

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460163

研究課題名(和文) 逆方向結合型プロテアーゼ阻害剤の分子設計によるマラリア治療薬開発

研究課題名(英文) Development of antimalarial agents through a design of reversely binding protease inhibitors

研究代表者

日高 興士 (Hidaka, Koushi)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：30445960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規マラリア治療薬を開発するために、独自の非天然アミノ酸であるアロフェニルノルスタチンを利用して基質とは逆方向に結合するマラリア原虫プラスメプシンの阻害剤を合成した。標的が局在する酸性食胞へ集積させるために塩基性補助基を導入した既存の阻害剤は優れた抗マラリア活性を有するが、クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫では阻害活性が大きく減弱した。そこで、クロロキンの化学構造の一部に類似する2-アミノエチルアミノ基を持たない塩基性補助基を導入したところ、耐性原虫に対して強力な阻害剤を獲得した。

研究成果の概要(英文)：To develop new antimalarial agents, plasmepsin inhibitors possessing an unnatural amino acid, allophenylnorstatine, which bind with in opposite way to that of substrate, were synthesized. The known inhibitors with basic auxiliary moiety were tested against chloroquine-resistant *P. falciparum* to exhibit large activity attenuation. Therefore, the new basic moieties, except 2-aminoethylamino group which is structurally similar to chloroquine, were incorporated. The synthesized compounds were found to be potent against the drug resistant parasite.

研究分野：医薬品化学

キーワード：マラリア HIV 治療薬 プロテアーゼ阻害剤 分子設計 プラスメプシン

### 1. 研究開始当初の背景

(1)マラリアはハマダラ蚊を媒介としてマラリア原虫に感染して起こる疾病で、世界保健機構 (WHO) の報告によると 2010 年にはおよそ 2 億 2 千万人がマラリアに感染し、そのうち約 65 万人が命を落としている。また近年における地球温暖化や交通手段の発達によりハマダラ蚊の生息地域は拡大している。ヒト感染マラリア原虫のうちで患者が死に至り易いのは熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) であり、近年ではクロロキンやスルファドキシム-ピリメタミン等の既存の抗マラリア薬に耐性を獲得した熱帯熱マラリア原虫が増え、問題となっている。薬剤耐性マラリア原虫に対してはアルテミシニンベースとした併用療法が有用であり、多くのマラリア感染国でアルテミシニンが使われるようになったが、単独療法しかできない国では耐性原虫の出現が危惧されており、最近ではカンボジアとタイの国境付近、そしてミャンマーやベトナムでも既にアルテミシニン耐性原虫が報告されている。この問題の解決策として、作用機序が異なる新たな抗マラリア剤の開発が求められる。

(2)著者らの研究グループはマラリア原虫固有のアスパラギン酸プロテアーゼであるプラスメプシン (Plm) と HIV プロテアーゼの基質認識の類似性に着目し、アロフェニルノルスタチン (Apsn) を有する HIV プロテアーゼ阻害剤を調べたところ、nM レベルの Plm II 阻害活性を示し、赤血球中でのマラリア原虫増殖抑制活性を示すことが分かった。更に、阻害剤に塩基性補助基を導入したところ、一連の誘導体は  $EC_{50}$  がサブ  $\mu$ M の抗マラリア活性を示すようになった。その後の Plm I の X 線結晶構造の解析により、Apsn 含有阻害剤の KNI-10006 は N 末端が基質の向きとは逆向きで結合することが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

本研究期間においては、独自の Apsn を含む Plm 阻害剤が逆向きに結合することを踏まえた新規阻害剤のデザインと合成を行い、Plm に対する阻害活性を評価し、構造最適化を行う。Plm と HIV プロテアーゼの基質認識の類似性より、変異に対する親和性の変化の情報を共有して Plm 阻害剤設計に活用し、熱帯熱マラリア原虫のヘモグロビン分解に働く Plm I, II, HAP, IV の重複酵素を全て抑制する高活性化化合物を獲得する。ペプチド型阻害剤の問題となる低い抗マラリア活性については、複合体の X 線結晶構造より結合に影響ない部位へ塩基性補助基を付加することで、標的の Plm が局在する酸性食胞へ阻害剤を集積させる。抗マラリア活性を飛躍的に向上させる補助基を探索し、薬剤耐性問題を克服する新規作用メカニズムの抗マラリア薬を開発する。

