

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288050

研究課題名(和文)水中バイオインスパイアード反応を駆使した生物活性アルカロイドの化学的研究

研究課題名(英文) Synthetic study of biologically active alkaloids using bio-inspired reactions

研究代表者

石川 勇人 (ISHIKAWA, HAYATO)

熊本大学・大学院先端科学研究部・准教授

研究者番号：80453827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの有機合成反応は、有機溶媒中で反応を行うのが常であった。一方、自然界では生体成分である水を溶媒として、様々な有用有機化合物(天然物)を作り出している。今回、我々はこの水溶媒に着目し、生体内で行われている化学反応をフラスコ内に取り出すことに成功した。標的とした天然物は、細菌由来のアルカロイド群である。種々検討の結果、数多くのアルカロイド類を網羅的かつ短工程で化学合成するに至った。得られた天然物ライブラリーの幅広い生物活性試験を行い、抗がん剤および動脈硬化治療薬となるリード化合物を見いだすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：A concise two one-pot synthesis of tryptophan-based dimeric diketopiperazine alkaloid is detailed based on a unique bioinspired dimerization reaction of tryptophan derivatives in aqueous acidic solution and one-pot procedure for construction of diketopiperazine rings. Total yields of these alkaloid syntheses were from 10% up to 27%. The studies detailed herein provided synthesized natural products for inhibitory activities of ubiquitin-specific protease 7 (USP7) and foam cell formation in macrophages. The newly listed biological evaluation for tryptophan-based dimeric diketopiperazine alkaloids discovered 15,15-bis-epi-eurocristatine, 1-(2-phenylethylene)-ditryptophenamine, and WIN 64745 as new drug candidates.

研究分野：有機合成化学

キーワード：バイオインスパイアード反応 水中反応 アルカロイド 全合成 ワンポット反応 ジケトピペラジン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

有機合成化学分野において活発に研究されている天然物全合成研究では、有機溶媒中で反応を行ない、反応性の高い官能基は保護基を用いてその活性を失活させ、順次フラグメントを構築していく手法が常法となっている。これまでも数多くの新規反応が見出され、それらを利用した有用天然物の全合成が達成されてきた。その中には医薬品へと応用されたものも少なくない。一方で、自然界に目を向けると、フラスコ内で用いられるような人工的な保護基は存在せず、反応溶媒として有機溶媒が使われることはない。すなわち、自然界では、主に水中で、酵素を巧みに用いて天然物を作り出している。このようにして作り出される天然物の中には、人類にとって有益な生物活性を持つものが数多く知られている。近年、急速な発展を見せている遺伝子工学によって、自然界における天然物生成経路の解明が一気に進んだ。それらの知見から、自然界で行われている生合成経路は極めて効率的であり、人工的な化学合成への応用に大きな期待が寄せられている。しかしながら、生体内酵素反応の理解が不十分であるため、人工的にフラスコ内で再現する事は、現代科学を持ってしても容易ではない。加えて、自然界と同様に有機合成反応を水中で進行させるためにはいくつかの課題を乗り越えなければならない。一つは有機化合物の溶解性の問題である。通常有機合成で取り扱われる有機化合物は脂溶性が高く、水への溶解度は極めて低い。もう一つの問題点は、水そのものが求核性、求電子性を有するため、基質や試薬と反応してしまうことである。これらの問題点を解決できれば、完全水中バイオインスパイアード反応を確立することができる。(バイオインスパイアード反応とは生物から着想を得た有機合成反応を指す。)

### 2. 研究の目的

先に述べたように、生物は極めて効率的な化学合成を、水中で酵素を巧みに用いて行なっている。筆者らは、自然界と同様に完全水中で化学反応を行い、有用天然物の短段階全合成を目指した。有機化合物を水に溶解させる工夫は、自然界から導き出した。自然界では、代謝によって有機化合物を脂溶性から水溶性へと転換し、化学反応に用いている。すなわち、酸や塩基による塩形成、水溶性の高い多糖類の付加、グルクロン酸抱合や多重リン酸化などにより、極性官能基を分子内に付加し、水溶性を獲得している。従って、上述したような官能基化を反応基質に施せば、望む水中バイオインスパイアード反応が行えると考えた。一方、水そのものの反応性は懸念事項として残るものの、今日発展してきた有機合成反応が、人工的かつ極めて反応性の高い基

