

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05730

研究課題名(和文)新規活性物質の創出に向けた天然物活性中心骨格を起点とするタンパク質の機能制御

研究課題名(英文)Protein function control starting from the pharmacophore skeleton of natural products for the development of new bioactive compounds

研究代表者

土川 博史(Tsuchikawa, Hiroshi)

大分大学・医学部・特任講師

研究者番号：30460992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経活動の中心的な役割を果たす膜タンパク質であるニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)と、その強力な阻害剤である海洋天然物スピロリドに焦点をあてて研究を行った。複雑な骨格を有するスピロリド構造から、活性に必要な最小構造(ファーマコフォア)を抽出し、その簡便な合成法の確立および迅速な構造展開を実施することで、新しい天然物創薬研究の手法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、医薬品の基として有用な天然物の問題点(構造の特異性・複雑性)を、独自の観点および手法で解決することに成功した。これは、近年存在感が薄れつつある低分子医薬品開発の新しい手法となり得るため、現在主流となりつつある抗体やペプチド技術を利用した高分子医薬品から、低分子医薬品への回帰「リバースパラダイムシフト」の流れを生み出す可能性がある。さらには天然物化学の新規戦略となることも期待され、これら分野を横断するインパクトを与える成果を得たと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), a membrane protein that plays a central role in neural activity, and its potent inhibitor, the marine natural product spiroolides. Extracting the minimum structure (pharmacophore) required for biological activity from spiroolide structure with a complex backbone, establishing a simple synthesis method, and conducting rapid lead exploration led to the proposal of a new method for drug discovery research on natural products.

研究分野：合成有機化学・天然物化学・ケミカルバイオロジー・創薬化学

キーワード：アセチルコリン受容体 スピロリド ファーマコフォア 化学合成 アミノ酸側鎖 構造展開

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然物は医薬品開発の魅力的なシーズであると同時に、様々な生命現象解明のツールとして、生命科学・医学の発展において多大な貢献をしてきた。しかし近年、特に医薬品開発のモダリティは、抗体や核酸、さらには再生医療やゲノム編集など多種多様に広がっており、天然物を含む低分子化合物の存在感は薄れつつある。その最も本質的な問題として、生理活性天然物は往々にして特異的かつ複雑すぎる構造を有するため、化学的アプローチによる精密な作用機序の解析が困難である場合が多く、創薬展開の大きな妨げになっている。しかし、天然物が有する幅広いケミカルスペースと sp³ 豊富な 3 次元骨格、切れ味鋭い生物活性は、依然として極めて魅力的であるため、上記の課題を克服し、天然物の特徴を最大限に活かすことができる新しい手法の開発が望まれている。研究代表者は、神経活動の中心的な役割を果たす膜タンパク質であるニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に焦点をあて、その強力な阻害剤である海洋天然物スピロリド(13-SPX C)の合成研究を展開してきた(Fig 1)。その中で、スピロリドの特徴的なスピロイミン部分構造(1a, 1b)の合成に成功し、それが依然として nAChR への結合活性を保持していることから、本構造がスピロリドの活性中心(ファーマコフォア)であると推察した。スピロリドは発見から 20 年以上経過した現在でも全合成が達成されていない極めて複雑な天然物と言えるが、抜き出した活性中心骨格の基本構造は、その合成およびさらなる官能基化も簡便に実施可能である。したがって、生理活性天然物の活性中心構造を切り取り、その系統的かつ迅速な誘導化、続く生物活性評価を実施することができれば、天然物の有能な特徴を保持した新規生理活性物質を創出し、新たな天然物創薬の道を切り拓く新しい手法となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、複雑骨格天然物の「生物活性中心骨格」を抜き出し、それを中心とした系統的な構造展開および生物活性評価を行うことで、生命現象の解明や医薬品開発に有用な新規生理活性物質を生み出すことを目的とした。特に、生命の根幹をなす膜タンパク質の一つである nAChR に焦点を絞り、その機能を精密に制御可能な天然物様化合物の設計・合成を達成することで、本研究戦略が天然物創薬の新規方法論となり得ることを証明できると考えた。

具体的にはまず、nAChR の強力な阻害剤であるスピロリドの部分構造から最適な「生物活性中心骨格」を抜き出すために、精密な設計・合成および構造活性相関を実施することとした。さらに迅速な構造展開を意図した新しい「生物活性中心骨格」の設計および合成も行い、その生物活性試験を実施することで、天然物の有能な特徴を保持した新規生理活性物質を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

予備実験としてすでにスピロリドのファーマコフォア部分であるスピロイミン構造(1a, 1b)の合成に成功し、不明であった 4 位の立体化学の決定に成功していた(Fig 1)。しかしながら、原料であるラクタム 3 の合成に多段階を要するなど、本部分構造を「生物活性中心骨格」として利用するには問題があった。そこで、より迅速な合成および的確な置換基導入が容易な骨格とすべく、その構造最適化を検討することとした。その後、確立した骨格構造に対して置換基の検討、および適切な生物活性試験を実施することで、生理活性天然物の活性中心構造を基にした「新規生理活性物質」を創出することとした。

