

クモ毒 NPTX-594 の蛍光標識類縁体の合成と生物活性に関する研究

佐野 雅子*, 中川 佳奈**, 山口 仁宏**, 中島 暉躬***, 若宮 建昭**

Study on the Syntheses and the Biological Activities of Fluorescent Labeled Analogs of Spider Toxin NPTX-594

Masako SANNO*, Kana NAKAGAWA**, Yoshihiro YAMAGUCHI**, Terumi NAKAJIMA*** and Tateaki WAKAMIYA**

The neurotoxic acylpolyamine NPTX-594 (1) was isolated from the venom of a Madagascar Joro spider. The toxin is comprised of four constituents, i.e., 2,4-dihydroxyphenylacetic acid (Dhpa), asparagine (Asn), 4,8-diaza-1,12-dodecanediamine (Dada) and lysine (Lys). Although spider toxins are known to be strong and specific blocker against the glutamate receptors (GluRs), the interaction between the toxins and the receptors has not been clarified yet. In order to confirm visually the complex formation between spider toxins and GluRs, the syntheses of several fluorescent labeled analogs of NPTX-594 were carried out. Furthermore, the biological activities of synthetic compounds are also described.

Key words: Fluorescent label, Glutamate receptor, 7-Hydroxycoumarin-3-carbonyl (HCC), 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-7-yl (NBD), NPTX-594, Spider toxin

1. 序論

グルタミン酸は、昆虫の運動や反射などの興奮性神経伝達物質であり、哺乳動物の記憶や学習などの神経機能の形成にも密接に関与する。ところがその一方、過剰のグルタミン酸は神経細胞を破壊して、脳や神経疾患を引き起こすという強い神経興奮性毒性も示す¹⁾。このようなグルタミン酸による神経伝達が、アシルポリアミンを含むクモ毒により強力且つ特異的に遮断されることに、以前から注目されてきた²⁾。しかしながら、その機構に関してはいまだに明らかではなく、クモ毒とグルタミン酸受容体タンパク質 (GluRs) との相互作用の解明は、生命科学における重要な研究課題の一つとされている。

そこで本研究では、クモ毒とその受容体タンパク質との相互作用を視覚的に確認するために、すでに我々により全合成が達成された、マダガスカル産ジョロウグモ毒 NPTX-594 (1)³⁾ の適当な位置に蛍光標識基を導入するか、構成成分の一部を蛍光標識基で置換した類縁体

を合成することにした (Fig. 1)。合成にあたり、蛍光標識基には一般的によく利用され、しかも分子サイズが比較的小さい 4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-7-イル (NBD) 基を用いることにした。

我々は以前に行った NPTX-594 の構造-活性相関の研究で、NPTX-594 分子を構成する 4 残基の構成成分のうち、中央に位置する 4,8-ジアザ-1,12-ドデカンジアミン (Dada) 残基の 1 位アミノ基に結合している Lys 残基を、中性アミノ酸に置換しても生物活性が保たれることを明らかにしている⁴⁾。この事実をもとに、Lys 残基の α - または ϵ -アミノ基に NBD 基を導入した蛍光標識体 NPTX-594-NBD (2) および NPTX-594(NBD) (3) をデザインした (Fig. 1)。

また、フォトアフィニティーラベル化類縁体の研究から、NPTX-594 分子左端の 2,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (Dhpa) 残基を他の芳香族化合物に置換しても、活性は保持されると推定された⁵⁾。そこで、NPTX-594 の Dhpa 残基を NBD 基に置換した蛍光標識体 NBD-des-Dhpa-NPTX-594 (4) もデザインした (Fig. 1)。これらの類縁体を用いて、コオロギに対する麻痺活性試験を行ない、クモ毒と GluRs との相互作用解明研究に役立てることを目指した。

