

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590024

研究課題名(和文) アクチンを標的とする抗腫瘍性ペプチドRA-VIIのファルマコフォアの解明と応用

研究課題名(英文) Exploration of the pharmacophore of antitumor peptide RA-VII that interacts with actin

研究代表者

一柳 幸生 (Hitotsuyanagi, Yukio)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80218726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンに作用する*Rubia*属植物由来抗腫瘍性環状ペプチドRA-VIIの水溶性の改善、ファルマコフォアの解明を目的にアザシクロイソジチロシンアナログ、ペプチド側鎖間架橋アナログ、フッ化イソジチロシンアナログの合成を行い、シクロイソジチロシンの芳香環の配向が活性発現に重要であること、芳香環の電子密度が高くなると細胞毒性が低下することを示した。*R. cordifolia*よりRA系ペプチドの生合成経路解明の手掛りとなる新規二量体RA系ペプチドを単離した。また、化合物ライブラリー構築を目的に*Stemona tuberosa*、*Eurycoma longifolia*より16種の新規化合物を単離した。

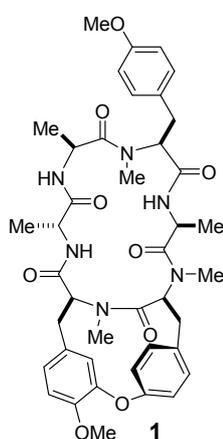
研究成果の概要(英文)：Aza-cycloisodityrosine-, conformationally constrained side chain-bridged-, and fluorinated cycloisodityrosine analogues of RA-VII, a *Rubia* plant-origin antitumor cyclic peptide, were synthesized to improve the water solubility and explore the pharmacophore of RA-VII. The results indicated that the orientation of the aromatic rings of the cycloisodityrosine moiety is important to express the cytotoxic activity and increase of the electron density of those aromatic rings decreases the activity. A new dimeric RA-series peptide was isolated from *R. cordifolia*, whose structure gave us some information about the biosynthesis of this series of peptides. In addition, sixteen new compounds were isolated from *Stemona tuberosa* and *Eurycoma longifolia* to develop chemical library for the screening assay.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗腫瘍活性 RA-VII アクチン 環状ペプチド アナログデザイン ペプチド合成 細胞毒性 配座解析

1. 研究開始当初の背景

動物細胞の細胞骨格（微小管、中間径フィラメント、アクチン）は、いずれも小さなユニットが重合して出来る繊維状の構造体である。これらの細胞骨格のうち、微小管は制がん剤の標的として古くから認識され、既にビンクリスチン、タキソールなどが制癌剤として開発され、臨床的に用いられている。一方、これまでアクチンを標的とする制がん剤は開発されていないが、異なる作用機序の薬剤を組み合わせることで用いること（多剤併用）が一般的である癌化学療法の見方から、アクチンを標的とする制癌剤を開発することは癌化学療法において新たなスキームを提供することとなり、重要な意義を持つ。申請者らのグループは、アカネ科植物より単離・構造決定された RA-VII (1) がアクチンに作用することを見出している。



2. 研究の目的

(1) 《水溶性の改善》アクチンに作用する RA 系ペプチド化合物は強い抗腫瘍活性を示す有望なリード化合物であるが、医薬品として開発するうえで毒性が高いことと併せ、水溶性が低いことが問題となっていた。そこで本研究では、RA 系ペプチド化合物の水溶性を改善したアナログをデザインして合成する。

(2) 《配座固定アナログ》RA 系ペプチド化合物は原料植物中の含量が少ない（約 0.01%）ため、医薬品として開発するうえで、安定に原体を供給する方法を確立することが求められていた。そこで、構造を単純化して簡便に

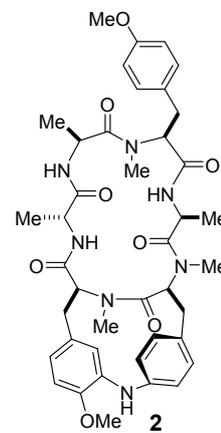
合成による供給が可能な RA アナログをデザインするために、活性配座構造を効果的に固定する方法を確立して活性発現に重要な芳香環部位の空間配置を特定する。

