

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249006

研究課題名（和文） 化学進化的合成化学による医薬機能分子の汎用性ある効率的創製

研究課題名（英文） Efficient Creation of Drug-functional Molecules with Chemically Evolutional Synthetic Chemistry

研究代表者 樋口 恒彦

(HIGUCHI TSUNEHICO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：50173159

研究成果の概要（和文）：任意の標的分子に対して、複数の化学平衡反応により経時的に親和性の高い分子を構築することを目指す本研究について次のような成果を得た。ホルミル基を3つ有する scaffold 1 を用いて、複数のアミンとヘミンを共存させてアミン/アルデヒド-イミン平衡反応を行い、ヘミンの存在下に増加した生成物が、他の生成物より高いヘム親和性を示し、比較的高い抗マalaria活性も示した。水溶性を高めた scaffold 2 の開発を行い平衡反応に用いた。ポルフィリン骨格にホルミル基前駆体を4カ所導入した scaffold 3 を開発した。さらに scaffold 1 と、剛直な屈曲したジアミンとの平衡反応を行うことにより、大きなケージ型超分子を選択的に得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）： We have succeeded in the development of 2,4,6-triethyl-1,3,5-di(alkylamino)benzene dynamic combinatorial library having affinity to hemin by utilizing aldehyde/amine-imine equilibrium reaction between 2,4,6-triethyl-1,3,5-benzenetricarbaldehyde (1) scaffold and amines. Increased products in the presence of hemin had higher affinity with hemin than not increased products. Porphyrin having four aldehyde precursors as a scaffold was synthesized. Equilibrium reaction between scaffold 1 and boomerang-form diamines converged to a cage-type supramolecule mainly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	18,200,000	5,460,000	23,660,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	31,400,000	9,420,000	40,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：化学平衡、親和性、ダイナミックコンビナトリアルケミストリー、創薬手法

1. 研究開始当初の背景

化学平衡を用いて、経時的に標的分子に対する高親和性分子を構築していく手法については、本研究者が1996年に考案した概念であるが、類似の概念がのちに海外でも提出さ

れ、最近では dynamic combinatorial chemistry と名付けられた一分野となっている。しかしながら、この dynamic combinatorial chemistry はまだ基礎研究段階に留まっており、医薬開発などへの応用にはまだ至っていなかった。

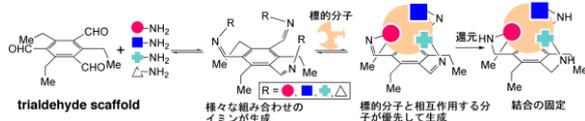
本研究者の研究開始当初においては、医薬等への応用を目的とし、これまで scaffold として検討した中で、2,4,6-triethylbenzene-1,3,5-trialdehyde を合成して用い、アミン-アルデヒド/イミンの化学平衡反応による動的な最適化を検討してきた。アミンを用いた以前の研究結果においては、標的分子に *N*-アセチルイソロイシンを用い、アミンの組合せを数種考えて平衡反応を行った結果標的分子の有無で生成物比が大きく異なった結果を得ていた。得られた分子として 2,4,6-triethyl-3,5-bis(allyloxymethyl)benzyl alcohol が最も生成物として増大していた。これと標的分子との親和性の正確な評価や、系の改良などを今後の課題としていた。

2. 研究の目的

本研究者の提案する「化学進化的合成化学」手法を何種類もの創薬標的に適用し、その汎用性、迅速性を実証することを目的とする。活性発現には、薬物受容体或いは酵素の基質結合部位に薬物が高い親和性と選択性を持って結合する必要がある。可逆的結合の場合には、結合することが熱力学的に極めて有利となることが重要な条件である。この点に着目して化学平衡により構造の最適化が行えれば高親和性の分子を選択的に合成できることになる。この、熱力学的に有利になる様な分子複合体の形成に平衡反応が応用可能と考えた。平衡反応を用いれば自動的に、経時的に望ましい構造に導くことができる。すなわち動的（化学進化的）に標的化合物に対し高親和性の分子を構築できることになる。本研究課題はこの概念に基づき幾つかの医薬に関連する標的分子に対してそれぞれ対応する複数の官能基が導入された親和性分子をオーダーメイドに合成するための適切な基質を抗体のように包含するのに適した鋳型-“scaffold”の設計を行い、それを用いて実証し、複数の標的に対してそれぞれ応用することを目的とする。scaffold の設計に関しては、化学進化的合成化学で得られた結果を、フィードバックし、改良を順次加えていく。以上の検討により、本手法がどの創薬標的に対しても同様の手順で簡便に行え、かつ汎用性が高いことを実証する。

3. 研究の方法

共通の scaffold としては、すでにこれまで開発してきた図のようなトリアルデヒドをまず用いる。これは 6 置換ベンゼンであるために置換基同士に立体反発が働き、ベンゼン環に対してアルデヒド基とアミンが可逆的に脱水縮合してできるイミノ基あるいはアミノアセタール基が 3 つとも同じ面側を向



き、標的化合物を包含するように複合体を形成することが期待できるためである。可変分子として、アミン以外にヒドラジドも用いる。標的分子としては、アルツハイマー病の医薬標的となるアミロイドβペプチドの部分配列、及びマラリアの医薬標的の一つであるヘミンを主に用いることとした。

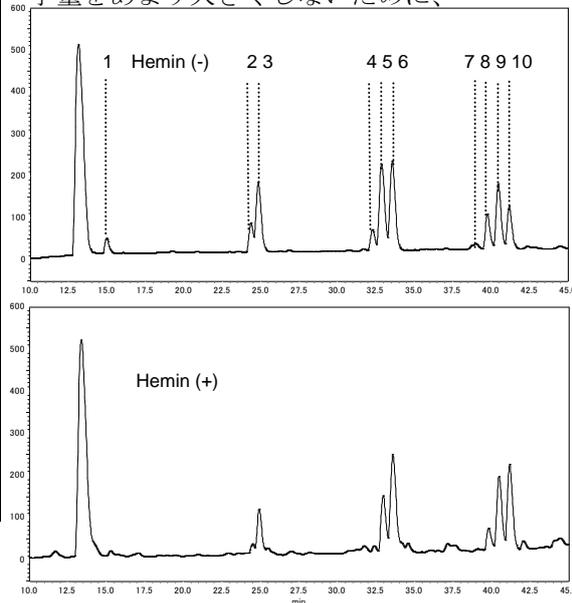
用いる可変分子の構造を多種類にして平衡反応を行い、優れた標的親和性分子の創製を目指す。この際に生じる平衡生成物は非常に多数になってしまうため、HPLCにおいてもピークの分離が困難になることが十分予想される。従って、この点を克服するために、以下のように標的分子を結合させたアフィニティーカラムを新たに調製し、そのカラムにおいて保持時間の長いものが親和性も高いと考えられるため、保持時間の長いものだけを選択的に分け取る。すなわち一定以上の親和性を有するものを選別する。精製してその中で特に親和性の強いものを見いだしていく。カラム担体は、ヨードアセチル基で修飾したアガロースゲルを用い、*N*末端にシステインを配置しスペーサーとしてエーテル鎖をはさみ標的分子を結合させたものを合成して担体と結合させることにより、調製する。これをカラムとして用いる。親和性の特に高いものが、平衡反応で経時的に増加しているかどうかを HPLC により確認していく。

さらに、scaffold であるトリアルデヒドと、ジアミンを共存させて平衡反応を行い、自己集合による一定の超分子形成が起きるかどうかについても検討する。

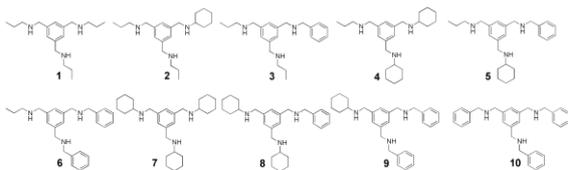
4. 研究成果

(1) ヘミンに対する高親和性分子の構築とその抗マラリア活性

抗マラリア薬開発における主要な医薬標的としてヘミンがあり、それに対する高親和性分子は、高い抗マラリア活性を示すことが期待できる。このためヘミンを標的分子として、種々のアミンを用いた。scaffold としては、分子量をあまり大きくしないために、



生成物の HPLC 分析



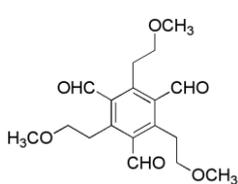
1,3,5-benzenetriyaldehyde を用いた。

平衡反応を行った結果、以下のようにヘミン共存下に増幅される生成物 **10** が見出された。生成物 **10** は、増幅のなかった生成物 **1** に対して、ヘミンとの親和性の違いを、UV-Vis スペクトルの変化率から算出し、**10** が約 3 倍 1 より大きいことが示された。さらに、生成物 **10** の抗マラリア活性を検定したところ、構造的には抗マラリア化合物として類似した化合物がないにもかかわらず、 IC_{50} 240 nM という割合高い活性を示した。このように本手法により、ユニークな構造を有する新規抗マラリア活性化化合物を迅速に得ることができたことで、他の生理活性化合物開発においての同様の成果が期待できる。

(2) アミロイドβ部分構造に対する高親和性分子の構築の検討

次に、アミロイドβペプチドの部分配列であり、その毒性の本体と考えられるオリゴマー体への凝集に強く関わると思われる配列 **KLVFF** を標的分子として用いた。

可変分子をアミンとすることは、多くのものが入手可能である点は利点であるが、結合の固定において還元過程を必要とし、平衡反応によって最適化する構造はイミン構造であるために、安定なアミン構造とやや乖離がある。次に可変分子としてアシルヒドラジドを用いることとした。アシルヒドラジドとアルデヒドは酸性条件で可逆的にアシルヒドラゾン形成するが、中性条件に移行させると平衡反応は停止し、ヒドラゾンとして安定になる。こちらの方が、最適化構造をそのまま安定に単離し得るので優れていると考えた。実際反応を行うと、ヒドラゾンとなった



ものはかなり脂溶性が高くなるためか、それら同士で集合しやすくなるために、沈殿物がかなり生じやすくなるという難

点があることもわかった。おそらくアシルヒドラゾンの部分がπ電子で共鳴している部分が脂溶性の上昇に寄与しているとは考えたが、scaffoldもトリエチルベンゼン構造部分がかかなり疎水性表面積が大きいので、次にこの部分の水溶性向上を行うことにより、ヒドラゾンの沈殿生成を抑える検討を行った。

これまでのもののエチル基3つを、より水溶性を高める2-メトキシエチル基に置き換えたもの(図)を合成し、同様の目的で検討を加えた。合成は、コバルト錯体を用いた炭素炭

素三重結合の3量化によって合成を行ったが、異性体の方が多く生成した。得られたエーテル基が3つ加えられ水溶性を高めた scaffold は、元のトリエチル体より40倍水溶性が高まっていることがNMR実験により明らかになった。しかし、ヒドラジドを用いた平衡反応にこの水溶性 scaffold を用いると、元のトリエチル体より沈殿が生じやすくなることが明らかになった。この理由は明らかではない。

このため、scaffoldを従来の scaffold に戻して、共溶媒を用いて、できるだけ水の濃度が高い条件で沈殿を生じさせずに行うための溶媒条件を検討した。これは、標的分子との相互作用には疎水性相互作用が重要であり、その相互作用を発現させるためには水の濃度が高いことが必要となるからである。種々の検討の結果DMSOを15%含有させた水あるいは緩衝液で行うこととなった。その条件で、かなり多くの条件で平衡反応を検討したが、標的分子の有無では、あまり生成物パターンに顕著な差が現れる例は、この場合では現在のところ見出せずにいる状況である。

以上のことから以下のような考察を行った。

(A) 差が見られにくい点に関しては、一つにはヒドラゾンの系では、有機共溶媒が一定濃度どうしても必要である点で、疎水性相互作用が過小評価されることにあるのではないかと考えられた。

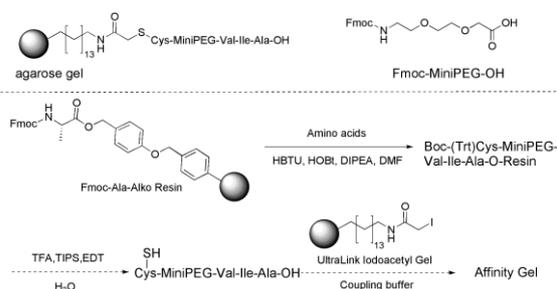
(B) もう一つとしては、scaffoldにヒドラジドが結合した分子と標的分子のみが相互作用することを中心に考えているが、それだけでなく、ヒドラゾン同士の相互作用や、ヒドラゾンとヒドラジドとの相互作用など、望まない相互作用もかなりの数考えられる。そのため、分子の増幅が他の多くの生成物にマスクされて検出しにくくなっていることが考えられる。

前者に関しては、ヒドラジドの共通部位の水溶性を高める改良を考えている。分子量はやや増えるが容易に実現可能と思われる。

後者に関しては、克服については困難な面もあるが、可変部位となるアルデヒドが3カ所では、高い親和性獲得のためには数が不足していることも考えられる。4-6カ所に増やした新たな scaffold を設計する必要があると考えている。また、標的分子と一カ所は共有結合で結合させ、残りの部分を平衡反応で構造を動的に最適化させることが、望まない相互作用をかなり低減させられることで、構造最適化の手法として、より確実ではないかと考えられる。

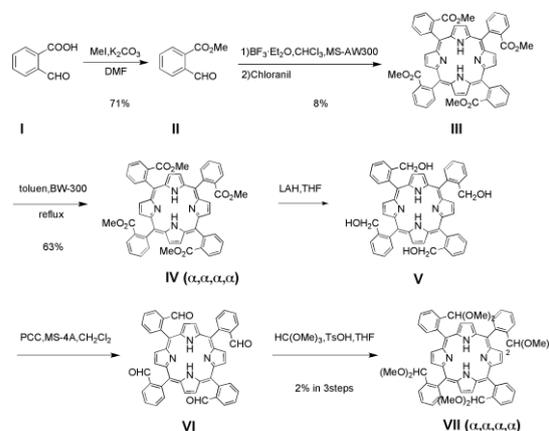
また、アミロイドβの凝集に関わると考えられているもう一つの配列であるC末端配列アフィニティゲルを構築した。これは、市販されているヨードアセチル基を有するゲ

ルと、末端にシステインのチオール基を結合させたスペーサーを挟んだ VAL-ILE-ALA 配列を有する分子とを結合させて調製した。これを標的分子として平衡反応を行うことを検討した。少量の親和性生成物が得られているが、現在構造を決定中である。



(3) ポルフィリン骨格を有する scaffold の構築

ポルフィリン骨格は、それ自身が光増感能を有することから、光線力学療法に用いることができる。またその金属錯体は、酸化触媒等の高機能を発現できることでも知られている。これに平衡反応による可変部位を導入した分子は、標的分子に親和性を持たせることにより標的分子の選択的攻撃が可能になると考えられる。そのため、アルデヒド基を4カ所導入したポルフィリンの合成を行い成功した。下図のようにメトキシカルボニル基を還元し、次にアルデヒドまで酸化し、最後

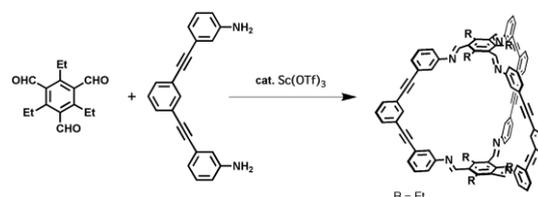


にジメチルアセタールとすることでアルデヒド等価体を、ポルフィリンの同じ面に導入したものを合成した。アルデヒドそのものは、ポルフィリンと可視光で生成する一重項酸素に酸化される可能性を考え、等価体とした。アセタールであってもアミンやヒドラジドとの平衡反応が進行するためこのまま用いることができる。この化合物では水溶性には乏しいため、今後水溶性を高める修飾も施す予定である。

(4) scaffold を用いた超分子の構築

トリアルデヒド scaffold を、これまで複数のアミンと標的分子を共存させて、標的分子

を内包させるホスト-ゲスト化学を行ってきた。これまでの検討とは異なり、標的分子を用いず、scaffold とジアミンとの平衡反応を行って、自己集合により超分子が構築できないかどうかについても検討を加えた。その結果、 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ を触媒として用いることにより、一定の収率で大きなカゴ状分子への自己集合・超分子化を行うことに成功した。



これにより、内部に空隙を持つ、イミン結合による超分子を容易に調製する一手法を確立できた。計算化学上は、空隙のサイズが C_{60} にちょうど当てはまるものであったため、 C_{60} の内包化をある程度検討した。現在のところ内包化までには至っていないが、これら機能性分子を内包させることができれば、殻の部分は容易に加水分解等が可能のため、ドラッグデリバリーシステムへの応用など幅広い応用も考えられる興味ある基礎的知見が得られたと考えている。今後、ジアミンのサイズや角度の異なるものを種々検討することにより、様々なサイズや形状の超分子を形成することができることを期待され、さらなる展開を行うことを計画している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

- ① [Naoki Umezawa](#), Yuka Noro, Kazuhiro Ukai, [Nobuki Kato](#), [Tsunehiko Higuchi](#), "Photocontrol of Peptide Function: Backbone Cyclization Strategy with Photocleavable Amino Acid", 査読有, *Chem. Bio. Chem.*, 12(13), 2011, 1694-1698, DOI: 10.1002/cbic.201100212
- ② Shinya Mimasu, [Naoki Umezawa](#), Shin Sato, [Tsunehiko Higuchi](#), Takashi Umehara, and Shigeyuki Yokoyama, "Structurally designed trans-2-phenylcyclopropylamine derivatives potently inhibit histone demethylase LSD1/KDM1", 査読有, *Biochemistry*, 49(30), 2010, 6494-6503
- ③ [Naoki Umezawa](#), Nobuyoshi Matsumoto, Shinsuke Iwama, [Nobuki Kato](#) and [Tsunehiko Higuchi](#), "Facile synthesis of peptide-porphyrin conjugates: Towards artificial catalase", 査読有, *Bioorg. Med. Chem.*, 18(17), 2010, 6340-6350

- ④ Mie Kamoto, Naoki Umezawa, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, "Turn-on fluorescent probe with visible light excitation for labeling of hexahistidine tagged protein", 査読有, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19(8), 2009, 2285-2288
- ⑤ Yuki Imamura, Naoto Watanabe, Naoki Umezawa, Takeshi Iwatsubo, Nobuki Kato, Taisuke Tomita, and Tsunehiko Higuchi, "Inhibition of γ -Secretase Activity by Helical β -Peptide Foldamers", 査読有, *J. Am. Chem. Soc.*, 131(21), 2009, 7353-7359
- ⑥ Natalya Hessenauer-Ilicheva, Alicja Franke, Maria Wolak, Tsunehiko Higuchi, and Rudi van Eldik, "Spectroscopic and Mechanistic Studies on Oxidation Reactions Catalyzed by the Functional Model SR Complex for Cytochrome P450: Influence of Oxidant, Substrate, and Solvent", 査読有, *Chem. Eur. J.*, 15(45), 2009, 12447-12459
- ⑦ 樋口恒彦, "触媒機能におけるシトクロム P450 配位構造の必然性: モデル錯体からのアプローチ", *有機合成化学協会誌*, 査読無, 67(2), 2009, 134-142
- ⑧ Takehiro Yamane, Kohei Makino, Naoki Umezawa, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, "Extreme rate acceleration by axial thiolate coordination on the isomerization of endoperoxide catalyzed by iron porphyrin: relevance to prostaglandin H2 isomerase catalysis", 査読有, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(34), 2008, 6438-6440
- ⑨ Mie Kamoto, Naoki Umezawa, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, "Novel Probes Showing Specific Fluorescence Enhancement on Binding to Hexahistidine Tag", 査読有, *Chem. -Eur. J.*, 14(26), 2008, 8004-8012
- ⑩ Shoji Akita, Naoki Umezawa, Nobuki Kato, and Tsunehiko Higuchi, "Array-based fluorescence assay for serine/threonine kinases using specific chemical reaction", 査読有, *Bioorg. Med. Chem.*, 16(16), 2008, 7788-7794

[学会発表] (計4件)

- ① 串田優, 加藤信樹, 梅澤直樹, 樋口恒彦
化学進化的合成化学: 新規スカッフオルドの合成とアミロイド β 親和性分子創製の検討

日本薬学会第131年会 2011年3月29日 静岡

② 藪名香宏介, 梅澤直樹, 加藤信樹, 樋口恒彦
化学進化的合成化学による抗マラリア薬を目指した高ヘム親和性化合物の開発

日本薬学会第129年会 2009年3月28日 京都

③ 藪名香宏介, 梅澤直樹, 加藤信樹, 樋口恒彦
化学進化的合成化学による抗マラリア薬を目指した高ヘム親和性化合物の開発

第27回メディシナルケミストリーシンポジウム

2008年11月27日 大阪

④ 樋口恒彦【招待講演】

官能基集積型機能分子: 酵素機構解明から医薬候補分子創製まで

京都大学大学院薬学研究科 2008年10月15日 京都

[図書] (計1件)

樋口恒彦 (共著)

無機化学 株式会社化学同人

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

①

名称: 抗マラリア活性化合物及び抗マラリア薬

発明者: 樋口恒彦、梅澤直樹、加藤信樹

権利者: 名古屋市立大学/(株)セラバリューズ

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/069392

出願年月日: 2011年8月29日

国内外の別: 国外

②

名称: 抗マラリア活性化合物及び抗マラリア薬

発明者: 樋口恒彦、梅澤直樹、加藤信樹

権利者: 名古屋市立大学/(株)セラバリューズ

種類: 特許

番号: 特願 2010-198651

出願年月日: 平成22年9月6日

国内外の別: 国内

③

名称: ケージド化合物の製造方法

発明者: 梅澤直樹、鶴飼和宏、樋口恒彦

権利者: 名古屋市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-16771

出願年月日: 平成20年6月26日

国内外の別：国内

④

名称：核酸複合体

発明者：筒井 宏典、渡邊健太郎、山本勝也、樋口恒彦、松本春香、加藤信樹、梅澤直樹

権利者：日産自動車(株)／名古屋市立大学

種類：特許

番号：特願 2008-59853

出願年月日：平成 20 年 3 月 10 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ysk/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 恒彦 (HIGUCHI TSUNEHICO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：50173159

(2) 研究分担者

梅澤 直樹 (UMEZAWA NAOKI) 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40347422

研究者番号：40347422

加藤 信樹 (KATO NOBUKI) 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50400221

(3) 連携研究者

今泉祐治 (IMAIZUMI YUJI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60117794