

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07779

研究課題名(和文) 神経変性疾患予防を指向した未解明天然物の網羅全合成と構造活性相関

研究課題名(英文) Collective total synthesis of unidentified natural products and structure-activity relationship on prevention of neurodegenerative disorder

研究代表者

小林 正治 (Kobayashi, Shoji)

大阪工業大学・工学部・准教授

研究者番号：30374903

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)：認知症の予防・改善に効果があると言われるキノコや、資源としてあまり活用されていない紅藻に含まれる微量な活性成分の人工全合成や神経細胞に対する作用を研究した。構造多様なキノコの活性成分の網羅的な合成法を開発し、その中のいくつかの分子に、認知症の原因の一つと考えられる小胞体の機能異常による細胞死に対して抑制効果(細胞保護効果)があることを見出した。さらに、化合物の構造と細胞保護効果の相関を初めて明らかにした。また、紅藻由来の成分の合成では、分子の立体化学を完全に制御した合成法を開発し、今まで未知であった天然分子の立体構造を初めて解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症をはじめとする神経変性疾患の予防や治療に役立つ可能性のある分子を合成化学的に供給する有効な手段を提供したことが最も重要な意義である。また本研究の成果は、キノコや海藻の生理機能を成分分子の働きとして理解し、活性発現の鍵となる分子の構造、分子構造と作用の相関関係、生理作用発現のメカニズムなどを解明することにも役立つ。

研究成果の概要(英文)：Artificial total syntheses of precious bioactive molecules that are included in medicinal mushrooms effective for prevention and treatment of dementia, and red algae unused as a resource, as well as their bioactivities against neuronal cells were studied. A divergent synthetic method to afford a variety of mushroom-derived natural products with different structures were developed. Some of the synthetic compounds exhibited neuroprotection against endoplasmic reticulum stress-dependent cell death, which is considered to be one of the causes for dementia. Furthermore, a structure-activity relationship for neuroprotection was elucidated for the first time. In addition, regarding the red algae-derived natural products, a highly-stereocontrolled synthetic method to establish all stereochemistries in the molecules were developed, and the unknown structures of natural products were identified.

研究分野：天然物合成化学

キーワード：天然物 全合成 構造活性相関 ゲラニル-レゾルシノール アセトゲニン 構造決定 小胞体ストレス 神経細胞保護効果

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知症の予防や治療は高齢化社会における最重要課題の一つであり、根本治療につながる医薬品の開発や、機能的食品による予防・改善が期待されている。研究代表者は、食用キノコであるヤマブシタケ(山伏茸)に抗認知症効果があるという報告に注目し、ヤマブシタケの子実体や菌糸体に含まれる特徴的な低分子成分を標的として、全合成と活性の解明に取り組んできた。本研究開始以前に、ヘリセン A やヘリセリンをはじめとする 10 種類以上の天然物の全合成に成功し、合成化合物のいくつかに、認知症の要因の一つと考えられる小胞体ストレス依存性神経細胞死に対する抑制効果(細胞保護効果)があることを見出した。しかしながら、その時点では詳細な構造活性相関を議論するには至っておらず、また、医薬リード化合物として展開できるような十分な活性を持った化合物は見出せていなかった。

一方、紅藻は豊富な海産資源のひとつであるが、食用に利用されているアマノリなどの一部の紅藻を除き、多くの紅藻の機能は未解明で、資源としては活用されていない。研究代表者は、フジマツモ科の紅藻類から多種多様な含臭素化合物が単離されているという報告に注目し、それらの合成を通して紅藻の機能解明や新たな活用法の提案につなげることを考えた。また、これらの含臭素天然物には構造や絶対配置が不確定な化合物も多く、それらを合成化学的手法で解明し、認知症の予防に資する何らかの生物活性が見出せないかと考えた。

2. 研究の目的

研究開始当初の具体的な目的は以下の通りである。

(1) ヤマブシタケの活性成分(ゲラニル-レゾルシノール類)に関して

- ①天然物および天然物類縁体の網羅的全合成
- ②小胞体ストレスに起因する神経細胞死の抑制効果に関する構造活性相関の解明
- ③構造活性相関に基づいた分子設計による新規細胞保護物質の合成

