

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590034

研究課題名（和文）天然物合成を基盤とするエピジェネティクスを指向した構造活性相関研究

研究課題名（英文）SAR studies for epigenetic research based on natural product synthesis

研究代表者

濱島 義隆 (HAMASHIMA YOSHITAKA)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：40333900

研究成果の概要（和文）：遺伝子の発現制御機構の異常は、ガンなどの疾病と密接に関連している。我々は、新しい創薬標的として、DNA の構造を規定するヒストンのメチル化による制御機構に興味を持ち、研究を行っている。本研究では、ヒストンメチル化酵素阻害活性を有する天然物 (+)-Chaetocin の化学合成法を開発し、さまざまな誘導体合成へと展開した。その結果、ガン細胞において過剰発現が認められているヒストンメチル化酵素 G9a に対して、強い阻害活性を有する新規化合物の創成に成功した。

研究成果の概要（英文）：The disorder of gene expression machinery is involved in various diseases including cancer. We have been focusing on controlling mechanism by selective methylation of histone protein that supports the structure of DNA as a novel target for drug discovery. In this study, we have developed an efficient method for the chemical synthesis of (+)-chaetocin, which is one of the promising inhibitors of histone methylation. This method allowed for the preparation of various analogs. Finally, we have succeeded in creating a novel and potent small molecule inhibitor of histone methyltransferase G9a, which is known to be responsible for cancerous diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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・化学系薬学

キーワード：天然物合成, エピジェネティクス, ヒストンメチル化, 構造活性相関, Chaetocin, ジスルフィド結合

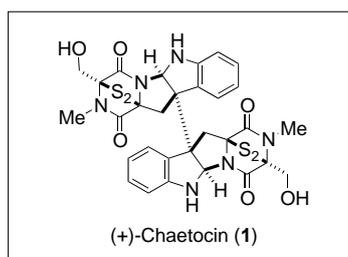
1. 研究開始当初の背景

生命の設計図である DNA は基本的にどの細胞でも共通なものであるが、それぞれの細胞が遺伝子の発現パターンを制御することで、異なる形質を獲得できる。世代を超えた

遺伝子発現の制御機構をエピジェネティクスといい、主に DNA のメチル化および DNA を折り畳んでいるヒストンと呼ばれるタンパク質の化学的修飾により行なわれている。エピジェネティクス研究は、細胞が如何に分

化するのかという学術的な興味だけでなく、その異常が様々な疾病と関与しているため、医薬品開発の観点からも極めて重要である。我々は特に、ヒストンの化学修飾に興味を抱き、天然由来の低分子化合物をリードとする構造活性相関研究からバイオプローブとして真に役に立つ有用分子を創製することを目標としている。

ヒストン是对应する酵素によってリン酸化、アセチル化、メチル化、およびユビキチン化の修飾を受けることが知られているが、その中でもメチル化は化学的に安定であることから世代を超えた継承に深く関ると考えられている。ヒストンメチル化酵素は、ヒストン上の特定の残基に対して複数の酵素が作用することが分かっている。さらにメチル化の程度もモノメチル化からトリメチル化と多段階に渡るため、メチル化による制御機構はとて複雑である。したがって、それぞれの酵素に特異的な阻害剤は遺伝子発現の制御メカニズムを知る上で極めて有用なバイオプローブになると考えられる。



(+)-Chaetocin (**1**) は、1970年に *Chaetomium minutum* から単離された真菌の二次代謝産物である。2005年、**1** がヒストンメチル化酵素阻害能を有することが報告された。遺伝子の発現を司るヒストンのメチル化は、種々の疾患に関与する事が示唆されているが、その制御メカニズムの全容は未解明である。そのため、ヒストンのメチル化酵素阻害剤である **1** は有用なバイオプローブとして期待されている。**1** の構造は、1972年に X 線結晶構造解析により決定されており、エピジチアジケトピペラジン骨格が二量化した対称な構造をしている。また、様々な条件に不安定なジスルフィド結合と 8 カ所の不斉点を有し、合成化学の見地から見ても極めて興味深い標的化合物である。しかしながら、その複雑な構造のために単離・構造決定から 40 年近く経過するにもかかわらず、我々が研究を開始した時点では **1** の合成研究は全く報告されていなかった。天然からの供給量も限られていることから、ヒストンメチル化酵素阻害剤として有望な **1** を化学合成により安定的に供給するは大変重要である。また、**1** は細胞毒性を有することが報告されてい

