

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590100

研究課題名（和文）蛋白核外移行阻害天然物をシーズとする新規医薬リード化合物の創製

研究課題名（英文） Exploration for New Medicinal Leads by Use of Natural Products Inhibiting Nuclear Export of Proteins as Scaffolds

研究代表者

村上 啓寿 (MURAKAMI NOBUTOSHI)

大阪大学・薬学研究科・寄附講座教授

研究者番号：00210013

研究成果の概要：

NES アンタゴニスト作用蛋白核外移行阻害天然物である 1'-acetoxychavicol acetate および valtrate について、活性発現部位ならびに作用メカニズムを考慮することにより、活性の増強されたアナログの創成に成功した。また、これらのアナログは MEK 活性化腫瘍細胞に対する選択的な細胞毒性を示すことを明らかにした。さらに、NES 非アンタゴニスト作用蛋白核外移行阻害天然物 peumusolide A を見出し、その絶対構造を明らかにするとともに、アナログの効率的な合成法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：核外移行シグナル(NES)、薬用植物、1'-acetoxychavicol acetate、valtrate、peumusolide A、医薬リード化合物、抗 HIV 剤、抗ガン剤

## 1. 研究開始当初の背景

核から細胞質への細胞情報伝達のために能動輸送される蛋白のなかには、約 10 残基のアミノ酸配列からなる核外輸送シグナル(NES)を有し、受容体蛋白 CRM1 により輸送され機能を発現するものが存在する。このような NES を含有し CRM1 により核外輸送される蛋白として、ガン細胞増殖シグナル伝達に關与する MEK やエイズウィルス(HIV)の複製シグナルの伝達に關与する Rev 蛋白などが

明らかにされた。また、NES 含有蛋白の核外移行阻害物質として放線菌より見出された leptomycin B の作用機序が受容体 CRM1 の 529 番目のシステイン残基への結合であることが明らかにされた。しかしながら、leptomycin B はその疎水性があまりにも高いことから、動物モデルでは弱い効果しか認められていなかった。

このような背景のもと、NES と蛍光蛋白(GFP)の融合蛋白を発現させた分裂酵母を用

いたアッセイ系を構築し、生薬 "カノコソウ" および "ダイコウリョウキョウ" から新規 NES 含有蛋白核外移行阻害活性成分として医薬品へと展開可能な適切な疎水性を有する valtrate および 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) を見出した。また、これらの両天然物がいずれも HIV-1 ウイルスの増殖を抑制することと MEK 活性化腫瘍細胞に選択的な細胞毒性を示すことを明らかにしている。さらに、両天然物の活性発現に必須の構造部位を特定するとともに、いずれも CRM1 の 529 番目のシステイン残基に結合して、NES アンタゴニスト作用により活性を発現することを明らかにしている。

また、ACA については実用的な合成法を確立するとともに、合成アナログの活性を比較することで、活性発現には 4 位水酸基上の官能基の加水分解と 1' 位の立体配置が重要であることを明らかにしており、valtrate については、母核である光学活性イリドイド骨格の構築法を確立するとともに、5,6-ジヒドロアナログを合成し、本アナログが valtrate とほぼ同程度の蛋白核外移行阻害能を示すことを見出している。さらに、標的蛋白である CRM1 の立体モデルを構築し、各種合成アナログとのドッキングモデルの MD 計算により算出される相互作用エネルギーと活性との良好な相関から、リガンド結合部位の立体構造の妥当性を検証するに至っている。

一方、NES 非アンタゴニスト作用による NES 含有蛋白核外移行阻害物質は全く見出されていなかったことに着目し、新たに構築した抗 MEK 抗体を用いて、NES 非アンタゴニスト作用 MEK 核外移行阻害物質として ent-kaure-16-ene-3-ol および ポリケチド peumusolide A を見出している。さらに、これらの化合物が MEK 活性化腫瘍細胞に対して選択的な細胞毒性を示すことも明らかにしている。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が見出した NES 含有蛋白核外移行阻害天然物をシーズとして、新規作用機序の抗エイズおよび抗がんリード化合物の創製を目的とする。NES アンタゴニスト作用活性天然物については、作用メカニズムから分子軌道計算を用いて活性化エネルギーの低い化合物を設計・合成するとともに、すでに構築した標的蛋白 CRM1 のリガンド結合周辺部の立体構造を利用し、ドッキングモデルの相互作用エネルギーの低い化合物を設計・合成し、天然物より活性の増強された合成リード化合物の創製を検討する。また、血清中での安定性向上を目的としたアナログの合成を行う。

