ミニレビュー

スクワレンエポキシダーゼを阻害する殺菌剤の探索研究*

汲 田 泉*

日本曹達(株)研究・技術本部

(平成 14 年 8 月 7 日受理)

Studies on Antifungal Compounds Inhibiting Squalene Epoxidase

Izumi KUMITA

Nippon Soda Co., Ltd., Reserch and Technology Division,
2-2-1 Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8165, Japan

Key words: squalene epoxidase inhibitor, antifungal activity, biorational approach, *Trychophyton mentagrophytes*, *Botrytis cinerea*, *C. albicans*.

1. は じ め に

これまで開発されてきた殺菌剤の多くは病原菌特有の生合成系を抑えているものが多い。その中でも注目されるのは、何らかの意味で膜系に関連しているものである。細胞膜は生体と外部の境界になっており、生体にとって重要な役割を果たしている。この部分の生合成の異常は生体にとって致命的な影響を与える。細胞膜の構成成分である脂質、特にステロールの生合成阻害剤については多くの合成化合物が知られている。農医薬において実用化されているものも多く、生化学的研究も進んでいる。今後も、ステロール生合成系は殺菌剤の重要なターゲットになる可能性を秘めている。

ステロールの生合成経路の阻害剤としては、これまでさまざまなタイプのものが知られている。P-450 阻害による脱メチル化を阻害するアゾール系化合物は、合成的自由度が大きく非常に多数の化合物が農業用、医療用として実用化されており、殺菌剤・抗真菌剤の中で重要な位置をしめている。二重結合の異性化・還元化反応の阻害剤としてはモルフォリン系殺菌剤が知られており、うどんこ病剤として広く使用されている。スクワレンエポキシダーゼ阻害剤としては医療用抗真菌剤として、アリルアミン系・チオカルバミン酸系の二つのタイプが実用化されている。In vitro 系において割合広い抗菌スペクトラムを有しており、新し

い農業用殺菌剤の可能性もあると思われる。スクワレンエポキシドサイクラーゼ阻害剤としてはまだ実用化されたものはないが、長鎖アルキルイミダゾールが阻害剤として知られており、今後の新しいターゲットの一つと考えられる。

農薬の探索研究はこれまで、総合的な評価ができるいわゆる“ぶっかけ試験”を中心としてきた。しかし、農薬の領域においても作用機作の研究などが大きく進み、生理生化学的手法をとりいれた Biorational approach (生合理的アプローチ)の基盤が整ってきた。ターゲットとして、生化学的評価のしやすいステロール生合成系を選定し、その阻害活性を有する殺菌剤の探索を行った。方法としては、単に抗菌力の強弱ではなく活性の質的な面に注目し、菌の形態観察(膜の異常は菌糸の形態異常を引き起こすと思われる)やステロールの分析を行いながら化合物を選抜して行くことにした。それにより、今までの方法では見過ごされるようなリード骨格を新たな視点で取り上げ発展させ、より合理的な新規殺菌剤の探索研究を目指した。

2. 1,2,4-オキサジアゾール, 1,2,4-チアジアゾール

誘導体の抗菌活性および

スクワレンエポキシダーゼ阻害活性

種々の目的で過去に合成された化合物ライブラリーより、約 3000 化合物について、白癬菌 (*T. mentagrophytes*) と *C. albicans* の in vitro 抗菌試験を行った。いくつかの化合物が抗菌活性を示したが、その中でもオキサジアゾール誘導体の 2 化合物 (図 1) は *T. mentagrophytes* に対して比較的高い抗菌活性 [最低生育阻止濃度 (Minimum inhibitory

*第 27 回大会シンポジウムの講演者による解説。

*〒100-8165 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号

E-mail: i.kumita@nippon-soda.co.jp

図1 最初のリード化合物

concentration, MIC) : 1~3 $\mu\text{g/ml}$] を示した。これらの化合物は顕微鏡観察において、エルゴステロール生合成阻害剤のクロトリマゾールに見られるような、菌糸の縮れた形

態異常を伴う生育抑制を示した(図2)。化合物を処理した *C. albicans* 菌体のステロール分析を行ったところ、エルゴステロールの顕著な減少とスクワレンの蓄積が認められ、スクワレンエポキシダーゼを阻害していることが示唆された。

これらのオキサジアゾール化合物について *T. mentagrophytes* に対する抗菌活性を指標にして、構造と活性の相関について検討しながら合成展開を行った。また、いくつかの化合物について、 ^{14}C -酢酸の取り込みによる菌体のステロールの分析によりスクワレンの蓄積率の比較を行った。

図2 顕微鏡観察下における *T. mentagrophytes* に対する薬剤の影響
A: 無処理, B: クロトリマゾール 0.03 $\mu\text{g/ml}$, C: 化合物 A 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 。

(A) チオカルバミン酸系

(B) アリルアミン系

(C) オキサジアゾール、チアジアゾール系

図3 種々のスクワレンエポキシダーゼ阻害剤(囲んだ部分は疎水性部分に対応している)

図4 スクワレンエポキシダーゼ阻害剤の一般構造
L₁, L₂: Lipophilic domains, P: a polar center.

種々の1,2,4-オキサジアゾール, 1,2,4-チアジアゾール誘導体を合成したが, 其中で最も活性の高かった3-(2,6-ジクロロフェニル)-5-置換アニリノ-1,2,4-チアジアゾール類は *T. mentagrophytes* や灰色かび病菌 (*B. cinerea*) に対し *in vitro* において高い抗菌活性を示し, スクワレンの顕著な蓄積を示した。

スクワレンエポキシダーゼ阻害剤としてはこれまでチオカルバミン酸系とアリルアミン系の二つのグループが知られていた (図3-A, B)。これらの化合物の特徴はナフタレン骨格あるいはその一部を飽和した疎水性基と, もう一つの疎水性基とが適当な長さのスペーサーでつながった構造を有していることである。Nussbaumer らはこの構造的特徴を, 二つの Lipophilic domain が極性のスペーサーでつながった図4のようなモデルで表わしている¹⁾。オキサジアゾール, チアジアゾール化合物は, ナフタレン骨格こそ持たないが, 二つの疎水性基とスペーサーからなる新規なスクワレンエポキシダーゼ阻害剤 (図3-C) として興味をもたれ, さらに合成展開を行った。

3. チアゾール誘導体の抗菌活性およびスクワレンエポキシダーゼ阻害活性

チアジアゾール誘導体の中で高い抗菌活性を示した2,6-ジクロロフェニル基と4-クロロアニリノ基を固定し, スペーサーとして機能していると考えられるチアジアゾール環部分の変換をまず試みた。チアジアゾール環の2位のNをCに変換したチアゾール誘導体が高い抗菌活性を示すことを見出し, 改めてそれぞれのフェニル環部分について置換基の変換を行い, 構造と活性の相関について調べた。チアゾール誘導体の中でも, 特に4位のフェニル基の2,6-ジクロロ体と2,6-ジメトキシ体 (図5) は高い活性を示し, トルナフテートに匹敵する抗菌活性を示した。モルモットの実験的皮膚白癬に対する治療効果を検討したところ, 特に2,6-ジクロロ体は0.3%製剤処理において肉眼的観察に

図5 スクワレンエポキシダーゼ阻害を有するチアゾール誘導体

よる病変改善効果だけでなく, 感染治療部位からの白癬菌の検出率も著しく低下しており, トルナフテート1%製剤処理と同等であり, さらに臨床的なレベルにおける有用性が期待できると思われた。

これらのチアゾール誘導体においても, ¹⁴C-酢酸を用いたステロール分析によるスクワレンの蓄積率と抗菌活性が良く相関しており, その作用機作はスクワレンエポキシダーゼ阻害によるものと考えられた。さらに¹⁴C-メバロン酸を基質にした *S. cerevisiae* の無細胞抽出系においても, トルナフテートと同様なスクワレンの蓄積が見られ, それが確認された。

また, 2,6-ジクロロフェニル部分を α -ナフチル基に変換した化合物は, ほぼ同等の抗菌活性と顕著なスクワレンの蓄積を維持した。一方, β -ナフチル基に変換した化合物は抗菌活性を失い, スクワレンの蓄積はほとんど見られなくなった。従って, 2,6-ジクロロフェニル基と α -ナフチル基はバイオアイソスター (生物学的等価性) の関係にあると考えられた。オキサジアゾールから出発し, チアジアゾール, チアゾールへと構造変換を行ったが, それぞれのヘテロ環はスペーサーとして, 二つの疎水性基を一定の位置関係に保持させる役割を果たしていると考えられ, さらにスペーサー部分の構造と抗菌活性の関係について検討した。チアゾール, ピリミジン, トリアジン骨格の間に良好なバイオアイソスターの関係があり, この系統化合物のスクワレンエポキシダーゼ阻害活性に必須な共通構造は, 図6のようなイミノ基を有するアニリノヘテロ環構造が考えられた。

4. その他の種々のスクワレンエポキシダーゼ阻害剤

2-置換アニリノ-4-(2,6-ジクロロフェニル)チアゾール類は強いスクワレンエポキシダーゼ阻害活性を示し, *in vitro* においては *T. mentagrophytes* や灰色かび病菌 (*B. cinerea*) に対し高い抗菌活性を示した。しかしながら, これらの化

図6 スクワレンエポキシダーゼ阻害剤の必須構造とスペーサーとしての種々のヘテロ環 (1)

図7 スクワレンエポキシダーゼ阻害剤の必須構造とスペーサーとしての種々のヘテロ環 (2)

図8 構造比較を行った特徴的な構造を有するスクワレンエポキシダーゼ阻害剤

化合物はインゲンマメ花器を用いた灰色かび病菌の生葉試験においてほとんど効果を示さず、農業用殺菌剤としては不十分であった。

さらに新しいリード化合物探索のために、他の菌に比べて感受性が高いと考えられる *T. mentagrophytes* を用いて ^{14}C -酢酸取り込みによるスクワレンの蓄積を指標にしたスクリーニングを行った。新たに合成された化合物ライブラリーの中から、二つの疎水性基をスペーサーで結合したタイプの化合物を選び、スクリーニングを行った結果、*N*-メチルトリアゾール、オキサジン誘導体の中から、スクワレンエポキシダーゼ阻害活性を有する化合物を見出した。強い阻害活性を有する化合物の特徴は2,6-ジクロロフェニル基と β -ナフチル基を含ま素ヘテロ環でつなぐというパターンを有していた。さらに、図7のようなイミノ基を含むヘテロ環を有するオキサジアゾール、チアゾール、ピリジン化合物を合成した。

その中で最も強いスクワレンエポキシダーゼ阻害活性を示したのは β -ナフチルピリジン誘導体 (図7化合物C) であり、*B. cinerea* において $1 \times 10^{-7}\text{M}$ で43.3%のスクワレンの蓄積を示し、2-(4-クロロアニリノ)-4-(2,6-ジクロロフェニル)チアゾール (図5) に匹敵するものであった。また、*in vitro* 抗菌試験のみならず、インゲンマメ花器を用いた灰色かび病菌の生葉試験において200, 50 ppmでそれぞれ100, 58%の防除効果を示した。

5. スクワレンエポキシダーゼ阻害剤の 計算機化学的な構造比較

スクワレンエポキシダーゼ阻害剤は二つの疎水性基とそれをつなぐスペーサーからなり、新たに見出されたチアゾール系、ピリジン系の化合物も含め、平面構造において共通の結合パターンが認められる。それぞれのグループから特徴的な構造を有する化合物1, 2, 3, 4 (図8) を選び配座解析を行い、それぞれ51, 22, 24, 4個の安定な配座

を得た。構造的な自由度が最も低いピリジン化合物4を基準にして、両端の芳香環の重なりを考慮し、他の3化合物との重ねあわせを行った。それぞれのグループの重なり共通体積の最大のものを選び、さらに4化合物すべてを重ねあわせ、化合物間の共通体積を比較検討した。化合物1, 2の α -ナフチル基と化合物3, 4の2,6-ジクロロフェニル基、化合物3の4-クロロフェニル基と化合物1, 2, 4の β -ナフチル基を対応させた時、最も大きい共通体積を与えた。これらの化合物間には立体構造的な類似性があり、リセプター部位での共通な結合の可能性をうかがわせた。

6. ま と め

本研究は、ステロール生合成系のスクワレンエポキシダーゼをターゲットとした殺菌剤の探索研究に関するものである。単に抗菌活性試験によるだけではなく、菌糸の形態観察とステロール分析により、生理活性の質的な面に注目し、スクワレンエポキシダーゼ阻害活性を有する抗菌活性化合物を見出した。また、スクワレンエポキシダーゼ阻害剤の構造パターンとの比較を行いながら、効率的に活性構造の最適化を行うことができた。動物実験における白癬に対して高い治療性を有するチアゾール誘導体を、また生葉試験においてインゲンマメ灰色かび病に対して活性を示すピリジン誘導体を見出した。

あらかじめターゲットを決め、生化学的評価を行うことによる Biorational (生合理的) な探索研究を目指したが、生化学的評価を初期の段階に取り入れるることにより、正確な生物評価ができ、研究の方向性が把握できた。予想されたことではあったが *in vitro* の抗菌試験の結果は *in vivo* の生葉試験の結果には直接結びつかなかった。化合物の水溶解度、分配係数などの物理化学的性質が関わる動態的な問題など、分子設計的にはさらに考慮すべきことはあるが、農業探索における *in vitro* 系による評価の可能性を示すことができたように思う。Biorational approach は、さまざま

なアイデアの源泉となり、生物評価・分子設計・合成の相互のダイナミックな探索研究を進める上で、基本的な力となった。また、なによりも研究を“おもしろく”してくれたことは確かである。

引用文献

- 1) P. Nussbaumer, I. Leitner, K. Mraz and A. Stütz: *J. Med. Chem.* **38**, 1831-1836 (1995).