ISSN 2186 − 3989

Purine 類縁体の神経突起伸展作用に関する構造活性相関

鈴木　宏一、山崎眞津美

Structure–activity Relationship of Purine analogues for
Neuritogenic Activity

Hirokazu Suzuki, Matsumi Yamazaki

北　陸　大　学　紀　要
第42号(2017年3月)抜刷

北陸大学紀要
第 42 号（2016）
pp.9～17
原著論文

Purine 類縁体の神経突起伸展作用に関する構造活性相関

鈴木　宏一*、山崎　眞津美*

Structure–activity Relationship of Purine analogues for Neuritogenic Activity

Hirokazu Suzuki*, Matsumi Yamazaki*

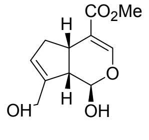
Received December 5, 2016

Abstract

We researched neuritogenic active compounds from purine analogues based on the electronic properties of tetrahydrobiopterin (BH4), genipins and nitric oxide synthase (NOS) activators. As a result, we selected 7-deazapurines as the target compounds which are similar to BH4's lowest unoccupied molecular orbital (LUMO)-energies, and prepared 7-deazapurine derivatives and examined their neuritogenic activities in PC12h cells and Nuaro2a cells. The results of Neuritogenic activities were shown that tend to increase with side chain extension at the 1- and 3-position of 7-deazapurines and substituents at the 9-position were unnecessary. The most effective among the 7-deazapurines was 1,3-dibutyl-7-deazaxanthine (**4**), which activity was similar to that of genipin and 1-isopropyloxygenipin (IPRG001). Then, we investigated interaction of **4** in the BH4 binding site by docking study. The docking model of **4** was indicated π-π interaction, hydrogen bond network similar to BH4 and the importance at 3-position substituents.

はじめに

現在、神経変性疾患の老人性認知症やパーキンソン病の患者の急増に伴い、その予防あるいは治療は大きな社会問題となっている。その予防あるいは治療薬は、現在のところ脳血流改善あるいは減少している神経伝達物質の補填に基づいた対症療法薬が中心であるが、障害を受け変性脱落する神経細胞に直接作用してその生存を維持・活性化する神経栄養因子様薬物はほとんど知られていない。我々は、天然物由来の神経栄養因子様活性物質を、神経系株細胞（ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12h 細胞 [1]、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞 [2]）を用いた神経突起伸展作用を指標に探索し、クチナシの果実由来の Iridoid 化合物；Genipin に強いその活性を見出している。これまでの Genipin に関する生化学的研究で下記の事項を明らかにしている [3−16]。



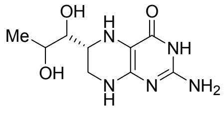
Genipin

*薬学部　Faculty of Pharmaceutical Sciences

（1） Genipin は細胞に直接作用し、神経突起の誘導および神経細胞としての機能的分化を促進した。

（2） 神経突起誘導作用は、NO-cGMP-cGMP dependent protein kinase 経路を介した ERK の活性化に依存した。

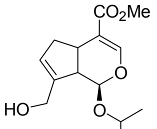
（3） 酸化ストレスあるいは小胞体ストレス障害モデルに対する Genipin の防護効果について検討した結果、血清除去、過酸化水素、6-hydroxydopamine、A23187、Tunicamycin およびβ-amyloid 誘発細胞傷害モデルにおいて、有効性が認められた。



BH4

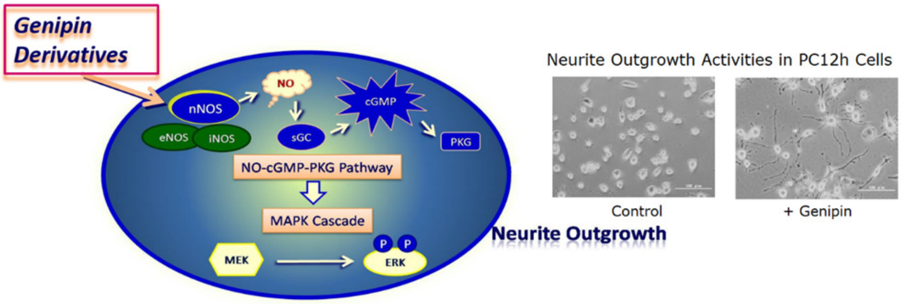
（4） Genipin の標的分子は、神経型 NO synthase（nNOS）で、Tetrahydrobiopterin（BH4）の作用を補填する可能性を示した。