### 3. 研究の方法

(1)阻害剤の合成は通常の液相ペプチド合成法のとおり行った。(1S,2R)-アミノインダノールを出発物質として、Boc-ジメチルチアゾリジンカルボン酸を BOP 試薬により縮合した。HCl/ジオキサンにより Boc 保護基を除去し、EDC-HOBt 法により Boc-Apsn-OH を縮合した。次いで HCl/ジオキサンにより Boc 保護基を除去し、4-(Boc-アミノ)-2,6-ジメチルフェノキシ酢酸を BOP 試薬により縮合した。得られた中間体の Boc 保護基を HCl/ジオキサンにより除去し、4-アミノ基を有する誘導体 KNI-1293 を得た。アルキルアミノ誘導体については、水素化シアノホウ素ナトリウムを用いる還元的アミノ化によりアルデヒドから N-アルキル化を行い、粗生成物を得た。また、4-アシル誘導体については相当するカルボン酸を BOP 法または混酸無水物法により縮合させ、脱 Boc 化した後、粗生成物を得た。合成化合物は全て逆相 HPLC により精製し、質量分析により同定し、HPLC 分析により >95% の純度を確認して最終化合物とした。

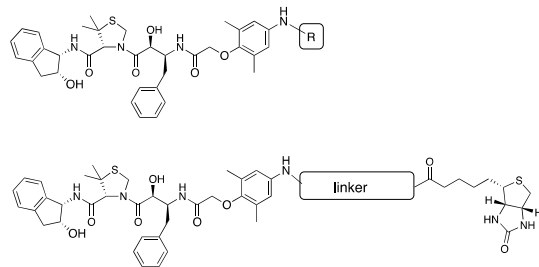


図 1. 合成した逆方向結合型 Plm 阻害剤の構造

(2)合成した新規誘導体は Plm II に対する阻害活性を評価した。ヘモグロビン鎖の 33-34 位の切断部分をもつペプチド発色基質を使用して、Plm II による切断速度を測定し、tight-binding 阻害の式にフィットさせて  $K_i$  値を求めた。

(3)Plm II を強力に阻害した化合物については、クロロキン感受性かつメフロキン耐性の D6 株およびクロロキン、メフロキン、ピリメタミンの多剤耐性を示す C235 株に対する熱帯熱マラリア原虫増殖阻害効果を SYBER Green I アッセイにより調べた。

(4)Plm のケミカルバイオロジー研究のツールとして Plm 阻害剤のアミノ基誘導体にアミノカプロン酸リンカーを伸長して末端にビオチンを結合させたビオチン化誘導体を合成した。HIV プロテアーゼをモデルにアフィニティー精製を行い、精製タンパク質について SDS-PAGE を行い、蛍光試薬によりタンパク質を定量して回収率を求めた。

### 4. 研究成果

(1)Plm IとKNI-10006のX線共結晶構造より、S2'ポケットから溶媒水に伸びる2,6-ジメチルフェノキシアセチル基から4-位を種々変換した誘導体を検討した。我々は既に報告した、Plmが局在する酸性食胞へ集積させるために2-アミノエチルアミノ基の塩基性補助基を導入した既存の阻害剤は、優れた抗マラリア活性を有するが、クロロキン感受性と耐性の熱帯熱マラリア原虫を比較すると、耐性原虫では増殖阻害活性が4~9倍減弱することが分かった(表1)。

表1. 既存の誘導体の熱帯熱マラリア原虫阻害活性

Compound	Anti- <i>P. falciparum</i> , EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)		
	D6	C235	C235/D6
KNI-10737	0.29	1.3	4.5
KNI-10740	0.19	0.86	4.5
KNI-10743	0.36	1.3	3.6
KNI-10741	0.22	1.9	8.6
chloroquine	0.046	0.47	10