質や反応剤を用いていることから、自然界で用いられているような化合物を試薬や反応剤として選定すれば、この問題も解決できると考えた。

本研究において、標的とする天然物群はアルカロイドである。アルカロイドとは、窒素原子を分子内に含む天然物の総称であり、その多くは、窒素原子の不對電子に由来した塩基性を示す。その生産生物は動物、植物、細菌と多岐にわたり、数多くの生物活性アルカロイドが単離、報告されている。今回、我々は、水中バイオインスパイアード反応を独自に開発し、Figure 1 に示すトリプトファン由来生物活性アルカロイド類の短工程かつ網羅的な全合成を目的とした。

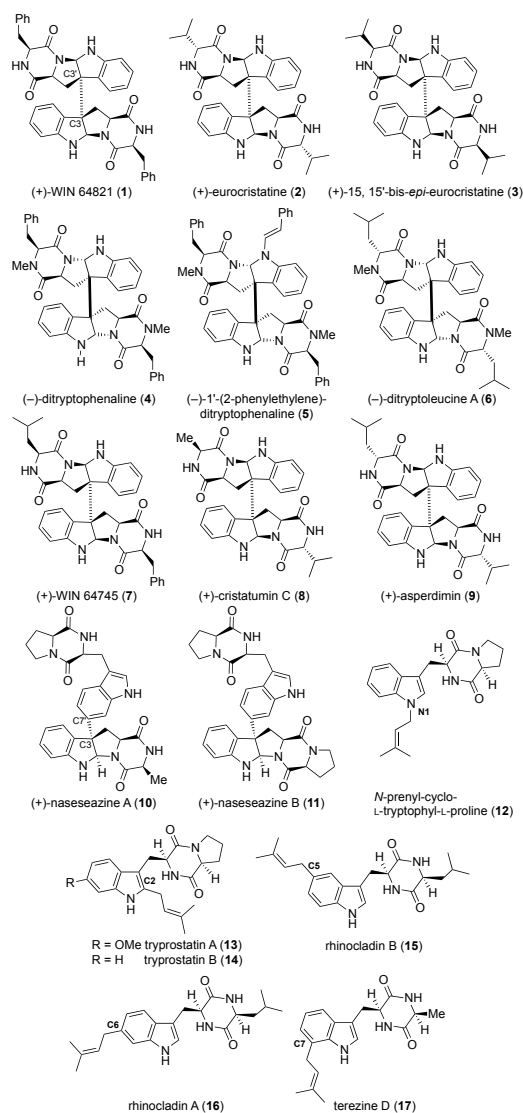


Figure 1. tryptophan based diketopiperazine alkaloids

### 3. 研究の方法

上述の研究目的を達成するため、トリプトファンエチルエステル(18)を基質とし、様々な酸性水溶液中、有機合成反応を行った。トリプトファンエチルエステル(18)は1級アミン部位を持つため、酸性水溶液中、塩となり水に溶解する。二量体型アルカロイドの合成は、水に可溶かつ水和されてい

る金属一電子酸化剤を選択し、トリプトファン<sup>1</sup>の直接的二量化反応を試みる。その後、対応するアミノ酸との脱水縮合、ジケトピペラジン環形成反応により **1**~**11** の天然物へ導く。さらに、このジケトピペラジン形成反応をワンポット反応へと展開し、網羅的に天然物を合成する。続いて、合成した天然物ライブラリーを共同研究により生物活性試験を行い、新しい医薬品のリード化合物とする。プレニル化インドールアルカロイド **12**~**17** の合成は水に可溶なプレニル化剤としてジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) を合成し、トリプトファンエチルエステル (**18**) を基質としてバイオインスパイアード水中プレニル化反応を開発する。開発したプレニル化反応を鍵工程として、天然物の全合成へ展開する。その際、工程数の簡略化、プロセス化学への応用を考慮に入れ、ワンポット反応を駆使する。

