

## 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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590059

研究課題名（和文）イミノ糖によるタンパク質プロセッシングの制御と作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Inhibition activities of iminosugars against glycoprotein processing.

研究代表者

足立 伊左雄（ISAO ADACHI）

富山大学・大学病院・教授

研究者番号：30151070

研究成果の概要（和文）：

D-DGJ が、 $\alpha$ -gal A の競合的な阻害剤として作用することに着目し、我々は、その鏡像異性体である L 型 DGJ の生理活性について検討を行った。D-DGJ (5  $\mu$ M) または L-DGJ (1000  $\mu$ M) 添加により、有意な酵素活性の低下抑制作用が認められた。さらに両化合物は、R301Q 変異繊維芽細胞においてもファーマコロジカルシャペロンとして機能し、 $\alpha$ -gal A 活性を顕著に上昇させることが確認出来た。更に合成例が乏しく、また阻害予測が非常に難しい D 型および L 型アゼチジン型イミノ糖の阻害活性を中心に検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

We studied the concise synthesis of DGJ and L-DGJ from L- and D-tagatose respectively in just four steps, and shows the value of the enantiomers of tagatose as chirons. As with other  $\alpha$ -galactosidases L-DGJ was found to be an inhibitor of  $\alpha$ -Gal A, about 1000-fold weaker than its enantiomer DGJ. L-DGJ was also found to be a chaperone for  $\alpha$ -Gal A, again about 1000 times less active than DGJ. Non-competitive inhibition by L-DGJ is consistent with binding at a different site than DGJ which shows competitive inhibition and binds at the active site. While the inhibition of the same glycosidase by both enantiomers of an iminosugar is well-known, this is the first example of enantiomeric iminosugars acting as synergistic pharmacological chaperones for misfolded proteins; this result may indicate that binding at the active site of the enzyme is not necessary. There are many hundreds of pyrrolidine, piperidine and azepane sugar mimics but azetidines are only just beginning to be studied. There are few examples of carbohydrate-derived azetidines, although the properties of hydroxyazetidines are of current interest. *N*-Alkyl hydroxyazetidines are potent inhibitors of purine nucleoside phosphorylase with subnanomolar *K<sub>i</sub>*. We studied the synthesis of an azetidine analogue of 6,7-diepicastanospermine and compares its glycosidase activity also with D-altronojirimycin.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2012 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：イミノ糖、グリコシダーゼ、光学異性体、リソソーム病、シャペロン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、世界的研究競争の中でもタンパク質の翻訳後修飾の機能を解明することが極めて重要な課題の一つとなっている。タンパク質が必要な場所で必要な時に正しい機能を発揮することを制御しているのは、様々な形で行われる翻訳後修飾のおかげである。翻訳後修飾では遺伝子に直接コードされている情報だけではなく、糖加水分解酵素（グリコシダーゼ）や糖転移酵素（トランスフェラーゼ）の連続的な反応が重要な役割を担っている事が示されている。このような、直接的には遺伝情報に依存しない翻訳後修飾を解明するためには、糖タンパク質や糖脂質における糖鎖の機能を詳細に研究することが重要である。さらに、これら糖鎖の形成・修飾に深く関与しているグリコシダーゼおよびトランスフェラーゼを制御する化合物を用いることで細胞生物学的な観点だけにとどまらず疾患の発症メカニズムの解明や効果的な疾患検査法の確立といった応用研究を大幅に進展させることも可能になる。

## 2. 研究の目的

糖の構造を擬態したイミノ糖は、糖質の加水分解や糖鎖プロセッシングに関与する一連のグリコシダーゼあるいは糖脂質生合成に関与する糖転移酵素を阻害することから、広範囲にわたる医薬品シーズとして注目が集まっている。これまでにピペリジン型イミノ糖の誘導体であるミグリトール (*N*-hydroxyethyl-DNJ) が、糖尿病治療薬として臨床応用されており、また 2012 年には、ザベスカ (*N*-butyl-DNJ) がニューマン・ピック病治療薬として、国内販売が開始された。私どもの研究室でも、これまでピペリジン型イミノ糖の水酸基の配位と阻害活性スペクトルの変化について継続的に研究を行っており、その研究成果として強力かつ選択的な $\beta$ -グルコセレブロシダーゼや $\alpha$ -ガラクトシダーゼ阻害剤のデザインに成功している。これら、従来までのイミノ糖をシーズとした医薬品開発研究では、D-グルコースや D-ガラクトースなど、D 型ピラノース環構造を忠実に擬態した D 型ピペリジン型イミノ糖が用いられており、非天然型の L 型イミノ糖には、ほとんど研究の焦点が当てられていない。このような背景のもと、我々は L 型ピペリジン型イミノ糖が、天然型の D 型を上まわる $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示すことを見いだした。そこで、本研究課題では、これら非天然型の L 型イミノ糖に焦点を当てた研究を展開することにより世界で初めての独創的な成果を上げることが目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) イミノ糖の合成

