

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460147

研究課題名(和文)メタロ- β -ラクタマーゼの分子構造と基質加水分解機構に立脚した阻害剤開発と創薬

研究課題名(英文)Development of inhibitors based on the molecular structure and mechanism of substrate hydrolysis by metallo-beta-lactamases

研究代表者

黒崎 博雅 (KUROSAKI, Hiromasa)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70234599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在臨床において感染症治療に使用されているカルバペネムを含むほぼすべての β -ラクタム剤が効かないメタロ- β -ラクタマーゼを産生する細菌が出現し、臨床で問題になっている。現在臨床で用いられているメタロ- β -ラクタマーゼ阻害剤はなく、その開発が緊急の課題となっている。本研究では、メタロ- β -ラクタマーゼ阻害剤開発を目的とし、メタロ- β -ラクタマーゼの構造に基づいて7種類の化合物を分子設計および合成した。

研究成果の概要(英文)：The emergence and rapid spread of carbapenem-resistant pathogens producing metallo-beta-lactamases such as IMP-1 and NDM-1 are of great concern in the clinical setting worldwide. There are no clinically available inhibitors for metallo-beta-lactamases at present. In order to develop the inhibitors for metallo-beta-lactamases, we synthesized seven novel compounds based on the X-crystal structure of metallo-beta-lactamase (IMP-1).

研究分野：機器分析学

キーワード：感染症 ラクタマーゼ 抗生物質 X線結晶構造解析 阻害剤 ラクタム剤

1. 研究開始当初の背景

1940年代にペニシリンが臨床で感染症の治療に使用され、それ以後、多種の抗菌剤が開発され細菌感染症の治療は著しく進歩した。近年、広域抗菌スペクトルを有する第3世代セフェム、セファマイシン、カルバペネム系などの新規β-ラクタム剤が開発され、日本ではこれらの抗菌剤が感染症治療の初期段階で第一選択薬として使用されている。β-ラクタム剤は、細菌の外膜の主要な構成要素であるペプチドグリカンの生合成に参与するペニシリン結合タンパク (Penicillin Binding Protein = PBP) のトランスペプチダーゼ機能を阻害する働きがあり、極めて選択毒性に優れている。しかし、その一方で、細菌はこれらの抗菌剤の進歩と共に自己を守るため耐性を獲得し、日和見感染症や院内感染の起因菌として薬剤耐性菌は社会的にも問題となっている。薬剤耐性菌の耐性機構のうち一つは、菌体内で産生される分解酵素による薬剤不活化 (β-ラクタマーゼの産生) などが挙げられる。

β-ラクタマーゼはβ-ラクタム剤のβ-ラクタム環のC-N結合を加水分解する酵素(図1)であり、β-ラクタム剤の抗菌活性を消失させる。β-ラクタマーゼは、Amblerらによってアミノ酸配列の相同性に基づき、4つのクラスA、B、C、Dに分類されている。クラスA、C、Dは酵素の活性中心にセリン残基をもつセリンβ-ラクタマーゼである。

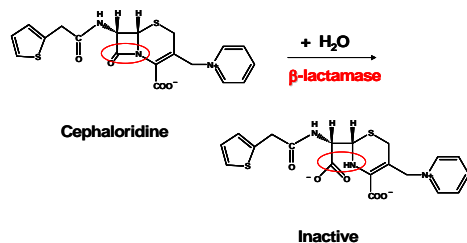


図1. β-ラクタマーゼによるβ-ラクタム剤の加水分解

2009年、新型のNDM-1 (New Delhi Metallo-β-lactamase)はインドから帰国したスウェーデン人からはじめて分離された。これまでのメタロ-β-ラクタマーゼは、緑膿菌など日和見細菌から殆ど産生されていたのに対して、NDM-1は大腸菌や肺炎桿菌から分離され、市中感染して世界的に蔓延することが危惧されている。

クラスBに属するメタロβ-ラクタマーゼは、さらにサブクラスB1からB3に分類(図2)され、活性中心にZn(II)を含有し、ペニ

	サブクラス	Zn1リガンド	Zn2リガンド
メタロ-β-ラクタマーゼ	B1	His, His, His	Asp, Cys, His
	B2	-----	Asp, Cys, His
	B3	His, His, His	Asp, His, His

図2. メタロβ-ラクタマーゼの分類

シリンからカルバペネムまでほぼ全てのβ-ラクタム剤を分解する。現在臨床使用されているクラバン酸やスルバクタムなどのセリン-β-ラクタマーゼ阻害剤に対して全く感受性を示さず、臨床効果的な阻害剤がないという深刻な問題がある。臨床株から分離されたMBLの殆どはサブクラスB1である。NDM-1の活性中心のZn(II)配位子はHis116-x-His118-x-Asp120-x-His196であり、サブクラスB1に帰属されている。

2. 研究の目的

本研究では、グラム陰性病原細菌が産生するβ-ラクタム剤不活化酵素「メタロβ-ラクタマーゼ」の基質認識、特異性発現と加水分解機構を原子・分子レベルで解明すると共にメタロβ-ラクタマーゼの立体構造に基づいて、すべてのメタロβ-ラクタマーゼを阻害する化合物をデザイン・合成し、臨床的に有用な化合物を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬と装置

薄層クロマトグラフィー(TLC)はSilica gel 60 F254 (MERCK)を用いた。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルにはSilica gel 60N (spherical, neutral) (関東化学)を用いた。¹H-, ¹³C-NMRスペクトル測定は、JNM-AL300 (300 MHz)を使用し、Chemical shiftはtetramethylsilane (TMS)を内部標準とした値(ppm)で示し、J値はHzで示した。質量分析[MS(FAB)]スペクトル測定にはJOELJMS-DX303HF MASS spectrometerを用いた。

(2) 合成

2-(2-(Benzyloxy)-2-oxoethyl)-2-hydroxy-succinic acid (1) と 4-(benzyloxy)-2-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-2-hydroxy-4-oxobutanoic acid (2)

無水クエン酸(15g, 780 mmol), ベンジルアルコール(21.2 g, 196 mmol), ホウ酸(0.5 g, 62 mmol)を室温で攪拌した。3日後、20% NaOHでpH 8.0に調整し、AcOEt (400 mL)を加え放置した。2日後、吸引濾過し沈殿をろ取り白色固体を得た。ろ液をHClでpH 1にし、AcOEtで抽出した。MgSO₄で乾燥させて無色油状として化合物1 (23.82 g, 43%)を得た。またろ取した白色固体をpH 1でAcOEtで抽出しMgSO₄で乾燥させて無色油状として化合物2 (5.49 g, 15%)を得た。

1: ¹H-NMR (CDCl₃) 2.89 (2H, dd J = 16.1Hz, CH₂), 2.99 (2H, dd J = 15.8Hz, CH₂), 5.13 (2H, s, CH₂Ar), 7.27-7.42 (5H, m, ArH). ¹³C-NMR (CDCl₃) 42.73, 42.96, 66.80, 72.80, 128.15, 128.25, 128.46, 135.17, 169.83, 172.95, 175.80. MS (FAB): m/z 283 (M + H)⁺.

2: ¹H-NMR (CDCl₃) 2.94, (4H, q, CH₂), 5.13 (2H, s, CH₂Ar), 7.31-7.34 (5H, m, ArH).

¹³C-NMR (CDCl₃) 42.69, 67.09, 73.17, 128.36, 128.47, 128.63, 135.18, 169.90, 176.58. MS (FAB): *m/z* 373 (M+H)⁺.

2-Hydroxy-4-oxo-2-(2-oxo-2-phenethoxyethyl)-4-phenethoxybutanoic acid (3)

クエン酸 (10.2 g, 53.2 mmol)、2-フェニルエチルアルコール (25.7 g, 210 mmol)、ホウ酸 (0.478 g, 7.78 mmol) を室温で撹拌した。1 日後、EtOAc (60 mL)を加える過した。ろ液を NaOH で pH 8.0 に調整した後、精製水 (80 mL)を加えた。析出した結晶を吸引ろ過して化合物 3 (6.40 g, 60%)を得た。

3: ¹H-NMR (CDCl₃) 2.75 - 3.01 (8H, m, CH₂, OCH₂), 4.31 (4H, t, CH₂Ar), 7.13 - 7.36 (10H, m, ArH). ¹³C-NMR (CDCl₃) 34.80, 42.52, 65.70, 73.04, 126.66, 128.54, 128.84, 137.31, 169.97, 176.15.

Dimethyl 3-(Benzylamino)glutarate (4)

Trans-グルタコン酸ジメチル (0.79 g, 5 mmol) を無水 MeOH (6mL)に溶解し、ベンジルアミン (0.59 g, 5.5 mmol)を加え、アルゴン雰囲気下、撹拌しながら還流させた。20 時間後溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (*n*-hexane : AcOEt = 4 : 1)で精製し、化合物 4 (0.454g, 34%)の紫色油状物質を得た。

4: ¹H-NMR (CDCl₃) 1.81 (br s, 1H, NH), 2.58 (d, *J* = 6.2Hz, 4H), 3.40 - 3.52 (m, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.94 (s, 2H), 7.23-7.31 (m, 5H). ¹³C-NMR (CDCl₃) 38.7, 51.0, 51.3, 51.6, 127.0, 128.1, 128.4, 140.1, 172.2.