2. 蛍光標識類縁体 2~4 の合成と活性

2.1 各類縁体の合成上重要な 2 種の構成成分の調製

2.1.1 Dada 保護誘導体の調製

平成 18 年 6 月 25 日受理

* 総合理工学研究科理学専攻

** 理学科

*** 星薬科大学

第 42 回ペプチド討論会 (2005 年 10 月, 大阪) にて一部発表

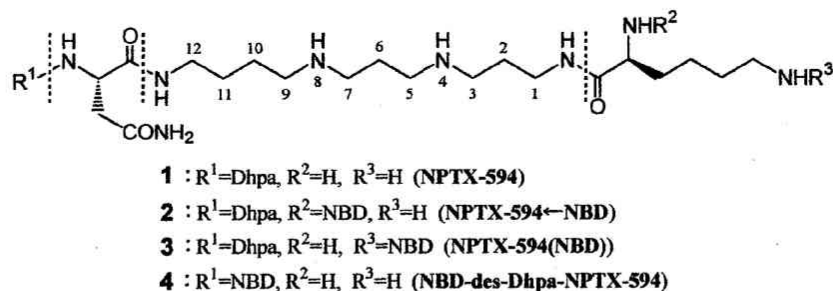
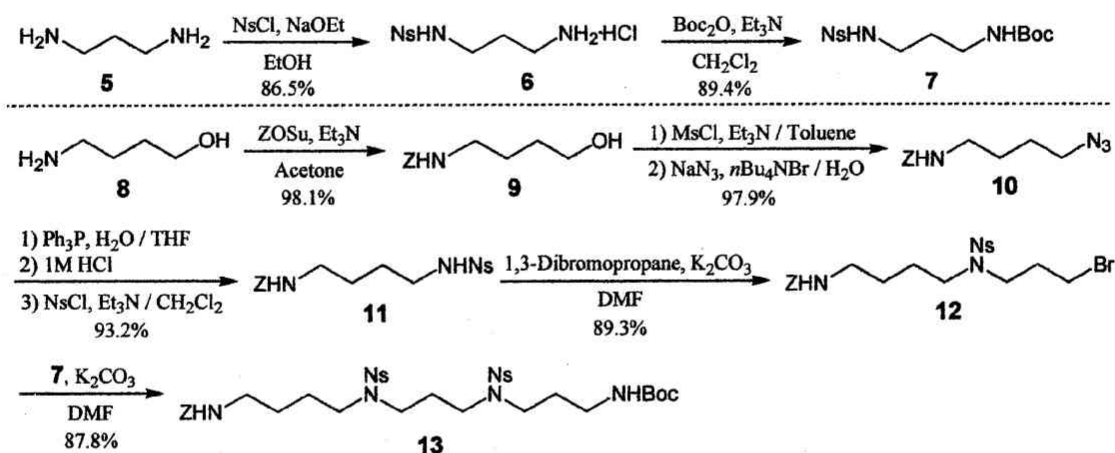


Fig. 1 NPTX-594 (**1**) and its fluorescent labeled analogs **2** ~ **4** designed at first for present study.



Scheme 1 Synthesis of Dada residue with suitable protecting groups.

蛍光標識 NPTX-594 類縁体の合成にあたり、まず全ての類縁体に共通な中心骨格となる、3 種の異なる保護基を有する Dada 誘導体の調製を行なった。Dada 部位を調製するには、4 種のアミノ基の保護に工夫が必要となる。すなわち、Dada 残基の 1 位と 12 位のアミノ基に Lys 残基と Asn 残基をそれぞれ段階的に導入しなければならないので、これらのアミノ基と残りの 4 および 8 位のアザ部分のアミノ基には、それぞれ異なる保護基を利用しなければならない。

以上の方針に基づいた Dada 保護誘導体の合成経路を Scheme 1 に示す。まず、1,3-ジアミノプロパン (**5**) の一方のアミノ基を選択的に 2-ニトロベンゼンスルホニル (Ns) 基で保護した。一般にジアミンの選択的モノアシル化反応は困難である。しかし、この反応では一方のアミノ基が Ns 化された後、もう一方のアミノ基が反応で生じる HCl と塩を形成して析出するために、二置換体の生成が妨げられる⁶⁾。このようにして得られた **6** の遊離アミノ基を Boc 基で保護し、Dada 残基中の 1 から 4 位部分に相当する **7** へと導いた。

