

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24年 5月18日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510218

研究課題名（和文） 新規有糸分裂阻害天然物ニグリカノシド類の立体構造と活性の解明を指向する合成展開

研究課題名（英文） Synthetic Studies on Novel, Natural Anti-Mitotic Agents, Nigricanosides, toward Elucidation of Their Stereochemistry and Biological Activity

研究代表者

藤原 憲秀（FUJIWARA KENSHU）

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：20222268

研究成果の概要（和文）：緑藻の一種が生産するニグリカノシド類は、エーテル結合型モノガラクトシルジアシルグリセロールであり、がん細胞の増殖を強力に抑制する。一方、その生産量が少なく立体構造も不明であり、詳細な生物活性研究が滞っている。そこで、ニグリカノシド類の立体構造と生物活性の解明を目的に合成研究を行い、2つのエーテル結合部の構築方法を開発し、天然物のガラクトースと脂肪酸鎖のエーテル結合部の立体化学を明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Nigricanosides, isolated from the green alga *Avrainvillea nigricans*, belong to a monogalactosyldiacylglycerol family and exhibit potent growth inhibitory activity against cancer cells. Because of the scarce supply from natural source and the unknown stereochemistry, nigricanosides are not explored biologically in detail. Therefore, studies aiming at the elucidation of their stereochemistry and biological activity have commenced with the partial synthesis of a congener, nigricanoside A dimethyl ester. As a result, methods for the construction of the two ether linkages have been established, and the stereochemistry of the ether junction between the galactose moiety and the lower acyl chain has been clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生物活性分子の設計・合成

1. 研究開始当初の背景

(1) ドミニカ産はうちわ属の緑藻 *Avrainvillea nigricans* から Anderson らにより最近単離・誘導された化合物・ニグリカノシド A、B、およびそのメチルエステル（図1）は、抗癌剤タキソールと同様に、有糸分裂阻害に基づく強力な癌細胞増殖抑制作用

を示す（ $IC_{50} \sim 3$ nM、表1）。また、これらは、2本の不飽和脂肪酸鎖とガラクトースがエーテルでクロスリンクした、これまでに無い特異な化学構造を持つので、既存の抗癌剤に耐性を示す癌にも有効な新規抗癌剤のリードとして強く期待される。一方、ニグリカノシド類は藻からの生産量が少ないため

($1.5 \sim 3.0 \times 10^{-6}$ % wet wt)、その供給法の開発が課題である。また、これらは、生物活性の詳細を研究する上で必須な立体化学が未解明なので、その究明も不可欠な課題である。

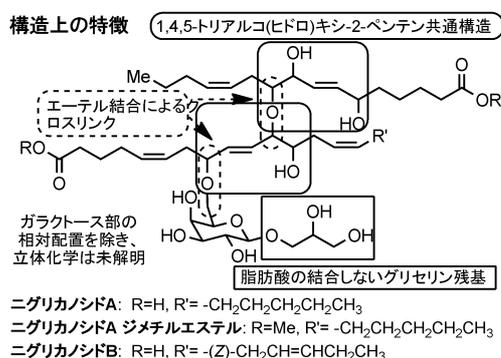


図 1

生物活性の特徴

ニグリカノシドA ジメチルエステル

IC ₅₀	増殖抑制	有糸分裂阻害
乳癌細胞 (MCF-7)	~ 3 nM	3 nM
大腸癌細胞 (HCT-116)	~ 3 nM	未報告

10 μMでチューブリン重合促進

- 癌細胞に対する有糸分裂阻害活性と増殖抑制活性が極めて強い
- 微小管の安定化による有糸分裂阻害の可能性が高い(タキサン系抗癌剤と類似)。
- メチルエステル化前のニグリカノシドA/Bの方が活性が高いと見積られている(詳細未報告)。

表 1

(2) 申請者は、これまでに鎖状分岐エーテルについて独自の立体選択的合成プロセスを開発している。光学活性なグリセルアルデヒド誘導体から調製したアセチレンケトンにアルコールを共役付加させ、ジオキソラン部の立体化学を利用してケトン部を立体選択的に還元後、グリコール酸のエステルあるいはエーテルに導き、それぞれ Claisen 転位と [2,3]Wittig 転位を施すと選択的に *syn* および *anti* 型の生成物が得られるプロセスである。これはニグリカノシド類の特異な 1,4,5-トリアルコ(ヒドロ)キシ-2-ペンテン構造の構築に合致しているため、これを利用すれば、供給法と立体化学解明の課題を有機合成化学的に解決可能と考えた。

