

天然資源の多様化による医薬品シード化合物の探索

Discovery of Novel Medicinal Seeds by Diversification of Natural Resources

平成 27 年度入学 鎌内 等 (Kamauchi, Hitoshi)

指導教員 小山 清隆

2015 年にノーベル医学生理学賞を受賞した大村, Campbell らによるイベルメクチンの開発と, Tu らによるアルテミシニンの開発のように天然資源からは, 複雑かつ多様な化学構造を持つ医薬品シード化合物が見出されている. しかし, 天然資源の枯渇や, 1993 年に締結した生物多様性条約などにより, 天然からの医薬品シード化合物の発見は困難になりつつある.

その中で, 創薬資源として真菌類は魅力的である. 真菌類は同一菌種でも異なる環境に生息する「生息環境多様性」や, 生産される二次代謝産物の「構造多様性」が豊富な点で他の資源よりも特徴的である. 当研究室では真菌類を使った新規医薬品シード化合物探索の一環として, 海洋由来真菌, キノコ, 発酵天然物などといった天然資源から成分探索研究を行っており, 構造多様性に富んだ新規化合物を報告してきた.¹⁻⁴⁾

本研究では新たな創薬資源を開発するにあたり, 「生息環境多様性」や二次代謝産物の「構造多様性」といった海洋由来真菌の持つ多様性に対し, 培養環境の改変と二次代謝産物の化学変換による更なる多様化を導入した. この複合的な新しい創薬資源から新規生物活性化合物の探索を行った.

1. 培地成分を変更した海洋由来真菌からのメラニン産生抑制化合物の探索

2005年11月千葉県一松海岸にて採取した海草より単離した海洋由来真菌 *Eurotium rubrum* (MPUC136) は水分活性の低い環境を好む好乾性カビの一種である。本菌は好乾性カビでありながら海洋より単離された点で、生息環境に多様性がある。

そこで、*E. rubrum* を Czapek-Dox 寒天培地と麦培地でそれぞれ培養し、 CHCl_3 で抽出したところ、両抽出エキスの含有成分に顕著な違いが確認された。また、麦培地で培養した抽出エキスは B16 melanoma 細胞を用いたメラニン産生抑制試験において、Czapek-Dox 培地で培養した抽出よりも強い抑制活性を示した (Fig. 1)。

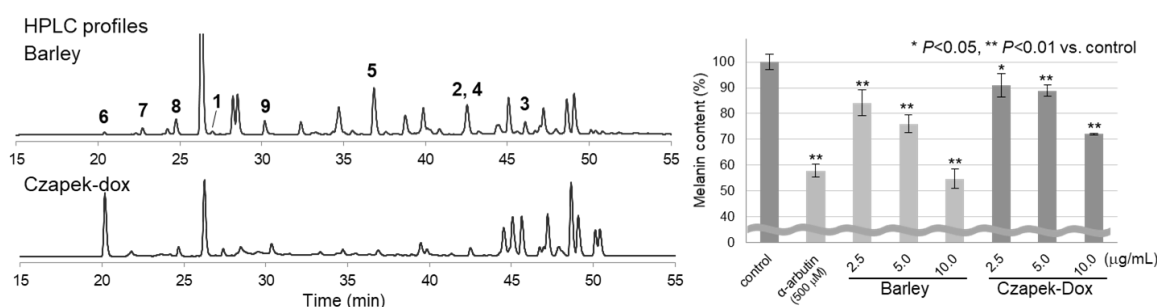


Fig. 1 培地条件による抽出エキスの含有成分とメラニン産生抑制活性の変化

麦培地で培養した *E. rubrum* CHCl_3 抽出エキスについてメラニン産生抑制活性を指標とした分離を行い、9種の化合物を単離した。単離した化合物に対し、NMR, MS等の各種スペクトルデータを用いた構造解析により、新規ジケトピペラジン化合物 **1**の構造を決定し、**2-9**の既知化合物を同定した (Fig. 2)。

得られた化合物と合成したジケトピペラジン化合物 **10**についてメラニン産生抑制活性を評価した。その結果 **2-4**にメラニン産生抑制活性が認められた。さらにプレニル基の位置及び数が活性発現に重要であることが明らかになった。⁵⁾