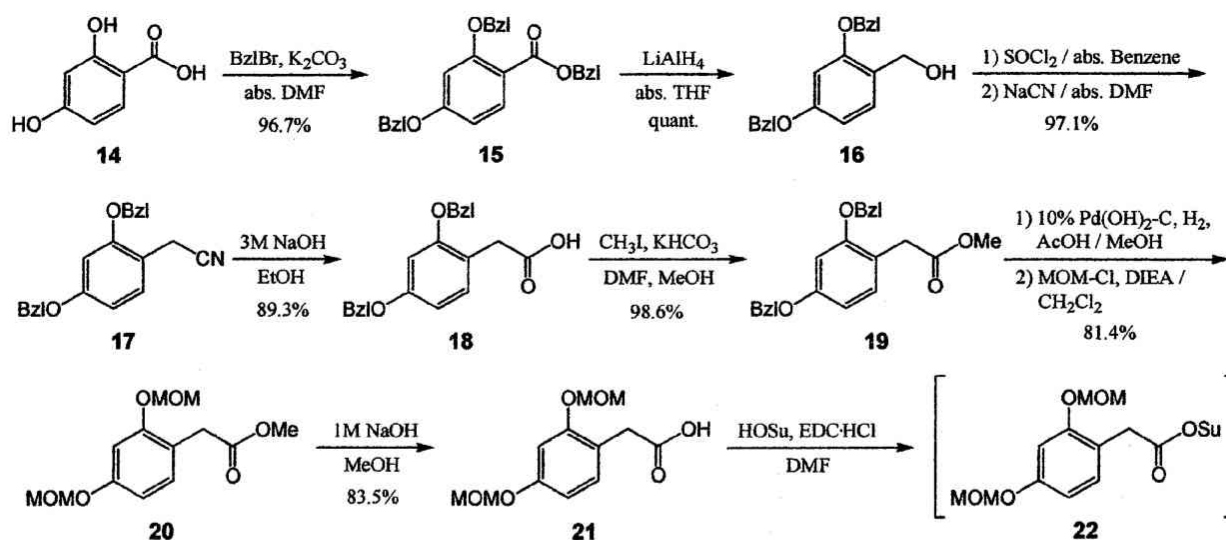
次に、4-アミノ-1-ブタノール (**8**) のアミノ基をベンジロキシカルボニル (Z) 基で保護し、遊離のヒドロキシル基をメシル (Ms) 化した後にアジ化した。得られた **10** のアジド基をトリフェニルホスフィンによりアミノ基に変換し、生じたアミノ基を Ns 基で保護した。この生成

物 **11** に 1,3-ジプロプロパンを反応させ **12** に導いた⁷⁾。得られた **12** を前述の保護ジアミノプロパン誘導体 **7** と反応させ、3 種の異なる保護基を有する Dada 誘導体 **13** を調製することができた。

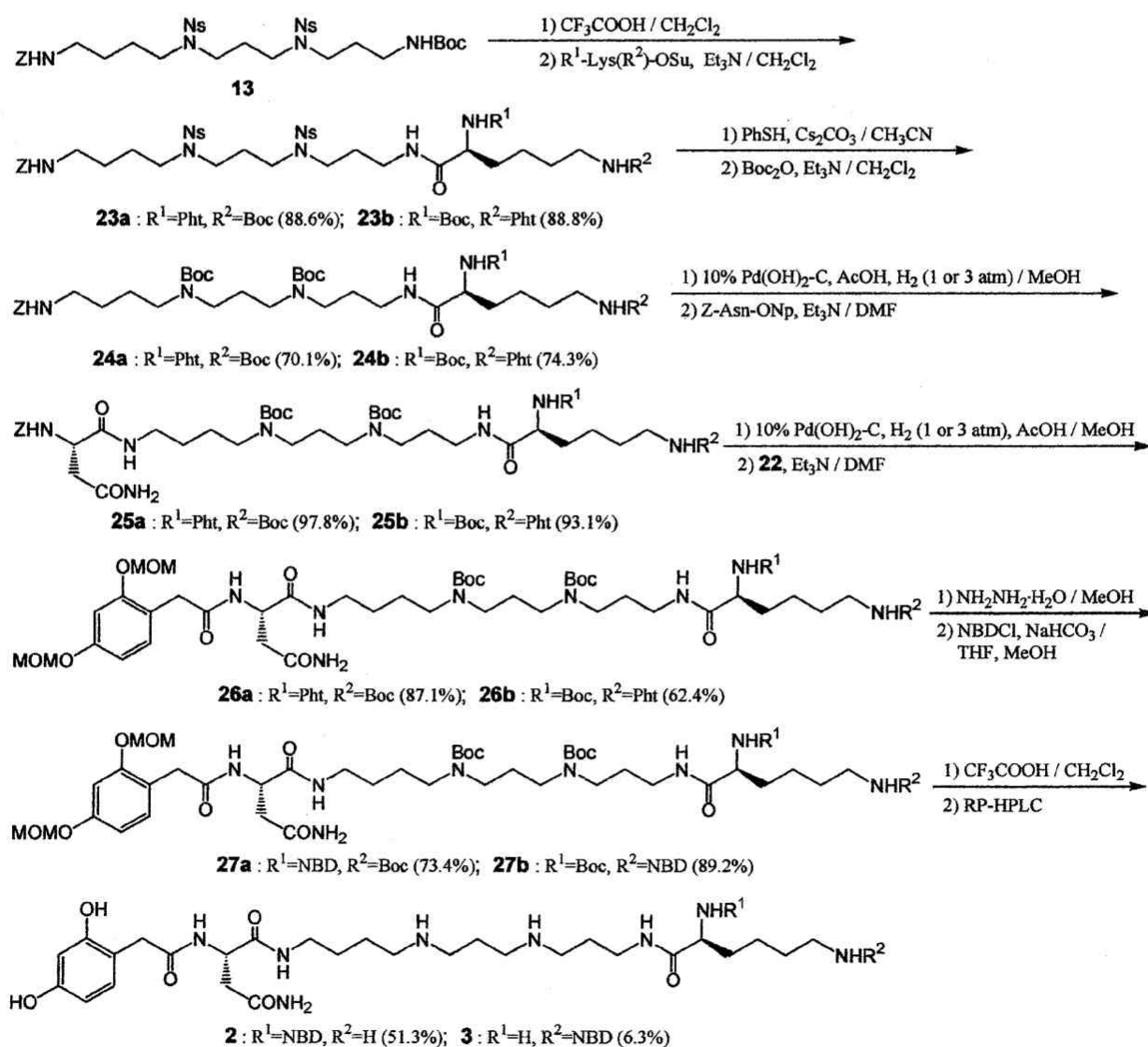
2.1.2 Dhpa 保護誘導体の調製

最終脱保護の際に、接触還元を用いると NBD 基のニトロ基も同時に還元されるため、Dhpa の水酸基を酸性条件で除去できる、メトキシメチル (MOM) 基で保護した誘導体を調製することにした。しかしながら、従来法により Dhpa 誘導体の調製を行なうと、ニトリル化反応で用いる塩化チオニルから生じる HCl により MOM 基が脱離する。そこで、一旦水酸基をベンジル (Bzl) 基で保護した Dhpa 誘導体を調製した後に、Bzl 基を MOM 基で置き換えることにした。

松下らの報告に従い⁸⁾、2,4-ジヒドロキシ安息香酸 (**14**) のヒドロキシル基とカルボキシル基を Bzl 基で保護した。得られた **15** のエステル基を LiAlH₄ で還元し、生じたヒドロキシル基をシアノ基に変換した。このシアノ基をアルカリ加水分解後、得られた Dhpa 誘導体 **18** の遊離のカルボキシル基をメチルエステルで保護した。続いて、このメチルエステル体 **19** の Bzl 基を接触還元により除去した後、遊離となったヒドロキシル基を今度は MOM 基で保護し、目的とする Dhpa 誘導体 **20** とした。得られた **20** の



Scheme 2 Preparation of Dhpa derivative.



