NIH, Jacobson 研究室に 留学して

大野 道博*

My Researches in National Institutes of Health

Michihiro Ohno*

Here I report my projects at Dr. Jacobson's laboratory in National Institutes of Health. Conformationally locked nucleotides, *N*-methanocarba analogs and oxabicyclo[2,2,1] heptane analog, were prepared for hP2Y₁ receptor. The most potent molecule is an *N*-methanocarba *N*⁶-methyl-2-iodo analogue (MRS-2500), which is the most potent antagonist selective for the P2Y₁ receptor yet reported. I also succeeded in identifying the pairs of neoreceptor-neoligand, which are pharmacologically orthogonal with respect to the native species.

Key words: P2Y₁ receptor, carbocyclic locked nucleic acid (c-LNA), methanocarba ribose, MRS-2500, adenosine receptor, neoreceptor

はじめに

私は2002年3月より2004年3月までの2年間、National Institutes of Health (NIH), K. A. Jacobson 研究室に留学する機会を得た。Jacobson 研はアデノシン受容体研究の分野で世界トップの研究室であり、メディシナルケミストリー研究が進められている。ポスドクは常時十数名であり、そのうち有機化学者が6-8名であった。日本人のポスドクは私が2人目とのことであった。Jacobson 研で私が担当したプロジェクトを中心に、NIHでの有機化学研究を体験談の形で紹介したい。

1. NIH とは

私が初めて NIH を訪れたのは2001年11月、Jacobson 先生と面談するためであった。ワシントン DC にあるレーガンナショナル空港に降り立ったとき、ペンタゴンが夕暮れの街明かりに映し出されていた。数カ月前の同時多発テロの傷跡もまだ生々しく、不安と緊張が増したのを記憶している。

NIH は、日本の厚生労働省にあたる Department of Health and Human Service (DHHS) の下にある国立研究機関であり、そのメインキャンパスは首都ワシントン DC の中心部から地下鉄で30分程のメリーランド州ベ

セスダ市に位置する。米国の研究者に対して研究費(グラント)を審査、提供していることで有名である。NIH は政府機関であるものの、その独立性を保った運営が国際的にも高く評価されており、約1万8千人の研究者を中心に米国の生命科学研究をリードする重責を果たしている。

また、NIH での有機化学研究もその歴史は長く、National Cancer Institute (NCI), National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) を中心に続けられている。Jacobson 研究室が所属する NIDDK の Laboratory of Bioorganic Chemistry (LBC) は、B. Witkop 先生、J. W. Daly 先生が中心となって発展させてきた化学系のラボであり、天然物化学、有機化学の研究を行っている。Daly 先生は、NIH シフトの発見で有名な研究者であり、現在も scientist emeritus として研究を続けられている。LBC には常時6-8名のセクションチーフ(教授に相当)が所属しており、現在は K. L. Kirk 先生がラボチーフとして率いている。Jacobson 先生も Kirk 先生も Daly 先生の直弟子であるため、LBC 全体が1つの研究室のような雰囲気であった。

NIH の有機化学研究者は全体で100名程と全研究者数からみるとわずかなので珍しがられる。近年、ポストゲノム研究の方向性が活発に議論されるなか、生体内の情報伝達をコントロールできる低分子化合物を合成する技術をもつ有機化学系研究室に NIH は注目している。Jacobson 研も生理活性化合物を提供できることから、NIH 内外の研究室との活発な交流を行っている。

* 東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室

* Toray Industries, Inc. Pharmaceutical Research Laboratories, Chemical Research Laboratory ( )

初めて NIH を訪れた際、私は大学院時代の論文¹⁾を題材に1時間ほどのセミナーを行ったが、慣れない英語に四苦八苦した。Daly 先生の「英語は下手だが、サイエンスは面白い」という講評が大変印象的であった。Jacobson 研のあるビルディング 8 には日本人が数名しかおらず、日本語はほとんど通じない環境であった。しかし、このセミナーのおかげでどの研究室のメンバーともすぐにうち解けることができた。また、Witkop 先生はお会いするたびに、なんと日本語で話して下さった。NIH の先生方の心遣いのおかげで、新研究生活の滑り出しは順調であった。

