99　酸化ステロイド構造を基盤とする生物活性分子創製	平井　剛

【目的】植物酸化ステロイドは、多様な構造・生物活性を持つが、その詳細な機能は未解明のものが多い。我々はこれまでに、最も酸化度の高い植物酸化セコステロイドの 1 つである physalin 類に着目した研究を展開してきた。部分構造の合成とその NF-κB 活性化阻害機構研究の結果、physalin 類の右側（DEFGH 環部）が中程度の NF-κB 活性化阻害活性を示し、さらにその作用機序も天然物と同様であることを見出している。右側構造の異なる withanolide 類も NF-κB 活性化阻害を示すが、その作用機序は異なることから、physalin 類の DEFGH 環部が NF-κB 活性化阻害の作用機序決定に寄与していることが示唆された。これらの知見を活かし、本研究では DEFGH 環部の誘導体を合成し、NF-κB 活性化阻害能の向上を目指した。

また physalin 類は、酸化度の低いステロイド誘導体から生合成されていると考えられる。植物ステロイドの生合成スキームを倣い、他のステロイド化合物の右側構造を改変することによって、新たな分子群を創製することにも挑んだ。

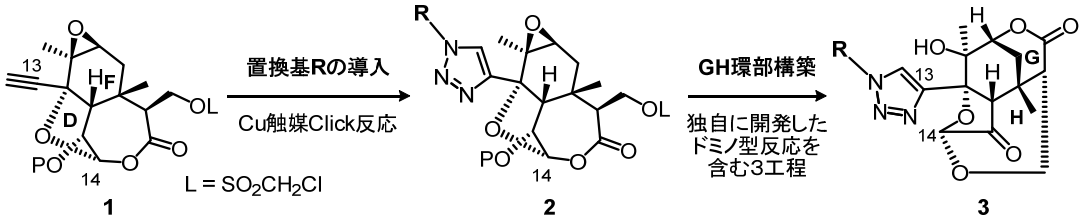
【方法】これまでの知見から、DEFGH 環部に疎水性置換基を導入することで、阻害活性の向上が期待された。そこで **1** のアルキン部に種々の官能基を Click-Chemistry によって導入後、DFGH 環構造を構築して各種誘導体 **3** を合成した。また、合成した化合物の NF-κB 活性化阻害能を、培養細胞を用いて評価した。

ステロイド化合物を基盤とした分子創製研究では、コレステロールを原料として誘導体合成を検討した。

【結果】化合物 **1** を 21 工程で合成し、クリック反応を利用して **2** を合成した。得た **2** の環構造を組み換え、3 工程で **3** に導いた。合成した 3 種の NF-κB 活性化阻害能を評価したところ、以前合成した DEFGH 環化合物と比べ、阻害活性が低下することがわかった。このことから、本生物活性には E 環部が重要であることが示唆された。

各種コレステロール誘導体の合成を種々検討し、これまでに 4 種の化合物を合成することに成功した。なお、本成果に関しては、都合により本報告書では詳細な内容は記載しない。

Physalin 類の DFGH 環部を基盤とする新規生物活性分子創製



99. 酸化ステロイド構造を基盤とする生物活性分子創製

平井　剛

九州大学 大学院薬学研究院 薬物分子設計学分野

Key words：植物ステロイド，NF-κB転写活性化，クリック反応，有機合成，分子設計

緒　言

Physalinは、松浦らによって *physalis alkekengi var. francheti*（和名：ホオズキ）から単離されたステロイド天然物である。その後、川井らを中心として、physalin類は30種以上同定されている。Physalin類は、ユニークな13、14-seco-16、24-cycloergostane 骨格が高度に酸素官能基化され、複雑に縮環している。Physalin 類のほとんどは、physalin B（**4**）、(図1）のようにC14-O-C27-C25に分子内のアセタール構造を有する。これまでに全合成例は報告されておらず、合成研究も天然物からの誘導によるものであった。Physalin B（**4**）の生物活性として、研究を開始した当初は抗腫瘍活性、抗炎症活性、NF-κB転写活性化阻害［1］などが報告されていたが、ヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害、ユビキチンープロテアソーム経路の阻害などが報告され、幅広い生物活性を有することが示唆されている。しかしながら、その分子レベルでの活性発現機構や活性に重要な部分構造は判明していない。

