

コンビナトリアル的分子集積に基づく 機能性超分子金属錯体の設計と合成

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科 教授 あおき しん 青木 伸

はじめに

私たちの研究室では、金属錯体、金属イオン、有機分子の配位結合やその他の非共有結合によって集積させ、様々な構造をもつ超分子の開発を行っている【図1】。主な研究テーマは、①分子集積による超分子酵素モデルの構築と、それらを用いる酵素反応機構の解明、②がん細胞のプログラム細胞死を誘導する超分子の開発、③炭素-炭素結合生成のための触媒的不斉反応の開発、④がん放射線療法に資する薬剤開発、⑤がん診断と治療のための新薬剤および技術開発、⑥抗菌剤（金属酵素阻害剤）・抗ウイルス薬の開発、⑦新規糖鎖合成法の開発などである。オリジナルかつ比較的短工程で合成できる金属錯体や有機化合物を設計・合成し、それらの組み合わせによるコンビナトリアル的集積（ユニット分子の組み合わせによって多数の化合物群を一度に、または短期間に合成すること）によって、多様な構造と機能を有する超分子の設計、合成を行っている。生体内の分子認識や化学反応は、水中もしくは水の割合が非常に高い環境で進行していることから、水溶液中での分子集積体の構築と機能開発、新薬剤の開発と同時に、我々自身が設計・合成した化合物を用いて生体内反応を理解したいと考えている。

複核亜鉛錯体、有機化合物、金属イオンのコンビナトリアル的集積による機能性超分子の構築

水溶液中での分子集積には金属イオンとアニオン性有機分子間の配位結合や、疎水性相互作用が有効であ

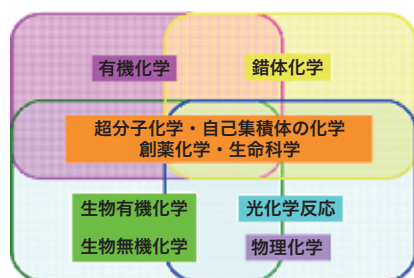
る。亜鉛イオン (Zn^{2+}) は、生体内において鉄に次いで2番目に多く存在する必須微量元素であり、様々な生体反応、生物の成長や分化において重要な役割を果たしている。X線結晶構造解析、核磁気共鳴スペクトル (NMR) など多くの分析法によって、 Zn^{2+} の生理的意義やタンパクや酵素中における Zn^{2+} の配位構造などが明らかになっている。また毒性が低く、 Zn^{2+} 錯体には様々な化学的および生物学的機能が期待できる。

Cyclen (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane) と呼ばれる4つの第2級アミノ基を有する12員環化合物は、中性H水溶液中で Zn^{2+} と安定な錯体 (Zn^{2+} -cyclen) を生成し、核酸塩基の1つであるチミジン (dT) のイミド基やリン酸モノエステルジアニオン、チオールの脱プロトン体であるチオラートイオンなどと配位結合を生成することが知られている¹⁾。我々は、複数の Zn^{2+} -cyclen 錯体を共有結合で接続した多核 Zn^{2+} 錯体が、ポリアニオンとの多点認識によって、熱力学的および速度論的に安定な複合体を生成することを見出した²⁾。

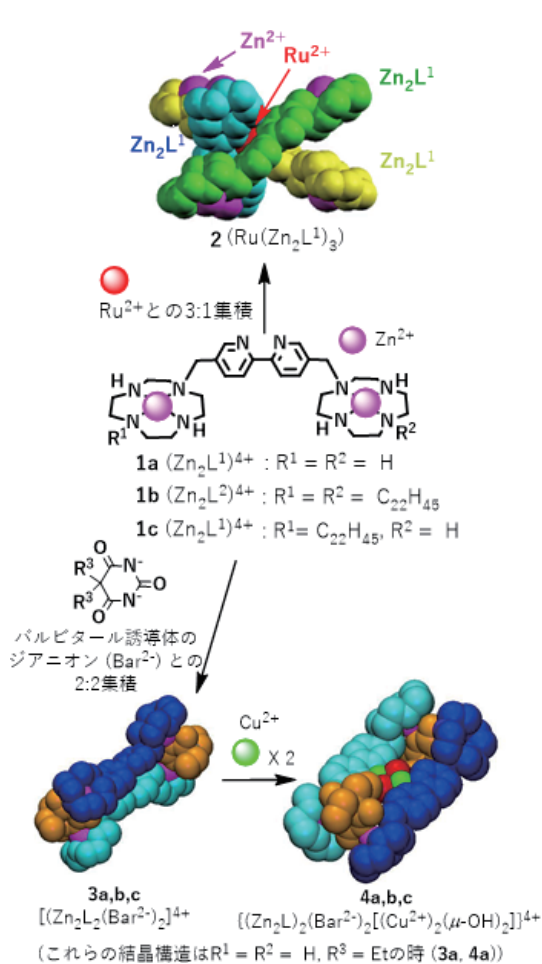
細胞内シグナル伝達機構におけるセカンドメッセンジャーの1つである Inositol-1, 4, 5-trisphosphate (InsP₃) は発色団を持たないため、その分布や濃度変化の検出は非常に困難である。そのため InsP₃ 選択的光センサーの開発が強く望まれているが、いくつかの InsP₃ センサータンパクが報告されているだけであり、人工的な InsP₃ 選択的センサーは殆ど存在しない。