4. 研究成果

まずジメチル基を有する 7 員環イミン構造について、市販原料より 2 段階で合成可能なジメチル基の無い 7 員環ラクタム 4 を基質として用いることで、より簡便に中心骨格を構築することを検討した。その結果、シラトランジエン 2 との Diels-Alder 反応により、ラセミ体ではあるものの望む立体化学を有する化合物 5 を 66% で得ることに成功した。さらに 2 段階を経てトシル体 6 へと変換後、シラトラン基を足掛かりとして Hiyama カップリング反応の条件に付すことで、5 位に種々の置換基を導入することに成功した。合成したデスメチル体に対して、ブタ脳より単離したシナプトソームを用い、nAChR に対する競合結合試験を実施したところ、5 位に p-CF₃-Ph 基を有する誘導体 7c が定量性は低いものの強力な結合活性を有することを見出した。以上の結果、より効率的な合成が可能な、生物活性を有する中心骨格構造を構築することに成功した。

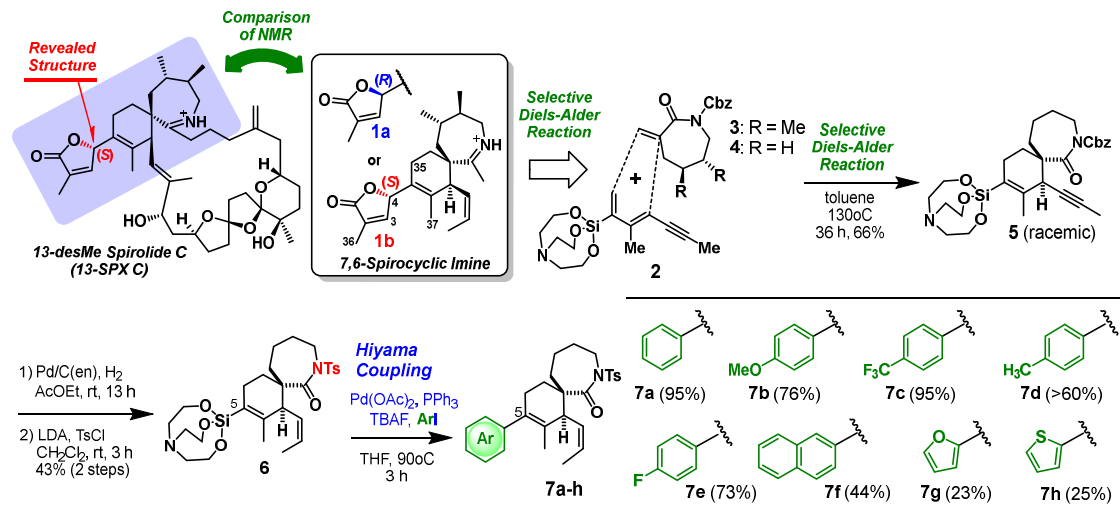


Fig 1

アリール基を中心とした置換基を5位に導入する上でシラトラン構造は有用であったが、種々のアミノ酸側鎖を効率的に導入するには不向きであった。そこで次に、より迅速かつ多様な構造展開を可能にする骨格合成法を検討した。まず骨格形成を行うDiels-Alder反応において、シリルエノールエーテル構造を有するジエン基質 **8** を用いて検討することで、後の5位の誘導化のバリエーションを広げること検討した (Fig 2)。化合物 **8** とラクタム **4** を用い、反応条件を種々検討した結果、不斉銅触媒存在下室温で反応させることで、5位にシリルエノールエーテル構造を有するシクロヘキセン骨格構造を、高収率、高エナンチオ選択的に合成することに成功した。続いて酸で処理することで、メチル基の立体化学は混合物となるものの、収率よくケトン体 **10** に変換することに成功した。これにより、求核反応により5位に種々のアミノ酸側鎖を導入することが可能となるため、より多様な構造展開が可能となる中心骨格構造を構築することができた。

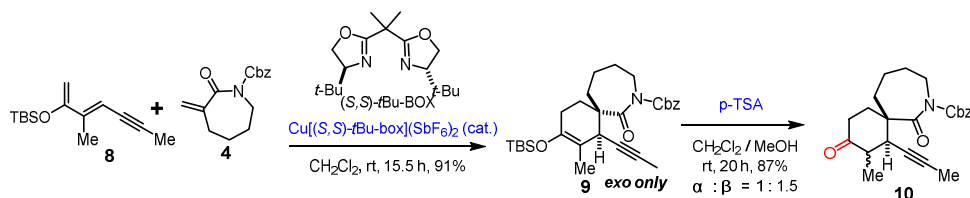


Fig 2

その一方で、本骨格のラクタム部分をイミン構造に変換する際に、反応性の低下や化合物の安定性の低下など、予想外の問題が生じた。そこで、これらの確立した中心骨格構造からのさらなる合成検討と並行して、新たな骨格の設計および合成の検討にも着手した。

