

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460155

研究課題名(和文)リン酸ミミックを活用する創薬研究

研究課題名(英文)Application of phosphate mimetics to development of biologically active compounds

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホン酸およびホスフィン酸を組み込んだ分子は、ホスホニル基およびホスフィニル基がリン酸エステルの等価構造あるいはジペプチドの加水分解遷移状態、さらにカルボン酸のバイオイソスターとして作用することから、様々な生物活性を示すことが知られている。本研究においては、ホスホニル基およびホスフィニル基の構造的な特徴を生物活性化合物の創製に利用する研究の新たな展開を期待して、さらに、有機酸触媒や金属キレートなどの機能を有する新規化合物の創製にも注目して、これまで合成が困難であったホスホン酸誘導体あるいはホスフィン酸誘導体の新規合成法の開発と機能評価を行った。

研究成果の概要(英文)：Phosphonyl and phosphinyl functionalities have been utilized as phosphate mimetics and a bioisostere of carboxylic acids to discover biologically active compounds. In this project, several methods for synthesis of novel phosphonate and phosphinate derivatives have been developed. A novel series of phosphonate esters was synthesized on the basis of our previously developed aryl carboxylate-type tryptase selective inhibitor. The potency of these synthesized compounds was assessed with an enzyme inhibition assay using three available serine proteases. The phosphonate derivative showed potent thrombin inhibitory activity, whereas it exhibited no or only weak tryptase and trypsin inhibition. The inhibition pattern against thrombin with developed compound is non-competitive in spite of the fact that the lead carboxylate compound is competitive inhibitor.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ホスホン酸 ホスフィン酸 生物活性 バイオイソスター 酵素選択性 阻害形式 結合定数 光学分割

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)₂」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)₂」のミメティックスとして、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「RCF₂PO(OH)₂」を活用してきた。本研究年度においては、新たな研究展開を期待して、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

本研究年度においては、ホスホニル基およびホスフィニル基の構造的な特徴を生物活性化合物の創製に利用する研究の新たな展開を期待して、さらに、有機酸触媒や金属キレートなどの機能を有する新規化合物の創製にも注目して、これまで合成が困難であったホスホン酸誘導体あるいはホスフィン酸誘導体の新規合成法の開発と機能評価を行う。

4. 研究成果

ホスホプロリン誘導体の簡易合成

ホスホプロリン 1 は、天然アミノ酸の1つであるプロリンのカルボキシル基をホスホニル基に置き換えた類縁体である。光学活性ホスホプロリン((R)-1 および(S)-1)は、ペプチド性プロテアーゼ阻害剤の構造ユニットとして、また、近年では、アルドール反応やマイケル反応の不斉有機酸触媒としても利用されるようになった。しかしながら、ホスホプロリン 1 の合成法は、数例しか報告されてお

らず、簡便かつ環境に優しい合成法が求められている。今回、DL-プロリンをトルエン中でベンズアルデヒドとジエチルホスファイトと存在下に、加熱環流すると、目的とする N-ベンジルホスホプロリンジエチルエステル 2 が高収率で得られることを見出した。本反応は、酸・塩基触媒を必要としないことから、環境に優しい新しいホスホプロリン誘導体の合成法として価値あるものである。本結果は、国際誌(Tetrahedron Letters)で発表した。

ホスホプロリンの光学分割

光学活性ホスホプロリンの合成法として、多段階を経る2つの合成法が開発されてきた。しかし、これらの方法は、一方のエナンチオマーの合成に利用されてきたが、両エナンチオマーを同時に合成する手法としては、効率的ではなかった。一方、ラセミ体の光学分割法は、簡便な分割法であれば、両エナンチオマーを同時に得ることが出来有用な方法の1つになる。本研究者は、前項で述べた反応で得られた化合物 2 の脱ベンジル体の光学分割について検討を加えた。その結果、(+)-dibenzoyl-L-tartaric anhydride から誘導されるジアステレオマー(3 および 4)は容易に分離可能であることを見出した。ジアステレオマー 3 の構造は、カリウム塩の X 線結晶構造解析により決定された。3 および 4 をそれぞれ加水分解することにより、ホスホプロリンの両エナンチオマー(S)-1 および(R)-1 を合成した。以上の結果は、論文として纏め国際誌(Tetrahedron: Asymmetry)で発表した。

ホスホン酸エステルが酵素選択性に与える効果

N-methyl-5-hydroxylphthalimide と 3-(6-aminopyridin-3-yl)propanoic acid をエステルで連結した誘導体 5 は、トリプターゼやトロンピンなどのセリンプロテアーゼに対して阻害活性を有することが知られている。なかでも、トリプターゼに対して高い拮抗阻害活性(IC₅₀=0.19 μM)を示す。5 のカルボン酸エステル構造をホスホン酸エステル構造に置き換えたところ、ホスホン酸類縁体 6 は、トリプターゼに対する阻害活性が低下し、トロンピンに対して阻害活性(IC₅₀=1.0 μM)が高まることが明らかとなった。また、トロンピンに対して、エステル誘導体 5 は、拮抗阻害を示すのに対して、ホスホン酸類縁体 6 は非拮抗阻害を示した。すなわち、カルボン酸エステルをホスホン酸エステルに変換するだけで、阻害形式が拮抗阻害から非拮抗阻害に変化し、さらに、酵素選択性が逆転することが明らかとなった。以上の結果は、国際誌(Bioorganic

Medicinal Chemistry Letters) で発表した。

ホスファオキセタンで配座固定したホスフィン酸誘導体の合成

ホスフィン酸は、カルボン酸のバイオイソスターとして広く活用されている。さらに、ホスフィン酸を環状構造に組み込んだ類縁体(環状ホスフィン酸誘導体)は、ホスフィン酸の配座固定類縁体として機能し、選択的な GABA 受容体アンタゴニストなどの創製に活用されている。本研究では、*7* 位および *8* 位にヒドロキシ基を有する対称性アルキルホスフィン酸誘導体 *7* から、オキセタンにホスフィン酸を組み込んだオキサホスフェタン誘導体 *8* の合成を検討した。*7* を Mitsunobu 反応条件で処理したところ、*7* のヒドロキシ基の立体配置に関係なく、*7* 位および *8* 位の相対配置がシス配置のメソ型化合物 *meso-8* が収率よく合成できることを見出した。以上の結果は、国際誌 (Synlett) で発表した。

1-Hydroxy-1,1-bisphosphonic acids の合成と金属キレート能の評価

1-Hydroxy-1,1-bisphosphonic acid 誘導体は、Ca²⁺ に対して、高いキレート能を示し、破骨細胞の活性化を抑制する作用を有することが知られている。これらの作用からビスホスホナート誘導体は、骨吸収抑制剤として利用されている。本研究では、新たな創薬の可能性を期待して、ホスフィン酸アナログ (1-Hydroxy-1,1-bisphosphonic acid) の合成と種々の金属イオンに対するキレート能を評価した。その結果、La³⁺、Ga³⁺ に対して、強い結合能を有することが明らかとなった。以上の結果は国際誌 (J. Iran. Chem. Soc.) で発表した。

軸対称性アミノビスホスフィン酸誘導体の光学分割と血清アルブミンとの相互作用

-アミノホスフィン酸誘導体は、プソイドペプチドの構成成分として生物活性化合物の創製に活用されている。本研究では、-アミノホスフィン酸の窒素原子を中心に対称化した軸対称性アミノビスホスフィン酸誘導体のラセミ合成と光学分割を検討した。その結果、キニーネを用いる光学分割に成功した。この結果は国際誌 (Chirality) で発表した。さらに、分割された光学活性体とウシ血清アルブミン複合体の結合定数や熱力学的パラメーターを分析して、複合体形成の主要因を明らかとした。以上の結果は、国際誌 (Int. J. Biochem. Biophysic) で発表した。

その他

Pyrazolo-[1,5a]quinoline 誘導体は、生物活性化合物の創製において、スキャホールドとしての有用性が期待される。そこで、リン酸ミミックとのハイブリッド分子を簡便に合成する目的で、本研究では、多置換 pyrazolo-[1,5a]quinoline 誘導体の簡易合成法を開発した。本検討では、これまで置換基導入が困難な pyrazolo-[1,5a]quinoline 誘導体の *5* 位に、アミノ基およびアルキル基が容易に導入できることを明らかとした。以上の結果は国際誌 (Tetrahedron) で発表した。

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7件)

1. B. Kaboudin, L. Karami, J. Kato, H. Aoyama, and T. Yokomatsu, Catalyst-free three-component decarboxylative coupling of amino acids with aldehydes and *H*-dialkylphosphites for the synthesis of α -aminophosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **54**, 4872-4875 (2013).
2. B. Kaboudin, J. Kato, H. Aoyama, and T. Yokomatsu, A novel and simple method for the preparation of (*R*)- and (*S*)-pyrrolidine-2-phosphonic acids: phosphonic acids analogue of proline; *Tetrahedron: Asymmetry*, **24**, 1562-1566 (2013).
3. J. Kato, R. Ijuin, H. Aoyama, and T. Yokomatsu, Synthesis of poly-substituted pyrazolo[1,5-*a*]quinolines through one-pot two component cascade reaction; *Tetrahedron*, **70**, 2766-2775 (2014).
4. B. Kaboudin, M. R. Faghihi, F. Mohammadi and T. Yokomatsu, Analysis of Binding Interaction between *N,N*-Bis(Phosphinomethyl)Amines as a New Class of 1-Aminophosphonic Acids and Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy, *Int. J. Biochem. Biophysic.*, **2**, 19-30 (2014).
5. B. Kaboudin, M. R. Faghihi, F. Kazemi and T. Yokomatsu, Resolution of enantiomers of novel *C*₂-symmetric aminobisphosphonic acids via diastereomeric salt formation with quinine; *Chirality*, **27**(1), 71-74 (2015).
6. H. Aoyama, R. Ijuin, J. Kato, S. Urushiyama, M. Tetsuhashi, Y. Hashimoto, and T. Yokomatsu; Discovery of Non-competitive Thrombin Inhibitor Derived from Competitive Trypsin Inhibitor

Skeleton: Shift in Molecular Recognition Resulted from Skeletal Conversion of Carboxylate into Phosphonate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3676-3680 (2015).

7. B. Kaboudin, A. Ezzati, M. R. Faghihi, A. Barati, F. Kazemi, H. Abdollahi and T. Yokomatsu, Hydroxy-bisphosphinic acids: Synthesis and complexation properties with transition metals in aqueous solution, *J. Iran. Chem. Soc.*, **13**, 747-752 (2016).
8. B. Kaboudin, H. Haghghat, and T. Yokomatsu, Studies on the Synthesis of Novel 4-Membered Cyclic Oxaphosphetanes *via* Intramolecular Mitsunobu Reaction of Bishydroxyalkylphosphinic acids, *Synlett*, **27**, 1537-1540 (2016).

[学会発表](計3件)

1. B. Kaboudin, L. Karami, J. Kato, H. Aoyama, and T. Yokomatsu, Synthesis of α -Aminophosphonates from α -Amino Acids by Catalyst-free Three-component Decarboxylative Coupling Reactions, 20th International Conference on Phosphorus Chemistry, 2014年6月、Doblin, Ireland.
2. 加藤 淳也, 伊藤 勇太郎, 伊集院 良祐, 青山 洋史, 横松 力, ベンズイミダゾ[1,5-a]キノリン類の新規合成法の開発, 第43回複素環化学討論会, 2013年10月, 岐阜県
3. 加藤 淳也, 伊藤 勇太郎, 伊集院 良祐, 青山 洋史, 横松 力, ベンズイミダゾ[1,5-a]キノリン類の簡便合成, 第39回反応と合成の進歩シンポジウム, 2013年11月, 福岡市

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

ナシ

(3) 連携研究者

青山 洋史 (AOYAMA Hiroshi)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 40374699

KABOUDIN Babak

Institute of Advanced Studies in Basic Sciences (Iran), Professor