Scheme 3 Syntheses of the fluorescent labeled analogs 2 and 3.

メチルエステルをケン化後、次の縮合に用いるコハク酸イミドエステル誘導体 **22** へと導いた (Scheme 2).

2.2 蛍光標識類縁体 **2** および **3** の合成

Dada 保護誘導体の 1 位アミノ基を保護している Boc 基をトリフルオロ酢酸 (TFA) で除去し、遊離となったアミノ基に Boc-Lys(Phth)-OH あるいは Phth-Lys(Boc)-OH 誘導体 ⁹⁾ を結合させた。得られた合成中間体 **23a** および **23b** の Ns 基は、その後に行う Z 基を除去するための接触還元に不安定であるため、この時点で Boc 基と置き換えることにした。

そこで、Ns 基をチオフェノールと炭酸セシウムを用いて除去した後^{6,7)}、Boc₂O と反応させ、新たな合成中間体 **24a** および **24b** とした。続いて、これらの分子末端に位置する Z 基の除去を試みたところ、Lys 残基の α-アミノ基をフタロイル基 (Phth) で保護した誘導体 **24a** の還元は、常圧ではほとんど進行しなかった。この理由として、**24a** では分子右端の Lys 残基の N^ε-Phth 基と分子左端の Dada 残基の N^ε-Z 基が静電的相互作用で互いに重なり合い、そのために触媒が Z 基に近づきにくくなっているものと推定された。種々条件検討の結果、3 気圧に加圧することにより還元は円滑に進行した。一方、**24b** の場合は常圧で還元が進行し、保護基の位置により分子構造が大きく異なることが示唆された。