#### 4. 研究成果

最初の合成標的はトリプトファン由来二量体型ジケトピペラジンアルカロイド群である (Figure 1, **1**~**11**)。本アルカロイド群の生合成を考慮すると、トリプトファンのインドール環部位にラジカルが生じた後、二量化していることが推測された。上述したように、本提案では、生体成分である水を溶媒とするため、トリプトファンエチルエステル (**18**) のアミンの塩基性を利用し、様々な酸と塩を形成させたのち、水に可溶な金属一電子酸化剤の検討を行った (Table 1)。その結果、3 価のマンガンをある酢酸マンガ、5 価のバナジウムである三フッ化酸化バナジウム及び酸化バナジウムを用いた際に、望む反応が進行することを見出した。なお、添加剤として様々な酸を検討した結果、いずれの場合もメタンスルホン酸 (pKa -2.6) が最適であった。酢酸マンガ及び三フッ化酸化バナジウムを酸化剤に用いた場合には、ヘテロ二量体である **21** が主成分として 28% 得られた。**21** の絶対立体配置は、天然物であるナセセアジン A (**10**) もしくは B (**11**) と同様の立体である。一方で、酸化バナジウムを酸化剤として用い

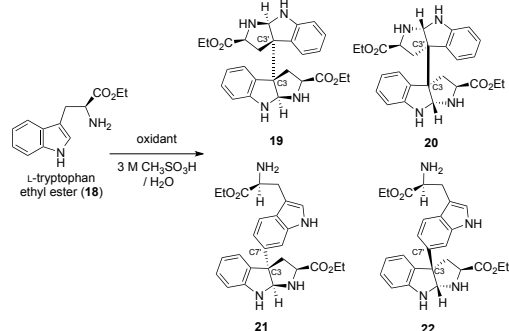
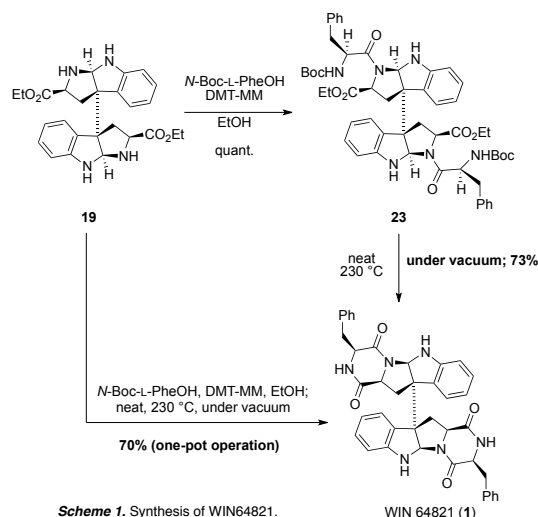


Table 1. Bioinspired dimerization reaction in water

entry	oxidant (equiv.)	temp. [°C]	time	yield [%]				recovered <b>18</b>
				<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	
1	Mn(OAc) <sub>3</sub> (1.5)	0	40 min	19	11	28	21	4
2	VOF <sub>3</sub> (1.5)	-10	30 min	19	11	28	24	8
3	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (0.55)	-15	126 h	28	28	14	10	0

た場合には、反応は低温条件下、徐々に進行し、対称構造をもつ二量体 **19** 及び **20** が主生成物として、それぞれ 28% で得られた。**19**、**20** は、天然物 **1**~**10** の合成前駆体である。また、いずれの反応も 10 グラムスケールでも再現よく進行した。

