

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26282208

研究課題名(和文) 環状デブシペプチド天然物を主軸とする創薬化学基盤技術開発

研究課題名(英文) Development of drug discovery chemistry centered on cyclodepsipeptide natural products

研究代表者

土井 隆行 (Doi, Takayuki)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90212076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：環状デブシペプチド天然物の類縁体を固相法を用いたペプチド伸長と大員環環化により効率よく合成し、三次元構造を含む構造活性相関を明らかにした。アプラトキシンAの毒性の原因構造を置き換えた16個の類縁体を合成した。中でもアプラトキシンM16は10種のガン細胞中8種に対してアプラトキシンAに勝るとも劣らない細胞増殖抑制作用を示した。また、デストラキシンEおよびBについてコンビナトリアル合成を行い、それぞれ18個、64個の類縁体を合成した。その結果、二つの分子内水素結合をとる三次元構造が破骨細胞の形態変化による骨吸収抑制活性に重要であることを明らかにした。さらにアジド基を導入した分子プローブを合成した。

研究成果の概要(英文)：We have achieved efficient synthetic methods for the synthesis of various analogues of naturally occurring cyclodepsipeptides, apratoxin A and destruxin E, through a solid-phase peptide synthesis and macrocyclization in solution. Based on the three-dimensional analysis of apratoxin A using a distance geometry method, we designed sixteen mimetics without having a modified thiazoline moiety that would cause non-specific interaction. We discovered apratoxin M16 that exhibited similarly high level of growth inhibitory activity against 8 of 10 cancer cell lines as apratoxin A. We also achieved the combinatorial synthesis of 18 and 64 analogues of destruxin E and destruxin B. It was revealed that two intramolecular hydrogen bondings in destruxin regulate the three-dimensional conformation that is crucial to the induction of morphological changes in osteoclast-like multinuclear cells. In addition, we prepared an azido-containing molecular probe to identify a target molecule of destruxins.

研究分野：有機合成化学

キーワード：環状デブシペプチド 天然物 全合成 コンビナトリアル合成 三次元構造解析 構造活性相関 ミメ
ティクス 創薬

1. 研究開始当初の背景

天然から数多くの環状デプシペプチドが単離・構造決定されている。これらはペプチド残基および不斉中心を複数有する脂肪酸等からなるため多様な構造を有しており、多彩な生物活性を示すばかりか、高い生物活性を特異的に示すものがある。これは標的化合物に結合するタンパク質の部分構造を天然物がミミックすることができるためと考えている。例えば、タンパク質の β -ストランド、 β -ターン構造はそれぞれタンパク質相互作用の重要なモチーフとして知られており、そのミメティクスの開発が進められ創薬に結びついている。一方、 α -ヘリックス構造についてはミミックすることが難しく、ミメティクスが創薬に結びついている例はほとんどない。これに対し小路らは、独自に設計した α -ヘリックスミメティクスを用いて β -カテニン/CBP相互作用阻害剤を見出し、タンパク質間相互作用阻害剤を開発している[MEDCHEM NEWS 2012, 22(1), 21]。したがって、生物活性をもつ環状デプシペプチドから活性発現に重要なモチーフを三次元構造を含めて抽出し、ミメティクスを設計できれば、新規創薬リード化合物に導く方法論として面白いと考えた。

アプラトキシン A (1) は、ハワイ大の Moore らにより海洋シアノバクテリアから単離・構造決定された 25 員環デプシペプチドである。ガン細胞に対する極めて強い細胞毒性を示し、従来の抗癌剤には無い作用機序を示すことが報告されている[Luesch *et al.* Nature Chem Bio 2006, 2, 158] (図 1)。我々はこれまでにアプラトキシン A (1) の全合成を達成し、固相合成法を開発して誘導体を簡便に合成する手法を確立している[Org Lett 2006, 8, 531; Chem Asian J 2009, 4, 111; *ibid* 2011, 6, 180]。全合成により十分な量の化合物を得たことから *in vivo* 試験を行い、1 が結腸癌細胞株 HCT-116 を異種したマウスに対して有力な抗腫瘍作用 ($T/C = 20\%$) を示すことを明らかにしている[ChemBioChem 2010, 11, 1458]。また、最近、山下・中尾と共同で、1 が幹細胞から心筋細胞への分化促進作用を示し、既存のシクロスポリンに比べ 1,000 倍強い作用があることを見出している[特願 2012-193433]。このことから 1 の類縁体合成に興味を持たれた。

一方、菌が生産する昆虫への毒素として単離構造決定されていたデストラキシン E (2) は、強い V-ATPase 阻害活性を示すことが報告されているが、共同研究者の中川らは 2 がさらに低濃度で破骨細胞を収縮させるという形態変化を引き起こし、骨吸収を抑制することを見出している[Nakagawa, *et al.* Bone 2003, 33, 443] (図 1)。骨代謝では破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が釣り合うことが重要であり、骨吸収が異常に進むことで骨粗しょう症等の疾患が発生する。これに対する医薬品としてビスホスホネ

ート系薬剤が使われているが、顎骨壊死等の重篤な副作用が問題となっている。これは破骨細胞のアポトーシスを引き起こして死滅させるため骨芽細胞も機能しなくなることが一因として挙げられている。すなわち破骨細胞の働きを抑制するが死滅させず、骨芽細胞の働きを活発化させることが、骨粗しょう症治療薬として望まれている。非常に低濃度で破骨細胞に形態変化を引き起こすデストラキシン E の生物活性は他の阻害剤には類を見ない特異なものである。したがって、その作用機序を明らかにすること、低毒性で高活性な類縁体あるいはミメティクスを創製することが骨粗しょう症に対する創薬として望まれる。我々はこれまでに固相法を用いてデストラキシン E の全合成を達成し、それまで未決定であったエポキシドの立体配置を (S) と決定している[Org Lett 2010, 12, 3792]。

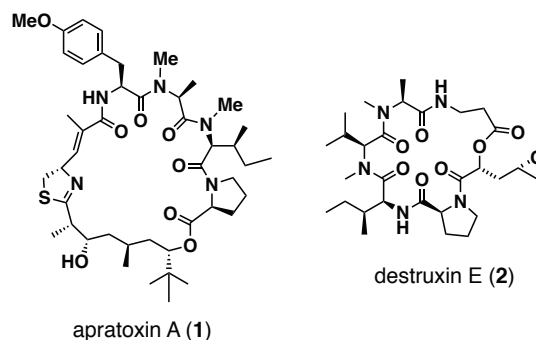


図 1 アプラトキシン A およびデストラキシン E の構造

2. 研究の目的

本研究では、特異な生物活性を有する環状デプシペプチド天然物を主軸として特に三次元構造に着目して次の研究を進める。

- (1) 固相法を用いた多様な類縁体のコンビナトリアル合成と構造活性相関
- (2) 単結晶化による X 線結晶構造解析、および NMR 解析と理論計算による立体配座解析。
- (3) 構造活性相関情報をもとにした活性分子プローブ、および不活性分子プローブの合成
- (4) 三次元的構造活性相関に基づく活性発現に必要なモチーフの抽出、それを再現するミメティクスの設計・合成。

これらの研究を通じ、環状デプシペプチド天然物のどの部位が大員環の立体配座を決定し、どの置換基・官能基が活性発現に必要なのかを明らかにするため、特に三次元構造に着目して研究を進める。各研究テーマを連携させフィードバックしながら精査することで創薬化学に必要な基盤技術を洗練し、レベルアップを図り、一連の創薬化学基盤システムを構築する。

3. 研究の方法

強力な抗腫瘍活性を示すアプラトキシン A, 破骨細胞を収縮し死滅させず抑制作用を示すデストラキシン E 等の生物活性環状デブシペプチド天然物について以下の検討を行った。

- (1) 固相合成によりペプチド残基の異なるコンビナトリアル合成を行い、構造活性相関を明らかにする。
- (2) 環上の *N*-メチル基の有無、環の員数を変えた類縁体の合成と構造活性相関。
- (3) 単結晶化を試み、X 線結晶構造解析により固体中の立体配座を視る。
- (4) NMR 測定とその情報を基にして理論計算と組み合わせて溶液中での立体配座を明らかにする。
- (5) 三次元的構造活性相関に基づくモチーフの探索とミメティクスの創製

4. 研究成果

(1) アプラトキシンの類縁体合成, 三次元的構造活性相関, ミメティクス創製

① アプラトキシン C の全合成と三次元構造解析

アプラトキシンの類縁体であるアプラトキシン C の全合成を行った。脂肪酸の合成について、新たに 2-メチルグルタル酸無水物の酵素を用いた不斉加水分解反応を基盤とする合成法を確立した。両天然物の合成化合物を用いて溶液中の立体配座解析を行った。CD₃CN 中で ROESY 測定を行い、交差ピーク強度からプロトン間の最大距離情報を見積もり、距離情報とし、この情報を拘束条件として分子力場計算を行い、様々な立体配座を任意に発生させるモンテカルロ法と組み合わせることにより溶液中の立体配座を求めた。その結果、アプラトキシン A, C は、母骨格が同じ三次元構造を取っていることを明らかにした[発表論文⑦] (図 2)。

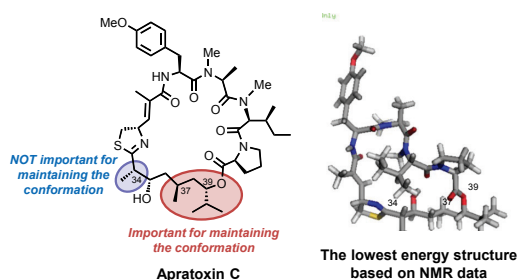


図 2 アプラトキシン C の全合成と NMR データから求めた三次元構造

② アプラトキシン C オキサゾリン誘導体の全合成

アプラトキシン C のチアゾリンをオキサゾリンに置き換えた誘導体の全合成を達成した。我々が合成した化合物は既報の化合物のスペクトルとは一致しなかった。既報では同化合物のガン細胞に対する細胞毒性はないとされていたが[Ma, *et al.* Chem Eur J 2006,

12, 7615], 本合成化合物は十分に活性を示したこと、アプラトキシン A のオキサゾリン誘導体とスペクトルが酷似していることから、既報のデータが誤りであると結論した。本結果からアプラトキシン類のチアゾリン環が活性発現に必須ではないことが明らかになった[発表論文④]。

③ アプラトキシン A の三次元構造ミメティクスの創製

アプラトキシン A には、マウスに対して致死的毒性があることがわかっている。これは分子内にある α , β -不飽和アミド部位への非特異的な共役付加反応、および化学的に不安定なチアゾリン環の存在 (まとめて MoCys と称す) のためと考えた (図 3)。そこで、アプラトキシン A の三次元構造を維持しながら MoCys 部位を単純なアミノ酸に置き換えることができれば、毒性を軽減でき、合成の効率も良くなると考えた。鎖状および環状のアミノ酸で置き換えたアプラトキシンミメティクス M1-M7 を合成し、結腸ガン細胞 HCT-116 に対する細胞毒性を評価したところ、M7 について十分な活性が認められ、アプラトキシン A と同様の三次元構造をとっていることがわかった。

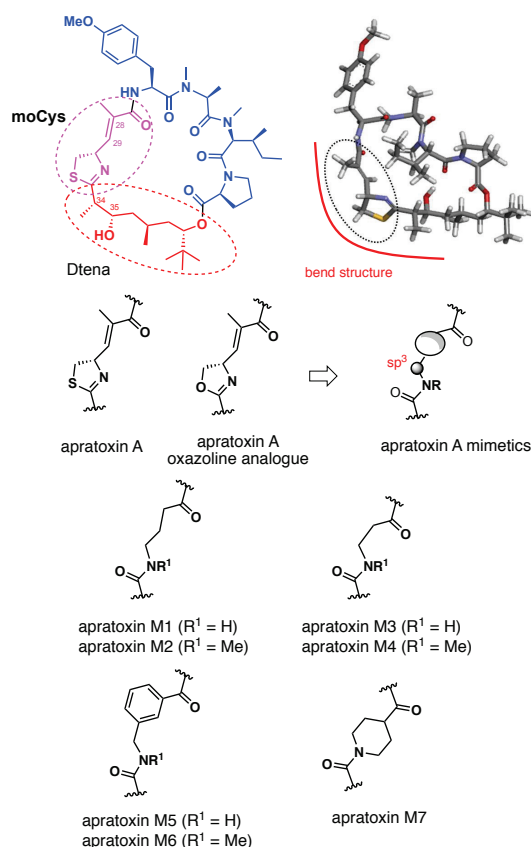


図 3 アプラトキシン M1-M7 の構造

次に、アプラトキシン M7 をもとに、他のアミノ酸残基の側鎖を替えた類縁体 9 つを設計し、合成した。その結果、Tyr(Me) を Phe(4-Ph) に替えたアプラトキシン M16 がア

プラトキシシン A に勝るとも劣らない活性を示すことを見出した (図 4)。さらに HCT-116 だけでなく、膵臓ガン (BxPC-3)、肺ガン (A549)、肝臓ガン (HuH-7)、胃ガン (MKN74)、脳腫瘍 (U-87 MG)、卵巣ガン (SK-OV-3)、子宮ガン (HEC-6)、肝臓ガン (786-0) に対して、nM オーダーの強力な細胞増殖抑制作用を示すことを明らかにした。アプラトキシシン A とアプラトキシシン M16 の各種ガン細胞に対する感受性がパラレルな結果を与えたことから、アプラトキシシン M16 はアプラトキシシン A と同じ標的分子に作用していると結論づけることができた。さらに肝ミクロソームを作用させた際の安定性も天然物と同等であり、今後動物モデルによる薬効評価に展開できると期待される [発表論文①, 特許出願]。

本成果は、環状ペプチド天然物の三次元構造を明らかにし、その構造をより構造を簡略化したミメティクス化合物で模倣し、それが天然物に勝るとも劣らない活性を示すことを明らかにしたものであり、当初の目的を達成することができた。

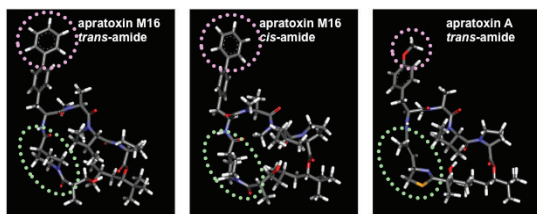
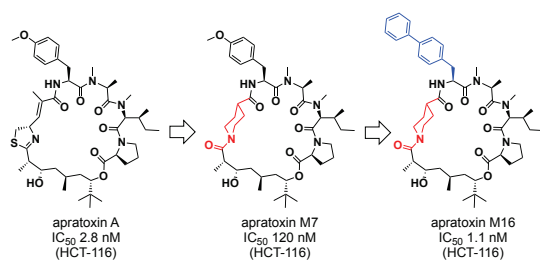


図 4 アプラトキシシン A, M7, および M16 の構造と HCT-116 に対する細胞毒性

(2) デストラキシシン E の類縁体合成、三次元の構造活性相関、立体配座解析法の確立

デストラキシシン E (2) の MeAla, MeVal, Ile の三残基について置換基を替えて $3 \times 3 \times 2$ の計 18 種類からなるコンビナトリアル合成を行った。鎖状の環化前駆体については固相法を用いたスプリット&ミックス法を用いて合成し、固相から切り出した後、マクロラクトン化およびエポキシド形成を液相で平行に行い、全 18 個の類縁体合成を達成した (図 5)。破骨細胞に対する作用を評価し、MeAla が必須であることを見出した [発表論文⑤]。またデストラキシシン E の X 線結晶構造解析、および前述の NMR による溶液中の三次元構造解析の結果から、いずれも、MeAla-MeVal 間のアミド結合が *s*-シス構造をとり、 β -ターン構造に類似した形を形成していること、分子内で 2 つの水素結合をと

り、キャタピラ型の構造をしているのが分かった。このターン構造が標的化合物のポケットにはまり込むと考えると MeAla の *N*-メチル基の存在によるアミド結合の *s*-シスフォームへの配座固定と小さい側鎖メチル基の存在がよいと考えられ、活性評価の結果を満足する。

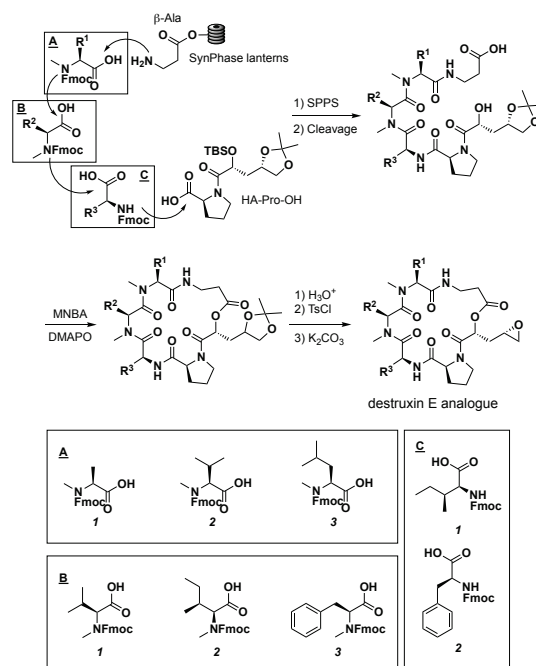


図 5 デストラキシシン E 類縁体 (18 化合物) のコンビナトリアル合成

また、標的分子を探索するための分子プローブ合成のため、 α -ヒドロキシ酢酸の側鎖について、2,3-エポキシプロピル基がそれぞれアシル基、イソブチル基であるデストラキシシン A および B を用いて、さらなる構造活性相関研究を行った。6 つの構成アミノ酸を組み合わせて $2 \times 2 \times 4 \times 2 \times 2$ の計 64 種類からなるコンビナトリアル合成を行った (図 6)。すべての類縁体の合成に成功し、活性を評価した結果、詳細な構造活性相関を明らかにすることができた [発表論文②]。特筆すべきは、プロリンの 5 員環上に置換基を入れても活性は全く減弱しないことであり、これをもとにプロリン部位にアジドアルコキシ基を入れた類縁体を合成し、活性を維持した分子プローブの合成に成功した。

さらに、高活性に必須である α -ヒドロキシカルボン酸の側鎖エポキシドについては、オキセタン、フラン、シクロプロパン、ジフルオロシクロプロパン等の類縁体の合成を達成し、かつ不活性な分子プローブの合成を完了した。現在、標的分子を同定する研究を進めている。

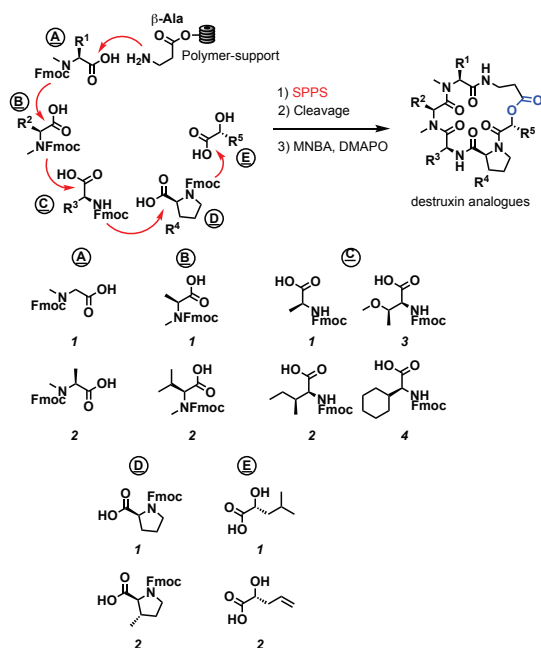


図6 デストラキシン A および B 類縁体 (64 化合物) のコンビナトリアル合成

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

- ① Y. Onda, Y. Masuda, M. Yoshida, T. Doi, Conformation-Based Design and Synthesis of Apratoxin A Mimetics Modified at the α, β -Unsaturated Thiazoline Moiety, *J. Med. Chem.*, 60, 6751-6765 (2017). 査読有, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00833.
- ② H. Sato, M. Yoshida, H. Murase, H. Nakagawa, T. Doi, Combinatorial Solid-phase Synthesis and Biological Evaluation of Cyclodepsipeptide Destruxin B as a Negative Regulator for Osteoclast Morphology, *ACS Comb. Sci.* 18, 590-595 (2016). 査読有, DOI: 10.1021/acscombsci.6b00076.
- ③ Y. Masuda, K. Aoyama, M. Yoshida, K. Kobayashi, T. Ohshiro, H. Tomoda, T. Doi, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Beauveriolide Analogues Bearing Photoreactive Amino Acids, *Chem. Pharm. Bull.*, 64, 754-765 (2016). 査読有, DOI:10.1248/cpb.c16-00095.
- ④ M. Yoshida, Y. Onda, Y. Masuda, T. Doi, Potent Oxazoline Analogue of Apratoxin C: Synthesis, Biological Evaluation, and Conformational Analysis, *Biopolymers (Peptide Science)*, 106, 404-414 (2016). 査読有, DOI:10.1002/bip.22781.
- ⑤ M. Yoshida, Y. Ishida, K. Adachi, H. Murase, H. Nakagawa, T. Doi, Solid-Phase Combinatorial Synthesis and Biological Evaluation of Destruxin

E Analogues, *Chem. Eur. J.*, 21, 18417-18430 (2015). 査読有, DOI: 10.1002/chem.201502970.

- ⑥ Y. Masuda, R. Tanaka, A. Ganesan, T. Doi, Structure Revision of Similanamide to PF1171C by Total Synthesis, *J. Nat. Prod.*, 78, 2286-2291 (2015). 査読有, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00643.
- ⑦ Y. Masuda, J. Suzuki, Y. Onda, Y. Fujino, M. Yoshida, T. Doi, Total Synthesis and Conformational Analysis of Apratoxin C, *J. Org. Chem.*, 79, 8000-8009 (2014). 査読有, DOI: 10.1021/jo501130b.

[学会発表] (計 99 件)

- ① 恩田勇一, 増田裕一, 吉田将人, 土井隆行, 三次元構造に基づいた Apratoxin A ミメティクスの創製, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2016 年
- ② T. Doi, Synthesis and Biological Evaluation of Cyclodepsipeptide Natural Products, The 10th International Symposium on Integrated Synthesis (ISONIS-10), 2016 年
- ③ 福島弘之, 前島寛, 魚崎英毅, 松尾武彦, 吉田将人, 恩田勇一, 鈴木淳, 藤野雄太, 増田裕一, 八田知久, 夏目徹, 神平梨絵, 坂本匠, 新井大祐, 堀越直樹, 鯨井智也, 胡桃坂仁志, 伏谷伸宏, 土井隆行, 山下潤, 中尾洋一, 海洋シアノバクテリア由来の心筋分化誘導活性物質, 第 58 回天然有機化合物討論会, 2016 年
- ④ T. Doi, Total synthesis of cyclodepsipeptide natural products and their biological evaluation, PACIFICHEM2015, 2015 年
- ⑤ M. Yoshida, Y. Ishida, H. Sato, K. Adachi, H. Murase, H. Nakagawa, T. Doi, Combinatorial synthesis and biological evaluation of cyclodepsipeptide destruxin E analogues, 第 52 回ペプチド討論会, 2015 年
- ⑥ 佐藤寛, 安達謙太, 石田恵崇, 村瀬隼人, 中川大, 吉田将人, 土井隆行, 骨吸収抑制作用を示す destruxin E 類縁体の合成と生物活性評価, 第 107 回有機合成シンポジウム, 2015 年
- ⑦ 吉田将人, 安達謙太, 佐藤寛, 村瀬隼人, 中川大, 土井隆行, 環状構造改変型デストラキシン E 誘導体の合成と生物活性評価, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年
- ⑧ 恩田勇一, 鈴木淳, 吉田将人, 増田裕一, 土井隆行, Apratoxin C オキサゾリン誘導体の全合成, 第 53 回日本薬学会東北支部大会, 2014 年
- ⑨ 土井隆行, 生物活性環状デプシペプチド天然物の全合成, 誘導体合成, 活性評価,

機能構造解析，平成26年度化学系学協会東北大会，2014年

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

①名称：環状デプシペプチド化合物
発明者：土井隆行，吉田将人，増田裕一，恩田勇一
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：特願 2016-027262、PCT/JP2017/005777，
W02017142040A1
出願年月日：平成28年2月16日，平成29年2月16日
国内外の別：国内，および国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~hannou/publication.html>

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~hannou/presentation.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 隆行 (DOI, Takayuki)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：90212076

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者