

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21810015

研究課題名（和文）グルタチオン生合成を制御する新規薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of novel regulators for controlling glutathione biosynthesis

研究代表者

渡辺 文太 (WATANABE BUNTA)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：10544637

研究成果の概要（和文）：

新しい感染症治療剤の開発を目指し、強力な $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素（ $\gamma$ -GCS）阻害剤である(2S)-2-アミノ-4-(2-カルボキシブチルスルフォニミドイル)ブタン酸のN末端に疎水性アミノ酸を縮合したプロドラッグを設計・合成した。合成化合物を大腸菌に投与したところ、菌体内のグルタチオン量をリード化合物よりも顕著に減少させることができた。この結果は、プロドラッグが菌体内へ取り込まれた後、ペプチダーゼ等による切断を受けて遊離した親化合物が $\gamma$ -GCSを阻害したためと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

This research is aimed to develop novel antiinfective drugs using (2S)-2-amino-4-(2-carboxybutylsulfonimidoyl)butyric acid, a potent  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) inhibitor, as a precursor. Hydrophobic amino acids were conjugated to N-terminal of the lead compound. The synthetic prodrugs significantly decreased glutathione content of *E. coli* as compared to the precursor. This result suggested that 1) these prodrugs were uptaken into *E. coli* and decomposed by peptidases, and 2) the liberated inhibitor inactivated *E. coli*  $\gamma$ -GCS *in situ*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：有機合成化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：有機科学、酵素反応、グルタチオン、感染症、化学療法剤、ドラッグデザイン

## 1. 研究開始当初の背景

グルタチオン ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) は、構成アミノ酸である Cys の SH 基の反応性を利用して、生体内で活性酸素種やラジカル、重金属やアルキル化剤といった毒物/異物の除去に関与し、化学的生体防御のフロントラインに位置する極めて重要なトリペプチドである。その生合成の律速段階を担うのが $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 ( $\gamma$ -GCS) であり、本酵素の活性が細胞内のグルタチオ

ンレベルを大きく左右する。

グルタチオンが欠乏すると、酸化ストレスにより細胞死やガン化を引き起こす。一方、抗ガン剤耐性を獲得したガン細胞や多剤耐性菌の多くはグルタチオン生合成系が増強され、グルタチオンを介した解毒機構を高度に発達させている。また、マラリアやトリパノソーマ症を引き起こす寄生性原虫は、グルタチオンを中心とする酸化ストレス耐性を獲得している。したがってグルタチオン生

合成系、とりわけ $\gamma$ -GCS は、多剤耐性菌やガン、新たな感染症などに対する化学療法において極めて重要な薬物ターゲットである。

実際に、古典的な $\gamma$ -GCS 阻害剤である L-ブチオン スルホキシイミン (BSO) は抗ガン剤の増感効果を示し、臨床試験が行われるまでに至っているほか、マラリア原虫の生育抑制効果なども報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究の全体構想は、生体内で活性酸素や異物の解毒代謝を担う重要な生理活性ペプチド グルタチオンの生合成/代謝系を標的とした選択的阻害剤の開発を通して、グルタチオンが果たす生理的役割の全貌を解明するとともに、グルタチオンによる生体の解毒システムを攪乱することで効果をあらわす新しい化学療法剤の開発を目指すことにある。その中で本研究は、グルタチオン生合成において律速段階を担う酵素 $\gamma$ -GCS の新規阻害剤の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

グルタチオン ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) は、まず $\gamma$ -GCS の触媒作用によりグルタミン酸とシステインが縮合した後、生じたグルタミルシステインにグリシンが縮合することで生合成される (図 1)。

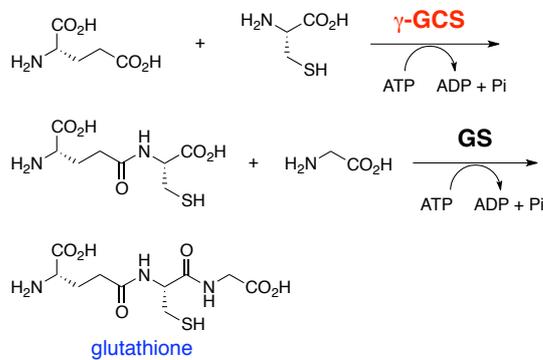


図 1 グルタチオンの生合成

古典的な $\gamma$ -GCS 阻害剤である L-ブチオン スルホキシイミン (BSO、図 2) は、 $\gamma$ -GCS によりスルフィドイル基 (S=NH) の窒素原子が ATP によるリン酸化を受け、酵素反応の遷移状態と極めて類似した構造を形成することで酵素の活性中心に強固に結合し、 $\gamma$ -GCS を阻害すると考えられてきた。

