

本田財団レポート No. 177

第 149 回 本田財団懇談会 (2019 年 6 月 5 日)

「サイエンスが直面する難題を有機化学で ブレイクスルーする」

横浜薬科大学 特任教授

大類 洋

公益財団法人 本田財団

講師略歴

大類 洋 (おおるい ひろし)

横浜薬科大学 特任教授



《略 歴》

- 1965年 東京大学農学部農芸化学科 卒業
- 1965年 宇部興産株式会社 入社
- 1966年 理化学研究所 入所
- 1971年 東京大学博士（農学）
- 1981年 東北大学農学部食糧化学科 助教授
- 1997年 東北大学大学院農学研究科 教授
- 2001年 東北大学大学院生命科学科 教授
- 2006年 横浜薬科大学 教授

《主な受賞》

- 1974年 日本農芸化学奨励賞
- 1991年 井上學術賞
- 2004年 日本分析化学会賞、日本農学賞、読売農学賞
- 2010年 日本学士院賞
- 2015年 瑞宝中綬章

《主な会員等》

- 日本農芸化学会
- 日本分析化学会

■ はじめに

サイエンスが直面する難題を 有機化学で ブレイクスルーする

横浜薬科大学 大類 洋
第149回本田財団懇談会
令和元年6月5日(水)18:30-19:40

皆さん、こんばんは。横浜薬科大学の大類です。本日はこのような機会をいただきまして、本田財団の皆様に御礼申し上げます。

私はタイトルを「サイエンスが直面する難題を有機化学でブレイクスルーする」にさせていただきました。

- 「サイエンスが直面する難題を
有機化学でブレイクスルーする」目標**
“他の人に見えないものを見て研究しよう！”
モットー
1. **夢のエイズ薬？の創製**
 2. **ジアステレオマー法の問題点をブレイクスルーした超高機能不斉識別法の創製**
 3. **活性酸素定量用の発蛍光フォスフィン試薬の創製**
 4. **糖(ヒドロキシメチル)の高純度(~100%)、高収率(>90%)キラル重水素標識化法の開発**

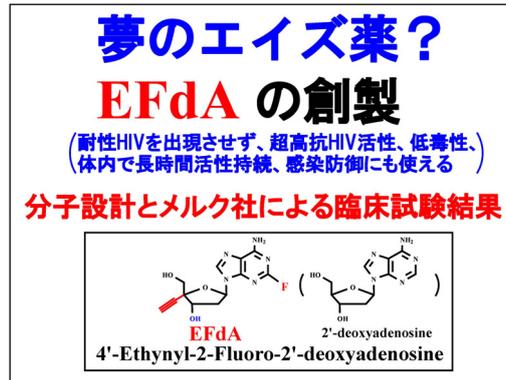
〈図-1〉

〈図-1〉 このタイトルは、私が理化学研究所から東北大学に移りましたときの目標です。

研究室では、オリジナリティのある独創的な研究をする為に、“ほかの人には見えないものを見て研究しよう”ということをもっとにしました。このモットーは、恩師松井正直先生に学んだものです。この目標とモットーとで東北大学で行った研究の中で、難題をブレイクスルーしたと考えられるものはこの4つです。いずれも「機能性分子の創製」です。

本日は「夢のエイズ薬の創製」と「ジアステレオマー法の問題点をブレイクスルーした超高機能不斉識別法の創製」についてお話させていただきます。

■ 夢のエイズ薬？

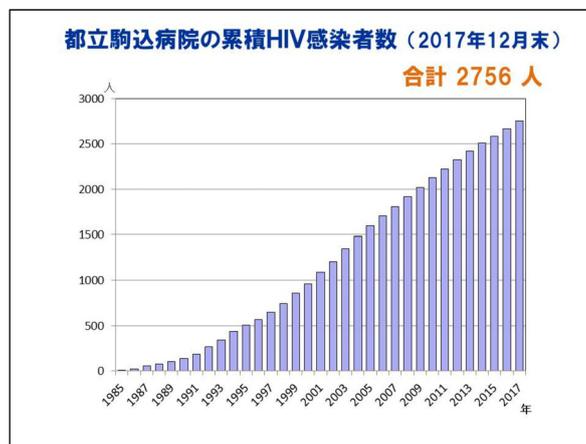


〈図-2〉

〈図-2〉 まず初めは「夢のエイズ薬？EFdA の創製」です。EFdA は現在、臨床試験の Phase2 の段階ですので、この「？」を付けさせていただきました。

EFdA は、4'-Ethinyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine で、比較的シンプルなヌクレオシド（核酸塩基と糖が結合した化合物の一種）です。しかし、EFdA は“薬剤耐性 HIV を出現させませんし、臨床薬に比べて非常に高い抗 HIV 活性を持ち毒性も低く、生体中で酵素分解を受けず、長時間活性が持続します。更に、感染防御にも使える”という非常に素晴らしい臨床試験の結果が報告されております。

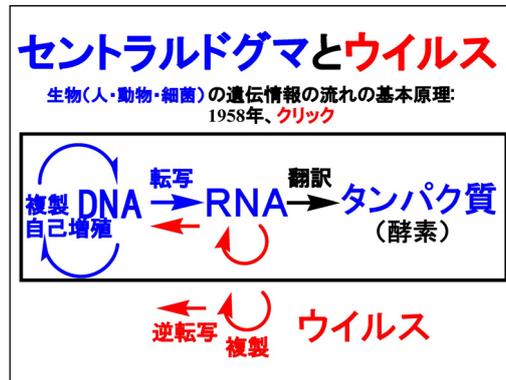
本日は、EFdA の分子設計と、メルク社により報告されている臨床試験結果を紹介させていただきます。



〈図-3〉

〈図-3〉 これは、都立駒込病院の累積 HIV 感染者数です。このように毎年増加しています。先進国の中で HIV 感染者が増加しているのは、わが国だけです。

■ セントラルドグマとウイルス

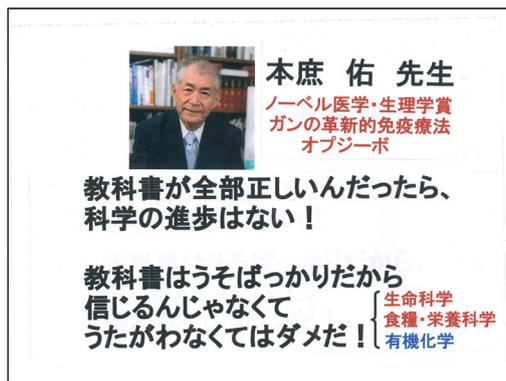


〈図-4〉

〈図-4〉初めに、セントラルドグマとウイルスということでお話させていただきます。1953年にワトソン博士とクリック博士によって、生物の遺伝子は「DNAが二重らせん構造をもつものである」という大発見がされました。その5年後に、その発見をされたクリック博士が、生物の遺伝情報伝達の基本原則としてセントラルドグマを提唱されました。それによりますと、生物の遺伝子はDNAであり、DNAは自己複製をして増殖することが出来る。しかし、DNAは不安定な分子で細胞の核の中にしか存在出来ません。そのDNAが持つ情報をよく似た、より安定なRNAに転写して、RNAからタンパク質ができます。DNA→RNA→タンパク質の順番です。これらのうち自己複製して増殖できるのはDNAだけであるというのがセントラルドグマです。私達はこのセントラルドグマを教科書で勉強したものです。

しかし、その後ウイルスの研究がされて、ウイルスにはDNAを遺伝子とするDNAウイルスとRNAを遺伝子とするRNAウイルスがあることが分かりました。このセントラルドグマによりますと、RNAウイルスは自己増殖、増えることができないわけです。しかし、その後の研究で、ウイルスのRNAは自己増殖できることが分かりました。即ち、RNAからRNAポリメラーゼを使って自己増殖するウイルスと、遺伝子RNAから逆転写酵素を使ってDNAをつくり、そのDNAを宿主（例えば人間）のDNAの中に取り込ませ、そのDNAからRNAをつくって増殖するレトロウイルスがあること明らかになりました。HIVはレトロウイルスです。本日の話は、この逆転写酵素阻害ヌクレオシド薬の創製の話です。

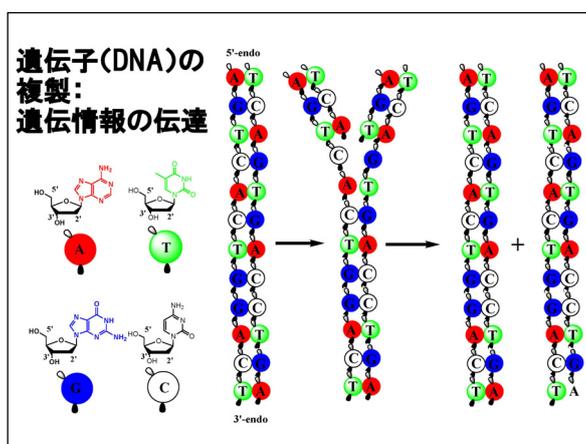
このように、ウイルスの研究によってセントラルドグマは修正されなければならなくなりました。ウイルスの研究によってこのような大発見がされたわけです。



〈図-5〉

〈図-5〉本庶先生は「教科書が全部正しいんだったら、科学の進歩はない！」「教科書はウソばかりだから、信じるんじゃなくて、疑わなくてはダメだ！」と云われております。生命科学、食糧・栄養科学ではそうです。といいますのは、これらの分野ではまだまだ未解明のことが多く、教科書を書き直すような大発見がされるわけです。しかし、有機化学は違いまして、ほぼエスタブリッシュされた学問でありまして、教科書を書き直すような大発見はとてもできません。難しい！そこで私達有機化学者は、有機化学の手法を使い、生命科学、食糧科学、栄養科学の研究を行って教科書を書き直すような大発見をしようとしているわけです。

■ 遺伝子 (DNA) の複製：遺伝情報の伝達

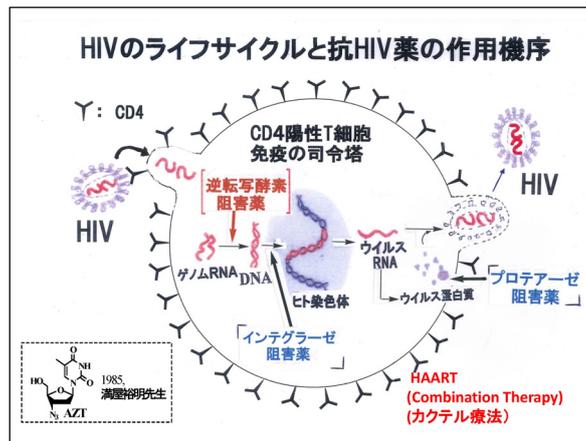


〈図-6〉

〈図-6〉これは、遺伝子 DNA の複製の様子を描いたものです。このように 2 本の DNA が A:T, G:C の水素結合で二重鎖になっています。実際は、これは螺旋構造をとっているわけですが、私には書けませんので、このように書かせていただきました。

複製をするときは 5'-エンドの方から二重鎖が分かると同時に A:T, G:C に従って DNA が合成されます。そうしますと左右の鎖から全く同じ DNA が複製され、2 倍になります。ヒトの DNA ポリメラーゼは突然変異をしたら大変ですから A:T, G:C をしっかり守ります。この様に、ヒトの核酸ポリメラーゼは基質選択性が非常に厳格です。

■ HIV のライフサイクルと抗 HIV の作用機序



〈図-7〉

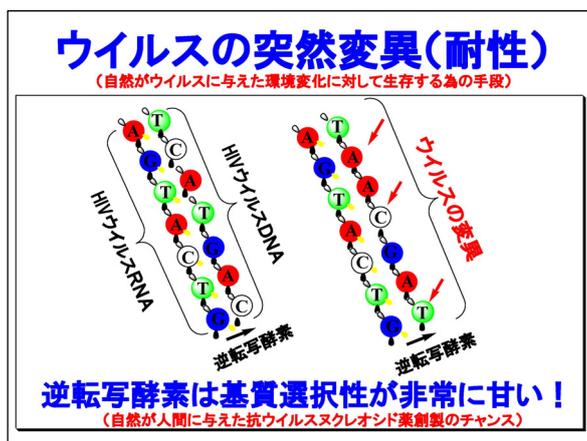
〈図-7〉 エイズは初め、その原因が分からず、エイズが発症すると致死でしたので、非常に恐れられた病気です。しかし、その後、エイズは HIV の感染症だということが分かり、HIV のライフサイクルも研究されるようになりました。それによりますと、HIV は細胞表層にある CD4 という突起をもつ細胞に接着して、中に侵入します。非常にまずいことに、この CD4 が陽性の細胞は我々の免疫系の司令塔である T 細胞であるわけです。HIV が体内に入りますと免疫系と戦いが起こります。10年ぐらいの戦いの後、この司令塔の T 細胞が感染によって戦死してしまいますので、免疫系がダメになってしまいます。これがエイズです。

