プロペン環を有する性フェロモン生合成阻害剤の合成 および構造活性相関

Synthesis and Structure-activity Relationship of Pheromone Biosynthesis Inhibitors Including a Cyclopropene Structure

生物相関システム学研究室 山本 雅信

目次

- 第1章 緒論
- 第2章 シクロプロペン化合物の合成
 - 第1節 目的
 - 第2節 シクロプロペン化合物の合成計画
 - 第3節 結果及び考察
 - 第4節 実験の部
- 第3章 シクロプロペン化合物の阻害活性の測定
 - 第1節 ¹⁴C-標識パルミチン酸を用いた生物検定
 - 第2節 ²H₃-標識パルミチン酸を用いた生物検定

摘要

参考文献

謝辞

第1章 緒論

フェロモンとは、生体内で生産された後に体外に放出され、同種 の他個体に作用し、特定の行動や生理反応を誘起する化学物質であ る。昆虫フェロモンの主なものとして性フェロモン、集合フェロモ ン、警報フェロモン、道しるベフェロモンなどがある。なかでも、 性フェロモンは子孫を残すために不可欠な生殖行動を制御しており、 昆虫にとって最も重要なフェロモンの一つである。現在では、合成 した性フェロモンを利用して交信攪乱、発生予察、大量誘殺が行わ れている。この性フェロモンの分泌を押さえることが可能になれば、 害虫の雌雄間のコミュニケーションは妨げられ、その結果として、 害虫の密度が低下すると考えられる。

性フェロモンの生合成に関する研究は 1980 年代になって活発に 行われるようになった。なかでも鱗翅目蛾類の性フェロモンは多数 同定されており、その化学構造は、多くがアルコール、アセテート、 アルデヒドなどの官能基を直鎖の末端に持つ不飽和脂肪族物質であ る。そして、その生合成過程は次の 4 つの段階に分けることができ る。(1)アセチル-CoA を出発物質とする脂肪酸の合成、(2)不飽和化 酵素による二重結合の導入、(3) -酸化などによる炭素鎖の伸長、 または短縮、(4)アセチル基のアルコールへの還元及びアセチル化反 応などによる官能基の形成である。これら生合成過程のうちの一つ でも阻害されれば、性フェロモンの生産は行われなくなり、正常な 交尾の確率は低下することが考えられるが、昆虫に対する選択性は 不飽和化の過程に求めることができる。Bjostad ら(1981)は、ラベ ル化合物を用いた研究を行った結果、11-位不飽和化合物が確認され たことから、鱗翅目昆虫の性フェロモン生合成における不飽和化過 程では、11-位不飽和化酵素が重要な役割を果たしているということ を示唆した。一方、カイコガ(*Bombyx mori*)の性フェロモンである ボンビコール[(10*E*,12*Z*)-10,12-hexadecadien-1-ol]は、パルミチン 酸を出発物質として、Z11-不飽和化酵素の働きにより(*Z*)-11hexadecenoateを経由して、E10,Z12-不飽和化酵素の働きにより、 (10*E*,12*Z*)-10,12-hexadecadienoateを経て、さらに還元酵素の働き によりボンビコールへと生合成されることが¹⁴C 標識パルミチン酸 を用いた実験により示された(Ando ら 1988, Fig.1)。このように、 11-位不飽和化酵素による反応は、多くの蛾類性フェロモン生合成過 程において共通の重要な生合成反応の一つであり、阻害剤開発の新 しい興味深いターゲットであると思われる。

アオイ目植物種子油に含まれる 9-位にプロペン環を有する脂肪 酸 sterculic acid[9,10-methyleneoctadec-9-enoic acid]は、鶏の肝 臓における不飽和化反応、すなわちステアリン酸からオレイン酸へ の Z9-不飽和化反応を阻害することが Rajuら(1967)により報告され た(Fig.2)。更に、Fogertyら(1972)は、sterculic acid を出発物質と して合成した 9,10-methylenepentadec-9-enoic acid と、天然抽出 物である 10-位にプロペン環を有する脂肪酸 malvalic acid[8,9methyleneheptadec-8-enoic acid]も鶏の肝臓における Z9-不飽和化 反応を阻害することを報告した。その後、Arsequell ら(1989)は、 12-位にプロペン環を有する脂肪酸 12,13-methylenehexadec-12enoic acid を合成し、*Spodoptera littoralis*の性フェロモン腺に投 与したところ、この化合物はその性フェロモン生合成過程における palmitate から(Z)-11-hexadecenoate への Z11-不飽和化反応を阻害 するが、(E)-11-hexadecenoate への E11-不飽和化反応を阻害しな いということを重水素標識パルミチン酸を利用した GC-MS 分析か ら証明した。また、10,11-methylenetetradec-10-enoic acid は、同 様の昆虫の性フェロモン生合成過程における(E)-11tetradecenoate から、(9Z,11E)-9,11-tetradecenoate への Z9-不飽 和化反応を阻害することが報告された(Gosalbo et al.,1994, Fig.3)。 不飽和化生合成反応において、n-位にプロペン環を有する脂肪酸は 不飽和化酵素、特に、(n-1)-位から(n+1)-位において起こる脂肪酸の (Z)-位不飽和化反応を特異的に阻害するという結果が得られている が、それらの化合物を害虫防除剤として利用するためには、プロペ ン環を有する脂肪酸が不飽和化反応を高い位置選択性の元に阻害す ることを更に多くの昆虫において確認しなければならない。また、 蛾類性フェロモンの研究において、不飽和化反応を含む性フェロモ ン生合成過程の詳細を知るための一つの手段として、シクロプロペ ン化合物の利用が考えられる。

そこで本研究では、プロペン環を有する種々の化合物の性フェロ モン生合成過程における影響を調べるための研究を行った。ボンビ コール生合成過程には、Z11-不飽和化反応、E10,Z12-不飽和化反応 という二つの不飽和化生合成過程を含んでおり、シクロプロペン化 合物がそれぞれの不飽和化反応にどのような影響を与えるかを調べ るため、プロペン環位置異性体である脂肪酸及びそのアミド体、メ チルエステル体、また、炭素鎖を短縮及び伸長した化合物を合成し、 それぞれの阻害活性を測定することを試みた。



Fig.1 Biosynthetic pathway of bombykol.



Fig.2 Effect of cyclopropene compounds in hen liver.



