

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460160

研究課題名(和文) 基質型阻害剤との複合体構造解析に基づく非ペプチド型プロテアーゼ阻害剤の開発

研究課題名(英文) Design of non-peptide inhibitors based on structure analyses of the protease/inhibitor complex

研究代表者

赤路 健一 (Akaji, Kenichi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60142296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：重症呼吸器症候群SARSおよびアルツハイマー病の原因は異なるが、その治療には鍵となるプロテアーゼの阻害が最も有望と考えられている。本研究では、これら疾患の発症の鍵となるプロテアーゼ阻害に基づく治療薬開発を目的として非ペプチド型阻害剤の創製を行った。各疾患の標的プロテアーゼは、SARS 3CLプロテアーゼとセクレターゼBACE1である。申請者がこれまで進めてきた複合体構造解析研究で明らかにしたペプチド性阻害剤とプロテアーゼとの主要相互作用部位である疎水性側鎖構造を環構造に組み込んだデカリン型骨格を論理的に設計し、これまでに例のない新規非ペプチド型阻害剤を開発した。

研究成果の概要(英文)：Evaluation of a novel decahydroisoquinolin scaffold as an inhibitor for severe acute respiratory syndrome (SARS) chymotrypsin-like protease (3CLpro) was achieved. Focusing on hydrophobic interactions at the S2 site, the decahydroisoquinolin scaffold was designed by connecting the P2 site group to the main-chain nitrogen atom of the P2 position via a methylene linker. All decahydroisoquinolin inhibitors synthesized showed moderate but clear inhibitory activities for SARS 3CLpro, which confirmed the fused ring structure functions as a novel scaffold for SARS 3CLpro inhibitor. Hydroxyethylamine (HEA) isostere, as a transition state mimic, was incorporated into macro-cyclic structures connecting the P2 and P4 site of the substrate sequence of BACE1, a key protease for the onset of Alzheimer diseases. Synthesized cyclic inhibitor showed moderate but clear inhibitory activity for BACE1, which confirmed the ring structure functions as a novel scaffold for BACE1 inhibitor.

研究分野：医薬品化学

キーワード：プロテアーゼ 阻害剤 疎水性相互作用 複合体構造解析 縮環構造

1. 研究開始当初の背景

本研究では、治療薬開発を目指す疾患として重症呼吸器症候群 (SARS; Severe Acute Respiratory Syndrome) とアルツハイマー病を取り上げた。SARS は新興感染症の代表的疾患の一つであり、強い感染力を持っているにもかかわらず治療薬がまだ開発されていない。一方、アルツハイマー病は超高齢化が急速に進行しているわが国で最も対策が必要とされる疾患であるにもかかわらず治療薬がまだ開発されていない。このため、本研究ではまだ治療薬が開発されていないこれら二つの疾患について、その発症の鍵となるプロテアーゼの阻害による治療薬開発を目指すこととした。

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は、2002 年 11 月中国広東省で発生し、短期間のうちに 8000 を超える症例と約 800 人の死者を出した呼吸器疾患である。発生と同時に発症原因の探索が行われ、感染源として新種の SARS コロナウイルス (SARS-CoV) が同定された。しかし、感染経路は未だ十分に解明されておらず、治療薬やワクチンも開発されていない。このような状況の下、2005 年中国でコウモリが新種の SARS-CoV 様ウイルスの感染種であることが明らかにされた。さらに最近になって SARS 関連ウイルスによる中東呼吸器症候群 (MERS; Middle East respiratory syndrome) の感染拡大が報告され、新興感染症の新たなパンデミックが危惧されている。しかし、最初の SARS 感染が東南アジア地域にほぼ限定されていたため、特に欧米での研究モチベーションが低く治療薬開発に向けた研究が遅れている。