上記のようにして Dada 残基上の Z 基を除去した後、Z-Asn-ONp¹⁰⁾ を反応させ **25a** および **25b** に導いた。続

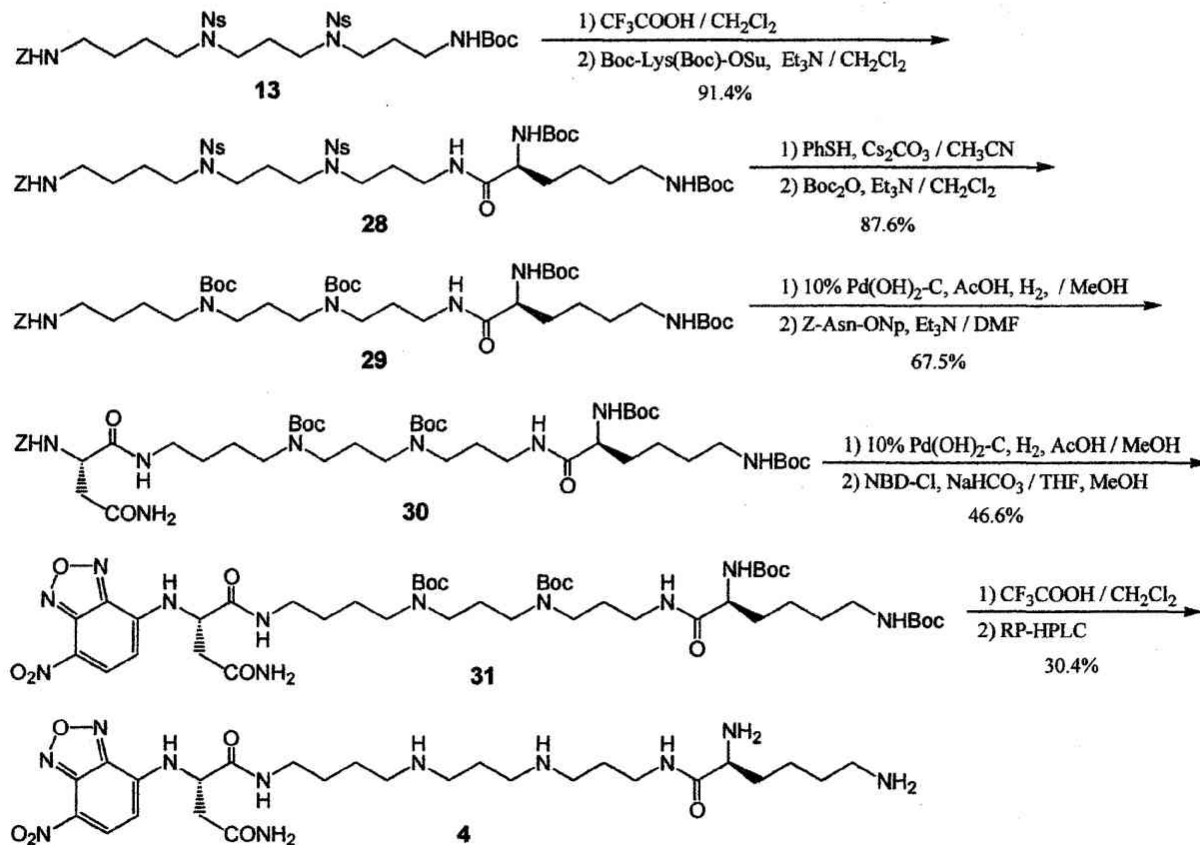
いて Asn 残基の Z 基を **25a** の場合は加圧下に、また **25b** は常圧による接触還元でそれぞれ除去した。遊離となった Asn 残基のアミノ基に、2.1.2 で調製した Dhpa 活性エステル誘導体 **22** を反応させた。得られた **26a** および **26b** の Phth 基をヒドラジン-水和物により除去し、遊離となったアミノ基に NBD-Cl を反応させ、目的化合物の完全保護体 **27a** および **27b** に導いた。最後に TFA により全ての保護基を除去し、粗生成物を逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で精製して、NPTX-594←NBD (**2**) および NPTX-594(NBD) (**3**) をそれぞれ得ることができた (Scheme 3).

2.3 蛍光標識類縁体 **4** の合成

蛍光標識類縁体 **4** は、類縁体 **2** および **3** と基本的には類似の経路で合成することができる。すなわち、Dada 残基の 1 位アミノ基に Boc-Lys(Boc) 残基を結合させ、Dhpa 残基を導入する段階で NBD 基を導入し、最後にすべての保護基を除去することにより、NBD-des-Dhpa-NPTX-594 (**4**) を合成できた (Scheme 4).

2.3 蛍光標識類縁体 **2**~**4** のコオロギに対する麻痺活性試験

合成した蛍光標識 NPTX-594 類縁体 NPTX-594←NBD (**2**)、NPTX-594(NBD) (**3**)、および NBD-des-Dhpa-NPTX-594 (**4**) についてコオロギ (*Grillus bimaculatus*) に対する麻痺活性試験³⁾を行った。測定方法は、コオロギの 2 番目と



Scheme 4 Synthesis of the fluorescent labeled analog **4**.

3 番目の足の間に 5 種類の濃度の類縁体を PBS(-) 溶液として、2 μ L ずつ注射した (Fig. 2)。コオロギは、1 種の濃度につき 5 匹 3 グループを用い、投与 5 分後に仰向けにした状態から起き上がれない場合を麻痺していると判定した。活性の評価は、プロビット法によりコオロギが半数麻痺する投与量 (ED_{50}) を求め、それぞれの ED_{50} 値を比較した。その結果、NPTX-594←NBD (2) では >37.2 nmol/g, NPTX-594(NBD) (3) では >40.4 nmol/g, NBD-des-Dhpa-NPTX-594 (4) では >48.8 nmol/g であった。比較対象となる天然物 NPTX-594 の ED_{50} 値は 0.64 ± 0.50 nmol/g³⁾ であり、合成した類縁体はいずれもほとんど活性を示さないことがわかった。



Fig. 2 Injection part of toxin solution.

