

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22603014

研究課題名（和文） ホオズキ成分 physalin 類の標的タンパク質同定に向けた有機合成化学的展開

研究課題名（英文） Synthetic approaches toward the identification of target proteins of physalins

研究代表者

平井 剛 (HIRAI GO)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・専任研究員

研究者番号：50359551

研究成果の概要(和文):本研究では、酸化ステロイド physalin 類の生物活性発現メカニズムを、有機合成とケミカルバイオロジーを駆使して明らかにすることを目指した。まずこれまでに合成した physalin B のかご型 DFGH 環部から、更に E 環部、及び C 環部の構築を検討した。E 環部は、予め F 環 17 位の官能基を整えた前駆体に対し、以前我々が確立したかご型構造構築法を適用することで構築でき、DEFGH 環化合物の合成に成功した。また C 環部に関しては、DEFGH 環化合物前駆体に対して 13 位及び 14 位の官能基修飾法を確立することが出来た。さらに構造活性相関も検討し、physalin B は他の酸化ステロイドとは異なる作用機序によって NF- κ B 活性化を阻害することを明らかにした。

研究成果の概要(英文): In this research grant, we intended to clarify the mode of action of oxygenated steroids, physalins, by means of organic synthesis and chemical biology. First, the constructions of E- and C-ring moieties from cage-shaped DFGH-ring compound of physalin B, whose synthetic strategy has been already established, were investigated. The synthesis of DEFGH-ring compounds were realized by adopting our original strategy to construct the unique cage-shaped skeleton as a key reaction for the precursor, which possessed an appropriate functionality at C17 on F-ring. For C-ring moiety, the establishing the strategy to form the C-C bonds at C13 or C14 of the precursor of DEFGH-ring compounds was also successful. Furthermore, structure-activity relationship study of synthetic DEFGH-ring compounds and natural products of oxygenated steroids isolated from *physalis* plants was carried out. As a result, we found that physalin B showed potent inhibitory activity for NF- κ B activation stimulated by TNF- α and have different mode of action with other oxygenated steroids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：ケミカルバイオロジー・有機合成化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：ホオズキ、ステロイド、有機合成、NF- κ B、physalin、ワンポット反応、ドミノ反応、構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

日本を含む比較的暖かい地域に分布しているホオズキ (*physalis plants*) の根は、酸漿根と呼ばれる生薬として利用されていたが、その活性本体や作用機序はまったく知られていなかった。ホオズキの苦み成分として1969年に単離・構造決定された **physalin** 類は、その複雑な構造とユニークな生物活性から関心が寄せられており (Figure 1)、2009年に発刊された *Nature Chemistry* 誌創刊号でも”synthetically challenging molecules”の1つとして取り上げられている。また近年の生物活性スクリーニングによって **physalin** 類は、A) *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍活性や抗炎症活性、B) Hedgehog/GLI を介した転写活性化の阻害、C) ホルボールエステルで活性化される NF- κ B 転写活性化の阻害、D) ユビキチン-プロテアソーム経路の阻害など多様な生物活性を示すことが報告されている。これらの活性の中で、B と D の活性は、他の化合物とは異なるプロファイルを示し、新規メカニズムを含むと考えられ、大変興味深い。さらにこれらの活性は抗ガン剤や免疫抑制剤などにつながる可能性を秘めていることから、創薬応用への道を拓くものとして期待されている。

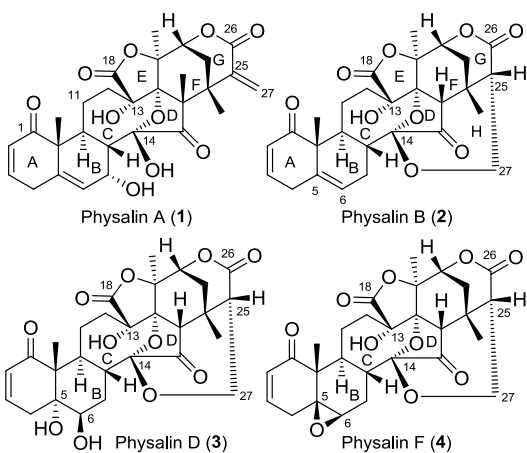


Figure 1. 代表的なPhysalin類の構造

しかし、構造決定から40年経った現在でも、その合成研究は天然物の誘導体化が報告されているのみであり、部分構造の生物活性や標的タンパク質は解明されていなかった。また、**physalin** 類の多様な生物活性から複数の結合タンパク質の存在が考えられた。このことから活性に必要な部分構造を確定し、これを含む様々な誘導体を有機合成化学的に調製することで、活性の分離や標的タンパク質同定に寄与できると考えられた。

