様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

科研費 KAKENHI

平成 ３０ 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：３２６５９
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０８０３３

研究課題名（和文）基質競合型プロテアーゼ阻害剤のリン原子導入による非競合化に関する基礎医薬基盤

研究課題名（英文）Basic pharmaceutical study of relationship between phosphorus atom introduction and non-competition of inhibitor

研究代表者
青山　洋史（Aoyama, Hiroshi）
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：４０３７４６９９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、セリンプロテアーゼの中でもトロンビンにのみ阻害活性を示し、さらに基質結合部位とは異なる部位に結合して阻害活性を示すホスホネート型化合物の阻害分子機構の解明を目指した基礎研究を行った。リード化合物の活性や酵素選択性が十分でなかったため、まず活性や選択性の向上を志向した構造展開を行った。その結果、末端の塩基部の塩基性を向上させることでトロンビンに対する阻害活性が向上することを見出した。酵素選択性には問題を残しているが、構造展開可能な部位に関する有用な情報を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We conducted basic research aiming at elucidating the inhibitory molecular mechanism of phosphonate compounds which show inhibitory activity only to thrombin among serine proteases, and also bind to sites different from the substrate binding site to show inhibitory activity. The conversion of the phosphonate site of the present compound to the carboxylate show competitive type inhibition and the enzyme selectivity decreases. This phenomena is a very interesting because the inhibition mode shows quite different only converted carbonyl group to phosphoryl group. However, the present compounds since strength and enzyme selectivity of the activity was not sufficient, in the present study were subjected to structural development was oriented to improve the activity and selectivity. As a result, various valuable information to increase the inhibition ability and enzyme selectivity was obtained.

研究分野：創薬化学

キーワード：セリンプロテアーゼ阻害剤　ホスホネート　非競合阻害剤　トロンビン

１．研究開始当初の背景

本研究課題の代表者はこれまでに、アトピー性皮膚炎、花粉症、喘息などのアレルギー性疾患に対する緩和薬／治療薬の開発を目指した研究を展開し、マスト細胞から炎症性メディエーターとして放出されるセリンプロテアーゼ（トリプターゼ）に注目した阻害剤の開発に取り組んできた。そして、新規かつ強い阻害活性を示すアリールエステル型の薬剤の開発に成功した。しかし開発した化合物は活性・酵素選択性が十分とは言えず、実用化に耐えうる段階までには至らなかったため、新たな構造展開の戦略としてカルボキシレート部位をエチルホスホネート構造へと変換した化合物を合成し､酵素阻害活性を評価した｡その結果、構造変換前の化合物がトリプターゼを選択に阻害する傾向を示したのに対し、変換後の化合物はトリプターゼには殆ど阻害効果を示さず、同じセリンプロテアーゼの中のトロンビンに選択的な阻害効果を示すことが明らかとなった。変換部位だけに注目すれば微小な変換と考えられるが、実際には酵素に対する結合部位が変わり、酵素特異性までもが大きく変化するという非常にユニークな現象を見出すに至った。また、酵素特異性の変化の原因を調査した結果、酵素阻害様式（競合や非競合）が異なる可能性が示された。

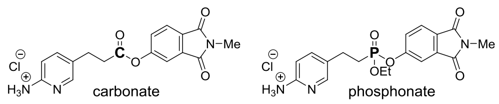
２．研究の目的

上述の酵素特異性の変化は酵素に対する阻害様式の差に起因する可能性を有しており、特に構造変換後のホスホネート型の化合物は基質結合部位には結合しない非競合型の阻害様式を示すことが示唆されている。しかし、本研究で見られた酵素特異性の変換という現象と、リン原子導入との相関関係は得られていない。もし本現象を分子レベルで解明できれば、類似構造を有する化合物群にも適用範囲が広げられると考えられ、最終的には標的への選択性の向上や薬剤併用への可能性、薬剤耐性を獲得した疾病に対する創薬研究の底上げが期待できる。そこで本研究では開発したホスホネート構造を有する阻害剤の詳細な分子機構分析を行うとともに､分子標的の決定を目的とした。

３．研究の方法

本研究の先行研究において、研究対象としているホスホネート型化合物がトロンビンの酵素活性を 50%阻害濃度が数μM 程度で抑制し、他の代表的なセリンプロテアーゼであるトリプシンとトリプターゼに対しては阻害効果を示さないことまでは明らかとしていた（表 1）。

表 1. 化合物の構造と酵素阻害活性



	IC_{50} (carbonate, μM)	IC_{50} (phosphonate, μM)
tryptase	0.20	> 10
trypsin	2.9[a]	> 10
thrombin	7.0	1.2

[a]Ki value of TFA salt instead of HCl salt in our previous report.