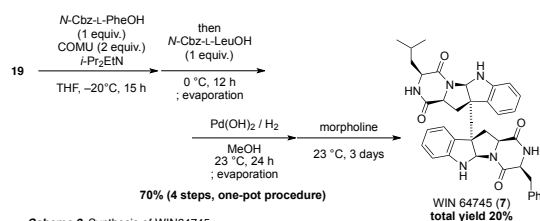
鍵となる中間体を簡便に合成することに成功したため、標的アルカロイド群の網羅的全合成研究へ移行した。これらアルカロイド類は、いずれも 2 つのアミノ酸から形成されるジケトピペラジン環構造を有している。そこで、独自にジケトピペラジン環形成反応を開発し、さらに、ワンポット反応へと展開することにした (Scheme 1)。完全な対称構造を持つ WIN64821 (**1**) の合成を例に開発した方法について述べる。WIN64821 (**1**) は、バイオインスパイアード反応で合成した **19** に 2 つのフェニルアラニン<sup>2</sup> を縮合し、続いてジケトピペラジン環を構築すれば得られる。そこで、脱水縮合には国嶋らにより開発された 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) を選択し、エタノール中で縮合反応を行った。続く、Boc 基の除去とジケトピペラジン形成反応は、種々条件検討の結果、無溶媒条件下、真空を維持した状態で 230 度に加熱することで達成され、高収率で **1** を与えた。この 2 段階反応をワンポット反応へと展開したところ、反応は問題なく進行し、最終的に **19** から収率 70% で **1** を得ることに成功した。トリプトファンエチルエステル (**18**) からの総収率は 20% であり、効率的な全合成となっている。



Scheme 1. Synthesis of WIN64821.

一方、天然物の中には完全な対称構造ではなく、中間体 **19** 及び **21** に 2 つの異なるアミノ酸が縮合し、ジケトピペラジン環を形成した化合物が存在する (Figure 1, **7**~**10**)。そこで、これらアルカロイド類の網羅的合成を目指し、2 つの異なるアミノ酸を連続的に縮合するワンポットジケトピペラジン環形成反応を開発することにした (Scheme 2)。様々な縮合剤の検討の結果、

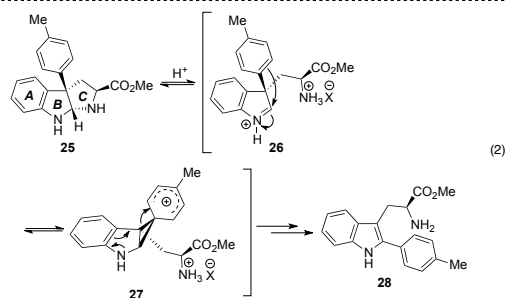
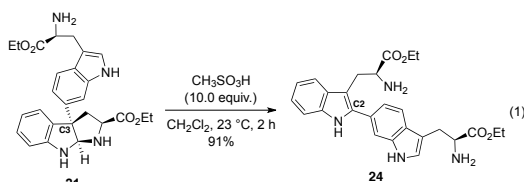
(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylaminomorpholinocarbenium hexafluorophosphate (COMU)が最も良好な結果を与えた。すなわち、基質 **19** を溶解した THF 溶液に 1 当量の *N*-Cbz-フェニルアラニンと 2 当量の COMU を加え、 $-20$  度で非対称化した後、1 当量の *N*-Cbz-ロイシンを加えて昇温するとビスアミド体が収率良く得られる。溶媒を減圧留去し、続けて水素添加反応、塩基によるジケトピペラジン形成を行うと、目的とする WIN 64745 (**7**) が 4 段階、ワンポット収率 70% で得られた。この全合成は市販のトリプトファンエチルエステル (**18**) から 2 つのワンポット反応、総収率 20% である。これまでの合成例に比べても、引けを取らない効率的な合成法とすることができた。



Scheme 2. Synthesis of WIN64745.

