

# 標的酵素誘導型トリアゾール化を利用した天然物創薬研究

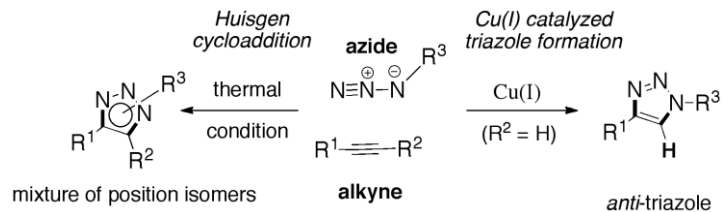
北里大学北里生命科学研究所 廣瀬 友靖

## 【略歴】

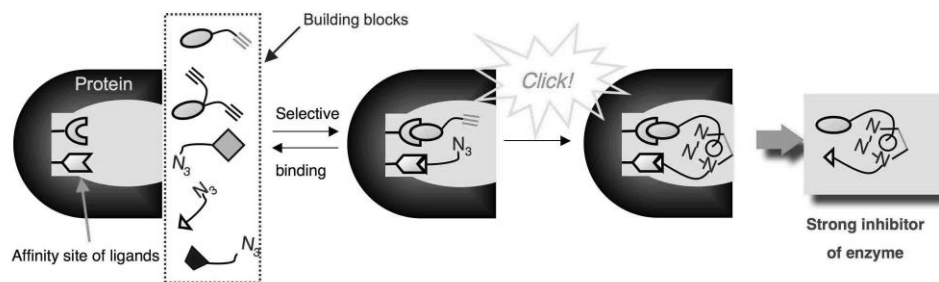
- 2001年3月 北里大学大学院薬学研究科博士課程修了（薬学博士）
- 2001年4月 ペンシルバニア大学化学科 博士研究員
- 2003年4月 (社)北里研究所基礎研究所天然物有機化学研究室 博士研究員
- 2005年1月～3月 スクリプス研究所 客員研究員（北里研究所より派遣）
- 2008年7月～現在 北里大学北里生命科学研究所（講師、准教授）

## 1. はじめに

2001年にK. B. Sharplessらによって提唱されたクリックミストリーは2種類の官能基間で起こる選択的かつシンプルでヘテロ原子を介した結合形成反応を総称したものである。‘クリック’とはバックルが、‘カチッ’と音を立てて繋がるように二つの分子が簡単に繋がることを意味している。その代表的な反応としてアジドとアセチレンによるトリアゾール化反応がHuisgen cycloadditionとして広く認知されている(Scheme 1)。



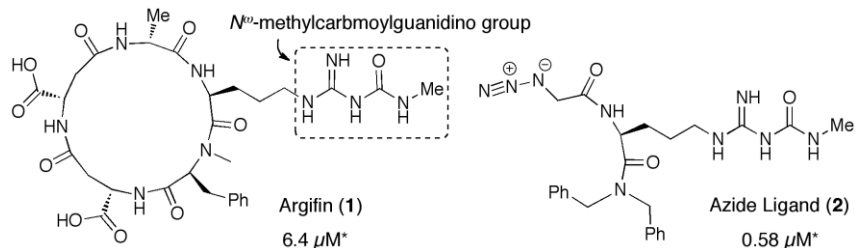
本反応は非対称なアセチレン化合物を用いた場合、環化の位置選択性は乏しく、トリアゾール体の2種の位置異性体を与える。一方、一価の銅触媒による末端アルキンを用いたトリアゾール化において完全な *anti*-選択的トリアゾール化反応が可能である。アセチレン化合物と有機アジドはそれぞれが比較的安定な上、これら両者間でおこる反応は官能基選択性に優れている。また基質のそれぞれの官能基は生体成分に影響を与えないためトリアゾール形成反応は反応の場を選ばず、酵素などのタンパクやウイルス表面上においても実行可能なことからその適用範囲は広大な可能性を秘めている。本シンポジウムでは生物活性天然物を基盤に、このトリアゾール化反応が標的タンパク質（酵素）のリガンド（阻害剤）作用部位を反応場として、金属触媒非存在下、アジド分子とアセチレン分子（いずれかがリガンド分子）が標的タンパク質のテンプレート効果により促進されることを指標に親和性の高いトリアゾール化合物を見出す方法[*in situ* クリックケミストリー (Figure 1)]<sup>1)</sup> を実践したので紹介したい。



**Figure 1** An illustration of *in situ* click chemistry.

## 2. 天然由来キチナーゼ阻害剤アージフィンと誘導体

キチンは自然界においてセルロースに次いで2番目に豊富な多糖類であり、線虫、原生動物、真菌などの細胞壁や外骨格の構成成分である。キチナーゼ (Chi) は、様々な生物に幅広く存在するキチン加水分解酵素であり、キチンを利用する生物

