

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580168

研究課題名(和文)天然物をモデルとした機能性分子プローブの創製研究

研究課題名(英文)Synthetic studies on bioprobes designed based on the structures of natural products

研究代表者

高橋 俊哉(Takahashi, Shunya)

独立行政法人理化学研究所・連携支援ユニット・専任研究員

研究者番号：00202151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精密有機合成化学的手法を基盤として、生体機能解明に重要な役割を果たすと考えられる機能性分子プローブの創製とのための合成方法論の開発を行った。まず、強力な腫瘍壊死因子(TNF)-発現制御活性を持つバイナリンBの標的分子探索に有用なジベンゾフラン型分子プローブの創製に成功した。また、ミトコンドリアコンプレックスIやN-アセチルグルコサミニダーゼ等の酵素の作用機構解明に役立つと期待できる環状エーテル化合物ならびにTMG-キトトリオマイシン関連糖類の効率的合成法を開発した。TMG-キトトリオマイシンの合成研究上では、同じ酵素の阻害剤であるポコニシンの構造訂正も達成した。

研究成果の概要(英文)：This research project aims to synthesize multifunctional bioprobes for the elucidation of fundamental biofunctions, and is composed of three themes as follows. 1) Vialinin B is a strong inhibitor of TNF- production, but its target molecule was unknown. In order to clarify the target, a biotinylated phenylbenzofuran was synthesized. 2) Although the annonaceous acetogenins inhibit mitochondrial complex I, the detailed mechanism was unclear. A new synthetic method for preparation of cyclic ethers included in the acetogenins was developed, and was successfully applied to construct the probe core mimicking acetogenins. 3) Total synthesis of a couple of N-acetylglucosaminidase inhibitors, TMG-chitotriomycin and pochonicine, was accomplished, and the proposed structure of pochonicine was revised. These compounds synthesized in this project would be quite useful tools for clarification of the target molecule and for detailed understanding of the functions of the corresponding enzymes.

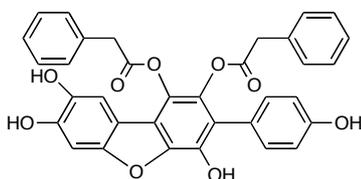
研究分野：有機合成化学

キーワード：有機合成 分子プローブ

1. 研究開始当初の背景

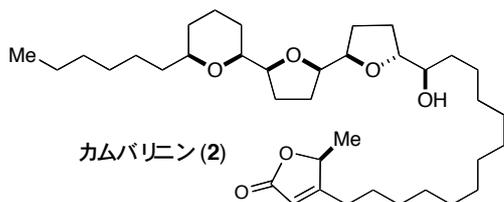
生体反応制御ならびに生体機能解明に向けて、低分子プローブを使った研究が脚光をあびつつある。そのため、天然物をモデルとしてデザインされた分子プローブの合成は、バイオサイエンス分野の中核を成すケミカルバイオロジー領域でも重要な研究の一つとして位置づけられてきた。以下に本研究の3つのプロジェクトの背景を簡潔に述べる。

(1) 強い腫瘍壊死因子(TNF)- α 発現制御活性を持つバイナリン B のターゲット分子探索：中国産食用キノコを起源とするバイナリン B (1) は、3 個のベンゼン環が一直線状に繋がった *p*-テルフェニル骨格を基本とし、2 個のベンゼン環上でエーテル架橋を形成したジベンゾフラン環を含む天然物である。このものは、強い腫瘍壊死因子(TNF)- α 発現制御活性を持ち、抗関節リュウマチ薬などとしての応用が期待されたが、そのターゲット分子や作用機序は不明であった。



バイナリン B (1)

