

学 位 論 文 題 名

新規細胞内 Ca^{2+} 動員物質サイクリック ADP
- リボースの安定等価体および拮抗体の創製

学位論文内容の要旨

1. はじめに

細胞内情報伝達系は、生体の恒常性維持において中心的な役割を担う。従って、その研究は細胞機能を解明するだけでなく、様々な疾患の理解、さらにはその治療法開発につながる可能性を秘める。最近、細胞内の Ca^{2+} 動員を担う新しいセカンドメッセンジャーとしてサイクリック ADP-リボース (cADPR, 1) が発見され、その構造が決定された。cADPR はイノシトールトリスリン酸 (IP_3) と同等もしくはそれ以上の強い Ca^{2+} 放出活性を示すが、一方で 1 は *N*-1-グリコシル結合部分で酵素的に速やかに代謝されるばかりか、中性水溶液中でさえ容易に同じ位置で加水分解を受ける程不安定なために、その機能は十分解明されていない。著者は cADPR の安定等価体の創製を目的として設計したリボース環の酸素原子をメチレンに置換した、即ち不安定な *N*-1-グリコシド結合を持たない化合物、サイクリック ADP-カーボサイクリックリボース (cADPcR, 2) 及び塩基部分としてヒポキサンチン環を有する同属体 cIDPcR (3) の合成に着手した。また、現在までに様々な cADPR 誘導体がアメフラシ由来の ADP リボシルシクラーゼを用いて NAD^+ 誘導体から合成されており、それらの構造-活性相関研究から、塩基部 8 位に置換基をもつ誘導体は、概ね cADPR に対する拮抗活性を持つことが知られている。そこで安定な拮抗体となることを期待して 8-Cl- (4), 8-PhS- (5), 8- N_3 - (6), 8- NH_2 -cADPcR (7) を目的化合物として設定し、合成することにした。

2. cIDPcR (3) の改良合成法の開発

2-1. 合成計画

前述のように酵素合成法は有用であるが、酵素の基質特異性により、合成可能な誘導体には限りがある。一方、既に 1 及びその誘導体の化学合成が試みられているが、この場合に鍵となる二個のリン酸基縮合による分子内ピロリン酸結合の形成が困難であるために、未だ cADPR 誘導体の化学合成は達成されていなかった。最近、著者の研究室では、cADPcR 関連化合物としては初めてイノシン体 3 の化学合成を達成した。また 3 の合成研究の際に、塩基部 8 位に臭素原子を導入して *N*-9-グリコシル結合回りの配座を閉環に有利な *syn* 型に制御した場合にのみ、望みの 2 個のリン酸基間の分子内縮合反応が進行することを見いだした。しかしながら、この合成法では鍵となる分子内ピロリン酸結合形成反応の収率が 23% と低いなどの理由で、生物活性を検討するのに十分量の 3 が得られなかった。

著者は、3 の合成ルートを再検討し改善を図った。鍵となる 2 個のリン酸基間の分子内縮合は、フェニルチオリン酸をヨウ素または銀イオンで活性化する方法が有効であると考えた。また *N*-1-カーボサイクリックイノシン構造の構築は、(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*)-(2,3-isopropylidenedioxy-4-hydroxymethyl)cyclopentylamine (8) と *N*-1-(2,4-dinitrophenyl)-5'-*O*-(monomethoxytrityl)-2',3'-*O*-isopropylideneinosine (9) を用いて達成できると考えた。

2-2. cIDPcR (3) の効率的合成

イノシン体 9 の塩基部 2 位に対するアミン体 8 の求核反応により、5-[[[(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*)-2,3-(isopropylidenedioxy)-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]aminomethyleneamino]-1-[5'-*O*-(monomethoxytrityl)-2,3-*O*-(isopropylidene)-β-D-ribofuranosyl]imidazole-4-(*N*-2,4-dinitrophenyl)carboxamide (10) へと誘導した。次に、塩基部開環体 10 を適切に再閉環して 8-ブromo-及び 8-無置換-*N*¹-(カーボサイクリックリボシル)イノシン構造を効率的に構築することができた。数行程を経て 8-ブromo及び 8-無置換型 *N*-1-[(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*)-2,3-(isopropylidenedioxy)-4-[[[(phosphoryl)oxy]methyl]cyclopentyl]-5'-*O*-[(phenylthio)phosphoryl]-2',3'-*O*-isopropylideneinosine (11, 12) を高収率で得た。化合物 11 の 2 個のリン酸基間での分子内縮合反応条件を種々検討した結果、モレキュラーシーブス 3A 存在下、溶媒としてピリジン、活性化剤としてヨウ素を用いて本反応を行なったときに最も良い結果を与え、目的とする分子内閉環反応が定量的に進行した。また、本反応は塩基部 8-位に臭素原子のない基質 12 を用いた場合でも、即ち *N*-9-グリコシル結合回りの配座を *syn* 型に制御しなくても、81%という高収率で分子内ピロリン酸結合が形成できることが分かった。更に数行程を経て、目的化合物である cIDPcR (3) へと誘導することができた。

