総合論文

らん藻 *Lyngbya majuscula* から単離された有糸分裂阻害剤 Curacin A の合成

白井 隆一*

Synthetic Study of Curacin A, A Novel Antimitotic Agent Isolated from Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*

Ryuichi SHIRAI*

Curacin A is a novel antitumor antimitotic agent isolated from a Caribbean cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Synthesis of the four stereoisomers of (+)- and (-)-2-(2-methyl)cyclopropyl-4-(1-propenyl)thiazoline was achieved to elucidate the absolute configuration of three chiral centers of natural curacin A. Next, the asymmetric total synthesis of curacin A was achieved in high stereoselective manner. 2-Methylcyclopropyl moiety was synthesized by asymmetric double Simmons-Smith cyclopropanation. Thiazoline moiety was constructed from L-cysteine and side chain was synthesized from geraniol. A series of side chain analogs of curacin A were also synthesized to find the minimal and common active structure to colchicine. However, these analogs showed weak or no anti-tubulin activity suggesting that the side chain of curacin A was restrictively recognized by microtubule proteins.

Key words: Curacin A, Cyanobacterium, Antimitotic agent, Colchicine, Tubulin, Microtubules, Total synthesis, Asymmetric synthesis, Simmons-Smith reaction, Structure-activity relationship

はじめに

微小管はすべての真核生物に必須な繊維状たんぱく質で、有糸分裂装置である紡錘体の主成分として細胞分裂に決定的な役割を担っているほか、細胞の形態形成、細胞内物質輸送などの中枢的な機能に関与している。微小管の基本構成単位は分子量約10万のチューブリンで、 α 、 β の2つのサブユニットからなり、 β -サブユニット上にはチューブリンの微小管への重合を妨げる化合物が結合する部位が大きく分けて2つ存在する。その一方には vincristine や maytansine、もう一方には colchicine や podophyllotoxin に代表される化合物群が結合する。これら化合物は有糸分裂阻害剤と呼ばれ、天然物あるいは合成化合物として多数見いだされているが、チューブ

リンに結合して正常な微小管の形成を抑え、細胞の有糸分裂を阻害し、抗がん剤をはじめとして抗かび剤、除草剤、駆虫薬などの広範な用途に供されている¹⁾。有糸分裂阻害剤の結合部位とチューブリンとの分子認識機構の解析は、新規な生理活性物質のデザイン・創製につながるるとともに、細胞機能解明へのアプローチとして重要である。

1. Curacin A の発見

Curacin A (1) は1994年にオレゴン州立大学の Gerwick らにより、カリブ海のらん藻 *Lyngbya majuscula* から brine shrimp に対する毒性を指標にして単離・構造決定された毒素で、大腸がん・腎臓がん・乳がん由来の細胞に対して顕著な細胞毒性を示し、新規な抗腫瘍活性化合物として注目された²⁾。その作用機作は colchicine や steganacin, podophyllotoxin, combretastatin A-4 などと同様にチューブリンの β -サブユニット上のいわゆる colchicine 部位に結合し、チューブリンの微小管への重合を阻害することによるが、シクロプロパ

* 東京大学分子細胞生物学研究所

()

* Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo ()

()

Fig. 1

ン、チアゾリン、側鎖からなるその構造は、colchicine 部位結合薬剤と全く様相を異にしており、その活性構造に大きな関心が持たれる(図1)。本論文では筆者による活性構造の探索を志向した合成研究に焦点を絞って解説したい。

2. Curacin A のシクロプロピルチアゾリン構造の合成と立体化学の決定

Curacin A と既存の colchicine 部位結合薬剤との構造上の共通点が乏しく、側鎖の活性への寄与が明確ではなかったこと、当初はまだ平面構造しか提出されていなかったことなどより、curacin A 全合成のアプローチとしてシクロプロピルチアゾリン構造の合成法をまず確立し、この部分の鏡像体を含む全ジアステレオマー(2)4種の合成を行った^{3a,3d}。以下、その詳細について述べる(スキーム1)。

2.1. *N*-Boc-チオールの合成

L-システイン塩酸塩(3)より Weinreb amide(4)⁵⁾を経由して数工程で合成したアルデヒド(5)の Wittig 反応により、高い *Z* 選択性でオレフィン(6)を得た。次に脱保護であるが、*N*-Boc と *N*, *S*-アセタールの同時脱保護は Kemp らにより報告されていたが⁶⁾, *N*-Boc を残したまま官能基選択的に *N*, *S*-アセタールのみを除去した例はなかった。そこで種々条件検討を行ったところ、市販塩化メチレンの希薄溶液中でトリフルオロ酢酸処理す

Scheme 1

ることにより望みのチオール(7)を得た。

しかしながら、当初は塩化メチレンのロットにより再現性が乏しいという欠点があったため、あらかじめ分液ロットで水と振り、水を飽和させた澄明な塩化メチレンを用いることにより、再現性良く脱保護できるようになった。

2.2. *N*-Boc-チオールエステルを経由したチアゾリンの合成と立体化学の決定

Bergman の方法により合成しキニン塩として光学分割した(−)-*cis*-2-メチルシクロプロパンカルボン酸((+)-8)⁷⁾と L-システインより合成した *N*-Boc-チオール(7)を縮合してチオールエステル(9)とした後、塩化メチレン中で脱 *N*-Boc 化し、さらに福山の方法⁸⁾によりベンゼン中加熱還流して絶対配置が確実なチアゾリン((+)-2a)を得た(スキーム1)。さらに L-あるいは D-システインとラセミ体の 8 から同様に合成し、それぞれ HPLC により精製し、計 4 種の鏡像体を含むすべてのジアステレオマー((+)-2a, (−)-2a, (+)-2b, (−)-2b)を得た。これらの絶対配置は各異性体の NMR、比旋光度データを((+)-2a)のものと比較して決定した。得られた 4 種の 2 と curacin A のスペクトルデータおよび比旋光度の比較から、curacin A のチアゾリン上の立体化学を(+)-2b と同一であると結論した(図2, 表1)^{3a,3d}。なお、White らは curacin A の chemical degradation により我々とは独立してシクロプロピルチアゾリン部分

Compound	J _{5a, 5b} (Hz)	J _{5a, 4} (Hz)	J _{5b, 4} (Hz)
2a	10.8	6.7	8.4
2b	10.8	9.8	8.3
Curacin A ^{a)}	10.7	10.0	- ^{b)}

に同様の立体化学を提出する一方、側鎖メチルエーテル部分の絶対構造も決定した^{2b)}。

Curacin A はその発見後すぐに精力的に全合成研究が展開され、現在までに筆者³⁾のほかにも White^{4a, 4b)}, Aubé^{4c, 4d)}, Kobayashi^{4e, 4f)}, Falck^{4g)}, Wipf^{4h)}, Pattenden⁴ⁱ⁾ ら 6 グループが全合成を完了している。以下に筆者の合成について詳細に述べたい。

本研究開始当初は curacin A の立体構造は、シクロプ

ロパン部分の相対配置が *cis* であること以外提出されていなかったため^{2a)}, すべての異性体が合成可能な経路を計画する必要があった。そこで curacin A を側鎖, チアゾリン, シクロプロパン部分に分け, 側鎖部分フラグメントはキラルなアリルチタン試薬とゲラニオールおよび 1,4-ブタンジオールから, チアゾリンフラグメントは L-システインから, そしてシクロプロパンフラグメントは酒石酸ジエチルより合成する経路を採用することにした。これらの各フラグメントは, 出発原料あるいは不斉合成によりすべての光学異性体が供給可能である。

3.2. *cis*-2-メチルシクロプロパンカルボン酸の両鏡像体の不斉合成

Curacin A と同一の絶対配置を有する *cis*-2-メチルシクロプロパンカルボン酸((-)-8)は光学分割で純度良く得ることができなかったため⁷⁾, 両鏡像体とも合成可能な不斉合成を行うことにした。L-酒石酸ジエチル(10)には C2 対称性が存在するが, *cis*-2-メチルシクロプロパンカルボン酸(8)の前駆体になりうる 13 のような化合物にも酸化状態あるいは保護基が異なっているが, 潜在的な σ 対称性が存在する(スキーム 3)。これらの対称

因子を活用し, 10 の C2 対称性を損なわないように 2 つのエステル官能基を同時に変換してキラルな C2 対称ジ

エン(11)に導き、それに対しダブル不斉 Simmons-Smith 反応を行えば、キラルな C2 対称ビスシクロプロパン誘導体(12)が得られ、さらにジオール開裂の前後に両端あるいは中央部分の酸化状態を調節すれば、8 の両鏡像体を得ることができると考えられる。不斉 Simmons-Smith 反応は類似の基質で好成績を収め、ジアステレオ面選択性も明確な田口、Barrette らの方法を応用することにした(図 3)⁹⁾。

