

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05868

研究課題名(和文)天然物 juglorubin 誘導体の合成と抗C型肝炎ウイルス活性評価

研究課題名(英文) Synthesis and anti-hepatitis C virus effect of juglorubin and its derivatives

研究代表者

倉持 幸司 (Kuramochi, Kouji)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・教授

研究者番号：90408708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：天然ナフトキノ二量体であるジュグロルビンの誘導体合成、抗C型肝炎ウイルス(HCV)活性評価、作用機構解析を行った。本研究で合成した化合物の中から高い抗HCV活性を有する2種類の誘導体を見出すことができた。それら活性化合物は、核内受容体の一つである肝臓X受容体(LXR)に対してアンタゴニスト活性を有し、細胞内脂肪滴の産生を抑制した。これらの結果から、juglorubin 誘導体はLXRの阻害を介し、HCVの粒子形成の場となる脂肪滴の産生を抑制することで抗HCV活性を発揮することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、C型肝炎ウイルスの複製を阻害する誘導体を見出すことができた。非常に低濃度で抗ウイルス活性を発揮することや、宿主細胞には毒性が少ないことから、抗ウイルス剤としての実用化が期待できる。さらには抗ウイルス薬の開発で鍵となる作用機構を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Juglorubin is a natural dye isolated from the culture of *Streptomyces* sp. 3094, 815, and GW4184. It has been previously synthesized via the biomimetic dimerization of juglomycin C, a plausible genetic precursor. In this study, the derivatives of juglorubin, 1-O-acetyljuglorubin dimethyl ester and juglorubin dimethyl ester, were found to exhibit antiviral activity against hepatitis C virus (HCV) without exerting any remarkable cytotoxicity against host Huh7 cells. They also inhibited liver X receptor activation and lipid droplet accumulation in Huh7 cells. These findings suggest that 1-O-acetyljuglorubin dimethyl ester and juglorubin dimethyl ester targeted the host factors required for HCV production.