Fig.3 Inhibit position of cyclopropene compounds in sex pheromone grand of *Spodoptera littoralis.*

第2章 シクロプロペン化合物の合成

第1節 目的

基質である脂肪酸において、不飽和化反応が進行する部位と阻害 剤であるシクロプロペン化合物のプロペン環の位置とが、どのよう な関係にあるかを調べるために、種々の位置異性体の合成を計画し た。ボンビコールの炭素鎖は炭素数が 16 のパルミチン酸に由来す るため、合成化合物の炭素数は 16 とし、ボンビコール生合成過程 に含まれる Z11-不飽和化反応と E10,Z12-不飽和化反応の 2 つの不 飽和化反応に与える影響を検討するために、プロペン環を 7-位、9-位、11-位、13-位に導入した脂肪酸を合成することとした。また、 脂肪酸は -酸化を受けやすく、カイコガ生体内において速やかに失 活する事が予想される。そこで、 -酸化を受けにくいと考えられる アミド誘導体を合成し、その阻害活性を脂肪酸から誘導したメチル エステルとともに検討した。さらに、不飽和化反応阻害の炭素数に おける特異性を調べるため、炭素数 14、及び炭素数 18 の 11-位に プロペン環を有する脂肪酸、及びアミド誘導体を合成した。

第2節 シクロプロペン化合物の合成計画

プロペン環を有する化合物の合成法として、Genslerら(1969)によ り報告されたカルボン酸アルキンを出発原料とし、ジアゾカルボン 酸エステルの付加反応を利用する方法がある。これとは別に、末端 アセチレンを出発原料としプロモホルムのカルベン付加反応を利用 する方法がBairdら(1992)により報告されている。本研究ではBaird らにより報告された合成法を用いることとした。(Fig.4 - Fig.6)

すなわち、目的とするシクロプロペン化合物のアルキル側の側鎖 に対応する炭素鎖を含む末端アセチレンに臭化水素を反応させモノ ブロム化物を合成する。化合物を強塩基存在下、ブロモホルムをカ ルベン付加させ、トリブロモシクロプロパン化合物へと導く。次に、 2 当量のブチルリチウムを反応させ、プロペン環へと導くと同時に、 森ら(1991)の合成方法に準じて調製したハロゲン化アルキル化合物 を反応させアルキル化を行い、プロペン環化合物を合成する。これ にアセトン-水の溶媒系にてシアン化ナトリウムを反応させ、ニトリ ル化合物を合成する。このニトリル化合物を 5N の水酸化ナトリウ ム水溶液により加水分解を行いカルボニル化合物を合成することと した。メチルエステル化合物は、このカルボン酸をジアゾメタンで 処理することで得た。また、アミド化合物の合成としては、一般的 にカルボン酸を塩化チオニルにより酸塩化物とし、その誘導体をア ンモニアと反応させることにより合成することができる。しかし本 研究に使用する化合物はプロペン環構造を有し不安定なため、より 穏和にニトリル化合物を 2Nの水酸化ナトリウム水溶液により加水 分解するという方法によりアミド化物を合成することとした。

第3節 結果及び考察

Baird らの方法によって合成されたシクロプロペン化合物は、¹H および ¹³C-NMR において特徴的なピークを示した。すなわち、プ ロペン環の二重結合による異方性効果により、プロペン環のメチレ ンは、¹H-NMR において 0.77ppm に一本の単一のピークを、¹³C-NMR においても 7.4ppm と通常のメチレンの示すケミカルシフト よりかなり高磁場にピークを示した。(Table 1 - Table 4)

	¹ H NMR Chemical Shifts (ppm), for Indicated Position									
Comp.	1	3	4	5	6	7	8	9	10	а
4a ^a	5.38(d) 5.55(d)	2.41(t)	1.55(tt)	-1.30	-1.30	-1.30	-1.30	-1.30	0.88(t)	
4b ^b	5.38(d) 5.55(d)	2.41(t)	1.53(tt)	-1.30	-1.30	-1.30	0.89(t)			
4c ^c	5.38(d) 5.54(d)	2.42(t)	1.54(tt)	1.34(tq)	0.92(t)					
4d ^d	5.37(d) 5.56(d)	2.46(t)	1.13(t)							
5a ^e	-	2.03(m)	1.70(m)	-1.30	-1.30	-1.30	-1.30	-1.30	0.89(t)	1.84(d) 1.94(d)
5b ^f	-	2.00(m)	1.70(m)	-1.30	-1.30	-1.30	0.90(t)			1.82(d) 1.95(d)
5c ^g	-	2.00(m)	1.70(m)	1.39(tq)	0.95(t)					1.83(d) 1.96(d)
5d ^h	-	2.02(dq)	1.25(t)							1.83(d) 1.96(d)
a $J_{1,1} = 1.3$ b $J_{1,1} = 1.3$ c $J_{4,4} = 1.3$	5Hz, J _{3,4} = 7 5Hz, J _{3,4} = 7 5Hz, J _{3,4} = 7	7.5Hz, J _{4,5} = 7.5Hz, J _{4,5} = 7.5Hz, J _{4,5} =	7.0Hz, J _{9,10} 7.0Hz, J _{7,8} 7.0Hz, J ₅ c) = 6.5Hz = 6.5Hz = 7.0Hz		$e J_{9,10} = 6.$ f $J_{7,8} = 6.5$	5Hz, J _{a,a} = 9 5Hz, J _{a,a} = 9. 0Hz, J _{a,a} = 7	0.0Hz 0Hz 1.5Hz . / =	= 9.0Hz	

 Table.1
 ¹H NMR Assignments of Synthetic Compounds (4 and 5)

b $J_{1,1} = 1.5$ HZ, $J_{3,4} = 7.5$ HZ, $J_{4,5} = 7.0$ HZ, $J_{7,8} = 6.5$ HZ c $J_{1,1} = 1.5$ HZ, $J_{3,4} = 7.5$ HZ, $J_{4,5} = 7.0$ HZ, $J_{5,6} = 7.0$ HZ d $J_{1,1} = 1.5$ HZ, $J_{3,4} = 7.5$ HZ

g $J_{4,5} = 7.0$ Hz, $J_{5,6} = 7.5$ Hz, $J_{a,a} = 9.0$ Hz h $J_{3,3} = 14.5$ Hz, $J_{3,4} = 7.0$ Hz, $J_{a,a} = 9.0$ Hz

	¹ H NMR Chemical Shifts (ppm) , for Indicated Position				
Comp.	H ₃ C-	H ₂ C-C=	-CH ₂ -	-CH ₂ -X ^a	а
6a	0.88(t)	2.38(t)	1.88(tt)	3.41(t)	0.78
6b	0.89(t)	2.38(t)	1.86(tt)	3.41(t)	0.77
6c	0.92(t)	2.38(t)	1.86(tt)	3.41(t)	0.77
6d	1.13(t)	2.38(t)	1.85(tt)	3.41(t)	0.78
6e	0.89(t)	2.38(t)	1.86(tt)	3.41(t)	0.77
6f	1.13(t)	2.38(t)	1.85(tt)	3.41(t)	0.78
7a	0.88(t)	2.38(t)	1.69(tt)	2.34(t)	0.78
7b	0.89(t)	2.38(t)	1.65(tt)	2.34(t)	0.77
7c	0.91(t)	2.38(t)	1.64(tt)	2.34(t)	0.77
7d	1.13(t)	2.38(t)	1.64(tt)	2.34(t)	0.78
7e	0.89(t)	2.38(t)	1.65(tt)	2.34(t)	0.77
7f	1.13(ť)	2.38(t)	1.64(tt)	2.34(t)	0.78
1a	0.88(t)	2.37(t)	1.64(tt)	2.36(t)	0.78
1b	0.89(t)	2.37(t)	1.64(tt)	2.36(t)	0.77
1c	0.91(t)	2.38(t)	1.63(tt)	2.35(t)	0.77
1d	1.27(t)	2.39(t)	1.63(tt)	2.35(t)	0.78
1e	0.89(t)	2.38(t)	1.64(tt)	2.36(t)	0.77
1f	1.27(t)	2.38(t)	1.63(tt)	2.35(t)	0.78
2a	0.88(t)	2.37(t)	1.64(tt)	2.23(t)	0.78
2b	0.89(t)	2.37(t)	1.64(tt)	2.23(t)	0.77
2c	0.92(t)	2.38(t)	1.63(tt)	2.22(t)	0.77
2d	1.13(t)	2.38(t)	1.64(tt)	2.22(t)	0.78
2e	0.89(t)	2.38(t)	1.64(tt)	2.23(t)	0.77
2f	1.13(t)	2.38(t)	1.64(tt)	2.22(t)	0.78
8c	0.91(t)	2.38(t)	1.56(tt)	2.30(t)	0.77

