ホスホン酸・ホスフィン酸を活用する生物活性化合物の創製

横松 力†

Development of Biologically Active Compounds on the Basis of Phosphonic and Phosphinic Acid Functionalities

Tsutomu Yokomatsu†

*School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences;
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan*

(Received May 2, 2017)

Phosphonic and phosphinic acids, especially α -heteroatom-substituted ones, possess unique structural and physical features which enable them to act as hydrolytically stable analogs to biological phosphates in biological processes. They also act as mimetics in the transition state of the protease-induced hydrolysis of dipeptides. The first half of this review focuses on selected new synthetic methods developed by our research group for the stereoselective synthesis of α -heteroatom-substituted phosphonic and phosphinic acid derivatives, including modified nucleotide analogs and phosphinyl dipeptide isosteres. In the latter half, this review summarizes the utility of difluoromethylenephosphonic acids and phosphonic acid esters in the development of enzyme inhibitors against protein tyrosine phosphatases, sphingomyelinases, purine nucleoside phosphorylases and thrombin. The enzyme inhibitors developed were used as probes to elucidate signal transductions and the mechanisms of enzyme actions. The findings of the studies are briefly described.

Key words——phosphonate; phosphinate; phosphate mimic; dipeptide isostere; nucleotide analogue; enzyme inhibitor

1. はじめに

筆者は、1979年3月に東京薬科大学大学院薬学研究科博士後期課程を修了後、カリフォルニア大学アーバイン校で博士研究員として、研究を開始した。¹⁾ 帰国後、幸いにも母校の薬品製造工学教室(加納慎蔵教授・本学名誉教授)の助手として採用された。助手及び講師を務めた1980年代は、精密合成化学という言葉がはやり始めた時代だった。筆者は、留学時代の経験を活かして、アルカロイドの精密合成法について研究した。この合成法では、アシルイミニウム中間体の π 電子環化反応を利用しており、不斉中心を多数持つアルカロイドの新しい立体制御合成法を確立することができた。²⁻⁴⁾

助教授昇進を機会に研究テーマを見直すこととした。当時、時代の要請もあって、本学の化学系研究

室の多くは、天然物の全合成を指向する精密合成化学を展開していた。薬学的に有用な分子の設計・合成、さらにその機能解析に力を注ぐメディシナルケミストリーと呼ばれる領域の研究は、かならずしも十分に行われていなかった。新しいテーマを模索するうちに、生体内で不安定な化学結合をホスホン酸やホスフィン酸などで化学修飾すると、メディシナルケミストリーとしても有用な化合物の創製につながることを期待でき、諸外国では、この領域の研究が活発に行われていることを学んだ。しかし、わが国の薬学領域ではあまり研究されていなかった。そこで、生体内で不安定な化学結合として、ペプチド結合とリン酸エステル結合に主に注目し、生物活性ペプチド及びリン酸エステルを「ホスホン酸・ホスフィン酸」と呼ばれる化合物群で化学修飾する研究を展開した (Fig. 1).⁵⁾

本稿では、はじめに α 位にヘテロ原子団を有するホスホン酸及びホスフィン酸誘導体などの不斉合成を目指した反応開発の経緯を簡単に概説する。後半では、それらの素反応を利用して、ホスホン酸を基盤とする新しい生物活性化合物を見出した経緯

東京薬科大学薬学部 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

現住所: *東京薬科大学中央分析センター (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

e-mail: yokomatsu@toyaku.ac.jp

本総説は、平成27年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Fig. 1. Phosphonates and Phosphinates in Medicinal Chemistry

について述べる。

2. α 位にヒドロキシ基あるいはアミノ基を有するホスホン酸誘導体の合成

α 位にヒドロキシ基を有するホスホン酸誘導体 (α -ヒドロキシホスホン酸誘導体) は、リン酸モノエステルの安定な生物学的等価体として機能することが期待できることから、リン酸エステル誘導体の化学修飾の領域で注目を集めていた (Fig. 2).⁶⁻¹⁰⁾ また、 α -ヒドロキシホスホン酸誘導体は、ヒドロキシ基をアミノ基に変換すれば、 α -アミノ酸のホスホン酸アナログ (α -アミノホスホン酸) に変換でき、合成中間体としても有用と考えられた。 α -アミノホスホン酸は、ある種のペプチドに組み込むと、遷移状態理論に基づくペプチド性プロテアーゼ阻害剤のジペプチドイソスターに利用でき、ペプチドミメティックスの分野で注目されていた (Fig. 2).¹¹⁾

α -ヒドロキシホスホン酸誘導体は、1) トリアルキルホスファイトをアルデヒドに熱的な求核付加する方法 (Abramov 反応),¹²⁻¹⁴⁾ あるいは、2) 亜リン酸ジアルキルのアニオンをアルデヒドに求核付加反応させる方法 (Pudovik 反応) で合成されている。¹²⁻¹⁴⁾ しかしながら、筆者が研究を開始した時点では、これらの方法を不斉反応に展開している報告は、数例に留まっていた。そこで、これらの反応の不斉反応への展開を試みた。¹⁵⁾

2-1. 不斉 Abramov 反応の開発 Abramov 反応を不斉反応に展開するために、筆者は、プロキラルアルデヒドをホモキラルジオキサンアセタール **1**

Fig. 2. Phosphoryl Mimetics for Phosphates and Dipeptides

に変換後、ルイス酸存在下でトリエチルホスファイトと低温で反応させる方法を検討した (Scheme 1).¹⁶⁾ この反応は、反応基質の選択、触媒のルイス酸性を適切に調整すると、アセタールがトリエチルホスファイトにより S_N2 型の求核攻撃を受け、**2** が高いジアステレオ選択性 (>95% de) で生成した。**2** は、キラル補助基を除去すると、目的とした α -ヒドロキシホスホン酸エステル **3** が高い光学純度で得られた。化合物 **3** は、ヒドロキシ基をアミノ基に変換すると、 α -アミノホスホン酸 **5** に容易に変換できた。

前述したように、 α -ヒドロキシホスホン酸誘導体は、リン酸エステルの安定な生物学的等価体として

横松 カ

1979 年東京薬科大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。1979 年カリフォルニア大学アーバイン校博士研究員。東京薬科大学薬学部助手、講師、助教授を経て、2004 年東京薬科大学薬学部教授。その間、医療衛生薬学科学科長、学長補佐などを歴任。2016 年 3 月定年退職。2016 年東京薬科大学名誉教授。2016 年より東京薬科大学中央分析センター特命教授。

Scheme 1. Stereoselective Synthesis of α -Hydroxyphosphonates from Homochiral Dioxane Acetals

Scheme 2. Stereocontrolled Synthesis of Hydroxymethylene Phosphonate Analogues of Phosphorylated Tyrosine

も注目されており、リン酸エステルの化学修飾に利用されていた。なかでも、リン酸化チロシン (*p*-Tyr) は、タンパク質-タンパク質間の相互作用に重要な役割を演じていることが明らかになり、*p*-Tyr のエステル酸素をヒドロキシメチン (CHOH) に置き換えた α -ヒドロキシホスホン酸誘導体 (HPmp) の合成も注目されていた (Scheme 2).¹⁷⁾ しかしながら、既存の合成法では、 α 位のヒドロキシ基の立体配置を立体選択的に構築することができなかった。

筆者は、L-ホルミルフェニルアラニン誘導体 **6** から容易に誘導されるキラルアセタール **7** を TiCl_4 存在下、低温でトリエチルホスファイトと作用させ、引き続き不斉補助基を除去すると、HPmp の合成中間体 **8** を立体選択的に合成することを見出した (Scheme 2).¹⁸⁾ 本法は、キラル補助基として、(*S,S*)-アセタールを用いると、**8** のジアステレオマーが立体選択的に合成できる。

2-2. 不斉 Pudovik 反応の開発 亜リン酸ジアシルキルは、ホスホネート **a** とホスファイト **b** の互変異性の平衡混合物として存在するが、塩基を作用

Scheme 3. Pudovik Reaction Catalyzed by a Base

させると平衡はホスファイトに傾きアニオン **c** が生成する (Scheme 3)。アニオン **c** とアルデヒドの反応から α -ヒドロキシホスホン酸誘導体を得る反応は Pudovik 反応と呼ばれている。¹⁴⁾ Pudovik 反応を不斉反応に展開するためには、1) ホスホネートのエステル部分をキラルにする、あるいは、2) キラルな塩基 **B** を用いるなどが考えられる。筆者が研究を開始した当時、1) の方法については、既に、優れた方法が報告されていた。¹⁵⁾ しかしながら、触媒量のキラルな塩基 **B** を用いる Pudovik 反応は、キニーネを用いる方法が一例報告されているのみであった。^{19,20)}

筆者は、不斉 Pudovik 反応への展開を期待し

Scheme 4. Chiral Transition Metal-catalyzed Pudovik Reaction with Aldehydes

て、従来のアルキルアミン、アルカリ及びアルカリ土類金属塩に代わる Pudovik 反応の活性化剤として、遷移金属錯体を適用したところ、Ti(OPrⁱ)₄やLa(OPrⁱ)₃が有効に機能することを見出した。²¹⁾そこで、不斉 Pudovik 反応に展開するために、Sharpless の不斉チタン触媒 **9**²²⁻²⁴⁾ 及び Shibasaki らが開発途上であった (R)-ランタンリチウムバイノール [(R)-LLB]^{25,26)} に注目し、これらの触媒存在下に垂リン酸ジエチルとアルデヒドとの反応を検討した (Scheme 4)。

不斉チタン触媒 **9** を用いた場合、顕著な溶媒効果が認められ、エーテルなどドナー性溶媒が効果的であり、**9** がルイス塩基として作用するものと考えられる。^{27,28)} (R)-LLB を触媒として用いると、脂肪族アルデヒドとの反応は、全く選択性を示さなかった。しかし、芳香族アルデヒドとの反応は、芳香核上の置換基効果を受けるが、アニスアルデヒドとの反応では、高いエナンチオ選択性 (82% ee) で、対応する Pudovik 生成物が得られた。^{28,29)} 本法は、不斉遷移金属錯体を用いる不斉 Pudovik 反応の最初の報告例となった。³⁰⁾

その後、Shibasaki らにより、エナンチオ選択性の高い触媒系が見い出された (Scheme 5)。³¹⁾ Shibasaki らは、不斉金属錯体として、LiAlH₄ と (R)-binaphthol から調製される触媒 [(R)-ALB] を用いると、脂肪族アルデヒドでも高いエナンチオ選択性を示す Pudovik 反応が進行することを見出し

Scheme 5. Improved Catalysts for Asymmetric Pudovik Reactions

ている。³¹⁾ また、(R)-LLB のリチウムをポタシウムに置換した触媒 [(R)-LPB] を用いると、アルドイミン類に対しても高いエナンチオ選択性で Pudovik 型の付加反応が進行することが報告された。³²⁾ さらに、最近では、不斉有機分子触媒を利用する Pudovik 反応も報告されるようになり、³³⁾ Pudovik 型の反応は不斉触媒の機能評価を検討する際の反応としても位置づけられるようになっている。

3. β-アミノ-α-ヒドロキシホスホン酸誘導体の合成

β-アミノ-α-ヒドロキシホスホン酸あるいは β-アミノ-α-ヒドロキシホスフィン酸を組み込んだオリ

Fig. 3. Biologically Active Peptides Possessing Phosphonate and Phosphinate Moieties

ゴペプチド **10** 及び **11** は、レニン阻害活性を発現することが知られていた (Fig. 3).³⁴⁻³⁶ また、Peyman らは、HIV プロテアーゼが C_2 軸対称性ホモダイマーとしてプロテアーゼの機能を示すことに注目して、 C_2 対称性あるいは擬対称性のオリゴペプチド **12** 及び **13** を合成し、それらに強い HIV 阻害活性を見出ししていた (Fig. 3).^{37,38}

以上のオリゴペプチドを構成する β -アミノ- α -ヒドロキシホスホン酸あるいは β -アミノ- α -ヒドロキシホスフィン酸は、高いジアステレオ選択性で得ることが困難であったため、ジアステレオマーの混合物がオリゴペプチドに組みこまれて活性評価が行われていた。

3-1. ジアステレオ選択的 Abramov 反応の利用

筆者は、以上の問題を解決するために、ルイス酸触媒下の α -ジベンジルアミノアルデヒド **14** のキレート及び非キレート制御下の Abramov 型の反応を検討した (Scheme 6).³⁹ すなわち、 $TiCl_4$, Et_2AlCl , $BF_3 \cdot Et_2O$ などのルイス酸の存在下、**14** にシリルホスファイトを作用させると、反応は非キレート遷移状態を経て進行しエリスロ体 **15** が高選択的に生成した。一方、過剰の $TiCl_4$ 存在下でジエチルホスファイトを作用させると、反応はキレート遷移状態を経て進行し、トレオ体 **16** が高選択的に得られた。すなわち、求核剤と反応条件を変化させることにより、立体分岐的な反応が高選択的に進行することが明らかとなった。

同様に、 α -ベンジルオキシアルデヒド **17** をシリルホスファイトと $TiCl_4$ 存在下に処理すると、キレート制御下の反応が進行し、**18** が高収率かつ高選択的に得られた。⁴⁰ **18** は、ヒドロキシ基をアミノ基に変換するとオキシアミノ酸のホスホン酸アナロ

Scheme 6. Hydrophosphonylation of α -Dibenzylamino Aldehydes and α -Benzyloxy Aldehydes

グ **19** に変換できる (Scheme 6)。

3-2. β -アミノ- α -ヒドロキシホスフィン酸合成への展開 以上の知見を踏まえて、次に、求核剤にアリルホスフィン酸エチル **20** 及びエチルホスフィン酸エチル **21** を用いて、 α -ジベンジルアミノアルデヒド **14** のホスフィニル化反応を検討した (Scheme 7).⁴¹⁻⁴⁶ この反応においては、ルイス酸は

Scheme 7. Hydrophosphinylation of α -Dibenzylamino Aldehydes with Alkyl-*H*-phosphinates Scheme 8. Hydrophosphinylation of α -Dibenzylamino Aldehydes with Ethyl Phosphinate

触媒として有効に機能しなかったが、**14**と**20**を触媒量のリチウムフェノキシド(PhOLi)と低温で作用させると、付加物**22**が中程度の選択性(52% de)で得られた。この反応において、PhOLiと類似の機能を有する不斉金属触媒(*(S)*-ALB)を用いると**anti-22**が90% deで得られた。しかし、(*R*)-ALBを用いるとジアステレオ選択性の低下が観測された。⁴¹⁾ (*S*)-ALBを用いた反応において、ジアステレオ選択性が高まったのは、(*S*)-ALBと基質の不斉がマッチして重複不斉誘導が生じたためと考えられる。エチルホスフィン酸エチル**21**を求核剤として用いても、同様の結果が得られた。**anti-22**は、数工程でオリゴペプチドに誘導可能なジペプチドイソスター**23**に変換された(Scheme 7)。⁴¹⁾

