

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書**海洋生物の防御機能を模倣したバイオマス循環型****船底付着阻害剤の合成的探索研究**

(1RF-1601)

平成28年度～平成29年度

Development of Biomimetic and Biomass-recycling Antifouling Material

〈研究代表機関〉 北海道大学

〈研究分担機関〉 なし

〈研究協力機関〉 電力中央研究所

平成30年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに (研究背景等)	1
2. 研究開発目的	2
3. 研究開発の方法	2
4. 結果及び考察	2
5. 本研究により得られた主な成果	5
6. 研究成果の主な発表状況	6
7. 研究者略歴	7
II. 成果の詳細	
各種グルコサミンイソニトリルの合成と生物活性試験 (北海道大学)	8
要旨	8
1. はじめに	8
2. 研究開発目的	9
3. 研究開発方法	9
4. 結果及び考察	10
5. 本研究により得られた成果	14
6. 国際共同研究等の状況	15
7. 研究成果の発表状況	16
8. 引用文献	16
III. 英文Abstract	17

I. 成果の概要

課題名 海洋生物の防御機能を模倣したバイオマス循環型船底付着阻害剤の合成的探索研究
 課題代表者名 梅澤 大樹（北海道大学大学院地球環境科学研究院 准教授）

研究実施期間 平成28～29年度

累計予算額 6,065千円（うち平成29年度：3,015千円）

本研究のキーワード 付着生物、付着阻害剤、生体模倣、バイオマス、有機合成

研究体制

(1) 各種グルコサミンイソニトリルの合成と生物活性試験（北海道大学）

研究協力機関

一般財団法人 電力中央研究所

1. はじめに(研究背景等)

船舶は人類の活動に不可欠な手段であるが、フジツボなどによる生物付着は航行効率の悪化、化石燃料の浪費を引き起こす。付着防止のため、TBTをはじめとする有機スズ化合物が1960年代から使用されたが、オスの巻貝のメス化などを引き起こし、環境ホルモン物質として指摘された。そのため、国際海事機関(IMO)は2008年に、「船舶の有害な防汚方法の規則に関する国際条約」によって、有機スズ化合物の使用を禁止した。また、船舶以外(発電所の冷却水導入管や養殖の網など)に対する、生物付着による被害も深刻である。現在、銅などの重金属を含む化合物が主として用いられているが、未確認の毒性も指摘されており、環境にやさしい更なる代替品の開発が望まれている。

現在の付着阻害剤に関する最近の研究例として、船底に凹凸をつける物理的アプローチや、撥水性ポリマーを利用する化学的アプローチなど、多方面から進められている。これらは優れた効果を示す一方で、短所も混在しており、いずれも究極的解決には至っていない。



2. 研究開発目的

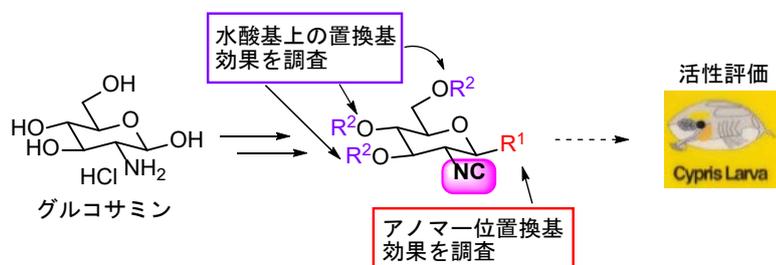
本研究では、船底に付着するフジツボなどの生物に対し、付着阻害活性を有する有機化合物を合成し付着阻害試験を経て、有望化合物(シーズ)を見出すことを目的とする。

研究代表者は、ウミウシなどの海洋生物から得られる有機化合物が強い付着阻害活性と低毒性を併せ持つことに着目した。海洋生物は、このような化合物を付着生物に対する防御物質として考えている。これら化合物の中にはイソニトリル基が含まれているものがあり、イソニトリル含有化合物はいずれも付着阻害活性を有することを過去の研究から明らかにした。本研究では、カニなどの外殻から得られるバイオマスであるグルコサミンにイソニトリル基を導入する。グルコサミンから短工程かつ安価に付着阻害化合物を合成し、船底を保護、劣化後は海洋へ流出、グルコサミンがカニなどに再取込みされれば、バイオマスとはいえ循環できる理想的な付着阻害剤が創出できる。このように、海洋中の防御機能を模倣し、循環できる化合物を創生できれば、本課題に対する究極的な解決法を提案できる。なお、本助成期間外となるが、有機合成の手法を駆逐することで、見出す化合物に更なる機能を付与することで、付着メカニズムを明らかにすることも計画している。

3. 研究開発の方法

(1) 各種グルコサミンイソニトリルの合成と生物活性試験

グルコサミンにはアミノ基、アノマー水酸基、その他3つの水酸基が含まれる。アミノ基はイソニトリル基へ導くこととし、残りの水酸基に種々の置換基 (R^1, R^2) を導入し、それらの付着阻害活性に与える効果を検討した。アノマー水酸基は、市販のグルコサミンから3工程で種々の置換基を導入できる経路を確立した。続く2工程で、他の水酸基への置換基導入を経て目的物へと導いた。これらは有機合成化学の手法で推し進めることとした。合成品の付着阻害活性 (EC_{50} : 50% effective concentration、半数有効濃度、値が小さいほど強い付着阻害活性) および毒性 (LC_{50} : 50% lethal concentration、半数致死濃度、値が小さいほど強い毒性) を、付着前のタテジマフジツボのキプリス幼生を用いて評価した。この生物を用いる評価は、共同研究先の電力中央研究所の野方靖行博士のもとで行った。得られた生物活性評価の結果は、次の分子設計の指針とした。このサイクルを繰り返し、強い付着阻害活性と低毒性を併せ持つ化合物創生を試みた。



