

生体高分子と複合する有機化合物の創製と反応

Synthesis and Reactions of the Organic Compounds That Interact with Biomolecules

代表研究者 筑波大学 木 越 英 夫 University of Tsukuba Hideo KIGOSHI
協同研究者 筑波大学 坂 倉 彰 University of Tsukuba Akira SAKAKURA

Aplyronine A is a potent antitumor macrolide isolated from a Japanese sea hare and depolymerize fibrous actin (polymer) to globular actin (monomer). To investigate the structure-actin depolymerizing activity relationships of aplyronine A, seventeen analogs were synthesized. It was found that the side chain moiety is essential to actin depolymerizing activity whereas the macrolide portion and functional groups were not so important for the activity. To study the binding site of actin toward aplyronine A, the photo-affinity labeling probes were designed and synthesized. These compounds proved to bind to actin efficiently.

To isolate a novel protein phosphatase, three derivatives of 9-antracencarboxylic acid were designed and synthesized. It was found that the position of the linker was important to inhibit the phosphatase. Jolkinolide D, a diterpene of plant origin, inhibited tumor invasion into the basement membrane and induced apoptosis in tumor cells. Jolkinolide D has a α -unsaturated- β -hydroxy- γ -methylene lactone unit as the pharmacophore structure, which suggests that jolkinolide D might alkylate biomolecules such as proteins and DNA irreversibly in contrast to popular α -methylenes that alkylate biomolecules reversibly. Jolkinolide D pharmacophore was synthesized and its reactivities toward amino acids, nucleotides, and DNA were investigated. The order of reactivity of jolkinolide D pharmacophore (2) toward nucleophiles is $-SH > -NH_2 > \text{nucleic acid bases}$.

研究目的

有機小分子と生体高分子との相互作用の研究は有機化合物による分子認識機構を解明するとともに医学・生物学の分野では生物活性物質の作用機構解明につながる必須の研究領域である。本研究では、生体内で重要な役割を演じている高分子であるアクチンおよびプロテインホスファターゼの機能を有機小分子との反応を用いて分子構造レベルで明らかにしようとするものである。また、顕著な生物活性を持つ天然物の生体分子との反応性を明らかにすることを目的とする。

(1) アクチンはほとんどすべての真核細胞に存在し、主要な細胞骨格を形成している。これまでアクチンと相互作用する有機小分子がほとんど知られて

いなかったために、その機能は十分に理解されていない。そこで、特にアクチンの最も重要な機能である重合機構について分子構造レベルで理解することを目的とする。

(2) プロテインホスファターゼは、プロテインキナーゼとともに生体内のタンパク質のリン酸化・脱リン酸化を制御することにより、細胞内シグナル伝達の重要な役割を担っている。最近、モルモット心筋中に新しい型のプロテインホスファターゼが存在していることが報告されたが、その詳細は不明のままである。そこで、まずこの新型酵素の単離を試み、これらの反応性を明らかにすることを目的とする。

(3) トウダイグサ科植物から単離されたジテルペン

は、アポトーシス誘導活性、腫瘍細胞浸潤阻害活性などの興味ある生物活性を示すが、その生体標的分子は明らかになっていない。そこで、この化合物のファーマコホア(生物活性に重要な部分構造)を合成し、この化合物の生体分子との反応性を明らかにすることを目的とする。

研究経過

1. アクチン脱重合分子

軟体動物より単離されたアプリロニンAは、細胞骨格タンパク質のアクチンに作用する抗腫瘍性物質であり、新しい作用機構に基づく制がん剤のリード化合物として注目されている。そこで、まず、アプリロニンAの天然および人工類縁体を化学合成により供給することとした。アプリロニンA自身の合成経路は既に我々が開拓している。その概要は、Evans アルドール反応と Sharpless 不斉エポキシ化反応を鍵反応として不斉中心を持つセグメントを構築した後、Julia オレフィン化反応を用いて連結し、官能基変換を行って合成するものである。

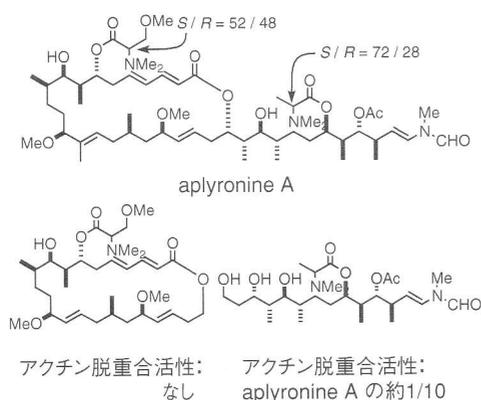


Figure 1. Structures and Actin-depolymerizing Activities of Aplyronine A and Its Analogs

