



天然物を範とした疾患関連蛋白質阻害剤の創成研究

山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻 准教授 今野 博 行

はじめに

天然物は特異な構造や生物活性を有するものが多く、農業・医薬開発のリード化合物として依然価値が高い。筆者はいくつかの疾患に関わる蛋白質を標的にした薬剤（阻害剤）開発に天然物を利用し、合成化学を基盤にした生物有機化学的な研究を行ってきた。以下に、その概要を紹介する。

1. シクロヘキサノイド型キラル合成素子の開発と天然物合成への適用

天然、非天然にかかわらず、目標とした化合物を効率良く合成することは、評価系への物質供給を行ううえで重要である。筆者は合成効率の向上を目指した機能性キラル合成素子がその一つの回答であると考え、ジアステレオ制御を容易にするピシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を等価体とするシクロヘキサノイド型化合物を創成した。本化合物はかご状構造のため、空間的に空いたコンベックス面でさまざまな試薬と反応する。また、ノルボルネン部分は加熱下 *retro* Diels-Alder 反応によりシクロペンタジエンを放出してシクロヘキセンを形成する。すなわちキラルなかご状化合物を経由すれば選択的にキラルなシクロヘキセンの調製が可能であり、さまざまな標的分子の合成素子になると考えた。

キラル化については、メソ型基質に対する生体触媒反応を検討した。その結果、リパーゼ LIP (TOYOBO) を用いると光学的に純粋な両対称体が得られることがわかった (図1)。

次に、絶対立体配置の決定ならびにさまざまな試薬に対する反応性を評価する目的でいくつかの天然物の合成を行った。ここでは malyngolide の合成について概説する。キラルシクロヘキサノイド型化合物に対して野崎反応によりジエン体を得た。その後プロモエーテル化、つづく接触水素化反応により望むエンドメチル体を得た。酢酸中亜鉛による処理後、生じたヒドロキシ基の酸化、つづく Grignard 反応によって炭素鎖を導入した。必要な二つの不斉中心を制御することができたので、加熱条件下 *retro* Diels-Alder 反応を起こしシクロヘキセノール誘導体に導いた。最後にオゾン分解など数工程を経て目的とする malyngolide を合成することに成功した。さらに図2に示した天然物の合成を行うことで、本方法の有用性を示すことができ

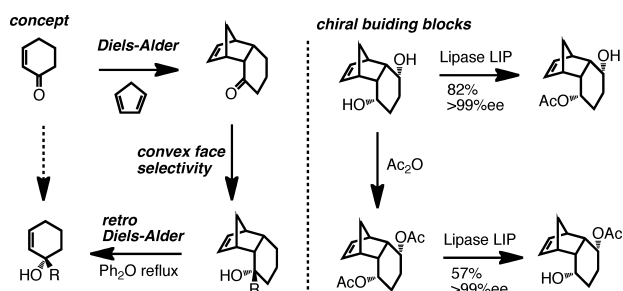


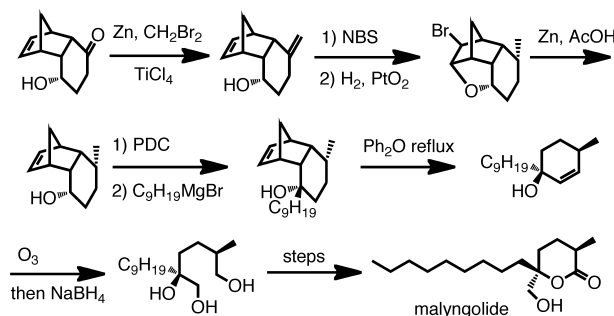
図1

た (図2)。

2. パンレイシ科アセトゲニン類の全合成とミトコンドリア Complex I に対する阻害活性

パンレイシ科アセトゲニン類は中央部に THF 環あるいは THP 環を、末端に γ -ラクトンを持つ脂肪酸系の化合物群で、抗腫瘍、抗マラリア活性をはじめとする広範な生物活性を有している。酵素レベルではミトコンドリア complex I を強力に阻害することが明らかにされ、構造の特異性もあり全合成、活性試験を中心に多くの研究報告がある。筆者はアセトゲニンが注目を集める以前に立体構造決定を目的に全合成研究を開始した。アセトゲニンはワックス性のため X 線結晶解析に不向きであり、さらに不斉中心が離れた位置に存在するため絶対立体配置の決定が難しい。このような場合、合成化学的手段は大きな力を発揮する。筆者は構造的に単純な mono-THF アセトゲニン solamin に着目し、その推定生合成中間体 epoxyrollin A, diepomuricanin A1 とともに全合成によってその立体化学を明らかにしようとした (図3)。実際の合成では中央部分 (THF 環あるいはエポキシ環) と γ -ラクトン部分を別途合成し、合成の終盤でカップリングする方法を一貫して採用した。その多くは園頭法を用いたが、より効率的なルートを目指す過程でクロスメタセシス法がたいへん優れていることを見だし、工程数を大幅に削減することに成功した (図4)。その結果、epoxyrollin A 提唱構造を修正し、diepoxyreticanin 1 と同一であることを明らかにした。また、diepomuricanin A1 ならびに solamin については、天然体の立体配置およびそのジアス

