

総説

平成の薬品化学分野

赤路健一*

京都薬科大学 薬品化学分野

私は平成元年2月から平成10年まで京都薬科大学・薬品化学分野の助教授として本学にお世話になり、その後平成23年に本学に戻ることになり令和2年の3月まで薬品化学分野に在籍いたしました。結局、平成の始めと終わりの約10年を本学・薬品化学分野で過ごしたことになります。この間、薬学部は4年制から6年制へと大きく変わり、本学の教育環境もソフト・ハード面共に大きく変わりました。本稿では、私が4年制薬学教育制度での教育・研究に携わった後、他学部を経て6年制薬学部での教育・研究に携わってきた間に感じたことを研究内容とともに紹介いたします。

キーワード：ペプチド、アミノ酸、有機合成、タンパク質化学、阻害剤

受付日：2020年2月25日，受理日：2020年3月4日

私は平成元年2月から平成10年まで京都薬科大学・薬品化学分野の助教授として本学にお世話になり、平成11年1月から大阪大学・蛋白質研究所に転任いたしました。その後、京都府立医科大学を経て、平成23年に本学に戻ることになり令和2年の3月まで薬品化学分野に在籍いたしました。結局、平成の始めと終わりの約10年を本学・薬品化学分野で過ごしたことになります。私が本学から転出し思いがけず舞い戻ってくるまでの間、薬学部は4年制から6年制へと大きく変わりました。本学の教育環境もソフト・ハード面共に大きく変わりました。4年制薬学部では三分の一程度の学部生が修士課程に進み、2年間の研究生生活を経て様々な就職先へと進んでいきました。その当時から就職先は、病院・薬局・企業（研究／開発）にほぼ

三分されていました。この点は6年制に変わってから大きくは変わっていないようです。一方、建物を含むハード面の刷新は目を見張るものがあり、私が本学に戻ってきたときには違う大学にきた感がありました。実務実習という非常に大きな教育課程が新たに設定され、学生さんたちが懸命に取り組んでいるのが印象的でした。本稿ではこのような教育課程の変化とともに本学で私が携わってきた研究に関するいくつかのトピックを書かせていただこうと思います。

私が最初に京都薬科大学にお世話になった時を今から振り返ってまず感じるのは「ほんとに好きにやらせてもらった」という印象です。建物は古く実験室は狭かった（人数に比して）ですが、私が実験していた部屋（今の薬学教育研究センター2階にありました）は教授室があった建物の隣の建物にありました。渡り廊下でつながってはいましたが1分以内で移動できる距

*連絡先：
〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町5

離ではないせいか、かなり自由な雰囲気で（好きに？）実験を進めることができました。1～2名の修士学生と数名の学部生とともに結構楽しく毎日実験していました（第7研究室という名前がついていましたが、陰では第7サティアンと呼ばれていたようです）。大学業務の負担もそれほど多くなく（たぶん）、当時の大学幹事会の先生方には大変感謝しております。

さてその実験ですが、ほんとにいろんな内容の実験を並行して進めていました。広い意味でアミノ酸・ペプチドに関連する合成研究が主な内容でしたが、そのうちにだんだん異常アミノ酸の合成と含硫アミノ酸であるシステインの化学に収斂していきました。まず、システインの化学について簡単に触れます。

システインは硫黄原子を含むチオール基を側鎖に持つアミノ酸で、二分子のシステインがジスルフィド結合を形成してシスチンになったり、逆にシスチンのジスルフィド結合が還元されてシステインに戻されたりします。生体はこの反応を実にうまく応用しており、タンパク質の立体構造のフォールディングに使ったり、酸化還元反応に使ったりしています。薬に関する反応では、グルタチオン抱合がよく知られています。先に書きましたようにいろんな実験をしていたのですが、その中にアミノ酸の側鎖官能基の保護と脱保護に関する研究が含まれていました。様々な官能基の新しい保護基の研究は当時の有機合成系研究の大きなテーマの一つになっており、私たちもその流れをアミノ酸研究に取り入れていました。システインについてもいろんな保護システイン誘導体について実験をしていたのですが、その途中で保護システインを扱っているのにシスチンができている現象に気が付きました。いろいろ調べてみて、その鍵となる試薬がトリクロロメチルシランであろう、と目星を付けました。それまでは単に副反応に過ぎませんでした（それでも新しい副反応

