

学位論文題名

サイクリック ADP カーボサイクリックリボース誘導体の
構造活性相関研究

- 高親和性および組織選択的アゴニストの開発 -

学位論文内容の要旨

サイクリック ADP リボース(cADPR)は、小胞体膜上のリアノジン受容体に作用して Ca^{2+} 放出を引き起こすセカンドメッセンジャーである。中枢や心臓、T細胞など多くの組織で機能することが確認されているが、中性水溶液中でも容易に加水分解されるほど不安定なため、その作用機序は十分に解明されていない。そこで、当研究室において cADPR の安定等価体として *N*-1-リボース部の環内酸素原子をメチレンで置換したサイクリック ADP カーボサイクリックリボース (cADPcR) が設計され、すでに化学合成に成功している。この cADPcR は、期待通り化学的にも生物学的にも安定であり、ウニ卵において cADPR を上回る強力な Ca^{2+} 放出活性を有することが報告されている。

本研究では、より有用なバイオツール及び創薬リードの開発を目的として、種々の cADPcR 誘導体を設計、合成し、その機能を評価した。

1. *N*-1-リボース部修飾 cADPcR 誘導体の構造活性相関

従来より、種々の cADPR 誘導体が酵素合成されその構造活性相関が研究されてきたが、cADPR 合成酵素の基質特異性による制限から、*N*-1-リボース部を修飾した誘導体についてはほとんど報告がない。そこで、この部位の構造活性相関を明らかにする目的で、cADPcR の *N*-1-カーボサイクリックリボース部を修飾した 8 種の誘導体、すなわち 2''-デオキシ cADPcR、3''-デオキシ cADPcR、3''-デオキシ-2''-*O*-MOM-cADPcR、3''-*O*-メチル cADPcR、サイクリック ADP カーボサイクリックキシロース (cADPcX)、3''-*O*-メチル cADPcX、2''3''-ジデオキシ cADPcR 及び 2''3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR を設計し、cADPcR と同様の方法で合成した。

続いて、各誘導体についてウニ卵抽出液における Ca^{2+} 放出活性を評価した。その結果、cADPR が $\text{EC}_{50} = 0.22 \mu\text{M}$ 、cADPcR が $\text{EC}_{50} = 0.079 \mu\text{M}$ で作用する活性評価系で、3''-デオキシ cADPcR が $\text{EC}_{50} = 0.014 \mu\text{M}$ と非常に強力な Ca^{2+} 放出活性を示した。2''-デオキシ cADPcR ($\text{EC}_{50} = 0.61 \mu\text{M}$)、2''3''-ジデオキシ cADPcR ($\text{EC}_{50} = 0.73 \mu\text{M}$) 及び 3''-デオキシ-2''-*O*-MOM-cADPcR ($\text{EC}_{50} = 5.7 \mu\text{M}$) の結果から、cADPR の 2''-位水酸基は Ca^{2+} 放出活性に重要であるが、3''-位水酸基は必要ではないことが明らかになった。また、3''-*O*-メチル cADPcR ($\text{EC}_{50} = 0.88 \mu\text{M}$)、cADPcX ($\text{EC}_{50} = 0.069 \mu\text{M}$) 及び 3''-*O*-メチル cADPcX ($\text{EC}_{50} = 0.74 \mu\text{M}$) の Ca^{2+} 放出活性から、

3''-位水酸基にかさ高い置換基は許容されないことが示唆された。一方、二重結合を導入した 2''3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR ($EC_{50} = 21 \mu\text{M}$) が他の誘導体と比べて著しく Ca^{2+} 放出活性が低下したことから、各誘導体の三次元構造が Ca^{2+} 放出活性に影響している可能性が考えられた。

そこで次に、各誘導体について NOE 相関に基づいた分子動力学計算を行い、最安定配座を解析した。その結果、強力な Ca^{2+} 放出活性を示す cADPR、cADPcR 及び 3''-デオキシ cADPcR は N-9-グリコシル結合回りの配座が *syn* 型で N-9-リボース部の配座が C2'-エンド型であるときに最も安定であった。一方、2''3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR の最安定構造は、N-9-グリコシル結合回りの配座が *high-anti* 型で N-9-リボース部の配座が C3'-エンド型であり、この安定配座の違いにより Ca^{2+} 放出活性が低下したことが明らかになった。

