

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

神経変性疾患における  
イニシエーターカスパーゼ活性化の分子機構と  
非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究

平成13(2001)年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 桃井 隆

平成14(2002)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告書

神経変性疾患におけるイニシエータ・カスパーゼ活性化の分子機構と  
非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究 桃井 隆 -----1

### II. 分担研究報告書

1. カスパーゼ並びに脳機能にかかわるプロテアーゼの阻害剤の  
探索及び創製に関する研究 橋本祐一 -----11

2. カスパーゼの立体構造のためのタンパク質発現系  
田之倉優 -----16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----30

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----32

# I 総括研究報告書

## 神経変性疾患におけるイニシエーターカスパーゼ活性化の分子機構と

### 非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究

主任研究者 桃井 隆 国立精神・神経センター 神経研究所  
疾病研究第5部 室長

**研究要旨** 遺伝性神経変性疾患の原因の一つである細胞質内および核内ポリグルタミン凝集は、1) ER ストレスシグナルである Grp78/Bip の up-regulation、CHOP/GADD135 の発現、JNK の活性化を誘導することから、ER ストレスを誘導することが明らかとなった。2) ポリグルタミンにより細胞死の分子機構を明らかにする目的で、ER ストレスにより発現されるカスパーゼ 12 の 318 番目のアスパラギン酸の切断点に特異的な抗体を作成した。3) ER ストレスに対する阻害剤を化合物ライブラリーの中から発見することができた。4) 酵母を用いて、カスパーゼ 12 酵素タンパクを大量調整することができた。

#### 研究組織

##### 分担研究者

- (1) 東京大学細胞分子生物学研究所  
橋本浩一 教授
- (2) 東京大学大学院農学生命科学研究科  
田之倉優 教授

#### A. 研究目的

アルツハイマー病、ポリグルタミン蓄積病などの神経変性疾患における細胞死ではカスパーゼの活性化が原因として問題となっている。こうした神経変性疾患の治療を最終目的として、本研究では神経変性疾患に関与するカスパーゼを特定するとともに、

細胞死に関与するカスパーゼの非ペプチド性阻害剤の開発をおこなうことを目的とした。

カスパーゼは線虫から哺乳類まで保存されており、細胞死を実行する分子として、現在までに 14 種類知られている。カスパーゼの活性化は、細胞死のシグナルにより上位に位置するイニシエーターカスパーゼから、下位に位置するエフェクターカスパーゼへと順に引き起こされ、いわゆるカスパーゼカスケードの活性化を介して細胞死を実行する。現在知られたイニシエーターカスパーゼとしてカスパーゼ 8、9、12 が知られている。下位に位置するカスパーゼの活性化の抑制だけでは細胞死は回避すること

はできず、また市販のペプチド阻害剤では、カスパーゼ 8、9、12 の自己プロセッシングを阻止できない。細胞死を完全に抑制するには様々な細胞死シグナルと接点をもつカスケードの最上位に位置するイニシエーターカスパーゼ (8、9、12) のオートプロセッシングを特異的に阻害する (非ペプチド型およびペプチド性) 阻害剤の開発が必要である。

虚血などの非遺伝性変性疾患ではミトコンドリア障害によるカスパーゼ 9 の活性化が細胞死をもたらす。われわれは、これまでカスパーゼ 3 と 9 の活性化のみを特異的に認識する抗体を作成し、細胞死の機構をカスパーゼの活性化と TUNEL との二重染色法により解析してきた。CAG トリプレットリピートの伸張を原因とするハンテントン舞蹈病、DRPLA などの神経変性疾患では核内でのポリグルタミンの蓄積が観察される。最近、Yuan らのグループがポリグルタミンがカスパーゼ 8 と細胞質を核内で共凝集を引き起こすことを報告している。我々は昨年カスパーゼ 8 の活性化型を特異的に認識する抗体を用いて、ポリグルタミンとの共凝集過程でカスパーゼ 8 が活性化することを明らかにした。しかしながら、細胞質内でのポリグルタミン凝集はカスパーゼ 8 の活性化を誘導するものの、細胞死を必ずしも誘導しなかった。

小胞体 (ER) での折り畳み不全や変異蛋白質の蓄積は ER ストレスを誘導し、Gp78/Bip などのシャペロン蛋白の up-regulation、JNK の活性化、細胞死に関連する GADD135/CHOP の発現を誘導する。最近、ER に局在するカスパーゼ 12 の活性化が ER ストレスを誘導する糖鎖の阻害剤で

あるツシカマイシン、ER ゴルジの膜輸送を阻害するゾレフェルジン、カルシウム ATPase の阻害剤である Thapsigargin、それにアルソハイマー前駆体蛋白の切断断片である Aβによって誘導されることが明らかにされている。

本報ではポリグルタミンの凝集と ER ストレスとの関係について解析した。凝集状態により、ポリグルタミン 72 の細胞質内、核内凝集は ER ストレスを誘導することを明らかにした。また、ER ストレスにより活性化されるカスパーゼ 12 の活性化型を特異的に認識する抗体の作成、および酵母を用いてのカスパーゼ 12 蛋白の大量調整に成功するとともに、カスパーゼ 12 の活性化を阻害する化合物を化合物ライブラリーより分離することができた。

## B. 研究方法

### 1) ER ストレスシグナルの解析

JNK の活性化は PhosphoPlus c-Jun (Ser63) II Antibody Kit (Cell signaling Technology) を用いて、c-Jun リン酸化特異抗体 (Cell signaling Technology) により検出した。C2C5 細胞に EGF 融合遺伝子 (pEGFP-72CAG, pEGFP-11CAG) をリン酸化カルシウム法を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション 5 時間後、細胞培養液で細胞の洗浄を行い、時間を追って回収し、実験に用いた。回収した細胞は RIPA buffer または 0.2% トライトン X-100 を含む PBS で懸濁した後、100000 で遠心し、得られた細胞上清 (50μg) を SDS ポリアクリルアミドゲル (12%) 電気泳動法により泳動し、ブロッティングを行った。ブロッティングしたニトロセルロースフィルターは、1 次抗体として抗 tubulin 抗体、抗 c-Jun 抗体、抗 c-Jun リン酸化特異抗体、抗 Bip 抗体、抗 GFP 抗

