

## 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24年 5月10日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659023

研究課題名（和文） 生体膜-膜タンパク質相互作用を利用した生物機能性分子の創製

研究課題名（英文） Bioactive compounds utilizing interactions between cell membrane and membrane proteins

研究代表者

新藤 充 (SHINDO MITSURU)

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号：40226345

研究成果の概要（和文）：アポトーシス阻害剤であるボンクレキン酸（BKA）の合成法を確立し、アポトーシス阻害活性試験法も確立した。さらに種々の BKA 誘導体を合成し、細胞試験を行ったところ、アポトーシス抑制活性には3つのカルボン酸が重要であることを明らかにした。またリン酸エステル基を導入したジカルボン酸でもアポトーシス抑制効果が発現した。一方、疎水性置換基をもつジカルボン酸や炭素鎖長の大きく異なるボンクレキン酸誘導体では細胞毒性が見られた。以上の成果はアポトーシス阻害剤の開発の端緒となると期待される。

研究成果の概要（英文）：Practical total synthesis of bongkrekinic acid (BKA) was achieved via our convergent strategy, and more than 10 mg of BKA was obtained. Based on these results, the BKA derivatives were also synthesized. We also established an assay protocol for staurosporin-induced apoptosis inhibitory activity of the HeLa cells. For apoptosis inhibitory activity, three carboxylic acid groups of BKA were found to be important. The analogues having only two carboxylates showed cell toxicity. The phospholipid-containing dicarboxylic acid analogues had an inhibitory activity of apoptosis. These results would give a clue for development of more efficient and easily available novel apoptosis inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

我々はアポトーシスに深く関わりとされるミトコンドリア膜タンパク質の**アデニンヌクレオチド輸送担体 (ANT)**に着目し、その阻害剤である**ボンクレキン酸**をベースとした細胞の機能制御に取り組んでいる。ANTの機能がボンクレキン酸により阻害される

と ATP の生産が抑制される。一方、ボンクレキン酸は細胞に作用させるとアポトーシスを阻害することが近年判明し、アポトーシス研究に重要な生化学ツールとして市販されている。しかしその活性プロファイルを明らかにするにはあまりに高価 (1万円/0.1mg) であり、大量入手も事実上困難である。従っ

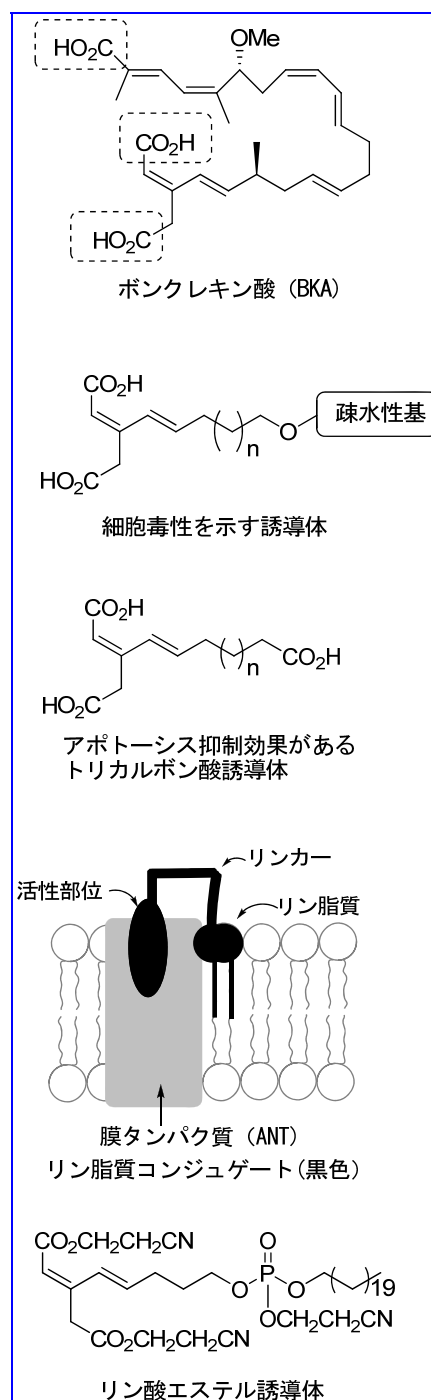
て、ボンクレキン酸の阻害機構を含めた活性プロファイルのほとんどが未解明である。ボンクレキン酸の有機合成は30年前に1報のみ報告があったが十分量を合成できる手法ではない。我々は最近、ボンクレキン酸の大量合成法の開発に成功したが (*TL*, 2009, 4164) 十分量を合成するにはいくつか改良点があった。

