

UV 照射下で標的タンパク質を分解する天然物誘導体の合成 Synthesis of Natural Product Derivatives for Photodegradation of Specific Protein

○関根智之¹, 浮谷基彦², 仁科淳良²*Tomoyuki Sekine¹, Motohiko Ukiya², Atsuyoshi Nishina²

Abstract: In this study, we synthesized known steroid (ethynylestradiol)-2-phenylquinoline conjugate (**5**), which is reported that degraded target protein under UV photo irradiation, and examined UV irradiation condition. In addition, for preparation of natural product derivative degrading target protein with UV, pentacyclic triterpenoid(oleanolic acid)-2-phenylquinoline conjugate (**11**) was synthesized as new compound.

1. 目的

がんは日本における死因の中で最も高い割合を持つ¹⁾。現在用いられているがん治療薬は副作用を示すため、副作用の少ないがん治療薬の開発が求められている。

一方、天然物は豊富な生理活性を持つことが知られており、また、構造多様性に富むことから、新規がん治療薬のリード化合物として有用であると考えられる。

ここで我々は、ステロイドホルモンに 2-Phenylquinoline を結合させた化合物 **5** が、UV 照射によって選択的にステロイドホルモンの受容体を分解し、その受容体に生存を依存するがん細胞に対して選択的な傷害活性を示す報告²⁾に着目した。

本研究では、がんに発現が亢進し、その生存に関与するタンパク質と立体的な親和性が高い天然物を用いた 2-Phenylquinoline 結合体を合成し、UV 照射によりタンパク質を分解することでがん細胞に対する選択的傷害活性を示す天然物誘導体を得ることを目的として実験を行った。

2. 方法

本研究では、

①UV 照射条件の検討

②天然物-2-Phenylquinoline 結合体の合成

を実施した。UV 照射条件は、既報³⁾の化合物 (Ethinylestradiol-2-Phenylquinoline 結合体; **5**) を合成し用いることで決定することとした。また、新規な天然物-2-Phenylquinoline 結合体は、天然トリテルペノイドの Oleanolic acid (**6**) および Betulin (**12**)を用いて合成し、アポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2 を標的分子とした天然物-2-Phenylquinoline 結合体を得る計画とした。

2.1 UV 照射条件の決定

Ethinylestradiol-2-Phenylquinoline 結合体を下記の手順で合成した後、乳がん細胞(SK-BR-3)および乳腺がん

細胞(MCF-7)に合成物を作用させ、UV 照射時間、照射強度等を変化させて、各細胞傷害活性を MTT 法により算出し、UV 単独で細胞を殺さず、UV 照射時に傷害活性が見られる条件を決定した。

[Ethinylestradiol-2-Phenylquinoline 結合体 (**5**)の合成]

Ethinylestradiol (**1**)を Dichloromethane に溶かし、2,6-Lutidine と *tert*-Butyldimethylsilyl trifluoromethane sulfonate (TBSOTf)を加えて攪拌し、化合物 **2** を得た。

化合物 **2** を THF に溶かし、Lithium Diisopropylamide (LDA)と Paraformaldehyde を加えて攪拌し、化合物 **3** を得た。化合物 **3** を Toluene に溶かし、DMAP, *O,O'*-Di-(2-pyridyl)thiocarbonate (DPTC), 2-Phenylquinoline-4-carboxylic acid を加え攪拌することで化合物 **4** を得た。化合物 **4** を THF に溶かし Tetrabutylammonium fluoride (TBAF) と酢酸を加えて攪拌し、目的化合物の Ethinylestradiol-2-Phenylquinoline 結合体 (**5**) を得た。

2.2 天然物-2-phenylquinoline 結合体の合成

以下に示す通り、Oleanolic acid (**6**) から 2-Phenylquinoline 結合体である化合物 **11** を、また、Betulin (**12**)から合成中間体である Betulinic acid (**14**)を合成した。

2.2.1 Oleanolic acid-2-Phenylquinoline 結合体の合成

Oleanolic acid (**6**)を Dichloromethane に溶かし、2,6-Lutidine と TBSOTfを加え攪拌し、化合物 **7** を得た。化合物 **7** を Dichloromethane に溶かし、Oxalyl chloride と Dimethyl sulfoxide を加え攪拌することで化合物 **8** を得た。化合物 **8** を THF に溶かし、Ethylene glycol と Triethylamine を加えて攪拌し、化合物 **9** を得た。化合物 **9** を Toluene に溶かし、DMAP, DPTC, 2-Phenylquinoline-4-carboxylic acid を加え攪拌することで化合物 **10** を得た。化合物 **10** を THF に溶かし Tetrabutylammonium fluoride (TBAF) と酢酸を加えて攪拌し、化合物 **11** を得た。

1 : 日大理工・院 (前)・応化 2 : 日大理工・教員・応化

2.2.2 Betulinic acid (14)の合成

Betulin (12)を酢酸エチルに溶かし、リン酸緩衝液と Trimethyl amine Bromide, acetamido-TEMPO を加え、NaOCl 水溶液及び NaClO₂ 水溶液を加えて攪拌し、Betulin aldehyde (13)を得た。Betulin aldehyde (13)を *t*-BuOHに溶かし、NaClO₃と 2-Methyl-2-butene, NaH₂PO₄を加えて攪拌し Betulinic acid (14)を得た。

