

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06975

研究課題名(和文)p97/VCP阻害活性を有する天然有機化合物の合成と標的部位の同定

研究課題名(英文)Synthesis and Target Molecule Identification of Natural p97/VCP Inhibitors

研究代表者

内呂 拓実(Uchiro, Hiromi)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授

研究者番号：00307711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Cdc48/p97(VCP)阻害作用をもつPhomapyrrolidone Aの世界初の不斉全合成を達成するとともに、その標的部位を同定することを目的として研究を行った。その結果、IMDA反応を利用したA/B-trans型の四環性化合物の合成に成功した。さらにこの化合物をPhomapyrrolidone Aの四環性フラグメントに導くことを目的として、D環部位の構造変換について検討した結果、完成まであと1段階のところまで到達することができた。また、A/B-cis型の四環性骨格をもつ類縁化合物Embellicine Aの全合成についても検討した結果、四環性フラグメントの合成を達成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、Cdc48/p97に対してアロステリック様の阻害作用を示すPhomapyrrolidone Aの世界初の全合成を達成するとともに、その標的部位を明らかにすることを通じて、阻害活性を発現する際に必要な分子間相互作用を解明することである。このようなCdc48/p97に対する阻害剤の研究は世界的に見ても未だ黎明期にあり、Phomapyrrolidone Aのように複雑な化学構造をもつ天然有機化合物を基盤とした研究については、これまでに全く報告されていない。したがって、学術的な独自性の高い知見を得た上で、特徴ある新しい抗がん薬の創出に向けた展開を図っていくことができる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to achieve the first asymmetric total synthesis of Phomapyrrolidone A, which has Cdc48/p97(VCP) inhibitory activity, and to identify its target site. As a result, stereoselective synthesis of A/B-trans-type tetracyclic compounds by use of the IMDA reaction was successfully achieved. Further investigation to convert this compound into the tetracyclic fragment of Phomapyrrolidone A was also investigated, and we were able to reach one step closer to the completion of the desired transformation. In addition, total synthesis of Embellicine A, a structurally-similar A/B-cis-type analog of Phomapyrrolidone A was also studied, and synthesis of the tetracyclic fragment was successfully completed.

研究分野：有機合成化学、医薬化学

キーワード：cdc48 p97 アロステリック阻害剤 Phomapyrrolidone A Embellicine A 全合成 高歪み化合物 macrocycle

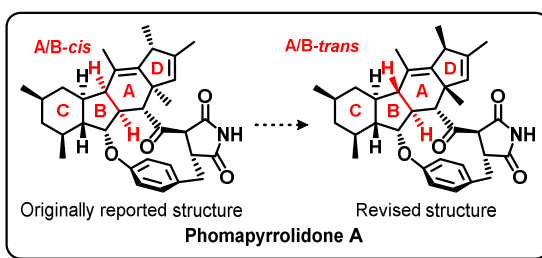
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内のプロテアソームによるタンパク質の分解に関する研究が活発に展開されており、中でもタンパク質がユビキチン化されることを契機として、プロテアソームに輸送・分解されていく機構の解明に注目が集まっている。このような中において、AAA+型のユビキチン選択的分子シャペロンである Cdc48/p97(VCP)は、K48 型ユビキチン鎖を認識して基質タンパク質の高次構造を解くとともに、シャトル分子である RAD23/Dsk2 と共同して基質タンパク質をプロテアソームに送り込む役割を果たすことが明らかにされている。また、がん細胞において Cdc48/p97 を阻害すると、ミトコンドリア外膜画分におけるユビキチン化タンパク質の蓄積が増大し、ミトコンドリア内へのタンパク質輸送の低下と ROS 産生の増大を引き起こすことにより、アポトーシスが誘導されることも報告されている(*J. Jap. Biochem. Soc.* 2016, 88, 211.)。

Cdc48/p97 に対する阻害作用をもつ既知物質としては、ML-240 を初めとした ATP 結合部位を標的とするものがすでに幾つか報告されている。しかしながら、多くの分子標的抗がん剤において認められているように、このような ATPase 阻害剤は結合部位の点変異による阻害活性の低下が起こりやすいことや、他の ATPase との作用選択性が得られにくいことが懸念されている。そこで申請者は、2013 年に米国アリゾナ大学の Gunatilaka らによって見出された Phomapyrrolidone A (**1**)に着目した(*J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 1860)¹⁾。