3.2.1. (–)-*cis*-2-メチルシクロプロパンカルボン酸の合成

L-酒石酸ジエチル(10)をジメチルアセタール化後、2 つのエステル部分を同時に水素化ジソブチルアルミニウム還元、Wittig 反応¹⁰⁾、水素化ジイソブチルアルミニウム還元により順次変換し、ビスアリルアルコール(16)へと導いた(スキーム 4)。次に両端の水酸基を先にトリフェニルフォスフィン-四臭化炭素によりジブロム化、水素化リチウムアルミニウム還元によりメチル基へと変換したジェン(18)を合成し、それに対しジエチル亜鉛-ヨウ化メチレンによるダブル不斉 Simmons-Smith 反応を行い、所望の立体化学を有するビスシクロプロパン誘導体(19)を高いジアステレオ選択性で得ることができ

た^{3c)}。その一方で、危険なジエチル亜鉛を使わずとも取り扱いやすい亜鉛-銅でも同様の高い選択性で望みの 19 を得ることができ、18 が極めて優れた基質であると判明した。次にジメチルアセタールの脱保護、過ヨウ素酸ナトリウム分解、過マンガン酸カリウム酸化を経て(–)-8へと導き、比旋光度を測定してその絶対配置を確認した。また、その光学純度は対応するアルコール(21)を Mosher エステル(22)とし、¹H NMR にて純度を > 99% de と決定した。

3.2.2. (–)および(+)-*cis*-2-メチルシクロプロパンカルボン酸の合成

次に先ほどのビスアリルアルコール中間体(16)から両鏡像体の不斉合成を行うことにした(スキーム 5)。まず、両末端の水酸基を *t*-ブチルジフェニルシリル基にて保護したのち、ダブル不斉 Simmons-Smith 反応を行い、スキーム 4 の場合と同様にジエチル亜鉛あるいは亜鉛-銅のどちらの条件でもビスシクロプロパン誘導体(24)を高ジアステレオ選択的に得た^{3c)}。両末端の *t*-ブチルジフェニルシリルオキシメチル基をメチル基に還元し、前述の 19 を得、さらに(–)-8へと誘導した。

次にその鏡像体を合成するためにまず 24 の分子中央

Scheme 5

のジメチルアセタールを塩化メチレン中、塩化第二鉄-シリカゲルで脱保護した。本反応は、通常の脱保護条件である含水メタノール中 *p*-トルエンスルホン酸やそのピリジン塩では脱シリル体の副生を抑えることができなかった。その後、過ヨウ素酸ナトリウム分解を経由してさらにメチル基にまで還元し、しかるのち両端の *tert*-ブチルジフェニルシリルオキシメチル基をカルボキシル基へと変換し(+)-**8**を得た。対応するアルコール体の Mosher エステルも同様に >99% de であり、*L*-酒石酸ジエチルから **8**の両鏡像体を合成することに成功した。

3.3. Curacin A 側鎖の合成

側鎖の合成経路をスキーム 6 に示す。容易に入手可能なゲラニオール(**26**)を塩化メチレン-リン酸緩衝液の 2 層系溶媒中、アセトンと Oxone[®] より発生させたジメチルジオキシランにて末端二重結合のみをエポキシ化

し¹¹⁾、次いでアセトン中で酸処理してジオールへの開環と保護を一挙に行いジメチルアセタール(**27**)を得た。さらに Br 体を経てホスホネート(**28**)を得、次に 1,4-ブタンジオールより合成したアルデヒド(**29**)との Wittig-Horner 反応により *E,E*-選択的にジェン(**30**, *EE/EZ* = 8.5/1)を得、分取 HPLC にて精製して以後の合成に用いた。末端のジメチルアセタールの脱保護、過ヨウ素酸ナトリウムによるジオールの酸化の開裂によりアルデヒド **31**を得、キラルなアリルチタン試薬(**32**)の不斉 1, 2-付加により高エナンチオ選択的(>99% ee)にホモアリルアルコール **33**を高収率で得¹²⁾、その光学純度は Mosher エステル(**34**)にて 99% de 以上であることを確認した。次にメチルエーテル **35**としたのち 4-メトキシベンジル(PMB)基の脱保護を行った。しかしながら常法である DDQ(2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾ

Scheme 6

Scheme 7

キノン)酸化¹³⁾等では深刻な分解物を与えるのみであった。徹底的な条件探索の結果、塩化メチレン中で臭化マグネシウム・エーテレート-ジメチルスルフィド処理すると、分解することなくアルコール体(36)に脱保護されることを見いだした。さらに PMB 基と他の保護基が共存する基質を用いて本脱保護の一般性についても検討し、穏やかで適応範囲の広い新脱保護反応を開発することができた^{3f)}。最後に脱 PMB 化した 36 をメタンスルホン化したのち、ヨード体(37)を経由して側鎖部分のホスホニウム塩(38)の合成を完了した。

