

# 中分子環状ペプチドの有機合成から多様な生物活性への展開

東北大学薬学研究科

土井 隆行

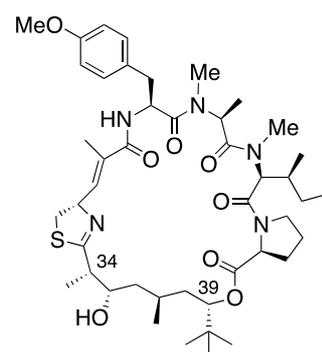
医薬品探索を目的とするコンビナトリアルライブラリーの合成は、これまで含ヘテロ環化合物を中心に行われてきた。しかし、これらを基にした化合物ライブラリーは医薬品探索に必要なケミカルスペースを十分にはカバーされないことが指摘されている。一方、天然の二次代謝産物から単離・構造決定される生物活性化合物は、非常にユニークな構造を有するものが数多くあり、それらを母骨格とする周辺化合物についてもたいへん興味を持たれる。通常天然物を基に誘導体を合成する際は、もともと存在する官能基を修飾することはできるが、その位置および種類は限られる。これに対し、天然物の骨格合成を基盤とし、合成ブロックを組み合わせで類縁体を合成するという化合物ライブラリーを構築できれば化合物の多様性を高めることができる。筆者は環状のペプチド化合物に非常に興味をもっている。その理由は、構造の多様性に優れており、特異な生理活性をもつ化合物が天然からも数多く単離・構造決定されていること、また、鎖状化合物に比べ立体配座が限定されるものの、5, 6員環の縮環化合物のように堅固なものとは異なり、いくらかフレキシブルであるため、側鎖の異なる誘導体を合成することにより活性のチューニングを行い易いと考えられるからである。中でも生物活性環状デプシペプチドは、N-メチルアミノ酸、D-アミノ酸、および光学活性なヒドロキシカルボン酸等を含むことで多様性に富み、強力な生物活性を示すものが多々発見されている。これは抗体が20種類のアミノ酸の組み合わせだけで多様な認識能を生み出しているに対し、より少ない数の構成成分で抗体に匹敵するほどの分子認識能を獲得するための工夫と言えるのではないだろうか。そのためには環状デプシペプチド天然物の機能と形を理解することが重要であると考えている。我々は、非常に強い生物活性をもつ環状デプシペプチド天然物をもとに、

1. 全合成してみる
2. 類縁体を合成し、生物活性をみる
3. NMR と理論計算を使って溶液中の構造をみる
4. *in vivo* 試験用にしっかりとした量をつくる。単結晶をとってX線結晶構造解析して結晶中の三次元構造をみる

## 5. 三次元構造と生物活性の相関をみる

という研究を展開しており，その一端を紹介します。

アプラトキシシン A (**1**)は 2001 年に Luesch らによって，海洋シアノバクテリア *Lyngbya majuscula* より単離・構造決定された 25 員環デブシペプチドであり，がん細胞に対して強い細胞毒性を示し，マウスについて抗腫瘍活性が認められている<sup>1</sup>。その構造はポリケチド部位に対して直接チアゾリン環が連結した特異なもので，34 位から 39 位にネオペンチル位のアルコールを含む四つの不斉炭素をもつヒドロキシカルボン酸がある。三つのメチル化されたアミノ酸残基 (*N*-メチルイソロイシン，*N*-メチルアラニン，*O*-メチルチロシン) と  $\alpha, \beta$ -不飽和システイン誘導体，四つの不斉を有する脂肪酸，およびプロリンからなる。このように合成上興味深い構造を有する化合物であり，2003 年には Forsyth らにより全合成が報告され，また我々と同時期に Ma らにより全合成および誘導体の合成とその活性について報告されている。



apratoxin A (**1**)

ここに，我々の全合成を紹介する。

脂肪酸フラグメント **11** については，reagent control による 3 つの鍵反応を組み合わせることで高立体選択的かつ，立体化学を様々変えた誘導体合成が可能な合成ルートの確立を行った(図 1)。まず，プロリン触媒を用いた不斉アルドール反応により得られた (*S*)-4-hydroxy-5,5-dimethylhexan-2-one の水酸基を MPM 基によって保護することで光学活性な保護体 **4** を得た。次に，ビニルグリニャール試薬の付加を行い，生じた水酸基を Ac 基により保護し **5** へと変換した。続いて，2 価のパラジウム触媒を用いて 3 級から 1 級のアリルアセタートへの転位を行い，加水分解によりアリルアルコール **6** を 4 段階 56%収率 (*E:Z* = 9:1) で得た。その後，野依らの不斉水素化条件にて 37 位の立体化学を誘起し，Swern 酸化によってアルデヒド **7** へと誘導した。得られた **7** に対して Paterson の anti 選択的な不斉アルドール反応を行い，生じた水酸基を TBS 基により保護し **8** を得た。MPM 基を除去した後，山口法を用いてプロリンエステル **10** へと変換し，最後に Bz 基の加水分解， $\alpha$ -ヒドロキシケトン部位の酸化的開裂を経てカルボン酸 **11** を合成した<sup>2a</sup>。

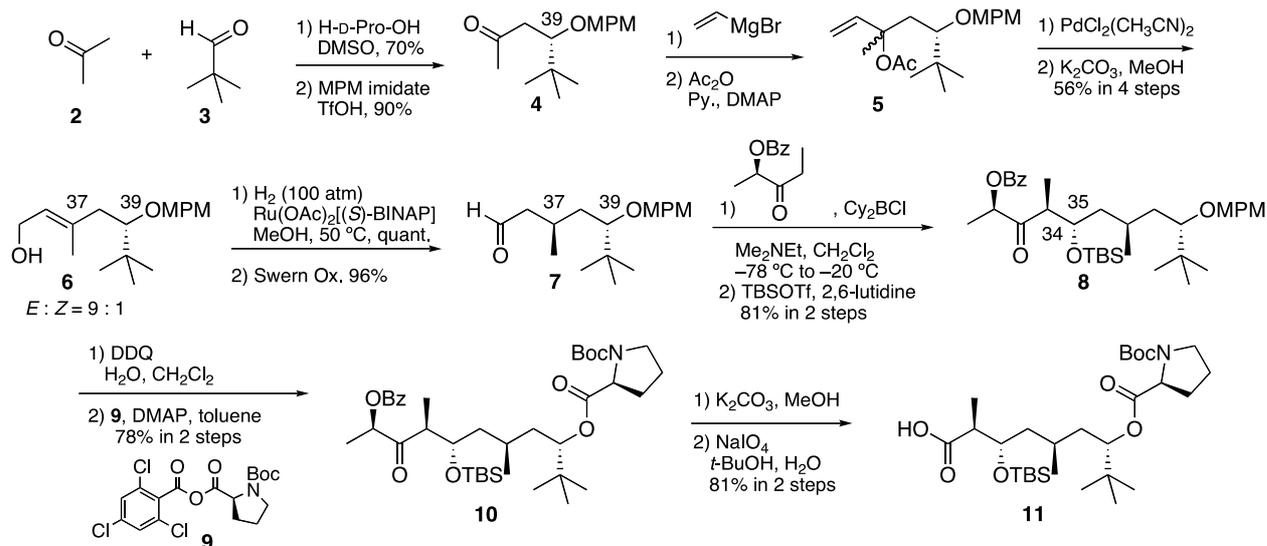


図1 プロリン-脂肪酸 **11** の合成

次にシステイン誘導体 **12** から誘導されるアミン **13** と、**11** の保護基をかけ替えたカルボン酸 **14** とを縮合し、**15** を得た (図2)。Kelly らの方法によりチアゾリン環を構築した後、直ちに Troc を除去し、アリルエステルからカルボン酸 **16** へ収率良く変換した。続いて別途調製したトリペプチド **17** と縮合し、得られる **18** のアリルエス

