

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K07421
研究課題名(和文) 合成化学を基盤とした機能性分子リガンドの開発

研究課題名(英文) Synthetic studies on ligand molecules

研究代表者

高橋 俊哉 (Takahashi, Shunya)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：00202151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体機能解明のための有用なツールとなりうる分子リガンドを創製することを目的とし、そのための基盤技術の開発を行った。まず、キノコや粘菌を起源とし酵素阻害活性や細胞毒性作用を持つ芳香族系化合物の効率的合成を達成し、天然物の提出構造式の構造訂正にも成功した。誤った構造式と正しい構造の化合物の生物活性を調べ、構造と活性の関係を明らかにした。また、天然物をモデルにデザイン合成された機能性分子リガンドの生物活性を調べ、リガンドデザインのための有用な知見を得た。さらに、植物起源の抗腫瘍活性ステロイドを機能性リガンド化するための基本的な合成方法の検討、新規なグリコシダーゼ阻害剤の創製も行った。

研究成果の概要(英文)：A ligand molecule that binds to a target protein is expected to be a useful tool for clarifying a variety of biofunctions. Bioactive natural products have been utilized as a model for designing a novel ligand molecule. In this project, p-terphenyls, steroids, and sugars are selected as the models, and basic studies based on the natural product synthesis were performed. Efficient methods for the syntheses of bioactive p-terphenyls such as polyozellin and kekorins A-E were developed, thus leading to the structural revision of polyozellin and studies of the structure-activity relationship. Bioassay of newly designed p-terphenyls carrying a biotinyl unit was also examined with the aim of searching the target. For preparation of a ligand molecule utilizing an anticancer steroid as a model, chemical reactions of androsterone were investigated. A novel branched sugar was designed as a glycosidase inhibitor and was synthesized from D-glucose.

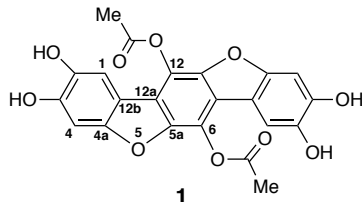
研究分野：天然物合成化学

キーワード：分子リガンド 天然物合成 生理活性天然物 酵素阻害剤 細胞毒性物質

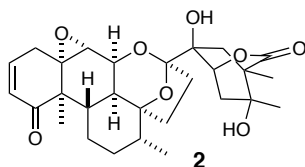
1. 研究開始当初の背景

生理活性天然物を構造モチーフとしてデザインされた分子リガンドは、生体機能解明のためのツールになりうる。そのため、分子リガンドの開発は、バイオサイエンス分野において重要な研究課題の一つとなりつつあり、国内外での研究は活発に行われてきている。その基となるのが天然物合成を中心とした物質創製のための基盤技術の開発である。以下に、本研究の3つのプロジェクトの背景を簡潔に述べる。

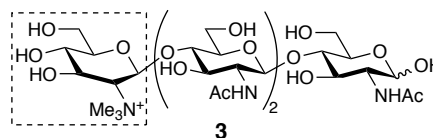
1) ビスフラン系 *p*-テルフェニル化合物の酵素阻害-抗腫瘍作用の相関研究と機能性リガンド化: ベンゼン環に2つのフェニル基がパラ位で置換した化合物は *p*-テルフェニル、ベンゼン環2つが繋がったビフェニルにエーテル架橋を形成したフラン誘導体はジベンゾフランと呼ばれている。最近、これらの構造的特徴を併せ持ち、腫瘍壊死因子 (TNF)- α 阻害活性や免疫抑制活性、抗腫瘍作用等を示す天然物がぞくぞくと見つかリ、注目を集めている。しかし、これらは sp^2 炭素や4級炭素で構成されているため、機器分析手法が著しく進歩した現在に於いても、構造解析は非常に難しい。よって、ポリオゼリン (初期の提出構造式 **1**) のような2つのジベンゾフラン構造を持つ天然物は、その提出構造式すらはっきりせず、興味ある生理活性が報告されているにもかかわらず、生化学、薬理学的研究は著しく立ち後れていた。



