

## 13. リシン脱アセチル化酵素阻害剤の創製研究

鈴木 孝禎

Key words : リシン脱アセチル化酵素, SIRT2, 阻害剤,  
クリックケミストリー, 治療薬

京都府立医科大学 大学院医学研究科  
医薬品化学

### 緒言

リシン脱アセチル化酵素 (KDAC) によるタンパク質リシン残基の脱アセチル化は、遺伝子発現を制御する重要なレギュレーターであることが知られている。KDAC ファミリーの ClassIII に属する Sirtuin は、NAD<sup>+</sup>を補酵素としてテロメア領域のヒストンタンパク質や、非ヒストンタンパク質である様々なタンパク質の脱アセチル化反応を行うことが知られている。ヒトでは7種類の Sirtuin (SIRT1-7) が知られているが、最近、ヒト Sirtuin の一つである SIRT2 が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病のような神経変性疾患やがんに関与することが分かった。したがって、SIRT2 阻害薬は、抗がん剤や抗神経変性疾患薬などの治療薬として期待されている。そこで本研究では、抗がん剤および抗神経変性疾患薬の開発を目指した新規 SIRT2 阻害薬の創製研究を行った。その結果、クリックケミストリーの手法を用いることで、短時間で高活性かつ高選択的な SIRT2 阻害薬を見出すことに成功したので、報告する。

### 方法、結果および考察

これまでの研究により、我々の研究グループは SIRT1 阻害薬 **1** をリードとした構造活性相関研究を行い、SIRT2 選択的阻害薬 **2**, **3** を見出している (Fig. 1) <sup>1)</sup>。今回、これまでの知見をもとに、より高活性かつ選択的な SIRT2 阻害薬を探索するべく、クリックケミストリーを利用した SIRT 阻害薬用フォーカスライブラリーの構築を行った。

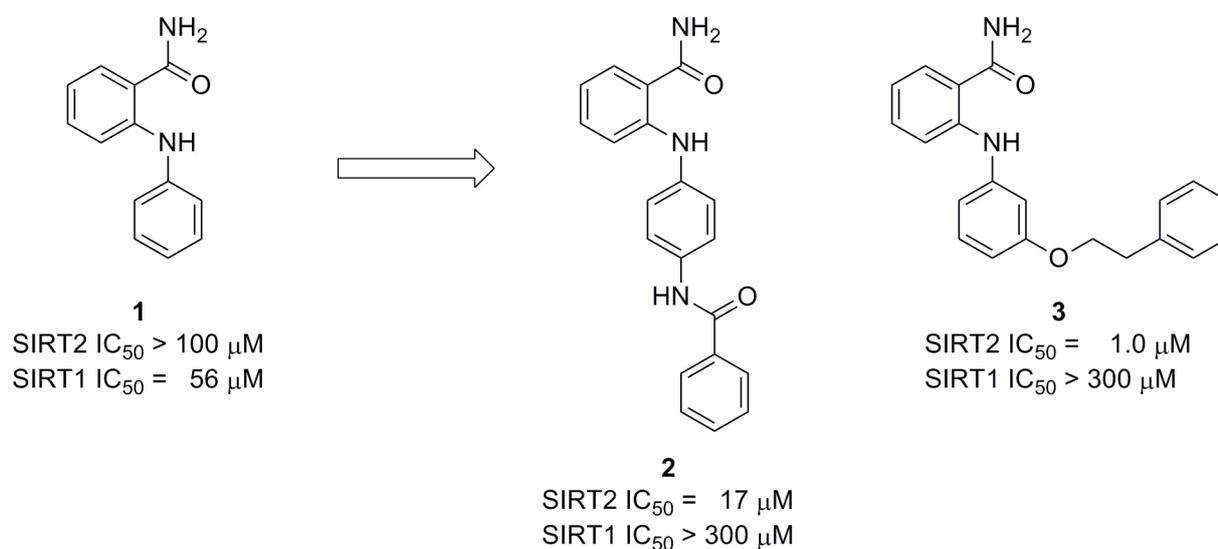


Fig. 1. 2-Anilinobenzamide-based SIRT2-selective inhibitors.