Phomapyrrolidone A (**1**)は、まず抗結核性物質として報告された後、その後の研究を通じて Cdc48/p97 阻害作用(IC₅₀: 6.6 μM)を示すことが明らかにされている(*ChemBioChem.* **2014**, 15, 2125.)²⁾。また、当初は A/B-cis 型の四環性骨格(ABCD 環部)をもつものとされたが、ごく最近になり、A/B-trans 型の四環性骨格をもつ化合物であることが X 線結晶解析を通じて明らかにされている(*J. Nat. Prod.* **2019**, 82, 1752.)³⁾。ここで注目すべきは、**1**が Cdc48/p97 の ATP 結合部位とは別の部位をその標的としており、アロステリック様の阻害様式を示すことである。このような阻害様式を示すにあたっては、**1**の高度に歪んだ 13 員環アリールエーテル構造を含む 7 環性骨格が分子認識の点で極めて重要となっていることが予想されるが、その結合部位やファーマコフォアの詳細等については、未だ明らかにされていない。



2. 研究の目的

本研究代表者は、Cdc48/p97 に対する阻害作用を有する **1** の世界初の全合成を達成するとともに、ここで確立される合成法を活用した分子プローブの作成と利用を通じて、Cdc48/p97 上に存在する **1** の標的部位を明らかにすることができれば、アロステリック様の阻害活性を発現する際に必要な分子間相互作用を解明しうるものと考え、本研究に着手することにした。このような Cdc48/p97 に対するアロステリック型阻害剤の研究は世界的に見ても未だ黎明期にあり、複雑な化学構造をもつ **1** のような天然有機化合物を基盤とした研究については、その合成的な困難さからこれまでに全く報告されていない。したがって、本研究を遅く推進していくことができれば、学術的な独自性の高い知見を得た上で、特徴ある新しい抗がん薬の創出に向けた展開を図っていくことが期待できるものと考えた。

3. 研究の方法

(1) Phomapyrrolidone A (**1**)の不斉全合成

まず、**1**の不斉全合成を達成することを通じて、本化合物の詳細な薬理学的プロファイルを明らかにするために必要なサンプルを供給するとともに、プローブ分子を作成するために必要な合成法の基盤を確立しようと考えた。そこで、**1**の合成にあたって以下のような3段階のプロセスを経由する戦略を立案した。

四環性骨格(ABCD環部)の構築

高度に歪んだ13員環エーテル構造(E環部)の構築

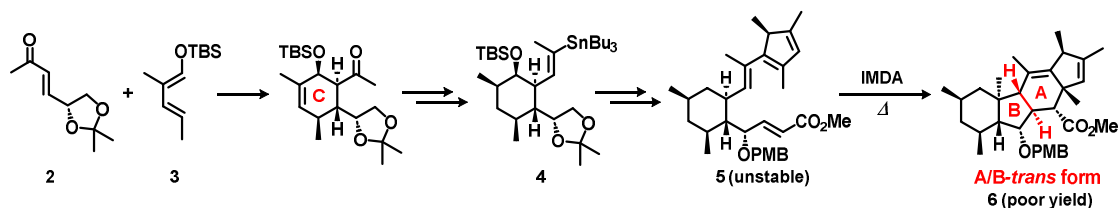
スクシンイミド部位(E環部)の構築

(2) Cdc48/p97 上の標的部位の解明

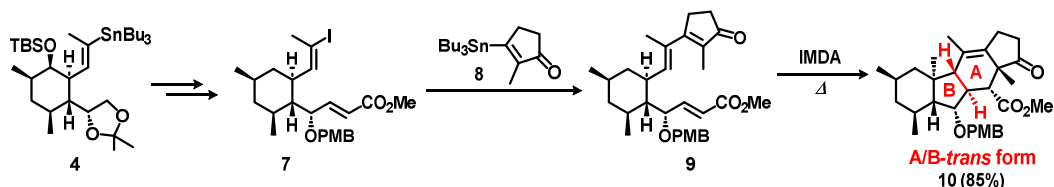
光アフィニティーラベル法を利用した分子プローブとして、**1** の Cdc48/p97 結合能に影響を与えないことが予想される位置にあらかじめ水酸基を導入し、ここにリンカー部を介してフェニルアジリジンユニットを結合させた化合物を合成することを計画した。

