

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659049
 研究課題名（和文）細胞内 Ca 動員系活性化によるインスリン分泌機序の解析と糖尿病治療薬創製
 研究課題名（英文）Investigation of the mechanism of insulin secretion via Ca²⁺-mobilization toward development of novel anti-diabetes
 研究代表者
 周東 智 (SHUTO SATOSHI)
 北海道大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：70241346

研究成果の概要（和文）：cADPR (1) Ca²⁺動員を担うセカンドメッセンジャーである cADPR (1) は非常に不安定であるので、申請者が先に開発した cADPR の安定等価体である炭素環アナログ cADPcR (cADPR, 2) をプロトタイプとして、ADPR 標的タンパク質同定のためのバイオリジカルツールの創出を目指した。バイオリジカルツールを創出する上での鍵化合物として 4'' α -アジド cADPcR (3) を設計し、その合成を達成した。さらに、3 が望みの生物学的機能を有することを確認した。

研究成果の概要（英文）：As the key molecule to develop effective biological tools for the identification of target proteins of cADPR in cells, 4'' α -aziceethyl-cADPcR (3) was designed and successfully synthesized. 4'' α -Azidoethyl-cADPcR (3) was shown to be biologically active as we expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計

1. 研究開始当初の背景

cADPR (1) は新しく同定された細胞内の Ca²⁺動員を担うセカンドメッセンジャーであり、従来より知られているセカンドメッセンジャーであるイノシトールトリスリン酸

(IP₃) よりも強い Ca²⁺動員活性を示す (Cyclic ADP-ribose and NAADP: Structures, Metabolism and Functions; Lee, H. C. Ed. 2002)。1993年岡

本らによって、cADPRが膵臓 β 細胞からのインスリン分泌を促すことを示唆する先駆的な研究成果が報告された(H. Okamoto et al., *Science* **1993**, 259, 370)。さらに、cADPRの合成酵素であるCD38の遺伝子欠損マウスでは膵臓からのインスリン分泌が減少すること (I. Kato et al., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 30045) や、糖尿病モデルマウスの β 細胞ではCD38発現レベルが極端に低下していること (S.

Takasawa et al. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273,2497) 等の様々な知見から、cADPRがインスリン分泌のセカンドメッセンジャーであることが示された。しかし、cADPRのインスリン分泌機序としては、次項図2に示すような、CD38によるNADからのcADPR合成→FK506-結合蛋白質 (FKBP12.6) の活性化→リアノジン受容体 (LyR) からのCa²⁺動員→インスリン分泌という仮説が提唱されているものの (例えば、W. X. Tang et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2002**, 28, 2H1304)、否定的な報告 (例えば、J. Xlao, et al., *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 34828) もあって、真実の解明が待たれている。

申請者は従来よりcADPR関連の創薬化学研究に取り組み (例えば、*J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8750; *Biochemistry* **2002**, 41, 6744; *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4741; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8846)、cADPRが極めて不安定であることを踏まえ、その安定等価体として炭素環類縁体であるサイクリックADP-カーボサイクリックリボース (cADPcR, **2**) を創出した。これら申請者独自の研究成果を基盤として、cADPRが関与するインスリン分泌機構の解明と創薬への展開が可能と考え、本課題を立案するに至った。

2. 研究の目的

Ca²⁺ 動員セカンドメッセンジャーであるサイクリック ADP-リボース (cADPR, 次項図 1, **1**) は、膵臓β細胞からのインスリン放出を促すことが知られている。本研究では、申請者が独自に開発した cADPR の安定等価体である炭素環アナログ cADPcR (cADPR, **2**) をプロトタイプとしてバイオリジカルツールを創出し、cADPR が関与するβ細胞におけるインスリン分泌機構解明に貢献する。

3. 研究の方法

本研究では、cADPR の安定等価体である cADPcR をリード構造として活用し、標的蛋白質同定のためのバイオリジカルツール (光標識プローブ) を開発する。

4. 研究成果

分子設計

以下に述べる理由から、4''α-アジド cADPcR (**3**) を設計した。

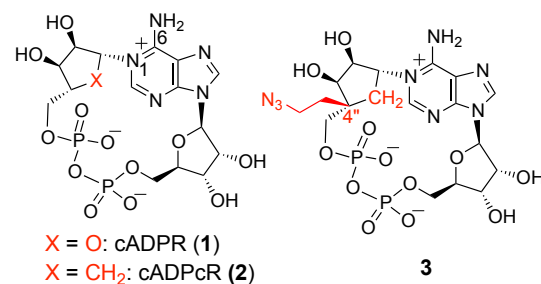


図1 cADPR (**1**), cADPcR (**2**), 4''α-N₃-cADPcR (**3**).

cADPcR (**2**) の三次元構造を分子動力学計算によって解析した結果 (図 2-b)、活性に重要と考えられるアミノ部およびピロリン酸部からその 4''α位が空間的に離れており、標的タンパク質による認識に関与しない可能性が推定された。また、この推論は、従来の cADPR 構造活性相関研究の結果とも矛盾しない。そこで、4''α位から側鎖を伸長して光反応性基あるいはビオチン基等を結合した標的分子同定用機能分子 (図 2-a) を合成することにした。その共通鍵前駆体として 4''α-アジド cADPcR (**3**) を設計した。4''α-アジド cADPcR (**3**) においては、そのアジド基の Huisgen 反応により様々な官能基を導入可能であり、標的分子同定用機能分子 (図 2-a) を合成する前駆体として好適であると推定した。

合成

4''α-N₃-cADPcR (**3**) を合成する上で鍵となるのは、4''位の第 4 級不斉炭素の立体選択的構築である。独自に開発したビニルシリル基をラジカル反