SIRT2-selective inhibitors **2** and **3** were discovered based on the structure of SIRT1 inhibitor **1**.

まず、2-アニリノベンズアミド構造を基に、ベンゼン環のパラ位またはメタ位にトリアゾール構造を持つ SIRT2 選択的阻害薬候補化合物 **AB** を設計した (Fig. 2).

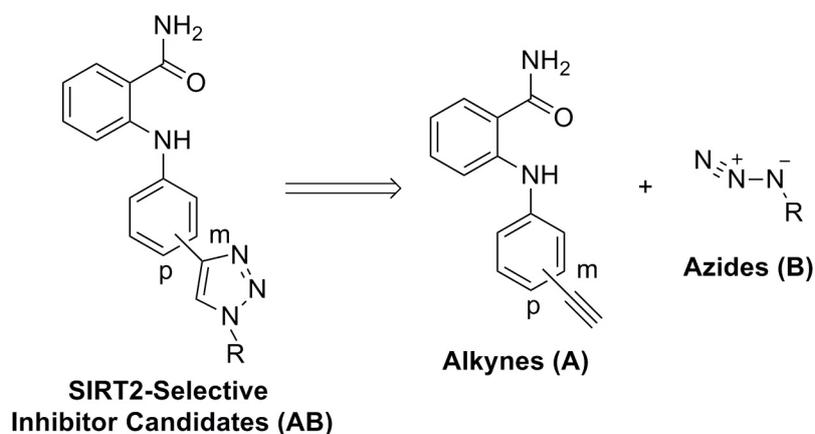


Fig. 2. Design of triazole-containing SIRT2-selective inhibitors.

SIRT2 inhibitor candidates **AB** containing a triazole structure can be synthesized by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (a representative reaction in click chemistry) between alkynes **A** and azides **B**.

具体的には、2-アニリノベンズアミド構造有するアルキン **A** 2種と SIRT2 の疎水性ポケットに収まることを期待したアジド **B** 57種を設計、合成した (Fig. 3)<sup>24</sup>.

