

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24550064

研究課題名(和文) 海洋シアノバクテリア由来環状デブシペプチドグラッシィペプトリド類の全合成研究

研究課題名(英文) Synthetic Studies of Cyclic Depsipeptide, Grassypeptolides from Marine Cyanobacteria

研究代表者

中村 豊 (NAKAMURA, Yutaka)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：20267652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：グラッシィペプトリド類は海洋シアノバクテリアが産生する抗がん作用を有する環状デブシペプチドである。グラッシィペプトリド類の全合成を目指し、新規な疎水性チオール保護基である4,4'-ビス(ドコシルオキシ)トリチル(HTrt)基を用いてグラッシィペプトリド類の南半球テトラペプチドの合成を達成した。HTrt保護合成中間体はアセトニトリルのような極性溶媒により沈殿させて簡単に単離することができた。標的となるテトラペプチドはカラムクロマトグラフィーによる精製を行うことなく、Fmoc-Cys(HTrt)-OAllから6工程収率63%、純度よく得られた。

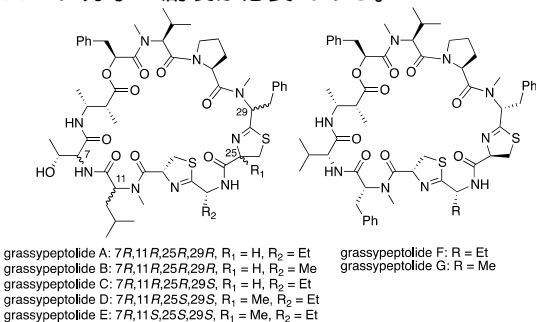
研究成果の概要(英文)：Grassypeptolides are cytotoxic cyclic depsipeptides isolated from marine cyanobacteria. A synthesis of a southern tetrapeptide fragment towards the total synthesis of grassypeptolides has been achieved using a new hydrophobic thiol protecting group, 4,4'-bis(dococylxy)trityl group (HTrt). The synthetic HTrt protected intermediates were easily isolated by precipitation with polar solvent such as acetonitrile. The target tetrapeptide was obtained in 63% overall yield and high purity from Fmoc-Cys(HTr)-OAll (6 steps) without column chromatographic purification.

研究分野：有機化学

キーワード：合成有機化学 天然物化学 天然物合成 フェイズタグ法 迅速合成

1. 研究開始当初の背景

創薬を目的として微生物や海洋生物からくすりの種となる化合物を見出そうという研究が盛んに行われており、抗菌性、抗腫瘍性および抗マalaria性などを有する新規な化合物が多数単離・構造決定されている。海洋シアノバクテリアは生理活性化合物の宝庫で、様々な生理活性化合物が見いだされている。シアノバクテリアが産生するチアゾール環やオキサゾール環などを含むペプチド群はシアノバクチンと称され、数多くの化合物が単離・構造決定されている。それらの中でグラッシィペプトリド類は、2つのチアゾリン環を含む環状デプシペプチドでアミノ酸残基もしくは絶対立体配置が異なる8種が存在する(図1)。これらは、HeLaなどの幅広い腫瘍細胞に対する細胞毒性と転写因子AP-1への阻害活性を有することから抗がん剤のリード化合物と成り得る化合物群である。しかしながら、これらは微量成分であることから詳細な生物活性試験や構造活性相関の研究ならびに作用機序の解明には天然品および非天然品の試料の供給、さらにはプローブ分子の創製が必要である。



一方、反応混合物から目的化合物を簡単に分離することができれば、迅速に目的化合物を入手することができる。その成功例が固相合成法であり、オリゴペプチドや核酸の自動合成への応用のみならず、コンビナトリアル合成において必須な合成手法となっている。しかしながら、固-液反応の低反応性や反応のモニタリングが難しいなど幾つか問題点があり、それを解決すべく数多くの検討が行われてきた。可溶性ポリマーを用いる合成法やフルオラス合成法をその好例として挙げることができる。最近、長鎖アルキル基の疎水性を利用して目的化合物の分離を行う研究が行われている。例えば Rademann らは、長い炭化水素鎖をタグとして付与した化合物が炭化水素修飾シリカゲル(汎用されているオクタデシルシリル化された逆相シリカゲル; ODS SiO₂)に強く吸着される性質を利用する Hydrophobically Assisted Switching Phase 合成法を提唱した。この方法は、液相で反応を行った後の粗生成物に ODS SiO₂を加え、最初に含水メタノール洗浄で非タグ化合物が除去され、ついでジクロロメタンを流すことによりタグ化合物を得ることができる。千葉らは、疎水性のタグを利用したソマトスタチンの液相合成を報告した。こ