2) フィサングリジンAの構造活性相関に基づく必須構造の抽出と機能性分子リガンドへの変換: ナス科植物の一種であるホオズキ *Physalis angulate* L. は、古来よりその実や葉がマラリア、喘息、肝臓障害やリウマチ等に対して効果のあることが知られていた。このため薬用成分の探索が精力的に行われ、ウイタノライドと呼ばれる抗腫瘍活性ステロイドラクトン類が多数単離されてきた。フィサングリジン類は、バイオアッセイを指標として最近見つかったウイタノライド類である。いずれも、ステロイドD環部が開裂し、側鎖上のケトラクトン部位で渡環反応とアセタール化を起こした新規な骨格を有している。詳細な生物試験の結果、これらはヒト癌細胞のG2/M期での細胞周期の停止とアポトーシス誘導を引き起こす事が判明し、その活性はフィサングリジンA (**2**) が最も強い。



3) TMG-キトトリオマイシンをモデルとした新規な分岐糖型酵素阻害剤の創製: 糖鎖加水分解酵素 (グリコシダーゼ) 阻害剤は、生化学試薬として利用出来るだけでなく薬理学的見地からも重要な意味をもつ。そのデザインは、糖鎖加水分解の遷移状態をミミックすることが基本である。よって、タミフルの例で見るとピラノース環内酸素原子を炭素、窒素、硫黄などで置き換えた擬似糖類がポピュラーな阻害剤となる。しかし、放線菌由来のTMG-キトトリオマイシン (**3**) は、擬似糖を含まないにもかかわらず *N*-アセチルグルコサミニダーゼの阻害剤になることから一躍注目を集めた。この理由は、非還元末端グルコサミン残基が傘高いトリメチル基を持つためピラノース環が歪み、あたかも擬似糖のようにふるまうためと推定される。その糖残基が通常の 4C_1 構造ではなく half-chair に近いコンホメーションを優先してとっている事はNMRデータから示唆されている。



2. 研究の目的

本研究の目的は、精密有機合成化学的手法を基盤として、標的タンパク質に特異的に作用しその機能を阻害あるいは活性化する低分子化合物の合成と、それらにビオチニル化や蛍光標識のような機能性を付与した分子リガンドの開発にある。合成品はバイオアッセイを行い、構造活性相関研究も展開する。実際の標的分子としては、1) ポリオゼリンのようなビスフラン系 *p*-テルフェニル天然物、2) フィサングリジンAのようなステロイド分子、ならびに3) TMG-キトトリオマイシンをモデルにデザインされた分岐糖を取り上げた。機能性分子リガンドの創製を行うにあたり、1) と2) ではモデルとなる天然物そのものの合成例がないため、方法論の開発から行う。

3. 研究の方法

1) ビスフラン系 *p*-テルフェニル化合物の酵素阻害-抗腫瘍作用の相関研究と機能性リガンド化: まず、天然物の提出構造式 **1** が正しいかどうかを確かめるため、これまでに開発してきた方法論を駆使して合成を行う。すなわち、Suzuki-Miyaura カップリング反応によって *p*-テルフェニル骨格を構築し、Ullmann 反応を利用してフラン環を一気に形成しようというものである。合成品と天然物との詳細なNMRスペクトルデータの比較を行い、天然物の構造を検証する。さらに、合成品は, prolyl oligopeptidase (POP) 阻害と抗腫瘍活性が調べられ、その相関関係を明らかにする。

2) フィサングリジンAの構造活性相関に基づく必須構造の抽出と機能性分子リガンドへの変換: フィサングリジンA (**2**) は、デカヒドロフェナンスレン誘導体とオキサピシ

クロ[2.2.2]オクタン誘導体とのカップリングにより合成できると考えられた。前者はデヒドロイソアンドロステロンの炭素骨格と不斉中心を利用しながら合成することとする。後者は、キラルなシクロヘキサノンから合成できると考えられた。