2. P2Y₁ 受容体拮抗薬

私は着任と同時に Dr. Hak-Sung Kim (現 Wonkwang University, 韓国) と協力して、リボースの pseudorotational cycle に着目した P2Y₁ 受容体拮抗薬の設計を開始した。この P2Y₁ 受容体拮抗薬は次世代抗血小板薬として期待されるものであった。

フラノース環は、多くのコンホメーションをとりうる。これらすべてのコンホメーションは、図 1 に示す pseudorotational cycle 上の角度 P として表記される²⁾。角度 P は sugar torsion angle ($\nu_0-\nu_4$ から図 1 の中央の式を用いて求められる。便宜的に $P=0^\circ$, $P=90^\circ$, $P=180^\circ$, $P=270^\circ$ のコンホメーションはそれぞれ north-

ern, eastern, southern, western と呼ばれる。

Jacobson 研ではアデノシン-3',5'-ビスホスホン酸が強力な P2Y₁ 受容体拮抗薬となること、P2Y₁ 受容体では northern 型コンホメーションのリガンドと高い親和性を示すことを見出しており、northern 型コンホメーションに固定した *N*-methanocarba 型リボースを用いた 3',5'-ビスホスホン酸誘導体の研究を進めていた。私は、このビスホスホン酸誘導体の P2Y₁ 受容体拮抗作用を最適化する担当となった。

まず、私は *N*-methanocarba リボース-3',5'-ビスホスホン酸エステル 10 を共通合成中間体として定め、すでにストックされていた中間体 8 から合成する条件の最適化を開始した。スキーム 1 に全合成ルートを示す^{3,4)}。とりかかってすぐに問題が発生した。この中間体 8 を 1 人のポスドクが使ってしまい、今後の研究に支障を来したのだ。結局、私は手元にある 10 を用いて合成を進めつつ、中間体 8 の再合成準備を始めることとなった。

N-Methanocarba リボース合成のキーの 1 つは、第 1 工程の不斉ハイドロボレーションである。以前合成を担当したポスドクによるとこの反応が意外に難しく、あるメーカーの最新バッチの試薬を用いないと収率が安定しないことがわかっていて。さらに、その後の合成ステップ数の多さと操作の複雑さから見ても研究の遅れは必至であり、困惑してしまった。

Fig. 1 Pseudorotational cycle and conformationally locked ribose analogs.

Scheme 1 Synthesis of northern-methanocarba ribose bisphosphate.

NIH では研究室間の垣根が低く、研究室の違いや専門の違いを越えた交流が活発に行われている。お互いの研究をプラスの方向へと運んでいこうという共通の思いで、研究者どうしがつながっているようであった。この時もすぐに NCI の Marquez 研から朗報がもたらされた。彼らはスキーム 2 に示す新合成ルートで 17 の合成を達成し、ちょうど発表したところであった⁵⁾。

ラセミ体の *N*-methanocarba リボース 15 を分子内 olefin-ketocarbene cycloaddition を用いて効率的に合成し、リパーゼで光学分割するという合成ルートである。スキーム 1 に比べてはるかに実用的になっていた。Jacobson 先生と相談した結果、やや値が張るのだが委託合成会社に 17 を 2 g 外注することになった。数カ月後、17 は予定どおり送られてきたので、私はスキーム 3 に示す合成ルートを進め、重要中間体 10 を得た⁶⁾。

リボース部分の合成と並行してプリン環の合成法を検討した⁴⁾。活性に影響があると予想されたプリン環の 2 位置換基の変換を可能にする合成ルートが必要であっ

た。しかし、プリン環の難溶性のため使用できる反応に大きな制約があった。そこで、私はプリン環の 9 位をピバロイルオキシメチル基で保護することで有機溶媒への溶解性をあげ、使用できる反応を拡大することにした。合成ルートをスキーム 4 に示す。

