

令和 3 年 4 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2020

課題番号：16KT0060

研究課題名(和文) 酵素反応の遷移状態構造を時間依存的に安定化する阻害薬の創製

研究課題名(英文) Development of inhibitors that stabilize the transition state of enzymatic reactions

研究代表者

鈴木 孝禎 (Suzuki, Takayoshi)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：90372838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：2-アミノアニリド化合物ライブラリーの構築、速度論的酵素阻害活性評価、ヒット化合物のアイソザイム選択性評価により、時間依存的に酵素反応の遷移状態を安定化しアイソザイム選択的阻害活性を示す化合物を見出した。また、薬理試験の結果、これらのアイソザイム選択的KDAC阻害剤は、記憶力増強効果など、高い薬理活性を示すことも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた日本では、がんやアルツハイマー病など、未だ特効薬の無い疾患が多数存在する。本研究により、酵素反応の遷移状態構造を考慮することにより、将来の医薬品につながる阻害剤の創製が可能であることが示された。本研究の成果は、アンメットメディカルニーズの高い疾患の治療につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We have identified isozyme-selective KDAC inhibitors that stabilize the transition state of enzymatic reactions by the construction of a 2-aminoanilide compound library, kinetic screening and isozyme selectivity evaluation of the hit compounds. These inhibitors showed potent pharmacological effects such as memory-enhancing activity.

研究分野：創薬化学

キーワード：遷移状態 酵素 阻害薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

酵素反応では、酵素と基質が「遷移状態」を形成した後に生成物を生じる。例えば、リシン脱アセチル化酵素 (KDAC) は、図 2 に示す遷移状態構造を経て、基質であるアセチル化されたりシン残基を脱アセチル化する。まず、KDAC の活性中心に在る Zn^{2+} 及びヒスチジン (His) 残基により活性化された水分子が、 Zn^{2+} (Lewis 酸) により活性化されたアセトアミドのカルボニル基を求核攻撃する。ここでカルボニルの炭素は四面体構造の遷移状態をとる。最終的には、アミンがプロトンを受け取りながら、C-N 結合の開裂が起きて脱アセチル化が完結する。

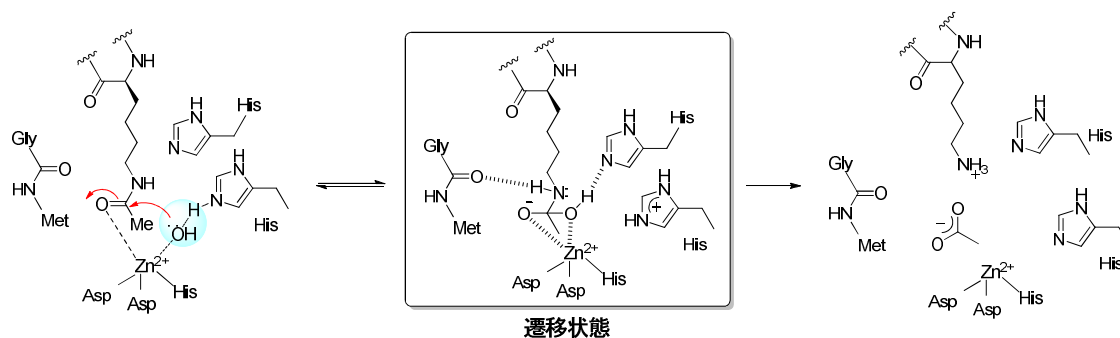


図 1. KDAC によるヒストンの脱アセチル化のメカニズム

この過渡的にしか存在しない遷移状態とよく似た構造をもつ安定な遷移状態アナログは、酵素の活性中心と直接相互作用するため、高活性、高選択的な酵素阻害薬となり得る。遷移状態アナログは、低分子医薬品創製、遷移状態アナログの免疫による抗体酵素の作製、ケミカルバイオロジー研究、酵素反応機構の解明研究など、さまざまな分野で応用されている。

これまでに報告された遷移状態アナログは、基質の構造を基にしたものがほとんどである。KDAC 阻害薬の創製研究においても、基質のホスホンアミド誘導体やスルホンアミド誘導体 (図 2) が設計、合成されたが、そのような遷移状態アナログに高い酵素阻害活性は見られなかった。

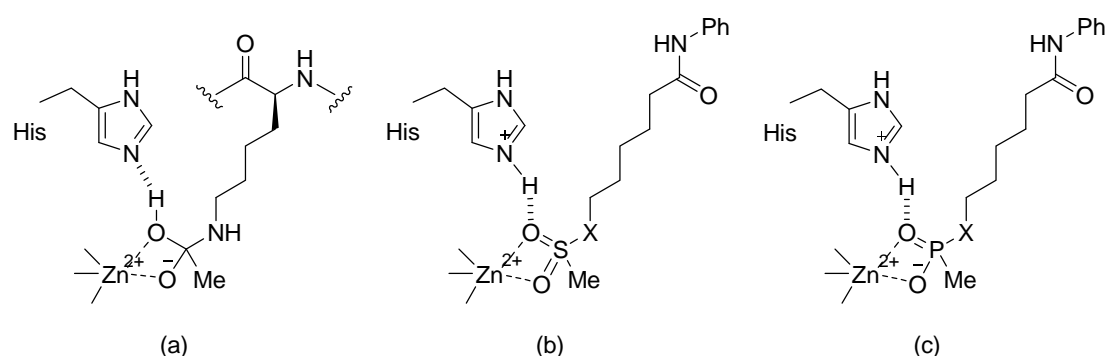


図 2. KDAC による脱アセチル化の遷移状態 (a) と KDAC 阻害を目指した遷移状態アナログスルホンアミド (b) およびホスホンアミド (c)

一方、我々の研究グループは、一見して基質と全く異なる構造の化合物が酵素の遷移状態構造を時間依存的に安定化し、高い酵素阻害活性、選択性を示すことを見出した。具体的には、2-アミノアニリド化合物が、KDAC にゆっくりと結合し、KDAC による脱アセチル化反応の遷移状態構造と同様に酵素の活性中心に在る亜鉛イオンに二座配位し、活性中心を形成するアミノ酸残基と水素結合を形成することで、KDAC を強力かつ選択的に阻害することが予備実験および

化学計算により示された。

2. 研究の目的

本研究では、上記の知見を基に、KDAC アイソザイムの遷移状態構造を時間依存的に安定化する高活性かつ高選択的な阻害薬の創製を目指した。2-アミノアニリド化合物のような時間依存的な阻害薬は、ゆっくりと標的酵素に結合し、ゆっくりと酵素から放出されることから、標的酵素内での滞留時間が長い。代謝、排泄によって阻害薬が血中から消失した後でも、阻害薬は標的酵素内に残ることから、時間依存的阻害薬は、薬効が長時間持続する副作用の少ない治療薬として大きな注目を集めている。本研究で得られる KDAC 阻害剤は、高い薬効を示す副作用の少ない治療薬として期待できる。

3. 研究の方法

(1) 2-アミノアニリド化合物ライブラリーの構築

2-アミノアニリド骨格をベースとしたアルキン化合物、酵素の表面に在るアミノ酸残基と反応する cap 構造を有するアジド化合物を合成し、クリックケミストリーを用いて、96 穴プレート上で 2-アミノアニリド化合物ライブラリーを構築する (図 3)。

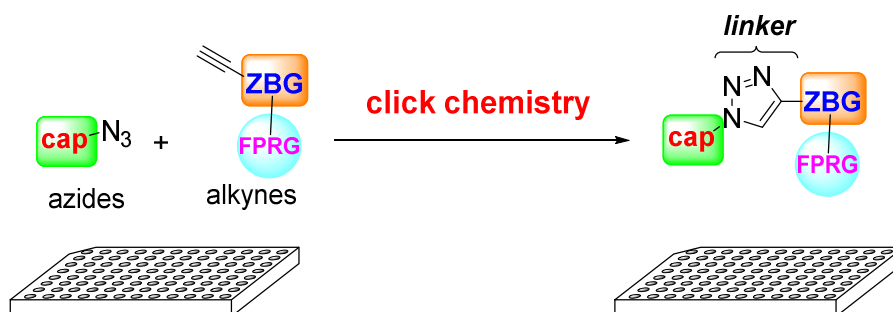


図 3. クリックケミストリーによる 2-アミノアニリド化合物ライブラリーの構築

(2) 速度論的酵素阻害活性評価

2-アミノアニリド化合物ライブラリーの速度論的酵素阻害活性評価を行う。具体的には、標的の KDAC アイソザイムと長時間インキュベーションした時に、より高い活性を示す化合物を、本スクリーニングにより見出す。

(3) ヒット化合物のアイソザイム選択性評価

上記で得られたヒット化合物を合成、精製し、詳細な KDAC アイソザイム選択性を調べる。

4. 研究成果

上記の 2-アミノアニリド化合物ライブラリーの構築、速度論的酵素阻害活性評価、ヒット化合物のアイソザイム選択性評価により、時間依存的に酵素反応の遷移状態を安定化しアイソザイム選択的阻害活性を示す化合物を見出した (図 4)。

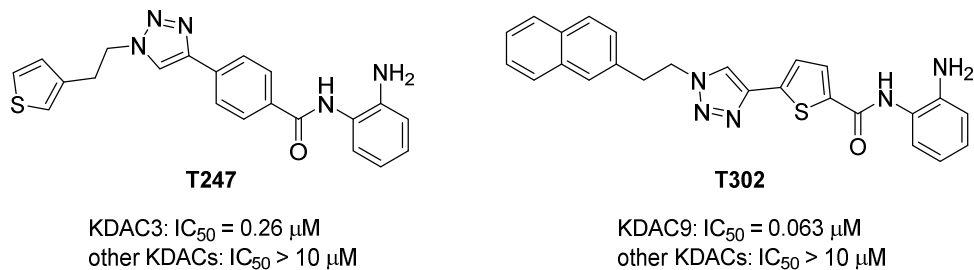


図 4. 本研究で見出した酵素反応の遷移状態を時間依存的に安定化するアイソザイム選択的 KDAC 阻害剤

これらの KDAC 阻害剤は、計算化学により、アイソザイムの酵素反応の遷移状態を安定化し、高いアイソザイム選択性を発揮することが示された (Tsukamoto, S. *et al. J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 125102.)。また、薬理試験の結果、これらのアイソザイム選択的 KDAC 阻害剤は、記憶力増強効果など、高い薬理活性を示すことも明らかになった (Uchida, S. *et al. Cell Rep.* **2017**, *18*, 352–366.)。