の合成では、疎水性タグ化された合成中間体は反応溶液に極性溶媒を添加することによって析出し、ろ過操作で分離することができるため迅速かつ比較的少量の試料を合成することが可能である。また、砂塚らも千葉らと同様な方法論で環状ペプチドであるアルギフィンの効率的な合成を行なっている。上述した Rademann ら、千葉らおよび砂塚らの方法は、中程度の分子量のペプチドあるいは糖鎖合成の迅速かつ効率的な合成法となりうる方法であるが、未だ幾つかの報告例があるに過ぎない。

2. 研究の目的

アミノ基やヒドロキシ基などの様々な官能基の保護基に長鎖アルキル基を付与した新しい疎水性保護基を開発し、これらをフェイズタグとして用いることによりタグ化された合成中間体は極性溶媒を加えることによる析出分離あるいは ODS SiO₂の固相抽出(以下 ODS-SPE)で分離することができ、迅速に標的化合物が合成できるのではないかと考えた。さらに ODS SiO₂によりアルキル基の鎖長や鎖数を認識されれば、鎖長もしくは鎖数が異なる疎水性保護基を用いることでミックチャー合成へ展開できるものと確信した。そこで本研究は、グラッシィペプトリド類を標的化合物として新規な疎水性保護基を用いて、天然物のみならず非天然型の同族体も合成できれば、合成による構造確認や詳細な生物活性試験の実施、さらには作用機序の解明などの創薬研究に大きく貢献できるだけでなく、ペプチド以外の複雑な天然物あるいは糖鎖合成へ広く用いることができる実用的な合成手法を提供できるはずである。このことを明らかにすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために以下の(1)から(3)の検討を行った。

(1)新しい疎水性保護基の開発

グラッシィペプトリド類を化学的合成する上で、アミノ基、カルボキシ基およびヒドロキシ基の保護は必須である。その際、脱保護条件の異なる種々の疎水性保護基の開発は多官能性の化合物の合成に利用する上で重要な検討項目である。そこで、アミノ基の保護基として汎用されている *t*-ブトキシカルボニル(Boc)基と 9-フルオレニルメトキシカ

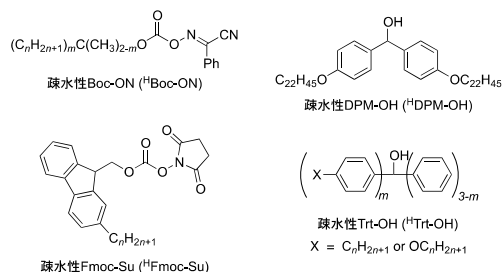


図2 疎水性保護化剤

ルボニル(Fmoc)基、ヒドロキシ基の他、チオール基やカルボキシ基の保護基として利用されるトリチル(Trt)基とジフェニルメチル(DPM)基に長鎖アルキル基(C₁₈H₃₇, C₂₂H₄₅等)を1~3本導入した疎水性 Boc、Fmoc、Trt ならびに DPM 化剤(図2)の合成とそれらが保護基としての性質を維持しつつ、フェイズタグとして機能するかを検討する。

(2) 疎水性保護基のミックチャー合成への利用の可否の検討

グラッシィペプチド類はアミノ酸残基が異なるだけでなくアミノ酸残基の立体配置が逆のジアステレオマーが見いだされており、これらを合成する上では、スプリット法やミックチャー合成法が有効であると考えられる。とりわけ、フルオラスミックスチャー合成と同様の方法論で疎水性タグを用いて一挙に同族体の合成を行うことができれば、フルオラスミックスチャー合成法と比較して多種類の試料を安価で比較的大量に供給できるはずである。そこで、L-およびD-アミノ酸誘導体に長鎖アルキル基の数が異なる保護基を導入し、これらの TLC での分離挙動等を観察して疎水性保護基を用いたミックチャー合成の可否について検討を行う。

(3) 疎水性保護基を用いたグラッシィペプチド F の迅速合成の検討

前述の新規疎水性保護基を用いてグラッシィペプチド F の迅速合成の検討を行う。その合成計画は次のようなものである。2つのチアゾリン環に隣接するキラル中心は非常にラセミ化しやすいため、最終段階で構築することとし、まず、その前駆体となる環状デプシペプチドを合成する。環状デプシペプチドは、大きな2つのフラグメント A と B を連結後、両末端の保護基を除去し、マクロ環化することで得られる。フラグメント A は、2つのシステインのチオール基に疎水性 Trt 基を導入し、適切な縮合剤を用いて Fmoc ストラテジーでペプチドフラグメントを調製する。フラグメント B はプロリン疎水性 DPM エステルから Fmoc 基を用いた N 端伸長法で得る(図3)。この合成では、各合成段階の疎