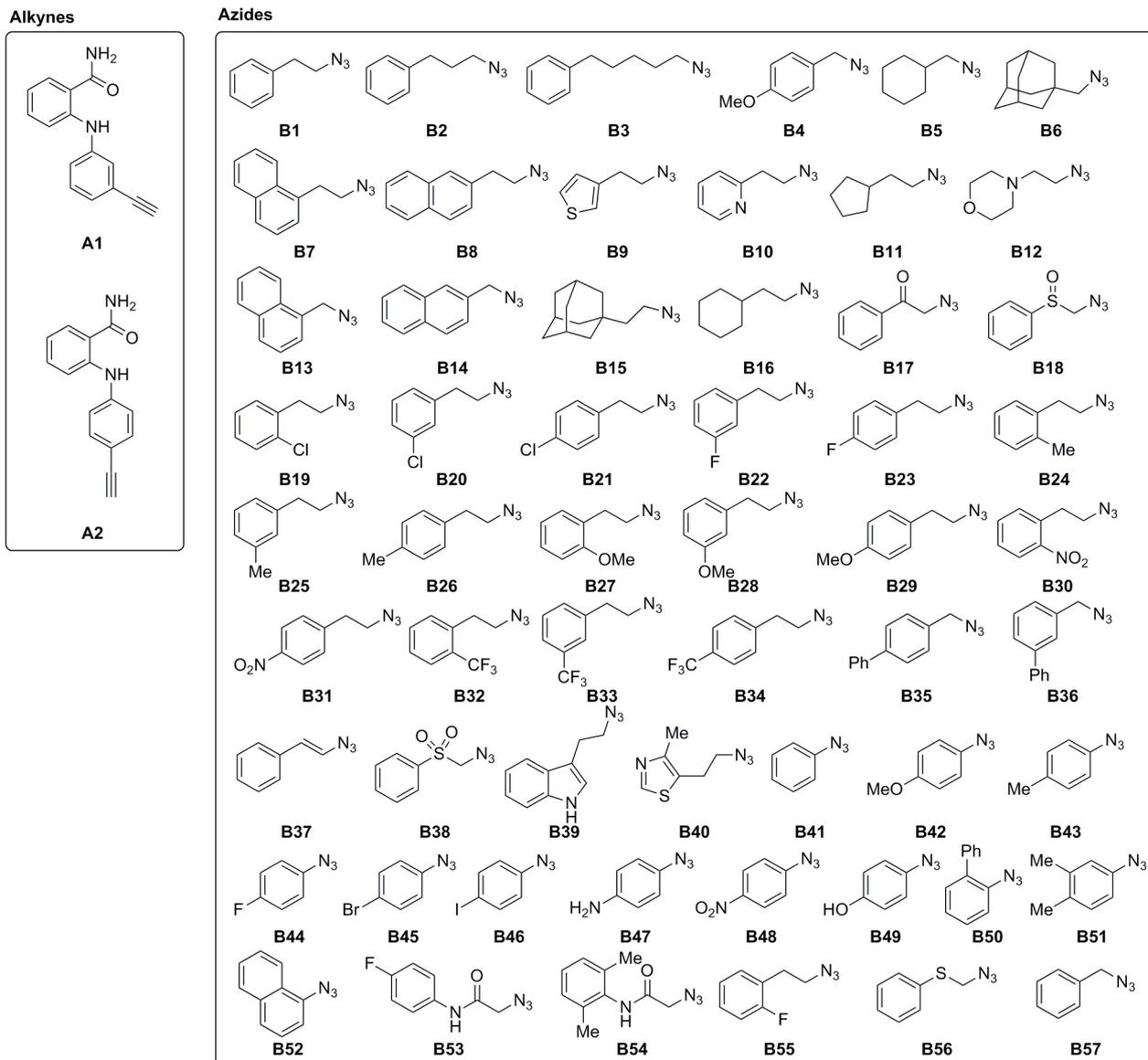


Fig. 3. Structures of alkynes **A** and azides **B** used for this study.

We designed and synthesized 2-anilinobenzamide (SIRT2 inhibitor pharmacophore)-containing alkynes **A** and azides **B** which can interact with the hydrophobic amino acid residues of SIRT2.

つぎに、マイクロプレート上で銅触媒存在下、アルキン **A** とアジド **B** をクリックケミストリーにより連結させ、114 個の SIRT 阻害薬用フォーカスライブラリー **AB** を構築した。アルキンとアジドの消失とトリアゾール **AB** の生成は、TLC および LCMS により確認した。クリックケミストリー反応の高い収率から、引き続き、単離、精製することなく直接 SIRT 蛍光アッセイを行った (Fig. 4).

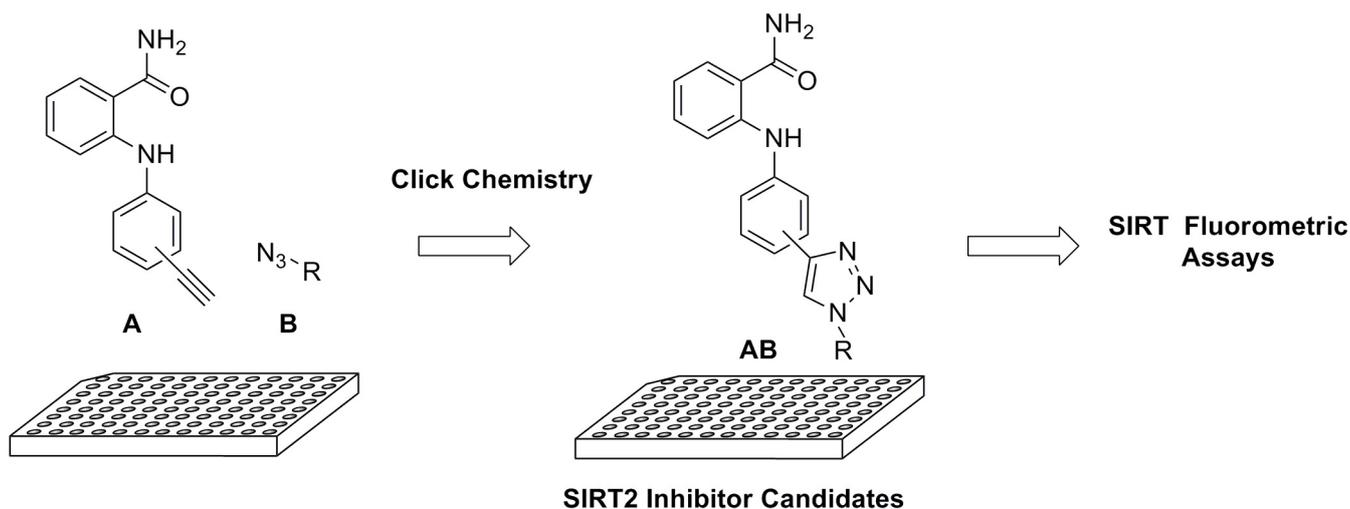


Fig. 4. Construction of a focused library for SIRT inhibitors by using click chemistry.

Copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions between alkynes **A** and azides **B** were performed in a microtiter plate. These reactions proceeded quantitatively.

トリアゾール **AB**10  $\mu$ M の SIRT2 阻害活性を SIRT 蛍光アッセイにより評価した結果, 化合物 **A1B11** および **A2B57** が既知の SIRT2 選択的阻害薬である **AGK2** と同等の SIRT2 阻害活性を示した (Fig. 5).

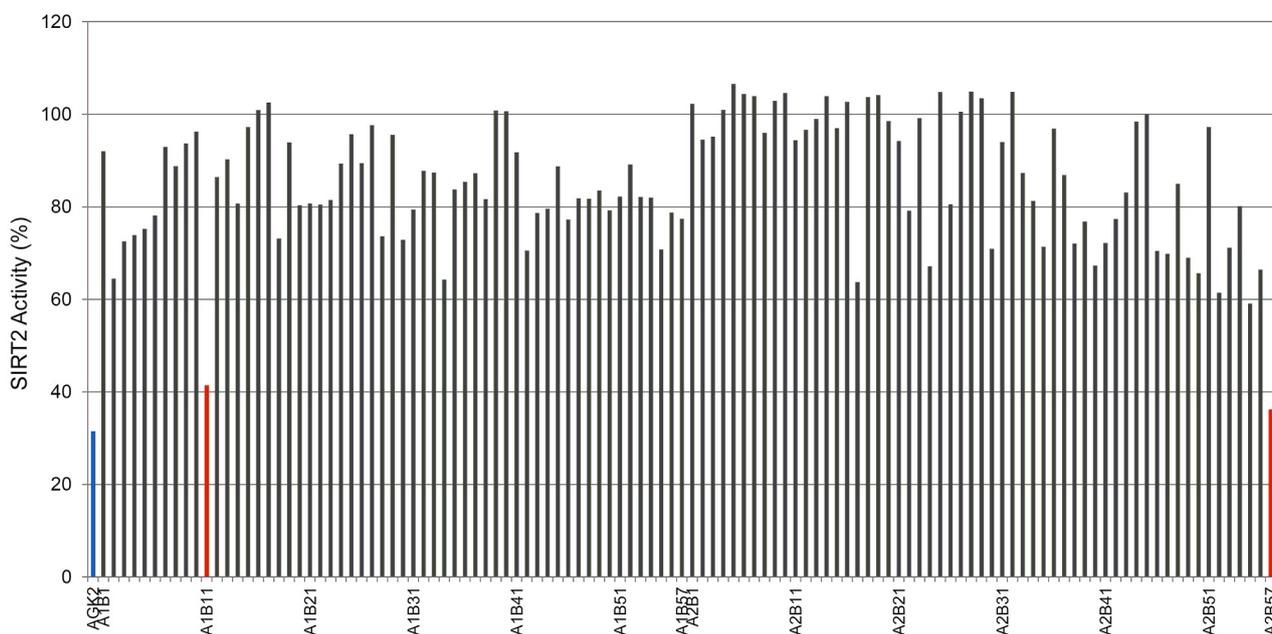


Fig. 5. Activity of SIRT2 in the presence of 114 2-anilinobenzamides (10  $\mu$ M).

Compounds **A1B11** and **A2B57** (red bars) inhibited SIRT2 by about 60% at 10  $\mu$ M.

マイクロプレート中の化合物 **A1B11** と **A2B57** は, crude 体である. そこで, きちんと精製した化合物 **A1B11** と **A2B57** の SIRT2 阻害活性の確認および SIRT2 選択性を調べるため, 化合物 **A1B11** と **A2B57** を別途合成した. 合成は, Fig. 6 にしたがって, クリック反応を用いて行った. 合成した **A1B11** と **A2B57** は, 再結晶により精製し, SIRT 阻害活性評価に用いた.

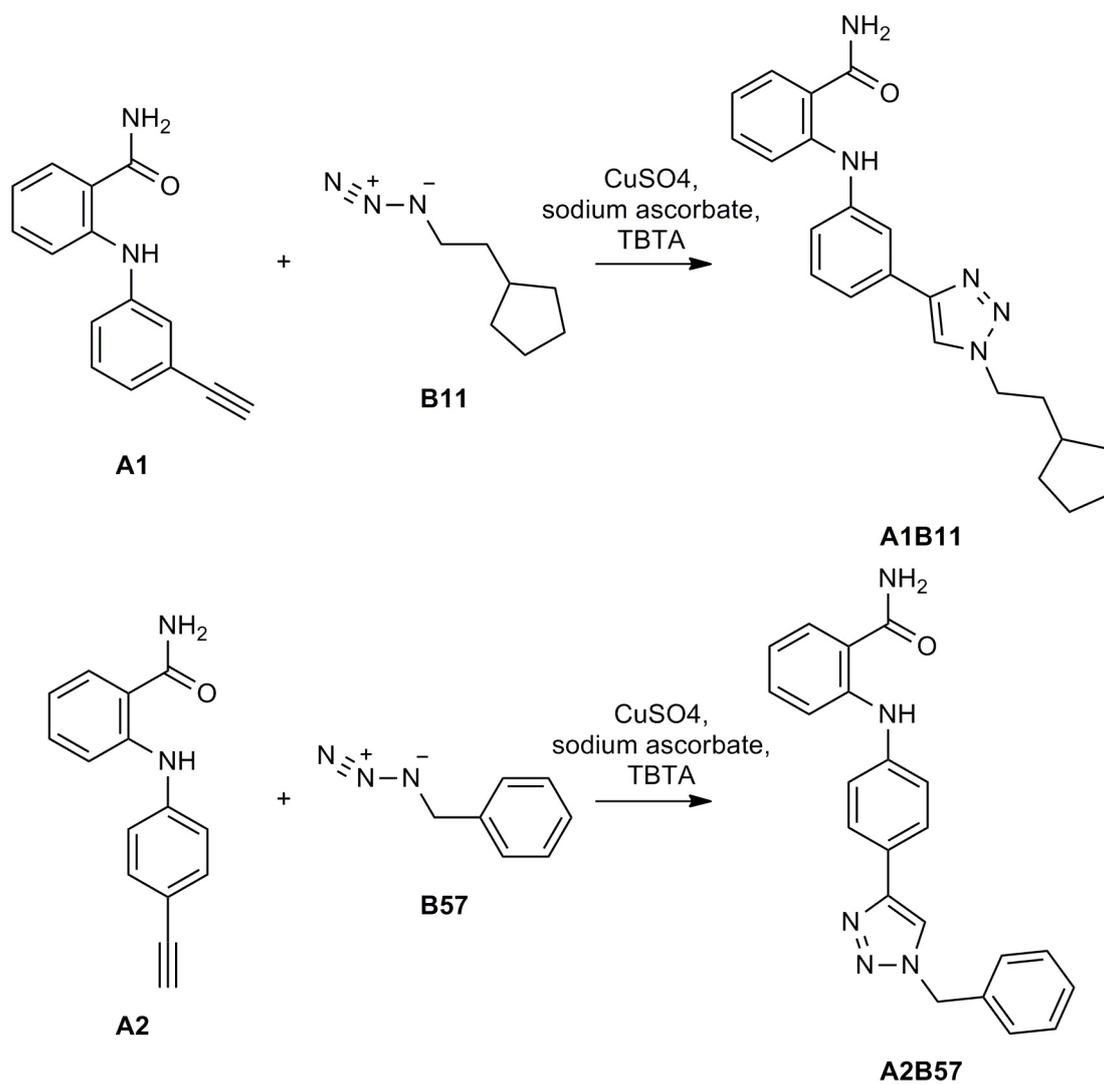


Fig. 6. Synthesis of **A1B11** and **A2B57**.

Compounds **A1B11** and **A2B57** were synthesized by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.

化合物 **A1B11** および **A2B57** の SIRT 阻害活性評価を行った結果、化合物 **A1B11** と **A2B57** は、**AGK2** に匹敵する SIRT2 阻害活性を示した (Table 1)。また、両化合物とも  $100 \mu\text{M}$  においても SIRT1 と SIRT3 を全く阻害せず、SIRT2 選択性が著しく高いことが分かった。以上の結果から、化合物 **A1B11** と **A2B57** は、高活性かつ高選択的な SIRT2 阻害薬であることが分かった。

Table 1. SIRT1, SIRT2 and SIRT3-inhibitory activities of **AGK2**, **A1B11** and **A2B57**

compound	IC <sub>50</sub> (μM)		
	SIRT2	SIRT1	SIRT3
<b>AGK2</b>	3.5	30	91
<b>A1B11</b>	5.3	>100	>100
<b>A2B57</b>	6.3	>100	>100

Compounds **A1B11** and **A2B57** showed potent SIRT2-inhibitory activity and high SIRT2-selectivity.

以上のように、クリックケミストリーの手法を用いて、効率的に SIRT2 選択的阻害薬 **A1B11**, **A2B57** を見出した<sup>5)</sup>。今後、化合物 **A1B11** と **A2B57** をリード構造とした更なる展開により、新規抗がん剤、神経変性疾患治療薬の開発を目指したい。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、京都府立医科大学大学院医学研究科医薬品化学研究室の伊藤幸裕講師、太田庸介大学院生である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Suzuki, T., Khan, M. N. A., Sawada, H., Imai, E., Itoh, Y., Yamatsuta, K., Tokuda, N., Takeuchi, J., Seko, T., Nakagawa, H. & Miyata, N. : Design, synthesis, and biological activity of a novel series of human sirtuin 2-selective inhibitors. *J. Med. Chem.*, **55** : 5760-5773, 2012.
- 2) Suzuki, T., Ota, Y., Kasuya, Y., Mutsuga, M., Kawamura, Y., Tsumoto, H., Nakagawa, H., Finn, M. G. & Miyata, N. : An unexpected example of protein-templated click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49** : 6817-6820, 2010.
- 3) Suzuki, T., Ota, Y., Ri, M., Bando, M., Gotoh, A., Itoh, Y., Tsumoto, H., Tatum, P. R., Mizukami, T., Nakagawa, H., Iida, S., Ueda, R., Shirahige, K. & Miyata, N. : Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries. *J. Med. Chem.*, **55** : 9562-9575, 2012.
- 4) Suzuki, T., Kasuya, Y., Itoh, Y., Ota, Y., Zhan, P., Asamitsu, K., Nakagawa, H., Okamoto, T. & Miyata, N. : Identification of highly selective and potent histone deacetylase 3 inhibitors using click chemistry-based combinatorial fragment assembly. *PLoS ONE*, **8** : e68669, 2013.
- 5) Tatum, P. R., Sawada, H., Ota, Y., Itoh, Y., Zhan, P., Ieda, N., Nakagawa, H., Miyata, N. & Suzuki, T. : Identification of novel SIRT2-selective inhibitors using a click chemistry approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24** : 1871-1874, 2014.