続いて、各誘導体についてマウス由来神経細胞及びヒト T 細胞における Ca^{2+} 放出活性を評価し、異種の動物細胞における生理活性の差を検討した。その結果、cADPcR 及び 3''-デオキシ cADPcR は神経細胞で、また 2''3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR は T 細胞で選択的に作用することが明らかとなり、組織選択的な cADPR 誘導体として機能する可能性が示唆された。

2. 4'',6''-ジデヒドロ cADPcR の設計と合成

cADPcR 誘導体は、ウニ卵抽出液及び神経細胞では顕著な Ca^{2+} 放出活性を有していたが、T 細胞ではいずれも cADPR と比べて Ca^{2+} 放出活性が低下した。この原因を、N-1-リボース部の環内酸素原子をメチレンで置換したことにより、cADPR と比べて塩基部 6-位アミノ基の pK_a 値及び安定配座が変化したためと考え、両者の影響を抑えることを期待して 4'',6''-ジデヒドロ cADPcR を設計、合成した。この誘導体は、期待通り塩基部 6-位の pK_a 値は cADPR のそれに近づいたが、N-1-カーボサイクリックリボース部に二重結合を導入したために cADPR 及び cADPcR と比べて安定配座が大きく変化した。ウニ卵抽出液において Ca^{2+} 放出活性が $EC_{50} = 1.8 \mu\text{M}$ と大きく低下した。

3. 塩基部 8-位修飾 3''-デオキシ cADPcR 誘導体の構造活性相関

塩基部 8-位修飾 cADPR 誘導体はアンタゴニストとして作用するが、cADPcR の塩基部 8-位修飾誘導体はフルアゴニストへと機能が変化する。ウニ卵において最も強い Ca^{2+} 放出活性を示した 3''-デオキシ cADPcR の塩基部 8-位修飾誘導体の生理活性に興味を持ち、8-クロロ-3''-デオキシ cADPcR、8-アジド-3''-デオキシ cADPcR、8-アミノ-3''-デオキシ cADPcR 及び、8-プロピルアミノ-3''-デオキシ cADPcR を設計、合成し、ウニ卵抽出液における Ca^{2+} 放出活性を評価した。その結果、8-プロピルアミノ-3''-デオキシ cADPcR は不活性であったが、その他の 3 種の誘導体は cADPR と比べて二割程度の Ca^{2+} 放出活性を示すパーシャルアゴニストであることが判明した。 EC_{50} 値を比較すると、8-アミノ体 ($EC_{50} = 0.028 \mu\text{M}$) が最も強力であり、8-クロロ体 ($EC_{50} = 0.34 \mu\text{M}$) 及び 8-アジド体 ($EC_{50} = 0.53 \mu\text{M}$) は cADPR と同程度であった。

4. cADPR 結合蛋白質に対する光アフィニティープローブの開発

cADPR は、リアノジン受容体に対して間接的に作用すると考えられているが、介在する結合蛋白質は明らかにされていない。光アフィニティーラベル法によりこの結合蛋白質を同定することを目的とし、8-アジド-3''-O-アジドエチル cADPcR 及び 3''-O-アジドエチル cADPcR を光アフィニティープローブとして設計、合成した。しかし、ウニ卵抽出液において 8-アジド-3''-O-アジドエチル cADPcR は $EC_{50} > 190 \mu\text{M}$ 、3''-O-アジドエチル cADPcR は $EC_{50} = 15.2 \mu\text{M}$ といずれも Ca^{2+} 放出活性が大幅に低下し、特異的な光アフィニティープローブとしては作用できないことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 周 東 智
副 査 教 授 松 田 彰
副 査 教 授 小 林 淳 一
副 査 講 師 久 保 田 高 明

学 位 論 文 題 名

サイクリック ADP カーボサイクリックリボース誘導体の 構造活性相関研究

－高親和性および組織選択的アゴニストの開発－

サイクリック ADP リボース(cADPR)は、リアノジン受容体に作用して Ca^{2+} 放出を引き起こすセカンドメッセンジャーである。中枢や心臓、T細胞など多くの組織で機能するが、非常に不安定なため、その作用機序は十分に解明されていない。福岡らは cADPR の安定等価体として *N*-1-リボース部の環内酸素原子をメチレンで置換したサイクリック ADP カーボサイクリックリボース (cADPcR)を設計・合成し、cADPcR が期待通り化学的にも生物学的にも安定であり、強力な Ca^{2+} 放出活性を有することを報告している。以下に述べる通り、工藤高志はこの知見を基に、より有用なバイオツール及び創薬リードの開発を目的として、種々の cADPcR 誘導体を設計、合成し、その機能を評価した。