4. 研究成果

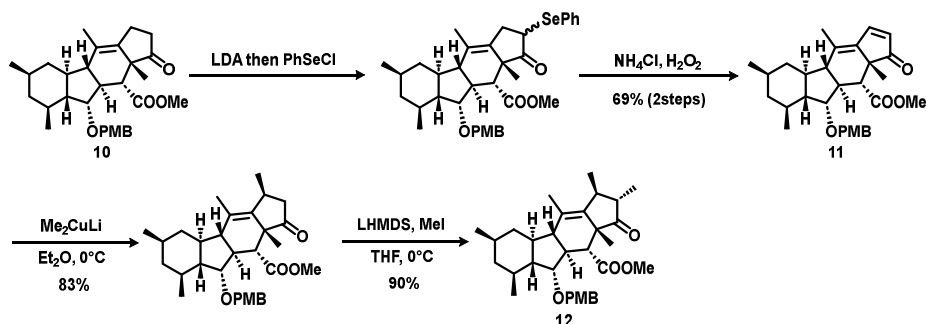
上記の研究計画に基づき、Phomapyrrolidone A (**1**)の四環性骨格部位の合成から検討を開始した。まず既知のキラルなエノン **2** とシロキシジエン **3** とのジアステレオ選択的な Diels-Alder 反応を経由して C 環部位を構築することにより、望みのビニルスタナン **4** を高収率かつ立体選択的に得る新たな方法を確立することができた。しかしながら、シクロペンタジエン構造をもつビニルヨードとの反応によって得られた IMDA 反応前駆体 **5** は不安定であり、加熱条件下で得られる IMDA 反応成績体 **6** は極めて低収率であった。



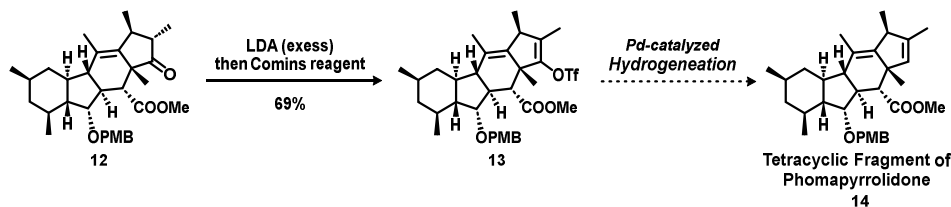
そこで、先に合成したビニルスタナン **4** を対応するビニルヨード **7** に導いた後、これにエノン構造をもつビニルスタナン **8** を作用させることにより、新たな IMDA 反応前駆体 **9** を合成した。この前駆体 **9** の IMDA 反応は加熱条件下で円滑に進行し、高収率で望みの四環性化合物 **10** を得ることに成功した。このようなケトンと共役した電子密度の低いジエンを利用した IMDA 反応の成功例は少なく、この点において新たな可能性を示すことができた。



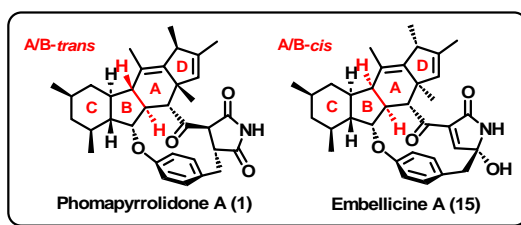
このようにして得られた四環性化合物 **10** を **1** の四環性フラグメントに導くべく、さらなる検討を行った。まず、**10** のシクロペンタノン部位の α 位に対するフェニルセレネニル化と続く酸化脱離反応により、エノン **11** を得た。このエノン **11** に対して Gilman 試薬を作用させる条件下で 1,4-付加反応を行ったところ、 β 位に完全かつ望みの立体選択性でメチル基を導入することができた。さらに、塩基性条件下でのエノラートイオンに対するメチル化反応により、 α 位に単一の立体化学でメチル基が導入された α,β -ジメチルケトン **12** に導くことができた。



