

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08026

研究課題名(和文)リンパ管新生を阻害するビスアセチレンアルコール標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of the target molecule of bis-acetylenic alcohols which inhibit the lymphangiogenesis

研究代表者

宮本 智文 (Miyamoto, Tomofumi)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：40182050

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)：沖縄県西表島産海綿(Callyspongia sp.)より発見したビスアセチレンアルコールについて、不斉合成と各種誘導体を用いた構造活性相関の検討により、合成した両エナンチオマーの細胞増殖阻害活性が4倍異なるというユニークな生物活性を見いだした。この細胞増殖阻害活性発現には、分子両末端の"1-yn-3-ol"が必須であり、その細胞増殖阻害機構が、微小管とは異なる2量体タンパク質の安定化と推定し、磁気ビーズ固定化による標的タンパク質の同定を企画した。現在、炭素鎖長20の一方に"1-yn-3-ol"を有する誘導体を合成しており、今後、本プローブを用い、標的タンパク質の同定を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The bisacetylenic alcohols have been discovered from a marine sponge (Callyspongia sp.) at Iriomote-island, Okinawa Prefecture. The structure-activity relationship using various synthetic derivatives revealed the unique phenomenon that cell proliferation inhibitory activity of each enantiomer differs by 4 times. For expression of the cell proliferation inhibitory activity of bisacetylenic alcohols, "1-yn-3-ol" at both ends of the molecule is essential for the activity, and its cell growth inhibition mechanism is different from stabilization of the microtubule in the cytoplasm. The identification of the target molecule by immobilizing magnetic beads of bisacetylenic alcohol was planned. Currently, NHS-beads having "1-yn-3-ol" in one of the alkyl chain lengths 20 has been synthesized, and future target molecule will be identified using this molecular probe.

研究分野：天然物化学

キーワード：リンパ管新生阻害 ビスアセチレンアルコール 標的分子探索 磁気ビーズ 細胞増殖阻害

1. 研究開始当初の背景

私は、天然由来の医薬シーズ探索研究の一環として、リンパ管内皮細胞増殖阻害活性を指標に、沖縄県西表島産海綿 (*Callyspongia* sp.) より、ビスアセチレンアルコールを発見した。不斉合成と各種誘導体を用いた構造活性相関の検討により、合成したエナンチオマーの細胞増殖阻害活性が4倍異なるというユニークな生物活性を見いだした。海綿由来のポリアセチレン系化合物はこれまでに約300種が発見され、特に、*Petrosia*, *Xestospongia* 属海綿に普遍的な二次代謝産物であることが報告されている。また、これらポリアセチレン系化合物には、DNA複製阻害に基づく抗腫瘍活性の他、抗菌、抗ウイルス、抗炎症作用など、様々な生物活性も報告されている。私は、ビスアセチレンアルコールの細胞増殖阻害機構が、細胞質内の微小管とは異なる2量体タンパク質の安定化と推定し、本研究を企画した。

2. 研究の目的

ビスアセチレンアルコールの細胞増殖阻害活性発現には、分子両末端の"1-yn-3-ol"と、このユニットを連結する適度な長さのアルキル鎖が必須であり、細胞増殖阻害機構は微小管とは異なる2量体タンパク質の安定化と推定した。本研究ではビスアセチレンアルコールとアジドビーズのクリックケミストリーによる標的タンパク質の検出、同定を行う。更にリガンド-タンパク質の分子間相互作用解析やリガンド構造最適化を行い、推定作用機構の証明、新しいがん治療薬シーズ探索を目的とした。