2. 研究の目的

ニグリカノシド類の癌細胞有糸分裂阻害作用の分子機構の解明を最終目的として、天然物の絶対立体配置の決定と、全合成による物質供給法の開発を目的に、合成化学的に研究

を展開する。

3. 研究の方法

研究課題完遂までの方法を以下(1)~(3)に示す。本申請課題では、(1)について重点的に検討した。

(1) 本課題では、ニグリカノシド A ジメチルエステルを具体標的として、合成化学的に絶対配置を決定する。その際、相対配置が既知のガラクトース部を起点に、少しずつ立体化学が明確な部分構造を伸長し、その都度天然物のスペクトルデータと比較する手法で、相対配置を決定する。具体的には①~⑥の手順に従う。

① ガラクトグリセロール部を含む下部脂肪酸部について、ガラクトースと脂肪酸鎖のエーテル結合部の構築法を開拓する。

② ガラクトースと脂肪酸鎖のエーテル結合部のジアステレオマーを複数合成し、天然物と NMR を比較検討して、天然物の同部分の立体化学を決定する。

③ 上部および下部脂肪酸鎖間のエーテル結合部分の構築について、前述の転位を用いる方法やその他の方法の応用を検討し、効率的な合成方法を開発する。

④ 上下脂肪酸鎖間のエーテル結合部およびその周辺について、複数のジアステレオマーを合成し、天然物と NMR を比較検討して、天然物の同部分の立体化学を決定する。

⑤ 上下脂肪酸鎖とガラクトグリセロール部の全体を含む構造の合成法を検討する。

⑥ 全体構造を持つ複数のジアステレオマーを合成し、天然物とスペクトルが一致する化合物を見出す。

(2) 最終的に、天然物とスペクトルデータが一致し、立体化学が明らかな化合物が全合成されることになる。従って、その化合物と天然物の旋光度を比較することにより天然物の絶対配置が決定できる。

(3) 合成法を最適化し、効率的で物質供給に適した全合成経路を確立する。

4. 研究成果

(1) ニグリカノシド類の立体化学解明に際し、ニグリカノシド A ジメチルエステルを具体標的とした。まず、相対配置が既知のガラクトース部と相対配置未知のグリセロール部、および下部脂肪酸鎖部とのエーテルクロスリンク部を含む部分構造について、モデル化合物 1~4 を設定した(図 2)。1~4 は、8' 位と 2'' 位について互いにジアステレオマーの関係となる。これらを合成して天然物と NMR データを比較して、一致の良いものが天然型の立体配置を持つと推測される。

なお、ニグリカノシド A が緑藻内の葉緑体中のモノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)を起源とするならば、ガラクトース

部はD型で、グリセロール部の2''位はR配置と予想される。ガラクトースのL型は天然には極めて稀のため、D型であることはほぼ確実に予想される。一方、グリセロール部は代謝の過程で、1''位と3''位間で転位すると立体化学が逆転するため、必ずしもMGDGと同一であるとは限らない。そのため、モデル化合物1~4を合成して確認することにした。