L-イミノ糖の効率的な合成を行うとともに、同時に反応中間体、生成物など一連の化合物を用いて cell-free 系にて各種グリコシダーゼおよびトランスフェラーゼに対する作用を系統的に解析する。本研究課題では特定の生物活性を有する天然有機化合物を合成することを考慮し、「経済的で簡便な調製」と「高い変換機能」を併せ持つ共通のキラル合成素子の開発を行った。これにより、目的とする化合物群の極めて効率的で柔軟性に富んだ合成法を提供が可能になった。

### (2) 糖尿病に対する化合物のデザイン：

ラット小腸から $\alpha$ -グルコシダーゼ（マルターゼ、イソマルターゼ、スクラーゼ）および $\beta$ -グリコシダーゼ（セロビアーゼ、ラクターゼ）を調製し、合成した L 型イミノ糖の活性評価を行った。 $\alpha$ -グリコシダーゼに対し、強力な阻害活性が認められた化合物を選択し、*N*-アルキル化、*C*-アルキル化あるいは配糖体化などにより、更なる活性の向上を目指した。

## 4. 研究成果

(1) イミノ糖は、単糖ピラノース環内の酸素原子が、窒素原子に置き換わった構造を有しており、各種グリコシダーゼを阻害することから低分子医薬品の候補化合物として注目を集めている。本研究課題では、従来までの D 型イミノ糖だけでなく L 型イミノ糖の有用性を見だし、医薬品応用の可能性を模索することを目的としている。本年度は、ピペリジン型イミノ糖である 1-deoxygalactonojirimycin (DGJ) の生理活性に着目した。D-DGJ は、 $\alpha$ -gal A の競合的な阻害剤として見出された化合物であるが、その強力な親和性から、活性中心に結合することで変異 $\alpha$ -gal A タンパクの失活を最小限に抑えるファーマコロジカルシャペロンとしても機能する。そこで我々は、非天然型である L 型イミノ糖の生理活性を、酵素への阻害活性及び親和性に基づくシャペロン活性の両側面から検討を行った。L 型イミノ糖は D 型同様に各種リソソーム酵素に対して親和性を示したが、その効果は D 体の約 1/1000 程度であった。 $\alpha$ -gal A に対する阻害様式を Lineweaver-Burk plots により検討したところ D-DGJ は $\alpha$ -gal A に対し競合的に、L 体は非競合的に作用していることが明らかになった。次に、熱刺激からのタンパク保護作用について検討を行った結果、化合物非添加時と比較して、D-DGJ (5  $\mu$ M) または L-DGJ (1000  $\mu$ M) 添加により、有意な酵素活性の低下抑制作用が認められた。さらに両化合物は、R301Q 変異繊維芽細胞においてもファーマコロジカルシャペロンとして機能し、 $\alpha$ -gal A 活性を顕

著に上昇させることが確認出来た。

(2) 合成例が乏しく、また阻害予測が非常に難しいアゼチジン型イミノ糖の生理活性に着目し、D型およびL型イミノ糖の酵素への阻害活性を中心に検討を行った。まず最初にD-およびL-リボースから1,3-dideoxy-1,3-imino-L-xylitol および1,3-dideoxy-1,3-imino-D-xylitolの両エナンチオマーを導いた。さらに構造活性相関を検討する目的でazet-DABおよびazet-LABの両エナンチオマーをD-およびL-アラビノースから導いた。これら4種のアゼチジン型イミノ糖の各種グリコシダーゼに対する阻害活性を検討したところ、1,3-dideoxy-1,3-imino-L-xylitolは、*A. niger*および*Rhizopus sp.*由来アミログルコシダーゼに対して、それぞれIC<sub>50</sub>値が414μMおよび25μMの阻害を示す選択的な阻害剤であった。一方、1,3-dideoxy-1,3-imino-D-xylitolは、アミログルコシダーゼをはじめ全てのグリコシダーゼに対し全く阻害を示さなかった。azet-LABは、*A. niger*由来α-グルコシダーゼ、ラット小腸由来ラクターゼおよび*Rhizopus sp.*由来アミログルコシダーゼに対してそれぞれIC<sub>50</sub>値が39μM、70μMおよび19μMと比較的強い阻害を示した。azet-DABでは、阻害活性が低下する傾向が認められたが、逆にα-マンノシダーゼに対して唯一阻害を示した。本研究から、これまで生理活性の報告がほとんどなかったアゼチジン型イミノ糖においても、取り得る立体配置により種々のグリコシダーゼに対する阻害を制御できる可能性が示された。

(3) 現在、イミノ糖をベースとした医薬品開発が盛んに行われているものの、その多くはピペリジン型イミノ糖であり、アゼチジン型イミノ糖の合成及び生物活性に関する知見は非常に少ない。一方で、N-アルキルヒドロキシアゼチジンが purine nucleoside phosphorylase に対し、nMオーダーの強力な阻害を示すことも報告されており、医薬品素材としての可能性は高いと考えられる。新たな活性を持つアゼチジン型イミノ糖のデザインを目的として 6,7-diepicastanospermine のアゼチジンアナログである tetrahydroxyconidine を L-arabinose を出発原料として合成した。インドリチジン型イミノ糖である 6,7-diepicastanospermine は、fungal 由来 α-glucosidase および *A. niger* 由来 amyloglucosidase に対し、80μM と中程度の阻害を示したのに対し、今回合成した tetrahydroxyconidine は、*Rhizopus sp.* 由来 amyloglucosidase およびラット小腸 lactase に対し、IC<sub>50</sub> 値が 532 および 418μM の阻害を示した。Tetrahydroxyconidine は、構造的にピペリジン型イミノ糖である *altro-DNJ* とアゼチジ

ン型イミノ糖である azet-LAB の両者が結合した二環性のアミンと見なすことができる。そこで、これらとの活性を比較したところ、azet-LAB は、*A. niger* 由来 α-glucosidase、ラット小腸由来 lactase および *Rhizopus sp.* 由来 amyloglucosidase に対し、IC<sub>50</sub> 値がそれぞれ 39、70 および 19μM の阻害を示した。対照的に *altro-DNJ* は、これら酵素に対して全く阻害を示さないものの bovine kidney 由来 α-L-fucosidase を阻害した (IC<sub>50</sub> 値=194μM)。以上に結果から、今回新たにデザインしたアゼチジンアナログである tetrahydroxyconidine は、従来までの単環性イミノ糖とは異なるスペクトルを持つ事が示された。

#### 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 6 件)

- ① Kato, A., Hayashi, E., Miyauchi, S., Adachi, I., Imahori, T., Natori, Y., Yoshimura, Y., Nash, R.J., Shimaoka, H., Nakagome, I., Koseki, J., Hirono, S., Takahata, H. : α-1-C-Butyl-LAB as a second-generation iminosugar-based oral α-glucosidase inhibitor for improving postprandial hyperglycemia. *J. Med. Chem.* 55 (23) 10347-10362, 2012, 査読有.
- ② Araujo, N., Jenkinson, S. F., Martínez, R. F., Glawar, A. F. G., Wormald, M. R., Butters, T. D., Nakagawa, S., Adachi, I., Kato, A., Yoshihara, A., Akimitsu, K., Izumori, K., Fleet, G. W. J. : Synthesis from D-altrose of (5*R*,6*R*,7*R*,8*S*)-5,7-dihydroxy-8-hydroxymethylconidine and 2,4-dideoxy-2,4-imino-D-glucitol, azetidines analogues of swainsonine and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-mannitol. *Org. Lett.* 14 (16) 4174-4177, 2012, 査読有.
- ③ Natori, Y., Kikuchi, S., Yoshimura, Y., Kato, A., Adachi, I., Takahata, H. : Asymmetric synthesis of 1-alkyl-2-deoxyiminofuranoses via The iridium-catalyzed intramolecular cyclization of an allylic carbonate. *Heterocycles*, 86 (2) 1401-1417, 2012, 査読有.
- ④ Taguchi, T., Imahori, T., Yoshimura, Y., Kato, A., Adachi, I., Kawahara, M., Yamaguchi, K., Takahata, H. : Asymmetric synthesis of 2-propylisofagomine using allylic hydroxy group accelerated ring-closing enyne metathesis. *Heterocycles*, 84 (2), 929-944, 2012, 査読有.