体を結合させ後、二次抗体として、アルカリリンソスファターゼ標識した抗マウスまたはウサギイムノグロブリン抗体を反応させ発色液(発色試薬である nitro blue tetrazolium, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate を含む)を用い、発色させた。

2) EGFP 融合タンパク質と蛍光標識抗体を用いた二重染色

pEGFP-72CAG 及び pEGFP-11CAG (5 $\mu$ g) は C2C5 細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、時間を追って 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS を用いて固定した。1 次抗体として抗 c-Jun リン酸化特異抗体を反応させ、さらに 2 次抗体としてテキサスレッド標識抗ウサギイムノグロブリン 抗体(赤色)を加え 37°C 1 時間反応後、共焦点レーザー顕微鏡 (CSU-10, 田コカフ) を用いて解析した。

pEGFP-C1 vector に 72 リピートの CAG を導入し、C2C5 細胞に導入発現させるとともに、テキサスレッド標識した c-Jun リン酸化抗体による二重染色、およびヘキスト 33342 染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡下でポリグルタミンによる JNK 活性化と細胞死を検討した。

3) カスパーゼ 12 の切断点を認識する抗体の作成

カスパーゼ 12 の活性化型に特異的な抗体は、切断部位 318 のアスパラギン酸の付着のペプチドを合成し、ペプチドを KLH(Kuyhole limpet hemocyanin: シグマ)に結合させたものをウサギに免疫して作成し、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。pFlag-CMV-2 (コダック)を用いて、N 端に Flag タグを付加したラットカスパーゼ 2D394、マウスカスパーゼ 6D162、マウスカスパーゼ 8D387(DED 領域欠損型)、マウスカスパーゼ 9 全長、D353 および D368、

マウスカスパーゼ 12D318 は EcoRI 断片を、Flag 発現ベクターの EcoRI サイトにサブクローニングした。DNA 配列はシーケンシングにより確認した。

pEGFP(enhanced green fluorescence protein)-C1 vector (クローンテック)を用いて、N 端に EGFP タグを付加したカスパーゼの発現系を作製した。マウスカスパーゼ-12 全長、D318 の断片は、pEGFP-C1 の EcoRI サイトにサブクローニングした。培養細胞への遺伝子導入(トランスフェクション)はリン酸カルシウム法により行った。リン酸カルシウム法を用い、活性化型のカスパーゼを認識する抗体の特異性をイムノブロットおよび EGFP 融合タンパク質と蛍光標識抗体を用いた二重染色で検討した。

#### (倫理面への配慮)

実験動物に対する倫理面については、当該研究所の倫理規定(指針)に基づき十分に配慮の上、実験の計画が立てられている。

### C. 研究成果

#### 1) polyQ の凝集体形成と ER ストレス

GFP-tag を付加した polyQ (CAG72 リピート: Q72/ CAG11 リピート: Q11)を P19EC 細胞に恒常的に c-Jun を発現させた C2C5 細胞に発現させたところ、主に核外に polyQ72 の凝集が検出された(図 1)。polyQ72 は発現初期には細胞質全体に均一に検出され(polyQ72/DC)、徐々に細胞質全体に小さな凝集体を形成し(polyQ72/DA)、核周辺に核を取り巻くような凝集体や(polyQ72/PA)、細胞質に球状の封入体(polyQ72/CI)として検出された。また数が少ないながらも核内の凝集も検出され、凝集初期には核内全体に小さな凝集が検出され(polyQ72/NA)、後に核内封入体が検出された(polyQ72/NI)。ト

トランスフェクション後48時間のそれぞれの凝集体(polyQ72/DC, DA, PA, CI, NA, NI)の割合は $34.1 \pm 6.4\%$ ,  $9.2 \pm 4.6\%$ ,  $8.2 \pm 5.2\%$ ,  $38.9 \pm 7.5\%$ ,  $4.3 \pm 0.8\%$ ,  $5.3 \pm 0.6\%$ だった。

一方、polyQ11では凝集体は検出されなかった(図1)。

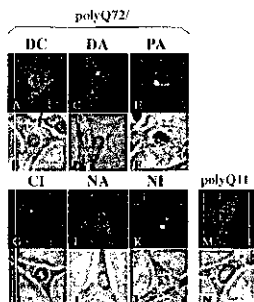


図1

ERストレスはIRE1及びTRAF2を介してJNKを活性化し、unfolded protein response (UPR) を介してBip蛋白の発現を上昇させる。そこで、polyQの凝集が、ERストレスのシグナル (JNKの活性化及びBipの発現上昇) を活性化するか、ウエスタンブロットで解析した。C2C5細胞にpolyQ72を発現させたところ、Bipの発現上昇が見られた(図2A)。

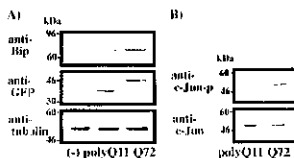


図2

さらにpolyQ72ではc-Junのリン酸化もみられ、JNKが活性化していることが示唆された(図2B)。一方、polyQ11ではBipの発現上昇もc-Junのリン酸化もみられなかった(図2A,B)。

さらに、c-Junのリン酸化特異抗体を用いて、polyQの凝集とJNKの活性化の関係を免疫染色で解析を行った。凝集の見られないpolyQ11やpolyQ72/DCではc-Junのリン酸化は観察されなかったが、凝集が見られた細胞の核内で、c-Junのリン酸化が観察された(polyQ72/PA, CI, NI)。トランスフェクション後48時間のそれぞれの凝集体(polyQ72/DC, DA, PA, CI, NA, NI, polyQ11)の割合は $3.1 \pm 0.5\%$ ,  $3.9 \pm 0.8\%$ ,  $85.1 \pm 6.8\%$ ,  $88.0 \pm 7.2\%$ ,  $8.3 \pm 2.4\%$ ,  $75.0 \pm 7.0\%$ ,  $2.9 \pm 0.7\%$ だった(桃井)。

