

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590126

研究課題名（和文）ホスホニル基およびホスフィニル基の構造的特徴を利用する創薬研究

研究課題名（英文）Development of biologically active compounds based on features of phosphonyl and phosphinyl functional groups

研究代表者

横松 力 (YOKOMATSU TSUTOMU)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70158369

研究成果の概要（和文）：

リン酸は生体内に普遍的に存在し、核酸の加リン酸分解やシグナルタンパク質のリン酸化など多くの生体機能に関与している。本研究課題では、ヌクレオシド加リン酸分解酵素を分子標的とした創薬研究を fragment-based drug design (FBDD) に基づいて展開させた。すなわち、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 阻害剤の創製研究では、PNP と親和性を示す 9-デアザグアニン誘導体 (DG) とリン酸ミミック ( $\text{CF}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ) をスパーサで連結した PNP 二基質複合型アナログを設計・合成した。スパーサ長の距離を種々変化させた類縁体の構造活性相関研究から、臨床で治療効果を発揮し得る高い阻害活性を有する PNP 阻害剤 (DFPP-DG) の創製に成功した。DFPP-DG は、各種アッセイの結果から、予想通り二基質複合類縁型 PNP 阻害剤として機能していることが明らかとなった。このことは、Calf-PNP/DFPP-DG の共結晶の X 線構造解析研究によっても支持された。一方、PNP 阻害剤は成人 T-細胞白血病 (ATL) の治療薬として利用可能と考えられることから、DFPP-DG 関連化合物のヒト白血病細胞やリンパ球細胞の増殖抑制率について検討した。その結果、予想通り当該細胞の増殖を抑制する効果が認められた。また、DFPP-DG は slow-binding inhibitor として機能し、平衡時の阻害定数は  $K_{\text{eqi}}=85$  pM を示すことが明らかとなった。ホスフィニルジペプチドイソスター (PDI) の合成研究では、これまでの成果を発展させ、光学活性 PDI の合成法を開発した。その他、ホスホニル化合物およびホスフィニル化合物の新規合成法を見出した。

研究成果の概要（英文）：

9-(5',5'-Difluoro-5'-phosphonopentyl)-9-deazaguanine (DFPP-DG) was designed as a multi-substrate analogue inhibitor against purine nucleoside phosphorylase (PNP) on the basis of X-ray crystallographic data obtained for a binary complex of 9-(5',5'-difluoro-5'-phosphonopentyl)guanine (DFPP-G) with calf-spleen PNP. DFPP-DG and its analogous compounds were adjusted by length of the linker achieved by the Sonogashira coupling reaction between a 9-deaza-9-iodoguanine derivative and  $\omega$ -alkynyldifluoromethylene phosphonates as a key reaction. DFPP-DG is a very potent PNP inhibitor with apparent inhibition constants (in the presence of 1 mM phosphate) of 4.4 nM and 8.1 nM vs calf spleen and human erythrocyte PNPs, respectively. One of its analogues, *homo*-DFPP-DG, with longer chain linking phosphonate and 9-deazaguanine is even more potent vs human enzyme, with an apparent inhibition constant of 5.3 nM (in the presence of 1 mM phosphate). The inhibition constant at equilibrium (1 mM phosphate concentration) with calf spleen PNP was shown to be  $K_{\text{eqi}}=85\pm 13$  pM (pH 7.0, 25°C).

In the research for developing phosphinyl dipeptide isostere (PDI), we have found a new method for synthesis of optically active PDI by using chemo-enzymatic processes. We also developed an efficient stereoselective synthesis of the Leu-Pro type PDI. In addition, we have also developed several new methods for synthesis of some new molecules having phosphonyl or phosphinyl functional group.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：ヌクレオチドアナログ、ジフルオロホスホン酸、PNP阻害剤、fragment-based drug design、ペプチドイソスター、遷移状態アナログ

1. 研究開始当初の背景

細胞には、細胞外からのシグナル（刺激）を細胞内に伝え、細胞の増殖・分化、アポトーシスなどをつかさどる様々な情報伝達系機構が存在する。蛋白質、糖質、脂質、ヌクレオシドのリン酸化により生じる生体内リン酸エステル誘導体の多くは、細胞情報伝達機構においてメディエーターとなり細胞機能を制御している。本研究は、細胞情報伝達機構におけるリン酸エステル系メディエーターに着目し、それらのミメティクスのデザイン・合成および物性機能評価を行い、細胞情報伝達機構の詳細を明らかとするためのプローブおよび細胞情報伝達機構の制御を基盤とする難治性疾患治療薬のシードを見いだすことを最終目的とする。