Table.2¹H NMR Assignments of Synthetic Compounds (1,2,6,7 and 8)

a Comp.6 : X = Br, Comp.7 : X = CN, Comp.1 : X = COOH,

Comp.2 : X = CONH₂, Comp.8 : X = COOCH₃

	¹³ C NMR Chemical Shifts (ppm) , for Indicated Position										
Comp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	а
4a	116.2	135.0	41.5	28.4	27.9	29.3	29.2	31.9	22.7	14.1	
4b	116.2	135.0	41.5	27.9	28.1	31.5	22.6	14.1			
4c	116.2	134.9	41.2	30.1	21.6	13.8					
4d	115.2	136.3	35.0	13.2							
5a	45.9	33.2	41.7	29.0	29.2	29.4	27.7	31.8	22.6	14.1	38.1
5b	45.9	33.2	41.7	28.6	27.7	31.7	22.6	14.1			38.1
5c	45.8	33.2	41.4	29.8	22.1	14.0					38.0
5d	47.0	33.0	35.4	12.0							37.9

 Table.3
 ¹³C NMR Assignments of Synthetic Compounds (4 and 5)

Table.4	¹³ C NMR Assignments of Synthetic
	Compounds (1,2,6,7 and 8)

	1:	¹³ C NMR Chemical Shifts (ppm) , for Indicated Position					
Comp.	C _(n)	-C=	=C-	C ₂	C ₁	Ca	
6a	14.1	109.9	108.8	32.6	33.8	7.4	
6b	14.1	109.2	109.5	32.8	33.9	7.4	
6c	13.9	109.3	109.3	32.8	34.0	7.4	
6d	12.0	110.5	109.1	32.6	34.6	7.4	
6e	14.1	109.2	109.5	32.8	33.9	7.4	
6f	12.0	110.5	109.1	32.8	34.6	7.4	
7a	14.1	110.1	108.6	17.1	119.7	7.4	
7b	14.1	109.6	109.1	17.1	119.8	7.4	
7c	13.9	109.4	109.3	17.1	119.8	7.4	
7d	12.0	110.6	109.1	17.1	119.9	7.4	
7e	14.1	109.6	109.1	17.1	119.8	7.4	
7f	12.0	110.6	109.1	17.1	119.9	7.4	
1a	14.1	109.7	108.9	33.9	179.2	7.4	
1b	14.1	109.5	109.2	34.0	179.9	7.4	
1c	13.9	109.3	109.3	34.0	179.6	7.4	
1d	12.0	110.6	109.1	33.9	179.2	7.4	
1e	14.1	109.5	109.2	34.0	179.9	7.4	
1f	12.0	110.5	109.1	33.9	179.2	7.4	
2a	14.1	109.7	109.0	35.8	175.4	7.4	
2b	14.1	109.5	109.2	35.9	175.8	7.4	
2c	13.9	109.3	109.3	36.0	176.1	7.4	
2d	12.0	110.6	109.1	35.9	175.6	7.4	
2e	14.1	109.5	109.2	35.9	175.8	7.4	
2f	12.0	110.6	109.1	35.9	175.6	7.4	
8c	13.9	109.3	109.3	34.1	174.4	7.4	
n : 1,2,7	,8 : a-d = 16	6, e = 18, f = 1	4				

6 : a-d = 15, e = 17, f = 13

第4節 実験の部

(1) 精製

合成中間体および最終化合物の精製は、主にシリカゲルカラムク ロマトグラフィーを用い、生成物が微量(約 200mg以下)の場合、シ リカゲル TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄ 0.5mm,MERCK)のかきとりによっ て行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、充填剤には吸 着型のシリカゲルを用い、溶出溶媒として、n-ヘキサン、ベンゼン、 酢酸エチルおよびそれらの混合物を用いた。

(2) 機器分析

それぞれの合成化合物の化学構造は、以下に示す機器分析法によって確認した。

¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトル

核磁気共鳴装置(NMR)は JEOL EX-270 FT-NMR 装置(日本電子株 式会社)を使用し、¹H-NMR を 270MHz、¹³C-NMR を 67.8MHz のそ れぞれにおいて測定した。内径 5mm のサンプルチューブに、試料 を約 5%の CDCl₃ 溶液として調製し、内部標準として 0.1%の Tetramethylsilane(TMS)を加え、内部ロック法にて測定した。

(3) 化合物の合成

合成反応の進行および終了の確認は、シリカゲル TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄ 0.25mm,MERCK)を用いて行った。反応後、有機溶媒にて抽 出を行い抽出液を水、1N 塩酸、飽和重曹水にて洗浄した。この作 業を3回繰り返して抽出液を合液し、無水硫酸ナトリウムを用いて 脱水し、エバポレーターにより減圧蒸留を行った。ただし、カルボ ン酸化合物の抽出においては飽和重曹水、アミド化合物の抽出においては 1N 塩酸による洗浄を省略した。

2-Bromo-1-decene(**4a**)

テトラヒドロナフタレン 100g に臭素(32g,400mmol)を氷冷下に おいて滴下し、臭化水素を発生させた。ジクロロメタン 100ml にテ トラエチルアンモニウムブロミド 23g を溶解した溶液の質量を測定 した後、発生した臭化水素を氷冷下吸収させた。黄濁した後、質量 の増加を測定し、1-Decyne(**3a**)(7.7g,50mmol)を注入、水浴 4 0 の条件において 5 時間攪拌した。攪拌終了後、氷冷し、ジエチルエ ーテル 200mlを注入し、テトラエチルアンモニウムブロミド塩をフ ィルター除去、抽出液を真空蒸留(130 ;8mmHg)により精製し、**4a** を得た。収率は 88.9%であった。

2-Bromo-1-octene(**4b**)

4aの合成と同様に、1-Octyne(**3b**)(7.4g,64mmol)をモノブロム化し、**4b**を得た。(収率:33.8%,b.p.60 ;30mmHg)

2-Bromo-1-hexene(**4c**)

4a の合成と同様に、1-Hexyne(**3c**)(8.2g,100mmol)をモノブロム 化し、**4c**を得た。(収率:45.9%,b.p.35 ;43mmHg)

2-Bromo-1-butyne(4d)

4aの合成と同様の操作を行ったが、反応温度を 0 、反応時間を 一昼夜とし、1-Butyne(**3d**)(5.4g,100mmol)をモノブロム化し、**4d** を得た。(収率:20.3%,b.p.10)

1,1,2-Tribromo-2-octylcyclopropane(**5a**)

4a(14g,64mmol)、ブロモホルム(31g,120mmol)および、セチルト リメチルアンモニウムブロミド 0.15g を混合し、20Nの水酸化ナト リウム水溶液を 12ml 滴下し、油浴 70 の条件において 12 時間還 流を行った。反応終了後、塩化メチレンによって抽出を行った。溶 媒留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行っ たところ、Hx:Bz=9:1の溶媒系にて流出し、5a を得た。収率は 28.0% であった。

1,1,2-Tribromo-2-hexylcyclopropane(5b)

5a の合成と同様に、4b(3.8g,20mmol)から 5b を得た。(収率:28.0%)

