

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05059

研究課題名(和文) PPI阻害による抗嫌気性菌抗生物質中分子ジチロマイシンの合成と創薬リードの創製

研究課題名(英文) Synthesis of the lead compound of PPI inhibitor, Dityromycin

研究代表者

砂塚 敏明 (Sunazuka, Toshiaki)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：30226592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ジチロマイシンを環状イソジチロシン骨格をNorthern partとデヒドロイソロイシン含有ペプチドをSouthern part、残りのトリペプチドをEastern partとして分割し、各フラグメントを縮合することにより収束的に天然物へと導くこととした。まずすでに確立された経路を基に最適化を行い各フラグメントに関してグラムスケールでの調製を達成した。次に、各種フラグメントカップリングを行うことで全炭素骨格を有するデカペプチドをグラムスケールにて調製した。続いて脱保護し、過剰量のEDCIを用いる条件によって環化体を効率よく取得した後、シリル基を除去することで大環状デブシペプチドを取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界で多くの問題となっている耐性菌に対してこれまでと違うメカニズムで抗菌活性を示す新規抗生物質であるDityromycinに関して、まず絶対構造を明らかにし、そしてさらに簡便な合成ルートを確立することにより、様々な類縁体を作ることによりこれまでない新規薬剤開発に繋がる。そしてこのDityromycinは、タンパクとタンパクとの結合を特異的に阻害する薬剤であるので、クライオ電子顕微鏡でどのように結合するかを明らかにすることにより特異的な薬剤開発に繋がり、将来の耐性菌問題に利用されることが多いに期待される。

研究成果の概要(英文)：As the retrosynthesis of dityromycin, we divided it into 3 fragments in convergent manner; the cyclic isodityrosin core as a northern part, highly oxidized dehydroisoleucine containing peptide as a southern part, and the remaining linear peptide as an eastern part.

Our synthetic endeavor was commenced with material pushing of each fragments on gram scale along the synthetic route we established before. As a side note, we improved the yield and suppressed the epimerization of the eastern part by capitalizing the Fm protecting group. En route to dityromycin, all fragments were condensed and afforded decapeptide which contains all amino acid components of dityromycin on gram scale. After numerous optimization and tunings, we obtained macrocyclized product on gram scale by sequential Alloc/Allyl cleavage, excessive EDCI mediated macrocyclization.

研究分野：天然物化学、有機合成化学

キーワード：抗生物質 嫌気性菌 大腸炎治療薬 PPI阻害剤 全合成 絶対立体化学構造 微生物培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

PPI 阻害による抗嫌気性菌抗生物質中分子ジチロマイシンの合成と創薬リードの創製

1. 研究開始当初の背景

1977年、北里研究所において放線菌 *Streptomyces* sp. AM-2504 株より単離された Dityromycin (**1**)は、天然及び異常アミノ酸を構成成分とする中分子天然物である。構造的な特徴として **1** は、イソジチロシン型環状トリペプチド構造とデヒドロイソロイシン酸化型異常アミノ酸を含む大環状デプシペプチドである。**1** の主な生物活性としては一部好気性細菌及び *Clostridioides difficile* infections の原因菌として知られる *C. difficile* などの偏性嫌気性菌に対して MIC = 0.25 - 8 µg/mL オーダーで抗菌活性を示すことが見出されている。更にその作用機序はリボソーム中における PPI (Protein-Protein Interaction) 阻害作用と興味深い。2014年イェール大学の Steitz らが報告した標的タンパク質との X 線共結晶構造よりそのファーマコフォアが示唆されていることから、**1** は創薬標的化合物として非常に有望であると言える (Fig. 1)。しかしながら **1** は単離から 46 年が経つ現在も絶対立体構造が未決定であり、全合成の報告はない。そこで絶対立体構造の決定及び後の創薬展開を目指し、全合成研究に着手することとした。

2. 研究の目的

本研究の標的である **1** に関して、環状イソジチロシン骨格を Northern part **2**、高度に酸化されたデヒドロイソロイシン含有ペプチドを Southern part **3**、残りのトリペプチドを Eastern part **4** として分割し、各フラグメントを縮合

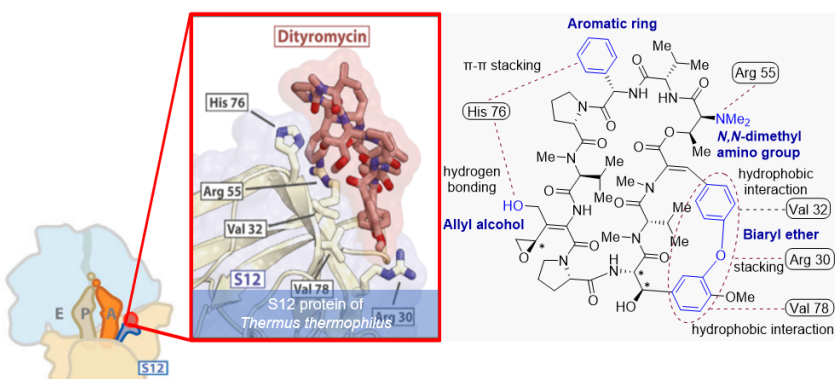


Fig. 1 Dityromycin(**1**)と S12 タンパク質の X 線共結晶構造

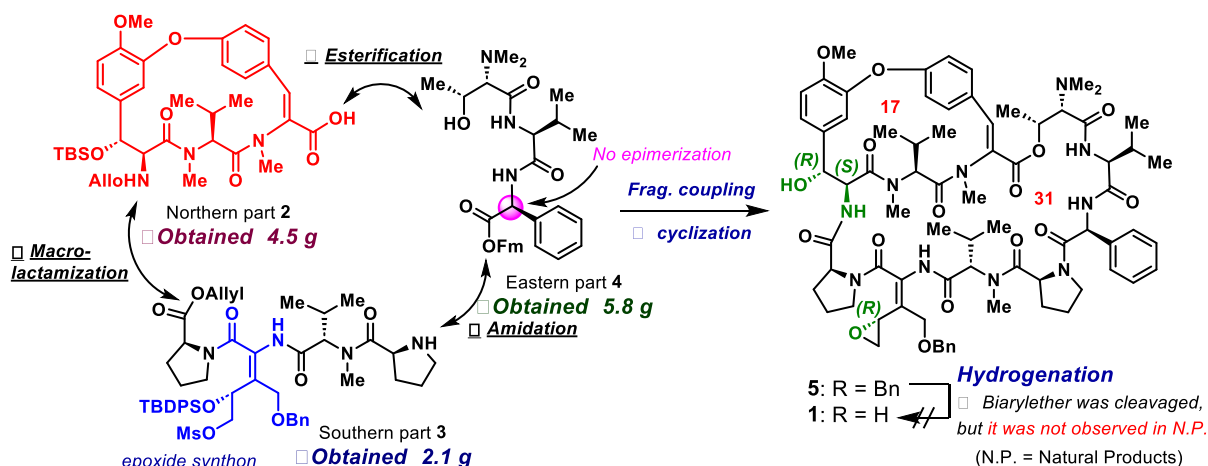
することにより収束的に天然物へと導くこととした。環化位置の戦略として、前駆体となる鎖状ペプチドの配列中心部にプロリンを配置することで、シスアミド構造を利用したコンフォメーションの湾曲を誘引し、環化点の接近が期待できると想定した。なお、**1** において絶対立体化学が未決定な部位については、Scheme 1 に示した立体化学を有する **1** を合成標的とした。これは、Steitz らにより取得された標的タンパク質と **1** の X 線共結晶構造図において、その電子密度から断定は出来ないものの天然物が有する可能性の最も高い立体化学である。

3. 研究の方法

4. 研究成果

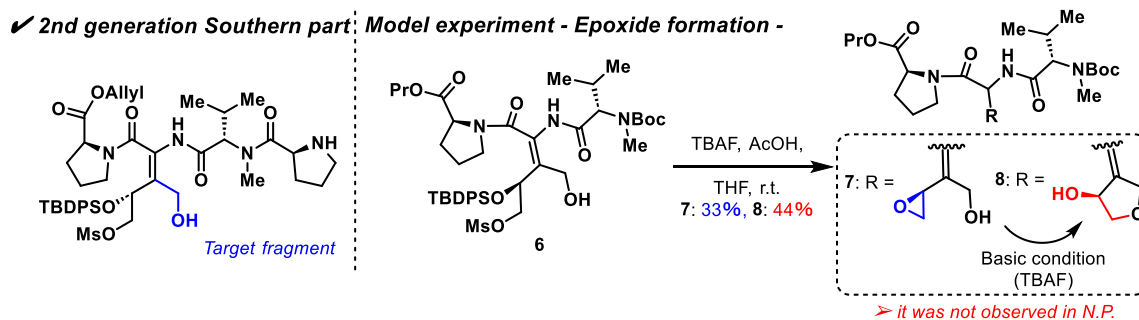
Reported-Dityromycin (**1**)の全合成研究

まず前任者により確立された経路を基に最適化を行いつつ量的供給を行うことで、各フラグメントに関してグラムスケールでの調製を達成した (Scheme 1)。特に Eastern part **4** に関して Fm エステル体を用いることでエピメリ化の抑制及び収率の向上を達成している。



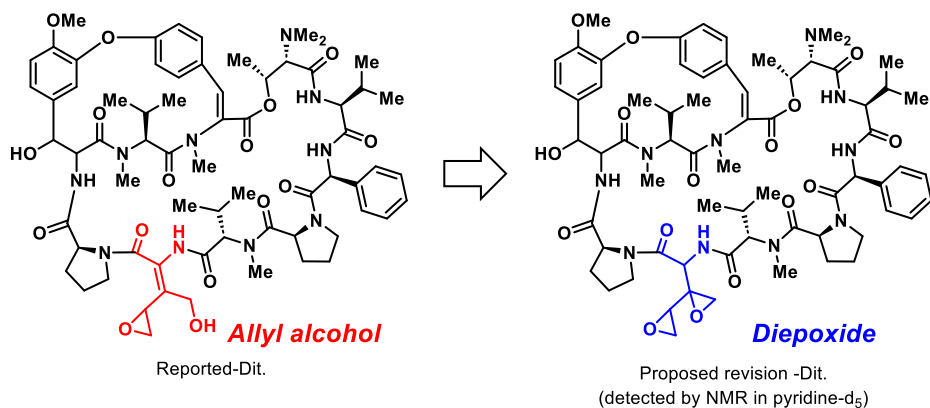
Scheme 1 各フラグメント及び大環状デブシペプチド **5** の合成

次に、各種フラグメントカップリングを行うことで全炭素骨格を有するデカペプチドをグラムスケールにて調製した。続いて、アリル基及びアロック基を除去し過剰量の EDCI を用いる条件によって環化体を効率よく取得した後、シリル基を除去することで大環状デブシペプチド **5** を取得した。得られた **5** に対しベンジル基の除去を行うべく、加水素分解の条件に付した所、副反応として環状ビアールエーテル部位の開裂が優先する結果を与えた。しかしながら、天然物 **1** に対して同様の条件を適用した所、本副反応が観測されることはなかった。次に、異なる戦略として予めベンジル基を除去した Southern part を合成し、各種フラグメントカップリング及び環化反応、続くシリル基の除去を行うことで **1** の合成を目指すこととした(Scheme 2)。そこでシリル基の除去に伴うエポキシドの形成に関してモデル検討を行った所、TBAF 存在下エポキシドの形成を確認すると共に、時間経過に比例して近傍のアリルアルコールからの巻き込みによる副反応⁹⁾が併発していることが示唆された。しかしながら、天然物 **1** に対して TBAF を作用させた所、本副反応が観測されることはなかった。



Scheme 2 第二世代 Southern part の設計とエポキシドの形成におけるモデル検討

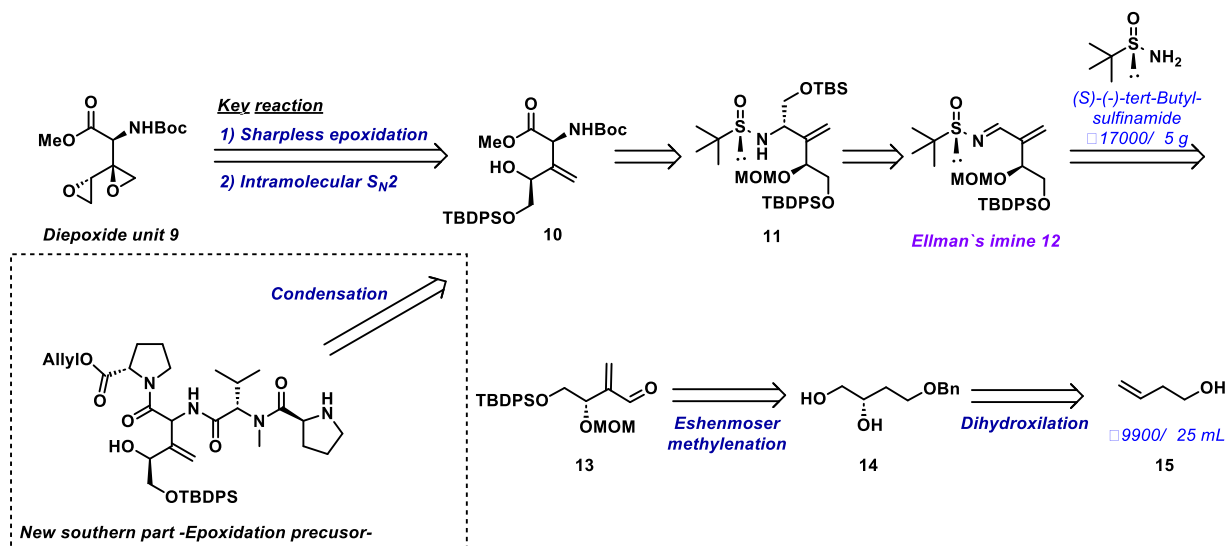
前述より合成品-天然物間における反応性・安定性の差が露見したため、アミノ酸分解によって構造決定がなされた本化合物に関して、NMR を用いた分光学的な構造解析に着手した。DEPT 及び HMBC 測定を軸とした種々解析の結果、報告済みの構造に含まれる高度に酸化されたイソロイシン型アミノ酸に替わり、下図に示すジエポキシド型アミノ酸を構成要素とする **1** の改訂構造を提唱した。なお、ジエポキシド型アミノ酸を有するペプチド化合物として、産業技術総合研究所の新家らにより **1** の類縁体である MBJ-0086 が報告されている⁶⁾。



Scheme 3 Dityromycin (1)の改訂構造

【Proposed Dityromycin の全合成研究】

従って、次なる方針として提唱構造の全合成達成を目指し、新規異常アミノ酸であるジエポキシドユニット含有フラグメントの構築に取り組んでいる。その合成戦略を以下に示す(Scheme 4)。本アミノ酸におけるジエポキシド **9** に関してはそれぞれ Sharpless エポキシ化及び分子内 S_N2 反応を用いて立体選択的に構築することとし、その前駆体であるアリルアルコール **10** に関してはエルマンイミン **12** を中間体とする立体選択的なヒドロキシメチル基の導入に続く種々保護基の脱着により導くこととした。また、**12** については 1-Butene-4-ol を原料として数工程の変換によって調製可能な不飽和アルデヒド **13** に対して不斉補助基を導入することで合成可能なものとした。なお、本戦略において標的に設定した立体化学は前述の X 線共結晶構造及び **1** の生合成酵素の立体構造を基に最も可能性が高いと推定されるものである。現在エルマンイミン **12** の調製が完了しており、引き続き本戦略に則り本ユニットの合成達成を目指す。



Scheme 4 ジエポキシド型異常アミノ酸の合成戦略

【今後の展望】ジエポキシド型アミノ酸含有フラグメントの合成を達成した後、既に調製が完了している Northern part **2** 及び Eastern part **3** と縮合し全合成達成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 S. Takahashi, A. Kimishima, T. Hirose, T. Yamada, A. Sugawara, T. Shirahata, Y. Noguchi, M. Iwatsuki, R. Hokari, A. Ishiyama, Y. Kobayashi, T. Sunazuka	4. 巻 67
2. 論文標題 Unified enantioselective total synthesis of 3,6-dioxygenated diketopiperadine natural products, diatretole and lepistamides A, B and C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.,	6. 最初と最後の頁 152895-152898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.152895	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 M. Ohara, A. Ikeda, A. Nakajima, T. Ono, Y. Noguchi, A. Watanabe, T. Hirose, T. Sunazuka	4. 巻 66
2. 論文標題 Toward the total synthesis of aurodox: preparation of the key hemiacetal-lactone.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.,	6. 最初と最後の頁 152799-152802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.152799	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 H. Miyachi, K. Kanamitsu, M. Isii, E. Watanabe, A. Katsuyama, S. Otsuguro, F. Yakushiji, M. Watanabe, K. Matsui, Y. Sato, S. Shuto, T. Tadokoro, S. Kita, T. Matsumaru, A. Masuda, T. Hirose, M. Iwatsuki, Y. Shigeta, T. Nagano, H. Kojima, S. Ichikawa, T. Sunazuka, K. Maenaka T. Sunazuka.	4. 巻 37
2. 論文標題 Structure, solubility, and permeability relationship in a diverse middle molecule library.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.,	6. 最初と最後の頁 127847-127855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.127847	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 A. Sugawara, H. Takada, T. Hirose, A. Kimishima, T. Yamada, M. Toda, T. Kojima, T. Matsumaru, T. Sunazuka	4. 巻 23
2. 論文標題 Pd-catalyzed regio- and stereoselective hydrostannylation of an alkyl ethynyl ether/one-pot stille coupling enables the synthesis of 14-membered macrolactone of luminamicin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Org. Lett.,	6. 最初と最後の頁 1758-1763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c00183	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 R. Saito, G. Sennari, A. Nakajima, A. Kimishima, M. Iwatsuki, A. Ishiyama, R. Hokari, T. Hirose, T. Sunazuka.	4. 巻 69
2. 論文標題 Discoveries and syntheses of highly potent antimalarial troponoids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.,	6. 最初と最後の頁 564-572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00132	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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木大貴、金井田将裕、野口吉彦、廣瀬友靖、砂塚敏明
2. 発表標題 新規PPI阻害剤創製を指向した中分子天然物ジチロマイシンの全合成研究- 1 -高度に酸素官能基化された非天然アミノ酸骨格の構築-
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金井田将裕、野口吉彦、鈴木大貴、廣瀬友靖、砂塚敏明
2. 発表標題 新規PPI阻害剤創製を指向した中分子天然物ジチロマイシンの全合成研究 -2-
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 砂塚 敏明
2. 発表標題 創薬を志向した大村天然物の合成と新手法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂塚 敏明
2. 発表標題 夢のある大村天然物創薬
3. 学会等名 第36回創薬セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中里 貴々、池田 朱里、富山 昂大、池谷 佳紀、本庄 雅子、浅見 行弘、廣瀬 友靖、砂塚 敏明
2. 発表標題 In situ click chemistryを用いた新規メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤の探索研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 亮、千成 恒、佐藤 翔悟、小川 昌也、君嶋 葵、増井 悠、高橋 孝志、廣瀬 友靖、砂塚 敏明
2. 発表標題 コンビナトリアルライブラリー構築を指向したエパーメクチン類の全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井田 将裕、野口 吉彦、堤 隼馬、稲橋 佑起、廣瀬 友靖、砂塚 敏明
2. 発表標題 新規PPI阻害剤創製を指向した中分子天然物ジチロマイシンの全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田 あかり、廣瀬 友靖、林 裕美、穂苅 玲、石山 亜紀、岩月 正人、砂塚 敏明
2. 発表標題 チオエーテル疎水性アンカー分子を用いた抗マalaria活性リポペプチドKozupeptin Aの環化誘導体合成
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野 孝典、野口 吉彦、渡邊 彰人、岩月 正人、稲橋 佑起、廣瀬 友靖、砂塚 敏明
2. 発表標題 抗トリパノソーマ活性を有するActinoalloide Aの全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学大村智記念研究所生物有機化学研究室 http://seibutyuuki.sakura.ne.jp 北里大学大村智記念研究所 https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/ 北里大学北里生命科学研究所・大学院感染制御科学府 生物有機化学研究室 http://seibutyuuki.sakura.ne.jp
--

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
---------	---------