

# 機能解明を志向した生物活性分子の設計・合成・評価

九州大学大学院理学研究院 大石 徹

## 1. はじめに

動植物や微生物から単離された天然有機化合物（天然物）の中には、特定のタンパク質や生体膜に作用して強力な生物活性を示す物質が存在し、抗生物質や制癌剤として利用されている。その「切れ味の鋭さ」は、生物機能を理解するための分子ツールとして有用である。我々は、自然界から微量しか得られない天然物の化学合成（全合成）によって、提出構造および活性本体であることの確認を行ってきた。さらに、化学合成を基盤とした構造活性相関研究や分子プローブの調製を行い、分子レベルでの活性発現機構の解明に取り組んでいる。天然物が生物活性を発現する原理を明らかにできれば、新しい薬剤の分子設計・化学合成が可能になり、疾病の予防や治療への応用が期待される（図1）。本講演では、渦鞭毛藻が産生する二次代謝産物を中心に、最近の研究成果について述べる。

### 天然有機化合物を基盤とした化学生物学の創成

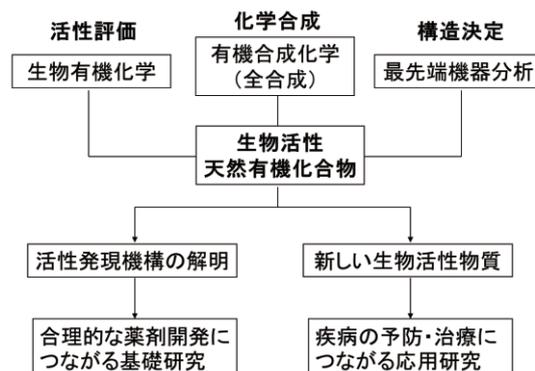


図1. 天然有機化合物を基盤とした化学生物学の創成

## 2. マイトトキシンの作用標的タンパク質および活性発現機構の解明を目指して

マイトトキシシン (MTX) は、魚介類による食中毒シガテラの原因物質のひとつとして単離・構造決定された梯子状ポリエーテルであり、渦鞭毛藻 (*Gambierdiscus toxicus*) によって生産される (図2)<sup>1)</sup>。分子量が三千を超える巨大分子であり、核間メチル基が多く存在する疎水性部分と、多くのヒドロキシ基や硫酸エステルが存在する親水性部分に分けることができる。二次代謝産物としては最強の毒 (マウス腹腔内投与 LD<sub>50</sub>=50 ng/kg) であり、強力な溶血活性 (ヒト赤血球、15 nM)<sup>2)</sup>やCa<sup>2+</sup>流入活性 (ラット・グリオーマ細胞、0.3 nM)<sup>3)</sup>を有することが知られているが、作用標的分子や生物活性発現機構については未解明である。天然物から誘導した分子プローブを用いた作用標的タンパク質の探索が試みられているが<sup>4)</sup>、非特異的吸着や現存するサンプルの希少性の問題があり同定には至っていない。