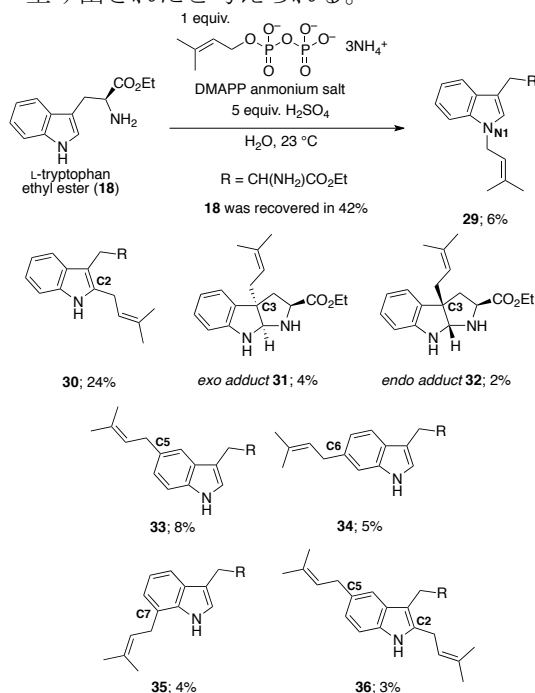
以上の開発した方法論を駆使して、これまでに天然より見出されているトリプトファン由来二量体型ジケトピペラジンアルカロイド類の網羅的全合成を行った。いずれの合成も 2 ポット反応で合成することができ、現在までに、Figure 1 に示す 11 種 (**1**~**11**) の天然物および類縁体の全合成を完了した。さらに、得られた天然物ライブラリーの生物活性試験を行った結果、これまでに報告例のない、抗がん剤として期待される USP7 阻害活性や、動脈硬化改善作用が期待されるマクロファージ泡沫化阻害活性を持つ分子を見出した。

一方、上述した研究の過程でヘテロ二量体 **21** を有機溶媒中、メタンスルホン酸で処理した際に、特異な芳香環転位反応を見出した (式 1)。すなわち、ピロリジノインドリン骨格の C3 位に結合したインドール環が C2 位へ転位する反応である。この反応の反応機構に関して興味を持ち、様々な基



質で検討を行なった結果、本反応はシクロプロパン中間体を経由して、位置選択的に進行することが示唆された (式 2)。加えて、幅広い基質一般性を有していることも明らかとなった。

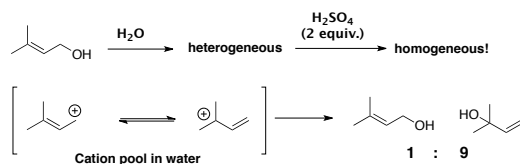
続いて、インドールプレニル化反応の開発について述べる。研究方法で述べたように我々は DMAPP を別途合成し、酸性水溶液中でトリプトファンエチルエステル (**18**) と攪拌した。すなわち、それぞれ 1 当量の **18** と DMAPP を 5 当量の硫酸水溶液中で反応を行った (Scheme 3)。その結果、酵素が存在しなくてもインドールプレニル化反応が進行し、N1-プレニル体 **29** を 6%、C2-プレニル体 **30** を 24%、C3-プレニル体 **31** 及び **32** を 6% (エキソ付加体 **31**; 4%、エンド付加体 **32**; 2%)、C5-プレニル体 **33** を 8%、C6-プレニル体 **34** を 5%、C7-プレニル体 **35** を 4% で得ることに成功した。この結果から、インドールのプレニル化反応には必ずしも酵素が必要ないことが明らかとなった。これまでプレニル化反応は酵素による疎水場が必要であると信じられてきた反応であり、その常識を覆す反応であると考えている。また、生命の進化において、元々存在していた天然物を生命が利用するために酵素が生み出されたと考えられる。



Scheme 3. Bioinspired indole prenylation reaction.

