

1. 研究課題名: 蛋白核外移行を制御する生物活性物質の合成

2. 研究者氏名: 村上 啓寿

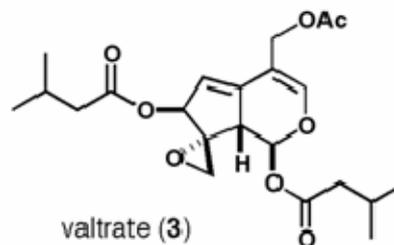
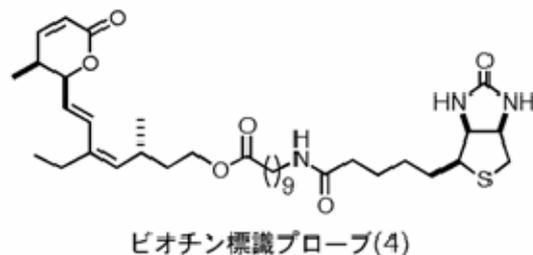
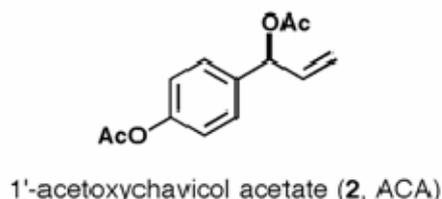
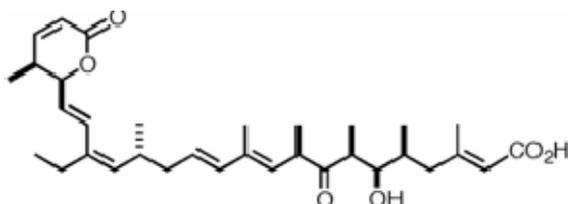
研究員: 金子 雅文 (研究期間 H.15.4.1~H.18.3.31)

研究員: 清水 伸泰 (研究期間 H.15.7.1~H.17.6.30)

3. 研究のねらい

最近の分子生物学の進歩に伴い、多数の蛋白の機能が急速に解明されている。エイズウィルスやがん細胞においては、パスポートのような役割を果たす特定のアミノ酸配列(核外移行シグナル、以下 NES と略す)を有する蛋白が核から細胞質へと輸送され、その蛋白が細胞質で機能することにより自らの増殖に関与していることが解明された。本プロジェクトでは、薬用植物からこれらの蛋白の核から細胞質への移行過程を制御する化合物を見出し、その分子をシーズ(種)と位置づけ、より作用の増強された抗エイズ薬や抗がん剤に繋がるリード化合物の合成を行う。

4. 研究成果



核外移行シグナル(NES)を有し重要な疾病に関与する蛋白として、エイズウィルスの複製に関与する Rev 蛋白や化学療法剤の効果の乏しいがん細胞の増殖に関与する MAPKK が明らかにされている。これまで NES 含有蛋白の核外移行阻害物質としては、放線菌の産生成分である leptomycin B(1, LMB)が知られていたが、合成や化学修飾による構造変換が極めて困難であることから、本化合物をシーズとする医薬リード化合物の探索は検討されなかった。そこで、著者は、NLS、NES および GFP(green fluorescence protein) の融合タンパク質を発現させた分裂酵母を用いて、これまで人類により服用経験のある薬用植物から新規 NES 含有蛋白核外移行阻害天然物の探索を行い、新規活性成分として 1'-acetoxychavicol acetate (2, ACA)および valtrate (3)を発見した。また、2 および 3 は、宿主細胞であるリンパ球細胞にほとんど傷害性を示すことなく、それぞれ 2 $\mu$ M および 1 $\mu$ M の濃度で HIV-1 ウィルスの増殖を 81%, 90%阻害した。また、両者は、MAPKK

が活性化されている腫瘍細胞株に対して、低濃度で選択的な生育阻害を示すことも明らかにした。

LMB は $\alpha,\beta$ -不飽和ラクトン構造を有しており、NES 含有蛋白の輸送担体 CRM1 の 529 番目の Cys 残基のチオール基が Michael 付加反応を起こすことで共有結合を形成し、核外移行阻害作用を示すことが報告されている。そこで、両者の作用機序を比較解析することを目的として、ストレプトアビジンに対して高い親和性を示すビオチンで標識したプローブ分子(4)を合成し、2 および 3 との競合実験を行った。その結果、両者も LMB と同様に、CRM1 の 529 番目の Cys 残基のチオール基と共有結合を形成し、NES 含有蛋白の核外移行を阻害することを証明した。また、両者と *N*-acetyl-L-cystein methyl ester との反応成績体を解析し、2 の 1-acetoxy-2-ene 構造および 3 のエポキシ部分が活性発現に必須の構造部位であることを明らかにした。