2. 研究の目的

Physalin 類は、13,14-*seco*-16,24-cycloergostane 骨格という他に例を見ないステロイド構造を有している。さらに DEFGH 環部は、高度に酸化され複雑に縮環しており、**physalin** 類の構造上もっとも特徴的な部分構造となっている。我々は、**physalin** 特有の CDEFGH 環部が生物活性に重要と考え、まず構築の難しい DFGH 環部の“かご型”構造 **5** (Figure 2) の合成を初めて達成した。合成した **5** から CDEFGH 環部を含む様々な誘導体やプローブ分子を創製できれば、多様な活性を有する **physalin** 類の標的タンパク質を網羅的に解明し、さらに新しい生物活性物質を創出することができると考えた。そこで、**5** から E 環部と C 環部を合成する手法を確立することを本研究の第一の目的とした。また、AB 環の構築法開発にも着手し、学術的にも興味深い全合成達成も視野に入れことにした。さらに、ホオズキからの天然物の取得も検討し、合成化合物と組み合わせて、構造活性相関研究に挑むことを第3の目的とした

3. 研究の方法

上記の目的のうち C 環部構築には、これまでに合成した **5** の 14 位と 13 位に官能基を導入する必要があり、難易度が高い。合成化学の発展に寄与することも視野に入れ、14 位に関しては近年合成化学のキーワードになっている C-H 活性化反応を利用し、効率的な合成法を開発することを目的とした。

AB 環部の構築に関しては、効率面を重視し Diels-Alder 反応を適用することとした。

ホオズキから天然物の単離は、観賞用ホオズキと食用ホオズキを理化学研究所の園芸部スペースを借用し栽培することとした。これにより多様な酸化ステロイドを単離できることを期待した。合成中間体と合わせて生物活性を評価することで、より多角的な視点で **physalin** 類の標的タンパク質や作用メカニズムを絞り込むが可能になると期待した。本研究では、**Physalin** 類の特徴的な生物活性の1つである TNF- α による NF- κ B 活性化阻害に関する詳細な解析を検討することとした。

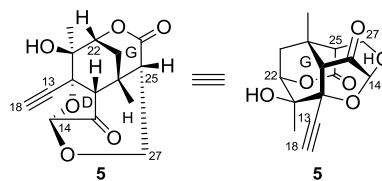


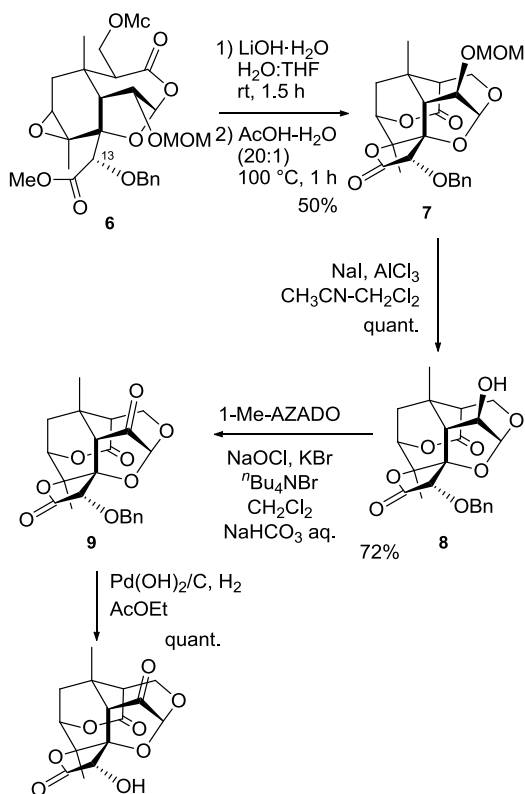
Figure 2. すでに合成しているDFGH環かご型分子**5**

4. 研究成果

1) **Physalin B** の DEFGH 環部の合成

すでに合成の完了している **5** から E 環部を構築することを検討した。しかし、かご型構造の不安定性のため、**5** のアルキン部を酸化すると、かご型構造がさらに酸化され複雑に縮環した生成物のみを与えた。そこで、**5** の前駆体のアルキン部を予め酸化し、E 環部に必要な官能基を整えた上で、かご型構造を構築することを考えた。

種々検討した結果、DEFGH 環部前駆体として **6** を合成した。これを LiOH で処理した後に酢酸中加熱すると、目的の DEFGH 環構造を有する **7** が 50% で生成した。これまでの DFGH 環合成では、望むかご型分子は H 環部が retro-oxy Michael 反応で開環したヘミアセタールとの平衡混合物として生成し、収率も 13% 程度であった。今回の **6** から **7** の変換では、**7** は速度論的に生成し、反応温度と反応時間のチューニングによって、収率を 50% まで向上させることに成功した。かご型分子 **7** は、条件を選べば分解させることなく DEFGH 環化合物 **10** に導くことが可能であった。すなわち、**7** の MOM 基を NaI と AlCl₃ で除去後、生じたアルコールを AZADO 酸化によりケトンへと変換し **9** を得た。最後に、過水素分解によって Bn 基を除去し、physalin B の DEFGH 環部に相当する **10** を得ることに成功した。本成果は、Organic Letters 誌に投稿した。