るため、毒性の無い、より優れたメチル化酵素阻害能を有する分子を創製する上で、構造活性相関研究は極めて重要である。そこで我々は、**1** の全合成ルートを確立し、それを基盤とする構造活性相関研究をおこなうべく、全合成研究に着手した。

2. 研究の目的

天然から極微量しか入手できない (+)-Chaetocin (**1**) の化学合成法を確立し、生物学的な研究に応用できるように、質的および量的な供給を可能とする。全合成研究を基盤として、**1** の構造活性相関研究を行う。これにより、**1** の活性発現に必要な部分構造を抽出し、より単純で活性の強い阻害剤を獲得する。それらを積み重ねて、複数存在するヒストンメチル化酵素それぞれに対する選択的な阻害剤を見出し、エピジェネティクス研究における重要な分子ツールを提供することを目的とする。また、阻害剤と酵素との結合様式を明らかにする検討も行い、より選択的で強力な阻害剤を設計するとともに、天然物の問題点である細胞毒性を分離した分子の開発を目指す。

3. 研究の方法

(+)-Chaetocin は、トリプトファンのインドール部位が酸化されることにより生じた炭素ラジカル種が二量化・環化し、特異な八環性対称構造を形成することが生合成研究によって示唆されている。そこで、その化学合成法においては、安価で入手容易なアミノ酸を出発原料とし、四環性化合物のラジカル的二量化反応を鍵とする短工程合成法を開発する。天然物のジスルフィド官能基の導入は、ラジカル的プロモ化反応を用いることでジケトピペラジンの α 炭素を酸化し、置換反応によりチオールへト変換することとした。

(+)-Chaetocin の構造活性相関に関しては、全合成研究を基盤として、様々な誘導体合成を行なった。特に、硫黄官能基の効果と二量化構造の必要性に焦点を当てながら検討を進めた。合成した化合物の阻害活性は、ヒストンメチル化酵素の中で、癌との関係が指摘されているヒストン H3 の 9 番目のリシン残基 (ヒストン H3K9) をポリメチル化する G9a に対して ELISA 法を用いて評価し、活性発現に必須な部分構造を明らかにした。得られた結果をもとに、より単純な構造からなるヒストンメチル化酵素の新規阻害剤を設計することとした。

4. 研究成果

(1) (+)-Chaetocin (1) の全合成

1 の対称な構造と生合成仮説に着目し、図 1 に示した逆合成ルートを考案した。酸化還元条件や塩基性条件に不安定なジスルフィド結合は、置換反応を利用することで合成の最終段階で導入することとし、その前駆体としてジケトピペラジン部位の α 位を酸化したテトラオール 2 を設定した。3 に示すように、硫黄求核剤は母核との立体反発を避けるように二量体構造の外側から反応し、天然物と一致する立体化学を与えると予想した。2 の合成にあたり、まず二量体構造を構築してから α 位を酸化するルート A を検討した。4 の合成にあたっては、最初にジケトピペラジン 7 のインドール環の一電子酸化を経る酸化的環化—二量化を検討したが、複雑な混合物を与えるのみであった。そこで、Movassaghi らの報告を参考に、セリンおよびトリプトファンから誘導したブロモ体 5 に一価のコバルト錯体 $[\text{CoCl}(\text{PPh}_3)_3]$ を用いる還元的ラジカル二量化を行ったところ、二量化は円滑に進行し 4 を得ることができた。しかしながら、3 の α 位の酸化については、塩基性条件やラジカル条件を種々検討したが、化合物の分解がおこるのみで、目的とする生成物を得ることはできなかった。そこで次に四環性化合物 5 の α 位を酸化して 6 へと変換したのちに二量化をおこなうルート B を検討することとした。

