微生物代謝産物サッカロスリオリド B に着想を得た
プロドラッグ化に関する研究

論文要約

２０２１

竹中　慧

序章

自然界に存在する天然有機化合物からは、これまで多くの有用な生物活性物質が見出され、一部は医薬品として用いられてきた。それらが有する特定の化学構造の中には、疾患の発症に関与する標的分子と共有結合を形成し、生物活性を制御することで薬理効果を示すものが存在する。

その中でも、α,β-不飽和カルボニル構造は標的分子との共有結合形成によってタンパク質の機能に干渉し、天然有機化合物の生物活性発現に必須の部位として機能するだけでなく、抗腫瘍薬にも活性を向上させる目的で導入されている重要な化学構造である。一方で、α,β-不飽和カルボニル構造が示す高い反応性は正常細胞の機能阻害をもたらし、副作用に繋がる可能性も懸念されている。高い反応性を制御する方法として、α,β-不飽和カルボニル構造に対してスルフィニル基やアミド基等を導入した誘導体を合成し、生物活性や溶解性の向上を試みる、いわゆるプロドラッグ化の手法が数多く報告されている。

所属研究室で希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 の培養液中より単離構造決定された天然有機化合物 saccharothriolide B (STL B) は、10 員環マクロライド骨格を有する saccharothriolides (STLs) の一つであり、7 位に *o*-aminophenol を有する。STL B は水溶液中にて *o*-aminophenol の脱離に伴い、α,β-不飽和カルボニル化合物 presaccharothriolide X (preSTL X) を放出する。この性質は *o*-aminophenol 部位が *o*-anisidine や anthranilic acid に置換された他の類縁体では確認されなかった。加えて、一連の類縁体で STL B と preSTL X の 2 化合物のみが高い腫瘍増殖抑制効果を示した。そのため、STL B は *o*-aminophenol を用いることで preSTL X が有する反応性の高い α,β-不飽和カルボニル構造を一時的に保護し、水溶液中にて活性本体の preSTL X を放出し、生物活性を発揮する前駆体として機能していると考えられた (Figure 1)[1]。以上のことから、STL B における水溶液中での *o*-aminophenol の放出は、*o*-aminophenol を基盤とした α,β-不飽和カルボニル化合物の新たなプロドラッグ化法の開発に繋がると考えた。第 1 章では簡素な構造を持つ化合物群を用いた *o*-aminophenol 脱離現象の普遍性と反応機構の検証、第 2 章では生物活性物質を用いた環境依存的な放出や放出速度の制御を検討し、*o*-aminophenol を基盤とした α,β-不飽和カルボニル化合物保護の生物活性物質への適用を試みた。

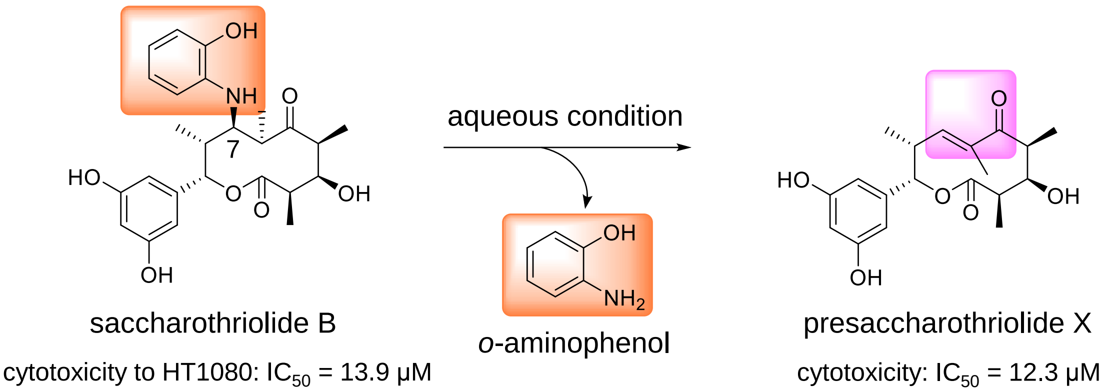

Figure 1. ***o*-Aminophenol** の脱離に伴う天然有機化合物 **STL B** から **preSTL X** への変換.