応によってその構築を計画した。

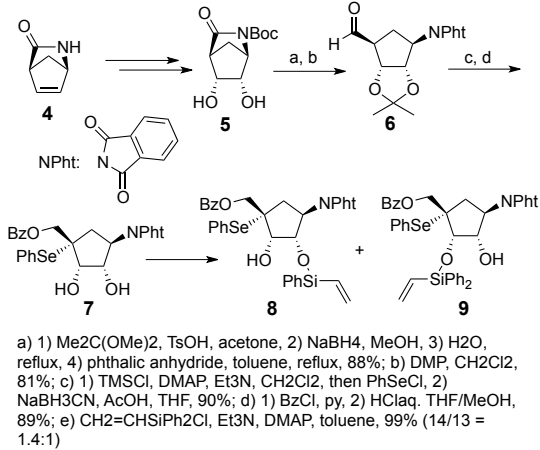
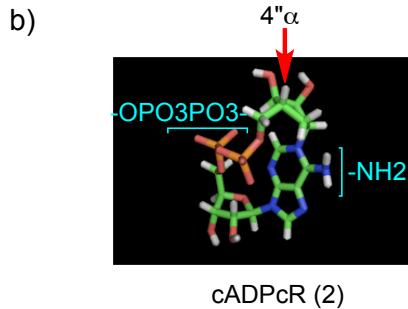
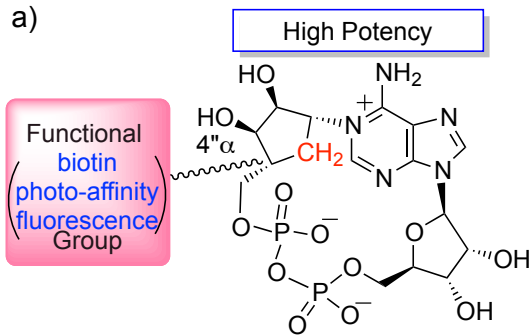


図3 ラジカル反応基質の合成

先ず、図3に示す経路を経てラジカル反応基質となる8と9の混合物を合成した。

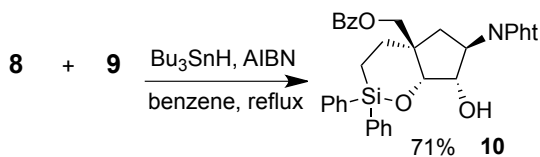
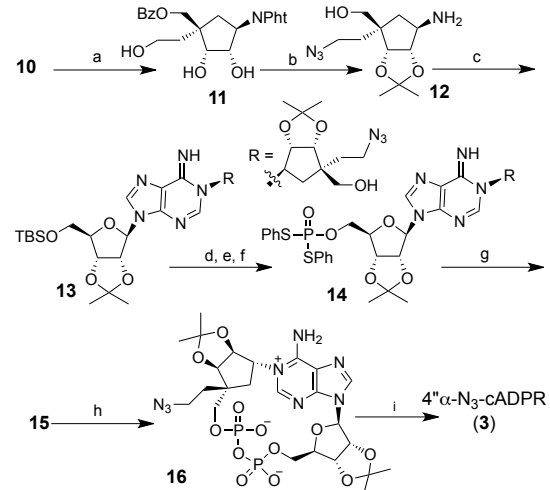


図4 鍵ラジカル反応による4級炭素の立

体選択的構築

そのラジカル反応を種々検討した結果、図4に示すように、目的の第4級不斉炭素を有する10の合成に成功した。



a) *m*-CPBA, DMF, 71%; b) 1) Me₂C(OMe)₂, TsOH, acetone, 2) TsCl, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂, 3) NaN₃, DMF, 4) H₂NNH₂·H₂O, EtOH, reflux, 64%; c) 8, K₂CO₃, DMF/THF, 69%; d) 1) DMTrCl, py, 2) TBAF, AcOH, THF, 64%; e) PSS, TPSCl, py, 69%; f) AcOH, CH₂Cl₂, 76%; g) 1) MeOPOCl₂, py, -30 °C, then TEAA buffer, 2) H₃PO₂, Et₃N, py, 0 °C - rt, 28%; h) AgNO₃, Et₃N, MS3A, py, 69%; i) 1) 60% HCO₂H, 2) 28% NH₃, quant.

図5 4'' α -アジド cADPcR (3) の合成

さらに、図5に示す経路により目的の4'' α -アジド cADPcR (3)を合成した。現在 Hüisgen 反応によるポオチン化を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

T. Tsuzuki, N. Sakaguchi, T. Kudoh, S. Takano, M. Uehara, T. Murayama, T. Sakurai, M. Hashii, H. Higashida, K. Weber, A. H. Guse, T. Kameda, T. Hirokawa, Y. Kumaki, B. V. L. Potter, H. Fukuda, M. Arisawa, S. Shuto, Design and Synthesis of Cyclic ADP-4-Thioribose as a Stable Equivalent of Cyclic ADP-Ribose, a Ca²⁺-Mobilizing Second Messenger. *Angew. Chem. Int. Ed.* 印刷中

〔学会発表〕(計 1件)

周東 智、Ca 動員セカンドメッセンジャーの化学 - 細胞内情報伝達系の創薬標的化を目指して -、産業総合

研究所・分子標的創薬セミナー、2000.12.6、産業
技術総合研究所生命情報工学研究センター（東京
都江東区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

周東 智 (SHUTO SATOSHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：70241346

(2) 研究分担者

嶋脇 健 (SHIMAWAKI KEN)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号：60451407

(2) 連携研究者

なし