3. 新規蛍光標識類縁体の合成とコオロギに対する麻痺活性試験

上記の結果より、まず Lys 残基を中性アミノ酸残基にすることにより、活性が失われる場合もあることが示唆された。ただし、Lys 残基の修飾に NBD 基が不適当であったことも考えられ、これらの点に関しては今後の検討が必要である。一方、類縁体 4 については、NBD の構造そのものに問題があるとも考えられるので、構造的により Dhpa に近い蛍光標識基 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸 (HCC) で置換した類縁体 HCC-des-Dhpa-NPTX-594 (32) (Fig. 3) を新たにデザインし、その合成を行った。

前述の 4 の合成で用いた中間体 30 の Z 基を接触還元により除去し、別に調製した HCC-OSu 誘導体¹⁰⁾ と縮合させ完全保護体 33 を得た。全ての保護基を TFA で除去後、RP-HPLC により精製し新規蛍光標識体 32 を得ることが出来た (Scheme 5)。得られた 32 のコオロギに対する麻痺活性試験を行った。その結果、 ED_{50} 値は 5.20 ± 19.4 nmol/g であった。天然物の NPTX-594 (1) と比較すると 10 分の 1 程度ではあるが、十分な活性を示すことがわかった。さらに、その蛍光スペクトルを測定したところ、447 nm の蛍光波長を示した。したがって、HCC-des-Dhpa-

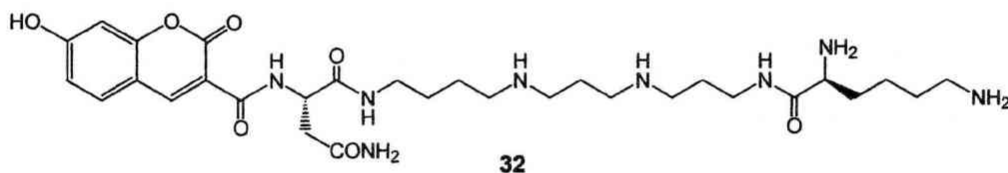
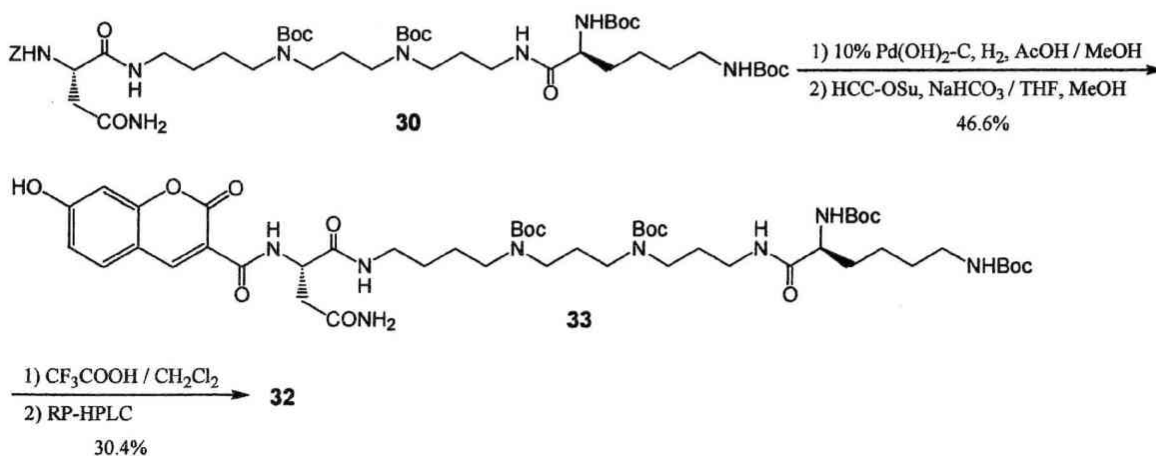


Fig. 3 A newly designed fluorescent labeled analog of NPTX-594.