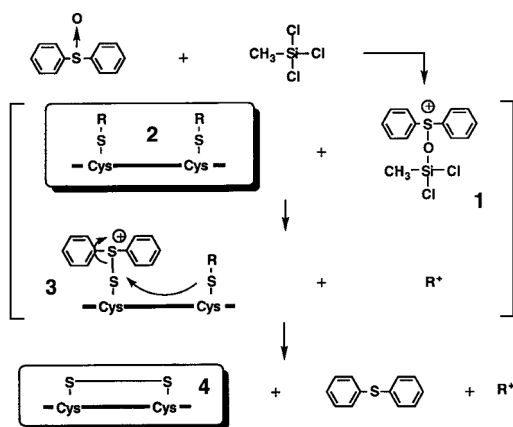


図1 トリクロロメチルシステインを利用するシスチン形成反応

なのでペーパーにはなりません）が、ターゲットとなる新しい化合物が特定できるとこれまでにない合成法の可能性が開けます。こうやって開発できたのが、図1に示す保護システインから直接シスチンを形成させる新しい方法です^{1,2)}。

この方法がよかったのは、シスチンを形成させるために開発されていたいくつかの従来反応と全く異なる新しい反応機構に基づく反応である点でした。つまり、既知の方法と組み合わせることができたのです。複数のジスルフィド結合の形成には、古くから空気酸化法が用いられてきました。複数のジスルフィド結合を一気に形成できるいい方法ではあるのですが、高度希釈が必要であるとともにコンパクトなタンパク質中の複数のジスルフィド結合形成には応用困難である、といった難点がありました。かといって、複数のジスルフィド結合を選択的に形成しようすると、従来法の組み合わせでは2本のジスルフィド結合しか形成させられず、3本あるいはそれ以上のジスルフィド結合を位置選択的に形成させることができませんでした。したがって、この新しい反応をうまく利用すると、3本あるいはそれ以上のジスルフィド結合を順次位置選択的に形成させることができる可能性が開けると考えました。

6個のチオール基から形成される3本のジスルフィド結合というのは、理論的には分子内だけに限っても $5 \times 3 = 15$ 通りの可能性があります。それまで行われてきた空気酸化法では、6個のチオール基を持ったペプチド鎖から一挙に3本のジスルフィド結合を形成させようとしていましたが、これはほとんど僥倖を祈るような方法でした。このような背景があったため、ごく自然に3本のジスルフィド結合を持ったヒトインスリンの完全化学合成が次のテーマになりました。インスリンが一番小さなサイズの（コンパクトな）タンパク質であるにもかかわらず分子間および分子内という性質の異なるジスルフィド結合を3本持っていること、それまでに報告（世界で3例のみ：ドイツ、アメリカ、中国）されていたインスリンの全合成法はとても再試をしようと思えるような合成法ではなかったこと、インスリンの活性測定が比較的容易であること、などが理由です。幸いなことに、いくつかの基礎実験を経て、これまで報告がなかった3本のジスルフィド結合の位置選択的形成に基づくヒトインスリンの全合成に到達することができました^{3,4)}（図2）。さらに、得られたインスリン合成品が市販のヒトインスリン製

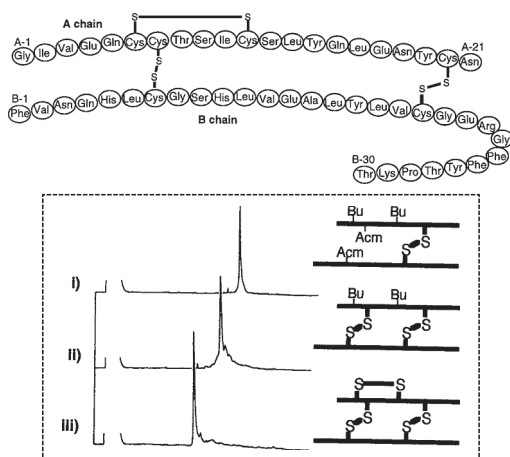


図2 位置選択的架橋法によるヒトインスリンの全合成

品と全く同等の血糖降下活性をマウスで示すことを自分自身で確認することができました。

次に、もう一つの研究テーマとして、異常アミノ酸の立体選択的合成とその縮合について簡単に触れます。タンパク質を構成しているのは20種類の α アミノ酸ですが、自然界にはこれら以外にも多くの変わった構造を持ったアミノ酸が多く存在します。バクテリアや海洋生物が産生する二次代謝産物として単離・構造決定されていますが、実に様々な生理活性が報告されています。このような多様な生理活性を持った異常アミノ酸含有化合物を薬へと構造変換するためには、異常アミノ酸の効率的合成とその縮合が必須となります。このような観点で異常アミノ酸の化学についていくつかの研究を行いました。ここでは含硫異常アミノ酸の一種である α メチルシステインについて述べます。この異常アミノ酸に着目したのは、これまでの実験で取り扱ってきたシステインの誘導体であることと、この異常アミノ酸を構成成分とする一連のthiazorine/thiazole系天然有機化合物類が知られていたためです（図3）。これら一連の天然物は α メチルシステインから生合成されると推定されていましたが、全合成にこの直線的経路を応用した報告はありませんでした。 α メチルシステインの立体障害が大きくて、当時知られていた縮合剤ではうまく α メチルシステイン

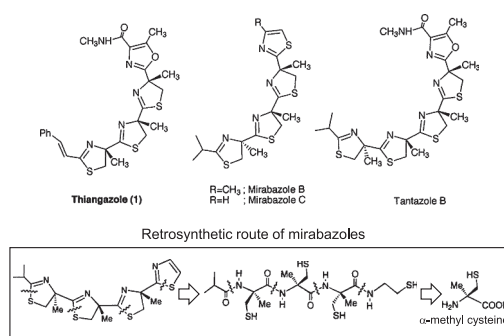


図3 Thiazorine/thiazole系天然有機化合物と α メチルシステイン

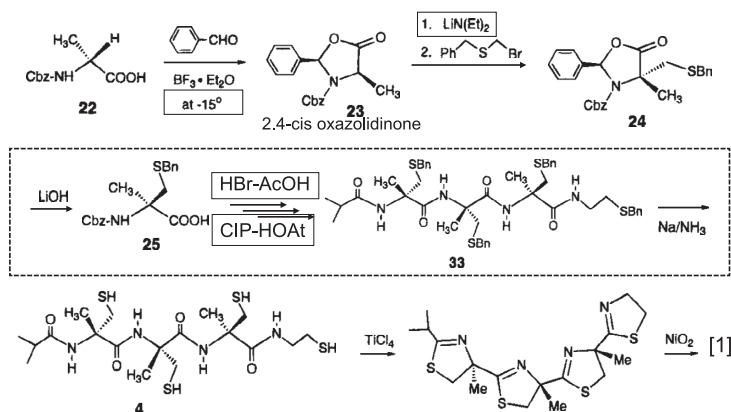


図4 Thiazorine/thiazole 系天然有機化合物の全合成

を縮合させられなかったためです。

そこでまず α メチルシステインを効率よく縮合できる縮合剤の開発から研究を始めました。いろいろ試したのですが、結局クロロイミダゾリジウム試薬 CIP と反応促進剤であるヒドロキシアザベンゾトリアゾール HOAt の組み合わせに行きつきました。反応機構を調べたところ、まず優先的にオキサゾロンが形成され、これが促進剤と速やかに反応することで実際の高活性反応種である活性エステルが極めて効率よく生成していることが確認できました。この結果をもとに、①構成異常アミノ酸である α メチルシステインを立体選択的に合成し、②新たに開発した縮合剤 CIP/HOAt で順次縮合させ、③得られた直鎖前駆体から一挙に環構造を形成する、という生合成経路を模倣した全合成経路を確立することに成功しました⁵⁾ (図4)。また、この方法で関連誘導体の全合成⁶⁾ も行い、新しい縮合剤の有用性を示すこともできました。

大阪大学蛋白質研究所に移動してからもこのような合成研究は続けていたのですが⁷⁾、やはり何とんでもタンパク質そのものについての研究状況を知ることができたことが蛋白研での最も大きな収穫でした。蛋白質研究所では、“タンパク質” というキーワードで基礎物理から応用生物までをカバーする様々な分野の研究が行

われていました。様々な研究セミナーも多く開催されており、まさに門前の小僧としてタンパク質研究に触れることができる最適の環境でした。タンパク質の合成（化学全合成および大腸菌を利用した組換えタンパク質合成）については自分自身で実験することができましたし、得られたタンパク質の結晶化についても経験することができました。この一連の経験が以下に紹介する阻害剤研究に大きく役立つことになります。

京都府立医科大学・大学院に独立した研究室を運営するようになって、上述したタンパク質化学と有機合成化学を融合できる研究テーマを考えました。この時から開始して本学に転任後も継続しているテーマがいくつかありますが、ここでは重症呼吸器症候群 SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) に関する研究について簡単に触れます。SARS は 21 世紀初頭に中国広東省で発生し、これまでに 8500 人を超える症例と約 800 人の死者を出した致死率の高い呼吸器疾患です。2002 年にこの疾患の原因ウイルスが新種のコロナウイルス (CoV: coronavirus) であることが確認され、2003 年には WHO より終息宣言が発令されました。しかし、2014 年には新種の CoV を発症原因とする MERS (middle east respiratory syndrome) が中東地域で流行し、

2020年には新型コロナウイルスによる感染とSARSを超える感染拡大が中国で発生しました。このようなCoVによる再パンデミックが再び喫緊の問題となっていますが、未だCoVに対する有効な治療薬やワクチンは開発されていません。

SARS CoVは一本鎖(+)のRNAを持つウイルスで、その増殖には宿主細胞内でウイルスRNAから翻訳されるプロテアーゼ(SARS 3CL protease)が必須です。このプロテアーゼ機能を止めることができればウイルスの複製を抑えることができるため、SARS 3CL protease 阻害剤は有望なSARS治療薬として期待されています。これまで多くの化合物が報告されてきましたが、上述したようにいずれも臨床応用にまでは至っていません。私たちの研究室でも独自にSARS 3CL protease 阻害剤設計と評価を行ってきましたが、私たちは高純度プロテアーゼの大量調製に基づく活性評価法と有機合成化学に基づく立体選択的合成法の組み合わせという研究アプローチをとりました。

まず、SARS 3CL proteaseの大腸菌を用いた発現実験に取り掛かりました。SARS 3CL proteaseは306残基のアミノ酸からなるシステインプロテアーゼで、ウイルス由来の前駆体タンパク質からウイルス複製に必要なタンパク質をプロセッシングする際に最も重要な酵素です(図5)。完全化学合成するには少々大きいので大腸菌を利用した発現法により調製することとしました。常法で調製できると甘く考えていたのですが、やってみるとほとんど目的タンパク質が取れませんでした。考えられる原因を一つずつ潰していき、ようやくこのSARS 3CL proteaseが自己分解しやすいということを突き止めるのに約1年かかりました。何とか分解個所を特定し変異を入れることで、ようやく自己分解抵抗性の変異型SARS 3CL proteaseを安定的に大量供給できるようになりました。

変異型SARS 3CL proteaseを大量かつ安定的

に供給できるようになると、有機系研究室で普通に備えている分析機器を用いて酵素活性を評価できるようになりました。このため、候補化合物の構造最適化効率が大きく向上しました。同時に、プロテアーゼの結晶化条件の検討もタンパク量を気にせず行えるようになり、X線結晶解析に耐えるきれいな単結晶を生成する結晶化条件を見つけることができました。こうして最初にできたのがSARS 3CL proteaseの基質配列をもとにしたペプチドアルデヒド型阻害剤Ac-Thr-Val-Cha-His-Hです⁸⁾(図6)。“基質配列をもとにした”と書きましたが、実は得られた阻害剤には元の基質配列はなくなっています。それまでに合成した阻害剤候補化合物とSARS 3CL proteaseとの複合体結晶構造解析によって、アミノ酸側鎖構造の最適化をある程度論理的に進めることができるようになり、構造最適化にかかる時間を短縮できた結果です。

次のステップとして、最適化したペプチド配列をもとに非ペプチド化を行うことを考えました。薬としては経口投与可能な非ペプチド型化合物の方が適しているであろうと考えたためです。その非ペプチド化ですが、もう一度複合体構造を見直すことから始めました。PC画面上で複合体構造をいろんな角度から見ていると、疎水性相互作用を狙って入れたシクロヘキサン環とペプチド主鎖がかなり近いことに気が付きしました。推定距離は約3.5 Åで、これは炭素一つを挟んだ共有結合距離にほぼ等しい距離です。そこで、主鎖に近いシクロヘキサン環炭素と主鎖アミド結合の窒素原子をメチレンでつないだ縮環構造を設計しました(図7)。

単に側鎖と主鎖をつないただけですが、結果として出てきた化合物は一見ただけではペプチドとは思えない構造を持っています。よく見ると元のペプチド構造が埋め込まれているのですが、ヘテロ原子を含む縮環骨格が中核となる特徴的な全体構造を持っています。この化合物

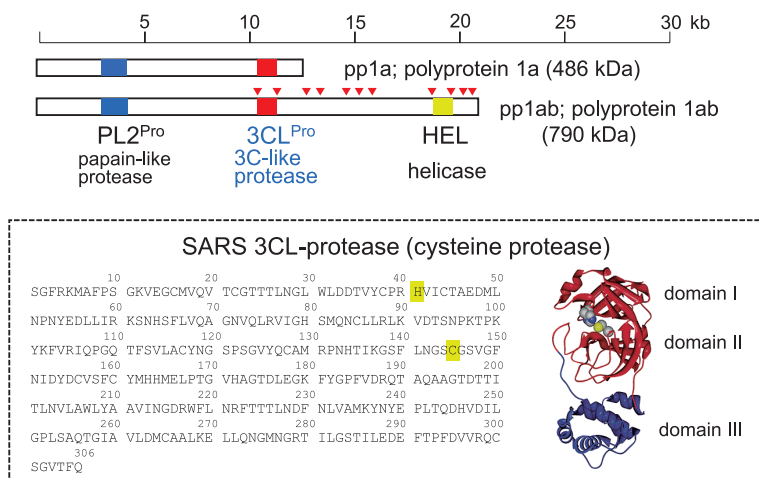


図5 SARS 3CL protease の構造

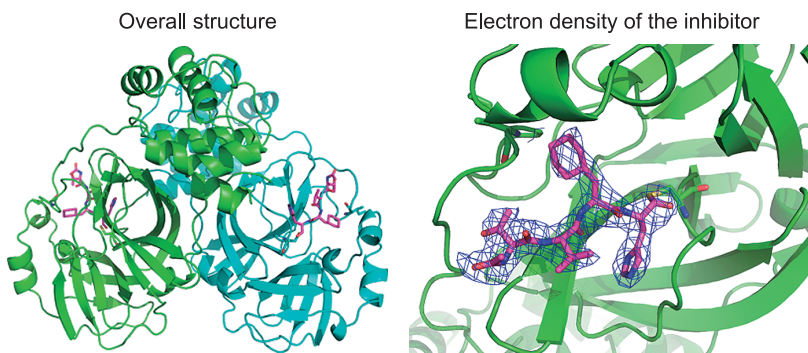


図6 ペプチドアルデヒド型 SARS 3CL protease 阻害剤の開発

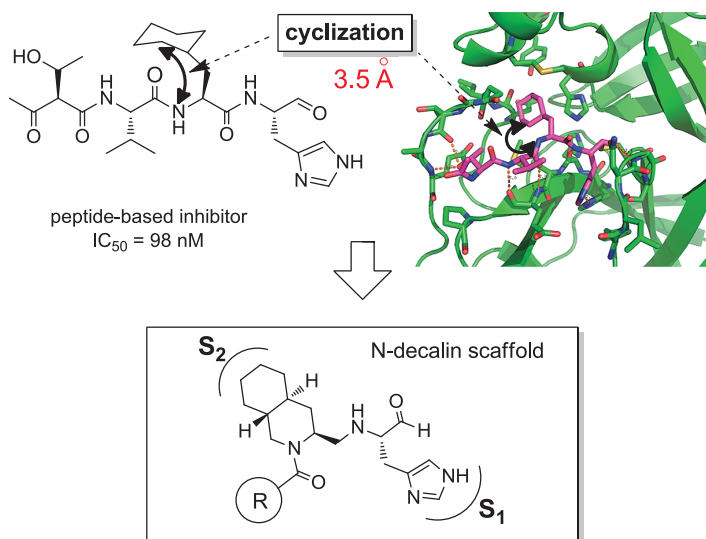


図7 ペプチド型阻害剤から非ペプチド型阻害剤へ (その1)