3) 活性型カスパーゼ12に対する抗体(anti-m12D318)の作製と特異性

カスパーゼ8、9と同様イニシエーターカスパーゼであると考えられているカスパーゼ12は、現在までその酵素活性の測定系が確立されていない。昨年度はカスパーゼ12の活性化に必要なオートプロセッシングの部位を解析し、318番目のアスパラギン酸で切断されることが明らかにした。マウスカスパーゼ12の切断部位のN末端側のアミノ酸配列のペプチドを合成し、ウサギに免疫し、精製し、ペプチド抗体 anti-m12D318 とした。FLAG抗体と異なり、作製したカスパーゼ12の切断点に対する抗体(anti-m12D318)は、活性型のFLAG-カスパーゼ12D318と反応するものの、カスパーゼ12の全長には反応しなかった。カスパーゼ12のオートプロセッシングによる切断部位をanti-m12D318を用いて調べた。COS細胞にマウスプロカスパーゼ12をト

ランスフェクションすると、12 時間後からオートプロセッシングによる切断が見られた。EGFP 標識したカスパーゼ 12 を COS 細胞に発現させ、抗体との反応性を調べたところ、その発現の初期には抗体に反応しない細胞が観察されたが、発現が進行するにつれ、ほとんどの細胞がそれぞれの抗体に陽性となった。以上の結果より、anti-m12D318 はオートプロセッシングによるマウスカスパーゼ 12 の断片を特異的に認識することが明らかとなった。この抗体は活性化されたマウスカスパーゼ 12 を免疫染色法により検出するのに有効であった (橋井)。

#### 4) 酵母によるカスパーゼ 12 の発現

大腸菌では多くの部位で切断されたことから、カスパーゼ 12 タンパク質の精製および解析が困難であると考え、酵母によるタンパク質発現を検討した。カスパーゼ 12 の C 端に His タグを付加したコンストラクトを、リチウム法を用いて酵母に導入し、大量培養を行い、タンパク質を精製した結果、1L の培養液中から、約 200  $\mu$ g のカスパーゼ 12 タンパク質が得られた。抗 His 抗体を用いて、精製したカスパーゼ 12 タンパク質をウェスタンブロットリングにより解析を行なったところ、全長である 61 kDa の断片とともに 35 kDa 付近の断片が検出された。このことから、酵母より精製したカスパーゼ 12 は N 端で切断されることが示唆された。すなわち、酵母での発現では、なんらかのストレスがから、カスパーゼ 12 により切断されたものと思われる (田之倉、橋井)。

#### 5) カスパーゼ 12 活性化を阻害する化合物の探索

カスパーゼの阻害剤の発見をなす、リーディング化合物を決定するため、プロテアーゼであるアミノペプチダーゼに対する阻害活性をめやすとして、ピューロマイシン、ペスタチン、サリドマイドを設定し、構造の重ね合わせ思考実験から、環状イミド構造を抽出し、系統的に構造展開をおこない、ホモブタリイミドが非ペプチド小分子プロテアーゼ阻害剤のファルマコアになることが明らかになった。化合物の誘導体 40 数種について、神経細胞死抑制作用について検定を行ったが、残念ながら活性を有するものは存在しなかった。すなわち、本活性を目的とする構造展開においては、PSA は適当な分子標的ではないこととなる。

効率的な構造展開には、分子標的の同定が必要不可欠であるため、神経細胞死抑制作用に関わる分子標的の探索研究に着手することとした。この際、バイオロープ作成のためのリードとなりうる化合物が必要であるが、早い化合物スクリーニングの結果、図 3 に示す化合物が良好な神経細胞死抑制作用を示した (橋井、桃井)

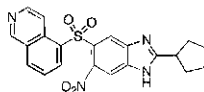


図 3

#### D. 考察

昨年度にカスパーゼ 8 の活性化を特異的に認識する抗体を作成し、CAG トリプレットリピート病におけるホリグルタミン凝集が



カスパーゼ 8 の活性化とその凝集をもたらす、転換としてカスパーゼ 8 からカスパーゼ 3 のカスケードを特異的に活性化することを明らかにした。しかし、既知カスパーゼ阻害剤では完全に細胞死を阻害できないことから、より強力な特異的なカスパーゼ阻害剤の開発が要求された。また別の可能性としてカスパーゼ 8-3 依存性の細胞死はポリグルタミンによる細胞死の一部であり、カスパーゼ 8 からカスパーゼ 3 以外の経路が存在する可能性も考えられる。こういった観点から、今回、変異蛋白質凝集がもたらす、ER ストレスに焦点をあて、ポリグルタミンによる ER ストレスの誘導について解析するに至った。

核内のポリグルタミン凝集はストレスシグナルのひとつである SEK1/JNK および ASK1 経路を活性化するという報告がなされている(Yasuda et al., *Genes Cells*, 1999)。またハンチントン病患者の血球細胞がストレスに対して脆弱性を示し、優位にアポトーシスを引き起こすという報告がなされ(Sawa et al., *Nat. Med.*, 1999)。ポリグルタミンによる細胞死とストレスとの関与が示唆されている。しかしながら、ポリグルタミンの凝集と ER ストレスとの関係については何も触っていない。本年度の研究により、polyQ72 は Bip の発現を上昇させ、JNK を活性化する事が明かとなった。Bip は小胞体シャペロン分子の一つで、ER ストレスがかかると、UPR により発現が上昇することが知られている。また ER ストレス時には同時に、Ire-1 が TRAF2 と結合し、JNK の活性化を引き起こす (Úrano et al., *Science*, 2000)。このことから、C2C5 細胞において polyQ72 は ER ストレスを引き起こしていることが示唆さ

れた。

また本年度の研究で、以前報告のあった核内のポリグルタミン凝集だけでなく核周辺の凝集や細胞質の封入体でも JNK が活性化する事が明かとなった。しかしながら核内核内のポリグルタミン凝集や核周辺の凝集、細胞質の封入体が ER ストレスとなるのが、そのメカニズムは定かではない。PolyQ72 は ER には存在していないが、核周辺の凝集、細胞質の封入体が一部 ER 膜に接触しているため、膜上に存在している Ire に直接影響を与えて ER ストレスを引き起こしている可能性や、核周辺の凝集、細胞質の封入体が細胞質オルガネラの機能不全の原因になっている可能性が考えられる。ハンチントン舞踏病の患者の脳ではミトコンドリアの機能不全が起きていることが報告されている (Gu et al., *Ann. Neurol.*, 1996)。核周辺の凝集、細胞質の封入体はシャペロン分子の機能や、または蛋白の高次構造に関わる酵素の機能を低下させ、ER 内に Unfolded 蛋白がたまり、ER ストレスになる可能性が示唆された。