Malyngolideの合成経路



target compounds

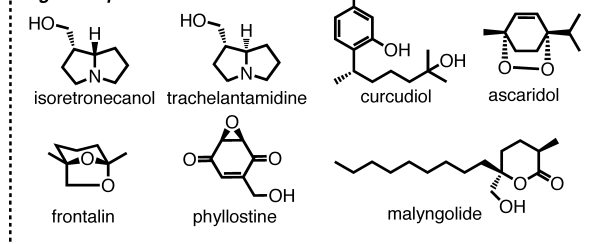


図2

レテオマーの合成も達成し、立体化学の確認を行うことができた。

アセトゲニン¹はミトコンドリア complex I を強力に阻害することが知られているが、必須構造の抽出にはまだ検討の余地があった。ミトコンドリア complex I を標的にした阻害剤は農薬開発に繋がるため古くから研究が行われており、アセトゲニンは新規リード化合物の可能性を秘めている。筆者が合成した化合物の阻害活性を評価した結果、THF 環一つのタイプでも十分阻害能 ($IC_{50}=2\text{ nM}$) を保持するものの、THF 環のないエポキシ環やヒドロキシ基のみでは大幅に低下することがわかった。

3. システインプロテアーゼを阻害する天然物の全合成と SARS 3CL プロテアーゼ阻害能評価

筆者はシステインプロテアーゼ cathepsin B と SARS 3CL protease の阻害剤創成研究を行った。Cathepsin B の異常抗進は筋ジストロフィーや骨粗鬆症を引き起こすとされ、以前から多くの阻害剤が創成されてきた。近年 cathepsin B は、老人性アルツハイマー病の原因の一つと考えられている野生型 APP を特異的に認識することも報告された。伏谷らによって単離、構造決定された miraziridine A は、異常アミノ酸が四つ、チオールキャプチャーが二つ存在するという例を見ないものであり、cathepsin B を強力に阻害する。筆者は miraziridine A が新規システインプロテアーゼ阻害剤のリード化合物になると考えた。そこで異常アミノ酸を立体選択的に合成し、それぞれをカップリングすることで全合成を行い、さらに酵素阻害能を評価することで阻害部位の特定を行うことにした。

はじめに異常アミノ酸類の効率的な合成法としてアジド、シアニド系超原子価シリケート剤が中性条件下エポキシドを攻撃し開環することを見いだした。次にこの反応を軸に Fmoc-statine, aziridine dicarboxylate の立体選択的合成を行った。

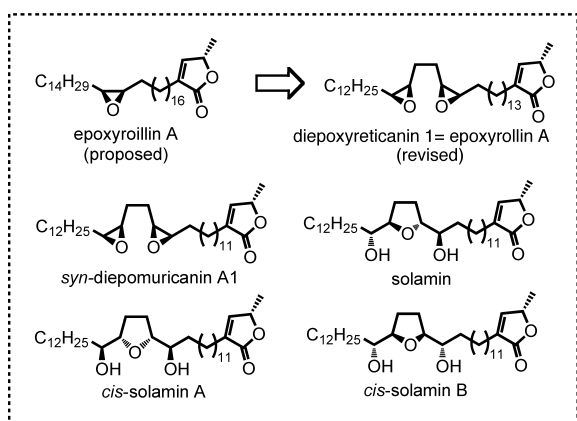


図 3

カップリングでは安定性の悪い C 末端側の vinyl arginine 部を合成の終盤で導入することで 2 例目となる全合成を達成した (図 5)。その後の構造活性相関研究で cathepsin B の阻害にはアジリジン部分が重要であることを突き止めた。

次に SARS 3CL protease 阻害剤創成を行った。SARS (重症急性呼吸器症候群) は 2003 年に東アジアで猛威を振るった呼吸器疾患であり、新種のコロナウイルスが原因である。ウイルス増幅に必須な SARS 3CL protease の阻害剤開発は医薬品に直結するが、一過性であったとの懸念から阻害剤研究はそれほど盛んではない。筆者は適切な阻害剤創成が今後の再興や新規抗ウイルス剤に応用可能であると考え研究を開始した。まず評価系構築のために SARS 3CL protease の発現を試み、安定性を欠くことを世界で初めて見いだした。さらにその原因となる部位を特定し、適切な変異導入により R188I mutant protease を作製した。先の miraziridine A が本酵素に無効であったことから、阻害剤として基質配列 (TSAVLQ/SGFRK) に基づいたペプチドアルデヒドをデザインし、その固相上での実用的な合成法を開発した。基質となるアルデヒドをアセタールとしてリンカーに結合し、樹脂に連結後 Fmoc-固相合成法によりペプチド鎖を伸長した。その後、チオアセタールを経由してリンカーから望むペプチドアルデヒドを効率良く得ることに成功した。本方法論を適用したペプチドアルデヒドライブラリーを用いた構造活性相関を行い、強力な阻害能を有するペプチド性化合物 (Ac-Thr-Val-Cha-His-H; $IC_{50}=98\text{ nM}$) の創成に成功した。