1,1,2-Tribromo-2-butylcyclopropane(5c)

5aの合成と同様に、4c(3.2g,20mmol)から 5cを得た。(収率:37.5%)

1,1,2-Tribromo-2-ethylcyclopropane(5d)

5a の合成と同様に、4d(2.7g,20mmol)から 5d を得た。(収率:35.0%)

1-Bromopentan-5-ol(10a)

1,5-Pentanediol(**9a**)(4.2g,40mmol)と 47% 臭化水素酸 7.1g を 30mlのトルエンに溶解し、油浴 110 の条件において一昼夜攪拌還

流した。トルエン層は冷却後、塩酸および飽和重曹水にて洗浄し、 硫酸ナトリウムにて乾燥した。水層は、ベンゼンにて2回抽出し、 トルエン層と同様の処理を行った。溶媒留去後、シリカゲルカラム クロマトグラフィーにより精製したところ、Bz:EtOAc=8:2 の溶媒 系にて流出し、10a を得た。TLC は Bz:EtOAc=1:10 にて、硫酸噴 霧後、加熱し発色させたところ、10a の Rf 値=0.49 であった。収率 は 48.5%であった。

¹H-NMR(ppm) : H-1 3.41(t,J=7.0Hz), H-2 1.85(tt,J=7.5Hz), H-3 1.37(tt,J=7.5Hz), H-4 1.57(tt,J=7.5Hz), H-5 3.63(t,J=6.5Hz)

¹³C-NMR(ppm) : C-1 33.7, C-2 32.5, C-3 24.4, C-4 32.5, C-5 62.6

1-Bromoheptan-7-ol(10b)

10aの合成と同様に、1,7-Heptanediol(9b)(5.0g,38mmol)から10b を得た。(収率:66.5%)

¹H-NMR(ppm) : H-1 3.41(t,J=6.5Hz), H-2 1.85(tt,J=7.5Hz), H-3-H-5 1.31(m), H-6 1.56(tt,J=7.0Hz), H-7 3.63(t,J=7.0Hz) ¹³C-NMR(ppm) : C-1 34.3, C-2 32.8, C-3 28.1, C-4 28.7, C-5 25.7,

C-6 32.7, C-7 62.9

1-Bromononan-9-ol(**10c**)

10a の合成と同様に、1,9-Nonanediol(9c)(6.4g,40mmol)から 10c を得た。(収率:78.3%)

¹H-NMR(ppm) : H-1 3.41(t,J=7.0Hz), H-2 1.85(tt,J=7.5Hz), H-3-H-7 1.31(m), H-8 1.56(tt,J=6.8Hz), H-9 3.63(t,J=7.0Hz)

¹³C-NMR(ppm) : C-1 34.0, C-2 32.8, C-3 28.1, C-4 28.7, C-5 29.4,

C-6 29.5, C-7 25.7, C-8 32.7, C-9 62.9

1-Bromo-5-iodopentane(**11a**)

トリフェニルホスフィン (3.2g,12mmol) とイミダゾール (0.84g,12mmol)をジエチルエーテル 36ml、アセトニトリル 12ml の混合溶液に氷冷下溶解した。この溶媒に攪拌しながらヨウ素 (3.2g,12mmol)を少量ずつ混入し溶解させた。全量溶解後、室温に おいて 15 分攪拌した後、10a(1.8g,11mmol)を氷冷条件下において 滴下し、1 時間攪拌した。TLC により反応の進行を確認した後、攪 拌を終了した。沈殿物をフィルター濾過し、溶液中に存在するヨウ 素をチオ硫酸ナトリウム水溶液によって処理し、ヘキサンにより抽 出を行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した ところ、Hx:Bz=9:1 の溶媒系にて流出し、11a を得た。TLC は Bz:EtOAc=10:1 にて、Rf 値=0.66 であった。収率は 85.7%であった。 ¹H-NMR(ppm) : H-1 3.42(t,J=6.5Hz), H-2 1.86(tt,J=7.5Hz), H-3 1.57(tt,J=7.5Hz), H-4 1.86(tt,J=7.5Hz), H-5 3.20(t,J=6.8Hz) ¹³C-NMR(ppm) : C-1 34.0, C-2 33.5, C-3 24.4, C-4 32.8, C-5 7.2

1-Bromo-7-iodoheptane(**11b**)

11a の合成と同様に、10b(2.1g,11mmol)から 11b を得た。(収率:75.6%)

¹H-NMR(ppm) : H-1 3.41(t,J=7.0Hz), H-2 1.87(tt,J=7.5Hz), H-3-H-5 1.37(m), H-6 1.86(tt,J=7.5Hz), H-7 3.20(t,J=7.0Hz) ¹³C-NMR(ppm) : C-1 34.0, C-2 33.6, C-3 28.7, C-4 29.2, C-5 28.1, C-6 32.7, C-7 7.3 1-Bromo-9-iodononane(**11c**)

11a の合成と同様に、10c(2.4g,11mmol)から 11c を得た。(収率:78.2%)

¹H-NMR(ppm) : H-1 3.41(t,J=7.0Hz), H-2 1.83(tt,J=7.5Hz), H-3-H-8 1.31(m), H-9 3.19(t,J=7.0Hz)

¹³C-NMR(ppm) : C-1 33.9, C-2 33.5, C-3 28.6, C-4 29.2, C-5 30.4, C-6 29.4, C-7 28.1, C-8 32.8, C-9 7.2

10-Ethylundecenoate(**13d**)

Undecenoic acid(**12d**)(20g,100mmol)をエタノール 200ml に溶解 し、濃硫酸 10g を滴下し、90 で攪拌還流した。TLC により反応の 終了を確認した後、ヘキサンにより抽出を行った。精製は行わず、 次の段階に進むこととした。TLC は Bz:EtOAc=4:1 にて、Rf 値=0.75 であった。収率は約 95%であった。

10-Undecen-1-ol(14d)

dry ジエチルエーテル 200ml に水素化リチウムアルミニウム (1.7g,45mmol)を加えた。13d の粗生成物(9.5g,約 40mmol)の dry ジ エチルエーテル溶液を滴下し、室温にて 2 時間攪拌を行った。TLC により反応の終了を確認した後、酢酸エチルにより抽出を行い、真 空蒸留(100 ;4mmHg)により精製を行い、14d を得た。TLC は Bz:EtOAc=10:1 にて、Rf 値=0.26 であった。収率は 91.2%であった。 ¹H-NMR(ppm) : H-1 3.63(t,J=6.5Hz), H-2 1.56(tt,J=6.5Hz), H-3-H-8 1.29(m), H-9 2.03(tt,J=6.5Hz),H-10 5.77(dt,J=6.5Hz), H-11 4.95(td, J=3.5Hz)

¹³C-NMR(ppm) : C-1 63.0, C-2 32.8, C-3 25.8, C-4-C-8 28.9-29.6, C-9 33.8, C-10 139.2, C-11 114.1

1-Bromo-10-undecene(15d)

テトラヒドロフラン (THF) 100ml に 14d (10g, 49mmol)を溶解、攪 拌した。30 分攪拌の後、四臭化炭素 (23g, 76mmol)を適量の THF 溶 液として加えた。更に 30 分後、適量の THF に溶かしたトリフェニ ルホスフィン (19g, 76mmol)を加え、2 時間攪拌した。反応の終了を TLC により確認した後、ヘキサンにより抽出を行った。溶媒留去後、 シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、Hx のみの溶媒系にて流出し、15d を得た。TLC は Hx:Bz=1:1 にて、Rf 値=0.40 であった。収率は 43.2%であった。

