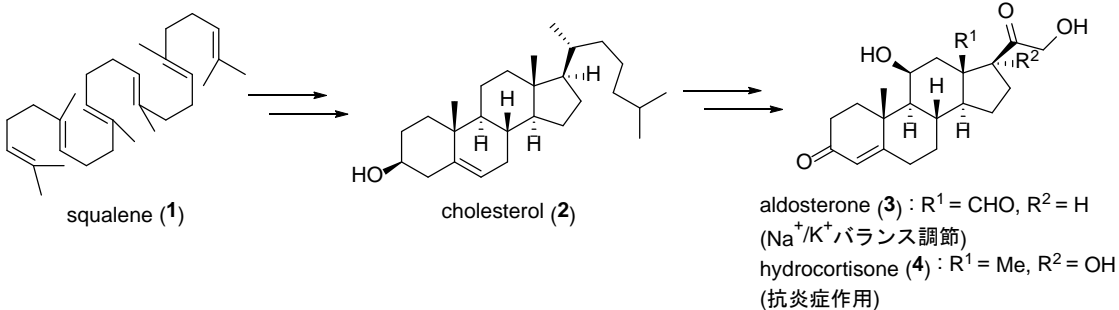


氏名・（本籍）	ふるた みゆ 古田 未有（埼玉県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博士甲第 4390 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ドミノ環化を基盤とする生理活性ステロイドの創薬研究
論文審査委員	（主査）教授 須貝 威（農学博士） （副査）教授 木内 文之（薬学博士） 准教授 大江 知之（博士（薬学））

論文内容の要旨

【背景】

ステロイド骨格を有する化合物は自然界に数多く存在し、さまざまな生理活性を有することが知られている。スクアレン (1) から立体選択的環化により合成されるコレステロール (2) の位置および立体選択的酸化を経て、副腎皮質ホルモンであるアルドステロン (3)、ヒドロコルチゾン (4) が生合成される (Scheme 1)。現在、生化学・創薬研究に向け、生理活性ステロイドの量的供給および新規類縁体合成が望まれているが、2 のような容易に入手可能なステロイド類の化学変換による合成は、化学的に不活性な部位の選択的修飾を要し、非常に困難である。また、微生物代謝法を用いる生物酸化は修飾可能な部位に制限があり、多様な類縁体の供給は困難である。例えば、11 位にヒドロキシ基を有する 3 と 4 は、酸化位置・段階が若干異なるだけであるが、3 は 4 に比べはるかに高価である。これまで、オキシドスクアレンから出発するステロイド骨格の一举構築やラジカル反応を用いたステロイド骨格の部分合成など、生合成を模倣したドミノ環化がいくつか報告されている。しかし、多官能基化された鎖状前駆体のドミノ環化による高い酸化段階を持つステロイドの合成はほとんど報告されていない。



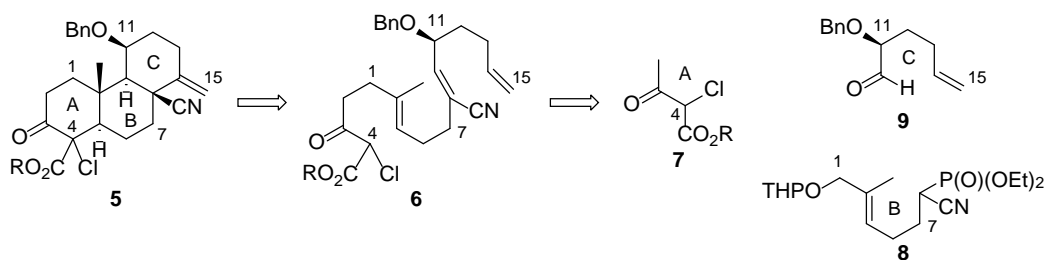
Scheme 1

【目的】

本研究では、予め官能基化した鎖状化合物を収束的に調製し、生合成経路を模倣したドミノ環化による、四環一挙構築を鍵反応とする 11-ヒドロキシステロイドの効率的合成法開発を目指すこととした。この際、11 位の不斉中心を足がかりとして他のすべての不斉中心の立体化学を制御しながら、ステロイド骨格を一挙に構築しようと考えた。標的化合物として、アルドステロン (**3**) を選定した。ドミノ環化を鍵反応とする **3** の効率的合成法が開発できれば、本手法を他の生理活性ステロイドの合成にも応用できる。

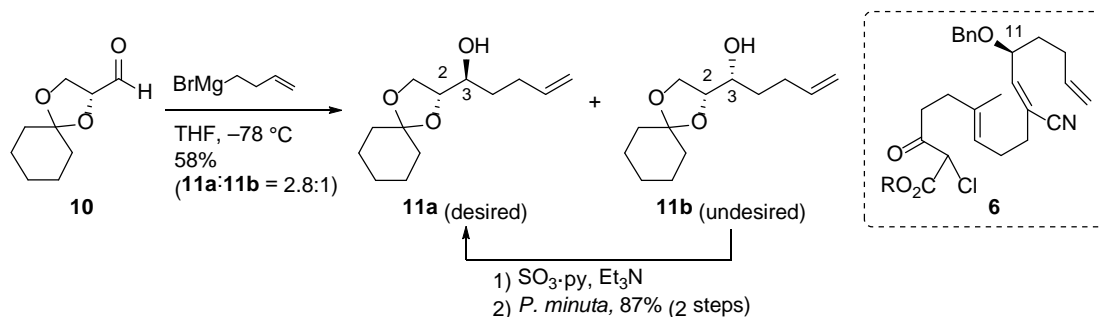
【ラジカルドミノ環化による三環性モデルの合成】

現在まで、高度に官能基化された鎖状前駆体を用いたドミノ環化によるステロイド類の合成例はほとんど報告されていない。そこで、四環性骨格合成に先立ち、11 位の不斉中心を有する鎖状トリエン **6** のドミノ環化による、アルドステロン (**3**) の ABC 環部モデル **5** を合成しようと考えた (Scheme 2)。環化前駆体 **6** は、アセト酢酸エステル **7**、シアノリン酸エステル **8** およびアルデヒド **9** をそれぞれ調製した後に連結し、収束的に合成することとした。



Scheme 2

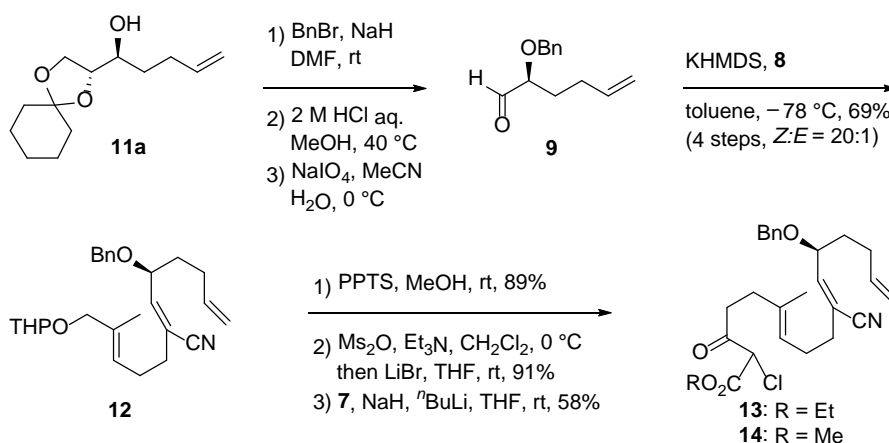
化合物 **6** は以下のように合成した。D-マンニトール由来のアルデヒド **10** に Grignard 試薬を作用させたところ、望む *anti* アルコール **11a** のほか、望まない *syn* アルコール **11b** が副生した (Scheme 3)。アルコール **11** の 3 位は環化前駆体 **6** の 11 位に相当することから、**11a** の立体選択的合成は、ドミノ環化の立体制御に重要である。そこで、望まない立体異性体 **11b** はアルコールをケトンに酸化後、微生物還元で **11a** に変換することとした。検討の結果、酵母 *Pichia minuta* (JCM 3622) を用いるカルボニル基の還元で、**11b** を望む **11a** に収束させることに成功した。



Scheme 3

アルコール **11a** をベンジルエーテルとして保護したのち、酸性条件下アセタールを除去し、酸化開裂によりアルデヒド **9** に変換した (Scheme 4)。続いて、シアノリン酸エステル **8** との Horner-Wadsworth-Emmons 反応により、BC 環部骨格炭素を有するトリエン **12** を合成した。さらに、脱保護で生じたアルコールを臭素原子で置換後、□クロロアセト酢酸エステル **7** で伸長し、環化前駆体 **13** および **14** を調製した。

環化前駆体 **13** に対し、酢酸溶媒中、酢酸マンガン(III)と酢酸銅(II)を用いてラジカルドミノ環化を試みたところ、望む三環性化合物は得られず、環化が途中で停止した単環性化合物が主生成物であった (Table 1, entry 1)。非プロトン性極性溶媒に代えた場合、



Scheme 4

望む *all-trans* 型に縮環した三環性化合物 **15a**、**15b** が生成したものの、収率は低かった (entry 2)。溶媒を検討した結果、エタノール中でアルドステロン型の立体化学を有する **15a** と、縮環部の立体化学が **15a** と鏡像関係にある **15b** を合計収率 55% で得ることに成功した (entry 3)。反応温度を 40 °C に昇温すると、収率が若干向上した (entry 4)。また、基質をメチルエステル **14** に代えてもほぼ同様の結果であった (entry 5)。なお、得られた環化生成物 **15a/b**、**16a/b** はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に分離可能であった。

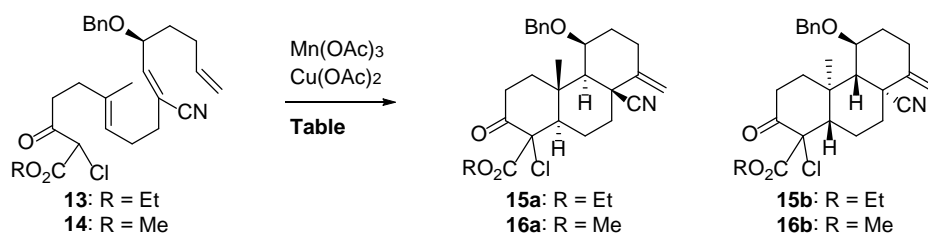
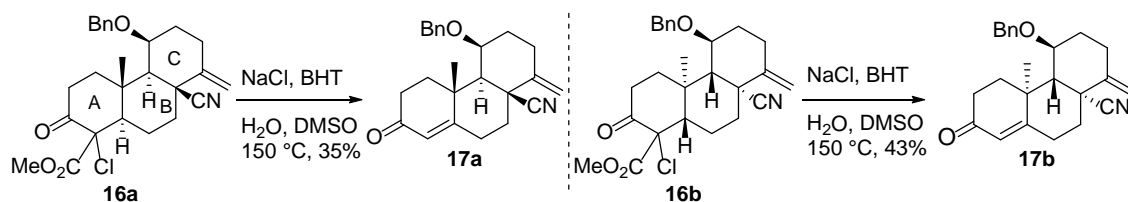


Table 1

entry	sub.	solvent	temp.	yield (%)
1	13	AcOH	rt	15a (0), 15b (0)
2	13	MeCN	rt	15a (12), 15b (15)
3	13	EtOH	rt	15a (25), 15b (30)
4	13	EtOH	40 °C	15a (34), 15b (29)
5	14	EtOH	40 °C	16a (30), 16b (27)

A環部をエノンに変換するため、得られたエチルエステル **15** に対し Krapcho 脱アルコキシカルボニル化を試みたところ、**15a**、**15b** とともに反応は全く進行しなかった (Scheme 5)。一方、メチルエステル **16a**、**16b** では、ともに脱アルコキシカルボニル化と β 脱離が一挙に進行し、アルドステロンの ABC 環部に相当するエノン **17a** およびそのジアステレオマー **17b** の合成に成功した。なお、得られた環化体の立体化学は、**16a** および **17b** の NOE 実験で Figure 1 のように決定した。