DEFGH-ring Compound (**10**)

Figure 3. DEFGH環かご型分子**10**の合成

2) C 環部および AB 環部構築法の開発

種々のかご型構造化合物を physalin 類の全合成研究で得ていくには、化合物 **10** の前駆体から ABC 環部を構築するのが理想的である。このためには、前駆体 **11** の 13 位ケトンに対する化学および立体選択的な付加反応と、14 位での C-H 挿入反応を達成する必要がある。種々検討した結果、13 位ケトンに対する付加は高立体選択的に進行する条件を確立した。また 14 位への C-H 挿入反応は、1 年半の検討の末、周辺の官能基、触媒の配位子などを種々検討し、70% で達成することが出来た。**11** のような高度に官能基化された系での C-H 挿入反応は例が少なく、合成化学的に興味深い知見となると期待される。さらに C-H 挿入後の AB 環部構築も検討した。目的の AB 環部連結体を得る Diels-Alder 反応の組み合わせはいくつか可能性が考えられるが、目的物を効率よく得るには、5-6 位および 9-10 位間で連結する必要があることがわかった。これらの知見は、全合成に有用な知見となる。

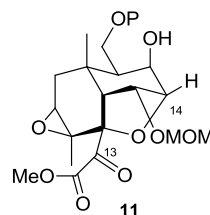


Figure 4. DEFGH環かご型分子**10**の前駆体**11**

3) 酸化ステロイドの構造活性相関研究による physalin B の作用機序研究

まず理化学研究所の畑で栽培した観賞用ホオズキから physalin 類を単離した。また、これまで天然物探索があまり進んでいなかった食用ホオズキも同時に栽培し、成分探索を検討した。その結果、幸いにも withanolide 類および perulactone 類を単離することができた。単離したこれら酸化ステロイドは、同じ AB 環部構造を持ちながら、右側の酸化構造が異なる化合物を含む。これらの天然物と合成化合物を組み合わせることで、酸化度の高い右側構造の生物活性への寄与を見積もれると考えた。

生物活性としては、TNF- α で誘導される NF- κ B 活性化の阻害活性で評価した。その結果、AB 環部構造だけでなく、右側構造も NF- κ B 活性化阻害活性に影響を与えており、withanolide 型もしくは physalin 型で顕著な阻害活性が見られた。一方、同じ AB 環部構造を有しながらも perulactone 型では阻害活性は大きく低下した。

さらに NF- κ B 活性化の鍵となる IkB α のリン酸化をこれら酸化ステロイドが阻害する

かを検討した。5-6 位にエポキシドを有する withanolide 類および physalin 類では NF- κ B 活性化阻害能と相関した IkBa のリン酸化阻害活性が見られた。しかし、5-6 位に 2 重結合を有する withanolide 類および physalin 類では、ほとんど IkBa のリン酸化を阻害しなかった。また、IkBa のリン酸化は IkBa の分解のトリガーとなる。5-6 位エポキシド誘導体は IkBa の分解を抑制したが、5-6 位 2 重結合誘導体ではほとんど IkBa の分解を抑制しなかった。このことから、5-6 位エポキシド誘導体は、IkBa のリン酸化と分解を抑制することが作用機序の 1 つと考えられるが、5-6 位 2 重結合誘導体は異なる作用機序を有すると考えられた。

そこで、IkBa のリン酸化と分解後に続くシグナル伝達である NF- κ B タンパク質のヘテロダイマー (RelA-p50/p52) の核移行と DNA 結合に対する酸化ステロイドの効果を検討した。その結果、5-6 位に 2 重結合を有する physalin B は RelA-p50/p52 の核移行と DNA 結合を抑制したが、同様に 5-6 位に 2 重結合を有する withanolide F では抑制効果は低かった。これらの結果は、physalin B では RelA-p50/p52 の核移行と DNA 結合の阻害が作用機序の 1 つであり、physalin 類の右側構造が作用機序に重要な役割を担っていることを強く示唆するものである。実際、合成化合物の NF- κ B 活性化阻害能を検討すると、Bn 体 **9** に中程度の NF- κ B 活性化阻害が認められ、さらに RelA-p50/p52 の核移行と DNA 結合を高濃度条件ではあるが抑制した。以上の結果は、酸化ステロイドの右側構造が、生物活性に寄与していることを示す重要な知見であり、physalin 類のかご型構造を足がかりに新規化合物を創製すれば、非ステロイド型の NF- κ B 阻害剤となることが期待される。今後は、合成研究と作用機序解明研究をさらに検討し、より高活性な阻害剤創製、physalin 類の標的タンパク質同定につなげて行く予定である。