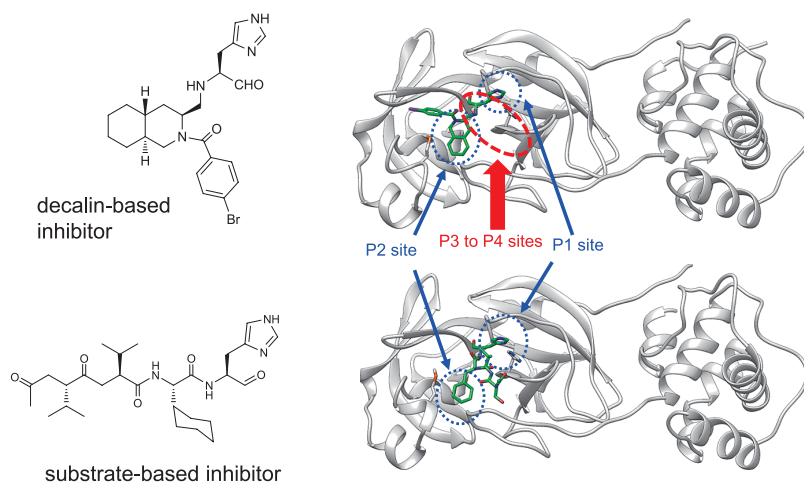


図 8 非ペプチド型阻害剤と SARS 3CL protease との複合体 X 線結晶解析

の合成にあたっては、縮環部分の立体構造を含めたいくつかの不斉点での立体構造を制御しつつ合成を進める必要がありました。特に鍵となる縮環構造の構築には、それまで別途進めてきた複素環含有天然物の全合成研究でなじみのあった Pd(II) 触媒を用いる環化反応を使うことにしました。一見関連性のない二つの合成研究が融合したことになります。もちろん実際の合成では多くの紆余曲折があったのですが、何とか目的化合物の合成に成功し阻害活性評価実験ができるまで到達しました。活性はあるはず、とは思っていましたが何せこれまで全く報告されていない新しい骨格の化合物です。大変不安な気持ちで活性を測定しました。翌日のデータから、基質ペプチドアルデヒド型阻害剤に比べ阻害活性は落ちるものの想定した阻害活性が確かにみられることを確認できました。これで行うべく安心して合成条件の最適化やプロテアーゼとの複合体構造解析を行うことができるようになりました。構造解析の結果を図 8 にまとめて示します^{9, 10)}。

この結果から、ペプチドアルデヒド型阻害剤に比べて阻害活性が低下したのは、プロテアーゼによって基質が切断される部位の N 端側にあたる部分での相互作用が欠損したためである

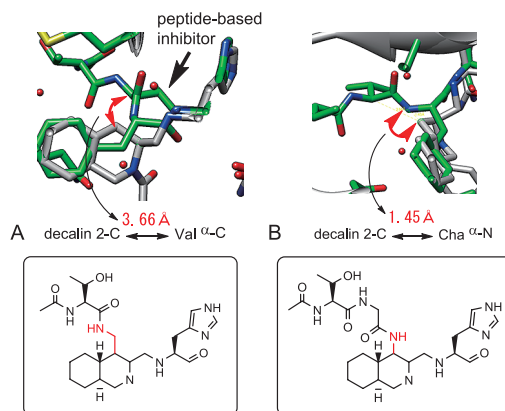


図 9 ペプチド型阻害剤から非ペプチド型阻害剤へ (その 2)

うと推定されました。そこで再度複合体構造の再検討を行うことにしました。縮環型構造を思いついた時と同じように、ペプチドアルデヒド型阻害剤の相互作用様式と今回得られた縮環型阻害剤の相互作用様式を PC 上で重ね合わせ、いろんな角度から見てみたのです。新たに作った縮環構造のどこにどのような構造を入れたらペプチド型阻害剤では機能していた相互作用を取り戻せるかを推測するためです。この検討から、新しい置換基を導入するのに適した縮環構造上の位置と導入すべきペプチド配列に対応する構造が見えてきました (図 9)。実際に図 9

のAに示した構造を持ったプロトタイプ阻害剤を合成して阻害活性を調べたところ、活性が置換基のない化合物の2倍以上に向上することが確認できています。これらの詳細については論文報告とともにどこかでより詳しくご紹介できたら、と思っております。

ここで紹介しましたSARS 3CL protease阻害剤研究の後半の仕事は、6年制薬学教育機関となった本学に戻ってきてからの研究内容です。4年制時代に設置されていた修士課程の院生はほとんど在籍していない状況ですが、代わって学部5・6年次生が頑張ってくれました。もちろん最初に研究室に所属してきた時点では研究活動そのものについての具体的なイメージもわからない状態ですが、年次が上がり学外での学会発表の機会があるとどんどん意識が変わっていきます。特に、研究室に博士課程の大学院生が一人でも在籍していると、研究活動や論文執筆の現場を生で見ることができます。このような機会を自分自身の体験として持つことによって、ガイダンス等での説明の何倍もの効果で研究活動の実際と意義を伝えることができます。こうなると、本学の高学年学部生は以前の修士課程院生と同等あるいはそれ以上の能力を発揮してくれます。平成の最後の10年間の本学での仕事は、これらの学部生および大学院生の努力の賜物です。ここですべてのお名前を挙げることでできず大変申し訳ありませんが、あらためて心から御礼申し上げます。本当にありがとうございます。

これまでの研究のいくつかについて、通常の原著論文では書かない思考過程を含めてその概略を述べさせていただきました。何かの参考にしていただければ望外の喜びです。なお、以下の引用文献についてはそれぞれのトピックの原著および関連総説のみを挙げています。大変恐縮ですが、実験の詳細等については各原著中の引用文献をご参照ください。

最後までお読みいただきありがとうございます。皆様の益々のご発展を祈念しております。

【引用文献】

- 1) Kenichi Akaji, Tadashi Tatsumi, Makoto Yoshida, Toru Kimura, Yoichi Fujiwara, Yoshiaki Kiso. Disulfide bond formation using the silyl chloride-sulfoxide system for the synthesis of a cystine peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4137–4143.
- 2) Kenichi Akaji. Disulfide bond formation using silyl chloride-sulfoxide system. *Reviews on Heteroatom Chemistry.* **1997**, 16, 85–100.
- 3) Kenichi Akaji, Kenji Fujino, Tadashi Tatsumi, Yoshiaki Kiso. Total synthesis of human insulin by regioselective disulfide formation using the silyl chloride-sulfoxide method. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11384–11392.
- 4) Kenichi Akaji, Yoshiaki Kiso. Synthesis of cytine peptides. In: Goodman M, editor. *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Houben-Weyl. **2003**, Vol. E22, p 101–141.
- 5) Kenichi Akaji, Naohiro Kuriyama, Yoshiaki Kiso. Convergent synthesis of (-)-Mirabazone C using a chloroimidazolidium coupling reagent, CIP. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3350–3357.
- 6) Kenichi Akaji, Yuzo Hayashi, Yoshiaki Kiso, Naohiro Kuriyama. Convergent synthesis of Dolastatin 15 by solid phase coupling of an N-methylamino acid. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 405–411.
- 7) Kenichi Akaji, Kenita Teruya, Saburo Aimoto. Solid phase synthesis of HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxyethylamine dipeptide isostere. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 4755–4763.
- 8) Kenichi Akaji, Hiroyuki Konno, Hiroshi Mitsui, Kenta Teruya, Yasuhiro Shimamoto, Yasunao Hattori, Kenji Ozaki, Masami Kusunoki, Akira Sanjoh. Structure-based Design, Synthesis, and Evaluation of Peptide-mimetic SARS 3CL Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 7962–7937.
- 9) Yasuhiro Shimamoto, Yasunao Hattori, Kazuya Kobayashi, Kenta Teruya, Akira Sanjoh, Atsushi Nakagawa, Eiki Yamashita, Kenichi Akaji. Fused-ring structure of decahydroisoquinolin as a novel scaffold for SARS 3CL protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 876–890.
- 10) Kenichi Akaji. Advances in the design of ligands interacting with 3CL protease of novel coronaviruses

causing infectious respiratory syndrome. Royal Society of Chemistry SPR Amino Acids, Peptides and Proteins.

2018, Volume 42, p 229–280.

Department of Medicinal Chemistry at 1990s and 2010s

Kenichi Akaji

Department of Medicinal Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

I have been at Department of Medicinal Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, during 1990s as an associate Professor, and during 2010s as a Professor. In these days, an educational system of Pharmaceutical Sciences has been changed largely from 4-years system to 6-years system as in Medical School. Educational circumstances at Kyoto Pharmaceutical University were also drastically changed in these years. In this short review, my research activities regarding specific topics in the transforming age will be discussed.

Keywords: peptide, amino acid, organic synthesis, protein chemistry, inhibitor