そこで我々は、2, 2'-bipyryl (bpy) 基をリンカーとして有する二核 Zn^{2+} 錯体 **1a** (Zn_2L^1) を合成し、3分子の **1** を1つの Ru^{2+} イオンへ配位させた六核 Zn^{2+} 錯体 **2** ($Ru(Zn_2L^1)_3$) を合成した【図2上】。そして、**2** が InsP₃ と、そのモデル化合物である *cis, cis*-1, 3, 5-cyclohexanetriol trisphosphate (CTP₃) と中性pH水溶液中で1対2複合体を生成し、発光強度が増大する InsP₃ センサーとして機能することを見出した³⁾。

一方、**1a** とバルビタール (Bar) を中性pH水溶液中で混合すると、2対2の比で自己集積体 **3a** を生成し【図2左下】、さらにこれに銅イオン (Cu^{2+}) を添加すると、**1a** と CA^{2-} と Cu^{2+} の2:2:2自己集積体



【図1】生物有機化学研究室の研究分野

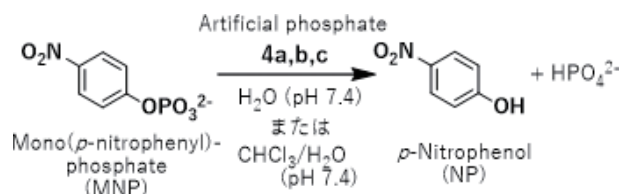


【図2】分子ブロック・有機分子・金属イオンの組み合わせによる超分子の構築

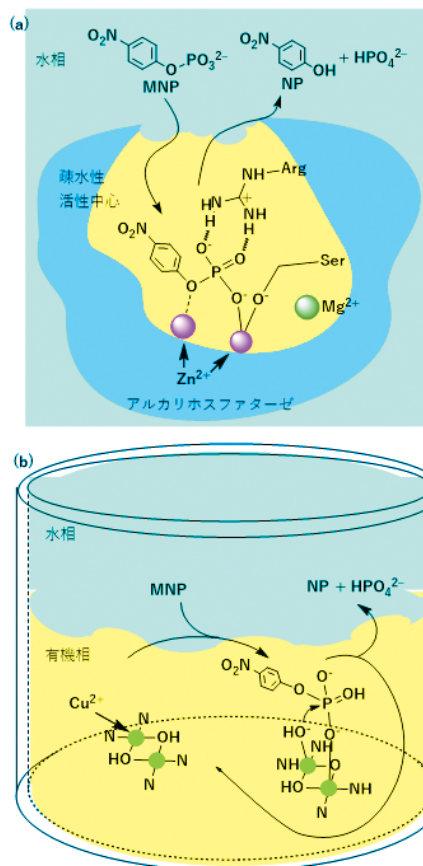
4a ($(\text{Zn}_2\text{L}^1)_4(\text{Ba}^{2+})_4-(\text{Cu}^{2+})_4$) 【図2右下】を生成した。4a の中心には四角形 (菱形) の $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})_2]_2$ 錯体が生成し、リン酸モノエステル (mono (*p*-nitrophenyl) phosphate, MNP) の加水分解を加速することがわかった【図3】⁴⁾。

加水分解酵素が生体内反応の触媒として機能するのは、基質を認識して疎水的な活性中心に取り込んで加水分解反応を加速し、生成物を放出して活性中心を再生させるからであると考えられる。アルカリホスファターゼ (AP) の場合、MNP のおおまかな加水分解機構 (*p*-nitrophenol (NP) と無機リン酸が生成) は【図4a】のように表すことができる。

AP のモデル化合物としては二核金属錯体の設計と合成が古くから行われているが、触媒回転 (1モルの触媒を用いた時、1モル以上の生成物が生成する、つまり、加水分解収率が触媒の当量よりも大きくなる) を有する分子はほとんど知られていなかった。そこで我々は、1a に疎水性アルキル基を2つ導入した二核亜鉛錯体 1b (Zn_2L^2) と1つ導入した 1c (Zn_2L^3) と、様々な官能基を導入したバルピタール誘導体の合成を行い、

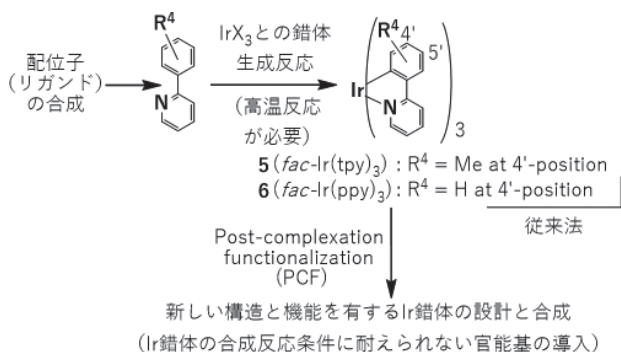


【図3】超分子4によるリン酸モノエステルの単一水溶液および有機相/水相二相系溶媒中での加水分解反応



【図4】(a) 生体内触媒であるアルカリホスファターゼの活性中心の模式図。(b) 有機相と水相からなる二相系溶媒中でリン酸モノエステルを加水分解する超分子酵素モデル

これらの組み合わせによって、4b, c など約 100 種類の超分子を合成した【図2下】。そして、疎水性および親水性環境の両方に親和性をもつ両親媒性超分子 (4c など) が、二相系溶媒 (CHCl_3 /水) 中で触媒的に MNP を加水分解することを発見した⁴⁾。【図4b】のように、超分子触媒が有機相で MNP を加水分解し、NP と無機リン酸を水相へ放出したと考えられる。しかも、速度論的解析によって、二相系溶媒系を考慮した超分子システム全体が、天然酵素と同様に Michaelis-Menten の反応速度論に従い、酵素モデルになりうることを証明した。



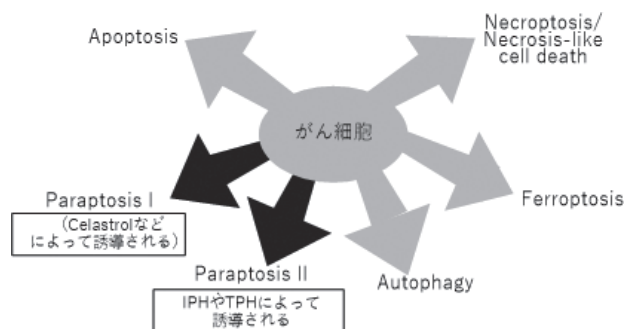
【図5】 Post-complexation functionalization (PCF)

シクロメタレート型イリジウム(III)錯体 (Ir(III)) 錯体の変換反応の発見と Ir(III) 錯体-ペプチドハイブリッドによるがん細胞の細胞死誘導

前項で InsP_3 センサーとして合成した2の発光が弱く (発光量子収率が低く), 細胞内への導入量も低かったため, 2の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 錯体部分をシクロメタレート型イリジウム(III)錯体 (cyclometalated Ir(III) complex) (例: *fac*-Ir(tolpy)₃, *fac*-Ir(ppy)₃ 5, *fa*-Ir(ppy)₃ 6 (ppy=2-phenylpyridine)) へ変更することにした. 一般的に Ir(III) 錯体は Ru 錯体よりも発光量子収率が高く, 水や有機溶媒中で非常に安定であるため, 発光ダイオード (OLED) や細胞イメージング材料として利用されている. また, 近年フォトレドックス触媒としての機能に注目が集まっていたからである.

我々は, Ir(III) 錯体の合成の途中で, 配位子 (リガンド) の C と Ir の結合の *p*-位で求電子置換反応が進行することを発見した. 従来の金属錯体の合成では, まず修飾されたリガンドを配位子 (リガンド) を合成し, 金属塩と錯体を合成する. シクロメタレート錯体を合成する場合, 一般的に高温などの厳しい反応条件が必要であり, 配位子に複数のヘテロ原子が含まれている場合や熱に弱い官能基を有する場合, 目的とする錯体の合成が困難である. そこで我々は, 上記の発見をもとに, まず Ir(III) 錯体骨格を生成し, これをビルディングブロックとして様々な分子変換による機能化を行った【図5】. それを Post-complexation functionalization (PCF) と呼んでいる⁵⁾. 本項では, リンカーを介してペプチド鎖を導入した Ir(III) 錯体-ペプチドハイブリッド (Ir(III) complex-peptide hybrids, IPH) について紹介する.

プログラム細胞死 (programmed cell death, PCD) は, 組織や器官の形成などに重要な役割を果たしており, 【図6】に示すような PCD (apoptosis, necroptosis, paraptosis, autophagy など) が知られている. これま

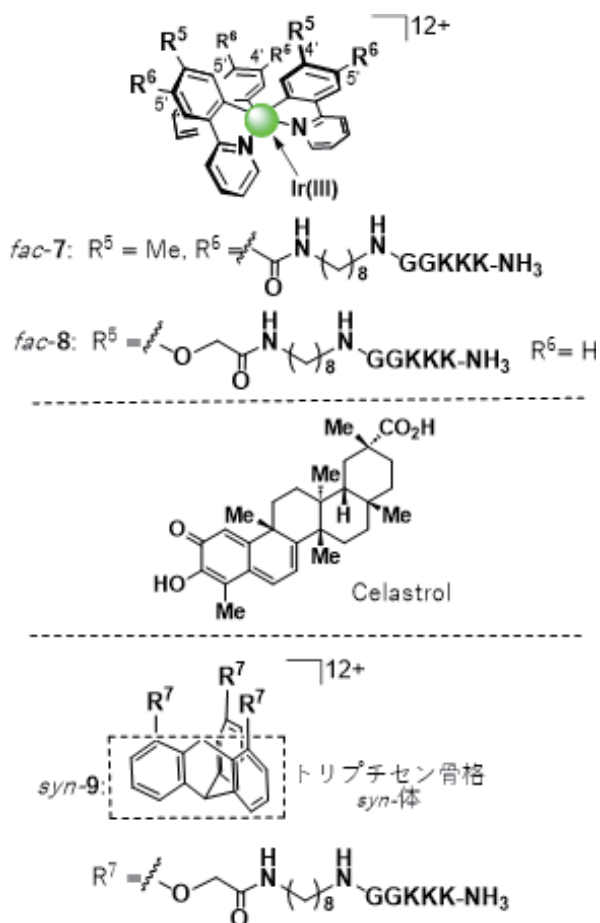


【図6】 代表的なプログラム細胞死 (Programmed cell death, PCD) と我々が発見した paraptosis II

で報告されている抗がん剤の多くは, がん細胞の PCD を誘導する. がん細胞の抗がん剤耐性に対応するため, 異なる PCD の誘起薬剤とその機構解明が求められる.

我々は, アルキル (炭素鎖 4~16) リンカーを介してカチオン性ペプチド KK(K)GG (K: リシン, G: グリシン) を導入した IPH を合成した【図7上】. それらのがん細胞と正常細胞に対する毒性を評価したところ, 適切な長さのアルキル (C6~C8) リンカーをもつ *fac*-7, 8 などが (*fac*とは, tpy 基のフェニル基が全て同じ方向を向いている (【図7】では全て上向き) facial 体のこと), Jurkat 細胞 (ヒト白血病がん細胞) に対して選択的な細胞死誘導活性を示し (EC₅₀ (50% 増殖阻害濃度) は 1.5 μM 程度), さらに死細胞内で時間依存的に強く発光することがわかった. また, H₃N-KK(K)GG (中性 pH で電荷は 3+ または 4+) ペプチド数とそれに伴う正電荷が増大すると抗がん活性が増強されることが確認された⁵⁾. しかし, そのメカニズムはそれまでに知られていた apoptosis とは異なることが示唆された.

近年, ライコウトウから単離されたトリテルペノイドである celestrol【図7中央】などが, paraptosis という PCD を誘導することが報告されている. そこで IPH と celestrol による細胞死を比較した結果, i) IPH (CGP37157【図8】という薬剤も) と celestrol によって細胞死が誘導された細胞の透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像が酷似していることがわかった. しかし, ii) IPH は数時間単位で paraptosis を誘導するが, celestrol による paraptosis には約一日必要である, iii) IPH はリソソームや小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) の液胞化を誘導するが, celestrol はリソソームの液胞化を誘導する, iv) IPH はミトコンドリアと ER の膜融合を誘導するが, celestrol は誘導しない, v) IPH はミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度上昇を誘導し, celestrol はミトコンドリアおよび細胞質内の Ca^{2+} 濃度を上昇させる, などの違いが観察された【図8】.

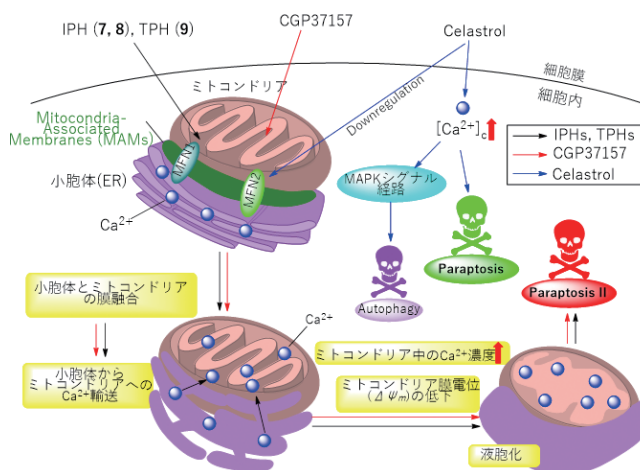


【図7】 Ir(III)錯体—ペプチドハイブリッド (IPH), トリプチセン—ペプチドハイブリッド (TPH), Celastrol の化学構造

これらの結果は、両者の paraptosis 誘導機構が異なることを示唆しており、celastrol によって誘導される PCD を paraptosis I, IPH によって誘導される PCD を paraptosis II と分類した【図8】⁶⁾。なお最近, Ir(III)錯体部分を有機分子であるトリプチセンへ置換したトリプチセン—ペプチドハイブリッド (tritycene-peptide hybrids, TPH) 9【図7下】も paraptosis II を誘導することが明らかになり⁷⁾, Jurkat 細胞以外のがん細胞の paraptosis についても検討中である。これらの分子群による細胞死を比較しながら, さらに paraptosis の機構解明と新規抗がん剤の開発を目指している。

おわりに

以上のように, 我々は種々の金属錯体, 有機分子, 金属イオンをビルディングブロックとして使用し, コンビナトリアル的な集積によって多様な高機能分子の創製が可能であることを示してきた。オリジナルな化合物を合成して他の分子やイオンと混合すると, 分子自身が相手を見つけて相互作用し, 独自の構造, 反応



【図8】 IPH および TPH によって誘導される paraptosis II と Celastrol による paraptosis I の模式図

性, 生物活性を有する集積体へ変化する。しかも, 対称性が高く美しい。今後は, 非対称な分子自己集積体の設計・合成についても挑戦し, 新しい触媒活性, 分子物理, 生理活性を有する超分子の開発を目指したい。さらに近年, がんの放射線治療用 (ホウ素中性子捕捉療法など) 薬剤⁸⁾や抗ウイルス薬⁹⁾や抗菌薬の開発も重要になっているので, 薬学研究者として貢献したいと考えている。

【参考文献】

- 1) S. Aoki, E. Kimura, *Chem. Rev.* 104, 769–788(2004).
- 2) S. Aoki, M. Zulkefeli, Y. Hisamatsu, M. Kitamura, In *Synergy in Supramolecular Chemistry*; T. Nabeshima, Ed.; CRC: Boca Raton, 2015, pp 33–56.
- 3) S. Aoki, M. Zulkefeli, M. Shiro, *et al. J. Am. Chem. Soc.* 127, 9129–9139(2005).
- 4) (a) A. B. Rahman, H. Imafuku, Y. Miyazawa, *et al. Inorg. Chem.* 58, 5603–5616(2019). (b) S. Aoki, A. B. Rahman, Y. Hisamatsu, *et al. Results Chem.* 3, 100133(2021).
- 5) (a) S. Aoki, K. Yokoi, Y. Hisamatsu, *et al. Top. Curr. Chem.* 380, 36(2022). (b) 青木, 横井, C. Balachandran, 久松, 有合化, 79, 1113–1124(2021).
- 6) (a) Yokoi, K. Yamaguchi, M. Umezawa, *et al. Biochemistry* 61, 639–655(2022). (b) 青木, 横井, 山口, 化学, 78, 68–69(2023).
- 7) K. Yamaguchi, K. Yokoi, M. Umezawa, *et al. Bioconjugate Chem.* 33, 691–717(2022).
- 8) (a) S. Aoki, H. Ueda, T. Tanaka, T. *et al. In Characteristics and Applications of Boron*; C. Wongchoosuk, Ed.; IntechOpen: Croatia, 2022, pp. 83–105. (b) H. Satoh, S. Ochi, K. Mizuno, *et al. Bioorg. Med. Chem.* 67, 116764(2022).
- 9) (a) H. Ohashi, K. Watashi, W. Saso, *et al. iScience* 24, 102367(2021). (b) Y. Takenaka, R. Tanaka, K. Kitabatake, *et al. Front. Pharmacol.* 13, 874375(2022).