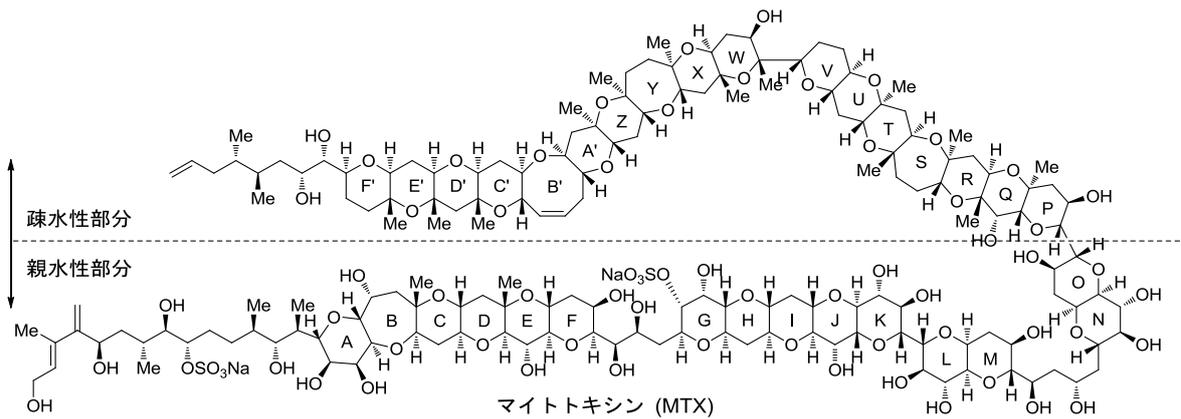


図2. マイトキシシン (MTX) の構造

我々は、「MTX が生物活性を発現する際に全構造が必須なのではなく、重要な部分構造が存在する」という仮説を提唱し、まず MTX の生物活性を阻害する分子の創成を目的として研究を行っている。MTX の疎水性部分は他の梯子状ポリエーテルと類似しており、また MTX の  $\text{Ca}^{2+}$  流入活性がブレベトキシシン類によって阻害されることが知られている<sup>3)</sup>。MTX の疎水性部分が膜タンパク質との相互作用に深く関わっているならば、この部分構造を持つ化合物は MTX の標的タンパク質に競合的に結合して MTX の生物活性を阻害する可能性が高いと考えられる (図 3)。すなわち、MTX よりも分子量が小さく非特異的な吸着が少ない優れたアンタゴニストを開発することが出来れば、光親和性プローブへと誘導することで作用標的分子の探索を行う上で有用なツールになると期待される。

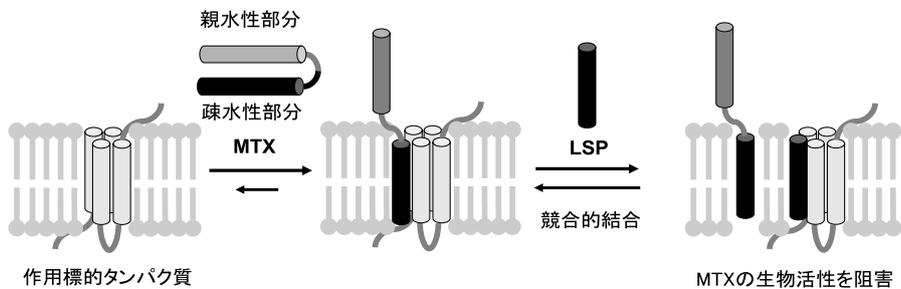


図3. MTX の作用標的タンパク質と阻害剤の相互作用 (仮説)

以上の仮説を基に、MTX の疎水性部分に着目した分子設計を行い、部分構造の化学合成を行うことにした (図 4)。

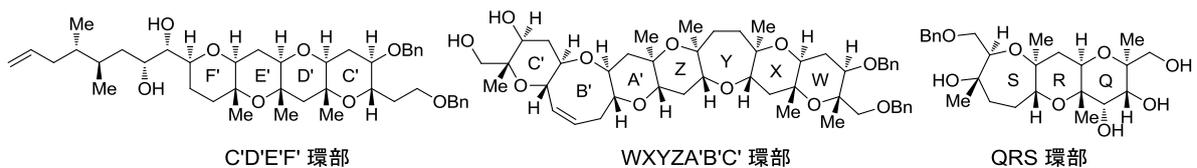


図4. MTX の疎水性部分 (合成品)

これまでに梯子状ポリエーテル天然物の全合成研究が数多く報告されているが<sup>5)</sup>、分子長の長い化合物を効率的に合成するためには、収束的な合成戦略を適用することが鍵となる。とりわけ各フラグメントを連結する際に間に二個の環が構築される二環構築型収束的合成法は有用である<sup>6)</sup>。我々は、 $\alpha$ -シアノエーテルを経由する二環構築型収束的合成法 ( $\alpha$ -シアノエーテル法)<sup>7)</sup>を開発した (図5)。