HIV は細胞に侵入すると、自分の遺伝子である RNA から逆転写酵素を使って DNA をつくります。その DNA をやはり自分のインテグラーゼという酵素を使い、宿主の DNA に取り込みます。取り込まれたことを知らずに、宿主はセントラルドグマに従って取り込んだ DNA から RNA をつくります。ウイルス由来の DNA 部位からつくられた RNA がウイルスの遺伝子である RNA になるわけです。このようにして、どんどんウイルスが増殖していくわけです。

この RNA から、またセントラルドグマに従ってタンパク質がつけられます。最初にできるタンパク質は長いタンパク質で酵素活性を持ちませんが、ウイルスは自分のプロテアーゼを使って適当な長さに切断して酵素活性を持つタンパク質にします。そのタンパク質（酵素）と遺伝子 RNA を組み合わせて成熟したウイルスとなって、細胞の外に出て感染を繰り返すわけです。

このようにライフサイクルが分かると、HIV 特有の酵素に対する阻害剤が抗 HIV 薬として開発されてきました。最初に開発されたのが、満屋弘明先生がアメリカ留学中に見つけられたアジドチミジン (AZT) です。アジドチミジンは逆転写酵素阻害ヌクレオシド薬です。しかし、これらの阻害薬単品を使うと HIV は突然変異して直ぐに薬剤耐性を獲得します。ですから、HIV 感染症の治療は非常に難しいということになったわけです。しかし、逆転写酵素、インテグラーゼ、プロテアーゼとそれぞれ作用機作が異なる阻害薬を組み合わせる HAART というコンビネーションセラピー（カクテル療法）が開発されました。これは、3つの薬に対して同時に耐性を獲得するのは難しいだろうという考えから開発された治療法です。これが非常に効果を発揮しまして「HIV 感染症は今や致死ではなく、コントロール可能な慢性感染症」と言われるようになりました。”慢性“というのは、宿主の DNA に取り込まれたウイルスはどうしようもありませんので、一生薬を飲まなくてはならない慢性感染症というわけです。

■ エイズ治療の問題点

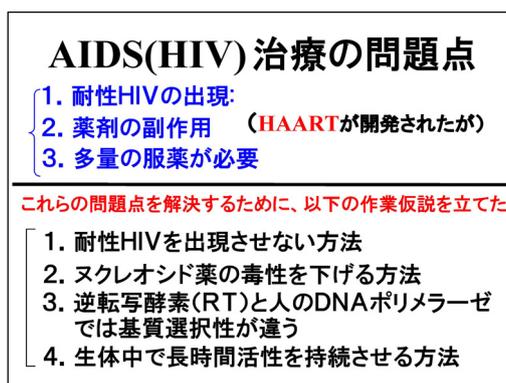


〈図-8〉

〈図-8〉ウイルスは、突然変異によって薬剤耐性を獲得します。突然変異とは、自分の遺伝子を変えることです。例えば、HIVはRNAから逆転写を使ってDNAをつくるわけですが、この際、A:T, G:Cが忠実に守られれば只一つのDNAしかできないわけですが、そうではありません。逆転写酵素はRNAからDNAを作るとき、A:T, G:Cを守りません。でたためにDNAをつくります。その中でたまたま薬剤耐性のウイルスが出現するわけです。

このように逆転写酵素の基質選択性は非常に甘いわけです。ですから、A, T, G, Cによく似たヌクレオシド薬をつくと、逆転写酵素は取り込むけれど、ヒトのDNAポリメラーゼは基質選択性が厳格なため、取り込まない可能性が有ります。それ故、優れた薬をつくれる可能性が有ります。

ですから私は「ウイルスの突然変異は、自然が人間に与えた抗ウイルスヌクレオシド薬創製の絶好のチャンスである」と考えております。



〈図-9〉

〈図-9〉エイズ (HIV 感染症) 治療の問題点は以下の3つです。

第一に、薬剤耐性 HIV の出現です。HAART が開発されましたが、多剤耐性 HIV が出現しております。そうなりますと治療が難しいわけです。

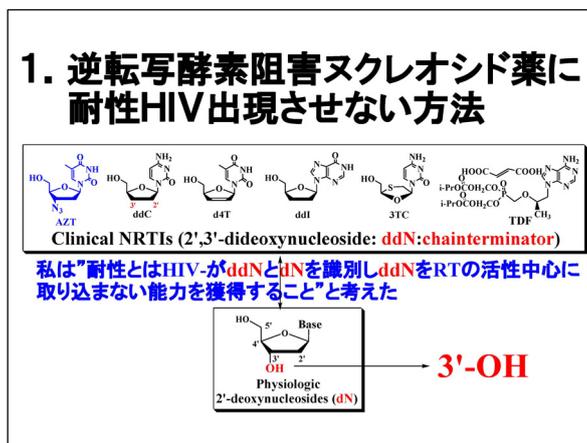
第二に、臨床薬の副作用です。副作用のため治療を中断しなければならないという事態も起きて来るわけです。

第三に、臨床薬はそれ程活性が高くないということと、生体中で分解されてしまうので、多量

の服薬が必要である。

これらの問題点を解決するために、私は「耐性 HIV を出現させない方法」「ヌクレオシドの毒性を下げる方法」「逆転写酵素とヒトの DNA ポリメラーゼは基質選択性が違うので、それを利用すれば優れた抗 HIV 活性をもつヌクレオシド薬の創製が可能である」という仮説と、さらに「生体中で酵素分解されず、長時間活性を持続させる方法」という 4 つの作業仮説を立てました。以下、これらの仮説を具体的に説明いたします。

■ 逆転写酵素阻害ヌクレオシド薬に耐性 HIV を出現させない方法



〈図-10〉

〈図-10〉 まず初めは「逆転写酵素阻害ヌクレオシド薬に耐性 HIV を出現させない方法」です。

上部の図は、現在臨床薬に使われている逆転写酵素阻害ヌクレオシド薬です。すべて、2',3'-dideoxynucleoside[2',3'-ジデオキシヌクレオシド (ddN)]の仲間です。この糖部の 2'-位と 3'-位に水酸基(OH)を持たないジデオキシ構造が抗 HIV 活性を持つために必須であると考えられておりました。しかし、全てのジデオキシ臨床薬にはとても容易に耐性 HIV が出現します。

下の図は、生理的 2'-deoxynucleoside[2'-デオキシヌクレオシド(dN)]で DNA の構成基質で 3'-位の水酸基(OH)を持ちます。この 5'-位と 3'-位の水酸基を両手として 5'-位の方から DNA 鎖がつくられます。

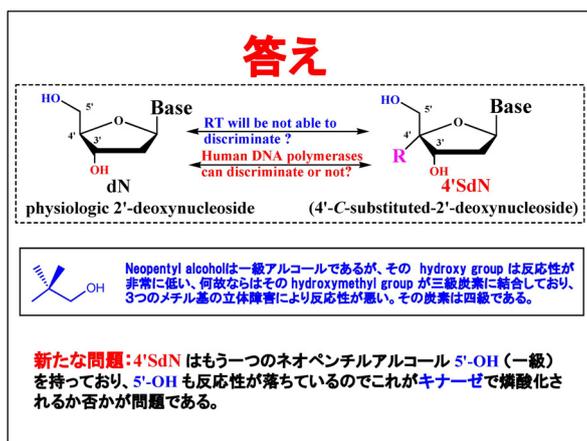
ジデオキシヌクレオシドは 3'-OH を持ちませんので、DNA 鎖に取り込まれるとここで DNA 鎖の生合成がストップしてしまい、チェインターミネーターとなり抗 HIV 活性を持ちます。

チェインターミネーターとなるためには 3'-OH を持たないジデオキシ構造が必須であると考えられていた訳です。しかしながらジデオキシヌクレオシド薬には容易に耐性 HIV が出現します。

私は、「耐性とは HIV がジデオキシヌクレオシド薬(ddN)と生理的 2'-デオキシヌクレオシド(dN)を識別して、ジデオキシヌクレオシド薬を偽物だと見抜いて、逆転写酵素の活性中心に取り込まないようになったものである」と考えました。両者の構造の違いは 3'-OH を持つか、持たないか、ですので、「HIV は 3'-OH を持つか否かで両者を識別している」と考えました。ですから、「耐性 HIV を出現させないヌクレオシド薬は HIV によって生理的 2'-デオキシヌクレオシド(dN)と識別されてはいけない、すなわち 3'-OH を持たなければならない」と考えたわけです。

これまでの常識では、3'-OH を持たせるなどということはとんでもないことでした。しかしな

がら、私は3'-OHを持ちながらDNA鎖合成のチェインターミネーターとする方法を考えました。



〈図-11〉

〈図-11〉その答えは、生理的2'-デオキシヌクレオシド(dN)の4'-位に置換基を導入することです。置換基を導入すると、4'-位炭素は四級炭素になります。そうなりますと、3'-OHはネオペンチル型の二級アルコールとなりますので、化学反応性が非常に低くなります。ですからこの3'-OHはちゃんと水酸基をもっているという認識には使えても、DNA合成には反応性が非常に低いため使えない。すなわちチェインターミネーターになる可能性があると考えたわけです。それ故、私は4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)を耐性HIVを出現させないヌクレオシドとして設計しました。

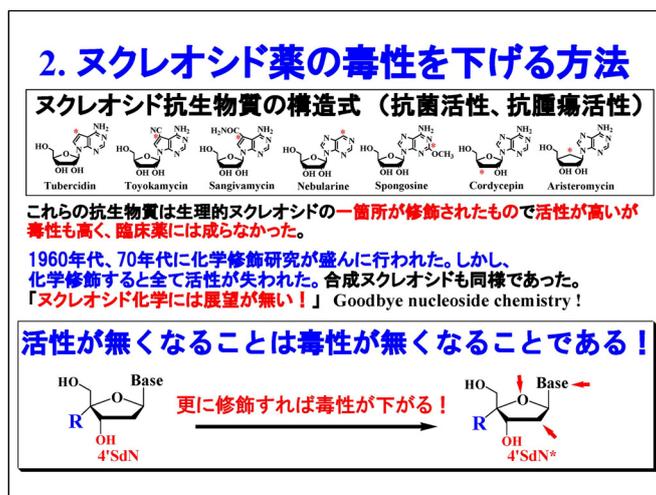
左下の化合物がネオペンチルアルコールです。この水酸基(OH)は一級水酸基なので反応性が高いはずですが、このヒドロキシメチル基は四級炭素に結合していますので、これら三つのメチル置換基による立体障害によって反応性が著しく低くなります。

ネオペンチルアルコールは大学で勉強しますので、誰でも知っていることです。4'-位に置換基を導入すると4'-位炭素は四級となり3'-OHがネオペンチルアルコールとなります。

しかしながら、この構造[4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)]には問題点があります。5'-位の水酸基もネオペンチルアルコールとなりますからこの水酸基も反応性が低くなります。ヌクレオシドがDNA鎖合成の基質となるためには、生体内でキナーゼによって5'-位の水酸基がリン酸化されてトリリン酸にならなければなりません。5'-位の水酸基の反応性が低いので、キナーゼによってリン酸化されるかどうかということが問題であるわけです。

HIVが生理的ヌクレオシド(dN)と4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)を識別出来ず取り込み、4'SdNがチェインターミネーターになれば抗HIV薬となれるわけです。しかし、ヒトのDNAポリメラーゼも4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)と生理的ヌクレオシド(dN)を識別出来ず4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)を取り込めば、これは毒性が非常に高いということになります。