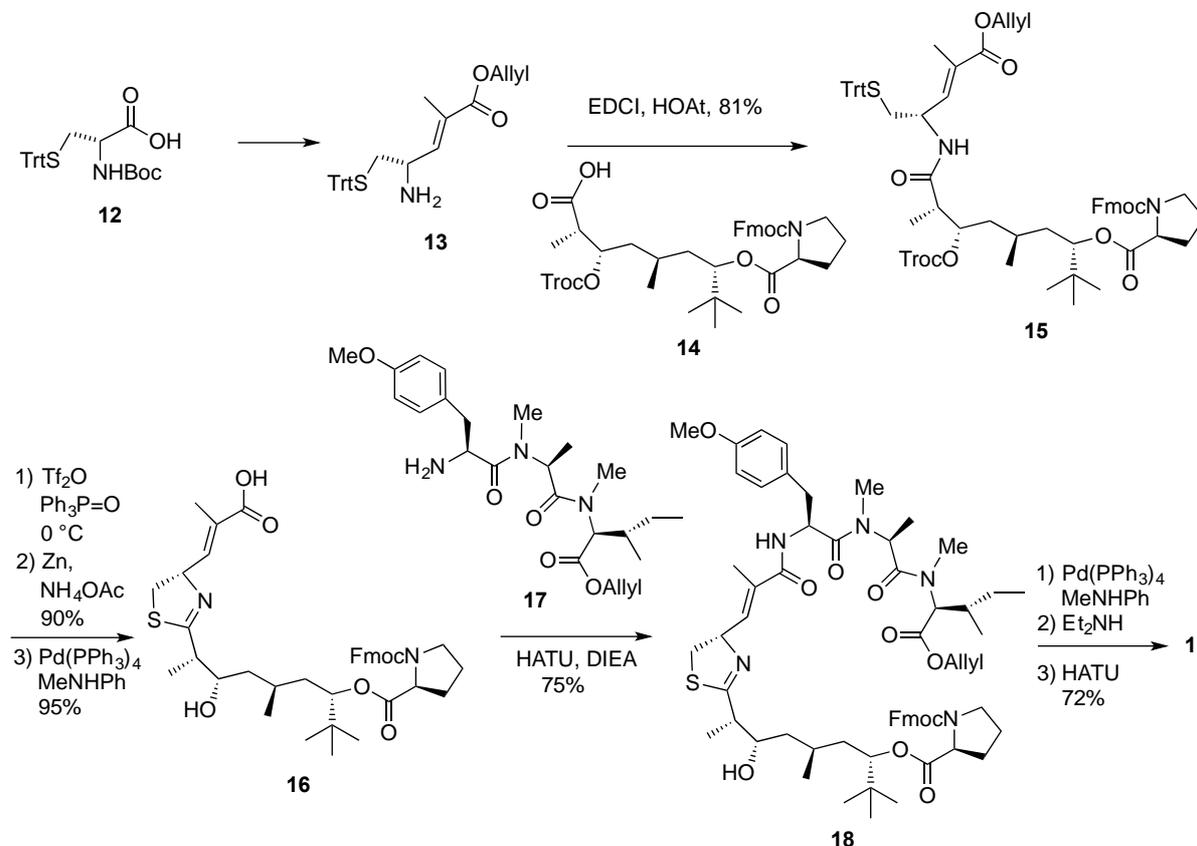


図2 アプラトキシシン A の全合成

テルと Fmoc を順に除去して環化前駆体へ導き, HATU を用いてマクロラクタム化を行ってチアゾリン環を損なうことなくアプラトキシシン A (**1**)の全合成を達成した<sup>2a</sup>。さらに, カルボン酸 **14** を効率良く得られる改良合成法を確立して<sup>2b</sup>, **1** を 80 mg 得た。このサンプルを用いて HCT-116 腫瘍マウスモデルを用いて抗腫瘍活性を評価したところ, 0.7 mg/kg・day を 5 日間投与したところ *T/C*, 20% と非常に強い抗腫瘍活性を示すことがわかったが, 致死的毒性が観察された<sup>2c</sup>。

次に類縁体を用いた構造活性相関を明らかにするため固相合成法を確立した (図 3)。トリチルリンカーを介し固相 (ランタン) 上に **19**~**21** の Fmoc-アミノ酸を順次縮合した後, あらかじめチアゾリンを構築した長鎖アミノ酸 **14** との縮合を試みた。縮合剤に PyAOP を用いることで固相上での縮合が速やかに進行した。Fmoc 基を除去した後 30%ヘキサフルオロイソプロピルアルコール(HFIP)を用いて弱酸性条件下で固相から化合物を切り出して環化前駆体 **22** を得た。図 2 で示したように HATU を用いてマクロラクタム化を行い, アプラトキシシン A (**1**)を総収率 53%で得ることに成功した<sup>2d</sup>。