## 2. 研究の目的

我々はボンクレキン酸の合成法を確立すること、それに基づき構造活性相関を明らかにし、さらに有効かつ合成容易な阻害剤を開発することを将来的な目標としているが、その中でも本研究は ANT がアニオン性リン脂質であるカルジオリピンとの親和性が高く脂質二重膜内で強く安定化されている事実に着目し、アニオン性リン脂質とボンクレキン酸の活性部位とをリンカーで結合させた **リン脂質コンジュゲート阻害剤の創製** を目的とした。この分子は膜内で ANT とリン脂質部分で強く相互作用 (**膜タンパク質-生体膜間相互作用**) するとともに、ボンクレキン酸の活性部位で ANT と結合することで、強い分子認識能とアポトーシス阻害活性を示すことを期待し分子設計したものである。

## 3. 研究の方法

アポトーシス阻害活性を測定するためには評価系の確立が必須である。そのためには新規阻害剤のみならず、コントロールとなるボンクレキン酸自体が十分量必要となる。そこでまず、ボンクレキン酸の実用的合成法の確立を目指した。次にこの合成ボンクレキン酸を用いて細胞試験における評価系の確立を行った。さらにボンクレキン酸の構造活性相関を明らかにすべく、ボンクレキン酸およびその誘導体を合成し、その細胞試験により細胞死制御活性について精査した。ジカルボン酸が ANT への阻害作用に必須であると過去の我々の実験から推測されたので、以下の誘導体の合成を計画した。①疎水性置換基を直鎖末端に持つジカルボン酸。疎水性置換基および直鎖炭素の炭素長を種々変換した。②カルボン酸は細胞膜透過性に乏しい。そこで①で合成したジカルボン酸のうち1位をエステル化した化合物を合成した。③BKA はトリカルボン酸であることから、①の疎水性置換基をカルボン酸に変換したトリカルボン酸誘導体を合成した。④①の疎水性置換基をリン酸エステルもしくはリン脂質に置換した化合物の合成を計画した。



## 4. 研究成果

ボンクレキン酸の合成と評価系の確立：我々は既にボンクレキン酸の合成法を見出しているが、十分量の合成に達していなかった。そこで、条件の最適化を徹底的に行った。また後処理法の改善と順相カラム (クロロホルム-メタノール溶媒) を用いた HPLC 精製により精製法も解決し、十ミリグラム単位 (時価 100 万円相当) での純粋な BKA の合成法を確立することができた。

このサンプルを指標にしてアポトーシス阻

害作用の評価系を検討し、HeLa 細胞にスタウロスポリンでアポトーシスを誘導する系を確立した。この段階でボンクレキンの EC50 は 80  $\mu\text{M}$  であることを明らかにした。また、細胞毒性試験を行ったところ、ほとんど毒性は観察されなかった。ボンクレキンの細胞作用に対する報告は散見されていたが、このような系統的な試験結果は報告例がない。次に、疎水性置換基を直鎖末端に持つジカルボン酸を合成し細胞試験を行った。その結果、比較的強い細胞毒性が発現することが見出された。脂溶性炭素鎖の炭素長と細胞毒性に相関があり、脂溶性が高いほど毒性が高く、これは非特異的結合によるものと推測された。また、エステル化するとさらに毒性が強くなることも明らかとなり、特にメチルエステルの効果が高いことが分かった。一方、炭素鎖末端にカルボン酸を付与したトリカルボン酸とすると細胞毒性は消滅し、アポトーシス阻害効果が見出された。その際の炭素鎖長も重要であり、BKA と炭素鎖長が近いものほど活性が強く、短いものや長いものは効果がなかった。膜タンパク質と相互作用する構造単位として新たな知見である。

また、イソ BKA への異性化の原因となる 23 位のメチレンの水素の pKa を上げるために、1 炭素伸長した BKA 誘導体も合成したが、強い細胞毒性が発現した。また、ミトコンドリア膜の特性を鑑み、リン脂質を末端に導入した BKA 誘導体を合成しようとしたが、安定性に問題が生じたために、より単純な構造のリン酸エステルを導入した。その結果、まだ予試験の段階ではあるがアポトーシス阻害効果が観察された。膜透過性やミトコンドリア膜への親和性などの点で有効に作用したと考えられる。

以上の結果から、1 位と 22 位のカルボン酸は阻害活性に必須であり、24 位はアルコールでも置換可能であることが明らかとなった。

最後に、リン脂質と結合した誘導体の合成の予備試験として長鎖アルコールと BKA 誘導体（末端アルコール）とのリン酸エステルの合成を行った。この化合物は加水分解されやすく不安定であるためジエステルの形で単離し活性試験を行った。その結果、本化合物もアポトーシス阻害に有効であることがわかった。以上の知見は合成容易かつより効果的なアポトーシス阻害剤開発の起爆剤となると期待される。

## 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 12 件)

### ① Stereoselective Synthesis of Tetrasubstituted

Alkenes via Torquoselectivity-Controlled Olefination of Carbonyl Compounds with Ynolates, Shindo, M.\*; Matsumoto, K. *Top. Curr. Chem.* in press. 査読有

- ② Palladium-Catalyzed Fluoride-Free Cross Coupling of Intramolecularly Activated Alkenylsilanes and Alkenylgermanes: Synthesis of Tamoxifen as a Synthetic Application Matsumoto, K.; Shindo, M.\* *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 642-650. 査読有
- ③ Efficient Synthesis of Dissymmetric Malonic Acid S,O-Esters via Mono-alcoholysis of Symmetric Dithiomalonates under Neutral Conditions, Matsuo, K.; Shindo, M.\* *Org. Lett.* **2011**, 13, 4406-4409. 査読有
- ④ Stereoselective synthesis of  $\beta$ -glycosyl esters of *cis*-cinnamic acid and its derivatives using unprotected glycosyl donors, Matsuo, K.; Nishikawa, K.; Shindo, M.\* *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 5688-5692. 査読有
- ⑤ Efficient Synthesis of Karrikinolide via Cu(II)-Catalyzed Lactonization, Matsuo, K.; Shindo, M.\* *Tetrahedron* **2011**, 67, 971-975. 査読有
- ⑥ (-)-Xanthatin selectively induces GADD45 $\gamma$  and stimulates caspase-independent cell death in human breast cancer MDA-MB-231 cells, Takeda, S.; Matsuo, K.; Yaji, K.; Okajima-Miyazaki, S.; Harada, M.; Miyoshi, H.; Okamoto, Y.; Amamoto, T.; Shindo, M.; Omiecinski, C. J.; Aramaki, H.\* *Chemical Research in Toxicology* **2011**, **24**, 855-865. 査読有
- ⑦ Efficient Synthesis of Karrikinolide via Cu(II)-Catalyzed Lactonization, Matsuo, K.; Shindo, M.\* *Tetrahedron* **2011**, 67, 971-975. 査読有
- ⑧ Construction of a fully substituted cyclopentenone as the core skeleton of stemonamide via a Nazarov cyclization, Yaji, K.; Shindo, M.\* *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 5469-5472. 査読有
- ⑨ Total Synthesis of Xanthanolides, Matsuo, K.; Ohtsuki, K.; Yoshikawa, T.; Shishido, K.; Yokotani-Tomita, K.; Shindo, M.\* *Tetrahedron* **2010**, 66, 8407-8419. 査読有
- ⑩ Cu(II)-Catalyzed Acylation by Thiol Esters Under Neutral Conditions: Tandem Acylation-Wittig Reaction Leading to a One-Pot Synthesis of Butenolides, Matsuo, K.; Shindo, M.\* *Org. Lett.* **2010**, 12, 5346-5349. 査読有
- ⑪ Total Synthesis of ( $\pm$ )-Xanthocidin using FeCl $_3$ -Mediated Nazarov Reaction, Yaji, M.;

Shindo, M.\* *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9808-9813. 査読有