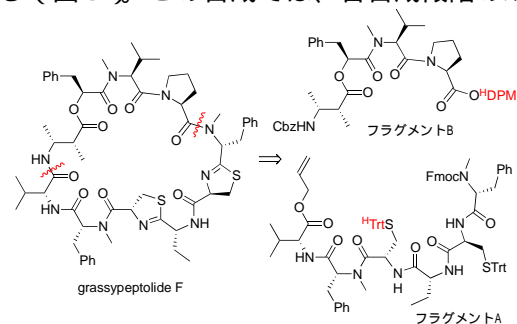


図3 グラッシィペプチドFの合成計画

水性保護基を有する生成物は反応溶液に極性溶媒を加えることで析出させるか、あるいは ODS SiO₂ を用いた固相抽出(SPE)によって簡単・迅速に分離できることからシリカゲル

カラムクロマトグラフィー精製をすることなく(必要な場合は、一般的な有機化合物と同様に精製することもできる)反応を進めることができる。したがって、有機合成で多くの時間と労力を費やしている分離・精製を大幅に省略できることから迅速に目的化合物を入手できることになる。

4. 研究成果

上記の方法(1)から(3)を検討した結果、以下の成果が得られた。

(1) 疎水性 Boc 化剤については、オクタデシル基を1~3本有する三級アルコールを調製し、これらとクロロギ酸誘導体の反応で合成を検討した。その結果、オクタデシル基が1本の保護化剤(¹¹Boc-ON)は好収率で、オクタデシル基を2本持つ保護化剤(¹²Boc-ON)は低収率ながら得ることができたが、3本のは立体障害のためか全く得ることができなかった。得られた¹¹Boc-ON ならびに¹²Boc-ON によりアミノ酸の α -アミノ基は保護され、酸により脱保護も行えた。さらにペプチド合成に利用できることを明らかにした。また、¹¹Boc 保護体は ODS-SPE で簡便に非保護体と分離された。疎水性 Fmoc 化剤は、2-ホルミルフルオレンから Wittig 反応を利用してフルオレン環の2位にノナデシル基を導入した Fmoc 化剤(¹¹Fmoc-OSu)の合成を行うとともに先の疎水性 Boc 基と同様に保護基として機能するばかりでなく、保護体が ODS-SPE で分離できることを示すことができた。ついで、疎水性 Trt 基はノナデシル基を1本およびオクタデシルオキシ基を2本導入したトリチルアルコール誘導体(¹¹Trt-OH)の合成を行った。(4-ノナデシルフェニル)ジフェニルメタノールの塩素化は円滑に進行し、保護化剤となる塩化物を得ることができた。一方、ビス(4-(オクタデシルオキシフェニル))フェニルメタノールの塩素化は対応する塩化物は得られず、原料が回収された。ここで得られたノナデシル化トリチルクロリドを用いていくつかの第一級アルコールの保護について検討を行ったところ、単純なアルコールには収率良く導入できるものの糖誘導体の6位ヒドロキシ基への導入収率は中程度であった。さらに疎水性 Trt 保護基は TFA 処理によって除去でき、保護体は ODS-SPE で非保護体と簡便・迅速に分離されることを確認した。一方、4,4'-ジドコシルオキシジフェニルメタノール(¹¹DPM-OH)を合成し、Fmoc-プロリンのエステル化を行った。その結果、対応するエステルは得られるものの疎水性タグとして導入したアルコキシ基の影響で非常に酸に鋭敏になったおり、シリカゲルの酸性程度で脱保護されてしまうため保護基として機能しないことが判明した。

(2) 疎水性保護基のミックチャー合成への利用の可否を検討するために、先に得られた

¹H¹Boc 基と ²H²Boc 基を用いてオキサゾールアミノ酸エステルとのミックスチャー合成を検討した。²H²Boc-L-Ala と ¹H¹Boc-D-Ala を合成し、これらを等モルずつ混合した。ついで、L-Thr メチルエステルと BOP で縮合を行った。反応をシリカゲル TLC で確認すると、2 つの生成物が確認された。生成物を ODS-SPE で分離後、常法にしたがって Deoxo-Fluor 処理によりオキサゾリン環を形成後、BrCCl₃ と DBU を反応させてオキサゾールアミノ酸エステルへ誘導した (図 4)。TLC では目的物の 2 つのメインスポットは確認されたが、複数の副生成物