■ ヌクレオシド薬の毒性を下げる方法



〈図-12〉

〈図-12〉ですから、次に私はヌクレオシド薬の毒性を下げる方法を考えました。図の上部のヌクレオシド類は天然から単離されたヌクレオシド系抗生物質の構造式です。いずれも生理的ヌクレオシドの1カ所が修飾されたもので、非常に高い抗菌活性、抗腫瘍活性を持ちますが、毒性も高く、臨床薬にはなり得ませんでした。

そこで、1960年代、1970年代に化学者達は、より優れた生物活性をもつヌクレオシドを得ようとして、これらの抗生物質を化学修飾しました。そうしたところ、全てのヌクレオシド抗生物質の活性が失われてしまいました。

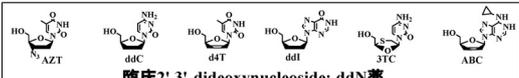
これは合成ヌクレオシドでも同じでした。生理的ヌクレオシドの1カ所を修飾したものは、活性が高いけれども毒性も高い。その1カ所を修飾したものを更に修飾すると、活性が失われてしまいました。

それ故当時、化学者達は、「ヌクレオシド化学には将来の展望がない」と云って、ヌクレオシド化学からどんどん去って行ってしまいました。特にアメリカでは、研究費を獲得することができませんでしたので、その傾向が非常に強かったわけです。

しかし、私は、「活性が無くなることは毒性が無くなることである」と考えました。ですから、「もしこの1カ所を修飾した4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)の毒性が高ければ、これを更に修飾すれば毒性を下げる事が出来る」と考えました。即ち1カ所を修飾したヌクレオシドは、ヒトの核酸ポリメラーゼはそれを生理的ヌクレオシドと識別することが出来ないで、取り込むけれど、2カ所またはそれ以上修飾すると、それらを識別でき、取り込まなくなると考えたわけです。

■ 逆転写酵素と DNA ポリメラーゼの基質選択性の違いを利用する

3. 逆転写酵素(RT)と人のDNAポリメラーゼでは基質選択性が違うからHIVに選択的に効き、毒性が低い優れた修飾ヌクレオシドの創製が可能である



臨床2',3'-dideoxynucleoside: ddN薬

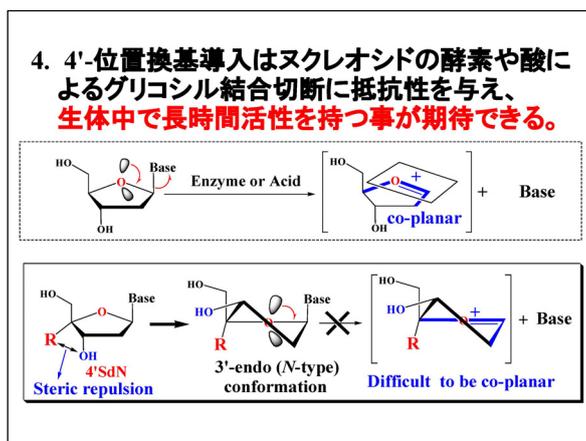
Sanger法(1980年、ノーベル賞)はジデオキシ法と云われる様に、ジデオキシヌクレオシドがDNAポリメラーゼのチェインターミネーターであることを利用している。即ち、これらジデオキシヌクレオシド薬はDNAポリメラーゼのチェインターミネーターであり、副作用を持つことを示している。それ故、これらジデオキシ薬は使用量を調節して現在も使われている。これは逆転写酵素に対する活性とDNAポリメラーゼに対する活性が違うこと、即ち両者では基質選択性が違うことを利用している。それ故、これら臨床薬より更に良く逆転写酵素に受け入れられ、DNAポリメラーゼには臨床薬より更に受け入れられないより優れたヌクレオシド薬の創製が可能である。

〈図-13〉

〈図-13〉 次の仮説は、「逆転写酵素とヒトの DNA ポリメラーゼでは、基質選択性が違うから、HIV に選択的に効き、毒性が低い、優れた修飾ヌクレオシド薬の創製が可能である」ということです。これは、突然変異からも云うことができますが、更に重要なことから云うことができます。それは、DNA のシーケンスを決定するサンガー法からも云えるということです。サンガー先生は、サンガー法の開発により 1980 年にノーベル賞を受賞されています。1980 年といえますと、未だエイズが出現する前です。サンガー法はジデオキシ法といわれるように、ジデオキシヌクレオシド(ddN)が DNA ポリメラーゼのチェインターミネーターであることを利用しております。すなわち、これらジデオキシヌクレオシド臨床薬が DNA ポリメラーゼのチェインターミネーターであり、副作用を持っていることを示しています。ですから、これらジデオキシヌクレオシド臨床薬は使用量を調整して使われています。しかしながら、副作用のため治療を中止しなければならないことも起きているわけです。

これは、臨床薬の逆転写酵素に対する活性と DNA ポリメラーゼに対する活性が違うからです。逆転写酵素はこれらの薬を容易に取り込むけれど、DNA ポリメラーゼはそれ程とりこまない、すなわち両者の基質選択性がちがうところからこのようなことが起きているわけです。ですから、これらの臨床薬より逆転写酵素によって更に良く取り込まれて、DNA ポリメラーゼによっては更に取り込まれないという臨床薬より優れた抗 HIV ヌクレオシド薬の創製が可能であると考えました。

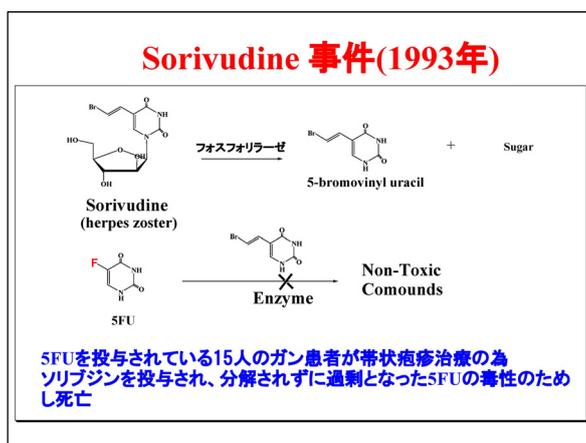
■ 生体中で長時間活性を持続させる方法



〈図-14〉

〈図-14〉 4番目の仮説は、「生理的ヌクレオシドの4'-位に置換基を導入すると、そのヌクレオシドは酵素や酸に対してグリコシル結合(糖と塩基との結合)の切断が抵抗性をもつようになり、生体中で長時間活性を持つことができる」、という仮説です。

ヌクレオシド薬のグリコシル結合が切断されると、そのヌクレオシド薬は生物活性を失います。さらに、時として切断されて遊離した塩基が新しい毒性を示すことがあります。その代表例がソリブジン事件です。



〈図-15〉

〈図-15〉 ソリブジンは共同研究者であるヤマサ醤油（株）によって開発された非常に優れた帯状疱疹ウイルスに対するヌクレオシド薬です。しかしながらこのヌクレオシドは体内でフォスフォリラーゼという酵素によってグリコシル結合が切断されて、5-bromovinyl uracil という塩基が出てきます。

5FU はガン治療に使われる薬ですが毒性が高いものです。しかし、5FU は体内の酵素によって毒性が低いものに分解されます。しかし、この 5-bromovinyl uracil は 5FU を分解する酵素を阻害します。そのことを知らない医者が、5FU で治療しているガン患者さんが帯状疱疹になったときに、ソリブジンを使ってしまいました。そうしますと、本来は体内で分解されて毒性が低くなるはずの 5FU が分解されずに過剰に蓄積してその毒性のために 15 人のガン患者さんが亡くなって

しまった事件です。ヌクレオシド薬が活性を失わないためにも、このようなことが起きないためにもグリコシル結合が生体中で安定であることが望まれるわけです。

グリコシル結合の切断は、図-14の糖部位のローンペアが関与して、平面 (co-planar) 構造をもつオキソカルベニウムイオンを形成して進みます。しかし、4'-位に置換基を導入すると、その置換基と3'-位の水酸基との立体反発によってフラノース環のコンフォメーションが安定な3'-エンドになります。このようなコンフォメーションを持つヌクレオシドでフラノース環のローンペアが隣接基関与して co-planar なオキソカルベニウムイオンをつくらうとしても co-planar にはなれません。ですから、ローンペアが隣接基関与出来ません。ということは、「4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)のグリコシル結合は生体中で安定で、長時間活性を持続すること出来るであろう」という仮説です。

以上4つの仮説に基づきまして、4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4'SdN)の合成と、生物学的評価研究を始めました。

本研究はアサヒビール(株)に生物活性試験をお願いして共同研究として始めました。
抗HIV活性試験は県立福島医大の馬場昌範先生(現、鹿児島大教授)にして頂きました。
また、畑辻明東工大教授が代表の科研費重点研究「核酸の構造と機能の有機化学的展開(1992~4)」の班員として研究を行う事が出来ました。
しかし、アサヒビール(株)が医薬品開発から撤退したので、次に、ヤマサ醤油(株)に共同研究として生物活性試験をお願い致しました。
ヤマサ醤油(株)は抗HIV活性試験を満屋裕明先生(熊本大、NIH)にお願いしましたので、私、ヤマサ、満屋先生との共同研究となりました。

〈図-16〉

〈図-16〉本研究は初め、アサヒビール(株)との共同研究で始めました。その際、抗HIV活性は福島県立医大の馬場昌範先生にお願いいたしました。馬場先生はその後、鹿児島大学に移られて活躍されております。しかしながら、アサヒビールさんが医薬品開発から撤退しましたので共同研究は終わりました。

そこで次に、ヤマサ醤油(株)に共同研究をお願いいたしました。そうしますと、ヤマサ醤油さんが抗HIV活性を満屋弘明先生(熊本大学医、NIH)にお願いしましたので、私とヤマサ醤油さん、満屋先生の共同研究で研究を進めてきたわけです。

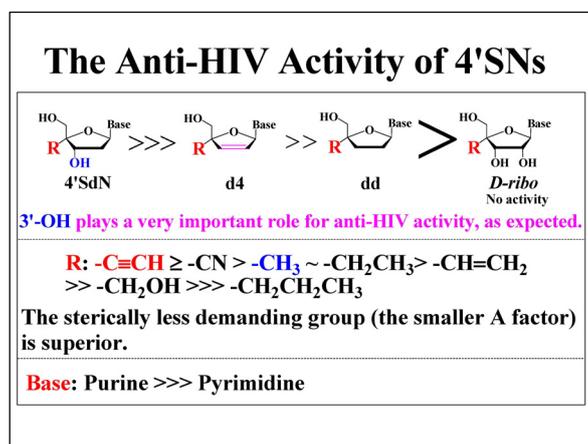
Anti-HIV Activity of 4'-C-Methyl-2'-deoxynucleosides				
Structure	Base	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)
	Ad	2.6	2.6	1.0
	Th	7.2	104	14.4
	C	0.072	0.13	1.8
	araC	0.080	0.09	1.13
	Pu	1.9	>200	>100
	Ad	>500	>500	1
	Th	21	330	16
	C	350	350	1
	Ad	30	400	13
	Th	>500	>500	1
	C	27	27	1
	AZT	0.001	>20	>2020

3'-OH is important for biological activity
MdC and MaraC are the chain-terminators of DNA-polymerase α and β !!
 Yamaguchi, T. et al. *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 1347-1350 (1997)

〈図-17〉

〈図-17〉 まず初めに、4'-位置換基として、合成が一番簡単と考えられる4'-位にメチル基を持ち2'-位、3'-位に水酸基をもたないジデオキシヌクレオシド(MddN)、ジデオキシヌクレオシド(Md4N、2',3'に二重結合を持つ)、および3'-位に水酸基を持つ2'-デオキシヌクレオシド(MdN)を合成しました。それらの中で、高い抗HIV活性を示したものは3'-位に水酸基を持つシトシン体(MdC)とAraC体(MaraC)でした。しかし、これらは毒性も高く、臨床薬としては使いものになりませんでした。MddNとMd4Nは臨床薬の構造を持つものです。3'-水酸基を持つdNが高い抗HIV活性を持ち、3'-水酸基を持たないddN及びd4Nが抗HIV活性を持たないという結果から、3'-位の水酸基が抗HIV活性に重要な役割を果たしていることが分かりました。

