

## 生物活性の探索と解明を指向した有用化合物の合成研究と化学生物学的研究



京都府立大学大学院生命環境科学研究科 准教授 倉持 幸司

## はじめに

化学的手法によって生体現象を解明するケミカルバイオロジーは世界中で急速に発展している。これはひとえに、生命の諸現象を分子レベルで解明することが生命科学の進歩ひいては人類の健康増進に不可欠と考えられ、生命科学の基盤としての化学の重要性がこれまで以上に認識されるようになったためにほかならない。筆者は、アポトーシスや DNA 複製などの生体現象の解明を指向した有用天然物の合成研究や、医薬品などの生物活性物質と相互作用するタンパク質群の分離同定法の開発を行ってきた。以下にその研究概要を紹介する。

## 1. 生物活性天然物の合成と生物活性評価

## 1.1 エポラクタエンおよび誘導体の合成

エポラクタエンは真菌 *Penicillium* sp. BM1689-P より単離された化合物で、ヒト神経芽腫 SH-SY5Y 細胞に対して神経突起伸長作用および細胞周期阻害作用を有する。筆者らはエポキシラクトン由来のオキシラニルアニオンをまずシリルエポキシラクトンに変換した後、フッ化物イオンにより再びアニオンを発生させアルデヒドを反応させるという 2 段階のカップリング反応を開発し、エポラクタエンおよび誘導体を効率的に合成することに成功した (図 1)。また、合成したエポラクタエンおよび誘導体を用いて新たな生物活性の探索や構造活性相関に関する研究を行った。その結果、エポラクタエンおよび誘導体が、血液系細胞株 BALL-1 細胞に対するアポトーシス誘導活性、DNA ポリメラーゼ阻害活性、DNA トポイソメラーゼ II 阻害活性、抗炎症活性など多様な生物活性を有することを見いだした。エポラクタエンのアポトーシス誘導活性の構造活性相関として、コア部位である  $\alpha,\beta$ -エポキシ- $\gamma$ -ラクタムが活性発現に必須で、側鎖部位のアルキル鎖が長くなるほど活性が強くなることがわかった。そこで生物活性発現機構の解明を目的に、活性発現に重要であるコア部位ではなく側鎖部位を蛍光標識化したエポラクタエン誘導体とビオチン化した誘導体を合成した。蛍光標識化体の細胞内局在を調べたところ、ミトコンドリアと細胞質に局在することがわかった。またビオチン化誘導体を用いたアフィニティー精製により結合タンパク質を分離・回収し、

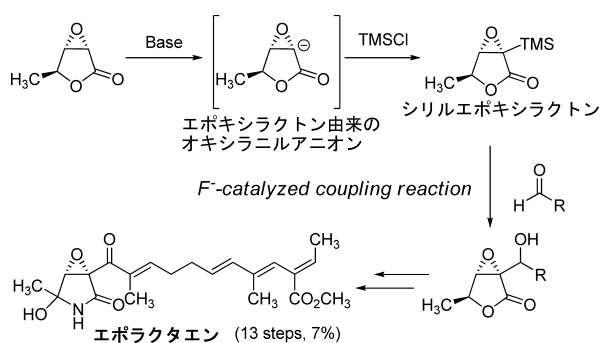


図 1 エポラクタエンの全合成

ペルオキシレドキシニン-1 などの結合タンパク質を同定することに成功した。さらにエポラクタエンと結合タンパク質の結合様式を解析する目的で、エポラクタエンと 20 種類の天然アミノ酸とそれぞれ反応させたところ、エポラクタエンはシステインと特異的に反応することがわかった。この反応でシステインは高収率でシステニンに変換され、エポラクタエンは  $\alpha$ -アシル- $\alpha,\beta$ -エポキシ- $\gamma$ -ラクタム骨格を失いカルボン酸へと変換されることを見いだした。以上の結果から、エポラクタエンおよび誘導体は、標的タンパク質のチオールをジスルフィドに酸化することで細胞内に酸化ストレスを誘起し、アポトーシス誘導活性を発現することが示唆された。

## 1.2 ネオエキヌリン A の全合成と絶対立体配置の決定

ネオエキヌリン A は、真菌 *Aspergillus ruber* から単離されたインドールアルカロイドで、抗酸化活性を有することが報告されている。ネオエキヌリン A の合成は既に 3 例報告されていたが、いずれの合成でもジケトピペラジンに存在する不斉炭素がラセミ化するという問題があった。筆者らは、ラセミ化しやすいジケトピペラジンの構築を最終段階に行い、ネオエキヌリン A を 95% ee で合成することに成功した (図 2)。この合成により、天然のネオエキヌリン A の絶対立体配置を S 配置であることを確定した。また、合成したネオエキヌリン A にさまざまなストレス誘導剤から細胞を保護する新規作用が見いだされた。

## 1.3 シュードデフレクツシンの全合成とアスペルギオン類の提出構造式の訂正

シュードデフレクツシンは真菌 *Aspergillus pseudodeflectus* より単離・構造決定された化合物で、ヒトがん細胞に対して増殖抑制作用を示す。筆者らは光学活性な (R)-メレインを出発して、シュードデフレクツシンの合成を達成した (図 3)。さらにこの合成した化合物を再結晶し、旋光度およびキラル HPLC による分析を行うことで、天然物の 7 位の絶対立体配置が R 配置であると決定した。また X 線結晶構造解析も行い、天然物の絶対立体配置を (7R, 9S) であることを決定した。一方、アスペルギオン A と B は *Aspergillus versicolor* より単離された化合物であるが、そのスペクトルデータはシュードデフ

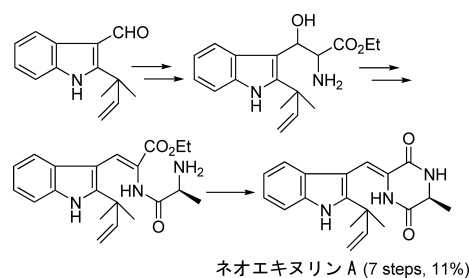


図 2 ネオエキヌリン A の全合成と絶対立体配置の決定

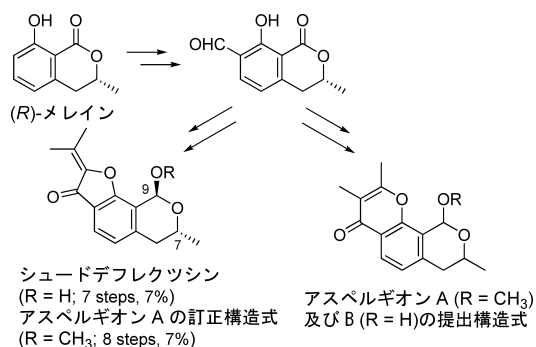


図3 シールドデフレクツシンの全合成とアスペルギオン類の提出構造式の訂正

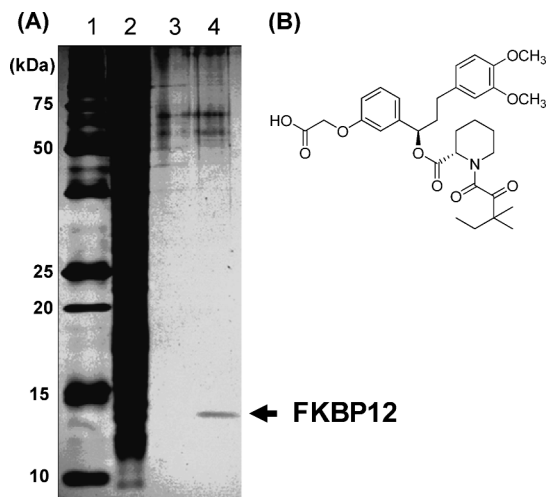


図4 SLF 固定 PEGA 樹脂を用いた FKBP12 の分離

レクツシンとはほぼ一致している。筆者はアスペルギオン A および B の提出構造式を合成し、これら化合物の構造式を訂正した。アスペルギオン B とシールドデフレクツシンは同一の化合物で、アスペルギオン A はシールドデフレクツシンのメチルアセタールであった。合成したシールドデフレクツシンを用いて詳細な細胞増殖抑制活性を調べた結果、本化合物は HCT116 や Colo205 などの大腸がん由来細胞に特に強く活性を示すことがわかった。