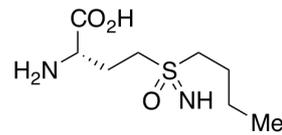


図 2 BSO の構造

本研究代表者の所属する研究グループでは上記の遷移状態アナログの概念をさらに発展させ、優れた阻害活性を示す $\gamma$ -GCS 阻害剤 **1** (cbBSO)を開発してきた (図 3)。さらに、阻害剤 **1** をリガンドとして $\gamma$ -GCS との複合体結晶を作成し、X 線結晶構造解析により大腸菌由来 $\gamma$ -GCS の活性中心の立体構造を世界で初めて明らかにした。その結果、酵素活性中心には基質の Cys 残基を認識するポケットが存在し、この部分の構造は、酵素の由来 (ほ乳類、寄生性原虫、バクテリア) によって大きく異なることが分かった。

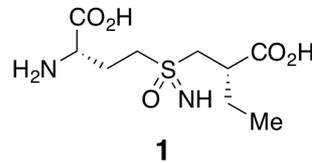


図 3 阻害剤 **1** (cbBSO)の構造

ところで、化合物 **1** は大腸菌由来の $\gamma$ -GCS に対して、BSO の 1000 倍以上の酵素阻害活性を有する現在世界最強の $\gamma$ -GCS 阻害剤であるが、連鎖球菌や病原性原虫に対して *in vivo* での生物活性をほとんど示さなかった。一方、酵素レベルでは大きく性能の劣る BSO ではあるが、前述のように、細胞にグルタチオン欠乏を引き起こす生物活性を有する。これは、**1** に存在する複数の極性官能基が膜透過性を妨げ、細胞内に存在する $\gamma$ -GCS に到達しないためと推測されるが、細胞内移行性の向上を指向した構造展開はこれまでに全くなされていなかった。

そこで本研究では、阻害剤 **1** をリード化合物として、トランスポーターを介した能動輸送系による薬剤の細胞内への取り込みを狙ったプロドラッグ化を行い、*in vivo* における活性の発現を目指した。具体的には N 末端にアミノ酸を導入したプロドラッグ **2** (図 4) を設計・合成し、大腸菌に対する効果を調べた。

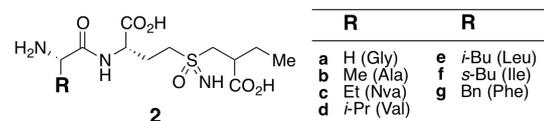


図 4 プロドラッグ **2** の構造

目的化合物の合成は、次のように行った。L-メチオニン (3) を原料とし、ホモシスチン (4) へと変換した後、アミノ基およびカルボキシ基を順次保護した。次にジスルフィド結合をトリブチルホスフィンにより還元して、ホモシステイン誘導体 7 を得た。これとアクリル酸エステル 8 のマイケル付加反応によりスルフィド 9 を合成した後、アミノ基上の保護基を除去してアミン 10 とした (図 5)。

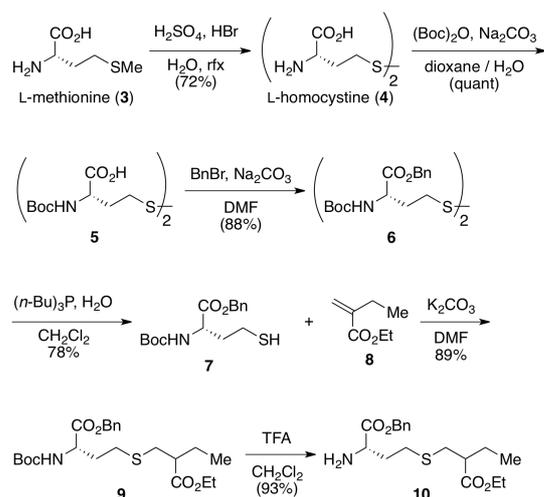


図 5 合成中間体 10 の調製

この共通合成中間体に種々の Z 保護アミノ酸 11a-g を縮合した後、硫黄原子を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化してスルホキンド 13a-g を得た。さらに、O-メシチレンスルホニルヒドロキシルアミン (MSH) を用いてスルホキシイミン 14a-g まで酸化した後、ベンジル系保護基を接触水素化により除去した。最後にエチルエステルを塩基性で加水分解し、イオン交換樹脂により精製して目的化合物 2a-g をアンモニウム塩として得た (図 6)。

なお、アラニン誘導体 2b については、硫黄原子および阻害剤 C 末端の不斉中心に起因する立体化学の影響を明らかにするために、スルホキシイミン 14b を弱酸性条件下で環化してイソチアゾール 15b とした後、クロマトグラフィーにより低極性異性体 15b<sup>LP</sup> および高極性異性体 15b<sup>MP</sup> (それぞれ、さらに二種類の立体異性体の混合物である。) を分離した。これらを同様に処理して、目的化合物 2b<sup>LP</sup>、2b<sup>MP</sup> へと導いた。

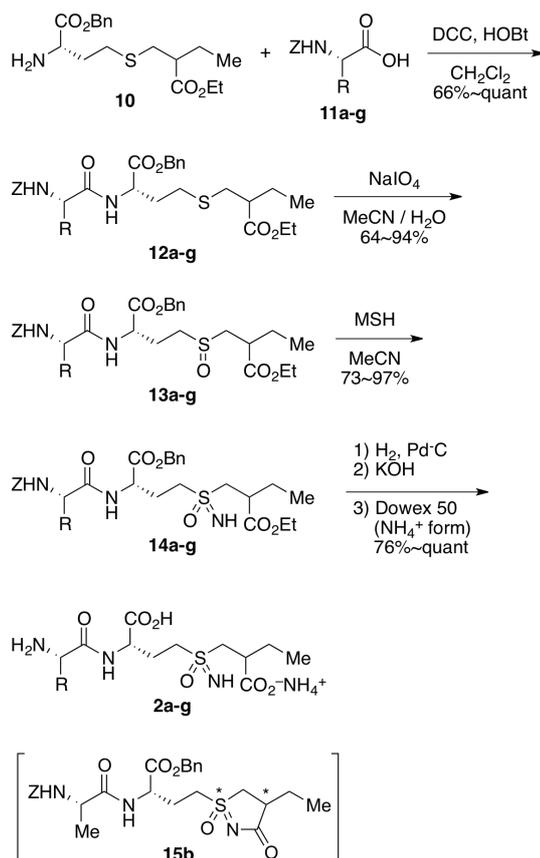


図 6 目的化合物 2a-g の合成

#### 4. 研究成果

合成したプロドラッグを添加した培地で大腸菌を生育させたところ、いずれの化合物も大腸菌のグルタチオン含量を顕著に低下させた (図 7)。特に、疎水性アミノ酸を結合した NcbBSO 2c、VcbBSO 2d、LcbBSO 2e、IcbBSO 2f、および FcbBSO 2g は 2~10 mM の添加濃度でグルタチオン量を検出不可な程度 (40%程度) まで減少させたことから、大腸菌内でグルタチオンの生合成を強く阻害することが示唆された。

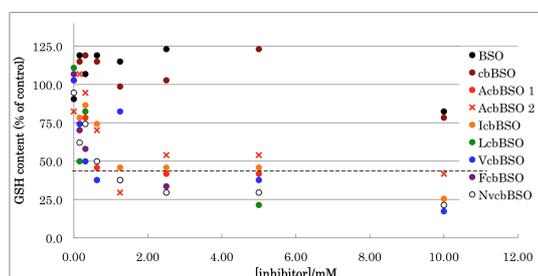


図 7 大腸菌菌体内のグルタチオン含量に及ぼす薬剤の影響 (cbBSO:1、AcbBSO1:2b<sup>LP</sup>、AcbBSO2:2b<sup>MP</sup>、IcbBSO:2f、LcbBSO:2e、VcbBSO:2d、FcbBSO:2g、NcbBSO:2c)

一方で、BSO や親化合物である cbBSO 1 は 10 mM の濃度においてもグルタチオン含量を 25%程度低下させるにとどまった。この結果は、プロドラッグが菌体内へ取り込まれた後、ペプチダーゼ等による切断を受けて遊離した 1 が  $\gamma$ -GCS を阻害したものと考えられる。

今回の研究で、大腸菌菌体内のグルタチオン含量を顕著に低下させることのできる新規化合物を見出すことができた。グルタチオンは前述のように、ガンや多剤耐性菌、寄生性原虫の防御物質として機能していると考えられている。そこで、従来の薬剤に加えて今回開発した新規化合物を併用することで、従来剤の効果を飛躍的に高め、薬剤耐性の問題も克服できると期待される。この観点から、本研究で合成したプロドラッグは、新しい化学療法剤の候補化合物として極めて有望であると言える。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

- ①. 山本 有紀、渡辺 文太、日比 隆雄、平竹 潤： $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 ( $\gamma$ -GCS) 阻害剤に基づいた抗菌剤の創製研究. 日本農芸化学会 2011 年度大会. 2011 年 3 月 27 日. 京都.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 文太 (WATANABE BUNTA)  
京都大学・化学研究所・助教  
研究者番号：10544637

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し

### (4) 研究協力者

平竹 潤 (HIRATAKE JUN)  
京都大学・化学研究所・教授  
研究者番号：80199075

日比 隆雄 (HIBI TAKAO)  
福井県立大学・生物資源学部・教授  
研究者番号：00285181