1. *N*-1-リボース部修飾 cADPcR 誘導体の構造活性相関

N-1-リボース部の構造活性相関を明らかにする目的で、2''-デオキシ cADPcR、3''-デオキシ cADPcR、3''-デオキシ-2''-*O*-MOM-cADPcR、3''-*O*-メチル cADPcR、サイクリック ADP カーボサイクリックキシロース (cADPcX)、3''-*O*-メチル cADPcX、2'',3''-ジデオキシ cADPcR 及び 2'',3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR を設計し、合成した。

ウニ卵抽出液における Ca^{2+} 放出活性を評価した結果、3''-デオキシ cADPcR が $\text{EC}_{50} = 0.014 \mu\text{M}$ と非常に強力な Ca^{2+} 放出活性を示した。また、2''-位水酸基は Ca^{2+} 放出活性に重要であるが、3''-位水酸基は必要ではないことが明らかになった。一方、二重結合を導入した 2'',3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR ($\text{EC}_{50} = 21 \mu\text{M}$) が他の誘導体と

比べて著しく Ca^{2+} 放出活性が低下したことから、その三次元構造が Ca^{2+} 放出活性に影響している可能性を推定した。

各誘導体について最安定配座を解析した結果、強力な Ca^{2+} 放出活性を示す cADPR、cADPcR 及び 3''-デオキシ cADPcR は N-9-グリコシル結合回りの配座が *syn* 型で N-9-リボース部の配座が C2'-エンド型であり、一方、活性の低い 2'',3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR の最安定構造は、*high-anti* 型/C3'-エンド型であり、この安定配座の違いにより Ca^{2+} 放出活性が低下したことが明らかになった。

神経細胞及び T 細胞における Ca^{2+} 放出活性を評価し、cADPcR 及び 3''-デオキシ cADPcR は神経細胞で、また 2'',3''-ジデオキシジデヒドロ cADPcR は T 細胞で選択的に作用することが明らかとなり、組織選択的な cADPR 誘導体を創製できるという創薬化学的に重要な知見を得た。

2. 4'',6''-ジデヒドロ cADPcR の設計と合成

cADPcR 誘導体は、ウニ卵抽出液及び神経細胞では顕著な Ca^{2+} 放出活性を有するが、T 細胞においては Ca^{2+} 放出活性が低下した。この原因を、N-1-リボース部の環内酸素原子をメチレンで置換したことにより、cADPR と比べて塩基部 6-位アミノ基の pK_a 値及び安定配座が変化したためと考え、両者の影響を抑えることを期待して 4'',6''-ジデヒドロ cADPcR を設計、合成した。この誘導体は、期待通りの塩基部 6-位の pK_a 値を示したが、二重結合を導入したために安定配座が大きく変化し、ウニ卵抽出液において Ca^{2+} 放出活性が大きく低下した。

3. 塩基部 8-位修飾 3''-デオキシ cADPcR 誘導体の構造活性相関

塩基部 8-位修飾 cADPR 誘導体はアンタゴニストとして作用するが、cADPcR の塩基部 8-位修飾誘導体はフルアゴニストへと機能が変化する。ウニ卵において強い Ca^{2+} 放出活性を示した 3''-デオキシ cADPcR の塩基部 8-位修飾誘導体の生理活性に興味を持ち、8-クロロ-3''-デオキシ cADPcR、8-アジド-3''-デオキシ cADPcR、8-アミノ-3''-デオキシ cADPcR 及び、8-プロピルアミノ-3''-デオキシ cADPcR を設計、合成し、ウニ卵抽出液における Ca^{2+} 放出活性を評価した。その結果、8-プロピルアミノ-3''-デオキシ cADPcR は不活性であったが、その他の 3 種の誘導体は cADPR と比べて二割程度の Ca^{2+} 放出活性を示すパーシャルアゴニストであることが判明した。

以上のように、工藤高志は cADPR に関して重要な構造活性相関を、特に三次元構造を重視して明らかにし、生物学的に有用な化合物を創製した。これらの成果は創薬化学及び生物有機化学の発展に大いに寄与するもので、薬学博士の学位を授与するに十分に値するものと判断した。