

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410179

研究課題名(和文) 標的酵素の立体構造に基づく新型アルドース還元酵素阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of new types of aldose reductase inhibitors based on the structure of the target enzyme

研究代表者

齋藤 良太 (SAITO, Ryota)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：90327974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルドース還元酵素(ALR2)阻害剤は糖尿病合併症治療薬になり得る。これまでに様々なALR2阻害剤が開発されたが、副作用等によりそのほとんどが臨床試験段階で脱落している。本研究では、標的酵素の立体構造に基づいた分子デザインにより、新規ALR2阻害剤候補としてbotryllazine B類、プテリン-7-カルボキサミド類、GFP発色団モデルの3つのクラスを見出した。これらの何れにおいても酵素との特徴的な相互作用が観測され、かつ非常に高い阻害活性と副作用軽減の鍵となるLeu300との相互作用が観測された。従ってこれらの化合物群は副作用の少ない糖尿病合併症治療薬へと展開可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aldose reductase (ALR2) is associated with the onset of diabetic complications, and therefore ALR2 inhibitors has attracted attentions of medicinal chemists. Despite numerous devotions of the researchers, only one drug, epalrestat, has been launched on the market, and accordingly the development of new candidates for ALR2 inhibitors is still desired. The present work revealed that botryllazine B analogues possessing diverse substituted phenylcarbonyl groups on the 2-position and various fused bicyclic aromatic systems on the 6-position, pterin-7-carboxamides, and (Z)-4-arylmethylidene-1H-imidazol-5(4H)-ones (GFP chromophore model compounds) are highly potent ALR2 inhibitors. Docking simulations of these compounds also revealed that each of them exhibited specific interaction with ALR2. In conclusion, the compounds synthesized in this study have proved to be potential drugs for diabetic complications.

研究分野：複素環化学

キーワード：アルドース還元酵素阻害剤 ドッキングスタディ ピラジン プテリン GFP発色団モデル

## 1. 研究開始当初の背景

アルドース還元酵素 (ALR2) は糖尿病合併症の発症に関わる酵素であり、この ALR2 の阻害剤は糖尿病性合併症の治療薬と成り得る。これまでの研究から、スピロヒダントイン環やカルボキシ基を含む化合物群が高い ALR2 阻害活性を示すことがわかっているが、その殆どが毒性の発現や *in vivo* での効能が低いなどの理由により薬剤としての開発が断念され、現在治療薬として臨床で利用されているものは epalrestat (商品名: Kinedak) のみである。しかし、この epalrestat も、因果関係が否定できない重篤な肝機能障害が数多く報告されたことから、現在でも新しい ALR2 阻害剤の開発が強く望まれている。

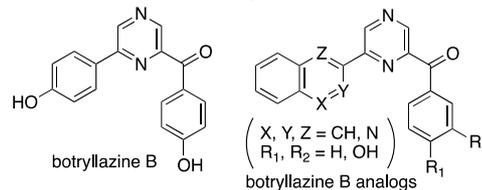
上記の問題点の多くは、阻害剤の構造そのものに起因する場合他に、ALR2 が属するケト-アルデヒド還元酵素スーパーファミリーの他の酵素との選択性の低さも一因であると指摘されている。とくに解毒に関わるアルデヒド還元酵素 (ALR1) に対する選択性は重要である。この選択性発現のためには、ALR2 に特有のアミノ酸残基 (Leu300) との相互作用が必要であると指摘されている。また Leu300 近傍の「特異的ポケット」や「疎水性ポケット」と呼ばれる部位との相互作用も重要であると指摘されており、これらの部位と特異的に結合する化合物の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

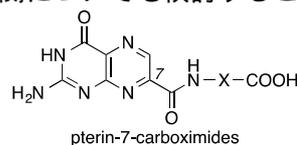
本研究は、上記の背景にもとづき、ALR2 との相互作用様式がこれまでの阻害剤とは異なり、かつ酵素選択性の高い新規糖尿病合併症治療薬の開発を主目的としている。