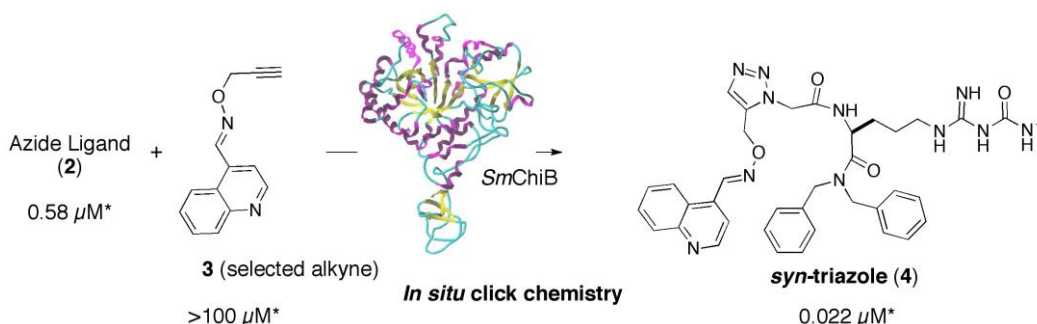


**Figure 2** Structures of argifin (1) and azide ligand (2); \*IC<sub>50</sub> values against *Serratia marcescens* Chitinase B (*SmChiB*).

の生命維持及び増殖に重要な因子となっている。そのため Chi 阻害剤は、選択毒性の高い殺虫剤、抗真菌剤への展開が期待できる。そのような背景の下、北里研究所の大村らによって、微生物代謝産物から新規 Chi 阻害剤アージフィン(1)が単離された (Figure 2)。5 つのアミノ酸から構成される 1 は霊菌 [*Serratia marcescens* (Sm)]をはじめ種々の Chi に対して強い阻害活性を示す。またその阻害活性発現に寄与する部位は側鎖の *N*-methylcarbamoylguanidino 基であることが判明していた。本研究で 1 を基盤に *in situ* クリックケミストリーを実践するにあたり、その構造から重要構造を抽出し、更にアジド基を導入した分子をデザインした結果、SmChiB 阻害活性を有するアジドリガンド(2)の創製に成功した<sup>2)</sup>。

### 3. *In Situ* クリックケミストリーによるスクリーニング<sup>2)</sup>

*In situ* クリックケミストリーはアジドリガンド(2)を用い、多彩な構造を有する 71 種の末端アルキンライブラリーを用いて 96 穴プレート上でスクリーニングを行った。実際のスクリーニング条件は、96 穴プレート上でリン酸バッファー中、2 (100  $\mu$ M)、各種アセチレン体 (300  $\mu$ M)、SmChi を加えて混合後、37  $^{\circ}$ C で 20 時間静置した後、その溶液を直接 LC/MS 分析することでトリアゾール体の生成量を評価した。その結果、2 とキノリン誘導体(3)の組み合わせにおいて SmChiB 存在下で *syn*-トリアゾール(4)の形成が促進されることが観察された (Scheme 2)。SmChiB に対する 4 の阻害活性 ( $IC_{50}$ ) は 0.022  $\mu$ M であり、2 (0.58  $\mu$ M) に比べ、約 30 倍向上している。



Scheme 2 A guided triazole derivative by SmChiB template *in situ* click chemistry.

### 4. X線共結晶解析による SmChiB の *syn*-トリアゾール(4) 形成促進効果の証明<sup>3)</sup>

さらに本研究ではキチナーゼを鋳型としたアジドリガンド(2)とアルキン(3)との会合状態を X 線共結晶解析により可視化する試みを行った。SmChiB 結晶へのソーキングにより 2 と 3 の 3 重結合部分を 2 重結合に変換した化合物を導入し、その結晶解析を行ったところ、その分子会合はまさに *syn*-トリアゾール(4)のみを形成する状態で酵素内に配置されている様子が観察された。またこの X 線情報を用いて DFT による酵素内でのトリアゾール形成反応解析を行うことで、酵素鋳型効果により Huisgen cycloaddition が進行することを証明している。

### 5. おわりに

以上述べてきたように演者は、天然物アージフィン(1)を基盤に *in situ* クリックケミストリーを駆使することで、酵素レベルにおける標的酵素の阻害剤探索スクリーニング法を確立した。今回実践した *in situ* クリックケミストリーを活用した創薬研究は有機化学研究者と生物系研究者が連携をすることで初めて促進されていくものであり、またそれがなされた成果の一つである。今後幅広い創薬研究分野での利用が期待されている。

### 謝辞

本研究に多大なご指導、ご支援を賜りました北里大学 大村 智 特別荣誉教授、北里大学北里生命科学研究所 砂塚 敏明 教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究はスクリプス研究所 K. B. シャープレス教授との共同研究の成果であり、ここに感謝の意を示します。そして実験遂行に御協力頂いた先生、多大な努力を注いでくれた多くの学生諸氏に感謝致します。

### 参考文献

- 1) S. K. Mamidyala *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1252-1261 (2010)
- 2) T. Hirose *et al.*, *J. Antibiot.*, **62**, 277-282 (2009)
- 3) T. Hirose *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **110**, 15892-15897 (2013)