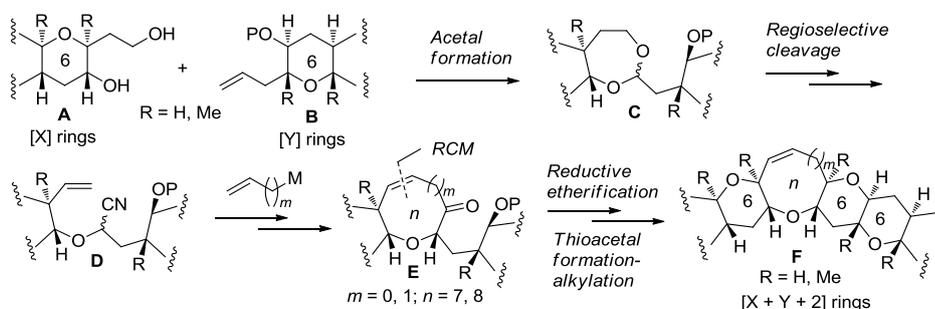


図5.  $\alpha$ -シアノエーテルを経由する二環構築型収束的合成法 ( $\alpha$ -シアノエーテル法)

すなわち、ジオール (**A**) とアルデヒド (**B**) の両フラグメントをアセタール化によって連結し (**C**)、位置選択的の開裂を経て鍵中間体である $\alpha$ -シアノエーテル (**D**) へと誘導する。中間体 (**D**) のシアノ基は、種々の求核試薬と反応させる際の足がかりとなり、ビニル基およびアリル基を導入後、閉環メタセシス反応 (RCM) を行うことで、七および八員環エーテルを構築できる。この際、 $\alpha$ -シアノエーテル (**D**) に由来するジアステレオマーが生じるが、塩基性条件下での異性化により熱力学的に安定なケトン (**E**) へと変換することが可能である。ケトン (**E**) から還元的エーテル化 ( $R=H$ )、あるいは混合チオアセタールに変換後メチル化 ( $R=Me$ ) を行うことで6/7/6および6/8/6環システムが構築される。この方法論を用いれば、 $X$ 個の環と $Y$ 個の環を連結することによって $[X+Y+2]$ 個の環を持つ梯子状ポリエーテルが合成でき、連続した核間メチル基を有するMTXのW-C'環部の合成にも適用可能である (図6)<sup>8)</sup>。また、イェットキシンのA-J環部<sup>9)</sup>や、七環性および十環性の人工梯子状ポリエーテルの合成にも応用可能である<sup>10)</sup>。