(1) 上記のとおり、スピロヒダントイン環やカルボキシ基を含む化合物には問題点があるため、これらを含まない新規 ALR2 阻害剤の開発は有意義である。これに対し著者は、ALR2 活性部位のアミノ酸残基が、オワンクラゲ発光タンパク質の発光基質認識部位と同じであることに着目した。そして、オワンクラゲ発光物質がフェノール性水酸基を介してタンパク質と相互作用していることから、フェノール性水酸基でも ALR2 の活性部位に結合できるのではないかと発想し、オワンクラゲ発光物質及びそれに類似したフェノール含有化合物を合成し、それらの ALR2 阻害能を評価した。その結果、アカホヤ由来の botryllazine B の誘導体群が、高い ALR2 阻害活性を有することを見出した。これらの化合物の阻害様式を酵素反応速度論的に調べたところ、競争阻害 - 反競争阻害混合型であることがわかった。従来阻害剤の阻害様式はすべて反競争阻害もしくは非競争阻害であることから、botryllazine B 類の阻害様式は従来阻害剤とは異なる新しいタイプであることがわかった。このことから、酵素への結合様式も従来阻害剤とは異なる可能性があるが、現時点では詳細は明らかになっ

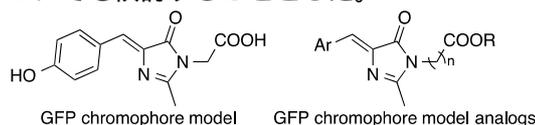
ていない。そこで、botryllazine B 誘導体ライブラリを増強し、それらの構造と ALR2 阻害活性との相関を精査することで、botryllazine B 類の酵素への結合様式を分子レベルで解明することを目的とした。



(2) これまでの研究から、高い ALR2 阻害活性を示すためには、ALR2 の触媒部位と強く結合するカルボキシル基を有し、かつ「疎水性ポケット」もしくは「特異的ポケット」と相互作用可能な部分構造として芳香環を分子内にあわせもつことが重要であると指摘されている。一方、著者らは最近毒性タンパク質 ricin の阻害剤として、ペプチドを含むプテリン-7-カルボキサミド類を合成し、プテリン環が ricin 活性部位の芳香族アミノ酸残基とπ-π相互作用し、さらにその周囲のアミノ酸と水素結合することで阻害活性を発現していることを報告した。このプテリン環の特性は、芳香族側鎖との相互作用が必要な ALR2 阻害剤の分子設計にも適用可能であると考えられるが、そのような検討がされたことはない。そこで、新規 ALR2 阻害剤開発の一環として、このプテリン環に着目し、種々のアミノ酸を導入した新規プテリン-7-カルボキサミド類を設計・合成し、これらが ALR2 阻害剤となり得るか明らかにすることを目的とした。また、側鎖の構造と ALR2 阻害活性との相関についても検討することとした。



(3) 現在知られている ALR2 阻害剤には、ヒダントイン環やチアゾリジン環などの五員環複素環を有する化合物が多く報告されている。一方、2006年に赤ホヤ由来イミダゾール含有化合物に弱いながら ALR2 阻害活性があることが報告された。しかしその後イミダゾール環含有 ALR2 阻害剤の報告例はない。そこで本研究では、新規 ALR2 阻害剤候補として、イミダゾール環を中心骨格とするオワンクラゲ緑色発光タンパク質 (GFP) 発色団モデル化合物に着目した。この構造は epalrestat に類似しており、ALR2 阻害活性を示すことが期待できるがそのような検討例はない。この天然由来 GFP 発色団モデルならびにその類似体を合成し、これらの ALR2 阻害活性を評価し、ALR2 との相互作用様式についても検討することとした。



