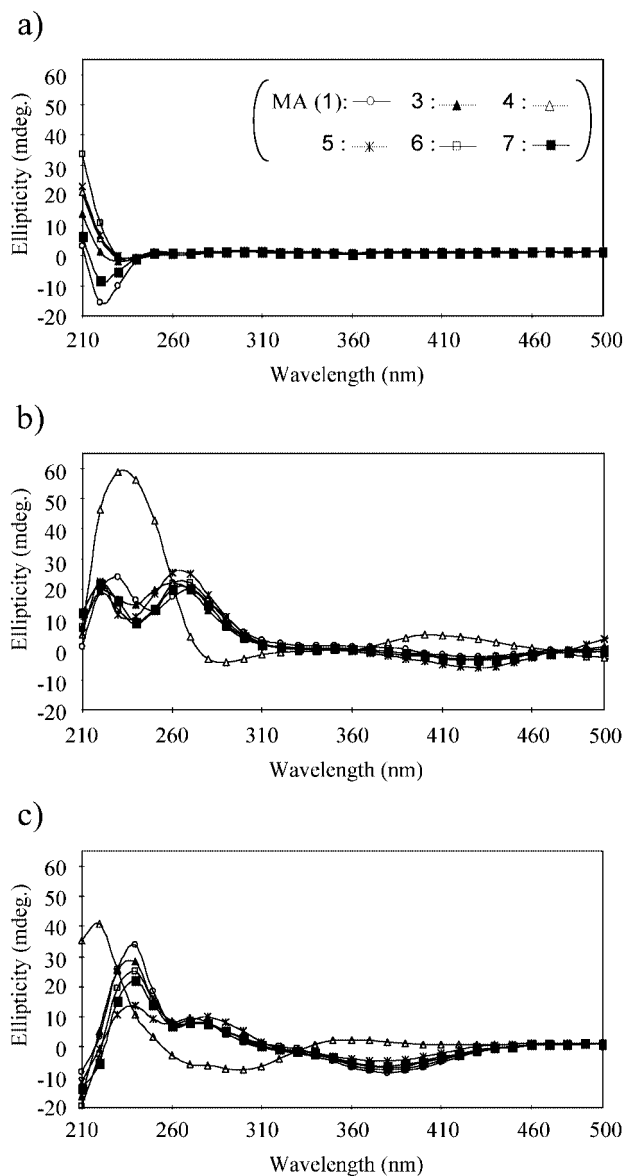


Fig. 3. a) CD Spectra of MA (1) and DMA Analogues 3–7, b) CD Spectra of Co(III) Complexes of MA (1) and DMA Analogues 3–7, c) CD Spectra of Fe(III) Complexes of MA (1) and DMA Analogues 3–7

は、各錯体の濃度を $50 \mu\text{M}$ にし、測定を開始して2日目の *fet3fet4* の発育により、それらの取り込みを評価した (Fig. 4)。

上記試験の結果から、MA—鉄(III)錯体が極めて効率よく取り込まれることが確認された。また、DMA 類縁体 3 及び 5—7 の鉄(III)錯体も十分取り込まれている。ただし、定性的な結果ではあるが、3 の方が 5 よりやや活性が高いと判断される。一方、CD スペクトルで他の錯体とは顕著に異なるスペクトルを与えた DMA 類縁体 4 の鉄(III)錯体では、

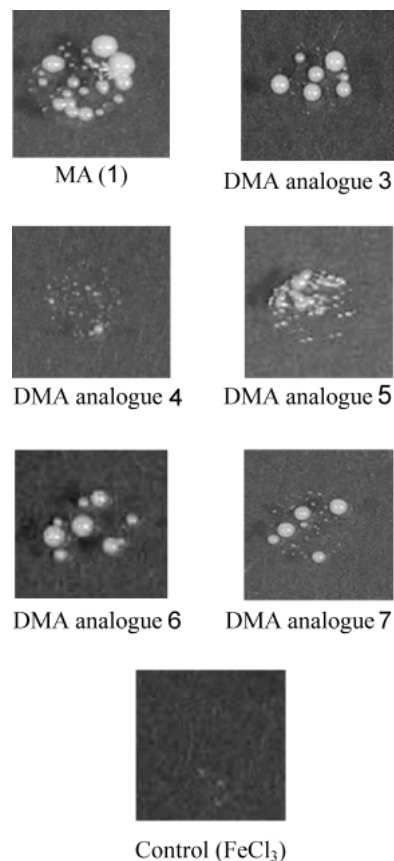


Fig. 4. Functional Complementation of the Growth of the Iron Uptake-defective Yeast Mutant *fet3fet4* by ZmYS1 Using the Fe(III) Complexes of MA (1) and DMA Analogues 3–7, Respectively

ほとんど酵母の発育が認められなかった。このことから、3位炭素の立体配置がムギネ酸の活性発現に極めて重要であることが明らかとなった。

7. 結語

本研究では、まず MA の構造—活性相関研究のため、新たに 2 種の DMA 類縁体の合成を行い、以前に合成された類縁体を含め計 5 種の DMA 類縁体とそれらのコバルト(III)錯体の ¹H NMR を測定し、錯体構造に関する新規な知見を得た。特に、類縁体 6 及び 7 においては、側鎖官能基が関与しない錯体を形成することを確認した。また、MA 及び DMA 類縁体のコバルト(III)錯体、及び鉄(III)錯体の CD スペクトルの比較から、両錯体間における構造の類似性を明らかにした。

次に、鉄(III)錯体の *fet3fet4* に対する取り込み試験が、MA の構造—活性相関の評価に極めて有効であることを明らかにした。さらに、MA の 3 位炭素の立体配置が活性発現に重要であること、また類

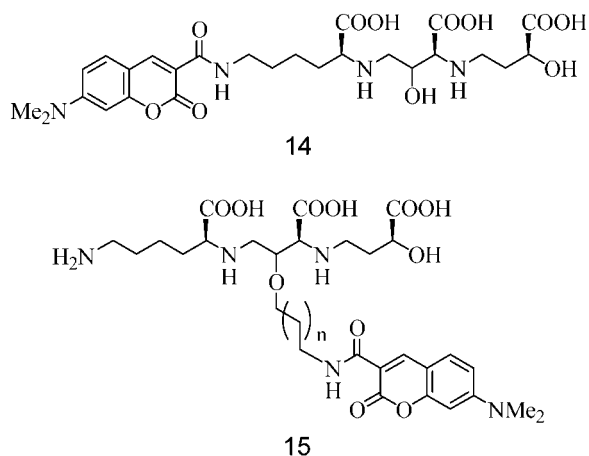


Fig. 5. Newly Designed Fluorescent MA Analogues **14** and **15**

縁体 **6** は、 $^1\text{H NMR}$ や CD スペクトルから推定されたように **3** と同じタイプの錯体構造を取ることがこの試験でも示唆された。

上記の結果を纏めると、MA の構造と活性相関の研究には、コバルト(III) 錯体の $^1\text{H NMR}$ 、コバルト(III) 錯体と鉄(III) 錯体の CD スペクトルを総合的に比較検討することに加えて、鉄(III) 錯体の *fet3fet4* に対する取り込み試験を行うことが有用であると結論できる。

以上の結果に基づき、われわれは本研究で紹介した類縁体以外に、**7** のリジン部位の ϵ -アミノ基に 4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-7-イル基あるいは 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボニル基のような蛍光標識基を導入した類縁体の合成を行った。¹³⁾ しかし、いずれもほとんど水に溶けないため、錯体形成や *fet3fet4* による鉄(III) イオンの取り込み実験を行うことができなかった。そのため、水溶性の向上を目指した新たな蛍光標識化合物 **14** 及び **15** をデザインし、現在それらの合成を進めている (Fig. 5)。