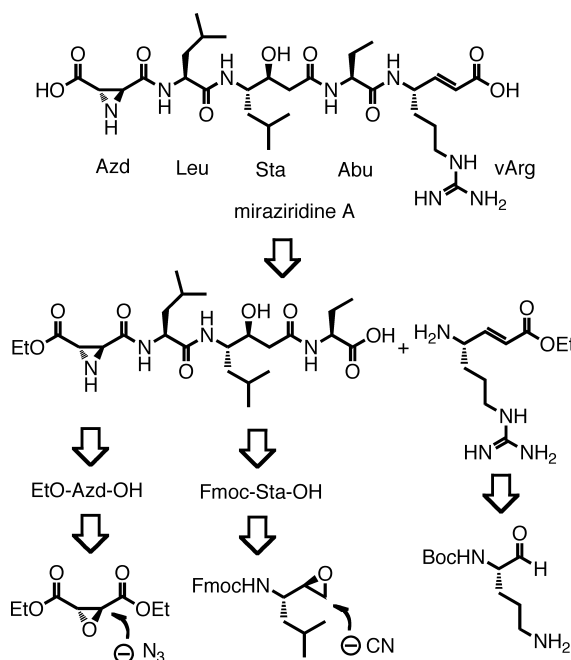


図 5

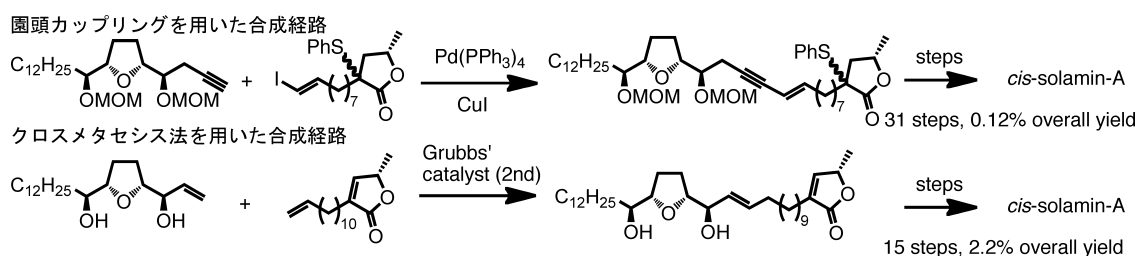


図 4

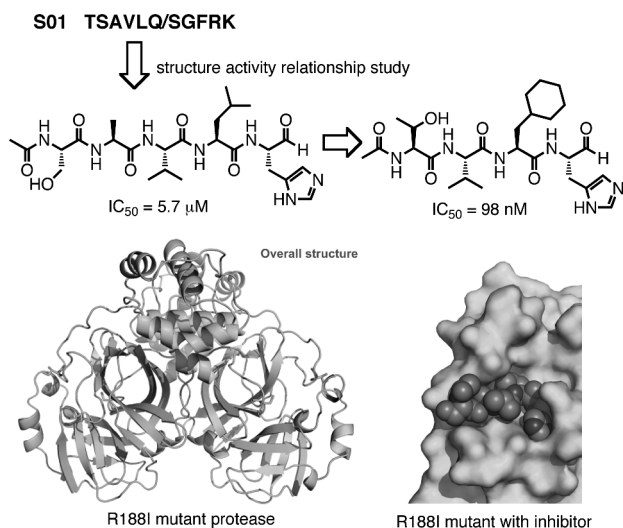


図 6

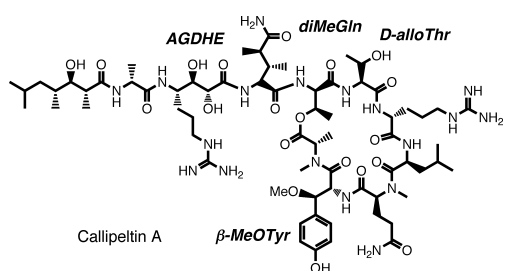


図 7

現在、結晶構造解析からのアプローチを展開中である (図 6)。

4. HIV 感染に関わる膜蛋白質 CCR5 阻害剤創成を目指した callipeltin 類の全合成研究と評価系の確立

ケモカインレセプター CCR5 は HIV 感染に関わる第二次受容体として知られ重要な創薬ターゲットである。Callipeltin 類は海綿由来の異常アミノ酸を豊富に含んだ環状デプシペプチドであり、CCR5 をターゲットにした HIV 阻害剤のリードあるいはバイオプローブとして期待されている。そこで callipeltin 類の全合成研究を開始した。

最初に β -methoxy-D-tyrosine 残基の絶対立体配置決定に取り組んだ。共通の原料であるケイ皮酸エステルから Sharpless の不斉ジヒドロキシル化、アミノヒドロキシル化反応を使い分けて不斉中心を構築し、さらに *retro* アルドール反応による分解を回避するためにアジリジンを経由して、位置および立体化学的に満足できる方法を確立した。その後トリペプチド誘導体にし、天然物との比較によって不明であった立体化学を 2*R*, 3*R* と決定した。次に L-dimethylglutamine, D-allothreonine の L-あるいは D-serine を用いたジアステレオ選択的な合成法を検討した。特に dimethylglutamine については、接触水素化ならびにアルキル化で高い立体選択性を得、効率の良い合成経路になった。

現在、残りの AGDHE と側鎖部分の合成、および固相法で

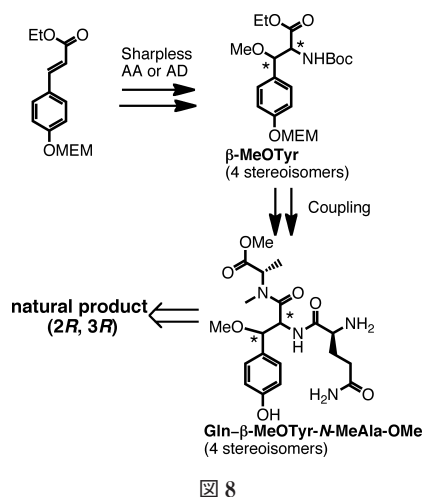


図 8

ラベル化 TAK779 の合成

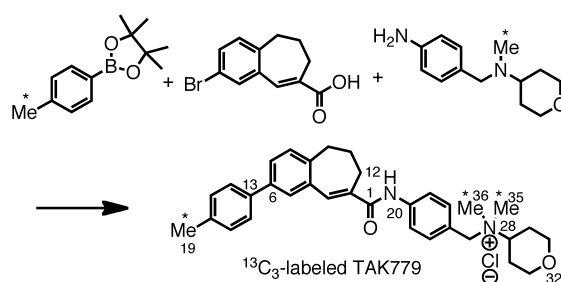


図 9

の環状ペプチドの合成を検討している。また、 ^{13}C -ラベル導入 TAK779 の合成を行い、CCR5 との相互作用解析から阻害剤と CCR5 の相互作用について解析中である。

おわりに

筆者は、以上四つの課題について生物有機化学的な研究を展開してきた。いずれの研究も天然物合成を基盤にしたものであり、今後も天然物を意識しながら阻害剤の創成を行っていきたい。

本奨励賞にご推薦いただきました東北大学大学院農学研究科・清田洋正先生に心より御礼申し上げます。本研究は東北大学、徳島大学、京都府立医科大学で行われたものです。その間、多くの方々にお世話になりました。特に東北大学名誉教授・折谷隆之先生、小笠原國郎先生、京都府立医科大学・赤路健一先生、服部恭尚先生、兵庫医科大学・野坂和人先生、富山県立大学・田中陽光先生、信州大学・真壁秀文先生、京都大学・三芳秀人先生、藤井信孝先生、ペンシルベニア大学・Amos B. Smith, III 先生に深く感謝いたします。本研究は、多くの共同研究者ならびに学生諸君のご協力によって成り立っており、この場を借りて厚く御礼申し上げます。