

キラル医薬品絶対配置決定法の開発

—DNA シーケンサのインパクトを超える汎用構造活性相関解析装置を目指して—

和泉 博¹、尾形 敦¹、須納瀬正範²、安藤 聡²

独立行政法人産業技術総合研究所¹、セキテクノトロン株式会社²

1. 要旨

サリドマイドの催奇性で社会問題化し広く知られるようになったキラリティーを有する医薬品が承認を受けるには絶対配置を決定することが不可欠である。しかしながら、既存の改良型モッシュャー法は適用範囲がはっきりしない欠点を有している。そこで、製薬業界から求められている、理論的に裏付けされたキラル医薬品の絶対配置決定法を開発した。この解析法は、1) 原子間結合の回転の自由度に起因する莫大な数の可能な分子の形（立体配座）から存在比の大きな立体配座を探索する技術、2) 莫大な数の立体配座構造を容易に区別し、大規模電算機処理を可能にする符号化立体配座表記法（立体配座コード）を活用する立体配座解析装置の2つの知的財産に支えられている。

本キラル医薬品絶対配置決定法は、赤外円二色性（VCD）分光装置を扱う企業との技術移転活動の連携を通して製薬企業及び薬科大学に導入されつつある。さらに、この活動を契機に製薬企業からの直接のニーズをフィードバックし、任意の分子を対象としたDNAシーケンサのインパクトを超える汎用構造活性相関解析技術の開発を進めている。同時に、国際基準であるIUPAC命名法への本表記法の採用にむけた国際連携による活動を開始している。

2. はじめに

DNAシーケンサにより人間の遺伝子配列まで完全に解析できる時代が来ているが、これはDNAが両端をもった一本の鎖から構成され、G、C、T、Aの4つのコードで順に符号化することで大規模計算処理を行えることが大きい。それに対し、薬として使われる医薬品は、環構造や複雑な枝分かれ構造を有しその分子構造は極めて多種多様である。そのため、現状では大規模計算処理にかけることのできる立体情報を含んだコード化表記法は存在せず、ただ単に物質名やその略号を使って薬物動態をはじめとする極めて複雑な生体調節機構の相関関係について解析が進められている。¹⁾ また、亀の甲で代表される化学構造式を表す描画ソフトウェアの発展が著しいことから、この化学構造式のデータベースを用いた構造活性相関の解析研究も盛んに行われている。しかしながら、化学構造式自体を文字列として扱うには、医薬品のような複雑な環、枝分かれ構造を有するケースでは文字列化は非常に困難であり、しかもその文字列に立体情報はまったく含まれていない。ポストゲノム研究の進展に伴い、例えば、抗癌剤として使用されるタキソールが、微小管を構成するβチューブリンと呼ばれるタンパク質に取り込まれた際の、その相互作用の解析が進められ

つつあるが、この解析において立体構造情報は極めて重要である。²⁾ 従って、任意の分子を統一的に扱うことができ、かつ大規模電算機処理を可能とする立体情報を含んだコード化表記法が存在すれば、構造活性相関解析において非常に便利なツールとして活用できるものと考えられる (図1)。

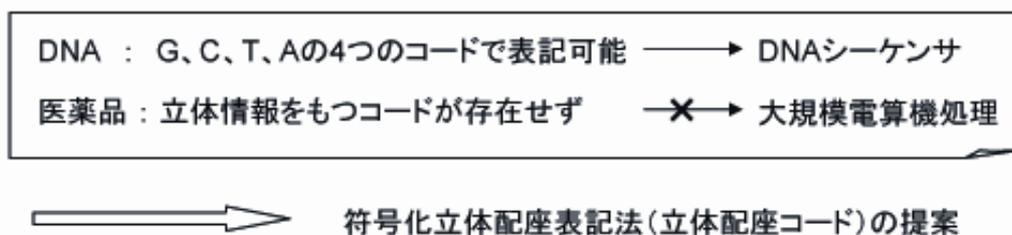


図1. 符号化立体配座表記法 (立体配座コード) のアイデア

一方で、右手、左手のように鏡に映した関係でそっくりでありながら互いに重ね合わせることの出来ない性質をキラリティーと呼び、そのキラリティーに対応する真の分子の立体構造を決めることを絶対配置を決定するという (図2)。サリドマイドの催奇性で大きな社会問題化し広く知られるようになったキラリティーを有する合成医薬品が承認を受けるには絶対配置を決定することが不可欠である。その上で、その絶対配置の帰属に基づく光学活性分子それぞれについて、薬効、安全性、代謝等の評価を行うことが必要である。現在では、核磁気共鳴 (NMR) 分光装置がどの製薬企業にも導入されているため、非常に簡便な改良型モッシャー法が絶対配置決定法として広く利用されている。しかしながら、この非常に有用な方法も後になって絶対配置の帰属が逆であったケースがまれに散見され、果たしてどの範囲まで適用可能かはっきりしない欠点を有している。³⁾ そのため、絶対配置を決定できないまま眠っている生理活性分子は数多く存在している。そこで、証拠となる裏付けを伴った正確な絶対配置決定法が製薬業界から求められている。

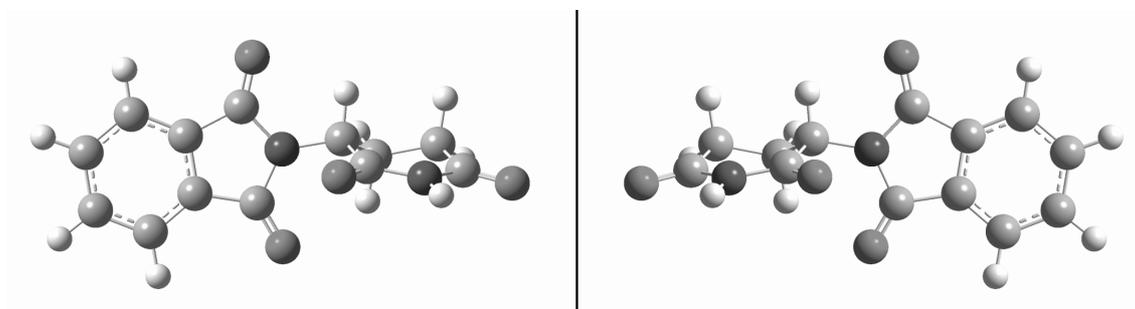


図2. キラリティー (光学活性)

今回開発したキラル医薬品絶対配置決定法は、平成 12・14 年度産業技術研究助成事業により、キラリティーを観測する手段である赤外円二色性 (VCD) 分光装置^{4,5)} を用いてキラル殺虫剤の解析⁶⁾ を進める中で得られた技術シーズを、いかにすれば産業界へ技術移転可能か模索する中で生み出されたものである (図 3)。本法を用いることにより、実測の VCD スペクトル形を一致よく予測から再現することが出来れば、正確にキラル医薬品の絶対配置を決定することが出来る。

本稿では、まず、特許のアイデアに結びついた溶液状態での偶奇効果の発見、⁷⁾ そこから派生した溶液中の立体配座探索技術、⁸⁾ 符号化立体配座表記法 (立体配座コード)、^{1,9)} キラル医薬品絶対配置決定法を用いたサリドマイド¹⁰⁾ 及びタキソール骨格¹⁾ の解析例について解説する。さらに、国際基準である IUPAC 命名法への採用にむけた取り組み、¹⁾ 製薬業界に向けた技術移転活動及びそのフィードバックによる直接の製薬企業のニーズを取り込んだ絶対配置決定及び構造活性相関解析技術の開発について述べる。

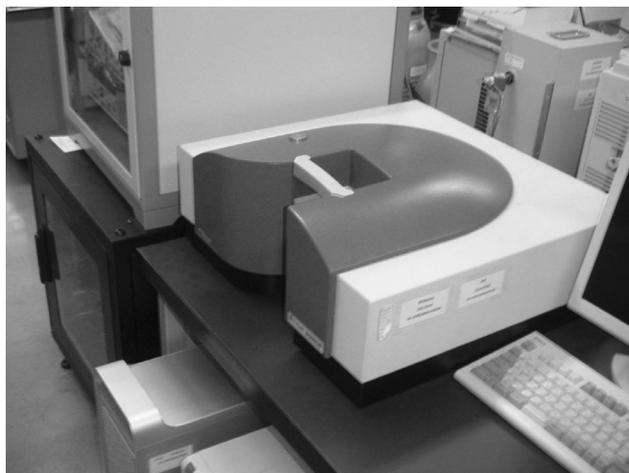


図 3. 赤外円二色性分光装置

3. シーズ技術の発見

偏光子により互いに垂直に直線偏光された二つの光を、90度位相をずらして重ね合わせるとらせん状に電気ベクトルが進行する円偏光が得られる (図 4)。この左右円偏光に対する媒質の吸収の差を測定する分光法のことを円二色性(CD)分光法と呼ぶが、紫外領域の測定装置が一般によく知られている。赤外円二色性分光法はフーリエ変換技術の進歩によりその波長領域が赤外領域まで拡張されたものであり、キラリティーを観測する手段の一つである。スペクトルバンドの多さが特徴となっており、光学純度も含めた生体分子の同定を簡単に行うことができる。⁵⁾

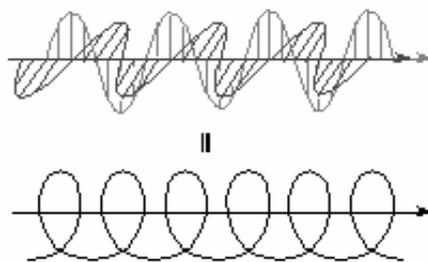


図4. 円偏光

我々は平成 12-14 年度産業技術研究助成の環境分野研究として、マラチオン、ペルメトリン、ヘプタクロルなどのキラル殺虫剤の VCD 解析を行ってきた。⁶⁾VCD スペクトルは赤外 (IR) スペクトルと対で解析に使用するが、VCD バンドの方はキラリティーの違いにより、正負全く逆のバンドを与えることで区別することができる (図5)。しかしながら、これらの殺虫剤が分子内単結合の回転の自由度に起因して莫大な数の立体配座構造をとりうることから VCD バンドの帰属が困難を極め、絶対配置の決定が容易でなかった。そこで、通常、溶液系の立体配座解析に用いられる核磁気共鳴 (NMR) 分光法との違いを対比させながら丹念に個々の立体配座構造の解析を進めてデータを蓄積し、その解決策を模索した。

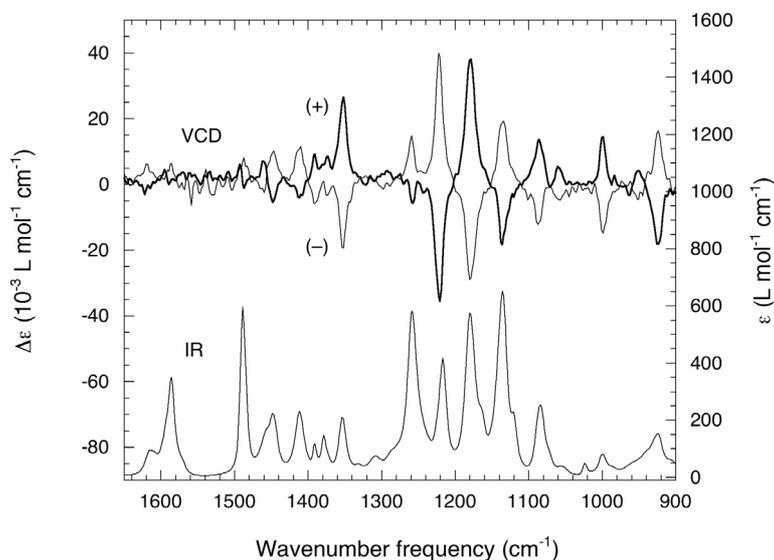


図5. (+)- 及び (-)-*cis*-ペルメトリンの VCD スペクトル⁶⁾

その中で、特に図6に示す、世界ではじめて溶液中における直鎖キラルアルキルアルコールの偶奇効果の観測に成功したことがキラル医薬品絶対配置決定法への展開の契機となった。⁷⁾ その発見以前には、固体状態における高分子などの物性値にアルキル鎖炭素数の偶奇効果が見られることはよく知られていたが、溶液状態では分子運動により様々な立体配座構造をとりうるため、偶奇効果は観測されないと考えられていた。ここでのポイントは1) VCD分光法は立体配座構造に極めて敏感な分光法であること、2) 莫大な数の立体配座構造をとりうる溶液状態においても存在比の大きな立体配座構造はそれほど多くはなく、代表する立体配座構造をモデルとして考慮すれば溶液状態でみられる事象を説明できるということであった。そこで、その解析から導き出されたアイデアに関して「光学活性分子の優位な立体配座の探索方法」という特許取得に至った。⁸⁾ 絶対配置決定のための解析にはどうしても分子軌道法計算を併用する必要がある、その分子軌道法計算の欠点の一つは分子に含まれる原子数の増大とともに計算時間がエクスポネンシャル的に増加してしまうことにあった。この特許は、必要とされる正確な立体配座構造を短時間のうちに絞り込むことで、現在開発が進められている医薬品の分子量程度まで絶対配置決定を可能にするものである。さらに、この特許で使用していた立体配座表記法が、構造が複雑な医薬品にも適用可能で、かつ大規模電算機処理を可能とするコード化表記法へと発展していった。

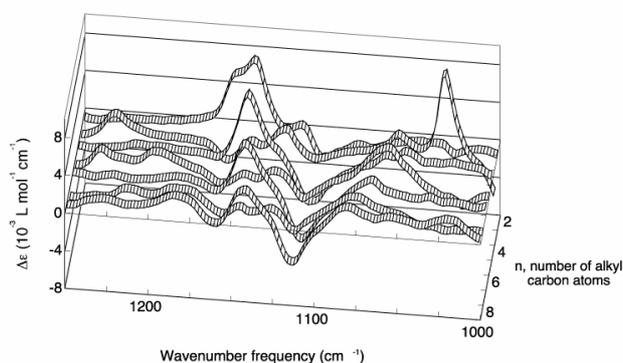


図6. 溶液中での(S)-CH₃CHOHC_nH_{2n+1}の偶奇効果⁷⁾

4. 符号化立体配座表記法（立体配座コード）及び国際基準への採用にむけた取り組み¹⁾

国際基準の一つとしてIUPAC（国際純正・応用化学連合）において化学用語は制定されており、元素名や化合物名についてのIUPAC命名法としてよく知られている。立体配座に関するIUPAC命名法もすでに1970年代には定められていた。その命名法によると立体配座は、原子がA-B-C-Dと結合しているときに原子ABCを含む面とBCDを含む面がなす二面角を利用して、図7に示す分類に従って定義することが定められている。¹⁾ このとき二面角を決めるための中心の結合にはそれぞれの末端の原子に複数個の置換基あるいは原子が結合しているため、どの置換基あるいは原子を優先して選択するか優先則が定められて

いる。すなわち、1) 末端の原子に結合する置換基あるいは原子がすべて異なる場合には、キラリティーを記述するための記号 *R* 及び *S* の定義に用いる順位則に従い、最も優先する置換基あるいは原子を選択し、2) 末端の原子に結合する置換基あるいは原子が一つだけ異なる場合にはその置換基あるいは原子を選択し、3) 末端の原子に結合する置換基あるいは原子がすべて同じ場合には、それぞれを区別することが出来ないため、最もねじれ角が小さくなる置換基あるいは原子を選択するというものである。

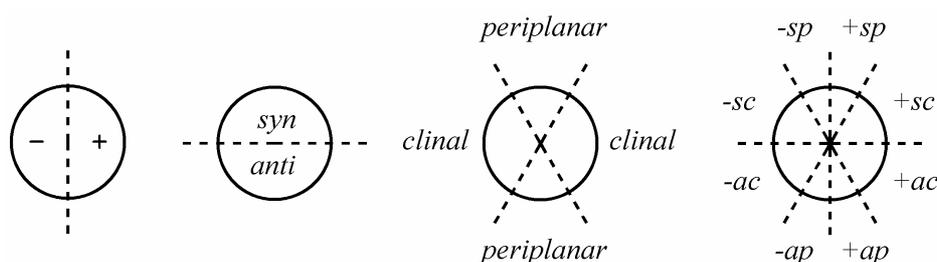


図 7. 立体配座に関する IUPAC 命名法による二面角の分類¹⁾

しかしながら、これらの定義は化合物の立体構造を含めて一つの名前として命名することを目的に定められており、幾何異性体や光学異性体まで同時に表記するだけでも非常に複雑な記述になっている。そのため、立体配座まで含めて表記されることは一般に行われておらず、分子全体で立体配座をいかに表記するかまったく定められていなかった。

そこで、我々は IUPAC 命名法のようにすべての化学構造を一度に表記するのではなく立体配座に絞って分子全体を表記する符号化立体配座表記法（立体配座コード）の提案を行った。本表記法では、コード化のために二面角の分類による立体配座二面角エレメントを ap ($+ap$ and $-ap$) = 1, $+sc$ = 2, $-sc$ = 3, sp ($+sp$ and $-sp$) = 4, $+ac$ = 5, $-ac$ = 6, $+ap$ = 1β , $-ap$ = 1α , $+sp$ = 4α , $-sp$ = 4β (α = 時計回り, β = 反時計回り) と定義する。また、複雑な分子のどこの二面角を指しているか記述する必要があるため、化学構造式に基づいた二面角ロケーションを定義し、[環の接頭辞]-[環の二面角ロケーション]-[環と側鎖の結合部位の第 1 二面角ロケーション]([側鎖の接頭辞]-[側鎖の二面角ロケーション])[環と側鎖の結合部位の第 2 二面角ロケーション]([側鎖の接頭辞]-[側鎖の二面角ロケーション])[環と側鎖の結合部位の第 3 二面角ロケーション]([側鎖の接頭辞]-[側鎖の二面角ロケーション])...と記述する。さらなる細かな規則については原著を参照されたい。¹⁾ 例えば、後述するタキソールの例では立体配座コードは ***bacc*-ABCDEF(*tail*-abcdefgh)** (A, B, C, D, E, F, a, b, c, d, e, f, g, h は立体配座二面角エレメントを記述するための二面角ロケーション)と記述される(図 8)。日本蛋白質構造データバンク (PDBj)¹¹⁾ に登録されている PDB ID が 1JFF¹²⁾ という、微小管を構成する β チューブリンと呼ばれるタンパク質に取り込まれたタキソール分子の実際の立体配座コードは ***bacc*-A33D53(*tail*-24623f14)**と記述され、文字列として、簡便に立

体配座の比較が行えるように工夫している。

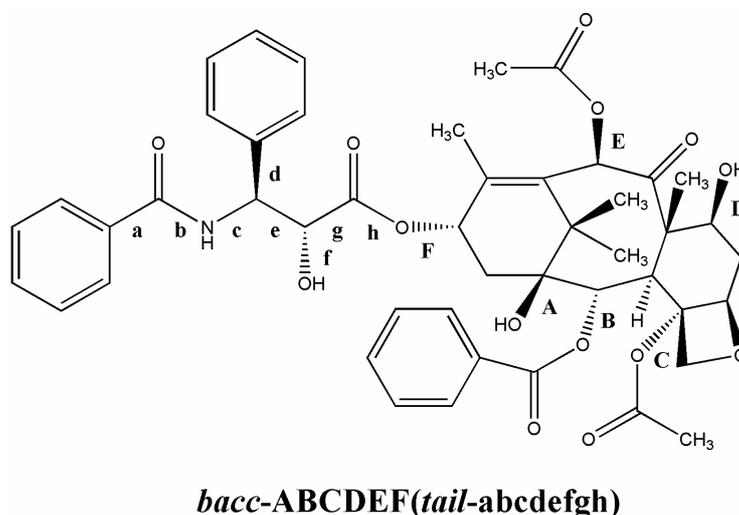


図 8. タキソール分子の立体配座コード¹⁾

第一段階の立体配座コードに関する提案は IUPAC 命名法との対比に重点を置きとりまとめを行っている。¹⁾ この提案に対し論文の査読過程を通して、タキソール解析等のアメリカ化学会有機化学コミュニティーからは正当な評価を受け、共同で研究を進めている Syracuse 大学の Nafie 教授との連携を基に、最終的には符号化立体配座表記法の IUPAC 命名法への採用を目指して活動を開始した。現状では、末端の原子に結合する置換基あるいは原子がすべて同じ場合にそれぞれが区別できないことが主要因となる、立体配座に関する IUPAC 命名法では大規模電算機処理に応用する際の不具合が 3 点見つかっており、今後その解決策に関する提案を引き続き行っていく。また、本表記法は特に国際基準と深い関わりをもってくるため日本の国際戦略にも通じるのではないかと考え、本表記法を使用する解析装置に関する特許出願を行い、知的財産強化もあわせて進めている。⁹⁾

5. 解析事例

サリドマイドは当初睡眠薬として開発されたが、催奇性があることが後になって判明し大きな社会問題となったため販売が中止された。ところが、近年になってハンセン病の痛みの特効薬であることが認められ、アメリカにおいても再認可されるに至っている。日本においても多発性骨髄腫の治療薬として治験が開始されている。このように、免疫調整、免疫抑制、血管新生阻害作用にかかわる様々な病気に対する有効性が明らかにされてきている。一方で、その有効性にもかかわらずその催奇性が失われたわけではなく、その使用に当たっては細心の注意と厳格な管理が求められている。さらに、その光学異性体の代謝生成物及びその血管新生阻害作用との関係については未だ不明な部分が多い。⁵⁾ このような

経緯をふまえ、医薬品の例としてまずサリドマイドの解析を行った。その結果、本キラル医薬品絶対配置決定法により絶対構造を正確に決定できるだけでなく、極性の低いクロロホルム中では分子間相互作用により容易に二量体構造をとり、**fliplike**な交換が起こっていることを明らかにしている（図9）。¹⁰⁾ 本知見は構造活性相関解析への活用も期待できる。

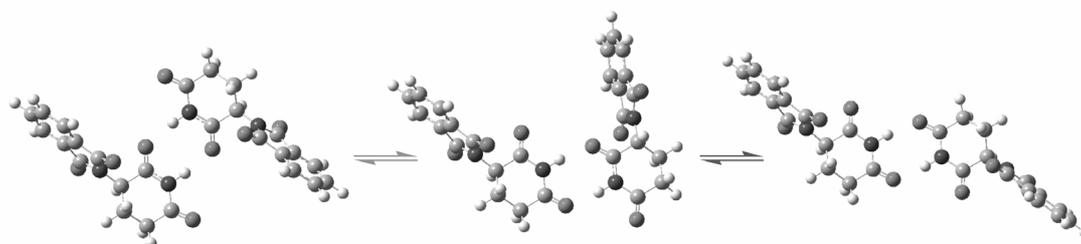


図9. (*R*)-サリドマイド二量体の **fliplike** な挙動¹⁰⁾

次に、製薬企業が特にタンパク質とリガンドとの相互作用に注目していることから、前述の符号化立体配座表記法の提案とあわせて、抗癌剤であるタキソールの骨格構造をなすバッカチン III の解析を行った。タキソールは微小管を構成するβチューブリンと呼ばれるタンパク質と相互作用する。立体配座コードを用いることにより、β-チューブリンと結合したタキソールとの構造比較を行い、分子内水素結合した置換基がスイッチの **on-off** のような働きをしていることを見いだした（図10、11）。¹⁾ また、医薬品ではタンパク質とあまりに強く結合してしまうとリガンドの分解が進まず毒性が高くなってしまうおそれがある。そのため、代謝の観点から、タンパク質と相互作用したリガンドの立体配座と溶液状態のフリーなリガンドの立体配座との相関性を明らかにする重要性を提案している。¹⁾

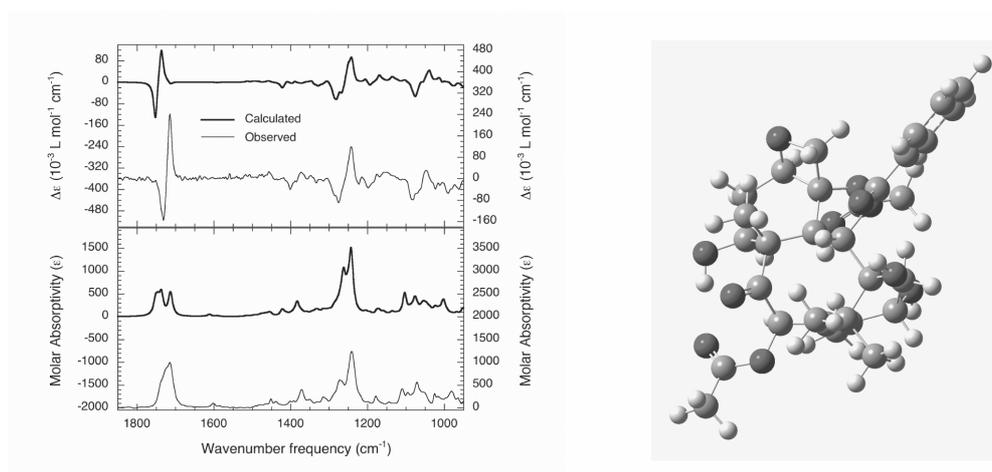


図10. バッカチン III の VCD スペクトル (左) 及びフリーな状態のスペクトル予測から導き出された分子内水素結合した立体配座 **bacc-233323** (右)¹⁾

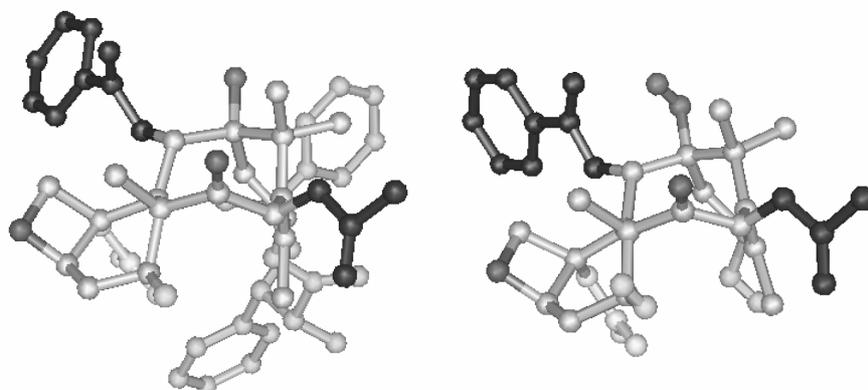


図 1.1. 1JFF¹²⁾ の立体配座 **bacc-A33D53(tail-24623f14)** (左) とスペクトル予測から導き出された水素結合をもたない不安定な立体配座 **bacc-233253** (右) との構造比較¹⁾

6. 技術移転活動を通しての絶対配置決定及び構造活性相関解析技術の開発

アメリカ合衆国の多くの製薬企業には VCD 分光装置の導入が進んでいるのに対し、日本においては企業への導入がまったくといっていいほど行われていない。そこで、VCD 分光装置を販売しているセキテクノロン株式会社と組み、最初にユーザーのニーズ調査を行った。その中で、ちょっとでも可能性があったら導入してみようというアメリカ合衆国の製薬企業に対し、日本の製薬企業は解析装置の性能重視で、要求基準を満たしてはじめて導入を検討するという国の文化、価値観の違いが明らかになってきた。VCD 分光装置自体は要求基準を満たすスペクトルが得られる装置としてすでに完成している。問題はその VCD スペクトルから要求基準を満たす精度でかつ製薬企業に負荷のかからない形でキラル医薬品の絶対配置が決定できるのかということであることがわかった。

また、セキテクノロン株式会社の仲介で複数の薬科大学、製薬企業のサンプル解析を行い、特に薬科大学へは絶対配置決定解析技術の移転まで進めている。その技術移転活動を通して、生理活性分子そのものを扱っている研究者にとっては、我々が当たり前のように使っている操作性の容易な分子軌道法計算アプリケーションですら障壁が大きいというフィードバックを得た。そこで、いかにすれば少しでも VCD スペクトルと医薬品の絶対配置決定の間の障壁を低くできるか検討を進めた上で、その第一の足がかりとして「平均化予測 VCD スペクトル作成テンプレート」を完成させた (図 1.2)。このテンプレートは分子軌道法計算アプリケーションの 100 個の立体配座アウトプットデータまでなら一気に計算結果から予測 VCD スペクトルを作成することができる。現在、このような活動を通して VCD 分光装置の導入を真剣に検討する製薬企業が現れる段階 (技術情報開示契約成立、特許実施許諾契約最終交渉中) に至っている。

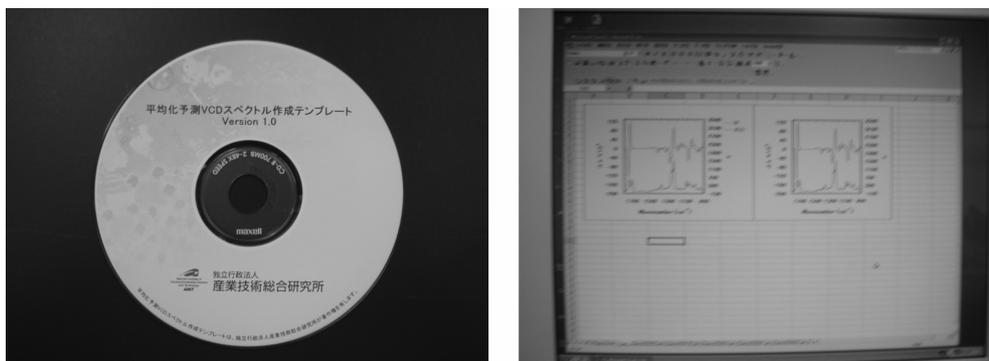


図 1 2. 平均化予測 VCD スペクトル作成テンプレート

さらに、海外に目をむけると我々の解析事例を含めたキラル医薬品の絶対配置解析データの蓄積により、医薬品等の製品の安全性と有効性を保証することを責務とする FDA（米国食品医薬品局）へ VCD 分光装置は導入される段階に至っている。そこで、社会的及び経済的インパクトにつながる、世界規模の波及効果をもつアウトカムの創出にむけ、外国特許出願を含め、⁹⁾ 分子軌道法計算アプリケーション開発会社とのコンタクト等を行い、立体配座コードを活用する汎用構造活性相関解析技術の海外展開も見据えた活動を同時に進めている。

7. おわりに

今後、分子軌道法計算によるスペクトル予測精度が向上すれば、符号化立体配座表記法（立体配座コード）は原理的に複雑な構造を有する分子を扱う、NMRをはじめとする多くの汎用的な分光装置に応用可能である。符号化立体配座表記法の提案が正当な評価を得たことを受けて、これからの国際基準採用にむけての活動を通して日本の国家戦略にも通じていけるとの意を強くしている。その立体配座コードの有用性を証明し、構造活性相関解析に適した様々な分光法との組み合わせを検討していくことで、DNA シーケンサのインパクトを超える汎用構造活性相関解析技術を社会に示していきたい。

謝辞

本研究は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) による平成 12-14 年度産業技術研究助成事業 (00A43007a) から得られた技術シーズを基に行われた。

一連の VCD 研究ならびにアメリカ合衆国の製薬企業の実情調査に関しまして、Syracuse 大学 Laurence A. Nafie 教授、BioTools Inc. Rina K. Dukor 博士から極めて有用なディスカッションをいただき深く感謝いたします。セキテクノトロン株式会社との連携による技術移転活動の関係構築にご尽力いただきました、財団法人日本産業技術振興協会産総研イノベーションズ 竹生一行氏、小林秀輝氏、大島聖一氏に深謝致します。絶対配置決定解析の技術移転に関して問題点洗い出しにご協力いただきました、東京薬科大学 青柳裕博士に感謝致します。磁気赤外円二色性 (MVCD) 現象を組み合わせた汎用構造活性相関解析技術の提案及び開発にご協力いただいている、有限会社エヌエスデザイン 根岸弘氏、竹田理化工業株式会社 高部茂明氏に感謝致します。一連の VCD 研究で有用なディスカッションをいただきました、大阪大学 井上佳久教授、森直准教授、北海道大学 西村紳一郎教授、門出健次准教授、谷口透博士、放送大学 濱田嘉昭教授、新佐依子博士、時田那珂子様に深く感謝致します。技術移転活動に関して海外の視点及びアウトカムの視点からのご指摘をいただきました、宮本宏四国センター所長に深く感謝致します。最後に、研究開始当初から本研究開発を進めることに多大なサポートをいただきました、前グループ長 二タ村森博士、山上奏子様 に深謝致します。

参考文献

- 1) H. Izumi, A. Ogata, L. A. Nafie, R. K. Dukor, *J. Org. Chem.*, **73**, 2367-2372 (2008).
- 2) A. A. Alcaraz, A. K. Mehta, S. A. Johnson, J. P. Snyder, *J. Med. Chem.*, **49**, 2478-2488 (2006).
- 3) X. Jiang, B. Liu, S. Lebreton, J. K. De Brabander, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6386-6387 (2007).
- 4) L. A. Nafie, R. K. Dukor, T. B. Freedman, In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, 2002; pp 731-744.
- 5) 和泉博, 化学装置, **49**, 5-7 (2007).
- 6) H. Izumi, S. Futamura, L. A. Nafie, R. K. Dukor, *Division of Environmental Chemistry Preprints of Extended Abstracts*, **42**, 177-182 (2002).
- 7) H. Izumi, S. Yamagami, S. Futamura, L. A. Nafie, R. K. Dukor, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 194-198 (2004).
- 8) 和泉博、山上奏子、二タ村森, 特許 3991106, 特願 2003-324999.
- 9) 和泉博、竹生一行、小林秀輝, PCT/JP2008/051673 (特願 2007-077133).
- 10) H. Izumi, S. Futamura, N. Tokita, Y. Hamada, *J. Org. Chem.*, **72**, 277-279 (2007).
- 11) http://www.pdbj.org/index_j.html
- 12) J. Löwe, H. Li, K. H. Downing, E. J. Nogales, *Mol. Biol.*, **313**, 1045-1057 (2001).