

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19142

研究課題名(和文)アルカロイド-核酸複合体による細胞機能制御法開拓

研究課題名(英文)Chemical genetic approach to control cellular functions exploiting complex between alkaloid and nucleic acid

研究代表者

大栗 博毅(OGURI, HIROKI)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80311546

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、テトラヒドロイソキノリン(THIQ)アルカロイド群の化学酵素ハイブリッド合成を展開し、A環5位と1位側鎖を改変した非天然型アナログ群を設計し、簡便に迅速合成した。C1位側鎖の構造がDNAアルキル化へ大きく影響することを明らかにした。A環C5位の酸素官能基を除去したデオキシ型アナログとすると、より広範な塩基配列を認識して共有結合を形成し、DNA-中分子アルカロイド複合体を形成できることが分かった。構造活性相関の知見を蓄積し、実際に天然物シアノサフラシンBよりも優れたDNAアルキル化能を発揮する5位デオキシアナログを創製することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、複雑な五環性骨格を一挙に構築する酵素合成と官能基を自在に変換する有機合成を融合させ、抗腫瘍性抗生物質サフラマイシン類の類縁体を簡便かつ迅速に合成した。この化学-酵素ハイブリッド合成によって初めて創出が可能となった化合物群の中から、実際に天然物シアノサフラシンよりも優れたDNAアルキル化能(共有結合形成能力)を有する創薬候補分子群を見出すことができた。更に、合成アナログ群の構造とDNAアルキル化能との相関を調査し、中分子アルカロイドと核酸との共有結合複合体を活用して核内タンパク質の機能を制御する萌芽的な研究を開拓することができた。

研究成果の概要(英文): In this study, we designed and synthesized C5-desoxy analogs of THIQ alkaloids as hitherto unexplored structural variants for the evaluation of their DNA alkylating activities. The C5-desoxy analog exhibited greater DNA alkylating ability with a wider tolerance for sequence variations compared to the commercially available cyanosafraicin B. These results clearly indicated that the oxygen-containing functional group at the C5 position is not essential for the DNA alkylation. Rather, the C5-desoxy analogs are capable of facilitating covalent adduct formation with DNA. The substantial influence of the C5-desoxy A-ring having the C8 phenolic hydroxyl group, as well as a C1 substituent in the vicinity of the C21 aminonitrile was also demonstrated.

研究分野：天然物化学・ケミカルバイオロジー・有機合成化学

キーワード：アルカロイド 核酸 共有結合複合体 天然物 抗腫瘍性抗生物質 サフラマイシン類 化学-酵素合成

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。

1. 研究開始当初の背景

サフラマイシン類 (**1**, **2**) に代表される抗腫瘍性アルカロイド群は、テトラヒドロイソキノリン (THIQ) 環が複数連結した複雑な五環性骨格を持つ (図1)¹⁾。ほぼ同一の五環性母骨格を共有する天然物群として、ジオルナマイシン A (**3**)、レニエラマイシン M (**4**)、エクテナサイジン 743 (**5**) 等の類縁体が報告されている。二つの THIQ 環で構成される天然物 (**1-4, 6**) はアミノニトリルから生じるイミニウムカチオンで DNA のグアニン塩基をアルキル化する。核酸アルキル化部位とタンパク質相互作用部位を併せ持つ **5** は制ガン薬 (トラバクテジン/ヨンデリス) として臨床応用されている。特異な構造を持ち、強力な制ガン作用を発現する THIQ アルカロイド群については、優れた全合成研究が活発に展開されてきた²⁾。極めて複雑な多環性構造を持つ制ガン薬 **5** は、培養で得られるシアノサフラシン B (**6**) からの多段階半合成 (21 工程) で供給されている³⁾。筆者らは、サフラマイシン A 生合成酵素 SfmC に非天然型基質群を適用して、**1-6** に共通する五環性母骨格を迅速に合成した。不安定な中間体を単離せずに官能基の化学変換を施し、サフラマイシン A (**1**)、ジオルナマイシン A (**3**)、*N*-Fmoc サフラマイシン Y3 (**7**) の系統的な全合成に成功した⁴⁾。

