

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：C-H 結合活性化を活用する独創的リード化合物高度化
3. 研究開発代表者：名古屋市立大学・大学院薬学研究科 教授 樋口恒彦
4. 研究開発の成果

支援研究：発症の分子機構に基づいた抗筋萎縮性側索硬化症(ALS)薬の開発

東京大学大学院薬学系研究科の一橋秀憲教授（制御拠点）との ALS（筋萎縮性側索硬化症：有効な治療法は確立されていない）治療薬を目指した共同研究における支援研究を平成 25 年度末から行ってきた。

家族性 ALS のうちの一部には、スーパーオキシドジスムターゼ-1 (SOD1)の変異体が発現していることに起因するものがあることが知られていた。これは、不良たんぱく質を分解に導く役割をもつ Derlin-1 に変異型 SOD1 が結合してその働きを阻害し、それによって不良たんぱく質蓄積→小胞体ストレスの増大→運動神経細胞死という過程を辿ることによることが判明している。しかしながら、これまで発症の分子機構に基づく治療薬は存在していなかった。一橋らは、Derlin-1 と SOD1 との相互作用を阻害する分子が抗 ALS 効果につながると考え、そのためのハイスループットスクリーニング系を開発、東京大学の化合物ライブラリー 15 万化合物をその系等で評価することで、主に 2 つの構造様式のヒット化合物群を見出した。その中の一方の芳香族ヘテロ環を母核とする化合物 A については、構造はドラッグライクネスを有しており、標的である 2 たんぱく質間相互作用の阻害効果は有していたが、細胞系での効果は認められていなかった。したがって、本研究グループは、化合物 A の構造を最適化することにより細胞系で活性なものを開発することを目標として、構造最適化を担当することとし実施した。

ライブラリーから得られたヒット化合物同士からの構造と活性の相関はあまり明確なものではなく、独自に様々な仮説を立てながら、類縁体の合成を行った。共通中間体の大量合成を行い、それからそれぞれ 4 つの合成段階を経て合成した。ヒット化合物では第 2 級アミド構造が共通構造としてあり、その部分に 4-ピリジニル基を導入したものを合成したところ、初めて細胞系での活性を発現した。また、アミド部分をこれまでになかった第 3 級アミド構造(*N*-アリル-*N*-フェニル体)としたところ、第 2 級アミドである *N*-(4-ピリジニル)体に比較し、毒性を示しにくく、且つ細胞系で高い活性を示すものであることがわかった。第 2 級アミドである *N*-フェニル体と第 3 級アミドである *N*-アリル-*N*-フェニル体について、それぞれ DFT 計算で安定なコンホメーションを算出し、比較したところ、前者では、分子全体が π 電子で共役した平面構造をとっていたのに対し、後者では *N*-フェニル基が他の平面部位と直交に近い形で折れた構造であり、対照的であった。そこで、後者に近いコンホメーションをとると予測された環状アミド構造 (*N*-テトラヒドロキノリル体) を合成したところ、予想通り良好な細胞系での活性を示した。これらの結果に基づき、合計 100 を越える化合物を設計・合成し生物検定に供した。その結果、*N*-アリル-*N*-フェニル体の活性をかなり上回る化合物も得ており、細胞系で活性を示すものは 33 化合物にのぼった。

N-アリル-*N*-フェニル体と *N*-(4-ピリジニル)体については、変異型 SOD1 を強制発現させた ALS 病態トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 試験が東京大学で実施された。その結果、*N*-(4-ピリジニル)体ではコントロールと差は見られなかったが、*N*-アリル-*N*-フェニル体では、ALS 様症状の発症を良好に抑制すること、並びに寿命を有意に延長することが確認された。このことにより、開発した化合物が *in vivo* でも有効であることが示された。現在、特許出願が最終段階に来ている。

次に、細胞系と *in vivo* で活性の確認された *N*-アリル-*N*-フェニル体が、実際に標的となっているたんぱく質を確認するために光親和性ラベリング法を行うこととした。*N*-アリル-*N*-フェニル体のアリル基の先にビオチンと光親和性を有するベンゾフェノン部位の両方を、リンカーを介して結合させたものを合成