## 2. 固相合成用樹脂をアフィニティー担体として利用したリガンド結合タンパク質の同定

固相合成用樹脂は固相合成の担体として開発され一般に利用されているが、筆者らは、固相合成用樹脂の中でも PEGA 樹脂や TentaGel 樹脂がタンパク質の分離・精製用のアフィニティー担体としても優れた特性を有することを見いだした。これらの樹脂に対する非特異的な吸着は非常に少なく、リガンド親和性結合タンパク質を効率的に濃縮できる。図4(A)に、免疫抑制剤 FK506 結合タンパク質 (FKBP) と結合する低分子リガンド SLF (図4(B)) を PEGA 樹脂に固定し、細胞抽出液から FKBP12 を分離・精製した結果を示す。ここで用いた SLF 固定 PEGA 樹脂の量はわずか 4 mg で、細胞抽出液 1 mL から FKBP12 を 50% 以上の回収率で分離することに成功した (図

4(A), Lane 4)。一方、SLF 未固定 PEGA 樹脂から FKBP12 は全く回収されなかった (Lane 3)。また、この SLF 固定 PEGA 樹脂を用いて、T7 ファージ cDNA ライブラリーからも FKBP12 提示ファージを回収することにも成功している。この SLF 固定 PEGA 樹脂により、Colo205 細胞由来ファージ cDNA ライブラリー中の FKBP12 提示ファージクローンを 7 ラウンドで  $1.0 \times 10^6$  倍に濃縮することに成功した。また筆者らは、照射により簡便にリガンドを固定することが可能な光反応性樹脂を合成し、リガンド光固定樹脂から T7 ファージディスプレイ法により結合タンパク質を探索する手法を確立した。この結合タンパク質同定法の実施例として、抗がん剤タキソールの新規結合タンパク質の同定や、免疫抑制剤シクロスポリン A の新規標的タンパク質の同定が挙げられる。

おわりに

筆者は、特異な生物活性を有する天然物やその誘導体を合成し、新規生物活性の探索、構造活性相関の解明、作用機構解析を行ってきた。また、固相合成の担体である固相合成用樹脂をタンパク質の分離・精製用のアフィニティー担体として利用し、いくつかの生物活性物質の新規結合タンパク質を同定することに成功した。いずれの研究も有機合成化学を基盤とした研究であり、本研究成果が生命現象の解明を目的とした生命科学の進展に貢献することを願っている。

本研究は、東京理科大学大学院薬研究科、同大学ゲノム創薬研究センターならびに理工学部応用生物科学科、そして京都府立大学大学院生命環境科学研究科において行われたものです。温かくご指導くださった東京理科大学薬学部・小林 進先生、同大学理工学部・菅原二三男先生、同大学同学部・坂口謙吾先生 (現 総合研究機構)、京都府立大学大学院生命環境科学研究科・椿 一典先生に心より感謝を申し上げます。また、多くの研究機関での研究経験なくして、他領域にわたる研究を推進することはできませんでした。筆者に研究の機会を与えてくださり、ご指導を賜りました理化学研究所・小川智也先生、同研究所・伊藤幸成先生、東京大学名誉教授・北原 武先生、同大学大学院農学生命科学研究科・渡邊秀典先生、米国 Yale 大学分子細胞発生生物学部・Craig M. Crews 先生に厚く御礼申し上げます。そして、本研究を大きく推進させることができたのは、多くの方々の共同研究のおかげです。共同研究を行ってくださったすべての皆様に心から御礼申し上げます。特に、名古屋大学大学院農学研究科・中崎敦夫先生、東京理科大学理工学部・池北雅彦先生、同大学同学部・新井孝夫先生、同大学同学部・渡邊伸央先生、神戸学院大学栄養学部・水品善之先生、オハイオ州立大学・諸橋賢吾先生、米国 Fred Hutchinson がん研究センター・武内 亮先生には多大なご尽力を賜り、深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長・加納健司先生、本賞への応募を勧めくださった京都府立大学大学院生命環境科学研究科・渡部邦彦先生に厚く御礼申し上げます。