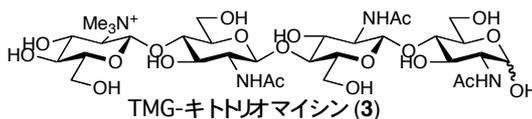
(2) バンレイシアセトゲニンによるミトコンドリアコンプレックス I 阻害の作用機構解明：バンレイシ科植物起源のアセトゲニンは、テトラヒドロフラン環や水酸基を含んだ長鎖アルキル基を持つ γ -ラクトンであり{例:カムバリニン(2)}、非常に強力な抗腫瘍活性を示す。その生物活性は、ミトコンドリアコンプレックス I の阻害によるものと推定されているが、その詳細は明らかではなかった。



カムバリニン(2)

(3) 選択的な *N*-アセチルグルコサミニダーゼ阻害活性を持つプローブ分子の開発：新型インフルエンザなどの感染症に対向する手段として、グリコシダーゼ阻害剤の創製は極めて重要な意味を持つ。放線菌の培養液から単離された TMG-キトリオマイシン (3) は、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) 阻害活性を示す 4 糖型の生理活性天然物である。糖尿病や白血病、癌等の際には血清中でこの酵素活性が上昇することが知られており、*N*-アセチルグルコサミニダーゼ阻害剤はこういった疾病の複雑なプロセスを解明するための重要なプローブにも

なりうると思われた。



TMG-キトリオマイシン (3)

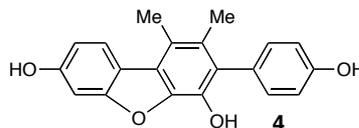
2. 研究の目的

本研究では、精密有機合成化学的手法を基盤として、以下の3つのプロジェクトを達成するための機能性分子プローブの創製とそのための方法論の開発を目的とする。

- (1) 強い腫瘍壊死因子(TNF)- α 発現制御活性を持つバイナリン B のターゲット分子探索
- (2) バンレイシアセトゲニンによるミトコンドリアコンプレックス I 阻害の作用機構解明
- (3) 選択的な *N*-アセチルグルコサミニダーゼ阻害活性を持つプローブ分子の開発

3. 研究の方法

(1) 強い腫瘍壊死因子(TNF)- α 発現制御活性を持つバイナリン B のターゲット分子探索：これまでのバイナリン B (1) の合成研究で、2 個のフェニルアセチル基は種々の化学変換に不安定であり機能性分子プローブへの誘導化には不向きな官能基であることがわかっている。そこで、フェニルアセチル基を化学的に安定なメチル基に置き換えたジベンゾフランをモチーフとするコア 4 をデザインした。その *p*-テルフェニル骨格の構築には鈴木-宮浦カップリングを、ジベンゾフラン環の合成には Ullmann カップリングを活用する。合成品は共同研究者により、TNF- α 発現制御活性等が調べられ、コア部分へリンカーを介してクリックケミストリーにより蛍光発色団やビオチンを連結する。さらに、ここで得られた中間体を活用すれば、合成化学的に未開拓なケホコリン A やフリシネロシド等の配糖体の合成も可能になると考えられた。



4

(2) バンレイシアセトゲニンによるミトコンドリアコンプレックス I 阻害の作用機構解明：アセトゲニンの示す強力な生理活性の作用機構をより明らかにするためには、構造改変をできるだけ行わず天然物そのものに近い構造のプローブが必要である。本研究では、モデル化合物として抗腫瘍活性を持つテトラヒドロピランアセトゲニンであるカムバリニン(2)を選んだ。この理由は、2 が金属イオンのキレート能に優れた環状エーテル部位と活性部位に相当するラクトン環が長鎖でへだてられており構造修飾で双方に及ぼす影響は小さいと考えられたからである。これまでの結果などから、水酸基ならびにピステラヒドロフラン環部位は必須である

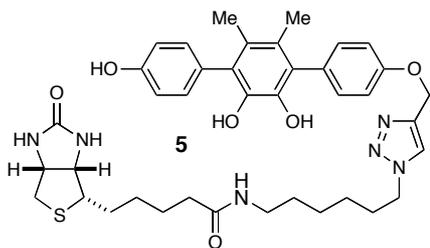
ので、**2**の構造修飾はテトラヒドロピラン環上で行うべきと考えた。そこで、テトラヒドロピラン環へ水酸基を導入しリンカーを介して蛍光試薬やビオチニル基を導入しようと計画した。