カスパーゼ12は、Nakagawaら (*J. Cell Biol.*, 2000) により、カルパインにより T132-A133、K158-T159 で切断されると、D318 部位が自己切断され、活性化へと変換されることが報告されている。また、カスパーゼ 12 は TRAF2 と結合しているが、小胞体のシグナルにより TRAF2 が Ire1 と結合するために、カスパーゼ 12 が TRAF2 から遊離して重合体を形成することにより、オートプロセシングを劇的に活性化を示すようになるという説 (Yoneda et al., *J. Biol. Chem.*, 2001) がある。カスパーゼ 12 がカスパーゼ7により D94 部位が切断されることにより、続いて D341 部位がオートプロセシングにより、切断され活性化に変換される説(Rao et al., *J. Biol. Chem.*, 2001)も報告されている。

して、その切断部位は、N 末端部位を欠失させたカスパーゼ 12 を作成し、そのサイズを比較したことによって、カルパイン切断部位といわれているカスパーゼ 12 の T132 部位付近であることが明らかとなった。酵母には最近のゲノム解析の結果からカルパインとホモログを持つ遺伝子を有していることが明らかとなったことから、このカスパーゼ 12 の T132 部位付近での切断はカルパインによるものではないかと考えられる。酵母ではカルパインで切断されると言われる部位付近で切断され、CARD ドメインが先に切断されてしまうため重合体を形成できず相互作用が起らないと示唆される。今後、カルパイン欠損酵母にカスパーゼ 12 を発現する計画やカスパーゼ 12 を発現させて、酵母でのストレスに対するプロセッシング、活性化について研究を進めたいと考えている。今回構築した発現系をもとに大量発現したタンパク質を用いて X 線構造解析を行い、活性化の分子機構を明らかにすることができると考えている。また、今後、ポリグルタミンがプロテアソーム/リソソーム系で分解されず、ER ストレスとして細胞死を誘導する機構について検討を行うと共に、作製したカスパーゼ 12 の切断部位に特異的に反応する抗体を用いて、変異蛋白の蓄積が観察される神経変性疾患でカスパーゼ 12 が活性化について検討する予定である。

PSA 阻害剤の中に神経細胞死抑制作用を有する化合物が見出されなかったのは予想外の結果であった。しかし、今回、図 3 に示す化合物に所望の活性を見出し、これを元に有望なバイオプローブとして target 1 をデザインすることが出来た。この化合物の標的蛋白を探索するとともに、ER ストレスによるカスパーゼ 12 の活性化を抑制する分子機構を明らかにする予

定である。

target 1 の合成については現在進行中である。すなわち、イソキノリンテオールに対してフルオロジブアミノベンゼンを導入し（第 1 ステップ）、次いでスベアサーとなるアミノカルボン酸をペンツイミダゾール環を形成させつつ導入する（第 2 ステップ）、アミノ基の保護基には、Boc 基を用い、導入するメチレン鎖の数(n)は、4~10 程度を考えている。

次いでチオール基をオゾンにて酸化しスルホンとし（第 3 ステップ）、混雑によりニトロ基を導入すると同時に保護基(Boc)をはずす（第 4 ステップ）。えられる target 1 は、市販の活性カルボン酸型アフィゲル 10 と融合させれば、所望のアフィニティゲルの作成が完成する。

本研究からは、リードや目的とする標的分子は今回とは異なるものの、過去に同様の手法によってアフィニティゲルを作成し、ベンゾラクタム特異的結合蛋白の探索や、フォスファチジルイノシトール結合蛋白の探索・同定、植物ホルモンサイトカイニン結合蛋白の探索・同定に成功した実績を持っており、本手法によって神経細胞死抑制に関わる分子標的が同定できる可能性は高いと考えている。

## F. 結論

C2C5 筋細胞ではポリグルタミンは意外に高頻度で蓄積し、ER ストレスシグナルの指標である Bip 発出の発現上昇と JNK の活性化を引き起こした。これらのことから、1) 伸長したポリグルタミンの蓄積は ER ストレスシグナルを活性化し、細胞死を引き起こしている可能性が考えられた、2) カスパーゼ 12 の活性化に特異的に反応す

る抗体を作成することにより、カスパーゼ 12 の活性化を細胞レベルで可視化することが可能となった。3) ER ストレスによるカスパーゼ 12 の活性化を抑制する化合物を同定した。4) 酵母を用いて、カスパーゼ 12 酵素蛋白を大量産生することができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Durr, E., Gotman, A., Ahlborn, E., Gotz, M., Momoi, T., Ceccatelli, S. Apoptotic morphology does not always require caspase activity in rat cerebellar granule neurons *Neurotoxicity Res.* 3, 501-514 (2001)
- 2) Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, Kiyono T, Takahashi T, Momoi T, Inagaki M. Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol.* 155(3):415-426 (2001)
- 3) Yaginuma, H., Shiraiwa, N., Shimada, T., Nishiyama, K., Hong, J., Wang, S., Momoi, T., Uchiyama, Y., Oppenheim, R.W. Caspase Activity Is Involved in, but Is Dispensable for, Early Motoneuron Death in the Chick Embryo Cervical Spinal Cord. *Mol Cell Neurosci.* 18, 168-82 (2001)
- 4) Nakagawara-Yagi, Y., Choi, D., Ogane, N., Shimada, S., Seya, M., Momoi, T., Ito, T., Sakaki, Y. Discovery of a novel compound: insight into mechanisms for acrylamide-induced axopathy and colchicine-induced apoptotic neuronal cell death. *Brain Res.* 909, 8-19 (2001)
- 5) Kaniya, K., Takahashi, K., Kitamura, K., Momoi, T., Yoshikawa, Y. Mitosis and apoptosis in postnatal auditory system of the C57/He strain (...)*Brain Res.* 901; 296-302 (2001).
- 6) Fujita, E., Egashira, J., Urabe, K., Kuida, K.,

Momoi, T. Caspase-9 processing via feedback amplification loop in vivo. *Cell Death and Differentiation* 8, 335-344 (2001).

- 7) Takahashi, K., Kaniya, K., Urabe, K., Fujita, E., Suga, M., Mori, H., Yoshikawa, Y., Ichimura, K., Kuida, K., Momoi, T. Requirement of caspase-3 in the adult auditory system. *Brain Res.* 894, 359-367 (2001)
- 8) Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H., Miura, M. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. *J. Exp. Med.* 193, 111-122 (2001)
- 9) Komeda, M., Kakuta, H., Takahashi, H., Fujimoto, Y., Kadoya, S., Kato, F., Hashimoto, Y. Specific inhibitor of puromycin-sensitive aminopeptidase with a homophthalimide skeleton: Identification of the target molecule and a structure-activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 121-131 (2001)
- 10) Sodeoka, M., Sampo, R., Kojima, S., Baba, Y., Morisaki, N., Hashimoto, Y. Asymmetric synthesis of a 3-acetylterpene acid derivative, RK-682, and formation of its calcium salt during silica gel column chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 206-212 (2001)
- 11) Takahashi, H., Hashimoto, Y. Formaldehyde-mediated modification of natural deoxyguanosine with amines: one-pot cyclization as a molecular model for genotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 729-731 (2001)
- 12) Morisaki, N., Hashimoto, Y., Furihata, K., Yazawa, K., Tamura, M., Mikami, Y. Glycosylative inactivation of cholcomycin and tylosin by clinically isolated *Nocardia asteroides* strain. *J. Antibiot.* 54, 157-165 (2001)
- 13) Ebisawa, M., Ohta, K., Kawachi, E., Fukasawa, H., Hashimoto, Y., Kagechika, H. Novel retinoid tropolone derivatives. Biosoteric relationship of tropolone ring with

benzoic acid moiety in retinoid structure. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 501-503 (2001)

14) Sou, S., Takahashi, H., Yamasaki, R., Kagechika, H., Endo, Y., Hashimoto, Y.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors with a 4,5,6,7-tetrachlorophthalimide skeleton pendanted with a cycloalkyl or dicarba-closo-dodecaborane group. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 791-793 (2001)

15) Kita, T., Takahashi, H., Hashimoto, Y. Thymidine phosphorylase inhibitors with a homophthalimide skeleton. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 860-862 (2001)

16) Kakuta, H., Koiso, Y., Takahashi, H., Nagasawa, K., Hashimoto, Y. Novel specific puronycin-sensitive aminopeptidase inhibitors: 5-(2,6-diethylphenyl)-2,4(1*H*,3*H*)-quinazolin-4-one and *N*-(2,6-diethylphenyl)-2-amino-4*H*-3,1-benzoxazin-4-one. *Heterocycles*, 55, 1433-1438 (2001)

17) Sakamoto, H., Ashima, T., Sato, S., Hashimoto, Y., Yamori, T., Tsuruo, T. Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 2513-2518 (2001)

18) Nishikawa, A., Saito, S., Hashimoto, Y., Koga, K., Shirai, R. Synthesis of L- $\alpha$ -phosphatidyl-D-*myo*-inositol 3,5-bisphosphate from D-glucose. *Tetrahedron Lett.* 42, 9195-9198 (2001)

19) Takahashi, H., Hashimoto, Y., Nagasawa, K. Novel formaldehyde-mediated dimerization reaction of *N*-alkyl-1-naphthylamine derivatives under mild/neutral conditions: application to synthesis of naphthylamine-derived macrocycles. *Heterocycles*, 55, 2305-2313 (2001)

20) Kakuta, H., Takahashi, H., Ou, S., Kita, T., Nagasawa, K., Hashimoto, Y. Enzyme inhibitors derived from thalidomide. *Recent Res. Develop. Med. Chem.* 1, 189-211 (2001)

21) Sakai, N., Yao, M., Itou, H., Watanabe, N., Yumoto, F., Tanokura, M., Tanaka, I. The three-dimensional structure of septum site-determining protein MinD from *Pyrococcus horikoshii* OT3 in complex with Mg-ADP. *Structure* 9, 817-826 (2001)

22) Yumoto, F., Nara, M., Kagi, H., Iwasaki, W., Ojima, T., Nishita, K., Nagata, K., Tanokura, M. Coordination structures of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in Akazara scallop troponin C in solution: FTIR spectroscopy of side-chain COO Groups. *Eur. J. Biochem.* 268, 6284-6290 (2001)

23) Kobori T, Sasaki H, Lee WC, Zenno S, Saigo K, Murphy ME, Tanokura M. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution. *J Biol Chem.* 276, 2816-2823 (2001).

## 2. 学会発表

1) Takashi Momoi, Eriko Fujita, Koko Urase: RA175/TSLC1, a new member of the immunoglobulin superfamily, is a cell adhesion molecule in the developing nervous system

第 24 回日本分子生物学会, 横浜, 12.9, 2001

2) 藤田恵典子, 田村梓, 辻弓子, 浦瀬香子, 日比野利彦, 桃井隆 :

表皮最終分化(角化)におけるカスパーゼ 14 の活性化と細胞死

第 24 日本分子生物学会, 横浜, 12.10, 2001

3) 神保敦, 藤田恵理子, 大西純一, 桃井隆 :

ER ストレスによるカスパーゼ 12 活性化の分子機構。

第 24 回日本分子生物学会、横浜、12.11、2001

4) 高橋依子、藤田恵理子、神保教、杭田慶介、米原伸、桃井隆：

Polyglutamine aggregates stimulates activation of caspase-12 apoptotic pathway via stress signal. 第 24 回日本分子生物学会、横浜、12.11、2001

5) 滝瀬香子、藤田恵理子、祖山晃子、桃井隆：魚疫イムノグロブリンs-バファミリー-荷属する新規遺伝子 RA175/TSLC1 の上皮組織形成における発現途局在。