第 1 章
Retro-Michael 反応による *o*-aminophenol の脱離条件の検討

第 1 章では、STL B で観察された *o*-aminophenol の脱離、および α,β-不飽和カルボニル構造の放出について、単純な構造を有する化合物を用いて、その普遍性と反応機構の考察を行った。

鎖状の α,β-不飽和カルボニル化合物 dodec-1-en-3-one に対し、*o*-aminophenol を付加させた化合物を合成し、水溶液中での *o*-aminophenol の脱離、すなわち retro-Michael 反応の進行を評価した。その結果、経時的な *o*-aminophenol の脱離と dodec-1-en-3-one の放出が確認され、“*o*-aminophenol による α,β-不飽和カルボニル構造の一時的な保護”は普遍的な現象であることが示された (Figure 2)[2]。また、溶液条件や *o*-aminophenol 以外のアニリン類を検討することで retro-Michael 反応の反応機構を考察し、*o*-aminophenol 上のフェノール性水酸基は、プロトン性溶媒中で進行する本脱離反応の制御因子であり、環境応答型の脱離を指向するにあたって修飾可能な部位であることが示唆された。

そこで次に、α,β-不飽和カルボニル部位に付加した *o*-aminophenol 上のフェノール性水酸基について、糖保護による環境応答的な脱離を試みた。その結果、糖加水分解酵素存在下において、保護基の除去に伴うフェノール性水酸基の露出が認められた。すなわち、*o*-aminophenol のフェノール性水酸基を糖などの基質で保護することにより、α,β-不飽和カルボニル化合物の環境応答的な放出が可能な修飾法への応用が期待された。

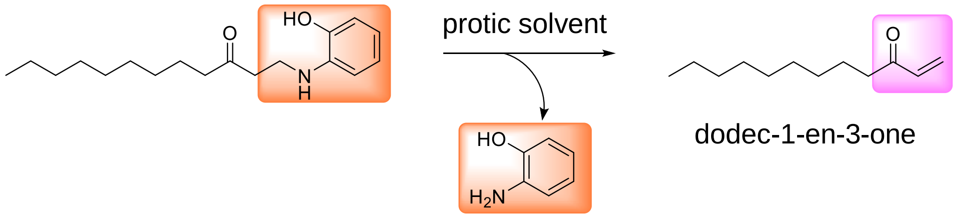

Figure 2. 簡易な構造を有する鎖状基質からの *o*-aminophenol 脱離. プロトン性溶媒中で retro-Michael 反応により *o*-aminophenol は脱離し、α,β-不飽和カルボニル化合物 dodec-1-en-3-one を放出する。

第 2 章
o-Aminophenol 修飾を基盤とした天然有機化合物のプロドラック化に関する検討

第 2 章では、腫瘍細胞に対して毒性を示す天然有機化合物 colchicine と oridonin を用いて、*o*-aminophenol を基盤とした α,β-不飽和カルボニル構造の保護と脱離がもたらす生物活性への影響を評価した。

1. 天然有機化合物 colchicine 誘導体を用いた脱離、生物活性評価

本項では *o*-aminophenol による α,β-不飽和カルボニル構造の保護戦略を、生物活性物質の colchicine 誘導体に適用可能か評価した。そのためにまず、微小管重合阻害剤 colchicine に対して、α,β-不飽和カルボニル構造を導入した新規誘導体を設計・合成した。得られた α,β-不飽和カルボニル型誘導体は微小管重合阻害作用を示したものの、腫瘍細胞増殖抑制効果は colchicine と比較して著しく低下した。

一方、HPLC 分析の結果、新規誘導体の α,β-不飽和カルボニル構造に *o*-aminophenol を付加した化合物は、水溶液中で経時的に *o*-aminophenol を脱離して α,β-不飽和カルボニル型誘導体を放出することが判明し、腫瘍増殖抑制効果も保護前と比較して高いことが示された。すなわち、生物活性評価試験においても *o*-aminophenol による一時的な α,β-不飽和カルボニル構造の保護は有効であると考えられた。そこで、*o*-aminophenol 上のフェノール性水酸基を糖で修飾した糖-*o*-aminophenol 保護体を合成して化合物の変換試験および生物活性試験を行った。すると本化合物は糖加水分解酵素の存在下にて、*o*-aminophenol 付加体を経て α,β-不飽和カルボニル型誘導体を速やかに放出した (Figure 3)。加えて、腫瘍細胞増殖抑制効果も α,β-不飽和カルボニル型誘導体と比較して向上した。以上の結果より、細胞培養系において糖修飾型誘導体は α,β-不飽和カルボニル型誘導体のプロドラッグ様化合物として機能したことが示唆された。