¹H-NMR(ppm) : H-1 3.40(t,J=6.5Hz), H-2 1.85(tt,J=6.5Hz), H-3-H-8 1.29(m), H-9 2.03(tt,J=6.5Hz),H-10 5.77(dt,J=6.5Hz), H-11 4.96(td,J=3.5Hz)

¹³C-NMR(ppm) : C-1 34.0, C-2 32.8, C-3 28.2, C-4-C-8 28.8-29.4, C-9 33.8, C-10 139.2, C-11 114.1

1-Bromoundecan-11-ol(**16d**)

窒素雰囲気下、dryTHF 20ml に水素化ホウ素ナトリウム (1.0g,26mmol) を 加 え 氷 冷 条 件 下 攪 拌 し 、 BF₃O(C₂H₅)₂(3.0g,21mmol)の THF 溶液を滴下し、ジボランを調製 した。15d(5.0g,22mmol)を滴下した後、室温で2時間攪拌した。TLC で反応の進行を確認した後、水 8ml、3N-NaOH 8ml、28%過酸化水 素水 8mlを加えた。酢酸エチルにより抽出を行い、溶媒留去後、シ リカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、 Bz:EtOAc=8:2 の溶媒系にて流出し、16d を得た。TLC は Bz:EtOAc=4:1 にて、Rf 値=0.40 であった。収率は43.2%であった。 ¹H-NMR(ppm):H-1 3.40(t,J=6.5Hz),H-2 1.85(tt,J=6.5Hz),H-3-H-9 1.29(m),H-10 1.55(tt,J=6.5Hz),H-11 3.61(t,J=6.5Hz) ¹³C-NMR(ppm):C-1 34.0,C-2 32.8,C-3 28.1,C-4-C-8 28.7-29.5, C-9 25.7,C-10 32.7,C-11 62.8

1-Bromo-11-iodoundecane(**11d**)

11a の合成と同様に、16d(3.8g,11mmol)から 11d を得た。(収率:82.0%)

¹H-NMR(ppm) : H-1 3.41(t,J=6.5Hz), H-3-H-10 1.31(m), H-11 3.19(t,J=6.5Hz)

¹³C-NMR(ppm) : C-1 34.0, C-2 33.5, C-3 28.7, C-4-C-8 28.4-30.4, C-9 28.1, C-10 32.8, C-11 7.3

15-Bromo-9,10-methylenepentadec-9-ene(6a)

窒素雰囲気下、-78 の条件にて、dryTHF 100ml に 5a(1.6g,5.0mmol)を攪拌しながら注入し、この溶液にn-ブチルリチ ウム(5.6ml,10mmol)をゆっくりと滴下し 30 分攪拌した。更に、 11a(1.5g,5.0mmol)をヘキサメチルホスホリックトリアミド (HMPT)25ml に溶解したものをゆっくりと滴下し、-78 で 1 時間 攪拌した後、室温で 1 時間攪拌した。水を加え、未反応の n-ブチル リチウムを分解し、ヘキサンにより抽出を行った。溶媒留去後、シ リカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、Hx の みの溶媒系にて流出し、6aを得た。TLCは Hx:Bz=4:1 にて、Rf 値 =0.59 であった。収率は 15.3%であった。

15-Bromo-7,8-methylenepentadec-7-ene(6b)

6a の合成と同様に、5b(1.8g,5.0mmol)から 6b を得た。(収率:17.2%)

15-Bromo-5,6-methylenepentadec-5-ene(6c)

6a の合成と同様に、5c(1.8g,5.0mmol)から 6c を得た。(収率:33.8%)

15-Bromo-3,4-methylenepentadec-3-ene(6d)

6a の合成と同様に、5d(1.6g,5.0mmol)から 6d を得た。(収率:11.4%)

17-Bromo-7,8-methyleneheptadec-9-ene(6e)

6a の合成と同様に、5b(1.8g,5.0mmol)から 6e を得た。(収率:12.0%)

13-Bromo-3,4-methylenetridec-9-ene(**6f**)

6a の合成と同様に、5d(1.6g,5.0mmol)から 6f を得た。(収率:15.3%)

7,8-Methylenehexadec-7-enenitrile(7a)

水 2ml、アセトン 10ml の混合溶液にシアン化ナトリウム (91mg,2.0mmol)を溶解した後、**6a**(230mg,0.90mmol)を混入し、 60 の条件にて 12 時間還流を行った。少量の水を加え、ヘキサン により抽出を行った。薄層 TLC を使用し、かき取りによる精製 (Hx:Bz=1:1)を行い **7a**を得た。TLC は Hx:Bz=1:1 にて、Rf 値=0.27 であった。収率は 62.5%であった。

9,10-Methylenehexadec-9-enenitrile(7b)

7a の合成と同様に、6b(150mg,0.5mmol)から 7b を得た。(収率:89.1%)

11,12-Methylenehexadec-11-enenitrile(7c)

7a の合成と同様に、6c(240mg,0.8mmol)から 7c を得た。(収率:49.9%)

13,14-Methylenehexadec-13-enenitrile(7d)

7a の合成と同様に、6d(150mg,0.5mmol)から 7d を得た。(収率:75.3%)

11,12-Methyleneoctadec-11-enenitrile(7e)

7a の合成と同様に、6e(280mg,0.9mmol)から 7e を得た。(収率:60.1%)

11,12-Methylenetetradec-11-enenitrile(7f) 7a の合成と同様に、6f(150mg,0.6mmol)から 7f を得た。(収 率:72.1%)

7,8-Methylenehexadec-7-enoic acid(**1a**)

エタノール 4ml に 7a(50mg,0.2mmol)を溶かし、5N の水酸化ナ トリウム水溶液を 1ml 滴下した。油浴 90 の条件にて 12 時間還流 し、加水分解を行った。10ml の水を加え酢酸エチルにより抽出を 行った。薄層 TLC を使用し、かき取りによる精製(Bz:EtOAc=1:1) を行い 1a を得た。TLC は Bz:EtOAc =1:1 にて、Rf 値=0.50 であっ た。収率は 8.4%であった。

9,10-Methylenehexadec-9-enoic acid(1b)

1a の合成と同様に、7b(50mg,0.2mmol)から 1b を得た。(収率:45.1%)

11,12-Methylenehexadec-11-enoic acid(1c)

1a の合成と同様に、7c(50mg,0.2mmol)から 1c を得た。(収率:32.6%)

13,14-Methylenehexadec-13-enoic acid(1d)

1a の合成と同様に、7d(50mg,0.2mmol)から 1d を得た。(収率:16.4%)

11,12-Methyleneoctadec-11-enoic acid(1e)

1a の合成と同様に、7e(50mg,0.2mmol)から 1e を得た。(収率:55.0%)

11,12-Methylenetetradec-11-enoic acid(1f)

1a の合成と同様に、7f(50mg,0.2mmol)から 1f を得た。(収率:32.2%)

7,8-Methylenehexadec-7-enamide(2a)

エタノール 4ml に 7a(50mg,0.2mmol)を溶かし、2N の水酸化ナ トリウム水溶液を 1ml 滴下した。油浴 90 の条件にて 12 時間還流 し、加水分解を行った。10ml の水を加え酢酸エチルにより抽出を 行った。薄層 TLC を使用し、かき取りによる精製(Bz:EtOAc=1:1) を行い 2a を得た。TLC は Bz:EtOAc =1:1 にて、Rf 値=0.14 であっ た。収率は 8.4%であった。