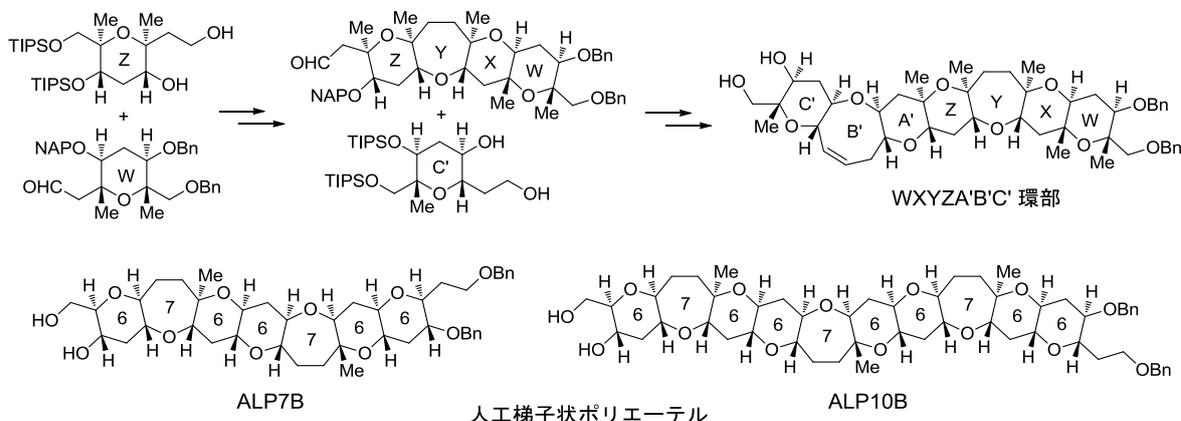


図6.  $\alpha$ -シアノエーテル法を利用した梯子状ポリエーテルの収束的合成

合成した W-C'環部を用い、MTX によって引き起こされる生物活性に対する阻害実験を行った。W-C'環部は MTX によって引き起こされる溶血活性を濃度依存的に阻害し、IC<sub>50</sub> 値は 5 μM であった<sup>8)</sup>。なお、類似の梯子状ポリエーテルであるブレベトキシシン B やイエツトキシシンは阻害活性を示さなかった。次に、MTX に特有な生物活性である Ca<sup>2+</sup> 流入活性について W-C'環部による阻害活性を調べた結果、IC<sub>50</sub> 値は 30 μM でありブレベトキシシン B と同程度であった<sup>4)</sup>。一方、天然物の部分構造ではない七環性人工梯子状ポリエーテルについて Ca<sup>2+</sup> 流入阻害活性を調べた結果、IC<sub>50</sub> 値は 2 μM であり、これまで報告されている中で最も強い阻害剤であることを偶然に発見した<sup>11)</sup>。この結果は、MTX に複数の作用標的分子が存在することを示唆するものであり、W-C'環部は溶血活性に、人工梯子状ポリエーテルと構造の類似した Q-V 環部はカルシウムイオン流入活性により重要な役割を果たしていると考えられる (図 7)。現在、この知見を基にあらたな分子設計と化学合成を進めている。

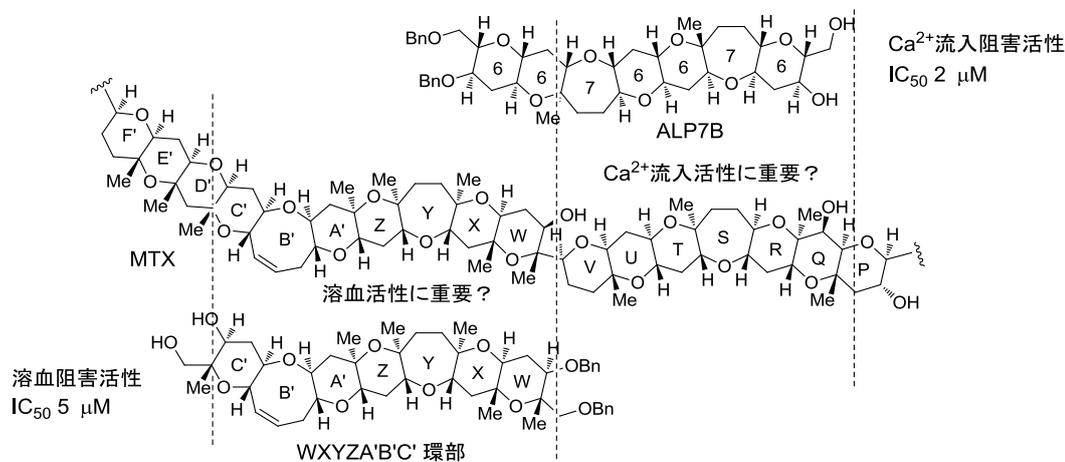


図 7. MTX の生物活性阻害作用に関する作業仮説

### 3. アンフィジノール 3 の合成研究—新しい抗真菌剤の開発を目指して

アンフィジノール類は、渦鞭毛藻 (*Amphidinium klebsii*) によって生産されるポリエンポリオール化合物群である。その中でもアンフィジノール 3 (AM3) は最も強い抗真菌活性 (MIC = 4 μg/disc) および溶血活性 (EC<sub>50</sub> = 9.4 nM) を示し、全立体配置が報告されている唯一の同族体である (図 8)<sup>12)</sup>。AM3 は、不斉炭素の約 70% が鎖状部分に存在するため、立体配置の決定が困難な化合物のひとつである。AM3 の絶対配置は主に JBCA 法<sup>13)</sup> や改良 Mosher 法<sup>14)</sup> など主に NMR を用いた手法、および天然物を分解し、標品と HPLC などと比較する方法が用いられている。しかしながら、希少な天然物からの誘導には限界があり、化学合成による構造確認が最も確実な方法と言える。