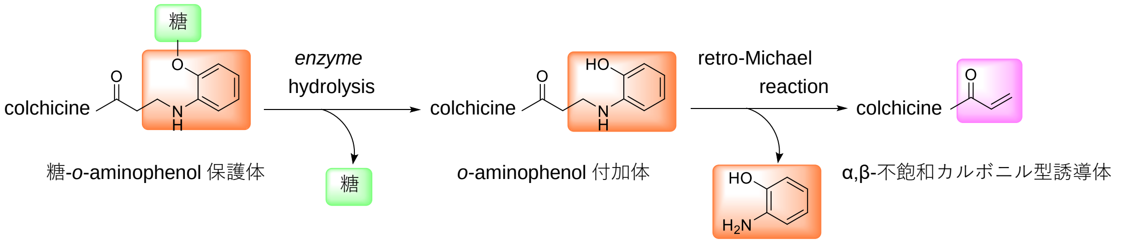

Figure 3. 酵素存在下における糖-*o*-aminophenol 保護体から α,β-不飽和カルボニル型誘導体の放出. Colchicine を基盤とした糖-*o*-aminophenol 保護体は、酵素存在下選択的に加水分解され、*o*-aminophenol 付加体へと変換された後、retro-Michael 反応によって α,β-不飽和カルボニル型誘導体を放出する。

2. アニリン誘導体を用いた天然有機化合物 oridonin の保護

Dodec-1-en-3-one と colchicine 誘導体を用いた実験から、*o*-aminophenol のフェノール性水酸基をメトキシ基に変換した *o*-anisidine を保護基として用いた場合、脱離速度が低下することが明らかになった。この結果から、アニリン芳香環への置換基導入によって脱離速度の制御、および生物活性発現の時間的制御が可能と考えた。そこで、*o*-aminophenol と *o*-anisidine の各付加体間において、同じく脱離速度の差が観察された抗腫瘍作用を示す天然有機化合物 oridonin を用いて評価した。

第 1 章の実験結果より、pKa が脱離速度に関与すると予想し、電子吸引基を中心とした置換基を有するアニリンを付加した誘導体を合成した (Figure 4)。得られた各誘導体の oridonin 放出速度および生物活性発現に要する時間を比較した結果、一部の電子吸引基を導入した誘導体において、脱離速度の低下と細胞毒性の発現が遅延する傾向が認められた。これらの結果は、アニリン芳香環への置換基導入により、生物活性物質の薬理効果が発揮される時間を調整できる可能性を示唆した。

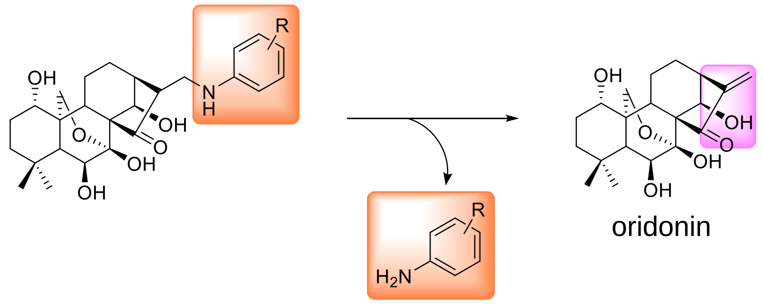

Figure 4. 各置換基を芳香環上に有するアニリン誘導体の脱離による天然有機化合物 oridonin の放出. アニリンの芳香環上に導入された置換基は、oridonin の放出速度や生物活性発現までに要する時間へ影響を与える可能性がある。

総括

本研究により、微生物代謝産物 STL B で見出された “*o*-aminophenol による α,β-不飽和カルボニル構造の保護” は、生物活性物質を含めた α,β-不飽和カルボニル構造を有する化合物群に対して応用可能であることが明らかになった。加えて、*o*-aminophenol 上のフェノール性水酸基の修飾は、環境応答的な活性物質の放出に有用であり、さらにはアニリン芳香環上への置換基導入により生物活性物質の放出速度を制御できる可能性も示された。これらの知見は、α,β-不飽和カルボニル構造を有する生物活性物質について、正常組織に対する非特異的作用を低減し、より安全で効果的なプロドラッグ修飾法の開発に繋がると期待される。また、反応性が高いために生物活性が評価されてこなかった化合物の再評価・再探索を行うための有効な手段としても期待できる。

参考文献

(1) Lu, S.; Nishimura, S.; Takenaka, K.; Ito, M.; Kato, T.; Kakeya, H. Discovery of presaccharothriolide X, a retro-Michael reaction product of saccharothriolide B, from the rare actinomycete *Saccharothrix* sp. A1506. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4406-4410.

(2) Takenaka, K.; Kaneko, K.; Takahashi, N.; Nishimura, S.; Kakeya, H. Retro-aza-Michael reaction of an *o*-aminophenol adduct in protic solvents inspired by natural products. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *35*, 116059-116064.