◆ 有機反応化学教室 ◆

教　授　　井上　将行（いのうえ・まさゆき）
平成 5 年東京大学理学部卒、平成 10 年同大学大学院理学系研究科博士課程修了
前職：東北大学大学院理学研究科　助教授、博士(理学)

講　師　　長友　優典（ながとも・まさのり）
平成 19 年東京理科大学理学部 I 部卒、平成 24 年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了
前職：東京大学大学院薬学系研究科　助教、博士(薬学)

助　教　　伊藤　寛晃（いとう・ひろあき）
平成 20 年東京大学薬学部卒、平成 25 年同大学大学院薬学系研究科博士課程修了
前職：富士フイルム株式会社勤務、博士(薬学)

助　教　　萩原　浩一（はぎわら・こういち）
平成 25 年東京大学薬学部卒、平成 27 年同大学大学院薬学系研究科修士課程修了
前職：東京大学大学院薬学系研究科　博士後期課程中退、修士(薬学)

研 究 の 概 要

有機反応化学教室は、有用な活性をもつ複雑な天然有機化合物の全合成、そのための新しい反応・合成法・戦略の開発と天然物の構造と機能をモチーフとした新機能分子の創出を主要テーマとしている。創薬にとって重要な有機化学の総合的な基礎研究を展開している。

当教室での研究基盤分子は、タンパク質などの生体高分子に強力に作用する極性官能基が密集した天然物と、生体高分子そのものの機能をもちうる巨大ペプチド系天然物である。タンパク質などの生体高分子に比べ分子量が圧倒的に小さい生物活性天然物は、多様な環状構造や官能基をもつことで、その機能情報を高密度に集積している。一方、その構造は最適・最小化されており、部分構造の欠如は、しばしば劇的な機能低下につながる。つまり天然物を、医薬や生物機能制御物質として応用するためには、その三次元的原子配列を完全に再現(全合成)する必要がある。しかし、強力な機能を持つ極性官能基密集型天然物や巨大ペプチドの全合成には、現在でも一般的な方法論が存在しない。我々は、このような高機能天然物の全合成を高度一般化するための反応・合成法・戦略の開発に取り組んでいる。さらに、自由自在に三次元構造を操れる有機合成化学を武器に、天然物が持たない化学的性質を付与した新機能分子や小型化されたタンパク質の創出を目指す。具体的には主に以下に挙げる課題について研究を行っている。

1. 全合成のための新しい反応・合成法・戦略の開発

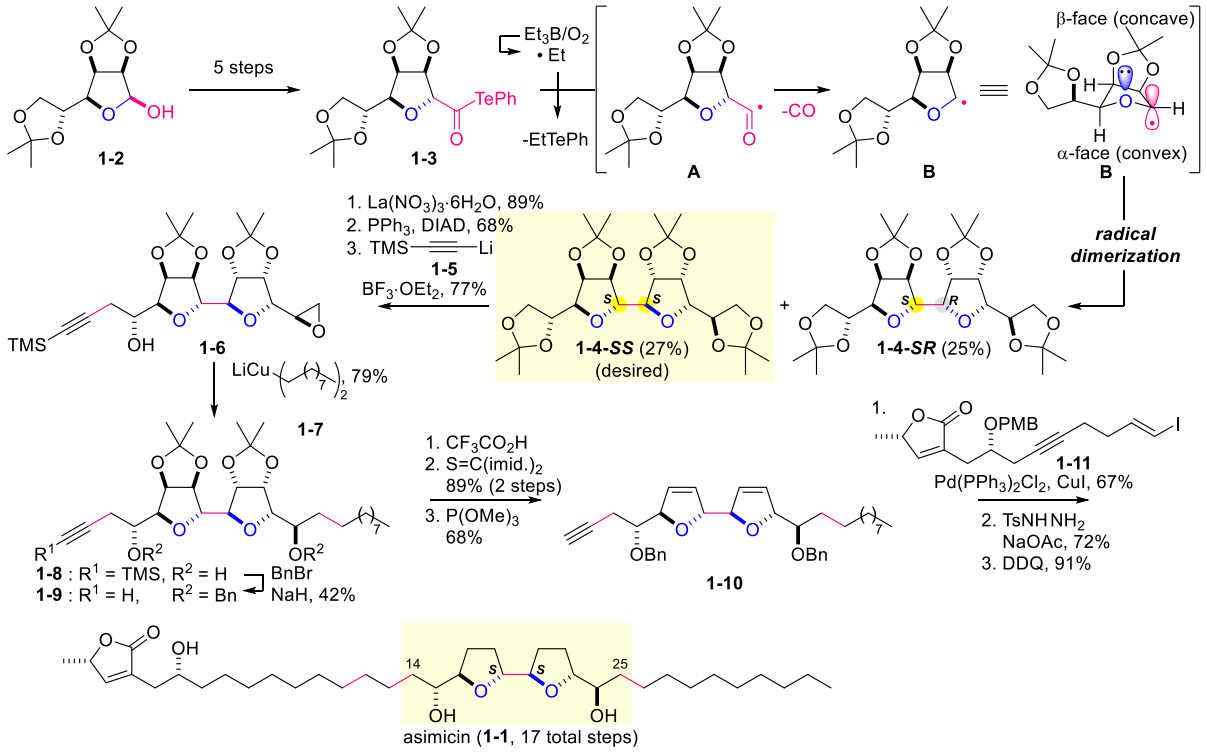
多数の極性官能基を含む天然物の合成を計画する場合、官能基をどのように組み込むか、分子の酸化度をどのように上げるかという、合成の成否を左右する重要な問題に直面する。往々にして合成標的分子特有の三次元構造に起因する、反応性・化学選択性・立体選択性などの制御に問題が生じる。それらを回避するために適切な保護基の利用が必須となり、一般に工程数が著しく増大する。また従来法では、同じ炭素骨格に対して異なる官能基を持つ類縁体の合成には、異なる合成ルートを考案しなくてはならないという大きな課題も残されている。

一方、炭素ラジカル種を介した炭素–炭素(C–C)結合形成反応は、高化学選択的であり、中性条件下進行するため、天然物の全合成において強力かつ実践的な手法になりうる。そこで我々は、高度に極性官能基化された部分構造の収束的連結への展開を目指し、α-ヘテロ炭素ラジカル種を用いたC–C 結合形成反応の開発に取り組んでいる。具体的には比較的弱い C–Te 結合が穏和な条件下均等開裂する性質に着目し、α-ヘテロ有機テルリドを炭素ラジカル前駆体として用いてきた。

本年度は、昨年度までに確立したα-アルコキシアシルテルリドからの脱一酸化炭素を伴う、ラジカル二量化反応を鍵工程として、高酸化度天然物であるアシミシンの収束的全合成を達成した。以下詳細を述べる。

1-1. 高酸化度炭素鎖の分子間ラジカル-ラジカルカップリング戦略によるアシミシンの全合成

アセトゲニン類はバンレイシ科植物より単離される天然物群であり、末端γ-ラクトン環と内部 THF 環が長いアルキル鎖で結ばれた構造的特徴を有している。本天然物群は、細胞毒性を含む幅広い生物活性を有する。アセトゲニン類の一つであるアシミシン(**1-1**)は、NADH 酸化還元酵素に対する強力な阻害活性を有し、癌細胞選択的な抗腫瘍作用を示す。我々は、**1-1** の興味深い生物活性と連続する 2 つの THF 環からなる C_2 対称骨格(C14-25)に着目し、当研究室で開発したラジカル二量化反応を利用した、**1-1** の全合成を目指した。



Scheme 1-1. Total synthesis of asimicin (**1-1**).

市販の D-グロース誘導体 **1-2** から 5 工程にてアシルテルリド **1-3** を合成した(Scheme 1-1)。**1-3** に対し、酸素存在下 Et_3B を作用させたところ、アシルラジカル **A** の生成と続く脱一酸化炭素で生じるα-アルコキシラジカル **B** の二量化が進行し、二量化体 **1-4-*SS*** と **1-4-*SR*** を得た。本反応では、**B** の *cis* 縮環した 5 員環構造の convex 面から優先的に反応が進行して立体選択性が発現したと説明できる。$La(NO_3)_3$ を用いて、**1-4-*SS*** の末端の 2 つのアセトニド基のみを選択的に除去し、続く光延反

応で C_2 対称ビス-エポキシドへと変換した。これに対し、リチウムアセチリド **1-5** の求核付加により非対称化して、アルキン **1-6** を得た。続いて、Gilman 反応剤 **1-7** による炭素鎖伸長(**1-6**→**1-8**)と TMS 基の除去を伴うベンジル保護で **1-9** を得た。**1-9** から酸素官能基の除去を含む 3 工程で、**1-10** を合成した。最後に、薗頭反応によりγ-ラクトン環部位 **1-11** を導入し、ジイミド還元と保護基の除去で、**1-1** の全合成を達成した。

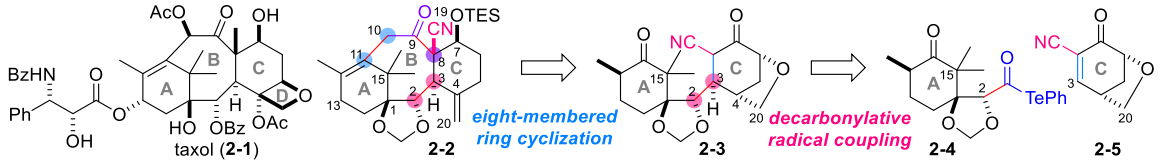
化学的に安定な炭素ラジカル供与体として、α-アルコキシアシルテルリド **1-3** を設定することで、室温かつ中性という極めて温和な条件下、ラジカル二量化反応によるアシミシン(**1-1**)の直截的な C_2 対称ビス-THF 環の構築を実現した。本成果により、高度に酸素官能基化された構造を収束的に合成する本法の実用性を実証した。アルキル鎖の導入による非対称化を経て、市販の **1-2** から 17 工程にて **1-1** を全合成した。今回開発した手法と既存の合成化学的手法を組み合わせれば、複雑な分子の斬新かつ実践的な合成戦略を立案することができる。これは取りも直さず、生物活性物質や機能性材料など全ての有用有機化合物の合成化学的供給に貢献できることを意味する。

