

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号 : 32607

研究種目 : 若手研究 B

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23790019

研究課題名(和文) カルピナクタムを基盤とした新規抗結核薬の開発

研究課題名(英文) Development of anti-tuberculosis drugs based on calpinactam

研究代表者

長井 賢一郎

北里大学・薬学部・助教

研究者番号 : 30321649

研究成果の概要(和文) : 抗結核菌活性を有する真菌由来代謝産物カルピナクタムの固相合成法を利用した合成を確立した。構造活性相関の解明を目的とした異常アミノ酸から成るカルピナクタム誘導体を合成した。構造活性相関の結果からアミノ酸の側鎖、立体化学、ペプチド鎖全体が抗結核菌活性に必須であることを明らかにした。今回の研究では D-Glu を D-Ala に置換した誘導体のみ抗結核菌活性を保持した。さらにカルピナクタムの標的分子を解明するため、この部位にビオチンタグを導入したケミカルプローブを合成した。

研究成果の概要(英文) : Synthesis of calpinactam, a fungal antimycobacterial metabolite, utilizing solid-phase peptide synthesis has been established. To explore the structure-activity relationships (SAR), its derivatives with different amino acids were also synthesized on the basis of the same synthetic strategy. The result of SAR revealed that the side chains, stereochemistry, and entire peptide chain length are essential for antimycobacterial activity. In this study, calpinactam derivative where D-Glu is replaced with D-Ala retained moderate antimycobacterial activity. Furthermore, calpinactam derivative bearing biotin tag was synthesized to elucidate the molecular target.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野 : 天然物化学

科研費の分科・細目 : 薬学・化学系薬学

キーワード : 抗結核薬、ペプチド、天然物、固相合成、カルピナクタム

1. 研究開始当初の背景

(1) WHO は、世界人口の約3分の1に相当する19億人が結核に感染しており、毎年920万人が新たに発病し、そして170万人が死亡していると報告している。

これは結核症がAIDSやマラリアに並ぶ世界の主要な疾患および死因の一つであり、単一

病原菌感染症としては世界最大の感染症に位置づけられることを示している。結核症は「過去の病」ではなく、深刻な「現代の病」なのである。とりわけアジアとアフリカなどの発展途上国ではHIV感染者とAIDS患者の増加に伴い結核の蔓延が加速しており、HIV患者の3分の1が結核症を合併している。このHIV

合併結核症は相互に拮抗する化学療法を伴うため同時治療が困難であり、その対策が緊急な課題となっている。さらに問題視されているのは、薬の効かない耐性菌の出現である。今日まで、第一選択薬と呼ばれるイソニアジド・リファンピシン・ピラジナミド・ストレプトマイシン・エタンブトールの多剤併用療法は長期投与の問題を抱えているものの、結核症の治療に多大な貢献をしてきた。しかし近年、第一選択薬のイソニアジドとリファンピシンが効かない多剤耐性結核菌の出現に加えて、ほぼ全ての薬剤が効かない超多剤耐性結核菌の広がりが新たな脅威となっている。

(2)わが国においても結核症は看過できる問題ではない。戦後、抗結核薬の開発や医療環境の改善などにより、国内の結核患者数は著しく減少した。しかし、2008年には一年間に約2万4千人が結核を発症し、約2千人が命を落とす日本でも危惧すべき再興感染症になっている。また抗癌治療や臓器移植、そして高齢化などの社会変化により、現状のままでは易感染性者の結核感染が将来蔓延すると予想されている。さらに日本では絶対数は少ないながらHIV感染者が徐々に増加していることから、HIV合併結核症が今後問題となる可能性がある。

2. 研究の目的

多剤耐性結核菌に対抗できる抗結核薬の開発は既存の薬剤と異なる作用メカニズムや新規骨格を持つことが求められている。研究協力者のグループでは選択的に結核菌 *Mycobacterium smegmatis* (病原性の無い迅速発育性菌) の生育を阻害する活性を指標として微生物由来培養液をスクリーニングした結果、真菌由来のカルピナクタムを見出した。カルピナクタムは、アミノカプロラクタムを含有する新規ペプチド性天然物であり、ヒト

病原性株である *M. tuberculosis* に対して選択的に増殖を抑制する。現在、その分子標的は不明であるが、既存の作用メカニズムと異なると推察されている。現在開発中の抗結核薬は新しい作用メカニズムで抗菌活性を示すが、これは既存薬にない新規骨格に起因している。このことから新規骨格を有するカルピナクタムは抗結核薬の貴重なリード化合物として期待でき、また不明である作用メカニズムの解明に興味を持たる。以上の研究により、新しい作用メカニズムと新規骨格を有する抗結核薬を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)カルピナクタムの合成を2つの固相担体で検討する。固相担体に2-クロロトリチルクロリドレジンを用いて、Fmoc-D-allo-Ile のカルボン酸を足掛かりに固相へ担持する(手順1)。続いてFmoc基の脱保護とFmocアミノ酸(D-Glu, His, Leu)の縮合を繰り返し、最後にBoc-D-Pheを縮合させる(手順2)。Boc, Trt, t-Bu基に影響しない酸性条件で鎖状ペプチドを固相担体から脱離させる(手順3)。液相で鎖状ペプチドとL-アミノカプロラクタムの縮合後、全ての保護基を除去してカルピナクタムを合成する(手順4)。LC-MS分析によって目的物質を同定した後、分取HPLCにより単離精製を行い、NMRとMSによりその構造を確認する。一方でセーフティーキャッチリンカーも検討する。まずトリチルリンカーと同様に樹脂上でペプチド鎖を伸長する(手順1)。続いて、酸性度の高いスルホンアミドを選択的にアルキル化し、C末端を活性化する(手順2)。活性エステルにL-アミノカプロラクタムを作用させ、固相担体から切出した後、全ての保護基を除去してカルピナクタムを合成する(手順3)。この方法は全ての反応を固相上で行えるため、反応操作が簡便であ

り、自動化し易い利点がある。これら2つの合成方法を比較し、精製効率の高い方法を誘導体合成に採用する。

(2) 研究協力者（北里大学薬学部 微生物薬品製造学教室の小山信裕 助教）のもとで結核菌 *M. smegmatis* に対してペーパーディスク法により誘導体の抗結核菌活性を評価する。同時にグラム陽性菌、陰性菌、酵母に対する抗菌活性を評価して選択性毒性を確認する。構造活性相関の結果を参考に新たな誘導体を設計し、抗菌活性の高い誘導体を見出す。

(3) カルピナクタムの構造活性相関から得られた知見を基に適切な部位にリンカーを導入し、蛍光色素のBODIPY-FL タグまたはビオチンタグを導入する。また、ビオチン標識体と高親和性タンパク質間の結合を強固にするため、光親和性タグのトリフルオロメチルジアジリン基を持つビオチン標識体の作成も試みる。またネガティブコントロールとして活性の消失した標識体も合成する。

(4) 結核菌 *M. smegmatis* より調整した細胞溶解物とビオチン標識カルピナクタムと反応させる。反応後、ストレプトアビジンビーズを用いて高親和性タンパク質をプルダウンし、電気泳動により分離・検出する。不活性なビオチン標識体と比較して、活性なビオチン標識体が特異的に結合したタンパク質のスポットをゲルから切り出す。ゲル内トリプシン消化後、MALDI-TOF/MS(またはESI-TOF/MS)分析を行う。検出されたペプチド断片の分子量からデータベース検索によってカルピナクタム高親和性タンパク質の同定を進める。

4. 研究成果

(1) 新たにカルピナクタムの固相合成法を確立した。2-クロロトリチルクロリドレジンを用いてFmoc-アミノ酸を担持させた後、目的の鎖状ペプチドが得られるまでFmoc基の脱保護（2% DBU/DMF）とFmoc-アミノ酸の縮合（PyBop, DIPEA, DCM/DMF）を繰り返した。続いてN末端にBoc-アミノ酸を縮合させた後、Boc, Trt, t-Bu基に影響しない酸性条件で鎖状ペプチドを固相担体から脱離させた（25% HFIP/DCM）。液相で鎖状ペプチドとアミノカプロラクタムの縮合後（HATU, DIPEA, DMF）、全ての保護基を除去（TFA, TIPS, H₂O）してカルピナクタム誘導体を合成した。また、各誘導体の収率は37~95%と高いため、セーフティーキャッチリンカーを用いた合成検討は中止した。また、第一世代の液相合成法（カルピナクタムの収率は6%）と比較して本手法は収率をかなり改善することができた。その手法を用いて、アラニン置換体6種、立体異性体6種、C末誘導体2種、N末誘導体4種を合成した。

(2) 合成誘導体の *Mycobacterium smegmatis* に対する抗結核菌活性評価の結果、カルピナクタムのMICは0.78 µg/mLであるのに対し、D-Glu残基のD-Ala置換体のみが中程度の活性を示し（6.25 µg/mL）、他の全ての誘導体は抗結核菌活性を消失した。このことから各アミノ酸残基の側鎖と立体化学は活性に必須であり、さらにペプチド鎖全体の長さも活性に重要であることを明らかにできた。

(3) カルピナクタムの標的分子を解明するためケミカルプローブの作成に着手した。活性が保持されたD-Glu残基のD-Ala置換体に着目し、D-Gluのカルボン酸を足掛かりにビオチンタグの導入を検討した。固相合成法を用いて中間体を調整し、リンカーを介してビオチンを

導入し、目的のビオチン誘導体を合成した。
様々な溶媒に対して難溶性を示したため、現
在は溶解性を向上させた誘導体を合成してい
る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kenichiro Nagai, Nobuhiro Koyama, Noriko
Sato, Chisato Yanagisawa, Hiroshi Tomoda,
Synthesis and antimycobacterial activity
of calpinactam derivatives. *Bioorg. Med.
Chem. Lett.* 2012, 22, 7739-7741.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.069>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 賢一郎 (Kenichiro Nagai)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：30321649

研究協力者

供田 洋 (Hiroshi Tomoda)
北里大学・薬学部・教授
研究者番号：60439156

小山 信裕 (Nobuhiro Koyama)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：70164043

佐藤 倫子 (Noriko Sato)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：146333