さらに、山口先生らとの共同研究によってMdCとMaraCはDNAポリメラーゼα、β、さらに逆転写酵素のチェインターミネーターであることを証明しました。このようにして、第一の仮説である「3'-水酸基をもっているでもチェインターミネーターになる」ということが分かったわけです。



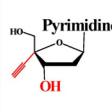
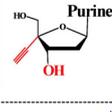
〈図-18〉

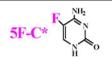
〈図-18〉 次に、4'-位の置換基として色々な置換基を持つD-リボ体、dd-体、d4-体、3'-OHを持つ2'-デオキシ体(4'SdN)体を合成しました。D-リボ体は生物活性を全く示しませんでした。dd-体、d4-体はそれ程高い抗HIV活性を示しませんでした。何故かといいますと、これらの5'-OHはネオペンチルアルコールになりますのでキナーゼによって全くリン酸化されないかそれ程されないためです。

dd-体、d4-体の 4'-位が H のものは臨床薬です。H だとキナーゼのよってリン酸化されて活性を持つので臨床薬として使われているわけです。

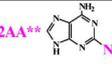
しかし、非常に幸運なことに、3'-OH を持つ 4' SdN は 5'-OH がキナーゼでリン酸化されて非常に高い抗 HIV 活性を示しました。幸運なことに 3'-OH が 5'-OH のキナーゼによるリン酸化に非常に役に立っているということが分かったわけです。これらの 4'-位の置換基の中でエチニル基（アセチレン）が最も優れていることを見出しました。これはヤマサ醤油さんとの共同研究の段階です。さらに、プリン塩基がピリミジン塩基より優れていることを見出しました。

Anti-HIV Activity of 4'EdN

Structure	Base	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	SI
 Pyrimidine	T	0.61	>380	>623
	5I-U	0.34	>260	>765
	5Me-C	0.011	0.70	63
	(Ara)-C	0.0048	1.74	363
	C	0.0048	0.92	192
	5F-C*	0.030	>100	>3333
 Purine	Ad	0.012	16	1333
	I	0.15	216	1440
	2AA**	0.0003	0.82	2733
	G	0.0014	1.36	971
	AZT	0.01	>20	>2000



5F-C*



2AA**

〈図-19〉

〈図-19〉これは、4'-エチニル-2'-デオキシピリミジン体、およびプリン体の抗 HIV 活性を示したものです。ピリミジンの中では、やはり 4'-メチル体と同様にシトシン体と AraC 体が高い抗 HIV 活性と毒性を示しました。シトシン体のシトシンの 5-位をフッ素で修飾し計 2 カ所を修飾した 5F-C は予想通り毒性が下がりました。喜びましたが、ヤマサ醤油さんの生物学者から「5F-C はある種の細胞に毒性を示した」という報告を受けましたので 5F-C の研究はこの段階でストップしました。プリン体はアデニン、グアニン、2-アミノアデニンが非常に高い抗 HIV 活性と非常に満足いく選択性指数（SI=毒性/活性、1000 を超えれば臨床薬になり得ると云われている）を与えました。

イノシン（I: ヒポキサンチン体）は DNA の構成成分ではないので、それほど高い活性も毒性も示しませんでした。

■ 耐性 HIV に対する活性

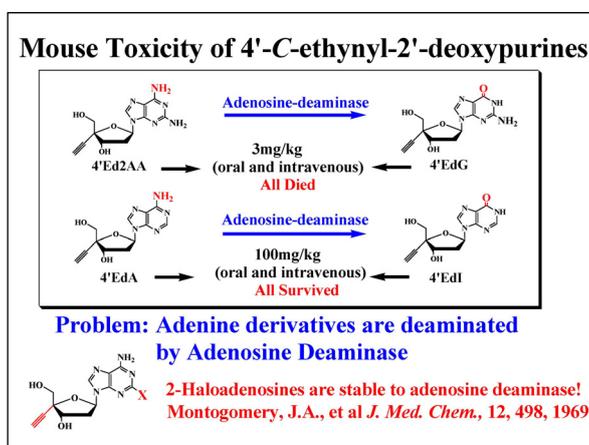
耐性HIVに対する活性

Compound	EC50 (μM)								CC50 (μM)	
	HXB2 ^{a)}	KH6SR	L74V	41/215	M184V	M184I	I255G	MDR		Y181C
4'EdC	0.0012	0.0008	0.0013	0.006	0.0024	0.0026	0.015	0.0012	0.0021	>200
4'EaraC	0.0071	0.015	0.026	0.026	0.71	0.0026	0.48	0.17	0.0079	>200
4'MedC	0.0058	0.0071	0.0052	ND	0.2	0.74	ND	0.0033	ND	>200
4'EdA	0.008	0.0033	0.004	0.012	0.047	0.022	0.065	0.0062	0.011	>200
4'Ed2AA	0.0014	0.00035	0.0007	0.0017	0.0059	0.0027	0.0041	0.001	0.0008	>200
4'EdG	0.007	0.001	0.0012	0.019	0.008	0.0041	0.0068	0.0048	0.01	52
4'EdI	0.81	0.25	0.61	1.3	1.6	1.5	2.2	0.51	ND	>200
AZT	0.022	0.02	0.02	0.3	0.01	0.07	1.6	15.7	0.014	>100
3TC	0.71	ND	ND	ND	>100	>100	5.9	1.1	ND	>100
ddC	0.2	3.0	1.5	ND	2.2	ND	1.3	5.5	ND	>100
ddI	3.9	12.7	19.5	3.6	10.1	ND	12.2	25	ND	>100

^{a)} Wild-type HIV
Anti-HIV activity was determined with MAGI assay.
ND=not determined

〈図-20〉

〈図-20〉この表は、耐性 HIV に対する活性です。青色の HXB2 が野生株で、KH65～Y181C が全て耐性 HIV です。ご覧の様に臨床薬(AZT, 3TC, ddC, ddI)には耐性 HIV が存在します。4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4' SdN)は置換基がメチルであれエチニルであれ、全ての耐性 HIV にある程度活性を示しました。中でもこれら赤色のプリン誘導体は、あたかも耐性 HIV を出現させないのではと思わせる程高い活性を示しました。しかしグアニン誘導体(4' EdG)はこの研究に使った HeLa 細胞(ガン細胞)に対しても活性(CC50=52)を示しましたので、毒性が高いものと予想されました。

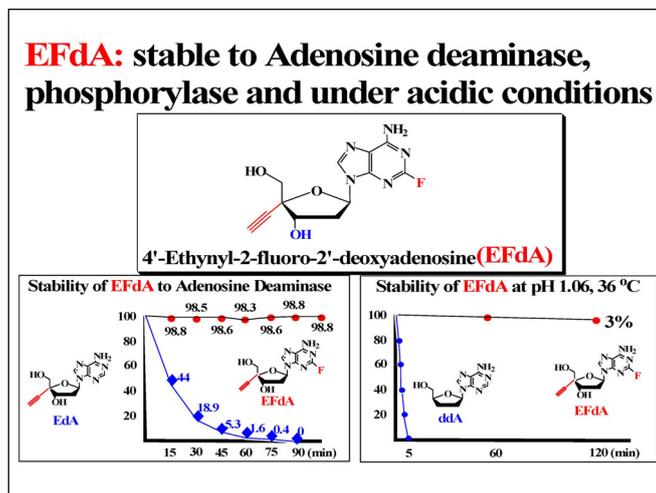


〈図-21〉

〈図-21〉そこで次に、プリン誘導体のマウスを使った毒性試験を行いました。その結果、やはりグアニン誘導体は経口投与、静脈投与とも非常に高い毒性を示しました。バタバタとマウスが死にました。2-アミノアデニン誘導体(4' Ed2AA)も同様の毒性を示しました。しかし、アデニン誘導体(4' EdA)およびイノシン誘導体(4' EdI)は毒性を示しませんでした。そこで、アデニン誘導体が非常に有望であると思われたわけですが、この研究中に非常に重要な事が分かりました。それは、これらアデニン誘導体(4' Ed2AA, 4' EdA)はマウス体内のアデノシンデアミナーゼによって容易にデアミネーションを受けて、4' Ed2AA は毒性の高いグアニン誘導体(4' EdG)に、4' EdA は活性も毒性も低いイノシン誘導体(4' EdI)になってしまうことが分かったことです。ですから、動物体内のアデノシンデアミナーゼが非常に重要な問題であることが分かりました。しかしながら、ア

デノシンデアミナーゼに関しては 1969 年以来、モントゴメリーらによって「アデニン塩基の 2-位にハロゲンを導入するとアデノシンデアミナーゼの作用を受けなくなる」という報告がありましたので、次に 4' EdA のアデニン塩基の 2-位にフッ素を持つ EFdA を合成しました。EFdA は二カ所が修飾されたもので、毒性が低くなると期待できるものです。

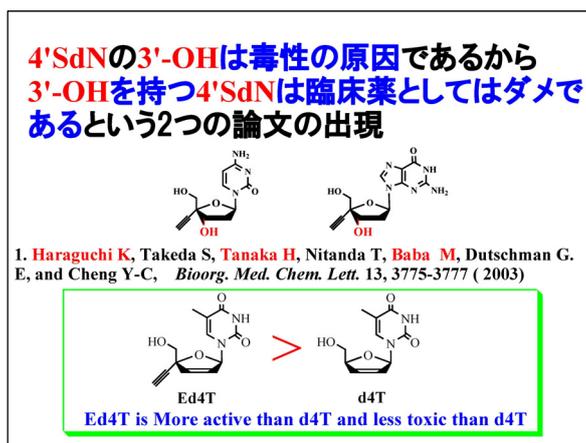
■ 2 つの論文の出現



〈図-22〉

〈図-22〉左下図は EFdA のアデノシンデアミナーゼに対する安定性を示したものです。2-位にフッ素がない EdA は左下図中の青線のように簡単に分解されますが、EFdA は同条件下で完全に安定でした。右下図は EFdA の胃酸中の pH での安定性を示したものです。臨床薬であるジデオキシヌクレオシド薬は青線のように直ぐ分解されてしまいます。ですから、臨床薬はカプセルまたはコーティングして、胃を通過するような方法で投与されています。しかし、EFdA は期待どおり 2 時間後でも 3%しか分解されず、非常に安定であることが分かりました。

さらに、フォスホリラーゼによってもグリコシル結合が切断されず安定であることが分かりました。



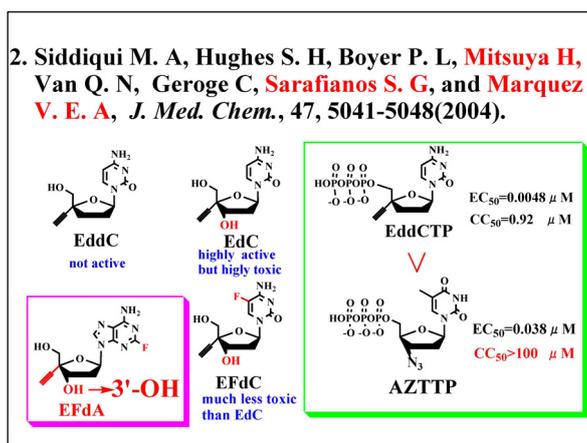
〈図-23〉

〈図-23〉そこで、いよいよ満屋先生に抗 HIV 活性などを調べて頂く段階になったわけですが、これまでの毒性試験の結果などを鑑みて、4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4' SdN)の 3'-位水

酸基は毒性の原因であるから、3'-位水酸基をもつ 4'-置換 2'-デオキシヌクレオシド(4' SdN)は臨床薬としてはダメであるという 2つの論文が出現しました。

その一つは昭和大学の田中先生、原口先生および鹿児島大学の馬場先生らによる共同研究です。先生らは、臨床薬である d4T の 4'-位にエチニル基を導入した Ed4T を合成されたところ、Ed4T は臨床薬である d4T より活性が高く、毒性が低い、非常にすぐれた抗 HIV ヌクレオシドであることを見つけられました (実際そうであります!)

