

学位論文題名

抗菌抗生物質ムライマイシン類をリードとする新規
抗菌剤の開発研究

学位論文内容の要旨

【1. 背景】

天然物は医薬品開発のリードとして重要な分子であるが、天然物やその生合成中間体が培養等によって大量に得られる場合を除いて、複雑な構造を有する天然物をリードとして創薬研究を行うことはしばしば困難である。従って天然物やその誘導体を効率的に供給できる合成法を確立すること、さらに活性を保持したまま単純な構造に置き換えるドラッグデザインが求められる。これは Function-Oriented Synthesis と呼ばれ、天然物をリードとする創薬研究において重要な考え方の一つである。当研究室はこれまで新規抗菌剤開発のリード化合物の創出を目指し、ヌクレオシド系天然物をリードとする構造活性相関 (SAR) 研究を行ってきた。

ムライマイシン類 (MRYS) は放線菌から単離された抗菌抗生物質であり、細菌の細胞壁の主成分であるペプチドグリカンの生合成に関わる必須酵素 *MraY* を強力に阻害し、優れた抗菌活性を示す。MRYS は、臨床で多く用いられるペニシリンやバンコマイシンなどの抗菌剤の作用点と異なる新たな標的を阻害することから、新規抗菌剤開発の優れたリード化合物と考えられる。そこで著者は、MRYS をリードとした FOS 研究を行うことにした。

【2. ムライマイシン類の合成経路の確立】

ムライマイシン類は、ウリジンとアミノリポース等からなる糖ヌクレオシド部と非天然アミノ酸である *L*-エピカブレオマイシジン (*L*-*epi*-Cpm) を含むウレアトリペプチド部がアルキル鎖で結合した構造を有している。糖ヌクレオシド部は活性発現に重要であると考えられ、MRYS だけでなく、他のヌクレオシド系天然物においても SAR 研究が盛んになされている。一方、ペプチド部の SAR 情報は乏しい。そこで著者は包括的なペプチド部の SAR 研究を視野に入れた合成法の確立を目指し、まず MRYS D2 の全合成を行うことにした。

合成経路に多成分反応を用いた場合、各成分の交換により多様な誘導体展開が可能であることから、MRYS のペプチド構造を Ugi 四成分反応 (U-4CR) を鍵として、合成終盤で一挙に構築することにした。U-4CR は、カルボン酸、アミン、アルデヒド、イソニトリルの 4 つの成分を反応させることで穏和な条件で α -アシルアミノカルボキサミド構造を有する化合物を与える多成分反応である。U-4CR に用いるアミンユニットはとしてアンモニアを用いることが考えられるが、一般にアンモニアを U-4CR に用いた場合、収率が低下することが知られている。そこで、アンモニア等価体として 2,4-ジメトキシベンジルアミンを用いることにした。イソニトリルユニットは当研究室ですでに合成法を確立しているウリジン誘導体から 7 工程 47% で合成した。またペプチド中の *L*-*epi*-Cpm は、*D*-チロシン保護体から得たサルファマトに対する二核ロジウム錯体を用いる C-H アミノ化反応を鍵として合成した。このとき C-H アミノ化反応の立体選択性には化合物の分子内水素結合が大きな影響を与えていることを見出し、既存の合成法よりも高立体選択的かつ高収率な *L*-*epi*-Cpm の合成法を確立した。合成したイソニトリルと *L*-*epi*-Cpm を用いて合成したジペプチドカルボン酸、2,4-ジメトキシベンジルアミン、イソバレールアルデヒドをエタノール中 50 °C で加熱しところ、収率 81% で Ugi 反応成績体が得られた。その後 2 工程で保護基を除去後、Ugi 反応で生じた 2 つのジアステレオマーを HPLC によって分離することでロイシン部のエピマーと共に MRYS D2 の初の全合成を達成した。なお新たに生じた不斉点の絶対立体配置は、化合物を塩酸処理により加水分解後に、アミノ酸分析を行うことで決定した。

【3. MRYS 誘導体による包括的な SAR 研究】

合成した MRYS D2 およびそのエピマーの生物活性を評価したところ、いずれの化合物も強力な *MraY* 阻害活性を示した。一方、黄色ブドウ球菌やそのメチシリン耐性菌である MRSA に対して抗菌活性を評価したところ、全く抗菌活性を示さなかった。*MraY* の活性部位は細胞膜の細胞質側に存在すると考えられており、抗菌活性を示さな MRYS D2 と比較して抗菌活性を示す MRYS A1 等は脂溶性側鎖部を有するため、化合物が細菌細