### 3. 研究の方法

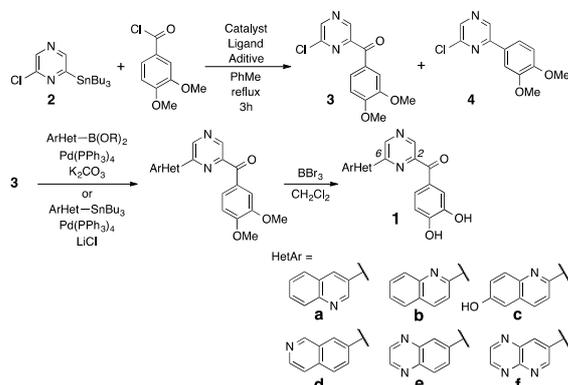
(1) botryllazine B 誘導体は著者らが開発した方法に従い合成する。次いで、これらの ALR2 阻害活性を、既報に従い評価する。さらに、ドッキングスタディによって、新規 botryllazine B 誘導体が、ALR2 の触媒部位に結合しているか、フェノール性水酸基が酵素結合部位として機能しているか、酵素選択性発現に必要な相互作用があるか、について明らかにする。

(2) 高い ALR2 阻害活性発現に必要なカルボキシル基を有する新規プテリン-7-カルボキサミド類を、著者が開発した手法を利用して合成する。そして、それらの ALR2 阻害活性を評価し、構造と阻害活性との相関を明らかにする。さらに、ドッキングスタディによって、新規プテリン-7-カルボキサミド類が酵素内でどのような 3 次元構造をとっているか、ALR2 の触媒部位に結合しているか、酵素選択性発現に必要な相互作用があるか、について明らかにする。

(3) 新規 GFP 発色団モデル類を、既報に従い合成する。そして、それらの ALR2 阻害活性を評価し、構造と阻害活性との相関を明らかにする。さらに、ドッキングスタディによって、新規 GFP 発色団モデル類が酵素内でどのような 3 次元構造をとっているか、ALR2 の触媒部位に結合しているか、酵素選択性発現に必要な相互作用があるか、について明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 新規 botryllazine B 誘導体 **1** をスキーム 1 に従って合成した。この合成過程において、ピラジン **2** と置換塩化ベンゾイルとの Stille カップリング反応を行った際に、目的のアシル体 **3** に加え脱カルボニル体 **4** が副生し、精製の困難さと相まって目的物 **3** の収率が低下する問題に直面した (Table 1, entry 1)。そこで、この望まない脱カルボニル化を抑制し、アシル体を効率よく得る手法の確立を目指した。



Scheme 1

まず、配位子による脱カルボニル化の抑制を検討した。その結果、配位子が高高いほど **4** の生成率が低く、**3** の収率が向上した (Table

1, entry 2-6)。次に、CO 雰囲気下で同様の反応を行ったところ、3/4 比に改善は見られたものの、**3** の収率自体はあまり向上しなかった (Table 1, entry 7)。続いて、*N*-ホルミルサッカリン存在下での反応を検討したところ、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  及び  $\text{Et}_3\text{SiH}$  共存下において、**4** の収率を 1% まで抑制し、**3** の収率を 85% まで向上させることに成功した。 (Table 1, entry 8)。

次いで、得られた **3** に対し、クロスカップリング反応を用いて二環式複素環を導入した後、三臭化ホウ素による脱メチル化によって **1b-f** を得た。

Table 1. Stille coupling reaction between **2** and 3,4-dimethoxybenzoyl chloride

Entry	Catalyst	Ligand	Additive	Yield (%)		Ratio (3/4)
				3	4	
1	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	-	-	57	24	2.38
2	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	$\text{P}(o\text{-tolyl})_3$	-	68	5	13.6
3	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	$\text{P}(t\text{-Bu})_3$	-	61	17	3.67
4	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	$\text{PPh}_3$	-	46	36	1.26
5	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Amphos	-	59	25	2.36
6	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	Triphos	-	27	34	0.80
7	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	-	CO (g)	61	13	4.69
8	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	-	<i>N</i> -formylsaccharin (1.5 eq.), $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1.6 eq.), $\text{Et}_3\text{SiH}$ (1.2 eq.)	85	1	85.0