ホスフィン酸エチル**24**とアミノアルデヒド**14**の反応では、(*S*)-ALBを触媒として用いると、**anti-25**が高いジアステレオ選択性で得られた。^{42,43)} 一方、(*R*)-ALBを用いると、**syn-25**が高選択的に得られた。本反応のジアステレオ選択性は、不斉金属触媒の不斉により制御されていることが明らかとなった(Scheme 8)。

α -アミノホスフィン酸を組み込んだ対称性あるいは擬対称性のオリゴペプチド**12**及び**13**に着目し、それらの類縁体の合成を目的として、キラルな α -アミノ-*H*-ホスフィナート**26**とプロキラルなアルデヒドあるいはイミンとの反応を検討した

Scheme 9. Stereoselective Synthesis of α,α' -Heteroatom-substituted Phosphinates

(Scheme 9).^{44,45)}

ベンズアルデヒドとの反応では、塩基触媒として酸化マグネシウムを用いると高ジアステレオ選択的なホスフィニル化反応が進行し**27**が高収率で得られることが明らかとなった。⁴⁴⁾ 一方、イミンとのホスフィニル化反応では、活性化剤として触媒量のYb(OTf)₃が有効であった。この反応のジアステレオ選択性は、イミンの置換基(R)の嵩高さにより変化した。嵩高いナフチル基を有するイミンとの反応では、**28**が極めて高い選択性(94% *de*)で得られた。⁴⁵⁾

3-3. 不斉ジヒドロキ化反応(AD反応)の利用

vic-ジオール誘導体の簡便にかつ立体選択的に合成する一般的な方法の1つに、オレフィン類のオスミウム酸化反応を利用する方法が挙げられる。1990年頃から、オスミウム酸化を利用するオレ

Scheme 10. Asymmetric Dihydroxylation of Alkenylphosphonates

フィン類のジヒドロキシ化反応は、不斉反応への展開が検討され、優れた反応系が開発されていた。なかでもシンコナルカロイド誘導体を不斉配位子に用い、 $K_2Fe(CN)_6$ をオスミニウムの再酸化剤として用いる Sharpless らの不斉ジヒドロキシ化反応 (AD 反応) は、不斉配位子の入手が容易で基質の適用範囲も広いこと、また、反応に必要なすべての反応剤を含有する AD-mix 試薬が利用可能なことから、実用的な反応系の 1 つであった。⁴⁷⁾ しかしながら、ホスホン酸誘導体の不斉合成に利用した研究は報告されていなかった。

そこで、筆者は、エナンチオ選択性に与えるホスホナート基の効果などの検証、並びに、 α -アミノホスホン酸誘導体の不斉合成への展開を念頭において、不飽和ホスホナート類の AD-mix 試薬を用いた不斉ジヒドロキシ化反応を検討した (Scheme 10).⁴⁸⁻⁵¹⁾ その結果、エナンチオ選択性は、基質の β 位に芳香族基が置換されていると、高まることが明らかとなった。また、ホスホン酸エステルの嵩高さは、エナンチオ選択性に影響を及ぼすことを明らかとした。さらに、AD 反応により得られたジオール **30** は、嵩高いシリクロライドで処理すると、 β 位のヒドロキシ基が選択的に保護され、**31** が得られた。**31** はオキシアミノ酸のホスホン酸アナログ **32** に変換された。⁵¹⁾

4. ω 位にホスホニル基を有する α -アミノ酸誘導体の合成

L-AP-3 及び **L-AP-4** などの側鎖末端 (ω 位) にホスホニル基を有する α -アミノ酸誘導体は、グルタミン酸受容体のサブタイプ受容体 (NMDA 受容体) に対するアンタゴニスト活性を示すことが知られていた (Fig. 4).⁵²⁾ これらの知見は、アゴニストである L-グルタミン酸の末端カルボキシ基を嵩高いホスホン酸型バイオイソスターで置き換える化学

Fig. 4. ω -Phosphono- α -amino Acids

修飾によるもので、ホスホニル基と α -アミノ酸部分の空間的な距離は、アンタゴニスト活性に相関すると推定されていた。⁵³⁾ また、**33** は、リン酸化セリン (*p*-Ser) の非水解性プローブとして、*p*-Ser 含有シグナルタンパク質の機能解析に利用されていた。^{54,55)}

一方、1990 年頃から、リパーゼが触媒するエステル類の不斉加水分解反応あるいは有機溶媒中でのアルコール類の不斉アシル化反応は、一般に高い不斉認識能を示すことから、ラセミアルコール類の光学分割法として広く利用されるようになっていた。⁵⁶⁻⁵⁹⁾ しかし、ホスホン酸を含むアルコール類の光学分割剤としてのリパーゼの有用性は十分に明らかとなっていなかった。

そこで、筆者は、**L-AP-3**、**L-AP-4** 及びフッ素アナログ **30** の不斉合成を目的として、対称 1,3-プロパンジオール **34a-c** の有機溶媒中でのリパーゼ触媒下のビニルアセテートとのエステル交換反応を検討した (Scheme 11).⁶⁰⁾ 種々の条件を検討したところ、エーテル系溶媒中で、lipase PS を触媒とすると、高いエナンチオ選択性 (96–98% ee) でエステル交換反応が進行し、光学活性アセテート **35a-c** が生成することが明らかとなった。ここに得られた **36a-c** の絶対配位は、Kazlasukas らが提唱していた lipase (*Pseudomonas ceparia*) の基質認識モデル⁶¹⁾ から予想される絶対配位とよく一致していた。また、フッ素を含む基質 **34c** は、フッ素を含まない基質 **34b** と比べて、エステル交換反応が 4 倍程度速く進

Scheme 11. Asymmetric Synthesis of ω -Phosphono- α -amino Acids

行した。フッ素原子はリパーゼの基質認識部位との親和性に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

35a-c は、数工程の官能基変換反応を経て、**37a**, **37b** 及び **37c** に誘導した。**37a** 及び **37b** は、脱保護して **L-AP-3**, **L-AP-4** に変換した。**37c** は、*p*-Ser の安定類縁体として、ペプチドに誘導可能である。^{54,55)}

前述したように、 ω -ホスホノ- α -アミノ酸のホスホニル基と α -アミノ酸部分の空間的な距離 [C(2)-P 空間距離] は、アンタゴニスト活性に相関があると推定されており、そのプローブとして配座固定型類縁体の合成が求められていた。⁵³⁾ 筆者は、これまで知られていた **L-AP-5** の配座固定型類縁体のアンタゴニスト活性と C(2)-P 空間距離の関係を解析したところ、その空間距離が 4.56 Å のときに、最も高い受容体結合能を示すと推定した。そこで、この空間距離に近似させた **L-AP-5** の配座固定型類縁体 **44** 及び **45** を設計し、合成を検討した (Scheme 12)。⁶²⁾

本合成法では、環状硫酸エステル **38** の環開裂を利用して合成されるホスホノアルコール **39** の光学分割をはじめに検討した。その結果、lipase AK 触媒下でビニルアセートとのエステル交換反応を行うと、高いエナンチオ比 ($E=152$) で酵素反応が進行し、光学純度の高いアセート **40** とアルコール **41** が得られた。アルコール **41** は、ヒダントイン **42** 及び **43** を経由して、目的とした **AP-5** の配座固定型類縁体 **44** 及び **45** に誘導された。

5. リン酸部修飾ヌクレオチドアナログの合成

5-1. アンチセンスオリゴヌクレオチドを指向する合成研究

RNA に相補的な塩基配列を有する天然型オリゴヌクレオチドは、対象遺伝子と安定な

Scheme 12. Synthesis of Conformational Constrained Analogues for **AP-5**

二重鎖を形成し、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして機能することが知られている。⁶³⁻⁶⁵⁾ しかし、天然オリゴヌクレオチドは、リン酸ジエステル結合が体液や細胞培養液に含まれるヌクレアーゼにより容易に加水分解を受け、その機能を消失する欠点がある。ヌクレアーゼに安定なオリゴヌクレオチドの構成ユニットとして、ホスホジエステル結合の酸素原子の 1 つをメチレンに置換したリン酸部修飾ジヌクレオチドアナログ **51** の合成を検討した (Scheme 13)。⁶⁶⁻⁶⁸⁾

D-グリセルアルデヒドから容易に誘導可能な共役ホスホナート **46a** を低温でラジカル環化すると、標的ヌクレオチドのグリコシド相当部 **47a** が高い選択性で得られた。⁶⁶⁾ **47a** とシリルチミン [(TMS)₂T] との *N*-グリコシル化反応は、種々の条件を検討したが、高い選択性が得られなかった。一方、共役ホスホノチオエート **46b** から誘導したグリコシド **47b** を糖供与体として用いると、(TMS)₂T の *N*-グリコシル化反応は、TiCl₄ 存在下、低温で進行し、高い選択性でヌクレオチドアナログ **49** ($\alpha:\beta=96:4$) が生成した。⁶⁷⁾ 選択性が高まるのは、ホスホノチオエート基の隣接基効果により二環性カチオン中間体 **48** が速やかに形成され、**48** の β 面から反応が優先的に起こることによると考察した。また、**49** はホ

Scheme 13. Stereocontrolled Synthesis of Phosphonate Analogues of 2'-Deoxyribonucleoside 3'-Phosphates

Scheme 14. Intramolecular *N*-Glycosylation for Nucleotide Analogues Scheme 15. *N*-Glycosylation with Glycosyl Donors Possessing a Group of "CF₂P(O)(OEt)₂"

スホン酸誘導体 **50** に容易に変換可能で、ジヌクレオチドアナログ **51** の合成に利用できた。

なお、**50** の脱ベンゾイル体 **53** は、**52** の分子内 *N*-グリコシル化反応を利用する方法でも合成が可能であった (Scheme 14).⁶⁸⁾

以上の知見を踏まえて、リン酸エステルとの等価性をさらに高めた類縁体の合成を目指して、3 位にジフルオロメチレンホスホニル基 [CF₂P(O)(OEt)₂] を有する糖供与体 **54** とシリルチミン

[(TMS)₂T] の *N*-グリコシル化反応を検討した (Scheme 15).^{69,70)} D-グリセルアルデヒドから得られた共役エステル **54** に、Michael 反応を利用して CF₂P(O)(OEt)₂ 基を導入すると、**55** がジアステレオマーの混合物として得られた。**55** を酸で処理すると、ジアステレオマーの 1 つだけがラクトン化され、もう一方のジアステレオマーは分解した。得られたラクトンは、ヒドロキシ基の保護及び官能基変換反応を経由して **57** に変換された。**57** と (TMS)₂T

Scheme 16. *N*-Glycosylation with Glycosyl Donors Possessing a Group of “ $\text{CF}_2\text{P}(\text{S})(\text{OEt})_2$ ” Scheme 17. *N*-Glycosylation of Adenine with Glycosyl Donor 60

を TiCl_4 存在下 0°C で反応させたところ、*N*-グリコシル化反応は糖供与体の α 面から進行し、さらに、予期に反してチミンの 3 位窒素がグリコシル化された付加物 58 が高選択的 (90% de) に得られ、所望の付加物は得られなかった。

そこで、次に、ホスホノチオエート型の糖供与体 60 を用いて、 $(\text{TMS})_2\text{T}$ の *N*-グリコシル化反応を検討した (Scheme 16).^{69,70)} このグリコシル化反応において、 TiCl_4 存在下、低温 (-40°C) で反応を行うと、ホスホナート型糖供与体 57 を用いた場合と同様に、チミンの 3 位がグリコシル化された付加物 61 がジアステレオマーの混合物として得られた。一方、反応を 0°C に昇温して行くと、所望のヌクレオチドアナログ 62 が高い選択性 ($\alpha:\beta=12:88$) で得られた。62 は、対応するホスホナート 63 に容易に変換できた。なお、61 は、 0°C で TiCl_4 と処理すると、62 に高選択的に異性化した。このことから、このグリコシル化反応では、61 が速度論的に生成した後、熱力学的に安定な 62 に異性化していると考えられる。

5-2. P2Y_1 受容体拮抗薬を指向するヌクレオチドアナログの合成研究 近年、ATP は、細胞内

においてシグナルタンパク質のリン酸化においてリン酸源を供給するばかりか、細胞外の情報伝達物質として受容体に作用し、多くの重要な生理機能を有していることが明らかとなっている。 P2Y_1 受容体は、ATP 受容体のサブタイプの 1 つで、血小板の凝集などの生理活性の発現に関与している。⁷¹⁾

3' 位及び 5' 位のヒドロキシ基がリン酸化されたアデノシン誘導体 (A3P5P) は、内因性の P2Y_1 受容体のアンタゴニストで、弱いアンタゴニスト活性を示すことが知られている (Scheme 17).⁷²⁾ また、A3P5P の 2'-デオキシアナログ (MRS2179) にも弱い活性が認められていた。⁷²⁾ 筆者は、MRS2179 の 3' 位のリン酸エステルを加水分解に安定な類縁体へ化学修飾する目的で、前述した *N*-グリコシル化反応で、良好な結果が得られた糖供与体 60 を用いて、*N*-ベンゾイルシリルアデニン [$\text{NBz-A}(\text{TMS})_2$] との *N*-グリコシル化反応を検討した (Scheme 17).^{69,70)} しかしながら、この *N*-グリコシル化反応は、糖供与体の 5 位ヒドロキシ基の保護基、ルイス酸、溶媒などを種々検討したが、高い β 選択性は認められなかった。

P2Y_1 受容体拮抗薬を指向する A3P5P の構造展

Fig. 5. Modification of **A3P5P** to Improve Antagonist Activities against $P2Y_1$ Receptor Scheme 18. Synthesis of Open Chain Analogues for **MRS2267** (1)

開において、糖部を炭素環に変更したアナログ (**MRS2267**)、及び、破線 a 部分で開環した非環式アナログ (**MRS2286**, **MRS2298**) などにも、高いアンタゴニスト活性が認められていた (Fig. 5).⁷³⁾ そこで、筆者は、**MRS2298** のリン酸エステルの 1 つをジフルオロメチレンホスホン酸で置換した安定類縁体 **65** の合成を検討した。⁷⁴⁾ また、炭素環アナログ (**MRS2267**) の炭素環を破線 b 部分で開環したアナログ **67** についても、あわせて合成法を検討した。⁷⁵⁾

