

In situ click chemistry を利用した D-アミノ酸
酸化酵素阻害剤の探索研究

北里大学大学院感染制御科学府

感染制御科学専攻 創薬科学履修コース

生物有機化学研究室

DI-13004

戸口 翔平

平成 27 年度

目次	頁
略語表	iii
論文要旨	vii
1 序論	1
1-1 統合失調症について	2
1-2 D-アミノ酸酸化酵素と統合失調症との関連	4
1-3 D-アミノ酸酸化酵素	12
1-4 Click chemistry について	13
1-5 <i>In situ</i> click chemistry の概念	17
1-6 <i>In situ</i> click chemistry の研究の最初の例: アセチルコリンエステラーゼ を用いた例	20
1-7 当研究室で行われた <i>in situ</i> click chemistry の例: キチナーゼ阻害剤の例	23
1-8 微生物由来天然物からの D-アミノ酸酸化酵素阻害剤探索の意義	26
1-9 北里生命科学研究所にて行われた微生物由来天然物からの D-アミノ酸 酸化酵素阻害剤の探索	27
1-10 研究目的	28

2 本論	31
2-1 大腸菌を用いたリコンビナント D-アミノ酸酸化酵素の大量発現 および精製	32
2-2 <i>In situ</i> click chemistry に利用可能なアンカー分子のデザイン	35
2-3 アンカー候補化合物の合成	38
2-4 過酸化水素を検出する方法を利用したアンカー候補化合物に対する 活性評価 (HRP/ABTS アッセイ)	40
2-5 酸素を検出する方法を利用したアンカー候補化合物に対する活性 評価 (オキシグラフアッセイ)	49
2-6 <i>In situ</i> click chemistry を利用した D-アミノ酸酸化酵素阻害剤の探索	57
2-7 トリアゾールの合成および幾何異性体の決定	61
2-8 トリアゾール形成促進効果が確認されたアジドおよびトリアゾールの 活性評価	64
2-9 D-アミノ酸酸化酵素阻害剤共存下での <i>in situ</i> click chemistry	72
2-10 <i>In situ</i> click chemistry を利用した微生物二次代謝産物由来天然物 からの D-アミノ酸酸化酵素阻害剤の探索	74
3 総括	83
参考文献	89
4 実験項	93
謝辞	158

略語表

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid

AChE : Acetylcholinesterase

AfChi : *Aspergillus fumigatus* Chitinase

Ala : Alanine

AMCase : Acidic mammalian Chitinase

Arg : Arginine

Asp : Aspartic acid

CuAAC : Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition

DAO: D-amino acid oxidase

DCM : Dichloromethane

DEAE : Diethylaminoethyl

FAB : Fast atom bombardment

FAD : Flavin adenine dinucleotide

Glu : Glutamic acid

Gln : Glutamine

Gly : Glycine

^1H -, ^{13}C -NMR : Proton-, Carbon-nuclear magnetic resonance

His : Histidine

HIV : Human immunodeficiency virus

HPLC : High performance liquid chromatography

HR-MS : High resolution mass spectrometry

HRP : Horseradish peroxidase

IC₅₀ : Concentration causing 50% inhibition

IR : Infrared

LC/MS : Liquid chromatography mass spectrometry

LC/MS-SIR : Liquid chromatography mass spectrometry selected ion recording

Leu : Leucine

Lys : Lysine

Met : Methionine

m.p. : Melting point

MS : Mass Spectrometry

NOE : Nuclear overhauser effect

NMDA : *N*-methyl-D-aspartate

Orn : Ornithine

PCP : phencyclidine

PCR : Polymerase chain reaction

Phe : Phenylalanine

Pro : Proline

rt : Room temperature

RuAAC : Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

Ser : Serine

SmChi : *Serratia marcescens* Chitinase

SIR : Single ion recording

TBTA : Tris-(benzyltriazolylmethyl)amine

THF : Tetrahydrofuran

Thr : Threonine

TLC : Thin layer chromatography

TN : turnover

Trp : Tryptophan

Tyr : Tyrosine

UV : Ultra violet

Val : Valine

In situ click chemistry を利用した D-アミノ酸酸化酵素阻害剤の探索研究

感染制御科学専攻 創薬科学履修コース 生物有機化学

DI-13004 戸口翔平

【背景・目的】

ヒト D-アミノ酸酸化酵素 (human D-Amino acid oxidase, hDAO) は、ヒト脳内に局在し、脳内 D-セリンの調整因子として作用している。統合失調症患者脳内において D-セリンが減少していることから、hDAO 阻害剤が統合失調症に対する新たな治療薬として期待されている。北里生命科学研究所では、以前、微生物二次代謝産物からの hDAO 阻害剤探索が行われていたが高活性化合物の発見には至っていない。hDAO は、D-アミノ酸を酸化する際に酸素を消費し過酸化水素を生成するため、hDAO に対する迅速な阻害活性物質探索では、過酸化水素を定量することにより評価している。しかしながら、これらの活性評価法は、培養液中や天然物自体に過酸化水素と反応しうる基質が存在していることが考えられるため、その評価には限界があった。また、正確な活性評価法として、減少する酸素量を測定するオキシグラフ法が用いられているが測定に時間を要する。

一方、当研究グループでは、標的酵素誘導型トリアゾール化反応を指標とした、*in situ click chemistry* を利用することにより、高親和性を有する酵素阻害剤の探索を精力的に行っている。*In situ click chemistry* とは、トリアゾール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、アジドとアセチレン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、より親和性の高いトリアゾール化合物を見出す方法である (Figure 1)。



Figure 1. *In situ click chemistry*

本研究において、アジドとアセチレンを利用し、hDAO テンプレートによるトリアゾール形成促進効果を指標とすることで hDAO 阻害剤の探索を行った。さらに、*in situ click chemistry* により見出されたトリアゾール形成促進効果を指標にすることで、そのトリアゾール形成を抑制する化合物が DAO 阻害剤となり得るという考えから hDAO 阻害剤の探索のスクリーニング法への利用を試みた。

【方法・戦略】

本研究を行うにあたり、以下の戦略を立案した (Figure 2)。すなわち、①共同研究者により報告されている hDAO と imino-DOPA との X 線共結晶図を参考にし、*in situ* click chemistry に利用可能なアンカー分子の設計および合成を行う。具体的には、imino-DOPA および imino-tyrosine タイプのアンカー分子を合成し、置換基 R(R')に、水素原子またはメチル基を導入し活性を比較することとした。②次に創製したアンカー分子と保有している 250 種類のアジドライブラリーとの *in situ* click chemistry を実施し LC/MS を用いたスクリーニングにより、高選択的な hDAO 阻害剤を見出す (Scheme 1)。③続いて、見出されたアンカー分子、およびアジドフラグメントに、imino-DOPA と同様に hDAO の活性部位に結合する hDAO 阻害剤として知られている、sodium benzoate を共存させ、トリアゾール形成促進効果が抑制されることを確認する。④さらにトリアゾール形成の阻害が確認された後、北里生命科学研究所で保有する天然物ライブラリー、および微生物培養液ライブラリーから、トリアゾール形成の阻害を指標とした hDAO 阻害剤の探索を行うことにした。

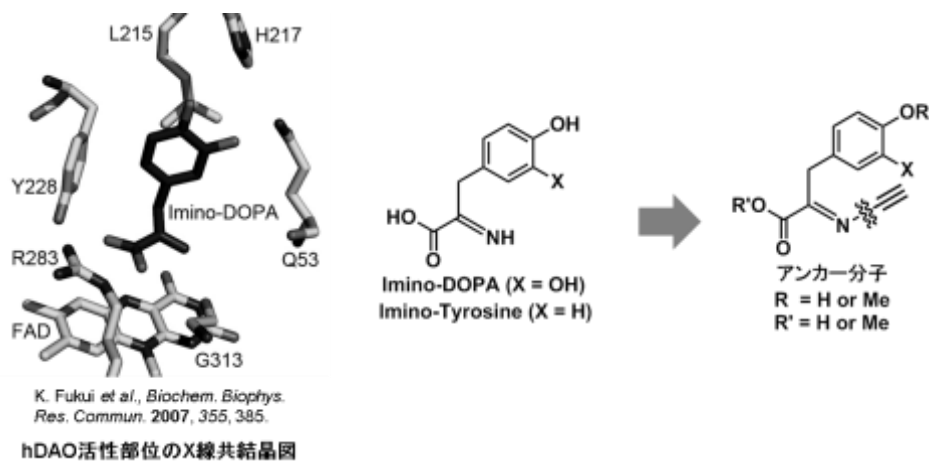
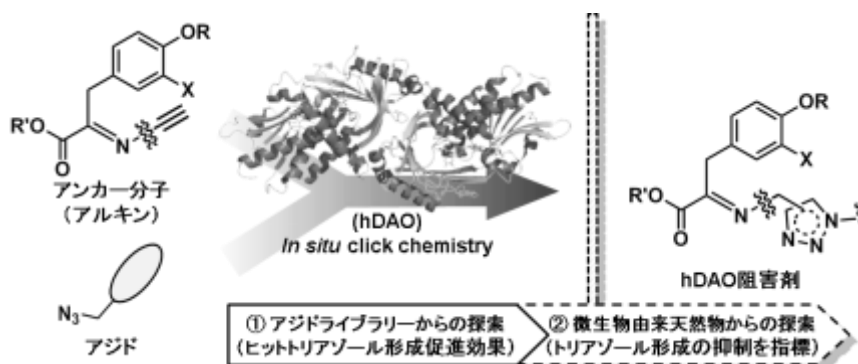


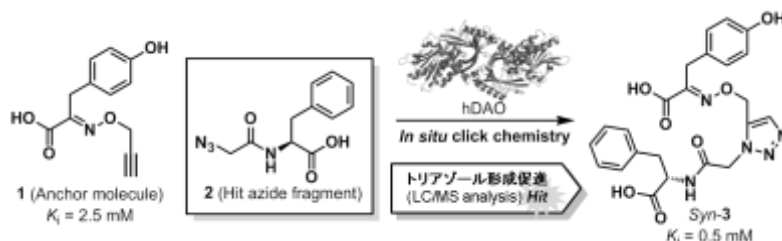
Figure 2. X 線共結晶図を参考にしたアンカー分子の創製



Scheme 1. *In situ* click chemistry による hDAO 阻害剤の探索

【結果・考察】

hDAO と imino-DOPA の X 線共結晶図を参考にし、*in situ* click chemistry のリガンドとして利用可能な末端アルキンを含む誘導体を種々合成し活性評価を行った。その結果、hDAO 阻害が確認された *O*-プロパルギルオキシム **1** (K_i : 2.5 mM) をアンカー分子として用いることとした。次に、アンカー分子 **1** との *in situ* click chemistry を行った (Scheme 2)。96 ウェルマイクロプレート上にアンカー分子 **1** (500 μ M) と 250 種のライブラリーからの各種のアジド体 (500 μ M) と hDAO (2 μ M) を pH 8.0 リン酸バッファーに加え混合させた後、25 $^{\circ}$ C にて 24 時間静置した。反応後、各溶液に MeOH を加え 50% MeOH 溶液とすることにより酵素活性を失活させ、その溶液に対し直接 LC/MS により分析を行うことでトリアゾール体の生成量の評価を行った。その結果、アジド **2** からトリアゾール形成が確認された (Figure 3)。さらに分離条件の精査を行うことにより、幾何異性体は *syn*-トリアゾール **3** と決定した。次に、ヒットした *syn*-トリアゾール体を別途合成し、オキシンググラフ法による活性評価を行った結果、*syn*-トリアゾール **3** の阻害活性 (K_i) は、0.5 mM であり、アンカー分子 **1** (2.5 mM) と比較し 5 倍の活性向上が確認された。また、阻害形式は競合阻害であることが明らかとなった。



Scheme 2. 創製したアンカー分子とアジドライブラリーとの *in situ* click chemistry

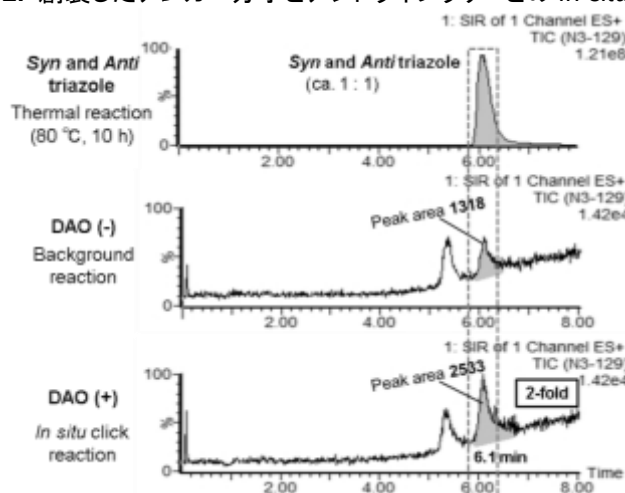
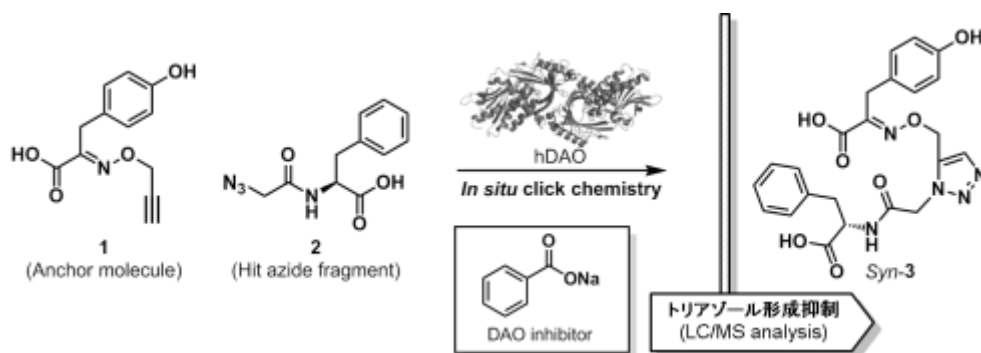


Figure 3 LC/MS 分析によりトリアゾール形成が確認されたチャート

続いて、*in situ* click chemistry により、トリアゾール形成の促進効果が確認されたことから、今度は、hDAO の活性部位に結合する hDAO 阻害剤である sodium benzoate (K_i : 3 μ M) を共存させ、トリアゾール形成促進効果が抑制されることの確認を行った結果、トリアゾール形成が抑制された (Scheme 3, Figure 4)。この結果からも *in situ* click chemistry により hDAO のテンプレート効果により、活性部位内でトリアゾール形成が促進していることが示された。



Scheme 3. DAO 阻害剤を共存させた *in situ* click chemistry によるトリアゾール形成抑制の確認

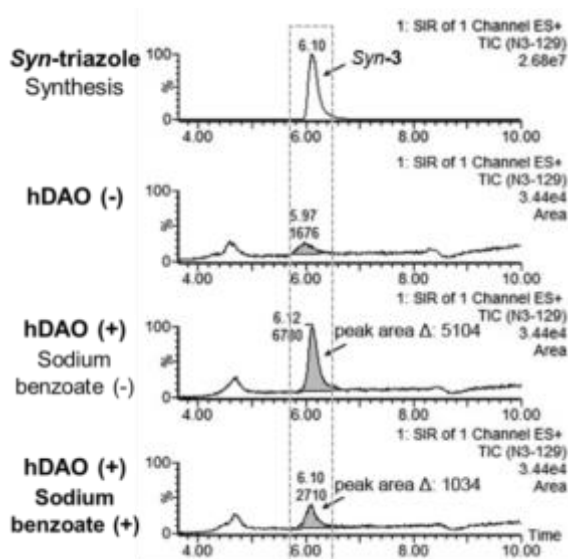


Figure 4. トリアゾール形成の抑制が確認された LC/MS チャート

次にヒットが確認された、アンカー分子 **1** とアジド **2** との *in situ* click chemistry によるトリアゾール形成促進効果の抑制を指標とした、hDAO 阻害剤の探索を 144 種類の天然物ライブラリーから行った。その結果、Thiolactomycin および Antimycin A からトリアゾール形成の抑制が確認された。

【結論】

創製したアンカー分子 **1** とアジド **2** との *in situ* click chemistry により、*syn*-トリアゾール **3** からトリアゾール形成促進効果が確認された。*Syn-3* の hDAO 阻害活性 (K_i : 0.5 mM) は、アンカー分子 **1** (K_i : 2.5 mM) と比較し 5 倍向上した。既知の hDAO 阻害剤である sodium benzoate (K_i : 3 μ M) を共存させ *in situ* click chemistry を行った場合、トリアゾールの形成が抑制された。以上の結果から、hDAO の活性部位で hDAO のテンプレート効果により、トリアゾール形成が促進され、より親和性の高い阻害剤が hDAO 自身により生成されたことが明らかとなった。さらに *in situ* click chemistry によるトリアゾール形成促進効果の抑制を指標として、天然物ライブラリーからの hDAO 阻害剤の探索を行った結果、Thiolactomycin および Antimycin A がトリアゾール形成を抑制することが確認された。ヒットが確認された天然物は、今後行われる微生物二次代謝産物からの探索におけるリード化合物となることが期待される。

1 . 序論

1-1 統合失調症について

統合失調症は、精神神経疾患中でうつ病に次ぐ、最も代表的なものである。以下に、2011 年に厚生労働省により報告されている精神神経疾患の患者数の割合を示す（Table 1-1-1）。

Table 1-1-1 日本の医療機関に受診する患者の疾病別内訳

精神神経疾患	(%)
てんかん	6.7
その他	5.5
薬物・アルコール依存症	2.4
不安障害	17.8
統合失調症	22.3
うつ病	29.9
認知症（アルツハイマー病）	11.4
認知症（血管性）	4.6

統合失調症は、主に 15～35 歳代に発症する脳の病気あり、人種や地域に関わらず人口の約 0.8%が罹患する発症率の高い精神障害である。精神機能の統合が失調することにより多彩な精神症状を呈し、社会の一員としての正常な機能が脅かされる^{1,2)}。統合失調症の特徴的な症状例として、幻覚や妄想を引き起こすことが挙げられ、人々と交流しながら家庭や社会で生活を営む機能が障害を受け（生活の障害）、感覚・思考・行動が病気のために歪んでいることを自分で振り返って考えることが難しくなりやすい（病識の障害）、という特徴を併せもつ。主に、陽性症状、陰性症状や認知機能障害が認められ慢性化しやすい。

- 陽性症状: 幻聴・妄想、思考の混乱、異常な行動
- 陰性症状: 感情・意欲減退、集中力の低下、社会的引きこもり
- 認知機能障害: 記憶・注意・判断力の低下、抽象化能力・判断力の低下

また、治療薬に抵抗する症状のために十分な治療がなされず慢性化し、十分な社会復帰を果たせない患者が多く存在し、その社会復帰が望まれている^{3,4)}。統合失調症の治療法として、休養や環境の調整、精神療法や薬物療法があり、これらを組み合わせることにより治療が行われている。また、薬物療法では、再発予防のため、治療を継続して行う必要がある。

1-2 D-アミノ酸酸化酵素と統合失調症との関連

D-アミノ酸酸化酵素（D-amino acid oxidase, DAO）は、統合失調症との関連が示唆されている。1948 年に、Moore と Stein によりイオン交換クロマトグラフィーとニンヒドリン発色法を組み合わせたアミノ酸定量分析法が確立されて以降、基礎生物学、生化学、医学、農芸化学、醗酵工学といった多くの分野では遊離アミノ酸のみならず、結合型として存在しているペプチドやタンパク質について、それ自体の機能や代謝、さらには関連する酵素などを標的とした研究が数多くなされてきた。その多くは、天然に存在するアミノ酸は通常タンパク質を構成すると考えられている L-アミノ酸であり、D-アミノ酸は微生物などが生産する稀な場合に限られるという漠然とした世界観に基づいてきた。

しかし近年、ヒトを含めた高等動物においても D-アミノ酸の存在とさまざまな作用が明らかにされつつある（Table 1-2-1）。たとえば、中枢神経系では D-セリンと記憶・学習といった脳の高次機能や神経変性疾患と関連することが示唆され、統合失調症においては臨床への応用が検討されている。また、D-アスパラギン酸はメラトニン、プロラクチン、テストステロンといった各種ホルモンの分泌や合成を制御することが報告されている。

Table 1-2-1 D-アミノ酸の生理作用との関連

組織	D-アミノ酸	生理作用
哺乳動物の脳	D-Ser	NMDA 受容体の coagonist
松果体実質細胞	D-Asp	メラトニンの分泌抑制
下垂体前葉	D-Asp	プロラクチンの分泌活性化
視床下部, 下垂体後葉	D-Asp	バゾプレッシンの産生調節, オキシトシンの産生調節
精巣ライディッヒ細胞	D-Asp	テストステロン合成促進

これまでに知られている統合失調症の発症メカニズムとしては、ドパミン受容体阻害薬が統合失調症の陽性症状に著効したことから、ドパミン伝達過剰仮説（ドパミン仮説）が提唱されてきた（**Figure 1-2-1**）。しかしながら、ドパミン伝達抑制薬では統合失調症の陰性症状や認知機能障害が改善しないため、ドパミン仮説では統合失調症症状の全てを説明することは困難であると考えられる。こうした疑問点を理解する手がかりとなったのは、乱用すると統合失調症の全ての症状と区別しがたい異常を引き起こすフェンサイクリジン（phencyclidine, PCP）が、強力な NMDA（*N*-methyl-D-aspartate）受容体遮断薬であることを明らかにした、Lodge らのグループの研究である³⁾。

その後、西川らのグループによって、統合失調症では脳内の NMDA 受容体機能が低下している可能性を考える「グルタミン酸仮説（グルタミン酸伝達機能低下仮説）」が提唱されるようになった^{4,5)}。

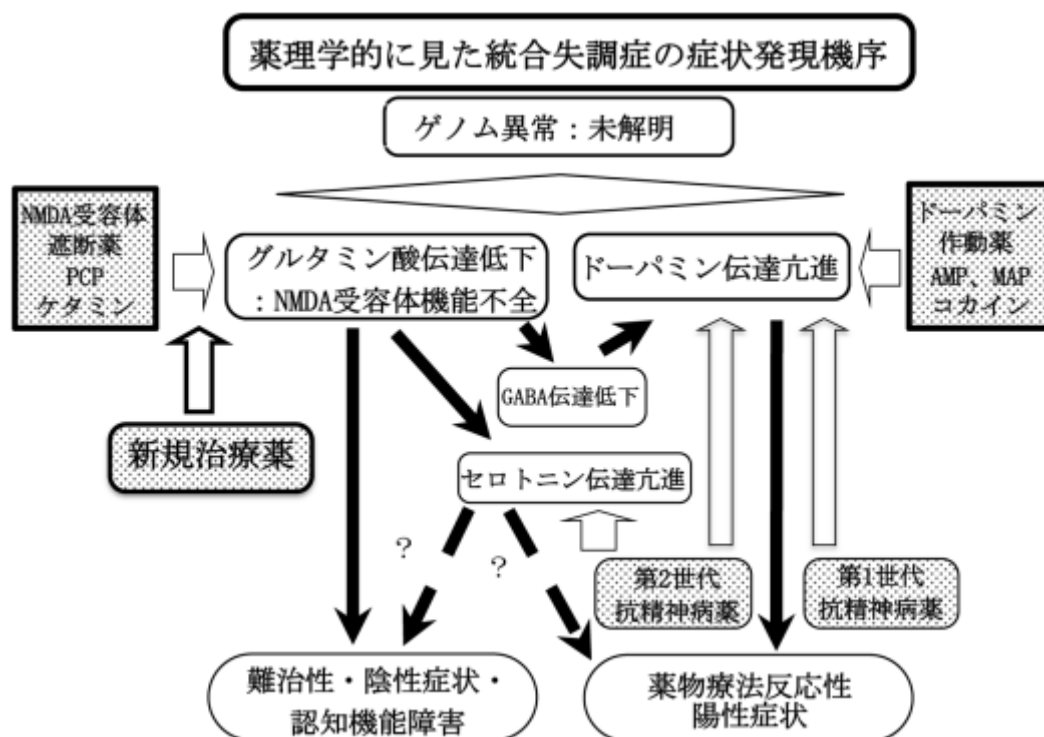


Figure 1-2-1 統合失調症の病態仮説：薬理学的観点から

NMDA 受容体は記憶や学習等に関与する重要な受容体であり、NR1 (GRIN1) と NR2A～2D (GRIN2A～2D) または NR3A～3B (GRIN3A, 3B) の各サブユニットが組み合わさり 4 量体を形成すると推測されている。グルタミン酸が結合する部位以外に、グリシン、マグネシウム、PCP、ポリアミン、亜鉛等の結合部位を持つことが知られている (**Figure 1-2-2**)。近年提唱されている統合失調症の『グルタミン酸伝達低下仮説』は、次のような根拠に基づいている：(1) NMDA 受容体遮断薬 (PCP, ketamine, dizocilipine 等) は統合失調症の陽性、陰性様症状を引き起こす、(2) 精神異常を誘発する力価は NMDA 受容体遮断作用と相関しており、例えば ketamine は NMDA 受容体遮断作用の強い立体異性体 (*S* 体の方が *R* 体よりはるかに強い) の方が精神異常を誘発しやすい、(3) 統合失調症患者は健常者より NMDA 受容体遮断薬に感受性が高く精神障害が生じやすい、(4)

PCP が精神障害を引き起こし、麻酔作用・意識障害を示さない時の血中濃度は、NMDA 受容体以外の神経伝達系には作用しない低レベルである。実際に統合失調症患者の死後脳研究において、まだ研究者間での不一致はあるものの、NMDA 受容体 mRNA、タンパク質発現量の変化が報告されている^{3,4)}。

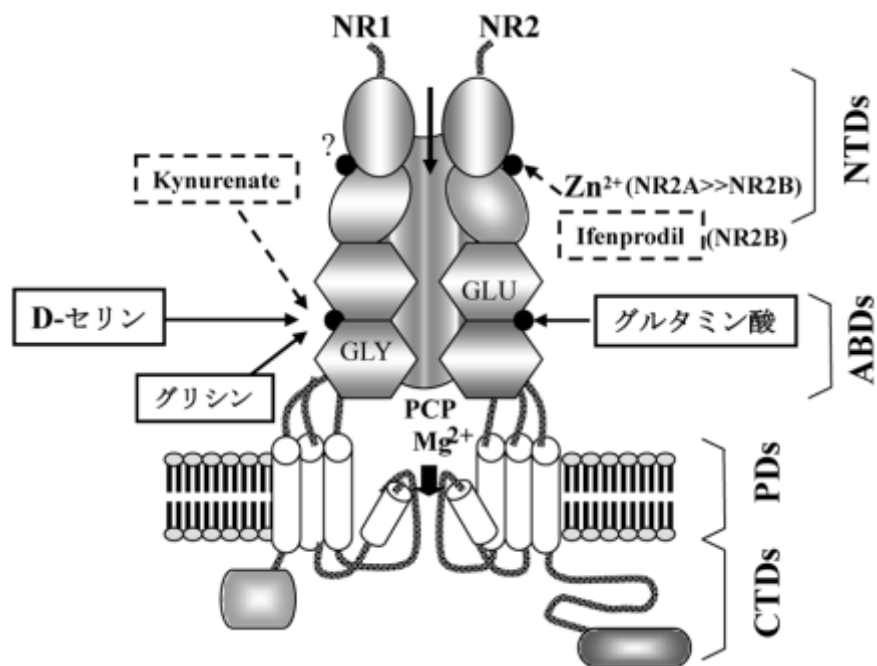


Figure 1-2-2 グルタミン酸（NMDA）受容体と主要な内在性リガンド作用部位

D-アミノ酸を基質とする D-アミノ酸酸化酵素が発見⁶⁾されてその反応機構について詳細な研究が行われてきたが、腎臓、肝臓、脳にこの酵素が存在する意義は不明であった。哺乳動物については 1980 年代に遊離型 D-アスパラギン酸、1990 年代初めに遊離型 D-セリンが見いだされた。1991 年に統合失調症への D-セリンの関与が報告され^{3,4)}、2002 年に D-アミノ酸酸化酵素の統合失調症への関与が報告された⁷⁾。現在、D-セリンは哺乳類の脳の内在性 NMDA 受容体のコアゴニストと考えられ、脳では、D-セリンの生合成、細胞外液への放出、取り込み、分解などの代謝過程が観察され、一群のグリアとニューロンに D-セリンが放出される (**Figure 1-2-3**)。統合失調症は神経伝達系の異常により引き起こされてことが示唆されている。D-アミノ酸は、広範囲の生物中に存在しているにも関わらず、多くの場合、非天然型アミノ酸と呼ばれている。近年、哺乳類の生体内には存在しないと考えられていた D-アミノ酸が生体内に存在し、特にヒト脳内において、遊離している D-セリンがグルタミン酸受容体 (N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA サブタイプ) の活性化因子(内因性のコアゴニスト)として作用し前脳内に豊富に存在していることが示唆されている⁸⁾。

ヒト D-アミノ酸酸化酵素 (Human D-Amino acid oxidase, hDAO) は、ヒト脳内に局在し、脳内 D-セリンの調整因子として作用し、ヒドロキシピルビン酸に変換される。従って、脳内 hDAO の過剰発現は、適切な神経機能に必要なレベル以下へと D-セリン量を減少させることから、hDAO 阻害剤が統合失調症に対する新たな治療薬として期待されている。

福井らは、アストロサイトにおける DAO の発現と D-セリン代謝脳内における DAO 遺伝子の発現の場は、その生理学的意義を考察する上で、極めて重要であると考えた。中枢神経系を構成する細胞として代表されるニューロンとグリアのどちらに DAO が発現しているかを明らかにするため、哺乳類(ラット)の脳よりグリア細胞の初代培養系を確立し、RT-PCR 法を用いて本酵素の遺伝子発現を検討した。その結果、小脳のみならず、従来は否定的であった大脳由来のグリア細胞でも DAO の遺伝子発現が認められた。さらにタイプ1、タイプ2アストロサイトの分離培養により、D-セリンの産生の場が主としてタイプ2アストロサイトであると考えられるのに対し、DAO はタイプ1アストロサイトでの発現が顕著であることを明らかにしている。⁹⁾

以上の研究結果より、hDAO の過剰発現により代謝が進行し、脳内 D-セリン濃度が減少することにより、神経伝達の異常が引き起こされ、精神神経疾患である統合失調症が引き起こされることが示唆される。また、現在この作用機序に基づいた既存の治療薬は存在していない。

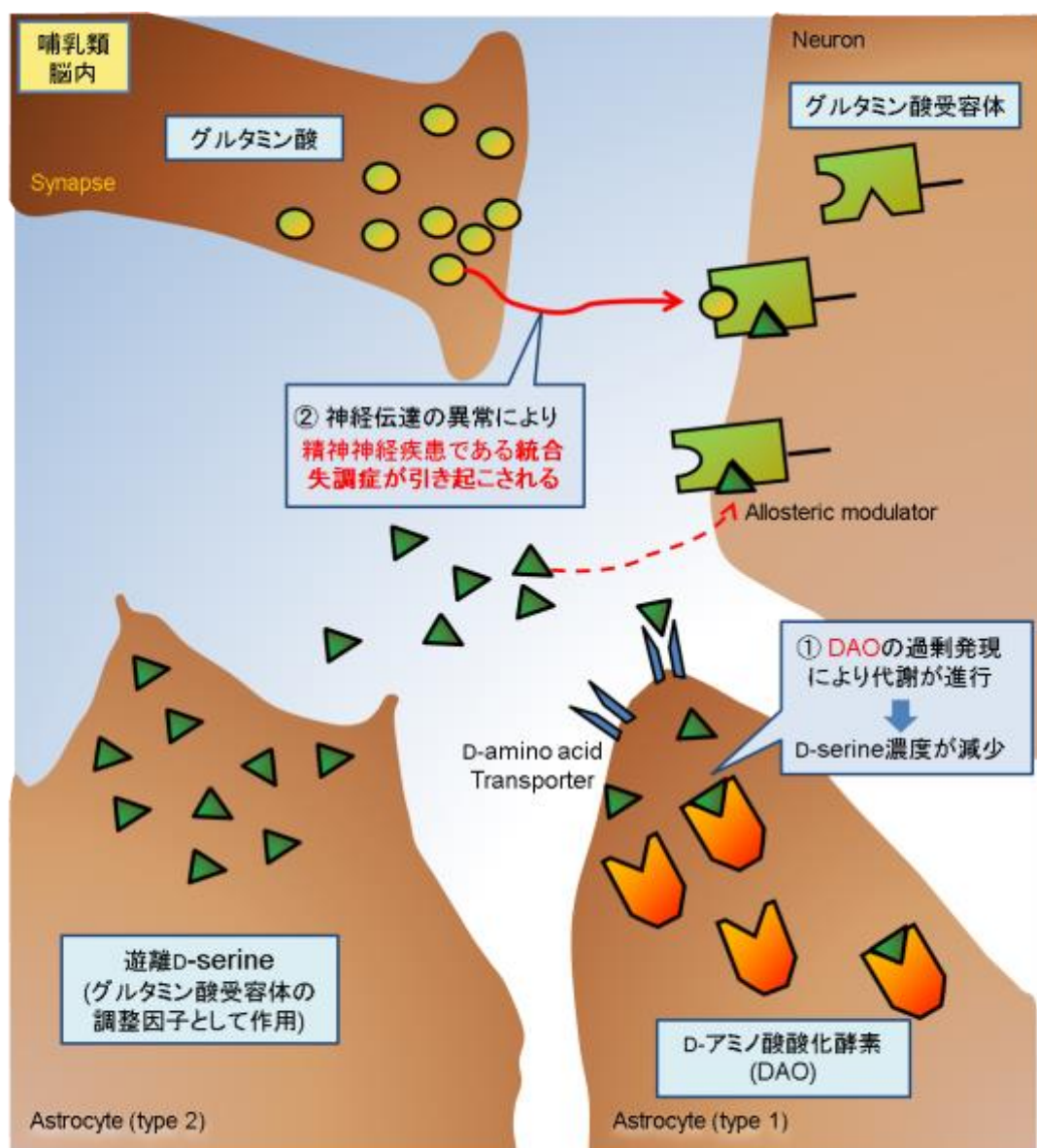
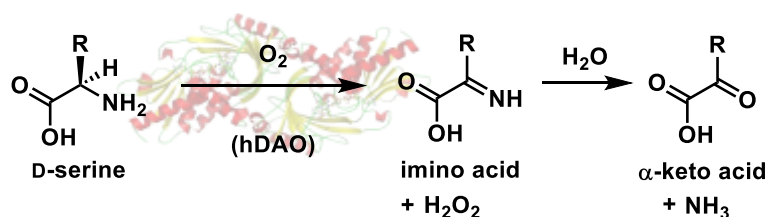


Figure 1-2-3 D-アミノ酸酸化酵素と統合失調症との関連

1-3 D-アミノ酸酸化酵素

D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は、Hans Adolf Krebs により、1935 年に初めて発見されたフラビン酵素として知られている⁶⁾。DAO は、フェニルアラニン、チロシンや DOPA などの中性かつ芳香族性を有する D-アミノ酸を良基質としているが、D-セリン、D-アラニン、D-プロリン、グリシンや *N*-メチルグリシン (サルコシン) も酸化する。また、脳内では、同一のサブユニットで構成されている 2 量体で存在していると考えられている。

hDAO は、D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒しイミノ酸に変換する。イミノ酸になった D-セリンは、非酵素的な加水分解反応により最終的には α -ケト酸とアンモニアに分解される (Scheme 1-3-1)。

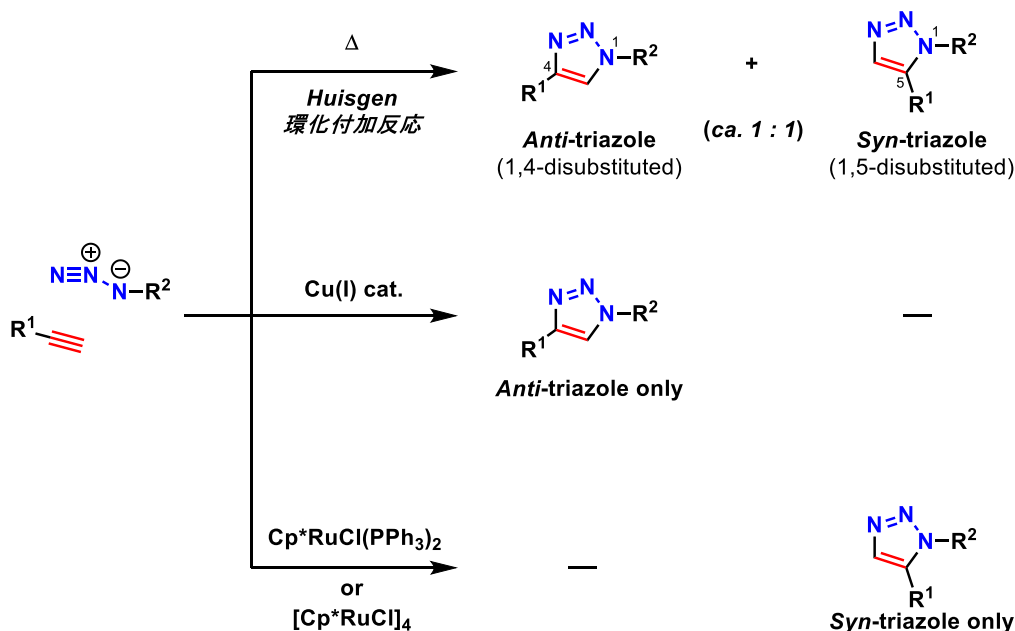


Scheme 1-3-1 D-セリンは DAO によりイミノ酸へと変換される

DAO は、フラビン酵素であり活性部位内に隣接し FAD が結合した状態をとっている。実際の反応機構は、D-アミノ酸がイミノ酸に変換される際に、FAD_{ox} は FAD_{red} に変換される。変換された FAD_{red} が酸素と反応する事により、再び FAD_{ox} に戻ることを促進させる。

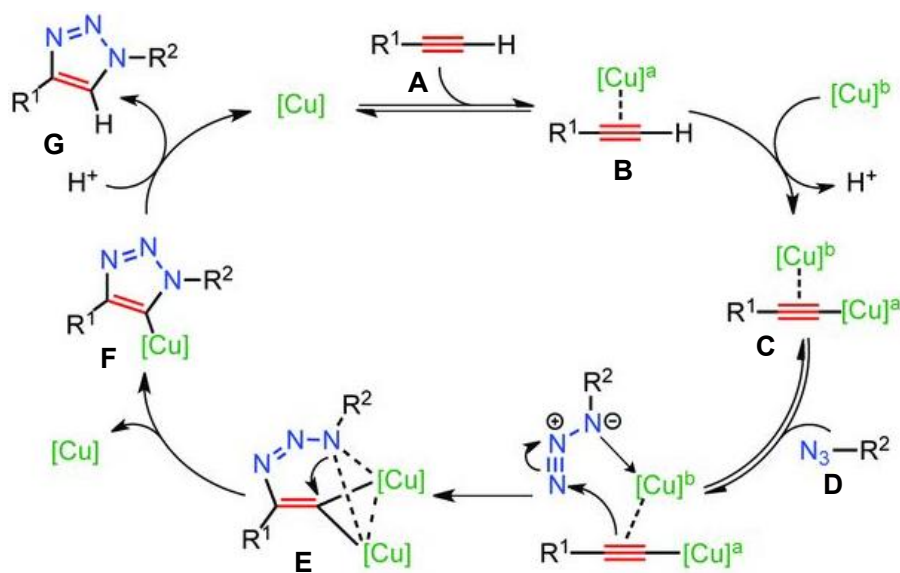
1-4 Click chemistry について

Click chemistry は 2001 年に K. B. Sharpless らによって提唱された、2 種類の官能基間で起こる選択的かつシンプルな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¹⁰⁾。Click chemistry に用いられる代表的な反応はアジドとアセチレンによるトリアゾール化反応である。トリアゾール化は、A. Michael らによって 1893 年に初めて報告された¹¹⁾。そして、R. Huisgen ら^{12,13)} により詳細な研究が行われ、現在では一般に Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition と呼ばれている。しかしながら、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可能性として 2 種類のジアステレオマーを与えるがその位置選択性の制御は難しく、一般的に 2 種類の混合物を与える。また、Cu(I)触媒および Ru(II)触媒を用いる事により、*anti* 体 (1,4-二置換トリアゾール) および *syn* 体 (1,5-二置換トリアゾール) の幾何異性体を単一で得ることも可能である (Scheme 1-4-1)。



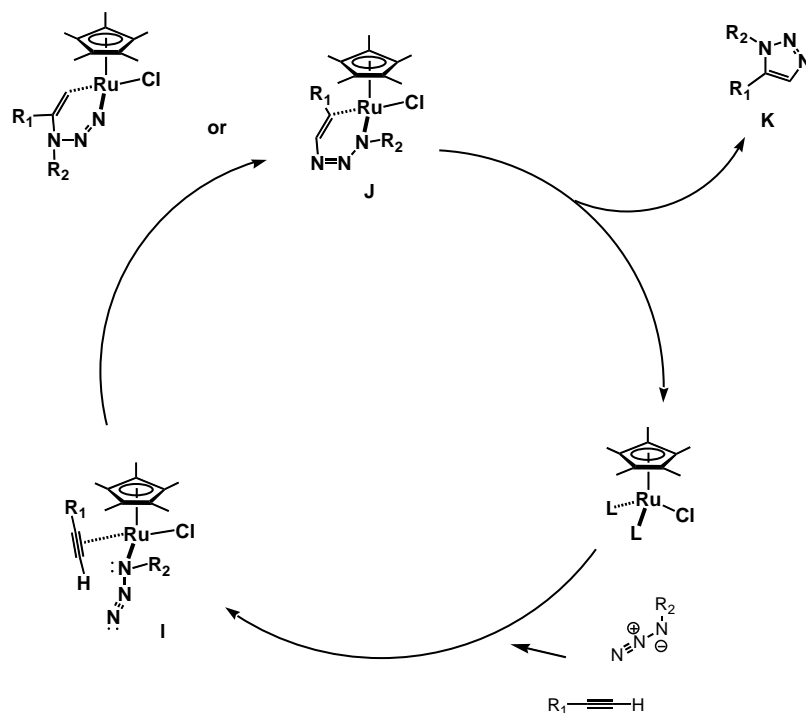
Scheme 1-4-1 Click chemistry

その後、Sharpless と Fokin、 Meldal の 2 グループからほぼ同時期に、末端アルキンと有機アジドを用いたトリアゾール化において一価の銅触媒による *anti*-トリアゾール形成 (1,4-二置換トリアゾール) の反応促進効果を発見したことで、完全な *anti*-選択的トリアゾール化反応が可能となった^{14,15}。そのメカニズムは、末端アセチレン (A) に一価の銅が配位し (B)、二核の銅アセチリド (C) を形成した後、アジド化合物 (D) と位置選択的に反応し、その後、(E) を経由し (F) が形成され、*anti*-トリアゾール環 (G) が形成される (Scheme 1-4-2)¹⁶。



Scheme 1-4-2 Cu(I)触媒による *Anti*-トリアゾール形成反応

また、二価のルテニウム触媒による *syn*-選択的トリアゾール化が 2005 年に Zhang らにより報告されている¹⁷⁾。そのメカニズムは、アセチレンの炭素とアジドの窒素がそれぞれ非末端部位で二価のルテニウムに配位し、(I) を経由して (J) となる。その後ルテニウムが脱離すると結果として *syn*-トリアゾール (1,5-二置換トリアゾール) 体 (K) が生成される (Scheme 1-4-3)¹⁸⁾。



Scheme 1-4-3 Ru(II)触媒による *Syn*-トリアゾール形成反応

このトリアゾール化は、多くのアジド分子とアセチレン分子の組み合わせにより多様な基質を生み出すことができるため、非常に有用であり、現在までに多くの分野で目覚ましい成果が報告されている¹⁹⁻²¹⁾。例えば、生物活性を示す化合物の合成、タンパク質やポリヌクレオチドの修飾機能化、色素の合成、ポリマーの高機能化、新規ポリマーの合成等が挙げられ、その成果には枚挙に暇がない。しかも、2003年のclick chemistryの総説²²⁾以降、関連の論文数は飛躍的に

増えており、Web of science Core Collection (THOMSON REUTERS™)によると、2015年までに全科学領域において11,000報を越えている（Table1-4-1, Figure 1-4-1）。

Table 1-4-1 Click chemistry の報告数

	Organic chemistry	All
2003	4	14
2004	16	47
2005	33	99
2006	85	218
2007	141	387
2008	200	643
2009	237	832
2010	287	1129
2011	334	1367
2012	352	1463
2013	383	1670
2014	405	1859
2015	358	1679
Total	2835	11407

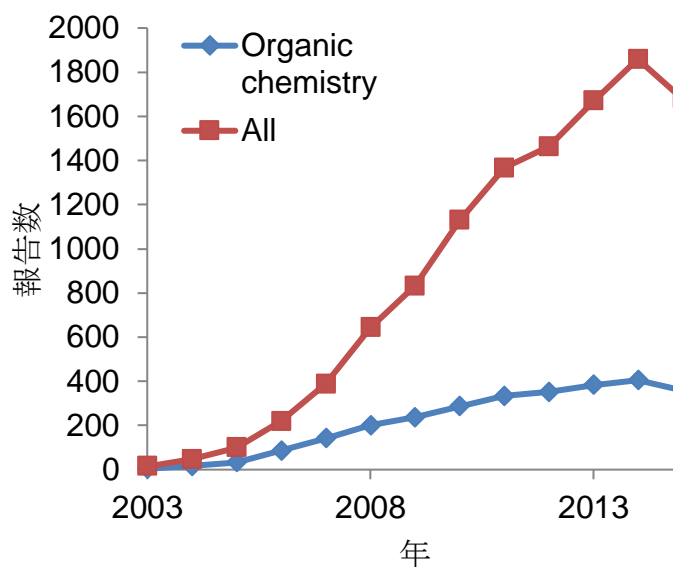


Figure 1-4-1 Click chemistry報告数

1-5 *In situ* click chemistryの概念

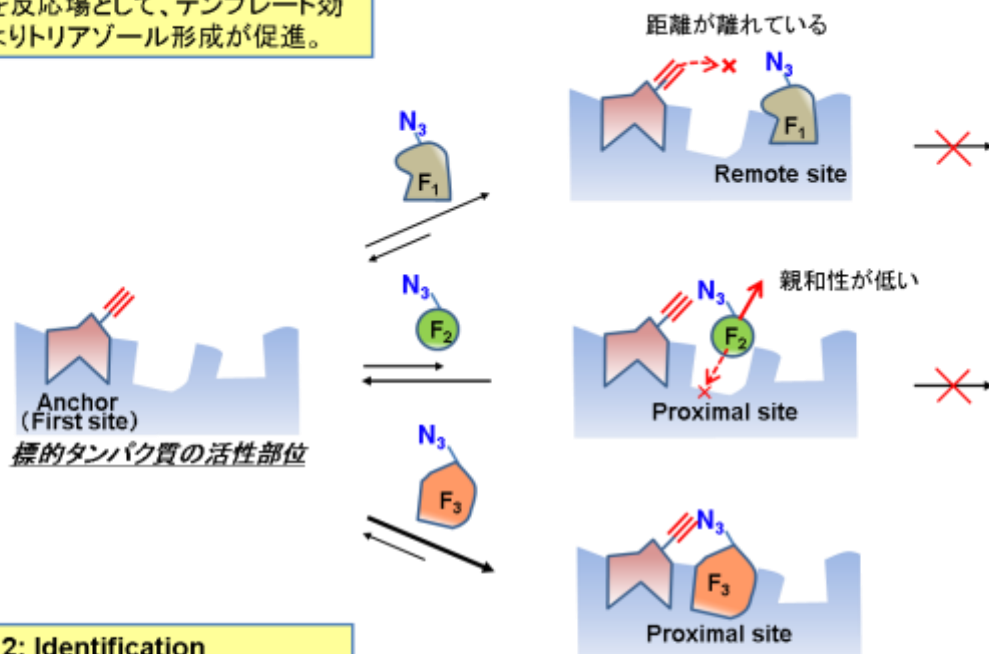
In situ click chemistry²³⁾とは、前述したclick chemistryを応用した考えであり、“酵素中で、酵素自身がclick反応を促進させ自らの強力な阻害剤を合成する”という概念に応用したものである (Figure 1-5-1)。トリアゾール反応を利用した*in situ* click chemistryとは、標的酵素（タンパク質）のリガンド（阻害剤）作用部位を反応場として、それぞれのビルディングブロック（有機アジドとアセチレン分子）が活性部位若しくはその周辺の結合部位に結合した後、標的タンパク質のテンプレート効果により促進されることを指標に、より親和性の高いトリアゾール化合物を探索する方法論である。

例えば、始めに標的タンパク質の活性部位にアンカー分子が結合する。次にF₁アジドが結合した場合では、アンカー分子との距離が離れていることから、トリアゾール化は進行しない。F₂アジドは、アンカー分子の近傍に結合するが、親和性が悪いことから、トリアゾール化反応は進行しない。F₃アジドは、アンカー分子の近傍かつ親和性が高いため、トリアゾール形成が促進され、より高活性なリード化合物が見出されたこととなる。

実際にダイナミックに動いている、標的タンパク質を捉えることにより、スタティックな情報からの合成よりもより高度に標的タンパク質に結合する化合物を見出すことが可能となる²³⁾。このようにして誘導される分子は標的酵素との結合親和性部位が新たに導入されたことになるため、より親和性の高い分子の創製が可能となる。

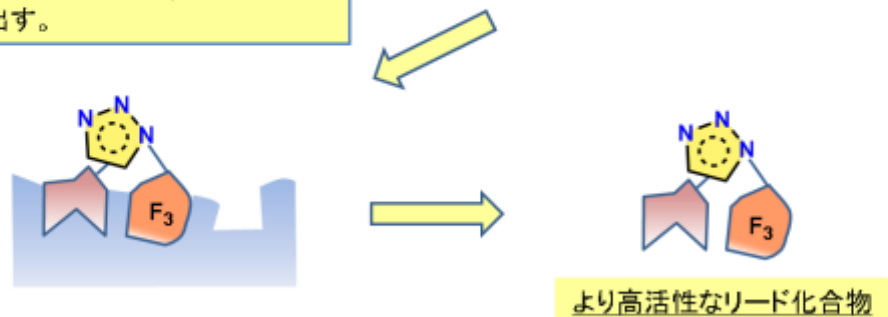
Step 1: Selective binding

アセチレンとアジド分子が標的タンパク質(酵素)のリガンド(阻害剤)作用部位を反応場として、テンプレート効果によりトリアゾール形成が促進。



Step 2: Identification

対応するアルキンとアジドと比較し、より高い親和性を示すトリアゾールを見出す。



- 1) W. G. Lewis et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 1053-1057.
- 2) T. Hirose et al., *J. Antibiot.*, 2009, 62, 277-282.

