

β酸化による C24:6 から C20:5 への推定生合成中間体関連化合物の合成 と核内受容体 HNF4αの結合に関する研究

医薬分子化学研究室 金森 聡

緒言

近年、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸 (ω -3 PUFA) の酸化代謝物が積極的な炎症収束作用を示すことが明らかになった。このような酸化型脂肪酸はメタボロミクスや分子生物学的研究に重要な分子である。脂肪酸酸化反応の代表例の一つに β 酸化が知られている。主に β 酸化はエネルギー産生に関する研究が発端となって研究が行われており、 β 酸化の異常による様々な疾患が報告されている。一方、 β 酸化経路の途中で様々な酸化状態を経ることが知られているが、それらの酸化体の生物活性に関してはほとんど研究・議論がなされていない。また β 酸化経路にある種々の中間体が生体内の成分にも関わらず、有機合成がなされていない。特に高度不飽和脂肪酸に関する β 酸化中間体においては構造式も十分に報告されていない。著者は、これら脂肪酸に着目し、有機合成ならびに本中間体の発展性を示す目的で脂肪酸をリガンドとする核内受容体に対する生物学的評価を行った。

第 1 章 β酸化による C24:6 から C20:5 への生合成中間体の合成

哺乳類において炭素数 22 の DHA は炭素数 24 の THA を原料とし、 β 酸化によって生合成される¹。また、DHA の β 酸化によって EPA が生合成される経路が報告されている²。両 β 酸化ともペルオキシソームで行われている点が、ミトコンドリアで行われる通常の β 酸化と異なっている。このような興味から DHA の生合成と EPA の生合成の推定機構に基づいた β 酸化の中間体の合成研究を計画した。この過程に推定される 7 種の中間体に対応する遊離脂肪酸 (2-8) を合成することで、サンプル供給を目的とした (Fig. 1)。

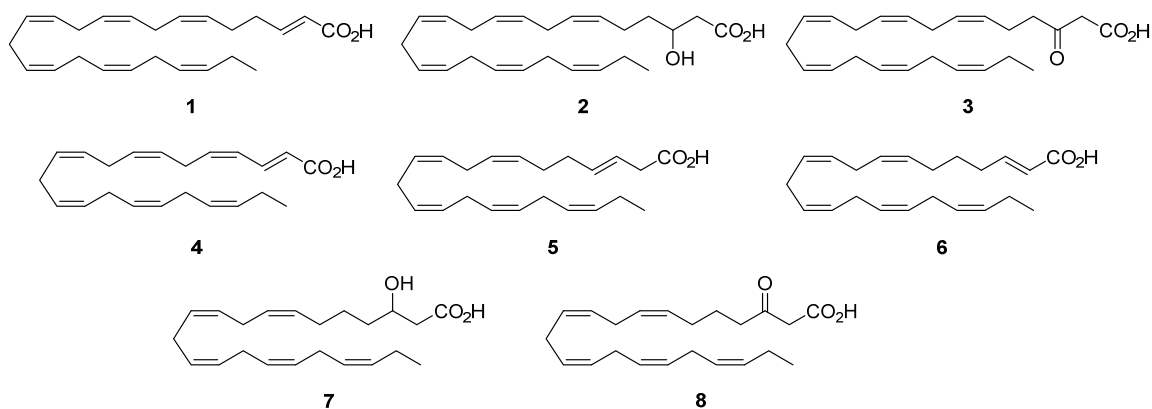


Fig. 1 化合物 1-8 の構造

1. β -オレフィン体の合成 : DHA または EPA を出発原料とし、ヨードラクトン化、グリコール開裂による減炭を経て鍵中間体であるホスホニウム塩³へ導き、Wittig 反応に付したところ対応する 2 重結合を有するエステル体がそれぞれ得られた。最後にエステルの加水分解を行い 4, 5, 6 へ導いた。加水分解段階において低収率であった共役ジエンを持つ 4 において共溶媒を 'PrOH から 'BuOH へ変更することで収率が改善した(35%から 50%)。

