

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、水素原子および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 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。

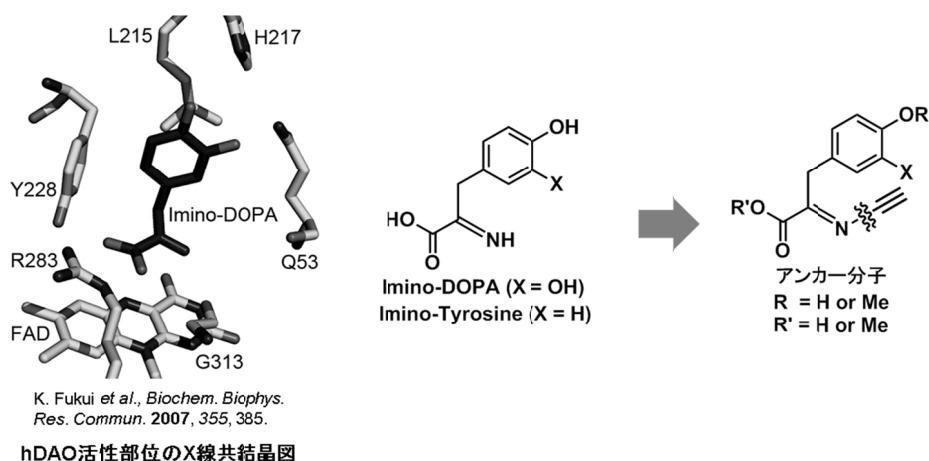
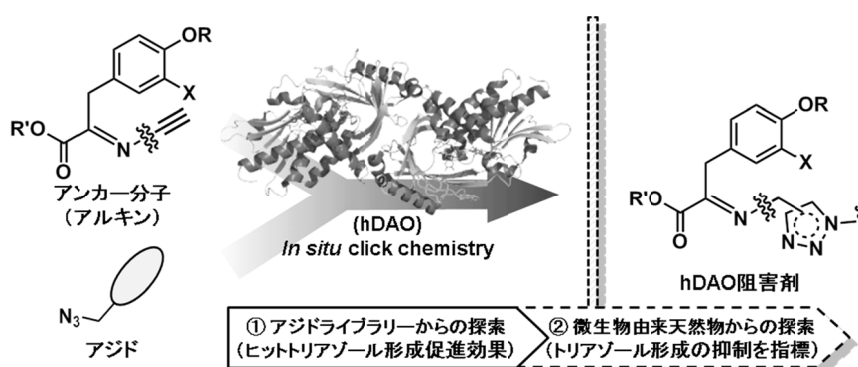


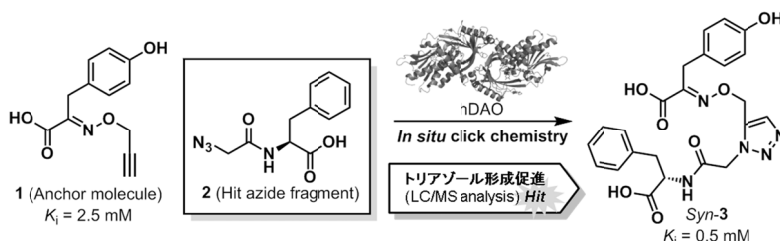
Figure 2. X 線共結晶図を参考にしたアンカー分子の創製



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*

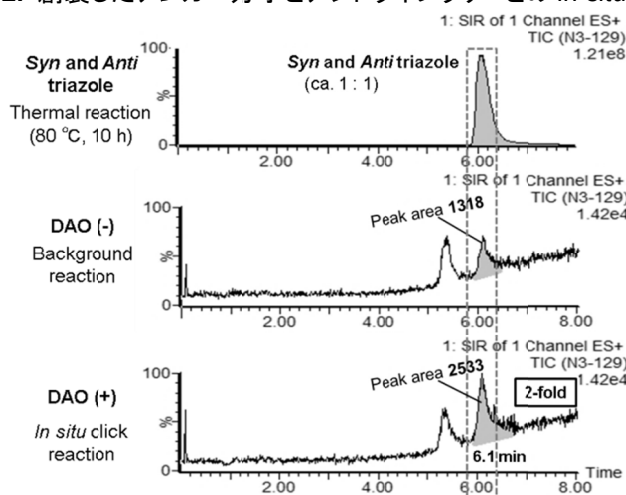
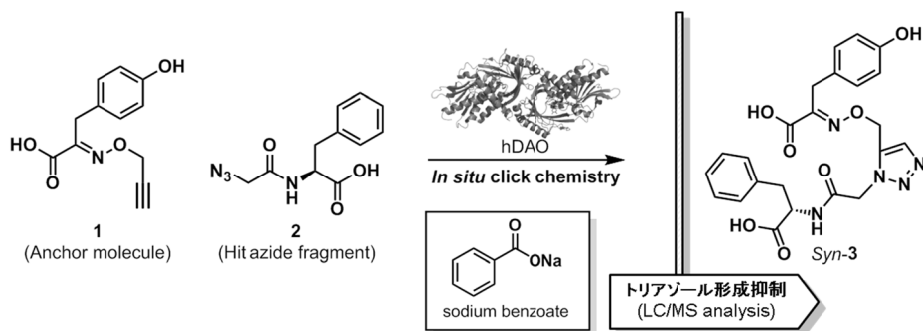


Figure 3 LC/MS 分析によりトリアゾール形成が確認されたチャート

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

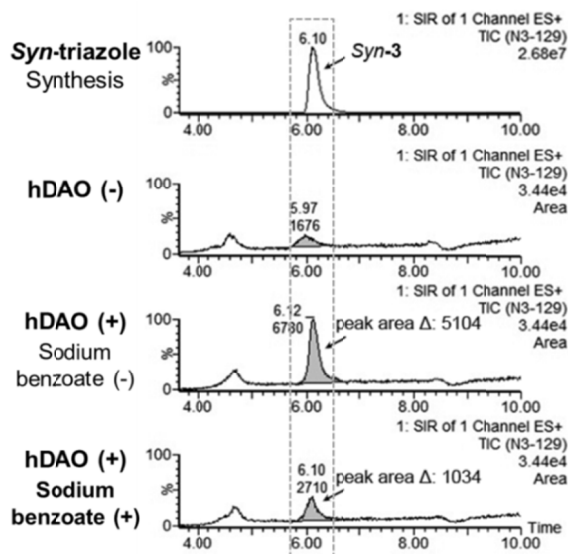


Figure 4. トリアゾール形成の抑制が確認された LC/MS チャート

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が抑制されている傾向が確認されている。

【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** (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。