

令和元年6月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05097

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌制圧に向けた天然物から創薬リードへの変換研究

研究課題名(英文) Development of drug leads for drug-resistance bacterial pathogens based on natural products

研究代表者

市川 聡 (Satoshi, Ichikawa)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60333621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：1)ムライマイシンの制御型誘導体の合成を行った。2)スファエリミシン誘導体の合成とMraY阻害活性評価を行い、高いMraY阻害活性を有する誘導体を見出した。3)ムレイドマイシンA誘導体を合成し、高いMraY阻害活性と抗緑膿菌活性を有する誘導体を見出した。さらにMraYとの複合体のX線結晶構造解析を行った。4)プラスバシンA3誘導体の合成を行った。またプラスバシンA3の作用機構解析も行った。5)コリスチン耐性細菌に有効な誘導体を見出すべく、コリスチン誘導体30個を合成しその抗菌活性を評価した。本研究では、抗薬剤耐性菌薬リードを開発する事が出来たと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌に対する新規薬剤の開発は世界的急務である。本申請研究は、グラム陽性菌・グラム陰性菌双方の新規多剤耐性抗菌薬のシード供給を実現すべく、複数の天然物を研究対象として誘導体合成の効率的な供給と理論的薬物設計を通して、活性増強・毒性の低減・低分子化等をはかり、効率的にシードを獲得する。創薬ターゲットは従来の薬剤にはない新規作用機序を原則とし、ヌクレオシド系天然物とペプチド系天然物をベースとして、それぞれにグラム陽性菌・グラム陰性菌に対抗できる天然物を研究対象とする。抗薬剤耐性菌薬リードを開発する本研究の成果は、将来的に世界的な健康福祉の維持、QOLの向上に大きく貢献する事が予想される。

研究成果の概要(英文)：1) Synthesis and biological evaluation of muraimycin analogues were investigated. 2) Synthesis of the core structure of phaerimycin and its derivatives was achieved and their MraY inhibitory activity was also conducted. As a result, one derivative showed high MraY inhibitory activity. 3) Mureidomycin A analogues were synthesized and it was found that some derivatives exhibited higher MraY inhibitory activity and anti-P. aeruginosa activity than pacidamycin D, which is a congener of mureidomycin A. Furthermore, X-ray crystal structure analysis of the complex of mureidomycin analogue bound to MraY was also established. 4) The synthesis and action mechanism analysis of plasbacin A3 and its derivative were conducted. 5) In order to find an effective derivative against colistin resistant bacteria, 30 colistin derivatives were synthesized and their antibacterial activities were evaluated.

Some drug resistant bacterial drug lead were developed in this study.

研究分野：創薬化学

キーワード：薬剤耐性菌 天然物 創薬化学 有機合成化学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗生物質を用いる感染症治療には常に薬剤耐性菌の出現が伴うが、超薬剤耐性緑膿菌 (XDR-PA) に代表される、既存の薬が全く効かない超薬剤耐性菌の出現とその蔓延は地球規模の極めて深刻な問題である。耐性菌の出現と「最後の砦」の再開発という「いたちごっこ」の構図は広く認知されているにもかかわらず、製薬会社における抗菌剤開発はひとところに比べて停滞しているのが現状である。感染症に対する治療の第一選択は言うまでもなく化学療法であり、他の疾病と比較して新規薬剤の開発の必要性は大きく、かつ継続されなければならない。従来薬物では対処できない細菌感染症を治療するためには、新規な作用機序を有する医薬品を開発することが必要である。医薬品開発に於いては、疾患ターゲットに作用する優れた化合物の取得がその成否を分けることから、リード化合物の選択はきわめて重要である。元来、様々な生理活性を指標に発見されてきた天然物は重要な創薬リード分子であり、2011年までの30年間に承認された医薬品1355個のうち、半数以上が天然物に関連している (Newman, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311)。これまで申請者は、科学研究費 (若手 A・基盤研究 B) の支援の下、薬剤耐性菌に対して有効な新規薬剤リードの開発を目的として、ヌクレオシド系天然物 (ムライマイシン・ムレイドマイシン類) の創薬化学研究を展開しており、これらの低分子化と高活性化を達成してきた。