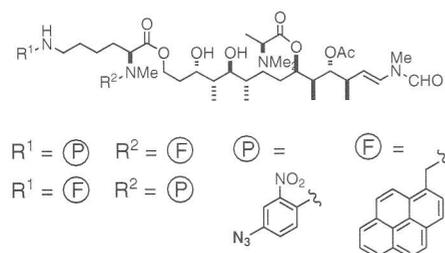


Figure 2. Photo-affinity Labeling Probes

その全合成で得られた知見を基に 17 種類の天然および人工類縁物質を合成した。これらの類縁物質のアクチン脱重合活性を検定した結果、アプリロニンAのアクチン脱重合活性にはその側鎖部分が必須であり、個々の官能基やマクロラクトン部は重要ではないことが判明した(Figure 1)。

上記の構造-活性相関に基づき、アクチンのアプリロニンA結合部位を明らかにすることを目的として、光アフィニティ標識実験を行った。アクチン脱重合活性に重要な部分構造である化合物に光標識基を連結した探索子(プローブ)を設計し、合成した(Figure 2)。これらを用いてアクチンとの結合実験を行ったところ、非常に高い収率でアクチンと結合することが分かった。結合生成物をタンパク質分解酵素で部分加水分解してペプチド断片化し、探索子の蛍光標識基を指標に分析を行ったところ、いくつかの断片を単離することができた。現在はこれらの断片の構造をアミノ酸分析とESI-MS/MS分析により解析中である。

2. 新型プロテインホスファターゼ探索子

新型プロテインホスファターゼは 9-アントラセンカルボン酸(9AC)に阻害されるので、そのアフィニティ担体を調製することを念頭に9AC誘導体を調製し、新型ホスファターゼに対する阻害活性を検討した(Figure 3)。その結果、9ACの 10 位に置換基を導入すると目的とするホスファターゼとの結合能がなくなるが、3 位に導入した誘導体は目的の酵素に弱いながら結合することが分かった。また、リンカーの性質を変えて、芳香環の電子密度に関する活性を検討したが、大きな差は見いだされなかった。今後は、9ACの 3 位にリンカーを導入した誘導体を合成し、セファロースに担持することによりアフィニティークロマト担体を調製し、これを用いて粗酵素抽出液を分離を行い、新型のプロテインホスファターゼの単離を目指す予定である。

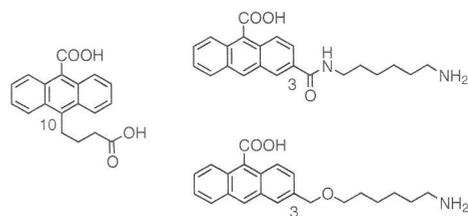


Figure 3. 9AC Derivatives

3. ジョルキノライドDファーマコホア

ジョルキノライドDの興味深い生物活性は、 γ , δ -不飽和- β -ヒドロキシ- α -メチレンラクトン構造であるファーマコホアに起因していると考えられる。これまでに多くの α -メチレンラクトン型の生物活性分子が見いだされているが、ジョルキノライドD型の官能基の反応性は検討されたことがなかったため、このファーマコホア分子を設計し、効率良く合成した (Figure 4)。この化合物は比較的安定であり、クロマト分離中や水溶液中ではほとんど分解しない。しかし、生理的条件下、アミノ酸と反応させるとアルキル化生成物を与えることが分かった (Figure 5)。さらにヌクレオシドやDNAも低収率ではあるがアルキル化することが分かった。これらのアルキル化反応は図4に示したような不可逆的な付加-脱離反応によるものであり、興味深い。各種求核基のこの化合物への反応性は SH基 > NH₂基, imidazole > 核酸塩基であり、これらの反応性から、この構造はチオール基の選択的かつ不可逆的アルキル化剤として、例えばタンパク質のチオール基の修飾剤などに応用できるものと考えられる。