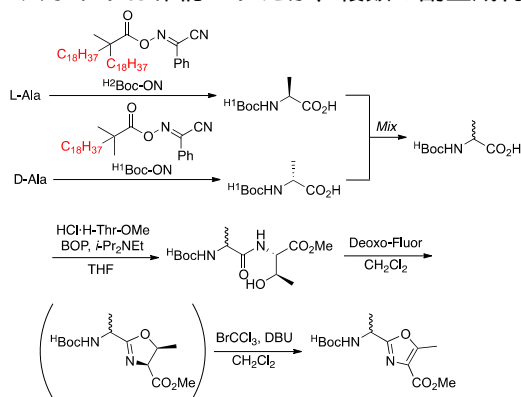


図 4 オキサゾールアミノ酸エステルのミックスチャー合成

も生成しており、ODS-SPE では分離できなかった。以上のことから、長い炭化水素鎖の数の違いによって ODS シリカゲル TLC だけでなくシリカゲル TLC においても分離されてしまうため反応の追跡が困難であること、さらにシリカゲルカラム精製が必要な場合、疎水性保護基の混合物も分離されてしまうためなどの理由から混合物で反応を行うメリットが希薄であると考えられる。したがって、鎖長もしくは鎖数が異なる疎水性保護基の混合物での多段階合成は不可能ではないが、効率的な合成法とはならないと判断するに至った。

(3) グラッシィペプチド類の迅速かつ効率的な合成を行うために、疎水性のトリチル (⁴Trt) 基を用いて、グラッシィペプチド類を構成する 2 つのチアゾリン環を含むテトラペプチドの合成について検討を行った。ただし、オクタデシルシリル(ODS)シリカゲルを用いた固相抽出(ODS-SPE)もしくは極性溶媒を添加することにより結晶として析出させて保護体と非保護体の分離を行う際の効率を高めるためにトリチル基に長鎖アルキル基としてドコシルオキシを 2 本導入することにした。まず、保護剤となる 4,4'-ジドコシルオキシトリチルアルコールは、4,4'-ジヒドロキシベンゾフェノンをプロモドコサンでジアルキル化後、臭化フェニルマグネシウムで処理することにより収率よく得ることができた。ついで、N-Fmoc-システインアシルエステルにジクロロメタンとジクロロメタン中で、保護剤と反応させると対応する S-疎水性 Trt 保護体が高収率で得られた。さらに Fmoc ストラテジーで N 末端側に

Fmoc-D-アミノブタン酸、Fmoc-S-Trt-システイン、Fmoc-D-N-メチルフェニルアラニンを経順次縮合し、テトラペプチドを合成した。この際、ODS-SPE だけでなく ⁴Trt 保護合成中間体は反応混合物にアセトニトリルを加えることにより結晶として析出させて吸引する過程によって分離することができ(6 工程収率 63%、カラム精製なし) 迅速に目的とするテトラペプチドを比較的大量に合成できることを明らかにした。また、テトラペプチドをジクロロメタン中、Hendrickson 試薬で処理することによりチアゾリン化を行うと、目的化合物であるグラッシィペプチド類共通ビスチアゾリン体を 57% で得ることに成功した (図 5)。

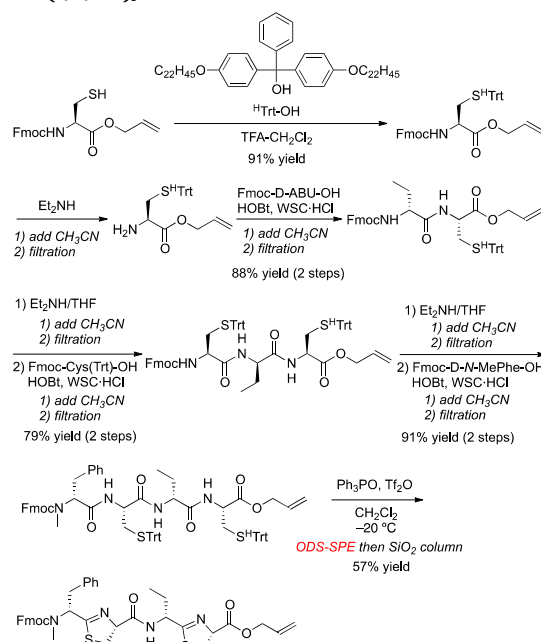


図 5 グラッシィペプチド類の共通骨格の合成

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中村 豊、斎藤立樹、石田京夏、風間瑞月、小島 勝、疎水性タグ法を用いる Grassypeptolide 類の合成研究、第 68 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(新潟シンポジウム)、2014 年 11 月 30 日、新潟大学五十嵐キャンパス

中村 豊、植物由来機能性物質の全合成研究、有機合成化学協会関東支部ミニシンポジウム湘南 2015、2015 年 6 月 27 日、東海大学湘南キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www12.plala.or.jp/environ_org_chem/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 豊 (NAKAMURA Yutaka)
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授
研究者番号：20267652

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

宮腰麻美 (MIYAKOSHI Asami)
赤塚厚太 (AKATSUKA Kota)
小林一也 (KOBAYASHI Kazuya)
斎藤立樹 (SAITO Tatsuki)
石田京夏 (ISHIDA Kyoka)