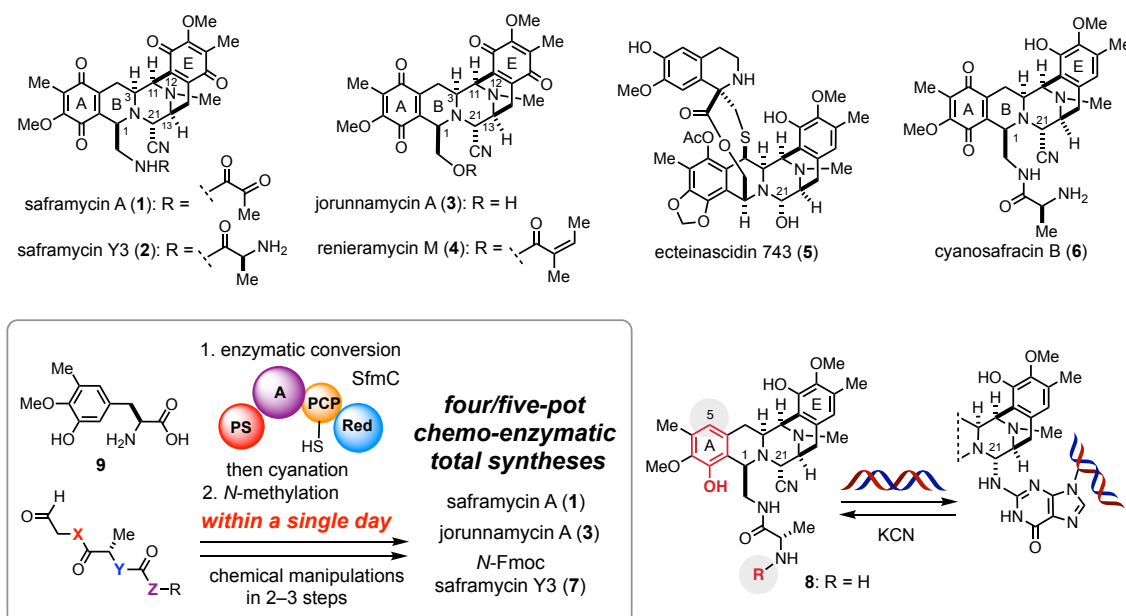


図1 テトラヒドロイソキノリンアルカロイド類 (**1-6**) と合成アナログ (**7, 8**).

2. 研究の目的

サフラマイシン A (**1**) は DNA 二重らせん副溝と相互作用し、21 位アミノニトリルから生じるイミニウムカチオンでグアニンをアルキル化する (図1)。GC-rich 領域の 5'-GGG-3', 5'-GGC-3' 配列等と選択的に会合し、中央のグアニンと共有結合を形成する。興味深いことに、A, E 環部が共にパラキノン構造を持つ **1** の DNA アルキル化能は弱く、細胞内で還元されて生じるヒドロキノン型のリガンドが優れた DNA アルキル化剤となる⁵⁾。A, E 環の酸化状態が DNA アルキル化能に大きな影響を及ぼすにもかかわらず、従前の全合成・半合成研究では、5 位デオキシ型中間体やアナログの合成例は限られていた。今回開発した化学・酵素ハイブリッド合成法で、5 位デオキシ型リガンド群 (**7, 8, 11, and 12**) を簡便に合成し、天然物シアノサフラシン B (**6**) と DNA アルキル化能を比較した⁶⁾。

3. 研究の方法

筆者らが開発した化学-酵素ハイブリッド合成法を適用して⁴⁾, C5 デオキシ型アナログ(**7**, **8**, **11**, and **12**) を短段階で合成した⁶⁾。チロシン誘導体 **9** とアリルカルバメート型リンカーを導入したペプチジルアルデヒド **10** を酵素 SfmC で変換した。非天然型基質となる **10** を活用した酵素変換は効率良く進行し, 7 連続反応を経て五環性骨格を一挙に構築した。酵素反応溶液にそのままシアン化カリウムを作用させ, C21 位をアミノニトリルへ変換した。簡便な抽出操作で酵素を除去した粗生成物に対し, ボラン-2-メチルピリジン錯体を用いた還元的アミノ化で N12 位をメチル化し, C5 デオキシ型アナログ **11** を簡便かつ迅速に合成した。パラジウム触媒でアリルカルバメートを除去し, C1 位側鎖末端を一級アミンとした **8** を合成した。更に, 末端アミノ基を活用して, Alloc 基, Fmoc 基を導入した C5 デオキシ型アナログ **12**, **7** をそれぞれ合成することができた。これら四種類の C5 デオキシ型アナログ群と天然物シアノサフラシン **B** (**6**) を活用して, C1 位側鎖の構造と DNA アルキル化活性の相関を調査した⁶⁾。

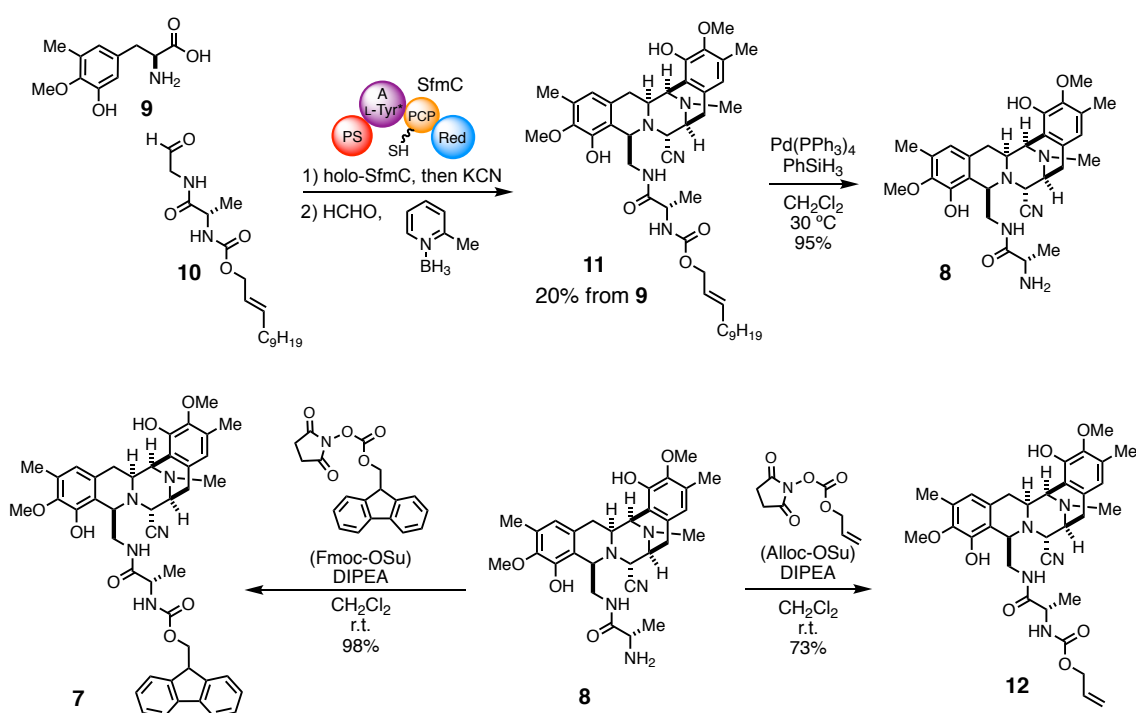


図2 化学-酵素ハイブリッド法による C5 デオキシ型アナログ群の迅速合成

4. 研究成果

合成した C5 デオキシ型アナログ群 (**7**, **8**, **11**, and **12**) の DNA アルキル化能力を電気泳動度シフトアッセイ [electrophoretic mobility shift assay (EMSA)] で評価した⁶⁾。サフラマイシン A (**1**) では, 5'-**GGG**-3' および 5'-**GGC**-3' 配列に対して優先的に DNA アルキル化することが知られている。これを踏まえて, フルオレセインラベル (FL) を連結した 15 残基のオリゴヌクレオチド 5'-ATAAT**GGG**GATAATA-3' を設計し, 二本鎖 DNA を調製した。末端アミノ基とした C5 デオキシ型アナログ **8** は, 5'-**GGG**-3' および 5'-**GGC**-3' 配列を含むこれら二本鎖 (ds) DNA オリゴマーに濃度依存的に結合した。二本鎖 DNA に対して, 5 モル等量以上の **8** をインキュベーションすると, アルカロイド-DNA の 1 : 1 型共有結合複合体へほぼ完全に変換 (> 95%) できることを明らかにした。更に, 天然物 **6** よりも酸化度が低い 5 位デオシアナログ **8** は, **6** よりも優れた DNA アルキル化能を発揮した⁶⁾。

