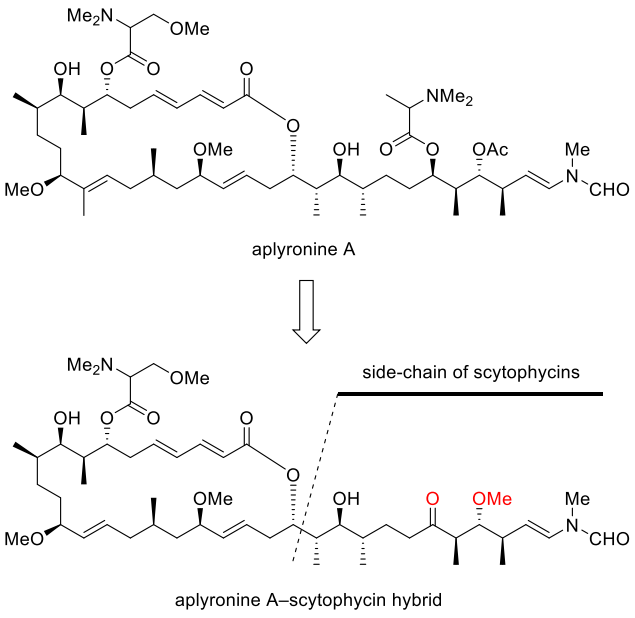
110　タンパク質間相互作用に基づく新規抗がんリードの創出	大好　孝幸

【目的】海洋天然物アプリロニン A は海洋軟体動物アメフラシから我々の研究グループにより単離されたマクロリド化合物であり、その抗腫瘍活性は既存の抗がん剤を大きく上回る。2013 年には、その強力な抗腫瘍性の作用機序はアプリロニン A が細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンとのタンパク質間相互作用を引き起こすという新規メカニズムであることを明らかにした。しかし、天然からの供給量が限られており、17 個の不斉中心、分子量 1,000 を超える本化合物自身を用いての創薬展開は、サンプル供給の面、誘導化の面から制限されている。そこで、アプリロニン A の構造活性相関研究を行い、創薬リードへの展開を目指すことにした。

【方法】アプリロニン A はその側鎖部でアクチンと結合し、生じたアプリロニン A－アクチン複合体がチューブリンと作用することで抗腫瘍活性を発現する。そのため、アクチン脱重合活性と抗腫瘍活性の強弱は比例関係にあることが予想される。すなわちアクチン脱重合活性を示す側鎖部をアプリロニン A マクロラクトン部に連結するハイブリッド化による構造活性相関研究を行うことにした。そこでまず、アプリロニン A の側鎖部と同じ位置でアクチンと結合するスウィンホライド A、イエジマライド B、サイトファイシン C の側鎖部を設計・合成し、アクチン脱重合活性を評価することにした。その後、得られた情報を基にハイブリッド化を検討することにした。

【結果】スウィンホライド A、イエジマライド B、サイトファイシン C 側鎖部を合成し、アクチン脱重合活性を評価したところ、サイトファイシン C 側鎖部がアクチン脱重合活性を示すことを明らかにした。そこで、アプリロニン A－サイトファイシンハイブリッド化合物を合成することにした。現在、三つに分割した各セグメントの合成を完了し、それぞれの連結について検討している。

アプリロニン A－サイトファイシンハイブリッド化合物の設計



110. タンパク質間相互作用に基づく新規抗がんリードの創出

大好　孝幸

筑波大学 数理物質系化学域 生物有機化学研究室

Key words：アプリロニン A，タンパク質間相互作用，アクチン，チューブリン，サイトファイシン

緒　言

がんは日本人の死亡原因の第 1 位であり、その治療法をあらゆる分野から探ることが必要である。抗がん剤治療の面では、既存のものとは異なる作用機序を有する化合物や強力な抗腫瘍活性を持つ化合物の研究が必須である。近年の調査［1］によると、抗がん剤の約 65%は天然有機化合物由来であり、抗がん剤開発において天然物化学は大きな役割を担っている。最近、分子量 1,000 を超える海洋天然物であるハリコンドリン B 由来の抗がん剤、エリブリンが上市され、抗がん剤開発において海洋天然物が注目を浴びている。