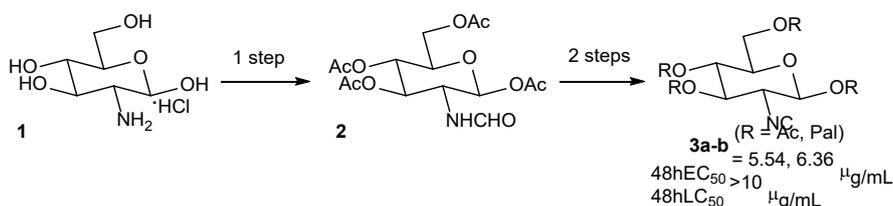
図(1)-1

4. 結果及び考察

(1) 各種グルコサミンイソニトリルの合成と生物活性試験

図(1)-2の方法で、エステル型の化合物 **3a**, **3b** を合成した。**3a**, **3b** の、48時間後の付着阻害活性 ($48hEC_{50}$) をタテジマフジツボのキプリス幼生を用いて評価したところ、それぞれ $5.54 \mu\text{g/mL}$, $6.36 \mu\text{g/mL}$ であった。これらの値は、現在使用されている付着阻害剤 (Sea-nine 211 $EC_{50} = 0.08 \mu\text{g/mL}$, CuSO_4 $EC_{50} = 0.18 \mu\text{g/mL}$) と比較すると弱い阻害活性であったが、本研究の可能性を示すことができた。毒性 (LC_{50}) に関して、両化合物とも $10 \mu\text{g/mL}$ でも死亡する個体は観測されず、低毒性を示すことができた。

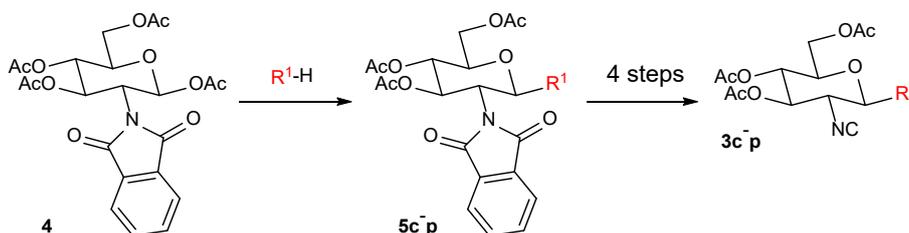
(略語、Ac = C(O)CH₃, Pal = C(O)*n*C₁₅H₃₁)

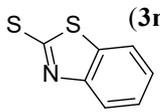
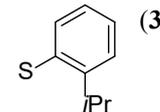
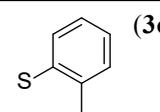
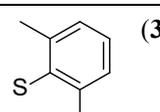
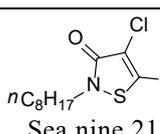


図(1)-2

次に、R¹にエーテル型またはチオエーテル型の置換基を導入した。なお、出発物質として、市販の4を用いた。タテジマフジツボのキプリス幼生に対する2種の生物活性(付着阻害活性EC₅₀値、毒性LC₅₀値)も測定した。いずれも強い付着阻害活性(EC₅₀ = 0.07~0.84 μg/mL)を示し、いくつかの化合物は現在用いられているsea nine 211と同等の強い活性を有していた。これらすべてで毒性はなかった。活性測定の結果、見出された傾向は以下の通りである。①エーテル型やチオエーテル型では、エステル型(図1-(2))よりも約1桁強い付着阻害活性を示すことがわかった。②エーテル(-OR¹)とチオエーテル(-SR¹)ではチオエーテルの方が強い活性を示す(3c vs 3j)、③R¹の分子サイズが小さいほど、強い活性を示す(3d vs 3e, 3f, 3i vs 3k, 3l)、エーテルやチオエーテルの置換基として、芳香環よりもアルキル基の方が強力である(3j vs 3l)。毒性については、いずれの化合物も10 μg/mLの高い濃度においても、死亡する個体は観測されなかったが、一部の化合物においては死亡しないものの浮遊したり(いずれ死んでしまう)、付着することなく幼生が変態してしまうものが見出されている。これらについて、原因は不明だが幼生に対する分子レベルでの作用機序が異なっている可能性もある。

(略語、Ph = C₆H₅, *i*Pr = CH(CH₃)₂)

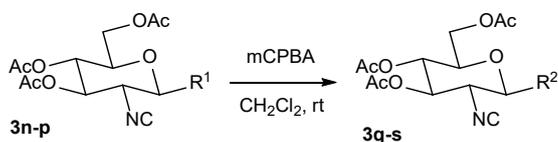


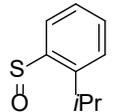
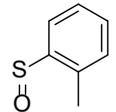
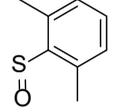
化合物	生物活性		化合物	生物活性	
	48hEC ₅₀ (μg/mL)	48hLC ₅₀ (μg/mL)		R ¹	48hEC ₅₀ (μg/mL)
R ¹			R ¹		
OPh (3c)	0.71	>10	 (3m)	0.21	>10
OCH ₂ Ph (3d)	0.70	>10	 (3n)	0.30	>10
OCH ₂ CH=CH ₂ (3e)	0.37	>10	 (3o)	0.30	>10
<i>Oi</i> Pr (3f)	0.23	>10	 (3p)	0.43	>10
OCH ₂ CF ₃ (3g)	0.36	>10	 Sea nine 211	0.08	0.1
SCH ₃ (3h)	0.11	>10			
<i>Sn</i> C ₁₂ H ₂₅ (3i)	0.84	>10			
SPh (3j)	0.43	>10			
<i>Si</i> Pr (3k)	0.07	>10			
SC ₆ H ₁₁ (3l)	0.07	>10			

図(1)-3

次に、スルホキシド(-S(O)R¹)の効果を調べることにした。目的化合物3q-sは3n-pから1工程で合成した。スルホキシドの付着阻害活性は概して弱かったものの、本結果はスルフィド(-SR¹)との比較から意義あるものと位置付けられる。すなわち、エーテル(-OR¹)とエステル(-OC(O)R¹)の結果と対応するからである。有機化学の視

点から、エーテルやスルフィドは電子供与基（電子を押し出す）として、エステルやスルホキシドは電子吸引基（電子を引き込む）として捉えることができる。このことから、強い付着阻害活性を有する化合物を合成するためには、電子供与能の大きい置換基を導入すればよいことを示唆している。今後は、この傾向を満足する化合物の合成を進めていく。