2. 生物活性天然物の全合成研究

我々は高度に酸化された炭素環を持つテルペノイド、ステロイドおよびポリケチドを標的とし、全合成効率化を目的とした研究を遂行している。全合成研究における課題設定は、環状構造に様々な置換基を持つ化合物群に対する統一的かつ短工程合成法の開発である。本年度は、顕著な抗腫瘍活性を有する複雑天然物タキソールの収束的な骨格構築法を確立した。また、強力な神経毒性を有するバトラコトキシンの収束的合成戦略に基づく骨格構築法を報告した。以下にその詳細を示す。

2-1. タキソールの合成研究

タキソール(**2-1**, Scheme 2-1)は、*Taxus brevifolia* より単離されたタキサンジテルペンである。**2-1** は、重合チューブリンの安定化により細胞分裂を阻害し、顕著な抗腫瘍活性を示す。また、6/8/6 員環が特異に縮環したタキサン骨格上に多数の不斉点および酸素官能基を有する **2-1** の合成は、有機合成化学的に極めて挑戦的である。我々は **2-1** の新たなラジカル反応を基軸とする収束的全合成を目指し研究に着手した。今年度はまず、タキソール骨格 **2-2** を合成標的とした。



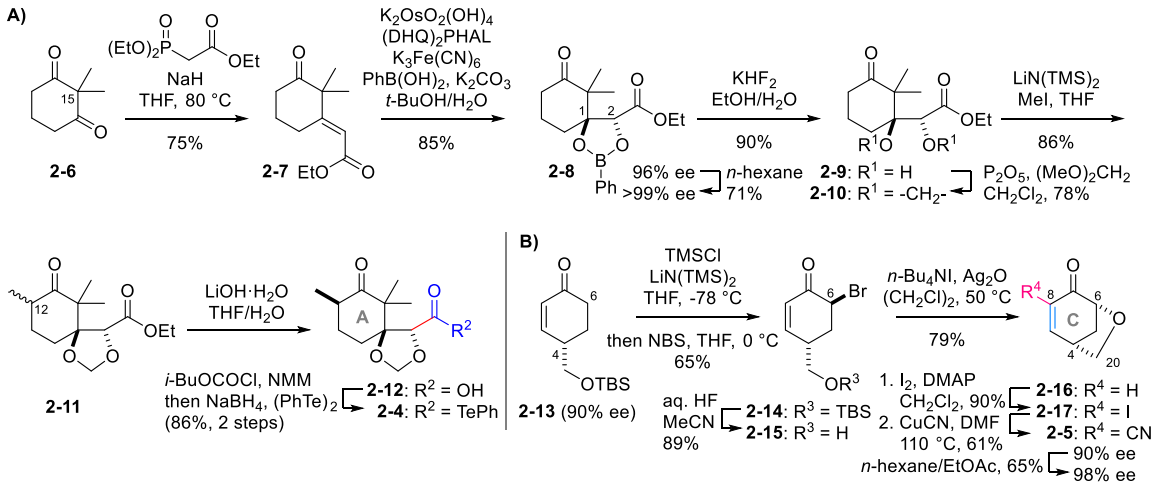
Scheme 2-1. Synthetic plan of taxol (**1**).

α-アルコキシアシルテルリドからの脱一酸化炭素を伴うラジカル付加反応を鍵とする収束的合成戦略を立案した(Scheme 2-1)。すなわち、**2-2** の A 環部に対応するアシルテルリド **2-4** および C 環部に対応するエノン **2-5** を用いたラジカル付加反応で、**2-2** を収束的に合成できると予想した。この際、2 環性骨格 **2-5** の convex 面より反応が進行することで、**2-3** が立体選択的に得られると期待した。**2-3** から、C8 位第 4 級炭素および C4-エキソオレフィンを構築した後、Pd(0)試薬を用いたケトンα位のアルケニル化反応を利用すれば、8 員環 B 環部が構築され、標的タキサン骨格 **2-2** へ至る。

A 環フラグメント **2-4**(Scheme 2-2A)および C 環 **2-5**(Scheme 2-2B)は、出発物質 **2-6** および **2-13** か

らそれぞれ 7 および 5 段階で容易に調製できた。C15 位第 4 級炭素を有する市販のジケトン **2-6** を、NaH および$(EtO)_2P(O)CH_2CO_2Et$ を用いてオレフィン化して、α,β-不飽和エステル **2-7** を得た。フェニルボロン酸の存在下、**2-7** に対して不斉ジヒドロキシ化を行い、再結晶後に光学的に純粋なボロン酸エステル **2-8**(>99% ee)とした。次に、**2-8** を KHF_2 水溶液で処理してフェニルボロン酸エステルを加水分解し、C1,2-ビシナルジオール **2-9** を得た。さらに、ジオール **2-9** をメチレンアセタールとして保護した後、生じたケトン **2-10** の C12 位をメチル化した(dr. 1.2:1)。立体異性体混合物 **2-11** を LiOH 水溶液で処理し、エステルの加水分解と C12 位のエピ化を同時に達成し、単一の立体異性体としてカルボン酸 **2-12** を得た。最後に、**2-12** をクロロ蟻酸イソブチルとの活性化エステルとした後、別途還元的に調製したフェニルテルロアニオンを作用させ、アシルテルリド **2-4** を合成した。

C 環フラグメント **2-5** の合成は、文献既知の光学活性なエノン **2-13** (90% ee)のα位臭素化反応で開始した。得られた臭化物 **2-14** の TBS 基を HF 水溶液で除去し、続いて Ag_2O を用いた 1 級アルコール **2-15** からのエーテル環形成は、2 環性化合物 **2-16** を与えた。最後に、α,β-エノン **2-16** のα位にヨウ素を導入し、CuCN とのカップリング反応により、所望の **2-5** を合成した。得られた **2-5** の光学純度は再結晶操作で 98% ee まで向上できた。

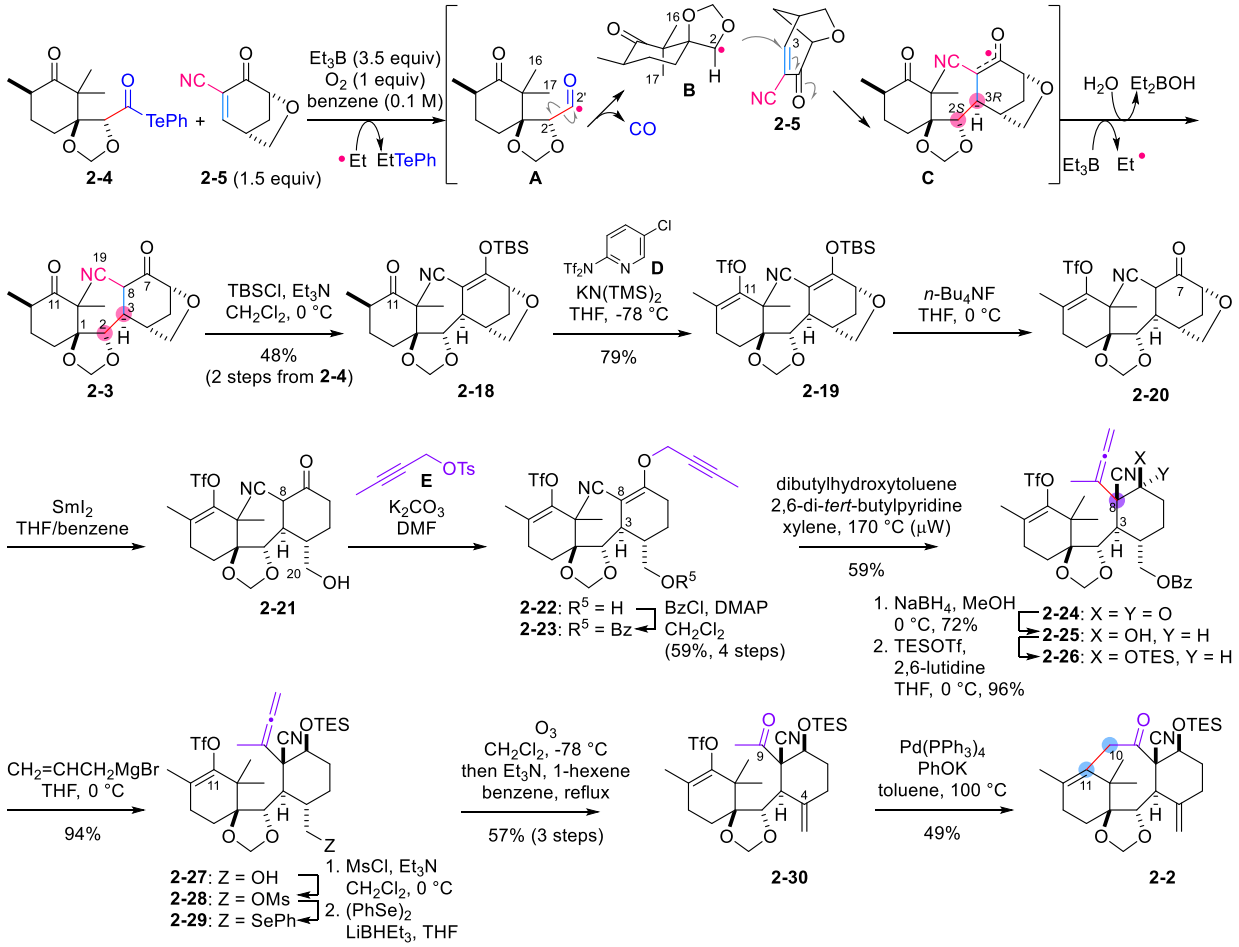


Scheme 2-2. Synthesis of A- and C-Rings.