おわりに

最近、アクチンとある種のPKCが結合することや、アクチン脱重合物質が有糸分裂を遅らせる新たなチェックポイント系を活性化することが報告されており、アクチンを標的とする抗腫瘍性物質はますます注目されるようになってきている。アプリロニンAなどのアクチン脱重合海洋天然物の生物活性の詳細な研究は、新しい型の抗癌剤開発の重要な基礎研究となると考えられる。今後、さらに詳細な構造-アクチン脱重合活性相関を検討するとともに、光アフィニティ標識実験を行ってアクチン脱重合活性の分子機構を明らかにすることにより、新しい抗腫瘍性の機構解明に迫ることができると考える。

プロテインホスファターゼはプロテインキナーゼとともに細胞内信号伝達などに重要な役割を果たしている酵素であり、新型のホスファターゼの発見は生物化学の様々な分野に波及すると期待できる。

天然物のその多彩な構造と反応性には現在でも驚かされることが多く、それらから得られる知見は医薬品などの応用研究で生かされている。ジョルキノライドDの有する生物活性も、化学的に解明

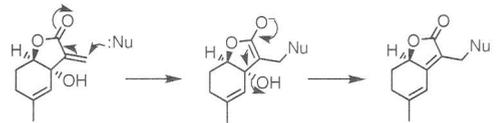
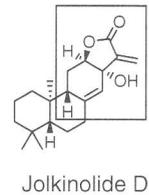


Figure 4. Jolkinolide D and Its Pharmacophore: Structures and Reaction with a Nucleophile

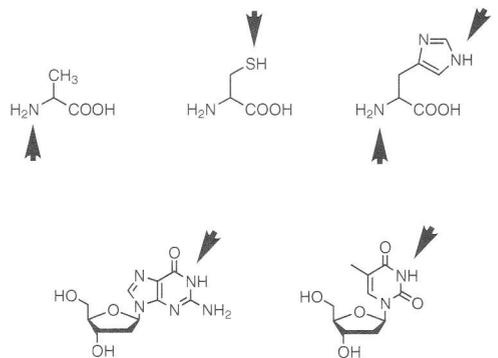


Figure 5. Alkylation Sites of Amino Acids and Nucleosides with Jolkinolide D Pharmacophore

することにより応用研究の道が開けると考えている。

今後も本研究を中心とした生命現象を有機分子の力で解き明かしていく研究を進めていきたい。本研究は研究代表者が二年前に筑波大学化学系で新研究室を立ち上げた際に中心研究課題として力を注いできたものであり、現在も進行中である。その際に今回の様な援助をいただいた山田科学振興財団の関係者の皆様に心より感謝いたします。

研究発表

口頭発表

1. 坂倉彰、山田静之、木越英夫；海洋産抗腫瘍性物質アプリロニンAの光アフィニティー認識基を備えた人工類縁体の合成、日本化学会第81春季年会、2002. 3、東京。

2. 宮沙織、坂倉彰、木越英夫；海洋産細胞毒性物質ミカロライドBの人工類縁体の設計と合成、日本化学会第 81 春季年会、2002. 3、東京。
3. 寺田康則、坂倉彰、木越英夫、高井章、周士勝、岡田泰伸；新規プロテインホスファターゼの合成と活性、日本化学会第 81 春季年会、2002. 3、東京。
4. 高柳維、坂倉彰、木越英夫；ジオルキノライドDファーマコファアの合成と反応性、日本化学会第 81 春季年会、2002. 3、東京。
5. 木越英夫；海洋産アクチン脱重合分子、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2002. 7、吹田。
6. 坂倉彰、高柳維、下川浩輝、木越英夫；ジオルキノライドDファーマコファア：合成とアミノ酸、ヌクレオシドおよびDNAに対する反応性、第 44 回天然有機化合物討論会、2002. 10、東京。

誌上発表

1. H. Kigoshi, K. Suenaga, M. Takagi, A. Akao, K. Kanematsu, N. Kamei, Y. Okugawa, and K. Yamada: Cytotoxicity and Actin-Depolymerizing Activity of Aplyronine A, a Potent Antitumor Macrolide of Marine Origin, and Its Analogs, *Tetrahedron*, **58**, 1075-1102 (2002).
2. A. Sakakura, Y. Takayanagi, and H. Kigoshi: Jolkinolide D Pharmacophore: Synthesis and Reaction with Amino Acids, Nucleosides, and DNA, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 6055-6058 (2002).