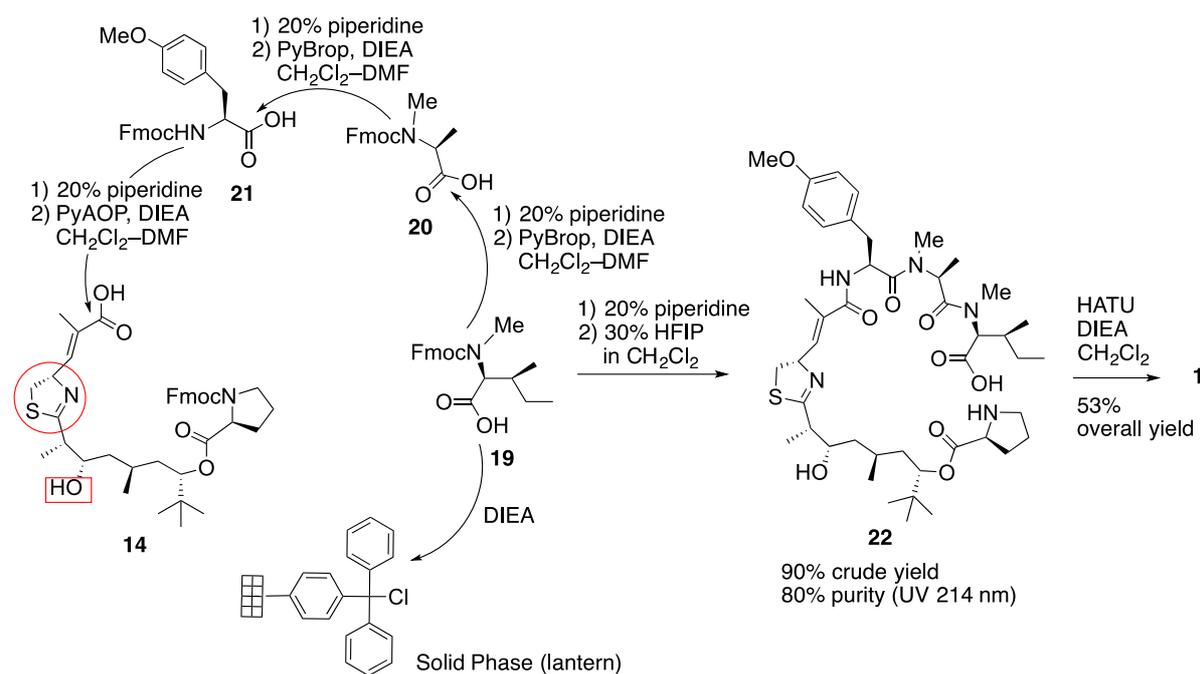


図 3 固相法を用いたアプラトキシシン A の全合成

本手法を用いて類縁体を合成し, HeLa 細胞に対する細胞毒性評価を行い, 構造活性相関を明らかにした。34 位のメチル基の立体配置は活性に影響を与えないこと, チロシンのメチルエーテル構造を改変しても活性が維持されることがわかった。一方, 35 位の水酸基をトリエチルシリル基で保護すると活性が激減した。これらの情報を基に分子プ

ローブ前駆体として有用なアジド基を持ち活性を示す分子プローブ前駆体 **23** を見出した (図 4) <sup>2d,e</sup>。

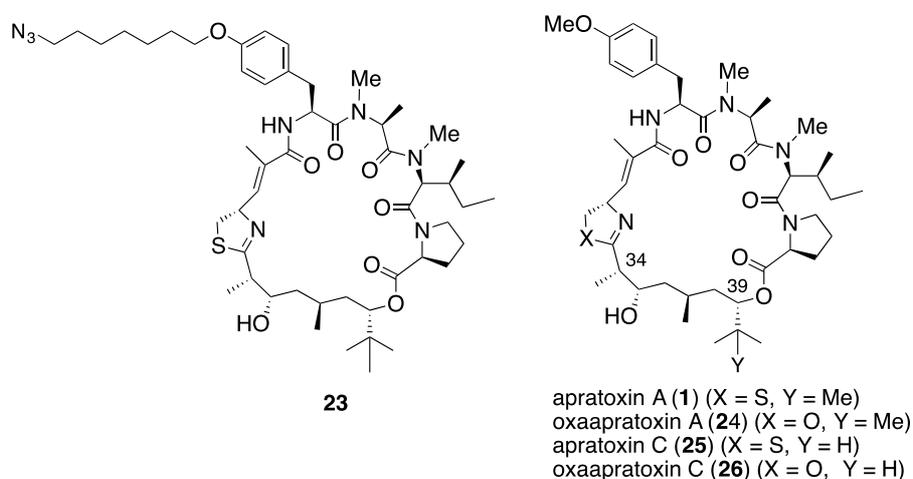


図 4 分子プローブ前駆体 **23** とアプラトキシシン A, C およびそのオキサゾリン類縁体

アプラトキシシン A の重クロロホルム中での三次元構造は, Luesch らにより NMR 情報から明らかにされているが, 我々もアプラトキシシン A とそのチアゾリンをオキサゾリンに置き換えた類縁体 **24**, さらにアプラトキシシン C (**25**)とそのオキサゾリン類縁体 **26** が, 重アセトニトリル中で同様の三次元構造をとることを明らかにした (図 4, 5) <sup>2f,g</sup>。最近, これらの情報をもとにチアゾリン-不飽和アミドを単純な構造に置き換えた類縁体を設計・合成し, その構造と活性の関係を明らかにしている <sup>2h</sup>。