第 24 回日本分子生物学会、横浜、12.12、2001

6) 桃井隆、滝瀬香子、藤田恵理子、祖山晃子：新規免疫イムノグロブリンs-バファミリーに属する RA175/TSLC1 の膜での発現と機能

第 44 回日本神経化学会、京都、9.26.2001

7) 藤田恵理子、高橋依子、杭田慶介、米原伸、桃井隆：

ポリグルタミン凝集とカスパーゼ 12 活性化  
第 44 回日本神経化学会、京都、9.27.2001

8) 高橋裕保、小磯邦子、小林久芳、橋本 幸一：

芳香族アミンによる核受容体のホルムアルデヒド依存修飾。  
日本薬学会 第 121 年会、札幌、9.26-9.30、2001

9) 藤井晋也、石岡利康、小磯邦子、橋本 幸一、遠藤泰之：

カルボラン含有核内レセプターリガンドの設計と合成・アンドロゲン・アンタゴニストへの応用…

日本薬学会 第 121 年会、札幌、9.26-9.30、2001

10) 馬場良泰、柳沢良史、袖岡幹子、貞弓 聡、橋本幸一：

蛋白質質の高次構造を認識する機能性分子の開発研究・PKC 結合分子の設計と評価…  
日本薬学会 第 121 年会、札幌、9.26-9.30、2001

11) 加来伸博貴、門矢静夫、高橋裕保、森崎尚子、佐藤敬三、橋本幸一：

ホモフタルイミド取特異的アミノペプチダーゼ阻害剤の構造活性相関。  
日本薬学会 第 121 年会、札幌、9.26-9.30、2001

12) 石岡利康、高橋裕保、小磯邦子、池岡幹子、橋本幸一：

新規アンドロゲンアンタゴニストの創製。  
日本薬学会 第 121 年会、札幌、9.26-9.30、2001

13) 荻原寧、高橋裕保、山崎福、橋本幸一：非糖型新規 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤の創製。日本薬学会 第 121 年会、札幌、9.26-9.30、2001

14) 貞弓聡、我妻翠那、小林久芳、橋本幸一、遠藤泰之、袖岡幹子：

ホルボールエステル結合タンパク質としての PDI。  
日本薬学会 第 121 年会、札幌、9.26-9.30、2001

15) Yuichi Hashimoto:

Development of biological response modifiers based on retinoids and thalidomide.  
第 15 回日仏医薬精密化学会議、奈良、5.7-5.10、2001

16) Poste Sesseion Hiroyuki Kagechika Masayuki Ebisawa, Kinunori Ohtu, Emiko

Kawachi, Hiroshi Fukasawa and Yuichi Hashimoto:

Novel synthetic retinoids and retinoid synergists.

第 15 回日仏医薬精密化学会議, 奈良, 5.7-5.10, 2001

17) Ryuichi Shirai, Kosaku Dodo, Masato Takahashi, Kenji Koga and Yuichi Hashimoto:

Asymmetric total synthesis of cdc25A inhibitor dysidiolide and its analogs

第 15 回日仏医薬精密化学会議, 奈良, 5.7-5.10, 2001

18) Kazuo Nagasawa, Angelina Georgieva, Takanori Ishiwata, Hiroyuki Koshino, Yuichi Hashimoto, Tadashi Nakata:

Synthetic studies on polycyclic guanidine alkaloids.

International Congress of Heterocyclic Chemistry 横浜, 7.29 - 8.3, 2001

19) Hiroki Kakuta, Hiroyasu Takahashi, Kazuo Nagasawa, Yuichi Hashimoto:

Novel specific inhibitors of puromycin-sensitive aminopeptidase.

International Congress of Heterocyclic Chemistry 横浜, 7.29 - 8.3, 2001

20) Ryuichi Shirai, Masato Takahashi, Kusuke Dodo, Kenji Koga, Yuichi Hashimoto:

Asymmetric synthesis of cdc25A inhibitor dysidiolide and its potent analogs.

International International Congress of Heterocyclic Chemistry 横浜, 7.29 - 8.3, 2001

21) Bitoku Takahashi, Masayuki Ebisawa, Kiminori Ohta, Emiko Kawachi, Hiroshi Fukasawa, Yuichi Hashimoto, Hiroyuki Kagechika:

Retinoid synergistic dibenzodiazepine and

pyrimidine derivatives.

International Congress of Heterocyclic Chemistry 横浜, 7.29 - 8.3, 2001

22) 長澤和夫, 喜多哲也, 橋本祐一, Angelina Georgieva, 中田忠:

新規 5 員性グアニジン化合物を触媒とする不斉合成反応の開発

第 27 回 反応と合成の進歩シンポジウム—ライフサイエンスを志向した理論、反応および合成、仙台, 11. 5 - 6, 2001

23) 西川明日香, 吉野賢司, 白井隆一, 橋本祐一:

Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI3,5-P2)の合成

第 27 回 反応と合成の進歩シンポジウム—ライフサイエンスを志向した理論、反応および合成、仙台, 11. 5 - 6, 2001

24) 藤井賢也, 石塚利廣, 小磯邦子, 橋本祐一, 遠藤素之:

ホウ素クラスターを疎水性ファーマコフォアとするアンドロゲンアンタゴニストの設計と合成.

第 21 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 京都, 11. 28 - 30, 2001

25) 橋本祐一:

レンチノイドとサリドマイドをリードとする生物応答調節剤の創製研究

第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2001

26) 李淑敏, 櫻井理弘, 小嶋俊郎, 松本宏, 薄野修平, 吉野謙, 田之倉優:

大腸菌の major nitroreductase NfsA の放射光を用いた構造解析.

第 14 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 広島, 2001

27) 田之倉優:

放射光の利用—生命科学, VSX 講習会「放射光で何がわかるか?」\_東京大学高輝度光

設計入門」、東京、2001

28) 鈴木論太郎, 永田宏次, 古谷昌弘, 丸山正, 出之倉優 :

2D EXSY NMR による好熱古細菌の FKBP の活性測定. 日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 294, 京都, 2001

29) 加茂昌之, 金子直美, 菅野修平, 西郷薫, 出之倉優 :

発光細菌 *Photorhabdus Luminescens* ルシフェラーゼの精製と結晶化.

日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 299, 京都, 2001

30) 伊藤三恵, 永田宏次, 加藤有介, 山越智, 鈴木和男, 出之倉優 :

サイトカイン LECT2 の NMR による高次構造解析. 日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 314, 京都, 2001

31) Sadykov, Marat, 半田直史, 森見安雄, 出之倉優 :

Selfish maintenance of BamHI RM gene complex on *Bacillus subtilis* chromosome resistance to replacement through post-segregational host killing and gene duplication. 日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 348, 京都, 2001

32) 吉川正人, 村崎和美, 武田篤, 出之倉優 :

ヒト SCCA 1(Squamous cell carcinoma antigen)の発現, 精製, 結晶化.

