

光反応性保護基を用いた protoaculeine B の合成研究

(^a横浜市大院生命ナノ、^b北大院水産)

○塩崎宏樹^a、宮原正義^a、梁夕藤^a、宮古圭^b、本田彬人^b、石川裕一^a、酒井隆一^b、及川雅人^a

【序論】

Protoaculeine B (pACU-B, Fig. 1, **1**)¹⁾ は、沖縄産の海綿 *Axinyssa aculeata* より単離されたペプチド aculeine B (ACU-B)²⁾ の N 末端部分構造で、tryptophan 由来と推定されるヘテロ三環性骨格に 1,3-propanediamine の 12-15 量体ポリマーが縮合した構造を有している。ACU-B は強い溶血作用を持つほか、培養がん細胞に対し毒性を示し、それが長鎖ポリアミン

部 (long-chain polyamine, LCPA) と細胞表面分子との特異的な相互作用に基づくことが示唆されており、新たなメカニズムに基づく抗がん剤の開発やドラッグデリバリーの観点から興味深い。

本研究では、ACU-B の機能解析を進めるため、その部分構造に相当する pACU-B および類縁体の全合成に取り組んでいる。すでにそのヘテロ三環性骨格の構築法については確立し、第 57 回の本討論会にて報告したが³⁾、LCPA の合成法やヘテロ三環性フラグメントとの縮合法については、検討の初期段階において複数の問題点を明らかにするとどまっていた。今回、それらの解決に成功し、propanediamine モノマーを有する **2** や、三環性骨格のみを有する desLCPA analog **3** などの類縁体合成と予備的活性評価の実施、さらに pACU-B の完全保護体の合成に成功したので報告する。

Fig. 1. ACU-A と ACU-B の構造

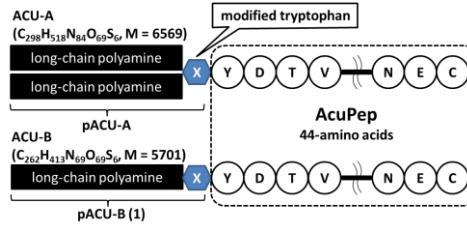
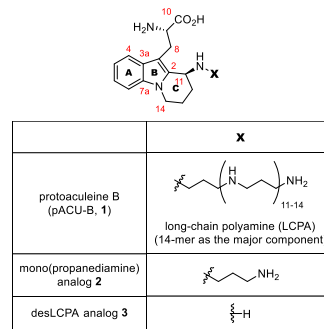


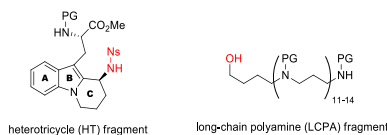
Fig. 2. pACU-B (**1**) と合成類縁体



【合成計画】

pACU-B (**1**) は、上述の通り、三環性ヘテロ環 (heterotricycle, HT) および LCPA のふたつのフラグメントに逆合成的に分け、それらのカップリングは Ns strategy により行うことにした (Fig. 3)。

Fig. 3. 本研究で設定したフラグメント



【光反応性保護基を用いた LCPA フラグメントの合成】

1,3-Propanediamine のポリマーの化学合成は例が少なく、pACU-B の構造に匹敵するものは、2010 年に報告された固相合成法が 1 例あるのみで、しかもその方法はそのままでは pACU-B の合成に適用することは困難であった⁴⁾。一方、我々が当初行った Ns strategy による 12 量体の合成では、11 個の Ns 基を有する LCPA 保護体 **4** は溶解性に乏しいという問題点が明らかになっていた (Fig. 4, 未発表)。そこで本研究では物性を改善するため、Ns 基の数を 4 個に減らし、他のアミノ基を Boc 基により保護する経路を考案した。さらに、一時的な保護基として、光照射による除去が可能な 1-(2-nitrophenyl)ethoxycarbonyl (NPEC) 基の適用性を検討し、これが Ns 基とオルソゴナルな反応性を有することを明らかにした (Table 1)⁵⁾。