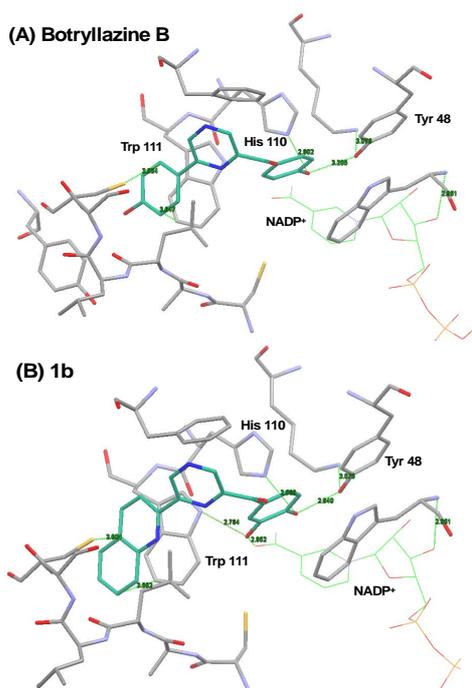
合成した **1b-f** の AR 阻害活性は、NADPH 存在下、組換えヒト ALR2 によるグリセルアルデヒドのグリセリンへの還元反応を 50% 阻害する濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) により評価した。結果を Table 2 に示す。いずれの化合物も nM オーダーの  $\text{IC}_{50}$  値を示し、botryllazine B に比べて阻害活性が顕著に向上した。二環式複素環としてはモノアジン体の 2-キノリル基が良好な結果を与え (**1b,c**)、窒素原子数が増加すると活性が低下した (**1d-f**)。また、2-キノリル基に水素結合可能な置換基を導入することで活性の向上を期待したが (**1c**)、無置換体 **1b** の活性の方が高かった。なお、この化合物は唯一の市販薬である epalrestat に匹敵する活性であった。

Table 2.  $\text{IC}_{50}$  values of **1a-f**

Compound	$\text{IC}_{50}$ (nM)
<b>1a</b>	100
<b>1b</b>	58
<b>1c</b>	92
<b>1d</b>	430
<b>1e</b>	570
<b>1f</b>	460
Botryllazine B	2,000
epalrestat	31

続いて、**1b** 及び botryllazine B の ALR2 へのドッキングスタディを行った。その結果 botryllazine B では ALR2 の活性部位 (Tyr48, His110, Trp111) との相互作用が 2-ベンゾイル基上パラ位水酸基と Tyr48 及び His110 との間の水素結合のみであるのに対し (Fig. 1-A)、

**1b** では同様の水素結合に加え 2-ベンゾイル基上メタ位の水酸基と Trp111 との水素結合も観測された(Fig. 1-B)。この 3,4-ジヒドロキシベンゾイル基を有する **1a-f** すべてが botryllazine B よりも高活性であることから、この部分構造は、カルボキシル基やスピロヒダントインに代わる、新たな ALR2 活性部位結合基となり得ることがわかった。また botryllazine B 及び **1b** とともに 6 位の芳香環部位が Trp111 と  $\pi$ - $\pi$ 相互作用しているポーズが得られているが、Trp111 との重なりは **1b** の方が大きいことから、この相互作用も **1b** の ALR2 阻害能を高めている要因の一つであることがわかった。