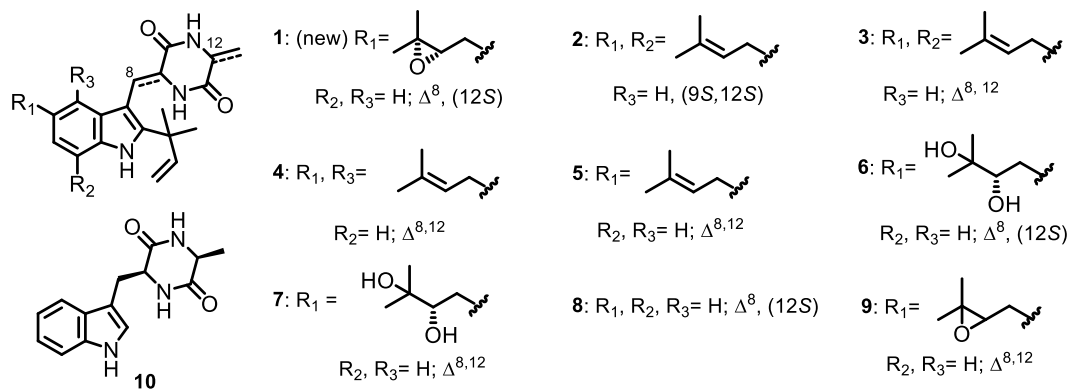


Fig. 2 単離したジケトピペラジン化合物 (1-9) と合成した化合物 (10) の構造

2. 海洋由来真菌抽出エキスの誘導化とメラニン産生抑制化合物の探索

Eurotium 属の近縁種にあたる *Aspergillus ruber* からはホルミル基を有するヒドロキノン化合物 (11-15) が主成分として単離されている。⁶⁾ そのため, *E. rubrum* 抽出エキスにも同様の化合物が含まれていると考えられる. 一般に, ヒドロキノン類はメラニン産生に関わる酵素, チロシナーゼを阻害するとされるため, 11-15 もチロシナーゼ阻害活性を示す化合物として期待された.⁷⁾ そこで, *E. rubrum* に含まれるホルミル基を有するヒドロキノン誘導体をリード化合物とし, メラニン産生抑制活性を示す誘導体探索を行った.

ヒドロキノン化合物を変換するにあたり, ドッキングスタディーを用いた誘導体デザインを行った. 比較的容易に合成可能な 13 種の誘導体をデザインし, チロシナーゼ L-DOPA 結合部との親和性を計算した. その結果, クマリン誘導体はより安定な結合親和性を示した (Fig. 3).

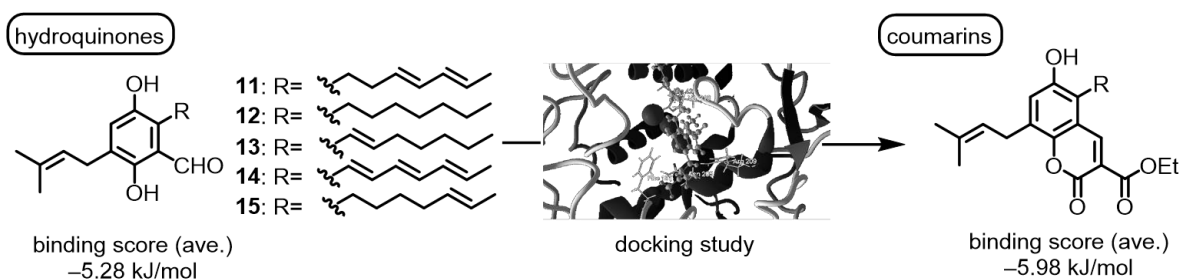


Fig. 3 ドッキングスタディーによる誘導体デザイン

そこで、chemically engineered extract (CEE) 法⁸⁾を用いた天然物誘導体の探索を行った。CEE法は天然物抽出エキスを直接反応させその反応混合物から天然物誘導体を探索する新しい天然物誘導体の探索方法である。CEE法に倣い、海洋由来真菌 *E. rubrum* 抽出エキス中の化合物に対し、knoevenagel 縮合によるクマリン誘導化を行ったところ、チロシナーゼ阻害活性が増強した (Fig. 4)。