MS (FAB) *m/z* 266 (M+H)⁺.

Dimethyl 3-aminoglutarate (5)

化合物 4 (1.0 g, 5.7 mmol)を MeOH (15mL)に溶解しアルゴン雰囲気下、Pd/C (0.11 g, 0.1 mmol)を加え、水素雰囲気下、室温で撹拌させた。12 時間後セライト濾過し、AcOEt で洗いこみした。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (溶出溶媒 AcOEt)で精製し、化合物(5) (0.32g, 76%)の黄色油状物質を得た。

5: ¹H-NMR (CDCl₃) 2.413 (2H, q, CH₂), 2.52 (2H, q, CH₂), 3.63 - 3.65 (1H, m, CH), 3.70 (6H, s, OMe). ¹³C-NMR (CDCl₃) 41.56, 45.29, 51.65, 172.20. MS (FAB) *m/z* 176 (M+H)⁺.

Dimethyl 3-Benzylloxycarbonyl-aminoglutarate (6)

化合物 5 (1.41 g, 8.05 mmol)を 1 M NaHCO₃ 溶液に溶解し、クロロギ酸ベンジル (50% W/V in toluene)を 0 で加え、その後室温で撹拌した。3 時間後 ether (20 mL × 3)で抽出し、得られた有機層を 3 M HCl (20 mL × 3)、sat. NaHCO₃ (10 mL × 2)、sat. NaCl (10 mL × 2)で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させて溶媒を減圧留去した。これをシリカゲルクロマトグラフィ (*n*-hexane : AcOEt=4 : 1)により精製し、無色油状として化合物 6 (1.93 mg, 78%)を得た。

6: ¹H-NMR (CDCl₃) 2.72(4H, q, *J*= 6.0 Hz, CH₂), 3.70 (6H, s, OMe), 4.38 - 4.40 (1H, m, CH), 5.12 (2H, s, CH₂Ar), 5.60 (1H, br d, NH), 7.40 (5H, s, ArH). ¹³C-NMR (CDCl₃) 37.84, 44.87, 51.79, 66.76, 128.08, 128.13, 128.51, 136.42, 155.50. MS (FAB) *m/z* 310 (M+H)⁺.

-(S)-Benzylloxycarbonylaminoglutaric acid monomethyl ester (7)

化合物 6 (2.4 g, 7.84 mmol)を pH 8.0 phosphate buffer-10% Acetone (8 mL)に溶解し、豚肝臓エステラーゼ (0.177 mg, 3200 unit)を加え、25 で撹拌した。7 時間後 acetone を減圧留去し、水層を pH 3.0 にした後、CH₂Cl₂ (50 mL × 3)で抽出した。飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させて溶媒を減圧留去し、粗結晶を得た。これを CH₂Cl₂ / *n*-hexane で再結晶し、化合物 7 (1.92 g, 83%)を得た。

7: ¹H-NMR (CDCl₃) 2.66 - 2.79(4H, m, CH₂), 3.67 (3H, s, OMe), 4.36 - 4.40(1H, m, CH), 5.08 (2H, s, CH₂Ar), 5.68 (1H, br d, NH), 7.34 (5H, s, ArH). ¹³C-NMR (CDCl₃) 37.75, 44.67, 51.90, 66.94, 128.20, 128.55, 136.20, 155.68, 171.62, 175.97. MS (FAB) *m/z* 296(M+H)⁺.

(3) メタロ ラクタマーゼ (IMP-1)の結晶化とX線結晶構造解析

リザーバー溶液には 30 w/v% PEG4000 in 0.1 M citric acid-sodium citrate 緩衝液 (pH 7.0)]を使用し、20 でハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行うと約 2 週間で結晶が析出した。メタロ ラクタマーゼ (IMP-1)に回折データを 2.0 で収集した。

(4) ドッキング実験

(3)で構造決定したメタロ ラクタマーゼ (IMP-1)の原子座標を用いて化合物(1)と IMP-1 との相互作用を AutoDock 4.3 により評価した。

4. 研究成果

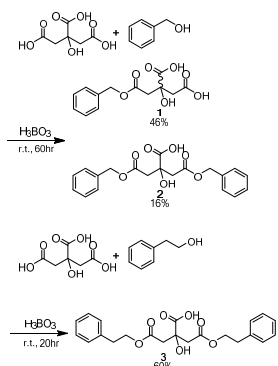
(1) 化合物(1)-(3)の合成

合成化合物(1)-(3)の合成法をスキーム 1 に示す。クエン酸とベンジルアルコールを混合しホウ酸を触媒に、室温で無水条件下撹拌させることでクエン酸にベンジル基を一つ導入した化合物(1)、ベンジル基を 2 つ導入した化合物(2)をそれぞれ収率 46%、16%で得た。クエン酸と 2-フェニルエチルアルコールを混合しホウ酸を触媒に、室温で無水条件下撹拌させ化合物(3)を収率 60%で得た。

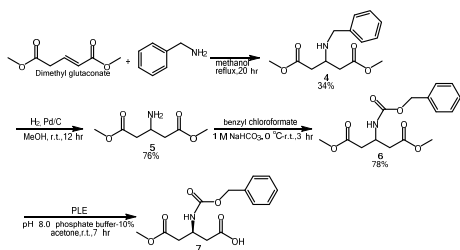
(2) 化合物(4)-(7)の合成

化合物(4)-(7)の合成法をスキーム 2 に示す。*Trans*-グルタコン酸ジメチルとベンジルアミンを無水条件下メタノールで還流し化合物(4)を 34%の収率で得た。化合物(4)を Pd/C

を用いて還元的にベンジル基を脱保護し、化合物(5)を76%の収率で得た。化合物(5)をZ化し化合物(6)を78%の収率で得た。化合物(6)に豚肝臓エステラーゼを作用させ、一方のメチルエステルを選択的に加水分解し、化合物(7)を83%の収率で得た。



スキーム 1. 化合物(1)-(3)の合成ルート



スキーム 2. 化合物(4)-(7)の合成ルート

(3) X線結晶構造解析

メタロ α -ラクタマーゼ(IMP-1)の結晶構造を 2.0 Å の分解能で決定した。信頼度因子 (R 値)は $R_{\text{free}} = 24.8\%$ と $R_{\text{working}} = 21.2\%$ であった。活性中心にクエン酸が結合することをX線結晶構造解析により明らかにした(図3)。クエン酸は3つのカルボキシ基を持っており、1つはフリーで、残り2つはメタロ α -ラクタマーゼ(IMP-1)活性中心の Zn(II)との配位結合や、アスパラギンと水素結合、リジンと疎水性相互作用していた。

(4) ドッキング実験

上記で決定した原子座標を用いてまずは、クエン酸並びに化合物(1)を用いてメタロ α -ラクタマーゼ(IMP-1)との相互作用を AutoDock 4.3 によるドッキングシミュレーションにより評価した。クエン酸と IMP-1 との結合エネルギーは -4.93 Kcal/mol であり、一方、化合物(1)と IMP-1 とでは -7.45 Kcal/mol であり、化合物(1)の方が安定であることがわかった。ドッキングシミュレーションから 51 位のフェニルアラニンのフェニル環と化合物(1)のフェニル環との間で相互作用しているためであることが明らかとなった(図4)。これらの結果を踏まえ、化合物(1)-(7)を分子設計することに至った。

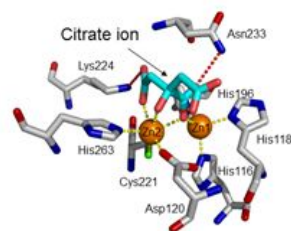


図 3. メタロ α -ラクタマーゼ(IMP-1)の結晶構造

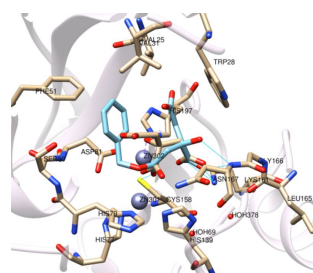


図4. ドッキングシミュレーションの重ね合わせ

(5) 総括

本研究では、メタロ α -ラクタマーゼ阻害剤としてクエン酸誘導体(1)-(3)とクエン酸類似体として(4)-(7)を分子設計、合成した。その結果、合成した化合物群の中ではクエン酸類縁体よりもクエン酸誘導体の方が阻害活性が強い結果となった。化合物(1)と(2)の方が化合物(3)よりもメタロ α -ラクタマーゼ(IMP-1)への阻害活性が高いことがわかった。今後は化学構造の改変と再液化を行っていくことで阻害剤としてのリード化合物につながるのではないかと考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒崎 博雅 (KUROSAKI, Hiromasa)
金城学院大学・薬学部・教授
研究者番号：70234599

(2)研究分担者

藤田 美歌子 (FUJITA, Mikako)
熊本大学・薬学部附属創薬研究センター・
准教授
研究者番号：00322256