

研究題目 インフルエンザ感染による重症化予防薬創製を指向した

Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4)阻害剤の創製研究

研究組織

- 研究代表者：砂塚 敏明（北里大学北里生命科学研究所）
- 共同研究者：木戸 博（徳島大学疾患酵素学研究センター）
- 研究分担者：廣瀬 友靖（北里大学北里生命科学研究所）
- 研究分担者：大村 智（北里大学北里生命科学研究所）
- 研究分担者：菅原 章公（北里大学北里生命科学研究所）
- 研究分担者：千成 恒（北里大学北里生命科学研究所）
- 研究分担者：堀越 俊（北里大学北里生命科学研究所）

【1】研究の概要

PDKはATP産生経路である糖代謝をコントロールする重要な因子である。しかしながらインフルエンザ感染時にはPDK発現量が大きく増加し糖代謝におけるピルビン酸からアセチルCoAへの合成が阻害される。PDK1、PDK2及びPDK3はインフルエンザ感染時に産生量が上昇し正常時の2~3.5倍の量が産生される。一方PDK4においてはPDK1-2と同様に筋細胞での発現が上昇しているが、その量は正常時の50倍にも達する。そこでPDK4を阻害することによりインフルエンザ重症化が抑えられることが期待される。PDK4阻害物質として知られているものはジクロロ酢酸のみであるが、その阻害活性は弱く(IC₅₀: 330μM)、さらに中枢神経障害などの副作用も大きいため、新規PDK4阻害剤の開発が望まれる。

そして北里研究所においてPDK4阻害剤の探索が行われ、ビタミンK₃などのナフトキノン骨格を持つ化合物にジクロロ酢酸を上回る阻害活性を示すことが見出された。

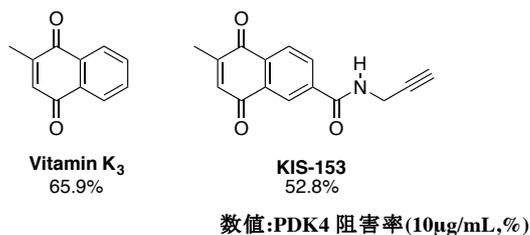


Figure. 1 PDK4 阻害活性物質

規阻害活性物質の創製に向け、ビタミンK₃を基盤とし様々な誘導体合成を行われるなかで、Fig.1に示した末端アルキンをもつKIS-153が合成された。そこで本研究においてKIS-153をリード化合物とした*In situ click chemistry*を用いた新規活性物質の探索に着手した。

【2】研究成果

*In situ click chemistry*は高活性な化合物を導く手法として精力的に当研究室で行われている。これは標的タンパク質のリガンド作用部位を反応

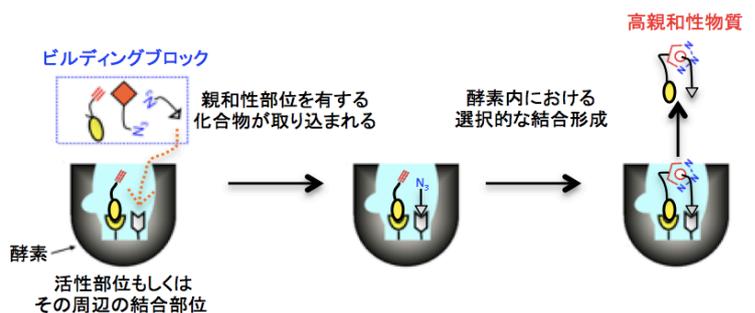


Figure 2. *In situ click chemistry*

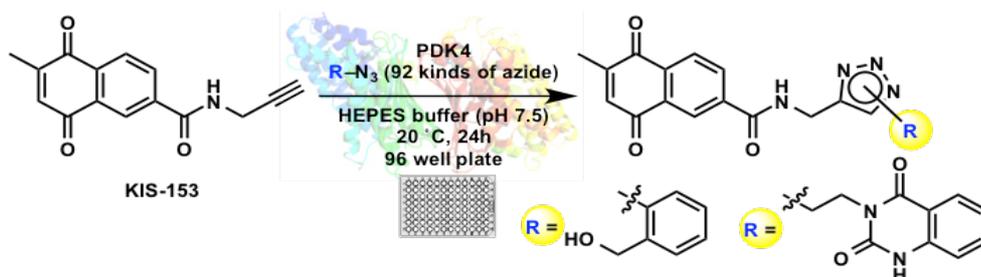
場として、標的タンパク質のテンプレート効果によりアジド分子とアルキン分子のカップリングが促進され、トリアゾールが形成されることを指標に高活性誘導体を見出す手法である(Fig. 2)。そこで、アセチレンを有する誘導体KIS-153を用いた*in situ click chemistry*を行い、更なる高PDK4阻害活性物質の創製が望めると考え展開した。

このような背景のもと当研究室にてPDK4の新

In situ click chemistry を行う際に、反応場となる酵素 PDK4 の取得が不可欠である。PDK4 発現ベクターを組み込んだ大腸菌 BL21 を用いて培養を行うことでその取得を試みた。種培養としてアンピシリン添加 LB 培地に植菌し、37 °C、21 時間培養した。次に、アンピシリン添加 LB 培地 1000 mL に種培養液を入れ、37 °C で 24 時間培養を行った。培養液を 25 °C にし、遺伝子発現誘発物質である 20% IPTG 溶液を入れ、再び 25 °C で 17 時間培養した。得られた培養液を遠心分離した後、沈殿した菌体を超音波破碎し、再び遠心分離を行った。最後に Ni カラムを用いた精製を行い、電気泳動によって PDK4 の画分を確認し、濃縮を行うことで PDK4 を取得した。

次にアルキン体である **KIS-153** を用いた *in situ click chemistry* による新規 PDK4 阻害物質の探索を行った。**KIS-153** に対して、92 種のアジド誘導体を用いて 96 穴プレート上でスクリーニングを行った (**Scheme 1**)。

生成物のトリアゾール体は、96 穴プレート上での反応直後、LC-MS-SIR を用いることで検出できるものとした。すなわち、LC-MS-SIR において、酵素存在下、非存在下の条件を比較したときに、酵素によってトリアゾール化が促進されると、LC-MS-SIR 上で、そのピークエリア面積が大きくなることを指標とした。スクリーニングの結果、2 種のアジド誘導体において酵素によるトリアゾール促進効果を見出した (**Scheme 1**)。今後は、ヒットしたトリアゾールについて、LC-MS を用いてより詳細な *in situ click chemistry* の反応解析を行い、生成してくるトリアゾール体の幾何異性の特定を行う。その後、それらを別途合成し PDK4 阻害活性を測定する。



Scheme 1 **KIS-153** を用いた *in situ click chemistry*

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後は今回ヒットしたトリアゾール体の合成と活性評価を行うと共に、アルキンもしくはアジド基を含む PDK4 阻害剤を合成し、それをリガンドとして *in situ click chemistry* を行い新規高活性物質の探索を継続して行う。