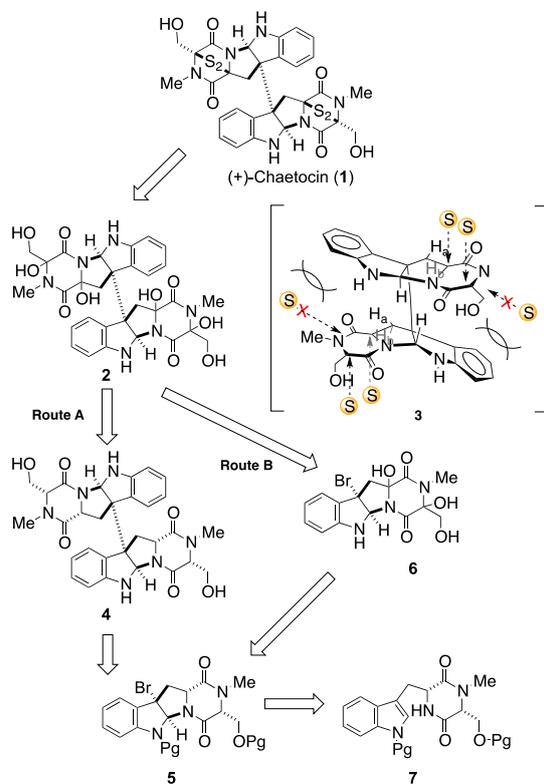


図 1 Chaetocin の逆合成解析

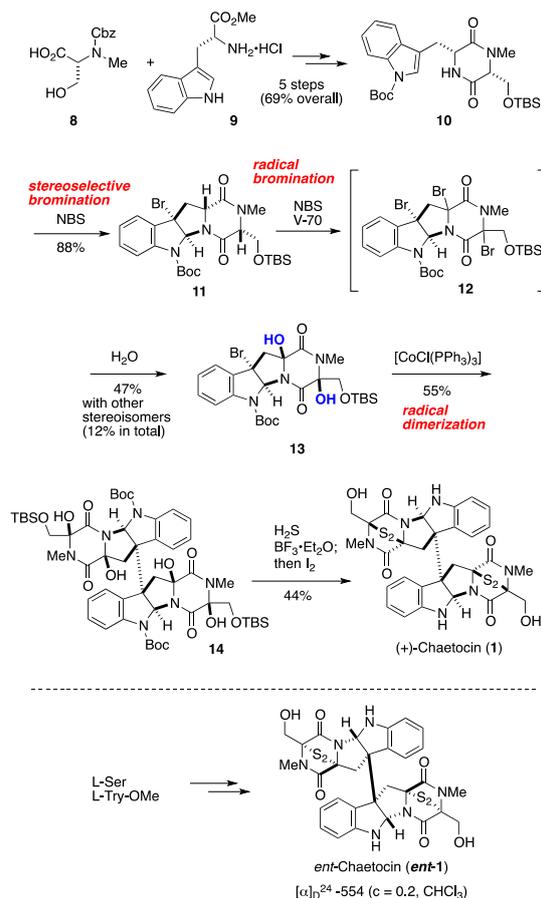


図 2 Chaetocin の全合成

実際の合成スキームを図 2 に示す。D-セリンから誘導した *N*-ベンジルオキシカルボニル-*N*-メチル-D-セリン 8 と D-トリプトファンメチルエステル 9 を出発原料として、ジケトピペラジン 10 を常法に従って収率良く合成した。得られた 10 と *N*-ブロモスクシンイミド (NBS) をアセトリトル中 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で反応させたところ、*exo* 閉環体 11 を単一生成物として収率 88% で得た。11 の相対立体配置の決定は誘導体の X 線結晶構造解析によりおこなった。続いて、11 に対して室温下で使用できるラジカル開始剤 2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル) (V-70) を用いたラジカルブロモ化の条件に付したところ、反応は円滑に進行しジブロモ体 12 を得た。11 を単離することなく水と反応させたところ、ヘミアミナル部位の立体異性によるジアステレオマーが四つ生成したが、そのうち水酸基が同じ方向を向いたジオール 13 を収率 47% で単離することができた。一価のコバルト錯体である $\text{CoCl}(\text{PPh}_3)_3$ を用いて 13 の還元的ラジカルカップリングをおこなった。その結果、不安定なヘミアミナル構造を有するにもかかわらず 12 の二量化が円滑に進行し、望みとする二量体 14 を収率 55% で得ることができた。最後に、

13 に対して三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体存在下、硫化水素を反応させたところ、全ての保護基の除去と同時にジケトピペラジンの α 位にチオール基を導入することができた。これを単離することなくヨウ素で酸化してジスルフィド結合を形成し、1 の初の全合成を達成した。

(2) 構造活性相関研究

1 の絶対立体配置および 1 の構造上の特徴である硫黄官能基がヒストンメチル化酵素阻害活性に及ぼす影響を合成化学的に調べるために、全合成ルートをもとに L-アミノ酸誘導体を出発原料として非天然型の *ent*-Chaetocin (*ent*-1) および硫黄官能基欠損型 Chaetocin 類縁体 15, 16 を合成した (図 2)。また、1 の TBS 保護体 17, テトラチオール体 18, チオエーテル体 19, 四環性エピジチアジケトピペラジン 20 をそれぞれ合成し、それらの鏡像異性体も合成した。

得られた類縁体の生物活性は、種々の疾病への関与が報告されているヒストンメチル化酵素 G9a に対する阻害活性試験を ELISA 法により行うことで評価した (図 3)。興味深いことに、1 とその光学異性体である *ent*-1 はほぼ同程度の阻害活性を示した。また、硫黄官能基が欠損した 15 および 16 は阻害活性を全く示さなかった。このことから、Chaetocin の硫黄官能基が、G9a 阻害活性に必須であることが明らかとなった。さらにジスルフィド結合の重要性を確認するため、化合物 18 と 19 の阻害活性を評価した。その結果、還元体 18 では活性が 1 の低下し、チオエーテル体 19 は全く阻害活性を示さなかった。このことから、ジチオール基の酸化段階も阻害活性に重要であることが分かった。

次に、天然物の炭素骨格について検討した。二量体構造の必要性を検証すべく、四環性エピジチアジケトピペラジンである 20 を図 4 に示すように合成した。すなわち、図 2 で合成したジオール 13 の臭素原子をラジカル還元により除去し、得られた還元体に対してルイス酸存在下、硫化水素と反応させてジケトピペラジン上の水酸基をチオールへと変換した。この際、一級水酸基の TBS 基が同時に除去されると期待したが、収率よく除去することは極めて困難であった。また、種々の反応条件を検討したが、TBS 基を除去できなかった。そこで、TBS 体のチオールをヨウ素により酸化することで低収率ながら目的とする四環性化合物 20 を得た。1 の TBS 保護体 17 の阻害試験の結果より、TBS 基の影響は小さいと仮定し、20 の活性評価を行った。その結果、20 は 3.3 μM と最も高い阻害活性を示すこ

とが分かった。一方、*ent*-20 を合成し、その阻害活性を調べたところ、天然物とは異なり、活性は大きく減弱した。このことから、阻害活性には八環性骨格は必須ではないが、化合物の立体化学は酵素により強く認識されることが確認された。

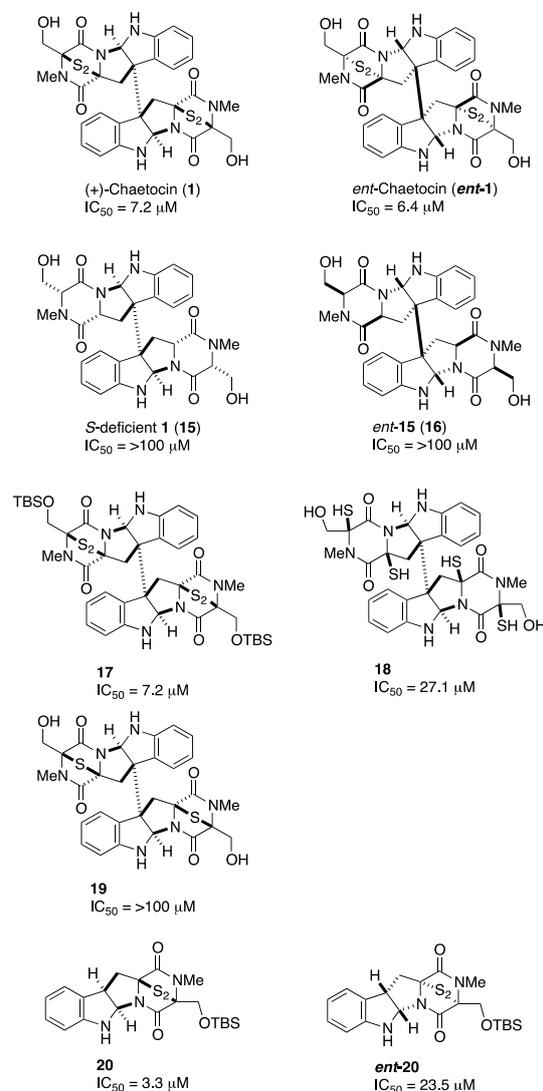


図 3 Chaetocin類縁体のG9a阻害活性評価

上記の結果を踏まえて、より単純なエピジチアジケトピペラジンの活性を検討した。1 の基本骨格を考慮し、セリンとプロリンからなる分子を設計・合成した (図 4)。すなわち、セリンとプロリン誘導体を縮合して得られた 23 に対して、これまでと同様にジスルフィド合成を行い、ポリチアジケトピペラジン 27 と 28 をラセミ体として合成した。得られた 2 つの化合物は、20 に相当する高い阻害活性を示した。さらに重要なことに、化合物 27 と 28 は、100 mM の高濃度条件でも高い細胞生存率を示した。このように、構造の簡素