以上、本研究により、酵素反応の遷移状態構造を考慮することにより、将来の医薬品につながる阻害剤の創製が可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Diaz-Perdigon Teresa, Belloch Francisco B., Ricobaraza Ana, Elboray Elghareeb E., Suzuki Takayoshi, Tordera Rosa M., Puerta Elena	4. 巻 45
2. 論文標題 Early sirtuin 2 inhibition prevents age-related cognitive decline in a senescence-accelerated mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 347 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-019-0503-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yeong Keng Yoon, Khaw Kooi Yeong, Takahashi Yukari, Itoh Yukihiro, Murugaiyah Vikneswaran, Suzuki Takayoshi	4. 巻 94
2. 論文標題 Discovery of gamma-mangostin from Garcinia mangostana as a potent and selective natural SIRT2 inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 103403 ~ 103403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2019.103403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Endo Kyoko, Kito Hiroaki, Tanaka Ryo, Kajikuri Junko, Tanaka Satoshi, Elboray Elghareeb E., Suzuki Takayoshi, Ohya Susumu	4. 巻 21
2. 論文標題 Possible Contribution of Inflammation-Associated Hypoxia to Increased K2P5.1 K+ Channel Expression in CD4+ T Cells of the Mouse Model for Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mellini Paolo, Itoh Yukihiro, Elboray Elghareeb E., Tsumoto Hiroki, Li Ying, Suzuki Miki, Takahashi Yukari, Tojo Toshifumi, Kurohara Takashi, Miyake Yuka, Miura Yuri, Kitao Yuki, Kotoku Masayuki, Iida Tetsuya, Suzuki Takayoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Identification of Diketopiperazine-Containing 2-Anilinobenzamides as Potent Sirtuin 2 (SIRT2)-Selective Inhibitors Targeting the "Selectivity Pocket", Substrate-Binding Site, and NAD+-Binding Site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 5844 ~ 5862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b00255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木孝禎	4. 巻 31
2. 論文標題 エビゲノム修飾薬	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 74-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shuichiro Tsukamoto, Yoshitake Sakae, Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki and Yuko Okamoto	4. 巻 148
2. 論文標題 Computational Analysis for Selectivity of Histone Deacetylase Inhibitor by Replica-Exchange Umbrella Sampling Molecular Dynamics Simulations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 125102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5019209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Syouchi Katayama, Atsushi Morii, Juliet O. Makanga, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata and Tetsuya Inazu	4. 巻 498
2. 論文標題 HDAC8 regulates neural differentiation through embryoid body formation in P19 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Marek, T. B. Shaik, T. Heimburg, A. Chakrabarti, J. Lancelot, E. Ramos-Morales, C. Da Veiga, D. Kalinin, J. Melesina, D. Robaa, K. Schmidtkunz, T. Suzuki, R. Holl, E. Ennifar, R. J. Pierce, M. Jung, W. Sippl and C. Romier	4. 巻 61
2. 論文標題 Structural basis of HDAC8 selective inhibition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 10000-10016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.8b01087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shigeki Saito, Yan Zhuang, Takayoshi Suzuki, Yosuke Ota, Marjorie E. Bateman, Ala L. Alkhatib, Gilbert F. Morris and Joseph A. Lasky	4. 巻 316
2. 論文標題 HDAC8 inhibition ameliorates pulmonary fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology	6. 最初と最後の頁 L175-L186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00551.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shusaku Uchida, Brett J.W. Teubner, Charles Hevi, Kumiko Hara, Ayumi Kobayashi, Rutu M. Dave, Tatsushi Shintaku, Pattaporn Jaikhan, Hirota Yamagata, Takayoshi Suzuki, Yoshifumi Watanabe, Stanislav S. Zakharenko, Gleb P. Shumyatsky	4. 巻 18
2. 論文標題 CRTC1 Nuclear Translocation Following Learning Modulates Memory Strength via Exchange of Chromatin Remodeling Complexes on the Fgf1 Gene	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 352-366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2016.12.052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Peng Zhan, Xueshun Wang, Xinyong Liu, Takayoshi Suzuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Medicinal Chemistry Insights into Novel HDAC Inhibitors: An Updated Patent Review (2012-2016)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Recent Patents Anticancer Drug Discovery	6. 最初と最後の頁 16-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1574892811666161101102842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takayoshi Suzuki
2. 発表標題 Discovery of Epigenetic Inhibitors Using Target-Guided Synthesis
3. 学会等名 The 4th Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayoshi Suzuki
2. 発表標題 Chemical Control of Epigenetics-Discovery of Histone Lysine Demethylase Inhibitors and Histone Deacetylase Inhibitors-
3. 学会等名 Lecture in Global Frontiers in Life Science A, Kyoto University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayoshi Suzuki
2. 発表標題 Chemical Control of Epigenetics for the Treatment of Cancers and Neurological Disorders
3. 学会等名 The 27th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayoshi Suzuki
2. 発表標題 Chemical Control of Epigenetics for the Treatment of Diseases
3. 学会等名 ICPAC Langkawi 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木孝禎
2. 発表標題 エピジェネティクス制御に基づいた創薬研究
3. 学会等名 京都工芸繊維大学昆虫先端研究推進拠点シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木孝禎
2. 発表標題 ヒストンアセチル化/メチル化を標的とした創薬研究
3. 学会等名 千葉大学 再生システムと疾患・癌エピゲノム公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayoshi Suzuki
2. 発表標題 Discovery of isozyme-selective lysine demethylase inhibitors and deacetylase inhibitors
3. 学会等名 AIMECS2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木孝禎
2. 発表標題 エピジェネティクスを標的とした創薬研究
3. 学会等名 Kyoto University MIC/SK-Project Seminar (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木孝禎
2. 発表標題 化学の力で難治性疾患に挑む ~エピジェネティクス創薬化学~
3. 学会等名 第6回CSJ化学フェスタ2016 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木孝禎
2. 発表標題 エピジェネティクス制御因子阻害剤の創製とその応用
3. 学会等名 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会 合同年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 炎症性腸疾患処置剤	発明者 長谷耕二、高橋大輔、鈴木孝禎、黒原崇、上田聡、田中	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-064635	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤	発明者 鈴木孝禎、伊藤幸裕、東條敏史、内田周作	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-08464	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪大学産業科学研究所 複合分子化学研究分野 https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/cmc/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------