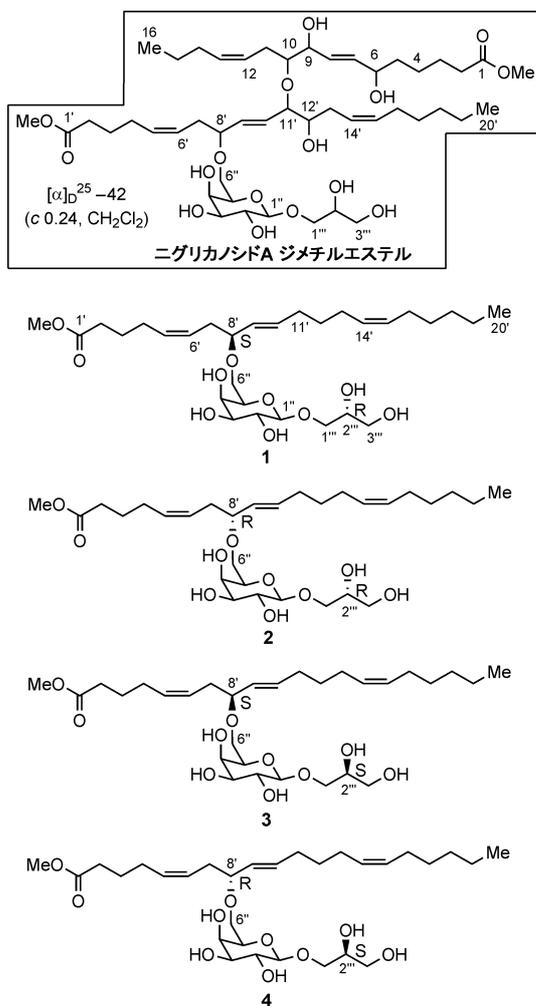
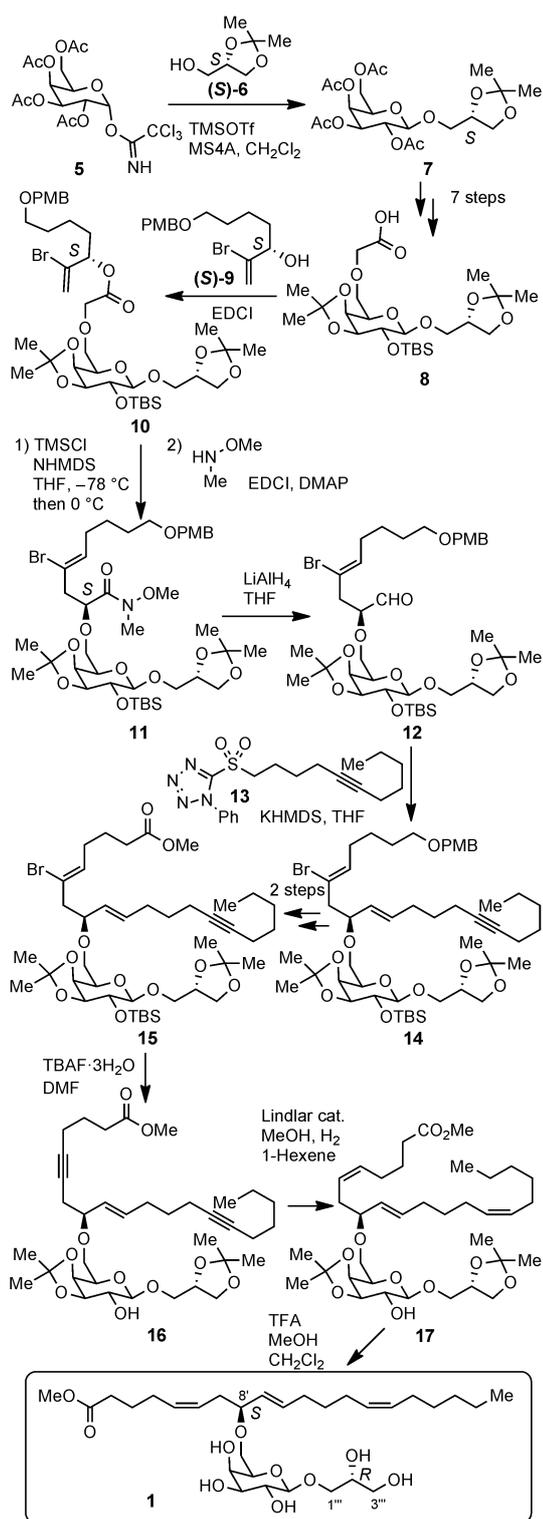


図 2

モデル化合物1~4の合成については、種々検討の末、Scheme 1 に示す経路を開発することができた。なお、Scheme 1 には代表例として化合物1の合成のみを示しているが、同様の方法で他の化合物2~4の合成も達成している。まず、化合物5にSchmidtの方法を適用して、保護した光学活性グリセロール誘導体6とグリコシル化して、β-ガラクトシド7を得た。その後、保護基の変換と6'位水酸基のカルボキシメチル化を経て化合物8に誘導した。次に、独自に合成した光学活性化合物9を縮合し、得られたエステル10にIreland-Claisen転位を誘起し、転位生成物