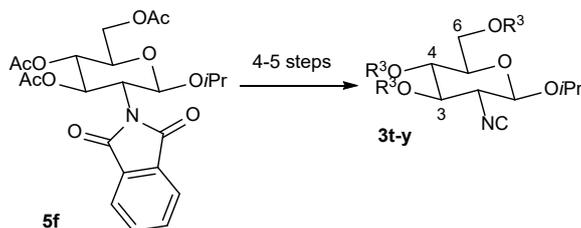


R	48hEC ₅₀ (μg/mL)	48hLC ₅₀ (μg/mL)
 (3q)	2.65	>10
 (3r)	3.32	>10
 (3s)	1.02	>10

図(1)-4

その他(3,4,6位)の水酸基にアセチル基以外の置換基を導入した。アノマー置換基には、エーテル型で強い付着阻害活性を示したイソプロピル基を採用した。合成は5fから始め、4-5工程でイソニトリル化合物3t-yへと導いた。各合成品の付着阻害活性を測定した結果、3yを除いていずれも強い付着阻害活性を示した。ただ、特筆すべき傾向を見出すことはできなかった。具体的には、前述したエステル(3t-3v)やエーテル(3w-3y)の間で大きな差はみられなかった。

(略語、TBS = *tertiary*-butyldimethylsilyl, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{tBu}$, MOM = CH_2OCH_3)



化合物	生物活性	
	48hEC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	48hLC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
R ³		
CO _n C ₇ H ₁₅ (3t)	0.79	>10
CO _n C ₁₅ H ₃₁ (3u)	0.31	>10
COPh (3v)	0.81	>10
TBS (3w)	0.25	>10
MOM (3x)	0.38	>10
CH ₂ Ph (3y)	5.5	>10

図(1)-5

ムラサキイガイに対する付着阻害試験

付着生物に関する問題はフジツボだけにとどまらず、様々な生物が関与している。本研究で合成した化合物がフジツボ以外の付着生物に対しても有効であるかを確かめるため、付着生物であるムラサキイガイに対して付着阻害試験を試みた。イソニトリル化合物として、**3a,3f,3k**を用いた。ムラサキイガイは足糸を形成し付着するが、永久付着ではなく足糸を切り離し移動することができる。このことから、ムラサキイガイの試験では、付着の指標となる足糸の数を表に示した。いずれの化合物も同様の傾向を示した。具体的には、1.0 $\mu\text{g/mL}$ よりも薄い濃度では、対照区と大きな差はみられなかったものの、10 $\mu\text{g/mL}$ では足糸の顕著な減少が確認できた。なお、10 $\mu\text{g/mL}$ でも死亡した個体は確認されなかった。

サンプル名	3a	3f	3k	対照
終濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				
0	—	—	—	240
0.1	219	282	299	—
0.3	300	318	237	—
1	241	272	291	—
10	133	159	180	—

図(1)-6

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

安価かつ大量に入手可能なバイオマスであるグルコサミン(あるいは市販のグルコサミン誘導体)から、3から6工程で付着阻害活性を有する多様なイソニトリル化合物を合成することができた。この少ない工程数は、「2. 研究開発目的」の項で述べた、研究代表者らによる過去のイソニトリル含有天然有機化合物合成(27工程)と比較すると明白である。効率的な合成法の開発は、実用的に化合物供給にとって不可欠である。

多様な化合物の合成の中で、種々の官能基(エステル、エーテル、スルフィド、スルホキシドなど)をグルコサミンに導入し、付着阻害活性を調べた結果、科学的に有用な知見が得られた。アノマー置換基において、①置換

基の電子的な性質(電子を押し出すor引き込む)が付着阻害活性に影響を及ぼす(エステルvsエーテル、チオールvsスルホキンド、押す方が強い活性)、②置換する元素が酸素よりも硫黄の方が強い活性を有する、③芳香環化合物よりもアルキル化合物(分子サイズの小さいアルキル)の方が強い活性を有する。それ以外の置換基については、④特筆すべき傾向は見出すことができなかった。これらの傾向は、分子レベルでの付着阻害メカニズムに影響を与えることが予想される。有機合成を駆使すれば、メカニズムを調べるための機能を付与した化合物(プローブ)も合成できる。本研究で得られた知見をもとに、プローブを合成し、メカニズムを明らかにすることで、より最適な化合物を今後創生する。また、④については、どのような官能基を導入しても活性に影響を与えないと言い換えることも可能である。付着阻害化合物は、塗料に混ぜて使われることになるので、塗料分子と結合を作るような分子設計も可能となる。

本研究により、現在用いられている付着阻害剤に匹敵する活性を持つ化合物を見出すこともできた。上記のように、科学的に意義ある傾向を見出したものの、更なる最適化の余地を十分に残しているため、今後はより強力なイソニトリル化合物を創出する。

(2) 環境政策への貢献

本研究(付着生物の阻害剤)に関する環境問題として、一昔前の有機スズ化合物や現在も用いられる銅や亜鉛などの重金属が船底などから海洋中へと流出する問題が挙げられる。海洋生物に悪影響を与えることはもとより、食物連鎖の結果として人類の健康に対する悪影響も指摘されている。重金属以外の付着阻害剤も使用されるが、大部分は生物殺傷(バイオサイド)型に属するため海洋環境への効果が懸念されている。また、このような付着阻害剤を利用しないと、船底に生物が付着する結果、付着除去に莫大な費用を要するだけでなく、燃費が悪化し二酸化炭素の排出増加を引き起こす。

一方、フジツボなどの付着生物はウミウシなどの海洋生物も付着の対象としているが、これら海洋生物は前述したイソニトリル化合物をはじめとする有機化合物で付着を防御している。これらの有機化合物は強力かつ低毒性が特徴である。この海洋生物の防御機能を模倣できれば、上述の問題を究極的に解決することが期待できる。本研究では、この生物模倣による付着生物の阻害剤に関する究極的な解決を目指して、イソニトリルを海洋産バイオマスであるグルコサミンに導入した各種化合物を合成した。合成品の付着阻害剤試験により、強力な付着阻害活性と低毒性を両立することが示された。海洋中で使用されるグルコサミンイソニトリルは、最終的には海洋へと流れ出る。これらが生物に取り込まれ再び抽出されて付着阻害剤になれば、バイオマスであっても循環する理想的な付着阻害剤となりうる。このような化合物が実用化できれば、SDGsでも掲げられている「14. 海洋と海洋資源の保全・持続可能な利用」に資するものとなり得る。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究では、バイオマス循環を提案する付着阻害剤開発の可能性を示した。バイオマスであっても循環するような化合物が実用化できれば、SDGsでも掲げられている「14. 海洋と海洋資源の保全・持続可能な利用」に資するものとなり得る。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) T. Umezawa, Y. Hasegawa, I. S. Novita, J. Suzuki, T. Morozumi, Y. Nogata, E. Yoshimura, F. Matsuda: Marine Drugs 203 (2017) (15,7).
Design, Synthesis, and Antifouling Activity of Glucosamine-Based Isocyanides

