



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Introducing stable isotopes into small molecule to elucidate functional analysis of biologically active compounds [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	章, 文
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16269号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94993
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ZHANG_Wen_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏 名 ZHANG Wen (章 文)

審査担当者	主査	教 授	橋本	誠
	副査	教 授	松浦	英幸
	副査	教 授	崎浜	靖子
	副査	准教授	村井	勇太

学位論文題名

Introducing stable isotopes into small molecule to elucidate functional analysis of biologically active compounds

(生理活性物質の機能解明を目指した低分子安定同位体標識法の検討)

本論文は英文 80 頁、図 33、表 23、4 章からなり、参考論文 3 編が付されている。

近年の加速度的な質量分析技術の進歩に伴い、生理活性物質中の元素を安定同位体に置き換え、標識する技術が注目されている。安定同位体導入による代謝遅延による生理活性の持続（重薬効果）などが報告され、様々な安定同位体導入法が開発されている。この学位論文では、1) 化学的な手法による水素-重水素交換反応、ならびに 2) 微生物代謝利用した一次、二次代謝産物の安定同位体標識について検討している。

1) 重水素化トリフルオロメタンスルホン酸を利用した、水素-重水素交換反応

水素-重水素交換反応は、生理活性物質に最終段階で重水素を導入することが可能であることから、標識前駆体からの全合成の必要がないことから注目されている。強酸性ブレンステッド酸である重水素化されたトリフルオロメタンスルホン酸(TfOD)は、その酸性度を利用することで、通常利用されている重塩酸、重硫酸存在下における加熱条件などが必要なく芳香族性水素を重水素に交換することが可能である。オーキシシンとして知られているインドール-プロピオン酸(IPA)、-ブタン酸(IBA)は、その重要な生理活性が知られているにも関わらず、水素-重水素交換反応の報告がなされていなかった。インドール-酢酸(IAA)は、インドール 2 位とカルボン酸間で分子内環化すると不安定な 4 員環となり、重塩酸、110 度加熱の条件での水素-重水素交換反応が報告されているが、IPA, IBA ではそれぞれ安定な分子内 5、6 員環を形成することから、水素-重水素交換反応の報告がなされていなかった。この点を鑑み、TfOD, 60 度以下の温和な条件下、インドール環上の水素を重水素に交換することに成功した。

2) 糸状菌 *Trichoderma virens* を利用した一次代謝産物 squalene の ^{13}C 標識検討

糸状菌は生育速度が比較的早く、培養条件の制御が比較的簡単なことから、有用産物の供給源として注目されている。菌体成長のためには、トリテルペンであるス

スクワレンの生合成が必須となるが、メバロン酸経路にて生合成されるスクワレンは直ちにさらなる代謝経路によりラノステロールやエルゴステロールへと変換され、通常状態ではスクワレンの蓄積はほとんど見られない。そこで培養中、スクワレン代謝の初期酵素であるスクワレンエポキシダーゼ (SQE) 阻害剤を投与することで菌体内でのスクワレン蓄積を検討した。スクワレン代謝を阻害することにより菌体生育の恒常性を保つことができなくなると死滅してしまうことから、生育しながらスクワレンを蓄積可能な糸状菌のスクリーニングを行った。北海道道央で分離した *Trichoderma virens* PS1-7 株に SQE 阻害剤ブテナフィン塩酸塩を共存させるとこの目的に適していること、ならびに NBRC から入手可能な *Trichoderma virens* 株群もこの目的に利用可能であることを明らかとした。メバロン酸経路上の前駆体群を外部投与することで、スクワレン生産の増強を試みたが、産生量の増加は観察されなかった。そこで、培地中の炭素源グルコースを[U-¹³C]-グルコースとすることでスクワレン中への ¹³C 取り込みを検討したところ、これまで報告されていなかった 25~30 の炭素が高度に ¹³C に置き換わったことが確認され、通常測定が難しいとされる ¹³C-¹³C COSY の測定にも初めて成功した。

3) *Trichoderma virens* を利用した二次代謝産物 viridin, viridiol の ¹³C 標識検討

Trichoderma virens は二次代謝産物として phosphoinositide 3-kinase の不可逆的共有結合阻害剤であるフラノステロイド viridin, viridiol を産生することが知られている。viridin 産生に関する遺伝子クラスターは viridin 生合成の前駆体までが報告されているが、viridin ならびにそのカルボニル基が還元された viridiol の報告はされていない。2) 項における至適 pH の探索時、viridin が pH3、viridiol が pH2 において極大産生することを見出した。pH 4 以上ではこれらの産生が見られないことから、構造安定性に起因していると考え、種々培養条件の検討を行った。pH 3 で培養後、培養液 pH を 5 にすると viridin が検出されなかった。また viridin はシリカゲル表面で容易に分解することが明らかとなり、この化合物の単離、構造決定、X 線構造解析を行ったところ、これまで存在が示唆されていたケト-エノール互変異性体である β-viridin の絶対構造を明らかとした。フラノステロイド viridin, viridiol の全合成は有機化学的にも注目されており、これまで 20 段階以上の合成例が 3 報あるのみであった。この確立した培養条件を用い[U-¹³C]-グルコースを利用することで、一週間の短期間で[U-¹³C]標識された viridin, viridiol を単離精製することに成功した。

以上の成果は、化学的のみならず微生物を利用した安定同位体調製に大きく寄与するものである。よって審査員一同は、ZHANG Wen が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。