一方、我が国における認知症の大部分を占めるアルツハイマー病の発症には、39-43 残基のアミロイドペプチドβの重合が大きくかかわっている (アミロイド仮説)。しかし、このアミロイド形成をきっかけとする発症機構に基づく治療薬は未だ開発されていない。アミロイドβは、その前駆体膜蛋白質 APP から BACE1 (β site APP cleaving enzyme 1, βセクレターゼ) およびγセクレターゼによる切断で生成するが、BACE1 による切断が最初のステップでアミロイドβ産生の律速段階となる。このため、多くのアミロイドβ産生抑制剤がアルツハイマー病治療薬として開発されてきたが、いずれの化合物も臨床応用されるには至っていない。そのもっとも大きな理由は、化合物の有効性と脳内移行性のバランスをとるのが困難なためである。

これら二つの疾患の発症病因は異なるが、その治療には発症の鍵となるプロテアーゼの阻害が最も有望と考えられている。したがって、この発症にかかわるプロテアーゼを有効に阻害する方法論を開発できれば治療薬開発につながる可能性が大きい。申請者はこ

の点に着目し、これら二つの疾患発症に必須となるプロテアーゼの認識配列に基づく阻害剤研究を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者のこれまでの研究成果を基に全く新しい非ペプチド性縮環型 scaffold を設計し、その有効性を検討することとした。

(1) SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤研究; 申請者は「あらたなパンデミックに先んじて SARS 治療薬を開発する」ことを目標とし、SARS ウイルスの増殖に必須の SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の研究を進めてきた。その結果、SARS 3CL プロテアーゼの 188 位 Arg を Ile に置換した分解抵抗性変異プロテアーゼ (R188I SARS 3CL プロテアーゼ) が野生型プロテアーゼの約 10^6 倍の酵素活性を示すこと、SARS 3CL プロテアーゼ認識配列 C 末端にアルデヒド基を導入したペプチドアルデヒドが数十 μ M 程度の IC_{50} を示すこと、これらの阻害剤と R188I SARS 3CL プロテアーゼとの複合体 X 線構造解析から、基質配列にはない P_1 His, P_2 Cha (cyclohexyl alanine) をもつペプチドアルデヒドが nM レベルの IC_{50} 値を示すこと、などを明らかにした^{1,2}。

本研究では、上記研究成果を基に、新規非ペプチド型 scaffold を設計・評価した。具体的には、SARS 3CL プロテアーゼと強く相互作用する P_1 および P_2 サイト構造を保持できる環状 scaffold としてデカリン型縮環構造を設計し、この環上にアルデヒド基あるいはその等価官能基を導入した (図 1)。同時に P_4 サイトと相互作用できる構造を環構造に付加し、3 つの異なるサイトでの相互作用が可能な新規デカリン型阻害剤の合成と評価を行った。

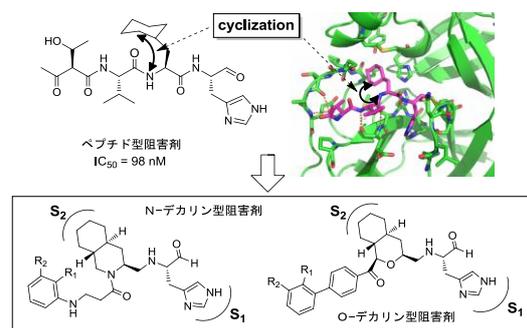


図 1 非ペプチド型 SARS-3CL^{pro} 阻害剤設計

(2) BACE1 阻害剤研究; 申請者は、発症機構に基づくアルツハイマー病治療薬開発を目的として、BACE1 阻害剤研究を行ってきた。すでに、独自の高度希釈下リフォールディング法による組換え BACE1 調製法を確立し、BACE1 切断部位に異常アミノ酸 [-Thi-Thi-Nva-]配列を持つペプチドがスウェーデン型基質配列よりも 10 倍以上速く切