続いて、ACA(2)の不斉合成法を確立し、各種合成アナログの構造活性相関解析の結果、1' 位の立体配置および 4 位アセトキシル基の加水分解が 2 の活性発現に重要であることを見出した。さらに、より活性の増強された合成アナログの論理的な設計を目指し、以下の検討を行った。各種合成アナログの 4 位アセトキシル基の加水分解時の活性化エネルギーを分子軌道法を用いて計算したところ、活性との間に良好な関係が観察された。本加水分解においては、芳香環上の置換基が特に大きく影響することが推察されたことから、活性化エネルギーを基に強力な活性を示すと考えられるハロゲンアナログを設計した。このようにして設計したハロゲンアナログを合成し、それらの NES 含有蛋白核外移行阻害活性を評価したところ、シーズとして位置づけた天然物である ACA(2)より 50 倍強い活性を示す化合物を創製することができた。

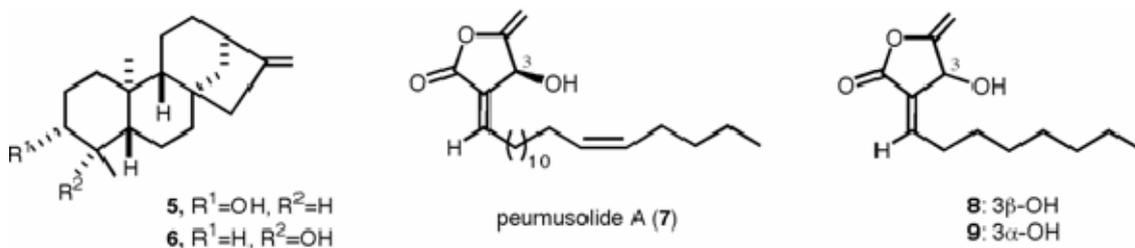
一方、上記活性天然物の標的蛋白である CRM1 については、立体構造既知の相同性の高い蛋白は見出されていなかった。そこで、京都大学薬学研究科の仲西先生との共同研究により、フォールド認識法によって CRM1 のモデル構造を構築し、分子動力学計算によりドッキングスタディを行ったところ、合成アナログの活性と計算した相互作用エネルギーに良好な相関性が見出された。さらに、本結合様式モデルを用いて、相互作用エネルギーの低い 1' 位の置換基の異なる活性増強アナログを設計・合成したところ、合成したアナログは予想通り、2 より活性が約 2 倍上昇していた。以上の結果から、ACA(2)の各種アナログを用いて構築した CRM1 と 2 の結合モデルは、活性アナログ設計の有用なツールとなることが証明された。

一方、valtrate (3)については、不斉 Diels-Alder 反応を鍵反応とする光学活性イリドイドの基本骨格の構築法を確立し、5,6-dihydrovaltrate の合成を達成するとともに、本合成アナログが天然物 3 と同程度の NES 含有蛋白核外移行阻害能を有することを見出した。3 は、不安定なヘミアセタールがエステル化された化合物であり、3 の脱アシル化体は不安定で単離できない。それゆえ、3 からの各種アナログの合成は、極めて困難であると思われる。今回合成した 5,6-dihydro アナログが天然物 3 と同程度の活性を示したことから、3 の各種アナログの合成の道が開かれたと考え

られる。

上述の2化合物(2,3)は、いずれも輸送担体であるCRM1の529番目のシステイン残基上のチオール基と結合し、NES アンタゴニスト作用により蛋白核外移行阻害作用を示すことが明らかにされた。そこで、これまで全く見出されていないNES 非アンタゴニスト作用 MAPKK 核外移行阻害剤の探索に着手した。まず、アッセイ法としては間接蛍光抗体法を利用し、MAPKKの局在化を直接観測する方法とした。そして、本アッセイ法で活性を示し、前述の分裂酵母のアッセイ法では活性を示さない化合物をNES 非アンタゴニスト作用 MAPKK 核外移行阻害物質として探索した。本評価系を用いて、薬用植物から活性物質の探索を行った結果、中央アフリカ薬用植物 *Annona senegalensis* から活性化合物として2種の *ent*-kaurenol(5,6)を同定した。また、南米産薬用植物 *Peumus boldus* MOLINA.から *peumusolide* A(7)と命名した活性新規化合物を単離した。これら3種のNES 非アンタゴニスト作用 MAPKK 核外移行阻害物質は、間接蛍光抗体法の系において50 $\mu$ M(5,6)、5 $\mu$ M(7)の濃度で完全にMAPKK核外移行を阻害した。また、プローブ分子4を用いた競合実験においてCRM1との結合に競合しないことが判明し、LMBや2,3と明確に作用機序が異なることを証明した。また、これらのうち7は、MAPKKが高度に活性化された細胞株に対して選択的な生育阻害作用を示すことも明らかにした。