Figure 1-5-1 *In situ* click chemistryのコンセプト²³⁾

*In situ click chemistry*は、Scripps研究所のSharpless教授のグループによって精力的に研究が行われており、標的タンパク質などに対し高い親和性を有する新規リガンド分子の開拓に利用されている。現在までに、*in situ click chemistry*を利用したタンパク質阻害剤探索研究から神経伝達物質分解酵素である、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤の探索²⁴⁻²⁷⁾、炭酸脱水酵素²⁸⁻³¹⁾、HIV-1プロテアーゼ³²⁾、SmChi (Chi)³³⁻³⁵⁾、結核菌のEthRタンパク質³⁶⁾、Akt1³⁷⁾、アセチルコリン結合タンパク質³⁸⁾、G-Quadruplex³⁹⁾ および、ビオチンタンパク質リガーゼ阻害剤⁴⁰⁾にてテンプレート効果が確認されている。以下、最初の例について簡単に言及する。

1-6 *In situ click chemistry*の研究の最初の例: アセチルコリンエステラーゼを用いた例

初めての*in situ click chemistry*は、アセチルコリンエステラーゼを標的としており、2002年、Scripps研究所のSharpless教授らによって報告された²⁵⁾。アセチルコリンエステラーゼは、神経伝達物質であるアセチルコリンを酢酸とコリンに加水分解する酵素であり、その阻害剤は、アルツハイマー病などの治療薬として展開されている。

アセチルコリンエステラーゼは、触媒部位と周辺部位の二つの結合部位を有しており、それら結合部位は、20 Åとお互い近傍に存在する。触媒部位は、活性ポケットの底に位置しており、周辺部位は、活性ポケットの入り口付近に存在している。また、特異的に相互作用する阻害剤は30年以上前から知られており、代表的な例を挙げると、tacrineは、触媒部位の阻害剤で $K_d=18$ nMと強力な活性を有し、一方、propidiumは、周辺部位の阻害剤で $K_d=1.1$ μ Mの活性を有する (Figure 1-6-1)。

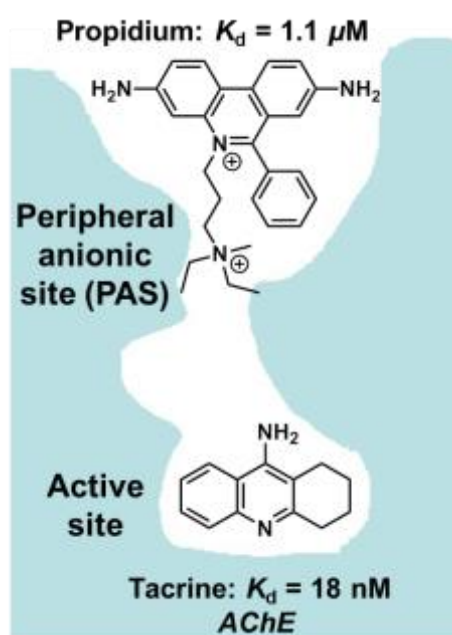


Figure 1-6-1 AChE の活性部位

Manetschらは、*in situ click chemistry*の概念を証明するために、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を有する触媒部位と周辺部位の阻害剤にアジドおよび末端アセチレンをそれぞれ導入し、アセチルコリンエステラーゼ中で反応させることにより高活性化化合物の探索を行った。それらの阻害剤が酵素中で適切な方向かつ位置でトリアゾール形成され、結果としてアセチルコリンエステラーゼとの作用点が二カ所となることにより強力な阻害剤が生じると考えた。即ち、アジドとアセチレンを有するtacrine誘導体とpropidium誘導体をそれぞれ調製し、マウスとウナギのアセチルコリンエステラーゼを用いて、*in situ click chemistry*を行った (Figure 1-6-2)。

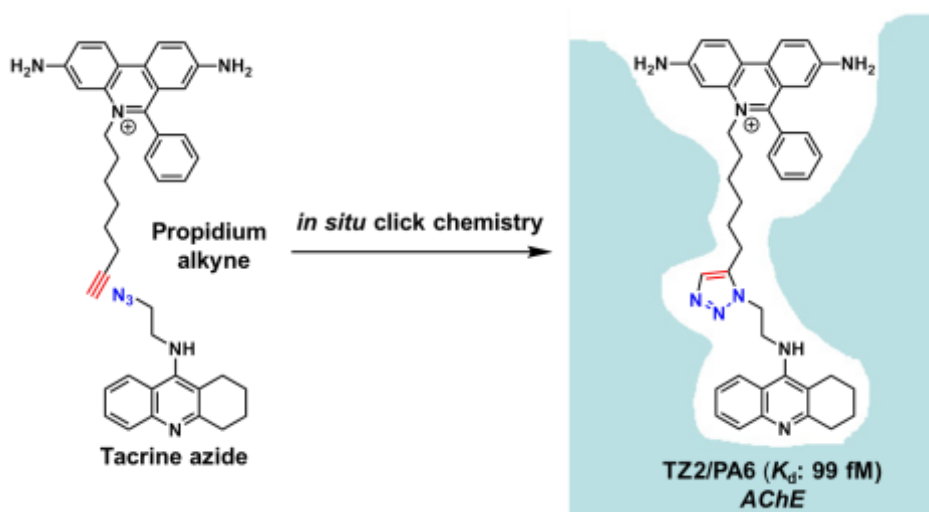


Figure 1-6-2. *In situ click chemistry*によるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の探索

189 種類 (トリアゾールの *syn/anti* 体を考慮すると 378 種類)の組み合わせをスクリーニングした結果、LC/MS-SIM の分析により 6 種類のトリアゾール体がヒットし、さらにそれらは全て *syn*-トリアゾール体を生成していることが判明した。それらの中で、**TZ2/PA6** が最も強力な阻害活性を有し、 $K_d = 99$ fM を示した。

以上のようにManetschらは、アセチルコリンエステラーゼを効率的に用いて*in situ click chemistry*の概念を具現化し、高活性な化合物の探索・創製に成功している。

1-7 当研究室で行われた *in situ click chemistry* の例: キチナーゼ阻害剤の例

当研究室では 2009 年に、キチン加水分解酵素である *SmChi* を用いた *in situ click chemistry* の研究が報告されている。天然物であるキチナーゼ阻害剤 *argifin* と *SmChiB* との X 線共結晶構造解析から、*argifin* の *N*-メチルカルバモイルグアニジル部位がキチナーゼのアミノ酸残基と相互作用する部分である事がわかっている³³⁾(**Figure 1-7-1**)。そこで、相互作用部位であるアルギニン残基を基にした、*in situ click chemistry* に利用可能なアンカー分子の設計および合成が行われ、アジド体 (**A**)が見出された。

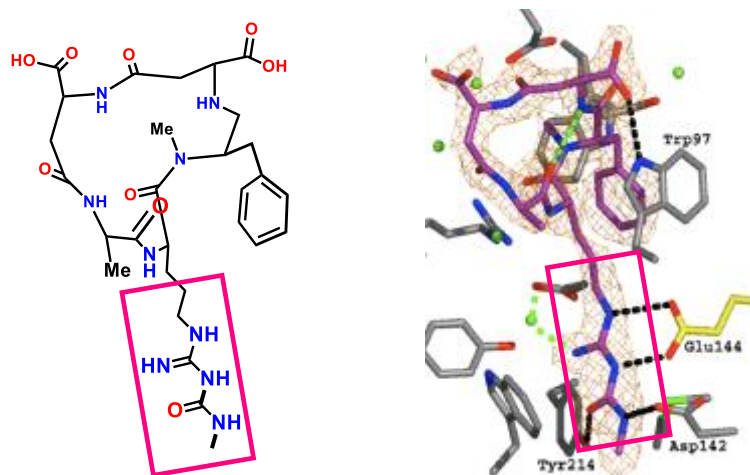


Figure 1-7-1 Argifin/*SmChiB* の X 線共結晶図

アジド体 (**A**)は天然物と比べ *SmChiA* に対しては同程度、*SmChiB* に対しては阻害活性が 10 倍向上した(**Figure 1-7-2**)。

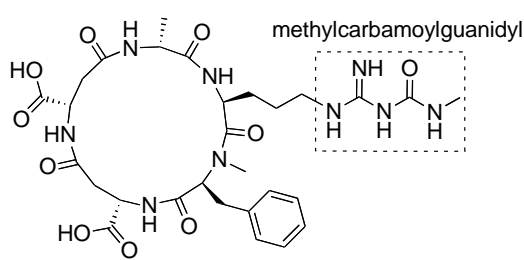
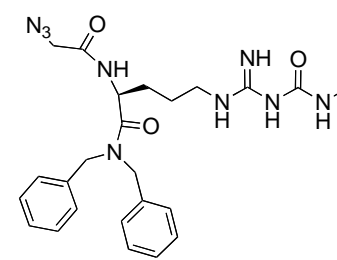
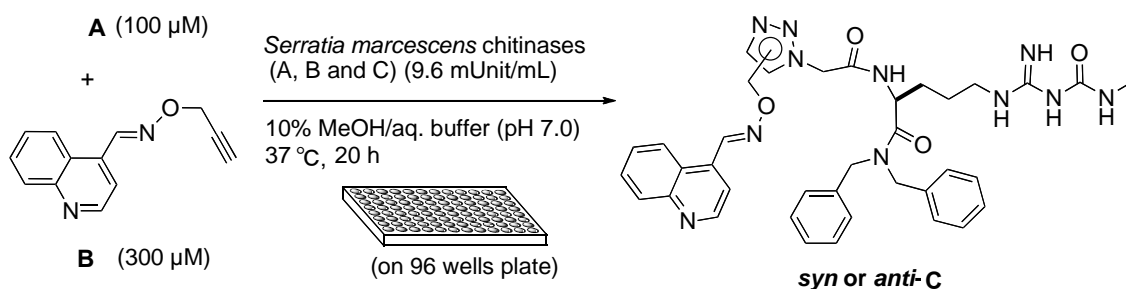
			
Argifin		IC ₅₀ values (μM)	
		Argifin	A
<i>Serratia marcescens</i> chitinase A (<i>SmChiA</i>)		0.025 μM	0.045
B (<i>SmChiB</i>)		6.4 μM	0.58
C (<i>SmChiC</i>)		>30 μM	>30

Figure 1-7-2 *In Situ* Click Chemistry for Chitinase Inhibitors

続いて、アジド体 (A)と 71 種のアセチレンライブラリーを用いて 96 ウェルプレート上でスクリーニングを行った (Scheme 1-7-1)。SmChi は市販されているキチナーゼ A, B, C 混合物を用いて行うことで一挙にすべてのイソ酵素に対してスクリーニング可能と考えた。また生成物のトリアゾール体の検出は Scheme 1-7-3 の反応後、LC/MS-SIR を用いて個々のトリアゾール体の検出を行い、酵素非存在下との反応と比較して行った。その結果、アセチレン誘導体 (B)において酵素によるトリアゾール体 (C)の形成が促進された (Figure 1-7-3)。



Scheme 1-7-3 SmChi テンプレート *in situ* click chemistry

続いて、*in situ* click chemistry でヒットした化合物(C)について銅触媒による *anti*-(C)とルテニウム触媒による *syn*-(C)の合成をそれぞれ行い阻害活性試験を行った。その結果、*syn*-(C)が *SmChiB* に対して IC₅₀ 値 0.022 μM と非常に強力な阻害活性を有することが確認された。これは天然物の Argifin に比べ約 300 倍の活性向上を達成している。

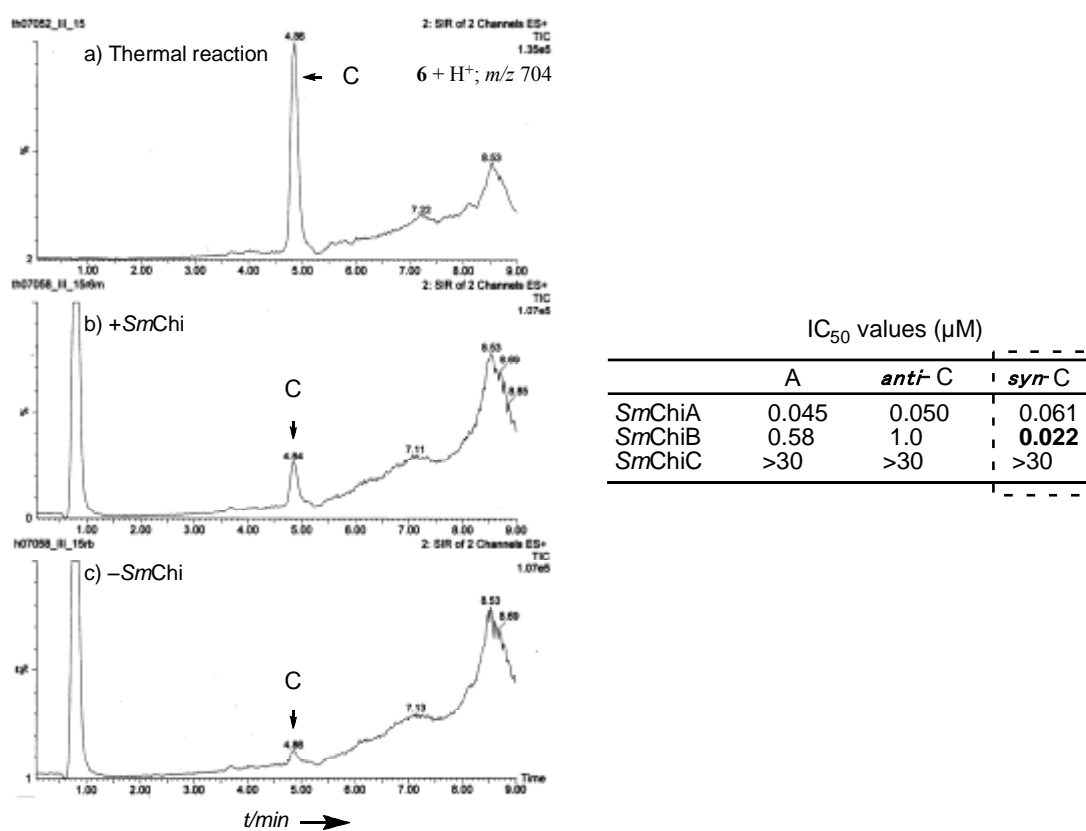


Figure 1-7-3 LCMS-SIR 分析の結果とトリアゾール C の阻害活性

1-8 微生物由来天然物からの D-アミノ酸酸化酵素阻害剤探索の意義

1981 年から 2012 年までに医薬品として承認された新規化合物は、1,355 種類報告されている。その中でも天然物由来の化合物は全体の 7 割をも占めている⁴¹⁾。(Figure 1-8-1) また、天然物は、多彩な化学構造を有していることから、創薬の大きなヒントとなり得る。

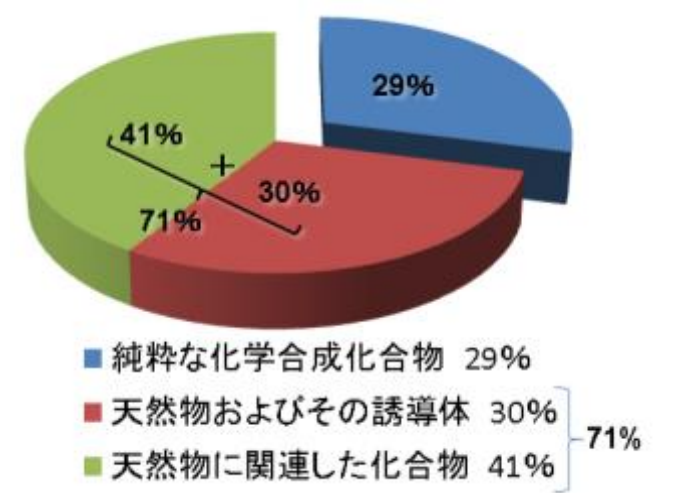
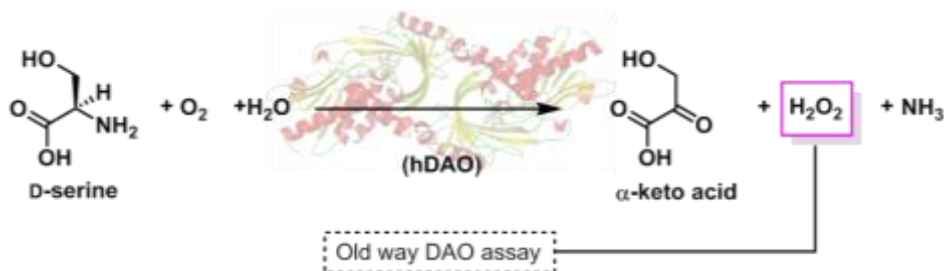


Figure 1-8-1 1981 年から 2012 年までに医薬品として承認された新規化合物

1-9 北里生命科学研究所にて行われた微生物由来天然物からの D-アミノ酸酸化酵素阻害剤の探索

hDAO は、D-セリンに作用し、酸化的脱アミノ化反応により、最終的に α -ケト酸へと変換される。その際、酸素を消費し過酸化水素を生成する (Scheme 1-9-1)。



Scheme 1-9-1 DAO による D-セリンの酸化

hDAO は、D-アミノ酸を酸化する際に酸素を消費し過酸化水素を生成するため、hDAO に対する迅速な阻害活性物質探索では、過酸化水素を定量することにより評価している。本スクリーニング法について詳しくは、本論で述べることとするが、生成する過酸化水素を 2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン) -6-スルホン酸 (ABTS) /西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) が間接的に定量することにより行われている。

これまで北里生命科学研究所において、本方法を利用して、微生物二次代謝産物からの DAO 阻害活性のスクリーニングが行われていたが、有用な DAO 阻害活性を有する化合物は見出されていない。本評価法の問題点として、培養液中や天然物自体に例えば硫黄を含む化合物などの過酸化水素と反応しうる基質が多いことが挙げられ、その評価に限界があった。また、正確に DAO の阻害活性を評価できる方法として、酵素反応により消費される酸素量を測定するオキシグラフ法があるが測定に時間を要するためスクリーニングには適していない。

1-10 研究目的

当研究グループでは、標的酵素誘導型トリアゾール化反応である *in situ click chemistry* を利用した、高親和性を有する酵素阻害剤の探索を精力的に行っている³³⁻³⁵⁾。

本研究の目的は、*in situ click chemistry* を利用した新たなスクリーニング法を確立し、微生物由来天然物からの hDAO 阻害剤の探索を行うことにより、hDAO 阻害活性を有する天然物を見出すことである (**Figure 1-10-1**)。その戦略として、hDAO 阻害剤探索において *in situ click chemistry* に利用可能な hDAO 阻害活性を有するアルキンもしくはアジド官能基を有するアンカー分子の創製を行い、その基質をリガンドとして hDAO 存在下、*in situ click chemistry* のスクリーニングを行い高活性 hDAO 阻害剤（ヒット化合物）を見出す。次に、hDAO テンプレートによる *in situ click chemistry* ヒット化合物（トリアゾール体）の生成促進効果を指標とし、そのトリアゾール形成を阻害する化合物を微生物培養液ライブラリーから探索することとした。

本反応を拮抗する分子は hDAO 阻害を示す分子であり、トリアゾール形成促進効果の指標から、hDAO 酵素活性部位に直接作用する分子を簡便に探索できる。さらに、得られた天然物から合成展開（全合成、誘導体合成）も行い、優れた医薬品候補化合物の創製を行うことも可能となる。

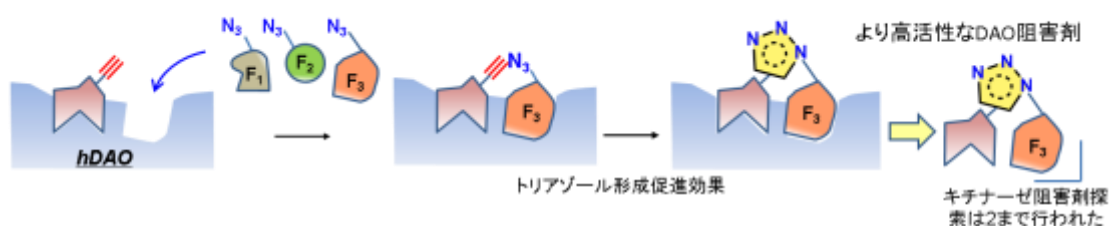
以上より、筆者は、①共同研究者により報告されている hDAO と imino-DOPA との X 線共結晶図を参考にし、*in situ click chemistry* に利用可能なアンカー分子の設計および合成を行う。②次に創製したアンカー分子と所属研究室で保有しているアジドライブラリーとの *in situ click chemistry* を行い LC/MS を用いたスクリーニングにより、高選択的な hDAO 阻害剤を見出す。③続いて、見出されたアンカー分子、およびアジドフラグメントに、imino-DOPA と同様に hDAO の活

性部位に結合する hDAO 阻害剤として知られている sodium benzoate を共存させ、トリアゾール形成促進効果が抑制されることを確認する。④さらにトリアゾール形成の阻害が確認された後、北里生命科学研究所で保有する天然物ライブラリー、および微生物培養液ライブラリーから、トリアゾール形成の阻害を指標とした hDAO 阻害剤の探索を行うことにした。

1. *In situ* click chemistryに利用可能なアンカー分子の創製



2. アンカー分子とアジドライブラリーとの *in situ* click chemistryによるhDAO阻害剤の探索



3. 微生物由来天然物ライブラリーからのhDAO阻害剤の探索

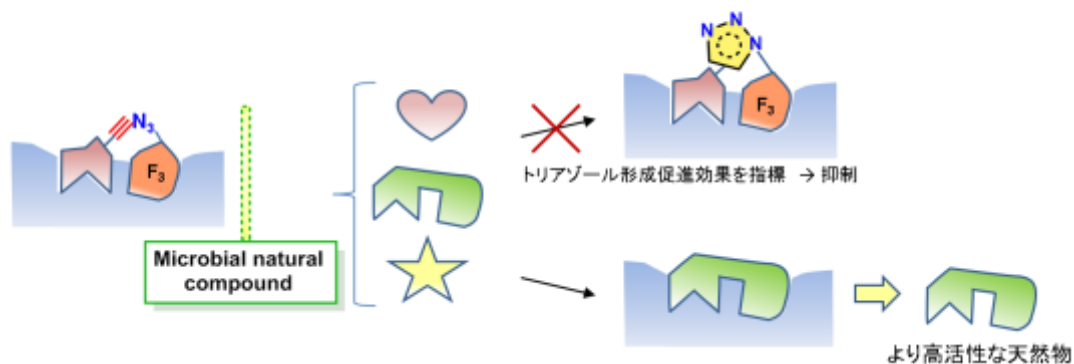


Figure 1-10-1 *In situ* click chemistry を利用した新規 hDAO 阻害天然物探索の戦略

2. 本論

2-1 大腸菌を用いたリコンビナントD-アミノ酸酸化酵素の大量発現および精製

ヒトD-アミノ酸酸化酵素 (human D-amino acid oxidase, hDAO) 阻害剤の探索で用いるhDAOの調整を行うこととした。共同研究先である、徳島大学 福井清教授により既に確立されている方法により、hDAOの発現・精製を行うこととした⁴²⁾。まず、*E. coli*.を用いたリコンビナントhDAOの大量発現を行った。hDAOの発現には、細胞発現ベクターであるpET-11bのT7プロモーター下流に組み込まれた、*E. coli*. BL21 (DE3) 株を用いた。

500 mLの三角フラスコ内の100 mL LB培地に大腸菌 (*E. coli*. BL21 (DE3)) 株を用いて植菌し、37 °Cにて24時間、振盪させ前培養を行った。5 Lの三角フラスコ内の1 L LB培地に、ampicillin、およびglucoseをそれぞれ加えた。さらに、100 mL大腸菌培養液を加え、37 °Cにて20時間、振盪させ大量培養を行った。600 nmのOD値を測定し0.6になったことを確認した後、培養を行った溶液にイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を加え、hDAOの発現誘導を37 °Cにて24時間行った。遠心分離により、沈殿物を回収し、hDAOを含有する菌体を湿重量にて60 g 得た (Figure 2-1-1)。

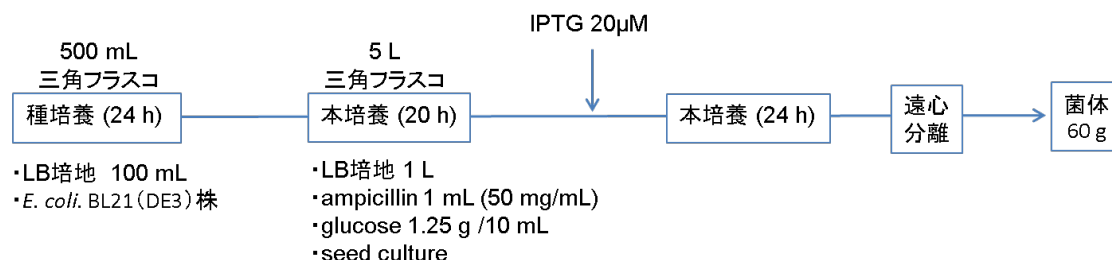


Figure 2-1-1. hDAOの発現

得られた菌体に対して超音波破碎を行った後、59 °Cにて3分間の熱処理によりhDAO以外のタンパク質を変性させた。硫酸分画および透析により精製したhDAO溶液に対し、陰イオンカラムクロマトグラフィー (DEAEセファロース) による精製を行った。同様に硫酸分画および透析を行ったhDAO溶液に対し、吸着クロマトグラフィー (Hydroxylapatite) による精製を行った。精製した

hDAO溶液に対し、硫酸分画および透析を行った後、濃縮を行い、2.0 mL (unit = 6.7 mg) の精製hDAOを取得した (Figure 2-1-2)。

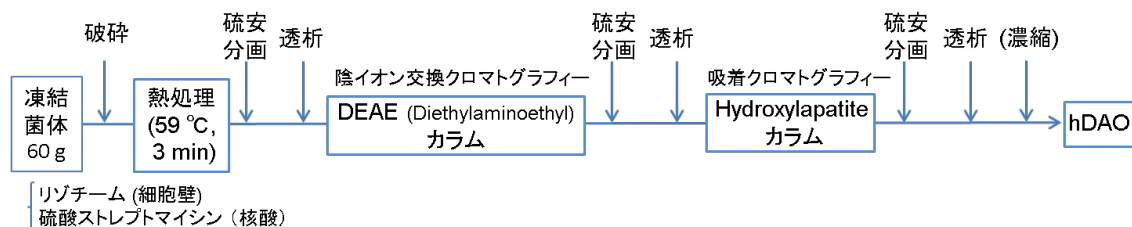


Figure 2-1-2. hDAOの精製

取得したhDAOが各段階で精製され、夾雑タンパク質が除去されていることの確認とhDAO含有分画の確認を吸光光度分析により、簡便に行うこととした。hDAOはフラビン酵素であり、FADがhDAOの活性中心に結合しホロ酵素として存在している時にその酵素としての機能が維持される。hDAOのホロ酵素の吸光スペクトルは、455 nm付近に確認される。熱処理後、DEAEカラム後、およびHydroxylapatiteカラム後に吸光スペクトルを分析した (Figure 2-1-3)。ホロ酵素 (455 nm) と芳香族性アミノ酸残基由来 (280 nm) のそれぞれの波長ピークを比較した結果、精製されていることが確認された。

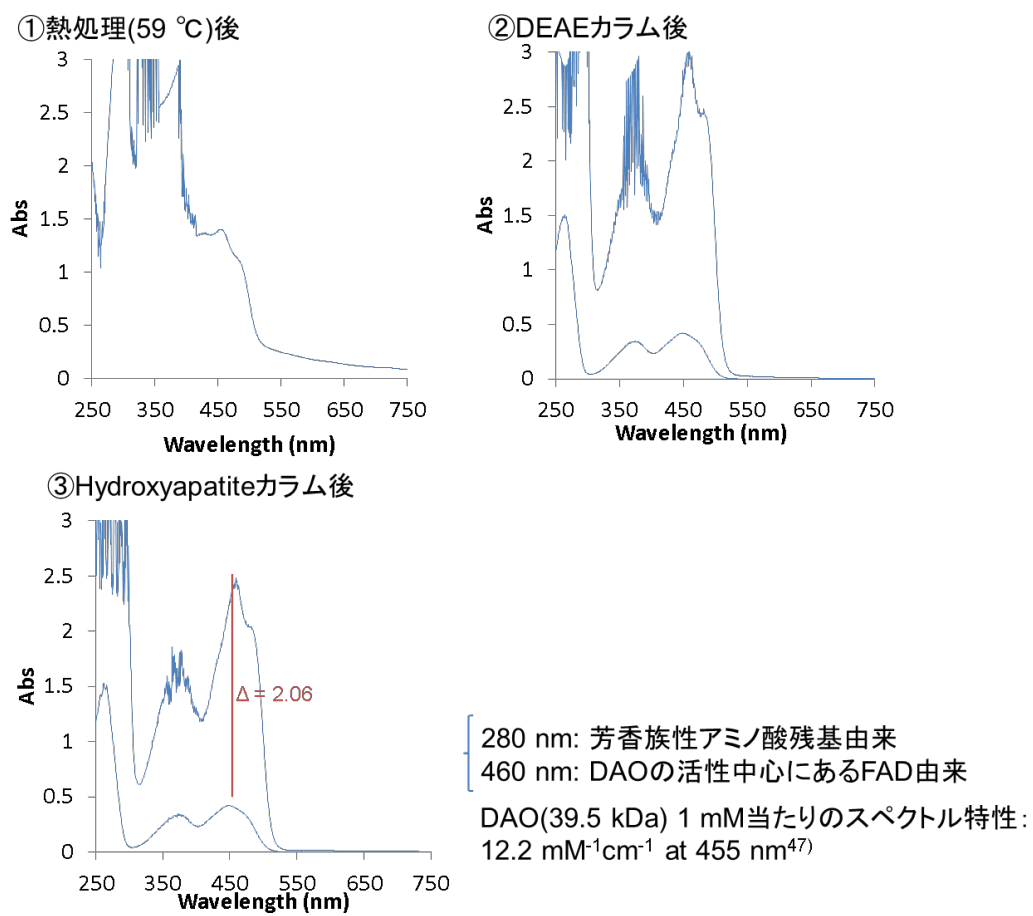


Figure 2-1-3 吸光スペクトルによるhDAOの純度の確認

2-2 In situ click chemistryに利用可能なアンカー分子のデザイン

共同研究先である徳島大学 福井清教授により、hDAO/FAD/リガンドの共結晶に対してX線分析が行われた結果、その結晶構造が明らかとなっている

(Figure 2-2-1, Figure 2-2-2)⁴²⁻⁴⁴)。既知のhDAOの基質アナログである阻害剤sodium benzoate、およびimino-DOPAは、D-アミノ酸が結合する活性部位と同様の部位で結合している。

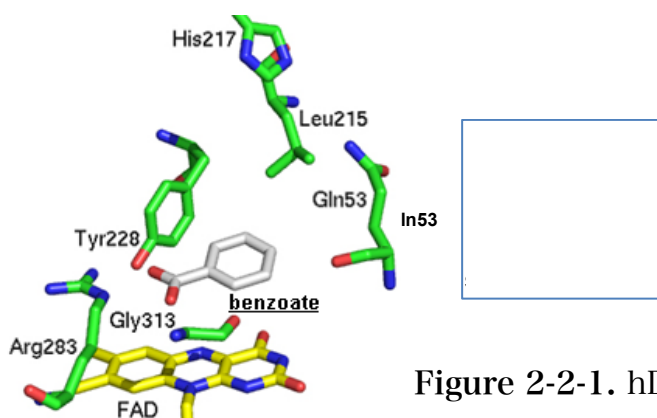


Figure 2-2-1. hDAO/FAD/sodium benzoateの結晶構造⁴²⁾

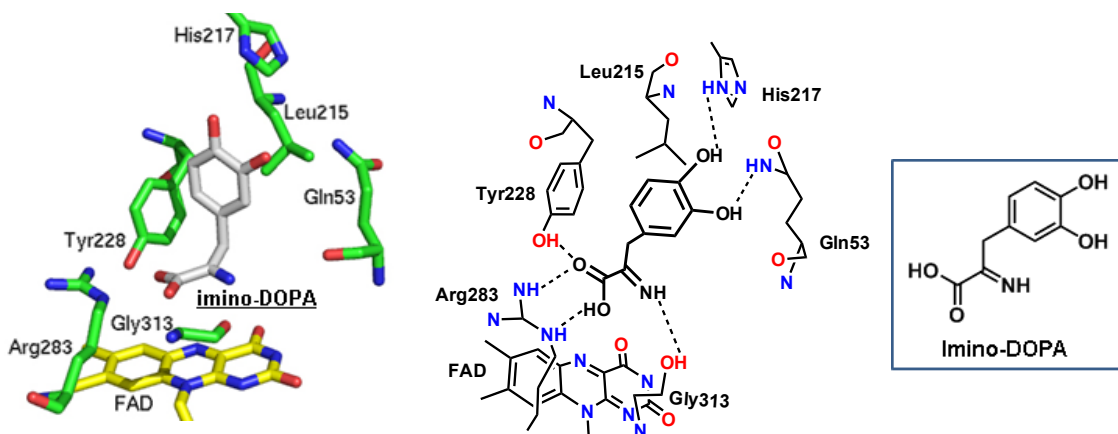


Figure2-2-2 hDAO/FAD/imino-DOPAの結晶構造⁴⁴⁾

そこで、hDAO/FAD/リガンドのX線共結晶図を参考にし、in situ click chemistryに利用可能なアンカー分子を合成することとした。

hDAOの活性部位で結合するhDAO阻害剤であるsodium benzoateの結晶構造を参考にしたアンカー候補分子を用いてin situ click chemistryによるhDAO阻害剤の探索を行うこととした (Figure 2-2-3)。Azido benzoateは既知化合物であり、安価かつ容易に入手が可能であることから、azidoを有するbenzoateをアンカー分子として利用しin situ click chemistryを行うこととした。また、hDAOに対する阻害活性は、4-azido benzoate (K_i : 0.1 mM)、3-azido benzoate (K_i : 0.1 mM)、2-azido benzoate (K_i : 1 mM) であることが明らかとなっている。

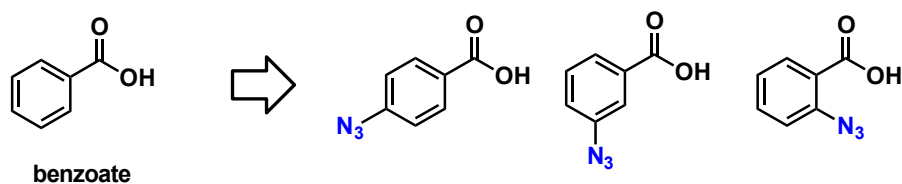


Figure 2-2-3. アンカー候補分子

さらに、hDAOとimino-DOPAのX線共結晶図を参考にしたアンカー分子の創製を行うこととした。Imino-DOPAは、Figure 2-2-2の黒色の破線で示している部位にて水素結合を形成している。Sodium benzoateの活性部位のX線共結晶図と比較すると、imino-DOPAはTyr228およびArg283とカルボン酸部位で同様に水素結合を形成している。また、imino-DOPAは、His217およびGln53とフェノール水酸基部位においても水素結合を形成していることが、明らかとなっている。

そこで、imino-DOPAの窒素原子上の部位にアルキンを導入した分子を設計し、in situ click chemistryに利用可能なアンカー候補分子の合成を行うこととした (Scheme 2-2-4)。また、imino-tyrosineのX線共結晶は明らかにされていないが、sodium benzoate やimino-DOPAと同じ活性部位内での結合が期待されることから、imino-tyrosineの窒素上にもアルキンの導入を行うこととした。

前述したように、hDAO/FAD/imino-DOPAの結晶の結合様式がX線分析によ

り明らかとなっている。Imino-DOPAはhDAOの活性部位に結合する基質であるが、イミンは通常、容易に加水分解され、対応するケトンとアミンを与える。そこで、イミンの代わりにオキシムを導入したアンカー候補分子の合成を行うこととした。オキシムは、イミンと比較し加水分解されにくく、比較的安定で取り扱いやすいことが期待される。さらに、置換基R (R')にメチル化を行うことにより活性に違いが生じるか精査することとした。

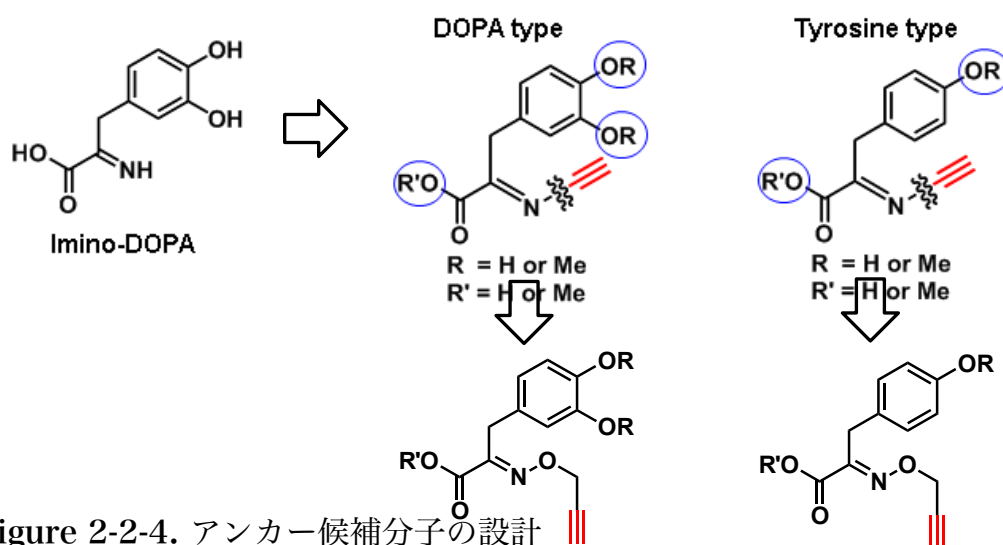
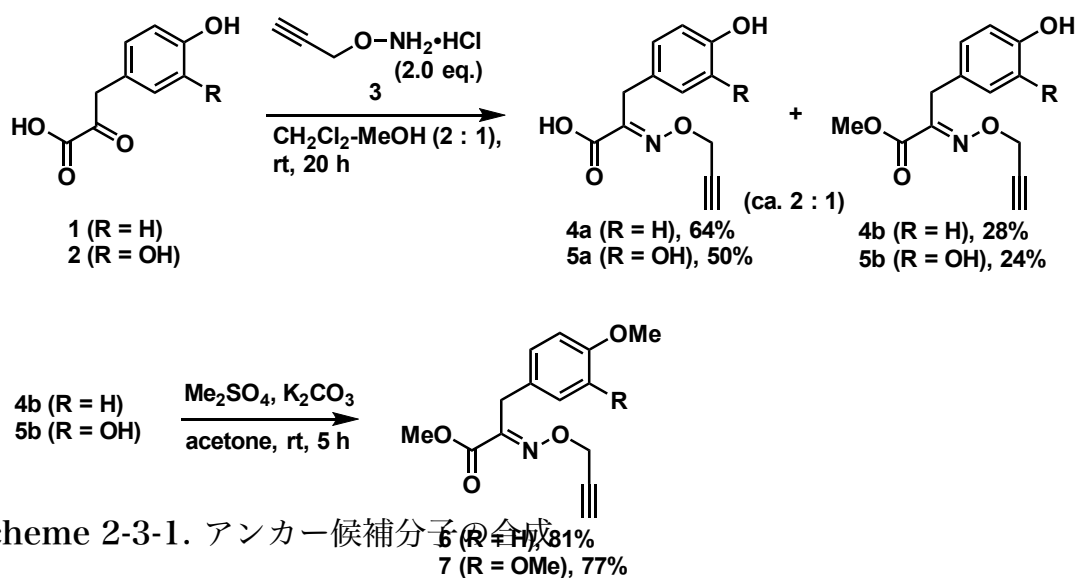


Figure 2-2-4. アンカー候補分子の設計

2-3 アンカー候補化合物の合成

O-プロパルギルヒドロキシルアミン塩酸塩 **3** と 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (**1**) とのオキシム形成は円滑に進行し、単一の幾何異性体として対応する O-プロパルギルオキシム **4a**、およびメチルエステル体 **4b** をそれぞれ 64% および 28% の収率で与えた。同様に 3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (**2**) を用いた、O-プロパルギルヒドロキシルアミン塩酸塩 **3** とのオキシム形成は、単一の幾何異性体として対応するオキシム **5a** およびメチルエステル体 **5b** をそれぞれ 50% および 24% の収率で与えた。さらに、**4b** および **5b** に対して、硫酸ジメチルおよび炭酸カリウムを用いて、フェノール性水酸基部位のメチル化を行った結果、目的とする **6** および **7** をそれぞれ 81% および 77% の収率で与えた。



Scheme 2-3-1. アンカー候補分子の合成

得られた、アンカー候補分子に対してNuclear Overhauser Effect (NOE) 相関ピークを観測することにより、オキシムの幾何異性体の決定を行うこととした (Figure 2-3-1)。DOPAおよびチロシンタイプのアンカー候補分子のオキシムの幾何異性は、Figure 2-3-1の赤色の矢印で示したメチレン部位でのNOE 相関ピークが確認されたことから、E体と決定した。

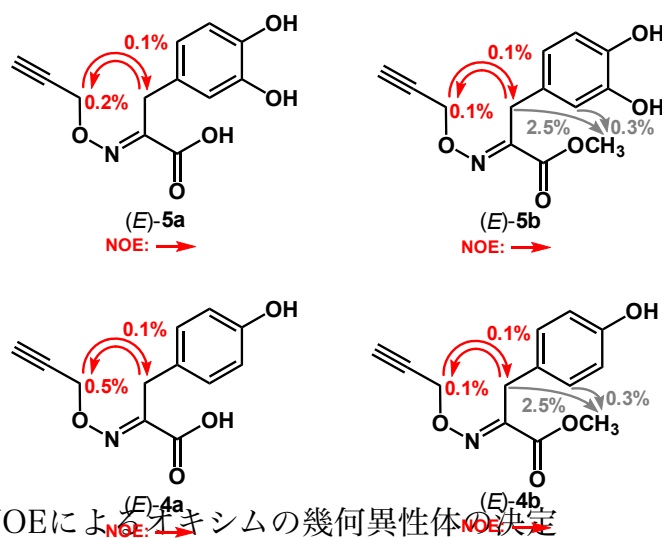
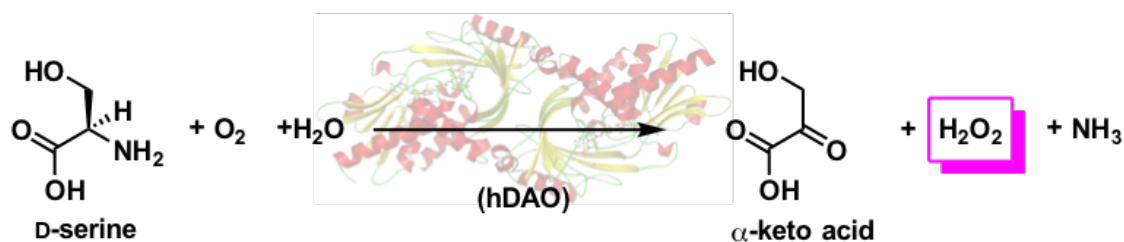


Figure 2-3-1 NOEによるオキシムの幾何異性体の決定

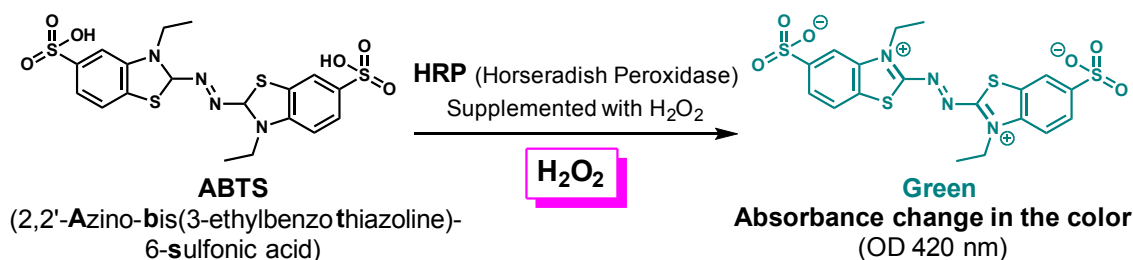
2-4 過酸化水素を検出する方法を利用したアンカー候補化合物に対する活性評価 (HRP/ABTSアッセイ)

合成したアンカー候補化合物のhDAOに対する阻害活性は、in vitroアッセイにより決定した。序論1-3で述べたように、hDAOはD-アミノ酸との酵素反応により α -ケト酸を与え、その際、酸素を消費し過酸化水素を生成する (Scheme 2-4-1)。



Scheme 2-4-1 hDAOとD-アミノ酸との酵素反応

hDAOのハイスループットな酵素活性評価法の一つとして、hDAOの酵素反応により生成した過酸化水素 (H_2O_2) を比色分析により、定量する方法が良く用いられている (Scheme 2-4-2)⁴⁵⁾。その方法は、 H_2O_2 を補足した西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase, HRP) により、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン)-6-スルホン酸 (ABTS) が酸化され、右に示す化合物へと変換される。右の化合物は、420 nmの光を吸収し緑色を示すことから、吸光度を測定し、その濃度を定量分析し、hDAOに対する阻害活性の有無を評価している。



Scheme 2-4-2 hDAOとD-アミノ酸との酵素反応により生成する過酸化水素を定量するアッセイ (西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) /ABTSアッセイ)

本方法の利点は、ABTSに対する酸化により得られた緑色の色素が、比較的

安定であることである。一方、HRPは、フェノール性水酸基を有する化合物の重合を触媒する問題を有しているが、ハイスループットスクリーニング法としての有用性を考慮し、アンカー分子の阻害活性の評価におけるファーストスクリーニングとして利用することとした⁴⁶⁾。実際の活性評価のメソッドを以下に示す。**Figure 2-4-1A**は、濃度調整した各試薬の使用量を示した。測定開始時には、合計0.1 mLの溶液を96ウェルプレートの各ウェルに加えた。**Figure 2-4-1B**は、試薬を加える手順を示した。D-プロリンもしくはH₂O₂を加える直前にブレインキュベートおよび420 nmの吸光度を測定した後、酵素反応を開始させ420 nmの吸光度を測定している。D-プロリンを加えることによりhDAOに対する阻害活性を測定し、H₂O₂を加えることにより、サンプルがHRPに対して影響を与えているか確認している。**Figure 2-4-1C**は、アッセイ時の96ウェルプレートと各サンプル濃度を示している。D-プロリン、もしくはH₂O₂を最後に加え吸光度を測定する。また、各アンカー候補分子に対するIC₅₀値は、以下の方法により算出した。

$$\text{Inhibition \%} = (1 - \Delta \text{OD}_{420 \text{ nm sample}} / \Delta \text{OD}_{420 \text{ nm control}}) \times 100$$

また、hDAO阻害剤であるsodium benzoate (IC₅₀ = 10 μM) を標準物質として用いることにより活性の評価を行うこととした。

A	Reagent	Final concentration	Amount (μL)
	10 μM hDAO	1 μM	10
	1 mM FAD	0.1 mM	10
	10 unit/mL HRP	1 unit/mL	10
	10 mM ABTS	1 mM	10
	MeOH (sample)		10
	0.1 M sodium phosphate buffer		40
	10 mM D-proline	10mM	10
	0.001% H ₂ O ₂	0.0001%	10
	total		100

B		vs hDAO (D-Proline)	vs HRP (H ₂ O ₂)
1	buffer	40 μL	40 μL
2	FAD	10 μL	10 μL
3	HRP	10 μL	10 μL
4	ABTS	10 μL	10 μL
5	sample	10 μL	10 μL
6	hDAO	10 μL	10 μL
		↓ <u>preincubate</u> (OD 420 nm)	
7	D-proline	10 μL	-
8	H ₂ O ₂	-	10 μL
		↓ <u>after 25 °C,</u> <u>10 min</u>	
		吸光度測定 (OD 420 nm)	

C		D-proline 1	H ₂ O ₂ 2
Sample 100 μM	A		
30 μM	B		
10 μM	C		
3 μM	D		
1 μM	E		
MeOH	F		
(control)	G		
	H		

D-Pro を10 μL (fin. 1 mM)添加
またはH₂O₂を添加 (2nd screening)

Figure 2-4-1 活性評価法（過酸化水素の定量）

実際に行った活性評価の結果を以下に示す。Sodium benzoateの活性評価を行った結果、 IC_{50} は10.7 (μM)となった (Figure 2-4-2)。全ての化合物の活性評価は、sodium benzoateをポジティブコントロールとして用い、同様の阻害活性をしめすことを確認している。