そして Ed4T や d4T の毒性が低いのは 3'-位に水酸基を持たないからであり、3'-位に水酸基を持つ 4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4' SdN)は 3'-位の水酸基による毒性のために、臨床薬としてはダメであるという論文を出されたわけです。



〈図-24〉

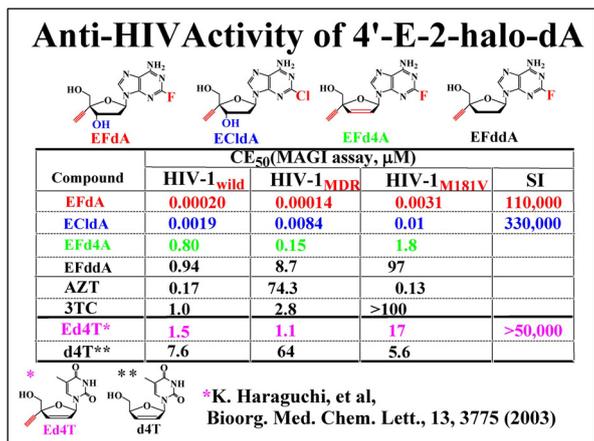
〈図-24〉 もう一つは、共同研究者の満屋先生らの論文で、NIHの核酸化学者(Marquez)、ミズーリ大学のウイルス学者(Sarafianos)らとの共同研究です。満屋先生は先程紹介いたしました毒性試験の後、「大類先生のヌクレオシドは毒性が高くてダメですよ。3'-位の水酸基が毒性の原因だからダメだろう」とよく云われていました。

私達は満屋先生との共同研究で、「3'-位水酸基を持たない EddC は 5'-位の水酸基がキナーゼによってリン酸化されないため抗 HIV 活性を持たない。しかし、3'-位水酸基をもつ EdC は高い活性を持つが毒性も高い。もう一カ所修飾した EFdC は毒性が下がる」という論文を書きました。

満屋先生らは EddC の 5'-位にトリリン酸を持つヌクレオチド(EddCTP)を合成しました。EddCTP と野生株の HIV の逆転写酵素を使って、酵素的研究を行い、EddCTP は当時一番抗 HIV 活性が高かったアジドチミジンのトリリン酸(AZTTP)より活性が高く、しかも毒性が低いということを見出されました。その結果に基づいて、3'-位に水酸基を持つ 4' SdN は毒性が高い、3'-位水酸基は毒性の原因であるから 3'-位に水酸基をもつ 4' SdN はダメであるという論文を出されました。

この2つの論文は、高名なウイルス学者と核酸化学者との共同研究であるので、世界中の研究者が、4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド(4' SDN)は 3'-位水酸基による毒性のためダメであると考えようになりました。ヤマサ醤油さんもそうです。「大類先生の 4' SdN は毒性が高くて臨床薬にはなり得そうにないので、共同研究をやめさせていただきたい」と申し出てまいりました。

しかし、私の研究では、3'-位水酸基は耐性 HIV を出現させない為に必須であります。また、EFdA は 2カ所修飾したものですので、毒性が低い可能性があります。



〈図-25〉

〈図-25〉そこで、EFdA とその塩素アナログ(ECIdA)、EFdA の 3'-位水酸基を取り除いた dd-体 (EFddA)、d4-体 (EFd4A) を合成して、満屋先生に抗 HIV 活性などを評価していただきました。その結果、3'-位水酸基を持たない EFddA、EFd4A は、臨床薬である d4T も Ed4T も同じですけど、野生株の HIV には良い活性を示しましたが、耐性 HIV になると活性がどんどん低下してきました。この結果は、3'-位水酸基を持たないヌクレオシドには耐性 HIV が出現するであろうということを示唆するものであると私は考えました。実際、d4T は臨床薬ですので、既に耐性 HIV が出現しています。

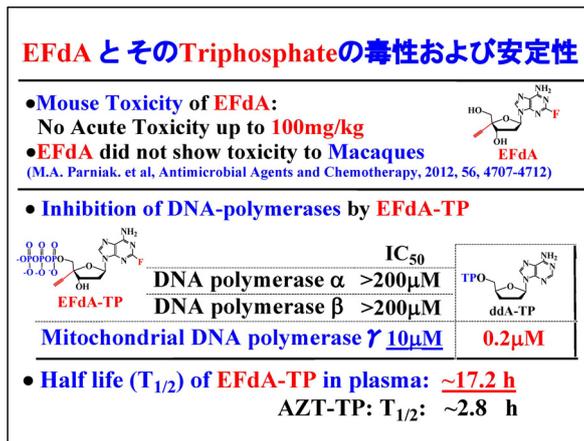
しかし、一方、3'-位水酸基を持つ EFdA と ECIdA は、特に EFdA は野生株の HIV に対しては臨床薬よりも数万倍もの高い活性を持ちます。しかも耐性 HIV に対しても非常に高い活性を持っています。さらに、非常に素晴らしい選択性指数(SI)、10 万を超える選択性指数を与えました。このことは、これらのヌクレオシドは臨床薬として使い得る、すなわち 3'-位水酸基があっても毒性が高くないことを示しています。

■ EFdA に耐性 HIV を出現させる研究



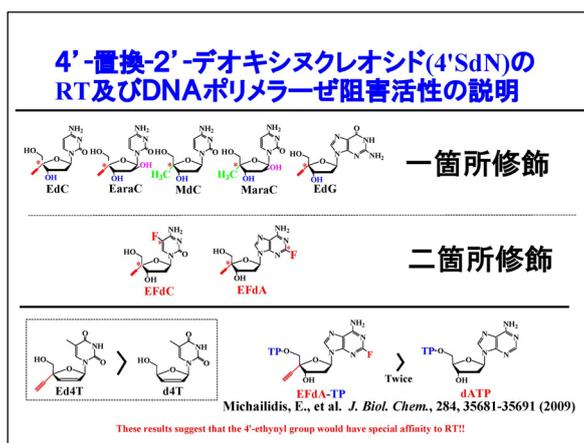
〈図-26〉

〈図-26〉耐性 HIV に関しましては、それ以後、満屋先生グループは EFdA に対して耐性 HIV を出現させる研究をずっとされております。その結果は、3'-位水酸基を持たない Ed4T、3TC、FTC には耐性 HIV が出現しましたが、3'-位水酸基をもつ EFdA には 20 年近く耐性 HIV は出現していません。この結果は、3'-位水酸基は耐性 HIV を出現させないために非常に重要であることを示すものです。



〈図-27〉

〈図-27〉 これは、EFdA とその活性本体である 5'-0-トリリン酸 (EFdA-TP) の毒性及び安定性です。EFdA はマウスや赤毛ザル (Macaques) に対して急性毒性を示しませんし、赤毛ザルに対しては6ヵ月間副作用を示しませんでした。EFdA の活性本体であるトリリン酸は、満屋先生らの研究によると、dNA ポリメラーゼ α、β の基質にはなりません。しかし、最も重要なミトコンドリア DNA ポリメラーゼ γ に対しては阻害して、IC₅₀ は 10 μmol という結果が得られました。臨床薬であるジデオキシヌクレオシド薬のトリリン酸の IC₅₀ は 0.2 μmol ですから、EFdA トリリン酸は臨床薬より 50 倍ほど毒性が低いという結果が得られたわけです。しかしながら、この結果を満屋先生の共同研究者であるミズーリ大学の Sarafianos 先生が追試したところ、EFdA トリリン酸はミトコンドリア DNA ポリメラーゼ γ の基質にならない、DNA ポリメラーゼ α、β と同じであるという結果が得られています。すなわち、EFdA はヌクレオシドとしての毒性は非常に低いという結果が得られているわけです。さらに、満屋先生らは、EFdA トリリン酸は血漿中での半減期が 17.2 時間と非常に長いので1日に一度の服薬で済むであろうという結果を得ています (例えばアジドチミジントリリン酸の半減期は3時間以内ですから、1日に数度薬を飲まなくてはならないということになります)。この結果は、後のメルク社による臨床試験結果と比較して頂きたいと思います。



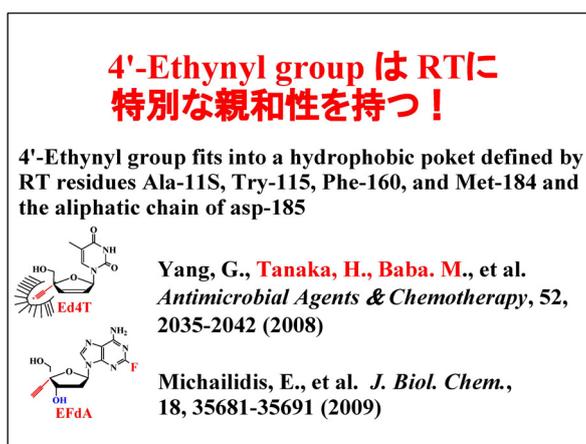
〈図-28〉

〈図-28〉 これは 4'-置換-2'-デオキシヌクレオシド (4' SdN) の逆転写酵素および DNA ポリメラーゼに対する阻害活性の説明です。1カ所が修飾されたものは、4'-位置置換基がエチニル基であれメチル基であれ抗 HIV 活性も高いけれど毒性も高いわけです。すなわち、1カ所が修飾されたもの

は、逆転写酵素も DNA ポリメラーゼもこれらを生理的ヌクレオシドと識別出来ず取り込んでしまうということです。しかし、2カ所を修飾しますと、特に EFdA は高い抗 HIV 活性を示すが毒性が低い、すなわち逆転写酵素は EFdA を取り込むが、DNA ポリメラーゼはとりこまない、基質選択性が違うからこのような結果が得られているわけです。

さらに、Ed4T は d4T より活性が高いということと、驚いたことに、EFdA トリリン酸 (EFdA-TP) は生理的基質である 2'-デオキシアデノシントリリン酸 (dATP) よりも、逆転写酵素は 2 倍好んで取り込むという結果がミズーリ大学で得られております。これらの結果は、4'-位エチニル基が逆転写酵素と特別な親和性を持つということを示唆するものです。

■ 4' エチニルグループは RT に特別な親和性を持つ



〈図-29〉

〈図-29〉 4'-エチニル基が逆転写酵素と特別な親和性を持つということが、初めて田中先生らのグループによって、Ed4T を使い、Ed4T が逆転写酵素に取り込まれたものの X 線結晶解析で明らかにされました。それによると、「4'-エチニル基が逆転写酵素のアミノ酸残基がつくる親油性のポケット (hydrophobic pocket) に手足を突っ込むような形で、非常に強い特別な親和性を持つ」ということが明らかにされたわけです。



〈図-30〉

〈図-30〉 1 年後にミズーリ大学のグループは、EFdA を使って全く同じ結果を得ております。

さらにミズーリ大学のグループは、EFdA を Translocation-Defective Reversetranscriptase Inhibitor と定義しています。と申しますのは、EFdA は 4'-エチニル基と 3'-水酸基で逆転写酵素と非常に強く結合するために、次のヌクレオシドを受け容れる場所に移ることができない、Translocation Defective であるので、非常に強い抗 HIV 活性を持つ逆転写酵素阻害ヌクレオシド薬であるということが分かったわけです。

これは誰も予測出来ないことで、EFdA の合成によってはじめて明らかになったものです。これは私共にとりましては非常に幸運であったわけです。

ルイ・パスツールは「Chance Favors the Prepared Mind」と云っておりますがこの場合は、まさに「Chance Favored Us」です。

全ての仮説の正当性が証明され、

- ① 耐性HIVを出現させない
- ② AZTの400倍以上の高活性
- ③ 他の臨床薬より数万倍高活性
- ④ 低毒性
- ⑤ 生体中で安定



EFdA

EFdAを創製することが出来た。

EFdAは現在 MK-8591として米国メルク社で臨床試験中

〈図-31〉

〈図-31〉 このようにして、色々な幸運に恵まれて、私の全ての仮説の正当性が証明されて、「耐性 HIV を出現させない、アジドチミジンの 400 倍以上、他の臨床薬より数万倍高い抗 HIV 活性を持ち、毒性が低く、生体中で安定な EFdA」を創製することが出来ました。EFdA は現在、米国メルク社が MK-8591 として臨床試験中で、Phase2 の段階です。

CROI, 2016, Boston

Long-Acting Oral and Parenteral Dosing of MK-8591 for HIV Treatment or Prophylaxis

