

平成 31 年 4 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18912

研究課題名(和文) 立体的かつ構造変化が容易な創薬候補化合物群を効率的に得る手法の開発

研究課題名(英文) Development of an Easily Modifiable Compound Library with More Complex Three-Dimensional Structures

研究代表者

唐木 文霞 (Karakai, Fumika)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80756057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：薬を創るには、標的タンパク質に結合する低分子化合物(リガンド)が必要であり、リガンドが未知である場合、新たにこれを探し出すのは難しい。この研究の目的は、リガンドになりやすい化合物の集団(ライブラリー)を構築する手法を開発することである。

最近では、より立体的な構造の化合物のほうが薬として有利であることが指摘されている。そこで、この研究では、立体的な7-アザノルボルナン骨格を修飾することで、ライブラリーを構築するというアプローチをとった。このように構築したライブラリーの活性を評価することで、グレリン受容体およびオピオイド受容体に対する新規リガンドを取得できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既知のリガンドが存在しないタンパク質を創薬の標的とする場合、膨大な数(数十万程度)の化合物の中からリガンドを探し出すハイスループットスクリーニングと呼ばれる方法を取ることが多い。しかし、ハイスループットスクリーニングでリガンドを見つけられる確率は一般的に非常に低く、このことが医薬開発の遅れを招いている可能性がある。これに対して、本研究でとった手法では、23%(22化合物中5化合物)という非常に高い確率で、リガンドとなる化合物を見つけることができた。この手法により、将来的には、新たに発見されたタンパク質を標的とした創薬が容易になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Ligands, small molecules that bind to the target proteins, are indispensable in drug development. Despite this, it is difficult to find out a ligand for proteins whose ligands have not ever been discovered. To address this issue, we set out to construct a compound library with high expectancy of discovering novel ligands.

It is currently said that sterically more complex molecules are more advantageous in developing drugs. Hence, we constructed a compound library by modifying a three-dimensional 7-azanorborene scaffold. By screening through the library constructed in this way, we successfully identified novel ligands for growth hormone secretagogue receptor and opioid receptors.

研究分野：創薬化学, ケミカルバイオロジー

キーワード：創薬化学 ライブラリー構築 click反応 医薬分子設計 立体的ファーマコフォア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新たに発見されたタンパク質を創薬の標的とする場合、そのタンパク質に結合する低分子化合物(リガンド)が必要である。既知のリガンドが存在せず、標的タンパク質の構造に関する情報もない場合には、スクリーニングによるリガンドの発見が試みられる。スクリーニングの対象として用いられている化合物ライブラリーには、現時点では、容易に構築可能な  $sp^2$  炭素に富んだ平坦な化合物が多い。<sup>1</sup> 一方で、 $sp^3$  炭素に富んだ立体的な化合物のほうが、タンパク質の結合ポケットと効率よく相互作用できるため、強い活性を持ちやすいとされている。<sup>2</sup> さらに、このような立体的な化合物は、標的タンパク質に対する選択性が高いため意図しない副作用が起こりにくく、溶解性や吸収性などの面でも有利であることが指摘されている。

薬として有利な、複雑な立体構造を有する化合物は天然物に多く認められる。しかし、天然物から成る化合物ライブラリーの中から所望の活性をもつ化合物を見出せたとしても、天然物は一般的に非常に複雑な構造であるため、ヒット化合物の構造を改変し、最適化することは容易ではない。これに対して、天然物のような立体的な構造と、構造改変の容易さを併せ持つ化合物ライブラリーは、革新的な医薬を創出する上で非常に有用だと期待される。しかしながら、このようなライブラリーを簡便に構築する手法に関する研究例は、現時点ではほとんど存在しない。

(参考文献)

1. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 861–863.
2. *J. Med. Chem.* **2006**, *52*, 6752–6756.

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、天然物のように立体的な構造を有し、かつヒット化合物の構造改変が容易な創薬候補化合物ライブラリーを効率的に構築する手法を開発することである。

### 3. 研究の方法

分子量が小さく、かつ立体的な構造の骨格を、click 反応などの信頼性の高い分子連結法を組み合わせることで修飾すれば、立体的な化合物ライブラリーを簡便に構築できると考えた。本研究では以下の理由から、修飾する骨格として7-アザノルボルナン骨格を選択した。

(1) 様々な方向に置換基を導入できるため、多様な立体構造を有する化合物群を構築するのに適している<sup>1</sup>

(2) 歪みアルケン的一种であるノルボルナンと類似した構造であり、テトラジンライゲーションによる修飾が可能だと期待される<sup>2</sup>

(参考文献)

1. Karaki F *et al.* *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1127–1141.
2. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131–5142.

