

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08021

研究課題名(和文) 結核菌細胞壁の構築阻害を特徴とする新規イミノ糖型治療薬のデザイン合成研究

研究課題名(英文) Strategy for designing selective rhamnosidase inhibitors: Synthesis and biological evaluation of L-DMDP cyclic isothiouras

研究代表者

足立 伊左雄 (ADACHI, ISAO)

富山大学・附属病院・教授

研究者番号：30151070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、結核菌の病原性発現には細胞壁の主要構成成分の1つであるL-ラムノースの代謝が重要性であることが示唆されている。本研究課題では、ピロリジン型イミノ糖のL-DMDPから種々のL-DMDP cyclic thiourea誘導体を導き、 α -L-ラムノシダーゼ阻害活性に及ぼす影響について検討を行った。最終的に強力かつ選択的な阻害剤として3',4'-dichlorobenzyl L-DMDP cyclic thioureaを見いだした(IC₅₀値0.23 μ M)。L-DMDP自体は阻害活性を示さないことから、ピロリジン型イミノ糖の環状化が阻害剤開発の新たなデザイン戦略になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study shows that the cyclization of L-DMDP thioureas to bicyclic L-DMDP isothiouras improved α -L-rhamnosidase inhibition which was further enhanced by increasing the length of the alkyl chain. 3',4'-dichlorobenzyl-L-DMDP cyclic isothiourea (3r) was found to display the most potent and selective inhibition of α -L-rhamnosidase, with IC₅₀ value of 0.22 μ M, increased by about 46-fold compared to the positive control 5-epi-deoxyrhamnojirimycin (5-epi-DRJ; IC₅₀ = 10 μ M) and occupied the active-site of this enzyme (K_i = 0.11 μ M). Bicyclic isothiouras of ido-L-DMDP did not inhibit α -L-rhamnosidase. These new mimics of L-rhamnose may affect other enzymes associated with the biochemistry of rhamnose including enzymes involved in progression of tuberculosis.

研究分野：糖質生化学、創薬化学

キーワード：ラムノシダーゼ イミノ糖 結核菌 グリコシダーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

糖の構造を擬態したイミノ糖は、糖質の加水分解や糖鎖プロセッシングに関与する一連のグリコシダーゼあるいは糖脂質合成に関与する糖転移酵素を阻害することから、広範囲にわたる医薬品シーズとして注目が集まっている。これまでにペペリジン型イミノ糖の誘導体であるミグリトール (*N*-hydroxyethyl-DNJ) が糖尿病治療薬として臨床応用されており、また 2012 年にはザベスカ (*N*-butyl-DNJ) がニーマン・ピック病治療薬として国内販売が開始された。一方、従来までのイミノ糖をシーズとした医薬品開発研究は、D-グルコースやD-ガラクトースなど D 型単糖をモチーフにしたデザイン研究に限られており、希少糖である L-ラムノースの代謝制御に関する研究は、ほとんど行われていない。

再興感染症として重視されている結核に対する標準的な治療法である多剤併用療法では、リファンピシンとイソニアジドに耐性を持つ多剤耐性結核菌の出現が問題となっている。L-ラムノースは結核菌細胞壁のリンカー部位にある重要成分であり、結核菌増殖にはラムノシダーゼによる細胞壁構造の分断と、ラムノース転移酵素による再構築が必要となる。従って、本研究課題の成果により、L-ラムノシダーゼ活性を制御できれば、耐性菌が発現しにくい新しい機序を持つ抗結核薬の開発につながると考えられる。

本研究で取り組む非天然型イミノ糖に焦点を当てた研究は、研究例に乏しい L-ラムノシダーゼの選択的な阻害に関する構造活性相関を明らかにするだけでなく、細胞内および細胞間における L-ラムノシダーゼの機能と役割を解明する点で極めて独創的であり先駆性が高い。

厚生労働省の調査では結核登録患者数は約 64,000 人、罹患率は人口 10 万人あたり 19.8 人、死亡者数は約 2,200 人に達するなど、結核は過去の疾患ではなく依然として根絶へ向けた対策が必要な疾患であると言える。更に結核菌多剤耐性株の増加と HIV 感染者での難治性結核の増加が、結核治療をますます困難なものにしており、新しい機序を持つ抗結核薬の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究で取り組む非天然型イミノ糖に焦点を当てた研究は、研究例に乏しい L-ラムノシダーゼの選択的な阻害に関する構造活性相関を明らかにするだけでなく、細胞内および細胞間における L-ラムノシダーゼの機能と役割を解明する点で極めて独創的であり先駆性が高い。

厚生労働省の調査では結核登録患者数は約 64,000 人、罹患率は人口 10 万人あたり 19.8 人、死亡者数は約 2,200 人に達するなど、結核は過去の疾患ではなく依然として根絶へ向けた対策が必要な疾患であると言える。

更に結核菌多剤耐性株の増加と HIV 感染者での難治性結核の増加が、結核治療をますます困難なものにしており、新しい機序を持つ抗結核薬の開発が急務である。本研究課題で着目する L-ラムノシダーゼは、結核菌においては増殖に必須な酵素であるのに対し、ヒトをはじめとする哺乳動物では、生存に本酵素を必要としない。従って、本研究では、これまで見過ごされてきた選択的な L-ラムノシダーゼ阻害剤を開発し、新たな結核に対する治療戦略に成り得る化合物のデザインを目的とした。

3. 研究の方法

所有するイミノ糖ライブラリーを活用し、基質の化学構造から予測される化合物のみに限定しデザインを行うのではなく、あくまでも結核菌由来 L-ラムノシダーゼに対して強いアフィニティーを持つ化合物を見だし、化合物個々の構造活性相関を検討することにより、最適構造を導く。

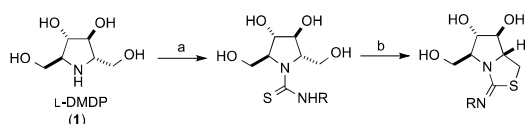
L-ラムノシダーゼの活性中心における各アミノ酸の寄与を明らかにし、より強力な阻害剤探索を行うことを目的とし、Protein Data Bank に収載されている酵素の 3 次元座標データを用いて、コンピュータリガンドドッキングを行う。その際には、 β -glucocerebrosidase に対する高親和性リガンドのデザイン研究で用いた研究方法を適用する。リガンド分子の構造最適化を行い、最終的に L-ラムノシダーゼに対して高い選択性を持つ、高親和性の新規化合物をデザインする。

4. 研究成果

1) ピロリチジン型イミノ糖を基盤とした化合物デザインの検討

所有するイミノ糖ライブラリーの中からピロリチジン型イミノ糖を選択し、スクリーニングを行ったところ、L-DMDP 関連物質に弱いながら細菌由来 -L-ラムノシダーゼに対する阻害活性が認められた。L-DMDP は、これまで哺乳動物由来 -グルコシダーゼの阻害剤である事が報告されているが、今回新たに各種グルコシダーゼに対する阻害選択性を調べたところ、他のガラクトシダーゼに対しても広範囲な阻害を示すことが明らかになった。また L-DMDP 自体には -L-ラムノシダーゼ阻害が認められなかったことから、阻害活性を示した L-DMDP ライブラリー化合物に共通する部分構造を精査したところ、二環性化合物に阻害活性を示すものが多く含まれることを見いだした。そこで、L-DMDP を基盤とした環状化合物のデザイン展開を試みた。その結果、L-DMDP cyclic thiourea への変換により -L-ラムノシダーゼ阻害活性が発現し、更に thiourea 部分にアルキル鎖を導入すると、アルキル鎖の伸長に伴い阻害活性も上昇した。しかしながら、その一方で -グルコシダーゼを始めとする他のグリコシダーゼに対する阻害活性も同時に

上昇する傾向が認められたため、導入する置換基をベンジル基に変えたところ選択性が明らかに上昇した。更にベンゼン環上に種々の置換基を導入し、その効果を比較検討した結果、最終的に強力かつ選択的な阻害剤として 3',4'-dichlorobenzyl L-DMDP cyclic thiourea を見出すことに成功した (IC₅₀ 値 0.23 μM)。この阻害値は、既存の基質類似体である 5-*epi*-deoxyrhamnojirimycin よりも 50 倍程度も強いものであった。更に Lineweaver-Burk plots により阻害様式を評価した結果、本化合物は競合的に α-L-ラムノシダーゼを阻害していることが明らかになった。



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) RNCS, NEt₃, pyridine, rt; (b) conc.HCl, MeOH, 50°C.

Table 1. Concentration of L-DMDP and their cyclic isothioureas derivatives giving 50% inhibition of various glycosidases

	IC ₅₀ (μM)	
	This study	
	L-DMDP (1)	N-Octyl-L-DMDP cyclic isothioureas (3c)
Enzyme		
α-L-Rhamnosidase		
<i>Penicillium decumbens</i>	*NI	1.6
β-Glucosidase		
Bovine liver	NI	NI

*NI: No inhibition (less than 50% inhibition at 1000 μM).

Table 2. Concentration of L-DMDP thiourea and L-DMDP cyclic isothioureas derivatives giving 50% inhibition of various glycosidases

	IC ₅₀ (μM)					
	L-DMDP cyclic isothioureas derivatives					
	n =	3	5	7	9	11
Enzyme						
α-L-Rhamnosidase						
<i>Penicillium decumbens</i>		37	5.3	1.6	0.77	0.46
β-Glucosidase						
Bovine liver		NI	NI	NI	NI	9.5

*NI: No inhibition (less than 50% inhibition at 1000 μM).

Table 3. Concentration of N-alkylbenzyl-L-DMDPcyclic isothioureas derivatives giving 50% inhibition of α-L-rhamnosidase

Compounds					IC ₅₀ (μM)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
3f	H	H	H	H	2.2
3k	H	H	Me	H	1.2
3l	H	H	OMe	H	1.6
3m	H	H	F	H	1.8
3n	H	H	Cl	H	0.89
3o	Cl	H	H	H	2.5
3p	H	Cl	H	H	0.70
3q	Cl	H	Cl	H	0.80
3r	H	Cl	Cl	H	0.23
3s	H	Cl	H	Cl	0.70
3t	H	Cl	Cl	Cl	0.45
5- <i>epi</i> -DRJ					10

2) インドリチジン型イミノ糖を基盤とした化合物デザインの検討

強力な α-マンノシダーゼ阻害剤として知られているインドリチジン型イミノ糖 swainsonine の鏡像異性体である L-swainsonine が細菌由来 α-L-ラムノシダーゼに対し IC₅₀=0.13 μM という強力な阻害を示すことに着目し、二環構造が阻害活性により適していると判断し、L-swainsonine の構造異性体の合成と活性評価を行った。標的化合物として、L-swainsonine より短行程での可能性があり、合成例がない 8-*epi*-L-swainsonine を選択した。合成した 8-*epi*-L-swainsonine は、細菌由来 α-L-ラムノシダーゼに対し選択的な阻害を示したものの、IC₅₀ 値は 87 μM と L-swainsonine より活性が低下し、C8 位の OH 基の配向が重要性が示唆された。更に活性向上を目的に 8-*epi*-L-swainsonine を基盤とした構造展開を模索した結果、6-C-methyl-8-*epi*-L-swainsonine では、阻害活性が更に低下したものの、6-C-benzyl-8-*epi*-L-swainsonine では逆に活性が強くなる傾向が認められた。このことから C6 位への芳香環の導入が細菌由来 α-L-ラムノシダーゼの阻害活性増強のための新たな戦術になると考えている。

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 1 件)

- 1) Miyawaki, S., Hirokami, Y., Kinami, K., Hoshino, M., Minehira, D., Miyamoto, D., Nash, R. J., Fleet, G. W. J., Adachi, I., Kato, A. (2017) Strategy for designing selective α-L-rhamnosidase inhibitors: Synthesis and biological evaluation of L-DMDP cyclic isothioureas. *Bioorg. Med. Chem.* 25 (1) 107-115.
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.10.015

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) 星野 雅子、加藤 敦、宮脇 章太、広上 由季、木南 今日子、友原 啓介、宮本 大樹、足立 伊佐雄、豊岡 尚樹：選択的 α-L-rhamnosidase 阻害剤のデザイン戦略：L-DMDP cyclic isothioureas の合成と構造最適化：日本薬学会第 137 年会、2017. 3, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立伊左雄 (ISAO ADACHI)

富山大学・大学病院・教授

研究者番号：30151070

(2) 研究分担者

加藤 敦 (ATSUSHI KATO)
富山大学・大学病院・准教授
研究者番号：60303236

名取良浩 (YOSHIHIRO NATORI)
東北医科薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：50584455