- ⑤ Luo, B., Marcelo, F., Desire, J., Zhang, Y., Sollogoub, M., Kato, A., Adachi, I., Canada, F. Jimenez-Barbero, J., Blieriot, Y. : Synthesis, conformational analysis, and evaluation as glycosidase inhibitors of two ether-bridged iminosugars. *J. Carb. Chem.* 30 (7-9), 641-654, 2011, 査読有.
- ⑥ Jenkinson, S. F., Fleet, G. W. J., Nash, R. J., Koike, Y., Adachi, I., Yoshihara, A., Morimoto, K., Izumori, K., Kato, A. : Looking-glass synergistic pharmacological chaperones: DGJ and L-DGJ from the enantiomers of tagatose. *Org. Lett.* 13 (15) 4064-4067, 2011, 査読有.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 渡邊靖香、佐久間俊嘉、名取良浩、吉村祐一、佐藤香純、加藤 敦、足立伊佐雄、高畑廣紀 :  $\alpha$ -1-C-アルキル-D-アラビノイミノ糖誘導体の触媒的不斉合成とその生物活性 : 日本薬学会第 133 年会、2013. 3.28-3.30, 横浜
- ② 佐久間俊嘉、渡邊はるか、名取良浩、吉村祐一、中川進平、加藤 敦、足立伊佐雄、高畑廣紀 : 1-C-n-ブチル-L-イミノフラノース誘導体の触媒的不斉合成 : 日本薬学会第 133 年会、2013. 3.28-3.30, 横浜
- ③ 名取良浩、今堀龍志、吉村祐一、嶋田陽介、加藤 敦、足立伊佐雄、高畑廣紀 : C1 位に 4-アリールブチル基を導入した L-アラビノイミノ糖誘導体の不斉合成と生物活性評価 : 日本薬学会第 133 年会、2013. 3.28-3.30, 横浜
- ④ 足立伊佐雄、加藤 敦、林 恵利奈、中川進平、名取良浩、吉村祐一、高畑廣紀 : 次世代型イミノ糖である  $\alpha$ -1-C-alkyl-LAB の特性と生物活性について (第 1 報) : 日本薬学会第 133 年会、2013. 3.28-3.30, 横浜
- ⑤ 加藤 敦、林 恵利奈、足立伊佐雄、今堀龍志、名取良浩、吉村祐一、島岡秀行、中込 泉、小関 準、広野修一、高畑廣紀 : 次世代型イミノ糖である  $\alpha$ -1-C-alkyl-LAB の特性と生物活性について (第 2 報) : 日本薬学会第 133 年会、2013. 3.28-3.30, 横浜
- ⑥ 名取良浩、吉村祐一、高畑廣紀、嶋田陽介、加藤 敦、足立伊佐雄 : C1 位に 4-アリールブチル基を組み込んだ L-アラビノイミノフラノースの触媒的不斉合成と

生物活性評価 : 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム、2012. 11.5-11.6, 東京

- ⑦ 名取良浩、今堀龍志、吉村祐一、中川進平、加藤 敦、足立伊佐雄、高畑廣紀 : C1 位に 4-アリールブチル基を導入した L-アラビノイミノ糖誘導体の触媒的不斉合成 : 日本薬学会第 132 年会、2012. 3.29-3.31, 札幌
- ⑧ 名取良浩、今堀龍志、吉村祐一、中川進平、加藤 敦、足立伊佐雄、高畑廣紀 : C1 位アルキル-L-アラビノイミノフラノース誘導体の触媒的不斉合成とその生物活性 : 第 53 回天然有機化合物討論会、2011.9.27-9.29, 大阪
- ⑨ 坂 知樹、杉本健士、松谷裕二、中川進平、山下侑子、加藤 敦、足立伊佐雄、豊岡尚樹 : フコシダーゼ阻害活性が期待されるイミノ糖誘導体の合成研究 : 日本薬学会第 131 年会、2011. 3.29-3.31, 静岡
- ⑩ 名取良浩、今堀龍志、吉村祐一、中川進平、加藤 敦、足立伊佐雄、高畑廣紀 : C1 置換 L-アラビノイミノ糖誘導体の触媒的不斉合成 : 日本薬学会第 131 年会、2011. 3.29-3.31, 静岡
- ⑪ 小池有理子、加藤 敦、足立伊佐雄、石井 達 : Pharmacological chaperone 活性を有する L 型イミノ糖の可能性について : 第 83 回日本生化学会大会、2010.12.7-12.10, 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

足立 伊左雄 (ISAO ADACHI)  
富山大学・大学病院・教授  
研究者番号 : 30151070

### (2) 研究分担者

高畑 廣紀 (HIROKI TAKAHATA)  
東北薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 00109109

加藤 敦 (ATSUSHI KATO)  
富山大学・大学病院・准教授  
研究者番号 : 60303236