(2)我々はこの結果について、誘導体のもつ2-アミノエチルアミノ構造がクロロキンの化学構造の一部に類似するために薬剤耐性機構に影響を受けたと考えた。そこで、2-アミノエチルアミノ基を持たない塩基性補助基を導入した(図1)。合成した誘導体は、Plm IIに対してK<sub>i</sub>値が1~22 nMの強いPlm II阻害活性を示した。その中にEC<sub>50</sub>値が0.26  $\mu$ Mと良好な抗マラリア活性を示すものを同定した(表2)。クロロキン耐性原虫に対しては、活性の減弱は1~3.6倍で穏やかで、活性がクロロキン感受性原虫を上回る誘導体(化合物1i)も見られた。この結果より、本研究を実施して得られた阻害剤はクロロキン耐性機構を回避でき、薬剤耐性マラリア原虫に有効な薬剤となる可能性がある。

表2. 新規誘導体の熱帯熱マラリア原虫阻害活性

Compound	Anti- <i>P. falciparum</i> , EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)		
	D6	C235	C235/D6
1a	0.33	1.2	3.6
1b	0.63	1.7	2.7
1c	1.2	1.9	1.6
1d	1.5	1.6	1.1
1e	0.85	1.7	2.0
1a	1.3	1.5	1.2
1f	6.3	>14	-
1g	11	>14	-
1h	0.26	0.73	2.8
1i	1.8	0.62	0.34
1j	3.1	4.1	1.3
1k	0.33	1.2	3.6

(3) KNI-10006 にアミノカプロン酸リンカーを介してビオチン結合させた Plm プローブ

を合成した(図1)。このプローブはリコンビナントの野生型および耐性変異を有するHIVプロテアーゼに対して強い阻害活性を維持し、ストレプトアビジンカラムを用いてアフィニティー精製ができた。プロリンロッドのリンカーを介してビオチン結合型阻害剤を合成した。このプローブはリコンビナントのHIVプロテアーゼに対して強い阻害活性を維持した。また、様々なリンカーの誘導体についてストレプトアビジンを担持したカラムや磁気ビーズを用いてアフィニティー精製を行ったところ、ペプスタチンのプローブと比較して顕著に優れていた。今後のこれらプローブを用いるPlmへ応用する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Takuya Miura, Koushi Hidaka, Yukiko Azai, Keisuke Kashimoto, Yuko Kawasaki, Shen-En Chen, Renato Ferreira de Freitas, Ernesto Freire, and Yoshiaki Kiso: Optimization of plasmepsin inhibitor by focusing on similar structural feature with chloroquine to avoid drug-resistant mechanism of *Plasmodium falciparum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24** (7), 1698-1701 (2014). DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.02.051

Koushi Hidaka, Yoshiaki Kiso, Yuko Tsuda: Design of biotinylated allophenylnorstatine-containing peptidomimetics. *Peptide Science 2013* (Y. Nishiuchi and T. Teshima eds.), pp. 73 (2014).

Koushi Hidaka, Motoyasu Adachi, Ryota Kuroki, Satoko Tokai, Kenichi Akaji, Yuko Tsuda, Yoshiaki Kiso: Lead optimization of allophenylnorstatine-containing inhibitors as therapeutic drug and application to peptidomimic protease probe. *PEPTIDES 2012: Proceedings of the Thirty-second European Peptide Symposium* (Eds. George Kokotos, Violetta Constantinou-Kokotou, John Matsoukas) pp. 44-45 (2013).