9,10-Methylenehexadec-9-enamide(2b)

2a の合成と同様に、7b(50mg,0.2mmol)から 2b を得た。(収率:16.4%)

11,12-Methylenehexadec-11-enamide(2c)

2a の合成と同様に、7c(130mg,0.5mmol)から 2c を得た。(収率:25.5%)

13,14-Methylenehexadec-13-enamide(2d)

2a の合成と同様に、7d(50mg,0.2mmol)から 2d を得た。(収率:18.3%)

11,12-Methyleneoctadec-11-enamide(2e)

2a の合成と同様に、7e(59mg,0.2mmol)から 2e を得た。(収率:34.6%)

11,12-Methylenetetradec-11-enamide(2f)

2a の合成と同様に、7f(50mg,0.2mmol)から 2f を得た。(収率:32.4%)

Methyl 11,12-Methylenehexadec-11-enoate(8c)

30ml コルベンを用い、水 2ml に KOH 1.2g を溶解させた。その 容器にジエチルエーテル 10ml を加え、氷冷下、 N-Methyl-N'nitro-N-nitrosoganizine を少量溶解させた。黄色を帯びた油層を分 取、KOH により脱水することにより、ジアゾメタンを得た。バイア ル中の 1c (5.0mg,0.02mmol)にジアゾメタンを数滴たらし、 5 分ほ ど室温にて放置した。溶媒を窒素気流でとばすことにより、8c を得 た。収率は約 100%であった。





Fig.4 Synthetic route of cyclopropene compounds.



a R: $CH_3(CH_2)_5$ n=3 (C_{16} 7,8-methylene) b R: $CH_3(CH_2)_3$ n=5 (C_{16} 9,10-methylene) c R: CH_3CH_2 n=7 (C_{16} 11,12-methylene) d R: H n=9 (C_{16} 13,14-methylene) e R: $CH_3(CH_2)_3$ n=7 (C_{18} 11,12-methylene) f R: H n=7 (C_{14} 11,12-methylene)

Fig.5 Synthetic route of cyclopropene compounds.



Fig.6 Halogenation of alkyl compounds.

第3章 シクロプロペン化合物の阻害活性の測定

第1節 ¹⁴C-標識パルミチン酸を用いた生物検定

(1)目的

ボンビコールの生合成経路は、¹⁴C-標識パルミチン酸をはじめと する種々の¹⁴C-標識化合物を利用して解明された。その際、¹⁴C-標 識パルミチン酸はボンビコールのみに変換されるのではなく、 hexadecane-1-ol および、生合成中間体である(Z)-11-hexadecenoate に対応する(Z)-11-hexadecen-1-ol にも変換されることが明らかに なっている(Fig.1)。そこで生物検定の方法としては、¹⁴C-標識パル ミチン酸を利用し、その(Z)-11-hexadecen-1-ol およびボンビコール への変換に及ぼす影響、すなわち、Z11-不飽和化反応および、 E10,Z12-不飽和化反応に及ぼすシクロプロペン化合物の影響を調 べ、プロペン環の位置と阻害される反応との関係を明らかにするこ ととした。

(2)材料および方法

a)¹⁴C-標識パルミチン酸

American Radiolabeled Chemical 社より購入した[1-¹⁴C]hexadecanoic acid(2.07GBq/mmol)を、約100,000dpm/µlの濃 度になるようにDMSOにより濃度調整を行い使用した。

b) 供試昆虫

家蚕交雑種の蚕種(春嶺×鐘月)からふ化した幼虫を人工飼料を用

い 16L8D、25 の条件にて飼育した。雌雄は幼虫期、あるいはさな ぎにおいて選別し、実験には処女雌を使用した。

c) シクロプロペン化合物の濃度調整

第2章で合成したシクロプロペン化合物、1a-f、2a-f、8cをそれ ぞれ1μg/μlの濃度になるようにDMSOにより濃度調整し使用した。

d) フェロモン腺への化合物の塗布

羽化後 25-27 時間経過(羽化1日、明期2時間後)したカイコガ処 女雌の性フェロモン腺に、シクロプロペン化合物を1頭あたり1µl をマイクロシリンジを用いて塗布した。その2時間後、¹⁴C-標識パ ルミチン酸(約 100,000dpm)の塗布を行った。各化合物当たり9頭 の処女雌を実験に使用した。

e) フェロモン腺成分の抽出および分析

¹⁴C-標識パルミチン酸の塗布から3時間後、性フェロモン腺をは さみで切除し、3頭を1組として少量の酢酸エチルに30分間浸漬し た。抽出液は、無水硫酸ナトリウムにて脱水濾過し、フェロモン腺 抽出液とした。

カイコガ性フェロモン腺中における標識化合物(アルコール体)の 分析はすでに確立しており、その方法(Ando et al.,1988)に準じて分 析を行った。すなわち、フェロモン腺抽出物は、順相シリカゲル TLC(Kieselgel 60 F254 0.25mm,MERCK)を用い、ベンゼン:酢酸エ チル=4:1 の溶媒系にて展開後、プレートにX線フィルムを密着させ、 -40 に1週間保管し、オートラジオグラムを得た。得られたオート ラジオグラムを指標に、放射活性を有するシリカゲルの部位を直接 バイアルにかき取り、10mlのキシレン系液体シンチレーションカ ウンターにより放射活性を測定した。ただし、合成ボンビコールと の比較によって確認したアルコール画分のシリカゲルは、回収後、 酢酸エチルにより抽出し、無水硫酸ナトリウムを詰めた脱水管を通 し、アルコール成分を得た。この抽出液を逆相 HPLC により分取し た。カラムは、ODS カラム(8mmx150mm)を用い、メタノール:水 =93:7 の溶媒系にて、流速 1.5ml/min で分取を行った。抽出液を注 入後、6 分後から分取を開始し、1 分ごとに 22 分まで分取を行った。 分取液に液体シンチレーターを 10ml 加え、放射活性を測定した。

(2)結果及び考察

フェロモン腺に 1µg のシクロプロペン化合物を投与し、¹⁴C-標識 パルミチン酸の各アルコール成分への変換を調べたところ、Fig.7 に示したように、1a および 2a(C16-7,8-methylene)はボンビコール 生合成過程における不飽和化反応に影響を及ぼさないことが明らか になった。1b および 2b(C16-9,10-methylene)を投与したものでは、 (Z)-11-hexadecene-1-ol への取り込み率が低下しており、またそれ と同程度のボンビコールへの取り込み率の低下がみられた。このこ とから、9-位にプロペン環を有する化合物は Z11-不飽和化反応のみ を特異的に阻害することが示唆された。一方、1c および 2c(C16-11,12-methylene)を塗布すると、(Z)-11-hexadecene-1-ol への取り 込み率は今回実験に用いた位置異性体のなかで最も大きく低下し、 また ¹⁴C-標識パルミチン酸のボンビコールへの取り込み率がほとん ど認められず、11-位にプロペン環を有する化合物は、Z11-と、 E10,Z12-不飽和化反応の両方を阻害することが示唆された。同様の 位置にプロペン環を有するメチルエステル化物 8c は、両方の不飽和 化に対して阻害活性を見せたが、1cおよび2cに比較すると弱い活 性であった。また、1d および $2d(C_{16}-13,14-methylene)$ では、(Z)-11-hexadecene-1-olへの取り込み率は低下していなかったが、ボン ビコールへの取り込み率は低下していたことより、13-位にプロペン 環を有する化合物は、E10,Z12-不飽和化反応のみを阻害することが 判明した。本来の基質である C₁₆のアシル化物とは異なる長さの炭 素鎖を持つ 1e、2e(C₁₈-11,12-methylene)および 1f、2f(C₁₄-11,12methylene)は、官能基からプロペン環への距離が等しい 1c、2c に 比較すると弱いものの、両不飽和化に同様の阻害を示した。以上の 結果から、カルボン酸の1b、1c、1d、1e、1f、それらのアミド化物 である、2b、2c、2d、2e、2f およびメチルエステル化物の 8c はボ ンビコールの生合成阻害活性を有することが判明した。また、カル ボン酸よりもアミド化物の方が高い活性を示した。これは、シクロ プロペンカルボン酸はカイコガ生体内においてβ-酸化を受け代謝さ れやすいが、アミド化物は代謝されることなく、阻害活性が維持さ れるためと考えられた。