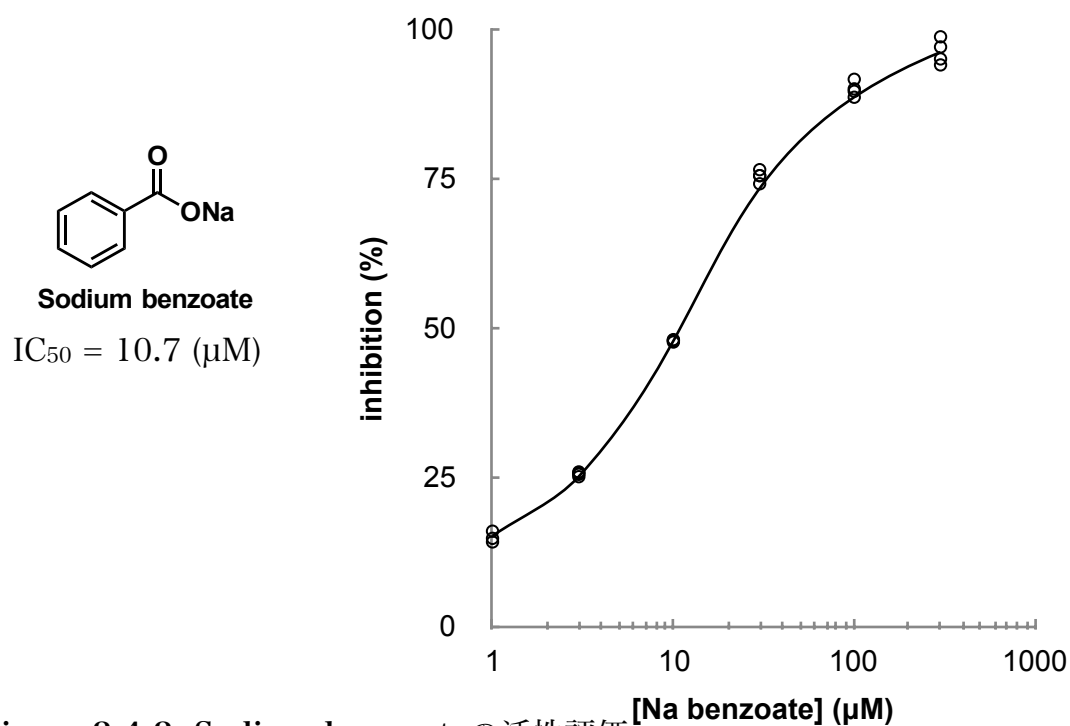


Figure 2-4-2 Sodium benzoateの活性評価

α -ケト酸 1の活性評価を行った結果、 IC_{50} は18.9 (μM)と決定した (Figure 2-4-3)。

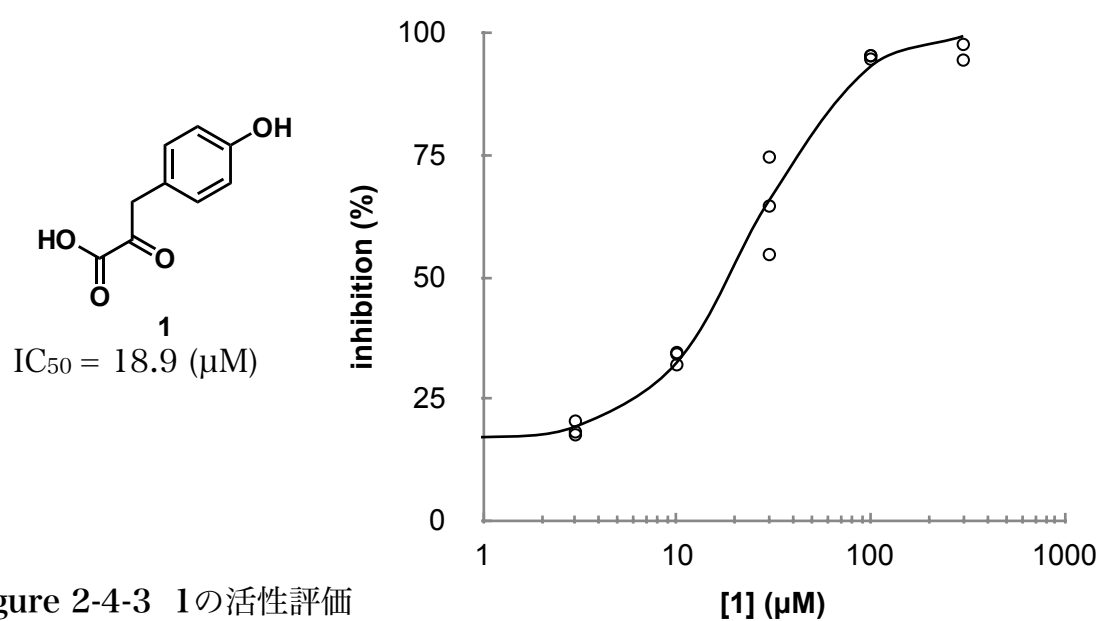


Figure 2-4-3 1の活性評価

4aの活性評価を行った結果、 IC_{50} は33.7 (μM)と決定した (Figure 2-4-4)。

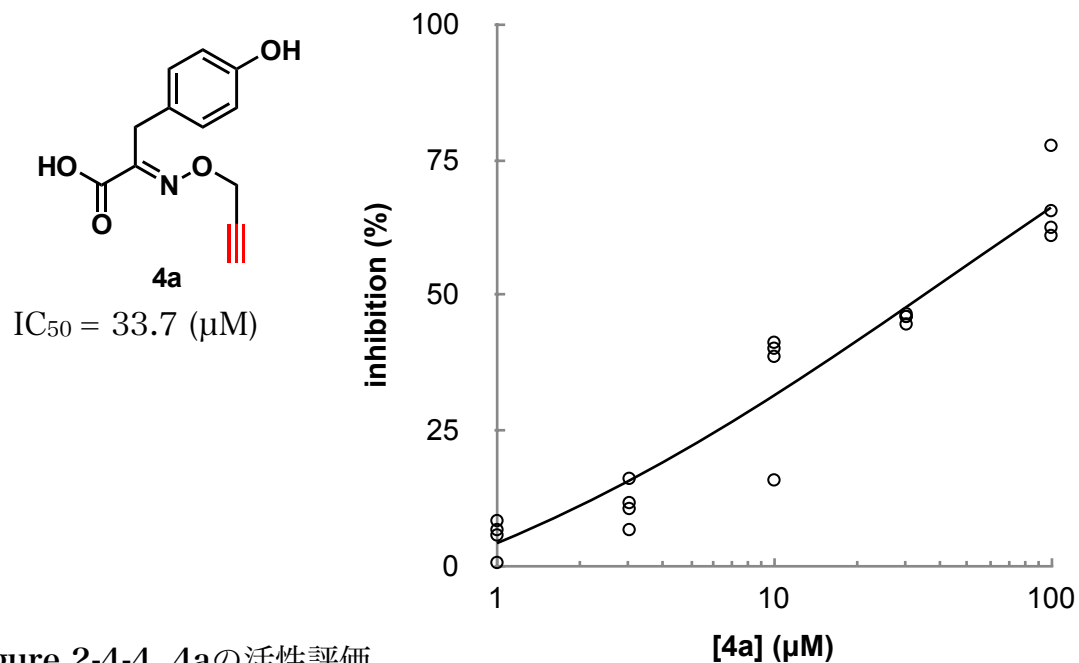


Figure 2-4-4 4aの活性評価

α -ケト酸 4bの活性評価を行った結果、 IC_{50} は11.7 (μM)と決定した (Figure 2-4-5)。

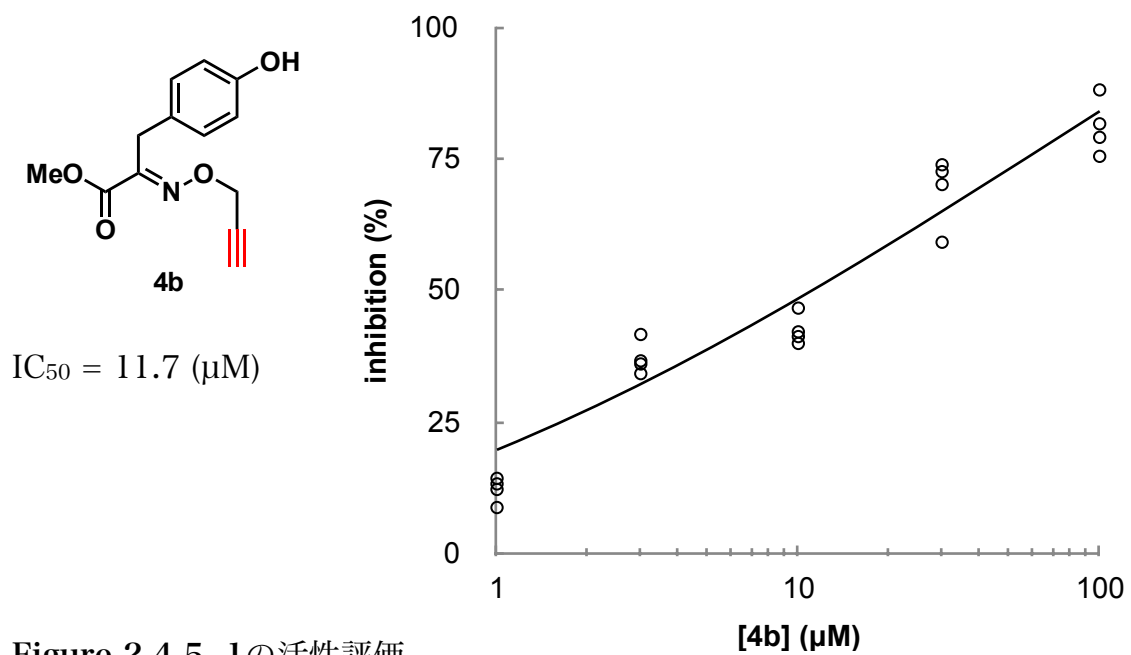


Figure 2-4-5 1の活性評価

6の活性評価を行った結果、hDAOに対する阻害活性は確認されなかった (Figure 2-4-6)。

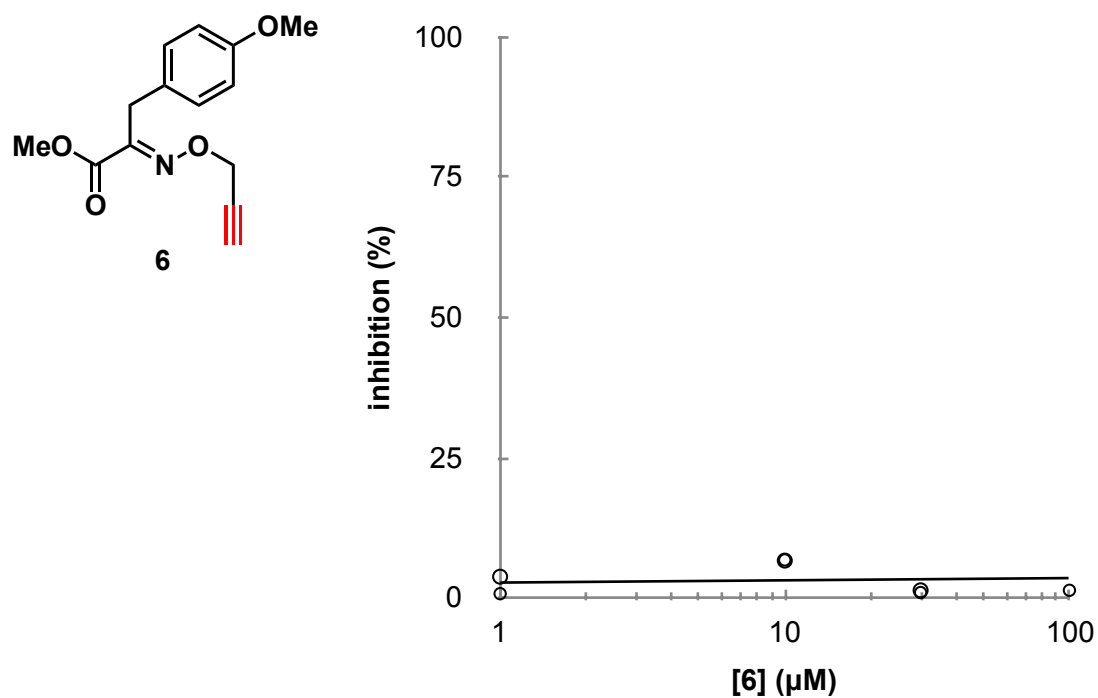
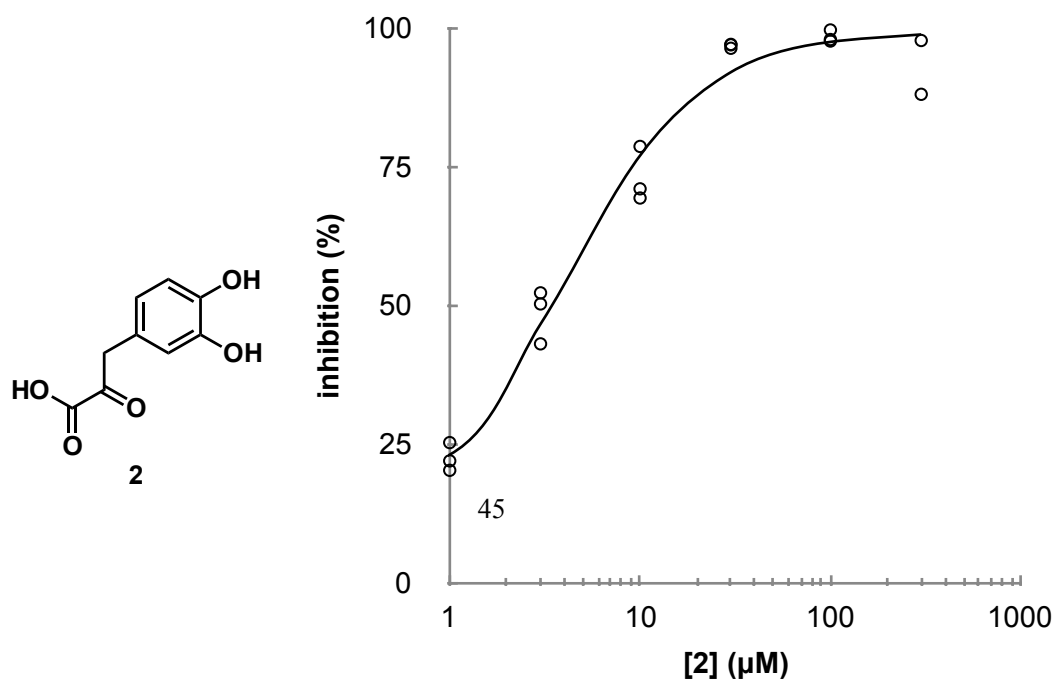


Figure 2-4-6 1の活性評価

α -ケト酸 2の活性評価を行った結果、 IC_{50} は3.4. (μM)と決定した (Figure 2-4-7)。



$$IC_{50} = 3.4 \text{ (}\mu\text{M)}$$

Figure 2-4-7 1の活性評価

5aの活性評価を行った結果、 IC_{50} は7.3 (μM)と決定した (Figure 2-4-8)。

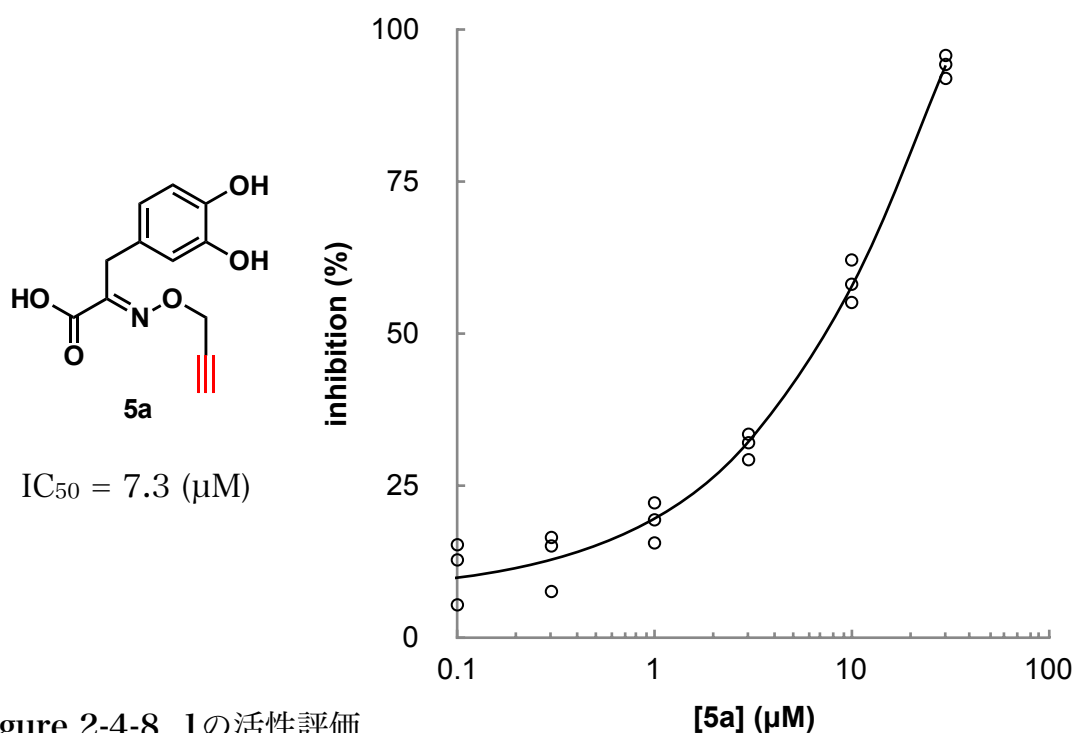
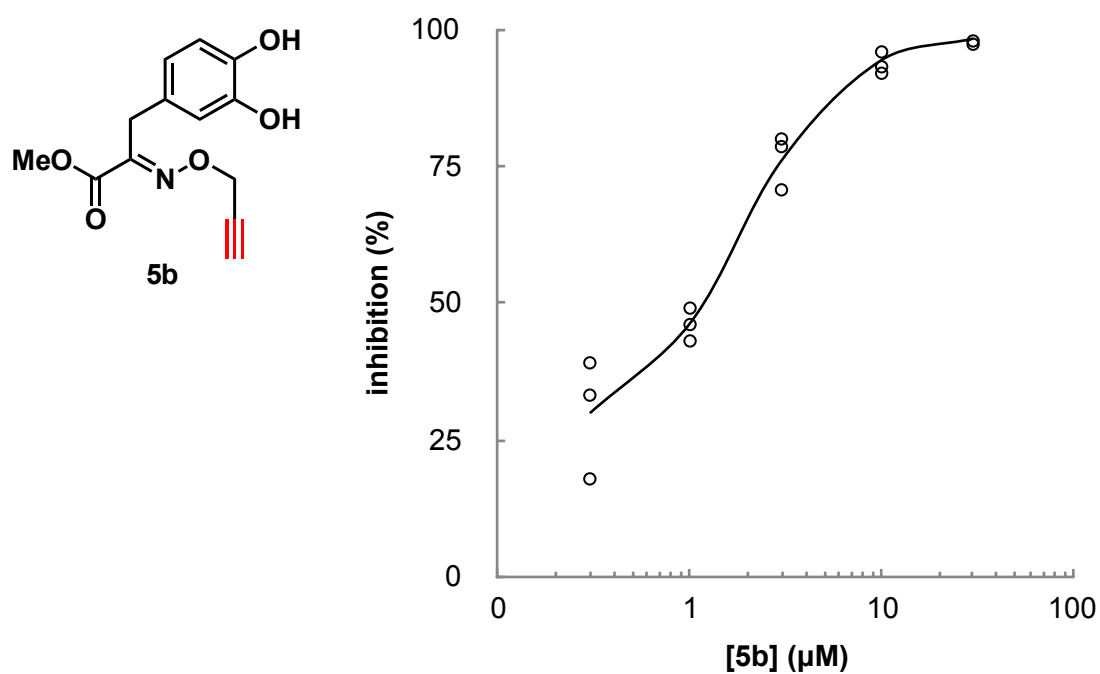


Figure 2-4-8 1の活性評価

5bの活性評価を行った結果、 IC_{50} は1.1 (μM)と決定した (Figure 2-4-9)。



$$IC_{50} = 1.1 \text{ (}\mu\text{M)}$$

Figure 2-4-9 1の活性評価

7の活性評価を行った結果、hDAOに対する阻害活性は確認されなかった (Figure 2-4-10)。

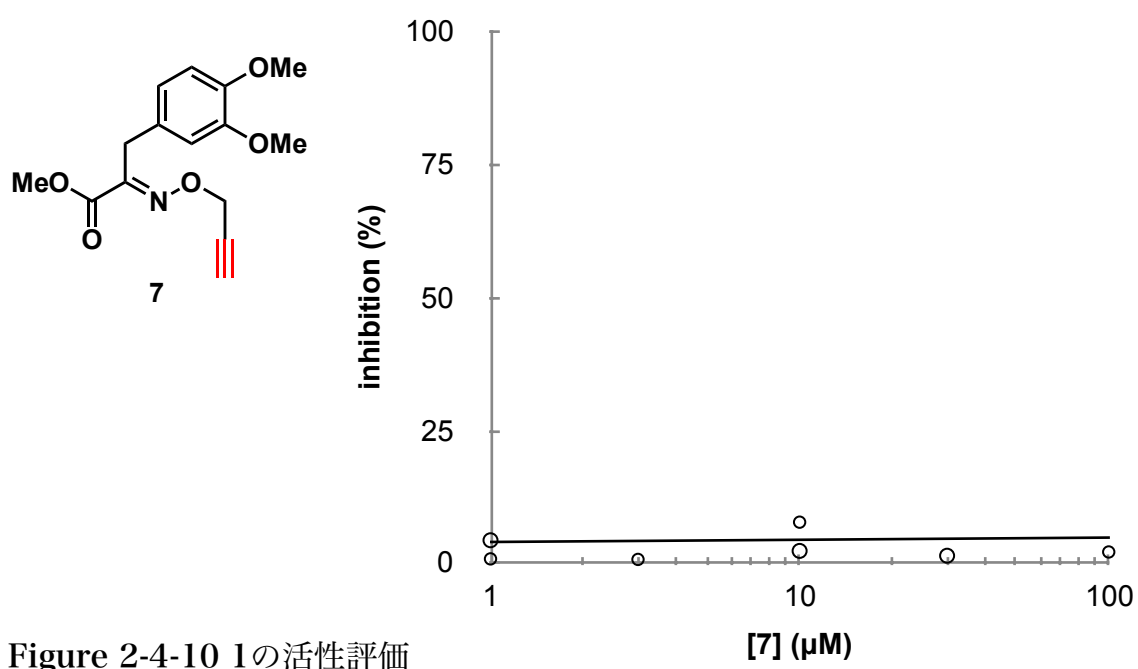


Figure 2-4-10 1の活性評価

以上、活性評価により算出したそれぞれのIC₅₀値をTable 2-4-1にまとめて示す。HRP / ABTSアッセイによる、一次スクリーニングを行った結果、DOPAタイプのアンカー候補分子 (**2**, **5a**および**5b**) (IC₅₀: 1.1~7.3 μ M) は、チロシンタイプのアンカー候補分子 (**1**, **4a**および**4b**) (IC₅₀: 11.7~33.7 μ M) と比較して強力な阻害活性を示した。一方メトキシ誘導体 **6**および **7**は、活性を示さなかった。そこで、IC₅₀値が300 μ M以下の化合物 (**4a**, **4b**, **5a**および**5b**) に対してオキシグラフィアッセイを行うこととした。

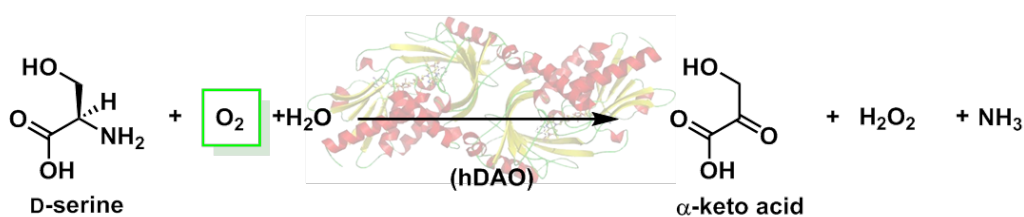
Table 2-4-1 過酸化水素を定量するアッセイ

Compounds	Anchor molecule	First screening ^{a)} : IC ₅₀ (μM)
1	Tyrosine-type	18.9
4a		33.7
4b		11.7
6		>300
<hr style="border-top: 1px dashed;"/>		
2	DOPA-type	3.4
5a		7.3
5b		1.1
7		>300

a) IC₅₀ values were calculated by HRP /ABTS assay.

2-5 酸素を検出する方法を利用したアンカー候補化合物に対する活性評価（オキシグラフアッセイ）

過酸化水素を定量するhDAOの阻害活性試験で数十 μ M以下の濃度で阻害活性が確認されたアルキン誘導体（4a, 4b, 5aおよび5b）に対して、より正確な活性評価法であるオキシグラフアッセイを行うこととした。序論1-3で述べたように、hDAOはD-アミノ酸との酵素反応により α -ケト酸を与え、その際、酸素を消費し過酸化水素を生成する（Scheme 2-5-1）。



Scheme 2-5-1 hDAOとD-アミノ酸との酵素反応

オキシグラフアッセイでは、hDAOとD-アミノ酸との酵素反応時に消費する酸素（O₂）の量を測定し活性評価を行っている（Figure 2-5-1）^{42,47}。その方法はクラーク型の酸素電極を用いて、酵素反応により消費した酸素の量を電流の変化を定量することにより評価を行う方法である。本評価方法は正確な評価が可能となるが1サンプルの測定に半日程度の時間を要することから、多数サンプルのスクリーニングには適さず、ロースループットな活性評価法である。

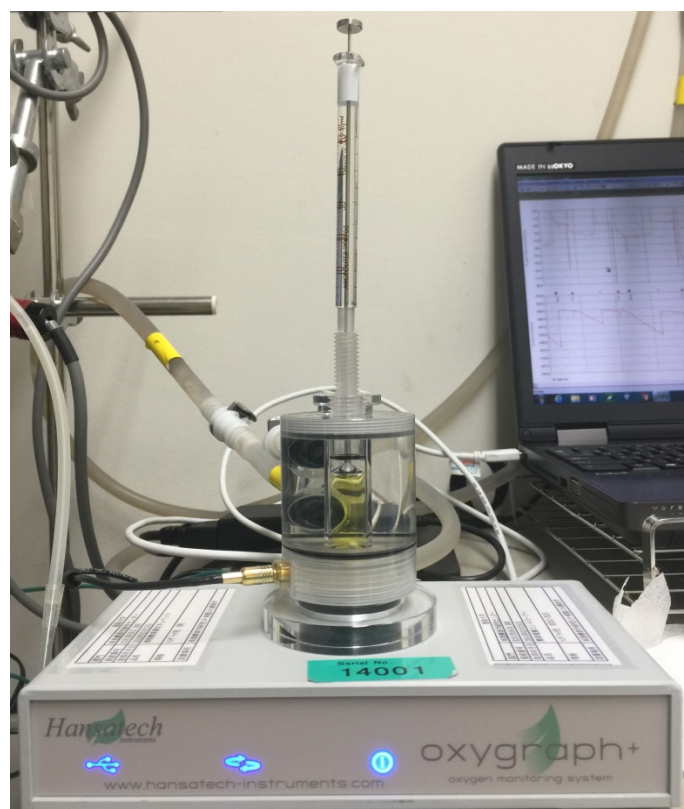
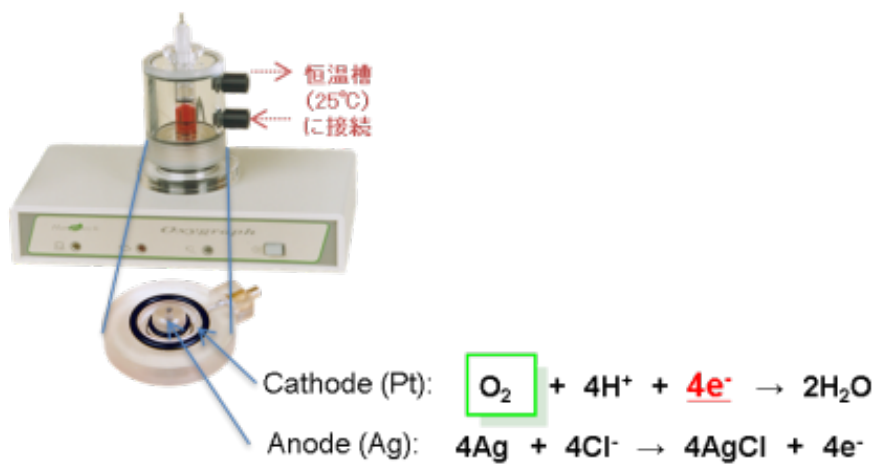


Figure 2-5-1消費する酸素を定量するアッセイ（オキシグラフアッセイ）

本方法は、hDAOに対する阻害定数 (K_i) を求めることにより評価を行う。
^{37,41)} また、hDAOのD-アミノ酸の結合する活性部位内に結合する競合的阻害剤である安息香酸ナトリウム ($K_i: 3\mu\text{M}$) を使用して阻害形式を確認した^{42,47)}。
 なお K_i 値は、Dixonプロット^{48,49)}により算出した。

K_i 値の測定法として結合が弱い阻害剤 ($[I]$ (阻害剤濃度) $\gg [E]$ (全酵素濃度)) の K_i 値の測定法としてDixon法が知られている。Dixonプロットによる K_i 値の決定は2つ以上の基質濃度で、種々の濃度の阻害剤を酵素に作用させることにより反応速度を決定する。 $[I]$ (阻害剤濃度) と $1/v$ ($1/\text{TN}$ (TN: turnover)) でプロットした時の直線の交点が K_i 値となり、 $[S_1] < [S_2]$ の時、**Figure 2-5-2**が成立し、 K_i 値が算出される。

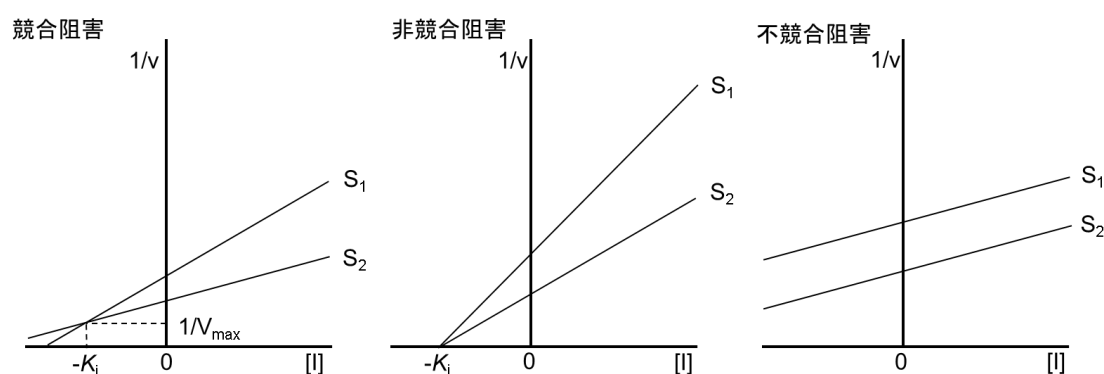


Figure 2-5-2 Dixonプロットによる K_i 値の決定

オキシグラフアッセイのメソッドを以下に示す (Figure 2-5-3)。Aは、各濃度に調製した試薬、およびオキシグラフのセルに加えた試薬を示している。Bのように各濃度に調製したサンプルとD-アラニンを用いてそれぞれの turnover を算出した。Cの、緑の破線で示したチャートが酸素の減少を示しているシグナルのチャートである。

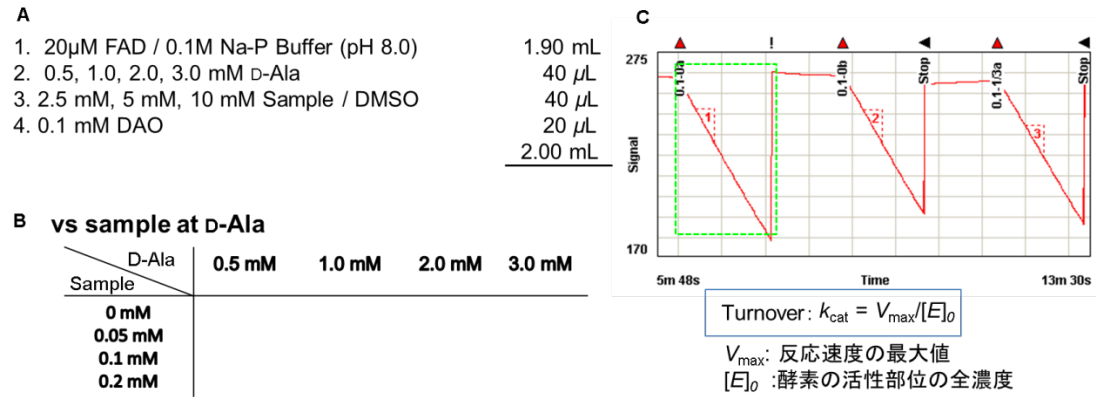
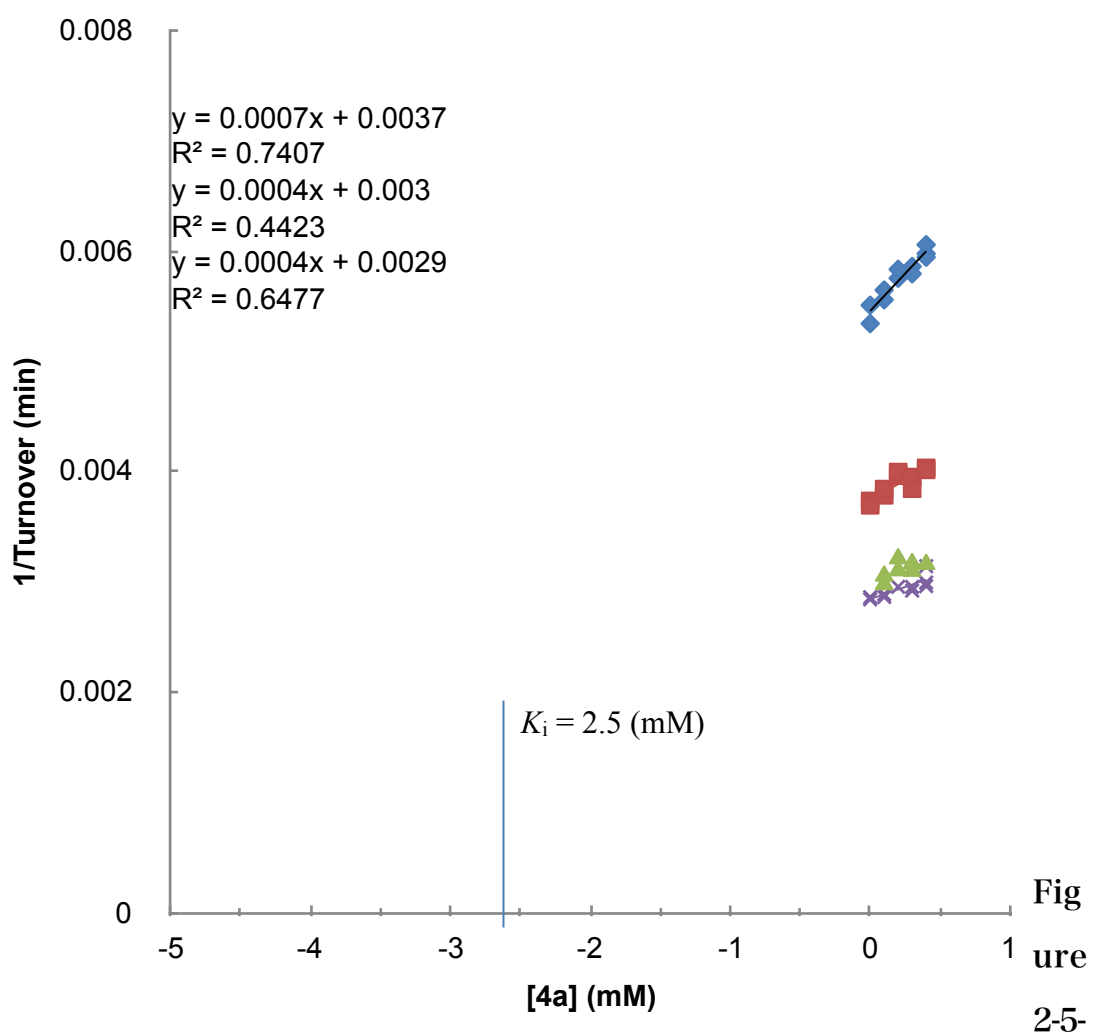


Figure 2-5-3 オキシグラフアッセイのメソッド

4aに対してオキシグラフを用いた活性評価を行った結果、 K_i は2.5 (mM)となった (Figure 2-5-4)。

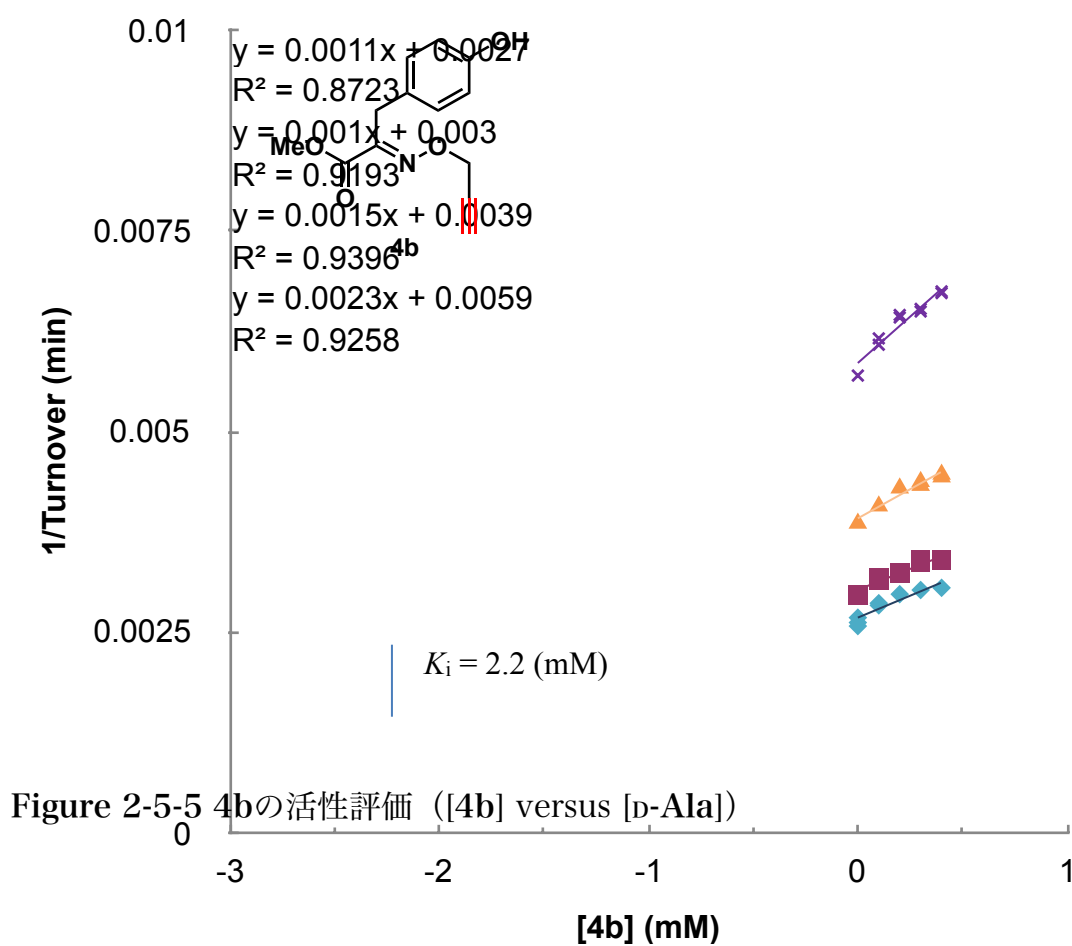
- ◆ 1/TN 0.5mM D-Ala
- 1/TN 1mM D-Ala
- ▲ 1/TN 2mM D-Ala
- × 1/TN 3mM D-Ala



4 4aの活性評価 ([4a] versus [D-Ala])

4bに対してオキシグラフを用いて活性評価を行った結果、 K_i は2.2 (mM)となった (Figure 2-5-5)。

- ◆ 1/TN 0mM
- 1/TN 0.1mM
- ▲ 1/TN 0.2mM
- × 1/TN 0.3mM



5aおよび**5b**は、阻害活性が弱いことから、オキシグラフにより、turnover (min)の値に差が生じなかったためDixon plotによる K_i 値を算出することが出来なかった。

以上の活性評価により算出したそれぞれの IC_{50} 値を**Table 2-5-1**にまとめて示す。チロシンタイプのアンカー分子 **4a**、および**4b**のそれぞれの K_i 値は2.5 mMおよび2.2 mMを示し、強力な競合阻害剤として同定された。一方、DOPAタイプのアンカー候補分子**5a**、および**5b**では、hDAOの阻害活性は弱いことが確認され、非競合的阻害であることが確認された。**5a**および**5b**の阻害活性が確認されなかった理由として、 H_2O_2 / ABTS/ HRPの活性評価系で、フェノール性水酸基部位が活性に影響を与えていることが示唆される。そこで、in situ click chemistryで利用するためのアンカー分子として、**4b**よりも水に対する優れた溶解性を有するアルキン**4a**を用いることとした。

Table 2-5-1. オキシグラフィアッセイ

Compounds	Anchor molecule types	Second screening ^{b)} : <i>K</i> _i (mM)	Inhibition pattern
1		∞	-
4a	Tyrosine-type	2.5	competitive
4b		2.2	competitive
<hr style="border-top: 1px dashed;"/>			
2		1.8	-
5a	DOPA-type	∞	non-competitive
5b		∞	non-competitive

b) K_i values were calculated by oxygraphic assay.

2-6 In situ click chemistryを利用したD-アミノ酸酸化酵素阻害剤の探索

In situ click chemistryによるhDAOテンプレートによるトリアゾールの形成促進効果の探索は、96ウェルマイクロプレートを用いて、並列に行うこととした。創製したアンカー分子と多様な構造を有するライブラリーを用いた、アルキンとアジドのトリアゾール化反応を利用したin situ click chemistryによるhDAO阻害剤の探索は、pH8.0リン酸バッファーを含む10%メタノール中、hDAO (2 μ M) の存在下で行うこととした (Figure 2-6-1)。25 $^{\circ}$ Cにて24時静置させた後、LC/MS-SIR (Liquid chromatography mass spectrometry selected ion recording) 分析により、各反応混合物の分析を行った。

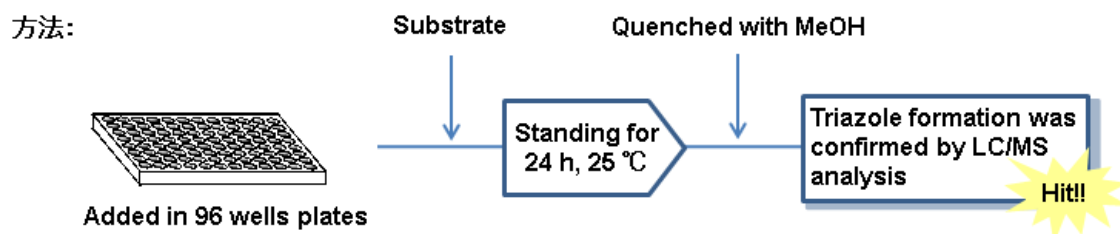
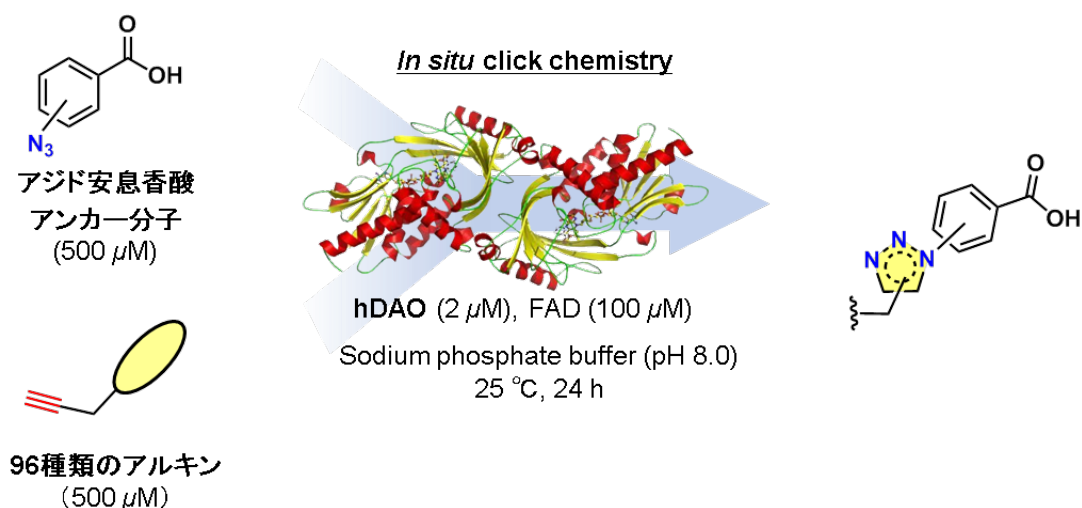


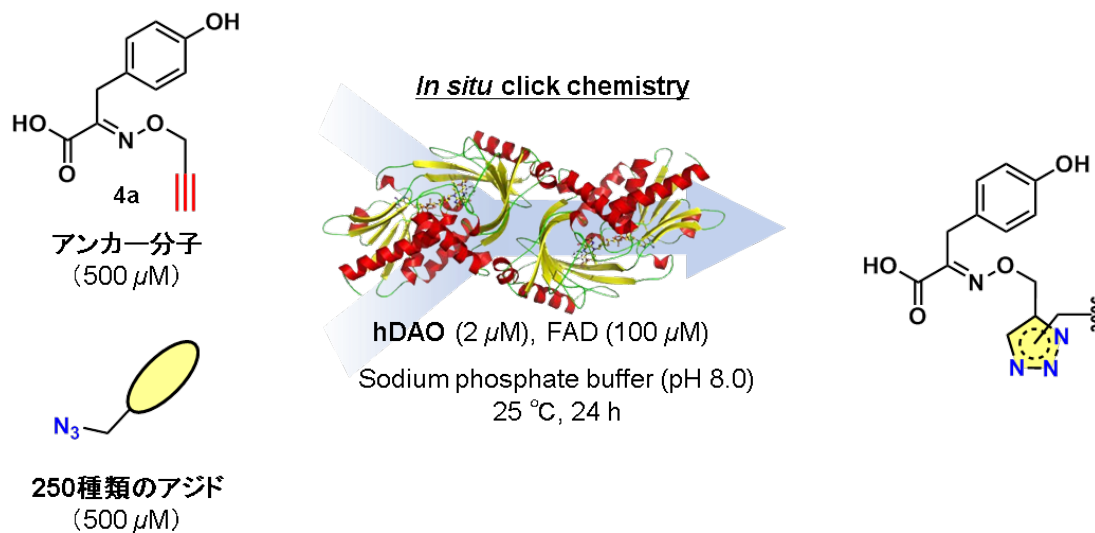
Figure 2-6-1 In situ click chemistryのメソッド

hDAOとsodium benzoateとのX線共結晶図に基づき設計した、2-アジド安息香酸、3-アジド安息香酸、および4-アジド安息香酸をアンカー分子として利用し、それぞれin situ click chemistryを行うこととした (Scheme 2-6-2)。当研究室で保有している96種類のアルキンライブラリーとのin situ click chemistryを行ったがトリアゾール形成の促進効果は確認されなかった。



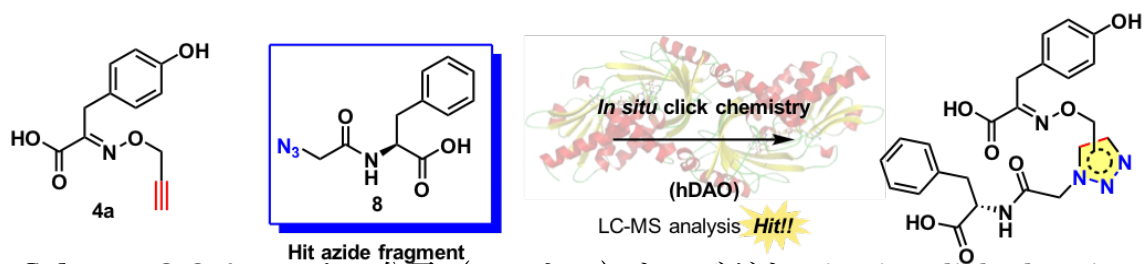
Scheme 2-6-2 アジド安息香酸とアルキンライブラリーとのin situ click chemistry

次に、hDAOとimino-DOPAとのX線共結晶図を参考にし創製したアルキンアンカー分子 **4a**とアジドライブラリーを利用したin situ click chemistryを Scheme 2-6-2と同様の条件にて行った (Scheme 2-6-3)。



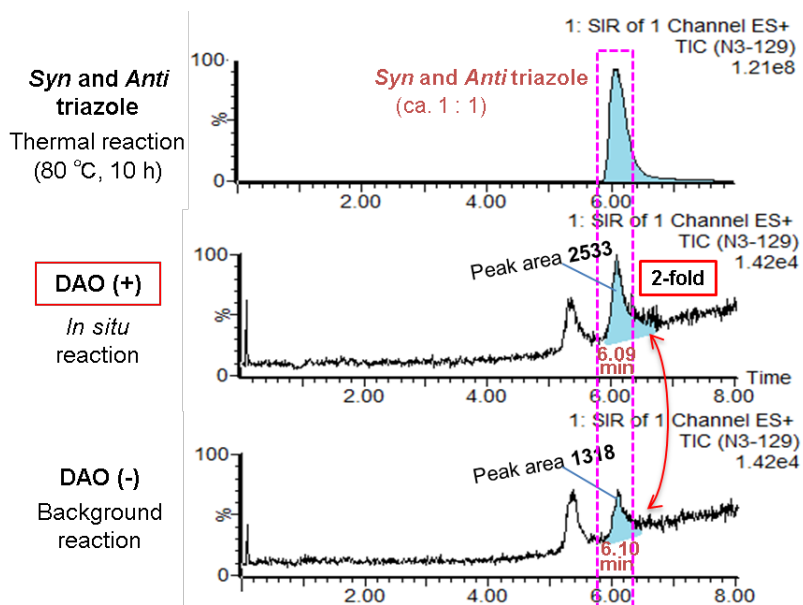
Scheme 2-6-3 アルキンアンカー分子 **4a**とアジドライブラリーとのin situ click chemistry

250種類のアジドライブラリーを用いてin situ click chemistryを行った。その結果、アルキン **4a**とアジド**8**⁵⁰⁾から、hDAOの存在下においてトリアゾール体**9**の形成の促進効果がLC / MS-SIR分析により、再現性良く確認された (Scheme 2-6-4)。



Scheme 2-6-4 アンカー分子 (アルキン) とアジドとのin situ click chemistry

トリアゾール形成の促進効果が確認されたチャートを以下に示す (Figure 2-6-1)。80 °Cにて10時間加熱を行ったチャート (syn : anti = 1 : 1) は、単一のピーク (6.1分) に確認された。トリゾールのピークは、DAOを加えていない、バックグラウンドと比較すると、2倍のトリアゾール化形成の促進が確認された。

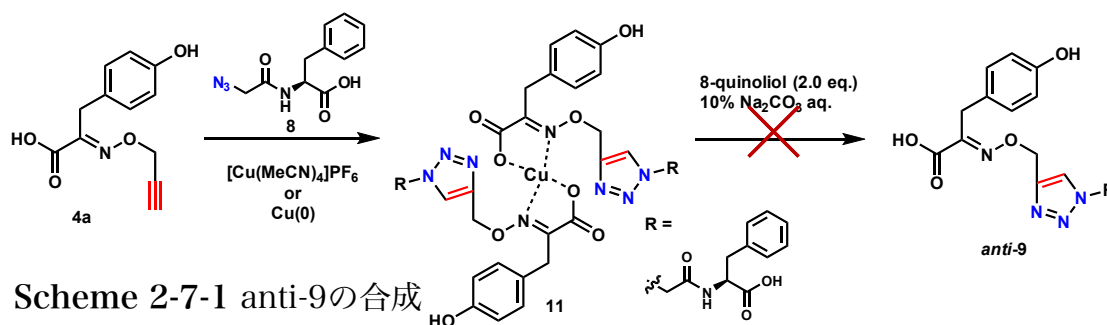


LC/MS-SIR analysis: Senshu PEGASIL SP100 ODS column 2φ × 50 mm, gradient 10% MeCN (0.05% TFA)/H₂O (0.1% TFA) to 100% MeCN (0.05% TFA) over 8 min, flow 0.2 mL/min.