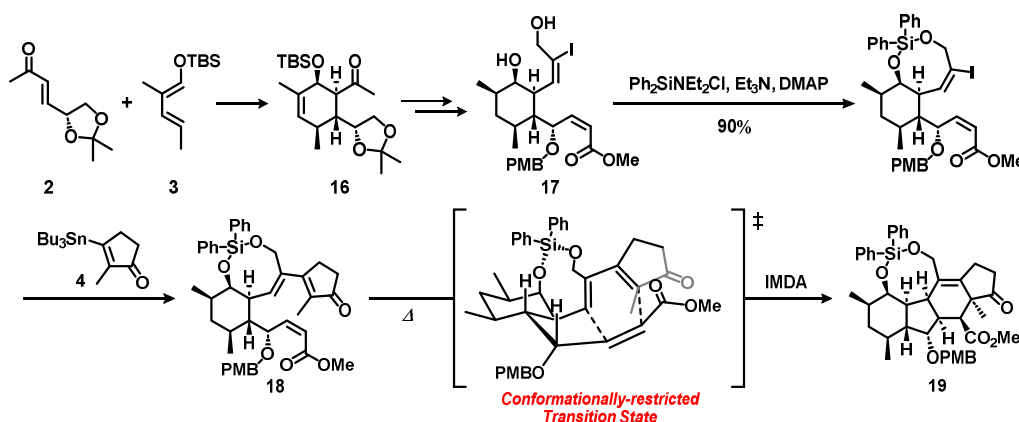
この α,β -ジメチルケトン **12** に対して、過剰量の LDA を作用させた後に Comins 試薬を添加したところ、望みのエノールトリフラート **13** に導くことができた。これにより、**1** の四環性フラグメント **14** の合成完了まであと 1 工程の段階にまで到達した。そこで、エノールトリフラート **13** に対するパラジウム触媒存在下での水素化反応についても種々検討したが、現在までに目的とする四環性フラグメント **14** を得るには至っていない。この原因については未だ明らかにすることができていないが、反応条件をさらに詳細に検討することにより、四環性フラグメント **14** の合成を達成できるものと考えている。



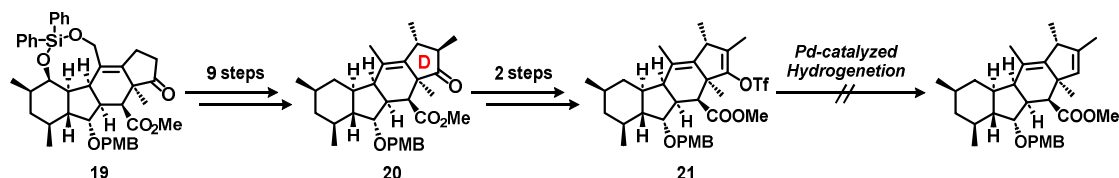
先にも述べたように、Phomapyrrolidone A (1) は A/B-*trans* 型の四環性骨格をもつ化合物であることが X 線結晶解析を通じて明らかにされているが、最初の単離構造決定時には A/B-*cis* 型の四環性骨格をもつものと誤って報告されていた。このような A/B-*cis* 型の四環性骨格をもつ 1 の類縁化合物としては、これまでに Embellicine A (15) が報告されている。この 15 には、TNF- α によって誘導された NF- κ B の転写活性を強力に阻害する興味深い生物活性が認められており、この作用にもプロテアソームにおける特定のタンパク質の分解が関係している可能性が推測される。そこで、上述の研究を通じて得られた知見を活用した 15 の全合成についても併せて検討することにした。



先に得られたジアステレオ選択的な Diels-Alder 反応成績体 16 から、ジオール 17 を經由してシリレン架橋部位の導入によって立体配座が規制された IMDA 反応前駆体 18 を合成した。この前駆体を加熱条件下で IMDA 反応に付したところ、ジエン部位の面選択性をシリレン架橋部位に基づく立体規制によって完全に逆転させることに成功し、望みの A/B-*cis* 型の四環性化合物 19 のみを立体選択的に得ることができた。

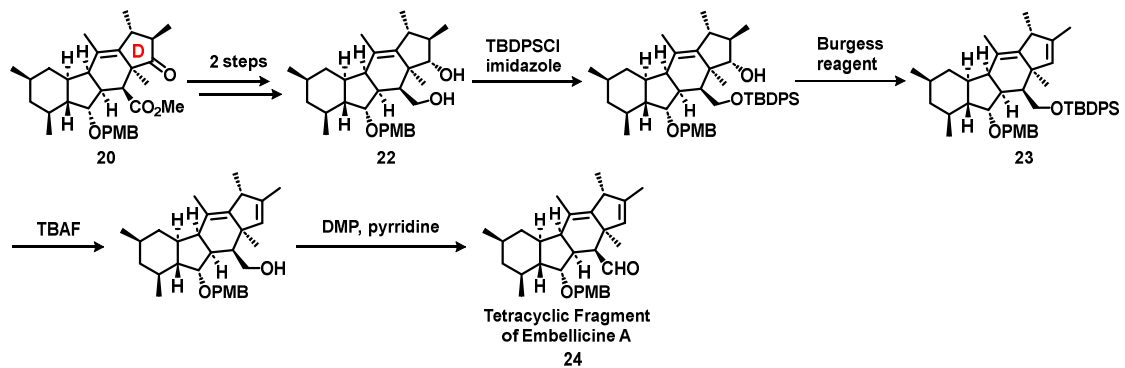


このようにして得られた A/B-*cis* 型の四環性化合物 19 に対して、シリレン架橋部位の除去と D 環部位への 2 つのメチル基の導入を順次行うことにより、 α,β -ジメチルケトン 20 に導くことができた。しかしながら、ここでも 20 から導かれるエノールトリフラート 21 のパラジウム触媒存在下での水素化反応を進行させることは困難であった。