一方、NES 非アンタゴニスト作用 MEK 核外移行阻害天然物については、各種誘導体を

用いて、活性発現に重要な構造部位の特定を行い、さらに、論理的な薬物設計を行う第 1 歩となる標的蛋白解析に有用なプローブ分子の創製に役立てる。

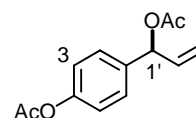
## 3. 研究の方法

NES アンタゴニスト作用蛋白核外移行阻害天然物である ACA は、4 位アセトキシル基の加水分解に続くキノンメチドの生成が作用メカニズムの一端を担っていると考えられるため、分子軌道計算によってキノンメチド生成へと至る活性化エネルギーを算出し、より低い活性化エネルギーを示すアナログほどキノンメチドを生成し易い、すなわち活性向上が期待されるアナログと推察した。計算方法の妥当性については、すでに合成したアナログについて核外移行阻害活性と活性化エネルギーの間に良好な相関性があることで確認した。また、標的タンパク CRM1 の立体モデルを用いたアナログの設計では、すでに結合部位の立体構造が構築できていることから、想定したアナログを用いて MD 計算によってドッキングスタディを行った。算出された相互作用エネルギーのより低い、すなわち CRM1 と安定な複合体を形成するアナログを活性向上が期待されるアナログと推察した。また、valtrate については、既に見出している比較的合成容易な活性等価体 5,6-dihydrovaltrate を基にアナログの創製を行った。アシル基の異なるアナログの合成は 5,6-dihydrovaltrate の合成法にしたがい、それぞれ対応するアシル化試薬を用いて行った。また、カーボネートおよびカーバメート体についても、クロロギ酸エステルあるいはイソシアネートをアシル化試薬に代えて用いることで合成した。

NES 非アンタゴニスト作用蛋白核外移行阻害天然物である peumusolide A については、既に同じラクトン構造の合成法が報告されていたことから、初期のアナログ合成は本法にしたがった。しかしながら、一方の幾何配置しかできないこと、不斉収率が低いことから、立体配置を制御した合成法として三重結合への選択的なヨウ素化を鍵反応とした新たな合成ルートを確立した。

## 4. 研究成果

NES アンタゴニスト作用蛋白核外移行阻害天然物 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) の作用メカニズムに基づき、活性中間体と推察されるキノンメチド生成へと至る活性化エネルギーについて、蛋白核外移行阻害活性と整合性のある、分子軌道計算を用いた算出方法を確立した。本方法にしたがって活性向上が期待される 3 位にフッ素、塩素あるいは臭素原子を導入したアナログにつ

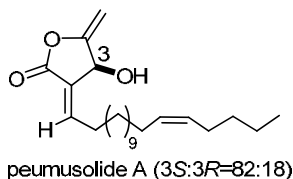


いて合成し、それらが ACA より強力な NES 含有蛋白の核外移行阻害活性を示すことを明らかにした。次に、既に確立した標的蛋白である CRM1 モデルを用いたドッキングスタディにより ACA より低い相互作用エネルギーが算出された 1' 位に *n*-pentanoyl 基、isohehexanoyl 基、*n*-propylcarbamoyl 基を有するアナログを合成し、ACA より強力な活性を示すことを明らかにした。また、4 位および 1' 位エステル結合をカーボネートあるいはカーバメートへと変換したアナログの活性は減弱が認められたが、1' 位のみをカーバメートへと変換したアナログについては ACA より強力な活性を示すアナログを見出した。

同様の NES 非アンタゴニスト作用蛋白核外移行阻害天然物である valtrate は、分子内にアシル基を有しており、医薬リードへと発展させるに当たって血中での安定性が懸念された。そこで、エステル結合をより安定な官能基へと変換することを前提に、まず、各アシル基の大きさが活性に与える影響を調べた。分子内に存在する 3 種のアシル基の高さを改変した (1-isovaleryl 1-Ac、7-isovaleryl 7-Ac、11-Ac 11-butyryl) 5,6-dihydrovaltrate 類を合成したところ、1-isovaleryl 1-Ac に改変したアナログが valtrate より強力な合成したアナログ中で最も強い活性を示すことを見出した。また、我々は過去の研究より脂肪族および芳香族エステルをカーボネートやカーバメートへと変換することで活性をほとんど減弱することなく血清中での安定性が向上する知見を得ていることから、良好な活性を示した 1-Ac-5,6-dihydrovaltrate のエステルをカーボネートおよびカーバメートへと変換したアナログを合成した。これらアナログの活性は若干減弱したものの、ヒト血清中での安定性は特にカーバメート体で大幅な改善が認められた。