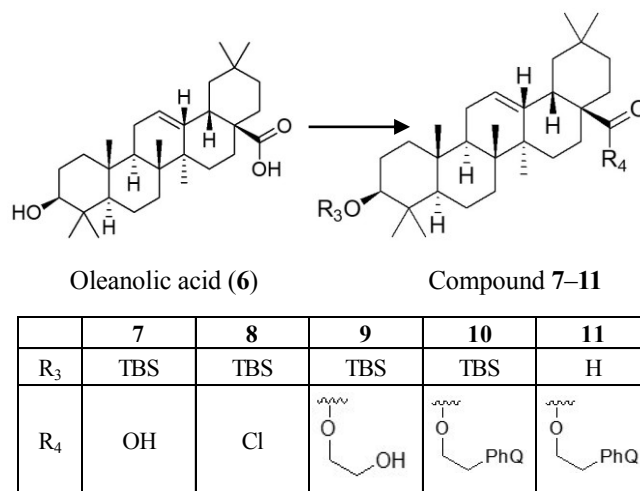


Figure 2 Chemical structures of compounds 6–11

また、Lupane 型トリテルペノイドの Betulin (12)から Betulinic acid (14)を合成した(Figure 3)。本化合物は、がん細胞の増殖に関わるアポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 に親和性が高いことが計算化学的手法で示されている³⁾ことから、2-Phenylquinoline と組み合わせることで、新たな腫瘍細胞傷害活性を持つ分子に発展することが期待できる。

3. 結果・考察

3.1 UV 照射条件の検討

Ethynylestradiol–2-phenylquinoline 結合体 (Figure 1; 5) と MCF-7 (乳がん) 細胞を用い、我々の実験環境における最適 UV 照射条件を照射時間 60 分、照射強度 340 μW/cm²と決定した。また、傷害活性がエストロゲン受容体に作用した結果であるかを検証する為、エストロゲン受容体陰性のがん細胞株 SK-BR-3 (乳がん細胞)を用いた実験も行い、化合物 5 が MCF-7 に対してのみ、UV 照射時に傷害活性を示すことを確認した。本結果から、化合物 5 がエストロゲン受容体に結合し、UV 照射でタンパク質を分解したことが推定され、決定した UV 照射条件が適切であると考えた。

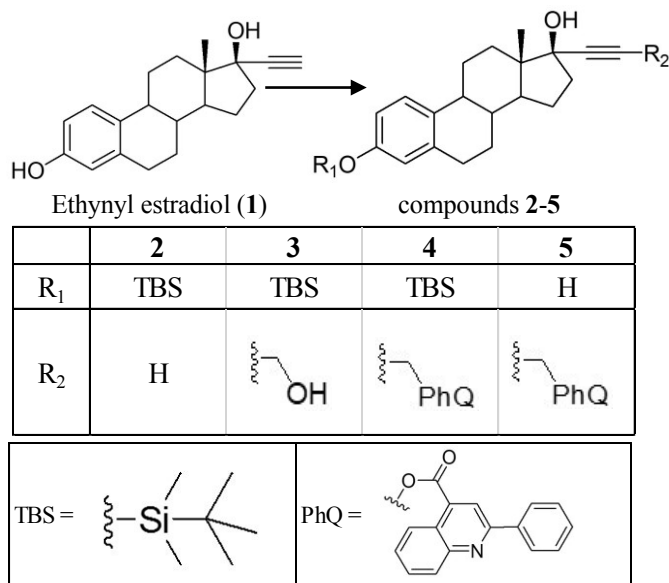


Figure 1 Chemical structures of compounds 1–5

3.2 天然物誘導体の合成

Oleanolic acid (6)を基質として、新規化合物 11 を合成した(Figure 2)。この結果から、5 環性トリテルペノイドの立体障害が大きい場所にあるカルボキシ基 (C-28 位) にスペーサーを介して 2-Phenylquinoline を結合できることが分かった。

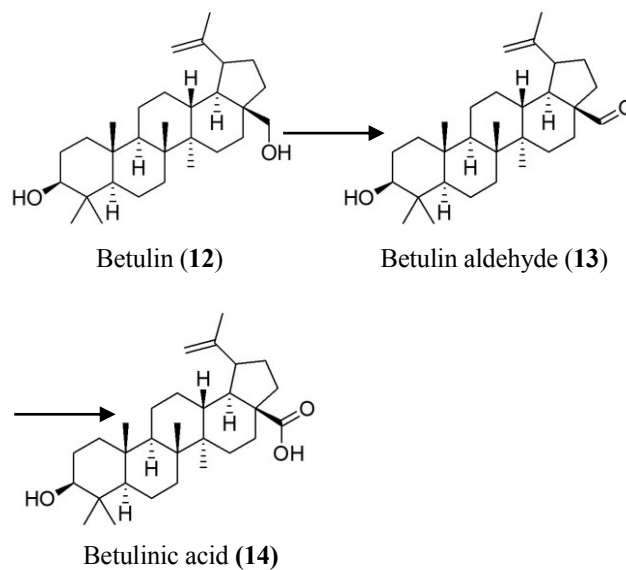


Figure 3 Chemical structures of compounds 12–14

4. 参考文献

- [1] 厚生労働省『平成29年度(2017)人口動態統計の年間推移』
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikai17/index.html>
- [2] A. Suzuki, et al., *Chem. Commun.*, **41**, 4620 (2007).
- [3] N. Phosrithong, et al., *Med. Chem. Res.*, **19**, 817 (2010).