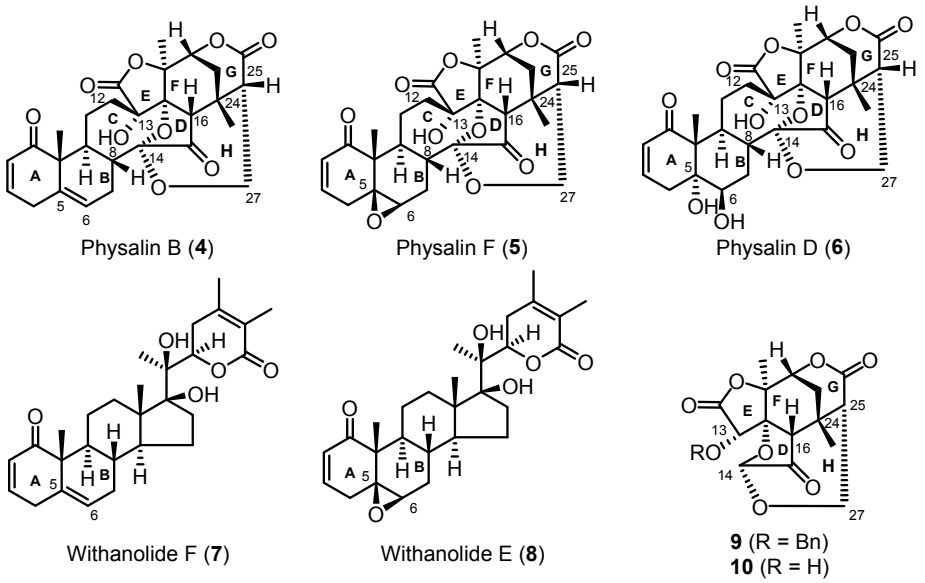


図1. Physalin類およびWithanolide類の構造と合成したDEFGH環部誘導体

我々は、これら生物活性の中でNF-κB転写活性化阻害に着目した。細胞内のシグナル伝達の1つであるNF-κB経路は、主にサイトカインやストレスなどで活性化され、炎症やガンなど様々な疾病に関与していることが知られている。このことから、創薬ターゲットしても注目されている。2006年にHeinrichらは、physalin B（4）とphysalin F（**5**）が、TNF-αで誘起されるNF-κB活性化を阻害することを報告した［1］。また同時に彼らは、B環部が異なるphysalin D（**6**）は、本阻害活性を示さないことも報告している。一方、我々も独自に取得した天然物ライブラリを評価した結果、似通ったAB環部を有しながらphysalin類とは全く異なる右側構造を有するwithanolide F（**7**）およびwithanolide E（**8**）も高い阻害活性を示すことを見出している。これらの結果は、特徴的な右側構造はあまり重要ではなく、5-6位にオレフィン、もしくはエポキシドを有することが阻害活性に重要であることを示している。しかし、これら天然物の構造-作用機序相関を調査した結果、5-6位エポキシド誘導体であるphysalin F（5）とwithanolide E（8）は右側構造

の違いに関わらず、IκBαのリン酸化と分解の抑制によって、NF-κB活性化を阻害することが示唆された。一方、5-6位オレフィン誘導体であるphysalin B（**4**）は、RelA／p50の核移行とDNAへの結合を抑制したが、withanolide F（**5**）はこの作用をほとんど示さなかった。同じAB環部を有し、かつ同程度のNF-κB活性化阻害能を有することから、physalin B（**4**）の作用機序の決定には、physalin類特有のDEFGH環部が重要な役割を担っていることが示唆された。

我々は、physalin特有の分子構造に惹かれ、DEFGH環部の合成を達成した［2, 3］。そのNF-κB活性化阻害能を調べたところ、Bn保護された化合物**9**において、中程度の阻害活性が確認され、その作用機序は**2**と同様であることが明らかとなった。Bn基を持たない化合物**10**には本阻害活性が見られなかったことから、AB環部構造はなくともphysalinの右側構造に何らかの疎水性官能基を組み込むことで、RelA／p50の核移行とDNAへの結合を抑制するNF-κB活性化阻害剤を創製できると考えられた［4］。

