

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21603009

研究課題名（和文）活性天然物由来プローブ分子による新規抗がんおよび抗 HIV 標的蛋白の解明

研究課題名（英文）Elucidation of new anti-tumor and anti-HIV target proteins by using probe molecules derived from bioactive natural products

研究代表者

村上 啓寿 (Murakami Nobutoshi)

京都薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：00210013

研究成果の概要（和文）：がん細胞の増殖やエイズウイルス(HIV)の複製に関与する蛋白の核外移行阻害を阻害し、その機能を阻害する活性天然物である peumusolide A および osthol の基本骨格分子に、標的蛋白との共有結合を形成させる光親和性基であるジアジリン基と標的蛋白-プローブ複合体の精製、検出に必要なビオチンを組み入れたジアジリン-ビオチンユニットを導入したプローブ分子の合成に成功した。さらに、合成したプローブ分子が、蛋白ラベル化に必要な光照射下でも安定でかつ、標的蛋白解明のための十分な活性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of new anti-tumor and anti-HIV target proteins has been investigated by using the probe molecules derived from the bioactive natural products, peumusolide and osthol, found by our group. Consequently, we disclosed the respective probe molecules not only containing the diardine-biotin unit to capture and purify target proteins under photo-irradiation but also inhibiting nuclear-export of MEK and Rev potently.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：天然物化学、生物有機化学、生薬学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：プローブ分子、抗 HIV、抗がん、天然物、標的蛋白

1. 研究開始当初の背景

がん細胞増殖に関与する MEK やエイズウイルス(HIV)の複製に関与する Rev 蛋白は、約 10 残基のアミノ酸配列からなる核外移行シグナル(NES)を有し、核から細胞質へと輸送され、その機能を発現する。これら蛋白の核外移行過程を阻害する分子は、新規作用機序の抗がん剤や抗 HIV 薬の開発に繋がることが強く期待されるにも関わらず、これまでこれら両蛋白の核外移行阻害分子の探索はほとんど行われていなかった。

このような背景のもと、申請者は、薬用植物から両蛋白の核外移行阻害天然物としてポリケチド peumusolide A ならびにプレニルクマリン osthol を見出し、両者が実際に抗がんならびに抗 HIV 作用を示すことを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者自らが見出したがん細胞増殖に関与する MEK やエイズウイルス(HIV)の複製に関与する Rev 蛋白の核外移行を阻害し、実際に抗がんおよび抗 HIV 作用を示す薬用植物より単離構造決定した天然物である peumusolide A ならびに osthol の作用機序を明らかにすることを目的として、合成プローブ分子を用いて両活性天然物の標的蛋白の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 申請者が見出した活性両天然物の標的蛋白を解明するには、その蛋白をラベル化し単離する必要がある。そのラベル化は光照射で行うが、そのためには標的蛋白との共有結合を形成させる光親和性基であるジアジリン基と標的蛋白-プローブ複合体の精製、検出に用いるビオチンを組み入れたジアジリン-ビオチンユニットが導入が必要である。しかしながら、両天然物にジアジリン-ビオチンユニットを導入する足がかりとなる官能基は存在しな

い。そこで、ジアジリン-ビオチンユニット導入可能な水酸基を有する基本ユニットとなる化合物の合成を行う。

Peumusolide A については、既に申請者が開発したアナログの合成手法を利用して、側鎖末端に水酸基を有するアナログを合成する。

また、osthol については、天然物の脱メチル化が極めて困難であることから、methoxyl 基を水酸基とした demethyl 体の実用的な化学合成法を開発する。

(2) 次に、上記で合成した基本ユニットとなる水酸基を有する化合物とジアジリン-ビオチンユニットを縮合させてプローブ分子の合成を行う。その合成は、基本ユニット分子にジアジリン-ビオチンユニットを直接エステル化したもの他に、スペーサーとしてアルキル鎖長の異なるヒドロキシカルボン酸やポリエチレングリコールなど導入した種々のプローブを合成する。

(3) 合成した各種プローブ分子については、HeLa 細胞を用いた MEK 核外移行阻害活性や Rev 蛋白核外移行阻害活性ならびに光照射下による安定性を評価し、標的蛋白ラベル化に実用可能なプローブ分子の選抜を行う。

