

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22603001

研究課題名（和文）ヒト致死性毒ポリカバノシド類の合成と生理活性発現機構の解明

研究課題名（英文）A marine lethal toxin polycavernoside A: synthesis and exploration of the molecular mechanism of action

研究代表者

葛西 祐介（KASAI YUSUKE）

東北大学・大学院生命科学研究所・産学官連携研究員

研究者番号：50379286

研究成果の概要（和文）：海藻摂取による食中毒の原因物質として同定された、強力なヒト致死毒性を有する海洋天然物ポリカバノシドAの全合成を達成した。マクロリド部分を2つに分け、鈴木-宮浦反応による部分構造の連結と Keck マクロラクトン化によるマクロリド形成によって、収束的にマクロリド部を合成した。2つの部分構造もそれぞれ触媒的不斉反応を鍵として収束的に合成した。二糖部分の合成では armed-disarmed 法を適用することで、より簡便かつ安全な合成方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：A total synthesis of (-)-polycavernoside A, a marine lethal toxin isolated from the edible alga *Gracilaria edulis*, has been achieved via a convergent approach. The synthesis is highlighted by catalytic asymmetric syntheses of the two key fragments and their union through Suzuki-Miyaura coupling and Keck macrolactonization. Efficient synthesis of L-fucosyl-D-xylose part was developed by using armed-disarmed concept.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物化学・海産毒・有機合成・鈴木-宮浦反応・マクロラクトン化

1. 研究開始当初の背景

ポリカバノシド A は1991年にグアムで突如発生した食中毒の原因物質として、東北大の安元・山下らによって紅藻カタオゴノリから単離された (Yotsu-Yamashita, M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1147.). オゴノリは日本でも刺身のツマや寒天原藻として用いられるごく一般的な食材であり、現地ではそれまで食中毒の事例が無かった。その11年

後にフィリピンで発生した食中毒でも、トゲノリから原因物質として単離されている。いずれの食中毒でも犠牲者を出さず結果となった。このような突発的な食中毒は、稀ではあるが、太平洋エリアでは日本を含めて広く発症例が報告されている。その中でもポリカバノシドによる中毒は非常に毒性が強いため、その生産生物の特定や生物活性発現機構の解明が強く望まれていた。

ポリカバノシド A は、テトラヒドロピランを含むマクロリド環に、疎水性基であるポリエチレン側鎖が結合した新奇な構造を有する配糖体であり、二糖部分である L-フコシル-D-キシロース部はヒドロキシ基が高度にメチル化されている。糖部分のメチル化の位置や疎水性側鎖の長さの違いに由来する数種類の類縁体が単離されており、最近ではマクロリド 5 員環部が還元およびメチル化されて構造を異にする類縁体も報告されている

(Yotsu-Yamashita, M. et al. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2255.). アグリコン部の構造的特徴から、生産生物はシアノバクテリアであると考えられているが、一方で糖部分のメチル化は海藻由来であるとの説もあり、その生合成の起源、および糖部メチル化と毒性との関連に興味もたれる。被害者の中毒症状から、ポリカバノシドは神経毒であることが予想されている。しかし、天然から化合物を単離するのは困難であり、試料不足のために活性発現機構に関する研究が立ち遅れている。

このような背景のもと、ポリカバノシド A の全合成研究も行なわれており、研究開始当時は 3 つの全合成例 (Fujiwara, K.; Murai, A, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10770.; Paquette, L. A. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 619.; White, J. D. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8593.) が報告されており、最近新たに 2 つの全合成が報告された (Woo, S. K.; Lee, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4564.; Brewitz, L. et al. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4532.). 全合成をきっかけとして化合物の絶対立体構造が明らかになっており、有機合成が天然物の研究進展に重要であることを示している。最近、合成されたポリカバノシド類縁体が、ヒト神経芽細胞腫に対して細胞内へのカルシウムイオン流入活性を有することが報告された (Cagide, E. et al. *Cell. Physiol. Biochem.* **2007**, *19*, 185.). しかし依然として試料不足の問題は解決していない。強力なヒト致死毒性と生産の突発性から、更なる調査研究が望まれている。

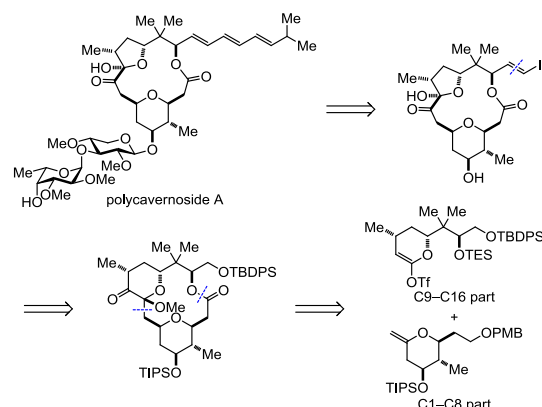
2. 研究の目的

本研究では、有機合成による天然物の効率的な全合成ルートを開発して量的供給を可能にする事を目的とした。確立した合成ルートを基に、類縁体の合成による構造活性相関研究、および作用標的物質特定のための有機ツール分子を合成し、ポリカバノシド類の生物活性発現機構の解明を行う。

3. 研究の方法

まず最も毒性が強いポリカバノシド A の効率的な全合成ルートの開発を目指した。天然物合成におけるフラグメント連結法として実績のある鈴木-宮浦カップリングを鍵反応とする収束的なマクロリド構築を計画し

た。各フラグメントの合成においても収束性の高い合成ルートを開発することで、大量合成を可能にすると共に、のちの類縁体合成も容易になるように計画した。



天然物の量的供給を可能にするために改善すべき問題の一つとして、マクロリド部へのグリコシル化の収率改善が挙げられる。過去の合成例を参照しても、グリコシル化の収率が非常に低い。過去の 3 例ではいずれも糖供与体としてチオグリコシドを用い、NBS を活性化剤としたグリコシル化を適用している。本研究ではフッ化グリコシドなどの他の活性化法も検討し、収率の改善を行なう。

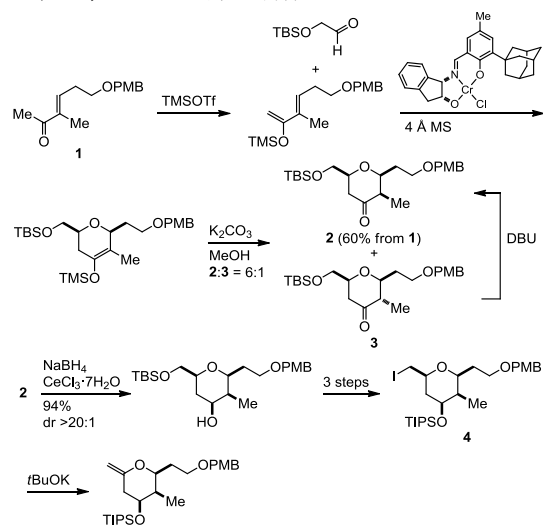
他の天然物ポリカバノシド類縁体についても全合成を達成し、構造確認と共に生物活性を精査して、構造と活性に関する知見を得る。また、マクロリド部の置換基をより簡略化した類縁体を合成し、構造活性相関試験を行う。最後に、作用標的物質の探索を行なうために、アグリコン部に光親和性標識を有する置換基を導入した基質を合成し、得られた知見を基にして分子間相互作用の解明を行い、生物活性発現機構の解明を目指す。

4. 研究成果

1) C1-C8 部の合成

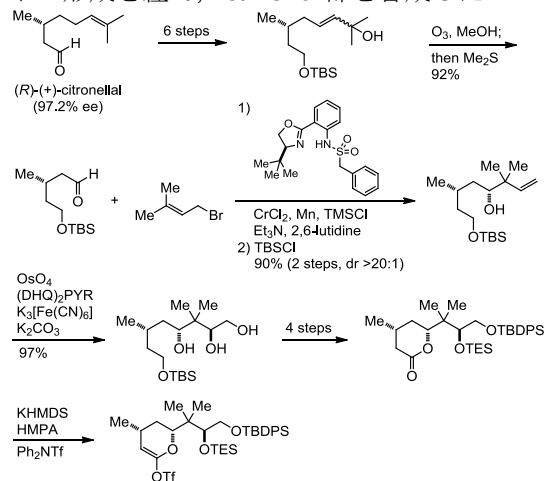
鍵となるテトラヒドロフラン環の構築には触媒的不斉ヘテロ Diels-Alder 反応を適用した。すなわち、エノン **1** から誘導したジエンとアルデヒドを、Jacobsen らが開発したキラルクロム(III)錯体を用いて無溶媒条件下反応を行ったところ、テトラヒドロフラン環を構築することに成功した。生じたメチル基の立体異性体 **3** は、DBU を用いたエピマー化によって望む立体化学を有する化合物 **2** へと変換した。化合物 **2** のカルボニル基は Luche 還元条件下で望む立体化学を有するアルコールへと高立体選択的に還元できた。この時点で生じた第 2 級アルコールを Mosher エステルへと誘導することで、絶対立体化学および光学純度を決定し、ヘテロ Diels-Alder 反応が高エナンチオ選択的に進

