

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710264

研究課題名（和文） 新規 V-ATPase 阻害剤 Destruxin E の構造活性相関研究と機能解析

研究課題名（英文） Library Synthesis of Destruxin E and its Biological Evaluation

研究代表者

吉田 将人 (YOSHIDA MASAHIRO)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：80511906

研究成果の概要（和文）：ペプチド系天然物としては稀有な V-ATPase 阻害活性を有する destruxin E の構造活性相関およびその機能解析を目標に誘導体合成を検討した。全合成に倣い、固相合成法によりペプチド鎖の伸長後、液相中におけるマクロラクトン化による大員環構築、続いて側鎖上にエポキシドを構築することで、構造活性相関解明の足がかりとなる各種誘導体の合成を達成した。

研究成果の概要（英文）：Library synthesis of destruxin E utilizing solid-phase synthesis has been achieved. Parallel synthesis of the cyclization precursors was performed by solid-phase peptide synthesis. After cleavage from the polymer-support, MNBA-mediated macrolactonization in solution-phase, followed by the epoxide formation furnished destruxin E library containing side chain- or ring size-modified derivatives.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：V-ATPase, 環状ペプチド, ライブラリー, 構造活性相関

## 1. 研究開始当初の背景

液胞型 ATPase（以下、V-ATPase）は ATP の加水分解エネルギーを利用してプロトンを小胞内に輸送することで、内部の酸性化に寄与している。V-ATPase は真核細胞に普遍的に存在しているが、癌細胞では顕著に発現していることが明らかにされており、薬剤耐性や転移に関わっていると考えられている。また、

骨形成に重要な役割を果たす破骨細胞にも V-ATPase は存在し、周辺環境を酸性にすることにより骨を溶解させるが、この働きが亢進すると骨芽細胞による骨の再構築よりも速く溶解が起こるため、骨が脆くなり骨粗鬆症の発症へと繋がる。したがって、V-ATPase 阻害剤は新たな抗癌剤や骨粗鬆症治療薬の候補化合物として期待されることから、V-ATPase に対して有効な化合物の探索や活

性発現機構の解明といった化学生物学的研究の更なる展開が望まれている。

## 2. 研究の目的

ペプチド系天然物としては珍しい V-ATPase 阻害活性を有する destruxin E について、構造活性相関の解明と機能解析に向けた誘導体合成を検討し、具体的には以下の3点について研究を進める。

(1) 化合物を構成するアミノ酸側鎖官能基が活性に与える影響を調べるために、側鎖改変型誘導体を設計し、その合成を検討する。

(2) 天然物が有する母骨格の影響を明らかにするために、環の員数または窒素上のメチル基を増減させた構造改変型誘導体の合成を検討する。

(3) 結合タンパク質のつり上げなど機能解析を行うためのツールとして、destruxin E のアミノ酸側鎖をアジドリンカーに変えた分子プローブを設計し、その全合成を行う。

## 3. 研究の方法

申請者は、標的化合物である destruxin E (1) について固相合成法を用いることにより初の全合成を達成するとともに、側鎖エポキシドの立体化学を決定し、V-ATPase 阻害活性発現にはエポキシドの立体化学が重要であることを明らかにしている (Organic Letters, 2010, 12, 3792-3795) (図1)。

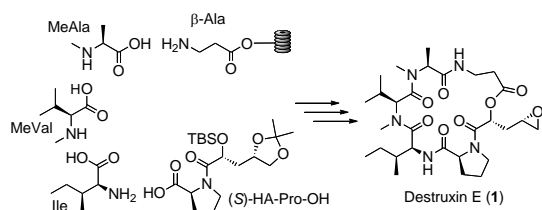


図1：固相法を用いた destruxin E の全合成

本研究における誘導体の合成は、全合成経路を参考にして固相合成法を用いて行う。また、多種多様な誘導体合成には対応するフラグメントを大量に必要とするため、大量供給可能な改良合成法についても検討する。

(1) 側鎖改変型 destruxin E 誘導体の合成  
Destruxin 類およびその構造類縁体は現在までに 30 種類以上単離・構造決定されている。類縁体にも同様に V-ATPase 阻害活性があると仮定し、天然物類縁体に含まれるアミノ酸残基を活用した誘導体合成を展開し、阻害活性への影響について評価する。

(2) 構造改変型 destruxin E 誘導体の合成  
環構造および窒素上の置換基の効果を調べるために、destruxin E が有する 19 員環を 18 または 20 員環へと変化させたもの、または窒素上のメチル基を取り除いた誘導体の合成について検討する。