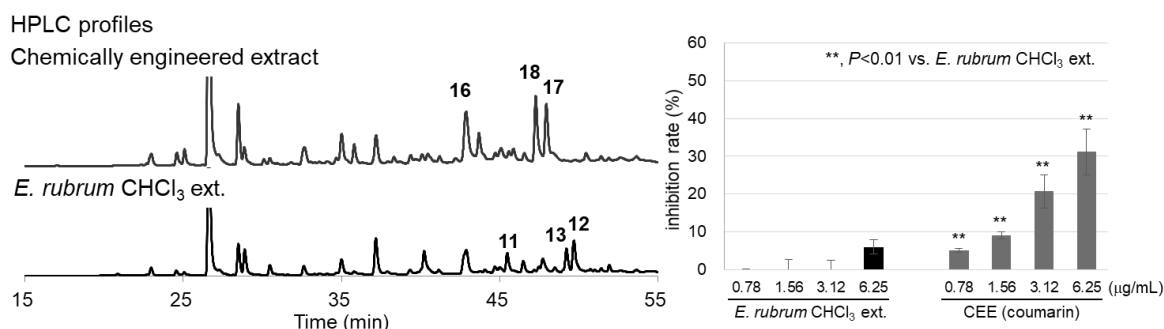


Fig. 4 抽出エキスの誘導化による含有成分とチロシナーゼ阻害活性の変化

クマリン誘導化エキスについて、新たに検出された成分を指標に詳細な成分探索を行った。その結果、3種の化合物 (16–18) を単離することに成功した。各化合物は NMR, MS 等の各種スペクトルデータより、側鎖構造の異なるクマリン誘導体であると決定した (Fig. 5)。16–18 と、既知の方法で合成したクマリン誘導体 (19) についてチロシナーゼ阻害活性試験、メラニン産生抑制活性試験を行ったところ、16–18 は両阻害活性試験において活性を示した。一方で 19 は阻害活性を示さなかった。⁹⁾

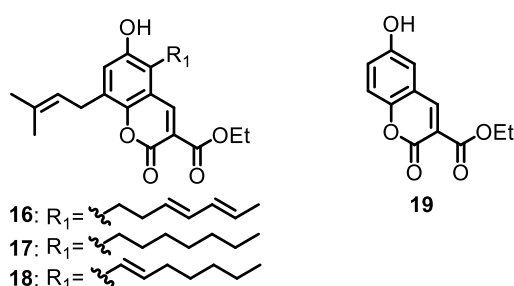


Fig. 5 単離, 及び合成したクマリン誘導体 (16–19) の構造

3. 海洋由来真菌抽出エキスのクマリン二量化とチロシナーゼ阻害活性化合物の探索

更なる生物活性天然物誘導体を探索するにあたり、天然物二量体に注目した。天然赤色色素であるカルタミンや抗血栓作用を示

すジクマロールといった天然物二量体は，二量化することによって物理的性質及び生物活性の強さが変化した化合物である．したがって二量化をターゲットとした天然物誘導体を探索することで，より強力なチロシナーゼ阻害活性化合物の発見が期待された．

海洋由来真菌 *E. rubrum* 抽出エキス中のヒドロキノンに対し，1,3-アセトンジカルボン酸ジエチルを反応させ，クマリン二量化を行った．その結果，クマリン二量化エキスにチロシナーゼ阻害活性の増強が認められた (Fig. 6)．

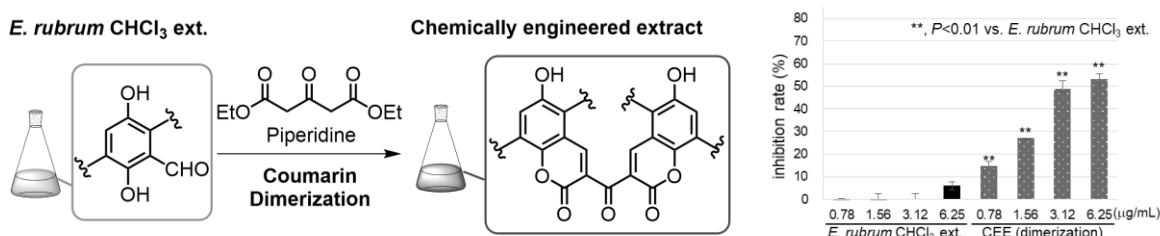


Fig. 6 抽出エキスのクマリン二量化とチロシナーゼ阻害活性の変化

クマリン二量化エキスについて詳細な成分探索を行ったところ，5種の化合物 (20–24) が単離された．NMR 等を用いた詳細な構造解析より，20–22 の構造を予想されたクマリン二量体であると決定した．また，23, 24 の構造は NMR 等の各種スペクトルデータ，ヒドロキノン化合物 (11, 12) からの誘導化及び TDDFT 法による ECD

スペクトルの計算により決定した (Fig. 7)．23, 24 の四環性骨格は Knoevenagel 縮合によるアルケン合成と，それに続く分子内 Diels-Alder 反応のドミノ型反応によって導かれた非常に稀な構造である (Scheme 1)．

