

京都大学	博士（薬科学）	氏名	恒松 雄太
論文題目	TGF-βシグナル伝達を阻害する新規天然有機化合物tryptopeptin類に関する研究		
（論文内容の要旨） TGF-βは癌の転移、線維化、血管新生などに関与するサイトカインであり、特に癌細胞において悪性度の高い癌への進行を促す作用をもつことが知られている。そのため、TGF-βによって誘導される細胞内シグナル伝達の阻害が癌の悪性化を防ぐ新たな癌治療法として注目されている。これまでにTGF-β受容体のキナーゼ活性をATP拮抗的に阻害する合成化合物が探索され、臨床開発が進められている。ところが、このような阻害形式を示す化合物は他の生体内キナーゼとの選択性に乏しく、望まざるオフターゲット分子の阻害に起因する副作用が問題視されている。そこで、本研究では既存の上記合成化合物などの作用点とは異なる作用点にてTGF-βシグナル伝達を阻害する化合物を、化学構造および生物活性に多様性のある天然有機化合物から見いだすことを目指した。 [第一章 放線菌が生産するtryptopeptins A-Eの単離とその平面構造決定] TGF-βが受容体に結合すると、転写因子Smadが活性化され、核内へと移行しDNAのSBE配列へと結合することで標的遺伝子の転写を調節する。そこで、SBE配列の下流にルシフェラーゼの遺伝子を導入した細胞株CAGA/Mv1Lu(ミンク肺上皮様細胞由来)を樹立し、TGF-β活性の簡便な測定系を構築した。本測定系を用いて約2000の微生物培養液についてスクリーニングを行い、<i>Streptomyces</i>属放線菌由来のKUSC_G10株に阻害活性を見いだした。そこで、目的の活性成分の単離・同定を目指し、本放線菌の培養抽出液を各種クロマトグラフィーによって分離し、目的の阻害活性を示す新規化合物tryptopeptins A(1), B(2), C(3), D(4), E(5)をそれぞれ単離した。なかでも1はTGF-βシグナル伝達を最も強力に阻害し、そのIC₅₀値は約1.0 μMであった。各種スペクトル解析から1の分子式をC₂₈H₄₀N₄O₆と決定し、本化合物はN末端側からisovaleric acid、N-methyl-valine、threonine、tryptophanと並んだアシル化トリペプチドを有する平面構造を決定した。なお、1のC末端tryptophan残基のカルボキシル基は異常な修飾を受けており、カルボン酸から2炭素増炭され酸化された、α,β-エポキシケトン を有していた。また、同様の手法を用い、2の構造が1の脱エポキシド体であること、3の構造が2のN末端イソ吉草酸のデヒドロ体であると決定した。一方、4と5は1のエポキシドが開環した後、その酸素原子がtryptophanのα炭素に求核攻撃して閉環したスピロアミナル構造を有していることを決定した。 [第二章 全合成および誘導体化によるtryptopeptins A-Cの絶対立体構造の決定] 1の絶対立体構造を解明するためにMarfey法を適応し、N-methyl-valineがL体、threonineがL-allo体であると決定した。続いて異常修飾されたtryptophan残基の立体化学は決定するため、様々な誘導体化を検討したが、1の天然から得られる量が微量で、かつ限りがあったことから、考えられる4種のジアステレオマー1a-1dの化学合成を行い、天然物とのスペクトルデータの比較によって絶対立体配置を決定することとした。1a-1dは既に絶対立体配置を決定している左側フラグメント6と絶対立体配置未決定のエポキシケトンを含む右側フラ			

グメント**7a-7d**を縮合させて合成可能と考えた。**6**はFmoc-L-allo-Thr-OHを出発原料とし、Fmoc-Me-L-Val-OH、イソ吉草酸クロリドを順次縮合させ合成した。L体のtryptophan由来の右側フラグメント**7a-7b**はBoc-L-Trp-OHを出発物質として、Weinreb amideへの変換、インドール窒素の保護、続くGrignard反応によってエノンとし、最後に過酸化水素水によってエポキシドを導入することで2つのジアステレオマー**7a**および**7b**を得た。同様に出发原料としてBoc-D-Trp-OHを用いて右側フラグメント**7c**および**7d**を得た。得られた**7a-7d**についてBoc基の脱保護、**6**との縮合、脱保護を行うことで**1a-1d**の4つのジアステレオマーを合成した。最後に各種スペクトルデータの比較検討を行い、合成した**1a-1d**のうち**1a**のみが天然物**1**と完全に一致したことから、天然物の全合成を達成するとともに、すべての絶対立体配置を決定した。同様の手法を用い、**2**と**3**の絶対立体構造を決定にも成功した。

[第三章 tryptopeptin誘導体の構造活性相関と作用機序解明を目指したケミカルプローブの開発]

これまでに得られた天然物tryptopeptin類およびその合成誘導体について生物活性の評価を行った。その結果、**1**に比べてC末端にエポキシケトンが存在しない化合物は大幅に阻害活性が低下すること、エポキシドの絶対立体配置が活性の強さに影響を及ぼしたことから、本部分構造が標的分子によって立体的に認識され、TGF- β シグナル伝達阻害活性において重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、本知見をもとに、**1**のN末端にdansyl基を導入した蛍光プローブ**8**を合成した。**8**の生細胞における細胞内局在を蛍光顕微鏡により解析したところ、細胞質への顕著な集積が確認され、細胞質に特定の標的分子が存在することが示唆された。

本研究ではTGF- β シグナル伝達阻害剤のリード化合物となり得る新規天然有機化合物tryptopeptin類を発見し、その化学構造を決定した。また、その過程において本化合物の全合成にも成功し、今後の詳細な作用解析研究や動物実験に必要な化合物量を供給することを可能にした。今後、さらなる構造活性相関研究による活性力価の向上、ならびにバイオチン化プローブ等の設計・合成を通じた標的分子の同定を含めた作用機序の解明を行うことで、本化合物の医薬品リード化合物としての有用性が明らかになることが期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、TGF- β シグナル伝達阻害剤のシード化合物となり得る放線菌由来の新規天然有機化合物tryptopeptins類を発見し、NMR等の詳細なスペクトル解析や全合成研究などを通じて立体構造を明らかにした。また、tryptopeptins類の各種合成誘導体の構造活性相関研究を通じて、TGF- β シグナル伝達阻害活性発現に重要かつ興味深いファーマコホアを明らかにした。さらに、tryptopeptins類の分子プローブの合成にも成功し、細胞内局在等の解析も行った。本研究は、tryptopeptins類の今後の詳細な作用解析研究や動物実験に必要な化合物量の供給を可能とした。これらの研究成果は、新規TGF- β シグナル伝達阻害剤の開発に有益な知見を含む優れた研究成果である。

よって本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成24年 3月31日以降