またこれまで植物由来のステロイド構造の酸化度の高い右側構造は、これまであまり活性に重要であるという認識を持たれていなかった。しかし、我々のこれまでの研究とWaldmannらによるwithanolideの研究［5］から、その右側構造の生物活性への関与が明らかとなって来ており、NF-κB活性化阻害に関しては上述のように作用機序にも影響があることがわかっている。Physalin類は、campesterolなどから段階的に酸化され、withanolide類を経て、生合成されると考えられる。これらのことから、「植物ステロイドの生合成的な構造変換は、結合タンパク質・生物活性の変化をもたらす」ということもできる。そこで本仮説を検証すべく、各種ステロイド誘導体の合成も検討した（詳細は、都合により割愛する）。

方法・結果・考察

1. 分子設計

本研究では、DEFGH環部の合成前駆体であるアルキン体**12**に対し、各種疎水性官能基をクリック反応で導入し**13**を合成した後、physalin右側骨格への環変換によって**14**に導くことを考えた。化合物**14**はE環部を持たないが、physalin特有のDFGH環部を維持しており、またその疎水性官能基を種々変換可能である。また、以前に合成した**9**はラセミ体であったが、**14**は天然型と同じ立体化学を有する光学活性化合物として合成することとした。我々はこれまでに、酵素を用いる速度論的な光学分割によって、**11**の不斉合成法を見出している［6］。化合物**11**からは、既知の手法を利用し16工程で**12**に導くことが可能であった。本報告書では、**12**の合成の詳細は割愛する。

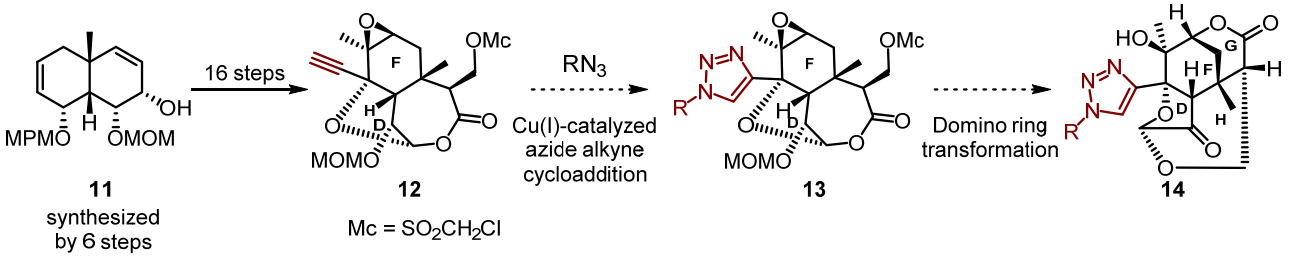


図2. 新規DFGH環部誘導体**14**の合成計画

2. 銅（I）触媒アジド-アルキン環化付加反応による疎水性官能基の導入

化合物**12**は安定な分子構造ではあるが、エポキシド、アルキンに加え、アセタール構造を含む7員環ラクトン、さらにそのβ位に脱離基であるモノクロロメシレートを持つ。これら構造を維持したまま、Cu（I）を用いるアジド-アルキンの環化付加反応（クリック反応）が進行すれば、各種置換基を導入した**14**の合成が容易となる。そこで、各種アジドとのクリック反応をまず検討した。アジドとしては、先に中程度のNF-κB活性化阻害活性を示した化合物**9**との構造類似性を考慮し、ベンジルアジドを用いた。TBTAをリガンドとし、銅源として$CuSO_4$、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウムを用いて、含水t-BuOH中80℃で反応させた。その結果、92%の高収率で**13a**を得ることができた。ベンゼン環の代わりにsp3リッチな疎水性官能基であるアダマンチル基を有するアジドや、ベンゼン環とDFGH

環部の間のメチレン基を長くしたアジドを用いても、反応は良好に進行し、それぞれ **13b**、**13c** を与えた（図 3）。本手法を用いれば、様々な疎水性官能基を **12** と連結できると考えられる。