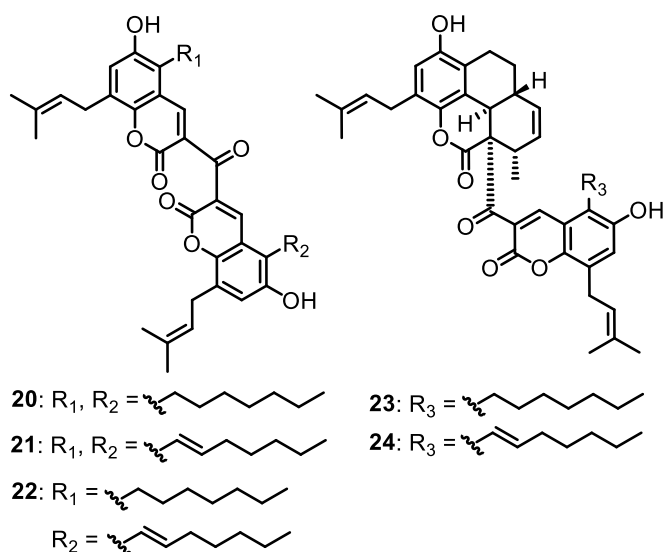
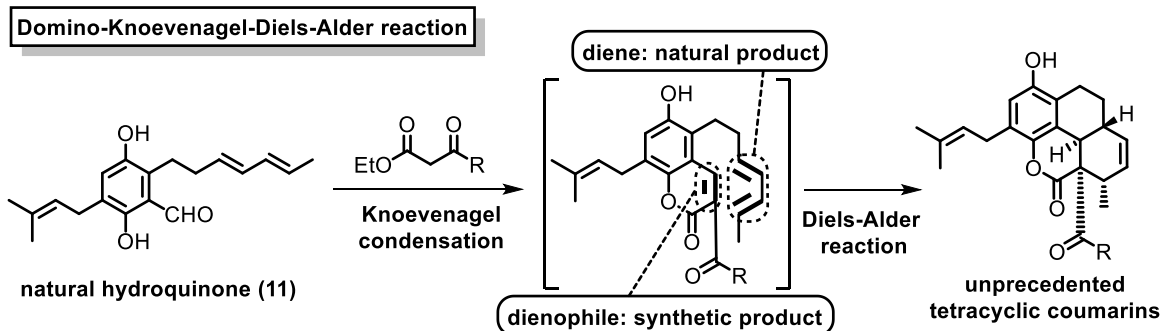


Fig. 7 クマリン二量体 (20–24) の構造



Scheme 1 ドミノ型反応による新規四環性クマリン骨格の構築

得られたクマリン二量体 (**20–24**) についてチロシナーゼ阻害活性を評価したところ，すべてのクマリン二量体に阻害活性が見られた．また，クマリン二量体の方がクマリン誘導體 (**16–18**) よりも強い阻害活性を示した．

4. 総括

本研究では，既存の天然資源である海洋由来真菌に対し，培養条件の検討や抽出エキスの誘導化をすることで，生物活性を有する多様な新規化合物を得ることに成功した．これらの結果は，成分探索研究が行われた既存の資源でさえも新たな創薬資源になり得ることを示している．したがって本研究は近年直面している創薬資源の枯渇を解決する新たなアプローチとなるものである．

参考文献

- 1) Ishino M., Kamauchi H., Takatori K., Kinoshita K., Sugita T., Koyama K., *Tetrahedron Lett.*, **57**, 4341–4344 (2016).
- 2) Kamauchi H., Kon T., Kinoshita K., Takahashi K., Koyama K., *Tetrahedron Lett.*, **55**, 7203–7205 (2014).
- 3) Kamauchi H., Kon T., Kinoshita K., Takatori K., Takahashi K., Koyama K., *Tetrahedron Lett.*, **56**, 4377–4382 (2015).
- 4) Kamauchi H., Kinoshita K., Takatori K., Sugita T., Takahashi K., Koyama K., *Tetrahedron*, **71**, 1909–1914 (2015).
- 5) Kamauchi H., Kinoshita K., Sugita T., Koyama K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 4911–4914 (2016).
- 6) Hamasaki T., Fukunaga M., Kimura Y., Hatsuda Y., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1685–1687 (1980).
- 7) Briganti S., Camera E., Picardo M., *Pigment Cell Res.*, **16**, 101–110 (2003).
- 8) López S. N., Ramallo I. A., Sierra M. G., Zacchino S. A., Furlan R. L. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 441–444 (2007).
- 9) Kamauchi H., Kinoshita K., Koyama K., *Heterocycles*, in press.