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 梅澤大樹・長谷川裕己・Ira Novita Sari・鈴木惇也・諸角達也・松田冬彦・野方靖行・吉村えり奈
2017 年度日本付着生物学会 総会・研究集会(2017)
「グルコサミン由来の付着阻害剤の合成と付着阻害活性」
- 2) 梅澤大樹・長谷川裕己・Ira Novita Sari・鈴木惇也・諸角達也・野方靖行・吉村えり奈・松田冬彦
第19回マリンバイオテクノロジー学会(2017)
「マリンバイオマス由来付着阻害剤の構造-活性相関研究」
- 3) 梅澤大樹・長谷川裕己・Ira Novita Sari・鈴木惇也・諸角達也・野方靖行・吉村えり奈・松田冬彦
第12回化学生態学研究会(2017)
「バイオマス由来付着阻害剤の構造-活性相関研究」

7. 研究者略歴

研究代表者

梅澤 大樹

大阪市立大学理学部卒業、博士(理学)、現在、北海道大学大学院地球環境科学研究院 准教授

研究分担者

該当なし

II. 成果の詳細

各種グルコサミンイソニトリルの合成と生物活性試験

国立大学法人北海道大学

地球環境科学研究所 物質機能科学部門

<研究協力者> 電力中央研究所

平成28～29年度累計予算額：6,065千円（うち平成29年度：3,015千円）

予算額は、間接経費を含む。

梅澤大樹

野方靖行

[要旨]

フジツボなどの付着生物は、船底などの海中構築物に多大なる損害を与える。これまで防汚剤として、毒性の強い有機スズ化合物が使用されてきた。国際海事機関（IMO）は、海洋環境汚染を受けて2008年に有機スズ化合物を禁止とする船底防汚塗料条約を採択しており、「環境にやさしい新規防汚剤」の開発が望まれている。一方、海洋生物であるウミウシからイソニトリル基（-NC）を含む天然有機化合物が強い付着阻害活性をもつことが明らかにされている。付着生物はウミウシなども付着の対象としているが、ウミウシは天然有機化合物を用いて付着を防御していると考えられている。しかしながら、それらは複雑な構造を有するために、効率的に化合物を供給することは困難である（前述の化合物合成には27工程が必要）。そこで、海洋産バイオマスであるグルコサミンにイソニトリル基を導入し、効率的にイソニトリル化合物を合成することにした。特に、アノマー置換基とその他の水酸基上の置換基の効果を調査した。合成品の生物活性試験を通じて、強い付着阻害活性と低毒性を併せ持つ化合物を見出すことを本研究の目的とした。

市販のグルコサミンあるいはその誘導体を出発物質に用いて、3～6工程で各種イソニトリル化合物を合成した。合成品の付着阻害活性および毒性の指標として、タテジマフジツボのキブリス幼生に対してそれぞれ、半数有効濃度（EC₅₀）および半数致死濃度（LC₅₀）を測定した。測定の結果、全ての合成品で毒性はなかった（LC₅₀ > 10 μg/mL）。EC₅₀に関して、アノマー置換基では以下の傾向を見出した：①置換基の電子的な性質（電子を押し出すor引き込む）が付着阻害活性に影響を及ぼす、②置換する元素が酸素と硫黄では硫黄の方が強い活性、③芳香環化合物よりもアルキル化合物の方が強い活性。本推進費によって得られた成果を通じて、イソニトリル化合物の実用化が可能となれば、SDGsでも掲げられている「14. 海洋と海洋資源の保全・持続可能な利用」に資するものとなり得る。

[キーワード]

付着生物、付着阻害剤、生体模倣、バイオマス、有機合成

1. はじめに

船舶は人類の活動に不可欠な手段であるが、フジツボなどによる生物付着は航行効率の悪化、化石燃料の浪費を引き起こす。付着防止のため、TBTをはじめとする有機スズ化合物が1960年代から使用されたが、オスの巻貝のメス化などを引き起こし、環境ホルモン物質として指摘された。そのため、国際海事機関(IMO)は2008年に、「船舶の有害な防汚方法の規則に関する国際条約」によって、有機スズ化合物の使用を禁止した。また、船舶以外（発電所の冷却水導入管や養殖の網など）に対する、生物付着による被害も深刻である。現在、銅などの重金属を含む化合物が主として用いられているが、未確認の毒性も指摘されており、環境にやさしい更なる代替品の開発が望まれている。

現在の付着阻害剤に関する最近の研究例として、船底に凹凸をつける物理的アプローチや、撥水性ポリマーを利用する化学的アプローチなど、多方面から進められている。これらは優れた効果を示す一方で、短所も混在しており、いずれも究極的解決には至っていない。



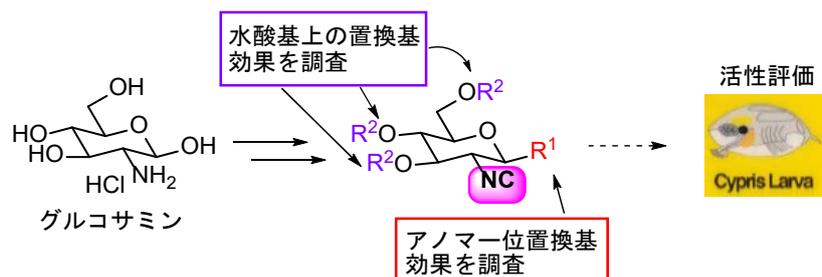
2. 研究開発目的

本研究では、船底に付着するフジツボなどの生物に対し、付着阻害活性を有する有機化合物を合成し付着阻害試験を経て、有望化合物(シーズ)を見出すことを目的とする。

研究代表者は、ウミウシなどの海洋生物から得られる有機化合物が強い付着阻害活性と低毒性を併せ持つことに着目した。海洋生物は、このような化合物を付着生物に対する防御物質としていていると考えられている。これら化合物の中にはイソニトリル基が含まれているものがあり、イソニトリル含有化合物はいずれも付着阻害活性を有することを過去の研究から明らかにした。本研究では、カニなどの外殻から得られるバイオマスであるグルコサミンにイソニトリル基を導入する。グルコサミンから短工程かつ安価に付着阻害化合物を合成し、船底を保護、劣化後は海洋へ流出、グルコサミンがカニなどに再取込みされれば、バイオマスとはいえ循環できる理想的な付着阻害剤が創出できる。このように、海洋中の防御機能を模倣し、循環できる化合物を創生できれば、本課題に対する究極的な解決法を提案できる。なお、本助成期間外となるが、有機合成の手法を駆使することで、見出す化合物に更なる機能を付与することで、付着メカニズムを明らかにすることも計画している。