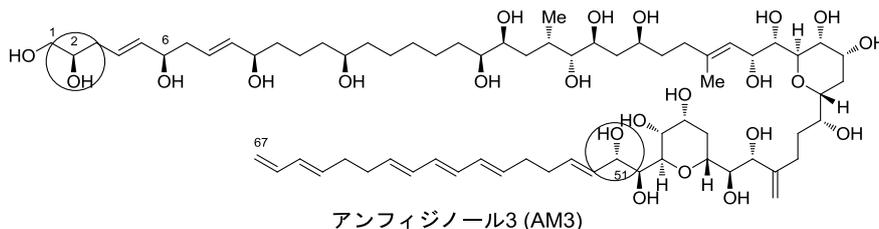


図 8. アンフィジノール 3 (AM3) の改訂構造

我々は、特に構造決定が困難であった C2 位および C51 位の絶対配置を化学合成によって確認することにした。すなわち、AM3 の C2 位、C6 位に関する 4 種類のジアステレオマー<sup>15)</sup>、および C51 位に関する 2 種類のジアステレオマー<sup>16)</sup>をそれぞれ合成し、天然物の NMR スペクトルと比較した結果、C2 位および C51 位の絶対配置は提出構造とは逆であることを明らかにした (図 9)。

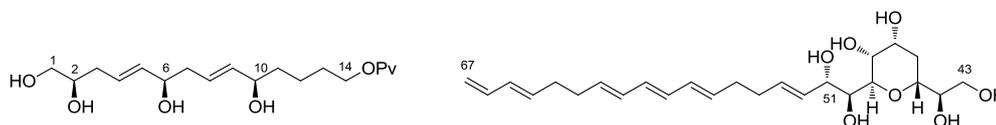


図 9. AM3 の部分構造 (合成品)

AM3 の生物活性発現機構は未解明であるが、以下の様な仮説が提唱されている (図 10、右)<sup>17)</sup>。すなわち、AM3 分子の中で疎水性の高いポリエン部分が脂質二重膜である細胞膜に挿入され、親水性の高いポリオール部分が分子内および分子間で水素結合を形成することで分子複合体が形成され、細胞膜に空孔を形成するためであると考えられている (トロイダルモデル)。我々は、生物活性を発現する最小限の構造を明らかにするため、ポリエン側鎖を含む AM3 の C31-C67 部分を設計・合成した (図 10、左)。現在、生物活性を評価中である。AM3 は、アンフォテリシン B と同様に直接細胞膜に作用するため、耐性菌の出現しにくい新しい抗真菌剤のリード化合物として期待される。構造活性相関研究を進めることで、真菌の細胞膜とヒトの細胞膜を明確に区別できるような化合物を創製することが、我々の夢である。

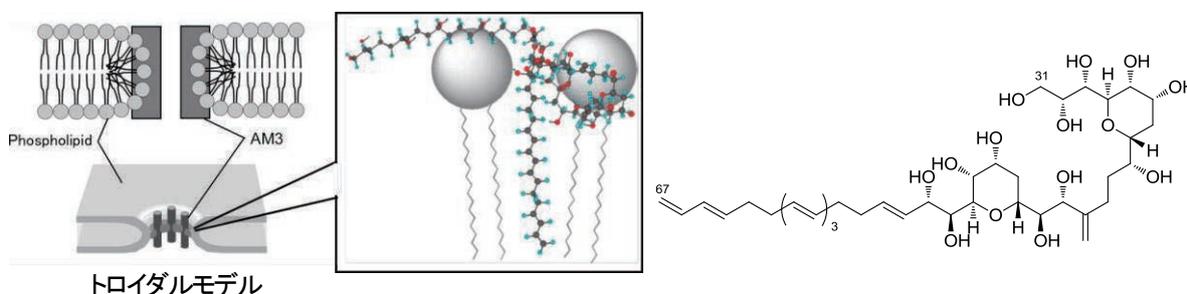


図 10. AM3 の生物活性発現機構の仮説 (左) および簡略化アナログ分子 (右)