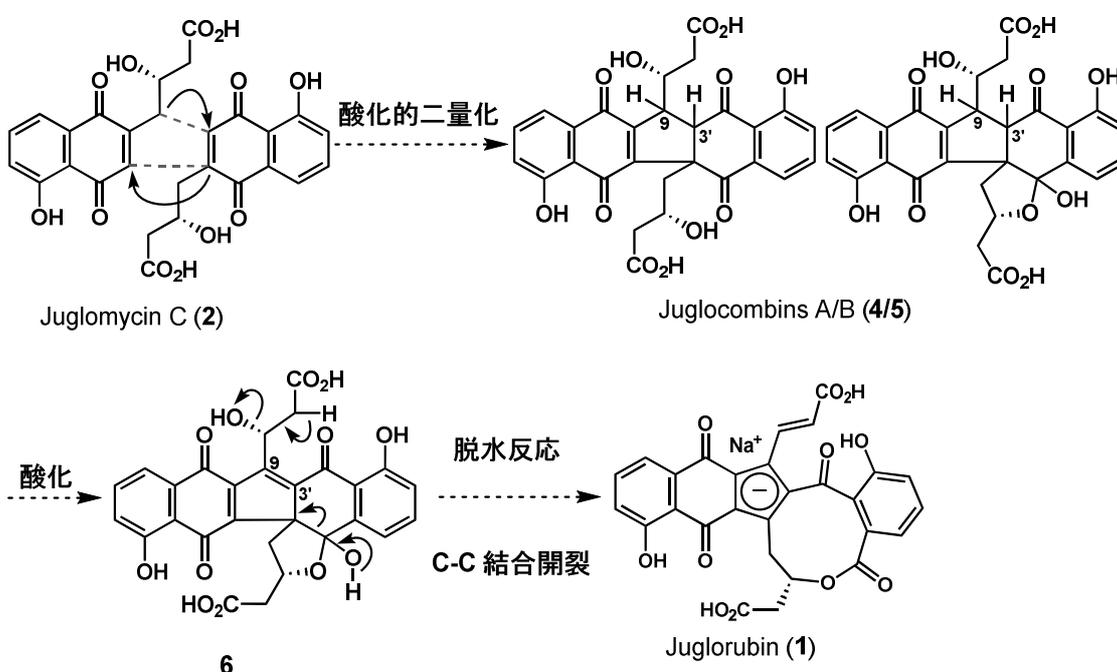
研究分野：生物有機化学

キーワード：1,4-ナフトキノ C型肝炎ウイルス ジュグロルビン

1. 研究開始当初の背景

Juglorubin (1) は 1993 年に放線菌から単離された赤色イオン性有機色素である (Lessmann, H. et al. *Z. Naturforsch.* **1993**, 48b, 672.) 構造的特徴は、5-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン、シクロペンタジエニルアニオン及び九員環ラクトンが縮環した五環性骨格であり、このような構造を有する天然物は他に類を見ない。興味深い構造を有する一方で、生物活性や機能に関する研究は、我々が研究に着手するまで行われていなかった。Juglorubin (1) の生合成は、同じ放線菌から単離されたナフトキノン天然物 juglomycin C (2) と juglocombins A/B (4/5) を経由する経路が提唱されている (【図 1】)。まず 2 分子の juglomycin C (2) が分子間-分子内連続マイケル付加反応により二量化し、生じたヒドロキノンが酸化されることで juglocombins A/B (4/5) が生じる。続いて 9, 3' 位が酸化を受け、中間体 6 が生じ、脱水反応と炭素-炭素結合開裂反応が進行することで juglorubin (1) が生合成されると考えられている。

【図 1】 Juglorubin (1) の推定生合成経路



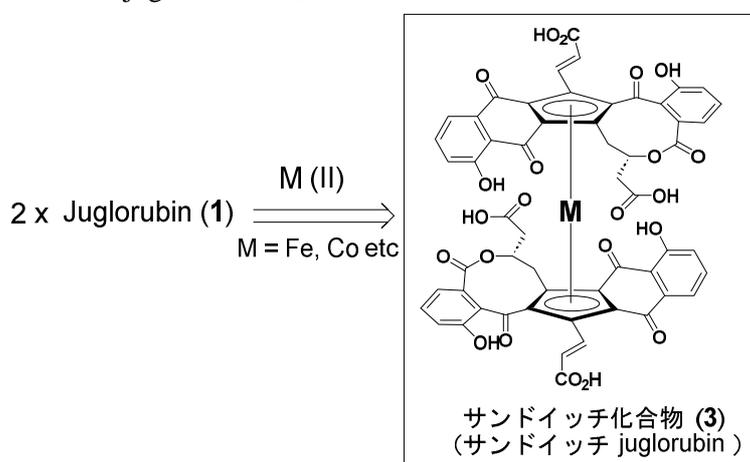
我々は、先行研究で juglomycin C (2) から juglorubin (1) へ変換する一段階合成反応を開発した (Kamo, S. et al. *Org. Lett.* **2018**, 20, 1082.)。この変換反応は、類似反応も含めてこれまで全く報告がない。特にこの反応で注目すべきは、シクロペンタジエニルアニオンを有する複雑な構造をわずか一段階で合成できる点である (【図 1】)。さらに研究協力者の渡士幸一博士 (国立感染症研究所) との共同研究で juglorubin (1) が C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖を抑制することを見出した。

2. 研究の目的

(1) Juglorubin 誘導体の創製と活性評価

Juglomycin C (2) から juglorubin (1) へ変換する一段階合成反応の基質一般性を検証するため、juglomycin C 誘導体から juglorubin 誘導体への変換を検討する。そして合成した juglorubin 誘導体の抗 HCV 活性を評価し、構造活性相関を解明する。さらに金属イオンを juglorubin (1) で挟んだサンドイッチ化合物 (3) を創製し、活性と機能の評価する (【図 2】)。

【図2】サンドイッチ juglorubin の設計



(2) Juglorubin の作用機構解析

抗ウイルス薬の開発では、薬剤の作用機構の解析が成功の鍵となる。Juglorubin の抗 HCV 活性は、核内受容体の一つである肝臓 X 受容体 (LXR) の阻害に基づくことが推測されており、本研究ではその仮説を検証することを目的とした。

(3) 新規脱酸素化反応の開発

基質合成の過程で、第三級もしくは第二級アルコールの脱酸素化反応を見出したため、本反応の基質一般性を確かめることとした。

3. 研究の方法

(1) Juglorubin 誘導体の創製と活性評価

Juglomycin C (2) から juglorubin (1) へ変換する反応では、juglomycin C (2) をリン酸緩衝液中、酸素雰囲気下でヨウ化ナトリウムと 2-メチル-2-ブテンと共に攪拌したのち、硫酸ナトリウム、酢酸、メタノールを作用させる。本研究では juglomycin C 誘導体 7 同様の変換反応を試みた(【図3】)。合成誘導体の抗ウイルス活性を渡土博士らのグループに評価していただいた。

【図3】一段階合成反応の基質



(2) Juglorubin の作用機構解析

Juglorubin 誘導体が LXR を標的とするかどうかを確かめるため、レポーターアッセイにより LXR アンタゴニスト活性を評価した。活性評価は、研究協力者の紙透伸治博士 (麻布大学) らのグループに行っていた。LXR 応答配列 (LXRE) をエンハンス領域に含むルシフェラーゼレポーター遺伝子と、補正用の β-ガラクトシダーゼ発現ベクターを Huh-7 細胞に導入した。6 時間後、誘導体と共に、LXR アゴニスト T0901317 を処理し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。また、Huh-7 細胞において誘導体が脂肪滴の産生を阻害するかどうかを、脂肪滴検出用試薬 (BODIPY493/503) を用いて定量した。脂肪滴産生阻害は渡土博士らグループに行っていた。

(3) 新規脱酸素化反応の開発

第三級もしくは第二級アルコールをアセトニトリル中、水素化ホウ素ナトリウム、塩化トリメチルシリル、ヨウ化カリウムで処理し、得られた生成物の収率を算出した。

4. 研究成果

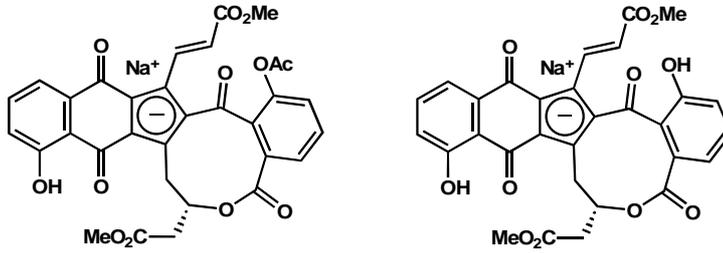
(1) Juglorubin 誘導体の創製と活性評価

種々の化合物 7 を用いて一段階合成反応を試みたが、所望の目的物は得られなかった。すなわち、基質が juglomycin C (2) のときのみ juglorubin (1) への変換反応が進行することがわかった。

そこで、juglorubin から 1-O-acetyljuglorubin dimethyl ester (7) と juglorubin dimethyl ester (8) を再合成して、抗 HCV 活性を評価することとした(【図4】)。その結果、両化合物に強い抗 HCV 活性が確認され、その IC₅₀ 値は 6.12 μM、0.047 μM であった。これら化合物は宿主細胞である Huh7.5.1 細胞には顕著な毒性を示さなかったことから、抗ウイルス薬候補と

して期待できる。

【図4】 ジュグロルビン誘導体



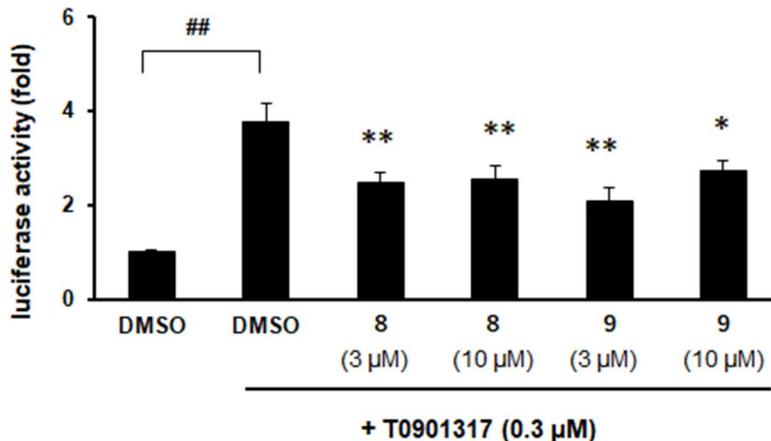
1-O-Acetyljuglorubin dimethyl ester (8) Juglorubin dimethyl ester (9)