行したことを確認した。最後に保護基の変換を経て、C1-C8 部を合成した。



2) C9-C16 部の合成

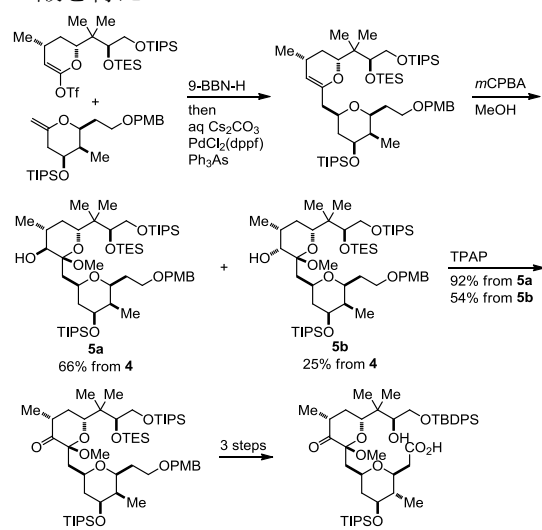
岸らが開発したキラルスルホンアミドを用いる触媒の野崎-檜山プレニル化を鍵反応として、C9-C16 部を合成した。(+)シトロネラルから誘導したアリルアルコールのオゾン酸化は、溶媒にメタノールを用いることで望むアルデヒドを高収率で与えた。プレニルブロミドを用いた触媒の不斉野崎-檜山反応は高収率かつ高立体選択的に進行した。生じた第2級アルコールの絶対立体化学は、この時点で6員環ラクトンへと誘導した後、NOE 相関を観測して決定した。続いて末端二重結合に対する Sharpless 不斉ジヒドロキシ化で望みの立体化学を有する第2級アルコールを構築した。生じた第2級アルコールの絶対立体化学の決定には、Rychnovsky の方法を用いた。すなわち、第1級アルコールを保護した後第2級アルコールを6員環アセトニドへと誘導し、¹³C NMR 化学シフトより決定した。その後保護基の変換と TEMPO 酸化による 1,5-ジオールからの6員環ラクトン形成を経て、C9-C16 部を合成した。



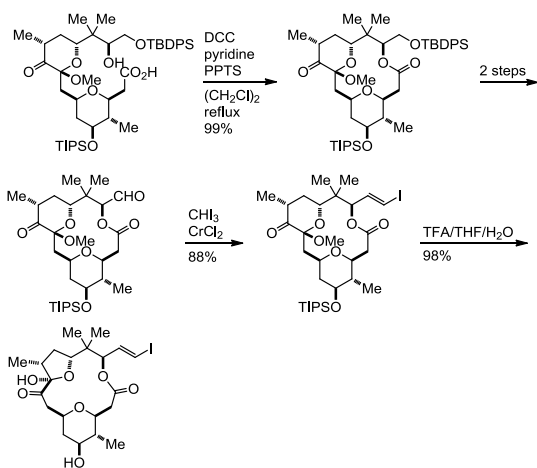
3) マクロラクTONの構築

鍵反応である鈴木-宮浦反応による2つの部分構造の連結、および改良 Keck マクロラクTON化はいずれも高収率で進行し、マクロラクTONを収束的に構築した。

鈴木-宮浦反応は、まず C9-C16 エノールホスフェートを用いて反応条件を種々検討した。しかし望むカップリング体の収率は非常に悪かった。そこで、C9-C16 エノールトリフラートを用いて検討を重ねた結果、Pd 触媒として PdCl₂(dppf) 錯体を用い、Ph₃As を添加する Johnson-Braun の条件下において高収率でカップリング体が得られることを見出した。生じたエノールエテルのエポキシ化と続くメタノールによる開裂反応をワンポットで行い、メチルアセタール **5** を得た。生じたヒドロキシ基の立体化学に由来する2つ種類のジアステレオマーは、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に分離できた。得られた第2級アルコールをそれぞれ酸化することでケトンとした後、TES 基と PMB 基の脱保護および第1級アルコールの選択的な酸化を経てヒドロキシカルボン酸を得た。