- ⑫ ミトコンドリアをターゲットとするアポトーシス阻害剤, 新藤充、篠原康雄, 化学と生物, **2010**, 48(12), 817-820. 査読無

[学会発表] (計 38 件)

- ① アポトーシス阻害活性を示すボンクレキシン酸及び類縁体合成と構造活性相関研究、森脇拓也、奥田勝博、松本健司、新藤充、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ② ボンクレキシン酸搭載 MITO-Porter の構築およびミトコンドリア送達・抗アポトーシス効果の検証、中村宏平、山田勇磨、古川亮、河村恵理子、奥田勝博、新藤充、原島秀吉、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ③ フローリアクターによるイノラートの常温迅速生成、梅津智、新藤充、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ④ Claisen 転位を利用した多置換共役ジエンの立体選択的合成、松本健司、新藤充、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ⑤ 細胞の生死を制御する有機小分子の合成と生物活性、新藤充、日本薬学会第 132 年会シンポジウム「ミトコンドリアへの薬物の作用と創薬について考える」、2012 年 3 月 29 日、北海道大学 (招待講演)
- ⑥ Stemonamide の合成研究、崔香花、西川慶祐、八道健太郎、新藤充、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ⑦ (-)Xanthatin の第二世代全合成、小谷内邦吉、松本健司、新藤充、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ⑧ イノラートを用いた Cassiol の全合成研究、中村信仁 1、西川慶祐 2、松本健司 2、新藤充、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ⑨ S, S'-ジチオマロン酸エステルの非対称アミド化反応の開発、和宇慶久史、松尾和真、松本健司、新藤充、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 28-31、札幌
- ⑩ 徳島産化学とその展開、新藤充、有機合成薬学シンポジウム、2012 年 3 月 9 日、徳島大学 (依頼講演)
- ⑪ Electrocyclic Reactions Controlled by Torquoselectivity, Mitsuru Shindo, The 4th French-Japanese Workshop on Computational Methods in Chemistry, 2012.3.5-6, 福岡県志賀島 (依頼講演)
- ⑫ イノラートによる精密有機合成、新藤充、日本プロセス化学会 2011 ウィンターシンポジウム、東京大学、2011 年 12 月 9 日 (招待講演)
- ⑬ Effect of Simplified Bongkreki Acid Derivatives on Staurosporine Induced Apoptosis, Katsuhiko Okuda, Keisuke Hasui, Satoshi Muroshita, Takuya Moriwaki, Kenji Matsumoto, Mitsuru Shindo, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS11), 2011.11.29-12.2, 東京
- ⑭ Olefination with Ynolate using continuous-flow reactors, S. Umezu, T. Yoshiiwa, M. Shindo, the 13<sup>th</sup> Cross Straits Symposium on Materials, Energy and Environmental Engineering, 2011, 11. 23-24, Fukuoka
- ⑮ ボンクレキシン酸の効率的全合成と構造活性相関研究、松本健司、森脇卓也、蓮井啓祐、佐藤幸子、室下敏、奥田勝博、安部真人、新藤充、第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム、2011.11.7-8、徳島
- ⑯ Cell Death Controlling Molecules, Mitsuru Shindo, Bio-inspired approaches: Micro- and Nano Architectures, Materials & Imaging, France-Japan Workshop, 2011.10.11-12, Bordeaux, France
- ⑰ Efficient Olefination of Esters with Ynolates, 梅津智、新藤充、国際プロセス化学 The 2nd International Symposium on Process Chemistry, 2011.8.11、国立京都国際会館
- ⑱ フローリアクターを用いたイノラートの生成と反応、梅津智、吉岩俊也、新藤充、第 48 回化学関連支部合同大会、2011.7.9、北九州国際会議場
- ⑲ 細胞死を制御するボンクレキシン酸の構造活性相関研究、森脇拓也、蓮井啓祐、奥田勝博、松本健司、新藤充、第 48 回化学関連支部合同大会、2011.7.9、北九州国際会議場
- ⑳ 二次軌道相互作用により制御されるカルボニルのオレフィン化反応、新藤充、第 99 回有機合成シンポジウム、慶応大学薬学部、2011 年 6 月 15 日 (受賞記念講演)
- 21 カルボニルの高度オレフィン化反応とその展開、新藤充、第 48 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場 2011 年 7 月 9 日 (依頼講演)
- 22 Olefination of Carbonyl Compounds with Ynolates, Mitsuru Shindo, 14th Asian Chemical Congress 2011, Bangkok, Thailand, Queen Sirikit National Convention Center, 5-8 September 2011 (招待講演)
- 23 チオエステルによる中性条件下での触媒的アシル化反応、新藤充、2011 年日本化学会西日本大会、徳島大学、2011 年 11 月 13 日 (依頼講演)
- 24 Efficient Olefination of Esters with Ynolates, 梅津智、新藤充、The 2nd International Symposium on Process