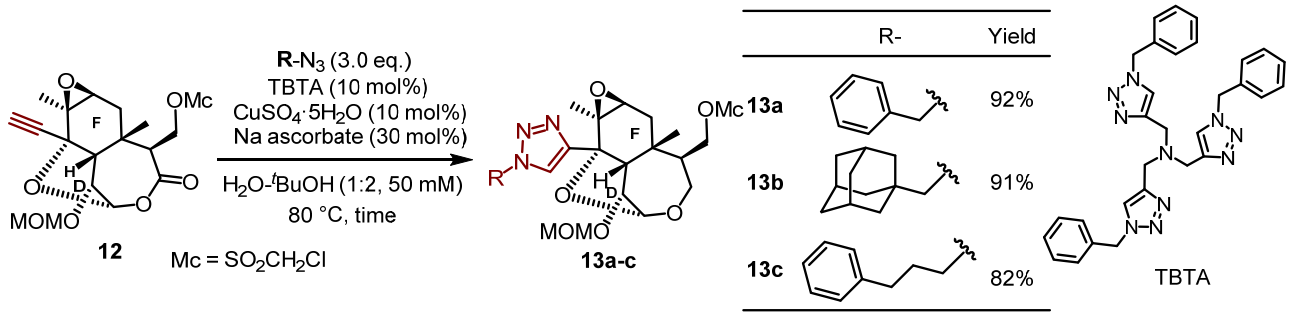
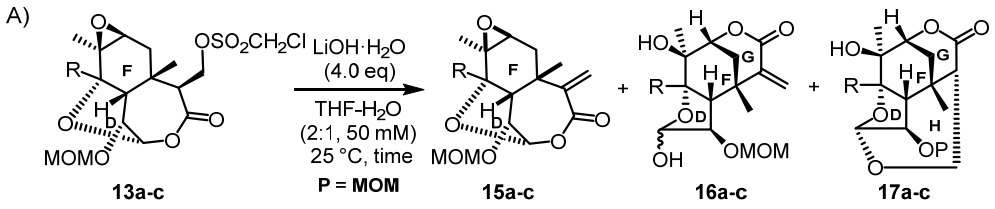


図 3. 化合物 **12** と各種アジドとのクリック反応による疎水性官能基の導入

3. 化合物 13 から 17 への変換とその考察

化合物 **13** から環構造を変換し、DFGH 環構造 **17** に導くことを検討した。アルキン体 **12** を THF-水中、LiOH で処理すると、G 環部を形成したアセタール **18** と H 環部まで形成した **19** の混合物を与える（図 4B）。本反応は、まず Mc 基が脱離し、α，β-不飽和ラクトンに変換された後、ラクトン環の加水分解と生じたカルボキシレートによるエポキシドの開裂反応によって G 環ラクトンが形成され、**18** を与える。化合物 **18** の 14 位ヘミアセタールは、**18α** と **18β** の混合物として生成するが、これらは平衡関係にあり、**18α** が 27 位にマイケル付加することで **19** を与える。**18α** と **19** の間にも平衡関係があり、最終的にそれぞれの安定性によって生成物の収率が決まることになる。アルキン体 **12** の場合、望む **19** はわずか 13%に留まり、**18** がトータルで 75%生成していた。



Entry	Substrate	Time	Yield of **15**	Yield of **16**	Yield of **17**
1	**13b**	1.5 h	28%	39%	38%
2	**13b**	3 h	5%	37%	39%
3	**13b**	8 h	trace	44%	52%
4	**13a**	8 h	6%	33%	29%
5	**13c**	8 h	8%	43%	30%

