

氏名 (生年月日) **吉澤 慎一郎** (1990年1月25日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第194号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 オクタヒドロイソクロメン構造を核とする SARS 3CL^{pro} プロテアーゼ阻害剤の設計と合成

論文審査委員 (主査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 古田 巧

(副査) 教授 山下 正行

論文内容の要旨

序章

重症急性呼吸器症候群 (SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome) は 2002 年に中国広東省で発生し、8000 を超える症例と約 800 人の死者を出した新興の呼吸器症候群である。感染原因ウイルスは新種の SARS コロナウイルスであり、その増殖にはウイルスが発現する SARS 3CL^{pro} (SARS chymotrypsin-like protease) が必須である。SARS 3CL^{pro} はキモトリプシン様の構造を持つシステインプロテアーゼで、ウイルス複製に必要な RNA レプリカーゼなどのプロセッシングを担う酵素である。このため、SARS 3CL^{pro} 阻害剤は有望な治療薬候補と考えられているが、いまだ SARS 治療薬は開発されていない。本研究では、疎水性オクタヒドロイソクロメン骨格を核とする縮環型化合物が新規 SARS 3CL^{pro} 阻害剤となり得ることを明らかにするとともに、その立体構造と阻害活性との相関について検討した。

第1章 オクタヒドロイソクロメン型 SARS 3CL^{pro} プロテアーゼ阻害剤の評価

先行研究により、SARS 3CL^{pro} の基質配列を基にしたペプチド型阻害剤 **1** (IC₅₀=98 nM) とプロテアーゼとの複合体X線構造解析に基づいたデカヒドロイソキノリン型阻害剤 **2** が報告されている (図1)。

S₂ ポケットでの疎水性相互作用に着目したデカヒドロイソキノリン型阻害剤 **2** は中程度の阻害活性 (IC₅₀=63 μM) を示したものの、ペプチド型阻害剤 **1** と比較すると阻害活

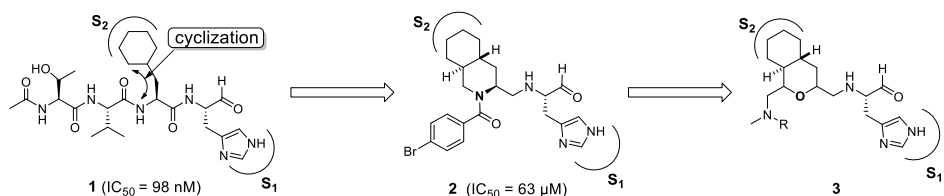


図1

性が低下していた。阻害剤 **2** とプロテアーゼとの X 線複合体結晶解析から、阻害剤 **2** のブロモフェニル基がプロテアーゼとの相互作用に関与していないことが活性低下の要因の一つと推定された。そこで本研究では、デカヒドロイソキノリン骨格とは異なる位置での置換基導入が可能な疎水性縮環構造であるオクタヒドロイソクロメン骨格に着目し、新規縮環型阻害剤 **3** の有用性を検討することとした。酸素原子を含むオクタヒドロイソクロメン構造の不斉構築には、Sharpless-香月不斉エポキシ化反応および Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応を用いることとした。また、同縮環構造の 1 位を新規相互作用部位に選び、その置換基効果を評価することとした。

オクタヒドロイソクロメン骨格の構築と阻害剤合成経路を図2に示す。市販の化合物4の一級水酸基をアリルアルコールに変換した後、Sharpless-香月不斉エポキシ化反応によりエポキシ体5を立体選択的に合成した。化合物5を(DHQ)₂AQN配位子を用いるSharpless不斉ジヒドロキシ化反応に付し、化合物6を合成した。予想に反し十分な立体選

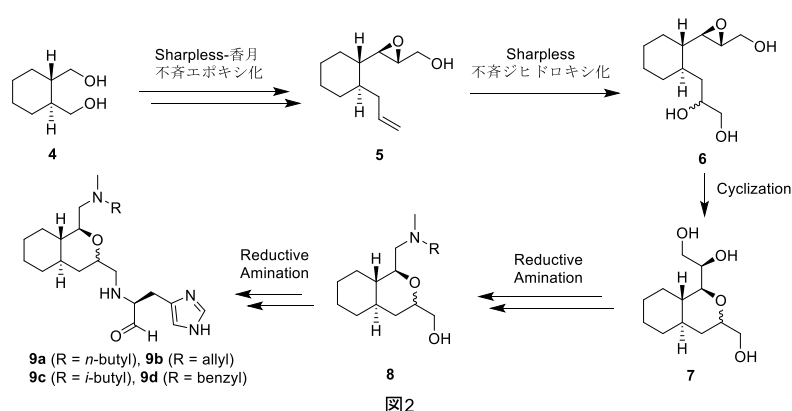


図2

択性が得られなかったが(選択比=6:4)、オクタヒドロイソクロメン骨格の有用性を確認するため両ジアステレオマーについて阻害剤候補化合物へと変換した。酸によるエポキシ開環反応によりオクタヒドロイソクロメン骨格7を形成し、1,2ジールの酸化的開裂と還元的アミノ化反応によって縮環骨格1位に種々の含窒素置換基を導入した。最後に、別途合成したヒスチジン誘導体を還元的アミノ化反応で導入することで化合物9a-dの合成に成功した。