3. 研究開発方法

グルコサミンにはアミノ基、アノマー水酸基、その他3つの水酸基が含まれる。アミノ基はイソニトリル基へ導くこととし、残りの水酸基に種々の置換基を導入し、それらの付着阻害活性に与える効果を検討した。これらは有機合成化学の手法で推し進めた。合成品の付着阻害活性 (EC₅₀: 50% effective concentration、半数有効濃度、値が小さいほど強い付着阻害活性)および毒性 (LC₅₀: 50% lethal concentration、半数致死濃度、値が小さいほど強い毒性)を、付着前のタテジマフジツボのキプリス幼生を用いて評価する。この生物を用いる評価は、共同研究先の電力中央研究所の野方靖行博士のもとで行った。得られた生物活性評価の結果は、次の分子設計の指針とした。このサイクルを繰り返し、強い付着阻害活性と低毒性を併せ持つ化合物創生を試みた。



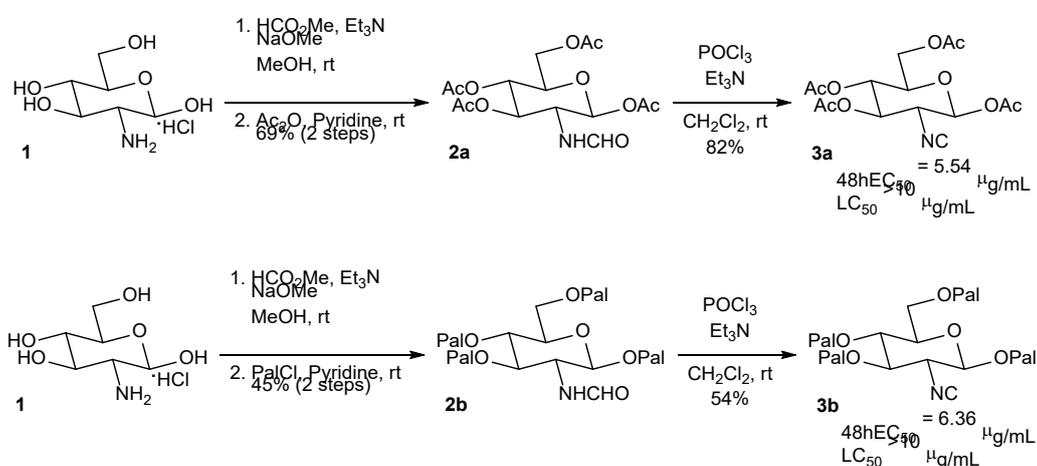
4. 結果及び考察

(1) 各種グルコサミンイソニトリルの合成と生物活性試験

始めに、全ての水酸基がエステル型に置換されているイソニトリル化合物の合成、および生物活性試験を検討した。まず、アセチル基(Ac)を有する化合物を合成した。市販のグルコサミン塩塩1から合成を開始し、アミノ基のホルムアミド化(HCO₂Me, Et₃N, NaOMe)と続くアセチル化(Ac₂O, Pyridine)反応で、イソニトリル前駆体2aを得た。最後に、塩化ホスホリル(POCl₃)を用いる脱水反応で目的のイソニトリル化合物3aを合成した。次いで、アセチル基よりもアルキル鎖の長いパルミトイル基(Pal)が置換したイソニトリル3b化合物も合成した。

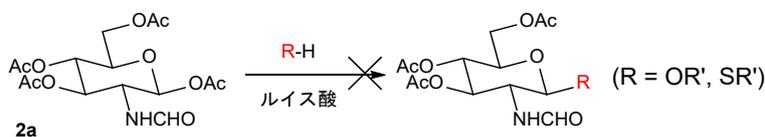
合成した化合物3a, 3bの、48時間後の付着阻害活性(48hEC₅₀)をタテジマフジツボのキブリス幼生を用いて評価したところ、それぞれ5.54 μg/mL, 6.36 μg/mLであった。これらの値は、現在使用されている付着阻害剤(Sea-nine 211 EC₅₀ = 0.08 μg/mL, CuSO₄ EC₅₀ = 0.18 μg/mL)と比較すると弱い阻害活性であったが、本研究の可能性を示すことができた。毒性(LC₅₀)に関して、両化合物とも10 μg/mLでも死亡する個体は観測されず、低毒性を示すことができた。

(略語、Me = CH₃, Et = CH₂CH₃, Ac = C(O)CH₃, Pal = C(O)nC₁₅H₃₁)



図(1)-2

次に、アノマー置換基として、エーテル型 (-OR') あるいはチオエーテル (-SR') 型のイソニトリル化合物を合成することとした (他の水酸基は、アセチル基とした)。合成の効率性を考慮して、2aから目的化合物を合成することを検討したが、アルコールや反応促進剤である種々のルイス酸を用いても、目的化合物を得ることができなかった。