2. β -水酸体の合成 : EPA または DHA エチルエステル体を出発原料に還元にて得られたアルデヒドに対し、Reformatsky 反応にて β 位に水酸基を導入したのち、加水分解にて (\pm)-2, (\pm)-7 を合成した。次に化合物 6 のエチルエステル体に対し不斉配位子 (*R*)-(*S*)-Josiphos を用いて不斉ヒドロホウ素化⁴を試みたところ、反応はエナンチオ選択的に進行し、 β -(*R*)-ヒドロキシエチルエステル 7 (2 steps, 37%, 84% ee) を得た。一方、化合物 2 の合成では 1 の

メチルエステル体に対して同条件下反応を行うことで β -(*R*)-ヒドロキシメチルエステル **2** (2 steps, 60%, 83% *ee*) を得ることができた。それぞれは加水分解により、(*R*)-**2**, (*R*)-**7** に導いた。

3. β -ケト酸の合成 : (\pm)-**2** のエステル体を出発原料として Swern 酸化にて **3** のケトエステル体を得た。しかし、様々な条件にて加水分解を試みたが目的のケト酸 **3** を得ることができなかった。これを解決するために β -カルボニルをアセタール保護し、エステルの加水分解の後 CBr_4 存在下 PPh_3 にてアセタールの脱保護を行うことでケト酸 **3** を得ることができた。同様の手順で β -ケト酸 **8** を合成したが、最終段階での脱保護には CBr_4 存在下 PPh_3 を用いたが、**5** の収率は 32%であった。次に PPh_3 代わりに $\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_3$ を用いたところ収率は 72%に改善した。

第2章 酸化型脂肪酸と核内受容体 HNF4 α の結合に関する研究

第1章で合成した β 酸化中間体を含む当研究室保有の脂肪酸ライブラリーを用いて HNF4 α のリガンドとなるか蛍光スペクトルを用いて、結合親和性をスクリーニングした結果、ほとんどの脂肪酸が μM 以下の *kd* 値を示し、リガンドとなることが明らかになった。また遺伝子転写活性化能を Cos7、HepG2 細胞を用いて評価した。その結果、オキソ PUFA は HNF4 α 活性化能を有していることや β 酸化中間体 (**4**~**8**) の活性化能は多様性を有していることが明らかになった。

オキソ PUFA は PPAR との共有結合形成能に活性化能を有していることが報告されている⁵。HNF4 α においても共有結合する可能性があると考え、共有結合実験を行った。その結果、HNF4 α への共有結合能があることが明らかになり、さらに反応性はカルボニルの位置と相関性があるが示唆された。また CD スペクトル測定にてオキソ脂肪酸は HNF4 α の2次構造を減少させることが判明した。この結果は共有結合形成すると推定した Cys246 との結合に伴う2次構造の変化が要因であると示唆された。また β 酸化中間体はすべて同じ炭素数にもかかわらず、結合親和性、活性、安定性において様々なプロファイルを示した。本結果から脂肪酸 β 炭素周辺の構造変化が HNF4 α への結合に変化をもたらしたと考えられる。これにより β 位および隣接位への修飾が HNF4 α の活性制御に有用であることを提案することができた。

結論

本研究はペルオキシソームにおける DHA や EPA の生合成中間体を合成することで標準品の提供が可能になるとともに、それら化合物を用いて構造活性相関研究の進んでいない HNF4 α と不飽和脂肪酸の置換基に関する知見を与えた。本研究成果はペルオキシソームの β 酸化に関する研究および HNF4 α に対する創薬研究に貢献できると考えられる。

参考文献

1) *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 19995–20000. 2) *Biochimica et Biophysica Acta*, **1991**, 1081, 85–91. 3) *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 98–108. 4) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 120, 151–153. 5) *Bioconjug. Chem.*, **2015**, 26, 690–698.

本研究の誌上発表

Kanamori S, Ishida H, Yamamoto K, Itoh T. Construction of a series of intermediates in the β -oxidation pathway from THA to EPA via DHA in free acid form. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 4390–4401.