日本農芸化学会 2001 年度大会講演要旨集 383, 京都, 2001

33) 出之倉優 :

蛋白質複合体と集合系の構造生物学.

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラム要旨集 58, 大阪, 2001

34) 吉川正人, 村崎和美, 武田篤, 出之倉優 :

ヒト SCCA 1(Squamous cell carcinoma

antigen)の発現, 精製, 結晶化.

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラム要旨集 130, 大阪, 2001

35) 鈴木倫太郎, 川上将, 永田宏次, 湯木史明, 古谷昌弘, 根本暢明, 足立恭子, 丸山正, 出之倉優 :

好熱古細菌 *Methanococcus thermoautotrophicus* の FKBP の構造と機能.

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラム要旨集 193, 大阪, 2001

36) 澤野頼子, 森野賢一, 村松知成, 永田宏次, 出之倉優 :

バイナップル菜由来プロメラインインヒビターの構造機能相関の解析.

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラム要旨集 198, 大阪, 2001

37) 伊藤三恵, 永田宏次, 加藤有介, 山越智, 鈴木和男, 出之倉優 :

サイトカイン LECT2 の NMR による高次構造解析.

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラム要旨集 199, 大阪, 2001

38) 湯木史明, 永田宏次, 岩崎むかぬ, 足立恭子, 小林由枝, 根本暢明, 尾島孝男, 西田清義, 出之倉優 :

アカザラガイ閉殻筋トロポニン C の構造解析.

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラム要旨集 241, 大阪, 2001

39) 加茂昌之, 金子直美, 菅野修平, 西郷薫, 出之倉優 :

発光細菌 *Photorhabdus Luminescens* ルシフェラーゼの精製と結晶化.

第 1 回日本蛋白質科学会年会プログラム要旨集 242, 大阪, 2001

40) 加藤有介, 伊藤三恵, 河合康二, 永田宏次, 出之倉優 :

さまざまな WW ドメインの Surface plasmon

resonance(SPR)を用いた相互作用解析.

第1回日本蛋白質科学会年會プログラム要旨集 427、大阪、2001

41) 田之倉優:

クロロジカビ脱色プロテアーゼAの結晶構造と機能.

日本生化学会東北支部第67回例会シンポジウム・特別講演講演要旨集、仙台、2001

42) Kobori, T., Lee, W. C., Sasaki, H., Koike, H., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M. F. P., Adman, E. T. and Tanokura, M.

Interaction of flavin reductase with its competitive inhibitors.

Keihanna International Conference on Molecular Biophysics "New Approaches to Solution Interactions of Biological Molecules" '20, Kyoto, 2001

43) 森井尚之, 伊藤三重, 清水隆, 田之倉優:

セルラータンパク質の stalk 領域の coil-coil 形成能の評価.

日本生物物理学会第39回年會講演予稿集 S194、大阪、2001

44) Hu, F. and Tanokura, M.

Structural genomics of hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii*.

International workshop on Bioactive Natural Products, Tokyo, 2001

45) Lee, W. C., Kimura, S., Zenno, S., Saigo, K., and Tanokura, M.

The X-ray crystal structure of nitroreductase KdsA from gastric pathogen *Helicobacter pylori*.

International workshop on Bioactive Natural Products, Tokyo, 2001

46) 田之倉優, 李恩哲, 櫻井雅弘, 佐々木宏, 西野修平, 西澤薫:

鮮菓の精造と機能—ニトロ/フラビン還元酵素を例に—.

バイオイメージング第10回学術集会議要旨集 10巻3号, S3-1 106、東京、2001

47) 寺内弘知, 米澤直人, 工藤勝康, 伊藤冬弥, 田之倉優, 三浦健一, 勝又敏行, 中野寛:

組換え体ブタ卵子透明帯糖タンパク質の糖子結合活性.

第74回日本生化学会大会発表抄録集 1P-079 697、大阪、2001

48) 田中俊亮, 中村彰男, 小濱一弘, 岩崎わかな, 佐々木宏, 田之倉優:

カルシウム結合タンパク質 CBP40 の機能構造解析.

第74回日本生化学会大会発表抄録集 1P-240 723、大阪、2001

49) 入本慶宣, 永田宏次, 阿部啓子, 荒井裕一, 田之倉優:

オリザシスタチンのホモダイマーの機能構造解析.

第74回日本生化学会大会発表抄録集 1P-545 772、大阪、2001

50) 澤野頼子, 泰賢賢一, 村松知成, 水田宏次, 田之倉優:

ハイネツプル (*Ananas comosus*) 茎山アノロメラインインヒビターの構造機能相関の解析.

第74回日本生化学会大会発表抄録集 1P-546 772、大阪、2001

51) Marat, S., 平正直史, 藤見安雄, 田之倉優, 坂谷光泰, 小村一三:

染色体上の複製酵素修飾酵素遺伝子の自己増幅.

第74回日本生化学会大会発表抄録集 3P-238 854、大阪、2001

52) 櫻井雅弘, 西野修平, 西澤薫, 田之倉優:

大腸菌ニトロ還元酵素 NfsA のシングル変異導入による反応特異性の解析.



第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-528 897、大阪、2001

53) 加茂昌之, 金子直美, 善野修平, 西郷薫, 田之倉優;

発光細菌 *Photobacterium luminescens* リンフェリンナーゼの精製と結晶化.

第 74 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-055 953、大阪、2001

54) Sawano, Y., Hatano, K., Muramatsu, T., Nagata, K., and Tanokura, M.

Cloning, Expression and Processing Mechanism of Bromelain Inhibitors.

2<sup>nd</sup> General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS), Munich, 2001

55) 湯本定明, 永田実次, 片崎わか, 尾立恭子, 小林由枝, 根本輔明, 尾島孝男, 西田清義, 田之倉優;

アカザガイ閉殻筋トロポニン C の C 末端半分子の溶液構造解析.

第 40 回 NMR 討論会講演要旨集 362、京都府、2001

56) Yumoto, F., Nagata, K., Iwasaki, W., Adachi, K., Kobayashi, Y., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K., and Tanokura, M.

Structural analysis of the C-terminal half of Akazara scallop troponin C in solution.

Abstract of International Workshop, Actin filament from structure to mechanism 19, 兵庫, 2001

(17) Sadykov, M., Handa, N., Asami, Y., Tanokura, M., Itaya, M., and Kobayashi, I.

Amplification of a selfish restriction-modification gene complex.

第 24 回日本分子生物学会年会プログラム 1P-160 (62)、横浜、2001

58) 伊藤三恵, 永田実次, 加藤竹介, 山越智, 山本健二, 鈴木和男, 田之倉優;

サイトカイン LECT2 の高次構造解析. 第

24 回日本分子生物学会年会プログラム、3P-113 (146)、横浜、2001

59) Dawson, W., Ishida, M., Kameoka, Y., Yamagoe, S., Futamura, Y., Yamamoto, K., Suzuki, K., and Tanokura, M.

A combined study of the LECT2 protein using molecular dynamics simulation and NMR chemical shift data.

第 24 回日本分子生物学会年会プログラム 4P-102 (191)、横浜、2001

60) 田之倉優, 伊藤三恵, 永田実次, 山越智, 山本健二, 鈴木和男;

LECT2 の高次構造解析.

第 4 回肝臓生物学会プログラム、千葉、2001

61) Dawson, W., Ito, M., Nagata, K., Yamagoe, S., Tanokura, M., Yamamoto, K., Suzuki, K.;

Analysis of 3D-Structure of LECT2.

第 4 回肝臓生物学会プログラム、千葉、2001

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## II 分担研究報告書

## カスパーゼ並びに脳機能にかかわるプロテアーゼの阻害剤の探索 及び創製に関する研究

分担研究者 橋本 祐一 東京大学分子細胞生物学研究所 教授

研究要旨：脳機能にかかわることが予想されるヒューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ(PSA)阻害剤の構造活性相関を解析し、各種誘導体を合成した。それらについて神経細胞死抑制作用を検証したところ、目立った活性を持つものは得られず、PSA については当初予想したような神経細胞死との関連は薄いことがうかがわれた。そこで、新たに、今回神経細胞死抑制作用のスクリーニング系で見出されたイソキノリン系化合物について、これをリードに神経細胞死抑制作用にかかわる分子標的の探索・同定を広めるべく、アフィニティゲルの作成を計画した。

### A. 研究目的

本年度は、昨年度の成果、すなわち、ホモソタルイミド骨格がヒューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ阻害剤に有効なファルマコフォアになり得る、という知見を元に、各種の誘導体を合成し、その中に神経細胞死抑制作用を持つ化合物を見出すことを目的とした。最終的には活性化合物を元に、神経細胞死抑制作用にかかわる分子標的を探索・同定することが目的である。

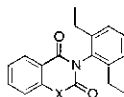
### B. 研究方法

ヒューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ(PSA)は、はじめエンケファリン分解酵素の候補として実行されたが、その生理的役割は未解明である。PSA はヒューロマイシンによる傷害を受けるアミノペプチダーゼであり、ベスタテンなどのペプチド系阻害剤によっても傷害を受けるが、未だ本薬業に特異的な阻害剤は見出

されていない。

PSA が脳などの神経系に多く分布することや、ベスタテンなどのアミノペプチダーゼ阻害剤に誘導される細胞分裂停止に関与する可能性等から、PSA と細胞死との関連が囁かれた。

本研究者は、非ペプチド系・小分子型アミノペプチダーゼ阻害剤の創製研究の過程で、図1の一般式で示される PSA 特異的阻害剤の創製に成功した。



X = NH, NMe, CH<sub>2</sub>, etc.

図1

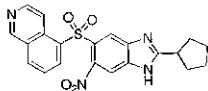
これらの阻害剤は、PSA に対して非競合的な作用機作用する特異的な阻害剤であり、2つの芳香環に各種置換基を導入することで多数の誘導体を合成することが出来る。それらの中には、血管新生との関わりが指摘されているチミジンホスホリラーゼに対する阻害活性を併せ持つものや、近年アルツハイマー病との関連が取りざたされているシクロオキシゲナーゼに対する阻害活性を併せ持つものも存在する。

### C. 研究結果

図1に示す化合物の誘導体40数種について、神経細胞死抑制作用について検証を行ったが、残念ながらめだつた活性を有するものは存在しなかった。すなわち、不活性を目的とする構造展開においては、PSA は適当な分子標的ではないことになる。

効率的な構造展開には、分子標的の同定が必要不可欠であるため、神経細胞死抑制作用に関わる分子標的の探索研究に着手することとした。この際、バイオプローブ作成のためのリードとなりうる化合物が必要であるが、並行化合物スクリーニングの結果、図2に示す化合物が良好な神経細胞死抑制作用を示したため、本化合物をリードに、その分子標的を探索するためのブフィニティゲルを作成することとした。

図2



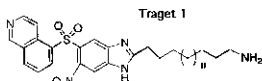
又2に示した化合物の軌的分子を探索するため、同化合物にスパーサーを導入してブフィニティゲルへ誘導することを計画した。スパーサーの導入位置に因っては、これまでの経験から、図2に示した化合物について以下の点を検討し

て候補位置を決定した。

すなわち、

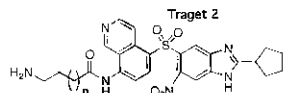
- (1) 同化合物の脂溶性シクロペンタニル鎖は、おそらく分子全体に使用をを付与して分子標的に対する親和性の向上、もしくは組織膜透過性に関与すると期待できること。
- (2) 一般に上記構造のような分子においては、分子骨格中央部への置換基導入は受容体への結合の立体的な障害になることが多いこと、の2点から、図3に示す target 1 をまず合成することとした。

図3



今ひとつの候補構造は、図4に示す target 2 であるが、イソキノリンの窒素原子が受容体結合に関与することが構造から考察され、target 1 の方が優れている可能性が高いと考えた。

図4



### D. 考察

PSA 阻害剤の中に神経細胞死抑制作用を有する化合物が見出されなかったのは予想外の結果であった。しかし、今回、図2に示す化合物に所望の活性を見出し、これを元に有望なバイオプローブとして図3に示す target 1 をデザインすることが出来た。

target 1 の合成については図5にしめるルートを考察し、現在進行中である。すなわち、イ