



Title	天然有機化合物の構造解析のためのNMR法の開発研究とその応用
Author(s)	福士, 江里
Description	農芸化学奨励賞受賞
Citation	北海道大学大学院農学研究科技術部研究・技術報告, 12, 1-3
Issue Date	2005-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35472
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p1-3.pdf



《農芸化学奨励賞》

天然有機化合物の構造解析のための NMR 法の開発研究とその応用



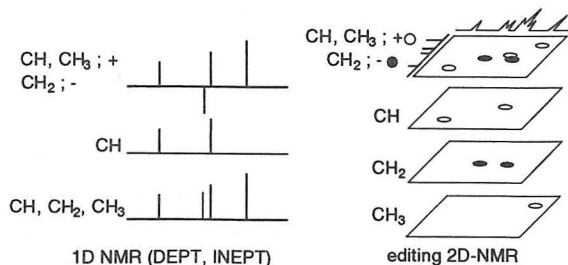
北海道大学大学院農学研究科 文部科学技官 福士 江里

NMR 法は有機化学研究において重要な役割を担っており種々の測定法によって複雑な天然有機化合物の構造が次々と明らかにされている。しかし、一般に使われているルーチンな測定法では解決できない構造をもつ化合物も多く、これらを克服するため新たな NMR 法の開発や既存の手法の改良を行い、以下のような生理活性化合物や食品中の生体機能調節物質の精密構造解析に応用した。

1. エディティング NMR 法によるメチン、メチレン、メチルの選択測定

NMR を使って天然有機化合物の構造を解析する際に、DEPT や INEPT といった 1 次元 (1D) ^{13}C -NMR 法によって、メチン、メチレン、メチル炭素の区別を行うことが古くから行われている。1D 法ではシグナルの正負の位相をスペクトルの基線に対する上下の向きで表し、DEPT や INEPT では測定条件の設定によってメチンとメチルが正でメチレンが負となるスペクトル、メチンシグナルのみのスペクトル、いずれのシグナルも正となるスペクトルを測定することができる。メチレン、メチルのみのスペクトルは直接は得られないが、上記 3 種類のスペクトルを適当な係数で加減することで得られ、この過程をスペクトル編集 (エディティング) と呼ぶ。

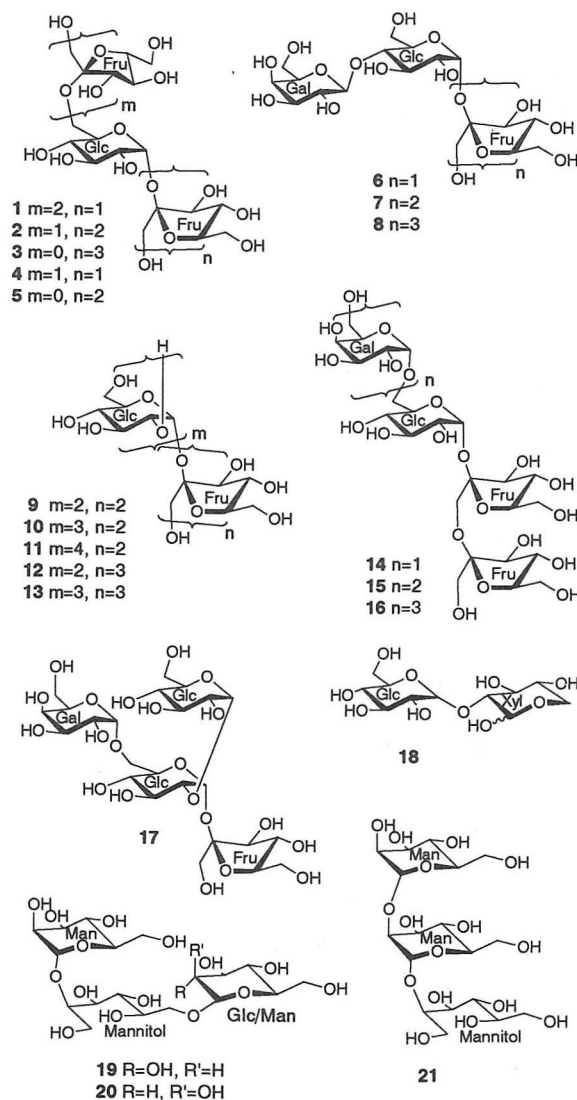
この考え方を 2 次元法 (2D) に拡張した 2D-DEPT, E(editing)-HMQC 法などにより、1D と同様の測定が可能である。2D 法ではシグナルの正負は紙面上に等高線などで表現され、1D 法と同様にメチン、メチレン、メチルシグナルを位相によって区別したり、いずれかのシグナルのみを選択的に測定したりでき、エディティング法と呼ばれる。筆者らはエディティング法によりメチン、メチレン、メチルのいずれかを選択的に測定することでスペクトルを単純化し解析を容易にすることができる点に特に着目し、E-HSQC 法と TOCSY, NOESY, ROESY などを組み合わせた手法を開発し構造解析に応用した。



2. メチレン選択 E-HSQC-TOCSY 法の開発とオリゴ糖の NMR 解析への応用

オリゴ糖類の NMR スペクトルはシグナルが重なり合いやすく解析が困難となることが多い。特にメチレン炭素は狭い化学シフト範囲に集中していることから、このことを逆を利用して 2D スペクトルの炭素軸方向にメチレン炭素のみを選択したス

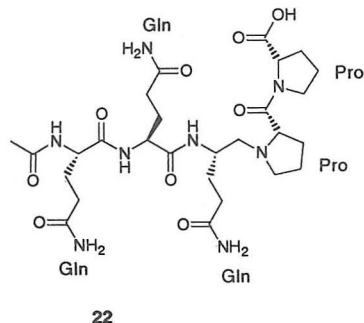
ペクトルにより炭素軸の分解能を高めることができる。HSQC-TOCSY 法は、一つの炭素と同じスピン系 (フルクトースでは同じ糖残基内の 3 位から 6 位まで、グルコースなどでは同一糖残基内すべて) の水素を区別して検出でき、オリゴ糖の構造解析に有力な手法である。本法からメチレン選択 E-HSQC-TOCSY 法を作成して得た高分解能のスペクトルと、降旗らによって発表された炭素軸方向に先鋭なピーク形状を有する ct-HMBC スペクトルを中心に、重なり合うシグナルを炭素軸へ分離し、アスパラガス由来や酵素合成した糖、あるいは酵素タンパク質の糖鎖ユニットなどの二〜六糖 1~21 の完全帰属を達成した。



3. E-HSQC-ROESY 法の開発と小麦アレルギー関連化合物の研究への応用

小麦アレルギーの原因および予防の化学的研究の一環として、抗原多糖およびエピトープペプチド、アレルゲン腸管透過

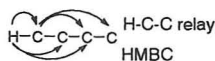
抑制物質などの構造解析を行った。特にエピトープペプチド Ac-Gln-Gln-Gln-Pro-Pro (22) の構造解析においては、同種のアミノ酸の NMR シグナルが重なり合い、 ^1H - ^1H ROESY では立体構造解析が困難であったため、炭素軸へのピークの分離を期待して HMQC-ROESY を測定したが十分な感度を得ることができなかった。そこで新たに作成した E-HSQC-ROESY 法によりメチン選択スペクトルを測定し、縦軸に各アミノ酸残基の α 炭素のみを選択し測定範囲を狭く設定することで、分解能を犠牲にすることなくデータポイントを減らし、その分積算回数を増やすことができた。その結果、各 α 水素からの相関を分離し、主鎖のアミド結合をすべてトランスと決定できた。



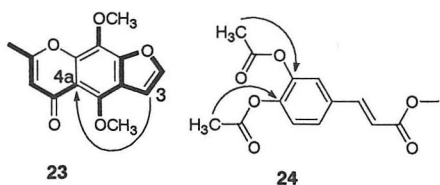
22

4. 超遠隔相関法の開発と応用

遠隔炭素(C)水素(H)相関法として広く用いられている HMBC では、通常 ^1H -X- ^{13}C または ^1H -X-X- ^{13}C 型の 2~3 結合はなれた C/H の関係までしか検出できない。この限界を超え 4 結合はなれた C/H の超遠隔相関を ^1H - ^{13}C -X-X- ^{13}C 型の 2 段階の磁化移動を経て検出する DEPT C-C relay 法を開発し、多置換芳香族化合物や海洋生理活性物質の構造解析に応用した。

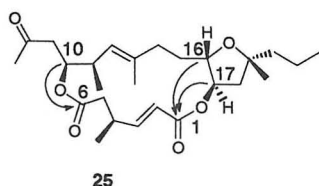


Khellin (23) は HMBC などでは図の太線の結合までしか検出されないためピロン環の向きを決定することができないが、1D DEPT C-C relay 法によりもう 1 結合遠い超遠隔結合 (矢印) を検出しピロン環の向きを一義的に決定できることを明らかにした (非ラベル 4 mg (15 μmol)/90 μL methanol- d_4 , 15 時間)。



23

24



25

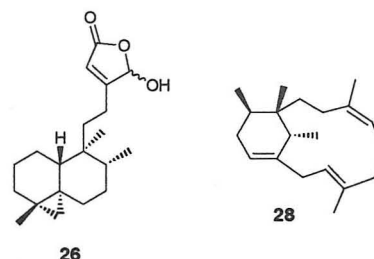
また, methyl 3,4-diacetoxycinnamate (24) のようなフェノールのエステルはアシル基の水素と水酸基の根元の炭素とが 4 結合はなれているため HMBC などによってこれらを帰属することができないが、2D DEPT long-range C-C relay スペクトルにより二つのアシル基を帰属することができた (非ラベル

28 mg (0.1 mmol)/60 μL chloroform- d , 19.5 時間)。渦鞭毛藻の産生する amphidinolide X (25) は二つのエステルカルボニル炭素が H-10, H-17 と HMBC 相関を与えず中員環の構造が決定できなかったが、2D DEPT long-range C-C relay 法により 16/1, 17/1, 10/6 の相関を得て構造を決定することができた (約 5% ラベル約 1 mg (2 μmol)/60 μL chloroform- d , 3.5 日)。

5. 結合定数測定と立体構造解析への応用

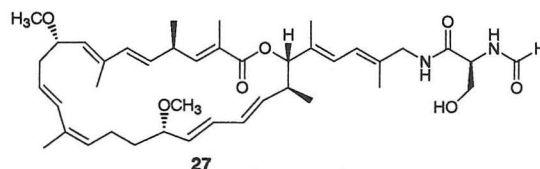
NMR におけるスピンスピン結合定数はその立体構造を反映することが知られており、H/H, C/H 結合定数による立体構造解析が試みられている。すでに報告されている H/H, C/H 結合定数測定法の応用と、新たに開発した C/H 結合定数測定法を組み合わせ、海洋生理活性物質や抗生物質の精密な立体構造解析を行った。また、H/H, C/H の結合定数と同様の立体構造依存性が知られている C/C 結合定数を上記超遠隔相関法から測定し、立体構造決定への応用範囲を検討した。

メチレンの多い海洋生理活性物質 dytesinin A (26) の NMR スペクトルはシグナルの重なり合いが多かったため、既述のメチレン選択スペクトルによるシグナルの分離、E-HSQC-NOESY の利用と結合定数測定を組み合わせ、精密立体構造解析に成功した。また、iejimalide B (27) や菌類のジテルペン生合成酵素反応の鍵となる環化中間体 phomactatriene (28) の立体構造を明らかにした。



26

28



27

6. 植物由来の生理活性物質、色素の構造解析

植物由来の抗菌・抗酸化活性成分や、色素の構造を明らかにし、完全帰属を行った。

多様な花色を持つ新しい品種の作出研究の一環としてヒアシンス、リンドウの花弁および培養細胞から再分化させた花弁からアシル化アントシアニンを微量成分も含めて単離、構造解析を行った。

最後に、NMR 装置およびソフトウェアの進歩によって NMR 法は身近になり、ルーチン測定は容易に測定できるようになってきた。これにより多くの化合物の構造解析がより速く進むようになっている一方、個々の化合物に合わせた構造解析法が必要となる場合も少なくない。NMR 法は複数パルスのソフトウェア制御 (パルスシーケンス) によってさまざまな情報を得ることができるため無数の手法が存在するといえる。今後、これら多くの NMR 測定法の応用や、新しい測定法の開発への要請は大きくなると考えている。

本研究は主に北海道大学大学院農学研究科において行われたもので、本研究の機会を与えてくださいました同研究科 GC-

MS 及び NMR 委員会委員長 田原哲士先生（同研究科教授）、前委員長 市原耿民先生（同研究科名誉教授）、元委員長 水谷純也先生（同名誉教授）に感謝いたします。また、NMR の手ほどきから共同研究まで終始ご指導くださいました北海道大学大学院農学研究科教授 川端 潤先生に心から御礼申し上げます。本研究において行った構造解析はすべて共同研究であり、共同研究の機会をくださいました、北海道大学農学研究科名誉教授 千葉誠哉先生、富田房男先生、北海道大学大学院農学研究科教授 木村淳夫先生、北海道大学大学院理学研究科教授 及川英秋先生、北海道大学大学院薬学研究科教授 小林淳一先生、同研究科助教授 津田正史先生、北海道大学大学院水産科学研究科助教授 栗原秀幸先生、酪農学園大学大学院酪農学研究科教授 塩見徳夫先生、帯広畜産大学畜産科学科教授 鍋田憲助先生、同学科助教授 田崎弘之先生、高崎健康福祉大学教授 渡辺道子先生、同大学講師 小林彰子先生、独立行政法人

食品総合研究所 渡辺 純博士、兵庫大学健康科学部教授 細川敬三先生、広島大学大学院生物圏科学研究科助教授 田辺創一先生、佐賀大学海浜台地生物生産研究センター助教授 亀井勇統先生、ならびに多くの共同研究者の皆様に感謝いたします。NMR の技術的なご指導をいただきました北海道大学大学院工学研究科助教授 平冲敏文先生、NMR 分光器制御のプログラミングについていつも丁寧に教えてくださいましたブルカー・バイオスピン株式会社の井町美佐子博士はじめ同社の皆様、学会等で有益なご助言をくださいました世界中の多くの研究者の方々に厚く御礼申し上げます。北海道大学大学院農学研究科 GC-MS および NMR 室の渡部賢二氏には NMR 装置保守および質量分析においてご協力いただきましたことを深謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました北海道大学大学院農学研究科教授 吉原照彦先生ならびに諸先生方に御礼申し上げます。