#### 4. おわりに

興味深い生物活性を有する天然物の活性発現機構を分子レベルで解明する上で、有機合成化学の果たす役割は大きく、特に希少な天然物をより効率的に合成する方法論の開発はこれからも益々重要になるであろう。天然物全合成の戦略、方法論にさらに磨きをかけ、分子プローブの合成を含め真に実用的な合成法を開発できれば、新たなライフサイエンスへの展開が期待できる。

謝辞：本研究は、九州大学大学院理学研究院の鳥飼浩平助教、海老根真琴助教、大阪大学大学院理学研究科の村田道雄教授、松森信明准教授、東北大学大学院農学研究科の此木敬一准教授、および日夜実験に励んでいる学生諸氏との共同研究であり深く感謝します。

<参考文献>

1. (a) Yasumoto, T.; Bagins, R.; Venoux, J. P.; *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1976**, *42*, 359-365. (c) Murata, M.; Naoki, H.; Matsunaga, S.; Satake, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7098-7107.
2. Igarashi, T.; Aritake, S.; Yasumoto, T. *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 71-79.
3. Konoki, K.; Hashimoto, M.; Nonomura, T.; Sasaki, M.; Murata, M.; Tachibana, K. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 409-416.
4. Konoki, K.; Hashimoto, M.; Honda, K.; Tachibana, K.; Tamate, R.; Hasegawa, F.; Oishi, T.; Murata, M. *Heterocycles* **2009**, *79*, 1007-1017.
5. (a) Hirama, M.; Oishi, T.; Uehara, H.; Inoue, M.; Maruyama, M.; Oguri, H.; Satake, M. *Science* **2001**, *294*, 1904-1907. (b) Inoue, M.; Miyazaki, K.; Ishihara, Y.; Tatami, A.; Ohnuma, Y.; Kawada, Y.; Komano, K.; Yamashita, S.; Lee, N.; Hirama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9352-9354. (c) Fuwa H.; Kainuma N.; Tachibana K.; Sasaki M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14983-14992. (d) Tsukano, C.; Sasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14294-14295. (e) Fuwa, H.; Ishigai, K.; Hashizume, K.; Sasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11984-11987.
6. (a) Nakata, T. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4314-4347. (b) Inoue, M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4379-4405.
7. Oishi, T.; Watanabe, K.; Murata, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7315-7319.
8. Oishi, T.; Hasegawa, F.; Torikai, K.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3599-3602.
9. Torikai, K.; Watanabe, K.; Minato, H.; Imaizumi, T.; Murata, M.; Oishi, T. *Synlett* **2008**, 2368-2372.
10. Torikai, K.; Oishi, T.; Ujihara, S.; Matsumori, N.; Konoki, K.; Murata, M.; Aimoto, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10217-10226.
11. Oishi, T.; Konoki, K.; Tamate, R.; Torikai, K.; Hasegawa, F.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3619-3622.
12. (a) Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9859-9861. (b) Murata, M.; Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Paul, G. K.; Tachibana, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 870-871.
13. Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866-876.
14. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
15. Oishi, T.; Kanemoto, M.; Swasono, R.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5203-5206.
16. (a) Kanemoto, M.; Murata, M.; Oishi, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8810-8813. (b) manuscript in preparation.
17. (a) Paul, G. K.; Matsumori, N.; Konoki, K.; Murata, M.; Tachibana, K. *J. Mar. Biotechnol.* **1997**, *5*, 124-128. (b) Houdai, T.; Matsuoka, S.; Morsy, N.; Matsumori, N.; Satake, M.; Murata, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2795-2802. (c) Houdai, T.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4191-4194. (d) Morsy, N.; Houdai, T.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3084-3090.