A,C 環両フラグメントを手にしたので、鍵となるラジカルカップリング反応を検討した(Scheme 2-3)。**2-4** および **2-5** の混合物に対し酸素存在下 Et_3B を作用させたところ、C2 位および C3 位立体選択的な付加反応が進行し **2-3** が形成された。C7,11-ジケトンのエノール化可能な C7 位カルボニル基を、位置選択的に TBS-エノールエーテルに変換し、**2-18** を 2 工程収率 48%で生成した。注目すべきことに、分子間ラジカル付加反応は立体的に込み入った C2–C3 結合を立体選択的に形成した。特に、ラジカル受容体 **2-5** の LUMO 準位は、確実にカップリングを成功させるために 2 つの電子求引性基（C=O および C≡N）によって低下させなければならなかった。すなわち、同じ反応条件では、立体障害が少ないにもかかわらず、**2-4** と **2-16** はカップリングしなかった。

本反応の想定機構は、Et_3B と酸素から生成されたエチルラジカルが、**2-4** の弱い C–Te 結合の均等開裂を誘引してα-アルコキシアシルラジカル **A** を形成する。**A** からの迅速な脱一酸化炭素はα-アルコキシラジカル **B** を与え、そして C2 位の立体化学情報を失う。**B** の C2 位ラジカルの片側は近傍の C16,17 位メチル基によって立体的に遮蔽されている。一方、**2-5** の C20 位メチレン架橋は

convex/concave 面を規定する。ゆえに、求核的ラジカル **B** および求電子性オレフィン **2-5** の双方はそれぞれのより立体的に空いた面から接近し、それによって同時に **C** の必要な C2 位および C3 位立体中心が導入される。最後に、ラジカル **C** が Et_3B によって捕捉され、エチルラジカルを放出しながら対応するホウ素エノラートを形成する。これが加水分解されて **2-3** を生じる。



Scheme 2-3. Construction of taxane skeleton.

C2,3 位立体選択的カップリング反応を実現したので、残る課題は、C8 位第 4 級炭素、C4 位メチレン基、および 8 員環 B 環の形成であった。まず、**2-18** に Comins 試薬 **D** を作用させ、ビニルトリフレート **2-19** とした。次いで、*n*-Bu_4NF で、**2-19** の TBS 基を除去し、ケトン **2-20** に変換した。次に、SmI_2 による **2-20** の処理は、架橋エーテル環の還元的開環を化学選択的に誘起し、潜在的な反応性を有する C8 位シアノ基を還元することなく 1 級アルコール **2-21** をもたらした。C8–H と C20–OH との間の pKa の差を利用することによって、トシル化物 **E** および K_2CO_3 を用いて **2-21** をプロパルギルエノールエーテル **2-22** に化学選択的に変換した。続いて、**2-22** の 1 級ヒドロキシ基をベンゾイル化して **2-23** を得た。プロパルギルビニルエーテル **2-23** をマイクロ波照射下で 170 ℃に加熱すると、[3,3]-シグマトロピー転位が嵩高い C3 位置換基の反対面から立体選択的に進行し、アレン **2-24** の C8 位第 4 級炭素を立体選択的に構築した。

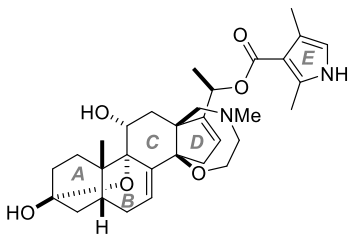
最後の 7 工程の変換で **2-24** から標的分子 **2-2** の合成が完了した。MeOH 中 **2-24** の $NaBH_4$ による還元は **2-25** の C7 位β配向アルコールを生成し、それを TES 基で保護して **2-26** を得た。臭化アリル

マグネシウムによる **2-26** のベンゾイル基の化学選択的除去の後、メシル化およびそれに続くベンゼンセレノレートでの置換によりアルコール **2-27** をセレニド **2-29** に変換した。次いで、**2-29** の C9 位ケトンおよび C4 位エキソオレフィンを同時に構築した。すなわち、-78 ℃での **2-29** のオゾン酸化により、C11 位ビニルトリフレートの存在下でアレン部分を化学選択的に開裂し、セレノキシドを得た。反応混合物をフェニルセレノールの捕捉剤としての 1-ヘキセンと共に加温すると、オレフィン形成が効率的に起こり、**2-30** を得た。最後に、**2-30** の C11 位ビニルトリフレートおよび C9 位メチルケトンを C10–C11 結合形成に利用した。**2-30** をトルエン中 100 ℃で $Pd(PPh_3)_4$ および PhOK で処理すると、メチルケトン **2-30** のエノール化を介して 8 員環 B 環形成反応が進行し、タキサン骨格を有する **2-2** が得られた。

今年度、我々はジケトン **2-6** から 22 段階でタキソール(**2-1**)の 6/8/6 員環炭素骨格 **2-2** を構築するための新しいラジカル合成戦略を開発した。A 環 **2-4** の C 環 **2-5** への分子間ラジカル付加は、完全に立体選択的な様式で C2 位および C3 位第 3 級炭素中心を連結した。本成果は高度に酸素官能基化された炭素骨格を組み立てるための本戦略の実用性を実証する。次いで、プロパルギルビニルエーテル **2-23** の[3,3]-シグマトロピー転位は C8 位第 4 級炭素を導入し、**2-29** のオゾン酸化は C9 位メチルケトンおよび C4 位エキソオレフィンの形成をもたらした。**2-30** の C11 位ビニルトリフレートおよび C9 位メチルケトンは、8 員環 B 環の Pd(0)が促進する環化に関与して、標的構造 **2-2** を生成した。**2-2** は **2-1** を含む様々なタキサンジテルペノイドへのさらなる誘導体化のための足掛かりとなる官能基を十分に備えている。

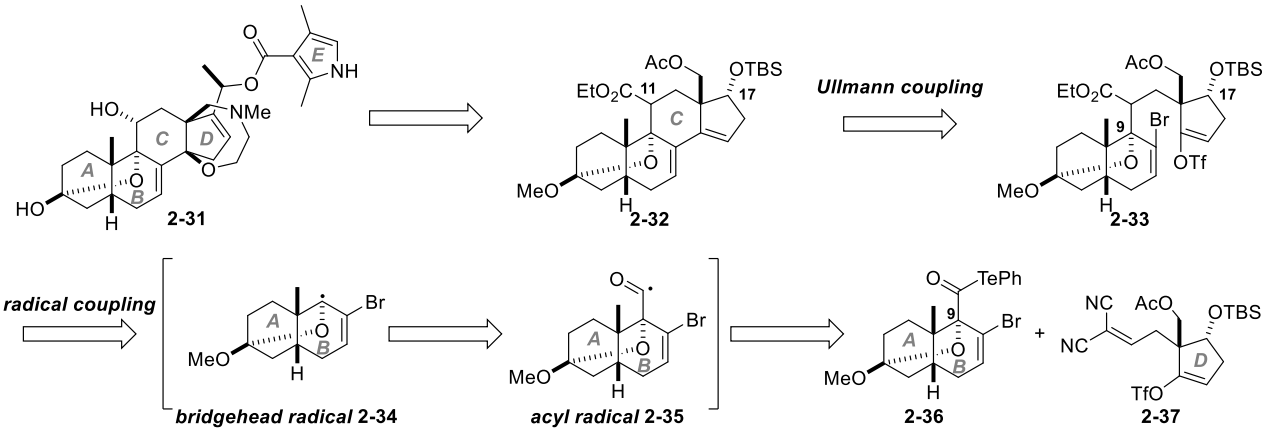
2-2. バトラコトキシンの合成研究

バトラコトキシン(**2-31**)は、モウドクフキヤガエル *Phyllobates* sp. の皮膚から単離・構造決定されたステロイドアルカロイドである。**2-31** は電位依存性ナトリウムイオンチャネルに不可逆的に結合し、持続性の活性化状態をもたらすことで強力な神経毒性を発揮する。AB 環および CD 環がそれぞれシスに縮環した **2-31** のステロイド骨格は、ヘミアセタールや 7 員環オキサゼパンなどによって高度に官能基化されている。そのため、その全合成は挑戦的な課題である。我々は、2 つのカップリング反応を鍵とする収束的合成戦略に基づいた **2-31** の全合成研究に着手した。



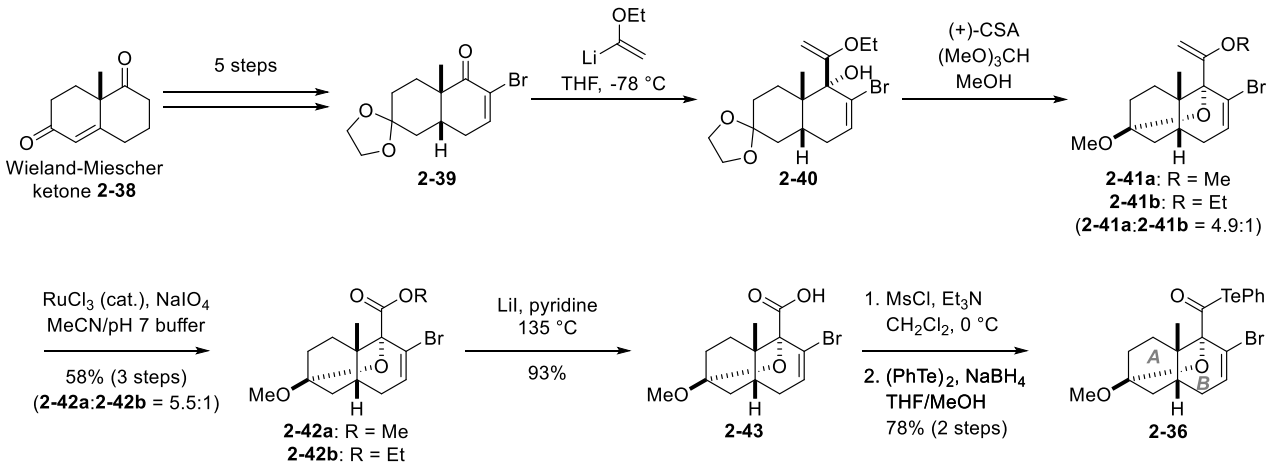
batrachotoxin (**2-31**)