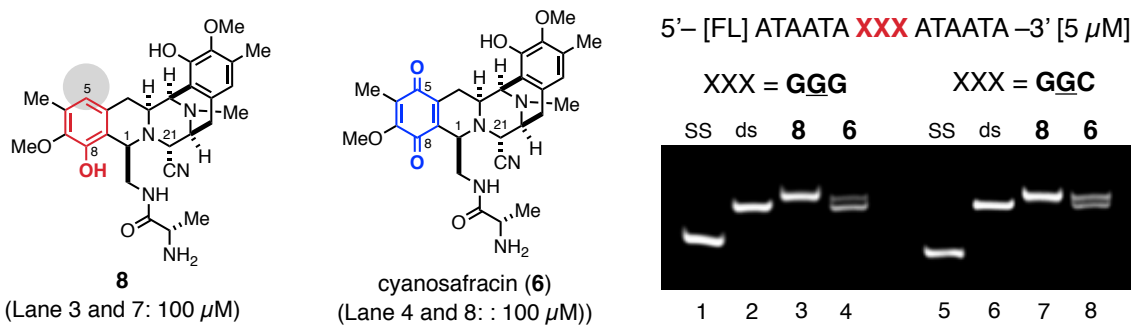


図3 C5 デオキシ型アナログとシアノサフラシシン (6) との DNA アルキル化能の比較

1 位側鎖を高くすると 21 位での DNA アルキル化が顕著に阻害されることが分かった (図4)。更に、DNA-アルカロイド複合体に KCN を作用させる簡便な操作で、逆反応となる脱アルキル化を可逆的に進行させることにも成功した (図1)。

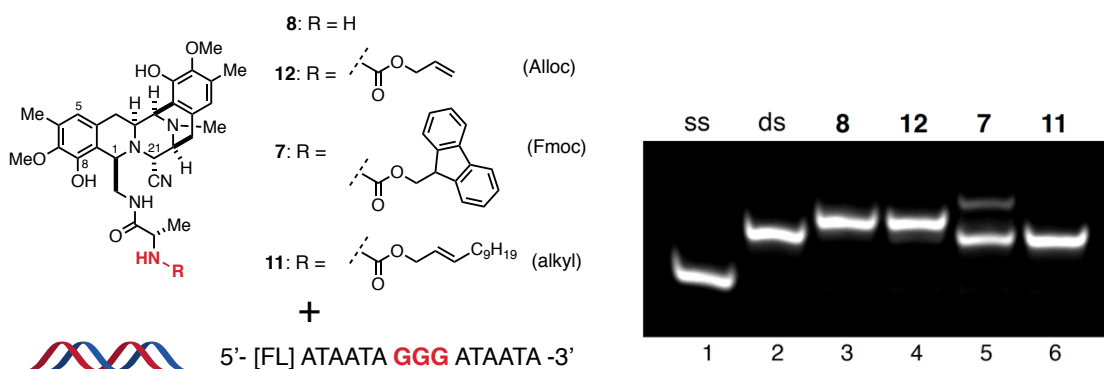


図4 C5 デオキシ型アナログ群における C1 側鎖の構造と DNA アルキル化能との相関

THIQ アルカロイドの生合成マシナリーでは、天然物の構造には存在しない長鎖脂肪酸部位がほぼ普遍的に必要となっている⁸⁾。脂肪酸側鎖が連結した基質を活用することで酵素から一旦遊離するアルデヒド中間体の拡散を抑制し、疎水性反応場での連続反応を効率良く進行させている可能性が推定される。今回の検討で 1 位に脂肪酸側鎖が連結したリガンドでは、DNA アルキル化能が大幅に減少した⁶⁾。これらの知見を統合すると、THIQ アルカロイドの生産菌類は脂肪酸側鎖をわざわざ連結するアプローチを採ることで、酵素反応効率の向上と DNA アルキル化能を持つ生成物の毒性軽減を両立しながら生合成していることが推察される⁷⁾。更に、生合成した中間体を速やかに脂質二重膜へ移行させた後、膜結合性ペプチド加水分解酵素 SfmE が脂肪酸側鎖を切断し⁹⁾、DNA アルキル化能の高い生物活性リガンドを細胞外へ放出していることが考えられる。このように THIQ アルカロイドの生合成マシナリーでは、脂肪酸側鎖の着脱によりプロドラック形成・活性化・放出を制御しうる合理的で精巧な生物活性物質生産システムとして進化してきた可能性が想定される。

参考文献

- 1) (a) Scott, J. D.; Williams, R. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669. (b) Le, V. H.; Inai, M.; Williams, R. M.; Kan, T. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 328. (c) Chrzanowska, M.; Grajewska, A.; Rozwadowska, M. D. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12369.
- 2) (a) Fukuyama, T.; Yang, L.; Ajeck, K. L.; Sachleben, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3712. (b)

- Myers, A. G.; Kung, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10828. (c) Scott, J. D.; Williams, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2951. (d) Dong, W.; Liu, W.; Liao, X.; Guan, B.; Chen, S.; Liu, Z. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5363. (e) Corey, E. J.; Gin, D. Y.; Kania, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9202. (f) Chen, J.; Chen, X.; Bois-Choussy, M.; Zhu, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 87. (g) Kawagishi, F.; Toma, T.; Inui, T.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13684.
- 3) Manzanares, I. *et al. Org. Lett.* **2000**, *2*, 2545.
 - 4) Tanifuji, R.; Koketsu, K.; Takakura, M.; Asano, R.; Minami, A.; Oikawa, H.; Oguri, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *130*, 7148.
 - 5) Ishiguro, K.; Takahashi, K.; Yazawa, K.; Sakiyama, S.; Arai, T. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2162.
 - 6) Tanifuji, R.; Tsukakoshi, K.; Ikebukuro, K.; Oikawa, H.; Oguri, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 1807.
 - 7) Tanifuji, R.; Minami, A.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *Advance Article* DOI: 10.1039/C9NP00073A.
 - 8) (a) Koketsu, K.; Watanabe, K.; Suda, H.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 408. (b) Koketsu, K.; Minami, A.; Watanabe, K.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 142. (c) Koketsu, K.; Minami, A.; Watanabe, K.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Methods Enzymol.* **2012**, *516*, 79. (d) Hiratsuka, T.; Koketsu, K.; Minami, A.; Kaneko, S.; Yamazaki, C.; Watanabe, K.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1523.
 - 9) Tang, G.-L.; Song, L.-Q.; Zhang, Y.-Y.; Pu, J.-Y.; Tang, M.-C.; Peng, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 9116.

謝辞：本研究は、東京農工大学の池袋一典先生、塚越かおり先生、北海道大学の及川英秋先生、東京大学の谷藤涼先生との共同研究の賜物であり、共同研究者各位に感謝いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanifuji Ryo, Tsukakoshi Kaori, Ikebukuro Kazunori, Oikawa Hideaki, Oguri Hiroki	4. 巻 29
2. 論文標題 Generation of C5-desoxy analogs of tetrahydroisoquinoline alkaloids exhibiting potent DNA alkylating ability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1807 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanifuji Ryo, Minami Atsushi, Oguri Hiroki, Oikawa Hideaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Total synthesis of alkaloids using both chemical and biochemical methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Natural Product Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NP00073A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroki Oguri
2. 発表標題 Development of divergent synthetic processes to explore frontiers in natural product chemistry
3. 学会等名 Let's Leap! Challenges in Organic Chemistry Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Oguri
2. 発表標題 Design and Synthesis of DNA Alkylating Natural Products: A Chemo-enzymatic Approach
3. 学会等名 International Symposium on Biosensing for Next Generation; Design and Development of Molecular Recognition Element, TUAT GIR International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Oguri
2. 発表標題 Concise and divergent access to alkaloidal scaffolds by integrating organic and biogenetic synthesis
3. 学会等名 The Fourth A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Oguri
2. 発表標題 Concise Synthesis of Natural Products and their Variants: a Chemoenzymatic and an Element Implantation Approach
3. 学会等名 The 14th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Oguri
2. 発表標題 Artificial assembly lines for divergent synthesis of natural products and their variants
3. 学会等名 The 27th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大栗博毅
2. 発表標題 生合成拡張型合成の新展開と機能創発への挑戦
3. 学会等名 理研シンポジウム：第14回有機合成化学フロンティア (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大栗博毅
2. 発表標題 生合成拡張型合成プロセスの開発と機能性中分子群創製
3. 学会等名 微生物ウィーク2019 コラボシンポジウム：放線菌が生産する構造多様性に富んだ化合物とその応用への展開（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大栗博毅
2. 発表標題 天然物合成化学と生合成工学・超分子化学との融合を目指して
3. 学会等名 産総研 第82回触媒化学融合研究センター講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院理学研究科化学専攻天然物化学研究室 http://natural.chem.s.u-tokyo.ac.jp/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考