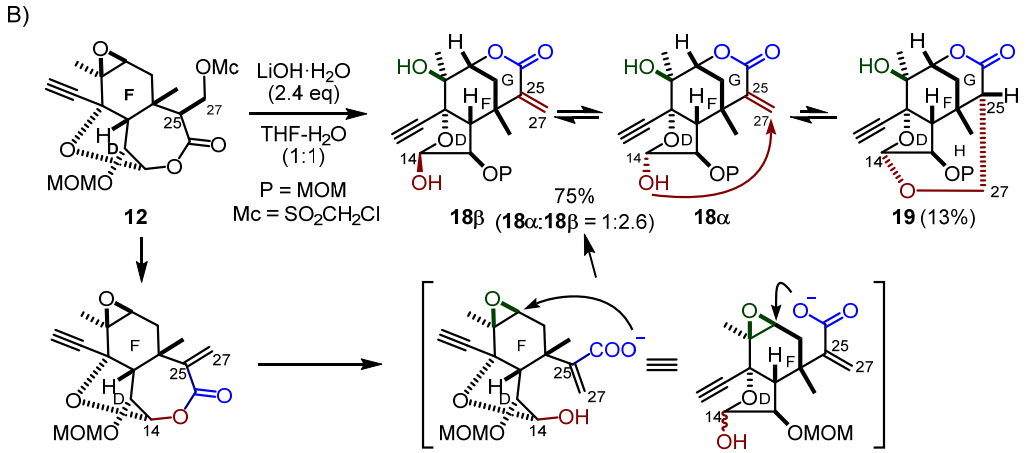


図 4. A）ドミノ型環変換反応による **17** の合成；B）**12** を用いたドミノ型環変換反応の結果とそのメカニズム

一方で、疎水性官能基を導入した **13** の環変換反応では、少々様子が異なっていた（図 4A）。先と同様、**13** を THF-水中、LiOH で処理すると、同様の反応が進行した。アダマンチル基を持つ **13b** を基質とした場合、LiOH との処理時間で脱離体 **15b** の生成量が減少し、G 環ラクトン体 **16b** と GH 環閉環体 **17b** の生成が徐々に増加した。最終的に 8 時間処理すると、ほぼ環変換反応は平衡に達し、望む **17b** を 52%、ヘミアセタール体 **16b** を 44%で得ることに成功した。他の置換基を持つ **13a**、**13c** でも 8 時間の処理時間でほぼ反応は完結し、**13a** からは望む **17a** を 29%、ヘミアセタール体 **16a** を 33%、**13c** からは **17c** を 30%、ヘミアセタール体 **16c** を 43%で与えた。いずれの場合も、先のアルキン体 **12** と比べ、G 環ラクトン体 **16** に対する GH 環閉環体 **17** の生成比は向上することがわかった。HPLC で分子した **16** と **17** を再度 THF-水中、LiOH で処理すると、**13** からの反応と同様の生成比で **16** と **17** の混合物を与えた。このことから、これらの間には平衡関係が存在し、環変換メカニズムは **12** と同様であることが示唆され、疎水性官能基の導入は DFGH 環化合物の安定性に寄与することがわかった。

4. 化合物 17 から 14 への変換

合成した各種 **17** の MOM 基を塩化アルミニウムとヨウ化ナトリウムで除去し **20** へと導いた後、生じた水酸基を 1-Me-AZADO［7］で酸化し、目的とする **14** を 3 種合成することに成功した。環変換反応時に副生したヘミアセタール体に由来する化合物は、HPLC で分離し、**14** を純度よく得ることができた（図 5）。

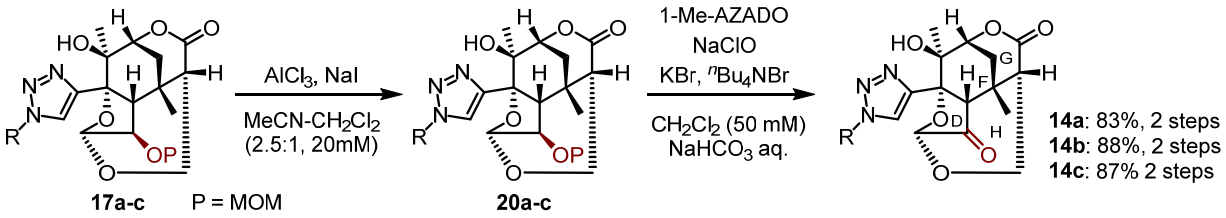


図5. 化合物**17**から**14**への変換

5. 化合物14のNF-κB活性化阻害活性の評価と考察

合成した **14** の NF-κB 転写活性化阻害活性を評価した。阻害活性は、プロモーター領域に NF-κB の結合サイトを組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を安定的に発現する HeLa 細胞を用いて、TNF-α によって誘起されるルシフェラーゼの発現をどのくらい抑制するかによって評価した。その結果、予期せぬことにアダマンチル基を持つ化合物 **14b** において、弱い阻害活性が見られたものの（IC_{50} ≒ 85 μM）、**14a**、**14c** には阻害活性は全く見られなかった（最終濃度 100 μM）。化合物 **14a** と中程度の阻害活性が見られた **9**（ラセミ体の IC_{50} = 43.6 μM）とを重ね合わせると、当然ながら DFGH 環構造はほぼ同じコンホメーションを持ち、疎水性官能基である Bn 基も同様のポジションに位置する（図 6）。しかしながら、**14a** が全く阻害活性を示さなかったことから、**14a** にはない E 環部ラクトン構造が **9** の阻害活性に寄与していたことが考えられる。また、DFGH 環構造と疎水性官能基の間にあるトリアゾール環の存在は、疎水性官能基の占める位置に制限を与えることや、そもそもトリアゾール環自体がターゲットタンパク質との相互作用に負に働いている可能性も考えられる。これらの考察を踏まえ、まずは **14a** のトリアゾール環を炭素鎖に置換した化合物を合成し、その阻害活性を評価することで、トリアゾール環と E 環部ラクトン構造の重要性について検証する予定である。

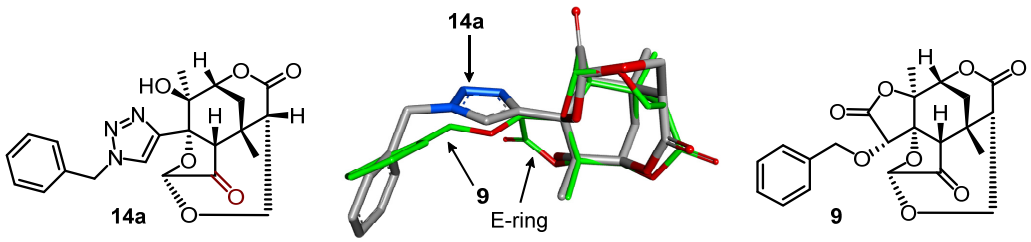


図6. 化合物**9**と**14a**の重ね合わせ

共同研究者・謝辞

本研究は、九州大学大学院薬学研究院薬物分子設計学分野の森田友己氏、および理化学研究所袖岡有機合成化学研究室の研修生、Manuel Gemander 氏が担当しました。また研究をサポートいただいた、九州大学大学院薬学研究院薬物分子設計学分野特任助教であった森田昌樹博士、および理化学研究所、袖岡幹子主任研究員に深く感謝申し上げます。生物活性評価に際し、九州大学大学院薬学研究院、山下智大助教に多大なるサポートをいただきました。この場をお借りし、深謝いたします。

文　献

1) Jacobo-Herrera NJ, Bremner P, Marquez N, Gupta MP, Gibbons S, Munoz E, et al. Physalins from Witheringia solanacea as Modulators of the NF-kB Cascade. Journal of Natural Products. 2006;69(3):328-31. PMID: 2005:1255239 DOI: 10.1021/np050225t.

2) Ohkubo M, Hirai G, Sodeoka M. Synthesis of the DFGH ring system of type B physalins: highly oxygenated, cage-shaped molecules. Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(21):3862-6. PMID: 19378305 DOI: 10.1002/anie.200900634.

3) Morita M, Hirai G, Ohkubo M, Koshino H, Hashizume D, Maruoka K, et al. Kinetically controlled one-pot formation of DEFGH-rings of type B physalins through domino-type transformations. Org Lett. 2012;14(13):3434-7. PMID: 22702243 DOI: 10.1021/ol301394b.

4) Ozawa M, Morita M, Hirai G, Tamura S, Kawai M, Tsuchiya A, et al. Contribution of Cage-Shaped Structure of Physalins to Their Mode of Action in Inhibition of NF-kappaB Activation. ACS Med Chem Lett. 2013;4(8):730-5. PMID: 24900739 DOI: 10.1021/ml400144e.

5) Švenda J, Sheremet M, Kremer L, Maier L, Bauer JO, Strohmann C, et al. Biology-Oriented Synthesis of a Withanolide-Inspired Compound Collection Reveals Novel Modulators of Hedgehog Signaling. Angewandte Chemie International Edition. 2015;54(19):5596-602. PMID: 25736574 DOI: 10.1002/anie.201500112.

6) Morita M, Kojima S, Ohkubo M, Koshino H, Hashizume D, Hirai G, et al. Synthesis of the Right-Side Structure of Type B Physalins. Isr J Chem. 2017;57(3-4):309-18. PMID: 28659646 DOI: 10.1002/ijch.201600110.

7) Shibuya M, Tomizawa M, Suzuki I, Iwabuchi Y. 2-Azaadamantane N-Oxyl (AZADO) and 1-Me-AZADO: Highly Efficient Organocatalysts for Oxidation of Alcohols. Journal of the American Chemical Society. 2006;128(26):8412-3. PMID: 16802802 DOI: 10.1021/ja0620336.