

学 位 論 文 題 名

作用機序に基づくヌクレオシド系抗生物質ネプラノシンA
の構造変換：抗RNAウイルス剤の開発を目指して

学位論文内容の要旨

最近、生体の重要な代謝過程の一つであるメチル化反応の制御に中心的な役割を担うS-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHase)が、RNAウイルスに対する化学療法の標的酵素として注目されている。

ヌクレオシド系抗生物質であるネプラノシンA (NPA)は、SAHaseに対して現存化合物中で最も強い阻害活性($IC_{50} = 0.004 \mu\text{g/ml}$)を有することから、著者はNPAをリード化合物としてSAHase阻害活性に基づく抗ウイルス剤の合成研究に着手した。

NPAは少なくとも三種類のadenosine (Ado)代謝に関与する酵素、即ち、SAHase, Ado kinase (AK)およびAdo deaminase (AD)と相互作用する。NPAの強い抗ウイルス活性はその強力なSAHase阻害活性に基づくものであり、一方、NPAは強い細胞毒性および抗腫瘍活性を示すが、これにはAKによるリン酸化経路が深く関与することが指摘されている。また、NPAはADにより速やかに脱アミノ化され、生物活性を示さないネプラノシンD (NPD)へと変換される。著者はこれらの知見を踏まえて、NPAの構造変換に取り組んだ。

1) AD抵抗性NPA等価体

まず、AD抵抗性を有する誘導体を得る目的で2-位ハロゲン置換体を設計・合成し、AD抵抗性NPA等価体としての特徴を有する2-フルオロNPA (FNPA)を見いだした。

FNPAは子牛小腸由来のADによる脱アミノ化を受けず、ウサギ赤血球由来のSAHaseを阻害($IC_{50} = 0.21 \mu\text{g/ml}$)し、かつNPAと同等の強い抗ウイルス活性を示したが、宿主細胞に対し殺細胞作用（増殖していない細胞に対する毒性）を有するなど、NPAと同等の強い細胞毒性を示した。このようにNPAの2-位の修飾ではADに抵抗性となったものの、細胞毒性は軽減しなかった。

2) 特異的SAHase阻害剤の創製

以上のことから、ADに抵抗性であるだけではなくAKの基質にもならない誘導体、即ち、特異的にSAHaseを阻害する誘導体を創製できれば、そのものは抗ウイルス剤として好適と考えた。そこで、NPAと相互作用する上記の三種の酵素がいずれもAdoの5'-位水酸基を認識することから、Adoの5'-位に相当するNPAの6'-位周辺を修飾することで、SAHase, AKおよびADの基質認識の差別化が可能ではないかと推論し、NPAの6'-位を変換した誘導体を設計・合成した。

6'-位水酸基を持たない誘導体にはSAHase阻害活性は認められず、SAHaseを強く阻害するには、NPAの6'-位水酸基は重要であることが示唆された。

NPAの6'-位水酸基近傍の三次元的環境が先に述べた三つの酵素との相互作用に重要であると考え、6'-位水酸基近傍のコンフォメーションを操作することで、これら酵素による認識の差別化が可能ではないかと推論し、6'-位炭素上に置換基を有する6'-C-アルキルNPA誘導体を設計・合成した。また、アデニン環と一級水酸基との相対配置を変化させる目的で、NPAの6'-位を一炭素増炭した6'-ホモログ(HNPA)を設計・合成した。

その結果、特異的なSAHase阻害剤と考えられる誘導体として、(6'R)-6'-C-メチルNPA(RMNPA)、(6'R)-6'-C-エチニルNPA(RENPA)およびHNPAを見いだした。

これらはSAHaseの阻害に基づき強いin vitro抗ウイルス活性を示し、かつ、ADによる不活化を受けず、しかもこれらの誘導体は宿主細胞に対する殺細胞作用を示さなかった。

また、これらの誘導体のSAHase阻害活性はNPAの1/200程度であるにもかかわらず、NPAを上回る強力な抗ウイルス活性を示したが、このことはこれらの誘導体がADによる不活化を受けないことを反映した結果と考えられる。

6'-C-アルキルNPA誘導体では、(6'S)-配置でメチル基を有するSMNPAのみが脱アミノ化を受けたが、(6'R)-配置のものは全く脱アミノ化を受けなかった。

またSAHaseに対して、(6'R)-配置でメチル基およびエチニル基を有するものが強力な阻害活性を示し、置換基が高くなるほど阻害活性は低下した。一方、(6'S)-配置のものはいずれもSAHase阻害活性および抗ウイルス活性を示さなかった。

このことから6'-位近傍の三次元的環境が、上記の三種の酵素のうち少なくともSAHaseおよびADの基質認識にとって重要であることが明らかとなった。

3) NPA誘導体の抗ウイルス活性あるいは抗白血病活性とSAHase阻害活性との相関性

縦軸にSAHase阻害活性を横軸に抗ウイルス活性(measles)をプロットした結果により、SAHase阻害活性と抗ウイルス活性との間に相関性があることを明らかにした。また同様に、縦軸にSAHase阻害活性を横軸にp388マウス白血病に対する増殖抑制作用をプロットした結果により、SAHase阻害活性と細胞増殖抑制作用との間にも相関性があることを明らかにした。