一方、プロペン環の位置と不飽和化反応阻害活性に関する報告で、 これまでは、n-位における不飽和化過程を阻害するには、(n-1)-位 から(n+1)-位の間にプロペン環が位置する必要のあることが述べら れている(Fogerty et al.,1972)。しかし、ボンビコール生合成過程 では、n-位における不飽和化過程を阻害するには、(n-2)-位から (n+1)-位にプロペン環が位置しなければならないという結果が得ら れた。これはプロペン環の構造が(Z)-体の二重結合と類似している ために阻害活性が発現するものと考えられている。しかし、プロペン環の位置と不飽和化阻害の関係がカイコガの性フェロモンの生合成のみに特有であるということは本研究からは言及できず、他の多くの昆虫においてシクロプロペン化合物の不飽和化反応への影響を調べる必要や、(E)-体のみの不飽和化反応に対する影響を調べる必要があると思われる。また、炭素鎖の長さが本来の基質と異なる阻害剤も若干弱いながらも阻害活性を持ち、不飽和化酵素の炭素鎖長に対する基質特異性の低さと、不飽和化部位が官能基側からの距離によって決定されることなどがわかった。



Incorporation of ¹⁴C-16:Acid

Fig.7 Incorporation(%) of ¹⁴C-16:Acid into fatty alcohols in the pheromone grands of *B. mori* that were pretreated with cyclopropene compounds.

第2節 ²H₃-標識パルミチン酸を用いた生物検定

(1)目的

¹⁴C-標識パルミチン酸を利用した生物検定により、プロペン環を 有するカルボン酸化合物、アミド化物およびメチルエステルはボン ビコールの生合成における不飽和化部位を阻害することが判明した。 そこで、これらの化合物におけるボンビコール生合成に対する阻害 活性の強さを比較するためにボンビコール生合成における不飽和化 阻害 50%薬量(*I*₅₀)を測定することとした。¹⁴C-標識パルミチン酸を 用いるよりも、簡便かつ高精度な測定を行うことを目的として、²H₃-標識パルミチン酸を利用した。各種濃度段階におけるシクロプロペ ン化合物を処理し、特定の分子イオンのみを観測する SIM 法により ²H₃-標識パルミチン酸のボンビコールへの取り込み率をそれぞれ測 定した。

(2)材料および方法

a)²H₃-標識パルミチン酸

ISOTEC 社より購入した[16,16,16-²H₃]hexadecanoic acid を DMSOにより 10µg/µlの濃度に調整し使用した。

b) 化合物の濃度調整

シクロプロペン化合物、1a-f、2a-f、8cを 10-10⁻⁴μg/μlの濃度に DMSO により濃度調整を行い使用した。 c)²H₃-標識パルミチン酸とシクロプロペン化合物の塗布

¹⁴C-標識パルミチン酸の代わりに²H₃-標識パルミチン酸を使用す る以外は¹⁴C-標識パルミチン酸による生物検定と同様の処理を行っ た。しかし、この生物検定では夾雑物の少ない状態で抽出を行うこ とが重要なため、3 頭を1 組としてヘキサンによる抽出を行った。

d) GC-SIM による分析

GC 部に 5980 SERIES II (Hewlett Packard)を備えた磁場型の JEOL JMS-SX 102A を使用した。カラムは TC-FFAP 極性キャピラ リーカラム(0.25mm i.d. x 30m;GL Science)を用いた。昇温条件は、 40 を 1 分後、140 まで 50 /min.、更に 220 まで 8 /min.に 設定して分析した。GC 部においてキャリアーガスのヘリウムを流 速 30-40ml/min.に、入口圧を 3kg/m²に、気化室温度を 250 に調 整し、スプリットレス注入法により分析を行った。また、MS 部に おいて、イオン化は EI 法により行い、イオン化エネルギーは 70eV とした。イオン源温度、GC インターフェイス温度はそれぞれ 280 に設定した。試料は 0.06 雌分を導入し、pentadecan-1-ol 10ng を 内部標品として混入し、それぞれ測定した。

(3)結果及び考察

GC-MS のマスクロマトグラムにより観測を行うと、DMSO で処 理し、²H₃-標識パルミチン酸を投与しなかったものではボンビコー ルの分子イオンピークである m/z 238 は観測されるが、m/z 238 よ り 3 マスユニット大きい²H₃-ボンビコールの m/z 241 のピークは観 察されなかった。一方、²H₃-標識パルミチン酸を投与したものでは、 ボンビコールの分子イオンピークである m/z 238 と²H₃-ボンビコー ルの分子イオンピークである m/z 241 のマスクロマトグラムを検索 したところ、両方のイオンピークが観測された。感度の問題から、 重水素標識化合物の投与量は、¹⁴C-標識化合物を用いた場合よりも 多くなる。前駆体を大量に投与する事による生合成系の乱れが心配 されたが、性フェロモン生産量は通常と変わらず、標識前駆体の投 与による影響は見られなかった。

11-位にプロペン環を有する阻害剤を 1µg 投与したものでは、m/z 238 のイオンピークは観測されたが、m/z 241 のイオンピークは観 測されなかった。また、TIC のピーク面積を対照である DMSO 処理 区と比較しても、その面積は小さくなっており、ボンビコール生合 成阻害は明らかとなった。選択した分子イオンを測定する GC-SIM により内部標品である pentadecan-1-ol と比較をし、各種濃度段階 のシクロプロペン化合物におけるボンビコール生合成の割合を測定 した。10µg-10-4µgの濃度段階でシクロプロペン化合物を投与し、 ²H₃-ボンビコール(m/z 241)のピーク面積を内部標品(pentadecan-1-ol:m/z 210)のピーク面積で割った値を DMSO のみで処理したと きのその値で割ることで、処理後におけるボンビコールへの取り込 み率を求めた。そして、Table 5 に示したような結果が得られた。 阻害活性を示したシクロプロペン化合物は、いずれもカルボン酸よ りアミド化物の方が高い阻害活性を持つことが一致していた。この ことより、カルボン酸はカイコガ生体内においてβ-酸化を受け代謝 されやすいが、アミド化物はβ-酸化を受けにくいためにカルボン酸 よりも少ない投与量で高い阻害活性を持つことが明らかとなった。 しかし、このことを明確にするために、それらのラベル化合物によ