Figure

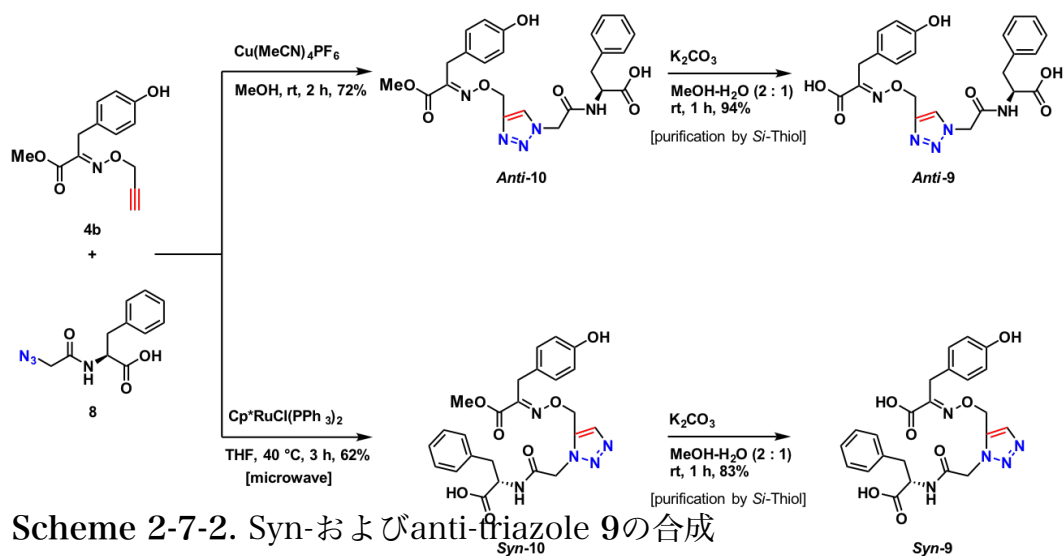
2-7 トリアゾールの合成および幾何異性体の決定

hDAOのテンプレート効果により生成したトリアゾール体のsyn / anti-の幾何異性体を決定するため、それぞれのsynおよびantiトリアゾールを化学合成することとした。アルキン4aとアジド8に対し、Cu (I) 触媒条件によるanti-トリアゾール形成の環化条件 (Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC)、^{14,15)} およびRu(II)触媒によるsyn-トリアゾール形成の環化条件 (Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, RuAAC) ^{17,18)} により、9の純粋な幾何異性体を調製することとした。しかしながら、本条件によりanti-9の合成を試みたがanti-9は得られなかった。おそらく11の様な銅との錯体が形成されたと考え8-quinoliolを作用させ錯体の開裂を試みた。しかしながら、anti-9を得ることが出来なかった。



Scheme 2-7-1 anti-9の合成

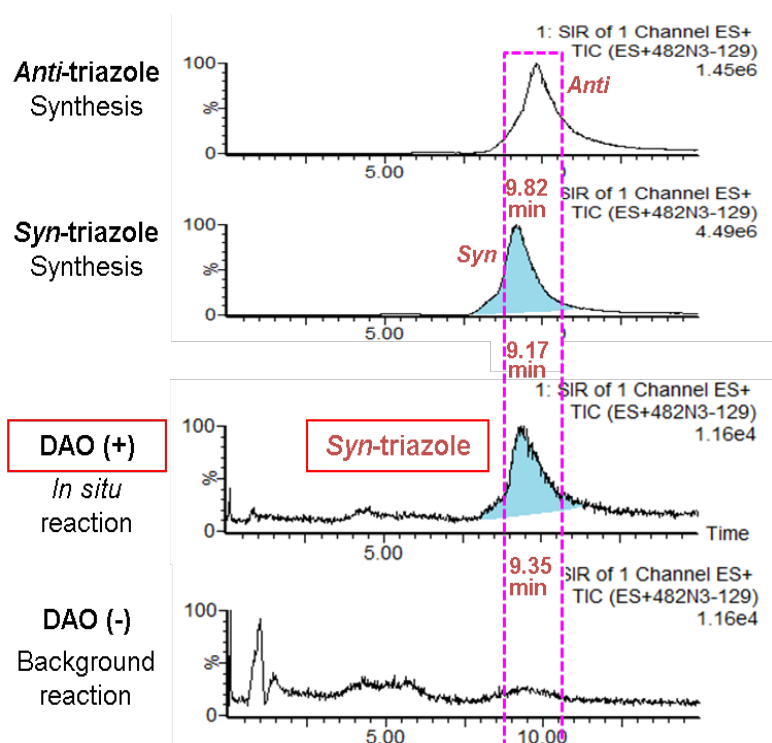
そこで、トリアゾール体の形成は、アジド8とエステル4bを用いて行うこととした。Cu (I) 触媒を用いる事により、収率72%で単一の異性体としてanti-10を与えた。また、Ru触媒を用いる事により、62%の収率でsyn-10を与えた。得られた、10の各異性体は、塩基性条件下による加水分解により、anti-9およびsyn-9として、それぞれ94%および83%の収率で与えた (Scheme 2-7-2)。また、残留した金属がhDAOの活性に与える影響を考慮しメタルスカベンジャーによる補足を行った。



THF =tetrahydrofuran.

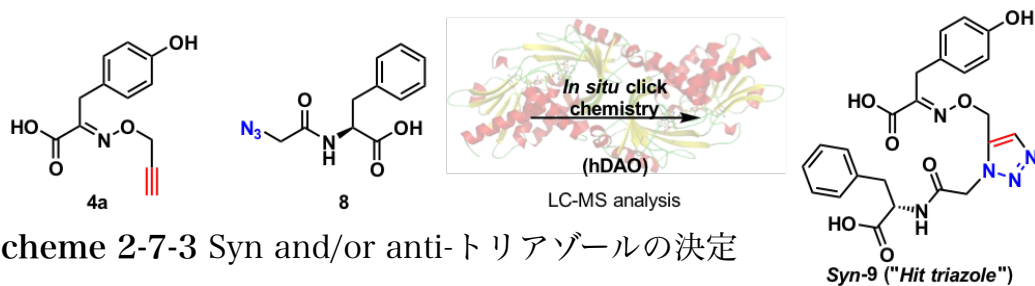
化学合成により得られたsynおよびanti-トリアゾール体の標品を用いて、LCの分離条件を最適化することとした (Figure 2-7-1)。LC条件の検討を行った結果、MeCN : H₂O = 20 : 80の時、Rt (anti) = 9.8 min、Rt (syn) = 9.2 minとなり、保持時間の差が0.6 minの条件が見出された。hDAOにより、トリアゾール形成の促進が確認された結果は、9.3 minにピークが確認されたことから、syn-トリアゾールが優先して生成していることが明らかとなった。

Syn-トリアゾールのピークが確認されたことから、hDAO存在下でのin situ click chemistryにより、アルキン 4aおよびアジド 8の組み合わせから、優先的にsyn-9が生成したことが明らかとなった (Scheme 2-7-3)。



LC/MS-SIR analysis: DOCOSIL SP100 C22 column 2φ × 50 mm, isocratic
20 % MeCN / H₂O (0.08% HCO₂H) , flow rate 0.2 mL/min .

Figure 2-7-1 Syn and/or anti-トリアゾールの決定 (LC/MSチャート)



Scheme 2-7-3 Syn and/or anti-トリアゾールの決定

2-8 トリアゾール形成促進効果が確認されたアジドおよびトリアゾールの活性評価

次にin situ click chemistryによりトリアゾール形成の促進効果が確認された syn-9、アジド8、およびanti-9に対して消費する酸素を定量する方法により、hDAOに対する阻害活性を評価した。オキシグラフアッセイのメソッドを以下に示す (Figure 2-8-1)。Aは、各濃度に調製した試薬、およびオキシグラフのセルに加えた試薬を示している。Bのように各濃度に調製したサンプルとD-プロリンを用いてそれぞれのturnoverを算出した。

A

1. 20 μ M FAD / 0.1M Na-P Buffer (pH 8.0)	1.86 mL
2. 1 mM D-Pro	40 μ L
3. 10 mM, 5 mM, 2.5 mM Sample / DMSO	40 μ L
4. 0.5 mM, 0.35 mM, 0.15 mM Na benzoate	40 μ L
5. 0.1 mM DAO	20 μ L
	<hr/> 2.00 mL

B vs Na Benzate at 1 mM D-Pro

Na Benz Sample	10.0 μ M	7.0 μ M	3.0 μ M	0 μ M
0 mM				
0.05 mM				
0.1 mM				
0.2 mM				

Figure 2-8-1 オキシグラフアッセイのメソッド

K_i 値は、Dixonプロット、および2次プロットにより導き出される以下の式から算出することとした。

$$-K_i = K_x(1 + [S] / K_s + [I] / K_i)$$

得られたそれぞれの回帰直線の切片/傾きをプロットし、2次プロットによる解析を行うことにより、 K_i 値を算出した（Figure 2-8-3）。D-Prolineの K_i 値は1.7 mMであることから、8の K_i 値は、0.9 mMと決定した。

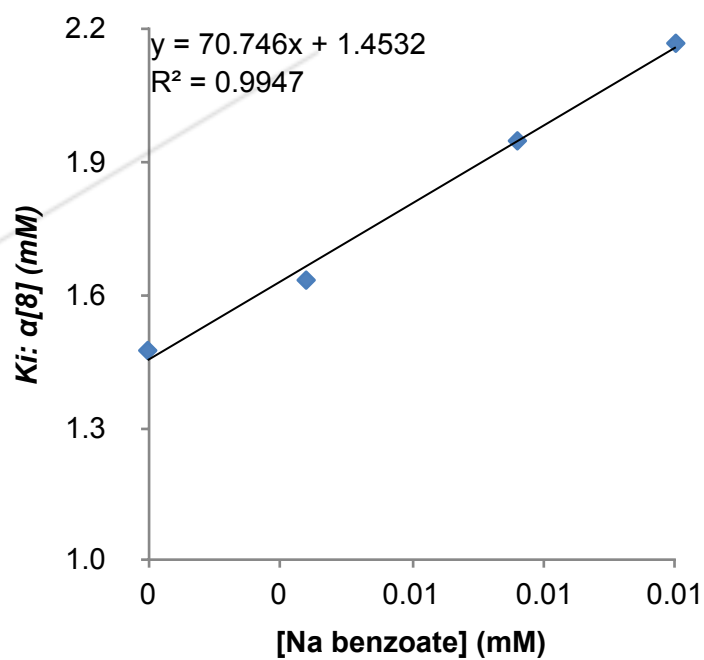


Figure 2-8-3 2次プロットによる解析

1 mM D-prolineを使用し、syn-9およびsodium benzoateの濃度を変化させることにより活性評価を行った (Figure 2-8-4)。

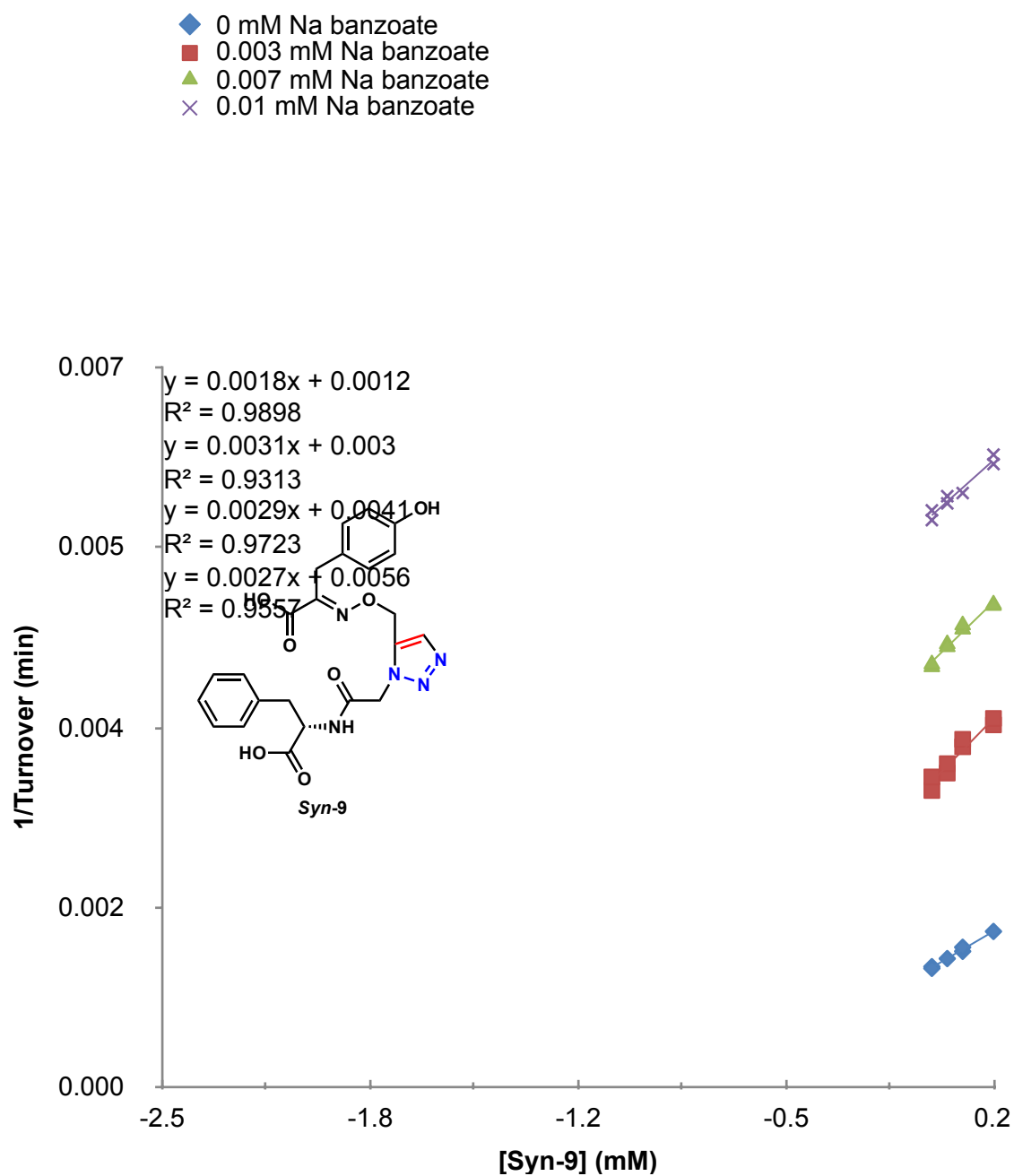


Figure 2-8-4 Dixonプロットによる K_i 値の算出 ([Syn-9] versus [sodium benzoate])

得られたそれぞれの回帰直線の切片/傾きをプロットし、2次プロットによる解析を行うことにより、 K_i 値を算出した (Figure 2-8-5)。D-Prolineの K_i 値は 1.7 mMであることから、syn-9の K_i 値は、0.4 mMと決定した。

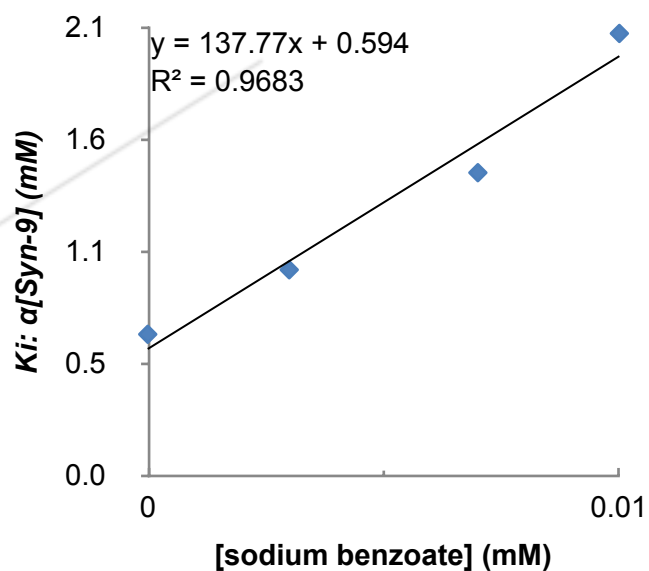


Figure 2-8-5 2次プロットによる解析 ([Syn-9] versus Na benzoate)

1 mM D-prolineを使用し、anti-**9**およびsodium benzoateの濃度を変化させることにより活性評価を行った結果、 K_i 値は、2.8 mMと決定した。（Figure 2-8-6）。

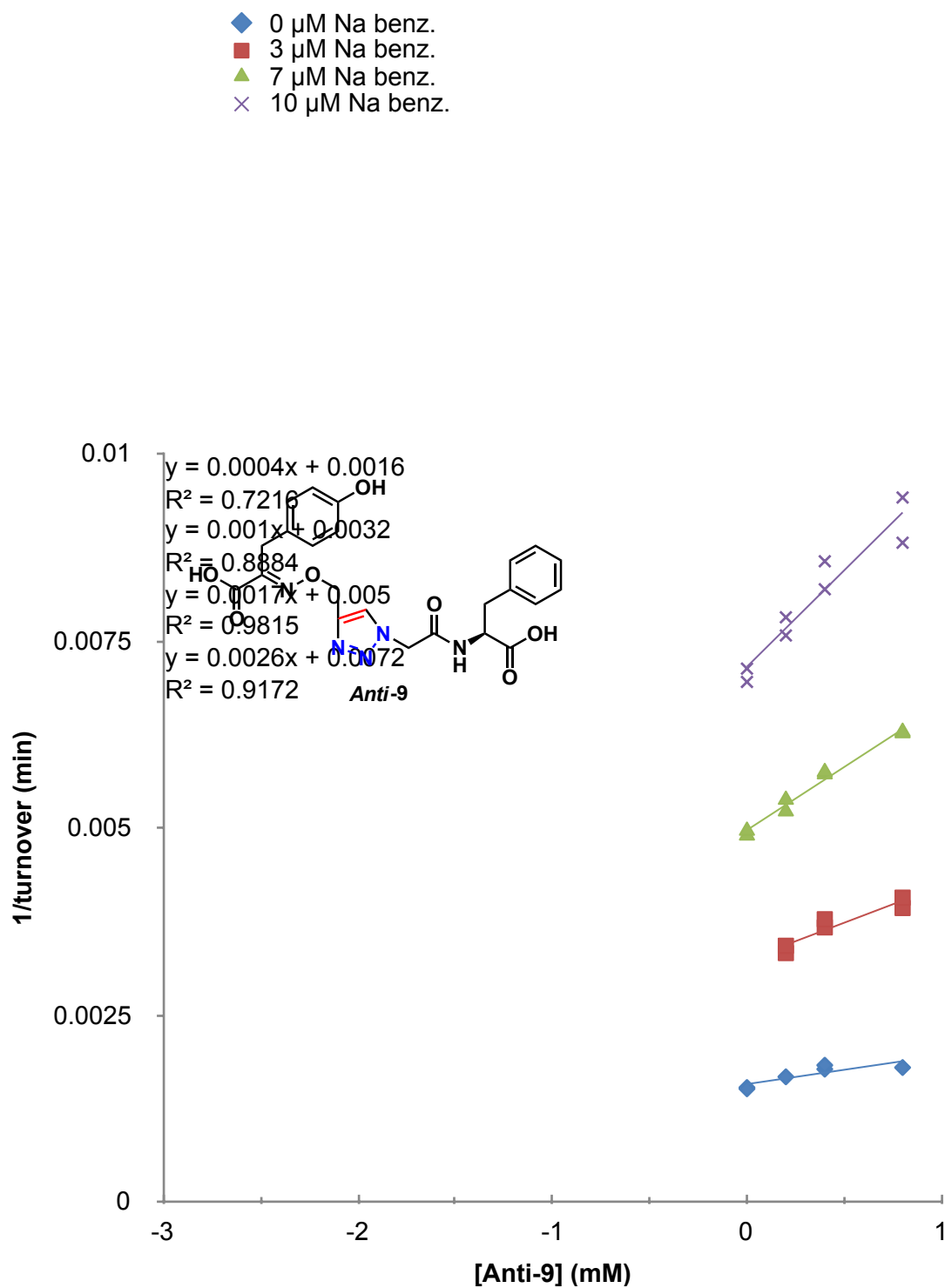
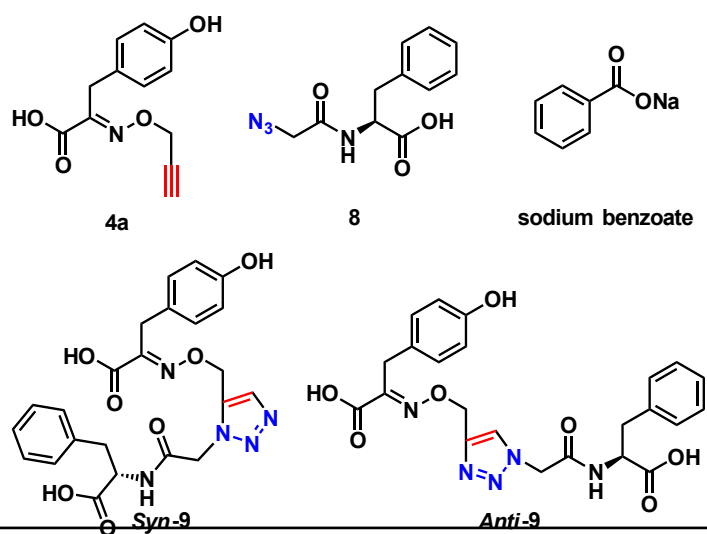


Figure 2-8-6 Dixonプロットによる K_i 値の算出 ([anti-9] versus [sodium

benzoate])

以上、活性評価により算出したそれぞれの K_i 値をTable 2-8-1にまとめて示す。 ヒットしたsyn-トリアゾール **9**では、hDAOに対する K_i 値は0.4 mMの活性が確認された。さらに、syn-トリアゾール **9**は、hDAO阻害剤の競合阻害であることが明らかとなった。また、syn-トリアゾール **9**とアンカー分子 **4a**の活性を比較すると5倍の活性向上が確認された。また、anti-トリアゾール **9**は、2.8 mMの活性であることが明らかとなった。一方で、アジド化合物 **8**の K_i 値は0.9 mMであり、hDAOの予想外に強力な阻害剤であることが見出されたが、syn-**9**は、アンカー分子**4a**とアジド **8**よりもhDAOに対して高い阻害活が示された。また、anti-**9**は、競合的阻害のパターンでの活性を示さなかった。

Table 2-8-1. トリアゾールの活性評価



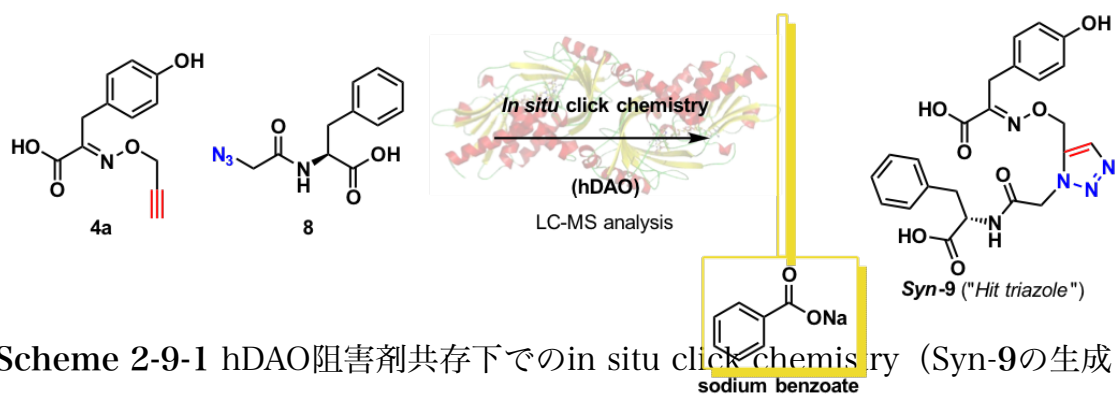
Compounds	Oxygraph assay: K_i (mM)	Inhibition type
4a	2.5	competitive
<i>Syn-9</i>	0.4	competitive
<i>Anti-9</i>	2.8	non-competitive
8	0.9	competitive

a) Inhibition constant (K_i) was calculated by oxygraphic assay.

2-9 D-アミノ酸酸化酵素阻害剤共存下でのin situ click chemistry

hDAO中でsyn-9が選択的に形成されたことが確認されたが、syn-9を形成するhDAO中のアミノ酸の結合部位でテンプレート効果によりトリアゾール形成が促進しているか確認を行うこととした。既知のhDAO阻害剤として知られている、sodium benzoate (K_i : 10 μ M) を共存させin situ click chemistryを行い、実際にhDAOがテンプレートとなりトリアゾール形成が阻害されるか確認を行うこととした。アルキン、およびアジドと同濃度（最終濃度500 μ M）のsodium benzoateを加え、これまでと同様の条件にてin situ click chemistryを行った（Scheme 2-9-1, Figure 2-9-1）。その結果、sodium benzoateを加えることで、約1/5程度にトリアゾール形成が抑制されていることが確認された。

この結果からもhDAOのX線共結晶図を基に設計したアンカー分子 4aおよびアジド8は、Figure 2-2-2（hDAO/imino-DOPAとのX線共結晶図）に示した、hDAO内のD-アミノ酸が酸化する部位に結合するリガンドと同じ活性部位でhDAOのテンプレート効果によるトリアゾール形成促進効果が進行していることが明らかとなった。



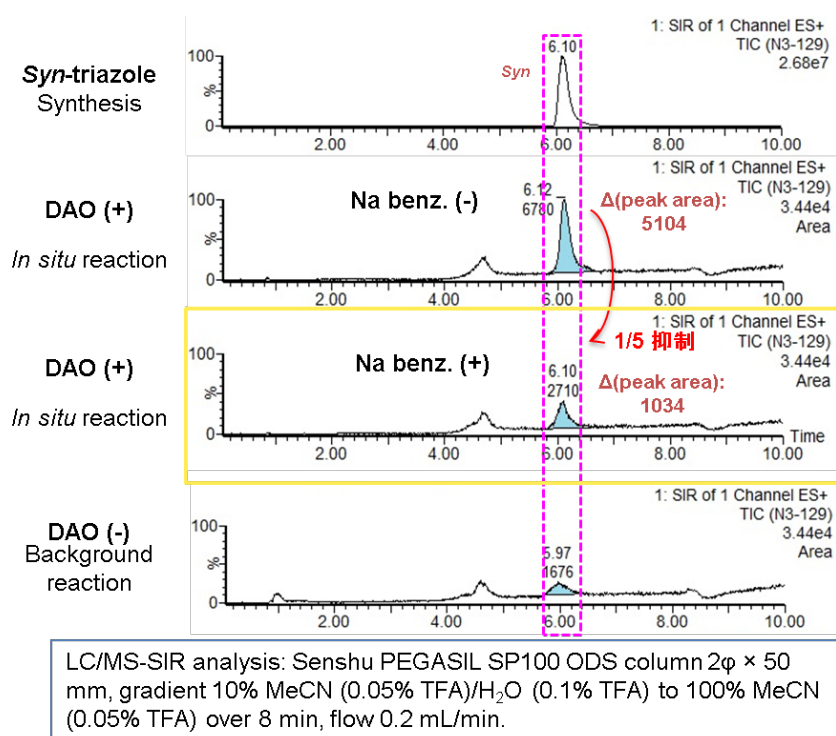
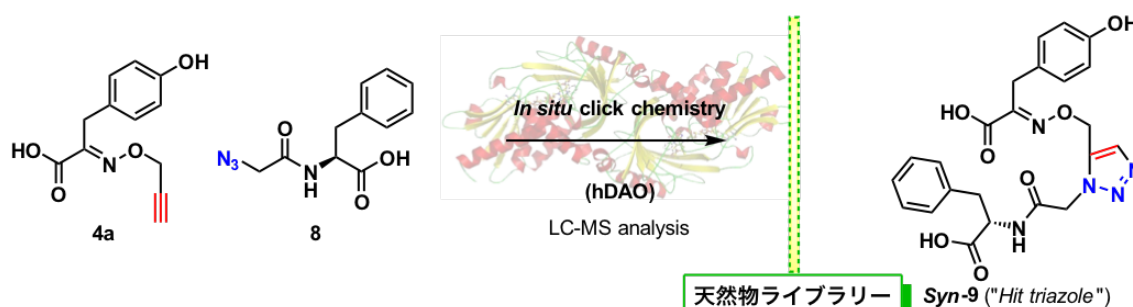


Figure 2-9-1 hDAO阻害剤共存下でのin situ click chemistry (LC/MSチャート)

2-10 In situ click chemistryを利用した微生物二次代謝産物由来天然物からのD-アミノ酸酸化酵素阻害剤の探索

Sodium benzoateを共存させアンカー分子（アルキン）**4a**とアジド**8**とのin situ click chemistryを行った場合、hDAOテンプレートによるトリアゾール形成の抑制が確認された。従って、得られたトリアゾール形成の抑制を指標とすることで微生物由来天然物ライブラリーからのhDAO阻害剤の探索が可能となると考えた。そこで、実際に微生物由来天然物ライブラリーを用いて、in situ click chemistryにおけるトリアゾール形成の抑制効果を指標とした、スクリーニングを行うこととした（Scheme 2-10-1）。

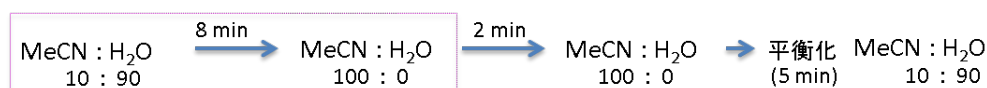


Scheme 2-10-1 天然物ライブラリー共存下でのin situ click chemistry（Syn-9の生成阻害）

北里生命科学研究所にて保有している、微生物二次代謝産物は、放線菌および糸状菌を併せて25,000種類に及ぶことから迅速にスクリーニングを行うことが大きな課題となる。トリアゾール形成が確認された条件にて、in situ click chemistryを行った場合、LC/MS-SIR測定時間が長い(gradient 8min, total 15 min)ことが問題となる。そこで、スクリーニングを行うためのgradient時間の短縮検討を行うこととした。gradient時間を8minから3 minに短縮し、スタート時の溶媒の割合を変更することにより検討を行った。

③Gradient: MeCN : H₂O = 30 : 70 → 100 : 0 (3min)、および④Gradient: MeCN : H₂O = 50 : 50 → 100 : 0 (3min)の条件では、トリアゾールのテーリングが確認された。そこで、①Gradient: MeCN : H₂O = 10 : 90 → 100 : 0 (3min)、および②Gradient: MeCN : H₂O = 20 : 80 → 100 : 0 (3min)の条件を最適化条件とした。最適化した条件により、実際にアンカー分子 **4a** とアジド**8**とのin situ click chemistryを行うことにより、測定時間の短縮が可能か確認を行うこととした (Figure 2-10-1)。

問題点: これまでの条件Gradient (Total 15 min)



Gradientを3 minにした検討

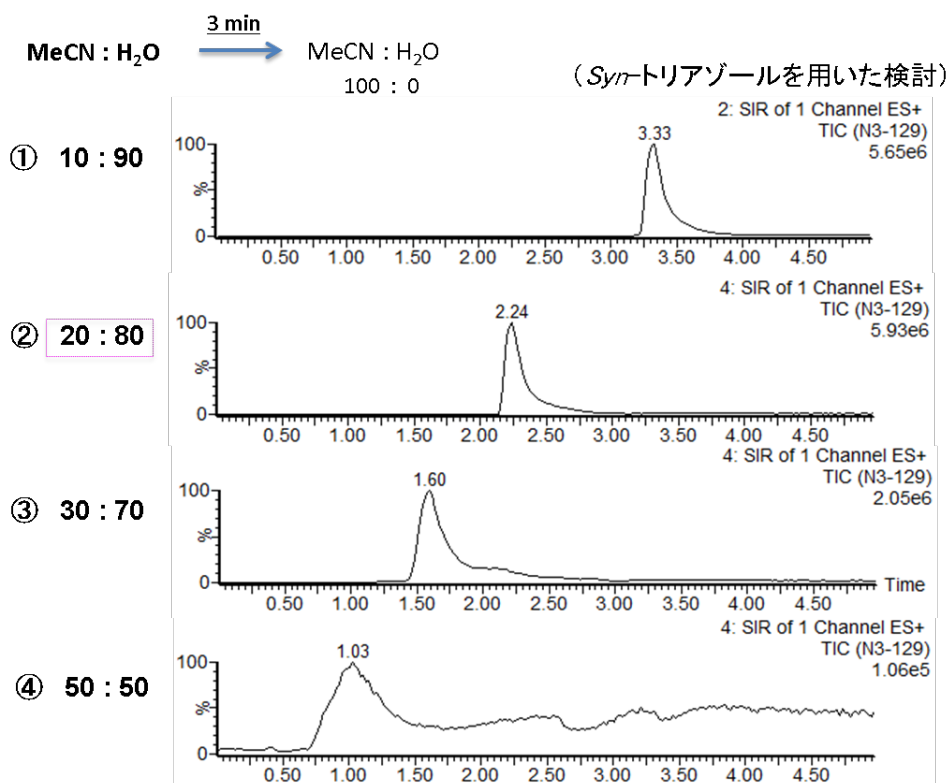


Figure 2-10-1 Gradientの検討

これまでの条件である Gradient: MeCN : H₂O = 20 : 80 → 100 : 0 (8min) にて、in situ click chemistryにおけるトリアゾール形成の促進効果の確認を行った、結果、5.7 minにトリアゾール形成の促進効果が確認された (Figure 2-10-2)。

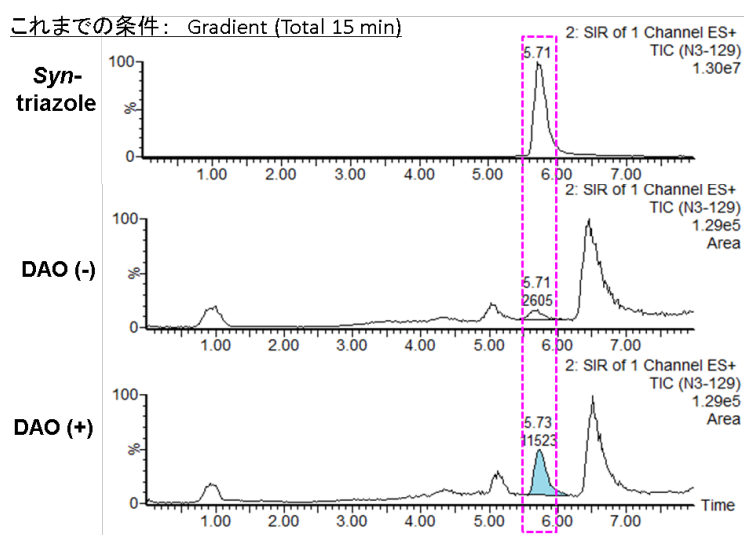


Figure 2-10-2 In situ click chemistry条件の検討①

次に、トリアゾール形成の促進効果が確認されたことから、②Gradient: MeCN : H₂O = 20 : 80 → 100 : 0 (3min)の条件にてin situ click chemistryにおけるトリアゾール形成の促進効果の確認を行った結果、2本のピークが2.3 minに確認されたことから、トリアゾール以外のピークが混雑している結果となった (Figure 2-10-3)。

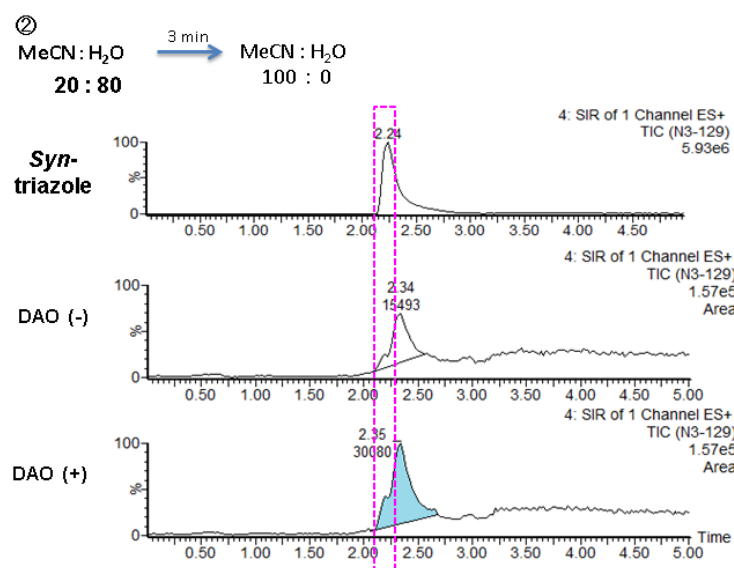


Figure 2-10-3 In situ click chemistry条件の検討②

そこで、①Gradient: MeCN : H₂O = 10 : 90 \rightarrow 100 : 0 (3min)の条件にて in situ click chemistryによるトリアゾール形成の促進効果の確認を行うこととした。その結果、3.4 minにトリアゾール形成の促進効果が単一のピークにて確認されたことから、本条件を最適化の条件として、微生物二次代謝産物からの探索を行うこととした (Figure 2-10-4)。

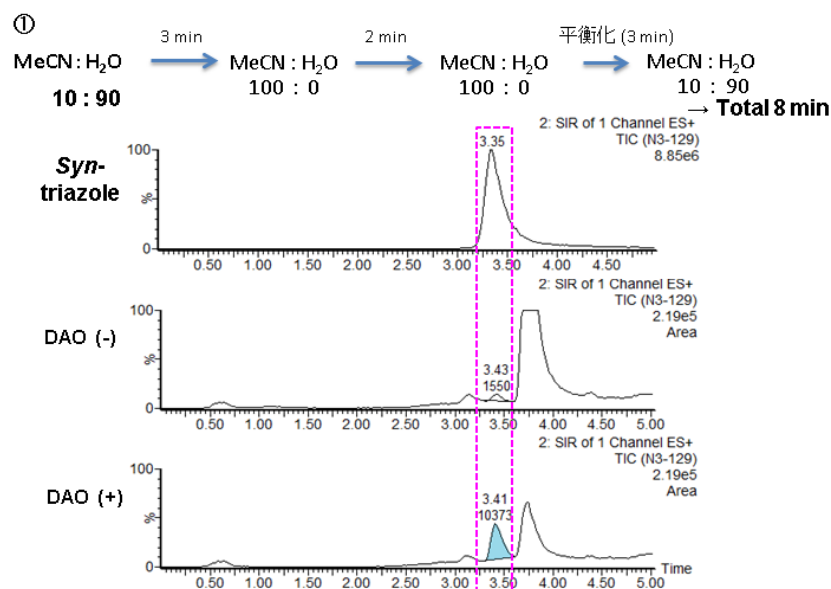
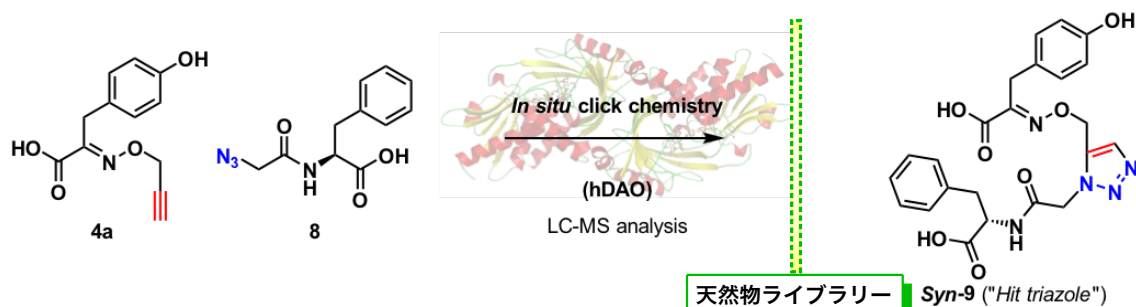


Figure 2-10-4 In situ click chemistry条件の検討③

さらに、ハイスループットな条件を指向し、複数のサンプルを混合し探索することにより、スクリーニングに要する時間の削減を行うこととした。

次に微生物二次代謝産物からのhDAO阻害剤の探索を行う前に、創薬グループが保有する天然物ライブラリー、315化合物を用いて、in situ click chemistryを利用したhDAO阻害剤スクリーニングを行った (Scheme 2-10-2)。



Scheme 2-10-2 天然物ライブラリー共存下でのin situ click chemistry

3化合物をひとまとめにし、105サンプルを用いて、in situ click chemistryを行った結果、2サンプルからヒットが確認された (Figure 2-10-5)。

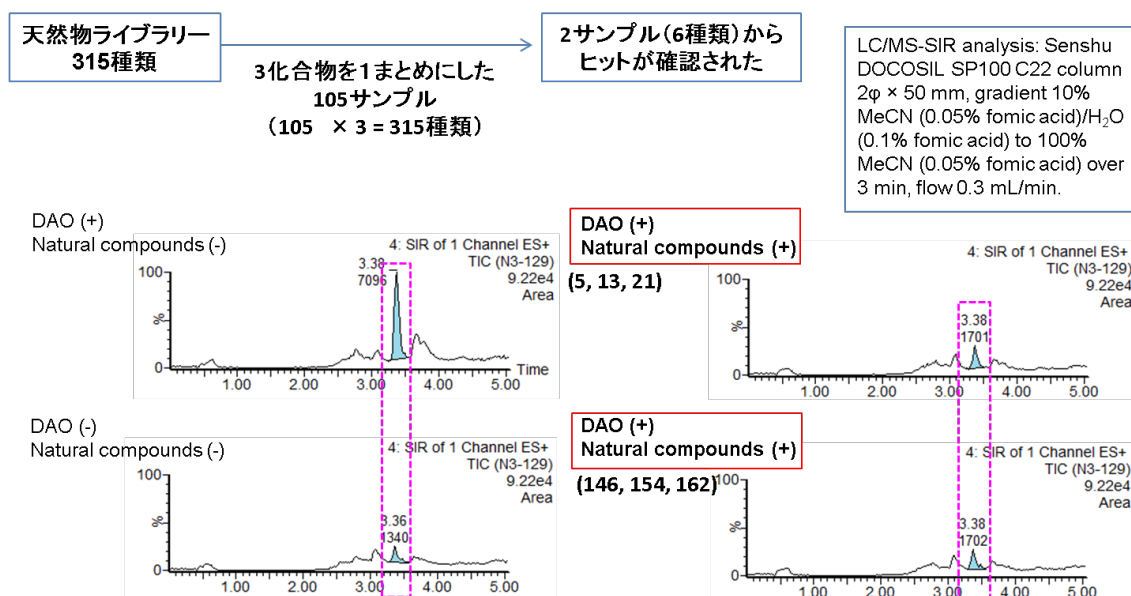


Figure 2-10-5 天然物ライブラリー共存下でのin situ click chemistry

次に、個別にした、6種類の天然物ライブラリーからのスクリーニングを行った結果、Antimycin AおよびThiolactomycinからヒットが確認された

(Figure 2-10-6)。Thiolactomycinは、既知のDAO阻害剤として報告されているものの、本結果からも、スクリーニングは、正しく行われていることが明らかとなった。

さらに、オキングラフを利用したhDAOに対する阻害活性の確認をAntimycin AおよびThiolactomycinに対して行うこととした。その結果、Antimycin Aでは、K_i値0.06 mMが確認され、Thiolactomycinからは、K_i値0.19 mMの阻害活性が確認された (Figure 2-10-7)。

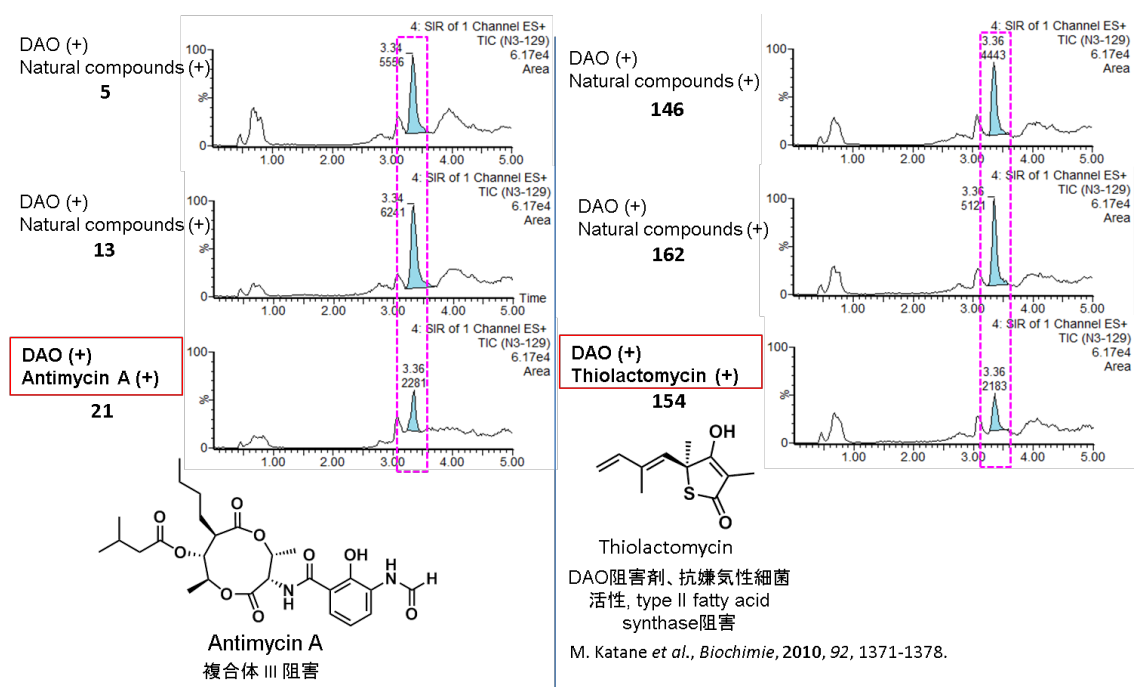


Figure 2-10-6 In situ click chemistryによりヒットが確認された天然物

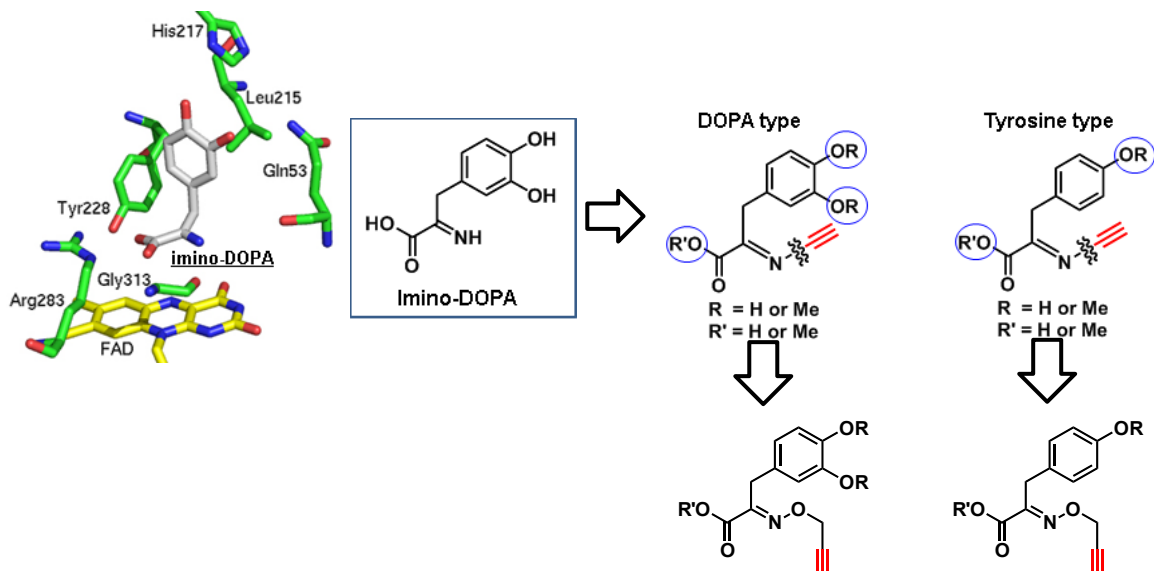
3. 総括

筆者は、in situ click chemistryを利用した新たなスクリーニング法を確立し、微生物由来天然物からのhDAO阻害剤の探索を行うことにより、hDAO阻害活性を有する天然物を見出すことを目的とし研究を行うこととした。