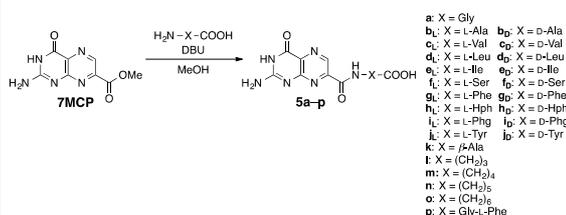


**Fig. 1** Docking poses of (A) botryllazine B and (B) **1b** in the active site of ALR2.

(2) 新規 ALR2 阻害剤開発研究の一環として、アミノ酸含有プテリン-7-カルボキサミド類を 25 種類合成し、それらの ALR2 阻害能を精査した。

プテリン類は一般的に溶解度が低く、そのため合成はプテリン-7-カルボン酸メチルと 10 当量以上のアミンをメタノール中密閉容器内で数日間加熱するという過酷な条件でのみ可能であり、誘導体合成が困難であった。これに対し著者は、反応系に有機塩基 DBU を添加し、プテリン類を DBU 塩とするだけで、ヘキサン系以外の一般的な有機溶媒に可溶となることを見出した。この DBU 塩法により反応条件は顕著に改善され、常温常圧下メタノール中で数分～数時間のうちに反応が完了し、合成に必要なアミン量もプテリンに対し 1～2 当量に抑えることに成功した。さらに、この DBU 塩法では種々のアミノ酸やペプチドを無保護のまま反応に使用することも見出した。そこで種々のアミノ酸を有する新規プテリン-7-カルボキサミド類 25

種をこの手法によって合成し (スキーム 2)、それらの組替え型ヒト ALR2 に対する阻害活性を評価した (Table 3)。その結果、合成した化合物のうち、グリシン体 **5a** において高い阻害活性が観測された ( $IC_{50} = 1.97 \mu M$ )。これは、高い阻害活性を示すことで知られている sorbinil ( $IC_{50} \sim 2 \mu M$ ) とほぼ同程度の活性であり、この化合物が良い ALR2 阻害剤となり得ることがわかった。メチレン鎖を伸長すると活性が低下したことから (**5k-o**)、メチレン鎖長は 1 が最適であることがわかった。また、アミノ酸側鎖の導入によっても活性が低下したことから、アミノ酸部位としてはグリシンが最適であることがわかった。



**Scheme 2**

**Table 3.** *In vitro* human ALR2 inhibitory activity of pterin-7-carboxamides (**5a-p**), **6**, **7**, folic acid, and epalrestat

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)	
			L-form	D-form
<b>5a</b>	H	NH-Gly-CO <sub>2</sub> H	1.97	
<b>5b</b>	H	NH-Ala-CO <sub>2</sub> H	12.4	72.0
<b>5c</b>	H	NH-Val-CO <sub>2</sub> H	83.4	194
<b>5d</b>	H	NH-Leu-CO <sub>2</sub> H	61.7	97.2
<b>5e</b>	H	NH-Ile-CO <sub>2</sub> H	69.0	278
<b>5f</b>	H	NH-Ser-CO <sub>2</sub> H	29.2	130
<b>5g</b>	H	NH-Phe-CO <sub>2</sub> H	46.0	68.1
<b>5h</b>	H	NH-Hph-CO <sub>2</sub> H	25.1	42.1*
<b>5i</b>	H	NH-Phg-CO <sub>2</sub> H	42.6	56.6
<b>5j</b>	H	NH-Tyr-CO <sub>2</sub> H	216	580
<b>5k</b>	H	NH-β-Ala-CO <sub>2</sub> H	17.5	
<b>5l</b>	H	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H	25.5	
<b>5m</b>	H	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> H	11.7	
<b>5n</b>	H	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub> H	4.02	
<b>5o</b>	H	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub> H	6.67	
<b>5p</b>	H	NH-Gly-Phe-CO <sub>2</sub> H	9% <sup>†</sup> @10.5 mM <sup>†</sup>	
<b>6</b>	COOH	H	–	
<b>7</b>	H	COOH	26.5	
Folic acid			52.5	
epalrestat			0.0665	

\*: DL-form. †: % inhibition at a given concentration.