そこで、やむなく α,β -ジメチルケトン 20 の還元反応によって得られるジオール 22 を經由した新たな合成経路について検討することにした。

ジオール 22 の第 1 級水酸基を TBDPS 基で保護した後、Burgess 試薬を作用させる条件下で脱水反応を行うことにより、アルケン 23 を得ることに成功した。さらに TBDPS 基の除去と生じた第 1 級水酸基の酸化反応を順次行うことにより、Embellicine A (15) の四環性フラグメント 24 の合成を完了することができた。



以上に述べたように、本研究の期間内において Phomapyrrolidone A (1) の全合成を完成するまでには至らなかったが、四環性フラグメントの合成完了まであと 1 工程の段階にまで到達することができた。よって、近い将来に世界初の不斉全合成を達成しうるものと考えている。また、本研究において得られた知見に基づき、NF- κ B 阻害活性をもつ類縁化合物である Embellicine A (15) の全合成にも取り組んだ結果、こちらは四環性フラグメントの合成を達成することができた。今後は 1 および 15 の全合成の完成に加えて、標的部位を解明するためのプローブ分子の合成に向けた検討を継続していく予定である。

< 引用文献 >

- 1) MacLeod, J. K., Moeller, P. D. R., Bandara, B. M. R., Gunatilaka, A. A. L., Wijeratne, E. M. K., *J. Nat. Prod.* 76(10), 1860–1865 (2013).
- 2) Kang, M. J., Wu, T., Wijeratne, E. M. K., Lau, E. C., Mason, D. J., Mesa, C., Tillotson, J., Zhang, D. D., Gunatilaka, A. A. L., La Clair, J. J., Chapman, E., *ChemBioChem.* 15(14), 2125-2131 (2014).
- 3) Chen, Y., Liu, A., Huang, Y., Liu, L., He, J., Wang, L., Yuan, J., She, Z., *J. Nat. Prod.* 82(7), 1752–1758 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井 侑耶、山内 敦貴、内呂 拓実
2. 発表標題 Embellicine Aの不斉全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 抗腫瘍性物質Tricobamide Aの二環性ラクタム部位の合成研究
2. 発表標題 山口 桃佳、内呂 拓実
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田翼、坪郷 哲、田中 健太、内呂 拓実
2. 発表標題 NF- κ B 阻害活性物質 Embellicine A の四環性骨格の構築法の開発
3. 学会等名 第64回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福原 慎ノ介、坪郷 哲、田中 健太、内呂 拓実
2. 発表標題 Pyrrocidine A のデカヒドロフルオレン骨格部位構築法の確立
3. 学会等名 第64回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田 翼、坪郷 哲、田中 健太、内呂 拓実
2. 発表標題 NF- B阻害物質Embellicine Aの合成研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会(広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福原 慎ノ介、山口 桃佳、坪郷 哲、田中 健太、内呂 拓実
2. 発表標題 Pyrrocidine Aの不斉全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会(広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大井 旬、豊田 輝道、寺井 麟太郎、内呂 拓実
2. 発表標題 Pyrrocidine A のデカヒドロフルオレン骨格構築法の改良に向けた検討
3. 学会等名 第 83 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂井 侑耶、山内 敦貴、内呂 拓実
2. 発表標題 Embellicine A の A/B-cis 縮環型四環性骨格部位の合成
3. 学会等名 第 84 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

上記の学会発表のうち、2件目（Pyrrocidine Aの不斉全合成研究）では、発表者（福原 慎ノ介）が日本薬学会第141年会学生優秀発表賞、8件目（Embellicine AのA/B-cis 縮環型四環性骨格部位の合成）では、発表者（坂井 侑耶）が第84回関東支部シンポジウム優秀発表賞をそれぞれ受賞した。

Embellicine AのA/B-cis型の四環性フラグメントの合成については、英語による論文発表を準備中である。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------