非環式アナログ **65** 及びそのエナンチオマー **ent-65** のエステル保護体 (**68** 及び **ent-68**) は、Scheme 18 に示すように、前述した光学活性モノアセテート **35c** を合成素子として利用すると、高収率で合成できた。⁷⁴⁾ また、非環式アナログ **67** 及びそ

のエナンチオマー **ent-67** のエステル保護体 (**73** 及び **ent-73**) は、ホスホノチオエート型ラクトン **59b** の還元的開環反応を経由して合成した共通合成中間体 **71** から、Scheme 19 に示す官能基変換反応を組み合わせて合成した。⁷⁵⁾ この合成法において、ホスホナート型ラクトン **56b** の還元的な開環反応は、ホスホナート基の分解が観察され、不成功であった。本合成法において、ホスホナート基の安定性を増す方法として、ホスホノチオエート基への変換が有効であることが明らかとなった。

6. ホスフィニルジペプチドイソスターの立体制御合成

6-1. 素反応の開発 リン原子は、3 価と 5 価の原子価状態を取り得る第 15 族の元素であり、そのオキソ酸は、いずれも 5 価のリン原子を中心とす

Scheme 19. Synthesis of Open Chain Analogues for **MRS2267** (2)

るテトラヘドラルな構造を有している。リン原子に2個のアルキル基が結合したオキソ酸はホスフィン酸と呼ばれ、安定に存在できる。テトラヘドラルなホスフィン酸の構造は、アルキル *gem*-ジオール構造とよく似ている。このようなホスフィン酸誘導体の構造的な特徴を利用して、不安定なアルキル *gem*-ジオール構造などを安定なホスフィン酸に置き換えて、新しい生物活性化合物の創製に利用されるようになっている。⁷⁶⁾

ホスフィニルジペプチドイソスター (PDIs) は、ジペプチドのアミド結合をメチルホスフィニル基で置換したジペプチドイソスターで、ジペプチドが加水分解されるときの水和遷移状態を模倣できる (Fig. 6).⁷⁶⁾ PDIs を組み込んだオリゴペプチドは、レニンや β -セクレターゼなどのアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤として利用されている (Fig. 6).⁷⁷⁻⁷⁹⁾ また、ホスフィン酸は亜鉛に二座配位できる性質を有するため、メタロプロテアーゼ阻害剤の重要な部分構造にも利用されている。⁸⁰⁾

これまで、PDIs の α 位と β' 位の立体配置を制御した合成法は知られていなかった。したがって、生物活性を有する所望の立体配置を有するオリゴマーは、ジアステレオマー混合物として合成された PDIs をオリゴペプチドに組み込んだ後に分離する方法により合成されていた。そこで、効率よい合成法をめざして検討したところ、ホスフィニル基の不

Fig. 6. Biologically Active Peptides Having a Phosphinyl Dipeptide Isostere

斉を有効に活用する PDIs の不斉合成法が開発できた (Scheme 20).⁸¹⁻⁸⁶⁾

すなわち、 α -アミノホスフィン酸誘導体 **77** を低温で LHMDS と処理し、生成するアニオンを求電子剤で捕捉すると、**79** が高いジアステレオ選択性 (10 : 1–4.5 : 1) で生成した。⁸²⁾ **78** を基質に用いると選択性が低下することから、高い選択性の発現に、アセタールの付け根のメチル基が重要な役割を演じていることが推定された (Fig. 7, A). **79** は、窒素

Scheme 20. Stereocontrolled Synthesis of PDIs

Fig. 7. Plausible Transition States for Stereoselective Alkylation Reactions

Scheme 21. Preparation of Starting Phosphinates

上の保護基を嵩高いトリシル基に変換後, 1,1-ジエトキシエチル基を除去し, アミノ-*H*-ホスフィナート **80** に変換した. **80** は, さらに, マグネシウム系塩基の存在下で, アクリル酸 *tert*-ブチルを作用させると, PDIs の基本骨格 **81** が高収率で生成した. 以上の変換過程で, ホスフィニル基の立体配置は保持されていた. **81** を LHMDS で処理し, 生成するエノラートをハロゲン化アルキルで捕捉すると, α 位及び β' 位にアルキル基を有する **82** が高選択的 (25:1-14:1) に得られた. 選択性の発現は, Fig. 7 に示した遷移状態 **B** あるいは **C** において, 親電子剤が嵩高いトリシル基の逆側からエノレートに接近することによると推定した. **82** は, オリゴペプチドに誘導可能な Fmoc 体 **83** に変換可能である.⁸³⁾

なお, 本合成法において, 出発原料となるヒドロキシメチルホスフィン酸誘導体 **76** は, ラセミ体として合成後, リパーゼ触媒を用いる不斉アシル化反応により速度論的光学分割を行うと, 高純度なそれぞれの鏡像異性体を得られた (Scheme 21).⁸⁴⁾ また, アミノメチルホスフィン酸誘導体 **75** は, 光学活性フェニルエチルアミンから得られるアミノホスフィン酸 **84** のジアステレオマー混合物を分離する方法で, 両エナンチオマーを得ることができる (Scheme 21).^{85,86)} さらに, **82** は, 塩基で処理後, 生成するエノラートをプロトン化すると, β' 位の立体配置が反転した誘導体に異性化できる.⁸⁶⁾ したがって, 本法は, 以上の知見を組み合わせると, PDIs の 4 つのジアステレオマーを, それぞれ, 光

Fig. 8. PDIs for Leu-Pro Dipeptides

Scheme 22. Stereoselective Synthesis of PDIs for Leu-Pro Dipeptide

学活性体として作り分けることが可能である。

6-2. Leu-Pro 型 PDIs の合成 成人 T 細胞白血病の発症に関与する human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) プロテアーゼなどある種のプロテアーゼは、基質タンパク質の切断部位にロイシンとプロリンが含まれている (Fig. 8)。これらのプロテアーゼを標的とするペプチド性プロテアーゼ阻害剤のジペプチドイソスターとして、Leu-Pro 型 PDIs は有用と考えられる。Leu-Pro 型 PDIs には、ジペプチドの窒素原子の 1 つが炭素原子で置き換えられているので、Fig. 8 に示すジアステレオマーが存在する。したがって、Leu-Pro 型 PDIs の合成では、高度な立体制御が必要となる。Leu-Pro 型 PDIs の合成例は極めて少なく二例しか報告されていないが、これらのジアステレオマーの立体選択合成には、成功していなかった。^{87,88)}

筆者は、6-1. で述べた合成法を踏まえて、はじめに、ホスフィン酸誘導体 **85** と共役エステル **86** の Michael 反応を検討した。⁸⁹⁾ しかし、生成物はジアステレオマーの混合物として得られ、この反応のジアステレオ選択性は認められなかった (Scheme 22)。

そこで、次に、ホスフィン酸誘導体 **85** とトリフ

ラート **88** のカップリング反応をパラジウム触媒として $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、リガンドに DPEphos、塩基として K_2CO_3 を用いて行いカップリング生成物 **89** を得た (Scheme 22)。このカップリング反応の過程で、リン原子の配位は完全に保持されていた。得られたカップリング生成物 **89** は、酸化白金触媒下で水添すると、**90** と **91** を生成比 11 : 1 で与えた。主成績体 **90** の β' 位の配位は天然型とは異なっていた。しかし、加熱条件で水添すると、**90** は天然型の立体を有する **91** へ完全に異性化することができた。本合成法は、Leu-Pro 型 PDIs の立体制御合成に関する、最初の報告例と考えられる。⁸⁹⁾

なお、PDIs に関する以上の成果は、山岸丈洋元講師 (現在、奥羽大学薬学部教授) が本教室に在籍中に行った業績の 1 つである。本業績は、山岸教授の日本薬学会東北支部若手奨励賞の受賞対象となった。⁸¹⁾ 大変喜ばしいことである。

7. ジフルオロメチレンホスホン酸誘導体のメディシナルケミストリー

細胞外の情報が細胞内に伝達されて、細胞の分化、増殖及び細胞死などの細胞応答に変換される仕組みは、細胞内情報伝達機構と呼ばれる。身体に存

Table 1. Physical Properties of Phosphates and Phosphonates

Compd.	X	angle α	bond length (Å)		pKa ₂
			a	b	
92	O	118.7°	1.59	1.43	6.4
93	CH ₂	112.1°	1.81	1.51	7.5
94	CF ₂	116.5°	1.85	1.50	5.6

在する様々な細胞内情報伝達機構を統合した複雑な生体システムが正しく働くことにより、心臓、肝臓、脳を始め、多くの臓器や組織が互いに正常に機能し、生命現象の恒常性が維持されている。多くの疾病の発症は情報伝達機構の不調に起因することが明らかにされるようになり、それらを正しく制御する物質が難治性疾患の治療薬や予防薬の創製に活用されるようになった。

タンパク質、糖質、核酸などから生成する多くの生体内リン酸エステルは、細胞内の情報伝達機構で重要な役割をしている。生体内リン酸エステルの物理化学的性質を保持したまま、加水分解酵素に対して安定な分子は、疾病と関連する細胞内情報伝達機構を解明する探索分子（分子プローブ）となるばかりか、情報伝達機構の破綻により生ずる疾病の治療薬リードとなることが期待された。

ジフルオロメチレンホスホン酸 **94**（以下 DFMPA と略す）は、リン酸エステル **92** のエステル酸素をジフルオロメチレン（CF₂）で置換した誘導体で、R-C-P の結合角と第二酸解離定数（pKa₂）がリン酸エステル **92** のそれらに近い値を示す（Table 1）。^{8,9,90} また、2つのフッ素原子は、水素結合のアクセプターとなることも報告されており、^{91,92} リン酸エステル **89** におけるエステル酸素原子の対電子をミミックすることができる。このような物理化学的性質を有するため、DFMPA はメチレンホスホン酸 **93** よりもリン酸エステル **92** に物理化学的な性質が似ている。筆者は、このような物理化学的な性質に注目し、DFMPA 誘導体の簡易合成法とそれを利用する生物活性化化合物の創製について検討した。

7-1. ジフルオロメチレンホスホン酸（DFMPA）誘導体の合成 筆者が研究を開始した当時、既に、DFMPA 誘導体の合成法は数多く報告されてい

Scheme 23. Representative Reactions for Synthesis of DFMPA Ester Derivatives

Scheme 24. Preparation of the Burton Reagent

た。⁹¹⁻⁹³ しかし、多くの合成法は不安定な試薬や毒性の高い試薬を用いるなどの操作上の制限があり、簡便な方法とは言えなかった（Scheme 23）。例えば、ベンゼン核に DFMPA エステル基を導入するには、不安定なケトホスホネートを有毒な DAST で処理する方法が利用されていた [Eq. (1)].⁹⁴⁻⁹⁶ アルキル鎖に DFMPA エステル基を導入するためには、不安定なトリフラートを低温で HCF₂P(O)(OEt)₂ のリチウム塩⁹⁷ [LiCF₂P(O)(OEt)₂] で処理する方法が利用されていた [Eq. (2)].⁹⁸⁻¹⁰⁰ LiCF₂P(O)(OEt)₂ は、-78°C 以上に昇温するとジフルオロカルベン (:CF₂) と LiP(O)(OEt)₂ に分解し、取扱が困難であった。また、立体障害の大きい 2 級トリフラートには反応しなかった。⁹⁸⁻¹⁰⁰ さらに、アルケンへの DFMPA エステルの導入は、アリルアルコールの転位反応を利用する間接的な方法が 1 例知られているのみであった [Eq. (3)].¹⁰¹

安定で毒性の低い試薬を用いる DFMPA 誘導体の合成法を調査したところ、エーテル系溶媒中でプロモ試薬 **95** と亜鉛から調製される亜鉛試薬 **96** は、熱的安定性が高く、取扱が容易な有機金属試薬であることが Burton らにより報告されていた（Scheme 24）。¹⁰² **96** は、CuBr 存在下で臭化ベンジル、臭化アリルなどの親電子剤と室温で容易に反応し、対応する DFMPA 誘導体を与えることも報告されていた。しかしながら、sp² 炭素や sp 炭素に DFMPA

Scheme 25. Versatile Reactivity of the Burton Reagent in DMF

エステルを直接導入するカップリング反応への展開はほとんど検討されていなかった。

そこで、筆者は、Burton 試薬の適用範囲を拡張するために、溶媒効果を検討した (Scheme 25)。その結果、DMF 系溶媒中で調製した亜鉛試薬 **96** を、触媒量の CuBr 存在下ヨードアルケン類と処理すると、立体特異的にカップリング反応が進行し二重結合に DFMPA エステル基を直接導入できることが明らかとなった。¹⁰³⁾ また、ヨードベンゼン誘導体との反応では、等量の CuBr と超音波の照射が必要であったが、ベンゼン環に DFMPA エステルを直接導入することに成功した。¹⁰⁴⁾ 以上の反応は、 sp^2 炭素に DFMPA エステル基を簡便に直接導入した最初の報告例となった。その他、DMF 系溶媒中で調製した亜鉛試薬 **96** は、環状アリルホスフェートやプロパギルアセテートと CuBr 存在下容易に反応し、アリル位及びアレンの sp^2 炭素に DFMPA エステルを簡便に導入することができた。^{105,106)}

本カップリング反応を利用すると、DFMPA エステル基を有する 1,3-ジエン **97** の合成が可能で、Diels-Alder 反応を組み合わせると、合成が比較的困難なシクロヘキセン誘導体 **98** が立体選択的に合成できた (Scheme 26)。¹⁰⁷⁾ さらに、DFMPA エステルと共役したアルケン類 **99** は、優れたラジカル受容体となり、テトラヒドロフラン及びピラン誘導体 **100** の簡易合成に利用できた (Scheme 27)。^{108,109)} **100** は **101** に立体選択的に変換可能である。また、カップリング反応で合成された DFMPA エステル **E-102** を、 $Pd(OAc)_2$ 存在下、ジアゾメタンと反応させると、シクロプロパン環に DFMPA エステル基が直結された誘導体 **103** の合成が可能であっ

Scheme 26. Introduction of DFMP Ester to Cyclohexene Moiety

Scheme 27. Reactivity of Alkenyldifluoromethylphosphonates toward Vinyl Radicals

た。¹¹⁰⁻¹¹³⁾ **103** は、共役エステル **104** のイオウイリドを利用するシクロプロパン化反応を経由する方法でも合成可能であった (Scheme 28)。¹¹²⁾ また、シクロパン誘導体 **103** は、リパーゼ触媒下の不斉アシル化反応により光学分割が可能で、高純度の両エナンチオマーを合成することができる。¹¹⁰⁾ **101** 及び **103** は、後述するプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 阻害剤の構造活性相関研究の合成中間体として利用された。

前述したように、ベンゼン環に DFMPA エステルを簡便に導入することができたので、本法をリン酸化チロシン (*p*-Tyr) のエステル酸素をジフルオ

Scheme 28. Cyclopropanation of Alkenyldifluoromethylphosphonates

Scheme 29. Synthesis of **F₂Pmp** Derivatives

ロメチレンで置換した類縁体 (**F₂Pmp**) の合成に利用した (Scheme 29).¹¹⁴⁾ **F₂Pmp** は、後述するプロティンチロシンホスファターゼ (PTP) のペプチド性阻害剤の構成アミノ酸として注目され、数種の合成法が報告されていた.⁹¹⁻⁹³⁾ 筆者らは、カップリング反応を利用して容易に合成できるジオール **106** のリパーゼ触媒下の不斉アシル化反応を検討したところ、非対称化が高選択的に進行しモノアセテート **107** が高純度で得られた. **107** は、ペプチドに誘導可能な **F₂Pmp** 誘導体 **108** に変換された.¹¹⁴⁾

また、Otaka らは、リン酸化スレオニン (**p-Thr**) のエステル酸素をジフルオロメチレンに置換した類縁体 **F₂Pmba** の合成に、ヨードアルケン **109** と亜鉛試薬 **96** のクロスカップリング反応を利用している (Scheme 30).¹¹⁵⁾ カップリング生成物は不斉補助基を有する共役エステル **110** に変換後、不斉還元を経て **111** に誘導された. **111** は、選択的な α 位アミノ化反応により **L-F₂Pmba deriv.** に変換された. **L-F₂Pmba deriv.** は、**p-Thr** の安定類縁体としてシグナルペプチドに取り込むことができる.

7.2. ジフルオロメチレンホスホノチオ酸 (DFMPTA) の合成と物性 前節で述べたジフル

Scheme 30. Application of the Cross Coupling Reaction to the Synthesis of **L-F₂Pmba Deriv.**

オロメチレンホスホン酸 [**DFMPA**, **R-CF₂P(O)(OH)₂**] は、極性の高さから、細胞膜の透過性が低く、細胞内に取り込まれ難いことが予想された. そこで、疎水性の向上を目的に、**DFMPA** のリン-酸素二重結合をリン-イオウ二重結合に置き換えた類縁体、すなわち、ジフルオロメチレンホスホノチオ酸 [**DFMPTA**, **R-CF₂P(S)(OH)₂**] の合成を検討した. 特に、後述するプロティンチロシンホスファターゼ阻害剤の創製をも念頭において、芳香族 **DFMPTA** の合成を検討した (Scheme 31).^{116,117)}

Scheme 31. Synthesis of Aryldifluoromethylphosphonothioic Acids

DFMPTA エステル基の芳香核への導入は、1) 対応するブロマイドから調製した亜鉛試薬 **112** とヨードアリール類の臭化銅存在下のカップリング反応で直接得る方法、2) ヨードアリールからカップリング反応で得られる DFMPA エステル誘導体 **114** をチオ化する 2 段階で得る方法を検討した。^{116,117)} 1) の方法は、カップリング生成物 **113** の収率 (10–34%) が低く実用的ではなかった。しかし、2) の方法では、チオ化剤として Lawesson's 試薬を用いると、高収率で DFMPTA エステル **113** が得られた。

DFMPA の合成と物性については古くから知られているが、⁹⁰⁾ DFMPTA の物性については、ほとんど報告がなかった。そこで、次に、DFMPTA エステル **113** の脱エステル化を検討した。DFMPA エステル **114** は、通常、TMSBr で処理後、中間体をメタノールなどで加溶媒分解すると容易に遊離酸に変換できる。しかしながら、DFMPTA エステル **113** は、この条件で脱エステル化すると、複雑な混合物を与え、遊離酸は得られなかった。

そこで、種々の脱エステル化を試みた。**113** は、ヨウ化ナトリウム存在下、3-ヨードプロペンと加熱すると、thiono-thiolo 転位反応が高収率で進行し、S-アリールエステル **115** に変換された。**115** は 0 価パラジウムで処理するとアリール基が除去され、遊離酸 **116** を与えた。¹¹⁶⁾ また、DFMPA エステル **114** は、2-シアノエチル基にエステル交換後、Lawesson's 試薬でチオ化して DFMPTA エステル **118** に誘導し

Table 2. Physical Constants of **119** and **120**

Compd.	X	<i>D</i>	p <i>K</i> _{a2}
119	O	0.18	5.4
120	S	0.82	4.5

Fig. 9. Reversible Reactions Catalyzed by PTK and PTP

た。**118** は、塩基で処理すると、遊離酸 **116** に高収率で変換できた。¹¹⁷⁾

DFMPA と DFMPTA の物性を比較するために、ナフタレン誘導体 **119** と **120** について、オクタノール/水分配比 (*D*) 並びに第二酸解離定数 (p*K*_{a2}) を求めた (Table 2).¹¹⁷⁾ ホスホン酸 **119** の *D* 値は 25°C において 0.18 と算出され、**119** はほとんどオクタノール層に分配されていないことが推定された。一方、ホスホチオ酸 **120** の *D* 値は 0.82 と算出され、**120** はオクタノール層と水層にほぼ 1 : 1 の割合で分配されていることが明らかとなった。**119** と **120** の p*K*_{a2} 値は、それぞれ、5.4、4.5 と算出された。以上のデータから、DFMPTA は DFMPA と同様に生理的 pH で解離し、疎水性が高く、細胞内に効率よく浸透できる分子となることが期待された。

7-3. プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) 阻害剤の創製 チロシンキナーゼ内在型受容体を介するシグナル伝達機構において、受容体に増殖因子などが結合すると、その刺激は、多段階の信号変換ステップを踏みながら核へと伝播され、最終的には核で遺伝子の制御を介して、多様な生物応答を引き起こすことが知られていた。¹¹⁸⁾ この多段階の信号変換ステップを制御している酵素に、プロテインチロシンキナーゼ (PTK) とプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) がある (Fig. 9)。

Figure 10 に模式的に示すように、この伝達機構において、受容体の細胞外ドメインに増殖因子などが結合すると、受容体の構造変化 (二量化) に伴っ

Fig. 10. Schematic Illustration of Tyrosine Kinase-mediated Signal Transductions

て PTK ドメインが活性化し、受容体のチロシン残基は自己リン酸化を受ける。この情報は、リン酸化された受容体タンパク質とリン酸化チロシン (*p*-Tyr) 残基を認識するアダプター分子などのシグナルタンパク質群との間に、タンパク質-タンパク質相互作用が起き、核に伝達される。PTP は、リン酸化された受容体タンパク質の *p*-Tyr を特異的に脱リン酸化する酵素で、PTK と PTP の拮抗作用のバランスは、細胞の恒常性の調節に大きな役割を果たしていると考えられていた (Fig. 9)。

形質転換した細胞には、*p*-Tyr の含量が異常に高く、PTP の酵素活性と細胞のがん化に深い関係があることが示唆されていた。¹¹⁸⁾ 一方、血管新生促進因子受容体の多くがチロシンキナーゼ内在型であり、PTK によるチロシンのリン酸化は血管新生を促進していると推定されていた。¹¹⁹⁾ このような背景から、PTP 阻害剤は、がん化や血管新生のメカニズム解明のための分子プローブになると考えられた。しかしながら、筆者が研究を開始した当時、バナジン酸ナトリウムや酸化フェニルヒ素などに PTP の阻害活性が報告されていたが、分子プローブとして利用可能な低分子化合物はほとんど報告されていなかった。

7-3-1. PTP 阻害剤の探索

そこで、筆者はリ

121

$$K_i(\text{ for PTP-1})=0.18\pm0.02\ \mu\text{M}$$

Fig. 11. A Peptidyl Inhibitor against PTP-1B

ン酸化チロシンの安定類縁体を基盤とする PTP 阻害剤の探索を行った。当時、このような手法による PTP 阻害剤の探索研究として、Burke らの先行研究が知られていた。¹²⁰⁻¹²⁴⁾ Burke らは、PTP-1B の基質となるリン酸化タンパク質のアミノ酸配列に注目して、**F₂Pmp** を組み込んだオリゴペプチド **121** にラット胎盤由来の PTP-1B に対する強い阻害活性を見い出していた (Fig. 11)。¹²⁰⁾ また、**121** の非ペプチド化を展開する過程で、ナフタレンの β 位に DFMPA 基を有する化合物 **119** に、弱い PTP-1B 阻害活性を見い出していた。¹²³⁾ さらに、**119** と PTP-1B の共結晶の X 線結晶構造解析が報告されていた (Fig. 12)。^{123,124)}

この報告では、**119** は、DFMPA 基が予想通りリン酸結合部位に結合している以外に、ナフタレンの B 環がリン酸結合部の近傍の Phe182, Tyr46, Ile219 残基から構成される疎水性部分と π スタッキング型の相互作用をしていることが明らかとされていた。

Fig. 12. Design for PTP Inhibitors Based on Phenyl-difluoromethylphosphonic Acids

しかしながら、Gul115, Asp181, Arg221 残基から構成される親水部分との相互作用は、観察されていなかった。

筆者は、構造展開の多様性を踏まえて、フェニルジフルオロメチルホスホン酸を基本構造に位置づけ、フェニル核に、疎水基 (L) と水素結合アクセプター基 (H) を配置した誘導体 **122** を設計した (Fig. 12).^{125,126} 具体的には、DFMPA 基のメタ位あるいはパラ位にフェニル基などの疎水基を導入した誘導体 *m*-**123a-d** 及び *p*-**123a-d** を合成・評価した (Table 3). また、アクセプター (H) としての機能を期待して、DFMPA 基のメタ位にスルホンアミド基及びビススルホンイミド基を配置し、さらに DFMPA 基のパラ位にスチリル基などの疎水基を

配置した誘導体 **124a,b** 及び **125a,b** をそれぞれ合成・評価した (Table 4). これらの誘導体の合成では、ブロムヨードベンゼン誘導体 (**126** と **129**) と BrZnCF₂P(O)(OEt)₂ の銅触媒下のカップリング反応¹⁰⁴⁾ により **127** 及び **130** を選択的に得た後、Still カップリング反応により疎水基を導入する方法が効果的であった (Scheme 32).^{125,126)}

PTP-1B の阻害活性の測定は *p*-ニトロフェニルホスフェート (*p*-NPP) を用い、PTP-1B が *p*-NPP を加水分解する反応を 50% 阻害する被験化合物の濃度を IC₅₀ 値として表し、評価した。

陽性対照薬としたナフタレン誘導体 **119** の IC₅₀ 値は 718.1 μM であるのに対し、ここで合成した誘導体はすべて **119** と同等あるいはそれよりも高い PTP-1B 阻害活性を示した.^{125,126)} フェニルエチニル誘導体 (**123b**) では *m*-置換、*p*-置換で活性にほとんど変化がみられなかったが、概して *m*-置換体が *p*-置換体よりも活性が高い傾向があると言える。置換基の種類ではエチニル基が最も高い活性を示し、*m*-エチニル誘導体 *m*-**123d** の IC₅₀ 値は 19.0 μM であった。残念なことに、*m*-**123d** は安定性が低く、活性の再現性が乏しかった。*p* 位あるいは *m* 位に (*E*)-スチリル基やフェニル基を導入した誘導体も **119** と同程度の PTP-1B 阻害活性を有していることが明らかになった。

フェニルエチニル誘導体 *p*-**123b** にモノスルホンアミド基を導入すると阻害活性はむしろ低下したが、ビススルホンアミド基を導入すると *p*-**123b** より活性が向上する傾向がみられた。*(E)*-スチリル誘導体 *p*-**123a** にモノスルホンアミド基あるいはビススルホンアミド基を導入した誘導体 (**124a** 及び **125a**) は、活性が顕著に向上した。このことから、

Table 3. IC₅₀ Values of Phenyl-difluoromethylphosphonic Acid Derivatives against PTP-1B

<p><i>p</i>-123a-d</p>			<p><i>m</i>-123a-d</p>			<p>119</p>		
						IC ₅₀ (PTP-1B)=718.1 μM		
Compound	R	IC ₅₀ , μM	Compound	R	IC ₅₀ , μM			
<i>p</i> - 123a	(<i>E</i>)-styryl	449.9	<i>m</i> - 123a	(<i>E</i>)-styryl	386.2			
<i>p</i> - 123b	phenylethynyl	128.3	<i>m</i> - 123b	phenylethynyl	135.9			
<i>p</i> - 123c	phenyl	778.9	<i>m</i> - 123c	phenyl	252.2			
<i>p</i> - 123d	ethynyl	77.5	<i>m</i> - 123d	ethynyl	19.0			

Table 4. Effects of Sulfonamides and Bis-sulfonimides on Inhibition against PTP-1B

124a,b			125a,b		
Compound	R	IC ₅₀ , μM	Compound	R	IC ₅₀ , μM
124a	(<i>E</i>)-styryl	175.7	125a	(<i>E</i>)-styryl	57.9
124b	phenylethynyl	167.1	125b	phenylethynyl	88.7

Scheme 32. Synthesis of Phenylidifluoromethylphosphonic Acid Derivatives

Fig. 13. PTP Inhibitors Based on Phenylidifluoromethylphosphonic Acids

スルホンアミド基は PTP-1B の活性中心付近の親水性部分と効果的に相互作用したと推察される。

なお、安定な阻害活性を示した **125a** のホスホチオ酸アナログ **134** の PTP-1B 阻害活性は IC₅₀=625.0 μM を示した。¹¹⁷⁾ すなわち、ホスホチオ酸に修飾すると活性が低下することが明らかとなった (Fig. 13)。

フェニルジフルオロメチルホスホン酸を基本構造とする PTP 阻害剤の創製研究において、最近では、さらに活性の高い誘導体も報告されるようになった。Burke らはフェニルジフルオロメチルホスホン酸のメタ位フェニル基からオキシムエーテルリ

ンカーでフラン-2-カルボン酸を連結した誘導体 **135** が強い PTP 阻害活性を示すことを報告している (Fig. 13)。¹²⁷⁾ **135** の合成において、DFMPA 基の導入には筆者らのカップリング反応が利用されている。

7-3-2. PTP 阻害剤の利用 安定で活性の高い **125a** について、さらにセリン/スレオニンホスファターゼ PP 2A、膜貫通受容体 PTP である LAR に対する阻害活性を評価したところ、¹²⁶⁾ **125a** はセリン/スレオニンホスファターゼ PP 2A には全く阻害活性を示さなかった。LAR にもほとんど阻害活性を示さなかった。**119** は PP 2A にも PTP-1B と同程度の阻害活性を示すことが報告されており、¹²³⁾

Table 5. Enzyme Selectivity and K_i value of **125a**

PTP-1B	PP2A	LAR
$IC_{50}=57.9 \mu M$	$IC_{50}>1000 \mu M$	$IC_{50}=414.9 \mu M$
$K_i=176 \mu M$	ND ^a	ND ^a
mix-type inhibition	ND ^a	ND ^a

^a Not determined.