さらに、**5a** と ALR2 とのドッキングスタディの結果から、プテリン部位が特異的ポケット内に位置し、Trp111 と  $\pi$ - $\pi$ 相互作用をしているだけでなく、極性官能基が補足的な水素結合をすることにより、酵素との相互作用を強めていることが示唆された (Fig. 2)。特に注目すべきは、プテリンのカルボニル酸素と、酵素選択性発現に必須である Leu300 との間に水素結合が観測されたことである。これらの結果から、**5a** は ALR1 に対する ALR2 選択性を有する新規糖尿病合併症治療薬の候補となり得ることが明らかとなった。

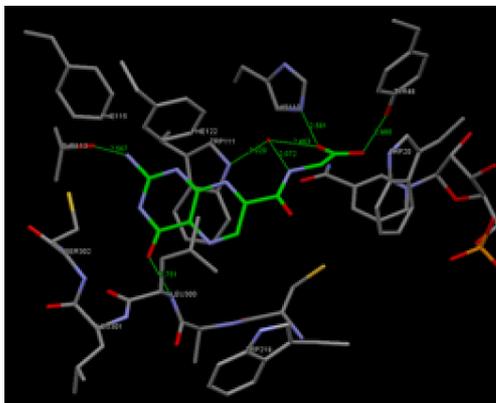


Fig. 2 Docking poses of **5a** in the active site of ALR2.

(3) 新規 ALR2 阻害剤開発研究の一環として、オワンクラゲ緑色蛍光タンパク質(GFP)の発色団モデルを 12 種類合成し、それらの AR 阻害能を精査した。

GFP 発色団モデル化合物ならびにその類似体の合成は以下のように行った。まず対応するベンズアルデヒドを出発原料として、それぞれ既報に従ってアズラクトン体へと変換した後、アンモニア水で処理することによりイミダゾロンへと変換した。水酸基を含むイミダゾロンは TBS 保護体へと変換した。次に炭酸カリウム存在下、プロモ酢酸エチルと反応させてエステル体を合成した。TBS 保護体はフッ化テトラブチルアンモニウムで脱保護した。最後にエステル部位を加水分解することでカルボン酸 **8a-j,m** を得た。一方、イミダゾロン中間体をアクリル酸エチルと反応させた後加水分解することにより、イミダゾロン環 1 位のアルキル鎖長を 1 つ伸ばした誘導体 **9** を得た。

合成した GFP 発色団モデル化合物類の ALR2 阻害活性は、上記と同様の手法で評価した。結果を Table 4 に示す。GFP モデル **8a** の  $IC_{50}$  値は  $0.36 \mu\text{M}$  と求まり、良い ALR2 阻害剤として知られる sorbinil ( $IC_{50} \sim 2.0 \mu\text{M}$ ) に比べ 5 倍以上高い活性を示した。構造活性相関について、水酸基の位置を変化させた **8b** ( $IC_{50} = 3.2 \mu\text{M}$ ) では約 9 倍活性が低下した。また **8a** のフェニル基上 3,5 位にメチル基を導入した **8j** ( $IC_{50} = 0.13 \mu\text{M}$ ) では活性の向上が見られた。メトキシ体 **8d** ( $IC_{50} = 0.51 \mu\text{M}$ ) では約 1.4 倍活性が低下した。カルボキシメトキシ基を有する **8m** ( $IC_{50} = 0.31 \mu\text{M}$ ) では殆ど活性の変化はなかった。一方、フルオロ基を持つ **8e** ( $IC_{50} = 0.65 \mu\text{M}$ ) では約 1.8 倍活性が低下したものの、同族のクロロ体 **8f** ( $IC_{50} = 0.27 \mu\text{M}$ )、プロモ体 **8g** ( $IC_{50} = 0.24 \mu\text{M}$ ) では阻害活性が向上している結果となった。**8a, c-j, m** の  $IC_{50}$  値を比較すると、フェニル基上には疎水性を向上させる置換基が存在した方が高い ALR2 阻害活性が得られることがわかった。このことを定量的構造活性相関によって評価するために、置換基の疎水性パラメーター ( $\pi$ )、Verloop の立体