(4) 上記で選抜したプローブ分子を用いて、光照射下 HeLa 細胞を用いて標的蛋白のラベル化を検討する。

4. 研究成果

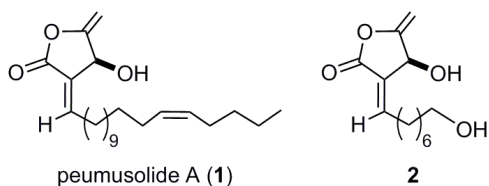
(1) MEK および Rev 蛋白核外移行阻害を示す両活性天然物の基本コア分子の合成

① MEK 核外移行阻害天然物 peumusolide A 基本コア分子の合成

MEK 核外移行を阻害し、抗がん作用を示す天然物 peumusolide A (1) について、ジアジリン-ビオチンユニットが導入可能な水酸基を側鎖末端に有する基本コア分子の合成を検討した。我々は、すでに 2-yn-1-ol に対する位置および立体選択的ヒドロヨウ素

化反応により得られたヨードアルケンに 2-yn-1-al を縮合させ全炭素骨格を構築した後に、数工程で誘導される 1-yn-4-en-3-one に対する不斉還元を用いる peumusolide A (1) アナログの立体選択的合成法を開発している。さらに、本法を用いて合成した側鎖炭素数が 7 個であるヘプチルアナログが、1 と同程度の MEK 核外移行阻害を示すことも明らかにしている。

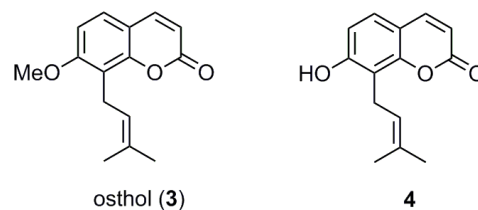
そこで、今回、本法を適用してヘプチルアナログと同じ側鎖炭素数を有し、その末端に水酸基を有する基本コア分子(2)の合成を計画した。末端水酸基を *t*-butyldimethylsilyl 基で保護した 2-yn-1-ol を用いて、本法に従い 2 の合成を検討したところ、全行程問題無く反応が進行し、目的とする基本コア分子(2)を得ることができた。



② Rev 蛋白核外移行阻害天然物 osthol 基本コア分子の合成

Rev 蛋白の核外移行を阻害し、抗 HIV 作用を示す天然物 osthol(3)については、不飽和ラクトン構造ならびに 6 位イソプレニル基が活性発現に必須の部分構造であることを明らかにしていることから、7 位メトキシル基を水酸基へと置換した 7-*O*-demethyl 体(4)を基本コア分子として設計した。

天然物の脱メチル化を種々検討したが極めて困難であることから、7-*O*-demethyl 体(4)の実用的な合成法の検討を行った。2,4-dihydroxybenzaldehyde を出発物質として、Claisen 転位によるイソプレニル基の導入、Wittig 反応による末端ジビニル構造の構築、第 2 世代の Grubs 触媒を用いた閉環メタセシスによる不飽和ラクトン環の形成を経由して、目的とする 7-*O*-demethyl 体(4)の実用的な合成法を確立することができた。



③ 両基本コア分子の蛋白核外移行阻害能の検定

合成した両アナログ (2, 4) について、間接蛍光抗体法により MEK および Rev の核外移行阻害能を評価した。その結果、両者が標的蛋白解明のためのプローブ分子のコア構造になる十分な蛋白核外移行阻害活性を示すことを明らかにした。

(2) MEK および Rev 蛋白核外移行阻害を示す両活性天然物由来のプローブ分子の合成

① MEK 核外移行阻害天然物 peumusolide A 由来のプローブ分子の合成

MEK 核外移行を阻害し、抗がん作用を示す天然物 peumusolide A(1)について、すでに昨年度合成した強力な MEK 核外移行阻害活性を有し、水酸基を側鎖末端に有する基本コア分子に対して、標的蛋白との共有結合を形成させる光親和性基であるジアジリン基と標的蛋白-プローブ複合体の精製、検出に用いるビオチンを組み入れたジアジリン-ビオチンユニットを種々のスペーサーを用いて縮合させ、数種のプローブ分子の候補物質を合成した。

