

## 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 4 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603001

研究課題名（和文） 基質認識特性に立脚した新規アミラーゼ阻害剤の分子設計

研究課題名（英文） Molecular design of amylase inhibitor based on the substrate recognition property of the enzyme

研究代表者

川端 潤 (KAWABATA JUN)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：60142197

研究成果の概要（和文）：膵  $\alpha$ -アミラーゼの阻害は肥満、糖尿病抑制に効果的である。しかし、この酵素はグルコースの連鎖を基質として認識するという特性から、親和性の高い低分子阻害剤がほとんど知られていない。本研究では、 $\alpha$ -アミラーゼの基質認識特異性を積極的に利用した分子を阻害剤として設計、合成して新たな低分子  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤をつくりだした。さらに、今後の阻害剤設計に有用な  $\alpha$ -アミラーゼの基質認識特性についても明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Inhibition of the pancreatic  $\alpha$ -amylase is useful for the treatment of obesity and diabetes mellitus. However, not many small molecule inhibitors are known for this enzyme due to its characteristic substrate recognition which recognizes chained glucoses. We used this characteristic mode of substrate recognition to design new small molecule  $\alpha$ -amylase inhibitors and synthesized them. These synthetic inhibitors revealed a useful property of the pancreatic  $\alpha$ -amylase for further development of the inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード： $\alpha$ -アミラーゼ、酵素阻害剤、糖尿病、分子設計、グルコシダーゼ阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の増加、低年齢化は大きな社会問題であり、なかでもわが国の糖尿病人口は1000万人に近く国民の10人に1人というおそろべき数字に達し、その予防は国をあげて取り組むべき急務である。このような観点から糖質消化吸收抑制物質の開発・応用研究が活発に行われている。申請者の研究室でも、これまで消化管内の主要な糖質水解酵素で

ある  $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼの阻害成分を広く天然中からスクリーニングにより探索し、有効なリード化合物を求める試みをここ十年來行ってきた。このうち二糖類水解酵素であるマルターゼやスクラーゼに阻害作用を示す化合物はいくつか見つかり、その中には製品化に結びついたものもある。また、薬剤でもデオキシノジリマイシン、ボグリボースなど卓効を示す

阻害剤も多い。しかしながら、 $\alpha$ -アミラーゼに関してはわずかにアカルボースが知られているのみである。天然にはタンパク質性のアミラーゼインヒビターが存在するもの、これらは哺乳類の消化酵素に対する活性が低く、実用的観点からは好ましくない。ヒトのエネルギー摂取量の50%をデンプンが占めることを考えると、その消化にかかわる $\alpha$ -アミラーゼの有効な阻害物質の開発は重要な課題といえる。

## 2. 研究の目的

マルターゼやスクラーゼの阻害物質は多いのに対し $\alpha$ -アミラーゼのよい阻害物質が少ないのは、 $\alpha$ -アミラーゼが自分自身より巨大な高分子であるデンプンしか基質としないという特性にある。そのため単純な低分子基質アナログでは酵素との親和性が低く阻害効果を発揮しにくいのである。天然のアミラーゼインヒビターが高分子のタンパク質であるという事実もそのことを支持している。

そこで本研究では $\alpha$ -アミラーゼの基質認識特性を活かして、低分子で取り扱いやすい効果的な阻害物質を合理的な分子設計で創製することを目的とした。すなわち、 $\alpha$ -アミラーゼが触媒部位であるグルコシド結合だけではなく、そこから上流部（マイナス方向）と下流部（プラス方向）に連なるグルコースの連鎖を認識するサブサイト部位をもっていることに着目し、酵素阻害につながる反応部位と、基質認識を向上させるサブサイト結合部位の両方をもつ分子を設計し、新しい発想での $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質を合成することである。

このような着想によってすでに一部候補分子の合成を開始した。まず、触媒部位に強力なマルターゼ阻害剤であるデオキシノジリマイシン (DNJ) を用い、その下流側にリンカー (L) を介してグルコース (Glc) を連結した DNJ-Ln-Glc 型分子 (n はリンカー炭素鎖数) を合成したが、ほとんど $\alpha$ -アミラーゼ阻害性は示さなかった。そこでアカルボースが糖転移によって上流側にグルコース鎖が結合した活性型に変化して阻害性を示すことに着目し、上流側にリンカーを介してグルコースを結合した Glc-Ln-DNJ 型分子を合成したところ、弱いながら酵素阻害性が認められた。本研究ではさらにリンカー部構造の最適化による活性の増強と、酵素阻害部位への新たな構造ユニットの組み込みによる新規阻害剤開発を企図した。