パラメーター ( $B_1, L$ ) 及びフロンティア軌道 (HOMO, LUMO) エネルギーを用いた重回帰分析を行った。その結果、式 1 のような回帰式が得られ、阻害活性 ( $pIC_{50}$ ) が疎水性パラメーターのみで記述できることがわかった。また **8a** のグリシン部分 ( $\text{NCH}_2\text{OOH}$ ) のアルキル鎖を 1 つ伸ばした **9** ( $IC_{50} = 10.7 \mu\text{M}$ ) では **8a** の約 30 倍活性が低下したことから、この部分のメチレン鎖は 1 つであることが、酵素の活性部位に入り込むのに都合のよい長さであり、高い ALR2 阻害活性発現のために重要であることがわかった。

$$pIC_{50} = 5.062 + 0.589\pi \quad (r^2 = 0.900, s = 0.109) \quad (1)$$

以上の結果から、GFP 発色団モデル化合物群が良い ALR2 阻害剤であることが明らかとなった。

Table 3. *In vitro* inhibitory activity of **8a-j** and **8m** against recombinant human ALR2

Compound	Ar	R	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>8a</b>	4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.36
<b>8b</b>	3-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	3.20
<b>8c</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.58
<b>8d</b>	4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.51
<b>8e</b>	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.65
<b>8f</b>	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.27
<b>8g</b>	4-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.24
<b>8h</b>	2-naphthyl	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.10
<b>8i</b>	1-naphthyl	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.54
<b>8j</b>	3,5-diCH <sub>3</sub> -4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.13
<b>8m</b>	4-OCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	0.31
<b>9</b>	4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	10.7
epalrestat			0.085

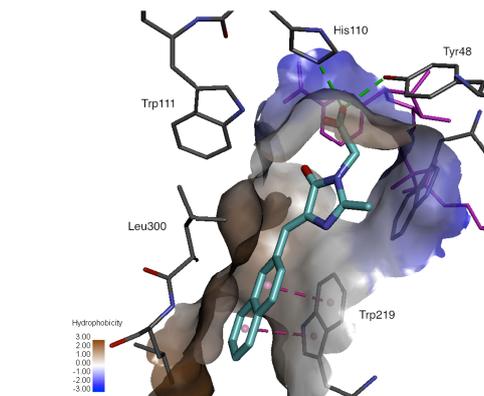


Fig. 3 The contour map of aromatic interaction surfaces of the binding-site residues in ALR2 superposed with the predicted docking pose for compound **8h**.

次に、これらの構造と ALR2 阻害活性との相関を詳細に検討するためにドッキングスタディを行った。通常ドッキングスタディでは蛋白質データベース(PDB)に登録されている蛋白質立体構造に対してリガンドをドッキングさせる。しかし ALR2 はリガンドの構造により活性部位の構造が変化する induced-fit 型の蛋白質であり、約 100 種類の ALR2-阻害剤共結晶構造が PDB に登録されているため、そこから新規阻害剤の解析に最適な立体構造を見出す必要がある。これに対し今回、実測の  $IC_{50}$  値とドッキングスコアとの相関を

利用して最適な蛋白質立体構造を定量的に決定する方法を新たに確立した。この手法により決定した結晶構造に対するドッキングスタディにより、最も活性の高かった GFP 発色団モデル **8h** は、活性部位との強い相互作用に加え、Trp219 及び Leu300 と疎水性相互作用していることがわかった(Fig. 3)。Lue300 との相互作用は毒性軽減に関連があるとされていることから、GFP 発色団モデルは毒性の少ない糖尿病合併症治療薬となり得ることが示唆された。