AB 環と D 環の連結、続く C 環形成によって、**2-31** の官能基されたステロイド骨格を構築する計画をした (Scheme 2-4)。7 員環オキサゼパンの構築、および C17 位への炭素鎖と C11 位へのヒドロキシ基導入を全合成終盤に行うものとし、**2-31** を逆合成的に **2-32** に導いた。**2-32** の C 環は、**2-33** のニッケル試薬とパラジウム試薬を用いた Ullmann カップリング反応によって形成できると予想した。C9 位四置換炭素の構築に伴う AB 環と D 環の収束的連結には、橋頭位ラジカル **2-34** のラジカルカップリングを利用することとした。すなわち、アシルテルリド **2-36** からアシルラジカル **2-35** の脱一酸化炭素を経て発生させる求核的な橋頭位ラジカル **2-34** は、**2-37** の求電子的なオレフィンと反応することで **2-33** を与えると予想した。



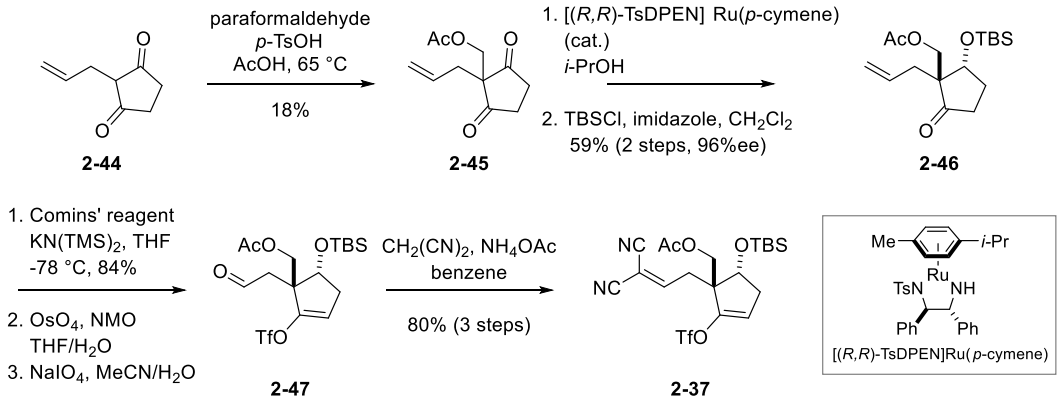
Scheme 2-4. Synthetic plan of batrachotoxin.

まず、AB 環 **2-36** を合成した(Scheme 2-5)。Wieland-Miesher ケトン **2-38** から 5 工程で合成した **2-39** に対し、ビニルエーテルを導入して **2-40** とした後、メタノール中で酸処理を行い環状アセタール **2-41** を誘導した。電子豊富なビニルエーテルを化学選択的に酸化的開裂することでエステル **2-42** とした後、ヨウ化リチウムとピリジンで処理してカルボン酸 **2-43** を合成した。**2-43** のメシル化後、ナトリウムフェニルテルリドを用いて、アシルテルリド **2-36** を得た。



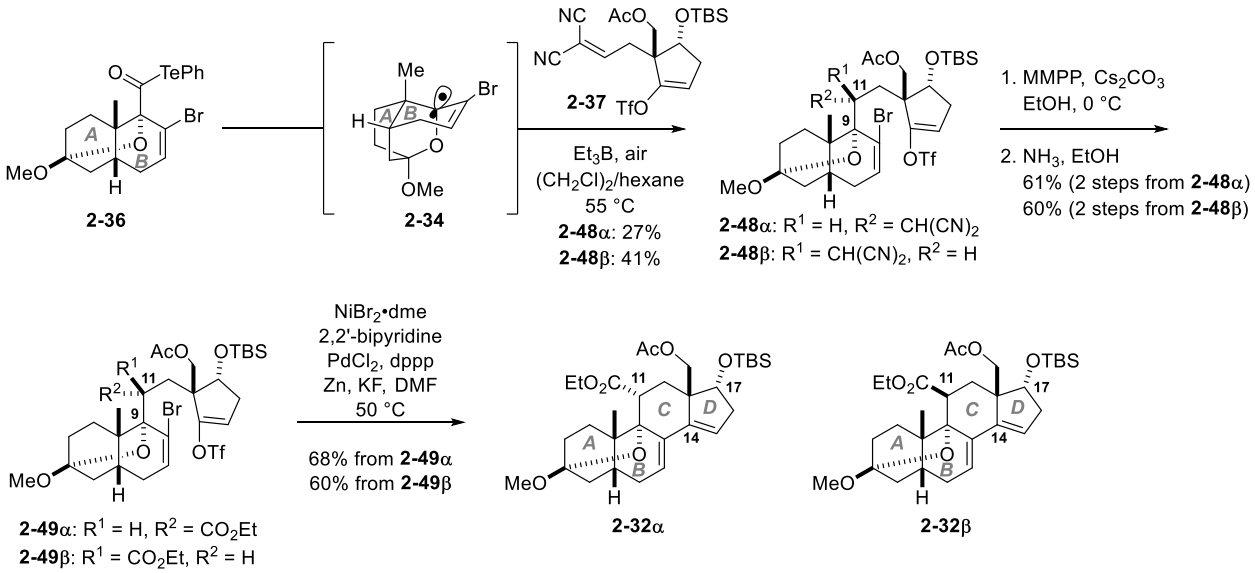
Scheme 2-5. Synthesis of AB-ring **2-36**.

次に、D 環 **2-37** を合成した(Scheme 2-6)。**2-44** に対してアセトキシメチル基を導入し、メソ体 **2-45** を得た。ジケトン **2-45** の野依不斉水素移動反応によりエナンチオ・ジアステレオ選択的に還元した後、生じたヒドロキシ基をアセチル基で保護して **2-46** とした。**2-46** のケトンのビニルトリフラート化、末端オレフィンの選択的な酸化的開裂によりアルデヒド **2-47** を誘導し、マロノニトリルとの縮合反応により、D 環 **2-37** を合成した。



Scheme 2-6. Synthesis of D-ring **2-37**.

2-31 のステロイド骨格を構築した(Scheme 2-7)。AB 環 **2-36** を酸素雰囲気下、トリエチルボランで処理したところ、化学選択的にアシルテルリドのみが反応し、ビニルブロミドを損なうことなく **2-34** が発生した。**2-34** は D 環 **2-37** の求電子的なオレフィンと速やかに反応し、**2-48** を与えた(d.r = 1:1.5)。本反応は、立体反転が不可能な橋頭位ラジカル **2-34** を経ることで C9 位に関して立体特異的に反応が進行した。**2-48** のマロノニトリル基の酸化と続くエタノリシスによりエステル **2-49** とした。**2-49** に対してニッケル試薬とパラジウム試薬存在下、亜鉛とフッ化カリウムを作用させたところ、Ullmann カップリング反応による C 環形成が進行し、ステロイド骨格 **2-32** を得た。



Scheme 2-7. Synthesis of D-ring **2-37**.

我々は、バトラコトキシン(**2-31**)の収束的合成戦略に基づく骨格構築法を確立した。橋頭位ラジカルによる化学選択的・立体特異的な AB 環と D 環の連結、および遷移金属を用いた C 環形成反応を利用し、Wieland-Miescher ケトン **2-38** より 15 工程で **2-31** のステロイド骨格を収束的に合成した。合成した **2-32** は、ステロイド上に **2-31** の環状アセタール構造、および 7 員環オキサゼパンの構築に必要な官能基を有している。

3. 天然物類縁体の網羅的全合成と機能解析

強力な生物活性を有する天然物は、医薬品等の有用な生体機能分子を創出するための非常に優れた構造基盤であると言える。また、これを実現するために天然物の複雑な機能を詳細に理解することは重要であり、効率的な類縁体合成と機能解析がそのための有効な手段の 1 つである。したがって、我々は天然物の構造と機能をモチーフとした天然物類縁体の網羅的全合成と機能解析を課題として研究を遂行している。本年は、巨大ペプチド天然物であるポリセオナミド B ならびにヤクアミド B を基盤として研究を展開した。以下詳細を述べる。

3-1. ポリセオナミドBの固相全合成と細胞内挙動解析

ポリセオナミドB (**3-1**, Figure 3-1)は、海綿共生微生物*Entotheonella*が産生する48アミノ酸残基からなるリボソーム由来ペプチドである。**3-1**は翻訳後修飾により、D-, L-アミノ酸が交互に配列し、側鎖が多数メチル化および酸素官能基化された特異な構造となる。本分子は、$\beta^{6.3}$-ヘリックスと呼ばれるらせん構造を形成し、脂質平面二重膜中で一価カチオン(H^+, Na^+, K^+, Cs^+)選択的なイオンチャネルとして機能する。また、**3-1**はP388マウス白血病細胞株に対し、極めて強力な毒性(IC_{50} = 0.098 nM)を示す。この細胞毒性は、**3-1**のイオンチャネル形成により細胞膜電位が乱れることに起因すると想定されていたが、**3-1**の哺乳動物細胞に対する作用機構は不明であった。我々は、詳細な作用解析を指向した**3-1**の効率的な固相全合成法の確立を目的として研究を展開し、合成供給した**3-1**の細胞内動的挙動および作用解析を実施した。

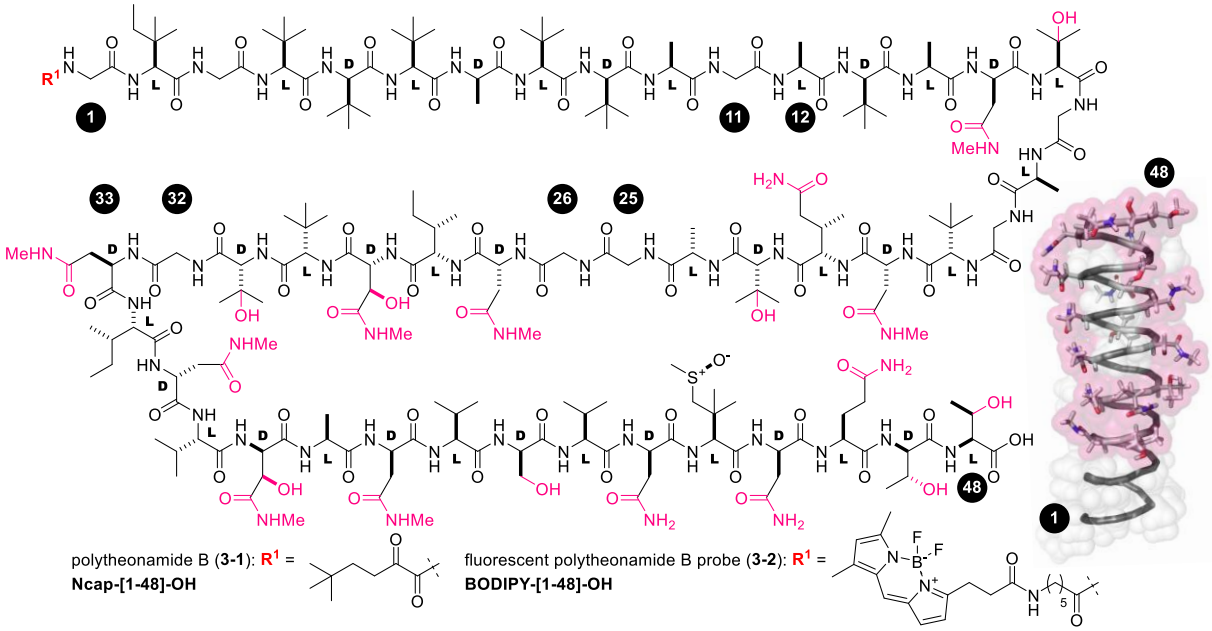


Figure 3-1. Structures of polytheonamide B (**3-1**) and fluorescent probe (**3-2**). $\beta^{6.3}$-Helical structure of **3-1** (PDB ID: 2RQO) are also displayed.

従来の**3-1**の全合成では、17残基以上のペプチド鎖の固相合成が困難であり、16残基以下の4つのフラグメント(1-11残基、12-25残基、26-32残基、33-48残基)の固相合成と、これらの液相カップリングにより**3-1**の全体構造を構築した。我々は、側鎖官能基への保護基導入(Figure 3-2)に基づく37残基のフラグメント(12-48残基)の固相合成と固相上でのフラグメント縮合により全体構造を構築する新

規合成法を立案した。本合成法の実現は、多段階の液相反応(9回)とHPLC精製(9回)を要した従来法に比して、液相反応(1回)とHPLC精製(2回)を最小化した効率的な**3-1**の供給を可能にする。

まず、固相合成における側鎖間の相互作用や副反応を抑制する目的で、**3-3**, **3-5**, **3-7**, **3-9**および**3-11**の極性官能基に保護基を導入した**3-4**, **3-6**, **3-8**, **3-10**および**3-12**を合成した(Figure 3-2)。すなわち、**3-3**の1級アミドおよび**3-5**の2級アミドをそれぞれTr基およびTmb基で保護し、**3-7**, **3-9**および**3-11**の2, 3級アルコールをTBS基で保護した。

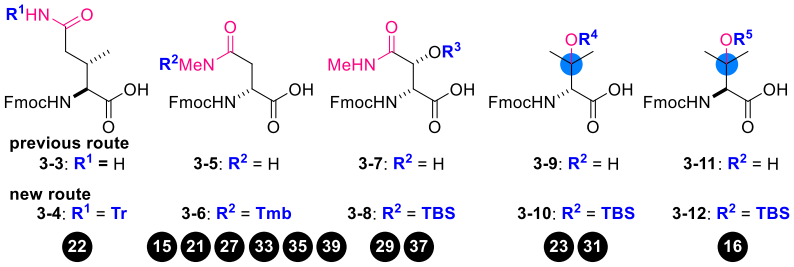
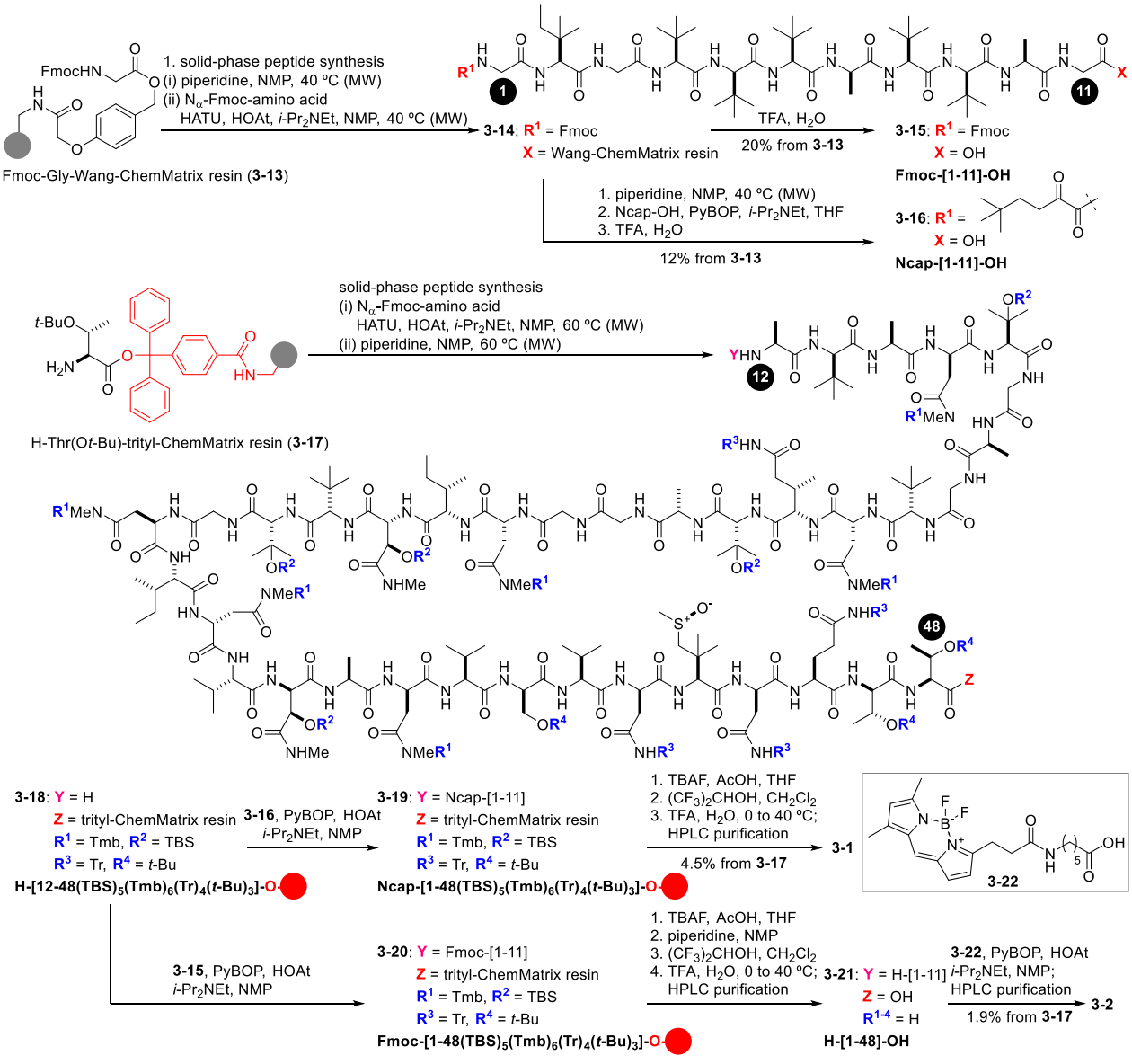


Figure 3-2. Component amino acids for the synthesis of **3-1**.



Scheme 3-1. Solid-phase total synthesis of **3-1** and **3-2**.

アミノ酸ユニットとして**3-4**, **3-6**, **3-8**, **3-10**および**3-12**を、担体としてChemMatrix樹脂を用いて、マイクロ波による加熱条件下固相合成を行った結果、予想通り37残基からなるC末端フラグメント**3-18**の構築に成功した(Scheme 3-1)。続いて、**3-13**から別途固相合成で調製したN末端フラグメント(**3-16**)と固相担持された**3-18**を縮合し、**3-1**の全配列を有する**3-19**を得た。最後に、TBAF、$(CF_3)_2CHOH$およびTFAを順次作用させて、18個の保護基の除去と樹脂からのペプチド鎖の切断を行い、**3-1**の固相全合成を達成した。本合成法は、従来と同等の4.5%の総収率で**3-1**を与えた。続いて、**3-1**の細胞内挙動を追跡するため、**3-1**の固相全合成法にしたがい、蛍光標識体**3-2**を合成した。すなわち、N末端がFmoc基のフラグメント**3-15**と**3-18**を縮合し、同様の化学変換によりN末端がアミンの**3-21**を得た。最後にBODIPY **3-22**をN末端に導入し、**3-2**を合成した。

合成した**3-1**および**3-2**のヒト乳がん細胞株MCF-7に対する増殖抑制活性をsulforhodamine B (SRB)アッセイにより評価した(Table 3-1)。その結果、**3-1**と**3-2**は同等のGI_{50}値(**3-1**: 0.69 nM, **3-2**: 2.31 nM)を示し、**3-2**は**3-1**の生物活性特性を保持していることが示唆された。

Table 3-1. Growth inhibitory activities of **3-1** and **3-2** against MCF-7 cells

compound	GI_{50} (nM)[a]
3-1	0.69
3-2	2.31

[a] GI_{50} (50% cell growth inhibition) values were determined by SRB assays.