3.4. 各フラグメントのカップリングによる 全合成の完結

ホスホニウム塩 38 と 5 の Wittig 反応により Z 選択的にオレフィンを得、部分構造の合成法にのっとり (-)-8 と縮合してチオールエステル(41)とし、トリフルオロ酢酸で脱 Boc 化した後ベンゼン中加熱還流してチアゾリンを構築し、curacin A (1)の合成を完了した(スキーム 7)。そのスペクトルデータは文献値と完全に一致し、さらにブタ脳より精製したチューブリンの重合を強力に阻害することを確認した^{3b, 3d, 14)}。

4. 活性構造解明を指向した curacin A 側鎖類縁体の合成

我々が当初合成した 2 の 4 種のジアステレオマーは豚の脳より重合・脱重合を繰り返して精製したチューブリンの重合に対して阻害活性を全く示さなかった^{3a, 14)}。また、側鎖合成の際に得た中間体(35, 36, 39, 42)等も不活性であった(図 4)^{3b, 3d)}。この活性の消失は側鎖構造が活性発現に極めて重要であることを示すものと考え、筆者もこの curacin A 合成法を基盤として側鎖の長

active

inactive

Fig. 4

さ、不飽和度の異なるものや、無置換あるいはメタ・パラ置換ベンゼン(ジェンの *s-cis*・*s-trans* をミミック)を組み込んだ新規類縁体を新たに合成した(図 5)^{3f)}。残念ながら、これらの化合物のチューブリン重合阻害活性も curacin A に比べるとかなり弱いものであった。化合物

Fig. 5

50 μ M における豚脳チューブリン重合阻害活性では、一部の化合物がある程度活性を示した。図5に示した数値は波線のところまで側鎖があった場合に50 μ Mでの重合阻害度を%で示したものである。側鎖の変換により活性が大きく変化することはその側鎖構造が厳密に認識されていることを支持するものである。一方、Hamelらも curacin A の天然異性体や合成化合物を用い、分子モデリングや定量的構造活性相関(QSAR)の検討を行っているが、やはり colchicine 等との構造上の類似性を明確には説明できていない¹⁵⁾。いずれにしても curacin A の側鎖が折り畳まれて芳香環のミミックになっていると推測され、今後その作用機構の解明とそれに基づいた新たな化合物の創製が待たれるところである。

おわりに

微小管を標的として臨床で用いられてきた抗がん剤には vincristine などがあるが、taxol の出現を契機として微小管を標的とする新たな化合物を発見していこうという機運が高まり、事実新たな有糸分裂阻害剤が次々と発見されている。微小管はがん征圧のための優れた分子標的であり、これからより優れた化合物が出現すると予想されるが、それらをただ全合成標的として捉えるのではなく、今後ともその作用機構の解明を指向した合成研究が大きく展開されていくことを期待したい。

謝 辞 本研究は東京大学分子細胞生物学研究所、生体有機化学研究分野で行われたものであり、研究の機会を与えていただきました岩崎成夫名誉教授、本研究に精力的に協力していただきました小野田俊彦博士、西川明日香学士、神谷正学士、河井伸之学士をはじめとする当研

究室の方々に感謝いたします。また細胞毒性試験を行っていただいた三共株式会社、平井功一博士に厚くお礼申し上げます。また本研究に対する武田科学振興財団・研究助成ならびに文部省科学研究費補助金の交付に感謝いたします。

(平成10年12月8日受理)