### 2. 研究の目的

本申請研究は、これまで行ってきた研究を基盤研究として発展させ、新規多剤耐性抗菌薬のシード供給を実現するものである。その方法として、グラム陽性菌・グラム陰性菌双方の薬剤耐性菌に対応すべく、複数の天然物を研究対象として包括的かつ多角的に研究を行うことを計画した。質の良い生理活性天然物の誘導体合成を指向した合成法の開発をベースにして、理論的薬物設計による活性増強・毒性の低減・低分子化等をはかり、効率的にシードを獲得するものである。

### 3. 研究の方法

以下の4項目を並行して行う。A) 標的酵素MraYの構造に基づいた薬物設計によりムライマイシンの低分子化と活性増強を図る。考えられる8つのジアステレオマーをすべて合成し、スファエリミシンの初の全合成・絶対立体配置の決定・構造活性相関を一挙に行う。B) 緑膿菌選択的な抗菌活性を有するムレイドマイシンの誘導体を合成し、高活性誘導体を見出す。C) プラスバシンの全合成と網羅的な構造活性相関を行い、低分子化と活性増強を図る。D) 毒性の低いコリスチン誘導体を開発する。いずれも効率的な有機合成化学による網羅的な誘導体供給と、各種生物活性評価 (研究協力者) からなるサイクルにより構造活性相関を検討する事で、研究を円滑に遂行する。

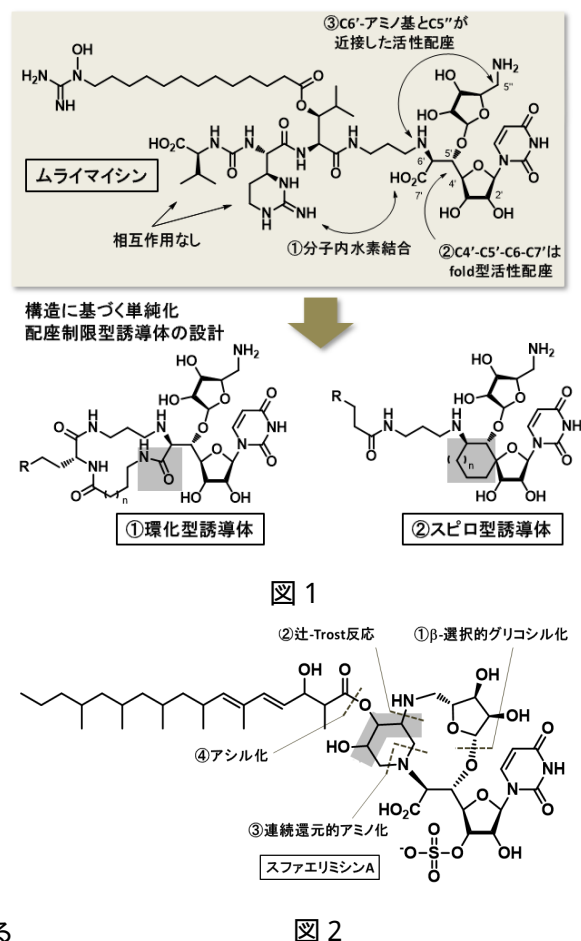
### 4. 研究成果

#### (1) ムライマイシン・スファエリミシン

ムライマイシンとMraYの複合体のX線結晶構造解析に基づいて、分子内イオン対形成やヌクレオシド部の配座に着目した環化型、スピロ型誘導体を設計・合成した (図1)。環化型誘導体は、ムライマイシンD2よりも2倍程度高いMraY阻害活性を示す事がわかった。スピロ型誘導体の合成を検討し、コア構造を得る事が出来た。各種環サイズの変更や脂溶性側鎖を変換した誘導体も合成した。MraYを強力に阻害するスファエリミシンに関しては、シクロペンテノールとアミノリボースを不斉辻-Trost反応にて連結し、連続還元的アミノ化反応によりピペリジン含有大員環を構築することで、考えられる8つのコア構造のうち2つのジアステレオマーの合成を達成した (図2)。さらに、生物活性に必須と考えられる脂溶性側鎖としてパルミトイル基を有する誘導体を合成し、そのMraY阻害活性を検討したところ、一方のジアステレオマーが強力なMraY阻害活性を有する事を明らかにした。

#### (2) ムレイドマイシン

ムレイドマイシン (図3) の誘導体の合成に関しては、多検体調製を可能とすべく固相合成と液相合成を検討した。その結果、ワンポット連続脱水縮合による液相合成を開発する



事ができた。更に固相合成も開発し、これらの方法を組み合わせることで誘導体 10 個を合成した。抗菌活性を評価したところ、N-、C-末端ともにm-L-チロシンを有する誘導体が、親化合物に比べて、約 2 ~ 4 倍強い抗緑膿菌活性を示す事を明らかにした。

### (3) プラスバシン

プラスバシンについては、 $\alpha$ -位に不斉中心を有する環状イミンを用いたジアステレオ選択的なUgi 多成分反応の再検討を行った。その結果、溶媒依存的なジアステレオ選択性の発現機構を明らかにする事ができた。本法を用いて、プラスバシンA3の全合成を達成する事が出来た(図4)。更にプラスバシンが有する2つのヒドロキシアスパラギン酸残基をアスパラギン酸に置換した誘導体を合成し、抗菌活性を評価したところ、活性が消失する事がわかった。各種構造解析や分子動力学計算による考察を行い、2つのヒドロキシアスパラギン酸のヒドロキシ基が、活性配座を保つのに重要な役割をはたす事が示唆された。

### (4) コリスチン

コリスチンの固相合成法を精査し、30個のコリスチン誘導体を合成した(図5)。緑膿菌に対する抗菌活性を評価することで、活性発現に必要なアミノ酸残基を同定する事ができ、ジアミノブタン酸残基は、抗菌活性に重要な影響を与える事がわかった。ほとんどのアミノ酸残基の置換は、抗菌活性を低下させたが、ジアミノブタン酸の一部をジメチルアミノブタン酸に変換しても抗菌活性は減弱しない事がわかった

抗薬剤耐性菌薬リードを開発する本研究の成果は、将来的に世界的な健康福祉の維持、QOLの向上に大きく貢献する事が予想される。本研究では、抗薬剤耐性菌薬リードを開発する事が出来たと言える。

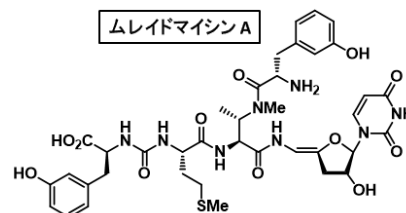


図 3

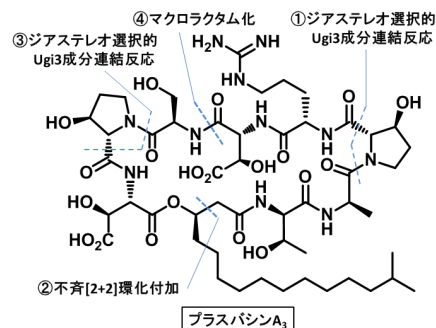


図 4

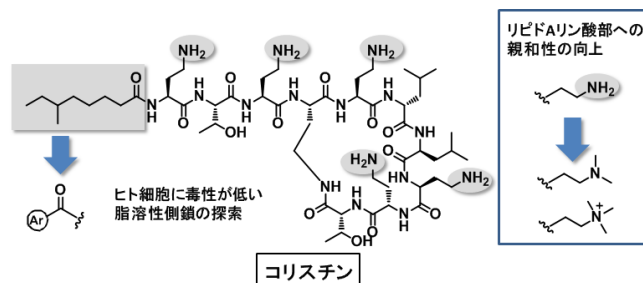


図 5

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

- Yoo, Jiho; Mashalidis, Ellene H.; Kuk, Alvin C. Y.; Yamamoto, Kazuki; Kaeser, Benjamin; Ichikawa, Satoshi; Lee, Seok-Yong. **GlcNAc-1-P-transferase-tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 217-224., 査読有
- Kinoshita, Yuhei; Yakushiji, Fumika; Matsui, Hidehito; Hanaki, Hideaki; Ichikawa, Satoshi.\* **Study of structure-activity relationship of polymyxin analogues.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, *accepted.*, 査読有
- Katsuyama, Akira; Yakushiji, Fumika; Ichikawa, Satoshi.\* **Total synthesis of plusbacin A<sub>3</sub> and its dideoxy derivative using a solvent-dependent diastereodivergent Joullié-Ugi three-component reaction.** *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 7085-7101., 査読有
- Yoshida, Takashi; Ri, Masaki; Kanamori, Takashi; Aoki, Sho; Ashour, Reham; Kinoshita, Shiori; Narita, Tomoko; Totani, Haruhito; Masaki, Ayako; Ito, Asahi; Kusumoto, Shigeru; Ishida, Takashi; Komatsu, Hirokazu; Kitahata, Shun; Chiba, Takuya; Ichikawa Satoshi; and Iida, Shinsuke.\* **Potent anti-tumor activity of a syringolin analog in multiple myeloma: A dual inhibitor of proteasome activity targeting  $\beta$ 2 and  $\beta$ 5 subunits.** *Oncotarget* **2018**, *9*, 9975-9991., 査読有
- Yamamoto, Kazuki; Yakushiji, Fumika; Matsumaru, Takanori; Ichikawa, Satoshi.\* **Total Synthesis of Tunicamycin V.** *Org. Lett.* **2018**, *20*, 256-259. DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03623
- Katsuyama, Akira; Sato, Kosuke; Yakushiji, Fumika; Matsumaru, Takanori; Ichikawa, Satoshi.\* **Solid-Phase Modular Synthesis of Park Nucleotide and Lipid I and Lipid II A,** 査読有 **analogues.** *Chem. Phar. Bull.* **2018**, *66*, 84-95. DOI: 10.1248/cpb.c17-00828
- Kitahata, Shun; Yakushiji, Fumika; Ichikawa Satoshi.\* **Impact of Structures of Macrocyclic Michael Acceptors on Covalent Proteasome Inhibition.** *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 6959-6963., 査読有

Katsuyama, Akira; Paudel, Atmika; Panthee, Suresh; Hamamoto, Hiroshi; Kawakami, Toru; Hojo, Hironobu; Yakushiji Fumika; Ichikawa, Satoshi\*. **Total Synthesis and Antibacterial Investigation of Plusbacin A<sub>3</sub>**. *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 3771-3774. , 査読有

Katsuyama, Akira; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi\*. **Revisited mechanistic implications of the Joullié-Ugi three component reaction**. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2552-2555. , 査読有

Kitahata, Shun; Chiba, Takuya; Yoshida, Takashi; Ri, Masaki; Iida, Shinsuke; Matsuda Akira; Ichikawa, Satoshi\*. **Design, synthesis and biological activity of isosyringolin A**. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2312-2315. , 査読有

Chung, C. Ben; Mashalidis, H. Ellene; Tanino, Tetsuya; Kim, Mijung; Matsuda, Akira; Hong, Jiyong; Ichikawa, Satoshi; Lee, Seok-Yong.\* **Structural insights into inhibition of lipid I production in bacterial cell wall synthesis**. *Nature*, **2016**, *533*, 557-561. , 査読有