そこで本研究の目的を達するために、以下の項目に対する研究を展開し、目標達成を目指した。

① 阻害様式の詳細解析

本化合物のトロンビンに対する阻害様式を明らかとするために、Lineweaver–Burk プロット解析を行うこととした。

② 活性向上を志向した構造修飾

本研究において開発した化合物の酵素結合部位の同定は必須の研究プロセスであり、下記の③と密接に関連している。しかし見出したホスホネート型阻害剤のトロンビンに対する阻害効果はそれほど強くなく、酵素との親和性の観点からそのまま共結晶作成のプロセスへの適応には不十分と考えられる。そこでリード化合物のセリンプロテアーゼ阻害活性を向上させることが不可欠であるため、まずリード化合物の構造を４つのパートに分け、各々のパート毎に導入する官能基の検討を行うこととした（図 1)。さらに得られた情報を基にして最終的な構造の最適化を行う計画である。

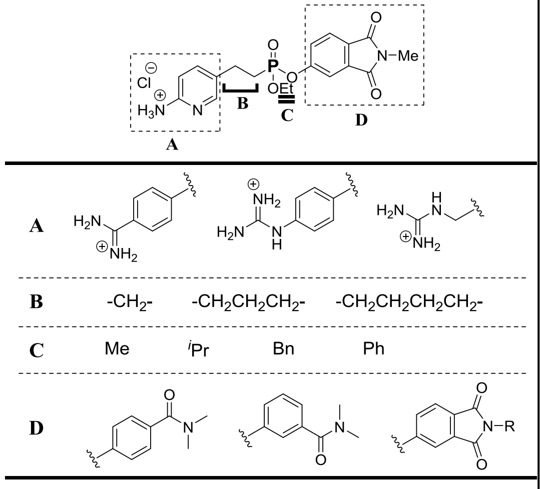


図 1. ホスホネート型化合物からの構造展開

③ 化合物－酵素複合体の共結晶の作成と X 線結晶構造解析

本計画は計画②の進行に依存するが、トロンビンに対する選択性を有し、かつ基質結合部位とは異なる部位を認識する非競合阻害剤の開発が達成されれば、トロンビンとの共結晶の作成するための条件検討を行う予定である。さらに良好な結晶が得られ

た場合には、X 線結晶構造解析の測定を行い、阻害剤の標的箇所の同定を行う予定である。

４．研究成果

① 阻害様式の詳細解析

まず、見出したホスホネート型阻害剤を様々な濃度に設定し、トロンビンタンパク質を用いた Lineweaver–Burk プロット解析を行った。その結果、プロットで描かれた直線の交点が X 軸上で交差した。この結果から、ホスホネート化合物が示す阻害様式は、トロンビンの加水分解触媒部位とは異なる部位に結合して引き起こす非競合型であることが強く示唆された（図 2)。