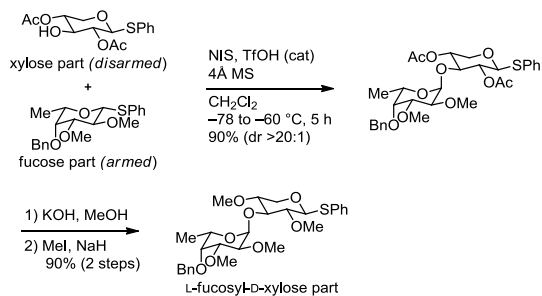


マクロラクTON化によるマクロリドの構築は過去の合成例においても採用されているが、全ての例で山口法を用いており、良好な収率でマクロリドを得ている。我々もまず山口法を検討したが、予想に反して非常に低収率であった。椎名法や Keck 法によるマクロラクTON化を種々検討した結果、正宗らがブリオスタチン7の合成時に見出した Keck 法の改良法 (DCC/pyridine/PPTS) の条件下で反応が円滑に進行し、高収率でマクロラクTONを与えることを見出した。その後、高井オレフィン化による増炭を経て、文献既知のマクロリド部の合成に成功した。



4) L-フコシル-D-キシロース部の合成

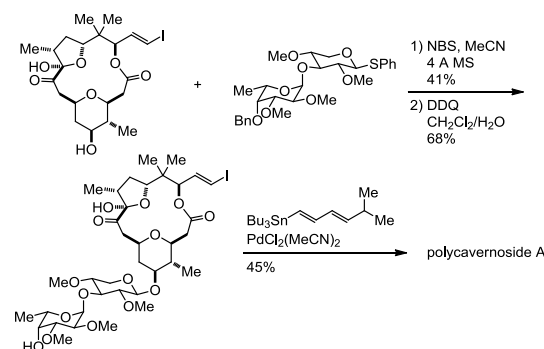
二糖部の合成では、armed-disarmed 法に基づくグリコシル化の適用により、量的供給を可能にする簡便な合成ルートの確立に成功した。これまでの報告例では、フコース部とキシロース部のチオグリコシドをそれぞれ合成し、フコース部を別途フッ化糖へと誘導した後、過塩素酸銀を用いたグリコシル化を行なって連結している。しかしフッ化糖への誘導に2段階を要する上、活性化剤である過塩素酸銀は爆発性が報告されており、大量合成には不向きであった。我々はフコースおよびキシロースの各チオグリコシドのヒドロキシ基の保護基に着目し、armed-disarmed 法を適用すれば、チオグリコシドから直接糖を連結出来ると考えた。すなわち、糖のヒドロキシ基がアシル基で保護されたキシロース部よりも、全てがエーテル系の保護基であるフコース部の方がアノマー位チオフェニル基の反応性が高く、選択的に活性化できると考えた。活性化剤として NIS/TFOH(cat) を用い、低温下で反応を行ったところ、予想通りフコース部チオフェニル基が選択的に活性化されて生成する望みの二糖を高収率かつ高立体選択的に得ることに成功した。その後保護基の変換を経て、L-フコシル-D-キシロース部を合成した。



5) ポリカバノシド A の全合成

既知の方法に従ってマクロリド部と二糖

を結合した後、別途調製した疎水性側鎖部との Stille カップリングを行うことで、天然物ポリカバノシド A の全合成を達成した。NMR を始めとする各種スペクトルデータは天然物のものと一致した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Yusuke Kasai, Takanori Ito, Makoto Sasaki, Total Synthesis of (-)-Polycavernoside A: Suzuki-Miyaura Coupling Approach, *Org. Lett.*, **14**(12), 3186–3189, 2012, 査読有 [DOI: 10.1021/ol301278e] (Highlighted by *SYNFACTS* **2012**, 8, 941.)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) ○葛西祐介・伊藤崇則・佐々木誠、海産毒ポリカバノシド A の全合成研究、日本化学会第 92 春季年会 (2012 年 3 月 27 日, 横浜)
- 2) ○葛西祐介・伊藤崇則・佐々木誠、海産毒ポリカバノシド A の全合成研究、日本化学会第 91 春季年会 (2011 年 3 月 26 日, 横浜)
- 3) Yusuke Kasai, Makoto Sasaki, Synthetic Studies on Polycavernoside A, *Pacificchem* 2010 (19 Dec. 2010, Hawaii, the United States)
- 4) ○葛西祐介・佐々木誠、海産毒ポリカバノシド A の全合成研究、日本化学会第 90 春季年会 (2010 年 3 月 28 日, 大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 祐介 (KASAI YUSUKE)

東北大学・大学院生命科学研究所・産学官連携研究員

研究者番号：50379286