謝辞 本研究は近畿大学理工学部化学科(現化学コース)天然物有機化学研究室において、東洋大学生命科学部及びサントリー生物有機科学研究所との共同研究として遂行されたものであります。このテーマを与えて下さり、終始ご指導をいただきました近畿大学の若宮建昭教授に感謝申し上げます。また、種々有益なご助言をいただきました山口仁宏助教授、及び共同研究者として実際の実験を進めるに

あたり多大なご協力をいただきました岩本徹也修士にお礼申し上げます。さらに、本研究全般について種々ご指導いただきました東洋大学生命科学部野本亨資教授、各種化合物の NMR の測定及び解析をしていただきましたサントリー生物有機科学研究所の岩下孝博士、及び鉄(III) 錯体の取り込み試験を行っていただきました同研究所の村田佳子博士に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Brown C. J., *Adv. Agron.*, **13**, 329–361 (1961).
- 2) Brown C. J., Holmes S. R., Tiffin O. L., *Soil Sci.*, **86**, 75–82 (1958).
- 3) Takagi S., *Soil Sci. Plant Nutr.*, **22**, 423–433 (1976).
- 4) Takemoto T., Nomoto K., Fushiya S., Ouchi R., Kusano G., Hikino H., Takagi S., Matsuura Y., Kakudo M., *Proc. Jpn. Acad.*, **54**, 469–473 (1978).
- 5) Nomoto K., Takemoto T., Fushiya S., Nozoe S., Takagi S., Abstracts of papers, the 22nd Symposium on the Chemistry of Natural Products, Fukuoka, October 1979, pp. 619–626.
- 6) Fushiya S., Sato Y., Nozoe S., Nomoto K., Takemoto T., Takagi S., *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3071–3072 (1980).
- 7) Nomoto K., Yoshioka H., Arima M., Fushiya S., Takagi S., Takemoto T., *Chimia*, **35**, 249–250 (1981).
- 8) Iwashita T., Naoki H., Nomoto K., Mino Y., Abstracts of papers, the 20th NMR Symposium, Tokyo, November 1981, pp. 253–256.
- 9) Nomoto K., Ohfuné Y., *J. Syn. Org. Chem. Jpn.*, **40**, 401–414 (1982).
- 10) Ma J. F., Kusano G., Kimura S., Nomoto K., *Phytochemistry*, **34**, 599–603 (1993).
- 11) Murata Y., Ma J. F., Yamaji N., Ueno D., Nomoto K., Iwashita T., *Plant J.* (2006) (in press).
- 12) Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Takemoto T., Tanaka H., Sugiura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4671–4676 (1983).
- 13) Nishimaru T., Iwamoto T., Nomoto K., Iwashita T., Murata Y., Yamaguchi Y., Wakamiya T., *Peptide Science* 2005, 263–266

- (2006).
- 14) Nishimaru T., Iwamoto T., Nomoto K., Iwashita T., Murata Y., Yamaguchi Y., Wakamiya T., Abstracts of papers, the 25th Seminar for Young Investigator of the Society of Synthetic Organic Chemistry, Japan, Kobe, November 2005, p. 14.
 - 15) Ma J. F., Shinada T., Matsuda C., Nomoto K., *J. Biol. Chem.*, **270**, 16549–16554 (1995).
 - 16) Shioiri T., Hamada Y., Matsushita F., *Tetrahedron*, **14**, 3939–3958 (1995).
 - 17) Miyakoshi K., Oshita J., Kitahara T., *Tetrahedron*, **57**, 3355–3360 (2001).
 - 18) Wakamiya T., Inoue M., Hirai E., Shimizu R., Yamaguchi Y., Iwashita T., Nomoto K., *Peptide Science 1998*, 465–468 (1999).
 - 19) Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Delaporta L. S., Brita J., Walker L. E., *Nature*, **409**, 346–349 (2001).