グルタミン酸受容体サブタイプ選択的リガンド分子の開発

Development of Subtype-Selective Ligands for Glutamate Receptors

代表研究者　東北大学　佐々木　誠　Tohoku University　Makoto Sasaki
共同研究者　東北大学　及川　雅人　Tohoku University　Masato Oikawa
北里大学　酒井　隆一　Kitasato University　Ryuichi Sakai

Dysiherbaine (**1**) is a marine sponge-derived excitatory amino acid with potent convulsant activity. This novel amino acid activates neuronal non-*N*-methyl-D-aspartate (non-NMDA) type glutamate receptors (GluR), namely, AMPA and kainic acid (KA) receptors, with considerable preference over KA receptors. Moreover, characterization of DH actions on recombinant GluRs revealed that the selective binding to the GluR5 and GluR6 subunits was of high affinity. Because of these intriguing pharmacological properties to KA receptors, as well as its potent epileptogenic action, DH and its designed analogues are anticipated to serve as useful tools for investigating GluR structure and function in the central nervous system. In order to reveal detailed structure–activity relationship profiles of dysiherbaines, we have developed a concise and efficient synthetic route to dysiherbaine analogue **4**. The synthesis features a stereoselective *C*-glycosidation to set the C_6 stereocenter and epoxide opening/ring closure to form tetrahydrofuran ring. We also characterized the pharmacological activity of simplified model compound **3**, which lacks the C_8 and C_9 functional groups of dysiherbaine. Radioligand binding assays and electrophysiological studies revealed compound **3** to be a selective antagonist to GluR5 KA receptor.

研究目的

グルタミン酸受容体は脊椎動物の中枢神経シナプスにおいて主要な興奮性神経伝達を司るのみならず、記憶・学習などの高次脳機能、テンカンや神経細胞死を伴う脳神経疾患に深く関わると考えられており、医学・神経科学の中心的研究課題のひとつである。グルタミン酸受容体は、イオンチャネルを形成して速いシナプス伝達を担うイオンチャネル型受容体と、Gタンパク質と共役してシグナル伝達を行う代謝調節型受容体の二つに大別される。イオンチャネル型受容体はさらにアゴニストに対する受容体親和性の違いから、*N*-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体、α-アミノ-3-ヒドロ

キシ-5-メチル-4-イソキサゾール（AMPA）受容体およびカイニン酸受容体の3つのサブタイプに分類されているが、さらに分子生物学的手法により細分化され、現在では約15種の受容体サブユニット遺伝子が存在することが明らかにされている。これら受容体サブユニットは、中枢神経系においてホモメリックまたはヘテロメリックな組合せで発現し、複合体を形成することにより機能の多様性を獲得している。しかし、ヘテロメリックな複合体チャネルにおいて個々のサブユニットが担う生理機能は完全には解明されていない。したがって、これら受容体分子のシナプスにおける複雑な生理機能を分子レベルで解明するためには、それぞれの受容体サブユニットに特異的に結合して機能を制御する分子の存在が不可欠である。

ミクロネシア産の海綿 *Dysidea herbacea* より単離・構造決定された興奮性アミノ酸ダイシハーベイン(**1**)は、マウスに対して非常に強い痙攣誘発活性を示し、これまで最強の興奮毒性を示すとされたドーモイ酸を凌ぐ（腹腔内投与で約6倍）。また、ダイシハーベインは非 NMDA 型グルタミン酸受容体（AMPA およびカイニン酸受容体）を選択的に活性化することが明らかにされているが、ラット海馬培養細胞ではカイニン酸受容体に対して特に高い親和性を示す（AMPA 受容体の約50倍）。さらに、発現細胞系を用いた実験によりカイニン酸受容体サブユニット GluR5 および GluR6 に非常に強い親和性を持つだけでなく、ヘテロメリックな受容体複合体 GluR5/KA2 において GluR5 のみをサブユニット選択的に活性化するという、これまでに全く知られていない特異な作用を有する。

本研究では、従来の興奮性アミノ酸には見られない特性を有するダイシハーベインおよびその類縁体の効率的全合成ルートを確立し、構造活性相関を行うことにより、サブタイプ高選択的なグルタミン酸受容体リガンドを開発することを目的に研究を行った。

← Figure 1

研究経過

1．ダイシハーベイン類縁体の短工程合成

我々はこれまでにダイシハーベイン(**1**)、ネオダイシハーベイン A (**2**)およびモデル化合物 **3** の全合成および構造活性相関研究を行い、6員環エーテル上のC_8およびC_9位の官能基がグルタミン酸受容体サブタイプに対する結合の選択性に関与している可能性を明らかにしてきた（Figure 1）。そこで、さらに詳細にC_8およびC_9位官能基に関する構造活性相関研究を行うための各種類縁体合成への展開を視野に入れた、ダイシハーベイン類縁体 **4** の効率的な合成経路を開

発した(Scheme 1)。ジアセチルアラビナール **5** に対してルイス酸として $Yb(OTf)_3$ の存在下、アリルシラン **6** を反応させることにより立体選択的に *C*-グリコシド **7** を得ることができた。次いで、AD mix-βを用いた不斉ジヒドロキシル化反応によりエキソオレフィン部を位置選択的に酸化した。しかし、反応の立体選択性は低く、C_4 位に関する約 2:1 のジアステレオマー混合物として得られた。さらに、一級水酸基を選択的にシリル基で保護した後、アセチル基を除去してアリルアルコール **8** へと導いた。**8** を *m*CPBA により酸化してβ-エポキシドを得た後、シリカゲルカラムにより精製すると三級水酸基の分子内攻撃による 5-exo 環化を経て、二環性ジオール **9** が立体選択的に得られた。ジオール部をアセトナイドとして保護し、ベンジル基を除去して一級アルコール **10** とした段階で、C_4 位に関するジアステレオマーを分離することができた。

次にアミノ酸側鎖を導入するために、アルコール **10** を酸化し、続く Wittig 反応により増炭してα,β-不飽和エステルとした。DIBALH 還元により得られるアリルアルコールに対して不斉エポキシ化反応を行ってエポキシアルコール **11** へと導いた。次いで、ベンジルイソシアネートと反応させて得られるベンジルカルバメートを塩基処理することにより C_2 位のアミノ基を立体選択的に導入し **12** を得た。生じた二級水酸基を Barton 法により還元除去後、得られた **13** に対して 4 行程で保護基の変換を行ってジオール **14** を合成した。ジオール **14** を塩基性条件下 $KMnO_4$ により酸化するとジカルボン酸 **15** とアミナール **16** の混合物が得られた。両者を分離することなく TPAP 酸化に付し、次いで過剰のトリメチルシリルジアゾメタンで処理することによりジエステル **17** を収率良く得ることができた。最後に、酸加水分解による脱保護を行い、目的とするダイシハーベイン類縁体 **4** の合成を達成した（化合物 **5** から 23 行程、総収率 2.5%）。また、重要中間体である **17** のアセトニドは選択的な脱保護が可能であり、C_8,C_9 位の修飾・変換による他の類縁体合成の重要中間体となるものと考えられる。 ← Scheme 1

さらに上記合成ルートの短縮化を目的として、**5** と、リンゴ酸から合成したアリルシラン **18** との反応を行ったところ立体選択的に *C*-グリコシド **19** を得ることができた（Scheme 3）。続いて Scheme 1 と同様の方法に従い、位置選択的ジヒドロキシル化を含む 5 行程で全炭素骨格を有する化合物 **20** を合成した。現在、C_4 位ジアステレオマーの分離と **4** への変換を検討中である。 ← Scheme 2

２．ダイシハーベイン類縁体の生物活性

合成したダイシハーベイン類縁体 **4** について、マウスに対する脳室内投与を行い痙攣誘発活性を評価した。しかし、高投与量（20 μg）でもマウスに対して有意な行動毒性を示さなかった。今後、ラット脳シナプス膜標本に対するトリチウム標識リガンドの結合阻害試験を行うことにより、グルタミン酸受容体に

対する結合親和性の評価等を行う予定である。

３．KA 型受容体選択的アンタゴニスト

ダイシハーベインの 6 員環エーテル上の C_8 および C_9 位の官能基を持たないモデル化合物 **3** が、マウスに対して可逆的に昏睡させる生理活性を示すことをすでに明らかにしている。しかし、その標的受容体および作用機構は不明であったので、それらについて詳細に検討を行った。

まず、カイニン酸受容体サブユニットに対する結合親和性を調べるために、3 種類のカイニン酸受容体サブユニットタンパク質（GluR5, GluR6, KA-2）を発現させた培養腎臓細胞 COS-7 から調製した膜標本に対するトリチウム標識したカイニン酸の結合阻害試験を行った。化合物 **3** はカイニン酸の GluR5 に対する結合を阻害するのに対して（Ki 値 = 128 nM）、GluR6 および KA2 に対する結合には 100 μM の高濃度でも影響を与えなかった。これらの結果は、ダイシハーベインの C_8,C_9 位官能基がカイニン酸受容体サブユニットに対する結合の選択性に関わる構造因子であることを強く示唆している。