(3) 選択的な *N*-アセチルグルコサミニダーゼ阻害活性を持つプローブ分子の開発：

本研究の目的は、前記2つのプロジェクトとは異なり標的分子の同定や作用機構の解明ではなく、新規な選択的 *GlcNAcase* 阻害剤の創製とそのための方法論の開発にある。D-グルコサミンならびに *N,N'*-ジアセチルキトビオースを *key* ビルディングブロックとして用いて *TMG*-キトトリオマイシンならびにそれらの糖鎖長を変えた化合物を合成し、種々の *GlcNAcase* に対する効果を調べ、選択的な *GlcNAcase* 阻害活性を持ったプローブ分子の創製を行う。

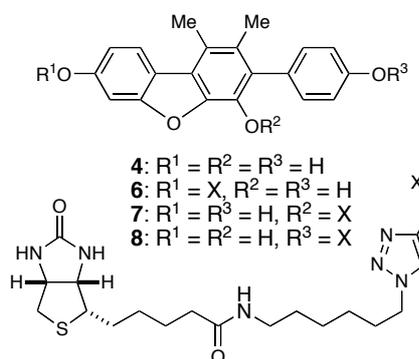
4. 研究成果

(1) 強い腫瘍壊死因子(TNF)- α 発現制御活性を持つバイナリン **B** のターゲット分子探索：バイナリン **B** (**1**) の活性を保持しながら化学的にも安定なバイオプローブを合成するに先立ち、**1** の構造類縁体でありほぼ同様の生物活性を有するバイナリン **A** のアドバンスアナログとして、フェニルアセトキシル基をメチル基に置き換えた化合物を創製し、この化合物に蛍光タグやビオチニル基等の機能性を付与したプローブ分子類を合成した。なかでも化合物 **5** が有効なプローブになることが判明し、生化学者と共同でバイナリン **A** のターゲット分子の一つとしてユビキチナーゼの一種 *USP5* を同定する事に成功した。



この知見を基に、**1** のアナログとしても同様にジメチル化された化合物の合成を行った。バイナリン **B** (**1**) はバイナリン **A** と異なりベンゾフラン環を有することが構造上の特徴である。そこで、バイナリン **A** アナログの合成の時とは異なり、*p*-テルフェニル骨格構築の際に、中央部の芳香環に左右異なるベンゼン環の導入が必要であった。まず、フラン環形成のため塩素原子を持つボロン酸を調製し、市販の *p*-アルキルオキシボロン酸と共に鈴木-宮浦カップリングを検討した。その結果、一段階目のボロン酸とのカップリングは酢酸パラジウム-*Buchwald* リガンド、あるいは炭酸セシウム-テトラキストリフェニル

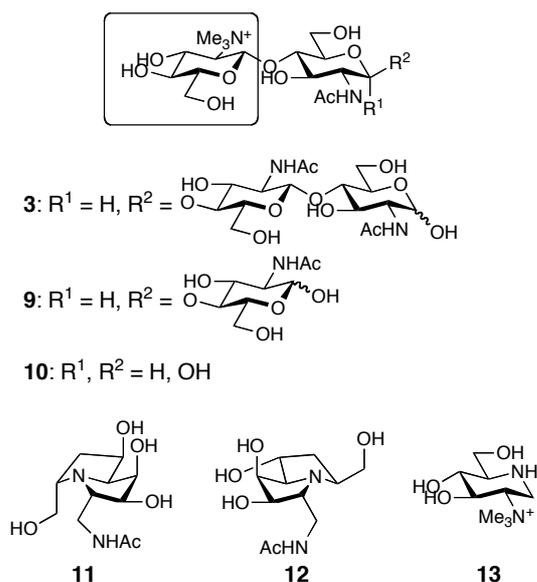
ホスフィンパラジウムともに良好な結果を与えたが、二段階目の塩素原子を持つボロン酸とのカップリングの場合は、後者の組み合わせの方が良い結果を与えた。そこで、この条件下ワンポットでカップリング反応を行い、左右異なるベンゼン環を持った *p*-テルフェニル化合物を合成した。次いで、*Ullmann* 反応を行い、目的とするバイナリン **B** アドバンスアナログ **4** の合成に成功した。さらにクリック反応を経て、ビオチンの導入位置を変えた3種の分子プローブ **6**~**8** の創製を達成した。現在、これらの機能性分子プローブを用いて、生化学者と共同で実験が進行中であるので、バイナリン **B** のターゲット分子に関する有用な情報が得られる事が期待できる。



