

学 位 論 文 題 名

P₃ purinoceptor-like protein (P₃LP) に対する
構造活性相関とリガンドの固相パラレル合成法の開発

学位論文内容の要旨

アデノシンは RNA の構成成分として遺伝情報の発現に関与しているだけでなく、アデノシン三リン酸 (ATP)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺)、S-アデノシルメチオニン、補酵素 A の形でエネルギー代謝やメチル基転移などに関与し、生命活動の維持に必要不可欠な分子である。さらにこのアデノシンならびにそのリン酸誘導体 (ATP、ADP) は細胞表面に存在するレセプター (purinoceptor) を介して様々な生理機能を制御する生理活性物質の役割を担っていることが広く知られている。現在、purinoceptor は基質特異性により 2 つのサブクラス、すなわちアデノシンを始めとするアデニンヌクレオシドを選択的に受容する P₁ purinoceptor (adenosine receptor) とそれらのリン酸誘導体を受容する P₂ purinoceptor に大別されている。これらのレセプターに対するアゴニスト、アンタゴニストは古くは約 70 年前のアデノシンによる心血管拡張作用の報告に始まり、最近では A_{2A} レセプターに対するアンタゴニストがパーキンソン症状を軽減する活性を有することが見出されるなど、多くの治療薬開発への応用が期待されている。一方、P₃ purinoceptor は P₁ purinoceptor および P₂ purinoceptor 両者の性質を合わせ持つ特異なレセプターであり、生理学的、薬理的、および発生学的に極めて魅力的な研究ターゲットであるにも関わらず、その存在は生化学的実験結果に基づいて提唱されているのみであり、生理作用や臓器分布などを始めとするほとんどの情報が得られていない。しかし、ごく最近 Nakata らはラットの脳膜から *N*-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) に高い親和性を有するタンパク質、P₃ purinoceptor-like protein (P₃LP) を単離した。この P₃LP は P₁、P₂ purinoceptor のいずれとも異なる性質を示し、P₃ purinoceptor のサブタイプであると考えられている。これまでに当研究室では P₃LP に対する選択的リガンドである 9-(6,7-dideoxy-β-D-*allo*-hept-5-ynofuranosyl)adenine (HAK2701) を開発している。本研究ではより詳細な P₃LP に関する情報を得ることを目的として種々のアデノシン誘導体を合成し、それらの P₃LP 結合活性を指標にした構造活性相関を検討した。また、より簡便に多種類のリガンドを合成することを目的としてアデノシン誘導体の固相パラレル合成法についても検討した。

まず、NECA をリード化合物としてアミド窒素上の置換基を変換した種々の 5'-*N*-修飾カルボキサミドアデノシンを合成し、P₃LP 親和性に及ぼす影響を調べた。その結果、これらの誘導体では 5'-*N*-アルキル置換基のある程度の炭素数増加は P₃LP に対する親和性を増加させ、炭素数 5 程度の置換基を有する化合物、すなわちアル

キル直鎖を有する化合物群では *N*-*n*-pentylcarboxamidoadenosine (NPCA; $K_i = 12$ nM) が、環状アルキル置換基を有する化合物群では *N*-cyclohexylcarboxamidoadenosine (CHCA; $K_i = 18$ nM) が最も高い親和性を示すことを見出した。また、親水性の置換基であるアミノ基を導入した誘導体 1-(6-aminopurin-9-yl)-1-deoxy-*N*-(2-aminoethyl)- β -D-ribofuranuronamide では親和性の低下 ($K_i = 167$ nM) が観察された。この結果より P_3 LP にアデノシン-5'位近傍の置換基を認識する疎水的な基質認識ポケットが存在することを明らかにした。そこでフェニル基等の疎水性の高い置換基を導入することでより高い親和性が得られるのではないかと考え、種々の芳香族置換誘導体を合成し、それらの構造活性相関についてさらに検討した。その結果、著者の予想通り 5'-位窒素原子上に芳香環を有する置換基を導入した化合物ではこれまでのいずれの化合物よりも高い親和性が得られた。また芳香環上の置換基も P_3 LP に対する親和性に影響を及ぼすことが明らかとなり、極めて高い親和性 ($K_i = 0.056$ nM) を示す 1-(6-aminopurin-9-yl)-1-deoxy-*N*-(4-*n*-propylphenyl)- β -D-ribofuranuronamide (PPPCA) を合成することができた。

さらにこの PPPCA は NECA や他のリガンドが P_1 purinoceptor サブタイプ (A_1 、 A_{2A} 、 A_3) に対しても親和性を有するのに対して P_3 LP のみに極めて高い親和性を示す優れたリガンドであることが明らかになった。

また、リガンドの *syn/anti* 配向と P_3 LP 結合親和性との相関関係を X 線結晶構造解析、NOE 実験で調べた結果、 P_3 LP に対して高い親和性を示した化合物は結晶中、また溶液状態のいずれにおいても 5'-位の比較的酸性度の高いプロトンとアデニン環 N3 位で分子内水素結合を形成することでアデニン環の配向を *syn* コンホメーションに優先させていることが明らかになった。このことから、 P_3 LP の基質認識部位は基質アデニン塩基の *anti*、*syn* 配向を厳密に認識していることが示唆された。以上得られた構造活性相関の情報をもとに P_3 LP のリガンド結合サイトにおける推定モデルを構築した。

さらに、 P_3 LP のリガンド認識に関する詳細な情報を得るためにはさらなる構造活性相関を検討する必要があると考えた。そこで著者は固相樹脂の利用に着目し、修飾アデノシン誘導体の固相パラレル合成法の開発を検討した。その結果、1-(6-aminopurin-9-yl)-1-deoxy- β -D-ribofuranuronic *N'*-phenylhydrazide アミン存在下酢酸銅 (II) で処理することにより効率よく 5'-*N*-修飾カルボキサミドアデノシンを合成する方法を開発できた。そしてこの反応を固相合成に適用した。すなわち、1-(6-aminopurin-9-yl)-1-deoxy- β -D-ribofuranuronic *N'*-phenylhydrazide を 2',3'-位水酸基を介して固相上に担持し、続いて各種アミン存在下酢酸銅 (II) で処理した。この際、フェニルヒドラジン部位はベンゼンと気体窒素として脱離する。最後に酸処理することで固相担体からの切り出しを行い、出発原料アデノシンからシリカゲルカラムを用いた精製を行うことなく目的とする 5'-*N*-修飾カルボキサミドアデノシンを HPLC 純度 80% 以上で得ることができた。この反応を用いることで 6,5'-位二置換アデノシン誘導体も同様に高純度で合成することができた。以上のようにして著者は多種類の誘導体を簡便に高純度で得ることができる固相パラレル合成法の開発に成功した。

学位論文審査の要旨

主査	助教授	南川典昭
副査	教授	松田彰
副査	教授	小林淳一
副査	助教授	森田博史

学位論文題名

P₃ purinoceptor-like protein (P₃LP) に対する 構造活性相関とリガンドの固相パラレル合成法の開発

アデノシンならびにそのリン酸誘導体 (ATP、ADP) は細胞表面に存在するレセプター (purinoceptor) を介して様々な生理機能を制御する生理活性物質の役割を担っていることが広く知られている。これまで purinoceptor は P₁ purinoceptor (adenosine receptor) と P₂ purinoceptor の二つのサブクラスに大別されていた。しかしごく最近、P₁ purinoceptor および P₂ purinoceptor 両者の性質を合わせ持つ特異なレセプター、P₃ purinoceptor の存在が提唱されはじめた。しかしこのレセプターについては生理作用や臓器分布などを始めとして、詳細な情報がほとんど得られていないのが現状である。海野貴志は、この P₃ purinoceptor のサブタイプであると考えられている P₃ purinoceptor-like protein (P₃LP) をターゲットとし、以下に述べるように、選択的リガンドの設計ならびに構造活性相関を検討することを目的に研究を展開した。

1) 5'-*N*-修飾カルボキサミドアデノシンの合成と構造活性相関 (脂肪族アルキル置換基が親和性に及ぼす影響)

N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) をリード化合物としてアミド窒素上の置換基を変換した種々の 5'-*N*-アルキルカルボキサミドアデノシンを合成し、P₃LP 親和性に及ぼす影響を調べた。その結果、これらの誘導体では 5'-*N*-アルキル置換基のある程度の炭素数増加は P₃LP に対する親和性を増加させ、炭素数 5 程度の置換基を有する化合物、すなわちアルキル直鎖を有する化合物群では *N*-*n*-pentylcarboxamidoadenosine (NPCA; K_i = 12 nM) が、環状アルキル置換基を有する化合物群では *N*-cyclohexylcarboxamidoadenosine (CHCA; K_i = 18 nM) が最も高い親和性を示すことを見出した。この結果より P₃LP にアデノシン-5'位近傍の置換基を認識する疎水的な基質認識ポケットが存在することを明らかにした。

2) 5'-N-修飾カルボキサミドアデノシンの合成と構造活性相関 (芳香族アルキル置換基が親和性に及ぼす影響)

上記の知見を基に、さらに種々の芳香族置換誘導体を合成した。その結果、極めて高い親和性 ($K_i = 0.056 \text{ nM}$) を示す 1-(6-aminopurin-9-yl)-1-deoxy-N-(4-n-propylphenyl)- β -D-ribofuranuronamide (PPPCA) を得ることに成功した。

さらにこの PPPCA は NECA や他のリガンドが P_1 purinoceptor サブタイプ (A_1 、 A_{2A} 、 A_3) に対しても親和性を有するのに対して P_3 LP のみに極めて高い親和性を示す選択的リガンドであることが明らかになった。

3) P_3 LP リガンド結合サイトの推定モデルの構築

リガンドの *syn/anti* 配向と P_3 LP 結合親和性との相関関係を X 線結晶構造解析ならびに NOE 実験により解析し、 P_3 LP の基質認識部位は *syn* 配向を優先する基質と強く結合することを明らかにした。さらに構造活性相関の情報をもとに P_3 LP のリガンド結合サイトにおける推定モデルを構築した。

4) 二置換アデノシンの固相パラレル合成法の開発

P_3 LP のリガンド認識のさらなる構造活性相関を目的とし、修飾アデノシン誘導体の固相パラレル合成法の開発を検討した。その結果、1-(6-aminopurin-9-yl)-1-deoxy- β -D-ribofuranuronic N'-phenylhydrazide アミン存在下酢酸銅 (II) で処理することにより効率よく 5'-N-修飾カルボキサミドアデノシンを合成する方法を開発し、多種類の誘導体を簡便に高純度で得ることができる固相パラレル合成法の開発に成功した。

以上の研究成果は、これまで未知であった purinoceptor の第三のサブクラス、 P_3 purinoceptor の性質を明らかにしたものであり、固相合成法の開発とともに今後の医薬化学的研究に大いに寄与するものである。従って薬学博士の学位を授与するに十分値するものと判断した。