のカルボン酸をWeinrebアミド化して、化合物11を立体選択的に得た。還元してアルデヒド12に変換後、化合物13とJulia-Kocienskiオレフィン化することにより化合物14をE選択的に合成することが出来た。1'位PMBエーテルの脱保護と酸化およびメチルエステル化を経て、化合物15に

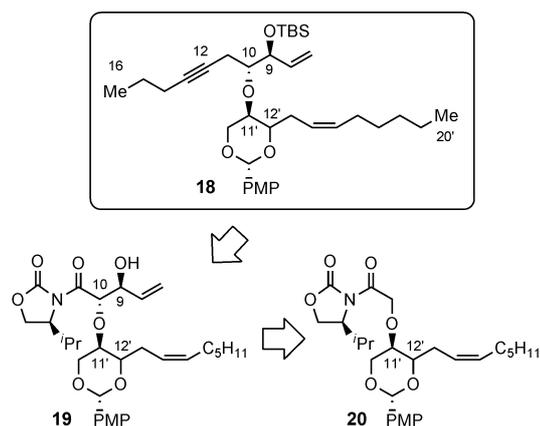
導き、森の方法でプロモオレフィン部をアセチレンに変換し化合物 **16** に導いた。Lindlar 還元により 2 つのアセチレン部を一挙に *cis*-オレフィンに変換し、酸性条件下でアセトナイド部を選択的に除去して目的のモデル化合物 **1**~**4** を得ることが出来た。

なお、化合物 **10** から **11** に至る Ireland-Claisen 転位による立体選択的エーテル合成法は、別途詳細に应用を検討し、環状エーテル合成にも適用可能なことを確認した。本法を用いて、他の環状エーテル系天然物への合成研究にも展開しており、汎用性の高い方法を開発することが出来た。

次に、得られたモデル化合物 **1**~**4** の ^1H NMR を測定し、天然物の報告データと比較した。脂肪酸鎖の 9' ~16' 位までの化学シフトはモデル化合物と天然物の構造が大きく異なるために、いずれのモデル化合物も大幅な差異が生じた。しかし、その他の部分ではモデルと天然物間の化学シフト差が少なくなり、さらにモデル間に系統的な差異の傾向が現れ、結果としてモデル化合物 **1** が天然物と極めて良い一致を示した。一方、 ^{13}C NMR の化学シフトにおけるモデルと天然物の差は、モデル間で同程度であるうえ、差異の傾向が異なる結果となり、 ^{13}C NMR からは天然物との一致不一致を判断する事は困難であった。

^1H NMR では磁気異方性効果は顕著に化学シフト影響することが知られている。従って、モデルおよび天然物の ^1H NMR の化学シフトには、 $\text{C}5'=\text{C}6'$ および $\text{C}9'=\text{C}10'$ の二重結合の磁気異方性効果を含まれると考えることができ、さらに 8' 位の立体化学が変わった際の化学シフトの系統的変化もこの磁気異方性効果の表れとして理解できる。一方、 ^{13}C NMR は、空間的に影響を与える磁気異方性効果に鈍感であるため、むしろモデル化合物で省略した部分構造の置換基効果が無いことが悪影響して、モデルによって化学シフトの差異の傾向が異なる結果を招いたと推測される。よって、現在のところ、 ^1H NMR の結果を基に、天然物はモデル化合物 **1** と同様に 8' *S*-2'' *R* の絶対立体化学を持つと推定される。

(2) 続いて、上下の脂肪酸鎖のエーテルクロスリンク部分の構築を検討した。全合成に向けた合成中間体の 1 つとして、化合物 **18** を設定した (Scheme 2)。原料として化合物 **20** を使い、Evans アルドール反応を適用すると、化合物 **19** が立体選択的に得られることが分かった。C12-C16 鎖の導入も可能であり、化合物 **18** の合成に成功した。Evans アルドール反応における反応条件と不斉補助基の立体化学を変えれば、異なる C9, 10 位の立体化学の合成にも対応できると期待される。



Scheme 2.