② Rev 蛋白核外移行阻害天然物 osthol 由来のプローブ分子の合成

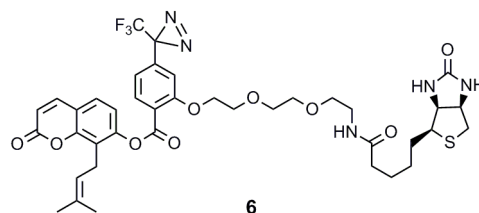
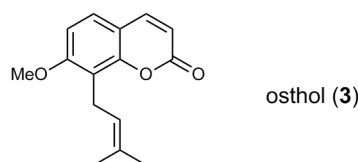
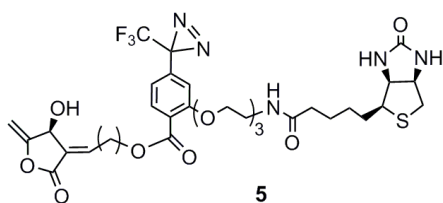
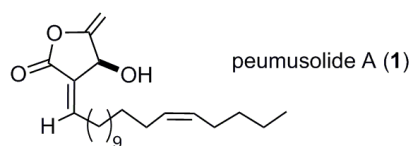
Rev 蛋白の核外移行を阻害し、抗 HIV 作用を示す天然物 osthol(3)については、すでに昨年度合成した強力な Rev 蛋白核外移行阻害活性を有し、7 位メトキシル基を水酸基へと置換した基本コア分子に対して、標的蛋白との共有結合を形成させる光親和性基であるジアジリン基と標的蛋白-プローブ複合体の精製、検出に用いるビオチンを組み入れたジアジリン-ビオチンユニットを種々のスペーサーを用いて縮合させ、数種のプロ

ープ分子の候補物質を合成した。

③ 蛋白ラベル化に適した候補分子の選抜

Peumusolide A(1)の数種のプローブ分子候補物質について、間接蛍光抗体法によるMEK核外移行阻害能ならびにHeLa細胞内での光安定性の評価を行った。その結果、ジアリジン部分とビオチンをトリエチレングリコールをスペーサーとして用いて合成したプローブ分子5(IC₅₀=15.2 μM)がHeLa細胞内で光安定性を有し、最も強い活性を示した。本プローブ分子は、シーズ分子である天然物1(IC₅₀=3.7 μM)と比較すると若干活性が低下していたものの、依然として強いMEK核外移行阻害活性を示し、標的蛋白解明のためのプローブ分子に成り得ることを明らかにした。

また、osthol(3, IC₅₀=1.6 μM)の数種のプローブ分子候補物質について、我々が構築したHA-RevプラスミドをHeLa細胞に随時トランスフェクションする間接蛍光抗体法によりRev蛋白の核外移行阻害能を評価した。その結果、osthol(3)についてもジアリジン部分とビオチンをトリエチレングリコールをスペーサーとして用いて合成したプローブ分子6(IC₅₀=12.1 μM)がHeLa細胞内で光安定性を有し、最も強い活性を示した。本プローブ分子は、シーズ分子とした天然物3(IC₅₀=1.6 μM)と比較すると若干活性が低下していたものの、依然として強いRev蛋白核外移行阻害活性を示し、標的蛋白解明のためのプローブ分子に成り得ることが判明した。



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6件)

1. Tamura, S.; Doke, S.; Murakami, N.: Total synthesis of peumusolide A, NES non-antagonistic inhibitor for nuclear export of MEK. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8476-8480 (査読有).
2. Tamura, S.; Fujitani, T.; Kaneko, M.; Murakami, N.: Prenylcoumarin with Rev-export inhibitory activity from *Cnidii Monnieris Fructus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3717-3720 (査読有).
3. Tamura, S.; Tonokawa, M.; Murakami, N.: Stereo-controlled synthesis of analogs of peumusolide A, NES non-antagonistic inhibitor for nuclear export of MEK. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3134-3137 (査読有).
4. Tamura, S.; Kaneko, M.; Shiomi, A.; Yang, G. M.; Yamaura, T.; Murakami, N.: Unprecedented NES non-antagonistic inhibitor for nuclear export of Rev from *Sida cordifolia*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1837-1839 (査読有).
5. Tamura, S.; Hattori, Y.; Kaneko, M.; Shimizu, N.; Tanimura, S.; Khono, M.: Peumusolide A, unprecedented NES non-antagonistic inhibitor for nuclear export of MEK. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1678-1681. (査読有).
6. Tamura, S.; Shiomi, A.; Kaneko, M.; Ye, Y.; Yoshida, M.; Yoshikawa, M.; Kimura, T.;

Kobayashi, M.; Murakami, N., : New Rev Export Inhibitor from *Alpinia galanga* and Structure Activity Relationship. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2555-2557 (査読有).

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 啓寿 (MURAKAMI NOBUTOSHI)

京都薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号 : 00210013

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :