

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510289

研究課題名(和文) 有糸分裂阻害天然物ニグリカノシド類とその多様な人工類縁体の合成研究

研究課題名(英文) Synthetic Studies on Anti-Mitotic Natural Products, Nigricanosides, and Their Artificial Analogues for Biological Evaluation

研究代表者

藤原 憲秀 (Fujiwara, Kenshu)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20222268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

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、がん細胞の有糸分裂を強力に抑制する。一方、その生産量が少なく立体化学も不明であり、詳細な生物学的研究が滞っている。そこで、立体化学を解明し、生物学的研究に役立てるため、ニグリカノシド類とその人工類縁体の合成を検討した。その結果、エーテル結合部の統一的構築法の開発と数種の人工類縁体の合成に成功した。

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 inhibition against cancer cells due to their anti-mitotic activity. 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 chemical synthesis of artificial analogues of nigricanoside A dimethyl ester. As a result, a common method for the construction of the two ether linkages has been established, and several artificial analogues have been synthesized.

研究分野：有機合成化学

キーワード：天然物合成化学 有糸分裂阻害 ニグリカノシド 人工類縁体 有機化学 立体選択的合成 グリセロ糖脂質 エーテル化合物

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 Andersen 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こと(IC₅₀ ~ 3 nM、表1)が報告されている(引用文献)。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産生量が少ないため(1.5 ~ 3.0 × 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。

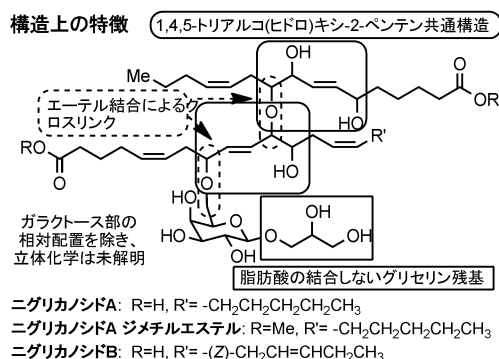


図1

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(引用文献)。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。

また、モデル化合物を用いた先行研究において(平成21年度~23年度基盤研究(C)、課題番号:21510218)、ニグリカノシド類のガラクトグリセロール部と下側脂肪酸鎖のエーテルクロスリンク部分の立体選択的構築に成功している。このモデル化合物(4種類)と天然物のNMRの比較から、天然物がD-ガラクトース、(R)-グリセロール、(8'S)-のエーテル結合部を持つことが判明している。一方、モデル合成に低収率の段階があるため、その改善が課題として残った。さらに、これらモデル化合物の生物活性も未調査であり、ニグリカノシド類の生物活性の構造要因の解明の一環として、その検討も課題として残った。

<引用文献>

D. E. Williams, C. M. Sturgeon, M. Roberge, R. J. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, (18), 5822-5823.
 A. Goto, K. Fujiwara, A. Kawai, H. Kawai, T. Suzuki, *Org. Lett.* **2007**, *9*, (26), 5373-5376.
 K. Fujiwara, K. Tanaka, Y. Katagiri, H. Kawai, T. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, (34), 4543-4546.

2. 研究の目的

ニグリカノシド類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。さらに、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、活性と構造の相関を調査するため、多様な構造の人工類縁体の合成を行う。

3. 研究の方法

研究課題完遂までの方法を以下(1)~(4)に示す。本申請課題では、(1)について重点的に検討し、一部(4)を調査した。

(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 ~ の手順に従う。

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。

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。

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。

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。

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。

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)上記(1)で立体化学を調査する際に合成する化合物は、生物活性と構造の相関を調査する上でも重要な化合物となる。これらについて生物活性を調査する。

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 (図 2) を具体標的とした。

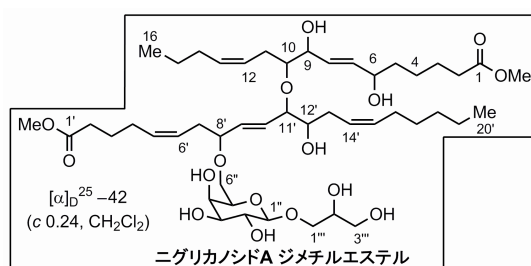


図 2

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 3)。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と予想される。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。

なお、1~4 は、先行研究 (平成 21 年度~23 年度基盤研究 (C), 課題番号: 21510218) において合成が成され、それぞれの ¹H NMR データと天然物の報告データとの比較も成されている。その結果、モデル化合物 1 が天然物と極めて良い一致を示すことが判明している。しかし、それぞれの合成に低収率の段階があるため、その改善が課題として残っていた。さらに、これら 1~4 の生物活性も未調査であり、その検討も課題として残っていた。そこで、まずこれらの課題解決を検討した。