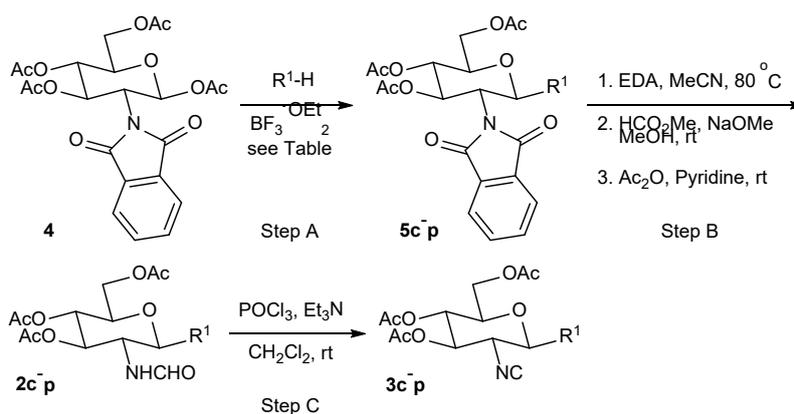
図(1)-3

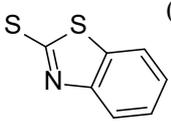
上記の結果を受けて、市販品である4から合成を進めることとした。初めに、グリコシル化反応でアノマー置換基を各種導入することとした。条件検討の結果、対応するアルコールあるいはチオールが存在下で、ルイス酸としてボロントリフルオライド (BF₃-OEt₂) をジクロロメタン中室温あるいはアセトニトリル中80度で反応させると、目的化合物を与えることを見出した。なお、表には検討した2つの条件のうち、収率が高かった条件を記載した。次に、合成した各化合物5をEDAでアセチル基およびフタロイル基の除去、ホルムアミド化、そして再びアセチル化することでホルムアミド2とした。最後に、前述と同じ条件で脱水反応させることで、目的のイソニトリル化合物3をそれぞれ合成できた。これら一連の合

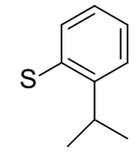
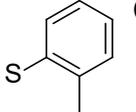
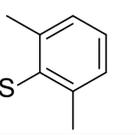
成では、個々の化合物に対する反応条件の最適化は行っていないため、中程度の収率にとどまっているものもあり、今後検討を予定している。

タテジマフジツボのキプリス幼生に対する2種の生物活性（付着阻害活性EC₅₀値、毒性LC₅₀値）も測定した。エーテル型やチオエーテル型では、エステル型（図1-(2)）よりも約1桁強い付着阻害活性を示すことがわかった。現在までで見出されている傾向は以下の通りである。①エーテル（-OR'）とチオエーテル（-SR'）ではチオエーテルの方が強い活性を示す（**3c** vs **3j**、**3f** vs **3k**）、②R'の分子サイズが小さいほど、強い活性を示す（**3d** vs **3e**、**3f**、**3g**）。毒性については、いずれの化合物も10 μg/mLの高い濃度においても、死亡する個体は観測されなかったが、一部においては死亡しないものの浮遊したり（いずれ死んでしまう）、付着することなく幼生が変態してしまうものが見出されている。これらについて、原因は不明だが幼生に対する分子レベルでの作用機序が異なっている可能性もある。

（略語、EDA = tetraethylenediamine, Ph = C₆H₅, *i*Pr = CH(CH₃)₂）

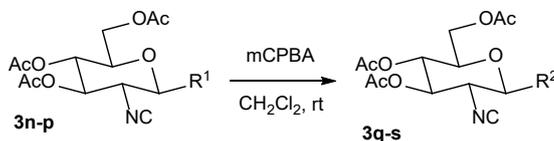


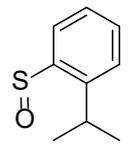
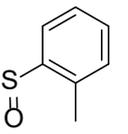
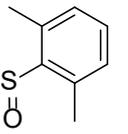
化合物	Step A		Step B	Step C	生物活性	
	Conditions	Yield (%)	Yield (%) for 3 steps	Yield (%)	48hEC ₅₀ (μg/mL)	48hLC ₅₀ (μg/mL)
R ¹						
OPh (3c)	CH ₂ Cl ₂ , rt	33	10	51	0.71	>10
OCH ₂ Ph (3d)	MeCN, 80 °C	54	41	61	0.70	>10
OCH ₂ CH=CH ₂ (3e)	MeCN, 80 °C	66	20	32	0.37	>10
O <i>i</i> Pr (3f)	MeCN, 80 °C	31	31	49	0.23	>10
OCH ₂ CF ₃ (3g)	CH ₂ Cl ₂ , rt	77	37	54	0.36	>10
SCH ₃ (3h)	市販品		55	90	0.11	>10
SC ₁₂ H ₂₅ (3i)	CH ₂ Cl ₂ , rt	75	39	73	0.84	>10
SPh (3j)	MeCN, 80 °C	51	31	41	0.43	>10
S <i>i</i> Pr (3k)	MeCN, 80 °C	77	35	44	0.07	>10
SC ₆ H ₁₁ (3l)	MeCN, 80 °C	82	39	38	0.07	>10
 (3m)	MeCN, 80 °C	76	19	61	0.21	>10

 (3n)	CH ₂ Cl ₂ , rt	64	79	90	0.30	>10
 (3o)	CH ₂ Cl ₂ , rt	59	58	79	0.30	>10
 (3p)	CH ₂ Cl ₂ , rt	66	47	80	0.43	>10
Sea nine 211					0.08	0.1

図(1)-4

スルホキシド (-S(O)R') の効果も検討した。先に合成した対応するチオエーテル (3n-p) をmCPBAで酸化することで調製した。なお、SCH₃ (3h)からの合成も各種試みたが、目的化合物を得ることができなかった。これは、想定生成物の不安定性に由来すると考察している。スルホキシドの付着阻害活性は概して弱かったものの、本結果はスルフィド (-SR') との比較から意義あるものと位置付けられる。この理由は、エーテル (-OR') とエステル (-OC(O)R') の結果と対応するためである。有機化学の視点から、エーテルやスルフィドは電子供与基 (電子を押し出す) として、エステルやスルホキシドは電子吸引基 (電子を引き込む) として捉えることができる。すなわち、強い付着阻害活性を有する化合物を合成するためには、電子供与能の大きい置換基を導入すればよいことを示唆している。



R ²	Yield (%)	48hEC ₅₀ (μg/mL)	48hLC ₅₀ (μg/mL)
 (3q)	56	2.65	>10
 (3r)	92	3.32	>10
 (3s)	56	1.02	>10

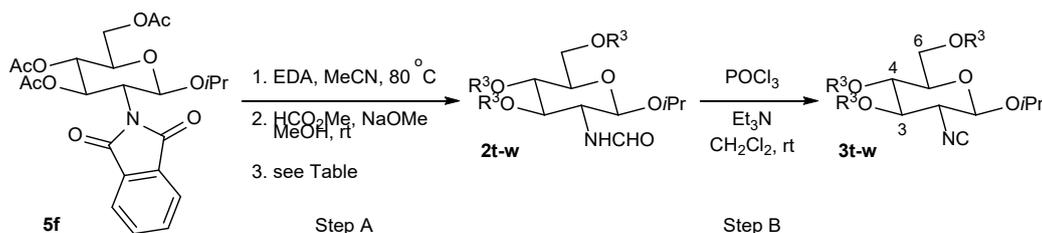
図(1)-5

最後に、その他 (3,4,6位) の水酸基にアセチル基以外の置換基を導入することとした。アノマー置

換基には、エーテル型で強い付着阻害活性を示したイソプロピル基を採用した。合成は**5f**から始め、EDAでアセチル基およびフタロイル基の除去、ホルムアミド化、そしてそれぞれの置換基を導入することでホルムアミド**2**とした。その後は、これまでと同様にイソニトリル化合物へと導いた。

