

氏 名 (生年月日) シマ モト ヤス ヒロ 嶋 本 康 広 (1986 年 7 月 15 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 科 学)

学 位 記 番 号 博薬科 第3号

学位授与の日付 2015 年 3 月 21 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 デカヒドロイソキノリン骨格を有する非ペプチド型 SARS3CL 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 山 下 正 行

(副査) 教 授 安 井 裕 之

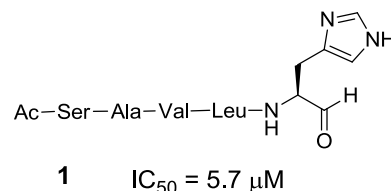
## 論 文 内 容 の 要 旨

### 1. はじめに

SARS (severe acute respiratory syndrome: 重症急性呼吸器症候群) は、2002 年 11 月中国広東省で発生し、8000 を超える症例と約 800 人の死者を出した呼吸器疾患である。発生と同時に発症原因の探索が精力的に行われ、新種のコロナウイルスである SARS-CoV (corona virus) が感染の原因であることが明らかにされた。しかし、未だ治療薬やワクチンはない。

SARS-CoV は一本鎖(+)の RNA を持つコロナウイルスで、その複製に必須となるプロテアーゼ (SARS 3CL<sup>pro</sup>: SARS 3 chymotrypsin like protease) 阻害剤 が有望な抗 SARS 薬として期待されている。申請者の所属研究室ではこれまでに、①野生型 SARS 3CL<sup>pro</sup>が自己分解を起こしやすいこと、②プロテアーゼ 188 位のアルギニンをイソロイシンに置換した変異プロテアーゼ R188I SARS 3CL<sup>pro</sup>がこの自己分解を起こさず、野生型プロテアーゼの約 10<sup>6</sup> 倍の酵素活性を有すること、③このため、蛍光試薬などを用いない汎用型 HPLC を用いた再現性の高い阻害剤評価が可能であること、④自己分解抵抗性 R188I SARS 3CL<sup>pro</sup>の大量調製が可能なため、阻害剤との複合体結晶形成による分子レベルでの相互作用解析が容易になること、などを明らかにしてきた。さらに、これらの成果をもとに、プロテアーゼの基質配列に基づくペプチドアルデヒド型阻害剤 **1** (Ac-Ser-Ala-Val-Leu-His-al; IC<sub>50</sub> = 5.7 μM) とプロテアーゼ相互作用様式が解明された。

本研究ではまず、これまでの研究で得られた基質ペプチド型阻害剤 **1** とプロテアーゼとの相互作用解析に基づく構造最適化を進め、ナノモルレベルの IC<sub>50</sub> 値を持つ低分子ペプチドアルデヒド型阻害剤の開発を行った。ついで、S<sub>2</sub> 部位での疎水性相互作用に着目することによって、これまでに例のないデカヒドロイソキノリン骨格を有する非ペプチド型 SARS 3CL<sup>pro</sup> 阻害剤の設計と合成を行うとともに、そのプロテアーゼ相互作用解析を行った。



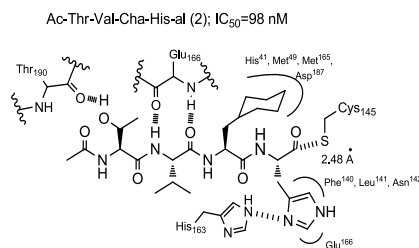
### 2. 低分子ペプチドアルデヒド型阻害剤の設計・合成と R188I SARS 3CL<sup>pro</sup> 相互作用解析

阻害剤 **1** と R188I SARS 3CL<sup>pro</sup> との X 線結晶構造解析の結果から、P<sub>1</sub> ロイシンの側鎖部分は S<sub>2</sub> 部位に密に入っており、これを埋める構造を導入すれば阻害活性の向上が望めると考えた。また、S<sub>4</sub> 部位のアラニン側鎖構造

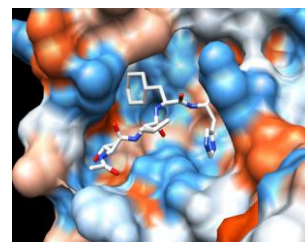
の変換で新たな水素結合の付加が可能ではないかと推測した。さらに、 $S_5$  部にあたるセリンはプロテアーゼ外側に位置していたので除去することができると考えた。これらの方針のもとに構造最適化を行い、阻害剤 **2**

(Ac-Thr-Val-Cha-His-al;  $IC_{50}=98$  nM)