海洋天然物アプリロニン A は海洋軟体動物アメフラシから我々の研究グループにより単離されたマクロリド化合物であり、その抗腫瘍活性は既存の抗がん剤を大きく上回る（P388 白血病マウスに対して、アプリロニン A：T/C＝545%、マイトマイシン C：T/C＝250%）。2013 年には、その強力な抗腫瘍性の作用機序はアプリロニン A が細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンとのタンパク質間相互作用を引き起こすという新規メカニズムであることを明らかにした（図 1）［2］。しかし、天然からの供給量が限られており、17 個の不斉中心、分子量 1,000 を超える本化合物自身を用いての創薬展開は、サンプル供給の面、誘導化の面から制限されている。

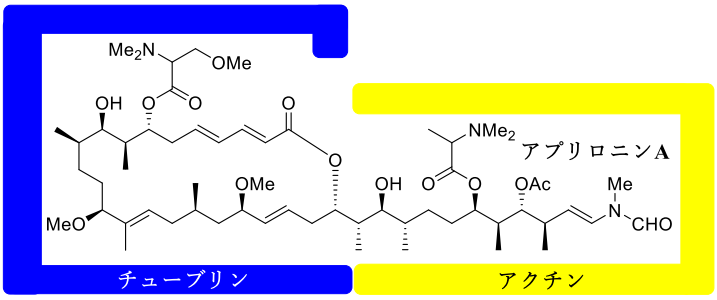


図 1. アプリロニン A－アクチン－チューブリン三元複合体の構造模式図

アプリロニン A は側鎖部でアクチンとマクロラクトン部でチューブリンと相互作用することが予想される。

チューブリンに作用する抗がん剤治療薬としてビンブラスチンやパクリタキセルなどよく知られている。いずれも単独でチューブリンに作用することで微小管の形成を妨げ、細胞分裂を停止させる。一方、アプリロニン A は単独ではチューブリンと作用することはできないが、アクチンとの複合体は強力にチューブリンの重合を阻害する。アプリロニン A は三元複合体を司る極めて珍しい天然物であり、このような二大細胞骨格タンパク質と三元複合体を形成することを引き金とする抗腫瘍性メカニズムは前例がない。すなわちアプリロニン A の創薬研究は新規作用メカニズムを有する抗がん剤開発への活路になると期待される。そこで、アプリロニン A の構造活性相関研究を行い、創薬リードへの展開を目指すことにした。

今回、アプリロニン A の特異な作用機序を保持するアナログを設計するにあたり、アクチン結合性天然物の側鎖部を合成し、アクチン脱重合活性を評価したので報告する。また、開発した側鎖部を連結した合成簡略型アプリロニン A の設計および合成研究についても併せて報告する。

方法および結果

１．アクチン結合性天然物の側鎖部の合成と生物活性評価

アプリロニンAはその側鎖部でアクチンと結合し、生じたアプリロニンA－アクチン複合体がチューブリンと作用することで抗腫瘍活性を発現する。そのため、アクチン脱重合活性と抗腫瘍活性の強弱は比例関係にあることが予想される [3]。そこで、アプリロニンＡの側鎖部と同じ位置でアクチンと結合するスウィンホライドA、イエジマライドB、サイトファイシンＣの側鎖部を設計・合成し、アクチン脱重合活性を評価することにした。

まず、スウィンホライドA側鎖部 3 の合成においては、（R）-Roche エステル（1）から不斉プロパルギル化を鍵反応としてアセチレンセグメント 2 を、市販の（*S*）-（＋）-3-ヒドロキシ酪酸メチル（3）から anti-還元を鍵反応としてテトラヒドロピランセグメント 4 をそれぞれ合成した（図 2)。さらに、両セグメントをアニオンカップリングにより連結し、スウィンホライドA側鎖部 5 を合成した。

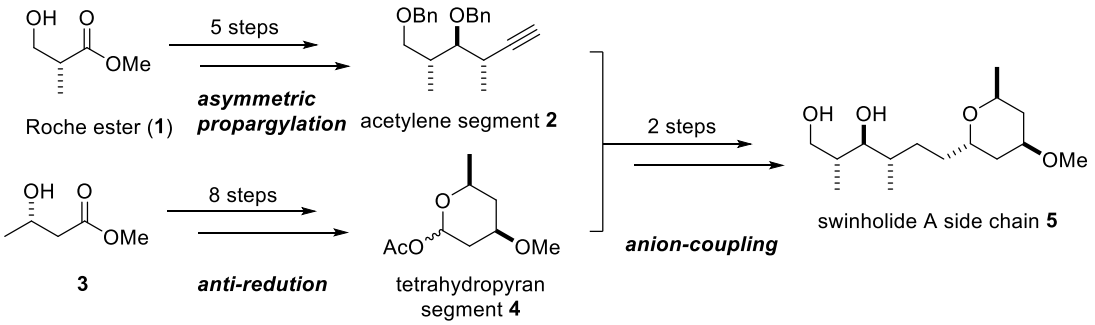


図 2. スウィンホライドA側鎖部 5 の合成

スウィンホライドA側鎖部をアセチレンセグメントとピランセグメントから合成した。

次に、イエジマライドB側鎖部 11 は市販の *L*-セリン (6) からカルボン酸セグメント 7 を、アルケン 8 と 9 の Heck 反応を鍵反応にアミンセグメント 10 を合成した（図 3)。さらに両セグメントを縮合により連結し、イエジマライドB側鎖部 11 を合成した。

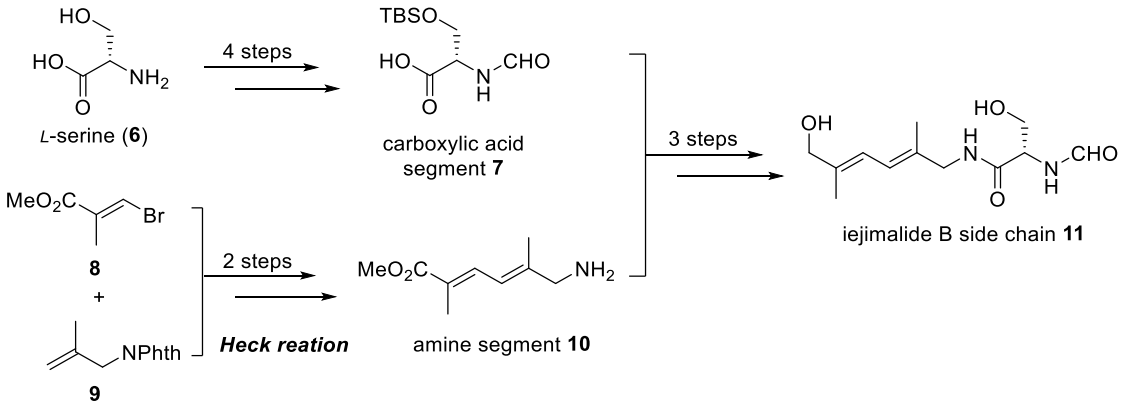


図 3. イエジマライドB側鎖部 11 の合成

イエジマライドB側鎖部をカルボン酸セグメントとアミンセグメントから合成した。

サイトファイシンＣ側鎖部 14 は（R）-Roche エステル（1）からクロチルボレーションを鍵反応に 2 つの異なるオレフィン 12、13 をそれぞれ合成した（図 4)。さらに、2 つのオレフィンをクロスメタセシス反応により連結し、サイトファイシンＣ側鎖部 14 を合成した。

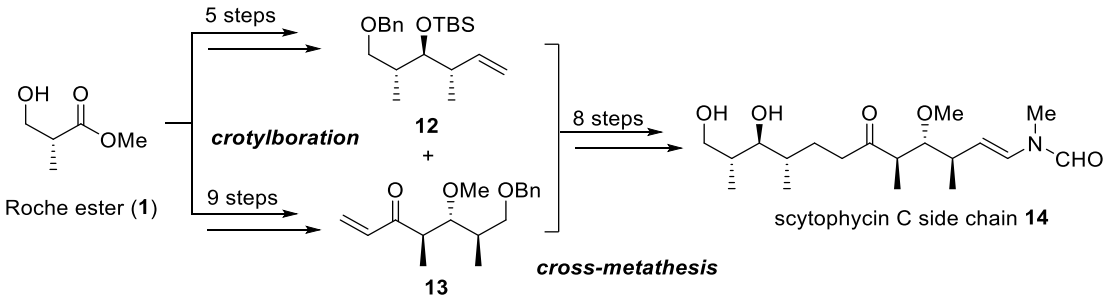


図 4. サイトファイシン C 側鎖部 14 の合成

サイトファイシン C 側鎖部をクロチルボレーションとクロスメタセシスを鍵反応に合成した。

合成した 3 つの側鎖部を用いて、3 μM のアクチンに対する脱重合活性を評価した。その結果、スウィンホライド A 側鎖部 5、イエジマライド B 側鎖部 11 はアクチン脱重合活性を示さなかった。一方で、サイトファイシン C 側鎖部 14 は中程度のアクチン脱重合活性を示した（EC_{50}＝47 μM）。

2. 合成簡略型アプリロニン A の設計と合成研究

前述した各種天然物のアクチン脱重合活性からサイトファイシン側鎖部を連結したアプリロニン A－サイトファイシンハイブリッドを設計した（図 5）。この化合物は不斉点の減少により、合成工程数を格段に削減することができると予想された。また、本合成では合成化合物を 3 つのセグメントに分割し、それぞれメタセシス反応、エステル化、NHK カップリングを鍵反応として合成することとした。

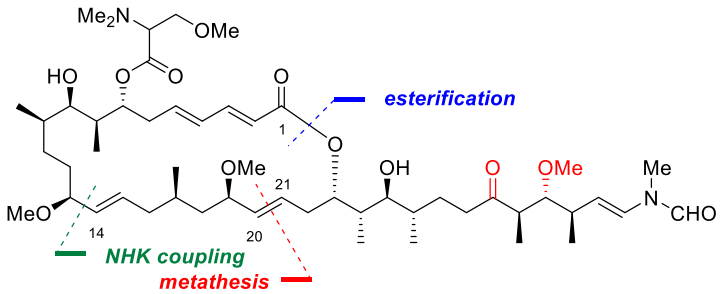


図 5. 合成簡略型アプリロニン A の設計と合成計画

サイトファイシン C の側鎖部を持つ簡略型アプリロニン A を設計した。また、メタセシス反応、エステル化、NHK カップリングにより連結する合成計画とした。

C1-C13 セグメントの合成

既知のアルコール 15 をアシル化後、閉環メタセシス反応を行うことでラクトン 16 とした（図 6）。その後、オレフィンの還元およびベンジル基の除去を一挙に行った後、Weinreb アミド 17 へと変換した。保護基の変換後、Me_2AlCl を用いた anti-アリル化を行い、生じたオレフィンを酸化開裂し、アルデヒド 19 とした。最後に、HWE 反応および保護基を除去することで C1-C13 セグメントの合成を完了した。

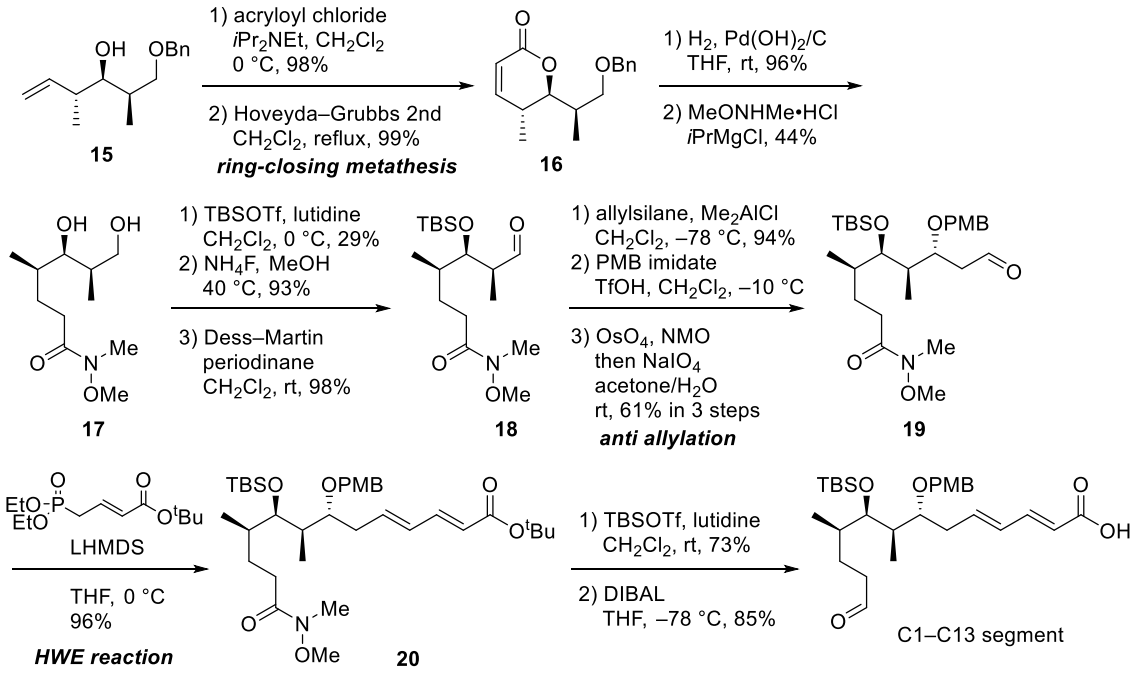


図 6. C1-C13 セグメントの合成

C1-C13 セグメントを閉環メタセシス反応、アンチ-アリル化、HWE 反応を鍵反応に合成した。

C21-C33 セグメントの合成

前述したサイトファイシン側鎖部の合成中間体 12, 13 をクロスメタセシスによって連結し、ケトン 21 を合成した（図 7）。その後、オレフィンの還元と二つのベンジル基を一挙に除去し、メチルアセタールとして保護することでアルコール 22 を合成した。生じた水酸基を Dess-Martin 酸化およびアリル化することで C21-C33 セグメントの合成を完了した。

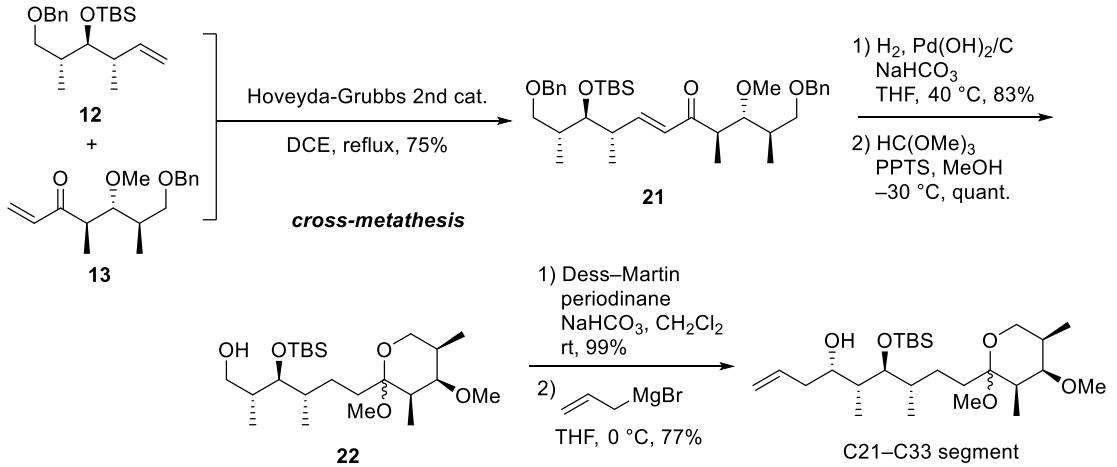


図 7. C21-C33 セグメントの合成

C21-C33 セグメントをクロスメタセシス反応に合成した。

セグメントの連結

合成した C21-C33 と別途調製した C14-C20 セグメントをクロスメタセシス反応によって連結し、ヨードオレフィン 23 とした（図 8）。続いて山口条件下、C1-C13 セグメントとの分子間エステル化し、NHK カップリング前駆体 24 を合成した。

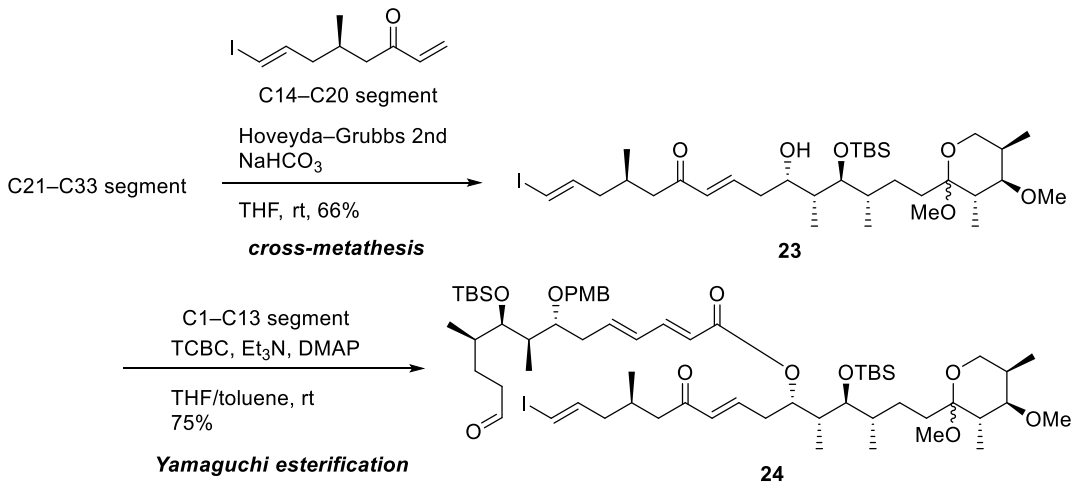


図 8. 各セグメントの連結

各セグメントをクロスメタセシス反応、山口エステル化により連結し、環化前駆体の合成を達成した。

考　察

以上のように、各種アクチン脱重合天然物の側鎖部を合成し、サイトファイシン類の側鎖部がアクチン脱重合活性を示すことを明らかにした。また、その結果からアプリロニン A－サイトファイシンハイブリッド化合物を設計し、現在、各セグメントの連結に成功している。今後、NHK カップリングおよび各種変換を経て、合成を達成する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究は、筑波大学大学院数理物質系化学域におきまして木越英夫教授のご指導のもと、吉田将人准教授、菊地いまり氏、小西翔太氏にご協力を賜りながら進めてまいりました。また、上原記念生命科学財団には多大なご支援を賜りました。この紙面をお借りいたしまして、心より感謝を申し上げます。

文　献

1) Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. J Nat Prod. 2020 Mar 27;83(3):770-803. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32162523 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285

2) Kita M, Hirayama Y, Yoneda K, Yamagishi K, Chinen T, Usui T, Sumiya E, Uesugi M, Kigoshi H. Inhibition of microtubule assembly by a complex of actin and antitumor macrolide aplyronine A. J Am Chem Soc. 2013 Dec 4;135(48):18089-95. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24228690 DOI: 10.1021/ja406580w.

3) Ohyoshi T, Takano A, Namiki M, Ogura T, Miyazaki Y, Ebihara Y, Takeno K, Hayakawa I, Kigoshi H. Development of a novel inducer of protein-protein interactions based on aplyronine A. Chem Commun (Camb). 2018 Aug 21;54(68):9537-9540. PMID: 30094443 DOI: 10.1039/c8cc04613a.