## 3. 研究の方法

(1) 上流側サブサイトを標的にした $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質の設計

酵素阻害につながる反応部位と、基質認識

を向上させるサブサイト結合部位の両方をもつ分子として、反応部位に強力なマルターゼ阻害剤であるデオキシノジリマイシン

(DNJ) を用い、リンカー (L) を介してグルコース (Glc) をサブサイト結合部位として連結した分子を設計した。この分子ではリンカーの長さが、グルコースのアミラーゼサブサイトによる認識に重要であると考えられたため、リンカーについてまず長さを検討した。

DNJ は文献 (Wennekes T., et al., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1088-1097) の方法を一部改良して、リンカーを結合する水酸基以外が保護されたものを合成した。

リンカーには柔軟性が高いことから単純で合成の容易なアルキルリンカーを選択した。炭素鎖数 6,9,12 のリンカーについては臭化アルキルアルコールとグルコシルブロミドとの間で $\alpha$  選択的グルコシル化反応を行い Glc-L ユニットをまず合成した。続いてリンカー末端の臭素を脱離基として利用することで DNJ と結合させることで目的の Glc-L6/9/12-DNJ を合成した。炭素鎖数 15 のリンカーについては同様の方法では反応性が低く、目的物が得られなかったことから脱離基を臭素からヨウ素へと変更し、さらに溶媒条件を種々検討した結果、テトラヒドロフラン中で反応を行うことで Glc-L15-DNJ を合成した。これらについてはそれぞれ、リンカーのみと DNJ を反応させることで HO-L6/9/12/15-DNJ を合成した。次に炭素鎖数 4, 5 のより短いリンカーを有した化合物については、同様にグルコースと結合させてから DNJ と反応させたところ、目的物が得られなかったため、結合させる順番を変更した。炭素鎖数 4, 5 のリンカーをまず DNJ と結合させておき、次にグルコシルブロミドとの間で $\alpha$  選択的グルコシル化反応を行うことで、Glc-L4/5-DNJ を得た。また中間体からグルコースのない HO-L4/5-DNJ も得ることが出来た。

合成した Glc-L-DNJ 及び HO-L-DNJ についてはブタ腭 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性を測定した。その結果、アルキルリンカーのみを DNJ に結合させた場合でも、 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性が上昇することが分かった。これはアルキルリンカーと $\alpha$ -アミラーゼとの間の疎水性相互作用のためだと考えられたため、次にグルコースの代わりに疎水性のより高い安息香酸、4-フルオロ安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテキユ酸を結合させ、それぞれの活性について測定した。

(2) 下流側サブサイトを標的にした $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質の設計

グルコースをサブサイトの下流に結合し

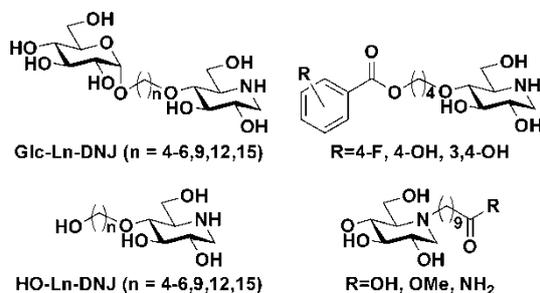
た DNJ-Ln-Glc 型の分子については、過去に合成され、ほとんど  $\alpha$ -アミラーゼ阻害性は示さないことが分かっている。

ブタ腭 $\alpha$ -アミラーゼの分子モデルには、サブサイトの下流側にリジン残基の存在が観察される。このリジン残基を利用したアミラーゼ阻害剤を設計した。(1)と同様に DNJ を酵素反応部位の阻害剤として利用し、DNJ の窒素原子からアルキルリンカーを介して、リジンのアミノ基とのイオンの相互作用が期待できるカルボキシ基を末端に配置した DNJ-L9-COOH を合成した。また合成中間体から水素結合性の期待できるメチルエステル体 DNJ-L9-COOMe、及びアミド体 DNJ-L9-CONH<sub>2</sub>についても調製し、これらの阻害活性を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 設計・合成した化合物

本研究では以下の化合物の合成を達成し、その $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を測定した。



##### (2) 上流側サブサイトを標的にした阻害物質のアミラーゼ阻害活性

Glc-Ln-DNJ についてはブタ腭 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性を測定した結果、リンカー炭素鎖数が長くなるほど阻害活性は高くなり炭素鎖数 12 で IC<sub>50</sub>=0.77 mM となった。さらに長い炭素鎖数 15 では阻害活性は低下した。DNJ のみではアミラーゼに対してほとんど阻害活性を示さないことから、このようなサブサイトというアミラーゼの基質認識特性を利用した阻害剤の有用性を示すことが出来た。

グルコースのない化合物である

HO-Ln-DNJ は、Glc-Ln-DNJ と比較して総じて弱い阻害活性を示した。ただ、グルコースがないことによる阻害活性への影響は小さく、またリンカー鎖長と活性の関係は同様の傾向を示した。この結果は、アミラーゼの基質認識に関する新たな知見を与えてくれた。今回用いたようなアルキルリンカーの付加による阻害活性の上昇は、酵素とリンカー間の疎水性相互作用が大きな要因を担っているものだと考えられる。その裏付けとして、ブタ腭 $\alpha$ -アミラーゼの分子モデルでは、サブサイトの上流側には疎水性の表面が多

いこと、シミュレーション解析を用いて Glc-Ln-DNJ とアミラーゼの相互作用を解析したところ、この疎水性部分にリンカーが沿っていたこと、があげられる。従って、このような疎水性が Glc-Ln-DNJ の阻害活性には重要な役割を果たしていると考えられ、またデンプンのようなアミラーゼの本来の基質の認識にも役立っているのではないかと考えられる。ただ、現時点では合成した Glc-Ln-DNJ または HO-Ln-DNJ が実際にブタ腭 $\alpha$ -アミラーゼとどのように相互作用しているのかを示す直接の証拠はなく、今後この点については明らかとする必要がある。

疎水性相互作用を利用したアミラーゼ阻害剤の例として、HO-L4-DNJ に疎水性相互作用の期待できる安息香酸を結合した化合物についても本研究では合成した。そのアミラーゼ活性は予想通り上昇したが、フッ素、水酸基で置換された安息香酸についても同様に検討したところ、無置換の安息香酸とは異なり阻害活性は減少した。この結果は、芳香環とアミラーゼの疎水性部位との相互作用は阻害活性にとって有用であることを示す一方で、フッ素や水酸基の影響により芳香環上の電子密度が増加すると、酵素との相互作用は減少することを示している。グルコースを結合させた Glc-L4-DNJ の阻害活性と安息香酸ではほとんど差がないことから、電子密度の高い芳香環よりも電子密度の低い飽和炭化水素や電子吸引性の置換基を付加した芳香環の方が、アミラーゼとの相互作用には有利なのかもしれない。

##### (3) 下流側サブサイトを標的にした $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質の活性

下流側のサブサイト付近に存在するリジン残基を標的にした DNJ-L9-COOH はアミラーゼ阻害活性を示さなかった。一方、DNJ-L9-COOMe では弱いながらも阻害活性を示した。DNJ-L9-COOH については分子内のアミンとカルボキシル基がイオン対を形成し、酵素とうまく相互作用しなかったことが原因と推定される。しかし、リジン残基との水素結合は期待できるメチルエステル体では活性の上昇が見られたことから、リジン残基を標的にした分子設計自体は有用だと考えられる。

以上のように、本研究ではアミラーゼの基質認識特性を利用した阻害剤として、マルターゼ阻害剤である DNJ に、アルキルリンカーを介して各種の置換基を結合した化合物を設計合成した。その結果アミラーゼにとって、サブサイトの下流側では基質との疎水性相互作用が大きな役割を果たしているという重要な結果を得た。そして、この相互作用を利用することで、アミラーゼに対してはほ

とんど阻害活性を示さない DNJ のようなマルターゼ阻害剤をアミラーゼ阻害剤として転用可能である可能性を示すことができた。

#### 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)

Eisuke Kato; Naoya Iwano; Akihiko Yamada; Jun Kawabata,  
Synthesis and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of glucose-deoxynojirimycin conjugates, *Tetrahedron*, 査読有, **67**, p7692-7702, 2011.

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 加藤英介、グルコース-デオキシノジリマイシン複合体の合成と $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性、日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同支部大会、2010年9月28日、東北大学(仙台市)
- (2) 加藤英介、基質認識機構を利用した $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤の合成と活性、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月26日、東京大学(東京)
- (3) 野澤裕介、基質ポケット近傍の相互作用を利用したデオキシノジリマイシン結型アミラーゼ阻害剤の合成と活性、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月25日、京都女子大学(京都市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川端 潤 (KAWABATA JUN)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：60142197

##### (2) 研究分担者

加藤 英介 (KATO EISUKE)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：40466446