断されることを見出した³。さらに、基質配列に基づく新規置換ヒドロキシエチルアミン型構造が数十 μ モルレベルの IC_{50} 値を示す阻害剤となることを見出し、この基質型阻害剤と BACE1 との複合体構造解析を進めている。現在、解像度は若干低いものの、基質遷移状態 mimic となる水酸基とプロテアーゼ活性中心 Asp 残基との相互作用を確認するとともに、 S_1 から S_3 サイトにかけて大きな疎水性ポケットが存在することを見出している (図 2)。

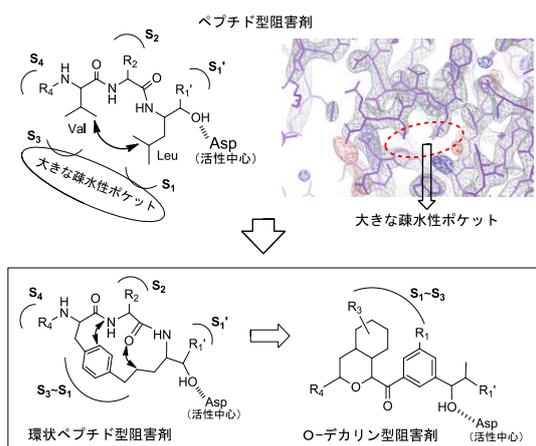


図 2 非ペプチド型 BACE1 阻害剤設計

本研究では、これまでの上記研究成果をもとに、 $S_1 \sim S_3$ サイトにあたる側鎖部分を結合した環状ペプチド型阻害剤を設計・評価し、疎水性ポケットとの相互作用に最適な環サイズを探索した。ついで、環状ペプチド型阻害剤評価で得られた環構造をもとに、さらに基質主鎖との環状化を進めた O-デカリン型阻害剤の設計・評価を行った (図 2)。

3. 研究の方法

(1) SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤研究；まず、窒素原子をデカリン骨格に含む N デカリン型阻害剤の合成法を確立した (図 3)。本窒素原子は、縮環構造構築や P_4 サイトに相当する N-置換基の導入を容易にするため導入した。

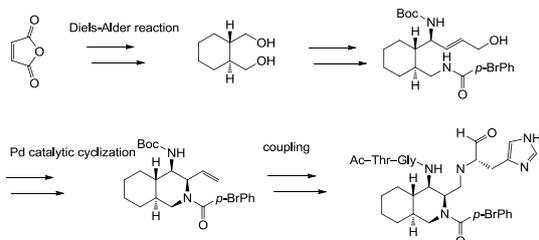


図 3 N デカリン型阻害剤の合成

目的とするデカリン環構築に必要な 6 員環前駆体を、1,3-プロパンジオールより得られる 6 とブタジエンとの Diels-Alder 反応

により合成した。ついでデカリン型縮環構造を、二価パラジウムを触媒とする環化反応により合成した。得られたデカリン型母核骨格と His 側鎖との連結には還元的アミノ化を用い、目的の化合物へと導いた。

N 型とは異なる相対配置での置換基導入が可能な O デカリン型阻害剤の合成は図 4 の経路に従って行った。

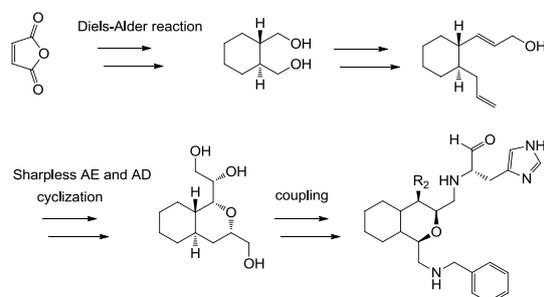


図 4 O デカリン型阻害剤の合成

環化前駆体の合成に必要な 6 員環構造を、市販の 3-buten-1-ol から Horner-Emmons 増炭反応により調製し、得られた化合物の Diels-Alder 反応により環化前駆体を合成した。ついで、母核となる O デカリン骨格を前駆体 10 の不斉エポキシ化と続く環化反応により立体選択的に合成した。最後に、グリニヤール反応と還元的アミノ化反応により O デカリン骨格の側鎖部分を導入した。

得られた化合物について、これまでの研究で確立した手法に従ってその阻害活性評価と数十 μ モル以上の IC_{50} 値を示した阻害剤についての複合体構造解析を行った。

(2) BACE1 阻害剤研究；これまでの予備実験で基質配列に置換 HEA (ヒドロキシエチルアミン) 骨格を組み込んだペプチド型 BACE1 阻害が数十 μ モルの IC_{50} 値を示すことを確認している。そこで、本研究ではこのペプチド型阻害剤の側鎖に疎水性環状構造を組み込んだ環状ペプチド型阻害剤を合成した。環状構造の構築にはオレフィン構造導入と芳香環導入の二つの経路を用いた。オレフィン構造導入は図 5 の経路に従って行った。

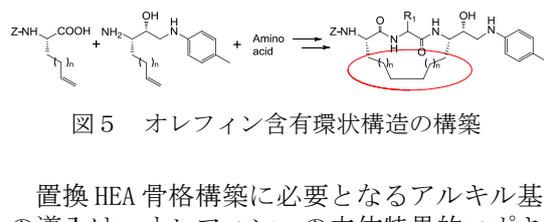


図 5 オレフィン含有環状構造の構築

置換 HEA 骨格構築に必要なアルキル基の導入は、オレフィンへの立体特異的エポキシ化と続くアミン化合物の付加により立体選択的に行った。続く環状化合物への変換は、オレフィンメタセシス反応を用いることによって、目的とする環状構造の構築に成功した。

ついで、図 6 に示す経路で芳香環導入に基

づく環構造構築を行った。置換 HEA 骨格構築はオレフィン型化合物と同様の方法で行った。続いて、分子内 Heck 反応を利用することによって芳香環含有大環状構造を構築することに成功した。

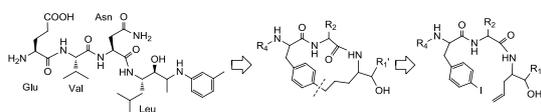


図6 芳香環含有環状構造の構築

最後に、申請者がすでに確立している組換え BACE1 を用いて得られた化合物の BACE1 阻害活性評価を行った。

4. 研究成果

(1) SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤研究；本研究によりこれまで全く報告のなかったデカリン型縮環構造を中心骨格とする阻害剤設計に成功した。本縮環構造は、これまでのペプチド型阻害剤がプロテアーゼとの相互作用に利用していた疎水性相互作用を格段に向上させることができる新規骨格である。さらに、デカリン骨格に窒素原子あるいは酸素原子を組み込むことで、縮環構造上に多様な置換基を導入することが可能になった。

本研究で合成した各種化合物は、中程度ではあるが確実な SARS 3CL プロテアーゼ阻害活性を示し、疎水性中心骨格の有効性を確認することができた。さらに、SARS 3CL プロテアーゼとの複合体構造解析により、推定疎水性相互作用を確認することができた。また、本縮環構造に組み込む置換基の導入位置と嵩高さを利用することで、あらたな SARS 3CL プロテアーゼとの相互作用部位を創出できることを確認した。

(2) BACE1 阻害剤研究；本研究により、これまでほとんど系統的な研究がおこなわれていなかった大環状 BACE1 阻害剤の活性評価が可能になった。さらに、オレフィン含有アミノ酸の側鎖構造やその導入位置を調節することで多様な大きさや構造を持った環状化合物を設計・合成することが可能になり、適度な疎水性と阻害活性を持った化合物設計が可能になった。これまで本研究で合成した各種環状化合物は、いずれも中程度ではあるが確実な BACE1 阻害活性を示した。現在、それらの活性データをもとに構造最適化を進めると同時に複合体構造解析を試みている。

さらに、本研究で合成した環状阻害剤はその設計のもととなったペプチド性阻害剤よりも疎水性が高くなっており、これまでのペプチド性化合物のもっとも大きな問題点であった脳移行性を改善できる見通しが高い。

<引用文献>

- ① Akaji, K. et.al., *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 9400-9408, 2008, and refs therein.