以上のように本研究では、標的酵素の立体構造に基づいた分子デザインにより、新規 ALR2 阻害剤候補として botryllazine B 類、プテリン-7-カルボキサミド類、GFP 発色団モデルの 3 つのクラスを見出した。これらの何れにおいても非常に高い阻害活性と酵素選択性の鍵となる Leu300 との相互作用が観測された。従ってこれらの化合物群は酵素選択性の高い阻害剤候補として *in vivo* 試験へと移行可能であり、本研究課題の目的は達成された。

## 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 2 件)

(1) Ryota Saito, Jeff M. Pruet, Lawrence A. Manzano, Karl Jasheway, Arthur F. Monzingo, Paul A. Wiget, Ishan Kamat, Eric V. Anslyn, and Jon D. Robertus "Peptide-Conjugated Pterins as Inhibitors of Ricin Toxin A" *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 320-329. (査読有) DOI: 10.1021/jm3016393

(2) Paul A. Wiget, Lawrence A. Manzano, Jeff M. Pruet, Grace Gao, Ryota Saito, Arthur F. Monzingo, Karl R. Jasheway, Jon D. Robertus, Eric V. Anslyn "Sulfur incorporation generally improves Ricin inhibition in pterin-appended glycine-phenylalanine dipeptide mimics" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 6799-6804. (査読有) DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.10.017

[学会発表](計 16 件)

(1) 齋藤良太ら(5名、5番目) アルドース還元酵素阻害活性を有する botryllazine B 類似体の合成と構造活性相関、第 71 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、2016 年 5 月 14 日、東京農工大学小金井キャンパス(東京都小金井市)

(2) Ryota Saito ら(5名、1番目) Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of botryllazine B analogues having bicyclic heterocycles on the C6 position: A structure-activity relationship study, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015、2015 年 12 月 18 日、ホノルル(アメリカ合衆国)

(3) Saito, Ryota; Hirano, Takashi; Maki, Shojiro; Niwa, Haruki, Development of non-CRET based orange chemiluminescent imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015、2015 年 12 月 16 日、ホノルル(アメリカ合衆国)

(4) 齋藤良太・柳場匠・鈴木雄稀・佐々木要、ビス(ベンゾイミダゾール-2-イル)ピラジン類の蛍光波長制御、第 45 回複素環化学討論会、2015 年 11 月 20 日、早稲田大学(東京都新宿区)

(5) 川埜紗椰・田村萌・吉川豊・安井裕之・佐々木要・齋藤良太、新規 4-ヒドロキシ-5-オキソ-2,5-ジヒドロ-1*H*-ピロール類を配位子とした亜鉛錯体の合成とインスリン様活性評価、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 28 日、日本大学(千葉県船橋市)

(6) 齋藤良太ら(6名、1番目) プテリン-7-カルボキサミド類の簡易合成とそれらのリシン毒素 A 鎖阻害能評価、第 44 回複素環化学討論会、2014 年 9 月 12 日、札幌市民ホール(北海道札幌市)

(7) 鈴木沙織・佐々木要・齋藤良太、プテリン-7-カルボキサミド類の合成とアルドース還元酵素阻害活性、第 44 回複素環化学討論会、2014 年 9 月 11 日、札幌市民ホール(北海道札幌市)

(8) 齋藤良太・川埜紗椰・佐々木要、ヒドロキシアジン系複素環を側鎖にもつ環状トリセリントリラク톤の合成と金属配位能、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 28 日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

(9) Ryota Saito ら(5名、1番目) Highly potent aldose reductase inhibitors derived from botryllazine B, 247th American Chemical Society Annual Meeting, 2014 年 3 月 16 日、ダラス(アメリカ合衆国)

[産業財産権]

取得状況(計 1 件)

名称: 二環式アリアル環又は二環式ヘテロアリアル環を有するピラジン誘導体

発明者: 齋藤良太、鴫田麻衣、小松俊哉

権利者: 学校法人東邦大学、興和株式会社

種類: 特許

番号: 特許第 5761971 号

取得年月日: 2015 年 6 月 19 日

出願年月日: 2010 年 11 月 26 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 良太 (SAITO, Ryota)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号: 90327974