化と天然物の問題点であった細胞毒性の軽減に成功した。

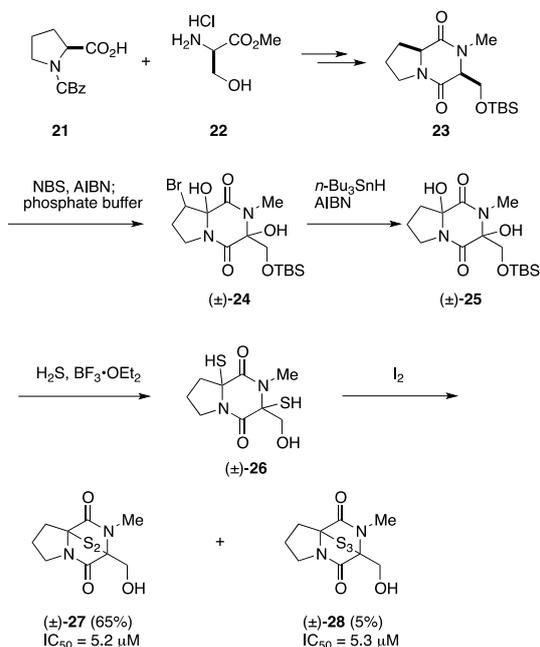


図 4 セリン-プロリン類縁体の合成

(3) 阻害メカニズムについての考察

Chaetocin (**1**) の G9a 阻害メカニズムについて以下のように考察した(図 5)。post-SET ドメインには 3 つのシステイン残基が存在し、活性中心を形成する SET ドメインの 1 つのシステインとともに亜鉛イオンにキレート配位した状態で存在している。G9a や SU(VAR)3-9 のような **1** が阻害活性を示すヒストンメチル化酵素群と SET7/9 のように阻害を全く受けない酵素群が報告されているが、それらの酵素の構造的な相違点は、前者は post-SET ドメインを有するが、後者は post-SET ドメインが欠損していることである。また、**1** は S-アデノシルメチオニン (SAM) と競合することが報告されていることから、**1** は SAM 結合部位付近に結合していることが予想される。Greiner らは、以前の報告において、アッセイ条件にジチオトレイトール (DTT) を過剰に加えても阻害活性が維持されることから、**1** のジスルフィド結合は阻害活性に関与しないと述べている。一方、今回の我々の結果からジスルフィド結合は必須であることが示された。また、SAM の結合部位は post-SET ドメインに接近していることが G9a 類縁体の X 線結晶構造解析により明らかにされている。以上のことから、**1** の阻害活性にはそのユニークなジスルフィド官能基とシステインリッチ領域の亜鉛と

の相互作用が重要ではないかと推定している。

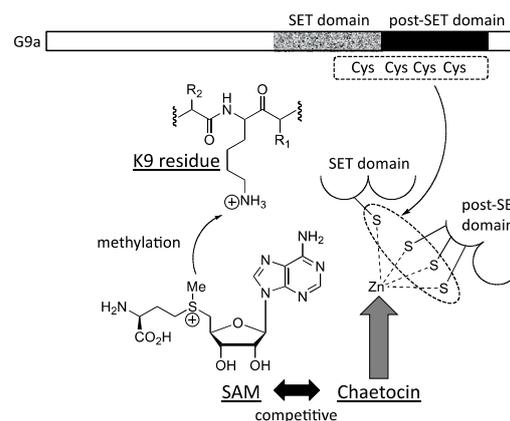


図 5 想定阻害メカニズム

一方、Greiner らは、同じ post-SET ドメインを有するヒストンメチル化酵素の中でも **1** の SU(VAR)3-9 に対する阻害能が G9a に対するものよりもはるかに高いことを報告している。本研究の G9a 阻害活性試験の結果は、**1** の絶対立体化学は G9a には厳密に認識されなかったことを示しているが、他の類縁酵素との識別には **1** の複雑な二量体構造が寄与しているのではないかと考えている。一方、合成類縁体である **20** の場合、絶対立体配置は強く認識され、阻害活性に大きな違いが見られた。このことより、化合物 **27** および **28** の光学活性体での評価が今後の課題としてあげられる。

さらに、ヒト白血病細胞 HL60 に対する細胞死誘導能を調べたところ、天然型ではなく非天然型の *ent-1* の方が、低い濃度でカスパーゼ 8 に依存したアポトーシスを誘導するという興味深い現象も見いだした。これら細胞死誘導のメカニズムの解明は、ヒストンメチル化酵素阻害活性と細胞毒性を分離した化合物の設計合成に役立つものと考えている。

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 6 件)

- ① E. Iwasa, Y. Hamashima, S. Fujishiro, E. Higuchi, A. Ito, M. Yoshida, M. Sodeoka, Total Synthesis of (+)-Chaetocin and its Analogs: Their Histone Methyltransferase G9a Inhibitory Activity, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読あり, 132 巻, 2010, 4078-4079.
- ② Y. Teng, K. Iuchi, E. Iwasa, S. Fujishiro, K. Dodo, Y. Hamashima, M. Sodeoka, Unnatural enantiomer of chaetocin shows

strong apoptosis-inducing activity through caspase-8/caspase-3 activation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読あり, 2010, 20 巻, 5085-5088.