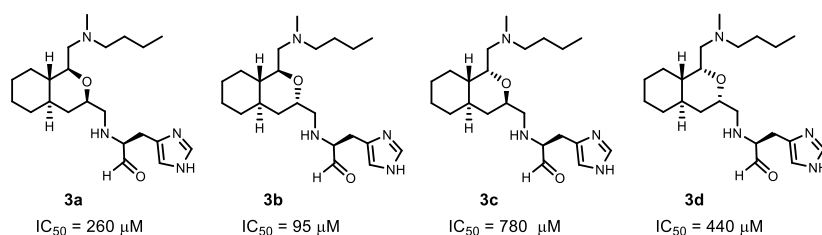
ついで、得られた化合物9a-dのSARS 3CL^{pro}阻害活性を評価した。その結果、9cを除く3種の化合物に明らかな阻害活性が認められた。このことから、新たに設計したオクタヒドロイソクロメン骨格が阻害剤中心構造と成り得ることが確認できた。さらに、R部位に*n*-ブチル基を導入した化合物が比較的良い阻害活性を示す一方で、アリル基やベンジル基では弱い活性に留まることが明らかになった。このことから、オクタヒドロイソクロメン骨格1位の置換基がプロテアーゼと何らかの相互作用を示すことが強く示唆された。

第2章 オクタヒドロイソクロメン骨格の立体構造と阻害活性

第1章での検討に基づき、オクタヒドロイソクロメン骨格の立体化学と阻害活性との相関について検討することを目的として立体選択的なオクタヒドロイソクロメン型阻害剤の合成を行った。まず、第1章で問題となったSharpless不斉ジヒドロキシ化反応における選択性向上について検討した。同じジヒドロキシ化反応に用いる配位子を検討した結果、①第1章で用いた(DHQ)₂AQNに変えて(DHQ)₂PHALまたは(DHQ)₂Pyrを用いると選択性が向上(6~7:1)すること、②(DHQ)₂PHALまたは(DHQ)₂Pyrを用いると選択性が完全に逆転すること、を明らかにした。選択性向上により、環化体7のジアステレオマー分離が可能になり、各ジアステレオマーの各種NMRスペクトルよりその絶対立体配置を決定することに成功した。

以上の検討により、Sharpless-香月不斉エポキシ化反応およびSharpless不斉ジヒドロキシ化反応の不斉配位子を組み合わせることで、可能性のあるすべての立体化学を有するオクタヒドロイソクロメン型阻害剤の選択的合成が可能になった。そこで、第1章で最も良い阻害活性を示した*n*-ブチル基をR基として有する阻害剤3a-dを合成し、そのSARS 3CL^{pro}阻害活性を評価した(図3)。その結果、(1*S*,3*S*)の立体化学を有する化合物3bがデカヒドロイソキノリン型阻害剤とほぼ同等の阻害活性を示す一方で、(1*R*,3*R*)の立体化学を有する化合物3cでは約1/8倍に阻害活性が低下することが分かった。

デカヒドロイソキノリン型阻害剤2とSARS 3CL^{pro}との共結晶構造をモデルとして化合物3bおよび3cのドッキングシミュレーションを行ったところ、両化合物とも疎水性縮環部ではデカヒドロイソキノリン型阻害剤と同様の相互作用が想定されるが、プロテアーゼ活性中心に近いイミダゾール環部位での相互作用が大きく異なっていることが強く示唆された。また、オクタヒドロイソクロメン環の立体構造の差異が1位置換基のプロテアーゼに対する相対配置を大きく左右することが推測された。



3a
IC₅₀ = 260 μM

3b
IC₅₀ = 95 μM

3c
IC₅₀ = 780 μM

3d
IC₅₀ = 440 μM

図3

総括

デカヒドロイソキノリン骨格に代わる新規の疎水性部位としてオクタヒドロイソクロメン骨格を有する SARS 3CL^{pro} 阻害剤を設計・評価した。まず、縮環構造構築の鍵反応である Sharpless-香月不斉エポキシ化反応および Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応における不斉配位子を選択することにより、可能性のある全てのジアステレオマーを合成し、その立体構造を決定した。ついで、その阻害活性評価により、① (1*S*,3*S*) 型縮環構造が SARS 3CL^{pro} の活性中心との相互作用において有効であること、②縮環構造部 1 位の置換基が新規相互作用部位として有効であること、を初めて明らかにした。