(2) バンレイシアセトゲニンによるミトコンドリアコンプレックス **I** 阻害の作用機構解明：天然物そのものを分子プローブに改変させる研究の一環としてカムバリニン(**2**)をモデルとして合成研究を行った。まずそのための基礎反応を検討した。カムバリニン(**2**)の持つ6員環エーテル部分はヨウ化サマリウムを用いる環化反応で構築可能であったが、コアを成す5員環エーテル部分を効率よく作るため、従来試みられていないジオール類の環化反応を調べた。アセト酢酸エステルや酒石酸誘導体から、ジエン-1,2-ジオールあるいはジエン-1,3-ジオール類を立体選択的に合成し2種のコバルト触媒を用いて末端オレフィンへの酸化的付加を検討した。基質が1,2-ジオールの場合、2種の環化モードが考えられる系においても当初の予想どおり5員環エーテルのみが生成した。1,3-ジオール類においては、2種の5員環エーテルの出来る可能性のある場合には2つの生成物が得られた。触媒による生成比の差は見られず、また2個の水酸基の立体化学 (*syn* ならびに *anti*) によっても選択性は変わらない事がわかった。このため、使う基質によっては水酸基の一方を保護してから環化反応を行う方が効率的である事がわかり **2** の合成に有用な知見を得ることができた。

(3) 選択的な *N*-アセチルグルコサミニダーゼ阻害活性を持つプローブ分子の開発：
N,N'-ジアセチルキトビオースから位置選択

的な水酸基の保護を経て2糖型重要中間体の合成を行った。*N*-アセチル基を保持したままでは各種溶媒への溶解性が低いことがわかり *N*-フタロイル誘導体も合成した。また、*D*-グルコサミンから同様に2糖、3糖ユニットを合成した。非還元末端単糖ユニットは2-アジド糖から導き、単糖ならびに2、3糖誘導体と縮合させて、TMG-キトトリオマイシンの持つ4糖構造**3**だけでなく、その3糖ならびに2糖アナログ**9**、**10**の合成を達成した。さらに、**3**より強いGlcNAcase阻害活性をもつ単糖アナログ型天然物：ポコニシンの提出構造式**11**を、化学合成と酵素阻害活性試験の結果より**12**に訂正する事に成功した。その構造活性相関研究の知見と、**3**の活性発現に重要な役割を果たす *N,N,N*-トリメチルアミノ基を有する *D*-グルコピラノースユニットの構造を基に、ピラノース環状酸素原子を窒素原子に置き換えた新規なアナログ**13**をデザインし、*D*-グルコサミンからその完全保護体の合成ルートを開発した。合成された各種オリゴ糖ならびに**13**は、各種 *N*-アセチルグルコサミンダーゼに対する阻害活性を調べることで、更なる阻害剤のデザインと創製に役に立つばかりでなく、当該酵素の機能解明のためのツールになると考えられる。



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 12 件)

- (1) Takahashi S., Yasuda M., Nakamura T., Hatano K., Matsuoka K., Koshino H., "Synthesis and Structural Revision of a Brominated Sesquiterpenoid, Aldingenin C", *J. Org. Chem.*, **79**, 9373-9380 (2014), 査読有, DOI: 10.1021/jo501228v.
- (2) Takahashi S., Yoshida A., Uesugi S., Hongo Y., Kimura K., Matsuoka K. and Koshino H., "Structural Revision of Kynapcin-12 by Total Synthesis, and Inhibitory Activities against Prolyl

Oligopeptidase and Cancer Cells", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 3373-3376 (2014), 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.05.091.

(3) Ye Yue-Q., Negishi C., Hongo Y., Koshino H., Onose J., Abe N., Takahashi S., "Structural elucidation and synthesis of vialinin C, a new inhibitor of TNF- α production", *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 2442-2446 (2014), 査読有, DOI: 10.1016/j.bmc.2014.02.058.

(4) Hongo Y., Nakamura T., Takahashi S., Motoyama T., Hayashi T., Hirota H., Osada H., Koshino H., "Detection of oxygen addition peaks for terpendole E and related indole-diterpene alkaloids in a positive mode ESI-MS", *J. Mass Spectrom.*, **49**, 537-542 (2014), 査読有, DOI: 10.1002/jms.3360.

(5) Yoshioka Y., Ye Y-Q., Okada K., Taniguchi K., Yoshida A., Sugaya K., Onose J., Koshino H., Takahashi S., Yajima A., Yajima S., Abe N., Yajima S., "Inhibition of tumor necrosis factor- α production by suppression of the activation of ubiquitin-specific peptidase 5, a target molecule of vialinin A", *PLOS ONE*, **8**, e80931 (2013), 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0080931.

(6) Okada K., Ye Y-Q., Taniguchi K., Yoshida A., Akiyama T., Yoshioka Y., Onose J., Koshino H., Takahashi S., Yajima A., Abe N., Yajima S., "Vialinin A is a ubiquitin-specific peptidase inhibitor," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 4328-4331 (2013), 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.05.093.

(7) Kitamura Y., Koshino H., Nakamura T., Tsuchida A., Nitoda T., Kanzaki H., Matsuoka K., and Takahashi S., "Total Synthesis of the Proposed Structure for Pochonicine and Determination of its Absolute Configuration," *Tetrahedron Lett.*, **54**, 1456-1459 (2013), 査読有, DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.01.015.

(8) Takahashi S., Akita Y., Nakamura T., and Koshino H., "Total synthesis of curvulone B and a proposed structure for dothiorelone B; determination of the configuration of curvulone B and structural revision of phomopsin A," *Tetrahedron Asymmetry*, **23**, 952-958 (2012), 査読有, DOI: 10.1016/j.tetasy.2012.06.009.

(9) Ye Y-Q., Koshino H., Hashizume D., Minamikawa Y., Kimura K., Takahashi S., "Synthesis and Biological Activity of Both Enantiomers of Kujigamberol Isolated from 85-Million-Years-Old Kuji Amber," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 4259-4262 (2012), 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.05.022.

(10) Onose J., Yoshioka Y., Ye Y-Q., Sugaya K., Yajima A., Taniguchi K., Okada K., Yajima S., Takahashi S., Koshino H., Abe N., "Inhibitory effects of vialinin A and its advanced analog on TNF- α release and production from RBL-2H3 cells," *Cell. Immunol.*, **279**, 140-144 (2012), 査読有, DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.10.008.

(11) Kimura K., Minamikawa Y., Ogasawara Y.,

Yoshida J., Saitoh K., Shinden H., Ye Y-Q., Takahashi S., Miyakawa T., Koshino H., “Kujigamberol, a new dinorlabdane diterpenoid isolated from 85 million years old Kuji amber using a biotechnological assay,” *Fitoterapia*, **83**, 907-912 (2012), 査読有, DOI: 10.1016/j.fitote.2012.03.024.