各合成品の付着阻害活性を測定した結果、いずれも強い付着阻害活性を示したが、特筆すべき傾向を見出すことはできなかった。ここで導入した置換基は、電子吸引性のエステル型あるいは分子サイズの大きいシリルエーテル (TBS) であった。これら水酸基に導入する置換基についても、前述と同じ傾向 (電子供与性のエーテルあるいは分子サイズの小さい方が強い付着阻害活性) を持つ可能性もある。

(略語、TBS = *tertiary*-butyldimethylsilyl, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{tBu}$, EDCI = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride, DMAP = 4-(dimethylamino)-pyridine, DMF = dimethylformamide)



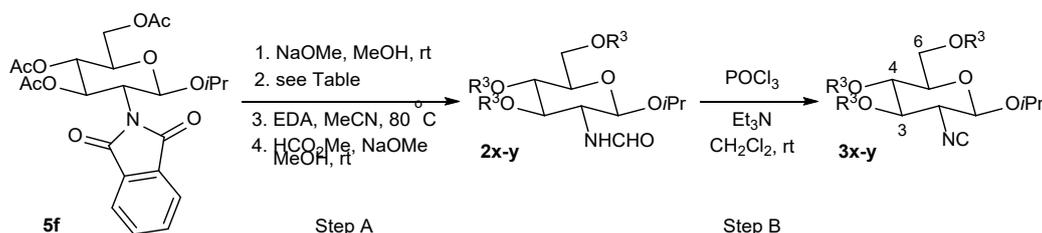
化合物	Step A		Step B	生物活性	
	Conditions	Yield (%) for 3 steps		Yield (%)	48hEC ₅₀ (μg/mL)
R ³					
CO _n C ₇ H ₁₅ (3t)	<i>n</i> C ₇ H ₁₅ COCl, DMAP, Pyridine, rt	24	60	0.79	>10
CO _n C ₁₅ H ₃₁ (3u)	<i>n</i> C ₁₅ H ₃₁ CO ₂ H, EDCI, DMAP, DMF, rt	16	54	0.31	>10
COPh (3v)	PhCOCl, DMAP, Pyridine, 60 °C	46	35	0.81	>10
TBS (3w)	TBSOTf, 2,6-lutidine, DMF, 120 °C	43	27	0.25	>10

図(1)-6

先の考察をもとに、電子供与性の置換基 (エーテル) 導入を行った。上記以外の置換基導入は、上述の方法では困難であったために図(1)-7の経路を用いた。フタルイミドを保持したままアセチル基を除去、遊離の水酸基に各条件で置換基を導入した。その後は同様の方法で、目的のイソニトリル化合物へと変換した。

各合成品の付着阻害活性を測定した結果、MOM基(**3x**)では強い活性を維持した一方、ベンジル基(**3y**)では活性が大きく低下した。前者はこれまで同様の結果であったが、後者の理由は**3v**との比較からも推定できなかった。

(略語、MOM = methoxymethyl, TBAI = tetrabutylammonium iodide)



化合物	Step A		Step B	生物活性	
	Conditions	Yield (%) for 4 steps	Yield (%)	48hEC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	48hLC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
MOM (3x)	MOM-Cl, NaH, TBAI DMF, rt	38	66	0.38	>10
CH ₂ Ph (3y)	BrCH ₂ Ph, NaH, TBAI DMF, rt	26	66	5.5	>10

図(1)-7

ムラサキイガイに対する付着阻害試験

付着生物に関する問題はフジツボだけにとどまらず、様々な生物が関与している。本研究で合成した化合物がフジツボ以外の付着生物に対しても有効であるかを確かめるため、付着生物であるムラサキイガイに対して付着阻害試験を試みた。イソニトリル化合物として、**3a, 3f, 3k**を用いた。ムラサキイガイは足糸を形成し付着するが、永久付着ではなく足糸を切り離し移動することができる。このことから、ムラサキイガイの試験では、付着の指標となる足糸の数を表に示した。いずれの化合物も同様の傾向を示した。具体的には、1.0 $\mu\text{g/mL}$ よりも薄い濃度では、対照区と大きな差はみられなかったものの、10 $\mu\text{g/mL}$ では足糸の顕著な減少が確認できた。なお、10 $\mu\text{g/mL}$ でも死亡した個体は確認されなかった。

サンプル名	3a	3f	3k	対照
終濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				
0	—	—	—	240
0.1	219	282	299	—
0.3	300	318	237	—
1	241	272	291	—
10	133	159	180	—

図(1)-6

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

安価かつ大量に入手可能なバイオマスであるグルコサミン（あるいは市販のグルコサミン誘導体）から、3から6工程で付着阻害活性を有する多様なイソニトリル化合物を合成することができた。この少ない工程数は、「2. 研究開発目的」の項で述べた、研究代表者らによる過去のイソニトリル含有天然有機化合物合成（27工程）と比較すると明白である。効率的な合成法の開発は、実用的に化合物供給にとって不可欠である。

多様な化合物の合成の中で、種々の官能基（エステル、エーテル、スルフィド、スルホキシドなど）をグルコサミンに導入し、付着阻害活性を調べた結果、科学的に有用な知見が得られた。アノマー置換基において、①置換基の電子的な性質（電子を押し出すor引き込む）が付着阻害活性に影響を及ぼす（エステルvsエーテル、チオールvsスルホキシド、押す方が強い活性）、②置換する元素が酸素よりも硫黄の方が強い活性を有する、③芳香環化合物よりもアルキル化合物（分子サイズの小さいアルキル）の方が強い活性を有する。それ以外の置換基については、④特筆すべき傾向は見出すことができなかった。これらの傾向は、分子レベルでの付着阻害メカニズムに影響を与えることが予想される。有機合成を駆

