

## 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6月13日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603004

研究課題名（和文）天然物の活性母核構造（fragment）を基盤とした新規生理活性分子の創出

研究課題名（英文） Creation of novel bioactive agents on the basis of fragment evolution approach of natural products

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

研究成果の概要（和文）：ほ乳類動物の中樞神経系のシナプス受容体に作用するリガンド化合物の開発は、複雑な脳機能を分子レベルで理解し制御するためにきわめて重要である。本研究ではイオンチャンネル型グルタミン酸受容体のサブタイプである AMPA 受容体を特異的に阻害する IKM-159 を見だし、その構造活性相関を合成化学的に展開した。その結果、(2R)-体がその活性を担うことを明らかにし、さらに GluA2 二量体との複合体の結晶構造およびそれらの相互作用を X 線結晶構造解析により明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Development of novel ligands, that specifically interact with receptors located at synapses of mammalian nervous system, is important to understand and control complex brain functions at a molecular level. We had synthetically developed IKM-159 as a specific AMPA receptor antagonist, and in the present study, the structure-activity relationships have been extensively studied. As a result, we found that (2R)-IKM159 is neuronally active, whereas the (2S)-isomer is inactive. Furthermore, the interactions with GluA2 subunit have been clarified by X-ray crystallography of (2R)-IKM159 in complex with GluA2 dimer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：グルタミン酸受容体・リガンド・fragment evolution・天然物

## 1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネル型グルタミン酸レセプター（iGluR）は、脊椎動物の中樞シナプスの神経伝達において中心的な役割を担い、痛みの伝達や、テンカンなどの脳疾患に関わると考えられるため、創薬ターゲットとして注目されている。研究分担者の酒井はマイクロネシ

ア産海綿より iGluR の選択的作動薬であるダイシハーベイン（DH）を見出し、それを用いて研究協力者の Swanson と共同でカイニン酸型受容体の生物機能を明らかにしてきた。しかしながら、iGluR は 20 種のサブタイプタンパク質が知られている構造・機能共に極めて多様性の高い受容体であるため、DH および

そのアナログだけではその生物機能を網羅的に研究することはできない。その点に着目し、研究代表者の及川は DH やカイニン酸の構造を起点に、多様な構造を有する人工 Glu アナログ類の化学合成を独自性の高い方法で行った。酒井（研究分担者）がそれらの生物活性を評価したところ、マウスの自発的行動を抑制する化合物（IKM-159）を見出した。また Swanson（研究協力者）は IKM-159 が培養海馬神経細胞の自発的興奮性シナプス電流を抑制することも見出している。これは IKM-159 の分子標的が iGluR である可能性を示唆するものであった。

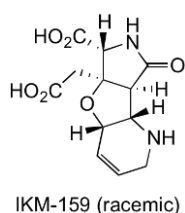


図 1 AMPA 受容体阻害剤 IKM-159

## 2. 研究の目的

そこで本研究では IKM-159 をはじめとする Glu アナログの構造活性相関に関するデータを取得し、それをもとに構造最適化を合成化学的に行って、①活性を担う部分構造を明らかにする、②分子標的を明らかにしてその相互作用を明らかにする、③活性強度を IKM-159 の 100 倍程度にまで向上させる、ことを目的としている。そのため、異なる背景の四者（及川、酒井、Swanson、Kastrup）が学際的に協力し合う、人工活性化合物の基礎開発研究としては希有で独創的な体制により研究を進める。

## 3. 研究の方法

この目的を達成するため、創薬分野において注目され始めた fragment evolution (FE) 法の適用を本研究は最大の学術的特色とする。一般に FE 法では、分子標的（本研究では iGluR）にしっかり結合したひとつの

fragment（本研究の場合は IKM-159）を出発点として、相互作用ポケット周辺のいまだ使われていない空間を占有しうる構造修飾を施して進化発展（evolution）させる。すなわち本研究は天然物化学と有機合成化学、さらに FE 法を有機的に結び付けたきわめて独創性の高い、高結合性人工リガンドの創製を軸としたケミカルバイオロジー研究である。

## 4. 研究成果

本研究では組み替えタンパク質を用いた結合試験と電気生理学試験を *in vitro* アッセイとして Swanson（研究協力者）がさらにを行い、IKM-159 は iGluR のサブタイプである AMPA 受容体のうち GluA1/GluA2 および GluA4 を特異的に阻害することを明らかにするこ

とができた。

このように IKM-159 の生物機能は極めて興味深い、上述の結果だけでは *in vitro* と *in vivo* の活性を結びつけることはできない。しかし GluA2 二量体に IKM-159 ラセミ体を作らせて得られる複合体の X 線結晶構造解析を Kastrup（研究協力者）が行ったところ、結合するのは (2R)-体であることが判明した（詳細は省略）。

すでに私たちは Ugi 反応のアミン成分に光学活性体を用いることによって様々な人工アミノ酸の不斉合成が可能になることを見出している（図 2）。この方法を用いて IKM-159

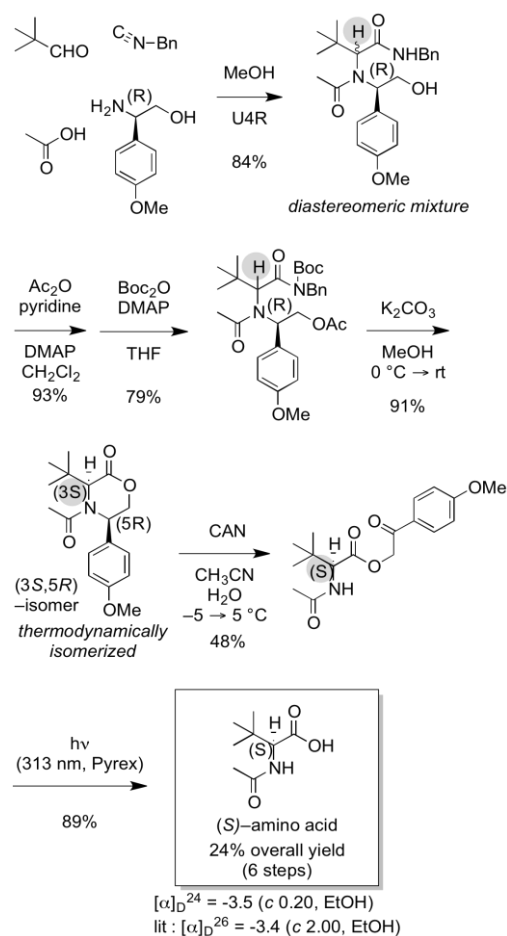


図 2 Ugi 反応によるアミノ酸合成法

の不斉合成を行ったところ、確かに (2S)-体には活性がなく、(2R)-体が活性であることを *in vivo* アッセイで明らかにすることができた（図 3）。「(2R)-IKM159 は AMPA 受容体をサブタイプ選択的に阻害し、その結果マウスは自発的行動の抑制を受ける」と言って良いと考えられる。すなわち (2R)-IKM159 は AMPA 受容体 (GluA1/GluA2 および GluA4) が 50 分～数時間にわたってノックダウンされたマウスを作り出すことのできる化合物である。また、グルタミン酸やカイニン酸、ダイシハ

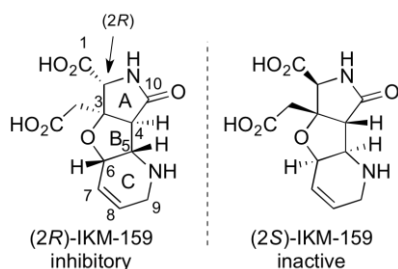


図3 光学活性 IKM-159 の生物活性

ーベインなど、天然由来のいわゆる興奮性アミノ酸はいずれも (2S) の立体配置を有する。IKM-159 においては (2R)-体が活性を担っており、X 線結晶構造解析で明らかになっている GluA2 との相互作用は、(2R)-IKM159 が親化合物であるカイニン酸やその他の興奮性アミノ酸と同じ結合ポケットに入っているながらも、その様式は異なっていることを示していた。さらなる合成化学的展開により AMPA 受容体に対する新たなリガンドグループが開発できるかもしれない。AMPA 受容体への特異的なリガンドは、イオンチャネルのゲーティングに関する分子基盤の確立にもつながるため、開発を継続してゆく予定である。

#### 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9件)

- ① 【査読あり】 M. Oikawa, M. Ikoma, M. Sasaki, M. B. Gill, G. T. Swanson, K. Shimamoto, R. Sakai, Improved synthesis and in vitro/in vivo activities of natural product-inspired, artificial glutamate analogs. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 3795-3804. DOI:10.1016/j.bmc.2010.04.044.
- ② 【査読あり】 M. B. Gill, S. Frausto, M. Ikoma, M. Sasaki, M. Oikawa, R. Sakai, G. T. Swanson, A series of structurally novel heterotricyclic  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptor-selective antagonists. *Br J Pharmacol* 2010, 160, 1417-1429. DOI:10.1111/j.1476-5381.2010.00784.x.
- ③ 【査読あり】 M. Oikawa, M. Ikoma, M. Sasaki, M. B. Gill, G. T. Swanson, K. Shimamoto, R. Sakai, Regioselective Domino Metathesis of Unsymmetrical 7-Oxanorbornenes with Electron-rich Vinyl Acetate toward Biologically Active Glutamate Analogues. *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 2009, 5531-5548. DOI:

10.1002/ejoc.200900580.

- ④ 【査読あり】 M. Ikoma, M. Oikawa, M. Sasaki, Chemospecific Allylation and Domino Metathesis of 7-Oxanorbornenes for Skeletal and Appendage Diversities. *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 2009, 72-84. DOI: 10.1002/ejoc.200800781.

〔学会発表〕(計35件)

- ① 及川雅人, 中枢神経シナプス受容体に作用する化合物の合成化学的展開, 静岡県立大学 薬学部, 日本薬学会東海支部 特別講演(静岡), 2012年1月19日.
- ② 及川雅人, 合成化学による神経生理活性化合物の開発, 北海道大学 大学院地球環境科学研究院(札幌), 2012年1月13日.
- ③ 及川雅人, 神経生理活性化合物の合成化学, 北海道大学 大学院水産科学研究院(函館), 2012年1月10日.
- ④ 及川雅人, 神経生理活性化合物の合成化学的開発と展開, 大阪市立大学重点研究シンポジウム「天然物分子科学研究の最前線」(大阪), 2011年9月30日.
- ⑤ 及川雅人, 中枢神経系の受容体に特異的に作用する海洋天然物および類縁体の合成研究, 山田科学振興財団 2011年度研究交歓会(東京), 2011年5月28日.
- ⑥ 及川雅人, 有機合成からケミカルバイオロジーへ ~多様性指向型有機合成法による神経生理活性化合物の開発~, 三井化学講演会(袖ヶ浦), 2011年1月14日.
- ⑦ 及川雅人, 天然物にヒントを得たグルタミン酸受容体リガンドの創製, 藪田セミナー(札幌), 2010年6月18日.
- ⑧ 及川雅人, 天然物の構造をモチーフとした合成化学的展開とケミカルバイオロジー, 早稲田大学総合研究機構ケミカルバイオロジー研究所 第2回シンポジウム(東京), 2009年12月25日.
- ⑨ 及川雅人, 合成化学とケミカルバイオロジー: 中枢神経系受容体に作用する小分子の開発を例に, 生体機能関連化学若手の会 第21回サマースクール(京都), 2009年7月13-14日.

〔図書〕(計6件)

- ① 及川雅人, 天然物合成化学とライフサイエンス, 生命化学研究レター, No. 38, p. 10-16, 2012.
- ② 及川雅人, 多様性指向型ワンポット合成と神経生理活性化合物への展開, 月刊ファインケミカル, Vol. 39, No. 4, p. 29-41, 2010.

[その他]  
研究室ホームページ  
<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・生命ナノシステム科学研究  
科・教授  
研究者番号：70273571

### (2) 研究分担者

酒井 隆一 (SAKAI RYUICHI)  
北海道大学・水産科学研究院・教授  
研究者番号：20265721