(12) Ye Y-Q., Onose J., Abe N., Koshino H., and Takahashi S., “Design and Synthesis of a Vialinin A Analog with a Potent Inhibitory Activity of TNF- α Production and Its Transformation into a Couple of Bioprobes,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 2385-2387 (2012), 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.02.034.

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 松本倫太郎、松岡浩司、越野広雪、高橋俊哉, “トリメチルアミノ基を有する擬似糖の合成研究,” *Glyco* 東京, 2014年11月8日, 千葉大学園芸学部(松戸)

(2) Nakamura T., Yamashita A., Hongo Y., Takahashi S., Takeuchi T., “Formation of isomeric ions in collision-induced dissociation process probed by energy-resolved ion mobility tandem mass spectrometry (ER-IMS/MS²),” 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014年8月28日, Geneva (Switzerland)

(3) Hongo Y., Koshino H., Takahashi S., Nakamura T., Takeuchi T., “Structure and energy dependent ion isomerizations of folates detected using ER-IMS/MSⁿ,” 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014年8月26日, Geneva (Switzerland)

(4) Koshino H., Hongo Y., Muto N., Takahashi S., Kazuma K., Konno K., Zaharenko A. J., “Study of small neutral losses and ion rearrangements on protonated bunodosine 391 and IAA(indole-3-acetic acid)-amino acid conjugates,” 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014年8月26日, Geneva (Switzerland)

(5) 高橋俊哉, “合成化学的手法を用いた天然物の構造訂正研究,” 理研シンポジウム(化学と情報学の融合: ¹³C-NMR 化学シフト分子構造予測システム CAST/C-NMR の開発と展開, 2013年11月8日, 理化学研究所(和光)

(6) Kitamura Y., Koshino H., Nakamura T., Tsuchida A., Nitoda T., Kanzaki H., Matsuoka K., Takahashi S., “Total synthesis and structural revision of pochonicine, a polyhydroxylated pyrrolidine alkaloid as a potent GlcNAcase inhibitor,” 第2回 Max-Planck シンポジウム, 2013年4月17日, 理化学研究所(和光)

(7) 岡田潔、叶躍奇、吉岡泰淳、谷口佳代子、本橋寛子、菅谷紘一、小野瀬淳一、高橋俊哉、越野広雪、矢島新、矢嶋俊介、阿部尚樹, “TNF- α 放出阻害物質 vialinin A の RBL-2H3 細胞における標的分子の同定,” 日本農芸化学会, 2013年3月25日, 東北大学(仙台)

(8) 吉岡泰淳、岡田潔、叶躍奇、谷口佳代子、菅谷紘一、小野瀬淳一、高橋俊哉、越野広雪、矢島新、矢嶋俊介、阿部尚樹, “Vialinin A 標的分子 USP5 の活性化抑制が TNF- α 放出に与える影響,” 日本農芸化学会, 2013年3月25日, 東北大学(仙台)

(9) 吉岡泰淳、叶躍奇、岡田潔、谷口佳代子、菅谷紘一、小野瀬淳一、高橋俊哉、越野広雪、矢島新、矢嶋俊介、阿部尚樹, “ビオチン標識化 Vialinin A アナログによる細胞内標的分子の同定と TNF- α 放出阻害作用の解析,” 2012年日本ハーブ療法研究会 設立記念学術集会, 2012年12月16日, 光の家会館(東京)

(10) 阿部尚樹、吉岡泰淳、叶躍奇、岡田潔、谷口佳代子、菅谷紘一、小野瀬淳一、高橋俊哉、越野広雪、矢島新、矢嶋俊介, “Vialinin A アナログ誘導体を分子プローブとして用いた細胞内標的タンパク質の同定と TNF- α 放出阻害作用の解析,” 第54回天然有機化合物討論会, 日本農芸化学会, 2012年9月18日, 東京農業大学(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊哉 (TAKAHASHI, Shunya)
独立行政法人理化学研究所・
連携支援ユニット・専任研究員
研究者番号: 00202151