した。この分子について東京大学一條研圓谷らが細胞系を用いて光親和性ラベリングを実施したところ、主に変異型SOD1に結合し、Derlin-1の方には結合していないことを示唆する結果が得られた。この知見により、活性化化合物と変異型SODとの複合体の結晶構造情報を得ることで、より論理的な構造最適化化合物設計への道が開かれた。

化合物の合成過程で気がついたことに、一連の化合物が比較的強い蛍光性を有していることがあった（例：365 nm励起で521 nm蛍光）。これは共通する母核によるものと思われた。このことを利用し、*N*-アリル-*N*-フェニル体の細胞内局在を検討することとし、共焦点顕微鏡で観測することで、小胞体に局在していることが分かった。小胞体は標的としているオルガネラであるため、合目的な性質と考えられる。

高度化研究

(1) 特徴的選択性を有するC-H結合活性化触媒の開発 ルテニウムポルフィリンは、アルカンの水酸化を行う優れた触媒であることを課題管理者らは既に見出している。この触媒の開口部を、周囲に芳香環を導入することで狭隘なものにする新規な合成法を見出した。この狭い開口部を有するRuポルフィリンを触媒として用い、*n*-ヘプタンを酸化すると、 ω -1位が最も反応し、次に ω -2位がその10分の1程度の反応に留まり、 ω -3位に至っては全く反応が起きなかった。開口部が広い通常のもので行くと、それらはほぼ同程度の酸化が進行すること、また、 ω -1選択性の高い触媒が知られていないことから、本触媒はユニークと言える。この触媒により、高選択的な酸化修飾が期待でき、構造最適化など創薬へ応用し得る。

(2) 立体的に混んだ連続する不斉第四級炭素構造の構築に関する新手法の開発 複雑な天然物化合物の中に見られ、構築が困難なものに、2つ以上の連続する不斉第四級炭素炭素結合がある。この構築のために、Ireland-Claisen転位を利用して立体選択的な構築法の開発を行った。その結果、高立体選択的に2つの隣合う第4級不斉中心を持つ構造の構築に成功した。

(3) ENPP1阻害剤探索用プローブの開発とスクリーニングヒットの取得 細胞外ヌクレオチド代謝酵素の1つであるヒトENPP1の酵素活性測定用蛍光プローブを合成し、これを用いて東大創薬機構所有の化合物9600種に対してスクリーニングを行い、再現性等も確認して、4種のスクリーニングヒット化合物を取得した。

(4) SIRT1/SIRT6活性モジュレーター探索用プローブの開発 エピジェネティック制御酵素の1つであるヒトSIRTの酵素活性測定用蛍光プローブを開発し、SIRTアイソザイムのうちSIRT1/SIRT6に比較的高い選択性を有することを確認した。一方、代謝は比較的反応性は低いもののSIRT2/SIRT3の基質ともなることが判明した。現在、スクリーニングを実施中である。

(5) γ -セクレターゼの強力な阻害剤としての β -ペプチドフォルダマーの開発 アルツハイマー病の原因物質として最も有力な β -アミロイド産生に重要な役割を担う γ -セクレターゼに対し、高度なヘリックス構造をとることが知られている β -アミノ酸のドデカペプチド類が高い阻害能を示した。また、 β -アミノ酸を一つずつ置き換えたものの活性を評価したところ、3番目のアミノ酸残基が特に重要なことを明らかにした。

(6) シトクロムP450の配位構造ヘム-チオラートの元素置換錯体の合成と化学特性の探究 これまでの研究でシトクロムP450の高い反応活性は、チオラート軸配位子に依るところが大きいことが分かってきた。そこで、軸配位子を同じアニオン性のアルコールやセレンラートにした時のヘムの反応性に興味が持たれたため、それぞれの錯体を合成した。アルコール配位ヘム錯体は、計算化学的にはチオラート配位ヘムより高活性になるという予測もあったが、過酸を用いた系では反応性は100分の1だった。一方、鉄をマンガンに置き換えたマンガンポルフィリン-チオラートも合成し、過酸を酸化剤とする反応性を比較すると鉄とほぼ同等の反応性を示し、強力な酸化触媒となることが期待される。