る代謝実験が必要であると考えられる。7-位にプロペン環を有する 化合物には阻害活性自体は見られたものの、最も高い濃度の場合に も阻害が50%に達することがなく、正確な定量を行えなかった。11-位にプロペン環を有する化合物と、13-位にプロペン環を有する化合 物とで阻害活性を比較すると、前者の方が高い阻害活性を示した。 前節の、14C-標識パルミチン酸を用いた実験から、11-位にプロペン 環を有する化合物は Z11-不飽和化反応と E10.Z12-不飽和化反応の 両方を、13-位にプロペン環を有する化合物は Z11-不飽和化反応の みを阻害するという結果が得られている。そのために、11-位にプロ ペン環を持つ化合物の方が 13-位にプロペン環を持つ化合物より高 い阻害活性を持つものと考えられた。また、飽和脂肪酸から Z11-位不飽和化脂肪酸に不飽和化を誘導する酵素反応と、Z11-不飽和化 脂肪酸から E10.Z12-不飽和化脂肪酸の不飽和化を同時に誘導する 酵素反応の違いにより、阻害活性に差異が生じたとも考えられる。 これらの化合物の阻害活性の差異を明確にするために、GC-SIM 法 により Z11-16:OH への取り込み率の検討が必要である。

本研究では、化合物としてカルボン酸、アミド化物、およびメチ ルエステル化合物を用いて実験を行ったが、更にほかの官能基を持 つシクロプロペン化合物による生物検定や、カイコガ以外の昆虫に 対する阻害活性の違いなども検討していく必要があると考えられる。

Table 5	I_{50} (µg) Values of Cyclopropene Compounds Measured
	by Incorporation of ² H ₃ -Palmitic Acid into Bombykol

inhibito	or carbon length	I ₅₀ (μg/gland)			
and position	on of cyclopropene	Acid (1)	Amide (2)		
C ₁₆	7,8-methylene(a)	> 10	>10		
C ₁₆	9,10-methylene(b)	0.73	0.23		
C ₁₆	11,12-methylene(c)	0.040	0.016		
C ₁₆	13,14-methylene(d)	2.2	0.50		
C ₁₈	11,12-methylene(e)	0.32	0.17		
C ₁₄	11,12-methylene(f)	0.21	0.10		

The I_{50} value of methyl 11,12-methylenehexadecec-11-enoate(8c) is 0.15 μ g/gland.



Fig.8 Biosynthetic pathway of bombykol and the prospective steps that were inhibited by cyclopropene compounds.

摘要

プロペン環を有する脂肪酸は生体内における直鎖脂肪酸の不飽和 化反応を阻害するため、カイコガ性フェロモンの生合成過程におけ る2つの不飽和化反応を阻害することが推察できた。そこで、7-位、 9-位、11-位および13-位にプロペン環を有する化合物(カルボン酸、 アミド化物およびメチルエステル)を合成し、それらシクロプロペン 化合物のボンビコール生合成過程における2つの不飽和化反応に与 える影響を検討した。生物検定において、標識した生合成前駆体と して、¹⁴C-標識パルミチン酸と、²H₃-標識パルミチン酸を使用した。

アミド化物(2a-f)は対応するカルボン酸(1a-f)よりも強い阻害活性を示したが、その理由はカルボン酸が生物体内で -酸化されるためだと考えられる。メチルエステル(8c)はカルボン酸よりもわずかに低い阻害活性を示し、カルボン酸と同様に -酸化を防ぐことはできなかったと考えられる。

7,8-位にプロペン環を持つ化合物(1a,2a)は、両不飽和化において 全く阻害を示さなかった。また、9,10-位の化合物(1b,2b)を塗布し た場合、Z11-16:OH とボンビコールの¹⁴Cの取り込みは低下し、ま た、それらの低下の割合がほぼ等しいことから、この化合物は Z11-不飽和化反応のみを阻害することが示された。また、同様の考察か ら、11,12-位の化合物(1c,2c)は、Z11-および E10,Z12-不飽和化反応 の両方を、13,14-位の化合物(1d,2d)は、E10,Z12-不飽和化反応のみ を阻害することが明らかになった。

ニワトリの肝臓での 9-位の不飽和化反応の阻害は、8-位から 10-位にプロペン環が位置する化合物に認められている。今回のボンビ コール生合成系における不飽和化反応においても、阻害剤のプロペ ン環の位置は二重結合が導入される場所と完全に一致する必要がな く、1 あるいは 2 結合分ずれてもある程度の活性を示す結果が得ら れた。また、プロペン環は Z-体の二重結合と構造上類似しているた めに阻害活性を持つことが推察されるが、E-体の二重結合を持つ性 フェロモンも少なくなく、それらの生合成にシクロプロペン化合物 がどのような影響を及ぼすかも興味深いところである。

C₁₈ および C₁₄ の化合物 (**1e**,**2e** および **1f**,**2f**)は C₁₆-11,12methylene(**1c**,**2c**)と同様、Z11-位不飽和化と、E10,Z12-位不飽和化 の両方に阻害を示したが、活性の強さは若干劣っていた。また、長 い炭素鎖と短い炭素鎖の間に有意な差はみられなかった。

今回の実験により、カイコガのフェロモン生合成の研究において、 重水素標識化合物が十分利用可能であることが明らかになった。感 度の問題から、重水素標識化合物の投与量は、¹⁴C-標識化合物を用 いた場合よりも多くなる。前駆体を大量に投与する事による生合成 系の乱れが心配されたが、性フェロモン生産量は通常と変わらず、 標識前駆体の投与による影響は見られなかった。また、¹⁴C-標識化 合物を用いた場合と比較して、安全性の向上、操作の簡略化などに より、迅速に結果を得ることができた。現在、同様な重水素標識化 合物を用いて他種の蛾類での性フェロモン生合成系の研究を行って いる。 Ando, T.; Hase, T.; Arima, R.; Uchiyama, M., Agric. Biol. Chem., **52**: 473-478 (1988).

Arsequell, G.; Fabrias, G.; Camps, F., *Insect Biochem.*, **19**: 623-627 (1989).

Baird, M. S.; Dale, C. M.; Lytollis, W.; Simpson, M. J., *Tetrahedron Lett.*, **33**: 1521-1522 (1992).

Binder, R. G.; Chan, B. G., Ent. exp. Appl., 31: 291-295 (1982).

Bjostad, L. B.; Roelofs, W. L., *Insect Biochem.*, **14**: 275-278 (1984).

Fogerty, A. C.; Johnson, A. R.; Pearson, J. A., *Lipids*, **7**: 335-338 (1972).

Gensler, W. J.; Floyd, M. B.; Yanase, R.; Pober, K., *J. Am. Chem.* Soc., 23: 2397-2398 (1969).

Gosalbo, L.; Fabrias, G.; Arsequell, G.; Camps, F., Insect Biochem. Mol. Biol., 22: 687-690 (1992)

Raju, P. K.; Reiser, R., J. Biol. Chem., 242: 379-384 (1967).

本研究を遂行するにあたり、随時ご指導いただきました本研究室 の安藤哲教授に深く感謝いたします。また、本研究における実験で、 当研究室の大野竜太氏、池本和久氏に大変お世話になり深く感謝い たします。更に、当研究にご協力くださいました生物相関システム 学研究室、および生物制御化学研究室のみなさまに厚くお礼申し上 げます。