2. 研究の目的

すでに、本研究者は、生体内リン酸エステル「R-OP(O)(OH)<sub>2</sub>」を生物学的等価構造に化学修飾する手法を用いて、1) プロテインチロシンホスファターゼ (PTP)、2) プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP)、3) スフィンゴミエリンナーゼ (SMase) などを分子標的とする阻害剤の創製と機能解析研究を行ってきた。これらの研究において、リン酸エステル「ROPO(OH)<sub>2</sub>」のミメティクスとして、物理化学的性質がリン酸エステルと近似し、加水分解に対する抵抗性を有するジフルオロメチレンホスホン酸「RCF<sub>2</sub>PO(OH)<sub>2</sub>」を活用してきた。本研究年度においては、これまでの研究を展開するとともに、新たな創薬手法を活用しながらホスホニル基とホスフィニル基の構造的特徴を踏まえた情報伝達制御分子の創製を目指す。

3. 研究の方法

(1) 二基質複合型酵素阻害剤の創薬研究

近年、新しい創薬の手法として、FBDD (fragment-based drug design) が注目されている。これは、標的タンパク質に対して親和性を有する個々の低分子（フラグメント）を適切なリンカーでつなぎ合わせ、比較的分子量が小さく、活性の高い化合物を効率的に見出すことができる方法である。リン酸及びリン酸エステル類は生体内に普遍的に存在する分子であり、これらを基質とする酵素が多数存在する。これらの酵素は、生体恒常性の維持に重要な役割を担っており、多くの場合リン酸結合部位および基質取り込み部位などから構成されている。リン酸結合部位を有する酵素阻害剤の創製において、フラグメント分子としてのリン酸と、リン酸結合部位の近傍に存在する他の基質結合部位に親和性を有するフラグメント分子とを適切なリンカーで連結することで、新規リガンドを見出すことが出来ると考えられる。このように設計された二基質複合型アナログは、リン酸結合部位でのアミノ酸残基とリン酸基の強い相互作用のために、標的酵素に高い親和性を示すことが期待できる。また、個々のフラグメント分子は様々なタンパク質に結合し得るが、フラグメント分子同士を連結することによって、高い選択性を示すことも期待される。本研究では、T細胞で充進しており、白血病などに深く関与しているプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) の阻害剤創製を目的に、FBDDに立脚してそれぞれの二基質複合型アナログを設計した。また、それらの合成・機能解析を行った。

(2) ホスフィニルジペプチドの合成研究

ホスフィニル基はカルボニル基の水和遷移状態と構造的に類似している。ジペプチドのアミド結合をホスフィニルメチレンで置

き換えた化合物（ホスフィニルジペプチドイソスター：PDI<sub>s</sub>）は、ペプチド性プロテアーゼ阻害剤の機能素子としての利用が期待できる。創薬に利用できる簡便な PDI<sub>s</sub> の立体制御合成法の開発を目的に研究を展開する。

#### 4. 研究成果

本研究では、当初の目標に沿って研究を展開させ、以下の成果を得た。

##### (1) 二基質複合型阻害剤の創製研究

PNP 阻害剤の創製においては、グアニンとリン酸ミミック (CF<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) を4つのメチレンで連結したヌクレオチドアナログ (DFPP-G) と PNP の共結晶の X 線結晶解析に成功した。これらの情報を基にして、PNP と親和性を示す 9-デアザグアニン誘導体 (DG) とリン酸ミミック (CF<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) をスパーサで連結した PNP 二基質複合型アナログを設計・合成した。スパーサ長の距離を種々変化させた類縁体の構造活性相関研究から、臨床で治療効果を発揮し得る高い阻害活性を有する PNP 阻害剤 (DFPP-DG) の創製に成功した。各種アッセイの結果から、予想通り二基質複合型阻害剤として機能していることが明らかとなった。このことは、Calf-PNP/DFPP-DG の共結晶の X 線構造解析研究によっても支持された。一方、PNP 阻害剤は成人 T-細胞白血病 (ATL) の治療薬として利用可能と考えられることから、DFPP-DG 関連化合物のヒト白血病細胞やリンパ球細胞の増殖抑制率について検討した。その結果、予想通り当該細胞の増殖を抑制する効果が認められた。また、DFPP-DG は slow-binding inhibitor として機能し、平衡時の阻害定数は K<sub>eqi</sub>=85 pM を示すことが明らかとなった。

##### (2) ホスフィニルジペプチドの合成研究

平成 20 年度までの研究成果において、著者はリン原子の不斉を利用するラセミ PDI<sub>s</sub> の立体制御合成法を開発した (*Org. Lett.* **10**, 4347-4350 (2008))。本合成法は、1,1-diethoxyethyl(hydroxymethyl)phosphinates (**1**) を合成素子として利用し、その不斉が PDI<sub>s</sub> の立体制御に有効に活用されている。そこで、本研究期間では、**1** の光学活性体の合成について検討した。その結果、リパーゼを用いる不斉アシル化反応を利用することにより、**1** の両エナンチオマーが簡便に得られることを見出した。また、Pd 触媒下のホスフィン酸誘導体とビニルトリフラートのクロスカップリング反応を利用して、Leu-Pro 型 PDI<sub>s</sub> の立体制御合成法を開発した。

#### 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) T. Yamagishi, S. Muronoi, S. Hikishima, H. Shimeno, S. Soeda, and T. Yokomatsu Diastereoselective synthesis of  $\gamma$ -amino- $\delta$ -hydroxy- $\alpha,\alpha$ -difluorophosphonates: A vehicle for the structure-activity relationship of SMA-7, a potent sphingomyelinase inhibitor; *J. Org. Chem.*, **74**, 6350-6353 (2009).
- 2) G. Chojnowski, K. Breer, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, H. Czapinska, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, M. Bochtler, A. Girstun, K. Staroń, A. Bzowska, 1.45Å resolution crystal structure of recombinant PNP in complex with a pM multisubstrate analogue inhibitor bearing one feature of postulated transition state, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **391**, 703-708 (2010).
- 3) K. Breer, B. Wielgus-Kutrowska, A. Girstun, K. Staroń, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, A. Bzowska, Overexpressed protein may act as mops removing their ligands from host cells: A case study of calf PNP, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **391**, 1203-1209 (2010).
- 4) L. Glavaš-Obrovac, M. Suver, S. Hikishima, M. Hashimoto, T. Yokomatsu, L. Magnowska, A. Bzowska, Antiproliferative activity of purine nucleoside phosphorylase multisubstrate analogue inhibitors containing difluoromethyl phosphonic acid against leukaemia and lymphoma cells, *Chem. Bio. Drug. Des.* **75**, 392-399 (2010).
- 5) S. Hikishima, M. Hashimoto, L. Magnowska, A. Bzowska and T. Yokomatsu; Structural-based design and synthesis of novel 9-deazaguanine derivatives having a phosphate mimic as multi-substrate analogue inhibitors for mammalian PNPs, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 2275-2284 (2010).
- 6) K. Breer, L. Glavas-Obrovac, M. Suver, S. Hikishima, M. Hashimoto, T. Yokomatsu, B. Wielgus-Kutrowska, L. Magnowska, A. Bzowska, 9-Deazaguanine derivatives connected by a linker to difluoromethylene phosphonic acid are slow-binding picomolar inhibitors of trimeric purine nucleoside phosphorylase, *FEBS Journal*, **277**, 1747-1760 (2010).
- 7) T. Yamagishi, N. Tashiro, and T. Yokomatsu, Diastereoselective synthesis of the Leu-Pro type phosphinyl dipeptide isostere; *J. Org. Chem.* **76**, 5472-5476 (2011).
- 8) T. Yamagishi, J. Mori, T. Haruki, and T.

Yokomatsu, A chemo-enzymatic synthesis of optically active 1,1-diethoxyethyl(aminomethyl)phosphinates: useful chiral building blocks for phosphinyl dipeptide isosteres; *Tetrahedron:Asymmetry* **22** 1358-1363(2011).

〔学会発表〕(計6件)

- 1) 野田祐介, 室野井真, 疋島貞雄, 山岸丈洋, 横松力, SMase 阻害剤を指向した新規 SMA-7 類縁体の合成研究, 第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2009 年 11 月、金沢
- 2) 谷津智之, 疋島貞雄, Agnieszka Bzowska, 横松力, SBDD を用いた新規 PNP 阻害剤の創製研究, 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2009 年 11 月、東京
- 3) 谷津智之, 疋島貞雄, Agnieszka Bzowska, 横松力, SBDD を用いた新規 PNP 阻害剤の創製研究, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月、岡山
- 4) T. Haruki, H. Ichikawa, J. Mori, T. Yamagishi, T. Yokomatsu, 18<sup>th</sup> International Conference on Phosphorus Chemistry, 2010 年 7 月、Wroclaw, Poland.
- 5) 春木 晶充, 山岸 丈洋, 横松 力, 非天然型の立体配置を有するホスフィニルジペプチドイソスターの合成研究, 日本薬学会第 132 年会, 2011 年 3 月、静岡
- 6) 春木晶充, 森淳一郎, 山岸丈洋, ホスフィニルジペプチドイソスターの効率的合成を指向したアミノメチルホスフィナートの不斉アシル化反応, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月、仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横松 力 (YOKOMATSU TSUTOMU)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：70158369

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

ANGIESKA BZOWSKA  
ワルシャワ大学・理学部・教授

疋島 貞雄 (HIKISHIMA SADAŌ)  
東京薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：70398816

山岸 丈洋 (YAMAGISHI TAKEHIRO)  
東京薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：90297606