一方、juglorubin に種々の金属イオンを作用させて、サンドイッチ化合物 (3)の創製を試みたが、所望の複合体の生成を支持するデータは得られなかった。

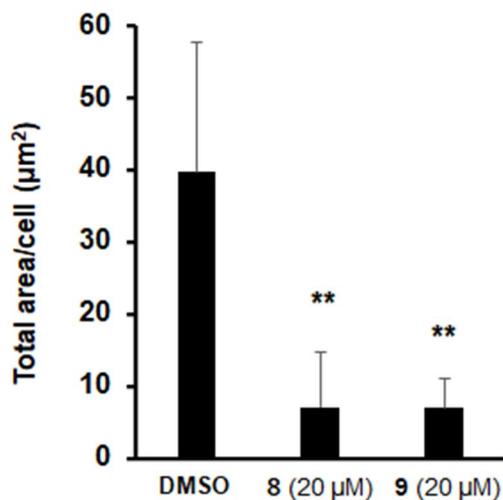
(2) Juglorubin の作用機構解析

レポーターアッセイの結果、化合物 8 と 9 は、LXR アゴニスト T0901317 で誘導されるルシフェラーゼ活性を阻害することがわかった (【図5】)。つまり、化合物 8 と 9 に LXR アンタゴニスト活性が認められた。また、両化合物には顕著な脂肪滴産生阻害活性が認められた (【図6】)。これからの結果から、juglorubin 誘導体は LXR の阻害を会介し、HCV の粒子形成の場となる脂肪滴の産生を抑制することで抗 HCV 活性を発揮することが示唆された。

【図5】 化合物 8、9 の LXR アンタゴニスト活性



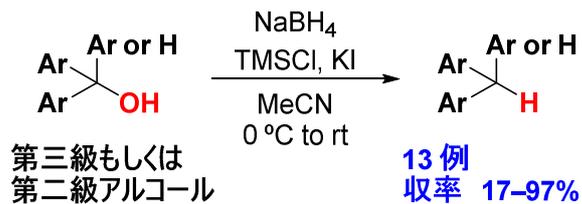
【図6】 化合物 8、9 の脂肪滴産生阻害活性



(3) 新規脱酸素化反応の開発

合計 13 種類の第三級もしくは第二級アルコールを還元条件にふしたところ、目的の生成物を 17~97%の収率で得ることに成功した(【図7】)。この条件では脱酸素化と同時に、メトキシメチル基(MOM基)や*t*-ブチルジメチルシリル基(TBS基)の脱保護も同時に進行することが大きな特徴である。

【図7】 トリアリールメタンの新規合成法



以上のように、我々は高い抗 HCV 活性を有する juglorubin 誘導体を見出すことができ、さらに作用機構解析を明らかにすることができた。また、合成研究の過程で新規な脱酸素化反応を見出し、国際誌に論文を発表することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuichi Kato, Tomoka Inoue, Yuuki Furuyama, Kenji Ohgane, Mahito Sadaie, Kouji Kuramochi	4. 巻 86
2. 論文標題 Deoxygenation of tertiary and secondary alcohols with sodium borohydride, trimethylsilyl chloride, and potassium iodide in acetonitrile.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2021.153519	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 Kohatsu Haruki, Kamo Shogo, Furuta Masateru, Tomoshige Shusuke, Kuramochi Kouji	4. 巻 5
2. 論文標題 Synthesis and Cytotoxic Evaluation of N-Alkyl-2-halophenazin-1-ones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 27667 ~ 27674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.0c04253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Haruki Kohatsu, Shogo Kamo, Takuya Hosokai, Shinji Kamisuki, Yutaro Machida, Ryota Kobayashi, Tsuneomi Kawasaki, Kenji Ohgane, Kouji Kuramochi	4. 巻 102
2. 論文標題 Synthesis, Photochemical Properties, and Cytotoxicity of 10-Alkylphenazin-2(10H)-ones.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 871~885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/COM-21-14420	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加茂 翔伍、古波津 春希、古田 将照、細貝 拓也、友重 秀介、大金 賢司、倉持 幸司
2. 発表標題 フェナジノン類の網羅的合成法と活性・物性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021 年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加茂 翔伍、椿 一典、倉持 幸司
2. 発表標題 Juglorubin および関連天然物の全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	渡土幸一 (Watashi Koichi) (40378948)	国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・総括研究官 (82603)	
研究協力者	紙透伸治 (Kamisuki Shinji) (30553846)	麻布大学・獣医学部・准教授 (32701)	

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