- ①共同研究者により報告されているhDAOとimino-DOPAとのX線共結晶図を参考にし、in situ click chemistryに利用可能なアンカー分子を創製した。
- ②創製したアンカー分子と当研究室にて保有しているアジドライブラリーとのin situ click chemistryにより、hDAOテンプレートによるトリアゾール形成の促進効果を確認し、高選択的なhDAO阻害剤を見出した。
- ③見出されたアンカー分子、およびアジドフラグメントに、imino-DOPAと同じhDAOの活性部位に結合するhDAO阻害剤として知られている、sodium benzoateを共存させ、in situ click chemistryを行った結果、トリアゾール形成促進効果の抑制が確認された。
- ④トリアゾール形成の抑制が確認されたことから、in situ click chemistryを利用した、微生物由来天然物ライブラリーからのスクリーニングを行い、Antimycin A、およびThiolactomycinからトリアゾール形成の抑制が確認された。さらに、Antimycin A、およびThiolactomycinはhDAO阻害活性を有していることが明らかとなった。

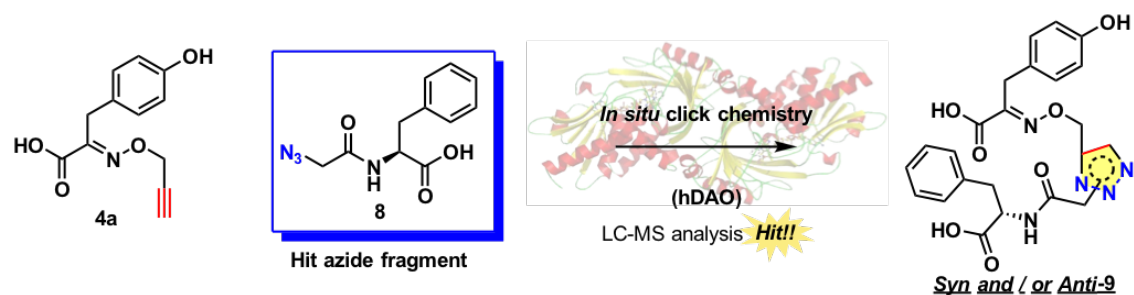
以上の結果の詳細を以下にまとめ示す。

アンカー分子の創製戦略は、hDAOと imino-DOPA とのX線共結晶構造に基づき設計を行い、イミン部位にアルキン機能を導入した。

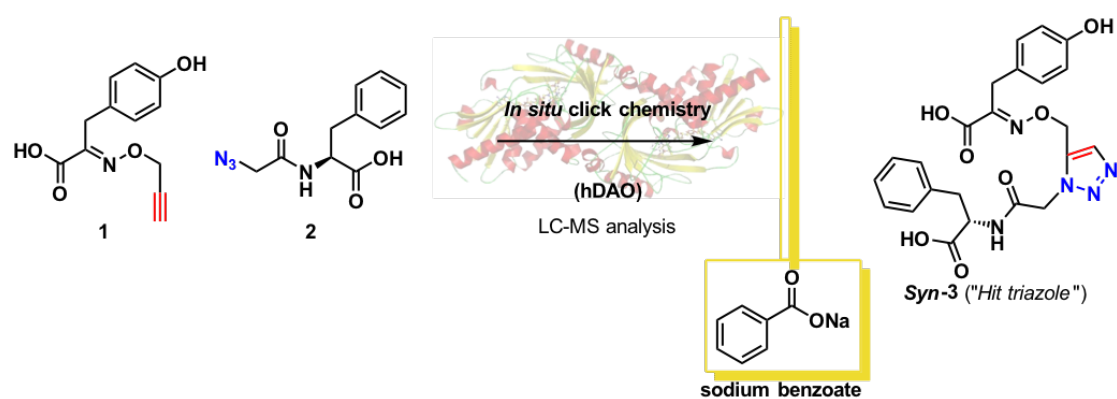


hDAOはアンカー分子であるアルキンと選択されたアジドフラグメント間のトリアゾール形成するための鑄型として利用した。In situ click chemistryにおけるhDAOの鑄型効果によるトリアゾール形成促進効果のプロセスは、高度な発エルゴンの性質により、プロセスの不可逆性および、酵素リガンド親和性部位での固有情報により固定される。hDAOは、強力な阻害剤を作成するために、分子スケールの反応容器として作用し、「鑄型」として標的酵素誘導型の阻害剤探索の有効性を実証した。In situ click chemistryプロトコルは長く、高価なアナログの合成を必要とせずに、hDAOの機能解明に向けた非常に魅力的なhDAO阻害剤の発見のためのリード化合物の発見を可能とした。

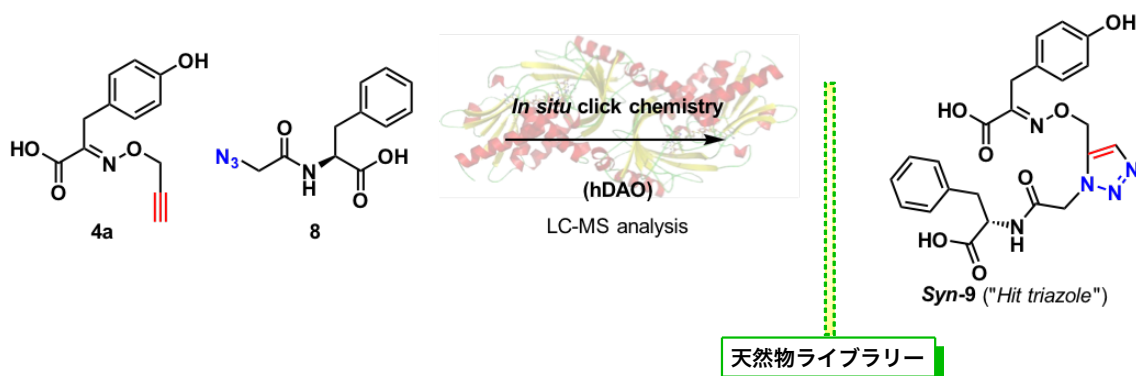
創製したアンカー分子 **4a** とアジド **8** との *in situ* click chemistry により、*syn*-トリアゾール **9** からトリアゾール形成促進効果が確認された。



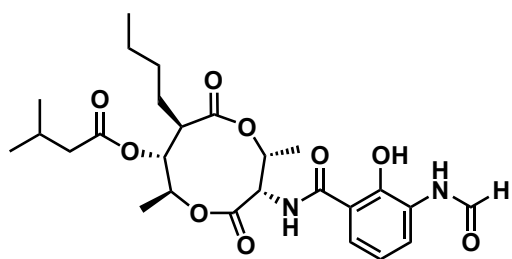
Syn-3のhDAO阻害活性 (K_i : 0.5 mM)は、アンカー分子 **1** (2.5 mM)と比較し5倍向上した。既知のhDAO阻害剤であるsodium benzoate (3 μ M)を共存させ *in situ* click chemistryを行った場合、トリアゾールの形成が抑制された。



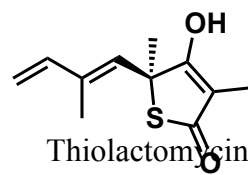
以上の結果から、hDAOの活性部位でhDAOのテンプレート効果により、トリアゾール形成が促進され、より親和性の高い阻害剤がhDAO自身により生成されたことが明らかとなった。さらにin situ click chemistryによるトリアゾール形成促進効果の抑制を指標として、天然物ライブラリーからのhDAO阻害剤の探索を行った。



その結果、Thiolactomycin (K_i : 0.19 mM) およびAntimycin A (K_i : 0.06 mM) がトリアゾール形成を抑制することが確認出来た。ヒットが確認された天然物は、今後行われる微生物二次代謝産物からの探索におけるリード化合物となることが期待される。



Antimycin A
複合体III阻害



Thiolactomycin
 K_i : 0.19 mM

DAO阻害剤、抗嫌気性細菌活性, type II fatty acid synthase阻害

参考文献

- 1) van Os J., Kapur S., *Lancet*, **374**, 635–645 (2009).
- 2) McGrath J., Saha S., Chant D., Welham J., *Epidemiol Rev.*, **30**, 67–76 (2008).
- 3) Anis N. A., Berry S. C., Burton N. R., Lodge D., *Br. J. Pharmacol.*, **79**, 565–575 (1983).
- 4) Ishiwatari K., Nshikawa T., *J.Soc. Jpn. Wom.Sci*, **14**, 10–15 (2014).
- 5) Nishikawa T., *Folia. Pharmacol. JPN.*, **128**, 13–18 (2006).
- 6) Krebs H. A., *Biochem J.*, **29**, 1620–1644 (1935).
- 7) Chumakov I., Blumenfeld M., Guerassimenko O., Cavarec L., Palicio M., Abderrahim H., Bougueleret L., Barry C., Tanaka H., La Rosa P., Puech A., Tahri N., Cohen-Akenine A., Delabrosse S., Lissarrague S., Picard F.-P., Maurice K., Essioux L., Millasseau P., Grel P., Debailleul V., Simon A.-M., Caterina D., Dufaure I., Malekzadeh K., Belova M., Luan J.-J., Bouillot M., Sambucy J.-L., Primas G., Saumier M., Boubkiri N., Martin-Saumier S., Nasroune M., Peixoto H., Delaye A., Pinchot V., Bastucci M., Guillou S., Chevillon M., Sainz-Fuertes R., Meguenni S., Aurich-Costa J., Cherif D., Gimalac A., Van Duijn C., Gauvreau D., Ouellette G., Fortier I., Raelson J., Sherbatich T., Riazanskaia N., Rogaev E., Raeymaekers P., Aerssens J., Konings F., Luyten W., Macciardi F., Sham P. C., Straub R. E., Weinberger D. R., Cohen N., Cohen D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13675–13680 (2002).
- 8) Park H. K., Shishido Y., Ichise-Shishido S., Kawazoe T., Ono K., Iwana S., Tomita Y., Yorita K., Sakai T., Fukui K., *J. Biochem.*, **139**, 295–304 (2006).
- 9) 福井清, 生化学, **80**, 344-351 (2008).
- 10) Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004–2021 (2001).
- 11) Michael A., *J. Prakt. Chem.*, **48**, 94–95 (1893).
- 12) Huisgen R., *Pure Appl. Chem.*, **61**, 613–628 (1989).
- 13) Huisgen R., “In 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry,” Vol. 1, ed. by Padwa A., Wiley, New York, 1984, pp. 1–176.
- 14) Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2596–2599 (2002).
- 15) Tornøe, C. W., Christensen C., Meldal M., *J. Org. Chem.*, **67**, 3057–3064 (2002).
- 16) Worrell B. T., Malik J.A., Fokin V. V., *Science*, **340**, 457-460 (2013).
- 17) Zhang L., Chen X., Xue P., Sun H. H. Y., Williams I. D., Sharpless K. B., Fokin V. V., Jia G., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15998–15999 (2005).

- 18) Rasmussen L. K., Boren B. C., Fokin V. V., *Org. Lett.*, **9**, 5337–5339 (2007).
- 19) Fazio F., Bryan M. C., Blixt O., Paulson J. C., Wong C.-H., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14397–14402 (2002).
- 20) Lee L. V., Mitchell M. L., Huang S.-J., Fokin V. V., Sharpless K. B., Wong C.-H., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9588–9589 (2003).
- 21) Hirose T., Sunazuka T., Noguchi Y., Yamaguchi Y., Hanaki H., Sharpless K. B., Ōmura S., *Heterocycles*, **69**, 55–61 (2006).
- 22) Kolb H. C., Sharpless K. B., *Drug Discov. Today*, **8**, 1128–1137 (2003).
- 23) Sharpless K. B., Manetsch R., *Expert Opin. Drug. Discov.*, **1**, 525–538 (2006).
- 24) Mamidyala S. K., Finn M. G., *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1252–1261 (2010).
- 25) Lewis W. G., Green L. G., Grynszpan F., Radić Z., Carlier P. R., Taylor P., Finn M. G., Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1053–1057 (2002).
- 26) Manetsch R., Krasinski A., Radić Z., Raushel J., Taylor P., Sharpless K. B., Kolb H. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12809–12818 (2004).
- 27) Krasinski A., Radić Z., Manetsch R., Raushel J., Taylor P., Sharpless K. B., Kolb H. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 6686–6692 (2005).
- 28) Mocharla V. P., Colasson B., Lee L. V., Röper S., Sharpless K. B., Wong C.-H., Kolb H. C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 116–120 (2004).
- 29) Wang J., Sui G., Mocharla V. P., Lin R. J., Phelps M. E., Kolb H. C., Tseng H.-R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 5276–5281 (2006).
- 30) Wang Y., Lin W.-Y., Liu K., Lin R. J., Selke M., Kolb H. C., Zhang N., Zhao X.-Z., Phelps M. E., Shen C. K. F., Faull K. F., Tseng H.-R., *Lab. Chip.*, **9**, 2281–2285 (2009).
- 31) Lee S. S., Lim J., Tan S., Cha J., Yeo S. Y., Agnew H. D., Heath J. R., *Anal. Chem.*, **82**, 672–679 (2010).
- 32) Whiting M., Muldoon J., Lin Y.-C., Silverman S. M., Lindstrom W., Olson A. J., Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., Elder J. H., Fokin V. V., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1435–1439 (2006).
- 33) Hirose T., Sunazuka T., Sugawara A., Endo A., Iguchi K., Yamamoto T., Ui H., Shiomi K., Watanabe T., Sharpless K. B., Ōmura S., *J. Antibiot.*, **62**, 277–282 (2009).
- 34) Hirose T., Sunazuka T., Ōmura S., *Proc. Jpn. Acad., Ser., B*, **86**, 85–102 (2010).
- 35) Hirose T., Maita N., Gouda H., Koseki J., Yamamoto T., Sugawara A., Nakano H., Hirono S., Shiomi K., Watanabe T., Taniguchi H., Sharpless K. B., Ōmura S., Sunazuka T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 15892–15897 (2013).

- 36) Willand N., Desroses M., Toto P., Dirié B., Lens Z., Villeret V., Rucktooa P., Locht C., Baulard A., Deprez B., *ACS Chem. Biol.*, **5**, 1007–1013 (2010).
- 37) Millward S. W., Henning R. K., Kwong G. A., Pitram S., Agnew H. D., Deyle K. M., Nag A., Hein J., Lee S. S., Lim J., Pfeilsticker J. A., Sharpless K. B., Heath J. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 18280–18288 (2011).
- 38) Grimster N. P., Stump B., Fotsing J. R., Weide T., Talley T. T., Yamauchi J. G., Nemezc Á., Kim C., Ho K.-Y., Sharpless K. B., Taylor P., Fokin V. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6732–6740 (2012).
- 39) Antonio M. D., Biffi G., Mariani A., Raiber E.-A., Rodriguez R., Balasubramanian S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 11073–11078 (2012).
- 40) Tieu W., Soares da Costa T. P., Yap M. Y., Keeling K. L., Wilce M. C. J., Wallace J. C., Booker G. W., Polyak S. W., Abell A. D., *Chem. Sci.*, **4**, 3533–3537 (2013).
- 41) Newman D. J., Cragg G. M., *J. Nat. Prod.*, **75**, 311–355 (2012).
- 42) Kawazoe T., Tsuge H., Pilone M. S., Fukui K., *Protein Sci.*, **15**, 2708–2717 (2006).
- 43) Kawazoe T., Tsuge H., Imagawa T., Aki K., Kuramitsu S., Fukui K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 385–391 (2007).
- 44) Kawazoe T., Park H. K., Iwana S., Tsuge H., Fukui K., *Chem. Rec.*, **7**, 305–315 (2007).
- 45) Gabler M., Hensel M., Fischer L., *Enzyme Microb. Tech.*, **27**, 605–611 (2000).
- 46) Nicell J. A., Bewtra J. K., Biswas N., ST. Pierre C. C., Taylor K. E., *Can. J. Civ. Eng.*, **20**, 725–735 (1993).
- 47) Molla G., Sacchi S., Bernasconi M., Pilone M. S., Fukui K., Pollegioni L., *FEBS Lett.*, **580**, 2358–2364 (2006).
- 48) Dixon M., *J. Biochem.*, **55**, 170–171 (1953).
- 49) Dixon M., *J. Biochem.*, **129**, 197–202 (1972).
- 50) Aizpurua J. M., Azcune I., Fratila R. M., Balentova E., Sagartzazu-Aizpurua M., Miranda J. I., *Org. Lett.*, **12**, 1584–1587 (2010).
- 51) Hentschel F., Sasse F., Lindel T., *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 7120–7133 (2012).

4. 実験項

General Information

hDAO was expressed in *E. coli* and purified as previously reported.³⁷⁾ All reagents were used as purchased without further purification unless otherwise noted. Unless otherwise noted, all reactions were carried out under nitrogen atmosphere. Precoated silica gel plates with a fluorescent indicator (Merck Ltd., Tokyo, Japan, 60 F254) were used for analytical and preparative thin layer chromatography. Flash column chromatography was carried out with Kanto Chemical silica gel (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan, Silica gel 60N, spherical neutral, 0.040–0.050 mm, catalog no. 37563-84) or Merck silica gel 230–400 mesh ASTM (Merck Ltd., Tokyo, Japan, 60N, 0.040–0.063 mm, catalog no. 109385). Microwave irradiation was carried out with Initiator +TM Eight (Biotage, Uppsala, Sweden). ¹H NMR spectra were recorded at 500 MHz, and ¹³C NMR spectra were recorded at 125 MHz on JEOL ECA-500 (500 MHz) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). The chemical shifts are expressed in ppm downfield from internal solvent peaks CD₃OD (3.31, 4.84 ppm, ¹H NMR), CD₃OD (49.0 ppm, ¹³C NMR), and J values are given in hertz. The coupling patterns are expressed by s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), or m (multiplet). All infrared (IR) spectra were measured with a Horiba FT-210 spectrometer (HORIBA Ltd., Kyoto, Japan) spectrometer and were reported in wavenumbers (cm⁻¹). High resolution mass spectra (HRSM) were measured on a JEOL JMS-700 MStation and JEOL JMS-T100LP (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Melting points were measured on a Yanaco micro melting system MP-500P (Yanaco New Science Inc., Kyoto, Japan). HPLC analysis was performed on a Waters 2795 separation module with Alliance HT (Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan) equipped with a diode-array detector and micromass ZQ (Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan). Optical rotations were measured by

using JASCO P-1010 polarimeter.

hDAO was expressed in *E. coli* and purified as previously reported.³⁷⁾

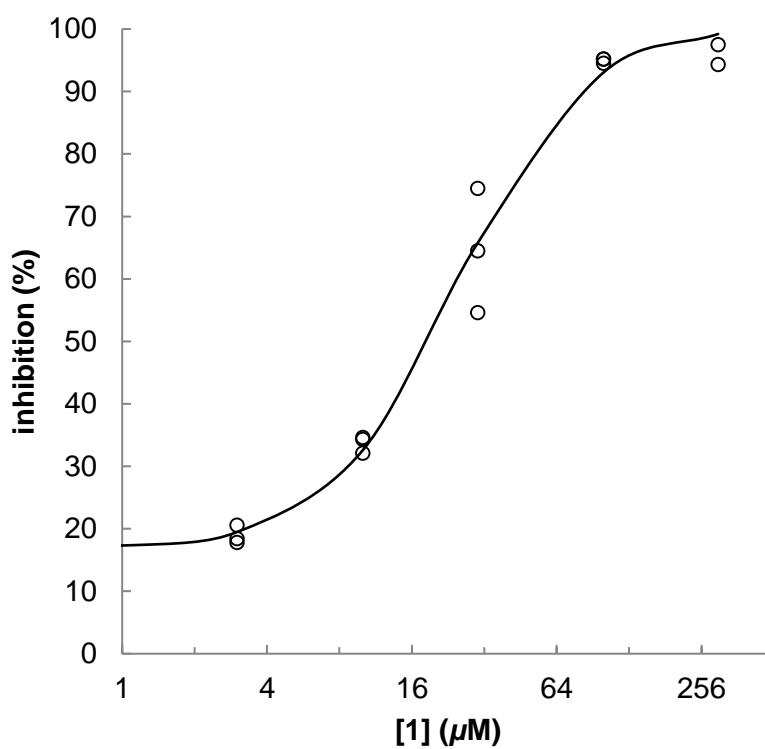
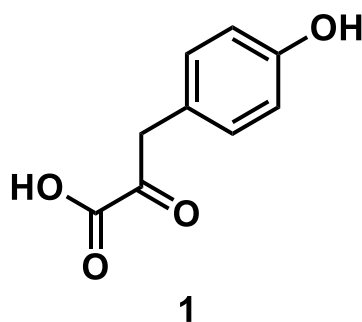
10	20	30	40	50
MRVVVIGAGV IGLSTALCIH ERYHSVLQPL DIKVYADRFT PLTTTDVAAG				
60	70	80	90	100
LWQPYLSDPN NPQEADWSQQ TFDYLLSHVH SPNAENLGLF LISGYNLFHE				
110	120	130	140	150
AIPDPSWKDT VLGFRKLTPR ELDMFPDYGW GWFHTSLILE GKNYLQWLTE				
160	170	180	190	200
RLTERGVKFF QRKVESFEEV AREGADVIVN CTGVWAGALQ RDPLLQPGRG				
210	220	230	240	250
QIMKVDAPWM KHFILTHDPE RGIYNSPYII PGTQTVTLGG IFQLGNWSEL				
260	270	280	290	300
NNIQDHNTIW EGCCRLEPTL KNARIIGERT GFRPVRPQIR LEREQLRTGP				
310	320	330	340	
SNTEVIHNYG HGGYGLTIHW GCALEAAKLF GRILEEKKLS RMPPSHL				

Determination of IC₅₀

IC₅₀ was calculated from;

$$\text{Inhibition \%} = (1 - \Delta\text{OD}_{420} \text{ sample} / \Delta\text{OD}_{420} \text{ control}) \times 100.$$

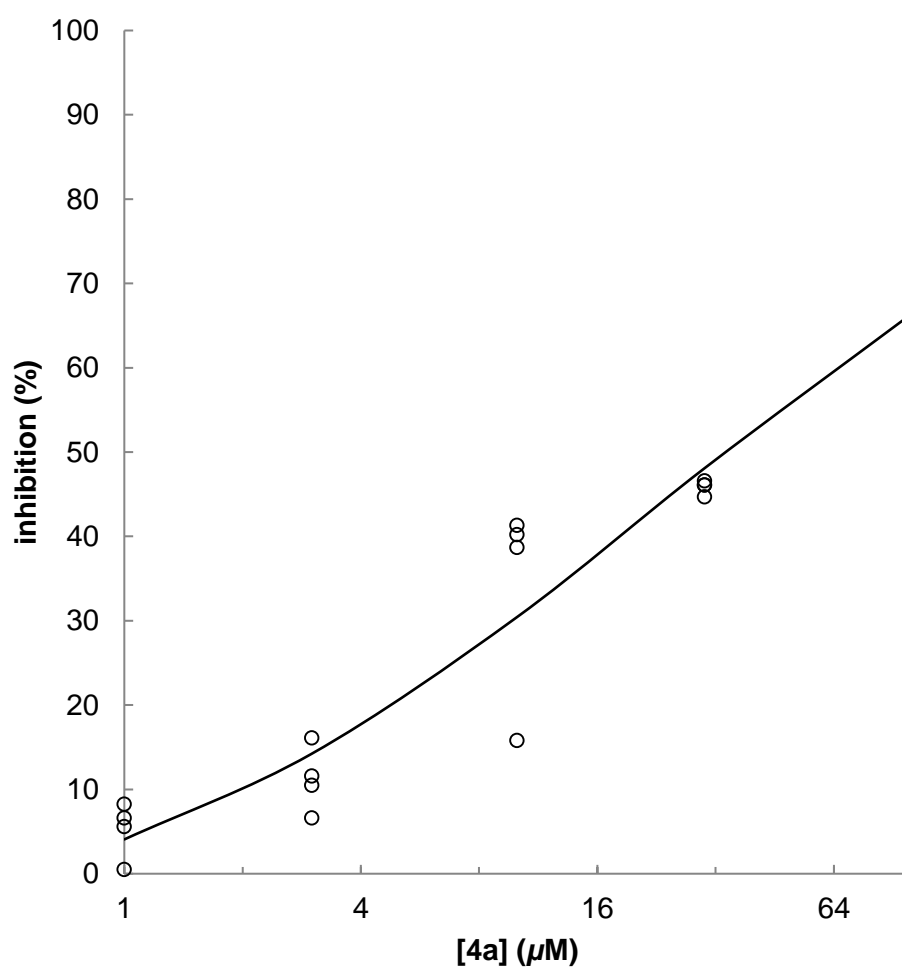
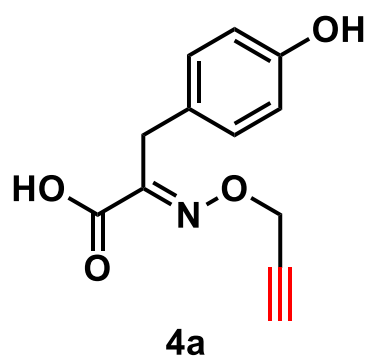
Quantitative evaluation of H₂O₂ (1)



$$\text{IC}_{50} = 18.9 \text{ (}\mu\text{M)}$$

Figure S1. Determination of IC₅₀ for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [1])

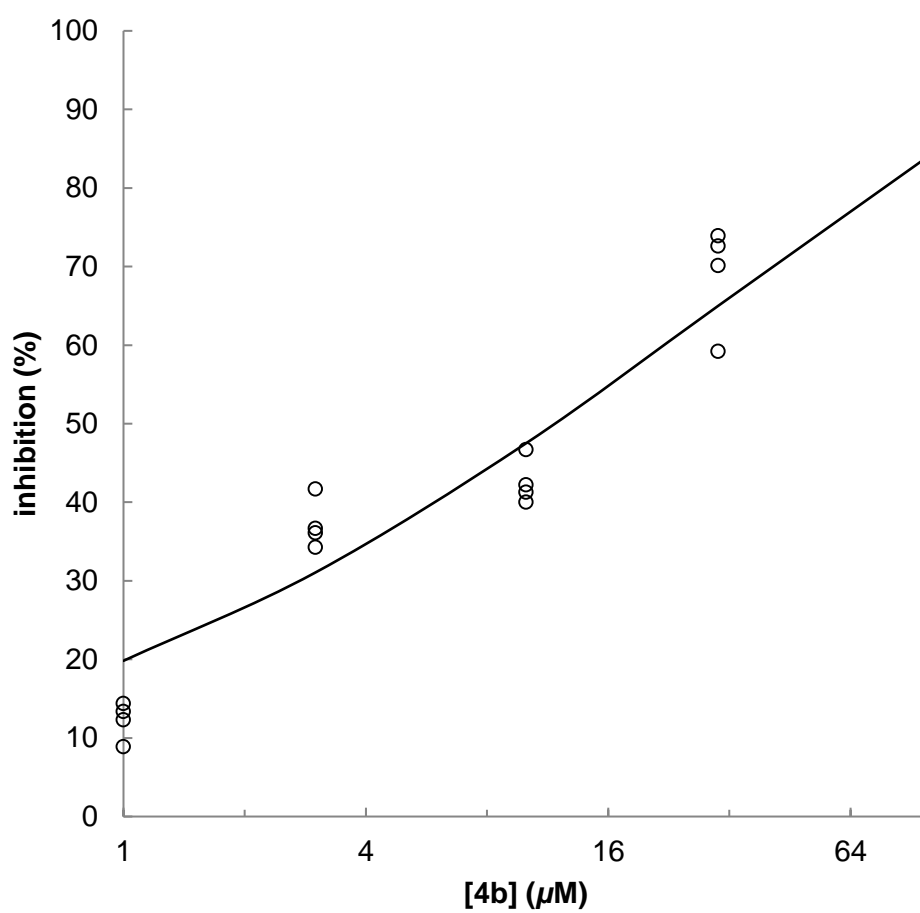
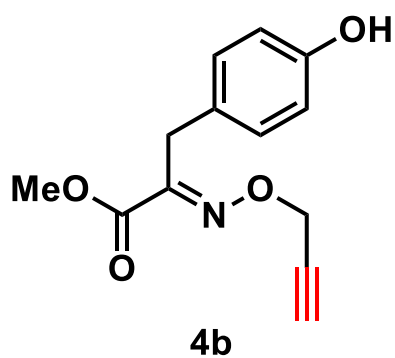
Quantitative evaluation of H₂O₂ (**4a**)



$$\text{IC}_{50} = 33.7 \text{ } (\mu\text{M})$$

Figure S2. Determination of IC_{50} for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [**4a**])

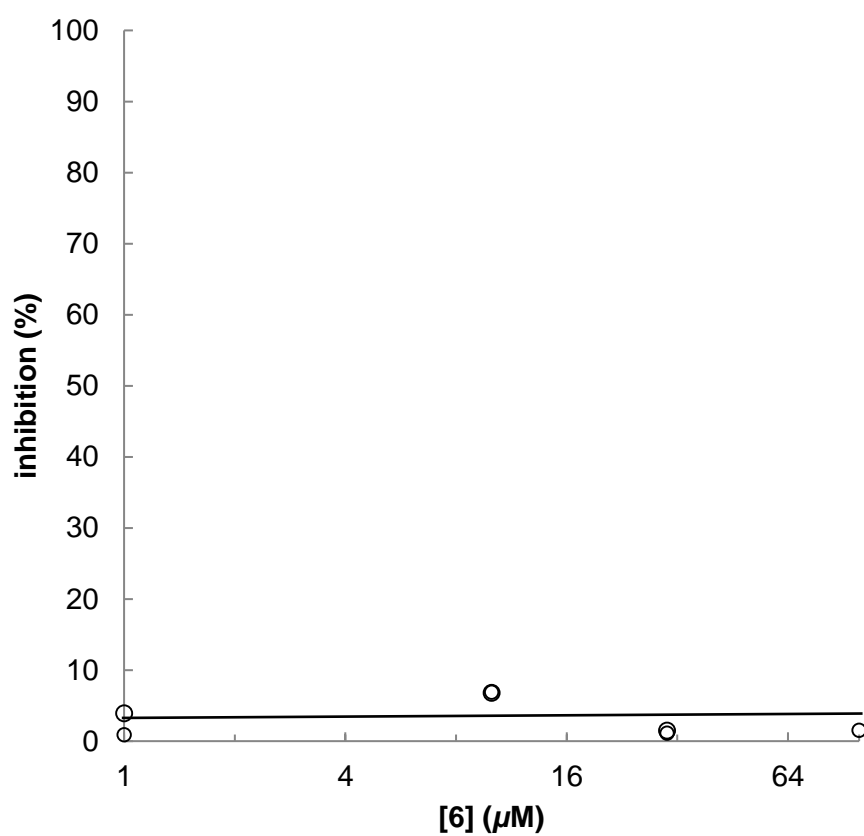
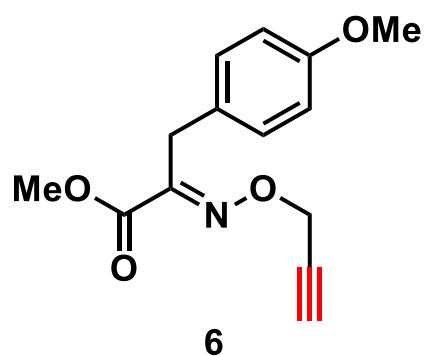
Quantitative evaluation of H₂O₂ (**4b**)



$$\text{IC}_{50} = 11.7 \text{ } (\mu\text{M})$$

Figure S3. Determination of IC₅₀ for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [**4b**])

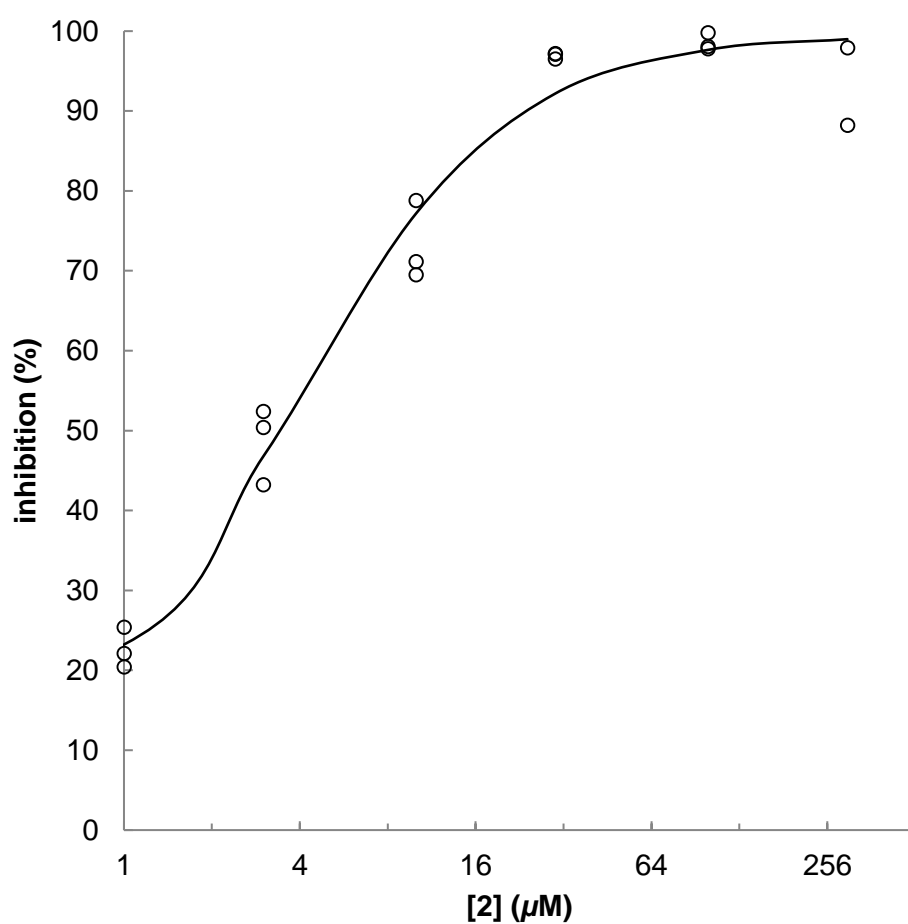
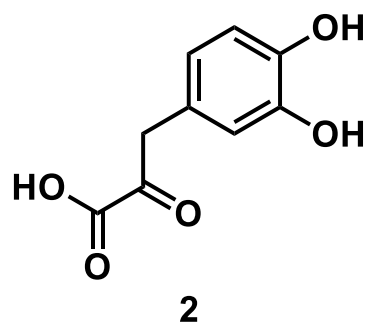
Quantitative evaluation of H₂O₂ (**6**)



$\text{IC}_{50} = >300 \text{ } (\mu\text{M})$

Figure S4. Determination of IC_{50} for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [**6**])

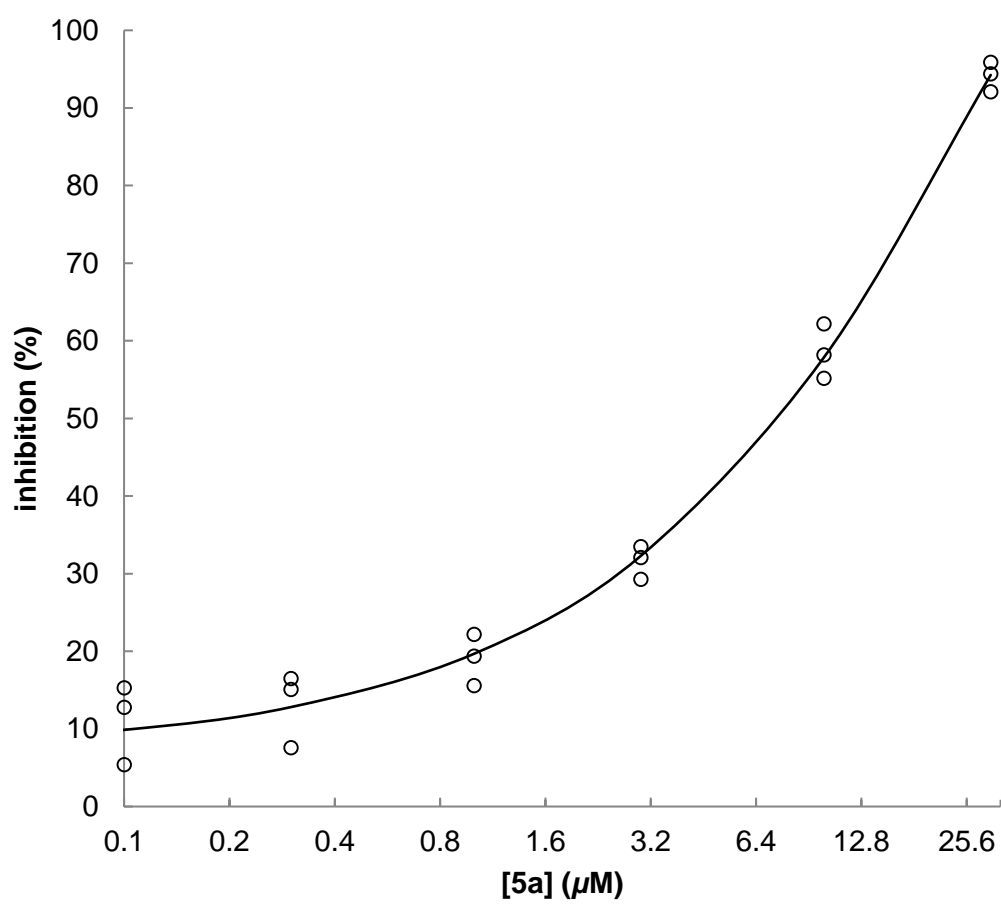
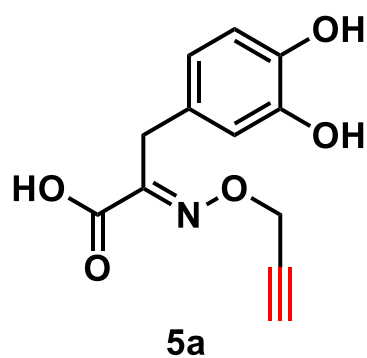
Quantitative evaluation of H₂O₂ (2)



$$IC_{50} = 3.4 (\mu M)$$

Figure S5. Determination of IC₅₀ for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [2])

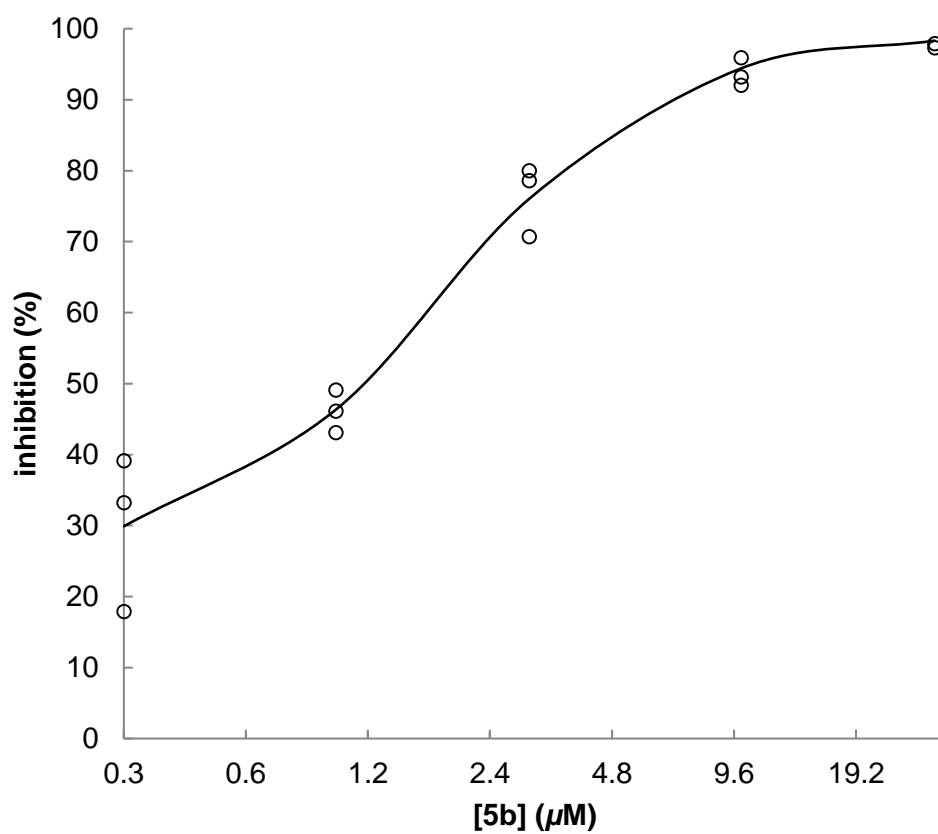
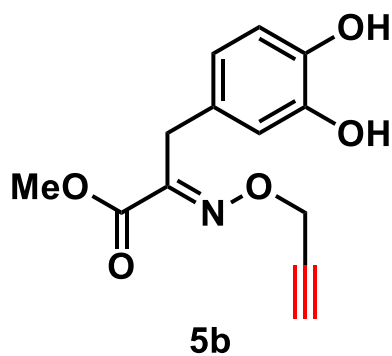
Quantitative evaluation of H₂O₂ (**5a**)



$\text{IC}_{50} = 7.3 \text{ } (\mu\text{M})$

Figure S6. Determination of IC_{50} for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [**5a**])

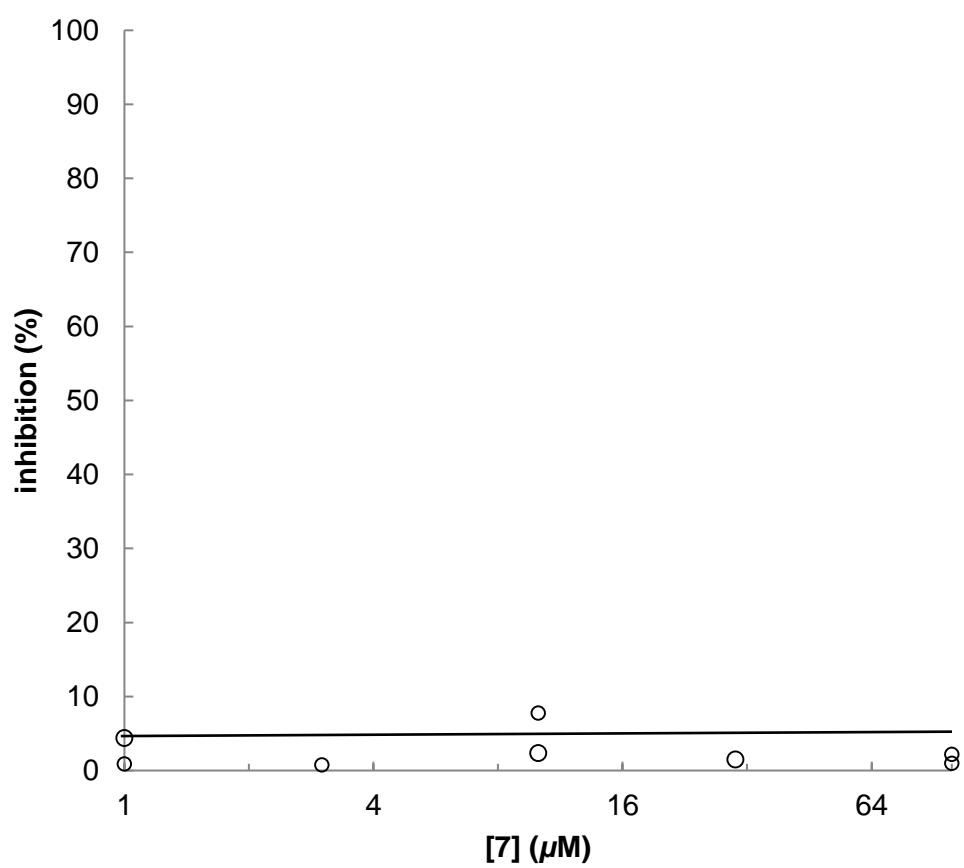
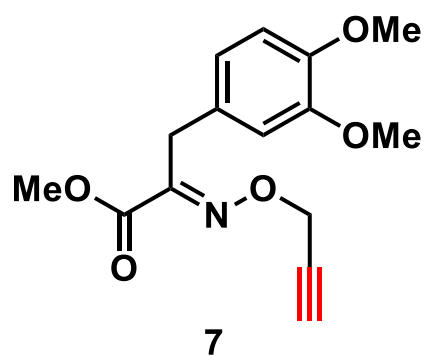
Quantitative evaluation of H₂O₂ (**5b**)



$\text{IC}_{50} = 1.1 \text{ } (\mu\text{M})$

Figure S7. Determination of IC_{50} for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [**5b**])

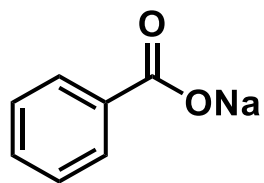
Quantitative evaluation of H₂O₂ (7)



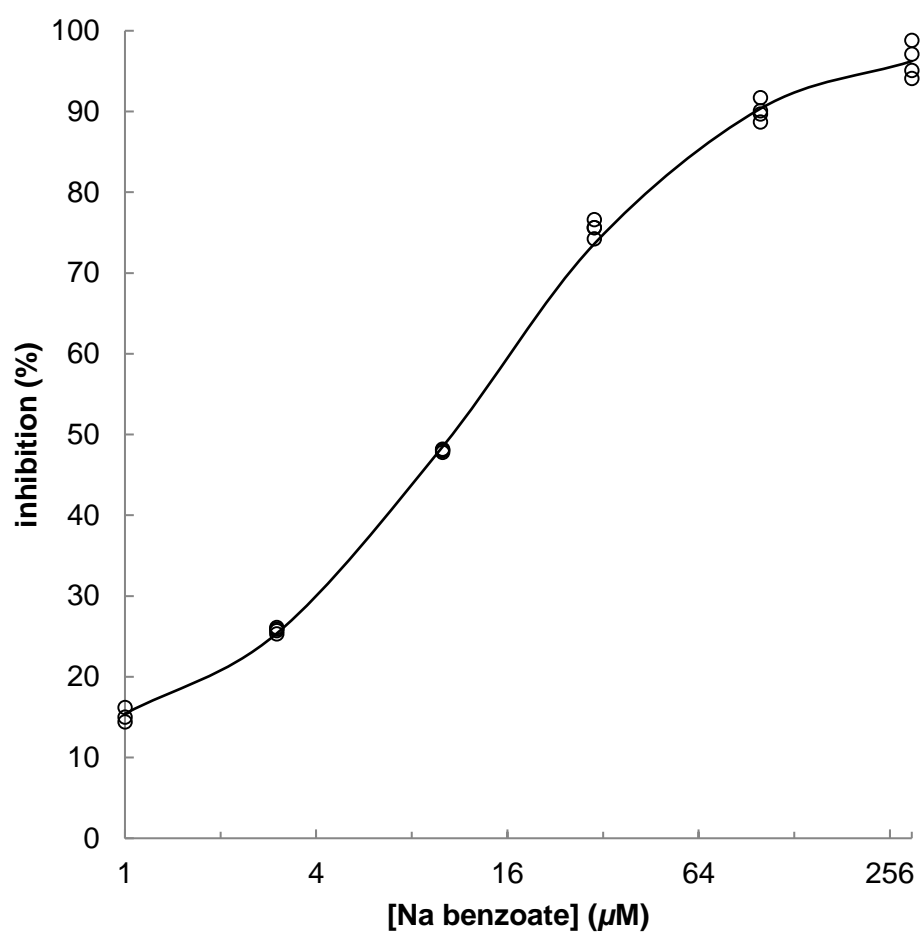
IC₅₀ = >300 (μM)

Figure S8. Determination of IC₅₀ for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [7])

Quantitative evaluation of H₂O₂ (Na benzoate)



Sodium benzoate



$$\text{IC}_{50} = 10.7 \text{ } (\mu\text{M})$$

Figure S9. Determination of IC_{50} for H₂O₂/ABTS/HRP assay (hDAO versus [Na benzoate])

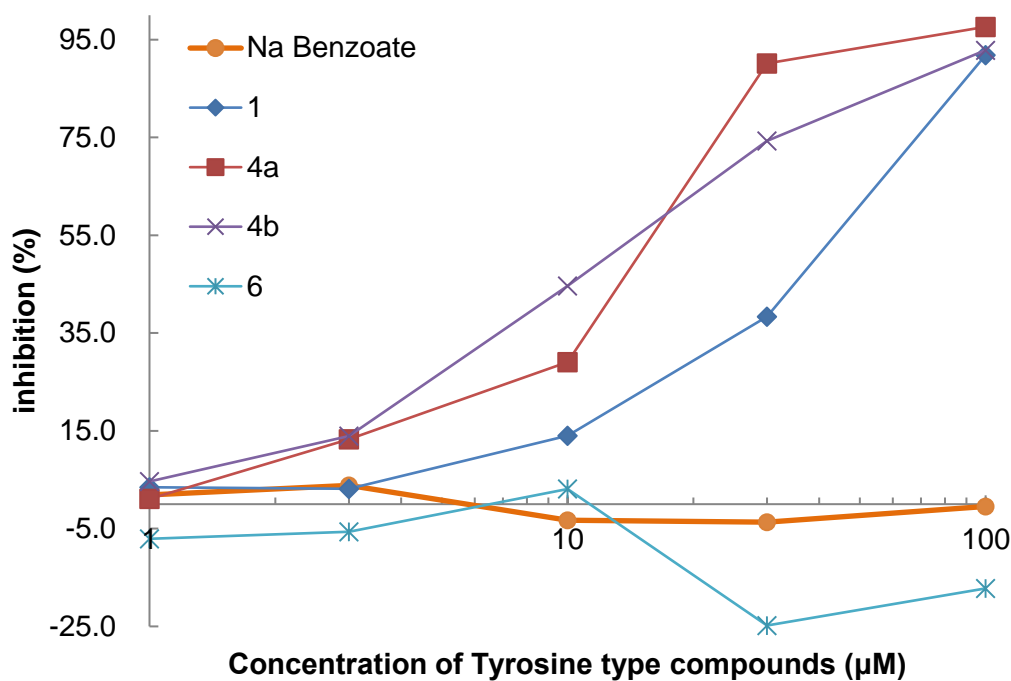


Figure S10. Determination of IC_{50} for H_2O_2 /ABTS/HRP assay (HRP versus [Na benzoate], [1], [4a], [4b], and [6])