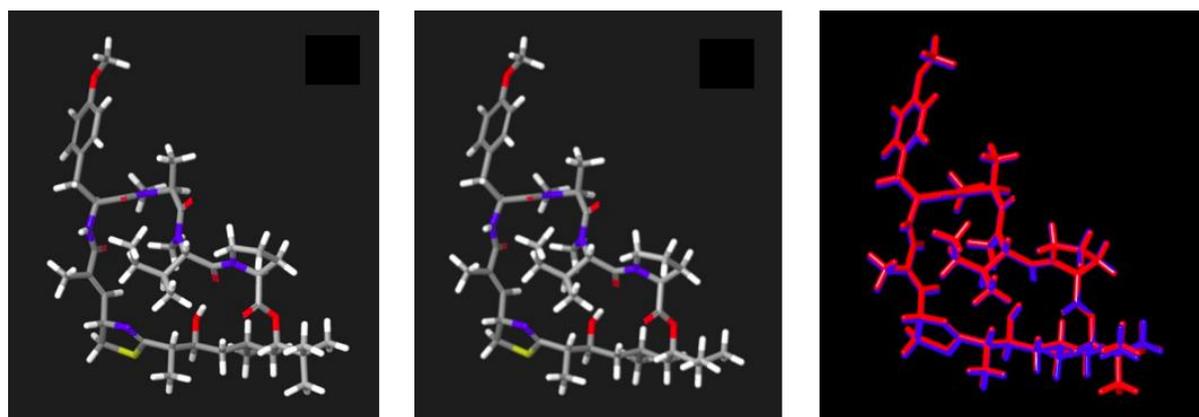


図 5 Distance geometry 法を用いて求めた重アセトニトリル中の三次元構造。(左 : apratoxin A, 中央 : apratoxin C, 右 : 重ね合わせ)

ところで, 山下, 中尾らにより新たな心筋分化誘導活性剤の開発を目的として, 海洋生物由来の心筋分化誘導活性物質の探索が行われた結果, 海洋シアノバクテリア *Moorea*

*bouillonii* から、非常に強力な心筋分化誘導活性を有する活性本体としてアプラトキシニン C (**24**) が見出された。心筋分化誘導活性が知られるシクロスポリン A や、IWP4, XAV939, IWR1 などの Wnt 阻害剤と比較して、約 1000 分の 1 の濃度において強い分化誘導活性を示すとともに、これまで必須であったフィーダー細胞が存在しない条件下でも強い分化誘導活性を示すことがわかった。

アプラトキシニン C (**24**) はアプラトキシニン A (**1**) の 39 位の *t*-butyl 基が isopropyl 基となっていることから (図 4), 我々はアプラトキシニン C を全合成し<sup>2f</sup>, その合成物が天然物と同等の活性を有することを明らかにした。さらに前述のアプラトキシニン A について検討した結果, アプラトキシニン A も同等の活性を示すことを見出した。また合成したアプラトキシニン A 類縁体を用いて構造-活性相関研究を行った。さらに **23** を用いて分子プローブを合成し, タンパク質ネットワーク解析を行い, その作用メカニズムの解析を試みたので紹介する<sup>2i</sup>。

#### 参考文献

- 1) Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Corbett, T. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5418.
- 2) (a) Doi, T.; Numajiri, Y.; Munakata, A.; Takahashi, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 531. (b) Numajiri, Y.; Takahashi, T.; Doi, T. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 111. (c) Tidgewell, K.; Engene, N.; Byrum, T.; Media, J.; Doi, T.; Valeriote, F. A.; Gerwick, W. H. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1458. (d) Doi, T.; Numajiri, Y.; Takahashi, T.; Takagi, M.; Shin-ya, K. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 180. (e) Doi, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 735. (f) Masuda, Y.; Suzuki, J.; Onda, Y.; Fujino, Y.; Yoshida, M.; Doi, T. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8000. (g) Yoshida, M.; Onda, Y.; Masuda, Y.; Doi, T. *Biopolymers (Peptide Science)* **2016**, *106*, 404. (h) Onda, Y.; Masuda, Y.; Yoshida, M.; Doi, T. *submitted*. (i) 福島弘之, 前島寛, 魚崎英毅, 松尾武彦, 吉田将人, 恩田勇一, 鈴木淳, 藤野雄太, 増田裕一, 八田知久, 夏目徹, 神平梨絵, 坂本匠, 新井大祐, 堀越直樹, 鯨井智也, 胡桃坂仁志, 伏谷伸宏, 土井隆行, 山下潤, 中尾洋一, 第 58 回天然有機化合物討論会要旨集, O-16, 仙台 (2016).