Fig. 14. Amplification of the Angiogenesis Signals by the PTP Inhibitor in VEGF-mediated Signal Transduction

125a が PTP-1B を選択的に阻害する化合物であることが明らかとなった (Table 5).

酵素選択性の高い PTP 阻害剤 **125a** を見い出すことができたので, **125a** を分子プローブとして用いて, 福岡大学生化学教室占野司教授及び添田泰司教授との共同研究として, 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の細胞内情報伝達機構に与える効果を検討した.¹²⁸⁾

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) が HUVEC の血管新生受容体 (VEGFR-2) に結合すると, VEGFR-2 に内在する PTK が活性化し, VEGFR-2 のリン酸化を経て血管新生のシグナルが生じることが知られている (Fig. 14). 血管新生のシグナル強度は, PTK による VEGFR-2 のリン酸化と PTP による脱リン酸化の拮抗バランスで調節されていると考えられた. PTP を阻害すると, 相対的に VEGFR-2 のリン酸化が促進され, 血管新生のシグナルが増幅されると推定した.

そこで, **125a** を HUVEC に作用させたところ, HUVEC 内の PTP 活性の阻害に伴って, PTK が相対的に活性化され, VEGF による血管新生シグナルの増幅が起こり, HUVEC の管腔形成, 増殖及び遊走が促進されることが確認された.¹²⁸⁾ また, マウスの背部皮下におけるマトリゲル誘起による血管新生は, **125a** の共存下で促進されることが, 機能形態学的にも観測されることが明らかとなった.¹²⁸⁾

7-4. スフィンゴミエリナーゼ (SMase) 阻害剤の創製 前述した PTP 阻害剤に関する共同研究

の打ち合わせ会議で, セラミドを介する情報伝達系を明らかとする分子プローブも同様の手法で作ることができないかとの提案があった. 特に, 共同研究者の一人の添田教授は, 長年, セラミドに関する生化学研究を展開していて, 分子プローブの必要性を感じているとのことであった. そこで, セラミドに関して文献調査をしたところ, セラミドは, 細胞内の情報伝達物質 (セカンドメッセンジャー) として, 細胞のアポトーシス誘導, 細胞増殖抑制, ストレス応答, 炎症反応, 脂質代謝, 遺伝子転写などに関与しているが, それらの生物応答のメカニズムなどについては, 不明な点が多く, それらを解明するための分子プローブは有用であることが分かった.¹²⁹⁾

セラミドは, 細胞内で様々な合成系・代謝系経路で産生されているが, その 1 つに, 細胞膜の主要な構成成分であるスフィンゴミエリン (SM) から酵素スフィンゴミエリナーゼ (SMase) によって加水分解を受けて生成される経路が知られていた (Fig. 15). この経路は 1 工程でセラミドを生成することから, 外的因子によって素早く細胞応答を引き起こす経路として重要と考えられていた. したがって, SMase 阻害剤はセラミドを介する細胞内情報伝達機構の解明のための最も有用な分子プローブの 1 つとなると期待されていた.

当時, SMase 阻害剤は, 天然物のスクリーニングによる手法で見い出されており, 代表的な化合物として scyphostatin が知られていた (Fig. 16).^{130,131)} scyphostatin はラット脳由来中性 SMase に対して強力かつ選択的な阻害作用 ($IC_{50}=1.0 \mu M$) を示することが明らかにされていた. しかしながら, scyphostatin は, 構造が複雑で全合成も確立されていなかったため, 分子プローブとして利用することは困難であった.

7-4-1. SMase 阻害剤の探索 筆者は, より単純な構造で, 比較的簡単に合成可能な SMase 阻害剤が分子プローブとして有用と考えた. 当時, SMase の活性部位のアミノ酸配列などの構造情報は知られていなかった. そこで, SMase の基質構造 (SM) に着目して, その化学修飾により SMase 阻害剤を見い出すこととした.

化学修飾に当たっては, 以下の点に留意した. すなわち, Katsumura らは, SM のアルケニル部 (A) を飽和させた短鎖アナログ **136** やアミノアルコール

Fig. 15. Metabolic and *de Novo* Pathways for Formation of Ceramide in Cells

Fig. 16. A Neutral SMase Inhibitor Isolated from Natural Sources

部分 (B) の立体配置をトレオ型に変換したアナログ **137** などを合成し、それらの SMase に対する親和性を評価していた (Fig. 17).¹³²⁻¹³⁴⁾ この報告によると、*E*-配置の二重結合を含む長鎖は、SMase との親和性に影響を及ぼさないが、アミノアルコール部分のエリスロ型立体配置は、親和性に重要な影響を及ぼすことが明らかとなっていた。しかしながら、コリン部分については、その必要性の有無は報告されていなかった。

そこで、筆者は、アミノアルコール部の立体配置と窒素上の置換基は天然型 SM のそれを保持し、リン酸ジエステル部 (C) と長鎖アルケニル部 (A) を、安定性を考慮してジフルオロメチレンホスホニル基とフェニル基でそれぞれ置換した類縁体 **138** を当初の標的化合物として設定し、関連化合物の合成と SMase 阻害活性評価を検討した (Fig. 17).^{135,136)}

標的化合物 **138** は、市販の (1*S*,2*S*)-2-amino-1-phenyl-1,3-propanediol (**139**) から容易に得られるアルデヒド **140** に $LiCF_2P(O)(OEt)_2$ を付加後、立体選択的に得られたアルコール **141** の脱オキシ化反応を経て合成した。また、アルコール **141** から、 α -ヒドロキシ類縁体 **143** も合成した。さらに、**139** のエナンチオマーも市販されていたので、**138** と

143 のエナンチオマー (*ent*-**138** 及び *ent*-**143**) についても、あわせて合成した (Scheme 33)。

同様の合成経路で、アミノアルコールの相対配置をトレオ型に変更した誘導体 **144** も合成可能であったが、**144** は、速い N $\rightarrow$ O アシル転位が起こり、生物活性評価を行うことはできなかった (Scheme 34).¹³⁶⁾ なお、*ent*-**138** については、ホスホノチオ酸エステル **142** から誘導したケトン **146** (R=Ph) の立体選択的な還元を利用する合成経路でも合成可能であった (Scheme 35).¹³⁷⁾

以上に合成した SM 類縁体 **138**, α -ヒドロキシ類縁体 **143** 及びそれらのエナンチオマー (*ent*-**138**, *ent*-**143**) について、ウシ脳ミクロソームから単離された Mg^{2+} に依存性の高い中性 SMase (N-SMase)、微生物 (*Bacillus cereus*) から単離された中性 SMase (N-SMase) 及びウシ脳リソソームから単離された酸性 SMase (A-SMase) に対する阻害活性を評価した (Table 6).^{135,136)}

これらの化合物は、微生物由来 (*Bacillus cereus*) の N-SMase に対しては、阻害活性を示さなかった。しかし、ウシ脳ミクロソームから単離された Mg^{2+} に依存性の高い N-SMase に対して阻害活性を示した。興味深いことに、天然 SM の立体配置と同じ立体配置を有する SM 類縁体 **138** 及び **143** よりも、それらのエナンチオマー *ent*-**138** 及び *ent*-**143** の方が約 4–60 倍高い阻害活性を示した。*ent*-**138** は、このシリーズのなかで、N-SMase に対して最も高い阻害活性 ($IC_{50}=3.3 \mu M$) を示し、前述した天然物 scyphostatin とほぼ同等の阻害活性を示すことが明らかとなった。また、*ent*-**138** は、 $3.3 \mu M$ の濃度でウシ脳リソソームから単離された A-SMase を 48% 阻害することも明らかとなった。さらに、Lineweaver-Burk plots の解析から、*ent*-**138** はウシ脳ミクロソームから得られた N-SMase を非

Fig. 17. Chemical Modification of Sphingomyelin

Scheme 33. Synthesis of the Target Compounds

Scheme 34. Synthesis of the *threo*-Isomer and the N→O Acyl Rearrangement

競合阻害することが明らかとなった。

以上の筆者らの報告とほぼ同時期に、Katsumuraらは、SMのエステル酸素を他の原子団で置換した短鎖類縁体 **147** の合成に成功し、その阻害活性を報告した (Fig. 18).^{133,134)} この報告では、これらの短鎖類縁体は微生物由来 (*Bacillus cereus*) の N-SMase を比較的低濃度で競合阻害することが明らかとされた。筆者らの阻害剤 **ent-138** は、Katsumura らの阻害剤 **147** とは、阻害形式が異なってい

た。**ent-138** の結合部位の特定など、更なる阻害メカニズムの解明と **ent-138** の構造最適化も必要であった。しかし、これらの研究展開は、当時の狂牛病の流行により研究材料のウシ脳ミクロソーム及びリソソーム由来の SMase が入手困難となり、断念しなければならなかった。誠に残念であった。

7-4-2. SMase 阻害剤 (SMA-7) の利用 しながら、SMase 阻害剤 **ent-138** は、N-SMase に対して十分な阻害活性を有することから **SMA-7** と命名し、福岡大学薬学部の添田教授との共同研究として、以下のセラミド情報系の機構解明の分子プローブとして活用することができた。¹³⁸⁻¹⁴²⁾

- 1) がん細胞における A-SMase の役割解明
- 2) 脳虚血による神経細胞死と SMase 活性の関連解明
- 3) ヒト末梢血単核細胞 (HPBMC) のリポポリサッカロイド (LPS) 刺激による炎症性サイトカインの放出阻止効果
- 4) 炎症性腸疾患の改善効果
- 5) SMase 活性の阻害による脂肪細胞のインスリン抵抗性の改善効果

以上の共同研究から、以下の結果が得られた。すなわち、**SMA-7** は腫瘍壊死因子 (TNF- α) で誘起される PC-12 ニューロンの細胞死を低濃度 (0.1 μ M) で阻止することが明らかとなった。この神経細胞死の抑制効果は、**SMA-7** が脳神経細胞膜に存在する Mg²⁺ 依存性中性 SMase を阻害し、脂質セカンドメッセンジャー (セラミド) のアポトーシスシグナルが遮断されることにより発現することが明らかとなった。さらに、マウス中大脳動脈閉塞モデ

Scheme 35. Alternative Synthesis of *ent*-138 through a Highly Divergent MethodTable 6. IC_{50} and K_i Values of SM Analogues against N-SMase from Bovine Brain Microsomes

Compd	IC_{50} (μM)	K_i (μM)
143	377	253
138	181	ND
<i>ent</i> -143	99	ND
<i>ent</i> -138	3.3	1.6

Fig. 18. Inhibitory Activities of SM Analogues Having a Choline Moiety

ルにおいて、**SMA-7**は投与群の脳の梗塞領域を有意に減少した。その減少効果はSMase阻害活性によく相関することが明らかとなった。以上の結果から、SMase阻害剤がサイトカインや虚血に起因する細胞ストレスシグナルの遮断に有効である可能性が示唆された。¹³⁹⁾

HPBMCのLPC刺激により放出される炎症性サイトカインは、**SMA-7**の共存下で有意に減少した。また、マウス炎症性腸疾患モデルにおいて、**SMA-7**の投与群は、杯細胞の減少と粘膜下層への細胞浸潤の抑制などがみられた。以上の結果から

N-SMaseを特異的に阻害することにより、炎症性腸疾患特有の病態が改善される可能性が示唆された。^{140–142)}

なお、**SMA-7**関連化合物のうち、 α -ヒドロキシ類縁体**143**はがん細胞における*de novo*セラミド合成ルートの活性化とジヒドロセラミド合成酵素の役割を明らかにするための有用な分子プローブとなることも判明した。¹³⁸⁾

7-5. プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 阻害剤の創製 リン酸は、生体内に普遍的に分布している分子であり、多くの生体内反応に係わっている。例えば、核酸のサルベージ経路において、プリンヌクレオシドは、PNPの触媒作用により加リン酸分解を受け、リボース-1-リン酸とプリン塩基に分解される (Fig. 19)。^{143,144)}

生体内では、この反応は、DNAやRNAの合成に必要なプリン塩基を供給する役割を担っている。したがって、PNPを阻害すると、細胞内でプリン塩基の供給が停止し、DNAやRNAの合成が抑制される。¹⁴³⁾

PNPはT細胞に高発現していることが知られており、PNP阻害剤はT細胞の異常増殖により引き起こされるT細胞白血病、T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病(ATL)などの治療薬として有用であろうと期待されている。¹⁴³⁾ PNPの活性部位には、プリン塩基を認識するPurine binding site、リ

Fig. 19. Phosphorolysis of Purine Nucleosides Catalyzed by PNP

Fig. 20. Binding Sites and Multi-substrate Analogue Inhibitors for PNP

Fig. 21. DFPP-G Analogues Having Modified Linkers and Nucleobases

ボース部分を認識する Ribose binding site, リン酸を認識する Phosphate binding site が存在することが知られている (Fig. 20).¹⁴⁵⁾ PNP は, これらの binding site にプリンヌクレオシドと無機リン酸の二基質を取り込み, Fig. 19 に示した加リン酸分解反応を触媒している。

PNP 阻害剤は, 1) 基質の 1 つであるプリンヌクレオシドを化学修飾する方法^{143,145-147)} と, 2) 2 つの基質 (プリンヌクレオシドと無機リン酸) に注目し, そのフラグメントをリンカーにより結合する方法^{143,148,149)} で見い出されてきた。2) の方法は, 標的タンパク質に対して親和性を有する 2 つのフラグメントをリンカーで連結し, もとのフラグメントよりも親和性の高い分子を見い出す方法, いわゆる fragment-based drug design (FBDD) を基本としている。¹⁵⁰⁾ 2) の方法による PNP 阻害剤の創製研究

において, Danzin らは, グアニンと無機リン酸のミミック [HCF₂P(O)(OH)₂] をメチレン 4 炭素で連結した誘導体 DFPP-G に強い PNP 阻害活性を見い出していた。¹⁴⁸⁾ しかしながら, T 細胞において, PNP は高発現していることから, PNP 阻害剤を医薬として利用するためには, 解離定数 K_d 値が 10 nM 以下で阻害活性を示す分子を見い出すことが求められていた。¹⁴³⁾ 筆者は, Danzin らの報告以降に DFPP-G の構造展開が十分に行われていないことに着目し, DFPP-G の構造展開を基本として高活性 PNP 阻害剤の創製を検討した。

7-5-1. リンカーの修飾 DFPP-G は, 二基質複合型アナログとして, PNP の Purine binding site と Phosphate binding site に取り込まれて阻害活性を示すが, 基質との競合阻害実験から推定されていた。¹⁴⁸⁾ DFPP-G の核酸塩基部とリン酸ミミック

Table 7. Comparison of Inhibition Constants of Synthesized Compounds for PNP

Compound	PNP from <i>Cellulomonas</i> sp.		PNP from human erythrocytes	
	IC ₅₀ (nM) ^a	K _i (nM) ^a	IC ₅₀ (nM) ^a	K _i (nM) ^a
DFPP-G	540	28.7	380	53.7
(<i>E</i>)- 148a	170	20.4	400	30.7
(<i>Z</i>)- 148a	200	29.1	310	27.6
(±)- 149a	390	28.2	330	43.4
(±)- 150a	291000	53200.0	391000	39067.0
(<i>E</i>)- 148b	280	11.4	320	32.1
(<i>Z</i>)- 148b	240	16.2	360	32.1
(±)- 149b	70	8.8	340	17.3
(±)- 150b	190	5.4	380	23.4
151	70	20.4	ND	ND
152	90	19.6	ND	ND
(±)- <i>cis</i> - 153	ND	ND	88	ND
(±)- <i>trans</i> - 153	ND	ND	320	ND
(±)- <i>cis</i> - 154	ND	ND	38	26.9
(±)- <i>trans</i> - 154	ND	ND	106	ND

^a Determined in the presence of 0.1 mM inosine and 100 mM Pi (pH 7.5).

ク部分の空間的な配置は、PNP との親和性に大きな影響を及ぼすことが考えられた。そこで、筆者は、リンカーの配座を制限した分子を合成し、それらの PNP 阻害活性を評価した。^{108-111,151)} 代表的な分子の構造と PNP 阻害活性を、それぞれ、Fig. 21 及び Table 7 に示す。合成法の詳細は省略するが、7-1. で述べた合成中間体が有効に利用された。

合成したヌクレオチドアナログは、イノシン (0.1 mM) 及び無機リン酸 (100 mM) の共存下、ヒト赤血球由来 PNP 並びに微生物 (*Cellulomonas* sp.) 由来 PNP に対する阻害活性を **DFPP-G** のそれと比較し評価した。**DFPP-G** の α, β 位に二重結合を導入した配座固定類縁体 (*E*-**148a** と *Z*-**148a**) では、活性の大幅な変化は認められなかった。^{110,111)} また、 α, β 位に *trans*-配置のシクロプロパン環を導入して配座固定した類縁体 [(±)-**149a**] においても、活性の大幅な変化は認められなかった。しかしながら、(±)-**149a** を 1 炭素減炭して (±)-**150a** に構造展開すると、活性は完全に消失した。¹¹¹⁾

一方、以上の配座固定類縁体 (*E*-**148a**, *Z*-**148a**, (±)-**149a**, (±)-**150a**) の核酸塩基部をグアニンからヒポキサンチンに変更した類縁体 (*E*-**148b**, *Z*-**148b**, (±)-**149b**, (±)-**150b**) では、活性が向上する傾向が認められた。¹¹¹⁾ 特に活性の認められな

Table 8. Effects of Pi Concentration on Inhibition of **DFPP-G** and (±)-*cis*-**154** for Human PNP

Compound	IC ₅₀ (nM) ^a		K _i (nM) ^a	
	1 mM PO ₄	100 mM PO ₄	1 mM PO ₄	100 mM PO ₄
DFPP-G	32.5	380	17.5	53.0
(±)- <i>cis</i> - 154	8.7	38	3.5	26.9

^a Determined in the presence of inosine (0.1 mM) at pH 7.5.

かった (±)-**150a** の核酸塩基部をヒポキサンチンに変更して (±)-**150b** に構造展開すると、PNP 阻害活性が認められ、PNP との親和性が **DFPP-G** よりも 2-5 倍に高まることが明らかとなった。(±)-**150b** の核酸塩基の α 位にメチル基を導入すると、活性の低下が観測された。(±)-**150b** の両鏡像体の合成も可能であったが、鏡像体による活性の違いは認められなかった。¹¹⁰⁾

β, γ 位にテトラヒドロフラン環及びピラン環を縮環した類縁体 [(±)-*cis*-**153**, (±)-*trans*-**153**, (±)-*cis*-**154**, (±)-*trans*-**154**] は、これらのヘテロ環がリンカーの配座固定と PNP の Ribose binding site との相互作用に寄与すると期待して設計された分子である。これらの分子の活性は、*trans* 体よりも *cis* 体の方が高まる傾向が認められた。^{108,109)} このシリーズのなかで最も高活性を示した (±)-*cis*-**154** について、さらに詳細な解析を行った。すなわち、ヒト細胞中のリン酸濃度は 1 mM であることから、リン酸濃度を 1 mM に変更して、ヒト PNP に対する阻害活性を評価した (Table 8)。その結果、リン酸濃度を 100 mM から 1 mM に低下すると、(±)-*cis*-**154** の IC₅₀ 値と K_i 値は濃度依存的に低下することが明らかとなった。これらの結果から、(±)-*cis*-**154** は、二基質複合型アナログとして Purine binding site と Phosphate binding site の両方に取り込まれて阻害活性を示す分子であることが推定された。また、1 mM のリン酸濃度で **DFPP-G** と (±)-*cis*-**154** の阻害活性を比較すると、(±)-*cis*-**154** は、**DFPP-G** の 4-5 倍の阻害活性を示すことが明らかとなった。

7-5-2. 核酸塩基部の修飾 (共同研究での展開)

前述したリンカーの修飾に関する結果が論文として掲載されて間もないころ、北海道大学薬学部で核酸化学の研鑽を積んだ疋島貞雄助教が本教室の教育研究教育に参加することとなり、PNP 阻害剤の開

Fig. 22. Interactions of **DFPP-G** with Calf-spleen PNP in the Binary Complex

発を担当することとなった。また、ワルシャワ大学物理学科の David Shugar 教授から一通の手紙と PNP に関する総説¹⁴³⁾が送られてきた。Shugar 教授は、世界的に著名な生物物理学者で、特に PNP の触媒機構研究の大家だった。この手紙をきっかけとして、Shugar 教授の後継者である Bzowska 教授のグループとの PNP 阻害剤に関する共同研究を推進することとなった。¹⁵²⁻¹⁶³⁾

この共同研究では、当初、(±)-**cis-154** の calf spleen PNP に対するより精密な阻害定数や解離定数が明らかとされた。また、三量体として存在する calf spleen PNP に対して、(±)-**cis-154** が結合する分子数（ストイキオメトリー）などの解析が行われた。¹⁵⁵⁾ さらに、PNP 阻害剤の治療薬としての可能性を探索したところ、リンカーにテトラヒドロフラン環を組み込んだ PNP 阻害剤 (±)-**cis-153** が自己免疫疾患患者（橋本病）の T リンパ球の増殖阻止に顕著な効果を示すことが明らかとなった。¹⁵⁷⁾

その後、**DFPP-G** と calf spleen PNP の共結晶の X 線結晶解析に成功し、詳細な結合様式を明らかにすることができた (Fig. 22)。¹⁵⁶⁾

この X 線結晶解析より、**DFPP-G** のジフルオロメチレンホスホン酸ユニットは、Phosphate binding site において Ser220, Ser33, Ala116 や塩基性アミノ酸残基 His86, Arg84 との水素結合を形成していた。すなわち、期待通りジフルオロメチレンホスホン酸ユニットはリン酸ミミックとして機能し、この結合部位にリン酸と同様に認識されていることが確認された。Purine binding site において、グアニンユニットは Asn243 と水を介した水素結合及び Phe200 とのスタッキングで相互作用していた。

Fig. 23. 9-Deazaguanine Derivatives for PNP Inhibitors

以上の解析結果から、Purine binding site との水素結合のネットワークにおいて、水を介さない水素結合が形成されるように、グアニン塩基部を化学修飾すれば、PNP との親和性が高まることが予想された。核酸塩基と Purine binding site との水素結合に関しては、Montgomery らにより詳細な検討がされており、グアニンを非天然型 9-デアザグアニンに置き換えると、水素結合のネットワークが変化し、PNP 阻害活性が 300 倍程度に高まることが報告されていた (Fig. 23)。^{143,145,146)}

また、9-デアザグアニンあるいは 9-デアザヒポキサンチンをアザ糖に結合した核酸アナログ (**Immucillin G** 及び **Immucillin H**) は、アザ糖の窒素原子がイノシンの加リン酸分解の遷移状態（電荷状態）を模倣できる遷移状態アナログで、ピコモルオーダーの濃度で PNP との親和性を示すことが知られており、臨床開発候補として研究が進められていた (Fig. 23)。¹⁴⁷⁾

以上の知見を踏まえて、筆者は、**DFPP-G** のグアニン塩基をデアザグアニンに置換した類縁体 (**DFPP-DG**) 及びその炭素鎖長を減炭あるいは増炭した類縁体 (**nor-DFPP-DG**, **homo-DFPP-DG** 及び **6C-DFPP-DG**) を新たにデザイン・合成した (Fig. 24)。¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾ また、水溶性の向上と加リン酸分解の遷移状態で生成するオキソカルベニウムイオンのミミックを目的として、**DFPP-G** のリンカーの

Fig. 24. Modifications of **DFPP-G** with Transition-state Features Scheme 36. Synthesis of **DFPP-DG Deriv.** and **aza-DFPP-DG**

2'位に窒素原子を組み入れた類縁体 (**aza-DFPP-DG**) をデザイン・合成した (Fig. 24).¹⁶³⁾ 合成法の詳細は省略するが, **DFPP-DG** 誘導体は, 9-ヨードデアザグアニン誘導体 **155** と ω -アルキニルホスホナート **157** の Sonogashira 反応により得られた中間体 **158** から容易に合成できた (Scheme 36). また, **aza-DFPP-DG** 誘導体は, 9-ホルミルデアザグアニン誘導体 **156** の還元的なアミノ化反応により得られる中間体 **160** から容易に得られた (Scheme 36).

以上に得られた **DFPP-DG deriv.** の阻害活性については, calf spleen 由来 PNP (caPNP) 及び human erythrocyte 由来 PNP (huPNP) に対する IC_{50} 値及びみかけの阻害定数 (K_i^{app}) で初期の評価を行った (Table 9).^{152,153,162)}

以上の評価において, **DFPP-DG** と **DFPP-G** を K_i^{app} で比較すると, わずかに **DFPP-DG** の活性が高いと言えるが, IC_{50} 値の比較では, ほぼ同等の活性を示した. また, **DFPP-DG** の炭素鎖を1炭素減炭すると活性の大幅な減少が認められた. リンカーの炭素を1炭素増炭すると活性が高まる傾向が

Table 9. Inhibitory Properties of **DFPP-DG Deriv.** against huPNP and caPNP

Compd.	Human erythrocyte PNP		Calf spleen PNP	
	IC_{50} [nM] ^a	K_i^{app} [nM] ^a	IC_{50} [nM] ^a	K_i^{app} [nM] ^a
DFPP-G	20.2	10.8 ± 0.7	18.7	6.9 ± 0.7
nor-DFPP-DG	173	—	—	—
DFPP-DG	20.4	8.1 ± 0.6	10.2	4.4 ± 0.6
homo-DFPP-DG	9.5	5.3 ± 0.4	—	5.7 ± 0.6
6C-DFPP-DG	—	13 ± 1	—	21 ± 2

^a Obtained in the presence of 1 mM phosphate.

認められたが, 2炭素増炭すると活性の低下が認められた. しかしながら, Montgomery の報告のように,^{143–145)} IC_{50} 値が劇的に低下することは認められなかった.

そこで, 次に, 核酸塩基を9-デアザグアニンに置換した効果を検証するために, **DFPP-DG**/caPNP 複合体の X 線結晶構造から, 相互作用のパターンを解析した (Fig. 25).¹⁵⁹⁾ その結果, **DFPP-DG** は, 二基質複合型アナログとして Purine bind-

Fig. 25. Interactions of **DFPP-DG** with Calf-spleen PNP in the Binary Complex

Fig. 26. Rate Constants for a Two-step Binding of **DFPP-DG** to Calf-spleen PNP

ing site と Phosphate binding site の両方に取り込まれて阻害活性を示す分子であることが確認された。また、Purine binding site の Asn243 との水素結合において、水分子は存在しておらず、期待通り、9-デアザグアニン部が直接相互作用していることが明らかとなった。

X線結晶解析で **DFPP-DG** の結合様式が明らかとなったので、次に、**DFPP-DG** について、阻害速度に関する速度論的解析を行った。¹⁶⁰⁾ その結果、**DFPP-DG** による caPNP の阻害は、EI 錯体のコンフォメーションを伴う2段階の連続反応で進行していることが明らかとなった (Fig. 26)。また、それぞれの素反応の速度定数の解析から、**DFPP-DG** は、slow-binding tight inhibitor として、PNP を阻害することが明らかとされた。

そこで、Fig. 26 の阻害反応が平衡に達したときの阻害定数 (K_i^{eq}) で、**DFPP-DG** 類縁体と **Immucillin H** の caPNP に対する阻害能を評価した。¹⁶⁰⁾ Table 10 に、 K_i^{eq} 値と解離定数値 (K_d) を示す。この解析により、**DFPP-DG** の K_i^{eq} 値は $85 \pm 13 \text{ pM}$ と算出され、**Immucillin H** のそれ ($K_i^{\text{eq}} = 23 \pm 5 \text{ pM}$) と同等の値を示した。また、**DFPP-G** と

Table 10. Inhibitory Properties of **Immucillin H** and **DFPP-DG** Derivatives at the Inhibition Equilibrium

	K_i^{eq} [nM]	K_d [nM]
Immucillin H	0.023 ± 0.005	$2.3 \pm 0.5 \times 10^{-11}$
DFPP-DG	0.085 ± 0.013	$1.0 \pm 0.5 \times 10^{-10}$
DFPP-G	0.72 ± 0.13	$4.6 \pm 1.1 \times 10^{-10}$
aza-DFPP-DG	6.8 ± 0.4	$3.6 \pm 0.5 \times 10^{-9}$

aza-DFPP-DG の K_i^{eq} 値は、それぞれ、 $0.72 \pm 0.13 \text{ nM}$ 及び $6.8 \pm 0.4 \text{ nM}$ を示した。すなわち、**DFPP-G** の核酸塩基部を 9-デアザグアニンに置き換えると、阻害活性が 10 倍程度に向上することが明らかとなった。しかし、リンカーへの窒素原子の導入と核酸塩基部の 9-デアザグアニンへの変更は予想に反して、阻害活性を低下させることが明らかとなった。

各種 cell line を対象とする細胞毒性試験の結果から、**DFPP-DG** は、橋本病やグレーブス病の自己免疫疾患患者から単離された T リンパ球に対して、顕著な増殖阻止効果を示すことが明らかとなった。¹⁶⁰⁾ しかし、**DFPP-DG** の細胞膜透過性は低く、増殖阻止濃度は中程度で留まった。**DFPP-DG** の細胞膜透過性の改善は今後の課題として残されたが、**DFPP-DG** 及び関連類縁体は、**Immucillin H** の PNP 阻害メカニズム解明のための分子プローブとして有効に利用された。^{155–163)}

8. トロンビン選択的非拮抗阻害剤の創製

2011 年 4 月に、分子細胞生物学研究所（橋本祐一先生の研究室）から、当教室の准教授として青山洋史先生が教育研究に参加することとなった。青山准教授は、タンパク質の行動制御に基づく創薬手法において、小分子によるプロテアソームなどのタンパク質の行動制御に成功していた。また、サリドマイドの構造展開から、トリプシン様セリンプロテアーゼのうち、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患のメディエーターの 1 つであるトリプターゼに、選択的な阻害活性 ($K_i = 44 \text{ nM}$) を示すフタル酸イミド誘導体 **161** を見い出していた (Fig. 27)。¹⁶⁴⁾ しかしながら、フタル酸イミド誘導体 **161** の活性と酵素選択性は十分とは言えず、実用化に耐え得る段階までには至っていなかった。

そこで、筆者らは以上の先行研究を踏まえて、フタル酸イミド誘導体 **161** の更なる構造展開を検討し

Fig. 27. A Tryptase Inhibitor Derived from Thalidomide

Fig. 28. Alternation of Inhibition Mode by Skeletal Conversion of Carboxylates to Phosphonates

た。構造展開では、フタル酸イミド誘導体 **161** のアリールカーボエステル構造が比較的不安定であることから、加水分解に安定なアリールホスホン酸エステル構造に置換し安定性を増すこととした。¹²⁾ フタル酸イミド誘導体 **161** は、トリプターゼの基質結合部位における競合阻害を示すことから、テトラヘドラルなアリールホスホン酸エステル構造で置換した誘導体は、アリールカーボエステルの水和遷移状態アナログとして機能して、トリプターゼとの親和性が高まると期待した。⁷⁶⁾ 筆者らは、このような誘導体として、2-アミノピリジンと *N*-メチルフタル酸イミドをアルキルホスホン酸エステル型のリンカーで連結した誘導体 **163** をデザイン・合成した。¹⁶⁵⁾ そして、トリプシン様セリンプロテアーゼに対する阻害活性について、アリールカーボエステル誘導体 **162** の阻害活性と比較した (Fig. 28 and Table 11)。

以上の検討から、アリールカーボエステル誘導体 **162** は、予想通り、トリプターゼ、トリプシン及びトロンビンに対して阻害活性を示した。しかし、アリールホスホン酸エステル誘導体 **163** は、当初の標的であったトリプターゼやトリプシンに対しては高い阻害活性は認められなかったが、トロンビンに対して高い阻害活性 ($IC_{50}=1.2\ \mu\text{M}$) を示した。また、Lineweaver-Burk plots の解析から、アリールカーボエステル誘導体 **162** はトロンビンを競合阻害したが、アリールホスホン酸エステル誘導体 **163** は、トロンビンを非競合阻害することが明らかとなった。すなわち、アリールカーボエステル構造をアリール

Table 11. IC_{50} Values of Carboxylate **162** and Phosphonate **163**

	IC_{50} (μM) for 162	IC_{50} (μM) for 163
tryptase	0.20	>10
trypsin	2.9	>10
thrombin	7.0	1.2

ホスホン酸エステル構造に置換するだけで、酵素選択性が劇的に変化するばかりか、阻害形式が競合阻害から非競合阻害に変化することを見い出した。

ホスホン酸誘導体を基盤とする酵素阻害剤の創製研究において、基質構造にホスホニル基を組み込むと、阻害形式が競合阻害から非競合阻害に変る現象が観察されることがあった。以上の発見は、その典型的な現象の1つと考えられる。現在、アリールホスホン酸エステル誘導体 **163** をリードとして構造最適化が行われている。これらの研究で、以上の現象が分子レベルで説明されれば、類似構造を有する化合物群への適用も考えられ、新しい創薬手法の開発につながると思われる。今後の展開が楽しみである。

9. おわりに

本研究は、長年にわたる研究生生活のうち、1990年以降に行われもののなかで、特にリン原子団を有する化合物の合成と生物活性に焦点を絞り総説にまとめた。研究テーマによっては、十分な展開ができず、見苦しいものもあると思いつつ論文をまとめた。しかし、いくつかの研究テーマでは、共同研究者に恵まれて、細胞内の情報伝達機構の生化学

的解明や酵素阻害メカニズムの生物物理学的な解明に分子プローブとして利用できる生物活性ホスホン酸誘導体を見出すことができた。本研究テーマ立ち上げ時の目標がある程度達成されたと考えている。また、定年間近ではあったが、ホスホン酸誘導体の生物活性に関する新たな側面を発見することができ、今後の展開を楽しみにしている。

謝辞 本研究は、東京薬科大学薬学部薬品製造工学教室、分子機能解析学教室において、教室員と大学院生・学生とともにやってきたものであり、研究推進に御尽力を頂いた皆様に心より感謝を申し上げます。特に、学生時代から研究の厳しさと方向性について御指導頂いた加納慎蔵東京薬科大学名誉教授（故人）、渋谷 皓東京薬科大学名誉教授に深謝いたします。共同研究に快く応じて頂き、種々の御助言と御指導を頂いた占野廣司福岡大学名誉教授、福岡大学生化学教室添田泰司教授に深甚なる感謝の意を表します。また、X線結晶構造解析や精密な阻害定数の測定などで御協力頂いたワルシャワ大学Bzowska教授に感謝します。研究テーマの立ち上げ時に、大学院生として、その後教員として研究に御協力頂いた山岸丈洋奥羽大学薬学部教授に感謝します。本研究の一部は、日本学術振興会外国人招へい事業（外国人招へい研究者長期・短期）により来日した研究者（Kaboudin教授）の協力により実現できました。招へいを支援して頂いた日本学術振興会に感謝いたします。最後に、本研究に御支援を賜った本学はもとより、日本学術振興会科研費補助金及び文部科学省私立大学ハイテクリサーチ事業からの研究助成に対して深謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Overman L. E., Yokomatsu T., *J. Org. Chem.*, **45**, 5229–5230 (1980)
- 2) Yokomatsu T., Shibuya S., *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **46**, 626–637 (1988).
- 3) Yokomatsu T., Yuasa Y., Shibuya S., *Heterocycles*, **33**, 1051–1078 (1992).
- 4) Shibuya S., Yokomatsu T., Yuasa Y., “Studies in Natural Products Chemistry,” Vol. 12, ed. by Rahman A. U., Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 445–498.
- 5) Shibuya S., *Yakugaku Zasshi*, **124**, 725–749 (2004).
- 6) Engel R., *Chem. Rev.*, **77**, 349–367 (1977).
- 7) Hilderbrand R. L., “The Role of Phosphonates in Living Systems,” CRC Press, Boca Raton, 1983.
- 8) Blackburn G. M., *Chem. Ind.*, 134–138 (1981).
- 9) Blackburn G. M., Kent D. E., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 913–917 (1986).
- 10) Lalinde N., Tropp B. E., Engel R., *Tetrahedron*, **39**, 2369–2372 (1983).
- 11) Bartlett P. A., Hanson J. E., Giannousis P. P., *J. Org. Chem.*, **55**, 6268–6274 (1990).
- 12) Engel R., “Synthesis of Carbon-Phosphorus Bonds,” CRC Press, Boca Raton, 1988.
- 13) Engel R., *Org. React.*, **36**, 175–248 (1988).
- 14) Pudovik A. N., Kononova I. V., *Synthesis*, 81–96 (1979).
- 15) Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S., *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **53**, 881–892 (1995).
- 16) Yokomatsu T., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **3**, 377–378 (1992).
- 17) Burke T. R., Smyth M. S., Otaka A., Nomizu M., Roller P. P., Wolf G., Case R., Shoelson S. E., *Biochemistry*, **33**, 6490–6494 (1994).
- 18) Yokomatsu T., Yamagishi T., Matsumoto K., Shibuya S., *Tetrahedron*, **52**, 11725–11738 (1996).
- 19) Wynberg H., Smaardijk A. A., *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5899–5900 (1983).
- 20) Smaardijk A. A., Noorda S., van Bolhuis F., Wynberg H., *Tetrahedron Lett.*, **26**, 493–496 (1985).
- 21) Yamagishi T., Ph.D. Thesis, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, March 1997.
- 22) Finn M. G., Sharpless K. B., “Asymmetric Synthesis, Vol. 5, Chiral catalysis,” ed. by Morrison J. M., Academic Press Inc., San Diego, 1985, pp. 247–308.
- 23) Hayashi M., Matsuda T., Oguni N., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1364–1365 (1990).
- 24) Katsuki T., Sharpless K. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5974–5976 (1980).
- 25) Sasai H., Suzuki T., Arai S., Arai T., Shibasaki M., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4418–4420 (1992).

- 26) Sasai H., Suzuki T., Itoh N., Shibasaki M., *Tetrahedron Lett.*, **34**, 851–854 (1993).
- 27) Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1779–1782 (1993).
- 28) Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1527–1534 (1997).
- 29) Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1783–1784 (1993).
- 30) Rath N. P., Spilling C. D., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 227–230 (1994).
- 31) Arai T., Bougauchi M., Sasai H., Shibasaki M., *J. Org. Chem.*, **61**, 2926–2927 (1996).
- 32) Sasai H., Arai S., Tahara Y., Shibasaki M., *J. Org. Chem.*, **60**, 6656–6657 (1995).
- 33) Hirashima S., Arai R., Nakashima K., Kawai N., Kondo J., Koseki Y., Miura T., *Adv. Synth. Catal.*, **357**, 3863–3867 (2015).
- 34) Patel D. V., Rielly-Gauvin K., Ryono D. E., *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5587–5590 (1990).
- 35) Patel D. V., Rielly-Gauvin K., Ryono D. E., *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5591–5594 (1990).
- 36) Patel D. V., Rielly-Gauvin K., Ryono D. E., Free C. A., Rogers W. L., Smith S. A., DeForrest J. M., Oehl R. S., Petrillo E. W. Jr., *J. Med. Chem.*, **38**, 4557–4569 (1995).
- 37) Peyman A., Budt K.-H., Spanig J., Stowasser B., Ruppert D., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 4549–4552 (1992).
- 38) Stowasser B., Budt K.-H., Jian-Qi L., Peyman A., Ruppert D., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 6625–6628 (1992).
- 39) Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1401–1404 (1993).
- 40) Yokomatsu T., Yoshida Y., Shibuya S., *J. Org. Chem.*, **59**, 7930–7933 (1994).
- 41) Yamagishi T., Kusano T., Kaboudin B., Yokomatsu T., Sakuma C., Shibuya S., *Tetrahedron*, **59**, 767–772 (2003).
- 42) Yamagishi T., Suemune K., Yokomatsu T., Shibuya S., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 5033–5036 (2001).
- 43) Yamagishi T., Suemune K., Yokomatsu T., Shibuya S., *Tetrahedron*, **58**, 2577–2583 (2002).
- 44) Kaboudin B., Haruki T., Yamagishi T., Yokomatsu T., *Synthesis*, 3226–3232 (2007).
- 45) Kaboudin B., Haruki T., Yamagishi T., Yokomatsu T., *Tetrahedron*, **63**, 8199–8205 (2007).
- 46) Suemune K., Ph.D. Thesis, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, March 2003.
- 47) Kolb H. C., VanNieuwenhze M. S., Sharpless K. B., *Chem. Rev.*, **94**, 2483–2547 (1994).
- 48) Yokomatsu T., Yoshida Y., Suemune K., Yamagishi T., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **6**, 365–368 (1995).
- 49) Yokomatsu T., Yamagishi T., Suemune K., Yoshida Y., Shibuya S., *Tetrahedron*, **54**, 767–780 (1998).
- 50) Yokomatsu T., Yamagishi T., Sada T., Suemune K., Shibuya S., *Tetrahedron*, **54**, 781–790 (1998).
- 51) Yokomatsu T., Suemune K., Yamagishi T., Shibuya S., *Synlett*, 847–849 (1995).
- 52) Schoepp D. D., Johnson B. G., *J. Neurochem.*, **53**, 273–278 (1989).
- 53) Hutchison A. J., Williams M., Angst C., de Jesus R., Blanchard L., Jackson R. H., Wilusz E. J., Murphy D. E., Bernard P. S., Schneider J., Campbell T., Guida W., Sills M. A., *J. Med. Chem.*, **32**, 2171–2178 (1989).
- 54) Berkowitz D. B., Shen Q., Maeng J.-H., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 6445–6448 (1994).
- 55) Otaka A., Miyoshi K., Burke T. R., Roller P. P., Kubota H., Tamamura H., Fujii N., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 927–930 (1995).
- 56) Xie Z.-F., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2**, 733–750 (1991).
- 57) Faber K., Riva S., *Synthesis*, 895–910 (1992).
- 58) Theil F., *Chem. Rev.*, **95**, 2203–2227 (1995).
- 59) Schoffers E., Golebiowski A., Johnson C. R., *Tetrahedron*, **52**, 3769–3826 (1996).
- 60) Yokomatsu T., Sato M., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 2743–2754 (1996).
- 61) Weissfloch A. N. E., Kazlauskas R. J., *J. Org. Chem.*, **60**, 6959–6969 (1995).
- 62) Yokomatsu T., Nakabayashi N., Matsumoto K., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **6**, 3055–3062 (1995).
- 63) Uhlmann E., Peyman A., *Chem. Rev.*, **90**, 543–584 (1990).
- 64) Morr M., Ernst L., Schomburg D., *Liebigs Ann. Chem.*, 615–631 (1991).
- 65) Pragnacharyulu P. V. P., Abushanab E.,

- Tetrahedron Lett.*, **36**, 5507–5510 (1995).
- 66) Yokomatsu T., Shimizu T., Yuasa Y., Shibuya S., *Synlett*, 1280–1282 (1995).
- 67) Yokomatsu T., Sada T., Shimizu T., Shibuya S., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 6299–6302 (1998).
- 68) Yokomatsu T., Shimizu T., Sada T., Shibuya S., *Heterocycles*, **50**, 21–25 (1999).
- 69) Murano T., Muroyama S., Yokomatsu T., Shibuya S., *Synlett*, 1657–1660 (2002).
- 70) Murano T., Yuasa Y., Muroyama S., Yokomatsu T., Shibuya S., *Tetrahedron*, **59**, 9059–9073 (2003).
- 71) Ralevic V., Burnstock G., *Pharmacol. Rev.*, **50**, 413–492 (1998).
- 72) Hollopeter G., Jantzen H.-M., Vincent D., Li G., England L., Ramakrishnan V., Yang R.-B., Nurden P., Nurden A., Julius D., Conley P. B., *Nature*, **409**, 202–207 (2001).
- 73) Jacobson K. A., Jarvis M. F., Williams M., *J. Med. Chem.*, **45**, 4057–4093 (2002).
- 74) Murano T., Kobayakawa H., Yuasa Y., Yokomatsu T., Shibuya S., *Synthesis*, 187–192 (2005).
- 75) Murano T., Yuasa Y., Kobayakawa H., Yokomatsu T., Shibuya S., *Tetrahedron*, **59**, 10223–10230 (2003).
- 76) Collinsová M., Jiráček J., *Curr. Med. Chem.*, **7**, 629–647 (2000).
- 77) Allen M. C., Fuhrer W., Tuck B., Wade R., Wood J. M., *J. Med. Chem.*, **32**, 1652–1661 (1989).
- 78) Manzenrieder F., Frank A. O., Huber T., Dorner-Ciossek C., Kessler H., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4136–4143 (2007).
- 79) Yiotakis A., Georgiadis D., Matziari M., Makaritis A., Dive V., *Curr. Org. Chem.*, **8**, 1135–1158 (2004).
- 80) Matziari M., Beau F., Cuniasse P., Dive V., Yiotakis A., *J. Med. Chem.*, **47**, 325–336 (2004).
- 81) Yamagishi T., *Yakugaku Zasshi*, **134**, 915–924 (2014).
- 82) Yamagishi T., Haruki T., Yokomatsu T., *Tetrahedron*, **62**, 9210–9217 (2006).
- 83) Yamagishi T., Ichikawa H., Haruki T., Yokomatsu T., *Org. Lett.*, **10**, 4347–4350 (2008).
- 84) Yamagishi T., Mori J., Haruki T., Yokomatsu T., *Tetrahedron: Asymmetry*, **22**, 1358–1363 (2011).
- 85) Haruki T., Yamagishi T., Yokomatsu T., *Tetrahedron: Asymmetry*, **18**, 2886–2893 (2007).
- 86) Haruki T., Ph.D. Thesis, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, March 2011.
- 87) Georgiadis D., Cuniasse P., Cotton J., Yiotakis A., Dive V., *Biochemistry*, **43**, 8048–8054 (2004).
- 88) Demang L., Dugave C., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 6295–6297 (2001).
- 89) Yamagishi T., Tashiro N., Yokomatsu T., *J. Org. Chem.*, **76**, 5472–5476 (2011).
- 90) Gautier A., *Heterocycles*, **67**, 823–837 (2006).
- 91) Taylor S. D., Kotoris C. C., Hum G., *Tetrahedron*, **55**, 12431–12477 (1999).
- 92) Yokomatsu T., Shibuya S., *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **60**, 740–751 (2002).
- 93) Romanenko V. D., Kukhar V. P., *Chem. Rev.*, **106**, 3868–3935 (2006).
- 94) Smyth M. S., Ford H. Jr., Burke T. R., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 4137–4140 (1992).
- 95) Smyth M. S., Burke T. R., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 551–554 (1994).
- 96) Solas D., Hale R. L., Patel D. V., *J. Org. Chem.*, **61**, 1537–1539 (1996).
- 97) Obayashi M., Kondo K., *Tetrahedron Lett.*, **23**, 2327–2328 (1982).
- 98) Berkowitz D. B., Eggen M., Shen Q., Sloss D. G., *J. Org. Chem.*, **58**, 6174–6176 (1993).
- 99) Berkowitz D. B., Sloss D. G., *J. Org. Chem.*, **60**, 7047–7050 (1995).
- 100) Berkowitz D. B., Bhuniya D., Peris C., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 1869–1872 (1999).
- 101) Halazy S., Gross-Bergès V., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 743–745 (1992).
- 102) Burton D. J., Yang Z.-Y., *Tetrahedron*, **48**, 189–275 (1992).
- 103) Yokomatsu T., Suemune K., Murano T., Shibuya S., *J. Org. Chem.*, **61**, 7207–7211 (1996).
- 104) Yokomatsu T., Murano T., Suemune K., Shibuya S., *Tetrahedron*, **53**, 815–822 (1997).
- 105) Yokomatsu T., Ichimura A., Kato J., Shibuya S., *Synlett*, 0287–0289 (2001).
- 106) Yokomatsu T., Kato J., Sakuma C., Shibuya S., *Synlett*, 1407–1410 (2003).
- 107) Yokomatsu T., Katayama S., Shibuya S., *Chem. Commun.*, 1878–1879 (2001).

- 108) Yokomatsu T., Hayakawa Y., Suemune K., Kihara T., Soeda S., Shimeno H., Shibuya S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2833–2836 (1999).
- 109) Yokomatsu T., Hayakawa Y., Kihara T., Koyanagi S., Soeda S., Shimeno H., Shibuya S., *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 2571–2579 (2000).
- 110) Yokomatsu T., Sato M., Abe H., Suemune K., Matsumoto K., Kihara T., Soeda S., Shimeno H., Shibuya S., *Tetrahedron*, **53**, 11297–11306 (1997).
- 111) Yokomatsu T., Abe H., Sato M., Suemune K., Kihara T., Soeda S., Shimeno H., Shibuya S., *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 2495–2505 (1998).
- 112) Yokomatsu T., Abe H., Yamagishi T., Suemune K., Shibuya S., *J. Org. Chem.*, **64**, 8413–8418 (1999).
- 113) Yokomatsu T., Suemune K., Murano T., Shibuya S., *Heterocycles*, **56**, 273–282 (2002).
- 114) Yokomatsu T., Minowa T., Murano T., Shibuya S., *Tetrahedron*, **54**, 9341–9356 (1998).
- 115) Otaka A., Mitsuyama E., Kinoshita T., Tamamura H., Fujii N., *J. Org. Chem.*, **65**, 4888–4899 (2000).
- 116) Yokomatsu T., Takechi H., Murano T., Shibuya S., *J. Org. Chem.*, **65**, 5858–5861 (2000).
- 117) Murano T., Takechi H., Yuasa Y., Yokomatsu T., Umesue I., Soeda S., Shimeno H., Shibuya S., *Arkivoc*, part (viii), 256–266 (2003).
- 118) Hinterding K., Alosio-Díaz D., Waldmann H., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 688–749 (1998).
- 119) van der Geer P., Hunter T., Lindberg R. A., *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **10**, 251–337 (1994).
- 120) Burke T. R., Kole H. K., Roller P. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 129–134 (1994).
- 121) Chen L., Wu L., Otaka A., Smyth M. S., Roller P. P., Burke T. R., Denhertog J., Zhang Z. Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 976–984 (1995).
- 122) Kole H. K., Smyth M. S., Russ P. L., Burke T. R., *Biochem. J.*, **311**, 1025–1031 (1995).
- 123) Burke T. R., Ye B., Yan X., Wang S., Jia Z., Chen L., Zhang Z.-Y., Barford D., *Biochemistry*, **35**, 15989–15996 (1996).
- 124) Ye B., Burke T. R., *Tetrahedron*, **52**, 9963–9970 (1996).
- 125) Yokomatsu T., Murano T., Umesue I., Soeda S., Shimeno H., Shibuya S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 529–532 (1999).
- 126) Murano T., Ph.D. Thesis, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, March 2004.
- 127) Bahta M., Lountos G. T., Dyas B., Kim S.-E., Ulrich R. G., Waugh D. S., Burke T. R., *J. Med. Chem.*, **54**, 2933–2943 (2011).
- 128) Soeda S., Shimada T., Koyanagi S., Yokomatsu T., Murano T., Shibuya S., Shimeno H., *FEBS Lett.*, **524**, 54–58 (2002).
- 129) Kolter T., Sandhoff K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1532–1568 (1999).
- 130) Nara F., Tanaka M., Hosoya H., Suzuki-Koyanagi K., Ogita T., *J. Antibiot.*, **52**, 525–530 (1999).
- 131) Nara F., Tanaka M., Masuda-Inoue S., Yamasato Y., Doi-Yoshioka H., Suzuki-Konagai K., Kumakura S., Ogita T., *J. Antibiot.*, **52**, 531–535 (1999).
- 132) Murakami M., Iwama S., Fujii S., Ikeda K., Katsumura S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 1725–1728 (1997).
- 133) Hakogi T., Taichi M., Katsumura S., *Org. Lett.*, **5**, 2801–2804 (2003).
- 134) Hakogi T., Yamamoto T., Fujii S., Ikeda K., Katsumura S., *Tetrahedron Lett.*, **47**, 2627–2630 (2006).
- 135) Yokomatsu T., Takechi H., Akiyama T., Shibuya S., Kominato T., Soeda S., Shimeno H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 1277–1280 (2001).
- 136) Yokomatsu T., Murano T., Akiyama T., Koizumi J., Shibuya S., Tsuji Y., Soeda S., Shimeno H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 229–236 (2003).
- 137) Yamagishi T., Muronoi S., Hikishima S., Shimeno H., Soeda S., Yokomatsu T., *J. Org. Chem.*, **74**, 6350–6353 (2009).
- 138) Koyanagi S., Kuga M., Soeda S., Hosoda Y., Yokomatsu T., Takechi H., Akiyama T., Shibuya S., Shimeno H., *Int. J. Cancer*, **105**, 1–6 (2003).
- 139) Soeda S., Tsuji Y., Ochiai T., Mishima K., Iwasaki K., Fujiwara M., Yokomatsu T., Murano T., Shibuya S., Shimeno H., *Neurochem. Int.*, **45**, 619–626 (2004).
- 140) Sakata A., Ochiai T., Shimeno H., Hikishima

- S., Yokomatsu T., Shibuya S., Toda A., Eyanagi R., Soeda S., *Immunology*, **122**, 54–64 (2007).
- 141) Sakata A., Yasuda K., Ochiai T., Shimeno H., Hikishima S., Yokomatsu T., Shibuya S., Soeda S., *Cell. Immunol.*, **245**, 24–31 (2007).
- 142) Soeda S., Sakata A., Ochiai T., Yasuda K., Kuramoto Y., Shimeno H., Toda A., Eyanagi R., Hikishima S., Yokomatsu T., Shibuya S., *Curr. Drug Therapy*, **3**, 218–225 (2008).
- 143) Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D., *Pharmacol. Ther.*, **88**, 349–425 (2000).
- 144) Stoeckler J. D., Ealick S. E., Bugg C. E., Parks R. E. Jr., *Fed. Proc.*, **45**, 2773–2778 (1986).
- 145) Montgomery J. A., Niwas S., Rose J. D., Secrist J. A. III, Babu Y. S., Bugg C. E., Erion M. D., Guida W. C., Ealick S. E., *J. Med. Chem.*, **36**, 55–69 (1993).
- 146) Miles R. W., Tyler P. C., Evans G. B., Furneaux R. H., Parekin D. W., Schramm V. L., *Biochemistry*, **38**, 13147–13154 (1999).
- 147) Evans G. B., Furneaux R. H., Greatrex B., Murkin A. S., Schramm V. L., Tyler P. C., *J. Med. Chem.*, **51**, 948–956 (2008).
- 148) Halazy S., Ehrhard A., Danzin C., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 315–317 (1991).
- 149) Halazy S., Ehrhard A., Eggenspieler A., Berges-Gross V., Danzin C., *Tetrahedron*, **52**, 177–184 (1996).
- 150) Tanaka D., *Yakugaku Zasshi*, **130**, 315–323 (2010).
- 151) Hikishima S., Isobe M., Koyanagi S., Soeda S., Shimeno H., Shibuya S., Yokomatsu T., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 1660–1670 (2006).
- 152) Hikishima S., Hashimoto M., Magnowska L., Bzowska A., Yokomatsu T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 4173–4177 (2007).
- 153) Hikishima S., Hashimoto M., Magnowska L., Bzowska A., Yokomatsu T., *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 2275–2284 (2010).
- 154) Yatsu T., Hashimoto M., Hikishima S., Magnowska L., Bzowska A., Yokomatsu T., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 661–662 (2008).
- 155) Iwanow M., Magnowska L., Yokomatsu T., Shibuya S., Bzowska A., *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **22**, 1567–1570 (2003).
- 156) Luić M., Koellner G., Yokomatsu T., Shibuya S., Bzowska A., *Acta Crystallogr. Sect. D*, **60**, 1417–1424 (2004).
- 157) Glavaš-Obrovac L., Suver M., Hikishima S., Yokomatsu T., Bzowska A., *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **26**, 989–993 (2007).
- 158) Breer K., Wielgus-Kutrowska B., Hashimoto M., Hikishima S., Yokomatsu T., Szczepanowski R., Bochtler M., Girstun A., Staroń K., Bzowska A., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **52**, 663–664 (2008).
- 159) Chojnowski G., Breer K., Narczyk M., Wielgus-Kutrowska B., Czapinska H., Hashimoto M., Hikishima S., Yokomatsu T., Bochtler M., Girstun A., Staroń K., Bzowska A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 703–708 (2010).
- 160) Breer K., Glavas-Obrovac L., Suver M., Hikishima S., Hashimoto M., Yokomatsu T., Wielgus-Kutrowska B., Magnowska L., Bzowska A., *FEBS J.*, **277**, 1747–1760 (2010).
- 161) Breer K., Wielgus-Kutrowska B., Girstun A., Staroń K., Hashimoto M., Hikishima S., Yokomatsu T., Bzowska A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 1203–1209 (2010).
- 162) Glavaš-Obrovac L., Suver M., Hikishima S., Hashimoto M., Yokomatsu T., Magnowska L., Bzowska A., *Chem. Biol. Drug Des.*, **75**, 392–399 (2010).
- 163) Wielgus-Kutrowska B., Breer K., Hashimoto M., Hikishima S., Yokomatsu T., Narczyk M., Dyzma A., Girstun A., Staroń K., Bzowska A., *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 6758–6769 (2012).
- 164) Tetsuhashi T., Ishikawa M., Hashimoto M., Hashimoto Y., Aoyama H., *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 5323–5338 (2010).
- 165) Aoyama H., Ijuin R., Kato J., Urushiyama S., Tetsuhashi M., Hashimoto Y., Yokomatsu T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3676–3680 (2015).