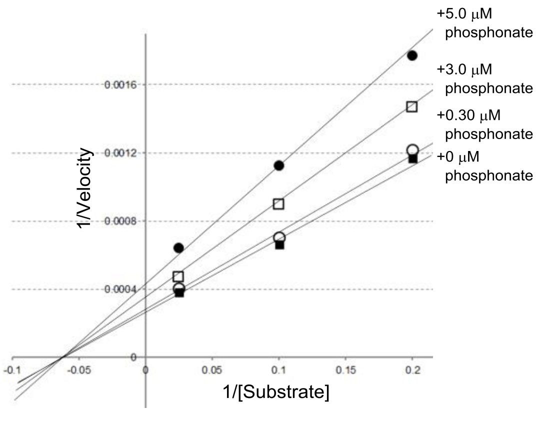


図 2. ホスホネート化合物による Lineweaver–Burk プロット解析

② 活性向上を志向した構造修飾

リードとしたホスホネート型化合物は中程度の選択性を示しているものの、最も注目しているトロンビンに対する阻害活性は 50%阻害濃度で 1.0 μM と決して高くはない。そこで研究計画の図 1 中の D に関する構造展開を行った。その結果、フタルイミドを開環させた類縁体（図 1D 左）においてはトロンビンに対する阻害活性が減弱することが明らかとなった。一方、フタルイミド窒素上にイソプロピル基を導入した化合物ではリード化合物とほぼ同程度の活性を示した（図 3)。これらの結果よりトロンビンに対する阻害活性の発現には、フタルイミドの構造が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

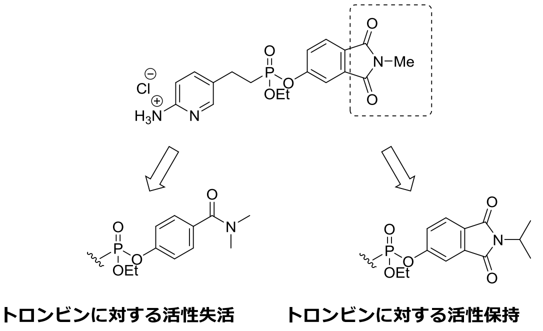


図 3. フタルイミド部位に関する SAR 解析

一方、図 1 における A 部に関しては、グアニジノ基を導入した場合にはトロンビンへの阻害活性が向上した。この結果から、A 部の塩基性の向上は活性向上と相関関係にあることが強く示唆された（図 4)。

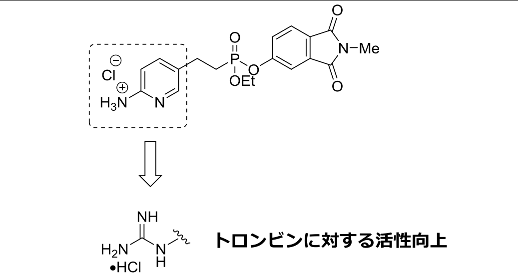


図 4. 塩基性部位に関する SAR 解析

さらに C 部に関してはメチル基への変換のみ、達成できたが、リード化合物と有意な差は見られなかった（図 5)。

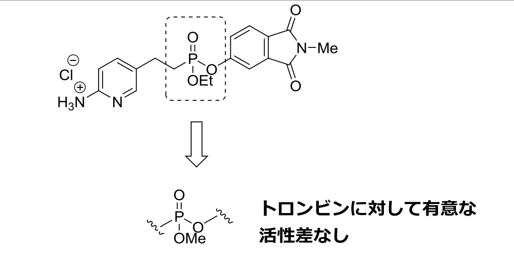


図 5. エステル部に関する SAR 解析

③ 化合物－酵素複合体の共結晶の作成と X 線結晶構造解析

上述のように、本項目の目標を達成するために②の研究を進めたが、計画時の目標に到達したと判断できる化合物の開発には至らなかった。そこで、リード化合物とトロンビンとの共結晶の作成を行い、そこから得られる情報を足掛かりとして研究を展開することとした。そのためにはリード化合物が量的に必要となるため、効率的な合成ルートの確立に取り組んでいるところである。現在、有用な中間体の効率的な合成まで達成できている。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Hiroshi Aoyama, Ryosuke Ijuin, Jun-ya Kato, Sarasa Urushiyama, Masashi Tetsuhashi, Yuichi Hashimoto, Tsutomu Yokomatsu; Discovery of non-competitive thrombin inhibitor derived from competitive tryptase inhibitor skeleton: Shift in molecular recognition resulted from skeletal conversion of carboxylate into phosphonate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3676–3680 (2015).

６．研究組織
(1)研究代表者
青山　洋史（AOYAMA HIROSHI）
東京薬科大学・薬学部・准教授
　研究者番号：40374699

(2)研究分担者
伊集院　良祐（RYOSUKE IJUIN）
東京薬科大学・薬学部・助教
　研究者番号：40442925

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし