



Title	システインおよびリンプロテインゼインヒビター開発に関する化学的研究
Author(s)	齊藤, 雅之
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37743
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	さい とう まさ ゆき 齊 藤 雅 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 0 0 7 1 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	システインおよびセリンプロテイナーゼインヒビター開発に関する 化学的研究
論文審査委員	(主査) 教 授 北川 勲 (副査) 教 授 今西 武 教 授 岩田 宙造 教授 富田 研一

論 文 内 容 の 要 旨

代表的なシステインプロテイナーゼである calpain は動物の各種組織細胞中に広く存在し、生理的および病理的に重要な役割を担っていると考えられている。そして、calpain の生体内での役割を解明するために特異的なインヒビターの開発が望まれている。これまでに低分子プロテイナーゼインヒビターが主に放線菌培養液から単離されているが、特異性の面で満足できるものではなかった。そこで筆者は、calpain に対して特異性の高い新規システインプロテイナーゼインヒビターを開発する目的で、特殊環境に生存する微生物の培養液からインヒビターの単離・精製を行うとともに、天然物由来のインヒビターをリード化合物として、より低分子で特異性の高いインヒビターの合成検討を行った。

新種のブドウ状球菌 (*Staphylococcus tanabeensis*) 培養液を各種カラムを用いて精製し、staccopin P1 (1), P2 (2) を単離した。そして、各種呈色反応、アミノ酸分析、¹H NMR およびマスマスペクトル等の結果から、その化学構造をそれぞれ H-(Val)₄-Phe-H (1), H-(Val)₄-Tyr-H (2) と決定した。1, 2 は papain, calpain を特異的に阻害し、*Staphylococcus* 属から最初に単離されたシステインプロテイナーゼインヒビターであるが、calpain に対する特異性は見られなかった。

そこで、calpain の基質特異性と天然物由来のインヒビターの構造を基にしてトリペプチド誘導体を合成し、acetyl-L-Leu-L-Leu-L-Met-H (3), acetyl-L-Leu-L-Leu-L-Nle-H (4) を得た。3, 4 と天然物由来インヒビターの papain, calpain に対する阻害活性の比較から、calpain に対しては L-Leu を P₂ サイトに持つインヒビターが強い阻害活性を示すことを明らかにした。次にトリペプチド誘導体よりもさらに低分子で特異性の高いインヒビターを得る目的で、P₂ サイトに L-Leu を導入したジペプチド誘導体を合成した。その結果、阻害活性がさらに向上し、特に、benzyloxycarbonyl-L-Leu-Nle-H (5)

は新たに細胞膜透過性を有し、血小板細胞内の calpain を特異的に阻害した。5 は calpain の *in vivo* での作用を解析し、その生理的役割を明らかにするために大変有用なインヒビターである。トリペプチドおよびジペプチド誘導体は calpain のみならず、cathepsin B, L も強く阻害し、特に P₃ サイトに L-Leu を持つトリペプチド誘導体は calpain よりも cathepsin L を強く阻害した。システインプロテイナーゼインヒビター合成研究の結果、インヒビターの阻害活性および特異性の発現には P₁, P₂, P₃ の 3 個のサブサイトが必要であり P₃ サイトの変換によって細胞膜透過性を有するインヒビターの合成が可能であることが明らかになった。

このようにして得られた知見をプロリルエンドペプチダーゼインヒビターの合成研究に応用した。セリンプロテイナーゼであるプロリルエンドペプチダーゼは脳や肝臓などで活性が高く、学習・記憶の固定と改善に関与すると考えられている TRH, vasopressin 等の生理活性ペプチドをプロリンのカルボキシル基側で切断することが知られている。したがって、この酵素に特異的なインヒビターによるこれらのペプチドの分解抑制ならびに作用の増強が考えられる。このような仮説を基に合成された各種プロリン誘導体が強い酵素阻害活性を示し、動物の実験的健忘症を予防することが明らかにされている。これは、プロリルエンドペプチダーゼインヒビターの抗健忘症薬としての可能性を示唆するものである。そこで著者は、高活性な新規プロリルエンドペプチダーゼインヒビターを合成し、その阻害活性、動物実験による抗健忘症作用を検討した。

まずこの酵素が L-Pro に特異的であることから、P₁, P₂, P₃ の 3 個のサブサイトから成るプロリナル誘導体を合成した。P₃ サイトのアリルアルキルアシル基を持つインヒビターは微生物および牛脳酵素を強く阻害し、アルキルアシル基を同じサイトに持つインヒビターは微生物酵素を強く阻害した。P₂ サイトに L-Pro を持つインヒビターが、同じ部位に他のアミノ酸を持つインヒビターよりも微生物酵素に対して強い阻害活性を示し、L-Val を P₂ サイトに持つインヒビターは牛脳酵素に対して強い阻害活性を示した。酵素阻害活性の強いインヒビターは腹腔内投与でラットに対して抗健忘症作用を示し、用量作用曲線が逆 U 字型になった。

プロリナル誘導体よりも安定なインヒビターを開発するために、P₁ サイトに各種アミンを導入したアミド体について合成検討を行った結果、ピロリジンおよびチアゾリジンアミド誘導体が強い酵素阻害活性および抗健忘症活性を示した。ピロリジンアミド誘導体において、P₃ サイトにアリルアルキルアシル基を持つインヒビターは微生物および牛脳酵素を強く阻害した。N を含む 5 員環をその構造中に含むアミノ酸 (L-Pro, L-Hyp, L-Thp) を P₂ サイトに持つインヒビターが強い阻害活性を示した。ピロリジンアミド誘導体のサブサイト特異性を基に合成した P₂ サイトに L-Pro, L-Hyp, L-Thp を持つチアゾリジンアミド誘導体は、強い酵素阻害活性および抗健忘症作用 (経口投与) を示した。

これらプロリルエンドペプチダーゼインヒビターの示す抗健忘症作用のメカニズムは現在のところ不明ではあるが、脳内酵素の阻害による vasopressin 等の記憶関連ペプチドの分解抑制が原因の一つとして考えられる。

論文審査の結果の要旨

プロティナーゼインヒビターには、薬理活性を示すものがあって、疾病治療への応用が期待される。本論文では、1) シスチンプロティナーゼおよび 2) セリンプロティナーゼの一つプロリルエンドペプチダーゼに対するインヒビターを、構造活性相関の視点から詳細に検討している。その結果、両インヒビターの阻害活性発現に必要なペプチド構造要因を明らかにし、強い酵素阻害活性と抗健忘症作用を示す数種の新しい化合物の合成に成功している。

以上の成果は、博士（薬学）の学位請求論文として充分価値あるものと認められる。