- ③ E. Iwasa, Y. Hamashima, M. Sodeoka, Epipolythiodiketopiperazine Alkaloids: Total Syntheses and Biological Activities, *Israel J. Chem.*, 査読あり, 51 巻, 2011, 420-433.
- ④ E. Iwasa, S. Fujishiro, Y. Hamashima, M. Sodeoka, Total syntheses of chaetocin and ent-chaetocin, *Tetrahedron*, 査読あり, 67 巻, 2011, 6587-6599.
- ⑤ M. Sodeoka, K. Dodo, Y. Teng, K. Iuchi, Y. Hamashima, E. Iwasa, S. Fujishiro, Synthesis and Biological Activities of Chaetocin and its Derivatives, *Pure Appl. Chem.*, 査読あり, 2012, 84 巻, 1369-1378.
- ⑥ S. Fujishiro, K. Dodo, E. Iwasa, Y. Sohtome, Y. Hamashima, A. Ito, M. Yoshida, M. Sodeoka, Epidithiodiketopiperazine as a pharmacophore for protein lysine methyltransferase G9a inhibitors: Reducing cytotoxicity by structural simplification, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読あり, 2013, 23 巻, 733-736.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 岩佐江梨子, 濱島義隆, 藤城信哉, 樋口瑛介, 伊藤昭博, 吉田稔, 袖岡幹子, ヒストンメチル化阻害剤 (+)-Chaetocin および類縁体の合成と構造活性相関, 日本ケミカルバイオロジー学会第五回年会, 2010年5月18-19日, 東京.
- ② 濱島義隆, 岩佐江梨子, 藤城信哉, 樋口瑛介, 伊藤昭博, 吉田稔, 袖岡幹子, ヒストンメチル化阻害剤 (+)-Chaetocin および類縁体の合成と構造活性相関, 第9回新規素材探索研究会, 2010年6月11日, 横浜.
- ③ 濱島義隆, 岩佐江梨子, 藤城信哉, 樋口瑛介, 伊藤昭博, 吉田稔, 袖岡幹子, ヒストンメチル化阻害剤 (+)-Chaetocin および類縁体の合成と構造活性相関, 第52回天然有機化合物討論会, 2010年9月29日-10月1日, 静岡.
- ④ E. Iwasa, Y. Hamashima, S. Fujishiro, E. Higuchi, A. Ito, M. Yoshida, M. Sodeoka, Syntheses of (+)-chaetocin and its analogues and their histone methyltransferase inhibitory activity, RIKEN Symposium on 2010 RIKEN Chemical Biology International Symposium, 2010年10月26-27日, 和光.
- ⑤ 藤城信哉, 岩佐江梨子, 濱島義隆, 樋口瑛介, 伊藤昭博, 吉田稔, 袖岡幹子, ヒストンメチル化酵素阻害剤 Chaetocin

の構造活性相関研究, 第29回メディスナルケミストリーシンポジウム, 2010年11月17-19日, 京都.

- ⑥ E. Iwasa, Y. Hamashima, S. Fujishiro, E. Higuchi, A. Ito, M. Yoshida, M. Sodeoka, Total synthesis of (+)-Chaetocin and its analogs: Their structure-activity relationship studies for histone methyltransferase G9a inhibitory activity, Pacificchem 2010, 2010年12月15-20日, Hawaii (USA).
- ⑦ Y. Hamashima, E. Iwasa, S. Fujishiro, E. Higuchi, A. Ito, M. Yoshida, M. Sodeoka, Synthesis of (+)-Chaetocin and Its Analogues: Investigation of Their Histone Methyltransferase Inhibitory Activity, AIMECS11, 2011年12月1日, 東京.
- ⑧ 藤城信哉, 岩佐江梨子, 藤玉鷗, 五月女宜裕, どの孝介, 濱島義隆, 樋口瑛介, 伊藤昭博, 吉田稔, 袖岡幹子, ヒストンメチル化酵素阻害剤Chaetocinの類縁体合成と構造活性相関研究, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28-31日

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/wako/organic/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱島 義隆 (HAMSHIMA YOSHITAKA)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号：40333900

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：