Scheme 5

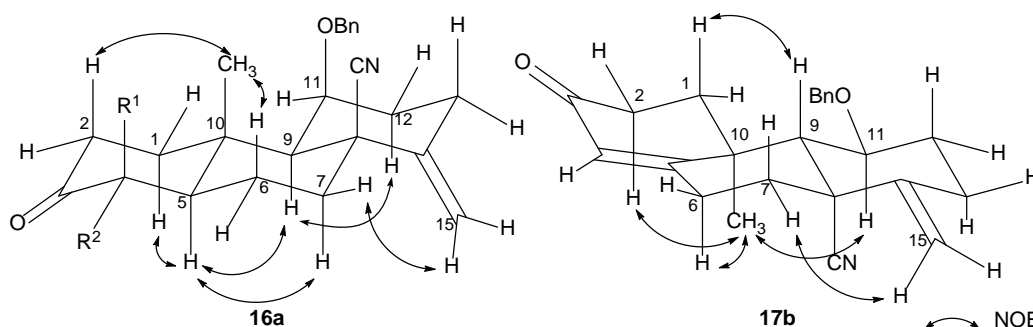
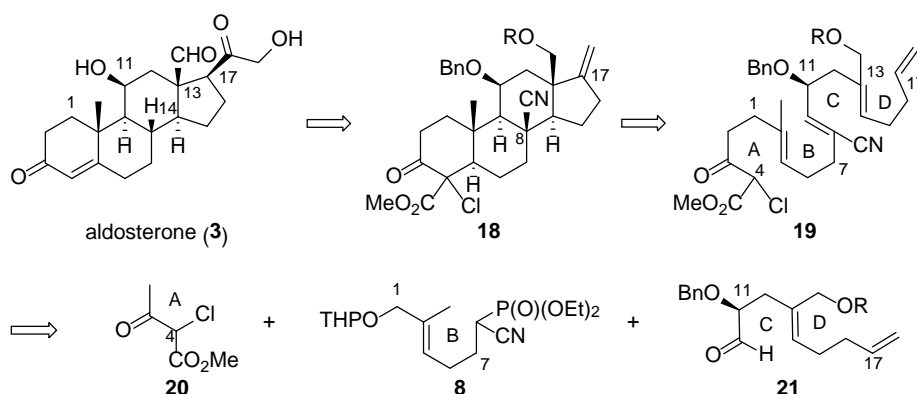


Figure 1

【11-ヒドロキシステロイドの合成研究】

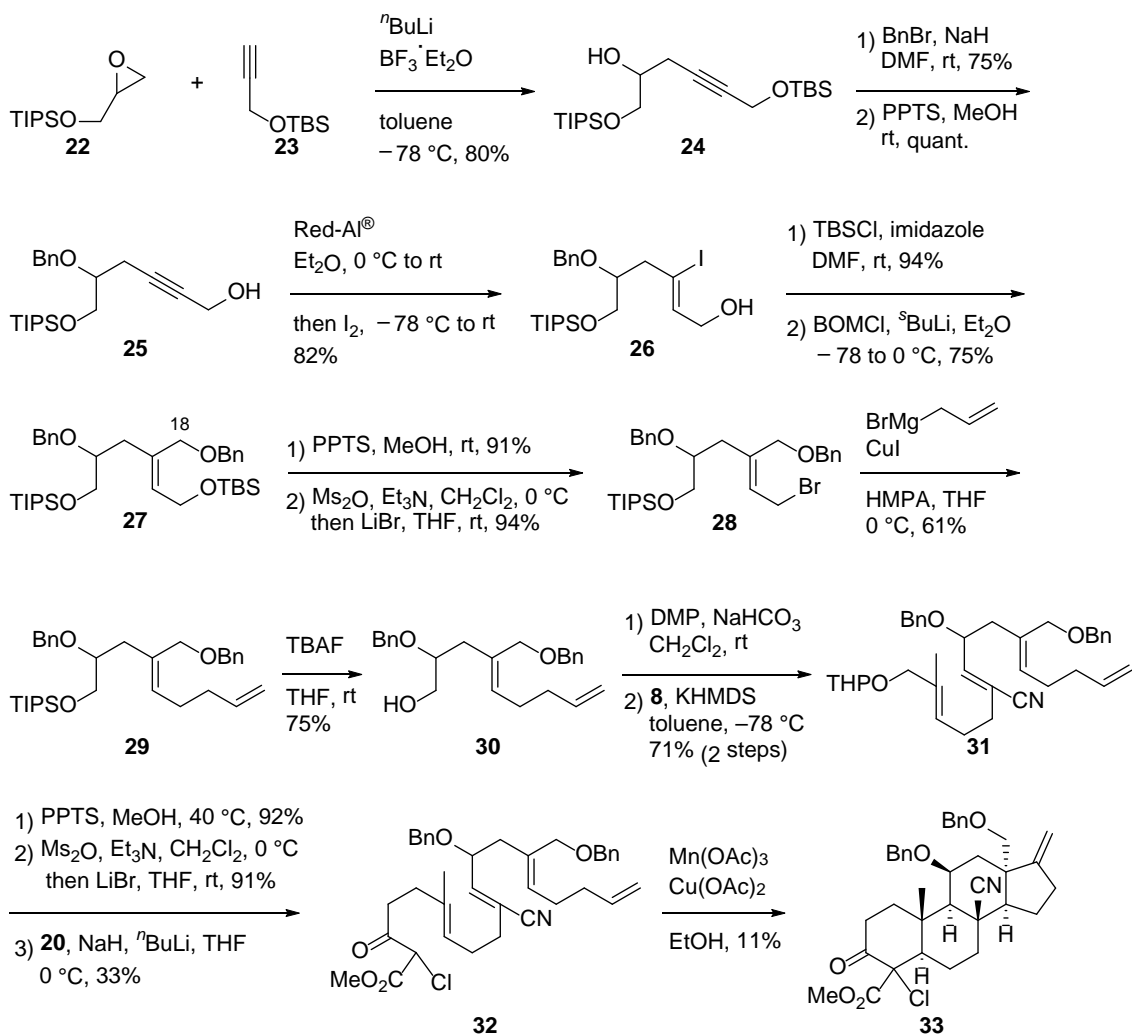
三環性モデルで得られた知見を活用し、アルドステロン (**3**) の四環性骨格を合成することとした。ドミノ環化で生成するラジカル中間体の求核性・求電子性を考慮し、三