Fig. 4. 第一世代合成により得た 12 量体 LCPA **4**

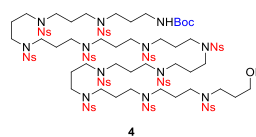


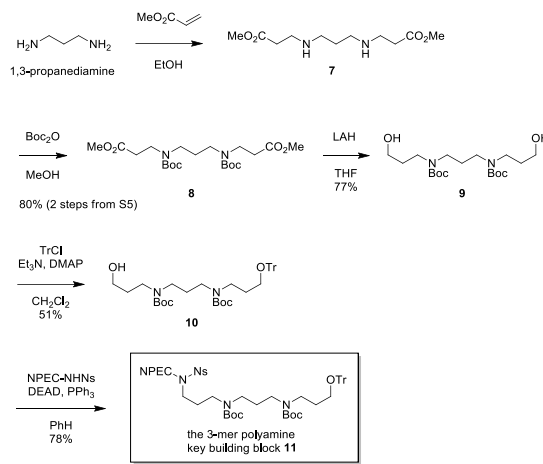
Table 1. 光照射による NPEC 基の選択的脱保護反応の検討

Entry	Irradiation source	Solvent / concentration	Time	Yield
1	UV lamp (365 nm),	MeOH / 0.003 M	9 h	85% (NMR)
2	UV lamp (365 nm),	TFE or HFIP / 0.003 M	9 h	100% (NMR) ^a
3	LED lamp (395 nm),	HFIP / 0.003 M	9 h	8.2% (NMR)
4	high-pressure Hg lamp	MeOH / 0.0005 M	1 h	100% (NMR) 94% (isolation)

これらの保護基の組み合わせを用いた反復合成法により、保護 12 量体 **15** の合成に以下のように取り組んだ。

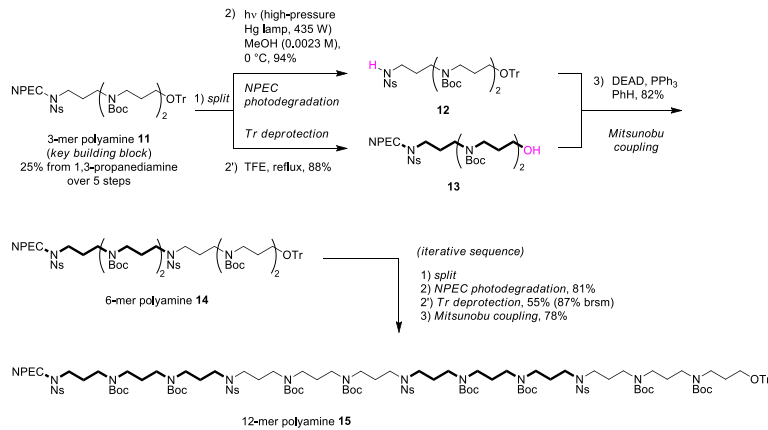
1,3-Propanediamine に 2 モルのアクリル酸メチルを作用させ、ジエステル **7** を得た (Scheme 1)。これを保護した後に還元し、生じたジオールのモノトリ化により **10** とした。さらに、本研究で開発した NPEC-NHNs との光延反応により 3 量体に相当するビルディングブロック **11** を得た。収率は 5 段階で 25% であった。

Scheme 1. 3 量体ビルディングブロックの合成



このビルディングブロック **11** は高圧水銀灯による照射で NPEC 基が除去された Ns amine **12** を与えた (Scheme 2)。また、**11** は 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) に溶解して加熱すると脱 Tr 化が起こり、アルコール **13** が得られた。これらを光延反応によりカップリングさせると 6 量体ポリアミン **14** が 82% の収率で得られた。この 6 量体に対し、NPEC 基/Tr 基の脱保護と光延カップリングを繰り返して 12 量体ポリアミン **15** を合成した。カップリング反応の収率は 78% と満足 of のゆくものであり、また、全ての反応において、深刻な副反応は観察されなかった。12 量体ポリアミン **15** は、先に合成した **4** (Fig. 4) とは異なり、酢酸エチルやジクロロメタンなど一般の有機溶媒に可溶であり、ここに物性が改善された 12 量体ポリアミン保護体の開発に成功した⁶⁾。

Scheme 2. 12 量体ポリアミン **15** の合成



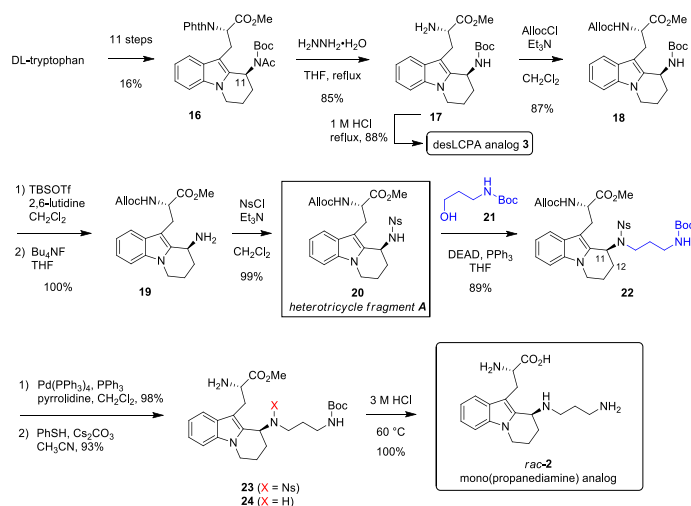
【ヘテロ三環性 (HT) フラグメントの合成】

すでに第 57 回討論会にて報告したとおり³⁾、我々は **tryptophan** を出発原料とする直線的な合成法により、三環性骨格化合物 **16** のジアステレオ選択的合成を達成し、その脱保護によって **desLCPA** 類縁体 **3** のラセミ合成に成功している (Scheme 3)。この合成での鍵反応は、11 位アミノ基の立体選択的導入であり、これはオキシムから得られるエナミドの接触水素化により実現することができた。この接触水素化の際に、側鎖アミノ基の保護に用いた *N*-Phth 基が、 π スタッキング相互作用によりエナミドの β 面を遮蔽して、水素の付加がもっぱら α 面から起こったことが推定されている。

今回は、この三環性骨格化合物 **16** から、適切に保護された HT フラグメント **20** の合成を試みた。まず、ヒドラジン処理により、*N*-Ac 基および *N*-Phth 基の除去を行ってアミン **17** とした。側鎖アミノ基を Alloc 基で保護し直して、得られた **18** の *N*-Boc 基を 2 段階で *N*-Ns 基に付け替え、HT フラグメント **20** を得た。

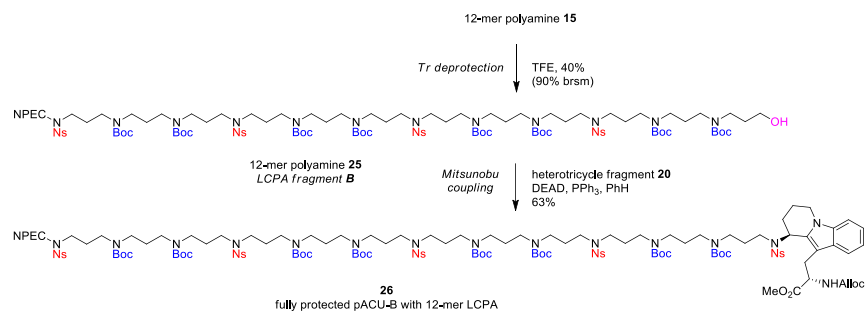
この HT フラグメント **20** の有用性を確認するため、光延反応による propanediamine モノマーの導入を試みた。このカップリング反応は、HT フラグメント **20** の構造の複雑さから容易には進行しないことが危惧されていたが、予期に反して反応は極めて円滑に進行し、**22** が 89% の高収率で得られた。また、この際に、C11-C12 位における脱離反応などの副反応は観察されなかった。**22** に対して、Alloc 基および Ns 基の脱保護を順次行い、最後に酸加水分解により Boc 基とメチルエステルを除去して、mono(propanediamine) 類縁体 **2** の合成に成功した。

