

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 4 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19191

研究課題名(和文) 光反応による構造多様性ビオチン化人工天然物エキスの創製

研究課題名(英文) Diversified artificial natural products extracts by photo-reaction

研究代表者

荒井 緑 (Arai, Midori)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：40373261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：天然資源から得られる抽出エキスは、人知の及ばない骨格から成り立つ多様な化合物の混合物である。光環化付加反応をエキスにほどこし、さらに多様性を増大させた人工天然化合物の混合物を作製することを目的とした。種々の生薬エキスのMeOH抽出エキスを用い、光反応を検討したが、再現性が乏しく、光反応自体をフルオロタグを付したオレフィンを用いて検討した。その合成検討に先立ち、ヘテロ環を有するロカグラミド誘導体の合成に成功した。それらは強いWntシグナル阻害作用を有していた。また、ビオチンタグを有するロカグラミド誘導体も合成し、阻害活性が保持されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では生薬エキスを用いて光環化付加反応を検討した。光反応を用いたエキス有機合成は初の試みであった。また、光環化付加反応を用いて種々のヘテロ環ロカグラミド誘導体の合成に成功し、それらが、がんで異常亢進しているWntシグナルに対する阻害作用を有していることを見いだした。この結果は、ヘテロ環含有ロカグラミドの新規生物活性を見いだした学術的意義もさることながら、ロカグラミド誘導体が新規抗がん剤リードになる可能性を示唆しており、社会的意義があるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Extract of natural resources is a mixture of unknown diversified natural products. In this research, we aimed the synthesis of new natural products mixture by photo-cyclized reaction. Although several MeOH extracts of plants were irradiated by UV lamp with olefin compounds, unfortunately reproducibility was low. Therefore, synthesis of rocaglamides with fluorine tag was examined. We also succeeded in synthesizing of rocaglamide derivatives with heterocycles. They showed strong Wnt signal inhibitory activity. Moreover, biotin-tagged rocaglamides retained the Wnt signal inhibitory activity.

研究分野：天然物化学, ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物 光環化反応 ロカグラミド Wnt がん

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

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、独自のタンパク質、細胞のアッセイ系を構築しながら、生物活性天然物の単離・構造決定を行い、その作用機序解析を行ってきた。また天然物様化合物の合成として、天然物を基盤とした多様性を有する化合物群の創成研究を行ってきた。このような背景から、化学合成と天然物エキスの融合ができないかと考えるに至った。天然物エキスを化学合成をほどこす研究例はいくつかの先行例があるが、光反応を用いた例は無かった。そこで光反応における天然物エキス混合物の多様性増加に興味を抱いた。申請者は、光環化付加反応によるロカグラミド誘導体合成研究を行っていた。

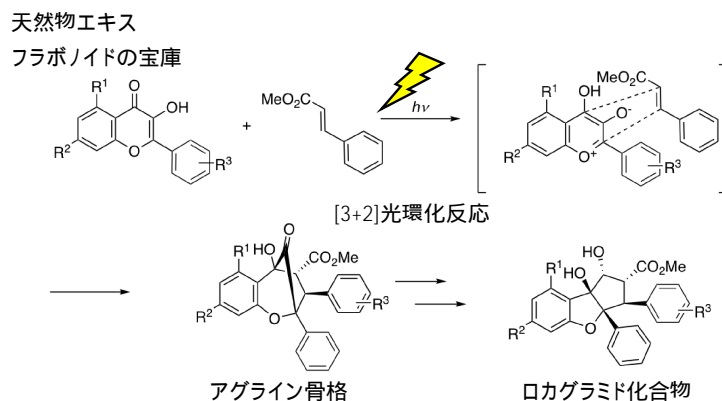
また、申請者は、天然物 fuligocandin B ヨウ素化体のピオチン化合物をデザイン・合成し、その標的分子がバロシン含有タンパク質(valosin containing protein; VCP)であることを決定した。fuligocandin B ヨウ素化体は、がん細胞を選択的にアポトーシスに導くデスリガンド、TRAIL に対する耐性を有するがん細胞を、TRAIL に対し感受性にさせる(すなわち TRAIL 耐性克服作用)。その作用機序を解明し、がん細胞の TRAIL 耐性と VCP の関連性を初めて見いだした。しかしながら、ピオチン化合物の合成は多大な労力を要することを経験した。このような背景から、申請者は天然物エキスを化学反応をほどこし、さらにピオチン化を行うことで、多様性が増大した人工天然物混合物を作成してみたいと考え、このような研究構想に至った。

2. 研究の目的

植物、放線菌などの天然資源から得られる抽出エキスは、人知の及ばない骨格から成り立つ多様な化合物の混合物である。この多様性と希少性に着目し、光環化付加反応をエキスにほどこし、さらに多様性を増大させた人工天然化合物の混合物を作製することを目的とする。ピオチンとタンパク質アビジンの結合は非常に強く様々な応用がなされ、特に有用なのはアビジンビーズを用いる化合物の標的タンパク質同定である。しかし、ピオチン化合物の作成は従来、多段階を有し低効率であった。本研究では、ピオチン化した天然物由来の構造多様性化合物群(ロカグラミド類)を一挙に得るための基盤となる研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ロカグラミド類は、フラボノイド類と二重結合を有するオレフィンとの[3+2]光環化付加反応で得られたアグライン骨格を有する化合物から、数工程で得ることができる。まず、フラボノイド類が多く含まれる植物に着目し、植物をメタノールで抽出したエキスを作成し、そのエキスにオレフィン類存在下、UV 照射することにより、光環化付加反応を進行させることを検討する。



(2)パーフルオロアルキル基等から構成されるフルオロタグは、優れた標識化合物であり、シリカゲル表面のシラノール基をパーフルオロアルキルシリル化剤で修飾したフルオラスシリカゲルを用いた固相抽出法により、フルオラス化合物を簡便に精製することができる。フルオロタグを用いてロカグラミドライブラリーを合成し、エステルを除去してピオチンを付加できるかを検討する。この試みがうまくいけば、植物エキスとフルオロタグ化オレフィンを作用させ、ロカグラミド化合物を生成することができる。その後、タグを加水分解で除去し、ピオチン化できると考えた。また、同時にピオチンが付加したロカグラミド化合物が生物活性を保持できるかも検討する。

4. 研究成果

(1)植物エキスの中に豊富に含まれるフラボノイド類に着目し、ケイ皮酸メチルを加え、UV 照射することにより、光環化付加反応を起こさせることを計画した。まず、フラボノイドが豊富な植物として、市販の生薬、アマチャ、センナなど、9種を選定した。それぞれ 30 g をメタノールにて 24 h 抽出し、エキスを得た。それぞれのエキス 50 mg をメタノールに溶解し、ケイ皮酸メチルを加え、UV 照射を行った。得られた混合物からシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて過剰のケイ皮酸メチルを取り除き、得られた混合物を LC-MS にて解析を行った。植

物のみのエキスと比べて、新規のピーク（化合物）が得られたものをヒットとした。

チョウジ、リョウキョウにおいて、光反応後に新規の化合物が得られることを確認した。そのうちチョウジにおいて、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS HPLC にて分離を行った。量が少なく解析が困難であったため、生薬エキスの量を 5 g とスケールを大きくして光反応を行い、標的のピークの分離を行った。化合物は MeO 基を 3 つ有する芳香族化合物であることが判明した。しかしながら、本方法は再現性が乏しく、光反応自体を精査することとした。

(2) フルオロタグ化合物の合成検討に先立ち、ヘテロ環を有するロカグラミド誘導体の合成を検討し、種々ロカグラミド誘導体の合成に成功した。それらは nM オーダーの強い Wnt シグナル阻害作用を有していた。続いて、フルオロタグ化合物の合成検討を行った。アセトアルデヒド誘導体とヘテロ環アルデヒドを塩基性条件下反応させ、カルコン誘導体を得た。チオフェン型化合物の場合、収率 77% であった。次に、過酸化水素存在下、環化反応を検討し、チオフェン環を有するクロモン化合物を低収率ではあるものの得ることができた。別途、合成したフルオロタグを有するオレフィンとの光環化反応によりアグライン化合物を得るべく、種々検討したが、フルオロタグの影響が、光反応はスムーズに進行しなかった。

また、ピオチンが付加したロカグラミド化合物が生物活性を保持できるかを検討するため、実際にピオチン化ロカグラミドの合成に着手した。チオフェン環を有するロカグラミドは、強い Wnt シグナル阻害活性を有することを見いだしている。そこで、そのロカグラミドのベンゼン環上より、エチレングリコールタグを付加し、ピオチン部を結合させた化合物の合成を行った。合成は各段階、スムーズに進行し、ピオチン部を有するロカグラミド化合物 2 種の合成に成功した。これらは、活性は弱まったものの、Wnt シグナル阻害活性を保持していた。このことにより、ロカグラミド化合物をピオチン化しても、生物活性が保持されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

蒔田吉功, 荒井緑, 石橋正己, "ヘテロ環含有ロカグラミド誘導体の合成と生物活性評価", 日本薬学会第 139 年会 (2019) 千葉

Y. Makita, M. A. Arai, M. Ishibashi, "Synthesis of rocaclamide derivatives with Wnt signal inhibition", The international Kyoto conference on new aspects of organic chemistry, November 12-16, 2018, Kyoto

蒔田吉功, 荒井緑, 石橋正己, "Wnt シグナル阻害作用を有するロカグラミド誘導体の創成", 第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2018 年 11 月 5-6 日, 熊本

Y. Makita, M. A. Arai, M. Ishibashi, "Synthesis of rocaclamide derivatives with Wnt signal inhibition", The 1st International Symposium of Soft Molecular Activation Research Center (SMARC), September 1, 2018, Chiba University

蒔田吉功, 荒井緑, 田中優貴, 石橋正己, "Wnt シグナル阻害作用を有するロカグラミド誘導体の創成", 日本薬学会第 138 年会 (2018) 金沢

Y. Makita, M. A. Arai, Y. Tanaka, M. Ishibashi, "Synthesis of rocaclamide derivatives with Wnt signal inhibition", The Second Symposium of Chiral Molecular Science and Technology in Chiba University, January 11, 2018, Chiba University

蒔田吉功, 荒井緑, 田中優貴, 石橋正己, "Wnt シグナル阻害作用を有するロカグラミド誘導体の創成", 第 47 回複素環化学討論会, 2017 年 10 月 26 日, 高知

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.p.chiba-u.jp/lab/kassei/index.html>

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：
ローマ字氏名：

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。