まず、ジアゾニウム経由のラジカル反応を使って 2 位にヨウ素を導入した 25 を合成した。次に 25 の 2 位のヨウ素を一旦トリメチルスズに変換し、鈴木らの方法⁷⁾を用いてヨウ化メチルと縮合させることで 2 位にメチル基を導入した。2-メチルアデニン誘導体はこれまで簡便な合成法がなかったのだが、このパラジウム縮合反応が予想以上に効果的だったため、ポスドク達から驚きの声が挙がった。また、25 は、鈴木-宮浦カップリングやパラジウム触媒を用いたシアノ化も 2 位選択的に高収率で進行することがわかった。

合成したプリン誘導体のピバロイルオキシメチル基は、メチルアミン処理またはイソプロパノール中でアルカリ加水分解することで容易に脱保護することができた。

Scheme 2 New synthesis of northern-methanocarba ribose.

Scheme 3 Synthesis of MRS-2500.

Scheme 4 Synthesis of 2-substituted purine derivatives.

以上のようにして得られた各種2位置換プリン誘導体と *N*-methanocarba リボース-3',5'-ビスホスホン酸エステルとを光延反応で縮合、ホスホン酸エステルを脱保護することで、多量の *N*-methanocarba ビスホスホン酸誘導体の合成に成功した。この中から MRS-2500 という世界最強の拮抗薬 ($K_i=0.78 \text{ nM}$) を見出した⁴⁾。スキーム3には MRS-2500 の合成例を示している。MRS-2500 の主薬効は血小板の凝集抑制であり⁶⁾、血小板の活性化に伴う shape change まで抑えることがわかった。私は東レに入社以来、プロスタグランジン I₂ 作動薬を

用いた抗血小板薬の研究に携わっていたので、その感激は人一倍であった。

3. Carbocyclic locked nucleic acid (c-LNA)

MRS-2500 誘導体で用いた *N*-methanocarba 型リボースは、 $P=-18^\circ$ のコンホメーションをとっている (図1)。そこで、 $P=+18^\circ$ のコンホメーションをとる northern-locked carbocyclic 型リボースを設計し、合成することにした。このプロジェクトも Dr. Hak-Sung Kim と協力して進めた^{8,9)}。スキーム5に46(MRS-

Scheme 5 Synthesis of new northern-locked carbocyclic ribose bisphosphate.

2584)の合成を示す。

Norephedrineを用いたエナンチオ選択的エポキシ開裂で不斉点を導入し、オレフィンをジヒドロキシ化して基本となる構造 35 を構築した。保護基の変換を行って 37 に誘導し、1 級水酸基をメシル化後、アセチル基をメタノリシスすることでビシクロ環構築を行った。この時、オキサビシクロ[2,2,1]ヘプタン系となる 38 のみが得られると考えていたが、予想外にもオキセタン環を持つ 39 が副生してきた。また、41 の 2 級水酸基は反応性が乏しく、プリン環との縮合に苦労したが、トリフレートを用いることで解決した。最後に 3',5'-ビスホスホン酸化を行い、目的とする 46 を得た。46 の P2Y₁ 受容体拮抗作用は $K_i=22.5$ nM であり、 $P=+18^\circ$ の Northern コンホメーションをとる c-LNA ビスホスホン酸も P2Y₁ 受容体に強い親和性を持つことがわかった⁸⁾。

4. ネオセプター

前述の *N*-methanocarba リボースが外注となったので、ネオセプターリガンドの設計と合成を新たに担当することになった。ネオセプターとは、ミュータント受容体とそれを選択的な作動薬(ネオリガンド)の組み合わせを用いて、細胞内シグナルを選択的にオンにしようという試みである¹⁰⁾。コンピュータモデリングが研究の中心であり、論文数が稼げないとの理由から化学系のポスト

クには人気がないテーマだった。私は新しい研究をやりたいという思いが強かったので喜んで引き受けた。

この研究のポイントは、いかに天然型受容体に親和性をなくし、ミュータント受容体のみに親和性を出すかという点であった。そこで、アミノ基を持つリガンドはアデノシン受容体への親和性が低下するという一般性に着目した。まず、受容体に hA2A 受容体を選び、モデリング担当のポスドクが、hA2A 受容体-薬物相互作用に関与している 4 つのアミノ酸残基を割り出した。次に分子生物学担当ポスドクが、これらのアミノ酸をそれぞれアスパラギン酸に変換した 4 種のミュータント受容体を調整した。そして私はアデノシンの 5' 位付近にアミノ基を導入したリガンドを設計し、合成を開始した。スキーム 6 に代表的な合成例を示す。

47 は 2',3'-イソプロピリデンアデノシンを三酸化クロムで酸化し、TMS ジアゾメタンでエステル化して合成した。47 のメチルエステルにアミンまたはヒドラジンを反応させて、長さの異なる側鎖をアミド結合で導入した。また、プリン環 6 位置置換基は、Dimroth 転位を用いて導入することで合成期間の短縮を図った。合成したヒドラジド体 49 が変異型 hA2A 受容体(Q89D)に強い親和性を ($K_i=16.4$ nM)を示した。ファンクショナルアッセイの結果、49 が変異型 hA2A 受容体(Q89D)においてフルアゴニスト ($EC_{50}=5.1$ nM)であることがわ

Scheme 6 Synthesis of neoceptor ligands.

かった。天然型 hA 2 A 受容体への親和性は $K_i=2230$ nM と低かった。このように、私はネオセプターの概念に合う変異アデノシン受容体と、その選択的作動薬の組み合わせを見出すことに成功した¹¹⁾。研究を開始した当初はここまで予想どおりになるとは私自身思っていなかった。Jacobson 研究室に蓄積されたりガンドの構造活性相関情報と GPCR ホモロジーモデリング技術のレベルの高さをあらためて認識させられた。

5. MRS-2500 の放射ラベル化

留学期間も半分以上を過ぎた頃、MRS-2500 を放射性同位元素でラベル化する研究を進めた。トリチウム (^3H) ラベル体、ヨウ素 (^{125}I) ラベル体、リン (^{32}P) ラベル体の 3 種をそれぞれ調製する合成法を準備した。リンラベル体の合成ルートを一スキーム 7 に示す。

実際のラベル化作業は共同研究先に移管したが、先方の研究との調整が整わず、半年以上経っても全く進展しなかった。ヨウ素ラベル体とリンラベル体を依頼した研

Scheme 7 Synthesis of ^{32}P -labeled MRS-2500.

研究室からは、担当者の合成技術指導のため私への出張要請までであった。なんと担当の学生は有機合成の経験がほとんどなかったというのだ。しかし、私の帰国時期直前に要請が来たこともあり、どうしても日程を調整できずに帰国の途についた。それから1年半近く経った昨年夏、担当の学生から1通のメールが届いた。リンラベル体の調製に成功したとのことであった¹²⁾。すっかりあきらめていた研究結果が急に戻ってきたことで、Jacobson先生と手を取り合って喜んだ。最終工程が担当者の得意とする酵素反応であったことも幸いしたようであった。

おわりに

今回、私のNIHでの研究の一部を紹介させていただいた。日の目を見なかった試みも多く、お世辞にも研究がスムーズに進んだとは言えなかったが、とにかく即断即決で走り続け、予想もしなかった結果となってしまった2年間であった。観光名所で有名なナイアガラのはらは車で約1日の距離にあったのに、見に行くのをすっかり忘れていたくらい研究に没頭してしまった。このすばらしい研究環境を与えてくださったJacobson先生、NIHの先生方、そして世界各国から集まった仲間達のおかげであると思っている。この場を借りて深く感謝する。また、私の体験談がメディシナルケミストリーを志す若い研究者の皆さんの一助となれば幸いである。最後になったが、私に貴重な2年間の研究機会を与えてくださった東レ株式会社医薬研究所、研究本部に深く感謝する。

(2006年1月10日受理)

文献

- 1) (a) M. Ohno, Y. Endo, M. Hirano, A. Itai, K. Shudo, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 8119 (1993); (b) Y. Endo, M. Ohno, M. Hirano, M. Takeda, A. Itai, K. Shudo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 491 (1994); (c) Y. Endo, M. Ohno, K. Shudo, *Yakugaku Zasshi*, **114**, 464 (1994); (d) Y. Endo, M. Ohno, M. Hirano, T. Fujiwara, A. Sato, Y. Hinuma, K. Shudo, *Biol. Pharm. Bull.*,

- 17, 1147 (1994); (e) Y. Endo, M. Ohno, M. Hirano, M. Takeda, A. Itai, K. Shudo, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1841 (1996)
- 2) C. Altona, M. J. Sundaralingham, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8205 (1972)
- 3) V. E. Marquez, P. Russ, R. Alonso, M. A. Siddiqui, S. Hernandez, C. George, M. C. Nicklaus, F. Dai, H. Ford, Jr., *Helv. Chim. Acta*, **82**, 2119 (1999)
- 4) H.-S. Kim, M. Ohno, B. Xu, H. O. Kim, H. Choi, X. D. Ji, S. Maddileti, V. E. Marquez, T. K. Harden, K. A. Jacobson, *J. Med. Chem.*, **46**, 4974 (2003)
- 5) Y. Yoshimura, H. R. Moon, Y. Choi, V. E. Marquez, *J. Org. Chem.*, **67**, 5938 (2002)
- 6) M. Cattaneo, A. Lecchi, M. Ohno, B. V. Joshi, P. Besada, S. Tchilibon, R. Lombardi, N. Bischofberger, T. K. Harden, K. A. Jacobson, *Biochemical Pharmacology*, **68**, 1995 (2004)
- 7) M. Suzuki, H. Doi, M. Bjorkman, Y. Andersson, B. Langstrom, Y. Watanabe, R. Noyori, *Chem. Eur. J.*, **3**, 2039 (1997)
- 8) M. Ohno, S. Costanzi, H. S. Kim, V. Kempeneers, K. Vastmans, P. Herdewijn, S. Maddileti, Z.-G. Gao, T. K. Harden, K. A. Jacobson, *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 5619 (2004)
- 9) H.-S. Kim, K. A. Jacobson, *Org. Lett.*, **5**, 1665 (2003)
- 10) K. A. Jacobson, Z.-G. Gao, A. Chen, D. Barak, S.-A. Kim, K. Lee, A. Link, P. V. Rompaey, S. van Calenbergh, B. T. Liang, *J. Med. Chem.*, **44**, 4125 (2001)
- 11) K. A. Jacobson, M. Ohno, H. T. Duong, S.-K. Kim, S. Tchilibon, M. Cesnek, A. Holy, Z.-G. Gao, *Chemistry and Biology*, **12**, 237 (2005)
- 12) D. Houston, M. Ohno, R. A. Nicholas, K. A. Jacobson, T. K. Harden, *British J. Pharmacol.*, in press

PROFILE

大野道博 東レ株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室・研究員 薬学博士

〔経歴〕1989年東京大学薬学部薬学科卒業、1994年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、同年、東レ株式会社基礎研究所に入社。主にプロスタグランジン関連の創薬研究を行う。2002年3月より2004年3月まで米国NIHに留学。2005年7月より組織改正により現職。〔専門〕創薬化学、有機合成化学。〔連絡先〕e-mail: [REDACTED]