Scheme 3. HT フラグメントの合成



さらに、HT フラグメント **20** と 12 量体 LCPA フラグメントのカップリング反応にも取り組んだ (Scheme 4)。まず、12 量体ポリアミン **15** の Tr 基を TFE により除去してアルコール **25** とした。これと HT フラグメント **20** のカップリングを光延反応により試みると、反応は室温で速やかに進行し、コンジュゲート **26** を 63% の収率で与えた。副生成物は観察されず、未反応の基質 **20/26** は回収された。pACU-B は、14 量体 LCPA を持つものも検出されており、今回合成した **26** は pACU-B の完全保護体とみなすことができる。1,3-Propanediamine ポリマーのコンジュゲートとしては、今回合成した **26** がこれまでで最も大きい。

Scheme 4. pACU-B 完全保護体の合成



【生物活性】

本研究で得た 2 種類縁体 **2, 3** は、ACU-B が毒性を示した複数の培養がん細胞に対して、いずれも細胞毒性を示さなかった。また、マウス脳室内投与においては、des LCPA 類縁体 **3** のみが興奮性の行動変化を引き起こした。これらの類縁体は、親化合物である ACU-B の生物機能を失っていることが示された。神経活性を示した desLCPA 類縁体 **3** については、標的探索を含めた詳細な解析を進めたいと考えている。

References

- 1) Matsunaga, S. et al, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 3090-3093.
- 2) Sakai, R. et al., *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 2191-2200.
- 3) 菅原ら, 第 57 回天然有機化合物討論会 (横浜) 講演要旨集, **2015**, p. 621-626.
- 4) Bernecker, A. et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 1023-1031.
- 5) Miyahara, M. et al, *manuscript in preparation*.
- 6) Shiozaki, H. et al, *Org. Lett.*, **2018**, *20*, 3403-3407.

Synthetic Study on Protoaculeine B Using Photoremovable Protecting Group

Hiroki Shiozaki^a, Masayoshi Miyahara^a, Ximeng Liang^a, Kei Miyako^b, Akito Honda^b,
Yuichi Ishikawa^a, Ryuichi Sakai^b, Masato Oikawa^a

(^aGraduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, ^bFaculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

A new tryptophan-derived amino acid protoaculeine B (pACU-B), isolated from the marine sponge *Axinyssa aculeata* collected in Iriomote, Japan, is an *N*-terminal amino acid of highly modified peptide toxin aculeine B. pACU-B is composed of a tryptophan-derived heterotricycle and a long-chain polyamine (LCPA), that is a linearly extended 14-mer of 1,3-propanediamine.

We have been working on the synthesis of pACU-B and the analogs to study the biological functions in detail. The method for construction of the characteristic heterotricyclic (HT) moiety had been already established, and, here, we report synthetic approach toward the LCPA fragment. The synthesis features our Ns-NPEC strategy, which uses photolabile NPEC group as a temporary protecting group for amine, in combination with Boc and Ns groups for persistent protection. By using the strategy in an iterative manner, synthesis of suitably protected 12-mer polyamine has been efficiently achieved.

Coupling reaction of the LCPA fragment with the HT fragment was next investigated. We found that the coupling reaction of Ns amine with alcohol is readily realized by Mitsunobu reaction by DEAD and PPh₃.

By the methodology developed here, mono(propanediamine) analog **2** and desLCPA analog **3** have been synthesized. Furthermore, synthesis of fully protected pACU-B with 12-mer polyamine has been accomplished.

Two analogs **2** and **3** were preliminarily evaluated in vitro and in vivo. Cytotoxic assay on several cancer cell lines revealed both analogs are inactive. Interestingly, however, intracerebroventricular injection in mice showed that the desLCPA analog **3** is neuroactive, while mono(propanediamine) analog **2** is inactive. We suppose that neuroactivity of **3** is mediated by the neuronal receptor in the central nervous system.