

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02920

研究課題名(和文) 強力な抗菌活性を有する特異構造天然物の全合成と構造活性相関及び化学生物学的展開

研究課題名(英文) Total synthesis of potent antibacterial natural products with unique chemical structures and their structure-activity relationship studies

研究代表者

桑原 重文 (Kawahara, Shigefumi)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：30170145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：5つの環系(A-Eユニット)から成る極めて特異なハイブリッド構造と薬剤耐性菌に対する強力な抗菌活性を持つ抗生物質amycolamicinの全合成を、以下の手法により達成した：(i)テトラエナル型鎖状前駆体の分子内Diels-Alder環化を経るC環部の高立体選択的構築、(ii)  $\alpha$ -アジドケトンに対する求核付加を経由するDユニットの調製、(iii)Aユニット誘導体( $\alpha$ -アノマー/ $\beta$ -アノマー = 1:1.1)のCDEユニットによる立体収束的なN-アシル化。Nonthmicinについては、西側部位、北側部位、南西部位の部分合成、Aplasmomycinについては、C12-C17セグメントの調製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AmycolamicinのCユニットの調製で用いたヒドロキシ基無保護の分子内Diels-Alder反応は、それまでの類似反応では実現されていなかったequatorialヒドロキシ基を持つtrans-デカリン系の高ジアステレオ選択的構築を達成したものであり、今後の天然物合成に対する貢献は大きい。また、アノマー混合物である二環性N-グリコシドをチオエステルでN-アシル化すると、単一のN-アシル化生成物を収束的に与えるという新知見は、類似天然物の合成における立体制御を大幅に簡略化できることを意味している。各種合成品の構造活性相関研究により、有用な抗菌剤等の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The total synthesis of amycolamicin, an antibiotic with a unique hybrid molecular structure consisting of five ring systems (A-E units) and potent antibacterial activity against a wide range of drug-resistant bacteria, has been achieved from a known D-lactic acid derivative by a 20-step sequence that features: (1) highly diastereoselective construction of the C ring via a protecting group-free Lewis acid-promoted intramolecular Diels-Alder cyclization of a teraenal-type acyclic precursor; (2) preparation of the D unit via an extremely diastereoselective nucleophilic addition of a vinyl lithium derivative to an  $\alpha$ -azidoketone intermediate; (3) efficient stereoconvergent N-acylation of an A unit derivatives ( $\alpha$ -anomer/ $\beta$ -anomer = 1:1.1) with the CDE unit (thioester derivative). We have also succeeded in synthesizing the western, northern, and southwestern parts of nonthmicin as well as the preparation of the C12-C17 segment of aplasmomycin.

研究分野：有機合成化学

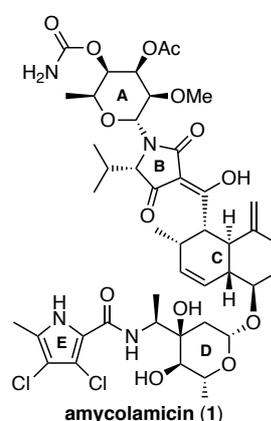
キーワード：amycolamicin nonthmicin aplasmomycin 抗菌物質

## 1. 研究開始当初の背景

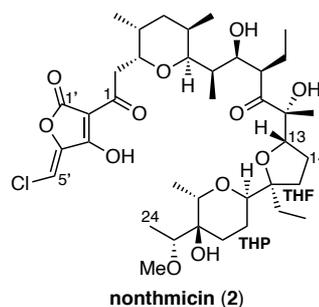
ペニシリンに始まる様々な抗生物質の創出は人々を感染症の脅威から解放したかに見えたが、それもつかの間、相次ぐ薬剤耐性菌の出現によって、人類は新たな脅威に晒されている。そのような緊迫した状況にあるにも関わらず、新規抗菌薬の開発は1980年代以降、著しく減少しており、このままだと2050年には薬剤耐性菌による死者が世界で1000万人に達するとの推計が出されている。今まさに、広い抗菌スペクトルと強力な抗菌力に加えて、交差耐性を生じにくい新規な構造と作用機序を持ち、多剤耐性菌にも打ち勝つことができる新しいカテゴリーの抗菌薬の起点となり得る化合物の開拓が急務となっている。一方で、広範な細菌に作用する広域抗菌剤の濫用による薬剤耐性菌の出現というこれまでの現実を鑑み、有用な腸内細菌叢の保全、常在細菌の耐性化の抑制という観点から、病因となっている特定の病原菌だけに有効な狭域抗菌剤にも注目が注がれている。このような背景のもと、本研究では、特異な化学構造と強力な抗菌活性を持つ amycolamicin と nonthmicin、並びに狭域抗生物質 aplasmomycin について、初の全合成を達成するとともに、構造活性相関研究・化学生物学的研究へと展開して、画期的な感染症治療薬の開発に繋げることを目指した。

## 2. 研究の目的

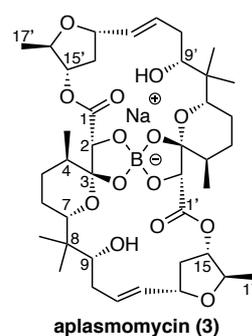
Amycolamicin (**1**) は希少放線菌 (*Amycolatopsis* 属及び *Kibdelosporangium* 属) が生産する抗生物質である。過去に類例の無いハイブリッド型化学構造を有し、MRSA, VRE を始め、広範なグラム陽性・陰性の薬剤耐性菌に対して強力な抗菌作用を示す (MIC 0.125–1 µg/mL)。1 の標的タンパク質は、細菌の DNA 合成必須酵素である DNA gyrase の GyrB subunit 及び topoisomerase IV の ParE subunit であり、それらと 1 の共結晶 X 線構造解析から、1 は同じ標的を持つ既存薬とは全く異なる新規な結合様式 (dual arm, U-shaped binding) を持つことが判明した。このことは、既存の抗菌薬に交差耐性を示さず、耐性発現頻度も極めて低い (FOR  $5 \times 10^{-10}$  未満) という 1 の良好な薬理特性の根拠となっている。1 はヒトの topoisomerase II は阻害せず、マウスに対する急性毒性も無いことから、構造的にも作用機序的にも全く新規な抗菌薬リード化合物として注目を集めている。また、2つの新規単糖ユニット (A, D) と3つの構造ユニット (B, C, E) が連なった構造は、天然物合成化学の見地からも近年稀に見る挑戦的な合成標的である。本研究では、誘導体合成にも柔軟に対応できる AB ユニット構築法や立体選択的な糖骨格構築法を開拓して 1 の初の全合成達成に挑むとともに、1 と受容体との共結晶構造に基づく構造活性相関を実施して、より有効で実用的な抗菌薬の創製に繋げることを目指した。



Nonthmicin (**2**) は希少放線菌 (*Actinomadura* 属) が生産する抗生物質である。グラム陽性菌に対する強力な抗菌作用に加え、癌細胞浸潤阻害、神経細胞モデル PC12D 細胞の MPP<sup>+</sup> 誘導細胞死の抑制、オートファジー亢進という多彩な生理活性を示す。2 の構造的特徴は、分子右下の THF/THP 連続環構造と前例のない塩素化メチレンテトロネ酸構造 (分子左側) の存在である。これまでの所、標的分子を含めて作用機序は不明である。本研究では、THF/THP 連続環構造の一段階構築法を開拓するとともに、類縁体合成にも適用可能な収束的合成戦略を立案して 2 の初の全合成を達成し、さらに構造活性相関・化学生物学的研究へと展開して、好適な薬理特性を持つ抗菌剤等の開発へと繋げることを目指した。



メナキノン系は原核生物では電子伝達系の必須要素として生合成される。メナキノンの生合成は主に大腸菌を用いて研究され、コリスミン酸から芳香族ケトジカルボン酸を経る経路 (主要経路) が確立されたが、近年、主要経路とは異なり、フタロシンを経る経路 (フタロシン経路) の存在が明らかとなった。有用な腸内細菌を始め、大多数の細菌は主要経路を用いるが、ピロリ菌、カンピロバクター、クラミジア、スピロヘータを含む一部の病原性細菌はフタロシン経路を使ってメナキノンを生合成している。フタロシン経路はヒト及び大多数の細菌には存在しないことから、その特異的阻害剤はヒトや腸内微生物叢に影響の少ない抗菌薬になり得る。ごく最近、*Streptomyces* sp. K15-0223 の培養液からフタロシン経路特異的阻害剤として aplasmomycin (**3**) が単離された。3 は *Bacillus halodurans* C-125 (フタロシン経路を使用) に対して強力な抗菌作用 (MIC: 40 ng/mL) を示す一方で、*B. subtilis* 168 (主要経路) に対しては 1 µg/mL まで活性を示さない。3 はフタロシン経路の後期過程を阻害するが、詳細は不明である。有機化学の見地からは、極めて稀



なホウ素含有 macrodiolide 構造を持つ **3** は全合成の対象として挑戦に値する。本研究では、aplasmomycin (**3**)の短工程全合成経路を開拓するとともに、特定の病原菌の除菌・殺菌に特化した、副作用と薬剤耐性発現リスクの少ない抗菌薬の開発に向けた構造活性相関・化学生物学的研究へと展開する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Amycolamicin (**1**)の合成研究

まず、新規単糖ユニット (A ユニット) と B ユニットの一部分から成る *N*-グリコシドセグメント、*trans*-デカリンユニット (C ユニット)、新規単糖を含む DE ユニットの調製する。DE ユニットで C ユニットのグリコシル化した後、C2 単位を増炭して南側のチオエステルセグメントとする。*N*-グリコシドセグメントをチオエステルセグメントで立体収束的に *N*-アシル化した後、Dieckmann 環化により B 環を構築し、A 環部へのカーバメート基の導入と脱保護により **1** の全合成を完成する。合成した各ユニット及びそれらの連結体、並びにそれらの各種誘導体、類縁体を使って構造活性相関研究を実施する。

#### (2) Nonthmicin (**2**)の合成研究

**2** の炭素骨格を北側部位 (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)、南東部位 (C<sub>13</sub>-C<sub>24</sub>)、西側部位 (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) に分けて合成を進める。北側部位の調製は、まずビニロガス向山アルドール反応を経て C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>セグメントを得た後、*anti*-アルドール反応、環化により C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>セグメント (アルデヒド) とする。C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>セグメント (アルデヒド) を再度、ビニロガス向山アルドール反応に付し、不斉ジヒドロキシ化等により C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>セグメントを完成させる。南東部位は、D-乳酸誘導体から C<sub>19</sub>-C<sub>22</sub>セグメントを調製し、C<sub>13</sub>-C<sub>18</sub>セグメントに相当するアリルブロマイドでアルキル化して C<sub>13</sub>-C<sub>22</sub>セグメントに導き、不斉酸化と環化により THF/THP 連結構造を完成させる。西側部位はピルビン酸を原料として調製する。各セグメントを連結することで、**2** の全合成を完成する。全合成が完成次第、構造活性相関研究へと展開する。

#### (3) Aplasmomycin (**3**)の合成研究

不斉アルドール反応、不斉還元、及びコバルト触媒を用いる *trans*-選択的 THF 環化を経て C<sub>12</sub>-C<sub>17</sub>セグメントを調製する。また、不斉アルドール反応を用いて C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>セグメントを得る。両者をカップリングして C<sub>7</sub>-C<sub>17</sub>セグメントとし、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>セグメントとのアルキル化による増炭等を経て、C<sub>1</sub>-C<sub>17</sub>セグメントを得る。それを二量化した後、立体収束的環化反応を行うことで **3** の短工程全合成を完成する。全合成が完成次第、構造活性相関研究へと展開する。

### 4. 研究成果

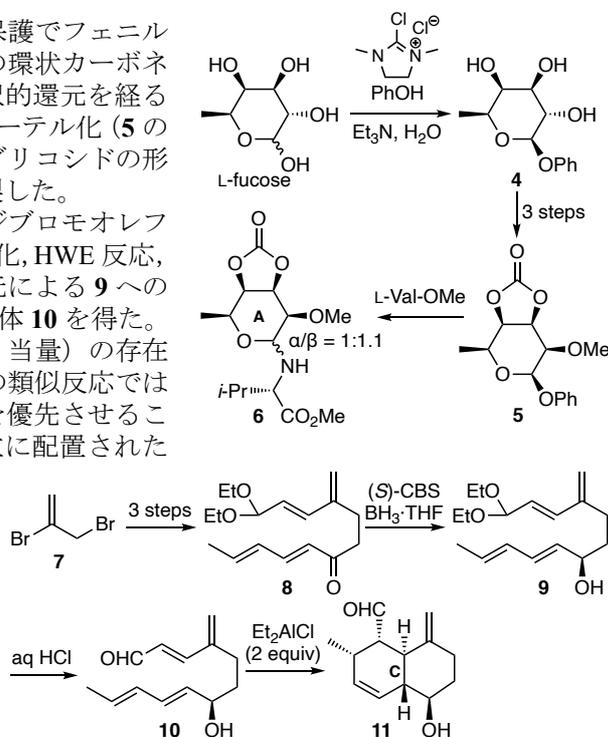
#### (1) Amycolamicin (**1**)の全合成の達成

*N*-グリコシド **6** の調製: L-フコースを無保護でフェニルグリコシド **4** に変換後、*cis*-ジオール部位の環状カーボネートへの変換、ケトンへの酸化と立体選択的還元を経る水酸基の立体反転 (ワンポット)、メチルエーテル化 (**5** の生成)、L-バリンメチルエステルによる *N*-グリコシドの形成により *N*-グリコシドセグメント **6** を調製した。

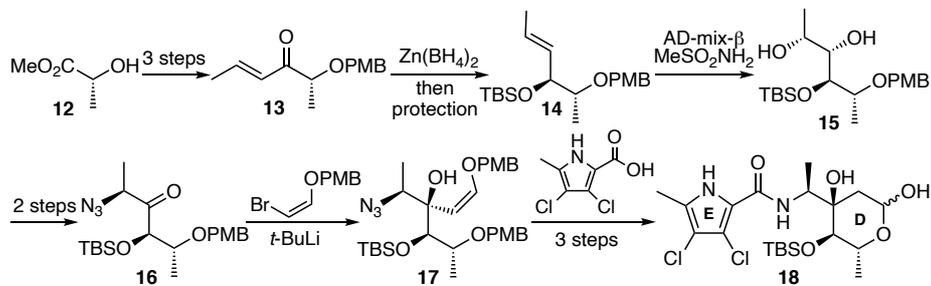
*trans*-デカリン誘導体 **11** の調製: 市販のジプロモオレフィン **7** をβ-ケトスルホネートとのアルキル化、HWE 反応、Heck 反応で増炭して **8** とした後、不斉還元による **9** への変換と加水分解によりテトラエナール中間体 **10** を得た。**10** を水酸基を無保護の状態、Et<sub>2</sub>AlCl (2 当量) の存在下、Diels-Alder 反応に付したところ、従来の類似反応では不可能であった *endo*-equatorial 遷移状態を優先させることに成功し、ヒドロキシ基が equatorial 位に配置された

*trans*-デカリン誘導体 **11** を極めて高い立体選択性 (ジアステレオマー比 >96:4) で得ることができた。ヒドロキシ基が過剰の Et<sub>2</sub>AlCl と反応して、酸素-アルミニウム結合が形成されていることが高立体選択性の要因であると考えられ、本方法論は、従来合成が困難であった類似構造の天然物の立体選択的全合成にも適用可能であると考えている。

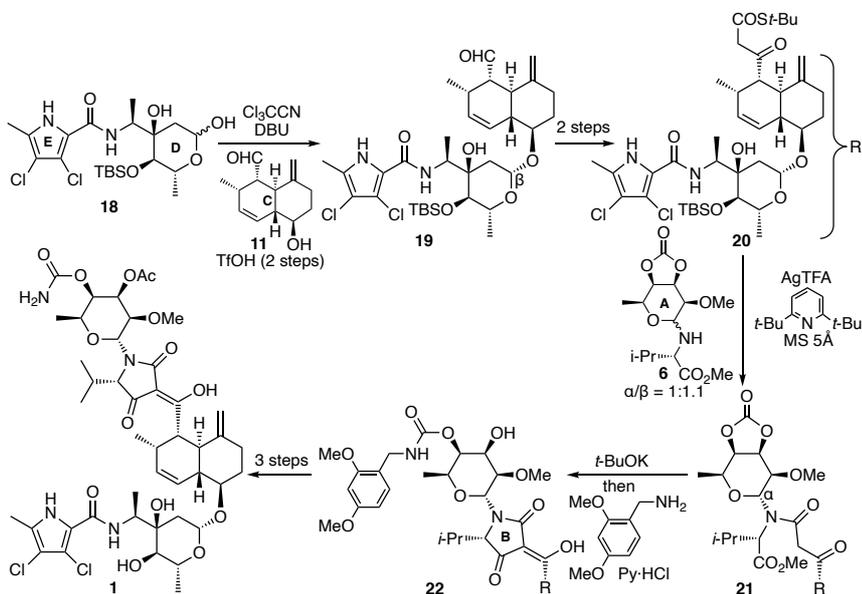
DE ユニット **18** の調製: D-乳酸エチル **12** を保護、ホスホネート化、HWE 反応によりエノン **13** とした後、ジアステレオ選択的還元と保護により **14** を得た。**14** を不斉ジヒドロキシ化により **15** とした後、位置選択的トシル化、酸化 (ワンポット)、アジドイオンによる求核置換反応で **16** に導いた。**16** に対し、臭化ビニル誘導体から導いたビニルリチウム試薬を付加したところ、第三級アルコール **17** が単一ジアステレオマーとして得られた。この立体選択性は Conforth-Evans モデルや polar Felkin-Anh モデルにより説明可能であった。**17** のアジド基を還元後、既知のピロ



ールカルボン酸 (E ユニット) とのアミド化を行い、最後に 2 つの PMB 基を除去することで DE ユニット **18** を調製した。

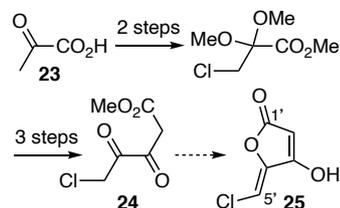


**18** を Schmidt グリコシル化の反応条件に付した所、N,O-アセタール化が進行した二環性中間体を生じたが、TfOH を用いるとグリコシルドナーとして機能させることができ、**11** とのグリコシル化により望むβ-アノマー**19** を優先的に与えた。**19** をアルドール反応を経由して 2 炭素増炭したチオエステル**20** に変換し、AgTFA 存在下、N-グリコシド**6** で処理したところ、立体収束的な N-アシル化が進行して、α-アノマー**21** を単一アノマーとして与えた。**21** を Dieckmann 環化に付して B 環部を構築した後、環状カーボネート部位をベンジルアミン誘導体で開環した所、カーバメート基が位置選択的に導入された**22** が得られた。最後に、**22** を保護基の除去とアセチル化により amycolamicin (**1**) の全合成を完成した。

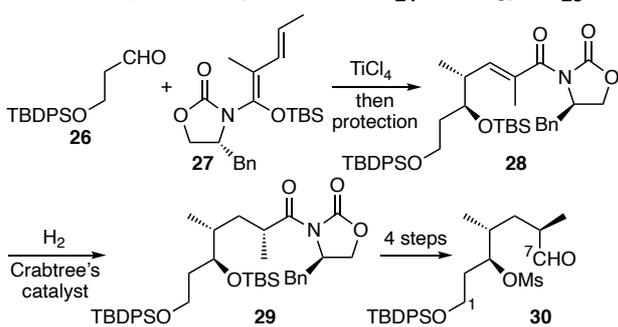


### (2) Nonthmicin (**2**) の全合成研究

西側部位 (25: C1'-C5') の調製: ピルビン酸 **23** を原料とし、塩素化、保護、Weinreb アミドを経由する増炭、脱保護により、**24** に導いた。現在、**24** を環化して **25** を得る反応条件を検討している。

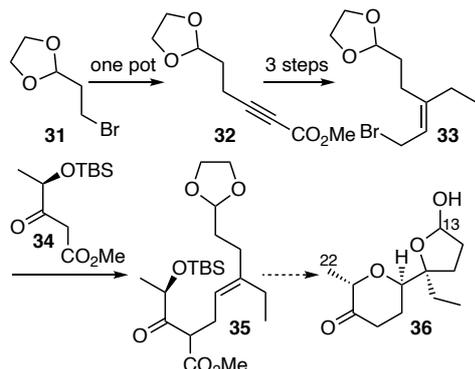


北側部位の部分合成 (30: C1-C7): アルデヒド **26** と Evans 型不斉補助基を有する **27** とのビニロガス向山アルドール反応と保護により、高立体選択的に **28** (ジアステレオマー比 25:1) を得た。**28** を Crabtree 触媒を用いて水素添加した所、立体選択的に **29** が得られた。**29** を 4 工程の官能基変換に付すことで C1-C7 セグメント **30** を調製することができた。



南西部位の部分合成 (36: C13-C22) の調製:

TMS-アセチレンから調製したリチウムアセチリドと臭化物 **31** の求核置換反応とメトキシカルボニル化をワンポットで行って **32** を得た。**32** の三重結合に対する有機銅試薬の Z-選択的付加と官能基の調整により臭化アリル誘導体 **33** に導いた。D-乳酸誘導体 **34** を **33** でアルキル化して **35** とした。現在、二重結合部位の酸化を経由する **36** (C13-C22) への変換を検討している。

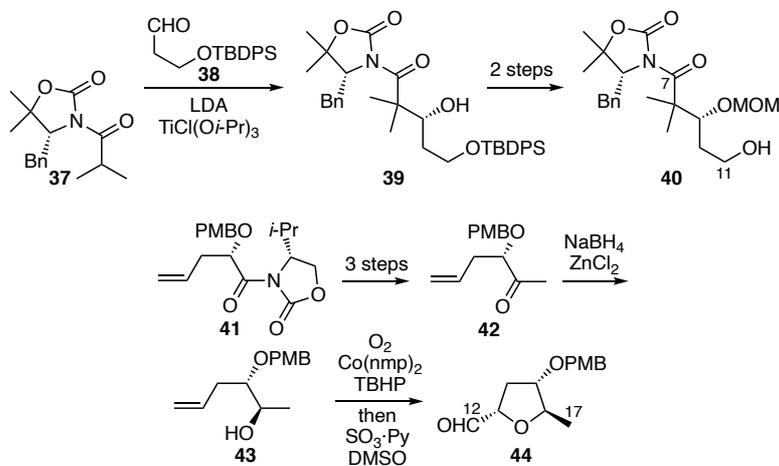


### (3) Aplasmomycin (**3**) の全合成研究

C7-C11 セグメント **40** の調製: キラルオキサゾリジノン誘導体 **37** とアルデヒド **38** との不斉アルドール反応により **39** を得た。**39** のヒドロキシ基を MOM 基で保護した後、シリル基を除去して C7-C11 セグメント **40** を調製した。

C12-C17 セグメント **44** の調製: 既知のキラルオキサ

グリジノン誘導体 **41** を Weinreb アミドに変換後、メチルリチウムで処理することでメチルケトン **42** を得た。**42** をキレーション制御によるジアステレオ選択的還元で付して **43** とした後に、コバルト触媒を用いる *trans*-THF 環化反応により **44** を得ることに成功した。今後は、**40** をスルホン誘導体に変換した後、**44** との Julia-Kocienski 反応に付すことで C<sub>7</sub>-C<sub>17</sub>セグメントとし、さらに増炭を行なって単量体 (C<sub>1</sub>-C<sub>17</sub>セグメント) を調製する。次に、単量体の二量化を行った後、立体収束的環化反応に付すことで **3** の短工程全合成を完成する。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Meguro Yasuhiro, Ito Junya, Nakagawa Kiyotaka, Kuwahara Shigefumi	4. 巻 144
2. 論文標題 Total Synthesis of the Broad-Spectrum Antibiotic Amycolamicin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 5253 ~ 5257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c00647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 asuhiro Meguro, Yuka Taguchi, Masaru Enomoto, Shigefumi Kuwahara	4. 巻 100
2. 論文標題 Synthesis of amikitanose, an O-carbamoyl sugar component of the antibiotic amycolamicin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2022.153891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiro Meguro, Masaru Enomoto, Shigefumi Kuwahara	4. 巻 21
2. 論文標題 Synthesis of the N-amykitanosyl tetramic acid moiety of amycolamicin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202300075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202300075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 目黒康洋, 桑原重文
2. 発表標題 アミコラマイシンの全合成研究
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 目黒康洋, 桑原重文
2. 発表標題 Amycolamicinの全合成研究
3. 学会等名 第31回万有仙台シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhiro Meguro, Shigefumi Kuwahara
2. 発表標題 Synthetic study of amycolamicin
3. 学会等名 International Chemistry Congress of Pacific Basin Societies 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原重文, 目黒康洋
2. 発表標題 抗生物質amycolamicinのAおよびDEユニットの合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目黒康洋, 伊藤隼哉, 仲川清隆, 桑原重文
2. 発表標題 抗生物質amycolamicinの全合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目黒康洋, 伊藤隼哉, 仲川清隆, 桑原重文
2. 発表標題 Amycolamicinの全合成
3. 学会等名 第120回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目黒康洋, 伊藤隼哉, 仲川清隆, 桑原重文
2. 発表標題 抗生物質amycolamicinの全合成
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目黒康洋, 田口優佳, 榎本賢, 桑原重文
2. 発表標題 抗生物質amycolamicinのA およびABユニットの合成研究
3. 学会等名 令和4年度日本農芸化学会北海道・東北支部合同支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 目黒康洋, 榎本賢, 桑原重文
2. 発表標題 広域抗生物質AmycolamicinのAおよびABユニットの合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 目黒康洋, 桑原重文
2. 発表標題 広域抗生物質 amycolamicin の全合成
3. 学会等名 本農芸化学会2023年度大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------