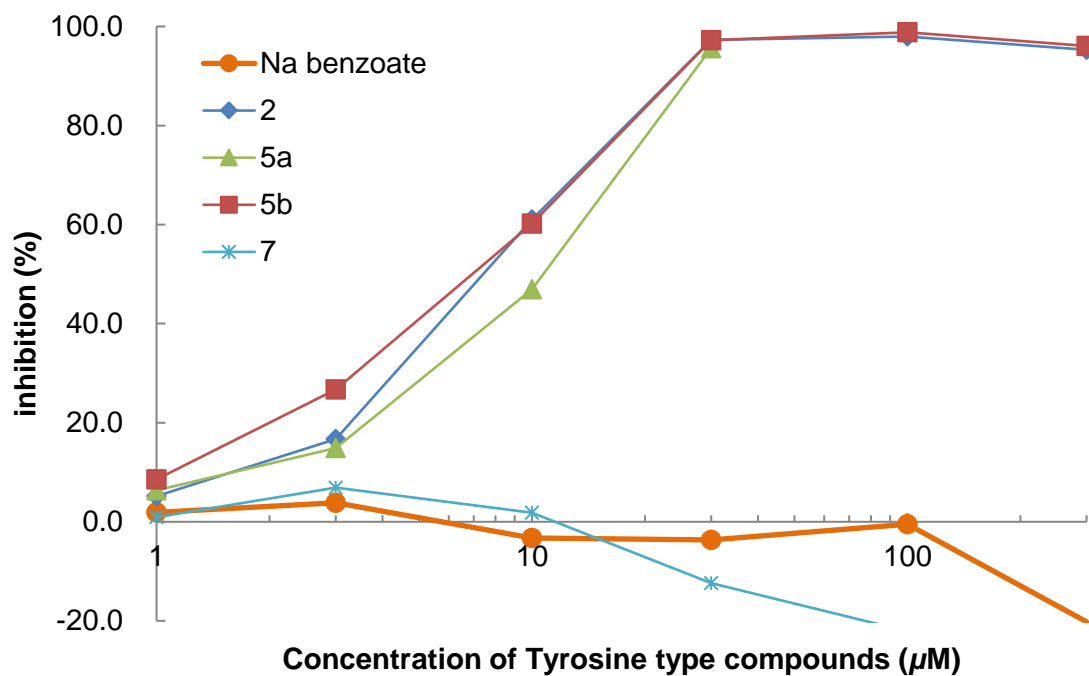


Figure S11. Determination of IC_{50} for H_2O_2 /ABTS/HRP assay (HRP versus [Na benzoate], [2], [5a], [5b], and [7])

Determination of K_i values

For competitive inhibition from Dixon plot and secondary plot, K_i was calculated from;

$$-K_i = K_x (1 + [S]/K_s + [I]/K_i) \quad (K_m(\text{D-Pro}) = 1.7 \text{ mM}).$$

Quantitative evaluation of O_2 (**4a**)

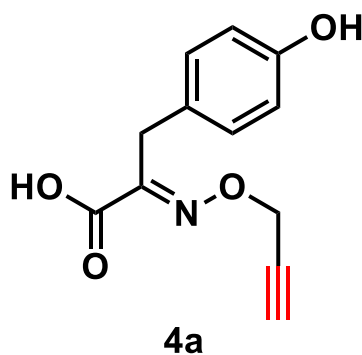


Table S7. Kinetic analysis of **4a**

	[D-Ala] (mM)	Rate (mol/nL/min)	Turnover (min)	1/Turnover (min)	[4a] (mM)
1	0.5	-37.44	187.20	0.00534	0
2	0.5	-36.31	181.55	0.00551	0
3	0.5	-35.99	179.95	0.00556	0.1
4	0.5	-35.43	177.15	0.00564	0.1
5	0.5	-34.77	173.85	0.00575	0.2
6	0.5	-34.29	171.45	0.00583	0.2
7	0.5	-34.14	170.70	0.00586	0.3
8	0.5	-34.53	172.65	0.00579	0.3
9	1	-53.5	267.50	0.00374	0
10	1	-54.07	270.35	0.00370	0
11	1	-52.78	263.90	0.00379	0.1
12	1	-52.01	260.05	0.00385	0.1

13	1	-50.06	250.30	0.00400	0.1
14	1	-50.42	252.10	0.00397	0.2
15	1	-50.01	250.05	0.00400	0.2
16	1	-50.58	252.90	0.00395	0.3
17	1	-51.96	259.80	0.00385	0.3
18	1	-49.54	247.70	0.00404	0.4
19	1	-49.76	248.80	0.00402	0.4
20	2	-65.21	326.05	0.00307	0
21	2	-65.06	325.30	0.00307	0
22	2	-67.01	335.05	0.00298	0.1
23	2	-65.32	326.60	0.00306	0.1
24	2	-62.13	310.65	0.00322	0.2
25	2	-64.3	321.50	0.00311	0.2
26	2	-64.4	322.00	0.00311	0.3
27	2	-62.99	314.95	0.00318	0.3
28	2	-63.14	315.70	0.00317	0.4
29	2	-62.98	314.90	0.00318	0.4
30	2	-63.53	317.65	0.00315	0.4
31	3	-69.74	348.70	0.00287	0
32	3	-70.21	351.05	0.00285	0
33	3	-69.69	348.45	0.00287	0.1
34	3	-69.11	345.55	0.00289	0.1
35	3	-67.53	337.65	0.00296	0.2
36	3	-67.44	337.20	0.00297	0.2
37	3	-68.31	341.55	0.00293	0.3
38	3	-67.55	337.75	0.00296	0.3
39	3	-67.38	336.90	0.00297	0.4
40	3	-66.66	333.30	0.00300	0.4

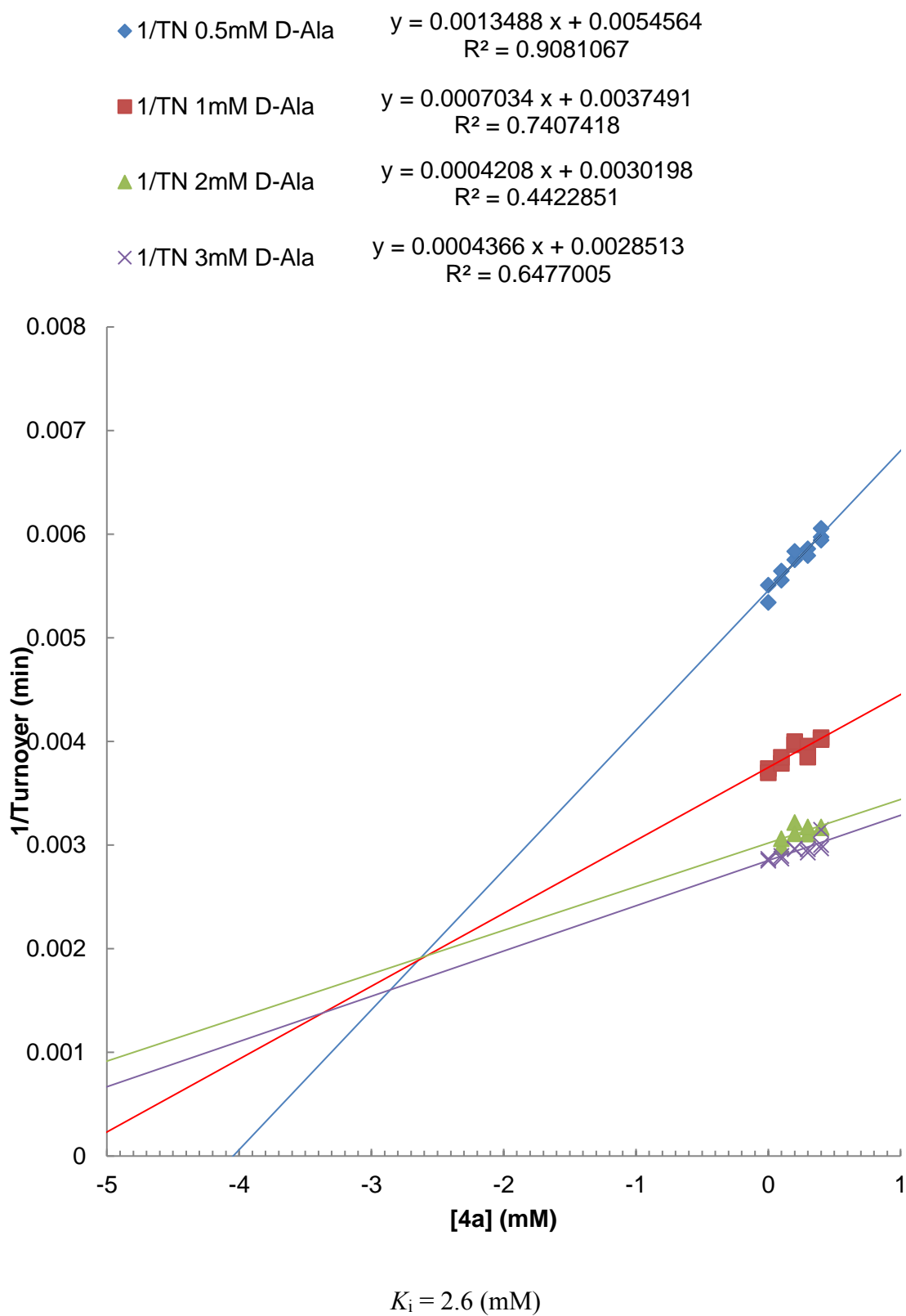


Figure S19. Determination of K_i values for hDAO inhibitor via Dixon plots ([4a]

versus D-Ala.)

Quantitative evaluation of O₂ (**4b**)

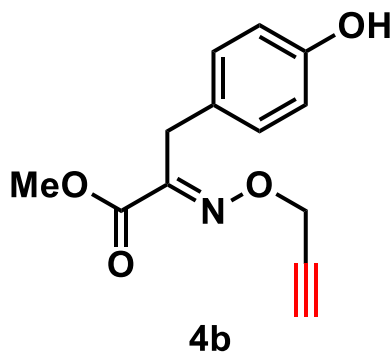
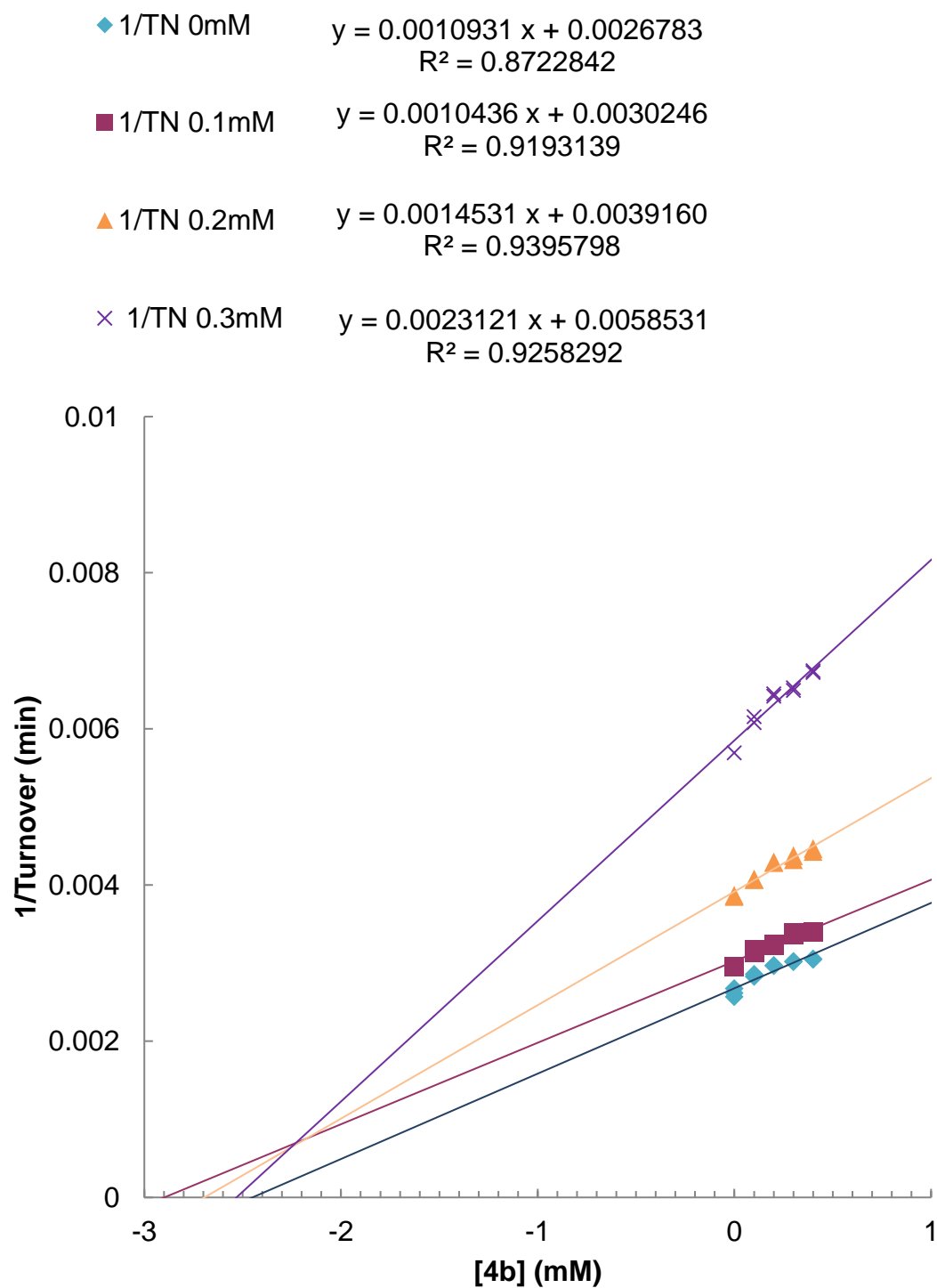


Table S7. Kinetic analysis of **4b**

	[D-Ala] (mM)	Rate (mol/nL/min)	Turnover (min)	1/Turnover (min)	[4b] (mM)
1	3	-77.74	388.70	0.00257	0.3
2	3	-74.69	373.45	0.00268	0.3
3	3	-76.43	382.15	0.00262	0.3
4	2	-67.62	338.10	0.00296	0.5
5	2	-65.74	328.70	0.00304	0.5
6	1	-51.86	259.30	0.00386	1.0
7	1	-51.70	258.50	0.00387	1.0
8	0.5	-35.40	177.00	0.00565	2.0
9	0.5	-35.11	175.55	0.00570	2.0
10	3	-69.98	349.90	0.00286	0.3
11	3	-70.64	353.20	0.00283	0.3
12	2	-63.70	318.50	0.00314	0.5
13	2	-63.08	315.40	0.00317	0.5

14	1	-49.12	245.60	0.00407	1.0
15	1	-49.04	245.20	0.00408	1.0
16	0.5	-32.89	164.45	0.00608	2.0
17	0.5	-32.47	162.35	0.00616	2.0
18	3	-67.33	336.65	0.00297	0.3
19	3	-67.27	336.35	0.00297	0.3
20	2	-61.85	309.25	0.00323	0.5
21	2	-61.70	308.50	0.00324	0.5
22	1	-46.56	232.80	0.00430	1.0
23	1	-46.62	233.10	0.00429	1.0
24	0.5	-31.00	155.00	0.00645	2.0
25	0.5	-31.15	155.75	0.00642	2.0
26	3	-66.17	330.85	0.00302	0.3
27	3	-66.23	331.15	0.00302	0.3
28	2	-58.91	294.55	0.00340	0.5
29	2	-59.27	296.35	0.00337	0.5
30	1	-46.21	231.05	0.00433	1.0
31	1	-45.70	228.50	0.00438	1.0
32	0.5	-30.79	153.95	0.00650	2.0
33	0.5	-30.64	153.20	0.00653	2.0
34	3	-65.58	327.90	0.00305	0.3
35	3	-65.45	327.25	0.00306	0.3
36	2	-58.85	294.25	0.00340	0.5
37	2	-58.86	294.30	0.00340	0.5
38	1	-45.11	225.55	0.00443	1.0
39	1	-44.77	223.85	0.00447	1.0
40	0.5	-29.65	148.25	0.00675	2.0
41	0.5	-29.74	148.70	0.00672	2.0



$$K_i = 2.2 \text{ (mM)}$$

Figure S19. Determination of K_i values for hDAO inhibitor via Dixon plots ([4b] versus D-Ala.)

Quantitative evaluation of O₂ (**8**)

Table S7. Kinetic analysis of **8**

	[D-Pro] (mM)	Rate (mol/nL/min)	Turnover (min)	1/Turnover (min)	[8] (mM)	[Na Benz] (mM)
1	1	-85.18	873.10	0.001145	0	0
2	1	-83.32	854.03	0.001171	0.05	0
3	1	-85.22	873.51	0.001145	0.05	0
4	1	-83.35	854.34	0.001170	0.1	0
5	1	-80.32	823.28	0.001215	0.1	0
6	1	-84.21	863.15	0.001159	0.1	0
7	1	-80.16	821.64	0.001217	0.2	0
8	1	-72.15	739.54	0.001352	0.2	0
9	1	-74.63	764.96	0.001307	0.2	0
10	1	-57.77	592.14	0.001689	0	0.003
11	1	-59.73	612.23	0.001633	0	0.003
12	1	-55.77	571.64	0.001749	0.05	0.003
13	1	-52.13	534.33	0.001871	0.05	0.003
14	1	-49.32	505.53	0.001978	0.1	0.003
15	1	-51.93	532.28	0.001879	0.1	0.003
16	1	-45.56	466.99	0.002141	0.2	0.003
17	1	-47.14	483.19	0.002070	0.2	0.003
18	1	-34.28	351.37	0.002846	0	0.007

19	1	-32.29	330.97	0.003021	0	0.007
20	1	-32.81	336.30	0.002974	0.05	0.007
21	1	-31.71	325.03	0.003077	0.05	0.007
22	1	-32.02	328.21	0.003047	0.1	0.007
23	1	-30.99	317.65	0.003148	0.1	0.007
24	1	-27.30	279.83	0.003574	0.2	0.007
25	1	-28.19	288.95	0.003461	0.2	0.007
26	1	-25.48	261.17	0.003829	0	0.01
27	1	-21.55	220.89	0.004527	0.05	0.01
28	1	-20.79	213.10	0.004693	0.1	0.01
29	1	-20.11	206.13	0.004851	0.2	0.01
30	1	-20.09	205.92	0.004856	0.2	0.01

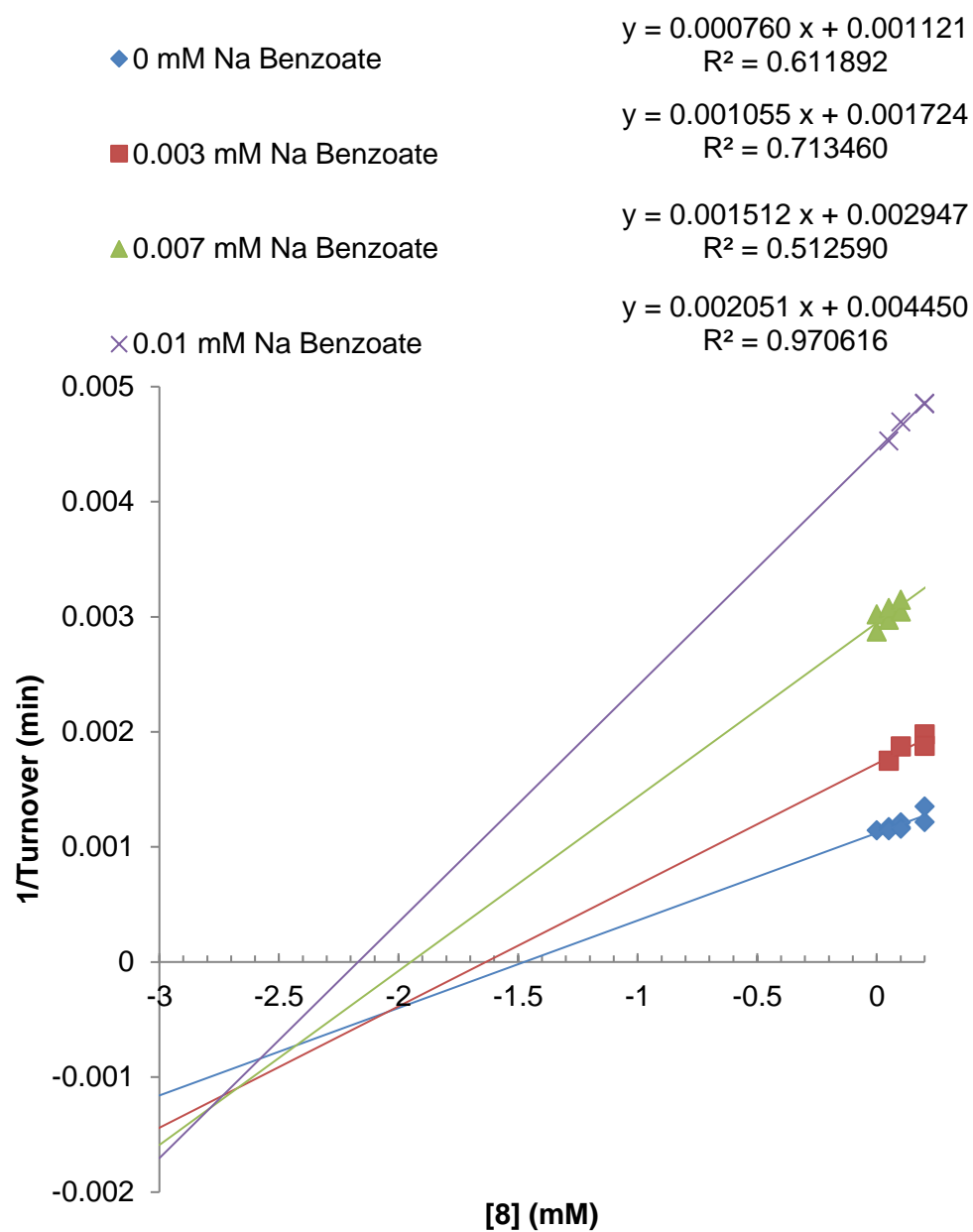
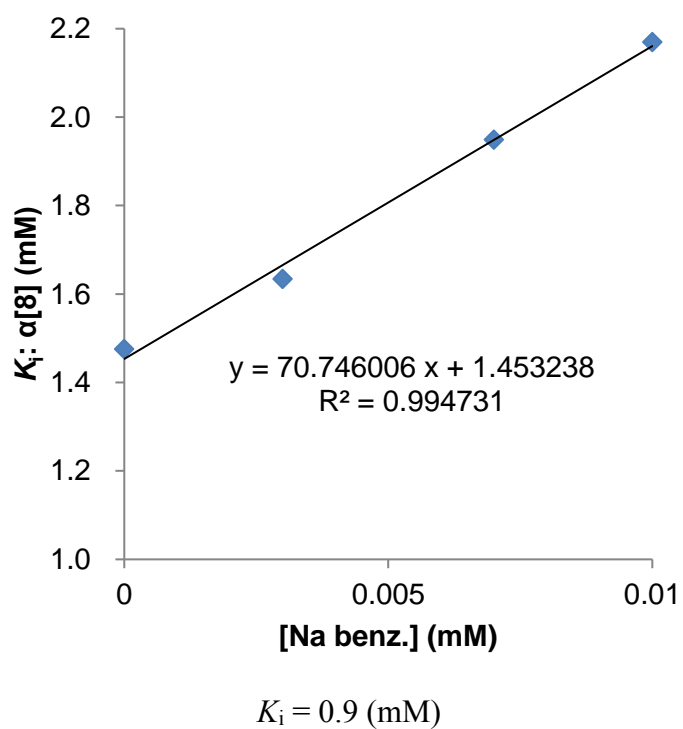


Figure S19. Determination of K_i values for hDAO inhibitor via Dixon plots ($[8]$ versus Na benzoate)

Table S8. Kinetic analysis of the data using secondary plot ([8] versus Na benzoate)

[Na benzoate] (mM)	Slope	Intercept	Intercept/Slope
0	0.000760	0.001121	1.475000
0.003	0.001055	0.001724	1.634123
0.007	0.001512	0.002947	1.949074
0.01	0.002051	0.004450	2.169673

**Figure S20.** Secondary plot ([8] versus Na benzoate)

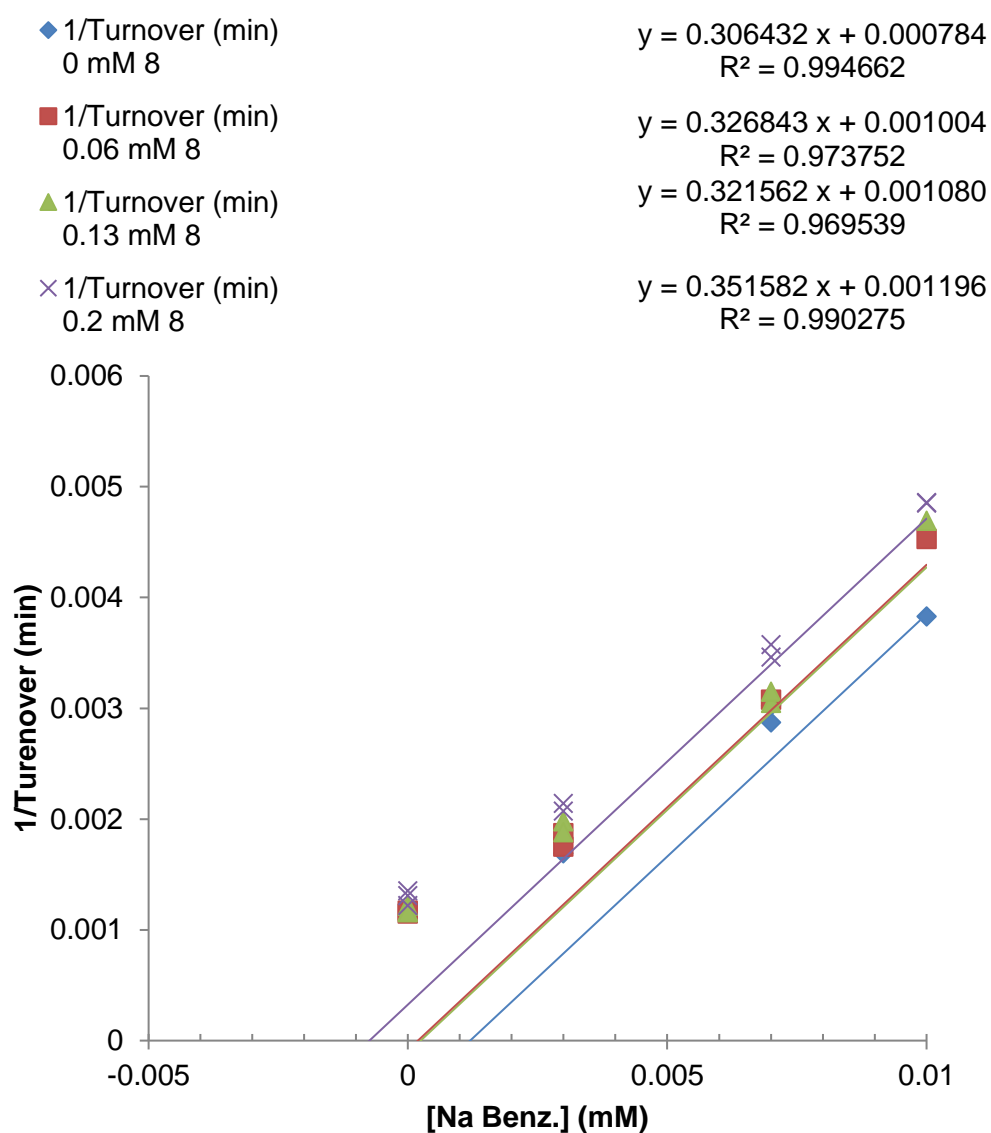
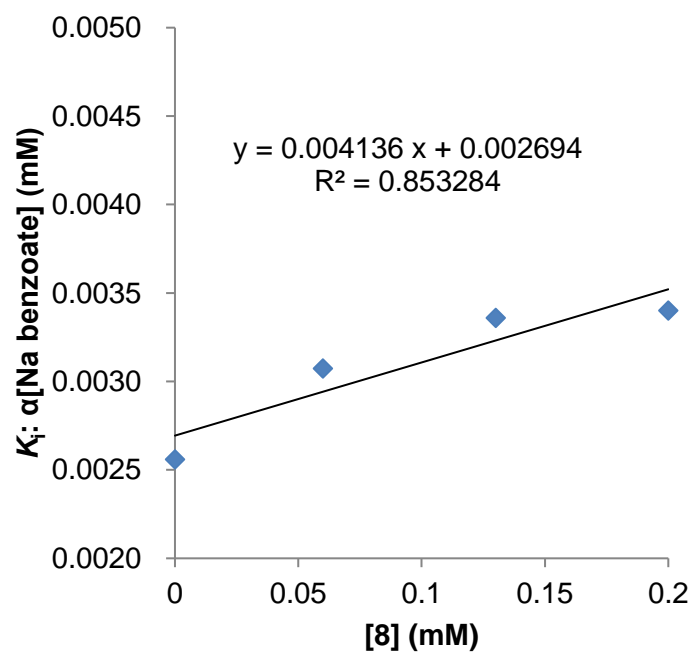


Figure S21. Determination of K_i values for hDAO inhibitor via Dixon plots ([8] versus Na benzoate)

Table S9. c

[8] (mM)	Slope	Intercept	Intercept/Slope
0	0.306432	0.000784	0.002558
0.06	0.326843	0.001004	0.003072
0.13	0.321562	0.001080	0.003359
0.2	0.351820	0.001196	0.003399



$$K_i = 0.002 \text{ (mM)}$$

Figure S22. Secondary plot ([8] versus Na benzoate)

Quantitative evaluation of O₂ (*Syn-9*)

Table S10. Kinetic analysis of *Syn-9*

	[D-Pro.] (mM)	Rate (mol/nL/min)	Turnover (min)	1/Turnover (min)	[<i>Syn-9</i>] (mM)	[Na benz.] (mM)
1	1	-83.58	852.52	0.001173	0	0
2	1	-84.76	864.55	0.001157	0	0
3	1	-78.32	798.86	0.001252	0.05	0
4	1	-74.15	756.33	0.001322	0.1	0
5	1	-72.00	734.40	0.001362	0.1	0
6	1	-64.69	659.84	0.001516	0.2	0
7	1	-33.97	346.49	0.002886	0	0.003
8	1	-32.49	331.40	0.003018	0	0.003
9	1	-32.09	327.32	0.003055	0.05	0.003
10	1	-31.16	317.83	0.003146	0.05	0.003
11	1	-29.61	302.02	0.003311	0.1	0.003
12	1	-28.98	295.60	0.003383	0.1	0.003
13	1	-27.82	283.76	0.003524	0.2	0.003
14	1	-27.34	278.87	0.003586	0.2	0.003
15	1	-23.98	244.60	0.004088	0	0.007
16	1	-23.82	242.96	0.004116	0	0.007
17	1	-22.74	231.95	0.004311	0.05	0.007
18	1	-22.89	233.48	0.004283	0.05	0.007

19	1	-22.01	224.50	0.004454	0.1	0.007
20	1	-21.81	222.46	0.004495	0.1	0.007
21	1	-20.87	212.87	0.004698	0.2	0.007
22	1	-20.93	213.49	0.004684	0.2	0.007
23	1	-17.78	181.36	0.005514	0	0.01
24	1	-17.48	178.30	0.005609	0	0.01
25	1	-17.27	176.15	0.005677	0.05	0.01
26	1	-17.06	174.01	0.005747	0.05	0.01
27	1	-16.97	173.09	0.005777	0.1	0.01
28	1	-16.18	165.04	0.006059	0.2	0.01
29	1	-15.94	162.59	0.006151	0.2	0.01

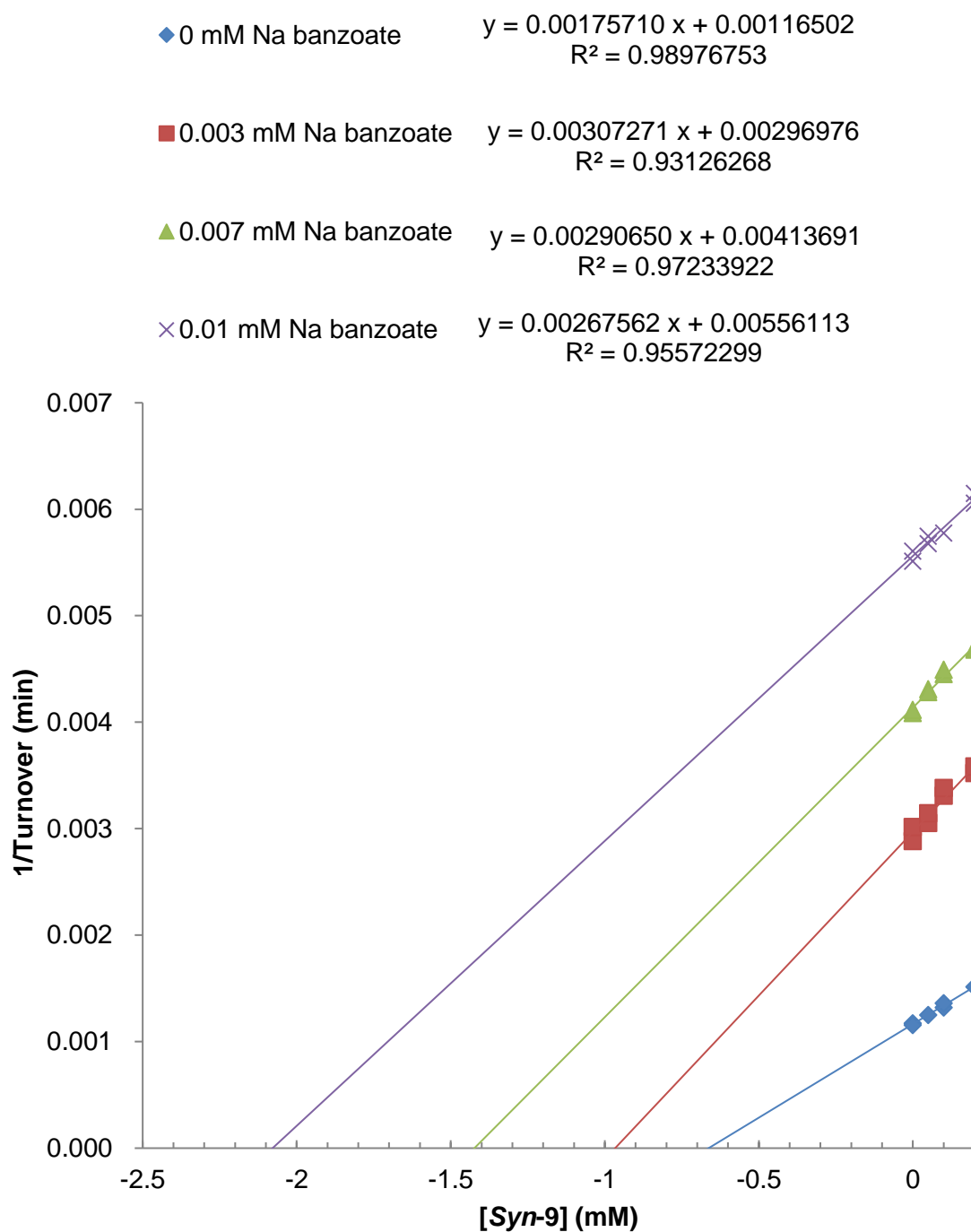
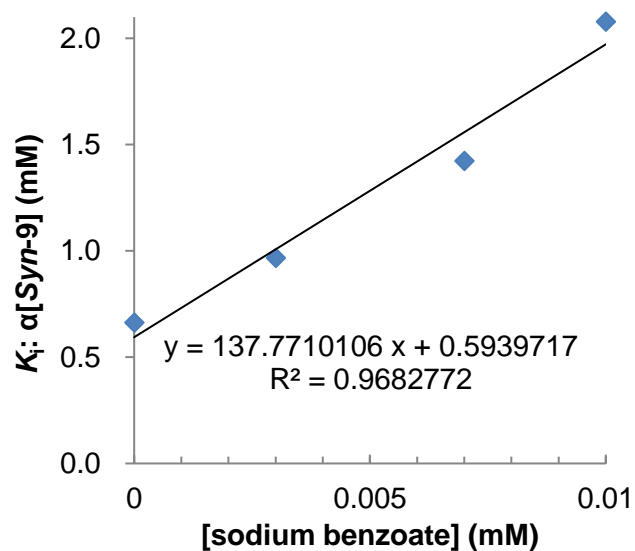


Figure S23. Determination of K_i values for hDAO inhibitor via Dixon plots ([Syn-9] versus Na benzoate)

Table S11. Kinetic analysis of the data using secondary plot (*[Syn-9]* versus Na benzoate)

[sodium benzoate] (mM)	Slope	Intercept	Intercept/Slope
0	0.001757	0.001165	0.663036
0.003	0.003073	0.002970	0.966495
0.007	0.002907	0.004137	1.423330
0.01	0.002676	0.005561	2.078445

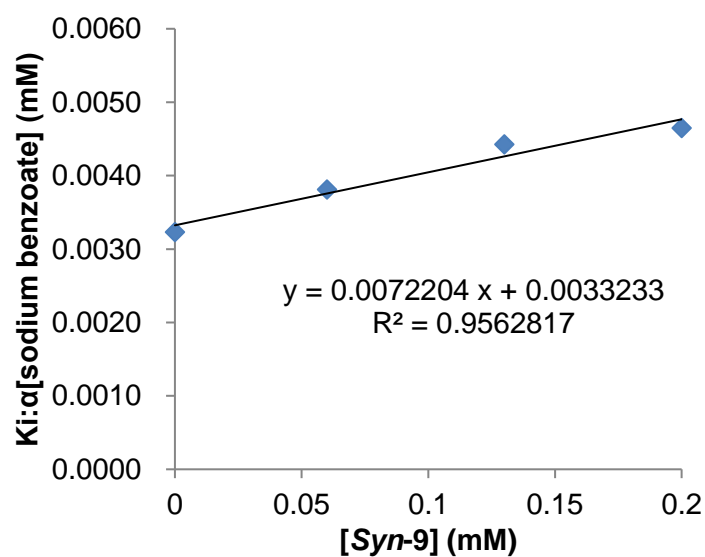


$$K_i = 0.4 \text{ mM}$$

Figure S24. Secondary plot (*[Syn-9]* versus Na benzoate)

Table S12. Kinetic analysis of the data using secondary plot ($[Syn-9]$ versus Na benzoate)

$[Syn-9]$ (mM)	Slope	Intercept	Intercept/Slope
0	0.418675	0.001352	0.003228
0.06	0.412023	0.001570	0.003811
0.13	0.402858	0.001783	0.004425
0.2	0.416698	0.001936	0.004645



$$K_i = 0.002 \text{ (mM)}$$

Figure S26. Secondary plot ($[Syn-9]$ versus Na benzoate)

Quantitative evaluation of O2 (*Anti-9*)

Table S13. Kinetic analysis of Anti-9

	[D-Pro.]	Rate	Turnover	1/Turnover	[<i>Anti-9</i>]	[Na Benz.]
	(mM)	(mol/nL/min)	(1/min)	(min)	(mM)	(mM)
1	1	-63.70	652.93	0.001532	0	0
2	1	-64.42	660.31	0.001514	0	0
3	1	-58.25	597.06	0.001675	0.2	0
4	1	-57.99	594.40	0.001682	0.2	0
5	1	-54.89	562.62	0.001777	0.4	0
6	1	-53.32	546.53	0.001830	0.4	0
7	1	-54.23	555.86	0.001799	0.8	0
8	1	-29.29	300.22	0.003331	0.2	0.003
9	1	-28.46	291.72	0.003428	0.2	0.003
10	1	-26.55	272.14	0.003675	0.4	0.003
11	1	-25.79	264.35	0.003783	0.4	0.003
12	1	-24.80	254.20	0.003934	0.8	0.003
13	1	-23.96	245.59	0.004072	0.8	0.003
14	1	-19.89	203.87	0.004905	0	0.007
15	1	-19.63	201.21	0.004970	0	0.007
16	1	-18.66	191.27	0.005228	0.2	0.007
17	1	-18.12	185.73	0.005384	0.2	0.007
18	1	-17.04	174.66	0.005725	0.4	0.007

19	1	-16.95	173.74	0.005756	0.4	0.007
20	1	-15.50	158.88	0.006294	0.8	0.007
21	1	-15.55	159.39	0.006274	0.8	0.007
22	1	-14.02	143.71	0.006959	0	0.01
23	1	-13.67	140.12	0.007137	0	0.01
24	1	-12.87	131.92	0.007580	0.2	0.01
25	1	-12.47	127.82	0.007824	0.2	0.01
26	1	-11.90	121.98	0.008198	0.4	0.01
27	1	-11.38	116.65	0.008573	0.4	0.01
28	1	-11.06	113.37	0.008821	0.8	0.01
29	1	-10.35	106.09	0.009426	0.8	0.01

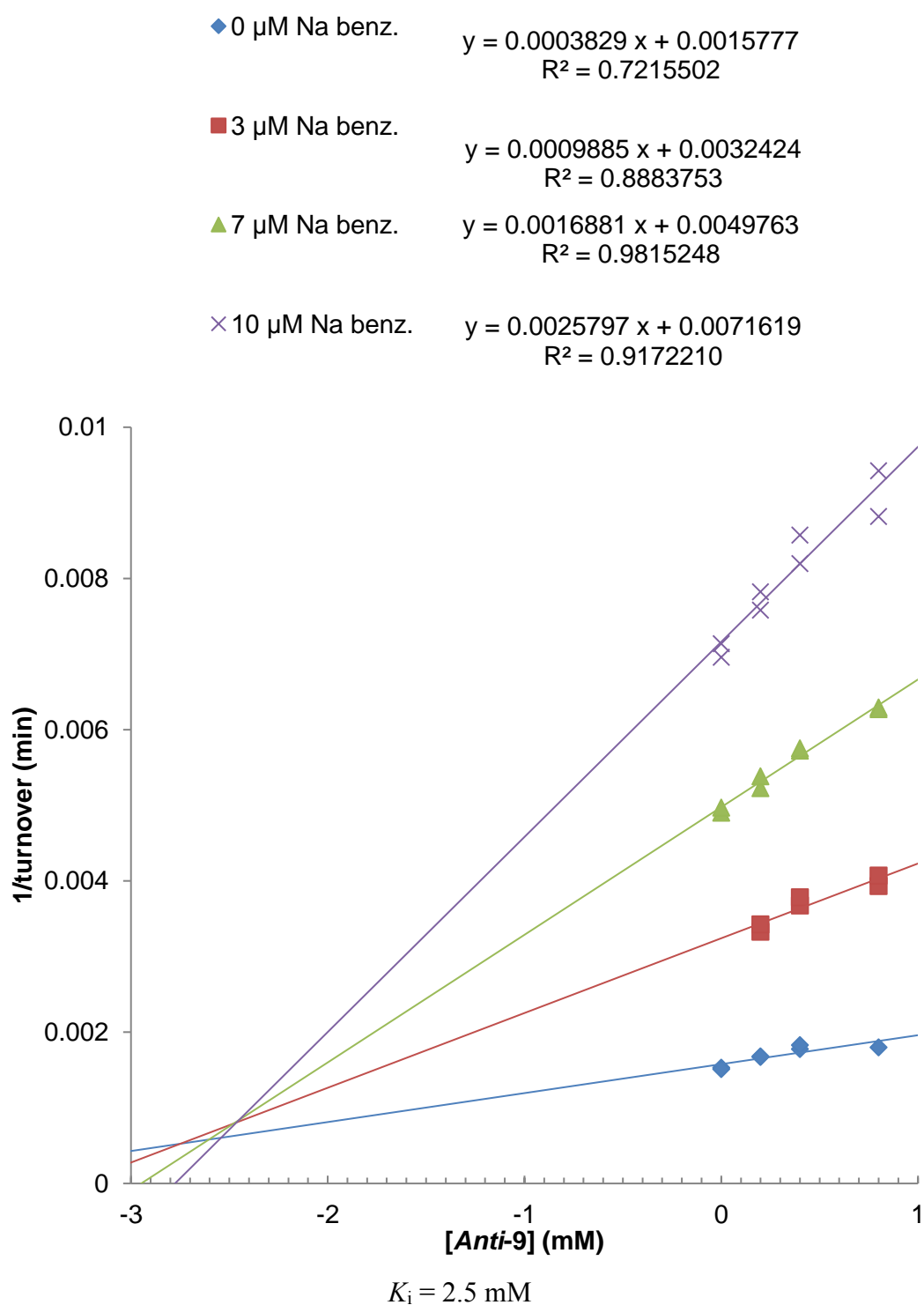


Figure S27. Determination of K_i values for hDAO inhibitor via Dixon plots ([*Anti-9*] versus Na benzoate)

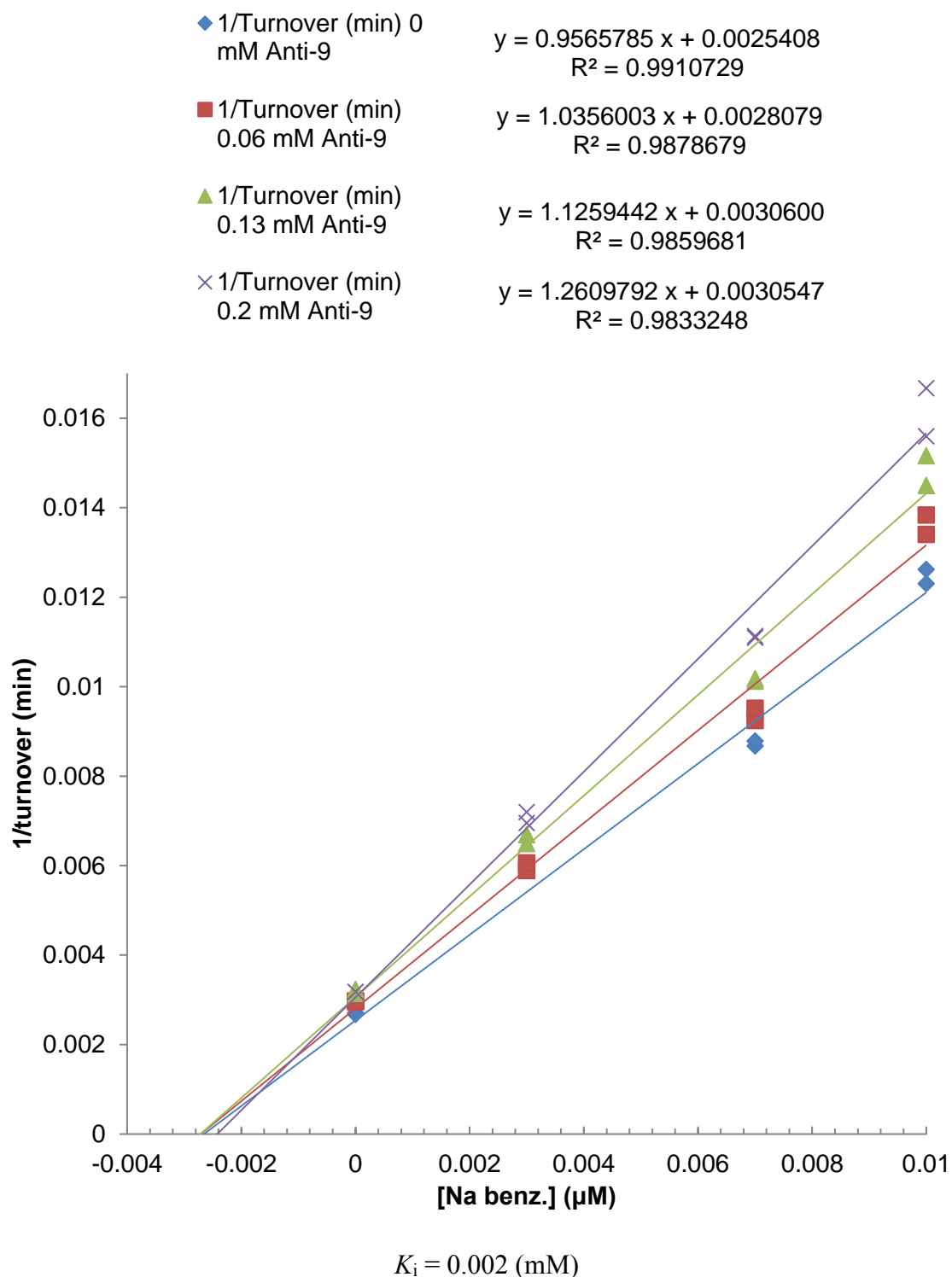
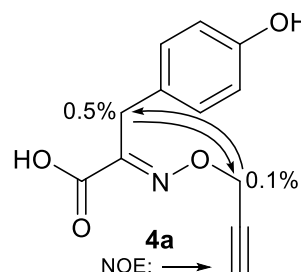


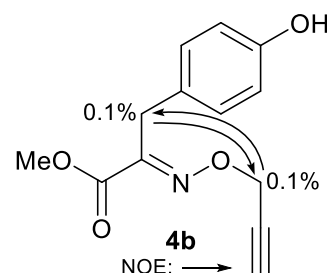
Figure S28. Determination of K_i values for hDAO inhibitor via Dixon plots ([*Anti-9*] versus Na benzoate)

(*E*)-3-(4-Hydroxyphenyl)-2-[(2-propyn-1-yloxy)imino]propanoic acid (4a) and **methyl (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-[(2-propyn-1-yloxy)imino]propanoate (4b)** To a solution of 4-hydroxyphenylpyruvic acid (**1**) (500 mg, 2.8 mmol) in CH₂Cl₂/MeOH (2/1 v/v) (28 mL) was added **3** (602 mg, 5.6 mmol) at room temperature. After stirring for 20 hr, the reaction mixture was concentrated, and the residue was purified by flash column chromatography (CHCl₃/MeOH = 50 / 1 to 10 / 1) to selectively afford (*E*)-oxime⁵¹ (**4a**) (420 mg, 64%) as a colorless powder and (*E*)-oxime-methyl ester (**4b**) (194 mg, 28%) as a colorless powder, respectively.; For **4a**: mp

137-139 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3487, 3255, 2121, 1712, 1604, 1512, 1435, 1357, 1257, 1219, 1126; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.08 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 6.67 (d, 2H, *J*=8.6 Hz), 4.86 (2H, d, *J*=2.3 Hz), 3.80 (2H, s), 2.97 (1H, t, *J*=2.3 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 165.8, 157.2, 153.9, 131.1 (2C), 127.7, 116.2 (2C), 79.7, 76.9, 63.7, 31.0; HRMS (ESI) *m/z*: 256.0575 [M + Na]⁺; calcd for C₁₂H₁₁NO₄Na, 256.0580.;

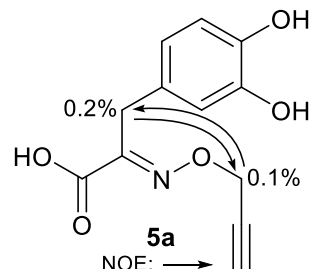


For **4b**: mp 79-82 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3433, 3278, 2121, 1728, 1604, 1512, 1442, 1365, 1326, 1227, 1134; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.06 (d, 2H, *J*=8.4 Hz), 6.67 (d, 2H, *J*=8.4 Hz), 4.85 (2H, d, *J*=2.3 Hz), 3.82 (2H, s), 3.78 (3H, s), 2.97 (1H, t, *J*=2.3 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 165.0, 157.2, 153.4, 131.1 (2C), 127.5, 116.2 (2C), 79.7, 76.9, 63.8, 53.0, 31.2; HRMS (ESI) *m/z*: 270.0732 [M+Na]⁺; calcd for C₁₃H₁₃NO₄Na, 270.0737.