続いて、**3-1**のイオンチャネル活性が細胞膜電位に及ぼす影響を、膜電位感受性色素$DiBAC_4(3)$により評価した。その結果、**3-1**のMCF-7細胞への添加により、濃度依存的に速やかな蛍光強度の増大が観測され、**3-1**のイオンチャネル形成とNa^+輸送に起因する脱分極が起きることが示唆された(Figure 3-3)。

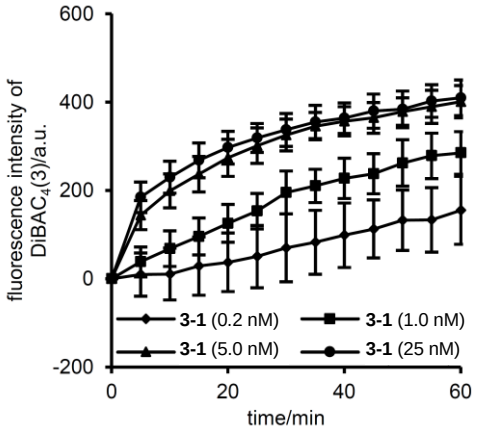


Figure 3-3. Time course of the change of the membrane potential caused by **3-1**.

さらに、蛍光標識体**3-2**のMCF-7細胞内局在を、オルガネラ蛍光染色試薬を用いて調査した。その結果、**3-2**の緑色蛍光(Figure 3-4a)は、リソソーム蛍光標識色素LysoTrackerの赤色蛍光と良く一致した。この結果を踏まえ、**3-1**の経時的なリソソームへの作用を解析した。MCF-7細胞への**3-1**の添加後4時間において、酸性度依存的に集積するLysoTrackerの蛍光が著しく減少したことから、**3-1**のイオンチャネル活性によるリソソームのプロトン濃度勾配の消失が示唆された。そこで、蛍光標識デキストランを用いてリソソームのpHを測定した。結果として、**3-1**の添加後リソソームのpHが経時的に上昇し、4時間後にはpHは4.1から6.7まで上昇した(Figure 3-4b)。以上より、**3-1**のイオンチャネ

ル形成とプロトン輸送に起因するリソソームpHの上昇が示唆された。

細胞膜電位の脱分極を起こす化合物、およびリソソーム-細胞質間pH勾配を消失させる化合物はアポトーシスを誘導することが知られているが、フローサイトメトリーおよびミトコンドリア膜電位感受性色素tetramethylrhodamine methyl esterを用いた解析により、**3-1**によるアポトーシスの誘導が示唆された。

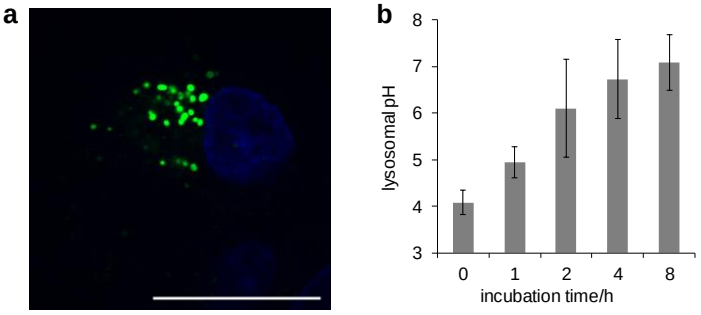


Figure 3-4. (a) Cellular localization of **3-2** in MCF-7 cells. Nucleus was stained by Hoechst 33342. Scale bar represents 20 μm. (b) Time course of the change of lysosomal pH caused by **3-1**.

本研究では、新たな保護基戦略に基づき、37残基からなるC末端フラグメントの固相合成を実現し、続く固相上でのフラグメント縮合により**3-1**の固相全合成を達成した。さらに、**3-1**および蛍光標識体**3-2**を用いた解析により、**3-1**が細胞膜電位の脱分極およびリソソーム-細胞質間のpH勾配解消という2つの作用を示し、これらの複合的な効果によりアポトーシスを誘導することを明らかにした。

3-2. ヤクアミドBの標的タンパク質同定

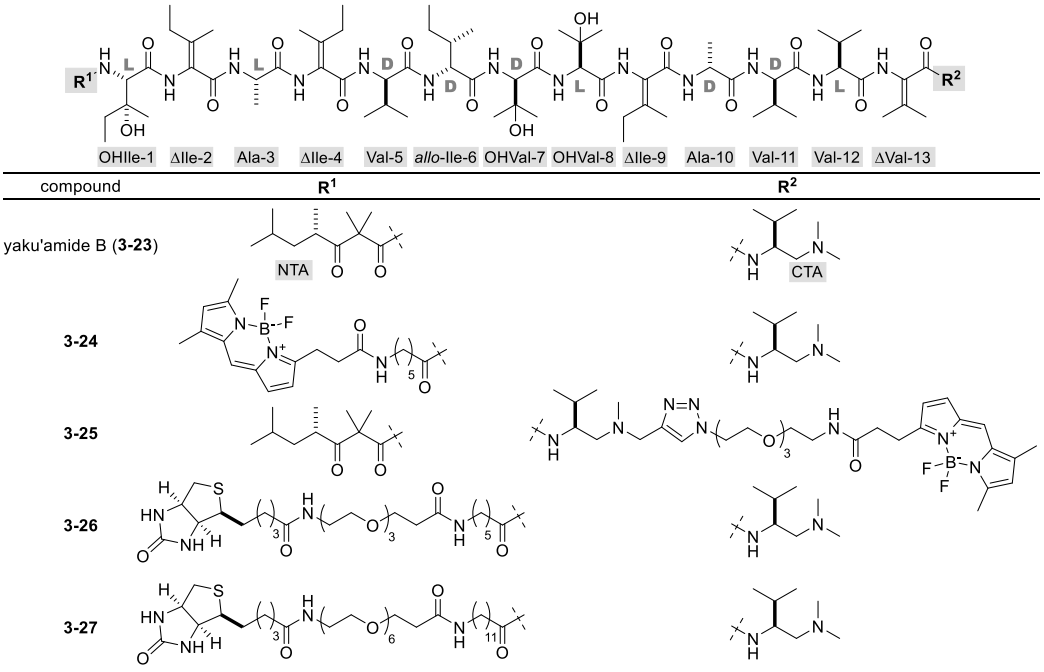


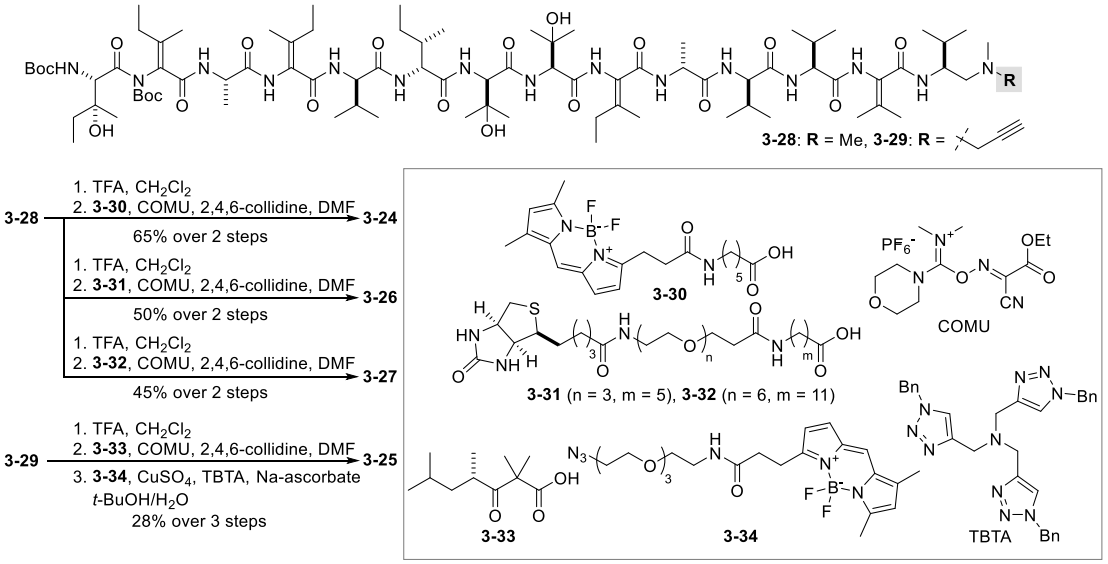
Figure 3-5. Structures of yaku'amide B (**3-23**), fluorescent probes (**3-24** and **3-25**), and biotinylated probes (**3-26** and **3-27**).

ヤクアミドB (**3-23**, Figure 1)は、屋久新曽根産の希少深海海綿*Ceratopsion* sp.から単離された複雑構造ペプチド系天然物である。13アミノ酸残基からなる**3-23**の配列は、4つのβ,β-ジアルキルデヒド

ロアミノ酸構造を含む多数の非タンパク質構成アミノ酸を有し、特異なN末端およびC末端構造(N-terminal acyl group = NTA、C-terminal amine = CTA)を持つ。また、**3-23**はJFCR39ヒトがん細胞パネルに対して、既存の抗がん薬とは異なるパターンで強力な細胞増殖阻害活性を示す。**3-23**は、上述のような構造的特徴と生物活性特性により、新規抗がん薬のシード化合物として有望であるが、天然由来化合物の希少性に加え、構造変換に適した官能基を持たないことから、詳細な生物学的機能解析への展開はこれまで困難であった。当研究室では、銅(I)触媒カップリング反応によるβ,β-ジアルキルデヒドロアミノ酸部位の構築を鍵とした**3-23**の収束的全合成を達成している。本研究では、確立した全合成ルートを基盤として、エナンチオマーを含む様々なケミカルプローブの合成と解析により、**3-23**の標的タンパク質を解析した。

最初に、**3-23**の標的タンパク質の細胞内局在に関する情報を得るため、蛍光プローブの細胞内挙動解析を計画した。蛍光官能基の導入に際しては、生物活性に対する影響を最小化するために**3-23**のアミノ酸配列は維持することとし、N末端またはC末端に蛍光団BODIPYを導入したプローブ**3-24**および**3-25**を設計した。また、標的タンパク質同定に向けて、ビオチン化プローブを用いたアフィニティープルダウンを実施することとした。分子設計に際しては、結合部位とビオチン部位の距離がプルダウン効率に影響を与えることが予想されたため、リンカー長の異なるビオチン化プローブ**3-26**および**3-27**をそれぞれ用いることとした。さらに、生物活性に対する生体内キラル分子の関与を直接的に評価するため、**3-23**および**3-24**のエナンチオマー(*ent*-**3-23**および*ent*-**3-24**)も合成し、解析に付すこととした。

3-23のエナンチオマー(*ent*-**3-23**)は、当研究室で確立された**3-23**の収束的合成法にしたがって、それぞれの中間体のエナンチオマーを用いて全合成した。N末端修飾プローブ(**3-24**, *ent*-**3-24**, **3-26**および**3-27**)は、**3-23**の合成中間体**3-28** (または*ent*-**3-28**)に対し、TFAを用いてN末端のBoc基を除去した後に、縮合剤COMUにより対応するN末端構造を縮合することで合成した(Scheme 3-2)。一方で、C末端修飾プローブ**3-25**は、**3-23**の全合成法を応用して誘導したC末端プロパルギル体**3-28**を変換することで得ることとした。すなわち、N末端にBoc基を有する**3-28**に対して先と同様の方法でNTA (**3-33**)を縮合した後に、TBTA存在下、銅触媒アジド-アルキン付加環化反応に付すことでC末端にBODIPY **3-34**を導入し、**3-25**を合成した。



Scheme 3-2. Synthesis of fluorescent probes (**3-24** and **3-25**) and biotinylated probes (**3-26** and **3-27**).

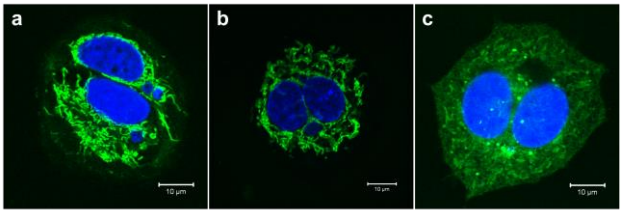
合成した全てのケミカルプローブに関して、ヒト乳がん細胞株MCF-7に対する増殖阻害活性をSRBアッセイにより評価した(Table 3-2)。その結果、**3-23**と*ent*-**3-23**のMCF-7細胞に対する50%細胞増殖阻害濃度(GI_{50})には3倍の差が見出された(**3-23**: GI_{50} = 10.7 nM, *ent*-**3-23**: GI_{50} = 29.2 nM)。これより、**3-23**の顕著な細胞増殖阻害作用に対するキラル分子の関与が示唆された。また、このエナンチオマー間の活性差は蛍光プローブ**3-24** (GI_{50} = 202 nM)と*ent*-**3-24** (GI_{50} = 1260 nM)にも反映された。さらに、N末端BODIPY修飾体**3-24**は、**3-23**に比して細胞増殖阻害活性が1/20倍に減弱したが、C末端BODIPY修飾体**3-25**は**3-23**の強力な活性を完全に維持した(GI_{50} = 12.6 nM)。また、ビオチン化プローブに関して、短鎖リンカーを有する**3-26**は、**3-23**に比して細胞増殖阻害活性を完全に消失した(GI_{50} = >9000)一方で、長鎖リンカーを有する**3-27**は活性を示し(GI_{50} = 149 nM)、リンカー長に依存した生物活性を有することが分かった。

Table 3-2. Growth inhibitory activity against MCF-7 cells

compound	GI_{50} (nM)[a]
yaku'amide B (**3-23**)	10.7 ± 3.1
ent-**3-23**	29.2 ± 2.9
3-24	202 ± 8.0
ent-**3-24**	1260 ± 46
3-25	12.6 ± 4.4
3-26	>9000
3-27	149 ± 54

[a]GI_{50} (50% cell growth inhibition) values were determined by SRB assays.

続いて、蛍光プローブ(**3-24**, *ent*-**3-24**および**3-25**)のMCF-7細胞内における局在を、オルガネラ蛍光染色試薬を用いて調査した。その結果、N末端BODIPY修飾体**3-24** (100 nM)の緑色蛍光(Figure 3-6a)は、ミトコンドリア蛍光染色試薬であるMitoTracker Red CMXRosの赤色蛍光と良く一致した。また細胞増殖阻害活性を完全に維持したC末端BODIPY修飾体**3-25**は、GI_{50}付近の濃度(20 nM)でミトコンドリアに局在することが分かった(Figure 3-6b)。一方で、*ent*-**3-24** (100 nM)は細胞内全体に分布し、ミトコンドリア染色試薬の局在とは一致しなかった(Figure 3-6c)。以上より、**3-23**の細胞内標的はミトコンドリアに存在するキラル分子であることが示唆された。



3-24 (100 nM) **3-25** (20 nM) *ent*-**3-24** (100 nM)

Figure 3-6. Subcellular localization of fluorescent probes **3-24** (a), **3-25** (b), and *ent*-**3-24** (c) in MCF-7 cells. Nuclear was stained with Hoechst 33342. Scale bar represents 10 μm.

以上の結果に基づき、ビオチン化プローブを用いたアフィニティープルダウンによるMCF-7全細胞ライセートからの標的タンパク質精製を試みた。プローブ**3-26**および**3-27**とともに、対照化合物として**3-35** (Figure 3-7a)を用いて比較したところ、細胞増殖阻害活性を示した**3-27**選択的に50 kDa付近に2つのバンドが見出された(Figure 3-7b、lane 1)。また、**3-27**とタンパク質の結合は**3-23**の存在に

よって完全に阻害される(Figure 3-7c、lanes 2–4)一方で、***ent*-3-23**による阻害は弱いことが明らかとなった (Figure 3-7c、lanes 5–7)。これらの結果は、2つのバンドが**3-23**の結合タンパク質であり、*ent*-**3-23**との親和性は比較的低いことを示唆した。また、検出されたバンドをゲル内消化後にLC-MS/MS解析に付したところ、主にミトコンドリア内膜に存在し、ATP合成を担うF_oF_1-ATP合成酵素のサブユニットαおよびβであることが明らかになった。

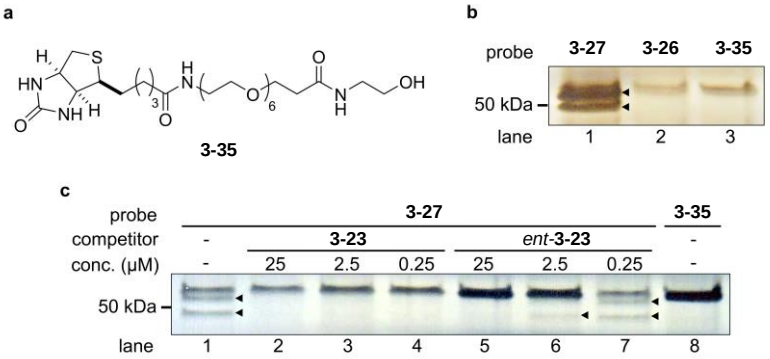


Figure 3-7. Affinity pull-down assays using biotinylated probes. (a) Structure of control probe **3-35**. (b) Affinity pull-down from whole-cell lysate of MCF-7 cells using probes **3-26** and **3-27**. (c) Competitive pull-down assay using **3-27** with **3-23** and *ent*-**3-23**.

F_oF_1-ATP合成酵素はミトコンドリア内膜を隔てて形成されたプロトン濃度勾配を駆動力としてATPを合成する。一方で、F_oF_1-ATP合成酵素は精製した状態においては逆反応であるATPの加水分解も触媒する。そこで、**3-23**の標的タンパク質への作用を明らかにするため、ミトコンドリアにおけるATP産生作用と精製したF_oF_1-ATP合成酵素の加水分解に対する作用を評価した。まず、ATP産生作用の評価において、既知のF_oF_1-ATP合成酵素阻害化合物であるoligomycin Aと比較したところ、**3-23**および*ent*-**3-23**はそれぞれのGI_{50}付近の濃度(**3-23**: EC_{50} = 15.5 nM, *ent*-**3-23**: 135 nM)でミトコンドリアF_oF_1-ATP合成酵素によるATP産生を阻害することが分かった(Figure 3-8a)。以上より、ATP産生阻害が**3-23**の細胞増殖阻害機構であることが強く示唆された。興味深いことに、ATP加水分解活性評価においては、oligomycin AがATP合成と同様に阻害作用を示すのに対して、**3-23**はATP加水分解を3倍程度亢進し、*ent*-**3-23**は効果を示さなかった(Figure 3-8b)。これらの結果は、**3-23**がoligomycin Aとは異なる作用機構を有し、**3-23**と*ent*-**3-23**が異なる様式でF_oF_1-ATP合成酵素に結合することを示唆した。

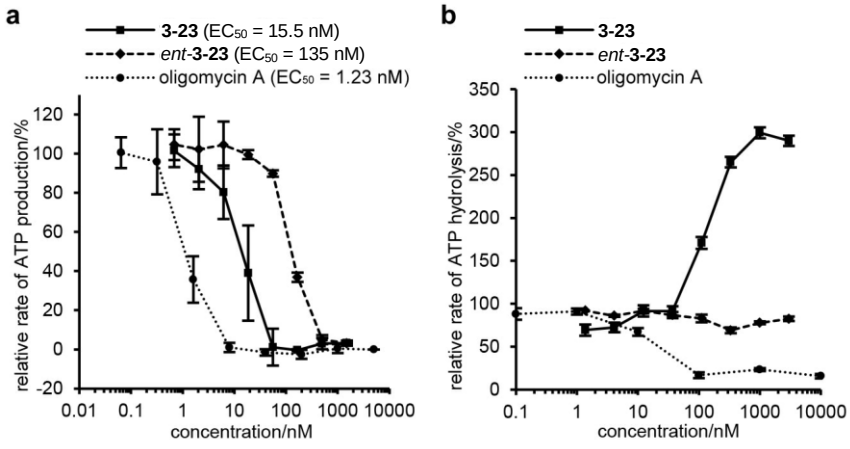


Figure 3-8. (a) Effect of **3-23** and *ent*-**3-23** on mitochondrial ATP production rate and (b) ATP hydrolysis rate. A F_oF_1-ATPase/synthase inhibitor oligomycin A was used as a control in the both experiments.