（5） Hemiacetal 構造を有する Genipin は水溶液中での安定性に問題があった。これに関し Genipin を 1-Alkyloxygenipin 誘導体に変換すると安定性の改善が認められた。その誘導体の中で 1-isoPropyloxygenipin（IPRG-001）は、Genipin と同等の神経突起誘導作用を示した。



IPRG-001

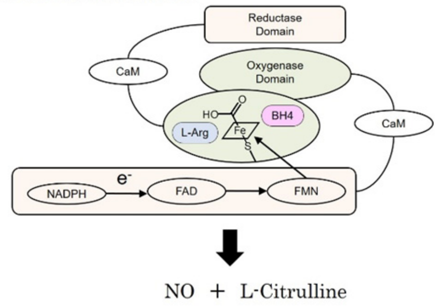
図 1



生体内において、NOS は L-Arginine（L-Arg）を基質にして NO と L-Citrulline の合成を触媒する。ヘムを含む酸化酵素ドメインと、NADPH、FMD、FMN を含む還元酵素ドメインの２つのドメインで構成されており、NOS の反応は二量体となって活性を発揮する。その二量体形成は、Calmodulin（CaM）が２つのドメイン間に結合し、電子は還元酵素ドメインからもう一方のサブユニットの酸化酵素ドメインへ移動する。また、その反応は基質 L-Arg や補酵素 BH4 が NOS に結合することによって促進されることが明らかにされており、特に BH4 は、ヘムへの電子の導入に関わっている [17]。（図 2） このことから、NOS 活性化物質の開発には、BH4 結合領域に作用し電子を受け取りやすい化合物が好ましく、また BH4 の代替薬として応用できると考えられる。対して、NOS 阻害物質は、L-Arg 結合領域および BH4 結合領域に親和

図 2

NOS Dimerization



性が高く NOS 二量体形成を阻害する化合物を開発すればよいと推測される。

本研究は、NOS を活性化させ神経突起伸展作用を示す Genipin にかわる化合物の創出を目指したものである。BH4 結合領域には、Tryptophan、Phenylalanine、Histidine の芳香族アミノ酸が存在し、また狭いことから（図 3)、平面性が高く BH4 の Pterine 骨格に類似したものとして Purine 骨格に着目した。そこで、これまでに我々が合成した Purine 類縁体 80 化合物（図 4）から神経突起伸展作用を有する化合物の創出について検討した。

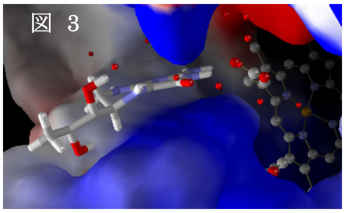
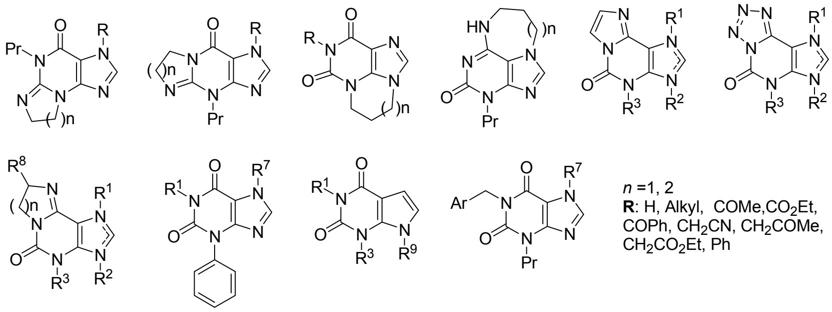


図 4



方　法

Purine 類は、Caffeine をはじめ Theophylline 等数多くの化合物が報告されており、Phosphodiesterase（PDE)、Adenosine 受容体など生体内の分子に作用することが知られている。そこで、まず 80 化合物の電子構造の特徴を BH4、Genipin を含む NOS 活性化剤および NOS 阻害剤と比較検討し、次に PDE1、PDE4 に作用しない化合物を検索することで候補化合物を見出すこととした。