(2) 紅藻含有成分(双環性含臭素 C₁₅アセトゲニン類)に関して

- ①ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタンを主骨格とする天然物群の一般合成法の開発
- ②構造不確定な天然物の全合成と絶対配置の解明
- ③合成した双環性含臭素アセトゲニンの生物活性探索

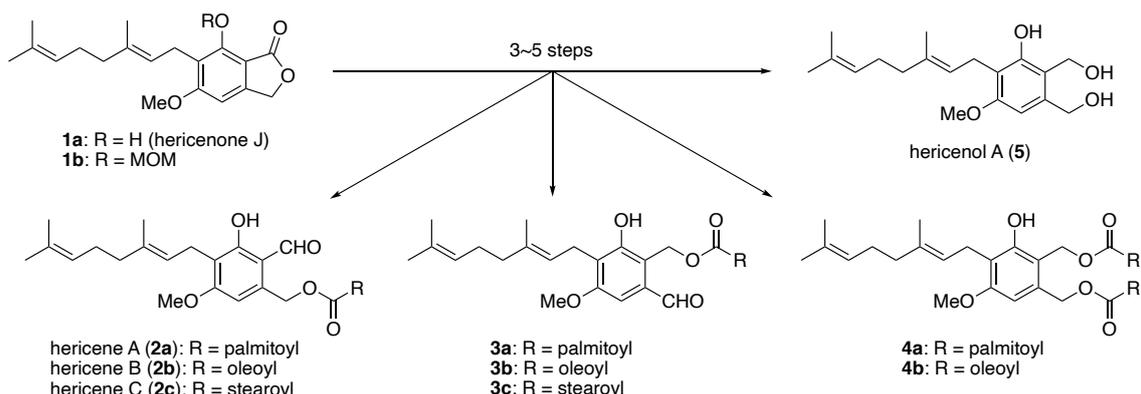
3. 研究の方法

- (1) ヘリセノン C-H をはじめとするゲラニル-レゾルシノール類を、今までに開発した合成法または新規方法論により網羅的に合成した後、Neuro2a 細胞を用いて小胞体ストレス依存性神経細胞死に対する細胞保護効果を検証する。構造活性相関から活性発現に重要な構造因子や官能基を特定するとともに、優れた活性プロフィールを持つ細胞保護物質を設計・合成する。
- (2) 以前に見出した立体特異的環縮小反応による双環性エーテル類の立体制御合成法を応用して、ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタンを主骨格にもつ含臭素アセトゲニン類の全合成を実施する。アセトゲニン類のもつ多様な立体化学に対応できるように環縮小反応の適用性を拡大するとともに、いくつかの立体異性体を平行して合成し、異性体間におけるスペクトルの差異を明らかにする。その上で、天然物の構造決定や絶対配置決定につなげる。合成した化合物を、神経変性疾患の改善や治療に関連性のある生物活性試験に付し、医薬リードとして展開できるかどうかを探索する。

4. 研究成果

(1) まず、ヤマブシタケの子実体に含まれるゲラニル-レゾルシノール類の基本的構造活性相関を明らかにするため、脂肪酸鎖ならびに脂肪酸の結合位置の異なる複数の天然物および類縁体を、以前に開発した方法で合成したヘリセノン J を共通中間体として、網羅的に全合成した(Scheme 1)。

Scheme 1.



(2) 合成化合物に対し、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を用いて小胞体ストレス依存性細胞死に対する抑制効果を検証した結果、オレイン酸側鎖を持つヘリセノン **2b** やその異性体である **3b** に、有意な細胞死の抑制効果が見られた (Figure 1, Chart A and B)。特に、非天然物である **3b** は、天然物 **2b** よりも低濃度で細胞死抑制効果を示した (Chart B)。一方、脂肪酸鎖のないヘリノール **A (5)** には細胞保護効果よりも細胞毒性が見られた (Figure 1, Chart C)。以上の結果から、細胞保護効果の発現には脂肪酸エステルの存在が不可欠であり、飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸の導入が細胞保護に望ましいことが判明した。また、脂肪酸鎖の結合位置が保護効果に影響を与えることが明らかとなった。