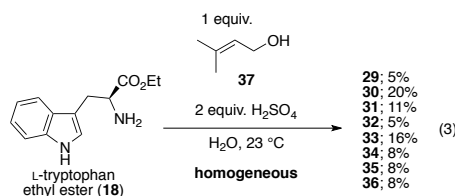
一方で、DMAPP は酸性水溶液中で速やかに加水分解されて、プレニルアルコール (**37**) へと変換される懸念があった。プレニルアルコール (**37**) と水を混ぜ合わせると完全にエマルジョン (二層) になる。上記反応が完全均一系で進行していたため、プレニルアルコール (**37**) への変換は当初疑っていなかった。しかしながら、酸性水溶液中でプレニルアルコール (**37**) が水に溶ける可能性が残っていたため検討を行っ

た。興味深いことに、エマルジョンを形成していたプレニルアルコール (37) は1当量の硫酸を添加すると完全均一系になることが明らかとなった (Scheme 4)。この事実は硫酸水溶液中でプレニルアルコール (37) がオキソニウムカチオン等価体として存在し、生体成分である水に溶解していることを示す。実際に1時間酸性水溶液中に暴露したプレニルアルコール (37) は水酸基の転位反応により3級アルコールへと平衡反応が偏っていることが明らかとなった。

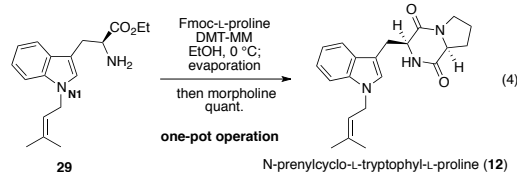


Scheme 4. Prenyl cation in acidic water

以上の結果から、我々が先に行ったインドールプレニル化反応は、反応系内でプレニルアルコール (37) が生じ、プレニルカチオンとなった後、インドール環上でFriedel-Craft アルキル化反応が起きていることが強く示唆された。そこで、DMAPPの代わりにプレニルアルコール (37) を用いて反応を行った (式 3)。その結果、予想通りプレニルアルコール (37) を求電子剤として用いた場合にも DMAPP と同様にインドールプレニル化体 29~36 が得られることを見出した。



以上の結果により得られた鍵中間体 29~35 を用いて、プレニル化インドールアルカロイド類の網羅的全合成を行なった。例としてN-プレニルシクロトリプトフィルプリン (12) の合成を示す (式 4)。29 は Fmoc 基を保護基にもつアミノ酸と DMT-MM を用いた縮合反応、続く、塩基によるジケトピペラジン環形成反応により、高収率で 12 へ変換した。同様のジケトピペラジン形成反応を駆使し、これまでに、Figure 1 に示すトリプロスタチン A (13) 及び B (14)、リノクラディン A (16) 及び B (15)、タゼチン D (17) の全合成を達成した。



## 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 17 件)

- ① Shinji Tadano, Yuri Mukaeda, Hayato Ishikawa, Bio-Inspired Dimerization Reaction of Tryptophan Derivatives in Aqueous Acidic Media: Three-Step Syntheses of (+)-WIN 64821, (-)-Ditryptophenaline and (+)-Naseseazine B, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有り, 52 巻, 2013 年, pp. 7990-7994.
- ② Shinji Tadano, Hayato Ishikawa, Synlett, 査読あり, 25 巻, 2014 年, pp. 157-162.
- ③ Shinya Shiomi, Erika Sugahara, Hayato Ishikawa, Efficient Organocatalytic Construction of C4-Alkyl Substituted Piperidines and Their Application to the Synthesis of (+)- $\alpha$ -Skytanthine, *Chemistry A European Journal*, 査読あり, 21 巻, 2015 年, pp. 14758-14763.
- ④ Shinji Tadano, Yukihiro Sugimachi, Michinori Sumimoto, Sachiko Tsukamoto, Hayato Ishikawa, Collective Synthesis and Biological Evaluation of Tryptophan-based Dimeric Diketopiperazine Alkaloids, *Chemistry A European Journal*, 査読あり, 22 巻, 2016 年, pp. 1277-1291.
- ⑤ Kazuki Urakawa, Michinori Sumimoto, Mitsuhiro Arisawa, Masaki Matsuda, Hayato Ishikawa, Redox Switching of Orthoquinone-Containing Aromatic Compounds with Hydrogen and Oxygen Gas, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有り, 55 巻, 2016 年, pp. 7432-7436.
- ⑥ Hayato Ishikawa, Shinya Shiomi, Alkaloid Synthesis using Chiral Secondary Amine Organocatalysts, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読あり, 14 巻, 2016 年, pp. 409-424.
- ⑦ Shinji Tadano, Hayato Ishikawa, Acid-Mediated Aryl Migration Reaction of C-3 Aryl Substituted Pyrrolidinoindolines, *Tetrahedron Letters*, 査読あり, 58 巻, 2017 年, pp. 5-8.