使すれば、メカニズムを調べるための機能を付与した化合物（プローブ）も合成できる。本研究で得られた知見をもとに、プローブを合成し、メカニズムを明らかにすることで、より最適な化合物を今後創生する。また、④については、どのような官能基を導入しても活性に影響を与えないと言い換えることも可能である。付着阻害化合物は、塗料に混ぜて使われることになるので、塗料分子と結合を作るような分子設計も可能となる。

本研究により、現在用いられている付着阻害剤に匹敵する活性を持つ化合物を見出すこともできた。上記のように、科学的に意義ある傾向を見出したものの、更なる最適化の余地を十分に残しているため、今後はより強力なイソニトリル化合物を創出する。

（２）環境政策への貢献

本研究（付着生物の阻害剤）に関する環境問題として、一昔前の有機スズ化合物や現在も用いられる銅や亜鉛などの重金属が船底などから海洋中へと流出する問題が挙げられる。海洋生物に悪影響を与えることはもとより、食物連鎖の結果として人類の健康に対する悪影響も指摘されている。重金属以外の付着阻害剤も使用されるが、大部分は生物殺傷（バイオサイド）型に属するため海洋環境への効果が懸念されている。また、このような付着阻害剤を利用しないと、船底に生物が付着する結果、付着除去に莫大な費用を要するだけでなく、燃費が悪化し二酸化炭素の排出増加を引き起こす。

一方、フジツボなどの付着生物はウミウシなどの海洋生物も付着の対象としているが、これら海洋生物は前述したイソニトリル化合物をはじめとする有機化合物で付着を防御している。これらの有機化合物は強力かつ低毒性が特徴である。この海洋生物の防御機能を模倣できれば、上述の問題を究極的に解決することが期待できる。本研究では、この生物模倣による付着生物の阻害剤に関する究極的な解決を目指して、イソニトリルを海洋産バイオマスであるグルコサミンに導入した各種化合物を合成した。合成品の付着阻害剤試験により、強力な付着阻害活性と低毒性を両立することが示された。海洋中で使用されるグルコサミンイソニトリルは、最終的には海洋へと流れ出る。これらが生物に取り込まれ再び抽出されて付着阻害剤になれば、バイオマスであっても循環する理想的な付着阻害剤となりうる。このような化合物が実用化できれば、SDGsでも掲げられている「14. 海洋と海洋資源の保全・持続可能な利用」に資するものとなり得る。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究では、バイオマス循環を提案する付着阻害剤開発の可能性を示した。バイオマスであっても循環するような化合物が実用化できれば、SDGsでも掲げられている「14. 海洋と海洋資源の保全・持続可能な利用」に資するものとなり得る。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. Umezawa, Y. Hasegawa, I. S. Novita, J. Suzuki, T. Morozumi, Y. Nogata, E. Yoshimura, F. Matsuda:
Marine Drugs 203 (2017) (15,7).
Design, Synthesis, and Antifouling Activity of Glucosamine-Based Isocyanides

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 梅澤大樹・長谷川裕己・Ira Novita Sari・鈴木惇也・諸角達也・松田冬彦・野方靖行・吉村えり奈
2017 年度日本付着生物学会 総会・研究集会（2017）
「グルコサミン由来の付着阻害剤の合成と付着阻害活性」
- 2) 梅澤大樹・長谷川裕己・Ira Novita Sari・鈴木惇也・諸角達也・野方靖行・吉村えり奈・松田冬彦
第19回マリンバイオテクノロジー学会（2017）
「マリンバイオマス由来付着阻害剤の構造-活性相関研究」
- 3) 梅澤大樹・長谷川裕己・Ira Novita Sari・鈴木惇也・諸角達也・野方靖行・吉村えり奈・松田冬彦
第12回化学生態学研究会（2017）
「バイオマス由来付着阻害剤の構造-活性相関研究」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

III. 英文Abstract

Development of Biomimetic and Biomass-recycling Antifouling Material

Principal Investigator: Taiki UMEZAWA

Institution: Hokkaido University

Kita10 nishi 5 kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0810, JAPAN

Tel: +81-11-706-2358 / Fax: +81-11-7.6-4517

E-mail: umezawa@ees.hokudai.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Fouling organism, Antifoulant, Biomimetic, Biomass, Organic synthesis

Continuous use of the above-mentioned structures encounters biofouling, undesirable accumulations of organisms on sea-immersed structures such as hull of ship and fishing net, by barnacle and mussel which cause serious economic troubles, waste of fuel consumption up to 40% and clogging the pipes or nets. In order to avoid the fouling problems, organotin compounds had been widely employed since 1960s due to the high potential of the antifouling property. However, the organotin compounds were suggested to be toxic, and actually induced biological troubles, for example, growth inhibition, masculinization of shell fish abnormal shell development, brittle shells, poor weight gain, and imposex to oysters. These unfavorable aspects of the organotin compounds drove on International Maritime Organization (IMO) to prohibit for ships all over the world in 2008.

Among current researches for the green antifouling material, natural products from marine creature are paid attentions as a potent candidate. For example, 10-isocyano-4-cadinene, obtained from nudibranchs of the family *Phyllidiidae*, shows not only the strong antifouling activity but also low toxicity against cypris larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*, comparable to CuSO₄. 10-isocyano-4-cadinene contains isonitrile group as an antifouling functional group. We would envision that the isonitrile is installed to glucosamine as a cheap abundant biomass platform through organic synthesis to find potent candidate for further study. The antifouling activities as well as toxicities against cypris larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite* are also evaluated to prove the feasibility of **6** as an alternative green antifouling material by investigations of substituent effects at C-1 and C-3, 4, 6 positions.

The isocyanide compounds were synthesized in 3-6 steps from the commercially glucosamine or its derivatives. EC₅₀ (50% effective concentration) and LC₅₀ (50% lethal concentration) values were estimated against cypris larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite* as an antifouling activity and toxicity, respectively. All compounds tested did not show toxicity (LC₅₀ > 10 µg/mL). Concerning to EC₅₀ value on the anomeric substituents, the following tendencies were found: ① electronic property of the substituents affected the antifouling activity, ② sulfur atom has more potent antifouling profile than oxygen atom, and ③ Stronger activities were observed with alkyl compounds rather than aromatic compounds. Notable features could not be found when testing the effects of other hydroxy groups. These results are expected to be utilized the development of green antifoulant.