[学会発表](計14件)

日高興土、木曾良明、津田裕子、ビオチン化阻害剤を利用するプロテアーゼ活性の新規検出法、日本薬学会135年会、2016年3月26日~28日、パシフィコ横浜(横浜)

Koushi Hidaka, Yoshiaki Kiso, Yuko

Tsuda: Detection of pathogenic protease activity using inhibitor stripping by avidin binding competition: ISAC. The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmSciences, Jan 21-22, 2016, Center for Learning and Innovation Takeda Pharmaceutical Company, Ltd. (Suita)

日高興土、木曾良明、津田裕子、阻害剤を利用した HIV プロテアーゼ活性の検出、第 29 回日本エイズ学会学術集会、2015 年 11 月 30 日～12 月 1 日、東京ドームホテル（東京）

Koushi Hidaka, Yoshiaki Kiso, Yuko Tsuda: Activity detection of aspartic proteases using biotinylated inhibitors. The 9th General Meeting of International Proteolysis Society (Golden Sans Hotel Conference Center, Peneng, Malaysia), Oct 4-8, 2015.

日高興土、木曾良明、津田裕子、ビオチン化阻害剤を利用した結合プロテアーゼの酵素活性の検討、第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2015 年 8 月 21 日～22 日、ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋（名古屋）

日高興土、亀岡正典、木曾良明、津田裕子、ビオチン化 PI の分子設計と活性 HIV プロテアーゼの同定、第 28 回日本エイズ学会学術集会、2014 年 12 月 3 日～5 日、大阪国際会議場（大阪）

日高興土、亀岡正典、木曾良明、津田裕子、ビオチン化アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤の開発研究、第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2014 年 8 月 8 日～9 日、千里ライフサイエンスセンター（吹田）

日高興土、亀岡正典、木曾良明、津田裕子、ビオチン化 HIV プロテアーゼ阻害剤の開発研究、第 28 回近畿エイズ研究会学術集会、2014 年 6 月 7 日、大阪市立総合医療センター（大阪）

日高興土、木曾良明、亀岡正典、津田裕子、ビオチン化アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤を用いた HIV プロテアーゼ研究、日本薬学会 134 年会、2014 年 3 月 28 日～30 日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本）

Hidaka K, Kiso Y, Tsuda Y: Design of biotinylated allophenylnorstatine-containing peptidomimetics. 4<sup>th</sup> Asia-Pacific International Peptide Symposium, 50<sup>th</sup> Japanese Peptide Symposium, 6th-8th November, 2013, Hotel Hankyu Expo Park (Suita)

Hidaka K, Kiso Y, Tsuda Y: Optimization of allophenylnorstatine-containing inhibitors as anti-infectious agents and protease probes. The 8th General Meeting of International Proteolysis Society, 20th-24th October, 2013, Cape Town (South Africa)

日高興土、安達基泰、黒木良太、木曾良明、津田裕子、薬剤耐性 HIV プロテアーゼに対するビオチン化阻害剤の結合評価、第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2013 年 8 月 16 日・17 日、吹田、千里ライフサイエンスセンター

日高興土、安達基泰、黒木良太、木曾良明、津田裕子、ビオチン化したアロフェニルノルスタチン含有阻害剤の薬剤耐性 HIV プロテアーゼ変異体に対する結合評価、日本ケミカルバイオロジー学会第 8 会年会、2013 年 6 月 19 日～21 日、東京医科歯科大学 M&D タワー（東京）

日高興土、木曾良明、津田裕子、ビオチン化したアロフェニルノルスタチン含有阻害剤の HIV プロテアーゼ結合評価、第 27 回近畿エイズ研究会学術集会、2013 年 6 月 1 日、大阪府立公衆衛生研究所（大阪）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称：ビオチン直接結合型タンパク質活性調節物質  
発明者：日高興土、津田裕子  
権利者：学校法人神戸学院  
種類：特許  
番号：特願 2015-153233  
出願年月日：2015 年 8 月 3 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
情報の公表 - 教員総覧 (薬学部)  
<http://www.kobegakuin.ac.jp/information>

/public/teacher/pharmacy/hidaka.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日高 興士 (HIDAKA, Koushi )  
神戸学院大学・薬学部・講師  
研究者番号：3 0 4 4 5 9 6 0

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし