

平成22年 6月 7日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790100
 研究課題名（和文）遷移状態アナログとしてグルタミン酸ラセマーゼを阻害する新規抗菌剤の開発
 研究課題名（英文）Development of novel antibiotics that inhibit glutamate racemase as transition state analogues
 研究代表者
 奥田 健介 (OKUDA KENSUKE)
 岐阜薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号：00311796

研究成果の概要（和文）：既存の抗菌剤に抵抗性を示す多剤耐性菌の出現・増大はますます深刻な問題となっている。この点に関し、細菌の生存に必須な酵素であるグルタミン酸ラセマーゼの阻害に新しく着目して本研究を行った。本酵素はヒトには存在しないため、その阻害剤はヒトに対する副作用が弱いことが期待される。酵素の作用機構に基づき基質類縁体をデザイン・合成し、実際に肺炎球菌に対する影響を検討したところ、抗菌活性が認められた。

研究成果の概要（英文）：Emerging and increasing of multidrug resistant bacteria has become an even more serious issue. In this regard, I pointed the aim at glutamate racemase inhibition, which is an essential enzyme for bacteria, as a novel drug target. As human do not have this enzyme, one can expect that inhibitors of this enzyme do not have side effects. I designed and synthesized substrate analogues as potential inhibitors based on their action mechanism. Actually, one compound showed some antimicrobial activity on *S. pneumoniae*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：遷移状態類縁体、フッ素、抗菌活性、グルタミン酸、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 感染症対策の分野において、臨床で用いられる既存の抗菌剤に抵抗性を示す多剤耐性菌の出現・増大はますます深刻な問題となっている。そのため、対象とする微生物の増殖・生存に必須であり、これまで十分には検討されていない新規な標的酵素の探索は、医

薬化学研究の中できわめて重要な分野の1つである。

(2) この点に関して、ここ近年グルタミン酸ラセマーゼに注目が集まっている。本酵素はグルタミン酸のラセミ化を行い、細菌が持つ細胞壁中のペプチドグリカンの生合成に必

須な D-グルタミン酸を L-グルタミン酸から供給する役割を持つ。本酵素は人体には存在しないためにその選択的阻害剤はヒトへの副作用がないことが期待され、選択毒性の観点からは理想的な標的酵素である。

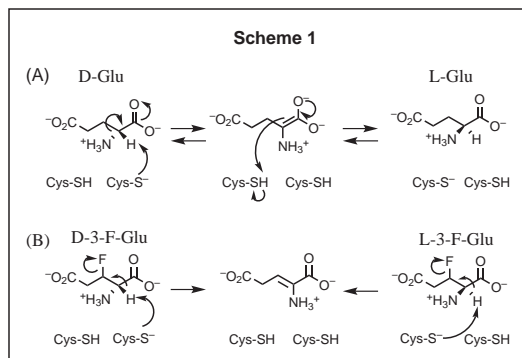
(3) グルタミン酸ラセマーゼの阻害に基づく抗菌剤の開発としては、1990年代に Martin E. Tanner らによる報告が行われているものの、その阻害能はさほど強いものではない[1,2]。実用的な観点からは、2002年に Alfonso de Dios らが 4-位に置換基を持つ一連の D-グルタミン酸誘導体を発表しているものが先駆けとして挙げられる[3]。彼らは *S. pneumoniae* に対して最小生育阻害濃度 (MIC) が 200 ng/ml 程度と高い活性を持つ化合物群を導出した。しかしこれらは、その原因は明らかになっていないものの *S. aureus* など他の細菌には効果を持たず、その抗菌スペクトルは非常に狭いものである。また、2007年には Tomas Lundqvist らによる high throughput screening の結果、*H. pylori* のグルタミン酸ラセマーゼのアロステリック部位に結合して酵素反応を阻害する化合物が見出された。その MIC は 4 µg/ml と比較的高いものであったが、*S. aureus* や *S. pneumoniae* 等の細菌に対する抗菌活性は弱かった[4]。

2. 研究の目的

(1) 本酵素は選択毒性の観点から抗生物質の標的として魅力的であり、広い抗菌スペクトルを有する阻害剤探索研究は重要であると考えられる。そこで本研究においては、1) 酵素の基質として反応した結果、強力に酵素反応を阻害することが期待される酵素反応の中間体アナログ前駆体を、酵素反応の作用機構に基づきデザインし、その合成を達成する、2) これらの化合物の実際の抗菌活性を評価して、構造活性相関研究を行う、この2点により、新規な作用機構に基づく抗生物質のリード化合物を導出することを目的とした。

(2) 以下に本研究における合理的な阻害剤の設計に関して概略を述べる。酵素反応での反応中間体は、反応基質および生成物よりも強力に酵素の反応中心に結合していると考えられており、その安定な類縁体は強力な酵素阻害剤になりうる。その一方、私は様々な酵素反応の速度論的な機構解明に必要なトレオ-3-フルオロ- α -アミノ酸の立体選択的な一般合成法の確立を行っており[5]、本手法により合成可能である 3-フルオログルタミン酸がグルタミン酸ラセマーゼによる反応を受けた際に安定な反応中間体アナログになりうることに気づいた。本酵素の反応機構とし

ては、まず酵素内のシステイン残基が塩基触媒として働き、 α -プロトンを引き抜いた平面状の遷移状態を形成する。引き続いて別のシステイン残基よりプロトンの供給を受けて立体が反転する (Scheme 1-A)。一方、3-フルオログルタミン酸を基質として用いた場合には α -プロトンの引き抜きに続いて、隣接するフッ素が脱離してエナミンを形成すると予想される (Scheme 1-B)。このエナミン体は反応中間体と同様に平面構造を持ちかつ安定であるために酵素の反応中心に強く結合することが期待され、反応中間体アナログ阻害剤として働くと考えられる。



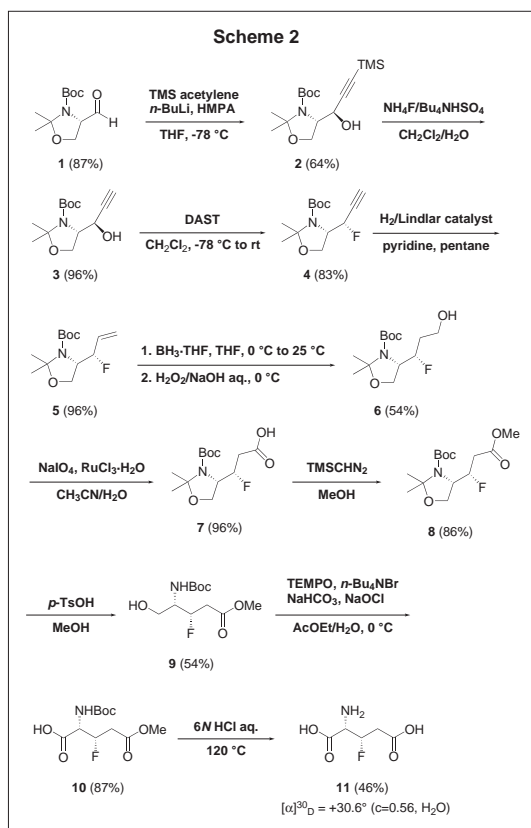
(3) 実際に、このような平面構造を持つ反応中間体アナログがアミノ酸ラセマーゼを阻害することは、古く 1974 年に Michael V. Keenan らにより報告されている[6]。彼らは、3,4-dihydro-2H-pyrrole-5-carboxylic acid がプロリンラセマーゼを強固に阻害することを見出した。この先行例からも、本研究で扱うグルタミン酸ラセマーゼの反応中間体アナログ前駆体が、強力に酵素阻害剤として働く可能性は高いものと考えられた。

3. 研究の方法

(1) (2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸の合成 (Scheme 2)

まず、私が確立したトレオ-3-フルオロ- α -アミノ酸の立体選択的合成法[5]を活用して得ることの可能な (2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸の合成を行った。合成ルートとしては、まず L-セリンから導かれる (*S*)-1 ((*S*)-Garner's aldehyde) より出発し、ジアステレオ選択的に trimethylsilylethynyl 基を付加させることにより既知化合物である二級アルコール((2*S*,3*R*)-2)へと選択的に導いた。TMS 基の除去の後、続いて求核的なフッ素化剤である diethylaminosulfur trifluoride (DAST) を作用させることにより、立体反転を伴う二級水酸基のフッ素への置換を行い(2*S*,3*S*)-4 を得た。さらに ethynyl 基の Lindlar 触媒によるオレフィンへの還元の後、BH₃-THF によるヒドロホウ素化-酸化を行ってアルコール体を得、RuCl₃-NaIO₄

によるカルボキシル基への酸化を行って(2*S*,3*S*)-**7**を得た。TMSCHN₂によりメチルエステルへと変換後、*p*-TsOHによるアセタール部位の除去、TEMPO/NaOCl aq.系による一級水酸基のカルボキシル基への酸化ならびにHClによるBoc基の除去を順次行い(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)を最終的に得ることに成功した。



(2) 抗菌活性の検討

合成した(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)を用い、*S. pneumoniae* R6 に対して希釈法により、その最小生育阻害濃度(MIC)を求めて抗菌活性を評価した。また(2*S*,3*S*)-**11**のジメチルエステル体およびモノメチルエステル体((2*S*,3*S*)-2-amino-3-fluoro-5-methoxy-5-oxopentanoic acid)に関しても、プロドラッグ的な作用による活性の向上を期待し、同様に抗菌活性を評価した。

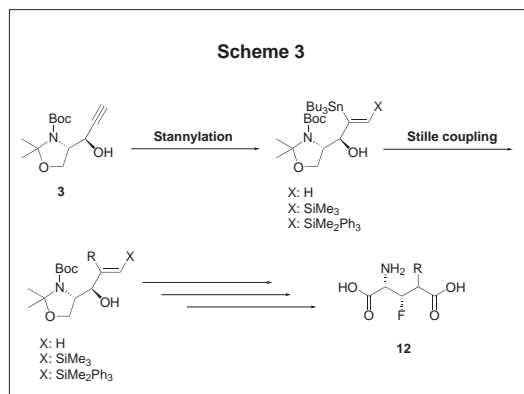
(3) (2*S*,3*R*)-3-フルオログルタミン酸の合成の試み

引き続きエリトロ体である(2*S*,3*R*)-3-フルオログルタミン酸の合成を試みた。(2*R*)-**1**より出発し、(2*S*,3*S*)-体の合成と同様にジアステレオ選択的に trimethylsilylethynyl 基を付加させることにより既知化合物である二級アルコール((2*S*,3*S*)-**2**)を得ることが出来、以後同様の変換反応を行うことにより、(2*S*,3*R*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)を得ることができる。

実際に反応を試みた所、(2*S*,3*S*)-**3**からのDASTによる反応では、主生成体としては環化した oxazolone 誘導体得られ、期待した(2*S*,3*R*)-**4**は全く得られなかった。そこで他の試薬としてKFによる反応を試みたが、望む生成物は得られなかった。さらに、この二級水酸基を活性なスルホン酸エステルに変換してしかる後にフッ素化を行う合成手法も試みたが、スルホン酸エステル(メシラートおよびトリフラート)への変換の段階で反応が進まず、原料回収に終わった。この理由としては、立体障害のために二級水酸基の反応性が非常に低いためと考え、選択的にアセタール部位のみを*p*-TsOHにより除去後、一級水酸基をトリチル基などで選択的に保護し、残された二級水酸基に対するフッ素への置換反応を種々検討したが、いずれの場合にも原料回収もしくは分解に終わった。現在の段階で、本手法による(2*S*,3*R*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)の合成には成功しておらず、今後の課題である。

(4) 4位に置換基を有する(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸の合成の試み

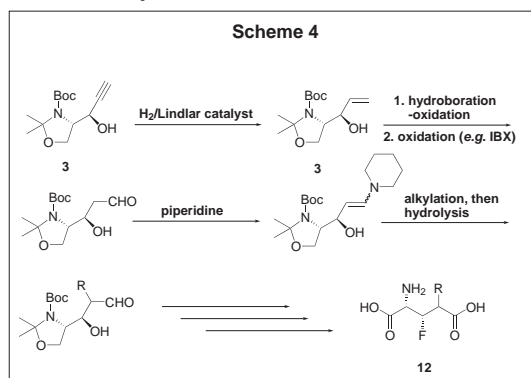
① (2*S*,3*R*)-**3**より出発し、ヒドロスタニル化反応あるいはシリルスタニル化反応を行って内部アルキン位置選択的にスタニル基を導入し、しかる後に Stille coupling 反応を行うことにより4位に炭素置換基を導入することができる。さらに適切に種々の官能基変換反応を行った後、4位に置換基を有する(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**12**)を得ることができる(Scheme 3)。



実際に反応を試みた所、ヒドロスタニル化反応は進行するものの内部アルキンへのスタニル化の位置選択性が非常に低いためこの段階で断念した。その一方、シリルスタニル化反応では、位置選択的反応に高収率で成功した。そこで引き続き Stille coupling 反応を行い、4位に Ph 基を導入した(R = Ph)。続いて Fleming-玉尾酸化に付すべくオレフィンの還元を試みたが、原料回収もしくは分解に終わった。そこで、TBAFにより脱シリル化反応を行った後にヒドロホウ素化を試みたが、これも原料回収に終わった。

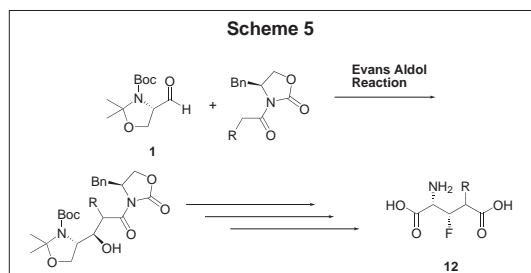
さらに(2*S*,3*R*)-**3**に対してスタンル化の代わりに有機ジルコニウム試薬を用いる位置選択的ヒドロウ素化あるいは有機銅を用いる位置選択的ヒドロアルキル化を試みたが、いずれも原料回収もしくは分解に終わった。

② 引き続き(2*S*,3*R*)-**3**より ethynyl 部分の Lindlar 触媒によるオレフィンへの還元、ヒドロホウ素化-酸化、2-iodoxybenzoic acid (IBX)等による酸化を順次行ってホルミル体へ導き、このホルミル基の α -位(4-位)に対して Stork enamine 合成などにより置換基を導入することができる。この後、先ほどと同様に(2*S*,3*S*)-**12**へ導くことが可能である (Scheme 4)。



実際に(2*S*,3*R*)-**3**への反応を試みた所、ヒドロホウ素化-酸化まではスムーズに進行したが、ホルミル基へと変換する酸化反応において反応が進行せず、この手法でのさらなる進展は困難であった。そこで(2*S*,3*R*)-**3**の二級水酸基をシリル基で保護してから反応に付した所、問題の酸化反応もスムーズに進行し、ホルミル体が得られた。さらにエナミンへの変換を試みたが、いずれの条件においてもエナミンは生成するものの、シリルエーテルの脱離反応も進行した結果、副生である共役オレフィンが生成物として得られるのみであり、この手法での更なる進展は困難であった。

③ さらには、(*S*)-**1**に Evans Aldol 反応を付すことにより、直接目的物の骨格を形成することも出来る。この後、先ほどと同様に(2*S*,3*S*)-**12**へ導くことが可能である (Scheme 5)。



実際に(*S*)-**1**への Evans Aldol 反応を検討し

たところ、反応の立体制御に成功せず多くの副生が得られたため、この手法での更なる進展は困難であった。現在の段階で、4位に置換基を有する(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**12**)の合成には成功しておらず、今後の課題である。

4. 研究成果

(1) (2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸の合成
「研究の方法」欄第1項で述べたように(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)の合成を Scheme 2 に示す方法により達成した。本合成は、先に私が確立したトレオ-3-フルオロ α -アミノ酸の立体選択的-一般合成法[5]の応用例の一つであり、種々の生理活性が期待されることの出来るキララな 3-フルオロ α -アミノ酸[7]の合成法として役立つことを示すことが出来た。

(2) (2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸およびその誘導体の抗菌活性

① *S. pneumoniae* R6 に対して(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)を評価したところ、MIC が 128 $\mu\text{g/ml}$ と弱いものの抗菌活性が認められた。その一方で(2*S*,3*S*)-**11** のジメチルエステル体およびモノメチルエステル体((2*S*,3*S*)-2-amino-3-fluoro-5-methoxy-5-oxopentanoic acid) に関しては、ほとんど抗菌活性が認められなかった。

② 現在の所、この抗菌活性の作用機構がグルタミン酸ラセマーゼの阻害によるものであることは明らかになっていない。そこで本点を検証するため、(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)の抗菌活性が D-グルタミン酸の添加により影響されるか否かを今後検討する。D-グルタミン酸の添加により抗菌活性が減弱する場合、3-フルオログルタミン酸の持つ抗菌活性の作用機構がグルタミン酸ラセマーゼの阻害に由来することを間接的に証明することができる。

③ 一方、ラセミ化が行われる炭素の隣接位に適切な脱離基を有する基質類縁体は、ラセマーゼ一般に適用可能な反応中間体アナログの前駆体として酵素反応を阻害することが予想されるものの、これまでその研究例はほとんど見当たらない。真に(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(**11**)がグルタミン酸ラセマーゼを阻害することが明らかになった場合には、広くラセマーゼ一般に適用可能な概念として、反応中間体アナログとしての基質類縁体阻害剤に新しい光を本研究結果は当て

④ 近年、相次いでグルタミン酸ラセマーゼ

の X 線結晶構造解析が報告された[4,8,9]。これらはそれぞれ *H. Pylori*, *S. pyogenes*, *B. anthracis* 由来の酵素であり、酵素そのもの自身だけでなく、基質あるいは Alfonso de Dios らの報告した阻害剤[3]存在下での共結晶の構造解析も行われており、反応中心に阻害剤が結合した際の酵素側の構造変化などが詳細に報告されている。これらに加え、以前より報告されている *B. subtilis* [10]および *A. pyrophilus* [11]由来の酵素の X 線結晶構造解析の結果より、これらの酵素の構造に共通する部分、例えば活性中心近傍を抽出して阻害剤候補化合物とのドッキングスタディを行うことにより、広い抗菌スペクトルを有する阻害剤の化合物設計に資することができる。

真に(2*S*,3*S*)-3-フルオログルタミン酸(11)がグルタミン酸ラセマーゼを阻害することが明らかになった場合には、基質類縁体である本化合物は酵素活性中心に結合すると予想されるため、広い抗菌スペクトルを有するグルタミン酸ラセマーゼ阻害剤の化合物設計の出発点になりうるものである。すなわち、本研究によって多剤耐性菌に対抗する強力な標的の一つとして考えられるグルタミン酸ラセマーゼの実用的な阻害剤の開発へと展開する基礎的な知見が得られ、今後の研究においてさらなる発展を期すことが出来る。

(参考文献)

1. Martin E. Tanner and Shichang Miao, *Tetrahedron Lett.* **35**, 4073–4076 (1994).
2. Suzana Glavas and Martin E. Tanner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2265–2270 (1997).
3. Alfonso de Dios, *et al.*, *J. Med. Chem.* **45**, 4559–4570 (2002).
4. Tomas Lundqvist, *et al.*, *Nature* **447**, 817–822 (2007).
5. Kensuke Okuda, *et al.*, in preparation.
6. Michael V. Keenan and William L. Alworth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 500–504 (1974).
7. 一例としては Kensuke Okuda, *et al.*, *J. Org. Chem.* **74**, 2609–2612 (2009).
8. Kook-Han Kim, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **372**, 434–443 (2007).
9. Melissa May, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **371**, 1219–1237 (2007).
10. Sergey N. Ruzheinikov, *et al.*, *Structure (Cambridge, MA, U.S.)* **13**, 1707–1713 (2005).
11. Kwang Yeon Hwang, *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 422–426 (1999).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 河村泰男、植月勇貴、竹内靖雄、上田聡、奥田健介、永澤秀子、グルタミン酸ラセマーゼ阻害剤を指向する 3-フルオロ-D-グルタミン酸の合成、創薬懇話会 2009、2009 年 12 月 10 日、アルモニーテラッセ (岐阜)

② 河村泰男、植月勇貴、竹内靖雄、上田聡、奥田健介、永澤秀子、グルタミン酸ラセマーゼ阻害剤を指向する 3-フルオログルタミン酸の合成、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、国立国際京都館 (京都)

[その他]

ホームページ等

http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_yakka.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 健介 (OKUDA KENSUKE)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00311796