3) TMG-キトトリオマイシンをモデルとした新規な分岐糖型酵素阻害剤の創製：TMG-キトトリオマイシン(3)におけるトリメチルアミノ基の効果と同様に、グルコピラノースの2位にメチレン基あるいは傘高いシクロプロピル基等を導入することで、ピラノース環のコンホメーションを変化させた分岐糖をデザインした。メチル α -D-グルコピラノシドをモデルとし、2、3位水酸基の反応性の違いを利用して2-エノピラノシド誘導体やアンヒドロ糖を合成する。次いで、増炭反応やアミノ基の導入を行い分岐糖を合成する。同様の反応をマルトース等のオリゴ糖にも拡張する。

4. 研究成果

1) ビスフラン系*p*-テルフェニル化合物の酵素阻害-抗腫瘍作用の相関研究と機能性リガンド化：本プロジェクトには、合成中間体の不安定性や予期せぬ反応性などで当初の予想をはるかに上回る時間がかかってしまった。しかしその分、リガンド分子のデザイン合成に極めて有用な知見を数多く得ることができた。以下にその詳細を記す。韓国産キノコから単離されたポリオゼリンは、POP阻害活性を示す代表的なビスフラン系*p*-テルフェニル化合物である。その構造は主にNMRスペクトル分析から、*p*-テルフェニル骨格上に*p*-置換のビスベンゾフラン構造を持つ化合物であると報告されたが、 σ -置換体との明確な区別がつかないため、提出構造式は未確定であった。そこで、まず化学構造を明らかにする目的で、提出構造式1の合成を行った。脱離基となるクロル原子を持つボロン酸と2,5-ジメトキシ-*p*-ベンゾキノ誘導体をSuzuki-Miyauraカップリング反応に供すると*p*-テルフェニル骨格が構築できた。キノン部分を還元して不安定な*p*-ヒドロキノンとした後、酸化銅を使ったUllmann反応を行うと、ダブル環化反応が進行して望む*p*-ジベンゾフランを収率良く与えた。しかし、中央ベンゼン環上のフェノールの保護基であるメチル基の除去はうまく進行しなかった。そこで、メチル基よりも脱保護の容易なメトキシメチル基へと変換し、同様の反応により*p*-ジベンゾフランを合成した。メトキシメチル基を加水分解後、アセチル化を行って目的物の完全保護体へと変換したがその収率は10%に満たないことが判明した。その理由は、フラン環形成後の*p*-ヒドロキノ誘導体が極めて不安定であるために、アセチル化を収率良く進めことができなかったからであった。そこで、メトキシメチル誘導体から*p*-ヒドロキノン中間体を経ずに直接アセチル誘導体へ変換できるような方法を検討

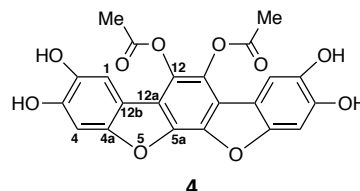
した。その結果、温和な条件下でのアセトリシスが効果的であることがわかり、収率良く目的物の完全保護体へと導くことができた。最後に、ベンジル基を除去すると目的の1が合成できた。しかし、得られた合成品のNMRデータは報告されているものとは一致しなかった(Table)。

Table. CDCl₃-DMSO-*d*₆(4:1)中の天然ポリオゼリン, 1 および 4 のNMR データ (δ).

位置	ポリオゼリン		1		4	
	¹ H ^a	¹³ C ^b	¹ H ^a	¹³ C ^b	¹ H ^a	¹³ C ^b
1	7.21	106.17	7.29	106.60	7.22	106.29
2	-	142.85	-	142.34	-	142.68
3	-	146.58	-	146.53	-	146.39
4	7.14	98.76	7.08	98.70	7.15	98.79
4a	-	150.74	-	151.13	-	150.94
5a	-	137.59	-	143.54	-	137.81
12	-	130.80	-	125.03	-	130.89
12a	-	116.94	-	117.27	-	117.05
12b	-	113.51	-	113.60	-	113.81

^a600 MHz, ^b150 MHz.