[学会発表] (計 67 件)

- ① 只野慎治、迎田友里、石川勇人、水中でのバイオインスパイアード反応を利用した WIN 64821、ジトリプトフェナリン、ナセセアジン B の 3 段階合成、第 23 回 万有福岡シンポジウム、2013 年 6 月 1 日 (土) 九州大学

- ② 石川勇人、只野慎治、迎田友里、水中バイオインスパイアード反応を鍵工程とする二量体型ジケトピペラジンアルカロイド類の短段階合成、第55回 天然有機化合物討論会、2013年9月20日（金）同志社大学寒梅館
- ③ 只野慎治、石川勇人、合成化学的手法によるジトリプトロイシンA、BおよびクリスタチュミンCの構造決定、日本薬学会第134年会、2014年3月28日（日）熊本大学
- ④ 石川勇人、生物に倣うインドール酸化反応を用いた生物活性アルカロイドの全合成、日本薬学会第134年会 シンポジウム、「薬学における生命指向型化学（生命現象解明を加速する統合的アプローチを探る）」、2014年3月30日（日）ホテル日航熊本
- ⑤ 石川勇人、直接的骨格構築反応を利用する生物活性化合物の短段階合成、第31回有機合成化学セミナー、2014年9月18日福岡県志賀島国民休暇村
- ⑥ 石川勇人、全合成におけるバイオインスパイアード反応と不斉有機触媒反応の利用、平成26年度 後期（秋期）有機合成化学講習会、2014年11月20日 日本薬学会会長井記念ホール
- ⑦ 石川勇人、Synthetic Study of Alkaloids Using Asymmetric Organocatalytic Reactions、第95回日本化学会春季年会、2015年3月26日 日本大学
- ⑧ Hayato Ishikawa, Synthetic Study of Biologically Active Piperidine Alkaloids using Asymmetric Organocatalytic Reactions, Pacificchem 2015, 2015年12月18日 Hilton Hawaiian Village (Hawaii, USA)
- ⑨ 石川勇人、有機合成におけるバイオインスパイアード反応と有機触媒反応、第26回 万有福岡シンポジウム、2016年4月23日 九州大学

〔図書〕（計 2件）

- ① Asymmetric Synthesis II: More Methods and Applications; Edited by Mathias Christmann, Stefan Brase, WILEY-VCH, 2013, Chap. 9, Total Synthesis of Oseltamivir and ABT-341 Using One-Pot Technology, Hayato Ishikawa and Yujiro Hayashi, pp. 61-66.
- ② 有機触媒の化学（CSJ カレントレビュー-22）化学同人、2016、Part II 研究最前線、Chapter 18、pp.195、有用物質（医薬品等）への応用、林雄二郎、石川勇人

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2件）

名称：レドックススイッチング材料、並びに、当該レドックススイッチング材料を利用したデバイスおよび当該デバイスの運転方法

発明者：石川勇人、松田真生、隅本倫徳

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：特願 2016-139608

出願年月日：2016年7月14日

国内外の別：国内

名称：植物成長抑制剤、およびそれを用いた植物成長抑制方法

発明者：石川勇人、石田喬志、澤進一郎、谷時雄

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：特願 2017-20616

出願年月日：2017年2月7日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~ishikawa/ishikawa-lab/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川勇人 (ISHIKAWA HAYATO)

熊本大学・大学院先端科学研究部・准教授  
研究者番号：80453827

(2) 研究分担者

高山廣光 (TAKAYAMA HIROMITSU)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号：90171561