すなわち、nAChR とスピロリドの複合体構造 (Fig 3a) を基にし、大分大学で進めているペプチド擬態技術を適用することで、相互作用に重要な側鎖の3次元構造を模倣可能な新たな骨格をドッキングシミュレーションにより探索した。その結果、スピロリドのファーマコフォア部分構造である **1b** と比べてより強い相互作用が期待できる骨格として、三環性化合物 NS-1 が得られた (Fig 3b)。本骨格の構築法はすでに大分大学で確立しているため、スピロリドの活性中心骨格より簡便に合成可能であり、かつ3種類の側鎖 R を迅速に変換することで、構造展開を容易に行うことができると期待される。ドッキングスコアの良好であった誘導体の一つ NS-2 を実際に合成し、狂犬病ウイルス増殖抑制試験を行ったところ、抗狂犬病ウイルス剤として市販されている T-705 の IC₅₀ 値 = 30 μM と同程度の活性を示すことが分かった (Fig 3b)。狂犬病ウイルスは宿主の nAChR を介して神経細胞に侵入することが知られているため、本化合物の抗ウイルス活性は nAChR への結合による効果であると考えている。以上の結果、生理活性天然物の活性中心構造を基に活性を保持した新たな骨格を創出することに成功した。さらなる置換基の最適化により活性の向上、さらには *in vivo* 試験へと進めることで、新たな天然物創薬の新しい手法として展開できると考えている。

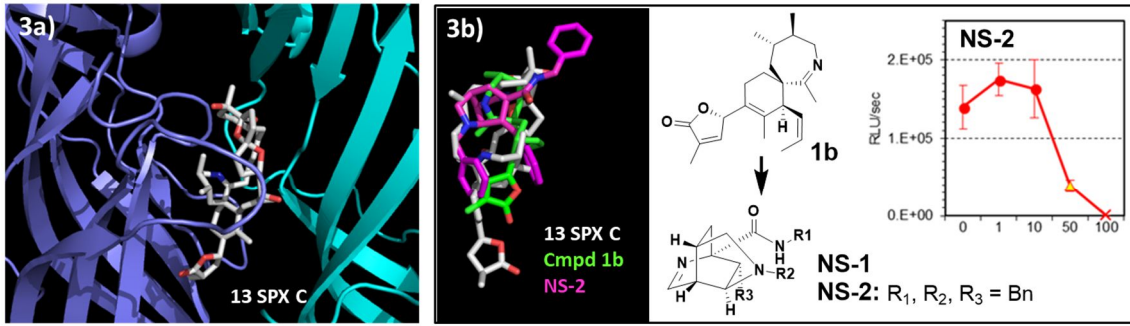


Fig 3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Umegawa Yuichi, Shimonishi Takeshi, Tsuchikawa Hiroshi, Murata Michio	4. 巻 60
2. 論文標題 LnDOTA-d8, a versatile chemical shift thermometer for 2H solid state NMR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance in Chemistry	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrc.5303	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 Umegawa Yuichi, Yamamoto Tomoya, Dixit Mayank, Funahashi Kosuke, Seo Sangjae, Nakagawa Yasuo, Suzuki Taiga, Matsuoka Shigeru, Tsuchikawa Hiroshi, Hanashima Shinya, Oishi Tohru, Matsumori Nobuaki, Shinoda Wataru, Murata Michio	4. 巻 8
2. 論文標題 Amphotericin B assembles into seven-molecule ion channels: An NMR and molecular dynamics study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabo2658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abo2658	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 Tsuchikawa Hiroshi, Monji Mami, Umegawa Yuichi, Yasuda Tomokazu, Slotte J. Peter, Murata Michio	4. 巻 38
2. 論文標題 Depth-Dependent Segmental Melting of the Sphingomyelin Alkyl Chain in Lipid Bilayers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5515 ~ 5524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c00092	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 Shinya Hanashima, Ryuji Ikeda, Yuki Matsubara, Tomokazu Yasuda, Hiroshi Tsuchikawa, J. Peter Slotte, Michio Murata	4. 巻 121
2. 論文標題 Effect of cholesterol on the lactosylceramide domains in phospholipid bilayers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophys. J.	6. 最初と最後の頁 1143-1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2022.02.037	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 Hiroshi Tsuchikawa, Takuya Ono, Masaki Yamagami, Yuichi Umegawa, Wataru Shinoda, Michio Murata	4. 巻 59
2. 論文標題 Conformation and Orientation of Branched Acyl Chains Responsible for the Physical Stability of Diphytanoylphosphatidylcholine.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3929-3938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00589	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kou Minamino, Sho Hayashi, Michio Murata, Noriko Shimada Keiichi Konoki, Hiroshi Tsuchikawa
2. 発表標題 Stereochemical determination of marine toxin spirolide homologues based on efficient synthesis of the 7,6-spirocyclic imine moiety
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 RSウイルス感染症の処置および/または予防用医薬としてのヘテロシクロアルキル置換ポリヘテロアゾール誘導体	発明者 松岡 茂, 土川博史, 山田健太郎, 加藤明 良	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/025361	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------