文 献

- (a) 岩崎成夫, 有合成, **49**, 892 (1991); (b) S. Iwasaki, *Med. Res. Rev.*, **13**, 183 (1993); (c) 岩崎成夫, 蛋白質核酸酵素, **38**, 1742 (1993); (d) 岩崎成夫, 化学と生物, **32**, 153 (1994)
- (a) W.H. Gerwick, P.J. Proteau, D.G. Nagle, E. Hamel, A. Blokhin, D.L. Slate, *J. Org. Chem.*, **59**, 1243 (1994); (b) D.G. Nagle, R.S. Gerald, H.-D. Yoo, W.H. Gerwick, T.-S. Kim, M. Nambu, J.D. White, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1189 (1995); (c) H.D. Yoo, W.H. Gerwick, *J. Nat. Prod.*, **58**, 1961 (1995); (d) R. F. Luduena, V. Prasad, M.C. Roach, M. Banerjee, H.D. Yoo, W.H. Gerwick, *Drug Development Res.*, **40**, 223 (1997)
- (a) T. Onoda, R. Shirai, Y. Koiso, S. Iwasaki, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 5765 (1995); (b) *idem*, *ibid.*, **37**, 4397 (1996); (c) T. Onoda, R. Shirai, N. Kawai, S. Iwasaki, *Tetrahedron*, **52**, 13327 (1996); (d) T. Onoda, R. Shirai, Y. Koiso, S. Iwasaki, *ibid.*, **52**, 14543 (1996); (e) T. Onoda, R. Shirai, S. Iwasaki, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 1443 (1997); (f) A. Nishikawa, R. Shirai, Y. Koiso, Y. Hashimoto, S. Iwasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2657, (1997)
- (a) J.D. White, T.-S. Kim, M. Nambu, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5612 (1995). (b) *idem*, *ibid.*, **119**, 103 (1997); (c) M. Z. Hoemann, K. A. Agrios, J. Aubé, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 953 (1996); (d) *idem*, *Tetrahedron*, **53**, 11087 (1997); (e) H. Ito, N. Imai, S. Tanikawa, S. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1795 (1996); (f) H. Ito, N. Imai, K. Takao, S. Kobayashi, *ibid.*, **37**, 1799 (1996); (g) J.Y. Lai, J.R. Yu, B. Mekonnen, J.R. Falck, *ibid.*, **37**, 7167 (1996); (h) P. Wipf, W.J. Xu, *J. Org. Chem.*, **61**, 6556 (1996); (i) J.C. Muir, G. Pattenden, T. Ye, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 2861 (1998)
- R.O. Duthaler, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **30**, 705 (1991) and personal communication.
- D.S. Kemp, R.I. Carey, *J. Org. Chem.*, **54**, 3640 (1989)
- R.G. Bergman, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 7405 (1969)

- 8) T. Fukuyama, L. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8449 (1993)
- 9) (a) T. Morikawa, H. Sasaki, R. Hanai, A. Shibuya, T. Taguchi, *J. Org. Chem.*, **59**, 97 (1994); (b) A.G. M. Barrett, K. Kasdorf, D.J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 1781; (c) A.G.M. Barrett, W.W. Doubleday, K. Kasdorf, G.J. Tustin, *J. Org. Chem.*, **61**, 3280 (1996)
- 10) (a) A. Krief, W. Dumont, P. Pasau, P. Lecomte, *Tetrahedron*, **45**, 3039 (1989); (b) M. Carmack, C.J. Kelley, *J. Org. Chem.*, **33**, 2171 (1968)
- 11) G. Cicala, R. Curci, M. Fiorentino, O. Laricchiuta, *J. Org. Chem.*, **47**, 2670 (1982)
- 12) A. Hafner, R.O. Duthaler, R. Marti, G. Rihs, P. Rothe-Streit, F. Schwarzenbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2321 (1992)
- 13) (a) Y. Oikawa, T. Yoshioka, O. Yonemitsu, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 885 (1982); (b) *idem*, *ibid.*, **23**, 889 (1982); (c) K. Horita, T. Yoshioka, T. Tanaka, Y. Oikawa, O. Yonemitsu, *Tetrahedron*, **42**, 3021 (1986)
- 14) M. Takahashi, S. Iwasaki, H. Kobayashi, S. Okuda, T. Murai, Y. Sato, T. Haraguchi-Hiraoka, H. Nagano, *J. Antibiotics*, **40**, 66 (1987)
- 15) (a) A.V. Blokhin, H.-D. Yoo, R.S. Gerald, D.G. Nagle, W.H. Gerwick, E. Hamel, *Mol. Pharmacol.*, **48**, 523, (1995); (b) P. Verdier-Pinard, J.Y. Lai, H.D. Yoo, J.R. Yu, B. Marquez, D.G. Nagle, M. Nambu, J.D. White, J. R. Falck, W.H. Gerwick, B.W. Day, E. Hamel, *ibid.*, **53**, 62 (1998)

会員増強運動にご協力を!!

本協会では会員増強運動を展開しております。お知り合いの友人・学生に是非ご入会をお勧め下さいませようお願い申し上げます。本協会の財政基盤は会費に大きく依存しています。あなたの行動が明日の協会を支えます。

なお、入会申込書は、本年度協会誌の毎号に綴込みのものをご使用下さい。また、事務所に一報下されれば直ちにお送りいたします。

事務局：社団法人 有機合成化学協会 会員係

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 1-5 化学会館（電話 03-3292-7621）