

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560418

研究課題名(和文) イオンチャネル・受容体の動的構造変化追跡を可能にするケミカルプローブの創製

研究課題名(英文) Studies toward creation of chemical probes for dissecting structural dynamics of ionotropic glutamate receptors

研究代表者

及川 雅人(Oikawa, Masato)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：70273571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイオンチャネル型グルタミン酸受容体(iGluR)のゲーティングメカニズムの解明に役立てることを目的とし海洋天然物ダイシハーベイン(DH)のプローブの合成化学的開発を試みた。具体的には、出発原料にD-riboseを用いて、まずそのアノマー位にビニル基を導入し、それに対するジヒドロキシ化を行った。アミノ酸側鎖は、アルデヒドに対するHWE反応によりエナミドを得たのちにBophozを用いた不斉水素化により構築した。本研究ではプローブの比較対照に用いるための類縁体の保護体までを得ることができた。また、研究分担者の酒井はマウスを用いた合成化合物の活性評価法の予備的な検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Chemical probes are important tools to elucidate functions of target proteins. Development of chemical probes for ionotropic glutamate receptor (iGluRs), that mediates majority of fast excitatory neurotransmission in the central nervous system (CNS), is highly challenging due to the unique structure of the ligand binding domain. Dysiherbaine (DH), which was isolated from Micronesian marine sponge *Lendenfeldia chondrodes* in 1997 by Sakai et al, is a potent agonist selective to GluK1- and GluK2-containing subtypes of kainate type iGluR. In the present study, we planned to synthesize clickable DH as a precursor for the chemical probe. We first synthesized the vital intermediate, which has three stereocenters, performed in 10 steps starting from D-ribose. The key transformation includes domino aldol-Cannizzaro reaction followed by stereoselective aldol reaction at the ring juncture of the bicyclo[3.3.0]octane skeleton, and stereoselective addition of vinyl group to the lactol moiety.

研究分野：有機合成化学、ケミカルバイオロジー

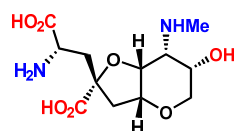
キーワード：化学プローブ イオンチャネル型グルタミン酸受容体 人工リガンド

### 1. 研究開始当初の背景

イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) は神経シナプス膜表面に発現し、神経伝達物質であるグルタミン酸の結合によって作動する脳神経伝達の要である。グルタミン酸のような小さな分子がどのようにして巨大なタンパク質の構造変化を惹起し、ひいてはイオンチャネルの開口、閉口という一連の動作をひきおこすのだろうか？ この謎を解明するため、グルタミン酸受容体全長の全構造の X 線解析が行われるなど、研究者のチャレンジは続いており、それによると iGluR は四量体で構成され、膜貫通部位 (TMD、チャネルを形成) リガンド結合部位 (LBD) そして最上段に N-末端部位からなる 3 階建て構造である。LBD と TMD の模式図は、4 つの LBD の開口部それぞれにアゴニストが結合することで閉じ、チャネルが開き、そのままチャネルが閉じ「脱感作状態」に移行する、という受容体の一連の「動き」を示している。この LBD の動きはハマグリ の貝殻の動きにたとえて「Clam Shell Model」と呼ばれている。

### 2. 研究の目的

定説では貝殻の「閉じ方」とチャネルの「開口」は反比例し、効率のよいアゴニスト (グルタミン酸のようなフルアゴニスト) では貝殻は完全に閉じチャネルは完全に開く。しかし、効率の悪いアゴニスト (パーシャルアゴニスト) ではそれが不完全で、アンタゴニストでは貝殻が閉じずに、チャネルは開かないとされている。研究分担者 (酒井) が見出したダイシハーペイン (DH) はこれまでに知られている最も強力なグルタミン酸受容体のアゴニストである。



Dysiherbaine (DH)

また、佐々木らが開発した DH 類縁体 MSVIII-19 は非常に効率の悪いパーシャルアゴニストであるが、X 線構造解析の結果から DH と MSVIII-19 は両者とも完全に貝殻を「閉じた」状態に導くことが判明した。これは「定説」を覆す結果である。一方で、研究代表者 (及川) は DH と古くから知られる iGluR アゴニストのカイニン酸とのハイブリッドである IKM-159 を合成した。興味深いことにこの化合物は iGluR アンタゴニストとして作用した。そこで、受容体との X 線構造解析を行ったところ、リガンドは受容体の 1 つにしか結合していなかった。これも、「それぞれの LBD にリガンドが結合する」という定説を覆している。これらの結果は、我々がこれまでに無い「稀有な」リガンドを手にしたことを意味する。本研究では、これらの化合物をベースに標的タンパク質を「可視化できる」リガンドを設計し、LBD の「動き」

を FRET などにより原子レベルで見るための素地を築こうとするものである。

### 3. 研究の方法

本研究においては、申請者らが開発した阻害剤 IKM-159 をベースに蛍光標識体を AMPA 受容体 (iGluR のひとつ) のケミカルプローブとして合成する。iGluR は一般に LBD におけるリガンドとの結合部の容積が小さく、これまでに蛍光物質を導入できた例がない。本研究で合成するケミカルプローブはこれに挑戦するとともに、これまで静的解析にとどまっている現状からさらに踏み込んで AMPA 受容体のダイナミクスに迫ることが可能になる。研究代表者らはすでに AMPA 受容体の LBD と IKM-159 の複合体の X 線結晶構造解析に成功しており、この情報によれば IKM-159 には蛍光基を導入するスペースの存在が示唆されていることから、われわれはこの「稀有な」リガンド IKM-159 をケミカルプローブ化し、その活性評価と X 線結晶解析までを本研究で行い、有望な化合物を開発したのち、次の段階にて FRET による原子レベルでの相互作用解明に発展させる。これまでの研究から IKM-159 は AMPA 受容体に対するアンタゴニストもしくはパーシャルアゴニストであると示唆されており、本研究は iGluR のパーシャルアゴニズムに関する知見を与えるものになるかもしれない。

2005 年、中川らは電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析法によりラット脳 AMPA 受容体の可視化に成功し、AMPA 受容体の細胞外領域はアゴニストや脱感作を阻害するアロステリックモジュレーターが存在下において大きく構造を変えることが明らかになった。また、2009 年、AMPA 受容体全体の結晶構造も明らかにされた。我々のケミカルプローブは FRET 解析の次のステージにて AMPA 受容体との複合体の単粒子構造解析にも用いたい。最終的に、AMPA 受容体の原子レベルからグロスレベルでの構造変化とチャネル活性との関係解明に道筋をつける。

また本研究では別の iGluR である KA 受容体に対し多様な薬理作用をもたらす一連のダイシハーペイン類縁体のケミカルプローブ合成に多様性指向型合成により挑戦する。これは、KA 受容体に対し原子レベルからグロスレベルでの構造変化に関する情報を得て、チャネル活性との関係づけを行うために用いる。

本研究ではリガンド作動性イオンチャネルのダイナミクスに、様々な機能を有するケミカルプローブを用いて取り組むもので他に類を見ない研究であり、これまでに iGluR に関しさまざまな情報を蓄積した、合成化学、天然物化学、薬理学、構造生物学を専門とする多様な研究者からなる我々のグループだけがなせるオリジナリティーの高いアプローチである。

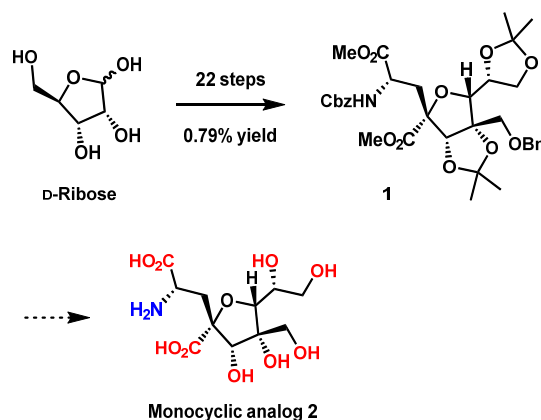
人工ケミカルプローブによりイオンチャネルの「コンホメーションとチャネル活性との関係」に切り込む本研究は、合成経路が確立していない部分があることや、本申請の延長線上に想定している FRET / 単粒子構造解析については実績がないことなど挑戦的で予想できない要素も含んでいるが、これらリガンド作動性である特性を利用して機能性リガンドを用いて取り組むものである。点変異による遺伝学研究に対し、ケミカルプローブを用いる本研究は化学遺伝学研究(ケミカルバイオロジー研究)ともとれるが、研究対象が巨大なイオンチャネルであることや、そのコンホメーション変化とチャネル活性の関係解明に化合物を用いて取り組む点など、従来のケミカルバイオロジーの枠に収まらない先端性を有するものであり、大きなインパクトを関連する分野に及ぼすものである。以上の状況を踏まえ、本研究では、AMPA 受容体阻害剤 IKM-159 ならびに KA 受容体作動薬ダイシハーベインおよび類縁体、などにアルキンを導入した化合物を化学合成し、蛍光基などを含むアジド化合物と click 反応させて蛍光基とのコンジュゲートを得る。これら機能性リガンド存在下での受容体のチャネル活性を *in vitro* および *in vivo* で評価する。本研究ではさらにこれらの化合物と LBD との複合体の X 線結晶構造解析を行うものである。

#### 4. 研究成果

プローブ化した海洋天然物ダイシハーベインの合成研究に際しては、ダイシハーベインと GluK1 の複合体構造から、C6 位へのアルキニル基導入が適切であると考えた。その合成を、マロン酸を出発原料とし酸素官能基を導入する戦略により取り組んだところ、マロン酸部の脱炭酸に起因する分解が、合成中間体の化学的安定性に悪影響を及ぼすことが判明した。

そこでふたつめの合成戦略にもとづき D-ribose を出発原料とする合成の検討を進めた。フラノース環上で二度のアルドール反応を行ってふたつの四級炭素の構築に成功し、ピラン環の構築に進んだ。その検討を、分子内 C-グリコシド化および閉環メタセシス反応により行ったが、いずれも良好な結果を与えなかった。そこで、ピラン環を有さない一環性プローブ化合物の開発に目標を修正した。ただし、ダイシハーベインの 8, 9 位に存在するヘテロ原子は iGluR との相互作用に必要であるため、まずビニル基を導入し、それに対するジヒドロキシ化を行った。アミノ酸側鎖は、アルデヒドに対する Horner-Wadsworth-Emmons 反応によりエナミドを得たのちに Bophoz を用いた不斉水素化により構築した。引き続き Cbz 基を Boc 基につけ替えたが、この際、末端のアセトニド基の分解が観察され、反応が複雑化してしまった。本研究ではプローブの比較対照に用いる

ための類縁体の保護体までを得ることができた。



また、合成化合物の活性評価のため、研究分担者の酒井はマウスおよびその自動行動トラッキングシステムの準備を行った。

#### 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 10 件)

【査読論文】M. Chiba, C. Fujimoto, R. Sakai, M. Oikawa, Structure - activity relationships of IKM-159: Diverted synthesis and biological evaluation of a series of C5-oxy analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015, 25, 1869-1871. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.03.037

【査読論文】M. Oikawa, Y. Kasori, L. Katayama, E. Murakami, Y. Oikawa, Y. Ishikawa, Biology- and diversity-oriented domino reactions for synthesis of AMPA receptor antagonist IKM-159 and analogs. *Synthesis* 2013, 45, 3106-3117. DOI: 10.1055/s-0033-1338543

【査読論文】L. Juknaitė, Y. Sugamata, K. Tokiwa, Y. Ishikawa, S. Takamizawa, A. Eng, R. Sakai, D. S. Pickering, K. Frydenvang, G. T. Swanson, J. S. Kastrup, M. Oikawa, Studies on an (S)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazolyl)propionic Acid (AMPA) Receptor Antagonist IKM-159: Asymmetric Synthesis, Neuroactivity, and Structural Characterization. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 2283-2293. DOI: 10.1021/jm301590z

〔学会発表〕(計 20 件)

福島孝一 石川裕一 及川雅人, Clickable ダイシハーベインの合成研究、日本化学会第 94 春季年会 (名古屋)、2014 年 3 月 29 日

福島孝一 及川雅人, Synthetic Study of Clickable Dysiherbaine, 3rd Chemical Biology Conference (Singapore)、2014 年 12 月 16 日

福島孝一 及川雅人、クリッカブルダイ  
シハーペインの合成研究、日本化学会第 95  
春季年会（船橋）、2015 年 3 月 26 日

〔図書〕(計 1 件)

及川雅人、AMPA 受容体の選択的リガンド、日  
本薬学会、ファルマシア、2014、1123-1127

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 1 件)

名称：Heterotricyclic AMPA Receptor  
Antagonists for Treatment of Epilepsy,  
Pain, and Other Neurological Disorders and  
Diseases

発明者：Geoffrey T Swanson; Martin B Gill;  
Ryuichi Sakai; Masato Oikawa

権利者：同上

種類：特許

番号：U.S. Patent Number: 8,895,579

出願年月日：March 21, 2011

取得年月日：Nov 25, 2014

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://oiklab.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

及川 雅人 (OIKAWA, Masato)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科  
学研究科・教授

研究者番号：7 0 2 7 3 5 7 1

### (2) 研究分担者

酒井 隆一 (SAKAI, Ryuichi)

北海道大学・大学院水産科学研究科・教授

研究者番号：2 0 2 6 5 7 2 1

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：