本研究では、確立された**3-23**の全合成法を基盤としたケミカルプローブ群の合成と応用により、**3-23**の結合タンパク質としてF_oF_1-ATP合成酵素サブユニットαおよびβを見出した。さらに、**3-23**がGI_{50}付近の濃度でF_oF_1-ATP合成酵素によるATP産生を阻害することを明らかにした。また、**3-23**が同酵素のATP加水分解活性を亢進することを明らかにし、F_oF_1-ATP合成酵素に対する**3-23**の特異な作用を見出した。今回明らかにした**3-23**のF_oF_1-ATP合成酵素に対する作用は、どちらも細胞内ATP濃度の低下に寄与し、**3-23**の標的タンパク質に対する機能が細胞増殖阻害機構と関連することを強く示唆する。

学 術 論 文

1) T. Mochimaru, K. Fukunaga, J. Miyata, M. Matsusaka, K. Masaki, H. Kabata, S. Ueda, Y. Suzuki, T. Betsuyaku, T. Goto, D. Urabe, M. Inoue, Y. Isobe, M. Arita, "12-OH-17,18-Epoxyeicosatetraenoic Acid Alleviates Eosinophilic Airway Inflammation in Murine Lungs," *Allergy* **2018**, *73*, 369-378.
2) K. Sakata, Y. Wang, D. Urabe, M. Inoue, "Synthesis of the Tetracyclic Structure of Batrachotoxin Enabled by Bridgehead Radical Coupling and Pd/Ni-Promoted Ullmann Reaction," *Org. Lett.* **2018**, *20*, 130-133.
3) K. Minagawa, D. Urabe, M. Inoue, "A Three-Component Coupling Approach to the ACE-Ring Substructure of C19-Diterpene Alkaloids," *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 326-332.
4) H. Itoh, K. Tokumoto, T. Kaji, A. Paudel, S. Panthee, H. Hamamoto, K. Sekimizu, M. Inoue, "Total Synthesis and Biological Mode of Action of WAP-8294A2: A Menaquinone-Targeting Antibiotic," *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 6924-6935.
5) Y. Kofuku, T. Yokomizo, S. Imai, Y. Shiraishi, M. Natsume, H. Itoh, M. Inoue, K. Nakata, S. Igarashi, H. Yamaguchi, T. Mizukoshi, E. Suzuki, T. Ueda, I. Shimada, "Deuteration and Selective Labeling of Alanine Methyl Groups of β_2-Adrenergic Receptor Expressed in a Baculovirus-insect Cell Expression System," *J. Biomol. NMR* **2018**, *71*, 185-192.
6) M. Koshimizu, M. Nagatomo, M. Inoue, "Construction of a Pentacyclic Ring System of Isoryanodane Diterpenoids by SmI_2-mediated Transannular Cyclization," *Tetrahedron* **2018**, *74*, 3384-3390.
7) A. Hayata, H. Itoh, M. Inoue, "Solid-Phase Total Synthesis and Dual Mechanism of Action of the Channel-Forming 48-mer Peptide Polytheonamide B," *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 10602–10611.
8) K. Kitamura, H. Itoh, K. Sakurai, S. Dan, M. Inoue, "Target Identification of Yaku'amide B and Its Two Distinct Activities against Mitochondrial F_oF_1-ATP Synthase," *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12189-12199.
9) D. Urabe, Y. Nakagawa, K. Mukai, K. Fukushima, N. Aoki, H. Itoh, M. Nagatomo, M. Inoue, "Total Synthesis and Biological Evaluation of 19-Hydroxysarmentogenin-3-*O*-α-L-rhamnoside, Trewianin, and Their Aglycons," *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 13888-13910.
10) T. Kawamata, A. Yamaguchi, M. Nagatomo, M. Inoue, "Convergent Total Synthesis of Asimicin via Decarbonylative Radical Dimerization," *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 18907-18912.
11) H. Matoba, T. Watanabe, M. Nagatomo, M. Inoue, "Convergent Synthesis of Taxol Skeleton via Decarbonylative Radical Coupling Reaction," *Org. Lett.* **2018**, *20*, 7554-7557.

総　説・著　書

1) 長友優典, 井上将行, “リアノダンジテルペンの統一的全合成,” *天然有機化合物の全合成　独創的なものづくりの反応と戦略(CSJ カレントレビュー 27) (日本化学会　編), 化学同人*, pp 103-109 (**2018**). ISBN: 9784759813876
2) 井上将行, 占部大介, “全合成の現在と未来：戦略面から見た全合成と人工分子創製の重要性,” *天然有機化合物の全合成　独創的なものづくりの反応と戦略(CSJ カレントレビュー 27) (日本化学会　編), 化学同人*, pp 20-23 (**2018**).　ISBN: 9784759813876
3) 井上将行, “新・化学を創ってゆく人びと：井上将行教授に聞く,” *化学* **2018**, *73*, 12-18.
4) 長友優典, “窮すれば通ずーリアノジン全合成からの学び,” *有機合成化学協会誌* **2018**, *76*, 494-497.

受　賞

1) 井上将行, 読売テクノ・フォーラム ゴールド・メダル賞
2) 井上将行, The Journal of Organic Chemistry Outstanding Publication of the Year Award Lectureship
3) 井上将行, Novartis Lecture (University of Toronto)
4) 長友優典, 平成30年度日本薬学会奨励賞
5) 川俣貴裕(博士課程3年), “アシミシンの全合成,” 日本薬学会第138年会学生優秀発表賞
6) 鎌倉大貴(博士課程2年) , “タラチサミンの全合成研究,” 第16回次世代を担う有機化学シンポジウム優秀発表賞
7) 清水慎介(博士課程1年) , “ブファジエノリド類の合成研究,” 第62回日本薬学会関東支部大会優秀口頭発表賞
8) 廣瀬哲(博士課程1年), “Study toward the Unified Total Synthesis of Tigliane and Daphnane Diterpens,” The 8th Junior International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (JICCEOCA-8)　Poster Presentation Award

招　待　講　演

1) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (ACP Lectureship), Institute of Chemistry, Academia Sinica, Taiwan, China, January 22, 2018.
2) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (ACP Lectureship), Institute of Biotechnology and Pharmaceutical Research, Taiwan, China, January 23, 2018.
3) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (ACP Lectureship), Department of Chemistry, National Tsing Hua University, Taiwan, China, January 24, 2018.
4) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (Swiss Chemical Society Lectureship), Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zurich, Zurich, Switzerland, May 7, 2018.
5) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (Swiss Chemical Society Lectureship), Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern, Bern, Switzerland, May 8, 2018.
6) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (Swiss Chemical

Society Lectureship), Department of Chemistry, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland, May 9, 2018.

7) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (Swiss Chemical Society Lectureship), Department of Chemistry, University of Geneva, Genève, Switzerland, May 11, 2018.
8) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (Swiss Chemical Society Lectureship), Institute of Chemical Sciences and Engineering, EPF Lausanne, Lausanne, Switzerland, May 14, 2018.
9) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (Swiss Chemical Society Lectureship), Department of Chemistry, University of Basel, Basel, Switzerland, May 15, 2018.
10) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” (Novartis Lectureship), Department of Chemistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, June 21, 2018
11) M. Inoue, “Total Synthesis and Biological Evaluation of Peptide Natural Products,” (JOC Lectureship), 256th ACS National Meeting, Boston, MA, USA, August 19, 2018.
12) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” 24th Conference on Isoprenoids, Białystok, Poland, September 11, 2018.
13) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” 22nd International Conference on Organic Synthesis (22-ICOS), Florence, Italy, September 20, 2018.
14) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” International Symposium on Frontiers of Natural and Biomimetic Drugs on “Natural Product Synthesis”, Huairou APEC Summit Venue, Beijing, China, October 18, 2018.
15) M. Inoue, “Radical-Based Approach for Synthesis of Complex Natural Products,” 6th UK-Japan Conference on Asymmetric Catalysis, Kyushu University, Fukuoka, Japan, November 6, 2018.
16) 井上将行, “薬を創る化学,” EMP プログラム, 東京大学(東京都, 文京区), 2018 年 1 月 19 日
17) 井上将行 (長友優典代理), “脱一酸化炭素を伴うラジカル反応を基盤とした高酸化度天然物の全合成戦略” 新学術領域研究「ハイブリッド触媒」 第 1 回公開シンポジウム, 名古屋大学 ES 総合館 ES ホール, (愛知県, 名古屋市), 2018 年 1 月 30 日
18) 井上将行, “OBOC 戦略によるペプチド系生物活性分子の創出,” 日本化学会第 98 春季年会ケミカルバイオロジー研究加速のための生物活性分子の発見戦略, 日本大学　理工学部船橋キャンパス, (千葉県, 船橋市), 2018 年 3 月 20 日
19) 井上将行, “複雑な分子を簡単に組み立てる,” 2018 年度　ゴールド・メダル賞受賞記念講演会, 日本プレスセンター１０階大ホール（東京都, 千代田区）, 2018 年 5 月 19 日
20) 井上将行, “複雑な化合物を合成するときの合成戦略,” 化学技術基礎講座・製品開発に必要な有機合成化学の基礎, 日本化学会館(東京都, 千代田区), 2018 年 9 月 6 日
21) 長友優典 “高酸化度天然物の全合成戦略の開発,” 日本薬学会　第 138 年会薬学奨励賞受賞講演, 石川県立音楽堂, 石川県金沢市, 2018 年 3 月 26 日
22) 長友優典 “高酸化度天然物の全合成戦略の開発,” 第 6 回慶應有機化学若手シンポジウム, 慶應義塾大学矢上キャンパス, 神奈川県横浜市, 2018 年 5 月 12 日

23) 長友優典 “立体電子的視座からの天然物合成,” 2018 年度三大学セミナー, 東京理科大大子研修センター, 茨城県大子町, 2018 年 6 月 16 日

24) 長友優典 “立体電子的視座からの天然物合成,” 第 53 回天然物化学談話会奨励賞受賞講演, 不死王閣, 大阪府池田市, 2018 年 7 月 5 日

25) 長友優典, 井上将行 “アシミシンの全合成,” 第 5 回中分子戦略若手シンポジウム, シーパル須磨, 兵庫県神戸市, 2018 年 8 月 17 日