PC12h 細胞は、神経成長因子（NGF）に応答して神経突起を伸展させる形態的変化と、神経細胞に特徴的な神経伝達物質の受容体やイオンチャネル、酵素活性などの質的変化を伴って交感神経様細胞に分化することが知られている。Neuro2a 細胞は、NGF 応答性がなく、cyclic AMP で神経分化することが知られている。PC12h 細胞は、5% 胎仔牛血清および 5% 馬血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）中で、10% CO_2 存在下、37℃で培養した。Collagen type I をコーティングした 35 mm 培養ディッシュを用いて、1×10^4 cells/cm^2 の細胞密度で培養した。24 時間後、試験化合物を含む DMEM/Ham' F-12(1:1)培地（DF）に 5 μg/mL transferrin/5 μg/mL insulin/20 nM progesterone（TIP）を添加した無血清培地（DF/TIP）に交換した。Neuro2a 細胞は、10 % 胎仔牛血清を含むイーグル最小必須培地（EMEM）中で、5% CO_2 存在下、37℃で培養した。35 mm 培養ディッシュを用いて、4×10^3 cells/cm^2 の細胞密度で培養した。24 時間後、試験化合物を含む EMEM に TIP を添加した無血清培地（EMEM/TIP）に交換した。神経突起伸展活性は、試験化合物を添加して 48 時間後、1 群 100 個の細胞について位相差顕微鏡像をもとに、個々の細胞の最も長い神経突起の長さを測定して評価した。

結　果

1. Purine 類縁体から 7-Deazaxanthine 誘導体

我々は、Genipin、BH4、これまでに報告されている NOS 活性化剤および NOS 阻害剤の HOMO、LUMO エネルギーを半経験的分子軌道法（MOPAC、PM5 法）にて計算した結果、HOMO エネルギーにはばらつきがあるが、LUMO エネルギーにおいては、Genipin および NOS 活性化剤は BH4 に類似した値を示し、NOS 阻害剤はそれらよりも高い値を示す傾向が見られた。（図 5－1）すなわち、NOS 活性化作用を示す化合物は阻害剤に比べ電子を受け取りやすい構造であることを示唆し報告している [15]。　その知見を基に、Purine 類縁体 80 化合物の HOMO、LUMO エネルギーを計算（HyperChem8.0：PM3 法）しプロットし（図 5－2）、その中から候補化合物を選ぶこととした。計算結果、Genipin に比べ Purine 類の LUMO エネルギーは全体的に低い値を示していたが、その中で比較的 BH4 に近いエネルギーを有する 19 化合物（図 5－2、点線内）に絞り、さらにその 19 化合物のうち PDE1、PDE4 阻害作用をほとんど示さない化合物を検索した結果、7-Deazaxanthine 誘導体がヒットした（図 5－3）。そこで 7-Deazaxanthine 誘導体（**1－5**）と Pyrrole 環の効果を検討する目的で 6-Aminouracil（**6**）の神経突起伸展作用を検討した。

図 5－1

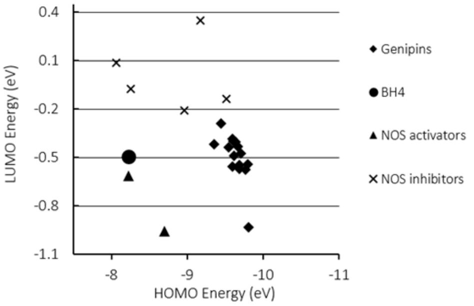


図 5－2

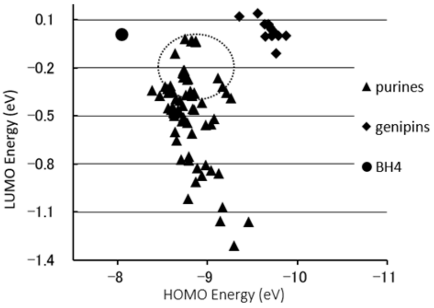
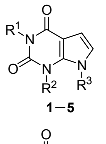
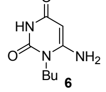