次に、AMPA およびカイニン酸受容体サブユニット（GluR4,5,6, KA-2）をホモメリックあるいはヘテロメリックに発現させた培養腎臓細胞 HEK293 に対する化合物 **3** の活性を電気生理学実験により検討した。ホモメリック（GluR4,5,6）およびヘテロメリックな受容体（GluR5/KA2）を発現させた系に対し化合物 **3** を投与しても、チャネル電流を惹起しなかった。これに対して、GluR4 AMPA および GluR5 カイニン酸受容体においてグルタミン酸投与により引き起こされる電流応答を阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 23 μM、23 nM であった（Figure 2）。 ← Figure 2

また、化合物 **3** が神経細胞の AMPA 受容体に対しても同様の阻害活性を示すかどうかを調べるために、海馬 CA1 錐体細胞に対する作用を調べた。化合物 **3** は AMPA 受容体を介した興奮性シナプス後電流を阻害し、その IC_{50} 値（16 μM）は発現系を用いた実験と同等であった。

以上の結果から、化合物 **3** が AMPA およびカイニン酸受容体、特に GluR5 カイニン酸受容体に対して親和性が高い、選択的なアンタゴニストであることが明らかとなった。

まとめ

ジアセチルアラビナールのアリルシランによる立体選択的 *C*-グリコシル化と 5-exo 環化によるテトラヒドロフラン環形成を鍵反応としてダイシハーベイン類縁体 **4** の短行程合成ルートを開発した。C_4 位四級炭素の立体制御に課題が残るものの、これまでの合成法に比較して大幅に合成ルートを短縮することができた。また、化合物 **17** から C_8,C_9 位水酸基の修飾・変換により他の類縁体の合成が可能と考えられる。

ダイシハーベインの C_8,C_9 位官能基を持たないモデル化合物 **3** が AMPA およびカイニン酸受容体、特に GluR5 カイニン酸受容体に対する親和性が高い、選択的アンタゴニストであることを明らかにした。これにより、ダイシハーベインの C_8 および C_9 位官能基を変換することによりグルタミン酸受容体サブタイプに対する薬理学的特性を制御できる可能性を示すことができた。現在、化合物 **4** の詳細な薬理学的、電気生理学的解析を行うとともに、他の構造類縁体の合成を進めている。

研究発表

口頭発表

1. J. M. Sanders, R. Sakai, K. Ito, M. Shoji, M. Sasaki, L. Settimo and G. T. Swanson; "Pharmacological and structural characterization of the action of novel marine toxins on glutamate receptors" 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience 2004 (San Diego, 2004)

2. 庄司宗生、塩原 薫、及川雅人、佐々木 誠、酒井隆一；「グルタミン酸受容体選択的リガンドの開発に向けたダイシハーベイン類縁体の短工程合成」、日本化学会第 85 春季年会（横浜、2005）

誌上発表

1. R. Sakai, G. T. Swanson, M. Sasaki, K. Shimamoto and H. Kamiya; "Dysiherbaine: A new generation of excitatory amino acids of marine origin" *Curr. Med. Chem.*, in press.
2. M. Shoji, K. Shiohara, M. Oikawa, K. Shimamoto, R. Sakai and M. Sasaki; "Concise synthesis and biological evaluation of dysiherbaine analogue" to be submitted.

3. E. Ito, F. Suzuki-Toyota, K. Toshimori, H. Fuwa, K. Tachibana, M. Satake and M. Sasaki; "Pathological effects on mice by gambierol, possibly one of the ciguatera toxins" *Toxicon*, **42**, 733-740 (2003).
4. C. Tsukano and M. Sasaki; "Total synthesis of gymnocin-A" *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14294-14295 (2003).
5. M. Sasaki, Y. Iwamuro, J. Nemoto and M. Oikawa; "Studies toward the total synthesis of azaspiracids: Synthesis of the FGHI ring domain" *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6199-6201 (2003).
6. H. Fuwa, N. Kainuma, M. Satake and M. Sasaki; "Synthesis and biological evaluation of gambierol analogues" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2519-2522 (2003).
7. M. Sasaki, C. Tsukano and K. Tachibana; "Synthetic entry to the ABCD ring fragment of gymnocin-A, a cytotoxic polyether" *Tetrahedron Lett.*, **44**, 4351-4354 (2003).

Figure 1. Structures of dysiherbaine (**1**) and its analogues

幅 6.5 cm

Scheme 1. Total synthesis of dysiherbaine analogue **4**

中幅 14 cm

Scheme 2. A concise route to compound **20**

中間 6.5 cm

Figure 2. Glutamate-evoked whole-cell currents in the absence and presence of **3** on GluR5 KAR

幅 6.5 cm