(3) 《電子密度を低下させたアナログ》RA 系ペプチドの活性発現は、3カ所のチロシン残基の芳香環が重要であると考えられる。そこで、活性発現に対する芳香環の電子的効果を解明するため、芳香環の電子密度を低下させたアナログを合成して細胞毒性活性を評価することにより、活性発現における芳香環の機能を解明する。ここで得られる知見は、前項(2)の目的と併せて、合成が困難なシクロイソジチロシンを、構造を単純化した他のユニットで置き換えた RA アナログをデザインするうえで有益と考えられる。

(4) 《新規化合物の探索》植物より抗腫瘍活性を示す（特にアクチンに作用する）低分子天然有機化合物をスクリーニングするための新規化合物ライブラリーの構築を行う。

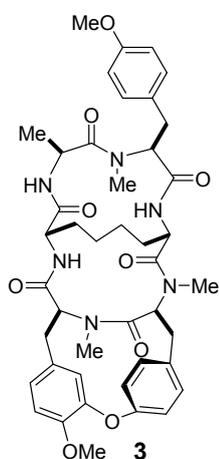
3. 研究の方法

(1) 《水溶性の改善》RA-VII (1) の立体構造を維持したまま水溶性を改善するために、シクロイソジチロシンのエーテル酸素原子を窒素原子で置き換えたアナログ(2)を設計した。2 は 1 と立体空間的にはほぼ等価な構造と見做すことができる。また、塩基性窒素原子を有するため、生理学的に許容しうる酸化化合物と水溶性の塩を形成できると考えられる。2 のアザシクロイソジチロシンユニットは、L-チロシンより合成可能な 3 位に

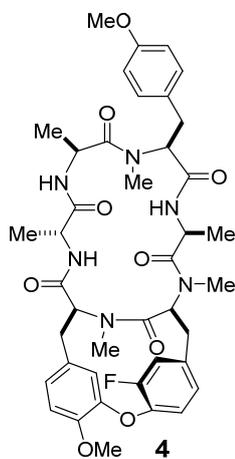


ボロン酸基を有するチロシン誘導体と、4-アミノ-L-チロシン誘導体を縮合してジペプチドとしたのち、アミノ基窒素原子と、ボロン酸基が結合した炭素原子との間でカップリング反応を行うことにより合成できると考えた。次にテトラペプチドを連結したのち、残基1、6間でマクロ環化反応を行い、**2**を合成することとした。

(2)《配座固定アナログ》アナログ**3**の構造に示すように、残基1、4間をトリメチレン基で架橋することで、18員環の配座構造の固定を行うこととした。L-アリルグリシン(allylGly)のN末側にペプチド鎖を伸長し、Boc-allylGly-Ala-N,O-diMe-Tyr-allylGly-OHを得る。アカネ根より単離精製して得たRA-VIIの滅成反応により供給されるシクロイソジチロシンと結合後、マクロ環化反応により[allylGly-2,allylGly-4]RA-VIIを得て、分子内オレフィンメタセシス反応による環化後二重結合を還元して**3**を合成することとした。



(3)《電子密度を低下させたアナログ》シクロイソジチロシンの芳香環の電子密度を低下させるため、Tyr-5残基の芳香環のε位をフッ素原子で置換した**4**をデザインした。L-チロシンより誘導した**3**位にボロン酸基を有するチロシン誘導体と、3-フッ化-L-チロシン誘導体を縮



合してジペプチドとしたのち、フェノールの酸素原子と、ボロン酸基が結合した炭素原子との間でカップリング反応を行うことにより、フッ化シクロイソジチロシンを合成する。テトラペプチドを連結したのち、残基1、6間でマクロ環化反応を行い、**4**を合成することとした。

(4)《新規化合物の探索》RA系ペプチド化合物の3次元的な構造—活性相関情報を得るために、*Rubia cordifolia*より新規RA系ペプチドを探索する。また、抗腫瘍活性物質探索用ライブラリー構築には、新奇性の高い構造を有する化合物を見出す可能性を期待してタマビヤクブ *Stemona tuberosa* およびナガエガサ *Eurycoma longifolia* について成分検索を行うこととした。単離した化合物については、機器スペクトル解析および化学的手法により構造決定を行う。

4. 研究成果

(1)《水溶性の改善》合成に成功したアナログ**2**は非晶質性化合物で、RA-VII(**1**)に比べて種々の極性溶媒に対する溶解性が大きく改善した。また、**2**の最安定配座構造を分子モデリングにより**1**の結晶構造と比較したところ、ほぼ完全に一致するほどの類似性を示した(図1)。一方、**1**と**2**の¹³C-NMRスペクトルの化学シフト値の比較から、窒素原子への置換により、芳香環の電子密度がRA-VIIに比べて高

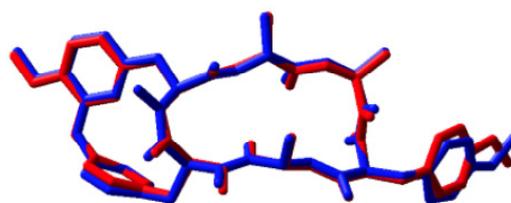


図1 RA-VIIの結晶構造(赤)とアナログ**2**のエネルギー最小化構造(青)の重ね合わせ

くなっていることが確認できた。**2**の細胞毒性活性 (HL-60、HCT-116) は、RA-VIIに比べ約1/5～1/7程度に低下していた。従って、シクロイソジチロシンの芳香環の電子密度を上昇させると、細胞毒性活性は低下することが示された。

(2) 《配座固定アナログ》合成した架橋アナログ **3** は、RA-VII (**1**)に比べて細胞毒性活性 (HL-60、HCT-116) は大きく低下 (1/20,000以下) していた。二次元 NMR スペクトルの解析から、**1** と **3** の残基1-4のペプチド骨格の配座構造はかなり類似しているが、シクロイソジチロシン部位の配座構造は大きく異なることが解り、シクロイソジチロシンの芳香環の配向が活性発現に重要であることが示された (図2)。

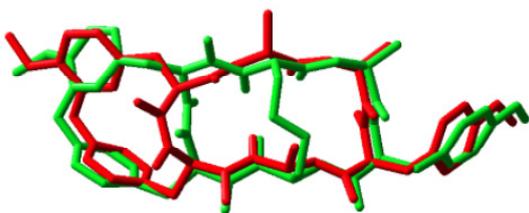
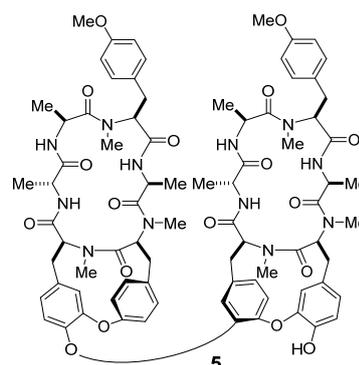


図2 RA-VII の結晶構造 (赤) とアナログ **3** のエネルギー最小化構造 (緑) の重ね合わせ

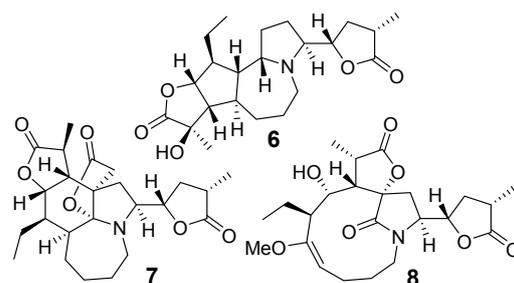
(3) 《電子密度を低下させたアナログ》RA-VII の Tyr-5 残基の芳香の一方の ϵ 位にフッ素原子を導入したアナログ **4** の合成法を確立した。また、Tyr-5 残基のもう一方の ϵ 位にフッ素原子をもつ異性体の合成に必要なシクロイソジチロシンを合成する反応条件を見出すことができた。

(4) 《新規化合物の探索》*R. cordifolia* より5種の新規ペプチドを、*S. tuberosa* より11種の新規アルカロイドを、*E. longifolia* より5種の新規カシンノイド化合物を得た。これらのうち *R. cordifolia* より単離した **5** は、deoxybouvardin と allo-RA-V がそれぞれの

シクロイソジチロシン間でジフェニルエーテル結合したユニークな構造を有しており、**5** が



植物より単離されたことは、RA系化合物の生合成過程において、シクロイソジチロシンのジフェニルエーテル結合が18員環ペプチド鎖の形成後に構築されることを示唆するものである。**5** は全合成により絶対配置を含めて構造を決定した。一方、*S. tuberosa* より得られた stemona-amine C (**6**)、E (**7**)、stemona-lactam M (**8**)は、いずれも新規骨格を有するアルカロイドであった。**6** と **8** の相対配置はX線結晶解析により決定し、**6** についてはそのVCDスペクトルをDFT計算値と比較することにより絶対配置を決定した。一方、**7** は二次元 NMR スペクトルの解析により相対配置を決定した。