(3) Destruxin E を基盤とする分子プローブの設計と合成  
つり上げの足がかりとなるアジド基を有する誘導体を 3 種類設計し、その合成を検討する。リジンの側鎖をアジド基へと変換したアミノ酸を調製し、固相法を活用した合成を行うことで誘導体へと導く。

## 4. 研究成果

### (1) 側鎖改変型 destruxin E 誘導体の合成

多種多様な誘導体の合成は、全合成により確立した固相合成法を用いることによって行うことにした。誘導体合成では十分量のフラグメントを用意する必要がある。そこで、誘導体合成の鍵となるヒドロキシカルボン酸-プロリンからなる 2 残基フラグメントの大量合成について検討した。過去の合成では、立体化学の決定のために非選択的なジオール化を経由したことで望む化合物の全収率が低いことが問題であった。本合成では容易に調製可能と考えられる **3** を設計し、ジアステレオ選択的なジオール化を行うことにより目的の **2** を得ることとした。この際、重要となるのは **3** に対するジオール化の立体選択性であり、一般的に末端アルケンのジオール化は選択性が低いことで知られている。

種々条件検討の結果、**3** に対し (DHQD)<sub>2</sub>PHAL を配位子として用いた不斉ジオール化を行ったところ、末端アルケンに対するジオール化としては高い選択性 (*S*:*R*=84:16) で望む *S*-ジオール **4** を得ることができ、続く 2 工程を経て目的とするフラグメント **2** の合成に成功した。本合成法は従来法に比べて短工程かつ約 3 倍の収率で **2** を供給可能である (図2)。

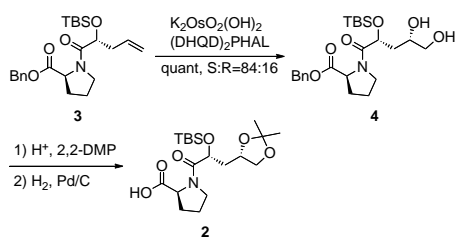


図 2 : 不斉ジオール化を利用した  
ジオールフラグメントの改良合成

得られたフラグメントを用い、固相法による環化前駆体の平行合成を行った。Ala, Val, Ile, Phe をコンビナトリアルに組み合わせた 4 残基ペプチドを調製後、先に得られた **2** を縮合し、固相からの切り出しによって望む環化前駆体を平行に合成した。得られた環化前駆体について、全合成で確立した合成法を参考に側鎖上にエポキシドの構築を行うことで、目的とする destruxin E 誘導体のライブラリー合成に成功した。

## (2) 構造改変型 destruxin E 誘導体の合成

天然物が有する 19 員環を 18 または 20 員環に、アラニンまたはバリン窒素上のメチル基を水素原子に置き換えた誘導体について合成を検討した。固相法によるペプチド鎖伸長後、固相上から切り出しを行い、液相中にてマクロラクトン化を試みた。環の員数または窒素上のメチル基を水素原子に置き換えても環化反応は問題なく進行した。環化反応により得られる化合物は構造が変化することで天然物とは異なり極性などの物性が大きく変わることが分かった。続いて、側鎖上にエポキシドを導入することで所望の誘導体の合成を達成した (図 3)。

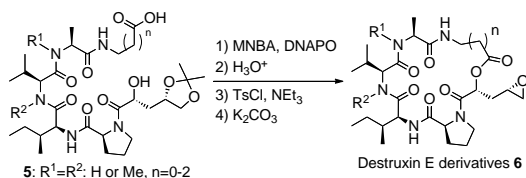


図 3 : 構造改変型 destruxin E 誘導体の合成

## (3) Destruxin E を基盤とする分子プローブの設計と合成

結合位置の同定等を行うことを指向した

destruxin E を基盤とする分子プローブの合成について検討した。まずは標識化するための適切な位置を決定するために、分子内に存在する Ala, Val または Ile をアジドリンカーを有するアミノ酸で置き換えた 3 種類の誘導体を設計し、その合成を試みた。リシンを出発原料として調製したアジドリンカーを有するアミノ酸を組み込んだ固相平行合成により、目的とする環化前駆体を得た後に、液相中でのマクロラクトン化とエポキシドを側鎖に構築することで望む 3 種類の誘導体の合成に成功した (図 4)。

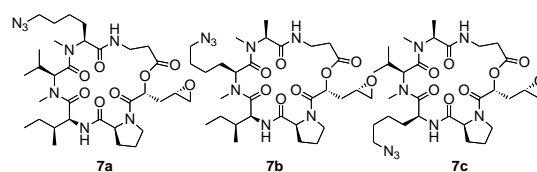


図 4 : アジドリンカーを有する  
destruxin E プローブの合成

本研究により得られた化合物群について生物活性評価を行うことで、構造活性相関の情報が得られるだけではなく、分子プローブを用いた V-ATPase 内での結合位置の解明へと繋げることで、既存の阻害剤とは全く異なる、ペプチドを基盤とした V-ATPase 阻害剤の探索へ展開可能であることが考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- (1) 吉田将人, 齋藤虹矢, 藤野雄太, 土井隆行, 9-アザジュロリジンを触媒として用いる 3-アロイルフラボン類の簡便合成, *Chemical Communications*, 48 巻, 2012 年, 11796-11798 (査読有)  
DOI: 10.1039/C2CC37015H
- (2) 吉田将人, 藤野雄太, 齋藤虹矢, 土井隆行, ジメチルアミノピリジンを触媒として用いるフラボン類の位置選択的合成に関する研究, *Tetrahedron*, 63 巻, 2011 年, 9993-9997 (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2011.09.063>
- (3) 吉田将人, 藤野雄太, 土井隆行, トリフルオロメタンスルホン酸を用いた位置選

択的環化反応による $\gamma$ -ベンゾピラノン骨格構築に関する研究, *Organic Letters*, 13 巻, 2011 年, 4526-4529 (査読有)  
DOI: 10.1021/ol2016934

[学会発表] (計 17 件)

- (1) 佐藤寛, 石田恵崇, 吉田将人, 村瀬隼人, 中川大, 土井隆行, 環状デブシペプチド Destruxin E 類縁体の合成と生物活性評価, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜
- (2) 吉田将人, 齋藤虹矢, 藤野雄太, 土井隆行, 分子内アシル基転位-位置選択的付加による生物活性フラボノイド Frutinone 類の全合成, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, 横浜
- (3) 吉田将人, 笹原健一, 土井隆行, スピルコスタチン類の固相全合成, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日, 横浜
- (4) 吉田将人, フラボンおよびオーロン類の多様性指向型位置選択的合成法の開発, 日本農芸化学会 2013 年度仙台大会, 2013 年 3 月 27 日, 仙台 (招待講演)
- (5) 吉田将人, 石田恵崇, 竹内久征, 中川大, 八代田陽子, 吉田稔, 高木基樹, 新家一男, 土井隆行, デストラキシン E およびその誘導体の全合成と生物活性評価, 第 49 回ペプチド討論会, 2012 年 11 月 8 日, 鹿児島
- (6) 吉田将人, 石田恵崇, 竹内久征, 中川大, 土井隆行, 量的供給を指向した Destruxin E の液相合成法の開発研究, 第 51 回日本薬学会東北支部大会, 2012 年 10 月 7 日, 青森
- (7) 吉田将人, 生物活性天然物の多様性指向型全合成研究, 第 47 回天然物談話会, 2012 年 7 月 5 日, 熊本
- (8) 吉田将人, 藤野雄太, 齋藤虹矢, 土井隆行, フラボノイド系天然物類縁体の合成を指向したイノンに対する位置選択的環化反応の開発研究, 第 22 回万有仙台シンポジウム, 2011 年 12 月 19 日, 仙台
- (9) Masahito Yoshida, Yoshitaka Ishida, Hisayuki Takeuchi, Yoko Yashiroda,

Minoru Yoshida, Hiroshi Nakagawa, Motoki Takagi, Kazuo Shin-ya and Takayuki Doi, Total Synthesis of Cyclicdepsipeptide Destruxin E and its Derivatives as a Potent V-ATPase Inhibitor, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011 年 12 月 1 日, Tokyo.

- (10) 吉田将人, 藤野雄太, 齋藤虹矢, 土井隆行, 位置選択的環化反応を利用したフラボノイド類縁体の合成研究, 第 100 回有機合成シンポジウム, 2011 年 11 月 10 日, 東京
- (11) 吉田将人, 石田恵崇, 竹内久征, 中川大, 八代田陽子, 吉田稔, 高木基樹, 新家一男, 土井隆行, 分子プローブを指向した Destruxin E 類縁体の全合成と生物活性評価, 第 50 回記念日本薬学会東北支部大会, 2011 年 10 月 30 日, 仙台
- (12) 吉田将人, フラボノイド類の多様性指向型合成法の開発研究, 第 8 回日本カテキン学会, 2011 年 9 月 22 日, 京都 (招待講演)
- (13) 吉田将人, 石田恵崇, 竹内久征, 中川大, 土井隆行, 固相法を用いた Destruxin E 類縁体の全合成と生物活性評価, 第 28 回有機合成セミナー, 2011 年 9 月 1 日, 山形

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~hannou/index.html>.

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
吉田 将人 (YOSHIDA MASAHIRO)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 80511906