審査の結果の要旨

《緒言》

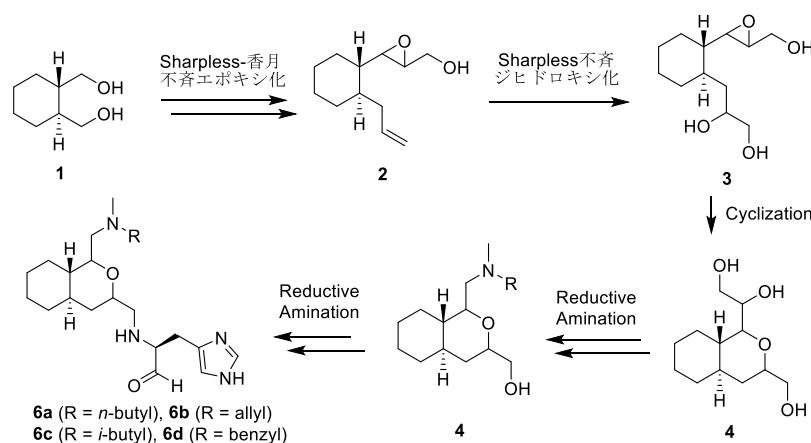
重症急性呼吸器症候群 (SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome) は 2002 年に中国広東省で発生した新興呼吸器症候群である。感染原因ウイルスは新種の SARS コロナウイルスで、その増殖には SARS 3CL^{pro} (SARS chymotrypsin-like protease) が必須である。このため、SARS 3CL^{pro} 阻害剤は有望な治療薬候補であるが、いまだ SARS 治療薬は開発されていない。本研究では、疎水性オクタヒドロイソクロメン骨格を核とする縮環型化合物が新規 SARS 3CL^{pro} 阻害剤となり得ることを明らかにするとともに、その立体構造と阻害活性との相関について検討した。

《審査結果の要旨》

1. オクタヒドロイソクロメン型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の評価

先行研究により、SARS 3CL^{pro} の基質配列を基にしたペプチド型阻害剤から非ペプチド性デカヒドロイソキノリン型阻害剤が開発された。本阻害剤は S₂ ポケットでの疎水性相互作用に基づく中程度の阻害活性を示したものの、ペプチド型阻害剤よりも阻害活性が低下した。本研究では、デカヒドロイソキノリン骨格とは異なる位置での置換基導入が可能な疎水性縮環構造であるオクタヒドロイソクロメン骨格を核とする新規縮環型阻害剤が設計された。酸素原子を含む同縮環骨格の構築には、Sharpless-香月不斉エポキシ化反応および Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応が用いられた。あわせて、同縮環構造の 1 位の置換基効果が評価された。

オクタヒドロイソクロメン型阻害剤は右図に示す経路で合成された。鍵反応である Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応では十分な立体選択性が得られなかったが (選択比=6:4)、両ジアステレオマーについて阻害剤候補化合物へと変換された。合成された化合物には明らかな阻害活性が認め



られ、新規オクタヒドロイソクロメン骨格が阻害剤中心構造と成り得ることが確認された。さらに、R 部位に *n*-ブチル基を導入した化合物が比較的良好な阻害活性を示す一方で、アリル基やベンジル基では弱い活性に留まることが明らかになった。

2. オクタヒドロイソクロメン骨格の立体構造と阻害活性

ついで、オクタヒドロイソクロメン骨格の立体化学と阻害活性との相関について検討することを目的として、立体選択的なオクタヒドロイソクロメン型阻害剤の合成を行った。上記の合成で問題となった Sharpless 不斉ジヒドロキシ化反応に用いる配位子を検討した結果、①(DHQ)₂AQN に変えて(DHQ)₂PHAL または(DHQ)₂Pyr を用いると選択性が向上(6~7:1) すること、②(DHQ)₂PHAL または(DHQ)₂Pyr を用いると選択性が完全に逆転すること、を明らかにした。さらにジヒドロキシ体の絶対立体配置を決定した。

得られた反応条件をもとに、酸素原子がかかわるすべての立体化学を有するオクタヒドロイソクロメン型阻害剤の選択的合成を行い、その SARS 3CL^{pro} 阻害活性を評価した。その結果、(1*S*,3*S*) の立体化学を有する化合物がデカヒドロイソキノリン型阻害剤とほぼ同等の阻害活性を示す一方で、(1*R*,3*R*) の立体化学を有する化合物では約 1/8 倍に阻害活性が低下することを初めて明らかにした。さらに、ドッキングシミュレーションにより、両化合物ではプロテアーゼ活性中心に近いイミダゾール環部位での相互作用が大きく異なっていることを示した。

《結論》

デカヒドロイソキノリン骨格に代わる新規の疎水性部位としてオクタヒドロイソクロメン骨格を有する SARS 3CL^{pro} 阻害剤が SARS 3CL^{pro} の活性中心との相互作用において有効であること、縮環構造部 1 位の置換基が新規相互作用部位として有効であること、を初めて明らかにした。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士(薬学)の学位論文としての価値を有するものと判断する。