Scheme 5 Synthesis of the HCC labeled analog of NPTX-594.

NPTX-594 (9) は、クモ毒と GluRs との相互作用や結合部位を、視覚的に確認するための研究に用いることのできる化合物であることがわかった。

4. 結論

本研究では、クモ毒ペプチドと受容体タンパク質との相互作用を視覚的に確認するために NBD 基を導入した蛍光標識 NPTX-594 類縁体 NPTX-594←NBD (2), NPTX-594(NBD) (3), および NBD-des-Dhpa-NPTX-594 (4) を合成した。しかし、これら類縁体のコオロギに対する麻痺活性試験を行った結果、いずれも十分な活性を示さなかった。この結果、Lys 残基の修飾に NBD 基は不適當であることがわかった。また、類縁体 4 に関しては、NBD 基が Dhpa 基に代わりうる芳香族化合物とはならないこともわかった。一方、Dhpa 基を HCC 基で置換した類縁体 HCC-des-Dhpa-NPTX-594 (32) が、NPTX-594 には劣るものの十分な活性を有することから、HCC 基は Dhpa 基に代わりうる芳香族化合物であることが明らかとなった。この結果は、今後の新たな蛍光標識化合物の開発に重要な知見となりうるものである。以上のように、本研究によりクモ毒と GluRs との相互作用を解明するために用いる蛍光標識化合物の開発に成功した。今後、32 あるいは新たな蛍光標識化合物を用いて、クモ毒と GluRs との相互作用の解明、さらにはグルタミン酸による神経情報伝達機構の解明研究を推進したいと考えている。

参考文献

1) 宮下正昭, 有機合成化学協会誌, **54** (1996), p. 846.

- 2) N. Kawai, A. Niwa and T. Abe, *Brain Res.*, **247** (1982) 169.
- 3) T. Wakamiya, A. Yamamoto, K. Kawaguchi, T. Kinoshita, Y. Yamaguchi, Y. Itagaki, H. Naoki and T. Nakajima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74** (2001) 1746.
- 4) T. Wakamiya, T. Kinoshita, Y. Hattori, Y. Yamaguchi, H. Naoki, G. Corzo and T. Nakajima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77** (2004) 331.
- 5) 若宮建昭, 木下智彦, 服部能英, 山口仁宏, G. Corzo, 直木秀夫, 中嶋暉躬, 日本化学会第 81 春季年会, 東京 (2002) 2A3-01.
- 6) 菅 敏幸, 福山 透, 有機合成化学協会誌, **59** (2001) p. 779.
- 7) a) Y. Hidai, T. Kan and T. Fukuyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **48** (10) (2000) 1570; b) T. Kan, A. Fujiwara, H. Kobayashi and T. Fukuyama, *Tetrahedron*, **58** (2002) 6267.
- 8) M. Matsushita, T. Kanemura, S. Hatakeyama, H. Irie, T. Toki and M. Miyashita, *Tetrahedron*, **51** (1995) 10687.
- 9) a) G. H. L. Nefkens, G. I. Tesser and R. J. F. Nivard, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **79** (1960) 688; b) B. W. Erickson, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (1973) 3757; c) L. Moroder, A. Hallett, E. Wünsch, O. Keller and G. Wersin, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357** (1976) 1651.
- 10) a) J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 2, John Wiley & Sons, N. Y. (1964) p. 891; b) 日本化学会編 第 4 版 実験化学講座 22 有機合成 IV, 丸善株式会社 (1992) p.263.
- 11) a) M. Zhou, I. Ghosh, *Org. Lett.*, **6** (2004) 3561; b) F. Fringuelli, O. Piermatti, F. Pizzo, *Synthesis*, **15** (2003) 2331.