

ヒスチジン残基を標的とした共有結合型ビタミン D 誘導体の創製

医薬分子化学研究室 吉澤 麻美

【緒言】

アスピリンやペニシリンなどに代表される共有結合型医薬品は古くから知られており、様々な疾患の治療薬として臨床応用されている。その多くは偶然の産物であり、共有結合型医薬品の積極的な開発は少ない。理由はタンパク質との非特異的な共有結合形成によって、予期せぬ作用を引き起こす可能性が懸念されているためである。一方、共有結合型化合物には作用持続時間の延長や活性の増強等の利点がある。そのため構造情報に基づいた標的残基の適切な選択と設計により開発された、標的分子に対する高い結合親和性と選択性をもつ共有結合型リガンドは有力な医薬品候補となる可能性がある。筆者はビタミン D 受容体 (VDR) を標的とした共有結合型ビタミン D 誘導体を設計、合成し、生物活性と VDR への共有結合能の評価を行い、医薬品開発に資する共有結合型リガンドの効果的な設計法の一つを提案することを目的とし、本研究を行った。

【結果・考察】

1. VDR のヒスチジン残基と共有結合を形成する求電子性ビタミン D 誘導体の設計と合成

3000 種を超えるビタミン D 誘導体が合成されているが、VDR と共有結合を形成するものは 2 例報告されているのみであり、いずれもシステイン残基を修飾すると考えられている。もしシステイン以外の残基と共有結合を形成するビタミン D 誘導体を創製することが出来れば、共有結合型リガンド設計の選択肢を拡大できると考えた。

活性型ビタミン D₃ である 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25D₃) は、VDR のリガンド結合ポケット上にある 6 つのアミノ酸残基と水素結合を形成する¹。このうち 1,25D₃ の 25 位水酸基は His301 および His393 と水素結合を形成し、VDR の活性発現に寄与する。そこで共有結合修飾の標的として、ヒスチジン残基のイミダゾール基が有する求核性に着目した。ヒスチジン残基は生理学的条件下で利用可能な塩基の 1 つであり、芳香族性に関与しない孤立電子対は求核剤となりうる。そこで求電子剤として、側鎖にエノン基を有するビタミン D 誘導体 **1**, **2** を設計し、合成した。また比較化合物として **3**, **4** を用いた (Figure 1)。

VDR への結合親和性と遺伝子転写活性化能の検討を行った結果、**1**~**4** は VDR への結合親和性とアゴニスト活性を示した。次に ESI-質量分析法を用いた結合実験より VDR への共有結合能を評価したところ、時間依存的に VDR とリガンド間に共有結合が形成されることが示された。またリガンドの側鎖構造の違いにより結合の速さに差が観測され、エノン基を有する **1**, **2** が高い反応性を示した。さらに VDR/リガンド複合体の X 線結晶構造解析から、**1**~**3** のエノン部またはイノン部が His301 と 1,4-共役付加により共有結合を形成していることが明らかになった。

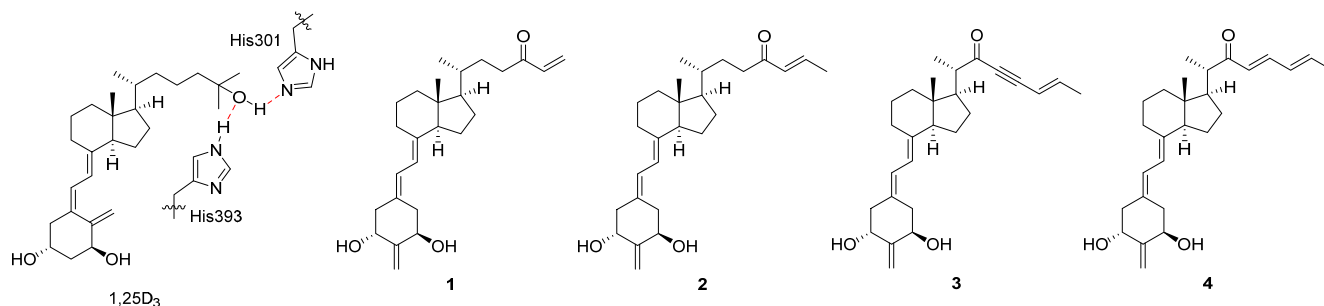


Figure 1. 側鎖にエノン基またはイノン基を有する共有結合型ビタミン D 誘導体 **1**~**4**

2. VDR への共有結合能を有するパーシャルアゴニストおよびアンタゴニストの創製

1~4 はいずれもアゴニスト活性を示したため、申請者は次に共有結合型リガンドの活性制御が可能かどうかを検討した。リガンドの適切な位置にかさ高い置換基を有する共有結合型リガンドを合成することでアゴニスト活性を抑制できると考えた。かさ高い置換基の導入はパーシャルアゴニストやアンタゴニストの設計に用いられるが、共役付加反応には立体的に不利になる可能性がある。そこで VDR との共役付加反応の反応性が高かった **1, 2** を母骨格とし、エノンのβ位にアリアル基を導入したビタミン D 誘導体 **5~12** を設計、合成し、VDR への活性化能および VDR との共有結合性について比較検討を行った (Figure 2)。

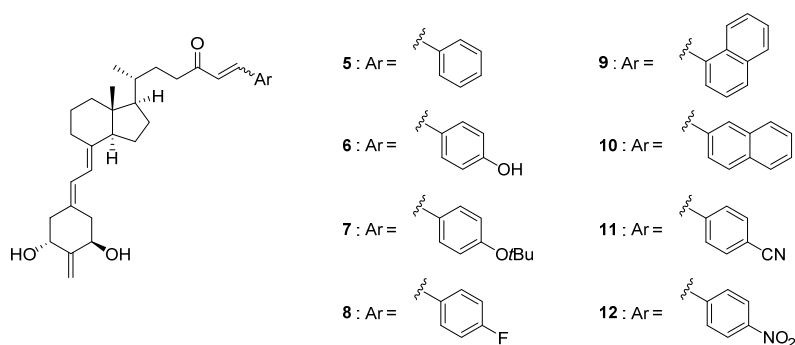


Figure 2. エノンのβ位にアリアル基を導入したビタミン D 誘導体 **5~12**

生物活性評価と ESI-質量分析より、アゴニスト **5**、パーシャルアゴニスト **8, 11, 12**、アンタゴニスト **10** が VDR との共有結合性を有することを明らかにした。期待通り、β位の置換基がかさ高いほどアゴニスト活性が減弱する傾向がみられた。**5, 8** と rVDR-LBD 複合体の X 線結晶構造解析から、His301 が共有結合形成部位であることが示唆された。また、アリアル基とヘリックス 11 上の Leu400 の立体反発が確認されたことから、ヘリックス 11 の不安定化がアゴニスト活性を抑制する機構により、パーシャルアゴニストまたはアンタゴニスト活性を示したと考えられる。またβ位の置換基の違いは VDR との共有結合形成能にも影響を及ぼした。計算化学により反応部位の反応性を予測したところ、一部相関がみられることがわかった。しかし今回合成したシリーズにおいては VDR への親和性の高いリガンドでは、予測された反応性を上回る共有結合形成能を示すことも示唆された。

【結論】

筆者は共有結合性 VDR リガンドを創製し、リガンドの置換基を検討することによって親和性、アゴニスト活性の制御、共有結合能の制御が可能であることを示した。また、これまでタンパク質中のヒスチジン残基と共有結合を形成する化合物の報告はわずかであったが、本研究は共有結合修飾の標的として、ヒスチジン残基の可能性を示すことができた。

【参考文献】

1) Shimizu, M. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6949–6964.

【本研究の誌上発表】

Yoshizawa M., Itoh T., Hori T., Kato A., Anami Y., Yoshimoto N., Yamamoto K. Identification of the Histidine Residue in Vitamin D Receptor That Covalently Binds to Electrophilic Ligands. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6339–6349.