胞膜を透過し抗菌活性を示すと考えた。そこで活性の向上を目指し、4種の脂溶性側鎖を導入した誘導体を合成した。その際、側鎖はMRYSが有するエステルリンカーよりも生物学的・化学的に安定な炭素-炭素結合で連結した。得られた誘導体の抗菌活性を評価したところ、いずれも薬剤耐性菌を含むグラム陽性菌に対して優れた抗菌活性を示し、特にペンタデシル基を導入した誘導体が天然物を凌駕する良い抗菌活性を示した。また合成した誘導体はいずれも良好なMraY阻害活性を示したことから、脂溶性側鎖を導入した誘導体は細菌細胞膜を透過しMraYを阻害することで抗菌活性を発現していることが分かった。従って抗菌活性の発現には化合物の細菌細胞膜の透過性が必須であることが示唆された。著者が合成した誘導体は、長鎖脂肪鎖と極性官能基を有することからミセル形成による細胞毒性が懸念されたが、ヒト肝ガン由来HepG2細胞に対する毒性試験において100 µg/mLの高濃度域においても細胞毒性を示さなかった。次に、これまでにSAR情報が皆無であるMRYSのウレアジペプチド部のSAR研究を行った。まずウレアジペプチド部を欠如した場合には、MraY阻害活性および抗菌活性が大きく減弱したことから、この部分が活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで分子の単純化を指向して、ペプチド部の必須構造を見出すためにL-*epi*-Cpm部やL-Val部などの極性官能基を順次欠如した誘導体14種類を合成・活性評価した。その結果、ウレアジペプチド部のL-Valや合成に多工程を要するL-*epi*-Cpmは活性発現に必須ではなく、活性を保持したまま単純なL-Argのみに置き換えられることが明らかとなった。以上の結果から著者のUgi反応を鍵とする本合成法は、MRYSの効率的なSAR研究に適した合成法であり、そのSAR研究から脂溶性側鎖、ペプチド部は生物活性発現に重要であるが単純化可能であることが示唆された。さらに薬剤耐性菌に対する抗菌剤開発の標的としてMraYが良い標的であり、またMRYSがMraY阻害剤開発の良いリード化合物であることを明らかとした。

【4. FOSに基づく単純化研究】

MRYSのヌクレオシド部は複雑な構造をしており、合成に多段階を要することから、効率的なSAR研究、化合物の大量供給に向けたヌクレオシド部の単純化研究を行う必要があった。その際、SAR研究により得られた重要官能基が適切な三次元的配置をとりMraYと相互作用する必要がある。しかしMraYのようなX線結晶構造のない膜タンパク質に対して、構造情報に基づいた薬物設計 (structure-based drug design) を行うことは難しい。そこで著者は、各置換基を三次元に網羅的に配置できるスキャホールドを導入し、単純化・最適化研究を行うことにした。これまでのSAR研究から、ヌクレオシド部はウラシル塩基とアミノリボース部が重要であることが知られている。特に5'位アンモニオ基がMraYの触媒活性に必須なMg²⁺と競合するモデルを予想し、5'位アミノ基が重要であると考えた。そこで著者は各種官能基を網羅的に配置しかつ糖ヌクレオシド部を単純化できるスキャホールドとして二環式イソキサゾリジン誘導体を設計した。ウリジンからHorner-Emmons反応を鍵として4工程で環化前駆体であるアルコールを合成した。水酸基を酸化後、得られたアルデヒドに各種ヒドロキシルアミンを作用させニトロンとした後に、単離することなく加熱還流することで望みのピシクロイソキサゾリジン誘導体のジアステレオマー二種を合成した。これら共通中間体に対してペプチド部、脂溶性側鎖部、極性官能基を導入した10種の誘導体を合成・活性評価し、薬剤耐性菌を含む様々な菌に対して抗菌活性を有するMRYSの単純化誘導体を見出した。

【5. 結論】

以上著者は、新規抗菌剤開発を指向しMRYSをリードとするFOS研究を行った。まず誘導体合成に適した合成法の確立を目指しUgi反応を鍵とするMRYS D2の初の全合成を行った。本法によりMRYSのSAR研究を行い、脂溶性側鎖が抗菌活性発現に必須であること、L-*epi*-Cpm部が単純なL-Argに置換できること、L-Val部が除去可能でありペプチド部が単純化可能であることを見出した。さらに[3+2]付加環化反応によるスキャホールド構築を鍵とするMRYS誘導体を設計・合成し、薬剤耐性菌を含む細菌に抗菌活性を有する誘導体を見出した。本法は煩雑であったヌクレオシド部の合成を極めて単純に行うことができ、またスキャホールドに対して容易に種々の置換基が導入可能であることから、更なるSAR研究により単純かつ高活性の誘導体を効率的に見出すことができると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	市川	聡
副査	教授	橋本	俊一
副査	教授	松田	彰
副査	准教授	穴田	仁洋

学位論文題名

抗菌抗生物質ムライマイシン類をリードとする新規 抗菌剤の開発研究

本学位論文は、新規抗菌剤開発の優れたリード化合物と考えられているヌクレオシド系天然物ムライマイシン類をリードとする新規抗菌剤の開発研究である。まず以下に本学位論文における業績を述べる。

著者は包括的なペプチド部の SAR 研究を視野に入れた合成法の確立を目指し、まず MRD2 の全合成を行うことにした。多様な誘導体展開が可能な Ugi 四成分反応 (U-4CR) を鍵として、合成終盤で一挙に構築することにした。ペプチド中の L-*epi*-Cpm は、D-チロシン保護体から得たサルファマトに対する二核ロジウム錯体を用いる C-H アミノ化反応を鍵として合成した。この際に、C-H アミノ化反応の立体選択性には化合物の分子内水素結合が大きな影響を与えていることを見出し、既存の合成法よりも高立体選択的かつ高収率な L-*epi*-Cpm の合成法を確立した。合成したイソニトリルと L-*epi*-Cpm を含むジペプチドカルボン酸、2,4-ジメトキシベンジルアミン、イソバレルアルデヒドを用いて Ugi 反応成績体を得た。その後 2 工程で保護基を除去して MRD2 の初の全合成を達成した。合成した MRD2 およびそのエピマーの生物活性を評価したところ、いずれの化合物も強力な *MraY* 阻害活性を示す一方で、抗菌活性は全く示さなかった。細胞膜透過性を付与することで活性の向上を目指し、新たに 4 種の脂溶性側鎖を導入した誘導体を合成・抗菌活性を評価したところ、いずれも薬剤耐性菌 (MRSA, VRE) を含むグラム陽性菌に対して優れた抗菌活性を示し、特にベンタデシル基を導入した誘導体が天然物を凌駕する良い抗菌活性を示した。これらの誘導体は、長鎖脂肪鎖と極性官能基を有することからミセル形成による細胞毒性が懸念されたが、ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞に対する毒性試験において 100 $\mu\text{g/mL}$ の高濃度域においても細胞毒性を示さなかった。続いて MRDs のウレアジペプチド部の SAR 研究を行っており、ペプチド部の必須構造を見出すために L-*epi*-Cpm 部や L-Val 部などの極性官能基を順次欠如した誘導体 14 種類を合成・活性評価した。その結果 L-Arg のみに置き換えられることが明らかとした。次に、各置換基を三次元に網羅的に配置できるスキャホールドを導入し、単純化・最適化研究を行うことにし、二環式イソキサゾリジン誘導体を設計した。二環式イソキサゾリジン部は、ニトロンをういた分子内[3+2]環化付加反応により効率的に合成した。さらにペプチド部、脂溶性側鎖部、極性官能基を導入した 10 種の誘導体を合成・活性評価し、薬剤耐性菌を含む様々な菌に対して抗菌活性を有する MRDs の単純化誘導体を見出した。

まず本学位論文は、C-H 活性化反応や Ugi 多成分反応を駆使して、天然物であるムライマイシンの初の全合成を達成しており、有機合成化学的に大きな意義があると言える。さらにその合成経路は、続く迅速かつ包括的な構造活性相関研究を可能としており、複雑な構造を有する 40 個以上もの誘導体の活性評価につながっている。その構造活性相関研究から、脂溶性側鎖、ペプチド部は生物活性発現に重要であるが単純化可能であること、薬剤耐性菌に対する抗菌剤開発の標的として *MraY* が良い標的であることを明らかとしており、現在深刻な問題となっている薬剤耐性菌に有効な創薬リードの創出にも成功したと言える。医薬品を開発するうえで、天然物は医薬品開発のリードとして重要な分子である。しかし天然物やその生合成中間体が培養

等によって大量に得られる場合を除いて、複雑な構造を有する天然物をリードとして創薬研究を行うことはしばしば困難である。従って天然物やその誘導体を効率的に供給できる合成法を確立すること、さらに活性を保持したまま単純な構造に置き換えるドラッグデザインが求められる。これは Function-Oriented Synthesis と呼ばれ、天然物をリードとする創薬研究において重要な考え方の一つである。著者は、3 次元多様性を有する土台 (scaffold) に、生物活性に必要な各種官能基を適切に配置した分子を新たに設計して、抗菌活性を保持しつつ低分子化にも成功しており、創薬化学に大きく貢献する研究であると言える。従って、審査委員会は谷野哲也氏の論文が北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。