の創製に成功した (右図)。



**2**

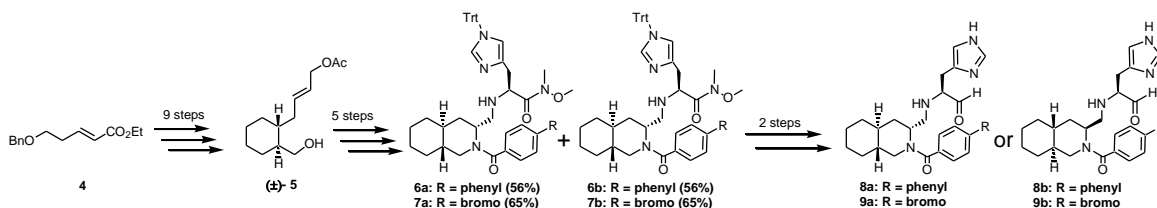
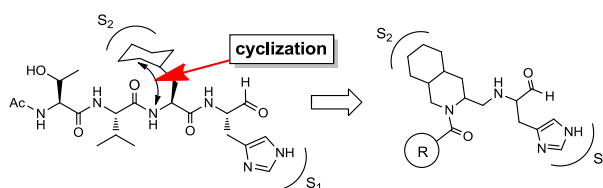


**3**

### 3. 複合体結晶構造解析に基づく新規縮環型阻害剤の設計と合成

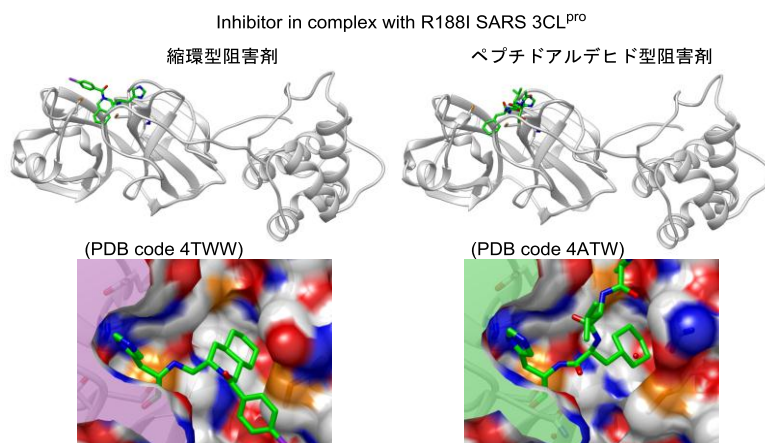
ペプチド型阻害剤の相互作用解析に基づき、デカヒドロイソキノリン骨格を有する非ペプチド型阻害剤の設計を行った。すなわち、 $P_2$  シクロヘキサン環をメチレンリンカーでペプチド主鎖に連結したデカヒドロイソキノリン骨格を基本 scaffold とし、 $P_1$  イ

ミダゾール基と活性中心アルデヒド基の導入とともに新たにアシル置換基を付加した (上図)。まず、既知のエステルを出発原料として、4-フェニルベンゾイル基と 4-ブロモベンゾイル基を側鎖にもつジアステレオマー混合物を得た。ついで、HPLC により分離した各ジアステレオマーから単一の立体化学を持つ目的化合物を合成した (下図)。得られた化合物は中程度ながらも明らかな SARS 3CL<sup>pro</sup> 阻害活性を示したため、次に立体化学の決定と構造活性相関研究を行った。



### 4. 縮環型阻害剤の立体化学とプロテアーゼ相互作用解析

まず、文献法を参考にシクロヘキセンカルボン酸塩の光学分割を行い、得られた化合物の立体化学を既知化合物との比旋光度比較によって推定した。ついで、得られたキラルなシクロヘキセンカルボン酸誘導体を出発原料として、上記と同様の合成経路によって目的化合物を合成した。あわせて、異なるアシル置換基を有する化合物合成を行った。得られた化合物は数十  $\mu$  モルレベルの阻害能を示し、アシル基の構造は活性に大きな影響をおよぼさないことが分かった。一方、縮環構造の立体化学の差異により阻害活性が 1/2 から 1/3 に低下することが明らかになった。



最後に、これら阻害剤と R188I SARS 3CL<sup>pro</sup>との複合体構造解析を行い、①縮環型阻害剤とペプチドアルデヒド型阻害剤ではそのノンプライムサイトでの相互作用様式が大きく異なっていること、②縮環部位の立体化学の変化がアシル基とプロテアーゼとの相互作用様式を大きく左右すること、などを明らかにした（上図）。以上、申請者は本研究によりプロテアーゼ基質配列に基づくペプチドアルデヒド型 SARS 3CL<sup>pro</sup>阻害剤ならびに疎水性相互作用を核とする新規縮環型阻害剤の創製に成功した。

## 審査の結果の要旨

SARS (severe acute respiratory syndrome: 重症急性呼吸器症候群) は、2002 年 11 月中国広東省で発生し、8000 を超える症例と約 800 人の死者を出した呼吸器疾患である。発生と同時に発症原因の探索が精力的に行われ、新種のコロナウイルスである SARS-CoV (corona virus) が感染の原因であることが明らかにされた。しかし、未だ治療薬やワクチンはない。

本研究では SARS ウイルスの増殖に必須となる SARS 3CL プロテアーゼに着目し、まず、既に報告のある基質ペプチド型阻害剤と SARS 3CL プロテアーゼとの相互作用解析に基づく構造最適化によってナノモルレベルの IC<sub>50</sub> 値を持つ低分子ペプチド 11 アルデヒド型阻害剤を開発した。ついで、S<sub>2</sub> 部位での疎水性相互作用を利用し、これまでに例のないデカヒドロイソキノリン骨格を有する非ペプチド型 SARS-3CL<sup>pro</sup>阻害剤の設計と合成を行うとともに、そのプロテアーゼ相互作用解析を行った。

### 1. 低分子ペプチドアルデヒド型阻害剤の設計・合成と SARS-3CL プロテアーゼ相互作用解析

基質型阻害剤と SARS-3CL プロテアーゼとの X 線結晶構造解析の結果から、P<sub>1</sub> ロイシンの側鎖部分が S<sub>2</sub> 部位に密に入っておらずより大きな構造が導入できること、S<sub>4</sub> 部位で新たな水素結合の付加が可能と推測できること、S<sub>5</sub> 部位がプロテアーゼ外側に位置していること、などがわかった。これらの構造解析をもとに最適化を行い、低分子ペプチドアルデヒド型阻害剤 (Ac-Thr-Val-Cha-His-al; IC<sub>50</sub> = 98 nM) の創製に成功した。

### 2. 複合体結晶構造解析に基づく新規縮環型阻害剤の設計と合成

ペプチド型阻害剤の相互作用解析に基づき、デカヒドロイソキノリン骨格を有する非ペプチド型阻害剤の設計を行った。すなわち、P<sub>2</sub> シクロヘキサン環をメチレンリンカーでペプチド主鎖に連結したデカヒドロイソキノリン骨格を基本 scaffold とし、P<sub>1</sub> イミダゾール基と活性中心アルデヒド基の導入とともに新たにアシル置換基を付加した。まず、既知のエステルを出発原料として、4-フェニルベンゾイル基と 4-ブロモベンゾイル基を側鎖にもつジアステレオマー混合物を得た。ついで、HPLC により分離した各ジアステレオマーから単一の立体化学を持つ目的化合物を合成した。得られた化合物は中程度ながらも明らかなプロテアーゼ阻害活性を示したため、次に立体化学の決定と構造活性相関研究を行った。

### 3. 縮環型阻害剤の立体化学とプロテアーゼ相互作用解析

まず、文献法を参考にシクロヘキセンカルボン酸塩の光学分割を行い、得られた化合物の立体化学を既知化合物との比旋光度比較によって推定した。ついで、得られたキラルなシクロヘキセンカルボン酸誘導体を出発原料として、目的化合物を合成した。あわせて、異なるアシル置換基を有する化合物合成を行った。得られた化合物は数十  $\mu$  モルレベルの阻害能を示し、アシル基の構造は活性に大きな影響をおよぼさないことが分かった。一方、縮環構造の立体化学の差異により阻害活性が 1/2 から 1/3 に低下することが明らかになった。

最後に、これら阻害剤と SARS-3CL プロテアーゼとの複合体構造解析を行い、縮環型阻害剤とペプチドアルデ

ヒト型阻害剤ではそのノンプライムサイトでの相互作用様式が大きく異なっていること、縮環部位の立体化学の変化がアシル基とプロテアーゼとの相互作用様式を大きく左右すること、などを明らかにした。

以上、申請者は本研究によりプロテアーゼ基質配列に基づくペプチドアルデヒド型 **SARS** プロテアーゼ阻害剤ならびに疎水性相互作用を核とする新規縮環型阻害剤の創製に成功した。

論文内容の口述発表とそれに対する公開質疑応答および論文内容を主とする関連領域に関する試問の結果より、十分な学識を有することを認める。

以上の結果より、申請者は博士（薬科学）の学位を受けるに必要かつ十分な条件を満たしているものと認定する。