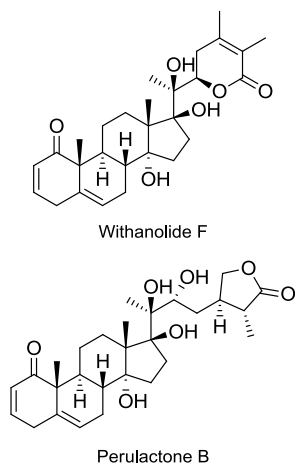


Figure 5. Withanolide類およびperulactone類

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Masaki Morita, Go Hirai, Meguni Ohkubo, Hiroyuki Koshino, Daisuke Hashizume, Keiji Maruoka, and Mikiko Sodeoka, *Org. Lett.*, 査読有, 2012, 14, 3434-3437.
- (2) Masaaki Ozawa, Masaki Morita, Go Hirai, Satoru Tamura, Masao Kawai, Ayako Tsuchiya, Kana Oonuma, Keiji Maruoka, and Mikiko Sodeoka, *ACS. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 2013, in press.

[学会発表] (計 16 件)

- (1) 森田昌樹、Diels-Alder 反応を基盤とした Physalin 類 AB 環部構築法の開拓、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 22~25 日、立命館大学
- (2) 森田昌樹、Physalin 類の特異な DEFGH 環部の合成と生物活性評価、天然物ケミカルバイオロジー地区シンポジウム、2013 年 3 月 16 日、理化学研究所、埼玉県和光市
- (3) Go Hirai、Creation of Novel Biologically Active Molecules Designed Based on Natural Products、ACP lectureship Tour、2013 年 2 月 24~3 月 2 日、Chulabhorn Research Institute, Mehidol University, Kasetsart University, Chulalongkorn University, Thailand
- (4) 平井剛、天然物を基に設計した新しい生理活性分子の合成と機能、工学院大学大学院講義「化学応用学特論 A」、2012 年 11 月 5 日、京都
- (5) Go Hirai、Synthesis of Natural Product Derivatives Which Control the Post-translational Modifications of Proteins、The 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Yarget ID and Regulation of Bioactivity、2012 年 10 月 31 日、京都
- (6) 平井剛、天然物を元に設計した新しい分子によるタンパク質リン酸化制御、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」第 2 回若手研究者ワークショップ、2012 年 10 月 30 日、大阪大学
- (7) 森田昌樹、かご型構造に焦点を当てたフィサリン類合成戦略の確立、第 3 回大津会議、2012 年 10 月 15~16 日、大津市
- (8) 森田昌樹、ドミノ型反応を活用したフィサリン類 DEFGH 環部の合成、名古屋大学-理研基幹研有機化学研究交流会、2012 年 3 月 19 日、理化学研究所、埼玉県和光市
- (9) 小沢正晃、Physalin 類縁体の単離・構造

研究者番号：30617262

- 解析および構造活性相関、第45回天然物化学談話会、2011年7月7～9日、静岡県熱川市
- (10) 森田昌樹、Physalin類 DEFGH環部の合成、第45回天然物化学談話会、2011年7月7～9日、静岡県熱川市
- (11) 森田昌樹、Physalin類の特異な DEFGH環部の合成と生物活性評価、日本化学会第91春季年会、2011年3月26～29日、神奈川大学
- (12) Go Hirai、Design, synthesis, and biological evaluation of physalins analogues、Pacifichem 2010、2010年12月15～20日、Hawaii, USA
- (13) Go Hirai、Synthesis and Biological Evaluation of DEFGH-ring System of Physalins、The 5th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-5), The 1st New phase International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (NICCEOCA-1)、2010年11月7～11日、Hsinchu, Taiwan
- (14) Go Hirai、Synthesis and biological evaluation of DEFGH-ring system of physalins、2010 RIKEN Chemical Biology International Symposium、2010年10月26～27日、理化学研究所、埼玉県和光市
- (15) 森田昌樹、ホオズキの苦味成分 physalin類 DEFGH環部の合成研究、第54回日本薬学会関東支部大会、2010年10月2日、東京薬科大学、東京都八王子市
- (16) 森田昌樹、ワンポット閉環反応を用いた Physalin 類 DEFGH環部の合成研究、第45回天然物化学談話会、2010年7月6～8日、愛知県蒲郡市

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 剛 (HIRAI GO)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・専任研究員

研究者番号：50359551

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

土屋 綾子 (TSUCHIYA AYAKO)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・客員研究員

研究者番号：80442987

(4) 研究協力者

小沢 正晃 (OZAWA MASAOKI)

独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・特別研究員