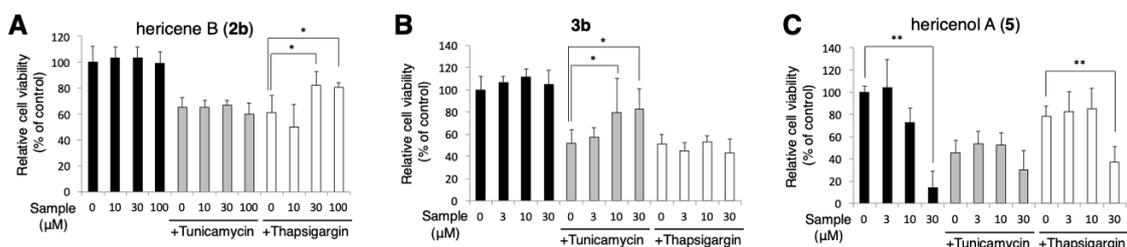


Figure 1. 各化合物存在下で Neuro2a 細胞を 24 時間培養したときの細胞生存率. Tunicamycin および Thapsigargin は小胞体ストレス誘発剤. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Tukey-Kramer 多重比較検定).

(3) (2)の結果を踏まえ、より詳細な構造活性相関およびヤマブシタケ含有成分の神経保護作用を分子レベルで解明するため、今まで合成されていなかったヘリセノン C~H および 3-ヒドロキシヘリセノン F の全合成を実施した (Figure 2)。これらの天然物は、活性発現に必須と考えられる脂肪酸エステルを含み、かつゲラニル側鎖にケトンが導入されている点の特徴である。合成上の様々な問題により従来の方法は適用できなかったが、1,3-転位反応を鍵とする新規なルートを開発し、ヘリセノン C~H ならびに関連化合物の初の全合成に成功した。このうち 3-ヒドロキシヘリセノン F に関しては、報告構造に誤りがあったことを見出し、合成によって正しい構造を提案するとともに、一連の天然物がどのような経路で生成しているか、生合成経路を反応化学的に立証した。先と同様に細胞保護活性を検証した結果、ヘリセノン C (**6a**) に弱い保護活性があることがわかり、二環性の **7a-c** は保護効果を示さないことがわかった。一方で、ヘリセノン E (**6c**) に存在するリノール酸エステルの導入位置を変えた異性体に、天然物に優る有意な保護活性があることを見出した。現在これらの結果をまとめている段階である。

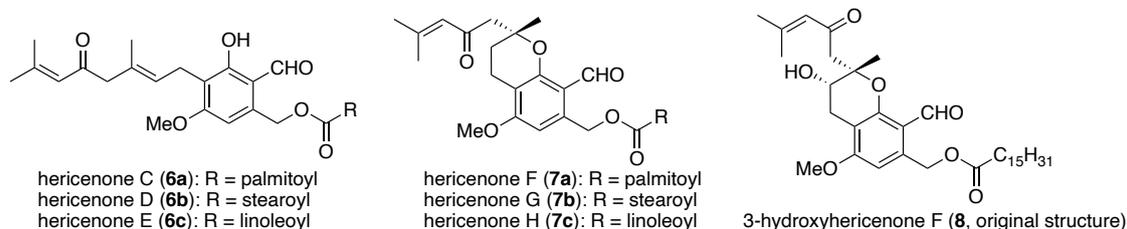


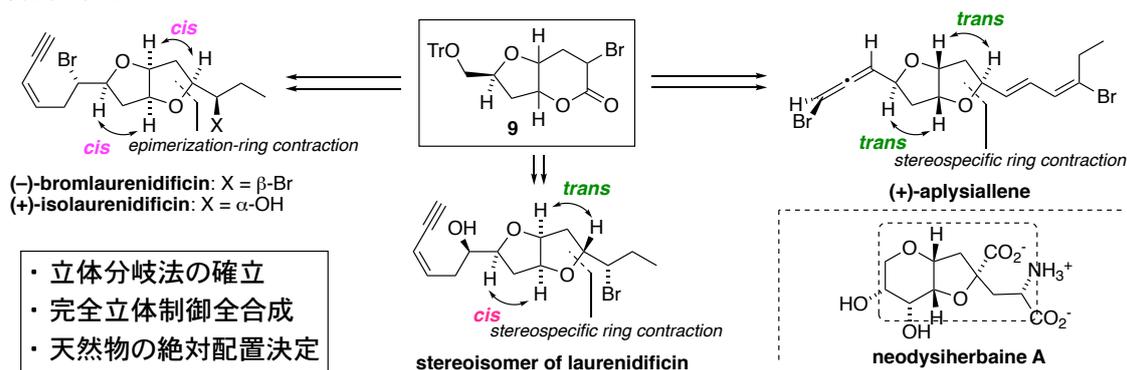
Figure 2. ヘリセノン C~H および 3-ヒドロキシヘリセノン F の構造

以上のように、ヤマブシタケの子実体に含まれるゲラニル-レゾルシノール類について、神経細胞保護効果に関する基本的な構造活性相関を初めて明らかにした。ヤマブシタケの生理活性や機能は国内外で研究されており、本研究は単一成分レベルで神経細胞に対する作用を明らかにした点で意義がある。認知症などの神経変性疾患では、病変部位の神経細胞やグリア細胞において小胞体ストレスシグナルの活性化が起こっていると考えられており、小胞体ストレスによる細胞死を抑制できれば神経変性疾患の予防や治療につながる可能性がある。本研究によって天然物よりも細胞保護効果の高い化合物も見出されており、医薬リード化合物創出への発展性も見込まれる。

(4) 紅藻類に含まれる含臭素アセトゲニン は、4~12 員環の多様な骨格構造を持ち、生物活性や立体構造が未確定な化合物が多い。自然界から単離される量も極微量であり、紅藻を海洋資源として活用するためには、合成化学的手法による物質供給、構造解析、構造活性相関の解明などが必要である。本研究では、ビス THF 環構造をもつ含臭素アセトゲニンとして、絶対配置が確立されていないイソローレニディフィシン (isolaurenidificin) およびブロムローレニディフィシン (bromlaurenidificin) を標的として、全合成法の確立と絶対配置の解明を検討した (Scheme 2)。ビス THF 環構造をもつ含臭素アセトゲニンは自然界から 15 種程度報告されているが、それぞれが固有の立体配置を持っており、それらを包括的に合成する戦術が必要になる。本研究では、独自に

開発していた立体特異的環縮小反応を異性化反応と組み合わせることによって、過去に合成不可能であった *cis* 型天然物（イソローレニディフィシやブロムローレニディフィシ）の合成法を確立した(Scheme 2)。本合成戦略は、紅藻由来の含臭素アセトゲニンのみならず、ビス THF 環構造をもつ化合物全般に適用できると考えられ、医薬候補化合物の合成を含む幅広い応用が期待できる（例えば、グルタミン酸受容体選択的作動薬であるネオダイシハーバイン A など、Scheme 2)。また、研究過程で、不斉点の立体配置の異なるいくつかの異性体を合成した。それらの NMR スペクトルの比較によって、立体異性体間での化学シフトやカップリング定数の差異が明らかになった。これらの情報は、今後関連天然物の合成や構造決定を行う上で極めて有益と考えられる。図示しないが、この他にもビス THF 環構造を有する関連天然物の全合成を検討し、部分構造の構築法を見出した。化合物の合成と立体化学の解明に多くの時間を要し、当初予定していた生物活性探索は検討できなかったが、複数の不斉点や二重結合の幾何異性の立体化学を完全に制御して初の全合成を達成したことは、紅藻由来の未解明天然物の化学的供給法や構造解析手法の発展に貢献するものと考えている。

Scheme 2.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi, S.*; Shibukawa, K.; Hamada, Y.; Kuruma, T.; Kawabata, A.; Masuyama, A.	4. 巻 83
2. 論文標題 Syntheses of (-)-Tripterifordin and (-)-Neotripterifordin from Stevioside	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 1606-1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.7b02916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi, S.*; Hamada, Y.; Yasumoto, T.; Hashino, Y.; Masuyama, A.; Nagai, K.*	4. 巻 59
2. 論文標題 Total syntheses and endoplasmic reticulum stress suppressive activities of hericenones A-C and their derivatives	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 1733-1736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2018.03.065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi, S.*; Tamura, T.; Yoshimoto, Y.; Kawakami, T.; Masuyama, A.	4. 巻 14
2. 論文標題 2. 4-Methyltetrahydropyran (4-MeTHP): Application as an Organic Reaction Solvent	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Asian J.	6. 最初と最後の頁 3921-3937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi, S.*; Hori, Y.; Yoneyama, R.; Tamura, T.; Masuyama, A.	4. 巻 84
2. 論文標題 1. Stereocontrolled Total Synthesis of (+)-Isolaurenidificin and (-)-Bromlaurenidificin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 15549-15556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b02532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林正治、田村朋葵
2. 発表標題 4-メチルテトラヒドロピラン(4-MeTHP)の有機反応溶媒としての応用：適用範囲と制限
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 越柴瑞穂、田村朋葵、長井薫、小林正治
2. 発表標題 リノール酸エステルを含むヘリセノン類の合成と小胞体ストレス誘導神経細胞死に対する細胞保護効果
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林正治、田村朋葵、濱田彬希、越柴瑞穂、益山新樹、長井薫
2. 発表標題 ヤマブシタケに由来するゲラニル-レゾルシノール類の合成と神経細胞保護効果に関する構造活性相関研究
3. 学会等名 第63回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Tamura, Takashi Kawakami, Saki Yoshimoto, Araki Masuyama, Shoji Kobayashi
2. 発表標題 Assessment of 4-Methyltetrahydropyran (4-MeTHP) as an Organic Reaction Solvent
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Process Chemistry (ISPC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村朋葵、濱田彬希、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 ヤマブシタケの子実体から単離された脂肪酸結合型ヘリセノン類の効率全合成
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米山亮、堀優、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 イソローレニディフィシンとプロムローレニディフィシンの立体制御全合成：天然物の絶対配置推定
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村朋葵、清水智志、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 1,3-転位を鍵とするヘリセノンC-Eの短段階全合成
3. 学会等名 第38回有機合成若手セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米山亮、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 イソローレニディフィシン：鏡像異性体の全合成による絶対配置決定
3. 学会等名 第38回有機合成若手セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米山亮、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 (+) - Isolaurenidificinの全合成 - 天然物の絶対配置推定 -
3. 学会等名 第114回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田村朋葵、安本健志、濱田彬希、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 1,3-グラニル転位を鍵とするヘリセノン類の短段階全合成
3. 学会等名 第62回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田村朋葵、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 4-メチルテトラヒドロピラン(4-MeTHP)の適用評価：反応溶媒としての展開およびラジカル反応における分解機構
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱田彬希、澁川圭佑、車拓磨、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 天然甘味料ステビオシドを原料とするトリプテリフォルデン類の短段階合成
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林正治、澁川圭佑、田村朋葵、益山新樹
2. 発表標題 新規疎水性エーテル系溶媒を用いる有機合成反応プロセスの改良実用化
3. 学会等名 第112回 有機合成シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱田彬希、澁川圭佑、車拓磨、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 五員環骨格を有するトリプテリフォルدين類の短段階合成
3. 学会等名 第61回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米山亮、堀優、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 絶対配置および構造活性相関の解明を目的としたローレニディフィシンの全合成研究
3. 学会等名 第34回有機合成化学セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱田彬希、澁川圭佑、車拓磨、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 光ラジカル反応を利用したステピオシドからトリプテリフォルدين類の短段階合成
3. 学会等名 第34回有機合成化学セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米山亮、堀優、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 ローレニディフィシンの絶対配置の解明に向けた全合成研究
3. 学会等名 第37回有機合成若手セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱田彬希、澁川圭佑、車拓磨、益山新樹、小林正治
2. 発表標題 ステビオイドを原料とするトリプテリフォルデン類の短段階合成
3. 学会等名 第37回有機合成若手セミナー
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪工業大学工学部応用化学科 物質生命化学領域ホームページ http://www.oit.ac.jp/chem/cherry/2_lab/ 大阪工業大学工学部応用化学科ホームページ http://www.oit.ac.jp/chem/research/member/lab-npc 大阪工業大学 OIT研究室ナビ https://www.oit.ac.jp/laboratory/room/96 大阪工業大学 研究室Voice https://www.oit.ac.jp/japanese/voice/eng/detail.php?id=201402003</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長井 薫 (Nagai Kaoru) (20340953)	千里金蘭大学・生活科学部・教授 (34439)	