### 4. 研究成果

(1) アジドとアルキンの click 反応による化合物ライブラリーの構築

小規模なライブラリーの構築と生理活性化合物の探索

「7-アザノルボルナンを修飾することで、リガンドが得られること」を示すことを本研究の最初の目標とした。これを達成するために、アルキン部位を有する7-アザノルボルナン(2-エチニル-7-アザノルボルナン)をアジドとのclick反応により修飾することで小規模な化合物ライブラリーを構築し、これらの活性を評価することで生理活性化合物の取得を試みることにした(図1)。ここでは、7位窒素原子上の置換基をメチル基に固定した2種類のアルキン2-*exo*-エチニル-7-メチル-7-アザノルボルナンおよび2-*endo*-エチニル-7-メチル-7-アザノルボルナンを合成し、11種類のアジドと反応させることで、22化合物からなるライブラリーを構築した。

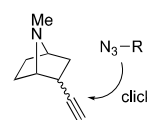


図1 click 反応によるライブラリーの構築

活性評価の対象とするタンパク質は、オピオイド受容体およびアセチルコリン受容体とする計画であった。しかし、CellKey™システムではHEK細胞がもつ内因性のアセチルコリン受容体に対する活性を検出できるため、遺伝子導入を行っていないHEK細胞に対する活性が認められた場合に、新たにアセチルコリン受容体に対する活性評価系を構築することとした。共同研究先(国立がん研究センター研究所 上園保仁研究室)ではオピオイド受容体発現細胞に加え、TRP受容体およびグレリン受容体の発現細胞も保有していたため、これらの受容体も活性評価の対象とした。

合成した化合物の活性を評価した結果、当初期待していた通り、2つの化合物がオピオイド受容体に作動活性を示した。これに加えて、3つの化合物がグレリン受容体に活性を示し、スクリーニングのヒット率は23%(5/22)となった。これは、一般的なハイスループットスクリーニングと比較すると極めて高い割合であり、当初目標としていた、「7-アザノルボルナンを修飾することで、リガンドが得られること」を示せたと考えている。現在、以上の結果に関する論文を執筆中である。

click 反応後、精製せずに活性を評価することによるスクリーニングの効率化

のライブラリーの構築では、アルキンとアジドをひとつずつ単離・精製した後に活性を評価していた。しかし、この単離・精製の工程は煩雑であり、この方法で大規模な化合物ライブラリーを構築するのは困難だと考えた。創薬化学の分野では、アルキンとアジドをマイクロプレート上で反応させ、精製せずに活性を評価することで、化合物探索の効率化が行われている。<sup>1</sup> したがって、本研究においてもこの方法を利用し、2-エチニル-7-アザノルボルナンとアジドをマイクロプレート上で反応させ、無精製のまま生理活性を評価することとした。

アルキンとアジドの click 反応には銅触媒が必須であるが、化合物を精製せずに活性を評価する場合、この銅触媒が評価系に悪影響をおよぼすことが懸念される。したがって、CellKey™ システムを使用した活性評価に、銅触媒が影響しないことを最初に確認した。オピオイド  $\mu$  受容体発現細胞を、この受容体の作動薬である DAMGO で処理した際の用量作用曲線は、銅触媒を共存させても変化しなかったことから、CellKey™ システムを用いた活性評価には銅触媒は影響しないと判断した (図 2)。

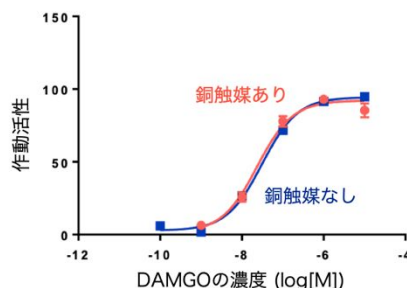


図 2 オピオイド  $\mu$  受容体発現細胞を DAMGO で処理した際の用量作用曲線

7 位窒素原子上に種々の置換基をもつ 16 種の 2-エチニル-7-アザノルボルナン (アルキン) と、11 種のアジドを 2 枚の 96 穴マイクロプレート上で反応させ、精製せずに CellKey™ システムで活性を評価した。その結果、 ヒット化合物を見出したオピオイド 受容体に加え、オピオイド  $\mu$  受容体およびオピオイド 受容体に対しても活性を示すウェルがあった。現時点では、目的物であるトリアゾールではなく未反応のアジドやアルキンが活性を示した可能性も否定できないため、ヒット化合物の再合成および単離・精製と、活性の確認を進めている。

(参考文献)

1. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2655-2664.

#### グレリン受容体作動薬の構造活性相関研究

ヒット化合物の構造改変により高活性な誘導体を創製できるのであれば、本研究で提案する手法は、創薬を志向したリガンドスクリーニングに有用だと言える。そこで、グレリン受容体にヒットした化合物 SYK786 の誘導体を合成し、構造活性相関情報を取得するとともに、構造最適化を試みた (図 3)。なお、グレリンは食欲増進作用や消化管運動亢進作用をもつペプチドホルモンであり、グレリン受容体作動薬は、がん患者が陥る進行性の栄養不良 (がん悪液質) に対する治療薬として有用だとされている。<sup>1</sup>

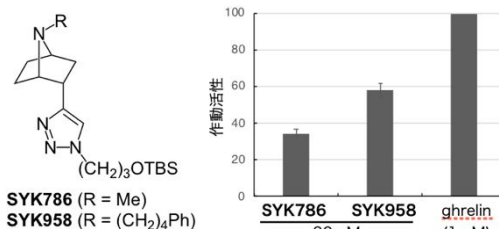


図 3 SYK786 および SYK958 の構造と、グレリン受容体に対する作動活性

7 位窒素原子上の置換基を種々変換し、グレリン受容体に対する作動活性をカルシウムアッセイにより評価した。<sup>2</sup> その結果、(1)アシル基を有する化合物には活性がなく、アルキル基を有する化合物には活性がある (2)鎖状のアルキル側鎖を伸ばしていくと、炭素数が 3 であるノルマルプロピル基では活性が損なわれる (3)フェニルアルキル基を有する化合物は一般に高活性であり、フェニルブチル基を有する SYK958 が現時点で最も高活性である (図 3) という知見を得た。今後は 7 位窒素原子上の置換基のさらなる最適化を試みるとともに、トリアゾール環上の置換基についても検討を行う。

(参考文献)

1. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *48*, 2172-2188.
2. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 1275-1286.

#### (2) テトラジンライゲーションによる 7-アザノルボルネンの修飾

##### 7 位窒素原子上の置換基がテトラジンとの反応におよぼす影響の調査

7-アザノルボルネンはノルボルネンと同様にテトラジンと反応すると考えられたが、実際にその反応性を調べた例は、研究を開始した当初は存在しなかった。そこで、7 位窒素原子上に種々の置換基を有する 7-アザノルボルネンを合成し、置換基がテトラジンとの反応速度におよぼす影響を精査した (図 4)。置換基 R がアルキル基の場合にはほとんど反応しなかったが、その他の場合はテトラジンと反応することが判明した。

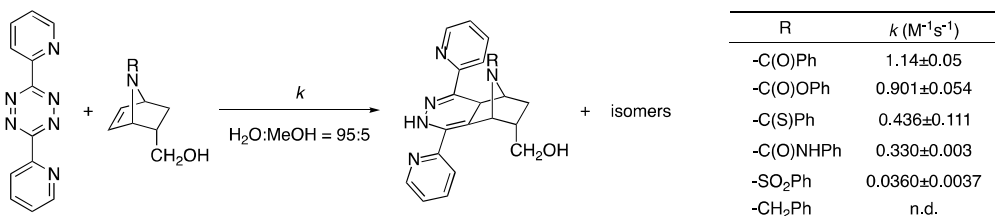


図4 7位窒素原子上の置換基がテトラジンの反応におよぼす影響

テトラジンと歪みアルケンの反応は逆電子要請型 Diels-Alder 反応であるため、電子求引性のカルボニル基を有する誘導体の方が、アルキル基を有する誘導体よりも反応性が低いと予想していた。しかし、実際の反応性はこの予想と逆であり、この理由に興味を持たれたため計算化学による解析を試みた。7-アザノルボルネンの7位窒素原子は、窒素原子上の置換基と橋頭位のプロトンとの立体反発のため非平面化しており、図5に示した *exo* 体と *endo* 体の2つのコンフォーマーが存在する。これらの分子のエネルギーおよび二重結合部分の軌道のエネルギーを計算し比較したところ、*exo* 体のほうが安定である一方、*endo* 体のほうがテトラジンと反応しやすいことが判明した。したがって、安定な *exo* 体が反応性の高い *endo* 体へと立体反転した後に、テトラジンと反応しているものと考えられる (図5)。

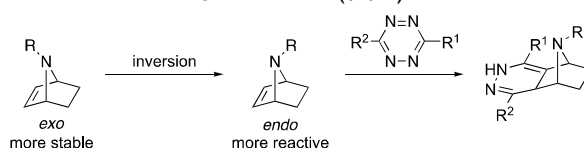


図5 テトラジンとの反応に先立つ7位窒素原子の立体反転

7位窒素原子の周りの結合角の和 ( $\theta$ ) を計算し、テトラジンとの反応における反応速度と比較したところ、 $\theta$  の値が大きいものほど反応が速いという傾向が認められた (図6)。 $\theta$  の値が大きく  $360^\circ$  に近いということは、窒素原子が平面であり  $sp^2$  性が高いことを意味する。以上の結果より、7-アザノルボルネンの反応性を決定しているのは7位窒素原子の  $sp^2$  性の高さであり、 $sp^2$  性が高い誘導体は安定な *exo* 体から反応性の高い *endo* 体への立体反転が起きやすいため、テトラジンと反応しやすかったものと考えている。以上の結果については2017年に *Eur. J. Org. Chem.* 誌に発表済みである (5. 主な発表論文等を参照のこと)。

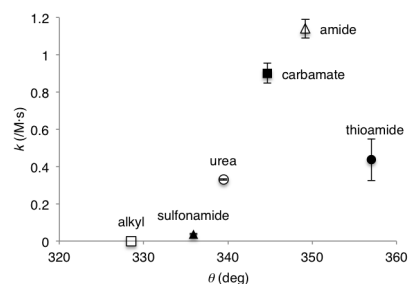


図6  $\theta$  の値と反応速度定数の関係

#### テトラジンライゲーションの生成物をピリダジンに収束させる光酸化反応の開発

研究開始当初は、触媒を必要としないテトラジンライゲーションにより7-アザノルボルネンを修飾し、精製せずに生理活性を評価する予定であった。しかし、歪みアルケン類のテトラジンライゲーションでは、最初に生成した1,4-ジヒドロピリダジンが徐々に酸化されてピリダジンに変換されるため、両者の混合物が得られる場合がある (図7)。したがって、(1)と同様にマイクロプレート上でテトラジンと7-アザノルボルネンを反応させ、無精製で活性を評価した場合、1,4-ジヒドロピリダジンとピリダジンのどちらが活性を示したのか特定する必要があり、その特定が難しい可能性があるかと懸念した。1,4-ジヒドロピリダジンを酸化すれば生成物はピリダジンに収束するが、無精製で生理活性を評価可能な酸化剤は見出されていない。この課題を解決するために、精製を必要としないクリーンな酸化剤の探索に着手した。

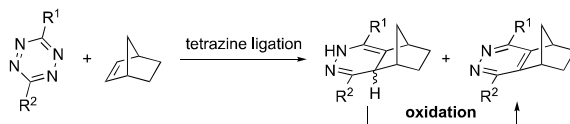


図7 テトラジンライゲーションの生成物

検討の結果、波長365 nmの紫外光を照射することで、生成物がピリダジンに収束することを見出した (図8)。現在は、基質一般性の検討と反応機構の解析を進めており、ここで得た知見を活かして、7-アザノルボルネンをテトラジンで修飾し、精製せずに活性を評価するプロトコルの確立を目指す。

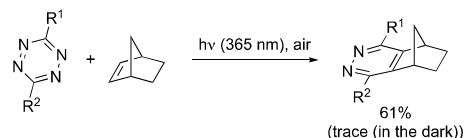


図 8 テトラジンライゲーシオンの生成物を収束させる光酸化反応

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Karaki, F.; Ohgane, K.; Imai, H.; Itoh, K.; Fujii, H. Reactivity of 7-Azanorbornanes in Bioorthogonal Inverse Electron-Demand Diels-Alder Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 3815-3829. 査読あり. DOI: 10.1002/ejoc.201700411

〔学会発表〕(計 5 件)

唐木文霞, 大金賢司, 今井浩孝, 伊藤謙之介, 藤井秀明. 多成分連結を志向した窒素置換型ノルボルネンの click 反応性の検討. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年.

梅本 翔, 唐木文霞, 芦沢夏鈴, 荻野拓海, 石橋尚人, 染谷僚人, 宮野加奈子, 平山重人, 上園保仁, 藤井秀明. 7-アザノルボルナンの修飾による立体的な創薬候補化合物ライブラリーを構築する手法の開発. 日本薬学会第 138 年会, 2018 年.

芦沢夏鈴, 梅本 翔, 染谷僚人, 唐木文霞, 江籐萌子, 野中美希, 宇津美秋, 宮野加奈子, 平山重人, 藤井秀明, 上園保仁. 立体的かつ構造改変が容易な創薬候補化合物群の探索 -CellKey アッセイシステムを用いて- 第 138 年会日本薬理学会関東部会, 2018 年.

大木智也, 唐木文霞, 梅本 翔, 平山重人, 宮野加奈子, 上園保仁, 藤井秀明. 7-アザノルボルナン骨格を有するグレリン受容体作動薬の構造活性相関研究. 日本薬学会第 139 年会, 2019 年.

木口卓人, 唐木文霞, 伊藤謙之介, 藤井秀明. テトラジンライゲーシオンの反応生成物をピリダジンに収束させる光酸化反応の開発. 日本薬学会第 139 年会, 2019 年.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。