Chiba, Takuya; Shun, Kitahata; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi\*. **Design, synthesis and biological evaluation of a structurally simplified syringoin A analogues**. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 811-816. , 査読有

〔学会発表〕(計 48 件)

山本 一貴、薬師寺 文華、市川 聡、Tunicamycin V の全合成 第 28 回万有福岡シンポジウム、2018 年 5 月 12 日、福岡

Shun Kitahata, Fumika Yakushiji, Satoshi Ichikawa, Development of a covalent proteasome inhibitor and kinetic analysis of its inhibitory mechanism, 256<sup>th</sup> ACS National Meeting & Exposition, August 22<sup>th</sup> (2018), Boston, United States

Shun Kitahata, Fumika Yakushiji, Satoshi Ichikawa, Impact of the structures of macrocyclic Michael acceptors derived from syringolin A on covalent proteasome inhibition, XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, September 4<sup>th</sup> (2018), Ljubljana, Slovenia

山本 一貴、市川 聡、Tunicamycin V の全合成と構造に基づいた MraY 選択的阻害剤への変換、第 60 回天然有機化合物討論会、2018 年 9 月 27 日、久留米

家口 凜太郎、勝山 彬、薬師寺 文華、市川 聡、フラグメント化によるコリスチン誘導体の合成と構造活性相関研究、第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム、2018 年 11 月 5 日、熊本

宮北 大暉、内海 翔平、勝山 彬、薬師寺 文華、市川 聡、ナノシスチン Ax の全合成、第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム、2018 年 11 月 5 日、熊本

龍見 健吾、北畑 舜、勝山 彬、薬師寺 文華、市川 聡、プロテアソーム β<sub>2</sub>, β<sub>5</sub> デュアル阻害剤の開発研究、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2018 年 11 月 29 日、京都

北畑 舜、市川 聡、不可逆のプロテアソーム阻害剤の作用機構解析、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台

勝山 彬、松田 彰、市川 聡、立体選択的 Joullié-Ugi 三成分反応の反応機構解析、日本薬学会第 137 年会 (口頭発表)、2017 年 3 月 27 日、仙台

山本 一貴、市川 聡、Tunicamycin 類の全合成研究、日本薬学会第 137 年会 (口頭発表)、2017 年 3 月 27 日、仙台

寺澤 侑馬、市川 聡、構造に基づいた配座制御型ムライマイシン誘導体の合成研究、日本薬学会北海道支部 144 回例会 (口頭発表)、2017 年 5 月 20 日、札幌

北畑 舜、市川 聡、共有結合型プロテアソーム阻害剤の創製と作用機序解析、第 15 回次世代を担う有機化学シンポジウム、2017 年 5 月 26 日、東京

勝山 彬、Atmika Paudel, Suresh Panthee、浜本 洋、市川 聡、プラスバシン A<sub>3</sub> の全合成と生物活性評価、第 59 回天然有機化合物討論会 (ポスター発表)、2017 年 9 月 21 日、札幌

勝山 彬、Atmika Paudel, Suresh Panthee、浜本 洋、薬師寺 文華、市川 聡、プラスバシン A<sub>3</sub> の全合成、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、2017 年 11 月 6 日、富山

勝山 彬、市川 聡、プラスバシン A<sub>3</sub> の合成研究、第 14 回次世代を担う有機化学シンポジウム (口頭発表)、2016 年 5 月 27 日、東京

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://japanese-apricot.pharm.hokudai.ac.jp/gousei iyaku/index.php>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：勝山 彬

ローマ字氏名：Akira Katsuyama

研究協力者氏名：佐藤 豊孝

ローマ字氏名：Sato Toyotaka

研究協力者氏名：Seok-Yong Lee

ローマ字氏名：Seok-Yong Lee

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。