- ② Akaji, K. et.al., *J. Med. Chem.*, 54, 7962-7937, 2011, and refs therein.
 ③ Akaji, K. et.al., *Bioorg. Med. Chem.* 19, 2785-2789, 2011, and refs therein.

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 5 件)

- ① Konno, H.; Sato, T.; Saito, Y.; Sakamoto, I.; Akaji, K. Synthesis and evaluation of aminopyridine derivatives as potential BACE1 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25, 5127-5132. (査読有)
 DOI
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.007>
- ② Hattori, Y.; Kobayashi, K.; Deguchi, A.; Nohara, Y.; Akiyama, T.; Teruya, K.; Sanjoh, A.; Nakagawa, A.; Yamashita, E.; Akaji, K. Evaluation of Transition-state Mimics in a Superior BACE1 Cleavage Sequence as Peptide-mimetic BACE1 Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 5626-5640. (査読有)
 DOI
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.023>
- ③ Shimamoto, Y.; Hattori, Y.; Kobayashi, K.; Teruya, K.; Sanjoh, A.; Nakagawa, A.; Yamashita, E.; Akaji, K. Fused-ring structure of decahydroisoquinolin as a novel scaffold for SARS 3CL protease inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 876-890. (査読有)
 DOI
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.028>
- ④ Teruya, K.; Hattori, Y.; Shimamoto, Y.; Kobayashi, K.; Sanjoh, A.; Nakagawa, A.; Yamashita, E.; Akaji, K. Structural basis for the development of SARS 3CL protease inhibitors from a peptide mimic to an aza-decaline scaffold, *Biopolymers*, DOI: 10.1002/bip.22773 (2015) (査読有)
- ⑤ Konno, H.; Endo, H.; Ise, S.; Miyazaki, K.; Aoki, H.; Sanjoh, A.; Kobayashi, K.; Hattori, Y.; Akaji, K. Synthesis and evaluation of curcumin derivatives toward an inhibitor of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 685-690. (査読有)
 DOI
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.039>

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kazuya Kobayashi, Yasunao Hattori,

Ayaka Deguchi, Yukie Nohara, Tomomi Akiyama, Kenta Teruya, Akira Sanjoh, Atsushi Nakagawa, Eiki Yamashita, Kenichi Akaji ; Evaluation of Hydroxymethylcarbonyl and Hydroxyethylamine Isosteres in a Superior BACE 1 Cleavage Sequence for BACE1 Inhibitors. 7th International Peptide Symposium (Singapore), 2015.12.

- ②井尻咲、松原弘樹、川崎友紀、宮城嵩滉、出口綾香、小林数也、服部恭尚、赤路健一：ヒドロキシアミン型BACE1阻害剤の活性立体配置の同定とプライムサイト構造活性相関研究. 日本薬学会第135年会(兵庫医療大学薬学部・神戸), 2015. 3. 28
- ③岸一俊、吉澤慎一郎、溝渕英権、照屋健太、小林数也、服部恭尚、赤路健一：オキサデーカリン型骨格を有するSARS 3CLプロテアーゼ阻害剤の合成、日本薬学会第135年会(兵庫医療大学薬学部・神戸)、2015. 3. 28
- ④吉澤慎一郎、越野裕貴、足尾真実、岸一俊、照屋健太、小林数也、服部恭尚、赤路健一：オキサデーカリン型骨格を有するSARS 3CLプロテアーゼ阻害剤の合成、第65回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪大谷大学・大阪) 2015. 10. 17

[その他]

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuhin/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤路健一 (AKAJI Kenichi)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：60142296

(2) 連携研究者

服部恭尚 (HATTORI Yasunao)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20567028