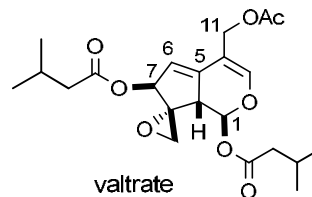
さらに、良好な活性を示した 3-fluoro-ACA と 1-Ac-5,6-dihydrovaltrate については、MEK 活性化腫瘍細胞と非活性化腫瘍細胞に対する生育阻害活性を比較することで、MEK 活性化細胞に対する選択的な細胞毒性が確認された。

一方、NES 非アンタゴニスト作用蛋白核外移行阻害天然物である peumusolide A については、まず、3 位絶対立体配置を決定する目的で、peumusolide A の側鎖  $[-(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3]$  を  $[-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3]$  に簡略化したアナログについて両エナンチオマーを合成し、その CD を測定することで天然物が主として *S* 配置であることを決定した。さらに、キラル HPLC を用いた検討によって、天



然物は *S*:*R*=82:18 の混合物であることを明らかにした。また、この際に合成した *S* 体アナログは、天然物と同等の活性を示した。次に、3 位絶対配置と二重結合の幾何異性の選択的な構築を制御した合成法を確立し、 $[-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3]$  の側鎖を有する各立体異性体を合成した。これらアナログの活性を比較することで *S* 体には *R* 体の約 5 倍の活性が認められ、二重結合の幾何配置は活性にほとんど影響しないことを明らかにした。また、側鎖アルキル鎖長の異なるアナログ (炭素鎖 1、4、7) については、いずれも活性が同等であったことから、

側鎖のアルキル鎖長は活性にほとんど影響しないことが明らかとなった。



## 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 3 件)

村上啓寿、Exploration of bioactive natural products from medicinal plants with novel mechanisms of action、Foods Food Ingredients J. Jpn.、212、217-226、2007、有

村上啓寿、The 7<sup>th</sup> forum of community research interchange from the fiftieth anniversary commemorative project of the faculty of pharmaceutical sciences of Osaka university. "Exploration of new functions of plant resources"、Foods Food Ingredients J. Jpn.、212、169-171、2007、有

下田博司、田中潤司、関あずさ、本田晴哉、赤荻誠一郎、小松原博文、鈴木信夫、亀山眞由美、田村理、村上啓寿、 $\alpha$ -リポ酸の製造工程で生成する重合物の安全性と構造解析、食衛誌、48、125-131、2007、有

[学会発表](計 8 件)

田村理、藤堂慎吾、村上啓寿、NES 含有蛋白核外移行阻害天然物 valtrate の血中安定アナログ、日本生薬学会第 55 回年会、2008 年 9 月 19-20 日、長崎

田村理、Mifundu Michel Ngoma、村上啓寿、生薬 "苦練皮" 由来抗トリパノソーマ活性成分、日本生薬学会第 55 回年会、2008 年 9 月 19-20 日、長崎

田村理、道家駿佑、服部雄飛、村上啓寿、MEK 核外移行阻害物質 peumusolide A の標的タンパクの探索、日本生薬学会第 55 回年会、2008 年 9 月 19-20 日、長崎

田村理、殿川雅之、村上啓寿、MEK 核外移

行阻害物質 peumusolide A アナログの立体選択的合成、日本薬学会第 128 回年会、2008 年 3 月 26 日-28 日、横浜

田村理、清水伸泰、藤原克昭、藤堂慎吾、村上啓寿、NES 含有蛋白核外移行阻害物質 valtrate のアナログ合成と生物活性、第 49 回天然有機化合物討論会、2007 年 9 月 19 日-21 日、札幌

田村理、塩見敦、小坂橋央旭、村上啓寿、標的タンパクとの結合モデルを用いた l'-acetoxychavicol acetate のアナログ設計と生物活性、日本生薬学会第 54 回年会、2007 年 9 月 14 日-15 日、名古屋

田村理、藤堂慎吾、清水伸泰、藤原克昭、村上啓寿、NES 含有蛋白核外移行阻害活性 valtrate のアナログ合成と生物活性、第 42 回天然物談話会、2007 年 7 月 11 日-13 日、仙台

田村理、塩見敦、小坂橋央旭、村上啓寿、標的タンパクに対する結合モデルを用いた l'-acetoxychavicol acetate のアナログ設計と生物活性、第 42 回天然物談話会、2007 年 7 月 11 日-13 日、仙台

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

Preparation of peumusolide A analogues as MAPKK nuclear export inhibitors、N. Murakami、S. Tamura、大阪大学、PCT Int. Appl.、PCT/JP2008/053090、2008 年 2 月 22 日、国外

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 啓寿 (MURAKAMI NOBUTOSHI)

大阪大学・薬学研究科・寄附講座教授

研究者番号：00210013

(2)研究分担者

(3)連携研究者