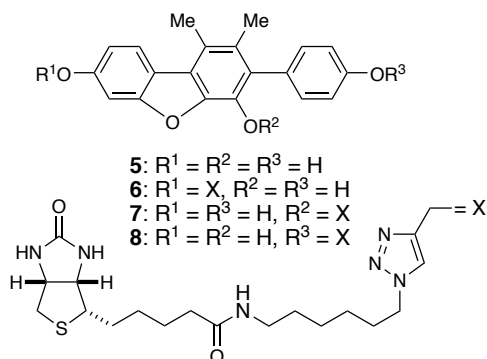
特に顕著だったのは中央ベンゼン環上のフラン環の付け根の炭素のケミカルシフト値(点線で囲まれた部分)であった。このことより、天然物の提出構造式1は誤りであることを明らかにすることができた。次に、天然物の真の構造式は何であるか考察を行った。発表されていたスペクトルデータの結果から、1の構造異性体であることは明白であった。さらにNMRスペクトルデータから、対称分子であることもまちがいがなかった。天然テルフェニル体は、これまで知られている化合物のほとんどが*p*-テルフェニルであることを考慮して、真の構造式は σ -誘導体4ではないかと推定し、その合成を検討した。既に我々が合成してい



たメチレンアセチル誘導体とクロル原子を持つボロン酸とのSuzuki-Miyauraカップリング反応を行って、*p*-テルフェニル骨格をまず構築した。Ullmann反応を利用したダブルフラン形成は良好に進行し、 σ -ジベンゾフランを与えた。この反応でも、酸化銅が最も良い結果を与えた。しかし、メチレンアセチル誘導体を加水分解して σ -ヒドロキノン誘導体とした後、アセチル誘導体へ変換する工程は、1の合成の時と同様に非常に困難であった。やはりこの場合も、得られた σ -ヒドロキノン誘導体が酸素に対して極めて不安定であったからである。そこで、この不安定な中間体を単離せずに、直接アセチル誘導体へ変換する方法を検討した。1の合成で良い結果が得られたアセトリシスを使う方法では満足はいく結果は得られなかったが、ピリジン中、4-ピロロピリジンの存在下でアセチル化を行うと、一気に目的物が得られることがわかった。最後に、加水分解を行い、異性体4を合成した。このものの各種スペクトルデータは報告

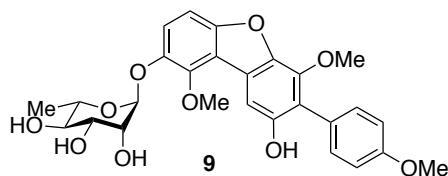
されている文献値 (Table) と良く一致し、天然ポリオゼリンの真の構造式は **4** であることを全合成により明らかにすることができた。次に、得られた化合物を使い、POP阻害ならびにガン細胞 (H-60とMCF-7) に対する抗腫瘍活性を調べた。POPに対しては、双方ともポジティブコントロールのプロペプチンと同様の強い阻害活性を示した。一方、腫瘍細胞に対する細胞毒性は、共に強いものではなかった。これらの結果より、フラン環の融合具合で阻害活性に差はなく、分子の平面性が保たれば、アセチル基の位置などにPOPの阻害活性は影響を受けないことが明らかとなった。また、強力なTNF- α 産生阻害剤であるバイリニンBをモデルとしてデザイン合成された

-テルフェニル誘導体 **5** をコアとし、ここにビオチニル基を結合させた3種の機能性リガンド分子 **6** ~ **8** のTNF- α 産生阻害ならびにユビキチン特異的ペプチダーゼ 5 (USP5) 阻害活性を調べた。その結果、バイリニンBと比べると弱いものの、コア部分にはTNF- α 産生阻害活性が見られた。一方、USP5に対する阻害作用は、ビオチニル体も含めて観測できなかった。このことより、リガンド分子をデザインするためにはオリジナルの天然物と同様の立体的な傘高さのみならず酸素官能基の存在も重要であるとの知見を獲得することができた。