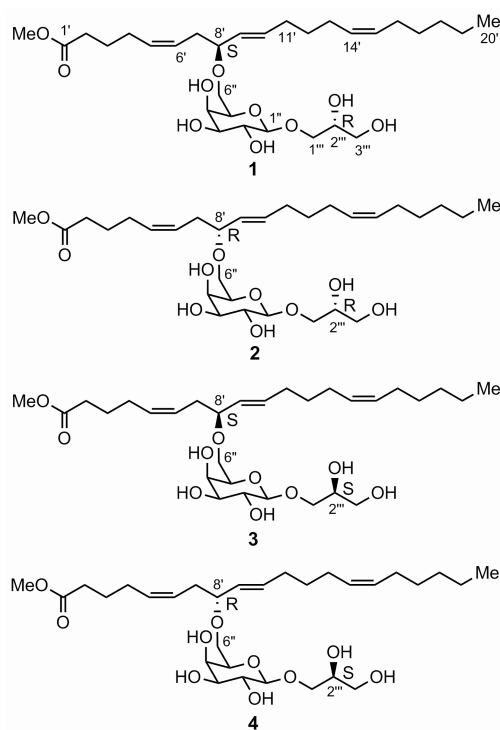


図 3

まず、合成の中盤で C10'-C20' に相当する部分を伸長する Julia-Kocienski 反応段階の低収率は、反応条件を最適化することで改善できた。

また、グリセロール部をガラクトース部に導入する段階は再現性が低く、収率の予測がつかないため、計画進行の障害となっていたが、原料のガラクトース誘導体の生成方法を変更して夾雑物を除くと、再現性良く良好な収率で目的物を与えることを見出した。

さらに、メチルエステル部の構築に際し、当初 *p*-メトキシベンジルエーテルから、一挙に脱保護、アルデヒドへの酸化、カルボン酸への酸化を行う方法を採用していたが、この段階も収率の再現性が低いことが判明した。そこで、脱保護と酸化を分離して実施することで再現性を向上させた。

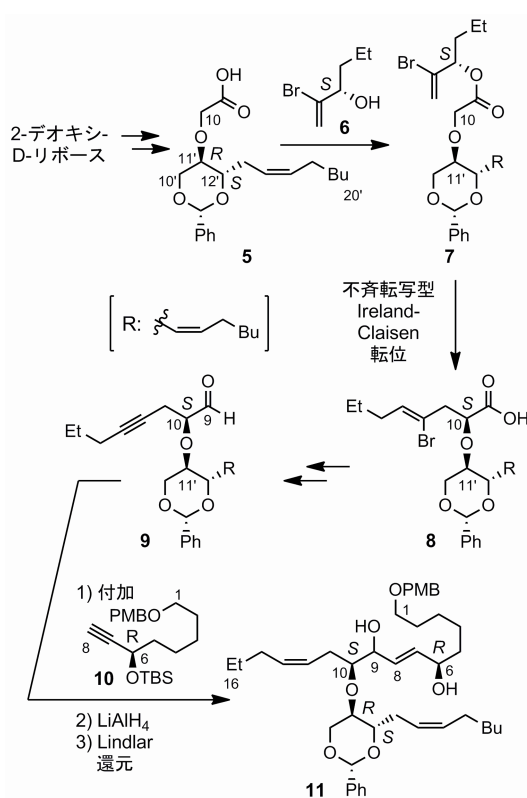
以上の変更により、化合物 1~4 を安定して合成することが可能となった。

次に、得られた化合物 1~4 の癌細胞に対

する増殖抑制活性を調査した。実際の調査は、専門の技術を要するため、青森県立保健大学栄養学科の講師・乗鞍敏夫博士に研究協力を依頼し、実現した。ヒト肝がん細胞 HepG2 を用いて、その増殖抑制の有無を調査したが、化合物 1~4 はいずれも 40 $\mu\text{mol/L}$ の濃度では活性を示さないことが判明した。これは、ニグリカノシド A ジメチルエステルが活性を示す濃度の 10,000 倍以上の濃度であり、それでも活性が発現しないことから、化合物 1~4 は活性発現の必要構造を満たしていないと判断された。

(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。

同部分は、先行研究(平成 21 年度~23 年度基盤研究(C), 課題番号: 21510218)において、Evans アルドール反応を利用した方法で構築可能なことを見出していた。しかし、その後の検討で、その方法は上部脂肪酸鎖骨格の全長を形成することに不向きであることが判明した。そのため、新たに同部分の構築方法を検討した。



同部分の構築法の検討に当たり、全合成に向けた鍵中間体の 1 つとして化合物 11 を設定し、その全体の合成も併せて検討した(図 3)。

原料として 2-デオキシ-D-リボースを用い、下部脂肪酸の 11' 位と 12' 位の不斉中心を R, S 配置として含むグリコール酸誘導体 5 を調製した。別途検討の末、光学活性なプロモアリルアルコール 6 の両対掌体の調製に成功し、(S)-6 と 5 を縮合してエステル 7 を得た。こ

れに対して Ireland-Claisen 転位を行うと、(S)-6 にあった不斉が転写して(10S)-配置のカルボン酸 8 のみを高収率で得ることが出来た。なお、R 体の 6 を用いると、(10R)-配置の 8 が得られることも確認している。これにより、ニグリカノシド A ジメチルエステルの 2 か所のエーテルクロスリンク部分について、統一的に不斉転写型 Ireland-Claisen 転位を用いる立体選択的構築法を確立することができた。

続いて、(10S)-8 のプロモアルケン部をアセチレンに、カルボン酸部をアルデヒドに変換して 9 を得た後、別途調製した光学活性な (R)-10 を付加させることで上部脂肪酸部の全長を構築することが出来た。さらに 7 位のアルキンをトランスアルケンに、12 位のアルキンをシスアルケンに変換し、上部脂肪酸部として必要な官能基を揃えることに成功した。

今後は (R)-10 の付加の際に不斉誘起することが課題となる。また、合成した 11 とガラクトシルグリセロール部を含む下部脂肪酸鎖の左側 (C1'-C9') との連結法の開発も今後の課題となる。これらの課題が解決されれば、全体構造の構築への道が拓かれるため、本科学研究費補助金における研究期間終了後も、検討を続ける予定である。

以上の様に、本申請課題では、ニグリカノシド A ジメチルエステル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の複数を合成する方法を改善し、生物活性試験に供給することを可能にした。一方、活性試験の結果、そのガラクトグリセロール部のみを含む単純な下部脂肪酸部は活性を示さないことが判り、最小活性発現構造の解明は今後に持ち越されることとなった。また、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、この段階にも不斉転写型 Ireland-Claisen 転位を利用する方法が有効であることを見出した。さらに、必要な官能基を揃えた上部脂肪酸鎖骨格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

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Naoto Kinashi, Kenshu Fujiwara, Takayuki Tsunoda, Ryo Katoono, Hidetoshi Kawai, Takanori Suzuki, "A stereoselective method for the construction of the C8'-O-C6'' ether of nigriganoside-A: synthesis of simple models for the C20 lipid chain/galactosyl glycerol segment", *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, (34), 4564-4567. 査読有,

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 藤原憲秀、角田隆幸、木梨尚人、上遠野亮、鈴木孝紀、「ニグリカノシド A の C10-0-C11' エーテル結合部の立体選択的構築の検討」、日本化学会第 95 春季年会講演要旨集 1J2-13、2015 年 3 月 26 日、日本大学船橋キャンパス/薬学部、船橋
- (2) 藤原憲秀、岡本 啓、角田隆幸、木梨尚人、上遠野亮、鈴木孝紀、「ニグリカノシド A ジメチルエステルの下部脂肪酸鎖モデルの合成研究」、化学系学協会北海道支部 2015 年冬季研究発表会 講演要旨集 P08、2015 年 1 月 28 日、北海道大学、札幌
- (3) 木梨尚人、藤原憲秀、上遠野亮、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脂肪酸鎖間エーテル部の構築」、日本化学会第 93 春季年会 講演要旨集 4C6-09、2013 年 3 月 25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、草津
- (4) 藤原憲秀、角田隆幸、木梨尚人、上遠野亮、鈴木孝紀、「ニグリカノシド A ジメチルエステルの下部脂肪酸鎖 グリセロ糖部の合成の検討」、化学系学協会北海道支部 2013 年冬季研究発表会 講演要旨集 P04、2013 年 1 月 30 日、北海道大学、札幌
- (5) 藤原憲秀、八巻太郎、高橋 拓、上遠野亮、鈴木孝紀、「1 級と 2 級の長鎖アルキル基を有する天然エーテル化合物の合成研究」、化学系学協会北海道支部 2013 年冬季研究発表会 講演要旨集 1A05、2013 年 1 月 29 日、北海道大学、札幌
- (6) 藤原憲秀、高橋 拓、八巻太郎、上遠野亮、鈴木孝紀、「ボツリオコッカス由来長鎖ジアルキルエーテル類の合成研究」、化学系学協会北海道支部 2013 年冬季研究発表会 講演要旨集 1A06、2013 年 1 月 29 日、北海道大学、札幌
- (7) 木梨尚人、藤原憲秀、上遠野亮、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」、第 54 回天然有機化合物討論会 講演要旨集 P-27、2012 年 9 月 18 日、東京農業大学世田谷キャンパス、東京

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

(3) 連携研究者

なし