

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08308

研究課題名(和文)アゼピン骨格を有する天然化合物ライブラリーの構築とVCD法による絶対構造の決定

研究課題名(英文) Construction of a natural product library composed of azepine alkaloids and determination of their absolute configuration by VCD spectroscopy.

研究代表者

一柳 幸生 (HITOTSUYANAGI, Yukio)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80218726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Stemona tuberosaより10種のアゼピン骨格を持つものを含む11種の新規アルカロイドを単離・構造決定した。化学的安定性の低いピロロ[1,2-a]アゼピンアルカロイドを緩和な条件で安定なN-オキシド体に変換する方法を見出した。赤外円二色性スペクトル法を18員環構造のペプチドアルカロイドRA-VIIについて試み、中分子化合物の絶対配置決定に本法が応用できることを示した。Rubia cordifoliaより新規RA系ペプチドアルカロイドを単離・構造決定するとともに、それらの配座解析からRA-VIIのTyr-5残基のN-メチル基は活性配座構造を優先的にとるために重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Stemona tuberosaより見出したアゼピン骨格を有する新規アルカロイド類はいずれも新奇性の高いユニークな構造を有しており、医薬品開発の活性スクリーニングに供する構造多様性に富む天然化合物ライブラリーを構築するうえで、重要度が高い構成要素となるものである。また、赤外円二色性スペクトル法を分子量の大きいマクロ環状ペプチドアルカロイドに適応し、非晶質性中分子化合物の絶対配置決定に本法が応用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Eleven new alkaloids were isolated from the roots of Stemona tuberosa to create a natural products library composed of alkaloids possessing an azepine ring, which is often found in the structures of important synthetic drugs. I found conditions to convert the chemically labile azepine alkaloid into its stable N-oxide to restrict the conformational freedom of the parent alkaloid. Vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy was applied to determine the absolute configuration of RA-VII, a bicyclic hexapeptide with an 18-membered ring, indicating that the VCD spectroscopy is applicable to macrocyclic peptides. Three new RA-series cyclopeptide alkaloids were isolated from the roots of Rubia cordifolia and their structures were determined. Conformational analysis and the DFT calculation of those new peptides revealed that the N-methyl group at Tyr-5 is important for RA-VII to preferentially adopt the active conformation.

研究分野：天然物化学

キーワード：赤外円二色性スペクトル 化合物ライブラリー アルカロイド 環状ペプチド 密度汎関数理論 Stemona tuberosa Rubia cordifolia

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在医薬品開発において、ロボットを用いた化合物ライブラリーの高速スクリーニングにより活性物質を探索する手法が一般的となっており、構造の多様な化合物ライブラリーを構築するうえで、天然有機化合物が注目されている。とりわけアルカロイド類は窒素原子を含み、医薬品として既に多く用いられていることからニーズの高いものとなっている。複素環のうち、含窒素7員環構造(アゼピン)は自然界に比較的稀な骨格構造であるが、ヒガンバナ科植物より得られるガラタミンはアゼピン骨格を有し、アルツハイマー型認知症治療剤として用いられている。一方、合成医薬品では構造中にアゼピン骨格を多く見出すことができる。イミプラミン(抗うつ薬)、ベセナプリル(ACE阻害薬)、アゼラスチン(抗アレルギー薬)、トルバプタン(選択的競合的バソプレシン受容体拮抗薬)などはアゼピン構造を有している。7員環構造は6員環構造に比べ配座自由度が高く、活性発現に関わるレセプターに対し、自身の配座構造を変化させて安定な結合形成を可能にする特性(誘導適合)に優れている。申請者は高等植物より種々の活性を有する天然有機化合物を探索しているが、このような構造特性を有するアゼピン型アルカロイド類は医薬品のリードとなり得るものとして注目しており、ビャクブ科植物 *Stemona tuberosa* の根より、ピロロ[1,2-a]アゼピン構造を有する新奇骨格を有するアルカロイドを種々単離し、赤外円二色性(Vibrational Circular Dichroism, VCD)スペクトルによる絶対配置決定を試みている。