さらに、今回開発した合成方法論の一般化と適用限界を探るため、合成例がなく構造の確定もなされていなかった粘菌由来の

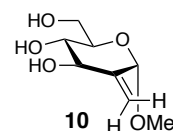
-テルフェニル類 {ケホコリンA (**9**)~E} の全合成へと応用した。その結果、効率良い全合成の達成による構造式の確定に成功し、本プロジェクトで開発された手法の有用性が確かめられた。



2) フィサングリジンAの構造活性相関に基づく必須構造の抽出と機能性分子リガンドへの変換: フィサングリジンAの機能性分子リガンド化を図るため、5環性コア部と2環性側鎖を別々に調製しリガンド分子への誘導を行おうと計画した。まず、5環性コア部の構築を目的に、デヒドロエピandroステロン 3-アセテートの官能基化を検討した。このもの

を、マンガン試薬で処理するとアリル位が酸化されたエノンが得られ、Bayer-Villiger酸化と引き続く環開裂反応で3環性ケトンが合成できた。また、D環部をエノンに変換することも試みた。すなわち、ケトンの α 位に脱離基を導入後、過酸化水素で処理すると二重結合の導入と同時に酸化反応も進行してしまうことがわかった。一方、ハロゲン化と続く脱ハロゲン化反応では、2種類の生成物を与え、主成分はC/D環がシスのエノンで、副生成物は β,γ -不飽和ケトンであることがわかった。後者はシリル化することでシリルエノールエーテルへと導いた。前者も同様の条件下で同じ生成物を与えることがわかったので、混合物のままシリル化することでジシリル体へ変換した。 -78°C にて、ニトロソベンゼンと[2+4]付加反応を行うと、立体選択的に β 面から付加反応が進行し、C/D環の核間に水酸基の導入されたエノナルコールが得られた。D環部の2重結合は選択的に還元され飽和のケトアルコールへ変換された。続いてBayer-Villiger酸化を行ったが、この反応は進行せずマンガン試薬を用いる酸化反応を行うと、B環部分に酸素官能基の導入されたジケトンを取率良く与えた。このものは5環性コア合成のための有用な中間体になりうると考えられる。また、側鎖を構成しているキラルなシクロヘキサノン誘導体を合成するために、Seebachのアセタールを持つエステルをアルキル化して不斉4級炭素を構築するルートを開発した。

3) TMG-キトトリオマイシンをモデルとした新規な分岐糖型酵素阻害剤の創製: 従来の擬似糖のデザインではなく、歪んだピラノース環を持つ分岐型糖をターゲットとして合成が検討された。D-グルコースの α -メチルグルコシドの4、6位水酸基を環状アセタールとして保護した後、2、3位の水酸基を区別して保護し、ついで2位水酸基のみフリーの糖を合成した。Swern酸化により、ウロースとした後、種々の増炭反応を検討した。傘高いWittig試薬などを用いると脱離反応が進行し3、4位へ二重結合が導入された不飽和糖のみが単離された。結局、メチレンWittig試薬のみ目的物を与えることがわかった。続いて、すべての保護基を除去することで2-デオキシ分岐糖 **10** の合成を達成した。また、条件を制



御することで4、6位の保護基と区別して3位の保護基のみはずすことができるので、この位置に選択的に糖鎖を導入することが可能である。さらに、2、3位の水酸基にトシル基を導入後、アルカリ処理することで2、3-アノヒドロ糖を合成した。ベンジリデン基を開裂させた後、アジドアニオンにてエポキシ環を開くと、2位がフリーの3-アジド糖誘導体が主成分で得られた。この2位水酸基を酸

化の後、メチレンWittig試薬により増炭すれば3-アミノ-2-デオキシ分岐糖の合成が達成できる。メチル α -D-グルコシドから分岐糖を合成する方法を確立することができたので、この手法をオリゴ糖に適用することも可能と考えられる。さらに、NMRを使った詳細なコンホメーション解析により、酵素阻害剤の構造情報に関してさらなる知見が得られるものと期待される。

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 7 件)

(1) Uchida T., Koshino H., Takahashi S., Shimizu E., Takahashi H., Yoshida J.,¹ Shinden H., Tsujimura M., Kofujita H., Uesugi S., and Kimura K., “Ca²⁺-Signal Transduction Inhibitors, Kujiol A and Kujigamberol B, Isolated from Kuji Amber Using a Mutant Yeast”, *J. Nat. Prod.* **81**, 1070-1074 (2018), 査読あり, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00922.

(2) Takahashi S., Kawano T., Nakajima N., Suda Y., Usukhbayar N., Kimura K. and Koshino H., “Synthesis of Polyozellin, a Prolyl Oligopeptidase Inhibitor, and Its Structural Revision”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 930-933 (2018), 査読あり, DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.01.054.

(3) Takahashi S., Suda Y., Nakamura T., Matsuoka K., Koshino H., “Total Synthesis of kehokorins A-E, Cytotoxic *p*-Terphenyls”, *J. Org. Chem.*, **82**, 3159-3166 (2017), 査読あり, DOI: 10.1021/acs.joc.7b00147.

(4) Takahashi S., Suda Y., Nakamura T., Matsuoka K., Koshino H., “Synthesis of 3-phenyldibenzo[b,d]furan-type bioprobes utilizing vialinin B as a structural motif”, *Syn. Comm.*, **47**, 22-28 (2017), 査読あり, DOI: 10.1080/00397911.2016.1245754.

(5) Takahashi S., Sato D., Hayashi M., Takahashi K., Yamaguchi Y., Nakamura T., Koshino H., “Total Synthesis of the Proposed Structure for Aromin and its Structural Revision”, *J. Org. Chem.*, **81**, 11222-11234 (2016), 査読あり, DOI: 10.1021/acs.joc.6b02187.

(6) Kim Y. J., Kim H-J., Kim G-W., Cho K., Takahashi S., Koshino H., Kim W-G., “Isolation of coralmycins A and B, potent anti-Gram negative compounds from the myxobacteria *Coralloccoccus coralloides* M23”, *J. Nat. Prod.* **79**, 2223-2228 (2016), 査読あり, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00294.

(7) Nishikawa Y., Furukawa A., Shiga I., Muroi Y., Ishii T., Hongo Y.³, Takahashi S.,

Sugawara T., Koshino H., Ohnishi M., “Cytoprotective Effects of Lysophospholipids from Sea Cucumber *Holothuria atra*”, *PLoS ONE*, **10**(8): e0135701 (2015), 査読あり, DOI:10.1371/journal.pone.0135701.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 須田康明, 松岡浩司, 中村健道, 越野広雪, 高橋俊哉, 強力な TNF- α 産生制御活性を持つ Vialinin B のターゲット探索のためのプローブ創製, 日本化学会秋季事業第6回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016年11月14日, タワーホール船堀 (東京・江戸川区).

(2) 須田康明, 松岡浩司, 中村健道, 越野広雪, 高橋俊哉, 強力な TNF- α 産生制御活性を持つ Vialinin B のターゲット探索のためのプローブ創製, GlycoTOKYO 2016 シンポジウム, 2016年11月19日, 東工大 大岡山キャンパス (東京・目黒区)

(3) Koshino H., Koichi S., Takahashi S., Satoh H., “EVALUATION OF REPORTED ¹³C NMR DATA AND CHEMICAL STRUCTURES BY USING CAST/CNMR SHIFT PREDICTOR AND STRUCTURE ELUCIDATOR”, European congress on magnetic resonance 2015 (国際学会), 2015年07月07日, Prague, Czech Republic.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊哉 (TAKAHASHI, Shunya)

国立研究開発法人・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号: 00202151