- Chemistry, 2011. 8. 11, 国立京都国際会館.
- 25 高速ナザロフ反応を利用した  $\alpha$ -exo-メチレンシクロペンテノンの新規合成法と (±)-xanthocidin の全合成、八道 健太郎、新藤 充、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 30、ツインメッセ静岡 (静岡市)
  - 26 イノラートによるエステルのおレフィン化ーカルボニル  $\alpha$  位の置換基効果ー、梅津 智、新藤 充、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 30、グランシップ (静岡市)
  - 27 Tandem Cu(II)-catalyzed acylation Wittig-lactonization reaction: Efficient synthesis of kalikinolide K. Matsuo; M. Shindo, Pacificchem2010, 2010.12.15-20, Honolulu, Hawaii
  - 28 Torquoselective Olefination with Ynolates, Shindo, M. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacificchem 2010), Honolulu, Hawaii, USA, 2010.12.15-20 (招待講演) .
  - 29 銅触媒を用いる対称マロン酸ジチオエステルの非対称化反応の開発、○松尾 和真、新藤 充、日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 30、グランシップ (静岡市)
  - 30 「フローリアクターを利用したイノラートの生成と反応」、新藤 充、反応集積化の合成化学、第 3 回若手シンポジウム、福岡 2011. 2. 5 (招待講演) .
  - 31 「植物の自己防衛機能分子は環境調和型農薬となるか?」、新藤 充、第 4 回エコファーマシンポジウム、熊本、2010. 2. 8 (招待講演) .
  - 32 Tandem Cu(II)-catalyzed acylation Wittig-lactonization reaction: Efficient synthesis of kalikinolide K, Matsuo, K.; Shindo, M. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacificchem 2010), Honolulu, Hawaii, USA, 2010.12.15-20.
  - 33 イノラートによる  $\alpha$ -アミノエステルの効率的オレフィン化反応、第 27 回日本薬学会九州支部大会、梅津智、新藤 充、2010.12.11-12、長崎大
  - 34 Cu(II)-Catalyzed Acylation by Thiol Esters Under Neutral Conditions. Tandem Acylation-Wittig Reaction Leading to a One-Pot Synthesis of Butenolides, Shindo, M. The 5<sup>th</sup> International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-5), Shinju, Taiwan, 2010.11.7-11.
  - 35 イノラートを用いたエステルのオレフィン化におけるカルボニル  $\alpha$  位の置換基効果、梅津智、新藤 充、第 22 回若手研究者のためのセミナー、2010.11.13、九大、福岡
  - 36 酸触媒高速ナザロフ反応の開発と生理活性天然物の合成研究、八道健太郎、新藤 充、第 52 回天然有機化合物討論会、2010.9.29-10.1 (静岡)
  - 37 多機能性銅触媒アシル化反応を鍵とするワンポットラクトン化反応の開発、松尾和真、新藤 充、日本プロセス化学会 2010 サマーシンポジウム 1P-18, 2010.7.15 (東京)
  - 38 エステルのオレフィン化におけるカルボニル  $\alpha$  位の置換基効果、梅津智、新藤 充、第 47 回化学関連支部合同九州大会 5-5.102、2010.7.10、北九州国際会議場
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/dv01/contents/research2.html>
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
新藤 充 (SHINDO MITSURU)  
九州大学・先導物質化学研究所・教授  
研究者番号：40226345
- (3) 連携研究者  
篠原康雄 (SHINOHARA YASUO)  
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授  
研究者番号：60226157