3. 研究の方法

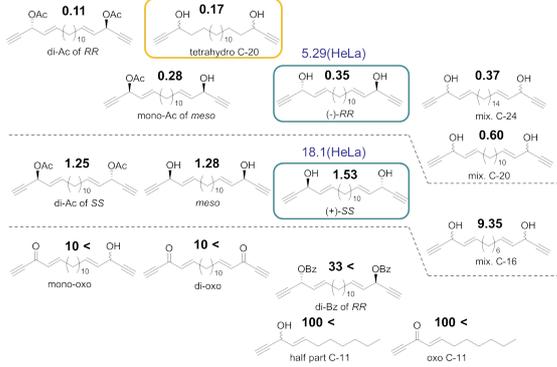
ビスアセチレンアルコールエナンチオマー2種とメソ体1種、及び11種の誘導体の他、炭素鎖長の異なるビスアセチレンアルコール(C16及びC24)を合成し、構造活性相関を解析した。調製した誘導体についてヒト子宮頸がん(HeLa)に対する増殖阻害活性を検討し、それぞれの IC_{50} 値を算出した。その結果、これまでの研究成果と併せ考え、標的探索用プローブを炭素鎖長24、分子両末端に"1-yn-3-ol"を有するビスアセチレンアルコールが最適構造と決定した。しかし、本化合物に購入したアジドビーズ(磁気ビーズ)をクリックケミストリーにより固定化した場合、分子片方のアセチレンがトリアゾールを生成し、標的タンパク質との親和性が消失することが懸念された。そこで、分子末端に"1-yn-3-ol"基を有する化合物をMacroModel(Schrodinger Suite社)を用い、構造最適化とコンフォメーション探索を行った。プローブの分子設計を見直し、-valerolactoneから誘導した"hepta-6-yne-1,5-diol"と1,8-diodooctaneあるいはN-(3-aminopropyl)diethanolamineとWilliamsonのエーテル合成を行った。しかし、3位の2級アルコールの反応性が高く、期待

したエーテル体は得られなかった。この結果より、プロパルギル位のアルコールの反応特異性が、活性に関与していると推定し、新たに炭素鎖末端に各2個のアセチレンを有するテトラアセチレンアルコールを合成した。Hexadecanediolに5等量のethynylmagnesium bromideを反応し、末端に4個のアセチレンと3級アルコールを有する新規化合物を合成した。また、Y. Genisson等が末端にキラルなalkynylcarbinolを有する化合物の合成と活性を報告しており、論文で、長鎖アルキルの一端にalkynylcarbinolを有する化合物の活性も報告していたことから、これら化合物についてHeLa細胞株に対する増殖阻害活性試験を行った。その結果、分子両末端に4個のアセチレンを有する化合物は対応するビスアセチレンアルコールの約1/18の活性であった。

次に、Hexadecanediolを出発原料として合成したテトラアセチレンアルコール及びstearylaldehydeを出発原料として合成したモノおよびジアセチレンアルコール体のがん細胞増殖阻害活性試験の結果、テトラアセチレン体及びジアセチレン体の活性は弱く、やはり活性の発現にはアルキル鎖末端の"1-yn-3ol"が必須であることを確認した。また、H27年度の研究成果で、一方のアルキル鎖末端に"1-yn-3ol"を有する炭素鎖長11のモノアセチレンアルコールに活性は確認されなかったが、H29年度に、stearylaldehydeのGrignard反応により合成した炭素鎖長20のモノアセチレンアルコールの IC_{50} は7.8 μ Mであった。本化合物の活性は対応するビスアセチレンアルコールの1/18であったが、本化合物をリードとし、新たなプローブ合成に着手した。1,16-hexadecanediol(16HDoI)に、1等量のBoc-glycineをエステル化し、収率37%で16HDoI-Boc-glycineを調製した。未反応の水酸基をPCC酸化しアルデヒドに変換した後、Grignard試薬(1.5eq. ethynylmagnesium bromide)によりアセチレンアルコールを導入した。Boc基をTFAで脱保護し、NH₂-リガンド固定用のNHS-COOH beadsによりアセチレンアルコールの標的タンパク質探索用プローブの合成が可能となる。また、上記、glycineをエステル結合したりリガンドはエステラーゼ等により加水分解を受けやすいと考えられることから、16HDoIをDMF中PBr₃でモノブrom化したアルコールをPCC酸化、Grignard試薬によるアセチレンアルコールの導入後、isoindoline-1,3-dioneにより、ブrom基をアミノ基に変換したプローブも現在合成中である。

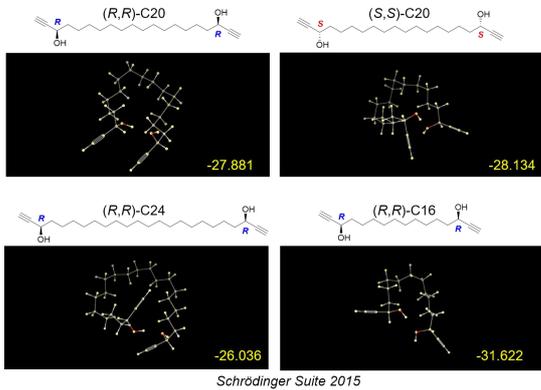
4. 研究成果

4-1. HeLa 細胞に対する IC₅₀ 値



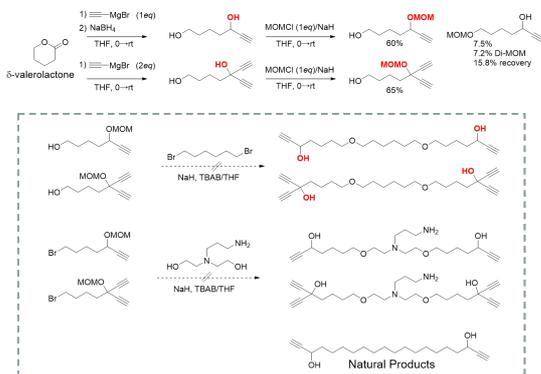
構造活性相関の解析により、炭素鎖長 20 以上で両末端に "1-yn-3-ol" が活性発現に必須構造と示唆された。

4-2. Macromodel を用いたコンフォメーション解析



ビスアセチレンアルコールのコンフォメーション解析により、末端の "1-yn-3-ol" は互いに近接していると示唆された。

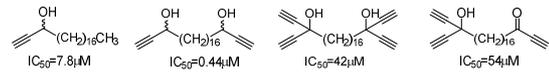
4-3. プロープ合成 その1



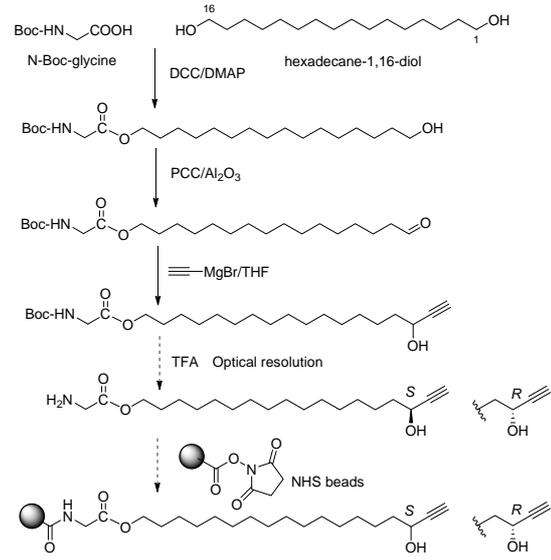
分子中央に磁気ビーズ結合のためのアミノ基を導入したビスアセチレンアルコールプロープの合成を行ったが、期待したエーテル体を得ることはできなかった。

4-4. プロープ合成 その2

HeLa 細胞に対する IC₅₀ 値



新たに合成したモノ、ビス、テトラアセチレンアルコール誘導体の活性を評価した結果、アルキル鎖長 20 の一方に "1-yn-3-ol" を有する誘導体に活性が確認されたことから、以下に示す新たなプロープ合成を行った。



現在、NBoc-グリシン-モノアセチレンアルコールの光学分割と NHS-beads への固定化条件の検討を行っており、プロープの合成が完了し次第、標的タンパク質の溶出と同定を行い、本研究課題を完了する予定である。

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1件)

Gabriel, A-F., Li, Z., Kusuda, R., Tanaka, C., Miyamoto, T.*, 2015, Six New Polyacetylenic Alcohols from the Marine Sponges *Petrosia* sp. and *Halichondria* sp., *Chem. Pharm. Bull*, 査読有, **63**, 469-475. DOI:10.1248/cpb.c15-00203

〔学会発表〕(計3件)

李禎, Adeymi Gabriel, 田中 千晶, 宮本 智文, 沖縄産海綿由来の新規細胞増殖阻害活性物質の探索第2報, 日本薬学会第135年会(仙台)2015年.

Tomofumi Miyamoto, Structures and Biological Activities of Polyacetylenic Compounds from the Japanese Marine Sponges, 8th US-Japan Symposium, Honolulu, Hawaii, 2016.

宮本智文, 西表島産海綿 (*Callyspongia* sp.) のポリアセチレンアルコールの構造と生物活性, 第 31 回海洋生物活性談話会, 秋田, 2017 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://npchem.phar.kyushu-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 智文 (MIYAMOTO, Tomofumi)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号 : 4 0 1 8 2 0 5 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()