本申請課題では、ニグリカノシド A ジメチルエステル部のガラクトグリセロール部を含む下部脂肪酸部について、部分構造のジアステレオマーを複数合成して、天然物と NMR を比較した。その結果、2'' 位と 8' 位の絶対立体化学をそれぞれ *R* および *S* と推定することができた。同時に、特異なエーテルクロスリンク型構造の合成方法を新たに開発した。さらに、別法により、上部および下部脂肪酸鎖環のエーテルクロスリンク部分の構築にも成功した。以上の結果は、ニグリカノシド類の全合成の基盤を整えるものであり、立体化学決定と物質供給に向けて道を拓くと期待される。

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 4 件)

- (1) Kenshu Fujiwara, Yuki Suzuki, Nao Koseki, Shun-ichi Murata, Akio Murai, Hidetoshi Kawai, and Takanori Suzuki, "Improved synthesis of C8-C20 segment of pectenotoxin-2.", *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, (43), 5589-5592, 査読有, DOI:10.1016/j.tetlet.2011.08.051
- (2) Atsushi Takemura, Yasushi Katagiri, Kenshu Fujiwara, Hidetoshi Kawai, and Takanori Suzuki, "Synthesis of the C22-C37 segment of prorocentoin.", *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, (11), 1222-1224, 査読有, DOI:10.1016/j.tetlet.2011.01.042
- (3) Kenshu Fujiwara, Keita Tanaka, Yasushi Katagiri, Hidetoshi Kawai, and Takanori Suzuki, "Model studies for the stereoselective construction of the BC-ring of armatol F based on Ireland-Claisen rearrangement and relay ring-closing olefin

metathesis.", *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, (34), 4543-4546, 査読有,
DOI:10.1016/j.tetlet.2010.06.103

- (4) Kenshu Fujiwara, Yuta Hirose, Daisuke Sato, Hidetoshi Kawai, and Takanori Suzuki, "Studies toward the total synthesis of armatol F: stereoselective construction of the C6 and C7 stereocenters and formation of the A-ring skeleton.", *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, (32), 4263-4266, 査読有,
DOI:10.1016/j.tetlet.2010.06.026

[学会発表] (計6件)

- (1) 木梨尚人、藤原憲秀、河合英敏、鈴木孝紀、「ニグリカノシドAジメチルエステルの合成研究」、化学系学協会北海道支部 2011年夏季研究発表会 講演要旨集 B05、2011年7月23日、室蘭工業大学、室蘭
- (2) 木梨尚人、藤原憲秀、河合英敏、鈴木孝紀、「ニグリカノシドAジメチルエステルの合成研究」、日本化学会第91春季年会 講演要旨集 1A1-31、2011年3月26日、神奈川大学横浜キャンパス、横浜(東日本大震災のため要旨集公開のみを以て発表成立)
- (3) Kenshu Fujiwara, Ayako Kawai, Naoto Kinashi, Hidetoshi Kawai, and Takanori Suzuki, "Synthetic Studies on Nigriganoside A Dimethyl Ester (2): An Approach to Construct the Ether Linkage between the Lipid Chains", *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies Abstract Book* 1901, 2010年12月19日, Honolulu, USA
- (4) Naoto Kinashi, Kenshu Fujiwara, Hidetoshi Kawai, and Takanori Suzuki, "Synthetic Studies on Nigriganoside A Dimethyl Ester (1): Construction of the Ether Linkage between the Galactose Moiety and the C20 Lipid Chain", *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies Abstract Book* 1904, 2010年12月19日, Honolulu, USA
- (5) 藤原憲秀、木梨尚人、河合英敏、鈴木孝紀、「エーテル結合性グリセロ糖脂質の合成研究」、日本化学会第90春季年会 講演要旨集 3A5-30、2010年3月28日、近畿大学本部キャンパス、東大阪
- (6) 木梨尚人、藤原憲秀、河合英敏、鈴木孝紀、「エーテル結合性糖脂質の合成研究」、化学系学協会北海道支部 2009年夏季研究発表会 講演要旨集 A08、2009年7月

11日、苫小牧工業高等専門学校、苫小牧

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 憲秀 (FUJIWARA KENSHU)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 20222268

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし