

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23102009

研究課題名(和文)高活性グルタミン酸リガンドの創製

研究課題名(英文)Study toward Development Ionotropic Glutamate Receptor Subtype Selective Ligand

## 研究代表者

品田 哲郎 (Shianda, Tetsuro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30271513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：キノコ毒として単離されたアクロメリン酸Aや放線菌から単離されたカイトセファリン(KCP)は天然由来の優れたグルタミン酸受容体リガンドである。これら天然物の潜在的な生物活性に着目した、脳神経系を標的とするケミカルバイオロジー研究を行った。その結果、天然物が結合する受容体(分子標的)に関する詳細な知見を得るとともに、天然物を凌駕する超活性リガンド分子として(7S)-KCPの創製に成功した。これより脳神経科学研究に資するリガンドが創製できた。

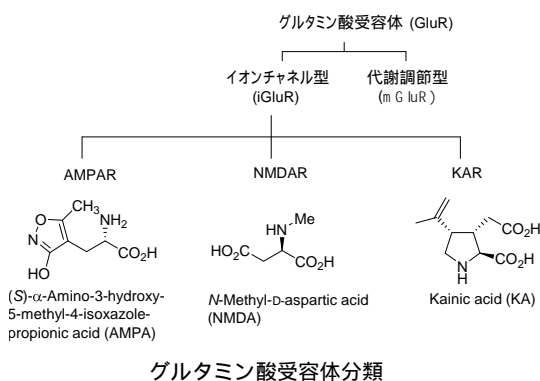
研究成果の概要(英文)：Chemical biology of natural products focusing on naturally occurring ionotropic glutamate receptor ligands, acromelic acid A and kaitocephalin was studied. Studies involving total synthesis of these natural products, their analog synthesis, ionotropic glutamate receptor binding assay, and structure analysis of ligand-protein complexes of these natural products bound to ionotropic glutamate receptors were conducted. As a result, the target receptor subtype of kaitocephalin was identified. Moreover, (7S)-kaitocephalin was discovered as a more potent NMDA receptor selective ligand than kaitocephalin.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：グルタミン酸受容体 天然物 カイトセファリン アクロメリン酸 リガンド 超活性

## 1. 研究開始当初の背景

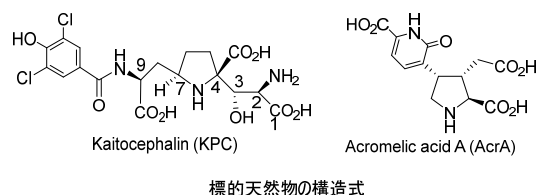
イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluRs) は中枢神経系における興奮性の情報伝達を担う受容体の一つである。記憶、学習などの高次脳機能を司ると共に、その失調がアルツハイマー病・パーキンソン氏病などの脳神経疾患と密接に関連していることが明らかにされている。iGluR はリガンドとの結合親和性の違いによって AMPA 型 (AMPA)、NMDA 型 (NMDAR)、カイニン酸型 (KAR) と呼ばれるサブタイプに分類されている。これらサブタイプは異なる情報伝達 (役割) を担っており、それらの機能の詳細と神経疾病との関連を探る研究が活発に進められている。



iGluR の機能を探る有効な手法の一つとして、受容体選択的なリガンドを用いる方法が知られている。天然物あるいは合成化合物の中から優れた iGluR リガンドを見出す研究が活発になされている。なかでも天然由来のリガンドは新規な構造と特異な活性の両面から研究者の関心を集めてきた。例えば、藻類から単離されたカイニン酸 (KA) は KAR を選択的に活性化するリガンドであり、側頭てんかんモデルを作成するための試薬として活用されている。KA 以外にもキノコ毒として単離されたアクロメリン酸 A (AcrA) や放線菌から単離されたカイトセファリン (KCP) が優れた天然リガンドであることが本国の研究者により示されている。その一方で KCP や AcrA は天然から微量にしか得られないために、それらの分子標的や機能の詳細は明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では KCP と AcrA のケミカルバイオロジー研究を行い、それらの分子標的を明らかにする。広範囲な構造活性相関研究から天然物を超える優れた iGluR リガンドを開発することを目的とした。



## 3. 研究の方法

### (1) 天然物およびアナログの合成

KCP および AcrA を全合成により供給する。構造活性相関研究に向けたアナログ合成を行う。

### (2) iGluR サブタイプ選択性の評価

ラット脳膜画分より iGluR を調製する。iGluR サブタイプ選択的なトリチウムラベルリガンド ( $[^3\text{H}]$ CGP 39653 for NMDAR,  $[^3\text{H}]$ AMPA for AMPAR, and  $[^3\text{H}]$ KA for KAR) の存在下、KCP と AcrA の iGluR サブタイプ選択性を調べる。あわせて、アナログの活性を調べる。

### (3) リガンド・受容体結合様式の解析

KCP と iGluR との共結晶構造解析を行い、天然物と iGluR との結合状態を明らかにする。受容体・リガンド結合状態のドッキングモデル解析を行う。これらの結果をもとに合理的なリガンド分子設計指針を得る。AcrA についても同様の解析を試みる。

### (4) 構造活性相関研究

設計指針をもとに KCP アナログを設計・合成する。それらの結合活性を調べることによって活性に必須の構造単位を明らかにする。

### (5) サブタイプ選択的 iGluR リガンドの創製

(1)~(4)の研究を循環させることによって、天然物の活性を凌駕する iGluR サブタイプ選択的リガンドを創製する。

## 4. 研究成果

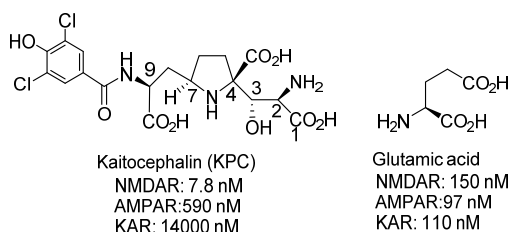
### (1) 天然物およびアナログの合成

KCP の量的合成法を駆使して KCP およびそのアナログを含む 20 種ほどを合成した (*Heterocycles*, **2015**, *91*, 2377; *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 1206)。AcrA については独自に開発したカイニン酸骨格構築法を参考に全合成した (*Org. Lett.* **2014**, *16*, 2550)。

### (2) iGluR サブタイプ選択性の評価

AcrA および KCP の iGluR サブタイプ選択性を調べた。その結果、AcrA はラット脳膜画分由来の iGluR に対して弱い結合活性しか示さなかった (未発表)。今回の結果とキノコ食中毒において末梢部位に炎症が生じることを考え合わせると、AcrA の標的は末梢の iGluR あるいは他の受容体を標的としている可能性が高いと推察される。詳細については現在も検討中であるが、本知見は AcrA の標的を探る上で重要な知見となりうるものと考えられる。

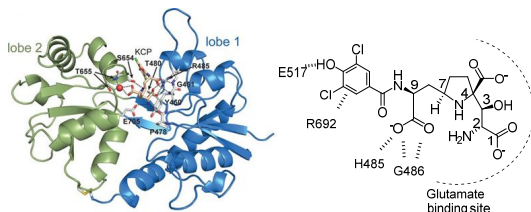
KCP は NMDAR に対して選択的かつ強力な結合活性を示すことが明らかになった (*Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 1206)。その活性は nM レベルであり、これほど強力な NMDAR リガンドは他に例がない。これより天然物の優れた活性特性が明らかになった。



KCP の iGluR サブタイプ選択性評価 (数値は  $K_i$  値(nM))

### (3) リガンド・受容体結合様式の解析

iGluR サブタイプの一つ、GluA2 のリガンド結合ドメインと KCP の結晶構造解析を国際共同研究 (コーネル大学分子生物学研究室 Oswald 教授) として実施し、その解析に成功した (*J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 41007. PDB ID 4GXS)。これにより KCP の右側構造がグルタミン酸結合部位に結合していること、7 位のベンゾイルアラニン部位がグルタミン酸結合サイトから離れたところに位置していることが示された。共結晶構造解析データをもとに KAR および NMDAR と KCP のドッキングモデル解析を行った。その結果、KCP の 9 位ベンゾイル基は NMDAR のアミノ酸側鎖と相互作用している一方で、KAR や AMPAR においてはそのような相互作用に乏しいことが示唆された。これら一連の考察は、KCP が NMDAR に選択的に結合する実験結果と一致するものである。

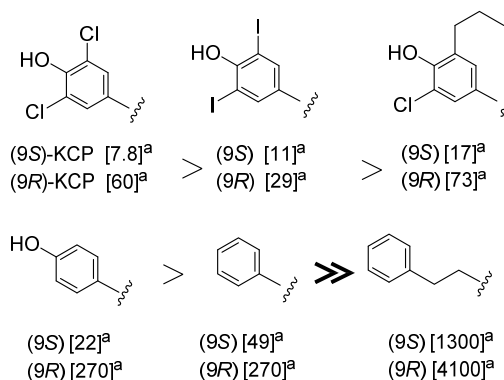


リガンド・受容体構造解析 (PDB ID: 4GXS) と結合様式図

### (4) 構造活性相関と超活性リガンドの創製

20 近い KCP アナログを合成し、それらの構造活性相関研究を実施した (*Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 1206)。結果は次のようにまとめられる。

- ・親和性の程度に違いが認められるものの、活性試験に供したアナログのほとんどが NMDAR 選択性を示す傾向が認められた。
- ・活性発現には天然物の右側・左側置換基のいずれもが必須であった。
- ・7 位、9 位の立体異性体は KCP よりは劣るものの依然としてナノモルレベルの活性を維持した。
- ・9 位の芳香環とカルボン酸はいずれも活性発現に必須であった。
- ・芳香環上の置換基を除去してもナノモルレベルの親和性が認められた。
- ・芳香環上の置換基のうち水酸基が活性発現に重要な役割をはたすことが示された。

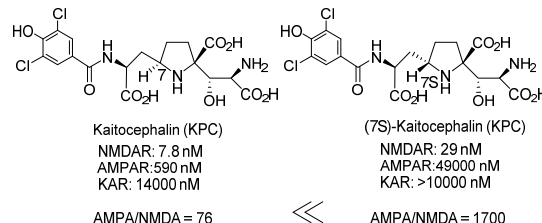


芳香環の構造活性相関 <sup>a</sup>NMDAR に対する  $K_i$  値 (nM)

カイトセファリンを特徴づけるベンゾイル置換基が、活性発現に重要であることなどの一連の結果は、3. で述べた受容体との結合モデルを用いることでうまく説明することができる (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, accepted)。

### (5) サブタイプ選択的リガンドの創製

本研究における特筆すべき成果として、KCP の 7 位の立体異性体である (7S)-KCP が、KCP を大きく上回る NMDAR 選択性を示すことを見出した (*Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 1206)。 (7S)-KCP の NMDAR 選択性は KCP と比べると 22 倍以上であり、その結合活性はナノモルレベルを維持していた。これにより天然物を超える優れた iGluR サブタイプ選択的リガンドの創製に成功した。



(7S)-KCP の iGluR サブタイプ選択性 (数値は  $K_i$  値(nM))

立体化学が異なる 7 位異性体が NMDAR に受容されることは、NMDAR のリガンド受容の寛容性を理解する上で興味深い知見であり、7 位異性体を基軸とする新たなリガンド設計の方向性を示すものである。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

Y. Yasuno, M. Hamada, M. Kawasaki, K. Shimamoto, Y. Shigeri, T. Akizawa, M. Konishi, Y. Ohfuné, T. Shinada, (7S)-Kaitocephalin as a potent NMDA receptor selective ligand, *Org. Biomol. Chem.* (査読有) **2016**, 14, 1206-1210.  
 DOI: 10.1039/C5OB02301G  
 Y. Yasuno, Y. Yoshida, A. Nishimura, Y.

Ohfuno, T. Shinada, A facile synthesis of (2*R*/*S*,5*R*)-1-tert-butyl-2-methyl-5-(((tert-butylsilyl)oxy)methyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid ester, *Heterocycles* (査読有) **2016**, *91*, 2377-2385.  
DOI: 10.3987/COM-15-13347

Y. Yasuno, A. Nishimura, Y. Yasukawa, Y. Karita, Y. Ohfuno, T. Shinada, The stereoselective construction of *E*- and *Z*- $\Delta$ -Ile from *E*-dehydroamino acid ester: the synthesis of the phomopsin A tripeptide side chain, *Chem. Commun.* (査読有) **2016**, *52*, 1478-1481.  
DOI: 10.1055/C5CC08458J

A. Manabe, R. Matsumoto, T. Shinada, Cyclopropanation of (*E*)-dehydroaspartic acid esters with furan derivatives: the synthesis of highly functionalized  $\alpha$ -2,3-methano- amino acid esters, *Synlett* (査読有) **2015**, *26*, 1710-1714.  
DOI: 10.1055/s-0034- 1380812

E. Nishimura, Y. Ohfuno, T. Shinada, Total synthesis of a monomeric phloroglucinol derivative isolated from *Myrtus Communis*, *Chem. Lett.* (査読有) **2015**, *44*, 445-447.  
DOI: 10.1246/cl.141168

M. Ueda, N. Doi, H. Miyagawa, S. Sugita, N. Takeda, T. Shinada, O. Miyata, Reaction of cyclopropenes with a trichloromethyl radical: unprecedented ring-opening reaction of cyclopropanes with migration, *Chem. Commun.* (査読有) **2015**, *51*, 4204-4207.  
DOI: 10.1039/C4CC09649E

E. Nishimura, Y. Ohfuno, T. Shinada, Total synthesis and structure elucidation of ( $\pm$ )-triumphalone & ( $\pm$ )- isotriumphalone, *Tetrahedron Lett.* (査読有) **2015**, *56*, 539-541.  
DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.12.005

Y. Totsuka, S. Ueda, T. Kuzuyama, T. Shinada, Facile synthesis of deuterium-labelled geranylgeraniols, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (査読有) **2015**, *44*, 575-577. DOI: 10.1246/bcsj.20140384

K. Oe, Y. Ohfuno, T. Shinada, Short total synthesis of (-)-kainic Acid, *Org. Lett.* (査読有) **2014**, *16*, 2550-2553.  
DOI: 10.1021/ol5009526

A. Manabe, Y. Ohfuno, T. Shinada, Toward the total synthesis of tetrodotoxin: stereoselective construction of the 7-oxanorborene intermediate, *Tetrahedron Lett.* (査読有) **2014**, *55*, 6077-6080.  
DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.09.036

K. Maeda, Y. Kuniwa, Y. Ohfuno, S. Ishiguro, K. Suzuki, K. Murata, H. Matsuda, T. Shinada, Solid phase synthesis of  $\alpha$ -amino squaric acid-containing peptides, *RSC Adv.* (査読有) **2014**, *4*, 50639-50643.  
DOI: 10.1039/C4RA10442K

Y. Kawanaka, A. Shimizu, T. Shinada, R. Tanaka, Y. Teki, Using stable radicals to protect pentacene derivatives from photogradation, *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読有) **2013**, *52*, 6643-6647.  
DOI: 10.1002/anie.201300595

T. Sato, H. Yamaga, S. Kashima, Y. Murata, T. Shinada, C. Nakano, T. Hoshino, Identification of Novel Sesterterpene/Triterpene Synthase from *Bacillus clausii*, *ChemBioChem* (査読有) **2013**, 822-825.  
DOI: 10.1002/cbic.201300035

Y. Yasuno, M. Hamada, T. Yamada, T. Shinada, Y. Ohfuno, Stereoselective synthesis of *E*- $\alpha$ , $\beta$ -dehydroamino acid esters, *Eur. J. Org. Chem.* (査読有) **2013**, 1884-1888.  
DOI: 10.1002/ejoc.200500434

A. H. Ahmed, M. Hamada, T. Shinada, Y. Ohfuno, L. Weerasinghe, P. P. Garner, R. E. Oswald, The structure of (-)-kaitocephalin bound to the ligand binding domain of the (S)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionic acid (AMPA)/glutamate receptor, GluA2, *J. Biol. Chem.* (査読有) **2012**, *287*, 41007-41013.  
DOI:10.1074/jbc.M112.416362

T. Okada, A. Shimoda, T. Shinada, K. Sakaguchi, Y. Ohfuno, Regioselective Prins cyclization of allenylsilanes: Stereoselective formation of multi-substituted heterocyclic compounds, *Org. Lett.* (査読有) **2012**, *14*, 6130-6133.  
DOI: 10.1021/ol302669q

Y. Ohfuno, K. Oe, K. Namba, T. Shinada, Total synthesis of manzacidins. An overview perspective, *Heterocycles* (査読有) **2012**, *85*, 2617-2649.  
DOI: 10.3987/REV-12-746

T. Shinada, K. Oe, Y. Ohfuno, Efficient total synthesis of manzacidin B, *Tetrahedron Lett.* (査読有) **2012**, *53*, 3250-3253.  
DOI:10.1016/j.tetlet.2012.04.042

大船泰史、カイニン酸、ドウモイ酸、藻類ハンドブック、エヌ・ティー・エス社、2012年、684-687頁(査読なし) ISBN-10: 4864690022

K. Nakao, K. Murata, T. Deguchi, K. Itoh, T. Fujita, M. Higashino, Y. Yoshioka, S. Matsumura, R. Tanaka, T. Shinada, Y. Ohfuno, H. Matsuda, Xanthine oxidase inhibitory activities crystal structures of methoxyflavones from *Kaempferia parviflora* rhizome, *Biol. Pharm. Bull.* (査読有) **2011**, *34*, 1143-1146.  
DOI: http://doi.org/10.1248/bpb.34.1143

Y. Yoshida, Y. Yasuno, Y. Ohfune, T. Shinada, Synthesis of Fluorescent-Labelled Kaitocephalin, 日本化学会第 96 春季年会、平成 28 年 3 月 24-27 日、京都府、京田辺市、同志社大学

A. Nishimura, Y. Yasuno, T. Shinada, Total Synthesis of Cirriatiomycin A and B, 日本化学会第 96 春季年会、平成 28 年 3 月 24-27 日、京都府、京田辺市、同志社大学

T. Shinada, Synthesis of Fluorescent Ligand for Visualization of Native Ionotropic Glutamate Receptors, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

T. Shinada, A. Yamada, Synthetic Study of Kainoid Analogs via Intramolecular Radical Cyclization Reaction, 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第 8 回公開シンポジウム、平成 27 年 6 月 8-9 日、宮城県、仙台市、東北大学片平キャンパス

保野陽子、品田哲郎、カイトセファリンの蛍光プローブ化に向けた構造活性相関研究、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー分子標的と活性制御」第 7 回若手研究者ワークショップ、平成 27 年 6 月 9 日、宮城県、仙台市、東北大学、青葉サイエンスホール

A. Manabe, S. Ueda, T. Shinada, Synthetic Study of Tetrodotoxin, The 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13), Nov. 9~13, 2015, Rihga Royal Hotel, Kyoto, Japan

T. Shinada, Y. Yoshida, Y. Yasuno Y. Ohfune, Synthesis of Aromatic Group-Modified Kaitocephalin Toward Development of Fluorescence-labelled NMDA Antagonist, 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第 3 回国際シンポジウム(第 7 回公開シンポジウム) Oct. 28~29, 2014, Senri Life Science Center, Toyonaka, Osaka, Japan

品田哲郎、山寄敦子、大船泰史、グルタミン酸アナログ類の昆虫麻痺活性とグルタミン酸受容体サブタイプ選択性、第 61 回トキシシンポジウム、平成 26 年 9 月 3~4 日、徳島県、鳴門市、ルネッサンスリゾートナルト

品田哲郎、高親和性イオンチャネル型グルタミン酸受容体リガンドの創製に向けた天然物ケミカルバイオロジー、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第 6 回公開シンポジウム、平成 26 年 5 月 28 日、愛知県、名古屋市、名古屋大学

T. Shinada, K. Shimamoto, Y. Ohfune, Synthesis of Kainoid Analogs Their

Affinities to Glutamate Receptors, The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID Regulation of Bioactivity, Oct. 10/28~29, 2013, Pasifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa, Japan

御前公美、大船泰史、品田哲郎、アクリン酸 A の全合成研究、平成 25 年 10/17~19 日、第 43 回複素環化学討論会、岐阜県、岐阜市、長良川国際会館

T. Shinada, Total Synthesis of Natural Products Exhibiting Glutamate Receptor Binding Activities, The 15th Asian Chemical Congress (ACC), (15th ACC 2013), Aug. 19~23, 2013, Resorts World Sentosa, Singapore

T. Shinada, Structure Activity Relationship of Kaitocephalin: Binding Structure of Kaitocephalin to Ionotropic Glutamate Receptor, 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第 4 回公開シンポジウム、平成 25 年 5 月 28~29 日、茨城県、つくば市、つくば国際会議場

Y. Wakabayashi, K. Shimamoto, T. Shinada, Y. Ohfune, Synthesis of Diaminopimelic Acid Derivatives Their Biological Activity, The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-12), Nov. 12~16, 2012, Rihga Royal Hotel, Kyoto, Japan

T. Shinada, Y. Yasuno, M. Hamada, Y. Ohfune, Development of Selective Ionotropic Glutamate Receptor Binding Antagonist: Structure-activity Relationship Study of Kaitocephalin, The 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural products: Target ID Regulation of Bioactivity, Oct. 30~Nov. 1, 2012, Kyoto, Japan

品田哲郎、非天然型アミノ酸構造を有する天然有機化合物の全合成研究、第 39 回有機反応懇談会、平成 24 年 8 月 3 日、大阪府、吹田市、関西大学

品田哲郎、大船泰史、高活性グルタミン酸リガンドの創製、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御」第 2 回公開シンポジウム、平成 24 年 6 月 17~18 日、東京都、文京区、東京大学弥生講堂

若林由華、島本啓子、品田哲郎、大船泰史、シスチン炭素鎖置換型アナログの xCT 阻害活性、日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会、平成 24 年 6 月 7~9 日、京都府、京都市、京都大学

品田哲郎、天然有機化合物を起点とする生物有機科学研究、平成 24 年 4 月 3 日、神戸薬科大学セミナー、兵庫県、神戸市、神戸薬科大学

K. Oe, T. Shinada, Y. Ohfune, Efficient

Total Synthesis of (-)-Kainic Acid, 8th  
AFMC International Medicinal Chemistry  
Symposium. Frontier of Medicinal Science,  
Nov. 29~Dec. 2, 2011, Keio Plaza Hotel,  
Shinjyuku, Tokyo, Japan

〔その他〕

ホームページ等

大阪市立大学理学研究科物質分子系専攻分  
子変換学研究室 HP

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/henkan/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

品田 哲郎 (Shinada, Tetsuro)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：30271513

### (2) 研究分担者

大船 泰史 (Ohfune, Yasufumi)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・名誉  
教授  
研究者番号：20142078

### (3) 連携研究者

島本 啓子 (Shimamoto, Keiko)  
(公益財団法人) サントリー生命科学財  
団・主幹研究員  
研究者番号：70235638

### (4) 連携研究者

坂口 和彦 (Sakaguchi, Kazuhiko)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：80264795