2. 研究の目的

本研究では、アゼピン骨格を有する新規アルカロイドを構成成分とする化合物ライブラリーの構築とともに、含窒素複素環構造を持つアルカロイド類のVCDスペクトル法による絶対配置決定の問題点の解決を目的とする。近年、VCDスペクトルは発色団を持たない化合物に適用できることから、絶対配置が明らかな低分子化合物の絶対配置の決定へ応用されている。それは、密度汎関数理論(Density Functional Theory, DFT)より求めた理論スペクトルと実測したVCDスペクトルを比較することにより行われる。6員環や5員環構造が融合したりジッドな構造を持つテルペノイド類では、モデリングにより得られる安定構造を直接DFT計算すれば理論スペクトルが得られるが、鎖状化合物や中~大員環構造を有する化合物の場合は配座解析を行い、エネルギーの低い配座構造それぞれについてDFT計算を行い、各理論スペクトルをボルツマン分布に従った存在比の重み付けをして合成スペクトルを得なくてはならない。即ち、高精度の配座解析およびDFT計算により、実際のVCD測定溶液中の分子の構造と状態を再現することが要求される。アルカロイドにおいてVCDスペクトルを用いて絶対配置を決定した例はあまり多くない。その理由の一つとして、窒素原子の孤立電子対の反転により多くの配座構造を生じるため、計算量が膨大で作業が複雑になることが挙げられる。そこで、第三級アルカロイドをN-オキシド化して化合物がとり得る配座構造の数を減らすことで計算量の低減をはかることを検討する。また、VCDスペクトル法の適用限界を把握するため、分子量が比較的大きなマクロ環構造を有する、中分子の生物活性ペプチドアルカロイド化合物について本法が適用可能であるか検証する。

3. 研究の方法

Stemona 属植物のアルカロイド成分の探索により、アゼピン骨格を有する天然化合物ライブラリーを構築する。アゼピン骨格を有する天然化合物の探索は、著者がこれまでに多くのユニークなアルカロイドを見出した *Stemona tuberosa* の根から調製したメタノールエキスを精査することにより行う。その絶対配置の決定は、VCDスペクトル法により行う。即ち、MacroModelおよびCONFLEX(新規導入)プログラムで化合物の配座探索を行ったのち、高性能ワークステーション(新規導入)上でGaussianプログラムを用いてDFT計算してVCDの計算スペクトルを得る。これを実測したVCDスペクトルと比較することで決定する。また、第三級アミン構造を有する光学活性なアルカロイドを緩和な条件下に収率良くN-オキシドへと変換する手法を開発し、N-オキシド体と元の第三級アミン化合物についてそれぞれVCDスペクトル法を行い、スペクトルの再現性と計算効率を比較する。

VCDスペクトルは、赤外領域のスペクトルを観測するため、分子の運動性に比べてスペクトルのタイムスケールが長くなり、さまざまな状態で存在する系内の全ての分子の平均化された値として測定される。このスペクトルを化学計算により再現するには、その分子が取りうるすべての配座構造を発生させ、それぞれの分子構造の最適化を行い、個々の分子が持つエネルギーの値より存在確率による重み付けを行い、合成スペクトルを得ることが必要となる。配座解析では、発生させる配座構造に取りこぼしがないこと、すなわちその分子が取り得る可能な配座構造を網羅的に発生させることができることが求められる。また、構造の最適化と安定度の評価は力場計算により行うため、力場パラメータの精度が重要である。そのため、配座解析には安定配座構造の取りこぼしを防ぐためアルゴリズムの異なるMacroModelおよびCONFLEXの2つのプログラムを用い、力場にはMMFFsを使用することとした。DFT計算は、計算に要する時間が事実上の制約となるが、精度を高めるため可能な限り高いレベルの基底関数を用いることとした。

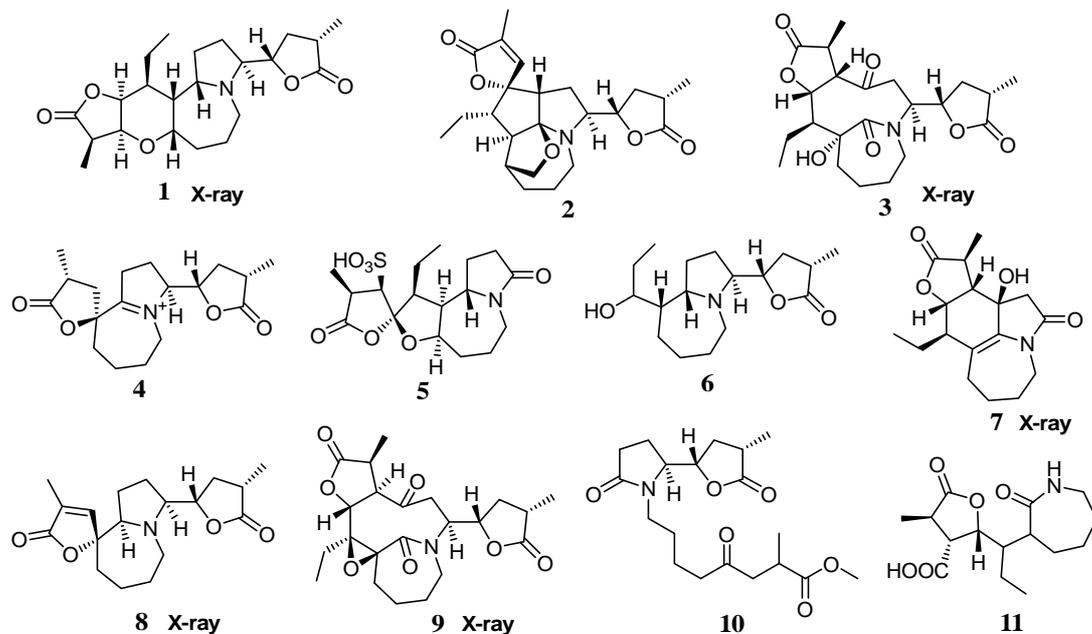
マクロ環状ペプチドアルカロイドについては茜草根(アカネ科植物 *Rubia cordifolia* の根)から調製したメタノールエキスを精査することにより得ることとした。