3. cADPcR (2) および cADPR の安定拮抗体 (5-7) の合成

上述のように、著者は極めて効率的な分子内ピロリン酸結合形成反応を開発することに成功した。次に上記の方法をアデニン型の cADPcR (2) の合成に適用した (Scheme 3)。目的化合物である 2 を合成するためには、効率的に *N*-1-カーボサイクリックリボシルアデニン構造を構築する必要がある。AICA リボシドから誘導した 5-(methoxymethyleneamino)-1-[5'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2,3-*O*-(isopropylidene)-β-D-ribofuranosyl]imidazole-4-nitrile (13) とアミン体 8 を用いて構築条件を検討した結果、メタノール中 K₂CO₃ 存在下両者を縮合することで、目的構造を効率良く構築することができた。数行程を経て閉環反応の基質である *N*-1-[(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*)-2,3-(isopropylidenedioxy)-4-(phosphonoxymethyl)cyclopentyl]-5'-*O*-[(phenylthio)phosphoryl]-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (14) へと導き、上記の縮合反応条件、即ちピリジン中モレキュラーシーブス 3A 存在下硝酸銀で処理すると、分子内閉環体 cADPcR diacetone (15) が収率 93%で得られた。最後に 2 個のイソプロピリデン基をギ酸水溶液で除去して目的物 cADPcR (2) の合成を達成した。化合物 5-7 も同様の方法で合成した。

以上のように、著者の開発した分子内ピロリン酸結合形成反応は、様々な cADPcR 類縁体の合成に適用可能である。

アデニン型の 2 は、天然の cADPR と比べて化学的にも生物学的にも極めて安定であり、且

つウニ卵細胞内で強力な Ca^{2+} 放出活性を持つことが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	松 田	彰
副 査	教 授	高 橋	保
副 査	教 授	橋 本	俊 一
副 査	助教授	周 東	智

学 位 論 文 題 名

新規細胞内 Ca^{2+} 動員物質サイクリック ADP ーリボースの安定等価体および拮抗体の創製

細胞内情報伝達系は生体の恒常性維持において中心的な役割を担う。従って、その研究は細胞機能を解明するだけでなく、様々な疾患の理解、さらにはその治療法開発につながる可能性を秘める。最近、細胞内の Ca^{2+} 動員を担う新しいセカンドメッセンジャーとしてサイクリック ADP-リボース (cADPR) が発見された。cADPR は強い Ca^{2+} 放出活性を示すが、一方で酵素的に速やかに代謝されるばかりか、中性水溶液中でさえ容易に加水分解を受ける程不安定である。福岡正哲は cADPR の安定等価体の創製を目的として設計した不安定な *N*-1-グリコシド結合を持たない化合物、サイクリック ADP-カーボサイクリックリボース (cADPcR) 及びその同属体の合成及その生物活性に関する以下のような研究を行った。

I. cIDPcR (3) の改良合成法の開発

cADPR 及びその誘導体の化学合成が試みられているが、鍵となる二個のリン酸基縮合による分子内ピロリン酸結合の形成が困難である。最近、cADPcR 関連化合物としては初めてイノシン体同族体 cIDPcR の化学合成が達成されたが、この合成法では鍵となる分子内ピロリン酸結合形成反応の収率が 23% と低いなどの理由で、生物活性の検討に至っていない。

福岡は、鍵となるリン酸基間の分子内縮合は、フェニルチオリン酸をヨウ素または銀イオンで活性化する方法が有効であると考え、効率的な cIDPcR の合成法の開発を検討した。まず、イノシンを原料として基本骨格である *N*-1-カーボサイクリックイノ

シン構造の新規構築法を開発した。さらに懸案のリン酸基間での分子内縮合反応が、モレキュラーシーブス 3A 存在下、溶媒としてピリジン、活性化剤としてヨウ素を用いると定量的に進行することを見出し、cIDPcR を極めて効率的に合成することに成功した。

II. cADPcR および cADPR の安定拮抗体の合成

次に上記の方法をアデニン型の cADPcR の合成に適用した。目的化合物を合成するためには、効率的に *N*-1-カーボサイクリックリボシルアデニン構造を構築する必要がある。AICA リボシドから誘導した 5-(methoxymethyleneamino)-1-[5-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2,3-*O*-(isopropylidene)- β -D-ribofuranosyl]imidazole-4-nitrile と既知のカーボサイクリックアミン体を縮合することで、目的構造を効率良く構築することができた。数行程を経て分子内閉環反応の基質へと導き、上記の縮合反応条件で処理すると、分子内閉環体 cADPcR diacetone が収率 93% で得られ、脱保護して目的物 cADPcR の合成を達成した。

さらに、この方法を応用して生物活性が期待される数種の誘導体を合成した。従って、本法は様々な cADPcR 類縁体の合成に適用可能であることが明らかとなった。

III. cADPcR の生物活性

cADPcR は安定性を検討したところ、当初の推論通り、化学的にもまた cADPR 分解酵素対しても安定であることが分かった。また、ウニ卵細胞内で cADPcR よりも強力な Ca^{2+} 放出活性を持つことが明らかとなった。従って、cADPR 機能解明をはじめとする種々の生物化学実験への有効利用が期待される。

以上の成果は、cADPR 関連の医薬化学に大いに寄与するもので、薬学博士の学位を授与するに値するものと判断した。