置換アルケンに電子供与基と電子求引基を交互に導入した環化前駆体 **19** のドミノ環化で四環性骨格を構築したのちに、**18** の A 環部のエノンへの変換、8 位シアノ基の還元、17 位アルケンのヒドロホウ素化により **3** を合成する計画を立案した (Scheme 6)。環化前駆体 **19** は、□クロロアセト酢酸メチル **20**、シアノリン酸エステル **8** およびアルデヒド **21** をそれぞれ合成したのちに連結しようと考えた。



Scheme 6

不斉合成に先立ち、ラセミ体で合成を検討した。グリシドール由来のラセミ体のエポキシド **22** に対し、アルキン **23** から調製したアセチリドを作用させ、第二級アルコール **24** を得た (Scheme 7)。アルコール **24** をベンジル基で保護したのち、TBS 基を選択的に除去し、プロパルギルアルコール **25** を調製した。生じたヒドロキシ基を足がかりとした **25** の位置選択的ヒドロアルミニウム化と、続くヨウ素化でビニルヨージド **26** を得た。アルコール **26** をシリル基で保護後、ビニルヨージドをリチオ化、さらにベンジルオキシメチルクロリド(BOMCl)を作用させ、18 位に酸素官能基を導入したジベンジルエーテル **27** を合成した。C 環部に相当する **27** の TBS 基を選択的に除去したのち、生じたヒドロキシ基を臭素原子で置換し、アリルブロミド **28** を得た。続いて、ヨウ化銅とアリルマグネシウムブロミドを作用させると、ジエン **29** が中程度の収率で得られた。ジエン **29** の TIPS 基の除去で得られたアルコール **30** を Dess-Martin 酸化でアルデヒドへと変換後、シアノリン酸エステル **8** との Horner-Wadsworth-Emmons 反応により、BCD 環部に相当する **31** を調製した。テトラエン **31** の THP 基を除去し、アルコールを臭素原子で置換後、□クロロアセト酢酸メチル **20** で伸長し、環化前駆体 **32** を合成した。続いて、三環性モデルと同様の条件でラジカルドミノ環化を行ったところ、低収率ながら四環性化合物 **33** を得ることに成功した。



Scheme 7

【結論および展望】

天然に豊富に存在する D-マンニトールを出発原料とし、11-ヒドロキシステロイドの ABC 環部骨格炭素を有する環化前駆体を収束的に合成した。さらに、ラジカルミノ環化と続く脱アルコキシカルボニル化を行い、アルドステロンとそのジアステレオマーの ABC 環部 **17a** および **17b** の合成に成功した。

三環性モデルで得られた知見を活かし、四環性骨格を有する 11-ヒドロキシステロイドの 1 つ、アルドステロン (**3**) の合成を目指した。CD 環部 **30** に A 環部、B 環部を順次連結して環化前駆体 **32** を調製し、続くラジカルミノ環化で四環性化合物 **33** を合成した。本手法は、11 位および 18 位に酸素官能基を有する鎖状化合物のラジカルミノ環化による四環一挙構築法として非常に有用であり、創薬研究におけるさまざまな 11-ヒドロキシステロイドの合成に適用可能と考えられる。

論文審査結果の要旨

博士論文発表は、平成 28 年 2 月 19 日（金）13 時 45 分から、慶應義塾大学薬学部 1 号館地下 1 階マルチメディア講堂にて、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学内公開の形で実施された。なお、本発表の前に、副査 2 名による事前の個人面接が行われており、論文内容に関する疑問点の指摘並びに改善に関する指導が行われた。

25 分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。

本発表では、申請者が有機薬化学講座で行った「ドミノ環化を基盤とする生理活性ステロイドの創薬研究」に関する分子設計・合成について述べられた。まず研究の背景として、コレステロールに代表される、容易に入手可能なステロイド類の化学変換および微生物代謝法を用いる希少ステロイドの合成は非常に困難であることについて述べた。

次いで、ステロイド骨格を段階的に構築する化学合成は多段階を要すること、高度に官能基化された鎖状前駆体のドミノ環化によるステロイドの合成はほとんど報告されていないことについて紹介した。このような背景から、予め官能基化した鎖状化合物を収束的に調製し、生合成経路を模倣したドミノ環化による、四環一挙構築を鍵反応とする 11-ヒドロキシステロイドの効率的合成法開発について、ほぼ中性に近い反応条件で発生可能なラジカルを経由する合成指針を示した。

ステロイド類の四環性骨格構築に先立ち、合成戦略の妥当性を検証するため、11 位に不斉中心を有する鎖状トリエンのドミノ環化で、アルドステロンの ABC 環部モデルを合成することとした。鎖状前駆体は、ABC 環それぞれの骨格炭素を有するアセト酢酸エステル、シアノリン酸エステルおよびアルデヒドを各々調製した後に連結し、収束的に合成する計画について言及した。

D-マンニトール由来のアルデヒドに Grignard 試薬を作用させたところ、望む *anti* アルコールのほかに、望まない *syn* アルコールが副生した。そこで、望まない *syn* アルコールをケトンに酸化後、微生物還元で望む *anti* アルコールに変換することとし、酵母の一種 *Pichia minuta* (JCM 3622) を用いるカルボニル基の還元で、*syn* アルコールを対応するケトンを経て、望む *anti* アルコールに収束させた。ヒドリド還元剤を用いる α -アルコキシケトンの還元では *syn* アルコールの生成が優先するため、この微生物酵素を用いた還元法は *anti* アルコールの選択的合成に非常に有用である。得られた *anti* アルコールを 3 工程で C 環部アルデヒドに変換後、シアノリン酸エステル **8** との Horner–Wadsworth–Emmons 反応により、BC 環部骨格炭素を有するトリエンに誘導した。さらに、脱保護で生じたアルコールを臭素原子で置換後、 α -クロロアセト酢酸エステルで伸長し、環化前駆体を調製した。

環化前駆体に対し、既報の環化条件である、酢酸溶媒中、酢酸マンガ(III)と酢酸銅

(II)を用いるラジカルドミノ環化を試みたところ、望む三環性化合物は得られず、環化が途中で停止した単環性化合物が主生成物であった。そこで、溶媒を検討し、エタノール中で望む三環性化合物が中程度の収率で得られることを見出した。次いで、Krapcho 脱アルコキシカルボニル化と β 脱離を一挙に進行させ A 環部をエノンに変換し、アルドステロンの ABC 環部に相当するエノンおよびそのジアステレオマーの合成について言及した。

上述の三環性モデルで得られた知見を活用し、アルドステロンの四環性骨格を構築することとした。環化前駆体の C 環部に新たにシアノ基を、D 環部にアルキンを導入した基質で環化を試みたが、二環性化合物が得られるのみであった。そこで、環化前駆体の三置換アルケンに電子供与基と電子求引基を交互に導入し、D 環部に不飽和エステルを導入した基質を別途調製し環化を検討したが、望む四環性化合物は得られず、三環性化合物が痕跡量生成した。さらに検討を重ね、不飽和エステル構築前の末端アルケンを環化前駆体としてドミノ環化を行い、多官能基化された四環性骨格の一挙構築に世界で初めて成功したことについて述べ、最後に本研究を総括した。

発表に続く質問討論においては、合成化学的視点からみた本研究の特長、すなわち、生理活性発現に重要な酸素官能基を有する鎖状化合物を前駆体とする、ドミノ環化による四環一挙構築法の新規性と有用性を再度確認した。さらに、四環性骨格の一挙構築達成に向けた合成戦略の改訂、反応性および立体選択性の予測等、実験で得られた結果を新たな環化前駆体の設計に活かした過程の妥当性が認められた。

以上、古田君の発表・質問討論は、以下のようにまとめられる。酸素官能基を有する希少ステロイドの効率的合成法開発を目指し、三環性モデルに必要な環化前駆体の収束的合成と、そのラジカルドミノ環化による三環性骨格の一挙構築を達成した。三環性モデルで得られた知見を基に、ステロイドの四環性骨格一挙構築に成功し、希少ステロイドの迅速合成法開発への道を拓いた。

提出論文並びに論文発表に対し、2名の副査からは以下のような見解が示された。

木内教授：医薬品として有用性が高い、3位と11位に酸素官能基を有するステロイド骨格を鎖状前駆体から一挙に構築するという課題に取り組み、最終的に多官能基化された四環性骨格の一挙構築に成功した。同君は、この研究の過程で直面した諸問題を緻密な考察と優れた実験能力によって解決しており、その研究成果が薬学の発展に大きく貢献することが期待される点とも相俟って、博士（薬学）の学位を授与するに相応しい研究であると判断した。

大江准教授：本研究の合成化学的かつ薬学的意義は大きい。また、論文に記述されている研究の進め方や考察は質が高く、発表や事前面談の試問においても論理的な応答

をしていたことより、自立的な研究者として博士の学位を取得するに相応しいと判断する。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で本研究論文に関する討議が行われたが、特に問題となる点の指摘はなく、古田未有君提出の学位論文の内容は博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが決定した。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

- 1) Furuta, M.; Shoji, M.; Sugai, T., Stereoselective approach to (2R,3S)- and (2R,3R)-1,2-(cyclohexylidenedioxy)hept-6-ene-3-ol by microbial reduction, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2012**, 82, 8-11.
- 2) Furuta, M.; Hanaya, K.; Sugai, T.; Shoji, M., Divergent Synthesis of Pseudoenantiomers for ABC-ring Moiety of Steroids, *Tetrahedron Lett.*, **2014**, 55, 3189-3191.

【参考論文】

- 3) Higashi, T.; Abe, C.; Ninomiya, K.; Machida, T.; Chishima, N.; Taketomi, S.; Furuta, M.; Komaki, Y.; Senba, Y.; Tokuda, T.; Shoji, M.; Sugai, T., Chemoenzymatic Synthesis of Both Enantiomers of 2-tert-Butyl-2-methyl-1,3-benzodioxole-4-carboxylic (TBMB) Acid, *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, 352, 2549-2558.
- 4) 古田未有、花屋賢悟、庄司 満、須貝 威、微生物酵素触媒を高度に活用するー合成経路デザインにおける、基質分子工学と触媒探索の重要性ー、有機合成化学協会誌 **2014**, 71, 237-246.
- 5) 古田未有、アザプロペランおよびスピロ環を有する(-)-Actumine の全合成、有機合成化学協会誌, **2014**, 72, 72-73.
- 6) 古田未有、桑田和明、花屋賢悟、庄司 満、須貝 威、酵素を用いて鏡像異性体を分ける、創る、速度論的分割の力、生物工学会誌、**2014**, 92, 298-302.
- 7) 須貝 威、古田未有：加水分解酵素を用いるエナンチオマー（鏡像異性体）の速度論的分割；有機合成化学協会編、有機合成実験法ハンドブック第2版、丸善出版、**2015**, 779-781.