図 5－3

7-Deazaxanthine（1－5）と 6-Aminouracil（6）の PDE1, 4 阻害活性と LUMO エネルギー



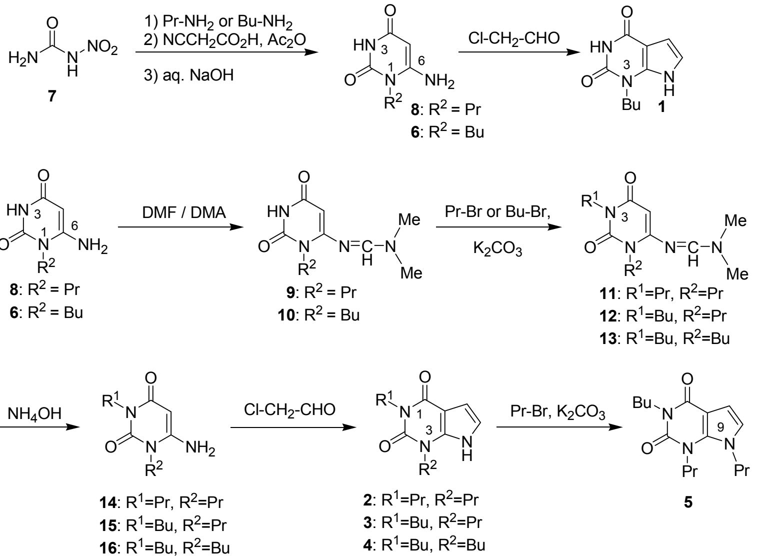


Compd. No.	R^1	R^2	R^3	LUMO energy (eV)	PDE1 and PDE4 inhibitory activities (IC_{50}, μM) PDE1	PDE4
1	H	Bu	H	-0.121	> 100	> 100
2	Pr	Pr	H	-0.035	> 100	67.9 ± 8.4
3	Bu	Pr	H	-0.036	> 100	31.9 ± 29.8
4	Bu	Bu	H	-0.035	> 100	51.4 ± 9.7
5	Bu	Pr	Pr	-0.0022	> 100	18.4 ± 11.4
6	—	—	—	-0.388	—	—

2. 7-Deazaxanthine 誘導体の合成法

Nitrourea（**7**）を出発原料に常法[18]に従い 1-Alkyl-6-aminiuracil（**6**, **8**）の合成を行った。**7** に対し、Propylamine および Butylamine と反応させ Alkylurea とした後、Cyanoacetic acid／Acetic anhydride 処理、環化反応により 1-Alkyl-6-aminiuracil（**6**, **8**）とした。**6** は、Chloroacetaldehyde と反応させ、対応する 3-Butyl-7-deazaxanthine（**1**）へ誘導した。1,3-Dialkyl-7-deazaxanthine（**2**－**5**）は、**6** および **8** の 6 位を Formamidino 基に変換し 6 位 Amino 基の反応性を抑えた後、3 位を K_2CO_3 存在下 Propyl bromide および Butyl bromide との反応による Alkyl 化、次いで脱保護化を順次行い 1,3-Dialkyl-6-Aminouracil（**14**－**16**）とし、**14**－**16** を **1** の合成と同様に Chloroacetaldehyde で処理することによって合成した。更に **3** は、Propyl bromide で処理し 1-Butyl-3,9-dipropyl-7-deazaxanthine（**5**）に誘導した。（図 6）

図 6



3. 7-Deazaxanthine 誘導体の神経突起伸展作用

PC12h 細胞を、**1**, **2**, **5** および 6-Aminouracil（**6**）で 48 時間処理すると、いずれの化合物も 5－20 μM で濃度依存的に有意な神経突起伸展を誘導した（図 7）。また、5 μM という低濃度では Pyrrole 環が開環した Aminouracil よりも 7-Deazapurine 環を有する化合物で強い活性が見られた。さらに、4 化合物のうち最も活性が強かったのは **5** であったが、陽性コントロールである 20 μM Genipin の活性には及ばなかった。

次に、**2**－**4** の神経突起伸展活性を検討した。各化合物を 5－20 μM で 48 時間処理すると、いずれも濃度依存的に有意な神経突起伸展を誘導した（図 8）。これらの化合物を比較すると、7-Deazaxanthine の 1 位および 3 位ともに propyl 基より butyl 基を導入したほうが強い活性を示し、最も活性が強かったのは **4** であった。しかし、陽性コントロールである 20 μM IPRG001 の活性には及ばなかった。活性が強かった 20 μM の **4** および **5** と、

20 µM の **2** の活性を比較すると、それぞれ **2** の 1.76 倍、1.37 倍であった。

また、6 化合物（20 µM）は Neuro2a 細胞に対しても神経突起伸展活性を示し、特に **4** は 20µM IPRG001 より強い活性を示した（図 9)。従って、6 化合物のうち、最も活性が強いのは **4** であることが確認できた。

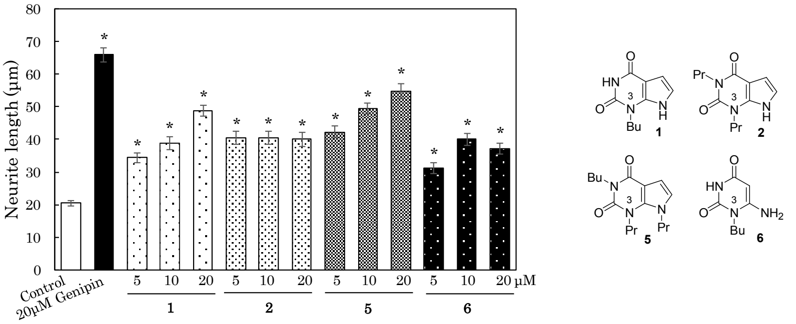


図 7　PC12h細胞における化合物1, 2, 5, 6の神経突起伸展作用

PC12h細胞を各化合物で48時間処理後，個々の細胞の最も長い神経突起の長さを測定した。
値は平均値±SEM（n=100）で示した。* p<0.01 vs. Control(ANOVA, Scheffe's test)

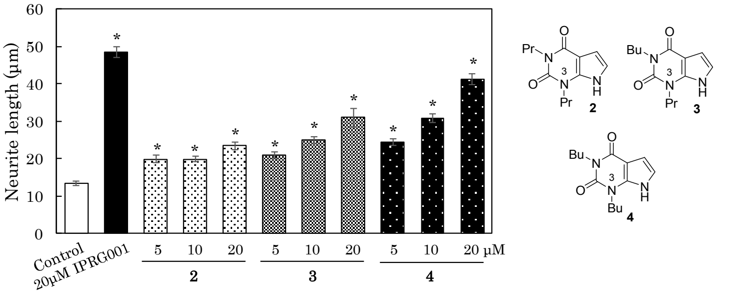


図 8　PC12h細胞における化合物2, 3, 4の神経突起伸展作用

PC12h細胞を各化合物で48時間処理後，個々の細胞の最も長い神経突起の長さを測定した。
値は平均値±SEM（n=100）で示した。* p<0.01 vs. Control(ANOVA, Scheffe's test)

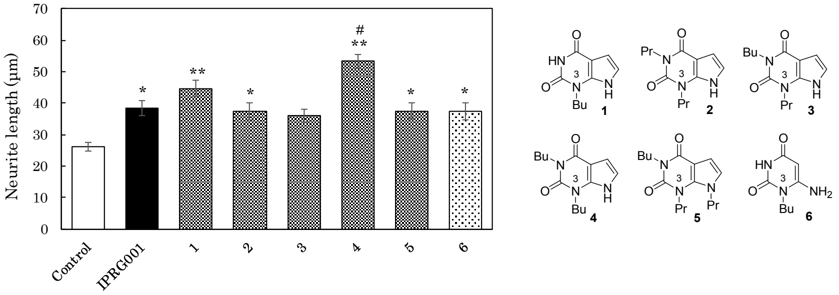


図 9　Neuro2a細胞における化合物1－6の神経突起伸展作用

Neuro2a細胞を各化合物（20 µM）で48時間処理後，個々の細胞の最も長い神経突起の長さを測定した。
値は平均値±SEM（n=100）で示した。
* p<0.05, ** p<0.01 vs. Control; #p<0.05 vs. IPRG001 (ANOVA, Bonferroni's test)

次に、**4** による神経突起伸展に NOS が関与しているかどうかを、NOS 阻害剤を用いて検討した。NOS 阻害剤である N^{G}-nitro-L-arginine methyl ester（L-NAME）または、その不活性体である N^{G}-nitro-D-arginine methyl ester（D-NAME）で PC12h 細胞を 30 分間処理後、20 μM **4** をさらに添加した。その 48 時間後に神経突起伸展活性を測定した。**4** による神経突起伸展は、10 mM L-NAME で著しく抑制されたが、10 mM D-NAME ではほとんど抑制されなかった（図 10）。

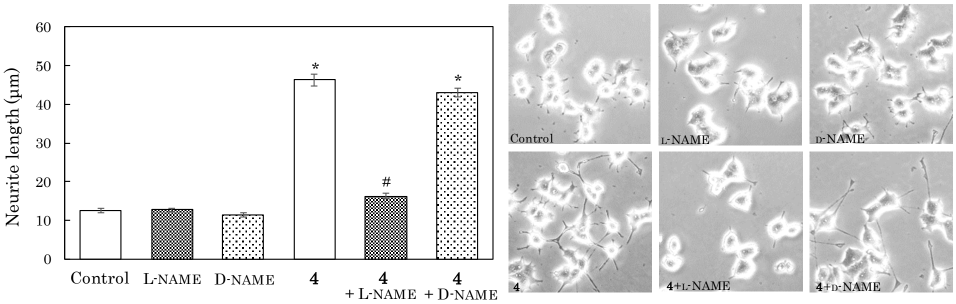


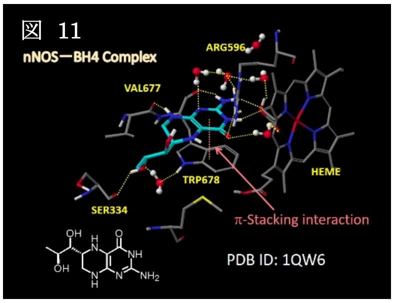
図 10　PC12h細胞における化合物4の神経突起伸展作用に対するNOS阻害剤の影響

PC12h細胞を10 mMのL-, D-NAMEで30分間前処理後，20 μM **4**で48時間処理後，個々の細胞の最も長い神経突起の長さを測定した。値は平均値±SEM（n=100）で示した。写真は測定時の位相差顕微鏡像を示す。
* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. Control; # $p<0.05$ vs. **4** (ANOVA, Scheffe's test)

考　察

今回、nNOS に作用し神経突起伸展作用を示す化合物を見出すことを目的に、Purine 類縁体に着目し、計算化学を利用し検討した結果、Genipin および IPRG001 と同等の強い活性を示す 1,3-Dibutyl-7-dezaxanthine（**4**）を見出すことに成功した。そこで、**4** の nNOS-BH4 結合領域での相互作用を Docking Study により検討した。方法は、**4** の 3D 構造を Gaussian09（DFT、B3LYP/6-31G*）で計算した後、CLC Drug Discovery で Docking 解析を行った。

BH4 は、Ser334、Arg596、Val677 との水素結合、周辺の水分子との水素結合ネットワークによる Heme との相互作用および Trp678 とのπ−π相互作用が報告されている[19]。（図 11、PDBID: 1QW6）　**4** の Docking Model より、BH4 と同様に平面な Deazapurine 環が Trp678 とのπ−π相互作用し、9 位 NH と周辺の水分子を介した Heme との水素結合ネットワークが観測された（図 12 − a）。また図 12 − b では、1-Alkyl-7-deazaxanthin 誘導体の分子の大きさが BH4 と同等であり nNOS-BH4 結合領域で相互作用しやすい構造であることを示唆していた。



7-Deazaxanthie 誘導体の神経突起伸展活性と Docking Study の結果から、以下のように考察した。

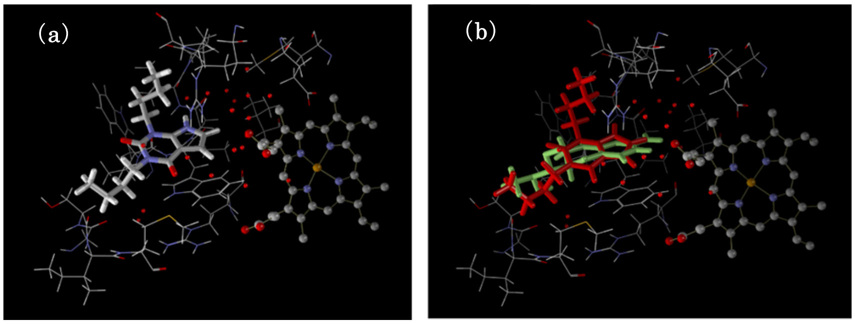


図 12　（a）BH4 結合領域での 1,3-Dibutyl-7-Deazaxanthine（**4**）の Docking Model
（b）Superimpose Model　赤：1,3-Dibutyl-7-Deazaxanthine（**4**）　緑：BH4

（1）　１位は、側鎖の延長に伴い活性が強くなる傾向を示した。すなわち、1,3-Dipropyl 体（**2**）と 1-Butyl-3-propyl 体（**3**）の活性（20 μM）の比較では、**3** が強い活性を示した（図 8）。Docking Model から Butyl 基程度の側鎖（C_4）が最適であると考えられる（図 12－a）。

（2）　３位の側鎖の延長に伴い活性が強くなる傾向を示した。すなわち、1-Butyl-3-propyl 体（**3**）と 1,3-Dibutyl 体（**4**）の比較では、**4** が強い突起伸展作用が認められたことから（図 8）、Butyl 基程度（C_4）の側鎖の置換基導入が好ましいと考えられる。

（3）　９位の置換基は、活性向上に関与しない。すなわち、1-Butyl-3-propyl 体（**3**）と 1-Butyl-3,9-dipropyl 体（**5**）の比較では、同等の活性であった（図 9）。また、Docking Model（図 12－a）から 9 位に置換基を導入すると、狭い Heme 付近領域での 9 位置換基の相互作用が難しくなり、結果 Deazapurine 環と Trp678 間のπ－π相互作用ができなると考えられる。

（4）　Pyrrole 環は活性発現に重要である。すなわち 3-Butyl-7-deazaxanthine（**1**）と Pyrrole 環開環体 6-Aminiouracil（**6**）の比較では、**1** が強い活性を示した（図 7）。

これまで、天然物由来の Genipin およびその誘導体の神経突起伸展作用について研究を進めてきた。今回これまでの知見を基に、新たに Purine 類縁体に着目し検討した結果、Purine 類縁体にも Genipin と同様に強い突起伸展作用を示すことが分かった。今回使用した化合物は、６化合物であり、データ的にもまだ乏しいものである。今後、今回得た知見を基に継続して進めていきたいと考えている。

謝　辞

本研究は、2013（平成 25）年度北陸大学特別研究助成の援助によって遂行されたもので、ここで感謝いたします。本助成で購入した計算化学ソフト（HyperChem8.0、Gaussiann09、CLC Drug Discovery）は、本研究を進めるのに大きく役に立ち、学生講義では化合物やタンパクの３D 構造を提供するのに利用させていただいています。また本研究に協力をしてくれた諸氏に感謝します。

参考文献

1 Hatanaka H., *Brain Res.*, **222**, 225-233(1981).

2 Augusti-Tocco G. and Sato G., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 311-315 (1969).

3 Yamazaki M., Chiba K. and Mohri T., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 791-795 (1996).

4 Yamazaki M., Chiba K., Mohri T. and Hatanaka H., *J. Neurochem.*, **79**, 45-54(2001).

5 Yamazaki M., Chiba K., Mohri T. and Hatanaka H., *Eur. J. Pharmacol.*, **488**, 35-43, (2004).

6 Yamazaki M. and Chiba K., *Eur. J. Pharmacol.*, **581**, 255-261(2008).

7 Yamazaki M., Sakura N., Chiba K. and Mohri T., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**,1454-1455(2001).

8 Yamazaki M. and Chiba K., *J. Health Sci.*, **51**, 687-692(2005).

9 Yamazaki M., Chiba K. and Satoh K., *J. Health Sci.*, **54**, 638-644(2008).

10 Yamazaki M., Chiba K. and Yoshikawa C., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**,1043-1046(2009).

11 Tanaka M., Yamazaki M. and Chiba K., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**,1220-1223(2009).

12 Ohkubo T., Yamazaki M., Yoshida A., Chiba K. and Mohri T., *J. Health Sci.*, **50**, 193-196 (2004).

13 Yamazaki M. and Chiba K., *J. Health Sci.*, **52**, 769-773(2006).

14 Yamazaki M., Chiba K. and Mohri T., *Neurosci Lett.*, **393**, 222-225 (2006).

15 Suzuki H., Yamazaki M., Chiba K. and Sawanishi H., *J. Health Sci.*, **53**, 730-733(2007).

16 Suzuki H., Yamazaki M., Chiba K., Uemori Y. and Sawanishi H. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 168-171(2010).

17 佐上　郁子、佐藤　裕子、野口　智子、宮島　教人、清水　透、生物物理 **41**、 137－141 (2001)

18 Miyamoto K., Yamamoto Y., Kurita M., Sakai R., Konno K., Sanae F., Ohshima T., Takagi K., Hasegawa T., Iwasaki N., Kakiuchi M. and Kato H., *J. Med. Chem.*, 36, 1380－1386(1993)

19 Fedorov R., Hartmann E., Ghosh D. K. and Schlichting I., *J. Biol. Chem.*, 278, 45818－45828(2003)