4. 研究成果

新規ステモナルカロイドの単離と構造決定

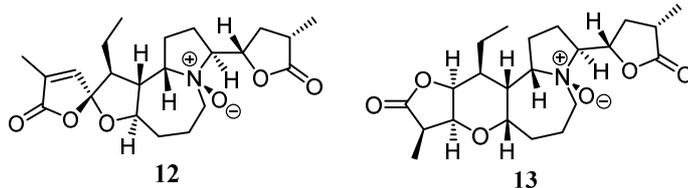
中国産ビャクブコン (タマビャクブ、*Stemona tuberosa* の根) のメタノール抽出エキスを分配操作して得られた粗アルカロイド画分を各種クロマトグラフィーにて分画した。一部の画分について高速液体クロマトグラフィーにより分離・精製を行い、11 種の新規構造を有するアルカロイド **1 - 11** とともに、*N*-オキシド誘導体の合成原料となる第三級アルカロイド tuberostemonine、stemoninine、dihydrostemoninine を単離した。

新規アルカロイドのうち、化合物 **1**、**3**、**7**、**8**、**9** は単結晶 X 線解析により構造決定した。残る 6 種は MS、IR、1 次元 (^1H 、 ^{13}C) および 2 次元 NMR (^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC) スペクトルの解析により平面構造を決定し、NOESY および ROESY スペクトルの解析により推定された立体構造を、MacroModel および CONFLEX プログラムにより求めた安定配座構造と照合することで相対立体配置を決定した。化合物 **1** については、MacroModel および CONFLEX プログラムを用いて配座解析を行って安定配座構造を抽出し、DFT 理論計算により求めた化合物 **1** の VCD 計算スペクトルを、実測した VCD スペクトルと比較することで絶対配置を明らかにした。新規アルカロイドのうち、化合物 **2** は *N*、*O*-アセタール構造を含む 6 環性構造、化合物 **4** はイミニウム構造を持つ 4 級アルカロイド、化合物 **5** はスルホン酸基が骨格炭素に結合した構造、化合物 **10** はアゼピン環が開裂した、それぞれユニークな構造を有していた。また、化合物 **9**、**10**、**11** について AChE 阻害活性 (IC_{50}) を評価したところ、それぞれ 124、150、 >200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらのアルカロイドは種々の医薬品の構造に見出されるアゼピン骨格やピロリドン骨格を有しており、その構造および単結晶 X 線解析により得られた高精度な構造座標は、医薬シーズ探索における *in vitro* および *in silico* スクリーニングに用いる質の高い化合物ライブラリーを構築するうえで重要な要素となる。



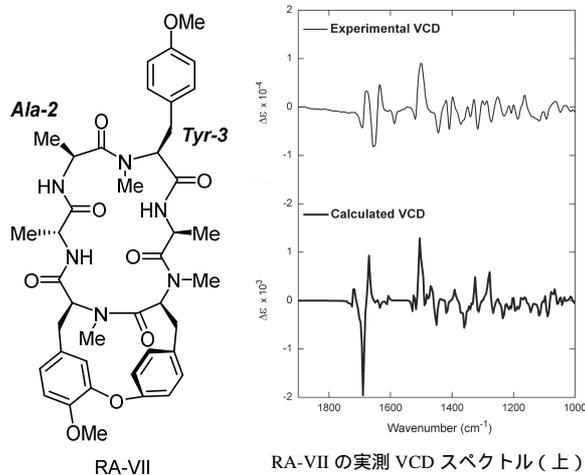
アゼピン骨格を有するアルカロイドの *N*-オキシド化と VCD スペクトルの計算

ピロロアゼピン骨格を持ち、*S. tuberosa* より比較的少量に得られる stemoninine を用いてアルカロイドの *N*-オキシド化を検討した。stemoninine は溶液中、室温で徐々に分解する化学的安定性の低い化合物であるが、過酸化水素水を用いて実用的な収率で *N*-オキシド体 **12** を得る条件を見出すことができた。化合物 **12** は中性条件下室温で安定であるが、液性を酸性にすると徐々に分解することが示された。一方、*N*-オキシド化合物の計算 VCD スペクトルを求める試みとして、X 線結晶解析により質の高い構造座標が得られた化合物 **1** を MacroModel 上で *N*-オキシド **13** に変換後、MacroModel および CONFLEX プログラムを用いて安定配座を探索し、その最安定配座構造について Gaussian プログラムを用いて DFT 計算により VCD の計算スペクトルを求めたところ、計算が収束せず計算スペクトルが得られなかった。種々パラメータを変えて試みたが、計算スペクトルを得ることはできなかった。



環状ペプチドアルカロイド RA-VII の VCD スペクトル

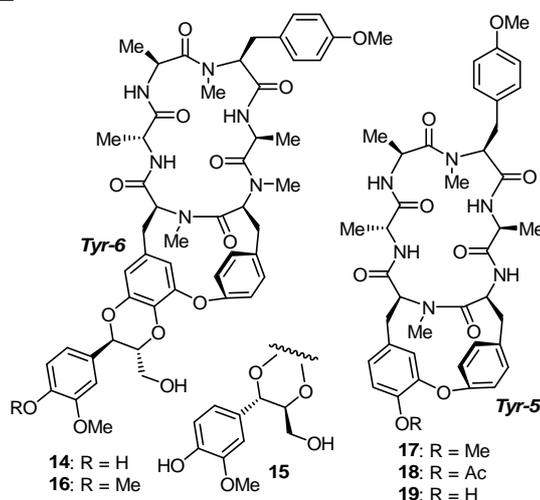
アゼピン骨格は7員環構造による高い配座自由度を持つが、さらに骨格原子の多いマクロ環状化合物へのVCDスペクトル法の適用性と限界を把握するため、茜草根由来のRA系ペプチドアルカロイドについてVCDスペクトル法を用いた絶対配置決定を試みた。RA系ペプチドは18員環構造を持つ二環性ペプチド化合物で、RA-VIIについては結晶構造と溶液中の配座解析について多くの研究成果の蓄積がある。RA-VIIは重クロロホルム溶液中でAla-2/Tyr-3残基間のペプチド結合の立体配置 (*cis/trans*) が異なる2種類の安定なコンホマーの混合物として存在する。2種類のコンホマーそれぞれについて構造最適化後VCDスペクトルを計算し、存在比 (*cis/trans* = 11/89) で重み付けして得られた理論スペクトルを重クロロホルム中で実測したVCDスペクトルと比較したところ、比較的よい一致を示した。従って、種々の配座構造をとり得るマクロ環状ペプチド化合物にもVCDスペクトル法を用いた配座解析 - 絶対配置決定法が適応可能であることを検証できた。そこで、新規環状ペプチドアルカロイドを探索し、その構造決定にVCDスペクトル法を応用することとした。



RA-VIIの実測VCDスペクトル(上)と計算スペクトル(下)

新規環状ペプチドアルカロイドの探索と構造解析

茜草根よりメタノールエキスを調製し、各種クロマトグラフィーを用いてペプチドアルカロイド成分を分離精製したところ、分子式 $C_{50}H_{58}N_6O_{13}$ 、 $C_{40}H_{48}N_6O_9$ 、 $C_{39}H_{46}N_6O_9$ を持つ3種の新規環状ペプチドアルカロイドを単離した。分子式 $C_{50}H_{58}N_6O_{13}$ の化合物は、その組成から deoxybouvardin (RA-V) にフェニルプロパノイドユニットが結合した構造と考えられ、二次元NMRスペクトルの解析により、本化合物の構造を14、15式で示す2種類のジアステレオマーのいずれかであると推定した。VCDスペクトル法は、一般に相対配置が明らかな化合物の絶対配置の決定に用いられるが、立体配置が不明な光学活性低分子化合物の構造決定に応用した例が報告されている。中分子化合物においてもVCDスペクトル法による構造決定が適応可能であるか否か検証するため、本化合物について試みることにした。それぞれの構造についてCONFLEXプログラムを用いて配座探索を行い、NMRスペクトルで観測される主コンホマー (存在比90%) に相当する最安定配座構造について密度汎関数法による構造最適化とともにVCDスペクトルを算出したが、それらのスペクトル間に顕著な差は認められなかった。また、計算スペクトルと実測VCDスペクトルとの類似性についてもジアステレオマー間で明確な差異は認められなかった。それぞれのジアステレオマーの側鎖部位の回転異性体や、寄与度の低いコンホマーの計算スペクトルを求めて精度を高めれば2種類のジアステレオマーの計算スペクトルと実測スペクトルの類似性を見出せる可能性はあるが、化合物の分子量を考慮すると膨大な計算量が必要となり、あまり現実的でない。従って、このような立体配置が不明な中分子化合物の立体構造をVCDスペクトル法により決定することは困難と考えられた。本化合物は、最終的にトリメチルエーテル16に誘導し、そのX線結晶解析により絶対配置を含めて14式と決定した。



分子式 $C_{40}H_{48}N_6O_9$ の化合物は結晶として得られ、X線結晶解析によりその構造を17式と決定した。分子式 $C_{39}H_{46}N_6O_9$ の化合物は、アセテート誘導体18のX線結晶解析によりその構造を19式と決定した。化合物17および19は、それぞれ全合成法および化合物17との化学的関連付けにより絶対配置を決定した。化合物17および19は重クロロホルム溶液中で主に2種類のコンホマーの混合物として存在していたが、二次元NMRスペクトルの解析により示された最も存在比の大きいコンホマーの構造は、化合物17および18の結晶構造と大きく異なっていた。そこで、化合物17についてMacroModelおよびCONFLEXプログラムを用いて配座解析を行い、DFT理論計算により最安定構造を求めたところ、その構造は化合物17および19の溶液中の主コンホマーの構造と良い一致を示した。一方、重クロロホルム溶液中で二番目に存在比の大きいコンホマーの配座構造は化合物18の結晶構造とほぼ一致し、RA-VIIの溶液中で主コンホマーと

一致した。化合物17についてMacroModelおよびCONFLEXプログラムを用いて配座解析を行い、DFT理論計算により最安定構造を求めたところ、その構造は化合物17および19の溶液中の主コンホマーの構造と良い一致を示した。一方、重クロロホルム溶液中で二番目に存在比の大きいコンホマーの配座構造は化合物18の結晶構造とほぼ一致し、RA-VIIの溶液中で主コンホマーと

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

して観測される活性配座構造にかなり類似していた。このことから、Tyr-5 残基の N - メチル基は、活性配座構造を優先的にとるために重要であることを明らかにした。この知見は、RA-VII のアナログデザインをするうえで重要性が高いものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Hitotsuyanagi, Yukio; Hirai, Masahito; Odagiri, Masumi; Komine, Miho; Hasuda, Tomoyo; Fukaya, Haruhiko; Takeya, Koichi. RA-XXV and RA-XXVI, bicyclic hexapeptides from *Rubia cordifolia* L.: Structure, synthesis, and conformation. *Chemistry - An Asian Journal*, 査読有, **2019**, *14*, 205 - 215
DOI: doi.org/10.1002/asia.201801466

Hitotsuyanagi, Yukio; Sekiya, Yoshiyuki; Fukaya, Haruhiko; Park, Hyun Sun; Zhu, Shu; Komatsu, Katsuko. Stemona-amines F and G, new alkaloids from *Stemona tuberosa*. *Tetrahedron Letters*, 査読有, **2016**, *57*, 5746 - 5749
DOI: dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.10.096

[学会発表] (計 7 件)

一柳 幸生 他、茜草根より単離したフェニルプロパノイド単位を持つ RA 系ペプチド化合物の構造 (II) . 日本薬学会第 139 年会、2019 年

一柳 幸生 他、タマビャクブ (*Stemona tuberosa*) から得られたアルカロイドの構造と生物活性について . 日本薬学会第 139 年会、2019 年

一柳 幸生 他、茜草根より単離したフェニルプロパノイド単位を持つ RA 系ペプチド化合物の構造 (I) . 日本薬学会第 138 年会、2018 年

一柳 幸生 他、ビャクブコンから得られた新規 stenine 型および croomine 型アルカロイドについて . 日本生薬学会第 65 回年会、2018 年

一柳 幸生 他、茜草根由来新規 RA 系ペプチド化合物の構造 . 日本生薬学会第 64 回年会、2017 年

一柳 幸生 他、抗腫瘍性環状ペプチド RA-VII の VCD スペクトル . 日本薬学会第 137 年会、2017 年

一柳 幸生 他、*Stemona tuberosa* から得られる新規アルカロイドに関する構造研究 . 日本薬学会第 137 年会、2017 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 深谷晴彦

ローマ字氏名 : FUKAYA, Haruhiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。