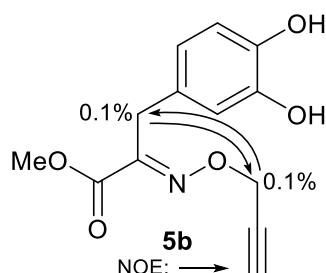


(*E*)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-[(2-propyn-1-yloxy)imino]propanoic acid (5a) and **methyl (*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(2-propyn-1-yloxy)imino]propanoate (5b)** According to the synthesis of **4a** and **4b**, **2** (100 mg, 0.51 mmol) was selectively

converted to (*E*)-oxime⁵¹ **5a** (63.5 mg, 50%) as a colorless powder and (*E*)-oxime-methyl ester **5b** (31.6 mg, 24%) as a colorless powder, respectively.; For **5a**: mp 140-143 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3394, 3278, 2121, 1728, 1612, 1520, 1442, 1357, 1203, 1119; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 6.73 (1H, bs), 6.73 (d, 1H, *J*=8.1 Hz), 6.59 (bd, 1H, *J*=8.1Hz), 4.80 (2H, bs), 3.80 (2H, s), 2.92 (1H, t, *J*=2.3 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 170.2, 158.4, 146.1, 144.8, 129.0, 121.6, 117.4, 116.1, 80.2, 76.5, 63.0, 31.7; HRMS (ESI) *m/z*: 272.0522 [M+Na]⁺; calcd for C₁₂H₁₁NO₅Na, 272.0529.;



For **5b**: mp 82-85 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3494, 3278, 2121, 1728, 1612, 1520, 1442, 1357, 1203, 1119; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 6.68 (1H, d, *J*=2.3 Hz), 6.64 (1H, d, *J*=8.0 Hz), 6.56 (1H, dd, *J*=8.0, 2.3 Hz), 4.85 (2H, d, *J*=2.3 Hz), 3.78 (3H, s), 3.77 (2H, s), 2.96 (1H, t, *J*=2.3 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 165.1, 153.5, 146.3, 145.1, 128.1, 121.4, 117.2, 116.3, 79.7, 76.9, 63.8, 53.0, 31.3; HRMS (ESI) *m/z*: 286.0689 [M+Na]⁺; calcd for C₁₃H₁₃NO₅Na, 286.0686.



Methyl (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-2-[(2-propyn-1-yloxy)imino]propanoate (6)

To a solution of **4b** (30 mg, 0.12 mmol) in acetone (1 mL) were added dimethyl sulfate (19.0 μ L, 0.2 mmol) and potassium carbonate (69.1 mg, 0.5 mmol) at room temperature. After stirring for 5 h, the reaction was quenched by the addition of sat. aq. NH₄Cl (2 mL), and the resulting mixture was extracted with EtOAc (5 mL \times 3). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by flash column chromatography (CHCl₃/MeOH = 50/1) to

afford methyl ether (**6**) (25.6 mg, 81%) as a colorless oil.; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3286, 2126, 1728, 1612, 1511, 1442, 1350, 1249, 1211, 1126; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.16 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 6.81 (2H, d, $J=8.8$ Hz), 4.86 (2H, d, $J=2.4$ Hz), 3.85 (2H, s), 3.78 (3H, s), 3.75 (3H, s), 2.97 (1H, t, $J=2.3$ Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 165.0, 160.0, 153.3, 131.1 (2C), 128.8, 114.9 (2C), 79.7, 77.0, 63.9, 55.6, 53.0, 31.2. HRMS (FAB, NBA) m/z : 284.0898 [M+Na]⁺; calcd for C₁₄H₁₅NO₄Na, 284.0893.

Methyl (*E*)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[(2-propyn-1-yloxy)imino]propanoate (7**)**

According to the preparation of **6**, **5b** (30 mg, 0.11 mmol) was converted to **7** (25.6 mg, 77%) as a colorless oil.; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3232, 2114, 1720, 1596, 1512, 1450, 1334, 1241, 1211, 1142; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 6.88 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.83 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 6.79 (1H, dd, $J=8.1, 2.0$ Hz), 4.88 (2H, d, $J=2.3$ Hz), 4.86 (3H, s), 3.86 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.00 (1H, t, $J=2.3$ Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 165.0, 153.1, 150.4, 149.4, 129.6, 122.5, 114.0, 113.1, 79.7, 77.0, 63.9, 56.5, 56.4, 53.1, 31.6; HRMS (FAB, NBA) m/z : 314.0994 [M+Na]⁺; calcd for C₁₅H₁₇NO₅Na, 314.0999.

(*E*)-4-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-methoxycarbonylethan-1-ylideneaminooxymethyl]-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acetyl)-L-phenylalanine (*anti*-10**)** To a solution of alkyne **4b** (100.0 mg, 0.40 mmol) in MeOH (4 mL) were added Cu(MeCN)₄PF₆ (15.0 mg, 0.04 mmol), tris-(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA) (21.2 mg, 0.04 mmol) and azide **8** (89.4 mg, 0.36 mmol) at room temperature. After stirring for 2 hr, the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (CHCl₃/MeOH = 10/1) to afford *anti*-**10** (128.8 mg, 72%) as a colorless powder.; $[\alpha]_D^{24} +41.91$ (c 1.00, MeOH); mp 170–173 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3293, 2954, 2337, 1728, 1674, 1612, 1512, 1442, 1335, 1219, 1126; ¹H NMR (500

MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.80 (1H, s), 7.26-7.14 (5H, m), 6.99 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 6.44 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 5.35 (2H, s), 5.12 (1H, d, $J=16.0$ Hz), 5.09 (1H, d, $J=16.0$ Hz), 4.63 (1H, dd, $J=8.6, 4.6$ Hz), 3.78 (2H, s), 3.76 (3H, s), 3.24 (1H, dd, $J=13.9, 4.6$ Hz), 2.98 (1H, dd, $J=13.9, 8.6$ Hz); ¹³C NMR (125 Hz, CD₃OD) δ (ppm): 175.8, 167.1, 165.2, 157.2, 153.3, 144.6, 138.7, 131.1 (2C), 130.4 (2C), 129.4 (2C), 127.6, 127.1, 116.3 (2C), 69.2, 56.4, 53.1, 53.04, 53.00, 38.8, 31.2; HRMS (ESI) m/z : 518.1646 [M+Na]⁺; calcd for C₂₄H₂₅N₅O₇Na, 518.1646.

(*E*)-4-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-carboxylethan-1-ylideneaminooxymethyl]-

(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acetyl)-L-phenylalanine (*anti*-9) *Anti*-10 (50.0 mg, 0.10 mmol) was dissolved into in the solution of K₂CO₃ (13.8 mg, 0.10 mmol) in MeOH/H₂O (2/1 v/v) (2 mL). The resulting mixture was stirred for 1 hr at room temperature and then acidified by the addition of 1M HCl aqueous solution (2 mL). The acidic solution was extracted with AcOEt (10 mL \times 3), and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to give pure product *anti*-9 (45.3 mg, 94%) as a colorless powder.; $[\alpha]_D^{24} +38.16$ (c 0.12, MeOH); mp 180–182 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3317, 3024, 2360, 1720, 1658, 1550, 1512, 1466, 1373, 1234, 1149; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.87 (1H, s), 7.27-7.16 (5H, m), 7.00 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 6.64 (2H, d, $J=8.6$ Hz), 5.35 (2H, s), 5.16 (1H, d, $J=16.0$ Hz), 5.11 (1H, d, $J=16.0$ Hz), 4.71 (1H, dd, $J=8.6, 4.6$ Hz), 3.77 (2H, s), 3.24 (1H, dd, $J=14.0, 4.6$ Hz), 3.00 (1H, dd, $J=14.0, 8.6$ Hz); ¹³C NMR (125 Hz, CD₃OD) δ (ppm): 174.1, 167.4, 166.0, 157.1, 153.7, 144.7, 138.1, 131.1 (2C), 130.3 (2C), 129.6 (2C), 127.9, 127.8, 127.3, 116.2 (2C), 69.0, 55.2, 53.0, 38.3, 31.0; HRMS (ESI) m/z : 504.1483 [M+Na]⁺; calcd for C₂₃H₂₃N₅O₇Na, 504.1490.

(*E*)-5-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-methoxycarbonylethan-1-ylideneaminooxymethyl]-

(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acetyl)-L-phenylalanine (*syn*-10) To a solution of alkyne **4b** (100.0 mg, 0.4 mmol) in THF (4 mL) were added Cp*RuCl(PPh₃)₂ (37.4 mg, 0.04 mmol) and azide **8** (89.5 mg, 0.36 mmol). The reaction mixture was heated to 45 °C by the irradiation of microwave with string. After 6 hr, the reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (CHCl₃/MeOH = 10/1) to afford *syn*-**10** (111.0 mg, 62%) as a colorless powder.; [α]_D²⁴ +16.44 (*c* 0.50, MeOH); mp 80-83 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3302, 2954, 2337, 1728, 1674, 1612, 1511, 1442, 1365, 1211, 1119; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.69 (1H, s), 7.23-7.12 (5H, m), 6.96 (2H, d, *J*=8.6 Hz), 6.66 (2H, d, *J*=8.6 Hz), 5.25-5.22 (2H, complex m; due to rotational isomers), 5.14-5.05 (2H, complex m; due to rotational isomers), 4.62 (1H, dd, *J*=8.0, 4.6 Hz), 3.78 (3H, s), 3.76 (2H, s), 3.26 (1H, dd, *J*=13.8, 4.6 Hz), 2.95 (1H, dd, 13.8, 8.0 Hz); ¹³C NMR (125 Hz, CD₃OD) δ (ppm): 176.1, 167.0, 164.9, 157.3, 153.8, 138.9, 136.2, 135.4, 131.0 (2C), 130.4 (2C), 129.4 (2C), 127.6, 127.5, 116.4 (2C), 65.4, 56.5, 53.2, 51.7, 39.0, 31.2; HRMS (ESI) *m/z*: 518.1649 [M+Na]⁺; calcd for C₂₄H₂₅N₅O₇Na, 518.1652.

(*E*)-5-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-carboxylethan-1-ylideneaminooxymethyl]-

(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acetyl)-L-phenylalanine (*syn*-9) According to the synthesis of *anti*-**9**, *syn*-**10** (50.0 mg, 0.10 mmol) was converted to *syn*-**9** (40.0 mg, 83%) as a colorless powder.; [α]_D²⁴ +6.27 (*c* 1.00, MeOH); mp 86–87 °C; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3325, 2962, 2330, 1728, 1682, 1543, 1512, 1450, 1365, 1227, 1111; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.70 (1H, s), 7.27-7.16 (5H, m), 6.98 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 6.66 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 5.26-5.22 (2H, complex m; due to rotational isomers), 5.17-5.08 (2H, complex m; due to rotational isomers), 4.72 (1H, dd, *J*=9.2, 5.2 Hz), 3.75 (2H, s), 3.24

(1H, dd, $J=13.8, 5.2$ Hz), 2.96 (1H, dd, $J=13.8, 9.2$ Hz); ^{13}C NMR (125 Hz, CD_3OD) δ (ppm): 174.1, 167.4, 165.9, 157.2, 154.6, 138.1, 136.2, 135.4, 131.0 (2C), 130.3 (2C), 129.6 (2C), 127.9, 127.7, 116.3 (2C), 65.3, 55.2, 51.6, 38.5, 31.1; HRMS (ESI) m/z : 504.1484 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_7\text{Na}$, 504.1490.

hDAO activity measurements

Protocol of H_2O_2 /ABTS/HRP assay

To measure H_2O_2 concentration, FAD (100 μM), compounds (1-300 μM , 10% MeOH), 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) (1 mM), hDAO (0.2 μM) and horseradish peroxidase (1 unit/mL) were added to 96 well micro plate. The increase in absorbance at 420 nm (Corona Electric, SH-9000 Lab) was monitored for 10 min after the addition of D-Proline (1 mM) at 25 $^\circ\text{C}$ and compared with a calibration curve obtained with the known amounts of sodium benzoate.

Protocol of oxygraphic assay

hDAO activity was measured in oxygraphic assays (Oxygraph Plus, Hansatech, UK)^{37,41}. The standard reaction mixture contained D-Proline, hDAO and 20 μM FAD, and hDAO inhibitor in a total volume of 2.0 mL. The reactions were initiated by the addition of hDAO and carried out in 0.1 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) at 25 $^\circ\text{C}$. The Michaelis constant (K_m) and turnover number (K_{cat}) were estimated from double reciprocal plots of the initial velocity versus the substrate concentration. The inhibition constant (K_i) for compound was estimated from Dixon plots⁴⁴⁻⁴⁵ of the initial velocity versus the D-Proline concentration in the presence of benzoate (0–10 μM).

Experiment for the broad screening *in situ* click chemistry with hDAO

Alkyne **4a** (5 μL ; 10.0 mM in MeOH) was diluted in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) (70 μL). Subsequently, the required FAD (10 μL ; 100 mM in 0.1 M sodium

phosphate buffer (pH8.0)) and azide compound (5 μ L; 10.0 mM in MeOH) were added to the alkyne solution, in 0.1 M sodium phosphate buffer to give final concentrations of 2.0 μ M hDAO, 500 μ M alkyne **4a** and 500 μ M of each azide in 10% MeOH/phosphate buffer (100 μ L). After mixing thoroughly, the reaction mixtures were incubated at 25 $^{\circ}$ C for 24 h, then diluted with 100 μ L MeOH to restrain the hDAO activity and injected directly into the LC/UV-MS instrument to perform LC/MS-SIR analysis: Conditions for HPLC; column, Senshu Pak Pegasil ODS SP100 (Senshu Scientific Co., Tokyo, Japan) 2 ϕ \times 50 mm, gradient 10% MeCN (0.05% TFA) in H₂O (0.1% TFA) to 100% MeCN (0.05% TFA) over 8 min, flow 0.3 ml min⁻¹, detect 200–400 nm, temp 20 $^{\circ}$ C; MS-SIR: cone voltage 40 V, source temp 110 $^{\circ}$ C, desolvation temp 350 $^{\circ}$ C, selected mass 482.2 [M+Na]⁺. The triazole products were identified by their retention times and molecular weights. Control experiments without hDAO, FAD (10 μ L; 100 mM in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH8.0)) and alkyne **2** (5 μ L; 10.0 mM in MeOH) and azides (5 μ L; 10.0 mM in MeOH) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) (80 μ L) at 25 $^{\circ}$ C for 24 h) were run consecutively.

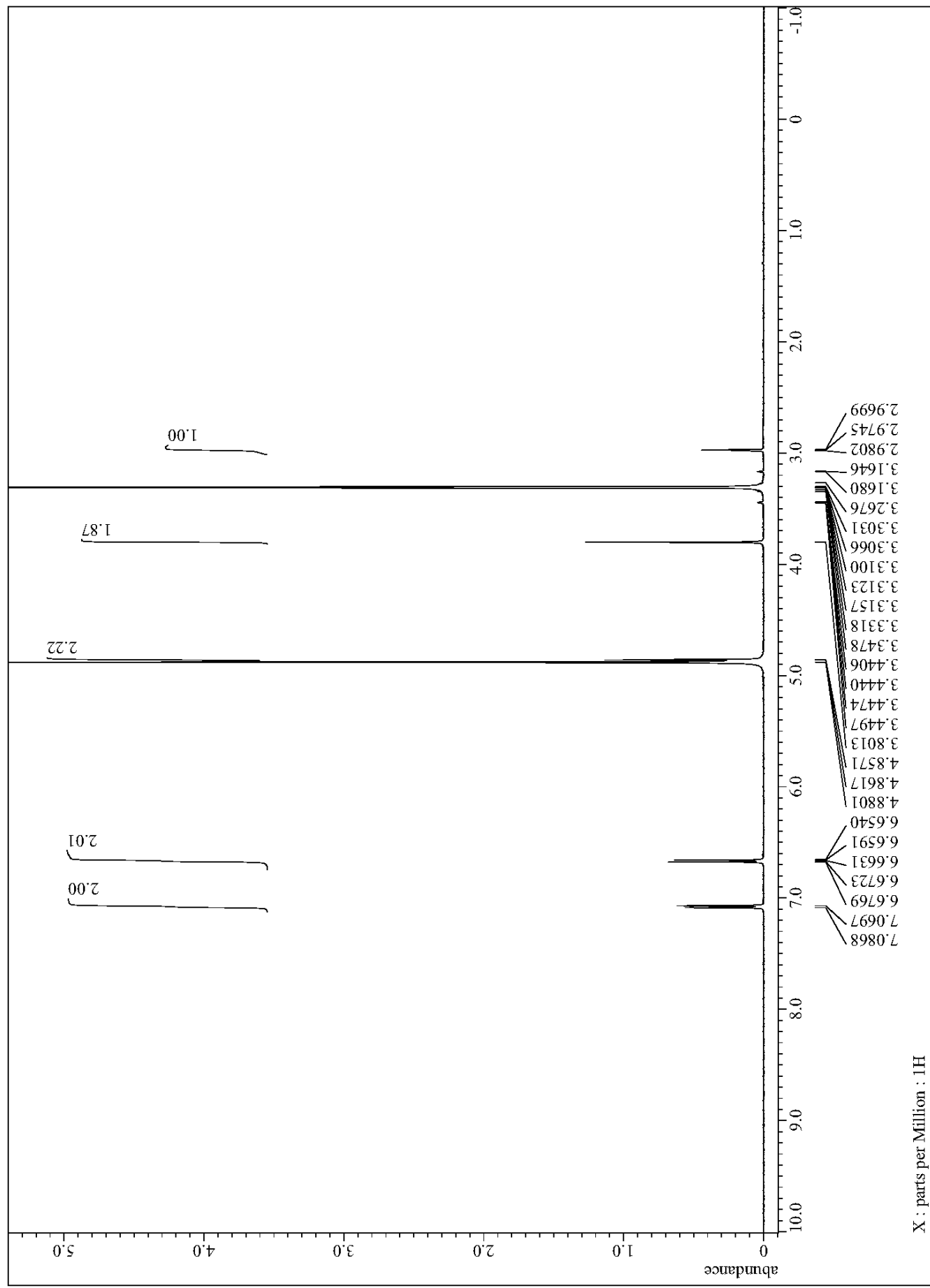
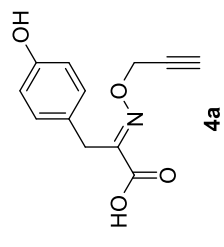
The condition of LC/MS-SIR for identification of the hit triazole isomer

Column, DOCOSIL C22 (Senshu Scientific Co., Tokyo, Japan) 2 ϕ \times 50 mm, isocratic 20% MeCN in H₂O (0.08% HCOOH), flow 0.2 ml min⁻¹, detect 210–400 nm, temp 20 $^{\circ}$ C; MS-SIR: cone voltage 38 V, source temp 110 $^{\circ}$ C, desolvation temp 350 $^{\circ}$ C, selected mass 482.2 [M+Na]⁺.

Experiment of *in situ* click chemistry of alkyne **4a and azide **8** with hDAO**

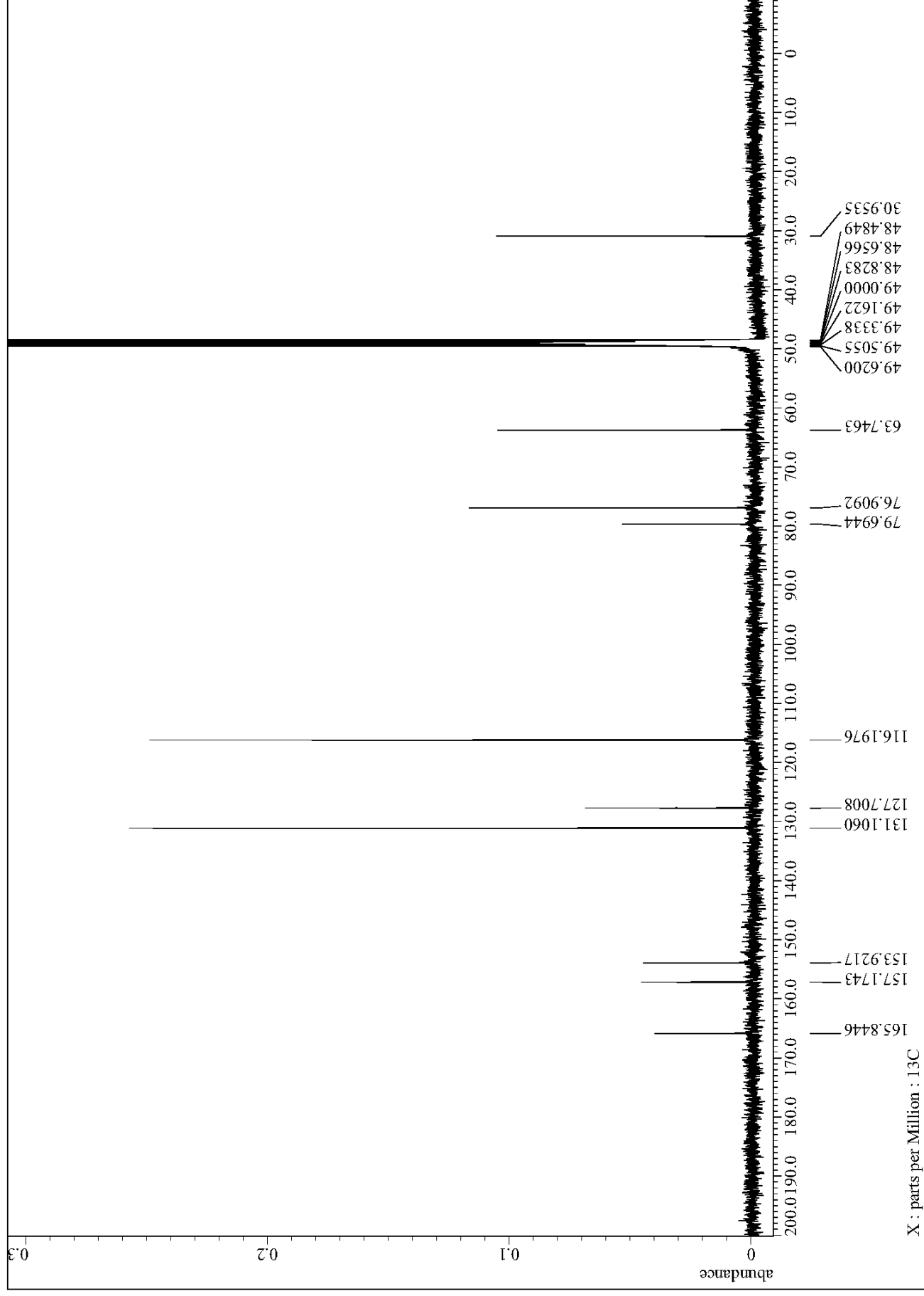
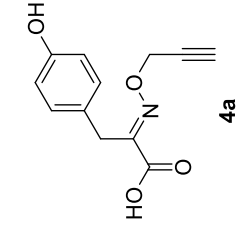
The condition of hDAO template triazole formation was followed to the procedure of broad screening method of *in situ* click chemistry. The detection condition of triazole compound by MS-SIR was only optimized to increase its sensitivity as follows; cone

voltage 38 V, source temp 110 °C, desolvation temp 350 °C, selected mass 482.2
[M+Na]⁺).

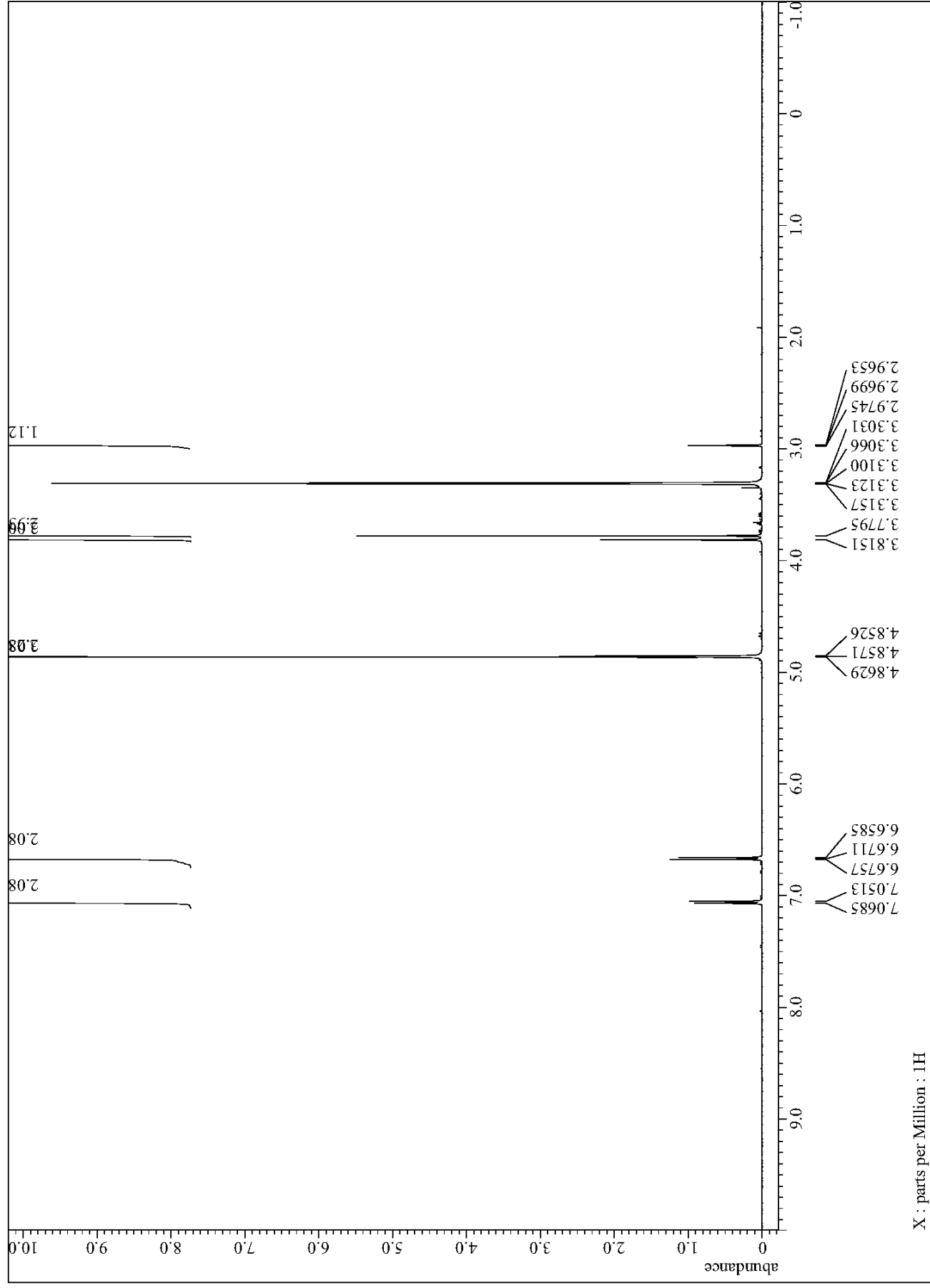
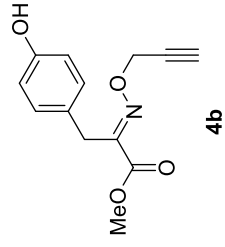


X : parts per Million : 1H

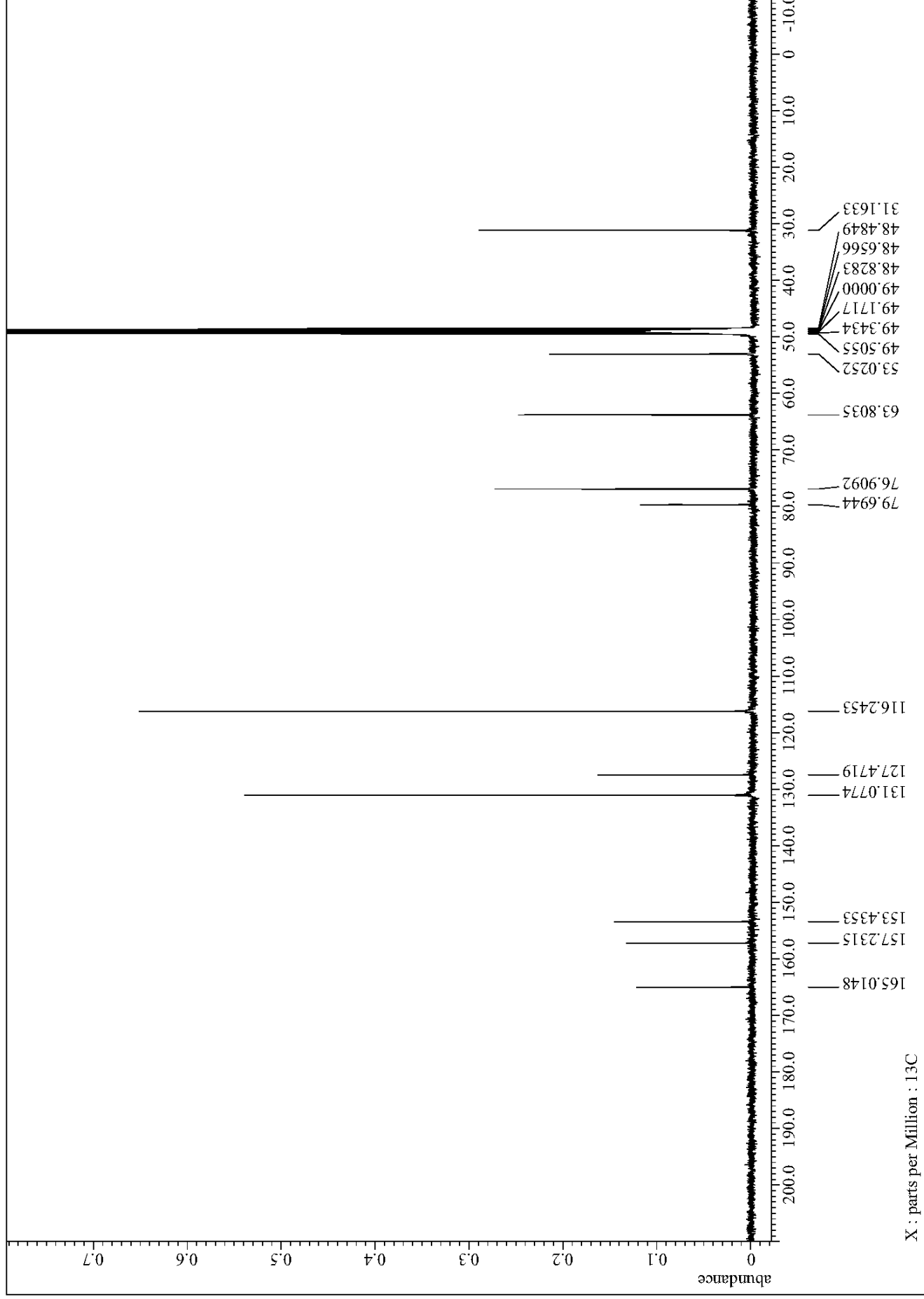
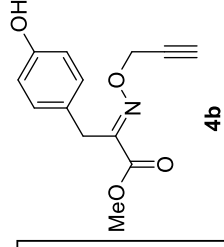
The 500 MHz ¹H NMR spectrum of **4a**



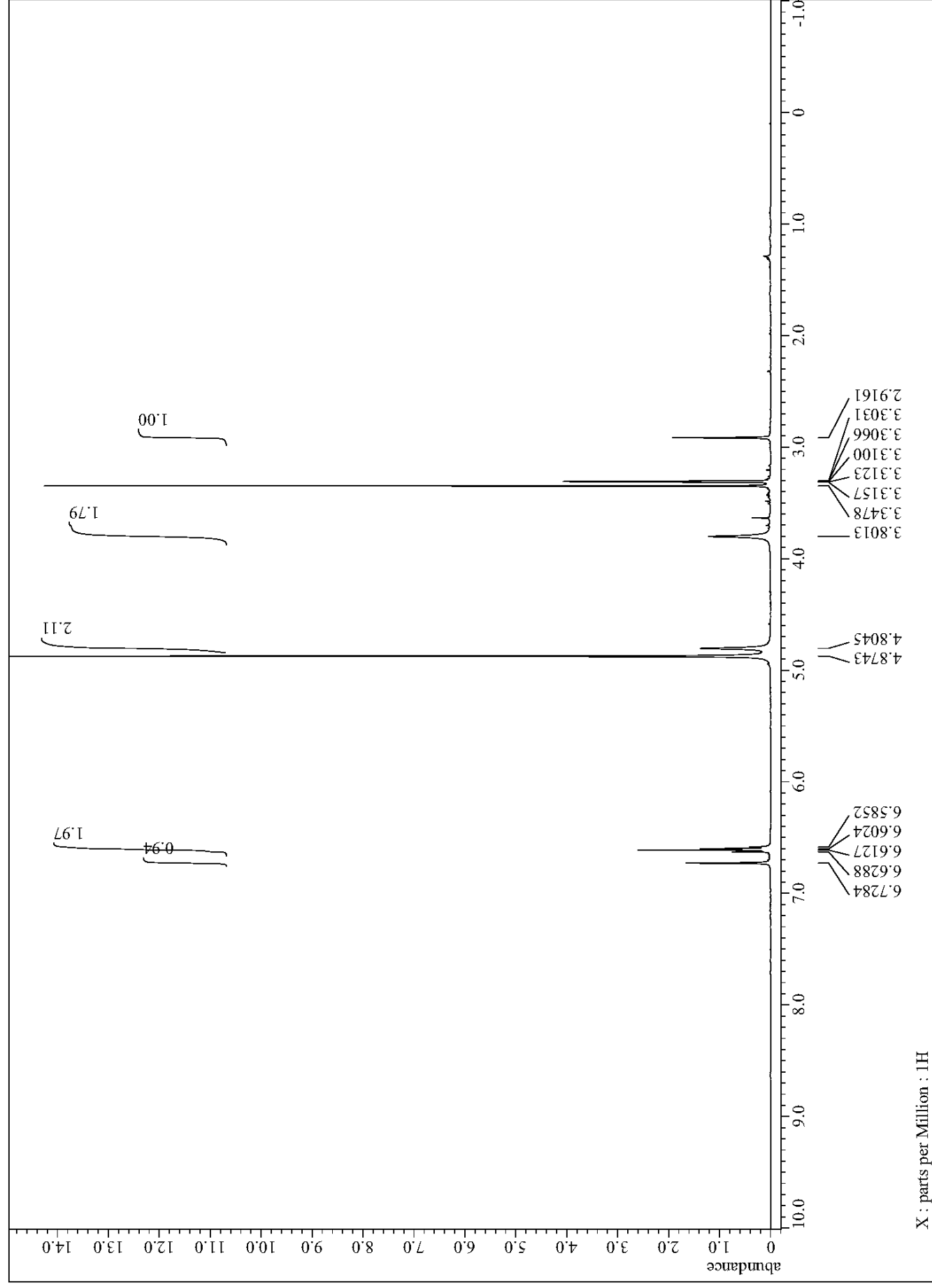
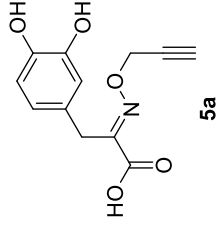
The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of **4a**



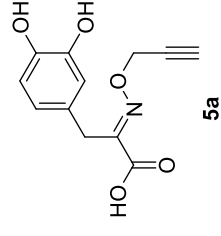
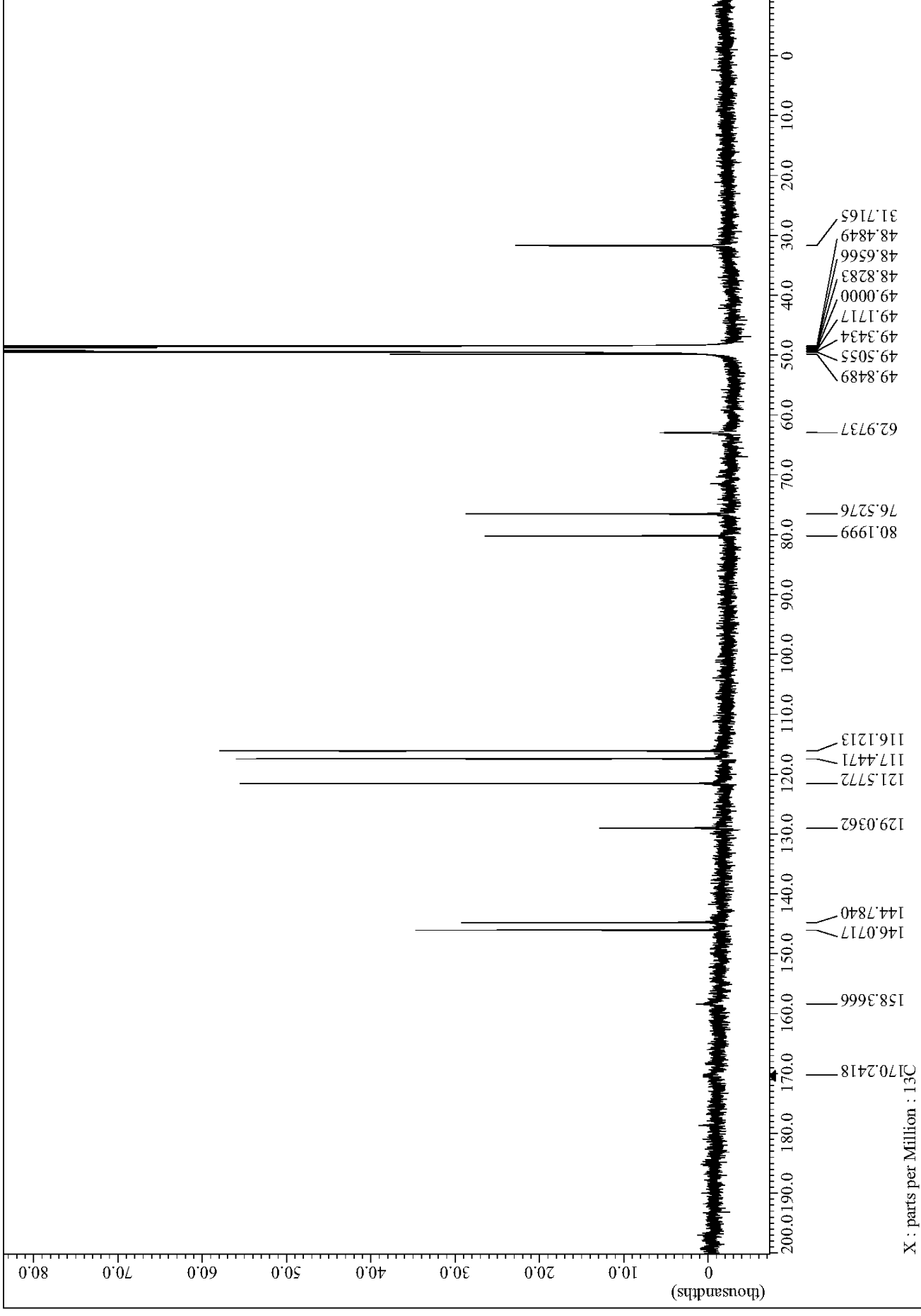
The 500 MHz ^1H NMR spectrum of **4b**



The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of **4b**

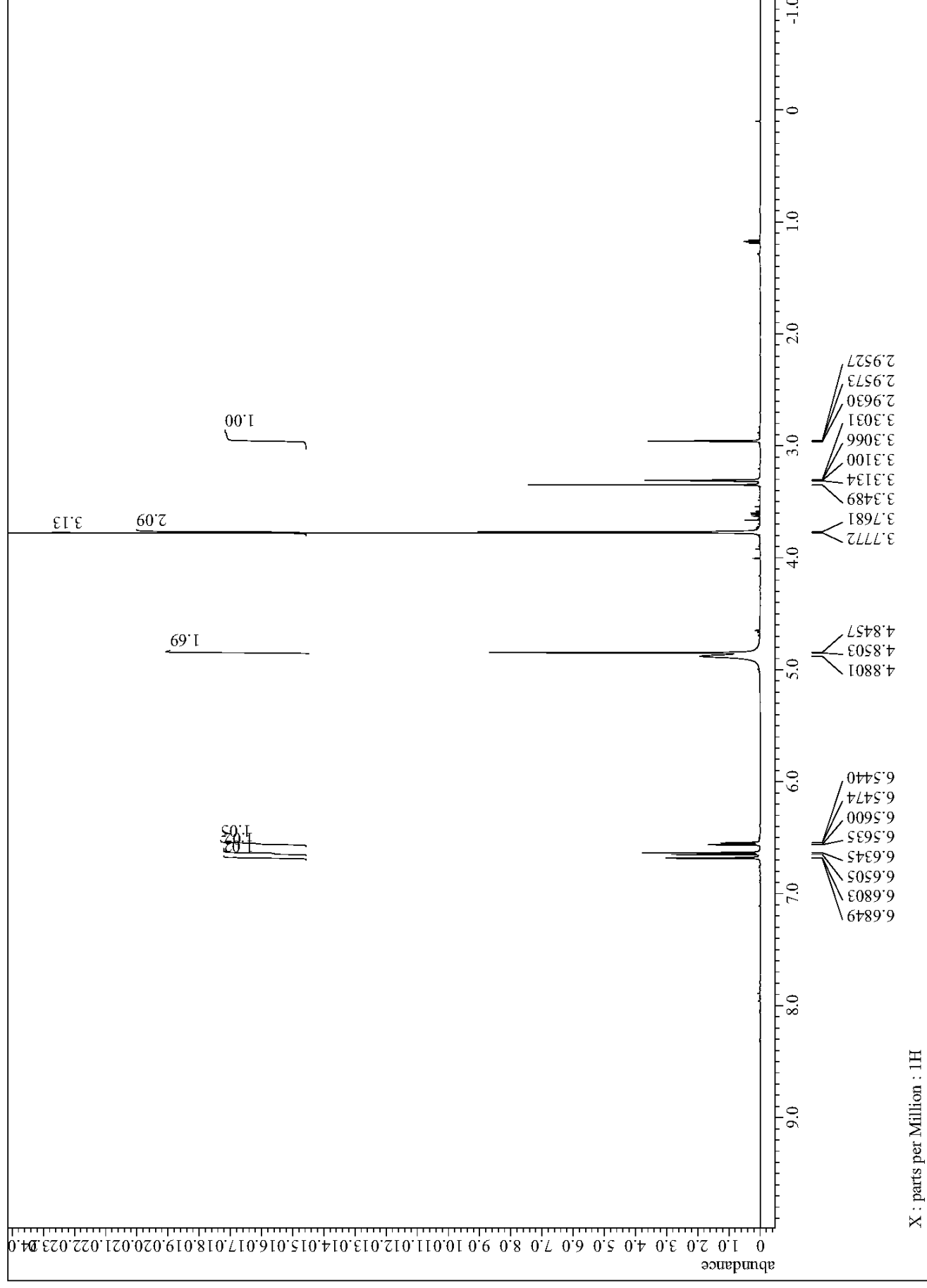


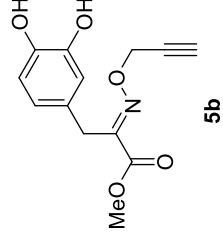
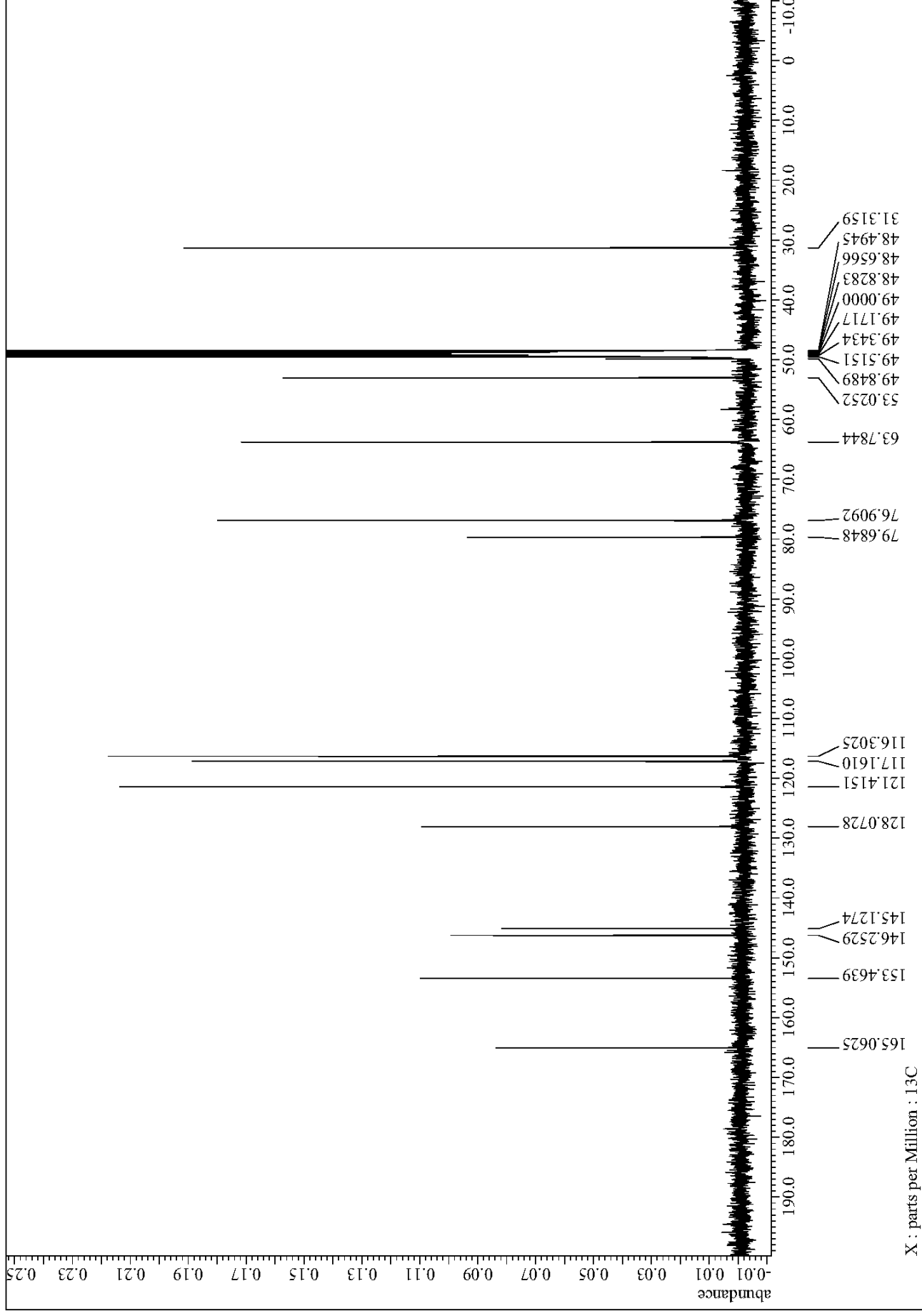
The 500 MHz ^1H NMR spectrum of **5a**



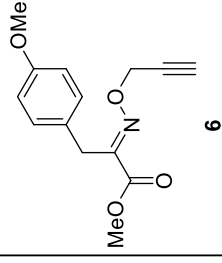
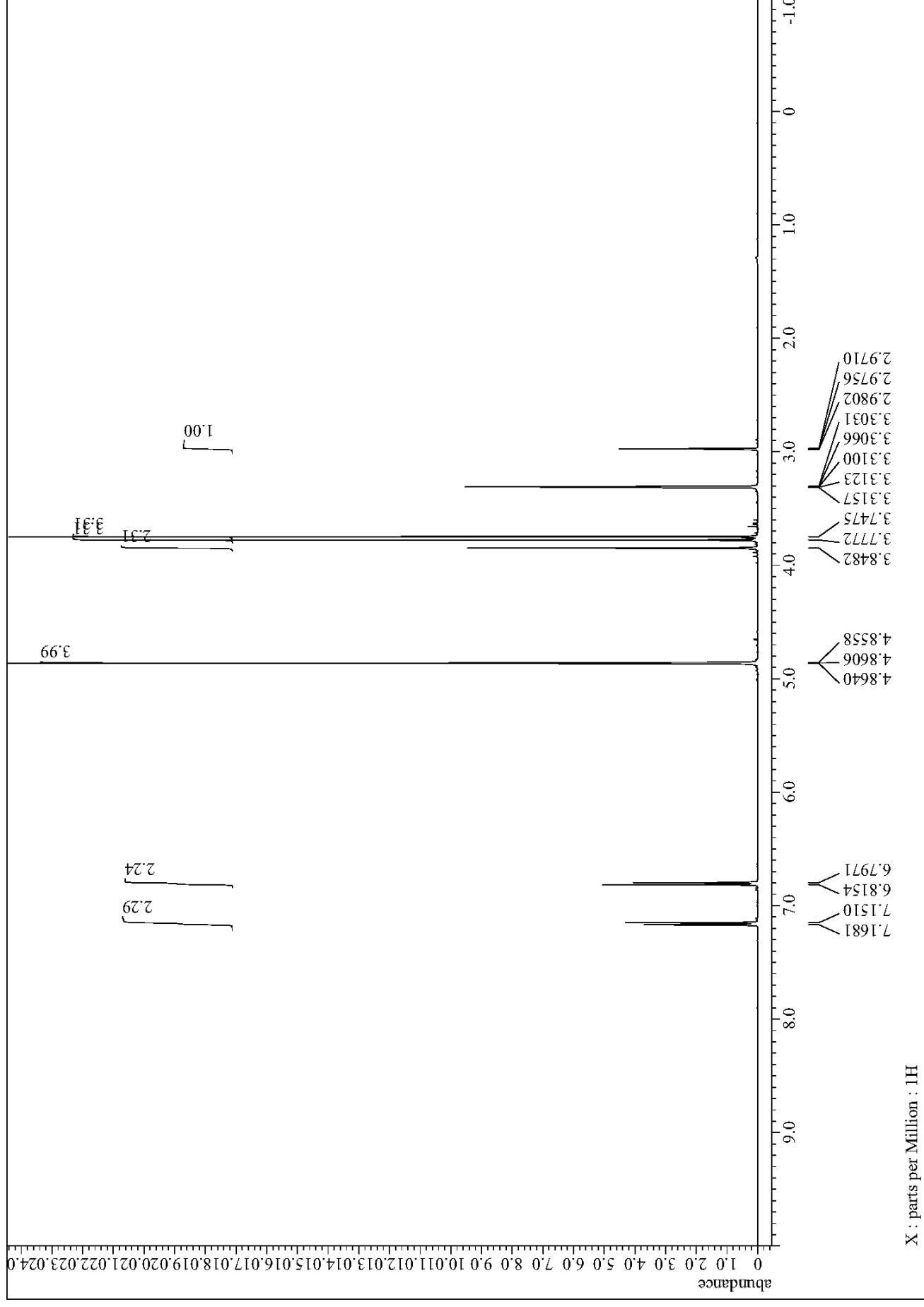
The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of **5a**

The 500 MHz ^1H NMR spectrum of **5b**

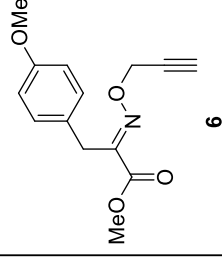
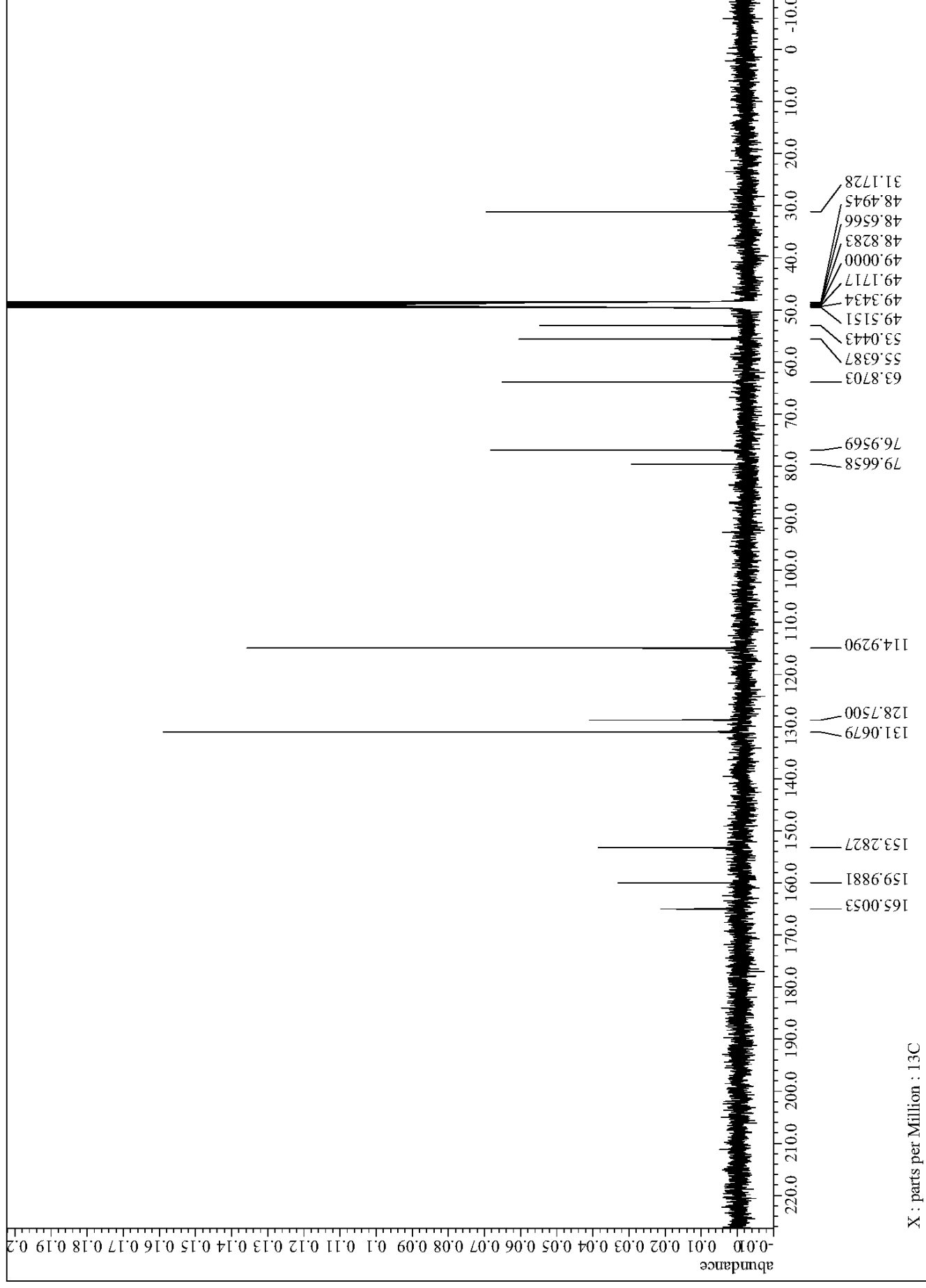




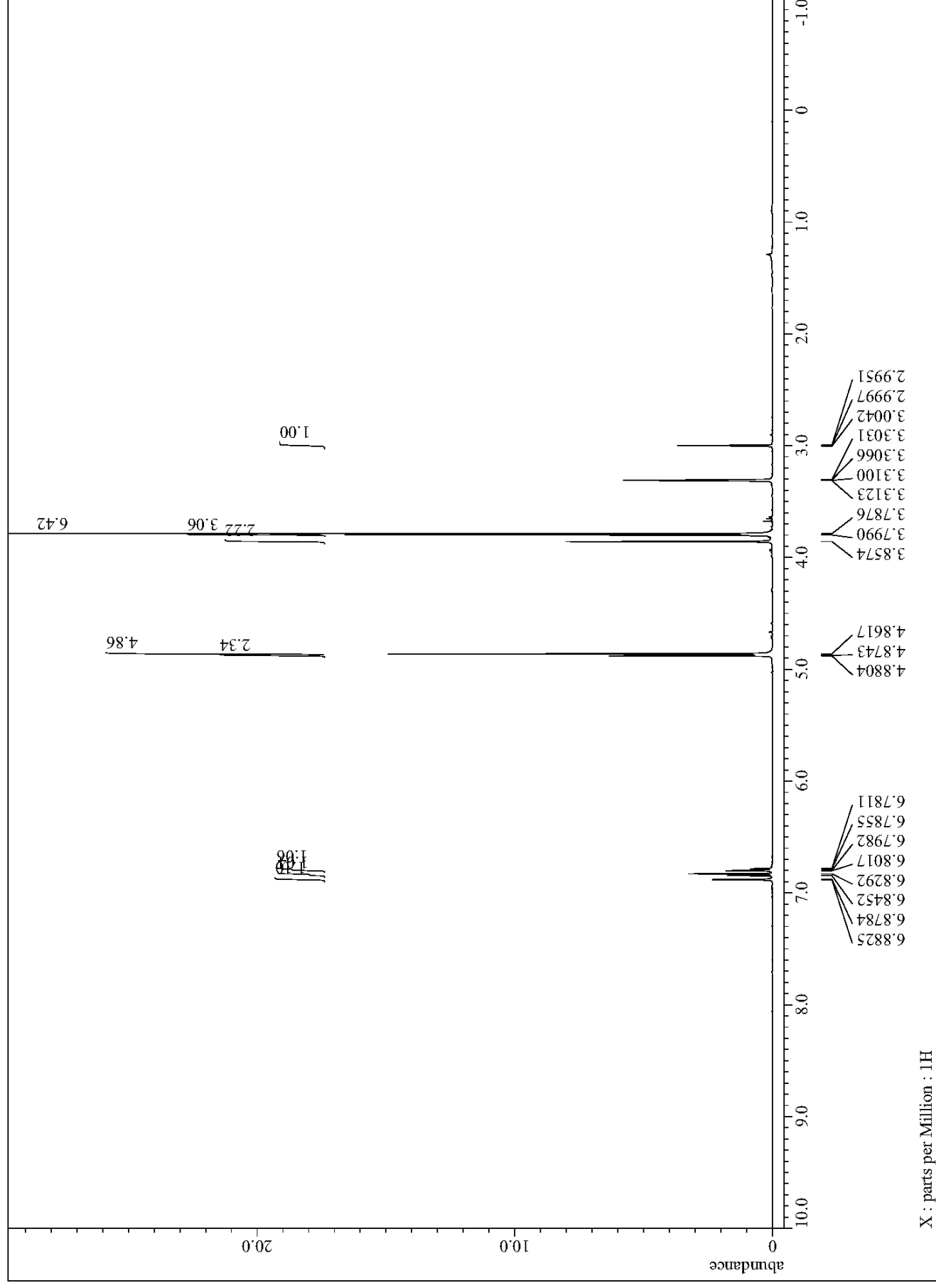
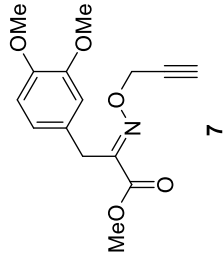
The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of **5b**



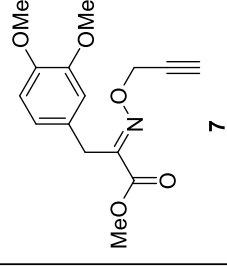
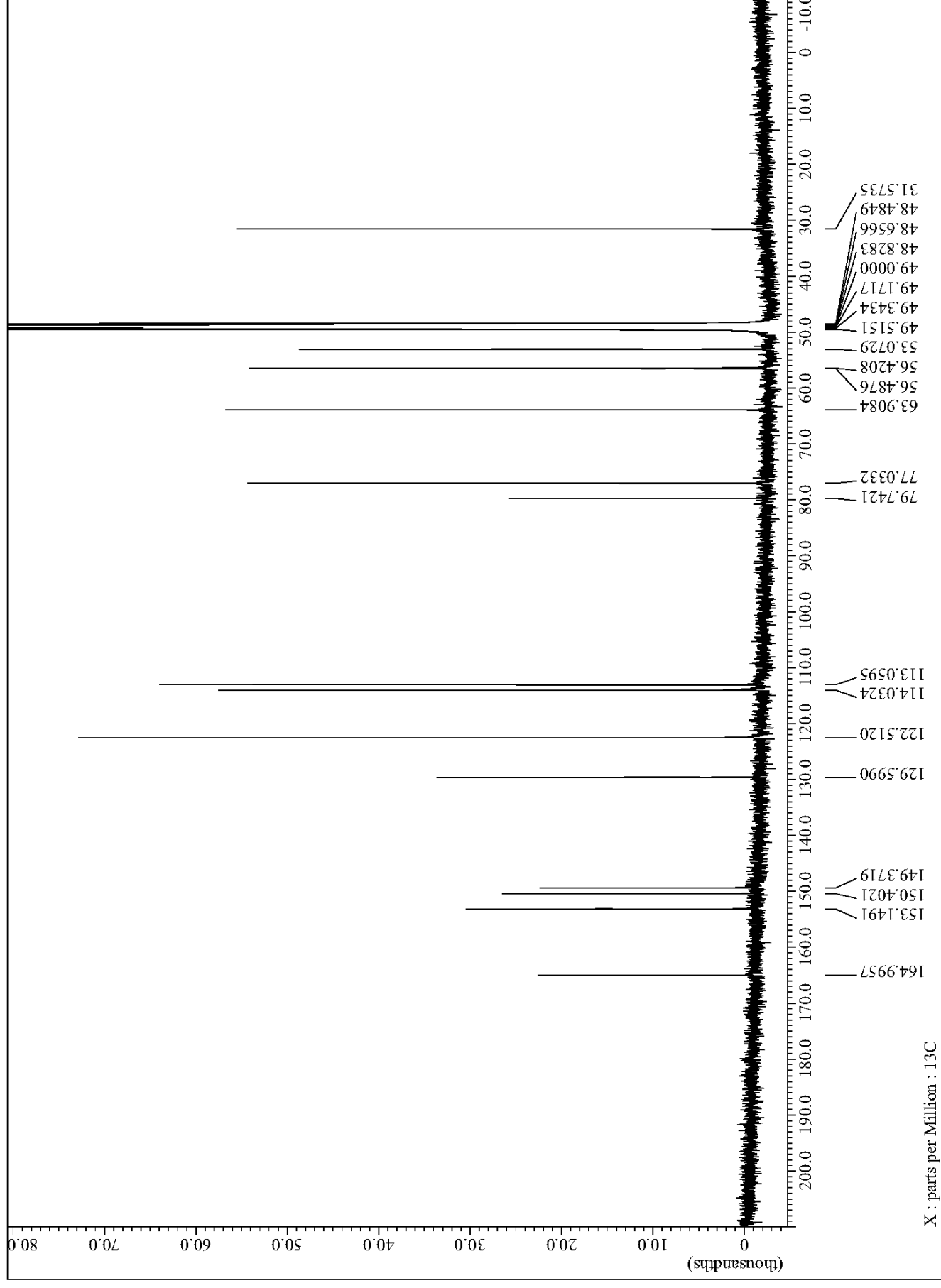
The 500 MHz ^1H NMR spectrum of **6**



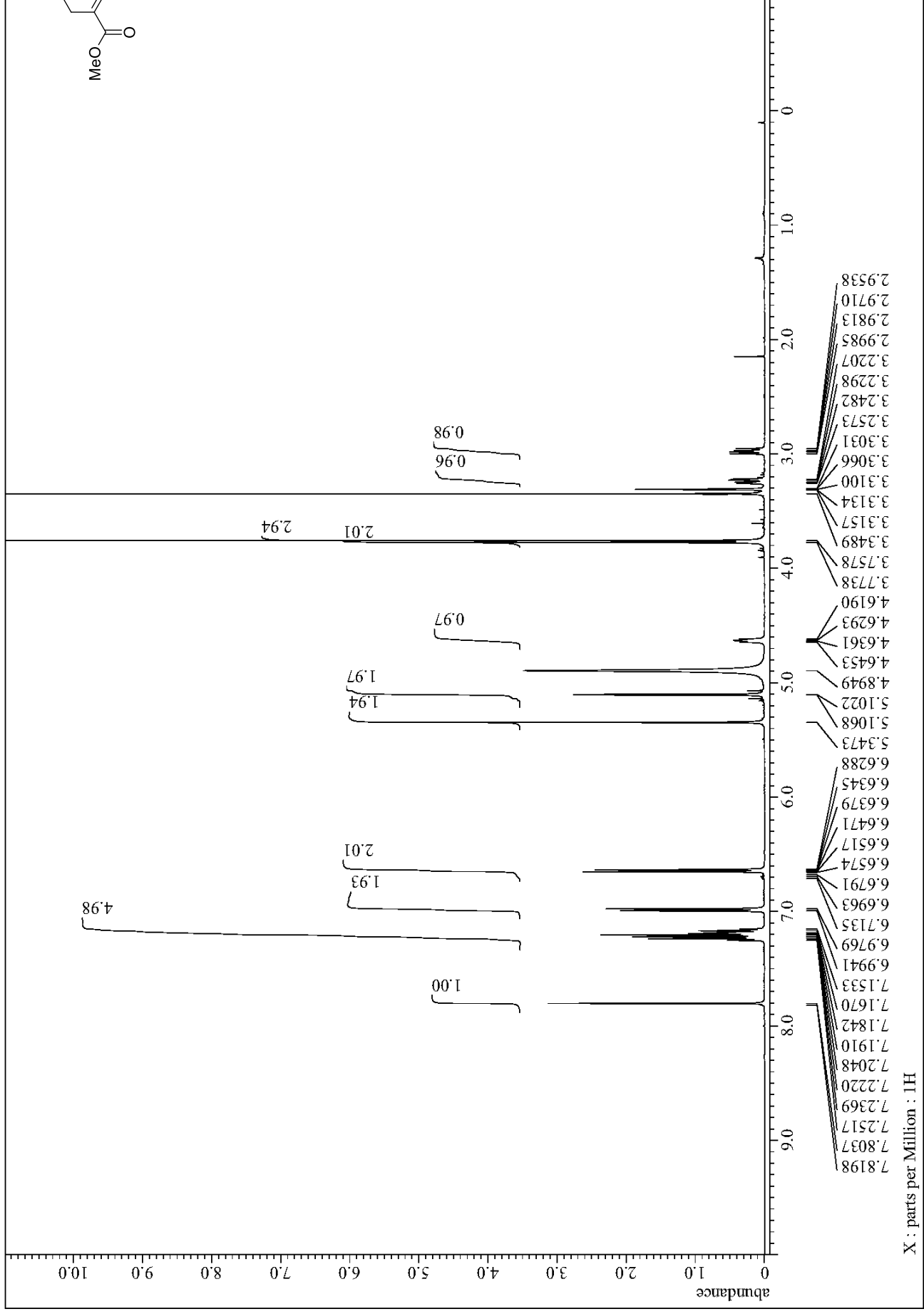
The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of **6**



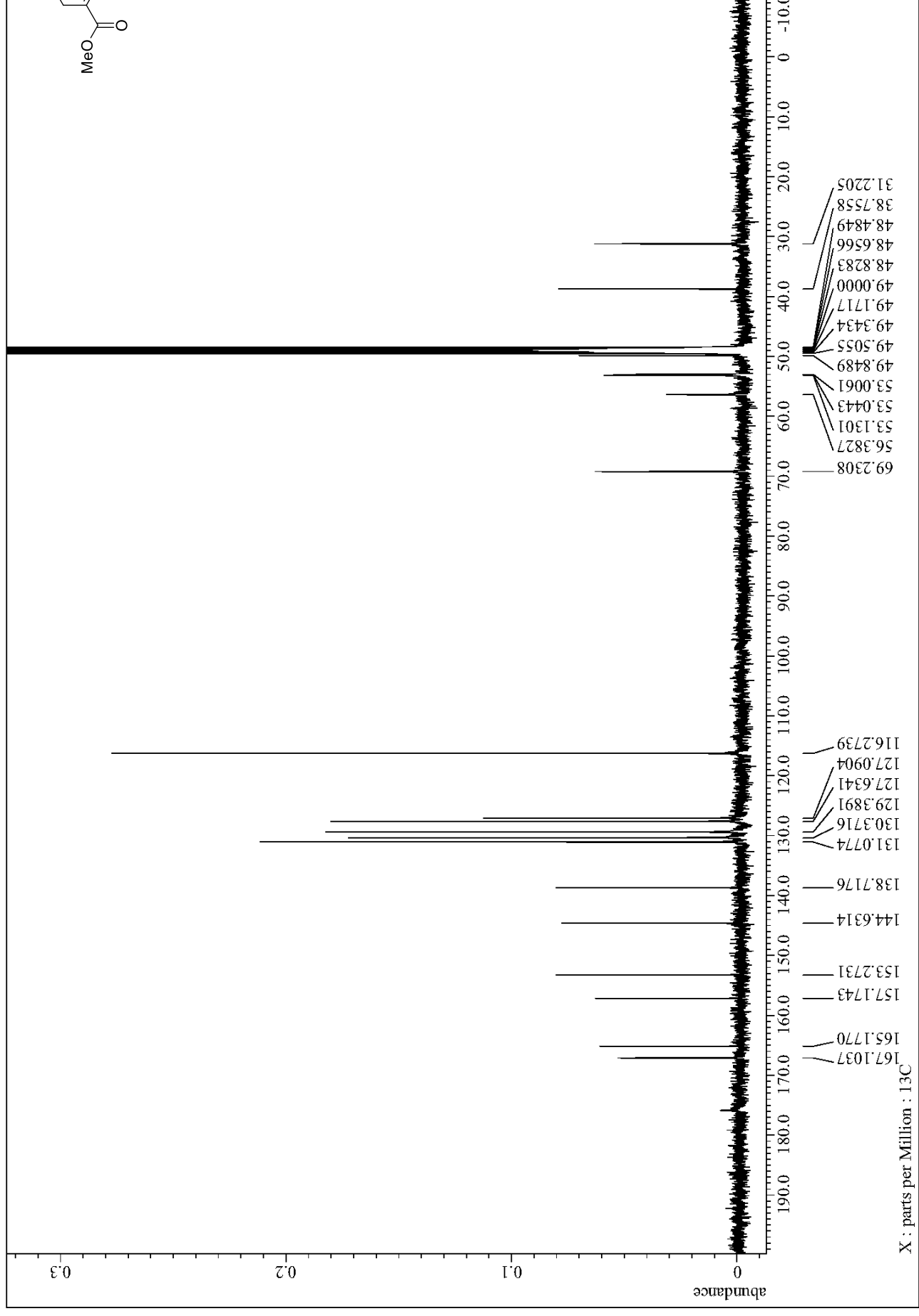
The 500 MHz ^1H NMR spectrum of 7



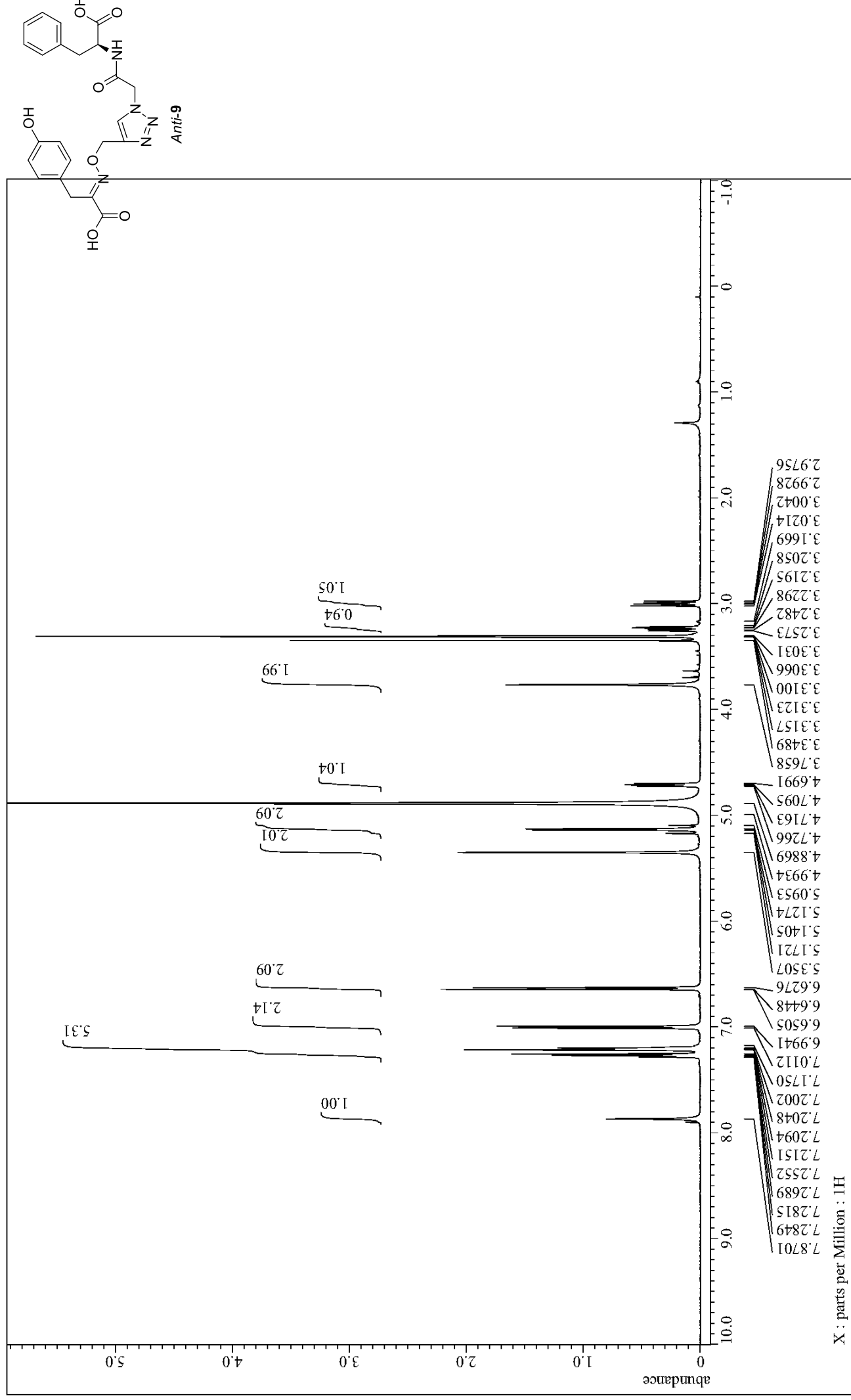
The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of 7



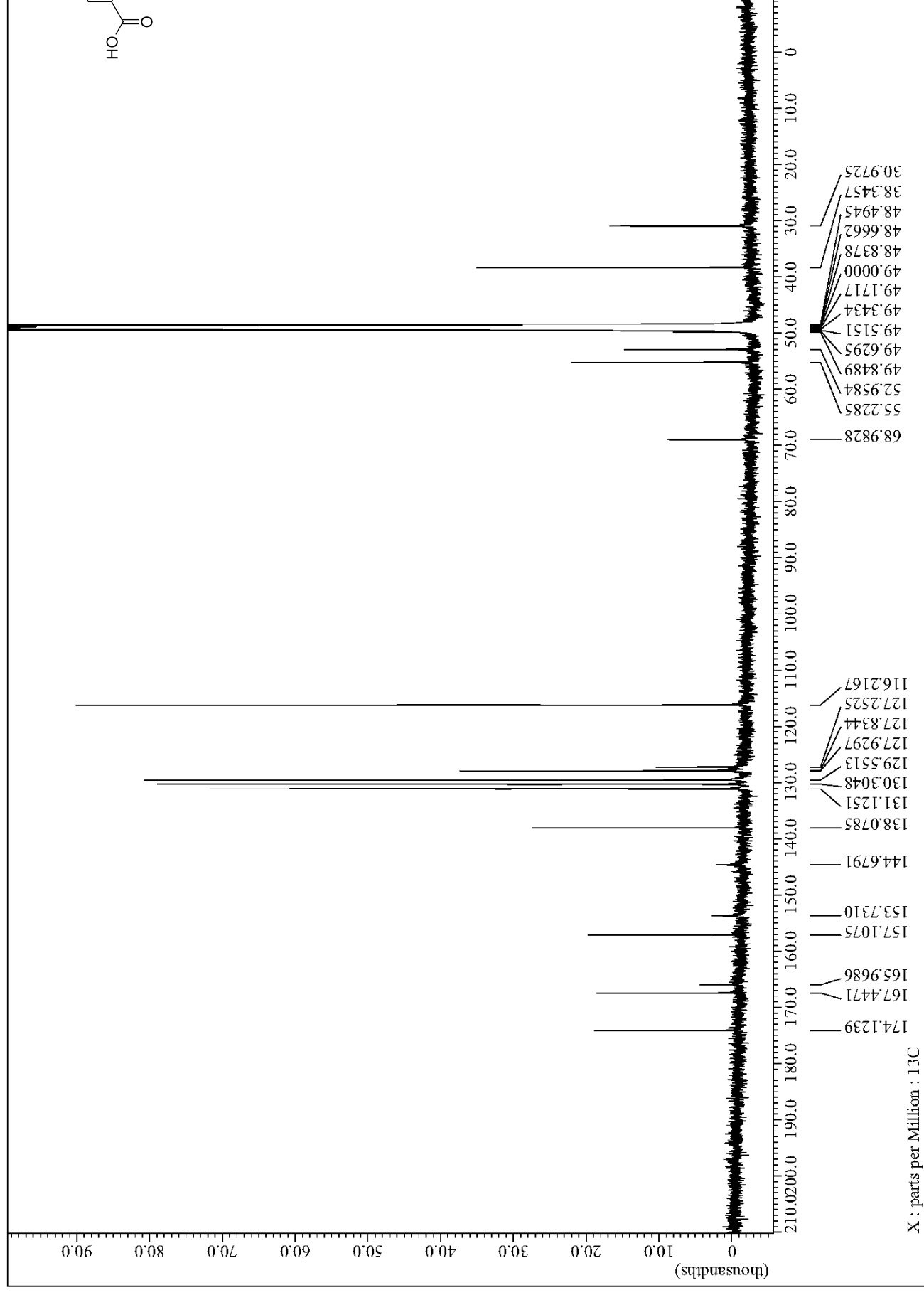
The 500 MHz ^1H NMR spectrum of *anti-10*



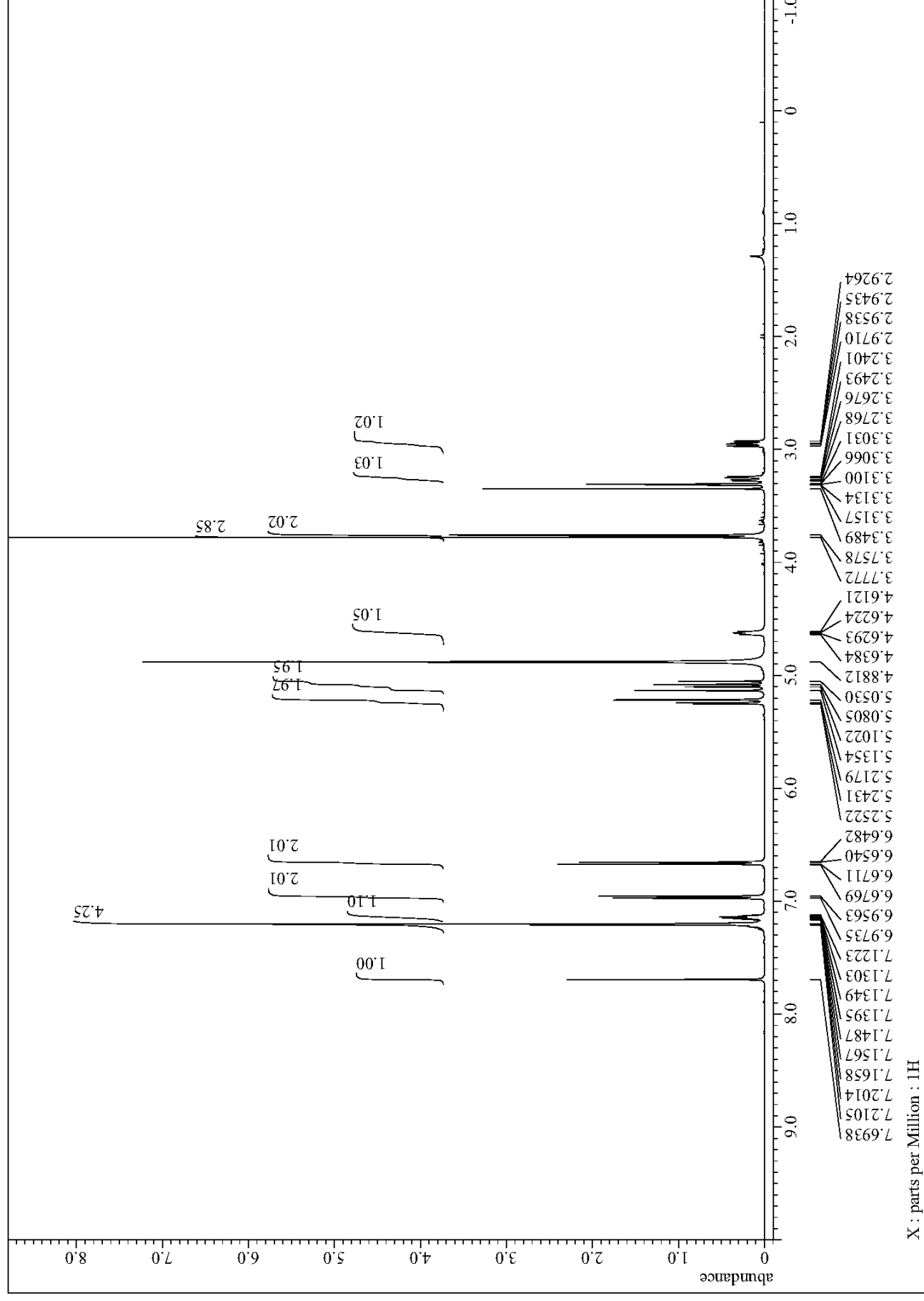
The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of *anti-10*



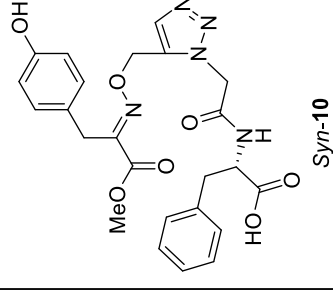
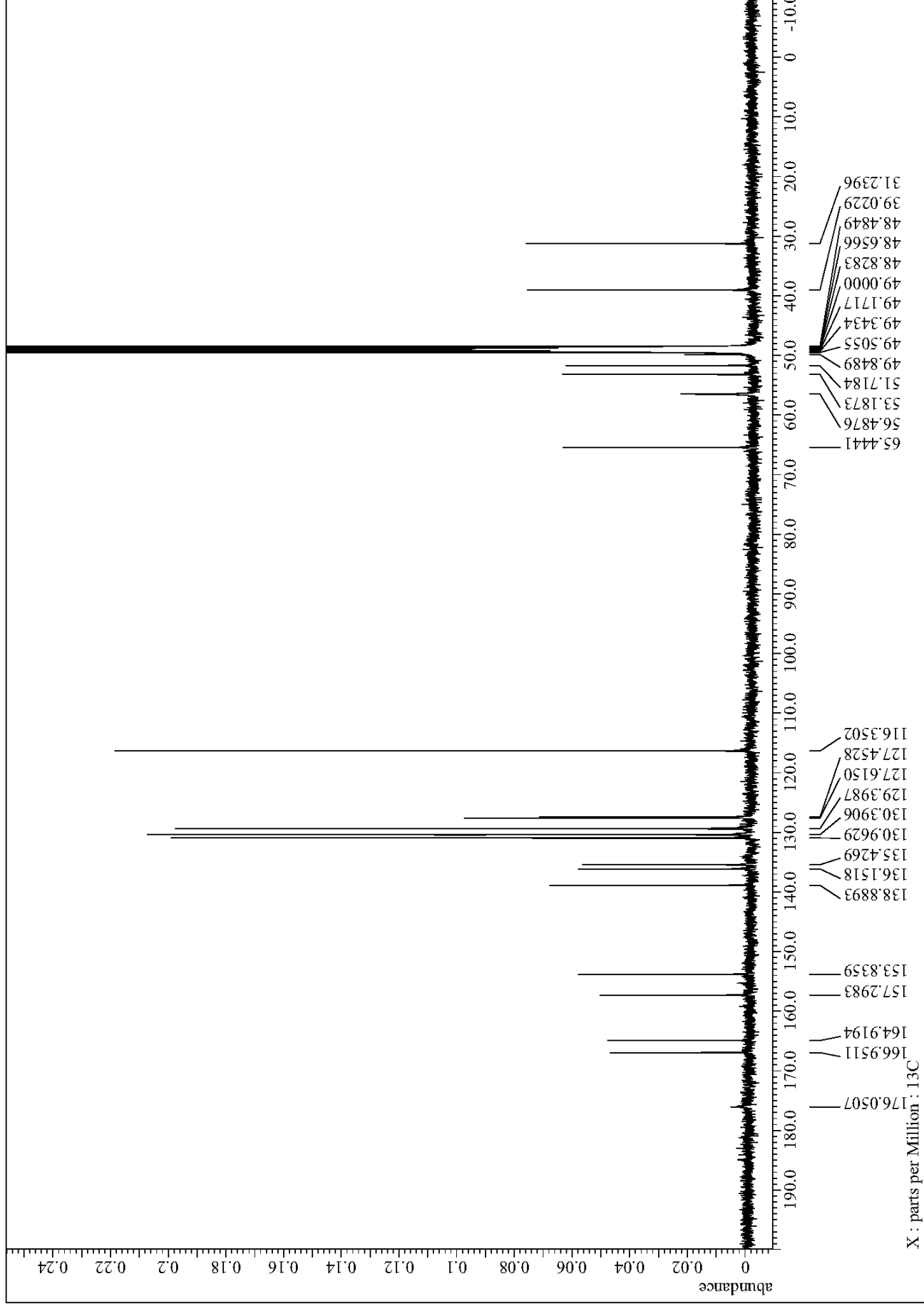
The 500 MHz ^1H NMR spectrum of *anti-9*



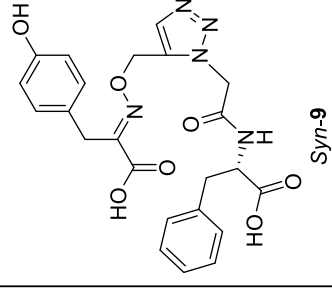
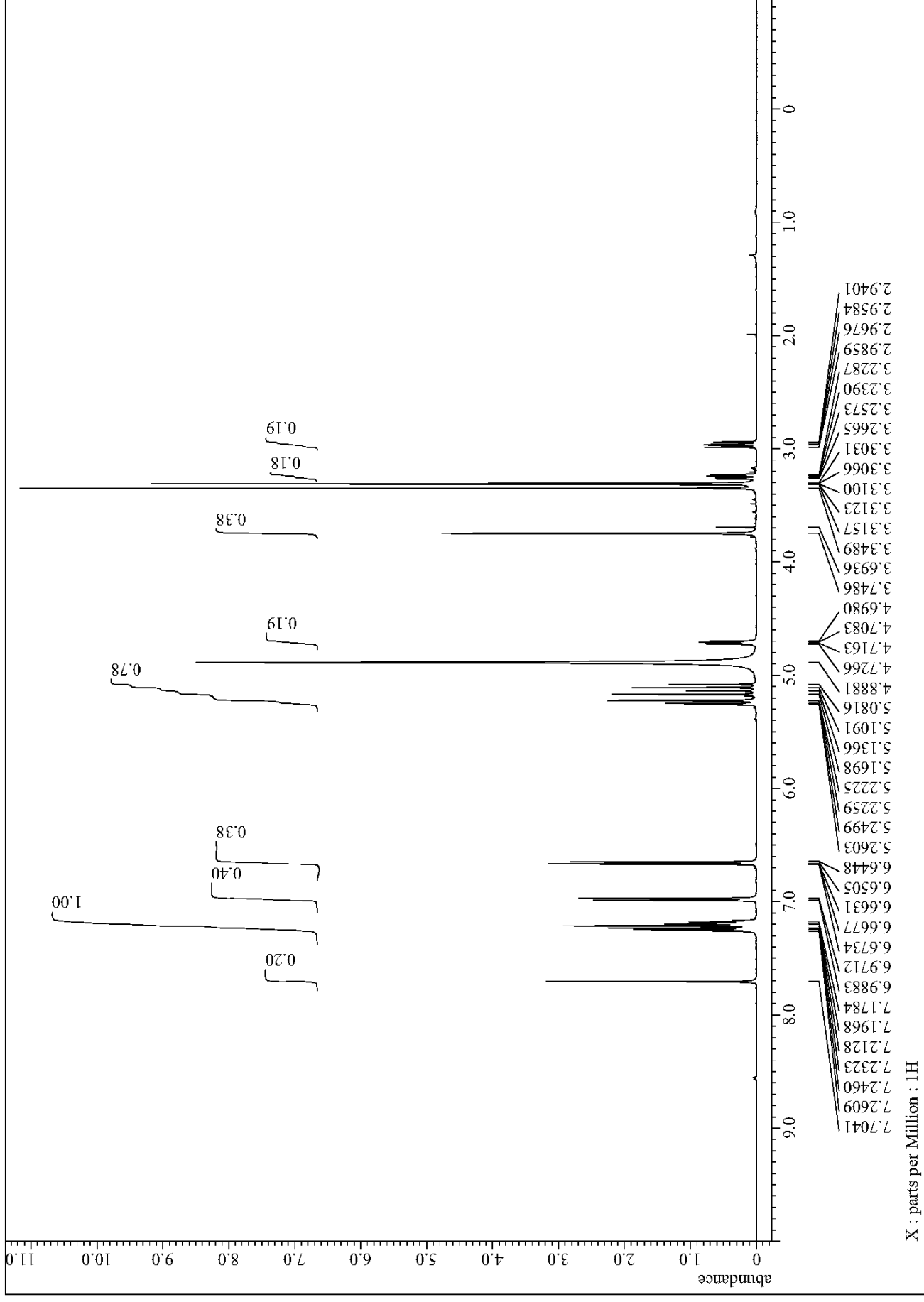
The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of *anti-9*



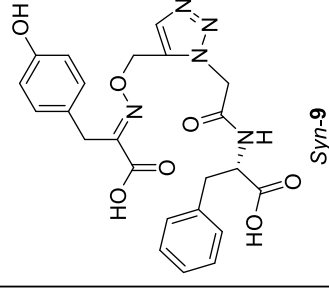
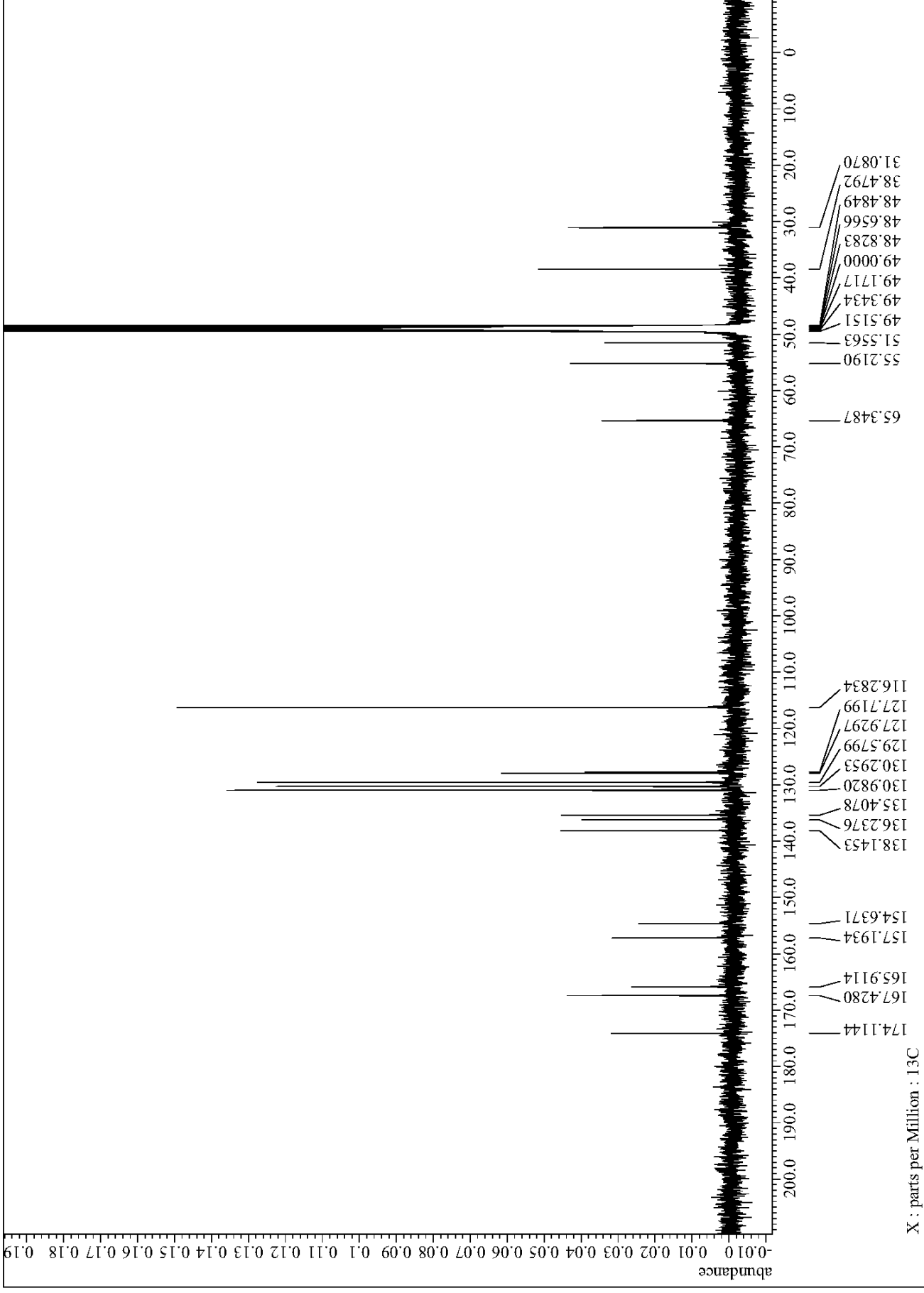
The 500 MHz ^1H NMR spectrum of **syn-10**



The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of *syn-10*



The 500 MHz ^1H NMR spectrum of **syn-9**



The 125 MHz ^{13}C NMR spectrum of *syn-9*

謝辞

本研究を行うにあたり、多大な御指導、御配慮を賜りました大村 智北里大学特別荣誉教授に深く感謝申し上げます。

本研究は北里大学大学院感染制御科学府 生物有機化学研究室 砂塚 敏明教授の直接の御指導のもとに行われたものであり、博士後期課程の三年間において多大な研究に関する御指導、御鞭撻のみならず、社会での人間関係のあり方に関しても終始温かい御指導、御鞭撻を賜りましたことを心より御礼申し上げます。

直接貴重な御助言を賜りました北里大学北里生命科学研究so 味戸 慶一客員教授、北里大学薬学部生命薬化学研究室 藤井 秀明教授、北里大学北里生命科学研究so 古源 寛客員教授に深く感謝申し上げます。

アジド化合物をご提供頂きました米国 Scripps 研究所 K. Barry Sharpless 教授、ならびに、hDAO のご提供、hDAO の発現精製、およびオキシグラフアッセイによる活性評価の御指導、御鞭撻を頂きました徳島大学 疾患酵素学研究センター 福井 清教授、頼田 和子助教に深く感謝申し上げます。

天然物ライブラリーをご提供頂きました北里大学北里生命科学研究so 熱帯病評価センター 岩月 正人講師に深く感謝致します。

MS スペクトルと NMR スペクトルをはじめとした各種機器測定をして頂きました北里大学薬学部化学系共有機器室長井 賢一郎助教、佐藤 倫子助教に深く感謝致します。

また、親身になって大学院生活をサポートして頂きました北里生命科学研究so 事務室の皆様感謝致します。

研究に対し、厳しく常に鋭く的確な視点での御指導、御鞭撻、ならびに叱咤激励を賜りました北里大学大学院感染制御科学府 生物有機化学研究室 廣瀬友靖准教授に心より御礼申し上げます。

本研究に、親身に貴重な御助言を頂きました 北里大学北里生命科学研究so 生物有機化学研究室 菅原 章公特任助教、山田 健特任助教、野口 吉彦特任助教に深く感謝致します。

研究室の先輩として研究が行き詰った際には快くディスカッションをして頂きました、小林 豊博士、井手口 哲也博士、中野 隼人博士に感謝致します。

同期として研究室に所属し常に研究生活を共にし、実験以外でも喜怒哀楽を共にし、刺激し合い、研究室生活をより充実したものにしてくれた、大下 純氏、君嶋 葵 氏に感謝致します。

実験に関して有益なご助言を頂きました、アステラス製薬株式会社 笠井尚子さんに感謝致します。

実験に御協力頂き、大学院生活を共に過ごした、北里大学大学院感染制御科学府 生物有機化学研究室 内山由佳里さん、栗原 ともこさん、渡上 友紀子さん、高瀬 遼一氏、角田 紀明氏、杉田 悠貴氏、千成 恒氏、高田 拓和氏、丸山 ひとみさん、荒内 陽斗氏、及川 大揮氏、久保 雅彦氏、佐竹 雄大氏、穂坂 美聡さん、堀松 優樹氏、渋谷 翔氏、鈴木 航氏、諸留 圭介氏、八木田 美有さん、矢作恭一氏、安藤 博康氏、大熊 惇生氏、村島 徳史氏、渡邊 彰人氏、大原 基義氏、佐藤 翔悟氏、堀越 俊氏、佐藤 達彦氏に心より感謝申し上げます。

博士後期課程への進学を後押ししてくださいました、齊藤 隆夫東京理科大学名誉教授に篤く御礼申し上げます。また、砂塚 敏明教授を直接ご紹介頂きました、筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIIS）杳村 憲樹准教授に深く感謝申し上げます。

最後に、私に勉学と研究を行える機会を与えて下さり、陰で支えてくれた両親と家族に心から感謝致します。

平成 28 年 3 月 10 日