4) AK欠損細胞に対する作用

AK欠損細胞に対する効果を検討した結果からも、NPAの細胞増殖抑制作用にはそのSAHase阻害活性が寄与している事がわかった。また、特異的なSAHase阻害剤と考えられるRMNPAおよびRENPAの細胞増殖抑制作用は、AKの関与を受けずSAHase阻害に基づき発現したことが示唆された。従って、NPAの細胞増殖抑制作用はAKによるリン酸化を介するものと、SAHase阻害によるものの和として発現したのと考えられる。

また、NPAは強い殺細胞作用を有するが、SAHaseの特異的阻害剤と考えられる誘導体にはそのような作用はなく、このことからNPAの殺細胞作用には主にリン酸化による毒性発現経路が関与するものと推論した。

5) in vivoウイルス感染治療効果

特異的なSAHase阻害剤と考えられるRMNPAを用いて牛口内炎ウイルス感染マウス対

する感染治療実験を試みた。

その結果、NPA投与群は無効であったのに対し、RMNPA投与群では明らかに延命効果を示し、これにより特異的なSAHase阻害剤が抗ウイルス剤となりうる可能について明らかにした。

以上示したように著者は、NPAがSAHase阻害に基づき抗ウイルス活性および細胞増殖抑制作用を示し、AKによるリン酸化を介して殺細胞活性を示すことを解明し、SAHase阻害剤の抗ウイルス剤としての有効性と限界について明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松田	彰
副査	教授	大塚	榮子
副査	助教授	井上	英夫
副査	助教授	周東	智

学位論文題名

作用機序に基づくヌクレオシド系抗生物質ネプラノシンA の構造変換：抗RNAウイルス剤の開発を目指して

最近、生体の重要な代謝過程の一つであるメチル化反応の制御に中心的な役割を担うS-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (SAHase)が、RNAウイルスに対する化学療法の標的酵素として注目されている。

尾原 巧は、ヌクレオシド系抗生物質であるネプラノシンA (NPA)は、SAHaseに対して現存化合物中で最も強い阻害活性($IC_{50} = 0.004 \text{ mg/ml}$)を有することから、NPAをリード化合物としてSAHase阻害活性に基づく抗ウイルス剤の合成研究に着手した。

NPAは少なくとも三種類のadenosine (Ado)代謝に関与する酵素、即ち、SAHase, Ado kinase (AK)およびAdo deaminase (AD)と相互作用する。NPAの強い抗ウイルス活性はその強力なSAHase阻害活性に基づくものであり、一方、NPAは強い細胞毒性および抗腫瘍活性を示すが、これにはAKによるリン酸化経路が深く関与することが指摘されている。また、NPAはADにより速やかに脱アミノ化され、生物活性を示さないネプラノシンD (NPD)へと変換される。これらの知見を踏まえて、NPAの論理的構造変換に取り組んだ結果、以下のような成果を得た。

1) AD抵抗性NPA等価体

まず、AD抵抗性を有する誘導体を得る目的で2-位ハロゲン置換体を設計・合成し、AD抵抗性NPA等価体としての特徴を有する2-フルオロNPA (FNPA)を見いだした。

2) 特異的SAHase阻害剤の創製

ADに抵抗性であるだけでなくAKの基質にもならない誘導体、即ち、特異的にSAHaseを阻害する誘導体を創製できれば、そのものは抗ウイルス剤として好適と考えた。そこで、NPAと相互作用する上記の三種の酵素がいずれもAdoの5'-位水酸基を認識することから、Adoの5'-位に相当するNPAの6'-位周辺を修飾することで、SAHase, AKおよびADの基質認識の差別化が可能ではないかと推論し、NPAの6'-位を変換した誘導体を設計・合成した。その結果、特異的なSAHase阻害剤として、(6'R)-6'-C-メチルNPA (RMNPA), (6'R)-6'-C-エチニルNPA (RENPA)および6'-オモローグ (HNPA)を見いだした。また、これらの構造活性相関研究から、NPA6'-位近傍の三次元構造が、上記の三種の酵素の基質認識にとって重要であることを示した。

3) 抗ウイルス活性あるいは抗白血病活性とSAHase阻害活性
NPA誘導体の生物活性を詳細に検討した結果、抗ウイルス活性あるいは抗白血病活性とSAHase阻害との間に相関性があることを明らかにした。

4) AK欠損細胞に対する作用

AK欠損細胞に対する効果を検討した結果からNPAの細胞増殖抑制作用にはそのSAHase阻害活性が寄与し、また、NPAは強い殺細胞作用には主にAKによするリン酸化が関与することを示した。

5) in vivoウイルス感染治療効果

RMNPAを用いて牛口内炎ウイルス感染マウスに対する感染治療実験を試みた結果、NPA投与群は無効であったのに対し、RMNPA投与群では明らかに延命効果を示し、これにより特異的なSAHase阻害剤が抗ウイルス剤となりうる可能性を明らかにした。

これらの成果は、抗ウイルス剤の医薬化学に大いに寄与するもので、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと判断した。