さらに、動物モデルでも効果を示す適度な疎水性を有するアナログを設計し、それらの3位の両エナンチオマー(8,9)を合成したところ、3S配置の立体異性体8が天然物 *peumusolide* A(7)とほぼ同程度のMAPKK核外移行阻害活性を示すことが判明した。また、8は9と比較して4倍強い活性を示したことから、3位立体配置が活性に重要な関与をしているとともに、側鎖二重結合および長鎖アルキル側鎖が活性に影響を及ぼさないことを明らかにした。



## 5. 自己評価

ACA(2)については、合成した各種アナログの構造活性相関の結果から、分子軌道計算による活性化エネルギーを基にしたアナログの論理的な設計法を見出し、シーズとした天然物より50倍活性の増強された化合物を見出すことができた。また、立体構造既知の相同性の高い蛋白が知られていないNES含有蛋白の輸送担体CRM1の立体構造モデルをフォールド認識法によって構築し、各種合成アナログのドッキングスタディーにより、構築したモデルの妥当性を検証すること

ができた。この立体モデルは、新規抗 HIV 薬や抗がん剤のリード化合物探索にも有効であると考えられ、各種アナログの合成と生物活性の評価の産物である。また、valtrate(3)についても、その 5,6-dihidro 体が天然物と同程度の活性を示すことを明らかにし、各種アナログの合成が可能な柔軟性のある合成ルートを確立でき、先に構築した CRM1 立体モデルを用いた論理的な活性増強アナログの創製が強く期待される。

さらに、NES 非アンタゴニスト様 MAPKK 核外移行阻害物質を世界で始めて見出し、それらが抗がん剤のシーズ分子となることも明らかにすることができた。特に、peumusolide A(7)からは、動物モデルでも有効な疎水性を示すアナログを最終段階でようやく見出すことができた。

当初、動物モデルでも活性を示す医薬リード化合物の合成を目標としてきたが、目標地点まで到達したとは言い難い。しかしながら、有望なリード化合物の発見に繋がった論理的なデザインも可能になったことから、迅速かつ正確な医薬リード化合物の創製が可能になったと考えている。

## 6. 研究総括の見解

新しい着眼点で薬剤開発を行った。エイズウイルスやガン細胞の増殖抑制のため、タンパクの核外移行を阻害する方法を明らかにした。とくに薬用植物から見出した天然物をシーズ分子とし、新たな作用機構をもつリード化合物の呈示に成功した。将来の結実が期待され高く評価される。

## 7. 主な論文等

### 特許出願

1. 村上啓寿、田村理、抗 HIV 化合物とその利用、科学技術振興機構、2003.12.16 出願(特願 2003-418796)。
2. 村上啓寿、田村理、MEK 核外移行阻害剤とその利用、科学技術振興機構、2003.12.16 出願(特願 2003-418797)。
3. 村上啓寿、田村理、Rev 蛋白核外移行制御物質の新規アッセイ法、科学技術振興機構出願日:2004.4.28 出願(特願 2004-134589)。
4. 村上啓寿、田村理、1'-(S)-アセトキシシャビコールアセテートの立体選択的化学合成法、科学技術振興機構、2005.1.31(特願 2005-23641)。
5. 村上啓寿、田村理、新規 MAPKK 核外移行阻害物質とその利用、科学技術振興機構、2005.1.31 出願(特願 2005-23645)。

### 招待講演

1. 薬用植物由来の核外移行シグナル受容体阻害成分の探索、第39回植物化学シンポジウム、

東京、2002年11月

2. 核外移行シグナル含有蛋白を標的とする生物活性天然物の探索、日本薬学会東海支部特別講演会、名古屋、2003年2月

3. 蛋白核外移行を制御する分子の探索、日本薬学会第124年会ミニシンポジウム：薬学における生命志向型化学、大阪、2004年3月

4. Synthesis of probe molecules derived from biologically active natural products、3rd Japan-Korea Young Scientists Meeting on Bioorganic and Natural Products Chemistry、三田、2005年9月