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4件)

- ① Yukio Hitotsuyanagi, Akihiro Miyazawa, Taka-aki Hinosawa, Yoshie Nakagawa,

Tomoyo Hasuda, Koichi Takeya, Azacycloisodityrosine Analogue of RA-VII, an Antitumor Bicyclic Hexapeptide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, Vol.23, 2013, 6728–6731

DOI:10.1016/j.bmcl.2013.10.033

- ② Yukio Hitotsuyanagi, Genta Shigemori, Haruhiko Fukaya, Maho Hikita, Shu Zhu, Katsuko Komatsu, Koichi Takeya, Stemona-amines C–E, New Alkaloids from *Stemona tuberosa*, *Tetrahedron Lett.*, 査読有, Vol.54, 2013, 6995–6998
DOI:10.1016/j.tetlet.2013.10.014
- ③ Yukio Hitotsuyanagi, Haruhiko Fukaya, Erika Takeda, Shoko Matsuda, Yuka Saishu, Shu Zhu, Katsuko Komatsu, Koichi Takeya, Structures of Stemona-amine B and Stemona-lacams M–R, *Tetrahedron*, 査読有, Vol.69, 2013, 6297–6304
DOI:10.1016/j.tet.2013.04.136
- ④ Haruhiko Fukaya, Yukio Hitotsuyanagi, Yutaka Aoyagi, Zhu Shu, Katsuko Komatsu, Koichi Takeya, Absolute Structures of Stemona-Lactam S and Tuberostemospiroline, Alkaloids from *Stemona tuberosa*, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol.61, 2013, 1085–1089
DOI:10.1248/cpb.c13-00454

[学会発表] (計 12 件)

- ① 竹谷孝一、*Stemona sessilifolia* より得られたアルカロイド類の構造、日本生薬学会第 59 回年会、2012 年 9 月 (千葉)
- ② 重森源太、ビャクブコンより得られた 2 種の新規アルカロイドの構造、日本薬学会第

133 回年会、2013 年 3 月 28 日 (横浜)

- ③ 土屋堯之、茜草根より単離した新規 RA 二量体化合物の構造、日本薬学会第 133 回年会、2013 年 3 月 29 日 (横浜)
- ④ 深谷晴彦、ビャクブコンより得られた新規 stemoninoamide 型アルカロイドの絶対構造について、日本薬学会第 133 回年会 2013 年 3 月 28 日 (横浜)
- ⑤ 一柳幸生、茜草根より単離した新規 RA 系ペプチド配糖体について、日本生薬学会第 60 回年会、2013 年 9 月 8 日 (札幌)
- ⑥ 深谷晴彦、ビャクブコンより得られた新規 croomine 型アルカロイドの絶対構造について、日本生薬学会第 60 回年会、2013 年 9 月 8 日 (札幌)
- ⑦ 高橋侑一、Rubiyunnanin A の合成研究、日本薬学会第 134 回年会、2014 年 3 月 29 日 (熊本)
- ⑧ 深谷晴彦、Stemona-amine C、D の絶対構造について、日本薬学会第 134 回年会、2014 年 3 月 29 日 (熊本)
- ⑨ 深谷晴彦、ビャクブコンより得られた新規 stemoninoamide 型アルカロイドの絶対構造について、日本生薬学会第 61 回年会、2014 年 9 月 13 日 (福岡)
- ⑩ 関谷好至、*Stemona tuberosa* より得られた 4 級アルカロイドの構造、日本生薬学会第 61 回年会、2014 年 9 月 13 日 (福岡)
- ⑪ 伊藤明子、*Eurycoma longifolia* から得られた新規カッシノイドの構造、日本生薬学会第 61 回年会、2014 年 9 月 13 日 (福岡)
- ⑫ 加藤光伸、*Eurycoma longifolia* から得られた新規カッシノイド配糖体の構造、日本薬学会第 135 回年会、2015 年 3 月 27 日 (神戸)

6. 研究組織

(1)研究代表者

一柳 幸生 (HITOTSUYANAGI Yukio)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号： 80218726