Jay A. Grobler, Ming-Tain Lai, Stephanie E. Barrett, Marian Gindy, Kerry Fillgrove, Wendy Anikrom, Sandra Wood, Evan Friedman, Marian Iwamoto, Daria J. Hazuda on behalf of the MK-8591 Early Development Team (West Point, PA)

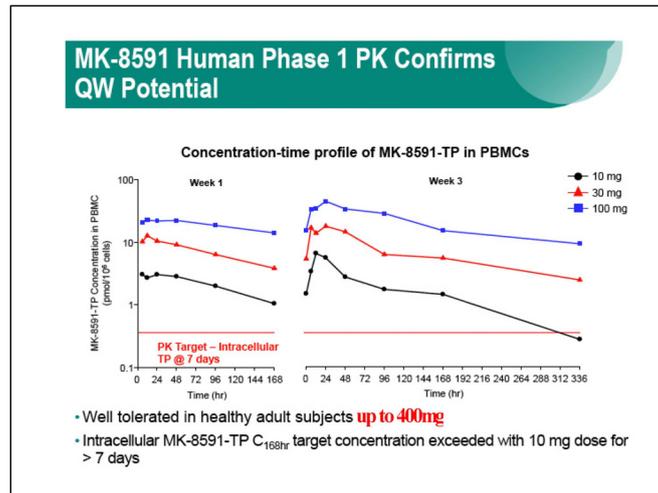
Merck & Co., Inc.
Kenilworth, NJ, USA





〈図-32〉

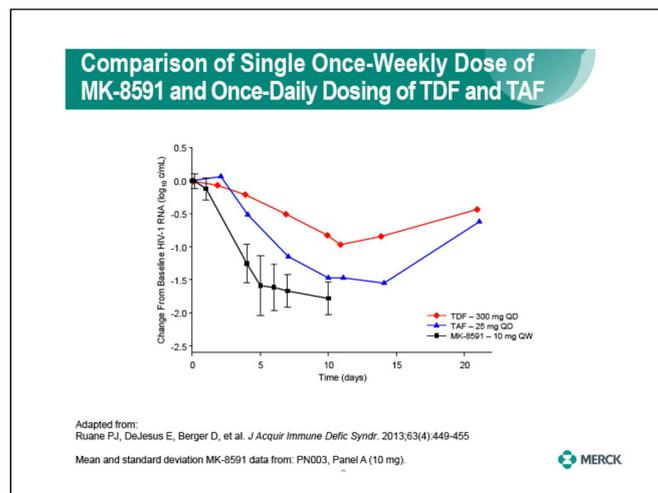
〈図-32〉 その結果が、CROI という学会や世界エイズ学会 (IAS) で 2016 年以来、公表されております。



〈図-33〉

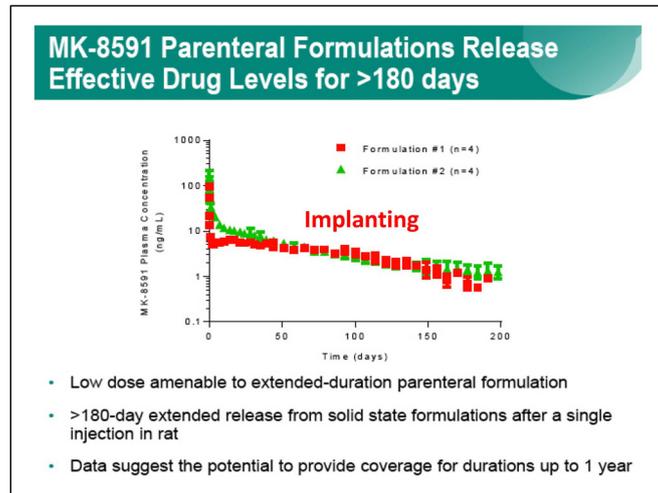
〈図-33〉 その結果によると、EFdA は経口投与でスムーズに体内に吸収され、活性本体でトリ燐酸となります。そのトリ燐酸は非常に安定で、10mg 一度の経口投与で 10 日間以上活性が持続するという事です。そうしますと、半減期は 100 時間程ということになります。

これは健常人で行った実験で、健常人は一度 400mg の投与でも副作用を示さなかったということです。



〈図-34〉

〈図-34〉 これは EFdA と他の臨床薬との活性を比較したものです。赤線は TDF 毎日 300mg 経口投与です。HIV がどんどん減ってきますが、10 日程で耐性 HIV が出現します。青線は TAF でさらに活性の高いものを毎日 25mg 経口投与すると、やはり HIV がずっと減りますが、15 日程で耐性 HIV が出現します。このように、臨床薬には容易に耐性 HIV が出現します。黒線は EFdA 一度で、毎日ではありません、10mg を一度服用しますと HIV がずっと減ります。満屋先生らの研究によると、15 年以上耐性 HIV が出現しないわけです。



〈図－35〉

〈図－35〉これは投与法を変えたもので、皮下に結晶をインプラントする方法です。そうしますと徐々にEFdAが溶け出てきて、活性が持続されて、1年に一度の投与で済むということです。HIV感染者の治療で一番の問題が、患者がお医者さんの言う通りに薬を飲むか飲まないかということ(アドヒアランス)です。この場合1年に1度の医者による投与ですので、容易にアドヒアランスが守られるわけです。

Adverse Effects

1. MK-8591 was well-tolerated by healthy adults up to **400mg**.
2. MK-85-91 is generally well-tolerated as a one-time dose (**0.5-30 mg**) to 30 HIV-1-infected adults.
3. Treatment-emergent AEs were seen in **27/30** subjects.
4. **There was no relationship between dose and frequency or severity of AEs.**
5. All AEs were **mild or moderate in severity**.
6. **The most common AEs assigned as related were headache, diarrhea, and eczema.**
7. **There were no clinically significant changes in vital signs, ECG parameter value, or laboratory safety findings.**

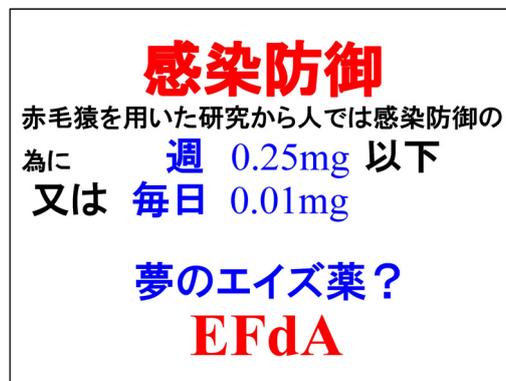
〈図－36〉

〈図－36〉副作用も報告されています。健常人ですと、一度400mgを飲んでも副作用はなかったわけですが、HIV感染者に対しては0.5～30mgを一度投与するとgenerally well-toleratedでした。「generally」が付いています。30人の患者さんのうち27人が副作用を訴えております。しかしながら、「その副作用の頻度や強さはEFdAの投与量と関係がないということが報告されています。ですから、副作用が本当にEFdAに起因するものかどうかということは疑問であるわけです。全ての副作用はmildかmoderateであったということです。最も共通な副作用は、頭痛、下痢、または湿疹でした。EFdAを投与したことによるバイタルサイン（血圧や体温、脈拍や心電図）への影響は全くない、更に、研究室でも安全に取り扱える、ということでした。おそらく副作用は有っても非常に低いものであると思われます。



〈図-37〉

〈図-37〉 昨年、最小投与量が発表され 1 週間に一度、0.5mg 飲めばよいという結果が得られております。1 年間は 52 週ですので、1 年間に直しますと 26mg です。これは現在飲んでいる臨床薬の一日の量です。



〈図-38〉

〈図-38〉 さらに、感染防御にも使えることが赤毛ザルの結果からも出ております。それを人間に換算すると、HIV 感染者は週に一度 0.25mg 飲めば母子感染も防ぐことができますし、感染者が非感染者と接触しても感染させることはないし、また、非感染者がこれだけ飲めば、HIV 感染者と接触しても感染を防御できるということが報告されています。

以上、臨床試験は今までのところ非常に素晴らしい結果が報告されておりますので、EFdA は「夢のエイズ薬」になるのではないかと期待しているわけであります。

謝辞

生物学的評価:

Prof. Dr. Masanori Baba (Fukushima Medical University,
Kagoshima University)

Prof. Dr. Hiroaki Mitsuya (NIH, Kumamoto University)

Prof. Dr. Stefan G. Sarafianos (Missouri University)

Prof. Dr. Michael A. Parniak (University of Pittsburgh)

Prof. Dr. Mineo Saneyoshi (Teikyo Science University)

研究費:

1. Grant-in Aid from Ministry of Education, Science ,
Sport, and Culture of Japan,
2. Asahi Beer, Breweries Ltd,
3. Yamasa Corporation,
4. T. Hasegawa. Co. LTD

合成法の改良:

Prof. Dr. Shigenobu Kuwahara (Tohoku University)

〈図-39〉

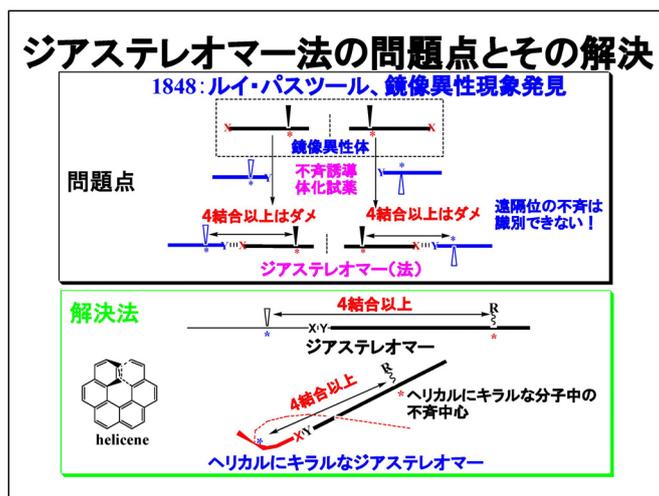
〈図-39〉 この研究は、多くの共同研究者と、及び色々なところからの研究費を頂いて、進めてまいりました。特に、抗 HIV 活性を調べて頂きました満屋弘明先生と、馬場昌範先生に感謝を申し上げます。

■ ジアステレオマー法の問題点とその解決

2. ジアステレオマー法の問題点を ブレイクスルーした 超高機能キラル識別法の開発

〈図-40〉

〈図-40〉 まだ時間がございますので、次の「ジアステレオマー法の問題点をブレイクスルーした超高機能キラル識別法の開発」について紹介させていただきます。



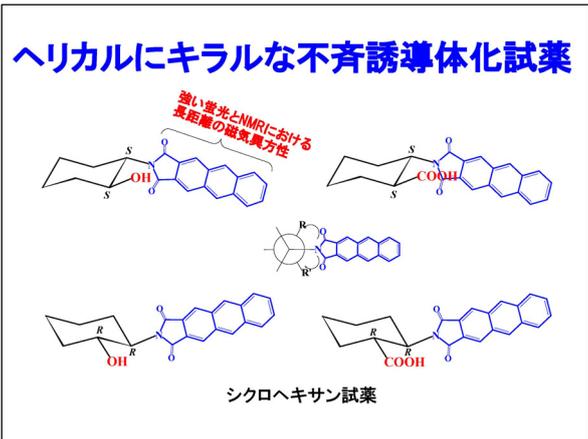
〈図-41〉

〈図-41〉まずジアステレオマー法とその問題点を紹介いたします。1848年ルイ・パスツールは光学活性化合物の鏡像異性現象を見つけられました。これは、光学活性化合物は右手と左手の様に、鏡で映した両体の可能性があるということです。この鏡像体は物理化学的性質が全く同じで、ただ旋光度だけが違うものですから、これを分離・識別することは難しいわけです。また、天然物は右手の形を持っているか左手の形を持っているかを決定しなければいけません、それも難しいわけです。

その鏡像体を分離・識別する方法で汎用されている唯一の方法がジアステレオマーです。ジアステレオマー法とは、「鏡像体を持つ誘導体化可能な官能基を使い、不斉誘導体化試薬と結合させてジアステレオマーに導きます。ジアステレオマーは鏡像体ではありませんので物理化学的性質が違いますので分離・識別が可能」と教科書に書かれています。しかし、実際はジアステレオマー分子中の不斉中心間の距離が4結合以上離れると分離・識別ができません。そのため、誘導体化可能な官能基から遠隔位にある不斉は識別できません。ですから、有機化学、特に天然物有機化学の進展が滞っています。この問題の解決に、これまでに多くの有機化学者が挑戦してきましたが、解決出来ず、おそらく解決は不可能であろうと考えられていました。

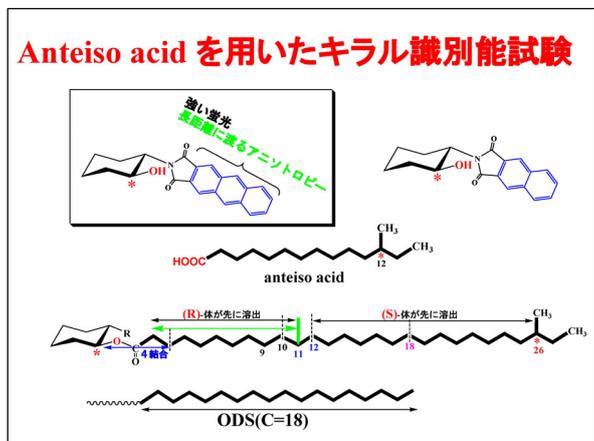
解決方法は、2つの不斉中心が離れていればそれを近づければ良いのではないかと誰でも考えるわけですが、その様な方法は誰も開発しておりません。

私は、2つの不斉中心を近づけるのではなく、誘導体化試薬の不斉を利用してヘリセンのようにヘリカルにキラルな分子でジアステレオマーをつくれれば、分析対象の不斉中心は2つの不斉中心の距離に拘わらずヘリカルにキラルな分子中の不斉中心によるジアステレオマーとなるわけですので、この不斉中心はどこにあっても何らかの方法で分離・識別出来るだろうと考えました。



〈図-42〉

〈図-42〉ヘリカルにキラルな不斉誘導体化試薬として、図に示すシクロヘキサン試薬を考えました。分子中のアントラセンイミド部位はHPLCにおける高感度分析のための強い蛍光と、NMR分析における長距離の磁気異方性（アニソトロピー）を期待したものです。実際合成しますと 10^{-15} mol(フェムトモル)での分析が可能な強い蛍光を持ちます。このヒドロキシ基(OH)を持つ試薬はカルボン酸用の誘導体化試薬です。このカルボキシル基を持つものはアルコール及びアミン用の試薬です。この(S,S)-体、(R,R)-体は鏡像体で、右巻きのヘリカル、左巻きのヘリカルなラセンを持つものです。



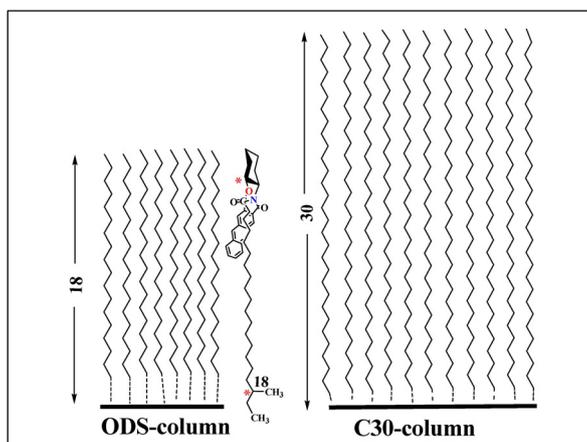
〈図-43〉

〈図-43〉まず初めに、この試薬の識別能を、図にあるようなアンテイソ酸といって、末端にメチル、エチルによる不斉を持つカルボン酸で調べました。その結果、まずNMRではカルボキシル基から11位離れたところの分岐メチルまで識別でき、非常に遠くまでR-,S-の立体化学を識別出来ることが分かりました。

さらに、非常に面白いことに、アニソトロピーが届く範囲、即ちアントラセン環の上にメチル基があるときはHPLCでの分離は、その溶出順序が決まっています。例えばある試薬ではR-体が出てきます。しかしながら分岐メチルがアニソトロピーの範囲を越えると、即ちアントラセン環より外に出ると溶出順序が逆転します。アントラセンよりもベンゼン環が一つ少ないナフタレン試薬を使うとアニソトロピーが9位までで、10位のところで溶出順序の逆転がおきます。この

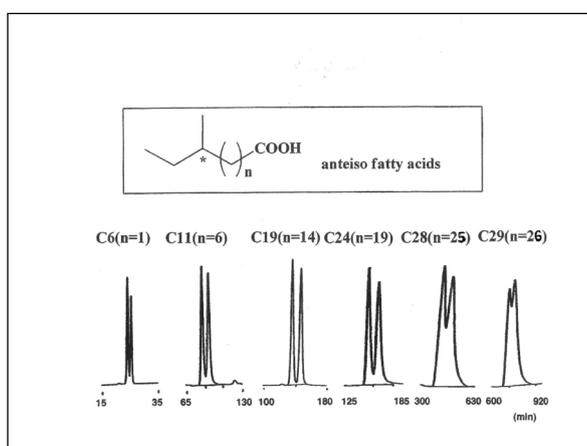
ように、溶出順序の逆転がおきるということは、この試薬にとっては一般的なことのようにです。ですから、溶出順序によって R, S を決定することも出来ます。

更におもしろいことに、ODS カラム (C18 のメチレン鎖を持つ) でやると、ODS と同じ長さである C18-位に分岐メチルを持つものまで HPLC でわけることが出来ましたが、ODS の長さより遠い位置に分岐メチルを持つと分けることが出来ませんでした。



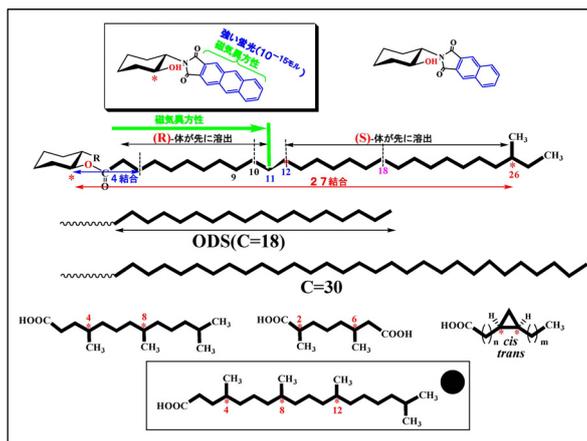
〈図-44〉

〈図-44〉このことはおそらく、逆相のメチレン鎖は単なる有機相ではなく、折れ曲がって折らず、まっすぐ伸びており、ジアステレオマー分子中の2つの不斉中心がメチレン鎖に同時に接触しなければ識別が起きないと考えて、ODS より更に長いメチレン鎖を持つ C30 カラムで分離を試みました。



〈図-45〉

〈図-45〉そうすると、予期通り、19 位に分岐メチルを持つアンテイソ酸の分離が出来ました。現在 26 位に分岐メチルまで HPLC で分離出来ます。

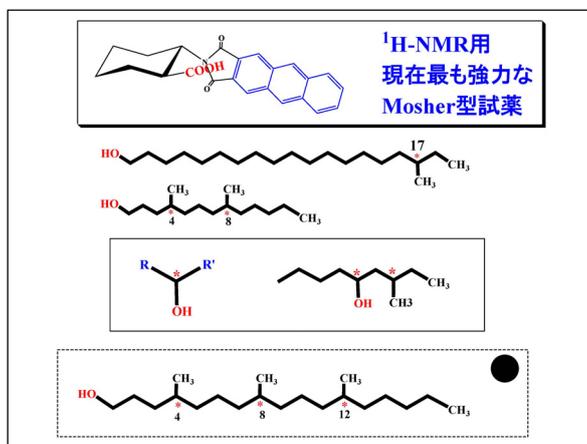


〈図-46〉

〈図-46〉以上まとめますと、この試薬は、アニトロピーは11位まで届き NMR で分析可能です。そして、HPLC では現在26位までC30カラムで分離出来ます。C30カラムは26位よりもっと長いので、もっと長くまで分離出来るだろうと思ひまして、更に長いアンテイソ酸を誘導体化しますと、誘導体がワックスになってしまい有機溶媒に溶けなくなりました。そういう問題で現在26位が限界です。

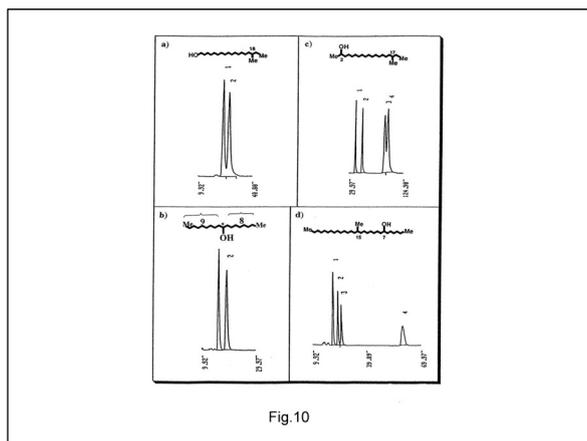
26位といいますと、不斉中心間は27結合です。今までは4結合になるとダメだったのですが、こんなに遠くまで識別が可能となったわけです。

更に、この試薬は分子内に2つ不斉中心をもつ計4つの立体異性体を分離出来ます。しかし、不斉中心が3つとなるとこのシクロヘキサン試薬は8つの立体異性体を分離出来ません。



〈図-47〉

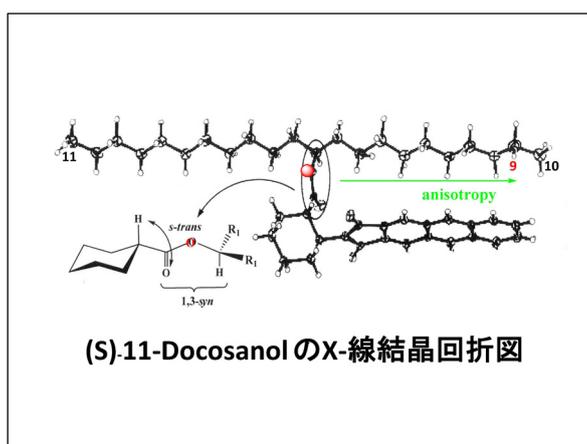
〈図-47〉このカルボキシル基を持つアルコール及びアミン用の不斉誘導体化試薬は、先ほどと同じように、OH基から離れたところのメチル、エチルの不斉をHPLCで分離することができます。不斉中心が2つある4種類の立体異性体も分離出来ます。さらに、2級アルコールになると、左右の構造が僅かに異なるキラルアルコールのR-体、S-体を分離出来ます。水酸基の結合位の不斉中心の他にもう一つ不斉中心を持つ計4種の立体異性体も分離出来ます。しかし、3つの不斉中心を持つものの計8種類の立体異性体はシクロヘキサン試薬では分離出来ません。



〈図-48〉

〈図-48〉これはクロマトグラムです。OH基から遠く離れたメチル、エチルによる異性体の分離も出来ます。左右のメチレン鎖の長さが一炭素だけ異なるキラルアルコールも分離出来ます。現在、左右の長さが14と15までの分離を行っています。

アルコールの付け根の不斉中心以外のどこの位置にメチル分岐を持っていても計4種類の立体異性体全てを分離出来ます。

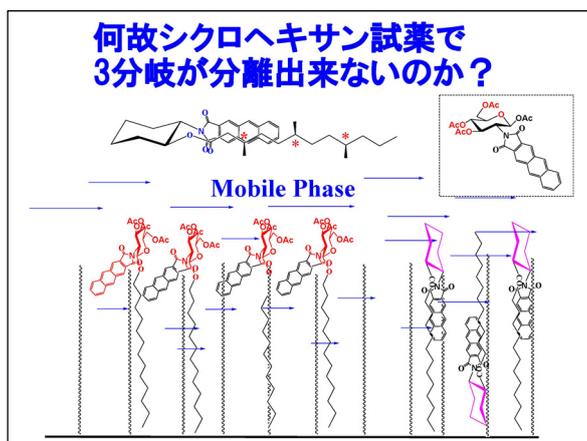


〈図-49〉

〈図-49〉これは、左右のメチレン鎖が10と11である光学活性二級アルコールを誘導体化したもののX線結晶回折図です。このようにアントラセンイミド試薬は、非常に結晶性が良く、X線結晶解析に適した結晶を与えますので、X線結晶解析でも有機化合物の絶対配置を決定出来ます。

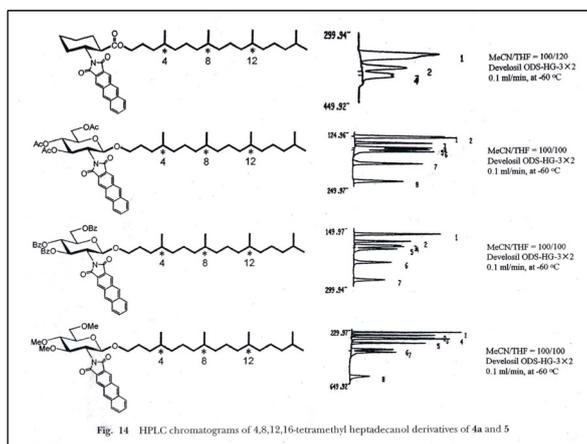
図の化合物は、溶液中で最も安定なコンフォメーション(s-trans, 1,3-syn)で結晶しています。最も安定なコンフォメーションでは左右のメチレン鎖の一方が完全にアントラセン環の上に乗っていますので、NMRで識別出来ます。さらに、アニトロピーはアルコール炭素をゼロとすると、9番目の炭素までという非常に遠くまで届きます。ですからこの試薬は現在最も強力なNMR用のMosher試薬です。

■ なぜシクロヘキサン試薬で3分岐は分離できないか



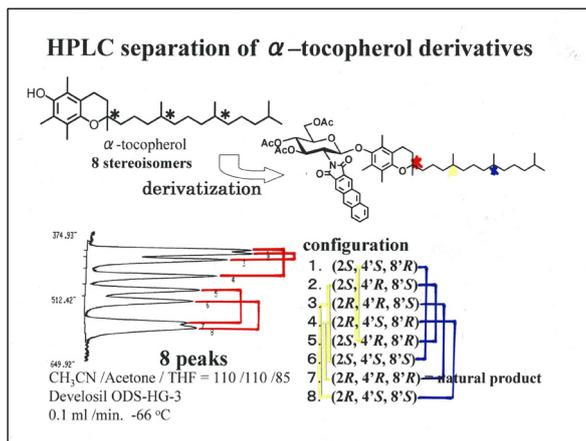
〈図-50〉

〈図-50〉なぜシクロヘキサン試薬では3つの分岐メチルをもつ立体異性体の計8種が分離出来ないかを考えました。図の上部中央にある構造式はシクロヘキサン試薬で誘導体化したものの構造式です。イミド部位とエステル部位に極性部位があります。有機化合物は溶液中で極性を揃えて並ぶ性質があります。しかしながら、この極性部位は左右に非極性部位がありますので逆相カラムと相互作用をするときに一定方向を向いての相互作用ではなく、図示するように異なる方向を向いて相互作用するものが出てくる可能性があります。異なる相互作用のため上手く8種類を分けることが出来ないと考えました。そこで、末端のシクロヘキサン部位に極性を持たせたと考えられる図のような糖試薬をグルコサミンから合成しました。この試薬の場合は、誘導体化はグリコシデーションで行いますが、 β -位にしか誘導体化されません。



〈図-51〉

〈図-51〉糖試薬で誘導体化しますと、図のように極性をそろえて相互作用をするため、より優れた分離が出来るであろうと期待しましたところ、シクロヘキサン試薬では図の最上部のように8種類を分けることが出来ませんが、糖試薬ですと、保護基がアセチルであれ、ベンズイル、メチルであっても、8種類全てを予期通り分けることが出来ました。

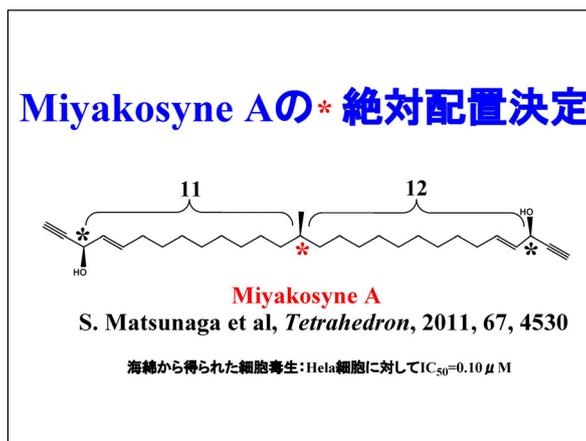


〈図-52〉

〈図-52〉これはビタミンEのフェノールの水酸基(OH)を使ってグリコシル化したものです。8種類の異性体をこのように分離することが出来ました。

このように、従来不可能であったキラル識別が可能となりましたので、これまで決定出来なかった天然物の絶対配置が、最近本分析法を使ってどんどん決定されるようになっていきます。

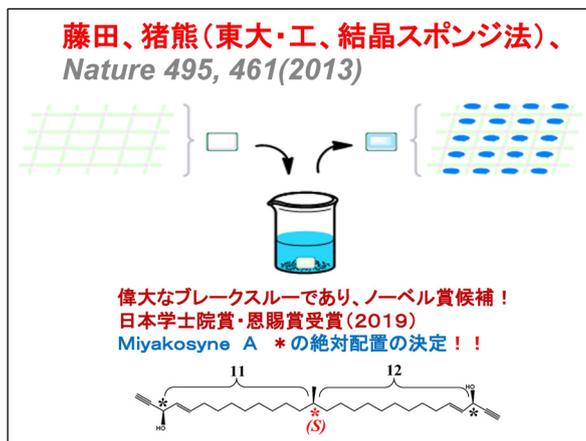
■ ミヤコシンAの絶対配置決定



〈図-53〉

〈図-53〉その一例として、ミヤコシンAの分子の中央にあるメチル基の絶対配置決定を紹介させていただきます。

ミヤコシンAは東大水産の松永先生らのグループが海綿から単離した抗腫活性を持つ化合物で、2つの水酸基の絶対配置はMosher法で決定していますが、中央のメチル基は2つの水酸基から何せ遠くにありますので決定出来ずにおりました。

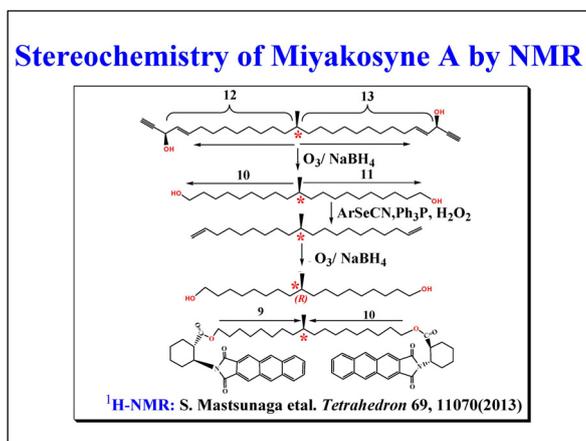


〈図-54〉

〈図-54〉そこで登場したのが東大工学部の藤田先生、猪熊先生の結晶スポンジ法です。先生らは格子状の金属錯体を合成されました。これを非結晶性の有機化合物の溶液に入れると、あたかもスポンジが吸収するように格子に有機化合物が吸収されます。ですから、非結晶性の化合物は結晶したと同じ様になりますので、それを X 線結晶回折で絶対配置を決定できるという素晴らしい方法です。

この方法は偉大なブレークスルーであり、ノーベル賞候補であると云われているものであります。藤田先生は今日、日本学士院賞の恩賜賞をこの結晶スポンジ法で受賞されました。

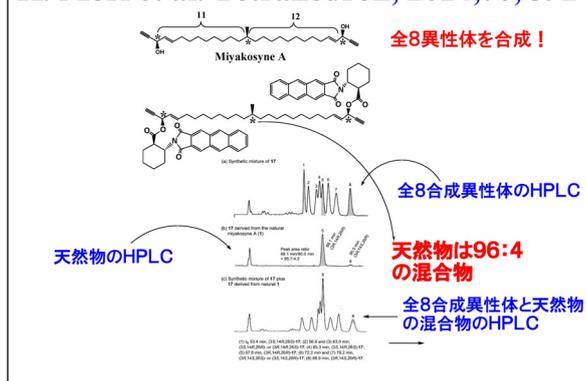
結晶スポンジ法をミヤコシン A に適用して、分岐メチルの立体化学を S であると決定され、Nature, 495, 461(2013)に発表されました。



〈図-55〉

〈図-55〉一方、松永先生らは、左右のメチレン鎖の長さが 8, 9 と異なるメチル分岐ジオールを合成して、私の試薬で誘導体化しますとアニソトロピーがメチル基まで届きますので R-体、S-体でメチル基のケミカルシフトが違うことを確認された後、ミヤコシン A の二重結合を使い、メチレン鎖を短くして、同じ分岐メチルジオールに導き、誘導体化して NMR を測定すると、結晶スポンジ法の結果とは違ってメチル基の立体化学は R であるという結果を得ました。

K. Mori et al. Tetrahedron, 2014,70, 392



〈図-56〉

〈図-56〉そこで登場されたのが、私の恩師である森謙治先生です。先生はミヤコシンAの8種類全ての立体異性体を合成されて、私の試薬で誘導体化すると8種類全てをHPLCで分離出来ることを見いだされました。HPLCのそれぞれのピークの化合物の絶対配置は決まっております。天然物を誘導体化すと、2つのピークを96:4の比で与えました。そして、大きなピークがR-体であり、小さなピークがS-体であるということを明らかにされたわけです。松永先生のNMR法では、感度の問題で4%のマイナーなピークを検知することが出来ませんでした。

このように、私の分析法が有機化学、特に天然物有機化学の進展に役立っております。これからも役立ってくれることを期待して居ります。

本日は、「サイエンスが直面する難題を有機化学でブレイクスルーする」というタイトルで講演させていただきました。長い時間ご清聴有難うございました。

「サイエンスが直面する難題を
有機化学で
ブレイクスルーする」
ご清聴
有難うございました。

【質疑応答】

司 会： 大類先生、どうもありがとうございました。では、これから皆様のご質問をお受けしたいと思います。ご質問がある方は挙手をお願いいたします。

参加者： 先日、満屋先生の話聞く機会があって、満屋先生はそのとき抗 HIV 薬全体のことをおっしゃっていて、細かいところは覚えていないのですが、そのときおっしゃったのが、今いわゆる臨床で1日1剤、1カプセル、1服で済むようになって、それが2、3年後には1週間に1回の服用で済むようになるだろうと。それで、あと数年経てば、1カ月に1回ぐらいの服用で済むのではないかという見通しをおっしゃっていたのですが、これは今先生がおっしゃっていた EFdA のことをおっしゃっていたのでしょうか。

大 類： EFdA も含めまして、満屋先生はプロテアーゼインヒビターの研究をされていて、非常に素晴らしいものを今開発中です。活性はものすごく高いですが、プロテアーゼインヒビターは感染後の治療ですので、感染の防御は難しいのではないかということ。人には感染させないようにはできますが、そういう問題を満屋先生がどう考えておられるか、私は存じ上げません。(満屋先生のお話は) EFdA を含めてだとは思いますが、先生が現在ご自分でほかの薬を開発されていますので、そのことも含めていわれているのか私には分かりません。ともかくウイルス学者の先生方は、これから HIV はそれほど問題ではないと考えられていらっしゃるそうです。

参加者： 分かりました。ありがとうございました。

司 会： ありがとうございました。それではお時間の関係もございますので、ご講演を終了させていただきます。大類先生、本日はどうもありがとうございました。

■ このレポートは令和元年6月5日コートヤード・マリオット銀座東武ホテルにおいて行われた、第149回本田財団懇談会の講演の要旨をまとめたものです。本田財団のホームページにも掲載されております。

講演録を私的以外に使用される場合は、事前に当財団の許可を得てください。

発行所 公益財団法人 **本田財団**
104-0028 東京都中央区八重洲2-6-20ホンダ八重洲ビル
Tel.03-3274-5125 Fax.03-3274-5103
<https://www.hondafoundation.jp>
発行者 常務理事 亀岡 晃浩